

マールに、緑茶カテキン類の効果を検証した (Fig. 2)。トリコテセン系かび毒の特徴として白血球細胞系に対して強い細胞毒性を呈することが知られている。したがって、トリコテセン系かび毒により感受性の高いマウスマクロファージ様細胞を本研究の研究材料に用いた。また免疫毒性を示す毒素であるルブラトキシン B の毒性を低減すること、並びにトリコテセン系かび毒が酸化ストレスを誘発する可能性が指摘されていることから、抗酸化作用を有する緑茶カテキン類に着目して、トリコテセン系かび毒に対する緑茶カテキン類の毒性低減効果を検討することとした。

## B. 研究方法

### 細胞培養

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 cm<sup>2</sup> の組織培養フラスコ (Techno Plastic Products, Zurich, Switzerland) で、37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

### トリコテセン系かび毒の調製

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

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

RAW264 細胞を 96 well plate (Techno

Plastic Products, Zurich, Switzerland) に  $1 \times 10^4$  cells/well となるように 100  $\mu$ l/well にて播種し 37°C、5%CO<sub>2</sub> 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  $\mu$ 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  $\mu$ M) の EGCG もしくは 40  $\mu$ 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  $\mu$ l/well 加え 4 時間培養し、Solubilization Buffer を 100  $\mu$ l/well 添加し 37°C、5%CO<sub>2</sub> 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

RAW264 細胞を 96 well plate に  $5 \times 10^4$  cells/well となるように 50  $\mu$ l/well 播種し、37°C、5%CO<sub>2</sub> 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 (Coring Costar, Kennebunk, ME, USA) に培養液を 80  $\mu$ 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。

### C. 研究結果

#### 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。Fig.3 は、x 軸を DON 濃度 (0 ~ 8,000 ng/ml)、y 軸を { (550 nm 吸光度) - (650 nm 吸光度) } の値で示したものである。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  $\mu$ M EGCG 以上では顕著に認められた (Fig. 3)。

#### 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  $\mu$ M EGCG 以上で顕著に認められた (Fig. 4)。

#### 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  $\mu$ M EGCG ではより顕著な抑制作用が認められた (Fig. 5)。

#### 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  $\mu$ M EGCG 以上で顕著に認められた (Fig. 6)。

## 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 (Fig. 2)。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≒EC>EGC>GA の順番で認められた (Fig. 7)。

## 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。Fig.8 は、x 軸を DON 濃度 (0 ~ 8,000 ng/ml)、y 軸を caspase-3/7 活性で示したものである。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 が上昇することが確認された。

この DON 誘導性 caspase-3/7 の活性化は EGCG (4, 40  $\mu$ 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。

## **D. 考察**

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。

今回検討した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。

## E. 結論

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結果、緑茶カテキン類がトリコ

テセン系かび毒誘導性細胞毒性を減弱させる作用を有することが明らかとなった。また、その分子メカニズムは同かび毒により誘導されるアポトーシスの阻害作用がその一つであることが推測された。

## 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. 健康危険情報

なし

#### G. 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 cultured macrophages, *Mycotoxin Res.* **27**, 281-285 (2011).

##### 【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. Sugiyama, K., Kinoshita, M., Minai, Y., Muroi, M., Tanamoto, K. and

Sugita-Konishi, Y: Trichothecene mycotoxins inhibit MyD88-independent pathways of Toll-like receptors, 9<sup>th</sup> Joint Meeting of ICS-ISICR, 39 (2011, 10).

2. 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）。

#### 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

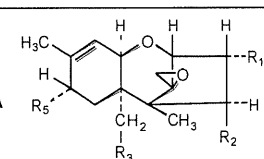
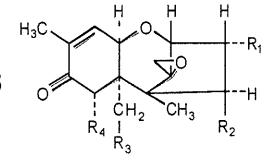
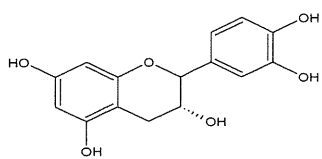
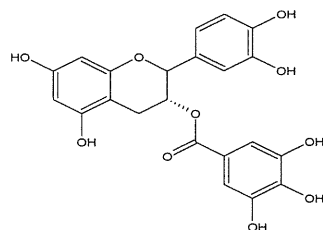
構造	名称	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
	T-2 toxin	OH	OAc	OAc	H	OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
	HT-2 toxin	OH	OH	OAc	H	OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
	Nivalenol (NIV)	OH	OH	OH	OH	
	Deoxynivalenol (DON)	OH	H	OH	OH	

