

トリコテセン誘導性のリンパ球アポトーシスに対するエンドトキシン増強作用はグルココルチコイドのアップレギュレーションにより仲介される

細菌性エンドトキシン(リポ多糖、LPS)に曝露することはきわめて多く、ヒトの場合、化学物質による組織損傷に対する感受性が増大することがある。本試験では、食物由来の一般的なトリコテセン系カビ毒であるボミトキシン(VT)に曝露した B6C3F1 マウスを対象に、LPS がリンパ組織枯渴を増強する機序について同定することを目的とした。DNA 断片化およびフローサイトメトリによる解析結果が示すように、胸腺、パイエル板、骨髄のアポトーシスは、Escherichia coli の LPS(0.1mg/kg 体重、腹腔内投与)と VT(12.5mg/kg 体重、経口投与)を同時投与してから 12 時間後顕著に認められたのに対し、対照マウスまたは一方の毒素のみによる処置マウスのアポトーシスは軽微であった。LPS および VT 同時処置後の腫瘍壞死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )およびインターロイキン(IL)-6 の血清濃度上昇結果に基づき、これらのサイトカインがアポトーシス増強作用に及ぼす役割を評価した。TNF- $\alpha$  発現阻害剤であるロリプラムを注射した場合、または IL-6 ノックアウトマウスを用いた場合、毒素の同時処置による胸腺アポトーシス誘導の阻害に有効性を示さなかったことから、これらのサイトカインが LPS の増強作用を仲介しなかったことを示唆する。毒素を同時処置すると、脾臓のシクロオキシゲナーゼ-2 の mRNA 発現が上昇したことから、プロスタグランジン類のアポトーシスへの関与の可能性が示唆された。しかし、シクロオキシゲナーゼの広域阻害剤であるインドメタシンは、胸腺のアポトーシスを阻止できなかった。毒素の同時処置により血清コルチコステロン濃度の上昇が認められ、さらにグルココルチコイド受容体拮抗剤である RU 486 を用いたところ、LPS+VT 曝露後の胸腺、パイエル板、骨髄のアポトーシスが有意に阻害された。上記結果、および既知のグルココルチコイドのアポトーシス誘導能から、視床下部・下垂体・副腎軸は、トリコテセン誘導性のリンパ球アポトーシスに対する LPS 増強作用に重要な役割を果たすことが認められる。

## LPS プライミングはマウスのトリコテセン系毒素デオキシニバレノールに対する炎症性サイトカイン応答を強化・延長する

マウスにおけるトリコテセン系デオキシニバレノール(DON)による炎症性サイトカイン発現の誘導及び IL-1 駆動リンパ球アポトーシスは、リポ多糖(LPS)への同時曝露により顕著に強化される。本研究の目的は、LPS プライミングが宿主の DON 誘導の炎症性サイトカイン発現とアポトーシスを刺激するという仮説を検討することであった。LPS によるプライミング (1mg/kg 体重、腹腔内投与) の 8 時間後に経口 DON 投与したマウスでは、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 及び TNF- $\alpha$  血清蛋白質並びに脾臓 mRNA を誘発する DON 最小用量は、賦形剤でプライミングしたマウスが要する DON 用量より有意に低かった。さらに LPS プライミングにより、サイトカイン応答の開始時間が減少し、強度と期間が劇的に増加した。LPS プライミングを受けたマウスは、24 時間まで DON に対する高感受性を維持した。50  $\mu$ g/kg 体重の低用量 LPS プライミングでも感作が生じた。DNA 断片化解析及びフローサイメトリーにより、8 時間の LPS プライミング(1mg/kg)及び DON 曝露(12.5mg/kg)を受けたマウスは、DON 又は LPS の単独曝露マウスより、アポトーシスによる大量の胸腺細胞消失が生じるのが 12 時間遅かった。LPS プライミングにより、DON 誘導 p38 及び ERK1/2 リン酸化が減少することから、マイトジエン活性化蛋白質キナーゼの活性化亢進は、サイトカイン応答增加に関与しないことが示された。総合すると、マウスは LPS への曝露により、DON のサイトカイン発現誘導の影響を非常に受けやすくなり、これは胸腺におけるアポトーシス増大に相関することが示された。

