

厚生労働科学研究費補助金（食の安全・安心確保推進研究事業）
総合研究報告書

カビ毒を含む食品の安全性に関する研究
カビ毒の消長に関する研究

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。初年度は小麦を汚染するトリコテセン系マイコトキシン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とその原料である小麦粉を製造元より購入し、パンの製造工程を経た DON および NIV 各々の残存率を算出し、その消長レベルを検討した。その結果、可食部あたり DON は約 $67.3 \pm 19.4\%$ 、NIV は約 $51.2 \pm 10.6\%$ が食パンの製造過程に減衰するとの結果を得た。また加工工程中に生ずると予想される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を試み、マウスマクロファージ様細胞におけるエンドトキシン（LPS）誘導性 IFN- β レポーター活性に対する DON の抑制作用がトリコテセン系マイコトキシンのバイオアッセイに応用可能であることを見出した。平成 20 年度はわが国で DON と NIV の複合汚染が問題視されていることから、昨年報告したバイオアッセイ系が DON と NIV の複合汚染時に適応可能か検証する目的で、IFN- β がその産生に関与するマクロファージにおける LPS 誘導性一酸化窒素（NO）産生を指標とした DON と NIV 各々単独並びに混合時の影響を検討した。その結果、DON と NIV の共存下では各々単独の処理時と比較し相加と考えられる NO 産生の阻害効果を示した。LPS で活性化したマクロファージ様細胞からの NO 産生に重要な IFN- β ではあるが、DON と NIV の毒性を評価する場合には不明であった実際の生体への影響が今回初めて明らかとなったことから、本研究事業で進めているトリコテセン系マイコトキシンの毒性評価系である LPS 誘導性 IFN- β レポーターアッセイ系はこれら毒素の複合汚染時の評価にも適応可能であることが示唆された。最終年度では、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。加えてオクラトキシン 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。

研究協力者：
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

カビ毒はタンパク質系毒素と比較し物理的、化学的処理に極めて安定であるが、カビ毒に汚染された食糧を加工・調理することによるカビ毒の消長について焦点をあてた包括的な研究は乏しいと言わざるを得ない状況である。カビ毒の消長について正確なデータを把握することは、健康被害を未然に防止するうえで極めて重要と考えられる。

近年、温暖化に代表される地球環境の変化から、小麦の生産・輸出国からの安定的な供給が揺らぎつつあり、また地産地消の観点からわが国で収穫された小麦を原料としたパンの製造が増加しつつある。そこで本研究ではまず小麦を汚染するカビ毒のトリコテセン系マイコトキシンであるデオキシニバレノール（DON）と、その類縁体であり主にわが国を含む東アジアにおいてその汚染が報告されているニバレ

ノール（NIV）について（Yoshizawa, 1983）、わが国において生産されるパンの原料となる小麦粉中（国産小麦由来を含む）に混入している各々の含有量および、その最終生産食品となる食パン中の含有量を調査し、わが国における原料の小麦粉中に含まれる DON および NIV の食パン加工による消長レベルの算出を行った。さらにそのバイオアッセイ系の構築を試み、トリコテセン系マイコトキシンが有する免疫毒性に着目し、動物細胞を用いた評価系の確立とその生理学的意義について検討した。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効性があり今後の検出系を見据えた場合有望なアッセイ系の 1 つである。

一方、オクラトキシン A においても同様にその加工工程中における消長とバイオアッセイ系の構築を試みた。オクラトキシン A は *Aspergillus* 属および *Penicillium* 属が産生し、（Sugiyama and Sugita-Konishi 2007）、動物実験から腎毒性・肝毒性等の毒性が指摘されているが、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)。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、本研究ではこの免疫毒性をメルクマールにオクラトキシン A のバイオアッセイ系の構築を試みた。また消長については、わが国固有の酒類となる清酒についてその製造過程におけるオクラトキシン A の挙動について検討を行った。

B. 研究方法

【DON/NIV の測定およびバイオアッセイ系の構築】

DON/NIV の測定については以下のとおりに実施した。国産を含む小麦粉およびそれを原料として製造された食パンは、全国の 9 地域からランダムに製造元より購入したものを分析試料とし、LC/MS 法により含まれる DON および NIV の濃度を測定した。試料をミキサーもしくは遠心粉碎機により粉碎し、試料 50.0 g を 200 ml 容三角フラスコに取りアセトニトリル：水 (85:15, v/v) 200 ml を加え、振とう機で 60 分間振とう抽出を行った。得られた上清約 40 ml を 50 ml 容の遠心管に分取し 3,000 rpm, 5 min 室温にて遠心分離を行った。得られた上清は MF-T1500 カラム (昭和電工株式会社) に 10 ml 負荷した。流速は 1 ml/min とした。最初に溶出する 4 ml の分画を捨て、次に溶出する分画 4.5 ml を分取し、2 本のバイアルに同液を 2 ml ずつ取り 45°C 以下の条件下にて窒素気流にて濃縮乾固した。得られたサンプルはバイアル当り 1.0 ml の 10 mM 酢酸アンモニウム：メタノール (90:10, v/v) の移動相で溶解し、LC/MS による分析に供した。加工前小麦粉対加工後小麦粉における DON および NIV の消長レベルは、食パン中に含まれる小麦粉量を食パン 437 g あたり 300 g として算出した (日本麦類研究会, 1981)。本調査研究においては、両カビ毒の検出限界は 2.0 ng/g、定量限界は 5.0 ng/g であった。回収率は食パンについて DON では 106.2±3.5%、NIV では 90.6±1.3% であった。小麦粉については本報告書内の小西の項に記載した。なお今回の DON/NIV 測定方法は共同研究者の田中によりバリデートされたものである。

DON のバイオアッセイ系の構築に関する実験は以下のとおりである。マウス 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。

IFN-β/RAW264 を 10 % 非働化仔ウシ血清 (Fatal Bovine Serum, 以後 FBS と略記：Invitrogen 社製)、ペニシリン・ストレプトマイ

シン (GIBCO) を含む Dulbecc's Modified Eagle Medium (以後 DMEM と略記：GIBCO) 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 条件下で前培養した同細胞を、12well 平板プレート (Techno Plastic Products) に 3-5 × 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 DON (62.5, 125, 250, 500, 1,000 ng/ml) およびエンドトキシンとして Sigma の *Escherichia coli* O111:B4 Lipopolisaccharide (LPS) 10 ng/ml をそれぞれ含む DMEM を各 well あたり 500 μl を加え細胞を培養し、6 時間後培養液を除去した。その後 2 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 μl 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 °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 μl 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。

