

101 穀物のフザリウム赤かび病の疫学

コムギとトウモロコシの *Fusarium graminearum* による穂感染病の疫学は、Sutton (1982) によってなされた優れたレビューの題目である。当時から小型穀物とトウモロコシのフザリウム病の疫学に関する重要な実験報告は少ない。コムギ、トウモロコシ、およびオオムギはフザリウム・トキシンの最も多くの影響を受けているようだが、これら3つの穀物は世界の穀物生産の 2/3 を占めている。エンバク、ライムギ、およびライコムギはすべてフザリウム・マイコトキシンを含むと報告されている (Chelkowski 1989a, Miller et al. 1985, Scott 1989)。しかしながら、これらの穀物はいくつかのライコムギ変種を除いて抵抗性を持ち、または大きな汚染を免れると見られている (Chelkowski 1989a, Miller et al. 1985)。

F. graminearum または *F. culmorum* が原因の赤かび病または Gibberella 穂腐れ病の評価項目は穀粒中のデオキシニバレノールである。従って、穏やかな疫病であっても、ヒトの食物や動物の飼料に非常に多くのマイコトキシンを含ませる穀物を生産することができる。カナダのガイドラインは、非精製の成人食用の軟質白色冬コムギ中のデオキシニバレノールは 2 ppm 以下、非精製の乳児食を目的とした軟質白色冬コムギ中では 1.2 ppm 以下を要求している (Van Egmond 1989)。動物用飼料は 1 ppm を超えるデオキシニバレノールを含んではならない。*F. moniliforme* が引き起こすフザリウム穀粒腐れの評価項目はフモニシンの存在である (Thiel et al. 1991)。ヒトと動物の食べ物中のフモニシンの安全な濃度は決定されていない。

本レビューは、Sutton (1982) による情報を基にして下記の3つの一般的分野に集中してまとめることを試みた。(1)コムギやトウモロコシ中で病気を起こすフザリウムに影響を及ぼす要因、(2)フザリウム赤かび病とトウモロコシ穂/穀粒腐れに関連する農業習慣の研究から得られる啓示、(3)コムギとトウモロコシの最初の感染のプロセスと疫病を促進する要因。この章で討議する植物の種は Nelson et al. のシステム (1983) に従った。

マウス胸腺細胞におけるフサレノン-Xによるアポトーシスの誘導

マウス胸腺およびT細胞亜集団に及ぼすフサレノン-X(12, 13 - エポキシトリコテセン; FX)の効果を研究した。3回のFX腹腔内投与をうけたマウスにおいて、胸腺は著しく萎縮し、胸腺皮質はほぼ完全消滅し、胸腺細胞の全数は正常マウスの2.2%に減少した。CD4⁺ CD8⁺胸腺細胞はこの処置によりほとんど完全枯渇し、一方 CD4⁺CD8⁻、CD4⁻CD8⁺および CD4⁻CD8⁻胸腺細胞はそれほどには減少しなかった。これは、CD4⁺CD8⁺胸腺細胞の選択的損傷が FX により誘導されることを示唆する。脾臓中では、CD4⁺または CD8⁺リンパ球および CD4⁻CD8⁻非 T 細胞は変化しないままであった。次いで、胸腺細胞中の損傷モードを FX の単回投与により研究した。FX 投与後 20 時間の胸腺皮質ではリンパ球核は断片化され、TUNEL(TdT 仲介 dUTP ニック末端標識)染色に対し陽性であった。凝集核を有するアポトーシスリンパ球および多くの核断片を取り込んだ間質細胞が、胸腺皮質中において電子顕微鏡で頻繁に観測された。ヌクレオソーム間 DNA 断片化は *in vivo* および *in vitro* の両方において FX 処置した胸腺細胞中で明白であった。従って、トリコテセン系マイコトキシン FX は同様な効果を起こす他の因子に加えて、マウスの CD4⁺CD8⁺胸腺細胞のアポトーシスを引き起こす新たな原因であることを示した。

103 デオキシニバレノールを含むカビの生えた穀粒のブタによる拒食

東南クイーンズランドのボーデザート近くにある農場の離乳したブタが、大半はコムギとオオムギから成る飼料を摂取するのを拒否した。より年上のブタは少量摂取し、結果として若い雌性ブタは肥大した赤い外陰部を示した。コムギ、オオムギ、およびライコムギは 1983 年にこの農場で栽培され、この年は特別に長続きして湿潤した気候であった。コムギとライコムギは収穫の後に水分 14% 以上のままで飼料とするまでに約 3 週間保存された。コムギとライコムギの試料はうすいピンクの穀粒を含み、これは菌の *Fusarium graminearum* Schw による感染を示した。分析により、*F. graminearum* によって生成される 2 種類のマイコトキシン、すなわち拒食と吐き気の原因となるデオキシニバレノール（ボミトキシン）と發情効果を持つゼラレノンが検出された。デオキシニバレノール濃度は、コムギ、ライコムギ、およびオオムギ中にそれぞれ、34、10、および <0.1 mg/kg であった。ゼアレノン濃度は、それぞれ、6.2、2.8、および 0.1 mg/kg であった。続いて、*F. graminearum* は穀粒と穀物残留物中から単離された。湿潤した気候が穀物の収穫前における *F. graminearum* の感染に寄与したが、多くのトキシンは恐らく貯蔵中に成長したものと思われる。

若齢七面鳥家禽における *Fusarium fujikuroi* 培養材料およびデオキシニバレノールを与えられたモニリホルミン摂取の単独および組合せ効果

20mg デオキシニバレノール(DON)/kg、100mg モニリホルミン(M)/kg の単独、または DON と M の組合せ(20mg DON/kg および 100mg M/kg)のどちらかを含む餌摂取の効果を、生後 1~21 日齢の成長七面鳥家禽雛で評価した。飼料摂取量および BW 獲得は M を含む食餌処理により減少した($P<0.05$)。飼料変換は如何なる食餌にも影響されず、M と DON 間に生産能力に及ぼす明白な相互作用効果はなかった。心臓と腎臓の絶対重量は M を含む餌を摂取した家禽において増加した($P<0.05$)。平均細胞容積は M および DON - M 処理により減少した；しかしながら、DON - M 組合せ処理を与えた家禽では減少は非常に小さく、M による DON への有意な相互作用を生じた($P<0.05$)。平均細胞ヘモグロビンおよび平均細胞ヘモグロビン濃度は如何なる食餌にも影響されなかつた。組織学的病変は対照家禽または DON 単独を摂取した家禽には見られなかつた。食餌と関連した病変は心臓と腎臓にのみ観測された。M のみまたは DON - M 組合せを含む餌を摂取した家禽は、多数の巨大核と心筋細胞横紋の一般的消失を有する種々の大きさの心筋細胞核の発生増加を示した。M および DON - M 組合せ食餌を摂取した家禽において、腎臓切片中の単離尿細管は温和なびまん性鉱化作用を有することが認められた。測定したどの応答変数も DON 単独では影響を受けなかつた。七面鳥家禽に 21 日間これらの毒素を同時に与えたとき、毒性の相乗作用は観察されなかつた。

添加したボミトキシンを含有する餌を摂取した Fischer ラットの奇形学的研究

Fusarium 種により生成されるトリコテセン系マイコトキシン、ボミトキシン(デオキシニバレノール)は、食物として人および動物により消費されるトウモロコシ、小麦および他の穀粒中に検出された。餌中に投与されたボミトキシンの催奇形性能を、妊娠全過程の Fischer 344 ラットのグループに、ボミトキシン含有認証ラット飼料を ad lib 摂取することにより研究した。ボミトキシンは 0.0、0.5、2.0 または 5.0 ppm レベルで餌に添加した。母動物中に毒性の明白な徴候はなく、対照グループと比較して如何なるレベルにおいても飼料消費に統計的有意差はなかった。最高レベルのボミトキシンを受ける 2 グループの母動物は他の雌より出産時において体重が少ない傾向にあり、仔や子宮を除去後の屠畜体重は対照グループのそれよりも有意に低かった。出産胎児を標準奇形学的手法により調べた。雄および雌の仔の体重は母体処理により影響されなかった。ボミトキシンは全体、骨格または内臓異常の発生に及ぼす統計的に有意な悪影響を示さなかった。母動物と仔のどちらも有意な病理組織的変化を示さなかった。

Sprague - Dawley ラットの受胎率、妊娠および生後発育に及ぼすデオキシニバレノール(ボミトキシン)の影響

精製デオキシニバレノール(DON)の 20ppm($\mu\text{g/g}$)を含有する餌を、交配前の雄および雌 Sprague - Dawley ラットにそれぞれ 60 日間および 15 日間与えた。妊娠中、および授乳中に DON を添加した飼料を摂取したラットは、毒性の臨床的徴候を示さず、対照グループまたは対飼育対照グループでも同様に示さなかった。DON 処理グループ中の雄ラットは飼料拒絶を示さなかったが、飼料の体重変換効率が、対照グループの雄よりも低かった。雌ラットの飼料拒絶は妊娠段階とともに変化した。交配前には、全飼料消費はすべてのグループで同様であったが、DON 処理グループでは最初の 2 日間は有意な飼料拒絶があった。飼料変換効率は DON 処理グループでは低下した。DON 処理した飼料を与えた妊娠ラットおよび授乳ラットは、溶媒処理した飼料を与えた対照ラットよりも、摂餌量は 6% 少なかった。対飼育された対照ラットは、DON 処理グループよりも 14~21% 摂餌量が少ないが、その体重は殆どの飼育実験期間中を通して、DON グループラットの体重より大きく、DON が毒性効果をもつことを示した。交配結果が妊娠になるのは、対照グループ中で 80% であるのに対し、DON グループのラット間では僅か 50% だった。雄仔の雌仔に対する比率、生存率または同腹仔の平均数および体重における差異はグループ間で検出されなかった。すべてのグループにおける仔の体重増加は生後 14 日間では同等だった。しかし、14 日から 21 日までは、対照グループ中の雄および雌の子の体重増加は、他グループの子より有意に大きかった。これは、DON グループの仔と、対飼育グループの仔における、それぞれ毒性と、栄養不良の影響の結果であろう。制限交差飼育の研究で、DON の影響が授乳母獣の乳汁を通して仲介されるのではないことが示唆された。処理に関連した精巣または卵巣の組織異常はなかった。

トリコテセン系マイコトキシン類の代謝 II. トリコテセン類のミクロソーム脱アセチル化の基質特異性

ウサギおよびラット肝臓由来のミクロソーム非特異性カルボキシエステラーゼ[EC3.1.1.1]の基質特異性を7種の(A)型および6種の(B)型 12, 13-エポキシトリコテセンマイコトキシンを用いて *in vitro* 研究した。ジアセトキシシルペノール、T-2 トキシン、モノアセチルニバレノール(フサレノン-X)およびジアセチルニバレノールの C-4 アセチル基はミクロソームエステラーゼにより選択的に加水分解され対応する C-4 脱アセチル化代謝産物を生じた: それぞれモノアセトキシシルペノール、HT-2 トキシン、ニバレノールおよび 15-アセチルニバレノール。モノアセチルデオキシニバレノールの C-3 アセチル基とテトラアセトキシシルペンの C-8 アセチル基も脱アセチル化された。トリアセトキシシルペンは、C-4 脱アセチル化生成物を含む2つの未同定代謝産物を生じた。8-ヒドロキシジアセトキシシルペノール(ネオソラニオール)、HT-2 トキシン、アセチル-T-2 トキシンおよびテトラアセチルニバレノールはこの型の加水分解による影響を受けなかった。これら結果から、C-4 アセチル基がミクロソームカルボキシエステラーゼにより加水分解され、C-3 および C-8 置換基がトリコテセン類の C-4 アセチル基の選択的酵素加水分解に寄与することが演繹された。速度論解析はウサギのミクロソームエステラーゼが T-2 トキシンおよびジアセトキシシルペノールのような(A)型トリコテセン類に対し高親和性を有し、ラットのミクロソームのそれはモノアセチルニバレノール(フサレノン-X)のような(B)型トリコテセン類に対し高親和性をもつことを示した。

この特異的脱アセチル化反応の重要性を、ウサギ網状赤血球における蛋白質合成に及ぼすそれらの阻害効果により明らかにされたトリコテセン誘導体の生物活性と関連付けて議論した。

108 捕獲アメリカシロヅル (*GRUS AMERICANA*) とカナダヅル (*GRUS CANADENSIS*) におけるマイコトキシン誘発の病気

1987 年に、米国メリーランド州のローレルにあるパタクセント自然環境研究センターで、ツルの動物間流行病が起こり、300 羽の捕獲アメリカシロヅル (*Grus americana*) とカナダヅル (*Grus canadensis*) の 80%が罹病し、これらツルの 15 羽が死んだ。肉眼での病理学的検査結果は結論が出ず、脱水症状、脂肪の委縮、腎不全、および脾臓の縮小などが見られた。広範な試験の結果、穀物ベースの飼料の成分からフザリウム種のカビが単離された。低濃度の 2 種類のマイコトキシン、すなわち T2 (1~2 ppm) とデオキシニバレノール (0.4 ppm) がペレット状飼料から単離された。

ラットにおけるデオキシニバレノール(ボミトキシン)誘導条件付け 味覚嫌悪は化学感受性最後野により仲介される

本実験では、新規サッカリン味覚に対する条件付け嫌悪を用いてデオキシニバレノール(ボミトキシン)投与の嫌悪効果を評価し、化学感受性最後野(AP)の推定上の仲介的役割を調べた。実験1において、成体雄ラットは新規0.15%サッカリン溶液を飲み、次いでデオキシニバレノール($n=7$; 0.125mg/kg, IP)または賦形剤($n=7$; プロピレングリコール, 0.5ml/kg)を注射された。引続く2ボトル嗜好試験にて、デオキシニバレノールにより条件付けされたラットは、サッカリン溶液に対する強い嗜好性を示した対照ラットと比較して、有意に($p<0.01$)低い絶対的および相対的摂取量レベルを示した。実験2において、成体の雄ラットは最後野切除($n=6$)またはシャム損傷($n=6$)を受けた。条件付け2日で、全ラットは新規0.15%サッカリン溶液を飲み、次いでデオキシニバレノール(0.125mg/kg, IP)を注射された。引続く2ボトル嗜好試験において、最後野切除ラットはサッカリン溶液に対し嗜好性を示した一方、シャム損傷を与えられたラットはサッカリン刺激に対して有意な($p<0.01$)嫌悪を示した。従って、デオキシニバレノールの全身投与、引続く新規味覚は最後野により仲介される条件付け味覚嫌悪を誘導した。

マウス CD4⁺ T 細胞におけるサイトカイン分泌および遺伝子発現に及ぼすトリコテセン構造の影響

サイトカイン分泌および遺伝子発現に及ぼすトリコテセン構造の効果をマウス脾臓由来の初代 CD4⁺ T 細胞中で評価した。種々の濃度のトリコテセン類、すなわち、ボミトキシン(VT またはデオキシニバレノール)、ニバレノール(NIV)、15 - アセチルデオキシニバレノール(15 - ADON)、3 - アセチルデオキシニバレノール(3 - ADON)、T - 2 トキシン(T - 2)およびベルカリン A(Ver A)の存在下、CD4⁺ T 細胞を 2 または 7 日間コンカナバリン A(ConA)により刺激した。続いて培養上清を ELISA によりインターロイキン(IL) - 2, IL - 4 および IL - 5 について分析した。2 日目に、全トリコテセンは IL - 2, IL - 4 および IL - 5 産生を阻害することが分かった。しかしながら、7 日目に対照 ConA 刺激培養と比較して、培養上清 IL-2 は VT,NIV,3-ADON,15-ADON を各々 250,250, 2500,1000ng/ml 用量含む培養において 2-5.5 倍有意に増加した ; T - 2 および Ver A で IL - 2 の有意な増加は観測されなかった。同様に 7 日目に、対照培養と比較で、IL-4 と IL-5 は VT(100ng/ml),NIV(100ng/ml), 3 - ADON(1000ng/ml), 15 - ADON(500ng/ml), T - 2(1ng/ml) および Ver A(50pg/ml, IL - 5 のみ) の存在下で有意に増加した。IL 産生は前述の最適条件を越えるトリコテセン濃度にて阻害された。2 日間培養の全 RNA をサザン解析と組合せて逆転写酵素ポリメラーゼ鎖反応法(RT - PCR 法)により評価したとき、IL - 2 mRNA は VT(50,100ng/ml),NIV(50,100,250ng/ml),3-ADON(1500ng/ml),15-ADON(100 ng/ml),T-2(0.5ng/ml),Ver A(25,50,100pg/ml) により ; IL - 4 mRNA は VT(50ng/ml), NIV(50ng/ml),Ver A(25,50,100pg/ml) により ; IL - 5 mRNA は VT(50ng/ml) により ; IL - 6 mRNA は 15-ADON(100ng/ml),Ver A(50pg/ml) により超誘導されることが分かった。トリコテセン濃度がこれらレベルから増加するに従い、mRNA 転写産物レベルの阻害も多くのインターロイキンについて観測された。結果を総合的に考えると、グループとしてのトリコテセンが CD4⁺ T 細胞中の IL 分泌および mRNA レベルの両方を阻害するか超誘導するかのどちらかができることが示唆された。超誘導は大環状>A 型>B 型トリコテセンの順であり、トリコテセン核のアシル化に依存していた。

ホルボールエステルおよびカルシウムイオノホア刺激したマウス CD4⁺ T 細胞中のボミトキシン仲介 IL - 2、IL - 4、IL - 5 超誘導： 増殖速度論との関係

