

201033056A

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

かび毒の毒性評価法およびデトキシケーションに  
関する研究

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 杉山圭一

平成 23 年 (2011) 年 3 月

## 目 次

<b>I.</b>	<b>総括研究報告</b>	
	かび毒の毒性評価法およびデトキシケーションに関する研究（総括）-----	<b>3</b>
	杉山圭一（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）	
<b>II.</b>	<b>分担研究報告</b>	
	ヒトマクロファージ様細胞における TLR4 シグナルに対する Aflatoxin M1 および Zearalenone の影響に関する研究 -----	<b>16</b>
	杉山圭一（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）	
	ヒトマクロファージ様細胞における TLR4 シグナルに対する Deoxynivalenol および Nivalenol の影響に関する研究-----	<b>27</b>
	杉山圭一（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）	
	ヒトマクロファージ様細胞における TLR4 シグナルに対する T-2 toxin および HT-2 toxin の影響に関する研究-----	<b>38</b>
	杉山圭一（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）	
<b>III.</b>	<b>研究成果の刊行に関する一覧表</b> -----	<b>48</b>
<b>IV.</b>	<b>研究成果の刊行物</b> -----	<b>50</b>

## I. 総括研究報告書

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)

かび毒の毒性評価法およびデトキシケーションに関する研究

総括研究報告書

研究代表者 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:本研究では平成22年度においてかび毒の毒性評価法について焦点をあて研究を実施した。かび毒については、乳幼児への影響が危惧されるかび毒に留意し、Aflatoxin M1 (AFM1)、Zearalenone (ZEN)、さらにトリコテセン系かび毒である Deoxynivalenol (DON)、Nivalenol (NIV)、T-2 toxin (T-2)、HT-2 toxin (HT-2) の毒性評価を試みた。これらの毒素の汚染対象は、AFM1 は牛乳をその他は穀類であるため乳幼児への影響も懸念されている。これらかび毒の毒性を、感染防御に関与する自然免疫系を活性化させる Toll-like receptor 4 (TLR4) をメルクマールに評価を試みた。自然免疫系は上述の役割のみならず、獲得免疫の成立にも関与することが近年の研究から指摘されつつあり、同免疫系への影響を指標に毒性を評価することは、免疫系の発達過程にある乳幼児期への影響についても貴重な知見が得られると考えられる。本研究ではより精緻にこれらかび毒のリスク評価を行うことを目的に、マウス由来マクロファージ様細胞からヒト由来マクロファージ様細胞に評価系のプラットフォームを変更している。その結果、本研究よりトリコテセン系かび毒については両細胞間で顕著な相違は認められず、同かび毒が TLR4 のアゴニストである Lipopolisaccharide により誘導されるシグナルを濃度依存的に抑制する作用を示すことが明らかとなった。一方、AFM1 については TLR4 シグナルの抑制作用は認められたものの濃度依存性は観察されず、その影響については、より多角的な検討を有すと考えられた。ZEN については本アッセイ系からは明確な毒性は認められなかった。本研究から少なくとも DON、NIV、T-2 および HT-2 という食品衛生上問題とされるトリコテセン系かび毒については、今回構築した評価系はリスクプロファイルの提供に用いるプラットフォームとしてのポテンシャルを有すと結論づけられる。なお、今回の研究から、T-2 と比較して同毒素の生体内代謝産物でもある HT-2 においてより強い TLR4 シグナル抑制作用が認められたことから、T-2 の毒性については HT-2 が示す毒性を考慮してリスクアナリシスを行うことも必要と考えられた。

