

## 研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	メラミンによる腎不全の発生機序の解明と健康影響評価手法の確立（課題番号：0905）（研究期間：平成21年度～平成23年度）
主任研究者名	所属：名古屋市立大学大学院医学研究科 腎・泌尿器科分野 氏名：郡 健二郎（研究課題番号：0905）

2008年に中国でメラミン混入食品により、腎結石と腎不全の発症に伴い乳幼児が死亡する事件が発生した。それをうけて、本研究では、その発症機序の解明と対策の確立を、メラミン結石動物を作成して調べた。

先ず始めに、メラミン結晶はメラミン単独投与では形成されず、類似化合物であるシアヌル酸と尿中で反応することによりはじめて形成されることが判った。

そこでメラミンとシアヌル酸との混合投与による14日目までの評価では、12mg/体重kg/day以上を投与すると腎結晶の形成を認めたが、8mg/kg/day以下の群では明らかな健康被害は見られなかった。組織学的検討からは、腎不全の形成機序はメラミンが腎尿細管管腔内で濃縮される段階で析出し、腎尿細管の閉塞により腎障害を引き起こすものと考えられた。雌雄差については、腎の癒痕形成は、雄の方が雌よりも著しくみられ、腎結石の形成量についても雄は雌の約1.5倍の結石形成を認めた。

また、投与した実験動物の週齢による比較では、6、10、26週齢と、週齢と共に結石形成が多かった。約1年にわたる経過観察では、メラミン投与中止後28日目にも腎組織の癒痕形成は残存していたが、メラミンによる健康被害リスクが発生しても、摂取中止を行うことで、その健康被害が改善する傾向にあり、約半年間で消失することが判明した。

## 研究成果報告書（本体）

研究課題名	メラミンによる腎不全の発生機序の解明と健康影響評価手法の確立（研究期間：平成21年度～平成23年度）
主任研究者名	所属：名古屋市立大学大学院医学研究科 腎・泌尿器科分野 氏名：郡 健二郎（研究課題番号：0905）

## I 研究の全体計画

## 1 研究期間

平成21年～平成23年（3年間）

## 2 研究目的

2008年に中国でメラミン混入食品により、腎結石の発生と腎不全で乳幼児が死亡する事件が発生した。その発生機序の解明と対策は緊急課題となっている。メラミン単独では健康被害の発生は少ないが、メラミンと同じトリアジン環を持つシアヌル酸の混入により、低濃度でも腎結石を生じ腎不全が引き起こされると考えられている。本研究では、メラミン結石モデル動物を用いて、メラミン並びにメラミンと結合力を有するシアヌル酸やアンメリン、アンメリドを投与し、腎結石形成および腎不全発生のメカニズムを明らかにするとともに、健康に影響を及ぼすメラミンや類似物質のリスク評価を行う。

具体的目標としては、その結果によりメラミン結石の形成メカニズムが解明し、モデル動物における腎結石や腎障害が発生するメラミン及び類似物質のリスクを判定する。さらに急性、亜急性、慢性暴露研究を行い、異なる性別、週齢で行うこと、多角的なリスクを判明させる。また、メラミンにより発生した結石の消失現象の有無を確認することにより、治療法の一つの根拠を判定する。以上より、正確な安全基準の作成が可能となり、食品の安全に貢献可能であると考ええる。

## 3 研究内容及び方法等

## (1) 研究内容及び方法

## 1) 研究項目名1：急性、亜急性暴露実験及び腎結石形成、腎不全発生メカニズムの解明（平成21年度）

メラミンおよびシアヌル酸による腎結石形成、腎不全発生のメカニズムは解明されていない。そこで私たちは、メラミン結石の形成モデル動物を作成し、腎結石形成、腎不全発生のメカニズムについて研究を行った。

in vitro 研究として 10mmol/l のメラミンとシアヌル酸の溶液を各々作成し、両者

を混合して水溶液、結晶形態の変化について観察した。in vivo 研究としては10週齢雄SDラットを、メラミン単独群、メラミン+シアヌル酸投与群、コントロール群の3群に分けた。メラミン単独投与群、メラミン+シアヌル酸投与群に関しては、投与量を低、中、高用量の3群に振り分けた。メラミン単独投与群の投与量は、腎不全発症症例で報告されたミルク内のメラミン混入量から24 mg/kg/day と換算し、その1/10量と10倍量の2.4, 24, 240 mg/kg/day とした。同様にメラミン+シアヌル酸投与群の投与量はメラミンとシアヌル酸を各々1.2, 12, 120 mg/kg/day とした。コントロール群は、蒸留水1mlを1日1回、胃管を用いて投与した。メラミン及びメラミン+シアヌル酸は1mlの蒸留水に混合し、1日1回胃管を用いて投与した。3, 7, 14日目に蓄尿、採血、腎摘出を行い(N=6)、腎組織をHE染色、Oil Red O染色(プラスチック・脂肪染色)とVon Kossa染色し、偏光顕微鏡、光学顕微鏡により結晶沈着、腎尿細管の構造変化の観察を行った。また尿中、腎組織の結晶について走査型電子顕微鏡を用いて観察し、結晶の成分分析を行った。

腎・尿路の健康影響リスク評価を行うには、F344ラットがより適しているため、再度F344ラットに対し研究を行った。メラミン及びシアヌル酸の投与を行い、急性期(14日・28日)、亜急性期(90日)における、腎結石形成、腎機能障害の評価を行った。健康影響リスクとなるメラミン及びシアヌル酸の量、組み合わせ濃度を明らかにした。メラミンとシアヌル酸の投与量は各々2~60mg/kg/day とし、各群にそれぞれ割り振った。腎組織(光学顕微鏡、電子顕微鏡)、血液、尿検体の分析より、健康影響を及ぼす濃度、期間を検討した。

## 2) 研究項目名2:

メラミンと結合性を有する物質に対して同時投与によるリスク評価(平成21年度)

メラミンと反応して結石を形成する物質としてシアヌル酸が知られているが、他にもアンメリンやアンメリドといった類似物質が存在する。類似物質の投与により健康影響が発生するかの検討は十分になされていない。メラミン、シアヌル酸に加えて、アンメリンやアンメリドといったメラミン化合物を投与し、検討を行う。メラミン、シアヌル酸、アンメリン、アンメリドの投与は1mlの蒸留水に混合し、1日1回胃管を用いて投与する。研究日数は14日間で行い、急性暴露による腎結石形成や腎不全発症などの健康影響を、腎組織を光学顕微鏡、偏光顕微鏡で観察、評価し、血液尿検体の測定を行い、健康に影響を与えるリスクを明らかにする。

### 3) 研究項目名 3 : 雌雄、年齢による健康影響リスク評価 (平成 22 年度)

本研究では、メラミン結石モデル動物を用いて年齢や性別によるリスクの変化について検討を行う。雌雄のF344ラットに対し、メラミン及びシアヌル酸の投与を行い、急性期 (14日・28日)、亜急性期 (90日) における、腎結石形成、腎機能障害などの分析や、血液検体の分析を行い、健康影響リスクとなる量、性差、年齢差を明らかにする。その際の投与量は平成 21 年度のリスク評価を元に行う。その際のラットの週齢は、各群にそれぞれ割り振る。さらに、そのほかの臓器 (肝臓、膀胱など) も評価を行う。リスク検討では、性別、年齢、濃度、摂取期間 (急性・亜急性) など多方面から検討を行い評価する。

### 4) 研究項目名 4 : 尿中メラミンや類似物質の測定、尿からの健康影響リスクの評価 (平成 22 年度)

メラミンは摂取後数時間で 90%以上が腎臓から排出されるといわれている。そのため、メラミン及びその類似物質を摂取すると尿中に排出される、尿路結石を形成し、腎機能障害などの健康影響リスクを生じると考えられる。本研究ではメラミン及び類似物質を投与した際の、尿中へのメラミン及び類似物質や代謝産物を測定し、腎結石、腎障害のデータと比較を行う。メラミン摂取量、尿への排出量のデータ及び健康影響データより、尿中代謝物の量によりメラミン摂取量の予想、健康影響リスク評価を行う。

### 5) 研究項目名 5 : メラミン投与中止後の経過実験 (平成 22 年度)

通常、尿路結石は、実験的には自然消失が認められ、私達も結石消失現象機序の解明を行っており、仮説の証明研究を行っている。メラミン結石は通常、尿路結石とは形成機序が異なることが 21 年度の研究で判明している。しかしメラミン結石が消失するか否かは判明していない。メラミン結石が発生した場合、通常、尿路結石と同様に、排石可能なものは排石を試み、自然排石が不可能なものは、結石破砕などの泌尿器科的手術が必要になっている。今回、メラミン及びシアヌル酸を投与し、メラミン結石を実験的に発生させ、投与終了後の腎結石の消失現象の有無、消失時間の検討を行い、さらにその際の腎組織の病理学的変化について検討を行う。その際、雌雄、年齢別にわけ、消失現象の差についても検討を行う。本研究は、メラミン結石患者の、実際の臨床における治療の根拠となることを目指す。

本研究では平成 21 年度の研究項目の研究結果をもとに投与量を試算し、雌雄両性にメラミン及びメラミン結合物質の投与を行い、急性、亜急性暴露の両面からメラミン結石発生、腎機能障害の発生の雌雄差、リスク評価の検討を行う。さらに、雌雄両性以外にも、週齢の異なる個体にもメラミン及びメラミン結合物質の投与を行い、

方法 : 本研究では、メラミン結石モデル動物を用いて研究を行う。6 週、10 週の雌雄 F344 ラット (4 群) に対し、メラミン及びシアヌル酸の投与を行う。メラミンとシアヌル酸は胃管で投与を行う。投与量はメラミンとシアヌル酸を各々 12mg/kg/day、各

18mg/kg/day の 2 群とする。14 日、28 日の投与後、投与を中止し、投与中止後 0 日目、7 日目、14 日目、28 日目にそれぞれ 6 匹ずつ採尿、採血、腎摘出を行い、腎組織を HE 染色、Oil Red O 染色（プラスチック・脂肪染色）や、ピゾラート染色（シュウ酸カルシウム染色）を行い、偏光顕微鏡、光学顕微鏡により結晶沈着、腎尿細管の構造変化の観察を行い、結石消失現象の有無、健康影響リスク評価を行う。また必要に応じ、電子顕微鏡を用いて腎の微細構造の変化を観察する。

現在のところ、主に腎臓、尿路結石形成に関し検討を行うが、そのほかの臓器（肝臓、膀胱など）に関しても病理学的に評価を行う。

#### 6) 研究項目名 6：慢性暴露からの健康影響リスク評価（平成 23 年度）

研究内容：メラミン結石のモデル動物に、メラミン及びメラミン結合物質を今までの研究では健康影響を与えなかった用量を長期的投与（慢性暴露：1 年）し、メラミン及び類似物質の慢性投与研究において、腎結石、腎機能障害などの健康影響リスクについて評価、検討を行う。メラミン結石のリスク評価に於いて、少量の慢性暴露の方面からの評価を行うことにより食品安全評価指標の算出の基となることを目指す。

方法：6 週の雌雄の F344 ラットに対し、メラミン及びシアヌル酸の投与を行う。メラミンとシアヌル酸は食餌量から換算して食餌に混入し自然摂取で投与する。投与期間は 1 年とする。投与量は平成 21、22 年度に行われた本研究の結果を基に、結石形成が少量認められた 12mg/kg/day より少なくし、結石形成がほとんど認められなかったが体重減少が軽度認められたメラミン＋シアヌル酸の摂取量 6mg/kg/day の群を中心に、2, 4, 6, 8mg/kg/day の 4 群、かつ雌雄の別を含めて 8 群での研究を行う。投与中は週一回の体重測定を行い、体重変化を追跡する。

投与後、採尿・採血を行い解剖し、腎組織、膀胱、肝臓など各組織を採取する。尿生化学及び血液生化学検査を行い、腎組織では結石形成を確認し、長期低用量投与での健康影響リスクを検討する。

#### 7) 研究項目名 7：メラミン投与中止後の長期経過観察実験（平成 23 年度）

研究内容：平成 22 年度の研究において、メラミン投与中止後にメラミン結石の減少を認めて報告している。結石形成部位が皮質側から乳頭部に向かい移動している所見も認められ、腎尿細管に発生した結石の排泄作用が起きていると考えられる。投与中止後 28 日目の時点でも癒痕形成が認められた。このことは、腎結石の減少が起きている、28 日間という短期間では腎障害がまだ残存していることが考えられる。しかし長期間の観察により、腎の癒痕形成の改善を認めることも十分考えられる。今回の研究では、メラミン投与中止後に長期間の観察を行い、結石形成量の変化、腎の癒痕形成量、炎症の改善に関して観察を行う。

方法：方法：本研究では、メラミン結石モデル動物を用いて研究を行う。6 週、10 週の雌雄 F344 ラット（4 群）に対し、メラミン及びシアヌル酸の投与を行う。メラミンとシアヌル酸は胃管で投与を行う。投与量はメラミンとシアヌル酸を各々 12mg/kg/day

とする。28日の投与後、投与を中止し、投与中止後0日目、14日目、28日目、90日後、180日後にそれぞれ6匹ずつ採尿、採血、腎摘出を行い、腎組織をHE染色、Oil Red O染色（プラスチック・脂肪染色）や、ピゾラート染色（シュウ酸カルシウム染色）を行い、偏光顕微鏡、光学顕微鏡により結晶沈着、腎尿細管の構造変化の観察を行い、結石消失現象の有無、健康影響リスク評価を行う。また必要に応じ、電子顕微鏡を用いて腎の微細構造の変化を観察する。

現在のところ、主に腎臓、尿路結石形成に関し検討を行うが、そのほかの臓器（肝臓、膀胱など）に関しても病理学的に評価を行う。

#### 4 倫理面への配慮について

動物実験に際して「動物実験の適正に向けたガイドライン」に基づき、科学的はもとより、動物福祉の観点からその倫理性に配慮した適正な動物実験の実施を図る。実験遂行に当たっては安全主任者の監督・指導の下に行っていく。現時点では予定はないが、必要に応じて名古屋市立大学の倫理委員会に諮り、研究を行う。

#### 5 当初計画からの変更点

##### （1）初年度の間評価結果を踏まえた変更点

食品安全委員会研究運営委員会の指摘により、メラミン投与中止後の経過実験（結石の消失の有無、組織の可逆的变化等）について研究を行い、メラミンの被曝により結石が発生した場合の、時間経過による腎結石、腎機能障害の変化について明らかにする。本研究は、メラミン結石患者の、実際の臨床における治療の根拠となることを目指す。

##### （2）2年目の中間評価結果を踏まえた変更点

## II 平成21年度研究成果報告

### 1 当該年度の研究目標

#### 急性、亜急性暴露実験及び腎結石形成、腎不全発生メカニズムの解明

2007年にアメリカで、メラミン混入ペットフードにより、犬や猫が死亡する報道があった。メラミン及び、メラミンと結合性を有する物質の併用摂取は腎結石形成及び腎不全発生の危険因子であり、摂取量によっては数日で腎不全にいたる事が予想される。急性暴露・亜急性暴露の両面から評価を行い、健康影響に対するリスクの分析を行う。

#### メラミンと結合性を有する物質の同時投与によるリスク評価

メラミンと反応して結石を形成する物質としてシアヌル酸が知られているが、他にもアンメリンやアンメリドといった類似物質が存在する。類似物質の投与により健康影響が発生するかの検討は十分になされていない。本研究では、メラミン、類似物質を組み合わせて投与を行い、腎結石、腎不全などの健康影響の発生の有無、リスク評価を行う。

### 2 平成 21 年度の主な研究成果

#### (1) 研究項目ごとの研究成果の概要

##### 1) 研究項目名 1

#### 急性、亜急性暴露実験及び腎結石形成、腎不全発生メカニズムの解明

研究の総括 (担当: 郡 健二郎)

研究の進行・監督 (担当: 戸澤 啓一)

組織観察・データ解析 (担当: 安井 孝周)

動物実験・光学顕微鏡と電子顕微鏡による組織観察 (担当: 岡田 淳志)

動物実験・電子顕微鏡による組織観察 (担当: 小林 隆宏)

病理的組織観察・評価 (担当: 白井 智之)

メラミン結晶はメラミン単独投与では形成されず、尿中で類似化合物であるシアヌル酸と反応することにより形成されることが判明した。その際の投与量であるが、6週齢のF344ラットに対し投与を行った。メラミン+シアヌル酸の投与量は2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 50, 120mg/kg/dayの各群に割り振り、一日一回胃管投与を行った。投与14日目までの評価では、12mg/kg/dayより投与量の多い群で腎結晶の形成を認めた。しかしながら結晶の形成量は種類の異なるSDラットより少なく形成された。8mg/kg/day以下の群では14日投与では明らかな健康影響を認めなかった。

50及び120mg/kg/dayの群において、腎の結晶形成部位は腎皮質を中心に形成されていた。12及び24mg/kg/dayの群においては腎の結晶形成部位は腎皮髄境界から乳頭部にかけて結晶の形成部位を認めた。腎のメラミン結晶の形成機序は、投与濃度により形成部位が異なることから、メラミンが腎尿細管管腔内で濃縮される段階で析出し、腎尿細管の閉塞により腎障害を引き起こすと考えられた。

6週齢にF344ラットに対し、前述の研究結果を元に、メラミン+シアヌル酸を食餌

に混入し、亜急性投与研究を行った。各群のメラミン+シアヌル酸の摂取量は各々6, 12, 18, 24, 36, 48, 60mg/kg/day とし行った。10 週齢の時点での結果ではあるが、各 24mg/kg/day 以上の投与量では 10 週齢までに全てのラットが腎不全により死亡した。その際の腎の病理組織では、腎尿細管管腔内に著明な結晶の形成を認めた。投与後 8 週の時点で、各 12mg/kg/day の群では皮髄境界から腎乳頭部を中心に結晶の形成を認め、腎機能の悪化を認めた。6mg/kg/day の群では、腎に結晶形成を認めず、腎機能の悪化を認めなかったが、軽度の体重減少を認めた。

## 2) 研究項目名 2

### メラミンと結合性を有する物質の同時投与によるリスク評価

研究の総括 (担当: 郡 健二郎)

研究の進行・監督 (担当: 戸澤 啓一)

組織観察・データ解析 (担当: 安井 孝周)

動物実験・光学顕微鏡と電子顕微鏡による組織観察 (担当: 岡田 淳志)

動物実験・電子顕微鏡による組織観察 (担当: 小林 隆宏)

病理的組織観察・評価 (担当: 白井 智之)

メラミンの類似物質であるアンメリン、アンメリドはその摂取により健康影響リスクが発生するかどうか今まで検討されていなかった。今回、10 週齢の雄 F344 ラットに対し、メラミン+シアヌル酸投与群 (各 24mg/kg/day)、メラミン+アンメリン投与群 (各 24mg/kg/day)、メラミン+アンメリド投与群に振り分け研究を行った。各群は生理食塩水に懸濁し、一日一回胃管投与を行った。

結果: メラミン+シアヌル酸群では、腎機能の悪化及び腎尿細管に結晶の沈着を認めた。メラミン+アンメリン投与群、メラミン+アンメリド投与群はともに腎機能に影響はなく、腎に結晶沈着を認めなかった。

## (2) 全体の研究成果

### 1) 全体の研究成果の要旨

メラミン結晶はメラミン単独投与では形成されず、尿中でシアヌル酸と反応することにより形成されることが判明した。急性期実験では、8mg/kg/day以下の群では14日投与では明らかな健康影響を認めなかった。

亜急性実験において、各24mg/kg/day以上の投与量では10週齢までに全てのラットが腎不全により死亡した。投与後8週の時点で、各12mg/kg/dayの群では皮髄境界から腎乳頭部を中心に結晶の形成を認め、腎機能の悪化を認めた。6mg/kg/dayの群では、腎に結晶形成を認めず、腎機能の悪化を認めなかったが、軽度の体重減少を認めた。

メラミン+アンメリン投与群、メラミン+アンメリド投与群ともに腎機能に影響はなく、腎に結晶沈着を認めなかった。

## 2) 研究成果

### 1) 研究項目名 1

#### 急性、亜急性暴露実験及び腎結石形成、腎不全発生メカニズムの解明

メラミン単独投与群、低用量(1.2mg/kg/day)のメラミン+シアヌル酸投与群では腎に結晶形成を認めなかった。中用量(12mg/kg/day)のメラミン+シアヌル酸投与群では3日目から結晶の形成を認め、経日的に増加した。結晶は主に皮髄境界部から乳頭部に認めた。(図1)