細胞増殖およびサイトカイン産生の速度論に及ぼすトリコテセンボミトキシン(VT)の効果をマウス CD4⁺ T 細胞にて評価した。CD4⁺培養は VT 濃度の範囲内でホルボール 12・ミリスタート-13・アセタート(PMA)とイオノマイシン刺激して、蛋白質キナーゼ C を活性化し、細胞質遊離カルシウムを増加させた。3, 5, 7, 9, 11 日における全および生細胞数は、50-100ng/ml の VT 含有培養で細胞増殖遅延または阻害を示し、250,500ng/ml の VT で完全阻害を観測した。本モデルの 3 日培養における蛋白質合成を 50% 阻害する VT 必要濃度は 40ng/ml だった。酵素連結免疫吸着定量(ELISA)をサイトカイン定量に用いた時、対照培養中の IL - 2 レベルは 1 日目に最高でその後急速に減退するのに対し、VT 群の IL-2 レベルは 3 日目に最高で 11 日まで上昇し続けた。IL-2 レベルは 100-500ng/ml の VT 連続曝露で上昇し、5-11 日目には対照と 250ng/ml VT 間で 100 倍以上の差が観測された。生細胞あたりの IL-2 レベルで表現すると、7 日目には 250-500ng/ml VT 处理と対照培養間で 6log に及ぶ顕著な差異増加が観測された。上清 IL - 4 と IL - 5 レベルは対照培養と比べて用量と時間に依存して 100,250ng/ml VT により増加したが 500ng/ml VT は阻害した。サザンハイブリダイゼーション解析と組合せた逆転写ポリメラーゼ鎖反応(RT - PCR)により、IL mRNA の相対豊富度を培養開始 3 日間で解析すると、100,250ng/ml VT 含有培養中で 1,2,3 日目における IL-2 mRNA レベルは対応する対照より大きくなかった。対照および VT 处理培養の両者における IL - 2 mRNA 豊富度は対照では 1 日目に最大でそれ以降急速に減少し、一方 100,250ng/ml VT では IL - 2 消失速度は遅かった。50,100ng/ml の VT 用量における IL-4 および IL-5 mRNA レベルも対照と比べて上昇した。CD4⁺細胞のパルス的な VT(8-48 時間)またはシクロヘキシド(8-48 時間)曝露は、新鮮培地 24 時間培養時に IL-2 の上清レベルは上昇したが IL-4 は上昇しなかった。本効果は持続的ではなかった。総合的に検討して、VT は、PMA 及びイオノマイシン刺激された CD4⁺ T 細胞中におけるピーク IL-2, IL-4, IL-5 遺伝子発現及び分泌を増加させ、及び/あるいは遅延させた。注目すべきことに、サイトカイン超誘導が細胞増殖の部分的あるいは最大阻害と同時に起こった。

マウス EL - 4 胸腺腫細胞および初代 CD4⁺ T 細胞における転写因子 NF-κB/Rel 結合活性におよぼすボミトキシン(デオキシニバレノール)の効果

トリコテセン系マイコトキシンであるボミトキシン(VT、デオキシニバレノール)は細胞モデルおよびマウスマルクの両者において IL - 2 および他の多くのサイトカインの遺伝子発現を超誘導する。転写因子 NF-κB/Rel はサイトカイン遺伝子転写制御に決定的役割を果たすことが示されているので、クローン(EL - 4) および初代(CD4⁺)マウス T 細胞の両者を用いる電気泳動移動度シフトアッセイにより NF-κB/Rel 結合活性に及ぼす VT の in vitro 効果を評価した。EL - 4 胸腺腫細胞を 500ng/ml VT の存在下でホルボール 12 - ミリスタート・13-アセタートとイオノマイシンで刺激したとき、核抽出物中の NF-κB/Rel による DNA 結合活性は、VT なしの対照と比較して 2-48 時間で増加した。VT は特に遅い時点で(8-48 時間)で NF-κB/Rel 複合体のより遅い移動電気泳動バンドを優先的に誘導した。バンドは c-Rel および p50 に対する特異抗体を用いるスーパーシフトアッセイにより c-Rel/p50 ヘテロ二量体を含むことが分かった。NF-κB/Rel 結合活性は VT により用量依存的に増強された。僅か 50ng/ml の少量 VT で、1 時間 EL-4 培養中で NF-κB/Rel 結合を増加するのに十分だった。ウエスタンプロット分析を用いると、EL-4 細胞に及ぼす効果はさらに NF-κB/Rel の細胞質阻害因子である IκBα 再合成の VT 仲介阻害と関連した。IκBα レベル減少は 4-48 時間 250-1000ng/ml VT により観測された。初代マウス CD4⁺ T 細胞培養を用いても、上昇した NF-κB/Rel および c-Rel/p50 結合活性と同時に減少した IκBα レベルが、500ng/ml VT にて 1-72 時間で観測された。これらデータは VT が NF-κB/Rel 結合活性、および特に転写活性化型 c-Rel を増加することを示唆した。細胞培養の後期(48 時間)における増加した NF-κB/Rel 結合活性は、細胞質阻害因子 IκBα 再合成の VT 仲介阻害および阻害性 p50 ホモ二量体の減少により部分的に説明し得る。上昇した NF-κB/Rel 結合活性は VT 誘導性サイトカイン遺伝子発現および結果として生ずる毒性および自己免疫効果と機構的に関連し得る。

育成ブタの免疫応答に対する段階的濃度の天然デオキシニバレノール汚染エンパクを含む飼料の影響

育成ブタの免疫応答と成績に対する、ブタの完全飼料中に異なる濃度でデオキシニバレノール (DON) 汚染エンパクを含ませる影響を評価するための試験を実施した。飼料は 0.6、1.8、および 4.7 mg · DON/kg を含み、制限給餌と不断給餌の両方法を採用した。成績は、体重増加、飼料摂取量、飼料利用効率、および枝肉品質で記録した。記録した免疫応答パラメータは、5 種類の異なる抗原を注入した後の一次及び二次抗体滴定値とした：抗原はヒト血清アルブミン (HSA)、ヒツジ赤血球細胞 (SRBC)、パラ結核ワクチン (MPT)、破傷風トキソイド (TT)、およびジフテリア・トキソイド (DT) とした。また、Johnin 試験も実施した。リンパ球刺激応答は 3 種類の異なるマイトジエン (PWM、ConA、および PHA) を用いて測定した。有意の DON 用量依存性の破傷風トキソイドに対する二次抗体応答の減少が観察された。中濃度と高濃度の DON グループで、低濃度 DON グループと比較して、リンパ球における PHA 刺激の後で若干高いマイトジエン応答が 9 週後に見られたが決定的ではなかった。その他に用量依存性の免疫応答阻害／刺激の徴候は見られなかった。DON の高い濃度で、有意に少ない飼料摂取量が、体重により制限給餌したグループに見られたが、不断給餌 (ad libitum) したグループでは見られなかった。

ラット造血祖先細胞におけるトリコテセン類の *in vitro* 毒性

トリコテセン類により誘発されるフザリウム中毒の特徴は、嘔吐、炎症、出血、下痢および血液学的变化などの一般的な症状である。トリコテセン類の亜慢性摂取は末梢白血球の疾患を引き起こす。動物におけるこの白血球減少変化は、非常に有名なヒト疾患である食中毒性無白血球症(ATA)の特徴として報告されている。本研究の目的は、トリコテセン類による血液学的疾患は骨髄毒性の結果であるかどうかを *in vitro* モデル研究により評価することであった。ラット造血祖先細胞、コロニー形成単位 - 顆粒球マクロファージ(CFU-GM)をいくつかの濃度の4種のトリコテセン類、T-2 トキシン、HT-2 トキシン、ジアセトキシルペノール(DAS)およびデオキシニバレノール(DON)存在下で培養した。これらトリコテセン類全てはラット造血先祖細胞において細胞毒性を示した。動物のトリコテセン中毒で観察される血液学的疾患は CFU-GM 細胞のような造血祖先細胞の破壊が原因であることが結論された。

ヒト造血祖先細胞におけるトリコテセン類の *in vitro* 毒性

ヒト造血祖先細胞、コロニー形成単位 - 顆粒球マクロファージ(CFU-GM)を4種のトリコテセン類、T-2 トキシン、HT-2 トキシン、ジアセトキシシルペノール(DAS)およびデオキシニバレノール(DON)存在下で培養した。その結果、トリコテセン類はヒト造血祖先細胞において細胞毒性を示した。本研究と文献に記述された結果の分析から、ヒト中毒時に観察される血液学的病変は、顆粒球マクロファージコロニー形成細胞のような造血祖先細胞の破壊が原因であると考えられた。

小粒穀類における Fusarium 赤カビ病—総説

小粒穀類の Fusarium 赤カビ病に関する本総説では、17 種類もの病原菌が存在し、世界の大部分の穀類産地で発生することを示す。最も普通種は、*Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*)、*F. culmorum*、*F. avenaceum* (*G.avenacea*)、*F. poae* および *Microdochium nivale* (*Monographella nivalis*) であった。本病害は高温多湿の気候条件で多発し、顕著な減収と穀粒中へのマイコトキシン蓄積が報告された。種菌の可能性のあるものとして、作物残渣、代替宿主および *Fusarium* 苗立枯病および穀類の根腐れ病が報告された。赤カビ病に対する種菌の伝播モードは依然として不明であるが、汚染媒介節足動物、植物の全身性真菌増殖、および胞子が風や雨はねにより伝播することが考えられる。小麦赤カビ病感染は主に開花期に起こり、真菌増殖刺激物質が薬の中に存在することを示した。本病害の重要性にもかかわらず、特に流行年においても防除法は限られている。抵抗性小麦品種の育種および抵抗性に関して考えられる機構や遺伝子的基盤をさらに研究することに多くの努力を注がれてきたが、成功は中程度である。驚くべきことに、本分野で本病害に関して殺真菌剤または生物学的防除に成功した論文はほとんど見当たらない。

15-アセチルデオキシニバレノール添加飼料曝露 B6C3F₁マウスにおける摂餌量および体重増加量の減少

デオキシニバレノール(DON)の生合成前駆体である 15-アセチルデオキシニバレノール(15-ADON)を *Fusarium graminearum* R6576 の米培養から抽出および精製した。成長期の雌 B6C3F₁マウスに 0,0.5,2.0,5.0ppm の 15-ADON 添加半精製飼料を 56 日間与え、摂餌量、体重増加量、末端臓器重量および血液凝固機能に及ぼす影響を分析した。摂餌量の有意な減少が 5.0ppm 投与群で 44 日後に認められたのに対し、体重増加率減少は 5.0ppm 投与群で 16 日後にすでに認められた。末端の肝臓、腎臓および脾臓の重量は、対照群と比較して 5.0ppm 摂取マウスで有意に低かった。0.5 および 2.0ppm の 15-ADON 投与群では、体重増加、摂餌量または臓器重量において明らかな影響は認められなかった。15-ADON 投与マウスでは出血時間が有意に減少したが、凝固機能の他の測定では対照群と処理群間の違いは認められなかった。結果は、15-ADON は DON と比較してやや毒性が低いが、15-ADON を含む食事を長期摂取すると DON について以前報告されているものと同様の現象が起こることを示した。そのため、DON に関する将来的リスク分析においては 15-ADON の存在と毒性に関しても考慮するべきである。

Fusarium マイコトキシン類であるデオキシニバレノール（ボミトキシン）およびゼアラレノン曝露飼料投与後の B6C3F₁ マウスにおける免疫応答抑制

B6C3F₁ マウスに関して、天然由来 *Fusarium graminearum* 毒素であるデオキシニバレノール(DON)およびゼアラレノン(ZEA)を飼料に添加したときの免疫機能への影響を研究した。DON 投与ではヒツジ赤血球に対するプラーク形成応答、キーホールリンペットヘモシアニンに対する遅延性過敏反応および *Listeria monocytogenes* 抵抗能が抑制された。DON 誘発性摂餌拒絶による摂餌制限群と比較して、摂餌制限した対照群においてもリステリア菌抵抗性は同様に減少した。一方、同様に摂餌制限してもプラーク応答または遅延性過敏反応は減少しなかった。ZEA 投与群では *L.monocytogenes* に対する抵抗性は減少したが、脾臓のプラーク形成応答または遅延性過敏反応に影響は見られなかった。リステリア菌抵抗性は DON 単独よりも DON および ZEA 共投与により大幅に減少したが、遅延性過敏反応を阻害する DON の能力は ZEA 存在下で有意に減少した。マイコトキシンを 2・3 週間投与したマウスにおいてリステリア菌抵抗性および遅延性過敏反応における影響が確認されたが、投与期間を 8 週間に延長するとこれらの影響は消失した。対照的に、プラーク形成応答に関しては 2 および 8 週間のマイコトキシン投与群両方においていくらかの影響が認められた。すなわち、免疫抑制は *F.graminearum* に感染した農作物摂取が原因であり、この抑制は DON および ZEA の直接的免疫毒性作用と DON 誘発性食事拒絶に伴う栄養作用の相互作用に起因すると考えられる。

ブタにおけるトリコテセン、15-アセチルデオキシニバレノールの催吐作用

ブタにデオキシニバレノール (DON) 前駆体である 15-アセチルデオキシニバレノール (15-ADON) を 25-200 μg /体重 kg の用量範囲で投与し催吐作用を評価したところ、DON の催吐作用と非常に類似していた。15-ADON および DON の最小有効経口用量は各々 75 および 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で、全用量範囲で、15-ADON 処置ブタの 3/15 頭、DON 処置ブタの 4/15 頭が嘔吐した。15-ADON および DON の最小有効腹腔内用量も各々 75 および 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で、全用量範囲で各群の 9/15 頭が嘔吐した。15-ADON および DON を腹腔内投与したブタにおいて、用量の増加に伴い嘔吐までの平均時間が減少し、嘔吐継続時間が増加し、平均嘔吐回数が増加した。

トリコテセンボミトキシンにより誘発される IgA 産生調節障害および IgA 腎症

B6C3F₁ マウスにおいてボミトキシン添加飼料に曝露したときの血清免疫グロブリン A (IgA) への影響を評価した。2,10,50ppm ボミトキシン投与マウスと比較して、血清 IgA レベルは 25ppm ボミトキシン投与マウスにおいて最大上昇した。25ppm ボミトキシン投与マウスでは、4 週間で有意な増加が認められ、トキシン曝露から 24 週間後で IgA 量は 17 倍以上に増加した。また血清 IgA は、ボミトキシン投与時に大部分の単量性 IgA から大部分の多量性 IgA に明らかにシフトした。投与マウスでは血清 IgG および IgM は減少し、この影響はアイソタイプ特異的であると考えられた。摂餌拒否を示したボミトキシン投与マウスと、同量の対照飼料を摂取したマウスにおいて血清 IgA 増加は認められなかつた。Ad lib 摂餌または食事制限した対照群由来の細胞培養と比較して、ボミトキシン投与マウス由来では自発性およびマイトジエン刺激脾細胞培養の両者において、IgA 産生は有意に増加した。ボミトキシン処置マウスの糸球体において、免疫蛍光染色ではメサンギウム IgA の顕著な蓄積が認められ、電子顕微鏡では高電子密度沈着物が認められたが、対照マウスでは認められなかつた。本研究で観察された IgA 産生調節障害および糸球体 IgA の蓄積は、世界的な糸球体腎炎のうち最も普通タイプであるヒト IgA 腎症の特徴と著しく類似していた。

トリコテセンボミトキシン（デオキシニバレノール）添加飼料摂取 がパイエル板および脾臓リンパ球による IgA および IgG の分泌に及 ぼす影響

トリコテセンボミトキシン添加飼料を長期間摂取したマウスでは、ヒト糸球体腎炎の IgA 腎症と非常に類似した様式で、高濃度の血清 IgA および腎臓糸球体メサンギウム IgA 蓄積が異常に誘発される。本研究では、パイエル板および脾臓リンパ球の IgA, IgG 産生能について、25ppm ボミトキシンを最高 12 週間投与した B6C3F₁ マウスと対照マウスで比較した。血清 IgA は 4,8,12 週間ボミトキシン投与後に各々 2,4,8 倍増加した。血清 IgG は影響を受けず、IgA は主要な血清アイソタイプだった。実験後には、8 週間トキシン投与後のパイエル板および 4,8,12 週間トキシン投与後の脾臓において IgA 分泌細胞数が増加した。4,8,12 週間の実験後のパイエル板では IgG 分泌細胞数も増加したが、脾臓においては影響が認められなかった。対照マウスと比較して、投与マウスでは上清 IgA および IgA 分泌細胞数はパイエル板由来リンパ球培養においては顕著に増加し、脾臓由来リンパ球培養においては程度が低くなるが増加した。相当する対照と比較した投与マウスの産生量から、IgA 分泌はコンカナバリン A 刺激および非刺激パイエル板培養において最大となった。対照マウスと比較して、投与マウスのマイトジエン刺激および非刺激パイエル板リンパ球培養において IgG 分泌および IgG 分泌細胞増大もまた観察された。しかし、脾細胞培養における違いはごくわずかであった。全 Ig 産生量より、対照および投与群パイエル板培養において、IgA 産生は IgG 産生より 8~20 倍高かった。一方、ボミトキシン投与によりリポ多糖類刺激脾臓培養において主要な IgG 産生は同等の IgA 産生へ転じた。これらの結果は、ボミトキシン摂取がパイエル板およびわずかではあるが脾臓においても IgA 分泌祖先細胞の最終分化を促進する *in vitro* 証明となる。これらの機能変化は主な血清アイソタイプが IgG から IgA へ転ずることと合致する。

トリコテセンボミトキシン（デオキシニバレノール）添加飼料摂取時のマウスのパイエル板および脾臓リンパ球における膜 IgA⁺、CD4⁺（T ヘルパー）数の増加

近年の研究から、トリコテセンボミトキシン添加飼料摂取によりマウスにおいて全体および抗原特異的血清免疫グロブリン A (IgA) および糸球体 IgA 蓄積が増加することを示す。本研究では、B6C3F₁マウスにおいて粘膜性リンパ球移動経路での免疫器官の組織学的およびリンパ球プロファイルに及ぼす 25ppm ボミトキシン添加飼料摂取の影響を評価した。ボミトキシン投与により、パイエル板、腸間膜リンパ節および脾臓における胚中心の大きさと数が著しく増加した。パイエル板において B 細胞の割合がわずかに増加したが、ボミトキシン投与は脾臓の B 細胞の比率には影響を与えたなかった。4,8,12 週間ボミトキシン投与においてパイエル板および脾臓の IgA⁺細胞の比率は対照群のおよそ 2 倍となったが、これら 2 器官における IgG⁺細胞の比率は減少した。ボミトキシン投与によりパイエル板および脾臓において T 細胞の比率が増加した。ボミトキシン処置後、CD4⁺細胞（T ヘルパーサブセット）の割合はパイエル板ではわずかに増加し、脾臓では顕著に（30～50%）増加した。一方、対照群と比較してボミトキシン投与マウスの脾臓では CD8⁺細胞（T 細胞傷害性／抑制性サブセット）の割合はわずかに増加しただけで、パイエル板では影響が認められなかった。これら 2 つの T 細胞数に及ぼすボミトキシンの相対効果は、パイエル板および脾臓において CD4⁺:CD8⁺比増加をもたらした。これらの結果は、ボミトキシン摂取がパイエル板レベルで IgA 応答の正常調節を変調させ、粘膜および全身部位両方においてリンパ球分布パターン変化を示すという仮説と一致する。IgA⁺および CD4⁺細胞の顕著な増加は各々、IgA 産生祖先細胞および T ヘルパーサブセットの存在を示し、それらは共に IgA 過剰産生および血清 IgA 増加に有利に作用すると考えられる。

