

201131036B

厚生労働科学研究費補助金

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 22～23 年度 総合研究報告書

研究代表者 杉山 圭一

平成 24 年 (2012) 年 3 月

## 目 次

I.	総合研究報告	
	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-----	3
	杉山圭一（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）	
II.	研究成果の刊行に関する一覧表-----	48
III.	研究成果の刊行物-----	50

## I. 総合研究報告

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

総合研究報告書

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：本研究課題は研究期間を2カ年とし、かび毒の毒性評価法およびそのデトキシケーションについて乳幼児も摂取する可能性のある同毒素にも留意して実施した。初年度では、新規な毒性評価法の構築を目的に、ヒトマクロファージ様細胞を用いた Toll-like receptor シグナルに対する各種かび毒の影響について解析を行った。最終年度では、かび毒のデトキシケーションを指向した研究として、トリコテセン系かび毒の毒性に対する緑茶カテキン類の効果とその作用メカニズムについて検討した。その結果、本研究から Deoxynivalenol、Nivalenol、T-2 および HT-2 toxin という食品衛生上問題とされるトリコテセン系かび毒については、今回構築した評価系はリスクプロファイルの提供に用いるプラットフォームとしてのポテンシャルを有すと考えられる結果を得た。デトキシケーションについては、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、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。さらに、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、またその還元状態へのシフトには細胞内の 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示唆された。かび毒による健康被害の抑制、特にかび毒に成人と比較してより感受性が高いと予想される乳幼児に対して今回得られた知見は貴重な情報を提供できたと考えている。即ち、乳幼児も摂取する可能性のある麦類等穀類を汚染するトリコテセン系かび毒については、同毒性を低減できる可能性を有す食品由来成分（緑茶カテキン類）の同定に成功したこと、またそのメカニズムが抗酸化作用によるものであることが示唆できたことは、今後より有用な食品由来成分の同定を可能とする研究成果である。今後は、本研究事業成果を活用しかび毒のデトキシケーションを指向したより一層の応用研究が望まれる。その延長線上には、国民が期待する「食品の安心・安全」を担保する毒性低減をキーワードとしたセーフティネットの構築があると考えている。

A. 研究目的

食品の安心・安全を確保するうえで、かび毒による健康被害はリスク低減を図るうえで最も難易度が

高い自然毒の一つである。かびの生息域が極めて広範囲にわたること（低い水分活性においても生育可能であること）、また一度発生されたかび毒は一般家庭における調理過程では容易に分解されないことが

ら、現在の科学技術ではかび毒による食品汚染の低減は困難と言わざるを得ないのが実情である。一方で、近年わが国でもアフラトキシン汚染米の存在が報告されたように、本邦でこれまで多くの報告事例があった以外のかび毒汚染についても対応を迫られる状況にあるのも事実である。地球温暖化等の地球環境変化も考慮した場合、かび毒の毒性を正確に把握した上でその減弱（デトキシケーション）を指向する研究の重要性は、かび毒汚染の抑止が極めて困難な現状では極めて高いと言えよう。

本研究では、まずはかび毒の正確な毒性把握を目的として、近年その分子基盤が明とされてきた自然免疫系に着目して、同免疫系を構成するシグナルであり、グラム陰性細菌外膜構成成分である Lipopolisaccharide (LPS) をリガンドとする Toll-like receptor 4 (TLR4) に対するかび毒の影響を検証した。毒性の多方面からの解析は、かび毒の過不足ないリスクアナリシスには極めて重要である。また、多くのかび毒の毒性として遺伝毒性に加え免疫毒性が知られるが、アフラトキシンはアフリカでのエイズ感染拡大の要因の一つとさせ認識されている毒性とも考えられており、その免疫系を介した毒性発現メカニズムの解明はグローバルレベルでの衛生問題へのソリューションに繋がる可能性をも内包する。また、昨今の新興・再興感染症の問題に関して、その原因もしくは増悪因子として、かび毒汚染が気象変動を伴う汚染域、および汚染種の拡大、変遷が関与する

可能性についても推測する為の予備データが得られる可能性もある。

低分子化合物であるかび毒を対象としたデトキシケーションは、その特徴故にハードルは高い。事実通常の調理レベルの物理・科学的処理での分解に多くは期待できない。そこで本研究では分解からではなく、生体内での毒性自体の減弱を目標に検討を行った。その結果、食品由来成分からの一部かび毒についてはその毒性を減弱できる可能性を示すことができた。

