

株式会社)を用いて尿検査を行った。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、子宮、膈、脾臓、胸腺、心臓、肺、膵臓、消化管、脳、下垂体、副腎、大動脈、三叉神経、骨格筋、骨、腸間膜リンパ節、食道、気管及び甲状腺を摘出し、腎臓、肝臓、脾臓、胸腺、心臓、肺および脳の重量を測定後、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、肝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、尿細管における陽性細胞数を、各個体200倍視野で左右腎臓につき、それぞれランダムに皮質～髄質外帯で片側5か所、計10か所観察し、陽性細胞数/尿細管上皮細胞数をカウントした。

肝臓におけるPCNA染色切片を用いて、陽性細胞数を、各個体100倍視野で計5か所観察し、陽性細胞数/肝細胞数をカウントした。

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)、尿検査、腎/肝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。

病理組織学的変化の発生頻度はFischerの直接確率法により対照群とCTN投与各群で比較した。

(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

体重は、CTN 30 ppm投与群において、投与後1、2週間で、対照群に比べて有意な低値を示した(Fig. 1)。飲水量は、CTN 15 ppm投与群で投与後5週目に有意な低値を示した。摂食量は投与期間を通じて明らかな変化を示さなかった(Fig. 1)。

2) 尿検査値

尿蛋白、潜血検査では、CTN投与群で対照群に比べて差異がなかった(Table 1)。尿pH値は投与後8週目において、CTN 15 ppm投与群で有意な高値を示した(Table 1)。

3) 臓器重量

卵巣重量(絶対値及び相対値)がCTN投与群で用量に関連して有意に増加した(Table 2)。また、相対肝重量がCTN 15 ppm投与群で有意に減少した(Table 2)。その他の臓器については、CTN投与群で対照群に比べて明らかな変化を示さなかった。

3) 血液生化学検査

検査項目のうち、BUN及びALTは用量に依存しないものの、CTN 30 ppm投与群で有意に減少ないし増加した(Table 3)。Creatinin、AST、ALP、TP及びalbuminはCTN投与群と対照群との間に差がなかった。

4) 病理組織学的変化および免疫組織学的変化

統計学的に有意な病理組織学的変化として、腎臓における限局性の再生尿細管の増加が CTN の 30 ppm 投与群で認められた。その他、CTN 投与群で、各群 1 例に腎臓に尿細管上皮の限局性腫大が認められた。また CTN 30 ppm 投与群で、肝臓に肝細胞の単細胞壊死、及び胸腺に好酸球の浸潤が各 1 例に認められた。その他、肝臓における胆管周囲の炎症細胞浸潤、肝臓における微小肉芽腫、限局性単核細胞浸潤、限局性肝細胞凝固壊死、心臓における鉍質沈着、脾臓における色素沈着を伴う肉芽腫、胃における粘膜下の炎症細胞浸潤、小腸における粘膜上皮の限局性過形成が認められたが、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、CTN 30 ppm 投与群で発情後期の組織像を示す個体が多い傾向が認められたが、卵巣、子宮、膣の形態で正常性周期を逸脱するものは認められなかった (Table 5)。一方、卵巣において小型卵胞、中型卵胞、大型卵胞、新世代黄体、旧世代黄体、閉鎖卵胞数をカウントしたところ、CTN 投与群で用量依存的に大型卵胞数が増加した (Table 5)。

腎臓では、PCNA 染色の結果、尿細管上皮の陽性細胞率に明らかな違いは認められなかった (Table 5)。更に肝臓においても、肝細胞の PCNA 染色陽性率の明らかな違いは認められなかった (Table 5)。

D. 考察

BALB/c マウスに CTN を 90 日間飲水投与し、腎臓、卵巣、子宮、膣及びその他の臓器への影響について解析した。

前回の投与実験において、1.25 ppm 以上の CTN 投与群で腎臓における PCNA 陽性細胞数の増加が弱いながらも認められたが、今回の検討では、明らかな変動は認められなかった。一方、病理組織学的検査において、CTN 投与群で各群 1 例ずつではあるが、尿細管上皮の限局性腫大が認められ、更に 30 ppm で再生尿細管の増加が認められた。CTN は近位尿細管を標的とした腎毒性

を示すことが知られており (Friis et al. 1969)、マウスにおいて CTN を経口投与することで、腎尿細管の拡張、尿細管内における尿円柱形成が報告されている (Jordan et al. 1977)。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%で腎腺腫の発生が報告されている (Arai et al. 1983)。これらのことから、軽度ではあるが腎臓への影響が示唆された。

生殖器においては、前回の投与実験で、7.5 ppm 以上の CTN 投与群で卵巣の相対重量増加が認められた。今回は、30 ppm CTN 群で、発情後期を示す個体が多く認められた。また CTN 投与群において、用量依存的に卵巣絶対重量及び相対重量の増加が認められた。今回の投与実験では、卵巣中の黄体数に関しては明らかな違いは認められなかったが、大型卵胞数が CTN 投与群で用量依存的に増加していたことから、大型卵胞数の増加が卵巣重量増加に寄与している可能性が考えられた。Chan ら (2008) により、21 日齢の ICR マウスを用いた CTN の飲水投与実験で、卵成熟の減少することが報告されており、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、前回の投与実験と同様に生殖器影響が示唆された。

E. 結論

雌 BALB/c マウスに CTN を飲水投与した結果、卵巣絶対/相対重量の増加および発情後期を示す個体の増加が認められた。更に、腎臓において、再生尿細管の増加が認められた。以上より、CTN の飲水投与による卵巣及び腎臓に対する毒性が示唆され、卵巣の変化は低用量群である 15 ppm から認められたことから、今後より低用量を含む用量設定で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)

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)

Friis P., Hasselager E., Krogh P.: Isolation of citrinin and oxalic acid from *Penicillium viridicatum* Westling and their nephrotoxicity in rats and pigs. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 77: 559-560 (1969)

Jordon W.H., Carlton W.W., Sansing G.A.: Citrinin mycotoxicosis in the mouse. *Food Cosmet Toxicol.* 1977 15: 29-34 (1977)