小麦粉抽出液の作成は以下の通りに行った。小麦粉 (日清手打うどんの小麦粉：日清製粉グループ) 5 g を 50 ml 容の遠心管に取り、アセトニトリル：水 (85:15, v/v) 20 ml を加え、振とう機で 30 分間振とう抽出を行った。抽出後 3,000 rpm、5 min 室温にて遠心分離を行い、得られた上清を小麦粉抽出液とした。同抽出液 300 μl を 15 ml 容の遠心管に分取し、アセトニトリルにより 100 ppm に調製された DON (Sigma) 溶液より 750、1,500 もしくは 3,000 ng となるよう添加し窒素気流にて濃縮乾固した。得られた試料は -20 °C で保存した。冷凍保存した試料を室温にて解凍後、10%FBS、ペニシリン・ストレプトマイシンを含む DMEM 培地 1.5 ml で溶解したのち 500 μl/well の容量にて前述と同様に培養された IFN-β/RAW264 細胞に加えて LPS 10 ng/ml を加えた後 6 時間培養した。刺激後の細胞は前述同様に細胞抽出液を調製しレポーターアッセイに供した。

【NO 測定】

マウスマクロファージ RAW264 細胞 (Riken Cell Bank, Tsukuba, Japan) は、10 % FBS 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 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。

標準品の DON (Wako 社製)は減衰を防ぐため、アセトニトリルに溶かし、-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。また、NIV (Riedel-de Haën 社製, GERMANY)の場合も同様に調製した。

LPS は滅菌水に溶解し、使用前にソニケーションを行った。

75 cm²の組織培養フラスコで培養中の RAW264 細胞をセルスクレイパーで掻き取り、50 ml チューブに全量移し替え、1,000 rpm、5 min、4 °Cで遠心分離した。そして上清のみを除去し、新たに 37 °Cに温めた DMEM を適量加えサスペンションした。そのうちの 50 µl をトリパンプルー溶液(SIGMA 社製)で 2 倍希釈したものを血球計算盤へ適量移し細胞数を計測した。細胞濃度が 2×10⁶ cells/ml となるよう DMEM で細胞を希釈し、96 well plate (Techno Plastic Products 社製)に 100 µl/well で播種し、37 °C、5 % CO₂ 条件下で一晩培養した。培養後、予め調製した DON/NIV および LPS を含む DMEM にて培地を置換し、37 °C、5 % CO₂ 条件下で 24 時間培養し、培養上清をサンプルとして NO 量の測定に供した。

NO₂/NO₃ Assay Kit-CII (Colormetric) - Griess Reagent Kit-(同仁化学研究所)を用いて、NO 量を測定した。付属の NaNO₂ 標準溶液、及び緩衝溶液を用いて、NO₂ 濃度(0, 25, 50, 100 µmol/l)を 80 µl 調製して検量線を作成した。サンプルも同様に 80 µl 使用した。それぞれに付属の緩衝溶液を 20 µl 加え Griess Reagent(SIGMA 社製)を 100 µl 加え混和し 15 分間放置した。その後 550 nm の吸光度を測定し作成した検量線からサンプル中の NO 濃度を求めた。

【オクラトキシン A の消長およびバイオアッセイ系の検討】

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-κB 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-κB 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/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 % FBS と、Penicillin-Streptomycin Mixed Solution を含む DMEM 培地 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。

LPS 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 3-5×10⁵ 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 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 µg/ml) および LPS 100 ng/ml をそれぞれ含む DMEM を各 well あたり 500 µl 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 5x を 5 倍希釈したものを各 well あたり 200 µl 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 °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 µl 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 1×10⁶ cells/well となるように 1 ml/well を 12-well plate に播種し、0.1 µg/ml phorbol myristate acetate (Sigma) および 0.1 µM 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、無血清の DMEM 培地 50 µl に pcELAM-L を 0.5 µg 相当を添加後 6.0 µl FuGENEHD (Roche) を加え 15 分室温放置した溶液を加えて最終容量を DMEM 培地で 0.5 ml として 24 時間、37 °C、5 % CO₂ 条件下でトランスフェクションの為の培養を行った。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 µg/ml) および LPS 100 ng/ml をそれぞれ含む DMEM を各 well あたり 500 µl 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 5x を 5 倍希釈したものを各 well あたり 50 µl 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 °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。

清酒の醸造は以下のとおりに行った。15°C で水麴を行い、添仕込を 15°C、仲仕込および留仕込は 10°C で行った。留仕込は以後 1.5°C づつ品温を上げ、留仕込 4 日目には品温を 15°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、麴は市販の甘酒用のものを使用した。

オクラトキシン A の分析は以下のとおりに行った。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クラムである 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. \times 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

【食パン加工工程における DON/NIV の減衰率】

原料の小麦粉と食パンに含まれる DON および NIV の含量を各都道府県から無作為に抽出したサンプルより測定し、各々の減衰率ならびにその平均値、標準誤差を算出した。その結果、小麦粉から食パンの製造工程の可食部における DON の減衰率は約 67.3 \pm 19.4%であった。一方、NIV の減衰率は約 51.2 \pm 10.6%であった。加工前小麦粉対加工後小麦粉における DON および NIV の消長レベルは各々約 58.3 \pm 17.2%、約 32.4 \pm 11.3%と算出された。なお、わが国の食パン中に含まれる DON と NIV の含量は今回の調査から各々約 9.0 \pm 4.7 ng/g、5.2 \pm 0.8 ng/g、また原料の小麦粉については各々約 35.4 \pm 28.5 ng/g、11.1 \pm 1.8 ng/g との結果を得た。

【免疫毒性を指標とした DON のバイオアッセイ系】

今回 IFN- β レポーターアッセイを指標に同誘導を DON が約 125 ng/ml 以上の濃度より濃度依存的に阻害することを明らかにした。この結果を受け、研究方法に記載した抽出方法で回収・

添加した小麦粉抽出成分存在下における DON の LPS 誘導性 IFN- β レポーター活性を測定した。その結果、本法に従って加えた小麦粉抽出成分存在下においても、少なくとも 500 ng/ml 以上の濃度の DON は有意に LPS 誘導性 IFN- β レポーター活性を阻害することを見出した。

