

**Table 5. Hematological data of male F344 rats fed diets containing nivalenol for 90 days.**

	Nivalenol in diet (ppm)			
	0	6.25	25	100
No. of animals examined	10	10	10	9
<b>Hematological data</b>				
RBC ( $\times 10^4$ /ml)	906.5 $\pm$ 18.3 <sup>a</sup>	927.1 $\pm$ 29.7	901.2 $\pm$ 25.3	855.7 $\pm$ 38.2**
Hb (g/dl)	15.3 $\pm$ 0.3	15.6 $\pm$ 0.5	14.8 $\pm$ 1.1	15.0 $\pm$ 0.7
HCT (%)	48.3 $\pm$ 1.0	49.6 $\pm$ 1.4	48.9 $\pm$ 1.4	47.9 $\pm$ 2.0
MCV (fl)	53.3 $\pm$ 0.5	53.5 $\pm$ 0.5	54.3 $\pm$ 0.2*	55.9 $\pm$ 0.4**
MCH (pg)	16.9 $\pm$ 0.4	16.8 $\pm$ 0.3	16.4 $\pm$ 1.0	17.5 $\pm$ 0.3*
MCHC (g/dl)	31.7 $\pm$ 0.6	31.4 $\pm$ 0.6	30.3 $\pm$ 1.8	31.3 $\pm$ 0.6
Plt ( $\times 10^4$ /ml)	66.1 $\pm$ 16.7	70.5 $\pm$ 3.8	66.3 $\pm$ 14.8	59.2 $\pm$ 3.4**
WBC ( $\times 10^2$ /ml)	38.5 $\pm$ 12.2	37.0 $\pm$ 12.2	36.9 $\pm$ 6.1	21.6 $\pm$ 3.9**
<b>Differential leukocyte counts</b>				
Band form neutrophils (%)	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
Segmented neutrophils (%)	21.1 $\pm$ 5.0	20.5 $\pm$ 4.0	21.3 $\pm$ 2.1	29.7 $\pm$ 5.1**
Eosinophils (%)	0.6 $\pm$ 0.6	0.8 $\pm$ 0.8	0.8 $\pm$ 0.7	1.1 $\pm$ 1.2
Basophils (%)	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
Lymphocytes (%)	78.2 $\pm$ 4.7	78.4 $\pm$ 3.9	77.5 $\pm$ 2.2	68.8 $\pm$ 5.4**
Monocytes (%)	0.2 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.6	0.4 $\pm$ 0.6	0.4 $\pm$ 0.2
Reticulocytes (/ 100 cells)	1.1 $\pm$ 1.1	0.9 $\pm$ 0.7	1.0 $\pm$ 1.0	1.9 $\pm$ 1.8

<sup>a</sup>Mean $\pm$ SD.

\*, \*\*: Significantly different from the controls at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively.

**Table 6. Hematological data of female F344 rats fed diets containing nivalenol for 90 days.**

	Nivalenol in diet (ppm)			
	0	6.25	25	100
No. of animals examined	9	10	10	10
<b>Hematological data</b>				
RBC ( $\times 10^4$ /ml)	919.2 $\pm$ 25.8 <sup>a</sup>	917.4 $\pm$ 51.2	900.0 $\pm$ 23.7	874.6 $\pm$ 59.2
Hb (g/dl)	16.3 $\pm$ 0.6	16.2 $\pm$ 0.8	15.5 $\pm$ 1.1	15.3 $\pm$ 1.0*
HCT (%)	51.3 $\pm$ 1.7	51.4 $\pm$ 2.7	50.3 $\pm$ 1.3	48.8 $\pm$ 3.3
MCV (fl)	55.8 $\pm$ 0.4	55.9 $\pm$ 0.4	55.9 $\pm$ 0.4	55.8 $\pm$ 0.5
MCH (pg)	17.8 $\pm$ 0.7	17.6 $\pm$ 0.5	17.3 $\pm$ 1.2	17.5 $\pm$ 0.6
MCHC (g/dl)	31.9 $\pm$ 1.2	31.5 $\pm$ 0.9	30.9 $\pm$ 2.0	31.3 $\pm$ 1.0
Plt ( $\times 10^4$ /ml)	76.6 $\pm$ 6.5	73.5 $\pm$ 3.0	74.2 $\pm$ 3.3	60.7 $\pm$ 5.3**
WBC ( $\times 10^2$ /ml)	38.8 $\pm$ 7.7	30.5 $\pm$ 10.1*	29.7 $\pm$ 5.5*	19.6 $\pm$ 4.5**
<b>Differential leukocyte counts</b>				
Band form neutrophils (%)	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
Segmented neutrophils (%)	19.3 $\pm$ 6.7	17.6 $\pm$ 3.8	18.3 $\pm$ 4.5	20.2 $\pm$ 3.5
Eosinophils (%)	1.3 $\pm$ 0.6	1.2 $\pm$ 0.9	1.0 $\pm$ 0.8	0.9 $\pm$ 0.9
Basophils (%)	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
Lymphocytes (%)	79.0 $\pm$ 6.5	80.6 $\pm$ 3.6	80.1 $\pm$ 4.8	78.7 $\pm$ 3.7
Monocytes (%)	0.5 $\pm$ 0.5	0.6 $\pm$ 0.5	0.6 $\pm$ 0.5	0.2 $\pm$ 0.4
Reticulocytes (/ 100 cells)	1.9 $\pm$ 1.1	2.2 $\pm$ 1.6	2.0 $\pm$ 0.9	2.4 $\pm$ 1.6

<sup>a</sup>Mean $\pm$ SD.\*, \*\*: Significantly different from the controls at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively.

