

201131036A

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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 杉山圭一

平成 24 年 (2012) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

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）-----	3
杉山圭一（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）	

II. 分担研究報告

マウスマクロファージ様細胞におけるトリコテセン系かび毒誘導性細胞毒性に対する緑茶カテキン類の効果に関する研究-----	20
杉山圭一（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）	

ヒト肝ガン由来細胞の細胞内レドックスにおよぼすトリコテセン系かび毒の影響に関する研究-----	36
杉山圭一（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	50
--------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物-----	52
-------------------	----

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：本研究課題において平成 23 年度ではかび毒のデトキシケーションについて焦点をあて研究を実施した。かび毒としては乳幼児への影響が危惧されるかび毒に留意し、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) を選択した。これらの毒素は穀類を汚染するため乳幼児への健康影響が懸念されるかび毒である。このトリコテセン系かび毒の毒性低減方法およびそのメカニズムについて、マウスマクロファージ様細胞とヒト肝ガン由来細胞株におけるそれぞれの細胞毒性と同毒性抵抗性を指標に検討を行った。その結果、本研究よりトリコテセン系かび毒により誘導されるマウスマクロファージ様細胞の細胞毒性を緑茶内に含まれるカテキン類が減弱させる効果を示すことが明らかとなった。またその効果はトリコテセン系かび毒が誘発するアポトーシスを同カテキン類が阻害することがその分子基盤の一つであることが示唆された。一方、白血球系細胞と比較しトリコテセン系かび毒に対して感受性の低いヒト肝ガン由来細胞株は、細胞毒性を呈しない濃度では細胞内を還元状態にシフトさせていることが明らかとなった。またその還元状態には細胞内の Glutathione ではなく Thioredoxin1 の蓄積が関与している可能性も明らかにした。抗酸化作用は緑茶カテキンの生理活性の一つである。以上の結果から、トリコテセン系かび毒のデトキシケーションには緑茶カテキン類が有効であること、またその機序は抗酸化作用によるアポトーシスの阻害である可能性が推測された。

A. 研究目的

食品の安心・安全を確保するうえで、かび毒汚染は人為的に制御が困難な自然毒である。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、今年度は乳幼児が摂取する可能性があるトリコテセン系かび毒の毒性低減を目的に研究を実施した。トリコテセン系かび毒に分類される Deoxynivalenol (DON) と Nivalenol (NIV) また T-2 toxin (T-2) および HT-2 toxin (HT-2) について同毒性を低減しうる食品由来成分の同定を図った。トリコテセン系かび毒に対して感受性が高いとされる白血球系細胞となるマウスマクロファージ様細胞を用い同細胞の細胞毒性を指標に検討した。食品由来成分としては、トリコテセン系かび毒と同様に免疫毒性を示すブルボキシンの毒性を低減することが知られる緑茶カテキンに着目し、そのトリコテセン系カビ毒誘導性細胞毒性に対する効果およびメカニズムについて生化学的手法を用いて検証した。メカニズムについては、ヒト肝ガン由来細胞株 HepG2 を用いて検討を進めた。HepG2 は白血球系細胞と比較してトリコテセン系カビ毒に対して感受性が低い。従って、HepG2 のトリコテセン系かび毒適応機構は、得られた同毒性を減弱しうる食品由来成分の分子基盤の解明に寄与すると考えられる。

B. 研究方法

マウスマクロファージ様細胞におけるトリコテセン系かび毒誘導性細胞毒性に対する緑茶カテキン類の効果に関する研究

細胞培養は以下の通りに行った。マウスマクロファージ様細胞株 RAW264 (Riken Cell Bank, Tsukuba, Japan) は、ペニシリン (100 units/ml) -ストレプトマイシン (100 µg/ml) 混合液 (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) および 10%非働化仔ウシ血清 (Gibco, Grand Island, NY, USA; Lot No. 1211852) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, 以後 DMEM と略記 : Gibco, Grand Island, NY, USA) にて 75 cm² の組織培養プラスチック (Techno Plastic Products, Zurich, Switzerland) で、37°C、5%CO₂ 条件下で培養した。