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

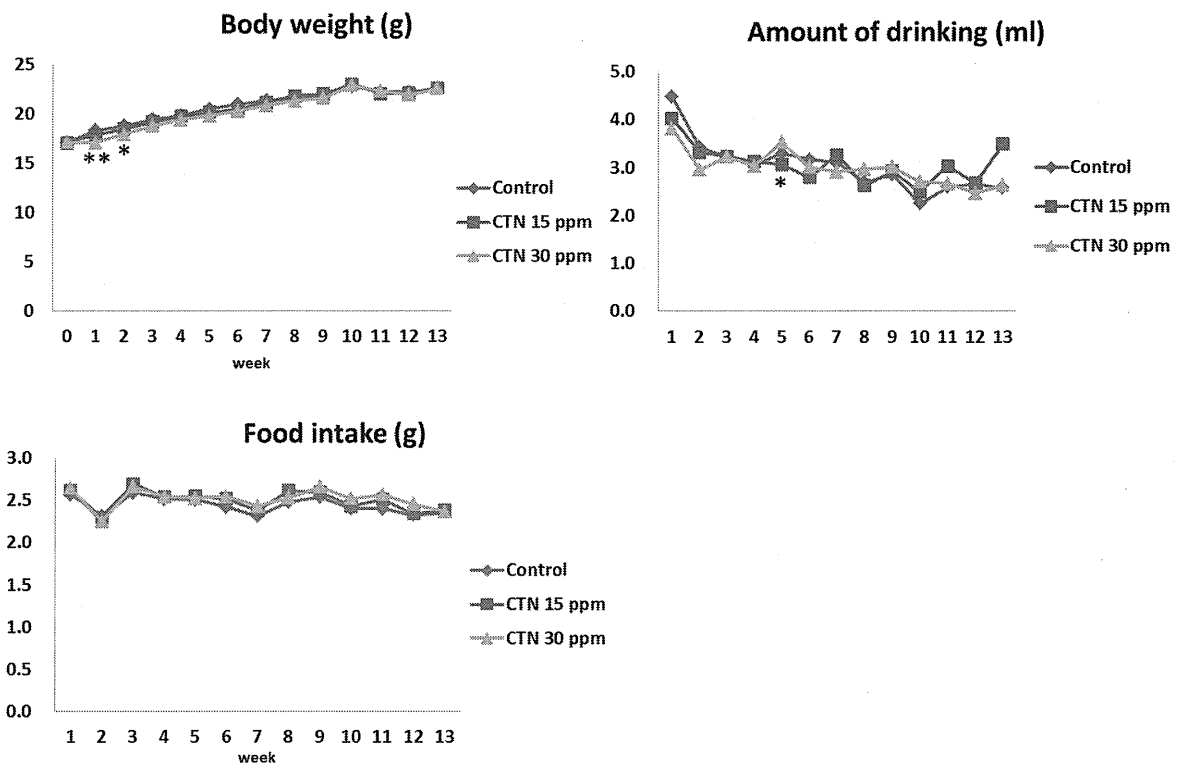


Figure 1. Body weight, water consumption and food intake of of BALB/c mice given citrinin (CTN) in the drinking water for 90 days.

Table 1. Urinalysis of BALB/c mice given citrinin (CTN) in the drinking water for 90 days

	Control	CTN, 15 ppm	CTN, 30 ppm
Urinary protein			
4 week	1.9±0.5 (14)	1.9±0.7 (12)	1.8±0.6 (15)
8 week	1.8±0.6 (15)	1.9±0.6 (14)	1.8±0.6 (15)
12 week	1.8±0.6 (12)	1.9±0.6 (13)	1.9±0.6 (14)
Urine pH			
4 week	6.3±0.5 (13)	6.6±0.7 (12)	6.4±0.8 (15)
8 week	6.3±0.6 (15)	6.9±0.5* (14)	6.7±0.8 (15)
12 week	6.7±0.8 (12)	7.0±1.1 (13)	7.1±1.1 (14)
Occult blood			
4 week	0 (14)	0 (12)	0 (15)
8 week	0.03±0.13 (15)	0 (14)	0 (15)
12 week	0.04±0.14 (12)	0.25±0.8 (14)	0.07±0.27 (14)

Numbers in parenthesis were those of animals examined.

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

Table 2. Organ weights of BALB/c mice given citrinin (CTN) in the drinking water for 90 days

*, **: Significantly different from the untreated controls ($P < 0.05, 0.01$, Dunnett's multiple test or Steel's test).

		Control	CTN, 15 ppm	CTN, 30 ppm
No. of animals examined		15	15	15
Kidneys	Absolute (g)	0.28 ± 0.02	0.29 ± 0.03	0.29 ± 0.03
	Relative (%)	1.24 ± 0.08	1.28 ± 0.12	1.27 ± 0.10
Liver	Absolute (g)	1.07 ± 0.10	1.02 ± 0.08	1.05 ± 0.07
	Relative (%)	4.73 ± 0.35	4.52 ± 0.33*	4.66 ± 0.16
Spleen	Absolute (g)	0.12 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.01
	Relative (%)	0.52 ± 0.07	0.51 ± 0.04	0.49 ± 0.04
Thymus	Absolute (g)	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01
	Relative (%)	0.19 ± 0.05	0.20 ± 0.05	0.19 ± 0.05
Heart	Absolute (g)	0.12 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.02
	Relative (%)	0.52 ± 0.06	0.52 ± 0.03	0.53 ± 0.05
Lungs	Absolute (g)	0.18 ± 0.04	0.17 ± 0.02	0.18 ± 0.02
	Relative (%)	0.80 ± 0.15	0.77 ± 0.11	0.81 ± 0.12
Brain	Absolute (g)	0.47 ± 0.03	0.48 ± 0.02	0.48 ± 0.02
	Relative (%)	2.11 ± 0.16	2.12 ± 0.16	2.14 ± 0.13
Adrenal glands	Absolute (g)	0.0095 ± 0.0022	0.0089 ± 0.0014	0.0096 ± 0.0031
	Relative (%)	0.0425 ± 0.011	0.0394 ± 0.0057	0.0426 ± 0.0133
Ovaries	Absolute (g)	0.0079 ± 0.0023	0.0096 ± 0.0021*	0.0098 ± 0.0017*
	Relative (%)	0.035 ± 0.009	0.042 ± 0.008*	0.044 ± 0.007**
Uterus	Absolute (g)	0.006 ± 0.005	0.005 ± 0.005	0.006 ± 0.005
	Relative (%)	0.027 ± 0.022	0.023 ± 0.024	0.028 ± 0.021

