

表3 T-2 トキシンと HT-2 トキシンの汚染実態 (合算値)

サンプル	試料数	陽性平均濃度 (ng/g)	最大濃度 (ng/g)
国産小麦	40	4.2	14.5
輸入小麦	98	10.4	93.4
国産大麦	10	5.4	14.4
輸入大麦	26	7.2	25.4
はと麦	20	10.4	65.8
ライ麦	11	23.7	150.3
ビール	20	0.2	0.7
コーングリッツ	20	0.5	1.3
コーンスナック	10	0	0
小豆	20	28.7	85
大豆	10	2.1	4.3
雑穀米	20	1.2	4.0
精米	10	0	0
ゴマ	20	0.2	0.2
計	335		

表4 ゼアラレノンの汚染実態

サンプル	試料数	LOQ以上の 割合(%)	LOQ (ng/g)	陽性平均濃度 (ng/g)	最大濃度 (ng/g)
国産小麦	40	22.5	0.7	3.8	8.4
輸入小麦	98	4.1	0.7	39.1	151
国産大麦	10	70.0	0.1	6.9	19.1
輸入大麦	26	3.8	0.1	0.7	0.7
はと麦	20	60.0	0.4	14.3	84.4
ライ麦	11	36.4	0.1	4.7	8.5
ビール	20	0	0.05	0	0
コーングリッツ	20	20.0	0.4	1.1	1.7
コーンスナック	10	0	0.4	0	0
小豆	20	100	0.4	45.9	125
大豆	10	0	3	0	0
雑穀米	20	95.0	0.7	6.2	39.3
精米	10	0	2	0	0
ゴマ	20	100	0.02	1.6	21.3
計	335				

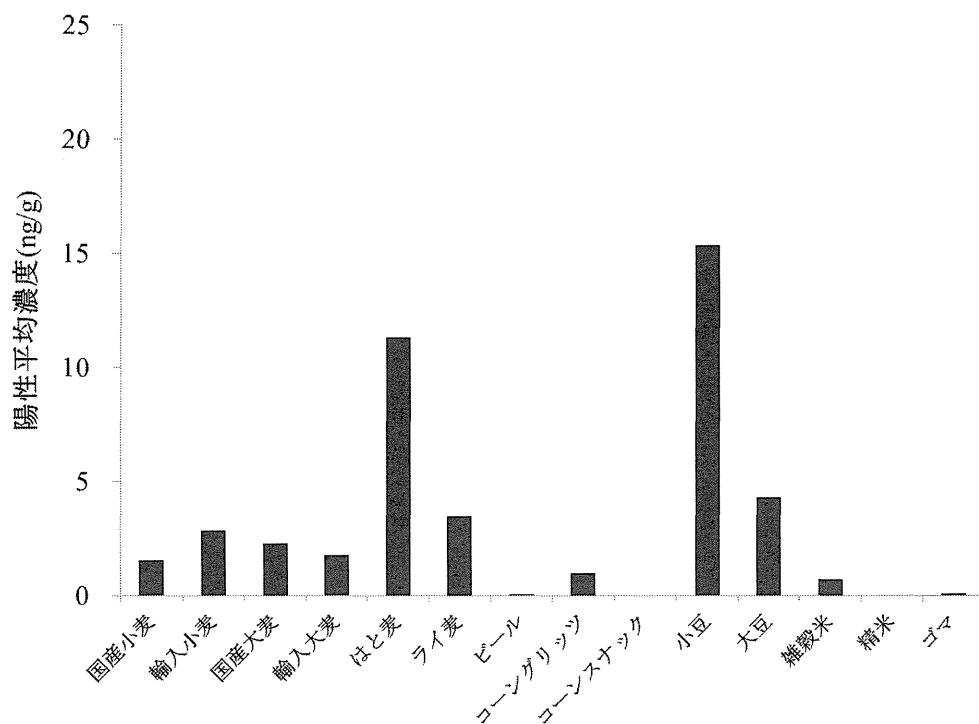


図1 T-2 トキシンの汚染実態

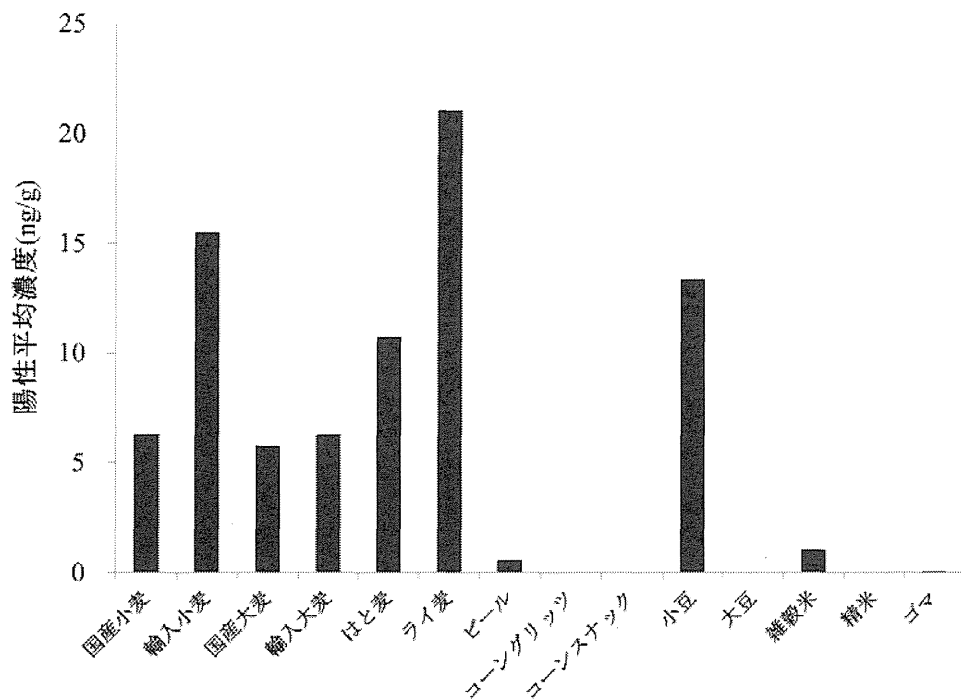


図2 HT-2 トキシンの汚染実態

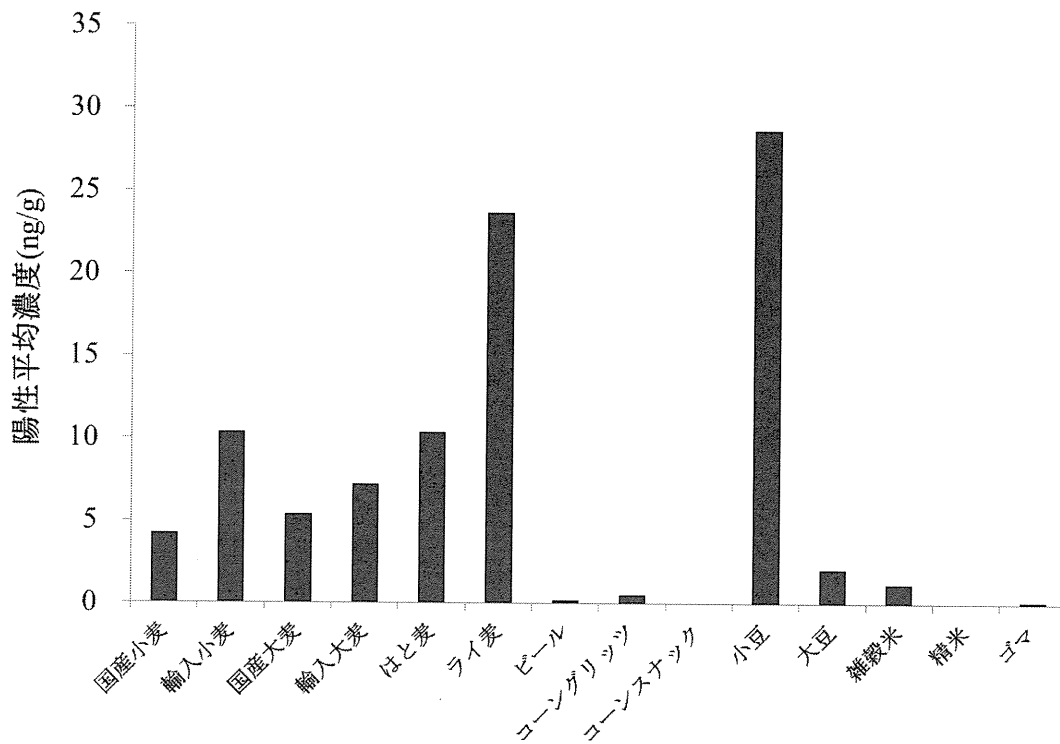


図3 T-2 トキシンと HT-2 トキシンの汚染実態 (合算値)

