

1.0mg/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、2mg/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。1mg/kg DON投与群では投与後90分目に、2mg/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、0.5mg/kg、1mg/kg、2mg/kgDON 投与群でいずれも90分目に有意 ($P < 0.05$) に低い値を示し、2mg/kgDON 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. 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：

肝臓ミクロゾームの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、新生子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た。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、肝臓ミクロゾームのAFB₁-DNA付加体生成活性の低下を反映したものと考えられた。肝臓S9分画のAFB₁-DNA付加体生成活性の成績は、新生子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子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子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が示唆された。

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：

新生子期におけるGSまたは α -ZOLへの暴露は、成熟ラットの肝臓におけるAFB₁の代謝活性に著しい変化を招来すること、即ち、アフラトキシンの活性化に関わるCYPのAFBO生成を促進するが、解毒に関するサイトゾールGST、リラクターゼ活性およびCYPのAFB₁水酸化活性も促進することが判明した。また、新生子期におけるGSまたは α -ZOLへの暴露は、成熟ラットに対するAFB₁の急性毒性を抑制することが示唆された。さらに、新生子期におけるGSへの暴露は成熟ラットにおけるAFB₁の慢性毒性を抑制するが、 α -ZOLにその効果がないことが示唆された。

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。

NIV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Ig

A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、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による糸球体糸脚へのIgA沈着の際に、その初期から糸脚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、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、さらに糸球体糸脚への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。

3. デオキシニバレノールの心機能に及ぼす影響 (H21)

トリコテセン系カビ毒の一種であるT-2トキシンでは、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、50~200mg/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、10~20ppm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 (1mg/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. 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結果、肝臓および腎臓のサイトゾール分画のGST活性の変化ならびに肝臓ミクロゾームと肝臓9000G遠心上澄分画のAFB1-DNA付加体生成活性の低下が生じることが明らかになった。

成熟ラットにおけるAFB₁の活性化と解毒に関わる肝臓代謝機能およびAFB₁の毒性に及ぼす新生時期の天然エストロゲンGSおよび α -ZOLへの暴露の影響について今まで不明であった重要な知見が得られた。要約すると、以下の結論が得られた。(1)

成熟ラットにおけるAFB₁の活性化と解毒に関わる肝臓代謝機能は新生時期におけるGSおよび α -ZOLへの暴露による影響を受けること。(2) 新生子期のGSおよび α -ZOL投与は肝臓のサイトゾールGSTおよび同リダクターゼ活性の上昇を引き起こすとともに、AFB₁の急性毒性影響の軽減を招来すること。同時に、(3) 新生子期のGS投与は成熟ラットにおけるAFB₁の慢性毒性を抑制したのに対し、 α -ZOL投与は逆にAFB₁の慢性毒性を促進すること。

2. ニバレノール誘発IgA腎症に関する研究

(H. 19-21)

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。

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、糸球体糸系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。

3. デオキシニバレノールの心機能に及ぼす影響 (H21)

DONは0.5mg/kgの皮下投与で軽度の心臓作用があり、1mg/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

Kumagai S, Nakajima M, Tabata S, Ishikuro E, Tanaka T, Norizuki H, Itoh Y, Aoyama K, Fujita K, Kai S, Sato T, Saito S, Yoshiike N, Sugita-Konishi Y.: Aflatoxin and ochratoxin A contamination of retail foods and intake of these mycotoxins in Japan. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 25(9):1101-1106(2008).

Kumagai S, Nakajima M, Tabata S, Ishikuro E, Tanaka T, Norizuki H, Itoh Y, Aoyama K, Fujita K, Kai S, Sato T, Saito S, Yoshiike N, Sugita-Konishi Y.: Aflatoxin and ochratoxin A contamination of retail foods and intake of these mycotoxins in Japan. Food Addit Contam. 15:1-6(2008).

Poapolathep A, Poapolathep S, Sugita-Konishi Y, Imsilp K, Tassanawat T, Sinthusing C, Itoh Y, Kumagai S.: Fate of fusarenon-X in broilers and ducks. Poult Sci. 87(8):1510-1515(2008).

Poapolathep A, Poapolathep S, Klangkaew N, Sugita-Konishi Y, Kumagai S.: Detection of deoxynivalenol contamination in wheat products in Thailand. J Food Prot. 71(9):1931-1933(2008).

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).

Sugita-Konishi Y, Kubosaki A, Takahashi M, Park BJ, Tanaka T, Takatori K, Hirose M, Shibutani M.: Nivalenol and the targeting of the female reproductive system as well as haematopoietic and immune systems in rats after 90-day exposure through the diet. Food

Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 25(9):1118-1127(2008).

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(1):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(1):125-135(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)

Dong M, Tulayakul P, Li JY, Dong KS, Manabe N, Kumagai S.: Metabolic conversion of zearalenone to alpha-zearalenol by goat tissues. J Vet Med Sci. 72(3):307-312. (2009).

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).

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, Kumagai S.: Exposure to aflatoxins in Japan: risk assessment for aflatoxin B1. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 27(3):365-372 (2010) .

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, Kumagai S.: Four-year surveillance for ochratoxin a and fumonisins in retail foods in Japan. J Food Prot. 73(2):344-352 (2010) .

Dong M, He XJ, Tulayakul P, Li JY, Dong KS, Manabe N, Nakayama H, Kumagai S.: The toxic effects and fate of intravenously administered zearalenone in goats. Toxicol. 55(2-3):523-530. (2010).

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

Amnart Poapolathep, Susumu Kumagai
Effects of naringenin on dispositions of deoxynivalenol in pigs
日本マイコトキシン学会第64回学術講演会、2008
(名古屋市)。

熊谷 進
動物体内におけるカビ毒の挙動に関する研究
日本マイコトキシン学会第66回学術講演会、2009
(千葉)。

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（東京）。

Poapolathep, S. Poapolathep, A., Machii, K., Nakayama, H., Sugita-Konishi, Y. and Kumagai, S. The effect of neonatal genistein exposure on aflatoxin B1 metabolism and toxicity in rats

The 49th Annual Meeting of the Society of

Toxicology, 2010（ソルトレーク市、米国）

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

1. 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

Table 1. The effect of neonatal administration with alpha-zearalenol and genistein on body and the liver weight of male rats after AFB1 induced acute toxicity

Group	Number of animals	Survival rate (%)	Body wt (g)	Liver wt (g)	Relative liver wt (g/100g bw)
Intact	3	100	160.20 ± 0.48	7.79 ± 0.21	4.86 ± 0.13
II (vehicle -AFB1)	3	100	172.40 ± 8.68	8.71 ± 0.88	5.05 ± 0.40
III (ZEA*-AFB1)	5	100	160.55 ± 3.88	5.85 ± 0.94	3.64 ± 0.53
IV (GS*-AFB1)	5	100	161.36 ± 11.31	7.49 ± 1.61	4.62 ± 0.80