## A. 研究目的

食品の安心・安全を確保するうえで、他の化学物質と異なり非人為的に起こりうるかび毒汚染の対策は人類の宿願的課題の1つといえる。特に乳幼児は成人よりもその体重比から考えてもその感受性が高く、EUでは1991年以降、乳幼児用食品へのかび毒の汚染には新たな項目を立てたうえで、より低い規制値の設定を行うなど特段の配慮を示している。本研究では、成育過程にあるため、より低濃度のかび毒の暴露により毒性が発現する可能性の高い乳幼児を念頭に、まずは乳幼児が摂取する可能性がある各種かび毒の毒性データの集積を図った。具体的には、本年度は申請者が確立させたマウスマクロファージ様細胞を用いた Type B トリコテセン系かび毒に分類される Deoxynivalenol (DON) と Nivalenol (NIV) の自然免疫系への毒性の評価法をヒト由来細胞に置換することにより、より精緻な毒性評価法の構築を目指し研究を行った。また、免疫毒性を有し粉ミルク等の乳製品への混入が強く懸念されている Aflatoxin M1 (AFM1)、さらには多くの穀類を汚染すると Zearalenone (ZEN) についても免疫毒性の報告があることから同法でのかび毒の毒性評価を実施した。また、DON 以外のトリ

コテセン系かび毒としてその汚染が食品衛生上問題視されている Type A トリコテセン系かび毒に分類される T-2 toxin (T-2) および HT-2 toxin (HT-2) についても本年度構築した上述のバイオアッセイ系を用いて毒性評価を行った。

食品の安全性は絶対的な精度が求められるが、特に乳幼児に対しては微量の汚染もその体重比から暴露量は相対的に高くなると予想される。今回初年度では、各種かび毒の免疫毒性評価について検討を行った。免疫系の確立は、感染症の罹患を防止する観点からも乳幼児期においてその成立は生育過程上重要なステップであることは論を待たない。本研究ではこの点に留意し乳幼児期に曝露される可能性を有するトリコテセン系かび毒を中心とした各種かび毒の毒性を自然免疫系への影響をメルクマールに評価できるアッセイ系の構築とそのデータに基づいたリスク評価を試みた。

今回、リスク評価を行うにあたり、ヒト由来マクロファージ様細胞を用いたアッセイ系を構築した。従って、これまでに得られたマウスマクロファージ様細胞で得られた結果を比較検討が可能となるだけでなく、種特異性に起因する差異の有無についても議論できる基礎的知見の集積できると期待

される。なお、本研究では、各かび毒の影響を Toll-like receptor 4 (TLR4) のシグナル伝達経路に対する作用を指標として検討した。TLR4 は他の TLR と異なり下流に複数の経路を介してシグナルを伝達している。複数経路に対する作用を検知できる可能性を有している自然免疫系を活性化する TLR4 シグナルは、本研究の目的である自然免疫系全般への影響を検討するにあたり好適と考えられる。

## B. 研究方法

ヒトマクロファージ様細胞における TLR4 シグナルに対する AFM1 および ZEN の影響に関する研究

ヒト単球由来 THP-1 細胞は  $1 \times 10^6$  cells/well となるように 1 ml/well を 12-well plate に播種し、0.1  $\mu$ g/ml phorbol myristate acetate (Sigma) および 0.1  $\mu$ M 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  $\mu$ l に pcELAM-L を 0.5  $\mu$ g 相当を添加後 6.0  $\mu$ l 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  $^{\circ}$ C、

5% CO<sub>2</sub> 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、それぞれのかび毒存在下で培養した。

AFM1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) および ZEN (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 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-30 $^{\circ}$ C で保存した。添加前に窒素ガスにて濃縮乾固し、DMEM 培地に溶解し使用した。

*Escherichia coli* 0111:B4 株由来 LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) は注射用水に溶解し 4 $^{\circ}$ C で保存した。使用前にソニケーションを行った。

### 【NF- $\kappa$ B 依存性レポーター活性の測定】

マクロファージ様に分化させた THP-1 細胞の上清を除去し、LPS 100 ng/ml 存在下、AFM1 (1.0, 10, 100, 1,000 ng/ml) 、または ZEN (1.25, 2.5, 5.0, 10 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、PBS で洗浄した。Passive Lysis Buffer (Promega, Madison, WI, USA) を 50  $\mu$ l/well を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  $\mu$ l を 96-well flat bottom white polystyrene plate (Coring 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。

