

3. 高速液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC-MS/MS) による測定

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 (例)

カラム (配布) : オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム温度 : 40 °C

移動相 : A溶媒 水、B溶媒 アセトニトリル

0分 A 95% B 5%

7分 A 35% B 65%

流速 0.4 ml/分

注入量 10 µl

イオン化法 : ESI (-)

モニターイオン (m/z) :

	プリカーサー	プロダクト 1	プロダクト 2
DON	295	265	138
3ADON	337	307	173
15ADON	337	150	219

2) 検量線の作成

- ① DON、3ADON及び15ADONの三種混合標準液 (配布) を室温に戻した後、100 µlをピペッターでキャップ付きバイアルにとり、アセトニトリル900 µlを加え密栓後、試験管ミキサー等で完全に溶解する。(スタンダード1 : 1µg/ml溶液)
- ② ①で作製したスタンダード1 : 1 µg/ml溶液100 µl をキャップ付きバイアルにとり、アセトニトリル900 µlを加え密栓後、試験管ミキサー等で完全に溶解する。(スタンダード2 : 100 ng/ml溶液)
- ③ ②で作製したスタンダード2 : 100 ng/ml溶液100 µlをキャップ付きバイアルにとり、アセトニトリル900 µlを加え密栓後、試験管ミキサー等で完全に溶解する。(スタンダード3 : 10ng/ml溶液)
- ④ その後、以下の表に従い、スタンダード1、2、3 をHPLC 用バイアルにピペッターで分注し、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。
- ⑤ 除去した後、HPLC注入液アセトニトリル : 水 (1:9) 1.0 ml を加えて、よく混和したものをHPLC 用検量線用溶液とする。
- ⑥ 作製した8濃度の検量線用溶液10 µl (試験溶液の注入量に合わせる) をLC-MS/MSに注入し、ピークの面積で検量線を作成する。

DON類の濃度(ng/ml)	1	2	5	10	20	50	100	200
スタンダード1 (1 µg/ml)						50 µl	100 µl	200 µl
スタンダード2 (100 ng/ml)			50 µl	100 µl	200 µl			
スタンダード3 (10 ng/ml)	100 µl	200 µl						

3) 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、得られたクロマトグラムにおいてDON、3ADON及び15ADONのそれぞれの保持時間と一致するピークの面積と「2) 検量線の作成」で求めておいた検量線から試験溶液中の濃度を求める。試験溶液中の濃度と試料中の濃度の関係は以下である。

$$\text{試料中のDONの濃度 (ng/g)} = \text{試験溶液中のDONの濃度 (ng/ml)}$$

(注)

DON及びアセチル化DONを扱う際には手袋を装着し、実験台にはベンチコート等を使用し、汚染に気をつけること。また、使用した容器・器具は1%次亜塩素酸ナトリウム液に2時間以上浸漬した後、通常の洗浄を行うこと。

「フモニシン類の分析法」

コロラティブスタディプロトコール

以下、フモニシンB1をFB1、フモニシンB2をFB2、フモニシンB3をFB3と表記する。

操作手順

1. 前処理

検体を天秤で20.0 gを正確に量りとり、300 ml容の共栓付き三角フラスコに移す。添加用試料（試料番号1～8を付する）の場合は、添加用FB1、FB2及びFB3の3種混合溶液を200 µl添加して暗所に1時間放置後に抽出溶媒を加える。これに抽出溶媒メタノール：水（3：1）100 mlを加える。振とう機を用いて15分間激しく振り混ぜ、50 ml容プラスチック遠心チューブに入れて3,000 gで5分間遠心分離し、上清液を抽出溶液とする。

2. カラム（強塩基性陰イオン交換体ミニカラム）による精製法

- 1) カラムの前処理：強塩基性陰イオン交換体ミニカラムa及びbをカラム架台にセットする（カラムaとbを用いた分析は同時に行う。）メタノール8 mlを入れ、自然落下で排出させる^{注1)}。抽出溶媒メタノール：水（3：1）8 mlを入れ、自然落下で排出させる。
- 2) サンプルの負荷及び洗浄：抽出溶液 10 mlをピペッター等で正確にカラムに入れ、自然落下で排出させる。抽出溶媒メタノール：水（3：1）8 mlを入れ、自然落下で排出させる^{注1)}。メタノール8 mlを入れ、自然落下で排出させる。
- 3) フモニシン類の溶出：溶出用溶液メタノール：酢酸（99：1）14 mlを入れ、流出液をキャップ付きバイアルに採る。
- 4) 試料のマトリックス効果を調べるため、以下の操作も行う。スタンダード1及びスタンダード2は「3. 2) 検量線の作成」に従って調製する。

添加用トウモロコシ試料（試料番号13及び14を付する）20 gに対し、上述の「1. 前処理」を行う。カラムa及びbを2本ずつ用意し、「2. 3)」の溶出まで行い、計4種の溶出液約14 mlをバイアルに得る。カラムaを用いて精製を行った溶出液の試料番号をそれぞれ13a及び14a、カラムbを用いて精製を行った溶出液の試料番号をそれぞれ13b及び14bとする。試料番号13a及び13bにスタンダード1（1 µg/ml溶液）を100 µl入れ、試料番号14a及び14bにスタンダード2（100 ng/ml溶液）を100 µl入れる。

試料番号	13a	13b	14a	14b
精製カラム	カラムa	カラムb	カラムa	カラムb
添加する標準液	スタンダード1 (1 µg/ml)		スタンダード2 (100 ng/ml)	
添加量	100 µl			

5) 3) 及び4) で得た溶出液について、アルミブロックヒーターを40°C以下で使用し窒素気流を送るか、エバポレーターを用いて、試験管中の溶媒を除去する。残留物にHPLC 注入液アセトニトリル：水（50：50）1.0 mlを加えたものを試験管ミキサー等で完全に溶解する。溶かした後、HPLC用バイアルに移す。試験溶液が濁っている場合は1.5 ml 容マイクロチューブ等に移し、10,000 g 以上、5 分間遠心し、その上清をHPLC 用バイアルに移す。これをLC-MS/MS用試験溶液とする。

なお、本スタディのサンプルにおいては、検量線から外れるものが多数存在する。そのため適宜試験溶液を希釈し、測定を行う。予備実験においては、原液とそれを20倍希釈した溶液を同時に測定し、検量線内に収まった値（両方とも収まった場合は原液の値）を用いた。