マウス T,B および IgA⁺細胞のアポトーシスに及ぼすボミトキシン
(デオキシニバレノール) in vitro 曝露の影響のフローサイトメトリ
一分析

トリコテセンボミトキシン (VT またはデオキシニバレノール) および他のトリコテセン類の免疫毒性作用はリンパ球との直接相互作用により仲介されると考えられる。本研究では、フローサイトメトリー細胞周期分析を特異的フルオレセインイソチオシアナート結合抗体による表現型染色と組み合わせて、胸腺、脾臓およびパイエル板 (PP) 培養における特異的 T 細胞、B 細胞サブセットのアポトーシスに及ぼす VT および別の蛋白質合成阻害剤、シクロヘキシミド (CHX) の in vitro 作用を分析した。VT および CHX の両者は胸腺、脾臓および PP より単離したデキサメタゾン (9α ・フルオロ- 16α ・メチルプレドニゾロン) 誘導 (DEX⁺) 細胞における T 細胞アポトーシスを顕著に阻害した。ゲル電気泳動で測定した全胸腺細胞溶解物のアポトーシス関連ヌクレオソーム間 DNA 断片化は、様々な処置群のフローサイトメトリーの結果と定性的に一致した。脾臓および PP 由来の未処置 (DEX⁻) T,B および IgA⁺細胞において VT および CHX はアポトーシスを誘導した。一方、同器官由来の B および IgA⁺細胞では DEX 誘導アポトーシスに及ぼす VT および CHX の作用はごくわずかであった。これらの知見は、VT は濃度依存的にプログラム化細胞死を阻害または促進すること、これはリンパ球サブセット、由来組織および糖質コルチコイド誘導に依存することを示す。

デオキシニバレノール：コムギとコムギ含有食品生産物中の濃度制限の誘導

フザリウム属の菌によって発生されるマイコトキシンであるデオキシニバレノール(DON)は、各種の穀物中で起こり得る。コムギとコムギ含有食品生産物中のDONの濃度制限を計算するために、体重kg当り $1.1\text{ }\mu\text{g}$ の暫定TDIが誘導されている。子供たち(1~4歳)は、体重kg当り・1日当り最高のコムギを消費しており、危険な人口層を形成する。(精製した)コムギの安全な濃度制限を誘導するために、筆者らは最高のコムギ消費をする子供を前提とした。食品生産物のコムギ含有量と(精製した)コムギ中のDONの誘導濃度制限値を基準として、各種食品生産物の濃度制限値を計算した。以下の一般的濃度制限値を提案した。(精製した)コムギ； $120\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{DON/kg}$ 、パン； $60\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{DON/kg}$ 、コムギ含有量が $>33\%$ の食品生産物； $120\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{DON/kg}$ 。コムギ含有量が $<33\%$ の食品生産物に対しては、(精製した)コムギのみを監視することを提案した。

菌と食品腐敗

要約なし

ブタ飼料中のデオキシニバレノール汚染コムギ

離乳ブタ食餌として正常コムギに替えて、6.8ppm のデオキシニバレノール (DON、一般名ボミトキシン) を含む *Fusarium graminearum* 感染（カビ中毒）コムギを用いて、それぞれ異なるレベルの DON を投与する 2 つの研究をおこなった。実験処理から 3 週後、実験 1 に含まれるブタの半数を屠殺し、心臓、腎臓、脾臓、肝臓に及ぼす DON の影響を評価した。これらの組織中の残留 DON の分析もおこなった。残り 16 頭のブタに 4 週にわたって通常の食餌を与え、その後の動物の生産力に対する DON の影響を評価した。4.9ppm の DON を含む別のカビ中毒コムギ試料を、成熟ブタの食餌としてモロコシ穀粒に替え、それ異なる濃度の DON を投与した。給餌期間 42 日後、8 頭のブタを屠殺して、選択組織に対する DON の影響を評価した。3 連の実験結果より、ブタの食餌中の DON 濃度が 1ppm に近いか超えると、食餌摂取量が低下することが示唆された。実験動物において、嘔吐を含め疾患の外見的徴候は観察されなかった。組織学的評価より、調べた組織において DON 摂取に関連した有意な病変や異常はないことが明らかとなった。屠殺時まで DON を含む食餌を消費した離乳ブタの腎臓、肝臓、脾臓、心臓中に、痕跡量の DON (8~28 ppb 湿重量) が見いだされた。屠殺の約 12 時間前に食餌から離された成熟ブタの組織中には、DON は見いだされなかった。

ブタ脳脊髄液中で測定された神経伝達物質レベルに及ぼす低レベル デオキシニバレノールの影響

デオキシニバレノール (DON) は真菌 *Fusarium* が産生する主要なマイコトキシンの 1 つで、経済的に重要な動物の食餌挙動に影響を及ぼすことが知られている。本研究では、低レベル DON が、脳の活性変化を反映する脳脊髄液 (CSF) に及ぼす影響を、ブタで調べた。動物に 30 分間隔で、静脈内投与 (iv) ($10 \mu \text{g/kg}$) あるいは胃内投与 (ig) ($30 \mu \text{g/kg}$) で反復 (6 回) 投与した。脳内に設置した新規半永久的留置カテーテルを介して CSF 試料を連続的に回収し、カテコールアミンレベルをモニタした。結果より、ig 投与後に 5-ヒドロキシインドール酢酸 (5HIAA) が迅速かつ持続的に上昇し、投与後 20 時間後まで高値が持続し、一方 iv 投与では上昇は小さく、投与後 6 時間後まで継続することが示された。これより、CNS のセロトニン作動活性が上昇することが示され、脳内セロトニンのターンオーバーと食事摂取量の減少を関連付ける理論が示された。ドーパミン (DA) の代謝変化も観察された。ig 投与後に、ホモバニリルアルコール (HVOL) が遅延上昇し、セロトニン作動活性低下とともにドーパミン作動応答上昇が起こることが示唆された。iv 投与後は、ホモバニリン酸 (HVA) レベルが急激に低下し、おそらく DA 代謝酵素の阻害剤として作用する直接的毒性効果が暗示された。

ブタ血液中のセロトニン作動性神経伝達物質レベルに及ぼすデオキシニバレノールの影響

デオキシニバレノール (DON) は、食餌消費量の低下（食欲不振）と嘔吐という、2つの特徴的な毒物学的效果をもたらす。いずれの効果も、中枢 (CNS) セロトニン作動活性と関連づけられている。末梢の関与が示唆されているものの、DON の毒性仲介におけるセロトニンや関連化合物の血液プールの役割はあまり明らかになっていない。本研究では、ブタを用いて、誘導性末梢セロトニン作動系を反映する、セロトニン (5-ヒドロキシトリプトアミン、5HT)、5HIAA (5-ヒドロキシインドール酢酸)、トリプトファン (TRP) の血漿中濃度に及ぼす DON の効果を調べた。

ブタにおける 5HT、5HIAA、TRP の血漿中濃度の典型値を確立した。胃内および静脈内への DON 投与後、8 時間にわたりこれらの物質の濃度変化を測定した。低濃度と高濃度の毒素投与による影響も比較した。

分析より、試験動物に嘔吐を引き起こすのに十分な投与量においても、対象化合物の血漿中レベルに対する影響は示されなかった。研究中の変動はすべて、許容管理限界内に収まった。これらの結果より、食餌挙動の変化や嘔吐と関連するセロトニン作動活性上昇の原因となる、DON による末梢効果はないことが示された。

ブタ脳膜におけるセロトニン受容体結合性に及ぼすデオキシニバレノールの影響に関する研究

トリコテセン系マイコトキシンであるデオキシニバレノール (DON) により惹起される食欲不振および／または嘔吐の機構に、中枢セロトニン (5-ヒドロキシトリプトアミン、5HT) 作動経路が関与していると考えられている。In vitro 膜受容体結合性アッセイを用いて、選択的 5HT 受容体サブグループに対して高親和性を有するいくつかの放射性リガンドに対する DON の競合能を調べた。ブタ脳の 12 の選択領域における受容体部位密度と置換プロファイルを調べた。全体的に、試験したいずれの 5HT リガンドに対しても、DON の阻止効果は僅かであった。結合阻害には IC₅₀ 値 (50% 阻害濃度) として最低 5mM 濃度の DON が必要で、いくつかの領域では 100mM 濃度でも影響はなかった。比較として、いくつかの標準的な 5HT 拮抗剤は、これらリガンドの結合置換において DON より 10³～10⁵ 倍の能力を示した。これらの結果より、本研究で調べた 5HT 受容体サブグループに対して DON は弱い親和性しか持たないことが示されたため、in vivo では、比較的高濃度の毒素が存在しない限り、その薬理学的影响は、中枢レベルにおいてセロトニン作動性受容体との機能的相互作用以外の機構により仲介されている可能性が高い。

静脈投与されたブタ中のデオキシンバレノールの組織分布

ブタにマイコトキシンデオキシンバレノール(DON)を単回iv投与(1mg/kg)し、投与後24時間にわたり組織中濃度をモニタした。最初のサンプリング時間(0.33h)において、すべての組織でDONが検出された;最大濃度は0.33~1.0hに測定されたが、血漿、肝臓、およびおそらく肺ではさらに早くピークが訪れたと思われる。最高レベルが検出されたのは血漿、腎臓、肝臓(1~2 μ g/g湿組織重量)で、続いて脂肪、リンパ、肺、副腎であった(200~500ng/g)。測定した他の組織ではさらに低濃度であった(20~165ng/g;脾臓、精巣、脳、心臓、筋肉、皮膚、腸、脾臓)。本研究より、DONは組織や体液へ速やかに分布し、全期間にわたってDON濃度が上昇した尿と胆汁を除き、続く24時間以内に痕跡量あるいは無視できるレベルへ減少することが示された。全体的な分布プロファイルより、どの組織においても広範囲の吸収や保持はないことが示され、低レベルのDON汚染された食餌を長期消費しても、ブタ中への残留物蓄積は生じないことが示唆された。

ブタにおけるデオキシニバレノール誘発嘔吐の予防における種々の クラスの制吐薬の効能

Fusarium マイコトキシンであるデオキシニバレノール (DON) は、強力な催吐薬である。嘔吐の誘発と仲介の基本機構はあまり理解されていないが、種々の神経伝達物質が関与しているらしい。これら伝達物質の作用は、種々の受容体特異的拮抗薬により阻害できる。本研究では、種々のクラスの受容体拮抗薬による、DON の催吐効果阻害に対する効能を調べた。制吐薬の前処理後、ブタに毒素を投与し (i.v., 80 μg/kg、あるいは経口 300 μg/kg)、嘔吐の発生をモニタした。いくつかの特異的セロトニン (5HT₃) 受容体拮抗薬 (ICS 205-930, BRL 43694A) が、DON により誘発される嘔吐を効果的に予防することが分かった。これらの観察結果は、化学的に誘発される嘔吐にセロトニンが重要な役割を果たしているという仮説を支持する。中程度の有効性を持ち、多量の投与が必要なものが、5HT₂受容体拮抗薬のシプロヘプタジンとスルピリドであった。強い抗コリン作動作用を有する種々の化合物も有効であった。しかしこれらは嘔吐中枢に直接作用するらしく、化学的に誘発される嘔吐を含め、原因に関係なく嘔吐を予防することができた。有効でないのは、抗ヒスタミンおよび抗ドーパミン作動制吐薬であった；例外は、かなりの抗コリン作動活性を有する制吐薬や、嘔吐開始に関与すると報告されている脳の化学受容体誘発帯 (CTZ) に見いだされる特異的受容体を阻害すると推測されている、クロロプロマジンを i.v. 投与した場合であった。

乳牛への経口投与後の牛乳へのデオキシニバレノール（ボミトキシン）の非伝達

Fusarium 種が産生するトリコテセン系マイコトキシンであるデオキシニバレノール (DON, ボミトキシン) の吸収を、乳牛において調べた。体重の近い 2 頭の泌乳牛にそれぞれ 920mg の DON を単回経口投与したのち、血清および牛乳中の DON レベルを定量した。DON 投与後の 2 頭の動物における血液中の最大レベルは 4.7 時間後と 3.5 時間後における、それぞれ 200ng/ml と 90ng/ml 血清だった。投与から 24 時間後にも、痕跡量 (<2ng/ml) が検出された。血清中の全レベルのうち 24~46% は抱合形態として説明できた。遊離および抱合 DON は牛乳中にも存在したが、検出されたのは極少量 (<4ng/ml) だった。

DON の検出においては、Sep-Pak C₁₈ 抽出カートリッジにより単離したのち、抽出物を活性炭／アルミナのショートカラムに通してさらに精製した。抽出物を N-ヘプタフルオロブチリルイミダゾールと反応させたのち、生じた DON-tris-ヘプタフルオロブチラート誘導体を、ガスクロマトグラフィー四重極質量分析計により、多重選択イオンモニタリングを用いて定量した。検出限界は 1ng/ml(1ppb) と低かった。

ヒツジへの経口投与および静脈内投与後のマイコトキシンデオキシニバレノールの血漿薬物動態

ヒツジへの静脈内投与および経口投与(それぞれ 0.5 および 5.0mg/kg)後の、デオキシニバレノール (DON) の薬物動態を研究した。血漿中濃度は、電子捕獲ガスクロマトグラフィ法を用いて測定した。iv 投与後、DON の血漿中レベルは双指数関数的に低下し、迅速な分布フェーズ ($t_{1/2\alpha}=12\sim23$ 分) と、引続くより遅い除去フェーズ ($t_{1/2\beta}=57\sim78$ 分) を示した。投与後 7 時間の血漿中には、DON は痕跡量しか検出されなかった。さらなる薬物動態学的データより、DON はおもに細胞外液中に限定されており、組織への有意な結合や吸収は起こらないらしいことが示唆された。経口投与後、DON は速やかに吸収されるが (t_{max} 4.0~5.3 時間)、ルーメン内微生物により迅速かつ効率的に代謝されることもあり、全身生物学的利用能はわずか 7.5% であった。経口投与後の除去の半減期 ($t_{1/2\beta}$) は 100~125 分で、動物に依存し、系から除去されるには 20~30 時間が必要だった。DON の iv および経口投与後のグルクロニド抱合物の代謝的形成は極めて効率的に起り (iv において 21%、経口において 75%)、これらの除去半減期は親毒素よりかなり長かった (iv において 150~200 分、経口において 6.1~7.1 時間)。血漿中における脱エポキシド代謝産物 DOM-1 の検出は、いずれの投与法後においても用量の僅かな部分を占めるのみで (iv において<2.0%、経口において<0.3%)、主にグルクロニド抱合物として生じた。

白色レグホン種雌鶏へ¹⁴C標識デオキシニバレノール投与した後の放射能の組織内分布と排泄

雌性ニワトリに対して単回経口投与、または6日間添加飼料を投与した後の[¹⁴C]標識デオキシニバレノール ([¹⁴C]DON) の体内動態を、組織中および排泄物中の特有の放射能を追跡することによって定量した。単回の挿管投与 (2.2 mg [¹⁴C]DON ; 2.4 μ Ci/bird) の後で、トキシンはほとんど吸収されていないことがわかった。ピーク血漿中濃度 (投与後2~2.5時間) は、投与量の1%よりも少なかった。最高組織内残留物は3時間に殆んどすべての組織 (肝臓、腎臓、脳、心臓、脾臓、前胃、砂嚢、小腸) で測定されたが、例外として脂肪、筋肉、および卵管は投与後6時間で起こった。臓器の中で最高の活性は腎臓、肝臓、および脾臓で測定された。しかしながら、これらの濃度は 500 ng · DON 当量/g · 組織と同等かそれ以下で、急速に減少した。組織からの放射能の消失は平均半減期 16.83 ± 8.2 時間 (組織により 7.7~33.3 時間の範囲) で起こった。標識化トキシンの排泄物からの排除は急速に起り、放射能の回収率は 24、48、72 時間後にそれぞれ 78.6、92.1、98.5% であった。非標識の 2.2 mg DON を 6 日間連続して投与し、続いて 2.2 mg [¹⁴C]DON(1.5 μ Ci) を 6 日間連続投与したニワトリでは、組織中の放射能の蓄積は起らなかった。最高の残留濃度は、腎臓で起ったが、僅か 60 ng · DON 当量/g であった。食料用組織に含まれる残留量の推定値は僅か 13~16 μ g · DON 当量/1.5 kg · bird であった。