**Table 7. Serum biochemical data of male F344 rats fed diets containing nivalenol for 90 days.**

	Nivalenol in diet (ppm)			
	0	6.25	25	100
No. of animals examined	10	10	10	10
Total protein (g/dL)	6.46 ± 0.27 <sup>a</sup>	6.41 ± 0.19	6.27 ± 0.18	6.22 ± 0.10*
A/G ratio	2.12 ± 0.15	2.03 ± 0.07	2.26 ± 0.09	2.76 ± 0.25**
Albumin (g/dL)	4.37 ± 0.17	4.30 ± 0.14	4.33 ± 0.12	4.57 ± 0.14*
Total bilirubin (mg/dL)	0.041 ± 0.006	0.038 ± 0.004	0.042 ± 0.007	0.042 ± 0.004
Direct bilirubin (mg/dL)	0.021 ± 0.003	0.020 ± 0.008	0.027 ± 0.007	0.026 ± 0.005
Indirect bilirubin (mg/dL)	0.020 ± 0.007	0.018 ± 0.006	0.016 ± 0.011	0.017 ± 0.005
Glucose (mg/dL)	151.1 ± 8.7	190.3 ± 21.1	144.6 ± 4.4	129.0 ± 10.0**
Triglyceride (mg/dL)	62.8 ± 17.8	71.8 ± 33.7	34.8 ± 10.0*	38.3 ± 10.1*
Total cholesterol (mg/dL)	66.1 ± 4.8	64.6 ± 4.6	58.7 ± 2.8**	56.0 ± 3.8**
Blood urea nitrogen (mg/dL)	18.4 ± 1.1	18.4 ± 2.1	16.7 ± 1.4	18.2 ± 1.2
Creatinine (mg/dL)	0.28 ± 0.03	0.29 ± 0.04	0.25 ± 0.03*	0.22 ± 0.01**
Sodium (mEQ/L)	144.7 ± 2.1	144.2 ± 2.0	144.3 ± 1.3	145.0 ± 1.0
Chloride (mEQ/L)	103.2 ± 0.4	103.2 ± 1.5	104.4 ± 1.8	107.1 ± 2.1**
Potassium (mEQ/L)	4.69 ± 0.17	4.61 ± 0.31	4.58 ± 0.19	4.31 ± 0.24**
Calcium (mg/dL)	10.72 ± 0.43	10.62 ± 0.48	10.60 ± 0.19	9.59 ± 2.90
Inorganic phosphate (mg/dL)	6.30 ± 0.29	6.25 ± 0.47	6.36 ± 0.61	5.93 ± 0.55
AST (IU/L)	98.0 ± 14.8	91.9 ± 6.6	87.8 ± 10.7	66.8 ± 6.0**
ALT (IU/L)	52.4 ± 16.6	46.1 ± 5.9	37.9 ± 5.9**	36.0 ± 5.3**

<sup>a</sup>Mean±SD.\*, \*\*: Significantly different from the controls at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively.

**Table 8. Serum biochemical data of female F344 rats fed diets containing nivalenol for 90 days.**

	Nivalenol in diet (ppm)			
	0	6.25	25	100
No. of animals examined	10	10	10	10
Total protein (g/dL)	6.19 ± 0.21 <sup>a</sup>	6.10 ± 0.21	5.95 ± 0.21*	5.72 ± 0.19**
A/G ratio	2.32 ± 0.16	2.41 ± 0.11	2.58 ± 0.21*	3.13 ± 0.24**
Albumin (g/dL)	4.31 ± 0.18	4.31 ± 0.14	4.28 ± 0.09	4.33 ± 0.14
Total bilirubin (mg/dL)	0.049 ± 0.009	0.052 ± 0.008	0.051 ± 0.009	0.050 ± 0.007
Direct bilirubin (mg/dL)	0.027 ± 0.007	0.031 ± 0.007	0.025 ± 0.01	0.028 ± 0.009
Indirect bilirubin (mg/dL)	0.022 ± 0.004	0.021 ± 0.007	0.026 ± 0.005	0.022 ± 0.009
Glucose (mg/dL)	103.0 ± 9.6	103.2 ± 10.3	107.0 ± 5.5	110.4 ± 18.9
Triglyceride (mg/dL)	19.8 ± 10.1	14.5 ± 4.8	16.5 ± 5.2	24.0 ± 6.4
Total cholesterol (mg/dL)	92.8 ± 10.5	85.9 ± 6.1	78.2 ± 8.1**	80.9 ± 7.3**
Blood urea nitrogen (mg/dL)	15.6 ± 1.0	14.8 ± 1.1	15.2 ± 1.8	16.6 ± 1.9
Creatinine (mg/dL)	0.27 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.23 ± 0.02**	0.21 ± 0.02**
Sodium (mEQ/L)	143.1 ± 1.2	143.2 ± 1.2	142.8 ± 0.6	143.7 ± 0.9
Chloride (mEQ/L)	105.6 ± 1.3	104.7 ± 1.3	105.9 ± 1.1	105.6 ± 1.3
Potassium (mEQ/L)	4.32 ± 0.31	4.48 ± 0.40	4.29 ± 0.22	4.50 ± 0.37
Calcium (mg/dL)	10.14 ± 0.24	10.18 ± 0.23	10.01 ± 0.13	10.04 ± 0.30
Inorganic phosphate (mg/dL)	5.28 ± 0.45	5.50 ± 0.60	5.54 ± 0.63	5.96 ± 0.56
AST (IU/L)	78.9 ± 4.6	72.1 ± 4.5	67.5 ± 5.3**	67.7 ± 10.9**
ALT (IU/L)	31.4 ± 3.0	29.3 ± 3.4	28.8 ± 2.3	30.7 ± 3.8

<sup>a</sup>Mean±SD.\*, \*\*: Significantly different from the controls at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively.