Fig.1 Structure of trichothecene mycotoxins

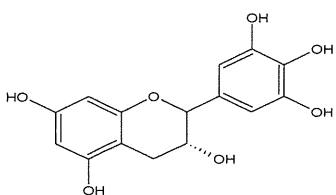




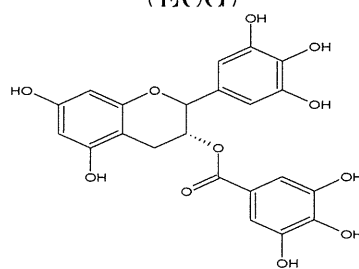
(-)-Epicatechin  
(EC)



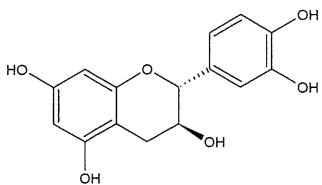
(-)-Epicatechin-3-gallate  
(ECG)



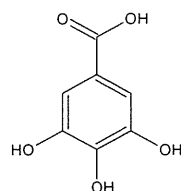
(-)-Epigallocatechin  
(EGC)



(-)-Epigallocatechin-3-gallate  
(EGCG)



(+)-Catechin



Gallic acid  
(GA)

Fig.2 Structure of catechins

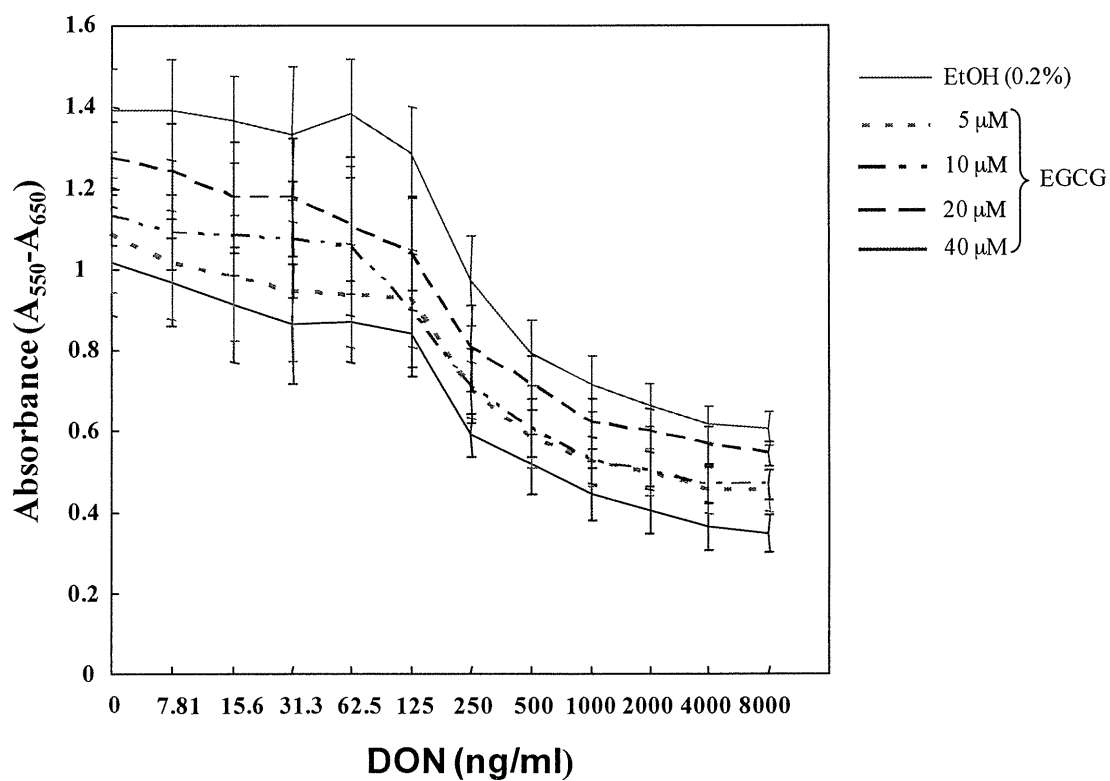


Fig. 3. Protective effect of Epigallocatechin-3-gallate on DON-induced acute damage to RAW264 cells. RAW264 cells were cultured in DMEM containing Epigallocatechin-3-gallate (5 - 40  $\mu$ M) in the presence of DON for 24 h. The results are expressed as mean value of absorbance that subtracted absorbance of 650 nm from absorbance of 550 nm. These are based on the RAW264 cells were cultured with EtOH (0.2%). Results are shown as means  $\pm$  S.D. of three independent measurements.