トリコテセン系かび毒の調製・取り扱いは下記の通りである。標準品の DON (Wako, Osaka, Japan) は減衰を防ぐためアセトニトリル (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) に溶解し、最終濃度 100,000 ng/ml となるように調製後 -30°C で保存した。同様に NIV (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 、T-2 toxin (Wako, Osaka, Japan) および HT-2 toxin

(Wako, Osaka, Japan) も最終濃度 100,000 ng/ml となるように調製後-30°Cに保存した。これらかび毒は窒素ガスで濃縮乾固した後、DMEM で溶解して使用した。

Catechin 類の調製・取り扱いについては以下のとおりである。EGCG (Wako, Osaka, Japan) と EGC (Wako, Osaka, Japan) はエタノール (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) に溶解し、最終濃度 0.2 M となるように調製後-30°Cに保存した。同様に ECG (Wako, Osaka, Japan)、EC (Wako, Osaka, Japan) および GA (Wako, Osaka, Japan) は最終濃度 0.02 M となるようエタノールに溶媒し調製後-30°Cに保存した。

MTT アッセイ法は以下の通りに行った。RAW264 細胞を 96 well plate (Techno Plastic Products, Zurich, Switzerland) に 1×10^4 cells/well となるように 100 μ l/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、カテキン類とトリコテセン系かび毒を含む培地を 100 μ l/well で加え、さらに 24 時間培養した。カテキン類と各種トリコテセン系かび毒を含む培地の調製法は次の通りである。各濃度 (0、5、10、20、40 μ M) の EGCG もしくは 40 μ M カテキン類 (EC、ECG、EGC、EGCG、GA) を含む DMEM を調製し、同 DMEM 培地を用いて

DON を 7.8 ~ 8,000 ng/ml になるよう段階希釈した。同様に各濃度の EGCG を含む DMEM を調製し、同 DMEM 培地を用いて NIV を 7.8 ~ 8,000 ng/ml、T-2 toxin および HT-2 toxin を 0.78 ~ 800 ng/ml になるよう段階希釈した。なお、コントロールには、上述のカテキン類含有 DMEM 調製時に含まれるエタノール濃度と同濃度となる 0.2% エタノールを含む DMEM を用いた。培養後、MTT 試薬 (Cell Proliferation Kit 1; Roche Diagnostics Basel, Switzerland) である MTT labeling reagent を 10 μ l/well 加え 4 時間培養し、Solubilization Buffer を 100 μ l/well 添加し 37°C、5%CO₂ 条件下で一晩保温後、吸光度 550 nm をマルチプレートリーダー Tristar LB 941 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) 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た。

Caspase-3/7 活性の測定は下記の通りである。RAW264 細胞を 96 well plate に 5×10^4 cells/well となるように 50 μ l/well 播種し、37°C、5%CO₂ 条件下で一晩培養した。培養液を吸引後、各濃度の EGCG と DON を含む培地を 50 μ l/well 加え、さらに 24 時間培養した。各濃度の EGCG と DON を含む培

地の調製法は次の通りである。各濃度 (0、4、40 μ M) の EGCG を含む DMEM を調製し、同 DMEM 培地を用いて DON を 125 ~ 8,000 ng/ml になるよう段階希釈した。なお、コントロールには、上述の EGCG 含有 DMEM 調製時に含まれるエタノール濃度と同濃度となる 0.2%エタノールを含む DMEM を用いた。培養後、Caspase-Glo 3/7 Reagent (Promega, Madison, WI, USA) を 50 μ l/well 加え攪拌後、37°C で 90 分間インキュベートした。インキュベート後、96 well flat bottom white polystyrene plate (Corning Costar, Kennebunk, ME, USA) に培養液を 80 μ l/well 加え、マルチプレートリーダー Tristar LB 941 を用いて発光を測定し、DON 非存在下におけるコントロールの値を 1 とし caspase-3/7 活性を算出した。