**Table 9. Body and organ weight of male F344 rats fed diets containing nivalenol for 90 days.**

	Nivalenol in diet (ppm)			
	0	6.25	25	100
No. of animals examined	10	10	10	10
<b>Absolute organ weight</b>				
Body weight (g)	303.9 ± 10.5 <sup>a</sup>	306.5 ± 13.9	282.2 ± 10.5**	227.7 ± 8.4**
Brain (g)	1.93 ± 0.03	1.92 ± 0.05	1.91 ± 0.04	1.88 ± 0.03**
Thymus (g)	0.157 ± 0.045	0.187 ± 0.030	0.172 ± 0.019	0.092 ± 0.039**
Lung (g)	0.977 ± 0.034	1.004 ± 0.083	0.974 ± 0.042	0.924 ± 0.050
Heart (g)	0.928 ± 0.049	0.940 ± 0.075	0.912 ± 0.053	0.824 ± 0.043**
Spleen (g)	0.622 ± 0.040	0.622 ± 0.032	0.618 ± 0.031	0.557 ± 0.032**
Liver (g)	7.113 ± 0.45	7.24 ± 0.49	6.54 ± 0.26*	5.81 ± 0.68**
Adrenals (g)	0.035 ± 0.008	0.032 ± 0.004	0.034 ± 0.009	0.034 ± 0.012
Kidneys (g)	1.87 ± 0.08	1.88 ± 0.11	1.82 ± 0.10	1.62 ± 0.08**
Testes (g)	3.18 ± 0.10	3.20 ± 0.20	3.21 ± 0.09	3.27 ± 0.07**
<b>Relative organ weight</b>				
Brain (g/100g BW)	0.636 ± 0.021	0.627 ± 0.029	0.677 ± 0.025**	0.826 ± 0.027**
Thymus (g/100g BW)	0.052 ± 0.015	0.061 ± 0.008	0.061 ± 0.006	0.041 ± 0.017
Lung (g/100g BW)	0.322 ± 0.009	0.328 ± 0.020	0.345 ± 0.015**	0.406 ± 0.013**
Heart (g/100g BW)	0.305 ± 0.012	0.307 ± 0.015	0.323 ± 0.017*	0.362 ± 0.017**
Spleen (g/100g BW)	0.205 ± 0.011	0.203 ± 0.004	0.219 ± 0.006	0.245 ± 0.011**
Liver (g/100g BW)	2.34 ± 0.09	2.36 ± 0.08	2.32 ± 0.05	2.55 ± 0.24*
Adrenals (mg/100g BW)	11.4 ± 2.6	10.5 ± 1.5	12.2 ± 3.2	14.9 ± 5.4
Kidneys (g/100g BW)	0.616 ± 0.023	0.615 ± 0.021	0.644 ± 0.017*	0.710 ± 0.032**
Testes (g/100g BW)	1.05 ± 0.04	1.04 ± 0.03	1.14 ± 0.05**	1.44 ± 0.04**

<sup>a</sup>Mean±SD.

Abbreviation: BW, Body weight.

\*, \*\*: Significantly different from the controls at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively.

**Table 10. Body and organ weight of female F344 rats fed diets containing nivalenol for 90 days.**

	Nivalenol in diet (ppm)			
	0	6.25	25	100
No. of animals examined	10	10	10	10
<b>Absolute organ weight</b>				
Body weight (g)	167.7 ± 8.1 <sup>a</sup>	167.9 ± 11.6	160.9 ± 5.3	138.5 ± 7.6**
Brain (g)	1.79 ± 0.04	1.82 ± 0.05	1.80 ± 0.04	1.70 ± 0.11*
Thymus (g)	0.175 ± 0.043	0.157 ± 0.019	0.154 ± 0.015	0.091 ± 0.020**
Lung (g)	0.699 ± 0.049	0.738 ± 0.034	0.730 ± 0.042	0.731 ± 0.091
Heart (g)	0.566 ± 0.035	0.594 ± 0.050	0.599 ± 0.032	0.536 ± 0.020
Spleen (g)	0.387 ± 0.021	0.400 ± 0.016	0.413 ± 0.025	0.380 ± 0.033
Liver (g)	3.67 ± 0.25	3.84 ± 0.26	3.68 ± 0.19	3.38 ± 0.51*
Adrenals (g)	0.037 ± 0.005	0.048 ± 0.013	0.040 ± 0.006	0.034 ± 0.016
Kidneys (g)	1.08 ± 0.06	1.13 ± 0.05	1.14 ± 0.07	1.01 ± 0.03*
<b>Relative organ weight</b>				
Brain (g/100g BW)	1.07 ± 0.05	1.09 ± 0.08	1.12 ± 0.04	1.23 ± 0.10**
Thymus (g/100g BW)	0.14 ± 0.02	0.094 ± 0.011	0.096 ± 0.008	0.065 ± 0.013*
Lung (g/100g BW)	0.417 ± 0.018	0.441 ± 0.032	0.454 ± 0.026*	0.529 ± 0.067**
Heart (g/100g BW)	0.338 ± 0.015	0.354 ± 0.031	0.373 ± 0.015*	0.388 ± 0.015**
Spleen (g/100g BW)	0.231 ± 0.012	0.238 ± 0.018	0.257 ± 0.013**	0.275 ± 0.026**
Liver (g/100g BW)	2.19 ± 0.11	2.30 ± 0.22	2.28 ± 0.07	2.45 ± 0.42*
Adrenals (mg/100g BW)	22.2 ± 3.0	28.5 ± 9.0	25.0 ± 4.2	24.2 ± 10.8
Kidneys (g/100g BW)	0.646 ± 0.022	0.677 ± 0.040	0.711 ± 0.037**	0.729 ± 0.034**

<sup>a</sup>Mean±SD.

