

オクラトキシンA 汚染実態調査結果

パスタ	原産国/加工地	測定値 (ng/g)		
		HPLC	LC/MS/MS	
35検体	スパゲッティ	不明	0.20	ng/g
	フェットチーネ	日本	0.40	検出限界 0.05
	スパゲッティ	日本	1.34	定量限界 0.10
	スパゲッティ	イタリア	0.12	
	スパゲッティ	イタリア	0.19	回収率 %
	スパゲッティ	イタリア	0.18	0.02 ng/g 107.9±1.5
	スパゲッティ	日本	ND	1 ng/g 93.0±1.9
	マカロニ	不明	0.55	
	スパゲッティ	日本	tr (0.09)	
	スパゲッティ	不明	0.25	
	スパゲッティ	日本	0.23	
	有機スパゲッティ	イタリア	ND	
	スパゲッティ	日本	0.60	
	ヌードル	イタリア	ND	
	マカロニ	イタリア	ND	
	スパゲッティ	イタリア	ND	
	スパゲッティーニ	イタリア	ND	
	マカロニ	イタリア	0.11	
	マカロニ	イタリア	ND	
	スパゲッティ	不明	tr (0.09)	
	スパゲッティ	イタリア	ND	
	スパゲッティ	不明	tr (0.09)	
	スパゲッティ	イタリア	0.10	
	スパゲッティ	イタリア	0.61	
	スパゲッティ	不明	ND	
	スパゲッティ	日本	tr (0.08)	
	スパゲッティ	イタリア	ND	
	スパゲッティ	イタリア	tr (0.07)	
	スパゲッティ	イタリア	0.11	
	有機スパゲッティ	イタリア	ND	
	マカロニ	イタリア	ND	
	スパゲッティ	日本	0.15	
	マカロニ	イタリア	ND	
	スパゲッティ	イタリア	0.10	
	スパゲッティ	イタリア	0.10	

オクラトキシンA 汚染実態調査結果

そば	原産国/加工地	測定値 (ng/g)			
		HPLC	LC/MS/MS		
40検体	そば	長野県	0.12		
	そば	長野県	0.16		
	十割そば	長野県	0.10		
	そば	長野県	ND		
	韃靼そば	福島県	0.26		
	そば	島根県	ND		
	八割そば	岩手県	tr (0.09)		
	そば	北海道(旭川)	ND		
	そば	千葉県	ND		
	そば	新潟県	0.11		
	そば	不明	tr (0.08)		
	そば	不明	0.24		
	そば	長野県	0.35		
	そば	兵庫県	tr (0.06)		
	韃靼そば	不明	tr (0.06)		
	そば	山形県	ND		
	そば	長野県	ND		
	そば	長野県	0.21		
	そば	千葉県	tr (0.08)		
	十割そば	長野県	0.24		
	そば	不明	0.11	0.19	
	そば	不明	0.29	0.35	
	そば	不明	0.90	0.87	
	そば	不明	0.14	0.16	
	そば	不明	0.14	0.17	
	そば	不明	0.12	0.16	
	そば	不明	0.20	0.24	
	とろろ入りそば	不明	0.10	tr (0.09)	
	八割そば	国産	tr (0.10)	0.14	
	そば	不明	0.23	0.16	
	有機そば	オーストラリア	0.11	0.12	
	八割そば	不明	0.25	0.29	
	山芋入そば	不明	0.15	0.15	
	そば	不明	tr (0.09)	tr (0.08)	
	そば	不明	0.11	0.12	
	そば	国産	ND	ND	
	五割そば	不明	0.14	0.16	
	そば	不明	tr (0.09)	tr (0.10)	
	そば	不明	0.12	0.13	
	そば	不明	tr (0.08)	tr (0.08)	

ng/g	
検出限界	0.05
定量限界	0.1

%	
回収率	%
0.1 ng/g	92.7±8.2
5.0 ng/g	76.4±5.9

ng/g	
検出限界	0.05
定量限界	0.1

%	
回収率	%
0.1 ng/g	125.9±2.6
5.0 ng/g	90.8±0.8

オクラトキシンA 汚染実態調査結果

チョコレート	原産国/加工地	測定値 (ng/g)			
		HPLC	LC/MS/MS		
20検体	チョコレート	不明	0.12		ng/g
	チョコレート(カカオ70%)	不明	0.30		検出限界 0.05
	チョコレート	不明	tr(0.07)		定量限界 0.1
	チョコレート	不明	tr(0.08)		
	チョコレート	不明	tr(0.08)		回収率 %
	チョコレート	不明	tr(0.05)		0.5 ng/g 100.0±3.7
	チョコレート	アメリカ	0.10		5.0 ng/g 83.0±2.6
	チョコレート	中国	tr(0.06)		
	チョコレート	不明	0.15		
	チョコレート	アメリカ	0.13		
	チョコレート(カカオ85%)	ガーナ	0.20		
	チョコレート	不明	0.31		
	チョコレート	不明	0.11		
	チョコレート	不明	0.17		
	チョコレート	不明	tr(0.08)		
	チョコレート	不明	0.17		
	チョコレート	スイス	0.24		
	チョコレート	ベルギー	0.20		
	チョコレート	スイス	N.D.		
	チョコレート	不明	0.15		

