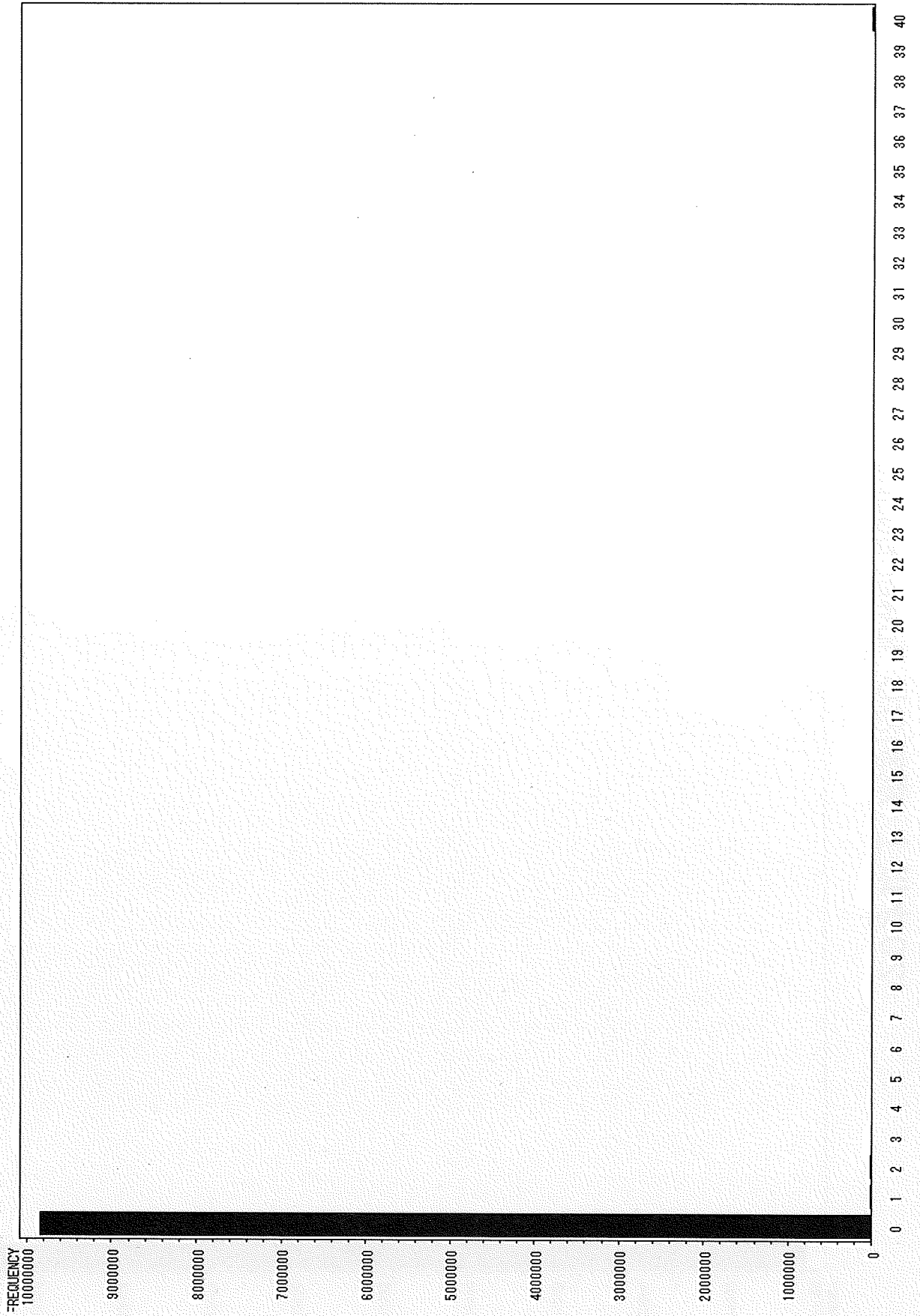
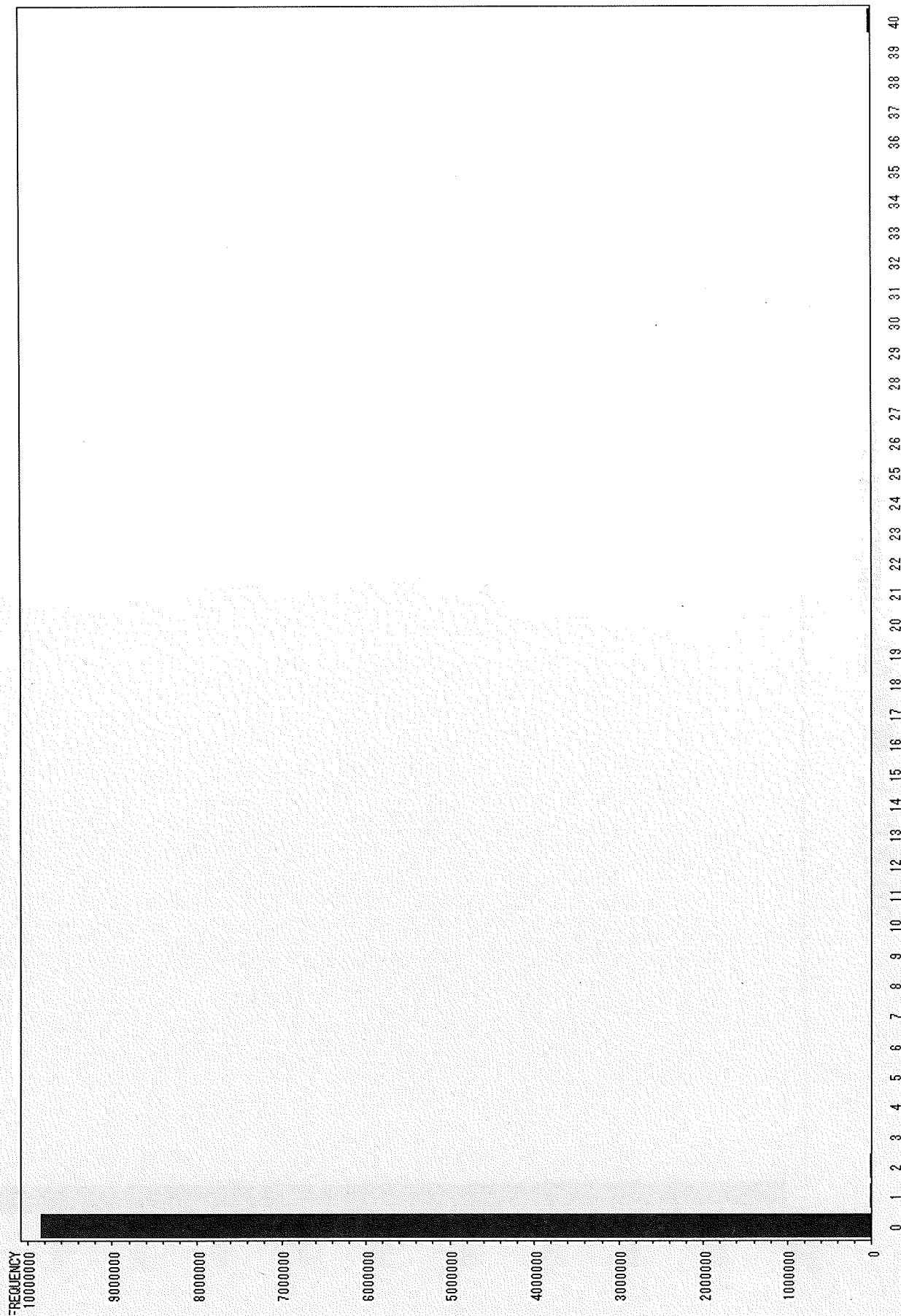