【LPS 誘導性 NO 産生への NIV の影響】

NIV 存在下、RAW264 細胞を LPS で刺激し、その細胞上清を用いて NO 量を Griess 法により測定した。その結果、LPS 誘導性 NO 産生量は 500 ng/ml 以上の NIV 存在下では顕著に抑制された。

【LPS 誘導性 NO 産生への DON の影響】

以上の結果より、NIV は RAW264 細胞において LPS 誘導性 NO 産生を抑制する可能性が認められた。そこで本作用を指標に両毒素の複合毒性を検討するために、次に前述の NIV と同様のアッセイ系で DON の LPS 誘導性 NO 産生への抑制作用を確認した。その結果、LPS 誘導性 NO 産生量は、NIV と同様に 500 ng/ml 以上の DON 存在下では顕著に抑制されることが確認された。

【DON と NIV 共存下における LPS 誘導性 NO 産生】

LPS 誘導性 NO 産生を指標に DON と NIV の複合毒性を検討するため、DON と NIV 共存下での同産生量を検討した。両毒素が等量で存在する場合、両毒素の総量が 500 ng/ml 以上の濃度において顕著な抑制作用が認められた。

これらの結果から、マウスマクロファージ様細胞 RAW264 を用いた LPS 誘導性 NO 産生を指標にした場合、DON と NIV の複合毒性は、それぞれ単独での毒性の相加として評価可能であることが示唆された。

【マクロファージ様細胞における LPS 誘導性 NF- κ B / 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】

RAW264 において LPS 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 LPS 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、LPS 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。一方、IFN- β プロモーター依存性レポーター活性については、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。

マクロファージ様細胞に分化させた THP-1 細胞において LPS による誘導される NF- κ B 依存性レポーター活性については、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。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 LPS 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示唆された。

【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、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。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。以上の結果から、清酒醸造工程におけるオクラトキシン 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、国産を含む小麦粉とそれを原料に製造された食パンの製造工程における DON および NIV の消長を、各地域より購入した合計 35 検体を用いて検討した。その結果、可食部あたりでは DON および NIV とともに、約 50~70% の減衰率であると判断できる結果を得た。平成 14 年度の厚生労働科学特別研究においてパン製造における DON の減衰率の報告があり、それによると減衰率は 2.9% となっている (熊谷, 2002)。本研究での減衰率は実際の製造工場で食パンが製造された場合の数値であり、前述の報告書ではホームベーカリーを使用したパンの製造工程における減衰率である。従ってこれら数値を単純に比較することはできないが、大量製造用の製パン設備と家庭用の製パン器でのスペックの相違、並びに製パン工程の差異が減衰率の差につながっているとも考えられる。故に、本研究でのサンプル間で減衰率の差異もこれら要因が寄与している可能性が考えられる。

現在 DON に関しては暫定基準値として 1,100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と規制されており、今回調査した小麦粉および食パンともに同基準値を超える検体は認められなかったが、本結果は、NIV の毒性の詳細ならびに DON との複合毒性の解明により規制値の再検討が必要となった場合の基礎データとなる。また、今回多くの一般家庭で消費されている食パンを検査対象としているため、より低濃度で毒性が発現する可能性が高い低年齢層に配慮する施策を策定する必要が生じた場合、極めて重要な知見となると考えられる。

DON の毒性としては既に易感染性などの免

疫毒性が報告されている (Tryphonas et al., 1986)。この毒性を利用し DON の毒性を評価した結果、検討した 62.5 ~ 1,000 ng/ml の DON 存在下で LPS 誘導性 IFN- β レポーター活性は濃度依存的に抑制する傾向を示した。さらに実際に小麦粉抽出成分から DON を測定する場合を想定し、本アッセイ系に対して小麦粉抽出成分を添加した条件下においても測定が可能と考えられる結果を得た。生物学的評価法は、1) 生物に対する作用を直接検討 2) 各種生体外異物の作用を総合的に検知 3) 未知の毒性物質の探知といった優れた特性を有する。一方で、その活用事例は系の構築に対象物質ごとにカスタマイズが求められる要素が比較的多く未だ少ないのが実状であるが、DON についてはアルカリ条件下で過熱した際に生じる DON 派生体の毒性が生物学的評価法により解析されているなど (Bretz et al., 2006)、今日改めてその重要性が認識されつつある。これまでに、生物学的評価法を基に DON の毒性評価をする方法としては、細胞毒性を指標にしたアッセイ系も報告されている (Sugita-Konishi et al., 2006)。ただし本法では、DON による細胞毒性は、NADH によるテトラゾリウム化合物の還元を指標にした細胞毒性試験では少なくとも今回使用したマウスマクロファージ様細胞において 1,000 ng/ml でも認められなかった。従って、LPS 誘導性 IFN- β レポーター活性を指標にしたバイオアッセイによる DON の毒性評価方法は細胞毒性を指標とする評価系よりも鋭敏である可能性が示唆された。今後は DON の食品成分からの抽出方法を多機能カラム等を利用することにより、その後のバイオアッセイ系における各種抽出成分による検出障害の低減化を図りつつ、DON と食品成分との複合体の毒性を正確に反映するアッセイ系構築の為にブラッシュアップが必要であろう。

本研究では、活性化マクロファージより産生される NO に対するトリコセシン系マイコトキシンである DON と NIV の影響についても検討した。DON は欧米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の報告がなされている (Tryphonas et al. 1986; Sugita-Konishi and Sugiyama 2008; Sugiyama and Sugita-Konishi 2007)。一方、NIV についてはわが国のほか、韓国などその汚染が東アジアに限局されることから (Sugiyama et al. 2009)、毒性を含め研究報告例は少ない。本研究では新規な毒性として今回初めて活性化マクロファージからの NO 産生におぼす DON と NIV の影響を検討した。その結果、各々の毒素単独処理による阻害レベルは両毒素間で顕著な差異は認められず、共存下の場合においても等量混合の場合では DON と NIV の各々の毒素単独処理時の

