

201426048B

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25年度～26年度 総合研究報告書

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25年度～26年度 総合研究報告書

研究代表者 豊留 孝仁

平成 27 (2015) 年 3 月

目 次

- I. 総合研究報告
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. 総合研究報告

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小麦を中心とする穀類汚染の原因となるカビ毒（マイコトキシン）であり、食品の安全を考えるうえで非常に重要なカビ毒である。デオキシニバレノールについては主に経口摂取による毒性を念頭に研究が行われてきたが、本研究では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。本研究において検討を行った結果、肺由来細胞株 A549 細胞に対して細胞増殖阻害を引き起こしていることが明らかとなった。さらに網羅的遺伝子発現変動解析からデオキシニバレノール処理により A549 細胞で有意に発現変動がみられる 16 遺伝子および 5 ノンコーディング RNA を見出した。これらのうち、5 遺伝子については定量 PCR 法によっても発現変動を確認した。これらの遺伝子がデオキシニバレノールによる増殖阻害につながる毒性発現に重要な役割を果たしていることが推測された。マウス個体を用いた検討では、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

真菌は発酵食品の製造などで人類にとって有益な微生物の一つであるとともに、食品の安全を脅かす有害な微生物の一つである。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

きている。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による汚染は世界的にも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グリオトキシンのような細胞傷害性やアフラトキ

シンのような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（マイコトキシン）と総称される。食品危害真菌が食品において生育し、その場でカビ毒を産生することによって食品が汚染される。カビ毒は一般的に非タンパク質性の低分子化合物である。熱に対して安定である化合物が多く、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タンパク質性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。アフラトキシンは発がん性の強さから非常に厳しくその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重要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、ムギ類などに感染し、圃場において病害を起こし、結果としてカビ毒の汚染を起こす。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の一つである。別名としてボミトキシンと呼ばれ、この名称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。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はシグマアルドリッチ社より購入して用いた。

2. 細胞株と培養方法

肺由来の細胞として広く用いられている A549 細胞を用いた。培養は以下の通り行った。4.5 g/L グルコースと 5.958 g/L HEPES、0.584 g/L L-グルタミン、0.0159 g/L フェノールレッドを含む Dulbecco's Modified Eagle Medium で 5%CO₂ 存在下 37°C で培養を行った。

3. 生細胞数測定

生細胞数の測定は Cell Counting Kit-8 (同仁化学社) を用いて行った。A549 5×10³ 細胞を 96 ウェルプレートの各ウェルに播種し、24 時間培養を行った。この細胞に DON を各種濃度となるように加えて、24 時間もしくは 48 時間処理を行った。処理後に Cell Counting Kit solution を 10μL 添加し、1 時間発色させたのちに 450nm の吸光度を Genios Pro 吸光度計により測定した。DON の 50% 阻止濃度は 4 係数ロジステ

ニック曲線に回帰して算出を行った。

4. 死細胞の検出と定量

アポトーシス細胞死している細胞を含めて死細胞の検出は Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit Plus (バイオビジョン社) を用いて行った。生細胞数測定と同様に播種・培養した細胞に対して、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DON で 24 時間処理を行い、Annexin V-FITC および SYTOX green で染色を行った。染色細胞は BD FACSCanto (ベクトン・ディッキンソン社) を用いて解析された。

5. 細胞周期解析

細胞周期解析は Cell Cycle Phase Determination kit (ケイマンケミカル社) を用いて行った。生細胞数測定と同様に播種・培養した細胞に対して、0.1、0.5、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DON で 24 時間処理を行い、プロピジウムイオダイドで染色を行った。染色細胞は BD FACSCanto (ベクトン・ディッキンソン社) を用いて解析された。

6. A549 細胞からの RNA 調製とマイクロアレイ解析

RNA は次のように調製した。生細胞数測定と同様に DON の処理を行った。DON の濃度は 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を採用した。24 時間処理後に TRI-Reagent と Direct-zol RNA MiniPrep kit

(ザイモリサーチ社) を用いて RNA 抽出を行った。サンプルは北海道システムサイエンス社に送付し、SurePrint G3 Human 8x10K ver. 2.0 (アジレント・テクノロジーズ) を用いてマイクロアレイ解析が行われた。

7. 定量 PCR による遺伝子発現の定量解析

上記の調製により得られた RNA もしくは SuperPrep Cell Lysis Kit for qPCR (東洋紡社) により得られた RNA を用いて定量 PCR を行った。逆転写反応はそれぞれ SuperPrep Cell Lysis Kit に最適化された逆転写試薬もしくは ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover kit (東洋紡社) を用いて行った。定量 PCR は THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix を用いて行った。

8. 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 μg 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°C で保存した。

9. マウス摘出肺からの 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. DON による A549 細胞増殖の抑制

まず、2.5 μ g/mL DON で処理を行い、24 時間後、48 時間後に顕微鏡で観察を行った。その結果、無処理ウェルに比べて DON 処理ウェルにおいては視野内の細胞数が少なく、一部は球形への変化がみられた。DON を 0.05 μ g/mL から 25 μ g/mL の濃度で A549 細胞に処理を行い、48 時間後に生細胞数を測定した。その結果、処理した DON 濃度が高くほど 48 時間後の生