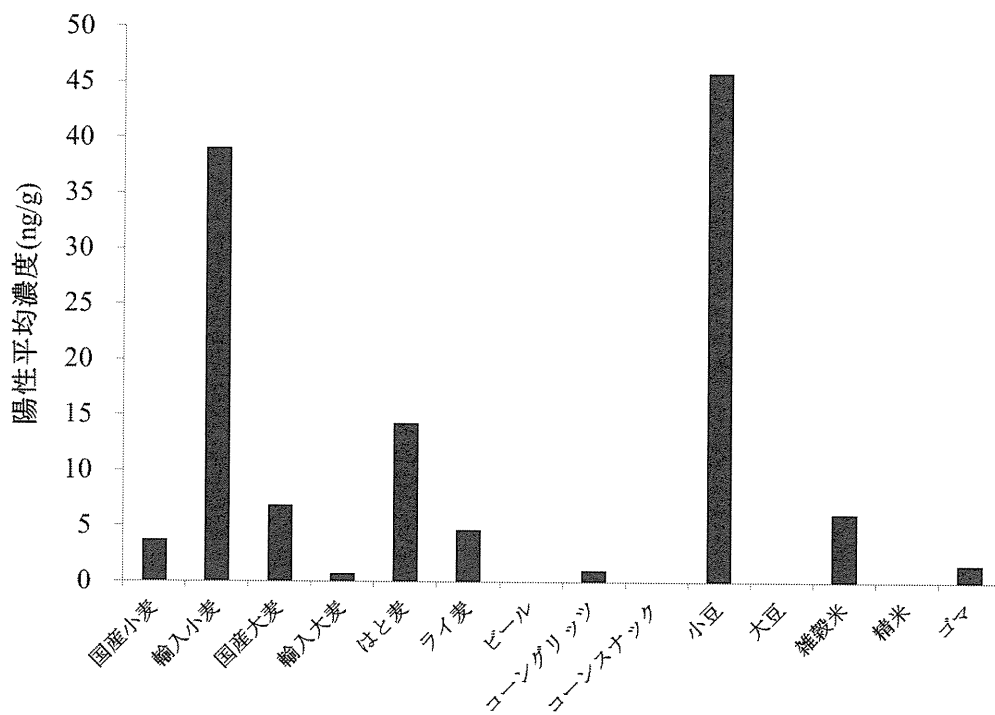


図4 ゼアラレノンの汚染実態

厚生労働科学研究費補助金  
(食品の安全確保推進研究事業)

分担研究報告書

T-2 トキシンの心臓血管系機能、酸化ストレス、  
心筋細胞ミトコンドリア機能に及ぼす影響

研究分担者 局 博一

東京大学大学院農学生命科学研究科附属食の安全研究センター特任教授

研究要旨

心血管系影響: 22~23 年度の研究では T-2 トキシシ (0.1 mg/kg 以上) のラットへの皮下投与によって不整脈が誘発されやすくなること、その原因の一部に自律神経系活動が関与していることが明らかになった。本年度では、T-2 トキシシ投与後 48 時間目で、心臓血管系における循環動態をドプラー・心エコー図法で観察したところ、低用量の 0.02 mg/kg の投与で総頸動脈の収縮期血流速度および心拍数の有意 ( $P < 0.05$ ) な増大が、0.5 mg/kg では総頸動脈の平均血流速度の有意 ( $P < 0.05$ ) な増大が認められたが、心拍出量、拍動係数、抵抗係数等に有意な変化は観察されなかった。

酸化ストレス影響: 組織障害を起こしうる酸化ストレスに注目した実験を行ったところ、0.02、0.1、0.5 mg/kg の T-2 トキシシの皮下投与によって投与後 48 時間目で用量依存性の活性酸素の増加が観察された。一方、抗酸化能 (還元能) の有意な変化は認められなかった。

心筋細胞のミトコンドリア・ストレステスト: 昨年度に実施した実験の再試験を行った。T-2 トキシシの 24 時間作用によって、低濃度のレベル ( $6 \times 10^{-5} \mu\text{M}$ ) から心筋細胞の酸素消費量の有意な減少およびオリゴマイシシ、FCCP に対する有意な反応性低下が認められ、定性的および定量的に前年度で得られた結果が再現された。

以上の実験結果から、T-2 トキシシの投与後 48 時間目では心臓血管系の循環動態はほぼ正常範囲に維持されていること、T-2 トキシシは全身の酸化ストレスをもたらすこと、また心筋細胞に直接作用させた場合には、低濃度レベルでミトコンドリア機能を阻害することが再確認された。

## A. 研究目的

### I. 心血管系影響

平成 22～23 年度の研究において、T-2 トキシンは、無麻酔、自由行動下のラットへの皮下投与 (0.1, 0.5, 1 mg/kg) によって、不整脈などの心機能異常をもたらすことが明らかになっている。また、同時に心拍変動解析の結果によって自律神経活動への影響も示唆された。これらの研究結果は、心電図記録をもとに得られたものであるため、不整脈の発現性や自律神経機能の変化を評価する上で有益であるが、心臓血管系の循環動態を把握するためには心エコー図による観察が適していると思われる。そのため、平成 24 年度では、最新のカラードプラー・心エコー測定装置を用いて、T-2 トキシンを投与されたラットにおける心臓機能および血管系の機能的変化を観察した。

### II. 酸化ストレス影響

デオキシニバレノールや T-2 トキシンの毒性影響の一部に活性酸素が関与する可能性が示唆されており、上記の循環器系影響への関与の可能性も否定できないことから、平成 24 年度では、T-2 トキシンを投与されたラットの血液中の活性酸素および抗酸化能を調べた。

### III. 心筋細胞のミトコンドリア・ストレステスト

平成 23 年度の研究で、T-2 トキシンは低濃度域から心筋細胞ミトコンドリア機能に対する直接作用があることが明らかになった。平成 24 年度では、同じ実験方法による再現性を確認するための追加実験を行った。

## B. 研究方法

### (1) T-2 トキシンの心臓血管系循環動態に及ぼす影響

Wistar 系雄ラット (8 週齢、20 匹) を対照群 (N=5)、T-2 トキシン 0.02 mg/kg (N=5)、0.1 mg/kg (N=5)、0.5 mg/kg (N=5) の 4 群に分けた。T-2 トキシンまたは対照液の皮下投与後、48 時間目に心エコー/ドプラー法

(測定器 Vevo2100) による血行動態の観察を行った。観察項目は、左室駆出率、左室内径短縮率、心拍数、一回拍出量、心拍出量、左側大腿動脈・左側総頸動脈の血流速度、拍動係数、抵抗係数とした。計測はウレタン全身麻酔下で行った。