Abbreviation: BW, Body weight.

\*, \*\*: Significantly different from the controls at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively.

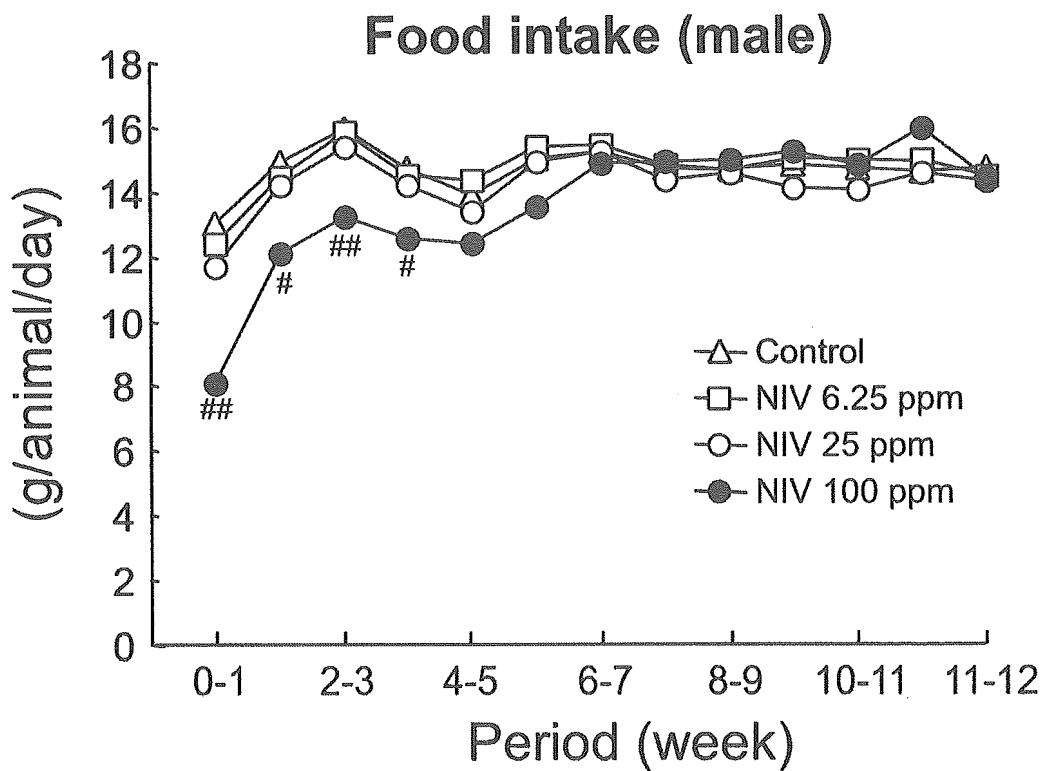
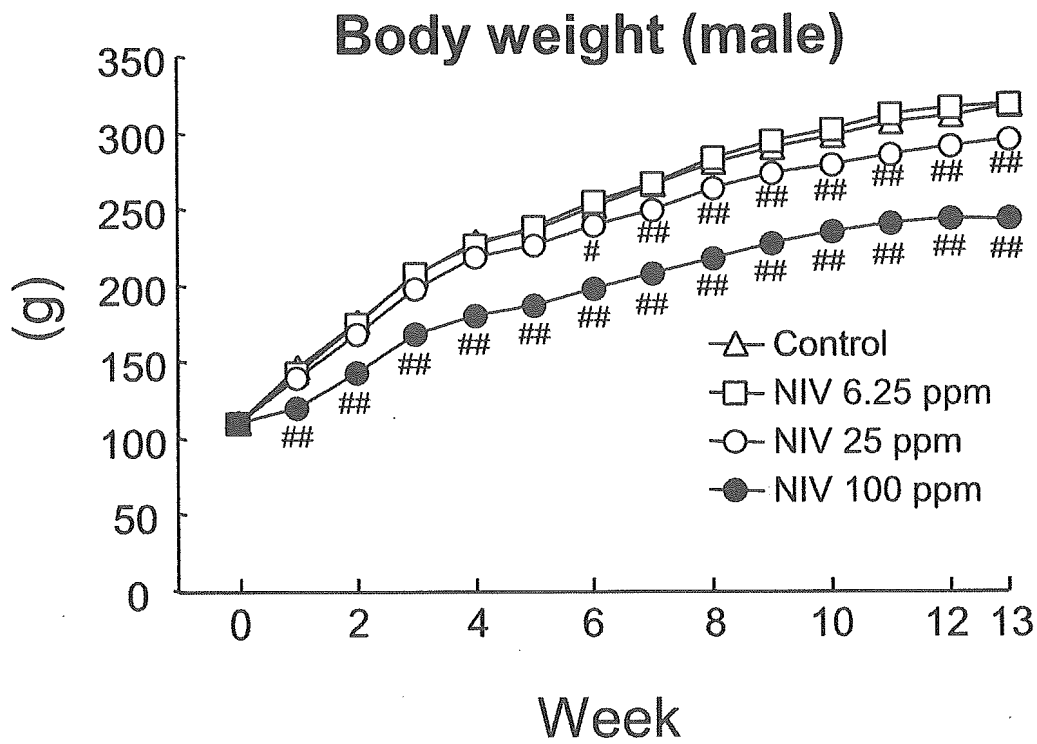


Fig. 1. Body weight and food intake during experiment (male).