ヒツジに対する経口および静脈内投与の後のマイコトキシン・デオキシニバレノールの排泄プロファイル

デオキシニバレノール (DON) と代謝物 (DON グルクロニド抱合体、 $3\alpha,7\alpha,15\text{-トリヒドロキシトリコテカ-9,12\text{-ジエン-8\text{-オン}}$ (DOM-1)、および DOM-1 グルクロニド抱合体) の排泄プロファイルを、静脈内 (iv) または経口投与でそれぞれ 0.5 および 5.0 mg/kg・体重のトキシン投与した雄性ヒツジを用いて明確にした。iv 投与の後、尿の DON 濃度は二相性方式で減少し、1.2 時間の平均消失半減期 (終末期) を示し、8 時間でベースライン濃度に下がった。確認された 2 種類の主要代謝物 (抱合 DON と抱合 DOM1) の最大尿中排泄速度は投与後 0.5~1.5 時間で起こり、消失半減期それぞれ 2.2 時間と 3.1 時間を示した。全回収量は投与の 66.5% に止まった：尿中は 63.0% (DON が 24.1%、抱合 DON が 21.2%、DOM-1 が 0.5%、抱合 DOM-1 が 17.2%)、胆汁中は 3.5% (殆ど全部が抱合 DOM-1) であった。抱合 DOM-1 のピーク胆汁排泄速度は投与後 1 時間以内に起こり、5 時間でベースラインレベルまで急速に減退することがわかった。経口投与後に、主要代謝物 (DON、抱合 DON、抱合 DOM-1) の尿中排泄速度は、投与後 6~9 時間で最高に達し、それぞれ指數関数的に $t_{1/2}$ 値が 3.2、4.0、5.0 時間で低下した。投与した DON の尿と胆汁からの回収率は平均しておよそ 7.1% であった：7.0% が尿 (DON が 2.1%、抱合 DON が 3.6%、DOM-1 が 0.06%、抱合 DOM-1 が 1.2%) で、0.11% が胆汁 (圧倒的に抱合 DOM-1) であった。経口投与の 54~75% が糞中に排泄された。これら所見は、DON と代謝物は、DON の単回血管投与と経口投与後に長くは体内に滞在することなく、急速に排泄されることを示す。しかしながら、静脈内投与の後で、投与量の一部 (33.5%) が不明のまま残り、確定不能の代謝物に変換したと推定される。これら結果に基づくと、代謝がヒツジにおける DON 消失の主要プロセスであると考えられる。

産卵鶏への経口投与後の卵への [¹⁴C] デオキシニバレノールの伝達

[¹⁴C] デオキシニバレノール (2.2mg DON、2.4 μ Ci/鳥個体) の単回経口投与後、低レベルの残留物が卵へ伝達された。投与後の初卵 (24 時間以内)において放射能が最大となり、1.9 μ gDON 等価量/60g 卵 (投与量の 0.087%) に達し、その後の卵ではレベルは急激に低下した。12 日にわたり食餌中へのスパイクとして DON を毎日消費したところ (6 日にわたり 2.2mg DON/鳥個体/日、その後 6 日にわたり 2.2mg [¹⁴C] DON、1.5 μ Ci/鳥個体/日)、放射能レベルは、毒素への最終曝露まで産卵した卵ごとに上昇した; 最大レベルは 4.2 μ g DON 等価量/60g 卵であった。清浄な食餌へ切り替えると、残留物は直ちに減少した。結果より、残留物は卵へ蓄積されるらしいが、汚染源を除去するとそのレベルは持続しないことが示された。卵物質の予備的分析より、存在する放射能の僅か 10%ほどが親毒素である DON として同定されることが示された。

泌乳ヒツジへの投与後のデオキシニバレノールの乳、尿、胆汁中に おける代謝運命と除去

放射性同位体計数とクロマトグラフィ検出法を併用して、泌乳ヒツジにおける血漿、尿、胆汁中のデオキシニバレノールの動態と代謝運命、および乳への残留物の伝達を調べた。

静脈注射後、血漿中から ^{14}C -DON 由来の放射能は急速に除去され、DON の双指数関数的減少（急速な分布フェーズ $t_{1/2\alpha} = 16.2$ 分、および遅い除去フェーズ $t_{1/2\beta} = 66.5$ 分）と主な血漿代謝産物（DON-グルクロニド抱合物で血漿放射能レベルの 13%を占める）の形成および除去 ($t_{1/2\beta} = 188.0$ 分) からなる 3 フェーズの減少曲線に従った。DON は 7 種類の可能な代謝産物へ代謝されて体内から迅速除去され、おもに尿 (91%) と、より少ない量で胆汁 (6%) 中に排出された。回収された放射能の大部分 (67%) は、DON のグルクロニド抱合物 (54%) と、脱エポキシド代謝産物 DOM-1 (13%) の形態であった。未代謝の DON の排出は 11% であった。残りの回収分 (18%) は、少量の DOM-1 (6%)、DON-硫酸塩抱合物 (2%)、および 3 つの未同定の放射能成分 (10%) であった。

乳中の DON 由来残留物の存在に関する研究より、毒素の経口あるいは iv 投与後、投与量に対して痕跡量のみが伝達されることが示された。

ブタにおける¹⁴C 標識デオキシニバレノールの薬物動態的運命

トリコテセン系マイコトキシンであるデオキシニバレノール (DON) の薬物動態について、ブタを対象にして、¹⁴C 標識トキシンの静脈内投与 (0.30 mg/kg : 0.35 μ Ci/kg) と胃内投与 (0.60 mg/kg : 0.60 μ Ci/kg) を追跡して研究した。静脈内投与の後の血漿濃度データは「3 区画オープンモデル」に適合した。ここでの半減期は、それぞれ急速分布期 (α)、遅速分布期 (β)、および末期消滅期 (γ) において 5.8、96.7、および 510.0 分であった。分布の見かけ容積 (V_d) は 1.34 l/kg、中央区画容積 (V_c) は 0.166 l/kg、および血漿内消失速度は 1.81 ml/min/kg であった。DON は本質的には変化せず急速に消え去り (>95%)、主として尿中に排泄され (86~104%)、胆汁からは僅かに消失 (3~5%) した。DON の胃内投与の後では、非常に速く吸収され、15~30 分以内にピーク血漿濃度に達した。濃度は高いまま (63~325 ng/ml) およそ 9 時間続きその後はゆっくりと ($t_{1/2}$ $\beta=7.1$ 時間) 減少し始めた。計算値の全身バイオアベイラビリティー (F) は 48~65% の間で、尿と胆汁からの回収は、実際にはより多くの吸収 (54~85%) が起ったことを示している。全体として、単回の静脈内または胃内投与に続いて DON は 24 時間以内に急速にかつ完全に消失したが、データは残留物が組織貯蔵として一時的に隔離されたらしいことを暗示している。

産卵鶏への ^{14}C 標識デオキシニバレノール長期投与に伴う残留物の 卵移行

白色レグホン鶏に低レベルの DON 混入飼料を長期投与した際の ^{14}C 標識デオキシニバレノール (DON; ボミトキシン) の放射性残留物の卵への移行について調べた。産卵鶏は 5.5 ppm の ^{14}C -DON をスパイクした飼料 (.55 mg DON; .825 $\mu\text{Ci}/\text{鳥}/\text{日}$) を 65 日間投与され、その後 21 日間、清浄で非混入飼料を投与された。(比放射能に基づく) 全残留物は ^{14}C -DON 曝露の 8 日目までは日増しに増加し、数日間レベルがプラトーに達し、その後はゆっくり減少した。測定された最大放射能は 60 g の卵あたり $1.7 \mu\text{g}$ DON または代謝産物に等しかった。卵黄、アルブミン、殻膜はそれぞれ全量の 70,29 および 1% の寄与であった。30 日までに、レベルはピークレベル ($.40 \mu\text{g}$ DON 等量/卵) の 25% に減少し、65 日でスパイク飼料を除去するまでほぼ一定を保ち、65 日目には残留物は極少量値に急速に減少した。これらの知見から、これらの給餌条件では卵中には非常に低濃度の DON しか確認されず、非常に低量であるので人への健康被害の可能性は少ないことがわかった。

ブタ脳各分野の神経伝達物質に及ぼすデオキシニバレノールの効果

ブタにおける脳のアミンレベルに対するデオキシニバレノール (DON, ボミトキシン) の影響について調べた。トリコテセンマイコトキシンである DON は、感受性種において、飼料摂取の抑制（食欲減退）を引き起こす。ブタに対して急性投与 (0.25mg/kg, IV) 後、内性カテコールアミンであるノルエピネフリン (NE)、ドーパミン (DA)、3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC) およびホモバニリン酸 (HVA) 並びにインドールアミンである 5-ヒドロキシトリプタミン (5 HT, セロトニン) および 5-ヒドロキシインドール酢酸 (5 HIAA) の濃度を、投与後 24 時間、定期的に 5 箇所の脳領域で定量した。分析は電気化学検出器を用いる高速液体クロマトグラフィーにより行った。

ブタの脳における DON の影響は、伝達物質、時間および領域特異的であった。投与後 8 時間までは、主伝達物質 (NE, DA および 5 HT) は視床下部 (Hypo)、前頭葉 (FCX) および小脳 (Cb) では、対照と統計的に異なった。全体的に、これらの領域において DON の投与により NE は上昇し、DA 濃度は抑制され、5 HT のレベルは初期(1h)には Hypo で増加するが、8 時間では Hypo でも FCX でも対照以下に大きく減少した。しかしこれらの変化は、化学的に誘起される食欲減退と関連した既知の神経化学的变化を示唆するものではなかった。むしろ、このデータから、急性 DON 曝露の神経化学的影響は末梢毒性学的效果（即ち嘔吐）によるものであり、この影響が些細な食欲減退よりも大きいことがわかった。

ブタの血液学的パラメータおよび臨床パラメータに及ぼす低レベルの食餌デオキシニバレノールの影響

飼育ブタにおける 32 日間の給餌期間中の飼料中デオキシニバレノール (DON) の亜急性毒性効果について調べた。DON は精製毒 (P) または自然混入トウモロコシ (N) のいずれかとして添加することにより、0,1,3mg/kg を餌に取り込んだ。試験期間中の成長性能、血液生化学パラメータおよび血液学的パラメータをモニタした。高毒物レベル (飼料 3P,3N) では、給餌直後に餌消費と体重増加が大きく低下したが、精製 DON 飼料 (3P) を給餌したブタの体重増加は数日後に回復し、自然混入飼料 (3N) を給餌したブタの値は試験期間中抑制されたままであった。これらの観察は自然混入穀物には他の未知の毒性化合物が存在することを反映している可能性がある。一般に混入飼料を給餌したブタの血液化学パラメータは対照と変わらなかった。ただし飼料 3N または 3P を摂取した動物では α -グロブリンは例外であり、コルチゾールも例外である可能性がある。データから α -グロブリン画分に及ぼす DON の影響は、この毒素に関連する拒食症候群とは無関係なものであることがわかった。RBC 計数、ヘマトクリット値、血小板値の増加を含むいくつかの血液学的計測における変化が、3ppm の飼料により孤発的に起こることがわかったが、これらの影響は飼料摂取の減少の影響と分離することはできず、ブタに及ぼす少量の飼料中 DON の影響の診断においての価値は小さいといえる。

デオキシニバレノールで誘発されたマウスの飼料摂取と体重増加の減退に及ぼす食欲増進剤シプロヘプタジンの影響

*Fusarium*マイコトキシンであるデオキシニバレノール(DON,ボミトキシン)は、5HT₂受容体を介すると考えられるセロトニン作動性(5HT)機構により食欲減退／拒食活性を誘発すると考えられる。本研究では、セロトニン拮抗薬で、食欲増進剤として知られているシプロヘプタジン(CYP)が、DONの悪影響を減らす効果についてマウスで調べた。CYPは、動物がDONを摂取し始める2日前に投与し、餌にも添加した。両薬剤はその後12日間同時に摂取した。投与レベルは0·16 ppmのDONと0·20 ppmのCYPの範囲で2種の化合物のいろいろな組み合わせを用いた。

結果からCYPは飼料DONにより起こる飼料摂取の減退を効果的に弱めることができるが、用量レベルを最適化したとき(CYPは狭い有効用量範囲があるようだ、これはDON濃度にも依存した)のみであることがわかった。実際に、最適CYP投与により、DONを投与されたマウスの飼料摂取を対照レベル以上に増加させることができることから、単に毒素の効果を直接阻止するだけ以上のことが起こっていることがわかった。しかし逆に、体重増加(WG)に対するCYPの効果ははっきりしなかった。単独または試験した最低DONレベル(4ppm)との組み合わせで、低用量のCYPの投与($\leq 5\text{ppm}$)においては、中程度の正の影響が明らかとなつたが、より高濃度のDON($\geq 8\text{ppm}$)では、一般的に全WGは減少し続け、CYP用量が増加すると更に減少する傾向があつた。

これらの結果からDON誘発性の飼料摂取低下を仲介するのに、セロトニン作動性機構が役割を果たしているのであろうということに対する追加的支持が得られた。しかしDONが実際にどこでどのように食欲減退効果を開始させるのかは解明されていない。

腸内細菌および自己抗原と反応する血清 IgA,IgM,IgG のボミトキシン誘発性調節不全

自然発生的腸内細菌および自己抗原と反応する免疫グロブリン類に及ぼす飼料ボミトキシン曝露の影響を B6C3F₁ マウスで調べた。4 週間および 8 週間、25ppm のボミトキシンの摂取により、準精製飼料のみを与えた対照マウスと比較して、全 IgA が有意に上昇するが、血清中の総 IgG と IgM は減少した。ホスホリルコリン (PC) とイヌリン（腸内細菌関連のハプテン）に特異的な IgA はボミトキシンを投与したマウスで大きく増加し、一方で同一特異性を持つ IgM は減少した。DNA およびプロメライン処理マウス赤血球 (MRBC) を認識する自己抗体について血清を調べると、ボミトキシン曝露したマウスは、対照と比較して特異的 IgA が上昇していた。同時に DNA 特異的 IgG および IgM の減少、MRBC 特異的 IgM の減少が起こった。更にボミトキシン曝露では経口投与したトリニトロフェニル化ヒツジ赤血球 (TNP-SRBC) に対する特異的血清 IgA 応答を増強することはないが、TNP 特異的血清 IgG は大きく抑制することがわかった。結果から経口抗原および自己抗原に特異的な血清 IgA と総血清 IgA の極端な増加がボミトキシン摂取により起こり、総および特異的 IgM および IgG のダウンレギュレーションと共に役することがわかった。これらの結果は、IgA 免疫複合体糸球体腎炎を誘発するボミトキシン能力に寄与すると考えられる。

BALB/c マウスにおけるボミトキシンによって起こる IgA 腎症時の ポリクローナル自己反応性 IgA の上昇とメサンギウム沈着

自己反応性抗体とボミトキシン誘発免疫グロブリン A (IgA) 腎症の関連を確立するために、BALB/c マウスにおける血清 IgA、IgA 生成細胞および蓄積メサンギウム IgA の抗原特異性に及ぼす飼料ボミトキシン曝露の影響を調べた。8 週間、飼料中ボミトキシンに曝露すると、総血清 IgA が有意に増加した。対照と比較してトリニトロフェノール (TNP), ホスホリルコリン、カルジオリピンおよびスフィンゴミエリンに特異的な血清 IgA が同時に有意に増加することから、自己反応性 IgA が上昇したことを示唆した。AIN-76A 飼料中に見出される蛋白質である、カゼインは血清 IgA のスフィンゴミエリンおよびカルジオリピンへの結合を阻害することから、これらの抗体は多特異的である可能性を示した。自己反応性 IgA 産生をモニタするために酵素連結免疫スポット分析を行うと、対照マウスと比較してボミトキシン摂取マウス由来のパイエル板中の TNP、カルジオリピンおよびスフィンゴミエリン特異的 IgA 分泌細胞が増加する傾向が見られた。TNP 反応性の IgA 産生細胞はボミトキシン摂取マウスの脾臓中で増加するが、他の抗原に対する IgA 分泌細胞への影響は小さかった。対照と比較してボミトキシン摂取マウスでは、メサンギウム IgA の顕著な沈着も観察された。処置マウスの腎臓切片から IgA を溶出し、酵素連結免疫吸着定量により調べると、上述の抗原パネルおよびイヌリン、DNA およびカゼインへの強い結合があることがわかった。これらのデータから飼料中ボミトキシンは IgA 産生細胞のポリクローナル活性化を誘起し、その結果自己反応性 IgA が腎臓メサンギウムに沈着することが示唆された。

ボミトキシン摂取マウスのパイエル板由来ハイブリドーマにより分泌された多特異性,自己反応性 IgA : 特性化と IgA 腎症における病原的役割の可能性

ボミトキシン摂取 BALB/c マウスのパイエル板から、全部で 122 の免疫グロブリン (Ig) A 産生ハイブリドーマ産生クローンが単離され、得られた抗体について抗原特異性と病原性の可能性について特性化した。自己抗原および非自己抗原の代表である DNA、スフィンゴミエリン、チログロブリン、コラーゲン、カゼイン、カルジオリビンおよびホスホリルコリン、イヌリン、トリニトロフェノールのウシ血清アルブミン結合物から成るパネルに対する反応性を調べると、モノクローナル IgA の約 95%が、少なくともパネル抗原の 1 種に結合し、80%が 1 以上の抗原に結合した。1 種の抗原がモノクローナル IgA の他の抗原に対する結合阻害能を示すことから、モノクローナル IgA のいくつかの多特異性が更に支持された。勾配未変性ポリアクリルアミドゲルの蛋白質染色およびウェスタンプロットにより、単離されたモノクローナル IgA では三量体 IgA が多いことがわかった。マウスに代表的モノクローナル IgA を反復注射すると、調べた 4 クローンのうちの 3 種において顕微血尿が誘起されるが、腎糸球体に IgA 沈着は起こらなかった。更に 4 種のモノクローナル IgA のうち 3 種は、腎メサンギウムにおいて IgG および C3 の沈着が起こった。これらの結果および以前の結果から、飼料中のボミトキシンがパイエル板レベルでポリクローナル活性化と IgA 分泌 B 細胞の拡大を促進し、その結果、多特異的、自己反応性 IgA が腎症発症に寄与することが示唆された。

ヒト赤芽球前駆細胞に対するトリコテセンの試験管内毒性

トリコテセン類は、各種農作物に発生する可能性のある各種の菌によって產生されるマイコトキシンである。これらの化合物の中で、T₂トキシン、HT₂トキシン、ジアセトキシシルペノール (DAS)、およびデオキシニバレノール (DON) は最も多く自然界で遭遇するもので、影響の大きいトリコテセンである。畜産動物やヒトによるトリコテセン汚染食品の摂取はマイコトキシン症をもたらす。トリコテセンはヒトや動物で、好中球減少症、血小板減少症、および再生不良性貧血などの血液学的障害を誘発する。