ヒト肝ガン由来細胞の細胞内レドックスにおよぼすトリコテセン系かび毒の影響に関する研究

細胞培養方法は下記の通りである。ヒト肝ガン細胞 HepG2 (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。

各種かび毒の調製は以下の通り行った。標準品の Deoxynivalenol (DON) および Nivalenol (NIV) は減衰を防ぐためアセトニトリルに溶かし、最終濃度 1 mM となるように調製後-30°C で保存した。実験に際しては、各種カビ毒を窒素ガスで濃縮乾固した後、DMEM で溶解させ使用した。

MTT アッセイは以下の通りに行った。HepG2 細胞を 96 well plate に 1×10^4 cells/well となるように 100 μ l/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、トリコテセン系かび毒を含む培地を 100 μ l/well 加え、さらに 24 時間培養した。各種トリコテセン系かび毒を含む培地の調製法は次の通りである。DMEM 培地を用いて DON を 1.25 ~ 10 mM になるよう段階希釈した。同様に NIV を 1.25 ~ 10 mM になるよう段階希釈した。なお、DMEM のみをコントロールとした。実際の測定方法は、「マウスマクロファージ様細胞におけるトリコテセン系かび毒誘導性細胞毒性に対する緑茶カテキン類の効果に関する研究」で記載した方法に準じて行った。

活性酸素種 (ROS) 濃度測定は下記の通りである。Dichlorodihydrofluorescein

diacetate (以後 DCFH-DA と略記 : Lamba, Grot-tenhofstr, Austria) は、Dimethyl sulfoxide (Wako, Osaka, Japan) に溶かし、最終濃度 1 mM となるように調製後-80°Cで保存した。

HepG2 細胞を 6 well plate (Techno Plastic Products, Zurich, Switzerland) 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、各種かび毒を含む培地を 1 ml/well 加え、さらに 24 時間培養した。各種かび毒を含む培地の調製法は次の通りである。DMEM 培地を用いて DON および NIV を 1.25 ~ 10 mM になるように段階希釈した。なお、コントロールには DMEM のみを用いた。ROS の測定方法として、Dichlorofluorescein assay を用いて次の通りに行った。培養後、1 mM DCFHDA を 10 μ l/well 加え、37°C、5%CO₂ で 30 分間培養した。上清を吸引し、Phosphate Buffered Saline (以後 PBS と略記 : Nissui Pharmaceutical CO., LTD, Tokyo, Japan) を 2 ml/well 加えて洗浄、吸引した。洗浄後、0.25% Trypsin-EDTA (Gibco, Grand Island, NY, USA) を 500 μ l/well 加え、37°C、5%CO₂ で 2 分間保温した。DMEM を 500 μ l/well 加え、全量を 1.5 ml マイクロチュ

ーブ (INA・OPTIKA CO., LTD, Osaka, Japan) に回収し、centrifuge (HITACHI, Tokyo, Japan) を用いて、5 分間、800 rpm、4°C で遠心分離した。上清を除去し、PBS を 200 μ l/tube 加えサンプルとした。次に Black 96 well plate (Sterilin Limited, Caerphilly, United Kingdom) にサンプルを 100 μ l/well 加え、マルチプレートリーダー Tristar LB 941 を用いて励起波長 485 nm および蛍光波長 530 nm を測定し ROS を検出した。

Total Glutathione 濃度測定は以下の通りである。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。Glutathione (以後 GSH と略記 : 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。N-Acetyl-L-cysteine (以後 NAC と略記 : Wako, Osaka, Japan) および (±)-Dithiothreitol (以後 DTT と略記 : Wako, Osaka, Japan) は、注射用水に溶かし、最終濃度 1 M となるように調製後-80°C で保存した。

