

に存在する NF- κ B の活性化を指標に検討した。その結果、AFM1 は同シグナルを阻害する可能性が認められた。従って、本研究より AFM1 は自然免疫系の抑制を介して免疫毒性を呈する可能性が示唆された。

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- κ 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- κ B and in vivo toxicity, *Eur. J. Pharmacol.* 594, 152-156 (2008).

Sugiyama, K., Hiraoka, H. and Sugita-Konishi,

Y: Aflatoxin M₁ contamination in raw bulk milk and the presence of aflatoxin B₁ in corn supplied to dairy cattle in Japan, *J. Food Hyg. Soc. Japan* 49, 352-355 (2008).

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 47th 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：麴菌と *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)。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究業績

【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, 49th Society of Toxicology (2010, 3).

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

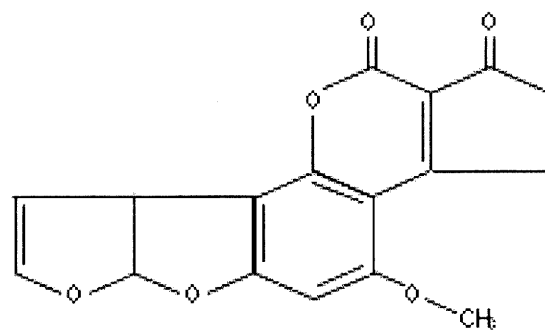


Fig. 1 Aflatoxin M1

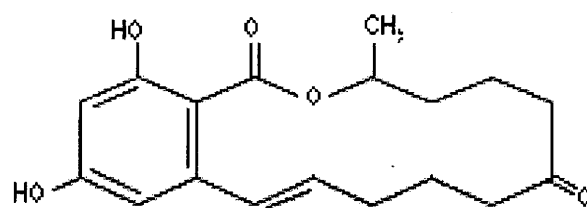


Fig. 2 Zearalenone

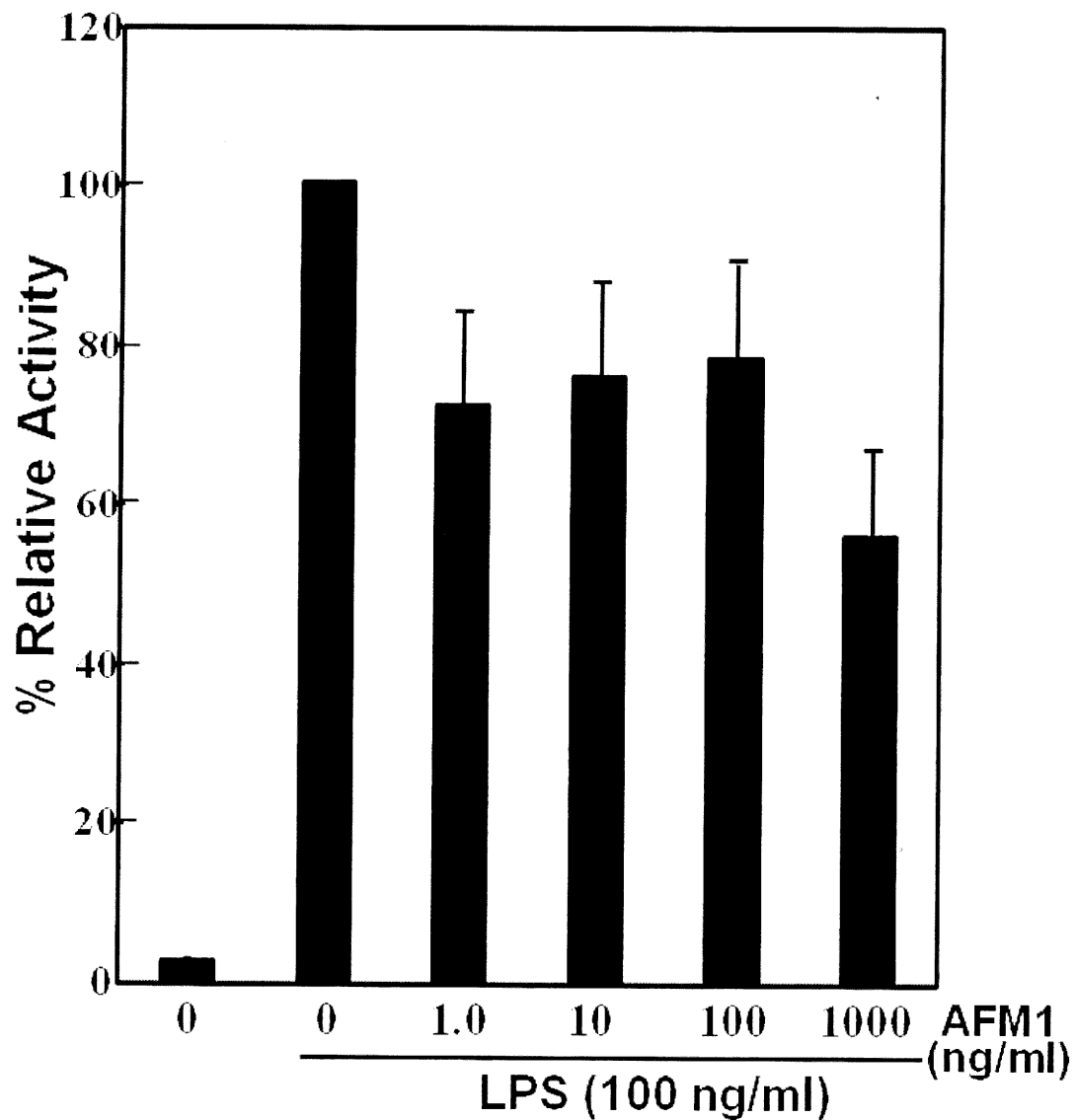


Fig. 3 Effects of AFM1 on LPS-induced NF- κ B dependent reporter activity in differentiated THP-1 cells.

Differentiated THP-1 cells were stimulated with AFM1 (1.0-1,000 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 three independent experiments.

