

## ヒト前骨髓性白血病細胞 HL-60 において T-2 毒素およびその他の天然毒素が誘発するアポトーシス

電子顕微鏡で観察される DNA 分裂のゲル電子泳動や形態変化の特徴に基づき、合計 31 種類の化学物質をヒト前骨髓性白血病細胞 HL-60 に用いて、3-[4,5-ジメチルチアゾル-ジイル]-2,5-臭化ジメチルテトラゾリウム(MTT)およびトリパンブルー排除を用いる細胞毒性試験とともに、マイコトキシンおよびその他の細菌産物による核のアポトーシス的変化の誘発を調査した。試験を実施した化学物質のうち、トリコテセン(T-2 毒素、ロリジン A、ニバレノール、デオキシニバレノール)、特定のアントラキノン(ルテオスカイリン、スカイリン、2-ヒドロキシエモジン)、ジケトビペラジン(エメタリシン A、エメストリン)、イソクマリン(オクラトキシン A、シトリニン)、ラクトン(ペニシリリン酸)、ジヒドロビスフラン(アフラトキシン B<sub>1</sub>)、カリウムイオノホア(バリノマイシン)、およびインターロイキン-2 合成阻害物質(シクロスボリン A)は DNA 分裂誘発に陽性であった。フモニシン B<sub>1</sub>、環状ペプチド(シクロクロロチン、ファロイジン、ミクロシスチン-LR)、特定のアントラキノン(エモジン、クリソファノール、ルグロシン)、およびその他(ステリグマトシスチン、サイトカラシン A、グリセオフルビン、フザリン酸、コウジ酸、ルプラトキシン B、ブテノリド、ワートマニン、FK506、およびスフィンゴシン)を用いたところ、本条件下で DNA 分裂は認められなかった。T-2 毒素およびルテオスカイリンに曝露した細胞のアポトーシス性変化を電子顕微鏡観察で確認した。用量および時間依存性に関して詳細な実験を実施したところ、T-2 毒素は濃度 10 ng/ml( $=4 \times 10^{-8}$ M)で 2~6 時間以内にアポトーシスを誘発し、染料排除および MTT で評価したところ有意な細胞毒性は認められないことが明らかになった。

選ばれたマイコトキシン：オクラトキシン、トリコテセン、麦角

抄録なし

## Fusarium graminearum に自然汚染されたトウモロコシ中のマイコトキシンであるニバレノールおよびゼアラレノンが成長中および妊娠中のブタの成績に及ぼす効果

5つの試験において、*Fusarium graminearum* に自然汚染され、ニバレノール (NIV)  $11.5 \text{ mg kg}^{-1}$  およびゼアラレノン (ZEA)  $3 \text{ mg kg}^{-1}$  を含有するトウモロコシを成長中および妊娠中のブタに給与した。14日間の試験において、成長中のブタ飼料に  $500 \text{ g kg}^{-1}$  および  $750 \text{ g kg}^{-1}$  の汚染されたトウモロコシを添加したところ、すべての成績形質が悪化した：自由飼料摂取量 (VFI) は  $2.17 \text{ kg 日}^{-1}$  (対照群) から  $1.45$  および  $1.09 \text{ kg 日}^{-1}$  ; 1日平均増体量 (ADG) は  $0.79 \text{ kg 日}^{-1}$  (対照群) から  $0.50$  および  $0.45 \text{ kg 日}^{-1}$  ; 飼料変換率 (FCR) は  $2.45$  (対照群) から  $3.49$  および  $3.23$ 。8週間のペア給餌試験において、成長中のブタの VFI、ADG、FCR は汚染されたトウモロコシの含有量の増加とともに徐々に悪化した。しかしながら、マイコトキシン含有飼料を給与されたブタにおいて達成された摂取量に一致させる形で栄養的にほぼ同等の対照飼料をブタに給与した場合、ADG および FCR の有意差は認められなかった ( $P>0.05$ )。見かけの消化率および窒素保持を測定する独立した代謝試験においてこれらの飼料の栄養素の類似性が確認された。汚染されたトウモロコシをブタに給与したところ、白血球数および好中球数の顕著な用量依存的減少が生じた ( $P<0.05$ )。雌ブタを対象とした 2つの試験では、対照飼料と汚染されたトウモロコシ  $600 \text{ g kg}^{-1}$  を含有する飼料について、栄養素量が同じになるように各飼料を調製して雌ブタに  $2 \text{ kg 日}^{-1}$  を給与した場合の比較を行った。1つの試験では、交配 30 日後に妊娠が確認された時点から約 35 日後の屠殺まで飼料を給与した。2番目の試験では、交配日から、あるいは交配日の 30 日後から飼料を給与し、約 35 日後にすべての雌ブタを屠殺した。いずれの試験においても、汚染されたトウモロコシ飼料は対照群と比べて受胎率と屠殺時の胎児の数および体重のいずれにも悪影響を及ぼさなかった。2番目の試験では、汚染されたトウモロコシ飼料を給与された雌ブタの方が総白血球数および総リンパ球数は少なかった ( $P<0.05$ )。

## 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 B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) 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、ウェスタンプロット分析では、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、ウェスタンプロット分析では 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 B<sub>1</sub>-DNA 付加物 (AFB<sub>1</sub>-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 AFB<sub>1</sub>-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 AFB<sub>1</sub> 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。群によつては、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つた。肉眼的病変や組織病理学的病変は検査を行つた臓器に認められなかつたが、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つた。血清アルカリ性ホスファターゼ活性に用量依存的增加が認められた。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が、明らかな傾向は認められなかつた。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增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つた。

## DONに重点を置いたトリコテセン類に関するワークショップ：要約

### 報告

トリコテセン類に属する多数のマイコトキシンは、穀類中に一般に検出される種々の *Fusarium* 真菌によって產生される。気象条件が悪いと、場合によつては小麦などの作物における *Fusarium* 感染が増加し、それに対応してトリコテセン含有量も増加する。そのため、ILSI 欧州天然毒素専門委員会はデオキシニバレノール (DON) に特に重点を置いたトリコテセンに関するワークショップを結成した。多数の専門家が現時点におけるトリコテセンの知見について以下の観点から検討した：発生（カビの成長、毒素形成、蓄積、処理の影響の各側面を含む）；予防；分析方法（サンプリングを含む）；調査および曝露評価；毒性学およびリスク評価。以下の項目について多数の勧告が行われた：予防、サンプリング方法/解析方法、曝露評価、毒性学。知識の格差も同定された。

## 低用量のデオキシニバレノール摂取は、仔ブタの血液学的反応、生 化学的反応、または免疫応答に影響を及ぼさない

*Fusarium* 属の產生するマイコトキシンであるデオキシニバレノール (DON) はよく見られる穀物混入物質である。飼料中に穀物が豊富に含まれるため、ブタはこのマイコトキシンに曝露される可能性が高い。ブタは DON に対し強い感受性を示す動物種の 1 つである。飼料中レベルが中用量から高用量の DON がブタに及ぼす作用は周知されているが、これには拒食、摂取量低下、免疫応答の変化などがある。飼料中の低レベルの DON の作用は、一般に混入飼料において検出されるが、不明なままである。本試験の目的は、低混入 DON で自然汚染された給餌（飼料中 0、280、560、840  $\mu\text{g/kg}$ ）の離乳した仔ブタの機能状態、および 34 項目の血液学的、生物学的、免疫学的変数に対する作用を調査することであった。低用量 DON により動物の機能状態（摂取量および体重増加）に変化はなかった。このような低用量の DON により、測定した 9 項目の血液学的変数（白血球数、赤血球数、血小板数、好中球とリンパ球の相対数、ヘマトクリット濃度、ヘモグロビン濃度など）または測定した 18 項目の生物学的変数（陽イオン濃度、グルコース濃度、尿素濃度、クレアチニン濃度、ビリルビン濃度、コレステロール濃度、トリグリセリド濃度、血漿酵素活性など）に変化はなかった。同様に低用量 DON によるブタの免疫応答（免疫グロブリンサブセット濃度、リンパ球増殖、サイトカイン産生）への作用も観察されなかった。

## DONに重点を置いたトリコテセン類に関するワークショップ：要約

### 報告

トリコテセン類に属する多数のマイコトキシンは、穀類中に一般に検出される種々の *Fusarium* 真菌によって產生される。気象条件が悪いと、場合によつては小麦などの作物における *Fusarium* 感染が増加し、それに対応してトリコテセン含有量も増加する。そのため、ILSI 欧州天然毒素専門委員会はデオキシニバレノール (DON) に特に重点を置いたトリコテセンに関するワークショップを結成した。多数の専門家が現時点におけるトリコテセンの知見について以下の観点から検討した：発生（カビの成長、毒素形成、蓄積、処理の影響の各側面を含む）；予防；分析方法（サンプリングを含む）；調査および曝露評価；毒性学およびリスク評価。以下の項目について多数の勧告が行われた：予防、サンプリング方法/解析方法、曝露評価、毒性学。知識の格差も同定された。

## 雌ブタにおける Fusarium マイコトキシン症と PGF2 $\alpha$ およびオキシトシンによる分娩誘発プログラムの適用の失敗との関連性

本試験は 1999 年 11 月から 2000 年 2 月までの期間に繁殖肥育一貫養豚場において実施した。1998 年 11 月以降、交尾後第 113 日に PGF2 $\alpha$  (Dinolytic 2 mL、筋肉内) を投与し、その 24 時間後にオキシトシン (Intertocine-S 1mL、筋肉内) を投与する分娩誘発プログラムを雌ブタに適用した。このプログラムの結果、高い割合の雌ブタがその日の作業時間内に分娩した。1999 年 12 月中旬、新生ブタにおいてガニ股、浮腫性腫脹、外陰部発赤が観察されるようになった。分娩に関連したパラメーターの同時低下も観察された。飼料の真菌毒性学的分析によってデオキシニバレノールおよびゼアラレノンによる同時汚染が明らかになった。4 週間の試験期間中、雌ブタを以下の 2 群に分類した：(a) 分娩誘発群、(b) 分娩非誘発群。異常分娩率 (<.05) ならびに妊娠期間 (<.05) について 2 群間の有意差が確認された。さらに、ガニ股および外陰部腫脹の比率と、作業日内に分娩した雌ブタの割合低下ならびに離乳前死亡率上昇との間には高い相関が認められた (<.05)。Fusarium マイコトキシン症の罹患中にはそうした分娩誘発プログラムの実施を避けるべきであると結論付けられた。

## Fusarium 毒素汚染飼料が雌ブタ卵母細胞の初期品質および減数分裂能に及ぼす影響

マイコトキシンは家畜の受胎能を阻害し、胎児の異常発達をもたらす動物飼料汚染物質である。本試験の目的は、Fusarium 毒素汚染飼料がブタ卵母細胞の卵丘形態および成熟に及ぼす影響を検討することである。Fusarium 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 (ZON) に自然汚染された小麦を、割合を高めながら雌ブタの飼料に添加した結果、両毒素の飼料中濃度は増加した (DON・ZON (mg/kg 飼料) : 第 1 群 (対照群) : 0.21・0.004 ; 第 2 群 : 3.07・0.088 ; 第 3 群 : 6.1・0.235 ; 第 4 群 : 9.57・0.358)。卵巣子宮摘出後の卵胞吸引によって雌ブタの卵巣から卵母細胞を採取した。顆粒膜細胞における P450scc および  $3\beta$ -HSD mRNA の発現について RT-PCR により分析を行い、さらに P450scc 蛋白質の発現についてウエスタンプロット法により分析した。マイコトキシンの適用によって、P450scc および  $3\beta$ -HSD mRNA の発現と P450scc 蛋白質の存在量のいずれにも有意な影響は生じなかった。異なる卵丘細胞形態の分布は群による影響を受けなかった。採取時において、未成熟クロマチンを認める緻密な卵丘を有する卵母細胞の割合は第 1 群および第 2 群と比べて第 3 群および第 4 群の方が低かった。減数分裂期の変性クロマチンを有する卵母細胞の割合は他の各群と比べて第 4 群において有意に高かった。培養において第 2 減数分裂中期に達した卵母細胞の割合は、第 1 群と比べて第 3 群および第 4 群の方が有意に低く、また第 1 群と比べて第 2 群の方が低い傾向が認められた。筆者らは、Fusarium 毒を雌ブタに給与することによって卵母細胞の質が有意に低下すると結論付けた。

ブタ卵母細胞の *in vitro* 成熟およびブタ受精卵の *in vitro* 培養に及ぼすマイコトキシン、デオキシニバレノールおよびゼアラレノールの影響

本試験の目的は特定の毒素が *in vitro* 成熟および胚培養に及ぼす影響を調査することである。 $\alpha$ -および $\beta$ -ゼアラレノールについて 3.75~90  $\mu\text{m}$ 、デオキシニバレノールについて 0.94~7.5  $\mu\text{m}$  の用量を漸増させて試験し、ブタ卵丘卵母細胞複合体の *in vitro* 成熟速度に対する作用の評価を行った。さらに、 $\alpha$ -ゼアラレノール (3.75~30  $\mu\text{m}$ ) の及ぼす *in vivo* 誘導受精卵の発生能への影響を、5 日間 *in vitro* 培養を行い評価した。3 種類の物質はすべて用量依存的に成熟および退化速度に影響したが、その程度は異なっていた。濃度 7.5  $\mu\text{m}$  以上の $\beta$ -ゼアラレノールで有意な相違が得られた。 $\beta$ -ゼアラレノールは卵母細胞の発生過程に悪影響を及ぼしたが、濃度 30.0  $\mu\text{m}$  から影響が生じ始めた ( $P < 0.05$ )。デオキシニバレノールは濃度 1.88  $\mu\text{m}$  において卵母細胞成熟に有意に影響した (31.4 に対し対照群では 79.3%)。濃度 15  $\mu\text{m}$  の $\alpha$ -ゼアラレノールにおいて *in vitro* での胚発生における相違が観察された ( $P < 0.05$ )。これらのデータは、受精卵の胚発生に対し $\alpha$ -ゼアラレノールが悪影響を及ぼすこと、およびブタ卵母細胞の減数分裂進行に対し 3 つの物質が化合物特定の用量依存的な作用を及ぼすことを実証する。

## マウスにおけるトリコテセンデオキシニバレノールによる組織分布 と向炎症性サイトカイン誘導：経鼻曝露と経口曝露の比較

一般的な穀物汚染物質であるトリコテセンデオキシニバレノール (DON) への経口曝露によって実験動物の成長および免疫機能に悪影響が生じる。DON は食物曝露に加えて穀物の収穫および処理の時期に空気で運ばれる可能性があるため農業労働者にとってリスクとなる。本試験の目的は、DON (5 mg/kg 体重) への経口曝露および鼻腔内曝露が成体雌マウスにおける組織分布および向炎症性サイトカイン誘導に及ぼす影響を比較することである。直接競合 ELISA により、曝露経路にかかわらず、血漿、脾臓、肝臓、肺、腎臓の DON 濃度は 15~30 分以内に最大値に達し、120 分後には 75%~90% 低下することが明らかになった。しかしながら、鼻腔内曝露後の血漿中および組織中の DON 濃度は、経口曝露の場合の 1.5~3 倍であった。脾臓、肝臓、肺における IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  mRNA 応答を測定することによって組織中 DON 濃度上昇の機能的意義を評価した。DON への経口曝露によって、60 分後および 120 分後に頑健な向炎症性サイトカイン遺伝子発現が誘発された。これに対し、経鼻曝露されたマウスにおける IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  の mRNA 誘導は、経口曝露されたマウス組織の場合と比べてそれぞれ 2~10 倍、2~5 倍、2~4 倍であった。以上を総合すると、DON は経口曝露よりも経鼻曝露の方がマウスに対する毒性が高く、それは毒素の組織負荷が高いことに関連している可能性があることをこれらのデータは示唆している。

in vitroでの胃腸管モデルにおける炭素／アルミノケイ酸  
塩ベースの製品における多種類のマイコトキシン結合の効果に関する評価

ブタ胃腸管の *in vivo* 状態を模擬するよう作製した実験モデルを使用し、多種類のマイコトキシン混入飼料に添加した場合のマイコトキシン吸収低下について、複数種類のマイコトキシンの小腸吸収および Standard Q/FIS (炭素／アルミノケイ酸塩ベースの製品) の有効性に関する試験を行った。マイコトキシンは、フモニシン B<sub>1</sub>と B<sub>2</sub>についてはそれぞれ 105% および 89%、オクラトキシン A では 87%、デオキシニバレノールでは 74%、アフラトキシン B<sub>1</sub>では 44%、ゼアラレノンでは 25% のレベルで小腸近位部において急速に吸収された。飼料に Standard Q/FIS を添加したところ (全体重量当たりの重量 2% 以下)、マイコトキシン吸収は用量依存的に有意に低下し、アフラトキシン B<sub>1</sub>では 88%、ゼアラレノンでは 44%、フモニシンおよびオクラトキシンでは 29% 低下した。Standard Q/FIS はデオキシニバレノール吸収低下には有効でなかった。以上の結果から、Standard Q/FIS が動物における単一または複合的なマイコトキシンの有害作用を防止する多種類毒素の吸着剤として使用され得ることが示唆される。

## *In vitro* 胃腸管モデルによるデオキシニバレノールとニバレノールの腸管吸収および活性炭とその他の吸着剤の結合効果の評価

デオキシニバレノール (DON) およびニバレノール (NIV) の結合能について pH 3~8 の範囲で、*Fusarium* 由来マイコトキシンの解毒に使用される一部の市販製品など吸着剤 14 種類の *in vitro* スクリーニング試験を実施した。活性炭だけが有効性を示し、吸着等温線から算出すると吸着剤 1 g 当たり DON および NIV についてそれぞれ  $35.1 \mu\text{mol}$  および  $8.8 \mu\text{mol}$  の結合能であった。健常ブタの胃腸 (GI) 管を模擬する動的実験モデル (TIM システム) を使用し、DON と NIV の小腸での吸収および当該吸収の低下に関する活性炭の効果を評価した。DON と NIV の *in vitro* 腸管吸収はそれぞれ 51% と 21% であったが、混入 (毒素を含有する) コムギを介して 170  $\mu\text{g}$  の DON と 230  $\mu\text{g}$  の NIV を摂取したものと見なされる。どちらのマイコトキシンも概ね空腸部分で吸収された。活性炭含有によって、マイコトキシンの腸管吸収は有意に低下した。含有率 2% では、摂取に関連する吸収は DON の場合 51% から 28% まで低下し、NIV の場合 21% から 12% まで低下した。トリコテセン類に関する活性炭結合能は、自然汚染された穀物においてこれらと同時発生する頻度の高いマイコトキシンであるゼアラレノンについて認められるよりも低かった。

## 小腸におけるD-グルコース取込に及ぼすデオキシニバレノールの *in vitro*効果および産卵雌ニワトリの単離空腸上皮全体でのデオキシニバレノールの吸収

デオキシニバレノール (DON) は家畜飼料における一般的なマイコトキシン混入物質であり、動物において多様な毒性作用を引き起こすことが明らかになっている。本試験の目的はニワトリ空腸のグルコース輸送能力に及ぼす DON の作用を評価し、Ussing chamber 法により DON そのものの浸透を調査することであった。ニワトリ空腸上皮に吸収されるグルコースは、粘膜溶液に  $200 \mu\text{mol/L}$  の  $^{14}\text{C}$  標識グルコースを添加後に測定した。対照条件下におけるグルコース吸収は  $3.28 \pm 0.53 \text{ nmol/cm}^2 \cdot \text{分}$  であった。グルコース吸収全体へのナトリウムグルコース共輸送体 1 (SGLT-1) 寄与は、フロリジン ( $100 \mu\text{mol/L}$ ) を用い SGLT-1 を阻害することにより評価した。フロリジン存在下において、グルコース吸収は  $1.21 \pm 0.19 \text{ nmol/cm}^2 \cdot \text{分}$  まで低下した ( $P < 0.05$ )。デオキシニバレノールによりフロリジン非存在下のグルコース吸収は  $1.81 \pm 0.24 \text{ nmol/cm}^2 \cdot \text{分}$  まで低下したが ( $P < 0.05$ )、フロリジン存在下のグルコース吸収には付加的な作用を及ぼさなかった ( $0.97 \pm 0.17 \text{ nmol/cm}^2 \cdot \text{分}$ )。粘膜から漿膜への DON 浸透は、粘膜側における  $1 \sim 10 \mu\text{g/mL}$  の濃度範囲では初期 DON 濃度に正比例した。DON 添加から 60~90 分後に測定した  $10 \mu\text{g/mL}$  の DON における浸透性は、 $1.7 \cdot 10^{-5} \text{ cm/s}$  であったことが明らかであった。結論として、DON ( $10 \text{ mg/L}$ ) によるグルコース吸収低下はフロリジンとほぼ同等の有効性であったと言える。グルコース吸収に関するフロリジンと DON との作用の類似性は、 $\text{Na}^+-\text{D}-\text{グルコース}$  の共輸送を阻害する共通の能力を証明するものである。局所作用に加えて、DON は空腸からも吸収され得る。主要部位の DON はニワトリ腸管上皮全体から受動拡散により透過するが、これは傍細胞経路におけるのと同様である。これらの結果は、DON が混入した飼料への曝露は、局所的（腸管 SGLT-1 の阻害）および全身的作用によって動物の健康と機能に有害作用を及ぼす可能性があることを示唆するものである。