### (2) T-2 トキシンの血液酸化ストレス・抗酸化能に及ぼす影響

上記 (1) の観察後、ラットの総頸動脈より全血を採取して血清分離を行った後、酸化ストレス (総活性酸素活性) の指標である d-ROMs 値および抗酸化能指標である BAP 値を測定した。測定器はフリーラジカル測定装置 (Free、ウイスマー社) を用いた。

### (3) 心筋細胞のミトコンドリア・ストレステスト

実験方法は前年度 (23 年度) 報告において述べた方法と同じある。新生子ラットの心臓から分離した心筋細胞をもとに一次培養系を作製し、培養液中で 72 時間培養した後に、T-2 トキシン添加培養液で 24 時間培養した。用いた T-2 トキシンの濃度は昨年度と同様に  $6 \times 10^{-8} \sim 6 \times 10^{-1} \mu\text{M}$  の 8 段階とした。これらの濃度の細胞への作用は同一のプレート (96 ウェル) 上で同時に行った。心筋細胞の酸素消費量 (OCR ; pMoles/min) の変化を光学センサーを内蔵した細胞外フラックスアナライザー (XF96 Analyzer、Seahorse Bioscience 社) で検出した。

観察項目としては、T-2 トキシンの 24 時間作用後の OCR のほかに、オリゴマイシン ( $3 \mu\text{M}$ ) を用いて ATP 産生に関連した OCR の変化を、また FCCP ( $2.5 \mu\text{M}$ ) を用いて電子伝達系の予備力 (RC) の変化を観察した。前者はオリゴマイシン作用直前直後の OCR の差分、後者は FCCP 作用直後とオリゴマイシン作用直前の OCR の差分によって求めた。

なお、上記 (1)、(2)、(3) の実験結果の統計処理は、投与量または濃度間の有意差検定を一元配置分散分析 (繰り返しなし) を用いて行った上で、対照群に対する各投与群の比較 Dunnett 検定を用いて行った ( $P < 0.05$  で有意差あり)。

### C. 研究結果

(1) T-2 トキシンの心臓血管系循環動態に及ぼす影響 (表 1)

ドプラー・心エコー法によって、心機能、大腿動脈および総頸動脈の血行動態を観察した。低用量の 0.02 mg/kg の投与で、総頸動脈の収縮期血流速度および心拍数の有意 ( $P<0.05$ ) な増大が、0.5 mg/kg で総頸動脈の平均血流速度の有意 ( $P<0.05$ ) な増大が認められたが、心拍出量、拍動係数、抵抗係数等に有意な変化は観察されなかった。

(2) T-2 トキシンの血液酸化ストレス・抗酸化能に及ぼす影響 (図 1)

T-2 トキシンの皮下投与後 48 時間目に測定した血清中の活性酸素活性 (d-ROMs; 平均  $\pm$ SD; 単位 U.CARR) は、対照群  $315.2 \pm 44.1$  に対して、0.02 mg/kg 群  $359.0 \pm 30.8$ 、0.1 mg/kg 群  $373.6 \pm 30.0$ 、0.5 mg/kg  $420.0 \pm 44.8$  であり、有意な相違 (ANOVA,  $P<0.005$ ) が示された。d-ROMs 値は T-2 トキシンの投与量に対して用量依存性の増大 (相関係数  $r=0.891$ ) を示した。対照群との比較では、T-2 トキシンの投与量 0.1 mg/kg 以上で対照群に対して有意な増大が認められた (0.1 mg/kg、 $P<0.05$ ; 0.5 mg/kg、 $P<0.01$ )。

一方、抗酸化能 (BAP; 平均  $\pm$ SD; 単位  $\mu$ mol/L) は、対照群  $2810.2 \pm 261.4$  に対して  $2714.6 \pm 274.2$  (0.02 mg/kg)、 $2804.7 \pm 349.4$  (0.1 mg/kg)、 $2831.9 \pm 256.9$  (0.5 mg/kg) であり、T-2 トキシンの投与群はいずれも対照群との間で BAP 値に有意差を示さなかった ( $P>0.05$ )。

活性酸素に対する抗酸化能の比率 (BAP/d-ROMs) は、T-2 トキシンの投与群では 0.5 mg/kg の投与量でのみ対照群に対して有意な増大 ( $P<0.05$ ) を示した。

(3) 心筋細胞のミトコンドリア・ストレステスト

T-2 トキシンの 24 時間作用によって、心筋細胞における基礎酸素消費量が  $6 \times 10^{-5}$   $\mu$ M の濃度で対照の 71.9% に減少した。より高濃度の  $6 \times 10^{-4}$   $\mu$ M ~  $6 \times 10^{-1}$   $\mu$ M では、対照の 15.4 %

to 18 % に減少した ( $P<0.0001$ )。ATP 合成に関連した酸素消費量 (オリゴマイシン反応性) は濃度依存性の変化 ( $P<0.001$ ) を示し、 $6 \times 10^{-4}$   $\mu$ M 以上の濃度では対照に対して有意な減少 ( $P<0.001$ ) を示した。また、ミトコンドリア予備力 (FCCP 反応性) も同様に濃度依存性の変化を示し、 $6 \times 10^{-5}$   $\mu$ M 以上の濃度では対照に対して有意な減少 ( $P<0.001$ ) を示した。

これらの結果は、平成 23 年度に実施した実験結果と同じであった。

### D. 考察

(1) T-2 トキシンの心臓血管系循環動態に及ぼす影響

平成 22~23 年度は心電図を中心にした循環器影響を観察したが、平成 24 年度は心臓血管系全体の循環動態の変化を知る目的でカラードプラー心エコー法による測定を行った。本法は近年、超音波周波数の向上により画像解像度が高まってきたことで、ラットやマウスのような小動物においても心臓や末梢血管の運動や血流を正確に測定することが可能になっている。これまでの研究で T-2 トキシンは 0.1 mg/kg 以上の皮下投与で不整脈を発現させ、少なくとも 3 日間にわたって持続的に観察されたことから、本研究では、0.02 mg/kg、0.1 mg/kg、0.5 mg/kg の投与後 2 日目で検査を行った。最高用量の 0.5 mg/kg 投与においても心拍出量 (1 回拍出量  $\times$  心拍数)、拍動係数、抵抗係数等に有意な変化は観察されなかったことから、投与後 2 日目では心臓血管系における循環動態は全体としては正常範囲に維持されているものと考えられた。

(2) T-2 トキシンの血液酸化ストレス・抗酸化能に及ぼす影響

T-2 トキシンは投与後 48 時間目の検査で血液中の活性酸素を有意に増大させることが明らかになった。T-2 トキシンの投与群では用量依存性の活性酸素種の増加が認められ、有意差が認められたのは 0.5 mg/kg 以上の濃度であったものの、0.02 mg/kg の低用量においても増加傾向 (114 %) が示されたことから、T-2 トキシンは全身の酸化ストレスを増大さ

せることが明らかである。活性酸素種は筋肉運動など生理的な刺激によっても増加するが、一般的には同時に抗酸化系酵素などの作用による抗酸化能も高まるため、相対的な酸化ストレス度はそれほど上昇しない。しかしながら、今回の実験では T-2 トキシンでは血液中の抗酸化能増大の傾向は認められなかった。

T-2 トキシンの投与によるフリーラジカルの増加の機序は明らかではないが、本トキシンによる組織傷害が二次的にフリーラジカルの産生を高める可能性があるものと思われる。また、ミトコンドリア内でフリーラジカルが異常に増加した場合には電子伝達系機能を阻害し、アポトーシスなど様々な障害を引き起こす誘因となることも推測される。

### (3) 心筋細胞のミトコンドリア・ストレステスト

昨年度に引き続いて、ラット一次培養心筋細胞を用いた基本酸素消費量の測定およびミトコンドリア・ストレステストを行った結果、 $6 \times 10^{-5} \mu M$  で有意なミトコンドリア機能低下が認められた。この結果は、昨年度に得られた結果と同じであり（昨年度より合計 4 回実施）、高い再現性が実証された。このようなミトコンドリア機能影響は、不整脈の発現など心機能に対して様々な影響を及ぼす可能性が推測される。なお、上記の閾値濃度は、デオキシニバレノールによる閾値の約 13000 倍低い濃度である。

