

食事小麦減少は英国成人の尿中デオキシニバレノールのレベルを低下させる

デオキシニバレノール (DON) は動物において嘔吐、飼料忌避、成長遅延を引き起こし、免疫系に影響を及ぼす。DON は小麦の普通の汚染物質であるが、個人レベルの曝露、従って如何なる関連健康影響を評価する検証済みバイオマーカーデータもない。免疫親和性 (IAC) クリーンアップ法および液体クロマトグラフィー (LC) -質量分析 (MS) 検出法を含む高頑健性尿中 DON アッセイの開発によって、(1)英国の個人における DON 曝露、および(2)尿中 DON レベルに対する小麦摂取介入の影響の評価が可能になった。英国からの志願者 25 人 (21~59 歳) が第 1 日および第 2 日に半重量食事スケジュールを守り (普通食)、第 3 日に朝の尿試料を提出した。第 3~6 日 (介入) の間、受検者は食事指針に従って主要な小麦摂取源を減らした。第 5 日および第 6 日にスケジュールを完了し、第 7 日にさらに朝の尿を提出した。IAC クリーンアップ法および LC-MS 法による分析の後、尿中 DON を測定した。小麦基準食物摂取 (平均 322g/日、範囲 131~542g/日) は介入期間中に 26g/日 (範囲 0~159g/日) に有意に ($P<0.001$) 減少し、良好なコンプライアンスを示した。第 3 日に採取した 25 の尿試料すべてで DON が検出された (幾何平均 7.2ng DON/mg クレアチニン、95%信頼区間 (CI) 4.9~10.5ng/mg) が、介入後に mg あたり 0.6ng (95%CI 0.4~0.9ng/mg) への 11 分の 1 の顕著な減少 ($P<0.001$) があった。これらのデータは、尿中バイオマーカーを用いて英国内の DON へのヒト曝露を実証している点で独特である。さらに、本研究は、食事中小麦を避けることによって曝露を明らかに減らすことができることを実証する。尿中バイオマーカーレベルに基づき、個人によっては現行の勧告一日 DON 摂取量を超えると予測され、従ってこれらの曝露の健康影響はさらに検討する価値がある。

英国人における尿中デオキシニバレノール量は穀類摂取量に相関する

背景：デオキシニバレノール（DON）はしばしば穀類を汚染する真菌の有毒な代謝物である。DON は動物に毒性を発揮するが、ヒトへの影響はあまりわかっていない。これは一部には曝露推定値の精度が低いからである。

目的：英国の成人を対象にした National Diet and Nutrition Survey を利用し、24 時間尿中 DON 排泄量を穀類摂取量と比較する。

方法：穀類低摂取群（1 日あたりの平均穀類摂取量 107g；範囲 88～125）、中摂取群（平均 179g；範囲 162～195）および高摂取群（平均 300g；範囲 276～325）に属する被験者 100 例を特定した。イムノアフィニティーカラムを用いた精製後の液体クロマトグラフィー質量分析にて、24 時間尿中の DON を定量した。

結果：300 尿サンプル中 296 サンプル（98.7%）で DON が検出された。穀類摂取量は尿中 DON に有意に相関し（ $p < 0.0005$ ）、低摂取群、中摂取群および高摂取群における幾何平均尿中レベルはそれぞれ $6.55 \mu\text{g}/\text{日}$ [95% 信頼区間 (CI) $5.71 \sim 7.53$]、 $9.63 \mu\text{g}/\text{日}$ (95% CI $8.39 \sim 11.05$)、 $13.24 \mu\text{g}/\text{日}$ (95% CI $11.54 \sim 15.19$) であった。多変量解析では、全粒パン（ $p < 0.0005$ ）、白パン（ $p < 0.0005$ ）、“その他” のパン（ $p < 0.0005$ ）、ロールパン/ケーキ（ $p = 0.003$ ）、高繊維質朝食用シリアル（ $p = 0.016$ ）、およびパスタ（ $p = 0.017$ ）が尿中 DON に有意に関連づけられた。単位摂取量あたりで尿中 DON 増加率が最大なのは全粒パンであったが、白パンのほうが摂取量が多いために尿中 DON レベルへの寄与は全粒パンの約 2 倍にもなった。

結論：英国の成人の大部分が DON に曝露されているらしく、我々は尿中 DON レベルに基づいて、一部の人々の DON 摂取量は欧州連合推奨最大耐容 1 日摂取量 $1,000\text{ng}/\text{kg b. w.}$ を上回ると推定する。このバイオマーカーは、監視戦略の一環としてのバイオモニタリングおよび DON およびヒト疾患リスクについての病因学的研究に役立つツールになる。

食品のカビ汚染とリスクアセスメント

アフラトキシンが発見され、食品のマイコトキシン汚染は国際的なリスクとなった。わが国では、2003年5月に食品安全基本法が制定され、内閣府に食品安全委員会が設置されて、食の安全を守るため、リスクアセスメントに取り組んでいる。食品におけるカビ汚染事例をみると、90年代から青果物のポストハーベスト病害、好乾性カビによる常温流通食品の事故、好冷・耐冷性カビによる低温流通食品の事故、耐熱性カビによるPETボトル詰め飲料・レトルト食品など加熱加工食品の事故が急増している。これらのカビによって産生されるマイコトキシンが食品から直接検出された場合は自然汚染といい、経口投与を主とする毒性試験・発癌性試験などと食品の調査に基づく汚染実態を根底にして、FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会(JECFA)がリスクアセスメントを行った後、規制が検討される。この作業は慢性毒性試験における無作用量(NOEL)を基本とし、これにヒトへの安全係数(通常 100)を見込んだものが耐容 1 日摂取量(TDI)として示される。国際規格化は FAO/WHO 合同食品規格委員会(CODEX)により進められ、最近ではアフラトキシン M₁, オクラトキシン A, デオキシニバレノール, T-2/HT-2 トキシン, パツリン, ゼアラレノン, フモニシン B などの TDI または最大基準値が議案になり、順次総会で規格基準が採択されている。わが国でもこれを受けて、デオキシニバレノール(暫定), パツリンの最大基準値が設定された。

トリコテセンによって誘導される白血球細胞傷害およびアポトーシスの TNF- α および Fas 活性化による増強

トリコテセン系マイコトキシンはリンパ組織におけるアポトーシス誘導によって免疫抑制を引き起こす。トリコテセン誘導白血球アポトーシスは細菌性のリポ多糖類 (LPS) によって増強されうるが、この増強作用に関与する機序は完全にはわかっていない。今回の研究目的は、トリコテセンであるデオキシニバレノール (DON、ボミトキシン) が LPS と直接、ならびに免疫/炎症反応に関係する他のメディエーターまたはアゴニストと相互に作用して初代培養マウス白血球にアポトーシスを誘導するという仮説を検証することであった。マウスの胸腺 (TH)、脾臓 (SP)、骨髄 (BM) およびパイエル板 (PP) に由来する初代白血球浮遊液を調製し、LPS、プロスタグランジン E₂ (PGE₂)、抗免疫グロブリン (抗原類似体)、デキサメタゾン、Fas リガンド、または TNF- α の非存在下または存在下で DON と共に培養した。MTT アッセイおよび形態学的アッセイにてそれぞれ細胞傷害性およびアポトーシスを評価した。DON は SP 培養物において LPS 誘導増殖およびデキサメタゾン誘導アポトーシスを阻害することが明らかになった。一方、抗 Fas 処理した BM 培養物および TNF- α 処理した TH 培養物では DON 誘導アポトーシスおよび細胞傷害の増強が認められた。薬理的阻害剤を利用して TNF- α による DON 誘導アポトーシスの増強を評価したところ、活性酸素種の生成、細胞内 Ca²⁺、p38/SAPK およびカスパーゼ-3 活性化の関与が明らかになった。総合するとこれらのデータは、LPS およびその下流メディエーターがトリコテセンと相互に作用し、白血球の増殖、細胞傷害性およびアポトーシスに関するトリコテセンの作用に組織特異的影響を及ぼすことを示す。

イムノアフィニティーカラムによる精製を伴う高速液体クロマトグラフィー-UV 検出法を利用した産卵鶏の卵へのデオキシニバレノールおよびデエポキシ-デオキシニバレノールの移行についての研究

デオキシニバレノール (DON) およびその代謝物であるデエポキシ DON の卵への移行はまだ十分に解明されていない。乾重量ベース DON 含有率 $11.9\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ のトウモロコシベース飼料を 16 週間産卵鶏に与える実験でこの問題を検討した。実験第 2、4、8 および 16 週に採取した卵の卵黄および卵白を凍結乾燥させ、そこに含まれる DON およびその代謝物であるデエポキシ DON の定量を行った。抱合体が生じる可能性を考慮し、抽出前にすべてのサンプルを β -グルクロニダーゼと培養した。アセトニトリル-水で卵黄および卵白の抽出を行い、抽出物を予備精製後にイムノアフィニティーカラム (IAC) で精製した。UV 検出を伴う高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にてこれらの毒素を定量した。凍結乾燥した卵黄および卵白における検出限界はどちらの毒素についてもそれぞれ 5 および $8\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ で、新鮮サンプル中ではそれぞれ約 2.5 および $1\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ に相当する。卵黄における DON およびデエポキシ DON の回収率はそれぞれ 80% および 78%、卵白ではそれぞれ 77% および 72% であった。どのサンプルにおいても、DON、デエポキシ DON および両物質のグルクロニド抱合体は検出できなかった。これらの結果は、ヒトの食物を通じた DON 摂取に卵が有意に寄与しないことを示す。

ヒト腸 Caco-2 細胞中の NF- κ B 活性化および IL-8 分泌に及ぼすデ オキシニバレノールの影響

デオキシニバレノール (DON) は、欧州および北米における作物中の最もありふれたトリコセセンマイコトキシンである。DON はヒト腸 Caco-2 細胞中のマイトジェン活性化蛋白質キナーゼ (MAPK) を活性化する。著者等は DON 摂取と腸炎症との間に関連があると考え、Caco-2 細胞を用いて、MAPK カスケード下流で作用する炎症仲介因子、すなわち核因子- κ B (NF- κ B) 活性化およびインターロイキン-8 (IL-8) 分泌に及ぼす、可能性のある腸濃度 (250～10,000ng/ml) の DON の効果を評価した。さらに、炎症を起こした腸上皮を模倣するために Caco-2 細胞を向炎症性刺激に同時曝露した。

10 μ g/ml の DON を用いるとそれぞれ 1.4 倍および 7.6 倍に達する NF- κ B 活性および IL-8 分泌の用量依存増加が観測された。阻害因子- κ B (I κ B) のリン酸化は DON レベル<0.5 μ g/ml で増加 (1.6 倍) した。Caco-2 細胞を向炎症性剤、すなわち 25ng/ml インターロイキン-1 β 、100ng/ml 腫瘍壊死因子- α または 10 μ g/ml リポ多糖類へ曝露すると NF- κ B が活性化され、IL-8 分泌が増加した。これらの刺激と DON との間に相乗効果的相互作用が観測された。

これらのデータは、DON が用量に依存して Caco-2 細胞中の NF- κ B 活性化および IL-8 分泌を誘導し、向炎症性刺激を受けるとこの効果が強調されることを示し、DON 曝露が腸炎症を引起すかまたは悪化させる可能性を示唆する。

食物中のマイコトキシンに関連する規制

これまでの経緯に基づく世界および欧州における展望

マイコトキシンの有害作用から消費者を保護するために、多くの国々がマイコトキシンに関する規制を設けている。マイコトキシンの規制値を決める意思決定プロセスにはさまざまな要因が影響を及ぼす。毒性学的データおよび発生データの利用可能性といった科学的要因、サンプリングおよび分析の可能性に関する詳細な情報、ならびに社会経済的問題がそうした要因に含まれる。2003 年末までに約 100 カ国（世界人口の約 85%をカバーする）が食物中のマイコトキシンについて具体的な規制または詳細なガイドラインを設けている。規制対象になっているマイコトキシンには、アフラトキシン（ B_1 、 B_2 、 G_1 および G_2 ）、アフラトキシン M_1 、トリコテセン（デオキシニバレノール、ジアセトキシシルペノール、T-2 毒素、および HT-2 毒素）、フモニシン（ B_1 、 B_2 、および B_3 ）、アガリン酸、麦角アルカロイド、オクラトキシン A、パツリン、ホモプシン、ステリグマトシスチン、およびゼアラレノンがある。欧州、特に欧州連合ではこの 10 年間で規制的見地および科学的見地からマイコトキシンへの関心が高まり、各国の自主的な活動が構造的ネットワーク的特徴を備えた EU レベルの活動に発展してきた。今ではマイコトキシンと食物との 40 種類の組み合わせに関するハーモナイズされた EU 規制値が存在する。2007 年にはこの数が 50 種類程度まで増えるものと予想される。欧州連合マイコトキシン規制の発展には欧州のさまざまな組織およびプログラムが直接的間接的に大きな影響を及ぼす。欧州食品安全機関（European Food Safety Authority）、Scientific Cooperation on Questions relating to Food、食品と飼料に関する迅速警戒システム（Rapid Alert System for Food and Feed）、EU Community Reference Laboratory for Mycotoxins の設置および食物中のマイコトキシン分析法の EC から欧州標準化委員会（European Standardization Committee）への委託などがそうである。“BioCop” および “MoniQA” としての大規模な汎欧州研究プロジェクトおよびネットワーク化プロジェクトも重要である。

デオキシニバレノールの上皮輸送：ヒト P-糖蛋白質 (ABCB1) およ び多剤耐性関連蛋白質 2 (ABCC2) の関与

デオキシニバレノール (DON) は、欧州および北米の穀物の主要マイコトキシン汚染物質である。ヒトおよび動物の汚染は主として経口によって生じ、この毒素は潜在的な健康影響を誘導する前に腸上皮障壁を横断しなければならない。本研究は DON 経上皮移動の機序を検討する。ヒト腸 Caco-2 細胞系統を用いた検討は毒素の基底面から頂端面への極性輸送を示した。頂端面・側底面 (AP-BL) への移動と側底面・頂端面 (BL-AP) への移動との両方が時間および濃度に依存し、5~30 μ M DON では飽和しなかった。Arrhenius プロット解析によって 10 μ M DON の移動が温度に依存し、見掛けの活性化エネルギーは AP-BL 方向が $E_a=3.2\text{kcal mol}^{-1}$ 、BL-AP 方向が $E_a=10.4\text{kcal mol}^{-1}$ であることを明らかにした。ATP 枯渇、P-糖蛋白質阻害剤バルスポダール、MRP2 阻害剤 MK571 によって細胞内 DON 蓄積が増加し、DON 流出が減少したが、BCRP 阻害剤 Ko143 は無効だった。そこでヒト P-糖蛋白質または MRP2 をトランスフェクトした上皮細胞系列を用いて細胞内 DON 蓄積を検討した。この蓄積は LLCPKI-MDR1 および MDCKII-MRP2 細胞では野生型細胞と比較すると減少し、減少はバルスポダールまたは MK571 によって逆転させることができた。総合すると、これらの結果は DON が P-糖蛋白質と MRP2 両者の基質であることを示唆する。

スイスにある厩舎の粗飼料の衛生的な質についての判定

スイス全土の 46 厩舎において、粗飼料（サイレージを含む）の衛生的な質を調査した。肉眼的検査に加え、微生物（細菌、酵母、および真菌）数のカウントを行った。さらにリポ多糖類（LPS）含有率およびデオキシニバレノール（DON）汚染を調べた。すべての粗飼料の乾物（DM）含有率を測定し、サイレージについては pH も測定した。主に藁では、干草およびサイレージに比べて衛生的な質が低かった。藁サンプルにおける LPS 含有率は干草サンプルに比べて有意に高かった。肉眼的検査および微生物数でも同様の傾向が認められた。8 わらサンプルおよび 1 干草サンプルに DON 汚染が見つかった。サイレージの DM 含有率中央値は 65.8%であった。これらのサイレージの pH は 4.3～5.9 であった。DM 含有率および pH の高い値にもかかわらず、主にサイレージは衛生的に高い質を示した。総じてわらの衛生水準は干草よりも悪かった。干草の衛生的な質と同じように敷きわらとして使用するわらにもこのことを考慮すべきである。