#### ヒトマクロファージ様細胞における TLR4 シグナルに対する DON および NIV の影響に関する研究

細胞培養方法については、ヒトマクロファージ様細胞における TLR4 シグナルに対する AFM1 および ZEN の影響に関する研究と同様である。

DON (Wako, Osaka, Japan) および NIV (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 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-30°C で保存した。添加前に窒素ガスにて濃縮乾固し、DMEM 培地に溶解し使用した。

*Escherichia coli* 0111:B4 株由来 LPS

(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) は注射用水に溶解し 4°C で保存した。使用前にソニケーションを行った。

#### 【NF- $\kappa$ B 依存性レポーター活性の測定】

マクロファージ様に分化させた THP-1 細胞の上清を除去し、LPS 100 ng/ml 存在下、DON (125, 250, 500, 1,000 ng/ml)、または NIV (125, 250, 500, 1,000 ng/ml) を含む DMEM にて培養を継続した。測定方法は、「ヒトマクロファージ様細胞における TLR4 シグナルに対する AFM1 および ZEN の影響に関する研究」におけるプロトコールに準じた。

#### ヒトマクロファージ様細胞における TLR4 シグナルに対する T-2 および HT-2 の影響に関する研究

細胞培養方法については、ヒトマクロファージ様細胞における TLR4 シグナルに対する AFM1 および ZEN の影響に関する研究と同様である。

T-2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) および HT-2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 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-30°C で保存した。添加前に窒素ガスにて濃縮乾固し、DMEM 培地に溶解し使用

した。

*Escherichia coli* 0111:B4 株由来 LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) は注射用水に溶解し 4°C で保存した。使用前にソニケーションを行った。

#### 【NF-κB 依存性レポーター活性の測定】

マクロファージ様に分化させた THP-1 細胞の上清を除去し、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。測定方法は、「ヒトマクロファージ様細胞における TLR4 シグナルに対する AFM1 および ZEN の影響に関する研究」におけるプロトコールに準じた。

### C. 研究成果

#### ヒトマクロファージ様細胞における TLR4 シグナルに対する AFM1 および ZEN の影響に関する研究

ヒト単球由来 THP-1 細胞をマクロファージ様細胞に分化させたのち、同細胞を用いて LPS 誘導性 NF-κB の活性化に及ぼす AFM1 の影響を NF-κB 依存性レポーター活性化に対する作用を指標に検討した。LPS 単独刺激により NF-κB 依存性レポーター活性はコントロールと比較し、20 倍以上の上昇を認めた。本条件下において、AFM1

による LPS 誘導性 NF-κB 依存性レポーター活性への影響を検討したところ、同活性は検討したいずれの濃度(1.0, 10, 100, 1,000 ng/ml)においても抑制作用を示すことが明らかとなった。但し、その効果に濃度依存性は認められなかった。

一方、ZEN 存在下での LPS 誘導性 NF-κB 依存性レポーター活性への影響については 1.25 および 5.0 ng/ml の ZEN 存在下において LPS 誘導性 NF-κB 依存性レポーター活性を抑制する傾向は認められるものの、その他の濃度においては顕著な作用は認められなかった。

#### ヒトマクロファージ様細胞における TLR4 シグナルに対する DON および NIV の影響に関する研究

ヒト単球由来 THP-1 細胞をマクロファージ様細胞に分化させたのち、同細胞を用いて LPS 誘導性 NF-κB の活性化に及ぼす DON の影響を NF-κB 依存性レポーター活性化に対する作用を指標に検討した。LPS 単独刺激により NF-κB 依存性レポーター活性はコントロールと比較し、20 倍以上の上昇を認めた。本条件下において、DON による TLR4 を介した LPS 誘導性 NF-κB 依存性レポーター活性への影響を検討したとこ



ろ、濃度依存的な抑制作用を示すことが明らかとなった。また、その作用は今回検討した最も低い濃度となる 125 ng/ml においても顕著に認められ LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B の活性化を約 50%にまで阻害する作用を示した。