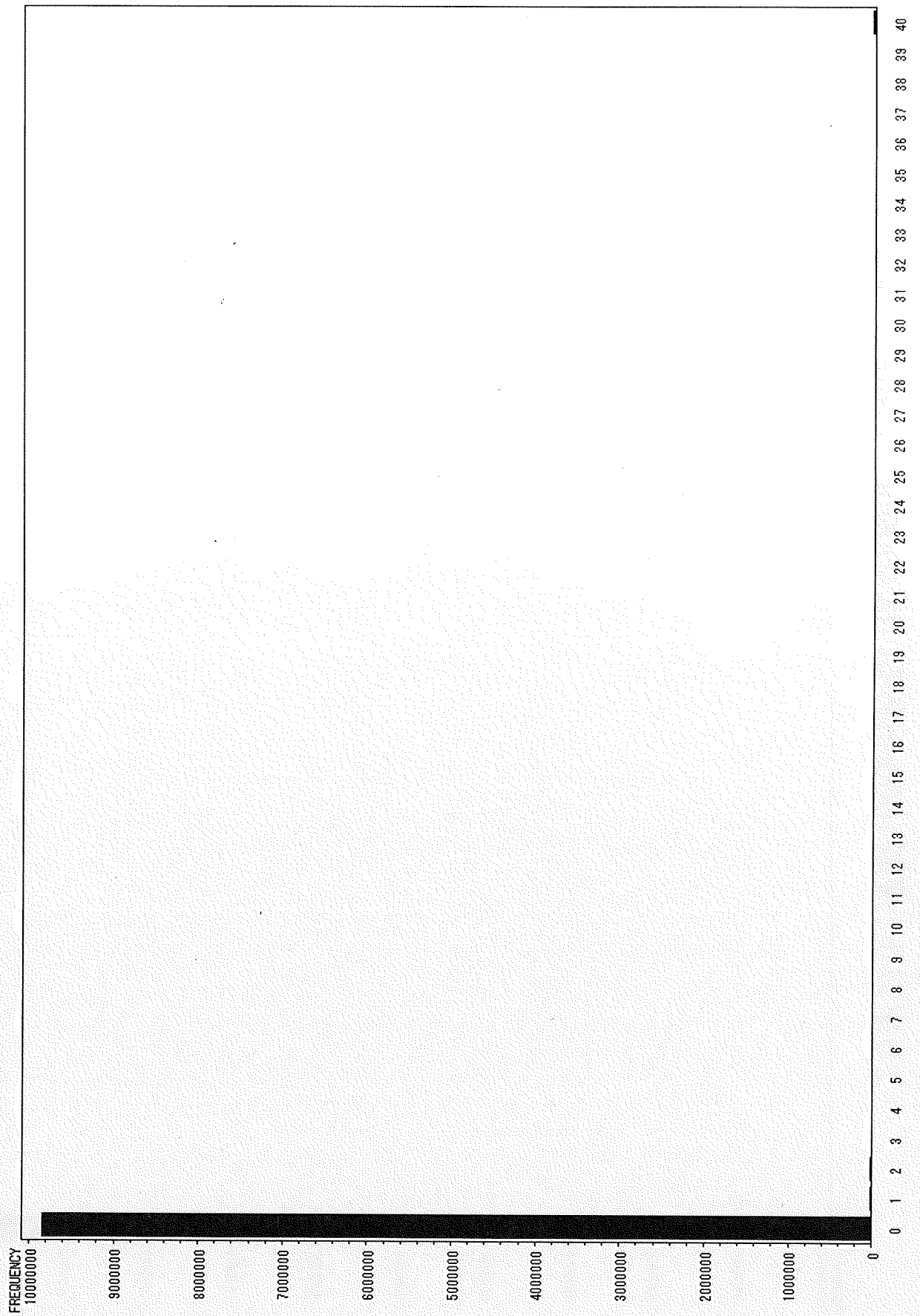
20才以上:規制なし upper bound



20才以上:規制なし lower bound



20才以上:規制1000ngあるいは4000ng upper bound



20才以上:規制1000ngあるいは4000ng lower bound

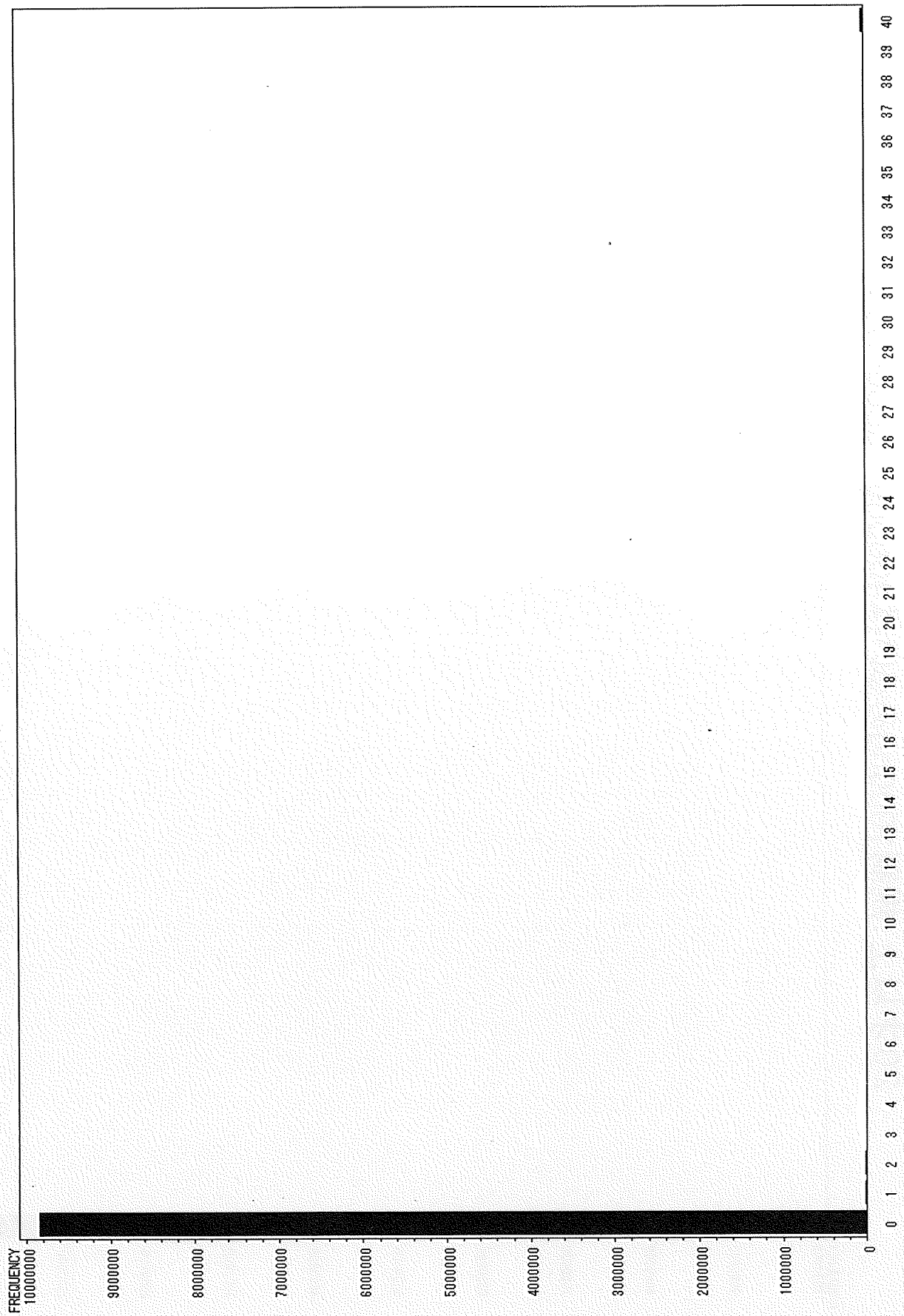


表6. フモニシン曝露量

シナリオ	50%タイム	60%タイム	70%タイム	80%タイム	90%タイム	95%タイム	97.5%タイム	99%タイム	99.5%タイム	99.8%タイム	99.9%タイム
1-6才規制なし:upper bound	0	0	0	0	0.050461998	10.21058456	54.5438784	191.5599328	376.9293637	782.1593959	1251.471511
1-6才規制なし:lower bound	0	0	0	0	0	7.204096607	52.78695156	190.4864742	377.2560047	785.6895022	1254.136077
1-6才規制1μg&4μg:upper bound	0	0	0	0	0.040895765	6.839843278	45.69758044	170.2857323	329.7424078	647.4623353	973.9984294
1-6才規制1μg&4μg:lower bound	0	0	0	0	0	7.08361268	51.3282415	179.3876483	341.9140282	661.9863296	992.6012067
7-14才規制なし:upper bound	0	0	0	0	0	4.552000812	27.3109155	100.3106406	201.5405703	425.3676959	684.5253799
7-14才規制なし:lower bound	0	0	0	0	0	1.217636854	26.96222254	100.598466	202.2911436	427.6605024	688.9053562
7-14才規制1μg&4μg:upper bound	0	0	0	0	0	4.495318448	26.77606073	95.34484485	184.1375873	361.2475773	549.0547031
7-14才規制1μg&4μg:lower bound	0	0	0	0	0	1.178875833	26.28432842	95.27434142	184.0305748	360.9126765	544.4005413
15-19才規制なし:upper bound	0	0	0	0	0	0	4.85902053	41.74777467	99.60656436	230.7067985	386.4080775
15-19才規制なし:lower bound	0	0	0	0	0	0	2.617310984	41.40944374	99.5220289	230.8088547	386.4080775
15-19才規制1μg&4μg:upper bound	0	0	0	0	0	0	4.802194906	40.51548872	94.06240496	207.2975957	326.8217979
15-19才規制1μg&4μg:lower bound	0	0	0	0	0	0	2.579234934	40.14773635	93.94655677	207.1882195	326.6355855
20才以上規制なし:upper bound	0	0	0	0	0	0	0.022942167	5.259284308	18.98924895	64.27241411	122.4362248
20才以上規制なし:lower bound	0	0	0	0	0	0	0.02291041	5.31391832	19.15751705	64.13830881	122.3776542
20才以上規制1μg&4μg:upper bound	0	0	0	0	0	0	0.022949283	5.277696421	19.16957657	64.16731172	122.923023
20才以上規制1μg&4μg:lower bound	0	0	0	0	0	0	0.022911068	5.326707382	19.15875023	64.13629006	122.586212