ブタ子宮内膜中のキャップ依存性翻訳制御の調節因子に及ぼすデオキシニバレノール (DNV) の *in vitro* および *in vivo* 効果

デオキシニバレノール (DNV) は、最もありふれた穀物系食品中のトリコセセンであり、農場動物および実験動物において種々の疾患を生じる毒性作用を発生させることができる。ブタ子宮内膜細胞中の本マイコトキシンにより仲介される効果を制御する分子機序は完全に理解されたとはいえない。最近の結果は DNV が活発に増殖中の組織内の蛋白質合成を阻害することを示している。従って、本研究は細胞レベルの本マイコトキシンの効果を *in vivo* および *in vitro* 系で検討した。細胞周期依存性キナーゼ MAPk および Akt (PKB) ならびにそれらの潜在的な標的 eIF-4E (真核生物翻訳開始因子 4E) および 4E-BP1 (4E 結合蛋白質、eIF-4E 抑制蛋白質) の存在量およびリン酸化状態 (活性) を調べた。従来の検討において、これら因子が mRNA 翻訳開始に関与することが見いだされた。結果は DNV が *in vitro* で p38 MAPk、蛋白質キナーゼ Akt ならびに α -および β -4E-BP1 バンドの存在量を強く減少させることを示す。これら蛋白質のリン酸化状態は明らかに変調されなかった。これに対して、DNV 処理細胞中の eIF-4E リン酸化は強く減少した。要約すると、著者等の *in vitro* 結果によれば DNV は遺伝子発現に潜在的に影響すると考えてもよい。しかし、本研究は mRNA 翻訳開始に関与するプロセスを DNV が変化させるという直接的な証拠は提示しない。驚くべきことに、*in vivo* では検討した分子事象に及ぼす DNV 給餌の影響を実証することはできなかった。

ブタ子宮内膜細胞中のマイコトキシン β - ゼアラレノールおよびデオキシニバレノールの分子効果の比較—総説

マイコトキシン β - ゼアラレノール (β -ZOL) およびデオキシニバレノール (DON) は、ヒトおよび動物の疾病の原因となる毒性作用を生じさせる。マイコトキシン仲介効果を制御する分子機構は完全に理解されているとは到底言えない。種々の結果によると、これらマイコトキシンは細胞増殖を阻害することができる。本短報では、(細胞増殖と相関する) mRNA 翻訳開始の調節に関与するキナーゼ類の存在量およびリン酸化状態に及ぼすブタ子宮内膜細胞 (PEC) 中の β -ZOL および DON の影響を比較した。著者等の結果は、これらマイコトキシンがこれら因子の発現およびリン酸化を異なる様式で変調することを示す。 β -ZOL は主として細胞外シグナル調節性蛋白質キナーゼ 1 および 2 (ERK1/2)、蛋白質キナーゼ B (Akt)、真核生物翻訳開始因子 4E (eIF4E) およびその抑制因子 4E 結合蛋白質 1 (4E-BP1) の生物活性に影響するが、DON は p38 MAPk、Akt および特異的 4E-BP1 バンドの存在量を減少させた。要約すると、これらの結果は、 β -ZOL がブタ子宮内膜中の mRNA 翻訳開始に関与する分子事象に影響するが、DON はそのようなプロセスを明白には変化させないことを示す。

マクロファージにおける TNF- α および IL-6 のボミトキシシン (デオキシニバレノール) による超誘導は mRNA 安定化によって調節される

トリコテセンの一種であるボミトキシシン (VT またはデオキシニバレノール) は *in vitro* および *in vivo* で炎症性サイトカイン遺伝子を超誘導する。この観察知見の基礎にある分子機序をもっと解明するため、リポ多糖類 (LPS) 刺激マクロファージ RAW 264.7 細胞を使って VT が TNF- α および IL-6 遺伝子の発現に及ぼす転写後の影響を調べた。VT は LPS の存在下に TNF- α および IL-6 の両方の蛋白質分泌を増強することがわかった。転写阻害剤である 5,6-ジクロロ-1-ベータ-D-リボフラノシルベンズイミダゾール (DRB) を添加すると、両サイトカインの分泌が阻害された。ノーザン分析を利用し、VT および LPS 曝露 DRB 処理細胞における TNF- α および IL-6 の mRNA の安定性を非同期モードおよび遅延同期モードで調べた。非同期モデルではまず LPS を含む培地で細胞を 2 時間培養してから、DRB および VT を含む培地に交換した。遅延同期モデルでは LPS を含む培地で細胞を 2 時間培養し、そこに DRB および VT を添加した。TNF- α および IL-6 の mRNA は非同期モデルおよび遅延同期モデルの両方で VT (100 および 250ng/ml) によって速やかに安定化した。非同期モデルにおける TNF- α mRNA の半減期は 25 分であったが、100 および 250ng/ml の VT 存在下ではこれが 3 時間超に延長した。VT は IL-6 mRNA の半減期も 60 分から 3 時間超に延長した。遅延同期モデルでは、それぞれ 1.3 および 1.5 時間であった TNF- α および IL-6 の mRNA の半減期が 100 および 250ng/ml の VT との培養によって 3 時間超に延長した。これらの結果は、マクロファージにおける炎症性サイトカインの VT および他のトリコテセンによる超誘導には mRNA 安定性の増強を介した転写後制御が寄与するらしいことを示唆する。

RAW 264.7 マクロファージ細胞における転写因子 AP-1、NF- κ B、および NF-IL6 の結合にボミトキシシン (デオキシニバレノール) が及ぼす影響

RAW 264.7 マウスマクロファージモデルを利用し、炎症性サイトカイン調節に決定的に重要な 3 つの転写因子の結合活性にボミトキシシン (VT) が及ぼす影響を電気泳動移動度シフトアッセイ (EMSA) にて評価した。100~250ng/ml の VT で処理した細胞では、2 および 8 時間後の活性化蛋白質-1 (AP-1 結合) が増加した。この作用はリポ多糖類 (LPS) との同時処理 (同期モデル) によって増強し、LPS との予培養 (遅延同期モデル) では増強しなかった。スーパーシフト EMSA は、VT が AP-1 ファミリーの JunB、JunD、リン酸化 c-Jun、c-Fos、および Fra-2 の結合活性を選択的に誘導することを明らかにした。LPS 存在下に VT に同期曝露または遅延同期曝露された細胞では、2 および 8 時間後の核因子 κ B (NF- κ B) 結合が増加した。スーパーシフト EMSA は、NF- κ B/Rel の p-50 および c-Rel サブユニットが特異的に影響されることを示した。同期および遅延同期 VT 曝露モデルにおいて、LPS の有無に関わらず 2 および 8 時間後の核因子-IL6 (NF-IL6) 結合が増えた。ここでは主に C/EBP β サブユニットが NF-IL6 結合増強に関与していた。VT の AP-1、NF- κ B、および NF-IL6 の結合促進能が *in vitro* および *in vivo* での VT 仲介サイトカイン上方調節に寄与しているのかもしれない。VT が同期モデルおよび遅延同期モデルで活性であるという観察知見は、毒素曝露と同時に活性化するかまたはそれ以前に活性化しているマクロファージがこのトリコテセンの影響を受けやすかったことを示唆する。

デオキシニバレノールグルクロニドの合成および特性化：デオキシニバレノールとの比較免疫毒性

デオキシニバレノール (DON) は、小麦、大麦およびトウモロコシを普通に汚染するマイコトキシンである。DON グルクロニド (DONGLU) は主要な DON 代謝物である。著者等は、DONGLU が DON と比較して K562 細胞に対する毒性がはるかに低いと仮定して、DONGLU を合成および精製し、その免疫毒性を試験した。ラット肝臓ミクロソーム、ウリジン - 5' - ジホスホグルクロン酸および DON を用いて DONGLU を合成し、セファデックス LH-20 カラムおよび逆相 HPLC で精製した。β - グルクロニダーゼ加水分解によって DON と同一の保持時間および UV スペクトルを有する生成物を生じた。負モードの大気圧化学イオン化を用いると精製 DONGLU の分子質量 (M-1) は 471g/mol であり；予測された分子量 472g/mol と一致した。MS および NMR によるとグルクロニド部分は DON の炭素-3-ヒドロキシル基と抱合していた。ヒト赤白血病細胞系 K562 を用いて細胞培養液中の DON および DONGLU の細胞毒性を比較した。メチルチアゾールテトラゾリウム (MTS) 細胞生存率アッセイを用いて、1.31 μM の DON 濃度で細胞数の 50% 阻害を観測したが、DONGLU では 270 μM まで有意な細胞毒性を観測しなかった。DONGLU は、各化合物の 0.5 μM、1.3 μM および 8.4 μM 濃度の組合せで DON の毒性に影響しなかった。これらのデータは、DONGLU が DON の解毒生成物であることを検証した。

ボミトキシシン（デオキシニバレノール）は EL-4 細胞において核蛋白質の IL-2 プロモーター陰性調節配列 NRE-A への結合を阻害する

初代マウス T 細胞およびクローン化マウス T 細胞におけるインターロイキン-2 (IL-2) 遺伝子発現はトリコテセン系マイコトキシシンであるボミトキシシン (VT、デオキシニバレノール) によって超誘導され、この作用がボミトキシシンの蛋白質合成阻害能に関係する。転写因子 ZEB (NIL-2-a) の陰性調節配列 NRE-A への結合は、マウス Th1-様リンパ腫である EL-4 細胞系における IL-2 発現の抑制に決定的に重要な役割を果たす。今回の試験目的は、VT が EL-4 T 細胞モデルにおける NRE-A 結合活性を阻害するという仮説を検証することであった。対照 EL-4 細胞の電気泳動移動度シフトアッセイ (EMSA) は、すでに ZEB と同定されている移動の遅いバンドと移動の速いバンドが存在することを明らかにした。VT は非刺激 EL-4 細胞において、両方のバンドの濃度依存的減少で証明される NRE-A 結合活性を阻害し、50ng/ml という低い濃度で阻害能を発揮した。(1) 過剰な非標識 NRE-A プローブとの競合および変異 NRE-A プローブまたは無関係な (NF- κ B) プローブとの競合の欠如、(2) ZEB に特異的な抗体を使用した EMSA スーパーシフトから、これら 2 つのバンドの NRE-A 結合についての特異性を確認した。ホルボール-12-ミリステート-13-アセテート (PMA) +イオノマイシン (ION) で処理した細胞でも、NRE-A 結合活性が低下した。VT の共処理は PMA+ION 仲介 NRE-A 結合活性の低下を濃度依存的に増強した。PMA+ION 刺激細胞における VT 仲介 NRE-A 結合減少は 2 時間後に早くも認められ、24 時間後もまだ検出可能であった。mRNA の競合的 RT-PCR 分析は、VT が ZEB 転写レベルを下げないことを示した。核抽出物のウエスタン分析は、VT 曝露は ZEB 蛋白質発現を抑制するが、その作用は最小限で高い VT 濃度 (500~1000ng/ml) を必要とし、同時に起こる NRE-A 結合活性の大規模な減少とは質的に整合しないことを明らかにした。さらに 1000ng/ml までの濃度の VT は全細胞ライゼートにおける ZEB 発現に影響せず、VT がこの陰性転写因子の翻訳を選択的に阻害したのではないことを示唆した。総合するとこれらのデータは、VT の IL-2 発現上方調節能はこのサイトカインのプロモーター領域にある陰性調節配列への ZEB 結合を抑制する VT の作用に一部関係するらしいことを示す。NRE-A 結合の減少を ZEB の転写または翻訳の阻害に関連づけられないことは、この陰性転写因子の翻訳後修飾が VT の下方調節作用にとって不可欠である可能性を示唆する。

リボ毒性マイコトキシンデオキシニバレノールはヒト上皮細胞中で

p21^{Cip/WAF1} mRNA 安定化を介して G₂/M 細胞周期停止を誘導する

デオキシニバレノール (DON) および他のトリコテセンマイコトキシンは、ヒト消化管および気管内の萎縮性成長阻害および炎症を含む広範囲の上皮性傷害を仲介する。本研究の目的は、DON がヒト上皮の病態形成と関連する細胞周期進行を変化させるという仮説を検証することであった。著者等は、ヒト上皮細胞が DON 処理に応答して、アポトーシス細胞死を有意に増加させずに G₂/M 期停止することを示した。さらに、p21 または p53 遺伝子発現が欠けた細胞は DON による G₂/M 期停止の応答低下を示した。p21 の遺伝子発現も DON 処理によって用量に依存して誘導されたが、p53 蛋白質レベルは増加せず、p53 非依存性 p21 誘導を示唆した。DON 誘導 p21 遺伝子発現と関連する情報伝達経路は、P13 キナーゼおよび ERK1/2 MAP キナーゼカスケードを含んでいた。特に、ERK1/2 シグナルはヒト上皮細胞中の DON 誘導 p21 mRNA 安定化と関連していた。総合すると、デオキシニバレノールは p21 遺伝子発現上昇を介して上皮細胞周期を G₂/M 期で停止させた。

Fusarium マイコトキシンに自然汚染された穀類の摂取が食肉用若鶏の飼育成績および代謝に及ぼす影響

Fusarium マイコトキシンに自然汚染された穀類の摂取が若鶏の飼育成績および代謝に及ぼす影響を調べる試験を実施した。26 週齢の雌性ニワトリ 42 羽および 26 週齢の雄性ニワトリ 9 羽に (1) 対照飼料、(2) 汚染穀類、(3) 汚染穀類 +0.2%高分子グルコマンナンマイコトキシン吸着剤 (GMA) を 12 週間与えた。汚染物質は主にデオキシニバレノール (飼料中の含有率 12.6mg/kg) で、ゼアラレノンおよび 15-アセチル-デオキシニバレノールも含まれていた。摂餌量および体重に飼料の影響はなかった。汚染穀類の摂取は産卵に有意な影響を及ぼさなかった。しかし第 4 週終了時に卵殻菲薄化が認められ、飼料への GMA 添加はこの作用を予防した。評価した他の卵パラメータに飼料の影響はなかった。第 4 週に汚染穀類摂取ニワトリの産んだ卵で早期 (1~7 日) 胚死亡が有意に増加したが、中期 (8~14 日) および後期 (15~21 日) 胚死亡率への飼料の影響はなかった。雛の孵化時体重および生存率に差はなかった。卵重量に対する雛体重の比に汚染穀類摂取の影響はなかった。標準的な雛用飼料を与えた雛の第 7、14 および 21 日の体重増加率に対する母ニワトリ摂取飼料の有意な影響はなかった。雄性ニワトリの精液量ならびに精子の濃度、生存率および運動性に汚染飼料摂取の影響はなかった。肝臓、脾臓、腎臓および精巣の相対重量に対する飼料の影響はなかった。汚染穀類の摂取は第 12 週終了時における感染性気管支炎ウイルスに対する抗体価を低下させ、飼料への GMA 添加はこの作用を予防した。ニューカッスル病ウイルスに対する血清中の抗体価への飼料の影響はなかった。*Fusarium* マイコトキシンで汚染された穀類のブレンド飼料摂取は、食肉用雌性ニワトリの飼育成績および免疫に悪影響を及ぼす可能性があるとは結論づけられた。

ニワトリ腸管微生物によるトリコテセンマイコトキシン類の分解

ニワトリ腸管微生物による 12 のトリコテセンマイコトキシン類の分解を正イオン大気圧化学イオン化下の液体クロマトグラフィー - 紫外線 - 質量分析法によってモニターした。脱アシル化および脱エポキシ化の 2 つの経路が観測された。基本的に、非アシル化トリコテセン類の 4-デオキシニバレノール、ニバレノールおよびベルカロールでは脱エポキシ代謝物への完全変換が観測された。しかし、モノアセチルトリコテセン類の 3-アセチルデオキシニバレノール、15-アセチルデオキシニバレノール (15ADON) およびフザレノン X では脱アセチル化が支配的な経路であった。I5ADON からは少量の脱エポキシ代謝産物が観測され、C-15 アセチル基が立体障害によって酵素攻撃から保護される 15-モノアセトキシシルペノールからは大量の脱エポキシ代謝産物が観測された。ジアセチル化トリコテセン類のジアセトキシシルペノールおよびネオソラニオールは脱アセチルしか示さなかった。HT-2 トキシンおよび T-2 トリオールでは、大きなイソバレリル官能基が除去に抵抗し、脱エポキシ反応が優勢であったが、T2 トキシンは脱アセチル化しか示さなかった。

自然汚染オオムギおよびコムギ中のデオキシニバレノール、ニバレノールおよびゼアラレノンレベルに加熱方法が及ぼす影響

穀類における *Fusarium* マイコトキシン除染モデルの基礎を確立するため、自然共汚染されたオオムギおよびコムギにおけるデオキシニバレノール (DON)、ニバレノール (NIV) およびゼアラレノン (ZEA) の含有率に加熱温度および加熱時間が及ぼす影響を調べた。毒素標準品およびオオムギ全粒粉サンプルを 140、160、180、200 または 220°C の対流式オーブンで加熱し、穀粒サブサンプル (各 200g) を 150、180 または 220°C の実験用回転式ガスロースターであぶった。どの処理も時間-温度依存的に毒素を分解し、毒素残留率の対数は加熱時間と線形関係を示した。この直線の式を使い、50% (H) 分解時間および 90% (D) 分解時間 (それぞれ 50% または 90% の毒素を分解するのに必要な時間) を推定した。DON および NIV の H および D 分解時間は同程度で、標準品加熱の際の分解時間はオオムギ全粒粉に比べて 50% 短かった。ZEA 標準品の分解時間はかなり長かったが、オオムギ全粒粉での分解時間は DON および NIV の分解時間と変わらなかった。加熱温度 220°C のときの DON、NIV および ZEA 標準品の D 分解時間はそれぞれ 11、10 および 85 分、オオムギ全粒粉での D 分解時間は 3 毒素とも同じであった (25 分)。H 分解時間および D 分解時間を明らかにすることは、各毒素の熱安定性を知る基礎となる。