ZEA*:alpha-zearalenol GS*:genistein

Table 2. The effect of neonatal administration with alpha-zearalenone and genistein on the kidney, testis and epididymis weights of male rats after AFB1 induced acute toxicity

	Kidney wt (g)		Testis wt (g)		Epididymis wt (g)	
	Left	Right	Left	Right	Left	Right
Intact	0.73 ± 0.02	0.71 ± 0.02	1.17 ± 0.07	1.09 ± 0.05	0.19 ± 0.02	0.17 ± 0.02
II (vehicle -AFB1)	0.86 ± 0.04	0.84 ± 0.02	1.08 ± 0.09	1.05 ± 0.09	0.21 ± 0.03	0.22 ± 0.03
(ZEA-AFB1)	0.75 ± 0.05	0.71 ± 0.06	1.10 ± 0.10	1.01 ± 0.12	0.20 ± 0.04	0.18 ± 0.0
IV (GS-AFB1)	0.80 ± 0.09	0.81 ± 0.10	1.04 ± 0.04	1.02 ± 0.05	0.20 ± 0.02	0.21 ± 0.0*

*p<0.05 vs II

Table 3. The effect of neonatal administration with alpha-zearalenol and genistein on body and the liver weight of female rats after AFB1 induced acute toxicity

Group	Number of animals	Survival rate (%)	Body wt (g)	Liver wt (g)	Relative liver wt (g/100g bw)
Intact	3	100	119.07 ± 4.03	5.05 ± 0.35	4.24 ± 0.15
I (vehicle-DMSO)	3	100	126.67 ± 3.86	4.43 ± 0.18	3.51 ± 0.23
II (vehicle -AFB1)	6	100	120.02 ± 5.64	4.40 ± 0.39	3.66 ± 0.24
III (ZEA-AFB1)	6	100	125.58 ± 5.81	4.27 ± 0.44	3.39 ± 0.24
IV (ZEA- DMSO)	3	100	120.33 ± 5.55	4.19 ± 0.09	3.34 ± 0.11
V (GS-AFB1)	5	100	117.68 ± 4.28	4.09 ± 0.21	3.47 ± 0.10
VI (GS- DMSO)	3	100	120.33 ± 5.55	4.06 ± 0.29	3.37 ± 0.13

**p<0.05 vs II

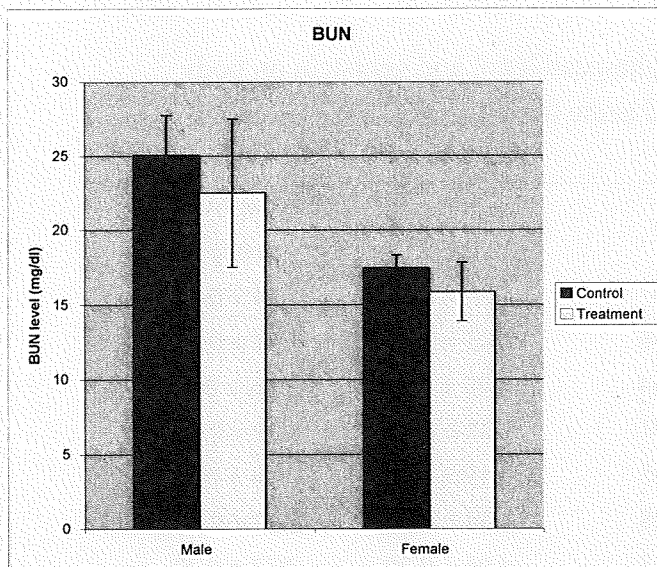
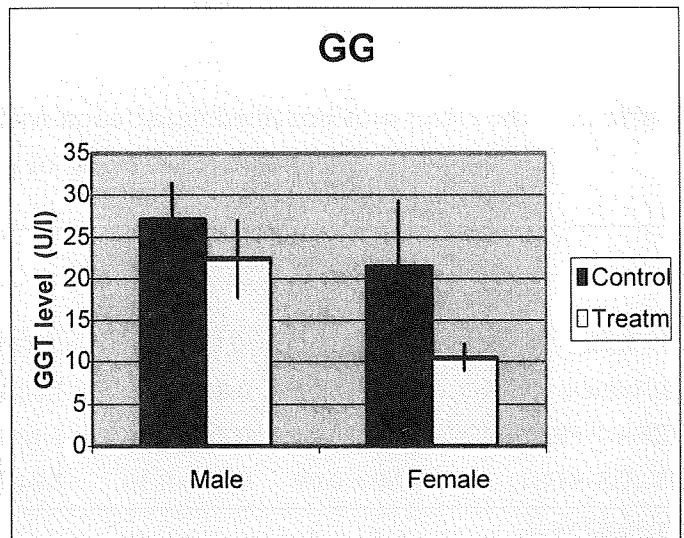
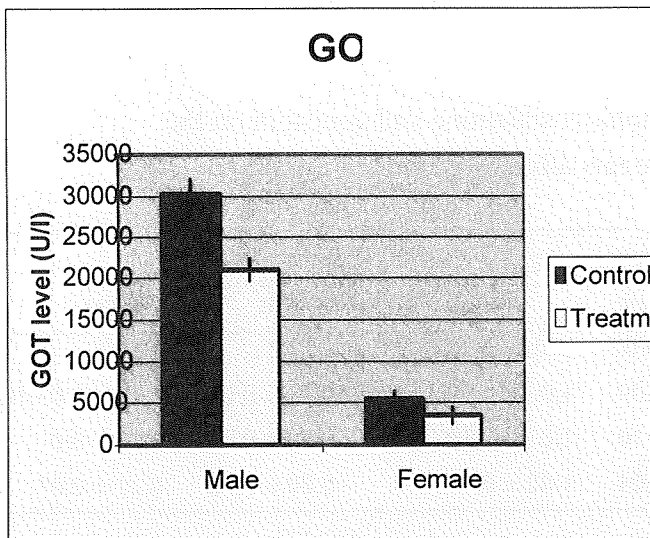
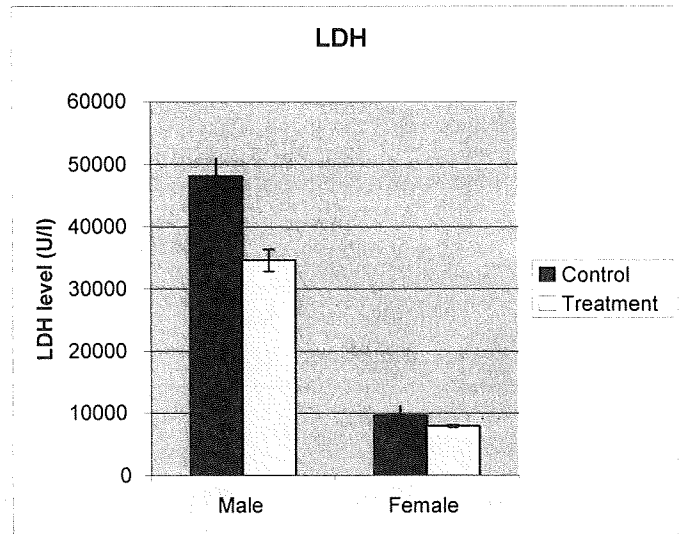
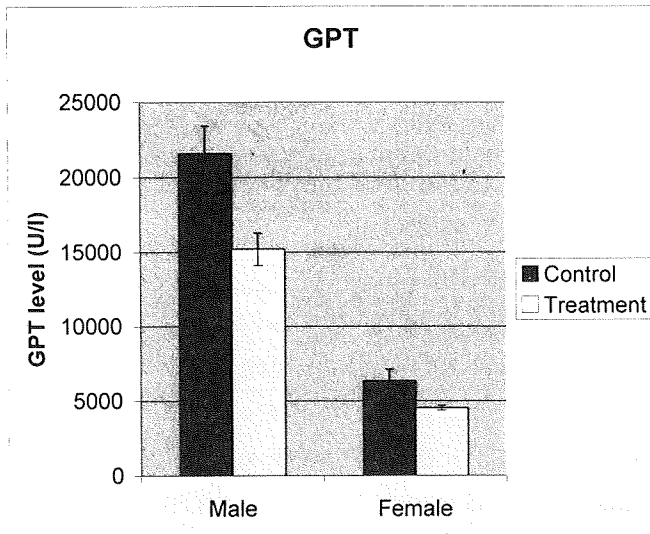


