

食品衛生基準科学研究費補助金
(食品安全科学研究事業)

分担研究報告書

マウスにおけるモニリフォルミンの毒性試験

研究分担者 渋谷 淳 (東京農工大学大学院 農学研究院 動物生命科学部門)

研究要旨

日本国内流通食品に検出される新興カビ毒の安全性確保に関する研究の一端として、新興カビ毒の一つであるモニリフォルミン (MON) についての毒性情報を得る為、2022 年度にマウスを用いた MON の単回投与試験を実施した。その結果、0、20、40、80 mg/kg 体重の単回経口投与をしたところ、MON は 40 mg/kg 以上で腎臓の近位尿細管壊死を誘発し、LD₅₀ の値は 68.1 mg/kg 体重と推定された。2023 年度には、マウスを用いた MON の 28 日間反復投与による一般毒性試験を実施した。その結果、0、10、20、40 mg/kg 体重/日の経口投与において、MON は 40 mg/kg で心臓の絶対重量を増加させたが、病理組織学的変化は見られなかった。対照的に、40 mg/kg の MON は、肝臓の絶対重量の増加を伴う小葉中心性の肝細胞肥大を誘発した。さらに、MON は用量依存的に 20 mg/kg 以上で腎臓の絶対重量を増加させ、40 mg/kg で腎尿細管再生の発生頻度が増加した。そこで 2024 年度では、MON による腎毒性の発現機序を検討することを目的として、MON 単回投与後の腎臓における遺伝子発現解析と免疫組織化学的解析を実施した。MON を 40 mg/kg 体重の用量で単回投与した後の腎皮質における RNA シーケンシング解析により、*Cyp3a13*、*Cyp26b1*、*Cyp4f15* などの代謝反応関連遺伝子、及び酸化ストレス関連遺伝子 *Gpx7* の発現上昇が明らかになった。IV 型 collagen に対する免疫組織化学的解析では、MON 投与によって誘発された壊死尿細管において基底膜の保持が確認された。これらの結果から、MON はマウスにおいて腎臓を標的とすることが示唆された。経口摂取された MON は、腎臓で代謝され、活性中間体や活性酸素種が腎尿細管毒性を誘発し、近位尿細管壊死を引き起こす可能性が示唆された。腎臓の変化に基づき、雄マウスを用いた 28 日間の経口毒性試験における MON の無毒性量 (NOAEL) は 10 mg/kg 体重/日と決定された。

A. 研究目的

カビ毒はカビが感染した農作物中に生産され、歴史的にカビ毒に汚染された食品により、急性摂取による中毒症状や慢性的な摂取による臓器障害が引き起こされてきた。また、動物実験の実施により腫瘍誘発性が証明されるようになり、発がん性等の毒性が懸念されてきている。これまで厚生労働科学研究において、平成13年度より様々なカビ毒について日本に流通する食品における汚染実態や毒性に関する研究を行い、カビ毒に汚染された食品摂取の低減を目的とした施策策定の科学的根拠となるデータを取得し、食の安全性確保に貢献してきている。

近年、新興カビ毒と呼ばれる今まで垣間見られてこなかった一群の新たなカビ毒の存在が注目されてきている。それらの発見は数十年前であり、当時は健康危害物質として認知されていなかったものの、近年の分析法の発展によって食品を汚染していることが明らかになってきたカビ毒の総称であり、国際的な関心が高まっている。モニリフォルミン

(MON) は新興カビ毒に分類される化合物で、平成29年に公表された欧州食品安全機関(EFSA)の評価結果において、実験動物において致死毒性を示すこと、様々な穀類に検出されることが公表され、国際的な関心が高まっており、さらなる情報の収集が望まれている。

既存のマウスを用いた MON の毒性試験(Burmeister et al., 1980) では、単回経口投与毒性試験における LD₅₀ 値が 47.6 mg/kg (体重 20 g と仮定して約 1 mg/animal/day) であったのに対し、21 日間反復飲水投与毒性試験においては上記 LD₅₀ 値の約 3 倍の摂取量に相当する 2.9 mg/animal/day の飲水投与用量群においても、有意な体重増加量の軽微な減少が認められたのみであり、一貫した結果が得られてい

ない。そのため、EFSA による MON のリスク評価(EFSA, 2018)においては、これらのマウスの毒性情報は考慮されていない。

そこで本分担研究では、マウスにおける MON の毒性兆候及び無毒性量(NOEL)等、リスク評価に必要な毒性情報を取得することを目的とした。令和4年度はマウスを用いた MON の単回投与試験及び14日間反復投与試験、令和5年度は28日間反復試験を実施した。これらの結果、マウスにおいて MON は腎臓を毒性標的とする可能性が示唆されたため、令和6年度は MON による腎毒性の発現機序について検討することを目的とし、MON 単回投与後の腎臓における遺伝子発現解析と免疫組織化学的解析を実施した。