リボ毒性トリコテセンデオキシニバレノールによるマクロファージ 内の競合するアポトーシスおよび生存情報伝達経路の誘導

デオキシニバレノール (DON) および他のリボ毒性トリコテセン類は、遺伝子発現およびアポトーシスをそれぞれ上方調節することによって、白血球中の免疫刺激および抑制を引き起こす。本研究の目的は、MAPK が DON 曝露マクロファージ中のアポトーシスと生存との両方を仲介するという仮説を検証することであった。部分的な翻訳阻害濃度で、DON は 15 分以内に RAW264.7 マクロファージ中の p38 および ERK1/2 マイトジェン活性化蛋白質キナーゼのリン酸化を誘導し、これらの効果は最長 3 時間続いた。DON 曝露細胞は 6 時間後に顕著なカスパーゼ 3 - 依存性 DNA 断片化を示し、これは p38 阻害剤 SB203580 および ERK 阻害剤 PD98059 によってそれぞれ抑制および減弱された。DON は p53 のリン酸化および活性を迅速に誘導し、これは SB203580 によって阻害可能であった。DON 曝露はミトコンドリアへの BAX 移送および相当するチトクローム C 放出を誘発したが、ミトコンドリア膜電位を変化させなかった。p53 阻害剤 PFT α は p53 の DON 誘発リン酸化と p53 結合活性との両方を減少させた。さらに、PFT α および p53 siRNA トランスフェクションはともに DON 誘発カスパーゼ - 3 活性およびその後の DNA 断片化を抑制した。p53 活性化と同時に、ERK 依存性 p90 Rsk と AKT 活性化の両者によって立証されるように、DON は 2 つの抗アポトーシス生存経路を活性化した。総合すると、これらの結果は、DON がマクロファージ中の競合するアポトーシス (p38/p53/Bax/ミトコンドリア/カスパーゼ - 3) および生存 (ERK/AKT/p90 Rsk/Bad) 経路を開始させることを示している。

トリコテセン系のボミトキシシンに曝露されたマウスの脾臓における
炎症性サイトカイン mRNA の発現に先立って生じる分裂促進因子活
性化蛋白質キナーゼおよび転写因子の迅速な逐次活性化

トリコテセン系のボミトキシシン (VT) は *in vivo* でリンパ系組織内の炎症性サイトカイン mRNA 発現を迅速 (1~2 時間) かつ一過性に (4~8 時間) 誘導することから、これらのサイトカインの遺伝子転写を伴う上流の分裂促進因子活性化蛋白質キナーゼ (MAPK) および転写因子がそれ以前またはそれと同時に活性化されるという仮説を立てた。この仮説を検証するため、まずマウスに VT を単回経口投与し、その脾臓における MAPK リン酸化を調べた。VT はわずか 1mg/kg で JNK1/2、ERK1/2 および p38 のリン酸化を誘導し、5~100mg/kg で最大効果が認められた。VT は 60 分にわたって JNK および p38 のリン酸化を一過性に誘導し、それぞれ投与の 15 および 30 分後に最大効果が認められた。一方、ERK のリン酸化は 15 分後から 120 分後まで続いた。次に 4 種類のコンセンサス転写制御モチーフを使った電気泳動移動度シフトアッセイ (EMSA) にて、VT 25mg/kg 経口投与から 0、0.5、1.5、4 および 8 時間後の activating protein 1 (AP-1)、CCAAT エンハンサー結合蛋白質 (C/EBP)、CRE 結合蛋白質 (CREB) および核因子- κ B (NF- κ B) の結合を測定した。AP-1 結合活性は 0.5 時間後から 8 時間後にかけてさまざまな上昇を示したのに対し、C/EBP 結合が上昇したのは 0.5 時間後だけであった。CREB 結合は 0.5 時間後にわずかに減少したが、徐々に増加して 4 時間後に最大になった。NF- κ B 結合は 4 および 8 時間後にわずかに増加しただけであった。過剰な非標識コンセンサスオリゴヌクレオチドおよび変異オリゴヌクレオチドを使った競合アッセイにて、AP-1、C/EBP、CREB および NF- κ B の関連する DNA モチーフについての特異性を確認した。スーパーシフト EMSA およびウエスタンブロット分析により、AP-1 (cJun、ホスホ c-jun、JunB および JunD)、C/EBP (C/EBP β)、CREB (CREB-1 および ATF-2) および NF- κ B (p50 および cRel) の特異的 VT 誘導 DNA 結合蛋白質を同定した。最後に、VT 経口曝露が 3、6 および 9 時間後の炎症遺伝子発現に及ぼす影響を評価し、脾臓における TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 の mRNA レベルが 3 時間後に最大になり、6 時間後でもまだ有意に高く、9 時間後に有意な上昇がないことを見出した。総合すると、VT は *in vivo* でまず MAPK を活性化し、それと同時 (AP-1、C/EBP) かその後 (AP-1、CREB、NF- κ B) にサイトカインプロモーターにおける潜在的調節モチーフに特異的な転写因子の結合活性を変化させる。これらの事象のタイミングは VT に曝露され

たマウスの脾臓における炎症遺伝子発現のキネティクスに高度に整合した。この試験は、毒性化合物に初めて曝露された動物における MAPK リン酸化、転写因子活性化およびサイトカイン遺伝子発現の相互の関係を調べるための新しいモデルを提供する。

マクロファージ中のトリコセンデオキシニバレノールへのリボ毒性ストレス応答には Src ファミリーキナーゼ Hck が関与する

トリコセンマイコトキシンおよび他の翻訳阻害剤は、マクロファージ内でサイトカイン遺伝子発現とアポトーシスとの両方を推進する“リボ毒性ストレス応答”と呼ばれる機構によってマイトジェン活性化蛋白質キナーゼ (MAPK) を活性化する。本研究の目的は、トリコセンデオキシニバレノール (DON) および RAW264.7 マクロファージをモデルとして用いてリボ毒性ストレス応答に関与する上流キナーゼを特定することであった。DON (100~1000ng/ml) は用量依存的に c-Jun N末端蛋白質キナーゼ (JNK)、細胞外シグナル調節性キナーゼ (ERK) および p38 MAPK のリン酸化を誘導した。MAPK リン酸化は DON 曝露に応答して早くも 5 分で生じ、15 から 30 分で最大となり、最長 8 時間続いた。蛋白質キナーゼ C、蛋白質キナーゼ A またはホスホリパーゼ C の阻害剤とプレインキュベーションしても DON 誘発 MAPK リン酸化への効果はなかった。これに対して、Src ファミリーチロシンキナーゼ阻害剤 PP1 (4 - アミノ - 5 - [4 - メチルフェニル] - 7 - [t - ブチル]ピラゾロ [3,4 - d] - ピリミジン) および PP2 (4 - アミノ - 5 - [4 - クロロフェニル] - 7 - [t - ブチル]ピラゾロ [3,4 - d] - ピリミジン) は 3 つの MAPK ファミリーすべてのリン酸化を濃度依存的に障害した。PP1 は MAPK 基質 c-Jun、ATF-2 および p90^{Rsk} の DON 誘発リン酸化を阻害した。2 つの他の翻訳阻害剤アニソマイシンおよびエメチンによる MAPK リン酸化も同様に Src に依存した。PP1 はいくつかの転写因子 (NF- κ B、AP-1 および C/EBP) の核レベルと結合活性の DON 誘導増加を減少させ、これらは TNF- α 産生、カスパーゼ - 3 活性化およびアポトーシスの低下に対応していた。マクロファージ中に見出される Src である造血細胞キナーゼ (Hck) のチロシンリン酸化は、DON 添加後 1 から 5 分以内で検出可能であり、PP1 によって抑制された。SiRNA による Hck 発現のノックダウンによって DON 誘発 TNF- α 産生およびカスパーゼ活性化におけるこの Src の関与を確認した。総合すると、Hck およびおそらく他の Src ファミリーチロシンキナーゼの活性化は、MAPK 活性化と、その結果である DON および他のリボ毒性ストレス因子による下流事象の誘導の両者に先行する重要シグナルである可能性が高い。

デオキシノバレノール誘導 ribotoxic stress response において二本鎖 RNA 活性化蛋白質キナーゼ R (PKR) が果たす役割

トリコテセン系マイコトキシンおよび他の蛋白質合成阻害剤は、“ribotoxic ストレス応答”と呼ばれている機序を介して分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) を活性化する。MAPK は、in vitro および in vivo でそうした化学物質への実験的曝露後に認められる白血球のアポトーシスを仲介すると考えられる。今回の研究目的は、二本鎖 RNA 活性化蛋白質キナーゼ (PKR) がトリコテセンであるデオキシノバレノール (DON) および他の翻訳阻害剤によって誘導される ribotoxic ストレス応答の決定的に重要な上流メディエーターであるという仮説を検証することであった。マウスマクロファージ RAW 264.7 細胞系において、DON は培地添加から 5 分以内に濃度依存的に JNK1/2、ERK1/2 および p38 のリン酸化を容易に誘導することがわかった。効果は添加から 15~30 分後に最大に達し、6 時間まで持続した。翻訳阻害剤であるアニソマイシンおよびエメチンを DON と等効力濃度で培地に添加しても、同様の作用を発揮した。自己リン酸化および真核生物翻訳開始因子 2 α (eIF2 α) のリン酸化からわかるように、DON は PKR を 1~5 分以内に速やかに PKR を活性化した。後者の作用は eIF2 α の急速な分解に関連づけられた。PKR の 2 つの阻害剤である 2-アミノプリン (2-AP) またはアデニン (Ad) による RAW 264.7 細胞の前処理は JNK>p38>ERK の順で RAW 264.7 細胞における MAPK リン酸化を顕著に阻害した。アンチセンス PKR 発現ベクターを含むヒト前単球 U-937 細胞系の安定な形質転換体においても、DON の MAPK リン酸化誘導能が顕著に抑制された。ベクターだけをトランスフェクトした対照細胞と比較したこの PKR 欠失細胞系における抑制は JNK>p38>ERK という順であった。DON ならびに他の 2 つの翻訳阻害剤アニソマイシンおよびエメチンによるアポトーシス誘導は、PKR 欠失細胞においてほぼ完全に阻止された。総合するとこれらの結果は、翻訳阻害剤によって誘導される ribotoxic ストレス応答には PKR が上流で決定的に重要な役割を果たすことを示す。

ブタの免疫応答の選ばれた指数に及ぼす経口投与された低用量のデオキシニバレノールの影響

デオキシニバレノールは、自家製飼料中に比較的ありふれたカマイコトキシンの 1 つである。この生体異物の動物体に及ぼす免疫抑制作用は、本マイコトキシンの高用量が投与されたとき、他の中毒症状の中で重要な役割を果たす。しかし、低用量は免疫系のある種の適応性機序を活性化する可能性が高い。本検討ではこの事実を確認する。

質量分析検出または電子捕捉検出を伴うガスクロマトグラフィーを利用した環境サンプルおよび食品サンプル中の微量トリコテセン系マイコトキシンの検出

選択イオン検出を伴うガスクロマトグラフィー質量分析または電子捕捉検出を伴うガスクロマトグラフィーのどちらかを利用して最も一般的なトリコテセンと一部の大環状トリコテセンを含む広範囲のトリコテセンを同時に検出する方法について記述する。各種基質から直接、または Clin Elut カラムからトリコテセンを抽出し、Florisil Sep-Pak カートリッジで精製した。大環状トリコテセンおよびネオソラニオールをそれぞれベルカロールおよび T-2 テトラオールへの加水分解後に検出した。調べたトリコテセンの範囲にわたって至適感度（0.5～10ng/サンプル）を備えており、エステル基加水分解の前後にかかわらず、四重極質量分析計および負イオン化学イオン化を利用してトリコテセンがそれらのヘプタフルオロブチレート派生体として検出された。電子衝撃イオン化を伴う磁場変更型質量分析計の利用でも大部分のトリコテセンについて同等の感度が得られたが、他のトリコテセン存在下でのベルカロール同時検出には便利でなかった。タイ産モロコシにおけるシルペントリオール、ニバレノールおよび 15-モノアセトキシシルペンジオールの検出にこれらの方法を使用した。電子捕捉検出を伴うガスクロマトグラフィーの利用により、加水分解後にそれほど複雑でない基質中のトリコテセンを検出することができた。

Fusarium マイコトキシンであるニバレノールおよびフザレノン X はヒト腸細胞系において低レベルで遺伝子毒性を発揮するおそれがある。

今回の研究目的は、各種 *Fusarium* 菌属が穀類上で産生するニバレノール (NIV) およびフザレノン X (FusX) の遺伝毒性を評価することであった。ヒト腸細胞様 Caco-2 細胞系の分裂中の細胞 (未分化細胞) および融合から 10~12 日後の細胞 (分化細胞) に毒素を適用し、時間および用量依存性実験を行った。壊死による DNA 損傷がもたらす偽陽性結果を回避するため、MTS アッセイおよびニュートラルレッドアッセイで求めたそれぞれの細胞傷害性閾値 IC_{10} を下回る濃度範囲の毒素でアルカリコメットアッセイを行い、遺伝毒性を評価した。FusX の細胞傷害性は NIV の 10 倍ほど強いことがわかったため、NIV および FusX が細胞傷害性を発揮しないそれぞれ $0 \sim 0.5 \mu M$ および $0 \sim 0.05 \mu M$ の濃度範囲で遺伝毒性を調べた。融合後の Caco-2 細胞ではどちらの毒素も 3 時間曝露で DNA 損傷を引き起こさなかったが、24 および 72 時間曝露は用量依存的に有意な DNA 損傷を引き起こした。分裂中の細胞では、FusX $0.01 \sim 0.05 \mu M$ に対する 72 時間曝露だけが DNA 鎖の切断を増やした。これらの結果は NIV および FusX が低い曝露レベルで遺伝毒性を発揮するおそれのあることを示しており、懸念が高まっているこれらの毒素のリスク評価プロセスに寄与するものと思われる。

ニバレノールはマウスの全体的および抗原特異的 IgE 産生を阻害する

ニバレノール(NIV)は、ヘルパーT2(Th2)細胞が調節する IgA の過剰産生を誘発すると報告されている。しかし、Th2 細胞の調節下にある IgE 産生が NIV によって誘発されるのかどうかに関しては依然としてほとんど明らかになっていない。本試験では、卵白アルブミン(OVA)特異的 T 細胞受容体 $\alpha\beta$ -トランスジェニックマウスを用いて抗原特異的 IgE 産生に及ぼす NIV の影響を検証した。マウスに OVA を経口投与したところ、血清中に全体的および抗原特異的 IgE、IgG1、および IgA を有意に産生した。OVA とともに NIV を投与したところ、全体的な IgE 産生および OVA 特異的 IgE、IgG1、および IgA 産生を有意に阻害した。OVA と NIV を含有する食餌をマウスに与え、このマウスから採取した脾細胞を用いてサイトカイン検定を実施したところ、インターロイキン 4(IL-4)産生が阻害され、インターロイキン 2(IL-2)産生が増大したことが明らかになった。こうした結果から、NIV が IL-4 産生の阻害と IL-2 産生の増大を誘発したことにより、全体的および抗原特異的 IgE 産生を阻害したことが示唆される。

トリコテセン真菌毒素が真核生物の蛋白質合成を阻害する機序

12,13-エポキシトリコテセンはセスキテルペノイド真菌抗生物質の一グループに属し、真核生物の蛋白質合成を阻害するが、共通の作用機序を持っていない。トリコデルミンはポリリボソームを安定化し、ピューロマイシンによるポリリボソームの分解と新生ペプチドのリボソームからの放出を防ぐ。ニバレノール、T2 トキシン、およびベルカリン A は、H-HeLa 細胞のポリリボソームを速やかに定量的に分解するが、このプロセスはアニソマイシン、シクロヘキシミド、トリコデルミンによって阻害される。酵母スフェロプラストにおいて、トリコデルミン、ニバレノール、ベルカリン A に同様の作用が観察された。我々は、ニバレノール、T2 トキシン、およびベルカリン A が、真核生物のポリペプチド鎖開始に対して、高度の選択性を有する強力な阻害剤となるが、トリコデルミンはポリペプチド鎖延長および(または)終結を阻害すると結論した。我々は、様々なトリコテセンの構造を比較検討し、共通構造であるトリコテセン環 15 位炭素の置換が各化合物の作用様式を決定する重要因子となることが示唆された。