## プロイラーニワトリの全身機能状態および腸管粘膜の電気生理学的特性に及ぼすデオキシニバレノールの影響

飼養試験を実施し、プロイラーの機能状態および腸の電気生理学的パラメータに及ぼすデオキシニバレノール (DON) で汚染された飼料の作用を評価した。対照群には DON 非添加のスタータ飼料と仕上げ飼料を与えた。別のプロイラー群に 10 mg/kg の DON を添加したスタータ飼料と仕上げ飼料を与え、また別の群に微生物飼料添加物 (*Eubacterium sp.*) を加えた DON 混入飼料を与えた。給餌は 6 週間、無制限に与えられた。DON は摂餌量、飼料要求率、または体重に作用を及ぼさなかった ( $P > 0.05$ )。空腸の電気生理学的パラメータに対する DON の作用について、単離腸粘膜を用いた *in vitro* 試験を Ussing chambers 法で実施した。給餌期間の終了時、各群から 7 羽ずつ屠殺し、腸の電気的特性評価を行うために基底およびグルコース刺激による経壁電位差 (PD)、短絡電流 (Isc)、および電気抵抗 (R) を単離腸粘膜において測定した。経壁 PD について群間差はなかった ( $P > 0.05$ )。組織抵抗については、対照群および DON 群と比較し、DON と微生物飼料添加物の投与群では多かった ( $P < 0.05$ )。単離粘膜の管腔側への D-グルコースの添加により対照群および DON 阻害群 (*Eubacterium sp.*; PB) において Isc が増加した ( $P < 0.05$ ) 一方、DON 群では減少した ( $P < 0.05$ ) が、これはグルコース誘導性の Isc が DON により変化したことを示す。結論として、DON 汚染プロイラー飼料に真性細菌を添加すると、腸における電気生理学的特性を対照群の場合と比較可能となる。飼料中 10 mg/kg の DON によりプロイラーの空腸における  $\text{Na}^+$ -D-グルコースの共輸送が障害されると考えられる。臨床徵候が認められない場合、および機能状態に障害がない場合、DON はプロイラーの腸機能を変化させると思われる。*Eubacterium* 属を添加することは、腸管のグルコース輸送に及ぼす DON の毒性作用に対する拮抗作用に有用な可能性がある。

## 産卵鶏の種々の腸区分から単離した上皮を横切る D-グルコース輸送に対する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 *in vitro* で産卵鶏の近位空腸におけるグルコース吸収を低下させるが、この効果は明らかにナトリウム・D-グルコース共輸送体の阻害により仲介される。DON は鶏のその他の腸領域の糖輸送を調節すると考えられる。このため、鶏の十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸から単離した上皮にグルコースを加える前後に DON を添加し、 $\text{Na}^+$ -D-グルコース共輸送体に対する DON の効果を電圧固定法に Ussing chamber 法を用いて測定した。データは、腸の全区分において粘膜側に D-グルコースを添加した場合に基底値と比較して電流 (Isc) が上昇したこと、基底値と比較してグルコースを小腸に添加した後の Isc が大腸の Isc、特に空腸のそれより大きかったこと ( $p < 0.002$ ) を示した。このことは、 $\text{Na}^+$ -D-グルコース共輸送用に調製するには空腸が最も優れた区分であることを示している。粘膜溶液にさらに  $10 \mu\text{g}$  DON/ml を添加すると全区分の Isc が低下し、特に十二指腸や空腸中部では Isc は基底値に戻った ( $p < 0.05$ )。それとは対照的に、組織を DON とともにインキュベートした後に粘膜側に D-グルコース 5mmol/l を添加すると、全区分において Isc に対する効果は認められなかった ( $p > 0.05$ )。このことは、DON が事前に  $\text{Na}^+$ -D-グルコース共輸送を阻害したことを示唆している。十二指腸および空腸中の DON の遮断効果は、消化管の他の領域における効果と比較して大きかった。産卵鶏の小腸は担体が仲介するグルコース輸送において最も重要な役割を果たしており、糖輸送能があまり高くない大腸は表面積が小さいためグルコース輸送に対する寄与は低いようだと結論付けることができる。D-グルコースが Isc に及ぼす効果は、全区分、特に十二指腸および空腸において DON により逆転した。このことは、DON が  $\text{Na}^+$ -D-グルコース共輸送系を完全に阻害したことを示唆している。この所見は、全区分における  $\text{Na}^+$  共輸送系の阻害が鶏の DON 毒性についての重要な作用機構と考えられることを示している。

## 産卵鶏空腸において管腔内デオキシニバレノールおよびL-プロリン が電気生理学的パラメータに及ぼす効果

ほとんどのアミノ酸はナトリウムとともに共輸送される。デオキシニバレノール (DON) は *in vivo* および *in vitro* でニワトリ小腸におけるグルコース吸収を低下させ、この効果は明らかにナトリウム・D-グルコース共輸送体の阻害により仲介される。DON はその他の腸内輸送体の活性を選択的に調節すると考えられる。この仮説を評価する目的で、L-プロリンをモデルとして用いて、粘膜アミノ酸の存在下で DON が産卵鶏空腸の電気生理学的パラメータに及ぼす *in vitro* 効果の特徴を明らかにする試験を実施した。リングル緩衝液中で Ussing chamber に設置した細く切った近位空腸片に L-プロリンを添加し（粘膜濃度 1mmol/l）、電気的特性を測定した。経壁電位差 (PD) は処置間でほぼ一定であった。組織抵抗 (Rt) は DON に曝露された組織が基底値や L-プロリン添加後の値と比較して高かった ( $P < 0.05$ )。単離した粘膜の管腔側への L-プロリンの添加により短絡回路電流 (Isc) が上昇し ( $P < 0.05$ )、DON 添加後には Isc は低下した ( $P < 0.05$ )。このことは、プロリンが誘発する Isc が DON により変化したことを示している。

組織を DON とともにインキュベートした後にプロリンを添加した場合には、PD または Rt に対する効果は認められなかった ( $P > 0.05$ )。この状況下でプロリンが Isc を上昇させることはなかった。プロリン添加後に DON を添加した場合には Isc が低下し ( $P < 0.1$ )、このことは DON が  $\text{Na}^+$  アミノ酸共輸送を阻害したことを見受けられた。本研究から、アミノ酸共輸送体の活性は DON 抑制に対して非常に感度が高いように見受けられると結論付けた。

## デオキシニバレノールは単球およびマクロファージにおける p38 と リボソームの相互作用を誘導する

トリコテセンマイコトキシンはリボソーム毒性ストレス応答として知られている過程を介して、単核食細胞における p38 を介した遺伝子発現およびアポトーシスを急速に誘導する。著者等は、トリコテセンデオキシニバレノール(DON)が p38 とリボソームの相互作用を誘導するという仮説を立てた。この仮説を検討するために 2 つのモデル (U937 ヒト単球、RAW 264.7 マウスマクロファージ) を用いたが、これは DON に対する急速かつ頑健な p38 リン酸化応答を惹起するこれらのモデルの能力に基づいている。U937 細胞の DON 処理後、溶解産物のショ糖密度勾配分画を行い、その結果生じたリボソーム分画を p38 プローブを用いるウエスタンプロット法で調べた。リボソームサブユニットおよびモノソーム (RS+M) が含まれる分画における p38 含有量は、DON 処理後 5 分以内に増加し、30 分間にわたって増加を続けた。p38 は最初 40S サブユニット分画と相互作用し、その後 60S ユニットおよびモノソーム分画と相互作用するように見受けられた。阻害剤 SB203580 によって p38 のリン酸化は阻害されたものの、キナーゼとリボソームの相互作用は影響を受けず、リボソーム結合とリン酸化は分離可能な事象であることが示唆された。RAW 264.7 細胞では、放射性標識 DON の取り込みが 15 分以内に生じたが、これは RS+M 分画における非リン酸化 p38 およびリン酸化 p38 の連続的増加に対応していた。p38 についての観察と同様に、DON は 2 種類のマイトジエン活性化蛋白質キナーゼ (c-Jun N 末端キナーゼ、細胞外シグナル調節キナーゼ) とのリボソーム相互作用ならびに両キナーゼのその後のリン酸化を RAW 264.7 細胞において誘導した。以上を総合すると、単核食細胞において DON は p38 のリボソームへの動員およびその後のリン酸化を誘導することをこれらのデータは示唆している。したがって、リボソームはリボソーム毒性ストレス応答における足場として中心的な役割を果たす可能性がある。

## フランス産小麦から分離した *Fusarium culmorum* 株の毒素産生能

フランスの種々の小麦栽培地域における種々の品種から収集した小麦粒から *F. culmorum* 60 株を分離した。分離株を加圧殺菌した小麦穀物上で増殖させ、トリコテセンおよびゼアラレノンの産生能を評価した。穀物中のエルゴステロール含有量から真菌バイオマスを評価した。全分離株がゼアラレノンを產生した (0.39~1660 mg/kg)。*F. culmorum* 60 株中、35 株がニバレノール (0.11~11.7 mg/kg)、12 株がフザレノン-X (0.05~8.42 mg/kg)、5 株が 15-アセチルデオキシニバレノール (0.48~27.7 mg/kg)、13 株が 3-アセチルデオキシニバレノール (0.07~21.0 mg/kg)、および 24 株がデオキシニバレノール (0.92~51.9 mg/kg) を產生した。この結果から、種々の毒素化学種およびマイコトキシン高產生および低產生 *Fusarium* 株の分布が地理的な産地と関連する可能性は低いと考えられる。

## デオキシニバレノール処理細胞株におけるアポトーシス誘発および JNK と p38 MAPK 経路の活性化

デオキシニバレノール (DON) は、最も一般的な毒素産生真菌と考えられている *Fusarium* 属が産生するマイコトキシンである。本論文では、前 B リンパ球 REH 細胞株における DON 処理後のアポトーシスの誘発、c-Jun N-末端キナーゼ (JNK) および p38 マイトジエン活性化プロテインキナーゼ (MAPK) のリン酸化、および c-Jun 蛋白質発現の結果について示す。さらに、ヒト前 B リンパ球ジャーカット細胞、ハムスター腎臓由来の BHK21 細胞、およびマウス肝癌 MH-22a 細胞を使用した *in vitro* 比較実験を実施したところ、DON の効果は細胞起源および投与量に依存し、血液細胞株では細胞増殖速度が有意に低下しアポトーシス細胞が増加することが明らかになった。BHK21 および MH-22a 細胞は DON の効果に対する感受性が比較的低かった。血液由来 REH 細胞およびジャーカット細胞においては、DON が誘発するアポトーシス性変化が表れる前に JNK や p38 MAPK リン酸化および c-Jun 発現が上昇した。しかし、JNK リン酸化および c-Jun 発現の活性化は一過性であり、互いに同時発生することはなかった。JNK1/2 の阻害薬である SP600125 は、DON 処置後の REH 細胞の生存能力にごくわずかな負の効果しか及ぼさず、このことは JNK が DON 誘発アポトーシスに寄与しないことを立証している。それとは対照的に、p38 MAPK の役割に関する研究から、REH 細胞における DON 誘発アポトーシスには p38 シグナル伝達が必要であることが明らかになった。

## 食品中のマイコトキシンは健康に有害か？

マイコトキシンの作用は古代からよく知られている。最新の微量成分分析によってマイコトキシンが食物連鎖中に広く存在することが明らかになっている。アフラトキシン類 ( $AFB_1$ 、 $AFB_2$ 、 $AFG_1$ 、 $AFG_2$ )、トリコテセン類 (デオキシニバレノール、T-2 毒素、HT-2 毒素)、ゼアラレノン、フモニシン類 ( $FB_1$ 、 $FB_2$ )、オクラトキシン A は世界中で最も重要なマイコトキシンである。植物由来の食物は通常、動物由来の食物よりも高頻度かつ高濃度に汚染される。ヨーロッパの食物において分析されたマイコトキシン平均濃度は低いと評価することができる。これは、急性中毒の発生がまれであり、耐容 1 日摂取量 (TDI) の限界値を超えることがほとんどないとの理由の一つであるかもしれない。しかしながら、「幼児」集団はトリコテセンの暫定 TDI 値を上回っている。少量のマイコトキシンの慢性摂取による影響の評価はほとんど不可能である。アフラトキシンが原発性肝癌の病因に関与していることは確実であると判断される。食事からのマイコトキシン摂取とヒトにおける特定の臨床症状との他の関連については現在まで説得力のある形で証明されていない。

## HLA 抗原に応じた Fusariumu マイコトキシンの免疫抑制効果

筆者らは、免疫抑制 Fusarium マイコトキシンの存在下および非存在下における HLA-B8、-DR3 陽性・陰性被験者のフィトヘマグルチニン (PHA) に対する幼若化応答について検討した。HLA-B8、-DR3 ハプロタイプはマイコトキシン非存在下ではマイトジエンに対する応答低下に関連していたが、デオキシニバレノールの存在下ではこのハプロタイプを持つ被験者と持たない被験者の間で有意差は認められなかった。

## *In vitro* ヒト免疫機能に及ぼすマイコトキシンの効果

国内産の食品中に免疫抑制性および発癌性の *Fusarium* 由来マイコトキシンが表れることがある。そのため、種々の血液ドナー由来のヒト末梢血単核細胞を用いて *Fusarium* マイコトキシンの免疫学的効果を調べた。本研究では、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、フザレノン-X、T-2 毒素、ゼアラレノン、 $\alpha$ -ゼアラレノール、 $\beta$ -ゼアラレノール、およびニバレノールが、細胞増殖アッセイにおいて T 細胞および B 細胞に及ぼす効果、抗体依存性細胞毒性(ADCC) およびヒト末梢血単核細胞に対するナチュラルキラー(NK) 細胞活性に及ぼす効果について調べた。本実験に適用した濃度は、正常なヒト末梢血系で認められる濃度と同等(0.2~1800 ng/ml)とした。検査対象とした 8 種のマイコトキシンの中で、T-2 毒素、フザレノン-X、ニバレノール、およびデオキシニバレノールは、*in vitro* でヒト末梢血単核細胞に対して最も高い免疫抑制効果を示した。マイコトキシン誘発免疫抑制は、T または B リンパ球活性が抑制された時に現れた。さらに、NK 細胞活性の阻害により、腫瘍発生に対する保護も弱まったと考えられる。

## *Fusarium* 損害を受けた冬小麦穀粒のマイコトキシン含有量推定

2001～2006 年の間にドイツ北部において冬小麦 (*Triticum aestivum* L., Ritmo and Dekan 栽培品種) 穀物をサンプリングした。視覚評価により、*Fusarium* 属真菌により損害を受けた穀粒を健全な穀物から分離した。*Fusarium* 損害穀粒を 0%、20%、40%、60%、80%、および 100% 含有する試料を集め、*Fusarium*B 型トリコテセンであるデオキシニバレノール (DON、2001～2006 年)、ニバレノール (NIV、2006 年)、3-アセチルデオキシニバレノール (3AcDON、2006 年)、および 15-アセチルデオキシニバレノール (15AcDON、2006 年) について分析した。各穀物ロットについて、マイコトキシン含有量と *Fusarium* 損害穀粒比率との間の関係を算出した。1 つの例外を除き、*Fusarium* 損害穀粒比率と NIV、3AcDON、または 15AcDON との間の関係は有意ではなかった。それとは対照的に、*Fusarium* 損害穀粒比率と DON 含有量との間には密接な関係が認められた ( $r^2=0.93\sim0.99$ )。y 軸切片は 0 と有意差が認められなかつたが、損害穀粒の DON 含有量は、年度間では 11.59 の係数でまた品種間では 1.87 の係数で変動が認められた。*Fusarium* 損害穀粒は、0.21～2.39  $\mu\text{g}$ /穀粒の範囲で DON を含有した。*Fusarium* 損害小麦穀粒の全体的な平均 DON 含有量は、 $1.29\pm0.11 \mu\text{g}$  であった。病気が表れた穀粒の DON 含有量は環境や小麦遺伝子型の影響を受けたが、遺伝子型と環境の相互作用は認められなかつた。平均して、*Fusarium* 損害穀粒のマイコトキシン含有量は、15AcDON と比較して DON が 9.7 倍、NIV と比較して DON が 19.5 倍、および 3AcDON と比較して DON が 26.9 倍高かつた。小麦穀粒あたりの 3AcDON および 15AcDON 含有量に、品種間で有意差は認められなかつた。平均して、*Fusarium* 損害穀粒の 4.27% が、EU における未加工シリアルの DON 限界値 1.25 mg/kg 穀物に達するのに十分量の DON を含有していた。現行の DON 法定規制値と同等の *Fusarium* 損害穀粒の比率が低いことを考えると、健全な穀粒を損害穀粒から分離する自動分類システムを用いる場合には、分類正確度 > 96% が必要であろう。

*Fusarium* 由来毒素デオキシニバレノールが *in vivo* および *in vitro*  
で单球由来樹状細胞の表現型および機能を阻害する

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) は、ブタにおいて全身性免疫抑制を引き起こし、ヒトでも長期間にわたる食事曝露後に免疫抑制を引き起こす可能性がある。各免疫反応の転帰は主に樹状細胞 (DC) により調節されていることから、本研究では DON が DC 機能に及ぼす直接的影響が DON 免疫毒性の発現に一定の役割を果たしているという仮説を立てた。この仮説を調べる目的で、 $2 \times 2$  要因デザイン試験を実施した。ブタに対照飼料または DON 含有飼料 (DON 飼料) を給餌した。その後これらのブタから採取した单球由来 DC (MoDC) を *in vitro* で DON 処置したまたは未処置で残した。MoDC の表現型および機能を分析した。対照飼料を与えたブタ由来の MoDC を *in vitro* で DON 処置した結果、CD80/86 および CD40 がダウンリギュレーションされた。このことはマイトジエン関連プロテインキナーゼ ERK1/2 および JNK の活性化と関連した。MoDC のエンドサイトーシス活性は *in vitro* の DON 曝露後低下した一方、その T 細胞刺激能に変化は認められなかった。DON 飼料を摂取したブタ由来の MoDC は、LLPS/TNF  $\alpha$  に反応した MHC-II のアップリギュレーションを示さなかった。ブタに対する DON 飼料曝露は、MoDC による FITC-デキストランのエンドサイトーシスを阻害したが、T 細胞刺激能に影響を及ぼすこととはなかった。ERK1/2 および JNK が DON 飼料を給餌したブタ由来の MoDC 中で構造的に活性化されることはなかった。DON 飼料を給餌したブタ由来の MoDC を *in vitro* で DON に曝露した場合に、MHC-II および CD80/86 がアップリギュレーションされたが、CD40 に影響は認められなかった。DON 飼料を給餌したブタ由来の未処置 MoDC と比較して、エンドサイトーシス能は大きくダウンリギュレーションされたが、マイトジエン活性化プロテインキナーゼ (MAPK) 活性は上昇した。要約すると、DON は *in vitro* および *in vivo* でブタの DC 機能を阻害するが、それがこのマイコトキシンの免疫抑制効果に寄与するのかもしれない。

## デオキシニバレノールとゼアラレノンがブロイラーの酸化ストレス と血液食細胞活性に及ぼす影響

雌雄両性の Ross 308 交配種ブロイラーに、様々なレベルのデオキシニバレノール(DON)およびゼアラレノン(ZEA)汚染飼料を供与し、その影響を調査した。孵化後、全てのニワトリに、同一の対照飼料を 2 週間与えた。グループ 1 のニワトリには、DON および ZEA をそれぞれ  $3.4\text{mgkg}^{-1}$  となるように添加した汚染飼料を与え、グループ 2 には  $8.2\text{mgkg}^{-1}$  DON と  $8.3\text{mgkg}^{-1}$  ZEA 汚染飼料を与えた。対照群飼料にはバックグラウンドレベルのマイコトキシンが含有されていた。2 週間後に血液検体と組織検体を採取した。両汚染飼料の摂取により、肝臓組織のグルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)活性が有意に低下し、マロンジアルデヒド(MDA)値が増加したが、腎臓における MDA 濃度はグループ 1 のみ有意に増加した。その一方で、血中 GPx 活性と血漿中  $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ(GGT)活性はグループ 2 のみ上昇した。肝臓におけるチオレドキシンレダクターゼ活性と十二指腸粘膜組織における GPx 活性、赤血球中スーパーオキシドジスマターゼ(SOD)活性ならびに十二指腸粘膜の MDA 濃度、および血漿中  $\alpha$ -トコフェロールは、食餌性マイコトキシンの影響を受けなかった。グループ 1 とグループ 2 で、血液中食細胞活性が有意に低下した。これら結果から、飼料が DON および ZEA により中等度の汚染を受けていれば、肥育ニワトリに酸化ストレスを誘導し食細胞活性を低下させる可能性のあることが示された。

乾燥比率が低く貯蔵期間が短いトウモロコシ飼料における

### *Fusarium* 由来毒素濃度の低下

好ましくない気候条件下においては、*Fusarium* 属が圃場のトウモロコシに混入して毒素を产生する可能性があり、その毒素はサイロ貯蔵時にも存在する。連続した 2 年間にわたり、トウモロコシ貯蔵牧草中のデオキシニバレノール、フモニシン B1 および B2、およびゼアラレノンの安定性を調べた。被験変数は、コーン乾物 (DM) および貯蔵の期間や温度とした。*Fusarium* 由来毒素の濃度はサイロ貯蔵により低下した ( $P<0.001$ )。貯蔵期間の増加や低 DM でのサイロ貯蔵の結果、毒素消失率、特に水溶性毒素であるデオキシニバレノールやフモニシン B1 の消失率が上昇した。毒素消失率は、ゼアラレノンの 50% からデオキシニバレノールの 100%までの範囲であった。それとは対照的に、温度による安定性への効果は認められなかった ( $P>0.05$ )。これらの結果から、サイロ貯蔵時の低 DM および貯蔵の長期化が *Fusarium* 由来毒素に汚染された貯蔵牧草において毒素を低減または除去する実用的な方法と考えられる。