本実験はあくまでも、細胞に対する直接作用を *in vitro* の実験系で調べたものである。食品中のカビ毒は消化器内部で他の物質によって捕捉（吸着）、分解を受け、一部が腸から吸収される。吸収されたカビ毒はさらに肝臓や血液中の酵素によって解毒、代謝を受けるため、実際に細胞に作用する有効量は非常に小さくなるものと思われる。

## E. 結論

平成 22～23 年度の研究によって、T-2 トキシンは 0.1 mg/kg 以上の皮下投与によって、心電図上不整脈が観察されている。今回の心エコー・ドプラー法による循環動態の観察で

は、0.5 mg/kg の投与の 48 時間後で心臓機能および末梢循環機能に軽度の変化が認められたものの、循環不全のような重大な変化は観察されなかったことから、この濃度レベルでは基本的な循環機能は維持されていることが明らかになった。

一方、T-2 トキシンは 0.5 mg/kg 以上の濃度では酸化ストレスをもたらす可能性が明らかになった。

さらに心筋細胞に対する直接作用では、かなり低濃度でミトコンドリア機能を低下させることが明らかになった。

これらの成績から、T-2 トキシンは低濃度で細胞機能障害を引き起こすが、生体内では様々な防御機構が働くことによって、T-2 トキシンの毒性作用を低減化されていることが考えられた。

## 参考文献

- 1) Bubien, J.K. and Woods W. T. Jr.(1987): Direct and reflex cardiovascular effects of trichothecene mycotoxins. *Toxicon*. 25(3): 325-331.
- 2) Fang, H., Wu, Y., Guo, J., Rong, J., Ma, L., Zhao, Z., Zuo, D., Peng, S. (2012): T-2 toxin induces apoptosis in differentiated murine embryonic stem cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. *Apoptosis*. 17, 895-907.
- 3) Feuerstein, G. et al. (1985): Cardio-respiratory, sympathetic and biochemical responses to T-2 toxin in the guinea pig and rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 232(3): 786-794.
- 4) Koshinsky, H., Honour, S., Khachatourians, G., (1988): T-2 toxin inhibits mitochondrial function in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151, 809-814.
- 5) Ma, Y., Zhang, A., Shi, Z., He, C., Ding, J., Wang, X., Ma, J. Zhang, H.(2012): A mitochondria-mediated apoptotic pathway induced by deoxynivalenol in human colon cancer cells. *Toxicol. in Vitro*. 26, 414-420.

- 6) Magnuson, B. A. et al. (1987): Cardiovascular effects of mycotoxin T-2 after topical application in rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65, 799-802.
- 7) Pace, J.G. (1983): Effect of T-2 Mycotoxin on rat liver mitochondria electron transport system. *Toxicon.* 21, 675-680.
- 8) Wilson, C. A. et al. (1982): Blood pressure changes and cardiovascular lesions found in rats given T-2 toxin, a trichothecene secondary metabolite of certain *Fusarium microfungi*. *Toxicol Lett.* 10(1):35-40.
- 9) Yarom, R. et al. (1983): T-2 toxin effect on isolated perfused rat hearts. *Basic Res Cardiol.* 78(6):623-630.
- 10) Yarom, R. et al. (1986): T-2 toxin effect on cultured myocardial cells. *Toxicol Lett.* 31(1):1-8.
- 11) Yarom, R. et al. (1987): T-2 toxin effect on rat aorta: cellular changes *in vivo* and growth of smooth muscle cells *in vitro*. *Exp Mol Pathol.* 47(2):143-153.

#### F. 健康危険情報

なし

#### 研究業績

##### 【論文発表】

- 1) Ngampongsa S, Ito K, Kuwahara M, Ando K, Tsubone H. 2012 : Reevaluation of arrhythmias and alterations of the autonomic nervous activity induced by T-2 toxin through telemetric measurements in unrestrained rats. *Toxicol Mech Methods.* 22(9):662-673.

##### 【学会発表】

- 1) 局 博一、Suchitra Ngampongsa、伊藤公一、桑原正貴、安東賢太郎、山本有希子、水流功春：カビ毒 T-2 トキシンによる心電図、自律神経機能および心筋細胞呼吸機能の変化に関する研究（第 29 回日本心電学会学術集会、千葉市、2012. 10. 12-13）

#### 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



表 1. ドプラー・心エコー測定による循環動態の検査結果

T-2トキシン 投与群		血流速度 (mm/sec)						拍動係数・抵抗係数			
		大腿動脈			総頸動脈			大腿動脈		総頸動脈	
		拡張期 血流速	収縮期 血流速	平均 血流速	拡張期 血流速	収縮期 血流速	平均 血流速	拍動 係数	抵抗 係数	拍動 係数	抵抗 係数
Control	Mean	28.6	166.2	76.2	40.2	642.8	196.7	1.77	0.82	3.08	0.94
	SD	8.5	72.4	30.0	13.3	186.0	59.3	0.17	0.02	0.28	0.02
0.02 mg/kg	Mean	44.4	201.9	96.6	37.3	883.7	264.5	1.68	0.78	3.20	0.96
	SD	16.5	52.4	31.0	16.2	145.3	44.9	0.30	0.06	0.07	0.02
0.1mg /kg	Mean	22.6	108.0	53.3	31.8	609.8	182.1	1.69	0.81	3.18	0.95
	SD	19.1	46.5	27.3	8.9	76.0	20.5	0.25	0.06	0.35	0.02
0.5 mg/kg	Mean	40.6	198.7	95.8	39.6	798.4	269.5	1.61	0.79	2.80	0.95
	SD	29.6	124.5	57.9	12.2	202.1	68.5	0.23	0.06	0.16	0.02

T-2トキシン 投与群		駆出率 (%)	左室内 径 短縮 率(%)	心拍数 (/min)	一回 拍出量 ( $\mu$ l)	心拍出 量(ml)
Control	Mean	88.4	59.9	315.5	127.8	40.4
	SD	5.0	6.9	87.6	17.2	13.0
0.02 mg/kg	Mean	94.5	70.3	434.0	105.8	45.3
	SD	3.7	6.6	45.6	45.3	17.6
0.1mg /kg	Mean	89.5	61.4	307.8	101.3	31.9
	SD	4.7	8.1	86.2	11.7	11.8
0.5 mg/kg	Mean	88.0	63.8	399.4	139.0	57.0
	SD	12.2	18.6	88.5	31.2	23.9

太線枠は、対照群 (Control) に対して有意差あり (P<0.05)