一方、NIV 存在下での LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B 依存性レポーター活性への影響についても DON と同様に同毒素の濃度依存的な LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B 依存性レポーター活性の抑制作用が確認された。

ヒトマクロファージ様細胞における TLR4 シグナルに対する T-2 および HT-2 の影響に関する研究

ヒト単球由来 THP-1 細胞をマクロファージ様細胞に分化させたのち、同細胞を用いて LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B の活性化に及ぼす T-2 の影響を NF- $\kappa$ B 依存性レポーター活性化に対する作用を指標に検討した。LPS 単独刺激により NF- $\kappa$ B 依存性レポーター活性はコントロールと比較し、10 倍以上の上昇を認めた。本条件下において、T-2 による TLR4 を介した LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B 依存性レポーター活性への影響を検討したところ、濃度依存的な抑制作用を示すことが明らかとなった。また、その作用は今回検討した

最も低い濃度となる 10 ng/ml においても顕著に認められ、LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B の活性化を約 50%にまで阻害する作用を示した。

同様に、HT-2 存在下での LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B 依存性レポーター活性への影響についても T-2 と同様に同毒素の濃度依存的な LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B 依存性レポーター活性の抑制作用が確認された。但しその効果は T-2 と比較してより低い濃度 ((1.0, 2.0, 4.0, 8.0 ng/ml)) で確認された。

#### D. 考察

ヒトマクロファージ様細胞における TLR4 シグナルに対する AFM1 および ZEN の影響に関する研究

ヒトマクロファージ様細胞 THP-1 を用いた LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B に及ぼす AFM1 と ZEN の影響について検討した。今回検討した AFM1 濃度において、LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B の活性化が抑制される可能性が示唆された。この TLR4 シグナル抑制作用は濃度依存性が今回の研究結果からは認められていない。また、その抑制作用は 1,000 ng/ml の AFM1 濃度においても約 50%の抑制効果に留まった。この事実は、TLR4 から転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化に至る経路において AFM1 が抑制的に作用する分子が存在する可能性

は推測されるが、同分子の TLR4 シグナル伝達経路における機能は間接的である可能性を示唆する。また、今回得られた結果は AFB1 についても認められる可能性があり、今後この確認を含め作用機序の解明が進めばアフラトキシン群の免疫毒性の機序について貴重な知見が得られる可能性がある。

同様に、LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B に及ぼす ZEN の作用については、今回のアッセイ結果からは明確な作用について言及することは困難と考えられる結果となった。ZEN はその構造式から女性ホルモンのエストロゲンとの類似性が指摘されている。故に ZEN の毒性発現メカニズムとしてエストロゲン受容体を介した内分泌かく乱作用が指摘されている。マウスマクロファージ様細胞 RAW264 を用いた内分泌かく乱作用に関する研究報告の存在は、マクロファージ様細胞においてもエストロゲン受容体を介したシグナルが惹起されている可能性を示唆している。従って、エストロゲン受容体を介し ZEN により THP-1 細胞内において内分泌かく乱作用が生じている可能性が考えられるが、同作用は少なくとも LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B の活性化には影響を与えないことが示唆された。但し、今回の結果からのみで ZEN の自然免疫系に対する免疫毒性につ

いて結論付けることは困難であり、獲得免疫系への影響も視野にさらに検討を加える必要性はあると考えられる。

#### ヒトマクロファージ様細胞における TLR4 シグナルに対する DON および NIV の影響に関する研究

ヒトマクロファージ様細胞 THP-1 を用いた LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B に及ぼす DON と NIV の影響について検討した。今回、DON と NIV は両毒素とも LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B の活性化を濃度依存的に抑制することが明らかとなった。今回認められた抑制作用は DON と NIV ともに 125 ng/ml においても約 50% の抑制作用を示し、1,000 ng/ml 存在下においてはコントロールと同レベルにまで LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B の活性化を阻害するというレベルであった。今回得られた結果は、TLR4 から転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化に至る経路において DON と NIV が抑制的に作用する分子が存在する可能性を推測させる。既に、マウスマクロファージにおいては、この機序について他の TLR レセプターについても同様の作用が確認されていることから、各種 TLR シグナル伝達に共有される分子に対して阻害的に作用している可能性が考えられている。しかも、この作用はマ