## 小麦の *Fusarium culmorum* 接種が、マイコトキシン蓄積進行、成分濃度、小麦残渣乾燥物の in sacco 第一胃分解に及ぼす影響

*Fusarium* 赤カビ病(FHB)-感受性冬小麦 cv. Ritmo の満開初期に *Fusarium culmorum* 孢子を接種した。開花から収穫までの期間に全小麦検体を週 1 回採取して、麦桿、包穎、および紡錘に分画し、デオキシニバレノール(DON)とゼアラレノン(ZON)を測定した。さらに、粗蛋白質(CP)と非-デンプン多糖類(NSP)含量を測定した。*Fusarium* 毒素である DON と ZON の合成は、形成日と濃度について差が認められた。収穫時における包穎、紡錘、および麦桿の DON 最終平均濃度は、それぞれ 37.5、28.1、および 5.0mg/kg DM だった。この時点で、紡錘、包穎、および麦桿の ZON 最大平均濃度はそれぞれ 587、396、および 275  $\mu\text{g}/\text{kg}$  DM と測定された。さらに、最後の 3 日間に採取した検体では、*Fusarium* 感染小麦残渣に CP がより高濃度で含まれていたが、NSP 濃度は低かった。さらに、麦桿と穀殻の収集検体を用い、*Fusarium* 汚染が乳牛の in sacco DM 分解に及ぼす影響を調べた。マイコトキシンならびに選択品質パラメーターについて、検体を分析した。麦桿と穀殻の乾燥粉碎検体の重量をナイロン袋に入れて秤量し、第一胃にカニューレを留置した 2 匹の乳牛に与えて、第一胃内で 4、8、16、24、48、72、96 および 120 時間インキュベーションした。麦桿と穀殻を比較すると、マイコトキシン汚染の度合いと成分組成に顕著な違いが見いだされた。さらに、第一胃インキュベーション 120 時間後には、接種した麦桿と穀殻の in sacco DM 分解は、対照に比べて有意に低下していた。菌接種検体では、可溶性分画が増加する一方で、分解の可能性があるが不溶性分画の減少はより顕著だった。菌非接種対照と比較すると、菌接種した麦桿で分解可能分画が減少し、穀殻の減少程度は小さかった。以上より、小麦に *F. culmorum* を感染させると、麦桿のマイコトキシン汚染リスクが増大すると結論した。また、*Fusarium* 感染により化学成分に影響が生じ、宿主細胞壁成分に *Fusarium* 増殖に関連した変化が起こる可能性がある。

## チトクローム P-450 不活化は *Fusarium* 種におけるトリコテセン多様性の決定因子である

*Fusarium* 属の種は、農業的に重要な多様なトリコテセン毒素を產生し、酸素化とエステル化パターンはそれぞれ異なっている。*Fusarium sporotrichioides* が產生する T-2 トキシンと、*F. graminearum* 菌株の一部が產生するニバレノール(NIV)では、C-4 位に酸素が存在する。別の *F. graminearum* 菌株が產生するデオキシニバレノール(DON)では、C-4 位に酸素は存在しない。NIV と DON は C-4 位以外の構造は同じだが、T-2 トキシンは他の 3 つの炭素位において、これらのトリコテセン類とは異なる構造を有している。以前に報告した *F. sporotrichioides* のコアトリコテセン遺伝子クラスタ上流のゲノム領域を、配列解析とノザン解析したところ、TRI13 と TRI14 の 2 つの遺伝子によってクラスタが延長していることがわかった。TRI13 はチトクローム P-450 酵素と非常に良く類似しているが、TRI14 は、今までに特性化された蛋白質との間に類似性はない。*F. sporotrichioides* の遺伝子破壊と発酵研究により、T-2 トキシンの C-4 位酸素付加には TRI13 が必要であるが、TRI14 はトリコテセン生合成に必要なことが明らかになった。PCR および配列解析にて、*F. graminearum* の NIV 產生菌株では TRI13 ホモログが機能しているが、DON 產生菌株では機能していないことが明らかになった。これらの遺伝学的所見は、T-2 トキシンと NIV の生合成に C-4 ヒドロキシラーゼが必要であるが、DON の生合成には必要ないという化学的所見と一致している。

## *Fusarium* 由来マイコトキシン：見落とされた微量水質汚染物質か

デオキシニバレノールおよびゼアラレノンは、*Fusarium* 属が産生する毒素の中で最も一般的なものである。食品や飼料中のこれらの毒素については数十年にわたり調べられてきたが、環境中での調査はまれであった。そのため我々は、水性の天然試料中に微量濃度で存在するこれらマイコトキシンを定量する固相抽出法および液体クロマトグラフィ・質量分析 (LC-MS) 法を確立した。本研究ではモデル排出試験を実施し、冬小麦圃場に *Fusarium graminearum* を植菌し、その後排水中のデオキシニバレノールおよびゼアラレノンのモニタリングを行った。2007 年 6 月および 7 月に収穫する前、収穫中および収穫後に排出されたこれら毒素の濃度は、デオキシニバレノールでは  $23 \text{ ng/L} \sim 4.9 \mu\text{g/L}$ 、およびゼアラレノンでは未検出～ $35 \text{ ng/L}$  であった。また同時に、2007 年 7 月と 8 月に、デオキシニバレノールがスイスの多数の川において最大  $22 \text{ ng/L}$  の濃度で検出され、ゼアラレノンは複数の川の試料中で測定法の定量限界未満の濃度で存在した。その他のマイコトキシンのいくつかはデオキシニバレノールやゼアラレノンと同様の量で産生され、デオキシニバレノールと比較して同様のまたはさらに高い水溶性を示すことから、他のマイコトキシンも *Fusarium* 感染圃場から排出されたかもしれない。地表水中におけるマイコトキシンの存在の生態毒生物学的結果については、今後解明すべき問題として残っている。

## 食品加工過程におけるマイコトキシンの安定性

穀物やその他の製品中で一般的に発生するマイコトキシンは、食品加工操作中に完全には破壊されず、最終加工食品に混入する可能性がある。穀物と最も一般的な関連が認められるマイコトキシンは、アフラトキシン、オクラトキシン A、フモニシン、デオキシニバレノール、およびゼアラレノンである。マイコトキシンに効果を及ぼすと考えられる種々の食品加工法には、選別、脱穀、洗浄、製粉、調理、(パンを)焼く、揚げる、ロースト、缶詰製造、フレーク化、アルカリ調理、(トルティーヤを焼くためのトウモロコシの)石灰処理、および加熱押し出し処理が含まれる。食品加工法のほとんどがマイコトキシンに様々な効果を及ぼし、その中でも最も高い温度を使用する方法が最も効果が高い。一般的に加工によりマイコトキシン濃度は有意に低下するが、マイコトキシンがすっかり排除されるわけではない。ローストや加熱押し出し処理はマイコトキシン濃度の低減に有望であるが、マイコトキシン濃度を大きく低下させるには非常に高い温度が必要とされる。ゼアラレノンは大きく低下させるには 150°C を超える温度での加熱押し出し処理を必要とするが、その操作によりアフラトキシンは中程度の低下、デオキシニバレノールは可変から少量の低下を示し、またフモニシンは大きく低下する。フモニシンの最大の低下は、グルコース存在下で 160°C 以上に加熱する押し出し処理により達成される。グルコース 10% を添加してフモニシンが混入した粗挽きトウモロコシを加熱押し出し処理した結果、フモニシン B<sub>1</sub> 濃度が 75~85% 低下した。加熱押し出し処理中に、添加グルコースを含有する加熱押し出し処理粗挽きトウモロコシ中に、少量の加水分解フモニシン B<sub>1</sub>、N- (カルボキシメチル) -フモニシン B<sub>1</sub>、およびいくらか高量の N- (1-デオキシ-D-フルクトス-1-イル) フモニシン B<sub>1</sub> など何種類かのフモニシン分解産物が形成される。フモニシン混入粗挽きトウモロコシを用いたラットを対象とした摂取試験毒性検査は、グルコースを添加して加熱押し出し処理した粗挽き粒の毒性にいくらかの低下が認められることを示している。

## 加熱押し出し調理中の穀物中マイコトキシンの推移：総説

加熱押し出し調理は、通常の食品加工法と比較して複数の利点を有するためには、この数年間に最も急速に成長しつつある食品加工法である。中間および最終加工製品の品質を改善するという主要目的とは別に、穀物中のマイコトキシン濃度を低下させる可能性があるため、加熱押し出し調理は付随的に安全性も改善すると考えられる。本総説では加熱押し出し調理に注目し、穀物中のマイコトキシン濃度の低下に及ぼす影響について一般的な概説を提示することを目的とする。加熱押し出し調理は一般的にマイコトキシン濃度を低下させ、その低下率は押し出し機の種類、スクリューのタイプ、金型形状、初期マイコトキシン濃度、バレル温度、スクリュー速度、原材料中の水分含量、および使用する添加物などの種々の因子に依存する。穀物の加熱押し出し調理中に、フモニシン、アフラトキシン、およびゼアラレノンがそれぞれ 100、95、83% 低下したと報告された一方、デオキシニバレノール、オクラトキシン A、モニリホルミンについては観測された低下は少なく、最大低下はそれぞれ 55、40、30% を上回らなかった。

## MTT バイオアッセイを用いた加熱押し出し処理による粗挽きトウモロコシ中のデオキシニバレノール毒性低下の確認

本研究の目的は、感受性チャイニーズハムスター卵巣（CHO-K1）細胞株を用いたテトラゾリウム塩（MTT）バイオアッセイにより、加熱押し出し処理穀物製品中でのデオキシニバレノールの毒性の低下を測定し、その結果を化学的分析法（高性能液体クロマトグラフィ、HPLC）および生化学的分析法（酵素免疫測定法、ELISA）の結果と比較することであった。150、175、200°Cの温度と 70 および 140 rpm のスクリュー速度で、分割区画設計を用いた加熱押し出し処理実験を実施した。人工的に *Fusarium graminearum* が混入した粗挽きトウモロコシ中の初期平均デオキシニバレノール濃度を HPLC で測定したところ、 $23.5 \mu\text{g/g}$  であった。加熱押し出し処理による粗挽きトウモロコシ中の混入デオキシニバレノールの低下率を HPLC、ELISA、MTT バイオアッセイで測定したところ、それぞれ 22~35%、21~34%、21~37% の範囲であった。MTT バイオアッセイ結果の HPLC 結果との間の相関 ( $r=0.90$ ) は、ELISA 結果との間の相関 ( $r=0.78$ ) と比較して高かった。感度の高い哺乳類細胞株を使用する MTT バイオアッセイは、デオキシニバレノールの定量に有用な測定法であること、および汚染された加熱押し出し処理穀物製品の潜在的な毒性スクリーニング法であることが立証された。

## MTTバイオアッセイにより同定されたFusariumマイコトキシンの 哺乳類培養細胞に対する細胞毒性

穀物や動物飼料の Fusarium マイコトキシン汚染は世界的に広がっており、ヒトと動物に Fusarium マイコトキシン症を発生している。本研究では、哺乳類培養細胞を用いて、最も一般的な Fusarium マイコトキシンであるデオキシニレバノール(DON)、ゼアラレノン(ZEN)、フモニシン B<sub>1</sub>(FB<sub>1</sub>)、およびモニリホルミン(MON)の細胞毒性をスクリーニング検査した。各 Fusarium マイコトキシンに対して最も感受性の高い細胞系を特定して、動物試験の代替法として毒物学的試験において使用することにした。チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO-K1)が DON と FB<sub>1</sub>に最も感受性が高いことが明らかになり、48 時間曝露後の IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 0.27 と 85.5 μg/ml だった。肝細胞癌細胞(HepG2)は MON に最も高い感受性を示し、IC<sub>50</sub> 値は 48 時間曝露では 39.5 μg/ml、72 時間曝露では 26.8 μg/ml だった。Balb/c マウスのケラチン細胞系(C5-O)は、ZEN に最も高い感受性を示し、IC<sub>50</sub> 値は 72 時間曝露で 24.1 μg/ml だった。試験したマイコトキシン中、培養細胞に対して最も高い細胞毒性を示したのは DON であり、その後に MON、ZEN、FB<sub>1</sub> が順次続いた。以上の結果から、DON、ZEN および MON に汚染された飼料ならびに食物エキスの予備スクリーニング検査には、それぞれ CHO-K1、C5-O、および HepG2 細胞を感受性細胞系として使用できることが見出された。

餌内許容濃度のデオキシニバレノールとゼアラレノンの併用は幼若  
ブタにおいて重大な生理学的影响を引起す

本研究では、ブタを用いてデオキシニバレノール(DON)とゼアラレノン(ZON)の併用効果を調査した。24 匹の離乳仔ブタを、マイコトキシンを含有していない対照飼料摂取群と、1mg/kg DON および 250 μg/kg ZON を含有するトキシン汚染飼料摂取群に分けた。試験結果から、飼料に DON と ZON を添加すると、ブタに大きな影響が生じることが明らかになった。より具体的には、DON と ZON を添加すると、血清中の総蛋白質量、アルブミン量、およびグロブリン量が、それぞれ 14.5%、6.5%、11.3% 減少し( $p<0.05$ )、同時に  $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、およびアラニンアミノトランスフェラーゼの血清中酵素活性が、それぞれ 72.0%、32.6%、36.6% 増加した( $p<0.05$ )。さらに、DON と ZON は、抗-古典的ブタコレラ抗体力値を 14.8% 減少させた( $p<0.05$ )。実時間 PCR により、DON と ZON が、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2 の mRNA 発現量を、それぞれ 36.0%、29.0%、35.4% 減少させることができた( $P<0.05$ )。組織病理学的研究により、DON と ZON が肝臓、脾臓、リンパ節、子宮、および腎臓に異常を引き起こすことが明らかになった。本研究で使用した DON と ZON 濃度は、BML が許可した公表基準値に合致する。本研究により、これらのトキシンの安全性基準と妥当性に対し明確な疑問が投げかけられた。飼料の安全性を高めるために、細胞分子学的技法をもっと利用して、飼料中に含まれるトキシンの安全性基準を見直す時期が来ていると考えられ、それにより安全性の高い食品を消費者に提供することができる。

## 飼料中の *Fusarium* 由来マイコトキシンが産卵鶏の血液学および免疫学に及ぼす効果

*Fusarium* 由来マイコトキシンで自然汚染された飼料穀物が、産卵鶏の代謝や産卵成績を変化させることが明らかにされている。本実験の目的は、*Fusarium* 由来マイコトキシンで自然汚染された飼料穀物が産卵鶏の血液学や免疫学的指標や機能に及ぼす効果、および重合体グルコマンナンマイコトキシン吸着剤 (GMA) 摂取の潜在的保護効果を調べることとした。産卵鶏 144 羽に対して 12 週間にわたり (1) 未混入穀物、(2) 混入穀物、または (3) 混入穀物 + 0.2% GMA で調製した飼料を摂取させた。カナダ、オンタリオ州で栽培した穀物中の混入飼料中から、デオキシニバレノール (DON、12 mg/kg)、15-アセチルデオキシニバレノール (15AcDON、0.5 mg/kg)、およびゼアラレノン (0.6 mg/kg) などの *Fusarium* 由来マイコトキシンが同定された。本研究で使用した自然汚染された穀物に起因する DON 濃度は、実験マウスに投与した精製マイコトキシンと同様であった。*Fusarium* 由来マイコトキシンの長期投与は、ヘマトクリット値、白血球総数、CD4<sup>+</sup> や CD8<sup>+</sup>T リンパ球と B リンパ球の両方を含むリンパ球、および胆汁 IgA 濃度のわずかな低下を誘発した。飼料由来の *Fusarium* 由来マイコトキシンを含有する飼料に GMA を補充することにより、末梢血中の B リンパ球総数の低下および胆汁 IgA 濃度の低下が予防された。さらに、飼料中のマイコトキシンによりジニトロクロロベンゼンに対する遅延型過敏性反応が上昇した一方、ヒツジ赤血球に対する IgG および IgM 抗体力価には飼料からの影響が認められなかった。本研究では、自然界で実際に起こる可能性のある濃度での *Fusarium* 由来マイコトキシン混入穀物の長期消費では全身性免疫抑制性や血液毒性は認められなかつたとの結論に達したが、粘膜の免疫能についてはさらに調べる必要がある。

## トリコテセン系毒素デオキシニバレノール及びサトラトキシン G によるマクロファージ炎症性蛋白質-2 と補体 3A 受容体のアップレギュレーション

トリコテセンは、白血球を標的とする広範囲の免疫調節作用を有するマイコトキシン群に属する。トリコテセン系毒素デオキシニバレノール(ボミトキシン、DON)及びサトラトキシン G(SG)の RAW 264.7 マクロファージ細胞株中 mRNA に対する作用を評価するため、差次の発現蛋白の分析を適用した。細胞を DON(1 μg/ml)又は SG(5ng/ml)と 2 時間インキュベートし、総 RNA についてオリゴ・プライマーセット(dT)による RT-PCR を行なった。得られた cDNA を下流側オリゴプライマー(dT)および任意のデカヌクレオチドの上流プライマーを用いて增幅し、<sup>35</sup>S 標識 PCR 産生物を得た。変性ポリアクリルアミドゲル中で産生物を分離後、23 の異なる発現 cDNA フラグメントを単離し、配列を決定した。上記のうち 2 フラグメントが、既知の遺伝子すなわち、組織損傷及び炎症に関与する好中球走化性因子であるマクロファージ炎症蛋白質-2(MIP-2)と、前炎症状態を媒介する補体 3a 受容体(C3aR)として同定された。MIP-2 及び C3aR mRNA とも DON によりアップレギュレーションされるが、その一方で MIP-2 mRNA のみが SG により誘導される。市販の抗体を用い、MIP-2 蛋白質は、RAW 264.7 細胞培養液中で DON 及び SG の両者により誘導されることも明らかになった。マウスに DON(12.5mg/kg)を投与したところ、脾の MIP-2 mRNA と血清 MIP-2 値が増加した。マウスに DON と LPS を併用投与すると、MIP-2 mRNA と血清 MIP-2 値は相乗的に増加した。MIP-2 と C3aR のアップレギュレーションは、トリコテセン誘導の炎症遺伝子アップレギュレーションに関する過去の報告結果と一致し、影響を受ける特定遺伝子はトリコテセンの構造に左右されることが示唆される。

## デオキシニバレノール(ボミトキシン)による TNF- $\alpha$ 発現のアップレギュレーションにおける p38 マイトジェン活性化プロテインキナーゼの転写時および転写後の役割

デオキシニバレノール(DON, ボミトキシン)は、*in vitro* および *in vivo* で炎症性サイトカインの遺伝子発現をアップレギュレーションすることにより毒性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。本試験の目的は、DON 誘導のマイトジェン活性化プロテインキナーゼ(MAPK)が、TNF- $\alpha$  遺伝子発現における転写時及び転写後のアップレギュレーションを媒介するという仮説を検討することであった。RNA 分解酵素の防御試験により、DON は 1 アップレギュレーション 00~500ng/ml で TNF- $\alpha$ 、IL-6、IFN- $\gamma$ 、TGF  $\beta$ -1 及び TGF  $\beta$ -3 の mRNA 発現を誘導し、これらの作用は 100ng/ml リポ多糖類(LPS)により強化されることが明らかになった。DON は RAW 264.7 マウスマクロファージモデルにおいて、p38 キナーゼ、細胞外シグナル調節キナーゼ(ERK)及び c-Jun アミノ末端キナーゼ(JNK)のリン酸化を用量依存的に誘導することが認められた。マウス TNF- $\alpha$  プロモータにより作動するルシフェラーゼ・レポーター遺伝子を用い、TNF- $\alpha$  遺伝子転写の DON によるアップレギュレーションにおける各種 MAPK の作用を検討した。p38 阻害剤 SB203580 は、DON、LPS 及び DON+LPS によるルシフェラーゼ活性の誘導を低下させた。さらに、ERK 阻害剤 PD 98059 は DON 及び DON+LPS 誘導のルシフェラーゼ活性を遮断し、JNK 阻害剤は LPS 及び DON+LPS 誘導のルシフェラーゼ活性を低下させた。細胞に 4 時間 LPS を前添加した後に培地を除去した非同期性モデルを用い、DON 誘導 TNF- $\alpha$  mRNA 安定化における MAPK の作用を検討した。転写抑制剤 5,6-ジヨクロロ- $\beta$ -D-リボフラノシル-ベンズイミダゾール含有の培地でインキュベート後、MAPK 阻害剤及び又は DON(250ng/ml) 培養液の TNF- $\alpha$  mRNA 発現をモニタリングした。SB 203580 存在下、DON 誘導による TNF- $\alpha$  mRNA 安定化が無効になる一方、DON による安定化は PD 98059 又は SP 600125 により影響されなかった。細胞を 18 時間、阻害剤存在下、LPS、DON 又は LPS+DON とインキュベートさせ、DON+LPS 誘導 TNF- $\alpha$  産生における MAPK の役割を検討した。上清について ELISA を実施したところ、DON のみによる TNF- $\alpha$  産生の誘導は、SB203580 及び PD 98059 により有意に低下したが、その一方、全 3 種阻害剤により LPS 及び DON+LPS 誘導の TNF- $\alpha$  産生が抑制された。総じて、上記結果により、DON 誘導 TNF- $\alpha$  mRNA 発現と共に、

p38 及び ERK 活性が DON 誘導の転写アップレギュレーションに関与し、p38 は mRNA 安定化に働くことが示唆される。

## デオキシニバレノール(DON、ボミトキシン)がラットの子宮内発育におよぼす影響

デオキシニバレノール(DON、ボミトキシン)は、世界中で最もよくみられる穀物汚染物質の一つである。DON が胎児発育におよぼす影響を、Charles River Sprague-Dawley 系ラットを用いて評価した。妊娠雌ラットに、妊娠日(GD)6 日から 19 日までの期間、用量 0、0.5、1、2.5 または 5mg/kg 体重の DON を一日一回強制経口投与した。GD20 に帝王切開して、生殖パラメーターと発育パラメーターを評価した。全ての雌ラットは帝王切開施行時まで生存した。DON 投与により、妊娠雌ラットの唾液分泌過剰が用量依存的に増加し、この変化はラットの嘔吐反射欠如と関連があると思われる。5mg/kg 投与群では、妊娠期間中の飼料摂取量と体重増加平均量が有意に減少し、平均増加体重(枝肉重量)と妊娠子宮重量も有意に低下し、同腹子の 52%が完全に吸収され(12/23)、同腹子あたりの早期・後期死亡数の平均値は有意に増加し、胎児の平均体重と頭殿長は有意に減少し、未熟子の発生率は有意に増加し、胎児胸骨分節、椎体、背弓、脊椎、中足骨、および中手骨の骨化が有意に低下した。DON を 2.5mg/kg 投与すると、胎児平均体重、頭殿長、および脊椎の骨化が有意に低下した。これらの作用は、母体毒性と胎児小型化に続発して発現した。5mg/kg 投与すると、正しく整列せずに融合した胸骨分節の発生率が有意に増加した。0.5mg/kg と 1.0mg/kg 投与では、発育に対する有害作用は観察されなかった。母体の肝臓重量対体重比は、DON 投与すると用量依存的に増加した(1、2.5 および 5mg/kg 投与群では有意に増加)。体重変化と、用量依存的に生じる肝細胞の細胞質変化とは相関性が認められた。本研究では、1mg/kg 投与から肝臓重量対体重比が用量依存的に増加するという結果に基づき、母体毒性の NOEL は 0.5mg/kg であるとした。2.5 および 5mg/kg 投与群で全体的な胎児発育抑制がみられたことから、本研究における胎児毒性 NOEL は 1mg/kg とした。Sprague-Dawley 系ラットでは、胸骨分節の発育異常に基づき、一日に 5mg/kg の DON 投与で催奇形性が認められるとした。

