

英国	2/4	10-91	2000	
アイルランド	1/2	33	2000	
オランダ	1/2	21	2000	
オーストリア	0/1	ND	2000	
フランス	1/3	20	2000	
スペイン	0/1	ND	2000	
モロッコ	0/5	< 10	2001	
ベルギー	60/62	10-185	2001	
デンマーク	2/2	10-87	2001	
フランス	4/4	13-18	2001	
ドイツ	2/2	10-35	2001	
アイルランド	2/2	63-69	2001	
メキシコ	2/2	12-13	2001	
オランダ	2/2	24-60	2001	
スコットランド	6/6	10-85	2001	
イタリア	3/10	20-22	2000	Visconti et al.(2000)
ベルギー	6/15	10-135	2000	
デンマーク	5/7	10-77	2000	
ドイツ	6/9	10-47	2000	
英国	2/4	10-91	2000	
アイルランド	1/2	33	2000	
オランダ	1/2	21	2000	
オーストリア	0/1	ND	2000	
フランス	1/3	20	2000	
スペイン	0/1	ND	2000	
米国	2/2	33-100	2000	
カナダ	1/1	10	2000	
アルゼンチン	0/1	ND	2000	
オーストラリア	1/1	52	2000	
メキシコ	1/2	10	2000	
スペイン	26/31	ND-146.8	2005	Medina et al.(2005)
ドイツ	10/15	ND-204.2	2005	
デンマーク	6/8	ND-96	2005	
オランダ	12/12	11.4-132	2005	
ベルギー	11/13	ND-120.4	2005	
スコットランド	1/1	-	2005	
欧州連合	1/1	-	2005	
米国	3/4	ND-114.8	2005	
メキシコ	2/2	32.2-101	2005	
オーストラリア	1/1	-	2005	

ND : not detected

表5. 白ワインのオクラトキシンA 汚染実態

由来国	汚染頻度	汚染レベル(ng/l)	報告年	文献
イタリア	4/9	10-970	1999	Blesa et al.(2006)
スペイン	7/12	154-208	2002	
モロッコ	7/7	28-180	2001	
イタリア	3/3	10-80	2003	
南アフリカ	15/15	40-330	2003	
スペイン	35/43	3-267	1999	
フランス	4/6	3-85	1999	
イタリア	2/6	3-6	1999	
ポルトガル	2/4	3-20	1999	
ドイツ	0/8	ND	1999	
米国	2/2	10-19	1999	
ギリシャ	55/118	50-1720	2003	
数ヶ国	14/362	50-100	2001	
フランス	4/4	< 10-20	1998	
ポルトガル	64/64	< 20	2000	
数ヶ国	24/24	< 3-178	1996	
世界中	15/60	< 10-1360	2000	
世界中	14/41	< 10-1200	1996	
スペイン	4/24	50-760	2004	
ブラジル	2/10	28.2	2004	
アルゼンチン	0/5	ND	2004	

ND : not detected

表6. 赤ワインのオクラトキシンA 汚染実態

由来国	汚染頻度	汚染レベル(ng/l)	報告年	文献
モロッコ	20/20	40-3240	2001	Blesa et al.(2006)
イタリア	14/96	10-3177	2001	
スペイン	13/28	50-316	2002	
ギリシャ	8/8	2-2350	2001	
モロッコ	3/3	551-554	2001	
スペイン-ポルトガル	6/6	2-500	2001	
フランス	12/12	2-3400	2001	
欧州	1/1	1540	2001	
イタリア	1/1	892	1999	
スペイン	66/72	< 3-603	1996	
スペイン	9/14	< 3-22	1996	
スペイン	3/6	< 10-0-190000	1996	
フランス	21/21	< 10-270	1998	
世界中	40/89	< 10-7000	1996	

世界中	165/305	< 10-3310	2000	
イタリア	37/38	10-7630	1999	
スペイン	3/6	< 10-500	2001	
南アフリカ	9/9	70-390	2003	
イタリア	5/5	230-910	2003	
フランス	8/8	4-452	1999	
イタリア	6/8	3-191	1999	
ポルトガル	2/2	11-20	1999	
ハンガリー	1/1	5	1999	
数ヶ国	96/580	50-200	2001	
数ヶ国	79/79	<3-388	1996	
ギリシャ	33/104	50-2690	2003	
イタリア	14/23	10-2000	2003	
スペイン	12/61	50-530	2004	
ブラジル	3/10	28.3-42.4	2004	Chulze et al.(2006)
アルゼンチン	2/7	28.3-42.4	2004	
チリ	2/5	28.3-70.7	2004	
南米	7/22	28.3-70.7	2004	

ND : not detected

表7. ロゼワインのオクラトキシン A 汚染実態

由来国	汚染頻度	汚染レベル(ng/l)	報告年	文献
イタリア	7/8	10-1150	1999	Blesa et al.(2006)
モロッコ	3/3	40-540	2001	
スペイン	24/26	3-155	1999	
フランス	2/2	161	1999	
イタリア	2/2	37-49	1999	
ポルトガル	1/2	3-10	1999	
ギリシャ	7/20	50-1160	2003	
フランス	2/2	< 10-110	1998	
数ヶ国	15/15	< 3-123	1996	
世界中	22/55	< 10-2380	2000	
世界中	7/14	< 10-2400	1996	
スペイン	8/21	50-460	2004	
ブラジル	1/5	35.4	2004	Chulze et al.(2006)