ウスとヒト両種で認められることから、種間で相同性が高い分子もしくは分子内モチーフにその作用点が存在することが示唆される。今後作用機序の解明が進めば、DONとNIVにより誘発される免疫毒性について貴重な知見が得られる可能性がある。

これまでに、マウスにおいてDONとNIVの自然免疫系に及ぼす影響については先行的に研究がなされてきた。今回、ヒトにおいても同様の毒性が認められることを初めて明らかにした。加えて、今回得られた毒性プロファイルは、これまでにマウスで認められた毒性プロファイルと比較して、EC50がより低濃度となる可能性が推測されるものであった。マウス由来のマクロファージ様細胞で得られた毒性よりヒト由来同細胞で認められた毒性がより強いことが本分担研究結果より示唆されたことにより、今後DONとNIVのリスクアセスメントを実施にあたっては、この点も留意する必要性があると考えられる。

#### ヒトマクロファージ様細胞における TLR4 シグナルに対する T-2 および HT-2 の影響に関する研究

ヒトマクロファージ様細胞 THP-1 を用いて LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B に及ぼす T-2 と HT-2

の影響について検討した。今回、T-2 と HT-2 の両毒素とも LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B の活性化を濃度依存的に抑制することが明らかとなった。今回認められた作用は、T-2 においては 10 ng/ml 存在下において LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B の活性化を約 50% に、HT-2 においては 1.0 ng/ml においても同活性化に対して顕著な抑制作用を示すレベルの阻害効果であった。

今回得られた結果は、TLR4 から転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化に至る経路において T-2 ならびに HT-2 が抑制的に作用するシグナル伝達分子が存在することを示唆する。TLR4 シグナルに対する阻害作用は、本研究から、トリコテセン系かび毒の Type A および B とともに確認されたこととなる。従って、少なくとも THP-1 細胞に対してはトリコテセン系かび毒の Type A および B は TLR4 シグナル伝達系をともに抑制することが強く示唆された。このことは、これらかび毒に汚染された食品を摂取した場合、正常な免疫応答が誘導されないことが危惧されるため、感染症等に罹患する危険性が高まることが予想される。また、今回得られたデータから、これまでに指摘されていたとおり、Type A においてより低濃度で毒性が認められる可能性が示された。加えて、

HT-2 と T-2 において TLR4 シグナルに対する阻害作用が HT-2 で約 10 倍高いことが示された事は、即ち、今後 Type A におけるトリコセン系かび毒のリスクアセスメントを行うにあたり、HT-2 の毒性について十分留意する必要性を示している。つまり T-2 が生体内で HT-2 に代謝されることを考慮した場合、少なくとも TLR4 シグナルに対する毒性を基準にそのリスクアナリシスする場合には、HT-2 の毒性を基準に T-2 の毒性も評価する必要性があると言える。

## E. 結論

厚生労働科学研究費補助金研究事業の食品の安心・安全確保推進研究事業において実施した「かび毒の毒性評価法およびデトキシケーションに関する研究」では、本年度はかび毒の毒性評価について研究を実施した。乳幼児も摂取する可能性のあるかび毒として ZEN、AFM1、さらにはトリコセン系かび毒である DON、NIV、T-2 および HT-2 についてその毒性について自然免疫系への影響の観点から検討を行った。今回選択したかび毒は穀類への汚染が認められるものであり、また、AFM1 については粉ミルクの原料ともなる乳牛から産生される原乳を汚染するかび毒でありその影響に

については多角的に検討される必要があるかび毒と言える。自然免疫系の役割として感染防御が挙げられるが、この点も成人はもちろん乳幼児においてはその罹患率の高さが危惧されているため、同免疫系への影響を解析することは厚生労働行政の観点から、重要な課題とも考えられる。