## 欧洲におけるマイコトキシンに関する調査、規制および毒性に関する最新情報

欧洲で最も一般的な毒素産生菌は、*Aspergillus*(アスペルギルス), *Penicillium*(ペニシリウム)及び*Fusarium*(フザリウム)属である。これらの菌は、乳汁中アフラトキシン MI となるアフラトキシン B1 及び、オクラトキシン、ゼアラレノン、フモニシン B1、T-2 トキシン、HT-2 トキシン及びデオキシニバレノール(ボミトキシン)を产生し、ヒトの健康に関する懸念となっている。これらのマイコトキシンは欧洲で現在検討中であるが、欧洲レベルでの規制面の調整及び合意が求められる。これらの菌は食品中に見出され、耐熱性であるため通常の生産加工又は調理では破壊されない。これらは代謝物でも依然として毒性を有するものがあり、ヒト疾患に関与する可能性がある。毒性作用(肝毒性、腎毒性及び造血毒性、免疫毒性、生殖毒性、胎児毒性、催奇性、特に発癌性)は主に、実験モデルで知られているが、ヒトへの外挿は不正確であることが多い。ヒトへの外挿が不正確になる理由として、十分な食物消費データがないこと、明確な制限を伴う相対的健康リスクに関する情報がないこと、同一食品に存在するその他のマイコトキシンとの相乗作用の可能性が挙げられる。その他の病理的要因として、ウイルス性肝炎、免疫不全又はホルモン欠乏症あるいは臓器不全が挙げられる。所定のマイコトキシンを特定するバイオマーカーがヒトで同定されても、遺伝子多型性及び食事の効用並びに、他の環境毒物の干渉があるため、所定の疾患との関連を確定するのは困難である。許容可能な日常の摂取制限は主に、動物に関するデータに基づいており、各動物種の感受性が異なるため高レベルに設定される可能性がある。予防としては、まず食品中のマイコトキシン濃度を低下させることが挙げられ、その後、ビタミン、抗酸化物質及び発癌性を予防することが知られる物質などの食事成分の摂取を増やすことである。

<sup>13</sup>C-メタセチル呼気検査を用いて評価される、肝機能に重点を置いた、メタ重亜硫酸ナトリウム(Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, SBS)処理あるいは非処理のフザリウムトキシン汚染ライ小麦を離乳子ブタに与えたときの影響

本実験の目的は、主にデオキシニバレノール(DON)とメタ重亜硫酸ナトリウム(Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, SBS)に汚染された湿保存ライ小麦が、子ブタの成長能、肝機能、臨床化学血漿パラメーター、および臓器の病理組織学的所見にもたらす影響を調べることである。このために、非汚染対照ライ小麦と DON 汚染ライ小麦を混入して飼料を作製し、これを無処理のまま(CON,FUS)あるいは SBS 処理をおこなってから(CON-SBS、FUS-SBS)、離乳時から 28 日間にわたり子ブタに与えた。DON、および SBS 処理により生じる DON 誘導体である硫酸 DON(DONS) の飼料中濃度を合計すると、CON 1kgあたりに含まれる DON は 0.156mg、CON-SBS では 0.084mg、FUS では 2.312mg、FUS-SBS では 0.275mg となり、食餌飼料 1kgあたりではそれぞれ<0.05mg、<0.05mg、<0.05mg、および 1.841mg となった。FUS 飼料摂取群を他の 3 群と比べると、28 日間の試験期間を通して、食事摂取量が減少し、ライ小麦と SBS 処理の間に有意な相互作用が考えられた( $p=0.014$ )、しかし、体重増加量と飼料摂取量：増加体重比に影響は見られなかった。血漿中総タンパク質濃度は、汚染飼料の摂取により有意に低下したが、一方で SBS 処理飼料では増加作用が認められた(子ブタ摂取飼料 CON、CON-SBS、FUS および FUS-SBS で、それぞれ 45.4、49.5、40.7、および 46.5g/l)。肝機能は <sup>13</sup>C-メタセチル呼気検査(MBT)を用いて検査し、シトクロム P4501A2 活性を評価した。MBT の結果は、360 分後の投与量回収累積率として表示し(cPDR360)、SBS 処理により肝機能が軽度に亢進することがわかった( $p=0.052$ ) (子ブタ摂取飼料 CON、CON-SBS、FUS および FUS-SBS でそれぞれ 37.5、39.4、37.4、および 55.1%)。肝臓重量と病理組織学的スコアについては、MBT 結果との間にごく弱い関連性が認められた。さらに腎臓、脾臓および心臓の組織病理学的に検査したところ、処理の影響は見いだされなかつた。SBS 処理した汚染ライ小麦飼料を摂餌した子ブタは、対照飼料を与えた子ブタと同レベルの成長能を維持し、肝機能、血漿タンパク質濃度以外の臨床化学血漿パラメーター、および臓器の病理組織学的所見に対する影響はごく小さいという結論が得られた。

## 妊娠最後の三分の一期間における、フザリウムトキシンであるデオキシニバレノール(DON)とゼアラレノン(ZON)の雌ブタ母体から妊娠満期胎仔ブタへの輸送

妊娠雌ブタに、対照飼料(CON, n=8, 0.21mg DON および 0.004mg ZON /kg 食餌飼料) もしくはフザリウムトキシン汚染小麦を 40%混入した飼料(MYCO, n=7, 9.57mgDON と 0.358mg ZON/kg 食餌飼料)のいずれかを、妊娠 75 日目から 110 日目まで摂餌させた。摂餌期間終了時に、帝王切開にて子ブタを出産させた。MYCO 群の子ブタの脾臓重量は有意に減少した。また、MYCO 群子ブタではヘモグロビン濃度とヘマトクリット値も有意に低く、この作用は雄性子ブタよりも雌性子ブタでより顕著に認められた。

DON と ZON の輸送については、食餌効率(生理学標本中の全ての代謝産物の合計濃度を食餌性トキシン濃度にて割算する)、および子ブタ効率(子ブタから採取した生理学標本中の全ての代謝産物の合計濃度を、雌ブタの合計濃度で割算する)を用いて評価した。肝臓の食餌効率は(雌ブタのみのデータ)、0.001(DON+脱エポキシ-DON)と、0.016(ZON と代謝産物)だった。胆汁中の DON 食餌効率は、雌ブタで 0.041、子ブタで 0.003 であり、ZON 食餌効率はそれぞれ 2.896 と 0.128 だった。胆汁の子ブタ効率は、DON と ZON でそれぞれ 0.309 と 0.518 と異なるが、血清中 DON 濃度は子ブタと雌ブタでほぼ同じ値となることがわかった(子ブタ効率中央値は 0.75)。

本研究の結果から、母ブタがフザリウムトキシン汚染飼料を摂餌すると、発育胎児が DON、ZON、およびその代謝産物の暴露を受けることが示唆された。

## 各段階レベルの Fusarium 由来毒素が混入した若年雌ブタ用小麦が、 食餌摂取、成長能力およびデオキシニバレノールとゼアラレノンの代 謝に及ぼす影響について

若年の雌ブタ総 36 匹( $103 \pm 6\text{kg}$ )を 4 群に分け、35 日間、Fusarium 由来毒素混入を上昇させつつ小麦を食餌として与えた。HPLC 法により、この指標となる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(ZON)濃度は 1~4 群で各々(DON/ZON)、摂取食餌当たり  $210/4$ ,  $3070/88$ ,  $6100/235$ 、 $9570/358\mu\text{g}/\text{kg}$  であった。第 2、3、4 群で試験の最初の 21 日以内に摂取は一部拒絶され、各群で各々、9 匹中 2、3、6 匹が罹患していた。食餌投与による高エストロゲン血症又は子宮肥大の徴候は認めなかった。DON、ZON の残さおよびその代謝産物について、血清、尿、胆汁及び肝臓を分析した。DON 及びその de-epoxy 代謝産物(de-epoxy-DON)が全分析標本に認められ、線形的に有意に増加した。元の毒素 DON だけでなく  $\alpha$ -ゼアラレノール( $\alpha$ -ZOL)及び  $\beta$ -ZOL が検出されたが、検出されたのは胆汁及び尿中からのみであった。結論として、食餌投与の結果、パラメータに対する影響は最大曝露群で最大であった。肝臓および食餌中の DON 濃度の最大比は 0.0013 で、ブタ肝臓の DON 混入可能性は非常に低く、ヒト DON 曝露に対し有意性を認めないことが示唆される。

## フザリウムトキシン汚染小麦と解毒剤の摂取が、非去勢雄ウシの成長能、去勢雄羊の栄養消化率、およびゼアラレノンのキャリーオーバーにもたらす影響

フザリウム汚染小麦(乾燥重量 1kgあたりに 10mg デオキシニバレノールと 0.76mg ゼアラレノン ZON を含む)と解毒剤(Mycofix® Plus、Biomin GmbH社、ヘルツォゲンブルク、オーストリア)が、非去勢雄ウシの成長能、ZON と代謝産物の体液ならびに組織へのキャリーオーバー、および去勢雄羊の栄養消化率に及ぼす影響を調べるために実験を実施した。2×2 の要因解析、すなわち非汚染対照小麦とフザリウムトキシン汚染小麦を、Mycofix® Plus 存在下および非存在下で試験するという実験デザインが採用された。

成長実験に使用した非去勢雄ウシの生体重は 244kg から 460kg の範囲だった(投与群あたり n=14)。バッチごとに 65%の割合で小麦を配合して濃厚飼料とした。濃厚飼料を実験計画にしたがって給餌し、サイレージ用トウモロコシを適宜摂取させた。Mycofix® Plus 非添加の対照小麦摂餌群、Mycofix® Plus 添加対照小麦摂餌群、Mycofix® Plus 非添加のフザリウムトキシン汚染小麦摂餌群、Mycofix® Plus 添加フザリウムトキシン汚染小麦摂餌群における一日あたりの乾燥飼料摂取量[kg/動物]は、それぞれ 7.40、7.52、7.51 および 7.49 であり、生体重増加量[kg/日]はそれぞれ 1.367、1.296、1.380 および 1.307 だった。ZON およびその代謝産物は可食組織において検出されなかった。

フザリウムトキシン汚染小麦の給餌は枝肉特性に最も強い影響をもたらし、食肉処理割合が低下し、内容物を除いた空の胃腸管の重量が増加し、睾丸重量が減少した。これらのパラメーターに解毒剤の影響は認められなかつたが、濃厚飼料へのフザリウムトキシン混餌とは無関係に心臓重量は増加した。

2種の小麦飼料バッヂ、すなわち Mycofix® Plus 非添加および Mycofix® Plus 添加小麦飼料の栄養消化率を、去勢雄羊を用いた別の実験で評価した。フザリウムトキシンを小麦飼料に混和しても、食餌に関する変数に変化はみられなかつた。解毒剤の添加による影響はマイコトキシンに非特異的であり、粗タンパク質消化率が増加し、粗纖維消化率を低下させた。

フザリウムトキシン汚染小麦を摂餌しても、非去勢雄ウシの成長能に有害な影響は無く(乾物飼料含量 88%を基準として、飼料 1kgあたりに約 2.2mg DON と 0.1mg ZON を含む)、去勢雄羊の栄養消化率にも影響は無いと結論した。

解毒剤である Mycofix® Plus の成長能と栄養消化率に対する影響は、どちら

かといえばフザリウムトキシン非特異的であった。成長能に対して軽度の悪影響が見られたが、これについては更なる調査が必要である。

## フザリウムトキシンであるデオキシニバレノールが、ブタにおける組織タンパク質合成にもたらす影響

いくつかの *in vitro* および *in vivo* 研究により、フザリウムトキシンの一つであるデオキシニバレノールがタンパク質合成の強力なインヒビターであることが明らかになっている。しかしながら、ブタでは、この毒性特性の重要性が未だ評価されていない。したがって、本実験では、ブタ組織のタンパク質合成を評価するために、[ $^2\text{H}_5$ ]-フェニルアラニンをトレーサーとして用いた食餌・用量手技法を施行した。計 25 頭の去勢雄ブタ（初期重量 23kg）を使用した。17 頭のブタに対照飼料（対照群）を、8 頭のブタにフザリウムトキシン汚染飼料（デオキシニバレノール(DON)の長期経口摂取群）を 4 週間給餌した。対照群から選んだブタを、DON 急性経口摂取群(n=7)、DON 静注投与群(i.v.)(n=5)に割り付けて、トキシンを単回暴露し、暴露同日にタンパク質合成を評価した。タンパク質合成評価前に投与した DON 用量は、対照群が  $2 \mu\text{g/kg}^{-1}$  生体重、DON 長期経口摂取群が  $77 \mu\text{g/kg}^{-1}$  生体重、DON 急性経口摂取群が  $83 \mu\text{g/kg}^{-1}$  生体重、急性 i.v.DON 投与群で  $53 \mu\text{g/kg}^{-1}$  生体重だった。

タンパク質合成を分画合成率(FSR)にて評価し、DON 暴露したブタでは腎臓、脾臓および回腸で FSR が有意に減少したが、急性経口摂取群では明確な効果は見られなかった。肝臓、骨格筋と心筋、腸間膜リンパ節、十二指腸、空腸、空腸粘膜細胞、脾臓、および肺の FSR は DON による影響を受けなかった。

Fusarium トキシン非汚染飼料または汚染飼料を給餌時の仔ブタに及ぼす高分子グルコマンナンマイコトキシン吸着剤の特異的および非特異的影響

離乳仔ブタ（実験開始時の生体重  $7.7 \pm 1\text{kg}$ ）を用いた食餌実験を実施し、Fusarium トキシン汚染飼料(4.44mg デオキシニバレノール[DON]/kg 飼料)を35日間摂取させたときの影響を非汚染飼料摂取時と比較した。高分子グルコマンナンマイコトキシン吸着剤(GMA)添加飼料および非添加飼料を摂取させ、非特異的成長成績パラメータおよび DON 吸着抑制の特異的証拠を評価し、GMA が有するとされる解毒作用を検証した。マイコトキシン汚染飼料群のブタは対照群に比し、摂餌量が 28%減少し生体重増加量は 14%低下した。これらの作用は GMA 添加とは無関係に発現した。成長成績データにおいて、マイコトキシン汚染飼料と GMA 添加との間に有意な相互作用は見出されず、GMA には DON 吸収を抑制する効果が認められなかつたことから、仔ブタ用 DON 汚染飼料への GMA 添加は、DON 有害作用を軽減するための有効手段として推奨できないという結論を得た。

## Fusarium トキシン汚染小麦粒が、乳牛第一胃における栄養利用効率、微生物蛋白質合成、およびデオキシニレバノールとゼアラレンの代謝に及ぼす影響

本研究の目的は、乳牛に Fusarium トキシン汚染小麦を食餌させたときの第一胃における栄養利用率、ならびにデオキシニレバノール(DON)、ゼアラレン(ZON)、およびその代謝産物の十二指腸への移行に及ぼす影響を調べることである。6 匹の乳牛の第一胃に大型カニューレを、近位十二指腸に簡易 T 型カニューレを留置し二つの実験で用いた。実験では、まず非汚染対照小麦飼料を食餌させる対照期間を設定し、さらに対照飼料を Fusarium トキシン汚染小麦飼料に換えた期間を設定した(実験 1 では、DON 8.05mg/kg と ZON 0.26mg/kg、実験 2 では、DON 7.15mg/kg と ZON 0.1mg/kg)。一日あたりの乾燥飼料(DM)食餌量に含まれる小麦の割合は合計 50%で、乾草または牧草サイレージで補完した。6 匹のうち 5 匹のウシが乳汁を分泌せず、一日あたりの DM 摂取量は 4 ~12kg だった。汚染小麦飼料を摂取しても、第一胃の pH 値と揮発性脂肪酸濃度に有意な影響はなかった。反対に、食餌後アンモニア濃度は、マイコトキシン汚染小麦摂取時に一貫して高くなった。さらに、同時に微生物蛋白質と利用可能な蛋白質の十二指腸への移行は減少した。凍結乾燥処理した十二指腸内消化物中の DON、ZON およびその代謝産物濃度は、対照期間中は検出値以下もしくは微量であったが、汚染小麦食餌期間になると検出測定可能値まで上昇した。ほとんどすべての DON は脱エポキシ-DON に代謝され、摂取した DON 量の 4~28%が十二指腸へと移行した。親トキシンである ZON 以外にも、ZON 代謝産物の  $\alpha$ -ゼアラレノール(ZOL)と  $\beta$ -ZOL が十二指腸で回収された。ZON 摂取量に対する回収率は 43~132%だった。Fusarium トキシン汚染小麦の摂餌により、第一胃における蛋白質利用効率が変化すると結論した。これが第一胃に存在するマイコトキシンに起因するのか、Fusarium 属増殖に関連した小麦粒の構造(細胞壁)変化に起因するのかは、検討する必要がある。十二指腸における DON 回収率が低いことから、この分子が第一胃内でほぼ完全に分解されるか、もしくは第一胃粘膜に吸収されると考えられるが、その一方で ZON 回収率が高いことから、第一胃における親トキシンの分解率が低いか、および/または腸肝循環性の胆汁由来の ZON/代謝産物の回収が示唆される。

未混入または *Fusarium* 由来毒素混入トウモロコシを含有する産卵鶏飼料に解毒薬を添加した場合の産卵成績およびゼアラレノン持ち越しに及ぼす効果

産卵鶏を用いた 16 週間の実験を実施し、マイコトキシン混入トウモロコシ (CM) が産卵成績、栄養消化率、臓器重量、血清化学パラメータ、および血清中のニューカッスル病ウイルス (NDV) に対する抗体価に及ぼす効果を調べた。また、卵黄中の fimbrien 抗原 K88 および卵や組織中のゼアラレノン (ZON) 残留物についても調べた。*Fusarium* 由来毒素汚染トウモロコシは、飼料 1 kgあたりデオキシニバレノール 17,630  $\mu\text{g}$  および ZON 1,580  $\mu\text{g}$  を含有した。さらに、未混入対照 (UCM) および CM 飼料 (70% の飼料用トウモロコシを含む) の両方に、解毒薬と言われている Micofix Plus (MP) を添加した。したがって、4 種の飼料 (UCM、UCM-MP、CM、CM-MP) をそれぞれ 25 羽の産卵交配種 (Lohmann Brown) に摂取させた。CM 飼料の摂取により、対照群と比較して摂取量が有意に (約 5%) 低下した。これは主に、実験初期に観察された効果が原因であった。1 日あたりに 1 羽の鶏が産卵する卵重量は、UCM、UCM-MP、CM、CM-MP 群でそれぞれ、56.6、58.4、53.9、55.2 g であった。栄養消化率および総エネルギー代謝は、CM 飼料の摂取によりわずかに低下し、MP の添加により改善した。CM 飼料の給餌の結果、NDV に対する血清力価は有意に低下し、抗原 K88 に対する卵黄力価は上昇した。卵黄、卵白、腹部脂肪、胸肉、直径 1 cm を超える卵胞、直径 1 cm 未満の卵胞を含む卵巣、有頭骨、および血清中に ZON 残留物またはその代謝産物は認められなかった。平均 2.1  $\mu\text{g} / \text{kg}$  および 3.7  $\mu\text{g} / \text{kg}$  の濃度で CM 飼料の接種を受けた鶏の肝臓中で、それぞれ ZON および  $\alpha$ -ゼアラレノール ( $\alpha$ -ZOL) が検出された。高濃度 *Fusarium* マイコトキシンが混入したトウモロコシの給餌は、鶏の産卵成績および免疫反応の調節に有害な影響を及ぼすとの結論に達した。所定濃度のゼアラレノンおよび示された検出限界では、卵中に ZON 残留物やその代謝産物は認められなかつた。被験解毒薬の効果は、マイコトキシンとは完全に無関係であった。

Fusarium 毒素汚染小麦を段階的濃度で混入した飼料を北京ダックに給餌したときの、成長能、健康状態、およびデオキシニレバノールとゼアラレノン代謝に及ぼす影響

1. Fusarium 毒素汚染小麦の飼料混入割合を漸増した飼料を北京ダックに49日間摂餌させて、最小作用量を求めた。食餌性デオキシニバレノール(DON)を6~7mg/kgに、ゼアラレノン(ZON)濃度を0.05~0.06mg/kgに漸次増加させた。

2. 飼料摂取量、生体重増加量、および食餌量：体重増加量の比率は、飼料摂取の影響を受けなかった。

3. 上部消化管の肉眼検査で、刺激、炎症、およびその他の病理学的变化は認められなかった。Fabricius 囊重量は、生体重と比較して、用量依存的に減少した。血清中のグルタミン酸脱水素酵素活性とγ-グルタミルトランスフェラーゼ活性については影響が見いだされない、もしくは食餌による一貫性のない影響を受けた。