注1) 前処理及び洗浄のステップにおいて、排出速度が極端に小さい場合は、圧力をかけることができる。ただし、1秒当たりの排出量は1~2滴を超えないこと。

3. 高速液体クロマトグラフ・質量分析計（LC-MS/MS）による測定

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（例）

カラム（配布）：オクタデシルシリル化シリカゲル（Inertsil ODS-4 3×50 mm, 2 µm）

カラム温度：40 °C

移動相：A溶媒 0.1% ギ酸水溶液、B溶媒 アセトニトリル

0分 A 75% B 25%

5分 A 50% B 50% →8分 A 50% B 50%

10分 A 75% B 25%

流速 0.2 ml/分

注入量 5 µl

イオン化法：ESI（+）

モニターイオン（*m/z*）：

	プリカーサー	プロダクト 1	プロダクト 2
FB1	722	334	352
FB2	706	336	354
FB3	706	336	354

2) 検量線の作成

- ① FB1、FB2及びFB3の3種混合標準液（配付）を室温に戻した後、100 µlをピペッターでキャップ付きバイアル[5.1(3)]にとり、HPLC注入液アセトニトリル：水（50：50）900 µlを加え密栓後、試験管ミキサー等[5.1(10)]で完全に溶解する。（スタンダード1：1 µg/ml溶液）
- ② ①で作製したスタンダード1：1 µg/ml溶液100 µl をキャップ付きバイアル[5.1(3)]にとり、HPLC注入液 [4.1(8)] アセトニトリル：水（50：50）900 µlを加え密栓後、試験管ミキサー等[5.1(10)]で完全に溶解する。（スタンダード2：100 ng/ml溶液）
- ③ ②で作製したスタンダード2：100 ng/ml溶液100 µlをキャップ付きバイアル[5.1(3)]にとり、HPLC注入液 [4.1(8)] アセトニトリル：水（50：50）900 µlを加え密栓後、試験管ミキサー等[5.1(10)]で完全に溶解する。（スタンダード3：10 ng/ml溶液）
- ④ その後、以下の表に従い、スタンダード1、2、3とHPLC注入液 [4.1(8)] アセトニトリル：水（50：50）をHPLC用バイアル[5.1(9)]にピペッター[5.1(2)]で分注し、よく混和したものをHPLC用検量線用溶液とする。
- ⑤ 作製した7濃度の検量線用溶液5 µl（試験溶液の注入量に合わせる）をHPLC に注入し、ピークの面積で検量線を作成する。

フモニシン類の濃度 (ng/ml)	2	5	10	20	50	100	200
スタンダード1 :1 µg/ml (µl)						100	200
スタンダード2 :100 ng/ml (µl)			100	200	500		
スタンダード3:10 ng/ml (µl)	200	500					
HPLC注入液 (µl)	800	500	900	800	500	900	800

3) 定量

試験溶液をLC-MS/MS[5.1(12)]に注入し、得られたクロマトグラムにおいてFB1、FB2及びFB3のそれぞれの保持時間と一致するピークの面積と「2）検量線の作成」で求めておいた検量線から試験溶液中の濃度を求める。試験溶液中の濃度と試料中の濃度の関係は以下である。

試料中のFB1、FB2又はFB3の濃度 (ng/g)

$$= \text{試験溶液中のFB1、FB2又はFB3の濃度 (ng/ml)} \div 2$$

(注)

フモニシン類を扱う際には手袋を装着し、実験台にはベンチコート等を使用し、汚染に気をつけること。また、使用した容器・器具は1%次亜塩素酸ナトリウム液に2時間以上浸漬した後、通常の洗浄を行うこと。

付 録 2

付録 2

ゼアラレノンについての総説

共同著者: Pierre Galtier、Michel Etienne

序章

ゼアラレノン (ZEA) はエストロゲン様の作用をもつマイコトキシンであり、畑の穀類 (コーン、オオムギ、コメ、オートムギなど) や、貯蔵所 (鉄条網で囲まれ、コーンの穂を貯蔵し風乾する) におけるコーンの中や、発芽段階のオオムギの中で産生される。またバナナより分離された株においてもゼアラレノンが産生されうる (Jiménez ら,1997)。

ZEA を産生する菌種はほとんどが *Fusarium* 属に属し、*F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. crookwellense*, *F. equiseti*, *F. oxysporum* である。ガラクトース酸化物を産生する傾向にある *Dactylium dendroide* は *Fusarium graminearum* であると同定された (Wilbert ら,2003)。その体系は分子学的に明らかにする必要があるが、主に形態学的基準に依存している (Miller,2002)。

これらの種は異なる生態を持ち、腐生菌あるいは植物病原体である。全ての株がフザリウム毒素を産生する訳ではなく、毒素を産生する能力は、一つに限られない。同じ化合物がさまざまな方法で合成されうるためである (Miller,2002)。湿度 74% と湿度が高い条件下では、*Aspergillus oryzae*, *A. parasiticus* および *A. versicolor* は、コーンの種子の中にこの毒素を産生することが示されている (Atalla ら,2003)。

1. ゼアラレノンの物理化学的性質

ゼアラレノンは分子量が 318Da であり、レソルシル酸ラクトン (ゼアラレン) であり (Urry ら,1966、Mirocha ら,1967)、 β -6-(10'-ヒドロキシ-6'-セト-トランス-1'-ウンデシル)- μ -ラクトン酸の光学対掌体である。

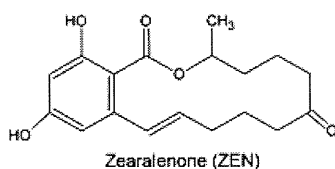


図 1. ゼアラレノンの分子構造

動物の臓器 (肝臓、消化管など) または汚染された穀物内部において、6'基におけるケトン基の還元によって α 、 β -ゼアラレノールなどの代謝物が生成される。紫外線により産生されるシス-ゼアラレノンは異性体であるトランス-ゼアラレノンと似た活性を持つ。6'基におけるケトン基の触媒による還元および、1'基における二重結合では α および β ゼアラレノールが作られる。その精製 α エピマーは同化物としてアメリカで用いられている (Bennett ら,1974)。1'基における二重結合ではゼアラレノンが作られる。

ゼアラレノンは白い固体結晶であり、融点は 165°C である。10'基での炭素非対称分子は光学活性を示す。10g/L のメタノール存在下においては旋光度 $[\alpha]^{25}_D = -170.5^\circ$ である。この分子は大変水に溶けにくく (25°C 下で 20mg/L) であり、ヘキサンに溶けやすい。溶

媒の極性の増加とともに溶けやすくなることが知られており、例えばベンゼン、クロロホルム、酢酸エチル、アセトニトリル、アセトン、メタノール、エタノールが該当する (Hidy ら 1977)。この理由のため、酢酸エチルは食品からの抽出溶媒として最も使用される。紫外線下では、分子は 236 nm、274 nm、314 nm という三つの最大吸光度を示す。メタノールでのモル吸光係数はそれぞれ 29700、13909、6020 となっている (Mirocha ら, 1977)。274 nm の吸光度が紫外線検出のために最も頻繁に使用されている。メタノール内にて 230~340 nm の光の照射を受けた時、分子は最大 450 nm の青色蛍光を呈する。

2. 分析の方法 (付録 1 の一般原則を参照のこと)

2. 1. 精製分離

多くの書誌雑誌において詳細にゼアラレノン分析法が説明されている (Krska と Joseph, 2001、Betina, 1993、Frisvad と Thrane, 1993、Scott, 1993、Lawrence と Scott, 1993、Steyn ら, 1991)。精製法として、液液抽出法 (LLE)、固相精製法 (SPE)、免疫法 (IAC)、液体または気体クロマトグラフィーがある。

LLE においては、有機層と水層という二層からなる。弱酸性 (フェノール) であることにより、アルカリ (NaOH または KOH) は有機層から水層に移動することができる。ゼアラレノンとその代謝物の液液抽出のために使用される溶媒は、主に酢酸エチル、メタノール、アセトニトリル、クロロホルムであり、混和してあるいは単独で用いる。アセトニトリル水和物 ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$) が最も一般的に用いられる。基質が固形の際には、有機溶剤、超音波やマイクロ波を用いた迅速抽出法などの手法を用いることができる (Pallaroni ら, 2003a と 2003b)。