オクラトキシンA 汚染実態調査結果

ココア	原産国/加工地	測定値 (ng/g)			
		HPLC	LC/MS/MS		
20検体	ココア	オランダ	0.803		ng/g
	ココア	オランダ	0.989		検出限界 0.03
	ココア	オランダ	1.287	1.405	定量限界 0.1
	ココア(有機栽培)	オランダ	0.678		
	ココア(有機栽培)	オランダ	0.731		回収率 %
	ココア	オランダ	0.453		1.0 ng/g 83.9±2.0
	ココア	マレーシア	0.370		5.0 ng/g 85.0±4.3
	ココア	マレーシア	0.405		
	ココア	日本	0.736		
	ココア	日本	0.818		
	ココア	日本	1.397	1.485	
	ココア(有機栽培)	オランダ	0.710		
	ココア	ボリビア	tr (0.086)		
	ココア(有機栽培)	オランダ	0.505		
	ココア(有機栽培)	オランダ	0.698		
	ココア	オランダ	0.558		
	ココア	日本	0.245		
	ココア	日本	1.664	1.705	
	ココア	マレーシア	0.494		
	ココア	マレーシア	0.404		

オクラトキシンA 汚染実態調査結果

ワイン	原産国/加工地	測定値 (ng/g)		
		HPLC	LC/MS/MS	
20検体	赤ワイン	日本(山梨県)	ND	ng/g
	赤ワイン	イタリア	1.742	検出限界 0.003
	白ワイン	フランス	0.053	定量限界 0.01
	赤ワイン	スペイン	0.623	
	赤ワイン	チリ	0.010	回収率 %
	白ワイン	日本(山梨県)	ND	0.1 ng/g 93.4±1.7
	赤ワイン	不明	ND	0.5 ng/g 89.4±3.0
	白ワイン	フランス	ND	
	赤ワイン	イタリア	0.043	
	赤ワイン	スペイン	0.326	
	赤ワイン	チリ	tr (0.003)	
	白ワイン	フランス	1.250	
	赤ワイン	スペイン	tr (0.007)	
	白ワイン	チリ	ND	
	白ワイン	アルゼンチン	ND	
	白ワイン	ドイツ	ND	
	白ワイン	日本(山梨県)	ND	
	白ワイン	フランス	ND	
	白ワイン	スペイン	0.097	
	赤ワイン	フランス	0.304	

オクラトキシンA 汚染実態調査結果

インスタントコーヒー	原産国/加工地	測定値 (ng/g)			
		HPLC	LC/MS/MS		
30検体	インスタントコーヒー	コロンビア・コスタリカ他	0.200		ng/g
	インスタントコーヒー	エチオピア・コロンビア他	1.026	1.145	検出限界 0.03
	インスタントコーヒー	コロンビア・ブラジル他	tr (0.085)		定量限界 0.1
	インスタントコーヒー	コロンビア・ブラジル他	0.252		
	インスタントコーヒー	ブラジル・インドネシア他	1.150	1.365	回収率 %
	インスタントコーヒー	コロンビア・コスタリカ他	0.613		0.1 ng/g 102.3±4.7
	インスタントコーヒー	ケニア・コロンビア他	0.501		5.0 ng/g 88.4±0.8
	インスタントコーヒー	ブラジル・コロンビア他	2.286	2.535	
	インスタントコーヒー	ブラジル・コロンビア	0.843		
	インスタントコーヒー	コロンビア・ブラジル	1.414	1.495	
	インスタントコーヒー	ブラジル・コロンビア他	0.857		
	インスタントコーヒー	ブラジル・エクアドル他	0.831		
	インスタントコーヒー	インドネシア	0.285		
	インスタントコーヒー	インドネシア・コロンビア他	0.378		
	インスタントコーヒー	ブラジル	1.239	1.280	
	インスタントコーヒー	コロンビア	0.723		
	インスタントコーヒー	エクアドル	2.072	2.095	
	インスタントコーヒー	コロンビア	1.983	2.065	
	インスタントコーヒー	インドネシア	0.244		
	インスタントコーヒー	タンザニア	tr (0.064)		
	インスタントコーヒー	コロンビア・ブラジル他	0.433		
	インスタントコーヒー	インドネシア他	0.227		
	インスタントコーヒー	ジャマイカ・コロンビア他	0.151		
	インスタントコーヒー	エチオピア	0.998		
	インスタントコーヒー	ブラジル・インドネシア他	0.147		
	インスタントコーヒー	タンザニア・ブラジル他	0.449		
	インスタントコーヒー	コロンビア・ブラジル他	0.309		
	インスタントコーヒー	ブラジル・インドネシア他	0.375		
	インスタントコーヒー	コロンビア・インドネシア他	1.054	1.145	
	インスタントコーヒー	ジャマイカ・ブラジル他	0.183		