マウスにおけるデオキシニバレノール誘導性のコルチコステロン応  
答および白血球アポトーシスのエンドトキシン増強作用における  
IL-1 $\beta$  の役割

エンドトキシン(リポ多糖、LPS)およびトリコテセンは、食物および環境に頻繁に認められる細菌毒素である。LPS およびトリコテセン系のデオキシニバレノール(DON、ボミトキシン)を同時曝露すると、マウスは胸腺、パイエル板、骨髓にコルチコステロン依存性のアポトーシスを誘導する。本試験では、インターロイキン-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )が、本モデルにおけるコルチコステロン誘導、およびその後生じる白血球アポトーシスに中心的な役割を果たすとの仮説について検討することを目的とした。LPS(0.1mg/kg、腹腔内投与)+DON(12.5mg/kg、経口投与)を同時曝露した場合、B6C3F1 マウスでは、賦形剤対照群または一方の毒素のみによる処置群に比べ、脾臓の IL-1 $\beta$  mRNA および IL-1 $\beta$  蛋白質の発現に有意なアップレギュレーションが認められた。IL-1 受容体 1 が機能的に欠損した B6.129S7-IL1r1<sup>tm1Imx</sup> マウスは、対応する野生型(WT)C57BL/6J マウスの場合よりも、LPS+DON の同時曝露によるコルチコステロン産生が有意に低下した。これらの知見と一致して、IL-1 受容体 1 欠損マウスは、DNA 断片化アッセイおよびフローサイトメトリの評価により測定したところ、白血球のアポトーシス誘導に抵抗性を示した。さらに、B6C3F1 マウスに IL-1 受容体拮抗剤(100  $\mu$ g/マウス、3 時間間隔 2 回)を腹腔内注射したところ、LPS+DON 誘導性の血漿コルチコステロン濃度の上昇、ならびに胸腺、パイエル板、骨髓におけるアポトーシスの増加が有意に阻害された。IL-1 $\beta$  のアポトーシス誘導能を確認するため、B6C3F1 マウスに本サイトカイン(500ng/マウス、腹腔内投与)を 2 時間間隔で 3 回注射投与し、次にコルチコステロン濃度およびアポトーシスをモニタした。12 時間後、IL-1 $\beta$  注射投与マウスは、対照マウスよりも有意に血漿コルチコステロン濃度が上昇し、胸腺およびパイエル板のアポトーシスも有意に増加した。LPS+DON 処置 B6C3F1 マウスの血漿副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)濃度は、血漿コルチコステロン誘導および白血球アポトーシス誘導と相関性を示さなかった。これらを総合すると、上記の結果から、IL-1 $\beta$  は LPS+DON 誘導性のコルチコステロン産生とその後生じる白血球のアポトーシスについての重要な仲介因子であり、さらに本サイトカインは ACTH 非依存性機構を通じて作用する可能性があることを示す。

## 細胞培養において代謝活性、膜完全性、およびリソゾーム活性を同時測定するバイオアッセイ

本試験では、生物活性の可能性を有する化合物または化学混合物のスクリーニングに向け、一般的な細胞毒性に対し複数のエンドポイントを併用する *in vitro* バイオアッセイ法の開発を目的とした。代謝活性の評価にはアラマーブルーアッセイ法、膜機能およびリソゾーム活性の評価にはニュートラルレッドアッセイ法、膜完全性の評価には乳酸デヒドロゲナーゼ漏出アッセイ法を用いた。ヒト線維芽細胞株(MRC-5)を用いて、各アッセイ法を個別の場合と併用の場合とで実施した。異なる細胞標的に影響を及ぼす異なる化学物質である、3種類の真菌性二次代謝産物(デオキシニバレノール、エンニアチンB1、2-アミノ-14,16-ジメチルオクタデカン-3-オル)をモデル化合物として検討した。個別の場合と併用の場合とで実施したアッセイ法から得られた化合物の阻害濃度には有意差を認めなかった( $P<0.05$ 、 $n=9$ )。単一のアッセイ法において複数の細胞毒性のエンドポイントを併用すると、1エンドポイントが不調でも、天然の化学混合物(例: 真菌培養物または植物由来抽出物)のスクリーニング中に生物活性/細胞毒性の可能性を有する化合物発見の機会が増大し、同時に細胞標的についてある程度の基本情報を与えうる。