図 1. 新生子期にゲニスタインを投与されたラットの成熟時におけるアフラトキシンに対する反応：血液生化学変化（平均値、SD）

Control：新生時に溶媒投与・成熟時にアフラトキシン投与

Treatment：新生時にゲニスタイン投与・成熟時にアフラトキシン投与

p<0.05；雌GPT、雌BUN、雄GOT、雄LDH：

p<0.01；雌GGT、雌GOT、雄GPT

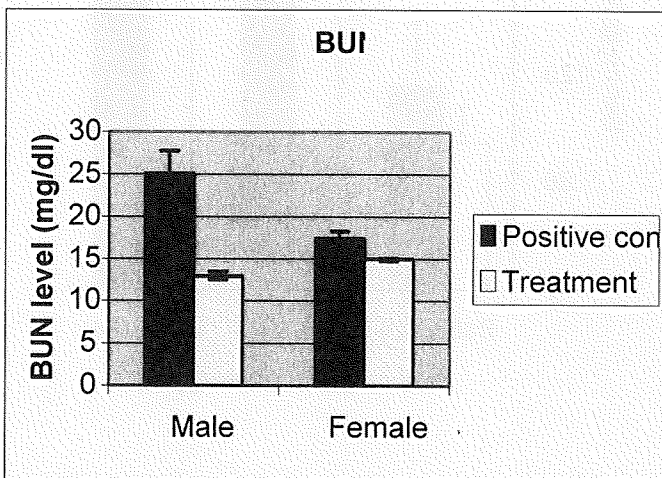
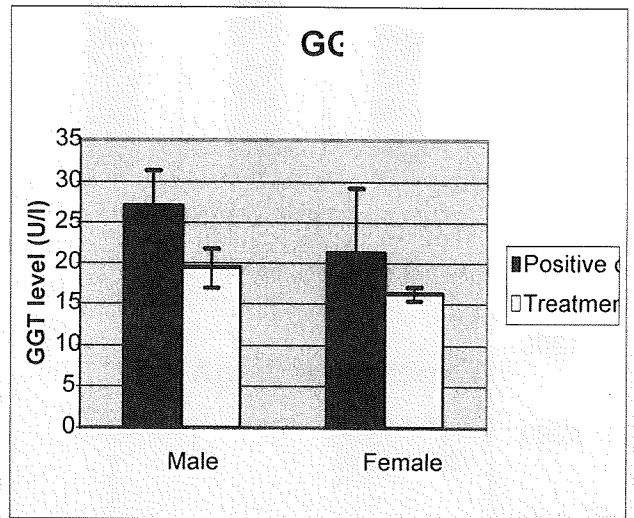
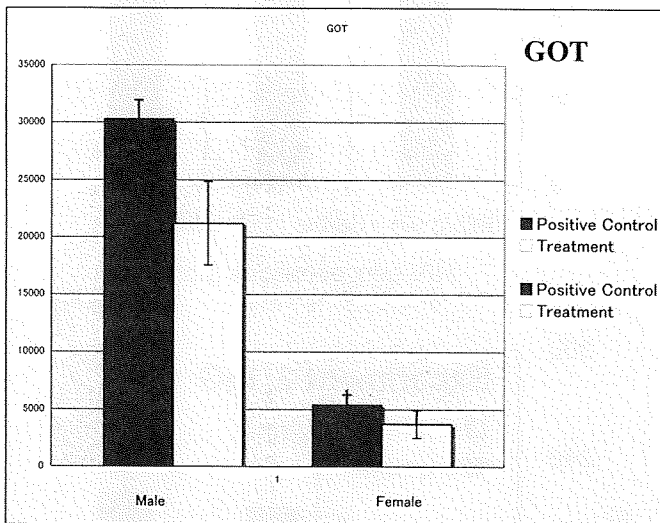
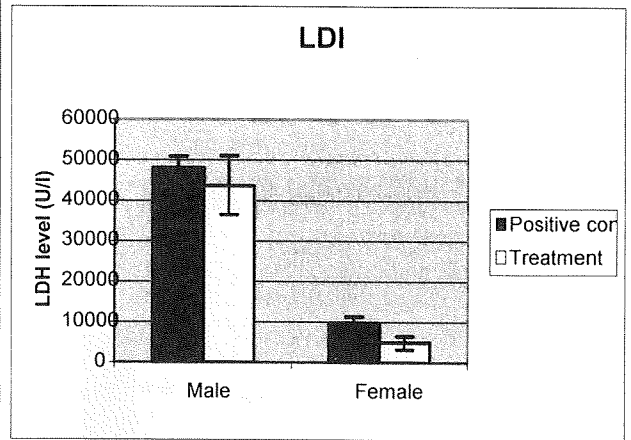
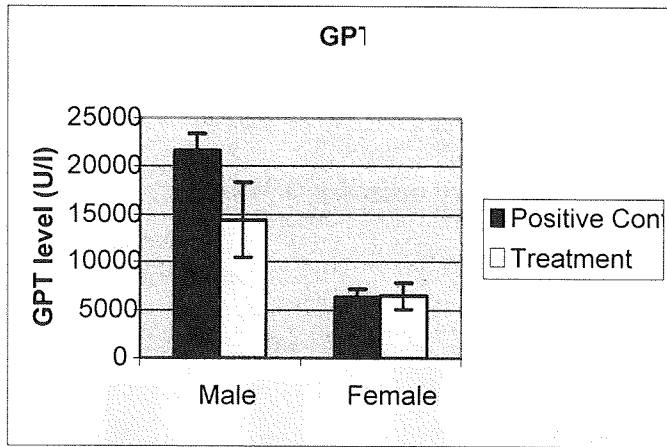


