

Table 5. Urinalysis of BALB/c mice given CTN in the drinking water for 90 days in 2012.

Criteria	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

## Legends

<Table 4>

Grade of score:  $\pm$ , minimal; +, slight; ++, moderate; +++, severe.

<sup>a</sup> 1, 2 or 3 animals could not be examined because of insufficient urine specimen.

\* Significantly different from the untreated controls ( $P < 0.05$ , Mann-Whitney's *U* test).

Abbreviation: CTN, citrinin.

<Table 5>

Grade of score:  $\pm$ , minimal; +, slight; ++, moderate; +++, severe.

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

Abbreviation: CTN, citrinin.

Table 6. Liver, kidneys, ovary and uterine weights of BALB/c mice given CTN in the drinking water for 70 days in 2010.

		CTN (ppm)		
		0 (Control)	1.25	7.5
No. of animals		15	15	15
Liver	Absolute (mg)	866.73 ± 64.49 <sup>a</sup>	849.20 ± 46.95	853.13 ± 57.95
	Relative (%)	4.07 ± 0.28	4.03 ± 0.16	4.00 ± 0.22
Kidneys	Absolute (mg)	235.40 ± 37.16	237.27 ± 12.91	244.93 ± 23.25
	Relative (%)	1.14 ± 0.10	1.13 ± 0.06	1.15 ± 0.11
Ovaries	Absolute (mg)	7.23 ± 1.63	7.92 ± 1.90	8.75 ± 2.73
	Relative (%)	0.034 ± 0.007	0.038 ± 0.009	0.041 ± 0.013*
Uterus	Absolute (mg)	99.53 ± 29.72	105.87 ± 40.85	98.33 ± 29.66
	Relative (%)	0.47 ± 0.14	0.50 ± 0.20	0.46 ± 0.14

<sup>a</sup> Mean ± SD.

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

Abbreviation: CTN, citrinin.

Table 7. Organ weights of BALB/c mice given CTN in the drinking water for 90 days in 2011.

		CTN (ppm)		
		0 (Control)	15	30
No. of animals		15	15	15
Liver	Absolute (mg)	1067.07 ± 103.67 <sup>a</sup>	1019.70 ± 75.70	1046.73 ± 66.94
	Relative (%)	4.73 ± 0.35	4.52 ± 0.33*	4.66 ± 0.16
Kidneys	Absolute (mg)	278.13 ± 21.13	290.80 ± 33.17	286.07 ± 24.59
	Relative (%)	1.24 ± 0.08	1.28 ± 0.12	1.27 ± 0.10
Spleen	Absolute (mg)	116.13 ± 14.59	115.60 ± 13.39	110.73 ± 8.88
	Relative (%)	0.52 ± 0.07	0.51 ± 0.04	0.49 ± 0.04
Thymus	Absolute (mg)	42.93 ± 11.55	45.67 ± 11.22	43.00 ± 11.01
	Relative (%)	0.19 ± 0.05	0.20 ± 0.05	0.19 ± 0.05
Heart	Absolute (mg)	116.40 ± 14.56	117.27 ± 8.84	118.20 ± 15.26
	Relative (%)	0.52 ± 0.06	0.52 ± 0.03	0.53 ± 0.05
Lungs	Absolute (mg)	180.93 ± 36.54	174.27 ± 18.79	180.53 ± 21.94
	Relative (%)	0.80 ± 0.15	0.77 ± 0.11	0.81 ± 0.12
Brain	Absolute (mg)	474.00 ± 26.33	477.40 ± 19.48	479.00 ± 17.94
	Relative (%)	2.11 ± 0.16	2.12 ± 0.16	2.14 ± 0.13
Adrenal gland	Absolute (mg)	9.55 ± 2.22	8.87 ± 1.45	9.70 ± 3.17
	Relative (%)	0.043 ± 0.011	0.039 ± 0.0057	0.0426 ± 0.013
Ovaries	Absolute (mg)	7.93 ± 2.30	9.61 ± 2.10*	9.83 ± 1.70*
	Relative (%)	0.035 ± 0.009	0.042 ± 0.008*	0.044 ± 0.007**
Uterus	Absolute (mg)	96.85 ± 27.37	89.95 ± 39.61	99.29 ± 27.73
	Relative (%)	0.027 ± 0.022	0.023 ± 0.024	0.028 ± 0.021

<sup>a</sup> Mean ± SD.

\*,\*\* Significantly different from the untreated controls (P < 0.05, 0.01, Dunnett's multiple test or Steel's test).

Abbreviation: CTN, citrinin.