オクラトキシンA 汚染実態調査結果

			測定値 (ng/g)			
焙煎コーヒー		原産国/加工地	HPLC	LC/MS/MS		
15検体	焙煎コーヒー	コロンビア・ブラジル他	0.1424		ng/g	
	焙煎コーヒー	コロンビア・ブラジル他	0.4207		検出限界	0.05
	焙煎コーヒー	コロンビア・ブラジル他	tr (0.0820)		定量限界	0.1
	焙煎コーヒー	タンザニア・コロンビア・ブラジル他	0.1546			
	焙煎コーヒー	ブラジル・コロンビア・グアテマラ他	tr (0.0736)		回収率	%
	焙煎コーヒー	コロンビア・ブラジル他	0.2331		0.1 ng/g	83.3±15.5
	焙煎コーヒー	グアテマラ・ブラジル他	0.1129		5.0 ng/g	90.1±4.3
	焙煎コーヒー	コロンビア・ブラジル他	0.1394			
	焙煎コーヒー	コロンビア・ブラジル他	0.4304			
	焙煎コーヒー	ブラジル・ベトナム他	0.5416			
	焙煎コーヒー	コロンビア・ベトナム他	0.4300			
	焙煎コーヒー	インドネシア・ブラジル他	0.1331			
	焙煎コーヒー	エルサルバドル・ブラジル他	0.1496			
	焙煎コーヒー	コスタリカ・ブラジル	0.1551			
	焙煎コーヒー	グアテマラ・ブラジル	0.2068			

オクラトキシンA 汚染実態調査結果

			測定値 (ng/g)			
缶コーヒー		原産国/加工地	HPLC	LC/MS/MS		
15検体	缶コーヒー	不明	0.0138		ng/g	
	缶コーヒー	不明	tr (0.0079)		検出限界	0.005
	缶コーヒー	不明	0.0127		定量限界	0.01
	缶コーヒー	不明	tr (0.0028)			
	缶コーヒー	不明	tr (0.0062)		回収率	%
	缶コーヒー	不明	0.0173		0.01 ng/g	116.6±9.6
	缶コーヒー	不明	tr (0.0036)		0.5 ng/g	103.0±6.0
	缶コーヒー	不明	tr (0.0033)			
	缶コーヒー	不明	tr (0.0071)			
	缶コーヒー	不明	0.0257			
	缶コーヒー	不明	tr (0.0060)			
	缶コーヒー	不明	tr (0.0018)			
	缶コーヒー	不明	tr (0.0022)			
	缶コーヒー	不明	tr (0.0098)			
	缶コーヒー	不明	tr (0.0036)			

オクラトキシンA 汚染実態調査結果

紅茶	原産国/加工地	測定値 (ng/g)		
		HPLC	LC/MS/MS	
15検体	紅茶	スリランカ	ND	ng/g
	紅茶	インド	ND	検出限界 0.05
	紅茶	インド・ケニア	ND	定量限界 0.1
	紅茶	中国	ND	
	紅茶	中国	ND	回収率 %
	紅茶	中国	ND	0.1 ng/g 99.3±6.5
	紅茶	中国	tr (0.0336)	5.0 ng/g 87.1±3.2
	紅茶	スリランカ・インド	ND	
	紅茶	スリランカ	ND	
	紅茶	スリランカ	ND	
	紅茶	インド・ケニア・スリランカ	ND	
	紅茶(有機栽培)	ケニア	ND	
	紅茶	パプアニューギニア・ケニア・インド	ND	
	紅茶	スリランカ	ND	
	紅茶	インドネシア・パプアニューギニア他	ND	

オクラトキシンA 汚染実態調査結果

ウーロン茶	原産国/加工地	測定値 (ng/g)		
		HPLC	LC/MS/MS	
15検体	ウーロン茶	中国	ND	ng/g
	ウーロン茶	台湾	ND	検出限界 0.05
	ウーロン茶(有機栽培)	日本	ND	定量限界 0.1
	ウーロン茶(有機栽培)	日本	ND	
	ウーロン茶	日本	ND	回収率 %
	ウーロン茶	中国	ND	0.1 ng/g 97.0±18.2
	ウーロン茶	中国	ND	5.0 ng/g 92.7±3.6
	ウーロン茶	中国	ND	
	ウーロン茶	中国	ND	
	ウーロン茶	中国	ND	
	ウーロン茶	不明	ND	
	ウーロン茶	中国	ND	
	ウーロン茶	中国	ND	
	ウーロン茶	中国	ND	
	ウーロン茶	中国	ND	

厚生労働科学研究費補助金研究事業
(食の安全・安心確保推進研究事業)
分担研究報告書(平成21年度)