Table 3. Serum biochemistry of BALB/c mice given citrinin (CTN) in the drinking water for 90 days

	Control	CTN, 15 ppm	CTN, 30 ppm
No. of pooled samples examined	7	8	8
Blood urea nitrogen (mg/dL)	23.9 ± 2.1	44.8 ± 60.0	20.8 ± 2.5*
Creatinin (mg/dL)	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1
Aspartate aminotransferase (IU/L)	56.4 ± 9.7	79.4 ± 45.5	71.9 ± 19.2
Alanine aminotransferase (IU/L)	28.7 ± 4.9	40.9 ± 15.5	39.0 ± 9.8*
Alkaline phosphatase (IU/L)	281.0 ± 13.9	237.6 ± 13.9	289.4 ± 19.9
Albumin (g/dL)	3.3 ± 0.1	3.3 ± 0.1	3.3 ± 0.1
Total protein (g/dL)	4.5 ± 0.1	4.5 ± 0.1	4.5 ± 0.1

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

Table 4. Histopathological changes in BALB/c mice given citrinin (CTN) in the drinking water for 90 days

Organ	group dose No. of animals	Control 15	Citrinin	
			5 µM 15	30 µM 15
Kidney				
Swelling of tubular epithelial cells, focal		0	1	1
Regenerating tubules, focal		3	5	10*
Liver				
Single liver cell degeneration/necrosis		0	0	1
Mononuclear cell infiltration, portal area		5	8	7
Microgranulomas		3	8	3
Mononuclear cell infiltration, focal		1	0	1
Coagulative necrosis, focal		1	0	0
Heart				
Myocardial mineralization		2	3	1/14
Thymus				
Eosinophil infiltration		0	0	1
Pancreas				
Microgranuloma with hemosiderin deposition		2	0	0
Stomach				
Inflammatory cell infiltration, submucosa		1	0	0
Small intestine				
Focal glandular hyperplasia		1	0	0

*: Significantly different from the untreated controls (P<0.05, Fischer's exact probability test).

Table 5. The number of PCNA-positive proximal tubular cells/hepatocyte, estrous cyclicity, and follicle/corpus luteum of BALB/c mice given citrinin (CTN) in the drinking water for 90 days

	Control	CTN, 15 ppm	CTN, 30 ppm
No. of animals examined	15	15	15
No. of PCNA-positive proximal tubular cells (/1000 cells)	2.40 ± 1.00	2.58 ± 1.76	2.78 ± 1.72
No. of PCNA-positive hepatocyte (/1000 cells)	0.13 ± 0.14	0.13 ± 0.14	0.14 ± 0.11
Estrous cyclicity			
Proestrus	4	5	3
Estrus	6	3	3
Metestrus	5	5	8
Diestrus	0	2	1
No. of small follicle/area	3.23 ± 1.64	3.98 ± 2.18	4.24 ± 1.25
No. of medium follicle/area	1.39 ± 0.56	2.43 ± 4.5	1.48 ± 0.62
No. of large follicle/area	1.90 ± 1.03	2.78 ± 0.95*	2.93 ± 0.97**
No. of currently formed corpus luteum/area	0.63 ± 0.43	0.84 ± 0.46	0.64 ± 0.31
No. of previously formed corpus luteum/area	1.58 ± 0.84	1.56 ± 1.54	1.08 ± 0.93
No. of atretic follicle/area	1.99 ± 1.36	1.86 ± 0.51	1.83 ± 0.97

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

厚生労働科学研究費補助金
(食品の安全確保推進研究事業)

分担研究報告書

カビ毒の暴露評価の問題点

分担研究者 佐藤敏彦 北里大学医学部教授
研究協力者 斉藤史朗 東京大学大学院

研究要旨：現在行われている食品摂取によるカビ毒の曝露量評価では、食品の汚染量のサンプル・データから汚染量を推定するパラメーターを導き、また食品の摂取量のサンプル・データから摂取量を推定するパラメーターを導いている。しかし、サンプル調査には限界があり、十分なサンプル数をとれているかどうかは不明であり、サンプル数の少なさによる誤差が、シミュレーション結果にどの程度の影響を与えているのかも不明である。そのため、出された結果に対して、どれくらいの誤算範囲を想定すればよいのかもわからない状態である。そこで、母集団とほぼ同じと考えられるデータから、ランダムにサンプルを選ぶことを繰り返し、サンプルの数がシミュレーション結果に与える影響を数理的に解析してみることを試みた。

食品摂取量に関しては平成 17 年度から平成 19 年度の 3 年間にわたって行われた「食品摂取量・摂取頻度調査」の結果から、摂取者が非常に多い 20 歳以上の「コメ」の食品摂取量を求め、その値をもとにシミュレーションを行った。サンプル数によって、コメの摂取量の実際とシミュレーション結果のズレの範囲には違いが生じたが、95%タイルで比較した場合、50 サンプル以上あれば、誤差範囲は上下 20%程度におさまることが確かめられた。

A. 研究目的

1. モンテカルロ・シミュレーションによる食物摂取量の誤差範囲

有毒物質の暴露評価では、近年、モンテカルロ・シミュレーションを利用した計算が行われることが国際的にも多くなってきている。その方法を簡単に述べれば、サンプルデータから対象食品の摂取量と当該有害物質の汚染量(汚染割合)の分布を決定するパラメーター(平均と標準偏差)を明らかにし、その値に基づいて数理的に分布をシミュレーションした結果同士を掛け合わせて曝露量を算出するというものである。