厚生労働科学研究費補助金

(食品の安全・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

カビ毒の毒性と評価

研究分担者 局 博一 東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻教授

研究要旨

1. ニバレノール誘発IgA腎症に対するSMTP-7の修飾作用の検討

平成20年度の研究において、ニバレノール(NIV)によるマウスIgA腎症の病態メカニズムを解明する目的で、組織プロテオリシス活性化化合物で、新規慢性腎疾患治療薬として期待される*Stachybotrys microspora* triprenyl phenol(SMTP)-7の本マウスIgA腎症に対する修飾効果について、IgA沈着に対する保護効果と、IgA沈着後での改善効果の有無の検討を開始した。本年度は昨年度終了した動物実験の腎組織でのIgA蛍光免疫染色像の画像解析により、糸球体に沈着したIgA蛍光強度値を定量的に計測し、NIV単独群に比して8週間にわたるNIVとSMTP-7の同時投与により、糸球体IgA沈着の蛍光強度値の有意な低下を確認したが、NIVの12週間にわたる投与の後に、NIVとSMTP-7を4週間併用投与した場合には、平均蛍光強度に有意な差は認めなかった。以上より、SMTP-7の急性期からのIgA沈着に対する保護作用が認められたことから、マウスIgA腎症の病態メカニズムには、糸球体糸球体における組織リモデリングの関与することが示唆された。

2. デオキシニバレノールの心機能に及ぼす影響 (H21)

デオキシニバレノール(DON)の成熟ラットへの皮下投与による心機能影響を調べた。心拍数は0.5 mg/kgでは明瞭な変化が認められなかったが、1 mg/kgおよび2 mg/kgでは、投与後90~180分にかけて有意な増加が認められた。PQ間隔は2 mg/kg、QT間隔は1 mg/kg および2 mg/kgでそれぞれ有意な延長が示されたが、QRS持続時間は有意な変化が認められなかった。DON投与群では対照群ではみられない不整脈の発現が多く認められた。0.5~2 mg/kgの間で濃度依存性に第2度房室ブロックの発現頻度が高まった。また上室性期外収縮や心室期外収縮の発現が1 mg/kgおよび2 mg/kgで認められた。心拍変動解析による自律神経機能の変化を調べたところ、DON投与群では投与後90分で交感神経活動および副交感神経活動がもっとも低くなり、2 mg/kgではその後も180分まで副交感神経活動の明瞭な低下が持続した。これらの成績から、DONは伝導障害や異所性刺激生成を主とする心機能異常を引き起こすこと、また投与直後の自律神経活動の著しい低下が生じることが明らかになった。

研究協力者：

渋谷 淳 東京農工大学大学院共生科学技術研究
部動物生命科学部門准教授

A. 研究目的

1. ニバレノール誘発IgA腎症に対するSMTP-7の修飾作用の検討

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、下痢、繁殖障害、栄養障害、免疫抑制等、動物に対して様々な毒性作用を示す他、家畜においてIgA産生に影響を及ぼすことが知られており、実験動物では、マウスに12 ppmのNIVないし25 ppmのDONを最低4週間混餌投与することにより、血清IgAの上昇とメザンギウムへのIgA沈着といったヒトIgA腎症様の変化が起きることが報告されている (Hinoshita et al., 1997 ; Pestka et al., 1989)。

IgA腎症は、日本において最も多い原発性糸球体腎炎であり、20年以上の経過を経て、40~50%の症例が透析療法や腎移植を必要とする末期腎不全に至る疾患である (Tomino, 1999)。その病因については、遺伝的素因、食物やウィルス惹起抗原、粘膜免疫系の機能低下、T・B細胞機能異常等の関与が報告されているが、詳細については不明な点が多く、治療・予防方法を確立することは臨床的、医療経済的にも重要な課題である。

19年度の研究において、BALB/cマウスにNIVを混餌投与すると、8週目において血清中のIgAレベルの上昇と糸球体へのIgA、IgGの用量依存的な沈着が12 ppm以上で認められることを確認した。また、IgA腎症を自然発生するhigh IgA strain (HIGA) マウスに対するNIV投与では、投与により血

清中のIgAレベルの増強を認めるものの、糸球体へのIgA、IgG沈着の増強は認めなかった。このことから糸球体へのIgA沈着の促進には、血清中のIgAレベル以外の要因の関与している可能性が示唆された。

カビ由来の組織プロテオリシス活性化化合物である *Stachybotrys microspora* triprenyl phenols (SMTPs) は、各種の慢性疾患に対して、局所のプラスミン活性を増強させて組織プロテオリシスの促進をはかることにより、組織のリモデリングによる治癒が期待される物質群である。SMTP-は、SMTPsの1種であり、80-150 μ Mの濃度で、高いプラスミノゲン活性を有することが知られており、プラスミノゲン活性の構造的制御や、抗血栓薬の研究に有効であることが知られている。

本研究では、NIVによって誘発されるIgA腎症の病態進行に関連する糸球体局所の要因を検討する目的で、20年度に、マウスに対してNIVと共に組織プロテオリシス活性化化合物であるSMTP-7を同時投与して、IgA腎症の発生に対する修飾作用の検討を初め、今年度は画像解析により糸球体へのIgA沈着の定量解析を終了した。

2. デオキシニバレノールの心機能に及ぼす影響 (H21)

デオキシニバレノール (DON) は、国内においても低濃度ながら穀類を中心にした多種類の食品原材料および加工食品への残留が認められ、その健康影響評価を広範囲に行う必要がある。DONと同じトリコセ系カビ毒であるT-2トキシンでは循環器毒性が生じることが知られているため、DONにおける循環器毒性の有無を調べることは意義が高い。この研究では、自由行動下のラットからテレメトリー心電図を記録することで、DONの投与による心拍数変化、不整脈の出現性および自律神経機能の変化を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. ニバレノール誘発IgA腎症に対するSMTP-7の修飾作用の検討

NIVは国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部に生成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1 L) にて接種し25℃, 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1 L) に, あらかじめ平板培養したFn-2Bを入れ, 25℃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℃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℃で保管した。Nivalenol (NIV)を24 ppmの混餌用量でBALB/cマウスに投与してIgA腎症を誘発するモデル

で, SMTP-7を10 mg/kg/日, 週3回の割合で, 8週間の間NIVと同時投与する群, ないし16週間NIVを投与して最後の4週間にSMTP-7を投与する群を設定して実験を行った。具体的には, 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, 実験1では, NIVによる急性期のIgA沈着に対するSMTP-7の保護作用の有無を検討する目的で, 一群8-12匹ずつで計3群を設定し, NIVを0.24 ppmの用量で8週間混餌投与し, 同時にSMTP-7を10 mg/kg/日, 週3回の割合で投与する群を設けた。次に実験2では, NIVによるIgA腎症病態進行に対するSMTP-7の影響を検討する目的で, 一群8-12匹ずつで計3群を設定し, NIVを0, 24 ppmの用量で16週間混餌投与し, さらに最後の4週間にSMTP-7をNIVと同時投与する群を設定した (Fig. 1)。NIVの投与量及び投与期間については, 昨年までに我々が実施したBALB/cマウスを用いたNIV誘発IgA腎症モデルを基にして24 ppmと設定した。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7~13例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℃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 μmに薄切し, -20℃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。すなわち, 糸球体におけるIgA抗体の沈着について, immunoglobulin A (goat anti-mouse IgA, x1000 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沈着については、200倍視野で1個体につきランダムに5ヶ所観察し、目視による蛍光強度について0から3のスコアをつけて評価した。また、WinROOF (version 5.7, Mitani Corp., Fukui, Japan) を用いて、腎糸球体のIgA沈着部の面積当たりの蛍光強度値を測定した。

統計学的解析は、体重、血清IgA・IgG濃度、臓器重量、IgA沈着の蛍光強度の定量値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Tukeyの多重比較を行い、不等分散の場合はSteel-Dwassの多重比較検定を行った。目視によるIgA沈着の蛍光強度については、Mann-Whitney's U-testによる比較を行った。

(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。

2. デオキシニバレノールの心機能に及ぼす影響 (H21)

(1) 供試動物およびテレメトリー送信機の埋め込み手術：合計16匹のWistarラット (8~12週齢、雄；日本SLCより購入) を用いた。実験期間中のラットは環境条件を調節できるチャンパー内 (1匹/1ケージ×4収容) で12時間周期の明暗周期 (暗期 24:00-12:00、明期12:00-24:00)、温度24℃、自由摂食・飲水の条件下で飼育された。ラットは8週齢で導入した後、1週間後に無線で心電図を搬送するためのテレメトリー送信機 (心電図用、A10ETA-F20, Data Science, St. Paul, MN) の体内埋め込み手術をペントバルビタールナトリウム (30 mg/kg i.p.) 全身麻酔下で行った。テレメトリー送信機の本体はラットの背部皮下に、本体に接続し

