

学的研究によってヒトにおいてアフラトキシン（トータルまたは AFB1）の潜在的な発ガン性が検討されている。アフラトキシンの曝露は B 型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルスの可能性もある、の曝露によりリスクは高まる。この関係は、ガン性の潜在性に影響を及ぼしているだけでなく、アフラトキシンの代謝系、生化学的、薬理的なプロセスにも影響を及ぼしている。他の多くの原発性肝ガンの多くの病原因子がアフラトキシン原発性肝ガンのリスクを背景とした疫学的研究の解釈を難しいものになっている。おそらく更なる進歩によって見出された生化学、薬理的なマーカーが正確な曝露評価を可能にするであろう。

アフラトキシン B 2, G 1, G 2 の毒性に関しては、1993 年に行われた IARC の評価後、新たな知見はない。

厚生労働科学研究費補助金研究事業

(食品の安心・安全確保推進研究事業)

総合研究報告書

食品中のカビ毒の毒性および暴露評価に関する研究

II. オクラトキシン A とフモニシンの毒性評価とわが国の汚染実態

主任研究者 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

分担研究者

熊谷 進 東京大学大学院 農学生命科学研究科

広瀬 雅雄 国立医薬品食品衛生研究所 病理部長

佐藤 敏彦 北里大学医学部

研究要旨：国際機関では基準値策定が進んでいるにも関わらず、わが国ではまだその汚染実態が分かっていないカビ毒は数多く存在するが、近年 OTAA (OTA) やフモニシン (FBs) などは、世界中の広い範囲で汚染が報告されてきており、OTA A においてはコーデックスでも JECFA (FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会) の毒性評価が決まり次第基準値策定を行なう予定となっている。このような世界的動向を受け、わが国における行政施策を含めた対策を講じることが必要となっている。そこで、本研究では、OTAA およびフモニシンに関して、現時点において収集可能な毒性に関する報告を調査し、毒性評価を行った。同時に、3年間通年で、わが国に流通している食品を対象に、OTA および FBs の実態汚染調査をおこなった。

OTA の毒性としては、最も腎毒性が強く、バルカン地方で起こる腎症との関連が疑われている。人への発がん性も否定できないが (国際癌研究機関によりグループ 2 B に分類) まだ、その発ガンメカニズムが十分解明されていない。JECFA では暫定一日耐容摂取量を $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/一週間と設定している。FBs は、腎毒性、肝毒性および発がん性が動物実験から明らかになっており、細胞毒性では脂質代謝障害を起こすことが知られている。ヒトにおいては、食道癌との因果関係および新生児の神経管閉鎖障害などとの関連が疑われている。暫定一日耐容摂取量は、フモニシン B1, B2, B3 あわせて又は単独で $2.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ bw/day と JECFA では設定

している。

OTAは、小麦、乾燥果実、コーヒー、ワイン、ビール、グレープジュースなど多食品に汚染している。FBsは主に穀類、トウモロコシに汚染している。わが国での実態調査では、OTAを対象に、23食品目、960検体を分析した。23品目中14品目に汚染が見られたが、その汚染濃度は比較的レベルであった。FBsは3年間通年で17食品目、608検体を測定した。うち12品目において検出されたが、汚染濃度は低レベルであった。

この結果よりOTA汚染食品が多品目にわたることが明らかになった。なお、3年間で分析できた検体数は限られているため、今後寄与率が高く、頻度の高い食品群を対象に検体数を増やしてより詳細な実態調査を行なう必要がある。FBsにおいても同様で、主汚染源であるトウモロコシが輸入依存であることから、さらに詳細な調査を行い、必要に応じて行政施策に反映する科学的根拠となるデータを提供していく。

A. 研究目的

(OTA)は、温帯の寒冷地においてはペニシリウム属によって産生され、熱帯においてはアスペルギルス属によって産生される、いわば世界中の広い範囲で汚染が見られるカビ毒である。そのため、ヨーロッパ諸国、カナダ等では基準値が設定されている。また、JECFA (FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会)やEU (ヨーロッパ連合)などでリスクアセスメントが行われており、我が国でもその毒性評価および汚染実態の把握が急がれている。そこで、本報告では、2001年 JECFA Monograph “Evaluation of Certain Mycotoxins in Food” およびそれ以降に発表された研究報告をまとめ、OTAの毒性に関して最新の知見を収集した。

フモニシン (FBs)は、フザリウム属真菌によって産生されるフザリウム毒素の1つである。FBsの発見は比較的新しく、1988年に

Fusarium moniloforme (現在の *F. verticillioides*) の培養物から発ガンプロモーターとして単離精製され、構造が決定された。その後数多くのFBs (B群、A群、C群、P群) が単離され構造決定されている。そのうち、フモニシン B1, B2, B3 は飼料・食品中に多く検出されることから、B1, B2, B3 をあわせてトータルフモニシン (FBs) と総称している。これらはウマの白質脳症、ブタの肺水腫の原因物質としてすでに同定されている。また、南アフリカ及び中国での食道癌多発地帯において、農産物が著しくこのかび毒に汚染されている事が報告された事から、FBsの発がん性が注目されるようになった。FBsは主にトウモロコシに汚染するが、最近では小麦や大豆にも汚染例が報告されている。そのためアメリカではガイドラインが設定されており、EU (ヨーロッパ連合) においても2007年、新たに基準値が設定され

る。また、JECFA (FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会) や EU (ヨーロッパ連合) の食品科学委員会 (SCF) などでもリスクアセスメントが行われており、我が国でもその毒性評価および汚染実態の把握が急がれている。