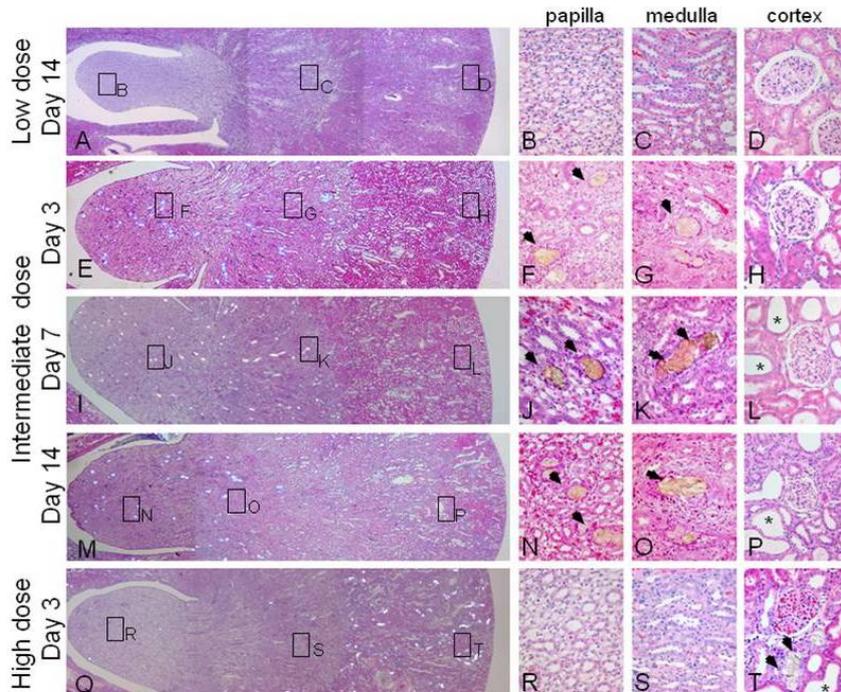


図3 腎組織 (HE染色 偏光顕微鏡 x40) (A, E, I, M, Q)  
メラミン+シアヌル酸投与群(1.2 mg/kg/day) (A, B, C, D)  
メラミン+シアヌル酸投与群(12mg/kg/day) 3日目(E, F, G, H), 7日目 (I, J, K, L),  
14日目(M, N, O, P)  
メラミン+シアヌル酸投与群(120mg/kg/day)3日目(Q, R, S, T) (x400). メラミン+シ

アヌル酸投与群(1.2 mg/kg/day)では腎尿細管に結晶形成を認めなかった(A)。メラミン+シアヌル酸投与群(12 mg/kg/day)は皮髓境界から乳頭部にかけて結晶形成を認めた(F, G, J, K, N, O)。メラミン+シアヌル酸投与群(120 mg/kg/day)は皮質を中心に結晶形成を認めた(Q)。

黒矢印は腎尿細管管腔内の結晶 米印(\*)は拡張した尿細管(L, P, T)

近位尿細管上皮は菲薄化し、腎尿細管は拡張していた。高用量(120mg/kg/day)のメラミン+シアヌル酸投与群では3日目から腎皮質を中心に結晶の形成を認め、7日以内に腎不全により死亡した。

### 亜急性暴露実験

各 24mg/kg/day 以上の投与量では 10 週齢までに全てのラットが腎不全により死亡した。腎では、腎尿細管管腔内に著明な結晶の形成を認めた。(図 2) 投与後 8 週の時点で、メラミン+シアヌル酸を各々 12mg/kg/day の群では、皮髓境界から腎乳頭部を中心に結晶の形成を認め、腎機能の悪化を認めた。

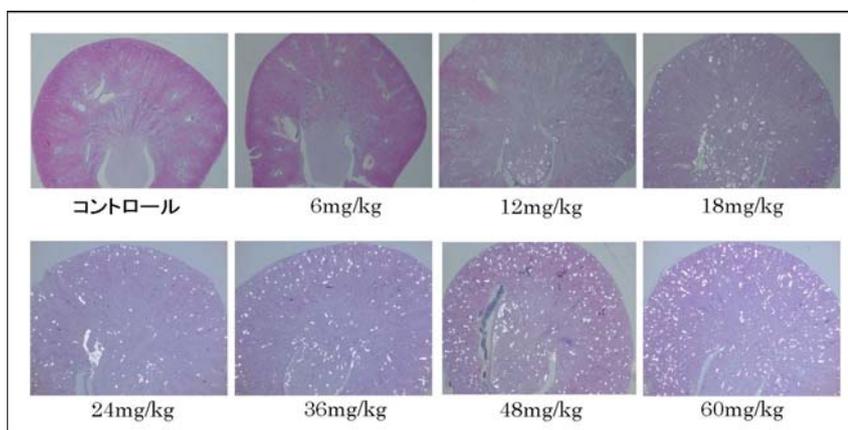


図 2 亜急性暴露実験における腎組織所見

12mg/kg/day 以上の投与群では腎にメラミン結晶の形成を認めた。低濃度では腎髓質を中心に結晶の形成を認めた。高濃度になるにつれ、腎皮質を含めて全体に結晶の形成を認めた。6mg/kg/day の投与群では、腎に結晶の形成を認めなかった。

## 2) 研究項目名 2

### メラミンと結合性を有する物質の同時投与によるリスク評価

10 週齢の雄 F344 ラットを、メラミン+シアヌル酸投与群、メラミン+アンメリン投与群、メラミン+アンメリド投与群 (各 24mg/kg/day) に振り分け研究を行った。

メラミン+シアヌル酸群では、腎機能の悪化及び腎尿細管に結晶の沈着を認めた。メラミン+アンメリン投与群、メラミン+アンメリド投与群はともに腎機能に影響はなく、腎に結晶沈着を認めなかった。

## 3) 考察及び結論

メラミン結晶は、メラミン単独投与では形成されなかった。しかしシアヌル酸と併せて暴露されることにより、腎尿細管管腔内にシアヌル酸メラミンの結晶形成を認めた。その形成機序は尿中で類似化合物であるシアヌル酸と反応することにより形成さ

れ、結晶が形成されるぎりぎりの濃度では、腎髄質を中心に結晶が形成され、結晶が多く形成される高濃度では腎皮質を中心に結晶が形成されたことから、メラミンが腎尿細管管腔内で濃縮される段階で析出し、腎尿細管の閉塞により腎障害を引き起こすと考えられた。つまり、摂取量、暴露量が、腎尿細管管腔内に結晶形成をさせる因子として一番重要なことが判明した。

SD ラットと F344 ラットに関し、急性期暴露実験を行った。SD ラットよりも F344 ラットの方が急性期に関しては腎尿細管への結晶沈着は少なく形成された。同じ動物でも種差があることが判明した。このことより、人間とラットでも耐用量に差があることが予想される。

F344 ラットに投与した急性期実験では、8mg/kg/day 以下の群では 14 日投与では明らかな健康影響を認めなかった。急性期暴露に於いて、健康影響を及ぼすメラミンとシアヌル酸の量は、8mg/kg/day の値が一つの目安になると考えられる。

亜急性暴露実験において、途中経過ではあるが、メラミンとシアヌル酸が各々 24mg/kg/day 以上の投与量では 4 週間以内に全てのラットが腎不全により死亡した。その際、投与後 2 週間で降より体重減少を認めた。食餌に混入した摂取方法でも、シアヌル酸メラミンの結晶が形成され、腎不全が発生することが判明した。その際の腎不全の進行は急速であり、大量の場合、摂取後一ヶ月以内に死亡することがあると判明した。メラミンとシアヌル酸の同時摂取は極めて毒性が高いものと考えられる。

結晶が形成されたラットの腎病理組織は、腎尿細管管腔内に著明な結晶の形成を認め、腎尿細管の閉塞所見を認めた。投与後 8 週の時点で、メラミン+シアヌル酸各々 12mg/kg/day の群では皮髄境界から腎乳頭部を中心に結晶の形成を認め、それにより尿細管の閉塞、近位尿細管の拡張を認め、腎機能の悪化を認めた。6mg/kg/day の群では、腎に結晶形成を認めず、尿細管の拡張所見もなく、腎機能の悪化を認めなかった。しかし軽度の体重減少を認めた。亜急性期暴露に関しては、投与後 8 週ではあるが、メラミン+シアヌル酸が各々 6mg/kg/day の群では、結晶形成を認めなかったが体重減少を認めた。亜急性期暴露に於いて、健康影響を及ぼすメラミンとシアヌル酸の量は、6mg/kg/day の値が一つの目安になると考えられる。

アンメリン、アンメリドはその摂取により健康影響リスクが発生するかどうか今まで検討されていなかった。メラミン+アンメリン投与群（各々 24mg/kg/day）、メラミン+アンメリド投与群（各々 24mg/kg/day）は腎にメラミンの結晶沈着を認めず、腎機能にも影響を認めなかった。メラミン+アンメリン、メラミン+アンメリドの組み合わせはメラミン+シアヌル酸の組み合わせよりは、健康影響リスクは低いものと考えられた。しかしながら、高濃度の群に関しては評価を行えていないので、健康影響リスクがないとは考えず、リスクが高いとすべきと考える。

### Ⅲ 平成22年度研究計画

#### 1 当該年度の具体的目標

平成21年度の研究項目の研究結果をもとに、雌雄両性及び週齢の異なるメラミン結石のモデル動物に、メラミン及びメラミン結合物質の投与を行い、急性暴露（14日、28日）、亜急性暴露（90日）の両面から健康影響リスク評価を行う。週齢、性別、期間、暴露量などの多方面から検討を行い、健康影響リスク評価を行う。メラミン結石のリスク評価に於いて、いままで知見のなかった、年齢、性別の方面からの評価を行うことにより食品安全評価指標の算出の基となることを目指す。

今までに私たちが作成したメラミン結石のモデル動物を用いて、研究の際に得られた尿の尿中へのメラミン、メラミン類似物質、結石形成促進因子、抑制因子の排泄量を、腎機能障害を主とした健康影響リスクと関連させ、統計学的に解析することで、尿中のメラミン及び関連物質の量をもとに健康影響を予想する指標を作成することにより、メラミン暴露の際の健康影響をあらかじめ予想しうるようにする。

食品安全委員会研究運営委員会の指摘により、メラミン投与中止後の経過実験（結石の消失の有無、組織の可逆的变化等）について研究を行い、メラミンの被曝により結石が発生した場合の、時間経過による腎結石、腎機能障害の変化について明らかにする。本研究は、メラミン結石患者の、実際の臨床における治療の根拠となることを目指す。

#### 2 平成22年度の研究概要

##### (1) 研究項目ごとの研究成果

##### 1) 研究項目名3 雌雄、年齢による健康影響リスク評価

研究の総括（担当：郡 健二郎）

研究の進行・監督（担当：戸澤 啓一）

組織観察・データ解析（担当：安井 孝周）

動物実験・光学顕微鏡と電子顕微鏡による組織観察（担当：岡田 淳志）

動物実験・電子顕微鏡による組織観察（担当：小林 隆宏）

病理的組織観察・評価（担当：白井 智之）

メラミン結石モデル動物を用いて、メラミン及びシアヌル酸の投与を行い、急性期（28日）、亜急性期（90日）における、健康影響リスクの性差、年齢差を明らかにするために研究を行った。

6週齢、10週齢、26週齢のF344ラットの雄・雌（各群6匹）に対し、メラミンとシアヌル酸を投与し研究を行った。投与量は平成21年度の投与実験の結果より、結石形成が発生するが、死亡するリスクが低い12mg/kg/day、18mg/kg/dayの2群とした。投与方法は食餌摂取量から換算し、上記の投与量となるようにメラミンとシアヌル酸を食餌に混入し、自然摂取とした。投与後4週、13週後に採血、採尿を行い、解剖を行った後、血液生化学検査、尿生化学検査、腎・肝・膀胱組織について観察し解析を行った。

同じ量のメラミン及びシアヌル酸を投与した際、腎臓の外観に雌雄差を認めた。雌

よりも雄に、凹凸の形成は著明に多かった。腎表面の凹凸は結石形成による炎症及び腎癒痕形成により形成されると考えられ、雌雄で明らかな差を生じており、雄のほうメラミン及びシアヌル酸により、炎症及び腎癒痕形成が発生しやすいと判明した。腎組織においても腎の癒痕形成に雄の方が雌よりも癒痕形成を多く認めた。

腎結石の形成の雌雄差についても、同じ投与日数、同じ投与量の場合、雌よりも雄のほう結石をより多く形成していた。6週齢のラットに12mg/kg/dayのメラミンとシアヌル酸を4週間投与した群では、雌の1.5倍の結石形成を雄に認めた。

異なる週齢間での結石形成量では、6週齢、10週齢、26週齢の順に結石形成を多く認めた。18mg/kg/dayのメラミンとシアヌル酸を投与した雄ラットでは、6週齢から投与を行った群では40匹中4匹が死亡し、10週齢から投与した群では2匹の死亡が観察された。しかし26週齢から投与した群で死亡したラットは観察されなかった。

## 2) 研究項目名 4

### 尿中メラミンや類似物質の測定、尿からの健康影響リスクの評価

研究の総括 (担当: 郡 健二郎)  
研究の進行・監督 (担当: 戸澤 啓一)  
組織観察・データ解析 (担当: 安井 孝周)  
動物実験・光学顕微鏡と電子顕微鏡による組織観察 (担当: 岡田 淳志)  
動物実験・電子顕微鏡による組織観察 (担当: 小林 隆宏)  
病理的組織観察・評価 (担当: 白井 智之)

メラミンとシアヌル酸を投与したF344ラットの雄・雌を解剖の際に採取した尿生化学を解析した。結石関連物質である尿中シュウ酸・クエン酸・カルシウムなどに関しては、通常用いられる結石モデルラットとは異なり変化を認めなかった。

## 3) 研究項目名 5 メラミン投与中止後の経過実験

研究の総括 (担当: 郡 健二郎)  
研究の進行・監督 (担当: 戸澤 啓一)  
組織観察・データ解析 (担当: 安井 孝周)  
動物実験・光学顕微鏡と電子顕微鏡による組織観察 (担当: 岡田 淳志)  
動物実験・電子顕微鏡による組織観察 (担当: 小林 隆宏)  
病理的組織観察・評価 (担当: 白井 智之)

6週齢、10週齢のF344ラットの雄・雌に対し、メラミンとシアヌル酸を投与し研究を行った。投与量はそれぞれ12mg/kg/day、16mg/kg/dayを投与した。28日間投与後に0日後、14日後、28日後に解剖を行い、検討を行った。

メラミンとシアヌル酸の投与を中止後、全ての群は体重の増加曲線の改善を認めた。腎臓の組織において、結石の形成量の減少が認められた。腎皮質において、メラミンとシアヌル酸投与後に、結石形成による炎症により組織の癒痕形成がおきるが、投与中止後28日目も癒痕形成の残存が認められた。短期間の観察であるため、現時点では癒痕形成の残存が認められたが、今後長期間の観察下では改善の可能性が有ると考える。

## (2) 全体の研究成果

### 1) 全体の研究成果の要旨

6週齢、10週齢、26週齢のF344ラットの雄・雌に対し、メラミンとシアヌル酸を投与し研究を行った。メラミンとシアヌル酸の同時摂取による結石形成は、雌雄に関しては、雌よりも雄の方に結石形成量がより多く形成されていた。週齢差に関しては雌雄共に6週齢が一番多く、次いで8週齢に多く26週齢が一番少なく結石が形成されていた。

メラミンとシアヌル酸を投与したF344ラットの雄・雌を解剖の際に採取した尿の生化学を解析した。結石関連物質である尿中シュウ酸・クエン酸・カルシウムなどに関しては、通常用いられる特に変化を認めなかった。

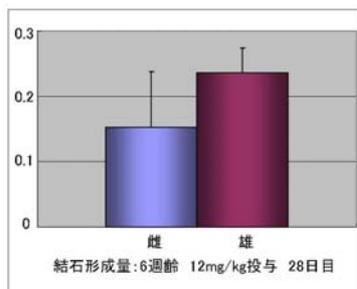
6週齢、10週齢、26週齢のF344ラットの雄・雌に対し投与中止後0, 14, 28日目に解剖を行った。6週齢、10週齢、26週齢の群は全てに投与中止後から体重の増加曲線の改善を認めた。腎臓の組織において、結石の形成量の減少が認められた。

## 2) 研究成果

### 1) 研究項目名3 雌雄、年齢による健康影響リスク評価

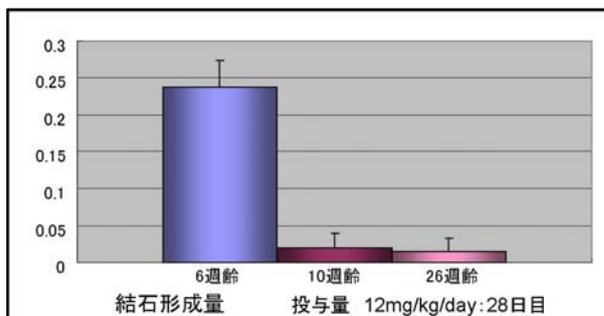
6週齢、10週齢、26週齢のF344ラットの雄・雌（各群6匹）に対し、12mg/kg/day、18mg/kg/dayのメラミン、シアヌル酸を食餌に混入し投与した。

同量のメラミン及びシアヌル酸を投与した際、雌では腎臓の表面の凹凸形成雌より雄に凹凸の形成は著明に多かった。腎表面の凹凸は結石形成による炎症及び腎瘢痕形成により形成されると考えられ、雌雄で明らかな差を生じており、雄のほうがメラミン及びシアヌル酸により、炎症及び腎瘢痕形成が発生しやすいと判明した。



腎尿細管及び腎盂における結石の形成量でも雌よりも雄のほうが結石をより多く形成していた。6週齢のラットに対し、12mg/kg ずつ 28日間投与した群では、結石形成量は雌の1.5倍雄に形成されていた(p=0.005)。

図3 6週齢 12mg/kg投与した群の腎結石形成の雌雄



週齢差において、雄ラットに対し6週齢のラットで一番結石形成量が多かった。10週齢、26週齢と週齢を重ねるにつれて、結石形成量は減っていく傾向を認めた。

図4 雄ラットにおける週齢による結石形成量の変化

メラミンとシアヌル酸が同一濃度で混入している食餌を摂取した場合、腎結石形成及び引き続いて起きる腎不全などの健康影響リスクが発生する可能性は、より若い群

に起きることが判明した。

## 2) 研究項目名 4 尿中メラミンや類似物質の測定、尿からの健康影響リスクの評価

尿量は、6週齢に対しメラミンとシアヌル酸を投与した群で、血液検査で腎機能障害を軽度認めたラットは尿量増加を認めた。しかしそれ以外の群では尿量に差を認めなかった。尿中Ca、尿中Pの排泄は共にコントロール群、メラミン+シアヌル酸投与群間で有意差を認めなかった。

尿中クエン酸、尿中シュウ酸の排泄濃度について検討を行った。尿中シュウ酸、尿中クエン酸の排泄濃度はいずれも上昇を認めなかった。

## 3) 研究項目名 5 メラミン投与中止後の経過実験

メラミンとシアヌル酸を混合した食餌を摂取すると、体重減少や増加不良が認められ、その現象は食餌を摂取しているかぎり継続している。メラミンとシアヌル酸が混入している食餌の摂取を中止後、体重増加曲線の著明な改善を認めた(図5)。

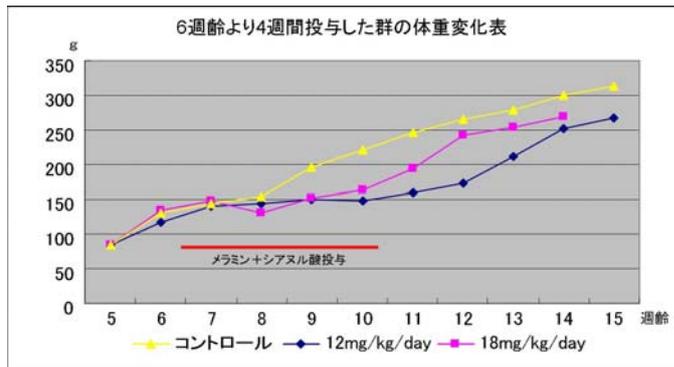


図5 6週齢から28日間メラミンとシアヌル酸投与終了後、通常の食餌に変更した際の体重変化表  
いずれも投与終了後から体重の増加曲線の改善を認めた。

腎臓の組織において、いずれの群においても結石の形成量の減少が認められた。

今回も同様に腎尿細管管腔内に結晶の形成を認めた。投与後、14日、28日と時間が経過するに従い、析出・形成された結晶は腎皮質に認める割合は減少し、乳頭部や腎盂内に認める割合が増えてきた。

## 3) 考察及び結論

平成21年度の研究に引き続いて、今年度は6週齢、10週齢、26週齢のラットの雌雄それぞれに対しメラミン及びメラミン類似物質の急性期・亜急性期暴露実験を行った。

F344ラットの雌雄それぞれに対し、同じ濃度のメラミンとシアヌル酸を暴露させる研究において、雌よりも雄の方がメラミン結石の形成量が多いことが判明した。通常、私たちが罹患する尿路結石に於いても、女性よりも男性の方がより罹患率が高い。メラミンにより引き起こされる結石は、通常の尿路結石は、結石形成機序が異なるが、同様の結果になったことは興味深い。メラミン結石に於いても、通常の尿路結石形成の際のメカニズムの一つである、腎尿細管への結石の付着能や排石機能に関し、雌雄差が存在し、それにより結石形成量に差が出ていることも考えられる。さらに、本研

