

氏名(本籍)	内山陽介(神奈川県)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	甲第33号
学位授与年月日	2020年3月15日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	米穀類を汚染するカビ毒シトレオビリジンの毒性学的研究
論文審査委員	(主査)小西良子 (副査)島田章則 宮武昌一郎

論文内容の要旨

シトレオビリジン (CTVD) は、*Penicillium citreonigrum*、*Aspergillus terreus*、*Eupenicillium ochrosalmoneum* などが二次代謝産物として産生するカビ毒である。CTVD を産生する *P. citreonigrum* などは穀類のうち主にコメを汚染するため、コメを主食とするアジアや南米などの国々で CTVD の汚染は問題となる。CTVD に汚染されたコメが黄色くなることから、CTVD は黄変米毒の一つとしても知られており、日本国内で過去に輸入米での汚染事例が報告されている。近年においても、タイやブラジルなど熱帯性気候の地域で CTVD 産生能を有する *P. citreonigrum* の存在が報告されている。

CTVD の毒性については、1940 年に *P. citreonigrum* に汚染されたコメの粗抽出物を腹腔内投与 (IP)、皮下投与 (SC) 又は経口投与 (PO) により哺乳類や脊椎動物に投与した場合に、四肢の進行性麻痺、嘔吐、痙攣、漸次的呼吸障害などを引き起こすことがいくつかの毒性学的研究から明らかとなった。その原因カビ毒として CTVD が同定され、精製品を用いた動物実験において、神経症状の進行時間は毒素抽出物の用量が多くなるほど短くなることが報告されている。マウスに対する CTVD の LD50 は 3.6-11.8 mg/kg (皮下投与)、7.5 mg/kg (腹腔内投与) とされている。ヒトで起こる健康被害としては、衝心脚気や Keshan 病との関連も指摘されており、2006 年にブラジルで発生した衝心脚気のアウトブレイクでは、当該地域のコメから CTVD を産生する *P. citreonigrum* が検出されており、同毒素が原因物質として疑われている。

毒性学研究においてはトキシコキネティクスや体内動態の情報が欠かせないが、CTVD の毒性実験が盛んに行われていた 1940 年代から 1980 年代には微量分析が可能な分析機器等がなく、感度の低い薄層クロマトグラフィーによる蛍光分析での結果に留まっていた。そこで、本研究では CTVD のトキ

シコキネティクスを明らかにする目的で、解剖学的、生理学的にヒトと類似しているブタを用いた CTVD の投与実験により検討した。また、ヒトとの比較を行うため、ヒト腸管細胞モデルである Caco-2 細胞を用いた透過実験及び代謝酵素を含む肝臓 S9 画分を用いた代謝実験を *in vitro* で行い、ヒトにおける CTVD のバイオアベイラビリティを推測した。本研究の概要は次のとおりである。

I ブタにおける CTVD のトキシコキネティクス

約 10 kg のブタに CTVD 0.1 mg/kg bw を静脈投与及び経口投与した。継時的に血液を採取し、分離した血漿中の CTVD 濃度を LC-MS/MS で分析した。分析結果から解析ソフト(WinNonlin)を用いてトキシコキネティクスパラメータ(TKパラメータ)を算出し、次の結果を得た。(1) 静脈投与後の CTVD の血漿中濃度は、投与後急激に減少し、最終採血時点である 48 時間後まで緩やかに減少したが 48 時間後でも血漿中から CTVD が検出された。(2) 静脈投与時の TK パラメータは、小さな速度定数(Kel) ($0.5 \pm 0.1 \times 10^{-1} \text{ h}^{-1}$) を示し、半減期 ($T_{1/2}$) 及び分布容積 (Vd) はそれぞれ $16.2 \pm 4.3 \text{ h}$ 、 $1.5 \pm 0.2 \text{ L}$ であった。(3) 経口投与後の CTVD の血漿中濃度は、投与後緩やかに上昇し、 $15.0 \pm 6.0 \text{ h}$ (T_{max}) でピーク ($C_{\text{max}}: 38.2 \pm 6.7 \text{ ng/mL}$) を迎えたのち、48 時間後まで緩やかに減少した。(4) 経口投与時の TK パラメータは、静脈投与と同様に Kel が小さく ($0.4 \pm 0.2 \times 10^{-1} \text{ h}^{-1}$)、比較的長い $T_{1/2}$ ($21.4 \pm 12.7 \text{ h}$) と大きな Vd ($1.7 \pm 0.3 \text{ L}$) を示した。(5) CTVD のブタにおけるバイオアベイラビリティは、投与後 48 時間までで 79.3% と比較的高く、無限時間まで外挿した場合には 116.4% を示した。これらの結果から、CTVD はブタにおいて高いバイオアベイラビリティを持つことが示唆された。また、CTVD は体内からの消失が遅く、組織移行性も高いと考えられ、比較的長く体内に残留することが示唆された。