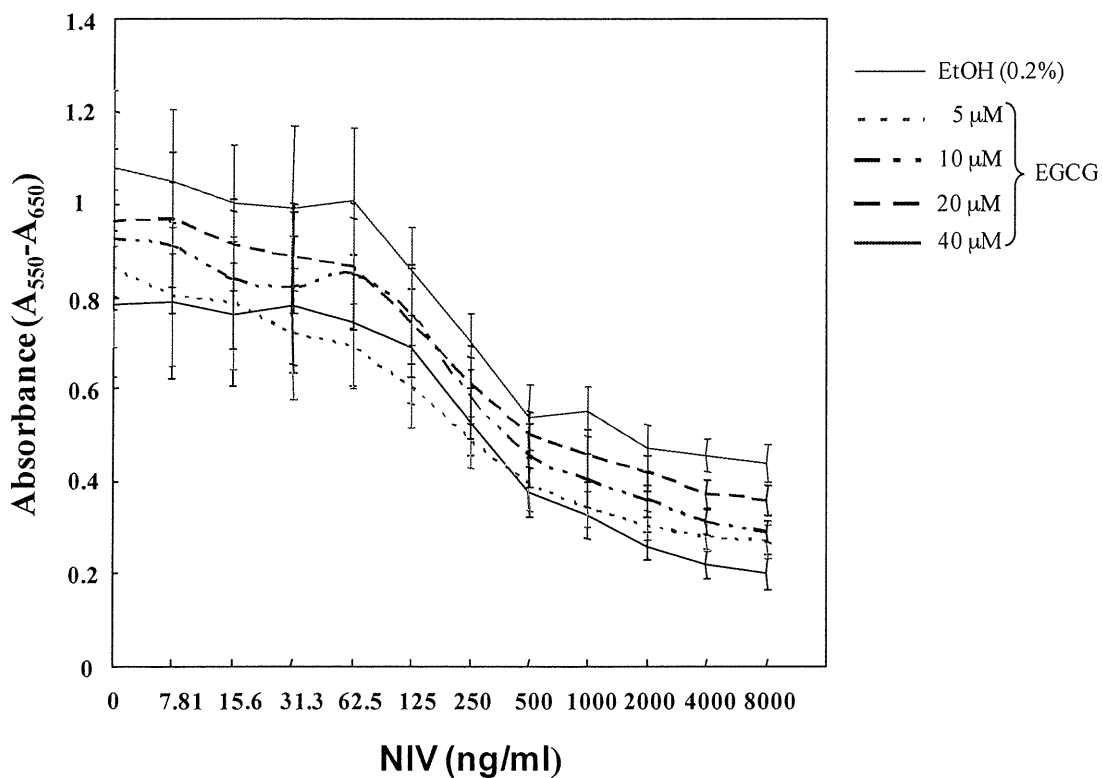


Fig. 4. Protective effect of Epigallocatechin-3-gallate on NIV-induced acute damage to RAW264 cells. RAW264 cells were cultured in DMEM containing Epigallocatechin-3-gallate (5 - 40  $\mu$ M) in the presence of NIV for 24 h. The results are expressed as mean value of absorbance that subtracted absorbance of 650 nm from absorbance of 550 nm. These are based on the RAW264 cells were cultured with EtOH (0.2%). Results are shown as means  $\pm$  S.D. of three independent measurements.

