

分担研究報告書

いわゆる健康食品による健康被害の発生要因に関する研究

研究分担者 松下 幸平 国立医薬品食品衛生研究所 病理部第三室 室長

研究要旨

本研究では、いわゆる健康食品による健康被害の未然防止に資する情報の収集を目的として、①モリンガの毒性情報収集と毒性試験実施の必要性の検討、②食品由来成分の腎毒性評価手法の検討を目的としたプベルル酸の腎毒性メカニズム解析、の 2 課題を実施した。モリンガの毒性情報について PubMed 等を用いて既報を精査した結果、妊娠ラットでの流産誘発を示す報告が確認された。また、肝・腎毒性を示唆する報告や、毒性がみられなかったという報告もあり、知見は一貫していなかった。一方、OECD ガイドライン準拠の一般毒性試験による全身毒性評価の報告は確認されず、毒性プロファイルおよび無毒性量を明らかにするために、標準化された毒性試験を実施する価値があると考えられた。プベルル酸の腎毒性メカニズム検討については、既報のラット 28 日間反復経口投与毒性試験で得られた凍結腎組織(対照群および高用量群、雌雄各 1 例)を用い、シングル核 RNA シークエンス解析を実施した。4 検体すべてでライブラリー品質は基準を満たし、検体間で推定核数や QC 指標に差はみられたものの、クラスター分布の把握および腎障害関連遺伝子の定性的評価は可能と判断された。Loupe Browser 解析では処置群でクラスター数の増加が認められ、*Havcr1*(Kim-1) および *Lcn2*(Ngal) の発現は雌雄とも処置群で上昇し、対照群では限定的であった。よって、薬剤誘発性腎障害のマーカーが食品由来成分の腎毒性評価にも応用可能であることが示唆された。

A. 研究目的

本研究班においてリスク検討対象成分として抽出されたいわゆる健康食品であるモリンガについて、毒性情報を詳細に調査研究するとともに動物を用いた毒性試験の実施の必要性について検討する。

また、食品由来成分の腎毒性評価手法の検討のため、ラットにおいて腎毒性が確認されたプベルル酸の腎毒性メカニズムの分子病理学的検討を通じて、他の注意を要する成分の毒性評価にも適用可能な手法を探索する。

B. 研究方法

B-1. モリンガの毒性情報調査

PubMed 等のデータベースにおいてモリンガの毒性試験について検索し、各論文のデータを精査した。

B-2. ラットにおいて腎毒性が確認されたプベルル酸の腎毒性メカニズムの検討

プベルル酸のラットを用いた 28 日間反復経口投与毒性試験 (J Toxicol Pathol, 2025; 38(4): 223-236) から得られた凍結腎臓サンプルを用い、雌雄の対照群および高用量群 (雄: 10 mg/kg、雌: 3 mg/kg) の各 1 例について、シングル核 RNA シークエンス解析を行った。シークエンス解析および Cell Ranger 解析はタカラバイオ株式会社に委託した。

腎臓組織から核を抽出・単離し、Chromium X (10x Genomics) を用いた Chromium 3' digital gene expression ライブラリーを作製した。ライブラリー作製には、Chromium Next GEM Single Cell 3' Reagent Kits v3.1 (Dual Index)、Chromium Next GEM Chip G Single Cell Kit、Dual Index Kit TT Set A (10x Genomics) および NIC+ Nuclei Isolation kit Full (S2 Genomics) を使用した。作製ライブラリーの品質は BioAnalyzer にて評価した。

シーケンスは NovaSeq X Plus (Illumina) を用いて実施し、試薬には NovaSeq X Series 10B Reagent Kit (Illumina) および PhiX Control Kit v3 (Illumina) を使用した。シーケンス関連ソフトウェアとして、Real Time Analysis (RTA) v4.6.7 (Illumina)、NovaSeqXSeries Control Software v1.2.0 (Illumina)、BCL Convert v4.3.6 (Illumina) を用いた。取得した FASTQ ファイルを用いて Cell Ranger (10x Genomics) で前処理を行った後、Loupe Browser (10x Genomics) で各サンプルについてクラスター解析を実施し、薬剤誘発性腎障害マーカーである Kim-1 (*Havcr1*) および Ngal (*Lcn2*) の遺伝子発現を可視化して、対照群と処置群で比較した。