カビ毒を含む食品の安全性に関する研究
オクラトキシンAの減衰ならびに生物学的評価法に関する研究

研究分担者 杉山圭一

国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部

研究要旨: 本分担研究では、カビ毒の加工工程における減衰レベルを明らかにすることを目的としている。昨年度までの2カ年では麦類を汚染するトリコセシン系カビ毒であるデオキシニバレノール(DON)とニバレノール(NIV)について、国産小麦粉も含む原料で製造された食パン製造時の各々の減衰率とカビ毒と食品成分の複合体の毒性評価を可能とするバイオアッセイ系の構築ならびに同評価系を用いた複合毒性について解析を行った。本年度は同じく穀類を汚染するカビ毒であるオクラトキシンAについてその減衰ならびに生物学的評価法について検討を行った。オクラトキシンAの汚染対象としてわが国の主食である米を想定し、同加工品である日本酒の製造工程における減衰について検討した。その結果、同加工品製造工程においてオクラトキシンAは、醸造終了した後に行われる圧搾工程後において約8.4%の残留に留まるとの結果を得た。また、オクラトキシンAの毒性評価法としてバイオアッセイ系の構築については、ヒトマクロファージ様細胞を用いたTLRシグナル阻害活性を指標としたアッセイ系の構築に成功した。同アッセイ系はオクラトキシンAの毒性を正確に評価するうえで欠かせない食品中のマトリックスとの複合体の毒性も評価可能とするものである。

協力研究者:

井沢 真吾 京都工芸繊維大学 大学院工芸
科学研究科応用生物学専攻准教授

A. 研究目的

カビ毒は真菌が産生する二次代謝産物であるが、比較的分子量が小さいということから、物理的・化学的処理に安定であるという特徴を有す。従って、カビ毒に汚染された食糧を加工・調理することによる同毒素の減衰レベルについて検証することは、カビ毒からの食の安心・安全を確保するうえで不可欠な検討課題の1つ考えられる。しかしながら、これら研究については少なくとも現時点では包括的な研究は乏しいのが現状と言わざるを得ない状況である(Sugita-Konishi and Sugiyama 2008; Sugiyama and

Sugita-Konishi 2007)。

一方、カビ毒のバイオアッセイ系は、その特徴として食糧・食品中のマトリックスとカビ毒の複合体の毒性評価が可能という有用性を有すと考えられるアッセイ系ではあるが、HPLC等を用いた分析方法と比較してその研究の裾野は広いとは言い難いのが実状である。

カビ毒の調理過程における消長・減衰は、カビ毒の暴露量を概算するうえで不可欠なインフォメーションであると同時に、減衰率をバイオアッセイ系により評価することは暴露量の正確な把握を可能とするという点から、両方向から食品におけるカビ毒の安全性について検討することは、得られる成果をより重層的にし、今後の厚生労働行政における施策に貴重な知見を付与できると考えられる。

本年はカビ毒としてオクラトキシンAについて、その消長レベルとバイオアッセイ系に構築を試みた。*Aspergillus* 属および *Penicillium* 属が産生する毒素であるオクラトキシン A は、麦類やコーヒー豆のほかに嗜好品であるビールやワインへの汚染事例も報告されているカビ毒であり (Sugiyama and Sugita-Konishi 2007)、動物実験から腎毒性・肝毒性・催奇形性・発癌作用がその毒性として指摘されているが、近年免疫毒性についても報告がなされてきている (Ferrante et al. 2008)。免疫毒性による評価は *in vitro* での評価が比較的容易であり、今般、世界的にその懸念が高まっている新興・再興感染症への影響も予想されることから、本研究ではオクラトキシン A の免疫毒性をメルクマールにバイオアッセイ系の構築を試みた。また、オクラトキシン A の消長については、汚染対象としてわが国の主食である米を想定して、その加工品である日本酒の製造工程における減衰について検討を行った。

B. 研究方法

【細胞培養・各種試料の調製】

ヒトモノサイトの THP-1 細胞は Human Science Research Resources Bank (Tokyo, Japan) より入手した。NF- κ B 依存性プロモーター領域の下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を連結した NF- κ B 依存性レポーター遺伝子を安定的に保持したマウスマクロファージ様細胞 RAW264 (ELAM/RAW264) および IFN- β プロモーター領域の下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を連結した IFN- β 依存性レポーター遺伝子を安定的に保持したマウスマクロファージ様細胞 RAW264 (IFN- β /RAW264) は、国立医薬品食品

衛生研究所、衛生微生物部、第一室の室井室長 (現所属：武蔵野大学) より供与頂いた。

ヒトモノサイトの THP-1 細胞は、10 % 非働化仔ウシ血清 (Fatal Bovine Serum, 以後 FBS と略記: Invitrogen 社製) と、Penicillin-Streptomycin Mixed Solution (10,000 U PCs and 10 mg SM/ml in 0.85%-NaCl: ナカライテクス株式会社, 京都) を含む DMEM 培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 以後 DMEM と略記: GIBCO 社製) High Glucose 1x の入った 75 cm² の組織培養フラスコ (Techno Plastic Products 社製) に播種後、37 °C、5 % CO₂ 条件下で培養した。

ELAM/RAW264 および IFN- β /RAW264 は 10% FBS と、Penicillin-Streptomycin Mixed Solution を含む DMEM High Glucose の培地にさらに 1.0 mg/ml の G418 二硫酸塩 (Nacalai tesuque) を加えた培地にて 37 °C、5% CO₂ 条件下で培養した。

標準品のオクラトキシン A (Wako 社製) は減衰を防ぐため、エタノールに溶かし、-30 °C で保存した。実験に用いるときは窒素ガスで濃縮乾固した後、DMEM で溶解した。