究の結果より、メラミン及びメラミン類似物質に暴露した際は男性の方がより健康影響が出やすいことが推察され、暴露の際の検査前情報として有用であると考えられる。

メラミンとシアヌル酸の同時摂取による結石形成は、雌雄共に6週齢が一番多く、次いで10週齢、26週齢の順に多く結石が形成されていた。このことを人間に置き換えて考えると、メラミンとシアヌル酸を成人が摂取した場合、成人がほとんど腎結石や腎不全を来さない少量の暴露であっても、乳幼児（特に乳児）に於いては、重篤な腎結石形成やそれにより腎不全を来す可能性が高いことが推察される。現在、メラミンの混入基準に於いて、粉ミルクへの混入の基準をかなり厳しくしていることは今回の研究結果に合致しており妥当であると考えられる。

メラミンとシアヌル酸を投与したF344ラットの雄・雌を解剖の際に採取した尿生化学を解析した。結石関連物質である尿中シュウ酸・クエン酸・カルシウム・マグネシウムなどに関しては、通常用いられる結石モデルラットとは異なり変化を認めなかった。このことはメラミン結石の発生に於いて、尿中への通常私たちが罹患するシュウ酸カルシウムにおける結石関連物質の排泄とは関係なく起こることが判明した。

6週齢、10週齢、26週齢のF344ラットの雄・雌に対し投与中止後0, 14, 28日目に評価を行った。6週齢、10週齢、26週齢の雄雌いずれの群においても、メラミンとメラミン類似物質の投与中止後から体重の増加曲線の改善を認めた。このことだけでもメラミンとメラミン関連物質の摂取はかなりの健康影響をもたらしていること、中止により回復に向かうことがわかる。

腎臓の組織において、経時的に結石の形成量の減少が認められた。注意深く観察すると、結石形成部位が皮質側から乳頭部に向かい移動している所見も認められ、腎尿細管に発生した結石の排泄作用が起きていることが推察される。この減少により、メラミン摂取により、腎結石が形成され、腎不全が発症した場合、速やかにメラミン摂取を中止し、腎機能保護の治療を行えば、腎結石の自然排石作用により腎結石が軽快していくと考えられる。現在の治療法の根拠となる研究であると考えられる。

腎皮質において、メラミンとメラミン類似物質投与後、結石形成や炎症により腎組織の瘢痕形成が発生している。今回の研究において、投与中止後28日目の時点でも瘢痕形成が認められた。このことは、腎結石の減少が起きてても、28日間という短期間では腎障害がまだ残存していることが考えられる。しかし長期間の観察により、腎の瘢痕形成の改善を認めることも十分考えられる。

### Ⅲ 平成23年度研究計画

#### 1 当該年度の具体的目標

##### 慢性暴露からの健康影響リスク評価

平成21年度の研究項目の研究結果をもとに、メラミン結石のモデル動物に、メラミン及びメラミン結合物質を今までの研究では健康影響を与えなかった用量を長期的投与(慢性暴露:1年)し、メラミン及び類似物質の慢性投与実験において、腎結石、腎機能障害などの健康影響リスクについて評価、検討を行う。メラミン結石のリスク評価に於いて、少量の慢性暴露の方面からの評価を行うことにより食品安全評価指標の算出の基となることを目指す。

##### メラミン投与中止後の長期経過観察研究

平成22年度の研究において、メラミン投与中止後の短期間(4週間)の観察で、メラミン結石の減少を認めて報告している。結石形成部位が皮質側から乳頭部に向かい移動している所見も認められ、腎尿細管に発生した結石の排泄作用が起きていると考えられる。しかし投与中止後4週間目の時点でも腎に腎障害による瘢痕形成が認められた。このことは、腎においてメラミンによる腎尿細管の石灰化の減少が起きてても、4週間という短期間では腎障害がまだ残存していると考えられる。しかし長期間の観察により、腎の瘢痕形成の改善を認めることも十分考えられる。今回の研究では、メラミン投与中止後に長期間の観察を行い、結石形成量の変化、腎の瘢痕形成量、炎症の改善に関して観察を行う。

#### 2 平成23年度の研究概要

##### (1) 研究項目ごとの研究成果

##### 1) 研究項目名 6 慢性暴露からの健康影響リスク評価

研究の総括(担当:郡 健二郎)

研究の進行・監督(担当:戸澤 啓一)

組織観察・データ解析(担当:安井 孝周)

動物実験・光学顕微鏡と電子顕微鏡による組織観察(担当:岡田 淳志)

動物実験・電子顕微鏡による組織観察(担当:小林 隆宏)

病理的組織観察・評価(担当:白井 智之)

メラミン結石モデル動物を用いて、メラミン及びシアヌル酸の投与を行い、慢性期(約1年)における、健康影響リスクを明らかにするために研究を行った。

6週齢のF344ラットの雄・雌(各群6匹)に対し、各2, 4, 6, 8mg/kg/dayのメラミンとシアヌル酸を投与し研究を行った。投与方法は食餌に混入し自然摂取とした。投与後45週後に採血、採尿を行い、麻酔下に解剖を行った後、血液生化学検査、尿生化学検査、腎・肝・膀胱組織について観察し解析を行った。

体重に関して、2~6mg/kg/dayの群においては増加不良を認めなかった。8mg/kg/dayの投与群では雌雄共にコントロールに比べて約一割の体重増加不良を認めた。

腎機能に関してはどの群もコントロール群と変化を認めなかった。腎結石形成に関しては、雌雄の8mg/kg/day群に少量の結石形成を認めたが、6mg/kg/day以下の群では、

結石形成を認めなかった。

## 2) 研究項目名 7 メラミン投与中止後の長期経過観察研究

研究の総括 (担当: 郡 健二郎)

研究の進行・監督 (担当: 戸澤 啓一)

組織観察・データ解析 (担当: 安井 孝周)

動物実験・光学顕微鏡と電子顕微鏡による組織観察 (担当: 岡田 淳志)

動物実験・電子顕微鏡による組織観察 (担当: 小林 隆宏)

病理的組織観察・評価 (担当: 白井 智之)

平成 22 年度の研究において、メラミン、シアヌル酸投与中止後の 4 週後の観察でメラミン結石の減少を認めて報告した。結石形成部位が皮質側から乳頭部に向かい移動している所見も認められ、腎尿細管に発生した結石の排泄作用が起きていると考えられた。

6 週、10 週の雌雄 F344 ラット (4 群) に対し、メラミン及びシアヌル酸の投与を行った。28 日の投与後、投与を中止し中止後 0 日目、28 日目、90 日後、180 日後にそれぞれ、結石消失現象の有無、健康影響リスク評価を行った。

腎機能は、雌は投与後もコントロール群と差を認めず、投与中止後も研究を通してコントロール群と差を認めなかった。雄の腎機能は投与終了直後に軽度上昇を認めたが、投与中止後 28 日経過以後はコントロール群と有意差を認めなかった。

雌は結石形成量が少ないながらも、減少傾向を認めた。投与終了後 90 日でほぼ結石は消失した。雄の腎結石形成は投与直後より日を経過するにつれて、減少傾向を認めた。

## (2) 全体の研究成果

### 1) 全体の研究成果の要旨

6週齢のF344ラットの雄・雌（各群6匹）に対し、各2, 4, 6, 8mg/kg/dayのメラミンとシアヌル酸を投与した。

体重増加に関して、8mg/kg/dayの投与群では雌雄共にコントロールに比べて約一割の体重増加不良を認めた。

腎機能に関してはどの群もコントロール群と変化を認めなかった。腎結石形成に関しては、8mg/kg/dayの群の中の1匹に少量の結石形成を認めたが、6mg/kg/day以下の群では、結石形成を認めなかった。

メラミン及びシアヌル酸を28日投与後し、投与後0日目、28日目、90日後、180日後に採尿、採血、腎摘出を行い、結石消失現象の有無、健康影響リスク評価を行った。

雄の腎機能は投与終了直後に軽度上昇を認めたが、28日経過以後はコントロールと有意差を認めなかった。

雌は結石形成量が少ないながらも、減少傾向を認めた。投与終了後90日ではほぼ結石は消失した。雄の腎結石形成は投与直後より日を経過するにつれて、減少傾向を認めた。炎症・癒痕も投与後に改善傾向を認めた。

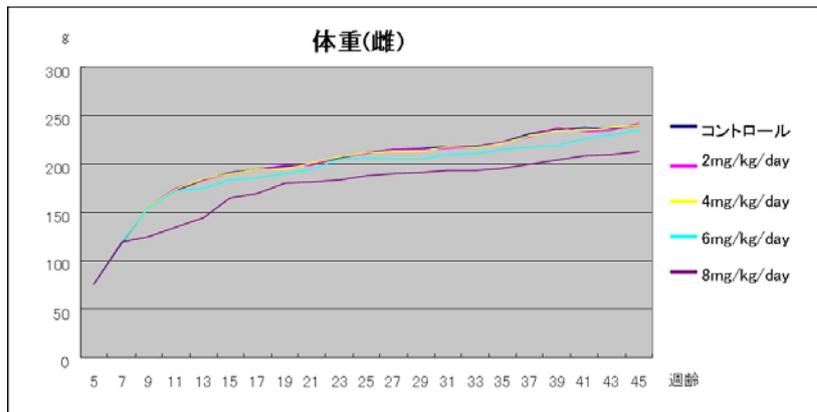
## 2) 研究成果

### 2) 研究成果

#### 1) 研究項目名6 慢性暴露からの健康影響リスク評価

平成21、22年度の研究では急性暴露、亜急性暴露でのメラミン及びその類似物質による健康影響評価を行ってきた。本研究では平成21、22年度の急性暴露・亜急性暴露研究において、ラットに対し結石形成を認めなかったメラミンとシアヌル酸の用量を投与し、メラミン及び類似物質の慢性投与実験（約1年）において、腎結石、腎機能障害などの健康影響リスクについて評価、検討を行った。

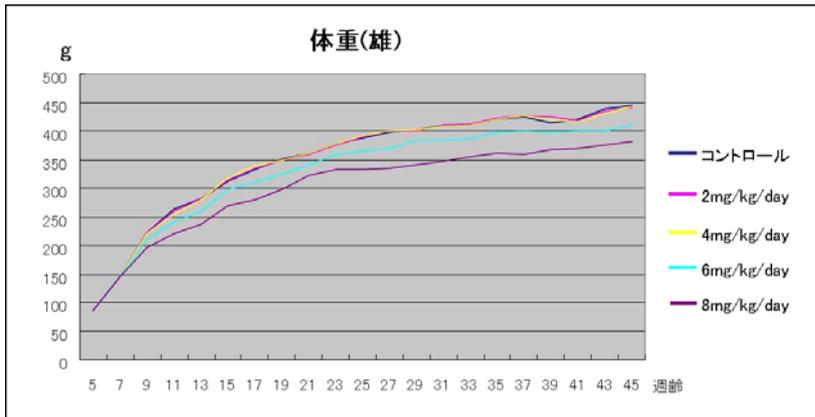
6週の雌雄のF344ラットに対し、メラミン及びシアヌル酸の投与を行った。メラミンとシアヌル酸は食餌量から換算して食餌に混入し自然摂取で投与した。本研究のメラミンとシアヌル酸の投与量は平成21、22年度のリスク評価を元に算出を行い、その量は結石形成を認めなかったが体重減少が認められた6mg/kg/dayを参考に投与量を計算して行った。2, 4, 6, 8mg/kg/dayの量と設定し、かつ雌雄の別を含めて8群での研究を行った。投与中は週一回の体重測定を行い、体重変化の追跡も行った。



(図6)

#### 雌の体重経過表

8mg/kg/dayの群で体重増加不良を認めた。



(図7)雄の体重経過表

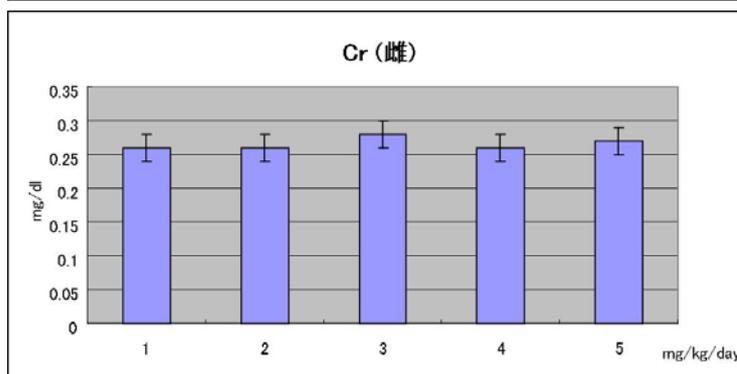
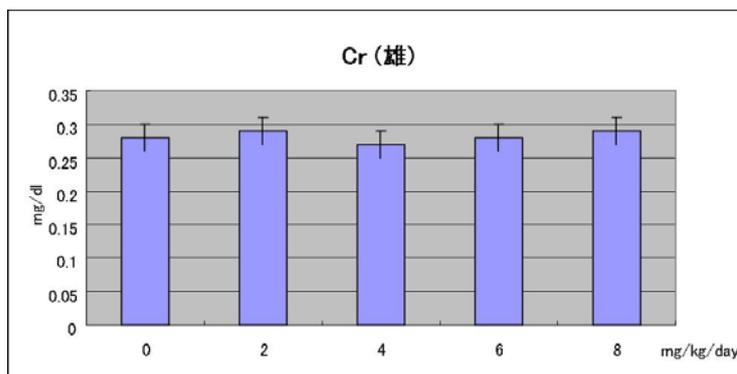
雌と同様に 8mg/kg/day の群ではコントロールに比べて体重増加不良を認めた。

雌の群において、メラミンとシアヌル酸の投与開始後に 6mg/kg/day 以下の群で体重増加はコントロール群と差を認めなかった。8mg/kg/day の群で約 1 割の体重増加不良を認めた。体重不良増加は、投与開始後から始まり、投与終了まで続いていた (図6)。

雄の群においても、メラミンとシアヌル酸の投与開始後に 6mg/kg/day 以下の群では、体重増加はコントロール群と差を認めなかった。8mg/kg/day の群で約 1 割の体重増加不良を認めた。(図7)。体重増加に関しては雌雄差を認めなかった。

投与終了時に採取時した血液の生化学に関して検討を行った。いずれの群においても電解質 (血清 Na、K、Cl、Ca、P) に関してコントロール群と差を認めなかった。さらに、同様に肝機能 (AST、ALT) に関してコントロール群と差を認めなかった。

今回の慢性期投与において、投与終了時の腎機能 (血清クレアチニン) に関しては雌雄共にコントロール群と差を認めなかった (図8、9)。



(上)図8、(下)図9

血清クレアチニン (Cr)

雌雄共にコントロール群とほぼ同値で、有意差を認めなかった。

メラミン、シアヌル酸投与終了時の尿中への電解質の排泄に関して検討を行った。尿中 Na、K、Cl、K に関していずれの群もコントロール群と差を認めなかった。

腎組織について検討を行った。腎の結晶形成に関しては、雌雄の 8mg/kg/day 群に少量の結石形成を認めたが、6mg/kg/day 以下の群では、結石形成を認めなかった（図 10、11）。結晶の形成量に関しては、少量であり、雌雄に差を認めなかった。

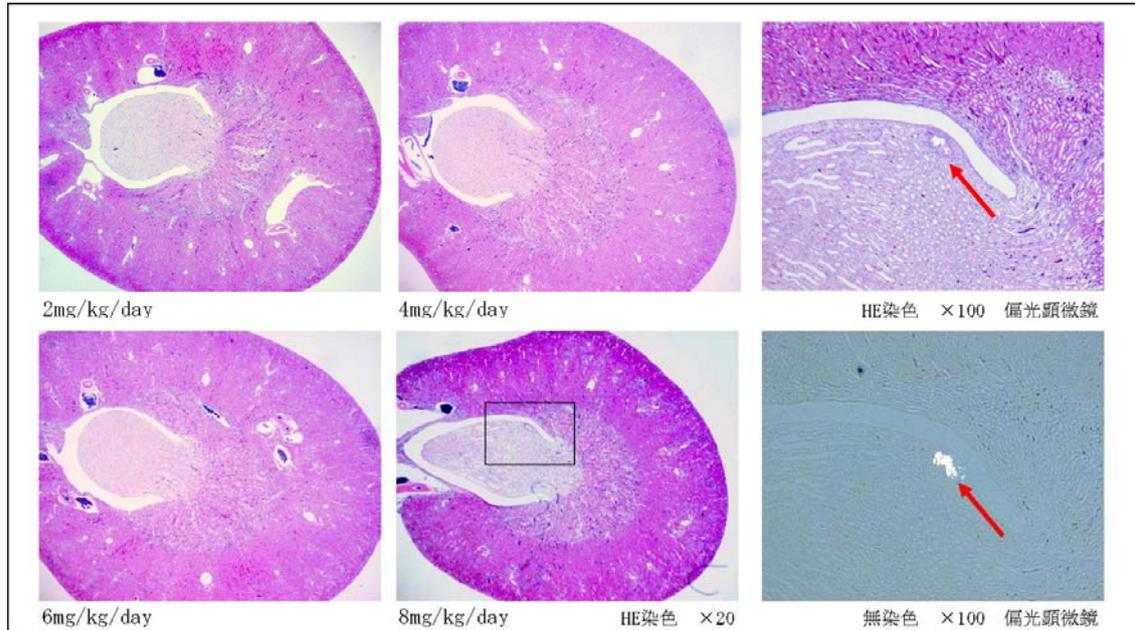


図 10 雌にメラミンとシアヌル酸を投与した際の腎組織

2~6mg/kg/day の群では結晶形成を認めなかった。8mg/kg/day の群で少量の結石形成を認めた。結晶は腎乳頭内に認めた。偏光顕微鏡では白色に光る結晶として認めた。(赤矢印)

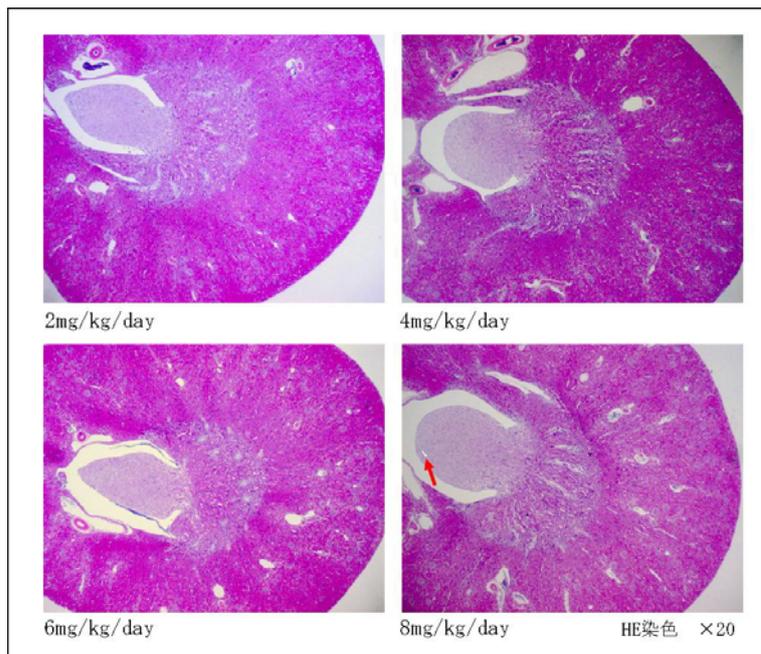


図 11 雄にメラミンとシアヌル酸を投与した際の腎組織

2~6mg/kg/day の群では結晶形成を認めなかった。8mg/kg/day の群で少量の結石形成を認めた。結晶は腎乳頭内遠位側に認めた。(赤矢印)

腎の炎症、癒痕に関しては結晶を形成している腎臓に関しては炎症、癒痕を認めたが、その程度は軽度であった。

## 2) 研究項目名 7 メラミン投与中止後の長期経過観察研究

平成 22 年度の研究において、メラミン、シアヌル酸投与中止後の 4 週後の観察でメラミン結石の減少を認めて報告した。結石形成部位が皮質側から乳頭部に向かい移動している所見も認められ、腎尿細管に発生した結石の排泄作用が起きていると考えられた。今回の研究では、メラミン投与中止後に長期間の観察を行い、結石形成量の変化、腎の癒痕形成量、炎症の改善に関して観察を行った。

本研究では、今まで用いてきたメラミン結石モデルラットを用いて研究を行った。6 週、10 週の雌雄 F344 ラットに対し、メラミン及びシアヌル酸の投与を行った。

食餌摂取量から換算したメラミンとシアヌル酸を、食餌に混入し自然摂取にて投与した。当初 16mg/kg/day で研究を開始したが、腎の結晶形成が多く、癒痕の程度が強かったため、12mg/kg/day に変更し研究を行った。

28 日の投与後、投与を終了し、投与終了後 0 日目、28 日目、90 日後、180 日後にそれぞれ採尿、採血、腎摘出を行った。光学顕微鏡により腎尿細管の構造変化の観察を行い、偏光顕微鏡により結石消失現象の有無の検討を行った。(図 1 2)