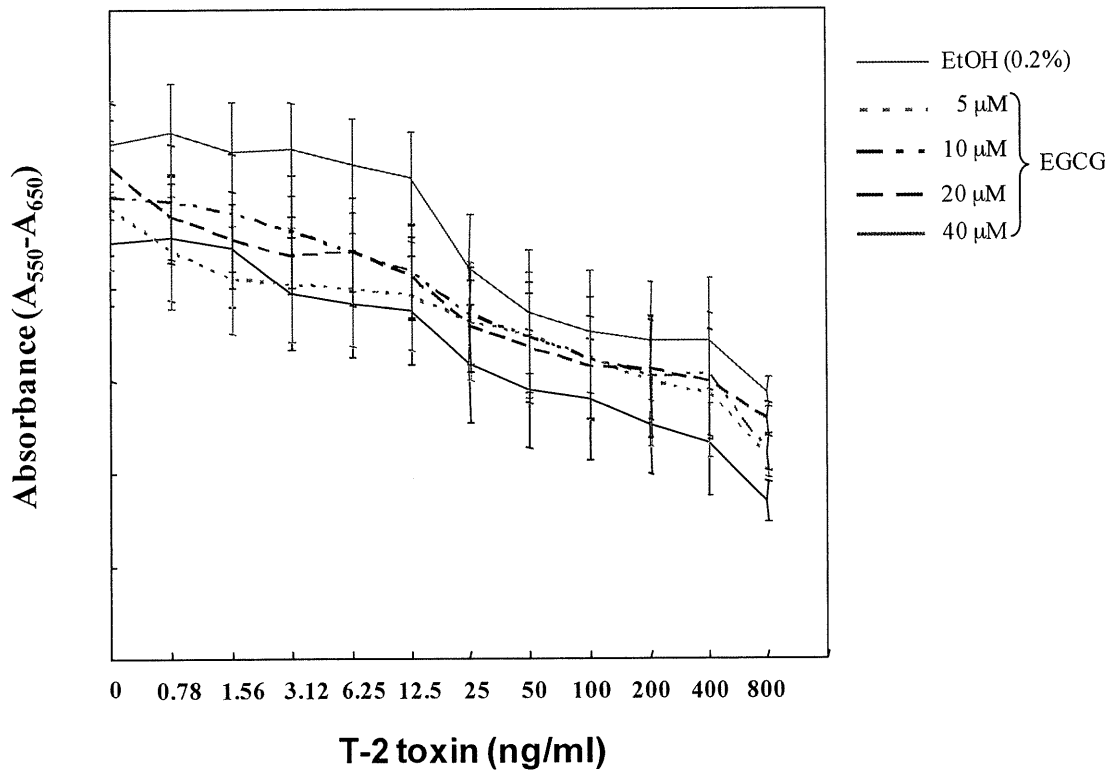


Fig. 5. Protective effect of Epigallocatechin-3-gallate on T-2 toxin-induced acute damage to RAW264 cells. RAW264 cells were cultured in DMEM containing Epigallocatechin-3-gallate (5 - 40  $\mu$ M) in the presence of T-2 toxin for 24 h. The results are expressed as mean value of absorbance that subtracted absorbance of 650 nm from absorbance of 550 nm. These are based on the RAW264 cells were cultured with EtOH (0.2%). Results are shown as means  $\pm$  S.D. of three independent measurements.