本研究において得られたデータは、自然免疫系のなかでも特にそのシグナル伝達系の解析が進み同免疫系の研究の発端ともなったといえる TLR4 シグナルへの影響を指標として用いている。TLR4 シグナルは他の TLR シグナルと異なり、下流に 2 経路を有するという特徴を持つ。本研究では自然免疫系への影響についてより多面的に検討することが望まれることから、複数経路を有する TLR4 のシグナル伝達経路をモデル系としたことは本研究目的に合致していると考えられる。

得られたデータから、少なくともトリコセン系かび毒は自然免疫系をかく乱する可能性を有することが明らかとなった。これまでに得られたマウス由来の細胞株を用いた実験系で得られたデータと、今回明らかとなったヒト由来の細胞株で得られた知見との間に明確な類似点が認められることも付記しておく。また、同かび毒において

Type A と Type B との間でのこれまで考えられてきた毒性レベル（毒性評価においては、Type B と比較し Type A の毒性が強いと推定されている）についても本アッセイ系で確認された。この事実は、本アッセイ系がトリコテセン系かび毒の毒性評価系に利用可能であることを示唆している。

一方、AFM1 については今回濃度依存的な作用を認めるには至らなかった。この点については、実験系のブラッシュアップによる毒性評価系の改善が必要と言えよう。

#### 参考資料

Shimomura-Shimizu, M., Sugiyama, K., Muroi, M. and Tanamoto, K: Alacholr and carbaryl suppress lipopolysaccharide-induced iNOS expression by differentially inhibiting NF- $\kappa$ B activation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332, 793-799 (2005).

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).

Sugiyama, K., Muroi, M. and Tanamoto, K: A

novel TLR4-binding peptide that inhibits LPS-induced activation of NF- $\kappa$ B and in vivo toxicity, *Eur. J. Pharmacol.* 594, 152-156 (2008).

Sugiyama, K., Hiraoka, H. and Sugita-Konishi, Y: Aflatoxin M<sub>1</sub> contamination in raw bulk milk and the presence of aflatoxin B<sub>1</sub> in corn supplied to dairy cattle in Japan, *J. Food Hyg. Soc. Japan* 49, 352-355 (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).

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).

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).

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).

Sugiyama, K., Kawakami, H., Kamata, Y. and Sugita-Konishi, Y: Effect of a combination of deoxynivalenol and nivalenol on lipopolisaccharide-induced nitric oxide production by mouse macrophages, *Mycotoxin Res.* 27, 57-62 (2011).

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) .

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) .

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) .

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 47<sup>th</sup> SOT meeting) , *Mycotoxins.* 58, 155-157 (2008) .

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) .

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) .

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, 350-352 (2009) .

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) .

Mycotoxin Conference MycoRed 2010,  
190 (2010, 12) .

## F. 研究業績

### 【原著論文】

1. Sugiyama, K., Kawakami, H., Kamata, Y.  
and Sugita-Konishi, Y: Effect of a  
combination of deoxynivalenol and  
nivalenol on lipopolisaccharide-induced  
nitric oxide production by mouse  
macrophages, *Mycotoxin Res.* **27**, 57-62  
(2011).

### 【学会発表】

1. Sugita-Konishi, Y., Koyama, D., Kadota,  
T., Itoh, S., Sugiyama, K., Tamura, C.,  
Nishijima, M. and Kamata, Y: Suppressive  
Effect of Pectin Gelation on Absorption of  
Deoxynivalenol in Mice, 49<sup>th</sup> Society of  
Toxicology (2010, 3).
2. Sugiyama, K., Kinoshita, M., Kamata, Y.,  
Minai, Y. and Sugita-Konishi, Y: Studies  
of protective effects of green tea  
catechins against cytotoxicity induced  
by trichothecene mycotoxins in mouse  
cultural macrophages, International

3. 杉山圭一、木下麻緒、薬袋裕二、室井正  
志、棚元憲一、小西良子:トリコテセン系  
マイコトキシン類のLPS誘導性TLR4シグ  
ナルに対する抑制作用、第33回日本分  
子生物学会年会・第83回日本生化学会  
大会(2010, 12).
4. 木下麻緒、小西良子、鎌田洋一、薬袋裕  
二、石澤聡美、杉山圭一:HepG2細胞レ  
ドックス状態に対するトリコテセン系カビ毒  
の影響、日本農芸化学会大会講演要旨  
集(2011・京都) (2011, 3).