Escherihica coli 0111:B4 株由来エンドトキシン (Sigma 社製) は滅菌水に溶解し、使用前にソニケーションを行った。

【レポーターアッセイ】

レポーター遺伝子を保持した細胞株である ELAM/RAW264 と IFN- β /RAW264 は、12well 平板プレート (Techno Plastic Products) に 3-5 \times 10⁵ cells/well となるように 1 ml/well 播種し約 12 時間培養した。培養後 37 °C に保温した Phosphate Buffered Saline (PBS) 1 ml/well で洗浄した。次にオクラトキシン A (3.13, 6.25, 12.5, 25, 50 μ g/ml) およびエンドトキシン 100 ng/ml をそれぞれ含む DMEM を各 well あたり 500 μ l

を加え細胞を培養し、6 時間後培養液を除去した。その後 1 ml の PBS にて各 well を洗浄した。細胞は Passive Lysis Buffer 5× (Promega) を 5 倍希釈したものを各 well あたり 200 μ l 加えセルスクレイパーで細胞を掻き取った。掻き取った細胞をマイクロチューブに取り、適宜に vortex を行いながら、氷上に 10 分間置いた。その後、4 $^{\circ}$ C、1,000 rpm、5min 遠心を行い、上清を試料としレポーターアッセイに供した。レポーターアッセイには Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を使用し、回収されたサンプルを 5.0 μ l を供してルシフェラーゼ活性を Multimode Reader TriStar LB 941 (BERTHOLD) により測定した。得られた活性はブラッドフォード法により測定したタンパク質量により補正した。

THP-1 細胞は 1×10^6 cells/well となるように 1 ml/well を 12-well plate に播種し、0.1 μ g/ml phorbol myristate acetate (Sigma) および 0.1 μ M 1,25-dihydroxy-vitamin D3 (Wako Pure Chemical Industries) 存在下で 72 時間培養し、マクロファージ様細胞に分化させた。分化後、1 ml の PBS にて各 well を洗浄した。洗浄後、DMEM 培地および無血清の DMEM 培地 50 μ l に pcELAM-L を 0.5 μ g 相当を添加後 6.0 μ l FuGENEHD (Roche) を加え 15 分室温放置した溶液を加えて最終容量を 0.5 ml として 24 時間、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下でトランスフェクションを行った。トランスフェクション処理した細胞は、1 ml の PBS にて各 well を洗浄後、オクラトキシン A (3.13, 6.25, 12.5, 25, 50 μ g/ml) およびエンドトキシン 100 ng/ml をそれぞれ含む DMEM を各 well あたり 500 μ l を加えて培養し、6 時間後培養液を除去した。その後 1 ml の

PBS にて各 well を洗浄し、Passive Lysis Buffer 5×を 5 倍希釈したものを各 well あたり 50 μ l 加えセルスクレイパーで細胞を掻き取った。掻き取った細胞をマイクロチューブに取り、適宜に vortex を行いながら、氷上に 10 分間置いた。その後、4 $^{\circ}$ C、1,000 rpm、5min 遠心を行い、上清を試料としレポーターアッセイに供した。レポーターアッセイには Dual-Luciferase Reporter Assay System を使用し、回収されたサンプルを 5.0 μ l を供してルシフェラーゼ活性を Multimode Reader TriStar LB 941 により測定した。得られた NF- κ B 依存性レポーター活性はブラッドフォード法により測定したタンパク質量により補正した。

【清酒小仕込試験】

通常の清酒の醸造に準じて試験を行った。15 $^{\circ}$ C で水麴を行い、添仕込を 15 $^{\circ}$ C、仲仕込および留仕込は 10 $^{\circ}$ C で行った。仕込み割合は Table 1 のとおりである。留仕込時に原料のかけ米を全量試験に添加することから、5 日目のサンプリングを発酵前とし、発酵を終了させる 25 日目を発酵後サンプルとした。

留仕込は以後 1.5 $^{\circ}$ C づつ品温を上げ、留仕込 4 日目には品温を 15 $^{\circ}$ C とし以後同温度を維持した。なお、原料の米は五百万石を、酵母は協会 7 号を使用した。

【オクラトキシン A の分析】

試料を遠心管に分取し 3,000 rpm、5 min 室温にて遠心分離を行った。得られた上清を 2 ml 分取し 18 ml の PBS を加えた。同サンプルはオクラトキシン A のイムノアフィニティーカラムである OtaCLEAN カラム (LCTech) に全量

負荷しクリーンアップを行った。水：アセトニトリル：酢酸(70:30:1, v/v)で溶解後、HPLC (ODS カラム：3.0 mm i.d. × 75 mm、移動相：アセトニトリル-水-酢酸(55+43+2)、流速 0.5 mL/min.、蛍光検出器：励起波長 333 nm、蛍光波長 460 nm) による分析に供した。