た心電図記録電極の先端を背部肩甲骨間の皮下と腹側胸部皮下に固定した (Apex-Base誘導、Kuwahara et al., 1994)。この埋め込み手術の1週間後から正式な心電図記録を開始し、DONの投与後3日間にわたって連続記録した。心電図の電氣的シグナルは1msecのサンプリングタイムで検出し、ケージの底面に設置した受信ボード (RA 1610, Data Science) に無線で連続的に搬送した。心電図波形はECGプロセッサ (softron) でリアルタイムに観察するとともに、ハードディスクに記録した。

(2) 投与プロトコール：各群4匹ずつの実験群を4群設けた。1群は対照群としDONを含まない溶媒 (プロピレングリコール) のみを0.2 ml投与した。他の3群は、DON (和光純薬、標準品) を0.5 mg/kg、1 mg/kg または2 mg/kgの用量で各ラットに皮下投与した。DON投与の24時間前に溶媒 (プロピレングリコール) のみを0.2 ml投与して同一個体における投与対照とした。

(3) データ解析および統計処理：ECGプロセッサシステム (ソフトロン社製) で取得した心電図データに基づいて、心拍数、心電図波形 (不整脈を含む) および心拍変動解析を専用のソフトウェア (ソフトロン社製SRV2W) を用いて行った。心拍数は心電図のR波から検出し、また心電図波形成分のうちPQ間隔 (心房-心室間の伝導時間)、QRS持続時間 (心室脱分極時間)、QT間隔 (心室の脱分極+再分極時間) を自動計測した。また、記録の全体を通じて目視による確認も行った。記録中に基線の大きな動揺や筋電図の混入が激しい部分は計測対象から除外した。一方、DON投与による不整脈の種類と発現頻度を観察した。

心拍間隔のゆらぎ成分の高速フーリエ変換によるパワースペクトラムを上記のソフトウェア (SRV2W) によって計測し、交感神経活動と副交感神経活動を反映する低周波成分 (LF) と副交感神経活動を反映する高周波成分 (HF) のパワー値を求め、DON投与による影響を調べた。

群間の有意差検定はKruskal-Wallisの一元配置分散分析法によって行い、次いで対照群とDON投与群との間の有意差検定はShirley-William testを用い

た。また、不整脈の発現頻度の検定は分散分析（ANOVA）によって行った。いずれも $P<0.05$ で有意差ありとした。

（倫理面への配慮）

本研究は東京大学大学院農学生命科学研究科動物実験委員会の承認のもと、東京大学動物実験実施マニュアルに沿って実施した。テレメトリー送信機の体内埋め込み手術は全身麻酔下で行い、術後1週間の回復期の後に、本試験を行った。

C. 研究結果

1. ニバレノール誘発IgA腎症に対するSMTP-7の修飾作用の検討

実験1. NIVによる急性期のIgA沈着に対するSMTP-7の修飾作用の検討：

実験期間でのin lifeパラメーター、血清IgA及びIgG濃度、腎臓重量、腎臓の病理組織学的検索結果は20年度に報告した。

糸球体へのIgA沈着に関する解析結果をFig. 2に示す。IgAについては、対照群では糸球体にほとんど蛍光が観察されなかったが、NIV単独群およびNIV+SMTP-7併用群では糸球体メザンギウム領域においてIgAの顕著な顆粒状沈着が認められた。腎糸球体におけるIgA分布では、NIV単独群と比べてNIV+SMTP-7併用群で、減少傾向を示したものの、明らかな差は認められなかった。しかし、腎糸球体におけるIgA蛍光強度値は、NIV単独群に比べてNIV+SMTP-7併用群で有意な低下が認められた(Fig. 4)。

実験2. NIVによるIgA腎症病態進行に対するSMTP-7の修飾作用の検討：

実験期間でのin lifeパラメーター、血清IgA及びIgG濃度、腎臓重量、腎臓の病理組織学的検索結果は20年度に報告した。

糸球体へのIgA沈着の解析結果をFig. 3に示す。IgAについては、NIV投与及びNIV+SMTP-7投与群において、メザンギウム領域を中心にIgA沈着が認められたものの、これらの分布において、SMTP-7投与による

明らかな影響は観察されなかった。また、同領域におけるIgA蛍光強度値を計測したものの、SMTP-7投与による明らかな影響は認められなかった(Fig. 4)。

2. デオキシニバレノールの心機能に及ぼす影響

(1) 心拍数(HR)の変化：対照群に比べて、1 mg/kg DON投与群では投与後90分から150分にかけて有意($P<0.01$)なHRの増加が、2 mg/kg DON投与群では投与後90分から180分にかけて有意($P<0.05$)な増加が認められた。0.5 mg/kg DONでは、投与後のどの時間帯においてもHRの有意な変化は観察されなかった。

(2) 心電図波形成分の変化：PQ間隔は2 mg/kg DON投与群で投与後30、60、90分目で対照群および他の投与群に比べて延長する傾向が示されたが、とくに90分目では有意($P<0.05$)に延長した(対照群 43.77 ± 2.94 msec、2 mg/kg DON投与群 49.29 ± 4.86 msec)。QRS持続時間はすべてのDON投与群において有意な変化は観察されなかった。QT間隔は1 mg/kg および2 mg/kg DON投与群でどの時間帯においても対照群に比べて延長する傾向があったが、投与後の60分目では有意差($P<0.05$)が認められた(対照群 66.97 ± 5.83 msec、1 mg/kg DON投与群 71.5 ± 5.27 msec、2 mg/kg DON投与群 76.21 ± 7.18 msec)。なお、0.5 mg/kg DON投与群では対照群との間に差がみられなかった。

(3) 不整脈の発現性：対照群では投与前後の全期間を通じて不整脈は観察されなかったが、DON投与群では投与後に第2度房室ブロック(図1)の濃度依存性の出現が認められ、2 mg/kg DONでは有意($P<0.05$; ANOVA)な発現(平均 3.75 episodes/rat; $n=4$)が示された。また、房室ブロックとともに洞性徐脈や補充収縮も認められる傾向があった。さらに、DON投与群では上室性期外収縮(supraventricular extrasystole)および心室期外収縮(ventricular extrasystole)の発現が認められた。前者はもっとも出現が多かった2 mg/kgで平均 2.5 episodes/rat; $n=4$ 、後者ではもっとも出現が多かった1 mg/kgで平均 3.0 episodes/rat;

n=4)であった。これらの不整脈はDONの投与後、およそ3時間以降に多く観察された。

(4) 心拍変動解析 (LF、HF) : 対照群におけるHFパワー値は投与後の180分間にわたってほぼ同程度のレベルを示したが、0.5 mg/kg DON投与群および1.0 mg/kg DON投与群では投与後90分でパワー値がもっとも低くなり、その後は120分から180分まで増大する傾向を示した。一方、2 mg/kg DON投与群では投与後はパワー値が時間の経過とともに明瞭に減少し、120分目、150分目および180分目では対照群に比べて有意 ($P < 0.05$) に減少した。一方、LFパワーはすべてのDON投与群で、投与後90分目でもっとも減少する傾向を示した。1 mg/kg DON投与群では投与後90分目に、2 mg/kg DON投与群では投与後60、90、120、150分目で有意差 ($P < 0.05$) が認められた。交感神経と副交感神経のバランスを示すLF/HFは、0.5 mg/kg、1 mg/kg、2 mg/kg DON投与群でいずれも90分目に有意 ($P < 0.05$) に低い値を示し、2 mg/kg DON投与群では120分目においても有意に低い値を示した。

D. 考察

1. ニバレノール誘発IgA腎症に対するSMTP-7の修飾作用の検討

BALB/cマウスを用いたNIVにより誘発されるIgA腎症において、8週間のSMTP-7併用投与による修飾作用について、IgA及びIgGの血清中濃度ならびに糸球体へのIgAの沈着を検討した。その結果、NIVの単独投与群及びNIV+SMTP-7併用投与群では、血清中IgA濃度の上昇が観察され、さらに糸球体へのIgA沈着が認められた。SMTP-7投与により、腎糸球体のIgAの蛍光強度に有意な低下が認められた。また、昨年度報告したように、SMTP-7投与により、相対腎重量に変化は認められなかったものの、体重及び絶対腎重量の減少傾向が認められた。以上の結果より、SMTP-7は、急性期からのIgA沈着に対して保護作用を示すことが考えられ、SMTP-7による組織リモデリング機能を考慮すると、NIVによる糸球体糸球体へのIgA沈着の際に、その初期から糸球体壁のリモデリングの関与していることが示唆さ

れた。

また、本IgA腎症モデルにおいて、16週間NIVを投与して、最後の4週間にのみSMTP-7を短期投与することにより、腎症がより進行した時期でのSMTP-7の反応性を検討した結果、昨年度報告したように、NIV投与群及びNIV+SMTP-7投与群で、血清中IgA濃度の上昇が観察され、さらに糸球体糸球体へのIgA沈着に明らかな増強が認められた。しかし、SMTP-7投与により、血清中IgA濃度及び糸球体へのIgA沈着に対する明らかな変化は認められなかった。また、SMTP-7の投与により、体重減少が認められ、それにより相対腎重量の増加が示された。以上の結果は、既に沈着したIgAに対してSMTP-7によって期待されるリモデリング効果による修復作用は認められないと考えられた。