筆者らの研究の目的は、造血系前駆細胞に対するトリコテセン類の影響を解明することである。以前にヒトの CFU-GM に対して強い細胞毒性を示した 4 種類のトリコテセンをヒト BFU-E に対して試験した。この目的のために、毒学的研究のために最適化したヒト赤芽球前駆細胞 (BFU-E) の培養モデルを使用して、赤芽球前駆細胞の増殖と分化に対する T₂、HT₂、ジアセトキシシルペノール (DAS)、およびデオキシニバレノール (DON) の影響を定量した。その結果は、DON を例外として、試験した濃度範囲で、ヒトの BFU-E はヒトの CFU-GM と同様にトリコテセンに対して過敏であることを示した。赤芽球前駆細胞の分化はこれらマイコトキシンにより妨害された。また、ヒトの赤芽球前駆細胞はトリコテセン類の攻撃対象である。

デオキシニバレノールおよび T-2 毒素の溶血活性

ラット赤血球に及ぼすデオキシニバレノール(DON)および T-2 毒素 (T-2) の溶血効果について、いろいろな濃度で調べた。T-2 毒素代謝を阻害する酵素阻害剤としてアジ化ナトリウムを用いた。T-2 の濃度は GC-MS により制御し、実験中毒素の減少は見出されなかった。真核細胞に対しては T-2 の毒性がずっと高いにもかかわらず、高濃度でも低濃度でも赤血球に対しては DON と T-2 が同程度の溶血活性を示した。130 μg/ml の濃度ではいずれの毒素も 11 時間のインキュベーション後でも有意な溶血は起こさなかった。本知見は、T-2 と DON はいずれも閾値が存在し、それ以下では溶血反応が起こらないことを示唆した。更にマンニトール、グルタチオン、アスコルビン酸、アルファ・トコフェロール、ヒスチジンの存在下で溶血試験を行った。分析から、すべての化合物が毒素の溶血反応をある程度阻害することがわかった。DON と T-2 は、3 つの異なる方式で原核細胞に対して毒性を示すことが示唆された：リン脂質二重層を透過し亜細胞レベルで作用する場合、細胞膜との相互作用による場合、およびフリーラジカル仲介リン脂質過酸化による場合である。1 以上の機構が同時に作用する可能性が大である。

ブロイラー種におけるトキシン产生菌と病気との関連性

1980～1981 年にかけての冬にスコットランドで起ったブロイラー種の不十分な成長、羽化の遅れ、および行動異常の発現について記述する。この出来事は、フザリウムが持続して高濃度で単離された飼料中のカビ汚染トウモロコシ／小麦成分に起因すると考えられた。4 つの種、すなわち、*Fusarium culmorum*、*F. tricinctum*、*F. nivale*、および *F. moniliforme* が同定された。原料、および 3 つのフザリウムの種を培養した人口培地のクロロホルム抽出物は、ヒト上皮細胞株 (HEp II) の組織培養に対して毒性を示した。薄膜クロマトグラフィーによるマイコトキシン類 (デオキシニバレノール、ゼラレノン、およびジアセトキシルペノール) の特異的同定がいくつかの抽出液において成功した。加えて、クロマトグラムのその他のいくつかの領域も HEp II 細胞システムで毒性を示すことがわかり、これらは標準品が入手不可能なトキシン、または以前には特性確認できなかった菌代謝産物を含むことが考えられる。フザリウムが產生するトキシンは、ニワトリが示す病状の主要寄与因子であるとの結論が得られた。

マウスにおけるデオキシニバレノール摂取に伴う蛋白質合成阻害および心臓病変

食料品の汚染原因物質であるデオキシニバレノール (DON) はマイコトキシン症の発症に関係している。0.35mg/kg の DON を摂取した Balb·c マウスは、食餌摂取が劇的に減少し、同時に体重が減少した。リンパ系器官と肝臓の重篤な消耗も見られた。10 から 20ppm の DON が混入された餌を数週間摂取した若齢動物においては、石灰化心膜炎として心臓病変が出現した。DON は蛋白質合成を阻害した。この阻害は他の組織よりも心臓において、より低用量で起こった。心臓組織に及ぼすこの選択的影響は、観察された心臓毒性と相關した。

デオキシニバレノールの免疫抑制特性

デオキシニバレノール (DON) の免疫抑制効果について、オスの Balb/c マウスで調査した。まず動物に対する DON 投与経路の影響について調べた。結果から DON は経口摂取により、免疫系に効果的に作用することがわかった。餌中 100ppm の DON 投与により、すべての動物が数日以内に死に至った。マウスに DON を経口投与後、肝臓と腎臓の重量は変化しないが、胸腺の重量が >10ppm で大きく減少した。脾臓の重量は胸腺の重量ほどは減少しなかった。組織学的には、胸腺の構造が損傷し、高用量投与によりこの器官の萎縮が起こった。抗ヒツジ赤血球 (SRBC) 抗体の血清レベルは有意に減少し、この効果は用量依存性だった。マイトジエンによる B 細胞と T 細胞の刺激は抑制された：細胞分裂応答は、脾臓細胞よりも胸腺細胞の方で減少が大きかった。 $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みにより算出されるように、DON は *in vitro* では細胞増殖を阻害した：マウス脾細胞 (培養の $\text{IC}_{50} = 131 \text{ ng/ml}$) は XP ヒト線維芽細胞 (培養の $\text{IC}_{50} = 252 \text{ ng/ml}$) より感受性が高かった。

V79 チャイニーズハムスター肺細胞を用いる肝細胞媒介突然変異試験におけるボミトキシン (4-デオキシニバレノール) の突然変異活性の細胞毒性と欠如

フザリウム属の菌により穀粒上に產生されるトリコテセン系マイコトキシンであるボミトキシン (4-デオキシニバレノール) の細胞毒性と変異原性を、チャイニーズハムスターの V79 細胞を用いて試験管内で定量した。1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (ppm) の濃度でコロニーサイズが減少し、2~3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (ppm) 以上ではコロニーの数とサイズが減少し、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (ppm) では細胞の 80~90%が死ぬなど細胞毒性が示された。

3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (ppm) までの濃度のボミトキシンは、肝細胞媒介活性化のあるなしにかかわらず、ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシリルトランスフェラーゼ (HGPRT) 遺伝子座において V79 細胞に対して変異原性を示さなかった。また、細胞毒性の限界濃度である 6 および 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で 6-チオグアニン抵抗性変異体の数を有意には増加させなかった (データは示されず)。

これらの所見と以前の研究を合わせると、ボミトキシンは他の 12,13-エポキシトリコテセン類と同じく、タンパク質の、および／または DNA 合成の抑制を通して細胞毒性を示すが、発がん性はないものと考えられる。

成長ブタモデルとしてのマイコトキシン曝露したマウスの利用における研究

ブタを用いた試験前に、食餌マイコトキシン相互作用スクリーニングにマウスを利用するとの可能性を判断するため、一連の実験をおこなった。選択したマイコトキシン類としてデオキシニバレノール (DON) と T-2 毒素を単独あるいは併用で、若齢マウスに摂取させた。DON (0-20mg DON/kg 食餌) による体重に及ぼす影響の大きさは、分散分析で反映されるように、給餌法として、混入食餌への曝露を 28 日齢から開始するより 21 日齢から開始する方が用量関連的に顕著であった（実験 1）。7 日後における食餌間の相対分散は、若齢マウスにおいて老齢マウスの 2 倍であった。両年齢群において、成長中のブタと同様、体重増加応答は線形であった。実験 2 において、7 日後に明らかになる食餌消費に対する食餌タイプ×DON 相互作用は有意 ($p < .05$) であり、DON の影響は食餌タイプ（凍結乾燥 vs. 通常マッシュ）に依存することが示された。食餌タイプ間において食餌効率の差はなかったが、DON による用量に強く依存する影響が観測された。若齢マウスへ DON と T-2 毒素を共摂取させた場合、毒素濃度が上昇するに従って、混入食餌において 7 日後に体重増加と食餌消費の有意な ($p < .001$) 線形減少が観測された。

大型動物研究の代替法としてのデオキシニバレノールに対するマウスのバイオアッセイの最適化

大型動物を用いた毒物学実験は、とくに統計的条件を満たすために措置あたり多数の動物が必要であることなど種々の理由により、小動物を用いた実験より困難である。動物の管理や取り扱いにおける問題のみならず、必要量の毒素／代謝産物を得ることが極めて困難でかつ費用がかかる。低コストで多量に迅速な入手が可能で、空間が少なくて済み、試験材料もはるかに少量で済むため、マウスやラットがよく用いられる。

食品動物研究センター (CFAR) における最近の研究から、デオキシニバレノール (DON, ボミトキシン) と *Fusarium graminearum* 代謝物 (Rotter et al., 1992b) や T-2 毒素 (Friend et al., 1992) との一定の組み合わせが、ブタに及ぼす効果において相互作用を生じることが示されている。マイコトキシンの研究においてブタのモデルとしてのマウスのバイオアッセイは、短期実験において、代謝物とその相互作用の可能性のスクリーニングのみを目的としている (Rotter et al., 1992a)。

マウスにおける食餌中の DON の毒性効果に関する情報は入手可能であるが (Arnold et al., 1986; Forsell et al., 1986, Tryphonas et al., 1986; Hunder et al., 1991)、食餌組成や性別 (Iverson et al., 1985) といった因子が DON への応答に及ぼす影響は、幅広くは報告されていない。本研究では、純粋な食餌中の DON に対するオスおよびメスのマウスの応答を比較し、次に高脂肪および低脂肪含量の食餌に対するオスのマウスの応答を比較するために実施した。

若齢ブタにおいて *Fusarium* マイコトキシンへの低レベル曝露がいくつかの免疫学および血液学的パラメータに及ぼす影響

食餌中の低濃度の *Fusarium* マイコトキシン(デオキシニバレノール(DON), 15-アセチル-DON, ゼアラレノン) が成長、免疫学、血液学パラメータに及ぼす影響を、若齢ブタについて 28 日間の給餌実験の間において決定した。清浄および天然混入したトウモロコシを基礎食として、0.00、0.75、1.50、3.00mg DON/kg を含む食餌を調合した。ペア給餌の対照動物を最高レベルの混入をおこなった各動物との比較のために用いた(食餌 4)。実験 1 週目に測定した皮膚温は、食餌中のマイコトキシンの濃度上昇とともに線形的に低下した。他にいくつかの線形的影響が観測された: 実験中にわたる食餌摂取量低下、甲状腺の大きさ(絶対的/相対的)減少、胃の食道部位の外見変化(毒素の濃度上昇とともに厚くなり折りたたみの程度が上昇した)。曝露から 7 日後と 28 日後において、血清 T₄(チロキシン)のレベルが、対照動物と比較して二次関数的に上昇した。混入レベルの上昇とともに、アルブミンレベルの上昇、 α -グロブリンのレベルの低下、アルブミン/グロブリンの比の全体的な上昇が本変化に伴った。ヒツジ赤血球(SRBC)による感作後、混入食餌を給餌させた動物では、ピーク滴定力価における応答が遅れた。実験終了時において、分節好中球の個数の上昇が観測された。食餌 4 を摂取した動物をペア給餌の対照動物と比較して以下の観察結果を得た: 皮膚温低下、食餌効率改善、胃のひだ増加、 α -グロブリンレベル低下、SRBC に対する抗体力価の低下。本研究により、マイコトキシン混入食餌に曝露された動物における生理生化学的適応応答が示された。大半の変化が動物の栄養状態に関連していると思われるが、皮膚温低下、胃の状態変化、 α -グロブリンレベル低下といった他の変化より、*Fusarium* 毒素による特異的効果が示唆される。これらの結論に至る上でペア給餌処置は重要であったが、この処置自体が食餌摂取量の低下に対する応答変化を導入したことも明らかである。

成長中のブタにおいてデオキシニバレノール混入食餌が性能と血液パラメータに及ぼす影響

デオキシニバレノール (DON) を混入させた食餌 (4.0mg DON kg^{-1} 食餌) の給餌による、成長中のブタ (体重 18.0-50.8kg) の 42 日間にわたる性能および血液パラメータに及ぼす影響を決定するため、実験をおこなった。毎週すべての動物から血液試料を採取した。随意給餌対照およびペア給餌対照群を用いて、食餌摂取量と DON 混入食餌の特異的影響間の差異を識別した。DON 混入食餌を給餌されたブタは、対照の随意給餌ブタと比較して食餌摂取量が平均 20%、体重増加が 13% 低かった。剖検において、臓器の絶対的および相対的重量に違いはなかったが、DON 混入食餌を給餌されたブタの胃の底部位は、両対照群よりひだが多かった。毎週採取した血液のプロファイルより、DON 混入食餌による血清蛋白質の一過性変化が示された。血清蛋白質は 2 週目と 3 週目において両対照群より低下したが、その後対照群の値へ回復した。2 週目から 4 週目において β -グロブリン値も低下した。このデータより、DON は肝臓中の蛋白質合成を低下させることが示唆されるが、動物は食餌中の混入物に適応でき、6 週間にわたる実験の最後には回復を示した。

デオキシニバレノール（ボミトキシン）の毒物学

トリコテセンマイコトキシンは、幅広い毒性効果をもたらす構造的に類似な一群の真菌代謝産物である。トリコテセンの1種であるデオキシニバレノール（DON、ボミトキシン）は、カナダやアメリカ合衆国を含め、食品や飼料生産に用いられる農作物に世界的に存在している。DONはトリコテセンの中でも急性毒性が最も低いものの1つだが、穀物に極めて一般的に混入しているため、食品安全上の重要な問題として取り扱うべきである。本総説では、種々の細胞系や動物種における毒物学的および免疫毒性的影響を誘起するDONの能力に焦点を当てる。細胞レベルにおいては、主な毒性効果はリボソームへの結合による蛋白質合成の阻害である。動物においては、毒素の中濃度から低濃度の摂取により、生産力および免疫機能の低下を伴う、現在のところあまり判明していない多数の影響が引き起こされうる。食物中の低濃度における顕著な主影響は、食物消費量の低下（食欲不振）で、一方で高濃度摂取は嘔吐を誘起する。DONは脳の神経化学物質を変化させることができている。摂餌行動と嘔吐応答の仲介においては、セロトニン作動系が寄与していると思われる。低濃度から中濃度を給餌された動物は初期の体重減少から回復できるが、高濃度摂取は摂餌行動をより長期にわたり変化させる。低用量のDONでは、血液学的、臨床的、免疫学的变化は一過的で、補償／適応機構が確立されるとともに低下する。ブタはマウス、家禽、反芻動物よりもDONに対する感受性が高いが、これはDONの代謝が異なることが一因で、またメスよりオスの方が高感受性である。正常な免疫機能を変化させるDONの能力に、とくに興味が持たれている。DONは曝露量と期間に依存して免疫抑制あるいは免疫賦活作用を及ぼすという証拠が幅広く存在する。免疫抑制作用は翻訳阻害により説明できる一方、免疫賦活作用は正常の調節機構に対する干渉に関係していると思われる。In vivoでは、DONは病原体に対する正常免疫反応を抑制すると同時に、ヒト免疫グロブリンA（IgA）腎症に似た自己免疫類似効果を誘起する。他の影響としては、ヘルペスT細胞によるサイトカイン産生を過剰誘導したり（in vitro）、マクロファージやT細胞を活性化させ、リポ多糖誘発ショックにおいて見られるのと類似の、炎症性サイトカイン波を産生させたりする。サイトカイン上昇がどの程度、摂餌量減少といった代謝的影響に寄与するかは確立されていない。これらの影響はマウスにおいてほとんど特性化されているが、DONを用いた種々の研究から、家畜動物に対しても免疫毒性効果があることが示唆される。さらなる毒物学的研究と、ヒト疾患における潜在的病原因子としてのDONの評価が求められる。

トリコテセン類の相対的毒性

Fusarium、*Myrothecium*、および *Trichoderma* のようなかびは 30 種類以上の 12、13-エポキシトリコテセンかび毒を作ることが知られている。微生物学的、化学的および毒物学的研究により、これらのかび毒にはヒトと動物の食事性疾患と密接に関係するものがあることが分かった。

トリコテセン化合物は核の 5 つの位置の置換基が異なり、3 群に分類されている。すなわち、生産かびにより、図 1 に示す通り T-2 毒タイプ(A)、ニバレノールタイプ(B)、そしてマクロサイクリックタイプ(C) である(上野ら、1972 年 b)。すべてのタイプ B 毒は C-8 (R_5) にカルボニル基を有し、タイプ A 化合物は C-8 が酸化・水酸化されていないかまたはエステル化されている。

トリコテセン化合物には、最初は抗かび剤または植物に対する毒素として分離されたものがある(Freeman ら 1949d 年、Brian ら 1961 年)。最近では、かびの生えた食品や飼料により自然発生する酩酊病因の研究において原因毒として分離されたトリコテセンも多い。ヒトおよび家畜の中毒の急性症状には、皮膚刺激、恶心、嘔吐、拒食、白血球減少と貧血を含む血液変調、神経攪乱および流産があった。これらの毒学的特徴の多くはマウス、ラットおよびネコなどの実験動物で再現された。病理学的には、細胞損傷の特徴は盛んに分裂している細胞の放射線類似変化である。生化学的には、トリコテセンは真核細胞におけるタンパク質と DNA 合成の強力な阻害剤である。

トリコテセンかび毒は全般的に、類似の化学的生物学的特徴を有する。本論文では、トリコテセンかび毒のいくつかの毒物学的活性を比較し考察する。

ボミトキシンによる BALB/3T3 マウス胚細胞の *in vitro* 形態変換

Fusarium 属の真菌により穀物上に生産されるトリコテセンマイコトキシンのボミトキシンの転換能を、マウス BALB/3T3 A31·1·1 胚細胞を用いて評価した。7.5%ウシ胎児血清を補充した Earle 塩を含む Eagle 基礎培地の中で増殖させた細胞を、蒸留水に溶解して濾過滅菌した高純度ボミトキシンで処理した。アッセイは、0.1·1.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲の用量レベルで 3 種類の異なる継代の細胞を用いておこなった。処置時間は 48h、試験した最高用量レベルにおいて、*in situ* 細胞計数より、およそ 10%が生存すると決定された。蒸留水と 3-メチルコラントレン(5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)をそれぞれ、賦形剤と陽性対照として用いた。用量群あたり 20 ディッシュを試験し、うちタイプⅢフォーカスの数は、溶媒対照において 0·1、陽性対照において 12·15、処理群において 0·9 であった。3 つのアッセイの比較より、応答レベルは継代数により異なることが示された。試験した 3 種類の継代—継代数 6,8,9 (p6,p8,p9)—の細胞のうち、継代数 9 の細胞が最強の陽性効果を及ぼした。