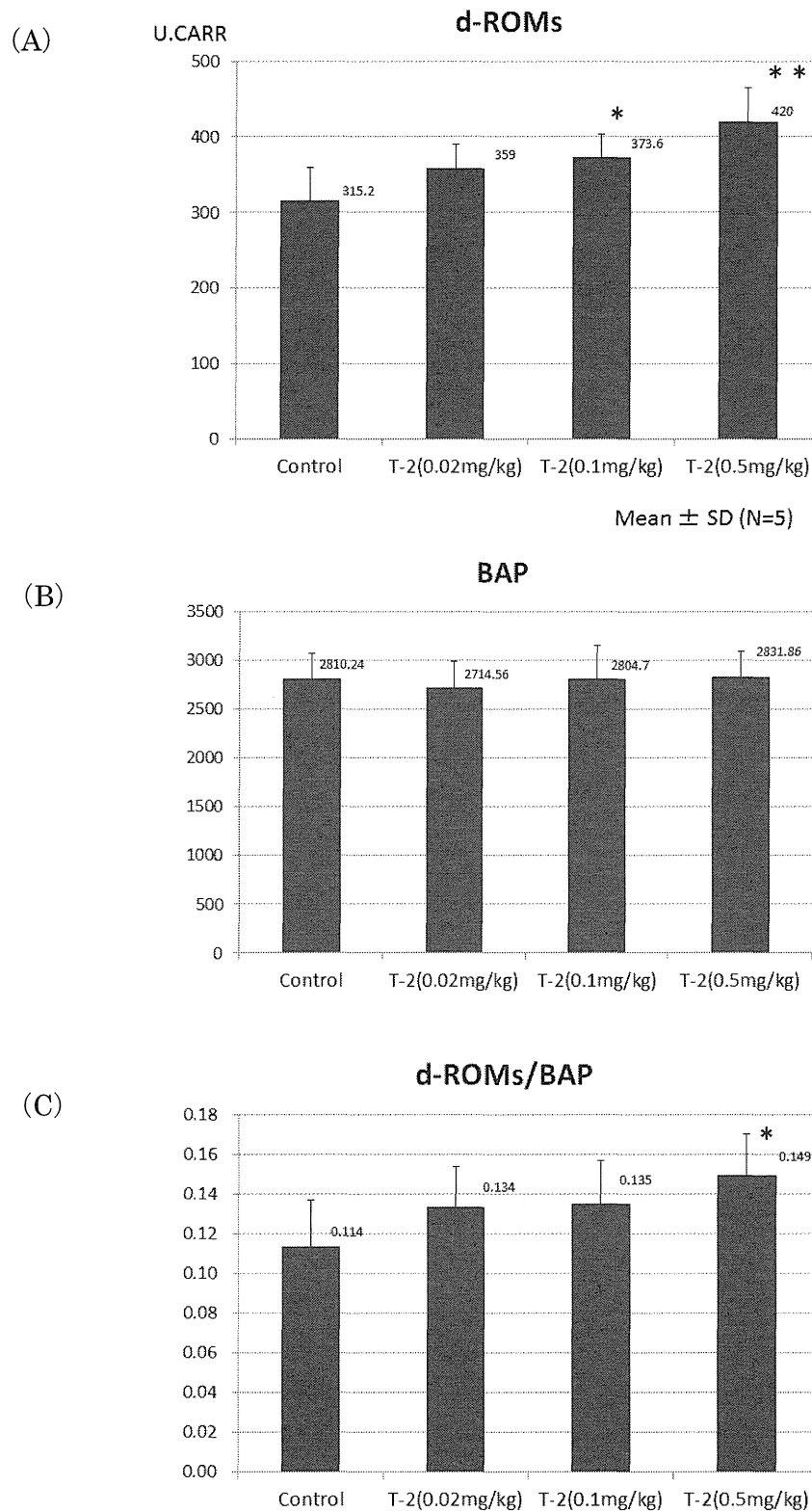


図1. T-2 トキシンの皮下投与による酸化ストレス指標の変化  
 A: 活性酸素種 (d-ROMs)、B: 抗酸化能 (BAP)、C: 実質的な酸化ストレス度 (d-ROMs/BAP) \* : P<0.05、\*\*P<0.01 v.s. Control

厚生労働科学研究費補助金  
(食品の安全確保推進研究事業)

分担研究報告書

シトリンの Maus 臓器および全身影響に関する研究

分担研究者 渋谷 淳 東京農工大学農学研究院動物生命科学部門 教授

研究要旨

本研究は、ペニシリウム属毒素のシトリン (Citrinin: CTN) について、実験動物に対する毒性プロファイルを明らかにすることを目的として実施した。平成 23 年度の研究では雌 BALB/c マウスを用いた CTN の 90 日間の飲水投与試験 (0、15、30 ppm) において、15 ppm 以上の投与群で卵巣の大型卵胞の増加を伴う重量増加が認められたため、15 ppm を LOAEL としたが、さらに NOAEL の決定が必要であると判断したため、24 年度は LOAEL である 15 ppm を高用量とし、公比 3 で投与群を 3 群設定し、飲水投与による 90 日間の亜急性毒性試験 (BALB/c マウス、雌、5 週齢、各群 15 匹、CTN 0、1.6、5、15 ppm) を行った。一般症状に明らかな変化はなかった。肝臓重量 (絶対値及び相対値) が 1.6 ppm 以上で低値を示した。また肝細胞の PCNA 染色陽性率が 5 ppm 群で有意に増加した。肝臓では自然発生性変化が散見されたが、それらの発生頻度に対照群との間に差は認められず、CTN の影響とは判断できなかった。卵巣重量 (絶対値及び相対値) は CTN 群で有意な変動は認めなかった。病理組織学的な検索により、膈および子宮粘膜の変化として、発情周期における明らかな偏りも認められなかった。また、卵巣に形態学的な変化も認められなかった。以上の結果より平成 23 年度に認められた卵巣変化は再現されず、生殖器系に対する影響はあったとしても軽微である可能性が示唆された。

研究目的

近年、カビ毒を対象に国際的成分規格を設定する動きが活発化している。我が国は輸入大国であることから、食の安全を確保するためには、食品の成分規格に対する国際的動向に対応できる体制が必要である。また国際的には問題とならないカビ毒でも、わが国の風土や食習慣に関わるカビ毒などは、重大な危害物質となりうる。本研究は、米汚染が危惧されているペニシリウム属毒素のシトリン (Citrinin: CTN) について、実験動物に対する毒性プロファイルを明らかにすることを目的として実施した。22 年度は、CTN に

ついて、実験動物に対する毒性影響を明らかにすることを目的として実験を行った。その結果、雌 BALB/c マウスを用いた 0、1.25、7.5 ppm (0、5、30  $\mu$ M) 用量での 70 日間の飲水投与実験で、腎臓において、用量に依存しないものの尿細管上皮の増殖活性の軽度な増加が 1.25 ppm 以上で認められ、また形態学的な変化は伴わないものの卵巣には 7.5 ppm 群で相対重量の増加および 1.25 ppm 以上で性周期の異常 (発情期の増加) 傾向が認められた。以上の結果より、更に詳細な検討が必要であると考え、23 年度は、用量を 22 年度の高用量である 7.5 ppm の 2-4 倍と

して雌 BALB/c マウスに 0、15 ないし 30 ppm を飲水にて 90 日間投与した。その結果、大型卵胞の増加と卵巣重量の増加が 15 ppm 以上で認められたため、15 ppm を LOAEL とした。24 年度は 23 年度で求めた LOAEL である 15 ppm を高用量とし、公比 3 で投与群を 3 群設定し、NOAEL を決定することを目的とし、90 日間の飲水投与による亜急性毒性試験を行った。

## B. 研究方法

4 週齢の雌 BALB/c マウス（日本エスエルシー）を 1 週間の馴化期間後、一群を 15 匹ずつとして計 4 群に分け、CTN を 0、1.6、5、15 ppm の用量で 90 日間飲水投与した。投与期間中、一般状態を 3~4 日に 1 回観察し、週に一度の割合で体重及び摂餌量、3~4 日に一度、CTN の交換および摂水量の測定を行った。また、4 週に一度の割合で尿試験紙（ウロペーパーⅢ/栄研化学株式会社）を用いて尿検査を行った。動物は全て、投与期間終了時に CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔下で放血を行い、放血後に屠殺した。得られた血液について血清分離を行い、株式会社三菱化学メディエンスに依頼して血液生化学検査を行った。なお、分離血清は、測定時まで -80℃にて保存した。

解剖時には、腎臓、肝臓、卵巣、子宮、膈、脾臓、胸腺、心臓、肺、膵臓、消化管、脳、下垂体、副腎、大動脈、三叉神経、骨格筋、骨、腸間膜リンパ節、食道、気管及び甲状腺を摘出し、腎臓、肝臓、脾臓、胸腺、心臓、肺および脳の重量を測定後、10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。卵巣及び子宮は固定後重量測定を行った。固定標本は、定法に従って、パラフィン包埋後薄切、ヘマトキシリンエオジン染色を行った。また、腎臓、肝臓および卵巣に関しては、proliferation cell nuclear antigen (PCNA) 染色を行った。