C. 研究結果及び考察

C-1. モリリングの毒性情報調査

妊娠ラットにモリリングとアダトダ・バシカの葉抽出物を乾燥原料換算 175 mg/kg 相当の用量で 10 日間投与した結果、流産が全例でみられたという報告があった (J Ethnopharmacol, 1992, 36, 147-154)。また他にも個別の臓器系についてモリリングの

毒性を検討した報告が散見され、毒性は示さないという結果や肝臓および腎臓に毒性を示すという結果が確認され、知見は一貫していなかった。一方、OECD ガイドラインに準拠した一般毒性試験による全身毒性を検討した報告は確認されなかった。よって、モリリングの毒性プロファイルおよび無毒性量を明らかにするために、標準化された毒性試験を実施する価値があると考えられた。

C-2. ラットにおいて腎毒性が確認された プベルル酸の腎毒性メカニズム検討

ライブラリー品質評価の結果、4 検体すべてにおいてシーケンス解析に必要な基準を満たした。

推定核数は対照群 2 例で約 1,000 核、プベルル酸処置群 2 例で約 5,700~6,700 核であり、処置群で多い傾向を示した (図 1)。Mean Reads per Cell は対照群で高値、処置群で相対的に低値であった一方、Median Genes per Cell は処置群で高値であり、対照群では低い傾向がみられた (図 1)。これらの所見は、サンプル間の核回収量やライブラリー/データ分配の違いを反映したものと考えられた。以上より、サンプル間で核回収量および QC 指標に差はあるものの、Loupe Browser によるクラスター分布の把握および *Havcr1/Lcn2* 発現の定性的評価は実施可能と判断した。

Loupe Browser による各サンプルのクラスター解析では、全サンプルで複数クラスターが認められた。Loupe 表示上のクラスター数は、雄対照群で 5 クラスター、雄処置群で 13 クラスター、雌対照群で 5 クラスター、雌処置群で 12 クラスターであり、群間でクラスター数に差がみられ

た（図 2）。この結果は処置群では正常な細胞に加えてプベルル酸の障害により遺伝子プロファイルの変動した細胞が存在することを反映していると考えられた。

Havcr1 および *Lcn2* の発現解析では、雌雄の処置群で発現シグナルが認められ、特に *Havcr1* ではより明瞭な発現が観察された（図 3 および 4）。一方、雌雄の対照群では、これらの発現は限定的であった。

D. 結論

モリंगाの毒性情報収集の結果、OECD ガイドラインに準拠した全身諸臓器の病理検査を含む一般毒性試験の実施価値が確認されたため、今後毒性試験を実施して毒性プロファイルの確認および無毒性量の算出を行う。またプベルル酸を投与したラット腎臓において、薬剤性腎障害のマーカーが上昇していたことから、これらのマーカーは食品由来物質の腎毒性評価にも使用できる可能性が示された。

E. 研究業績

1. 論文発表
なし
2. 学会発表等
なし

F. 知的財産権の出願、登録

なし

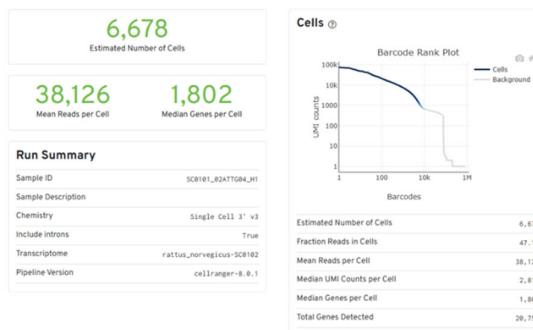
Table 1. モリンガの毒性情報収集結果（主要なものを抜粋）

系統種	投与期間	投与用量	投与経路	結果	雑誌	年	巻	頁
Rats（妊娠）	10 日	175 mg/kg （モリンガとダトダ・バシカの葉抽出物を乾燥原料換算）	経口	流産	J Ethnopharmacol	1992	36	147-154
Wister male rats	60 日 単回	60 日: 250, 500, 1500 mg/kg 単回: 6400 mg/kg 以下（経口）、 2000 mg/kg 以下（腹腔）	経口、腹腔	60 日：毒性なし 単回：LD50 > 2000 mg/kg（経口）、 LD50 ≒ 1585 mg/kg（腹腔）	J Ethnopharmacol	2012	31	330-6
Wister rats	90 日 単回	90 日：150, 300, 600 mg/kg 単回：2000 mg/kg	経口	90 日：重篤な毒性なし 単回：LD50 > 2000 mg/kg	J Food Biochem	2020	44	e13400
ICR mice	28 日 単回	28 日：125, 250, 500, 1000 mg/kg 単回：2000 mg/kg	経口	1000 mg/kg：肝・腎毒性 単回：LD50 > 2000 mg/kg	Sci Prog	2021	104	1-36
Swiss mice	28 日 単回	28 日：250, 500, 1000 mg/kg 単回：2000 and 5000 mg/kg	経口	28 日：NOAEL：抽出液 1000mg/kg、 粉末 250 m/kg 急性毒性：LD50 > 2000 mg/kg	J Ethnopharmacol	2022	296	115504
Wister rat	90 日 単回	90 日：190, 380, 760 mg/kg 単回：5000 mg/kg 以下	経口	90 日：血液、肝、腎、生殖器への有害影響 急性：LD50 = 3808 mg/kg	J Ethnopharmacol	2026	354	120545