4. 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にて測定した、血漿中と胆汁中のDON および脱エポキシ-代謝産物の濃度は、それぞれの検出限界値である6ng/ml、16ng/ml以下だった。

5. 血漿および肝臓で、ZON またはその代謝産物は検出されなかった(HPLC 検出限界は、ZON が 1ng/g、 $\alpha$ -ゼアラレノール( $\alpha$ -ZOL)は 0.5ng/g、 $\beta$ -ゼアラレノール( $\beta$ -ZOL)は 5ng/g)。胆汁中の ZON、 $\alpha$ -ZOL、および  $\beta$ -ZOL 濃度は、食餌 ZON 濃度に比例して直線的に増加した。すべての代謝産物中に占める ZON、 $\alpha$ -ZOL、および  $\beta$ -ZOL の平均割合は、それぞれ 80%、16%、4% だった。

6. 総合すると、北京ダックでは、6mg/kg DON ならびに 0.06mg/kg ZON を食餌摂取しても、成長能と健康状態に有害作用はみられないという結論が得られた。

## ブタにおけるデオキシニバレノール(DON)の毒物動態学と代謝

11 匹の去勢雄ブタ、平均体重  $88.1 \pm 3.9\text{kg}$  に、DON を含む飼料( $4.2\text{mg DON/kg}$ )を 7 日間摂取させた。一回の摂餌量は  $1.1\text{kg}$  に制限した(一日二回摂餌)。測定当日の朝に DON 含有飼料を給餌後、間隔を空けて(1、2、3、4、5、6、8、15、18 および 24 時間後)すべてのブタを順次屠殺し、ただし一匹は無給餌で屠殺した。血清検体と逐次分節化消化管(胃、小腸は同じ長さになるように三分割、盲腸、結腸、直腸)の消化内容物検体の、DON と脱エポキシ-DON を測定した。DON は、胃と近位小腸を通過する間に、速やかにほぼ完全に吸収された。DON 混入飼料摂取後 4.1 時間で最大血清濃度に達し、全身吸収された DON の半分が 5.8 時間後に排出された。脱エポキシ-DON の割合は遠位小腸で増加し、DON+脱エポキシ-DON の総量の約 80%が、直腸から収集された糞便から回収された。主に後腸において生じる DON の脱エポキシ化は、ブタの解毒機構にほとんど寄与していないのではないかと結論した。

肥育ブタに、段階的濃度での Fusarium トキシン汚染小麦を飼料として摂取させときの、成長能、栄養消化率、デオキシニレバノール平衡、血清の臨床的特性におよぼす影響

飼料中のデオキシニレバノール(DON)量が増加したときの、成長能、血清の臨床的特性、栄養消化率および DON 代謝に及ぼす影響を調べるために、ブタを用いて用量応答試験を実施した。このために、Fusarium トキシン自然汚染を受けている小麦をブタ飼料に混入し、その混入割合を増加して、実験第 1 相(14 日間)では計算上 DON 含量を 0、2.3、および 4.6mg/kg とした開始飼料を与えた。実験第 3 相(56 日)では、0/0、1.2/1.4、2.3/3.7mg/kg の開始飼料／肥育飼料を与えた。実験開始時の平均生体重約 28kg の雌雄両性のブタ 16 匹を、各食餌群に割り付けた。第 1 相と第 3 相の肥育実験の間に回復相(第 2 相、21 日)をはさんだが、これは食餌性 DON 濃度が最も高いブタの一部が第 1 相中に摂餌を拒絶するようになったためで、この回復相では全群に非汚染飼料を摂餌させた。摂餌拒否をしたブタもこの実験相で完全に回復した。第 3 相において、低濃度の DON 汚染飼料を与えたブタでは、成長能に変化はおきなかった。血清の臨床的特性(肝臓障害を示す酵素、総蛋白質、免疫グロブリン)については、飼料中の DON 量を增量しても反応はなかった。血清中 DON 濃度は、食餌性 DON 濃度の増加に伴って用量依存的に増加した。しかし、このパラメーターと、検査した成長能パラメーターや血清特性との間の関連は全く見いだされないか、ごく弱いもののみであった。また、飼料の栄養消化率と窒素貯留は汚染飼料による影響がみられず、粗脂肪消化率には影響が見られるも一貫性は見いだされなかった。DON とその代謝産物である脱エポキシ-DON の尿中濃度は、飼料 DON 濃度の増加に伴い、用量依存的に強い線形相関性を示して増加した。DON 尿排出量 + 脱エポキシ-DON 尿排出量に対する、脱エポキシ-DON 尿排出量の割合は、最大 4%まで直線的に増加した。DON 摂取量に対する DON + 脱エポキシ-DON 回収量の割合は 45%～57%で、飼料 DON 濃度の影響はみられなかった。糞便中に回収された DON の割合は、摂取 DON の約 0.1%とごく少量であった。

## プロイラー飼料中の *Fusarium* 由来毒素混入小麦と非澱粉多糖体加水分解酵素との間の相互作用が産卵成績、腸内粘性、およびデオキシニバレノールの持ち越しに及ぼす影響について

小麦に *Fusarium culmorum* を植菌した。この *Fusarium* 混入小麦 (FIW) または対照小麦 (CW) を 60% の比率で含有するプロイラー飼料を調製し、*Fusarium* 混入に関連した NSP 加水分解酵素活性の上昇がデオキシニバレノール (DON) などの真菌起源のマイコトキシンの有害効果を相殺するという仮説を調べることを目的として、これらの飼料に外因性非澱粉多糖体 (NSP) 加水分解酵素製剤 [エンド-1,4- $\beta$ -キシラナーゼ (EC 3.2.1.8) 1,000 FXU/g, ZY 68, Lohman Animal Health 社、ドイツ、クックスハーフェン] を添加しないまたは添加した被験飼料を作成した。CW および FIW のデオキシニバレノール濃度は、それぞれ 0.045 および 2.5 mg/kg 乾物 (DM) であった。35 日後、摂取量レベルは一般的に FIW 含有飼料を摂取させたプロイラーが低かった。CW および FIW の両飼料タイプに NSP 酵素を添加して飼料摂取を促進した。生体重の上昇に類似の関係が観察されたが、酵素の効果は CW 納餌プロイラーのほうが顕著であった。CW 摂取プロイラーの産卵成績は NSP 酵素未添加の FIW を摂取したプロイラーと比較してさらに悪かった。外因性 NSP 加水分解酵素の補充により空腸および回腸中の粘性が有意に低下した。しかしこの効果は、小麦と NSP 酵素との間の有意の相互作用により示された通り、対照飼料に酵素を添加した場合により顕著であった。血漿、胆汁、肝臓、および胸肉における DON およびその代謝産物であるデエポキシ-DON の濃度は、適用した HPLC 法の検出限界よりも低かった。全体として、腸内粘性の低下および外因性 NSP 加水分解酵素製剤の添加の効果が CW 摂取の場合と比較して顕著でなかったことから示される通り、FIW の摂取はプロイラーの産卵成績や栄養生理に正の影響を与えると結論付けられる。

## 長期保存が小麦中 Fusarium トキシン濃度に及ぼす影響—分析結果

### 誤差の原因

Fusarium トキシンであるデオキシニレバノール(DON)とゼアラレノン(ZON)の高濃度汚染小麦粒バッチを 1 年以上保存し、28 日おきに 15 回のサンプルを採取して追跡調査を行った。小麦バッチ表面の大気温度は 7~22°C の範囲で、相対湿度は 44~55% の範囲で変動し、これに対して小麦粒の水分含量は 11.5~12.3% の範囲に変動した。これらの変動と ZON および DON 濃度の間に相関性は認められず、それぞれの濃度は 0.46~0.66mg/kgDM、15.0~19.5mg/kgDM の範囲で変動していた。したがって、データを用いて分析結果誤差の原因を分析した。サンプリング、サンプル調製+分析による分散比は、DON と ZON では異なるパターンを示した。サンプリングによる分散比は、ZON では 0.62 であり、これはサンプル調製+分析の分散比 0.38 に対応した。対照的に、DON では後者の分散比は 1.0 と算出され、結果的にサンプリング誤差に完全に重なった。周囲の大気温度、相対湿度、および穀粒含水量の測定変動を考慮しても、汚染小麦粒の長期保存が、DON と ZON 濃度に影響を与えることは無いと結論した。したがって、汚染小麦を大気温度にて 1 年間保存しても、DON と ZON は分解されないといえる。サンプリング、およびサンプル調製+分析が最終分析結果に及ぼす影響は、DON と ZON では異なっており、更に検討する必要がある。

成長能、健康状態およびデオキシニレバノールとゼアラレノン持込  
みに関するシチメンチョウ飼料内の Fusarium トキシン汚染小麦と  
非デンプン多糖類加水分解酵素の間の相互作用

1. Fusarium トキシン汚染小麦の混入割合を增量した飼料を(0、170、340、  
および 510gCW/kg)、雄シチメンチョウ(BUT Big 6)に 21 日齢から 56 日齢まで  
摂餌させた。飼料を非・デンプン多糖類(NSP)加水分解酵素調製物の非添加または  
添加で検査した。食餌性デオキシニバレノール(DON)濃度とゼアラレノン  
(ZON)濃度を、それぞれ約 5.4mg/kg と 0.04mg/kg まで漸次増加させた。

2. CW の割合が増加するに伴って体重増加は軽度に減少し、その減少程度は  
1.6%、0.7%、3.6%だった。この他の成長能パラメーターに影響は無かった。  
NSP 酵素を飼料に添加しても影響は無かった。

3. 内容物を除去した空腸+回腸の重量は、生体重と相関して用量依存的に減  
少し、NSP 酵素は体重減少効果をさらに増強した。同様に、NSP 酵素は心臓重  
量も減少させた。血清中のグルタミン酸脱水素酵素活性は、CW 混入割合が最  
大の飼料群で有意に増加したが、 $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ活性に変化  
は無かった。

4. 小腸の粘度は、飼料に NSP 酵素を添加すると有意に低下した。この作用  
は、CW の割合を増加することにより抑制できた。

5. DON とその脱エポキシ代謝産物である脱エポキシ-DON の血漿中、肝臓中、  
および胸肉中濃度は HPLC 測定の検出下限値以下であり、それぞれ 2ng/ml(血  
漿)と 4ng/ml であった。胆汁中 DON 濃度は 13~23ng/ml に到達したが、脱エ  
ポキシ-DON 濃度は 4ng/ml 以下だった。

6. ZON またはその代謝産物は、血漿、肝臓、胸肉では検出されなかった(HPLC  
検出下限値は、ZON が 1ng/g、 $\alpha$ -ゼアラレノール(ZOL)が 0.5ng/g、 $\beta$ -ZOL は  
5ng/g だった)。ZON と  $\alpha$ -ZOL の胆汁中濃度は、食餌 ZON 濃度とともに増加し  
た。全 3 種類の代謝産物の総計に対して ZON、 $\alpha$ -ZOL、および  $\beta$ -ZOL が占め  
る割合の平均値は、それぞれ 19%、77%、4% だった。

マウスへのデオキシニバレノール(ボミトキシン)腹腔内投与により  
誘導される骨格変形

有機酸による飲料水汚染、セレン欠乏症、および真菌マイコトキシン経口摂取は、Kashin-Beck 病の三大病因である。マイコトキシンによってトリ脛骨軟骨異形成症が誘発されたという報告もある。デオキシニレバノール(DON)は、最も一般的な汚染真菌種が産生する多くのマイコトキシンの一つである。妊娠マウスに DON を腹腔内投与したときに誘発される骨格異常のパターンを報告する。主な奇形として肋骨脊柱異常が観察された。前述した軟骨異形成症は観察されなかった。

毒素産生 *Fusarium* 属が産生した揮発性代謝産物の検出を目的としたヘッドスペース固相微量抽出およびヘッドスペース吸着抽出法の使用

真菌類が産生した揮発性代謝産物のヘッドスペース固相微量抽出 (SPME) およびスターバー抽出法に基づき、毒素産生 *Fusarium* 属の増殖を測定する有効な測定法を開発した。SPME およびヘッドスペース吸着抽出法 (HSSE) を用いて、トリコテセンの合成における揮発性マーカーであり中間体であるトリコジエンなどのセスキテルペノン炭化水素の de novo 産生をモニターした。麦芽エキス寒天培地やポテトデキストロース寒天培地などの増殖培地上で、毒素産生株である *Fusarium sambucinum* や *Fusarium sporotrichioides* がトリコジエンを産生したことが明らかになった。この化合物が培養液のヘッドスペース抽出における主な揮発性代謝産物であった。その一方、デオキシニバレノールを産生する *Fusarium graminearum* は完全に異なる揮発性セスキテルペノンパターンを示し、ヘッドスペースプロフィールに基づき *F. graminearum* のゼアラレノン産生株と容易に区別可能であった。したがって、SPME および HSSE による揮発性真菌代謝産物のヘッドスペース分析とガスクロマトグラフィ/質量分析の併用法は、*Fusarium* の毒素産生株を鑑別するための適切なモニタリング法であると結論づけられる。

リボソーム蛋白質 L3 切断型の発現はヤマゴボウ抗ウイルス蛋白質と Fusarium マイコトキシンデオキシニバレノールに対する抵抗性を付与する

小麦、大麦、トウモロコシなどの重要な農産物が Fusarium 種に感染して、トリコテセンマイコトキシンであるデオキシニバレノール(DON)汚染が発生することが世界的問題となっている。トリコテセン類はリボソーム蛋白質 L3 を標的として、蛋白質合成を阻害する。ヤマゴボウ抗ウイルス蛋白質(PAP)はリボソーム不活化蛋白質であり、L3 と結合し大 rRNA の  $\alpha$ -サルシン/ループを脱プリン化する。野生型 PAP により植物を形質転換すると病変が生じ、PAP がそれ自身の mRNA を不安定化して発現を自己調節することに起因する、非常に低レベルの PAP が発現される。本稿において、著者等は野生型 PAP と酵母 L3 切断型(L3 $\Delta$ )の両者を発現しているトランスジェニックタバコの表現型が正常であることを示した。これら植物では PAP mRNA と蛋白質レベルが非常に高く、L3 $\Delta$  が PAP mRNA 発現の自己調節を抑制することを示す。PAP と L3 $\Delta$  を発現しているトランスジェニック植物では、PAP がリボソームに会合しても、リボソームは脱プリン化されない。これらの植物では、内在性タバコリボソーム蛋白質 L3 の発現がアップレギュレートされ、Fusarium マイコトキシン DON に対して抵抗性となる。以上の結果から、酵母 L3 蛋白質の N 末端断片が発現すると、PAP とトリコテセンマイコトキシン DON に対して trans 優性抵抗性が生じ、両トキシンが共通の作用機序により L3 を標的としている証拠が示された。

## 重合体グルコマンナン吸着剤添加および無添加の *Fusarium* 由来毒 素で自然汚染された飼料穀物が、初回出産授乳雌ブタの乳分泌、血 清化学、および離乳後の繁殖成績に及ぼす影響

デオキシニバレノールなどの *Fusarium* 由来マイコトキシンで自然汚染された飼料穀物が初回出産雌ブタの乳分泌、代謝、および離乳後の繁殖成績に及ぼす効果を調べ、重合体グルコマンナンマイコトキシン吸着剤（GMA）の有効性を評価することを目的として実験を実施した。ヨークシア雌ブタ 36 頭を 3 群に分け、妊娠 91±3 日から出産後 21 日の離乳時まで各群に 3 種の飼料を給餌した ( $n=12$  ブタ／飼料)。飼料は、1) 対照、2) 混入穀物、および 3) 混入穀物 + 0.2%GMA とした。測定変数は、平均飼料摂取日量 (ADFI)、平均 1 日あたり体重 (BW) 変化、血清化学、乳組成、離乳時の仔の BW、および離乳から発情までの間隔とした。混入穀物および混入穀物 + GMA の摂取により、ADFI は低下した ( $P<0.001$ )。混入穀物の摂取の結果、対照群と比較して体重が減少し ( $P=0.007$ )、また混入穀物 + GMA では対照群と比較して体重増加が少なかった ( $P=0.028$ )。混入穀物群の雌ブタと混入穀物 + GMA 群との間で平均 1 日あたり BW 変化に有意差は認められなかった。出産日に、総血清蛋白質濃度は混入穀物群の雌ブタが対照群と比較して低く ( $P=0.038$ )、また混入穀物群の雌ブタは混入穀物 + GMA 群と比較しても低かった ( $P=0.019$ )。出産後 7 日時点での血清尿素濃度は、混入穀物群の雌ブタ ( $P=0.049$ ) および混入穀物 + GMA 群 ( $P=0.048$ ) が対照群と比較して低かった。処置により乳組成に影響は認められなかった。離乳時の仔の BW または授乳中の仔ブタの死亡率に対する飼料の効果は認められなかった。混入穀物群の雌ブタ ( $P=0.09$ ) または混入穀物 + GMA 群の雌ブタ ( $P=0.08$ ) に対照群と比較して離乳から発情までの間隔が上昇する傾向が認められた。授乳中の雌ブタに対して *Fusarium* 由来マイコトキシンで自然汚染された飼料を摂取させると、摂取量が低下し BW 減少が上昇すると結論付けた。混入飼料を給餌した雌ブタでは、離乳から発情までの間隔が長くなる傾向も認められる。混入飼料に GMA を補充することにより、混入飼料を摂取させた雌ブタで観測される血清蛋白質や血清尿素の低下を是正することが可能と考えられる。

## 重合体グルコマンナンマイコトキシン吸着剤添加および無添加の *Fusarium* 由来マイコトキシンで自然汚染された飼料穀物が妊娠雌 ブタの繁殖成績および血清化学に及ぼす効果

家畜飼料の *Fusarium* 由来マイコトキシン混入は、摂取量の低下と高アミノ酸血症を引き起こし、その結果肝臓の蛋白質合成が低下する可能性がある。本研究では、*Fusarium* 由来マイコトキシンで自然汚染された飼料穀物の摂取が雌ブタの繁殖成績、血清化学、平均飼料摂取日量 (ADFI)、および平均増体日量 (ADG) に及ぼす効果を調べ、重合体グルコマンナンマイコトキシン吸着剤 (GMA) が混入飼料の効果を低下または除去する可能性を検査した。ヨークシア雌ブタ 36 頭を 3 群に分け、妊娠 91±3 日から出産時まで各群に 3 種の飼料を給餌した ( $n=12$  ブタ/飼料)。飼料は、1) 対照、2) 混入穀物、および 3) 混入穀物 + 0.2% GMA とした。*Fusarium* 由来マイコトキシン混入飼料が ADFI に影響を及ぼすことはなかったが ( $P=0.24$ )、ADG ( $P=0.029$ ) および G : F ( $P=0.047$ ) は低下した。 $\beta$ -ヒドロキシ酪酸、ハプトグロビン、蛋白質、アルブミン、グロブリン、尿素、グルコース、コレステロール、Ca、Na、Mg、P、K、Cl の血清中濃度、および肝臓酵素活性に飼料による影響は認められなかつた。死産仔ブタの頻度は、混入穀物を給餌した雌ブタが混入穀物 + GMA を摂取したブタと比較して高かった ( $P=0.03$ )。また、混入穀物 + GMA の摂取により、混入飼料を摂取した雌ブタと比較して生産率が高くなつた。結論として、*Fusarium* 由来マイコトキシンで自然汚染された飼料を摂取した雌ブタは死産の発現率が高い可能性があり、飼料への GMA の補充によりこの効果が低下する可能性がある。

## 仔ブタ飼料中の *Fusarium* 属トキシン濃度を増量したときの、子宮 および臍の組織学的パラメーターへの影響

*Fusarium* 属トキシン汚染トウモロコシに由来する、1kgあたりゼアラレノンを 0.01、0.06、0.15、0.22 および 0.42mg、またデオキシニバレノールを 0.2、0.8、1.0、1.9 および 3.9mg 含有する飼料を、50 匹の思春期前子ブタに給餌して(摂餌群あたり 10 匹；体重  $32.6\text{kg} \pm 5.4\text{kg}$ ；約 70 日齢)、子宮に対する影響を調べた。最高濃度汚染飼料摂取群では、屠殺時の子宮平均重量が有意に增加了。組織学的検査において摂餌群間で顕著な差は見られなかった。汚染飼料を与えると、子宮上皮、子宮腺および臍上皮の組織学的パラメーターに変化はなかった。

## 飼料中の Fusarium 属トキシン汚染トウモロコシを段階的に增量した時の雌離乳仔ブタに対する影響

仔ブタ飼料中の Fusarium 属トキシン汚染トウモロコシを段階的に增量したときの、成長能、血清臨床特性、器官重量、体液および組織中の残留ゼアラレノン(ZON)量／デオキシニレバノール(DON)量／その代謝産物量に及ぼす影響を調べるために、用量応答試験を実施した。このために、Fusarium 属トキシン汚染トウモロコシ（トウモロコシ 1kg 当たり ZON1.2mg、DON8.6mg）を仔ブタ用トウモロコシ飼料中へ、0、6、12.5、25、50%混入して試験飼料とした。体重が  $12.4 \pm 2.2\text{kg}$ ～ $32.5 \pm 5.6\text{kg}$  の範囲にある 100 匹の雌仔ブタを、20 個の飼育箱に割りあて(飼育箱当たり 5 匹)、試験飼料を給餌して調べた。Fusarium 属トキシン汚染トウモロコシが最も多く混入した飼料を摂取した動物では、自発摂餌量とその結果として体重増加量が有意に減少したが、食餌転換率は汚染飼料摂取による影響を受けなかった。同じ群のブタでは、体重に関連した子宮平均重量が対照群に比して約 100%増加した。この群では血清総蛋白質値が有意に減少し、一方汚染トウモロコシを 6%以上混入した飼料を摂餌したすべての群で、肝臓酵素であるグルタミン酸脱水素酵素の血清中活性と血清中卵胞刺激ホルモン値が減少した。免疫グロブリン血清値については、摂餌と一貫性のある変化は見られなかった。食餌性曝露量に応じて、胆汁、肝臓および蓄尿検体中の ZON 値と  $\alpha$ -ゼアラレノール値が増加した。代謝産物である  $\beta$ -ゼアラレノールは胆汁でのみ検出された。胆汁中の ZON および代謝産物の総濃度と、飼料汚染の間に十分な関連性が認められた( $r=0.844$ )。DON は、血清、胆汁、および蓄尿検体中で検出されたが、脱エポキシ-DON は尿でのみ検出された。血清 DON 濃度と、屠殺 3～4 時間前までに摂取したトキシン量との間に十分な関連性が認められた( $r=0.957$ )。残留物に関するすべての解析において、飼料中のトキシン濃度がごく小さくても、トキシン残留が確認された点に注目する必要がある。