## デオキシニバレノール誘導性免疫グロブリン A 腎症におけるシクロオキシゲナーゼ-2 の役割

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)摂取により、最もよくみられるヒト糸球体腎炎である IgA 腎症(IgAN)の初期段階に類似する血清 IgA 上昇と腎メサンギウム IgA 沈着が生じる。過去の研究によれば、このモデルではインターロイキン 6 (IL-6)の上昇が不可欠で、DON によるシクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)誘導により、IL-6 がアップレギュレーションされる。著者等は、COX-2 とその代謝物が DON 誘導性 IgAN に不可欠であり、IgA アップレギュレーションの異常を防ぐ上で適切な標的になるとの仮説を立てた。COX-2 ノックアウトマウス又は COX-2 特異的阻害剤であるロフェコキシブ(Vioxx)を用いた DON 摂取試験により、この仮説を検討した。第 1 試験の結果、野生型マウスの DON 摂取により血清 IgA 及び IgA 免疫複合体(IC)蓄積、IgA 腎沈着並びに脾臓 IgA 分泌が生じることが実証された。COX-2 欠損は上記パラメータのアップレギュレーションに影響はなく、むしろ DON 誘導血清 IgA 上昇を促進した。第 2 試験の結果、ロフェコキシブは DON 誘導血清 IgA、血清 IgA-IC 及びメサンギウムでの IgA 沈着を阻害できず、その代わりに血清 IgA のアップレギュレーションが強化された。確証的な結果を総合すると、COX-2 は DON 誘導 IgAN に不可欠ではなく、さらにロフェコキシブなどの COX-2 阻害剤は IgAN の早期段階の予防に禁忌的であることが実証された。

マウスにおいてドコサヘキサエン酸およびエイコサペンタエン酸はデオキシニバレノール誘導性の実験的 IgA 腎症を抑制するが  $\alpha$ -リノレン酸は抑制しない

(n-3)PUFA(ドコサヘキサエン酸[DHA]、エイコサペンタエン酸[EPA]、およびその前駆体である  $\alpha$ -リノレン酸[ALA])に富む飼料が、マイコトキシンのデオキシニバレノール(DON)によりマウスで誘導される IgA 腎症(IgAN)の発症軽減に示す効能について検討した。マウスに次の 1)~4)の成分を含有する AIN-93G 飼料を 18 週間給餌し、DON に対する影響を比較した。1)コーン油 10g/kg+オレイン酸 60g/kg(対照群) ; 2)コーン油 10g/kg+オレイン酸 35g/kg および DHA に富む魚油 25g/kg(DHA 群); 3)コーン油 10g/kg+オレイン酸 33g/kg および EPA に富む魚油 27g/kg(EPA 群) ; 4)コーン油 10g/kg+オレイン酸 37g/kg および DHA+EPA(1:1)に富む魚油 23g/kg(DHA+EPA 群)。DHA 群、EPA 群、DHA+EPA 群の飼料では、飼料中の DON(10mg/kg)による血清 IgA および IgA 免疫複合体、腎臓メサンギウムへの IgA 沈着、および脾臓細胞による IgA の ex vivo 分泌の誘導が減弱した。DHA+EPA 群の飼料では、飼料摂取から 8 週間後、脾臓およびパigel 板における DON 誘導性のインターロイキン(IL)-6(DON 誘導性 IgA 腎症に不可欠なサイトカイン)の遺伝子発現が有意に抑制された。最後に AIN-93G 飼料中に ALA 含有アマニ油を 60g/kg を限度に混合したところ、マウスの DON 誘導性の IgA 調節障害には影響を及ぼさなかった。これらを総合すると、DHA および EPA の両者は初期段階の IgAN を軽減するが、ALA は軽減せず、これらの作用は IL-6 の産生能低下に関連すると考えられる。