細胞数が少なくなることが明らかとなり、50%阻止濃度 IC₅₀ は 0.52 µg/mL と見積もられた。

そこで DON 処理後の影響についてさらに検討を行った。上記の原因として、細胞死の誘導による減少、もしくは細胞増殖の抑制、またはその両者によると推測した。まず、死細胞の割合について検討を行った。2.5 µg/mL DON 処理 A549 細胞と無処理の A549 細胞について死細胞の割合について検討したが、ほとんど差は認められなかった。次に細胞増殖抑制の可能性を検討するために、2.5 µg/mL DON 処理 A549 細胞と無処理の A549 細胞について細胞周期解析を行った。その結果、2.5 µg/mL DON 処理 A549 細胞においては無処理の細胞に比べて G2/M 期の細胞の割合がおよそ 2 倍となっていることが明らかとなった。0.1 もしくは 0.5 µg/mL DON 処理 A549 細胞では G2/M 期の細胞割合の増大は認められなかった。これらの結果から DON は細胞周期に何らかの影響を与えて、細胞増殖を抑制していることが強く示唆された。

2. DON 処理による遺伝子発現変動解析

DON 処理により A549 細胞が増殖抑制をうけることが明らかとなった。そこで 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解析を行った。強い DON 処理ではほぼすべての遺伝子の発現が低下する可能性などを懸念し、DON 処理濃度はほとんど細胞増殖阻害が認められない 0.2 µg/mL を採用した。DON 処理細胞および無処理細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。得られた解析結果から、有意に発現変動している遺伝子を抽出したところ、16 遺伝子および 5 ノンコーディング RNA が見出された。

3. 定量 PCR による個別的遺伝子発現変動解析

マイクロアレイ解析から得られた 16 遺伝子のうち、15 遺伝子についてその発現について検出を試みた。その結果、6 遺伝子については発現が確認できた。A549 細胞への DON 処理濃度を 0.1、0.5、2.5 µg/mL として定量 PCR による解析を行った。その結果、0.5、2.5 µg/mL DON 処理において 5 遺伝子についてはマイクロアレイで得られた結果と同様に遺伝子発現の変動がみられ、いずれも発現が低下していることが明らかとなった。これらの結果から、DON 処理は A549 細胞に対して、遺伝子発現変動を引き起こすことが明らかとなった。

4. 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有意な差は認められなかった（図2）。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（図3）。

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。

5. 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倍以下に低下した遺伝子を143遺伝子（ノンコーディングRNAを含む）見出した。

D. 考察

本研究では肺由来のA549細胞を用いてDONの影響について検討を行った。その結果、処理後に細胞の増殖が抑制され、無処理集団に比べて生細胞数が少ないとの結果が得られた。生細胞数を指標としてIC₅₀を決定したところ、0.52 μ g/mLの値が得られた。Cetinらは2005年にCHO-K1、Caco-2、C5-O、V79、HepG2の各細胞でDONのIC₅₀を決定している（Cetin, Food and Chemical Toxicology, 2005; 43: 755-764）。Cetinらの報告ではチャイニーズハムスターの肺由来細胞であるV79細胞に対するDONのIC₅₀は0.49 μ g/mLと報告しており、今回の我々がA549細胞で得た0.52 μ g/mLの値とほぼ同等であった。Cetinらの検討で用いられているヒト由来の細胞はCaco-2細胞

（消化管由来）、HepG2 細胞（肝臓由来）であるが、これらの IC₅₀ はそれぞれ 1.02、8.36 $\mu\text{g/mL}$ と報告されている。これらに比べると A549 細胞の IC₅₀ は低い値であり、肺の上皮細胞はより感受性が高いことが考えられる。

DON 処理による A549 細胞の増殖抑制については、本研究では死細胞の割合増大が認められなかった。そのため、細胞死の誘導は弱い、もしくはほとんど影響していないと考えられる。しかしながら、細胞死の誘導について多くの論文において報告されており、今後も詳細な検討が必要と考えられる。一方、細胞周期の解析では 2.5 $\mu\text{g/mL}$ DON 処理により、無処理群に比べて G2/M 期細胞の割合が増加することが明らかとなった。このことから DON による何らかの作用により、G2/M 期にとどまる細胞が多くなったと推測される。しかし、DON 処理を行っても G0/G1 期の細胞が主要であることから、DON が細胞周期全体に影響を及ぼして細胞増殖を抑制している可能性も考えられ、今後さらなる検討が必要である。

このような DON の作用のメカニズムを解明するためにマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現変動解析を行った。その結果、統計的に有意な変動がみられた 16 遺伝子と 5 ノンコーディング RNA を見出した。16 遺伝子のうち、5 遺伝子については定量 PCR を用いて発現変動を確認した。これら遺伝子については DON によって発現に影響を受けることはこれま

で報告されていない。現在、個々の遺伝子がどのような役割を果たしているか、さらに検討を進めている。

また、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 $\mu\text{g/回}$ 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变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 $\mu\text{g/回}$ 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 $\mu\text{g/回}$ 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 $\mu\text{g/回}$ 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

イング 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* 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

肺由来 A549 細胞は DON 処理によって細胞増殖が抑制されることが明らかとなった。また、DON 処理によって G2/M 期にとどまる細胞の割合が増大していた。さらにマイクロアレイ解析により、DON 処理において有意に発現変動をしている 16 遺伝子と 5 ノンコーディング RNA を見出し、このうち 5 遺伝子については定量 PCR によりその発現変動を確認できた。

肺由来細胞に対しても DON は影響を及ぼすことが明らかとなり、吸入

暴露でも毒性発現の可能性が示された。

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

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）
総合研究報告書

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）
総合研究報告書

研究成果の刊行に関する一覧表
該当なし