効果の和に相当するレベルであったことが明らかとなった。この結果は少なくとも、DONとNIVのLPS誘導性NO産生への阻害において、その作用点が共通していることを予想させる。DONによる免疫毒性として易感染性が指摘されているが、その詳細な分子メカニズムについては未だ不明な点が多い。今回、リステリア菌や結核菌、サルモネラ菌等の細胞内寄生菌からの感染防御に重要な役割の担うと考えられているNO産生へのDONもしくはNIVの阻害作用は、これら病原菌感染時におけるトリコテセン系マイコトキシンによる易感染性を説明しうるエビデンスの1つと考えられる(図)。但し、最終的な結論を導くには、他の体液性免疫へのトリコテセン系マイコトキシンの影響を追加検討したうえで、*in vivo*での感染実験の実施が必要であろう。

今回得られた結果はH19年度のLPS誘導性IFN- β レポーター活性を指標としたDONのバイオアッセイ系の生理学的意義を明確にし、トリコテセン系マイコトキシンの毒性評価へのLPS誘導性IFN- β レポーター活性の適応の妥当性を高めたものといえる。今後は、実際のトリコテセン系マイコトキシンの消長に向け必要な各種阻害因子耐性を付与したアッセイ系へのブラッシュアップ、具体的には食品からの毒素抽出時に多機能カラム等を利用することで食品由来成分による検出障害の低減化等を図る必要がある。

オクラトキシンAのバイオアッセイ系については、活性化マクロファージにおけるLPS誘導性シグナル伝達系におよぼす影響を指標に検討した。オクラトキシン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LPS誘導性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。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%未満の検出レベルに留まる可能性が明ら

かとなった。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ンAの挙動の機序についての検討が必要となろう。

E. 結論

わが国において国産も含む小麦粉で生産された食パンにおけるDONとNIVの減衰率は可食部あたり各々約67.3 \pm 19.4%、51.2 \pm 10.6%であることを明らかにした。またDONの免疫毒性を指標としたDONのバイオアッセイ系の構築を試み、同方法が既に報告されている細胞毒性を指標とした検出系より鋭敏にDONの毒性を測定できる可能性を示唆した。また、DONとNIVの免疫毒性として、LPSにより活性化されたマクロファージ様細胞からのNO産生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。加えて、その複合毒性は各々の毒素の相加として評価可能と考えられる結果を得た。

一方、オクラトキシン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LPS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

Yoshizawa, T: Trichothecenes-Chemical, Biological and Toxicological Aspects (ed, Ueno, Y.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 195-209 (1983).

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).

日本麦類研究会：小麦粉、(有)ユニ・アート、615-666(1981).

熊谷進：小麦等のデオキシニバレノールに係わる規格基準設定のための緊急調査研究、厚生労働科学特別研究、20-30 (2002).

Tryphonas, H., Iverson, F., So, Y., Nera, E. A., McGuire, P. F., Ogrady, L., Clayson, D. B. and Scott, P. M. T: Effects of Deoxynivalenol (Vomitoxin) on the humoral and cellular immunity of mice, *Toxicol.* **30**, 137-150 (1986).

Bretz, M., Beyer, M., Cramer, B., Knecht, A., Humpf, H.U: Thermal degradation of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol, *J. Agric. Food Chem.* **54**, 6445-6451(2006).

Sugita-Konishi, Y., Park, B.J., Kobayashi-Hattori, K., Tanaka, T., Chonan, T., Yoshikawa, K. and Kumagai S: Effect of cooking process on the deoxynivalenol content and its subsequent cytotoxicity in wheat products, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**, 1764-1768 (2006).

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., Tanaka, H., Kamata, Y., Tanaka, T. and Sugita-Konishi, Y: A reduced rate of deoxynivalenol and nivalenol during bread production from wheat flour in Japan, *Mycotoxins* **59**, 1-6 (2009).

F. 健康危険情報 なし

G. 研究業績 【原著論文】

1. 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**, 75-80 (2007).
2. Sugiyama, K., Hiraoka, H. and Sugita-Konishi, Y: Aflatoxin M₁ contamination in raw bulk milk and the presence of aflatoxin B₁ in corn supplied to dairy cattle in Japan, *J. Food Hyg. Soc. Japan* **49**, 352-355 (2008).
3. Sugiyama, K., Tanaka, H., Kamata, Y., Tanaka, T. and Sugita-Konishi, Y: A reduced rate of deoxynivalenol and nivalenol during bread production from wheat flour in Japan, *Mycotoxins* **59**, 1-6 (2009).
4. 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).

5. 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).
6. Sugiyama, K., Muroi, M., Tanamoto, K., Nishijima, M. and Sugita-Konishi, Y: Deoxynivalenol and nivalenol inhibit lipopolisaccharide-induced nitric oxide production by mouse macrophage cells, *Toxicol. Lett.* **192**, 150-154 (2010).

【総説・解説】

1. 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**, 73-78 (2007).
2. 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**, 1-10 (2008).
3. 杉山圭一:第47回 SOTにおけるマイコトキシン関連研究発表の動向 (From 47th SOT meeting), *Mycotoxins*. **58**, 155-157 (2008).
4. 杉山圭一:自然免疫からみた免疫毒性 (An innate immunity-based approach for examining immunotoxicity -Bacteriology has led me to the field of immunotoxicology-), *ImmunoTox Letter*. **13**, 8-9 (2008).
5. 杉山圭一:麹菌と *Aspergillus* 属についての一考察, *生物工学会誌*. **86**, 557 (2008).
6. 杉山圭一, 小西良子:わが国におけるカビ毒による食中毒とその現状, *公衆衛生*. **73**, 101-103 (2009).
7. 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-自然免疫学の新たな展開*. 高田春比古, 谷徹, 嶋田紘 (編). 81-83 医学図書出版株式会社. (2009).

【プロシーディング】

1. Sugiyama, K., Muroi, M., Tanamoto, K., Nishijima, M. and Sugita-Konishi, Y: Effect of deoxynivalenol on LPS signaling in macrophage, *The Toxicologist*. **102**, 102 (2008).
2. 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**, 101 (2008).
3. Sugiyama, K., Muroi, M., Tanamoto, K., Nishijima, M. and Sugita-Konishi, Y: Effect of deoxynivalenol and nivalenol on LPS-induced nitric oxide production by mouse macrophages, *Innate Immunity*. **14**, 48 (2008).
5. Sugiyama, K., Muroi, M., Tanamoto, K., Nishijima, M. and Sugita-Konishi, Y: Effect of deoxynivalenol and nivalenol on LPS-induced nitric oxide production by mouse macrophages, The 10th Biennial Meeting of the International Endotoxin and Innate Immunity Society, 48 (2008, 7).