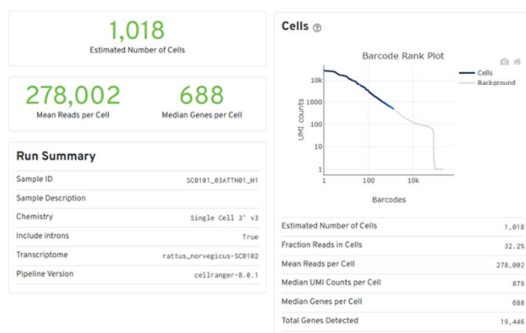
対照群・雄



処置群・雄



対照群・雌



処置群・雌

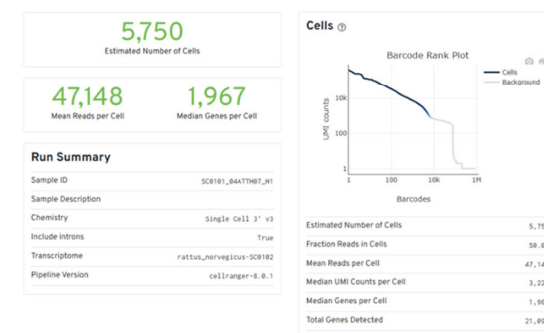
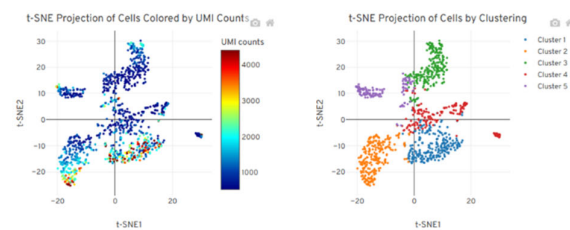
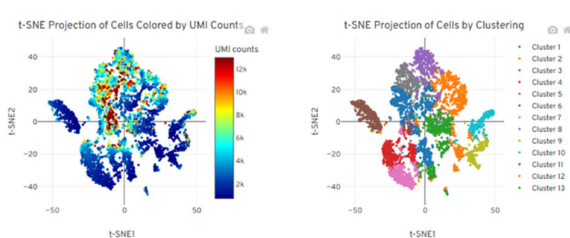


図 1. Cell Ranger 解析に基づく各サンプルの QC 結果

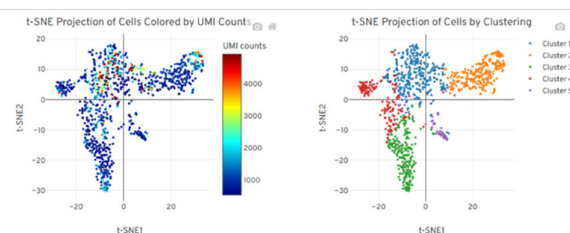
対照群・雄



処置群・雄



対照群・雌



処置群・雌

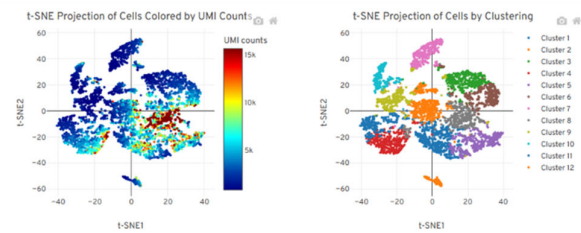


図 2. 各サンプルのクラスター解析

対照群・雄

処置群・雄

対照群・雌

処置群・雌

図 3. 各サンプルにおける *Haver1* (Kim-1) の発現

対照群・雄

処置群・雄

対照群・雌

処置群・雌

図 4. 各サンプルにおける *Lcn2* (Ngal) の発現