B. 研究方法

(1) 化学物質と動物

化学合成された MON は、Chemspace (Riga, Latvia) から購入した。MON は水に溶解し、InertSep C2 カートリッジ(GLサイエンス株式会社、東京)を通し、残留化学試薬を除去した後、エバポレーターで乾燥させて精製した。雄性 Crl:CD1(ICR)マウス(5週齢)は、Jackson Laboratory Japan, Inc. (横浜)より購入し、試験期間中、室温 23±2°C、相対湿度 55±15%、12 時間明期/12 時間暗期のサイクルという制御された条件下で飼育した。予備動物実験(急性毒性試験及び14日間毒性試験)及び実験2の急性毒性試験の動物は、紙製敷料を備えたポリカーボネート製ケージで3匹または4匹/ケージ飼育し、実験1の28日間毒性試験の動物は、紙製敷料を備えたポリカーボネート製ケージで個別飼育し、動物実験期間中、すべての動物に飲料水(フィルターろ過した水道水)とペレット状の基礎飼料(CRF-1; オリエンタル酵母工業株式会社、東京)を自由に摂取させた。

(2) 動物実験

①予備動物実験

28日間反復毒性試験におけるMONの最高経口投与量を決定するため、東京農工大学でMONの急性毒性試験及び14日間毒性試験の予備動物実験を行った。単回経口投与による急性毒性試験では、MONを超純水に溶解し、MON濃度を16 mg/mLに調整した投与用試験液を調製した。1週間の馴化後、動物を層別無作為化により体重に基づいて4群に割り付け(N=5/群)、試験液を0(溶媒対照)、20、40、80 mg/kg 体重/日の用量で単回経口投与した。投与中及び投与後(投与前及び投与直後、投与10時間後まで1~2時間毎、投与24時間後)に動物の死亡及び一般状態を含む臨床徴候をモニターした。投与翌日、動物はイソフルランによる深麻酔下で腹部大動脈から採血して安楽死させ、病理組織学的検査のために剖検した。14日間の反復投与試験では、投与用のMONの試験溶液を超純水で8 mg/mLの濃度に調製した。1週間の馴化後、体重に基づいて3群に割り付けた動物(N=3/群)に、0(溶媒対照)、20、40 mg/kg 体重/日の用量で14日間、試験溶液を連日経口投与した。高用量レベルは急性毒性試験の試験結果を参考に決定した。動物の死亡及び全身状態を含む臨床徴候を、毎日の投与时(投与前及び投与直後)に確認した。動物は剖検まで週3回、体重と摂餌量を測定した。最終投与の翌日、動物はイソフルランによる深麻酔下で腹部大動脈から採血して安楽死させ、全身臓器／組織の病理組織学的評価のために剖検した。

②実験1

MONの28日間反復経口投与毒性試験は、(株)ボゾリサーチセンターで実施した。1週間の馴化後、体重に基づいて3群に割り付けた動物(N

=10/群)に、試験液(超純水に8 mg MON/mL)を0(溶媒対照)、10、20、40 mg/kg 体重/日の用量で28日間、連日経口投与した。最高用量レベルは予備動物実験の試験結果を参考に決定した。毎日の投与中(投与前、投与直後、投与1~3時間後)及び剖検日の剖検前に臨床徴候をモニターした。投与1週目は週3回、その後は週1回、体重、摂餌量、摂水量を測定した。最終投与の翌日、動物の体重を測定し、血液学及び血液生化学検査のため、一晚絶食させずにイソフルランによる深麻酔下で後大静脈から血液サンプルを採取した。その後、動物は予備動物実験と同様に直ちに安楽死させ、病理組織学的評価のために剖検した。

③実験2

MONによる腎毒性のメカニズムを検討するため、MONの急性毒性試験の動物実験を東京農工大学で実施した。1週間の馴化後、体重に基づいて2群に割り当てた動物(溶媒対照群:N=6、MON投与群:N=12)に、超純水(溶媒対照群)または40 mg/kg 体重 MON/日の試験溶液(超純水中に8 mg MON/mL)を単回経口投与した。

投与6時間後の剖検で、溶媒対照群の全動物及びMON投与群から無作為に選んだ6匹の動物を、イソフルラン麻酔下で腹部大動脈から採血して安楽死させ、左右の腎臓の重量を測定し、遺伝子発現解析及び病理組織学的検査のために採取した。摘出された腎臓は中央で長軸に垂直に2片に切断した。左右一対の組織片を、60%(v/v)メタノール、30%(v/v)クロロホルム、10%(v/v)氷酢酸からなるメタカーン溶液中で、4°Cで2時間固定し、遺伝子発現解析のために既述の方法に従って処理した(Shibutani et al., 2000)。もう1セットの組織片は、4%(w/v)パラホルムアルデヒド(PFA)、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)で4°C、一晚固定