そこで、OTA および FBs を対象に諸外国および国際機関で行われている毒性評価を基に検討を行った。

また、これらのカビ毒における汚染実態を把握するために本研究の調査対象とした。

実態調査は3年間数年で行い、調査結果および最新情報を基に必要に応じた食品の見直しを行なった。本研究で得られた結果から、わが国に流通している食品のなかで、これらのカビ毒の汚染頻度および濃度の高い食品が明らかになった。

今後の汚染実態調査対象の設定および暴露評価を行うに当たり、重要な知見となった。

B. 研究方法

1. 毒性評価

(1) OTA の毒性評価

2001年までのOTAの毒性に関しては2001年 JECFA Monograph を参考に検討した。その後の文献は内閣府食品安全委員会の平成16年度食品安全確保総合調査「食品等に係るカビ毒・自然毒のリスク評価に関する情報調査」の調査結果および独自に収集を行なって検討資料とした。

(2) FBs の毒性評価

FBs の毒性に関しては、2003年にSCFで再検討された報告書と、2001年にJECFAにおいて毒性評価されたMonographを参考に行なった。

その後の文献は内閣府食品安全委員会の

平成16年度食品安全確保総合調査「食品等に係るカビ毒・自然毒のリスク評価に関する情報調査」の調査結果および独自に収集を行なって検討資料とした。

2. 我が国における汚染事例の調査

過去の知見に照らしてOTAおよびFBsに汚染されやすいと考えられる食品を収集し、それら食品についてクリーンアップ方法を含め予め検討した分析法を用いて、分析を行なった。対象食品は1年毎に見直しを行い、汚染が検出された食品に関しては検体数を増やしてさらに調査を続け、最新の情報に基づいて、食品目を増やしていった。

(1) 試料：米は農林水産省から提供されたものを、その他の食品は全国各地のスーパーマーケット等で購入したものを、それぞれ分析試料とした。

(2) 分析法

(2)-1. OTA の分析

固体試料はミキサーあるいは遠心粉砕器等で粉砕し、均一になるように良く混合してから、小麦粉・ライ麦粉についてはアセトニトリル-水 (6+4) で、コーン製品・米・オートミール・コーンフレーク・そば粉については塩化ナトリウムを加え、メタノール-水 (8+2) で、レーズン・生コーヒー豆についてはメタノール-1%炭酸水素ナトリウム水溶液 (7+3) でそれぞれ振とう抽出した。ワイン、ビールについては1%ポリエチレングリコール 8000-5%炭酸水素ナトリウム水溶液を加え混合した。抽出物または混合物をろ紙でろ過してから、イムノアフィニティーカラム (r-Biopham-rhone 社, VICAM 社)) でクリーンアップを行なった。メタノ

ール-酢酸 (99+1) で溶出し、HPLC (ODS カラム : 4.6mm i.d. × 250mm、5 μm、移動相 : アセトニトリル-水-酢酸 (55+43+2)、流速 : 1 ml/min、蛍光検出器 : 励起波長 333nm、蛍光波長 460nm) による分析に供した。

(2)-2. FBs の分析

試料をミキサーまたは遠心粉碎器で粉碎し混合してから、塩化ナトリウムとメタノール-水 (3+1) を加え、振とう抽出した。ろ紙 (Whatman No. 4) でろ過し、得られたろ液をイオン交換カートリッジカラム (Bond Elut LRC (VARIAN)) でクリーンアップを行なった。メタノール-酢酸 (99+1) 溶出液を LC/MS (カラム : ZORBAX Eclipse XDB-C18) による分析に供した。

C. 研究結果

1. 毒性評価

(1) OTA の毒性

(1)-1. 急性毒性

LD50 は、経口投与ではマウス 46-58mg/kg (体重当り)、ラット 20-30 mg/kg、ラット新生児 3.9 mg/kg、犬 0.2 mg/kg、豚 1 mg/kg、鶏 3.3 mg/kg であり、腹腔投与ではマウス 22-40 mg/kg、ラット 13 mg/kg、静脈投与ではマウス 26-34 mg/kg、ラット 13 mg/kg であった。経口投与ではげっ歯類より犬、豚の方が感受性は高い。

(1)-2. 腎毒性

OTA のおもな標的臓器は腎臓である。いまままで実験に供されたほ乳類すべてにおいて腎毒性を示しており、組織学的には近位尿細管の萎縮と尿細管皮質間質の繊維性変性、糸球体のヒアリン化が観察される。機能的には尿の濃縮機能の低下、尿中酵素、タンパク、

糖などが増加する。豚ではその感受性もとても高く、0.2mg/kg (0.008 μg/kg bw/day) の投与で腎機能低下をもたらした。この値は現在の暫定週耐容摂取量の根拠ともなっている。

(1)-3. 遺伝毒性および発ガン毒性

OTA は通常の変異原性試験、すなわちエイムス試験などにおいては陰性であったが、マウス腹腔内投与による腎、肝、脾臓細胞における 1 本鎖 DNA 損傷試験や小核試験、不定期 DNA 合成試験、姉妹染色分体交換試験などの変法や bacteria や NIH/3T3 細胞での gene mutations (エイムス変法) で陽性を示すことが報告され、OTA が遺伝毒性を示すことが明らかとなった。

OTA の発ガン性についてはマウスおよびラットにおいてすでに検証されている。ラットでは雌雄に、マウスでは雄のみに腎臓ガンが引き起こされる。ラットの腎では非常に低容量でガン発症が観察されており (70 μg/kg bw)、腎発ガン性における最小作用量はマウスの 1/63 である。さらにマウスでは雌雄ともに肝臓ガンが引き起こされる。これらの結果を受けて 1993 年 IARC は OTA の発ガン性を再評価し、グループ 2B (ヒトに対して発ガン危険性の可能性がある) に分類した。