生物学的基質 (原形質、尿、糞便など) からの抽出においては、精製工程の前に、加水分解工程を用いて位相 II の代謝物を得る段階をおく必要がある。酵素法 (*Helix pomatia* の抽出液、*Escherichia coli* β -グルクロニダーゼ) や化学法 (加溶媒分解やメタン分解) はいずれも、複合体を分解するために使用することができる。体液中のゼアラレノンとその代謝物の濃度は、正確に評価する必要がある。この評価にあたっては全体のプロトコルの中で、最も重要と考えられる段階をおさえてある必要がある (Zöllner ら, 2002)。植物性基質中における硫酸 (Plasencia と Mirocha, 1991) や配糖体 (Gareis ら, 1990) の複合体の存在により、干渉がおこることで、実際のゼアラレノン汚染の過小評価につながることが多い。

カートリッジまたは SPE ディスク (Ware ら, 1999) 上での精製は干渉があったとしてもゼアラレノン分離することができる。ほとんどすべての固定相を使用することができる: 逆相 (シリカ製の C18、C8、C4 のタイプ、またはスチレン系共重合体、ジビニルベンゼンのタイプがある)、順相 (フロリジル、SiOH、NH₂) (Llorens ら, 2002)、あるいは陰イオン交換 (SAX) も使用可能である。また、洗浄や選択的保持といった干渉を受けずに迅速 (30 秒) にサンプル精製を行うことができる Mycosep® カラム (Romer Labs Inc, Union, MT, USA, ZON #224) も使用できる (Silva さんら, 2001)。Mycosep 多機能固定相は、石炭、セライトや樹脂を交換するイオンなどの吸着剤になる。

IAC カラムはまた、この毒素のために開発され、頻繁に使用されている (DeSaeger ら, 2003、Eskola ら, 2002、Meyer ら, 2002、Fazekas と Tar, 2001、Kruger ら, 1999、Zöllner ら, 1999、Schuhmacher ら, 1998、Visconti と Pascale, 1998、Rosenberg ら, 1998)。

最後に、半調製 HPLC はまた、ゼアラレノンに関する開発とその代謝物の投与に応用されている。これは使用には難はあるものの、その分離能は高く精製に適している。

ここでゼアラレノンには、特に溶液中で、感光されやすいことに注意する必要がある。光分解を防止するために、実験中はよく注意する必要がある。

2. 2. 検出および投与

穀物やミルク、体液中のゼアラレノンを検出するために、免疫を利用した技術が数多く開発されている。モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を利用する RIA と ELISA 法もその一部である (Meyer ら, 2002、Pichler ら, 1998)。しかし、これらのキットは α -ゼアラレノールと β -ゼアラレノール間で交叉反応 (Maragos ら, 2004) する可能性がある。その検出限界は、 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の 10 分の 1 から 100 分の 1 にとどまり低い。

サンプルがこのマイコトキシンで汚染されていない場合、およびマイコトキシンやその代謝物を定量する必要がない場合での検出という目的に限れば、これらの技術は有用である。物理化学的手法においては、分離方法が体系的に関連付けられており検出に特化している。このマイコトキシン群の化学構造では、HPLC および GC を用いることができる。薄層クロマトグラフィーは、現在ではほとんど使われない (Dawlatana ら, 1998、De Oliveira ら, 1998)。出版された研究のほぼ全てにおいて選択された方法は、逆相の原理を使用して液体クロマトグラフィーによって分離されており、C18 型固定相と $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 移動相を組み合わせた使用が多い。分子認識ポリマー (MIP) を使用して、より特異的に検出する方法が近年開発された (Weiss ら, 2003)。

多くの検出器の種類を使用することができる：蛍光光度計 (De Saeger ら, 2003、Eskola ら, 2002、Fazekas と Tar, 2001、Kruger ら, 1999、Ware ら, 1999、Visconti と Pascale, 1998) や、特異性の低いダイオードストリップに置き換えられることも多い固定波長 UV 検出器 (Llorens ら, 2002、Fazekas と Tar, 2001) がある。代謝物に応じて、検出感度は異なり、さらに代謝物濃度 (α -ゼアラレノールと β -ゼアラレノール) が低いと検出感度も低い。LC-MS や大気圧インターフェイスといった技術を組み合わせる方法が考案されて以降、安息香酸ラクトンに特化した方法が開発された。いわゆる大気圧化学イオン化法 (APCI) は、エレクトロスプレー (Kleinova ら, 2002) に続いておそらく最もよく使われる (Pallaroni ら, 2002a、Jodlbauer ら, 2000、Zöllner ら, 1999、Rosenberg ら, 1998)。LC-MS/MS 分析は特異性が非常に高いため、分析にかける前に精製手順を組み込む必要はないとされる (Jodlbauer ら, 2000、Pallaroni ら, 2003b、Zöllner ら, 1999, 2000, 2002)。共抽出による干渉は、イオン化効率を低下させ、検体の濃度 (イオン除去機構) を過小評価することに繋がる。ゼアラレノンとその代謝物は、GC-MS で分析できる (Meyer ら, 2002、Pillay ら, 2002、Tanaka ら, 2000、Ryu ら, 1996) が、最初に派生反応を組み込む必要がある。フルオロアシル化と同様にトリメチルシリルがよく使われており (Ryu ら, 1996)、特に負化学イオン化モード (Miles ら, 1996、Kennedy ら, 1998) においてシグナル感度を向上させることができる。

3. 食品商品の内容量に影響する要因

3. 1. 真菌の発育およびゼアラレノン産生に関する要因

ヨーロッパ、アメリカ、アジアといった地域において、天候が悪い時 (さらに穂が露出した状態) において、穀物の種子の成熟段階において毒素原性の真菌によってトリコテセンなどの他の毒素と同様にゼアラレノンがつけられる (Gajecki ら, 2002)。種子においてゼアラレノンがつけられる条件は、温度、水分、水分活性 (aw)、基質、真菌の由来が複

合的に関与する。ゼアラレノン産生は 32°C 下においては非常に乏しく、20°C で最大となるが、菌の遺伝的違いにより異なる (Llorens ら, 2004)。連続した温度変化の後に産生が顕著に増加するという報告があり (Sherwood ら, 1974、Eugenio ら, 1970)、これはコーンが貯蔵庫に保管されている際に発生しうる。

F. graminearum、*F. verticillioides*、*F. proliferatum* といった真菌の競合的影響は *Fusarium* 属菌のコロニー形成と関連するが、ゼアラレノン産生とは関係がない (Velutti ら, 2000)。