Table 8. Organ weights of BALB/c mice given CTN in the drinking water for 90 days in 2012.

		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.

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

Abbreviation: CTN, citrinin.

Table 9. Serum biochemistry and immunoglobulin levels of BALB/c mice given CTN in the drinking water for 70 days in 2010.

	CTN (ppm)		
	0 (Control)	1.25	7.5
No. of animals	5	5	5
Blood urea nitrogen (mg/dL)	26.4 ± 3.8 <sup>a</sup>	27.6 ± 3.5	29.6 ± 3.8
Creatinine (mg/dL)	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0
Aspartate aminotransferase (IU/L)	53.4 ± 5.7	58.8 ± 4.3	54.8 ± 6.9
Alanine aminotransferase (IU/L)	24.8 ± 3.1	28.2 ± 3.4	26.2 ± 8.9
Alkaline phosphatase (IU/L)	292.6 ± 22.3	311.0 ± 17.4	283.0 ± 14.7
Albumin (g/dL)	3.48 ± 0.16	3.48 ± 0.13	3.40 ± 0.14
Total protein (g/dL)	4.64 ± 0.23	4.60 ± 0.19	4.54 ± 0.15
No. of animals	11 <sup>b</sup>	9 <sup>b</sup>	11 <sup>b</sup>
IgG (mg/dL)	111.8 ± 48.4	97.3 ± 36.5	100.6 ± 28.1
IgA (mg/dL)	31.6 ± 6.0	29.0 ± 7.8	31.1 ± 5.3

<sup>a</sup> Mean ± SD.

<sup>b</sup> Four or five pooled samples/group were subjected to analysis: Control, N=4 pooled samples, each from 2, 2, 3, and 4 animals; 1.25 ppm CTN group, N=5 pooled samples, each from 2, 2, 2, 2, and 1 animals; 7.5 ppm CTN group, N=5 pooled samples, each from 3, 2, 2, 2, and 2 animals.

Abbreviation: CTN, citrinin.

Table 10. Serum biochemistry of BALB/c mice given CTN in the drinking water for 90 days in 2011.

	CTN (ppm)		
	0 (Control)	15	30
No. of pooled sample	7	8	8
Blood urea nitrogen (mg/dL)	23.9±2.1 <sup>a</sup>	44.8±6.0	20.8±2.5*
Creatinine (mg/dL)	0.3±0.1	0.3±0.1	0.3±0.1
Aspartate aminotransferase (IU/L)	56.4±9.7	79.4±45.5	71.9±19.2
Alanine aminotransferase (IU/L)	28.7±4.9	40.9±15.5	39.0±9.8*
Alkaline phosphatase (IU/L)	281.0±13.9	237.6±13.9	289.4±19.9
Albumin (g/dL)	3.3±0.1	3.3±0.1	3.3±0.1
Total protein (g/dL)	4.5±0.1	4.5±0.1	4.5±0.1

<sup>a</sup> Mean±SD.

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

Abbreviation: CTN, citrinin.



Table 11. Serum biochemistry of BALB/c mice given CTN in the drinking water for 90 days in 2012.

	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*	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*	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.

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

Abbreviation: CTN, citrinin.

Table 12. Histopathological changes in BALB/c mice given CTN in the drinking water for 70 days in 2010.

	CTN (ppm)		
	0 (Control)	1.25	7.5
No. of animals	15	15	15
<b>Liver</b>			
Microgranulomas	8	11	9
Microgranulomas with liver cell necrosis	0	1	2
Inflammatory cell infiltration, bile duct	3	7	7
<b>Kidneys</b>			
Regenerating tubules, focal	1	0	1
Cytoplasmic vacuolation, proximal tubules	1	1	0
Hydronephrosis	1	0	2
<b>Estrous cyclicity</b>			
Proestrus	4	2	2
Estrus	3	6	6
Metestrus	4	3	5
Diestrus	4	4	2

Abbreviation: CTN, citrinin.

Table 13. The number of PCNA-positive tubular cells and follicles/corpora lutea of BALB/c mice given CTN in the drinking water for 70 days in 2010.

	CTN (ppm)		
	0 (Control)	1.25	7.5
No. of animals	15	15	15
Kidneys			
No. of PCNA-positive tubular cells <sup>a</sup>	0.11 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.16 ± 0.07*	0.17±0.08*
Ovaries			
No. of primordial follicles/area	2.39 ± 1.64	2.33 ± 1.54	2.92±1.88
No. of primary follicles/area	3.71 ± 2.31	3.01 ± 1.40	3.91±2.23
No. of secondary follicles/area	7.12 ± 3.85	4.99 ± 1.43	6.41±2.73
No. of atretic follicles/area	3.14 ± 1.27	2.74 ± 1.52	3.38±1.79
No. of corpora lutea/area	1.14 ± 1.28	1.19 ± 0.69	1.08±1.23

<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.