算出された曝露量が 90%水準でどれくらい

の誤差範囲を持つのかという形で暴露評価の結果を評価しようとする場合、従来他の分野で多く行われてきたのは感度分析である。上述のように曝露量評価のモンテカルロ・シミュレーションは、食物摂取量と汚染量に分解することができるので、結果の精度も二つの分布のシミュレーションの精度に左右されることになる。そして、それぞれの分布を決定するのは平均と標準偏差である。それゆえ、感度分析を行うのであれば、これらのパラメータをどれくらい動かすのかの目安が必要となる。しかし、この目安をどう設定するのかについては、先行研究が存在しない。そこで今回、統計的処理により、パラメーターについての目安を作成し、摂取量

についてのシミュレーション結果と実データを比較して誤差範囲がどの程度になるのかを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1) 分析対象データ

パラメータの誤差範囲やあるいはパラメータを利用したシミュレーション結果の誤差範囲について、誤差をはかる相手となる母集団は、摂取量であれば日本人全体の摂取量であり、汚染量であれば、日本に流通している当該食品全てということになる。近似的にこうした母集団に代替可能な大量データが手に入るということで、食物摂取量についてのデータを使用し、摂取量のシミュレーションについて分析を行うこととした。対象食品は日本人の主食である「コメ」にして、平成17年度～19年度「食物摂取量・摂取頻度調査」より、20才以上の米（「めし」：白米）摂取量のデータ（32,814 サンプル）を利用した。（そのうち、「めし」摂取有りが全体の93.7%の30,740 サンプルであった。）

2) 対数正規分布という仮定についての誤差

現在行われている曝露量のモンテカルロ・シミュレーションにおいては、サンプルからパラメータである平均と標準偏差を明らかにすると、そのパラメータ値を持った対数正規分布を発生させることが多い。実際にそうした場合の対数正規分布と元のサンプルの分布とは適合度が高い場合が多いのだが、適合度で言えば、その他の分布の方が良い場合もある。

そこで、今回、上記データから明らかになった平均（5.97g/体重 Kg/日）と標準偏差（2.94）をもとに作成した対数正規分布と、実際のサンプルデータの分布とがどれくらい異なっているのかを調べてみた。（90%点、95%点、99%点、99.9%点の値の比較を行った。）

3) パラメータ推計のサンプル数による誤差

摂取量のパラメータを推計するに際して誤差の生む要因としては、そもそもサンプルをとってきた集団の問題や、摂取量を記録する方法の問題など、サンプル調査の方法的な問題をあげることができるが、ここでは調査の中身には立ち入らずに、サンプル数による誤差の問題を取り扱う。サンプル数がどれくらい少ないと、平均的にどれくらいの誤差を生むのかを調べてみる。

上記の20才以上のこめ摂取者のデータセットから、ランダムにサンプルを抽出することを各サンプル数（50, 100, 200, 300, 500, 1000）ごとに1,000回ずつ行い、サンプル数ごとに摂取量の分布を求め、上下95%の範囲の上限・下限（97.5%点と2.5%点）の値を求めた。

4) 摂取量のシミュレーション結果の誤差

上記3)で求めた各サンプル数ごとの平均の上限・下限と標準偏差の上限・下限を用いて、最大誤差をもたらす組み合わせによって、摂取量のシミュレーションを行い、実際の摂取量分布と比較を行う。（90%タイル値、95%タイル値、99%タイル値、99.9%タイル値の比較を行った。）

C. 研究結果

1) 対数正規分布という仮定についての誤差

対象者全体の6.3%については米の摂取がなかったが、残りの93.7%について平均5.97g/体重 Kg/日、標準偏差が2.94というパラメータによって対数正規分布を発生させた。

93.7%の摂取量ありについての実際の分布と対数正規分布の差をグラフ表示すると別紙図表の図1のようになる。

摂取量なしもふくめた全件についての体重1Kgあたりの摂取量のずれを比較したのが別紙図表の表1になる。

2) サンプル数に由来するパラメーターの誤差範囲

サンプル数ごとに1,000回試行した結果のうち、2.5%点と97.5%点の値を取って、以下の表2にまとめた。平均と標準偏差の95%はこの間に入ることになる。

結果については別紙表2を参照。

3) パラメーターの誤差による摂取量の誤差範囲

上記2)の結果から、サンプル数ごとに、摂取量のシミュレーション結果の最大誤差をもたらすパラメーターの組み合わせによって、計算を行った。結果を別紙図表の表3に掲げてある。結果を各サンプル数ごとに、500サンプルmin(500サンプルの最小のシミュレーション結果：グラフが一番左にずれる)、500サンプルmax(500サンプルの最大のシミュレーション結果：グラフが一番右にずれる)というように表記している。

D. 考察

95%タイル値を比較した場合、サンプルサイズが50程度であれば、上下20%くらいのずれがあり、サンプルサイズを大きくしていくと、そのズレは小さくなり、500サンプルになると、そのズレは10%を切り、1000サンプルになると、大きい方のずれでも6%強でとどまっている。

99%タイル値を比較した場合には、50サンプルで上下30%弱で、500サンプルになると15%弱、1000サンプルでは11%強のズレとなった。

20才以上における米の摂取量ということで、

サンプル数が非常に多いので、20才以上の日本人全体の摂取量という母集団にほぼ近いと想定されるデータに対して、試みられたシミュレーション結果とのズレ(誤差範囲)であるが、現在暴露評価に多く利用される95%タイル値については、50サンプル程度であっても、それほど大きなズレはないととらえてよさそうである。

また、分布の右側の裾野にひろがるほど、maxの方の誤差が大きくなる傾向にある。これは、シミュレーションの結果が、分布の右裾ほど過大評価するというを示しているが、規制値などを考える際には、特別に多くの量を摂取する、一部の人口に対するリスクを高く見ることになり、国民の健康保護という面からは望ましいのではないかと思われる。

ただし、この結果がほかの食品、とりわけ米とは摂取パターンの異なる食品の場合にもあてまるとは限らないので、今後、摂取パターンの異なる(たとえば、季節性が高いとか、個人差が非常におおきな食品など)食品においても同様の検証を行う必要がある。

E. 結論

食品摂取量についてのシミュレーションを行う場合の、パラメーターを決めるためのサンプルデータのサンプル数は、50以上あれば、誤差範囲が上下20%程度の範囲に収まっている。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