C. 研究結果

【RAW264 におけるエンドトキシン誘導性 NF- κ B 依存性レポーター活性におよぼすオクラトキシン A の影響】

RAW264 においてエンドトキシンによる誘導される NF- κ B 依存性レポーター活性におよぼすオクラトキシン A の影響を検討した。オクラトキシン A 存在下、RAW264 細胞をエンドトキシンで刺激し、細胞抽出液を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、エンドトキシン誘導性 NF- κ B 依存性レポーター活性は 50 μ g/ml のオクラトキシン A 存在下でコントロールと比較し約 40% のレベルまで抑制された (Fig. 1)。一方、25 μ g/ml 以下のオクラトキシン A 存在下ではエンドトキシン誘導性 NF- κ B 依存性に対して顕著な変化認められなかった。

【RAW264 におけるエンドトキシン誘導性 IFN- β プロモーター依存性レポーター活性におよぼすオクラトキシン A の影響】

次に、RAW264 においてエンドトキシンによる誘導される IFN- β プロモーター依存性レポーター活性におよぼすオクラトキシン A の影響を検討した。その結果、エンドトキシン誘導性 IFN- β プロモーター依存性レポーター活性は 25 μ g/ml 以上の濃度のオクラトキシン A 存在下において濃度依存的な抑制効果が認められた (Fig. 2)。一方、12.5 μ g/ml 以下のオクラトキシン A 存在下では

エンドトキシン誘導性 IFN- β プロモーター依存性レポーター活性に対して顕著な変化認められなかった。

【THP-1 におけるエンドトキシン誘導性 NF- κ B 依存性レポーター活性におよぼすオクラトキシン A の影響】

マクロファージ様細胞に分化させた THP-1 細胞においてエンドトキシンによる誘導される NF- κ B 依存性レポーター活性におよぼすオクラトキシン A の影響を検討した。その結果、エンドトキシン誘導性 NF- κ B 依存性レポーター活性は 6.25 μ g/ml 以上の濃度のオクラトキシン A 存在下において濃度依存的な抑制効果が確認された (Fig. 3)。以上の結果から、本研究で検討した上記 3 種類のアッセイ系においては、マクロファージ様細胞に分化させたヒト単球由来細胞 THP-1 細胞におけるエンドトキシン誘導性 NF- κ B 依存性レポーター活性がオクラトキシン A に最も感受性が高いことが明らかとなった。

【清酒発酵過程におけるオクラトキシン A の消長】

小仕込試験による清酒醸造工程におけるオクラトキシン A の消長について HPLC を用いて検討を行った。小仕込試験サンプルの上清画分についてオクラトキシン A の抽出方法について検討した結果、今回の抽出メソッドにおいて行ったオクラトキシン A の添加回収実験において、発酵前サンプルにおいては 93.1 ± 8.4 、発酵後サンプルにおいては 93.5 ± 9.0 の回収率を得た (Table. 2)。本法に基づきオクラトキシン A の挙動を検討した結果、小仕込試験 5 日目サンプルに 5ppb のオクラトキシン A を添加した場合、その残存率は 5 日目で 14.6%、発酵後 (25 日目) では 8.4% との結果を得た (Table. 3)。以

上の結果から、清酒醸造工程にけるオクラトキシシン A は発酵過程にかかわらず、可溶性画分に留まる可能性は低いことが示唆された。

D. 考察

今回、オクラトキシシン A のバイオアッセイ系への応用の観点から、活性化マクロファージにおけるエンドトキシシン誘導性シグナル伝達系におよぼすオクラトキシシン A の影響を検討した。オクラトキシシン A は世界各国においてその汚染が認められることから、免疫毒性を含め多くの毒性報告がある (Ferrante et al. 2008)。マウスマクロファージ様細胞 RAW264 とヒト単球由来細胞 THP-1 をマクロファージ様細胞に分化させた細胞の 2 種類の細胞を用いて検討した結果、ヒト単球由来細胞 THP-1 で惹起されるエンドトキシシン誘導性に NF- κ B 依存性レポーター活性が検討したなかで最もセンシティブであることが明らかとなった (Fig. 1, 2, 3)。この結果は、細胞がマウスではなくヒトであることから、その毒性評価はより正確な影響を反映していることが期待できる点で優位性を有すといえる、但し、現時点ではレポーター遺伝子のトランスフェクションがステイブルでないため、今後はトランスフェクションステップの削減と結果の安定性を図る点から、ステイブル株の構築が望まれる。

一方、清酒発酵過程におけるオクラトキシシン A の消長については、今回の一連の研究から原料中に混入したオクラトキシシン A は、その醸造期間中において少なくとも上清画分から約 14.6% の未満の検出に留まる可能性が明らかとなった (Table. 3)。この結果は、醸造過程の最終産物としての酒中にはオクラトキシシン A は

移行しにくいことを強く示唆している。今後は、今回のオクラトキシシン A の挙動の機序についての検討が必要となろう。その際、発酵過程におけるオクラトキシシン A の抽出方法については、上清画分については本研究において構築した回収方法を適用可能であるが、沈殿画分についてはそのサンプル形態の違いから新たな抽出メソッドの確立が必要と考えられる。沈殿画分からのオクラトキシシン A の抽出方法の構築は、今回のオクラトキシシン A の発酵過程の動態について極めて重要な知見を付与すると考えられる。つまり、清酒醸造工程にけるオクラトキシシン A が発酵過程にかかわらず、可溶性画分に留まる可能性の低い理由が分解によるものであるのか否かは勿論、その発酵過程におけるオクラトキシシン A の消長のタイムコースの詳細なデータも得られると期待できる。