本研究では、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)、また Aflatoxin M1 (AFM1)、Zearalenon (ZEN) を対象に実施した。これら毒素は乳幼児も摂取する可能性を有するかび毒であり、本研究対象として好適と考える。

## B. 研究方法

ヒトマクロファージ様細胞における **TLR4** シグナルに対する **AFM1** および **ZEN** の影響に関する研究

ヒト単球由来 THP-1 細胞は  $1 \times 10^6$  cells/well となるように 1 ml/well を 12-well plate に播種し、0.1  $\mu$ g/ml phorbol myristate acetate (Sigma) および 0.1  $\mu$ M 1,25-dihydroxy-vitamin D3 (Wako Pure Chemical Industries) 存在下で 72 時間培養し、マクロファージ様細胞に分化させた。分化後、1 ml の PBS にて各

well を洗浄した。洗浄後、無血清の DMEM 培地 50  $\mu$ l に pcELAM-L を 0.5  $\mu$ g 相当を添加後 6.0  $\mu$ l FuGENEHD (Roche) を加え 15 分室温放置した溶液を加えて最終容量を DMEM 培地で 0.5 ml として 24 時間、37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下でトランスフェクションの為の培養を行った。トランスフェクション処理した細胞は、1 ml の PBS にて各 well を洗浄後、それぞれのかび毒存在下で培養した。

AFM1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) および ZEN (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) は、減衰を防ぐためにアセトニトリル (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) に溶解し-30 $^{\circ}$ C で保存した (Fig.1, 2)。添加前に窒素ガスにて濃縮乾固し、DMEM 培地に溶解し使用した。

*Escherichia coli* 0111:B4 株由来 LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) は注射用水に溶解し 4 $^{\circ}$ C で保存した。使用前にソニケーションを行った。

#### 【NF- $\kappa$ B 依存性レポーター活性の測定】

マクロファージ様に分化させた THP-1 細胞の上清を除去し、LPS 100 ng/ml 存在下、AFM1 (1.0, 10, 100, 1,000 ng/ml)、または ZEN (1.25, 2.5, 5.0, 10 ng/ml)、を含む DMEM にて培養を継続した。6 時間後に培養液を除去、その後、PBS で洗浄した。Passive Lysis Buffer (Promega, Madison, WI, USA) を 50  $\mu$ l/well を加えセルスクレイパーで細胞を掻き取った。掻き取った細胞をマイクロチューブに取り、on ice と vortex をそれぞれ 30 sec、計 10 分処理後、4  $^{\circ}$ C、4,000 rpm、

5 分遠心を行い、上清を試料として用いた。

試料 5.0  $\mu$ l を 96-well flat bottom white polystyrene plate (Coring Costar, Kennebunk, ME, USA) に添加し、基質には Luciferase Assay Reagent II (Promega, Madison, WI, USA) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。測定にはマルチプレートリーダー Tristar LB 941 (Berthold Technologies, Germany) を用いた。なお、測定結果はタンパク質量で補正した。

ヒトマクロファージ様細胞における TLR4 シグナルに対する DON および NIV の影響に関する研究

細胞培養方法については、ヒトマクロファージ様細胞における TLR4 シグナルに対する AFM1 および ZEN の影響に関する研究と同様である。

DON (Wako, Osaka, Japan) および NIV (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) は、減衰を防ぐためにアセトニトリル (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) に溶解し-30 $^{\circ}$ C で保存した (Fig. 3, 4)。添加前に窒素ガスにて濃縮乾固し、DMEM 培地に溶解し使用した。

*Escherichia coli* 0111:B4 株由来 LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) は注射用水に溶解し 4 $^{\circ}$ C で保存した。使用前にソニケーションを行った。

#### 【NF- $\kappa$ B 依存性レポーター活性の測定】

マクロファージ様に分化させた THP-1 細胞の上清を除去し、LPS 100 ng/ml 存在下、DON (125, 250, 500,

1,000 ng/ml)、または NIV (125, 250, 500, 1,000 ng/ml) を含む DMEM にて培養を継続した。測定方法は、「ヒトマクロファージ様細胞における TLR4 シグナルに対する AFM1 および ZEN の影響に関する研究」におけるプロトコールに準じた。