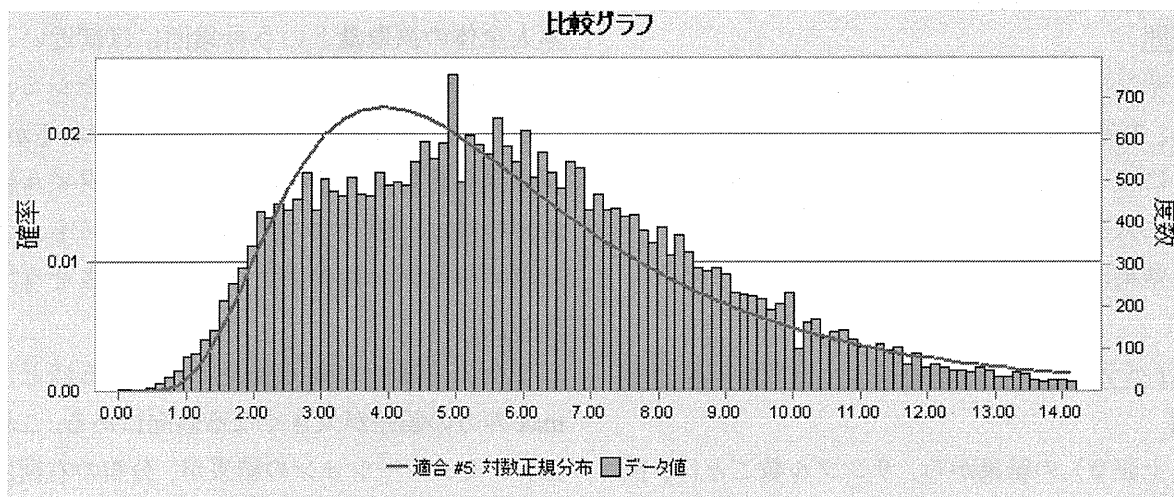


図1 米摂取量の実際（ヒストグラム）と対数正規分布（曲線）

表1 対数正規分布を想定したシミュレーションの母集団データとのズレ

	母集団	シミュレーション	ズレ
90%タイル値	9.65	9.56	1%
95%タイル値	11.11	11.35	2%
99%タイル値	14.55	15.66	8%
99.9%タイル値	19.88	22.4	13%

表2 サンプル数による2.5%点と97.5%点の値

2.5%点	5.16	5.39	5.56	5.64	5.72	5.80
97.5%点	6.74	6.54	6.37	6.27	6.23	6.15
	50サンプル	100サンプル	200サンプル	300サンプル	500サンプル	1000サンプル
2.5%点	2.26	2.43	2.58	2.65	2.69	2.77
97.5%点	3.82	3.48	3.38	3.29	3.21	3.11

表3 サンプル数による各パーセンタイル値のズレの割合 (%)

	母集団	50サンプルmin	ズレ	50サンプルmax	ズレ	100サンプルmin	ズレ	100サンプルmax	ズレ
90%タイル値	9.65	7.96	-21.2%	11.31	14.7%	8.39	-15.0%	10.75	10.2%
95%タイル値	11.11	9.29	-19.6%	13.74	19.1%	9.83	-13.0%	12.91	13.9%
99%タイル値	14.55	12.4	-17.3%	18.77	26.4%	13.23	-10.0%	18.23	20.2%
99.9%タイル値	19.88	17.11	-16.2%	29.65	33.0%	18.4	-8.0%	26.75	25.7%
	母集団	200サンプルmin	ズレ	200サンプルmax	ズレ	300サンプルmin	ズレ	300サンプルmax	ズレ
90%タイル値	9.65	8.73	-10.5%	10.46	7.7%	8.9	-8.4%	10.25	5.9%
95%タイル値	11.11	10.28	-8.1%	12.56	11.5%	10.49	-5.9%	13	14.5%
99%タイル値	14.55	13.94	-4.4%	17.71	17.8%	14.27	-2.0%	17.28	15.8%
99.9%タイル値	19.88	19.58	-1.5%	25.97	23.5%	20.11	1.1%	25.24	21.2%
	母集団	500サンプルmin	ズレ	500サンプルmax	ズレ	1000サンプルmin	ズレ	1000サンプルmax	ズレ
90%タイル値	9.65	9.03	-6.9%	10.13	4.7%	9.2	-4.9%	9.94	2.9%
95%タイル値	11.11	10.65	-4.3%	12.11	8.3%	10.87	-2.2%	11.85	6.2%
99%タイル値	14.55	14.49	-0.4%	16.92	14.0%	14.86	2.1%	16.47	11.7%
99.9%タイル値	19.88	20.43	2.7%	24.57	19.1%	21.05	5.6%	23.76	16.3%

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

ヒト肝ガン由来細胞株 (Hep G2) における酸化ストレスおよび
ヒト単球由来細胞株 (THP-1) における免疫毒性影響

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

研究要旨：本研究は、食品に残留が認められ、食品衛生上問題となっているカビ毒の毒性に焦点をあて実施した。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) 並びに Ochratoxin A (OTA) および Citrinin (CIT) である。本研究では、T-2 と HT-2 が肝細胞由来細胞内の Glutathione (GSH) 含量におよぼす影響を、また OTA と CIT についてはそれら毒素の複合毒性について免疫細胞の細胞毒性を指標に各々の生体毒性影響を検討した。

T-2 および HT-2 存在下において、ヒト肝ガン由来細胞株である Hep G2 の細胞内 GSH 含量は異なる挙動を示した。50 - 100 nM の T-2 存在下において細胞内 GSH 含量は有意な上昇傾向を示したが、HT-2 では濃度依存的な減少が認められた。一方、より高濃度である 200 - 400 nM の毒素存在下では、両カビ毒ともコントロールと比較し約 50%まで GSH 含量の低下が確認された。HT-2 は T-2 の代謝産物であることを考慮した場合、これら両毒素による肝細胞由来細胞内の GSH 含量におよぼす作用は、本研究で検討した濃度においては抑制作用と捉えられる。この抑制メカニズムとしては、毒素の解毒に GSH が消費されたことと、これら毒素により誘発されると考えられる酸化ストレスへの適応に消費されたことが推測された。

