

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 総括研究報告書

研究代表者 豊留 孝仁

平成 26 (2014) 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 . 總括研究報告

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

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ている。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。

A. 研究目的

真菌は食品の安全を脅かす主要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、食品の不適切な長期保存などにより、真菌の食品汚染の問題は身近かつ重要となってきた。

真菌による食品汚染の中でも、真菌が産生するカビ毒（マイコトキシン）による汚染は非常に重要である。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。

フザリウム属菌は主な食品危害真菌の一つである。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。

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

デオキシニバレノール（DON）は主なフザリウムトキシンの一つである。DON はトリコテセン系のカビ毒であり、別名ボミトキシと呼ばれる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。これまでの多くの研究においてはDONに汚染された食品が経口的に摂取されるケースがほとんどであることから、動物を用いた実験では経口投与による検討がほとんどである。また、*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、他の主要な体内への取り込み経路として汚染された穀物・飼料の粉末・粉塵の吸入が想定される。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>）。このようにカビ毒の吸入暴露リスクが存在するが、吸入を念頭に置いた基礎的検討は少なく、さらなる知見の積み上げが必要である。

限られているが以下の報告がなされている。Amuzie ら（Amuzie, *Toxicology*, 2008; 248: 39-44）はマウスを用いてDON 単回鼻腔投与後の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の吸入暴露を念頭に置いて、肺由来の細胞株を用いてDON単回暴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暴露を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 係数ロジスティ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 μg/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 μg/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. RNA 調製とマイクロアレイ解析

RNA は次のように調製した。

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

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。

（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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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(図1)。DONを0.05 µg/mLから25 µg/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。

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 µg/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 µg/mL と報告しており、今回の我々が A549 細胞で得た 0.52 µg/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 µg/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 µg/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に報告されていない。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、これまでに肺由来の細胞を用いて DON の影響を検討し、DON が肺由来細胞に対しても細胞増殖抑制という形で影響を及ぼすことが明らかとなってきた。そこで今後はマウスを用いて経気管的投与を行い、その影響を検討したい。

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

今後の検討により、呼吸器に与える DON の影響を明らかとしたい。

2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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。今後はマウスを用いた解析などにより、詳細なメカニズムを明らかとする。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Deoxynivalenol affects to proliferation of and gene expression in A549 lung epithelial cell. (投稿準備中)

2. 学会発表

(平成 26 年度にマイコトキシン学会等で発表予定)

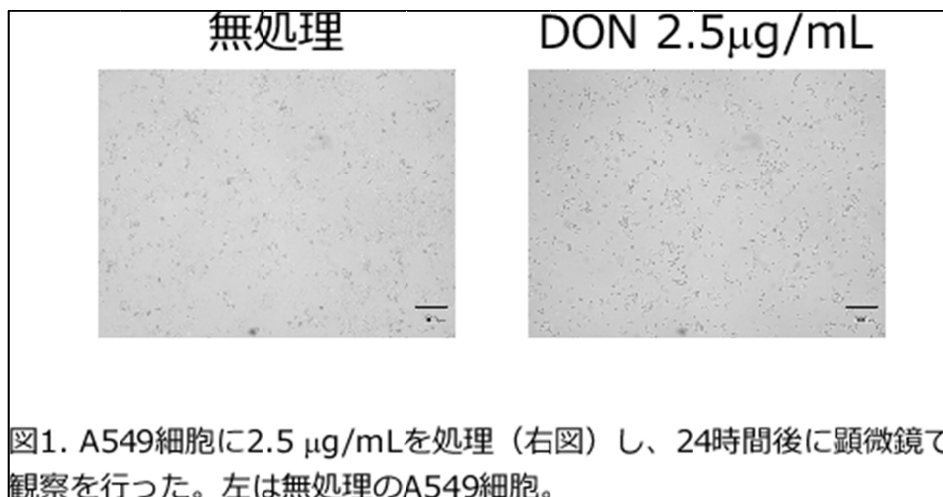
H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

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



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