HepG2 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、各種かび毒を含む培地を 1 ml/well 加え、さらに 24 時間培養した。各種かび毒を含む培地の調製法は次の通りである。DMEM 培地を用いて DON を 1.25 ~ 10 m M になるよう段階希釈した。同様に NIV を 1.25 ~ 10 m M 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 80µl/tube 加え、凍結(-80°C)と融解を 2 回繰り返した。融解後、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 m M GSH を測定した。

ウエスタンブロッティングについては下記の通り行った。HepG2 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、各種かび毒を含む培地を 1 ml/well 加え、さらに 16 時間培養した。各種かび毒を含む培地の調製法は次の通りである。DMEM 培地を用いて DON を 2.5 ~ 20 m M になるよう段階希釈した。さらに、DMEM 培地または DON を含む DMEM

培地に GSH を 0.25 ~ 1.0 mM、NAC および DTT を 1.0 mM になるように添加した。なお、コントロールには DMEM のみを用いた。培養後、PBS を 2 ml/well 加え洗浄した。0.5% Triton X-114 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) およびプロテアーゼ阻害剤として Complete mini EDTA-free (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany) を含む PBS を 100 μ l/well 加え、CELL SCRAPER にて細胞を掻き取った後、1.5 ml マイクロチューブに回収した。適宜にボルツェックスを行いながら氷上で 5 分間放置した後、centrifuge を用いて、5 分間、4000 rpm、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、ブラッドフォード法によりタンパク質量を測定した。ブラッドフォード法によるタンパク質量測定は次の通りに行った。サンプルを 10 倍希釈し、96 well plate に 2.5 μ l/well 加え、10 倍希釈した Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad laboratories, inc., USA) を 250 μ l/well 加えた。吸光度 550 nm をマイクロプレートリーダー THERMO (Tecan Group Ltd., Switzerland) を用いて測定し、タンパク質量を算出した。標準曲線としてウシ血清アルブミン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を用いた。

タンパク質 30 μ g 相当になるように各サンプルを分取し、4×SDS Buffer (Novagen, USA) を加え、5 分間、100°C 処理した後、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動に供した。12% SDS-ポリアクリルアミドゲルを作製し、サンプルおよびマーカートをロードした。マーカートとして Prestained XL-Ladder Broad (APRO, Tokusima, Japan) を用いた。泳動 Buffer には、10×泳動 Buffer (0.25 M Tris、1.92 M Glycine、10% SDS) を 10 倍希釈したものを使用し、電気泳動は POWER PACK200 (Bio-Rad laboratories, inc., USA) を用いて 100V で行った。泳動後、分離ゲルを Towbin Buffer (25 mM Tris、192 mM Glycine、20% Methanol) で 15 分間振とうさせ平衡化を行った。

転写用メンブレンである Immobilon-P Transfer Membranes (Millipore Georgia, USA) をメタノール (Wako, Osaka, Japan) に 15 秒程度浸漬させ、その後濾紙 (Bio-Rad California, USA) と共に Towbin Buffer に浸漬させた。分離ゲルの平衡化終了後、TRANS-BLOT SD (Bio-Rad, California, USA) の中央に十分に浸漬させた濾紙、メンブレン、分離ゲル、濾紙の順番に置いた。10 ~ 15 V で 5.5 mA/cm² の電流を 30 分間通電することでブロッキングを行った。ブロッティ

ング終了後、メンブレンを 1×Tris Buffered Saline with Tween20 (以後 TBST と略記 ; pH7.6、25mM Tris、150 mM NaCl、0.1% Tween20) に 5%量スキムミルク (Wako, Osaka, Japan) を添加した 5%スキムミルク TBST 溶液に浸し 30 分間ブロッキングした。