【招待講演】

1. 杉山圭一: 微生物由来の毒物からのリスク回避にむけて, 東京農業大学栄養生化学セミナー, 2008年3月10日
2. 杉山圭一, 小西良子: 食品成分を用いたマイコトキシン毒性制御のアプローチ, 東京大学大学院農学生命科学研究科 食の安全研究センターシンポジウム (日本農芸化学会 薮田セミナー), 2009年3月10日
3. 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
4. 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
6. 杉山圭一, 齊藤史朗, 佐藤敏彦, 鎌田洋一, 田中宏輝, 田中敏嗣, 小西良子: わが国に流通している国産小麦由来食パン等におけるDONおよびNIVの減衰に関する研究, 日本マイコトキシン学会第64回学術講演会講演要旨集 27 (2008, 8).
7. 杉山圭一, 室井正志, 葉袋裕二, 棚元憲一, 芳賀 実, 小西良子: デオキシニバレノールのToll-like receptor シグナル伝達系に対する作用機構の解析, 第15回日本免疫毒性学会学術大会講演要旨集 78 (2008, 9).
8. 青山幸二, 中島正博, 堤 徹, 法月廣子, 小木曾基樹, 石黒瑛一, 甲斐茂美, 田端節子, 山口茂明, 前田 守, 田中敏嗣, 杉山圭一, 伊藤嘉則, 小西良子: 日本に流通する食品中のオクフラトキシンAおよびフモニシン汚染実態調査(平成19年度), 第96回日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集 98(2008, 9).
9. 齊藤史朗, 佐藤敏彦, 田中敏嗣, 高橋正紀, 田中宏輝, 小木曾基樹, 前田 守, 杉山圭一, 小西良子: 国産小麦粉中のNIVの汚染実態とそれに基づいた暴露評価, 第96回日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集 99 (2008, 9).
10. 杉山圭一, 室井正志, 棚元憲一, 小西良子: マウスマクロファージにおけるLPS誘導性NO産生に与えるデオキシニバレノールおよびニバレノールの影響, 第14回日本エンドトキシン研究会, プログラム・講演抄録集, 34(2008, 10).

【学会発表】

1. 杉山圭一: 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, 第34回カビ毒研究連絡会, (2007).
2. Sugiyama, K., Muroi, M., Tanamoto, K., Nishijima, M., and Sugita-Konishi, Y: Effect of deoxynivalenol on LPS signaling in macrophage, 47th Society of Toxicology (March, 2008).
3. 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, 47th Society of Toxicology (March, 2008).
4. 杉山圭一, 濱田 理, 室井正志, 葉袋裕二, 棚元憲一, 芳賀 実, 小西良子: Toll-like receptor シグナリングに及ぼすデオキシニバレノールの影響, 2008年度日本農芸化学会講演要旨集 131 (2008).
11. 杉山圭一, 川上 浩, 鎌田洋一, 小西良子: マクロファージのLPS誘導性NO産生を指標としたデオキシニバレノールとニバレノールの複合毒性の解析, 日本農芸化学会大会講演要旨集(2009・福岡) 212 (2009, 3).
12. 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).
13. 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).
14. 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:低オキシル
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).

15. 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).
16. 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).
17. 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
キシソ学会第 67 回学術講演会講演要旨集
19 (2010, 1).
18. 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テセン系カビ毒誘導性
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

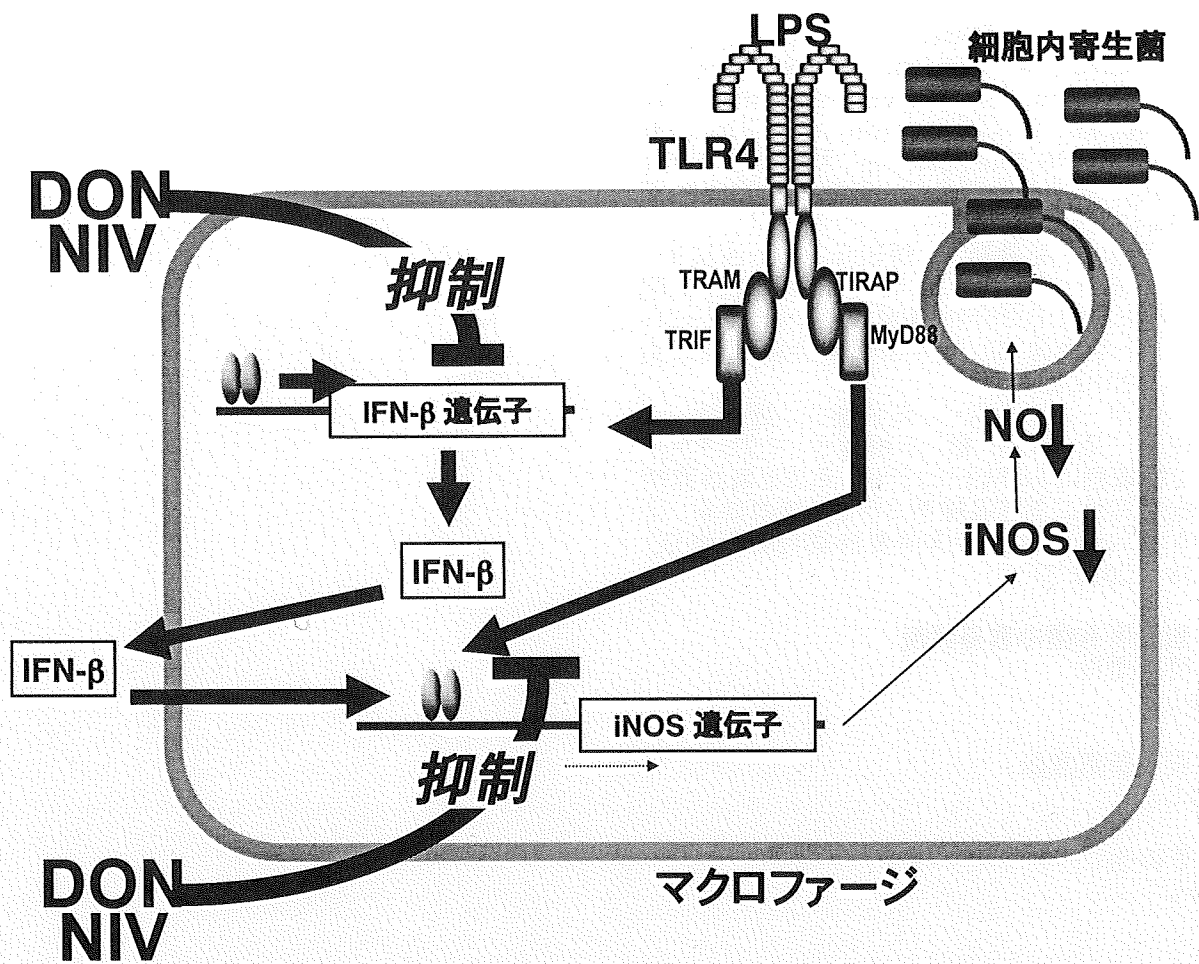


図. 推測されるトリコテセン系マイコトキシンによる
易感染性のメカニズム

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)

(総合) 研究報告書

カビ毒を含む食品の安全性に関する研究

研究分担者：熊谷 進 東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻教授

(平成19年度—平成20年度)

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(平成21年度)

研究要旨

1. 新生子へのフモニシン暴露の薬物代謝機能影響および新生子期におけるエストロゲン様化合物の摂取が成熟期のアフラトキシン毒性感受性に及ぼす影響 (H. 19-20)

新生子期に投与されたフモニシンの成熟後における薬物代謝活性への影響を、とくにアフラトキシン(以下AF)代謝関連酵素に着目して検討した。新生児ラットへのフモニシンB1単回投与による成熟時の肝臓と腎臓の薬物代謝酵素活性に及ぼす影響を調べた。その結果、肝臓および腎臓のサイトゾール分画のethacrynic acidやtrans-4-phenyl-3-butene-2-oneに対するGST活性の変化並びに肝臓ミクロゾームと肝臓9,000G遠心上澄分画のAFB1-DNA付加体生成活性の低下等が認められた。以上の成績から、新生児のフモニシンB1暴露の薬物代謝機能におよぼす影響が成熟時まで残ることが示された。新生子期にゲニスタイン(GS)または α -ゼアラレノール(α -ZOL)を投与されたラットにおいては、成熟後にアフラトキシンの急性毒性に対する感受性が低下することが認められた。しかしながら、 α -ZOL投与はAFB₁の慢性毒性を促進することが示された。

2. ニバレノール誘発IgA腎症に関する研究 (H. 19-21)

19年度は、食品中のカビ毒の毒性評価手法確立の一環として、nivalenol (NIV)により誘発される実験的IgA腎症モデルの作出ならびに高IgA血症を示すhigh IgA strain (HIGA)マウスのIgA腎症病態進行におけるNIVの影響を検討した。その結果、雌Balb/cマウスにNIV 12 ppm以上を8週間投与することにより、血清IgA値及び糸球体へのIgA・IgG沈着の増加を認め、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、これらの動物モデルの有用性が示唆された。20、21年度は、IgA腎症の腎糸球体局所での病態の進行を規定する要因を追求するため、組織プロテオリシス活性化化合物の*S. tachybotrys microspora* triprenyl phenol (SMTP)-7のマウス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、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。

3. 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0.5mg/kgでは明瞭な変化が認められなかったが、1mg/kgおよび2mg/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。0.5~2mg/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1mg/kgおよび2mg/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、2mg/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。

分担研究者：

熊谷 進 東京大学大学院農学生命科学研究科獣
医学専攻教授

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

協力研究者：

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. 新生子へのフモニシン暴露の薬物代謝機能影響および新生子期におけるエストロゲン様化合物の摂取が成熟期のアフラトキシン毒性感受性に及ぼす影響 (II. 19-20)

胎児や新生児に対するフモニシンの毒性影響については、母親への毒性影響を介した間接的な影響は認められていたが、直接的な顕著な毒性影響を認めた報告は少なかった (Safety evaluation of certain mycotoxins in food, EHO Food Additives series 47, 2001, pp147)。しかし最近、妊娠マウスに投与したフモニシンが胎児に神経管欠損を引き起こすことが実験的に示され

(Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol., 2005, 73, 487-97)、さらに、テキサス・メキシコ境界地域で多発した人の神経管欠損のリスクを

高めることが提唱されている (Environ. Health Perspect., 2006, 114, 237-41)。

しかし、胎児期や新生児期にフモニシンに暴露された場合の、それによって引き起こされる成熟後の異常の有無についての知見はこれまでに見られない。本研究では、ラットの新生子期に投与されたフモニシンの成熟後における薬物代謝活性への影響を、とくにアフラトキシン (以下AF) 代謝関連酵素に着目し究明することを目的として、平成19年度は新生子ラットへのフモニシンB1投与による成熟時の肝臓と腎臓の薬物代謝酵素活性に及ぼす影響を調べた。

また、平成20年度は成熟時アフラトキシン毒性に対する感受性に及ぼすエストロゲン様化合物の新生時期暴露による影響を究明した。アフラトキシンB₁ (AFB₁) はヒトや動物に対して肝毒性と肝臓がんを招来するカビ毒であり、これら毒性影響に、肝臓チトクローム酵素 (CYP) によるAFB₁のAFB₁-エポキシド (AFB₀) への変換が重要な役割を果たすことが知られている。すなわち、この反応性に富む代謝物は、細胞内DNAと共有結合によりAFB₁-DNA付加体を生成するが、この反応が発がんに必要なプロセスとされている。また、DNAを含め細胞内高分子化合物へのAFB₀の結合がAFB₁の急性毒性を引き起こすものと考えられている。また、肝臓CYPは、AFB₁をアフラトキシンQ₁ (AFQ₁)、P₁ (AFP₁)、M₁ (AFM₁) に、肝臓サイトゾールのリダクターゼはアフラトキコールにそれぞれ代謝変換するが、これ

ら代謝物の毒性および発がん性はAFB₁よりも低いことが知られている。さらにAFB₁の解毒過程として、肝臓サイトゾールのグルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) によるAFB₀のグルタチオン抱合化が知られている。本研究は、エストロゲン活性をもつ天然化合物として大豆等の食品に含まれているゲニスタイン (GS) および*Fusarium*により産生されるカビ毒ゼアラレノール (α -ZOL) を用い、新生児ラットへのこれら化合物の暴露が、成熟後のAFB₁の毒性と発がん性に及ぼす影響を究明することを目的とした。

2. ニバレノール誘発IgA腎症に関する研究 (H. 19-21)

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週間餌飼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。

一方、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-7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。

本分担研究の一部では、19年度は、食品中のカビ毒であるNIVの毒性リスクであるIgA腎症を対象として、その予防・治療を目的とした毒性評価手法確立の一環として、NIV投与により実験的IgA腎症モデルを作出するとともに、IgA腎症の自然発症モデルであるHIGAマウスにNIVを投与し、その病態進行に対するNIVの影響を検討した。

20、21年度は、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、NIVと共に組織プロテオリシス活性化化合物であるSMTPを同時投与し、IgA腎症の発生に対する修飾作用を検討した。

3. 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と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と同じトリコテセン系カビ毒である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. 新生子へのフモニシン暴露の薬物代謝機能影響および新生子期におけるエストロゲン様化合物の摂取が成熟期のアフラトキシン毒性感受

性に及ぼす影響 (H. 19-20)

新生子へのフモニシン暴露の薬物代謝機能影響:

2日齢の雌雄フィッシャーラット (F344) にフモニシンB1 (10mg/kg) を皮下投与後、2ヶ月齢時にエーテル麻酔下でと殺し肝臓と腎臓を摘出、肝臓は生理食塩水で還流した後に液体窒素で冷凍し-80℃下で使用時まで保存した。常法に従い調整した各組織のホモジネイトを、9000Gで遠心し、その上澄 (以下S9分画) を得るとともに、S9分画を105,000Gで遠心することにより、ミクロゾームとサイトゾールの各分画を得た。

ミクロゾームとS9分画については、 $[^3\text{H}]$ AFB₁、子牛胸腺DNA、NADPH (2mM)、G-6-Pデヒドロゲナーゼ (1Unit/ml)、G-6-P (10mM) とともにインキュベートし、生成された $[^3\text{H}]$ AFB₁-DNA付加体量を測定することにより付加体生成活性 (AF活性化) 能を調べた。サイトゾール分画については、ミクロゾール分画 (ハムスター肝臓由来) による AFB₁-DNA付加体生成反応系に、サイトゾール分画とグルタチオントランスフェラーゼ (GST) による付加体生成阻害活性を調べた。さらにサイトゾールについては、AFB₁とDNAに替えて、(CDNB)、(EA)、(t-PBO) または (CPH) を基質として反応系に加えることによって、それぞれの基質に対するGST活性を求めた。

新生子期におけるエストロゲン様化合物の摂取が成熟期のアフラトキシン毒性感受性に及ぼす影響:

新生子期にゲニスタイン (GS) または α ゼアレノール (α -ZOL) を皮下投与されたラットに対して成熟後にアフラトキシンB₁ (AFB₁) を単回経口投与し、その肝臓毒性の発現性を調べた。

(1) AFB₁代謝肝酵素の発現性: 生後2日目のラットにGSまたは α -ZOLを皮下投与した後に、6週令時または2ヶ月令時に肝臓を搾取し、それら組織の分画についてAFB₁代謝に関わる酵素活性をin vitro試験系を用いて調べた。

(2) 成熟ラットにおけるAFB₁の急性毒性: 新生時GSまたは α -ZOL投与の影響を究明するために、2日齢のラットにGSまたは α -ZOLを投与した後、2ヶ月齢時に0.5mg/kg体重または2.5 mg/kg体重のAFB₁を経口投与し、48時間目に血液と肝臓を採取し、それぞれ血液生化学検査と病理組織学的検査を行った。

(3) 成熟ラットにおけるAFB₁の慢性毒性: 新生時GSおよび α -ZOLの影響を究明するために、前章と同じ方法により2日令ラットにGSまたは α -ZOLを投与した後に、2ヶ月令時に0.2mg/kg体重のAFB₁を1日1回、週5日間、2週間にわたって経口投与してから18週間後に血液と肝臓を採取し、それぞれ血液生化学検査と肝組織中GST-P陽性fociの測定に供した。

2. ニバレノール誘発IgA腎症に関する研究 (H. 19-21)

NIVは国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部にて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℃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°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。

NIV誘発IgA腎症モデルの作出:

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時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 (x 100 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。

NIV誘発IgA腎症に対するSMTP-7の修飾作用の検討:

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。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 (x 100 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、NIV誘発IgA腎症モデルの作出に関する研究では、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Dunnnett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。

NIV誘発IgA腎症に対するSMTP-7の修飾作用の検討では、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。

3. 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バー内 (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 (30mg/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지의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0.2ml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0.2ml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. 新生子へのフモニシン暴露の薬物代謝機能影響および新生子期におけるエストロゲン様化合物の摂取が成熟期のアフラトキシン毒性感受性に及ぼす影響 (II. 19-20)

新生子へのフモニシン暴露の薬物代謝機能影響：

新生子ラットへのフモニシン投与によって、2ヶ月齢時の体重が雌雄共に、対照群に比して有意に低かった。3~12日齢にフモニシンを投与されたラットにおいてもこうした体重低下の影響が既に報告されている (Neurotoxicology, 1997, 18, 571-79) が、その機序の詳細は不明である。

肝臓サイトゾール分画のGST活性については、フモニシン投与により、EAを基質とした活性は雄において有意に低下し、t-PROに対する活性は雌雄共に有意に上昇することが認められたが、CDNBとCPHに対する活性にはフモニシン投与の影響が認められなかった。

肝臓サイトゾール分画のGST活性については、雄におけるCDNBとCPHに対する活性の上昇および雌雄におけるEAに対する活性の上昇が認められた。t-PROに対する活性は検出できなかった。

肝臓S9分画のAFB1-DNA付加体生成活性は、フモニシン投与により低下傾向が見られ、とくに雄においては有意に低下したのに対し、腎臓S9分画のAFB1-DNA付加体生成活性は逆に上昇することが認められた。

肝臓マイクロゾームのAFB₁-DNA付加体生成活性は雌雄共にフモニシン投与による低下が認められたが、これは、新生児へのフモニシン投与によって、肝臓CYPのAFB₁-epoxide生成に関わる酵素が抑制されることを示唆している。一方、CDNBに対する肝臓サイトゾールのGST活性がフモニシン投与によって影響を受けなかったことと一致し、肝臓サイトゾール存在下でAFB₁-DNA付加体生成活性の低下は、肝臓サイトゾール分画のAFに特異的なGST活性の上昇によるものではなく、肝臓マイクロゾームのAFB₁-DNA付加体生成活性の低下を反映したものと考えられる。

肝臓S9分画のAFB₁-DNA付加体生成活性の成績は、新生児のフモニシン暴露によりAFの肝臓毒性と肝発がん性が減弱する可能性を示唆しているが、これについてはさらなる研究が必要である。フモニシンにプロモーター活性があることはよく知られており (Safety evaluation of certain mycotoxins in food, EHO Food Additives series 47, 2001, pp147)、ラットを用いた実験において、アフラトキシンとフモニシンが肝発がん性に対して相乗効果を示すことが報告されている

(Toxicology, 2002, 171, 161-73) が、アフラトキシンの発がん性や毒性に及ぼす胎児または新生児へのフモニシン暴露の影響については不明である。本研究で認められた新生児へのフモニシン暴露による成熟後の関連酵素活性の変化は、胎児または新生児へのフモニシン暴露の影響が成熟後まで残ることを示唆している。

新生子期におけるエストロゲン様化合物の摂取が成熟期のアフラトキシン毒性感受性に及ぼす影響:

(1) AFB₁代謝肝酵素の発現性

新生子期にゲニスタインまたは α -ゼアラレノールを投与されたラットにおいては、成熟後にアフラトキシンの急性毒性に対する感受性が低下することが認められた。すなわち、新生時にGS投与を受けた2ヶ月齢ラットにおいては、肝マイクロゾームのAFB₁-DNA付加体生成活性の上昇が雄ラットにお

いて、しかし、肝サイトゾールのAFB₁-DNA付加体生成阻害活性の上昇および肝ポストミトコンドリア分画のAFB₁-DNA付加体生成活性の低下が両性ラットにそれぞれ認められた。また新生時に α -ZOL投与を受けた2ヶ月齢ラットにおいては、肝マイクロゾームのAFB₁-DNA付加体生成活性の上昇および雌ラットにおける肝サイトゾールのAFB₁-DNA付加体生成活性の上昇が認められたが、肝ポストミトコンドリア分画のAFB₁-DNA付加体生成活性については対照ラットと比較して差異が認められなかった。1-Chloro-2,4 dinitrobenzene (CDNB) 等を基質として用いた2ヶ月齢時における肝サイトゾールのGST活性は、GSおよび α -ZOLの新生時投与により上昇することが、また雄ラットにおいては肝サイトゾールのAFB₁のアフラトキシコール (AFL) への変換活性も同処理によって上昇することが認められた。加えて、肝マイクロゾームによるAFB₁からAFM₁等の脂溶性化合物への代謝変換も、新生時GSまたは α -ZOL投与によって促進されることが認められた。

(2) 成熟ラットにおけるAFB₁の急性毒性

1.5mg/kg体重のAFB₁投与によって血漿gamma glutamyl transpeptidase (GGT) 等の血液生化学パラメータのレベルが顕著に上昇すること、しかしこの上昇は、とくに肝細胞障害の指標であるパラメータについては、新生時GSまたは α -ZOL投与によって有意に抑制されることが認められた。また、AFB₁投与によって引き起こされた肝臓の出血と壊死を含む病理組織学的変化も、新生時GSおよび α -ZOL投与によって抑制されることが認められた。0.5mg/kg体重のAFB₁投与は、軽微な毒性を招来したが、これに対しては、GSと α -ZOLともに有意な影響をもたらさなかった。

(3) 成熟ラットにおけるAFB₁の慢性毒性

AFB₁投与によって血漿ALTレベルの上昇と肝組織におけるGST-P陽性細胞と同fociの生成が誘起されることが見出された。しかし、AFB₁によるこれらの変化は、新生時GS投与により抑制されることが認められた。一方、新生時 α -ZOL投与は、そのみで成熟時肝組織にGST-P陽性細胞の出現を招く

ことが見出された。さらにAFB₁投与により引き起こされた血漿ALTレベルの上昇と肝組織GST-P陽性細胞と同fociの生成に対しては、新生時 α -ZOL投与の影響は認められなかった。

2. ニバレノール誘発IgA腎症に関する研究 (H. 19-21)

NIV誘発IgA腎症モデルの作出:

実験1: Balb/cマウスを用いた実験的IgA腎症モデルの作出に於いては、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。

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、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。

糸球体へのIgA沈着については、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。

実験2: HIGAマウスのIgA腎症病態進行に対するNIVの影響の検討に於いては、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濃度については、NIV投与の有無にか

かわらず、HIGAマウスでは、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。

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。

糸球体へのIgA沈着については、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、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。

NIV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の修飾作用の検討に於いては、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、NIV単独群及びNIV+SMTP-7併用群において減少傾向を示したが、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濃度は、対照群と比して、NIV単独群及びNIV+SMTP-7併用群において有意な上昇が認められたものの、NIV単独群とNIV+SMTP-7併用における差は認められなかった。一方、血清IgG濃度については、NIV単独投与及びNIV+SMTP-7併用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単独投与及びNIV+SMTP-7併用投与による変動は認められなかった。また病理組織学的検索においても、腎糸球体に

においてNIV単独投与およびNIV+SMTP-7併用による明らかな変化は観察されなかった。

糸球体への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。

実験2：NIVによるIgA腎症病態進行に対するSMTP-7の修飾作用の検討に於いては、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。また、実験期間を通じ、NIV投与群及びNIV+SMTP-7短期投与群において体重の減少傾向が観察されたが、個体当たりの摂餌量・摂水量については、NIV投与およびSMTP-7短期投与による明らかな影響は認められなかった。

血清IgAは、対照群と比較してNIV投与群とNIV+SMTP-7投与群で高値を示したものの、NIV投与群とNIV+SMTP-7投与群における差は認められなかった。血清IgG濃度は、群間で差は認められなかった。

腎臓絶対重量は、NIV投与及びNIV+SMTP-7投与による変動は認められなかった。しかし、相対重量において、対照群に比較してNIV+SMTP-7投与群では、有意な増加が認められた。病理学的検索においては、腎糸球体においてNIV投与およびNIV+SMTP-7投与による明らかな変化は観察されなかった。

糸球体への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。

5. デオキシニバレノールの心機能に及ぼす影響

(H21)

(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