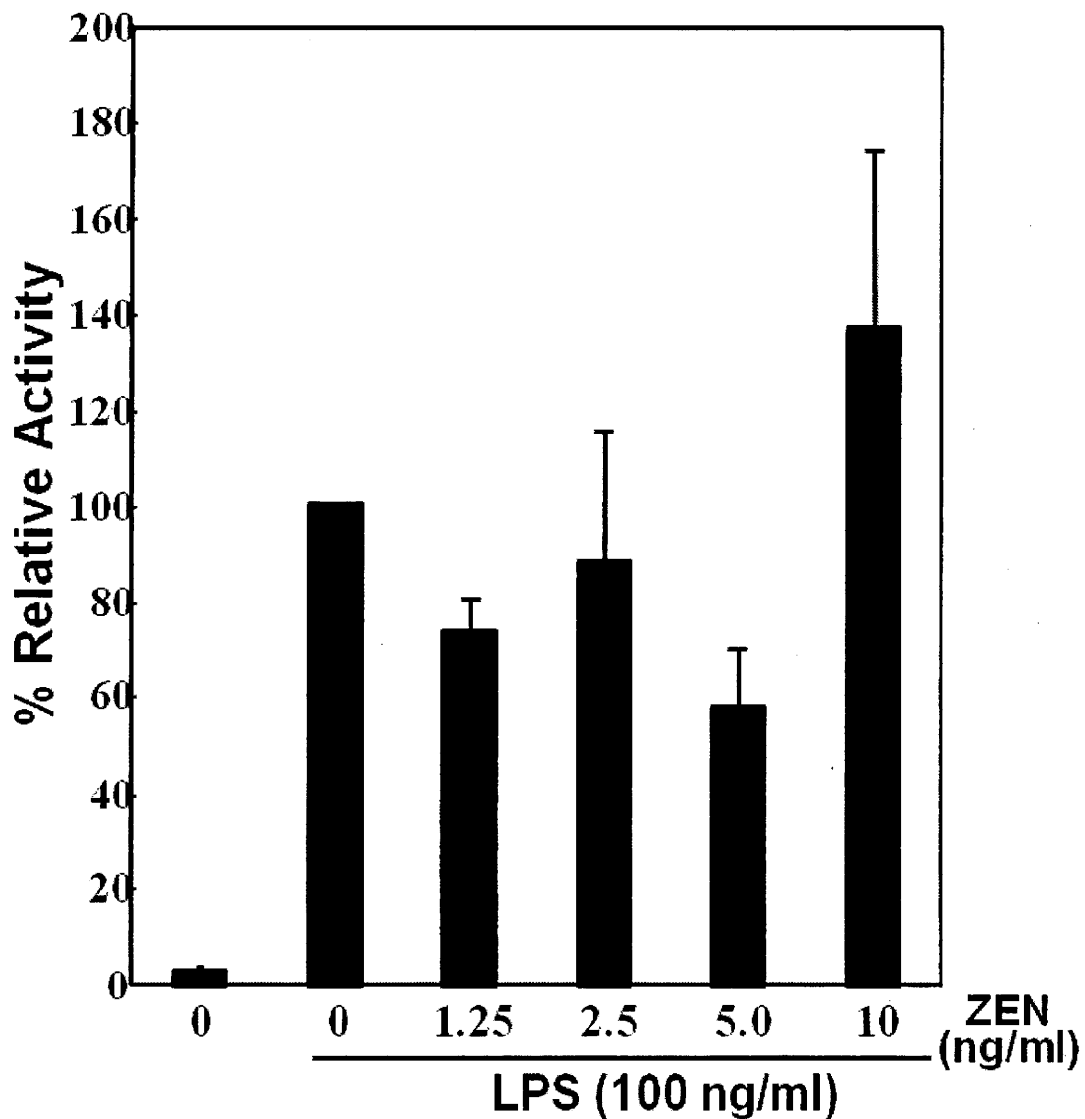


Fig. 4 Effects of ZEN on LPS-induced NF- κ B dependent reporter activity in differentiated THP-1 cells.

Differentiated THP-1 cells were stimulated with ZEN (1.25-10 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 three independent experiments.

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 Deoxynivalenol
および Nivalenol 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：フザリウム属真菌が産生するかび毒であるトリコテセン系かび毒は、小麦を含む穀類を汚染するため、食品衛生上同汚染は憂慮されており、特にその特徴でもある免疫系に対するかく乱作用については、毒性評価の観点からより正確な情報提供が待たれている。本分担研究では、マクロファージ様細胞に分化させた THP-1 細胞を用いて Type B トリコテセン系かび毒の Deoxynivalenol (DON) と Nivalenol (NIV) の Toll-like receptor 4 (TLR4) シグナルに対する影響を検討した。その結果、DON および NIV とともに Lipopolisaccharide 誘導性 TLR4 シグナルを濃度依存的に抑制することが明らかとなった。従って本研究から Type B トリコテセン系かび毒の毒性評価系の基盤として本アッセイ系が利用できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

かび毒による食品への汚染は、環境中への残留が制御できない多くの自然毒のなかでも、主食となる穀類をも汚染する可能性を有すことから、食品衛生上その毒性の正確な理解が最も求められる毒素の一つである。特に、主にフザリウム真菌が産生する二次代謝産物であるトリコテセン系かび毒

は、その汚染が小麦を含む主要な穀類にその残留が認められることから、アフラトキシンと並びかび毒のなかでも、その食品汚染による健康被害については世界的に注視されている。