# 分担研究報告書

ニバレノールの毒性影響と毒性学的同等性

窪崎 敦隆



厚生労働科学研究費補助金  
(食品の安心・安全確保推進研究事業)

ニバレノールの毒性影響と毒性学的同等性

分担研究報告書

分担研究者 小西良子 国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部

第4室室長

協力研究者 窪崎 敦隆 食品の安心・安全確保推進研究推進事業

リサーチ・レジデント

研究要旨：ニバレノールはトリコテセン系マイコトキシンの一種であり、我が国では国内汚染があることからその健康被害が危惧されている。しかし、デオキシニバレノールに比べて汚染地域が限られていることから毒性に関する知見が少なく JECFA などの国際機関やヨーロッパ連合の食品技術専門家会議では、その毒性評価は行われていない。我が国では国産小麦においてデオキシニバレノールとニバレノールの共汚染が高い頻度で見られるため、早急の対策が求められている。本研究ではニバレノールの毒性評価に一環として、90日間短期毒性試験を行い、その免疫系への影響を抗体価の変動およびナチュラルキラー活性を指標として検討した。その結果、脾臓免疫担当細胞に対する短期免疫毒性を見いだした。特に脾臓リンパ球のうち、細胞障害性T細胞のニバレノールに対する高い感受性を観察した。又、高濃度のニバレノール暴露によってナチュラルキラー活性担当細胞への細胞毒性が観察される一方、低濃度ではナチュラルキラー活性の上昇が見られた。抗体価においてはIgMに変動が観察された。これらの知見は、人に対するニバレノールの免疫毒性を考える上で重要な知見を与えるものである。

A. 研究目的

トリコテセン系マイコトキシンは、トリコテセン骨格と呼ばれる特徴的な4環構造を共通に持つマイコトキシンであり、現在までに70種類以上の化合物が知られている。主要な化合物として、T-2トキシシン・ニバレノール・デオキシニバレノール

ールなどがあり、*Fusarium* 属の菌によって産生され、世界中においてムギやトウモロコシに広く汚染が見られる。そのうちニバレノールは、その構造からタイプBに分類されるトリコテセン系マイコトキシンである。現在までに、ニバレノールの実験動物に対する急性毒

性及び長期毒性に関して様々な研究が行われてきたが、短期免疫毒性に関する知見が不足していた。そこで、本研究において F344 系統ラットを用い OECD Test Guideline 408 に従って、飼料へのニバレノール混合による 90 日間暴露を行い、ニバレノールの短期免疫毒性に関して検討を加えた。具体的には、細胞表面マーカーを指標とした脾臓細胞サブセット解析・脾臓細胞のナチュラルキラー活性測定・血清中イムノグロブリン量の測定を行った。

#### B. 研究方法

本研究の為に、F344/DuCrj 系統の 5 週齢雄ラットを日本チャールズリバーラボラトリーズ社から購入し、12 時間ごとに部屋の明暗が調整されている SPF の環境下で飼育した。ラットは、1 週間飼育後、実験に供した。ニバレノールは研究指導者の研究グループが産生・精製を行った。実験動物用飼料 (CRF-1) はオリエント酵母社より購入し、ニバレノールを最終濃度が 0、6.25、25、100 ppm になるように混合した。ニバレノールの 90 日間暴露後、ラットから脾臓を摘出し実験に供した。

まず、細胞表面マーカーを指標とした脾臓細胞サブセット解析の為に、ベクトンディッキンソンバイオサイエンス社より購入した以下のモノクローナル抗体を用いた：FITC 標識抗ラット CD8a 抗体 (クローン OX-8)、FITC 標識抗

ラット CD3 抗体 (クローン G4.18)、FITC 標識抗ラット NKR-P1A 抗体 (クローン 10/78)、PE 標識抗ラット CD4 抗体 (OX-35)、PE 標識抗ラット CD45RA 抗体 (OX-33) 及び PE 標識抗ラット CD3 抗体 (1F4)。ニバレノールの 90 日間暴露後に回収した脾臓を破碎し、メッシュを通す事によって単細胞を回収した。単離した脾臓細胞を蛍光色素標識モノクローナル抗体で染色する際に、抗体の非特異的結合を防ぐ為に、抗 Fc $\gamma$ R II 抗体 (クローン D34-485) を用いた。上記の蛍光色素標識抗体を組み合わせることで脾臓細胞を染色し、ベクトンディッキンソンバイオサイエンス社のフローサイトメトリー (FACSCalibur) を用いて脾臓細胞サブセット解析を行った。

次に、単離した脾臓細胞のナチュラルキラー活性の測定を行った。本研究では、脾臓細胞の標的細胞として、ナチュラルキラー活性に対して感受性のある Yac-1 細胞を用いた。シグマ社より購入した PKH2 Green Fluorescent Dye と Yac-1 細胞を 3 分間反応させ、細胞表面を染色した。細胞を洗浄後、96 穴丸底マイクロプレート中に、蛍光標識をした Yac-1 細胞を  $1 \times 10^4$  細胞 /  $100 \mu\text{l}$  になるように準備した。エフェクター細胞である脾臓細胞をエ

フェクター細胞：標的細胞比が 50:1、25:1、12:1 及び 6:1 になるように 100  $\mu$ l 培養液中に準備し、Yac-1 細胞と混合して 37°C / 5% CO<sub>2</sub> 存在下で 2 時間培養した。培養後、死細胞の核を染色する Propidium iodide で Yac-1 細胞を染色し、PKH2 蛍光標識 Yac-1 細胞中の死細胞の数をフローサイトメトリーで測定した。