## デオキシニバレノールとゼアラレノンに対するマイコトキシン解毒剤の効果の評価に関する *in vitro* 試験

食品添加物として市販されているマイコトキシン解毒剤と吸着物質について、デオキシニバレノール(DON)とゼアラレノール(ZON)に対する *in situ* 解毒作用の効果を評価するために、*in vitro* 簡易試験法を開発した。*in vitro* 実験モデルでは、ブタがマイコトキシンに対して最も鋭敏に反応する胃腸管反応条件(pH、温度、および通過時間)になるようにシミュレートした。この実験条件では、市販製品は DON と ZON に対して有効な解毒作用を示さなかつたが、活性炭は両トキシンとコレステラミンを結合させ、修飾アルミニノケイ酸塩は良好な ZON 吸着作用を示した。用量依存試験において得られたデータから、コレステラミン吸着能は解毒剤 1kg 当たり ZON11.7g、修飾アルミニノケイ酸塩吸着能は解毒剤 1kg 当たり ZON 5.7g と推算された。今回の試験で採用された *in vitro* 試験法は簡便であり、ブタ胃腸管の反応条件をシミュレートした状態で DON と ZON の解毒作用をスクリーニングにするのに有用である。とはいえ、効果を確証するためには *in vivo* 試験が不可欠である。

## Fusarium トキシン汚染トウモロコシを混入した仔ブタ飼料における修飾アルミニノケイ酸塩の解毒剤としての効能

飼料に Fusarium トキシンが 500g/kg となるように汚染トウモロコシを混入し(8.6mg/kg デオキシニバレノール(DON);1.2mg/kg ゼアラレノン(ZON))、さらに解毒剤として 4g/kg アルミニノケイ酸塩(AS)を添加したときの効果を調査するために、雌離乳仔ブタを用いて、2×2 完全要因計画により 2 件の食餌実験を実施した。4 種類の ad libitum 食餌が給餌されることになり、実験 1 では平均生体重  $10.5 \pm 1.3$ ~ $27.5 \pm 4.4$ kg の 80 匹の仔ブタに給餌し(食餌群あたり 20 匹を 20 に仕切られた飼育檻に割り当てた)、実験 2 では平均生体重  $9.7 \pm 1.8$ ~ $21.4 \pm 4.8$ kg の 48 匹の仔ブタに給餌した(食餌群あたり 12 匹を 12 に仕切られた飼育檻に割り当てた)。実験 1 では、実験飼料を与えて 34~36 日目に、実験動物を屠殺処分した。マイコトキシンの分析で、対照トウモロコシ飼料もかなりの Fusarium トキシン汚染を受けていることが明らかになったが、対照飼料と汚染飼料の DON 濃度と ZON 濃度差が十分に高く、両トキシンの用量依存的効果が明らかになった。いずれの実験においても、Fusarium トキシン汚染トウモロコシ混入飼料摂餌群では、自発摂餌量と生体重増が有意に低下し、実験 1 では飼料摂取量：增量体重の比率が有意に低下した。さらに、汚染トウモロコシ混入飼料を摂餌した動物では、子宮、胃、および心臓の相対重量が有意に増加した。汚染トウモロコシ混入により、血清アルブミン値と GLDH 活性が有意に低下した。Fusarium トキシン汚染飼料に AS を添加しても、前述の影響を防ぐことも軽減することもできなかった。さらに、両実験において、AS 補充により飼料摂取量が減少する傾向が認められ、実験の本要因について摂取量：增量体重の比率も同様に有意に減少した。AS を飼料に添加すると、血清アルブミン濃度、ASAT と  $\gamma$ GT 活性が有意に増加したが、血清コレステロール値は減少し、 $\alpha$ -トコフェロール血清濃度には減少傾向がみられた。肝臓と血清中のレチノール濃度とレチニルエステル濃度は給餌による影響を受けなかった。ゼアラレノン(ZON)とその代謝産物の胆汁中濃度は、飼料中の ZON 濃度に依存して変化することが明らかになり、AS には消化管からのトキシンの吸収を防ぐ効果はなかった。また、DON 血清濃度は、検体サンプリング前の DON 摂取量を反映していた。しかしながら、AS 添加飼料摂取群と非添加飼料摂取群との間に差が見いだされなかつたことから、AS には DON 吸収を防御する効果もないことが示唆された。今回試験対象とした添加物について、その解毒作用を立証することはで

きなかつたため、in vivo 試験で解毒剤全般を批判的に検証する必要性がある。

## 肉ブタ用マッシュ飼料とペレット飼料におけるデオキシニレバノールの実際関連濃度

Fusarium 感染小麦(2.5mg DON /kg、飼料の 0%、25%、および 50%)、飼料加工法(マッシュおよびペレット)、ならびにその相互作用が、肉用ブタ(96 匹、n=16/群)に及ぼす影響を 2×3 完全二要因計画を用いて調査した。摂取量：增量体重比は、汚染小麦摂取により有意に増加したが(Fusarium 感染小麦が 0%では 2.65kg/kg ,25%では 2.62kg/kg および 50%では 2.73 kg/kg)、栄養消化率と代謝エネルギーは小麦バッチの影響を受けなかった。飼料加工法により、摂取量：增量体重比は有意に変化したが、有機物消化率、粗脂肪消化率、代謝エネルギーに対する有意な作用を伴った。臨床化学パラメーターに、感染小麦の飼料混入による変化は見いだされなかった。いずれの実験要因に対しても、リンパ球増殖能は有意な影響を受けなかった。飼料処理法がデオキシニレバノール(DON)の変動に寄与しているか否かを、今回の試験結果から推測することはできない。

## 単離した Fusarium 毒素デオキシニバレノールの中等度負荷飼料が 育成中の離乳仔ブタの一部代謝パラメータに及ぼす亜急性影響

雌離乳仔ブタ 36 頭において、単離精製した Fusarium 毒素デオキシニバレノール(DON)を種々の用量(0,300,600,1200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  飼料)の影響を 8 週間調べた。試験条件は標準化した。ブタは制限給餌させ、すべてのブタが完全飼料摂取を行えるようにした。パラメータは肝機能、血液学的検査データ、ならびにエネルギーおよび蛋白質の代謝成分の血中濃度とし、週 1 回測定した。Wald の F 検定により酵素のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼは、年齢による亜臨床的影響を受け、投与量による有意な影響を受けることが判明した。その他の酵素、例えばアラニンアミノトランスフェラーゼ、 $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、およびソルビトールデヒドロゲナーゼには、明らかな系統的影響はみられなかった。血中尿素および血中グルコースには相互関係が認められた。グルコース濃度の上昇に伴い、DON の負荷に応じて尿素濃度は低下した。血清アルブミンおよび血清総蛋白質については、DON 関連性の有意な影響は認められなかった。血中ヘモグロビンは DON により有意な影響を受けることが Wald の F 検定により判明したが、この影響は DON 1200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の飼料に比べ DON 600  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の方が顕著であった。DON 投与量および投与時間に依存した、肝臓、窒素代謝、および造血刺激が受ける明らかな DON 関連性の影響について述べる。

## 肥育仔ブタに単離デオキシニバレノール(DON)を添加した飼料を与えることによって誘導される血清 IgA 促進効果

デオキシニバレノール(DON)は、トリコテセン系に属する *Fusarium* トキシンの一つであり、家畜に対して、蛋白質合成阻害、食餌量の低下、免疫系の変化など、様々な健康被害をもたらすことが報告されている。ブタを用いて、半合成飼料に化学的に純粋な DON を添加して、その含有量を増量したときの、成長能、健康状態、および血清中免疫グロブリン A(IgA)値を調査した。穀物成分が含まれず、トリコテセン(8種類の主要トリコテセン)が混入していない飼料に、純粋な単離 DON を飼料 1kgあたり 0、300、600、および  $1200 \mu\text{g}$ となるように添加し、標準条件下で離乳した 34 匹の雌ブタに 8 週間給餌した。体重増加、ならびに血液検体と血清検体の生化学検査値と血液学的検査値、すなわち IgA 値、血糖値、コルチゾール値、インシュリン様成長因子 1(IGF-1)を測定した。飼料中の DON 量を増加すると、血糖値が有意に低下した。コルチゾール値と IGF-1 値は有意な影響を受けなかったが、実験終了時には試験群間で差が認められた。600  $\text{DON} \mu\text{g/kg}$  でも、血清中 IgA 値が有意に増加することが認められた。本稿は、肥育仔ブタに制限用量の DON を与えると血清中 IgA 増加が亢進する可能性があることを *in vivo* 研究で明らかにした初めての報告である。

## in vitro における *Lactobacillus* 株および *Propionibacterium* 株による一般的な *Fusarium* 毒素の除去

選択された *Lactobacillus* 株および *Propionibacterium* 株について、一般的な *Fusarium* 毒素であるトリコテセン類の液体培地からの除去能を検討するため、本試験を実施した。試験対象のトリコテセンは、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(3-AcDON)、ニバレノール(NIV)、フザレノン(FX)、ジアセトキシシルペノール(DAS)、T-2 トキシン(T-2)、HT-2 トキシン(HT-2)とした。*Lactobacillus rhamnosus* GG 株(LGG)、*Lactobacillus rhamnosus* LC-705 株(LC-705)、*Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS(PJS)を、毒素 20 μg/mL 含有 PBS 緩衝液において 37°Cで 1 時間 培養した。遠心後、上清画分を用いて毒素濃度を測定した。液体培地からの毒素の除去において、LGG および PJS の生菌体および加熱死菌体は、ともに LC-705 より有効性を示した。LGG および PJS は 7 種類の被験毒素のうち 4 種類を除去し(18~93%の範囲で除去)、LC-705 は 2 種類の毒素を除去した(10~64%)。これらの毒素のうち 3-AcDON はいずれの細菌でも除去されず、HT-2 は LGG 死菌体により除去され、LC-705 死菌体でもわずかに除去された。また、DAS は 3 種すべての被験細菌により除去された。生菌体と加熱死菌体との間に トリコテセン除去能の差が認められず、ガスクロマトグラフィー(GC)-質量分析(MS)により毒素の分解産物が検出されなかったことから、除去機構の可能性として毒素との結合が考えられた。結論として、in vitro における細菌のトリコテセン結合能には有意な差が存在する。

## トウモロコシおよびトウモロコシ加工品における特定のマイコトキシンの発生、ならびに加工時のフモニシン B<sub>1</sub>の熱安定性

エジプト各地から収集したトウモロコシおよびトウモロコシ加工品の計57試料について、*Fusarium* マイコトキシン(T-2、ジアセトキシシルペノール(DAS)、デオキシニバレノール(DON)、フモニシン B<sub>1</sub>(FB<sub>1</sub>)、アフラトキシン)の解析を行った。FB<sub>1</sub>は、黄色トウモロコシ、コーンミール、白色トウモロコシ、ポップコーン試料からそれぞれ約 80%、53.85%、33.3%、28.57% 検出された。FB<sub>1</sub> の濃度は 10~780 μg/kg の範囲であった。T-2 および DAS は、黄色トウモロコシ試料からそれぞれ 5% および 10% 検出され、DON は白色トウモロコシ、ポップコーン試料からそれぞれ 28.8 μg/kg および 10.1 μg/kg の濃度で検出された。デンプン試料には、*Fusarium* マイコトキシンを認めなかった。バラディパン(balady bread)を 450°C/分で加熱した場合、FB<sub>1</sub> が 72.4% に低下したのに対し、フランコパン(Franco bread)を 250°C/20 分で加熱した場合、FB<sub>1</sub> は 57.4% に低下した。マカロニおよびトウモロコシを熱湯で煮沸すると、FB<sub>1</sub> は汚染試料から完全に除去された。他方、コーンフレーク試料は、アフラトキシン B<sub>1</sub> およびアフラトキシン G<sub>1</sub> による汚染が濃度 6~10 ppm の範囲で認められたが、試料の 2.9% にアフラトキシン B<sub>1</sub>>35 ppm、アフラトキシン G<sub>1</sub>>16 ppm の汚染が認められた。

## ブタの回腸消化物および糞便中のトリコテセン類の変換

ブタ消化管微生物叢がトリコテセン類 3-アセチル-デオキシニバレノール (3-acDON) およびニバレノール (NIV) を代謝する能力を検討した。3-acDON は、異なる養豚場で回収したブタ糞便とともに嫌気的インキュベーションを行うと脱アセチル化されて DON となる。さらに、これらのインキュベーションにおいて 3-acDON と NIV はともに代謝されて、脱エポキシ代謝物になる。消化管微生物叢に 3-acDON 及び NIV を脱エポキシ代謝物に変換する能力のないブタ 5 頭に、低濃度の DON を 7 週間混餌投与した。消化管微生物は、7 週間の曝露期間で脱エポキシ化能を獲得しなかった。曝露期間終了時、脱エポキシ化能を有することがわかっているブタの糞便を檻に散布し、24 時間放置した。ペンに糞便を散布した 1 週間後に、糞便インキュベーションにおいて、実験ブタの 5 頭中 4 頭から脱エポキシ化能が検出された。腸内脱エポキシ化能に関するこの代謝能の変化には、細菌群集組成の DNA プロファイルの検出可能な変化が伴わなかった。この結果より、ウプサラ地域の養豚場において、腸内脱エポキシ化能は普遍的なものであり、この能力はひとつのストック内のブタの間で伝達されることがある。

## ブタにおける 3-アセチル DON の吸収、代謝、排泄

3-アセチルデオキシニバレノール (3-aDON) のブタにおける吸収、代謝、排泄を検討した。トリコテセンを脱エポキシ化できることがわかつている糞便微生物叢を有するブタを実験に用いた。ブタに 3-aDON を 2.5 mg/kg 飼料の濃度で加えた市販飼料を 2.5 日間与えた。血漿、尿、糞便中に、3-aDON やその脱エポキシ化代謝物の痕跡は認められなかった。デオキシニバレノール (DON) が、飼料を与え始めてから 20 分後に早くも血漿中から検出された。最高血漿中 DON 濃度には 3 時間後に到達し、その後急速に減少した。飼料を与え始めてから 8 時間後の血漿には、検出限界に近い低濃度しか認められなかった。血漿中 DON の相当部分がグルクロン酸抱合型 ( $42 \pm 7\%$ ) であった。60 時間の曝露の間に、DON の血漿中での蓄積は生じなかった。DON の排泄は、主に尿中であり (ブタにより摂取されたトキシンの  $45 \pm 26\%$ )、糞便中からは 3-aDON の代謝物のごく少量しか回収されなかつた ( $2 \pm 0.4\%$ )。脱エポキシ化 DON は、糞便中から検出された 3-aDON 代謝物の総量の  $52 \pm 15\%$  を占めていた。糞便中の残りの部分は DON であった。DON は、最後の曝露後 48 時間のサンプリング期間終了時でも、尿および糞便中に存在していた。この結果より、脱エポキシ化活性を有する糞便微生物叢をもつブタであつても、トリコテセン曝露後、脱エポキシ化物はブタの血漿および尿中で認められないことが示された。トキシンのアセチル化型は、*in vivo* で脱アセチル化される。さらに、この実験により、DON の主要部分は、速やかに排泄され、血漿中には蓄積されないが、トキシンの少量の一部は停留し、ブタから徐々に排泄されることが示された。

## SF-9 昆虫細胞株におけるニバレノール、デオキシニバレノールおよびフモニシン B<sub>1</sub>により誘導される細胞毒性

マイコトキシンであるニバレノール (NIV)、デオキシニバレノール (DON) およびフモニシン B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) の毒性を、鱗翅目 *Spodoptera frugiperda* (SF-9) 細胞において、それぞれトリパンブルー色素排除および 3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ビフェニルテトラゾリウムブロミド (MTT) 試験、細胞毒性の取込み分析、ならびに細胞代謝により試験した。アポトーシスおよび細胞周期分布の確認にはフローサイトメトリーによるデオキシリボ核酸分析を用いた。曝露 48 時間後、MTT およびトリパンブルー色素排除試験により、NIV は DON よりも有意に毒性が高いこと、ならびに両者は FB<sub>1</sub> よりも有意に毒性が高いことが示された。NIV と DON の IC<sub>50</sub> (増殖の 50% 阻害を生じるマイコトキシン濃度) 値はそれぞれ 4.5 及び 4.1 μM であり、CC<sub>50</sub> (50% 細胞毒性を生じるマイコトキシン濃度) 値はそれぞれ 9.5 および 45 μM であった。FB<sub>1</sub> の最高濃度において (100 μM)、生存率は 80% あった。同じインキュベーション時間において、細胞周期分布は、NIV (最高 0.3 μM)、DON (最高 3 μM)、FB<sub>1</sub> (最高 10 μM) の存在下で G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期の細胞停止を示していた。アポトーシスの形態学的証拠は物質の毒性と関連しており、より毒性の高い NIV が遅発性アポトーシスを誘導する一方、DON と FB<sub>1</sub> は早期アポトーシスに特徴的な重篤度の低い形態学的变化を生じた。本研究により、NIV は DON よりも毒性が高く、DON は FB<sub>1</sub> よりも毒性が高いことが示唆された。これらのマイコトキシンは、細胞周期の正常な進行を変化させ、アポトーシスの過程を生じる。

## ニワトリ白血球において食事性ヌクレオチドが T-2 トキシンおよび デオキシニバレノールによる DNA 損傷の低減に果たす役割

本研究の目的は、T-2 トキシンおよびデオキシニバレノール (DON) が、ニワトリの脾臓白血球の DNA 断片化および酸化ストレスに及ぼす影響を明らかにし、さらに、食事性ヌクレオチドがトキシン誘発性 DNA 損傷の低減における効力を評価することであった。雄プロイラーを、T-2 トキシン又は DON の 10 mg/kg 飼料に、食事性ヌクレオチドを加えた場合と加えない場合で曝露した。処理 17 日後に、脾臓白血球の DNA 損傷をコメットアッセイにより測定し、脂質過酸化反応をマロンジアルデヒド(MDA)、血漿中の総抗酸化物質状態(TAS)、およびグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) アッセイにより試験し、肝毒性を血漿中肝酵素値 (ALT、AST および GGT) 測定により研究した。ニワトリ脾臓白血球において T-2 トキシンおよび DON により DNA 断片化を誘発し、ヌクレオチドを添加すると、損傷の量は T-2 トキシンに添加した場合のみ減少した。対照群との比較において、T-2 トキシンを与えた群で、ヌクレオチド添加の有無にかかわらず TAS および AST 値は有意に減少した。T-2 トキシンおよび DON を与えた群の血漿および肝臓中 MDA 含量は、対照群と有意差はなかった。食事性ヌクレオチドは、マイコトキシンとともに飼料に添加した場合、MDA 產生に影響を及ぼさなかった。得られた結果より、食事性ヌクレオチドは、免疫細胞において T-2 トキシンの作用により生じた DNA 損傷の程度を軽減する効力を有することが示唆される。これは、マイコトキシン中毒において、食事性ヌクレオチドが免疫系に有益作用を及ぼす可能性があることを明確に示している。

## トリコテセン類は循環血液細胞の生存率を減少させ、止血パラメータを変化させるか？

本稿では、T-2 トキシンおよび DON が、凝固時間、血小板凝集、赤血球溶血、RBC ブドウ糖含量、乳酸放出、グルタチオン枯渇並びに白血球生存率の変化を生じる能力を明らかにするために、ヒト血液細胞を用いて実施した実験結果について述べる。In vitro の結果により、止血パラメータ及び赤血球は、造血祖先細胞の増殖阻害を生じることができる濃度で、影響を受けないことがわかった。 $10^{-8}M$  および  $10^{-6}M$  の T-2 存在下で、白血球数は、24 時間後にそれぞれ 30% および 50% 減少した。 $10^{-5}M$  の DON では、白血球数の 50% 減少が観察された。結果を、造血祖先細胞の感度と比較した。成熟血球と造血祖先細胞との間で感度に差があることから、トリコテセン中毒に関連した血液の異常は、造血阻害が原因であると思われる。

## 毒性学的研究のための巨核球祖先細胞培養の改良

本研究は、巨核球祖先細胞の増殖および分化に関する生体異物の毒性を評価する *in vitro* 試験法の確立を目的とした。血液細胞は急速に更新するため、造血系は生体異物の毒性の影響を受けやすい。血液毒性分子は、1つ以上の造血系譜に影響を及ぼし、血液疾患をもたらす場合がある。毒性研究に適用する *in vitro* 巨核球形成モデルには、正確性、精密性、再現性、高感受性、特異性が必要である。臍帯血由来のヒト巨核球祖先細胞をコラーゲン培地に播種した。3種類の溶媒(エタノール、メタノール、アセトン)を選択し、1種類(ジメチルスルホキシド；DMSO)については、検討濃度において細胞毒性を認めたため除外した。凍結保存を行っても、生体異物に対する CFU-MK の感受性には影響を与えたなかった。細胞懸濁液の濃縮として本懸濁液を一晩培養後プレーティングしたところ、CD34<sup>+</sup>細胞の陰性選択よりも優れたクローニング効率を示した。種々のパラメータ間の比較により、毒性研究における *in vitro* 巨核球形成モデルに適した試験計画の提唱が可能となった。毒性試験に関わる本クローン生成アッセイの効率を検証するため、CFU-MK の発生に及ぼす 3種類の毒素の影響を検討した。ここに定義した CFU-MK 培養条件は、巨核球祖先細胞に対する薬剤の細胞毒性およびその増殖障害を調査するのに有用であることが認められた。