トリコテセン系かび毒のうち食品衛生上問題視されているのは Type A および B である。このうち Type B の Deoxynivalenol

(DON) は世界的にその汚染が認められることから (Fig. 1)、その毒性の正確な理解および把握はトリコテセン系かび毒のなかでも極めて重要な課題と認識されている。

一方、同じく Type B に分類される Nivalenol

(NIV) については (Fig. 2)、その食品への汚染がわが国を含む東アジア地域において認められており、前述の DON と並びその毒性の正確な理解が求められている毒素である。

トリコテセン系かび毒の特徴として免疫毒性が挙げられる。動物実験においては、易感染性を呈するという報告もある。しかしこれら免疫系に対する毒性発現に至る機序については不明な点が多い。マウスマクロファージ様細胞を用いた研究において、自然免疫系に関わるグラム陰性細菌の外膜構成成分である Lipopolisaccharide (LPS) を認識する受容体である Toll-like receptor 4 (TLR4) に対してそのシグナルを DON および NIV が抑制することが最近報告された。

本研究においては、ヒトマクロファージ様細胞を用いて LPS により賦活化される TLR4 シグナリングに対する影響について検討を行った。毒性の種差の有無さらには DON および NIV の毒性をより正確に把握することがその目的である。また、同様の

結果が得られた場合には、今後 *in vivo* での評価についても検討の余地が生まれることも期待できる。

B. 研究方法

ヒト単球由来 THP-1 細胞は 1×10^6 cells/well となるように 1 ml/well を 12-well plate に播種し、0.1 μ g/ml phorbol myristate acetate (Sigma) および 0.1 μ 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 μ l に pcELAM-L を 0.5 μ g 相当を添加後 6.0 μ 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% CO₂ 条件下でトランスフェクションの為の培養を行った。トランスフェクション処理した細胞は、1 ml の PBS にて各 well を洗浄後、それぞれのかび毒存在下で培養した。

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-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、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。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 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-κB の活性化を約 50% にまで阻害する作用を示した (Fig. 3)。

一方、NIV 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も DON と同様に濃度依存的な LPS 誘導性 NF-κB 依存性レポーター活性の抑制作用が確認された (Fig. 4)。

D. 考察

本分担研究では、ヒトマクロファージ様細胞 THP-1 を用いた LPS 誘導性 NF-κB の活性化に及ぼす 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-κB 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 (Fig. 3, 4)。今回認められた抑制作用は DON と

NIV とともに 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- κ 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- κ 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、種間で相溶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。

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 DON と NIV の影響を、同シグナルの下流に存在する NF- κ B の活性化を指標に検討した。その結果、DON と NIV とともに同シグナルを阻害する可能性が認められた。従って、本研究より DON と NIV はヒトにおいても自然免疫系の抑制を介して免疫毒性を呈する可能性が強く示唆された。

参考資料

Shimomura-Shimizu, M., Sugiyama, K., Muroi, M. and Tanamoto, K: Alcohol and carbaryl suppress lipopolysaccharide-induced iNOS expression by differentially inhibiting NF- κ 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- κ B and in vivo toxicity, *Eur. J. Pharmacol.* 594, 152-156 (2008).
- Sugiyama, K., Hiraoka, H. and Sugita-Konishi, Y: Aflatoxin M₁ contamination in raw bulk milk and the presence of aflatoxin B₁ in corn supplied to dairy cattle in Japan, *J. Food Hyg. Soc. Japan* 49, 352-355 (2008).
- 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 47th 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) .

F. 健康危険情報

なし

G. 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. 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 cultured macrophages, International Mycotoxin Conference MycoRed 2010, 190 (2010, 12).

2. 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).