しかし、OTA の発ガンメカニズムについての確証的な証拠はまだ明らかになっていない。一般的に遺伝毒性による発ガン物質の初期作用は、DNA と化学的に、またはその代謝物が共有結合すると考えられている。そのため、多くの研究者が OTA または OTA の代謝産物と DNA 付加体の検出を試みている。³²P-ポストラベリング法を用いた方法では、最長 2 年間 OTA を投与した結果、腎、肝、脾臓にお

いて OTA 依存の DNA 付加体が発見されているが、この方法は非特異的な方法であるため、DNA 付加体に OTA あるいはその代謝物が含まれているかどうかは証明されていない。放射能標識した OTA を用いたラットの実験においても肝 DNA および腎 DNA から放射能活性は検出されなかった。また、活性酸素のスキャベンジャーで前処理した場合に OTA 付加体の生成抑制が観察されることから、直接 OTA が DNA と付加体を形成するというよりも OTA が活性酸素種を発生させるような細胞毒性を誘発することにより付加体が形成されると考えられている。

OTA の発ガン性および遺伝毒性が発現するメカニズムは未だ不明な点が多く、更なる研究が急務とされるが、今のところ、OTA の生体内変換にはペルオキシダーゼ経路が関与していること、グルタチオン S トランスフェラーゼ活性 (GST) およびチトクローム P450 (おもに CYP2C11) のエポキシゲナーゼが関与していることが示唆されている。すなわち、OTA の酸化還元サイクルによる OTA からキノン OTA への変換が活性酸素生成や脂質過酸化を引き起こす経路と、OTA から直接チトクローム P450 や GST によってヒドロキノン OTA およびその酸化物であるキノン OTA が形成される経路の両者から DNA 切断やエキソサイクリック DNA 付加体形成が起こるのではないかと仮説が考えられている。

(1)-4. その他の毒性

OTA の主たる毒性は腎毒性であるが、その他に免疫毒性、催奇形性毒性、神経毒性、タンパク合成阻害、酵素活性阻害等が報告されている。しかし、これらの毒性を発現するために要する用量は、腎毒性発現量の数倍から

数十倍であるため、OTA の週耐容摂取量は腎毒性発現用量から算出されている。

(1)-5. ヒトへの影響

バルカン諸国 (ユーゴスラビア、ブルガリア、ルーマニア) の特定地域では風土病的に腎疾患が多発し、この地方独特の疾患とみとめられ、バルカン腎症と呼ばれている。時として重篤な場合は死に至る。この疾患はデンマークで報告された OTA が原因とされる豚の腎炎と酷似しており、この地方の人の食物や血清中の OTA 濃度とバルカン腎症の高発生率の間には相関があることから OTA 原因説が根強い。また、この腎症がよく起こる地域では尿道ガンも高い発症率で起こっていることから OTA とヒトの発ガンとの関係も示唆されているが、まだ確証は得られていない。バルカン地方と同様に血液中に高濃度の OTA が検出される人々でも腎疾患を有さない人も多く存在するため、遺伝的な背景や他の原因であることも否定できない。

(1)-6. 体内動態および代謝

OTA は腸管からはゆっくりと吸収され、血液を經由して主に腎臓に分布されるが、肝臓、筋肉、脂肪などにも低レベル分布する。乳への移行はラット、ウサギ及びヒトにおいて観察されるが反芻動物では第 1 胃内で細菌によって代謝されてしまうため、大量に与えたときしか移行しない。吸収後の OTA は門脈から肝臓に運ばれるがそのうち一部は胆汁と主に腸管に排出され、再び腸肝循環で肝臓に戻る。この経路によって OTA の血中濃度は減少し、人への影響を抑えることができるが、急性腸炎の発症を高めることもある。肝臓から胆管への OTA の分泌は有機陰イオンポリペプチド輸送体によって行われている。血液中

の OTA は血清タンパクと強く結合して循環する。このタンパク接合体は糸球体では濾過できず、尿細管から排泄される。ここで排泄されなかった一部の OTA はふたたびネフロンによって吸収され、腎組織中に蓄積される。タンパクに結合した OTA の安定性は高いため、OTA の血液中の半減期は他のカビ毒とくらべると非常に長い。種間で大きな差があるが、マウスでは 24~39 時間であるのにラットでは 55~110 時間、豚では 72~120 時間、マツカッカーサルでは 510 時間、ヒト（ボランティア）では 840 時間に及ぶ。この性質は OTA 摂取を評価するためのバイオマーカーとしても利用されており、食品中の汚染実態とともにヒトの血清中および乳中の OTA 量も暴露評価のための重要な情報となる。

(1)-7. 暫定一日耐容摂取量

JECFA は 1991 年に開かれた第 37 回会議および 1995 年に開かれた第 44 回会議において OTA の評価を行い、発がん性についても議論したが、豚における腎毒性を基礎として評価を行った。その結果 1991 年に、豚における NOAEL である $8 \mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}$ に安全係数 500 を乗じて、週耐容摂取量 $112 \text{ ng}/\text{kg bw}$ と設定したものであるが、1995 年に JECFA は再評価して $100 \text{ ng}/\text{kg bw}$ と丸めた。カナダ政府機関は暫定一日耐容摂取量を $1.2\text{--}5.7 \text{ ng bw}/\text{day}$ としている。

(2) FBs の毒性

(2)-1. 構造および物理化学的性質

FBs の構造は炭化水素鎖とアミノ基で構成され、分子量は 700 以上あり、カビ毒としては比較的大きな分子である。食品汚染が問題となる FB1, B2, B3 のうち、含量、頻度が高く

最も毒性が強いのは、FB1 である。FB1 は分子量が 721, 分子式が $\text{C}_{34}\text{H}_{59}\text{NO}_{15}$ で、水溶性の物質である。