マウスのリンパ器官における T₂ 毒素誘導アポトーシスの進行過程

10mg/kg b.w. の T₂ 毒素を経口投与したメス ICR:CD-1 マウスを投与 1,3,6,9,12,24,48 時間後 (HAT) に屠殺し、胸腺および脾臓における T₂ 毒素誘導アポトーシスの進行過程の調査に供した。胸腺中 3HAT において、細胞体の萎縮と核クロマチン凝縮により特徴化されるリンパ球の初期微細構造変化が検出された。断片化 DNA の *in situ* 検出法により観察されたアポトーシスリンパ球数は、胸腺においては 9HAT から 24HAT において著しく上昇したのに対し、脾臓では 12HAT に上昇が開始した。アガロースゲル電気泳動による DNA ラダーは、胸腺では 9HAT において初めて検出され、12HAT から 24HAT において明瞭になったが、一方脾臓では観察期間にわたって明瞭には検出されなかった。したがって、T₂ 毒素誘導アポトーシスは、脾臓より胸腺においてより早く進行し、見かけ上重症度が高い。アポトーシスは初め電子顕微鏡によって検出され、次に断片化 DNA の *in situ* 検出法により、最後に DNA アガロースゲル電気泳動により検出された。

マウスの造血組織における T-2 毒素誘導アポトーシス

メス ICR:CD-1 マウスに 10mg/kg 体重の T-2 毒素を経口接種したのち、48 時間にわたって骨髓および赤脾髄における T-2 毒素誘導病変を調べた。組織病理学的に、骨髓と赤脾髄は著しい低細胞性を示した。骨髓中では、未成熟の顆粒球、赤芽球、リンパ球の損失により、骨髓球の数が有意に低下した。核濃縮あるいは核崩壊を示す残存細胞の核を、TdT 仲介 dUTP ニックエンド標識 (TUNEL) 法により陽性染色したところ、これらの TUNEL 陽性細胞はアポトーシスの微細構造的特徴を示した。アガロースゲル電気泳動により、骨髓試料中に DNA ラダーが明瞭に検出された。赤脾髄中の TUNEL 陽性細胞数は、白脾髄より早く上昇した。したがって、造血組織およびリンパ組織中の T-2 毒素誘導病変は、構成細胞のアポトーシスにより引き起こされた。骨髓におけるアポトーシスの誘導においては、造血微環境に対する損傷も間接的な役割を果たすと考えられる。

Fusarium culmorum により引起される赤かび病がコムギ穀粒の毒素含量と重量に及ぼす影響

10 の遺伝子型の秋まきコムギに *Fusarium culmorum* の 3 種類のオランダ株 (IPO 39-01, IPO 348-01, IPO 436-01) を接種した。種子試料中の何種類かのトリコテセンマイコトキシンとゼアラレノンを分析した。デオキシニバレノールが、0·48 mg/kg の濃度範囲で検出された。マイコトキシンの 3·アセチルデオキシニバレノール、ニバレノール、フサレノン・X、ゼアラレノンは検出されなかった。赤かび病と穀粒デオキシニバレノール含量について、菌株と遺伝子型との相互関係が観測された。各菌株について、デオキシニバレノール含量と収穫量減少との間に高い相関が見いだされた。経路解析により、デオキシニバレノールと穀粒重量減少との間に関連性が示唆された。高病原性株の感染では、穀粒数としての収穫量が減少した。2 種類の中病原性株の場合、収穫量の低下は穀粒重量の低下によりもたらされた。本報告は、*Fusarium culmorum* が引き起こす赤かび病、穀粒の毒素含量、収穫量の低下の関係に関する初の報告である。

IL-6KO[B6129-IL6 〈TmlKopf〉 (IL-6 遺伝子欠損)]および WT[無傷 IL-6 遺伝子を持つ B6129-IL6 の野生型]マウスにおける精巢形態、精巢の精子細胞数、精巢上体の精子数に及ぼすボミトキシン（デオキシニバレノール）の影響

ボミトキシン（VT）が精巢の形状と精巢および精巢上体における精子数に影響を及ぼす可能性を、3種類の系統のマウス：IL-6KO [B6129-IL6 〈TmlKopf〉 (IL-6 遺伝子欠損)]、WT [B6129F2 (無傷 IL-6 遺伝子を持つ B6129-IL6 の野生型)]、B6C3F₁ マウスにおいて、90日間の給餌研究において評価した。処置したマウスに、食餌中で濃度 10ppm の VT を投与した。VT 処置したマウスの体重は、対照動物に比べて有意に低下した。精巢の相対重量と精巢の精子細胞数においては、統計的に有意でないわずかな変化が観測された。VT 処置した動物の精巢には、組織学的変化は明確でなかった。VT 処置群の細精管断切片あたりの細精管の直径、精上皮の高さ、Sertoli 細胞核小体の数は、対応する未処置対照群と有意に違わなかった。VT 処置した IL-6KO および B6C3F₁ マウスでは、対応する対照群に比べ、精巢上体尾の重量が有意に低下した。これらの変化は精子数の低下によるものではなく、この知見より、VT は精巢上体に悪影響を及ぼすことが示唆される。

感染病に対する宿主防衛に及ぼすトリコテセン類の影響

比較的低濃度の 5 種類のトリコテセン類（デオキシニバレノール (DON)、ジアセトキシシルペノール (DAS)、T-2 毒素 (T-2)、フサレノン-X (FX)、ニバレノール (NIV)）が、サルモネラ菌感染に対する宿主抵抗性に及ぼす影響を、マウスを用いて調べた。飲用水中に毎日各トリコテセンを与えたマウスに、トリコテセンへの曝露開始から 14 日後に、*Salmonella enteritidis* を経口感染させた。サルモネラ菌感染に対する抵抗性の減少において、5 種類のトリコテセン誘導体のうち DON が最も大きな効果を及ぼすことが分かった。DON によるこの効果は、血清抗サルモネラ菌 IgM 力値の低下と、遅発性過敏反応を伴い、いずれもサルモネラ菌の感染に対する防御機構と見なされる。これらの結果より、低用量の DON への食餌曝露により、細胞性および液性免疫に及ぼす毒性効果を介して、サルモネラ菌の経口感染に対する罹患性が上昇することが示唆された。

細胞培養における 12,13-エポキシトリコテセンマイコトキシン類の構造活性相関：全動物致死性との比較

19種類の 12,13-エポキシトリコテセンマイコトキシン類について、Vero 細胞とラット脾臓リンパ球における蛋白質合成の相対阻害能を調べた。リンパ球の方が一般的にマイコトキシンに対する感受性が高かったが、2種の細胞系の種々のトリコテセン類の相対効力間には高い相関が存在した。もっとも効力の高いマイコトキシン (T-2、ベルカリン A、ロリジン A) は、基本環構造の 4 位と 15 位炭素上にアセチル側鎖を持つ、あるいはその間に炭化水素鎖を持つものであった。これらの部位のいずれかから側鎖が失われるか、8 位炭素のイソバレリル基が失われることで、蛋白質合成阻害が減少した (T-2 から HT-2、ネオソラニオール、ジアセトキシルペノール)。3 部位からの消失の如何なる組み合わせも (T-2 トリオール、T-2 テトラオール、15-モノアセチル DAS、シルペントリオール、フサレノン X、デオキシニバレノール)、さらに効果が弱まった。水酸基が水酸化物へ還元され、ベルカロールあるいはデオキシベルカロールが生成することで、最も効力の高いマイコトキシンに比べ効力が 1000 分の 1 以下に低下した。側鎖付加により効力が低下するのは、T-2 (アセチル T-2 へ) とデオキシニバレノール (3-アセチルデオキシニバレノールへ) の 3 位炭素にアセチル基が付加した場合か、ジアセトキシルペノールの 9,10 位炭素にわたるエポキシドに置換された場合 (β -エポキシド DAS) のみであった。これらおよび他のマイコトキシンの効果の組合せは加算的で、活性部位への結合に対する相乗性および競合性は示さなかった。これらのマイコトキシンの *in vitro* 効果を全動物致死性試験の結果と比較したところ、いくつかのトリコテセン類では、*in vitro* 蛋白質合成阻害は弱いものの、*in vivo* 毒性は T-2 毒素に近かった。したがって、供試されたトリコテセンの *in vitro* 細胞応答は必ずしも、全動物における毒性の正確な予測子ではない。

トリコテセン類へのヒトリンパ球の *in vitro* 曝露：感受性の個体差 とリンパ球機能に及ぼす複合曝露の影響

トリコテセン類は、穀物由来の食品や試料中に一般的に存在する *Fusarium* 属の真菌が産生するマイコトキシンである。ほとんどのトリコテセン類において十分な毒物学的データがないため、これらの毒素のリスク評価に対して、*in vitro* 研究が貢献すると思われる。本報告では、ヒトリンパ球培養を用いて、ヒト間での感受性の個体差と、Ig の *in vivo* 生産に及ぼす影響を調べた。さらに、2種類の毒素の組合せに曝露した細胞の増殖反応を調べた。本研究では、4種類の毒素、T-2 毒素、ジアセトキシシルペノール (DAS)、ニバレノール (NIV)、デオキシニバレノール (DON) を対象とした。試験した4種類のトリコテセン類すべてが、マイトジエン誘導リンパ球増殖を効果的に阻害した。女性と男性の血液提供者由来のリンパ球の間で、これらの毒素に対する感受性に、統計的に有意な差はなかった。IC₅₀ 値の範囲として評価した、感受性の個体変動は、比較的限られていた (3-4 倍以内)。ヤマゴボウ刺激ヒトリンパ球による免疫グロブリン生産も効果的に阻害され、その IC₅₀ 値は、DON と NIV における増殖試験での IC₅₀ 値と近かった。しかし、T2 に曝露した培養細胞の Ig 合成における IC₅₀ 値は、増殖試験において対応する IC₅₀ 値よりも約 2-3 倍高かった。低レベルの曝露では、試験した 5 人の提供者のうち 4 人に由来するリンパ球培養細胞において、Ig 生産の増加が観測された。この効果は、IgA 合成において最も顕著であった。NIV と T2, DAS あるいは DON の組み合わせにより、リンパ球増殖試験において加算的な毒性が生じたが、DON と T2 あるいは DAS の組合せでは、個々の毒素による阻害から予想されるより阻害の程度がわずかに低くなった。結論として、試験したトリコテセン類は、ヒトリンパ球における増殖と Ig 生産を用量依存様式で阻害し、感受性の個体変動は限られていた。低用量の毒素に曝露した培養細胞では、Ig 生産の増加が観測された。2種類の毒素を組合せて曝露させることにより、主に加算的あるいは拮抗的効果が生じたが、相乗的効果は排除できず、さらなる研究が必要である。これらの知見より、リスク評価において A 型と B 型のトリコテセン類の全摂取量を考慮する必要があることが示された。

ボミトキシン（デオキシニバレノール）汚染小麦給餌実験：ブタ、ニワトリ、および乳牛におよぼす影響

3種の家畜を使った栄養学・毒物学実験により、ブタの飼料摂取量と体重増の減少が、たとえば DON 2 mg/飼料 kg すなわち 2 ppm という低ボミトキシン（デオキシニバレノール、DON）飼料摂取の主な影響であることが分かった。

本給餌実験が示唆するように、ブタは 2 mg/飼料 kg までの DON を摂取しても強い悪影響はない。ニワトリは少なくとも DON 5 mg/飼料 kg に耐えられる。事実、DON 5 mg/飼料 kg までの濃度では、ニワトリに対する有益な影響も見られた。乳牛では、まぐさを自由に与えながら DON 6 mg/kg を含有するコムギ - エンバクを 1 日当たり体重の 1%を与えると飼料摂取がわずかに減少した。カナダ穀類に関する過去 3 年間の調査では、カナダ東部のコムギの DON 含有量（最大 8.5 mg/kg）は家畜の拒食、嘔吐および生殖問題を説明できるだけの濃度ではなかった。コムギの DON 濃度が最高であっても配合飼料のコムギの割合は最大約 70~80%であるというのが、この結論の論拠の一部である。したがって、家畜に与える飼料の実際の DON 含有量はそれよりずっと低い。

デオキシニバレノール汚染硬質赤冬小麦のエビ飼料としての利用

小麦はタンパク質源およびエネルギー源ならびに水安定性を促進する栄養結合剤としてエビ飼料に使われる。しかし、成長期に高湿度条件が続くと、コムギはデオキシニバレノール (DON またはボミトキシン) に汚染される可能性がある。デオキシニバレノール汚染小麦をエビ飼料に加え、DON レベルを 0.2、0.5 および 1.0 ppm とした。太平洋白エビ *Litopenaeus vannamei* が満足するまで飼料ペレットを毎日 3 回与えた。生物学的指標（生体重、週間体重増、飼料転換比および生存率）を隔週 16 週間測定した。生育 8 および 16 週間後のサンプルからエビの組織学的特徴を測定した。高速液体クロマトグラフィーにより、小麦粉、粉碎飼料、ペレット、冷凍乾燥エビの DON 濃度を測定した。飼料中の 0.2、0.5 および 1.0 ppm のデオキシニバレノールにより、エビの体重と成長速度は有意に減少した。しかし、0.2 および 0.5 ppm の DON の効果は成長後期に現れ、0.2 ppm の DON は成長速度だけに有意の効果を及ぼし、体重には影響しなかった ($P<0.05$)。0.2、0.5 および 1.0 pm の DON を含有する餌をあたえたエビの飼料転換比と生存率は対照飼料 (DON 0.0ppm) を他与えたエビと有意差はなかった。成長 16 週間後には、冷凍乾燥エビには DON は検出されず、いろいろなレベルの DON を含有する飼料を与えたエビの器官の組織学的観察結果には一貫した差異は見られなかった。試料の DON レベルが低くてもエビの体重と成長速度は有意に低下しうるので、飼料成分を監視して DON に留意するべきである。

マウス体液性免疫に及ぼすデオキシニバレノール(ボミトキシン)の影響

離乳雄スイス・ウェブスター マウス群に対し体重 kg 当たり平均 0.75、2.5、7.5mg のボミトキシンを強制経口投与し、免疫系に対するボミトキシン(デオキシニバレノール; DON)の影響を検討した。本試験では非投与対照群及び溶媒対照群(プロピレン・グリコール、エタノール及び蒸留水が 4:1:5)も検討した。ヒツジ赤血球(SRBC)に対する血清抗体(IgM)値は対照群に比し投与群で有意に低下した。プラーカ形成細胞(PFC)数も対照群より投与群で低値を示した。さらに、0.75mg/kg のボミトキシン投与では対照群の場合より、アルブミン、アルブミン/グロブリン比が有意に増加し、 α -2 グロブリン分画が低下した。上記群の全動物で 7.5mg/kg ボミトキシン投与後 3 週以内に、毒性による死亡を認めた。上記予備試験の所見により、ヒトに重篤な結果を生じうるボミトキシンの免疫系に対する作用の可能性が示唆された。

マウス体液性免疫及び細胞性免疫に及ぼすデオキシニバレノール (ボミトキシン)の影響

一連の独立した 4 試験において、近交系雄イス・ウェブスター マウスに対するボミトキシン(デオキシニバレノール; DON)の準致死量(0.00、0.25、0.50 及び 1.00mg/kg b. w. /day)投与後の体液性免疫、細胞性免疫及び血清蛋白質に及ぼす影響を検討した。ボミトキシンを基礎食に添加し(検出限界未満、食餌 g 当りボミトキシン<0.05 μg)、生後 21 日から 5 週間、マウスに投与した。第 2 試験では、5 週間のボミトキシン投与後 40 日間基礎食を与えた。

1.00mg/kg のボミトキシン投与後、対照群に比し、有意に血清中 α_1 及び α_2 -グロブリン値が低下した他、総血清アルブミン增加および食餌摂取量低下並びに体重増加を認めた。ボミトキシン 0.50mg/kg 投与後、血清中 α_2 -及び β -グロブリンの有意な低下が認められる一方、第 4 週のみ有意な食餌摂取低下を認めた。同様に、本マウス群における体重増加は第 2 週に有意に抑制されたが、第 3 週で正常値まで上昇し、第 4 週及び第 5 週で対照群と並行関係を示した。ボミトキシンの両値(0.50 及び 1.00mg/kg)とも対照群に比し、*L. monocytogenes* 添加後の死亡までの時間が用量関連性に短縮し、マイトジエンであるフィトヘムアグルチニン P(PHA-P)刺激の脾臓リンパ球培養の増殖能を高めた。ボミトキシン 0.25mg/kg は、検討項目に対し有意な影響を示さなかった。上記及び過去の免疫学的試験に基づき、マウスにおける免疫学的影響に関する「影響なし」の合理的推定値は 0.25~0.50mg/kg b. w. /day であると思われる。

一次培養ラット肝細胞における食品カビ毒、天然食品添加物および天然香料の細胞毒

ラット肝細胞の一次培養を生体異物細胞毒評価の通常代替モデルとして使った。細胞損傷は、 $0.01\sim2.50\ \mu\text{mg}/\text{mL}$ のいろいろな食品カビ毒、 $0.02\sim7.50\ \mu\text{mg}/\text{mL}$ の天然食品添加物と天然香料に 24 時間暴露した 4 時間培養における一連の酵素および機能指標により評価した。培養において、LDH、AST および ALT の漏出評価により細胞毒は明らかであった。LDH、AST および ALT は有意に増加した ($p<0.05$) が細胞内タンパク質と細胞生存率は有意に減少した ($p<0.01$)。上記において、細胞変性効果は明らかに用量依存的上昇を示した。試験した天然生体異物の細胞毒性効果は明らかに用量依存的に発生し、次の順であった：アフラトキシン B₁ > ルテオスカイリン > フモニシン B₁ > デオキシニバレノール、ケルセチン > ケンフェロール > グリチルリジン > カフェイン、サフロール > ヒペリシン > クマリン > ベルベリン > サントニン > β -アサロン > アリシンまたはアロイン。本研究において、細胞毒濃度の閾値は次の通りであった：アフラトキシン B₁ $0.01\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、フモニシン B₁・ルテオスカイリン・デオキシニバレノール $0.05\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、サフロール $0.10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、ケンフェロール・ケルセチン・クマリン・ヒペリシン・ベルベリン $0.50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、グリチルリジン・ β -アサロン・サントニン $1.50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、そしてカフェイン $7.50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 。アリシンとアロインの細胞毒効果は同濃度では他の天然香料ほど顕著ではなかった。さらに、LDH の漏出は用量 $7.50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ではわずかに増加した。上記の知見も示唆する通り、培養ラット肝細胞の代謝完全性の尺度は天然生体異物細胞毒性評価の特異な尺度の敏感な指標であり、たとえば次のものがある：LDH、AST および ALT の漏出、細胞内タンパク質量、細胞生存率および培養ラット肝細胞の細胞変性効果。これらにより後期の細胞損傷を検出できる。