最後に、血清中イムノグロブリンのうち、IgG, IgM 及び IgA サブクラスに着目し、これらの血清中量の測定を行った。スタンダードとしてラット IgG<sub>1</sub> (BioLegend 社), ラット IgM (eBioscience 社) 及びラット IgA (ベクトンディッキンソン バイオサイエンス社) を用いた。コーニング社の 96 穴平底マイクロプレートに抗ラット IgG/IgM/IgA (Open Biosystems 社) 又は抗ラット IgA (Sigma 社) を 4°C で一晩インキュベートした。洗浄後、血清中イムノグロブリンの非特異的結合を防ぐ為、1% BSA (Serological Proteins 社) を室温で 90 分間ブロックした。洗浄後、希釈した血清又はスタンダードを 96 穴平底マイクロプレートの決められた場所に添加し、室温で 90 分間インキュベートした。洗浄後、適量のペルオキシ

ダーゼ標識抗ラット IgG 抗体 (Invitrogen 社)、抗 IgM 抗体 (Stressgen Bioreagents 社) 又は抗ラット IgA 抗体 (Bethyl 社) をそれぞれ決められた場所に添加した。マイクロプレートを洗浄後、TMB 基質 (ベクトンディッキンソン バイオサイエンス社) を添加して発色させ、EL800 Universal microplate reader (BIOTEK 社) を用い 450 nm の波長で吸光度を測定した。

統計処理には、Analysis of Variance (ANOVA) または Student's *t*-test を用い、 $P < 0.05$  で統計学的に有為な差があると判断した。

### C. 結果および考察

ニバレノールの免疫毒性を知る為、ニバレノール暴露後の脾臓中の T 細胞及び B 細胞の細胞比を細胞特異的表面マーカーである CD3 及び B220 を指標にフローサイトメトリーで解析した。その結果、T 細胞 / B 細胞 (CD3<sup>+</sup> / B220<sup>+</sup>) の比が、ニバレノール暴露 25 及び 100 ppm 群において有為に低い事を見いだした (Fig.1)。さらに、脾臓 T 細胞のうち、ヘルパー T 細胞と細胞障害性 T 細胞の細胞比を、それぞれ CD4 及び CD8 を指標にフローサイトメトリーで解析した。その結果、ヘルパー T 細胞 / 細胞障害性 T 細胞

胞 ( $CD4^+ / CD8^+$ ) の比が、ニバレノール暴露 6.25 及び 25 ppm 群において有為な変化を見いだせなかったが、100 ppm 群において有為に高い事を見いだした (Fig.2)。加えて、ナチュラルキラー活性を担っているナチュラルキラー細胞やナチュラルキラーT細胞などの細胞表面マーカーである NKR-P1A を指標に、NKR-P1A<sup>+</sup>細胞の比率をフローサイトメトリーで解析した。その結果、統計学的に有為な減少を観察した (Fig.3)。

次に、Yac-1 細胞に対する脾臓細胞のナチュラルキラー活性を調べた結果、コントロール群と比較して有為に高い事を見いだした (Fig.4)。具体的には、エフェクター細胞：標的細胞比が 25:1 において、ニバレノール暴露 6.25、25 及び 100 ppm 群はコントロール群と比較して、それぞれ 1.7、

2.7 及び 2.6 倍にナチュラルキラー活性が上昇した。

最後に、血清中量の IgG、IgM 及び IgA サブクラス量を測定した結果、ニバレノール暴露によって IgM の量が統計学的に有為に上昇した。特に、ニバレノール暴露 100 ppm 群にお

いて約 26% 上昇した。一方、IgG 量はニバレノール暴露によって、上昇する傾向を見いだしたが、統計学的な有為差は見いだせなかった (Table 1)。ニバレノール暴露によって IgA 量に変化は見いだせなかった。

以上の結果から、飼料へのニバレノール混合による 90 日間暴露によって、脾臓免疫担当細胞に対する短期免疫毒性を見いだした。特に脾臓リンパ球のうち、細胞障害性 T 細胞のニバレノールに対する高い感受性を観察した。又、高濃度のニバレノール暴露によってナチュラルキラー活性担当細胞への細胞毒性が観察される一方、低濃度ではナチュラルキラー活性の上昇が見られた。これは T 細胞数の減少に対する補完反応の可能性がある。過去の研究から、ニバレノールと IgA との関係について報告があるが、本研究では IgM に変化を観察した。本研究によって得られたこれらの知見は、人に対するニバレノールの免疫毒性を考える上で重要な知見を与えるものである。