ブロッキングしていた溶液を除去後、5%スキムミルク TBST 溶液を 10 ml 加えメンブレンを浸漬させ、一次抗体 Anti-trx (FL-105) (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) を 10 μ l および Monoclonal Anti- β -Actin Antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を 3.0 μ l 加え 30 分間室温でインキュベートした。その後、余分な一次抗体を除去するため TBST を適量加え、5 分間振とうさせた。この洗浄操作を 5 回行った。次に 5%スキムミルク TBST 溶液を 10 ml 加えメンブレンを浸漬させ、二次抗体 Anti-Rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch, Philadelphia, USA) および Anti-Mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, Philadelphia, USA) を各 1.0 μ l 加え 30 分間室温でインキュベートした。その後、余分な二次抗体を除去するため TBST を適量加え、5 分間振とうさせた。この洗浄操作を 5 回行った。バンドの検出には、ImmunoStar LD (Wako, Osaka, Japan)

を用いた。メンブレンに Luminescence Solution A および Luminescence Solution B が同量含まれる混合液を滴下し、余分な溶液を除去した。二次抗体に結合しているペルオキシダーゼと基質の反応により生じた化学発光を LumiCube (Liponics, Inc., Tokyo, Japan) を用いてバンドの確認を行った。

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

C. 研究成果

マウスマクロファージ様細胞におけるトリコテセン系かび毒誘導性細胞毒性に対する緑茶カテキン類の効果に関する研究

【DON 誘導性細胞毒性に対する EGCG の効果】

マウスマクロファージ様細胞 RAW264 を用いて DON により誘導される細胞毒性に対する EGCG の効果について検討した。その結果、EGCG はコントロール (0.2% EtOH) と比較して 250 ng/ml 以上の DON により誘導される細胞毒性を低減させる作用を有することが明らかとなった。また、この抑制作用は EGCG 濃度依存的であり、特に 20 μ M EGCG 以上では顕著に認められた。

【NIV 誘導性細胞毒性に対する EGCG の効果】

RAW264 を用いて NIV により誘導される細胞毒性に対する EGCG の効果について検討した。その結果、同カテキンを含まないコントロール (0.2% EtOH) と比較して 500 ng/ml 以上の NIV により誘導される細胞毒性を EGCG は低減させることが明らかとなった。また、この抑制作用は EGCG 濃度依存的であり、特に 20 μ M EGCG 以上で顕著に認められた。

【T-2 toxin 誘導性細胞毒性に対する EGCG の効果】

T-2 toxin 濃度を 0 ~ 800 ng/ml とし、RAW264 を用いて T-2 toxin により誘導される細胞毒性に対する EGCG の効果について検討した。その結果、同カテキンを含まないコントロール (0.2% EtOH) と比較して 800 ng/ml T-2 toxin により誘導される細胞毒性を EGCG は低減させる作用を有することが明らかとなった。また、この抑制作用は EGCG 濃度依存的であり、特に T-2 toxin 濃度 800 ng/ml 以下で誘導される細胞毒性に対し、40 μ M EGCG ではより顕著な抑制作用が認められた。

【HT-2 toxin 誘導性細胞毒性に対する EGCG の効果】

T-2 と同様に RAW264 を用いて HT-2 toxin により誘導される細胞毒性に対する EGCG の効果について検討した。その結果、コントロール (0.2% EtOH) と比較して 12.5 ng/ml 以上の HT-2 toxin により誘導される細胞毒性を EGCG は低減させることが明らかとなった。また、この抑制作用は EGCG 濃度依存的であり、特に 20 μ M EGCG 以上で顕著に認められた。

【DON 誘導性細胞毒性に対する緑茶カテキン類の効果】

緑茶葉には EGCG 以外のカテキン成分として、EGC、EC および ECG が含まれる。RAW264 を用いて DON により誘導される細胞毒性に対する EGCG、EGC、ECG および EC の効果について検証し、さらに EGCG および ECG 分子内に存在する GA の効果についても検討した。その結果、緑茶カテキン類および GA はコントロール (0.2% EtOH) と比較して 500 ng/ml 以上の DON により誘導される細胞毒性を低減することが明らかとなった。また、この効果作用は EGCG>ECG \approx EC>EGC>GA の順番で認められた。