し、病理組織学的検査を行った。投与 24 時間後の剖検で、MON 投与群の残り 6 匹を予備動物実験と同様に安楽死させ、左右の腎臓の重量を測定、採取し、病理組織学的及び免疫組織化学的検索のために一晚 PFA 緩衝液で固定した。

病理組織学検査

予備動物実験及び実験 1 では、すべての動物を安楽死させ、予定された剖検時に完全な剖検を行った。実験 1 では摘出した脳、胸腺、心臓、肺、脾臓、肝臓、腎臓、精巣、精巣上体を組織固定前に秤量した。剖検時に肉眼的変化を記録し、肉眼的に観察された異常部位は、他に採取した臓器・組織と同様に採取した。死亡が確認された動物は直ちに剖検したが、摘出臓器の重量は測定しなかった。

予備動物実験では、大脳、小脳、顎下リンパ節、胸腺、心臓、気管支を含む肺、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、腸間膜リンパ節、脾臓、肝臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、大腿骨、及び肉眼的に異常な部分を、死亡した動物を含むすべての動物で解剖した。

実験 1 では、死亡した動物を含むすべての動物から、眼球、ハーダー腺、大脳、小脳、脊髄（胸部）、下垂体、顎下腺、舌下腺、顎下リンパ節、上皮小体を含む甲状腺、胸腺、心臓、大動脈（胸部）、気管、気管支を含む肺、舌、食道、胃、十二指腸、空腸、パイエル板を含む回腸、盲腸、結腸、直腸、腸間膜リンパ節、脾臓、肝臓、胆嚢、膵臓、腎臓、膀胱、副腎、精巣、精巣上体、凝固腺を含む精嚢、前立腺、骨格筋、坐骨神経、胸骨、大腿骨、皮膚（鼠径部）、および異常部位を摘出した。眼球、精巣、精巣上体以外の臓器及び組織は、中性緩衝 10%ホルマリン（pH7.4）で固定した。視神経を含む眼球は、2.5%ホルマリン、3.0%グルタルアルデヒド緩衝液で固定した。精巣と精巣上体組織はまず

Bouin 溶液で固定し、次に 10%緩衝ホルマリン液で固定した。固定後、臓器と組織をパラフィン包埋し、4 μm の組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色を行い、病理組織学的検査を行った。

血液学及び血液生化学的解析（実験 1）

剖検時に採取した血液サンプル（N=7 または 10/群）を用いて、血液学的解析は ADVIA 2120i（Siemens Healthcare Diagnostics Inc., East Walpole, MA, USA）、血液生化学的解析は TBATM-120FR（Canon Medical Systems Corp.）を用いて実施した。血液学的検査では、赤血球数（ $10^4/\mu\text{L}$ ；フローサイトメトリー法）、ヘモグロビン濃度（g/dL；改変シアノメトログロビン法）、ヘマトクリット（%）、平均赤血球容積（fL；フローサイトメトリー法）、平均赤血球ヘモグロビン（pg）、平均赤血球ヘモグロビン濃度（g/dL）、赤血球分布幅（%）、網状赤血球数（ $10^9/\text{L}$ ；フローサイトメトリー法）、血小板数（ $10^4/\mu\text{L}$ ；フローサイトメトリー法）、白血球数（ $10^2/\mu\text{L}$ ；フローサイトメトリー法）、微分白血球数（ $10^2/\mu\text{L}$ ；フローサイトメトリー法）を解析した。血液生化学検査では、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（IU/L；UV-rate 法）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（IU/L；UV-rate 法）、乳酸脱水素酵素（IU/L；UV-rate 法）、アルカリホスファターゼ（IU/L；Bessey-Lowry 法）、トリグリセリド（mg/dL；LPL-GK-GPO-POD 法）、グルコース（mg/dL；グルコースデヒドロゲナーゼ法）、血中尿素窒素（mg/dL；ウレアーゼ-LEDH 法）、クレアチニン（mg/dL；クレアチナーゼ-クレアチナーゼ-サルコシンオキシダーゼ-POD 法）、総蛋白（g/dL；ビウレットテスト）、アルブミン（g/dL；BCG 法）、アルブミン/グロブリン比を解析した。死亡動物は検査しなかった。