メラミン投与期間中に体重の増加不良を認めた。投与終了後に体重は順調に増え始め、投与終了後 8 週目にはコントロールと変わらない体重となった。

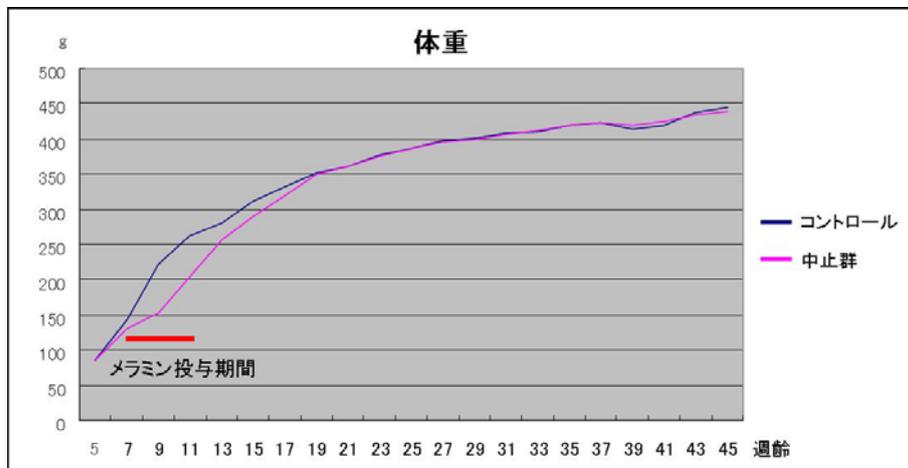


図 1 2 雄 6 週齢ラットにメラミン投与⇒中止群とコントロール群の体重変化

メラミン投与中は体重増加不良を認めたが、19 週時点(終了後 8 週)の時点でコントロールの体重と差を認めなかった。

雌の腎機能に関しては、投与後もコントロール群と差を認めず、投与終了後もこの研究を通してコントロール群と差を認めなかった。

雄の腎機能はメラミンとシアヌル酸の 28 日投与終了時にコントロール群の Cr が  $0.25 \pm 0.02$  (mg/dl) であるのに対し、投与群は  $0.36 \pm 0.06$  (mg/dl) と軽度上昇を認めた。投与終了後 28 日以後は腎機能の改善を認め、コントロール群と有意差を認めなかった。

(図 1 3、1 4)

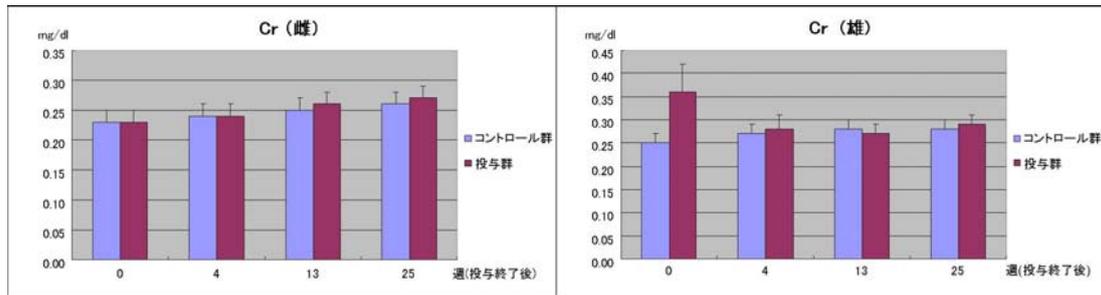


図 1 3、1 4 投与終了後からの腎機能(Cr)の推移

左の雌は投与終了後からコントロール群と腎機能(Cr)に差を認めなかった。右の雄は投与直後は腎機能の悪化を認めたが、終了後4週以降はコントロール群と差を認めなかった。

雌のラットでは結石形成量が少ないながらも、減少傾向を認めた。投与終了後90日ではほぼ結石は消失した。投与終了後は腎の癒痕形成、尿細管の拡張を多く認めたが、投与後28日以降は減少していた。投与後90日には腎の結晶は乳頭部のごく一部に認めるのみであった(右上)。投与後180日では、結晶形成も認めず、腎の炎症、癒痕も認めなかった。(図15)

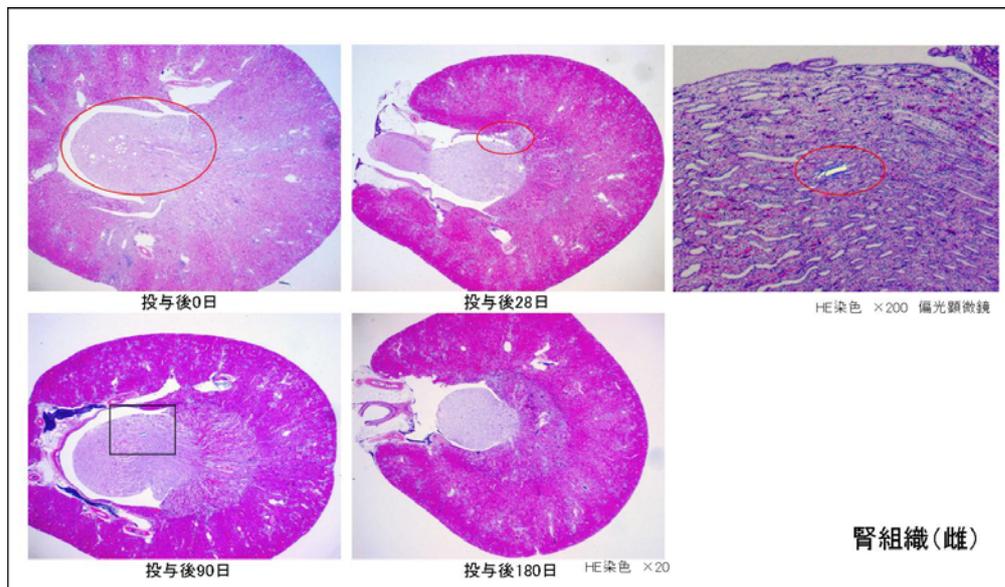


図 1 5 雌の投与終了後からの腎組織(6週から投与した群)

投与後0日には腎乳頭部に結晶を多数認めたが、28日、90日と経過するにしたがい結晶は減少傾向を認めた。(赤丸)

雄のラットで、雌と同様に28日投与後に腎にメラミン結晶形成を認めた。投与終了後28日、90日と結晶形成の減少を認めた。腎の炎症・癒痕に関しては個体差が大きかったが、減少傾向を認めた。180日経過時点では、かなり改善を認めた。(図16)

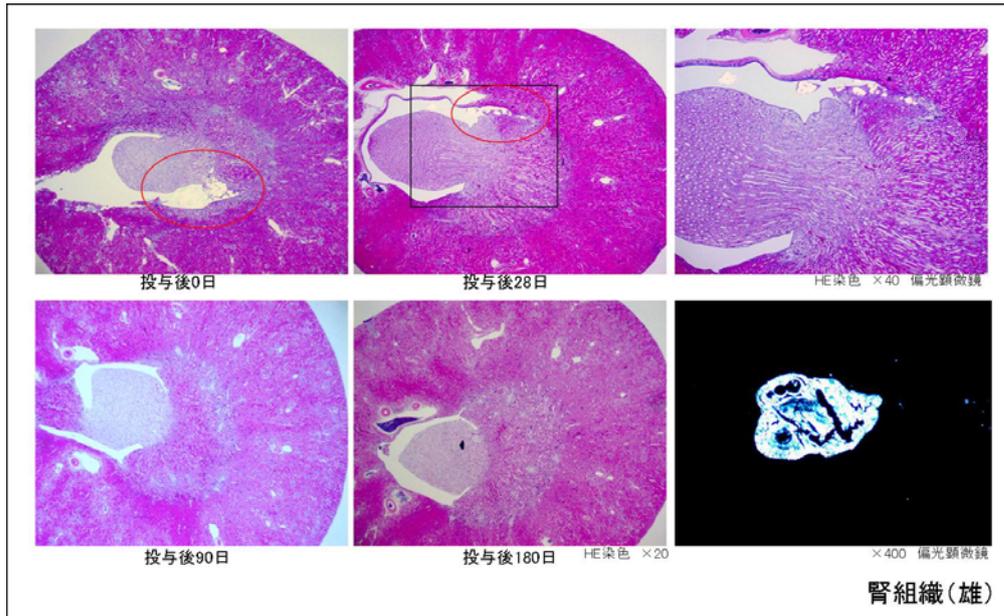


図15 雄の投与終了後からの腎組織（6週から投与した群）

左上の投与後0日では腎盂内に結晶形成を認めた。投与後28日の時点では、減少傾向を認めたが腎盂内に結晶形成を多数認めた。90日目以降はかなり減少を認めた。（赤丸）腎盂内の結晶はかなり尿細管径より大きく、腎盂内で結晶が凝集して結石様になったものと考えられた。（右下）

### 3) 考察及び結論

平成 21 年度の研究では、メラミンとシアヌル酸の投与を行い、メラミン結石モデルラットを作成し、急性期、亜急性期におけるメラミン結石形成のメカニズムを解明した。その際にその投与量が各 8mg/kg/day 以下では結晶形成を認めなかったことを報告している。しかし長期間(慢性期研究)でのメラミンとシアヌル酸投与は行っておらず、慢性期暴露において、結晶形成などの健康影響リスク評価を行っていなかった。今年度は、平成 21 年度の研究では行われなかった、慢性期投与(1 年)研究を行い、メラミンの健康影響リスク評価を行った。

6 週齢の F344 ラットの雄・雌(各群 6 匹)に対し、各 2, 4, 6, 8mg/kg/day のメラミンとシアヌル酸を投与し研究を行った。

投与開始後、8mg/kg/day 投与している群では、雌雄共に体重の増加不良を認めた。体の小さな雌は投与初期ではその傾向が顕著であった。投与日数が経過するに従い、8mg/kg/day 投与群の体重はコントロール群の約 1 割少ない体重まで回復したが、研究を通して、体重増加不良は続いていた。6mg/kg/day 以下の群ではやや少ない傾向もうかがわれたが、コントロール群と差を認めなかった。

腎機能に関しては、いずれの群においてもコントロール群と差を認めなかった。しかし体重の少ない場合、筋肉量が少なく、クレアチニン(Cr)が少なくなるため、Cr は低下する。8mg/kg/day 投与群では体重が 1 割少ないのに関わらず、測定した腎機能はコントロール群と差を認めなかった。このことより、腎機能に少なからず影響を及ぼしていると考えられた。

腎の結晶形成に関して、8mg/kg/day の群にのみわずかに結晶形成を認めた。平成 22 年度の研究では、結晶形成の雌雄差(雌<雄)を認めたが、今回の研究では結晶形成は少量であり、雌雄差を認めなかった。6mg/kg/day 以下の群では、明らかな結晶形成を認めなかった。メラミンとシアヌル酸による結晶形成は、平成 21 年度の急性期研究において、投与された濃度によって発生することが判明したが、今回の慢性期研究でも、総投与量ではなく、摂取した濃度によって、腎結晶が形成されることが判明した。このことより、メラミンとシアヌル酸を極少量長期間摂取しても健康影響が発生しにくいことが考えられる。最終的に口に摂取される加工された食品でのメラミン濃度が、健康影響を予想する際に考慮すべき重要なことと考えられた。

平成 22 年度の研究の中のメラミン、シアヌル酸投与中止後の経過観察研究で、メラミン・シアヌル酸摂取終了 4 週後の観察でメラミン結石の減少を認めて報告した。さらに結石形成部位が皮質側から乳頭部に向かい移動している所見も認められた。今年度は平成 22 年度の研究では行われなかった、投与終了後の長期間(約半年)の観察を行い、腎結晶の減少の観察や炎症・瘢痕形成の改善について検討を行った。

メラミン投与期間中に体重の増加不良を認め、投与終了後に体重は順調に増え始めた。最終的に投与終了後 8 週目にはコントロールと変わらない体重となった。平成 22 年度の研究では終了後 28 日目までしか観察しておらず、その時点では体重の回復は認められたが、コントロールの体重までの回復ではなかった。今回の研究で、メラミン

摂取中止後に経過を見ていけば、正常値まで体重が回復することが判明した。

腎機能（Cr）に関しては、平成 22 年度の研究でも判明しているように結晶形成量の多い雄では投与直後に腎機能の悪化を認めた。投与終了後 28 日目の時点で、改善しコントロールと差を認めなかった。雌に関しては、今回の研究では腎機能の悪化を認めず、中止後もコントロールと差を認めなかった。メラミンを摂取後、ある程度の腎機能障害に関しては、中止後の経過観察で改善することが判明した。重篤な障害でなければ、メラミンによって発生する健康影響は可逆的で、メラミン摂取中止することで改善すると言え、さらに適切な治療でより早期に回復することが予想された。

腎の結晶形成に関して、雌では投与中止時の時点で、腎乳頭部にメラミン結晶を認めた。投与後 28 日目、90 日目でも結晶形成を認めたが、その量は少量であり、結晶形成を認めないものの方が多く、明らかに結晶量減少を認めた。投与後 180 日目には結晶形成を認めなかった。雄では、雌と同様に腎尿細管内に結晶形成を認めたものもあったが、腎盂内に結晶形成を認めた。その大きさは投与中止時点では大きく量も多かったが、投与終了後 28 日の時点では小さくなり量も減少を認めた。90 日経過時点では、腎盂内の結晶を認めず、結晶の量はかなり減少を認めた。以上より、メラミン摂取中止後 90 日経過すると、結晶形成はほぼ消失することが判明した。腎の炎症・瘢痕形成に関しては、定量化は行えていないが、投与終了後経過するにつれて減少を認めた。

平成 22 年度の研究で投与後早期から結晶量の減少を認めたが、この傾向は長期の経過観察においても認めることが判明した。メラミン結晶量は 180 日の時点では消失した。また摂取を中止すること自体がメラミンによる健康影響の治療となることが判明した。今回の研究では約半年で結晶の消失を認めたが、さらに通常の結石治療に用いられる、飲水指導・点滴による尿量増加や、排石促進作用を有する薬物の使用により、より早期に結石を排石させ治療できることが考えられる。メラミン摂取により、腎結石が形成され、腎不全が発症した場合、速やかにメラミン摂取を中止し、腎機能保護の治療を行いつつ、必要に応じ薬物治療を行えば、自然排石作用により腎結石が排石され、体重減少、腎機能悪化、腎結石が改善することが判明した。

今年度の研究で、メラミン結石モデルラットに対し各 6mg/kg/day のメラミン・シアヌル酸投与では一年の慢性期暴露となってもメラミンによる健康影響リスクが発生しないことが判明した。

メラミンによる健康影響リスクが発生しても、摂取中止を行うことで、その健康影響が改善傾向となり、約半年で消失することが判明した。

## V 研究期間を通じた全体の研究成果

### 1 3年間（2年間）の主な研究成果

#### （1）研究項目ごとの研究成果の概要

##### 1) 研究項目名 1

###### 急性、亜急性暴露実験及び腎結石形成、腎不全発生メカニズムの解明

研究の総括（担当：郡 健二郎）

研究の進行・監督（担当：戸澤 啓一）

組織観察・データ解析（担当：安井 孝周）

動物実験・光学顕微鏡と電子顕微鏡による組織観察（担当：岡田 淳志）

動物実験・電子顕微鏡による組織観察（担当：小林 隆宏）

病理的組織観察・評価（担当：白井 智之）

メラミン結晶はメラミン単独投与では形成されず、尿中で類似化合物であるシアヌル酸と反応することにより形成されることが判明した。その際の投与量であるが、6週齢のF344ラットに対し投与を行った。メラミン+シアヌル酸の投与量は2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 50, 120mg/kg/dayの各群に割り振り、一日一回胃管投与を行った。投与14日目までの評価では、12mg/kg/dayより投与量の多い群で腎結晶の形成を認めた。しかしながら結晶の形成量は種類の異なるSDラットより少なく形成された。8mg/kg/day以下の群では14日投与では明らかな健康影響を認めなかった。

50及び120mg/kg/dayの群において、腎の結晶形成部位は腎皮質を中心に形成されていた。12及び24mg/kg/dayの群においては腎の結晶形成部位は腎皮髄境界から乳頭部にかけて結晶の形成部位を認めた。腎のメラミン結晶の形成機序は、投与濃度により形成部位が異なることから、メラミンが腎尿細管管腔内で濃縮される段階で析出し、腎尿細管の閉塞により腎障害を引き起こすと考えられた。

6週齢にF344ラットに対し、前述の研究結果を元に、メラミン+シアヌル酸を食餌に混入し、亜急性投与研究を行った。各群のメラミン+シアヌル酸の摂取量は各々6, 12, 18, 24, 36, 48, 60mg/kg/dayとし行った。10週齢の時点での結果ではあるが、各24mg/kg/day以上の投与量では10週齢までに全てのラットが腎不全により死亡した。その際の腎の病理組織では、腎尿細管管腔内に著明な結晶の形成を認めた。投与後8週の時点で、各12mg/kg/dayの群では皮髄境界から腎乳頭部を中心に結晶の形成を認め、腎機能の悪化を認めた。6mg/kg/dayの群では、腎に結晶形成を認めず、腎機能の悪化を認めなかったが、軽度の体重減少を認めた。

##### 2) 研究項目名 2

###### メラミンと結合性を有する物質の同時投与によるリスク評価

研究の総括（担当：郡 健二郎）

研究の進行・監督（担当：戸澤 啓一）

組織観察・データ解析（担当：安井 孝周）

動物実験・光学顕微鏡と電子顕微鏡による組織観察（担当：岡田 淳志）

動物実験・電子顕微鏡による組織観察（担当：小林 隆宏）

病理的組織観察・評価（担当：白井 智之）

メラミンの類似物質であるアンメリン、アンメリドはその摂取により健康影響リスクが発生するかどうか今まで検討されていなかった。今回、10 週齢の雄 F344 ラットに対し、メラミン+シアヌル酸投与群（各 24mg/kg/day）、メラミン+アンメリン投与群（各 24mg/kg/day）、メラミン+アンメリド投与群に振り分け研究を行った。各群は生理食塩水に懸濁し、一日一回胃管投与を行った。

結果：メラミン+シアヌル酸群では、腎機能の悪化及び腎尿細管に結晶の沈着を認めた。メラミン+アンメリン投与群、メラミン+アンメリド投与群はともに腎機能に影響はなく、腎に結晶沈着を認めなかった。

### 3) 研究項目名 3 雌雄、年齢による健康影響リスク評価

研究の総括（担当：郡 健二郎）

研究の進行・監督（担当：戸澤 啓一）

組織観察・データ解析（担当：安井 孝周）

動物実験・光学顕微鏡と電子顕微鏡による組織観察（担当：岡田 淳志）

動物実験・電子顕微鏡による組織観察（担当：小林 隆宏）

病理的組織観察・評価（担当：白井 智之）

メラミン結石モデル動物を用いて、メラミン及びシアヌル酸の投与を行い、急性期（28 日）、亜急性期（90 日）における、健康影響リスクの性差、年齢差を明らかにするために研究を行った。

6 週齢、10 週齢、26 週齢の F344 ラットの雄・雌（各群 6 匹）に対し、メラミンとシアヌル酸を投与し研究を行った。投与量は平成 21 年度の投与実験の結果より、結石形成が発生するが、死亡するリスクが低い 12mg/kg/day、18mg/kg/day の 2 群とした。投与方法は食餌摂取量から換算し、上記の投与量となるようにメラミンとシアヌル酸を食餌に混入し、自然摂取とした。投与後 4 週、13 週後に採血、採尿を行い、解剖を行った後、血液生化学検査、尿生化学検査、腎・肝・膀胱組織について観察し解析を行った。

同じ量のメラミン及びシアヌル酸を投与した際、腎臓の外観に雌雄差を認めた。雌よりも雄に、凹凸の形成は著明に多かった。腎表面の凹凸は結石形成による炎症及び腎癒痕形成により形成されると考えられ、雌雄で明らかな差を生じており、雄のほうがメラミン及びシアヌル酸により、炎症及び腎癒痕形成が発生しやすいと判明した。腎組織においても腎の癒痕形成に雄の方が雌よりも癒痕形成を多く認めた。

腎結石の形成の雌雄差についても、同じ投与日数、同じ投与量の場合、雌よりも雄のほうが結石をより多く形成していた。6 週齢のラットに 12mg/kg/day のメラミンとシアヌル酸を 4 週間投与した群では、雌の 1.5 倍の結石形成を雄に認めた。

異なる週齢間での結石形成量では、6 週齢、10 週齢、26 週齢の順に結石形成を多く認めた。18mg/kg/day のメラミンとシアヌル酸を投与した雄ラットでは、6 週齢から投与を行った群では 40 匹中 4 匹が死亡し、10 週齢から投与した群では 2 匹の死亡が観察

された。しかし 26 週齢から投与した群で死亡したラットは観察されなかった。

#### 4) 研究項目名 4

##### 尿中メラミンや類似物質の測定、尿からの健康影響リスクの評価

研究の総括 (担当: 郡 健二郎)  
研究の進行・監督 (担当: 戸澤 啓一)  
組織観察・データ解析 (担当: 安井 孝周)  
動物実験・光学顕微鏡と電子顕微鏡による組織観察 (担当: 岡田 淳志)  
動物実験・電子顕微鏡による組織観察 (担当: 小林 隆宏)  
病理的組織観察・評価 (担当: 白井 智之)