(2)-2. 毒性

FBs の急性毒性は非常に低く、 LD_{50} は報告されていない。ウマやブタでは、白質脳症や肺水腫など FBs が原因とされる疾病が報告されている。培養液から抽出された FBs でも、ウマにおいては白質脳症を起こし、ブタに対しては肺に水腫を起こすことが確認された。ブタでの標的臓器は肺、肝臓およびすい臓と報告されている。

げっ歯類においては、FB1 の毒性は血統および性によって異なっている。たとえば、BDIX 血統の雄のラットは、FB1 の肝毒性影響において他の血統種より感受性が高かった。一方 Fischer 344N, Sprague-Dawley, RIVM:WU 血統のラットは、腎毒性の影響において、より感受性が高かった。マウスでは、腎臓より肝臓の方が感受性が高く、雌は雄より敏感であった。長期給餌試験では、FB1 は、肝臓ならびに腎臓の腫瘍を誘発した。Fischer 344 ラットにおける腎臓癌および腎毒性の無影響濃度 (NOEL) はそれぞれ、 $0.67\text{mg}/\text{kgbw}/\text{day}$ と $0.2\text{mg}/\text{kg bw}/\text{day}$ であった。給餌による摂取を制限した雄の BDIX ラットおよび雌の B6C3F1 マウスの肝臓癌の NOEL はそれぞれ、 $0.8\text{mg}/\text{kg bw}/\text{day}$ と $1.9\text{mg}/\text{kg bw}/\text{day}$ であった。

FB1 の発がん性はげっ歯類では実証されたことから、2002 年に国際癌研究機関により、ヒトへの発がん性の可能性があるクラス (グループ 2B) に分類された。しかしヒトでの発がん性との因果関係を確認付ける疫学調査はまだ出されていない。

(2)-3. 毒性機序

FBs の構造は動物細胞の膜脂質構成物質であるスフィンゴシンに類似していることから、スフィンガニンのアナログとしてスフィンゴリピッド生合成系における N-アシルトランスフェラーゼの働きを阻害する。FBs のこのような毒性機序がどのように発症に関わっているかは不明な点も多いが、スフィンゴ脂質代謝の失調やグリセロリン脂質代謝への影響が、間接的に疾病の発症に関わっていると考えられている。また血液中のスフィンガニン/スフィンゴシン濃度の割合 (Sa/So) は、FBs 暴露により影響を受けることから、FBs 汚染のバイオマーカーとして使われている。

(2)-4. ヒトへの影響

最近報告された FBs の新しい毒性としては、神経管閉鎖障害がある。1990 年から 1991 年にかけて、テキサス-メキシコ国境付近で神経管閉鎖障害の出生児が他の地域に比べ 2 倍に増加した。キャメロン郡だけで 6 週間のうちに 6 人の無脳症又は脳不全児が生まれた。調査の結果近隣の郡で神経管障害発症率が高いことがわかった。1992 年にこの流行は終息したが、テキサス保健当局は、発症の多かった年のトウモロコシに FBs が高濃度に含まれていたことやその地域の馬に FBs による致死性脳疾患が流行していたことから、トウモロコシに汚染する FBs との因果関係を疑った。その後の詳細な調査研究が行なわれ、メキシコで主食として食されているトルティーヤの消費量と FBs 暴露と神経管閉鎖障害リスクの関連についての研究結果が報告された。この研究によれば、妊娠期間の最初の三ヶ月に 300-400 枚のトルティーヤを食べた場

合、100 枚以下の場合に比べて神経管閉鎖障害の子ども生まれるリスクは 2 倍以上となる。また血液検体からも血中 (Sa/So) 変動と神経管障害リスクに相関関係があることが示唆された。しかし新しい研究が発表されてもテキサスでの流行が FBs のせいであるかどうかは不明である。当時のトウモロコシは残っていないので決定的な証拠とはならないが今後さらに研究を進めていく必要がある。

FBs の摂取とヒト癌との関連については、FBs 発見当時から食道癌の原因の可能性が示唆されてきた。今回 SCF での毒性評価の結果、肝臓癌、食道癌の発症リスクの高い地域別に、FBs で汚染された食品標本の割合および汚染の程度に関して、当該地域間で比較検討された。その結果 FBs 摂取の測定は間接的であり、疾患の発生は特定食品、特にトウモロコシの摂取と関係づけられた。しかし、偏差、偶然、交絡要素を除外することはできなかった。従って、FBs の単独での発癌性影響の証拠は限定されたものでしかなかった。

(2)-5. 体内動態および代謝

FBs は消化管から吸収されにくく、急速に循環、排出される。吸収された FBs の大部分は肝臓と腎臓に保持され、ラットにおいては FB1 は、血漿よりも肝臓と腎臓に長く留まる。妊娠したラットとウサギにおいては、非常に低濃度の FB1 が子宮および胎盤において検出された。しかし胎児には FB1 は一切検知されず、胎盤通過がないことが示された。最近の神経管閉鎖障害との因果関係を明らかにする研究が多くなされるようになったが、これらの研究によると一部のマウスにおいては胎盤通過が疑われているケースもあり、今後

の更なる研究が必要であろう。FBs は、薬物代謝に関係するチトクローム P450 酵素により代謝されないが、FB1 はスフィンゴ脂質合成を変えるメカニズムを通じてこれらの酵素の活性を抑制することが考えられている。

(2)-6. 一日耐容摂取量

2000 年に行なわれた SCF では、数系統のラットを用いて行なわれた長期摂取試験の結果をもとに、腎毒性を発現する FB1 量が、他の毒性発現用量に比べて最も低く NOEL が 0.2mg/ kg bw/day だった。FBs は遺伝原性がないので NOEL の数値に安全係数 100 を乗じて、FB1 の暫定一日耐容摂取量を 2 μ g/kg bw/day と設定した。2001 年の JECFA での毒性評価では FB1, B2, B3 の合計で 2 μ g/kg bw/day と設定している。