2. デオキシニバレノールの心機能に及ぼす影響

トリコテセン系カビ毒の一種であるT-2トキシシンでは、ブタにおいて心筋の多発性変性、水腫、心内膜下出血、単核球浸潤などの病理学的変化を起こす (Pang VF et al., 1986 Vet. Pathol.) やT-2トキシシン (2mg/kg) のイヌへの静脈内投与によって、30分以内の収縮期圧の低下、45分前後からの心拍数増加および60分以内の房室ブロックが生じることが明らかにされている (Toxicol. 1987; 25 (3): 325-31. Bubien JK, Woods WT Jr.)。上記の心拍数増加はプロプラノロールによって半減することから、交感神経活動が部分的に関与していることが示唆されている。また、ラットの培養心筋細胞に直接T-2トキシシンを作用させたin vitroの実験では、250 μ g/ml以上の濃度で拍動数の減少に続く不可逆的な拍動停止が生じることが明らかになっている (Yarom R. et al., 1986; Toxicol Lett.)。一方、DONの心臓作用に関してはこれまであまり注目されていないが、Peng SQらのラット培養心筋細胞の電気生理学的研究では、50~200 mg/LのDONによって、活動電位振幅の抑制、活動電位発生頻度の抑制、活動電位持続時間 (APD) の延長などの変化が生じることが述べられている (Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi. 2003 37 (6): 423-425. 中国国内誌)。また、10~20

ppmの濃度でDONを含む餌を数週間摂食したマウスでは、石灰化した心膜炎が生じることを示されている。また蛋白合成が抑制されているが、このような変化は他の臓器よりも低濃度で生じることが報告されている (Robbana-Barnat S et al., Food Addit Contam. 1987 4(1):49-56.)。近年、DONによる肝細胞のアポトーシスやDNA傷害は、活性酸素種の影響要因として関与する可能性が示唆されている (Zhang et al., 2009)。これらの研究知見を考慮すると、DONもT-2トキシンと同様に心臓毒性を有していることが推測されるが、in vivoの実験も含めDONの心臓機能影響に関する知見は乏しいのが現状である。

本研究では、DON 0.5, 1, 2 mg/kgの無麻酔、無拘束ラットへの皮下投与による心臓機能影響をテレメトリー法によって調べた。その結果、1) 1, 2 mg/kgでは投与後90分以降に心拍数の増加が生じること、2) DON投与により、PQ間隔の延長 (2 mg/kg) およびQT間隔の延長 (1 mg/kg, 2 mg/kg) が生じること、

3) 第2度房室ブロック、洞性徐脈、上室性期外収縮、心室期外収縮などの不整脈が生じること、4) 投与後90分で自律神経活動 (LFパワー+HFパワー) がもっとも低くなること、などが明らかになった。

DON投与後120分以降にみられた心拍数の増加は、概ねHFパワー成分の低下と一致していたことから、主として副交感神経活動の低下によるものと考えられるが、有意差はないもののLFパワーおよびLF/HF比が120分以降で上昇傾向を示していることから、この時間帯における交感神経活動の増大も部分的に関与している可能性が示唆される。一方、DON投与後90分では、LFパワーおよびHFパワーのいずれもが著しい低下を示したことから、この時間帯においては自律神経活動が全般的にかなり抑制された状態に陥っていることが示唆された。PQ間隔の延長および第2度房室ブロックが頻繁に認められたことから、DONは心臓の心房-心室間における興奮伝導傷害をもたらすことが明らかになった。また、2 mg/kgの投与量ではQRS持続時間の延長を伴わないQT間隔の延長が出現したことから、DONは心室再分極過程を遅延させる可能性が示唆さ

れた。上室性期外収縮および心室期外収縮 (short-run含む) も多く認められたことから、心臓内における正規の興奮伝導リズムから逸脱した異所性刺激生成が生じていることが示された。これらの不整脈が連続して生じる場合は心拍出量の低下と全身血圧の低下を招き個体死につながる危険性がある。上述した心臓機能異常はDONの心臓への直接作用と自律神経系を介した間接的な作用の両方が関与しているものと推測される。なお、0.1, 0.5, 1, 2mg/kgのDONをラットに皮下投与して血中DON濃度を調べた別の実験では、投与後3時間目で血中濃度が投与前の濃度レベル近くまで低下していたことから、血中濃度レベルと上記の不整脈の発現時間との間には時間的なずれが存在することが示唆された。

E. 結論

1. ニバレノール誘発IgA腎症に対するSMTP-7の修飾作用の検討

BALB/cマウスを用いたNIVにより誘発されるIgA腎症に対して、組織プロテオリシス活性化化合物であるSMTP-7の修飾作用を検討した結果、SMTP-7の急性期からのIgA沈着に対する保護作用が認められたことから、マウスIgA腎症の病態メカニズムには、糸球体係蹄における組織リモデリングの関与することが示唆された。一方で、既に沈着したIgAに対してSMTP-7のリモデリング効果による修復作用は認められなかった。

2. デオキシニバレノールの心臓機能に及ぼす影響 (H21)

DONは0.5 mg/kgの皮下投与で軽度の心臓作用があり、1 mg/kg以上では明らかな心臓毒性作用があることが明らかになった。この心臓毒性にはDONの心臓に対する直接作用と自律神経を介した間接作用が関与することが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表 参考文献

- 1) Ali NS, Yamashita A, Yoshizawa T.: Food Additives Contaminants 15: 377-384 (1998).

- 2) 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).
- 3) 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).
- 4) 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).
- 5) Pestka JJ, Moorman MA, Warner RL.:
Food Chem. Toxicol. 27: 361-368 (1989).
- 6) Sudakin DL.: Toxicol. Lett. 143: 97-107 (2003).
- 7) 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

1. Dewa, Y., Kemmochi, S., Kawai, M., Saegusa, Y., Harada, T., Shimamoto, K., Mitsumori, K., Kumagai, S., Sugita-

Konishi, Y., Shibutani, M.: Rapid deposition of glomerular IgA in BALB/c mice by nivalenol and its modifying effect on high IgA strain (HIGA) mice. Exp. Toxicol. Pathol. 2009. (in press).

2. 学会発表

- 1) Ngampongsa Suchitra, Ito Koichi, Kuwahara Masayoshi, Kumagai Susumu, Tsubone : Hirokazu Circulatory and autonomic nervous short-term effects of deoxynivalenol toxin evaluating by a telemetric system as a recorder in conscious rats. 日本マイコトシン学会第67回 学術講演会抄録集14頁、2010.1 (東京)。