メラミンとシアヌル酸を投与した F344 ラットの雄・雌を解剖の際に採取した尿生化学を解析した。結石関連物質である尿中シュウ酸・クエン酸・カルシウムなどに関しては、通常用いられる結石モデルラットとは異なり変化を認めなかった。

#### 5) 研究項目名 5 メラミン投与中止後の経過実験

研究の総括 (担当: 郡 健二郎)  
研究の進行・監督 (担当: 戸澤 啓一)  
組織観察・データ解析 (担当: 安井 孝周)  
動物実験・光学顕微鏡と電子顕微鏡による組織観察 (担当: 岡田 淳志)  
動物実験・電子顕微鏡による組織観察 (担当: 小林 隆宏)  
病理的組織観察・評価 (担当: 白井 智之)

6 週齢、10 週齢の F344 ラットの雄・雌に対し、メラミンとシアヌル酸を投与し研究を行った。投与量はそれぞれ 12mg/kg/day、16mg/kg/day を投与した。28 日間投与後に 0 日後、14 日後、28 日後に解剖を行い、検討を行った。

メラミンとシアヌル酸の投与を中止後、全ての群は体重の増加曲線の改善を認めた。腎臓の組織において、結石の形成量の減少が認められた。腎皮質において、メラミンとシアヌル酸投与後に、結石形成による炎症により組織の癒痕形成がおきるが、投与中止後 28 日目も癒痕形成の残存が認められた。短期間の観察であるため、現時点では癒痕形成の残存が認められたが、今後長期間の観察下では改善の可能性が有ると考えられた。

#### 6) 研究項目名 6 慢性暴露からの健康影響リスク評価

研究の総括 (担当: 郡 健二郎)  
研究の進行・監督 (担当: 戸澤 啓一)  
組織観察・データ解析 (担当: 安井 孝周)  
動物実験・光学顕微鏡と電子顕微鏡による組織観察 (担当: 岡田 淳志)  
動物実験・電子顕微鏡による組織観察 (担当: 小林 隆宏)  
病理的組織観察・評価 (担当: 白井 智之)

メラミン結石モデル動物を用いて、メラミン及びシアヌル酸の投与を行い、慢性期 (約 1 年)における、健康影響リスクを明らかにするために研究を行った。

6週齢のF344ラットの雄・雌（各群6匹）に対し、各2, 4, 6, 8mg/kg/dayのメラミンとシアヌル酸を投与し研究を行った。投与方法は食餌に混入し自然摂取とした。投与後45週後に採血、採尿を行い、麻酔下に解剖を行った後、血液生化学検査、尿生化学検査、腎・肝・膀胱組織について観察し解析を行った。

体重に関して、2~6mg/kg/dayの群においては増加不良を認めなかった。8mg/kg/dayの投与群では雌雄共にコントロールに比べて約一割の体重増加不良を認めた。腎機能に関してはどの群もコントロール群と変化を認めなかった。腎結石形成に関しては、雌雄の8mg/kg/day群に少量の結石形成を認めたが、6mg/kg/day以下の群では、結石形成を認めなかった。

## 2) 研究項目名7 メラミン投与中止後の長期経過観察研究

研究の総括（担当：郡 健二郎）

研究の進行・監督（担当：戸澤 啓一）

組織観察・データ解析（担当：安井 孝周）

動物実験・光学顕微鏡と電子顕微鏡による組織観察（担当：岡田 淳志）

動物実験・電子顕微鏡による組織観察（担当：小林 隆宏）

病理的組織観察・評価（担当：白井 智之）

平成22年度の研究において、メラミン、シアヌル酸投与中止後の4週後の観察でメラミン結石の減少を認めて報告した。結石形成部位が皮質側から乳頭部に向かい移動している所見も認められ、腎尿細管に発生した結石の排泄作用が起きていると考えられた。

6週、10週の雌雄F344ラット(4群)に対し、メラミン及びシアヌル酸の投与を行った。28日の投与後、投与を中止し中止後0日目、28日目、90日後、180日後にそれぞれ、結石消失現象の有無、健康影響リスク評価を行った。

腎機能は、雌は投与後もコントロール群と差を認めず、投与中止後も研究を通してコントロール群と差を認めなかった。雄の腎機能は投与終了直後に軽度上昇を認めたが、投与中止後28日経過以後はコントロール群と有意差を認めなかった。

雌は結石形成量が少ないながらも、減少傾向を認めた。投与終了後90日でほぼ結石は消失した。雄の腎結石形成は投与直後より日を経過するにつれて、減少傾向を認めた。

## (2) 全体の研究成果

### 1) 全体の研究成果の要旨

メラミン結晶はメラミン単独投与では形成されず、シアヌル酸と反応することにより形成されることが判明した。急性期研究では、投与量 8mg/kg/day 以下の群で明らかな健康影響を認めず、亜急性研究では、各 24mg/kg/day 以上では 10 週齢までに全てのラットが腎不全により死亡した。6mg/kg/day の群で、腎に結晶形成を認めなかった。

メラミン+アンメリン投与群、メラミン+アンメリド投与群とも、結晶沈着を認めなかった。

雌よりも雄の方に結晶形成が多く、週齢差では、若い 6 週齢の結晶形成量が多かった。

尿中シュウ酸・クエン酸・カルシウム排泄量に関しては、特に変化を認めなかった。

慢性期研究では、8mg/kg/day で雌雄共に比べて約一割の体重増加不良を認めた。結晶形成に関して、6mg/kg/day 以下の群で、結石形成を認めなかった。

メラミン及びシアヌル酸を 28 日投与、中止後の経過研究では、メラミン、シアヌル酸投与中止後から体重の増加曲線の改善を認め、結晶の形成量の減少が認められた。投与終了後 90 日ではほぼ結石は消失した。

## 2) 研究成果

### 1) 研究項目名 1

#### 急性、亜急性暴露研究及び腎結石形成、腎不全発生メカニズムの解明

in vitro の研究として 10mmol/l のメラミンとシアヌル酸の溶液を各々作成し、両者を混合して水溶液、結晶形態の変化について観察した。メラミンとシアヌル酸の各々単独では溶解したが、混合により無色透明の溶液が瞬時に白濁し、沈殿物を生じた。形成した結晶形態は針状であった。

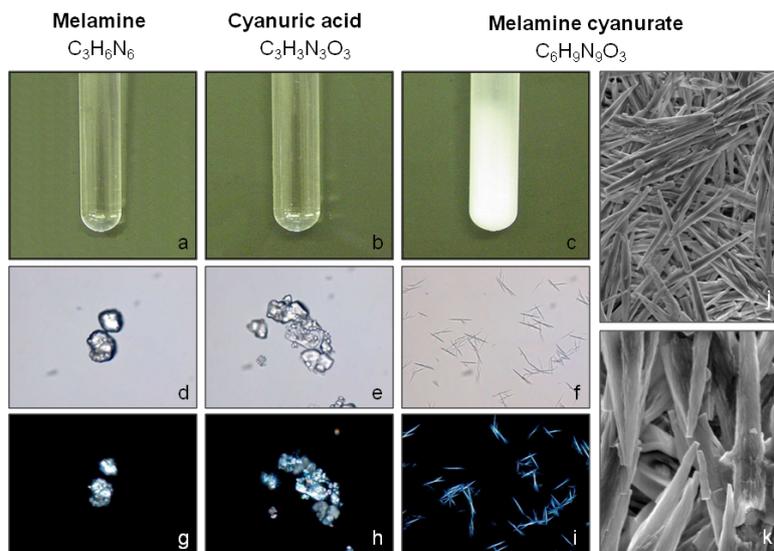


図 1 a. 10mmol/l のメラミン溶液（無色透明） b. 10mmol/l のシ

アヌル酸溶液(無色透明) c. aとbの混合溶液(白色に混濁) d. e. f.  
 メラミン、シアヌル酸、混合物の結晶(光学顕微鏡) g. h. i. メラ  
 ミン、シアヌル酸、混合物の結晶(偏光顕微鏡) i. j. 混合物の走査  
 型電子顕微鏡像(7000倍, 25000倍)

in vivoの研究として10週齢雄SDラットを、メラミン単独群(N=54)、メラミン+シアヌル酸投与群(N=54)、コントロール群(N=18)の3群に分けた。メラミン単独投与群、メラミン+シアヌル酸投与群に関しては、投与量を低、中、高用量の3群に振り分けた。メラミン単独投与群の投与量は、腎不全発症例で報告されたミルク内のメラミン混入量から24 mg/kg/dayと換算し、その1/10量と10倍量の2.4, 24, 240 mg/kg/dayとした。同様にメラミン+シアヌル酸投与群の投与量はメラミンとシアヌル酸を各々1.2, 12, 120 mg/kg/dayとした。コントロール群は蒸留水1mlを1日1回、胃管を用いて投与した。メラミン及びメラミン+シアヌル酸は1mlの蒸留水に混合し、1日1回胃管を用いて投与した。3, 7, 14日目に蓄尿、採血、腎摘出を行い(N=6)、腎組織をHE染色、Oil Red O染色(プラスチック・脂肪染色)とVon Kossa染色し、偏光顕微鏡、光学顕微鏡により結晶沈着、腎尿細管の構造変化の観察を行った。また尿中、腎組織の結晶を走査型電子顕微鏡で観察し、結晶の成分分析を行った。

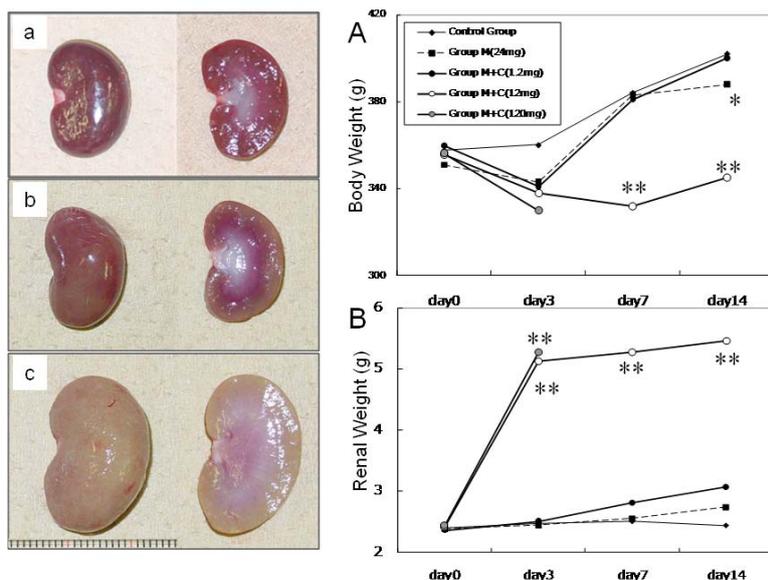


図2 a. コントロール群の腎(7日目) b. メラミン投与群(24mg/kg/day)の腎(7日目) c. メラミン+シアヌル酸投与群(各120mg/kg/day)の腎(3日目)

A. 体重変化: メラミン+シアヌル酸投与群(12mg/kg/day)は7日目以降体重減少を認めた。メラミン+シアヌル酸投与群(120mg/kg/day)は7日目を超えて生存したラットは認めなかった。

B. 腎重量: メラミン+シアヌル酸投与群(12および120mg/kg/day)は腎の重量の増加を認めた。コントロール群、メラミン単独投与群、メラミン+シアヌル酸投与群(1.2mg/kg/day)は変化を認めなかった。

in vivo研究ではメラミン単独投与群、低用量(1.2mg/kg/day)のメラミン+シアヌル酸投与群では腎に結晶形成を認めなかった。中用量(12mg/kg/day)のメラミン+シアヌ

ル酸投与群では 3 日目から結晶の形成を認め、経日的に増加した。結晶は主に皮髄境界部から乳頭部に認めた。(図 2, 3)

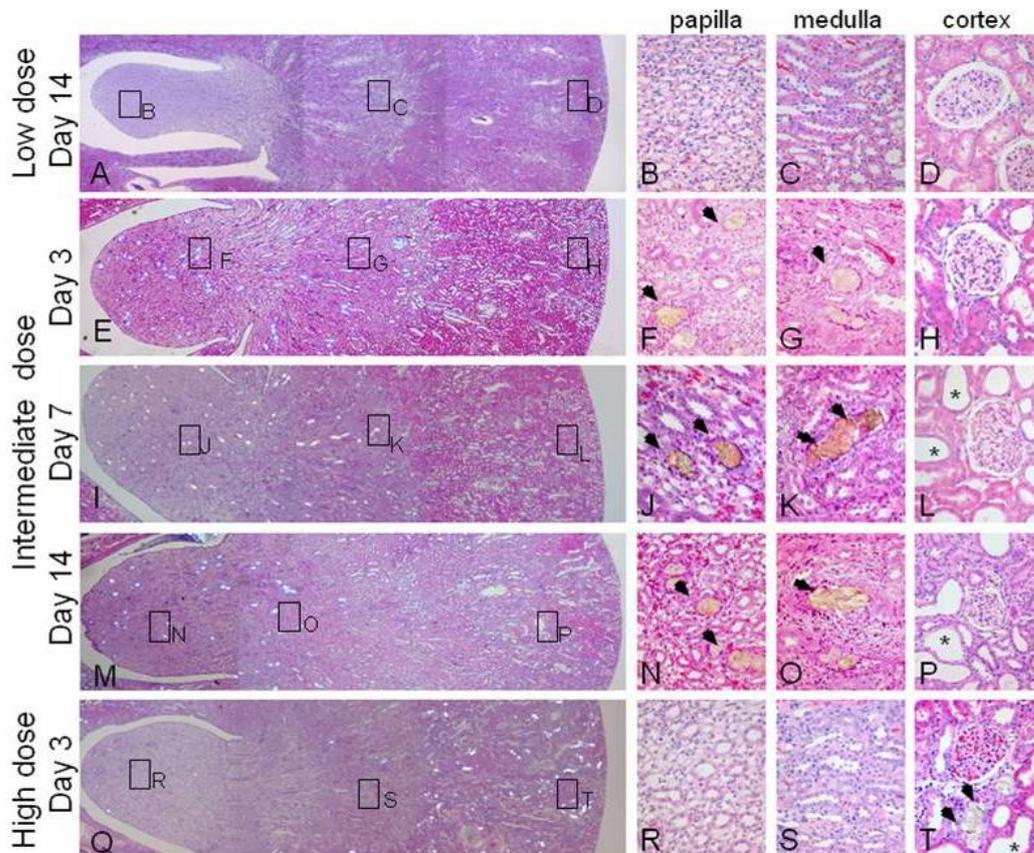


図 3 腎組織 (HE 染色 偏光顕微鏡 x40) (A, E, I, M, Q)

メラミン+シアヌル酸投与群 (1.2 mg/kg/day) (A, B, C, D)

メラミン+シアヌル酸投与群 (12mg/kg/day) 3 日目 (E, F, G, H), 7 日目 (I, J, K, L), 14 日目 (M, N, O, P)

メラミン+シアヌル酸投与群 (120mg/kg/day) 3 日目 (Q, R, S, T) (x400). メラミン+シアヌル酸投与群 (1.2 mg/kg/day) では腎尿細管に結晶形成を認めなかった (A)。メラミン+シアヌル酸投与群 (12 mg/kg/day) は皮髄境界部から乳頭部にかけて結晶形成を認めた (F, G, J, K, N, O)。メラミン+シアヌル酸投与群 (120 mg/kg/day) は皮質を中心に結晶形成を認めた (Q)。

黒矢印は腎尿細管管腔内の結晶 米印(\*)は拡張した尿細管 (L, P, T)

近位尿細管上皮は菲薄化し、腎尿細管は拡張していた。高用量 (120mg/kg/day) のメラミン+シアヌル酸投与群では 3 日目から腎皮質を中心に結晶の形成を認め、7 日以内に腎不全により死亡した。

結晶は HE 染色では薄茶色に、Oil Red O 染色では紅色に染色され、Von Kossa 染色では染色されなかった。(図 4)

結晶形成を認めた群では尿中にも卵円形の表面に小さな凹凸のある結晶を認めた。走査型電子顕微鏡でも同様の所見であった。(図 5)

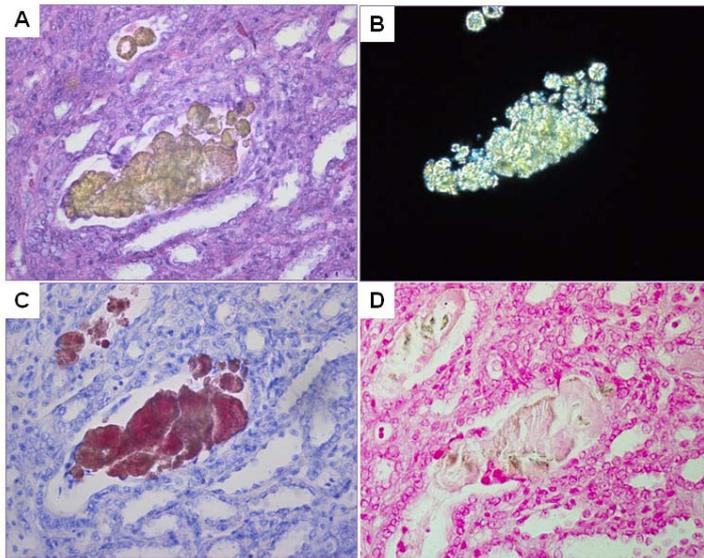


図4 メラミン+シアヌル酸投与群(12mg/kg/day)の連続切片による結晶 HE 染色 (A), 偏光顕微鏡 (B), Oil Red O 染色 (C) and von Kossa 染色 (D) (x200). HE 染色では薄茶色に、Oil Red O 染色では紅色に染色され、Von Kossa 染色では染色されなかった。

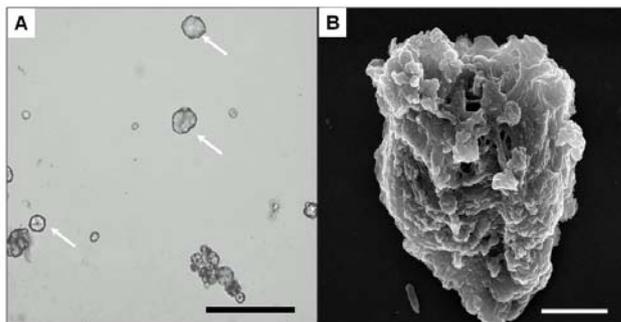


図5 尿中の結晶 (光学顕微鏡A x400, 走査型電子顕微鏡B x8000) 黒線 (A) 50 µm 白線 (B) 2.5 µm. 尿中に卵円形の結晶を認めた。走査型電子顕微鏡では、細かな凹凸がある均一な結晶構造を認めた。

結晶と結晶周囲の腎組織の成分分析では、結晶は炭素、窒素、酸素が主成分であり、カルシウム成分を認めなかった。周囲の腎組織は炭素、酸素が主成分であり、窒素成分を認めなかった。(図6)

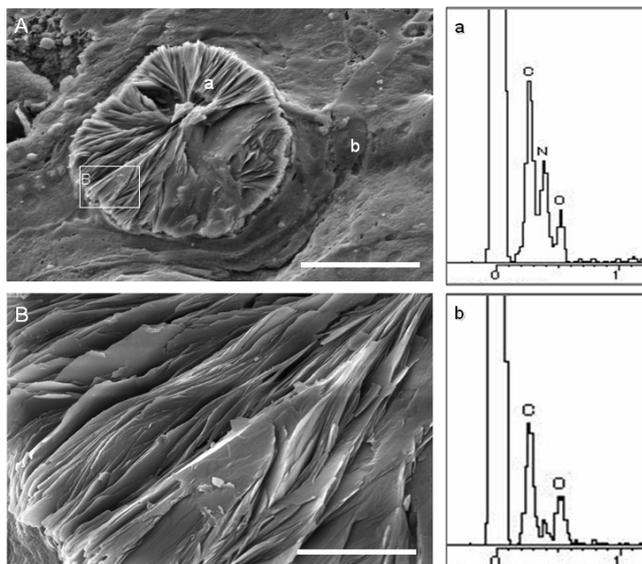


図6 走査型電子顕微鏡による腎尿細管内の微細結晶構造 (A, B) と X線成分分析 (a, b). (A x1000, B x7000) 白線 (A) 10 µm, (B) 4 µm.

