

201426048A

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

デオキシニバレノールが呼吸器由来細胞や
マウス肺に与える影響

平成26年度 総括研究報告書

研究代表者 豊留 孝仁

平成 27 (2015) 年 3 月

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

デオキシニバレノールが呼吸器由来細胞や
マウス肺に与える影響

平成26年度 総括研究報告書

研究代表者 豊留 孝仁

平成 27 (2015) 年 3 月

目 次

- I. 総括研究報告
デオキシニバレノールが呼吸器由来細胞やマウス肺に与える影響----- 1
豊留孝仁

I. 総括研究報告

デオキシニバレノールが呼吸器由来細胞やマウス肺に与える影響

研究代表者 豊留 孝仁

帯広畜産大学動物・食品検査診断センター食品リスク分野 講師

研究要旨

デオキシニバレノールは *Fusarium* 属が産生するカビ毒（マイコトキシン）の一種で、小麦類を中心とする穀類を汚染する。汚染食品の摂取によるカビ毒中毒が懸念され、これまでに盛んに研究が行われてきている。特に経口摂取を念頭に数多くの研究が行われてきたが、吸入摂取を念頭に置いた肺や肺由来細胞への影響について検討を行った研究は少ない。そこで本研究では肺由来細胞株 A549 細胞への *in vitro* での処理およびマウス個体への反復経気管投与処理の二つの手法を用いて検討を行った。マウス個体への週 2 回 3 ヶ月にわたる経気管投与において外見上の大きな変化は認められなかった。肺より RNA を調製し、網羅的な遺伝子発現変動解析を行った結果、デオキシニバレノール処理により発現が 2 倍以上上昇した遺伝子を 82 遺伝子（ノンコーディング RNA を含む）、0.5 倍以下に低下した遺伝子を 143 遺伝子（ノンコーディング RNA を含む）見出した。これら発現変動がみられる遺伝子はデオキシニバレノール処理と関連があると推定される。

A. 研究目的

真菌は食品の安全を脅かす重要な微生物である。特に食品の輸入流通量増大、食品の多様化、食品の長期保管などを背景として、真菌の食品汚染の問題は身近かつ重要となってきた。

真菌そのものによる食品汚染も重要であるが、真菌が産生するカビ毒（マイコトキシン）による汚染は世界的に大きな問題となっている。多くの真菌、特に糸状菌は多様な二次代謝産

物を産生することが知られている。真菌が産生する二次代謝産物には細胞傷害性や発がん性など有害な作用を持つ代謝産物も含まれ、カビ毒と総称される。食品危害真菌が食品において生育し、カビ毒を産生することによって食品が汚染される。カビ毒はタンパク質ではなく、熱に対して安定である化合物が多い。そのため、多くのカビ毒が調理などの熱処理を加えても毒性を維持したまま残存する点は多くの細菌毒素と異なる点として留意し

なければならない。カビ毒として最もよく知られているのはアスペルギルス・フラブスなどが産生するアフラトキシンである。アフラトキシンはナッツ類などを汚染する。アフラトキシンはその発がん性の強さから非常に厳しく汚染が監視されている。

デオキシニバレノール（DON）はフザリウム属菌という主な食品危害真菌の一つが産生する。ほかの食品危害真菌同様に食品保存中に汚染を生じさせるほかに、ムギの赤カビ病原菌として圃場において汚染を起こす。フザリウム属菌はDON以外にも複数のカビ毒を産生することが知られており、総称してフザリウムトキシンと呼ばれている。DONはトリコテセン系のカビ毒である。別名としてボミトキシンと呼ばれることが示すように、吐き気などの胃腸障害が急性毒性として知られている。慢性毒性としては免疫機能の低下や体重増加抑制などを引き起こすことが報告されている。DONに汚染された食品が経口的に摂取されることが想定されて、これまでにに行われている大多数の研究では動物を用いた経口投与による検討が行われている。一方、*in vitro*において用いられる細胞種についても消化器由来の細胞を用いている実験が多い。

しかしながら、DONの他の主要な体内への取り込み経路を考えると、汚染された穀物・飼料の粉末・粉塵の吸入も想定される。実際に独立行政法人労働安全衛生総合研究所によって実施されたトウモロコシ荷揚げ作業の

アフラトキシン（主なカビ毒の一つ）ばく露状況等の調査ではアフラトキシンによる健康障害の発生の可能性はほとんどないものの防塵マスクを使用せずに荷揚げ作業を行った場合や作業時の発塵状況、輸入されるトウモロコシの汚染状態によってはアフラトキシン暴露リスクが高まる可能性があることが報告された（鹿島港におけるトウモロコシ荷揚げ作業のアフラトキシン曝露調査報告書 <http://anzeninfo.mhlw.go.jp/horei/hor1-48/hor1-48-29-1-9.pdf>）。これを受けて、荷揚げ作業時の防塵マスク着用等の徹底が要請されている（厚生労働省 職場のあんぜんサイト 法令情報 <http://anzeninfo.mhlw.go.jp/anzen/hor/hombun/hor1-48/hor1-48-29-1-0.htm>）。上述のように通常ではカビ毒吸入による健康障害が生じる可能性はほとんどないものの吸入を念頭に置いた基礎的検討も必要と考える。しかし、このような検討は少なく、今後の基礎的検討と知見の積み上げが重要と考える。