Penicillium 属真菌が産生する OTA と CIT は共汚染が認められるカビ毒で、OTA は免疫系への作用が指摘されているが CIT についての免疫毒性に関する報告例は少ない。今回、ヒト単球由来細胞株 THP-1 を用いて共存下での細胞毒性を評価した。その結果、両毒素共存下(各 6.25 nM)では単独処理で認められない細胞毒性が認められることが明らかとなった。従って、単球の細胞毒性を指標とした場合、両毒素の複合毒性は相乗として現れる可能性が示唆された。本結果は OTA と CIT の複合毒性における新たな知見となり、そのリスクアセスメントに貴重な情報となる。

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、その食品への残留は食品衛生上問題視されている自然毒の1つである。対策として規制値の策定は有効な手段とはなるが、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。

トリコテセン系カビ毒の食品への残留はグローバルレベルでの問題でもあり、わが国もその例外ではない。本邦では、トリコテセン系カビ毒のタイプ B となる Deoxynivalenol と Nivalenol の産生菌が生息し、実際にその残留も認められることが報告されている(小西良子 and 杉山圭一 2008)。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 T-2 toxin (T-2) と HT-2 toxin (HT-2) による汚染の可能性も、昨今の異常気象を考慮すれば否定できない。さらに、これら両毒素はタイプ B と比較して毒性が高いことを考慮すると、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、その解毒に関与すると考えられる組織である肝臓に焦点をあて検討を行った。肝細胞としては、ヒト肝ガン由来細胞株 Hep G2 細胞を用いた。指標には、細胞内の Glutathione (GSH) 含量を用いている。GSH は生体外異物の代謝と、細胞内の酸化度を維持に関わる機能を併せ持つ。したがって、両毒素が肝細胞に与える影響を両側面から検証できる可能性がある。特に、トリコテセン系カビ毒が酸化ストレスを惹起することが報告されていることから、その毒性低減方法についても貴重な知見が得られる可能性がある。

本研究では、*Penicillium* 属真菌が産生する Ochratoxin A (OTA) および Citrinin (CIT) の複合毒性についても免疫系への作用を指標に検討した。両毒素については RNA 合成阻害について相乗的作用を呈することが知られている(杉山圭一 and 小西良子 2009)。しかし、その免疫毒性に関しては OTA では各種免疫細胞への影響について報告があるものの(Pfohl - Leszkowicz and Manderville 2007)、CIT についての研究報告例は少ない。本研究ではこれまで明確にされていない OTA と CIT 共存下における免疫毒性を、マクロファージ様細胞を用いて検討を行った。

B. 研究方法

【T-2 および HT-2 の生体毒性影響】

細胞培養

ヒト肝ガン細胞 Hep G2 (Riken Cell Bank, Tsukuba, Japan) は、ペニシリン-ストレプトマイシン混合液を各々 100 units/ml、100 mg/ml および 10% FBS (Filtron Pty LTD., Brooklyn, Australia) を含む DMEM の入った 75 cm² の組織培養フラスコに播種後、37°C、5%CO₂ 条件下で培養した。

T-2 および HT-2 の調製

T-2 toxin および HT-2 toxin は減衰を防ぐためアセトニトリルに溶かし、最終濃度 10 μM となるように調製後 -30°C で保存した。実験に際しては、各種マイコトキシンを窒素ガスで濃縮乾固した後、DMEM で溶解させ使用した。

試薬の調製

5-Sulfosalicylic acid (以後 SSA と略記: Wako, Osaka, Japan) は、MilliQ に溶かし、最終濃度 5% SSA となるように調製後 4°C で保存した。GSH (Wako, Osaka, Japan) は、注射用水

(Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan) に溶かし、最終濃度 0.5 M となるように調製後-30°Cで保存した。

Total GSH 測定

Hep G2 細胞を 6 well plate に 5×10^5 cells/well となるように 2 ml/well にて播種し、37°C、5%CO₂ 条件下で一晩培養した。培養液を吸引後、各種マイコトキシンを含む培地を 1 ml/well 加え、さらに 24 時間培養した。各種マイコトキシンを含む培地の調製法は次の通りである。DMEM 培地を用いて T-2 toxin および HT-2 toxin を 50~400 nM になるよう段階希釈した。なお、コントロールとして DMEM を 1 ml/well 加えた。Total GSH 濃度の測定は、Total Glutathione Quantification Kit (Dojindo Molecular Technologies, INC., Kumamoto, Japan) を用いて次の通りに行った。培養後、上清を吸引し、PBS を 1 ml/well 加えて洗浄、吸引した。PBS を 300 µl/well 加え、CELL SCRAPER (Techno Plastic Products, Zurich, Switzerland) で細胞を掻き取った後、全量を 1.5 ml マイクロチューブに回収し、centrifuge を用いて、10 分間、200 g、4°C で遠心分離した。上清を除去し、再度 PBS を 300 µl/tube 加え、centrifuge を用いて、10 分間、200 g、4°C で遠心分離した。上清を除去後、10 mM HCl (Wako, Osaka, Japan) を 80 µl/tube 加え、凍結(-80°C)と溶解を 2 回繰り返した。溶解後、5% SSA を 20 µl/tube 加え、10 分間、8000 g、4°C で遠心分離した。遠心後、上清を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移しサンプルとした。次に 96 well plate に Coenzyme working solution (Dojindo Molecular Technologies, INC., Kumamoto, Japan) を 20 µl/well、Enzyme working solution (Dojindo Molecular Technologies, INC., Kumamoto, Japan) を 20 µl/well および Buffer

solution (Dojindo Molecular Technologies, INC., Kumamoto, Japan) を 120 µl/well 加え、5 分間、37°C でインキュベートした後、サンプルを 20 µl/well 加え、10 分間、37°C でインキュベートした。インキュベート後、Substrate working solution を 20 µl/well 加え、10 分間、室温でインキュベートし、吸光度 405 nm をマルチプレートリーダー Tristar LB 941 を用いて測定し、total GSH 濃度を算出した。標準曲線として 1.5 - 100 mM GSH を測定した。標準曲線の調製法は、1.5 ml マイクロチューブに 0.5% SSA を 50 µl および 200 mM GSH を 50 µl 加え 100 mM GSH とした。さらに、1.5 ml マイクロチューブに 0.5% SSA を 50 µl/tube 加え、50 µl ずつ段階希釈を行った。