【DON 誘導性アポトーシスに対する EGCG の効果】

DON は caspase-3 を活性化することによ

りアポトーシスを誘導することが報告されている。そこで RAW264 を用いて DON により誘導されるアポトーシスに対する EGCG の効果について caspase-3/7 を指標に検討した。その結果、コントロール (0.2% EtOH) では、DON 濃度依存的に caspase-3/7 の上昇が確認された。この DON 誘導性 caspase-3/7 の活性化は EGCG (4, 40 μ M) 存在下では抑制されることが明らかとなった。特に、DON 濃度 500 ng/ml 以上において誘導される caspase-3/7 活性の誘導を EGCG は顕著に抑制することが明らかとなった。

ヒト肝ガン由来細胞の細胞内レドックスにおよぼすトリコテセン系かび毒の影響に関する研究

【HepG2 細胞内酸化度におよぼす DON と NIV の影響】

ヒト肝ガン由来細胞株 HepG2 細胞を用いて、今回使用する DON と NIV 各濃度における細胞毒性を MTT アッセイにより確認した。その結果、今回使用した濃度 (1.25 - 10 μ M) では HepG2 細胞は細胞毒性を示さないことが明らかとなった。同濃度域において、DCFH を用いて HepG2 細胞内酸化度を測定した。DON においては同濃度依存的な細胞内酸化度の減少が確認された。特に 10 μ M 存

在下では顕著な減少が認められた。一方 NIV においては 1.25 μ M で顕著な減少となることが明らかとなった。

【HepG2 細胞内 GSH 含量におよぼす DON と NIV の影響】

次に、主要な細胞内還元物質の一つである細胞内 GSH 含量におよぼす DON と NIV の影響を検討した。DON 処理された HepG2 細胞においては今回検討した濃度 (1.25 - 10 μ M) では少なくとも細胞内 GSH 含量の増加傾向は確認されなかった。10 μ M 存在下 DON 存在下では有意な減少が確認された。NIV においても減少傾向が認められ、細胞内 GSH 含量は 2.5 μ M から有意な減少が確認される結果となった。

【HepG2 細胞内 Trx1 発現量におよぼす DON の影響】

GSH とともに細胞内に主要な還元力を提供する Trx1 発現量におよぼす DON の影響について確認した。その結果、GSH とは異なり、濃度依存的な増加傾向が認められることが明らかとなった。

【HepG2 細胞における DON 誘導性 Trx1 発現上昇におよぼす各種抗酸化剤の影響】

HepG2 細胞において認められた DON 誘導性の Trx1 発現量の上昇に対する各種還元剤の影響を検討した。その結果、同上昇は

検討した GSH 濃度 (0.25 - 1.0 mM) において、濃度依存的に抑制されることが確認された。さらに GSH 以外の還元剤である DTT (1.0 mM) および NAC (1.0 mM) によっても同様に DON 誘導性 Trx1 の発現上昇は阻害されることが明らかとなった。

D. 考察

マウスマクロファージ様細胞におけるトリコテセン系かび毒誘導性細胞毒性に対する緑茶カテキン類の効果に関する研究

マウスマクロファージ様細胞 RAW264 を用いてトリコテセン系かび毒誘導性細胞毒性に対する緑茶カテキン類の効果について検討した。その結果、緑茶カテキン類および構成成分は、トリコテセン系かび毒誘導性細胞毒性を減弱させる効果を示した。その作用は GA 単独でも認められたから、GA 様分子をより多く含む緑茶カテキンがトリコテセン系かび毒誘導性細胞毒性を減弱させる効果が高いことが推察された。GA 様分子を 2 分子有する EGCG が最も高いトリコテセン系かび毒誘導性細胞毒性を示したことは本推察を支持する。また、EGCG が緑茶カテキン類として最も高い含有量 (約 50%) であることは、トリコテセン系

かび毒のデトキシケーションに緑茶カテキンを利用するにあたりアドバンテージの一つと言えよう。

本研究より、検討したトリコテセン系かび毒は食品衛生上問題となる Type A および B の両タイプに有効であることが明らかとなった。この事実は、わが国で汚染が認められる Type B のみならず、世界的にその汚染が問題とされている Type A にも有効であることを意味し、本研究がグローバルレベルで有益な情報を提供しているとも換言できる。