ラットにおけるデオキシニバレノール・マイコトキシン（ボミトキシン）の胎児毒性効果

抄録無し

ボミトキシン：穀物における自然発生並びにブタに対する拒絶要因 及び催吐因子としての重要性

50例の 12,13-エポキシトリコテセンが文献で報告されている。そのうち世界的に穀物で自然発生を認めているのはジアセトキシシルペノール, T-2 toxin、ニバレノール及びボミトキシンである。ボミトキシンは *Gibberella zaeae* の成長に有利な高湿度の涼しい天候条件下、収穫前のトウモロコシの穂に発生する。この種のボミトキシンが含まれる可能性のある感染トウモロコシは、ブタが示す拒絶因子及び催吐因子と関連する。

Fusarium 汚染トウモロコシから得られる催吐因子の単離

ブタの嘔吐の原因となるマイコトキシンを、フザリウム汚染の飼料用トウモロコシから単離した。上記化合物は、トリコテセン(3, 7, 15-トリヒドロキシ-12, 13-エポキシ-トリコテ-9-エン-8-オン)として一定割合で同定され、慣用名はボミトキシンである。

ブタおよびラットにおけるトリコテセン添加トウモロコシの許容性

ブタおよびラットは、T-2 トキシン又はジアセトキシシルペノールのいずれか 40ppm 添加トウモロコシの摂取量について同様の反応因子(動物が摂取する非汚染トウモロコシ平均消費量当たりの動物が摂取するトリコテセン添加トウモロコシの平均消費量)を示した。ボミトキシン 40ppm 含有トウモロコシに対するラットの反応因子は、T-2 トキシンまたはジアセトキシシルペノール 40ppm 含有トウモロコシの 1.8 倍であった。ボミトキシン 40ppm 含有トウモロコシに対するブタの反応因子はラットの反応因子より 1.8 倍高かった。

北ベトナムにおける飼料用トウモロコシ中の *Fusarium* 由来毒素およびアフラトキシン B₁ の自然同時発生

ベトナム、ハノイの複数地域で 1993 年収穫のトウモロコシから 1994 年に無作為抽出した 32 の標本について、*Fusarium* 属のマイコトキシン(トリコテセン及びフモニシン)及びアフラトキシン B₁(AFB₁)の自然発生を検討した。最初にトウモロコシ標本を微粉末に粉碎し、メタノール水(3:1)で抽出し、その抽出物を用いてトリコテセンの同時分析を実施した。すなわち、ニバレノール(NIV)、デオキシニバレノール(DON)及び T-2 トキシン(T-2)をガスクロマトグラフィ/質量分析(GC/MS)で、フモニシン B₁(FB₁)、B₂(FB₂)及び B₃(FB₃)を蛍光検出器付高速液体クロマトグラフィ(HPLC)で、AFB₁をモノクローナル抗体使用 ELISA キットにより分析した。その結果、15 種のトウモロコシの穀粒標本のうち 14, 8, 4, 3, 2 標本が各々、AFB₁、FB₁、FB₂、FB₃、NIV 陽性を示し、平均値は各々 28, 1, 101, 276, 232, 858ppb で、DON と T-2 のいずれも検出されなかった。その他のトウモロコシ粉末標本中 13, 15, 12, 10, 4, 2 標本が各々、AFB₁、FB₁、FB₂、FB₃、DON、NIV 陽性を示し、平均値は 30, 780, 289, 176, 3, 170, 1,365ppb で、T-2 は検出されなかった。

この陽性率及び生菌数はその他の報告で示される数値の範囲内にあるが、*Fusarium* 属由来の毒素(NIV, DON 及びフモニシン)及び *Aspergillus* 毒素(AFB₁)が北ベトナム生産のトウモロコシから選択された標本に同時に自然汚染していた。

中国肝癌多発地域海門におけるトウモロコシのマイコトキシン複合汚染調査

1993年、中国の Penlai (Sandong) および Haimen (Jiangsu) の各々で、原発性肝臓癌の低リスク及び高リスクの収穫トウモロコシ 80 標本のアフラトキシン B₁、フモニシン及びトリコテセンの自然発生について検討した。Haimen 地域では、アフラトキシン B₁、フモニシン B₁、B₂、B₃、デオキシニバレノール陽性の標本数は各々、37(平均値 24.0 ppb)、37(平均値 5.11 ppm)、25(平均値 2.02 ppm)、25(平均値 1.12 ppm)、40(平均値 0.89 ppm) であった。Penlai 地域で陽性のトウモロコシ穀粒標本数は 13 で、そのうちアフラトキシン B₁、フモニシン B₁、デオキシニバレノール陽性標本は各々、12、2、9 であった。但し、上記 Penlai 標本にフモニシン B₂ と B₃ はいずれも認めなかつた。その他のトリコテセンとして、Haimen の 1 標本にのみニバレノールが検出されたが、本調査のトウモロコシ全標本に T-2 トキシンを認めなかつた。上記結果により、中国のトウモロコシではアフラトキシン B₁、フモニシン及びデオキシニバレノールの複合汚染が広く認められることが示唆される。さらに、Haimen におけるアフラトキシン B₁ とフモニシンの同時自然発生の陽性率は、Penlai におけるものより高かつた。その結果から、中国で原発性肝臓癌発症率が高い地域での腫瘍リスク要因は、アフラトキシン B₁ およびフモニシンの複合汚染と関連することが示唆される。

T 細胞インターロイキン産生と IgA 分泌に及ぼすボミトキシン（デオキシニバレノール）の *in vitro* 効果

自然発生する毒素ボミトキシンが血清免疫グロブリン A (IgA) 上昇及び IgA 腎症を誘発する機構の可能性をマウスにおいて判定するため、リンパ球培養液をボミトキシンに曝露させた。パイエル板及び脾から調製したリンパ球培養液をボミトキシン 10~1000ng/ml に曝露させたところ、DNA 合成、蛋白合成及び IgA、IgG 及び IgM 産生が抑制された。精製 B 細胞をボミトキシン存在下で培養後、同様に IgA、IgG 及び IgM 産生抑制を認めた。しかし、ボミトキシン及びマイトイジエンであるコンカナバリン A (ConA) への 24 時間パルス併用曝露では、マイトイジエンのみに曝露した対照である T 細胞を B 細胞と共に培養した場合に比べて、CD4⁺/CD8⁺細胞を B 細胞と共に培養した場合、3 倍~5 倍の IgA の産生増加可能となった。但し、IgG 及び IgM について同様の結果はみられなかった。ConA 及び毒素への 48 時間パルス曝露を行った場合、CD4⁺細胞は同様に、B 細胞による IgA 産生の有意な増加を生じさせた。CD4⁺細胞を ConA 及びボミトキシンに 48 時間パルス曝露させ、5 日間培養したところ、ConA 刺激のみの CD4⁺細胞より有意にヘルパー T 細胞産生のサイトカイン IL-4、IL-5、IL-6 の産生が増加した。上記結果から、ボミトキシンには CD4⁺媒介の B 細胞による IgA 産生を強化可能であることと、また、この作用がサイトカイン産生増加により媒介される可能性が示唆される。

Fusarium 由来マイコトキシンであるネズミチフス菌に対する変異原性の欠如

8種の Fusarium 属の毒素の変異原性(モノ-, ジ-およびトリアセトキシシルペノール、T-2 トキシン、デオキシニバレノール、3-アセチル-デオキシニバレノール、ゼアラレノン及びモニリホルミン)及び 2 種の陽性対照(アフラトキシン B₁ 及びステリグマトシスチン)のヒスチジン要求性 *Salmonella typhimurium* (ネズミチフス菌)(TA 98、100、1535 及び 1537)に対する変異原性を代謝活性あり及びなしで検討した。アフラトキシン B₁ 及びステリグマトシスチンとも *S.typhimurium* に対する変異原性を示したが、8種の Fusarium 属の毒素はいずれも変異原性を示さなかった。T-2 トキシンとジアセトキシシルペノールでの変異原性の欠如は、*in vivo* 発癌性試験で得られた陰性結果を裏付けるものである。その他 4 種の試験対象 12, 13-エポキシトリコロテセン類及び、ゼアラレノン並びにモニリホルミンのいずれも変異原性を認めなかつたが、慢性毒性の詳細報告が得られなかつたため、*in vivo* 試験との相関性を認めるまでに至らなかつた。

カビ毒関連疾患の疫学

ヒトの疾病の多くはかび毒への暴露に起因すると示唆されている。しかし、そのような疾病の多くについて、暴露と疾病の因果関係を確立する疫学的データはない。本章の目的は、特定のカビ毒暴露をヒトかび毒症に関連付けるデータを見直しかび毒が関係する疾病的理解を改善しうる道筋を提案することである。我々は特にかび毒暴露測定改善の可能性と将来の疫学的研究の戦略を考察する。疫学的データは Hill (1965 年) の原因基準に照らして考慮する。重要と考えられる基準は、(1) 異なる研究法と対象人口を使って繰り返し観察された関連、(2) 想定される原因が効果に先行した証拠、そして (3) 暴露があった場合、疾病的相対的リスクにより測定した強い関係の証拠。さらに、かび毒量の増加に伴い疾病発生率または重篤度が増加することを示す文献から用量反応関係を探した。これら基準採用の前提条件として、疾病的他の原因との混同は分析において排除されていると仮定した。一連の事例ではこの形式の論拠は提供できない。事例では暴露なしの疾病発生、疾病発生がない場合の暴露を測定できず、混同を補正できない。暴露レベルが異なるいろいろな地域または暴露が変動（生態学的研究）した場合には時間経過における疾病発生率を比較した研究は、関係を示唆するとみなされた。しかし、地理的時間的に変化する他の原因因子による混同は、そのような研究において排除することが非常に困難である。それゆえ、事例管理にしても集団にても解析研究は疾病関係を最も強く示す証拠とみなされた。無作為実験において、疾病発生率が介入の影響を受け暴露が減少することを示す証拠を見たいものであるが、この証拠は想定されるいかなる関係のもなかつた。

RAW 264.7 マウスマクロファージ細胞株におけるトリコテセン系マ イコトキシンであるボミトキシンによる IL-1 β 、IL-6 および TNF- α 分泌と mRNA 発現の調節

過去の報告で、マウスのボミトキシン(VT)経口曝露によりマクロファージ活性関連のサイトカイン数種の遺伝子発現強化が示されている。本報告ではマウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 における *in vitro* での VT 曝露によるサイトカイン分泌と mRNA 発現に対する影響を判定した。上清について酵素免疫測定法(ELISA)を実施したところ、リポ多糖類(LPS)活性化あり又はなしのいずれにおいても、VT 100ng/ml 及び 250ng/ml 曝露 2 日後に腫瘍壞死因子- α (TNF- α)分泌の有意な増加を認めた。VT は LPS が存在しない場合は IL-6 分泌に影響しなかつたが、LPS 存在下、VT 250ng/ml 暴露の 1,2, 5 日後、培養上清に有意な IL-6 産生増加を認めた。対照又は VT 投与細胞培養液において、LPS 活性あり又はなしのいずれにおいても可溶性 IL-1 β は検出されなかつた。フローサイトメトリー分析を並行実施する細胞内サイトカインの免疫化学染色により、陽性細胞割合及び細胞当たりの産生量に対する VT の作用を検出した。細胞内 TNF- α を產生した細胞の割合は、LPS あり又はなしの条件下、VT 100 及び 250ng/ml で有意に増加し、細胞当たりの IL-6 産生については、LPS 存在下、100 及び 250ng/ml VT で増加を認めた。サイトカインでの mRNA 発現に対する VT の作用を評価するため、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法(RT-PCR)にサザンハイブリダイゼーションを組み合わせ、RAW 264.7 細胞を半定量的に分析した。LPS なしで、VT 100 及び 250ng/ml 投与 6 時間及び 24 時間に TNF- α の mRNA 上昇を認めた。VT 存在下では、LPS を添加した場合、TNF- α の超誘導を認めなかつた。LPS 存在下、VT 100 及び 250ng/ml 投与 24 時間後に IL-1 β 及び IL-6 mRNA 増加を認めた。上記結果により、VT はマクロファージ培養液中のサイトカイン分泌及び mRNA の両者を超誘導することが実証された。

ラットへのデオキシニバレノール投与後の代謝における腸微生物の役割

1. 対照ラットへのデオキシニバレノール(DON)の経口投与により、尿及び糞便中の de-epoxy 代謝物の出現が生じた。
2. 腸内の微生物叢除去のため抗生素質を投与するラットに DON を投与したところ、糞便又は尿中の de-epoxy 代謝物としての放射活性の排出はほとんどなかった。
3. 腸内容物を厳格に嫌気的に調製し DON と培養したところ、24 時間の培養時間中に de-epoxy DON の漸進的な出現を認めた。
4. 肝ホモジネートと DON を培養したところ、de-epoxy DON 代謝物の出現は認めなかつた。
5. 上記結果により、DON 経口投与後、ラット糞尿中に de-epoxy DON を認めるのは、腸内微生物による代謝の結果であることが示される。

ボミトキシン急性曝露マウスから単離したパイエル板細胞の IgA 分泌強化における IL-5 と IL-6 の役割の可能性

マウスへのボミトキシン(VT)の食餌曝露により、血清 IgA および IgA 腎症が急増した。上記 IgA 調節異常におけるサイトカインの考えられる役割を評価するため、B6C3F1 雄マウスへ VT を 0, 5 又は 25mg/kg BW 単回経口曝露したことによる、パイエル板(PP)及び脾細胞培養液中の IgA およびサイトカイン産生に対する影響を検討した。マウスから調製した PP 細胞培養液中で、VT への経口曝露の 2-24 時間後、IgA 値は有意に増加し、ホルボールミリスチン酸アセテート(PMA)及びイオノマイシン(ION)又はリポ多糖類(LPS)による刺激を受けた。脾細胞培養液では IgA 産生に対する有意な作用は認められなかった。IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 などのサイトカインは IgA 産生を促進することが明らかなため、これら媒介物の PP 及び脾培養液中での分泌に対する、同一 VT 曝露レジメンの作用を判定した。上清での IL-2 と IL-4 の値は、動物に対する VT 前投与の影響を受けなかった。対照的に、PMA+ION 曝露あり及びなしの条件下、VT 曝露 2 時間後に得た PP 細胞を 7 日間培養中に IL-5 値は有意に上昇したが、その他の培養液中では上昇しなかった。VT 曝露 2 及び 24 時間後に PP から調製した LPS 添加培養液中で IL-6 値は有意に上昇した。IL-6 値は、VT 曝露の 2 時間後に脾から調整した PMA+ION 又は LPS 添加培養液中でも有意に上昇したが、24 時間後に上昇は認めなかった。*in vitro* での IgA 急増における IL-5 又は IL-6 の役割を評価するため、VT 25mg/kg 曝露の 2 時間後に得たマウスの PP 及び脾細胞を、サイトカイン中和抗体(Abs)存在下で培養し、IgA 産生をモニタリングした。以前に報告された IL-5 の IgA 産生における役割を裏付けるものとして、PMA+ION 又は LPS 存在下、対照及び VT 曝露 PP 又は脾細胞の培養液中で、抗 IL-5 は IgA 値をバックグラウンド値より低下させた。同様の結果が抗 IL-6 の添加でも認められた。LPS 存在下、VT 曝露マウス由来の PP 細胞及び脾細胞を PMA+ION と培養し、抗 IL-2 抗体を添加したところ、IgA はより僅かな程度で低下した。このように、VT への単回経口曝露早くも 2 時間後、遅くとも 24 時間後に、リンパ球中に IgA 産生增加の可能性があり、これは T 細胞及びマクロファージ起源のヘルパーT 細胞産生サイトカインの作用増加が関連すると思われる。総じて、この結果により、マウスの VT への経口曝露後の IgA 分泌の上流制御は部分的に、サイトカイン発現の超誘導によることが示唆される。

ボミトキシン急性経口曝露後のパイエル板培養による IgA と IL-6 產生增加におけるマクロファージの役割

マウスにボミトキシン (VT) を経口曝露したところサイトカイン遺伝子発現が促進され、IgA 產生および IgA 腎症が増加した。これらの事象におけるマクロファージ (Mφ) の潜在的役割を確定するために、0 または 25 mg/kg 体重の VT を経口投与後 2 時間経過したマウスからパイエル板 (PP) と脾細胞を調製して *ex vivo* モデルを作成し、培養後に IgA およびサイトカイン IL-6 產生について評価した。共刺激非存在下、またはホルボールミリストートアセテートおよびイオノマイシン (PMA+ION) かリポ多糖類 (LPS) のいずれかの存在下で培養された場合、投与群マウス由来の PP と、幾分少なくはあるが脾細胞の双方とも対照群と比較し 7 日間の IgA 產生が増加し、IgA 上昇は LPS 処理した培養物において最も顕著であった。VT の作用は、Mφ を枯渇させた PP 培養物において完全に消失したが、Mφ を枯渇させた脾細胞培養では消失しなかった。同様に VT 曝露により IgA 分泌に重要なヘルパー因子である IL-6 の產生も、LPS 刺激された PP と脾細胞培養において増加した。IL-6 产生も Mφ 枯渇により消失した。また、VT 投与動物由来の Mφ を枯渇した PP 細胞を VT 投与動物由来の腹腔 Mφ と共に培養した場合に IgA と IL-6 の両產生が増加したことにより、Mφ の共刺激役割の可能性も示唆された。同様の作用が、精製した PP の B 細胞と腹腔 Mφ を用い類似の *ex vivo* 手法を使用した場合に観察された。対照動物由来の PP の B 細胞も、VT 投与動物由来の脾 CD4⁺ 細胞を用い共培養した場合に IgA の分泌が上昇したことから、既に試験で証明されている T 細胞が IgA 產生の増加に寄与することも確認した。VT 处理された Mφ から分離された PP 細胞の培養物において IgA 產生を測定した場合、このプロセスでは可溶性伝達物質および細胞接触の潜在的役割が示唆される。総合すると、今回の結果とこれまでの結果から VT 曝露マウスの IgA 产生と IgA 腎症の増加において Mφ が重要な機械的役割を果たしていることが示唆される。