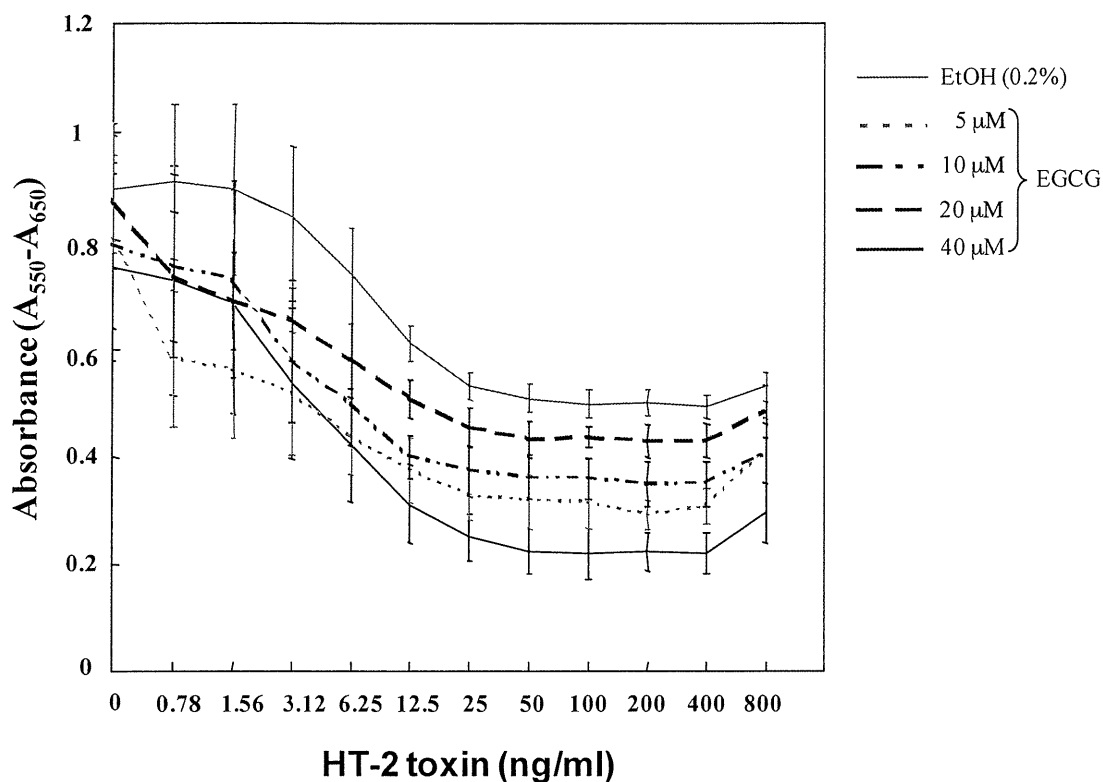


Fig. 6. Protective effect of Epigallocatechin-3-gallate on HT-2 toxin-induced acute damage to RAW264 cells. RAW264 cells were cultured in DMEM containing Epigallocatechin-3-gallate (5 - 40  $\mu$ M) in the presence of HT-2 toxin for 24 h. The results are expressed as mean value of absorbance that subtracted absorbance of 650 nm from absorbance of 550 nm. These are based on the RAW264 cells were cultured with EtOH (0.2%). Results are shown as means  $\pm$  S.D. of three independent measurements.