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

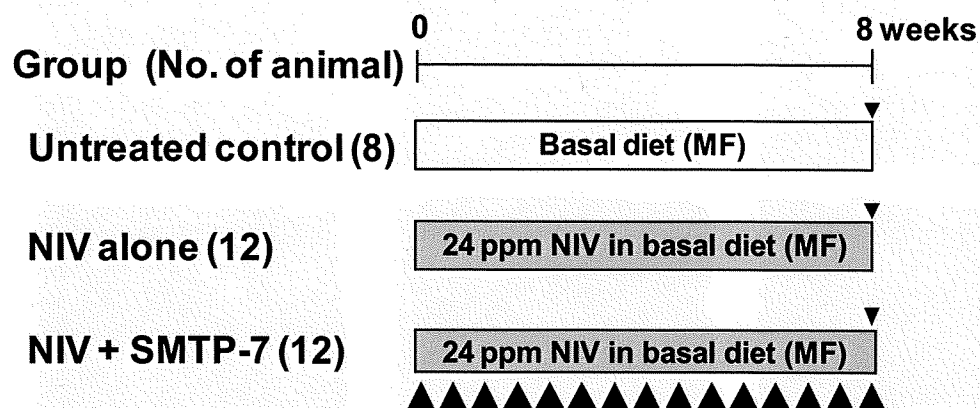
なし

3. その他

なし

1. ニバレノール誘発IgA腎症に対するSMTP-7の修飾作用の検討

Experiment 1



Experiment 2

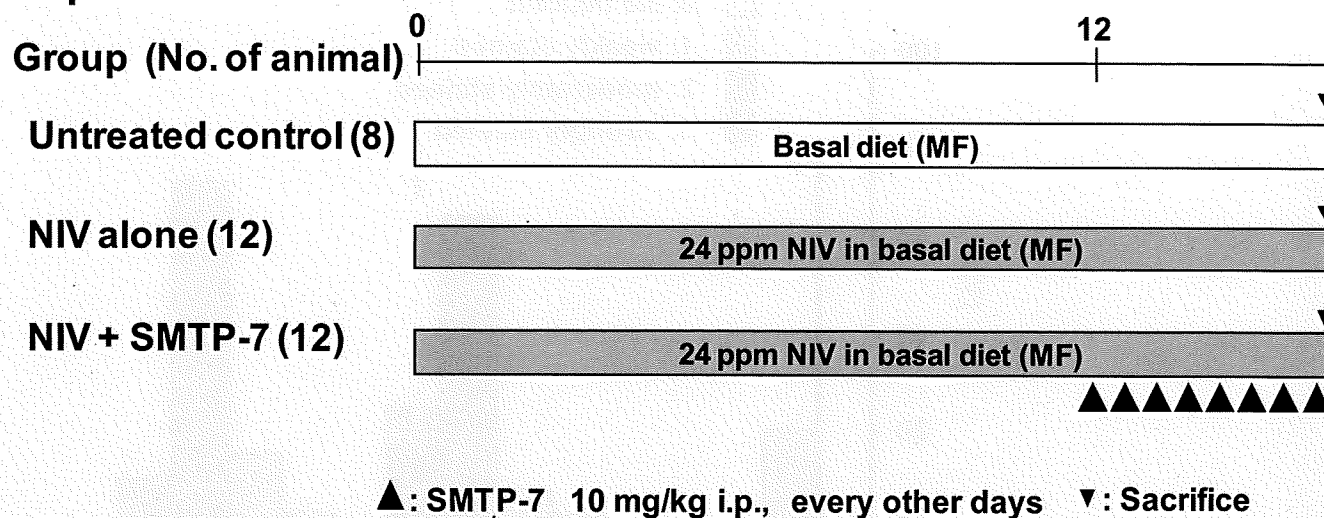
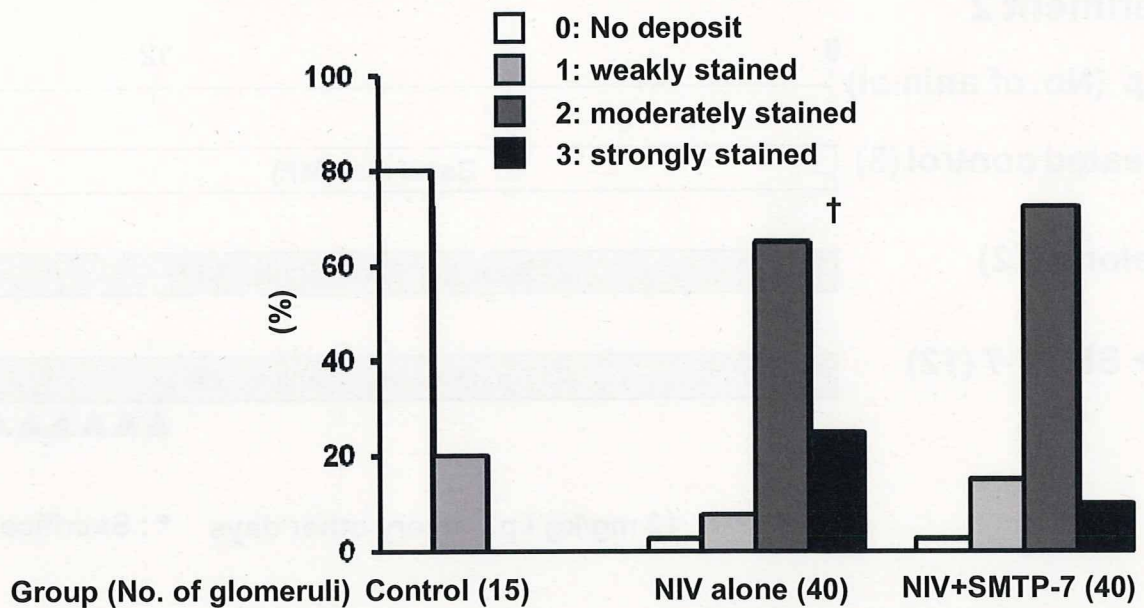
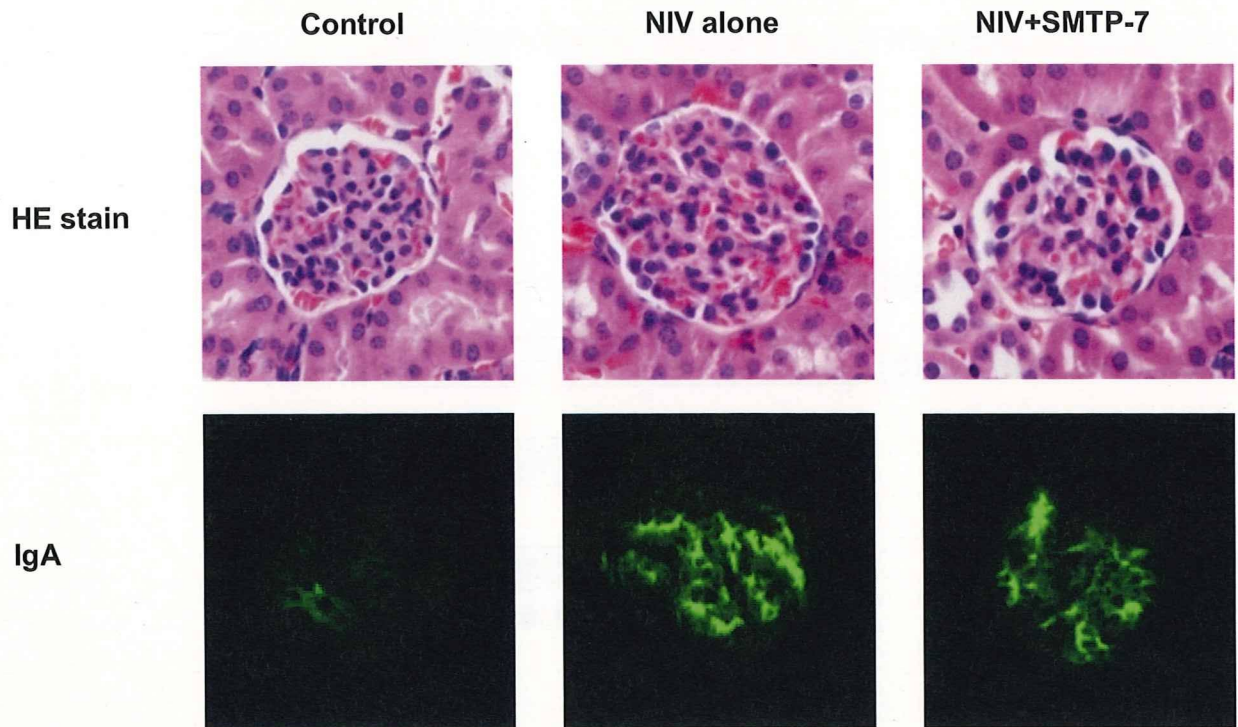


Fig. 1.
Experimental design



†: $P < 0.05$ vs. Control group (Mann-Whitney's U-test)

Fig. 2.
Light microscopical view of the glomeruli, glomerular IgA deposition and the intensity scores of the deposition in Experiment 1