複数の *Fusarium crookwellense* 株によるゼアラレノン産生に培養温度が及ぼす影響

コメ上での 6 週間培養では、明所での周囲温度 (16~29℃) 培養のほうが暗所での周囲温度 (18~23℃) 培養や暗所での 11、20 または 25℃の制御温度培養に比べて *Fusarium Crookwellense* 2 株のゼアラレノン産生量が増えた (培養物乾重量 1kg あたり 6060~5010mg)。25℃での収量は低かった。さらに 3 週間にわたる 11℃での培養で収量が増えたのは、予備培養の温度が 25℃の場合だけであった。暗所における制御温度での 6 週間培養では、4 株が 20℃で最も多くゼアラレノンを産生し (2460~21 360mg/kg)、1 株が 11℃で最も多くゼアラレノンを産生した (6570mg/kg)。培養温度が 10~20℃の範囲の日内変動を示すときの収量は 15℃で培養したときの収量を下回った。5 株のうち 1 株が相当量の α -ゼアラレノール (20℃で 1645mg/kg) を、2 株が相当量のニバレノール (20℃で 340 および 499mg/kg) を産生した。

トリコテセンの皮膚への影響および除染による作用の緩和

トリコテセン、特に T2 毒素 (T2) の皮膚に及ぼす刺激作用が実験動物のげっ歯類およびウサギで調べた。T2 の皮膚毒性は強力で、 $1 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ 未満の適用でラット皮膚に刺激反応を引き起こすことがわかった。皮膚作用は用量にかかわらず、適用から約 6 時間後に現れる遅発性であった。溶媒を変えても、皮内または皮下に注射しても、刺激反応の発現が早まることはなかった。

低用量 T2 の皮膚からの除去には石鹼水溶液がかなり有効であったが、高用量除去には効果がなかった。しかしポリエチレングリコール 300 による汚染皮膚の洗浄は高用量 T2 の皮膚からの除去に非常に有効であった。大環状トリコテセンであるベルカリン A は T2 と同程度にラット皮膚を刺激した。ジアセトキシシルペノールおよびニバレノールの刺激作用はそれほどでなかった。

産卵鶏の健康および血漿パラメータに及ぼす食餌中の純粋ニバレノールによる効果

産卵鶏の健康および生産性に対するトリコテセンニバレノール (NIV) の効果を給餌調査において測定した。55 週齢の白色レグホン雌鶏に 0、1、3 および 5mg NIV/kg を含む食餌を 50 日間給餌した。飼料摂取量は NIV によって減少したが、体重、卵生産性および卵品質に対する影響はなかった。肝臓および胆汁中に痕跡量の未変化 NIV が見出された。血漿中のアルカリホスファターゼは、0、1 および 3mg NIV/kg の食餌を給餌された雌鶏では増加したが、5mg NIV/kg の食餌を給餌された鳥では低下した。5mg NIV/kg の食餌を給餌された雌鶏では全蛋白質量およびグルコースが若干減少した。病理検査によって NIV (3 および 5mg/kg) が加えられた食餌を給餌された雌鶏の 40-75%は砂囊損傷、十二指腸内出血、および排泄腔膨潤および未熟卵を有する輸卵管を示したが、1mg NIV 群の特定の鳥は軽量で脆い肝臓を示すことが明らかになった。糞便中の NIV および代謝産物の脱エポキシ NIV が摂取 NIV の最大 10%になることを見出した。

Fusarium culmorum によるマイコトキシン産生に抗真菌薬マタドール (テブコナゾール/トリアジメノール) が及ぼす影響

出穂時に *Fusarium culmorum* を接種した秋まきコムギ (Slejpnar) に抗真菌薬マタドールを適用したところ、赤かび病の発生が大きく減少した。今回報告する試験では、選択イオン検出ガスクロマトグラフィー質量分析によるその後のマイコトキシン分析により、マタドール 1L/ha を 1 回散布したサンプルにニバレノール (NIV) が比較的高いレベルで含まれることが明らかになった。*F. culmorum* 接種の 3 時間前または 24 時間後に抗真菌薬処理したコムギには、NIV がそれぞれ 2432 および 860 μ g/kg と対照のそれぞれ 16 および 6 倍という高い値で認められた。ブタ腎単層細胞を標的細胞とした 3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド (MTT) 細胞培養バイオアッセイで粗サンプル抽出物を試験したところ、やはり高い細胞傷害性が認められた。抗真菌薬マタドールによる穀類処理は、*F. culmorum* による NIV 産生を顕著に刺激するおそれがある。赤かび病の発生は検出されるマイコトキシン量と関連しないため、そのような処理を行った穀類の質の評価を意味あるものとするには、マイコトキシン分析に MTT 細胞培養などのバイオアッセイを組み合わせることが推奨される。

usarium crookwellense による、フザレノン X、ニバレノール、ゼアラレノン、 α -トランス-ゼアラレノール、 β -トランス-ゼアラレノールおよびフサリン C の産生

Fusarium crookwellense KF748 (NRRLA-28100) (中部ポーランドの乾燥ジャガイモ塊茎から単離)から、米とトウモロコシの両方を基質として 25℃において、6 種類のマイコトキシンを産生した。検出した代謝産物は、ゼアラレノン、 α -トランス-ゼアラレノール、 β -トランス-ゼアラレノール、フザリン C、トリコセセン系フザレノン X、およびニバレノールであった。本稿は、*F. crookwellense* が α -トランス-ゼアラレノール、 β -トランス-ゼアラレノール、フザレノン X、およびニバレノールを産生するという初めての報告である。

ニバレノールの亜急性経口投与がマウスの免疫防御系および代謝防御系に及ぼす影響

ニバレノール (NIV) は穀粒に自然に生じる *Fusarium* 菌属の有毒な二次トリコテセン系代謝物である。無毒性量 (NOAEL) を評価するためにさまざまな用量の NIV をマウスに経口投与し、血漿生化学、免疫系および肝薬物代謝への影響を調べた。C54B16 マウスに週 3 回 4 週間 NIV を経口投与した (0.014、0.071、0.355、1.774 または 8.87mg/kg b.w.)。最高用量の NIV だけが血漿中のリン酸増加、血漿中の尿素および免疫グロブリン M の減少、ならびに血漿中のアルカリホスファターゼおよび免疫グロブリン G の増加のようなその他の変化を引き起こした。培養マウス脾臓細胞において、インターロイキン 4 産生量が増加した。肝薬物代謝酵素については、低用量 (0.071 および 0.355mg/kg b.w.) NIV 投与マウスにおいて 1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼンを基質として受け入れるグルタチオントランスフェラーゼ活性だけが一過性に増加した。チトクローム P450 モノオキシゲナーゼについては、エトキシレゾルフィン *O*-デエチラーゼ活性に有意な変化が認められなかった一方、最高用量 (8.87mg/kg b.w.) の NIV でメトキシレゾルフィンおよびペントキシレゾルフィン *O*-デアルキラーゼ活性が 38%~45%低下した。しかしウエスタンブロット分析では、NIV 投与動物におけるマウス P450 1a、2b、2c、3a、および 4a サブファミリーのタンパク質発現に変化はなかった。結論として、我々の試験におけるこの毒素の NOAEL は 1.774mg/kg b.w. で、これは含有率 5ppm の汚染食物への曝露に相当する。実際に肝毒性が現れたのは、その 5 倍高い 8.87mg/kg b.w. の NIV 経口投与を受けたマウスだけであった。かかる曝露レベルは、0.34~1.86ppm の範囲にあることがわかっている欧州産自然汚染穀類を摂取した場合に認められる最大量をはるかに上回るようである。

食肉用の若い雄性ニワトリに対するニバレノール汚染飼料摂取の影響

2 つの給餌試験において、ニバレノール (NIV) が雄の食肉用若鶏に及ぼす影響を調べた。実験期間中にわたり、市販の幼鳥用飼料を自由に摂取させた。7 日齢になったところで NIV を飼料に添加した。その後 20 日間 5 日おきに成長と摂餌量を記録した。最初の試験では NIV 含有率 0、0.5、2.5 または 5ppm の飼料を与えた。対照と比べて有意に変化した評価項目は血漿中の尿酸濃度だけで、2.5 および 5ppm 摂取群でそれぞれ 94% および 66% 上昇した。2 つ目の試験では NIV 含有率を 0、3、6 および 12ppm とした。6 および 12ppm の摂取に伴い、20 日間の体重増加率が 11% 低下した。この期間中、これらの群のニワトリでは摂餌量および飼料効率が約 6% 低下した。NIV 12ppm 摂取群のニワトリの 33%、3 または 6ppm 摂取群のニワトリの 8% に砂嚢びらんが認められた。対照群のニワトリにそうしたびらんは認められなかった。12ppm 摂取群では体重以上に肝重量の減少率が大きかった。対照と比較したファブリキュウス嚢、脾臓および砂嚢の相対重量への影響はなかった。血液については、ヘマトクリット、ならびにグルコース、カルシウム、コレステロール、トリグリセリドおよび尿酸の血漿中濃度、さらには血漿中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼおよび γ グルタミルトランスペプチダーゼの活性に対照と比べた変化は認められなかった。

ブタにおけるニバレノールの吸収および代謝

ニバレノール(NIV) 0.05 mg/kg 体重を 1 日 2 回給与されたブタを対象に NIV の吸収および代謝について検討した。第 1 日と第 3 日に肝門脈および腸間膜末梢動脈のカテーテルを通じて血液検体を採取した。給餌開始から 20 分後に採取した最も早い血液検体の大部分においてニバレノールが検出された。給餌後 7.5 時間において、NIV 投与量の 11~43% が吸収された。全身ピーク濃度は NIV 3~6 ng/ml であり、ほとんどの場合は給餌から 2.5~4.5 時間にこの濃度に達した。給餌から 16 時間後、NIV は依然として腸から吸収されており、全身濃度は NIV 1~3 ng/ml であった。ニバレノールは主に糞中に排泄され、糞は最大 3.2 mg/kg の NIV を含有していた。血漿中、尿中、糞中において NIV の代謝産物はグルクロン酸抱合体、硫酸抱合体、脱エポキシ NIV のいずれとしても認められず、代謝の欠如が示された。NIV を給与しても摂食拒否は生じず、測定を行った臨床血漿パラメーターは正常範囲内であった。

飼料を通じたニバレノール曝露が若いブタの肉眼的病理所見および一部の免疫学的パラメータに及ぼす影響

精製ニバレノール (NIV) 0、2.5 または 5mg/kg を添加した飼料を若いブタに与えた。この曝露を 3 週間続けても拒食、嘔吐、一般状態の変化を示す徴候は認められず、曝露による体重および臓器重量の変化もなかった。しかし最終的な肉眼的検査で曝露群のブタのほとんどの胃腸のびらんと腎症の徴候が明らかになった。0、1 および 3 週間後に採取された血液サンプルにおける白血球数および白血球百分比、ならびに試験終了時の胸腺細胞数に对照群-曝露群間の差はなかった。3 週間の曝露後に脾臓細胞数の用量依存的減少が認められ、NIV 含有率 5mg/kg の飼料を摂取したブタと对照ブタとの差は統計的に有意であった。リンパ球のフローサイトメトリー分析では、脾臓細胞数の減少を反映して 3 週間曝露後の脾臓における CD4+細胞数および CD8+細胞数の減少が認められたが、割合に変化はなかった。NIV への曝露は血液において、1 週間曝露後の CD4+細胞数の割合の一過性の減少を引き起こした。血漿中の IgG および IgA を調べたところ、2.5mg/kg 群で時間依存的な IgA 濃度上昇傾向および IgG 濃度低下傾向が認められたが、どの時点でも曝露群-对照群間に Ig 濃度の差は認められなかった。血液、脾臓および胸腺由来のリンパ球の分裂促進因子誘導増殖に差は見られなかった。結論として、若いブタにおける飼料を通じた NIV への曝露は腎臓および胃腸管における病理学的変化を引き起こし、脾臓細胞数を減少させた。また、NIV への曝露が 2.5mg/kg 群において IgA 産生量の時間依存的増加を引き起こすという結果も得られた。

環境中の低用量マイコトキシン、ニバレノールにより誘発される実験的 IgA 腎障害

IgA 腎症 (IgAN) は何らかの体外抗原をトリガーとして、粘膜免疫システムの調節不良を誘発するという仮説に基づき、著者らは東南アジアおよび日本において農産物を汚染することの多い環境中マイコトキシン、ニバレノール (NIV) が経口的に IgAN を誘発する実験モデルを開発した。本試験では、低用量の経口 NIV が糸球体メサンギウムの IgA 沈着を再現的かつ有意に誘発し、株に関係なくマウスの血清中 IgA 濃度を上昇させたことから、ヒト IgAN に類似する免疫病理学的変化の程度は、NIV 治療の用量と期間に関連した。さらに、NIV 類似体-蛋白質結合体を用いた競合的酸素結合免疫吸着検査法から、NIV モデルマウスの血清中 IgA 抗体はマイコトキシンに対し高い親和性を有することが明らかになった。結論として、このような結果から、NIV はマウスにおいてヒト IgAN に類似するある種の病理学的変化を誘発し、このマイコトキシンはある種の糸球体腎症の原因と関連することが示唆される。

四酢酸ニバレノールに対するモノクローナル抗体の産生および特性 化ならびにニバレノールの酵素結合イムノアッセイへのそれらの応 用

ウシ血清アルブミンに共有結合した 8-ヒドロキシ-3,4,7,15-テトラアセチル-ニバレノールヘミグルタレート接種した BALB/c マウスから分離した脾臓細胞とマウスメラノーマ細胞との融合により、3 種類のモノクローナル抗体を得た。

これらの抗四酢酸ニバレノールモノクローナル抗体は IgG 抗体で、四酢酸ニバレノールへの特異性が高く、見かけ上の結合定数は約 10^8M^{-1} であった。1 つのモノクローナル抗体の四酢酸ニバレノール、アセチル T-2 毒素、および三酢酸シルペノールとの相対的な交差反応性は、それぞれ 1.0、0.02 および 0.03 であった。他の派生体はまったく交差反応性を示さなかった。クローン由来抗体 D18.102.59 を利用し、競合結合原理に基づく間接酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) を開発した。この系の感度は、アッセイあたり四酢酸ニバレノール約 0.1ng であった。

競合的間接 ELISA およびガスクロマトグラフィー (GC) で得られた自然汚染オオムギサンプル中のニバレノールレベルはよく一致し、この抗体が自然汚染穀類中のニバレノール測定に役立つことを示した。

ラットへの亜慢性食餌曝露後のニバレノールの免疫毒性

Fusarium nivale によって産生されるトリコテセンマイコトキシンニバレノール (NIV) の免疫生物学的効果を亜慢性毒性調査における 0、0.4、1.5 および 6.9mg/kg 体重/日 (それぞれ 0、6.25、25 および 100ppm) の投与量での 90 日食餌曝露後の雄 F344 ラット中で調べた。血清免疫グロブリンレベルについては 6.9 mg/kg で IgM の若干の増加 (26%増加) が観測されただけであった。一方、IgG および IgA のレベルはどの投与量でも変化しなかった。脾細胞のフローサイトメトリ分析により、1.5mg/kg から T リンパ球/B リンパ球 (CD3⁺/B220⁺) 比が投与量に依存して減少すること、および 6.9mg/kg において CD4⁺ヘルパー/CD8⁺細胞傷害性 T リンパ球比が上昇することが明らかになった。さらに、すべての投与量で YAC-1 標的細胞に対する脾臓リンパ球のナチュラルキラー (NK) 活性の増加が観測されたが、1.5~6.9 mg/kg では変化の大きさは同様であった。6.9 mg/kg において、脾臓中の NK 細胞の指標である NKR-PIA⁺脾細胞比の減少が明らかであった。他の従来の NIV の研究の場合と同じく、本研究では 1.5 mg/kg から体重の低下が実験中に観測された。要約すると、NIV は 90 日食餌曝露後にラット中の免疫機能に影響を及ぼした。NK 活性の増加から判断すると、影響は 0.4 mg/kg から明らかであった。ただし、1.5mg/kg から表れた免疫変化には栄養低下が影響した可能性がある。

成長中のブタ消化管に沿った上皮におけるグルタミン異化関連酵素 活性に及ぼす食餌ニバレノール曝露の効果

食餌中のニバレノール (NIV) に曝露された成長中のブタ消化 (GI) 管に沿った上皮組織におけるグルタミンの酸化的代謝に関与する酵素活性および蛋白質含量の変化を検討した。NIV を含まない食餌 (対照)、2.5mg NIV/kg を含む食餌 (低投与量) および 5.0mg NIV/kg を含む食餌 (高投与量) を給餌された 3 群の動物の胃、小腸および結腸から上皮組織を採取した。グルタミナーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、オキシグルタル酸デヒドロゲナーゼ、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ、およびアラニンアミノトランスフェラーゼ活性を測定した。

対照群のブタでは、小腸上皮におけるオキシグルタル酸デヒドロゲナーゼおよびアラニンアミノトランスフェラーゼ活性は胃および結腸と比べて高かった ($P<0.05$) が、グルタミナーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼおよびイソクエン酸デヒドロゲナーゼ活性には差がなかった。小腸および結腸上皮におけるオキシグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性は食餌中に含まれる NIV の増加とともに減少し ($P<0.05$)、小腸上皮におけるアラニンアミノトランスフェラーゼ活性は増加する ($P=0.07$) 傾向があった。グルタミナーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼおよびイソクエン酸デヒドロゲナーゼの活性は、食餌中に NIV が含まれても影響を受けなかった。