II ヒト腸管培養細胞 Caco-2 細胞を用いた CTVD の透過係数

ヒトにおける CTVD のバイオアベイラビリティを推定するため、ヒト腸管細胞モデルである Caco-2 細胞を用いた透過実験を実施した。Corning™ BioCoat™ Intestinal Epithelium Differentiation Environment Kit を用い、単層に培養した Caco-2 細胞の粘膜面側に CTVD ($3 \mu\text{M}$ 及び $10 \mu\text{M}$) を暴露し、 37°C でインキュベートした。2 時間後の粘膜面側及び基底膜面側の培地を採取し、培地中の CTVD 濃度を LC-MS/MS を用いて測定して、経上皮電気抵抗値 (TEER) 及び透過係数 (Papp) を求めた。その結果、(1) いずれの CTVD 濃度においても TEER に変化は認められなかった。(2) 各 CTVD 濃度における Papp は、それぞれ 52.2 ± 28.3 、 42.6 ± 17.7 ($\times 10^{-6} \text{ cm/s}$) であり、比較的高い透過係数を示した。これらから、CTVD はブタと同様にヒトにおいても体内に吸収されやすいことが示唆された。高い透過係数は、CTVD の脂溶性の高さを反映する結果と考えられる。

III ブタ及びヒト肝臓 S9 画分を用いた CTVD の代謝とその代謝物

ブタを用いた CTVD の *in vivo* 実験において、血漿中 CTVD 濃度が比較的緩やかに減少し、48 時間

後においても血漿中に残留していたことから、ブタにおいては代謝が比較的遅い可能性が示唆された。そのため代謝酵素を含むブタ及びヒトの肝臓 S9 画分を用いた代謝実験により CTVD への代謝能を比較した。始めにグルコース-6-リン酸 (G-6-P) 及び NADP を含む溶液中に肝臓 S9 画分 (0.5 mg/mL) 及び CTVD (1.5 µg/mL) を加え、37°C でインキュベートした。インキュベート後 30 分、1 時間及び 4 時間後の溶液を採取し、Q-TOF で分析した。その結果、(1) CTVD の代謝物は主に水酸化-メチル化体、不飽和化体及びジヒドロキシ化体であることが推測された。(2) いずれの代謝物もヒト肝臓 S9 画分を用いたほうがブタ肝臓 S9 画分を用いるよりも有意に多く産生された。(3) CTVD 濃度がブタ肝臓 S9 画分を用いるよりもヒト肝臓 S9 画分を用いたほうが有意に低下した。これらから、CTVD は、ブタにおいて S9 による代謝が遅いことが示唆され、ヒトにおいてはブタよりも CTVD を代謝しやすいことが考えられた。

S9 画分を用いた代謝実験において、グルクロン酸抱合体が産生されなかったことから、ウリジン二リン酸グルクロン酸及びアラメチシンの存在下で CTVD と S9 画分をインキュベートして、CTVD のグルクロン酸抱合体の産生を調べた。その結果、(1) いずれの S9 画分を用いた場合でも、インキュベート後 30 分までに CTVD のグルクロン酸抱合体は産生されなかった。(2) インキュベート後 4 時間でブタ肝臓 S9 画分を用いたほうがヒト肝臓 S9 を用いるよりも有意にグルクロン酸抱合体が産生された。これらから、CTVD のグルクロン酸抱合体についてはブタのほうがヒトよりも産生されやすいことが示唆された。

本研究では、in vivo におけるブタでの CTVD のトキシコキネティクスの結果より、CTVD が体内に吸収されやすく、長い半減期と大きい分布容積を持つことが示された。これらのことから比較的長く体内に残留することを明らかにした。また、CTVD のバイオアベイラビリティはブタにおいて高いだけでなく、ヒトにおいても高い可能性を in vitro で明らかにした。一方で、CTVD の代謝については、ヒトではブタよりも早い、グルクロン酸抱合体形成能はブタのほうが優れていたことを in vitro の観点から明らかにした。

論文審査の結果の要旨

本研究は、カビ毒のリスク評価に貢献する目的で、コメに汚染するカビ毒、シトリオビリジンに焦点をあて、その体内動態をブタを用いた in vivo 手法により明らかにしたうえで、ヒト培養細胞やヒトおよびブタの肝臓 S9 画分による代謝産物を用いた in vitro 手法の結果と比較検討することで、ヒトでのバイオアベイラビリティの予測を行い、健康被害の推測を行った。概要は以下のとおりである。