図 2. 新生時期に α ゼアラレノールを投与されたラットの成熟時におけるアフラトキシンに対する反応：血液生化学変化（平均値、SD）
 Positive Control：新生時に溶媒投与・成熟時にアフラトキシン投与
 Treatment：新生時に α ゼアラレノール投与・成熟時にアフラトキシン投与
 $p < 0.05$ ；雌GGT、雌GOT、雌LDH：
 $p < 0.01$ ；雄GGT、雄GOT、雄GPT、雌雄BUN

2. ニバレノール誘発IgA腎症に関する研究

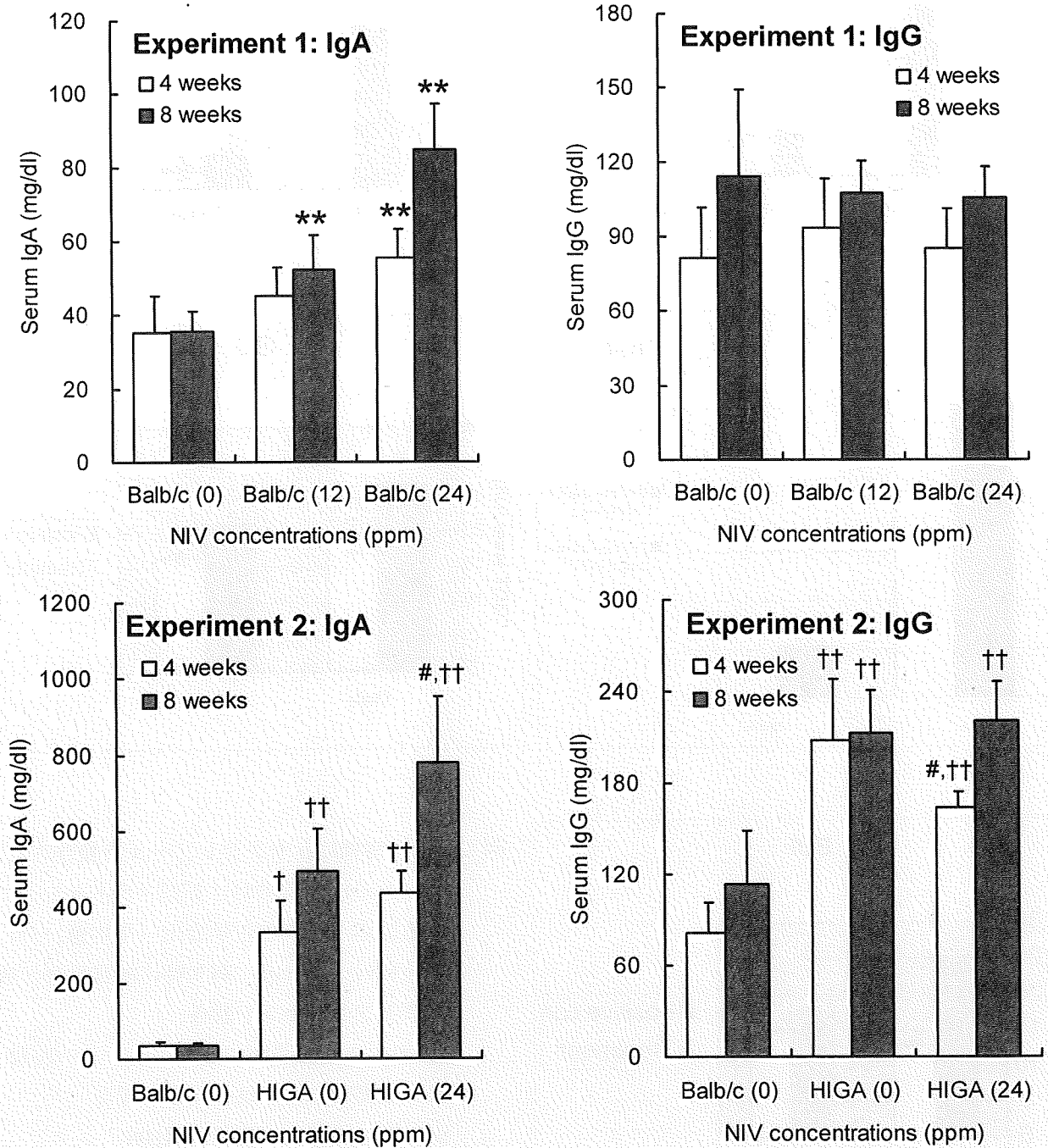


Fig. 1. Serum IgA and IgG levels for female Balb/c and HIGA mice given nivalenol (NIV) for 4 or 8 weeks. Data represents means±S.D. ** $P < 0.01$, as compared with the untreated control (Dunnett's test). # $P < 0.05$, as compared with the untreated HIGA mice (Tukey test). † $P < 0.05$; †† $P < 0.01$, as compared with the untreated Balb/c mice (Tukey or Steel-Dwass test).

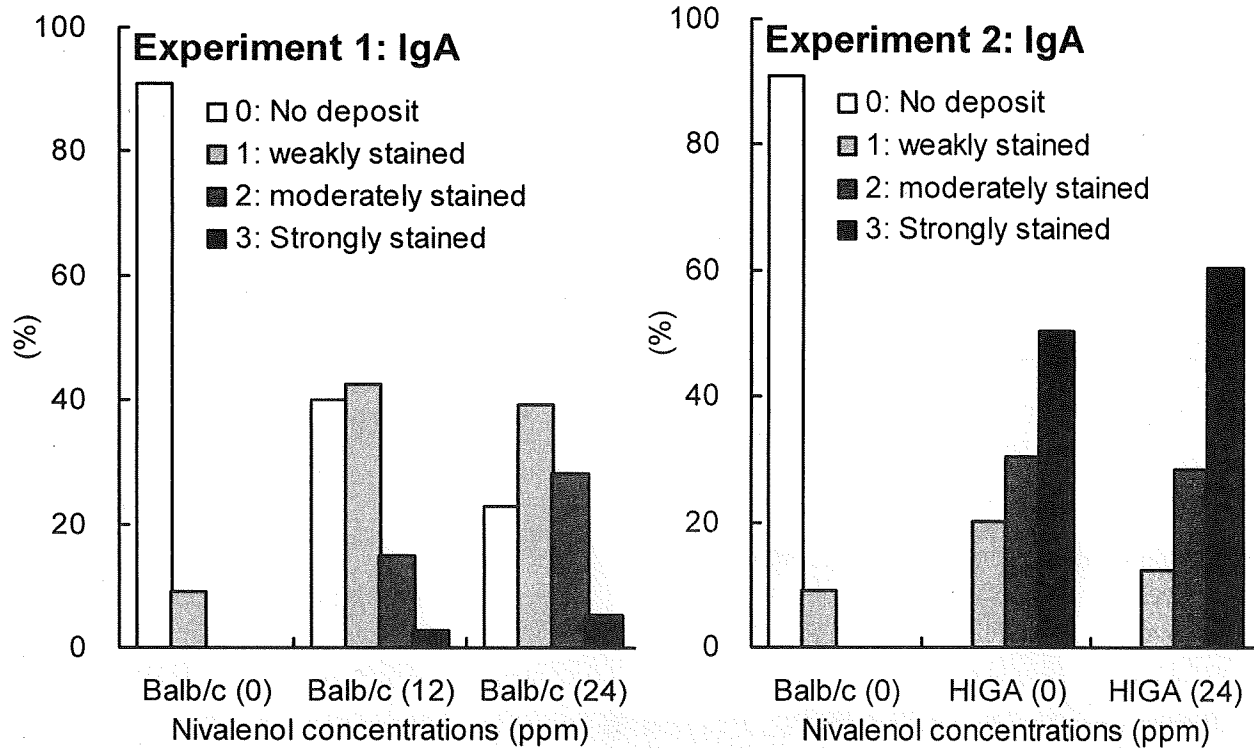


Fig. 2. Glomerular IgA deposition in the kidneys of Balb/c and HIGA mice given NIV.

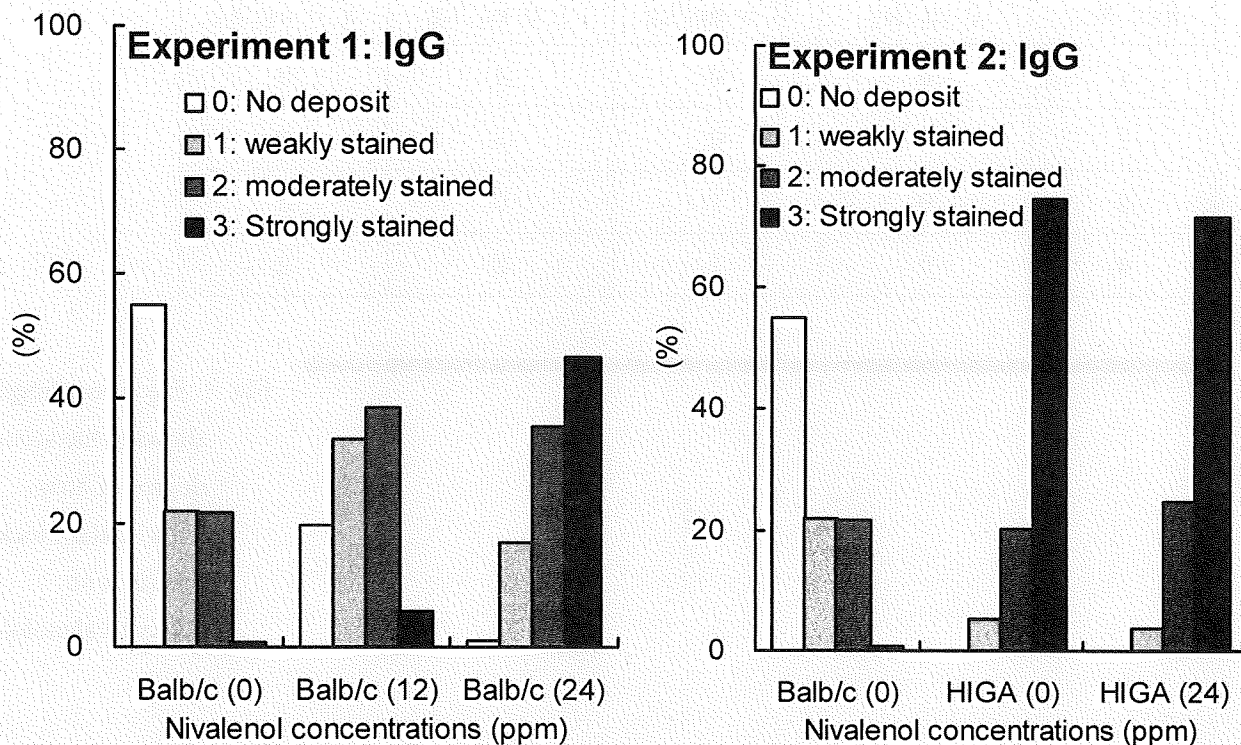


Fig. 3. Glomerular IgG deposition in the kidneys of Balb/c and HIGA mice given NIV.

Table 1. Serum concentrations of IgA and IgG

Experiment 1	Control	NIV alone	NIV+SMTTP
No. of animals examined	7	10	13
Serum IgA (mg/ml)	45.29 ± 4.12	74.07 ± 15.98**	69.37 ± 11.25**
Serum IgG (mg/ml)	149.86 ± 29.86	140.44 ± 24.42	152.62 ± 31.04
Experiment 2	Control	NIV alone	NIV+SMTTP
No. of animals examined	8	12	14
Serum IgA (mg/ml)	51.53 ± 11.43	116.11 ± 4.94**	112.06 ± 29.65**
Serum IgG (mg/ml)	208.33 ± 49.48	199.22 ± 40.42	216.69 ± 36.86

**; Signifi

cantly different from the control mice at $P<0.01$ (Tukey test).**; Significantly different from the control mice at $P<0.01$ (Tukey test).

3. デオキシニバレノールの心機能に及ぼす影響

Table 1. Occurrence of the second degree of atrio-ventricular block in rats administered with deoxynivalenol

Rat No.	0 mg/kg	0.5 mg/kg	1.0 mg/kg	2.0 mg/kg
1	0	0	4	8
2	0	0	3	3
3	0	1	0	2
4	0	1	2	2

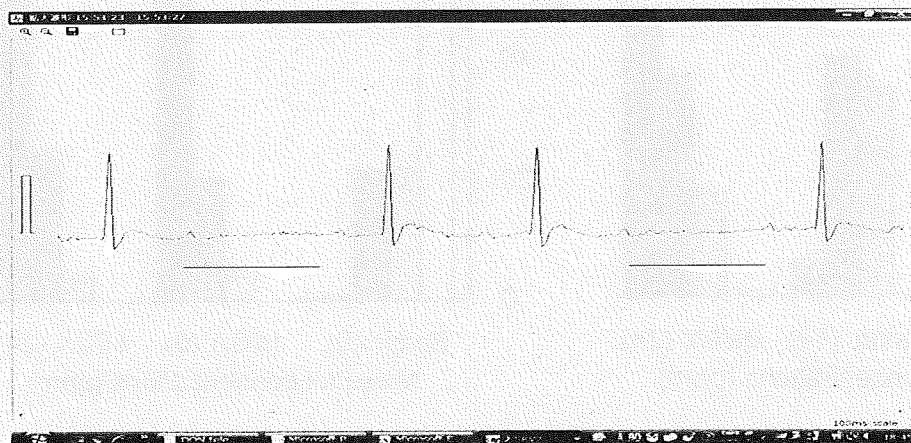


Fig. 1. Electrocardiogram showing the second degree of atrio-ventricular block in a rat with deoxynivalenol.

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
熊谷 進	はじめに一食の安全確保に向けた科学的対応の足跡一	東京大学食の安全研究センター	「食の安全科学の展開一食のリスク予測と制御に向けて一」	シーエムシー出版	東京	2010年	1～7頁
局 博一	全身健康影響指標を利用した安全性評価	東京大学食の安全研究センター	「食の安全科学の展開一食のリスク予測と制御に向けて一」	シーエムシー出版	東京	2010年	67～70頁

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

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）
総合研究報告書

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 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、ヒトおよび家畜等に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。分析法の妥当性評価に関しては、国際的なハーモナイゼーションのためにも分析学の専門家や統計的専門家などで組織された評価委員会を設けることが求められている。そのため、本研究において今後我が国で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を評価した。

本研究で評価したカビ毒試験法は、小麦玄麦中のデオキシニバレノールおよびニバレノール一斉試験法、落花生のトータルアフラトキシン試験法、牛乳・粉ミルクのアフラトキシンM1試験法、総アフラトキシン等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの作成であった。小麦玄麦中のデオキシニバレノールおよびニバレノール一斉試験法は、多機能カラムで前処理をしたのち HPLC・UV 検出器で検出する試験法に妥当性が認められると判定した。落花生のトータルアフラトキシン試験法は多機能カラムで前処理またはイムノアフィニティーカラムで前処理をした後、HPLC・蛍光分析器で検出する試験法に妥当性が認められると判定した。牛乳・粉ミルクのアフラトキシンM1試験法は、イムノアフィニティーカラムで前処理をした後、HPLC・蛍光分析器で検出する試験法に妥当性が認められると判定した。総アフラトキシン等の妥当性評価ガイドラインは、平成19年11月15日に通知された「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」をたたき台として作成した。以上の評価結果は厚生行政の施策として資する。

研究協力者

石黒瑛一（（財）日本食品分析センター）
伊藤嘉典（平成20年度まで：前国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部）

永山敏廣（東京都健康安全研究センター）
中島正博（名古屋市衛生研究所生活環境部）
堀江正一（大妻女子大学 家政学部教授）
山本勝彦（名古屋学芸大学短期大学部）

内藤成弘 (独)農研機構 食品総合研究所)
小西良子 (国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部)
鎌田洋一 (国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部)
大西 貴弘 (国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部)
望月直樹 (アサヒビール株式会社)
宮下 隆 (キューピー株式会社)
細井理恵子 (キューピー株式会社)
門田智之 (キリンホールディングス株式会
社)
伊藤勇二 (キリンホールディングス株式会
社)
滝埜昌彦(アジレントテクノロジー株式会
社)
田中宏輝 (サントリー株式会社)、
高橋正紀 ((社)全日本検数協会)
杉浦義紹 (神戸市環境保健研究所)

A. 研究目的

カビ毒は自然毒であるため、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必要となる。

法律規制に伴う基準値には、その分析値が担保されていなければならない、そのため、分析法の妥当性を評価することが必要

になる。この重要性は国際的な動きとして、多くの国で受け入れられ、AOAC International やIUPAC, ISOなどの国際的な機関が、その評価方法の指針を示している。我が国も、カビ毒の汚染実態調査結果や、規制を行うための試験法の国際的ハーモナイゼーションを図るために、その試験法の妥当性を評価出来る組織を設立し、国際的指針に従って検討しておく必要がある。そのため、本研究において分析法および統計学的な専門家によって評価する「カビ毒試験法評価委員会」を平成20年に設立し、今後我が国で策定されるカビ毒試験法を対象に妥当性評価を行うこととした。

B. 研究方法

1.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。

(i) カビ毒試験法評価委員会組織 (平成21年度現在)

① 委員長 :

田中敏嗣 (神戸市環境保健研究所)

② 実務委員 :

石黒瑛一 ((財)日本食品分析センター)

永山敏廣 (東京都健康安全研究センター)

中島正博 (名古屋市衛生研究所)

堀江正一 (大妻女子大学)

③ 統計学的評価委員 :

山本勝彦 (名古屋学芸大学短期大学部)

内藤成弘（（独）農業・食品産業技術
総合研究機構食品総合研究所）

④ 事務局（作業部会）：

小西良子（国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部）

鎌田洋一（国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部）

大西貴弘（国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部）

各委員の任期は1年間で、評価対象のカビ毒によって臨時委員を設けることがある。

なお、事務局は作業部会も兼ねており、分析法のプロトコールの作成、コラボティブスタディに用いる試薬の調製、配布、データの収集などを行う。事務局は評価には関与しない。

(ii) 評価委員会による試験法の評価までの流れ

1) 委員会に属する作業部会委員がプロトコール(案)を作成し、委員会に提出する。

2) 委員会はプロトコールのプレビューし、必要な修正を申し出でる。

3) 作業部会は修正し国立医薬品食品衛生研究所のHPに掲載し、一般からのパブリックコメントを求める。

4) パブリックコメントを委員会が検討し、さらに必要であれば適切な修正を申し入れる。

5) これらの修正がなされたプロトコールを最終的なコラボラティブスタディ用プロトコールとしてHPに掲載し、同時に一般からのコラボラティブスタディ参加機関(11-12機関)を募る。

6) 作業部会が試料等を作成し、コラボラティブスタディを実施する。

7) 結果を作業部会がまとめ、委員会に提

出する。

8) 委員会は、その結果を基に分析法の妥当性の有無を評価する。

9) 妥当性があると評価された方法はHPに公開する。

2. 評価した試験法

1) 小麦のデオキシニバレノールおよびニバレノールの同時分析法

すでに「小麦のデオキシニバレノールに係る暫定的な基準値の設定について」(平成15年7月17日食安発第0717001号)において示された試験法を基に、国内汚染が問題となっているニバレノールを同時に分析できる試験法を予備検討を含めて検討し、試験法を確立した。これを基に作製されたコラボラティブスタディ用プロトコールが事務局から提出され、評価委員会で、試料の妥当性、均一性、普及性などを検討し、ホームページ上で公開したのちパブリックコメントを募集した。その結果を考慮に入れ修正し、以下の様な最終プロトコールとなった。

(1) 試験試料

本試験に用いた非汚染および汚染小麦の試験試料は、(独)農業・食品産業技術総合研究機構九州沖縄農業研究センター赤かび病研究チーム長中島隆博士より提供して頂いた。LC/MS/MSで測定した結果、ブランク試料は <0.005 mg/kg、汚染試料はDON 0.96 µg/kg とNIV 1.03 µg/kgであった。

(2) 試験方法

(i) 装置

定性及び定量試験として紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフまたは、液体クロマトグラフ・質量分析計を用いる。

(ii) 試薬・試液

次に示すもの以外は、「食品に残留する農

薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」(平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号) 別添の第 1 章総則の 3. 試薬・試液に示すものを用いる。

多機能ミニカラム

内径 12~13 mm のポリエチレン製のカラム管に、多機能カラム充てん剤(逆相樹脂、イオン交換樹脂、活性炭)約 2.5 g を充てんしたもの又はこれと同等の性能を有するものを用いる。

(iii) 標準品 デオキシニバレノール 本品はデオキシニバレノール 98 % 以上を含む。
融点 本品の融点は 151~153 °C である。
ニバレノール 本品はニバレノール 98 % 以上を含む。

融点 本品の融点は 223~225 °C である。

(iv) 試験溶液の調製

a 抽出法

検体を 1,000 µm の標準網ふるいを通してように粉碎した後、その 25.0 g を量り採り、200 mL の共栓三角フラスコに移す。これにアセトニトリル及び水の混液(85:15) 100 mL を加え、10 分間室温で静置する。振とう機を用いて 30 分間激しく振り混ぜ、50 mL の共栓遠心沈殿管に入れて 3,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清液を抽出溶液とする。

b 精製法

多機能ミニカラムに a 抽出溶液 10~20 mL を入れ、毎分 1 mL 以下の流速で流出させる。デオキシニバレノールおよびニバレノールが流出する分面の約 4 mL をすり合わせ試験管、又は共栓付き試験管に採り、溶出液とする。

高速液体クロマトグラフ用試験溶液にあ

っては、溶出液の 2.0 mL を共栓付き試験管に正確に採り、45 °C 以下で溶媒を除去する。上記の残留物にアセトニトリル、水及びメタノールの混液(5:90:5) 1.0 mL を加えて溶かした後、10,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清液を試験溶液とする。

液体クロマトグラフ・質量分析計試験溶液にあつては、この溶出液の 1.0 mL を共栓付き試験管に正確に採り、45 °C 以下で溶媒を除去する。上記の残留物に移動相 1.0 mL を加えて溶かした後、10,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清液を試験溶液とする。

操作法

① 高速液体クロマトグラフを用いて試験を行う場合

紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフを用いて、次の操作条件で試験を行う。得られた試験結果は、標準品と一致しなければならない。定量はピーク高法又はピーク面積法により行う。

操作条件例

カラム充てん剤 オクタデシルシリル化シリカゲル(粒径 5 µm)を用いる。

カラム管 内径 4~4.6 mm、長さ 250 mm のステンレス管を用いる。

カラム温度 40 °C

検出器 波長 220 nm で操作する。

移動相 アセトニトリル、水及びメタノールの混液(5:90:5)を用いる。

流速 0.6~1.0 mL/分

② 液体クロマトグラフ・質量分析計を用いて試験を行う場合

液体クロマトグラフ・質量分析計を用いて次の操作条件で試験を行う。得られた試験結果は、標準品と一致しなければならない。定量は、ピーク高法又はピーク面積法

により行う。

操作条件例

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム温度：40 °C 移動相 A 10 mmol/L 酢酸アンモニウム、B メタノール 0.5 分 A 90% B 10 % 15 分 A 20 % B 80 % 20 分 A 20 % B 80 % 21 分 A 90 % B 80 %

流速：0.2 mL/分

イオン化法：ESI (-)、APCI (-)、APPI

(-)

モニターイオン (m/z)：DON；355 (プリカーサーイオン) 295 (プロダクトイオン) NIV；371 (プリカーサーイオン) 281 (プロダクトイオン)

2) 落花生の総アフラトキシン試験法

事務局から提出されたプロトコールを検討し、ホームページ上で公開したのちパブリックコメントを募集した。その結果を考慮に入れ修正し、以下の様な最終プロトコールとなった。

「落花生のトータルアフラトキシン分析法」コラボラティブスタディプロトコール
操作手順

(i) 抽出

多機能カラム用 (アセトニトリル抽出)

(1) 多機能カラム用試料50.0 gを抽出用容器に量り採る。

(2) 自然汚染試料の場合は、これに抽出溶媒アセトニトリル：水 (90：10) 200 mLを加え、5分間程度静置した後、ブレンダーで5分間 (3000 rpmが適当) ブレンドする。

添加用試料の場合は、添加用アフラトキシン溶液を200 μL添加して暗所に1時間放置後に抽出溶媒を加える。(要領参照)

(3) ガラスロートにろ紙(Whatman No. 4 同等品)をセットし、ろ過するか、または

遠心分離 (3000 rpm, 5 分間) する。ろ液を共栓付き三角フラスコにとる。

多機能カラム用 (メタノール抽出)

(1) 多機能カラム用試料50.0 gを抽出用容器に量り採る。

(2) 自然汚染試料の場合は、これに抽出溶媒メタノール：水 (95：5) 200 mLを加え、5分間程度静置した後、ブレンダーで5分間 (3000 rpmが適当) ブレンドする。

添加用試料の場合は、添加用アフラトキシン溶液を200 μL添加して暗所に1時間放置後に抽出溶媒を加える。(要領参照)

(3) ガラスロートにろ紙(Whatman No. 4 同等品)をセットし、ろ過するか、または遠心分離 (3000 rpm, 5 分間) する。ろ液を共栓付き三角フラスコにとる。

イムノアフィニティーカラム用

(1) イムノアフィニティーカラム用試料50.0 gを抽出用容器に量り採る。

(2) 添加用アフラトキシン溶液を200 μL添加して、暗所に1時間放置する。(要領参照) これに塩化ナトリウム5.0 gおよび抽出溶媒メタノール：水 (8：2) を200 mLを加え、5分間程度静置した後、5分間 (3000 rpmが適当) ブレンドする。

(3) ガラスロートにろ紙(Whatman No. 4 同等品)をセットし、ろ過する。ろ過が困難な場合は遠心分離 (3000 rpm, 5 分間) する。ろ液を共栓付き三角フラスコにとる。

(i i). カラムによる精製

(1) 前処理用多機能カラム精製法

① 多機能カラム (配付) をカラム架台にセットする。(多機能カラムでフリットと充填剤の間に隙間がある場合は上から針で押して密着させる。)

② アセトニトリル抽出の場合：ろ液2.5-3

mLを多機能カラムにゆっくり注入し、1分間に1.0 mL以下の流速で流出する。最初に溶出される流出液1 mL(1~1.2 mL)を目盛り付き試験管 [5.1 (19)] に集める。(ろ液が少なくなったために分画している途中に流速が落ちた場合はカラム上部にろ液を加える。

メタノール抽出の場合：ろ液2.5-3 mLを多機能カラムにゆっくり注入し、1分間に1.0 mL以下の流速で流出する。最初に溶出される流出液1 mLを目盛り付き試験管に集め捨て、次の流出液1 mL(1~1.2 mL)を目盛り付き試験管に集める。(ろ液が少なくなったために分画している途中に流速が落ちた場合はカラム上部にろ液を加える。)

③ HPLC分析の場合、その試料溶液の0.5 mLをキャップ付きバイアルあるいは同等品に正確にとり、窒素気流を送るかエバポレーターを用いて溶媒を除去し、乾固する。

④ 残さにトリフルオロ酢酸 (TFA) 0.1 mLを加え、密栓して試験管ミキサー等で激しく攪拌する。室温、暗所で15分間放置したのち注入溶媒アセトニトリル：水 (1：9) 0.4 mLを加えて混和したものをHPLC用試験溶液とする。

⑤ LC/MS (またはLC/MS/MS) 分析の場合、②で得られた試験溶液の0.4 mLをキャップ付きバイアルあるいは同等品へ正確にとり、窒素気流を送るかエバポレーターを用いて溶媒を除去する。残さをLC/MS移動相0.4mLで溶解後、高速液体クロマトグラフ-質量分析 (LC/MS) 用試験溶液とする。

LC/MS/MSの場合は残さをLC/MS/MS移動相0.4 mLで溶解後、LC/MS/MS用試験溶液とする。

(2) イムノアフィニティーカラム精製法

<イムノアフィニティーカラムの取り扱い上の注意>

カラム内にはPBSが充填されていて、カラム上部には僅かに空気が入っている。そのため、横に倒すと空気がカラム (充填剤) に触れてしまい、その結果良好な回収率が得られなくなるため、保存時から分析終了時まで直立の状態を保っている必要がある。もし、ゲル上の白いフリッツ表面に気泡が溜まっていたら、タッピングして除去すること。

① イムノアフィニティーカラム (配付) は室温になるまで放置する。

② きり等でイムノアフィニティーカラムの上キャップに穴を開けてから上キャップをはずした後、下キャップをはずし、必要であれば開栓したストップコックを取り付け、カラム架台あるいはバキュームマニホールドにセットする。カラム内溶液を自然落下で排出後、あらたにPBSでカラム内を満たし、自然落下で排出させる。再度PBSでカラム内を満たし、PBSを半分程排出させた後、ストップコックを閉じるか下キャップを付ける。

③ 「(i). 抽出」の操作で得られたろ液10.0 mLを正確にピペッターまたはホールピペットなどで50 mLのメスフラスコへとり、標線までPBSを加え、良く混合する。

④ ガラスロートにガラス繊維ろ紙をセットしろ過を行う。ろ液を三角フラスコにとる。

⑤ アダプターでリザーバーとカラムを連結する。

⑥ ④で得られた希釈したろ液10.0 mLをピペッターまたはホールピペットで正確にとりイムノアフィニティーカラムに注入する。

ストップコックを開き、1~2滴/秒の速さでろ液を排出させる（途中、排出速度が非常に遅くなった場合には、ゲル上の白いフリット表面に泡が付着していることがあるので、リザーバーおよびカラムを手で保持し試料ろ液がこぼれないよう注意し、カラムを指等でタッピングし泡を取り除く）。全てのろ液を排出させたのち、リザーバーを取り除き、カラムをPBS 10mL以上および精製水10mL以上で洗浄し、アダプターを取り付けたシリンジ等で強く通気しカラム内の水分を十分に追い出す。その後共栓付き10 mL容目盛りつき試験管あるいは5 mL容メスフラスコにアセトニトリル1 mLで溶出し5分間放置後、アセトニトリルを1 mLずつ2回、合計3 mLで溶出させ、さらにアダプターを取り付けたシリンジ等で強く通気し、ゲル内のアセトニトリルを排出させ、アセトニトリルで5 mLに定容し良く混合する。

⑦ HPLC分析の場合、その試験溶液2.5 mLをキャップ付きバイアルあるいは同等品に量り採り、窒素気流を送るかエバポレーターを用いて溶媒を除去する。

⑧ 残さにTFAを0.1 mL加え、密栓をして試験管ミキサー等で激しく攪拌する。室温、暗所で15分間放置したのち注入溶媒0.4 mLを加えたものをHPLC用試験溶液とする。

⑨ LC/MS（またはLC/MS/MS）分析の場合、⑥で得られた試験溶液2.0 mLをキャップ付きバイアルあるいは同等品に量り採り、窒素気流を送るかエバポレーターを用いて溶媒を除去する。LC/MS移動相0.4 mLで残さを溶解したものをLC/MS用試験溶液とする。LC/MS/MSの場合は残さをLC/MS/MS移動相0.4 mLで溶解後、LC/MS/MS用試験溶液とする。

(iii) 試料溶液の調製

「(ii). カラムによる精製」で作製した試験溶液はシリンジ（1 mL容が適当）で吸い上げ、孔径0.45 μm メンブランフィルターを装着し、ろ過し、そのろ液をHPLCおよびLC/MS用ガラスバイアルにうつす。または、エッペンドルフ用チューブなどにうつし、10,000 rpm以上、5分間遠心し、その上清をHPLCおよびLC/MS用ガラスバイアルにうつす。

(iv). 高速液体クロマトグラフ (HPLC) による測定

HPLCを用いて試験溶液について測定を行う。

(1) 測定条件 (例)

カラム充てん剤 オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径3~5 μm ）を用いる。

カラム内径4.6 mm、長さ150 mm 又は250 mm

カラム温度 40 $^{\circ}\text{C}$

HPLC 移動相アセトニトリル・メタノール・水（1:3:6）を用いる。

流速 0.6-1.0 mL/min

検出波長 励起波長365 nm、蛍光波長450 nmで測定する。

注入量 20-100 μL (50 μL が適当)

(2) アフラトキシン検量線の作成

① アフラトキシン標準液（配付）を室温に戻した後、100 μL をピペッターでキャップ付きバイアル（褐色シラン処理）にとり、アセトニトリル900 μL を加え密栓後、試験管ミキサー等で完全に溶解する。（スタンダード1:100 ng/mL溶液（B1, G1の濃度：以下同様））。

② ①で作製したスタンダード1:100 ng/mL標準溶液100 μL をキャップ付きバイアル（褐色シラン処理）にとり、アセトニ