吸入摂取を念頭に置いた検討としては次のような過去の報告が挙げられる。Amuzieら（Amuzie, *Toxicology*, 2008; 248: 39-44）はマウスを用いてDON単回鼻腔内投与後のDON血中濃度の推移を検討しており、単回経口投与後に比べて非常に高い濃度に到達することを明らかとしている。また、鼻腔投与によって肝臓、脾臓、肺での炎症性サイトカインの産生量が経口投与よりも高くなることが示されて

いる。さらに亀井ら（亀井, マイコトキシン, 2008; 58: 47-51）はマウス肺へのトリコテセン系カビ毒の影響について検討を行っている。トリコテセン系カビ毒産生株と非産生株の胞子を2週間に3回の頻度で1か月にわたって6回反復投与を行った結果、トリコテセン系カビ毒産生株投与群においては半数で肺動脈壁の肥厚などがみられたのに対し、トリコテセン系カビ毒非産生株においてはこのような変化がみられなかった、と亀井らは報告している。

このようにDONを含めてトリコテセン系カビ毒を含む菌体・汚染粉末の吸入による長期曝露が健康影響を及ぼすことが強く推測されているが、呼吸器由来細胞株を用いた研究はほとんどなく、研究の進展も限られたものとなっている。また、経気管的投与によるマウスを用いた評価も十分には行われていない。そこで、本研究はDONの吸入曝露を念頭に置いて、肺由来の細胞株を用いてDON単回曝露の影響を検討することとした。また、マウスへの経気管的曝露を3か月行うことで肺への影響を検討することとした。

B. 研究方法

1. 試薬

デオキシニバレノール (DON) はシグマアルドリッチ社より購入して用いた。

2. マウスへのDON反復経気管投与

異なるDON量を1週間に2回、3か月経気管反復投与してマウスの体重変化、外見所見を観察し、初回投与後90日目に解剖し肺を摘出し、病理学的所見の観察を行った。

マウスは6週齢のC57BL/6オスを用いた。1群あたり3頭のマウスを用いた。DONは1回あたりの投与量を0.1、1、10、100 μ gに設定した。

DON反復投与後の肺における網羅的遺伝子発現変動解析を行うために、同様のマウスへの経気管反復投与を行った。1群マウス5頭とし、DONは1回あたりの投与量を100 μ gとした。3ヶ月の投与終了後にマウスの肺を摘出した。摘出肺は適切に処置して、RNA抽出まではRNAlater (Thermo Scientific社) 中にて-80 $^{\circ}$ Cで保存した。

3. RNA調製とマイクロアレイ解析

摘出肺標本は北海道システムサイエンス社に送付し、RNAはRNeasy Mini Spin Column (キアゲン社) を用いて抽出された。マイクロアレイ解析はSurePrint G3 Mouse 8x60K ver. 1.0 (アジレント・テクノロジーズ) を用いて行われた。

(倫理面への配慮)

毒物及び劇物の管理を徹底し、並びに化学物質全般において規定してい

る PRTR 法やその他の法令、「国立大学法人帯広畜産大学毒物及び劇物取扱規程」等の遵守を徹底して研究を行った。

カビ毒を用いるため、「国立大学法人帯広畜産大学病原体等安全管理規程」等を遵守し、定められた取扱い及び安全確保の措置を執って、研究を行った。

本研究計画は動物実験を含むため、動物実験委員会の承認のもと、「国立大学法人帯広畜産大学動物実験等に関する規程」を中心として「動物の愛護及び管理に関する法律」及び「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」、「動物の処分方法に関する指針」を遵守して行われた。具体的には（1）動物愛護の観点から個々の実験計画を遂行する上で使用する動物は必要最低限とすること、（2）動物の処分は社会的に容認されており、できる限り処分動物に苦痛を与えない方法をとること、などの措置を講じて研究を行った。

本研究では遺伝子組換え実験や倫理委員会の承認が必要な実験は含まれず、これらに該当しない。本研究を行うにあたり、講習会受講等の必要な措置をとり、また大学内において研究計画の申請・承認を受けた上で行われた。

C. 研究結果

1. デオキシニバレノールの経気管
反復投与のマウスへの影響
まず、異なるデオキシニバレ

ノール（DON）量を投与して、マウスに与える影響を検討した。1 群 3 頭を設定して検討を行ったが、投与直後の死亡が DON 非投与群（初回投与後 66 日、投与 20 回目）、DON 1 μ g/回投与群（初回投与後 17 日、投与 6 回目）、DON 10 μ g/回投与群（初回投与後 17 日、投与 6 回目）において 1 頭ずつ見られた。今回設定したいずれの DON 量においてもマウスの外見に大きな変化は認められなかった。体重変動においても群間で差は認められなかった。さらに摘出肺の病理標本を作製し、観察を行ったが、顕著な変化は認められなかった。