PCNA 染色では、mouse-on-mouse immunodetection kit (Vector Laboratories Burlingame, CA, USA) を用い、一次抗体として PCNA (mouse monoclonal antibody, clone PC10, 1:800 dilution; Dako, Glostrup, Denmark)、発色には 3,3'-diaminobenzidine (DAB) を用いた。賦活化はマイクロウェーブ (97℃、15 分) で行った。

卵巣における PCNA 染色切片を用いて、小型卵胞、中型卵胞、大型卵胞、新黄体、旧黄体、及び閉鎖卵胞の数をカウントし、卵巣全体の面積あたりの数を算出した。

腎臓における PCNA 染色切片を用いて、尿細管における陽性細胞数を、各個体 200 倍視野で左右腎臓につき、それぞれランダムに皮質~髄質外帯で片側 5 か所、計 10 か所観察し、陽性細胞数/尿細管上皮細胞数をカウントした。

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

統計学的解析は、体重、臓器重量、血液生化学検査値 (Creatinine、BUN、ALP、AST、ALT、Albumin、TP)、腎/肝 PCNA カウント値、卵巣および黄体カウント値について、各群の分散を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、不等分散の場合は Kruskal-Wallis の方法により検定を行った。尿検査の値 (カテゴリカルデータ) について、Mann-Whitney's *U*-test により対照群と CTN 各投与群で比較した。病理組織学的変化の発生頻度は Fisher の直接確率法により対照群と CTN 各投与群で比較した。

(倫理面への配慮)

投与実験は飲水投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物は全て CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 深麻酔下で後大静脈からの放血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。

また、動物飼育、管理にあつては、国立大学法人 東京農工大学の実験取扱い倫理規定に従った。

### C. 研究結果

#### 体重、飲水量、摂餌量：

体重は、CTN 投与群において、投与期間を通じて明らかな変化を示さなかった (Fig. 1, Table 1)。飲水量は、5、15 ppm 群で、投与 8、10 週目および 12 週目に無処置対照 (0 ppm) 群に比較して有意な低値を示した。摂餌量は 5 ppm 群で投与 8、12 週目に有意な低値を示した (Fig. 1)。

#### 尿検査値：

尿蛋白、尿 pH、尿潜血検査では、CTN 投与群で無処置対照群に比べて差がなかった (Table 2)。

#### 臓器重量：

肝臓重量 (絶対値及び相対値) が CTN 群で有意に減少した (Table 3)。卵巣を含むその他の臓器については、CTN 群で無処置対照群に比べて明らかな変化を示さなかった。

#### 血液生化学検査：

検査項目のうち、BUN が 1.6 ppm 群で有意に増加し、ALT が 5 ppm 群で有意に減少した (Table 4)。Creatinine、AST、ALP、TP 及び albumin は CTN 投与群と無処置対照群との間に差がなかった。

#### 病理組織学的変化および免疫組織学的変化：

肝臓における胆管周囲の炎症細胞浸潤、微小肉芽腫、限局性単核細胞浸潤、限局性肝細胞凝固壊死、腎臓における限局性の再生尿細管、水腎症、心臓における外膜鉍質沈着、胸腺における好酸球浸潤、胃、小腸、膀胱にお

ける粘膜下への好中球やリンパ球浸潤が認められたが、CTN 投与に関連した変化ではなかった (Table 5)。

子宮、膣の組織像で正常性周期を逸脱するものは認められなかった (Table 5)。また、卵巣において小型卵胞、中型卵胞、大型卵胞、新世代黄体、旧世代黄体、閉鎖卵胞数をカウントしたところ、無処置対照群との違いは認められなかった (Table 6)。

腎臓では、PCNA 染色の結果、尿細管上皮の陽性細胞率に明らかな違いは認められなかった (Table 6)。肝臓において、肝細胞の PCNA 染色陽性率が 5 ppm 群で軽度増加していた。 (Table 6)。

### D. 考察

BALB/c マウスに CTN について 15 ppm を最高用量として 90 日間飲水投与し、腎臓、肝臓、卵巣、子宮、膣及びその他の臓器への影響について解析した。

5 及び 15 ppm 群において投与 8、10 週目、及び 5 ppm 群において投与 12 週目で、飲水量の低値が認められた。これに関しては忌避による飲水量低下と考えられたが、体重に差が認められなかったことから毒性学的な意義は低いと考えられた。肝臓重量 (絶対値及び相対値) が 1.6 ppm 以上で低値を示した。肝細胞の増殖活性が 5 ppm 群で軽度増加していた。肝臓では微小肉芽腫、門脈への炎症細胞浸潤、限局性単核細胞浸潤、限局性凝固壊死などが発生したが、それらの発生頻度に対照群との間に差は認められなかった。よって、形態学的な変化を伴っていなかったことから肝臓変化は CTN の影響とは判断できなかった。23 年度の投与実験において、15 及び 30 ppm 群で卵巣重量 (絶対値及び相対値) の増加と大型卵胞の増加が認められたが、今回の投与実験では 15 ppm を含む全投与群

において明らかな変動は認められなかった。病理組織学的検査においても、各種卵胞数や黄体数は対照群との差は認められず、膣および子宮粘膜の変化として、発情周期における偏りも認められず、CTNによる雌生殖器への影響は明らかではなかった。

## E. 結論

今回の実験において、平成 23 年度に 15、30 ppm 群で認められた卵巢変化（大型卵胞の増加を伴う重量増加）は再現されず、生殖器系に対する影響はあったとしても軽微である可能性が示唆された。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Hayashi H., Itahashi M., Taniai E., Yafune A., Sugita-Konishi Y., Mitsumori K., Shibutani M.: Induction of ovarian toxicity in a subchronic oral toxicity study of citrinin in female BALB/c mice. J. Toxicol. Sci. 37:1177-1190 (2012)

## 2. 学会発表

1) 板橋 恵、林 仁美、谷合枝里子、盛田怜子、赤根弘敏、鈴木和彦、小西良子、三森国敏、渋谷 淳: シトリニンの雌BALB/cマウスを用いた90日間反復投与試験. 第39回日本毒性学会学術集会, 仙台, 第39回日本毒性学会学術集会講演要旨集: P-40, p. S176, 7月17-19日, 2012