Table 14. Histopathological changes in BALB/c mice given CTN in the drinking water for 90 days in 2011.

	CTN (ppm)		
	0 (Control)	15	30
No. of animals	15	15	15
<b>Liver</b>			
Single cell necrosis of liver cell	0	0	1
Mononuclear cell infiltration, periportal	5	8	7
Microgranulomas	3	8	3
Mononuclear cell infiltration, focal	1	0	1
Coagulative liver cell necrosis, focal	1	0	0
<b>Kidney</b>			
Regenerating tubules, focal	2	7	8
<b>Heart</b>			
Myocardial mineralization, focal	2	3	1
<b>Thymus</b>			
Eosinophil infiltration	0	0	1
<b>Pancreas</b>			
Microgranulomas	2	0	0
<b>Stomach</b>			
Inflammatory cell infiltration, submucosa	1	0	0
<b>Small intestine</b>			
Hyperplasia of foveolar epithelium, focal	1	0	0
<b>Estrous cyclicity</b>			
Proestrus	4	5	3
Estrus	6	3	3
Metestrus	5	5	8
Diestrus	0	2	1

Abbreviation: CTN, citrinin.

Table 15. The number of PCNA-positive tubular cells/hepatocytes and follicles/corpora lutea of BALB/c mice given CTN in the drinking water for 90 days in 2011.

	CTN (ppm)		
	0 (Control)	15	30
No. of animals	15	15	15
Kidneys			
No. of PCNA-positive tubular cells (/1000 cells) <sup>a</sup>	2.40 ± 1.00 <sup>b</sup>	2.58 ± 1.76	2.78 ± 1.72
Liver			
No. of PCNA-positive hepatocytes (/1000 cells)	0.13 ± 0.14	0.13 ± 0.14	0.14 ± 0.11
Ovaries			
No. of small follicles/area	3.23 ± 1.64	3.98 ± 2.18	4.24 ± 1.25
No. of medium-sized follicles/area	1.39 ± 0.56	2.43 ± 4.50	1.48 ± 0.62
No. of large follicles/area	1.90 ± 1.03	2.78 ± 0.95*	2.93 ± 0.97**
No. of currently formed corpora lutea/area	0.63 ± 0.43	0.84 ± 0.46	0.64 ± 0.31
No. of previously formed corpora lutea/area	1.58 ± 0.84	1.56 ± 1.54	1.08 ± 0.93
No. of atretic follicles/area	1.99 ± 1.36	1.86 ± 0.51	1.83 ± 0.97

<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, 0.01, Dunnett's multiple test or Steel's test).

Abbreviation: CTN, citrinin.

Table 16. Histopathological changes in BALB/c mice given CTN in the drinking water for 90 days in 2012.

Abbreviation: CTN, citrinin.

	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

Table 17. 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 in 2012.

	CTN (ppm)			
	0 (Control)	1.6	5	15
No. of animals	15	15	15	15
Kidneys				
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
Liver				
No. of PCNA-positive hepatocytes (/1000 cells)	0.03 ± 0.08	0.16 ± 0.21	0.14 ± 0.15*	0.47 ± 0.70
Ovaries				
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 formed corpora lutea/area	0.84 ± 0.57	1.05 ± 0.68	0.60 ± 0.56	0.70 ± 0.63
No. of previously formed 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事業  
(食品の安全確保推進研究事業)