ND : not detected

付表1. アフラトキシン回収率

食品名	濃度(ng/g)	B1		B2		G1		G2
香辛料	5.0	98.6		102		57		66.2
ホテイハツハ - 一味唐辛子	5.0	127		129		116		118
シナモン	5.0	71.8		67		65.2		46
7*ラツカ*ツハ -	5.0	107		118		105		118
一味唐辛子	5.0	111		118		120		125
7*ラツカ*ツハ -	5.0	106		111		99.2		99.6
シナモン	5.0	91.6		96.2		96.4		93.4
7*ラツカ*ツハ -	5.0	97.4		103		87		93
カイシハ*ツハ -	5.0	95		103		99.6		103
ホテイハツハ -	5.0	98.6		101		87		87.8
7*ラツカ*ツハ -	5.0	89.8		95.2		85.6		86.4
ホテイハツハ -	5.0	106		107		33.6		93.6
カイシハ*ツハ -	5.0	98.2		87		76.6		82.6
セロソジヤモシ	5.0	67.4		67.6		64.6		64.8
シナモン	5.0	66.8		64.8		60		51.6
ホテイハツハ -	5.0	89.4		91.8		71.6		77.2
レツ*ハ*ツハ -	5.0	115		120		102		113



アーモンド	0.1	81	78.6	85.4	88.6	80.6	79.5	85.9	90.5
	5.0	71.2	70.6	76.8	76.2	70.5	71.2	75	75.9
アーモンド	0.2	115.6± 12.2		90.3± 11.8		93.2±9.7		111.3± 14.0	
	5.0	97.8±0.5		102.0± 0.4		100.5±0.3		102.8± 0.7	
ピスタチオ	0.1	81.2	84.2	83.2	88.9	87.4	80.1	86.1	87
	5.0	71.7	71.4	76.7	77.4	72.5	72.7	76.7	78.2
ピーナッツ	0.2	110.9± 14.4		99.6± 12.0		94.9±5.6		107.8± 11.3	
	5.0	100.1± 1.9		102.6± 2.1		101.6±1.5		101.6± 1.8	
ピーナッツバター	0.2	97.2±3.8		100.2± 4.3		118.8±2.4		99.3±3.3	
	5.0	97.3±1.2		100.0± 2.0		97.3±3.1		98.0±2.0	
ゴマ油	0.2	93.5±6.0		93.3±7.6		73.3±2.9		96.7±7.6	
	5.0	103.2± 1.4		93.7±1.5		80.6±1.4		89.9±0.4	

コーンフレーク		0.1	72	76	82	80
		5.0	85.3	89.6	76.9	91.7
コーングリッツ		0.1	75	93	85	105
		5.0	101	109	93.7	109
ポップコーン		0.1	72	76	82	83
		5.0	62.5	75.6	74.9	77.6
スイートコーン		0.1	58	81	58	55
		5.0	58.1	71.3	59.4	63.4

付表2. オクラトキシンA回収率

食品名	濃度(ng/g)	1	2	3
オートミール	0.1	110	90	90
	5.0	92.8	91.2	98.4
ワイン	0.05	92	100	100
	5	83.2	82.2	82
レーズン	0.1	100	80	80
	5.0	81.4	80.8	84
グレープジュース	0.05	100	92	92
	5.0	99.8	101.2	96.4
ココア	0.1	70	100	90
	5.0	72.2	75.6	78.8
チョコレート	0.1	90	100	110
	5.0	91.2	77.2	71.2
コーングリッツ	0.1	95.7±7.1		
ライ麦粉	0.1	109.0±3.2		
	5.0	97.4±2.5		
ポップコーン	0.1	86.4±4.5		
小麦粉	0.1	107.1±2.6		

	5.0	94.7±1.9	
せんべい	0.1	113.5	
	5.0	101.4	
米			
パスタ	0.1	97.3	
	5.0	86	

付表3 . フモニシン回収率

食品名	濃度 ( ng/g)	FB1	FB2	FB3
大豆加工品	10	98.3±7.20	108.8±1.81	63.8±1.80
	1000	65.9±4.41	75.0±4.90	71.4±3.68 ( B3:100ng/g )
大豆	10	98.3±7.20	108.8±1.81	63.8±1.80
	1000	65.9±4.41	75.0±4.90	71.4±3.68 ( B3:100ng/g )
米	10	107.9±3.59	113.3±8.13	107.7±1.99
	1000	86.5±1.51	97.4±1.74	100.4±4.01 ( B3:100ng/g )
雑穀米	2	88.3±8.7	84.8±6.8	79.9±5.7
	10	67.7±3.1	69.5±3.3	66.7±3.3
コーンスターチ	2	86.6±7.0	93.2±4.2	84.8±2.5
コーングリッツおよびコーンフラワー	2	114.1±14.7	98.5±9.3	92.7±5.9
	500	73.2±1.8	72.2±1.0	74.4±0.7 ( B3:100ng/g )
とうもろこし	10	102.2±6.42	114.8±2.09	110.8±2.24
	1000	89.6±2.11	88.9±14.96	92.9±2.99 ( B3:100ng/g )
スイートコーン	3	75.2±4.44	93.1±7.22	92.2±8.08
	1000	77.5±3.51	72.4±2.35	74.0±2.23
スイートコーン ( 缶詰・汁 )	3	87.5±6.94 ( B1:5ng/g )	111.7±5.51	109.9±0.71
	1000	95.6±12.6	85.1±11.8	86.5±13.5 ( B3:100ng/g )