腎臓の免疫組織化学分析（実験 2）

実験 2 で採取した PFA 緩衝液固定腎組織片から、切断面に平行な 3 mm スライスを作製し、PFA 緩衝液で一晩固定した後、パラフィン包埋し、3 μ m の薄切片を作成し、免疫組織化学的染色に供した。脱パラフィンした切片を抗原賦活化処理[10 mM クエン酸緩衝液(pH 6.0)中、121°Cで 10 分間オートクレーブ処理]、内因性ペルオキシダーゼ活性の阻害（絶対メタノール中 0.3% H_2O_2 処理、室温で 30 分間）、非特異的抗体結合のブロッキング（PBS 中 1.5%正常ヤギ血清処理、室温で 30 分間）を行った。切片を IV 型 collagen 抗体に対する一次抗体（ウサギポリクローナル、100 倍希釈；Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA）と 4°Cで一晩インキュベートした後、Vectastain® Elite ABC Kit (Vector Laboratories Inc, Burlingame)に含まれる二次抗体溶液及びアビジン-ビオチンペルオキシダーゼ複合体溶液とそれぞれ室温で30分間インキュベートした。抗原特異的免疫反応性の発色は、発色剤 3,3'-diaminobenzidine (同仁堂)を用いて行い、核をヘマトキシリンで対比染色した。一次抗体を含まない溶液を用いて 1 切片をインキュベートして免疫組織化学の陰性対照として免疫反応性の欠如を確認した。

腎皮質の RNA シーケンシング (RNA-seq) 解析（実験 2）

RNA-seq 解析は、溶媒対照に対する MON 単回投与 6 時間後の腎臓におけるトランスクリプトームプロファイリングのために実施した。メタカーン固定した腎組織片から、内径 1 mm の生検パンチ装置（貝印、関市）を用いて皮質組織を採取するために、切断面に平行な 2 mm のスライスを作製した。採取した組織は、total RNA 抽出まで-80°Cで保存した。RNeasy Mini kit (QIAGEN; N=6/グループ、1 サンプルとし

てプール)を用いて全 RNA を抽出した。各群で、各動物から 800 ng の total RNA サンプルを分注し、RNA-seq 解析用に各群 6 匹のプールサンプルを作成した。TruSeq stranded mRNA LT Sample Prep Kit (Illumina, Inc.)を用いて total RNA サンプルから調製したフラグメントライブラリーを、NovaSeq 6000 装置 (Illumina, Inc.)を用いて、既報の方法 (Ojiro et al., 2023) に従って配列決定した。得られた配列は修飾、トリミング、アセンブルし、Genome Reference Consortium が提供する参照ゲノム *Musculus mm10* にマッピングした。その後、リードカウントデータを正規化し、Fold Change, edgeR による exactTest を用いて、各比較ペアについて統計解析を行った。有意な結果は、 $|\log_2 \text{fold-change}| \geq 2$ 及び exactTest P 値 <0.05 の条件下で、溶媒対照と比較して選択した。DAVID 解析ツール (Huang et al., 2009a,b) を、差次的発現遺伝子の遺伝子オントロジー濃縮解析に使用した。

統計解析

数値データは平均値 $\pm$ SD で示した。統計学的比較は、溶媒対照群と各 MON 群との間で以下のように行った：分散の均一性は Levene の検定によって評価した。分散が均質な場合は、データの比較に Dunnett の検定法を採用して統計学的有意差を比較した。分散が有意なデータについては、Bonferroni 補正を加えた Aspin-Welch の t 検定を用いて統計学的有意差を比較した。2 群間の差の比較では、Levene 検定法で分散が均一であれば Student の t 検定法を、そうでなければ Aspin-Welch の t 検定法を適用した。病理組織所見のカテゴリーデータについては、発生頻度の比較は Fisher の直接確率法を、重症度の比較は Mann-Whitney の U 検定法を用いた。すべての統計解析には IBM SPSS Statistics ソフトウェア (ver.25 ; IBM

Corporation, Armonk, NY, USA) を使用し、 P 値 < 0.05 を統計的に有意とみなした。

(倫理面への配慮)

動物実験は動物の愛護及び管理に関する法律(動愛法)」を遵守し、実験動物の飼育及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(環境省告示第 88 号)、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針(文部科学省告示第 71 号)、厚生労働省の所管する動物実験等の実施に関する基本指針(厚生労働省通知科発 0601002 号)、動物実験の適正な実施に向けたガイドライン(日本学術会議)の指針及びガイドラインに即して設けられた東京農工大学実験動物取り扱い倫理規程に則り、東京農工大学動物実験小委員会の上を承を得て適切に動物実験を実施した。

C. 研究結果

(1) 予備動物実験における急性毒性試験

①臨床徴候

急性毒性試験では、動物に MON を 0 (溶媒対照)、20、40、80 mg/kg 体重/日の単回用量で経口投与した。40 mg/kg 体重群の 1 匹及び 80 mg/kg 体重群の全匹が、投与後 1 時間目で自発運動の低下を示した。これらの動物のうち、40 mg/kg 体重群の 1 匹は投与 2 時間後に回復した。80 mg/kg 体重群の 1 匹は投与 2 時間後に死亡した。この時点で、80 mg/kg 体重群の 3 匹は瀕死状態となり、剖検のため速やかに安楽死させた。80 mg/kg 体重群の 1 匹は投与 3 時間後に回復した。従って、実験終了までの生存匹数は、溶媒対照群、20、40 及び 80 mg/kg 体重群で、それぞれ 5、5、5 及び 1 であった。MON の LD_{50} 値は 68.1 mg/kg 体重であった。