2. 3 年間の汚染実態報告

(1) OTA

本研究事業で調査した食品目は次のとおりである。

ビール、ポップコーン、コーンフレーク、コーングリッツ、スイートコーン、オートミール、ワイン、レーズン、おせんべい、小麦粉、米、そば粉、グレープジュース、ココア、焙煎コーヒー、生コーヒー豆、インスタントコーヒー、缶コーヒー、鰹節、チョコレート、ソバ、ライ麦、パスタ。

これらのうち、コーンフレーク等のとうもろこし製品、せんべい、かつお節、米およびその加工品からは検出されなかったが、パスタ、レーズン、ワイン、ビール、生コーヒー豆、焙煎コーヒー、そば粉、そば麺、ライ麦粉、小麦粉、オートミールの一部から最大

13.3 ng/g の汚染が、また、ココアの全て、チョコレートとインスタントコーヒーの大部分から最高 4.25 ng/g の汚染が認められた (表 1)。汚染食品における平均汚染濃度は、缶コーヒーの 0.02ng/g からオートミールの 1.36 ng/g の間であり、比較的低レベルであった。EU の基準値を超えていたものは 13.3 ng/g のオートミールと 12.5 ng/g のレーズンだけであった。

わが国の主食である米においてはまったく汚染が見られなかったため、早急に健康被害を引き起こす危険はないと考えられるが、わが国で消費量が多いと考えられるソバや近年消費量が増加する傾向にあるパンやパスタにおいて汚染が検出されていることから、より数を増やして実態調査を行い、その頻度および汚染濃度を詳細に調査することが必要である。

(2) FBs

本研究事業で調査した食品目は次のとおりである。

コーングリッツ、生トウモロコシ、ビール、ポップコーン、ソバ、そば粉、コーンスターチ、雑穀米、米、大豆、大豆加工品、押し麦、スイートコーン、コーンフレーク、コーンスープ、コーンスナック。

これらのうち、コーンスターチ、スイートコーン、コーンスープ、米からは検出されなかったが、コーンスナック、コーングリッツ、ポップコーン、コーンフレーク、大豆、ビールの多くより、FB1 が検出された。汚染が検出された食品目ごとの平均汚染濃度は、FB1 として 4.46ng/g から 73.2 ng/g の範囲であった。

ポップコーンから比較的高い頻度で FBs が

検出されており（最高汚染量 453 ng/g）、大豆・大豆加工品からも微量ながら検出された。（4.46–4.68 ng/g）。

D.考察

OTA はアスペルギルス属およびペニシリウム属の数種のカビによって産生されるカビ毒で、世界中の穀類やコーヒー豆、豆類、乾燥果実などに汚染している。また、熱に安定であることから加工品であるコーヒー、ワイン、ビール、グレープジュースにも高頻度で残存する。家畜の飼料からも移行し、腎臓、肝臓及び血液なども汚染しているため、畜産加工品に対する汚染実態の把握も必要となる。OTA は生体内では血清アルブミンと結合体を作り比較的長期間残存することから、ヒトの血液中の OTA 濃度を測定することによりその暴露状況が推察できる。食品やヒトの血液試料においての OTA 汚染の研究から、OTA の暴露が世界中で頻度高く起こっていることが示された。

OTA はげっ歯類に発がん性があり、催奇形性、免疫毒性および神経毒性を有する腎毒性カビ毒である。さらにバルカン腎症と尿管ガンの発症に関与する因子であると言われている。また、フランスおよび北アメリカのデータから慢性間質腎炎と OTA の高濃度暴露との相関が指摘されている。

OTA の毒性評価および規制に対しての取り組みはヨーロッパ諸国および国際機関で行われている。SCF の 1994 年に発表されたオピニオンでは、OTA は腎毒性であり発ガン性がある因子の可能性が有することおよび遺伝毒性を有していることが明言されている。遺伝毒性影響はタンパク合成機能低下などの間

接的なメカニズムにより説明できるとしている。

OTA の汚染実態報告は、1990 年 European Commission: EC（欧州委員会）が確立した SCOOP Task (Scientific co-operation task) 3.2.2 “Assessment of dietary intake of Ochratoxin A by the population of EU Member States” により報告されている調査が、最も大規模なものである。1999 年に調査した結果を 2002 年に報告している。それによると、穀類ではライ麦 (53.2%) が最も汚染率が高く、ワイン、コーヒーおよびレーズン等の乾燥果実の汚染率も高く注目されている。ヨーロッパ以外の国では、韓国、ブラジル、日本の汚染実態が報告されているが、韓国での穀類の検出率は 12.5% と比較的低かった。ブラジルではグレープジュースで 70.8–87.5% の高い検出率であった。

本研究事業で行われている我が国の汚染実態調査の結果では、ココアやインスタントコーヒー、チョコレートでは 85% 近く、パスタ、小麦粉から 50% 以上、そばからは 32% が検出されたが、汚染濃度はレーズンを除いて比較的 low だった。

血清中の OTA を測定することによって、ヒトにおける暴露の程度が直接的に測定することができる。ドイツ、イタリア、ノルウェー、スペイン、スウェーデン、イギリスの 6 カ国から提供された血清中の OTA の汚染データが 2002 年に SCOOP Task により報告されたが、これらの国においては 84.6–100% の汚染頻度であった。平均汚染濃度はスペインが一番高く 1.19 $\mu\text{g/L}$ であった。我が国の OTA 汚染レベルも 1992–1996 年に東京で調査されており、汚染濃度は低いが、184 人中 156 人

に OTA 汚染が認められている。この結果はわが国において、その程度は他の国と比べ非常に低いレベルであるが、暴露は起こっていることを示している。日本人が日常的に良く食するソバに OTA が検出されているが、EU の基準値を超えたものは 1 検体も存在しなかった。しかし、わが国の汚染原因食品を特定し、より検体数を増やし、正確な暴露評価を行うことが重要である。

2001 年に開かれた JECFA では CODEX 委員会の要請を受け OTA の基準値を $5\mu\text{g}/\text{kg}$ または $20\mu\text{g}/\text{kg}$ とした場合の健康被害へ与える影響を評価したが、ヨーロッパアンタイプの食生活をしている場合 95% タイルまでの人々にはその基準値の差は有意なものではないと結論付けた。それを受けて 2003 年に開かれた CODEX 委員会総会では小麦、大麦およびライ麦およびその加工品に対しての OTA の最大基準値設定を討議したが、発ガン性のメカニズムに関する知見が乏しいと判断し、未だ結論に至っていない。今後の予定では 2006 年までに各地域からデータ収集を行い、2007 年 6 月に JECFA で暴露評価と毒性の再評価されることになっている。2004 年の CCFAC 部会においては OTA の最大基準値設定は小麦、大麦、ライ麦に限定することが合意されている。既に汚染実態調査および暴露評価を行っている EU では、ソバやコメを含む穀類では $5\mu\text{g}/\text{kg}$ 、穀類由来食品では $3\mu\text{g}/\text{kg}$ 、乾燥ブドウでは $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 、ワインおよびグレープジュースでは $2\mu\text{g}/\text{kg}$ に基準値を設定した。ベビーフードおよび幼児・子供用の穀物由来加工品と医療目的の幼児用食品についても $0.5\mu\text{g}/\text{kg}$ としている。

OTA の腎毒性および発ガン性は最も重要な

毒性と考えられているが、そのメカニズムは未だ解明に至っていない。今後は遺伝毒性及び発ガンの分子メカニズムの解明することさらにヒトの遺伝子多型との関連を解明することが急務となっている。

FBs は、ブタの肺水腫やウマの白質脳炎の原因物質であり、げっ歯類においては、肝毒性、腎毒性および発ガン性を有する。ヒトでの健康被害としては、食道がんや新生児の神経管閉鎖障害などが疑われている。FBs はその構造から細胞内の脂質代謝を阻害する作用を有するが、この毒性と FBs が原因でおこる疾病との関係を解明することが急務である。

今後期待される研究としては、FBs の発ガン性メカニズムや、神経管閉鎖障害の疫学的研究、脂質代謝異常を介した細胞表面上のレセプターの変化と疾病(感染症)の関連に関する研究などが挙げられる。

FBs の汚染実態報告は、2001 年の SCOOP Task の報告によると、とうもろこしでは平均汚染濃度 $357\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、ポップコーン $80\mu\text{g}/\text{kg}$ 、コーンフレーク $46\mu\text{g}/\text{kg}$ 、小麦粉では $15\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。この結果を受けて EU では大規模な暴露評価を実施しているが、計算の基となった FB1 の濃度の平均値として $1.4\text{mg}/\text{kg}$ (未加工トウモロコシ) が使われている (中央値 $0.42\text{mg}/\text{kg}$)。またカビ毒は年毎の汚染能の変動が激しいが、いずれかの年の国際貿易における健康なトウモロコシ中の FB1 の平均濃度は、 $0.2\text{mg}/\text{kg}$ と $2.5\text{mg}/\text{kg}$ の間であると予想している。2003 年にオランダで行なわれた暴露評価の結果では、生涯にわたって暴露する FB1 の量は平均中央値で $0.03\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}$ であるとしている。

わが国の汚染実態調査では、大豆や小麦から検出はされるものの、主な汚染源はトウモロコシである。現在のところそれぞれの食品における平均汚染濃度は 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下であり、EU で行なわれた暴露評価に用いられた値に比べると非常に低いレベルにある。しかしわが国は輸入トウモロコシに依存しているため、今後もモニタリングを続け、必要とあれば基準値を設けるべきであろう。また、本研究により、わが国でもトウモロコシ以外の食品からも FBs が検出することが明らかとなり、食品の種類を多様にして実態調査をすすめるとともに、いままで検出された食品群においてはその検体数を増やし、適切な暴露評価を可能にする必要がある。

さらにトウモロコシは、アフラトキシンや、デオキシニバレノール、ゼアラレノンなどのフザリウム毒素も頻度高く汚染している。これらの複数のカビ毒の毒性に関する研究は始まったばかりであるが、今後加速度的に発展していかなければならない分野である。

E.参考文献

JECFA (2001) Safety evaluation of certain mycotoxins and food. WHO Food Additives Series 47.

IARC: (2002) International Agency for Research on Cancer (IARC) - Summaries & Evaluations, Fumonisin, 82

Bolger, M., Coker, R.M., DiNovi, M., Gaylor, D., Gelderblom, W., Olsen, M., Paster, N., Riley, R., Shephard, G. and Speijers, G.J.A. (2001). In: Safety evaluation of

certain mycotoxins in food: Fumonisin. Prepared by the 56th Meeting of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives(JECFA), WHO Food Additives Series No 47. Pp 104-275, World Health Organization, Geneva, International Programme on Chemical Safety.

EHC (2000). Fumonisin B₁. Environmental Health Criteria 219, Pp 1-150. International Programme on Chemical Safety. World Health Organization, Geneva.

SCOOP (2003). Report on tasks for scientific cooperation. Reports of experts participating in task 3.2.10, April 2003. Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU Member States. D. Subtask III:Fumonisin. European Commission, Directorate-General Health and Consumer Protection, Brussels, 485-577. (http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/index_en.html, September 2003)

Van Egmond, H.P. and Jonker, M.A. (2003). Current Mycotoxin Limits and Regulations in Food. Accepted for publication in: Mycotoxins in food: detection and control. N.Magan and M. Olsen(Eds.) Woodhead Publishing Ltd. London, 2004.

Bakker, M.I., Speijers, G.J.A., Paulsch, W.E., van Egmond, H.P., Risk assessment of fumonisin B₁ in Netherlands, RIVM report 310301001/2003

F.研究発表

I. アフラトキシンの毒性評価とわが国の暴
露評価を参照

G.知的財産権の出願登録状況

なし

表1 平成16年度から平成18年度までのオクラトキシンA汚染実態調査結果

オクラトキシンA 3年間 食品目 23 検体数 960

検出された品目と検数	Av					
	H16	H17	H18	合計	汚染件数	OTA 範囲
ビール	20	20	21	61	38	0.033 0.010-0.445
ポップコーン	/	5	5	10	0	
コーンフレーク	20	15	10	45	0	
コーングリッツ	5	5	5	15	0	
スイートコーン	30	20	/	50	0	
オートミール	20	14	20	54	14	1.36 0.06-13.3
ワイン	10	23	20	53	16	0.264 0.02-1.29
レーズン	10	10	10	30	2	1.32 0.07-12.5
おせんべい	/	/	21	21	0	
小麦粉	50	50	30	130	69	0.21 0.06-0.57
米	50	30	10	90	0	
そば粉	10	10	5	25	8	0.44 0.159-1.791
グレープジュース	/	10	10	20	0	
ココア	/	/	21	21	21	0.85 0.12-3.45
焙煎コーヒー	9	10	10	29	13	0.358 0.106-0.922
生コーヒー豆	10	10	/	20	5	0.395 0.108-0.763
インスタントコーヒー	/	10	26	36	35	0.821 0.117-4.234
缶コーヒー	/	/	20	20	2	0.024 0.024-0.024
鰹節	/	/	22	22	0	
チョコレート	/	41	32	73	64	0.25 0.02-0.94
ソバ	/	40	25	65	25	0.33 0.1-1.48
ライ麦	10	10	10	30	17	0.63 0.05-2.59
パスタ	/	20	20	40	26	0.485 0.11-1.66

表2 平成16年度から平成18年度までのフモニシン汚染実態調査結果
 フモニシン 3年間 食品目数 17 検体数 608

	H16			H17			H18			合計	汚染件数(B1)	B1		B2		B3	
	H16	H17	H18	H16	H17	H18	Av	範囲	Av			範囲	Av	範囲			
コーングリッツ	10	10	10	15	35	35	69.1	3.2-453	19.8	2.0-105	12.6	2.0-72.7					
生トウモロコシ	18	10	10	10	38	38	2.14	2.14									
ビール	15	13	15	15	43	43	2.45	2.2-2.9	18.3	2.0-94.0	10.8	2.0-64.0					
ポップコーン	30	20	20	20	50	50	73.1	2.8-354									
そば	10	10	10	10	10	10											
そば粉	10	10	10	5	15	15	27.4	6.6-62.7	11.1	5.4-16.7	7.1	7.1					
コーンスターチ	10	10	10	10	10	10	6.3	6.3									
雑穀米	11	11	10	10	21	21											
米	20	20	20	22	42	42	4.46	3.27-6.1	4.38	4-4.75							
大豆	10	10	10	10	10	10	4.68	2.13-8.00	4.00	4.00							
大豆加工品	20	20	20	20	40	40											
押し麦	51	32	29	29	112	112	9.86	4.26-36.0	14.8	14.8							
スイートコーン	13	13	9	9	22	22											
スイートコーン(汁)	30	15	16	16	61	61	23.4	9.05-59.0	7.75	7.75							
コーンフレーク	29	20	20	20	69	69	5.46	4.32-6.26	8.88	2.1-26	6.18	2.1-17.4					
コーンスナック	20	20	20	20	20	20	43.2	2.0-124									

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90日間反復投与毒性を評価した。初年度である16年度は、雄性F344ラットにおけるNIVの14日間混餌投与による予備試験を実施した。投与用量は25, 100 ppmとし、無処置対照として基礎食のみの群も設定した。その結果、精巣において25 ppm以上でごく軽微で用量反応性がはっきりしない精細管変化を認めたのみで(有意差無し)、予備試験の再検討が必要と考えられた。17年度は、用量を変えて14日間の予備試験IIを再度実施したところ、投与1週目に150 ppm以上で体重減少、2週目では150 ppmで体重増加抑制、300 ppmで体重減少と共に途中死亡例が1例認められたが、精巣毒性は再現されなかった。この結果を踏まえ、本試験として、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、骨髄造血細胞の減少、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影響が観察された。また精巣毒性は認めなかった。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 系マイコキシンはリポ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 LD₅₀ 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、16年度は、予備実験として、NIV を 0, 25, 100 ppm の割合で基礎飼料に混じて 14 日間の反復投与試験を実施した。16年度の試験の結果、精巣のごく軽微な変化以外に NIV による毒性を示唆する変化が確認されなかったため、17年度は、最高用量を 300 ppm として、再度、用量設定試験を実施し、それによ

て得られた結果をもとに90日間反復投与毒性試験を実施した。18年度は、17年度に開始した90日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, リン酸水素ナトリウム 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, リン酸水素ナトリウム 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 1L) 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週ごとにを行い、調製した飼料は4°Cで保管した。