E. 結論

今回オクラトキシシン A の免疫毒性として、ヒト単球由来細胞 THP-1 をマクロファージ様細胞に分化させた細胞におけるエンドトキシシン誘導性 NF- κ B 依存性レポーター活性に対する阻害作用が評価系として利用できることを明らかにした。また、清酒醸造過程におけるオクラトキシシン A の消長を検討した結果、発酵過程にかかわらず、可溶性画分に留まる可能性が低いことが強く示唆された。

参考文献

Sugita-Konishi, Y. and Sugiyama, K: The risk assessment of mycotoxins and its international trends, *J. Food Hyg. Soc. Japan* **49**, 1-10 (2008).

Sugiyama, K. and Sugita-Konishi, Y: Mycotoxin regulations in foods in European Union, United States and Japan, *A Technical Journal on Food Chemistry & Chemicals* **264**, 73-78 (2007).

Ferrante, M. E., Raso, G. M., Bilancione, M., Esposito, E., Iacono, A. and Meli R: Differential modification of inflammatory enzymes in J774A.1 macrophages by ochratoxin A alone or in combination with lipopolysaccharide, *Toxicol. Lett.* **181**, 40-46 (2008).

F. 健康危険情報

なし

G. 研究業績

【原著論文】

1. Aoyama, K., Nakajima, M., Tabata, S., Ishikuro, E., Tanaka, T., Norizuki, H., Itoh, Y., Fujita, K., Kai, S., Tsutsumi, T., Takahashi, M., Tanaka, H., Iizuka, S., Ogiso, M., Maeda, M., Yamaguchi, S., Sugiyama, K., Sugita-Konishi, Y. and Kumagai, S: Four-year surveillance for ochratoxin A and fumonisins in retail foods in Japan, *J Food Prot.* **73**, 344-352 (2010).
2. Sugita-Konishi, Y., Sato, T., Saito, S., Nakajima, M., Tabata, S., Tanaka, T., Norizuki, H., Itoh, Y., Kai, S., Sugiyama, K., Kamata, Y., Yoshiike, N. and Kumagai, S: Exposure to aflatoxins in Japan: Risk assessment for aflatoxin B1, *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* **27**, 365-372 (2010).

3. Sugiyama, K., Muroi, M., Tanamoto, K., Nishijima, M. and Sugita-Konishi, Y: Deoxynivalenol and nivalenol inhibit lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by mouse macrophage cells, *Toxicol. Lett.* **192**, 150-154 (2010).

【総説・解説】

小西良子, 杉山圭一: マイコトキシン被害の現状とその対策について, *獣医公衆衛生研究*. **12**, 9-11 (2010).

【著書】

杉山圭一, 室井正志, 棚元憲一, 小西良子: LPS誘導性一酸化窒素産生におよぼすトリコテセン系マイコトキシンの影響, *エンドトキシン研究12ー自然免疫学の新たな展開ー*. 高田春比古, 谷徹, 嶋田紘 (編). 81-83 医学図書出版株式会社. (2009).

【招待講演】

1. Sugiyama, K: Effect of deoxynivalenol on Toll-like receptor signaling, The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology, 2009年5月29日
2. 杉山圭一: 微生物毒素の制御を目指して, 京都工芸繊維大学微生物工学セミナー, 2009年8月6日

【学会発表】

1. Sugiyama, K., Narui, T., Kamata, Y., Kobayashi, K., Tadokoro, T. and

- Sugita-Konishi, Y: Effects of epigallocatechin gallate on cytotoxicity induced by deoxynivalenol in mouse cultural macrophages, ISM Conference 2009, 102 (2009, 9).
2. Tamura, C., Nakamura, M., Kadota, T., Itoh, S., Kamata, Y., Sugiyama, K., Nishijima, N. and Sugita-Konishi, Y: Sealing effects of pectin gelatin on mycotoxin reduction in food, ISM Conference 2009, 97 (2009, 9).
3. 田村千佳子、杉山圭一、鎌田洋一、小西良子、中馬 誠、門田智之、西島基弘:低トキシシルペクチンのゲル化を利用したカビ毒の封入効果、第98回日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集 106(2009, 10).
4. 杉山圭一、室井正志、棚元憲一、小西良子:TLRシグナルに対するdeoxynivalenolの抑制機構、第82回日本生化学会大会プログラム、371(2009, 10).
5. Sugita-Konishi, Y., Aoyama, K., Nakajima, M., Tabata, S., Ishikuro, E., Tanaka, T., Norizuki, H., Itoh, Y., Fujita, K., Kai, S., Tsutsumi, T., Takahashi, M., Tanaka, H., Iizuka, S., Ogiso, M., Maeda, M., Yamaguchi, S., Sugiyama, K. and Kumagai, S: Five-year surveillance for Ochratoxin A and Fumonisin in retail foods in Japan, UJNR Panel meeting (天然資源の開発利用に関する日米会議 有毒微生物専門部会), (2009, 11).
6. 木下麻・、葉袋裕二、鎌田洋一、小西良子、杉山圭一:デオキシニバレノール誘導性細胞毒性に対するカテキン類の効果、日本マイコキシン学会第 67 回学術講演会講演要旨集 19 (2010, 1).
7. 杉山圭一、木下麻・、葉袋裕二、鎌田洋一、佐藤一臣、宮田 徹、小西良子:マクロファージ様細胞におけるトリコセシン系カビ毒誘導性細胞毒性に対する緑茶カテキン類の効果、日本農芸化学会大会講演要旨集(2010・東京) 58 (2010, 3).