腎・尿路系の評価にあたり、SD ラットより F344 ラットのほうが適しているので、メラミンに対する反応の種差を見るために、6 週齢の F344 ラットに対し急性期暴露研究を行った。メラミン+シアヌル酸を各々2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 50, 120mg/kg/day の各群に割り振り (N=6)、一日一回胃管投与を行った。投与 14 日目に採血、腎摘出を行い、腎組織を光学顕微鏡、偏光顕微鏡により結晶沈着、腎尿細管の構造変化の観察を行った。

投与 14 日目での評価では、12mg/kg/day より投与量の多い群で腎にメラミン結晶の形成を認め、結晶形成量は投与量が増加するに従い増加した。しかし結晶の形成量は種類の異なる SD ラットより少なく形成された。8mg/kg/day 以下の群では明らかな健康影響を認めなかった。(表 1)

メラミン+シアヌル酸群	14日
8mg/kg/day	-
12mg/kg/day	極少量+ (SDよりかなり少ない)
16mg/kg/day	+
24mg/kg/day	++(死亡例あり)
50mg/kg/day	++(死亡例あり)

表 1

F344 ラットの腎結晶形成表

メラミン+シアヌル酸が各々50, 120mg/kg/day の群において、腎の結晶形成部位は腎皮質を中心に形成されていた。12 及び 24mg/kg/day の群においては腎の結晶形成部位は腎皮髄境界から乳頭部にかけて結晶の形成部位を認めた。

### 亜急性暴露研究

6 週齢の雄 F344 ラットを用いて検討を行った。前述の研究結果を元に、メラミン+シアヌル酸を食餌に混入し、メラミンとシアヌル酸の亜急性暴露研究を行った。各群のメラミンとシアヌル酸の摂取量は食餌の摂取量より計算し、各々6, 12, 18, 24, 36, 48, 60mg/kg/day とし行った。各 24mg/kg/day 以上の投与量では 10 週齢までに全てのラットが腎不全により死亡した。

その際の腎の病理組織では、腎尿細管管腔内に著明な結晶の形成を認めた。(図 7) 投与後 8 週の時点で、メラミン+シアヌル酸を各々12mg/kg/day の群では、皮髄境界から腎乳頭部を中心に結晶の形成を認め、腎機能の悪化を認めた。各 6mg/kg/day の群では、腎に結晶形成を認めず、腎機能の悪化を認めなかったが、軽度の体重減少を認めた。

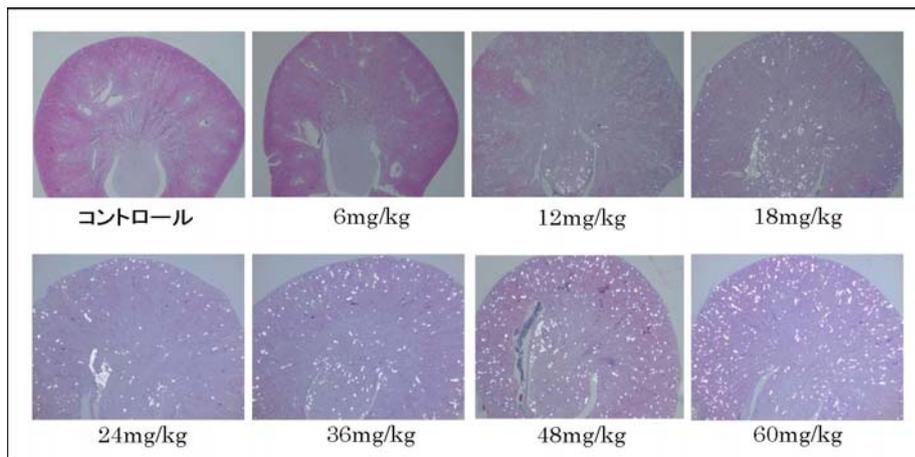
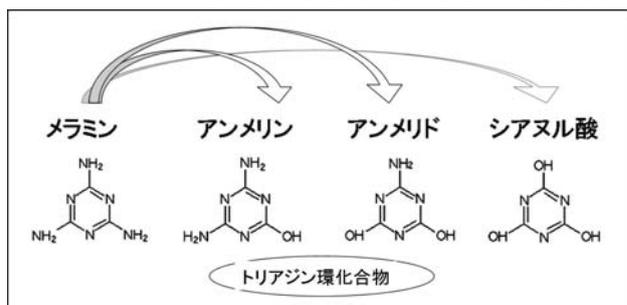


図7 亜急性期暴露研究における腎組織所見

12mg/kg/day 以上の投与群では腎にメラミン結晶の形成を認めた。低濃度では腎髄質を中心に結晶の形成を認めた。高濃度になるにつれ、腎皮質を含めて全体に結晶の形成を認めた。6mg/kg/day の投与群では、腎に結晶の形成を認めなかった。

## 2) 研究項目名2

### メラミンと結合性を有する物質の同時投与によるリスク評価



メラミンの類似物質であるアンメリン、アンメリドはその摂取により健康影響リスクが発生するかどうか今まで検討されていなかった。今回、10 週齢の雄 F344 ラットを、メラミン + シアヌル酸投与群（各 24mg/kg/day）、メラミン+アンメリン

投与群（各 24mg/kg/day）、メラミン+アンメリド投与群に振り分け（N=12）研究を行った。メラミン、アンメリン、アンメリドは生理食塩水に懸濁し、一日一回胃管投与を行った。14 日目に採血、腎摘出を行い、腎組織を HE 染色で偏光顕微鏡、光学顕微鏡により結晶沈着、腎尿細管の構造変化の観察を行った。

結果：メラミン+シアヌル酸群では、腎機能の悪化及び腎尿細管に結晶の沈着を認め

た。メラミン+アンメリン投与群、メラミン+アンメリド投与群はともに腎機能に影響はなく、腎に結晶沈着を認めなかった。（図8）

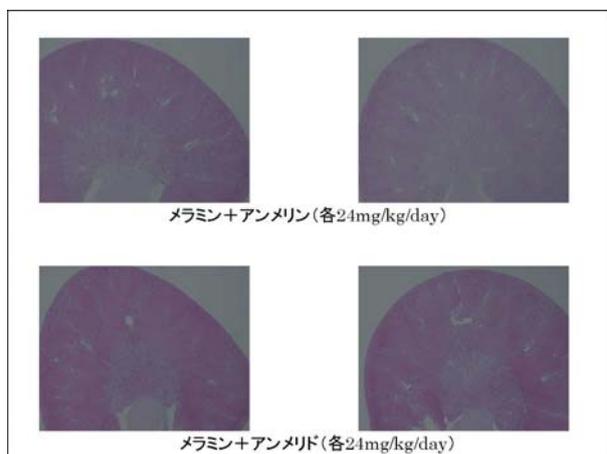


図8 メラミン+アンメリン、アンメリド投与における腎組織どの腎にも結晶沈着を認めなかった。

### 3) 研究項目名3 雌雄、年齢による健康影響リスク評価

メラミン結石モデル動物を用いて、メラミン及びシアヌル酸の投与を行い、急性期(28日)、亜急性期(90日)における、健康影響リスクの性差、年齢差を明らかにするために研究を行った。

6週齢、10週齢、26週齢のF344ラットの雄・雌(各群6匹)に対し、メラミンとシアヌル酸を投与し研究を行った。投与量は平成21年度の投与研究の結果より、結石形成が発生するが、死亡するリスクが低い12mg/kg/day、18mg/kg/dayの2群とした。投与方法は食餌摂取量から換算し、上記の投与量となるようにメラミンとシアヌル酸を食餌に混入し、自然摂取で投与を行った。メラミンとシアヌル酸の投与後4週目、13週目に代謝ゲージで採尿を行い、その後麻酔下に下大静脈より採血を行い、解剖を行った。採取した血液は血清Na、K、Cl、Ca、P、クレアチニン、肝酵素(AST、ALT)について測定を行った。尿に関しては、Na、K、Ca、P、クレアチニンを測定し、さらに通常の結石関連物質である尿中クエン酸、尿中シュウ酸の測定をFOM-110Aを用いて行った。

腎・肝・膀胱組織についてはHE染色、Von Kossa染色を行い光学顕微鏡・偏光顕微鏡で腎尿細管の結晶沈着や構造変化、腎臓の瘢痕形成、膀胱結石の有無、肝臓組織の変性について観察し解析を行った。

同じ量のメラミン及びシアヌル酸を投与した際、腎臓の外観に雌雄差を認めた。雌の場合、腎表面の凹凸は多くないのに対し、雄の場合、凹凸は著明に多かった。腎表面の凹凸は結石形成による炎症及び腎瘢痕形成により形成されると考えられ、雄のほうがメラミン及びシアヌル酸により、炎症及び腎瘢痕形成が発生しやすいと判明した(図10)。

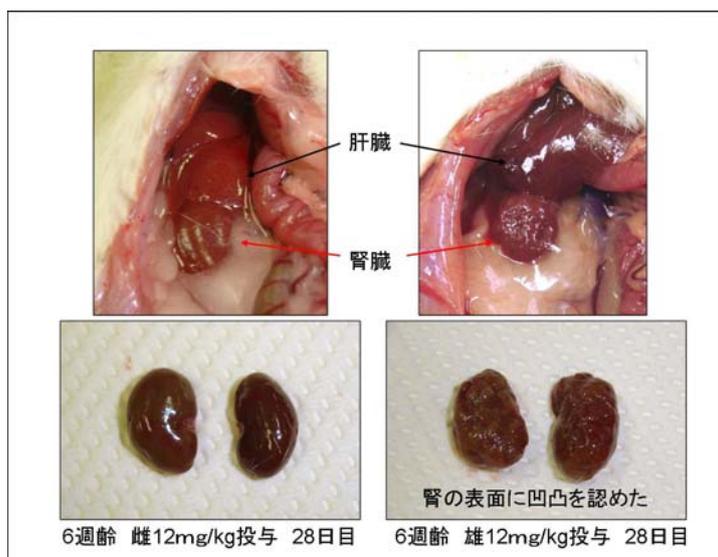


図10

雌雄による腎の外観差

左の雌は肝臓と腎臓が共に表面平滑であるのに対し、右側の雄は腎臓の表面に凹凸がある。

腎臓のみで比較すると、雌には凹凸は少数認めるのみであるが、雄は凹凸が顕著に認められた。

腎尿細管及び腎盂における結石の形成の雌雄差について検討を行った。同じ投与日数、同じ投与量の場合、雌よりも雄のほうが結石をより多く形成していた(図2)。6週齢のラットに対し、12mg/kg ずつ28日間投与した群に関して、結石形成量は雌の

1.5 倍の結石が雄に形成されていた ( $p=0.005$ ) (表 2)。

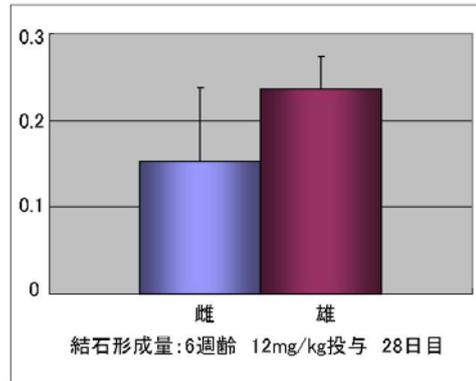
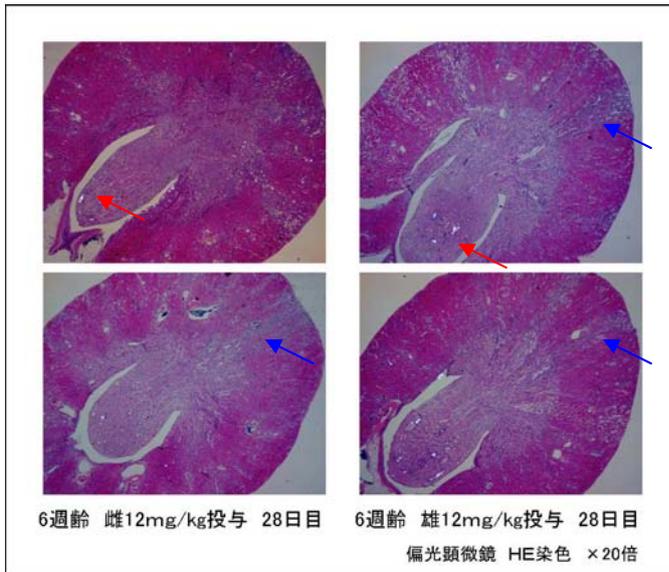


表 2 6週齢 12mg/kg 投与した群の腎結石形成の雌雄差(左雌 右雄)  
左側の雌の約 1.5 倍、雄に結石形成を認めた

図 1 1 6週齢 12mg/kg 投与した腎臓の断面(左雌 右雄)

HE 染色にすると結石の脱落が多いが、雌よりも雄のほうに結石(赤矢印)を多く認めた。雌雄共に腎尿細管の拡張を認めた。腎尿細管の拡張を認めた部位には腎の炎症、瘢痕形成を認めた。炎症・瘢痕形成の頻度も結石と同様に雌より雄の方が多く認められた。(青矢印)

次いで週齢差について検討を行った。雄ラットに対し 12mg/kg ずつ 28 日間投与した群において、26 週齢のラットの結石形成量が一番少ない結晶形成であり、次いで 10 週齢、6 週齢の順に結晶形成が増加していく傾向を認めた。その他の群においても 26 週齢の結石形成が一番少なく、6 週齢の群が一番多く結石形成を認めた。(図 1 2、表 3)

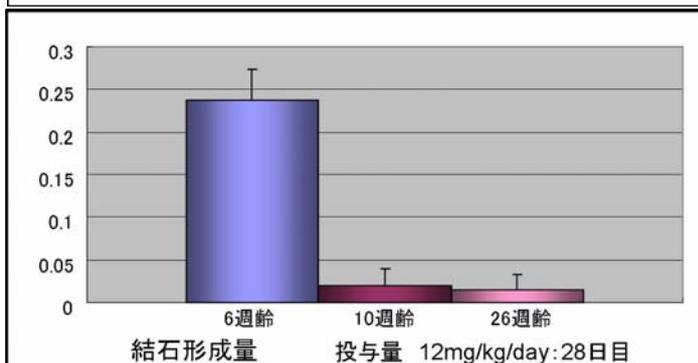
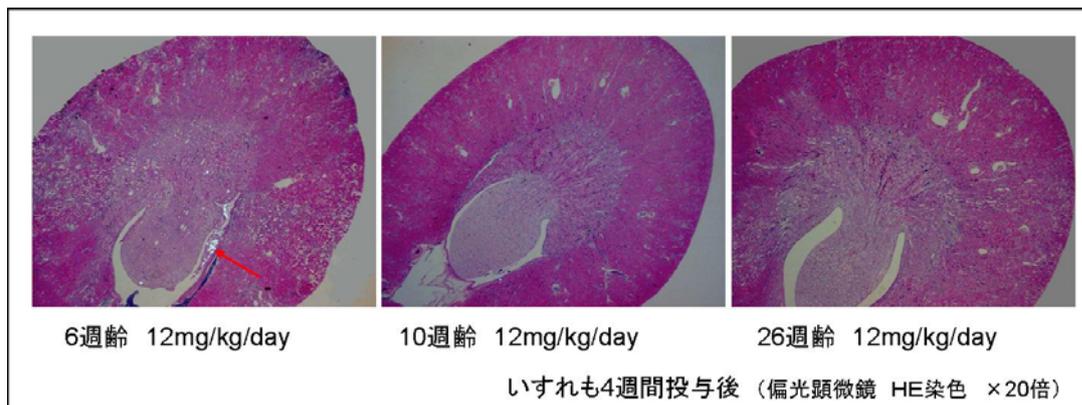


図 1 2 雄ラットにおける週齢による結石形成量の変化

左より 6 週齢、10 週齢、26 週齢に 12mg/kg/day のメラミンとシアヌル酸を 28 日間投与した群。左の 6 週齢に一番腎結石形成を認めた。腎の炎症・瘢痕形成も 6 週齢の群に一番多く認めた。

**表3** 12mg/kg/day 投与を6、10、26週齢より28日投与した際の腎結石形成量  
6週齢から投与された際の結石形成量が一番多かった。10週齢、26週齢も結石形成を認めたが、6週齢よりも少なかった。

また、12mg/kg/day より少し濃い濃度の 18mg/kg/day の投与群において、腎不全により死亡したラットを認めた。6週齢から投与を開始したラットは30匹中4匹死亡した。10週齢から投与を開始したラットは30匹中2匹が死亡した。26週齢から投与を開始したラットは1匹も死亡しなかった。血液検査による腎機能評価でも6週齢・10週齢から投与を開始したラットのほうが雌雄共に腎機能の悪化傾向を認めた。

以上より、メラミンとシアヌル酸が同一濃度で混入している食餌を摂取した場合、腎結石形成及び引き続いて起きる腎不全などの健康影響リスクが発生する可能性は、より若い群に起きることが判明した。また、健康影響によっては死亡する場合があります、そのリスクも若い群に発生しやすいことが判明した。

#### 4) 研究項目名4 尿中メラミンや類似物質の測定、尿からの健康影響リスクの評価

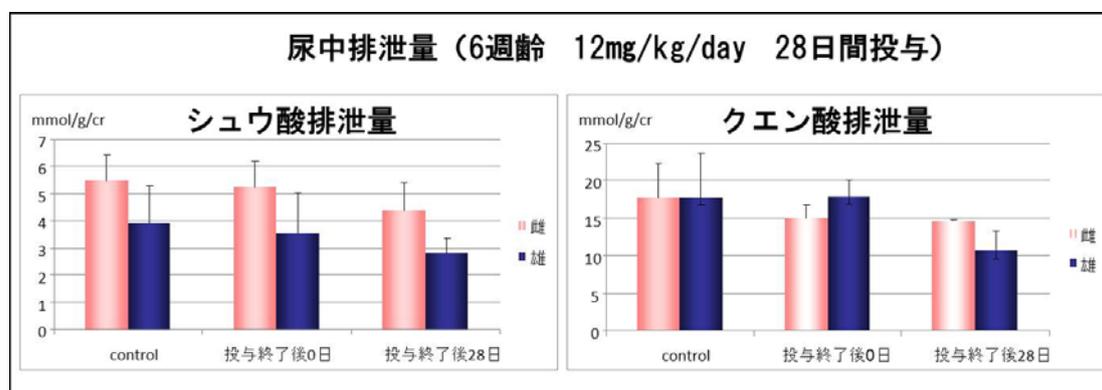
6週齢、10週齢、26週齢のF344ラットの雄・雌（各群6匹）に対し、メラミンとシアヌル酸を投与し研究を行った。

メラミンとシアヌル酸の投与後4週目、13週目に代謝ゲージで採尿を行い、その後麻酔下に下大静脈より採血を行い、解剖を行った。尿に関しては、Na、K、Ca、P、クレアチニンを測定し、さらに私たちが通常罹患する尿路結石の尿中関連物質である尿中クエン酸、尿中シュウ酸の測定をFOM-110Aを用いて行った。

尿量は、6週齢の群で血液検査に腎機能障害を軽度認めたラットで尿量増加を認めた。しかしそれ以外の群では尿量に差を認めなかった。今回の研究で用いたメラミンとシアヌル酸では、腎不全を来たす場合が少なく、尿量に差が出なかったと考える。

尿中生化学について検討を行った。尿中Ca、尿中Pの排泄は共にコントロール群、メラミン+シアヌル酸投与群間で有意差を認めなかった。

尿中クエン酸、尿中シュウ酸の排泄濃度について検討を行った。尿中シュウ酸、尿中クエン酸の排泄濃度はいずれもコントロール群と差を認めなかった。（表4）



**表4** 尿中シュウ酸、クエン酸排泄量  
尿中シュウ酸、尿中クエン酸の排泄濃度はいずれもコントロール群と差を認めなかった。

## 5) 研究項目名5 メラミン投与中止後の経過研究

6週齢、10週齢のF344ラットの雄・雌（各群6匹）に対し、メラミンとシアヌル酸を投与し研究を行った。投与量は前述のとおり12mg/kg/day、18mg/kg/dayの2群とした。投与方法は食餌摂取量から換算し、上記の投与量となるようにメラミンとシアヌル酸を食餌に混入し自然摂取で投与を行った。メラミンとシアヌル酸の投与後4週目に投与を終了し、食餌をメラミンとシアヌル酸の混入していない通常の食餌に変更し、投与終了後0日目、14日目、28日目に解剖を行った。採取した血液、組織は前述の研究と同様に処理、検査、観察を行い、その後解析を行った。

メラミンとシアヌル酸を混合した食餌を摂取すると、体重減少や増加不良が認められた。その現象は食餌を摂取しているかぎり継続していた。今回の研究でメラミンとシアヌル酸が混入している食餌の摂取を中止すると、体重増加曲線の著明な改善を認めた。中止後28日の段階では、投与を行っていなかったコントロール群の体重には及ばなかったが、明らかな改善を認め、経過観察を行えば、コントロール群と同様な体重になることが予想された。（表5、表6）