畑において成長する条件下で、わらに比べてコーンやソルゴーにおいてよりゼアラレノンが存在する傾向にある。

ゼアラレノンは、小麦においては何も付加されていない状態や、ゼアラレノン-4-β-D-グルコシドの状態 (陽性サンプルの 42% でこの状態であった) で産生される。この濃度は 17~104 μg/kg となり、ゼアラレノン量は 10~860 μg/kg となる (Schneweiss ら, 2002)。代謝物 (α および β ゼアラレノール) は汚染された穀類において認められる (Halgler ら, 1979、Schwardof ら, 1992)。ゼアラレノン産生カビは穀類にとどまらず、干し草や乾燥があまりされていないわら中でも認められる (Scudamore と Livesey, 1998)。サイレージ飼料に含まれるゼアラレノンは、二つの起源を持つ。一つは、サイロに入れるときに汚染された飼料によってもたらされるというものであり、もう一つはサイロで生成されるというものである。サイロ中での産生は、サイロ外での産生に比べ少ないと考えることもできるが、サイロ内に入れられた後数時間で起こる酸性度減少やサイロの不良圧縮が *Fusarium* 属菌の発育やゼアラレノン産生を高めうる。

これらの条件は、サイロに入れられ、乾物量が 35% 以上である長い束の形をした状態で貯蔵されるコーンで頻繁に起きる。したがって、Borreani ら (2003) はコーンのサイロ内のゼアラレノン産生は、酸素濃度が低い中心部よりもサイロ周囲において問題となることを示した。

1997 年 5 月~2001 年 3 月にかけてブラジルで行われた疫学研究においては、コーンサイレージにおいてマイコトキシン汚染の可能性が高いと考えられた分析試料の 57.5% でゼアラレノンが検出された (Netto ら, 2002)。ゼアラレノンを産生する種の一部が頻繁にニュージーランドの放牧草を汚染する (Di Menna と Parle, 1970)。さらに、乾燥させた放牧草 (Towers, 1993、Towers と Sposen, 1993) や干し草 (Mirocha ら, 1968) においてはゼアラレノンに 300~3,000 μg/kg 汚染されていることが明らかとなった。

3. 2. ゼアラレノン含有量の検索法

市場に流通している小麦中のゼアラレノンとデオキシニバレノールの再分配量は似ており (トリコテセンの章を参照のこと)、小麦粉と比べふすまや穀物中の内容量が同じである (Lee ら, 1987、Trigo-Stockli ら, 1996)。

ゼアラレノンはデオキシニバレノールとニバレノールよりも難水溶性であり、異なるコーンスターチン製品において広く分布している。

Lauren と Ringrose は、1997 年に種よりもグルテンにおいてゼアラレノン汚染が多い (200~1,200%) ことを報告している。可溶性画分のゼアラレノン含有は報告が様々であり、1997 年の Lauren と Ringrose による報告では、Bennett ら (1978) とは逆に、浸積水ではほとんどあるいは全くゼアラレノンが検出されなかったと述べている。

コーンの粗挽き粉では、Bennett ら (1978) は、ゼアラレノン濃度が穀粒に比べて胚、特に脂肪で 2~3 倍に達すると報告した。グリッツ (粗挽き粉) の汚染が少ない場合においては、ブランでの汚染が穀粒よりも多く、胚よりは少ないことが明らかとなっている。

4. 毒性の特徴

2000年にSCFとJECFAにより、有用な毒性データが調査された。本章に記載されているデータや結論は大部分をこれら2つの評価機関に依拠しており、2000年以後の研究をさらに付け足している。

4. 1. 毒性動力学

異なる薬物代謝研究において、ゼアラレノン経口投与直後から迅速に吸収され、ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼの作用により、 α -および β -ゼアラレノールに代謝される。これは、グルクロニド抱合を受けることによる。種に応じた代謝が異なることが報告されている：ラットにおいては、ゼアラレノンの大半は、遊離もしくは抱合化された状態にある。しかし、わずかな量であるが、ゼアラレノールとその抱合体が形成される（SCF,2000、JECFA,2000）。ラットやマウスでは、腸肝循環と関連する胆汁中排泄が観察されるが、ラットにおいては毒素の尿中排泄が優勢となる。ブタにおいてはゼアラレノンの腸における再吸収の度合いが低く、腸肝循環が起こるが、尿中排泄が主となる。

in vitro 試験によって、特に α -ゼアラレノールの立体特異的還元活性化やグルクロン酸抱合に関して、動物種間で動態が異なることが確認されている（Malekinejadら、2006a）。

ヒトに適用可能なデータは一つだけ存在する：ブタと同じようにゼアラレノンは、グルクロン酸抱合親化合物と α -ゼアラレノールの形で尿中に排泄されるというものである（SCF,2000、JECFA,2000）。血液においてはゼアラレノンやゼアラレノールはヒトの性ホルモンの特定のグロブリンに結合する（JECFA,2000；EriksenとAlexander,1998）。

4. 2. 一般的な毒性

4. 2. 1. 急性毒性

経口投与後のゼアラレノンの急性毒性は、マウス、レートおよびモルモットに腹腔内投与後と同様に弱い。DL50は4,000~20,000mg/kg pc程度である（JECFA,2000）

4. 2. 2. 亜急性、亜慢性毒性

90日間以上の経口投与による毒性研究によって、実験動物や家畜への影響はエストロゲン受容体とゼアラレノンあるいはその代謝物の相互作用により高まることが明らかとなっている。ブタと羊はげっ歯類より感受性が高い。反復投与試験によって、ブタのNOAELは組織および繁殖に関わるエストロゲン作用に基づいて、40 μ g/kg pc/dayとされる。しかし、ラットのNOAELは100 μ g/kg pc/dayに達する（JECFA,2000；Kuiper-Goodmanら、1987）。

4. 2. 3. 遺伝毒性

1993年、IARCは枯草菌を用いたDNA修復SOS染色体試験で陰性となった一方で、同じ細菌のREC-アッセイでは陽性となったことを明らかにした。ゼアラレノンは、ネズミ

チフス菌 (Ames 試験) や。酵母の遺伝子組み換えを誘発しないが、姉妹染色分体交換や、染色体異常、CHO 細胞倍化を引き起こす (IARC,1993)。一方で代謝活性化は起こさない。最近の研究では、本毒素が溶原菌の DNA による SOS 機序修復を誘導しうるが、この効果はビタミン E の存在下は起こらないことが示されている (Ghedira- Chekir ら,1998)。同ビタミンはサルの腎臓細胞やマウスの骨髄で観察されているゼアラレノンの小核誘導化を防ぐ (Ouanes ら,2003)。

in vivo における遺伝毒性効果はこまめに反復投与を行い LD₅₀ の 0.4~4% に相当する 10~40 mg/kg pc を投与した際に、マウスの骨髄における染色体異常の割合が増加した。ビタミン E 前処理を行い 17β-エストラジオール又はプロゲステロンを投与すると、特に、各受容体での競合によって染色体異常の減少が認められた。この結果は、これらの複合体が分子機序を阻害することを示唆する (Ouanes ら,2005)。DNA 付加体形成は BALB/c 雌マウスで研究されており、経口投与または腹腔内投与によって、2 mg/kg の蛍光色素をつけたゼアラレノンを用いて行われている。12~15 種類の付加体が肝臓や腎臓で発見されている。DNA 付加体の量は特に腹腔内投与後において、肝臓で多いことが明らかとなっている。4 mg/kg pc/day のビタミン E の同時投与により、この DNA 付加体の形成が顕著に減少する (Grosse ら,1997)。マウスの卵巣内では、1、5、7、9、10 日に渡って 1 mg/kg pc の反復経口投与を行った際に 6 種類の DNA 付加体が観察されている (Pfohl-Leszkowicz ら,1995)。マウスで前もって β-ナフトフラボン措置を行うことで、ゼアラレノン投与量に応じて付加体形成が増加することが確認されている。しかし、そのような増加は Ah 受容体欠落マウスにおいては認められない。