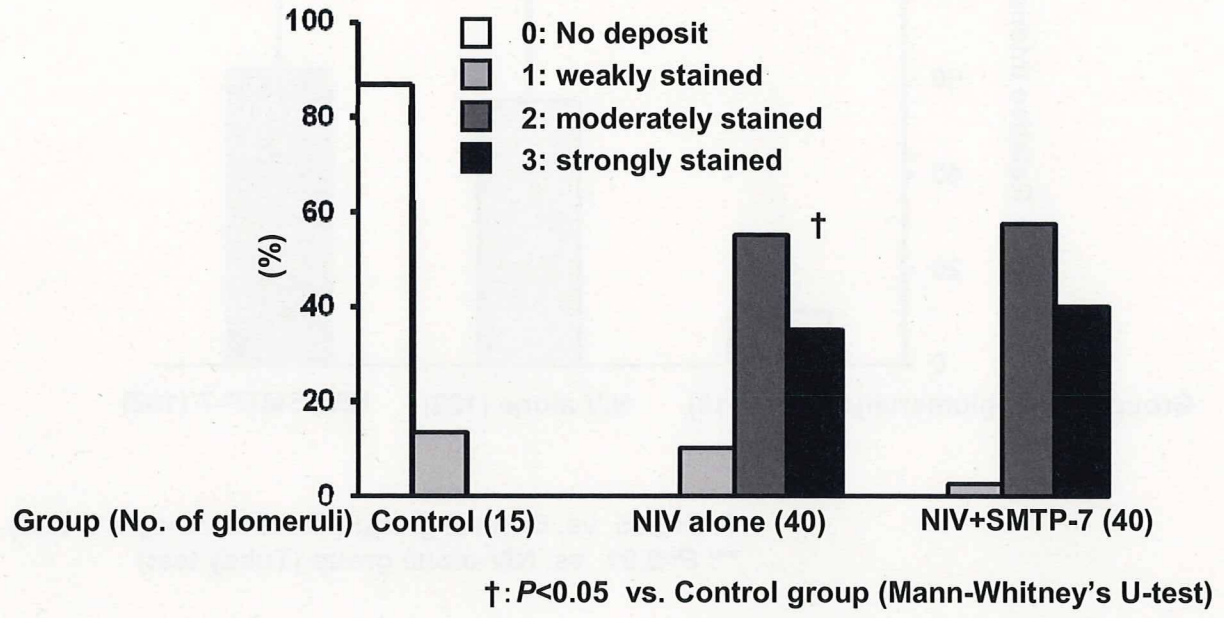
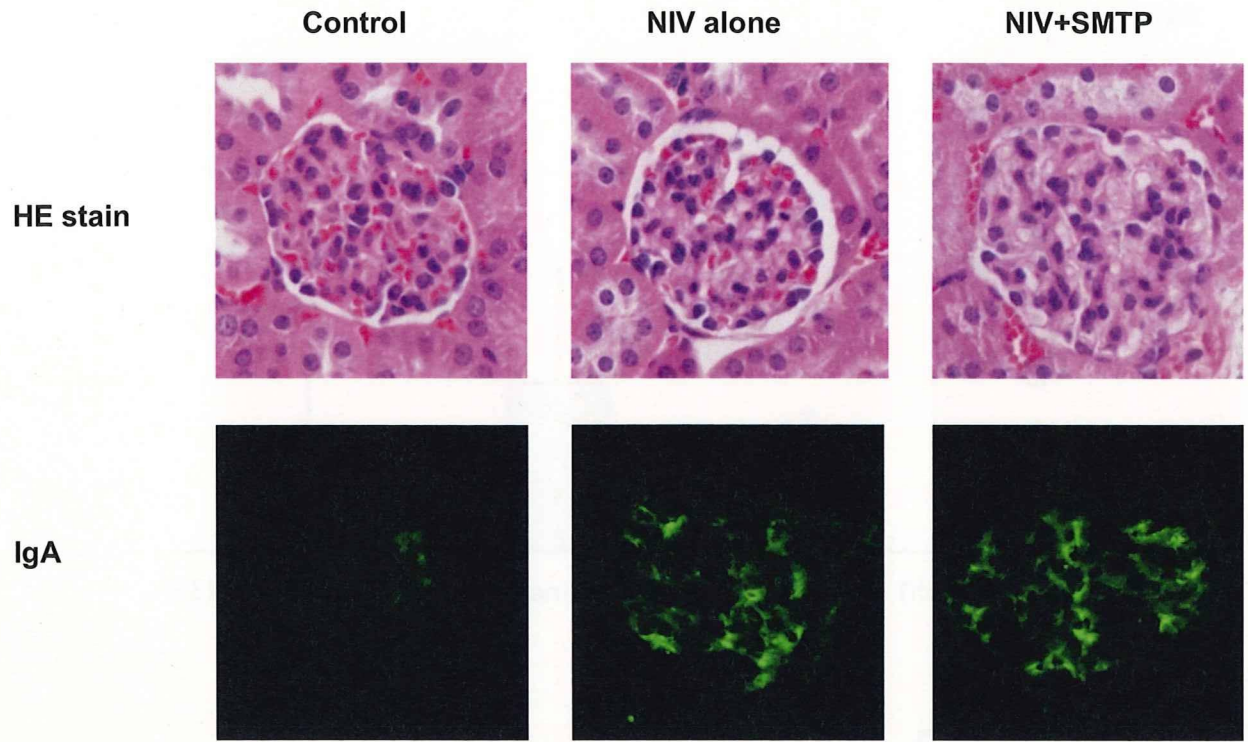
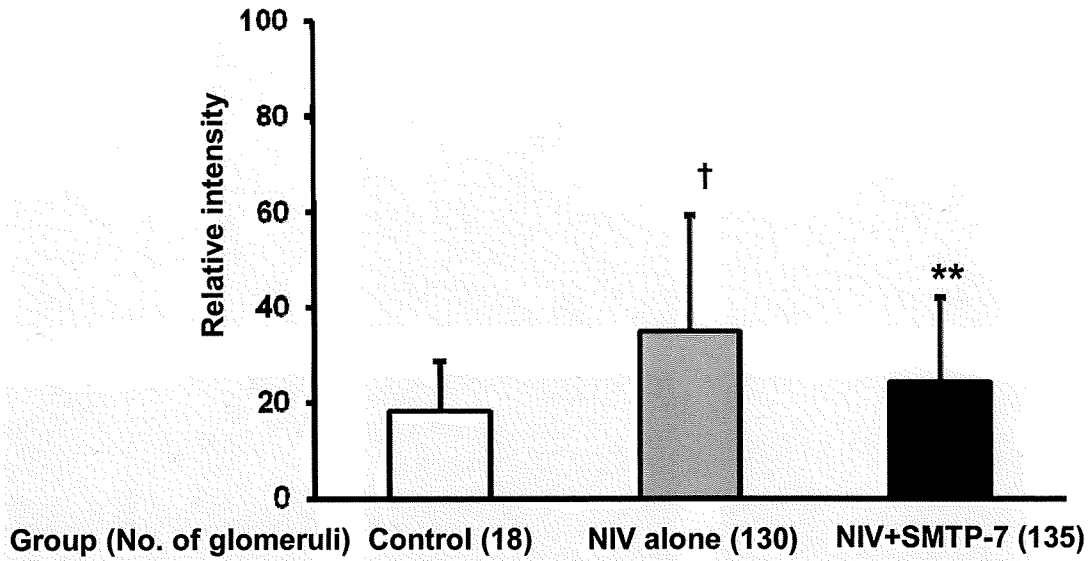
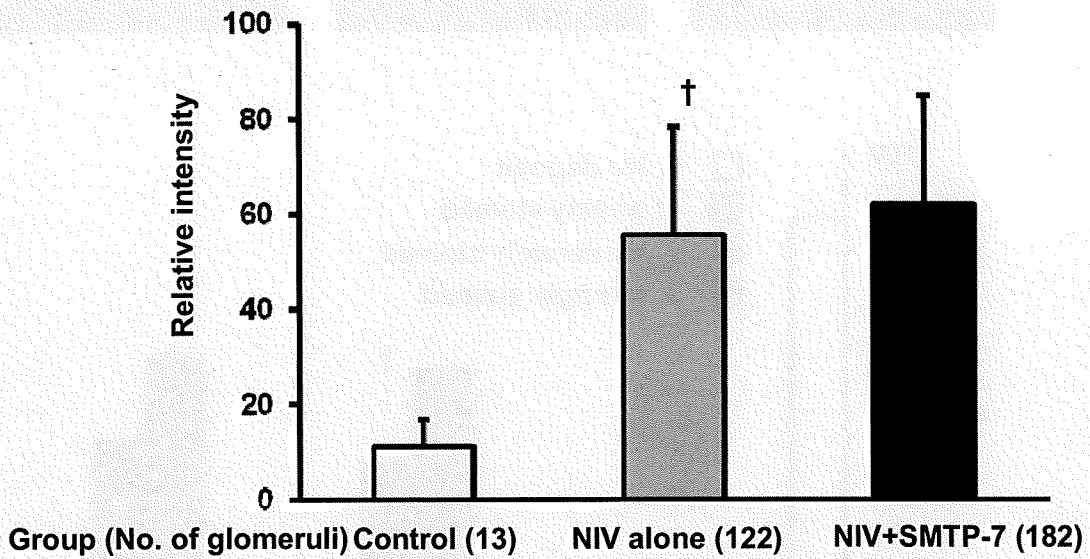


Fig. 3. Light microscopical view of the glomeruli, glomerular IgA deposition and the intensity scores of the deposition in Experiment 2

Experiment 1



Experiment 2



†: $P < 0.05$ vs. Control group (Mann-Whitney's U-test)

** : $P < 0.01$ vs. NIV-alone group (Tukey test)

Fig. 4.
Immunofluorescence intensity of IgA deposited in glomerular tufts in Experiment 1 and 2