②肉眼所見及び病理組織学的データ

80 mg/kg 体重群で死亡または瀕死状態のため安楽死処置の対象となった 4 匹のうち、瀕死の 1 匹は剖検時に左心房の拡張が認められた。試験期間を全うした動物では、80 mg/kg 体重群で 1 匹が生存し、腸うっ血が認められた。病理組織学的変化については、40 と 80 mg/kg 体重群で腎皮質に近位尿細管の限局性壊死が散在性に認められた。しかし、この尿細管病変の発生頻度及び重症度は、これらの群では溶媒対照群と比較して統計学的な差を認めなかった。その他の病変も散発的に観察されたが、いずれの投与群においても発生頻度に溶媒対照群と比較して有意差は認められなかった。また、80 mg/kg 体重投与群で死亡が確認された動物または瀕死状態のため安楽死処置の対象となった動物では、心臓、肺、肝臓、顎下リンパ節及び腸間膜リンパ節に病理組織学的変化が認められた。

14 日間反復経口投与毒性試験 (予備動物実験) 動物実験中のデータ

14 日間反復投与試験では、0 (溶媒対照)、20、40 mg/kg 体重/日の用量で MON を 14 日間連日経口投与した。その結果、すべての動物に異常な臨床症状は認められなかった。いずれの MON 投与群でも、投与期間中に体重に有意な変化は見られなかった。統計的比較は実施できなかったが、MON 投与群では投与期間中の摂餌量に明らかな変化は見られなかった。

肉眼所見及び病理組織学的変化

すべての動物で、肉眼所見に変化は見られなかった。病理組織学的変化については、40 mg/kg 体重群で腎臓の巢状尿細管再生が検出され、その発生頻度と重症度が有意に増加した。その他の病変も散発的に検出されたが、いずれの投与群においても発生頻度に有意な変化は認められなかった。

(2) 実験 1

①動物実験中のデータ

実験 1 では、0 (溶媒対照)、10、20、40 mg/kg 体重/日の用量で MON を 28 日間連日経口投与した。その結果、40 mg/kg 体重群では 3 匹の動物に自発運動の低下がみられ、うち 2 匹は投与 2 日目に死亡し、もう 1 匹は投与 3 日目に死亡した。この群の 1 匹も投与 3 日目に自発運動が低下したが、その後回復した。したがって、生存匹数は溶媒対照群、10、20 及び 40 mg/kg 体重群でそれぞれ 10、10、10 及び 7 匹であった。投与 28 日目の体重及び摂餌量は 40 mg/kg 体重群で有意に増加した。摂水量はどの MON 投与群でも有意な変動を示さなかった。

②血液学及び血液生化学データ

血液学的には、20 mg/kg 体重群でヘモグロビン濃度が有意に減少したが、赤血球分布幅が有意に増加した。血液生化学的には、いずれの MON 投与群においても、どのパラメータにも統計学的に有意な変化は見られなかった。

③剖検時の肉眼所見及び臓器重量の変化

すべての動物で肉眼所見に変化は見られなかった。臓器重量の変化については、脾臓の絶対重量が 20 mg/kg 体重群で増加した。腎臓の絶対重量は 20 及び 40 mg/kg 体重群で増加した。心臓と肝臓の絶対重量は 40 mg/kg 体重群で増加した。MON を投与したいずれの群でも、その他の臓器・組織の絶対重量または相対重量に統計的に有意な変化は認められなかった。

④病理組織学的変化

腎皮質における限局的な尿細管再生はどの群でも検出されたが、40 mg/kg 体重群では、この所見の発生頻度と重症度が統計学的に有意に増加した。肝細胞の小葉中心性肥大は 40

mg/kg 体重群で検出され、その重症度は有意に増加した。その他の病変も散発的に検出されたが、どの MON 投与群でも発生頻度に統計的に有意な変化は見られなかった。40 mg/kg 体重群で死亡が確認された動物では、腎臓、心臓、肝臓、脾臓、顎下リンパ節、大腿骨に病理組織学的病変が認められた。

(3) 実験 2

①臨床徴候

実験 2 では、動物に MON を 0 (溶媒対照) または 40 mg/kg 体重の単回用量を経口投与した。実験期間中、MON 投与群では臨床徴候に変化は見られなかった。

②組織病理学的及び免疫組織化学的变化

MON の単回投与から 24 時間後に、腎皮質の近位尿細管の巣状壊死が、6 例中 2 例でみられた。これらの動物では、MON の単回投与後、壊死した尿細管に IV 型 collagen に免疫反応性を示す基底膜の保持がみられた。