## II. 分担研究報告書



## 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)

# ヒトマクロファージ様細胞における TLR4 シグナルに対する Aflatoxin M1 および Zearalenone の影響に関する研究

## 分担研究報告書

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、Aflatoxin M1 (AFM1) および Zearalenone (ZEN) の自然免疫系におよぼす影響について、Toll-like receptor 4 (TLR4) シグナルに対する作用を指標に検討した。TLR4 のリガンドである Lipopolisaccharide (LPS) により誘導される転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化に対して、AFM1 は抑制作用を呈する可能性が示唆された。一方、ZEN 存在下における LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B の活性化については、その影響に濃度依存的な作用を認めなかった。従って本研究から、AFM1 は TLR4 シグナル伝達経路を阻害する可能性があることが、また ZEN については同経路に対しての明確な作用を有さないことが推測された。本結果は、AFM1 の毒性に関しては自然免疫系に対する影響も考慮しリスク評価を行う必要性を示している。

### A. 研究目的

現在、グローバルベースでの環境変化を伴う気象変動に対し対策を講ずる必要性がある課題のうち、食品・食料への汚染物質については、食の安全の確保の点から早急にその対策が望まれる課題の一つである。殊のほか、乳幼児が摂取する可能性のある当該物質については、より精緻な情報収集の必要性があると考えられる。成人と比較

してその低体重である点と生育期にあるという特徴は、毒性の発現の閾値の低下を容易に推測させる。事実、かび毒について EU では乳幼児における規制値を成人と比較してより厳しい数値を設定している。

乳幼児が摂取する可能性のある食品群のうち、粉ミルクはその特徴から安全性の確保については最大限配慮されるべき食品の

一つと言える。乳牛の飼料として給餌される輸入トウモロコシ等に含まれる Aflatoxin B1 (AFB1) は乳牛の体内で代謝され Aflatoxin M1 (AFM1) として原乳に分泌される (Fig. 1)。得られた原乳を原材料として製造される粉ミルク中には AFM1 の残留の可能性が懸念される。発がん性については動物実験から AFB1 と同様に AFM1 についても報告されている。但し、その毒性は AFB1 と比較して 1/10 とも言われているが、前述の乳幼児の特徴とその体重あたりの摂取量を考慮したリスクアナリシスが乳幼児には必要性と考えられる。

本研究では乳幼児期においても曝露される可能性のあるかび毒である AFM1 について、免疫系に対する影響をその獲得免疫に成立にも関与する自然免疫系への影響を指標に検討を行った。Toll-like receptor (TLR) は各種病原微生物の構成成分を認識し、感染防御に関与することが知られている。自然免疫系としてグラム陰性細菌の外膜構成成分である Lipopolisaccharide (LPS) を認識する TLR4 シグナルを指標に同シグナル伝達に対する影響を解析した。

これら AFM1 とともに今回各種穀類を汚染することが知られている Zearalenone (ZEN) についても LPS 誘導性 TLR4 シグ

ナルに対する影響を検証した (Fig. 2)。フザリウム属真菌が産生する ZEN は各種穀類に残留することが知られており、乳幼児用の食品を含む多くの食料品への汚染が懸念されている。従って、今回 LPS 誘導性 TLR4 シグナルに対する作用を ZEN についても解析することで、かび毒の毒性評価をより精緻なものとするのを試みた。

## B. 研究方法

ヒト単球由来 THP-1 細胞は  $1 \times 10^6$  cells/well となるように 1 ml/well を 12-well plate に播種し、0.1  $\mu$ g/ml phorbol myristate acetate (Sigma) および 0.1  $\mu$ M 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  $\mu$ l に pcELAM-L を 0.5  $\mu$ g 相当を添加後 6.0  $\mu$ l 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% CO<sub>2</sub> 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、それぞれのかび毒存在下で培