協力研究報告書

カビ毒によるヒト単球由来株免疫毒性および  
ヒト肝癌由来細胞株酸化ストレス影響に関する研究

研究協力者 杉山 圭一 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部

研究要旨

本研究は食品に残留が認められるカビ毒、特にトリコテセン系カビ毒である T-2 toxin (T-2) と HT-2 toxin (HT-2) 並びに Ochratoxin A (OTA)、Citrinin (CIT) の生体毒性について検討を行った。これら毒素は穀類にも汚染が認められることから、その毒性把握は食品衛生上重要と考えられるカビ毒である。マウスマクロファージ様細胞において T-2 および HT-2 は、グラム陰性細菌の外膜構成成分である Lipopolisaccharide をリガンドとする Toll-like receptor 4 (TLR4) のシグナル伝達を阻害することが明らかとなった。TLR はその後の各種免疫反応を惹起するトリガーとなり、炎症性サイトカインの産生を誘導し感染防御に関わることが知られる。従って、今回得られた結果は、T-2 および HT-2 が示す易感染性の分子メカニズムの一序を示唆している可能性が考えられた。また、ヒト肝ガン由来細胞に対しては、200 nM および 400 nM の T-2 もしくは HT-2 の両毒素は、細胞内の主要な抗酸化物質である Glutathione を減少させることが明らかとなった。一方、共汚染が認められる OTA と CIT については、ヒト単球由来細胞に対する細胞毒性を指標とした場合、毒性は相加とはならない可能性が認められた。以上の結果は、これらカビ毒のリスク評価において貴重な知見となる。

I. 研究目的

真菌の二次代謝産物であるカビ毒の種類は100種類を超え、さらに構造的に

他の多くの微生物毒素と比べ低分子であり、物理的、化学的処理に比較的安定という特徴を有する。従って、一度汚染さ



れた食糧、食品に残留するカビ毒の減毒に対しては衆目の一致する有効な対策は現時点では確立されているとは言えないのが現状である。

カビ毒による健康被害を軽減、回避するうえで汚染実態を把握することは、効果的な同対策を講ずるために不可欠な研究である。同時に、その毒性を正確に理解することは、汚染実態調査で得られるデータを健康被害の抑制に有効利用するうえで不可欠となる情報である。極微量で生体に毒性を呈するカビ毒には、その汚染レベルは規制により厳しく制限する必要がある。一方、多方面からの毒性解析により、毒性として作用を呈する濃度が通常の汚染レベルの食品摂取では達しない場合には、その対策の緊急度は低いことになる。即ち、正確な毒性理解は、適切な対策を講ずる上で極めて重要であるとも換言できる。

本総合研究報告書では、平成22年度および23年度の両年度において国立医薬品食品衛生研究所の衛生微生物部で実施したカビ毒の生体毒性に関する研究成果について述べる。初年度は、タイプ A に分類されるトリコテセン系カビ毒である T-2 と HT-2 について、その毒性を自然免疫系に対する影響の観点から検討を加えた。免疫毒性をその特徴の1つとするトリコテセン系カビ毒については、自然免疫系を構成する Toll-like receptor 4 (TLR4) シグナルをタイプ B トリコテセン系カビ毒が抑制することが報告されて

いる[1]。この報告に基づき、今回は T-2 と HT-2 の毒性を検討した。なお、TLR4 の下流には 2 経路が存在し、それぞれ MyD88 依存・非依存経路と称されるが、本研究では NF- $\kappa$ B の活性化レベルを MyD88 依存経路の、IFN- $\beta$  プロモーターの活性化レベルを MyD88 非依存経路の指標に検討した。

次年度では同じく T-2 と HT-2 について、その解毒に関わる肝臓に焦点をあて検討を行った。肝細胞としては、ヒト肝ガン由来細胞株 Hep G2 細胞を用いた。細胞内の Glutathione (GSH) 含量を指標に肝臓におよぼす両カビ毒による影響を検討した。GSH は生体外異物の代謝と、細胞内酸化度の維持に関わる生理機能を有する。したがって、両毒素が肝細胞に与える影響をそれぞれの観点から検討できると考えられる。特に、トリコテセン系カビ毒が酸化ストレスを惹起することが報告されていることから、その毒性低減方法についても貴重な知見が得られる可能性がある[2]。

本研究では、*Penicillium* 属真菌が産生する Ochratoxin A (OTA) および Citrinin (CIT) の複合毒性についても免疫系への作用を指標に検討した。両毒素については RNA 合成阻害について相乗的作用を呈することが知られている[3]。しかし、免疫毒性に関しては OTA では各種免疫細胞への影響について報告があるものの[4]、CIT についての研究報告例は少ない。本研究ではこれまで明確にされてはいない

OTA と CIT 共存下における免疫毒性を、マクロファージ様細胞を用いて検討を行った。

## J. 研究方法

### 【細胞培養・各種試料の調製】

マウスマクロファージ RAW264 細胞 (Riken Cell Bank, Tsukuba, Japan) は、10% 非働化仔ウシ血清 : Fetal Bovine Serum (以後 FBS と略記 : Filtron, Brooklyn 3025, Australia; Batch No. 19397)、ペニシリン・ストレプトマイシン (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (以後 DMEM と略記 : Gibco, Grand Island, NY, USA) にて培養することをその条件とした。また培養には 75 cm<sup>2</sup> の組織培養フラスコ (Techno Plastic Products, Zurich, Switzerland) を用いて 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。なお、ホタルルシフェラーゼ遺伝子の上流に IFN- $\beta$  プロモーターを有するプラスミドが安定的にトランスフェクトされた IFN- $\beta$ /RAW264、ならびにホタルルシフェラーゼ遺伝子の上流に NF- $\kappa$ B 依存性プロモーター領域を有するプラスミドが安定的にトランスフェクトされた ELAM/RAW264 は、上記の条件に加えて 1 mg/ml の G418 二硫酸塩 (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を添加した培地を用いて培養を行った。