③RNA-seq 解析

合計 397 個の遺伝子が MON 曝露後に転写レベルの上昇を示した [$\log_2$ (倍率変化) ≥ 2 、溶媒対照と比較して $P < 0.05$]。合計 321 遺伝子が MON 曝露後に転写レベルの減少を示した [$\log_2$ (倍率変化) ≤ -2 、溶媒対照と比較して $P < 0.05$]。

遺伝子オントロジーに基づく機能アノテーション解析により、40 mg/kg 体重の MON を単回経口投与した 6 時間後に発現が有意に増加した遺伝子は、多くの機能グループを形成していることが明らかになった。腎皮質で発現が増加した代表的な遺伝子クラスターには、外部刺激に対する応答 (*Ces1g*、*Cyp26b1*、*Plxna3*、*Ren1*、*Rest*)、細胞移動 (*Egr1*、*Plxna3*、*Rnd1*)、免疫系プロセスの制御 (*Cyp26b1*、

P4htm, *Tnfrsf13b*)、脂質結合 (*Cyp4f15*)、レチノイド代謝プロセス、ジテルペノイド代謝プロセス、及びテルペノイド代謝プロセス (*Cyp26b1*, *Cyp3a13* 及び *Ttr*)、ステロイド代謝プロセス (*Ces1g*, *Cyp26b1*, *Cyp3a13*, *Egr1*, *Hsd17b14*, 及び *Rest*)、同一タンパク質結合 (*Apobec2*)、及び細胞外領域 (*Gpx7*) が見出された。

D. 考察

本研究では、MON のリスク評価の基礎となる一般的な毒性プロファイルを得るため、雄マウスを用いた MON の急性及び亜急性毒性を検討した。0、20、40、80 mg/kg 体重を単回経口投与した急性毒性試験では、40 mg/kg 体重以上の MON が腎皮質の近位尿細管壊死を誘発したが、その発生頻度や重症度は溶媒対照と比較して統計的に有意な差を示さなかった。MON の用量を 0、20、40 mg/kg 体重/日と設定して実施した 14 日間の予備的毒性試験では、40 mg/kg 体重/日までの用量で、明らかな臨床所見や、体重及び摂餌量に変化は見られなかったが、腎尿細管再生は 40 mg/kg 体重/日で誘導された。そこで、0、10、20、40 mg/kg 体重/日の反復経口用量を設定し、28 日間の亜急性毒性試験を実施したところ、40 mg/kg 体重/日 MON で心臓の絶対重量が増加したが、病理組織学的検査では心臓に明らかな変化は認めなかった。さらに、20 mg/kg 体重/日以上 の MON で用量依存的な腎臓絶対重量の増加を認め、40 mg/kg 体重/日の MON で腎皮質の近位尿細管再生の発生頻度が増加した。これらの結果から、MON はマウスへの経口投与により腎近位尿細管を標的とする可能性が示唆された。この種の腎毒性は、家禽類で以前に報告された腎毒性 (Harvey et al., 1997 ; Ledoux et al., 2003 ; Morris et al., 1999) と本質的に類似している可能性がある。MON による腎毒性メカ

ニズムを検討するために実施した腎皮質の RNA-seq 解析により、40 mg/kg 体重の MON を単回経口投与した後、*Cyp3a13*, *Cyp26b1*, *Cyp4f15* などの代謝反応関連遺伝子が発現上昇することが判明した。さらに、今回の 28 日間の試験で、40 mg/kg 体重の MON は絶対肝重量を増加させ、小葉中心性肝細胞肥大を誘発した。小葉中心性肝細胞肥大は、生体異物の反復投与後に起こる適応的变化であり、代謝／解毒に関与するミクロソームの増加をもたらす (Maronpot et al., 2010)。したがって、今回の研究結果は、近位尿細管上皮細胞及び肝細胞における MON の代謝活性化が、尿細管毒性に関与している可能性を示唆している。

MON の重篤な急性毒性を示唆する研究もある。例えば、MON の経口 LD₅₀ 値は、1 日齢の鶏で 5.4 mg/kg 体重、雌の Sprague-Dawley 及び Wister ラットで 18.5 mg/kg 体重と報告されている (Abbas et al., 1990; Burmeister et al., 1979)。雄の Sprague-Dawley ラットを用いた別の研究では、MON の LD₅₀ カットオフ値は 25 mg/kg 体重であったと報告されている (Jonsson et al., 2013)。対照的に、雄性マウスを用いた急性経口毒性試験では、MON の LD₅₀ 値は 68.1 mg/kg 体重であり、MON による急性毒性に対して、マウスはニワトリやラットよりも感受性が低いことが示唆された。過去にマウスに対して MON を 0、10、20、40、80 mg/kg 体重単回投与した急性毒性試験では、LD₅₀ 値は 47.6 mg/kg 体重と報告されており (Burmeister et al., 1980)、今回の結果と概ね一致している。MON 以外のフザリウムマイコトキシンのマウスにおける急性毒性、すなわち T-2 トキシン、デオキシニバレノール、ゼアラレノンの経口 LD₅₀ 値がそれぞれ 10.5、78、> 2000 mg/kg 体重であることを考慮すると (Forsell et al., 1987; National Toxicology Program, 1982; Ueno, 1984)、MON はマウスに