マウスにおいてドコサヘキサエン酸はマイコトキシン誘導性の免疫グロブリンA腎症、インターロイキン-6転写、およびマイトジエン活性化蛋白質キナーゼリン酸化を減弱する

本研究は、ドコサヘキサエン酸(DHA)がマウスにおいてデオキシニバレノール(DON)誘導性の IgA 腎症に及ぼす用量依存的効果、ならびに DHA と向炎症性遺伝子発現およびマイトジエン活性化蛋白質キナーゼ(MAPK)活性化との関連性について検討することを目的とした。DHA 1g/kg、5g/kg、30g/kg を含有する修正 AIN-93G 飼料を摂取させたところ、対照飼料に比べ、用量依存的な肝臓リン脂質中の DHA の増加とともにアラキドン酸の減少をもたらした。DON 給餌マウスにおいて、DHA は血清 IgA および IgA 免疫複合体(IC)の上昇、ならびに腎臓における IgA 沈着を用量依存的に阻害した。DHA 30g/kg 飼料は最も早期に効果が検知され、かつ最大の効能を示した。脾臓において、インターロイキン-6(IL-6)転写指標である IL-6 mRNA およびヘテロ核 RNA(hnRNA)の両者は、DHA 5g/kg、30g/kg 摂取 DON 給餌マウスにおいて有意に減少し、シクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)mRNA も同様の減少を示した。引続く研究において、DON 急性曝露(25mg/kg 体重)により、対照飼料給餌マウスでは脾臓の IL-6 mRNA および hnRNA、ならびに COX-2 mRNA を誘導したのに対し、DHA 30g/kg 給餌マウスでは両 RNA 種の誘導も有意に阻害した。後者のこうした阻害効果は、脾臓における p38、細胞外シグナル制御キナーゼ 1/2、c-Jun N 末端キナーゼ 1/2 MAPK の DON 誘導性リン酸化低下に対応していた。これらを総合すると、上記の結果が示すように、DHA は用量依存的に IgA の調節不全および IgA 腎症を阻害し、MAPK 活性化の阻害、ならびに COX-2 および IL-6 の発現阻害は、重要な上流機構である可能性が考えられる。

## ドコサヘキサエン酸の摂取はマウスマクロファージにおけるデオキシニバレノール誘導性のCREB/ATF1活性化およびIL-6遺伝子転写を阻害する

マウスにおいて、マイコトキシンデオキシニバレノール(DON)は IL-6 発現のアップレギュレーションにより IgA 腎症を誘導するが、これは(n-3)PUFA 摂取により抑制される。本試験では、(n-3)PUFA のドコサヘキサエン酸(DHA)がマウスマクロファージの IL-6 mRNA に対し、DON 誘導性の転写および転写後のアップレギュレーションを阻害するとの仮説について検討することを目的とした。AIN-93G 対照飼料を 4 週間給餌したマウスで誘導したマクロファージの場合、DON は IL-6 転写の進行指標である IL-6 mRNA および IL-6 ヘテロ核 RNA(hnRNA)の発現を誘発したが、DHA 30g/kg を含有する修正した AIN-93G 飼料給餌で同一期間飼育したマウス由来のマクロファージの場合、両 RNA 種の発現は抑制された。DON は、対照飼料給餌マウスおよび DHA 飼料給餌マウス由来のマクロファージにおいて同様に IL-6 mRNA の安定性を増強したことから、(n-3)PUFA が効果を示したのは転写後ではないことが示唆された。対照飼料給餌マウスの核抽出物において、DON は、cAMP 応答要素結合蛋白質(CREB)およびアクチベーター蛋白質 1(AP-1)の、各々のコンセンサス配列への結合活性をアップレギュレートしたが、両活性とも DHA 飼料給餌マウスの核抽出物においては抑制された。対照飼料給餌マウスのマクロファージでは、CREB の Ser-133 および ATF1 の Ser-63 のリン酸化、ならびにリン酸化 CREB/ATF1 と IL-6 プロモーターの cis エレメントとの核内結合が DON により誘導されたが、両活性とも DHA 飼料給餌マウスのマクロファージでは阻害された。DHA 摂取により、CREB キナーゼ AKT の DON 誘導性リン酸化が阻害された。AKT の阻害により、CREB/ATF1 リン酸化および IL-6 転写の両者も抑制された。これらのデータから、DHA を摂取すると、AKT 依存性のリン酸化、および以降の CREB/ATF1 の IL-6 プロモーターへの結合を一部阻害することにより、マクロファージにおける DON 誘導性の IL-6 転写を抑制することが示唆される。