トリコテセン系かび毒誘導性細胞毒性の分子機序の一つと考えられるアポトーシスの同かび毒による誘導に対する EGCG の効果についても検討した。その結果、EGCG はトリコテセン系かび毒により誘発される caspase-3/7 活性を濃度依存的に抑制させることを見いだした。アポトーシスの際活性化される同酵素の活性化を EGCG が阻害することが、緑茶カテキン類が示すトリコテセン系かび毒誘導性細胞毒性に対する抑制作用の一序であることが本研究より示唆された。

ヒト肝ガン由来細胞の細胞内レドックスにおよぼすトリコテセン系かび毒の

影響に関する研究

ヒト肝ガン由来細胞 HepG2 を用いた細胞内レドックスにおよぼすトリコテセン系かび毒の影響について検討した。今回用いたトリコテセン系かび毒である DON と NIV は細胞毒性を呈しない濃度 (1.25 - 10 μ M) で HepG2 細胞内の酸化度を減少させることが明らかとなった。さらに、DON による細胞内酸化度の減少は細胞内 GSH 含量に起因せず、Trx1 のアップレギュレーションによる可能性が示唆された。白血球細胞においてトリコテセン系かび毒は酸化ストレスを誘発しアポトーシスを誘導することで細胞毒性を呈するとする報告がある。実際に、今回使用した DON 濃度ではヒト白血球系細胞では顕著な細胞毒性が認められる。一方、ヒト肝ガン由来細胞 HepG2 においては、同濃度域において細胞毒性は認められず、むしろ細胞内の酸化度は減少傾向にあることが明らかとなった。本研究から、HepG2 細胞においてはトリコテセン系かび毒による細胞内酸化度の上昇を抑制する機序を有すること、また同機序が細胞内 GSH 含量ではなく Trx1 量のアップレギュレーションによる可能性が強く示唆された。HepG2 における DON 誘導性 Trx1 量の増大が各種還元剤により抑制されたことは、この推測を支持

する。本研究結果は、トリコテセン系カビ毒に対する白血球系細胞の高感受性と、同毒に対して白血球系細胞と比較して低感受性となる肝臓細胞のそれぞれのメカニズムを合理的に説明する知見を提供したと言える。

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」において、本年度はかび毒のデトキシケーション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であるトリコテ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、マウスマクロファージ様細胞に対する細胞毒性をメルクマールに同毒性を低減出来る食品由来成分として緑茶カテキン類を同定した。また、白血球系細胞に対してトリコテセン系かび毒が惹起するアポトーシスを緑茶カテキン類が抑制をすることがその分子基盤である可能性も示唆した。さらにトリコテセン系かび毒に対して白血球系細胞と比較して耐性を持つヒト肝ガン由来細胞株 HepG2 を用いた検証で、緑茶カテキンの抗酸化作用

がトリコテセン系かび毒の毒性低減に有効であることも示唆した。HepG2 細胞は細胞内の主要な還元分子の一つである Trx1 をアップレギュレーションすることによりトリコテセン系かび毒により惹起される細胞毒性に対して適応している可能性あることから、抗酸化作用を有する分子が同毒性の低減に有効であることが推察された。

本研究はトリコテセン系かび毒のデトキシケーションに緑茶カテキン類が有効であること、またその分子機序に抗酸化作用が関与している可能性を示唆した。トリコテセン系かび毒毒性低減に緑茶カテキン類が活用できる可能性を示したことは元より、より有効な食品成分の探索についても、その指標となる生理活性が推測できている点で、本研究は食品の安心・安全確保に直接的に貢献できる成果を得たと言えよう。

参考資料

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).

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).

Sugiyama, K., Kinoshita, M., Kamata, Y., Minai, Y. and Sugita-Konishi, Y: (-)-Epigallocatechin gallate suppresses the cytotoxicity induced by trichothecene mycotoxins in mouse cultured macrophages, *Mycotoxin Res.* 27, 281-285 (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, 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. 研究業績

【原著論文】

1. Sugiyama, K., Kinoshita, M., Kamata, Y., Minai, Y. and Sugita-Konishi, Y: (-)-Epigallocatechin gallate suppresses the cytotoxicity induced by trichothecene mycotoxins in mouse cultural macrophages, *Mycotoxin Res.* **27**, 281-285 (2011).
2. Sugiyama, K., Kinoshita, M., Kamata, Y., Minai, Y., Tani, F. and Sugita-Konishi, Y:

Thioredoxin-1 contributes to protection against DON-induced oxidative damage in HepG2 cells, *Mycotoxin Res.* (in press).

【プロシーディング】

1. Sugiyama, K., Kinoshita, M., Minai, Y., Muroi, M., Tanamoto, K. and Sugita-Konishi, Y: Trichothecene mycotoxins inhibit MyD88-independent pathways of Toll-like receptors, *Cytokine.* **56**, 39 (2011).

【学会発表】

1. 杉山圭一、木下麻緒、鎌田洋一、薬袋裕二、小西良子: HepG2 細胞におけるデオキシニバレノールの抗酸化作用に関する研究、第 84 回日本生化学会大会 (2011, 9) .
2. Sugiyama, K., Kinoshita, M., Minai, Y., Muroi, M., Tanamoto, K. and Sugita-Konishi, Y: Trichothecene mycotoxins inhibit MyD88-independent pathways of Toll-like receptors, 9th Joint Meeting of ICS-ISICR, 39 (2011, 10).
3. 杉山圭一、木下麻緒、薬袋裕二、鎌田

洋一、谷 史人、小西良子：ヒト肝臓
癌由来細胞株 HepG2 の細胞内レドック
スにおよぼすデオキシニバレノールの
影響、日本マイコトキシン学会第 70 回
学術講演会講演要旨集 31 (2012, 1) .

4. 木下麻緒、小西良子、薬袋裕二、杉山
圭一：TLR シグナルに対するデオキシ
ニバレノールの阻害メカニズムの解明、
日本農芸化学会大会講演要旨集
(2012・京都) (2012, 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)

マウスマクロファージ様細胞におけるトリコテセン系かび毒誘導性
細胞毒性に対する緑茶カテキン類の効果に関する研究

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、マウスマクロファージ様細胞 RAW264 を用いてトリコテセン系かび毒誘導性細胞毒性に対する緑茶カテキン類の効果について検討した。マウスマクロファージ様細胞 RAW264 において、トリコテセン系かび毒により誘導される細胞毒性に対して、緑茶カテキン類はデトキシケーション作用を有することが明らかとなった。またトリコテセン系かび毒により誘発されるアポトーシスを阻害することがその分子機序の一つである可能性が示唆された。緑茶カテキン類は食品由来成分であることから、乳幼児も摂取する可能性のある主食の多くを汚染するトリコテセン系かび毒の毒性低減に、緑茶カテキン類は応用できる可能性がある。

A. 研究目的

気象変動により食糧需給が逼迫する可能性が指摘されつつある今日、わが国の食糧自給率はカロリーベースで 50% 割り込む状況であることも考慮すると、かび毒による食糧汚染による摂取可能な食糧の減少に対する対策は、食品の安心・安全確保の観点からも重要な検討課題の一つと言える。特に、カロリーの的にわが国の乳幼児から成人に至るまでその多くを依存する米、麦等

の主食となる食糧のかび毒汚染による被害は甚大となると容易に推測されることから、本研究の緊急度は高いと考えられる。

Fig.1 に示す 2 種類のタイプのトリコテセン系かび毒はこれら主食となる米、麦等を汚染するかび毒であり、その汚染はわが国のみならず、世界的に食品衛生上の問題とされている。本研究ではトリコテセン系かび毒により惹起される細胞毒性をメルク