においてデオキシニバレノールに匹敵する急性毒性を示す可能性が見出された。

前述した通り、MON は主に心臓を標的とした毒性を示すものと考えられている (Fraeyman et al., 2017)。ラットに MON を 12 週間経口投与した亜慢性毒性試験では、心筋の変性、壊死、線維化などの心臓の病理組織学的変化が報告されている (Kriek et al., 1977)。我々は、28 日間の試験において、40 mg/kg 体重/日の MON を投与したマウスで心臓の絶対重量が増加した。40 mg/kg 体重群の 10 例中 3 例が最初の投与期間中に死亡したことから、MON が急性心不全を引き起こした可能性があると考えられた。しかし、病理組織学的解析では、MON 投与 28 日後に心臓に明らかな病理組織学的変化は見られなかったが、死亡が確認された 3 匹の動物のうち 2 匹は、右心房室領域が著しく拡張した。さらに、本試験における MON の単回投与では、心臓に病理組織学的変化は認めていない。ラットでは、MON は単回経口投与後も、28 日間の反復経口投与後も、病理組織学的変化が見出されていない (Jonsson et al., 2015, 2013)。これらの結果から、マウスに MON を最大 28 日間投与した急性・亜急性毒性試験では、心臓の病理組織学的変化を引き起こさない程度の心臓のインパルス伝導系や心筋の機能異常が誘発される可能性が示唆された。摘出した心臓に MON を灌流すると心筋収縮力が低下することが報告されており、ラットに MON を静脈注射すると心室性不整脈が誘発されることも報告されている (Fan et al., 1991)。従って、今回の 28 日間反復投与試験で認められた心臓の絶対重量の増加は、心筋収縮能が低下していることを示唆している。

本研究の MON の急性経口毒性試験では、40 mg/kg 体重以上の MON を投与されたマウスの腎皮質に、近位尿細管上皮の限局性壊死

が散見された。80 mg/kg 体重の MON を単回投与したところ、5 匹中 4 匹に死亡または瀕死状態がみられたことから、前述のとおり、MON の毒性による急性心不全の誘発が示唆された。急性心不全は、急性尿細管壊死または腎皮質壊死を引き起こすことが知られている (Di Lullo et al., 2017)。しかし、全身循環障害に起因するこれらのタイプの尿細管壊死は、尿細管基底膜の破壊の有無にかかわらず、近位尿細管の不規則な壊死 (急性尿細管壊死) または両側皮質の全部または一部の壊死 (腎皮質壊死) をもたらしことが知られている (Cianciolo and Mohr, 2015)。したがって、本研究における MON 投与後の局所的尿細管壊死の分布における散在パターンは、これらのタイプの腎臓に対する低灌流由来の虚血性尿細管壊死とは区別される。さらに、14 日間及び 28 日間の反復経口投与毒性試験では、40 mg/kg 体重 MON/日の投与により、腎皮質における尿細管再生の発生頻度の増加が認められた。しかし、これらの試験では、尿細管基底膜の破壊による尿細管再生不全の結果を示唆する線維化変化は認められなかった。実際、本研究で認められた壊死尿細管における尿細管再生に不可欠な IV 型コラーゲンの基底膜の免疫反応性は、MON の単回投与後も維持されていた。この再生能力の主要な決定因子は尿細管基底膜の生存能力であり、これは低灌流由来の虚血性傷害後よりも、毒性由来の傷害後の方でより一貫して保持されることが示されている (Breshears and Confer, 2016)。これらの所見から、マウスに MON を反復投与した後の近位尿細管再生は、代謝活性化により誘発された MON 毒性により、反復投与初期に急性尿細管壊死が生じた可能性が示唆される。