コーンスープ ( ベースト状・汁状 )	3	108.2±7.36	97.7±5.26	95.2±8.15
	1000	86.9±10.8	81.9±5.34	82.9±6.95 ( B3:100ng/g )
コーンスープ ( 粉末状 )	3	72.5±6.15 ( B1:5ng/g )	93.7±5.39	93.4±5.36
	1000	108.4±10.7	81.5±4.65	83.2±8.34 ( B3:100ng/g )
コーンフレーク プレーン	5	120.1±8.66	116.5±2.16	104.8±3.65
シガ-	5	112.1±6.49	99.4±0.14	96.8±0.43
プレーン	1000	97.2±2.16	96.2±3.95	94.2±3.15 ( B3:100ng/g )
シガ-	1000	100.4±3.59	91.8±5.39	93.8±4.77 ( B3:100ng/g )
ポップコーン	10	89.2±9.7	73.9±3.7	73.8±3.6
	1000	67.6±0.9	67.0±0.5	66.7±1.5 ( B3:100ng/g )
コーンスナック	10	107.4±0.5	87.9±4.0	90.9±2.1
	1000	77.7±0.8	74.2±0.5	73.3±0.9 ( B3:100ng/g )
ビール	10	106.3±1.0	71.7±1.4	85.1±1.2
	1000	94.6±2.3	89.0±1.7	87.8±1.4 ( B3:100ng/g )

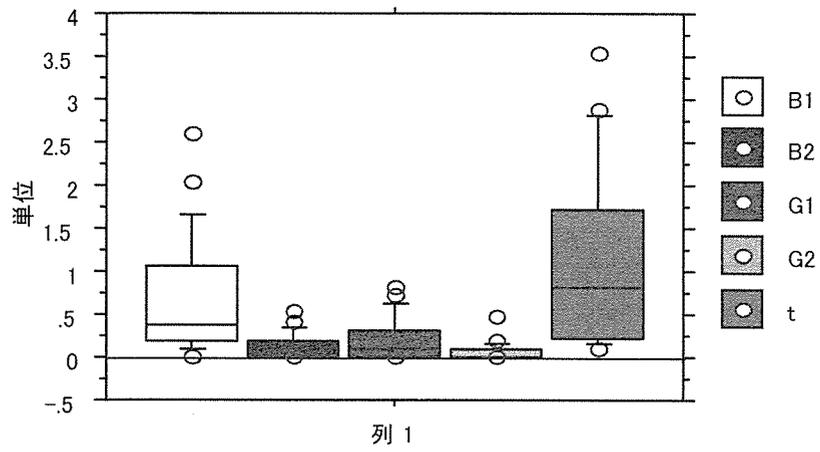


図 1 .平成 1 8 年度ピーナッツバター の AFB1、AFB2、AFG1、AFG2、  
 総量の濃度。単位は ng / g。

# 分担研究報告書

実験動物を用いたニバレノールの毒性実験

広瀬 雅雄

食品中のカビ毒の毒性および暴露評価に関する研究

実験動物を用いたニバレノールの毒性実験

分担研究者 広瀬 雅雄 国立医薬品食品衛生研究所 病理部長

協力研究者 渋谷 淳 国立医薬品食品衛生研究所 病理部室長

高橋 美和 国立医薬品食品衛生研究所 病理部研究員

研究要旨：食品中のカビ毒である nivalenol (NIV)のラットに対する毒性を評価するために、雌雄 F344 ラットを用いて、0, 6.25, 25, 100 ppmの混餌用量で90日間反復投与毒性試験を実施した。実験開始直後より雌雄とも100 ppmで体重増加抑制と軽度の軟便が観察され、雄の25 ppmにおいても6週目から体重増加抑制が認められた。実験終了時には、体重増加抑制の影響により多くの臓器の絶対重量が減少したが、雌の100 ppmにおいて胸腺重量（絶対および相対）の減少が明らかであった。血液学的検査では、雄の100 ppmおよび雌の6.25 ppm以上で白血球数減少が用量依存性に認められた他、雌雄の100 ppmで血小板の減少、雄の100 ppmで赤血球の減少、雌の100 ppmでヘモグロビンの減少が認められた。組織学的変化は、雌雄の100 ppm群において胸腺の萎縮、骨髓造血細胞の減少、下垂体前葉のびまん性好塩基性細胞肥大、雌では閉鎖卵胞の増加等造血および免疫系臓器、下垂体、雌性生殖器を中心に観察された。血液学的検査の結果から、ラットの90日間反復投与毒性試験におけるno-observed-adverse-effect level (NOAEL)は、6.25 ppm (0.4 mg/kg/day)未満であると考えられた。

