

ている。

T-2 トキシンは、*Fusarium* 属である、*F. acuminatum*, *F. nivale*, *F. oxysporum*, *F. poae*, *F. sporotrichoides* 及び *F. solani* から産生され、トリコテセン類のタイプ A に属する。

T-2 産生の温度領域は広く (0-32°C)、15°C 以下で最も産生量が多いとされている。

HT-2 トキシンは T-2 トキシンのカルボキシエステラーゼによる代謝物である。欧州では、T-2 トキシンおよび HT-2 トキシンを同等の毒性を有するものと評価しており、一日耐容摂取量の設定 (60ng/kg bw/day) もその合算で行っている。

毒性の観点から見ると、T-2 トキシンは経口及び吸入で速やかに吸収され、一度摂取されると、毒素は体全体に分布し、血液脳関門及び胎盤を通過する。畜産物においては卵や乳中に移行することが知られている。T-2 トキシン代謝物のうち HT-2 トキシン以外の代謝産物には、3'-ヒドロキシHT-2、T-2 トリオール、3'-ヒドロキシT-2 トリオール、4-ジアセチルネオソラニオール及びその先の T-2 テトラオールがある。とくに 3'-ヒドロキシ T-2 トキシンは、T-2 トキシンそれ自体よりも毒性が強いと確認されている。T-2 及び HT-2 トキシンに加えその代謝産物は、主にグルクロニド抱合体として尿及び糞便中に数日以内に排泄され、尿及び糞便への排泄の割合は種によって異なっている。

トリコテセン類の主な毒性は、タンパク合成阻害、又は高用量の際の RNA 及び DNA の合成阻害である。その上、アポトーシスが T-2 トキシンで報告されている。骨髄、リンパ節、

胸腺及び脾臓膜といった細胞分裂が活発に行われている組織は、T-2 トキシンの作用に対する感受性が最も高い。リスク評価に最も関連のある作用は、一般毒性、血液毒性及び免疫毒性である。

造血/免疫系は T-2 トキシンの主要な標的である。T-2 トキシンは他のトリコテセン類と同様に、曝露の用量やタイミングに応じ免疫抑制的又は免疫促進的に作用し得る。T-2 トキシンの液性及び細胞性免疫への作用は様々な研究で報告されている。また T-2 トキシンの曝露は、多種多様な病原体への感受性を高めることが知られている。

微生物を用いた遺伝毒性試験はいくつか *in vitro* 及び *in vivo* で実施されており、陰性であった。しかし、タンパク合成や DNA/RNA 合成抑制作用を発現する用量より多い場合は、T-2 及び HT-2 トキシンの結果は陽性と報告されている。確認される遺伝毒性は恐らく二次的なものであると推測される。

IARC は 1993 年に、ヒトへの発癌性の有効なデータがなく、実験動物による T-2 トキシンの発癌性に関する証拠が非常に限られていることから、T-2 トキシンを発癌性グループ 3 に分類した。現存するデータは、T-2 トキシンが主として免疫系と造血系に作用する、かなり強力な毒性を持つことを示している。

ヒトにおける食中毒事例としては、ATA 症 (alimentary toxic aleukia) が代表例として挙げられる。この中毒は旧ソビエト連邦のシベリア、アムール地区で 1940 年代に頻発した事例で、原因は T-2 トキシンとされている。

ATA

症は初期には嘔吐腹痛、発熱などが見られるが、重篤期には白血球が急激に減少し死に至る。

このようにT-2トキシンおよびHT-2トキシンは、DONやNIVに比べて非常に強い免疫毒性を持っている。そのため、実態調査の値に注意を払う必要がある。

今年度の実態調査結果から、輸入・国産小麦並びに輸入・国産大麦からT-2トキシンが検出され、小麦類より大麦類にその頻度も濃度も高いことが認められた。このことを受けて来年度はさらに検体数を増やして実態調査を行う必要がある。

2003年に出されたヨーロッパ連合でのT-2トキシンの実態調査結果によるとT-2トキシンは小麦、小麦粉、大麦、オート麦、から検出されており、そのレンジは平均で0.8-280 µg/kgであった。欧州食品化学委員会(SCF)で設定された一日耐容摂取量により曝露評価を行った結果によると、T-2トキシンおよびHT-2トキシンは、成人においては一日耐容摂取量の61-171%を示しており、子供では26.7-563.3%と推測された。

我が国の曝露評価は今後実態調査を継続して推定されるものであるが、国産小麦および大麦からも検出されていることを考慮すると、基準値設定も必要になるかもしれない。

ZEAは、デオキシニバレノール(DON)やニバレノール(NIV)を産生するフザリウム菌が同時に産生するカビ毒であるため、これらのカビ毒との共汚染が危惧されている。急性毒性は知られていないが、環境ホルモンとしての作用があることが報告されている。エストロ

ゲン様作用があるため、特にブタなどの繁殖周期をみだすことから、経済的損出が大きい。ZEAの代謝産物として $\alpha$ ゼアラレノール、 $\alpha$ ゼアララノール、 $\beta$ ゼアラレノール、 $\beta$ ゼアララノールが知られている。

ZEAは、ハトムギ、雑穀米から高い頻度で検出され、ハトムギの濃度も高い水準にあった。これらのほとんどは輸入品であると考えられる。一方国産小麦からも比較的高い頻度で検出されている。しかしその濃度は低レベルである。コーングリッツでは頻度は国産小麦と同等であったが、その濃度は比較的高かった。

今年度の実態調査はZEAのみとしたが、今後は代謝物も含めて調査する必要があるかもしれない。

CITは、今回の分析法では高感度には測定出来なかったが、米からは検出されなかった。しかしながら、1検体ではあるがコーングリッツから検出された。この結果は、シトリニンの食品汚染が我が国においてもあることを示している。

CITに関しては今後毒性、分析法などをより検討していく必要がある。

## E. 結論

本研究では今後3年間通年で3種のフザリウムトキシン(T-2トキシン、HT-2トキシンおよびゼアラレノン)とシトリニンを測定した。

トリコテセン系カビ毒の中で最も毒性が高いT-2トキシン、HT-2トキシンが、国産および輸入麦類から検出された。国際的にもまだ

基準値が設定されていないが、その汚染はヨーロッパを中心に報告されており、基準値の必要性が高まってきている。我が国においても汚染があることが確認されたことから、より詳細なデータを収集する必要がある。

ZEA は、我が国にも生産菌が生息しており、その産生菌はDON およびNIV も産生することが知られている。そのため、DON、NIV、ZEA の共汚染を危惧しなければならない。今年度の実態調査では、ハトムギおよびコーングリッツで比較的高濃度が検出されているが、国産輸入小麦においては低レベルの汚染であった。

CIT は黄変米毒の1種であるため、米への汚染を注意しなければならないが、今年度の実態調査では米汚染は見られなかった。一方低レベルではあるが、コーングリッツに汚染が見られた。