対照群のブタでは、小腸上皮における蛋白質含量は胃および結腸より高かった ($P<0.05$) が、食餌中に NIV が含まれても蛋白質含量に及ぼす効果はなかった。

本研究から、NIV を含む食餌に曝露されたブタの小腸および結腸の上皮組織では、トリカルボン酸サイクル (TCA - サイクル) 内で α - ケトグルタル酸を利用する酵素能力の低下が生じると結論することができ、これら器官へのエネルギー供給障害を示唆した。

ノルウェー産穀類から単離した *Fusarium equiseti* 株により產生されたトリコテセン類およびフサロクロマノンの細胞毒性

Fusarium equiseti のノルウェー株 28 個の細胞毒性および二次代謝産物を特性化した。株の稲培養抽出物中のトリコテセン類およびフサロクロマノン (FUCH) をガスクロマトグラフィー - 質量分析法 (GC-MS) および高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって分析した。すべての分離株中で以下の代謝産物が見出された: FUCH、ニバレノール (NIV)、シルペントリオール (SCIRP)、4-アセチル - ニバレノール (4-ac-NIV、別称フサレノン - X)、15-アセチル - ニバレノール (15-ac-NIV) およびジアセトキシシルペノール (DAS)。5 つの分離株中で 4,15-ジアセチル - ニバレノール (ジアセチル-NIV) を見出した。ブタ腎臓上皮細胞 (アメリカ培養細胞系統保存機関、PKI5) を稲培養抽出物に曝露して細胞毒性を調べた。同定した二次代謝産物の記述統計学および因子分析によると主要代謝産物は FUCH、NIV、SCIRP、DAS および 15-ac-NIV の流れであった。個々のトリコテセン類は密に相互関連していたが、アセチル化 NIV および DAS の產生の関連は若干低かった。稲培養抽出物の細胞毒性および代謝産物プロファイルの逐次重回帰分析によると、SCIRP または DAS も複合毒性物質であるが、毒性は主として FUCH と 15-ac-NIV との組み合わせに帰属された。

建築物および部屋由来の微生物学的脅威およびヒト健康へのその影響（シックビルディング症候群）

建築物の中で多数の異なる細菌株、400 を超える糸状真菌種、木材および木材様材料の腐敗を引き起こす多数の真菌株、多数の藻類、アブラムシの種および他の種類の栽培物および種子植物、さらには 30 を超えるダニの種類、特にハウスダスト中に見られるダニを観察することができる。建築物、特に建築物の内装は非常に特異な微小気候を有する。その中ではこれらの生物の定着、成長および生殖に適した状態が生じるいわゆる生態学的低地の区域が形成される。居住者の健康にとって障害となる建築物は用語「シックビルディング症候群」から「シックビルディング」と呼ばれる。ある種の糸状真菌の発生および発達は、二次代謝産物すなわちマイコトキシンと呼ばれる非常に有毒な代謝産物の産生と関連している。

アフラトキシン - *Aspergillus flavus*、オクラトキシン類 - *Aspergillus ochraceus*、ルブラトキシン類 - *Penicillium rubrum* またはストラキボトリトキシン類 - *Strachybotrys chartarum* のような最も強力なマイコトキシンを産生する種との長期のヒト、特に子供たちの接触は死亡の原因になることさえあり得る。糸状真菌または単にカビは、多数の異なる系統群 (*Mucor*、*Aspergillus*、*Penicillium*、*Fusarium*) に属する腐生性真菌である。真菌は、アルテルナリオール、アフラトキシン類、グリオトキシン類、オクラトキシン類、ニバレノール、シチニン、ジクマロール、ルグロシン、トリコビリジンおよびその他の、変異原性を考慮するとヒト、動物、植物および微生物に潜在的に危険な約 200 以上の致死性マイコトキシンを産生することができる。

1970 年および 1971 年に Julian Aleksandrowicz 教授および Boleslaw Smyk 教授が開始した研究によると、白血病罹患者のいわゆる「白血病ハウス」には毒素産生性真菌、特に *Aspergillus flavus* と判明した最も強力な真菌が多かった。毒素産生性真菌類は、古い住居でも新しい住居でも多くの住空間および地下室に多い。マイコトキシンは、非常に有毒、有害であることが示されており、これらの住空間の住民の多くが絶えず病気、主として上気道感染症、無気力症、持続性頭痛、吐き気および全体的病気感、であることは不思議ではない。かなりの期間これらの住空間に居住すると癌になることがある。

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。

雌性マウスにおけるニバレノールの慢性毒性： *FUSARIUM NICALE* Fn

2B 株汚染米を用いた 2 年間にわたる摂食試験

7 週齢の雌性 C57BL/6CrSlc SPF マウス 42 頭に、0、6、12、30 ppm のニバレノール (NIV) を含有する飼料を 2 年間にわたって接触させた。処置群のすべてのマウスに体重増加の減退と飼料効率の低下が見られ、これは高用量群で有意であった。30 ppm 群の肝臓絶対重量および 12 ppm 群と 30 ppm 群の腎臓絶対重量が、対照群に比べ有意に減少した。脳重量に対する相対値で表すと、12 ppm NIV 群のみに腎臓重量の減少が見られた。処置群、特に 30 ppm 群のマウスにいくらか白血球減少が見られたが統計的に有意ではなく、アルカリ性ホスファターゼと非エステル化脂肪酸の血清中濃度は用量依存的に増加した。いずれの処置群においても NIV を原因とする腫瘍は認められなかった。自然発生の腫瘍はほとんどがリンパ腫であり、すべての群で発生率は類似していたが、他群に比べて 30 ppm 群のマウスでは発現が遅く、成長速度も遅かった。アミロイドーシスの発生率は、特に小腸における発生率が対照群に比べ高用量 2 群で低かった。30 ppm NIV 群の死亡率は対照群よりも低く、これは初期の腫瘍発生率やアミロイドーシス発生率が低かったことが一因とも考えられる。

Fusarium nivale の毒性代謝物であるニバレノールが HeLa 細胞の増殖周期と生体高分子合成におよぼす阻害効果

ニバレノールは *Fusarium nivale* 感染コメ粒から分離される毒性産物であり、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で HeLa 細胞の増殖を完全に阻害することが分かった。濃度 5 $\mu\text{g/mL}$ では、蛋白質と DNA 合成はほぼ完全に抑制されたが、RNA 合成はほとんどまたは全く阻害されなかった。DNA と蛋白質合成におよぼす阻害効果は、その速度と強度において類似した。

細胞周期分析が示すように、S 期への直接効果に加え、ニバレノールは G1 細胞の S 期への移行と G2 細胞の有糸分裂への移行に影響した。これらの結果を、その作用と既知の蛋白質合成阻害剤との類似性に特に注目して考察した。

スウェーデン産穀類中のニバレノール - 汚染率、含有率およびニワトリへの毒性

1987年から1990年にかけてスウェーデン産の穀類に含まれるニバレノールを調べ、ニバレノールがオートムギ（全サンプルの 35%）、オオムギ（13%）、およびコムギ（4%）に含まれること、および年ごとの変動が大きいことを見出した。含有率は最高で $4700 \mu\text{g/kg}$ であった。汚染サンプルから *Fusarium poae* のニバレノール産生株を分離した。ニバレノールを含む飼料を雛に与えたところ、含有率 5mg/kg 未満では毒性がなく、6 および 12mg/kg でもわずかな作用しか生じなかった。

ニバレノールで処理したマウス胸腺細胞初代培養物中の T 細胞亜集団における早期アポトーシスの進行および変化

トリコテセンマイコトキシンニバレノール (NIV) は、主として *Fusarium nivale* によって産生される真菌二次代謝産物である。著者等は、NIV がマウスリンパ組織内のリンパ球亜集団においてアポトーシスおよび変化を誘導することができることを最初に報告した。本研究では胸腺細胞に及ぼす NIV の直接効果を明らかにするために、マウス胸腺細胞初代培養物を 0.25、0.5 および 1.0 μ g/ml 用量レベルの NIV で処理し、処理後 24 時間までフローサイトメトリーによって調べた。生細胞数は用量および時間に依存して 6 時間以降有意に低下し、FACS 分析によってアポトーシス細胞指数は全処理群において 3 時間以降時間に依存して有意な増加を示すことを明らかにした。24 時間における指数は 1.0 μ g/ml 群が最低だった。CD4⁺CD8⁺細胞数は、すべての群において時間に依存して顕著に枯渇した。他方、CD4⁺CD8⁻および CD4⁻CD8⁺細胞数は、24HAT の 1.0 μ g/ml の群だけで有意に枯渇した。これらの結果は、NIV が直接胸腺細胞に影響を及ぼし、主に CD4⁺CD8⁺細胞中にアポトーシスを誘導することを示す。

ニバレノールを経口接種したマウスのリンパ器官内のリンパ球亜集団中の早期アポトーシスの進行および変化

15mg/kg 体重の主要タイプ B トリコテセンマイコトキシニンバレノール (NIV) の経口投与後の雌 BALB/c マウスのリンパ器官内のリンパ球亜集団中の早期アポトーシスの進行および変化を FACS 分析によって調べた。生細胞数およびアポトーシス細胞指数の結果から判断すると、NIV は Peyer 板を最初に攻撃し、胸腺を最も激しく攻撃した。胸腺中で、接種後 (HAI) 9 時間のアポトーシスのピークに続いて、12 および 24HAI に CD4⁺CD8⁺細胞の選択的損傷を観測した。CD4⁺細胞は Peyer 板中で 3HAI、腸間膜リンパ節中で 9HAI 以降、脾臓中で 3 から 12HAI においてそれぞれ明らかに抑制された。CD8⁺細胞も腸間膜リンパ節中で 24HAI、脾臓中で 12HAI においてそれぞれ抑制された。B 細胞亜集団中の変化で見ると、腸間膜リンパ節中の IgG⁺細胞が 3 から 12HAI において有意に減少し、B 細胞亜集団はすべて 24HAI において有意に低下した。脾臓中で、IgM⁺細胞は 9HAI において抑制された。他方、Peyer 板中で、3HAI における pan-T および pan-B 細胞ならびに生細胞数の明らかな減少の後、すべての B 細胞亜集団、特に IgA⁺細胞は 9HAI において有意な数の増加を示し、その後 IgA⁺および IgM⁺細胞数は対照より高い値のままであった。総合すると、3HAI における Peyer 板中の大きな NIV 誘起損傷からの回復過程で、NIV と Peyer 板との相互作用の結果、この部位におけるインターロイキン産生が *in vivo* 刺激され、9HAI 以降の IgA 分泌性 B 細胞の増殖および分化の増加が起る可能性がある。

マウスの胸腺、脾臓および Peyer 板中のニバレノール誘導アポトーシス

ICR:CD-1 雄マウスにニバレノール (NIV) を 5、10 および 15mg/kg 体重の用量レベルで経口投与し、胸腺、脾臓および Peyer 板中のアポトーシスの進行過程を解明するために接種後(HAI) 12、24 および 48 時間にそれぞれ調べた。胸腺重量が 48HAI で有意に低下した以外、48HAI まで臨床疾患の徴候も、体重および器官重量の変化もなかった。免疫病理化学的には、断片化 DNA の *in situ* 検出によって評価したアポトーシスリンパ球の数は、胸腺と Peyer 板との両者において 12HAI で用量依存性増加を示し、一方、脾臓では 24HAI において増加した。胸腺、脾臓および Peyer 板中の死滅リンパ球はアポトーシスの超微小構造特性を示した。さらに、12HAI におけるアガロースゲル電気泳動によって 15mg/kg 群の胸腺中に DNA ラダーを初めて検出した。これらの結果は、マウスのリンパ組織中で NIV がアポトーシスを誘導することができることを明らかに示している。

食肉用の若いニワトリおよびアヒルにおけるフザレノン-X の運命

食肉用の若いニワトリとアヒルとでフザレノン-X (FX) の運命および体内動態を比較するため、ニワトリおよびアヒルに FX を静脈内投与または経口 (p. o.) 投与した。ガスクロマトグラフィー-質量分析を利用し、血漿および排泄物中の FX およびその代謝物 (ニバレノール、NIV) の定量を行った。ニワトリおよびアヒルに対する i. v. 投与および p. o. 投与のそれぞれ 180 分後および 120 分後まで、FX の血漿中濃度を調べた。NIV の消失はその親化合物よりもゆっくりであった。ニワトリおよびアヒルにおける FX の体内動態はオープン 2 コンパートメント薬物動態モデルにあてはまった。アヒルにおける FX 消失半減期 ($t_{1/2\beta}$) はニワトリに比べて長かった。消失速度定数 ($ke1$) はニワトリのほうがアヒルより高く、FX の経口バイオアベイラビリティはアヒルのほうがニワトリより高かった。血漿におけるガスクロマトグラフィー-質量分析プロファイルは、ニワトリおよびアヒルのどちらにおいても投与された FX の大部分が NIV として回収されることを明らかにした。肝ミクロソーム画分および細胞質画分と FX との in vitro 培養は、肝臓および腎臓に FX から NIV への変換能があることを明らかにした。したがって今回の試験は、FX はアヒルでニワトリより効率的に吸収され、ゆっくりと消失することを明らかにした。つまり FX の毒性はニワトリよりもアヒルで深刻な影響をもたらすと思われる。

トリコテセン系マイコトキシンであるニバレノールおよびフザレノン-X のマウスにおける運命

ニバレノール (NIV) および NIV の 4-アセチル体 (フザレノン-X、FX) のマウスにおける運命を比較するため、 ^3H -FX または ^3H -NIV をマウスに経口投与した。 ^3H -FX 投与マウスでは主に尿を介して放射能が排泄されたが、 ^3H -NIV マウスでは主に糞を介しての排泄であった。 ^3H -FX 投与マウスでは ^3H -NIV 投与マウスに比べ、血漿中ピークレベルが 5 倍、曲線下面積 (AUC) が 10 倍の高値であった。これらの知見は、FX が NIV よりも胃腸管から速やかかつ効率的に吸収されることを明らかに示している。尿および糞のアセトニトリル抽出物の放射能の HPLC プロファイルは、FX が胃腸管から吸収されてすぐに NIV に代謝されることを示した。組織ホモジネートの ^3H -FX との *in vitro* 培養は、肝臓および腎臓が FX から NIV への変換に関与する臓器であることを明らかにした。したがって今回の試験は、マウスおよびラットで認められる FX の経口毒性が NIV の経口毒性より強いのは FX が NIV よりも効率的に胃腸管から吸収され、肝臓および腎臓で速やかに NIV に変換されるためであることを証明した。

マウスにおけるトリコテセンマイコトキシン、ニバレノールおよび フサレノン - X の胎盤および母乳伝達

妊娠マウスから胎児マウス、および授乳マウスから吸乳マウスへのニバレノール (NIV) およびフサレノン-X (FX) の移動を検討するために、妊娠マウスまたは授乳マウスに ^3H -NIV または ^3H -FX を経口投与した。胎児組織全体ならびに胎児肝臓および腎臓において放射能が検出され、レベルは母体組織のレベルと同程度であった。 ^3H -NIV または ^3H -FX を投与した母獣の母乳および吸乳マウスから採取した肝臓および腎臓組織中でも放射能が検出された。非標識化 FX または NIV を投与した妊娠マウス由来の胎児組織ホモジネートの HPLC 分析によればどちらの毒素の投与後も胎児への NIV の伝達が明らかであった。非標識化 FX を投与したマウスにおいて、吸乳マウス組織ホモジネート中に HPLC 上の NIV および FX の大小のピークが認められた。これらの結果は、NIV は形を変えずに胎盤または母乳を介して胎児または吸乳マウスにそれぞれ移動し、FX は主に母体中で NIV へ代謝されてから移動することを示している。

マウスにおけるニバレノールの急性および慢性毒性

ニバレノール (NIV) の毒性効果を正確に確認する目的で、マウス発癌研究中に LD₅₀ を測定しマウスを屠殺した。6 週齢の雄 ddY マウスに対する NIV の LD₅₀(mg/kg) は、38.9 (po)、7.4 (ip)、7.2 (sc) および 7.3 (iv) であった。7 週齢の雌 C57BL/6CrSlc SPF マウスに 0, 6, 12 および 30 ppm (mg/kg) の NIV を含有する餌を 1 年間以上与え、体重増加、飼料効率、末端器官重、血液学的特徴および組織病理学的特徴に関する影響を評価した。全試験期間において、体重増加速度と飼料効率は明らかな用量依存的相関を示した。対照マウスと NIV 投与マウスの肝臓、胸腺、脾臓、腎臓、胃、副腎、下垂体、卵巣、胸骨、骨髓、リンパ節、脳、およびパイエル板付きおよび無しの小腸に関して肉眼および組織病理学的評価を実施し、これらの組織は外観と組織病理学的構造が正常であることが分かった。また、骨髓の微細構造にも変化は見られなかった。しかし、NIV の経口投与は、末端器官重記録において、絶対器官重量 (mg) の用量依存性減少と相対器官重量 (mg/g 体重) の用量依存性増加を引き起こした。6 ヶ月後には 30 ppm 群において、そして 1 年後には全 NIV 処理群において有意の白血球減少が見られた。他の血液学的パラメータに関しては顕著な変化は見られなかった。これらの結果が示すように、6 ppm 以上の NIV を 1 年間経口投与すると、マウスにはトリコセンカビ毒に特徴的な毒性効果が現れる。

世界的規模の分子調査で判明した赤かび病の新しい病原菌およびトリコテセン毒素の多様性

赤かび病 (FHB) 病原菌およびトリコテセン系毒素の多様性に関する知識の拡充を目的に 2100 分離株の世界的なコレクションで新しい遺伝的変異を探し、系統発生的に異なる 16 の FHB 分離株を同定した。MLST 法による DNA 配列データ (13 遺伝子 ; 16.3kb/株) の系統発生的解析に形態学、コムギへの病原性、およびトリコテセン系毒素産生能の解析を組み合わせることにより、これら新規分離株の類縁性と分類学的地位を評価した。我々はこれらの解析結果に基づき、*Fusarium graminearum* 種群 (*Fg* 種群) 内の新しい 2 菌種 (*Fusarium vorosii* および *Fusarium gerlachii*) を正式に記述し、米国内のニバレノールケモタイプまたは 3-アセチルデオキシノバレノールケモタイプを持つ *Fg* 種群分離株を初めて報告する。さらに、米国のメキシコ湾岸に由来する *F. graminearum* の高度に多様な集団ならびにオーストラリアおよび南アフリカに由来する *F. acaciae-mearnsii* の異なる分離株について記述する。

飼料を通じてラットに 90 日間与えたニバレノールは造血系および免疫系のほかに雌性生殖系に影響を及ぼす

ニバレノールは世界中でコムギおよびオオムギを頻繁に汚染することから、*Fusarium* 菌属によって産生される重要なトリコセン系マイコトキシンと考えられている。今回の試験では、NIV 含有率 0、6.25、25 および 100mg kg⁻¹ の飼料を雌雄の F344 ラットに 90 日間与え、NIV の亜慢性毒性を調べた。実験期間中、100mg kg⁻¹ 飼料摂取群の雄および 0mg kg⁻¹ 飼料摂取群を除く全群の雌で白血球数が減少した。組織病理検査において 100mg kg⁻¹ 飼料摂取群の雌雄の造血系および免疫系、ならびに同群の雌の生殖系に投与に関連する変化が認められた。脾臓細胞のフローサイトメトリー分析は、100mg kg⁻¹ 飼料摂取群でヘルパー/細胞傷害性 T リンパ球の比の上昇を明らかにした。要約すると、NIV は NIV を 90 日間摂取させたラットの造血系および免疫系のほかに雌性生殖系にも影響を及ぼす。対照に比べた雌性ラットにおける白血球の有意な減少に基づき、最小作用量は 0.4mg kg⁻¹ b. w. day⁻¹ と算出された。

F344 ラットにおけるトリコテセンマイコトキシン、ニバレノールの

90 日亜慢性毒性研究

トリコテセンマイコトキシン、ニバレノール (NIV) の亜慢性毒性研究を 0、6.25、25 または 100ppm 濃度を含む食餌を 90 日間給餌された雌雄 F344 ラットにおいて行った。100ppm で体重の低下および軟便が実験の開始から雌雄両方で観測され、25ppm で第 6 週から雄の体重低下が観測された。剖検すると、100ppm で雌雄両性の多くの器官が主に体成長の低下による絶対重量減少を示し、雌では胸腺相対重量の低下が明らかであった。血液学的には白血球数の減少が雄では 100ppm、雌では 6.25ppm から見いだされた。さらに、100ppm で雌雄両性の血小板計数減少、雄の赤血球数減少および雌のヘモグロビン濃度低下が検出された。組織病理学的には、100ppm で雌雄両性の造血器官および免疫器官ならびに下垂体前葉および雌の生殖器官中に、胸腺萎縮、骨髓中細胞数低下、下垂体前葉中の去勢細胞の増加を伴う好塩基球のびまん性肥大、および卵巣閉鎖卵胞の増加などの投与関連変化が主に観測された。血液学的データにもとづいて NIV の悪影響非観測レベルは、6.25ppm (雌雄とも 0.4mg/kg 体重/日) 未満であると測定された。

フサリオトキシニンバレノールの経上皮輸送：ABC 輸送体による分泌の仲介

マイコトキシニンバレノール (NIV) は、世界中の種々の穀類、動物飼料および加工穀物の天然汚染物質である。ヒトおよび動物の汚染は主として経口によって生じ、この毒素は潜在的な健康影響を誘導する前に腸上皮障壁を通過しなければならない。本研究では NIV 経上皮移動に関与する機序を検討した。ヒト腸 Caco-2 細胞株は、NIV の基底面から頂端面への分極輸送を示した。代謝阻害剤および温度依存実験を用いて、NIV の側底面 - 頂端面 (BL-AP) 移動はエネルギー依存性輸送を含み、一方、頂端面 - 側底面 (AP-BL) 移動は受動拡散によって支配されることを示した。NIV 流出は P-糖蛋白質 (P-gp) 阻害剤バルスポダール、多剤耐性関連蛋白質 (MRP) 阻害剤 MK571 存在下で有意に低下したが、乳癌耐性蛋白質 (BCRP) 阻害剤 Ko143 によっては変化しなかった。ヒト P-糖蛋白質または MRP2 のどちらかで形質移入した上皮細胞株を用いて細胞内 NIV 蓄積を検討した。この蓄積は LLC PK1/MDR1 および MDCKII/MRP2 細胞中で野生型細胞と比較して有意に低下し、この効果はバルスポダールおよび MK571 によってそれぞれ反転した。これらの *in vitro* 結果によると NIV が P-糖蛋白質と MRP2 両者の基質であることが示唆された。この相互作用は、動物試験における NIV の弱い腸管吸収および主に糞便中の NIV の多量排泄において基本的な役割を演じている可能性がある。

Fusarium langsethiae、*Fusarium poae*、および *Fusarium sporotrichioides* による代謝物産生の多様性

UV ダイオードアレイ、電子捕捉または質量分析のいずれかの検出システムを伴う培養抽出物の液体クロマトグラフィーまたはガスクロマトグラフィーを利用し、109 株の *Fusarium langsethiae*、*Fusarium poae*、*Fusarium sporotrichioides*、および *F. kyushuense* によるマイコトキシンおよび他の代謝物の産生を 4 研究施設で別々に調べた。結果をまとめたところ、*F. langsethiae* はトリコテセン系のジアセトキシシルペノール (DAS)、T-2 毒素 (T-2)、HT-2 毒素 (HT-2)、およびネオソラニオール (NEO) に加え、量は少ないが他のトリコテセン派生体をいくつか一貫して産生することがわかった。また *F. langsethiae* は、culmorin 類、chrysogine (CHRYG)、aurofusarin (AUF) およびエニアチン (EN) も産生した。*F. sporotrichioides* が *F. langsethiae* に似た代謝物プロファイルを示したのに対し、*F. poae* は 49 株中 41 株が DAS およびその派生体に加えてニバレノール (NIV) および他の 8-ケトトリコテセン類を産生するという異なるプロファイルを示した。*F. kyushuense* の 1 株からは微量の NIV しか検出されなかった。要約すると、この共同研究で調べた中心的な 3 分類群はすべてトリコテセンを産生することが明らかになった。*F. langsethiae* からフザリン C (F-C) は検出されなかったが、*F. poae* および *F. sporotrichioides* はこれを産生した。*F. langsethiae* では少数の株からしか aurofusarin が検出されなかったが、*F. poae* および *F. sporotrichioides* ではほぼすべての株がこれを産生した。一方、*F. poae* から chrysogine が検出されなかったが、他の 2 つの分類群はこれを産生した。エニアチンを産生する株は今回調べた主な 3 分類群にわたって散見され、*F. poae* および *F. sporotrichioides* の多くの株が beauvericin (BEA) を産生した。*F. langsethiae* では 1 株 (IBT 9959) だけが beauvericin を産生した。しかしこの株の分類学上の地位ははっきりしない。種特異的代謝物プロファイル、*F. poae* の果物のような香り、および形態学的観察所見を利用した多相アプローチから判断すると、*F. langsethiae*、*F. poae* および *F. sporotrichioides* は種レベルにある 3 つの重要な分類群と見なすべきである。

In vitro のチャイニーズハムスターV79-E 細胞における *Fusarium* マイコトキシン (ニバレノール、フザレノン-X、T-2 トキシン、ゼアラレノン) の遺伝毒性

In vitro のチャイニーズハムスターV79-E 細胞における染色体異常誘発性障害、SCE 誘導、細胞周期遅延に関してマイコトキシンであるニバレノール、フザレノン-X、T-2 トキシン、ゼアラレノンの検討を行った。トリコテセンであるニバレノール、フザレノン-X、T-2 トキシンによって顕著な毒性が誘発され、特に細胞周期遅延として発現した。

毒性と比較して、これらの染色体異常誘発能は弱い。S9 ミックスの添加によってニバレノールは毒性化され、T-2 トキシンは無毒化されたが、フザレノン-X 活性に対する顕著な影響は認められなかった。SCE 値はわずかに上昇した。観察された影響は非特異的なものであり、蛋白合成の抑制を原因とするものであることが示唆される。ゼアラレノンは3つのアッセイにおいて不活性であった。*Fusarium* 毒素の遺伝毒性および発癌性の問題について考察する。

Fusarium poae に類似した Fusarium による T-2 トキシンの産生

F. poae に類似した微小形態と *F. sporotrichioides* に類似した代謝産物プロフィールを有する *Fusarium* 種を同定した。小分生子は典型的な *F. poae* のように球形から洋梨形の形状を有するが、特に Czapek-Dox Iprodione Dichloran 寒天 (CZID) 上で粉末状外観を示し、気中菌糸体が少なく、ポテトスクロース寒天 (PSA) 上で果実様匂いがないことから *F. poae* とは異なる。大分生子、ポリフィアリドおよび厚膜胞子がないことにより *F. sporotrichioides* とは異なる。検討した 18 の分離株は、ノルウェー産 15、オーストリア産 2、オランダ産 1 であり、PSA または酵母抽出物スクロース寒天 (YES) 上ですべて T-2 トキシン (25-400 $\mu\text{g/g}$) を産生した。さらに、種々の量のネオソラニオール、イソネオソラニオール、HT-2 トキシン、4-および 15-アセチル T-2 テトラオール、T-2 トリオールおよび T-2 テトラオールならびに 4,15-ジアセトキシシルペノールが形成された。これらのどの培養物中에서도ニバレノール、4-または 15-アセチルニバレノール、4,15-ジアセチルニバレノールは検出されなかった。一方、これらの毒素は調べた 12 の典型的な *F. poae* 分離株のすべてによって少なくとも少量産生された。この *Fusarium* が *F. poae* または *F. sporotrichioides* あるいは別の分類群として分類されるべきかの疑問に対処する必要がある。

Fusarium nivale 生育米の毒性成分ニバレノールによる Ehrlich 腹
水腫瘍における蛋白質合成および DNA 合成の阻害

抄録なし

Fusarium nivale 栽培米から分離された毒性成分であるニバレノールによるウサギ網状赤血球における蛋白質合成阻害

Fusarium nivale の毒性代謝産物に関する生物学的検定法を見出すために、研究を行い以下の結果を得た。

1. ウサギ網状赤血球の蛋白質合成反応が **Fusarium nivale** 栽培米由来の毒性成分の分画に適用出来た。
2. 分離された毒素、ニバレノールは細胞のリボソームレベルで蛋白質合成を阻害した。

ニバレノールの長期摂食がアフラトキシン B₁ により開始されたマウス肝臓癌形成に及ぼす影響

トリコセテンの一種であるニバレノールは、穀物や食品に広く発生するが、今回の 2 年間摂食試験により、雌マウスにおいて腫瘍原性作用はないことが判明した。ニバレノールが直接アフラトキシン-B₁ (AFB₁) により開始された肝臓癌形成の発生を変化させるかどうかを検討するために、1 週齢 C57B1/6×C3HF₁ マウスに、6 mg/kg bw の AFB を腹腔内注射し、6 週間後にニバレノールを 0、6 または 12 ppm 含有する飼料を 1 年間与えた。3 群全ての雄マウスで、肝細胞癌及び腺腫が発生したのに対し、雌の発生率は、AFB₁ 単独投与群で 31%、AFB₁ とニバレノールを 6 又は 12 ppm 投与した群は、それぞれ 20%及び 0%であった。これらの知見から、ニバレノールが、雌マウスにおいて、おそらくプロモーション段階に作用することにより、AFB₁ により開始された肝臓癌形成を直接抑制することが示唆される。

Curtobacterium 属菌株 114-2 における T-2 毒素の代謝

T-2 毒素同化性土壌細菌の 1 つである *Curtobacterium* 属菌株 114 における T-2 毒素の代謝経路を薄層クロマトグラフィー分析およびガス-液体クロマトグラフィー分析にて調べた。唯一の炭素およびエネルギー源として基本培地に加えた T-2 毒素は、HT-2 毒素と未知の代謝物に生体内変換された。赤外線分析、質量スペクトル分析、陽子磁気共鳴分析、および他の物理化学分析の結果、この新しい代謝物は T-2 トリオールと同定された。T-2 毒素はこの菌によってまず脱アセチル化されて HT-2 毒素になり、これが T-2 トリオールに生体内変換され、ネオソラニオールおよび T-2 テトラオールは形成されない。長時間培養後の培地にトリコテセンは残留していなかった。全細胞、無細胞可溶性画分および培養物ろ液で T-2 毒素加水分解酵素の一部の特性が認められた。T-2 毒素のほか、ジアセトキシシルペノール、ネオソラニオール、ニバレノール、およびフザレノン-X などのトリコテセンもこの菌によって同化された。

トリコテセン系マイコトキシンであるニバレノールによる GST-P 陽性肝細胞巢発達の増強

食物および食品に自然に生じるトリコテセン系マイコトキシンである T-2 毒素 (T-2) およびニバレノール (NIV) は発癌性なのか、アフラトキシン B₁ (AFB₁) による肝癌誘発の調節能を有するのかを明らかにするため、中期肝発癌アッセイを行った。雄性 F344 ラットの腹腔内にジエチルニトロソアミン (DEN、200mg/kg) を単回投与し、その 2 週間後から 6 週間にわたって被験物質であるトリコテセンを飼料に混ぜて与えた (T-2 は 2 および 5ppm、NIV は 6ppm)。DEN だけを投与する対照群を設けた。AFB₁ とこれらのトリコテセンの相乗作用を調べるため、上述の DEN 投与から 2 週間後のラットの腹腔内に AFB₁ (0.5mg/kg) を単回投与し、6 週間にわたって NIV 含有飼料 (6ppm) を与えた。担体だけを投与する対照群のほか、DEN を投与せずに AFB₁、NIV または T-2 だけを上記要領で投与する対照群も設けた。第 3 週にすべてのラットの肝臓を 2/3 だけ部分切除 (PH) し、第 8 週に屠殺して肝切片における胎盤型グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST-P) の発現を調べた。DEN が投与されなかったラットでは、先行報告どおり AFB₁ だけの投与が GST-P 陽性細胞巢の数および面積の両方を増やし、NIV または T-2 だけの投与は顕著な変化を引き起こさなかった。最初に DEN が投与されたラットでは AFB₁ によって GST-P の顕著な発現が生じ、AFB₁ の肝癌誘発性が改めて確認された。T-2 または NIV を摂取したラットにおける GST-P 陽性細胞巢の発現は背景レベルで、この中期バイオアッセイ系では T-2 および NIV といったトリコテセン系マイコトキシンの肝癌誘発性が予測されないことを示した。一方、DEN 投与に続けて AFB₁ が投与された群ではその後に NIV を摂取したラットにおいて GST-P 陽性細胞巢の数および面積の両方の増加が認められ、この増加は AFB₁ または NIV どちらか一方の個別データ合計より統計的に有意に大きかった。このことから、NIV は AFB₁ による肝癌誘発を促進すると予測される。

異なる地域に由来する *Fusarium crookwellense* 分離株によるマイコトキシンの生成

オーストラリア、欧州および北米の各大陸に由来する 18 の *Fusarium crookwellense* 分離株をトウモロコシ上で 2 週間 25℃にて培養し、そのマイコトキシン産生能を比較した。各 *Fusarium* 分離株と培養したトウモロコシの抽出物に含まれるマイコトキシンを薄層クロマトグラフィー (TLC) およびガスクロマトグラフィー/質量分析 (GS/MS) で分析した。検出された毒素は、ゼアラレノン (13 株)、フザリン C (11 株)、ニバレノール (4 株) およびジアセトキシシルペノール (2 株) であった。どの大陸由来の分離株もゼアラレノンおよびフザリン C を産生したのに対し、ニバレノールが検出されたのはオーストラリア由来の複数の株と米国由来の 1 株だけであった。