#### A. 研究目的

近年、赤カビ病菌 *Fusarium* 属の産生する trichothecene 系マイコトキシン類の内、nivalenol (NIV)や deoxynivalenol (DON)が、小麦、大麦およびトウモロコシ等の穀類やそれらの加工品から検出されることが明らかにされ、ヒトや家畜の健康を損なうことが懸念されている(Ali et al., 1998; Sudakin, 2003)。

Trichothecene 系マイコトキシンは体重増加抑制、免疫抑制、下痢、繁殖障害、栄養障害等、動物に対して様々な毒性作用を示し、特に強力な trichothecene 系マイコトキシンである T-2 toxin や diacetoxyscirpenol は消化管の出血壊死、造血リンパ組織の破壊、皮膚や口腔粘膜刺激等、重篤な症状を引き起こすことが知られている(Ryu et al., 1988; Hascheck et al., 2002; SCF, 2002; Rocha et al., 2005)。

Trichothecene 系マイコトキシンはリボソームに結合

することにより蛋白質合成を阻害する他、DNA や RNA 合成阻害作用も有することから、リンパ造血組織や消化管等細胞増殖のさかんな組織が障害されやすい(Hascheck et al., 2002; SCF, 2002; Rocha et al., 2005)。更に、サイトカインや免疫グロブリンの産生促進やアポトーシスを介して、免疫機能に影響を及ぼすことが示されている(Thuvander et al., 1999; Bondy and Pestka, 2000; Pestka et al., 2004)。マウスでは、12 mg/kg/day の NIV を8週間混餌投与することにより、血清 IgA の上昇とメサンギウムへの IgA 沈着といったヒト IgA 腎症様の変化が起こることが報告されている (Hinoshita et al., 1997)。

これまでに、NIV の毒性作用に関する報告はマウスを用いた試験が多く、ラットに関する報告は乏しい。マウスでは、NIV を最高 30 mg/kg/day の用量で12週ないし1年間混餌投与した実験において、用量依存性の体重増加抑制と白血球減少が報告されており、マウスの反復経口投与における low-observed-

adverse-effect-level (LOAEL)は 0.68 mg/kg/day とされている(Ryu et al., 1988; Yamamura et al., 1989)。一方ラットでは、単回急性投与による LD<sub>50</sub> 値が雌雄とも 19.5 mg/kg であったが、0.4 ないし 2.0 mg/kg/day の用量で、15 ないし 30 日間連日強制経口投与を行った場合では、組織学的に明らかな毒性変化は認められていない(川崎ら, 1990)。しかし、15 日間投与を受けた雄ラットにおいて、用量との相関性はないものの白血球の減少が認められている(川崎ら, 1990)。

本研究では、ラットに対する NIV の亜急性毒性作用を評価する目的で昨年度より実施している 90 日間反復投与毒性試験の評価を終了した。

## B. 研究方法

NIV は当研究所衛生微生物部にて精製されたものを使用した。産生菌として *Fusarium kyushuense* (Fn-2B) を用い、角田平板寒天培地(硝酸ナトリウム 2 g, リン酸水素二カリウム 1 g, 塩化カリウム 0.5 g, 硫酸マグネシウム 0.5 g, 酵母エキス 2.5 g, ポリペプトン 5 g, シュクロース 50 g, 寒天 15 g, 精製水 1L) に接種し 25°C, 7 日間, 前培養した。次いで、本培養として、角田液体培地(硝酸ナトリウム 2 g, リン酸水素カリウム 1 g, 塩化カリウム 0.5 g, 硫酸マグネシウム 0.5 g, 酵母エキス 2.5 g, ポリペプトン 5 g, シュクロース 50 g, 精製水 1 L) に、あらかじめ平板培養した Fn-2B を入れ、25°C, 5 日間ジャーにより培養を行った。培養後、ガーゼで 3 回ろ過し菌体を取り除いた培養液に同量のアセトニトリルを加え、よく混和後、硫酸アンモニウムを加え、上層のアセトニトリル層を採取し、濃縮した。濃縮物にメタノールおよびクロロフォルムを加えて溶解後、ヘキサンで平衡化したフロリジルカラムに付加し、その溶出液を乾固し、それを再度、アセトニトリル/メタノール/水に溶解後、ODS 分

取用カラムに付加した。次いで、フザレノン X 画分を集め、透析乾燥後 0.1N アンモニウム/メタノール溶液に溶解し、18 時間反応させた後に濃縮・乾固し、温メタノールで完全に溶解し、4°C で 5 時間放置することにより再結晶化させた。精製した NIV は、LC/MS によって純度 98% 以上であることを確認した(LCMS-2010A; Shimadzu Corp., Kyoto Japan, LC-2010CHT; Shimadzu Corp.)。

混餌投与には NIV を少量のエタノールに溶解した後、粉末基礎飼料(CRF-1: オリエンタル酵母)に混じて投与した。NIV の安定性は 2 週間まで 92% 以上維持されることが確認されたため、飼料の調製は 2 週ごとに行い、調製した飼料は 4°C で保管した。