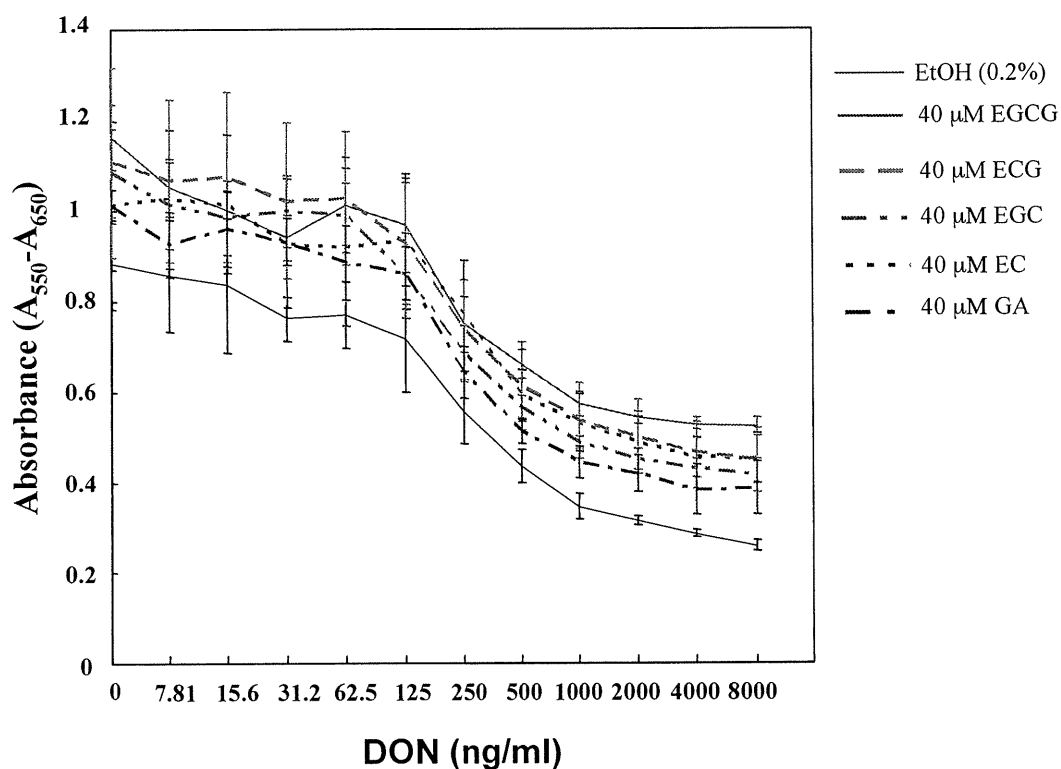


Fig. 7. Protective effect of Catechins on DON-induced acute damage to RAW264 cells. RAW264 cells were cultured in DMEM containing 40  $\mu$ M Catechin in the presence of DON for 24 h. These are based on the RAW264 cells were cultured with EtOH (0.2%). The results are expressed as mean value of absorbance that subtracted absorbance of 650 nm from absorbance of 550 nm. Results are shown as means  $\pm$  S.D. of three independent measurements.

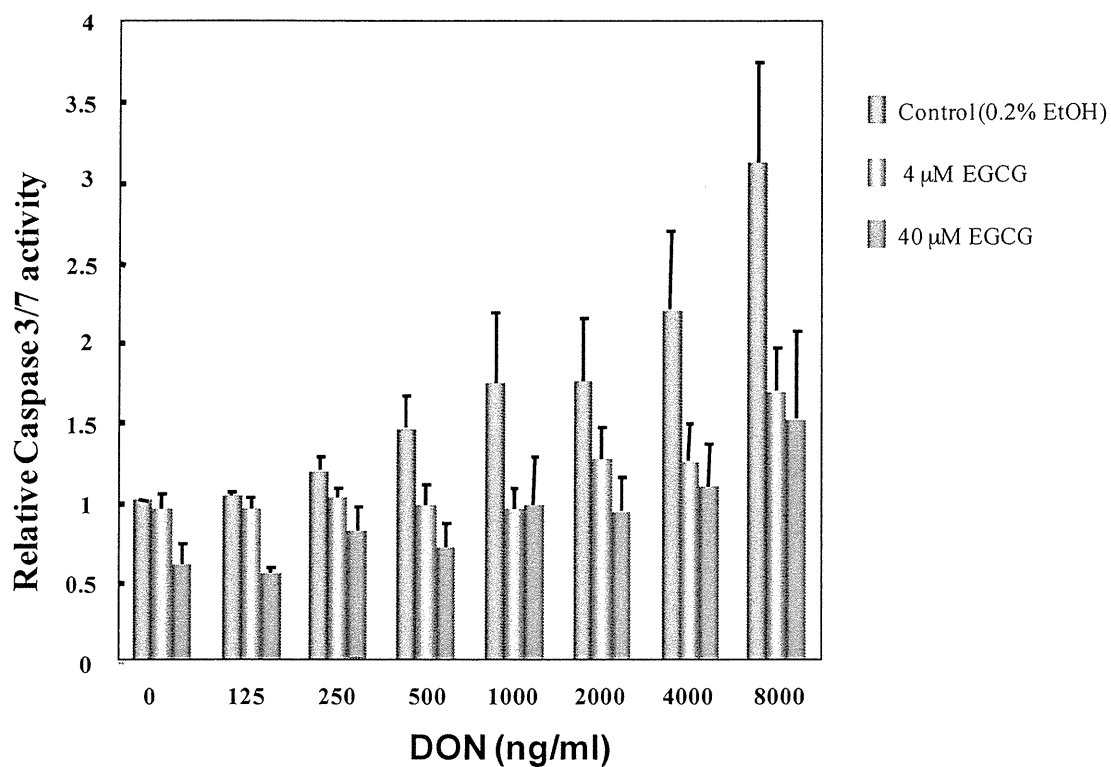


Fig. 8. Effects of EGCG on DON-induced caspase 3/7 activity. RAW264 cells were treated with DON (125 – 8,000 ng/ml) in the presence of indicated concentrations of EGCG for 24 h, and caspase 3/7 activity was then measured using Caspase-Glo™ 3/7 assay. The value of control (0.2% EtOH) in the absence of DON was fixed at 1, and the rest of the values are compared relative to that. 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

#### 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：トリコテセン系かび毒は白血球細胞に酸化ストレスを介して強い細胞毒性を示すと考えられている。本研究では、トリコテセン系かび毒の Deoxynivalenol (DON) と Nivalenol (NIV) のヒト肝ガン由来細胞株 HepG2 における同細胞内の酸化還元状態（レドックス）におよぼす影響を検討した。その結果、細胞毒性が認められない 1.25 - 10  $\mu\text{M}$  の DON もしくは NIV 存在下では HepG2 細胞内酸化度は減少することが明らかとなった。細胞内における主要な還元力は Glutathione (GSH) と Thioredoxin1 (Trx1) となる。DON は細胞内 GSH 含量については減少させたが、Trx1 の細胞内含量は増加させた。また、DON による細胞内 Trx1 含量のアップレギュレーションは GSH を含むその他還元剤により抑制されることも確認された。以上の結果から、HepG2 細胞はトリコテセン系かび毒に対して還元力としての細胞内 Trx1 含量を上昇させることにより同毒性に対して耐性を獲得している可能性が示唆された。本結果は、トリコテセン系かび毒のレドックスに還元材が有効であることも示唆している。

#### A. 研究目的

トリコテセン系かび毒の毒性発現機序として酸化ストレスが関与することが報告されている。同ストレスによりトリコテセン系かび毒は白血球系細胞にアポトーシス

を誘導し細胞毒性を呈するとする報告もある。一方、白血球系細胞以外の細胞においては、同細胞ほどトリコテセン系かび毒に感受性を示さない。前項においてマウスマクロファージ様細胞 RAW264 における各種



トリコテセン系かび毒により誘導された細胞毒性を緑茶カテキン類が抑制することを示した。トリコテセン系かび毒の毒性発現機序として酸化ストレスが関与する可能性を考慮した場合、本抑制効果は緑茶カテキン類が有する抗酸化能によるものであることが推測される。

本分担研究では、白血球系細胞と比較してトリコテセン系かび毒に低感受性であるヒト肝ガン由来細胞株 HepG2 を用いて、トリコテセン系かび毒が同細胞内の酸化還元状態におよぼす影響を検討した。細胞内の主要な還元力となる Glutathione (GSH) と Thioredoxin1 (Trx1) の挙動について、細胞内酸化度に対する同毒素の影響を確認した上で検討した。トリコテセン系かび毒の毒性低減に有効であることが明らかとなった緑茶カテキンの毒性低減作用が、同カテキンが有する抗酸化能に起因するものか、本研究は貴重な知見を提供すると考えられる。

## B. 研究方法

### 細胞培養

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 cm<sup>2</sup> の組織培養フラスコに播種後、37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

### 各種かび毒の調製

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、各種かび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

HepG2 細胞を 96 well plate に 1×10<sup>4</sup> cells/well となるように 100 μl/well にて播種し 37°C、5%CO<sub>2</sub> 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 μl/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。培養後、MTT 試薬である MTT labeling reagent を 10 μl/well 加え 4 時間培養し、Solubilization Buffer を 100 μl/well 添加し 37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。一晩培養後、吸光度 550 nm をマルチプレートリーダー Tristar LB

941 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。

#### 活性酸素種 (ROS) 濃度測定

Dichlorodihydrofluorescein diacetate (以後 DCFH-DA と略記 : Lamba, Grottenhofstr, 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  $5 \times 10^5$  cells/well となるように 2 ml/well にて播種し、37°C、5%CO<sub>2</sub> 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  $\mu$ l/well 加え、37°C、5%CO<sub>2</sub> 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  $\mu$ l/well 加え、37°C、5%CO<sub>2</sub> で 2 分間保温した。DMEM を 500  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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

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  $5 \times 10^5$  cells/well となるように 2 ml/well にて播種し、37°C、5%CO<sub>2</sub> 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

HepG2 細胞を 6 well plate に  $5 \times 10^5$  cells/well となるように 2 ml/well にて播種し、37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で一晩培養した。培養液を吸引後、各種カビ毒を含む培地を

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 mM 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  $\mu$ 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。適宜にボルツテ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  $\mu$ l/well 加え、10 倍希釈した Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad laboratories, inc., USA) を 250  $\mu$ 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  $\mu$ g 相当になるように各サンプルを分取し、4 $\times$ 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をロードした。マーカーとして Prestained XL-Ladder Broad (APRO, Tokushima, Japan) を用いた。泳動 Buffer には、10 $\times$ 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