本研究の 28 日間の試験では、20 mg/kg 体重以上の MON/日で、腎臓の絶対重量が用量依存的に増加した。ラットに経口投与した際の

MON の生体内運命を解析した研究では、経口投与された MON のほぼ 42%が尿中に、わずか 1%未満が糞便中に検出されている (Jonsson et al., 2013)。一方、投与された MON の残りの約 60%の運命は不明なままである (Jonsson et al., 2013)。これらの知見は、経口投与後に一次尿中に排泄された MON は、生体内変換及び代謝のために近位尿細管上皮に再吸収される可能性がある、という前述の仮説を支持するものである。さらに、本研究における RNA-seq 解析により、MON の単回経口投与は、マウス腎皮質における代謝応答関連遺伝子 (*Cyp3a13*, *Cyp26b1*, *Cyp4f15*) 及び酸化ストレス関連遺伝子 (*Gpx7*) を発現上昇させることが明らかになった。シトクロム P450 (CYP) は様々なカビ毒の生体内変換に寄与することが知られている。カビ毒とその代謝物が細胞内に蓄積すると酸化ストレスが生じ、多くの重要な細胞プロセスに影響を及ぼすことが知られている (Wen et al., 2016)。マウスの肝臓において、CYP3A13 はアフラトキシン B₁ の代謝活性化を触媒する重要な酵素であり、反応性で求電子性のエキソアフラトキシン B₁-8,9-エポキシドを生成する (Yanagimoto et al., 1994)。CYP26B1 はオールトランス-レチノイン酸のクリアランスに関与し (Isoherranen and Zhong, 2019)、CYP4F15 はアラキドン酸カスケードにおいて重要な CYP4F サブファミリーのメンバーである (Kalsotra and Strobel, 2006)。Gpx7 にコードされるグルタチオンペルオキシダーゼ 7 は、様々なストレスに応答してジスルフィド結合をシャットリングすることにより、相互作用タンパク質にシグナルを伝達するストレスセンサー／伝達物質として機能する (Chen et al., 2016)。MON の代謝に関与する CYP は未だ特定されていないが、見出された遺伝子発現変化は、腎尿細管で MON が代謝される際に生成される活性中間代謝物や活性酸素種に

よる毒性が、MON 投与により誘発される近位尿細管壊死の原因である可能性を示している。また、28 日間の試験では、40 mg/kg 体重/日の MON を投与したマウスで、肝臓の絶対重量の増加とともに、小葉中心性の肝細胞肥大が観察された。多くの有害化合物は、数日間の連続投与により、肝臓のミクロソームで CYP を含む代謝酵素の産生を誘導することが知られている (Amacher et al., 1998)。したがって、経口投与された MON は、肝臓でも代謝を受けた可能性が示唆される。経口投与された MON は、肝細胞だけでなく、近位尿細管上皮細胞でも代謝される可能性があり、活性中間体や活性酸素種が尿細管毒性を引き起こした可能性が示唆される。

今回のマウスを用いた MON の 28 日間投与試験でも、20 mg/kg 体重/日の投与により、血中のヘモグロビン値の低下、赤血球分布の高値、脾臓の絶対重量の増加が認められた。しかし、これらの変化は投与用量に依存した変化ではなく、病理組織学的検査でも骨髓や脾臓を含む造血器官に明らかな変化は認められなかったことから、この試験で認められた造血器関連の変化は MON による毒性学的な変化との関連性は低いことが示唆された。

今回の雄マウスを用いた 28 日間試験では、腎臓で観察された変化に基づいて、最小毒性量 (LOAEL 及び NOAEL) が決定された。すなわち、40 mg/kg 体重 MON/日で尿細管再生が誘導され、腎臓の絶対重量の増加とともに、MON の単回投与後の尿細管壊死との関連が示唆された。MON (≥20 mg/kg 体重/日) も腎臓の絶対重量を増加させたが、これは近位尿細管上皮細胞の代謝活性化に関連している可能性がある。したがって、雄マウスに 28 日間反復経口投与した後の MON の LOAEL 及び NOAEL は、それぞれ 20 mg/kg 及び 10 mg/kg 体重/日であった。

E. 結論

本試験の結果、MON の単回経口投与による急性毒性試験では、40 mg/kg 体重以上で腎近位尿細管壊死が誘発され、雄マウスにおける経口 LD₅₀ 値は 68.1 mg/kg 体重と決定された。雄マウスを用いた 28 日間の反復経口投与毒性試験では、MON は心臓の病理組織学的変化を伴うことなく、心臓の絶対重量を増加させた。さらに、MON の反復経口投与は、肝臓の絶対重量の増加を伴う肝細胞肥大を誘発した。さらに、MON は腎皮質の尿細管再生を誘導し、腎臓の絶対重量を増加させた。MON の単回投与により、腎皮質における代謝反応関連遺伝子が上昇したことを考慮すると、経口投与された MON が肝細胞及び近位尿細管上皮細胞で代謝され、活性中間体または活性酸素種が尿細管毒性を引き起こす可能性が示唆された。腎臓で観察された変化から、28 日間の反復経口投与後の MON の NOAEL は、雄マウスで 10 mg/kg 体重/日と決定された。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ojira, R., Zou, X., Yamagata, H., Ebizuka, Y., Kobayashi, M., Kigata, T., Tang, Q., Yoshida, T., Tomoya Yoshinari, T., Shibutani, M.: Emerging mycotoxin moniliformin induces renal tubular necrosis after oral exposure in mice. Food Chem. Toxicol. 19:115336, 2025.

本文中の引用文献は、この論文内に記述している。

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし