

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 で 5 日間, ジャーにより培養を行った。培養後, ガーゼで 3 回ろ過して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.)。

混餌飼料には, NIV を少量のエタノールに溶解した後, 粉末基礎飼料 (MF: オリエンタル酵母工業) に混じて投与した。混餌飼料中における NIV の安定性は, 2 週間まで 92% 以上維持されることが同様の基礎飼料を用いて確認されているため, 飼料の調製は 2 週間ごとに行い, 調製した飼料は 4°C で保管した。

実験的 IgA 腎症モデルの作出として, 5 週齢の雌 Balb/c マウス (日本エスエルシー) を 1 週間の馴化期間の後, 一群 8 匹ずつとして計 6 群に群わけし, NIV を 0, 12, 24 ppm の用量で 4 週間ならびに 8 週間混餌投与した。さらに, IgA 腎症の自然発症モデル動物である HIGA マウス (日本エスエルシー; 雌 5 週齢を 1 週間馴化後に使用) を一群 8 匹ずつ計 2 群に群分けし, NIV を 0 ないし 24 ppm の用量で 4 週間ならびに 8 週間混餌投与して HIGA マウスの IgA 腎症病態進行に対する NIV の影響を解析した。NIV の投与量及び投与期間については, Hinoshita ら (1997) による, C3H 系マウスを用いた NIV

誘発 IgA 腎症モデルを参考に, 最高用量を 24 ppm とし, 用量反応関係をみるために 12 ppm 投与群を設定した。投与期間中, 一般状態を毎日観察し, 週に一度の割合で体重, 摂餌量並びに摂水量を測定した。動物は全て, 投与期間終了時にエーテル麻酔下で採血を行い, 放血後に屠殺した。各群 5~6 例 (4 週間投与) ないし 6~8 例 (8 週間投与) の動物から得られた血液について血清分離を行い, 株式会社エスアールエルに依頼して, 血清中 IgA 及び IgG 濃度を測定した。なお, 分離血清は, 測定時まで -80°C にて保存した。

解剖時には, 腎臓を摘出して重量を測定後, 短軸・長軸方向に半割した組織について, 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定するか, OCT compound にて包埋後, ドライアイス上で急速凍結した。ホルマリン固定標本については, 定法に従ってパラフィン包埋後薄切, ヘマトキシリンエオジン染色ならびに PAS 染色を施した。凍結組織材料については, クリオスタットにて約 4 μ m に薄切し, -20°C で 5 分間アセトン固定した切片について, 蛍光免疫染色を実施した (8 週間投与)。すなわち, 糸球体における IgA ならびに IgG 抗体の沈着について, immunoglobulin A (goat anti-mouse IgA, x1000 dilution: KPL) ならびに immunoglobulin G (goat anti-mouse IgG, x500 dilution: KPL) 抗体を一次抗体として用い, FITC 標識 anti-goat immunoglobulins (x100 dilution: DAKO) 抗体を二次抗体として, 励起波長 488 nm, 蛍光波長 520 nm 前後において得られる緑色蛍光を共焦点レーザー顕微鏡 (Confocal Laser Scanning Microscope, TCS NT; Leica) を用いて観察した。

糸球体における IgA 及び IgG 分布及び強度については, 各群全例について 200 倍視野で 1 個体につきランダムに 5 ヶ所観察し, 0~3 のスコアをつけて評価した。

統計学的解析は, 体重, 血清 IgA・IgG 濃度, 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, 不等分散の場合は 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 の方法で無処置対照群と NIV 投与の各群間で有意差検定を行った。HIGA 実験における多重比較については、Balb/c マウスの対照群、HIGA マウスの対照群、HIGA マウスの NIV 24 ppm 投与群における全群比較を行い、等分散の場合は Tukey の多重比較を、不等分散の場合は Steel-Dwass の多重比較検定を行った。

(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後大静脈からの放血により屠殺し、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、国立大学法人 東京農工大学の実験取り扱い倫理規定に従った。

C. 研究結果

Balb/c マウスを用いた実験的 IgA 腎症モデルの作出 (実験 1) :

実験期間を通じて、死亡動物及び一般状態の変化は認められなかった。実験期間中の体重は、24 ppm で投与 4~6 週目にかけて、12 ppm では投与 6 週目において減少した (Fig. 1) が、個体当たりの摂餌量及び摂水量については、NIV 投与による明らかな影響は認められなかった。

血清 IgA, IgG 濃度測定の結果を Fig. 2 に示す。4 週間投与における血清 IgA 濃度は、24 ppm において有意な上昇がみられ、8 週間投与では、NIV 投与による用量依存的な IgA 濃度の上昇が認められた。一方、血清 IgG 濃度については、NIV 投与による影響は認められなかった。

腎臓重量は、絶対・相対重量ともに NIV 投与による変動は認められず (Table 1)、また病理組織学的検索においても、Balb/c マウスの糸球体において NIV 投与による明らかな変化は観察されなかった (Fig. 3)。

糸球体への IgA 及び IgG 沈着に関する解析結果を Fig. 4 及び Fig. 5 に示す。IgA については、対照群ではほとんど蛍光が観察されなかったが、NIV 投与群では糸球体メザンギウム領域におい

て IgA の顆粒状沈着が認められた。IgG については、対照群においても約半数の糸球体においてメザンギウムを中心にびまん性に沈着が認められ、IgA と同様、NIV 投与により沈着強度/分布が増加する傾向が認められた。

HIGA マウスの IgA 腎症病態進行に対する NIV の影響 (実験 2) :

実験期間を通じて、死亡動物及び一般状態の変化は認められなかった。実験期間を通じ、HIGA マウスの NIV 投与群において体重低値が観察され、投与 3, 4, 7 週目では有意な減少が認められた (Fig. 1) が、個体当たりの摂餌量・摂水量については、NIV 投与による明らかな影響は認められなかった。

血清 IgA, IgG 濃度測定の結果を Fig. 2 に示す。NIV 投与の有無にかかわらず、HIGA マウスの血清 IgA・IgG 濃度は、対照群として設定した Balb/c マウスと比較して高値を示した。また、HIGA マウス間では、8 週間投与により、有意な IgA 濃度の上昇が、また 4 週間において IgG 濃度の低下がそれぞれ観察された。

腎臓重量は、Balb/c マウスの対照群と比較して HIGA マウスで絶対重量の増加ならびに相対重量の減少が認められた。また HIGA マウス間における比較では、投与群において相対重量の増加が観察された (Table 1)。

病理組織学的検索の結果、HIGA マウスの腎臓では、軽度のメザンギウム増生ならびに PAS 染色陽性像に一致した尿細管上皮の空胞変性が認められたが、これらの所見も含め、NIV 投与による明らかな変化は観察されなかった (Fig. 3)。

糸球体への IgA 及び IgG 沈着の解析結果を Fig. 4 及び Fig. 5 に示す。IgA については、NIV 投与の有無にかかわらずメザンギウム領域を中心に IgA 沈着が認められられ、ヒト IgA 腎症に認められる半球状構造物 (paramesangial deposit) の蛍光像がしばしば観察された。IgG についても、ほとんどの糸球体において全節性に蛍光が認められたが、これらの沈着において、NIV 投与による明らかな影響は観察されなかった。

D. 考察

実験的 IgA 腎症モデルの作出では、Balb/c マウスに NIV を 8 週間まで投与し、IgA 及び IgG の血清中濃度ならびにそれらの糸球体への沈着について解析した。その結果、NIV の投与量・投与期間に関連した血清中 IgA 濃度の上昇が観察され、さらに糸球体への IgA 沈着に明らかな増強が認められた。これらの結果は、Hinoshita ら (1997) が Balb/c 系マウスを含む複数の系統において、同様の実験系によって実験的 IgA 腎症を作出した結果と一致するものであり、本実験モデルの作出方法はバリデートされたと考えられた。

一方で、本実験に用いた NIV の投与量及び投与期間では、IgA 腎症に関連した病理組織学的変化を観察することができなかったことから、今回の実験モデルは、IgA 腎症発症のごく早期の段階を反映したものと考えられ、病態の進行にはさらに NIV を反復投与することが必要であると推察された。

HIGA マウスの IgA 腎症病態進行に対する NIV の影響を検討した結果、HIGA マウスでは、Balb/c マウスと比較して血清 IgA・IgG 濃度が高度に保たれており、メザンギウムにおける IgA・IgG 沈着が優位に認められることが確認された。HIGA マウスは、長期飼育によって血清 IgA 濃度の増加と糸球体 IgA 沈着、メザンギウム増殖性腎炎を来たす ddY マウス個体を選択・交配し、若年から均一に IgA 高値を呈する純系 high IgA (HIGA) マウスとして樹立された実験的 IgA 腎症モデル動物である (Muso et al., 1996)。今回、HIGA マウスに NIV を 24 ppm の濃度で 8 週間投与した結果、HIGA マウスの血清 IgA 値に有意な上昇が認められたことから、NIV が HIGA マウスの病態進行を促進する可能性が考えられたが、糸球体への IgA 沈着を含む病理組織学的解析では、NIV の影響を示唆する所見は認められず、結論は得られなかった。IgA 腎症過程では、TGF β の発現増強に伴い IV 型コラーゲンやフィブロネクチン等の基質蛋白が増加することが知られており、HIGA マウス

の IgA 腎症病態進行においてもその関与が示唆されている (Oyama et al., 2001)。従って、HIGA マウスに対する NIV の影響を評価するためには、これらの因子等を考慮に入れた解析が今後必要であると考えられた。

次年度は、Balb/c マウスを用いて確立できた IgA 腎症の早期モデルを用いて、化学予防物質として、組織プロテオリシスを活性化する化合物の投与実験を計画している。

E. 結論

実験的 IgA 腎症モデルの作出として、雌 Balb/c マウスに NIV を反復投与した結果、血清 IgA 値及び糸球体への IgA・IgG 沈着の増加が認められた。さらに、HIGA マウスの IgA 腎症病態進行に対する NIV の影響を検討した結果、NIV は HIGA マウスにおける血清 IgA 値を有意に上昇させることが確認され、カビ毒 NIV による IgA 腎症の発症機序ならびにその予防研究におけるこれらの動物モデルの有用性が示唆された。

参考文献

- Ali NS, Yamashita A, Yoshizawa T.: Food Additives Contaminants 15: 377-384 (1998)
- 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)
- Muso E, Yoshida H, Takeuchi E, Yashiro M, Matsushima H, Oyama A, Suyama K, Kawamura T, Kamata T, Miyawaki S, Izui S, Sasayama S.: Kidney Int. 50: 1946-1957 (1996)
- Oyama A, Muso E, Ono T, Matsushima H, Yashiro M, Suyama K, Kamata T, Nogaki F, Kobayashi I, Miyawaki S, Yoshida H, Sasayama S.: Nephron 88: 368-375 (2001)

Pestka JJ, Moorman MA, Warner RL.: Food Chem. Toxicol. 27: 361-368 (1989)

Sudakin DL.: Toxicol. Lett. 143: 97-107 (2003)

Tomino Y.: Contrib. Nephrol. 126: 1-115, (1999)

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kubosaki A, Aihara M, Park BJ, Sugiura Y, Shibutani M, Hirose M, Suzuki Y, Takatori K, Sugita-Konishi Y.: Immunotoxicity of nivalenol after subchronic dietary exposure to rats. Food Chem. Toxicol. 46: 253-258 (2008)

Takahashi M, Shibutani M, Sugita-Konishi Y, Aihara M, Inoue K, Woo GH, Fujimoto H, Hirose M.: A 90-day subchronic toxicity study of nivalenol, a trichothecene mycotoxin, in F344 rats. Food Chem. Toxicol. 46: 125-135 (2008)

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Table 1.

Final body and kidney weights of Balb/c and HIGA mice given diet containing nivalenol (NIV) for 4 or 8 weeks

Strain	Nivalenol (ppm)	Duration (week)	No. of Animals	Final bod weight (g)	Kidney weights	
					Absolute (g)	Relative (%)
Balb/c	0	4	8	20.21±0.96	0.276±0.022	1.36±0.07
	12	4	8	19.88±1.83	0.266±0.020	1.34±0.08
	24	4	8	18.79±1.31	0.251±0.019	1.33±0.03
	0	8	8	22.36±1.54	0.295±0.027	1.32±0.08
	12	8	8	21.32±0.87	0.284±0.010	1.33±0.05
	24	8	8	20.94±0.70*	0.272±0.015	1.30±0.05
HIGA	0	4	8	34.46±2.71 ^{††}	0.370±0.031 ^{††}	1.07±0.07 ^{††}
	24	4	8	31.51±3.10 ^{††}	0.373±0.017 ^{††}	1.19±0.14 ^{†, #}
	0	8	8	37.95±3.73 ^{††}	0.434±0.042 ^{††}	1.14±0.04 ^{††}
	24	8	8	34.07±3.83 ^{††}	0.429±0.034 ^{††}	1.27±0.10 [#]

*: Significantly different from the control Balb/c mice at $P<0.05$ (Dunnett's test).

^{†,††}: Significantly different from the control Balb/c mice at $P<0.05$ and $P<0.01$ (Tukey test).

[#]: Significantly different from the control HIGA mice at $P<0.05$ (Tukey test).

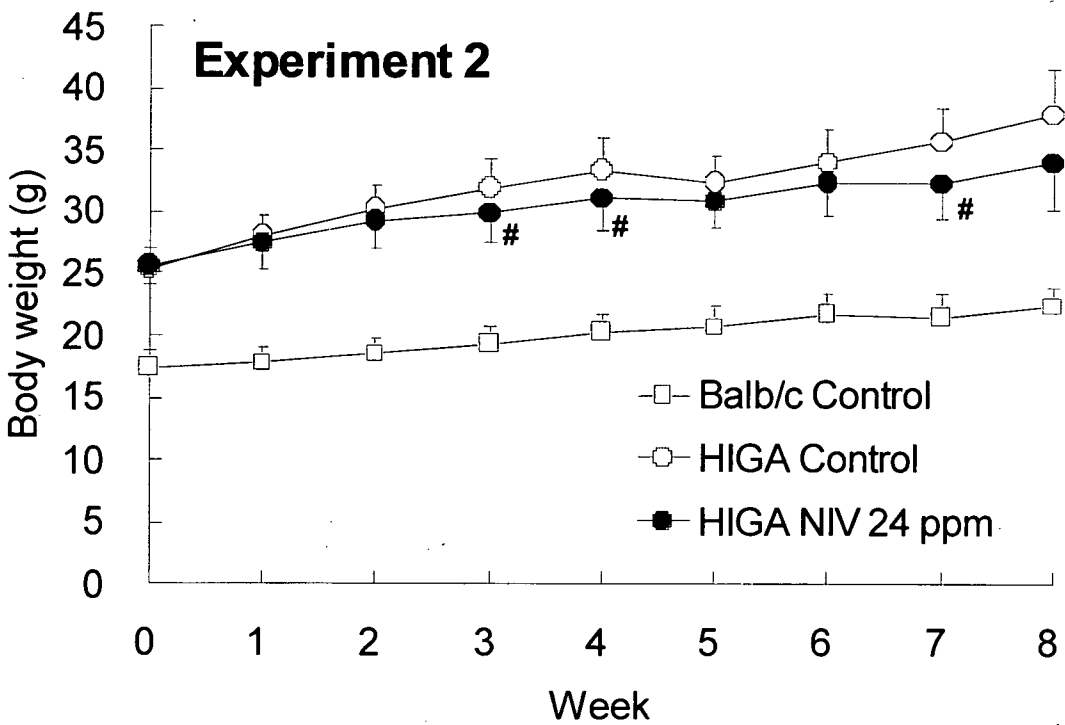
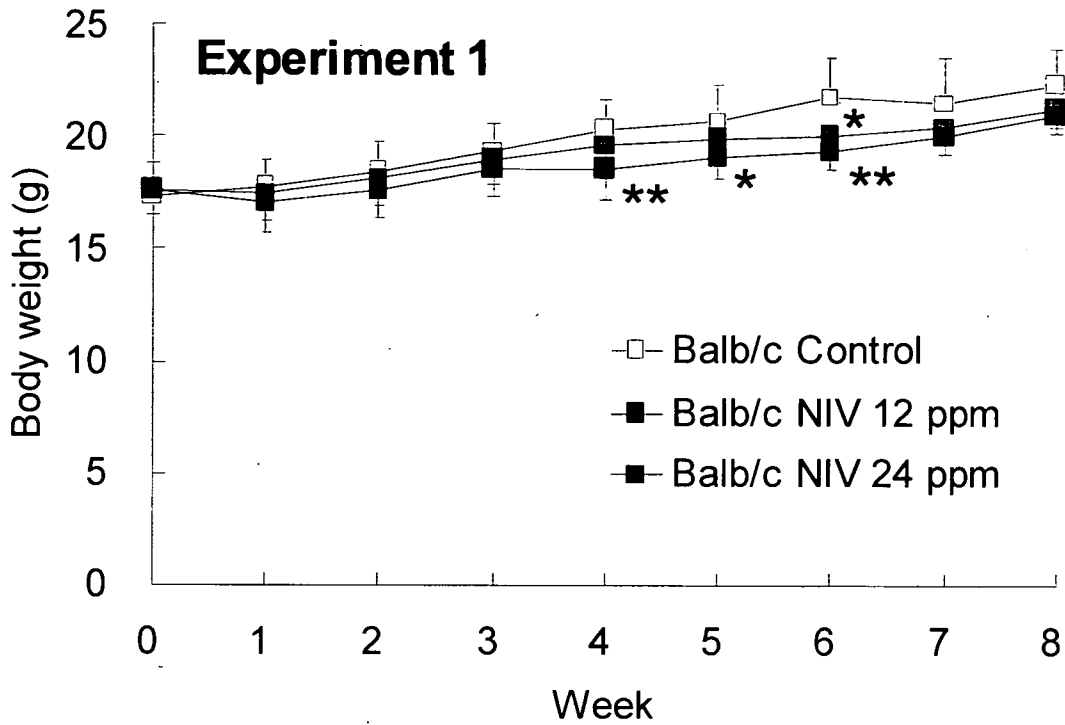


Fig. 1.

Body weight curves for female Balb/c and HIGA mice given nivalenol (NIV) for 4 or 8 weeks. Data represents means±S.D. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, as compared with the untreated control (Dunnett's test). # $P < 0.05$, as compared with the untreated HIGA mice (Tukey test). In experiment 2, body weights of HIGA mice in each week were significantly higher than those of untreated Balb/c mice ($P < 0.01$; Tukey test).

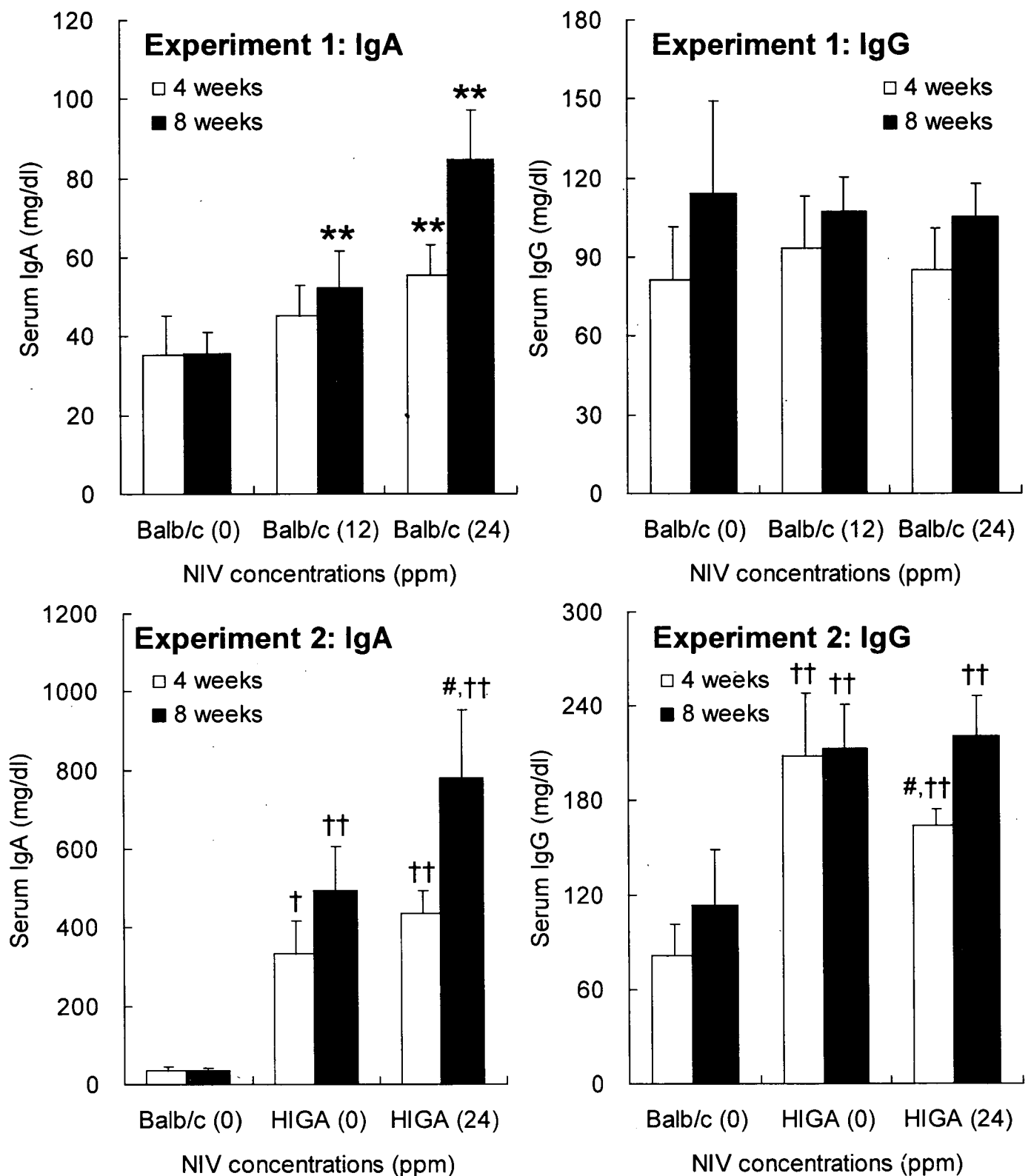


Fig. 2.

Serum IgA and IgG levels for female Balb/c and HIGA mice given nivalenol (NIV) for 4 or 8 weeks. Data represents means±S.D. ** $P < 0.01$, as compared with the untreated control (Dunnett's test). # $P < 0.05$, as compared with the untreated HIGA mice (Tukey test). † $P < 0.05$; †† $P < 0.01$, as compared with the untreated Balb/c mice (Tukey or Steel-Dwvass test).

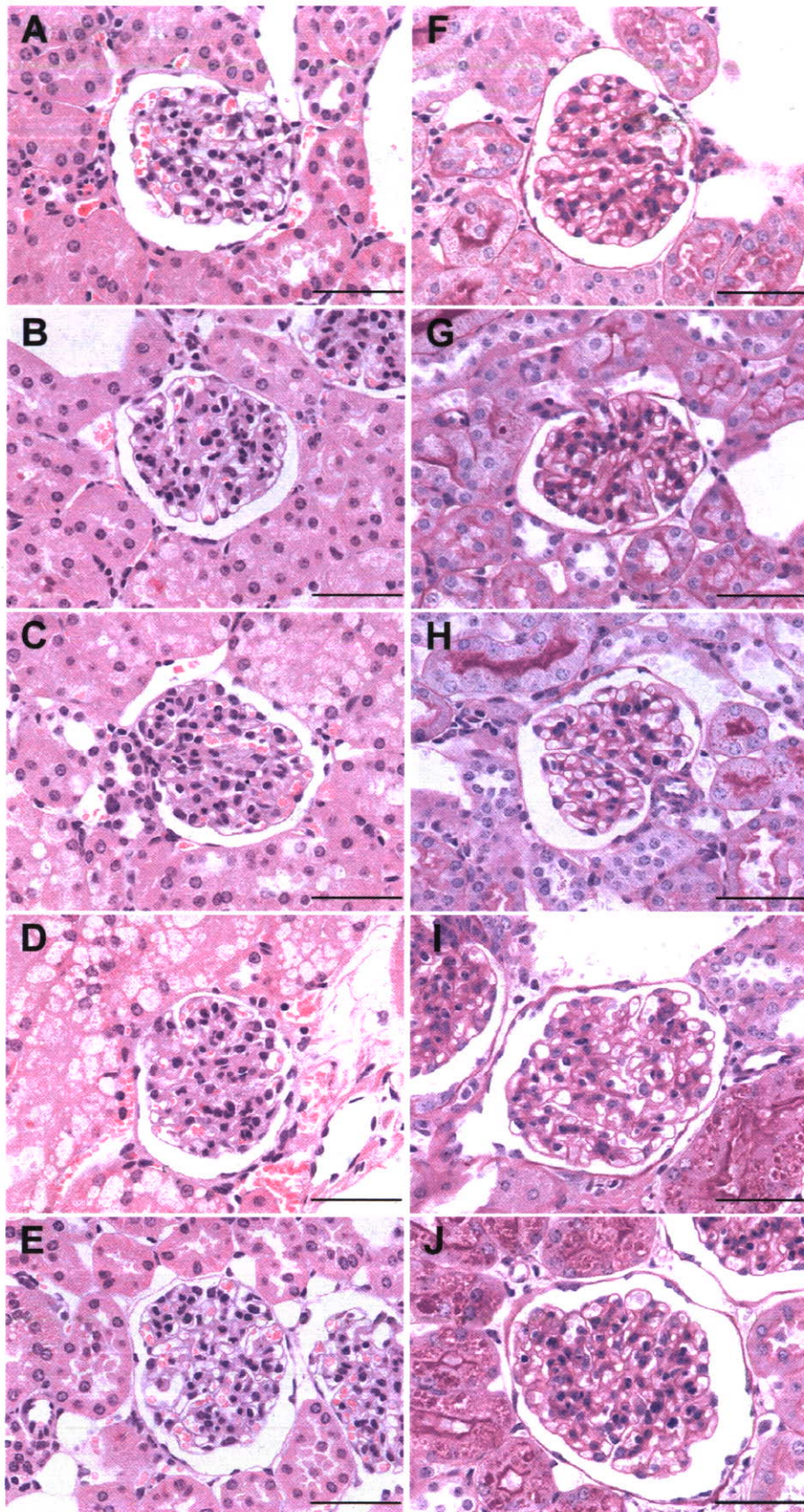


Fig. 3.

Light microscopical view of the kidneys in H&E (A-E) and PAS stain (F-J). Control Balb/c mice (A,F); Balb/c mice given 12 ppm (B,G) or 24 ppm (C,H) of NIV; Control HIGA mice (D,I); HIGA mice given 24 ppm of NIV (E,J). Original magnification: x 400. Bar: 50 μ m.

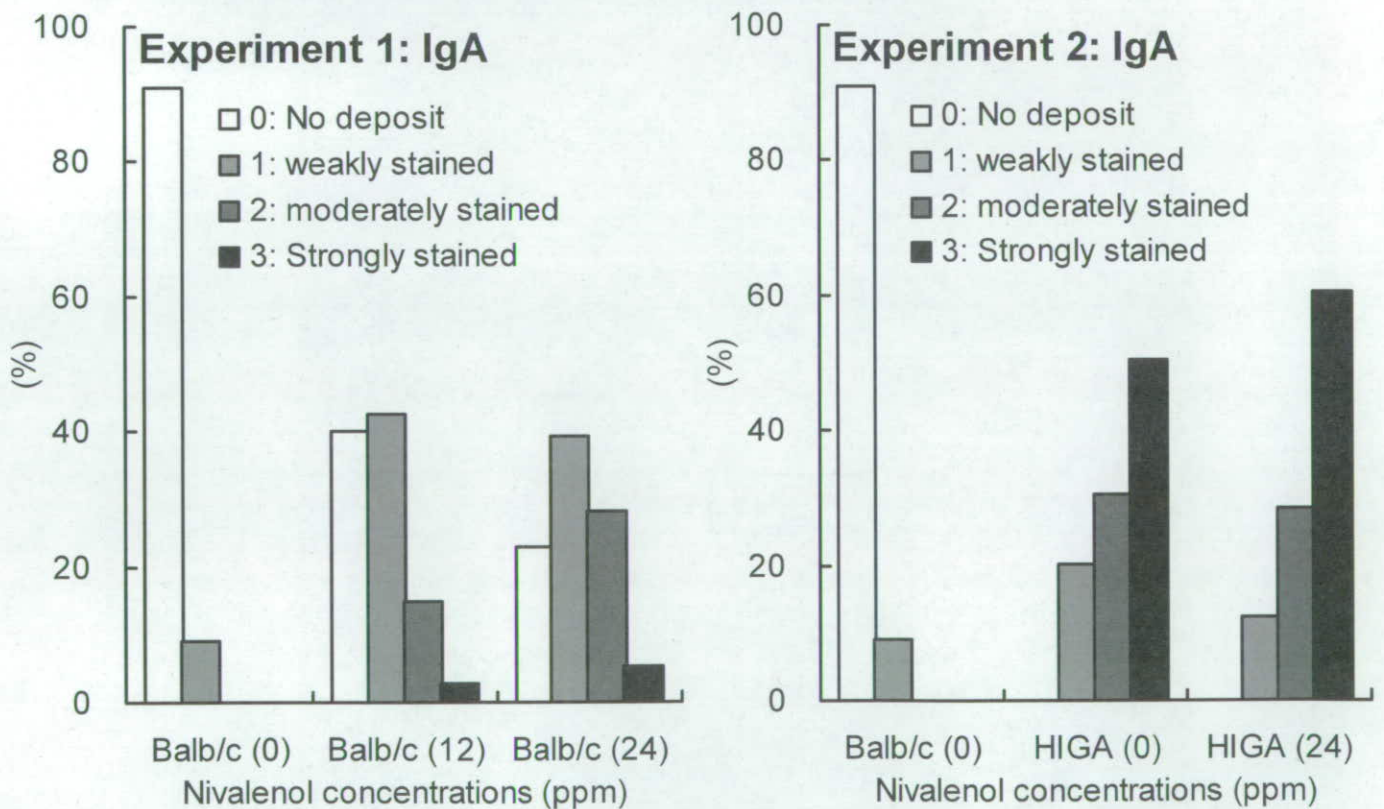
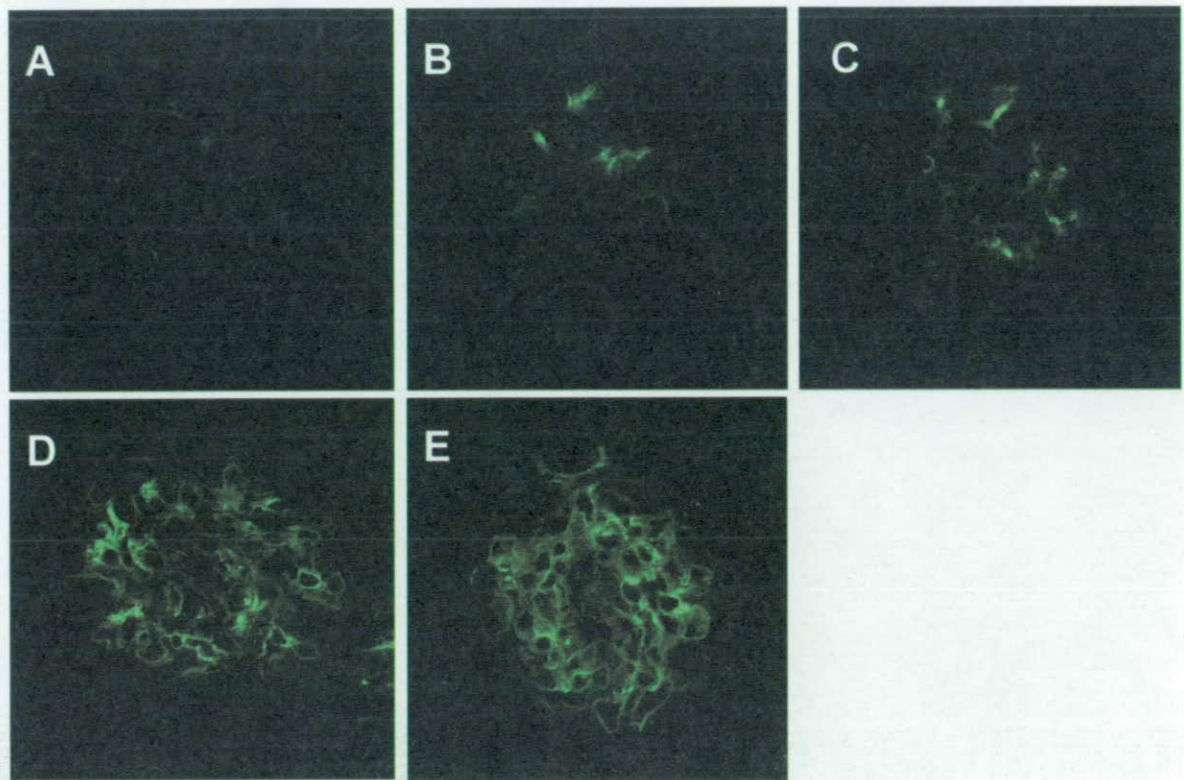


Fig. 4.

Glomerular IgA deposition in the kidneys of Balb/c and HIGA mice given NIV. Control Balb/c mice (A); Balb/c mice given 12 ppm (B) or 24 ppm (C) of NIV; Control HIGA mice (D); HIGA mice given 24 ppm of NIV (E). The intensity of immunofluorescence for IgA in each group was scored from 0 to 3.

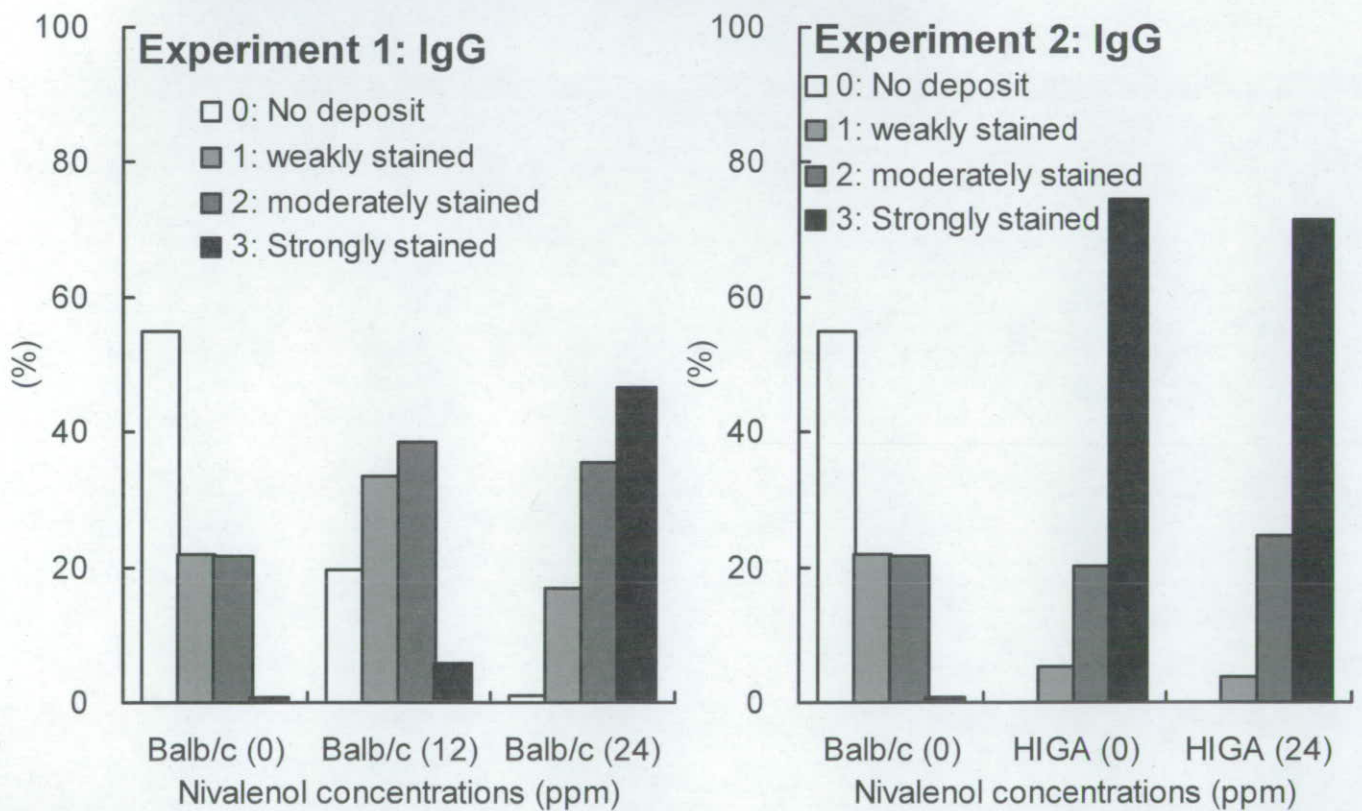
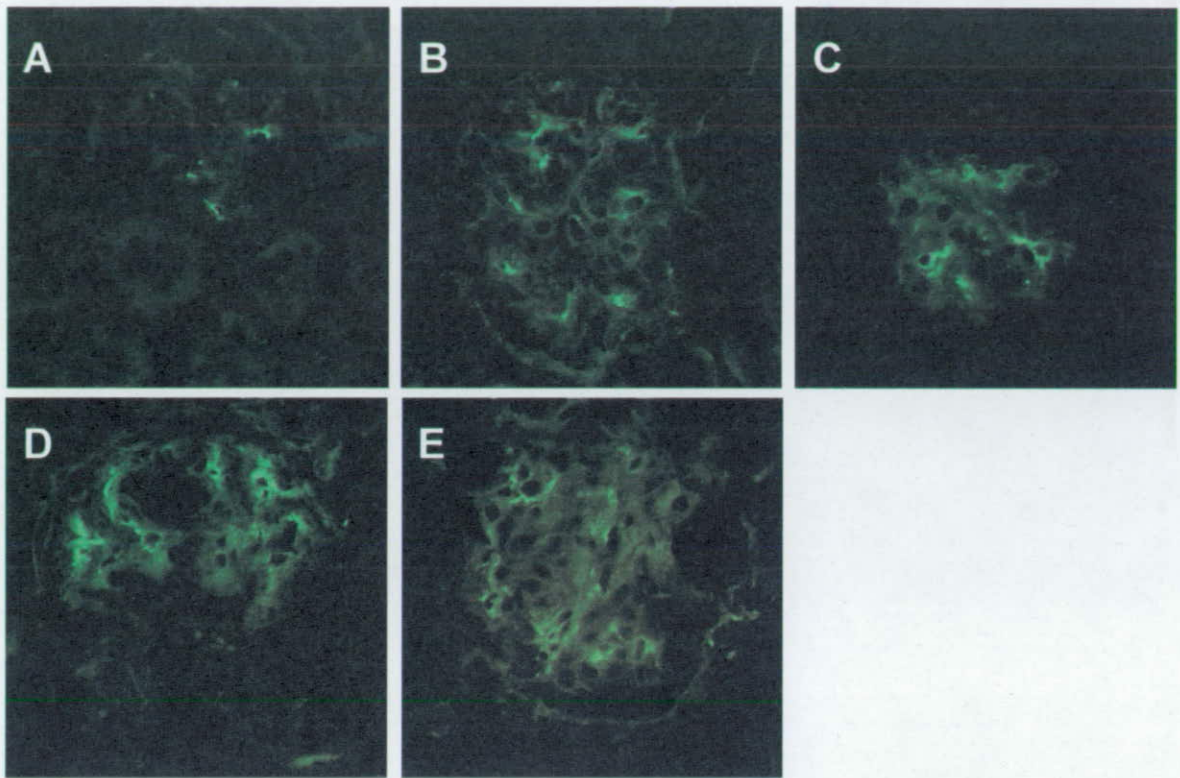


Fig. 5.

Glomerular IgG deposition in the kidneys of Balb/c and HIGA mice given NIV. Control Balb/c mice (A); Balb/c mice given 12 ppm (B) or 24 ppm (C) of NIV; Control HIGA mice (D); HIGA mice given 24 ppm of NIV (E). The intensity of immunofluorescence for IgG in each group was scored from 0 to 3.

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
小西良子	カビ対策ガイドブック 第4章 健康被害とカビ		カビ対策ガイドブック	(社) 日本食品衛生協会	日本	2007.4	p.66-79
小西良子	食中毒予防必携第2版 5. カビ毒	食中毒予防必携第2版編集委員	食中毒予防必携第2版	(社) 日本食品衛生協会	日本	2007.8	p.257-67
小西良子	カビ毒 Mycotoxin	日本リスク研究会	リスク学用語小辞典	丸善(株)	日本	2008.1	p.59

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Miwa Takahashi, Makoto Shibutani, Yoshiko Sugita-Konishi, Maki Aihara, Kaoru Inoue, Gye-Hyeong Woo, Hitoshi Fujimoto, Masao Hirose	A 90-day subchronic toxicity study of nivalenol, a trichothecene mycotoxin, in F344 rats	Food Chem Toxicol	46	p.125-35	2008
Atsutaka Kubosaki, Maki Aihara, Bong Joo Park, Yoshitsugu Sugiura, Makoto Shibutani, Masao Hirose, Yoshihiko Suzuki, Kosuke Takatori, Yoshiko Sugita-Konishi	Immunotoxicity of nivalenol after subchronic dietary exposure to rats	Food Chem Toxicol	46	p.235-58	2008
Sugita-Konishi, Y., Niimi, S. and Sugiyama, K	An inter-laboratory study to validate quantitative and qualitative immunoassay kits for rapid detection of aflatoxin in corn	Mycotoxins	57	p.75-80	2007
Poapolathep, A., Poapolathep, S., Imsilp, K., Wannapat, N., Klangkaew, N., Kusutjarit, N. Kumagai, S	Distribution and residue depletion of oxytetracycline in giant freshwater prawn (Macrobrachium rosenbergii)	Journal of Food Protection	70, in press		
Tulayakul P, Dong KS, Li JY, Manabe N, Kumagai S.	The effect of feeding piglets with the diet containing green tea extracts or coumarin on in vitro metabolism of aflatoxin B1 by their tissues	Toxicon	50	p.339-48	2007

K. Dong, Y. Sugita-Konishi, J. Yu, P. Tulayakul, S. Kumagai	The effects of subcutaneous administration of T-2 toxin on liver drug metabolizing enzymes in piglets	Toxicological & Environmental Chemistry	90	p.401-13	2008
Yoshiko Sugita-Konishi	Toxicity and control of trichothecene mycotoxins	Mycotoxins	58(1)	p.23-28	2008
Sugiyama, K., Muroi, M., Tanamoto, K., Nishijima, M. and Sugita-Konishi, Y	Effect of deoxynivalenol on LPS signaling in macrophage	The Toxicologist	102	p.102	2008
Sugita-Konishi, Y., Kubosaki, A., Sugiyama, K., Poapolathep, A., Dong, K. and Kumagai, S	Effects of T-2 toxin on hepatic drug metabolizing enzymes and the binding activity of aflatoxin B1 to DNA in rats	The Toxicologist	102	p. 101	2008
小西良子	カビ毒のリスクファイルと直面する問題	国際生命科学研究機構	No.89	p.56-62	2007
杉山圭一, 小西良子	食品のマイコトキシンに関する欧米の規制と日本の規制	フードケミカル	264	p.73-78	2007
小西良子, 杉山圭一	カビ毒のリスク評価と国際的な動向	食品衛生学雑誌	49	p.1-10	2008