#### G. 研究発表

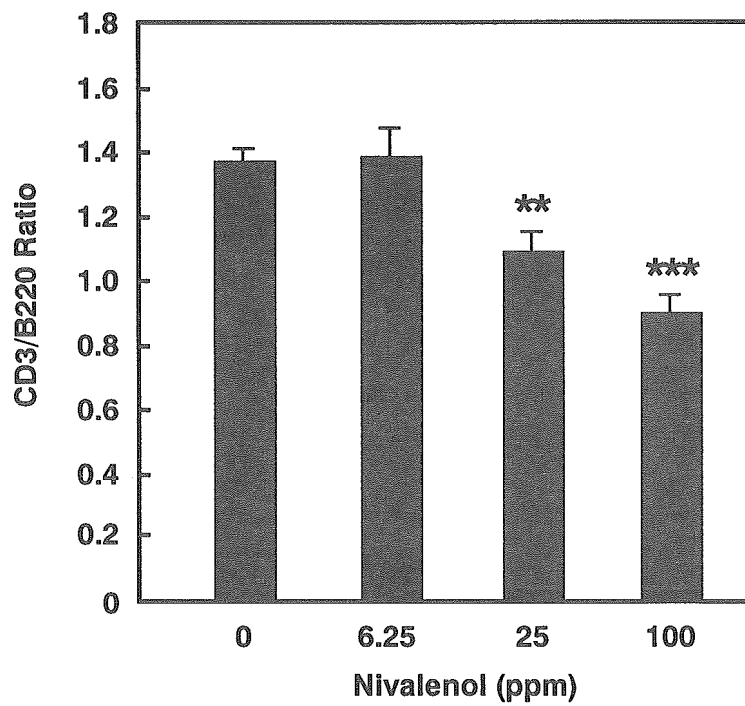
1. 論文発表  
なし

2. 口頭発表

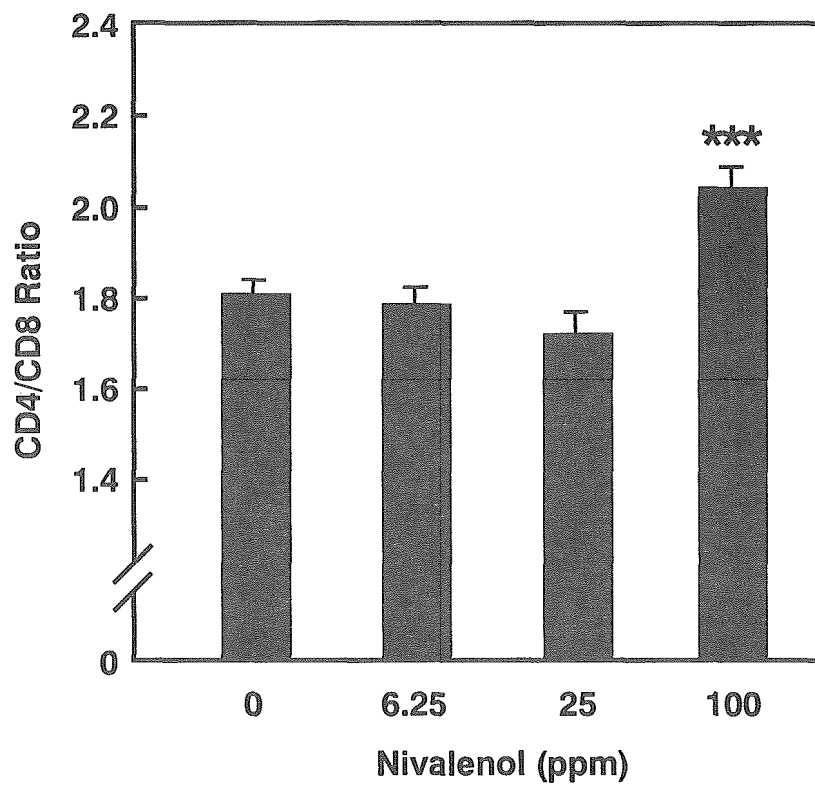
A. Kubosaki, Y. Sugita-Konishi " Production of reactive

oxygens species following  
Aflatoxins exposure in  
human hepatoma cell line”  
40<sup>th</sup> Toxic Microorganisms  
Joint Panel Meeting、

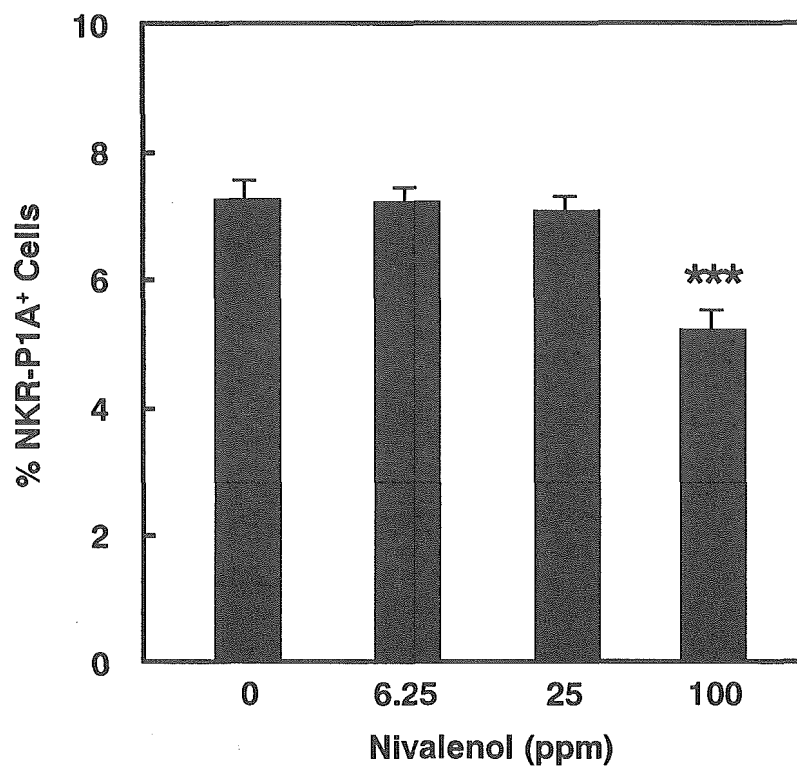
Matsuchima, Japan, Nov.  
(2005)  
H.知的財産権の出願登録状  
況 なし