そこで無処理群（5 頭）と DON 量 100 μ g/回投与群（6 頭）の 2 群を設定して再度投与実験を行った。これらのマウスも投与後 90 日まで外見に変化は認められなかった。体重変動においては DON 投与 6 頭中 2 頭において初回投与後 40 日前後において体重増加の停滞もしくは減少が 10~20 日間程度継続する現象が見られた。この 2 頭においてこれらの期間以外では体重の増加傾向が認められた。

2. DON 処理による遺伝子発現変動解析

DON 処理時の遺伝子発現変動についてマイクロアレイによ

る網羅的な解析を行った。DON 100 μ g/回で反復投与したマウスおよび無処理マウスそれぞれ2個体から摘出した肺を用いて、それぞれ RNA を抽出してマイクロアレイ解析を行った。得られた解析結果から、デオキシニバレノール処理により発現が2倍以上上昇した遺伝子を82遺伝子（ノンコーディング RNA を含む）、0.5倍以下に低下した143遺伝子（ノンコーディング RNA を含む）を見出した。

D. 考察

本研究ではマウスを用いて DON の影響について経気管反復投与を行って検討を行った。その結果、最大で100 μ g/回を1週間に2回の頻度で3ヶ月にわたって投与しても外見的に変化は認められなかった。また、体重についても停滞や現象は見られなかった。DON 0.1 μ g/回の量で投与を行った群のマウスにおいては無処理を含む他群に比べてやや体重が大きく推移したが、初回投与後90日において有意な差は見られていない。今回は少数での検討であったため、この体重が大きく推移したことがDONによるかどうかは再度検討が必要と考える。また、6頭のマウスを用いて、100 μ g/回の投与量で1週間に2回の頻度で3ヶ月にわたって経気管反復投与を再度行った結果、2頭に一時的な体重増加の停滞もしくは減少が見られた。これらの影響がDONによるかどうかは再度の

検証が必要と考える。

これらの結果から100 μ g/回での投与を再度行い、無処理群マウスおよびDON投与処理群マウスから初回投与後90日目で肺を摘出した。摘出肺より抽出したRNAを用いてマイクロアレイで網羅的に遺伝子発現変動を解析した。その結果、デオキシニバレノール処理により発現が2倍以上上昇した遺伝子を82遺伝子（ノンコーディング RNA を含む）、0.5倍以下に低下した遺伝子を143遺伝子（ノンコーディング RNA を含む）見出した。これまでに肺由来細胞株A549細胞においてDON処理により遺伝子発現変動が見られた遺伝子と共通するものが含まれているかどうかを検討したが、共通する遺伝子は含まれていなかった。この理由として、肺全体を使用しており、細胞として肺胞上皮細胞のみならず、常在マクロファージやその他の肺を構成する細胞集団全体として発現変動を見ているためにin vitroでの細胞を用いて得られた影響を受ける遺伝子と共通する遺伝子が得られなかったと推測される。一方で今回変動が見られた遺伝子は肺を構成する肺胞上皮細胞以外の細胞集団で変動している可能性がある。これらの可能性も含めて、今後さらなる検討を行う必要がある。今回得られた結果とさらに詳細な発現変動解析により、肺におけるDONの影響の詳細な機構が明らかになると期待する。

E. 結論

マウス（1群3頭）に様々な投与量でDONを投与したが、外見上に変化は認められなかった。また、体重変動においてもDON 0.1 μ g/回の投与量の群でやや体重が大きく推移したが初回投与後90日において有意差は認められなかった。また、DON 100 μ g/回の投与量でさらに6頭のマウスを用いて体重変動を観察したところ、2頭において一時的な体重増加の停滞もしくは減少が認められた。

さらにDON 100 μ g/回の投与量を用いて1週間に2回の頻度でマウスに経気管反復投与を行い、摘出肺中の網羅的遺伝子発現変動解析を行った。その結果、デオキシニバレノール処理により発現が2倍以上上昇した遺伝子を82遺伝子（ノンコーディングRNAを含む）、0.5倍以下に低下した遺伝子を143遺伝子（ノンコーディングRNAを含む）見出した。

これらの結果から、肺においてDONが遺伝子発現に影響を及ぼしていることが示された。肺におけるDONの影響について、本研究の成果と今後の解析により、さらに詳細な機構が明らかになると期待される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表
投稿準備中
2. 学会発表

1. 豊留孝仁、高橋弘喜、亀井克彦. デオキシニバレノールが肺胞由来 A549 細胞に与える影響. 日本マイコトキシン学会 第75回学術講演会. 2014年9月5日. 岐阜
2. 豊留孝仁、亀井克彦. デオキシニバレノールが肺胞上皮由来 A549 細胞に及ぼす影響. 第58回日本医真菌学会総会・学術集会. 2014年11月1日-2日. 横浜
3. 豊留孝仁. カビ毒デオキシニバレノールの呼吸器由来株化細胞に与える影響. 第88回日本細菌学会総会. 2015年3月26日-28日. 岐阜

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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）
総括研究報告書

研究成果の刊行に関する一覧表
該当なし