養した。

AFM1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) および ZEN (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 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-30°C で保存した。添加前に窒素ガスにて濃縮乾固し、DMEM 培地に溶解し使用した。

*Escherichia coli* 0111:B4 株由来 LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) は注射用水に溶解し 4°C で保存した。使用前にソニケーションを行った。

#### 【NF-κB 依存性レポーター活性の測定】

マクロファージ様に分化させた THP-1 細胞の上清を除去し、LPS 100 ng/ml 存在下、AFM1 (1.0, 10, 100, 1,000 ng/ml) 、または ZEN (1.25, 2.5, 5.0, 10 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、PBS で洗浄した。Passive Lysis Buffer (Promega, Madison, WI, USA) を 50 μl/well を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 μl を 96-well flat bottom white

polystyrene plate (Coring 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

ヒト単球由来 THP-1 細胞をマクロファージ様細胞に分化させたのち、同細胞を用いて LPS 誘導性 NF-κB の活性化に及ぼす AFM1 の影響を NF-κB 依存性レポーター活性化に対する作用を指標に検討した。LPS 単独刺激により NF-κB 依存性レポーター活性はコントロールと比較し、20 倍以上の上昇を認めた。本条件下において、AFM1 による LPS 誘導性 NF-κB 依存性レポーター活性への影響を検討したところ、同活性は検討したいずれの濃度(1.0, 10, 100, 1,000 ng/ml)においても抑制作用を示すことが明らかとなった。但し、その効果に濃度依存性は認められなかった (Fig. 3)。

一方、ZEN 存在下での LPS 誘導性 NF-κB 依存性レポーター活性への影響については 1.25 および 5.0 ng/ml の ZEN 存在下におい

て LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B 依存性レポーター活性を抑制する傾向は認められるものの、その他の濃度においては顕著な作用は認められなかった (Fig. 4)。

#### D. 考察

ヒトマクロファージ様細胞 THP-1 を用いた LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B に及ぼす AFM1 と ZEN の影響について検討した。今回検討した AFM1 濃度において、LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B の活性化が抑制される可能性が示唆された (Fig. 3)。この TLR4 シグナル抑制作用は濃度依存性が今回の研究結果からは認められていない。また、その抑制作用は 1,000 ng/ml の AFM1 濃度においても約 50% の抑制効果に留まった。この事実は、TLR4 から転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化に至る経路において AFM1 が抑制的に作用する分子が存在する可能性は推測されるが、同分子の TLR4 シグナル伝達経路における機能は間接的である可能性を示唆する。また、今回得られた結果は AFB1 についても認められる可能性があり、今後この確認を含め作用機序の解明が進めばアフラトキシン群の免疫毒性のメカニズムについて貴重な知見が得られる可能性がある。

同様に、LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B に及ぼす ZEN

の作用については、今回のアッセイ結果からは明確な作用について言及することは困難と考えられる結果となった。ZEN はその構造式から女性ホルモンのエストロゲンとの類似性が指摘されている。故に ZEN の毒性発現メカニズムとしてエストロゲン受容体を介した内分泌かく乱作用が指摘されている。マウスマクロファージ様細胞 RAW264 を用いた内分泌かく乱作用に関する研究報告の存在は、マクロファージ様細胞においてもエストロゲン受容体を介したシグナルが惹起されている可能性を示唆している。従って、エストロゲン受容体を介し ZEN により THP-1 細胞内において内分泌かく乱作用が生じている可能性が考えられるが、同作用は少なくとも LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B の活性化には影響を与えないことが示唆された。但し、今回の結果からのみで ZEN の自然免疫系に対する免疫毒性について結論付けることは困難であり、獲得免疫系への影響も視野にさらに検討を加える必要性はあると考えられる。

#### E. 結論

ヒトマクロファージ様細胞を用いて LPS により惹起される TLR4 シグナルに対する AFM1 と ZEN の影響を、同シグナルの下流