**Fig. 1 Effect of Nivalenol on CD3/B220 ratio in spleen after 90 days exposure**

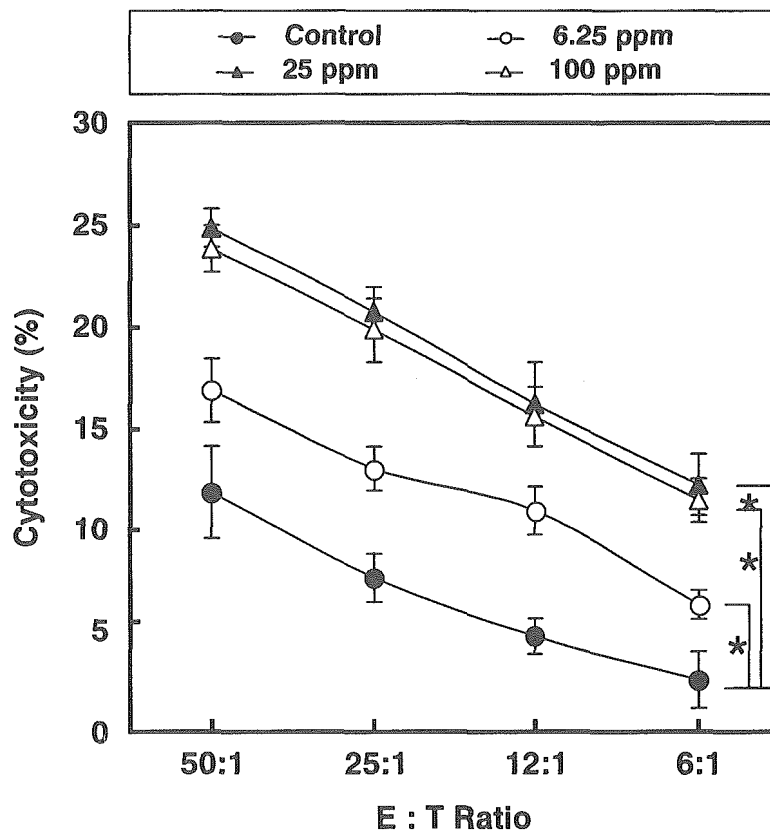


**Fig. 2 Effect of Nivalenol on CD3/B220 ratio in spleen after 90 days exposure**



**Fig. 3 Effect of Nivalenol on Natural Killer cell in spleen after 90 days exposure**





**Fig. 4 Effect of Nivalenol on Natural killer cell in spleen at various E/T ratio**

Table 1. Effect of three oral doses of NIV administered for 90 days, on plasma immunoglobulin levels of male F344 rat

Isotype	Ig ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	0 (Control)	6.25 ppm	25 ppm	100 ppm
IgG	40574 $\pm$ 7804	41464 $\pm$ 5805	49020 $\pm$ 6873	43209 $\pm$ 6646
IgM	54.69 $\pm$ 2.87	55.54 $\pm$ 3.36	57.99 $\pm$ 4.05	69.11 $\pm$ 3.15 *
IgA	0.351 $\pm$ 0.03	0.335 $\pm$ 0.03	0.312 $\pm$ 0.01	0.409 $\pm$ 0.03

Data are means  $\pm$  SEM.

\* Significantly different from corresponding control ( $p = 0.044$ ; ANOVA).

# 分担研究報告書

モンテカルロ法による日本人の小麦摂取による  
デオキシニバレノール(DON)曝露量の推定

佐藤敏彦

厚生労働科学研究費補助金  
(食品の安心・安全確保推進研究事業)  
分担研究報告書

モンテカルロ法による日本人の小麦摂取による  
デオキシニバレノール (DON) 曝露量の推定

分担研究者 北里大学医学部 佐藤敏彦  
研究協力者 東京大学 斉藤史郎

研究要旨

小麦食品摂取量および小麦中のデオキシニバレノール (DON) 含有量データより、モンテカルロシミュレーションを用いて、日本人の年齢階級別DON曝露量を推定した。その結果、95 パーセンタイル値では、一日当たり耐用摂取許容量である体重1kg当たり $1\mu\text{g}$ を超える値は認められなかった。一方、99 パーセンタイル値においては、乳幼児において、現行の基準値の2倍を超える曝露推定値を示した。仮想摂取量分布の不適合の影響による過大評価の可能性があるものの、より高い安全性を示すには、乳幼児に関しては更に検討を行った上で、何らかの特段の措置を実施する必要があるかもしれない。

A. 研究目的

デオキシニバレノール (DON) は麦の病気である赤かび病の原因となるフザリウムというかびが作る天然毒素であり、その健康影響についてFAO/WHO合同食品添加物専門化会議によってリスク評価が行われている。その結果を踏まえ、わが国では小麦のDONの規制値を1.1ppm以下とする措置がとられている。本研究は、わが国で用いられる小麦のDONの含有量と、日本人の小麦摂取量から、日本人のDONの曝露量を推定し、現在の規制値が適正なものであるか検討するものである。

B. 方法

コンピュータシミュレーションであるモンテカルロ法を用いて以下のとおり推定を行った。

1・小麦の摂取量についてのシミュレーション

(1)食品の分類

平成14年の国民栄養調査より小麦を含んだ108

の食品の摂取量データを元にした<sup>1)</sup>。まず、108の食品を専門家の意見を参考にしつつ、以下の5つに分け、それぞれにつき摂取量のシミュレーションを行うことにした。

(108食品の具体的分類については表1参照)

(2)それぞれの平均小麦含有率

a.粉もの：100%が小麦とした

b.パン類：レシピなどにある重量比を利用して、パン類の平均小麦含有量を計算して、81%とした。

c.麺類：「国民栄養調査」により、30%とした。

d.中華：「国民栄養調査」により、30%とした。

e.菓子類：レシピなどにある重量比を利用して、菓子類の平均小麦含有量を計算して、42%とした。

(3)食品摂取量分布の推定

aの粉ものからeの菓子類まで5つの食品分類に対して、年齢階層別(1歳から6歳、7歳から14歳、15歳から19歳、20歳以上の4層)に、摂取量の分布の推定を行なった。分布推定にはソフトウエアとして構造計画研究所社製 Crystal