統計学的処理

統計学的処理は、unpaired Student's *t*-test を用いて行った。

【OTA および CIT の複合毒性】

細胞培養

ヒト単球性細胞株 THP-1 細胞 (Human Science Research Resources Bank, Tokyo, Japan) は、10%FBS、ペニシリン・ストレプトマイシン (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を含む DMEM の入った 75 cm² の組織培養フラスコ (Techno Plastic Products) に播種後、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。

OTA と CIT の調製

基準品の OTA と CIT (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、-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。

MTT アッセイ

THP-1 細胞を 96 ウェルプレート (Techno Plastic Products Zurich Switzerland) に 2×10^4 cells/well、 1×10^4 cells/well になるように 100 μ l/well にて播植し、37°C、5%CO₂ 条件下で一晩培養した。培養液を吸引後、OTA と CIT を含む培地を加え (100 μ l/well) さらに 24 時間培養した。OTA と CIT を含む培地の調製方法は以下のとおりである。1.0 mM OTA もしくは 1.0 mM CIT を使用し、DMEM を用いて各濃度 (0、0.781、1.56、3.13、6.25、12.5、25、50、100 μ M) になるように段階希釈した。培養後、MTT 試薬 (Cell Proliferation Kit 1 ;Roche Diagnostics Basel,Switzerland) の MTT labeling reagent を 10 μ l/well 加え 4 時間後、Solubilization Buffer を 100 μ l/well 添加し 37°C、5%CO₂ 条件下で静置した。1 晩静置させた後、吸光度 550 nm をマルチプレートリーダー THERMO (Tecan Group Ltd, Switzerland) を用いて測定した。リファレンス波長には吸光度 650 nm を使用した。得られた {(550 nm 吸光度) - (650 nm 吸光度)} の値を細胞増殖活性とし、OTA および CIT 非存在下におけるコントロールの値を 100% として細胞増殖活性を評価した。

統計解析

MTT assay の測定結果から ANOVA (分散分析) を行い、Dunette 法を用いて統計学的比較を行った。値は平均 \pm 標準誤差 (Standard Error of Mean:SEM) として表した。

C. 研究結果

【Hep G2 細胞の細胞内 GSH 含量におよぼす T-2 および HT-2 の影響】

Hep G2 細胞の細胞内 GSH 含量におよぼす T-2 および HT-2 の影響を検討した。その結果、50 - 100 nM の T-2 存在下においては、細

胞内 GSH 含量は有意な上昇傾向を示した。一方、HT-2 では検討した濃度 (50 - 400 nM) において依存的な減少が確認された。但し、より高濃度である 200 - 400 nM の T-2 存在下では、コントロールと比較し約 50%まで GSH 含量の低下が確認された。本減少は同濃度の HT-2 処理でもほぼ同様の傾向が確認された減少である。以上の結果から、Hep G2 細胞における細胞内 GSH 含量は少なくとも 200 nM 以上の T-2 および HT-2 存在下では非存在下と比較して約 50%程度まで低下することが明らかとなった(図 1)。

【THP-1 細胞生存率を指標とした OTA と CIT の複合毒性】

THP-1 細胞を用いて、OTA と CIT の複合毒性を同細胞の生存率を指標に検討した。その結果、OTA 単独処理では 25 nM 以上の濃度から有意な細胞毒性が認められることが明らかとなった(図 2)。CIT 単独処理においては、検討した濃度で最も高い 100 nM においてのみ有意な細胞毒性が認められた(図 3)。両毒素を等量含んだ条件下においては、12.5 nM 処理 (各毒素 6.25 nM) 存在下から有意な細胞毒性が確認され、その作用は濃度依存的であった(図 4)。

D. 考察

今回、肝細胞由来細胞内の GSH 含量におよぼす T-2 および HT-2 の作用と、免疫細胞の細胞毒性を指標とした OTA と CIT の複合毒性を検討した。肝細胞内 GSH 含量におよぼす T-2 および HT-2 の作用としては、ヒト肝ガン由来細胞株である Hep G2 の細胞内 GSH を 200 nM 以上の濃度において、両毒素とも減少させることが明らかとなった。一方、T-2 においてのみ細胞内 GSH 含量を増大させる効果が認められた。この GSH 含量を増大させる機序としては GSH が生体外異物の

解毒に関与することから、同分子の *de novo* 合成系が促進されたことが考えられる。しかし、T-2 は体内で加水分解され HT-2 に代謝されることから、肝細胞内における T-2 誘導性 GSH 含量の増大の可能性は低いと推測される(Sugiyama, Kinoshita et al. 2011)。一方、HT-2 は今回検討した濃度では細胞内 GSH 含量を減少させること作用を示すことが明らかとなった。この減少は肝細胞における HT-2 の代謝(解毒)に GSH が用いられたことが推測される。事実、トリコテセン系カビ毒が肝臓で GSH 抱合体となることが知られている(Gouze, Laffitte et al. 2006)。また本研究よりトリコテセン系カビ毒の毒性低減に抗酸化物質が有効である可能性が示唆された。すなわち、GSH は細胞内で主要な抗酸化物質であることから、抗酸化物質により、細胞内酸化度の上昇が抑制され、これらトリコテセン系カビ毒の毒性低減効果が期待される。実際に、白血球系細胞を用いたトリコテセン系カビ毒誘導性細胞毒性に対するカテキンによる抑制作用が報告されており(Sugiyama, Kinoshita et al. 2011)、同報告はこの推測を支持する。したがって、今後抗酸化物質によるトリコテセン系カビ毒の減弱作用の研究は、食の安全をはかる上で重要なテーマの一つと考えられる。

免疫毒性からみた OTA と CIT の複合毒性については、本研究よりその作用は相加ではない可能性が示唆された。OTA と CIT 各々単独では細胞毒性が認められない濃度においてその共存下ではマクロファージ様細胞において毒性を呈することが明らかとなった。両毒素は *Penicillium* 属真菌が産生する二次代謝産物であり、共汚染が認められることから(杉山圭一 and 小西良子 2009)、今回見出した毒性は OTA と CIT のリスク評価に貴重な知見を付与するもの