#### ヒトマクロファージ様細胞における TLR4 シグナルに対する T-2 および HT-2 の影響に関する研究

細胞培養方法については、ヒトマクロファージ様細胞における TLR4 シグナルに対する AFM1 および ZEN の影響に関する研究と同様である。

T-2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) および HT-2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) は、減衰を防ぐためにアセトニトリル (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) に溶解し-30°C で保存した。添加前に窒素ガスにて濃縮乾固し、DMEM 培地に溶解し使用した (Fig. 5, 6)。

*Escherichia coli* 0111:B4 株由来 LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) は注射用水に溶解し 4°C で保存した。使用前にソニケーションを行った。

#### 【NF-κB 依存性レポーター活性の測定】

マクロファージ様に分化させた THP-1 細胞の上清を除去し、LPS 100 ng/ml 存在下、T-2 (10, 20, 40, 80 ng/ml)、または HT-2 (1.0, 2.0, 4.0, 8.0 ng/ml) を含む DMEM にて培養を継続した。測定方法は、「ヒトマクロファージ様細胞における TLR4 シグナルに対

する AFM1 および ZEN の影響に関する研究」におけるプロトコールに準じた。

#### 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 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・取り扱いは下記の通りである。標準品の DON (Wako, Osaka, Japan) は減衰を防ぐためにアセトニトリル (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 (Fig. 3 - 6)。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。epigallocatechin gallate (EGCG) (Wako, Osaka, Japan) と epigallocatechin (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 epicatechin gallate (ECG) (Wako, Osaka, Japan)、epicatechin (EC) (Wako, Osaka, Japan) および gallic acid (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 (Fig. 7)。

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  $1 \times 10^4$  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 活性の測定は下記の通りである。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。

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 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<sup>4</sup> 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、トリコテセン系かび毒を含む培地を 100  $\mu$ 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<sup>5</sup> 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  $5 \times 10^5$  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  $\mu$ l/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  $\mu$ l/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  $\mu$ l/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  $\mu$ l/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  $\mu$ l/well、Enzyme working solution (Dojindo Molecular Technologies, INC., Kumamoto, Japan) を 20  $\mu$ l/well および Buffer

solution (Dojindo Molecular Technologies, INC., Kumamoto, Japan) を 120  $\mu\text{l/well}$  加え、5 分間、37°C でインキュベートした後、サンプルを 20  $\mu\text{l/well}$  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  $\mu\text{l/well}$  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。

Thioredoxin1 (Trx1) の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  $5 \times 10^5$  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 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  $\mu\text{l/well}$  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  $\mu\text{l/well}$  加え、10 倍希釈した Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad laboratories, inc., USA) を 250  $\mu\text{l/well}$  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  $\mu\text{g}$  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、メンブレン、分離ゲル、濾紙の順番に置いた。10 - 15 V で 5.5 mA/cm<sup>2</sup> の電流を 30 分間通電することでブロッティングを行った。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 分間ブロッティングした。

ブロッティ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 µl および 2000 倍に希釈した Monoclonal Anti-β-Actin Antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を 3.0 µl 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 µl 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

ヒトマクロファージ様細胞における **TLR4** シグナルに対する **AFM1** および **ZEN** の影響に関する研究

ヒト単球由来 THP-1 細胞をマクロファージ様細胞に分化させたのち、同細胞を用いて LPS 誘導性 NF-κB の活性化に及ぼす AFM1 の影響を NF-κB 依存性レポーター活性化に対する作用を指標に検討した。LPS 単独刺激により NF-κB 依存性レポーター活性はコントロールと比較し、20 倍以上の上昇を認めた。本条件下において、AFM1 による LPS 誘導性 NF-κB 依存性レポーター活性への影響を検討したところ、同活性は検討したいずれの濃度(1.0, 10, 100,

1,000 ng/ml)においても抑制作用を示すことが明らかとなった。但し、その効果に濃度依存性は認められなかった (Fig. 8)。

一方、ZEN 存在下での LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B 依存性レポーター活性への影響については 1.25 および 5.0 ng/ml の ZEN 存在下において LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B 依存性レポーター活性を抑制する傾向は認められるものの、その他の濃度においては顕著な作用は認められなかった (Fig. 9)。