16年度の用量設定試験Iでは、動物は、5週齢の雄性 F344 ラット(日本チャールズリバー)を用い、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、それぞれの群について NIV を 0, 25, 100 ppm の割合で基礎飼料(CRF-1:オリエンタル酵母)に混じり、14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。投与終了時にエーテル麻酔下で採血を行い、脱血後、動物を屠殺し、脳、胸腺、肺、心臓、脾臓、肝臓、副腎、腎臓、精巣、小腸を採取し、小腸以外の臓器については重量を測定した。次いで、胸腺、脾臓、肝臓、腎臓、副腎は10%緩衝ホルマリンに浸漬固定し、小腸はホルマリン注入後、同様に浸漬固定した。精巣に関しては、ブアン液にて固定を行った。ホルマリン固定組織は3日後に、ブアン固

定組織は翌日に切り出しを行い、定法に従いヘマトキシリン・エオジン染色切片を作製し、病理組織学的に検索を行った。また、採取した全血を用いて塗抹標本作製し、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。

17年度に実施した用量設定試験IIにおいては、5週齢の雄 F344 ラット (日本チャールズリバー)を用い、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、それぞれの群について NIV を 0, 150, 300 ppm の割合で基礎飼料 (CRF-1: オリエンタル酵母)に混じり、14日間投与を行った。実験期間中に体重、摂餌量及び解剖後の臓器重量を測定し、血液学的検査を実施した。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、脳、胸腺、肺、心臓、脾臓、肝臓、副腎、腎臓、精巣、小腸を採取し、小腸以外の臓器については重量を測定した。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、前述した方法で白血球百分率を求めた。

用量設定試験II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。即ち、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前述したような白血球百分率を含む血液学的検査を行った。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、脾臓、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、精巣上体、精囊、前立腺、子宮、卵巣、膈を摘出し、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Dunnnett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

16年度の用量設定試験Iでは、実験期間中の体重及び摂餌量は、投与により明らかに変動を示さなかった。末梢血中の白血球分画にも明らかな変動は認められなかった。解剖時の脳、胸腺、肺、心臓、脾臓、肝臓、副腎、腎臓、精巣の重量を測定した結果、25 ppm群で肝臓の相対重量が若干の低値を示した以外は、絶対・相対とも明らかな変動を示さなかった。胸腺、脾臓、肝臓、腎臓、小腸、精巣の病理組織学的検索の結果、肝臓で微小肉芽腫、腎臓で限局性再生尿細管等のごく軽度の自然発生性病変が対照群を含む少数例に認められたが、投与に起因する発生頻度や病変の増強は認められなかった。精巣においては、精細管腔へのごく軽度の細胞残屑の出現が対照群を含む殆どの例に認められたが、セルトリ細胞の空胞変性や、精細管中の精上皮細胞の部分的な脱落病変も認められ、その出現例が有意差はないもののNIV投与により増加傾向を示した。

17年度の用量設定試験IIの結果、投与1週目に150 ppm以上で体重が減少し、2週目では150 ppmで体重増加抑制、300 ppmで体重減少と共に途中死亡例が1例認められた。個体あたりの摂餌量は150 ppm以上で減少した。また、2週目に150 ppmでは軟便が、300 ppmでは下痢が観察された。血液学的検査においては、150 ppm以上でMCV、MCHが減少し、300 ppmでRBC、Hbが増加、Pltが減少した。また、150 ppmでのみWBCが減少した。臓器重量は、150 ppm以上で胸腺、肝臓の絶対重量が用量依存的に減少し、300 ppmで脾臓、腎臓、精巣の絶対重量、胸腺の相対重量の減少及び腎臓の相対重量の増加が認められた。また、150 ppmのみで肝臓、精巣の相対重量が増加した。

90日間反復投与毒性試験の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。個体当たりの摂餌量は、100 ppmで雄の投与開始後4週目までと雌のほぼ全ての試験期間において減少した。また、雌雄共に100 ppmにおいて軽度の軟便が観察された。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。血液学的検査では、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。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。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。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。

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。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。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。

血液学的検査の結果、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。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。

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。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。

病理組織学的検索の結果、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。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。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。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、唾腺液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。その他に自然発生の病変として、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

16 年度の用量設定試験 I で用いた混餌投与による最高用量 (100 ppm) は、体重を 200 g、1 日当たりの摂餌量を 15 g として換算した場合、7.5 mg/kg/日の投与量で、用量としては既報告例より 3 倍以上高い濃度であったものの、14 日間の投与で標的と考えられる臓器・組織に明らかな毒性影響を認めなかった。このことから、NIV による毒性発現を捉えるためには、投与濃度を高く設定して 14 日間投与試験を再度実施する必要があり、その結果、高用量のみで毒性が発現した場合、1 年間の慢性毒性試験の実施に踏み切るより、慢性毒性試験成績と同様に、ラットで未だ報告のない 90 日間亜慢性毒性試験の実施を考慮すべきであると考えられた。また、用量設定試験 I で、NIV 投与に関連して新たに見出された、セルトリ細胞の空胞変性や、精細管中の精上皮細胞の部分的な脱落等の精巣変化は、かなり微弱であり、同様に、追試による確認が必要であると考えられた。

17 年度に、最高用量を 300 ppm として用量設定試験 II を行ったところ、300 ppm では投与 1 週目から体重が減少し、2 週目には途中死亡例が 1 例認められた。150 ppm においても投与 1 週目に体重が減少した後に、2 週目に強い体重増加抑制が認められた。また、投与 2 週目には、150 ppm で軟便が、300 ppm で下痢が観察され、消化管に毒性影響が生じている可能性も考えられた。その結果を踏まえ、100 ppm を最高用量として 90 日間反復投与毒性試験を実施することとした。

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、骨髓造血細胞の減少や、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。

NIV に関するこれまでの報告で、マウスに最高 30 ppm の摂餌用量で 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、血清卵巣刺激ホルモン(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トリ細胞のインヒビ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様反応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-生殖器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陰粘膜の変化(発情休止期)については、卵巣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 α_{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 の蛋白質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)。