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

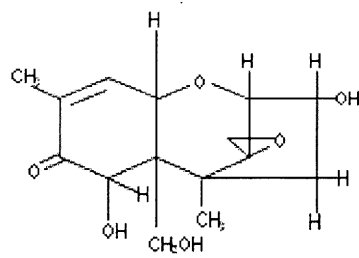


Fig. 1 Deoxynivalenol

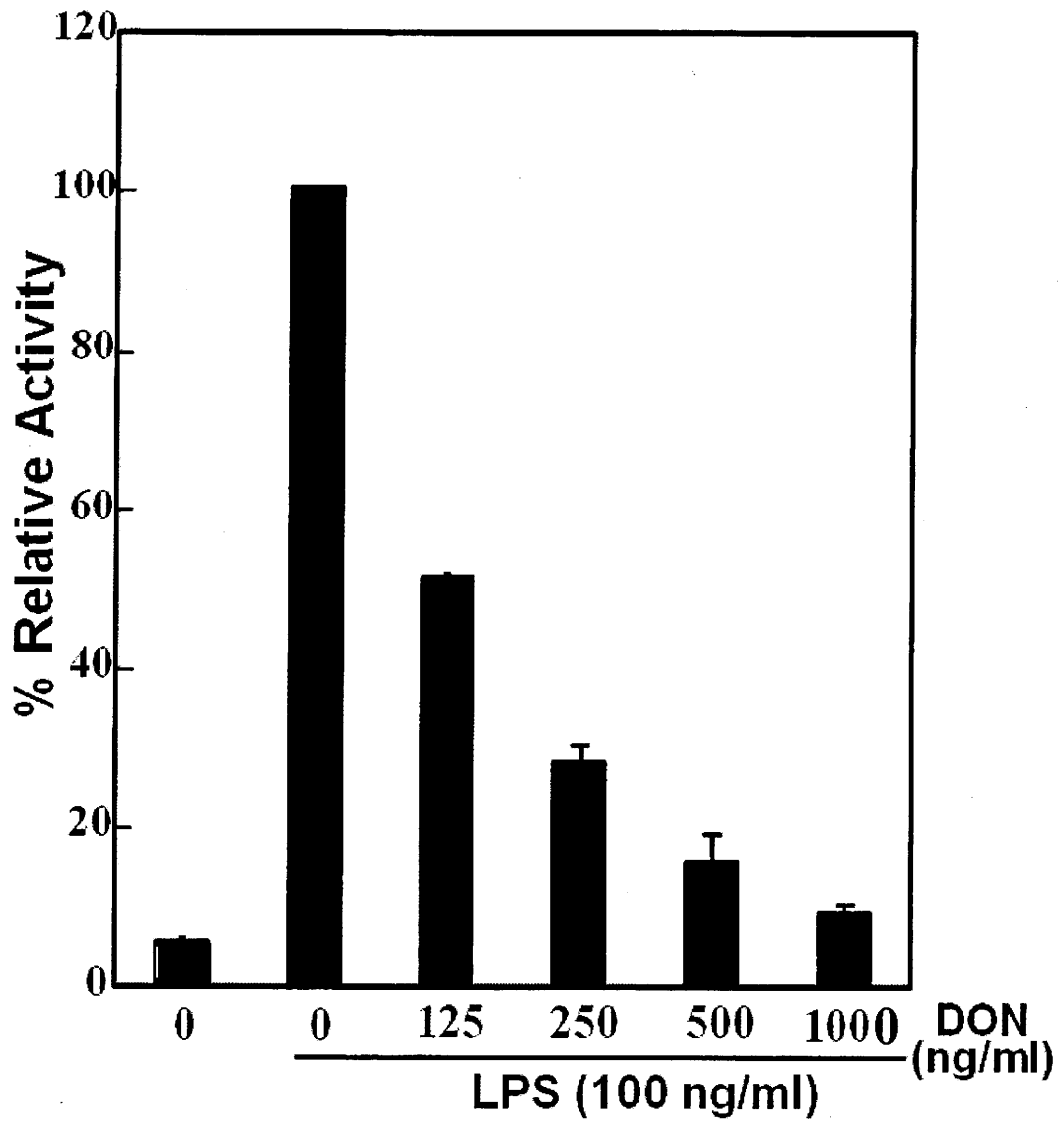


Fig. 3 Effects of DON on LPS-induced NF- κ B dependent reporter activity in differentiated THP-1 cells.