昨年度までに用量設定試験として、5 週齢の雄 F344 ラット(日本チャールズリバー)を 1 週間の馴化期間の後、一群 8 匹ずつとして計 3 群に群分けし、NIV を 0, 150, 300 ppm の用量で 14 日間混餌投与した。その結果、1 週目から 150 および 300 ppm 投与群において体重減少が認められ、2 週目に 300 ppm 投与群の 1 例が死亡したため、90 日間反復投与毒性試験では 100 ppm を最高用量として設定した。

90 日間反復投与毒性試験においては、5 週齢の雌雄 F344 ラットを用い、1 週間の馴化期間の後、一群 10 匹ずつとして計 4 群にそれぞれ NIV を 0, 6.25, 25, 100 ppm の割合で基礎飼料に混じり、90 日間投与を行った。投与期間中、一般状態を観察し、週に一度の割合で、体重と摂餌量を測定した。動物は全て、投与終了時にエーテル麻酔下で採血を行い、脱血後に屠殺した。全例の血液について多項目自動血球計数装置(K-4500 型, 東亜医用電子株式会社)にて赤血球数(RBC), ヘモグロビン量(Hb), ヘマトクリット値(Ht), 平均赤血球容積(MCV), 平均赤血球血色素量(MCH), 平均赤血球血色素濃度(MCHC), 血小板数(Plt), 白血球数(WBC)の測定を行った他、

血液細胞自動分析装置 (MICROX HEG-120A 型, 立石電機株式会社)にて桿状核好中球 (band-form neutrophils), 分葉核好中球 (segmented neutrophils), 好酸球 (eosinophiles), 好塩基球 (basophils), リンパ球 (lymphocytes), 単球 (monocytes)の分類を行い, 網状赤血球 (reticulocytes)の数も求めた。また, 血清を分離後凍結し, 株式会社エスアールエルに依頼して, 総蛋白 (TP), アルブミン/グロブリン比 (A/G), アルブミン (Alb), 総ビリルビン (TB), 直接ビリルビン (DB), 間接ビリルビン (IB), グルコース (Glu), トリグリセライド (TG), 総コレステロール (TC), 尿素窒素 (BUN), クレアチニン (Cre), ナトリウム (Na), クロール (Cl), カリウム (K), カルシウム (Ca), 無機リン (IP), アスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST), アラニントランスアミナーゼ (ALT)を測定した。

解剖時には脳, 胸腺, 肺, 心臓, 脾臓, 肝臓, 副腎, 腎臓, 精巣, 下垂体, 鼻腔, 眼球, ハーダー腺, 脊髄/脊椎 (頸部, 胸部, 腰部), 唾液腺, 胃, 小腸および大腸, 膵臓, 膀胱, 皮膚, 乳腺, リンパ節 (頸部及び腸間膜), 気管, 食道, 甲状腺, 舌, 胸骨, 大腿骨, 大腿筋, 坐骨神経, 精巣上部, 精囊, 前立腺, 子宮, 卵巣, 臍を摘出し, 脳, 胸腺, 肺, 心臓, 脾臓, 肝臓, 副腎, 腎臓, 精巣については重量を測定した。精巣を除く臓器は 10%緩衝ホルマリン液にて固定し, 精巣はブアン液にて固定を行った。鼻腔, 脊髄, 胸骨, 大腿骨等脱灰が必要な組織については, 10%ギ酸および 10% ホルマリン混合液で脱灰処理を行った。まず雌雄の 0 および 100 ppm 群の全臓器について病理組織学的検索を実施し, 100 ppm 群において投与に関連した病変が認められた臓器に関しては, 6.25 および 25 ppm 群についても検索を行った。臓器は定法に従ってパラフィン包埋後薄切し, ヘマトキシリンエオジン染色を施した。

統計学的解析は, 体重, 血液および血清生化学検査値, 臓器重量について各群の分散を Bartlett の方法で検定し, 等分散の場合は一元配置の分散分析を行い, 不当分散の場合は Kruskal-Wallis の方法により検定を行った。群間に有意差が認められた場合, その多重比較は Dunnett の方法で無処置群と NIV 各群の間で有意差検定を行った。摂餌量については各群の例数が少ないため (3 ケージ/群), 分散分析の後, Student あるいは Welch の *t* 検定を実施した。病変の発生率は Fisher 直接確率検定, 病変のグレードについては Mann-Whitney U 検定によって比較を行った。

(倫理面への配慮)

投与実験は混餌による経口投与が主体であり, 動物の苦痛を最小限に留めた。また, 動物はすべてエーテル深麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し, 動物に与える苦痛は最小限に留めた。また, 動物飼育, 管理に当たっては, 研究所の動物実験に関する指針に従った。

### C. 研究結果

実験期間中に死亡した動物は認められなかった。雌雄共に 100 ppm において軽度の軟便が観察されたが, その他の異常はみられなかった。実験期間中の体重は, 雄の 25 ppm 以上で用量依存的に減少し, 雌の 100 ppm でも減少した (Fig. 1)。個体当たりの摂餌量は, 100 ppm で雄の投与開始後 6 週目までと雌のほぼ全ての試験期間において減少し, 25 ppm では雌の投与期間前半において減少した (Fig. 2)。摂餌量は, 個体当たりでは雌雄とも 100 ppm 群で若干減少したが, 体重当たりに換算すると, 雌では他の群と変わらなかったものの, 雄では減少ではなくむしろ軽度の増加を示した。このことから, 体重当たりの NIV 摂取量は概ね投与濃度に相関していることが確認された (Table 1)。