2. デオキシニバレノールの心機能に及ぼす影響

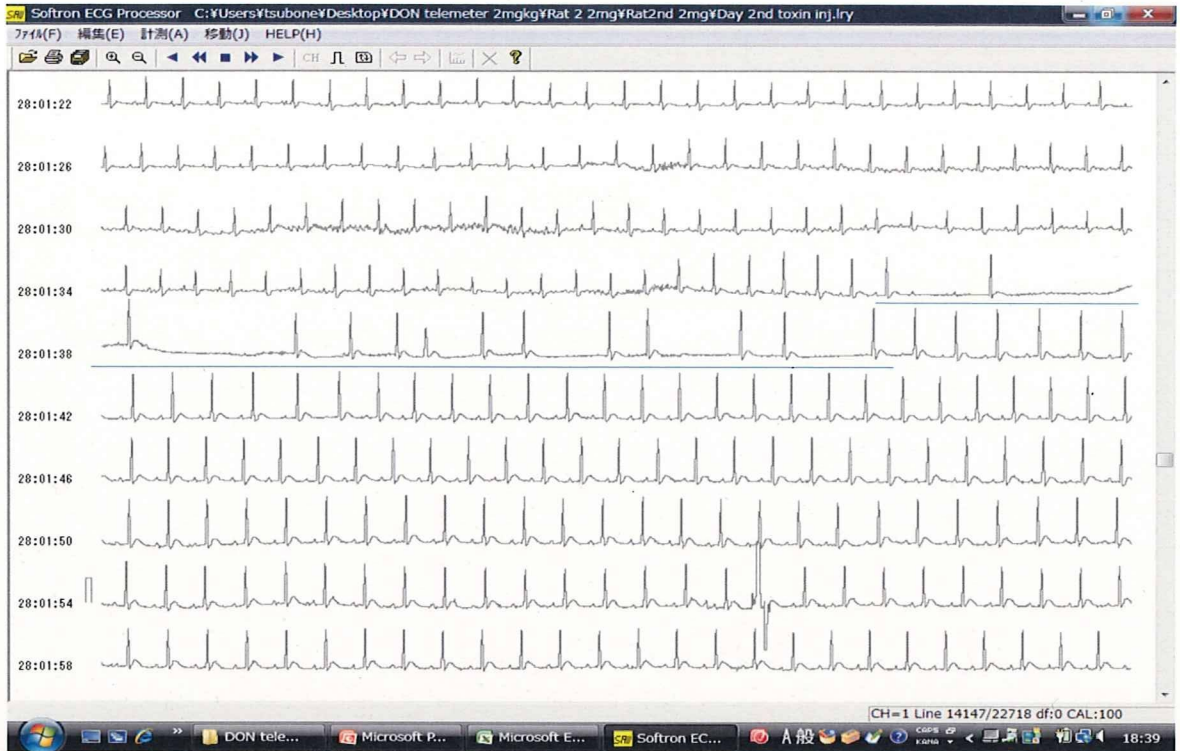


図1. 不整脈（房室ブロック）の出現例

デオキシニバレノール2mg/kg s.c. 投与。図はテレメトリー法による心電図連続記録を示す。下線部で第2度房室ブロックを主とした不整脈が認められる。

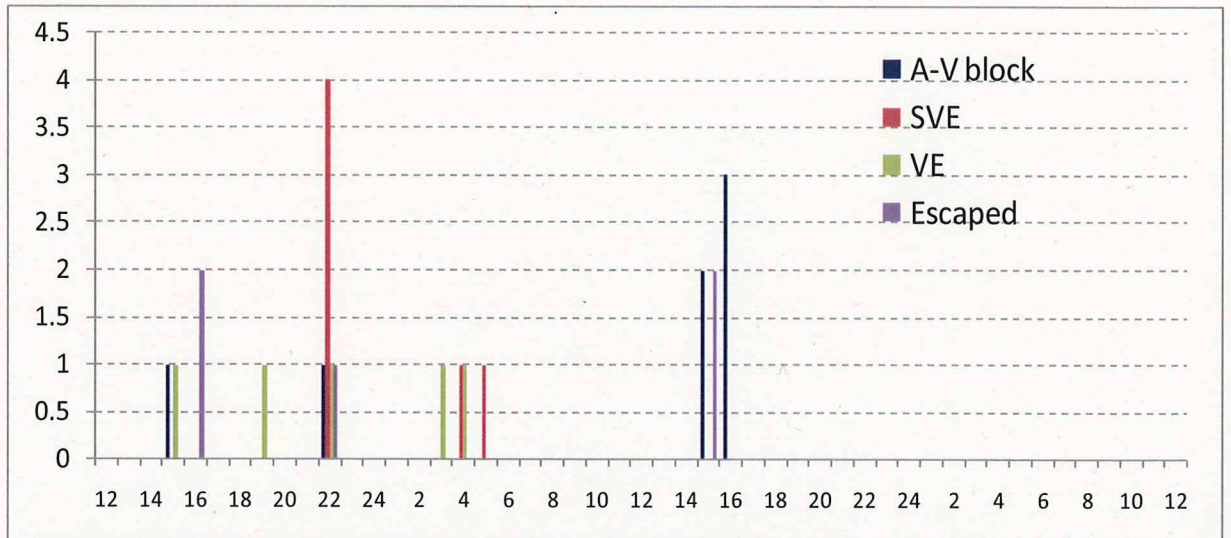


図2. 不整脈出現の経時的分布例

デオキシニバレノール2mg/kg s.c. を投与されたラット（1匹）における第2度房室ブロック（A-V block）、上室性期外収縮（SVE）、心室期外収縮（VE）、補充収縮（Escaped）の1時間毎の発現頻度。横軸は時間を示す。DONは左端の12（時）の時点で投与された。

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

カビ毒を含む食品の安全性に関する調査研究
分析法のバリデーション等に関する研究

研究分担者 田中 敏嗣 神戸市環境保健研究所

研究要旨 農産物や食品は圃場や貯蔵、流通過程でカビの寄生や繁殖により、そのカビが産生するカビ毒の汚染を被る。そしてカビ毒によるヒトおよび家畜等の健康被害を引き起こす。今後健康被害が予測されるカビ毒に対して基準値設定をして、カビ毒摂取を最小限に抑えることが食品衛生上極めて重要となる。基準値には、その分析値を担保するため、分析法の妥当性を評価することが必要になる。そのため、本研究において今後策定されるカビ毒分析法が、国際的に充分通用する分析法であるかを評価するための「カビ毒試験法評価委員会」を設立し、コラボラティブスタディを実施し、その結果を基に分析法の妥当性の有無を評価した。

発がん性を有するカビ毒アフラトキシンについて、ピーナッツ中の総アフラトキシン及び乳中のアフラトキシンM1試験法のコラボラティブスタディを実施することによってその妥当性を委員会で評価した。室内併行性、室間併行性等を評価した結果、本分析法の妥当性が認められると判定した。

さらに、食品衛生法に定めている総アフラトキシン及びアフラトキシンB₁試験法以外の方法によって試験をする場合に、その試験法の妥当性を各試験機関が評価するためのガイドラインについて、カビ毒試験法評価委員会で検討し、策定した。

A. 研究目的

カビ毒は自然界に生息するカビによって産生され、しばしば農産物や食品を汚染し、ヒト及び家畜等に健康被害を引き起こす。自然毒であるカビ毒の食品への汚染を防止することや食品から除去することは極めて困難であるといわれている。そのため、ヒトへのカビ毒による健康被害を防ぐには、生産国では農業規範を守り、カビ毒の汚染

しやすい環境をつくらないこと、輸入国では基準値設定をして、カビ毒摂取を最小限に抑えることが最も効果的な方法となる。輸入食品への依存度の高いわが国としては、積極的に今後健康被害が予測されるカビ毒に対しての基準値策定などが望まれる。

法律規制が伴う基準値には、その分析値を担保するため、分析法の妥当性を評価することが必要になる。また、国際的な動き

として、実態調査を行う場合もバリデーションのとれた分析法が必要となってきた。

そのため、本研究において今後策定されるカビ毒分析法が、国際的に充分通用する分析法であるかを評価するための「カビ毒試験法評価委員会」を平成20年に設立し、試験法の評価を行った。

アフラトキシンはコウジかびの一種である *Aspergillus flavus* や *Aspergillus parasiticus* によって蛍光物質の B₁、B₂、G₁、G₂ の4つの異性体が産生される。さらに、汚染飼料を摂取した牛などの乳から検出される B₁ の代謝物 M₁ が食品衛生上重要である。国際ガン研究機関 (IARC) によるアフラトキシン B₁ (AF B₁) の発ガン性評価では、人及び動物に対して十分な証拠があるとされるグループ 1 に分類している。

現在、我が国においては、AF B₁ を検出した食品は食品衛生法第 6 条第 2 号に違反するものとして規制されているが、コーデックス委員会において木の実へのアフラトキシンの規格策定の動き等を受け、厚生労働省は平成 16 年度から厚生労働科学研究費で食品中のアフラトキシンの実態調査を行ってきた。この調査研究の結果を踏まえ、平成 20 年 7 月厚生労働省薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食品規格部会において審議が行われ以下の内容を鑑み、現在の規制に加えて、今後、落花生及び木の実（アーモンド、ヘーゼルナッツ、ピスタチオ）について、コーデックス規格と同様に総（トータル）アフラトキシン (AF B₁、AF B₂、AF G₁ 及び AF G₂) の規格基準の設定を検討するとの

結果を得ている。

- ① 落花生について、AF B₁、アフラトキシン B₂ (AF B₂) アフラトキシン G₁ (AF G₁) アフラトキシン G₂ (AF G₂) の複合汚染が増加していること
- ② 我が国で流通する落花生において AF B₁ より AF G₁ の汚染濃度が高い場合があること
- ③ 我が国は、木の実の輸入国であること

したがって、21 年度はピーナッツにおける総アフラトキシン試験法及び乳中の AFB₁ の代謝物 AFM₁ について試験法を検討し、コラボラティブスタディを実施することによってその妥当性を評価した。

さらに、上記以外の方法によって試験を実施する場合には妥当性が評価された試験法と比較して真度、精度及び定量限界において同等又はそれ以上の性能を有するとともに、選択性を有すると認められることが求められる。したがって、その試験法の妥当性を各試験機関が評価するためのガイドラインをカビ毒試験法評価委員会において検討する。

B. 研究方法

1. 平成 21 年度カビ毒試験法評価委員会の組織及び業務

本委員会は、委員長のほか以下に示すように実務委員として食品のカビ毒分析の専門家 4 名、統計解析の専門家 2 名及び事務局で構成され、将来我が国で基準値が設定された場合に通知法となりうる方法または実態調査に用いられるカビ毒試験法の妥当性を科学的にオーソライズする委員会とした。