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

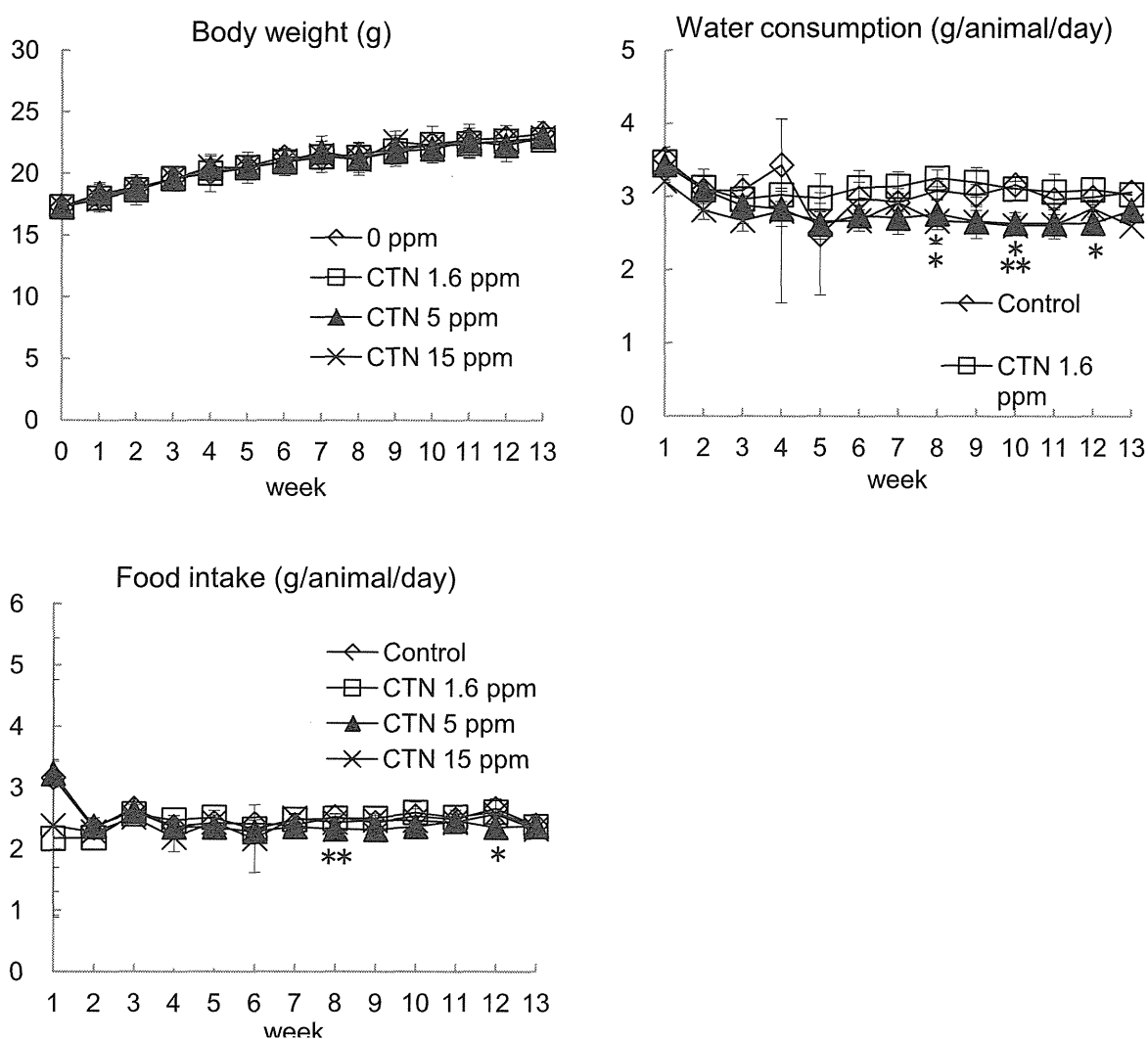


Figure 1. Body weight, water consumption and food intake of BALB/c mice given CTN in the drinking water for 90 days. \*, \*\*Significantly different from the untreated controls ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ , Dunnett's multiple test or Steel's test). Abbreviation: CTN, citrinin.

Table 1. Final body weights, food intake, water consumption and CTN intake of BALB/c mice given CTN in the drinking water for 90 days

	CTN (ppm)			
	0 (Control)	1.6	5	15
No. of animals	15	15	15	15
Final body weight (g)	23.29±1.17 <sup>c</sup>	22.74±1.28	23.01±1.22	22.92±0.96
Food intake (g/animal/day) <sup>a</sup>	2.52±0.22	2.45±0.14	2.44±0.25	2.40±0.12
Water consumption (g/animal/day) <sup>b</sup>	3.06±0.24	3.12±0.13	2.80±0.23	2.75±0.17
CTN intake (mg/kg body weight/day)	0	0.23±0.03	0.67±0.10	1.98±0.26

<sup>a,b</sup>Mean value of each week. <sup>c</sup>Mean±SD. Abbreviation: CTN, citrinin.

Table 2. Urinalysis of BALB/c mice given CTN in the drinking water for 90 days

	Time point (week)	Criteria	CTN (ppm)			
			0 (Control)	1.6	5	15
Urinary protein	4	No. of animals	15	14 <sup>a</sup>	14 <sup>a</sup>	15
		-	0	0	0	0
		±	0	0	0	0
		+	14	13	13	15
		++	1	1	0	0
		+++	0	0	1	0
	8	No. of animals	14 <sup>a</sup>	14 <sup>a</sup>	15	15
		-	0	0	0	0
		±	0	0	0	0
		+	2	0	0	1
		++	8	13	14	13
		+++	4	1	1	1
	12	No. of animals	15	15	15	15
		-	0	0	0	0
		±	0	0	0	0
		+	1	0	0	0
		++	6	12	6	10
		+++	8	3	9	5
pH	4	No. of animals	15	14 <sup>a</sup>	14 <sup>a</sup>	15
		6	5	4	7	2
		6.5	0	0	0	0
		7	10	10	7	12
		8	0	0	0	1
		9	0	0	0	0
	8	No. of animals	14 <sup>a</sup>	14 <sup>a</sup>	15	15
		6	4	3	5	4
		6.5	0	0	0	0
		7	9	6	7	9
		8	1	5	3	2
		9	0	0	0	0
	12	No. of animals	15	15	15	15
		6	8	7	6	4
		6.5	0	0	0	0
		7	3	6	7	9
		8	4	2	2	2
		9	0	0	0	0
Occult blood	4	No. of animals	15	14 <sup>a</sup>	14 <sup>a</sup>	15
		-	13	13	13	15
		±	0	0	0	0
		+	1	1	0	0
		++	1	0	1	0
		+++	0	0	0	0
	8	No. of animals	14 <sup>a</sup>	14 <sup>a</sup>	15	15
		-	12	11	12	15
		±	0	0	2	0
		+	0	2	1	0
		++	1	0	0	0
		+++	1	1	0	0
	12	No. of animals	15	15	15	15
		-	14	12	14	14
		±	0	0	0	0
		+	1	0	1	0
		++	0	2	0	0
		+++	0	1	0	1

Grade of score: ±, minimal; +, slight; ++, moderate; +++, severe.

<sup>a</sup> 1 animal could not be examined because of insufficient urine specimen.

Abbreviation: CTN, citrinin.



Table 3. Organ weights of BALB/c mice given CTN in the drinking water for 90 days

		CTN (ppm)			
		0 (Control)	1.6	5	15
No. of animals		15	15	15	15
Liver	Absolute (mg)	1227.47 ± 101.38 <sup>a</sup>	1075.53 ± 81.25 <sup>**</sup>	963.97 ± 253.22 <sup>**</sup>	1052.87 ± 67.31 <sup>**</sup>
	Relative (%)	5.27 ± 0.30	4.73 ± 0.19 <sup>**</sup>	4.19 ± 1.14 <sup>**</sup>	4.60 ± 0.39 <sup>**</sup>
Kidneys	Absolute (mg)	362.47 ± 21.49	305.60 ± 29.10	297.33 ± 22.07	302.93 ± 21.76
	Relative (%)	1.57 ± 1.02	1.35 ± 0.14	1.30 ± 0.12	1.32 ± 0.11
Spleen	Absolute (mg)	123.67 ± 21.09	128.20 ± 15.56	126.07 ± 15.80	119.40 ± 12.86
	Relative (%)	0.53 ± 0.11	0.56 ± 0.06	0.55 ± 0.07	0.52 ± 0.05
Thymus	Absolute (mg)	41.87 ± 12.31	42.11 ± 7.35	41.19 ± 9.48	35.76 ± 6.63
	Relative (%)	0.18 ± 0.05	0.19 ± 0.03	0.18 ± 0.04	0.16 ± 0.03
Heart	Absolute (mg)	135.93 ± 13.10	128.27 ± 10.19	129.33 ± 13.24	126.73 ± 11.49
	Relative (%)	0.58 ± 0.05	0.57 ± 0.05	0.56 ± 0.06	0.55 ± 0.05
Lungs	Absolute (mg)	274.73 ± 92.91	318.00 ± 44.05	259.73 ± 54.21	275.20 ± 44.40
	Relative (%)	1.18 ± 0.38	1.40 ± 0.20	1.13 ± 0.25	1.21 ± 0.22
Brain	Absolute (mg)	482.80 ± 19.45	496.47 ± 17.75	499.60 ± 19.26	496.27 ± 13.91
	Relative (%)	2.08 ± 0.11	2.19 ± 0.12	2.18 ± 0.12	2.17 ± 0.10
Adrenal glands	Absolute (mg)	12.03 ± 4.53	12.31 ± 3.99	12.09 ± 3.75	12.04 ± 3.70
	Relative (%)	0.051 ± 0.018	0.054 ± 0.016	0.053 ± 0.016	0.053 ± 0.016
Ovaries	Absolute (mg)	12.69 ± 2.15	13.57 ± 2.71	12.34 ± 3.25	11.53 ± 1.95
	Relative (%)	0.055 ± 0.009	0.060 ± 0.011	0.050 ± 0.020	0.050 ± 0.009
Uterus	Absolute (mg)	144.26 ± 43.80	153.27 ± 46.58	149.08 ± 41.35	140.85 ± 33.83
	Relative (%)	0.62 ± 0.18	0.68 ± 0.21	0.65 ± 0.19	0.62 ± 0.15