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Table 1 清酒小仕込試験の仕込配合

	水麴	添	仲	留	合計	
総米	8	22	56	84	170	g
麴米	8	0	9	17	34	g
蒸米	0	28	61	87	176	g
汲水	45	0	66	98	209	ml

Table 2

小仕込試験上清画分からのオクラトキシンAの回収率

回収率(%)	5日目(発酵前)	25日目(発酵後)
5 ng/g	93.1±8.4	93.5±9.0

Table 3

小仕込試験上清画分中のオクラトキシンAの残存率

	5日目(発酵前)	25日目(発酵後)
残存率(%)	14.6	8.4

Fig. 1

Effect of OTA on LPS-induced NF- κ B dependent reporter activity in RAW264 stably transfected with ELAM reporter gene

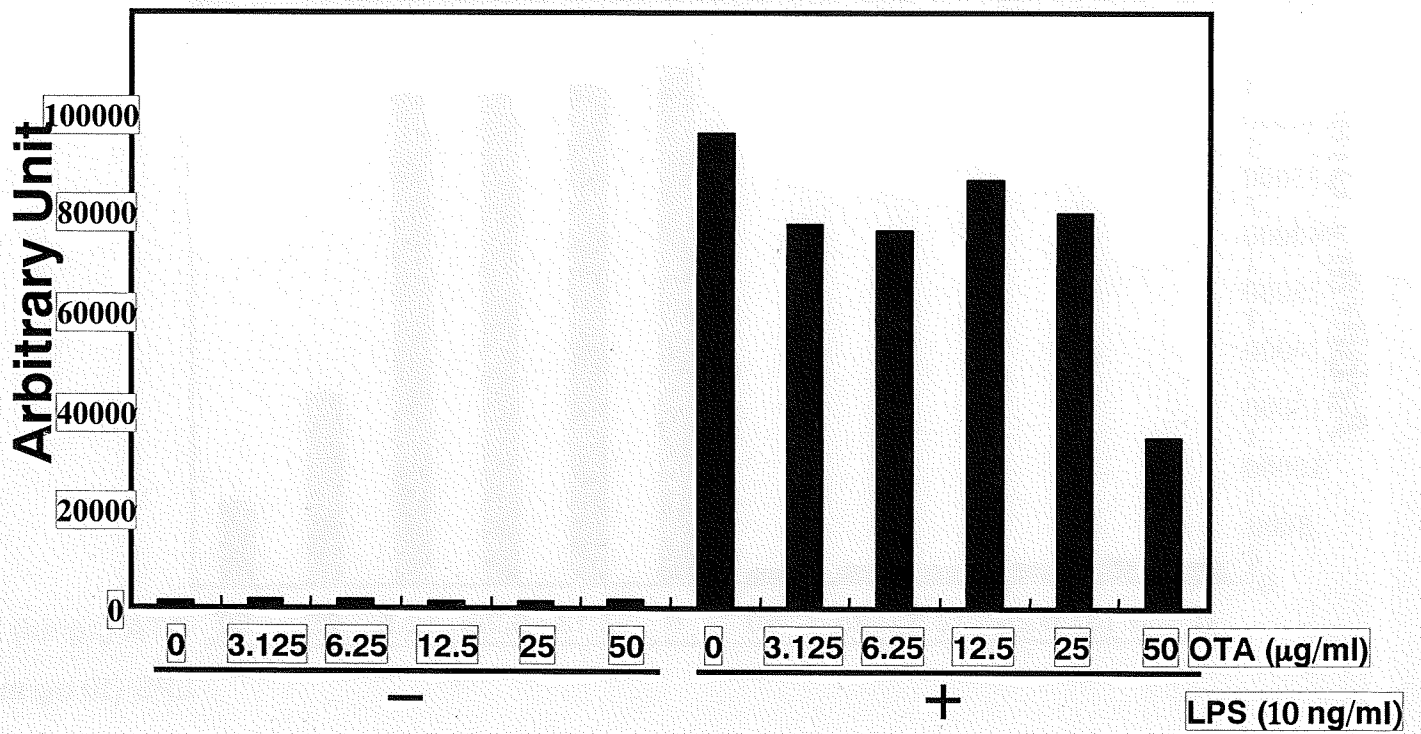


Fig. 2

Effect of OTA on LPS-induced IFN- β promoter activity in RAW264 stably transfected with IFN- β reporter gene