シトレオビリジン (CTVD) は、*Penicillium citreonigrum*、*Aspergillus terreus*、*Eupenicillium ochrosalmoneum* などが二次代謝産物として産生するカビ毒である。CTVD を産生する *P.*

citreonigrum などは穀類のうち主にコメを汚染するため、コメを主食とするアジアや南米などの国々で CTVD の汚染は問題となる。CTVD に汚染されたコメが黄色くなることから、CTVD は黄変米毒の一つとしても知られており、日本国内で過去に輸入米での汚染事例が報告されている。近年においても、タイやブラジルなど熱帯性気候の地域で CTVD 産生能を有する *P. citreonigrum* の存在が報告されている。

CTVD の毒性については、1940 年に *P. citreonigrum* に汚染されたコメの粗抽出物を腹腔内投与 (IP)、皮下投与 (SC) 又は経口投与 (PO) により哺乳類や脊椎動物に投与した場合に、四肢の進行性麻痺、嘔吐、痙攣、漸次的呼吸障害などを引き起こすことがいくつかの毒性学的研究から明らかとなった。その原因カビ毒として CTVD が同定され、精製品を用いた動物実験において、神経症状の進行時間は毒素抽出物の用量が多くなるほど短くなることが報告されている。マウスに対する CTVD の LD50 は 3.6-11.8 mg/kg (皮下投与)、7.5 mg/kg (腹腔内投与) とされている。ヒトで起こる健康被害としては、衝心脚気や Keshan 病との関連も指摘されており、2006 年にブラジルで発生した衝心脚気のアウトブレイクでは、当該地域のコメから CTVD を産生する *P. citreonigrum* が検出されており、同毒素が原因物質として疑われている。

毒性学研究においてはトキシコキネティクスや体内動態の情報が欠かせないが、CTVD の毒性実験が盛んに行われていた 1940 年代から 1980 年代には微量分析が可能な分析機器等がなく、感度の低い薄層クロマトグラフィーによる蛍光分析での結果に留まっていた。そこで、本研究では CTVD のトキシコキネティクスを明らかにする目的で、解剖学的、生理学的にヒトと類似しているブタを用いた CTVD の投与実験により検討した。また、ヒトとの比較を行うため、ヒト腸管細胞モデルである Caco-2 細胞を用いた透過実験及び代謝酵素を含む肝臓 S9 画分を用いた代謝実験を *in vitro* で行い、ヒトにおける CTVD のバイオアベイラビリティを推測した。

I ブタにおける CTVD のトキシコキネティクス

約 10 kg のブタに CTVD 0.1 mg/kg bw を静脈投与及び経口投与した。継時的に血液を採取し、分離した血漿中の CTVD 濃度を LC-MS/MS で分析した。分析結果から解析ソフト(WinNonlin)を用いてトキシコキネティクスパラメータ(TKパラメータ)を算出し、次の結果を得た。(1) 静脈投与後の CTVD の血漿中濃度は、投与後急激に減少し、最終採血時点である 48 時間後まで緩やかに減少したが 48 時間後でも血漿中から CTVD が検出された。(2) 静脈投与時の TK パラメータは、小さな速度定数(Kel) ($0.5 \pm 0.1 \times 10^{-1} \text{ h}^{-1}$) を示し、半減期 ($T_{1/2}$) 及び分布容積 (Vd) はそれぞれ $16.2 \pm 4.3 \text{ h}$ 、 $1.5 \pm 0.2 \text{ L}$ であった。(3) 経口投与後の CTVD の血漿中濃度は、投与後緩やかに上昇し、 $15.0 \pm 6.0 \text{ h}$ (T_{max}) でピーク ($C_{\text{max}}: 38.2 \pm 6.7 \text{ ng/mL}$) を迎えたのち、48 時間後まで緩やかに減少した。(4) 経口投与時の TK パラメータは、静脈投与と同様に Kel が小さく ($0.4 \pm 0.2 \times 10^{-1} \text{ h}^{-1}$)、比較的長い $T_{1/2}$ ($21.4 \pm 12.7 \text{ h}$) と大きな Vd ($1.7 \pm 0.3 \text{ L}$) を示した。(5) CTVD のブタにおけるバイオアベイラビリティは、投与後 48 時間までで 79.3% と比較的高く、無限時間まで外挿した場合には 116.4%