と考えられる。今後、その毒性機序について研究を進めることで同毒性の発現メカニズムが明らかとなれば、対策法と各毒素の新たな毒性情報が得られると期待される。OTA については免疫毒性として T および B リンパ球の増殖阻害等研究例が報告されているが(Pfohl - Leszkowicz and Manderville 2007)、CIT の明確な免疫毒性についての報告例は少ない。したがって、特に CIT については本研究を推進することで、新規毒性に関する知見が得られると期待できる。また両毒素とも腎毒性を有することが知られるが(杉山圭一 and 小西良子 2009)、両毒素共存下での腎毒性発現機序に今回の現象を誘発する機構が影響している可能性も否定できず、その場合これら毒素の腎毒性についても新たな知見が付与できよう。

E. 結論

本研究から、タイプ A トリコテセン系カビ毒の T-2 と HT-2 は、ヒト肝ガン由来細胞 Hep G2 の細胞内 GSH 含量を 200 - 400 nM の毒素存在下ではコントロールと比較し約 50%まで低下させることが明らかとなった。本結果は、T-2 と HT-2 の毒性低減に抗酸化物質が有効であることを示唆する。

OTA と CIT の免疫細胞におよぼす複合毒性については、両毒素による複合毒性は相乗的である可能性が示唆された。本結果は今後両毒素のリスクアナリシスを行うにあたり貴重な知見となる。

参考文献

- 1) Gouze, M., J. Laffitte, et al. (2006). "Effect of various doses of deoxynivalenol on liver xenobiotic metabolizing enzymes in mice." *Food and chemical toxicology* **44**(4): 476-483.

- 2) Pfohl-Leszkowicz, A. and R. A.Manderville (2007). "Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans." Molecular nutrition & food research **51**(1): 61-99.
- 3) Sugiyama, K., M. Kinoshita, et al. (2011). "(-)-Epigallocatechin gallate suppresses the cytotoxicity induced by trichothecene mycotoxins in mouse cultural macrophages." Mycotoxin Research: 1-5.
- 4) 小西良子 and 杉山圭一 (2008). "カビのリスク評価と国際的な動向." 食品衛生学雑誌 **49**(1): 1-10.
- 5) 杉山圭一 and 小西良子 (2009). "わが国におけるカビ毒による食中毒とその現状 (特集 自然毒食中毒)." 公衆衛生 **73**(5): 350-352.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究業績

なし

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

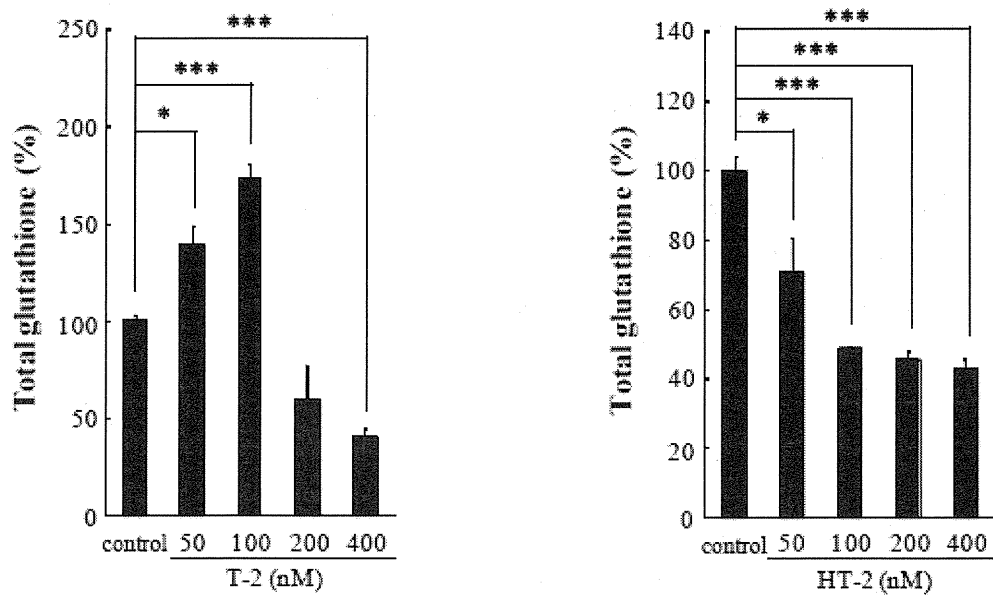


図1 HepG2細胞のGSH含量に及ぼすトリコテセン系カビ毒の影響
*P<0.05, ***P<0.001

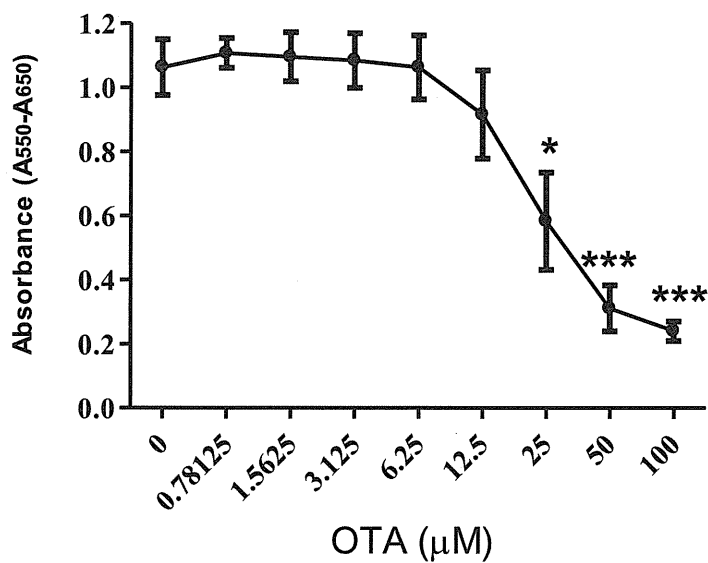


図2 THP-1細胞生存率に及ぼすオクラトキシンAの影響
*P<0.05, ***P<0.001