T-2, HT-2 (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、最終濃度をそれぞれ T-2 が 10  $\mu$ g/ml、HT-2 が 1  $\mu$ g/ml となるように調整し、-30°C で保存した。実験に使用する際は、窒素ガスを用いて濃縮乾固し、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、使用前にソニケーションを行った。

### 【IFN- $\beta$ プロモーターおよび NF- $\kappa$ B 依存性レポーター活性の測定】

IFN- $\beta$ /RAW264 細胞、または ELAM/RAW264 細胞を、12 well plate (Techno Plastic Products, Zurich, Switzerland) に  $3-5 \times 10^5$  cells/ml で撻種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で一晩インキュベートした。インキュベート後、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。6 時間後に培養液を除去、その後、Phosphate buffered saline で洗浄した。Passive Lysis Buffer (Promega, Madison, WI, USA) を 250  $\mu$ l/well で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°C、4,000 rpm、5 分間遠心を行い、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 (Croning 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。

#### 【T-2 および HT-2 の生体毒性影響】

ヒト肝ガン細胞 Hep G2 (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  $\mu$ g/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。

T-2 toxin および HT-2 toxin は減衰を防ぐためアセトニトリルに溶かし、最終濃度 10  $\mu$ M となるように調整後-30°Cで保存した。実験に際しては、各種マイコトキシンを窒素ガスで濃縮乾固した後、DMEM で溶解させ使用した。

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。GSH (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。

Total GSH 測定は以下の通りに行った。Hep G2 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、各種マイコトキシンを含む培地を 1 ml/well 加え、さらに 24 時間培養した。各種マイコトキシンを含む培地の調製法は次の通りである。DMEM 培地を用いて T-2 toxin および HT-2 toxin を 50 - 400 nM 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、セルスクレーパー ( 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 tube に 80  $\mu$ l 加え、凍結 (-80°C) と溶解を 2 回繰り返した。溶解後、5% SSA を tube に 20  $\mu$ l 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ M GSH を測定した。標準曲線の調製法は、1.5 ml マイクロチューブに 0.5% SSA を 50  $\mu$ l および 200  $\mu$ M GSH を 50  $\mu$ l 加え 100  $\mu$ M GSH とした。さらに、1.5 ml マイクロチューブに 0.5% SSA を tube に 50  $\mu$ l 加え、50  $\mu$ l ずつ段階希釈を行った。

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

#### 【OTA および CIT の複合毒性】

ヒト単球性細胞株 THP-1 細胞 (Human Science Research Resources Bank, Tokyo, Japan) は、10%FBS、ペニシリン・ストレプトマイシン (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を含む DMEM の入った 75 cm<sup>2</sup> の組織培養フラスコ (Techno Plastic Products) に播種後、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

OTA と CIT (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、-30°C で保存した。実験に使用する際は、窒素ガスを用いて濃縮乾固し、DMEM 培地に溶解し使用した。

MTT アッセイは以下の通りに行った。THP-1 細胞を 96 ウェルプレート (Techno Plastic Products Zurich Switzerland) に  $2 \times 10^4$  cells/well になるように 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、OTA と CIT を含む培地を加え (100  $\mu$ l/well) さらに 24 時間培養した。OTA と CIT を含む培地の調製方法は以下のとおりである。1.0 mM OTA もしくは CIT を使用し、DMEM を用いて各濃度 (0, 0.781, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu$ M) になるように段階希釈した。培養後、MTT 試薬 (Cell Proliferation Kit 1 ; Roche Diagnostics Basel, Switzerland) の MTT labeling reagent を 10  $\mu$ l/well 加え 4 時間後、Solubilization Buffer を 100  $\mu$ l/well 添加し 37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で静置した。一晩静置させた後、吸光度 550 nm をマルチプレートリーダー THERMO (Tecan Group Ltd, Switzerland) 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、OTA および CIT 非存在下におけるコントロールの値を 100% として細胞増殖活性を評価した。

統計学的処理は ANOVA (分散分析) を行