## 制御された保存条件下のトウジンビエ中の菌類及びマイコトキシンの変化

トウジンビエは、米国南部でのレクリエーション用野生動物及び養鶏業で付加価値を有する穀物として生産が増大している。著者等は、生産地域で通常用いられる保存条件での穀物のカビ発生を評価する 3 試験を実施した。変数は、生産年度、温度、相対湿度、大気及び穀物水分含量であった。第 1 回試験では、穀物を 20 又は 25°C で 9 週間保存し、相対湿度(r.h.)は 86% 又は 91% を維持した。第 2 回試験では、穀物を空气中(好気性)又は N<sub>2</sub> 中(嫌気性)のいずれかで 20 又は 25°C で 9 週間保存し、100% r.h. を維持した。第 3 回試験では、水分高含量の穀物を 20 又は 25°C で 3 週間保存し、100% r.h. を維持した。菌の発生頻度の変化を検討するため 1 週毎に穀物のサンプリング及びプレーティングを行った。単離された菌類は以下の通りである : *Fusarium chlamydosporum*(穀物の 19%)、*Curvularia* spp.(14%)、*F.semitectum* (16%)、*Alternaria* spp.(9%)、*Aspergillus flavus*(8%)、"Helminthosporium"型菌(6%)及び広義の *F.moniliforme*(3%)。穀物生産年度は、菌類の分離頻度に有意な影響を与えた。水分低含有穀物からの分離頻度は、気温、相対湿度又は大気処理の影響を受けることは稀であったが、一部菌類は保存期間による影響を受けた。水分高含有穀物では、毒素産性菌の分離頻度に変動を認めた。86% 及び 91% r.h. で保存した穀物中で *F.chlamydosporum* の分離頻度が上昇した。水分高含有穀物中で、*A.flavus* の発生頻度が特に 25°C で増加した。デオキシニバレノールの発生頻度は保存条件による影響を受けなかった。100% r.h. でインキュベートした穀物の大半で低濃度のニバレノールが検出された。穀物の水分含量が 20~22% の場合のみ、ゼアラレノンが検出された。全条件で、アフラトキシン汚染は平均 174ng g<sup>-1</sup> で、25°C で保存した水分高含有穀物で 798ng g<sup>-1</sup> まで上昇した。

## Fusarium 毒素汚染ライ小麦の存在又は非存在下における乳牛飼料の濃縮比が雌牛の成長成績に対する影響

本試験では、乳牛の成長成績に及ぼす濃縮比 50%のデオキシニバレノール(DON)汚染飼料の影響を検討し(第1期間)、濃縮比が60%まで上昇した場合の影響を、濃縮比30%飼料と比較検討した(第2期間)。第1期間では、ドイツの泌乳ホルスタイン牛13頭(Myco群、平均29日間の乳)に試験食餌(平均5.3mgDON/kg DM)を混合飼料として11週間以上与え、別の雌牛14頭(平均33日間の乳)には対照食餌を与えた。両飼料とも50%濃縮物(DMベース)を含有した。第2期間(18週間)では、同一の雌牛27頭に5頭を追加し4群に分けた: 対照-30群(30%濃縮比)、Myco-30群(30%濃縮比、4.4mgDON/kg DM)、対照-60群(60%濃縮比)及びMyco-60群(60%濃縮比、4.6mgDON/kg DM)。全体の成長成績は、第1期間の平均1日DM摂取量が17.9kg及び平均1日乳生産量が脂肪修正乳(FCM)で26.7kg、第2期間のDM摂取量が17.3kgでFCMが24.5kgであった。両期間とも、Fusarium 毒素汚染飼料を摂取した雌牛のDM摂取量の方が多い(第2期間では、Myco-30群のみ有意)、Fusarium 自然汚染ライ小麦の体内摂取率への刺激効果により生じた。第1期間では、Fusarium 毒素汚染飼料摂取の雌牛は、乳量、乳中尿素及び体細胞数が有意に高かったが、乳脂肪、蛋白質濃度及び、脂肪/蛋白質比(FPR)は有意に低かった。第2期間では、低濃縮比でMyco-30群のFCMは有意に高かった。高濃縮比で、Myco-60群の乳生産量は有意に高かったが、乳脂肪、蛋白質濃度、FPR及び乳中尿素は有意に低かった。濃縮比60%では、乳脂肪濃度に対する抑制効果がみられたがFusarium 毒素汚染及びFusarium 損傷ライ小麦存在下ではさらに顕著だった。