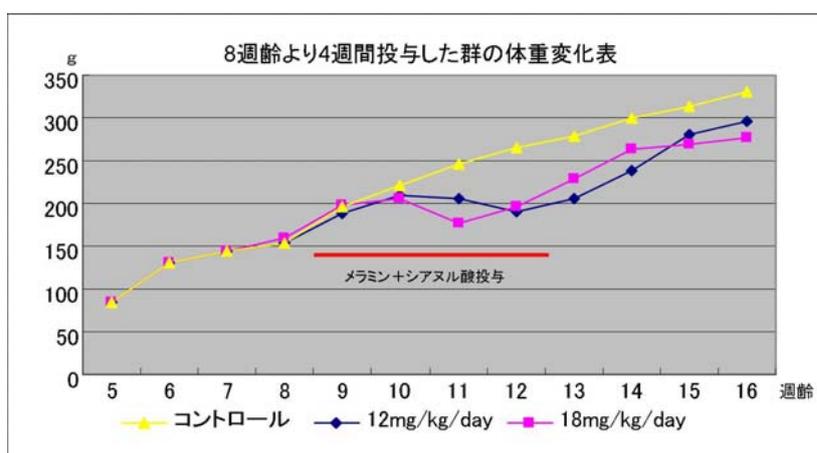
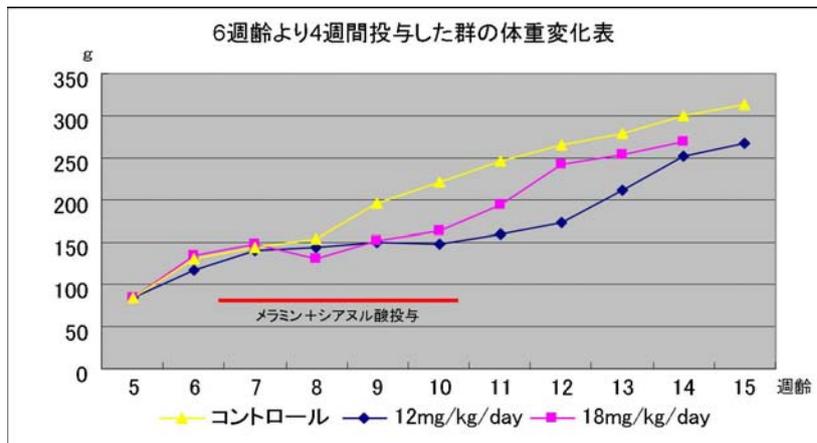


表5・表6 6週齢、8週齢から28日間メラミンとシアヌル酸投与終了後、通常の食餌に変更した際の体重変化表 いずれも投与終了後から体重の増加曲線の改善を認めた。

腎臓の組織において、いずれの群においても結石形成量の減少が認められた。腎尿細管でのメラミン結石形成は、投与濃度にもよるが、メラミンとシアヌル酸が腎尿細

管腔内で析出し、その析出した結石により腎尿細管を閉塞することにより、腎機能障害が発生することが判明している。

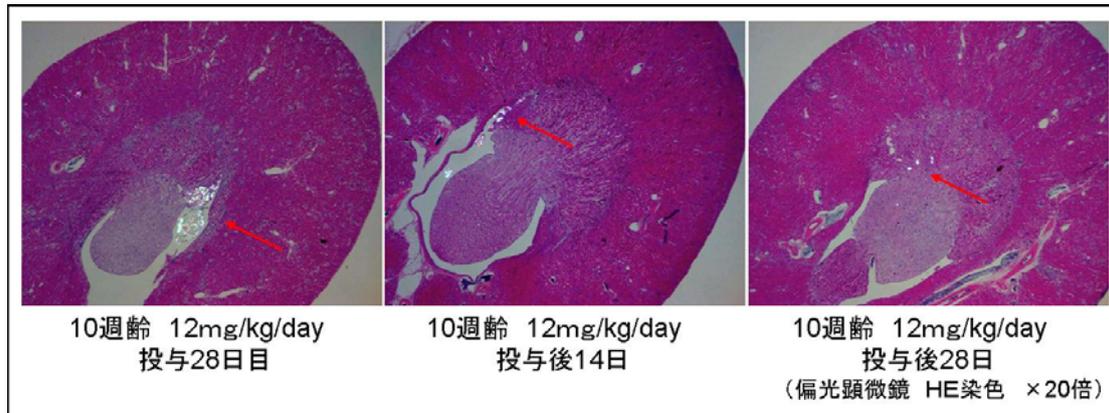


図13 10週齢の雄ラットに12mg/kg/dayを28日投与 左より28日投与後、投与終了後14日、投与終了後28日

腎尿細管や腎乳頭部、腎盂に形成された結晶は投与終了後より14日後、28日後のほうが減少していた。しかし、28日経過した時点では、皮質の尿細管の拡張や腎の炎症・瘢痕形成は認められた。

今回も同様に腎尿細管管腔内に結晶の形成を認めた(図13)。投与後、14日、28日と時間が経過するに従い、析出・形成された結晶は腎皮質に認める割合は減少し、乳頭部や腎盂内に認める割合が増えてきた。このことは析出した結石が排石作用により、尿細管から集合管に移動し、腎盂へ排石されているものと考えられた。

メラミンとシアヌル酸投与後に腎皮質において、結石形成による炎症により組織の瘢痕形成がおきるが、投与中止後28日目も瘢痕形成が認められた。短期間の観察であるため、現時点では瘢痕形成の残存が認められたが、今後長期間の観察下では改善の可能性が有ると考える。

26週齢から投与を始めた投与量18mg/kg/day雄ラットの中には、投与から4週間後に腎盂の拡張(水腎症)が認められたものがいた(図14)。腎盂・尿管内には肉眼的に明らかな結石の形成を認めなかったが、通常臨床的には尿路結石の形成で発生することが多い。別の群ではあるが6週齢から投与を始めた投与量18mg/kg/day雄ラットの中には投与4週間目で腎盂内に肉眼的で判別できる結石形成を認めたものがあった。



(図15)

図14 腎盂拡張を認めた腎臓

通常の腎臓(左)は腎盂の内部に拡張を認めない。右側の腎臓は腎盂の拡張を認め、内部に尿の貯留を認めた。尿路の閉塞により発生する現象であり、メラミン結石により尿路閉塞が起こったものと考えられる。



図 1 5

腎断面にて腎盂内に肉眼で判別できた結石  
18mg/kg/day のメラミンとシアヌル酸を6週齢の雄  
に投与した群において、腎臓の断面に肉眼でも判別  
できる結石を認めた(約 1mm)

今までの研究では主に腎尿細管管腔内の結晶化及びその結晶による尿細管の閉塞を観察してきた。また腎尿細管の閉塞により腎機能障害が引き起こされると考えてきた。今回の研究モデルで、通常私たちが経験する尿路結石と同様に、腎盂に肉眼的に判別できる結石の形成を認め、腎盂の拡張(水腎症)を認めたことより、腎尿細管の閉塞により腎機能障害が引き起こされるのみでなく、尿路結石により、腎盂や尿管などの尿路に閉塞が引き起こされ、それにより腎機能障害が引き起こされることもあると考えられた。

## (2) 全体の研究成果

### 1) 全体の研究成果の要旨

6週齢のF344ラットの雄・雌(各群6匹)に対し、各2, 4, 6, 8mg/kg/dayのメラミンとシアヌル酸を投与した。

体重増加に関して、8mg/kg/dayの投与群では雌雄共にコントロールに比べて約一割の体重増加不良を認めた。

腎機能に関してはどの群もコントロール群と変化を認めなかった。腎結石形成に関しては、8mg/kg/dayの群の中の1匹に少量の結石形成を認めたが、6mg/kg/day以下の群では、結石形成を認めなかった。

メラミン及びシアヌル酸を28日投与後し、投与後0日目、28日目、90日後、180日後に採尿、採血、腎摘出を行い、結石消失現象の有無、健康影響リスク評価を行った。

雄の腎機能は投与終了直後に軽度上昇を認めたが、28日経過以後はコントロールと有意差を認めなかった。

雌は結石形成量が少ないながらも、減少傾向を認めた。投与終了後90日でほぼ結石は消失した。雄の腎結石形成は投与直後より日を経過するにつれて、減少傾向を認めた。炎症・瘢痕も投与後に改善傾向を認めた。

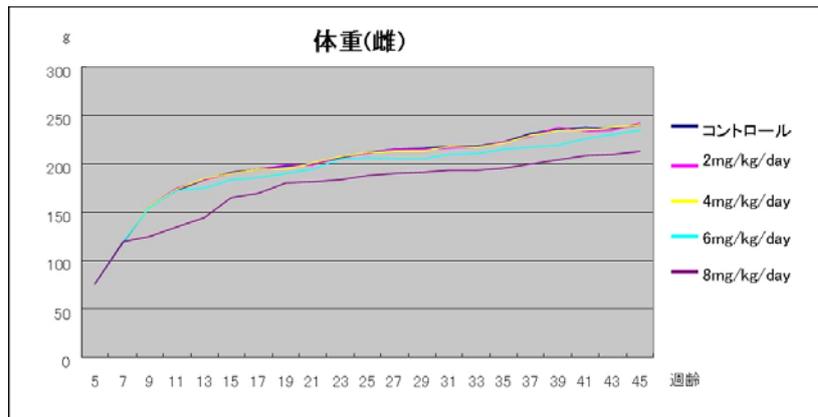
## 2) 研究成果

### 1) 研究項目名 6 慢性暴露からの健康影響リスク評価

平成21、22年度の研究では急性暴露、亜急性暴露でのメラミン及びその類似物質による健康影響評価を行ってきた。本研究では平成21、22年度の急性暴露・亜急性暴露

研究において、ラットに対し結石形成を認めなかったメラミンとシアヌル酸の用量を投与し、メラミン及び類似物質の慢性投与実験(約1年)において、腎結石、腎機能障害などの健康影響リスクについて評価、検討を行った。

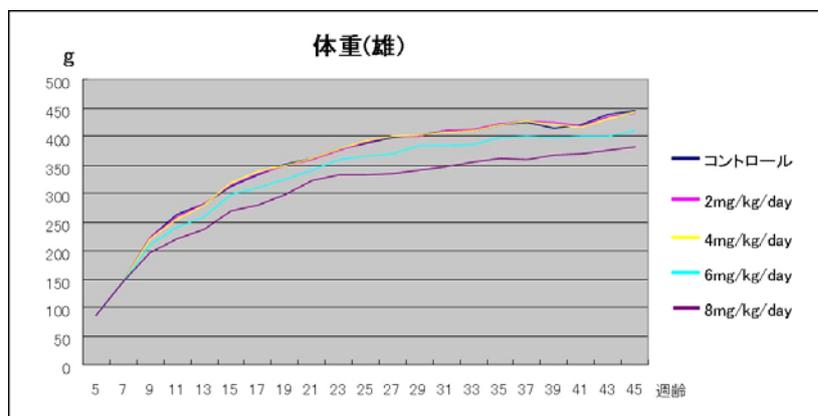
6週の雌雄のF344ラットに対し、メラミン及びシアヌル酸の投与を行った。メラミンとシアヌル酸は食餌量から換算して食餌に混入し自然摂取で投与した。本研究のメラミンとシアヌル酸の投与量は平成21、22年度のリスク評価を元に算出を行い、その量は結石形成を認めなかったが体重減少が認められた6mg/kg/dayを参考に投与量を計算して行った。2, 4, 6, 8mg/kg/dayの量と設定し、かつ雌雄の別を含めて8群での研究を行った。投与中は週一回の体重測定を行い、体重変化の追跡も行った。



(図6)

雌の体重経過表

8mg/kg/day の群で体重増加不良を認めた。



(図7)雄の体重経過表

雌と同様に8mg/kg/dayの群ではコントロールに比べて体重増加不良を認めた。

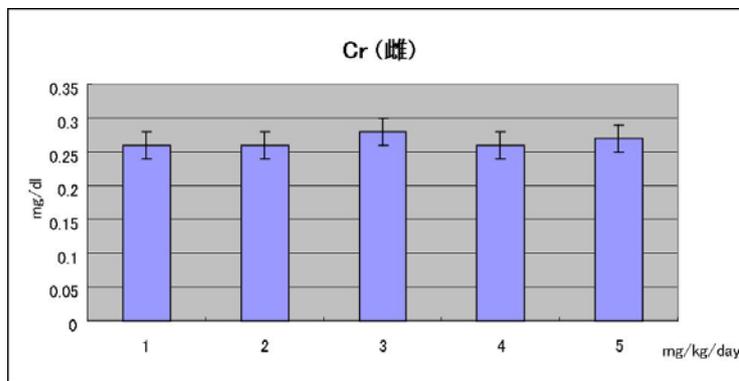
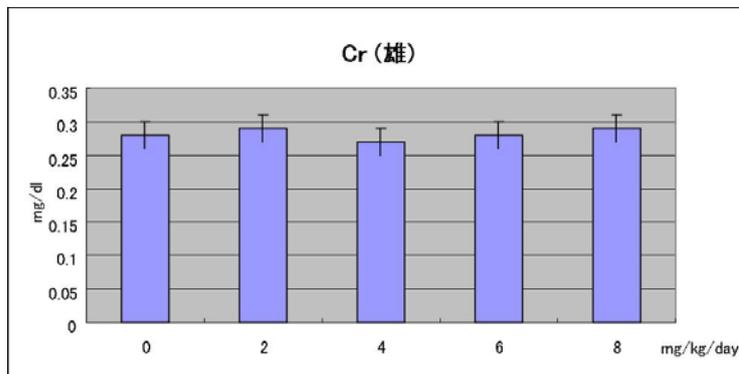
雌の群において、メラミンとシアヌル酸の投与を開始後に6mg/kg/day以下の群で体重増加はコントロール群と差を認めなかった。8mg/kg/dayの群で約1割の体重増加不良を認めた。体重不良増加は、投与開始後から始まり、投与終了まで続いていた(図6)。

雄の群においても、メラミンとシアヌル酸の投与を開始後に6mg/kg/day以下の群では、体重はコントロール群と同様に増加していった。8mg/kg/dayの群で約1割の体重増加不良を認めた。(図7)。体重増加に関しては雌雄差を認めなかった。

投与終了時に採取時した血液の生化学に関して検討を行った。いずれの群においても電解質(血清Na、K、Cl、Ca、P)に関してコントロール群と差を認めなかった。さ

らに、同様に肝機能(AST、ALT)に関してもコントロール群と差を認めなかった。

今回の慢性期投与において、投与終了時の腎機能(血清クレアチニン)に関しては雌雄共にコントロール群と差を認めなかった(図8、9)。



(上)図8、(下)図9  
血清クレアチニン(Cr)  
雌雄共にコントロール群  
とほぼ同値で、有意差を認め  
なかった。

メラミン、シアヌル酸投与終了時の尿中への電解質の排泄に関して検討を行った。尿中Na、K、Cl、Kに関していずれの群もコントロール群と差を認めなかった。

腎組織について検討を行った。腎の結晶形成に関しては、雌雄の8mg/kg/day群に少量の結晶形成を認めたが、6mg/kg/day以下の群では、結晶形成を認めなかった(図10、11)。結晶の形成量に関しては、少量であり、雌雄に差を認めなかった。

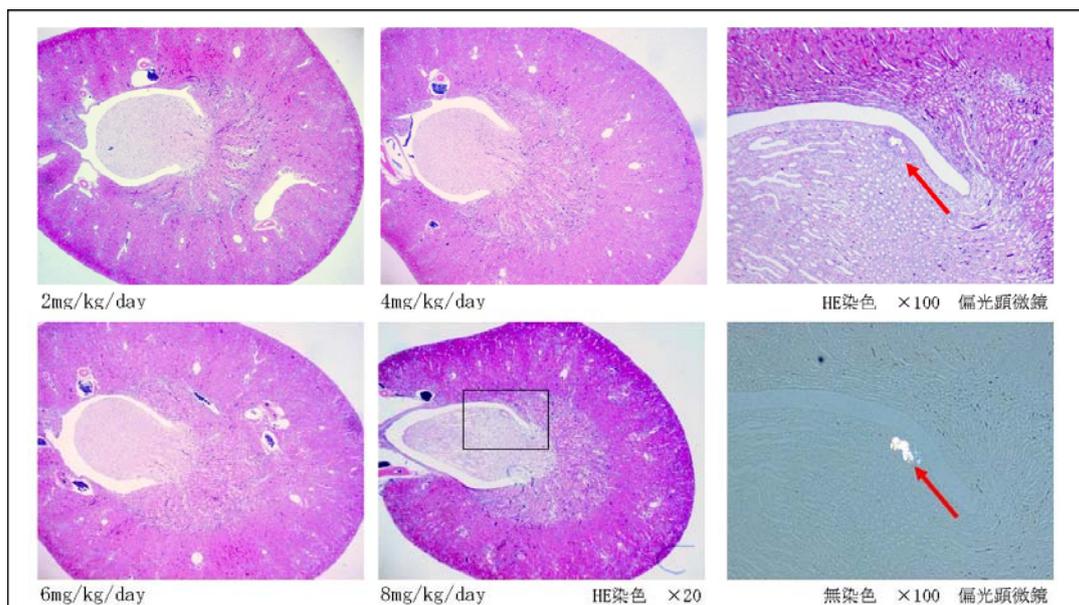


図10 雌にメラミンとシアヌル酸を投与した際の腎組織

2~6mg/kg/day の群では結晶形成を認めなかった。8mg/kg/day の群で少量の結石形成を認めた。結晶は腎乳頭内に認められた。偏光顕微鏡では白色に光る結晶として認めた。(赤矢印)

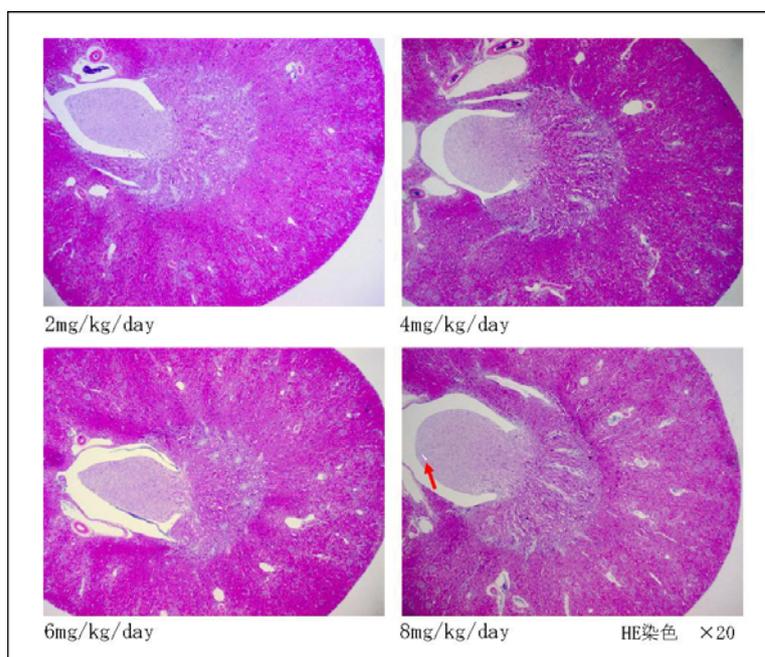


図1.1 雄にメラミンとシアヌル酸を投与した際の腎組織

2~6mg/kg/day の群では結晶形成を認めなかった。8mg/kg/day の群で少量の結石形成を認めた。結晶は腎乳頭内遠位側に認められた。(赤矢印)

腎の炎症、癒痕に関しては結晶を形成している腎臓に関しては炎症、癒痕を認めたが、その程度は軽度であった。

## 2) 研究項目名7 メラミン投与中止後の長期経過観察研究

平成22年度の研究において、メラミン、シアヌル酸投与中止後の4週後の観察でメラミン結石の減少を認めて報告した。結石形成部位が皮質側から乳頭部に向かい移動している所見も認められ、腎尿細管に発生した結石の排泄作用が起きていると考えられた。今回の研究では、メラミン投与中止後に長期間の観察を行い、結石形成量の変化、腎の癒痕形成量、炎症の改善に関して観察を行った。

本研究では、今まで用いてきたメラミン結石モデルラットを用いて研究を行った。6週、10週の雌雄F344ラットに対し、メラミン及びシアヌル酸の投与を行った。

食餌摂取量から換算したメラミンとシアヌル酸を、食餌に混入し自然摂取にて投与した。当初16mg/kg/dayで研究を開始したが、腎の結晶形成が多く、癒痕の程度が強かったため、12mg/kg/dayに変更し研究を行った。

28日の投与後、投与を終了し、投与終了後0日目、28日目、90日後、180日後にそれぞれ採尿、採血、腎摘出を行った。光学顕微鏡により腎尿細管の構造変化の観察を行い、偏光顕微鏡により結石消失現象の有無の検討を行った。(図1.2)