代謝活性化の方法における P450 の 1A2 チトクロームの役割の可能性を示す現象は in vivo モデルで確認されている (Pineau ら,1998)。しかし、3 週間にわたって 0.05 mg/kg のゼアラレノン (5 μg/kg pc) を含む餌を与えられた Sprague - Dawley 雌ラットの器官からは、DNA 付加物は認められていない (Li ら,1992)。

4. 2. 4 発癌性

1993 年に CIRC/ IARC はゼアラレノン評価を行った。動物実験の数が少ないため、他のフザリウム毒素同様第 3 群に分類されており、人における発癌性が評価できないというものである (IARC,1993)。

NTP レポートによると、1982 年には B6C3F マウスの調査によると、103 週間にわたって、0.50~100mg/kg のゼアラレノン (雌について 0.9~18mg/kg、雄について 0.8~17mg/kg pc/day) を含む餌を与えることにより、群内における生存や体重損失について有意差は認められなかったことが示されている。雄においてはこの措置によって、腫瘍性病変は認められなかった。雌においては、骨髄に影響を及ぼす骨髄線維症など特定の臓器 (子宮線維症、哺乳動物の腺の嚢胞管) において投与量依存性エストロゲン作用が認められている。肝細胞腺腫は、雄の 8、6、14% に雌の 0、4、14% において認められ、統計的に有意な増加は雌において認められた。下垂体腺腫の発生においても統計的に有意な傾向が認められており、雄で 0、9、14%、で雌 7、5、31% となっている。下垂体癌は、少量の投与を行った雄一匹と、多用量の投与を行った雌 2 匹で認められている。しかし、投与群とコントロール群において、下垂体癌発症について有意な差は認められなかった。また、このような腫瘍は、ホルモンの濃度による影響よりも用量依存性の傾向が認められた (特に

8～9 mg/kg pc/day 以上)。2000 年には、SCF 調査会がこれらの腫瘍はマイコトキシンのエストロゲン効果による影響と結論づけた。同じ結論は、1998 年の JECFA によって α -ゼアララノール評価の際に下されている。

Fisher ラットを用いた研究 (NTP,1982) においては、103 週間にわたって、0、25 または 50mg/kg のゼアラレノンを含む餌を投与したところ (すなわち 0、1、2 mg/kg pc/day)、その平均体重増加量がコントロール群より低い値を示した。またが平均体重の減少が投与量に依存して認められた (最も多い投与量について 44 週間投与後に、雄の 19%、雌の 11%において認められた)。投与群とコントロール群との間で生存に有意な差は認められていない。また、用量の多さや雌雄の違いを問わず以下の非腫瘍性病変が観察されている：前立腺炎、精巣萎縮、雄の腺嚢胞管・肝細胞空胞化の発生増加、進行的慢性腎症の発生増加である。雄雌いずれにおいても少量の投与量で、網膜症、白内障の発生増加が認められている。腫瘍の発生については、投与による増加は認められていない。

Wister ラットで行われた研究では、104 週間にわたってゼアラレノンに汚染された餌を投与 (0、0.1、3.0 mg/kg pc/day) し、3 mg/kg pc の投与において雄雌いずれも統計的に有意な肝臓の肥大化が観測された。さらに、子宮重量は最大投与量を与えられた群の雌 2 匹において増加した。3mg/kg pc 投与を受けたラットにおいては、大腿骨の小柱形成が認められた。この現象を除いては、生存率と腫瘍の発生といったどんな生物学的変化も観察されていない (Becci ら,1982)。この研究から 0.1 mg/kg pc/day の NOAEL が推定されている。

4. 3. 臓器毒性

4. 3. 1 免疫毒性

in vitro 研究において、リンパ球をゼアラレノン下に曝露した後免疫学的パラメータの変化が示されている：マイトジェン活性、IL - 2 および IL - 5 産生増加による、刺激後のリンパ球増殖抑制である (JECFA,2000)。一方、in vivo 研究ではゼアラレノンの免疫毒性は認められていない。

2 週間にわたって 10mg/kg のゼアラレノンを添加した飼料を B6C3F マウスに与えた。リステリア菌の感染後、脾臓菌数は、コントロール群と比較して、感染後 1 日と 4 日において増加傾向を示している。感染後 8 週間後における負の影響は認められていない (Pestla ら,1987)。

B6C3F マウスを使用した別の研究では、ゼアラレノンの 45mg/kg pc の皮下内投与後、リステリア菌に感染させている。この研究では、投与群とコントロール群との間に、生存率や脾臓細菌数の差は認められていない (Pung ら,1984)。

また、6 週間にわたってゼアラレノンの 10mg/kg 添加飼料を与えた B6C3F マウスでは、IgG、IgM、IgA、リンパ球、好中球、単球、好酸球数の血中濃度の変動は認められなかった (Forsell ら,1986)。

4. 3. 2. 生殖毒性

多くの *in vitro* 研究において、ゼアラレノンとその代謝物は、エストロゲン受容体 (ER) に競合的に結合することが示されている。特定の受容体との結合は、様々な種において子宮、腺、肝臓、視床下部において起こることが *in vivo* 研究で実証されている。ラットの子宮内の細胞膜受容体に対するゼアラレノンとその副産物における結合率は、次の順序による。 α -ゼアララノール $>$ α -ゼアラレノール $>$ β -ゼアララノール $>$ ゼアラレノン $>$ β -ゼアラレノールの順である (Kuiper-Goodman ら,1987、Eriksen と Alexander,1998)。

ゼアラレノンは ER α および ER β 受容体に結合し、活性化できるようである。これはヒトの ER α および ER β 受容体を導入した細胞において認められる。ゼアラレノンは、ER α 受容体のトータルアンタゴニストであり、ER β 受容体におけるアゴニストとアンタゴニストのいずれの作用も有することが考えられる (Kuiper ら,1998)。マウスにおける膈上皮角化試験でエストラジオールと比較した結果、皮下および局所投与後におけるエストロゲン活性は 0.001 および 0.01 であった。この試験では、 α -ゼアラレノールのエストロゲン活性はほぼ同じであるが、子宮を用いた試験ではより活性が高くなると考えられている (Kuiper と Goodman ら,1987)。

in vitro 研究において、ヒト前立腺の過形成の均質化が起こり、ゼアラレノンは α -および β -ゼアラレノンに代謝される。この減少に関与するのが、3 α -および 3 β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼである (Thouvenot ら,1981)。最近ではこれらの結果は、ブタ顆粒膜または卵細胞培養 (Malekinejad ら,2006b) および豚の肝臓の亜細胞画分でも確認されている (Malekinejad ら,2005)。ゼアラレノンは、テストステロンが 5 α -ジヒドロテストステロン (雄においてアンドロゲン作用を示す) に代謝される過程で 17 β -エストラジオールの競争阻害剤として働く (Thouvenot ら,1980)。その他食品の植物性エストロゲン (クメストロール、ケルセチンは、ビオカニン A) はヒト黄体顆粒膜細胞で試験が行われ、ゼアラレノンはアロマターゼ活性を阻害するが、タイプ 1 デヒドロゲナーゼ 17 β -ヒドロキシステロイドは阻害しないことが示されている (Whitehead と Lacey, 2003)。同じ細胞モデルでは、ゼアラレノンはアロマターゼ活性を持つアンドロステンジオンからのエストラジオール形成を抑制する効果があると考えられる。しかし、このエストラジオール形成に関わる酵素タンパクの発現低下は伴わない (Lacey ら,2005)。このような分子間相互作用は、ヒトなど様々な動物種でゼアラレノンのエストロゲン活性に関与する可能性がある。