ラット肝の薬物代謝活性に及ぼすニバレノールの影響

雄ラットを用いて肝の薬剤代謝活性およびアフラトキシン B₁ (AFB₁) 代謝に及ぼすトリコテセン系マイコトキシンであるニバレノール (NIV) の影響を調査した。NIV 6~12 ppm を含有する食餌を 2 週間または 4 週間与えたラットにおいては、初回摂取量、末期の体重増加、および臓器重量などの減少が認められた。肝ミクロソームにおいてはチトクロム P-450 作用の増大が認められ、ウェスタンブロット分析では、P4502B1/2 の一時的な増大とともに、P4501A2 のわずかな誘発も認められた。ラットにおいてはサイトゾルのグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) 酵素の作用も増大し、ウェスタンブロット分析では GST 1-2 の上昇も認められた。NIV 食餌を与えたラットの肝ミクロソーム標本を用いた実験では、アフラトキシン B₁-DNA 付加物 (AFB₁-DNA) の形成が増大したが、NIV 処置ラットから作製したサイトゾルを添加したところ、付加物形成能のあるミクロソームが減少した。*in vivo* 実験においては、NIV 処置ラットの AFB₁-DNA 濃度は対照よりも低かった。このような結果から、数週間にわたり NIV を与えたラットにおいては、チトクロム P-450 および GST 酵素の作用が増大したことが示唆される。これらの第 1 相および第 2 相の酵素濃度を変更したところ、*in vitro* および *in vivo* において DNA に対する AFB₁ 付加物の調節が変化した。

C57BL/6 マウスにおけるニバレノールを用いた亜慢性摂取試験

C57BL/6CrSlc SPF マウス雌雄10匹ずつからなる各群に、ニバレノールを0、6、12、30 ppm 含有する飼料を4または12週間摂取させた。雌雄ともに体重増加の低下を認めたが、雄の場合用量依存的に減少した。摂取量も低下した。群によっては、投与に関連する肝、腎、脾、および胸腺の重量変化が認められたが、明らかな傾向は示されなかった。肉眼的病変や組織病理学的病変は検査を行った臓器に認められなかったが、剖検において投与群では脂肪組織が対照群と比較し著しく少なかった。血清アルカリ性ホスファターゼ活性に用量依存的増加が認められた。その他の血清パラメータでは散在性に大きく値が変化した、明らかな傾向は認められなかった。ただし、12 および 30 ppm を12週間摂取させた群の雄の GOT 値には統計学的に有意な用量依存的増加が明らかであったが、正常範囲内であったため肝毒性を示すとは見なされなかった。

東南アジア産トウモロコシにおける *Fusarium* マイコトキシン（フモニシン、ニバレノールおよびゼアラレノン） およびアフラトキシン

フィリピン、タイおよびインドネシアから集めたトウモロコシサンプルで *Fusarium* マイコトキシン（フモニシン、ニバレノールおよびゼアラレノン） およびアフラトキシンによる自然汚染状況を調べた。各国のトウモロコシサンプルの 50%以上にフモニシン B₁ および B₂ が認められ、アフラトキシンとの共汚染率が 48%に上った。これらの東南アジアのサンプルではこうしたマイコトキシンのほか、どちらも *Fusarium* 菌属のマイコトキシンであるトリコテセン系のニバレノールおよびエストロゲン様のゼアラレノンが検出された。これは、アジアの熱帯地方で採れるトウモロコシが *Fusarium* マイコトキシン（ニバレノールおよびゼアラレノン） と共にフモニシンとアフラトキシンという 2 つの発癌性マイコトキシンに同時に汚染されることを明らかにした最初の報告である。

トリコテセン系マイコトキシンの微生物的修飾および化学的修飾に関する比較研究

Fusarium nivale および *F. solani* のトリコテセン産生株によるいくつかのトリコテセン系マイコトキシンの微生物的修飾について調べた。それらの結果を対応する化学的修飾と比較した。*Fusarium* 菌属の生長中の菌糸は 4 β -アセトキシ-3 α , 7 α , 15-トリヒドロキシ-12, 13-エポキシトリコテク-9-エン-8-オン (フザレノン) を 3 α , 4 β , 7 α , 15-テトラヒドロキシ-12, 13-エポキシトリコテク-9-エン-8-オン (ニバレノール) に変換しなかったが、3 α , 4 β , 7 α , 15-テトラアセトキシ-12, 13-エポキシトリコテク-9-エン-8-オン (テトラアセトキシニバレノール) は脱アセチル化されて 3 α -ヒドロキシ-4 β , 7 α , 15-トリアセトキシ-12, 13-エポキシトリコテク-9-エン-8-オン (4, 7, 15-トリアセチルニバレノール) になり、それ以上の脱アセチル化されることはなかった。T-2 毒素は HT-2 毒素に変換され、8 α -(3-メチルブチリロキシ)-3 α , 4 β , 15-トリアセトキシ-12, 13-エポキシトリコテク-9-エン-8-オン (酢酸 T-2) は T-2 毒素を経て HT-2 毒素に変換された。水酸化アンモニウムによる化学的修飾は 4, 7, 15-トリアセチルニバレノールを経てテトラアセチルニバレノールをフザレノンに変換した。3 α , 7 α , 15-トリアセトキシ-12, 13-エポキシトリコテク-9-エン-8-オン (トリアセチルデオキシニバレノール) は 7 α , 15-ジアセトキシ-3 α -ヒドロキシ-12, 13-エポキシトリコテク-9-エン-8-オン (7, 15-ジアセチルデオキシニバレノール) のほかに C-7 または C-15 のアセチル基を欠く脱アセチル化体を生じた。これらの結果は、トリコテセンの微生物的修飾における位置選択性を明らかにしている。これらの結果および現在発表されているトリコテセンの変換に関する情報に基づき、これらのマイコトキシンの生物学的修飾には複数の機序があると考えられる。

マイコトキシンと乳牛の生産性，健康状態，繁殖性能との関連，および推奨される防御方法，対策(1)

世界中のマイコトキシン学者の集まりで，研究が優先されるマイコトキシンのリストが策定された(Hesseltine, 1986a)。そのリストには，アフラトキシン，オクラトキシン，トリコテセン類(主に T-2 トキシン，ゼアラレノン，デオキシニバレノール)，シトリニン，ステリグマトシステイン，パチュリン，およびシクロピアゾン酸が収載された。フモニシンは，このリストが作成された後に識別・同定された(Gelderblom et. al., 1988)マイコトキシンであるが，その汚染状況や被害状況を勘案すれば，確実にそのリストに収載されるべきマイコトキシンである。

一般に牧草主体で飼育されている牛の場合，最も発生しやすいマイコトキシン症は，麦角中毒，スズメヒエ中毒による旋回病，フェスク中毒，スウィートクローバー中毒，顔面湿疹病，およびスラフラミン毒性などである。これらのマイコトキシン症の重要性は，Lacey(1991)によって総説されている。

この論文では，牧草ではなく貯蔵飼料を摂取する乳牛において，最も重要なマイコトキシンについての記述に集中する。それらは，1)主にアスペルギルス属のカビによって作り出されるアフラトキシン，フミトレモーゲン，およびステリグマトシステインなど，2)フザリウム属のカビによって作り出されるデオキシニバレノール，ゼアラレノン，T-2 トキシン，ジアセトキシサイペノール(DA)，およびフモニシンなど，3)主にペニシリン属のカビによって作り出されるオクラトキシン，PR 毒素，およびロキフォルティンなどである。これら以外のマイコトキシンや，上記リストの類縁物質もまた，ときどき，多量に生成し動物に被害を与えることが知られている。症例報告が少ないことや単純な分析方法がないことが，これらマイコトキシンの蔓延を許し，また家畜生産性への影響の大きさを十分に理解させていない原因であろう。

デオキシニバレノール暫定基準値設定に対する生産現場での対応状況

平成 14 年 5 月、厚生労働省により小麦に含まれるデオキシニバレノール(以下 DON と略する)の暫定的な基準値が 1.1mg/kg と設定され、この数値を超える麦の市場流通が禁止された。

国内産小麦の主産地である北海道は DON 対策を最重要の課題として、その対応に取り組んできた。平成 14 年 5 月の DON 暫定基準値設定後、直ちに農産物検査ロット毎の小麦 DON 濃度の検査体制を整備した。平成 15 年度からは生産現場における DON 簡易検査法の普及を通じて、収穫後の受入れ時、あるいは調製段階での DON 濃度を把握することが可能となった。さらに、道立農業試験場で検討された選別・調製による小麦 DON 濃度の低減化技術や品種の選択、効率的な防除方法が生産現場で普及に移される等、DON 濃度低減に向けた取り組みが行われてきた。ここでは、北海道産小麦の安全性を確認するために構築した DON 濃度の検査体制を中心に、それらの概要を紹介したい。

食品のカビ汚染とリスクアセスメント

アフラトキシンが発見され、食品のマイコトキシン汚染は国際的なリスクとなった。わが国では、2003年5月に食品安全基本法が制定され、内閣府に食品安全委員会が設置されて、食の安全を守るため、リスクアセスメントに取り組んでいる。食品におけるカビ汚染事例をみると、90年代から青果物のポストハーベスト病害、好乾性カビによる常温流通食品の事故、好冷・耐冷性カビによる低温流通食品の事故、耐熱性カビによるPETボトル詰め飲料・レトルト食品など加熱加工食品の事故が急増している。これらのカビによって産生されるマイコトキシンが食品から直接検出された場合は自然汚染といい、経口投与を主とする毒性試験・発癌性試験などと食品の調査に基づく汚染実態を根底にして、FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会(JECFA)がリスクアセスメントを行った後、規制が検討される。この作業は慢性毒性試験における無作用量(NOEL)を基本とし、これにヒトへの安全係数(通常 100)を見込んだものが耐容 1 日摂取量(TDI)として示される。国際規格化は FAO/WHO 合同食品規格委員会(CODEX)により進められ、最近ではアフラトキシン M₁、オクラトキシン A、デオキシニバレノール、T-2/HT-2 トキシン、パツリン、ゼアラレノン、フモニシン B などの TDI または最大基準値が議案になり、順次総会で規格基準が採択されている。わが国でもこれを受けて、デオキシニバレノール(暫定)、パツリンの最大基準値が設定された。

ニバレノール産生型麦類赤かび病菌における試験研究用菌株の選定

西日本で分離されたニバレノール産生型ムギ類赤かび病菌について、胞子形成能、病原力および感染コムギ粒におけるマイコトキシン産生性を調査し、胞子形成能が比較的高く病原力の異なる 2 菌株を、試験研究用菌株として選定する。

麦類における収穫前降雨が赤かび病かび毒蓄積に及ぼす影響

麦類における収穫前降雨が赤かび病かび毒蓄積に及ぼす影響について、デオキシニバレノール(DON)・ニバレノール(NIV)に加えゼアレノン(ZEA)も対象とし、圃場試験およびポット試験により検討した。圃場試験では、圃場に栽培し赤かび病菌を接種したコムギ「チクゴイズミ」・「農林 61 号」および二条オオムギ「ニシノチカラ」について、収穫前降雨処理(約 20mm/h×15min のスプリンクラー散水を 13 回/日、3～6 日間)の有無の区を設け、それぞれかび毒を測定した。降雨処理は、「チクゴイズミ」は収穫適期前(開花 30 日後)から、その他については収穫適期(開花 37～38 日後)から行った。ポット試験では、圃場で接種し鉢上げしたコムギ「農林 61 号」について、収穫適期前および収穫適期からの降雨処理(5mm/h 連続降雨、3～4 日間)の有無の区を設け、それぞれかび毒を測定した。以上の結果、収穫前の降雨により DON・NIV が減少し ZEA が顕著に増加することが示され、また収穫適期前の降雨では、降雨期間終了後に、一旦減った DON・NIV が再び増加する可能性が示唆された。

カビの産生する有毒二次代謝産物：マイコトキシン

抄録なし

第 6 回食品リスク研究講演会～カビ毒のリスク評価について～

I. カビと食品衛生

食品衛生上カビが問題となるのは、カビの発育を原因とする食品の変質・変敗やマイコトキシン(カビ毒)汚染である。細菌とは異なり、カビの発育は肉眼的に観察できるため、苦情食品の多くは“カビ様異物の混入”として保健所に届けられ、異臭や変色の苦情原因になることもある。目視によりカビ発生が確認できた食品は、通常、商品価値を失い、消費者の口に入ることはない。しかし、食品の原材料がカビ毒に汚染された場合は、正常な食品として喫食される可能性が高い。マイコトキシンには急性毒性以外に、微量を長期間摂取することにより発生する慢性毒性があり、発がん性や免疫抑制等の毒性を有する。わが国の食品衛生上の規制は、カビ発生に対しては清涼飲料水の成分規格だけであるが、食品中のマイコトキシンに対しては現在、アフラトキシン B₁、デオキシニバレノール、パツリンの 3 種の暫定基準値あるいは基準値が定められている。本稿では、カビが食品の品質や安全性に及ぼす影響について考察した。

家畜に対するマイコトキシンの影響

カビ(真菌)が産生する二次代謝産物で、ヒトや動物に対して有毒なものをマイコトキシンあるいはカビ毒と呼ぶ。高鳥は、飼料に常在するカビについての調査を行い、ほとんどの飼料に *Aspergillus* 属、*Penicillium* 属、*Fusarium* 属やケカビ目のカビが常在していることを報告している¹⁾。したがって、温度、湿度などカビの繁殖条件がそろえばこれらが増殖し、マイコトキシンが飼料を汚染する。また、*Fusarium* 属のカビはイネ科植物に赤カビ病を起こす病害菌であり、圃場で飼料作物に病害を起こすと同時にマイコトキシンの汚染する。さらに、カビにとってストレスが加わった状態、すなわち低温や殺カビ剤の使用でカビの増殖が盛んでない状態でも、マイコトキシンが産生されるという報告もある²⁾。

このように、種々の条件で飼料がマイコトキシンの汚染される可能性があり、家畜に対する影響が懸念される。本稿では、マイコトキシンが家畜におよぼす影響とその評価について概説する。

JECFA による評価

2001 年 2 月に第 56 回 JECFA(Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)が開催され、フモニシン B₁, B₂, B₃, デオキシニバレノール, T-2 トキシン, HT-2 トキシンについて初めての評価が、アフラトキシン B₁, オクラトキシン A について再評価が行われた。ここではそれらのうちトリコデセンについての評価結果の主要な部分を紹介する。

有害化学物質のバイオコントロールによる小麦製品の高度安全性確
保の研究

抄録なし

酒類の安全性に関する調査(第 2 報)—デオキシニバレノールの分析

—

抄録なし

第 6 回食品リスク研究講演会～カビ毒のリスク評価について～

カビ毒を含む食品を安全に使用するためには、カビ毒を含む食品を摂取することによる健康リスクを評価し、現状のリスクが高い場合には、カビ毒を含む食品の流通を規制し、リスクを低くし安全性を確保する必要がある。本稿では、小麦に含まれるカビ毒であるデオキシニバレノール(DON)の小麦摂取による曝露量評価を、モンテカルロ法を用い、現行の規制値の妥当性を検討した。モンテカルロシミュレーションを行うにあたり、小麦サンプル中の DON 含有量に関するデータと小麦の摂取量に関するデータから全体の母集団の分布をまずシミュレーションし、データセットを作り、それらを用いて、さらにシミュレーションを行い曝露量を推定した。その結果、年齢階級別では 1～6 歳でもっとも高い値を示し、7 歳以上では年齢の上昇とともに低下した。規制に関する 3 つのシナリオ(規制なし、1.1ppm、2ppm)では大きな差異を認めなかった。また、95 パーセンタイル値では、各シミュレーションにおいて $1\mu\text{g/kg}$ を超える値は認められなかった。99 パーセンタイル値では、1～6 歳以下で約 $2\mu\text{g/kg}$ となり、7 歳以上ではほぼ $1\mu\text{g/kg}$ と、耐容一日摂取量(TDI)を上回る結果となった。本研究では小麦摂取に関する母集団の推定分布に 2 つの対数正規分布を仮定し、適合性を高める工夫をしたが、実際の摂取量より高い値がシミュレーションデータに存在した可能性がある。結果の解釈についてはこのことを考慮する必要がある。

マイコトキシンの免疫毒性

抄録なし

マイコトキシンは今

マイコトキシンの免疫毒性

マイコトキシンにはそれぞれ標的臓器があり(表—1), その標的臓器に主たる傷害がみられるが, アフラトキシン, フモニシン, オクラトキシン, ゼアラレノンなどはそれらに加え実験的に免疫系にも影響を及ぼすことが知られている。一方, T-2 トキシンやデオキシニバレノールなどのトリコテセン系マイコトキシンはリンパ組織への傷害が主体であり, 免疫毒性のほか家畜では増体の抑制などが問題となる。