Differentiated THP-1 cells were stimulated with DON (125-1,000 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 three independent experiments.

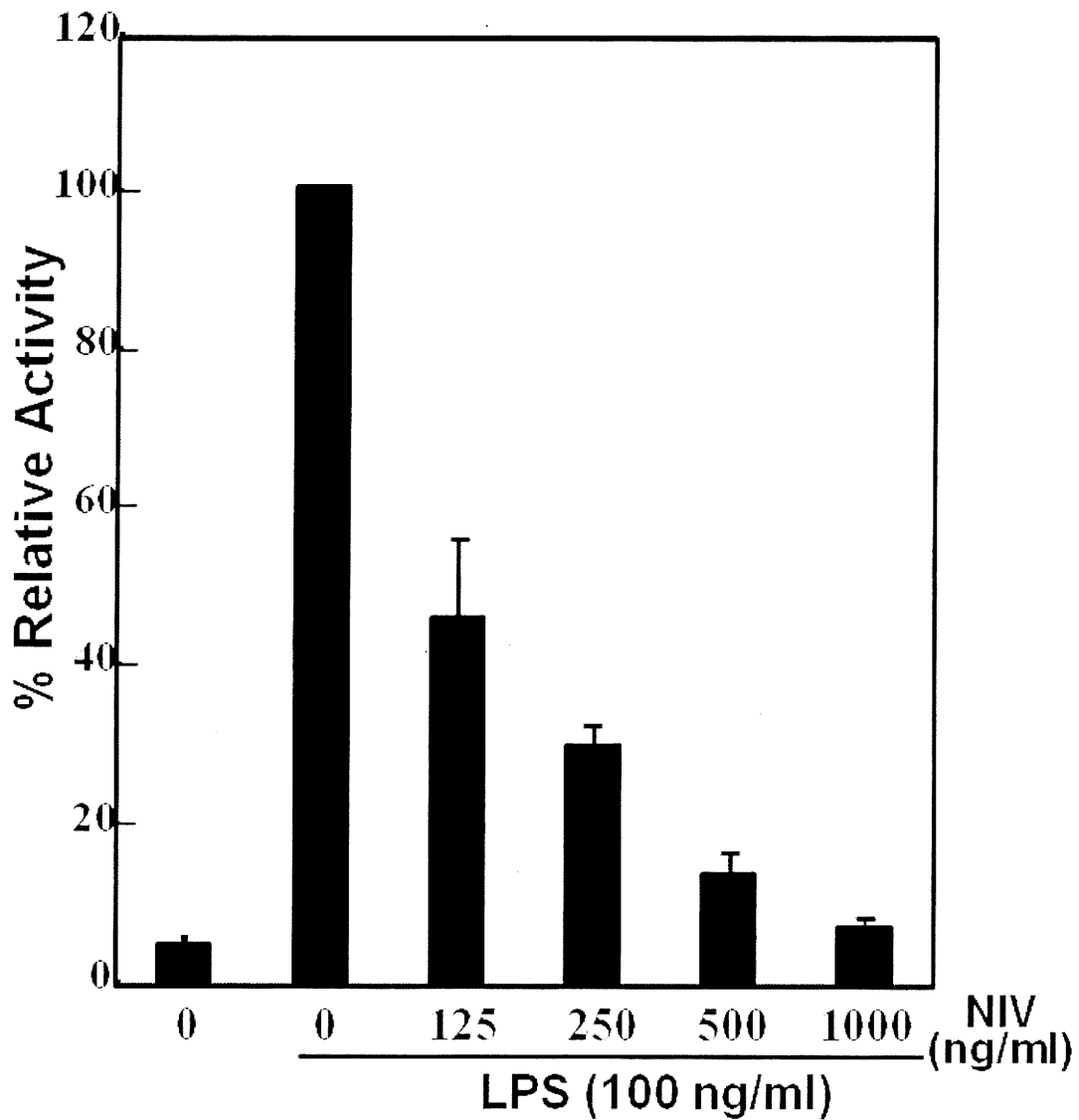


Fig. 4 Effects of NIV on LPS-induced NF- κ B dependent reporter activity in differentiated THP-1 cells.