## F. 研究業績

### 【論文】

- 1) Nakatani, Y., Satoh, T., Saito, S., Watanabe, M., Yoshiike, N., Kumagai, S., Sugita-Konishi, Y.: Simulation of deoxynivalenol intake from wheat consumption in Japan using the Monte Carlo method. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.*, **28**, 471-476 (2011).
- 2) Nishikawa, A., Inoue, T., Umemura, T., Inoue, K., Yoshida, M., Sekita, K., Ishii, Y., Ogawa, K., Hirose, A., Takagi, A., Tsutsumi, T., Ohno, Y., Shibutani, M., Takahashi, M., Sugita-Konishi, Y., Akiyama, H., Kanno, J.: Current topics in biological safety tests on foods, food additives and contaminants, *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (in Japanese)*, **51**, 415-443 (2010).
- 3) Tanaka, H., Takino, M., Sugita-Konishi, Y., Tanaka, T., Leeman, D., Toriba, A., Hayakawa, K.: Determination of Fusarium mycotoxins by liquid chromatography/tandem mass spectrometry coupled with immunoaffinity extraction. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **24**, 2445-2452 (2010).
- 4) Poapolathep, A., Poapolathep, S., Sugita-Konishi, Y., Wongpanit, K., Machii, K., Itoh, Y., Kumagai, S.: The effect of naringenin on the fate and disposition of deoxynivalenol in piglets. *J. Vet. Med. Sci.* **72**, 1289-1294 (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., 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) 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**, 344-352 (2010).
- 7) Tanaka, H., Sugita-Konishi, Y., Takino, M., Tanaka, T., Toriba, A., Hayakawa, K.: A survey of the occurrence of Fusarium Mycotoxins in biscuits in Japan by using LC/MS. *J. Health Science*, **56** (2), 188-194, (2010).

### 【学会発表】

- 1) 門田智之、竹澤陽子、平野哲、田嶋修、Chris Maragos、中島隆、田中敏嗣、鎌田洋一、小西良子：SPRによるニバレノール、デオキシニバレノール分別検出法の検討。  
日本マイコトキシン学会第68回学術講演会、つくば、2010.9
- 2) 佐久間久子、伊藤有加里、小林政人、渡辺康、杉山圭一、鎌田洋一、小西良子：木の実中の総アフラトキシンの迅速法キットの検討。  
日本マイコトキシン学会第68回学術講演会、

つくば, 2010. 9

- 3) 渡辺康、佐久間久子、鎌田洋一、杉山圭一、  
斉藤史朗、佐藤敏彦、小西良子：パスタ調理  
におけるオクラトキシンAの消長について。  
第 100 回日本食品衛生学会学術講演会，熊  
本, 2010. 9
- 4) 門田智之、木村真、平野哲、田嶋修、中島  
隆、鎌田洋一、小西良子：LC/MS/MS を用い  
た小麦中のトリコテセン系マイコトキシン  
(タイプB) 及びその前駆体・代謝産物の同  
時分析。  
第 100 回日本食品衛生学会学術講演会，熊  
本, 2010. 9
- 5) 青山幸二、甲斐茂美、小木曾基樹、高橋正  
紀、山口茂明、田中敏嗣、熊谷進、小西良子：  
日本に流通する食品中のフモニシンを対象  
とした6年間のサーベイランス。  
第 100 回日本食品衛生学会学術講演会，熊  
本, 2010. 9
- 6) 中島正博、永山敏廣、石黒瑛一、内藤成弘、  
堀江正一、大西貴弘、鎌田洋一、小西良子、  
田中敏嗣：アフラトキシンM1 試験法の妥当  
性評価。  
第 100 回日本食品衛生学会学術講演会，熊  
本, 2010. 9
- 7) 法月廣子、中島正博、田端節子、青山幸二、  
和田丈晴、菊川浩二、伊藤嘉典、石黒瑛一、  
田中敏嗣、熊谷進、小西良子：日本に流通す  
る食品中のオクラトキシンAを対象とした  
6年間のサーベイランス。  
第 100 回日本食品衛生学会学術講演会，熊  
本, 2010. 9
- 8) Sugita-Konishi Y : Current topics of food  
poisoning in Japan : Mycotoxins and Mirine toxins.  
2010 International Symposium, 韓国 ソウ  
ル, 2010.10
- 9) Saito M, Irikura D, Yahata Y, Sugita-Konishi Y,  
Kaji Y, Kamata Y : The Japanese habit of  
eating raw equine flesh has presented a new  
parasitic foodborne disease.  
45th Annual Meeting of the UJNR Joint Panel  
on Toxic Microorganisms , Seattle, WA,  
2010.11
- 10) Sugita-Konishi Y, Itoh S, Tamura C,  
Kamata Y : Pectin Gelation Suppresses  
Bioavailability of Deoxynivalenol in Mice.  
45th Annual Meeting of the UJNR Joint Panel on  
Toxic Microorganisms , Seattle, WA, 2010.11
- 11) Sato T, Saito S, Nakajima M, Tabata S, Tanaka  
T, Norizuki H, Itoh Y, Kai S, Aoyama K, Wada T,  
Kikukawa K, Ogiso M, Yamaguchi M, Yoshida  
K, Kumagai S, Sugita-Konishi Y : Exposure to  
ochratoxin A and fumonisin in Japan.  
International Mycotoxin Conference MycoRed,  
Penang, Malaysia, 2010, 12
- 12) Saito M, Irikura D, Yahata Y, Sugita-Konishi Y,  
Kaji Y, Kamata Y : The Japanese habit of eating  
raw equine flesh has presented a new parasitic  
foodborne disease.  
45th Annual Meeting of the UJNR Joint Panel on  
Toxic Microorganisms , Seattle, WA, 2010.11
- 13) Sugita-Konishi Y, Itoh S, Tamura C, Kamata  
Y : Pectin Gelation Suppresses Bioavailability of  
Deoxynivalenol in Mice.  
45th Annual Meeting of the UJNR Joint Panel on  
Toxic Microorganisms , Seattle, WA, 2010.11
- 14) 青山幸二、佐藤敏彦、斉藤史朗、中島正  
博、田端節子、田中敏嗣、法月廣子、伊藤嘉  
典、甲斐茂美、和田丈晴、菊川浩史、小木曾  
基樹、山口茂明、由田克士、熊谷進、小西良  
子：我が国における食品からのオクラトキシ  
ンAおよびフモニシンの暴露評価。  
日本マイコトキシン学会第 69 回学術講演会、  
東京、船堀, 2011. 1
- 15) 杉山圭一、石澤聡美、木下麻緒、葉袋裕  
二、小西良子：Type A トリコテセンの自然  
免疫系におよぼす影響。  
日本マイコトキシン学会第 69 回学術講演会、  
東京、船堀, 2011. 1
- 16) Type A トリコテセンの自然免疫系におよ  
ぼす影響：戸谷香央里、門田智之、新井佐知  
子、鎌田洋一、伊東正吾、小西良子  
日本マイコトキシン学会第 69 回学術講演会、  
東京、船堀, 2011. 1

17) Poapolathep A, Poapolathep S, Isariyodom S, Imsilp K, Klangkaew N, Sugita-Konishi Y, Kumagai S : Metabolic Conversion of Aflatoxin B2 to Aflatoxin B1 in Ducks.

Society of Toxicology Annual Meeting 2011, Washinton,D.C. USA,2011.3

18) Kadota T, Kimura M, Hirano S, Tajima O, Nakajima T, Kamata Y, Sugita-Konishi Y : Simultaneous Determination of Type B

Trichothecene Mycotoxins and Their Derivatives in Wheat by LC/MS/MS.

Society of Toxicology Annual Meeting 2011, Washinton,D.C. USA,2011.3

19) Irikura D, Saito M, Sugita-Konishi Y, Kamata Y : New Food-Borne Hazard Parasite Toxin.

Society of Toxicology Annual Meeting 2011, Washinton,D.C. USA,2011.3

表1. T-2トキシンの汚染実態

| 食品目     | 試料数 | LoQ以上の試料数 | 平均濃度<br>( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) | LoQ<br>( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) | 最大濃度<br>( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) |
|---------|-----|-----------|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| 小麦(国産)  | 32  | 5         | 0.07                                | 1                                  | 0.36                                |
| 小麦(輸入)  | 32  | 2         | 0.03                                | 1                                  | 0.55                                |
| 大麦(国産)  | 8   | 3         | 0.58                                | 1                                  | 1.9                                 |
| 大麦(輸入)  | 8   | 2         | 0.22                                | 1                                  | 1.6                                 |
| コーングリッツ | 20  | 8         | 0.48                                | 0.14                               | 1.8                                 |
| 雑穀米     | 20  | 2         | 0.03                                | 0.1                                | 0.17                                |
| 小豆      | 10  | 0         | 0.09                                | 1                                  | 0.9                                 |
| 小麦粉     | 23  | 0         | -                                   |                                    | -                                   |
| 鳩麦      | 20  | 2         | 0.8                                 | 0.1                                | 14.1                                |
| 胚芽入り加工品 | 10  | 3         | 1.32                                | 1                                  | 5.3                                 |
| 合計      | 183 | 27        |                                     |                                    |                                     |

表2. T-2トキシン+ HT-2トキシンの汚染実態

| 食品目     | 試料数 | LoQ以上の試料数 | 平均濃度<br>( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) | LoQ<br>( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) | 最大濃度<br>( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) |
|---------|-----|-----------|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| 小麦(国産)  | 32  | 7         | 0.47                                | 4.8                                | 2.83                                |
| 小麦(輸入)  | 32  | 4         | 0.35                                | 4.8                                | 6.21                                |
| 大麦(国産)  | 8   | 3         | 1.96                                | 4.8                                | 11.19                               |
| 大麦(輸入)  | 8   | 2         | 1.9                                 | 4.8                                | 10.9                                |
| コーングリッツ | 20  | 8         | 0.36                                | 3.94                               | 1.8                                 |
| 雑穀米     | 20  | 3         | 0.1                                 | 0.5                                | 0.8                                 |
| 小豆      | 10  | 0         | 0.27                                | 3                                  | 2.7                                 |
| 小麦粉     | 23  | 5         | 0.19                                |                                    | 1.14                                |
| 鳩麦      | 20  | 2         | 1.41                                | 0.5                                | 22.3                                |
| 胚芽入り加工品 | 10  | 3         | 3.45                                | 3                                  | 14.4                                |
| 合計      | 183 | 37        |                                     |                                    |                                     |

表3. ゼアラレホンの汚染実態

| 食品目     | 試料数 | LoQ以上の試料数 | 平均濃度<br>( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) | LoQ<br>( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) | 最大濃度<br>( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) |
|---------|-----|-----------|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| 小麦(国産)  | 32  | 15        | 1.64                                | 5.7                                | 12                                  |
| 小麦(輸入)  | 32  | 6         | 0.13                                | 5.7                                | 1.35                                |
| 大麦(国産)  | 8   | 2         | 0.42                                | 5.7                                | 3.06                                |
| 大麦(輸入)  | 8   | 4         | 4.66                                | 5.7                                | 27.1                                |
| コーングリッツ | 20  | 10        | 12.38                               | 5.7                                | 32                                  |
| 雑穀米     | 20  | 18        | 1.34                                | 0.15                               | 6.27                                |
| 小豆      | 10  | 2         | 0.43                                | 1                                  | 3                                   |
| 小麦粉     | 23  | 0         | -                                   |                                    | -                                   |
| 鳩麦      | 20  | 18        | 8.29                                | 0.15                               | 83.02                               |
| 胚芽入り加工品 | 10  | 2         | 0.48                                | 1                                  | 2.1                                 |
| 合計      | 183 | 77        |                                     |                                    |                                     |

表4. シトリニンの汚染実態

| 食品目     | 試料数 | LoQ以上の試料数 | 平均濃度<br>( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) | LoQ<br>( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) | 最大濃度<br>( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) |
|---------|-----|-----------|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| コーングリッツ | 16  | 1         | 0.07                                | 1.14                               |                                     |
| 押麦      | 14  | 0         | -                                   | -                                  |                                     |
| 玄麦      | 6   | 0         | -                                   | -                                  |                                     |
| 玄米      | 8   | 0         | -                                   | -                                  |                                     |
| 精米      | 15  | 0         | -                                   | -                                  |                                     |
| 合計      | 59  | 1         |                                     |                                    |                                     |

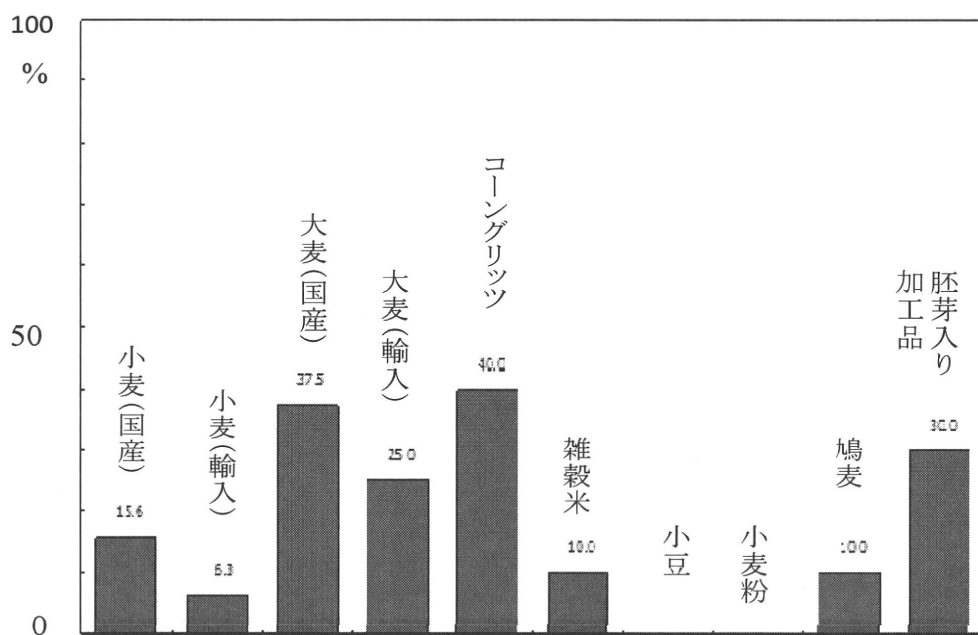


図1. T-2 トキシンの汚染実態 (汚染頻度)

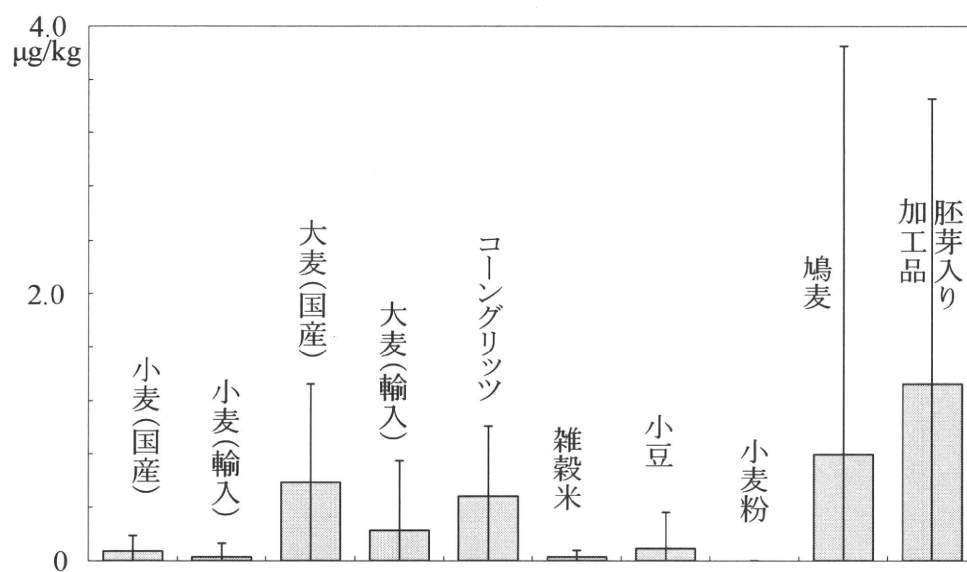


図2. T-2 トキシンの汚染実態 (平均濃度)



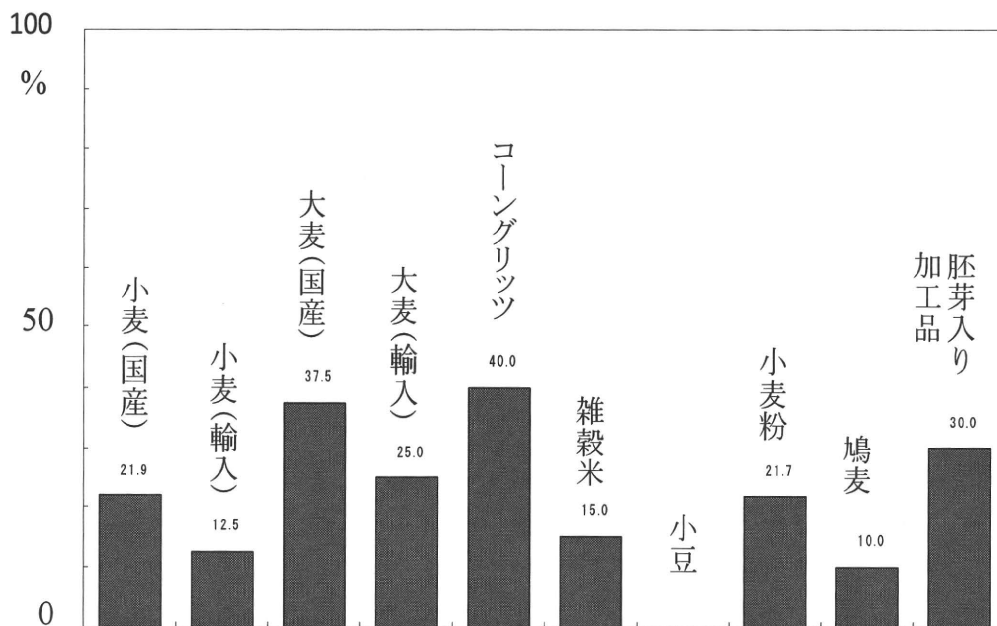


図3. T-2 トキシン、HT-2 トキシンの汚染実態 (汚染頻度)

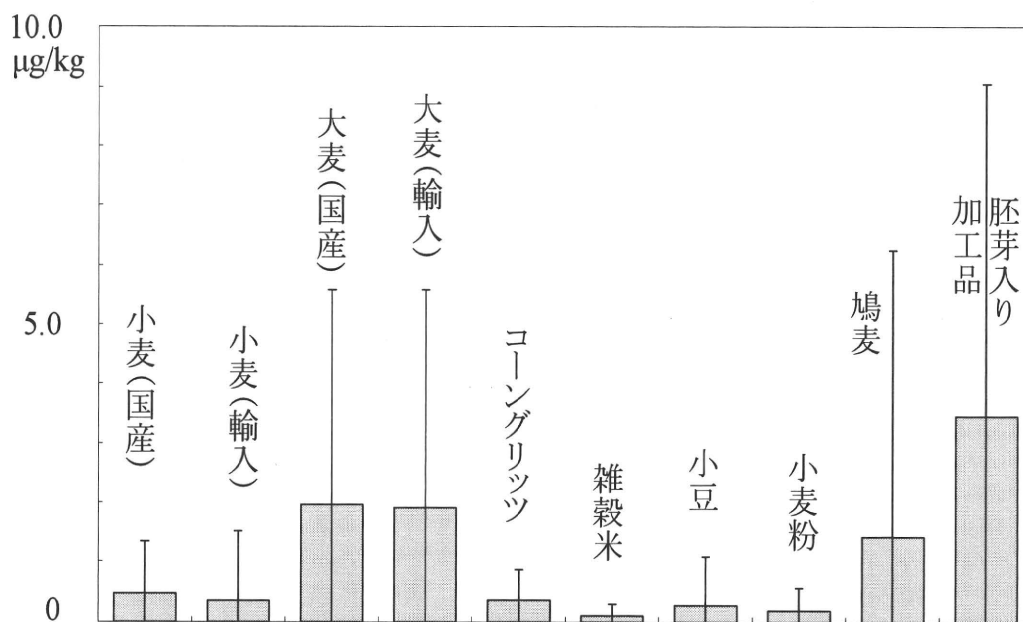


図4. T-2 トキシン、HT-2 トキシンの汚染実態 (平均濃度)

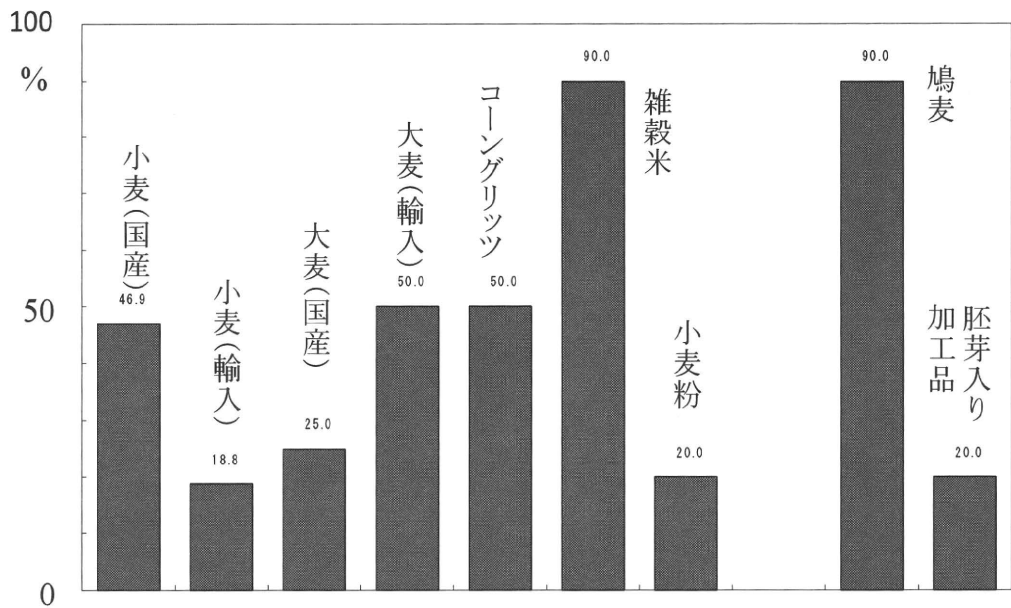


図5. ゼアラレノンの汚染実態 (汚染頻度)

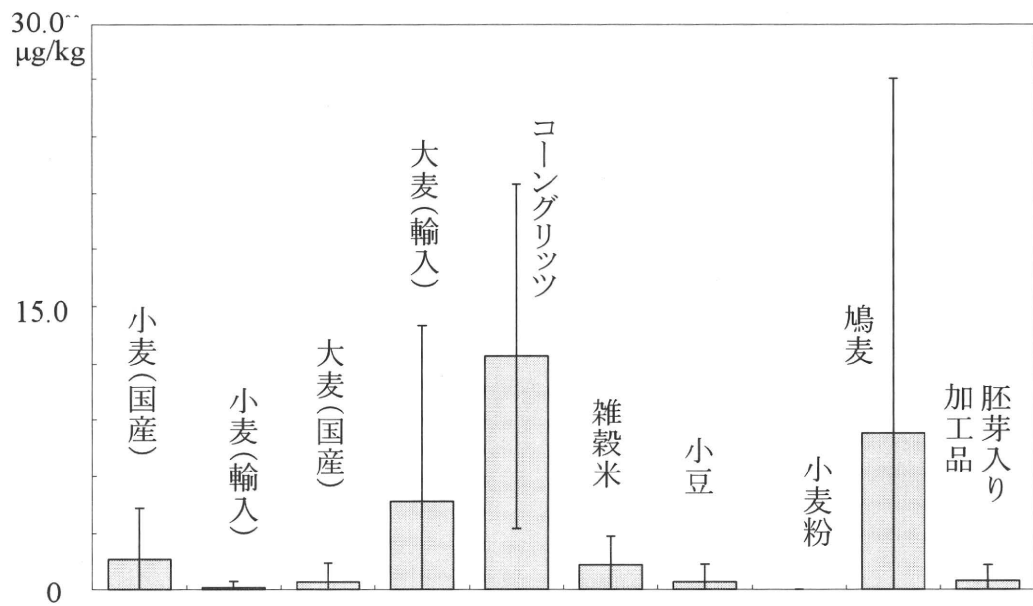


図6. ゼアラレノンの汚染実態 (平均濃度)

## スキーム1. 3種のフザリウムトキシシンの分析法

### 1. 抽出

- (1) 試料25gを正確に抽出用容器に量り採る。
- (2) これに抽出溶媒メタノール：水（75：25）を100 mLを加え、30分間振とう抽出する。
- (3) 遠心分離（3000rpm（1410g）、10 分間）し、上清を**抽出溶液**とする。
- (4) 添加用試料の場合は**別添1**の容量を添加して、暗所に1時間放置した後、抽出する。（要領参照）

### 2. イムノアフィニティーカラムカラムによる精製

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、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（10mL程度）。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。
- ③ 「1.」の操作で得られた**抽出溶液**10.0mLを正確にピペッターまたはホールピペットなどで50mL のメスフラスコへとり、標線までPBS を加え良く混合し、**試料溶液**とする。
- ④ ③の溶液が混濁した場合は、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り、**試料溶液**とする。
- ⑤ カラムにアダプターを取り付けたリザーバーを連結する。
- ⑥ ③または④で得られた**試料溶液**5.0mL 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ツ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、カラムを精製水10mL で洗浄する。カラム内の水分はアダプターを取り付けたシリンジ等で強く通気し十分に追い出す。その後共栓付き10mL容試験管あるいはキャップ付きバイアルにメタノール2mL で溶出した後、アダプターを取り付けたシリンジ等で3回溶液を吸引及び通気を繰り返した後、強

く通気し、ゲル内のメタノールをすべて排出させる。

### 3. 試料溶液の調製

「2.」の⑥で得られたメタノール溶液を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/MS移動相0.5mLで溶解する。孔径0.45 μm メンブランフィルターでろ過するか、あるいは10,000rpm以上、5分間遠心し、その上清をLC/MS/MS用試験溶液とする。

### 4. 高速液体クロマトグラフ-質量分析計 (LC/MS)による分析

LC/MS/MSを用いて試験溶液について測定を行う。

#### (1)測定条件

LC/MS/MSの測定例

カラム充填剤 ZORBAX C18 (粒径1.8 μm)

カラム [5.1 (29)] 内径2.1 mm、長さ100 mm

カラム温度 40 °C

LC/MS/MS 移動相 A: 10 mmol/L 酢酸アンモニウム

B: アセトニトリル

グラジュエント条件 : A/B(90/10)---(20分間)---A/B(30/70)

流速 0.2 mL/min

注入量 5μL

質量分析計条件(例)

イオン化モード ESI-positive

ドライガス 7L/min at 350°C

ネプライザーガス 345kPa

フラグメンター電圧 100V

モニターイオン (m/z)

|      | Precorser | Target | Qualifier | CE<br>(Target) | CE<br>(Qualifier) |
|------|-----------|--------|-----------|----------------|-------------------|
| DON  | 297       | 249    | 203       | 10             | 10                |
| HT-2 | 442       | 263    | 215       | 9              | 9                 |
| T-2  | 484       | 305    | 215       | 10             | 20                |
| ZEA  | 319       | 187    | 283       | 20             | 10                |

表 5. シトリニンの検量線 (検量点 : 0.2, 0.5, 1, 5, 10, 20, 100 ppb)

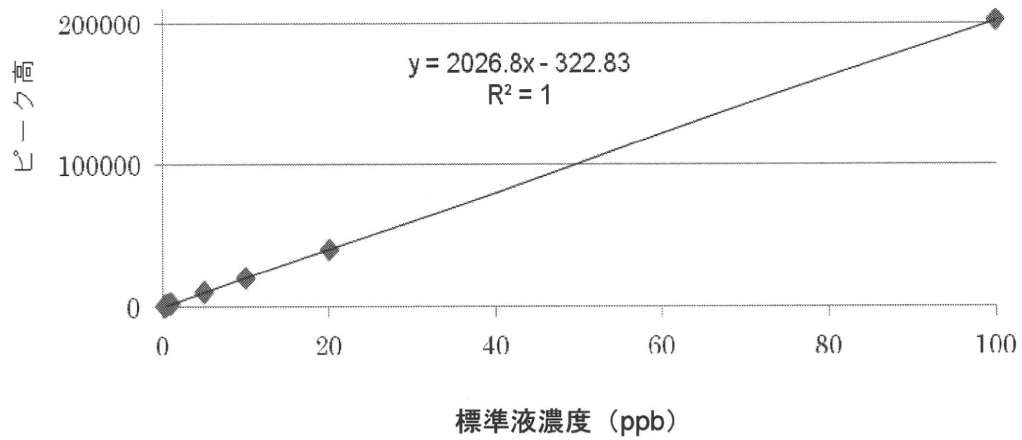
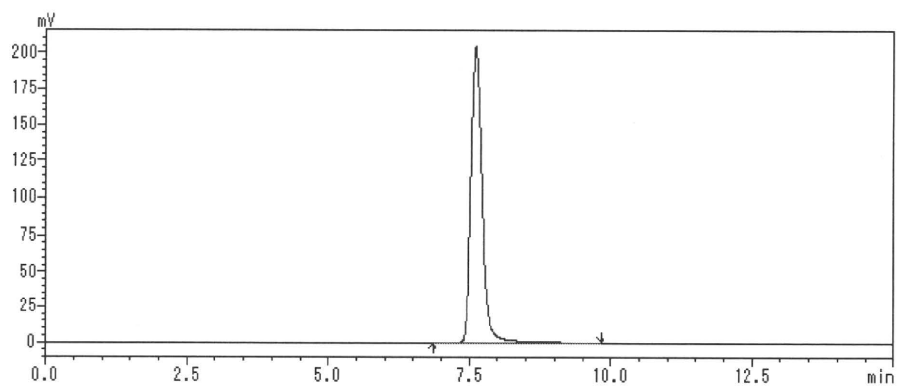


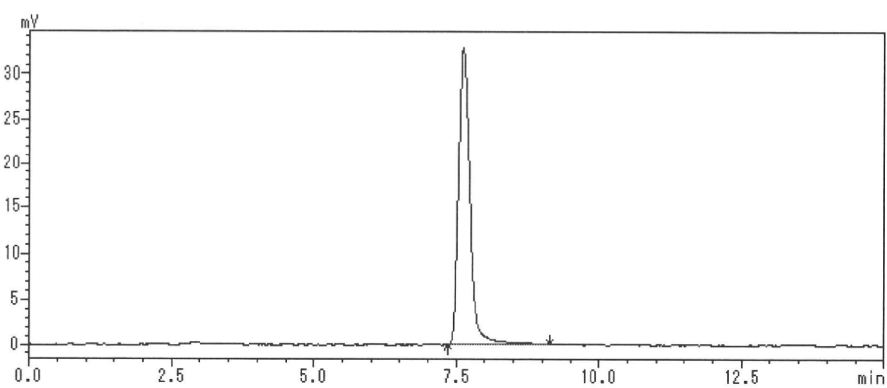
表 6. シトリニンの添加回収試験

|          | 100 ng/g 添加 | 10 ng/g 添加 |
|----------|-------------|------------|
| Ave. (%) | 79.1        | 78.9       |
| SD       | 2.0         | 1.0        |
| RSD (%)  | 2.6         | 1.3        |

① Citrinin 標準 100 ppb



② 100 ng/g 添加 (白米)



③ 10 ng/g 添加 (白米)

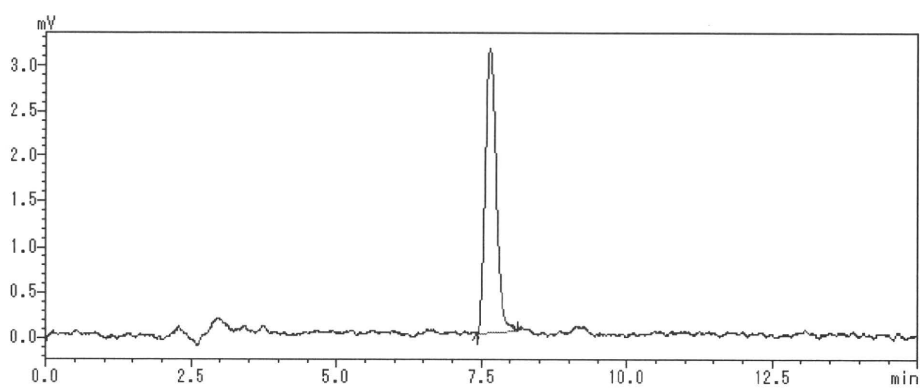


図7. CIT のクロマトグラフ

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

T-2 トキシンの心機能への影響に関する研究

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

要旨

T-2 トキシン (0.1 mg, 0.5 mg, 1.0 mg/kg) の成熟ラットへの皮下投与(3日間隔で2回投与)による心機能への影響を調べた。0.1 mg/kg では、心拍数、自律神経機能指標 (LF パワー、HF パワー、トータルパワー) には明瞭な変化が認められなかった。0.5 mg/kg および 1.0 mg/kg では、1回目投与および2回目投与で、投与後に自律神経機能に明らかな変化が出現し、LF パワー(1.0 mg/kg  $P<0.05$ )、HF パワー(1.0 mg/kg  $P<0.05$ )、トータルパワー (0.5 mg/kg  $P<0.01$ 、 $P<0.05$ ) の低下が認められた。また、0.1 mg/kg の投与量から第2度房室ブロック、上室性期外収縮、心室期外収縮、洞性徐脈といった不整脈が投与後6時間以降を中心に多く発現した。不整脈の発現頻度は、0.5 mg/kg が 0.1 mg/kg にくらべて多い傾向が認められた。1.0 mg/kg では重度の不整脈を伴って死亡する個体が認められた。心拍数は、0.5 mg/kg および 1.0 mg/kg で投与後に明瞭な増加を示した( $P<0.05$ ) (1.0 mg/kg ではその後減少に転じた。)。心電図波形構成成分のうち、PR 間隔、QT 間隔およびQRS 持続時間に関しては、いずれの投与量においても変化が認められなかった。

A. 研究目的

平成 21 年度の研究において、デオキシニバレノール (DON) は、ラットへの皮下投与 (0.5mg/kg~2.0mg/kg) によって、不整脈などの心機能異常をもたらすことが明らかになっている。T-2 トキシンは DON と同様に、*Fusarium* 属のトリコテセン系マイコトキシンに属することや、DON よりも毒性が強いことが示唆されるため、心臓に対する何らかの毒性影響が存在する可能性が考えられる。この研究では無麻酔、自由行動下のラットにおけるテレメトリー心電図の連続記録によって、T-2

トキシンの心機能に及ぼす影響を明らかにする目的で行われた。

B. 研究方法

(1) 供試動物、心電図記録法

成熟雄ラット (Slc:Wistar; 8 週齢 ; 12 匹 ; 日本エスエルシーより購入) (SPF) をペントバルビタール (ネンブタール) の 30-40 mg/kg の腹腔内投与による全身麻酔下を施した上で、心電図計測用テレメトリー送信機本体 (weight=3.9g, volume=1.9cc; TA10ETA-F20, Data Science, St. Paul, MN) をラットの頸背部皮下に外

科的に埋入した。本体に接続された記録電極（リード線の先端）は+側を左後肢大腿部の皮下に、マイナス側を右肩甲部の皮下に設置し、標準肢Ⅱ誘導の心電図が記録できるようにした。

ラットは1匹ずつ個別のポリカーボネートケージに収容し、照明および温度の制御が可能なインキュベーションチャンバー内（容積 $m^3$ ）で、6匹（6ケージ）を同時に飼育した。チャンバー内の照明条件は、L（明期）=12:00-24:00、D（暗期）=24:00-12:00の12時間周期とし、温度条件は24℃とした。飼育期間中は自由飲水、自由摂餌とした。

## (2) 投与プロトコル

供試ラットを T-2 トキシンの投与量の違いによって 0.1 mg/kg (n=4) , 0.5 mg (n=4) , 1.0 mg/kg (n=4) の3グループに分けた。

テレメーター送信機の埋入手術後1週間以上の回復期間を経たのちに、T-2 トキシンの投与実験に供した。対照溶液（プロピレングリコール）0.2 ml を背部皮下に投与した。次いで3日後に T-2 トキシンの 0.1 mg/kg、0.5 mg または 1.0 mg/kg のいずれかを投与し、さらに3日後に同量の T-2 トキシンを反復投与した。これらの投与時間は、12:00 とした。なお、T-2 トキシンの投与量は、Feuerstein, G ら（1985）および Magnuson, B. A. ら（1987）の報告を参考にした。

## (3) データ取得、解析方法

テレメーター送信機からの心電図信号は受信ボードに無線で伝送され、受信ボードから A/D コンバーターを介して、PC に内蔵のソフトウェア（ECG processor

analyzing system、Softron、SRV2W、SBP2000）を用い解析した。心電図のサンプリングレートは 1 msec とした。

## C. 研究結果

### (1) 心拍数

0.1 mg/kg では、明期および暗期のいずれも心拍数に有意な変化が認められなかった（図 1）。しかしながら、0.5 mg/kg では、1 回目の投与後の 3 日間において対照群にくらべて明期の心拍数の有意な増加が観察された（351 v.s. 388、 $P<0.05$ ）（図 2）。2 回目の投与後の 3 日間においても有意ではないものの増加傾向が示された。このような心拍数の増加は投与直後から始まり、約 6 時間高いレベルを示したのち、いったん減少したが、その後も全体的に高いレベルで推移した。

1.0 mg/kg では、投与後 24 時間以内の死亡個体が現れるため、測定が可能であった投与直後の明期の心拍数は対照群にくらべて明らかな増加が示された（341 v.s. 400, n=3）。

### (2) 自律神経機能（心拍変動解析）

LF パワー（交感神経+副交感神経）は、0.1 mg/kg および 0.5 mg/kg では、明期および暗期のいずれも有意な変化が認められなかった。1.0 mg/kg では、投与後 1 日以内の明期において明らかな低下が示された（3.89 v.s. 1.11 msec<sup>2</sup>、 $P<0.05$ ）。

HF パワー（副交感神経）は、LF パワーと同様に 0.1 mg/kg および 0.5 mg/kg では、明期および暗期のいずれも有意な変化が認められなかった。1.0 mg/kg では、投与後 1 日以内の明期において明らかな



低下が示された (1.22 v.s. 0.44 msec<sup>2</sup>, P<0.05)。

LF/HF 比 (自律神経バランス) は、いずれの投与量においても有意差が認められなかった。

トータルパワーは、0.1 mg/kg では対照群との間に有意差が認められなかったが、0.5 mg/kg では、明期の値が第 1 回目および第 2 回目の投与のいずれにおいても有意な低下が示された (第 1 回目投与 P<0.01、第 2 回目投与 P<0.05)

### (3) 不整脈

0.1 mg/kg および 0.5 mg/kg のいずれも最初の T-2 トキシン投与後 6 時間以降に不整脈が多く出現した (図 3)。不整脈の種類は、房室ブロック (A-V block) がもっとも多く、そのほかに上室性不整脈 (supraventricular extrasystole; SVE)、洞性徐脈 (atrial bradycardia; SA)、心室期外収縮 (ventricular extrasystole; VE) が観察された。不整脈の発現は 0.1 mg/kg では、投与後 2 日目にもっとも高く、3 日目にやや減少した。0.5 mg/kg では、投与後 1 日目から房室ブロックを中心にして多くの不整脈が出現し、2 日目、3 日目においても多くの不整脈が認められた。不整脈の発現数は、投与後の 3 日間で 0.1 mg/kg では 22 回 (n=4)、0.5 mg/kg では 56 回 (n=4) を示した。

### (4) 刺激伝導系および心室興奮関連指標の変化

洞房結節から心筋に至る刺激伝導系の興奮伝導時間を示す PR 間隔、心筋全体の興奮時間 (脱分極時間) を示す QRS 持

続時間および心筋の脱分極と再分極の合計時間を示す QT 間隔について、0.1 mg/kg、0.5 mg/kg、1.0 mg/kg のいずれの投与量においても明瞭な変化が観察されなかった (図 4)。

## D. 考察

本研究によって、T-2 トキシンは心機能に対して明らかな影響をもたらすことが明らかになった (表 1)。0.5 mg/kg 以上では、T-2 トキシンの投与後に心拍数の増加が示された。心拍数の増加は交感神経の活動亢進、副交感神経の活動低下および洞房結節の自動能の亢進などが原因となって生じうる。心拍数増加の要因として全身血圧の低下による圧反射が交感神経活動亢進と副交感神経活動低下を招く可能性も考えられる。しかしながら、覚醒ラットへの T-2 トキシン 0.5 mg~2.0 mg/kg の静脈内投与によって 6~8 時間持続する血圧上昇とその後の血圧低下が生じるという報告 (Feuerstein G, 1985) がある。もしこの報告が正しい場合、投与直後の心拍数増加は血圧低下による圧反射に起因するとは考えがたい。しかしながら、全身麻酔下のイヌの実験では 2.0 mg/kg の静脈内投与によって、急性的な房室ブロックと約 4 時間持続する心拍数増加が出現し、この心拍数増加は血圧低下に起因し、交感神経遮断薬のプロプラノロールで抑制されるという報告 (Bubien, J. K. and Woods, W. T. Jr. 1987) がある。したがって、T-2 トキシンの投与による心拍数増加は自律神経系への直接作用あるいは洞房結節への作用が考えられるとともに、圧反射への影響も考慮す

る必要がある。心拍変動解析による自律神経機能への影響に関する評価では、トータルパワーの低下が投与後に認められたことから、自律神経系の活動全体がT-2トキシンによって低下することが示唆される。副交感神経活動を反映するHFパワーは低下傾向を示したことから、とくに副交感神経の活動低下が比較的強く生じた可能性が高い。T-2トキシンの投与による心拍数増加の要因として副交感神経活動低下が関与している可能性が考えられる。

T-2トキシン（トリコテセン系Aグループ）の健康影響として代表的なものは、嘔吐、免疫系細胞のアポトーシス、造血系組織の障害などである。しかしながら、T-2トキシンには以前から循環器影響が存在することも指摘されている。イヌの心筋乳頭細胞の活動電位への影響（Feuerstein G, 1985）、ラットの血管傷害（Wilson CA, 1982; Yarom R, 1987）、心筋細胞の拍動停止と細胞死（Yarom R, 1986）、心電図異常と収縮力低下（Yarom R, 1983）などの報告がある。最近、同じトリコテセン系のマイコトキシンであるデオキシニバレノール（DON）（トリコテセン系Bグループ）において催不整脈作用があることを研究代表者が報告している。上記のT-2トキシンによる心循環系毒性を考慮すると、T-2トキシンには不整脈を誘発する催不整脈作用が存在する可能性が考えられる。本研究では、テレメトリー法によって、無麻酔、自由行動下のラットから長時間の連続心電図記録を行ったところ、少なくとも0.1 mg/kgの皮下投与によって房室ブロックなどの

不整脈が生じることが明らかになった。不整脈の発現開始時間は、投与後6時間以降であったことから、T-2トキシンの心臓影響が発現するまでには、ある程度の時間経過が必要であると思われる。DONによる催不整脈効果においても、投与後10時間程度の時間経過が必要であることから、これらのマイコトキシンによる心臓影響の発現は急性的な生理的変化というよりは細胞傷害、組織傷害的な変化が関与していることが推測される。心臓におけるこのような変化は、心筋梗塞、狭心症、心筋症などの心臓基礎疾患や薬物摂取や腎障害による感受性変化を有す患者においては症状を悪化させる可能性が示唆される。

## E. 結論

本研究によって、T-2トキシンは心機能および自律神経系に対して明らかな影響をもたらすことが明らかになった。T-2トキシンを大量に摂取した場合には、基礎疾患を有すハイリスク患者などでは心臓障害を高める危険性が示唆された。

## 参考文献

- 1) Bubien, J.K. and Woods W. T. Jr.(1987): Direct and reflex cardiovascular effects of trichothecene mycotoxins. *Toxicol. 25(3): 325-331.*
- 2) Feuerstein, G. et al.(1985): Cardio-respiratory, sympathetic and biochemical responses to T-2 toxin in the guinea pig and rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther. 232(3): 786-794.*

- 3) Magnuson, B. A. et al. (1987): Cardiovascular effects of mycotoxin T-2 after topical application in rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65, 799-802.
- 4) Wilson, C. A. et al. (1982): Blood pressure changes and cardiovascular lesions found in rats given T-2 toxin, a trichothecene secondary metabolite of certain *Fusarium microfungi*. *Toxicol Lett.* 10(1):35-40.
- 5) Yarom, R. et al. (1983): T-2 toxin effect on isolated perfused rat hearts. *Basic Res Cardiol.* 78(6):623-630.
- 6) Yarom, R. et al. (1986): T-2 toxin effect on cultured myocardial cells. *Toxicol Lett.* 31(1):1-8.
- 7) Yarom, R. et al. (1987): T-2 toxin effect on rat aorta: cellular changes *in vivo* and growth of smooth muscle cells *in vitro*. *Exp Mol Pathol.* 47(2):143-153.

#### F. 健康危険情報

なし

#### F. 研究業績

##### 【論文発表】

- 1) Suchitra NGAMPONGSA, Koichi ITO, Masayoshi KUWAHARA, Susumu KUMAGAI, Hirokazu TSUBONE :

Arrhythmias and alterations in autonomic nervous function induced by deoxynivalenol (DON) in unrestrained rats. *J. Toxicol. Sci.*, 2011. (in press)

##### 【学会発表】

- 1) Suchitra, N., Ito, K., Kuwahara, M. Kumagai, S., Tsubone H. (2010): Circulatory and autonomic nervous short-term effects of deoxynivalenol toxin evaluating by a telemetric system as a recorder in conscious rats. 第67回日本マイコトキシン学会学術講演会。

##### 【著書】

- 1) 局 博一 (2010) : 第8章全身健康響指標を利用した安全性評価。「食の安全科学の展開 - 食のリスク予測と制御に向けて -」(東京大学 食の安全研究センター編)。シーエムシー出版 67 - 72 頁

#### 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

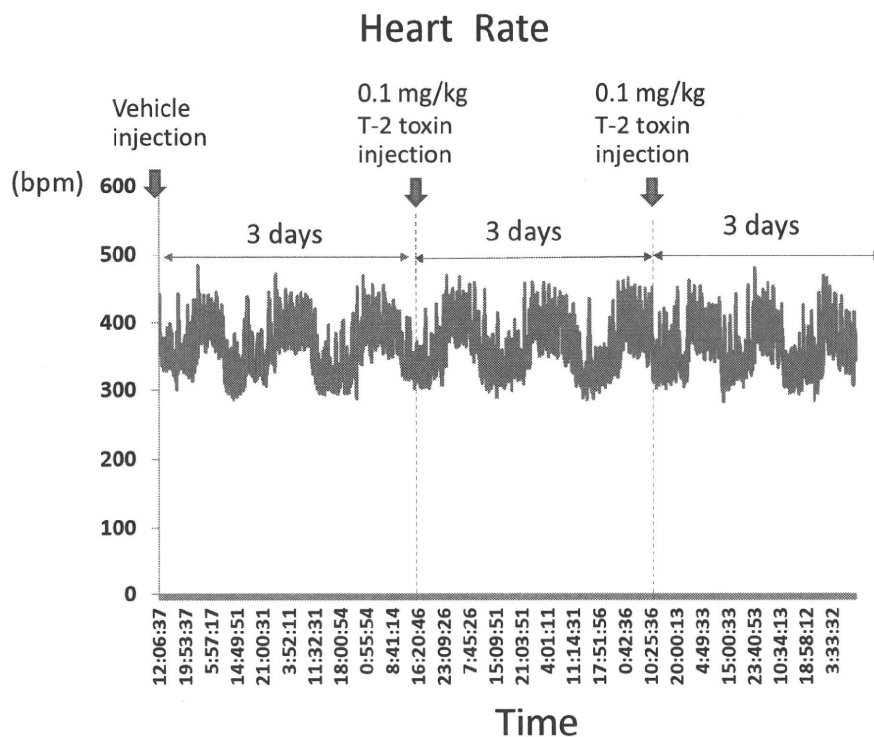


図1. 心拍数の経時的变化

対照溶液 (vehicle)、T-2 トキシン (0.1 mg/kg) を3日間隔で皮下投与した。

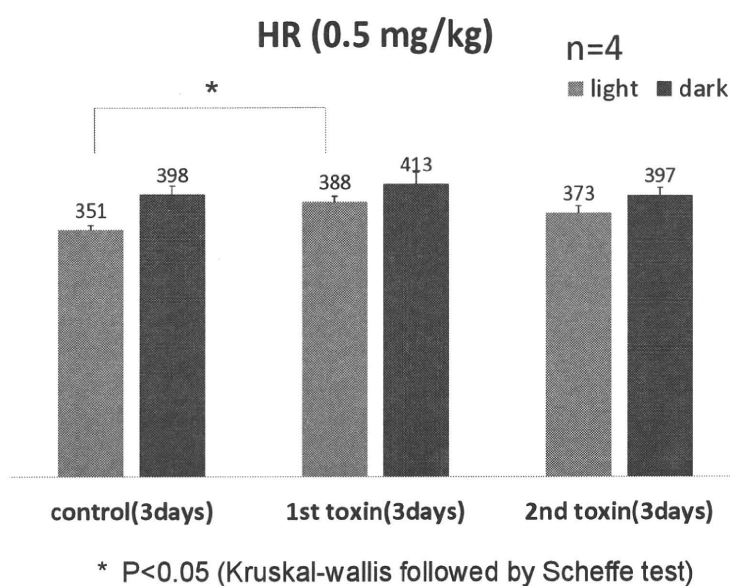


図2. T-2 トキシン (0.5 mg/kg) の投与による心拍数の変化

Control: 対照群 (溶媒のみを投与した群)、1st toxin: 1回目の投与  
2nd toxin: 2回目の投与 データは3日間の平均値±S.E.で示す。