ヒトマクロファージ様細胞における TLR4 シグナルに対する DON および NIV の影響に関する研究

ヒト単球由来 THP-1 細胞をマクロファージ様細胞に分化させたのち、同細胞を用いて LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B の活性化に及ぼす DON の影響を NF- $\kappa$ B 依存性レポーター活性化に対する作用を指標に検討した。LPS 単独刺激により NF- $\kappa$ B 依存性レポーター活性はコントロールと比較し、20 倍以上の上昇を認めた。本条件下において、DON による TLR4 を介した LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B 依存性レポーター活性への影響を検討したところ、濃度依存的な抑制作用を示すことが明らかとなった。また、その作用は今回検討した最も低い濃度となる 125 ng/ml においても顕著に認められ LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B の活性化を約 50% にまで阻害する作用を示した (Fig. 10)。

一方、NIV 存在下での LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B 依存性

レポーター活性への影響についても DON と同様に同毒素の濃度依存的な LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B 依存性レポーター活性の抑制作用が確認された (Fig. 11)。

ヒトマクロファージ様細胞における TLR4 シグナルに対する T-2 および HT-2 の影響に関する研究

ヒト単球由来 THP-1 細胞をマクロファージ様細胞に分化させたのち、同細胞を用いて LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B の活性化に及ぼす T-2 の影響を NF- $\kappa$ B 依存性レポーター活性化に対する作用を指標に検討した。LPS 単独刺激により NF- $\kappa$ B 依存性レポーター活性はコントロールと比較し、10 倍以上の上昇を認めた。本条件下において、T-2 による TLR4 を介した LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B 依存性レポーター活性への影響を検討したところ、濃度依存的な抑制作用を示すことが明らかとなった。また、その作用は今回検討した最も低い濃度となる 10 ng/ml においても顕著に認められ、LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B の活性化を約 50% にまで阻害する作用を示した (Fig. 12)。

同様に、HT-2 存在下での LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B 依存性レポーター活性への影響についても T-2 と同様に同毒素の濃度依存的な LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B 依存性レポーター活性の抑制作用が確認された。但しその効果は T-2 と比較してより低い濃度 ((1.0, 2.0, 4.0, 8.0 ng/ml)) で確認された (Fig. 13)。

マウスマクロファージ様細胞におけるトリコ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  $\mu$ M EGCG 以上では顕著に認められた (Fig. 14)。

#### 【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. 15)。

#### 【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. 16)。

#### 【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. 17)。

#### 【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 (Fig 18)。

#### 【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  $\mu\text{M}$ ) 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 (Fig. 19)。

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  $\mu\text{M}$ ) 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 (Fig. 20)。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  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$  で顕著な減少となることが明らかとなった (Fig. 21)。

#### 【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  $\mu\text{M}$ ) 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  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$  から有意な減少が確認される結果となった (Fig. 22)。

#### 【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 (Fig. 23)。

#### 【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 (Fig. 24)。

#### D. 考察

ヒトマクロファージ様細胞における TLR4 シグナルに対する AFM1 および ZEN の影響に関する研究

ヒトマクロファージ様細胞 THP-1 を用いた LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B に及ぼす AFM1 と ZEN の影響について検討した。今回検討した AFM1 濃度において、LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B の活性化が抑制される可能性が示唆された。この TLR4 シグナル抑制作用は濃度依存性が今回の研究結果からは認められていない。また、その抑制作用は 1,000 ng/ml の AFM1 濃度においても約 50% の抑制効果に留まった。この事実は、TLR4 から転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化に至る経路において AFM1 が抑制的に作用する分子が存在する可能性は推測されるが、同分子の TLR4 シグナル伝達経路における機能は間接的である可能性を示唆する。また、今回得られた結果は AFB1 についても認められる可能性があり、今後この確認を含め作用機序の解明が進めばアフラトキシン群の免疫毒性の機序について貴重な知見が得られる可能性がある。

同様に、LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B に及ぼす ZEN の作用については、今回のアッセイ結果からは明確な作用について言及することは困難と考えられる結果となった。ZEN はその構造式から女性ホルモンのエストロゲンとの類似性が指摘されている。故に ZEN の毒性発現メカニズムとしてエストロゲン受容体を介した内分泌かく乱作用が指摘されている。マウ