## 細菌株 BBSH 797によるタイプ A トリコテセンの微生物分解後における代謝産物の構造特性化

畜産業において一群の *Fusarium* 属マイコトキシンであるトリコテセン類による飼料汚染は、免疫抑制作用および胃腸管系における負の影響による生産性損失をきたす。微生物分解は 1 つの可能性のある解毒法であり、本試験の中心テーマとした。BBSH 797 は、トリコテセン類のマイコトキシンの一部を分解可能な細菌株であり、既に単離されている。BBSH 797 は、デオキシニバレノール(DON)を脱エポキシ化した無毒代謝産物 DOM-1 に変換する。DON の微生物分解と同様に、6 種類のタイプ A トリコテセンの変換が認められた。出現した代謝産物は、TRI-SIL®TBT による誘導後 GC-MS により特性化した。粒子ビームインターフェースを用いた液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-PB-MS) の電子衝撃(EI)イオン化モードによって、さらに 2 種類の代謝産物を同定した。重要な知見として、シルペントリオールが脱エポキシ化した無毒の代謝産物のシルペントリオールに完全に変換されたのに対し、マイコトキシンの T-2 トリオールはより複雑な代謝を受けた。本試験によれば、T-2 トリオールは脱エポキシ化した無毒物に分解後、T-2 テトラオールを経て、次いでさらに脱エポキシ T-2 テトラオールに代謝された。TRI-SIL®TBT による誘導後 GC-MS は、トリコテセンおよびその分解産物の構造特性化に適していた。既知の分解産物の質量スペクトルに加え、新たな代謝産物のスペクトルについても LC-PB-MS による記録が可能となった。

## カビおよびトキシンに汚染されたオオムギが産卵鶏の産卵能および健康に及ぼす影響

カビやマイコトキシンに汚染されたオオムギを、産卵能および健康への影響を検討するために、産卵鶏の飼料に混合した。健康の指標は、さまざまな血漿パラメータと肝臓のビタミン A および E のレベルであった。合計 30 羽に、3 種類の飼料を与えたが、ひとつはトキシン非含有、2 つは異なるカビの生えたオオムギを 30% 添加し、1997 年と 1998 年に 7 週間与えた。カビの生えた飼料には低濃度～中濃度のオクラトキシン A、ゼアラレノン、デオキシニバレノールおよびニバレノールが含まれていた。カビの生えたオオムギを飼料に混合すると、摂餌量、飼料要求率、栄養の消化率、産卵および卵の質に悪影響があった。血漿中アルカリホスファターゼは上昇し、特定の血液生化学的パラメータ（ビリルビン、尿酸、塩素、蛋白、アルブミン、ビタミン A）も対照と比較して高値となったか、変化した。オクラトキシン A の汚染も、比較的少ないものの、これらの影響の一部に寄与しており、摂餌量が低下した。1998 年の飼料に含まれていたオオムギの方がカビと未確認細胞毒性成分に高濃度で汚染されたことから、この飼料の方では影響が大きかったこともおそらく説明できる。

## 食物由来 *Fusarium* 属マイコトキシンがシチメンチョウの脳領域神経化学に及ぼす影響

*Fusarium* 属マイコトキシンで自然汚染された飼料穀類が、シチメンチョウの脳領域神経化学に及ぼす影響を調査するため、実験を実施した。グルコマンナンポリマーを用いたマイコトキシン吸着剤(GMA)による抑制効果の可能性も判定した。1日齢の雄シチメンチョウ雛45羽に、コムギ、トウモロコシ、大豆を主成分とする飼料を、対照穀類、汚染穀類、汚染穀類+0.2%GMAとして調製し、6週間まで給餌した。デオキシニバレノールを主要汚染物質とし、開始期および育成期の濃度をそれぞれ 2.2mg/kg、3.3mg/kg とした。脳橋、視床下部、および大脳皮質を含む脳の個別領域において、脳モノアミン神経伝達物質および代謝産物の濃度を電気化学検出 HPLC により測定した。ノルエピネフリン、ドーパミン、3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸、セロトニン(5-ヒドロキシトリプタミン、5-HT)、および 5-ヒドロキシインドール酢酸(5-HIAA)を含む神経伝達物質および代謝産物について解析した。汚染穀類摂取後、脳橋の 5-HIAA 濃度および 5-HIAA : 5-HT の比は有意に低下した。飼料に GMA を添加すると、これらの影響は抑制された。脳橋において、汚染飼料摂取後の 5-HT 濃度と BW 増加との間に有意な正相関( $r=0.52$ 、 $P<0.05$ )を認めた。視床下部および大脳皮質については、汚染飼料摂取による神経伝達物質濃度および代謝産物濃度に有意な影響を認めなかった。結論として、*Fusarium* 属マイコトキシンで自然汚染された穀類の消費は、シチメンチョウ脳橋のセロトニン作動系には有害な変化をもたらした。これらの影響は GMA の添加により一部阻害された。

## エストロゲン作用を有するマイコトキシンの食事性起源と雌イヌの健康への影響

ポーランドにおいて、穀物、食品、飼料およびその構成成分における毒素産生真菌の発生、ならびにこれらの物質でのマイコトキシンの蓄積は、我々の研究グループを含む多くのチームによって、1969年から30年以上にわたり研究されてきた。毒素産生真菌の有無、その毒素産生能、自然のマイコトキシン汚染について、多くの穀物粒および飼料が検討してきた。オクラトキシン A、デオキシニバレノール、ニバレノール、およびモニリホルミンは、農産物の重要な汚染物質であることが、高割合の穀類サンプルにおいて明らかにされている。毒性代謝物のプロフィールは類似しているが、トキシンの濃度レベルは、既に公表されている同じ気候帯のデータと比較して低かった。エストロゲン様活性を有する非ステロイド性マイコトキシンであるゼアラレノン (ZEA) を、保存状態の悪い農産物および食料品で多くみられるカビ (フザリウム属) より合成した。イヌで実施した一連の検査と外科処置以後、卵巣嚢腫が検出され、これが、雌の約30%で発見される子宮内膜子宮留膿複合体 (EPC) の第一段階であることが多いことから、我々はマイコトキシン (ZEA) と病理学的異常の両因子がおそらくこれらの動物において関係しているのではないかと考えている。トキシン (おそらくイヌのペレット飼料中に存在している) の類似した活性と雌イヌの不妊などの作用から、この問題に関するさらなる試験が必要であることが推測される。

## マウスにおける低経口用量のデオキシニバレノールおよびニバレノールの個々の作用及び複合作用

デオキシニバレノール (DON) 及びニバレノール (NIV) は、通常穀類において一緒に発生することの多い有毒なフザリウム属二次トリコテセン代謝物である。これらの化合物を、C57BL/6 系マウスへの毒性について、複数のパラメータ、(例、血漿生化学、免疫系反応性、及び肝薬物代謝能の変化など) について比較した。マウスに、各トキシン (0.071 又は 0.355mg/kg 体重) の単独又は組み合わせを、週 3 日で 4 週間経口投与した。摂餌量は NIV0.355 mg/kg の単独投与で変化したが、体重、臓器重量、肝蛋白含量の顕著な変化は検出されなかった。NIV 投与により、総 CO<sub>2</sub> 及び血漿中尿酸濃度の有意な変化も生じた。個々のトキシン曝露により血漿中 IgA の上昇に至り、脾細胞によるサイトカインの *ex vivo* 産生の検出可能な変化も認められた。肝 ethoxyresorufin O-deealkylase、pentoxyresorufin O-depentylase 及びグルタチオン S-トランスフェラーゼの活性は、チトクローム P4501a 及び P4502b サブファミリーの発現に合わせて上昇した。DON と NIV の併用投与により、各トキシンを単独で用いた場合に観察されたものと類似した反応が生じた。しかし、トキシン投与量の比及び生化学的パラメータに応じて、相加的な反応 (血漿中 IgA 及び肝 DCNB 抱合) や相乗的な反応 (血漿中尿酸) も一部認められた。

## マウスにおいて種々の投与量のオキシニバレノールが肝異物代謝酵素に及ぼす影響

DON は、世界中で認められる穀類の主要なマイコトキシン汚染物質のひとつである。本研究の目的は、亜慢性毒性アッセイにより、曝露したマウスを使用して、環境的に問題となる DON 量の範囲の影響を明らかにすることであった。マウスに週 3 日で 4 週間、トキシン 0.014、0.071、0.355 又は 1.774 mg/kg 体重を投与した。0.014 mg/kg を除く全投与量で、血漿中免疫グロブリン A の上昇が惹起されたのに対し、アルカリホスファターゼ、電解質及びその他の免疫グロブリンなどの血漿中生化学的パラメータに変化はなかった。0.071 又は 0.355 mg/kg の投与量により、肝ミクロソームの pentoxyresorufin depeptylase 及び細胞質ゾルのグルタチオン *S*-トランスフェラーゼ活性が上昇した。蛋白修飾を検討するために、これらの投与を受けたマウスの肝分画のウエスタンプロット分析により、P450 2b、GST  $\alpha$  及び  $\pi$  アイソザイムの濃度が上昇したが、P4501a 発現の変化は生じなかつたことが判明した。デオキシニバレノールが *in vitro* において CDNB 抱合に有意な競合的阻害作用を及ぼすことから、マイコトキシンはグルタチオン *S*-トランスフェラーゼの推定上の基質であることが示唆される。これらの肝異物代謝酵素の変化は、デオキシニバレノールの構造的性質と、他のトリコテセンにより発揮された類似した作用に関する過去の報告を検討することにより考察する。これらの結果より、低用量のデオキシニバレノールに亜慢性的に曝露することにより、生体異物の正常な肝代謝に変化が生じることが示唆される。

## 自然に汚染されたコムギのフザリウム属トキシンであるデオキシニバレノール (DON) のブタにおけるバイオアベイラビリティ

自然に汚染されたコムギ (16.6 mg DON/kg) のデオキシニバレノール (DON) に長期曝露後、又は単回経口投与後（急性）の毒性動態を調べるために、去勢した雄豚 16 頭 ( $41.5 \pm 2.0$  kg) で実験を実施した。DON の全身吸収（バイオアベイラビリティ）は、純粋な DON ( $53 \mu\text{g}/\text{kg}$  生体重) を経口投与後（慢性又は急性）及び静脈内投与後の吸収曲線下面積に基づき推定した。さらに、DON の代謝を定量的に追跡するために、バランス試験を実施した。

静脈内 (IV) DON 投与後 ( $n=5$ )、血清中 DON 濃度は二相性に減少し、終末消失半減期 ( $t_{1/2\beta}$ ) は 4.2~33.6 時間であった。DON は、経口曝露後迅速に吸収され、最高血漿中濃度 ( $C_{max}$ ) は、長期 ( $n=5$ ) 及び短期 ( $n=6$ ) 投与群において 88.4 及び 99.1 分後 ( $t_{max}$ ) に、それぞれ 21.79 及び 15.21 ng DON/ml 血清に達した。その後、血清中 DON 値は緩徐に減少し、消失半減期 ( $t_{1/2\beta}$ ) は、両経口群について 6.28 及び 5.32 時間であった。DON の平均バイオアベイラビリティ (F) は長期群で 89%、短期経口群で 54% であった。DON は全群で高度に分布し、みかけの分布容積 ( $V_d$ ) は、全身水分量よりも多かった。デオキシニバレノールのグルクロロン酸抱合は、血清サンプルで経口曝露後にみられたが、静脈内投与後ではみられなかった。

飼料中 DON により、尿中及び糞便中の DON 濃度が有意に上昇したのに対し、代謝物脱エポキシ DON は 4 週間よりも長い投与前期間のある試験でのみ認められた。総回収率は、対照群及び長期 DON 群でそれぞれ  $66.6 \pm 39.0\%$  及び  $54.0 \pm 9.7\%$  であり、尿が主な排泄経路であった。

結論として、経口投与された DON は速やかに 50% を超える程度にまで吸収され、高度に分布し、代謝はごくわずかにすぎなかった。経口投与 24 時間後に、DON は、検出限界のレベルであった 1 頭の長期投与ブタを除き、血清中で検出できなかった。

## 妊娠 35~70 日目中の母ブタから胎児への Fusarium トキシンデオキシニバレノール (DON) およびゼアラレノン (ZON) の移行

体重 153~197 kg の妊娠雌ブタ 11 頭に、対照飼料 (CON : DON 0.15 mg、および ZON 0.0035 mg/kg 飼料) または Fusarium トキシンに汚染されたライコムギを 15% 含有する飼料 (MYCO : DON 4.42 mg および ZON 0.048 mg/kg 飼料) のいずれかを、妊娠 35~70 日目の期間に与えた。全試験期間中、全ての母ブタに同量の飼料 (2000 g/日) を与える制限給餌計画により、摂餌量の間接的影響と、Fusarium トキシンの直接的影響とを区別した。実験終了時、胎児を帝王切開により分娩させ、安楽死させた母ブタと胎児の血清、胆汁、尿、肝臓、腎臓および脾臓のサンプルを採取し、DON、ZON およびその代謝物の濃度を分析した。Fusarium トキシン含有飼料を妊娠ブタに与えることにより、成長成績、臓器重量、および妊娠の維持に有害な影響は生じず、胎児の体重および体長にも影響はなかった。さらに、催奇形性や胎児致死作用は MYCO 群で観察されなかつた。母ブタおよび胎児の血液学的および臨床化学的パラメータは、MYCO 群の母ブタの GLDH (グルタミン酸デヒドロゲナーゼ) 血清中活性が有意に低かったことを除き、飼料の影響は受けていなかつた。

飼料から母ブタや胎児の組織への DON および ZON のキャリーオーバーを、飼料比 (生理学的検体における全代謝物の濃度の合計を飼料中トキシン濃度で除したもの) により算出し、一方胎児比は、胎児の生理学的検体中の全代謝物の濃度の合計を母ブタのそれで除すことにより評価した。DON および脱エポキシ DON が MYCO 群の母ブタの尿、胆汁、血清、肝臓、腎臓および脾臓で検出されたが、胎児の胆汁からは検出されなかつた (脾臓は分析しなかつた)。ZON およびその代謝物の  $\alpha$ -ゼアラレノール ( $\alpha$ -ZOL) が、母ブタの尿および胆汁中で検出されたが、胎児の全検体並びに母ブタの血清および肝臓では、ZON 代謝物は検出されなかつた。MYCO 群の母ブタの尿および胆汁に関する最高飼料比は、DON 代謝物で 0.84 および 0.05、ZON 代謝物で 1.2 および 3.8 であり、両トキシンの代謝および排泄の差が際立つていた。MYCO 群母ブタの肝臓、腎臓および脾臓への DON および脱エポキシ DON の最高飼料比は、それぞれ 0.003、0.007 および 0.003 であった。胎児の尿、胆汁、血清、肝臓および腎臓の DON および脱エポキシ DON の最高胎児比は 0.006、0、0.5、0.88 および 0.33 であったのに対し、最高胎盤比 (胎児の生理学的検体中のトキシン濃度の合計を母ブタの血清中トキシン濃度で除したもの) は、それぞれ 0.64、0、0.50、0.70 および 0.52 であった。したがつて、発達中の胎児は、母ブタに Fusarium トキ

シン含有飼料を与えたとき、妊娠 35~70 日目の間に DON に曝露したと結論することができる。MYCO 飼料中の ZON 濃度は低すぎて、胎児比および胎盤比について信頼のおける結果を得ることはできなかった。

飼料を ad libitum 摂取させた場合と制限摂取させた場合に慢性デオキシニバレノール中毒がブタの成長成績、血液および血清パラメータに及ぼす影響

主にデオキシニバレノール (DON) (DON 16.6 mg /kg) に汚染されている Fusarium 属に自然感染したコムギを加えて、400 g/kg 飼料の総一定コムギ含量とした。摂餌量と DON 汚染飼料の特異的影響の違いを区別するために、対照および DON 汚染飼料を、ad libitum 摂取および制限給餌条件下で、ランダムに 4 群に分けた (n=12 頭／群) 48 頭の両性のブタに 11 週間与えた。Ad libitum 摂取対照群について摂取量は 2.90 kg/日、増体量は 987 g/日、および摂取 : 増体量比は 2.77 kg/kg であった。DON 汚染コムギの ad libitum 摂取群は、有意に 15% 摂取量が少なく、増体量が 13% 少なかったのに対し、摂取 : 増体量比に影響はなかった。さらに、制限給餌群では増体量に群間差はなかったことから、DON 汚染飼料の方で成長成績が低かったことは、主に自発的摂餌量が減少したことが原因であると結論づけた。逆に、代謝エネルギー、有機物質の窒素保持消化率、粗蛋白質、粗脂肪および粗繊維は、DON 群の方がそれぞれ 3、10、3、6、9 および 20% 有意に增加了。DON 汚染飼料を与えられたブタの方が、対照群よりも制限給餌の割当量を摂取するためにより多くの時間を要した。例えば、給餌後最初の 1 時間に、対照群のブタの 85% が全ての飼料を摂取したのに対し、DON 群はわずか 39% であった。血液および血清パラメータの差はごくわずかであり、個体差が大きいことが特徴であった。血清中の DON および IgA 濃度は、有意に DON 曝露の影響を受けた。

## Fusarium 毒素デオキシニバレノール(DON)が IgA、IgM、IgG 濃度 およびブタ血中リンパ球の増殖に及ぼす影響

トリコテセン系マイコトキシンの重大な影響は免疫機能の障害であるが、免疫毒性試験は主にマウスモデルで実施されている。今回の試験では、ConA 刺激したブタ末梢血リンパ球(PBL)増殖に及ぼすデオキシニバレノール(DON)の影響について、in vitro においては DON 70-560ng/ml の培地添加後、および in vivo においては食餌中 DON(5.7mg/kg) の慢性曝露および急性曝露(単回投与)後に評価を行った。免疫グロブリン(IgA、IgG、IgM)濃度を、ブタ PBL 上清および血清を用いて ELISA で測定した。増殖速度は 2 種類のアッセイ法を用いて評価した(BrdU 取込み、および MTT 切断法)。In vitro において、ConA 刺激による増殖は、BrdU 法および MTT 法によりそれぞれ DON 200ng/ml および 309ng/ml で 50% 阻害(IC<sub>50</sub>)を受け、DON に対する DNA 合成の感受性が高いことを示した。PBL の in vitro 増殖 72 時間後の上清の免疫グロブリン濃度は、DON 濃度上昇に伴って有意に低下し、IgA、IgM、IgG の IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ DON 120.6ng/ml、84.1ng/ml、71.7ng/ml となった。

In vivo においてリンパ球増殖の有意な阻害が認められたのは、MTT 法を用いた DON 急性曝露群のみであったが、阻害値は BrdU 法および DON 慢性曝露後とも低下傾向を示した。培養リンパ球上清中の免疫グロブリン(IgA、IgM、IgG)については、DON 飼料曝露後有意な影響を受けなかった。ブタ血清 IgA については群間に有意差を認めなかったが、IgM および IgG については DON 急性曝露群において有意な上昇を示した。

## 自然汚染コムギからブタへの Fusarium 毒素(デオキシニバレノール およびゼアラレノン)のキャリーオーバー

Fusarium 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(ZON)による頻繁な穀物汚染は、動物およびヒトの栄養における重大な問題である。しかし、Fusarium 毒素に曝露した動物組織を摂取することによる本毒素へのヒト曝露(キャリーオーバー)に関するデータは断片的である。よって、ブタ(雌および去勢雄)肥育試験により、DON、ZON、およびその代謝産物の残留物について、組織および体液の測定を行った。ブタを対照群( $n=6$ 、食餌中 DON 0.24mg/kg および ZON 0.009mg/kg)、または Fusarium 毒素汚染飼料群( $n=12$ 、食餌中 DON 6.68mg/kg および ZON 0.056mg/kg)に割り付け、12 週間 ad libitum または制限給餌させた。屠殺後(生体重  $96.3 \pm 11.6\text{kg}$ )、DON 濃度およびその代謝産物である脱エポキシ DON を、血清、胆汁、肝臓、腎臓、最長筋、背脂肪において測定し、一方 ZON およびその代謝産物である  $\alpha$ -および  $\beta$ -ゼアラレノール( $\alpha$ -/ $\beta$ -ZOL)を、血清、胆汁、肝臓において測定した。キャリーオーバー因子である DON+脱エポキシ DON の平均値は、組織/体液における両物質の濃度を飼料中の DON 濃度で除した数値と定義し、すべてのブタについて胆汁( $0.1046 \pm 0.0653$ ) > 腎臓( $0.0151 \pm 0.0070$ ) > 肝臓( $0.0057 \pm 0.0043$ ) > 血清( $0.0023 \pm 0.0018$ ) > 筋肉( $0.0016 \pm 0.0016$ ) > 背脂肪( $0.0002 \pm 0.0004$ )の順に低下した。Fusarium 毒素に曝露した制限給与によるブタ試料を解析したところ、給餌終了と屠殺との時間間隔は、DON+脱エポキシ DON 濃度に一貫した影響を認めなかった。ZON およびその代謝産物については、ブタ血清への移行を認めなかつたが、ZON+ $\alpha$ -ZOL+ $\beta$ -ZOL キャリーオーバー因子の平均値は、肝臓および胆汁において各々  $0.0094 \pm 0.0123$ 、および  $4.0 \pm 2.2$  であった。したがって、血清は DON 曝露の指標として信頼できるが、ZON 曝露を推定するパラメータとしては不適切であり、ZON の場合、ZON+ $\alpha$ -ZOL+ $\beta$ -ZOL の胆汁濃度によってより良く表現されると結論できる。しかし、Fusarium 毒素に曝露した動物の食用組織の摂取によるヒト曝露リスクは、穀類由来食品を直接摂取した場合に比べると軽微である。