血液学的検査の結果を Table 2 に示す。雄の 25 ppm

以上で MCV が用量依存的に増加し、100 ppm で MCH の増加及び WBC, RBC, Plt の減少が認められた。また、白血球分画では、100 ppm でリンパ球比率が減少し、好中球比率が増加した。雌では、6.25 ppm 以上で WBC が用量依存的に減少し、100 ppm で Hb, Plt が減少した。

血清生化学的検査では、雄の 25 ppm 以上で TG, TC, Cre, ALT が減少し、100 ppm で A/G, Alb, Cl が増加、TP, Glu, K, AST が減少した (Table 3)。雌では、25 ppm 以上で A/G の増加、TP, TC, Cre, AST の減少が認められた (Table 3)。

臓器重量は、雄の 25 ppm 以上で、脳、肺、心臓、腎臓、精巣の相対重量が用量依存的に増加し、肝臓の絶対重量が用量依存的に減少した。また、100 ppm で、精巣の絶対重量及び脾臓、肺の相対重量が増加し、脳、胸腺、心臓、脾臓、腎臓の絶対重量が減少した (Table 4)。雌では、25 ppm 以上で肺、心臓、脾臓、腎臓の相対重量が用量依存的に増加し、100 ppm で脳、肝臓の相対重量の増加、脳、胸腺、肝臓、腎臓の絶対重量及び胸腺の相対重量の減少が認められた (Table 4)。

病理組織学的検索結果を Table 5 に示す。雌雄共に 100 ppm において、胸腺の萎縮および骨髓造血細胞の減少がしばしば観察された (Fig. 3A, B, C and D)。脾臓では、雌の 100 ppm で軽度の髄外造血が観察されたのみで、雄では組織学的な変化は認められなかった。雌の 100 ppm において、閉鎖卵胞および間質腺の増加が顕著であり、重度の例では黄体を欠いていた。しかし、二次卵胞の数には変化はみられなかった (Fig. 3E and F)。雌の 100 ppm 群では卵巣の病変に伴って子宮は萎縮し、多くの動物で膻は発情前期あるいは休止期の状態を呈した (Fig. 3G and H)。これに対し雄では、精巣および副生殖器に、投与に関連した病変は認められなかった。下垂体前葉では、100

ppm 群の雌雄において、去勢細胞の増加や好塩基細胞の肥大がびまん性に観察された。同様の変化は 25 ppm においても数例認められ、6.25 ppm の雄 1 例では限局性の好塩基性細胞の肥大が観察された。乳腺では、雌の 100 ppm 群のみで腺房増生が認められた。甲状腺では雌雄共に 100 ppm で、扁平な上皮で囲われた大型の濾胞が増加する傾向がみられた。雄の 100 ppm では、副腎皮質束状帯の脂肪滴が他の群と比較して細かく均一な形状に変化していたが、皮質の肥大は認められなかった。雄ラットの腎臓では、近位尿細管において好酸性小体や硝子滴変性が自然発生性の病変として観察されるが (Onodera et al., 1994), 100 ppm 群ではこれらの病変が減少していた。また、雌雄共に 100 ppm で、唾液腺導管の分泌顆粒の減少が観察された。腸間膜リンパ節では 100 ppm において、マクロファージおよび肥満細胞の集積の程度が重度になる傾向がみられた。雌の 100 ppm では、肺胞壁におけるマクロファージ集簇巣の発生頻度が増加した。また、雌雄共に 100 ppm では、副鼻腔上皮の杯細胞の数が増加する傾向を示した。胸骨および大腿骨では、雌雄の 100 ppm において、骨梁の減少と骨幹部の菲薄化がしばしば観察された。その他に自然発生性病変として、肺動脈壁の石灰沈着、肝臓の微小肉芽腫、心筋の微小壊死および炎症細胞浸潤、好塩基性あるいは再生尿細管、膵臓外分泌腺の限局性萎縮が観察されたが、いずれの病変もその発生率に NIV 投与による影響は認められなかった。

#### D. 考察

Trichothecene 系マイコトキシンは蛋白質合成阻害作用を有することから、リンパ造血組織や消化管等細胞増殖活性の高い臓器が標的となりやすい (Ueno et al., 1973; SCF, 2000, 2002; Hascheck et al., 2002)。こ

のことから、本研究において雌雄共に 100 ppm で認められた胸腺の萎縮、骨髄造血細胞の減少や、雌の 6.25 ppm 以上で認められた白血球の減少は、NIV の蛋白合成阻害作用に起因すると考えられた。