Differentiated THP-1 cells were stimulated with NIV (125-1,000 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 three independent experiments.

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 T-2 toxin および

HT-2 toxin 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：フザリウム属真菌が産生するかび毒であるトリコテセン系かび毒は、小麦を含む穀類を汚染するため、食品衛生上同汚染は憂慮されており、特にその特徴でもある免疫系に対するかく乱作用については、毒性評価の観点からより正確な情報提供が待たれている。本分担研究では、マクロファージ様細胞に分化させた THP-1 細胞を用いて Type A トリコテセン系かび毒の T-2 toxin (T-2) と HT-2 toxin (HT-2) の Toll-like receptor 4 (TLR4) シグナルに対する影響を検討した。その結果、T-2 および HT-2 とともに Lipopolisaccharide 誘導性 TLR4 シグナルを濃度依存的に抑制することが明らかとなった。またその阻害は Type B トリコテセン系かび毒の Deoxynivalenol と Nivalenol と比較しより低濃度で認められ、T-2 では約 1/10、HT-2 においては約 1/100 のレベルで確認された。従って、今後トリコテセン系かび毒のリスクアナリシスを行うにあたっては、HT-2 の毒性にも十分留意する必要があると考えられる。

A. 研究目的

フザリウム真菌が産生する二次代謝産物であるトリコテセン系かび毒は、その汚染が小麦を含む主要な穀類に及ぶことから、アフラトキシンと並びかび毒のなかでも、その食品汚染による健康被害については世

界的に注視されている。

トリコテセン系かび毒のうち食品衛生上問題視されているのは Type A および B である。このうち Type A の T-2 toxin (T-2) は旧ソビエト連邦で起きた食中毒の原因物質として知られ (Fig. 1)、食中毒性無白血病症

がその特徴的食中毒症状として報告されている。一方、HT-2 toxin (HT-2) は T-2 の生体内での代謝産物ともなる Type A トリコテセン系かび毒であり (Fig. 2)、T-2 とともに同時汚染されていることも知られている毒素である。これら Type A トリコテセン系かび毒は前述の Type B トリコテセン系かび毒である Deoxynivalenol (DON) および Nivalenol (NIV) と同様に食品衛生上その毒性の正確な理解が求められている毒素である。

最近、マウスマクロファージ様細胞を用いた研究において、自然免疫系に関わるグラム陰性細菌の外膜構成成分である Lipopolisaccharide (LPS) を認識する受容体である Toll-like receptor 4 (TLR4) に対してそのシグナルを DON および NIV が抑制することが報告されている。

本分担研究においては、ヒトマクロファージ様細胞を用いて、LPS により活性化される TLR4 シグナリングに対する Type A トリコテセン系かび毒である T-2 および HT-2 の影響について検討を行った。ヒト由来細胞を用いることにより、より正確な毒性データの集積が期待できること、また本研究により Type A と B における毒性レベルを同じアッセイ系で比較検討が可能となり、T-2

と HT-2 のリスクアナリシスの実施に際して貴重なデータが得られると考えられる。

B. 研究方法

ヒト単球由来 THP-1 細胞は 1×10^6 cells/well となるように 1 ml/well を 12-well plate に播種し、0.1 μ g/ml phorbol myristate acetate (Sigma) および 0.1 μ 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 μ l に pcELAM-L を 0.5 μ g 相当を添加後 6.0 μ 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% CO₂ 条件下でトランスフェクションの為の培養を行った。トランスフェクション処理した細胞は、1 ml の PBS にて各 well を洗浄後、それぞれのかび毒存在下で培養した。

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