スマクロファージ様細胞 RAW264 を用いた内分泌かく乱作用に関する研究報告の存在は、マクロファージ様細胞においてもエストロゲン受容体を介したシグナルが惹起されている可能性を示唆している。従って、エストロゲン受容体を介し ZEN により THP-1 細胞内において内分泌かく乱作用が生じている可能性が考えられるが、同作用は少なくとも LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B の活性化には影響を与えないことが示唆された。但し、今回の結果からのみで ZEN の自然免疫系に対する免疫毒性について結論付けることは困難であり、獲得免疫系への影響も視野にさらに検討を加える必要性はあると考えられる。

ヒトマクロファージ様細胞における TLR4 シグナルに対する DON および NIV の影響に関する研究

ヒトマクロファージ様細胞 THP-1 を用いた LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B に及ぼす DON と NIV の影響について検討した。今回、DON と NIV は両毒素とも LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B の活性化を濃度依存的に抑制することが明らかとなった。今回認められた抑制作用は DON と NIV とともに 125 ng/ml においても約 50% の抑制作用を示し、1,000 ng/ml 存在下においてはコントロールと同レベルにまで LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B の活性化を阻害するというレベルであった。今回得られた結果は、TLR4 から転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化に至る経路において DON と NIV が抑制的に作用する分子が存



在する可能性を推測させる。既に、マウスマクロファージにおいては、この機序について他の TLR レセプターについても同様の作用が確認されていることから、各種 TLR シグナル伝達に共有される分子に対して阻害的に作用している可能性が考えられている。しかも、この作用はマウスとヒト両種で認められることから、種間で相同性が高い分子もしくは分子内モチーフにその作用点が存在することが示唆される。今後作用機序の解明が進めば、DON と NIV により誘発される免疫毒性について貴重な知見が得られる可能性がある。

これまでに、マウスにおいて DON と NIV の自然免疫系に及ぼす影響については先行的に研究がなされてきた。今回、ヒトにおいても同様の毒性が認められることを初めて明らかにした。加えて、今回得られた毒性プロファイルは、これまでにマウスで認められた毒性プロファイルと比較して、EC50 がより低濃度となる可能性が推測されるものであった。マウス由来のマクロファージ様細胞で得られた毒性よりヒト由来同細胞で認められた毒性がより強いことが本分担研究結果より示唆されたことにより、今後 DON と NIV のリスクアセスメントを実施にあたっては、この点も留意する必要性があると考えられる。

ヒトマクロファージ様細胞における TLR4 シグナルに対する T-2 および HT-2 の影響に関する研

究

ヒトマクロファージ様細胞 THP-1 を用いて LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B に及ぼす T-2 と HT-2 の影響について検討した。今回、T-2 と HT-2 の両毒素とも LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B の活性化を濃度依存的に抑制することが明らかとなった。今回認められた作用は、T-2 においては 10 ng/ml 存在下において LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B の活性化を約 50% に、HT-2 においては 1.0 ng/ml においても同活性化に対して顕著な抑制作用を示すレベルの阻害効果であった。

今回得られた結果は、TLR4 から転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化に至る経路において T-2 ならびに HT-2 が抑制的に作用するシグナル伝達分子が存在することを示唆する。TLR4 シグナルに対する阻害作用は、本研究から、トリコテセン系かび毒の Type A および B ともに確認されたこととなる。従って、少なくとも THP-1 細胞に対してはトリコテセン系かび毒の Type A および B は TLR4 シグナル伝達系をともに抑制することが強く示唆された。このことは、これらかび毒に汚染された食品を摂取した場合、正常な免疫応答が誘導されないことが危惧されるため、感染症等に罹患する危険性が高まることが予想される。また、今回得られたデータから、これまでに指摘されていたとおり、Type A においてより低濃度で毒性が認められる可能性が示された。加えて、HT-2 と T-2 において TLR4 シグナルに対する阻害作用が HT-2 で約 10 倍高いことが示された事は、即ち、今

後 Type A におけるトリコテセン系かび毒のリスクアセスメントを行うにあたり、HT-2 の毒性について十分留意する必要性を示している。つまり T-2 が生体内で HT-2 に代謝されることを考慮した場合、少なくとも TLR4 シグナルに対する毒性を基準にそのリスクアナリシスする場合には、HT-2 の毒性を基準に T-2 の毒性も評価する必要性があると言える。