Trichothecene 系マイコトキシンは細胞死を介して免疫抑制作用を示す一方、免疫機能を刺激することも報告されている(Bondy and Pestka, 2000; Pestka et al., 2004)。Thuvander らは、*in vitro* において、高用量の NIV はヒトリンパ球の mitogen 刺激による増殖や免疫グロブリン産生を阻害するが、低用量では免疫グロブリン産生を促進することを見出している(Thuvander et al., 1999)。本研究においても、生体内の防御反応の亢進を示唆する NK 細胞の活性増加が NIV を投与した全群において認められており、その効果は低用量群でより明らかであった(窪崎ら、投稿中)。また、血清生化学的に 100 ppm の雄および 25 ppm 以上の雌において、A/G の明らかな増加を認めたにも関わらず、この用量では雄で若干の Alb の増加が認められたのみであったことから、雌雄ともにグロブリンが減少を示しているものと推測され、過去の報告と類似した所見が得られた。一方で、マウスでは NIV 投与によりヒト IgA 腎症に類似した病変が生じることが報告されているが(Hinoshita et al., 1997)、本研究では腎糸球体において NIV 投与による毒性影響は観察されず、血清生化学的検査では血清グロブリンの減少を示唆する所見が得られたことから、IgA 腎症の発症には種差の存在することが示唆された。

これまでの報告で、マウスに最高 30 ppm の混餌用量で NIV を 12 週ないし 1 年間投与した試験において、6 ppm 以上で用量依存的な体重増加率の減少が観察されている(Ryu et al., 1988; Yamamura et al., 1989)。一方、ラットに 0.4 ないし 2.0 mg/kg の NIV を 15 あるいは 30 日間反復投与した試験では、投与

群と対照群との間に体重の差はほとんど認められていない(川崎ら, 1990)。本研究では雌雄とも 100 ppm において、顕著な体重増加抑制が観察された。今回の摂餌量から NIV 摂取量を換算すると 100 ppm 群の雄では 6.9 mg/kg/day、雌では 6.4 mg/kg/day となり、既報の 2.0 mg/kg NIV 反復投与試験より 3 倍以上高い投与濃度であった。100 ppm では摂餌量の減少がみられたものの雄では実験期間の初期に限られていることから、体重増加抑制は単に摂餌量の減少だけでなく、NIV の消化管への毒性による栄養吸収障害等の影響も関与すると考えられる。栄養失調や蛋白質欠乏により、破骨細胞の活性化を伴わない骨梁の消失が引き起こされることが知られているが(Leininger and Riley, 1990)、100 ppm 投与群の雌雄において同様の骨病変がしばしば観察され、投与に起因した栄養状態の悪化が推察された。

Sprando らは、DON を最高 5.0 mg/kg/day の濃度で雄ラットに 28 日間経口投与した実験において、血清卵胞刺激ホルモン(FSH)および黄体ホルモン(LH)が上昇し、血清テストステロンが減少することを見出し、DON が下垂体-精巣軸に影響を及ぼすことを示している(Sprando et al., 2005)。血清 FSH の増加は、DON による下垂体前葉への直接作用あるいはセルトリ細胞のインヒビリン産生阻害によって生じた可能性が考えられ、血清テストステロンの減少は DON 反復投与によるストレスに起因すると推察されている(Sprando et al., 2005)。また CD-1 マウスでは、T-2 toxin に暴露された後に、血清コルチコステロンレベルの上昇等のストレス様反応の生じることが報告されている(Taylor et al., 1989)。本研究において、雌雄の下垂体において FSH や LH 産生細胞を含む好塩基性細胞の肥大や去勢細胞の増加が認められたことや、雌の 100 ppm で観察された卵巣の変化から、雌雄差については不明な点はあるが、NIV 投与に起因する

ストレスにより血清ホルモンレベルが変化した可能性や、NIV が下垂体-生殖軸に直接作用した可能性が考えられる。雌の乳腺、雌雄の甲状腺、雄の副腎で認められた組織学的な変化も、NIV の内分泌系に対する影響かもしれない。

雌の 100 ppm で認められた子宮の萎縮や膣粘膜の変化（発情休止期）については、卵胞発育障害に伴う変化であると考えられた。Fusarium 属菌が産生するマイコトキシン的一种である zearalenone は、エストラジオールに構造的に類似していることから、エストロゲン作用を示す(Kuiper et al., 1998; Hascheck, et al., 2002)が、本実験で使用した NIV には zearalenone の混入がないことを HPLC 解析によって確認している。唾液腺導管部の分泌顆粒はホルモンの影響を受けていることが知られているが(Flynn et al., 1983; Neuenschwander and Elwell, 1990), 雌雄の 100 ppm で顆粒の減少が観察された。同様に、雄ラットの腎臓近位尿細管において、通常観察される好酸性小体や硝子滴変性が 100 ppm 群では減少していた。好酸性小体や硝子滴変性は雄ラットに特有の蛋白質である  $\alpha_{2u}$ -グロブリンの蓄積と考えられているが(Burnett et al., 1989; Ridder et al., 1990), この蛋白質の合成は肝臓において、性ホルモンを含む複数のホルモンによって制御されている(Shapiro and Sachchidananda, 1982; Motwani et al., 1984; Yamasaki et al., 2002)。このような唾液腺および尿細管の組織学的変化に関するメカニズムは不明であるが、NIV の蛋白合成阻害作用だけでなく、ホルモン変動も関与している可能性が考えられる。

TP, TG, TC, AST, ALT の減少のような血清生化学的パラメーターの変動は、毒性学的意義が乏しいものと考えられた。同様に、今回認められた脳、心臓、肝臓等の臓器重量の変化は、体重増加抑制の影響と考えられ、組織学的検索においても、これら