ゼアラレノンは、げっ歯類や家畜動物における生殖障害を引き起こす。マウス、ラット、モルモット、ウサギにおいて、出生率の低下、胚致死的な吸収量の増加、産児の体重減少、副腎腺・甲状腺・下垂体重量の変化だけでなく、プロゲステロン・エストラジオールの血中濃度の変化などの多様なエストロゲン作用が報告されている。ただし、催奇形性効果は報告されていない (JECFA,2000)

豚は、げっ歯類よりもゼアラレノンの生殖毒性により感受性を持つと考えられる。性的に成熟した雌豚について、発情周期の 5~20 日間の間に 0、1、5 および 10 mg/kg (0、40、200、400 μ g/kg pc/day) のゼアラレノンを含む 2kgs の飼料を与えた研究が行われている。5 または 10 mg/kg に汚染された飼料を与えた際に、発情間隔は、コントロール群の 21 \pm 0.3 日から 32.7 \pm 3.3 日に顕著に増加する。これは 1 mg/kg の汚染飼料では認められていない。黄体はゼアラレノンフリーの飼料を与えると減少する (Edwards ら,1987b)。

思春期前の雌豚で行われた研究では、低用量のエストロゲン効果が報告された (Bauerら,1987)。豚二匹については 0.25 mg/kg ゼアラレノン含有飼料を与え (11 日間にわたって 10 μ g / kg pc/day の投与)、続いて 5 日間にわたってゼアラレノンを含む飼料を与えた。また別の豚二匹については、0.05mg/kg のゼアラレノン含有飼料を与えた (21 日間にわたって 2 μ g / kg pc/day の投与)。そして一匹の豚はコントロールとして用いた。最も高い投与量においては、外陰部の赤みや腫れだけでなく、乳房の腫れも起こった。さらに、卵巣においては多くの小胞と嚢胞性卵胞が観察されている。この低用量投与の実験期間の後において特異な兆候があったとの報告はされていないが、検死の結果、卵巣での小胞卵胞の数がコントロール群と比べて投与群で多いことが示されている。これらの効果は、影響のない投与量を確立するために、より多くの動物を使用してさらに研究を進めていく必要がある。

4. 4. 参考毒性値

1999 年、公衆衛生上級理事会 (the France Public Superior Hygiene Council : CSHPF) は、一日耐容許容量を 0.1 μ g/kg/day と提案した。これは、サルでの生殖におけるエストロゲンの影響の研究から導かれた NOAEL 50 μ g/ kg/day を踏まえた最適な値であると考えられる。

同じ年、JECFA 委員会は、暫定的最大一日耐容許容量 (DJMTP) として、0.5 μ g/kg/day を設定した。これは、Edwards らによる研究で、成豚の短期間投与 (15 日) から計算された値である (1987b)。

委員会は安全係数 100 を使用して、直接および α -ゼアラレノール代謝物となった後の影響が出る可能性がある最小量として 200 μ g/kg/day を設定した。委員会はゼアラレノンおよびその代謝物の投与量が 0.5 μ g/kg pc の値を超えないことを勧告している。

2000 年には、SCF は 0.2 μ g/kg pc という暫定的一日投与量を決定した。これは、Edwards らによる成豚を使用した研究に由来している (1987b)。この研究においてはホルモンの影響を考慮し、200 の安全係数を適用して、40 μ g/kg pc/day NOAEL 値が設定された。

5. フランス人のゼアラレノン曝露

5. 1. ヒトの健康への影響 (疫学データ)

ゼアラレノンは 49 人の女性の子宮内で計測されている。27 人が腺癌を示し、11 人が子宮内膜過形成、11 人では子宮内膜の増殖が報告された。各グループでのゼアラレノンの値はそれぞれ、48 \pm 6、167 \pm 18 ng/ml、検出限界以下であった。子宮内膜過形成の組織の 8 例、腫瘍組織の 5 例において、ゼアラレノンの存在は認められなかった (Tomaszewskiら,1988)。

1978 年から 1981 年にかけて、ゼアラレノンおよびゼアラレノールはプエルトリコにおける幼児の思春期の早期化をもたらした可能性が疑われている (Saenz de Rodriguez, 1984; Saenz de Rodriguezら,1985)。ゼアラレノールやその代謝物は血漿中で検出された。地元産の食肉の粉碎物の分析において、著者らはラットの子宮小胞体細胞質内の ER 受容体が強く反応を示すことを明らかにした。これは、ER と関連する物質の存在を示している。FDA により行われた研究では、食品内のエストロゲン様成長因子は認められてい

ない。その後、思春期の変化と肉と大豆ベースの製品の消費の間に統計的な関係が認められたが、特定された症例の50%以上では統計的関連性が認められなかった（Freni-Titulaerら,1986）。別の研究においても、確認された症状についてゼアラレノンまたはゼアララノールとの関連は明らかにできなかった。このことからエストロゲン様作用のフタル酸エステルが原因ではないかという仮説も挙げられている（Colon, 2000; Larriuz-Serranoら,2001）

5. 2. ヒトの曝露

フランス人の「ready to eat」食品からのゼアラレノンへの曝露量を調査するために2000年より始まったトータルダイエツトスタディ（EAT）では、245の食品サンプルの分析により、5サンプル（2%）の食品が検出限界以上のゼアラレノン含有していた。中でも2サンプルについては、欧州委員会が設定した50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の最大許容量を上回っていた（ミュージリータイプの朝食用シリアル、コーンの花びらはそれぞれ200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と22 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、滅菌ツルマメ（soja）は53 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、ゴマは18 $\mu\text{g}/\text{kg}$ となっていた）（Leblancら,2005）。大人と子供含めた一般的な消費者（P95）における平均曝露量について表1に示した。

表1：ゼアラレノンに汚染された食品の平均供給量の推定値とのフランス人の異なる集団（P95）。

集団の属性		平均供給量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$ pc/day)	P95 供給量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$ pc/day)	P95における 暫定的摂取量 (%)	暫定摂取量を 超える人 (%)
一般人	成人(15歳以上)	0.033	0.070	36	0.2
	小人(3~14歳)	0.066	0.132	65	2.5
ベジタリアン (15歳以上)	オボラクトベジタリアン (卵○・乳製品○)	0.050	0.110	55	0
	ラクトベジタリアン(卵×・乳製品○)	0.060	0.120	60	0
	ヴィーガン (いずれも×)	0.200	0.570	285	31

SCFは暫定摂取量を0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc/dayと定めている。

フランス人のゼアラレノン曝露に寄与する食品は、小麦、小麦の加工品、コーンやコメなどである。ゼアラレノン理論上の供給量は3~14歳の小児の2.5%とヴィーガンの31%においてSCFで設定された暫定一日耐容量を超えると考えられる。