を示した。これらの結果から、CTVD はブタにおいて高いバイオアベイラビリティを持つことが示唆された。また、CTVD は体内からの消失が遅く、組織移行性も高いと考えられ、比較的長く体内に残留することが示唆された。

II ヒト腸管培養細胞 Caco-2 細胞を用いた CTVD の透過係数

ヒトにおける CTVD のバイオアベイラビリティを推定するため、ヒト腸管細胞モデルである Caco-2 細胞を用いた透過実験を実施した。Corning™ BioCoat™ Intestinal Epithelium Differentiation Environment Kit を用い、単層に培養した Caco-2 細胞の粘膜面側に CTVD (3 μM 及び 10 μM) を暴露し、37°C でインキュベートした。2 時間後の粘膜面側及び基底膜面側の培地を採取し、培地中の CTVD 濃度を LC-MS/MS を用いて測定して、経上皮電気抵抗値 (TEER) 及び透過係数 (Papp) を求めた。その結果、(1) いずれの CTVD 濃度においても TEER に変化は認められなかった。(2) 各 CTVD 濃度における Papp は、それぞれ 52.2 ± 28.3 、 42.6 ± 17.7 ($\times 10^{-6}$ cm/s) であり、比較的高い透過係数を示した。これらから、CTVD はブタと同様にヒトにおいても体内に吸収されやすいことが示唆された。高い透過係数は、CTVD の脂溶性の高さを反映する結果と考えられる。

III ブタ及びヒト肝臓 S9 画分を用いた CTVD の代謝とその代謝物

ブタを用いた CTVD の in vivo 実験において、血漿中 CTVD 濃度が比較的緩やかに減少し、48 時間後においても血漿中に残留していたことから、ブタにおいては代謝が比較的遅い可能性が示唆された。そのため代謝酵素を含むブタ及びヒトの肝臓 S9 画分を用いた代謝実験により CTVD への代謝能を比較した。始めにグルコース-6-リン酸 (G-6-P) 及び NADP を含む溶液中に肝臓 S9 画分 (0.5 mg/mL) 及び CTVD (1.5 μg/mL) を加え、37°C でインキュベートした。インキュベート後 30 分、1 時間及び 4 時間後の溶液を採取し、Q-TOF で分析した。その結果、(1) CTVD の代謝物は主に水酸化-メチル化体、不飽和化体及びジヒドロキシ化体であることが推測された。(2) いずれの代謝物もヒト肝臓 S9 画分を用いたほうがブタ肝臓 S9 画分を用いるよりも有意に多く産生された。(3) CTVD 濃度がブタ肝臓 S9 画分を用いるよりもヒト肝臓 S9 画分を用いたほうが有意に低下した。これらから、CTVD は、ブタにおいて S9 による代謝が遅いことが示唆され、ヒトにおいてはブタよりも CTVD を代謝しやすいことが考えられた。

S9 画分を用いた代謝実験において、グルクロン酸抱合体が産生されなかったことから、ウリジン二リン酸グルクロン酸及びアラメチシンの存在下で CTVD と S9 画分をインキュベートして、CTVD のグルクロン酸抱合体の産生を調べた。その結果、(1) いずれの S9 画分を用いた場合でも、インキュベート後 30 分までに CTVD のグルクロン酸抱合体は産生されなかった。(2) インキュベート後 4 時間でブタ肝臓 S9 画分を用いたほうがヒト肝臓 S9 を用いるよりも有意にグルクロン酸抱合体が産生された。これらから、CTVD のグルクロン酸抱合体についてはブタのほうがヒトよりも産生されやすいことが示唆された。

本研究では、*in vivo* におけるブタでの CTVD のトキシコキネティクスの結果より、CTVD が体内に吸収されやすく、長い半減期と大きい分布容積を持つことが示された。これらのことから比較的長く体内に残留することを明らかにした。また、CTVD のバイオアベイラビリティはブタにおいて高いだけでなく、ヒトにおいても高い可能性を *in vitro* で明らかにした。一方で、CTVD の代謝については、ヒトではブタよりも早い、グルクロン酸抱合体形成能はブタのほうが優れていたことを *in vitro* の観点から明らかにした。

以上の結果を踏まえ、シトレオビリジンのヒトへの影響として、ブタと同様にバイオアベイラビリティが高いこと、代謝についてはヒトではブタよりも早い、グルクロン酸抱合体形成能はブタのほうが優れていたことを明らかにし、ヒトへの健康被害予測として重要な知見を見出した。本研究は、主査、副査による審査において、麻布大学大学院環境保健学研究科の博士（学術）にふさわしい内容であるという意見で一致した。