メラミン投与期間中に体重の増加不良を認めた。投与終了後に体重は順調に増え始め、投与終了後8週目にはコントロールと変わらない体重となった。

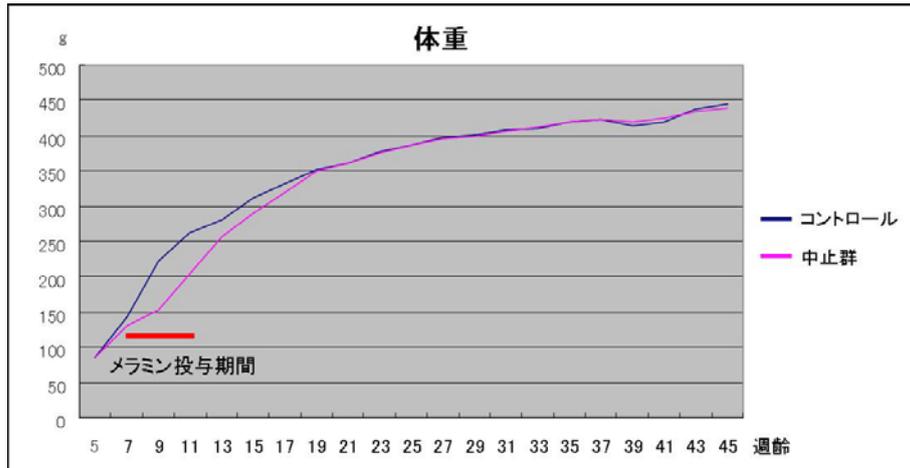


図 1 2 雄 6 週齢ラットにメラミン投与⇒中止群とコントロール群の体重変化

メラミン投与中は体重増加不良を認めたが、19 週時点(終了後 8 週)の時点でコントロールの体重と差を認めなかった。

雌の腎機能に関しては、投与後もコントロール群と差を認めず、投与終了後もこの研究を通してコントロール群と差を認めなかった。

雄の腎機能はメラミンとシアヌル酸の 28 日投与終了時にコントロール群の Cr が  $0.25 \pm 0.02$  (mg/dl) であるのに対し、投与群は  $0.36 \pm 0.06$  (mg/dl) と軽度上昇を認めた。投与終了後 28 日以後は腎機能の改善を認め、コントロール群と有意差を認めなかった。

(図 1 3、1 4)

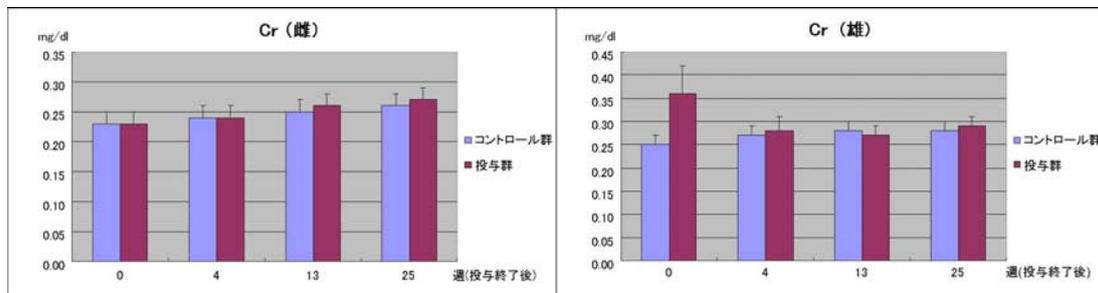


図 1 3、1 4 投与終了後からの腎機能(Cr)の推移

左の雌は投与終了後からコントロール群と腎機能(Cr)に差を認めなかった。右の雄は投与直後は腎機能の悪化を認めたが、終了後 4 週以降はコントロール群と差を認めなかった。

雌のラットでは結石形成量が少ないながらも、減少傾向を認めた。投与終了後 90 日ではほぼ結石は消失した。投与終了後は腎の癒痕形成、尿細管の拡張を多く認めたが、投与後 28 日以降は減少していた。投与後 90 日には腎の結晶は乳頭部のごく一部に認めるのみであった(右上)。投与後 180 日では、結晶形成も認めず、腎の炎症、癒痕も認めなかった。(図 1 5)

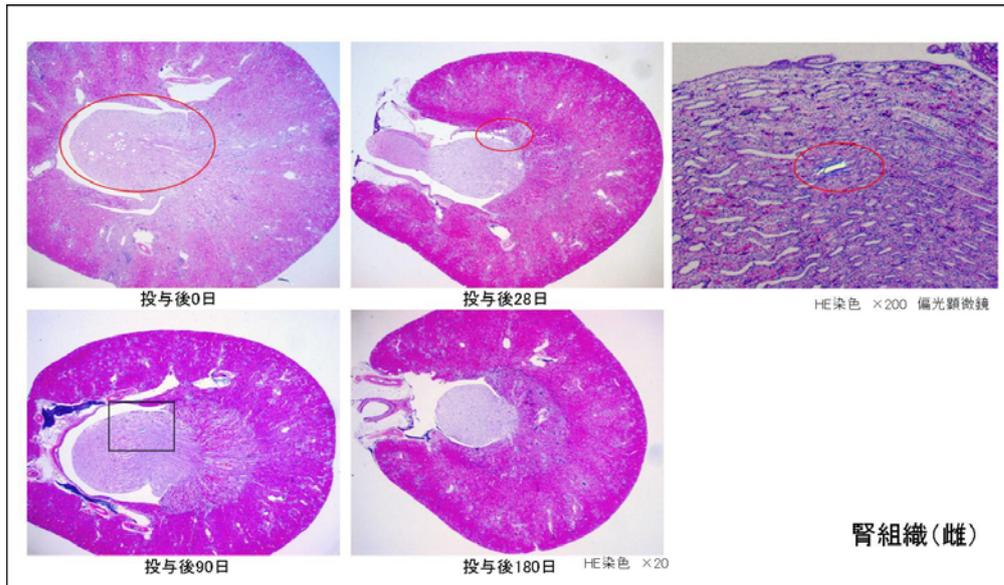


図 1 5 雌の投与終了後からの腎組織 (6 週から投与した群)

投与後 0 日には腎乳頭部に結晶を多数認めたが、28 日、90 日と経過するにしたがい結晶は減少傾向を認めた。(赤丸)

雄のラットで、雌と同様に 28 日投与後に腎にメラミン結晶形成を認めた。投与終了後 28 日、90 日と結晶形成の減少を認めた。腎の炎症・癒痕に関しては個体差が大きかったが、減少傾向を認めた。180 日経過時点では、かなり改善を認めた。(図 1 6)

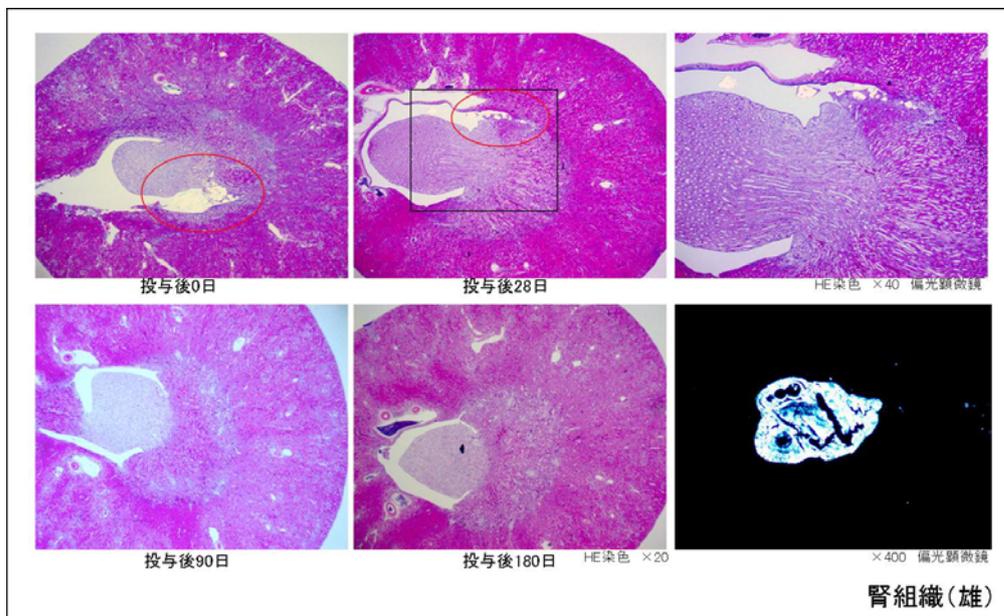


図 1 5 雄の投与終了後からの腎組織 (6 週から投与した群)

左上の投与後 0 日では腎盂内に結晶形成を認めた。投与後 28 日の時点では、減少傾向を認めたが腎盂内に結晶形成を多数認めた。90 日目以降はかなり減少を認めた。(赤丸) 腎盂内の結晶はかなり尿細管径より大きく、腎盂内で結晶が凝集して結石様になったものと考えられた。(右下)

### 3) 考察及び結論

平成 21 年度の研究でメラミン結晶は、メラミン単独投与では形成されなかった。しかしシアヌル酸と併せて暴露されることにより、腎尿細管管腔内にシアヌル酸メラミンの結晶形成を認めた。その形成機序は尿中で類似化合物であるシアヌル酸と反応することにより形成され、結晶が少なく形成される低い濃度では、腎髄質を中心に結晶が形成され、結晶が多く形成される高濃度では腎皮質を中心に結晶が形成されたことから、メラミンが腎尿細管管腔内で濃縮される段階で析出し、腎尿細管の閉塞により腎障害を引き起こすと考えられた。つまり、摂取量、暴露量が、腎尿細管管腔内に結晶形成をさせる因子として一番重要なことが判明した。

F344 ラットに投与した急性期実験では、8mg/kg/day 以下の群では 14 日投与では明らかな健康影響を認めなかった。急性期暴露に於いて、健康影響を及ぼすメラミンとシアヌル酸の量は、8mg/kg/day の値が一つの目安になると考えられた。

亜急性暴露実験において、メラミンとシアヌル酸が各々24mg/kg/day 以上の投与量では 4 週間以内に全てのラットが腎不全により死亡した。食餌に混入した摂取方法でも、シアヌル酸メラミンの結晶が形成され、腎不全が発生することが判明した。その際の腎不全の進行は急速であり、大量の場合、摂取後一ヶ月以内に死亡することがあると判明した。メラミンとシアヌル酸の同時摂取は極めて毒性が高いものと考えられる。

結晶が形成されたラットの腎病理組織は、腎尿細管管腔内に著明な結晶の形成を認め、腎尿細管の閉塞所見を認めた。投与後 8 週の時点で、メラミン+シアヌル酸各々 12mg/kg/day の群では皮髄境界から腎乳頭部を中心に結晶の形成を認め、それにより尿細管の閉塞、近位尿細管の拡張を認め、腎機能の悪化を認めた。6mg/kg/day の群では、腎に結晶形成を認めず、尿細管の拡張所見もなく、腎機能の悪化を認めなかった。しかし軽度の体重減少を認めた。亜急性期暴露に関しては、投与後 8 週ではあるが、メラミン+シアヌル酸が各々6mg/kg/day の群では、結晶形成を認めなかったが体重減少を認めたことより亜急性期暴露に於いて、健康影響を及ぼすメラミンとシアヌル酸の量は、6mg/kg/day の値が一つの目安と考えられた。

アンメリン、アンメリドはその摂取により健康影響リスクが発生するかどうか今まで検討されていなかった。メラミン+アンメリン投与群（各々24mg/kg/day）、メラミン+アンメリド投与群（各々24mg/kg/day）は腎にメラミンの結晶沈着を認めず、腎機能にも影響を認めなかった。メラミン+アンメリン、メラミン+アンメリドの組み合わせはメラミン+シアヌル酸の組み合わせよりは、健康影響リスクは低いものと考えられた。しかしながら、高濃度の群に関しては評価を行えていないので、健康影響リスクがないとは考えず、リスクが高いとすべきである。

平成 22 年度の研究では雌雄それぞれに対しメラミン及びメラミン類似物質の急性期・亜急性期暴露実験を行った。

F344 ラットの雌雄それぞれに対し、同じ濃度のメラミンとシアヌル酸を暴露させる研究において、雌よりも雄の方がメラミン結石の形成量が多いことが判明した。通常、私たちが罹患する尿路結石に於いても、女性よりも男性の方がより罹患率が高い。メ

ラミンにより引き起こされる結石は、通常の尿路結石は、結石形成機序が異なるが、同様の結果になったことは興味深い。メラミン結石に於いても、通常の尿路結石形成の際のメカニズムの一つである、腎尿細管への結石の付着能や排石機能に関し、雌雄差が存在し、それにより結石形成量に差が出ていることも考えられる。さらに、本研究の結果より、メラミン及びメラミン類似物質に暴露した際は男性の方がより健康影響が出やすいことが推察され、暴露の際の検査前情報として有用であると考えられた。

週齢差の研究において、メラミンとシアヌル酸の同時摂取による結石形成は、雌雄共に6週齢が一番多く、次いで10週齢、26週齢の順に多く結石が形成されていた。このことを人間に置き換えて考えると、メラミンとシアヌル酸を成人が摂取した場合、成人がほとんど腎結石や腎不全を来さない少量の暴露であっても、乳幼児（特に乳児）に於いては、重篤な腎結石形成やそれにより腎不全を来す可能性が高いことが推察される。現在、メラミンの混入基準に於いて、粉ミルクへの混入の基準をかなり厳しくしていることは今回の研究結果に合致しており妥当であると考えられる。

メラミンとシアヌル酸を投与したF344ラットの雄・雌を解剖の際に採取した尿生化学を解析した。結石関連物質である尿中シュウ酸・クエン酸・カルシウム・マグネシウムなどに関しては、通常用いられる結石モデルラットとは異なり変化を認めなかった。このことはメラミン結石の発生に於いて、尿中への通常私たちが罹患するシュウ酸カルシウム結石における結石関連物質の排泄とは関係なく起こることがわかる。

F344ラットの雄・雌に対しメラミン投与中止後0, 14, 28日目に評価を行った。いずれの群においても、メラミンとメラミン類似物質の投与中止後から体重の増加曲線の改善を認めた。このことだけでもメラミンとメラミン関連物質の摂取はかなりの健康影響をもたらしていること、中止により回復に向かうことがわかる。

腎臓の組織において、経時的に結石の形成量の減少が認められた。注意深く観察すると、結石形成部位が皮質側から乳頭部に向かい移動している所見も認められ、腎尿細管に発生した結石の排泄作用が起きていることが推察される。この減少により、メラミン摂取により、腎結石が形成され、腎不全が発症した場合、速やかにメラミン摂取を中止し、腎機能保護の治療を行えば、腎結石の自然排石作用により腎結石が軽快していくと考えられる。現在の治療法の根拠となる研究であると考えられる。

腎皮質において、メラミンとメラミン類似物質投与後、結石形成や炎症により腎組織の癒痕形成が発生している。今回の研究において、投与中止後28日目の時点でも癒痕形成が認められた。このことは、腎結石の減少が起きても、28日間という短期間では腎障害がまだ残存していることが考えられる。しかし長期間の観察により、腎の癒痕形成の改善を認めることも十分考えられる。

平成23年度は、平成21、22年度の研究結果を基に、慢性期投与(1年)研究を行い、メラミンによる健康影響リスク評価を行った。

6週齢のF344ラットの雄・雌（各群6匹）に対し、各2, 4, 6, 8mg/kg/dayのメラミンとシアヌル酸を投与し研究を行った。

投与開始後、8mg/kg/day投与している群では、雌雄共に体重の増加不良を認めた。

体の小さな雌は投与初期ではその傾向が顕著であった。投与日数が経過するに従い、8mg/kg/day 投与群の体重はコントロール群の約1割少ない体重まで回復したが、研究を通して、体重増加不良は続いていた。6mg/kg/day 以下の群ではやや少ない傾向もうかがわれたが、コントロール群と差を認めなかった。

腎機能に関しては、いずれの群においてもコントロール群と差を認めなかった。しかし体重の少ない場合、筋肉量が少なく、クレアチニン(Cr)が少なくなるため、Crは低下する。8mg/kg/day 投与群では体重が1割少ないのに関わらず、測定した腎機能はコントロール群と差を認めなかった。このことより、腎機能に少なからず影響を及ぼしていると考えられた。

腎の結晶形成に関して、8mg/kg/day の群にのみわずかに結晶形成を認めた。平成22年度の研究では、結晶形成の雌雄差(雌<雄)を認めたが、今回の研究では結晶形成は少量であり、雌雄差を認めなかった。6mg/kg/day 以下の群では、明らかな結晶形成を認めなかった。メラミンとシアヌル酸による結晶形成は、平成21年度の急性期研究において、投与された濃度によって発生することが判明したが、今回の慢性期研究でも、総投与量ではなく、摂取した濃度によって、腎結晶が形成されることが判明した。このことより、メラミンとシアヌル酸を極少量長期間摂取しても健康影響が発生しにくいことが考えられる。最終的に口に摂取される加工された食品でのメラミン濃度が、健康影響を予想する際に考慮すべき重要なことと考えられた。

平成22年度の研究の中のメラミン、シアヌル酸投与中止後の経過観察研究で、メラミン・シアヌル酸摂取終了4週後の観察でメラミン結石の減少を認めて報告した。さらに結石形成部位が皮質側から乳頭部に向かい移動している所見も認められた。今年度は平成22年度の研究では行われなかった、投与終了後の長期間(約半年)の観察を行い、腎結晶の減少の観察や炎症・瘢痕形成の改善について検討を行った。

メラミン投与期間中に体重の増加不良を認め、投与終了後に体重は順調に増え始めた。最終的に投与終了後8週目にはコントロールと変わらない体重となった。平成22年度の研究では終了後28日目までしか観察しておらず、その時点では体重の回復は認められたが、コントロールの体重までの回復ではなかった。今回の研究で、メラミン摂取中止後に経過を見ていけば、正常値まで体重が回復することが判明した。

腎機能(Cr)に関しては、平成22年度の研究でも判明しているように結晶形成量の多い雄では投与直後に腎機能の悪化を認めた。投与終了後28日目の時点で、改善しコントロールと差を認めなかった。雌に関しては、今回の研究では腎機能の悪化を認めず、中止後もコントロールと差を認めなかった。メラミンを摂取後、ある程度の腎機能障害に関しては、中止後の経過観察で改善することが判明した。重篤な障害でなければ、メラミンによって発生する健康影響は可逆的で、メラミン摂取中止することで改善すると言え、さらに適切な治療でより早期に回復することが予想された。

腎の結晶形成に関して、雌では投与中止時の時点で、腎乳頭部にメラミン結晶を認めた。投与後28日目、90日目でも結晶形成を認めたが、その量は少量であり、結晶形成を認めないものの方が多く、明らかに結晶量減少を認めた。投与後180日目には結

晶形成を認めなかった。雄では、雌と同様に腎尿細管内に結晶形成を認めたものもあったが、腎盂内に結晶形成を認めた。その大きさは投与中止時点では大きく量も多かったが、投与終了後 28 日の時点では小さくなり量も減少を認めた。90 日経過時点では、腎盂内の結晶を認めず、結晶の量はかなり減少を認めた。以上より、メラミン摂取中止後 90 日経過すると、結晶形成はほぼ消失することが判明した。腎の炎症・瘢痕形成に関しては、定量化は行えていないが、投与終了後経過するにつれて減少を認めた。

平成 22 年度の研究で投与後早期から結晶量の減少を認めたが、この傾向は長期の経過観察においても認めることが判明した。メラミン結晶量は 180 日の時点では消失した。また摂取を中止すること自体がメラミンによる健康影響の治療となることが判明した。今回の研究では約半年で結晶の消失を認めたが、さらに通常の結石治療に用いられる、飲水指導・点滴による尿量増加や、排石促進作用を有する薬物の使用により、より早期に結石を排石させ治療できることが考えられる。メラミン摂取により、腎結石が形成され、腎不全が発症した場合、速やかにメラミン摂取を中止し、腎機能保護の治療を行いつつ、必要に応じ薬物治療を行えば、自然排石作用により腎結石が排石され、体重減少、腎機能悪化、腎結石が改善することが判明した。

今年度の研究で、メラミン結石モデルラットに対し各 6mg/kg/day のメラミン・シアヌル酸投与では一年の慢性期暴露となってもメラミンによる健康影響リスクが発生しないことが判明した。

メラミンによる健康影響リスクが発生しても、摂取中止を行うことで、その健康影響が改善傾向となり、約半年で消失することが判明した。

- 3 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト（論文は添付すること）

The Mechanism of Renal Stone Formation and Renal Failure Induced by Administration of Melamine and Cyanuric Acid. (Urological Research Volume 38, 2010, Number 2, 117-125)

Long-term follow-up of nephrotoxicity in rats administrated both melamine and cyanuric acid. (投稿中)
- 4 本研究を基にした学会発表の実績

平成 21 年 4 月に第 97 回日本泌尿器科学会総会で発表した。  
平成 21 年 5 月にアメリカ泌尿器科学会 annual meeting で発表した。  
平成 21 年 6 月に第 52 回日本腎臓学会学術総会で発表した。  
平成 21 年 9 月に日本尿路結石症学会第 19 回学術集会で発表した。  
平成 21 年 10 月に第 59 回日本泌尿器科学会中部総会. で発表した。  
平成 22 年 4 月に第 98 回日本泌尿器科学会総会で発表した。  
平成 23 年 4 月に第 99 回日本泌尿器科学会総会で発表した。  
平成 24 年 4 月に第 100 回日本泌尿器科学会総会で発表予定。
- 5 特許及び特許出願の数と概要  
なし
- 6 その他（各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等）の実績  
なし
- 7 今後の問題点等  
1998年に中国においてメラミンが混入した乳製品を摂取した非常に多くの乳幼児が健康影響を受けた事件は非常に衝撃的であった。メラミンに関して非常に多くの報告が出ている。しかし実際に健康影響が発生した中国の事案において、メラミン濃度の報告が第三国から無いことが、研究に際して投与量設定の振り分けを難しくしており、その報告が待たれることである。