自然罹病穀類中の毒性物質に関する研究（第3報）

新赤カビ毒 : Deoxynivalenol および Deoxynivalenol Monoacetate
の急性毒性作用

デオキシニバレノール (I) およびそのモノアセテート (II) の急性毒性に対し、新規の *Fusarium roseum* (菌株 No. 117) 由来トリコテセン系マイコトキシンについて調査を行い、その結果として得たデータをニバレノール (III) とフサレノン (IV) のデータと比較した。

(1) 腹腔内投与した DDY マウスにおける I、II、III および IV の LD₅₀ 値は、雄ではそれぞれ 70、49、6.9、5.6 mg/kg であり、雌ではそれぞれ 77、47、6.2、5.2 mg/kg であった。経口投与では雄マウスの LD₅₀ 値は、I については 46 mg/kg、II については 34 mg/kg、IV については 5.5 mg/kg であった。毒素を投与したマウスの急性症状は、胃腸管出血および精巣のうつ血を伴う著しい拡張が認められた。

(2) C4 ヒドロキシ基を欠損するデオキシニバレノール (I および II) では、この官能基を有するあらゆる既知のトリコテセンと比べて、マウスに対する毒性は低かった。この事実は、C4 ヒドロキシ基が哺乳動物に対するトリコテセンの毒性に重要な役割を担っている可能性を示唆する。

(3) 10 日齢の雛アヒル (Pecking ducklings) の皮下投与の LD₅₀ 値は、I については 27 mg/kg、II については 37 mg/kg であった。両毒素の最小の嘔吐誘発量は約 10 mg/kg であった。

(4) イヌにおける嘔吐および下痢の I と II の最小皮下投与量はそれぞれ 0.1 および 0.2 mg/kg であった。用量と最初および最後の嘔吐時期との関連性、用量と嘔吐頻度との関連性が注目された。

(5) 4 種類の毒素は原生動物、*Tetrahymena pyriformis* W および哺乳動物の培養細胞に対する注目すべき細胞毒性を示した。同期分割のテトラヒメナ細胞における I、II、III および IV の中央抑制投与量は、それぞれ 4.6、29.0、8.8 および 5.0 μg/ml であった。

動物におけるデオキシニバレノール（トリコセテン・マイコトシキ
ン）からの新しい代謝体の構造

抄録無し

泌乳牛の生態液体におけるデオキシニバレノールの完全酸化代謝体

DOM-1 の確認

抄録無し

若ブタのトウモロコシ飼料中のボミトキシン¹

若ブタを用いた 4 件の試験を実施し、ボミトキシン汚染トウモロコシの飼料中レベルが及ぼす機能状態への作用や病理学的作用を評価した。飼料中レベル約 20 ppm のボミトキシンにより嘔吐を引き起こし、ボミトキシン 12 ppm ではほぼ完全な拒食を、1.3 ppm では重大な摂取量および体重増加率の低下を引き起こした。飼料中レベル 43 ppm 以下のボミトキシンを 21 日間与えたブタでは、ボミトキシンに起因する病変は認められなかった。ボミトキシン投与群に関し血清特性に多様な変化が観察されたが、その作用が低摂取量に起因するものと切り離すことはできなかった。

化学的および物理的処理による汚染コムギにおけるデオキシニバレノールの飼料中濃度の低下

約 $1 \mu\text{g/g}$ のデオキシニバレノール (DON、ボミトキシン) に自然汚染された米国オンタリオ州のソフトホワイトフュコムギは多様な水溶性試薬や気体試薬により処理されていた。調査を行ったこれらの試薬のうち、水溶性亜硫酸水素ナトリウムの作用により DON 飼料中レベルが大幅に減少したが、その低下の程度は濃度と接触時間に依存性であった。亜硫酸水素塩で処理したコムギから製粉された小麦粉は、DON 含有量は低量 (原料の約 5%) に過ぎなかった。しかし、この小麦粉を焼いた多様な製品になると、DON スルホン酸塩中間体のアルカリ加水分解により DON 含有量は未処理コムギの場合より 50~75% 増加した。生地の流動特性への有害作用により、使用された処理用量 (小麦粉 1 kg 当たり 10% の SO_2 (w/w) の当量を含有する水溶液 33 ml) から得られた小麦粉は商業用途に適さない。純粋 DON と水溶性亜硫酸水素塩との反応は室温で急速に生じたが (10% の SO_2 当量存在下において半減期 5.6 分)、DON は気体 SO_2 を用いた処理により影響を受けなかった。

マウスにおける $[^3\text{H}]$ ゼアラレノンのオートラジオグラフィ試験

雄マウス、卵巣摘出および妊娠の雌マウスについて $[^3\text{H}]$ ゼアラレノン注射投与後に全身のオートラジオグラフ撮影したところ、放射能は急速に胆汁および尿へ排出されることが明らかとなった。子宮、精巣間質細胞、卵巣卵胞などのエストロゲン標的臓器に特異的局在化が認められた。自然エストロゲンと異なり、ゼアラレノンやその代謝物は副腎皮質および肺の気管支には認められなかった。胸膜腔と腹膜腔中の流体排出量の放射能検出により、ゼアラレノンの作用部位がほかにあることが示唆される。使用した妊娠マウスでは、放射能は妊娠後期の胎児においてのみ検出され、主に腎、胆汁、結合組織に認められた。

ラットおよびヒトリンパ球増殖誘導に及ぼすデオキシニバレノール、

3-アセチルデオキシニバレノールおよびゼアラレノンの阻害作用

デオキシニバレノール (DON)、3-アセチルデオキシニバレノール (アセチル DON) およびゼアラレノン (Ze) がマイトジエン誘導性リンパ球幼若化に及ぼす *in vitro* 作用について、ラットまたはヒトの末梢血リンパ球 (PBL) を用い試験を行った。各々のマイコトキシンについてリンパ球増殖の用量依存的減少を実証した。しかし、DON の阻害作用はアセチル化化合物の場合より有意に高かった。90 ng/ml および 220 ng/ml の濃度ではラットおよびヒトリンパ球幼若化をそれぞれ 50% 阻害したが、アセチル DON では同一の作用を生じるには 450 ng/ml および 1060 ng/ml を必要とした。幼若化を 50% 阻害するために必要な Ze の量は、DON の場合に必要とするよりも 250 倍高かった。細胞死の証拠はなく、予測した反応は DON と Ze の併用で変化しなかった。

大腸菌を用いた SOS スポット試験による、マイコトキシンの遺伝毒性作用の評価

真菌は毒性代謝産物である様々なマイコトキシンを产生し、これらのマイコトキシンは細胞毒性を発現するだけでなく(Moreau and Moss, 1979 年を参照)、動物実験では細菌系変異原性と発癌性を発現することも報告されている(Stark, 1980 年を参照)。ほとんどのマイコトキシンは、自然発生の環境汚染物質としてヒト食料や動物飼料を汚染することから(Rodricks et al., 1977 年)、現在では、その長期作用が非常に注目されている。

細菌試験によるマイコトキシン遺伝毒性評価については、既にいくつかの報告があるが、発癌性に関する研究では一致した見解が得られていない。我々は、20 種類の真菌産生物質を選択して、その遺伝毒性作用を評価し(表 1)、これらの真菌産生物の抗菌作用について報告した(Boutibonnes et al., 1984 年)。その研究では、Quillardet らが 1982 年に開発した独創的な試験法である、*sfiA::lacZ* 融合体を担持する大腸菌株 K12 を用いたプレート拡散法を用いて(Quillardet et al., 1985 年)、遺伝毒性を評価した。この比色分析法の機序は、細胞分裂制御に関与している *sfiA* 遺伝子の SOS 機能を、DNA 損傷性物質により誘導発現させるというものである(Huisman and D'Ari, 1981 年)。*sfiA* 遺伝子発現は、誘発された β -ガラクトシダーゼ活性を測定してモニターする。

スポット試験法。定性的スポット試験は、既発表論文に記載されている方法にしたがって実施し(Quillardet et al., 1985 年)、記述にしたがって直接作用剤(STA 培地)と代謝活性剤(STB 培地)を用いた。 β -ガラクトシダーゼの基質には 0.04mg/ml X-gal を用いた。Ueno らが 1976 年に、"rec-アッセイ"では PR トキシンとペニシリン酸が pH 依存的であると報告していることから、我々は化学物質の試験にわずかな修正を加えた: すなわち、寒天培地の pH を 1N HCl または 1N NaOH を添加して 6.0 または 7.0 に調整した; 薬剤添加と 37°C インキュベーションの間に、4°C にて 2 時間のインキュベーションを差し込んで実施することにより、寒天内の拡散状態がより良好となる。

サルモネラ／哺乳類ミクロゾームアッセイにおける植物性エストロゲンの変異原性の欠損

8種類の植物性エストロゲンの変異原性を、サルモネラ／哺乳類ミクロゾーム(またはエームス試験ともいう)アッセイ変法を用いて試験した。ゼアラレノンは、*Fusarium graminearum*(*Gibberella zae*)の穀物汚染によって產生されるマイコトキシンであり、ゼアラレノール異性体はゼアラレノンの還元誘導体である。この他の試験化合物は全てフラボノイドで、多くの植物に、特にマメ科植物に天然に高濃度含まれている。これらのフラボノイドのうち4種類はイソフラボン類であり(ダイゼイン、ゲニステイン、フォルモノネチン、ビオカニン-a)、5種類目はクメスタン類のクメストロールである。

各化合物について、プレートあたり 1~500 μg 範囲内のいくつかの濃度で試験を実施した。アロクロール 1254(PCB)誘導したラット肝臓からミクロゾーム分画を採取した。これらの化合物については、いずれの濃度においてもサルモネラ菌株 TA1538、TA98、TA100 に変異原性を認めなかった。

実際量のゼアラレノン投与後の雌ブタ生殖管における変化

ゼアラレノンは飼料に最も頻繁に自然発生するカビ毒の 1 つである。分析した 710 種類のサンプルのうち 13.9% に 1.0~1,725 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 濃度のゼアラレノンが存在した。

雌ブタへの投与実験が示した通り、250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 飼料のゼアラレノン投与により外陰部に赤色と膨らみができ、乳房が僅かに膨らみ、卵巣に多数の胞状卵胞といいくつかのう胞性卵胞ができた。飼料のゼアラレノン濃度が 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の場合は外部生殖管の症状は観察されなかった。しかし、外部生殖管ではこれらブタの卵巣の胞状卵胞は対照ブタの卵巣より頻発した。

ラットにおけるゼアラレノン長期発癌性試験と毒性試験

Fusarium 属が產生する真菌エストロゲンであるゼアラレノンを飼料添加して FDRL ウィスター系ラットに生涯にわたり摂取させ、その影響を検討した。ラットには対照飼料または一日あたりゼアラレノンを 0.1、1.0 または 3.0mg/kg 体重 添加した飼料を摂取させた。試験で使用したラットは、F0 親世代に同一量のゼアラレノンを交配前の 5 週間、交配時期、および妊娠期間中に摂取させて繁殖させて得た。ただし授乳期間中はゼアラレノンを摂取させなかつた。雄性ラットに 1.0 および 3.0mg/kg ゼアラレノンを摂取させると、対照群に比し、体重増加が有意に抑制された。試験期間中に 1.0 および 3.0mg/kg ゼアラレノンを摂取した雌性ラットで、散発的に体重減少が認められた。しかしながら、試験終了時には差がなくなつた。試験期間中および試験終了時に測定した血液学的検査、生化学検査、および尿検査の結果に関しては、試験群間で有意差は見いだされなかつた。雌性ラットでは試験終了時に、3.0mg/kg 摂取群で肝臓重量が有意に増加し、1.0 および 3.0mg/kg 摂取群では子宮重量が有意に増加した。これらの重量変化と、臨床的所見または形態学的所見に関連性はみいだされなかつた。高用量ゼアラレノンを摂取したラットでは、大腿骨骨隨骨増加の発生率が大きくなつた。骨髓骨の形成程度を 0 から 4 までのスコアで評価したところ、高用量摂取した雌雄性ラットは対照群ラットと比べてスコアが有意に高くなつた。特記すべき顕微鏡的所見はなく、ゼアラレノンに発癌作用は認められなかつた。

ラットにおけるゼアラレノンの二世代生殖催奇形性試験

ゼアラレノンの毒性を、二世代ウィスターラットを用いて約10ヶ月間試験した。ゼアラレノンを飼料に添加して投与し、全世代において、投与量は一日あたり0、0.1、1.0および10.0mg/kg体重とした。F0親世代を2回交配させて、F1A世代とF1B世代を繁殖させた。F1A世代を交配させてF2A世代を繁殖させた。剖検所見において、ゼアラレノン投与に関連があると思われる唯一の病変は、高用量投与ラットにおける大腿骨骨髄骨形成の増大であった。F1およびF1A世代の雌雄性ラットにおいて、甲状腺・下垂体・副腎の絶対重量と相対重量が用量依存的に増加した。このような内分泌器官の重量変化は、おそらくゼアラレノンのエストロゲン様作用に起因すると考えられる。ゼアラレノンの摂取により、繁殖率が低下し、生存同腹仔数が減少し、母体の黄体数・着床数・胎児吸収数が減少した。F1BとF2A1胎児において、特に1.0および10.0mg/kg摂取群で、骨格異常と軟組織異常の発生率に統計学的有意差が認められた。これらの異常は胎児の発育遅延を示している可能性が高い。明確な催奇形性は見いだされなかった。

Fusarium 毒および *Alternaria* 毒

Fusarium 種と *Alternaria* 種は、生植物のような高水分含量に適応している。穂軸として保存されるトウモロコシまたは間欠天日乾燥の際に起きるような乾燥がなければ、穀物はかびの増殖を支え続ける。果実と野菜は、その生育および保管段階でこれらのかびの増殖を支えうる。

本論文は、*Fusarium* 種及び *Alternaria* 種の既知の蔓延と保存食品におけるそのかび毒について吟味する。保存中のポテト、トマト、バナナおよび柑橘果実の *Fusarium* または *Alternaria* によるかび毒汚染が報告されている。これらかび毒の毒性効果を簡単に吟味する。最近の研究では、*F. moniliforme* による発がん性フモニシンの生産と食道がん発生との関係が注目されている。*A. alternata* による altertoxin を含むいくつかの代謝物の変異原性も特に懸念される。これら 2 種のかびは熱帯を含む世界中の食品作物に最も広く蔓延するかびの仲間である。栽培から保存までを想定して予期される通り、同じかびによるかび毒と他の二次代謝物の生産は大きく異なる可能性がある。その原因是環境要因とカビのニーズである。今後の研究では、保存環境が促進する二次代謝変化と保存環境中の微生物競合の性質に、より積極的に注目する必要がある。

トリコテセンボミトキシン（デオキシニバレノール）を経口摂取すると、パイエル板 B 細胞の IgA 分泌血漿細胞への終末分化が促進される

B6C3F1 マウスを使い、カビ毒ボミトキシン (25 ppm) の 8 週間経口摂取が免疫グロブリン (Ig) の生体外生産速度とリンパ細胞培養における IgA 分泌細胞の出現に与える影響を評価した。同投与法では、IgA:IgG 血清比は 2.4 であり対照では 0.4 であったことから、全身コンパートメントにおける IgA 生産の制御不能が示唆された。以前の毒投与試験では、パイエル板 (PP) の生存性や脾臓リンパ細胞培養への影響はなかった。ELISA 法で測定した IgA 生産量は、対照に比べ、2~11 日間培養した処理 PP と脾臓リンパ細胞より有意に多かった。生産レベルははるかに低かったが PP 培養における IgG 生産にも同様な傾向が認められた。処理マウスから新たに調製した PP および脾臓リンパ細胞には,ELISPOT 分析で測定すると、対照マウスに比べ IgA 生産細胞がそれぞれ 1.7 倍および 2.0 倍多かった。対照的に、2 日後には、コンカナバリン A (Con A)、LPS、および無刺激処理の PP 培養にはそれぞれ 10.9 倍、3.2 倍、および 12.4 倍多い IgA 分泌細胞があり、2 日間処理脾臓培養にはそれぞれ 4.0 倍、2.0 倍、および 3.5 倍多い IgA 分泌細胞があった。Con A 刺激培養では IgA と IgG の分泌は処理 T 細胞と対照 B 細胞を組み合わせると対照 T 細胞と対照 B 細胞を組み合わせる場合より有意に多かった。T 細胞に起因する Ig 分泌の増加は、細胞分裂促進因子の有無にかかわらず、LPS 刺激または無刺激 PP 再構築培養または脾臓再構築培養には観察されなかった。この結果は、経口摂取ボミトキシンが PP において IgA 分泌細胞の終末分化を促進する証拠である。このことと IgA 分泌細胞の全身コンパートメントへの移行により、主要血清タイプが IgG から IgA に替わりやすくなる。

Fusarium croockwellense が生産するカビ毒 (*)

本研究の目的は、*Fusarium crookwellense* の毒生産能力を評価して本種と *Fusarium graminearum* Schwabe (Ichinoe ら 1983 年、Marasas ら 1984 年、Logrieco ら 1988 年) に関して最近報告されたいいくつかのトリコテセン生産性株 (化学型) との分類学的 (化学分類学的) 関係を評価することである。*F. crookwellense* によるカビ毒生産については予備データがある (Bottalico ら 1988 年および 1988 年 a)。本論文では、いろいろな寄主と起源の *F. crookwellense* のいくつかの分離株のゼアラレノン (ZON, α -ZOH, β -ZOH) とトリコテセン (NIV と FUS) を生産する能力について徹底的に調べ報告する。