ヨーロッパの研究（SCOOP Task,2003）において決定されたフランス人の食品からの平均曝露量は、フランスの研究（表2）で観察された値とほぼ同じである。

表2：フランス人のゼアラレノンに対する食を介した平均曝露量（SCOOP Task, 2003）

集団属性	平均曝露量($\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{day}$)
全成人	0.027
成人男性	0.029
成人女性	0.024
小人 (3~14 歳)	0.042

フランス人の食品からの曝露量は、オーストリア ($0.029 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)、フィンランド ($0.027 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)、オランダ ($0.021 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) と似た値であり、イギリス ($0.014 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)、ドイツ ($0.005 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)、ノルウェー ($0.001 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)、ポルトガル ($0.004 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) よりは多い。しかし、食品の調査の種類、分析サンプル数、分析手法や研究室の数は国によって異なっており、欧州諸国の曝露量との間で比較して、正確な結論を出すことはできない。

6. 動物の曝露

6. 1. 副産物への移行を通じて起こる動物の健康への影響

6. 1. 1. 豚

思春期以前の豚において、ゼアラレノン精製体あるいは自然に汚染された食品の消費に関係するエストロゲン過剰の症状が頻繁に報告されている。

膣の脱出同様に、外陰部の赤色化および腫れは雌で観察されている (Zwierzchowski ら, 2006)。子宮が肥大化し、卵巣が萎縮し、膣上皮の厚さが増加する (Jakimiuk ら, 2006)。精巣萎縮 (Farnworth と Trenholm, 1981) や、雄における直腸の脱出や、雌雄における乳首の発達が観察される。これらの症状は 3~7 日 $1.5 \sim 2 \text{mg}/\text{kg}$ のゼアラレノンを含む食品の摂取後に表れ、汚染された食物の摂取を止めた後、7~14 日の間に消える。脱出組織の出血や感染によって死に至る可能性がある。こうした若い豚の症状に反して、妊娠中または授乳期、思春期の雌では高エストロゲン血症はほとんど観察されない。こうした症状を観察するためには、より多くの汚染量を必要とする (例えば $64 \text{mg}/\text{kg}$ (Long ら, 1982))。しかし、若い雌豚に対して $2.21 \text{mg}/\text{kg}$ のゼアラレノンを餌から投与しても、成長速度は影響を受けない (Friend ら, 1990)。

雌の性的成熟に対するゼアラレノン摂取の影響はあまり明確ではない。178 日齢の豚に対して、2 週間にわたり $10 \text{mg}/\text{kg}$ のゼアラレノンを含む餌 (Green ら, 1990) や、70 日齢の時期から $1.5 \sim 2 \text{mg}/\text{kg}$ の餌 (Rainey ら, 1990) を与えた際には、性的成熟は影響を受けない。しかし、3 回中 1 回において、Edwards ら (1987a) は、145 から 193 日齢において、 $10 \text{mg}/\text{kg}$ のゼアラレノンを含んだ餌を与えると、10 日間の思春期遅延を示す。この際においても、思春期に達する動物の割合は影響を受けない。

逆に、Rainey ら (1990) によると、若い雌豚において 70 日齢から $2 \text{mg}/\text{kg}$ のゼアラレノンを含んだ餌を与えられると、思春期がより早期に訪れる。このような結果は、投与量、動物の年齢や汚染された餌の投与期間などの違いによって説明されるかもしれない。

成豚が 15 日間にわたって、5 または $10 \text{mg}/\text{kg}$ のゼアラレノンに汚染された餌を摂取すると、発情周期の長さや発情間隔の増加が認められる (Edwards ら, 1978a, b)。そのような効果は、JECFA と SCF によって NOAEL として決定された一日摂取量 $40 \mu\text{g}/\text{kg pc}$ に

対応する 1mg/kg のゼアラレノン汚染餌摂取後には観察されていない。Young ら (1990) は、汚染レベルと発情サイクルの長さの間に相関関係が認められると報告した。雌豚において 3 mg/kg の量を超えると起こる発情遅延は、発情休止期とみなされるため産業上重要である。ゼアラレノンにより約 4mg/kg 汚染された餌を摂取した豚の半数 (15/33) は、思春期以来、50 日を経過しても発情を示さなかった (Etienne と Jemmali,1982)。屠殺時に認められた黄体の出現と卵巣における白体の消失から、周期性がなくなっていることが分かった。子宮角は肥大し、光沢が認められていた。黄体の減少は、汚染された食品を再び摂取した後 30 日間の間に起こると考えられる (Edwards ら,1987b)。

黄体の持続に対するゼアラレノンの関与メカニズムが議論されている。Flowers ら (1987) によると、ゼアラレノンは安息香酸エストラジオールに反して直接卵巣に作用する。PGF α 分泌増加を妨げることや、LH 分泌を阻害することはない。しかし、Green ら (1990) によると、雌豚に 10ppm のゼアラレノンを含む餌を一週間与えると、平均 LH 量の減少が起こり、続いて LH のパルス頻度と大きさが上昇し FSH 分泌が起こるが、異常を修正する動きは認められない。また、Diekman ら (1986) によれば、卵巣を摘出した雌豚において、1mg/kg pc のゼアラレノンの経口投与によって LH や FSH の分泌抑制が認められた。

授精前におけるゼアラレノンの用量が 10 mg/kg 程度の場合、排卵率、受胎能、受胎率、子宮内や出生時の一腹子数、胚の死亡率に影響はない。妊娠中に高い投与量を与えた場合は、一腹子数は減少し、場合によってはゼロとなる (64ppm: Long ら,1982; 60 および 90 mg/kg: Long と Diekman,1984; 108 mg/day: Long と Diekman,1986)。効果の大きさは、毒素の投与量に関係していると考えられ (Long と Diekman,1984; Young ら,1990)、ある研究では、ゼアラレノン量が 60ppm 以下の場合においても、一腹子数及び胚の生存率が減少しうることが示されている。Long ら (1982) は、雌豚において餌のゼアラレノン含有量を 0~7、38 および 64mg/kg にした際に一腹子数がゼロの個体や、異常に少ない (1~3 胎児) 個体の数が増加することを明らかにした。限られた期間における投与でも胎児の死亡率を増加させる: 妊娠 7~10 日目の間にゼアラレノンを摂取した場合において、4 頭中わずか 1 頭の雌豚において懐胎が認められたが、2~6 日目または 11~15 日目までの間において影響は認められなかった (Long と Diekman,1986)。

ゼアラレノンの曝露量が 7 mg/kg や 30mg/kg 以上の場合、子宮内に存在する胚胎膜が変性することによって妊娠 40 日後に胎児の死亡が確認される (Long and Diekman,1984)。加えて、Long ら (1992) は妊娠 7 および 10 日においてゼアラレノン 1 mg/kg pc を摂取すると、妊娠 11 日目から胚盤胞の変性が起こり、13 日目には変性が更に進行することを報告した。胚死亡率におけるゼアラレノンの作用機序はまだ明確化されていない。

108mg/kg のゼアラレノンを摂取した母豚において、子宮組織の弱拡大の組織学的小および顕微鏡視野では異常が認められず、生理学的変化は起こらなかった (Long と Diekman,1984,1986; Long ら,1992)。プロゲステロンと 17 β -エストラジオールの量と同様、子宮内の胚盤胞の間隔は変化がないが、Ca、Mn、Zn の濃度は、コントロール群と比較して異なる (Long ら,1998)。プロゲステロンとプロラクチン量だけでなく、LH のピーク数も減少することが報告されている (Long と Diekman,1984,1986)。しかし、そのような変化や胚死亡との関係は明らかになっていない。

黄体の持続と発情期への回帰がないという現象は、妊娠期間の1および3日目において胎児を有しない豚で観察されている (Etienne と Jemmali,1982; Long ら,1982; Long と Diekman,1984; Young と King,1986)。受胎しなかった雌豚はゼアラレノン摂取によって疑似懐胎 (受精せず発情周期を持たない状態) となった (Etienne と Jemmali,1982)。黄体維持を説明できるもう一つの理由は、受胎した雌において全胎児が死に、未受胎の雌と同様の状況になるためである。

ゼアラレノンは胎児の成長や発達に影響をもたらす。受精が始まってからの4mg/kgのゼアラレノンの摂取が、妊娠80日後において24%の体重減少をもたらす (423gに対して323g)、一腹仔の異常を増加させる (Etienne と Jemmali,1982)。胎盤の重量も減少し、母胎間を繋ぐ機構の変化が示唆される。さらに、胎児は貧血となる (赤血球数が-11%となる)。Young と King ら (1986) はまた、新生子豚の出生体重が、食品のゼアラレノンの含有量が上がると減少することを発見した (0~9mg/kgのゼアラレノンを摂取した際において1.42kg→1.05kgとなる)。逆に、Long と Diekman (1984, 1986) は、同様の影響を見出せなかったが、彼らの研究においては、ゼアラレノンの投与期間は大変短く、妊娠30~40日目で屠殺した際において胎児もあまり発達していなかった。また他に、新生児の後肢の外転は、汚染された餌を食べた母豚の影響であると分かった (Miller ら,1973)。

乳中のゼアラレノンの存在の影響について焦点をあてた研究は少ない。Young ら (1982) や Dacasto ら (1995) によると、生まれた後の子豚の生存に影響がある。逆に Edwards ら (1987a) は、影響はないと述べている。出生後以後において授乳中の子豚における高エストロゲン血症が報告されており (Dacasato ら,1995)、生後8日 (Palyusik ら,1980) および35日齢における報告がある (Young ら,1982)。

α および β -ゼアラレノールは人工的に精製ゼアラレノンで汚染させた40mg/kgの餌を摂取した豚の乳中から検出されている (Palyusik ら,1980)。しかしながら、これらの化合物はいずれも胎盤で見つかっていない (Etienne と Jemmali,1982)。

イノシンの繁殖へのゼアラレノンの影響は限定されていると考えられる。未熟児において、18週齢まで、40mg/kgのゼアラレノンを含有する食品を摂取させると、性欲は減少するが、思春期の年齢やその精巣と精巣上体の大きさや重量、精子細胞数や精子の運動性には影響しない (Berger ら,1981)。8週間0~200mg/kgのゼアラレノンを摂取させた繁殖用イノシンにおいては睾丸の大きさ、性欲、テストステロンおよび血中17 β -エストロジオールは影響を受けない (Ruhr ら,1983)。従って彼らは、イノシンの繁殖においてはこのカビ毒は影響しないと結論づけている。

●動物の組織への移行

豚の組織におけるゼアラレノンおよびその残渣の貯留に関するデータは少ない (Sundlof と Strickland,1986)。

豚においては、ゼアラレノン抱合体と α -ゼアラレノールはゼアラレノンの主要な代謝物であり、 α -ゼアラレノールはゼアラレノンに比べて3~4倍エストロゲン作用が強い。20~30kgの豚に置いて、正味重量で0~11.5mg/kg経口投与すると、遊離したゼアラレノンが血中に10分で現れる (Farnworth と Trenholm,1981)。その量は10~20分後に最大となることから、すぐに吸収されることが考えられる。その後、すぐに代謝や排泄によっ

て減少するが、最大限投与を行った際においては24時間経過後も血液中で認められる。Dänickら(2005)によると、ゼアラレノンの消失半減期は、血漿中で2.6時間である。4日にわたって192 μ g/kg pc/dayを投与された雌豚においては、ゼアラレノンおよび α -ゼアラレノールはグルクロン酸に結合し、投与後5日まで血液中から、投与後4日まで尿中に検出される(Olsenら,1985)。

49kgの豚24匹を対象として、少量のゼアラレノン(LOAELである200 μ gあるいは400 μ g)を一週間にわたって毎日投与を行うと、最初の接種から2時間後にゼアラレノンと α -ゼアラレノールは増加する(Obremskiら,2003)。 α -ゼアラレノールの濃度はゼアラレノン濃度に比べて常時高い値となる。10kgの子豚に対して40mg/kgのゼアラレノンを含む餌を4週間にわたって与えると肝臓中に最大0.23mg/kgのゼアラレノンと0.31mg/kgの α -ゼアラレノールが認められる(JamesとSmith,1992)。Palyusikら(1980)の報告によると40mg/kgのゼアラレノンを含む餌を9日にわたって与えた豚の乳中に含まれるゼアラレノンは、ほとんどがゼアラレノールの構造で存在する(82~84%が β -ゼアラレノールの構造で、13~17%が α -ゼアラレノールの構造となる)。これらの毒素は汚染された餌を与えて42~44時間で検出された。乳中のゼアラレノン濃度は最大で0.58~0.79mg/kgとなる。

トリチウム化されたゼアラレノンを静脈内投与した実験で、胆汁はゼアラレノンとその代謝物を排泄する非常に重要な経路であることが明らかとなった(Biehlら,1993)。胆汁中の物質は腸管循環によって再利用され、体内存在期間が長くなる(豚においては3.3時間でなく胆汁中で86時間持続していた)。繁殖異常を起こした豚729頭のほとんどから胆汁中にゼアラレノンと α -および β -ゼアラレノールが検出された(Meyerら,2000)。Dollら(2003)によると、 β -ゼアラレノールは胆汁中にしか存在しない。DON 0.24mg/kg、ゼアラレノン0.009mg/kgを含んだ餌を12週間にわたって摂取すると、ゼアラレノンおよびその代謝物と餌中のそれとの比率は肝臓で0.009であったのに対して、胆汁中では4を示した(Goyartsら,2007)。ゼアラレノンを1.37mg/kg含むなど種々の毒素で汚染された餌を18日にわたって摂取した豚においては、筋肉中のゼアラレノンとその代謝物はごく少量(0.05%)となった。ゼアラレノールが筋肉中に含まれるということは、肝臓や腸管領域にゼアラレノンの代謝は限定されないことを意味する(Zöllnerら,2002)。

Mirochaら(1981)によると、ゼアラレノンとその代謝物は糞便や尿において、63%がゼアラレノン単体またはゼアラレノン抱合体として、32%が α -ゼアラレノールとして、5%が β -ゼアラレノールとして排除される。

6. 1. 2. 鳥類

●健康への影響

調査したすべての動物種の中で、鳥類は最もゼアラレノン耐性のようなものである(Gaumyら,2001a)。これまでの研究において、一般的には100 mg/kgを超える量が臨床症状を得るために必要であり、得られる臨床症状は表3にまとめている。