<sup>a</sup>Mean±SD.

<sup>\*\*</sup> Significantly different from the untreated controls (P<0.01, Steel's test).

Abbreviation: CTN, citrinin.

Table 4. Serum biochemistry of BALB/c mice given CTN in the drinking water for 90 days

		CTN (ppm)			
		0 (Control)	1.6	5	15
No. of pooled sample		6	5	6	7
Blood urea nitrogen (mg/dL)		18.6 ± 2.3 <sup>a</sup>	24.6 ± 3.3 <sup>*</sup>	19.9 ± 2.7	22.6 ± 4.3
Creatinine (mg/dL)		0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0
Aspartate aminotransferase (IU/L)		80.6 ± 27.4	102.6 ± 46.6	60.3 ± 21.8	60.9 ± 6.9
Alanine aminotransferase (IU/L)		37.4 ± 10.5	40.4 ± 7.8	27.7 ± 3.9 <sup>*</sup>	29.6 ± 3.7
Alkaline phosphatase (IU/L)		348.4 ± 21.9	353.4 ± 13.5	320.4 ± 24.1	321.0 ± 28.1
Albumin (g/dL)		3.8 ± 0.1	4.0 ± 0.2	3.8 ± 0.2	3.8 ± 0.2
Total protein (g/dL)		5.2 ± 0.2	5.4 ± 0.3	5.1 ± 0.1	5.1 ± 0.2

<sup>a</sup>Mean±SD. <sup>\*</sup> Significantly different from the untreated controls (P<0.05, Dunnett's multiple test or Steel's test).

Abbreviation: CTN, citrinin.

Table 5. Histopathological changes in BALB/c mice given CTN in the drinking water for 90 days

	CTN (ppm)				
	Control	1.6	5	15	
	No. of animals	15	15	15	15
Liver					
Microgranuloma		11	12	14	14
Mononuclear cell infiltration, focal		2	6	4	3
Single cell necrosis of liver cell		0	0	0	0
Coagulative liver cell necrosis, focal		0	1	1	0
Lymphocytic infiltration, periportal		9	8	11	14
Kidneys					
Regenerating tubules, focal		0	0	3	1
Hydronephrosis		3	2	1	0
Heart					
Mineralization		6	9	7	7
Thymus					
Eosinophil infiltration		10	14	14	11
Stomach					
Inflammatory cell infiltration, submucosa		2	1	0	1
Small intestine					
Inflammatory cell infiltration, submucosa		0	1	0	0
Pancreas					
Microgranuloma		0	0	0	0
Urinary bladder					
Inflammatory cell infiltration, submucosa		3	3	3	1
Estrous cyclicity					
Proestrus		4	3	4	4
Estrus		3	9	7	5
Metestrus		7	3	3	4
Diestrus		1	0	1	2

Abbreviation: CTN, citrinin.

Table 6. The number of PCNA-positive proximal tubular cells/hepatocyte and follicle/corpus luteum of BALB/c mice given CTN in the drinking water for 90 days

	No. of animals	CTN (ppm)			
		0 (Control)	1.6	5	15
		15	15	15	15
<b>Kidneys</b>					
No. of PCNA-positive tubular cells (/1000 cells) <sup>a</sup>		1.09 ± 0.81 <sup>b</sup>	0.72 ± 0.82	0.83 ± 0.51	1.31 ± 0.49
<b>Liver</b>					
No. of PCNA-positive hepatocytes (/1000 cells)		0.03 ± 0.08	0.16 ± 0.21	0.14 ± 0.15*	0.47 ± 0.70
<b>Ovaries</b>					
No. of small follicles/area		3.26 ± 2.30	2.79 ± 1.40	3.42 ± 2.18	2.24 ± 1.35
No. of medium-sized follicles/area		1.51 ± 0.93	2.09 ± 1.68	2.38 ± 1.74	2.02 ± 1.06
No. of large follicles/area		4.93 ± 1.98	5.90 ± 4.41	5.37 ± 2.08	4.74 ± 1.63
No. of currently forming corpora lutea/area		0.84 ± 0.57	1.05 ± 0.68	0.60 ± 0.56	0.70 ± 0.63
No. of previously forming corpora lutea/area		1.75 ± 1.06	1.81 ± 1.16	1.54 ± 1.28	1.93 ± 1.16
No. of atretic follicles/area		2.50 ± 1.13	2.91 ± 1.10	3.47 ± 1.14	3.23 ± 1.58

<sup>a</sup> Tubular cells in the cortex and outer stripe of medulla.

<sup>b</sup> Mean ± SD.

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

Abbreviation: CTN, citrinin.

厚生労働科学研究費補助金

(食品の安全確保推進研究事業)

分担研究報告書

カビ毒の暴露量評価

研究分担者 小西良子 国立医薬品食品衛生研究所・衛生微生物部長

協力研究者 斉藤史朗 東京大学大学院

#### 研究要旨

国際的に対策推進が進んでいるカビ毒のうち、まだ国内の暴露実態が把握されていないカビ毒が存在する。今回は3種のフザリウム毒素 (T-2 トキシン、HT-2 トキシン、ゼアラレノン) について、汚染実態調査および食品摂取調査の結果にもとづき、日本人の暴露量についての本格的シミュレーションを行うための施行を行った。

本研究の目的は、摂取量の多い食品と少ない食品で、どれだけ暴露についての寄与の度合いが異なるのか、その程度を推定してみることである。

あずき含有食品は、とりわけ摂取量の多い20歳以上の年齢層における「まんじゅう類」の場合、摂取者割合は12%を超えるが、はとむぎについては、摂取量の多い20歳以上でも、摂取者割合は0.5%にも満たない。その結果、推定された暴露量においても、95%タイル値で、20歳以上のゼアラレノンの upper bound の暴露量はあずき単独の場合に2.66ng/体重 Kg/day であるのに対して、はとむぎによる暴露量を加えた合計の暴露量でも2.69ng/体重 Kg/day であった。同じく T-2 トキシンではあずき単独の場合に2.20ng/体重 Kg/day であるのに、合計暴露量は同じく2.20ng/体重 Kg/day であった。HT-2 トキシンでは、あずき単独の場合に2.68ng/体重 Kg/day であるのに対して、合計暴露量では2.69ng/体重 Kg/day であった。このように、摂取者の割合が少ない食品は暴露量への寄与が無視できるほど小さかった。

一方、小麦類など、摂取者割合・摂取量ともに多い主食と言われる食品による暴露が健康被害には重要に作用すると思われる。今後の主食類による暴露評価が望まれる。