#### 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  $\mu\text{M}$ ) 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、初年度はかび毒の新規な毒性評価法について、次年度（最終年度）はかび毒のデトキシケーションおよびそのメカニズムについて検

討した。新規な毒性評価法については、多くのかび毒が免疫毒性を呈すことから、近年明らかにされた自然免疫を指標に、同免疫系に及ぼす影響についてTLR4シグナルをメルクマールに解析した。その結果、得られたデータから、少なくともトリコテセン系かび毒は自然免疫系をかく乱する可能性を有することが明らかとなった。既に報告されているマウス由来の細胞株を用いた実験系で得られたデータと、今回明らかとなったヒト由来の細胞株で得られた知見との間に明確な類似点が認められた。また、同かび毒においてType AとType Bとの間でのこれまで考えられてきた毒性レベル（毒性評価においては、Type Bと比較しType Aの毒性が強いと推定されている）についても本アッセイ系で確認された。この事実は、トリコテセン系かび毒の毒性評価系に本アッセイ系が利用可能であることを示唆している。一方、AFM1については今回濃度依存的な作用を認めるには至らなかった。

一方、デトキシケーションについては次年度において、トリコテセン系かび毒であるDON、NIV、T-2およびHT-2により惹起される細胞毒性を緑茶カテキン類が減弱させることを明らかにした。本成果はトリコテセン系かび毒に感受性の高い白血球系細胞であるマウスマクロファージ様細胞を用いているが、反対に同細胞より感受性の低い（耐性を有する）肝細胞系細胞であるヒト肝ガン由来細胞株HepG2を用いてDONを含むトリコテセン系かび毒

存在下における細胞内還元物質の動態を解析した結果、細胞毒性を呈しない濃度においては、同物質の一つである Trx1 がアップレギュレーションされていることが明らかとなった。しがたって、緑茶カテキン類がマウスマクロファージ様細胞において示したトリコセセン系かび毒誘導性細胞毒性の減弱効果は、同分子が有する抗酸化作用に起因することが推測された。

なお、本研究は乳幼児に対する影響についても留意して実施している。今回検討したかび毒は、その汚染対象食品・食糧の見地から乳幼児も摂取する可能性があるものであることを付記しておく。

#### 参考資料

Shimomura-Shimizu, M., Sugiyama, K., Muroi, M. and Tanamoto, K: Alacholr and carbaryl suppress lipopolysaccharide-induced iNOS expression by differentially inhibiting NF- $\kappa$ B activation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332, 793-799 (2005).

Sugita-Konishi, Y., Niimi, S. and Sugiyama, K: An inter-laboratory study to validate quantitative and qualitative immunoassay kits for rapid detection of aflatoxin in corn, *Mycotoxins* 57, 75-80 (2007).

Sugiyama, K., Muroi, M. and Tanamoto, K: A novel TLR4-binding peptide that inhibits LPS-induced

activation of NF- $\kappa$ B and in vivo toxicity, *Eur. J. Pharmacol.* 594, 152-156 (2008).

Sugiyama, K., Hiraoka, H. and Sugita-Konishi, Y: Aflatoxin M<sub>1</sub> contamination in raw bulk milk and the presence of aflatoxin B<sub>1</sub> in corn supplied to dairy cattle in Japan, *J. Food Hyg. Soc. Japan* 49, 352-355 (2008).

Aoyama, K., Nakajima, M., Tabata, S., Ishikuro, E., Tanaka, T., Norizuki, H., Itoh, Y., Fujita, K., Kai, S., Tsutsumi, T., Takahashi, M., Tanaka, H., Iizuka, S., Ogiso, M., Maeda, M., Yamaguchi, S., Sugiyama, K., Sugita-Konishi, Y. and Kumagai, S: Four-year surveillance for ochratoxin A and fumonisins in retail foods in Japan, *J Food Prot.* 73, 344-352 (2010).

Sugita-Konishi, Y., Sato, T., Saito, S., Nakajima, M., Tabata, S., Tanaka, T., Norizuki, H., Itoh, Y., Kai, S., Sugiyama, K., Kamata, Y., Yoshiike, N. and Kumagai, S: Exposure to aflatoxins in Japan: Risk assessment for aflatoxin B<sub>1</sub>, *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 27, 365-372 (2010).

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).