ブタに自然汚染コムギ由来の Fusarium トキシンデオキシニバレノールを亜慢性または 1 回単回投与した場合に末梢血リンパ球の *in vivo* 蛋白質合成および血漿蛋白質に及ぼす影響

デオキシニバレノール (DON) などのトリコテセン類は、真核生物のリボソームの 60S サブユニットに結合することにより *in vitro* での蛋白質合成を阻害することが知られている。したがって、リンパ球や肝臓（アルブミンおよびフィブリノゲン合成）などの蛋白質ターンオーバーが盛んな細胞や組織は、DON に対し最も敏感に反応することが示唆される。しかし、著者が知る限り、この知見は、DON に対する感受性が最も高い家畜と考えられているブタにおいて *in vivo* で立証されたことはない。

合計 31 頭の German Landrace x Pietrain の交配種の去勢雄豚（体重約 40 kg）に、DON 汚染飼料 (5.7 mg/kg) を、急性（1 回の単回投与）または亜慢性（4 週間以上）に、もしくは対照飼料 (0.1 mg/kg) を与えた。さらに、ひとつの群に 53  $\mu$ g DON/kg LW を静脈内注射した。飼料を与えた 1 時間後に、安定同位体 L-[ $^2$ H]<sub>5</sub>-フェニルアラニン (125 mg/kg LW) を「大量投与」し、60 分間に亘って頻回に採血した（留置カテーテル）。血漿中の遊離および蛋白質結合したフェニルアラニンのモル過剰率 (MPE) を GC/MS により測定した。

血漿中の総蛋白質、アルブミン、フィブリノゲン濃度および血清中酵素に、群間差はみられなかった。一方、亜慢性もしくは 1 回単回経口および静脈内 DON 曝露後、アルブミンの分画合成率 (FSR %/日) は、有意にそれぞれ 43%、45% および 26% 減少し、リンパ球の FSR は 27%、19% および 24% 減少したのに対し、フィブリノゲンは有意な影響を受けなかった。さらに、アルブミンの絶対合成率 (ASR, g/日) およびアルブミン：全身蛋白質合成の割合は同様に減少したのに対し、アルブミン分泌時間は 6.8～34.4 分であり、投与の影響を受けなかった。結論として、大量投与法は、DON に関連した蛋白質合成への影響を区別するのに適していると思われるのに対し、血漿中蛋白質濃度の測定は適切なパラメータではないと思われる。

二本鎖 RNA 活性化蛋白質キナーゼは単球においてデオキシニバレノール、志賀毒素 1 型およびリシンによるインターロイキン-8 の発現誘導を仲介する

トリコテセン系マイコトキシンのデオキシニバレノール (DON) やリボソーム阻害蛋白質 (RIP) などの翻訳阻害因子は、マイトジエン活性化蛋白質キナーゼ (MAPK) に誘導されたケモカインやサイトカインの産生を、リボトキシンストレス応答 (RSR) として知られる機序により誘導する。二本鎖 RNA 活性化蛋白質キナーゼ (PKR) はリボソームと結合して、一意的に 28S リボソーム RNA 損傷を感じるよう配置し、RSR を開始する。著者等は以前、PKR がマクロファージおよび単球において、DON 誘発性 MAPK リン酸化を仲介することを立証した。本試験の目的は、単球において DON および 2 つの典型的 RIP であるリシンと志賀毒素 1 型 (Stx1) によるインターロイキン (IL)-8 の発現誘導には PKR が必須であるという仮説を検討することであった。ヒト単球性 U937 細胞を PKR 阻害剤 C16 および 2-アミノプリン (2-AP) とともに前培養すると、DON 誘発性の IL-8 蛋白質および mRNA の発現が阻害された。IL-8 発現の誘導は、ドミナントネガティブ型 PKR プラスミド (UK9M) で安定トランスフェクトされた U937 細胞において、対照プラスミド (UK9C) でトランスフェクトされた細胞と比較して同様に損なわれた。NF- $\kappa$ B 結合 (以前に DON 誘発性 IL-8 転写に必要であることが示されている) は、UK9C 細胞と比較して、UK9M 細胞で著しく減少していた。DON で観察されたのと同様に、リシン誘発性および Stx1 誘発性の IL-8 発現は、PKR 阻害剤 C16 および 2-AP により抑制され、また UK9M 細胞において損なわれた。まとめると、これらデータは PKR が DON および 2 つの RIP による IL-8 誘導において、共通の役割を果たしていることを示し、このキナーゼは RSR において重要な因子である可能性が示唆される。

## ヒト単球におけるデオキシニバレノール誘発性IL-8発現の転写制御

トリコテセン系マイコトキシンのデオキシニバレノール (DON) (汚染された穀類に世界中で多くみられる) は、ヒト単球において、ケモカインであるインターロイキン (IL)-8 発現を誘導する。本試験の目的は、DON は U937 ヒト単球モデルにおいて IL-8 発現の転写制御および転写後制御を修飾するとの仮説を検討することであった。U937 細胞に野生型 IL-8 プロモータールシフェラーゼ構築物 (-162/+44 IL-8 LUC) をトランスフェクトし、DON (1 μg/ml) または陽性対照であるリポ多糖 (LPS) (1 μg/ml) とインキュベートしたとき、ルシフェラーゼ発現に有意な増加がみられた。核因子-κB (NF-κB) 結合部位の変異により、DON 誘発性および LPS 誘発性のルシフェラーゼ発現は共に有意に損なわれた。これとは対照的に、活性化蛋白-1 結合部位の変異により、DON 誘発性および LPS 誘発性のルシフェラーゼ発現は有意に増加した。CCAAT／エンハンサー結合蛋白質β、octamer-1 または NF-κB 抑制因子結合部位の変異は、DON 誘発性ルシフェラーゼ活性に影響を及ぼさなかった。レポーター試験と一致して、NF-κB 阻害物質カフェイン酸フェネチルエステルは、DON 誘発性 IL-8 mRNA および蛋白質発現を完全に消失させた。NF-κB サブユニットの特異的 IL-8 プロモータープローブへの結合を酵素結合免疫測定法 (ELISA) により評価したとき、DON は p65 結合を 21 倍増加させ、p50 結合への影響はなく、p52 結合を減少させることが観察された。DON が U937 細胞において IL-8 mRNA を安定化させることは認められなかった。まとめると、これらのデータより、DON 誘発性 IL-8 発現は転写レベルで、NF-κB、特に p65 により仲介される可能性があることが示唆されるが、mRNA の安定化には関与していないようと思われる。

## Fusarium 毒素が離乳ブタの成長、体液性免疫応答、および内臓に及ぼす影響、ならびに解毒剤としてのリンゴ圧搾粕の有効性

離乳ブタ 220 頭を用いて 2 シリーズの実験からなる飼養試験を実施し、Fusarium 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(ZON)による汚染飼料の影響、ならびにリンゴ圧搾粕がこれらのマイコトキシン類の解毒剤として作用するとの仮説について検討した。2 種類(リンゴ圧搾粕非含有または 8% 含有)の非汚染コムギ配合飼料、および 2 種類(リンゴ圧搾粕非含有または 8% 含有)の自然汚染コムギ配合飼料(シリーズ 1 は DON 3.2mg/kg および ZON 0.06mg/kg、シリーズ 2 は、DON 2.1mg/kg および ZON 0.25mg/kg)を用いて 5 週間 ad libitum 摂取させた。マイコトキシン曝露により、飼料摂取量の減少( $P<0.01$ )、成長低下( $P=0.05$ )、およびエネルギー変換率の低下傾向( $P=0.06$ )が認められた。リンゴ圧搾粕の摂取により飼料摂取量は増加しなかったが、主にマイコトキシン存在下で成長を回復することにより(マイコトキシンとリンゴ圧搾粕の相互作用に対し  $P=0.08$ )、成長率は上昇した( $P=0.04$ )。シリーズ 1 の実験では、供試動物はパルボウイルスワクチンにより免疫化された。セロコンバージョンした動物の比率は、処置による差がみられなかったことから( $P=0.56$ )、DON は体液性免疫応答に影響しないことを示す。シリーズ 2 の実験では、リンゴ圧搾粕添加の有無に関わりなく、汚染飼料を給餌した雌仔ブタは、非汚染飼料を給餌した仔ブタよりも子宮重量が増加した( $P<0.01$ )。本結果から、リンゴ圧搾粕は、成長については DON による負の影響を軽減しうるが、ZON によるホルモンへの影響については阻止しないことが示された。

## DONに重点を置いたトリコテセン類に関するワークショップ:要約

### 報告

トリコテセン類に属する多数のマイコトキシンは、穀類中に一般に検出される種々の *Fusarium* 真菌によって產生される。気象条件が悪いと、場合によつては小麦などの作物における *Fusarium* 感染が増加し、それに対応してトリコテセン含有量も増加する。そのため、ILSI 欧州天然毒素専門委員会はデオキシニバレノール (DON) に特に重点を置いたトリコテセンに関するワークショップを結成した。多数の専門家が現時点におけるトリコテセンの知見について以下の観点から検討した：発生（カビの成長、毒素形成、蓄積、処理の影響の各側面を含む）；予防；分析方法（サンプリングを含む）；調査および曝露評価；毒性学およびリスク評価。以下の項目について多数の勧告が行われた：予防、サンプリング方法/解析方法、曝露評価、毒性学。知識の格差も同定された。

## 培養中の子宮内膜間質細胞における DDE 誘導性アロマターゼ活性変化

環境毒物は、乳癌及び子宮内膜症など複数のエストロゲン依存性疾患で重要な役割を果たすと考えられている。毒物誘導により上昇するアロマターゼ活性すなわち、アンドロゲンからエストロゲンへの転換における最終的な律速段階を触媒する酵素複合体が、胎盤ミクロソーム及び癌細胞を用いた *in vitro* アッセイで報告されている。上記データにより、環境毒物がアロマターゼ活性を高め、局所組織のエストロゲン値を増加させる可能性があり、標的組織におけるエストロゲン依存性機能との関連性が示唆される。そこで本試験では、ヒトの脂肪組織、血清及び卵胞液から広く検出される毒物で DDT の安定した分解産物である 2,2'-ビス (p-クロロフェニル)エチレン (*p,p'*-DDE) の、エストロゲン感受性標的組織である子宮内膜でのアロマターゼ活性に対する影響を定量することとした。特にアロマターゼ活性に対する *p,p'*-DDE 対数濃度上昇の影響を子宮内膜間質細胞(ESC)の培養で検討した。*p,p'*-DDE 処理群では ESC のアロマターゼ活性が対照群に比し有意に増大した (135%)。さらに、*p,p'*-DDE 添加の ESC 細胞は、アロマターゼに対する免疫陽性を示したのに対し、対照培養ではアロマターゼ染色陽性を認めなかった。本試験データから、*p,p'*-DDE 添加により培養 ESC のアロマターゼ活性が上昇する可能性があることが実証された。

## 中国の食道癌及び胃噴門癌の高リスク地域由来の食物中の主要 Fusarium 毒素ニバレノールはマウスにおいて良性及び悪性腫瘍を 誘発する

これは中国の食道癌及び胃噴門癌高リスク地域由来の食物中に高濃度で自然に存在する Fusarium 毒素ニバレノール(NIV)により、マウスの良性及び悪性腫瘍が誘発することの最初の報告である。中国で食道癌及び胃噴門癌による死亡率が高い 2 地域 (132/100,000) すなわち、河南省 Linxian 及び河北省 Cixiang の家族から採取した食用小麦粉、大麦及びトウモロコシの合計 97 サンプルを対象に、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて、2 種の Fusarium 毒素(ニバレノール(NIV)及びデオキシニバレノール(DON)) の濃度を測定した。3 種の食物中の NIV 及び DON 平均濃度は各々、 $830 \pm 927 \mu\text{g/kg}$  ( $584 \sim 1,780 \mu\text{g/kg}$ ) 及び  $4,281 \pm 6,114 \mu\text{g/kg}$  ( $732 \sim 10,980 \mu\text{g/kg}$ ) であった。NIV の最高平均濃度は、Linxian の大麦に認めた  $1,780 \pm 1,705 \mu\text{g/kg}$ 、DON の最高平均濃度は、Cixiang のトウモロコシに認めた  $10,980 \pm 10,139 \mu\text{g/kg}$  であった。NIV は米国由来のコメの 2 サンプルからは検出されなかった。この高リスク 2 地域の 3 種主要食物中の NIV 平均濃度は米国の平均濃度の 400~800 倍と推定され、米国では NIV は食物中に検出されず、米国白人の食道癌による死亡率は 5/100,000 未満であった (オッズ比は 17~34 と推定、 $p < 0.000005$ )。これらのデータにより、高濃度 NIV 含有の食事をとる Linxian 及び Cixiang の農民は、全く NIV を含有しないか又は少量のみ含有する食物を摂取する米国住民に比べ、食道癌発症リスクが有意に高かった。NIV を 12·テトラデコノイル·ホルボール·13·アセタート(TPA)と交互に、間歇的に皮膚塗布した Balb/C マウスを用いて、3 件の反復試験を行った。試験の 11~60 週生存マウス合計 49 匹中 23 匹 (47%) が乳頭腫及び癌腫を発症した。この腫瘍全例中、癌腫 4 例をマウス 3 匹中に認めた。TPA 又はアセトン (溶媒) のみ皮膚塗布した対照マウス 60 匹には全く腫瘍を認めなかった。

## NIH マウスにおけるステリグマトシスチン及びデオキシニバレノールの発癌効果

目的：NIH マウスにおけるステリグマトシスチン(ST)の発癌性及びデオキシニバレノール(DON)の相乗的発癌効果の可能性をさらに検討する。方法：NIH マウスを各 30 匹からなる 6 群に無作為割付した。マウス 5 群に各々、胃挿管法で ST $3 \mu\text{g/kg}$ 、ST $30 \mu\text{g/kg}$ 、ST $3 \mu\text{g/kg} + \text{DON } 1.5 \mu\text{g/kg}$ 、ST $30 \mu\text{g/kg} + \text{DON } 1.5 \mu\text{g/kg}$  及び DON $1.5 \mu\text{g/kg}$  を週 3 回 24 週投与した。残りの 1 群は対照とし、通常の生理食塩水を与えた。全マウスに対し、HPLC で確認したマイコトキシン非含有の食餌を与え分析した。第 58 週及び 74 週にマウスを屠殺し、病理学的検査を行った。結果：マウス対照群に病理学的变化は認められなかった。ST $3 \mu\text{g/kg}$ 、ST $30 \mu\text{g/kg}$ 、ST $3 \mu\text{g/kg} + \text{DON } 1.5 \mu\text{g/kg}$ 、ST $30 \mu\text{g/kg} + \text{DON } 1.5 \mu\text{g/kg}$  及び DON $1.5 \mu\text{g/kg}$  群の各々、25.0%、41.7%、62.5%、69.2% 及び 37.5% に肺腺癌を認めた。さらに上記投与群の各々、50.0%、58.3%、37.5%、53.8% 及び 25.0% に腺胃異形成を認めた。結論：ST 又は DON の NIH マウスに対する経口投与により、肺腺癌及び腺胃異形成を誘発する可能性がある。ST 及び DON を併用すると、相乗的発癌効果が生じる。

## トリコテセンがヒト樹状細胞に及ぼす *in vitro* 影響

本研究の目的は、*in vitro*においてトリコテセンがヒト樹状細胞に及ぼす影響について検討することである。トリコテセンは *Fusarium* 属、*Myrothecium* 属、*Stachybotrys* 属等の真菌類が產生するマイコトキシンである。本論文では以下の 2 点について検討した： IC 50(阻害濃度)測定による未熟樹状細胞に関するトリコテセンの細胞毒性、および樹状細胞成熟過程に及ぼすトリコテセンの影響。免疫毒性物質として知られる 2 種類のマイコトキシン(T-2 および DON)について、単球由来樹状細胞培養モデルを用いて検討した。T-2 毒素および DON が未熟樹状細胞に及ぼす細胞毒性作用から、DON は T-2 毒素ほど強力ではないことを示した。LPS または TNF- $\alpha$  添加に伴う樹状細胞成熟時におけるトリコテセン曝露は、CD-86、HLA-DR、CCR7 等の成熟マーカーのアップレギュレーションを顕著に阻害した。IL-10 および IL-12 の分泌ならびにエンドサイトーシス等の LPS または TNF- $\alpha$  仲介性の樹状細胞成熟特性も、トリコテセン投与に応じて障害された。これらの結果から、トリコテセンは樹状細胞および樹状細胞成熟過程において悪影響をもたらすことが示唆される。

デオキシニバレノール(DON)はヒトの結腸細胞株、肺細胞株及び単球細胞株に毒性であるが、アレルギーマウスモデルの IgE 応答を増加させない

本試験では *Fusarium* 種の一般的な農作物マイコトキシンであるデオキシニバレノール(DON)がヒトの結腸細胞株(Caco-2)、肺細胞株(A549)及び単球細胞株(U937)に毒性を示すか否かを検討した。さらに、DON は Th2 サイトカイン及び総 IgE 値上昇を誘発するとの報告があり、又著者等はマウスでカビ抽出物によるアレルギー発症を認めたため、DON のアレルギーに及ぼすアジュバント作用の可能性をマウスモデルにより検討した。上記細胞のいずれも 24 時間 DON 曝露により細胞の蛋白質合成、増殖及び生存率の用量依存的低下を認めた。さらに U937 細胞株では、DON の最高毒性値より僅かに低い値で、IL-8 産生が 8 倍まで増大したことから、単核食細胞における細胞毒性の新たな指標として IL-8 が使用可能であることが示された。しかしアレルギーマウスモデルでは、アレルゲン特異的 IgE 又は IgG1 値の DON による増大はみられなかった。この結果、DON の吸入又は経口摂取のいずれも、ヒトの肺胞マクロファージ及び、肺及び結腸内の上皮細胞に対する毒性を生じる可能性があるが、アレルゲンに対するアレルギー応答を増大させないことが示された。

p38 マイトジェン活性化蛋白質キナーゼは、ヒト単球においてリボトキシンであるデオキシニバレノールによる IL-8 誘発を仲介する

クローン化されたヒト単球及び末梢血単核細胞(PBMC)において、マイトジェン活性化蛋白質キナーゼ(MARK)仲介 IL-8 発現に及ぼすリボトキシンであるトリコテセンのデオキシニバレノール(DON)の影響を検討した。DON (250~1000ng/ml)は濃度依存的に、ヒト U937 単核細胞株中の IL-8 mRNA 及び、IL-8 転写指標である IL-8 異核 RNA(hnRNA)の双方を誘発した。IL-8 hnRNA、mRNA 及び蛋白質の発現は p38 リン酸化との相関性を示し、p38 MAPK 阻害剤 SB203580 により完全に破棄された。同様に健康ボランティアから得た PBMC 培養で、500ng/ml の DON により p38 依存性 IL-8 蛋白質および mRNA 発現が誘導された。DON (500ng/ml)投与の PBMC では、やはり一部 p-38 依存的な、IL-6 及び IL-1 $\beta$  の細胞内蛋白質および mRNA 発現の有意な増加も認めた。PBMC のフローサイトメトリーを実施したところ、毒素濃度(25~100ng/ml)の閾値及びリン酸化 p38 $^+$ 細胞の割合の相対的増加と関連し、個体間で DON 誘導の p38 リン酸化に変動があった。DON 誘導の p38 活性化は CD14 $^+$ 単球集団のみに生じた。DON はヒトの Toll 様受容体 2,3,4,5,7,8 及び 9 に対するアゴニスト活性をもたなかつた。しかし、その他の 2 種のリボトキシン、エメチン及びアニソマイシンは、DON と同様 PMBC において p38 リン酸化を誘導した。以上から、これらのデータから、(1)単球における IL-8 と向炎症遺伝子発現の誘導には p38 活性化が必要であること、(2)DON はヒト単球内のリボトキシンによるストレス応答経由で p38 活性化を誘発することが示された。

リポ多糖およびボミトキシン(デオキシニバレノール)同時曝露後の  
マウスリンパ球集団におけるグルココルチコイド依存性 *in vivo*  
アポトーシスの差異的誘導

マウスリンパ組織においては、リポ多糖(LPS)およびボミトキシン(VT)の相乗作用により、グルココルチコイドによるアポトーシス性細胞死が誘導される。グルココルチコイドの既知の作用に基づき、LPS および VT の複合曝露により未熟リンパ球集団が標的になるとの仮説を立てた。本仮説を検討するため、著者等は、VT および LPS が胸腺の T リンパ球サブセット、ならびにパイエル板および骨髄の B リンパ球サブセットのアポトーシス誘導に及ぼす影響を定量化した。フローサイトメトリを用いたところ、LPS(0.1mg/kg 体重、腹腔内投与) および VT(12.5mg/kg 体重、経口投与)の同時単回投与から 12 時間後、未熟胸腺細胞(CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>)および成熟胸腺細胞(CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>)のアポトーシスが促進し、24 時間後にはこれら集団がさらに減少することが認められた。グルココルチコイド受容体拮抗剤である RU 486 は、CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>、および CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>サブセットのアポトーシスを有意に阻害し、細胞数の損失も抑制した。毒素の同時曝露から 12 時間後、パイエル板では成熟 B リンパ球(B220<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>)のアポトーシスがみられ、骨髄ではプロ/プレ B リンパ球(B220<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>)および成熟 B リンパ球(B220<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>)のアポトーシスが認められた。RU 486 は、12 時間後のパイエル板および骨髄における前述のサブセットについて、LPS+VT 誘導性アポトーシスを阻害した。これらを総合すると、上記データからマウスにおいて LPS は VT と相互作用して、マウス胸腺の未熟胸腺細胞および細胞傷害性 T リンパ球、パイエル板の成熟 B リンパ球、ならびに骨髄のプロ/プレ B リンパ球および成熟 B リンパ球に対し、グルココルチコイド誘導性アポトーシスによる損失をもたらすことが示唆される。