の臓器には投与に関連する病変は認められていない。100 ppm 群において、肺胞壁で観察されたマクロファージ集簇や副鼻腔上皮の杯細胞の増加は、NIV の刺激に対する防御反応であると推測される(Pang et al., 1987; Rogers, 1994)。腸間膜リンパ節におけるマクロファージおよび肥満細胞の集積については、T-2 toxin が肥満細胞の活性化を誘発するという報告があるものの、その発生機序は不明である(Doebler et al., 1992)。

## E. 結論

ラットを用いた NIV の 90 日混餌投与試験を実施した結果、NIV は雌雄の造血・リンパ系組織、下垂体を主体とする内分泌系臓器および雌性生殖器を主体に病変を誘発し、血液学的検査の結果から no-observed-adverse-effect level (NOAEL)は 6.25 ppm (0.4 mg/kg/day)未満であると考えられた。

## 参考文献

- Ali NS, Yamashita A, Yoshizawa T.: Food additives and contaminants 15: 377-384 (1998)
- Bondy GS, Pestka JJ.: J Toxicol Environ Health B Crit Rev 3: 109-143 (2000)
- Burnett VL, Short BG, Swenberg JA.: J Histochem Cytochem. 37: 813-818 (1989)
- Doebler JA, Martin LJ, Morse JD, Ballough GP, Strauss JA, Anthony A.: Toxicol Lett. 62: 33-38 (1992)
- Flynn EA, Yelland KT, Shklar G.: Anat Rec. 206: 23-30 (1983)
- Hascheck WM, Voss KA, Beasley VR.: Handbook of

- Toxicologic Pathology, 2nd edition, Vol. 1, Academic Press, San Diego, CA, pp. 645-700 (2002)
- Hinoshita F, Suzuki Y, Yokoyama K, Hara S, Yamada A, Ogura Y, Hashimoto H, Tomura S, Marumo F, Ueno Y.: *Nephron* 75: 469-478 (1997)
- 川崎 靖, 内田雄幸, 関田清司, 松本清司, 落合敏秋, 臼井章夫, 中路幸男, 降矢 強, 黒川雄二, 戸部満寿夫 : *食衛誌*. 31: 144-154 (1990)
- Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA.: *Endocrinology* 139: 4252-4563 (1998)
- Leininger JR, Riley MG.: *Pathology of the Fischer Rat: Reference and Atlas*, Academic Press, San Diego, CA, pp. 209-226. (1990)
- Motwani NM, Caron D, Demyan WF, Chatterjee B, Hunter S, Poulik MD, Roy AK.: *J Biol Chem*. 259: 3653-3657 (1984)
- Neuenschwander SB, Elwell MR.: *Pathology of the Fischer Rat: Reference and Atlas*, Academic Press, San Diego, CA, pp. 31-42 (1990)
- Onodera H, Mitsumori K, Yasuhara K, Shimo T, Kurokawa N, Takahashi M.: *Eisei Shikenjo Hokoku* 112: 82-88 (1994)
- Pang VF, Lambert RJ, Felsburg PJ, Beasley VR, Buck WB, Haschek WM.: *Toxicol Pathol*. 15: 308-319 (1987)
- Pestka JJ, Zhou HR, Moon Y, Chung YJ.: *Toxicol. Lett*. 153: 61-73 (2004)
- Ridder GM, Von Bargaen EC, Alden CL, Parker RD.: *Fundam Appl Toxicol*. 15: 732-743 (1990)
- Rocha O, Ansari K, Doohan FM.: *Food additives and contaminants* 22: 369-378 (2005)
- Rogers DF.: *Eur Respir J*. 7: 1690-1706 (1994)
- Ryu JC, Ohtsubo K, Izumiyama N, Nakamura K, Tanaka T, Yamamura H, Ueno Y.: *Fundamental and applied toxicology* 11: 38-47 (1988)
- SCF (Scientific Committee for Food). *Opinion on Fusarium toxins. Part 4<sup>1</sup>: Nivalenol*. (2000)
- SCF (Scientific Committee for Food). *Opinion on Fusarium toxins. Part 6: Group evaluation of T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol and deoxynivalenol*. (2002)
- Shapiro LE, Sachchidananda J.: *Endocrinology* 111: 653-660 (1982)
- Sprando RL, Collins TF, Black TN, Olejnik N, Rorie JI, Eppley RM, Ruggles DL.: *Food Chem Toxicol*. 43: 623-635 (2005)
- Sudakin DL.: *Toxicology Letters* 143: 97-107 (2003)
- Taylor MJ, Smart RA, Sharma RP.: *Toxicology* 56: 179-195 (1989)
- Thuvander A, Wikman C, Gadhasson I.: *Food Chem Toxicol*. 37: 639-648 (1999)
- Ueno Y, Sato N, Ishii K, Sakai K, Tsunoda H.: *Applied Microbiology* 25: 699-704 (1973)
- Yamamura H, Kobayashi T, Ryu JC, Ueno Y, Nakamura K, Izumiyama N, Ohtsubo K.: *Food Chem Toxicol*. 27: