

図3. T-2 トキシン (0.1 mg/kg) の皮下投与による不整脈の発現性
 データは第1回目の投与後3日間の経過を示す。A-V block: 房室ブロック、SVE: 上室性期外収縮、VE: 心室期外収縮、AB: 洞性徐脈

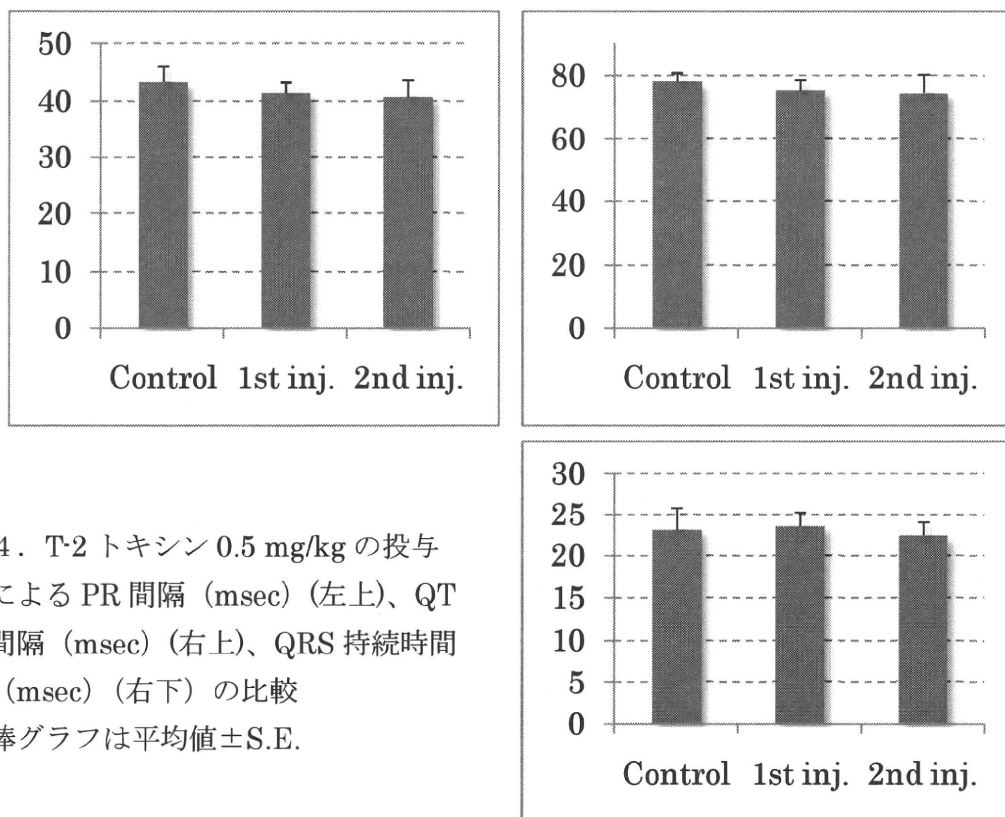


図4. T-2 トキシン 0.5 mg/kg の投与によるPR 間隔 (msec) (左上)、QT 間隔 (msec) (右上)、QRS 持続時間 (msec) (右下) の比較
 棒グラフは平均値±S.E.

表 1. 心拍数、自律神経活動、不整脈に関する結果のまとめ

/kg sc	HR	Total Power	LF Power	HF Power	LF/HF	Arrhythmia
0.1mg	—	—	—	—	—	+
0.5mg	↑	↓	↓	↓	↓	+
1.0mg	↑↓	↓	↓	↓	↓	+

HR : heart rate, LF power: Low frequency power, HF power: high frequency power
 Arrhythmia: 房室ブロック (A-V block) , 上室性期外収縮 (supraventricular extrasystole) , 心室期外収縮 (ventricular extrasystole)、洞性徐脈 (atrial bradycardia)

厚生労働科学研究費補助金
(食品の安全・安心確保推進研究事業)

分担研究報告書

シトリニンのマウス臓器および全身影響に関する研究

分担研究者 渋谷 淳 東京農工大学農学研究院動物生命科学部門 准教授

要旨

本研究は、ペニシリウム属毒素のシトリニンについて、実験動物に対する毒性プロファイルと、共汚染しやすい他のマイコトキシンとの複合影響を明らかにすることを目的としている。平成 22 年度は、シトリニンの毒性プロファイルを明らかにする目的で、生殖毒性ないし卵巣毒性の報告されている用量を参考に、マウスに対して 10 週間に及ぶ反復投与毒性試験を実施した。即ち、BALB/c マウス（雌、5 週齢、各群 15 匹）にシトリニン 0 μM 、5 μM ないし 30 μM を飲水にて 10 週間投与した。体重、飲水量、摂餌量、一般症状の全てにおいて明らかな変化はなかった。また剖検時での腎・肝・子宮重量に変化はなかったが、卵巣相対重量が 30 μM で有意に増加した。病理組織学的な検索により、子宮粘膜の変化として、発情期の組織像を示す個体が多い傾向が認められた。腎臓では、尿細管等に明らかな組織学的変化は認められなかったが、PCNA 染色の結果、尿細管上皮での陽性細胞率がシトリニン投与の 2 群で有意な増加を示し、細胞増殖活性の亢進を示すことが見出された。以上の結果より、極低用量のシトリニンによる卵巣に対する毒性および腎発がんの誘発の可能性が示唆され、より高用量での追加試験が必要と考えられた。

A. 研究目的

近年、カビ毒を対象に国際的成分規格を設定する動きが活発化している。我が国は輸入大国であることから、食の安全を確保するためには、食品の成分規格に対する国際的動向に対応できる体制が必要である。また国際的には問題とならないカビ毒でも、わが国の食習慣に関するカビ毒などは、重大な危害物質となりうる。本研究は、ペニシリウム属毒素のシトリニンについて、実験動物に対する毒性プロファイルと、共汚染しやすい他のマイコトキシンとの複合影響を明らかにすることを目的として実施している。平成 22 年度は、米汚染が危惧されているペニシリウム毒素シトリニンについて、実験動物に対する単独作用を明らかにすること

を目的として実験を行った。

B. 研究方法

4 週齢の雌 BALB/c マウス（日本エスエルシー）を 1 週間の馴化期間後、一群を 15 匹ずつとして計 3 群に群わけし、シトリニン (Citrinin: CTN) を 0, 5, 30 μM の用量で 10 週間飲水投与した。CTN の投与用量に関しては、マウス飲水投与の実験において、5 μM で卵巣毒性 (in vivo, Chan et al. 2008)、また杯盤胞を用いた実験において、15~30 μM で発生毒性 (ex vivo, Chan et al. 2007) が認められたため、低用量群を 5 μM 、高用量群を 30 μM と設定した。投与期間中、一般状態を 3~4 日に 1 回観察し、週に一度の割合で体重及び摂餌量、

3~4日に一度、CTNの交換および摂水量の測定を行った。動物は全て、投与期間終了時にエーテル麻酔下で放血を行い、放血後に屠殺した。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IgG及びIgA濃度の測定を行い、株式会社三菱化学メディエンスに依頼して血液生化学検査を行った。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、肝臓、卵巣及び子宮を摘出し、腎臓および肝臓の重量を測定後、腎臓をパラホルムアルデヒドにて固定し、肝臓、卵巣及び子宮を10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。卵巣及び子宮は固定後重量測定を行った。固定標本は、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を行った。また、腎臓および卵巣に関しては、proliferation cell nuclear antigen (PCNA) 染色を行った。PCNA染色では、Mouse-on-mouse immunodetection kit (Vector Laboratories Burlingame, CA, USA)を用い、一次抗体としてPCNA (mouse monoclonal antibody, clone PC10, 1:800 dilution; Dako, Glostrup, Denmark)、発色には3,3'-diaminobenzidine (DAB)を用いた。賦活化はマイクロウェーブ(97℃、15分)で行った。

卵巣におけるPCNA染色切片を用いて、原始卵胞、一次卵胞、二次卵胞、黄体及び閉鎖卵胞の数をカウントし、卵巣全体の面積あたりの数を算出した。

腎臓におけるPCNA染色切片を用いて、近位尿細管における陽性細胞数は、各個体100倍視野で左右腎臓につき、それぞれランダムに皮質で2か所及び髓質1か所、計6か所観察し、陽性細胞/尿細管上皮細胞をカウントした。

統計学的解析は、体重、臓器重量、血液生化学検査値(Creatinin, BUN, ALP, AST, ALT, Albumin, TP)、血清IgG・IgA濃度、腎PCNA

カウント値について、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。(倫理面への配慮)

投与実験は飲水投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物は全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、管理にあつては、国立大学法人 東京農工大学の実験取扱い倫理規定に従った。

C. 研究結果

(1) 体重、飲水量、摂食量

CTN 5 μ M 投与群、30 μ M 投与群のいずれも対照群に比べて、体重、飲水量および摂食量に有意な変化は認められなかった (Table 1)。

(2) 臓器重量

腎臓、肝臓および子宮の重量は、CTN 5 μ M 投与群、30 μ M 投与群のいずれも対照群に比べて差異が認められなかった (Table 2)。一方、CTN 30 μ M 投与群では、卵巣相対重量の有意な増加 ($P < 0.05$) が観察された。

(3) 血液生化学検査および免疫グロブリン値測定

Creatinin, BUN, AST, ALP, ALT, TP, albuminのいずれの値もCTN投与群と対照群との間に差が認められなかった (Table 3)。また、免疫グロブリン (IgG, IgA) に関しても全ての群間で有意差のある変化が認められなかった。

(4) 病理組織変化および免疫組織学的変化

病理組織学的変化として、CTN投与群で、肝臓に肝細胞の単細胞壊死を伴う微小肉芽腫が認められた。また、CTN投与群で、肝臓における胆管周囲の炎症細胞浸潤の増加傾向が認め

られた。その他、腎臓における再生尿細管、尿細管上皮の空胞化、水腎症が認められたが、CTN 投与に関連した変化ではなかった (Table 4)。

子宮粘膜の変化として、発情期の組織像を示す個体が多い傾向が認められた (Table 5)。しかし、一次卵胞、二次卵胞、黄体、閉鎖卵胞数をカウントしたところ、群間で明らかな違いは認められなかった (Table 5)。

腎臓では、尿細管等に明らかな病理変化は認められなかったが、PCNA 染色の結果、尿細管上皮の陽性細胞率が CTN 5 μ M 投与群及び 30 μ M 投与群で用量依存的に有意に増加 ($P < 0.05$) した (Table 5)。

D. 考察

BALB/c マウスに CTN を 10 週間飲水投与し、腎臓、肝臓、卵巣及び子宮への影響について解析した。

その結果、CTN 5~30 μ M の濃度で、卵巣に明らかな形態学的な変化を伴わないものの、発情期を示す個体が多く認められた。また 30 μ M 投与群において、卵巣相対重量の増加が認められた。Chan ら (2008) により、21 日齢の ICR マウスを用いた飲水投与の実験で、卵成熟が減少することが報告されている。また、同グループの胚細胞を用いた実験では (2007)、15 μ M 及び 30 μ M CTN によりアポトーシスが増加し、また胚着床後の吸収率の増加や胎児の体重減少を示すなど発生毒性も報告されている。これらのことから、なんらかの生殖器影響が示唆され、今後投与量ないし、投与期間を変更した再試験が必要と考えられた。

また、免疫組織学的検査においては、腎臓の PCNA 染色により、用量依存的に皮質から髓質にかけて腎尿細管上皮の陽性細胞数が増加し、増殖活性の軽度増加が認められた。CTN には様々な染色体異常が報告されており、ヒトリンパ球を用いた試験では小核出現率の増加

(Donmez-Altuntas et al. 2007)、HEK293 細胞株では数的染色体異常 (Chang et al. 2011) が報告されている。更に雄性 F344 ラットに 0.1%CTN を最大 80 週間混餌投与した試験においては、40 週以上生存したラットの 72.9% で腎腺腫の発現が報告されている (Arai et al. 1983)。また培養細胞を用いた実験では活性酸素種を発生させることで細胞をアポトーシスへ導くこと (Chang et al. 2007)、またスーパーオキシドアニオンを形成し、抗酸化酵素を阻害することで酸化ストレスを引き起こすこと (Ribeiro et al. 1997) が報告されている。これらのことから CTN が何らかの尿細管毒性を示す可能性が示唆された。本試験においては、明らかな変性性変化は認めなかったものの、腎尿細管上皮の増殖活性の増加が認められたことから、なんらかの受容体を介した細胞増殖シグナルの活性化が示唆され、より高用量域での再現性の検討の後に、発がん性試験ないし二段階発がんモデルを用いた検討を行う必要が示唆された。

E. 結論

雌 BALB/c マウスに CTN を飲水投与した結果、卵巣相対重量の増加および発情期を示す個体の増加が認められた。さらに、腎臓を用いた PCNA 染色の結果、尿細管上皮において、増殖活性の軽度増加が認められた。以上より、極低用量の CTN による卵巣に対する毒性および腎発がん誘発の可能性が考えられ、今後さらなる検討を行う必要性が示唆された。

参考文献

- 1) Arai M., Hibino T.: Tumorigenicity of citrinin in male F344 rats. *Cancer Lett.* 17:281-287. (1983).
- 2) Chang C.H., Yu F.Y., Wu T.S., Wang L.T, Liu B.H.: Mycotoxin citrinin induced cell cycle G2/M

arrest and numerical chromosomal aberration associated with disruption of microtubule formation in human cells. *Toxicol. Sci.* **119**:84-92 (2011).

3) Ribeiro S.M., Chagas G.M., Campello A.P., Klüppel M.L.: Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. V. Effect on the homeostasis of the reactive oxygen species. *Cell Biochem. Funct.* **15**:203-209 (1997).

4) Chan W.H.: Effects of citrinin on maturation of mouse oocytes, fertilization, and fetal development in vitro and in vivo. *Toxicology Lett.* **180**:28-32 (2008).

5) Chan W.H., Shiao N.H.: Effect of citrinin on mouse embryonic development *in vitro* and *in vivo*. *Reprod. Toxicol.* **24**:120-125 (2007).

6) Chan W.H.: Citrinin induces apoptosis via mitochondria-dependent pathway and inhibition of survival signals in embryonic stem cells, and causes developmental injury in blastocysts. *Biochem. J.* **404**:317-326 (2007).

7) Dönmez-Altuntas H., Dumlupinar G., Imamoglu N., Hamurcu Z., Liman B.C.: Effects of the mycotoxin citrinin on micronucleus formation in a cytokinesis-block genotoxicity assay in cultured human lymphocytes. *J. Appl. Toxicol.* **27**:337-341 (2007).

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

Table 1.

Final body weights, food intake and water consumption of BALB/c mice given citrinin (CTN) in the drinking water for 10 weeks.

	Control	CTN, 5 μ M	CTN, 30 μ M
No. of animals	15	15	15
Clinical observations	No changes	No changes	No changes
Final body weight (g)	21.33 \pm 0.95	21.07 \pm 0.75	21.31 \pm 0.82
Food intake (g/day/animal)	2.48 \pm 0.12	2.46 \pm 0.12	2.54 \pm 0.13
Water consumption (g/day/animal)	3.20 \pm 0.24	3.21 \pm 0.16	3.24 \pm 0.17

Table 2.

Kidney, liver, ovary and uterine weights of BALB/c mice given citrinin (CTN) in the drinking water for 10 weeks.

		Control	CTN, 5 μ M	CTN, 30 μ M
	No. of animals	15	15	15
Kidneys	Absolute (g)	0.24 \pm 0.04	0.24 \pm 0.01	0.24 \pm 0.02
	Relative (%)	1.14 \pm 0.10	1.13 \pm 0.06	1.15 \pm 0.11
Liver	Absolute (g)	0.87 \pm 0.06	0.85 \pm 0.05	0.85 \pm 0.06
	Relative (%)	4.07 \pm 0.28	4.03 \pm 0.16	4.00 \pm 0.22
Ovaries	Absolute (g)	0.0072 \pm 0.0016	0.0079 \pm 0.0019	0.0088 \pm 0.0027
	Relative (%)	0.034 \pm 0.007	0.038 \pm 0.009	0.041 \pm 0.013*
Uterus	Absolute (g)	0.096 \pm 0.030	0.110 \pm 0.040	0.098 \pm 0.030
	Relative (%)	0.47 \pm 0.14	0.50 \pm 0.20	0.46 \pm 0.14

*: Significantly different from the untreated controls (P<0.05, Dunnett's multiple test).

Table 3.

Serum biochemistry and immunoglobulin value changes of BALB/c mice given citrinin (CTN) in the drinking water for 10 weeks.

	Control	CTN, 5 μ M	CTN, 30 μ M
No. of animals	5	5	5
Blood urea nitrogen (mg/dL)	26.4 \pm 3.8	27.6 \pm 3.5	29.6 \pm 3.8
Creatinin (mg/dL)	0.2 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	0.2 \pm 0
Aspartate aminotransferase (IU/L)	53.4 \pm 5.7	58.8 \pm 4.3	54.8 \pm 6.9
Alanine aminotransferase (IU/L)	24.8 \pm 3.1	28.2 \pm 3.4	26.2 \pm 8.9
Alkaline phosphatase (IU/L)	292.6 \pm 22.3	311.0 \pm 17.4	283.0 \pm 14.7
Albumin (g/dL)	3.48 \pm 0.16	3.48 \pm 0.13	3.40 \pm 0.14
Total protein (g/dL)	4.64 \pm 0.23	4.6 \pm 0.19	4.54 \pm 0.15
No. of animals*	11	9	11
IgG (mg/dL)	111.8 \pm 48.4	97.3 \pm 36.5	100.6 \pm 28.1
IgA (mg/dL)	31.6 \pm 6.0	29.0 \pm 7.8	31.1 \pm 5.3

* Pooled serum samples (N=4 or 5/group) were subjected to analysis: Control, N=4, each from 2, 2, 3, and 4 animals; 5 μ M CTN group, N=5, each from 2, 2, 2, 2, and 1 animals; 30 μ M CTN group, N=5, each from 3, 2, 2, 2, and 2 animals.

Table 4.

Histopathological changes in BALB/c mice given citrinin (CTN) in the drinking water for 10 weeks.

	Group	Control		
		CTN		
	Dose	-	5 μ M	30 μ M
	No. of animals	15	15	15
Kidneys				
Regenerating tubules, focal		1	0	1
Cytoplasmic vacuolation, proximal tubules		1	1	0
Hydronephrosis		1	0	2
Liver				
Microgranulomas		8	11	9
Microgranuloma with liver cell necrosis		0	1	2
Inflammatory cell infiltration, bile ducts		3	7	7

Table 5.

The number of PCNA-positive proximal tubular cells, estrous cyclicity, and follicle/corpus luteum of BALB/c mice given citrinin (CTN) in the drinking water for 10 weeks.

	Control	Citrinin 5 μ M	Citrinin 30 μ M
No. of animals	15	15	15
No. of PCNA positive cells	0.11 \pm 0.04	0.16 \pm 0.07*	0.17 \pm 0.08*
Estrous cyclicity			
Proestrus	4	2	2
Estrus	3	6	6
Metestrus	4	3	5
Diestrus	4	4	2
No. of primordial follicle/area	2.39 \pm 1.64	2.33 \pm 1.54	2.92 \pm 1.88
No. of primary follicle/area	3.71 \pm 2.31	3.01 \pm 1.4	3.91 \pm 2.23
No. of second follicle/area	7.12 \pm 3.85	4.99 \pm 1.43	6.41 \pm 2.73
No. of Atresia follicle/area	3.14 \pm 1.27	2.74 \pm 1.52	3.38 \pm 1.79
No. of corpus luteum/area	1.14 \pm 1.28	1.19 \pm 0.69	1.08 \pm 1.23

*: Significantly different from control (P<0.05. Steel test).

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

日本人の牛乳を介したカビ毒の曝露量推定～アフラトキシン M1 を例として

研究分担者 佐藤敏彦 (北里大学医学部附属臨床研究センター教授)

要旨

現在、日本で流通している粉ミルクおよび牛乳を介したアフラトキシン M1 の曝露量がどれくらいになり、それが健康にどのような影響を及ぼすのかをシミュレーションで検討した。その結果、現状では粉ミルクおよび牛乳を介してのアフラトキシン M1 による健康への悪影響はほぼないものと考えられる。

研究協力者 齊藤史朗 (北里大学医学部附属臨床研究センター)

A. 研究目的

牛乳のカビ毒汚染については、飼料についたカビおよびその毒を牛が摂取したものが、乳の中に出るとい形で汚染が生じるアフラトキシン M1 による曝露が問題になる。日本国内で従来流通している牛乳類はほぼ全てが国内産でチーズやバターなどの加工品について主に欧米各国からの輸入品が含まれているが、昨今、アジア諸国での牛乳の生産が盛んになり、近い将来に日本への製品輸出が行われることが予測される。その場合のアフラトキシン M1 の規制のあり方の基礎資料として、現状における日本人の牛乳を介したアフラトキシン M1 の曝露量推定を行った。

B. 研究方法

- (1) 1才未満の対象者
a. 牛乳の摂取量

「乳幼児に対する粉ミルク量および体重の試算」データから、1ヶ月ごとの毎日の粉ミルク摂取量と平均体重から、平均値を出して体重 1Kg あたりの平均摂取量を算出した。(分布を見ることはしていない)

元になった上記データでは月齢ごとに粉ミルクの1日の摂取量とその月齢のときの平均体重が明らかになっているので、次のようにして生まれから一年間の総摂取量を計算した。

それぞれの月の粉ミルクの一日摂取量(たとえば、3・4月であれば「113g」)を、その月の男女平均体重(3・4月では 6.47Kg)で割って、その月の体重 1Kg あたりの摂取量(17.47g/Kg)を算出した。年間の粉ミルクの摂取量は、それぞれの月ごとに出した一日あたりの体重 1Kg あたりの摂取量に 365.24/12 をかけて算出した。また、全ての月の分を合計して、生まれてからの1年間

の総摂取量を計算した。なお、実際には粉ミルクを飲まない乳児が存在するが、ここではその点は考慮に入れていなかった。

乳幼児に対する粉ミルク量及び体重の試算

月齢	ミルク量 mL	粉ミルク g/日	体重(kg)			備考
			男子	女子	男女平均	
出生児	840	113	3.04	2.96	3.00	離乳前
1-2月	840	113	4.87	4.60	4.74	離乳前
2-3月	840	113	5.88	5.53	5.71	離乳前
3-4月	840	113	6.72	6.22	6.47	離乳前
4-5月	840	113	7.32	6.75	7.04	離乳前
5-6月	840	113	7.79	7.18	7.49	離乳初期
6-7月	840	113	8.17	7.54	7.86	離乳初期
7-8月	720	97	8.48	7.82	8.15	離乳中期
8-9月	720	97	8.74	8.05	8.40	離乳中期
9-10月	480	65	8.94	8.26	8.60	離乳後期
10-11月	480	65	9.13	8.46	8.80	離乳後期
11-12月	480	65	9.33	8.67	9.00	離乳後期
平均		98.3			7.10	

- * ミルク量は1回240mL(粉として32g)とした。改訂「離乳の基本」の母乳・育児用ミルクの回数に基づき計算
- * 離乳前のミルク摂取量は離乳初期と同じにした。
- * 体重は乳幼児身体発育調査報告書(平成12年)を使用した。
- * 乳の摂取量は厚生労働省が策定した「授乳・離乳の支援ガイド」を参考(離乳初期、中期、後期について)

b. 粉ミルクの汚染量

粉ミルクの汚染量については、平成22年度の「食品中のかび毒に係る試験検査(アフラトキシン M1)」のデータからシミュレーションにより分布を作成した。

c. 曝露量の算定

上記 a の方法でもとめた摂取量に、b の方法でもとめた汚染量をかけることによって出生してから1才になるまでの総曝露量を算定した。

(2) 1才以上の対象者

a. 牛乳の摂取量

牛乳の摂取量については、「食品摂取量・摂取頻度調査」のデータから、年令階層別(1才から6才、7才から14才、15才から19才、20才以上の4つの階層)に分布を作成した。

平成17年度から19年度に行われた「食品摂取量・摂取頻度調査」のデータを利用

した。この調査では連続3日間摂取した食品を調査することを年間で4回行っている。このデータのカナで、季節変動を考慮するために、12回全部の調査に答えた人のデータのみを利用した。すなわち、12回の調査の平均値を求めて、その平均値の分布を推定した。(分布の種類としては対数正規分布を想定。) こうすることによって、同じ人でもたまたま多く摂取したというのを平均化した。

b. 牛乳の汚染量

牛乳の汚染量については、国立医薬品・食品衛生研究所による「市販乳 AFM1 濃度一覧」を利用して、分布を作成した。サンプル数は208でLOQ未满是14サンプルであるので、GEMS FOODの規定(LOQ未满是60%以下)により、Lower boundはLOQ未满是ゼロとし、Upper boundはLOQ未满是LOQの半分(ゼロからLOQ

の一様分布)とした。

c.曝露量の算定

一日あたりの曝露量は上記 a の方法でもとめた摂取量に、b の方法でもとめた汚染量をかけてことによって算定し、総曝露量は、一日あたりの曝露量を年あたり 365.24 倍して、該当する年齢層分の年数をかけて、さらに4つの年齢層分を合計して算出した。

(3)総曝露量の推定

0才から1才までの粉ミルクによる曝露量合計に、1才から70才までの牛乳による曝露量合計を合算した。その際、各シナリオ (lower bound および upper bound) どうしで合算した。(lower bound と lower bound, upoper bound と upper bound を合算)。

1才から70才までについて年齢層をまたぐ場合に、各年齢層での曝露量の順番(何番目に多く曝露しているか)をあわせて計算した。(1才から6才までで一番多く曝露している人は、7才から14才、15才から19才、20才以上のそれぞれのライフ・ステージでも一番多く曝露していると仮定した。)

0才から1才までの曝露量合計と1才から70才までの曝露量合計の合算においては、ランダムに合算した。(0才から1才までは摂取量についての傾向性(分布)の想定をしていないため、曝露量合計の差は汚染量に由来するため)

C. 研究結果

(1) 粉ミルク

a.粉ミルクの摂取量

上記Bの(1)のaの方法により、出生から1才までの1年間の粉ミルクの体重1kgあ

たりの摂取量を5780.23gとした。

b.粉ミルクの汚染量

基礎となるデータは、「平成22年度食品中のかび毒に係る試験検査(アフラトキシンM1)」より求めた。サンプル数は108とした。検出値があるものが36サンプル、LOD以上が14サンプル、LOQ以上は2サンプルのみであった。

LOQ未満についてはWTOのGEMS FOODの規定により、LOQ未満が80%以上の場合にあたるので、Lower bound: LOQ未満はゼロとし、Upper bound: LOQ未満はLOQと等しいとした。(LOQは0.12)

シミュレーションとしては、2サンプルの値(0.148と0.177)が、108分の1 \approx 0.00926の確率で発生するプログラムを組んで分布を作成した。

c.粉ミルクの曝露量

上記のaで求めた摂取量にbで求めた汚染量をかけて曝露量(体重1Kgあたりのng数)を計算した。

Lower boundでは平均が17.35、標準偏差が127.00、中央値が0、99%タイル値が855.47となった。

Upper boundでは平均が698.19、標準偏差が35.10、中央値が693.627、99%タイル値が855.47となった。

※ただし、この分布は一定の値のみが一定の出現数を取るため、LOQ未満の確率が圧倒的に多いので(0.9815)、その場合にとる値の違いが大きな差を生んでいる。

(2) 牛乳

a.牛乳の摂取量

利用データの概要と、シミュレーションのための基礎データを示すと以下のようになる。

年齢層	全被験者数	12回あり	摂取あり	摂取割合	A-D値	χ 二乗値	K-S値	平均	標準偏差
1-6才	227	83	82	0.99	2.91	19.7	0.14	11.27	19.16
7-14才	400	214	214	1.00	2.26	31.83	0.09	6.21	5.23
15-19才	315	141	135	0.96	6.37	65.2	0.16	4.22	21.18
20才以上	3671	2194	1994	0.91	43.66	570.96	0.09	2.38	8.51

(単位は体重 1Kg あたりの摂取量 (g))

この平均と標準偏差の値を使ってシミュレーションを行った。

その結果、それぞれの年齢層の摂取量分布は次のようになっている。1才から6才では、平均が 11.14、標準偏差が 19.05、中央値が 5.62、99%タイル値が 85.50 (いずれも体重 1Kg あたりの g)。7才から14才までは、平均が 6.20、標準偏差が 5.22、中央値が 4.75、99%タイル値が 26.07 (いずれも体重 1Kg あたりの g)。15才から19才では、平均が 4.04、標準偏差が 20.47、中央値が 0.74、95%タイル値が 53.68 (いずれも体重 1Kg あたりの g)。20才以上では、平均が 2.17、標準偏差が 8.37、中央値が 0.52、99%タイル値が 26.20 (いずれも体重 1Kg あたりの g)。

b. 牛乳の汚染量

Lower bound では、平均で 0.0093、標準偏差が 0.0025、中央値が 0.01、99%タイル値が 0.01 (いずれも g あたりの ng) となっている。

Upper bound では、平均で 0.0094、標準偏差が 0.0021、中央値が 0.01、99%タイル

値が 0.01 (いずれも g あたりの ng) となっている。

c. 曝露量

年齢層ごとに計算した摂取量の合計から1才から70才までの合計摂取量を計算し、それに汚染量をかけて、1才から70才までの合計曝露量を計算することにより、次の分布を得た。Lower bound では、平均が 842.26、標準偏差が 2360.51、中央値が 335.03、99%タイル値が 8172.75。Upper bound では、平均が 851.09、標準偏差が 2345.08、中央値が 341.10、99%タイル値が 8183.10 であった。(いずれも単位は体重 1Kg あたりの ng)

(4) 総曝露量の推定

シミュレーションによれば、1才までの粉ミルクの曝露量と1才から70才までの牛乳による曝露量を合わせた総曝露量 (単位は体重 1Kg あたりの ng) は Lower bound、Upper bound のそれぞれについて以下のようになる。

シナリオ	10%タイル	20%タイル	30%タイル	40%タイル	50%タイル	60%タイル	70%タイル	80%タイル
lower bound	50.66157	110.6967	173.5182	248.2339	345.3726	481.7332	692.7144	1057.354
upper bound	759.6935	814.3391	874.6412	947.3153	1041.536	1170.088	1364.665	1707.244

シナリオ	90%タイル	95%タイル	97.5%タイル	99%タイル	99.5%タイル	99.8%タイル	99.9%タイル
lower bound	1856.483	3062.518	4794.77	8194.907	11911.02	18815.48	26042.58
upper bound	2527.959	3741.864	5479.453	8881.52	12586.79	19512.46	26729.25

D. 考察

(1) シナリオによる総曝露量の違い

99%タイルまでは、シナリオによる総曝露量の違いが大きいが、これは、粉ミルクの摂取量シミュレーションにおける LOE 未満の値の処理の違いによるものと思われる。すなわち、約 99.5%までが LOE 未満なので、lower bound では約 99.5%までについては摂取量がゼロとなってしまうのに対して、upper bound では約 99.5%までは摂取量が 0.12 とされているため、そこまでについては、粉ミルクによる曝露量に大きな違いで生じてしまうのである。

(2) アフラトキシン M1 曝露による健康への影響について

アフラトキシン M1 の健康への影響のうちで最も考慮しなければならないのは発ガンであるが、これについては、以下のような発ガン率の計算式が認められている。

※体重 1Kg あたりのアフラトキシン M1 の曝露量 (ng) × {B 型肝炎キャリアー% (日本では 2%) * 0.03(キャリアーのアフラトキシン M1 の発がん率) + B 型肝炎非キャリアー% (日本では 98%) * 0.001(健常人のアフラトキシン M1 の発がん率)} = 10 万人あたりにガンを発生する人の数

そこで、まずは 70 才までの生涯の総曝露量から、一日あたりの曝露量を計算するために、総曝露量を (365.24 × 70) = 25566.8 (単位は日) で割る。さらにその値に、上記の計算式による日本人の現状の数値をあてはめて、0.00158 をかけると、それぞれの%タイルにおける 10 万人あたりのガンを発生する人の数がわかる。

たとえば、99%タイルにおける両シナリオよりも多めに 9,000ng と仮定してみると、10 万人あたりにガンを発生する人の数は 0.000553 人となり、日本人口総数を 1 億 2

千万人としても、 $0.000553 \times 1200 = 0.636$ 人で、一人にも満たないことになる。

それゆえ、現状では牛乳を介したアフラトキシン M1 による発ガンの恐れは、ほぼないと考えてよいと思われる。

(3) 今後の課題について

a. 粉ミルクの摂取量データ

生後時期ごとに、どれくらいの粉ミルクを摂取しているのか (体重 1Kg あたり)、摂取がない場合についても含めたデータが必要である

b. 粉ミルクの汚染量計算

GEMS FOOD の規定をそのまま適用しているが、lower bound は少し過少評価だろうし、upper bound はあまりに過大評価をしていると思われる。この間を取るような、LOQ 以下の評価の仕方を考えてみる必要がある。

c. 牛乳の摂取量計算における年齢層をまたぐ場合の取り扱い方法について

今回は、各年齢層における摂取量の順位は人 (サンプル) によって異ならなかった。いわば、いくつになっても、多く摂取する人は多く摂取するという考え方を極端にしたものである。しかし、現実には、各年齢層ごとの摂取量の順位は高い相関はあろうが、厳密に一致するものではあるまい。そこで、各年齢層における摂取量の順位の相関を利用したシミュレーションが行えると、より現実的になるかと思われる。ただし、その場合、相関係数を求めるためのデータの入手という新しい課題が発生する。

d. 牛乳の摂取パターンについて :

年齢が上がると、「牛乳を飲む頻度が少ない」人が増えてくる。頻度の少ない人と、多い人とでは、摂取計算を別にした方が良いかもしれない。

E. 結論

現在、日本国内に流通している粉ミルクおよ

び牛乳を介したアフラトキシン M1 の曝露量によって健康に悪い影響が生じる恐れはほぼないと考えられる。(99%タイルという高い曝露量の水準で計算しても日本総人口あたりにガンを発症する人数は1人未満となる。)

3. その他

参考文献

F.健康危険情報

なし

G. 研究業績

【論文発表】

- 1) Sato, T., Saito, S., Nakajima, M., Tabata, T., Tanaka, S., Norizuki, H., Itoh, Y., Kai, S., Sugiyama, K., Kamata, Y., Yoshiike, N. and Kumagai, S. (2010) : Exposure to aflatoxins in Japan. Risk assessment for aflatoxin B1. *Food AdditContam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 27: 365-372.

【学会発表】

- 1) 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).
- 2) 青山幸二、佐藤敏彦、齊藤史朗、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)

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

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

In vitro 評価系における T-2, HT-2 トキシンの免疫細胞毒性に関する研究

研究協力者 杉山圭一 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部

要旨

本協力研究では、食品や食材に残留が認められ、食品衛生上問題となっているカビ毒に対して特にその毒性に焦点をあて研究を実施した。対象となるカビ毒はトリコテセン系カビ毒である T-2 toxin (T-2) と HT-2 toxin (HT-2) である。これらカビ毒はタイプ A のトリコテセン系カビ毒に分類され、その毒性はわが国で検出される B-type の毒素と比較し毒性が高いことが報告されている。近年の気象変化は地球規模でのタイプ B の毒素産生菌の生育域の変化を誘発する可能性があり、わが国もその例外ではない。本研究では、タイプ A トリコテセン系カビ毒が有する免疫毒性を、マウスマクロファージ様細胞を用い Toll-like receptor 4 (TLR4) シグナルに対する抑制作用をメルクマールに検討した。TLR4 のアゴニストである lipopolisaccharide 刺激により活性化されたマウスマクロファージ様細胞をもちいて、TLR4 シグナルを指標にタイプ A トリコテセン系カビ毒の作用を検討した結果、T-2 および HT-2 においてもタイプ B 同様に TLR4 シグナルに対して抑制作用が確認された。従って、タイプ A の T-2 および HT-2 もタイプ B と同様のアッセイ系で免疫毒性を評価できる可能性が明らかとなった。加えて、本評価系からはタイプ A の毒性はタイプ B よりも低濃度で認められること、また HT-2 と T-2 の比較では、HT-2 がより強い毒性を示す可能性が示唆された。

A. 研究目的

真菌の二次代謝産物であるカビ毒は物理的、化学的処理に極めて安定であるため、その食品・食料品への残留は食品衛生の観点から対策を講じる必要のある自然毒の1つである。対策として規制値等の策定は有効な手段となるが、その策定に際してそれぞれのカビ毒が呈する毒性の理解は重要である。従って、カビ毒からの健康被害を未然に防止するうえ観点から、カビ毒の毒性の正確なデータ把握は、食品の安全確保の観点から不可欠であることは論を待たない。

近年、地球規模による気候変動が世界的に問題視されつつあるが、生態系の変動を誘発する可能性があることがその理由の1つである。フザリウム属真菌が産生するカビ毒のうち、トリコテセン系カビ毒の食品への残留はグローバルな食品衛生上の問題であり、わが国もその例外ではない。これまでわが国ではトリコテセン系

カビ毒のうちタイプ B に分類される deoxynivalenol (DON) と nivalenol (NIV) の産生菌の存在が広く認知され、実際にその残留も認められることが報告されている¹⁾。しかし、今後はわが国でも欧州等で検出され衛生上問題とされているタイプ A に分類されるトリコテセン系カビ毒である T-2 toxin (T-2) と HT-2 toxin (HT-2) による汚染の可能性は、昨今の異常気象の観点から否定できないと考えられる。さらに、これら両毒素はタイプ B と比較してその毒性が高いと考えられていることを考慮すると、今後タイプ A 汚染に対する対策を講じることは食品衛生上喫緊の検討課題の1つと言える。

本研究では、タイプ A に分類されるトリコテセン系カビ毒である T-2 と HT-2 について、その毒性を自然免疫系に対する影響の観点から検討を加えた。免疫毒性をその特徴の1つとするトリコテセン系カビ毒については、タイプ B おい

て自然免疫系を構成する Toll-like receptor 4 (TLR4) シグナルを抑制する可能性がある事が報告されている²⁾。この報告に基づき、今回 T-2 と HT-2 の毒性を検討した。

なお、TLR4 の下流には 2 経路が存在し、それぞれ MyD88 依存・非依存経路と称されるが、本研究では NF- κ B の活性化レベルを MyD88 依存経路の、IFN- β プロモーターの活性化レベルを MyD88 非依存経路のメルクマールとして用いた。

B. 研究方法

【細胞培養・各種試料の調製】

●RAW264 細胞

マウスマクロファージ RAW264 細胞 (Riken Cell Bank, Tsukuba, Japan) は、10%非働化仔ウシ血清 : Fetal Bovine Serum (以後 FBS と略記:Filtron, Brooklyn 3025, Australia; Batch No.19397) 、ペニシリン・ストレプトマイシン (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (以後 DMEM と略記:Gibco, Grand Island, NY, USA) にて培養することをその条件とした。また培養には 75 cm² の組織培養フラスコ (Techno Plastic Products, Zurich, Switzerland) を用いて 37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。なお、ホタルルシフェラーゼ遺伝子の upstream に IFN- β プロモーターを有するプラスミドを安定的にトランスフェクトされた IFN- β /RAW264、ならびにホタルルシフェラーゼ遺伝子の upstream に NF- κ B 依存性プロモーター領域を有するプラスミドを安定的にトランスフェクトされた ELAM/RAW264 は、上記の条件加えて 1 mg/ml の G418 二硫酸塩 (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を添加した培地を用いて培養を行っている。

●T-2, HT-2 の調製

T-2, HT-2 (Wako, Osaka, Japan) は、減衰を防ぐためにアセトニトリル (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) に溶解し、最終濃度をそれぞれ T-2 が 10 μ g/ml、HT-2 が 1 μ g/ml となるように調製し、-30°C で保存した。実験に使用

する際は、窒素ガスを用いて濃縮乾固し、DMEM 培地に溶解し使用した。

●lipopolisaccharide (LPS) の調製

Escherichia coli 0111:B4 株由来 LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) は注射用水に溶解し、使用前にソニケーションを行った。

【RAW264 における IFN- β プロモーターおよび NF- κ B 依存性レポーター活性の測定】

●ルシフェラーゼアッセイ

IFN- β /RAW264 細胞、または ELAM/RAW264 細胞を、12 well plate (Techno Plastic Products, Zurich, Switzerland) に 3-5 \times 10⁵ cells/ml で撻種し、37°C、5% CO₂ 条件下で一晩インキュベートした。

インキュベート後、上清を除去し、LPS 100 ng/ml 存在下、T-2 (10, 20, 40, 80 ng/ml)、または HT-2 (1.0, 2.0, 4.0, 8.0 ng/ml)、を含む DMEM にて培養を継続した。6 時間後に培養液を除去、その後、Phosphate buffered saline で洗浄した。Passive Lysis Buffer (Promega, Madison, WI, USA) を 250 μ l/well で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、on ice と vortex をそれぞれ 30 sec、計 10 分処理後、4°C、4,000 rpm、5 分遠心を行い、上清を試料として用いた。

試料 5.0 μ l を 96-well flat bottom white polystyrene plate (Corning Costar, Kennebunk, ME, USA) に添加し、基質には Luciferase Assay Reagent II (Promega, Madison, WI, USA) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。測定にはマルチプレートリーダー Tristar LB 941 (Berthold Technologies, Germany) を用いた。なお、測定結果はタンパク質量で補正した。

C. 研究結果

【RAW264 における LPS 誘導性 IFN- β レポーター活性におよぼす T-2 および HT-2 の影響】

RAW264 における TLR4 シグナリングに与える T-2 または HT-2 の影響を、IFN- β プロモータ

一活性を指標に検討した。その結果、LPS 誘導性 IFN- β プロモーターレポーター活性に対して T-2 は 10 ng/ml から 80 ng/ml では濃度依存的な抑制効果を示した (Fig. 1)。80 ng/ml の T-2 濃存在下では、LPS 単独刺激時のレポーター活性と比較し、およそ 10 分の 1 にまで抑制されていた。HT-2 においても、1.0 ng/ml から 8.0 ng/ml の濃度範囲において、LPS 誘導性 IFN- β プロモーターレポーター活性に対して濃度依存的な抑制効果が認められた (Fig. 2)。以上の結果から、T-2、HT-2 は共に TLR4 の MyD88 非依存経路を阻害することが示唆された。

【RAW264 における LPS 誘導性 NF- κ B 依存性レポーター活性におよぼす T-2 および HT-2 の影響】

ELAM/264 細胞を用いて、TLR4 を介する転写因子 NF- κ B の活性化に対する T-2 および HT-2 の作用を検討した。その結果、LPS 誘導性 NF- κ B 依存性レポーター活性は、T-2、HT-2 とともに抑制効果を示したものの、IFN- β プロモーターレポーター活性に対して認められた顕著な濃度依存的抑制効果は見られなかった (Fig. 3, Fig. 4)。NF- κ B の TLR4 による活性化は MyD88 依存経路が主要な経路と考えられている。従って、TLR4 の MyD88 依存経路に対する阻害作用は両毒素とも限定的であることが示唆された。

D. 考察

今回、LPS 誘導性 TLR4 シグナリングに対する T-2 および HT-2 影響をマウスマクロファージ様細胞にて検討をした。その結果、両毒素とも TLR4 シグナルの下流に存在する 2 経路を阻害することが明らかとなった。この結果は、これまでに報告されてきたトリコテセン系カビ毒のタイプ B に相当する DON と NIV と類似する²⁾。従って、トリコテセン系カビ毒のタイプ A および B はともに TLR4 シグナルに対して抑制的に作用する可能性が示唆された。このことは、トリコテセン系カビ毒の毒性の特徴として挙げられる免疫毒性、特に易感染性を合理的に説明する 1 つの証左ともいえる。但し、その毒性レベルは各毒素間で異なることが推測された。今回

明らかとなった T-2 と HT-2 の LPS 誘導性 IFN- β レポーター活性に対する抑制作用は、これまでに報告されている DON と NIV の濃度と比較し 1/10 以下の濃度で認められている²⁾。

これは、タイプ B と比較してタイプ A の毒性が強いとのこれまでの報告と一致する。また本研究では、HT-2 が T2 と比較してより強い TLR4 シグナリング抑制作用を示している。T-2 は摂取された場合、代謝過程で HT-2 に変換されることが知られている。従って、T-2 と HT-2 のリスクアナリシスにおいては、HT-2 が示す毒性を十分考慮して検討する必要がある。但し、最終的な結論を導くには、今後様々な観点から T-2 と HT-2 の毒性試験を実施したうえで、得られた知見を重層的に検討する必要がある。

食品衛生上問題視されているタイプ A および B のトリコテセン系カビ毒は、今回用いたバイオアッセイシステムで毒性評価できることが本研究より明らかとなった。同一のプラットフォームでその毒性を比較検討できることは、それぞれの毒性プロファイルを作成するうえで必要な精緻な基礎データを提供できることが期待される。また、タイプ A および B のトリコテセン系カビ毒は MyD88 非依存経路に対して濃度依存的な阻害活性を示すことから、トリコテセン系カビ毒の免疫毒性の機序解明につながる貴重な知見が得られたことも本研究成果の 1 つと言える。

E. 結論

タイプ A トリコテセン系カビ毒の T-2 と HT-2 について、これら毒素が本研究からタイプ B と同様に LPS 誘導性 TLR4 シグナルを抑制すること、特に、その下流 MyD88 非依存経路については濃度依存的な阻害活性を有することを明らかにした。免疫毒性をその特徴の 1 つとするトリコテセン系カビ毒の毒性のプロファイルから推測した場合、今回得られた結果に矛盾はないと考えられ、またその作用点が TLR4 シグナル伝達経路の MyD88 非依存経路に存在する可能性を示唆したことは、今後のトリコテセン系カビ毒の精緻なリスクアナリシスに寄与すると考

えられる。なお、留意点としてT-2とともにHT-2の毒性についても注意を払う必要性を挙げる。本研究結果からT-2と比較してHT-2の毒性が高いことが示唆され、今後のリスクマネジメントにあたってはこの点を十分考慮する必要があると考えられる。

参考文献

- 1) 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).
- 2) 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).

F. 健康危険情報

なし

G. 研究業績

【学会発表】

- 1) 渡辺康、佐久間久子、鎌田洋一、杉山圭一、齊藤史朗、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(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回学術講演会講演要旨集 31 (2010, 9)。
- 3) 杉山圭一、石澤聡美、木下麻緒、栗袋裕二、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回学術講演会講演要旨集 19 (2011, 1)。

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

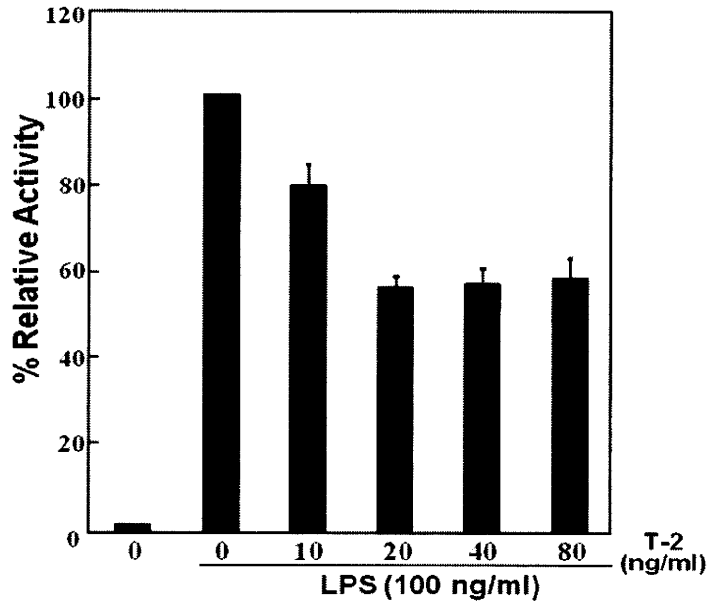


Fig. 3 Effects of T-2 on LPS-induced NF- κ B dependent reporter activity in RAW264 cells. ELAM/RAW264 cells were stimulated with T-2 (10-80 ng/ml) and LPS (100 ng/ml) for 6 h and luciferase activity was then measured. The reporter activity in response to LPS alone is expressed as 100%. Values are means \pm SEM from four independent experiments.

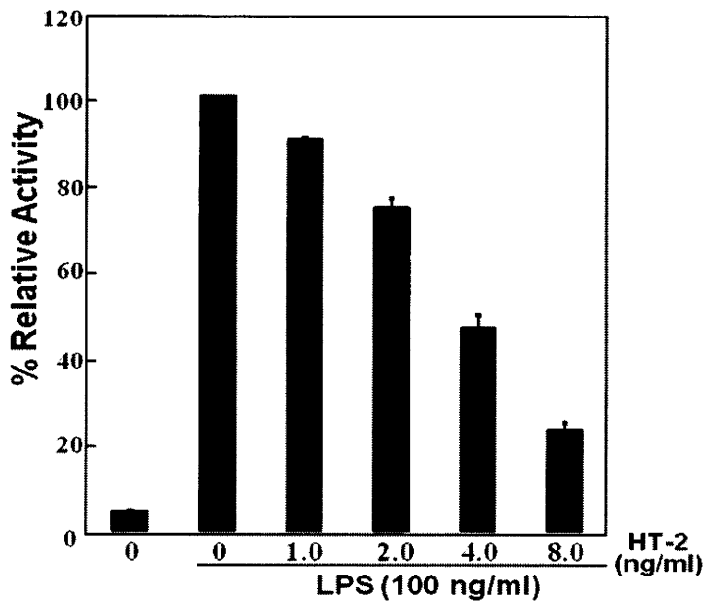


Fig. 2 Effects of HT-2 on LPS-induced IFN- β reporter activity in RAW264 cells. IFN- β /RAW264 cells were stimulated with HT-2 (1.0-8.0 ng/ml) and LPS (100 ng/ml) for 6 h and luciferase activity was then measured. The reporter activity in response to LPS alone is expressed as 100%. Values are means \pm SEM from four independent experiments.