マイコトキシンの免疫毒性に関する研究は精力的に行われており, 論文も多数発表されている。しかし, 標的臓器に傷害がみられる濃度以上の高濃度で免疫毒性がみられたとしても, 実質的にはあまり重要ではないと考えられる。Corrier¹⁾は総説のなかで「マイコトキシンの摂取により, 明らかな臨床症状を示さないレベルで免疫機能の抑制や感染症に対する抵抗力の減弱が起こり得る」と述べているが, 実際にはどの程度の影響があるのでしょうか。in vitro の実験では, ごく微量のマイコトキシンが免疫細胞へ影響を及ぼしたとする報告もあるが, 生体内では吸収や代謝など様々な要因が複雑に絡み合うため, それらは必ずしも生体での影響を示すものではない。そこで本稿では in vivo の報告を中心に免疫系への影響を考察し, また実験例についても紹介する。

まず, 何をもって免疫毒性を評価しているかということであるが, 多くの論文では主に次のような方法を用いている。病理学的には肉眼で胸腺やリンパ節などリンパ組織の萎縮や臓器重量(相対重量)の減少, 組織学的にはリンパ球の減少や消失, 早い時期であればアポトーシス, そして末梢血の白血球数の減少の確認などである。細胞性免疫の評価としては, フィトヘマグルチニン(PHA)やコンカナバリン A(ConA)などのマイトジェンによるリンパ球の幼若化反応や遅延型過敏反応が挙げられる。液性免疫では羊赤血球(SRBC)に対する抗体産生やブラーク法, ワクチン接種後の抗体価の測定などが行われる。そのほか, 単球やマクロファージの貪食能, 好中球の走化性, サイトカイン動態の測定などが行われている。

また, 易感染性(宿主抵抗性の減弱)を検討する方法としては, マイコトキシン投与前または投与後, あるいは同時に(実験デザインは報告により多様である)病原微生物を実験動物に接種し, 死亡率を比較したり, 臓器からの分離細菌数やウイルスタイトルの測定, また病理所見の程度(病変の大きさ, 数, 拡がり)の比較などが行われている。

デオキシニバレノールの豚初代培養肝細胞に対する影響

デオキシニバレノール(DON)は *Fusarium* 属の真菌によって産生されるトリコテセン系マイコトキシンの一種で、日本を含む多くの国で麦類を汚染している。飼料に DON が混入すると、豚では飼料摂取量低下や増体率低下、ときに嘔吐、下痢などの症状が認められる。しかし、DON の実質臓器に対する影響は詳細に検討されていない。本研究では DON の豚肝細胞に対する影響を検討した。1 カ月齢の子豚より肝細胞を分離して 5×10^5 の細胞密度で播種し、培地に DON をそれぞれ 100, 10, 1, 0.1, 0.01 $\mu\text{g/ml}$ (終濃度) 添加した。3, 6, 12, 24 時間後に形態的変化の観察と培地中のアルブミン分泌量を ELISA で測定した。DON を 100 または 10 $\mu\text{g/ml}$ 添加した群では、6 時間後より肝細胞の細胞死がみられた。細胞死は 24 時間後には顕著となり、1 $\mu\text{g/ml}$ 以上の添加群で濃度依存性に認められた。また、24 時間後のアルブミン分泌量は、0.1 $\mu\text{g/ml}$ 以上の添加群で対照群よりも低下していた。DON は豚の肝細胞に細胞死を誘導することが明らかになった。形態的には対照群と差がみられなかった 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 添加群においても、アルブミン分泌量の減少がみられた。こういった DON の肝臓に対する細胞障害や機能的障害が、増体率などにも悪影響を及ぼしている可能性が考えられた。また、初代培養肝細胞を用いた実験系は、DON の肝細胞に対する障害メカニズムの解明に有用であるものと思われた。

カビ毒が豚に与える影響と対策

抄録なし

マイコトキシンのリスクプロファイル

抄録なし

食品中のカビ毒の毒性および暴露評価に関する研究

食品を汚染する有害化学物質は多く存在するが、カビ毒は気象条件に左右される汚染物質であるため、防御が困難な物質の代表的なものである。カビ毒は、圃場や貯蔵段階で、農産物に汚染したカビによって産生され蓄積される。カビ毒が含まれている食品を食することにより、癌や腎臓疾患、胃腸障害、免疫疾患など様々な健康被害が引き起こされる。しかし、加熱や製造工程でその減衰が難しい化合物であるため、含まれる量を規制することがヒトや動物への暴露量を最小限にするための最も有効な対応策といえる。カビ毒産生菌は世界中に分布しているため、この防御や規制に対しては国際的な取り組みがなされている。すでにいくつかのカビ毒に関してコーデックスなどで国際的に基準値が設定されているが、我が国で基準値が設定されているのはパツリンのみである。本研究では我が国でまだ基準値が設定されていないにもかかわらず国際的に対応が急がれているカビ毒を対象に、基準値設定の根拠となる科学的基礎データをを得ることを目的としている。本年度の成果は以下の通りである。①我が国に流通している食品中のトータルアフラトキシン、オクラトキシン A、フモニシンについてそれぞれ 397 検体、335 検体、192 検体を対象に汚染実態調査を行った。その結果アフラトキシンは、市販の、ポップコーン、スイートコーン、コーンフレーク、豆がし、ゴマ油、そばめん、せんべい、米、豆菓子については定量下限未満であったが、香辛料、ココア、チョコレート、ホワイトチョコレート、ハトムギ、アーモンド、ピスタチオナッツ、ピーナッツ、そば粉、コーングリッツ、ピーナッツバターの一部より定量下限以上の濃度の AFB1 が検出された。オクラトキシン A は、コーンフレーク等のとうもろこし製品、せんべい、かつお節からは検出されなかったが、パスタ、レーズン、ワイン、ビール、生コーヒー豆、煤煎コーヒー、そば粉、そば麺、ライ麦粉、小麦粉、オートミールの一部から、また、ココアの全て、チョコレートとインスタントコーヒーの大部分から最高 4.25ng/g の汚染が認められた。フモニシンは、コーンスターチ、スイートコーン、コーンスープ、米からは検出されなかったが、コーンナック、コーングリッツ、ポップコーン、コーンフレーク、大豆、ビールの多くより、数十 $\mu\text{g/kg}$ 以下、一試料から 453 $\mu\text{g/kg}$ のフモニシン B1 が検出された。②フモニシンの毒性評価に関する文献調査をおこなった。フモニシンは発ガン性および肝、腎毒性があり、トウモロコシがその主汚染源である。アメリカでは、2001 年にガイドラインが決められたが、2000 年にヨーロッパ連合において、2001 年に JECFA においてその暫定一日耐容摂取量が設定されたことから、ヨーロッパ連合においても基準値の設定がされているところである。③

わが国の国産小麦で汚染が問題になっているニバレノール(NIV)の慢性毒性試験では昨年行なった雌雄のラットを用いた90日間反復投与毒性試験の検体を詳細に検討した。その結果、血液学的検査では、雄の100ppmおよび雌の(NOAEL)は、6.25ppm(0.4mg/kg/day)未満であると考えられた。④3年間通年で実態調査をした結果を踏まえて、モンテカルロ・シミュレーション法による日本人のアフラトキシン曝露量の推定を行った。アフラトキシン B1 に対して10 μ g/kgで規制をしている現状においては、年齢構成比で重み付けした日本人全体のアフラトキシン B1 の曝露量は、もっとも安全側をとったシナリオである「B1 10 μ g/kg 規制」の場合で99.9パーセンタイル値において2.06ng/kg/dayであり、もっとも少なめに見積もられる「B1 4 μ g/kg、トータル8 μ g/kg 規制値」で99.9パーセンタイル値においては1.88ng/kg/dayであった。アフラトキシン摂取量が1ng/kg/day/を超える人口の割合はいずれのシナリオにおいても0.2%程度となった。

食品中のカビ毒の毒性および暴露評価に関する研究

カビ毒は、カビの 2 次代謝物のうちヒトや動物に有害な影響を及ぼすものをいう。カビ毒は慢性疾患を引き起こすことが懸念されており、一般的に熱に安定であることから、食品衛生上大きな問題となる。カビ毒産生菌は世界中に分布しているため、この防御や規制に対しては国際的な取り組みがなされている。すでにいくつかのカビ毒に関してコーデックスなどで国際的に基準値が設定されているが、我が国で基準値が設定されているのはパツリンだけである。本研究では我が国でまだ基準値が設定されていないにもかかわらず国際的に対応が急がれているカビ毒を対象に、基準値設定の根拠となる科学的基礎データをを得ることを目的としている。本年度の成果は以下の通りである。①我が国に流通している食品中のトータルアフラトキシン、オクラトキシン A、フモニシンについてそれぞれ 235 検体、367 検体、204 検体を対象に汚染実態調査を行った。その結果アフラトキシンは、市販の殻付きピーナッツ、ピーナッツ、コーングリッツ、ポップコーン、スイートコーン、コーンフレーク、ゴマ油、米、豆菓子からは検出されなかったが、ピーナッツバターの一部より $0.7 \cdot \text{g/kg}$ 未満の濃度の AFB1 が検出された。オクラトキシン A は、コーンフレーク等のとうもろこし製品、グレープジュース、米からは検出されなかったが、レーズン、ワイン、ビール、生コーヒー豆、煤煎コーヒー、そば粉、そば麺、ライ麦、小麦粉、オートミールの一部から検出され、その濃度は大部分が $1 \cdot \text{g/kg}$ 未満であった。フモニシンは、押麦、そば粉、そば麺、精白米からは検出されなかったが、ポップコーン、コーングリッツの多くより、数十 $\cdot \text{g/kg}$ 以下、一試料から $185 \cdot \text{g/kg}$ のフモニシン B1 が検出された。②オクラトキシン A の毒性評価に関する文献調査をおこなった。オクラトキシン A は腎毒性および発ガン性が主たる毒性であり、多くの国で汚染が起こっていること、半減期が極端に長いこと、などから健康被害を未然に防ぐために早急に基準値設定が必要であると思われた。コーデックス委員会でも近い将来基準値が設定される。③わが国の国産小麦で汚染が問題になっているニバレノール(NIV)の慢性毒性試験では用量を再度検討した後、最高用量を 100ppm として、25 及び 6.25ppm の混餌用量で雌雄のラットを用いた 90 日間反復投与毒性試験を実施した。その結果、雄の 25ppm 以上、雌の 100ppm で体重増加が抑制され、雌雄の 100ppm では摂餌量も減少した。臓器重量は、雄の 100ppm で精巣重量(絶対・相対)が増加し、胸腺絶対重量が減少した。雌でも、100ppm で胸腺重量(絶対・相対)が減少した。血液検査では、雄の 100ppm、雌の 6.25ppm 以上で白血球が減少し、血小板の減少が雌雄の 100ppm、赤血球の減少が雄の 100ppm、ヘモグロビンの減少が雌の

100ppm で認められた。また、雄では 100ppm で白血球分画中でのリンパ球比率の減少、好中球比率の増加を認めた。以上、NIV のラットへの経口投与により、弱い貧血とともに白血球を標的とした毒性が示された。③モンテカルロ・シミュレーション法による日本人の小麦類からの DON 曝露量の推定を行った結果、95 パーセンタイル値では、一日当たり耐用摂取許容量である体重 1kg 当たり 1 μ g/ を超える値は認められなかった。一方、99 パーセンタイル値においては、乳幼児において、現行の基準値の 2 倍を超える曝露推定値を示した。仮想摂取量分布の不適合の影響による過大評価の可能性があるものの、より高い安全性を示すには、乳幼児に関しては更に検討を行った上で、何らかの特段の措置を実施する必要があるかもしれない。

穀類中のカビ毒デトックス法の探索と安全性評価

抄録なし

ニバレノールの毒性影響と毒性学的同等性

ニバレノールはトリコテセン系マイコトキシン的一种であり、我が国では国内汚染があることからその健康被害が危惧されている。しかし、デオキシニバレノールに比べて汚染地域が限られていることから毒性に関する知見が少なく JECFA などの国際機関やヨーロッパ連合の食品技術専門家会議では、その毒性評価は行われていない。我が国では国産小麦においてデオキシニバレノールとニバレノールの共汚染が高い頻度で見られるため、早急の対策が求められている。本研究ではニバレノールの毒性評価に一環として、90 日間短期毒性試験を行い、その免疫系への影響を抗体価の変動およびナチュラルキラー活性を指標として検討した。その結果、脾臓免疫担当細胞に対する短期免疫毒性を見いだした。特に脾臓リンパ球のうち、細胞障害性 T 細胞のニバレノールに対する高い感受性を観察した。又、高濃度のニバレノール暴露によってナチュラルキラー活性担当細胞への細胞毒性が観察される一方、低濃度ではナチュラルキラー活性の上昇が見られた。抗体価においては IgM に変動が観察された。これらの知見は、人に対するニバレノールの免疫毒性を考える上で重要な知見を与えるものである。

市販 ELISA キットによる玄麦中デオキシニバレノールの迅速簡易スクリーニング法の評価

デオキシニバレノール(DON)は穀物の赤カビ病の原因菌であるフザリウム属に属する *Fusarium graminearum* により主に産生されるトリコテセン系マイコトキシンであり、DON は多くの動物実験から、胃腸障害や神経毒性、免疫抑制などの毒性を示すことが明らかにされており、ヒトでの中毒例も多い。我が国でも赤カビ汚染穀物が原因と推定されるヒトの中毒例が古くから知られており、1957 年に北海道で起きた赤カビ中毒事例では 43 名の被害を出している。中国やインドでもトリコテセン系マイコトキシンが原因と推定される大規模な食中毒例が、1960～1991 年の間に 53 件記録されており、その対策が急がれている²⁾。

DON のリスクについては 2001 年 2 月に行われた JECFA の会議において評価が行われ、DON の暫定一日耐容量(PMTDI)として $1\mu\text{g/kg}$ 体重/day が設定された³⁾、この経緯を受けて我が国においても 2002 年 5 月に小麦玄麦中の DON に対する行政上の指導指針としての暫定基準値が 1.1ppm と設定された⁴⁾。現在その分析法として UV 検出器を用いた高速液体クロマトグラフィーによる方法が(HPLC・UV)厚生労働省からの通知法として提示されているが⁴⁾、HPLC・UV は大量の試料を短時間に処理するには適当ではないため、スクリーニング法として、簡便かつ迅速に分析できる ELISA 法の導入が切望されている。そこで、本研究では 3 種類の市販 ELISA キットを用いてスクリーニング法としての ELISA 分析法の評価試験を 14 試験機関で行い、使用の妥当性および問題点を検討した。

トリコテセン系マイコトキシンのマクロファージへのサイトカイン

産生能

抄録なし

秋まき小麦の赤かび病防除とデオキシニバレノール対策

北海道の秋まき小麦で問題となる赤かび病菌は *microdochium nivale* と *Fusarium graminearum* である。M. nivale に対しては開花始から 1 週間間隔の 2 回の薬剤散布が有効であり、F. graminearum による DON 汚染の低減には 3 回散布が有効である。

Fusarium graminearum のデオキシニバレノール産生を誘導する炭素源

Fusarium graminearum は、開花期以降のムギ類の穂に感染し赤かび病を引き起こすとともに感染組織にデオキシニバレノール(DON)を蓄積する。DON 産生誘導機構を明らかにすることを目的に、*F. graminearum* H3 菌株を用いて液体培養条件(攪拌強度・通気性・培地 pH)及び DON 産生を誘導する炭素源を検討した。

DON (デオキシニバレノール ; 赤かび病菌毒素の一種)

抄録なし

食品の安全性及び機能性に関する総合研究—安全性—第 3 編世界的
に信頼される分析データ提供システム等の基盤構築第 1 章国際基準
に則った食品の安全性保証システムの構築 2 マイコトキシン分析の
信頼性確保のための外部精度管理システムの開発

食飼料を汚染するマイコトキシンの分析精度はここ四半世紀の間に大幅に向上し、その間に分析法の主力は TLC から HPLC へと変化してきた。

ELISA 分析は、制限はあるもののマイコトキシンの分析法として充分に使用できる可能性を持つものである。

コメに関しての分析法の適用範囲拡大(マトリックスエクステンション)にあたっては、コメと他の穀類の間には成分的に違いがあることをふまえて十分な検討をする必要がある。

ニバレノール静脈内投与による実験的急性中毒発症豚における病理
学的変化

抄録なし

デオキシニバレノール汚染に対応した小麦の乾燥・調製技術

小麦中のデオキシニバレノール (DON) 濃度比はいわゆる 2 段階乾燥の貯蔵段階において上昇する可能性が高い。DON 濃度上昇のリスクは穀粒含水率 (14 ~ 18% w.b.) とは無関係であるように見受けられる。DON 濃度上昇は DON の初期濃度が 2 mg/kg を超える高値である場合に顕著に発生した。迅速な乾燥によって DON 濃度上昇を回避することができる。

DON に汚染された穀物はある種の物理的処理によって除去することが可能である。寸法測定器、重力分離装置、光学式 (近赤外線) ソーターを用いて DON 濃度を効果的に低下させることが可能である。

重力分離では、各検体 (分離前の検体、合格検体、不合格検体) の DON 濃度は検体の容積重量に反比例する。したがって、重力処理による DON 標的濃度は合格検体の容積重量から大まかに推定することが可能である。