## Fusarium 毒素汚染ライ小麦含有及び非含有の乳牛飼料の濃縮比により影響される第一胃内発酵パターン及び尿中の酸塩基代謝パラメータ

授乳初期のドイツ・ホルスタイン牛 13 頭に対し 50%濃縮比の混合飼料を平均デオキシニバレノール(DON)濃度 5.3mg/kg DM で与えたところ(Myco 群)、対照群の牛 14 頭に比し、第一胃内発酵パターンの変化(酢酸及びイソ酪酸のモル比が低下、吉草酸のモル比が上昇)を認めた(第 1 期、11 週)。Myco 群では、第 4 週及び 8 週に、第一胃 pH 値の有意な低下を認め、亜急性第一胃アシドーシス発症の重要な因子である最小 pH 値低下を認めた。これに伴い、正味の酸塩基尿中排泄量及び塩基/酸比は低下した(第 8 週のみ有意)。これらの効果は恐らく、乾燥物質摂取が増加したためであり、Fusarium 毒素の存在は関連していないと思われる。第 2 期では、同一の雌ウシ 27 頭に 5 頭を追加し 4 群に分け、18 週以上追跡調査した。濃縮比 60%までの上昇の効果を Fusarium 毒素存在下及び非存在下で検討し(対照-60 群、0.4mgDON/kg DM 及び Myco-60 群、4.6mg DON/kg DM)、30%濃縮比摂取(対照-30 群、0.6mg DON/kg DM 及び Myco-30 群、4.4mg DON/kg DM)の 2 群と比較した。予想通り、高濃縮比は第一胃発酵パターンに有意な影響を及ぼした。正味の酸塩基排泄量及び塩基/酸比は濃縮比の明らかな影響を受けず、食餌制限の 3~5 時間後に第一胃液を採取したところ、第一胃 pH 値は全群で高値を示した(中央値 6.8~7.2)。両濃縮比で Fusarium 毒素存在下、短鎖脂肪酸のプロファイルにさらなる影響が認められた。すなわち、第一胃微生物に関して、マイコトキシンの直接的効果、及び/又は感染穀物の生理化学的特性の Fusarium 感染関連変化の間接的な効果による微生物群の転換が示唆される。

## デオキシニバレノール中毒の診断指標としての血漿中ハプトグロビン及び免疫グロブリン

本試験の目的は、デオキシニバレノール(DON)中毒のバイオメーカーの可能性を検討することである。B6C3F1 雄マウスに対し 0.83, 2.5 及び 7.5mg/kg (体重) DON への経口投与を 8 日間実施し、SELDI・飛行時間/質量分析(TOF/MS)により血漿中蛋白質の発現差を判定し、血清中免疫グロブリン(Ig)G, A, M 及び E を検討した。DON 投与により 11.7kDa 蛋白質が有意に高度発現したため、メチルセラミック HyperD F カラム及び、吸着・脱着用に最適化した緩衝液を用いて、上記蛋白質を精製した。精製蛋白質は、LC/Q-TOF/MS 及び MALDI-TOF/MS を使用したペプチドマッピングによりハプトグロビン前駆体と同定され、この結果をウェスタンプロッティング及び ELISA により確認した。血清中の IgG 及び IgM は用量依存的に低下し、IgA は DON 7.5mg/kg bw 用量で低下したが、IgE 値は変化しなかった。アフラトキシン B1(AFB1)、ゼアラレノン (ZEA) 及び DON の中毒間でハプトグロビン発現及び Ig パターンを比較するため、ラットに対し AFB1 1.0、ZEA 240 及び DON 7.5mg/kg bw を 8 日間 経口投与した。ハプトグロビンは DON 7.5mg/kg bw 投与の場合のみ増加し、ZEA 240mg/kg bw では僅かに低下、AFB1 1.0mg/kg 投与では全く検出されなかった。DON 投与により IgG 及び IgA は低下したが、IgG, IgA, IgM 及び IgE は全て AFB1 により増加した。ZEA 投与後には変化がなかった。これらの結果により、血漿中ハプトログビンは、同時に血清中 Ig を検討する場合、DON 中毒の診断バイオマーカーとなりうる。

## デオキシニバレノール曝露マウスにおける脾臓内遺伝子発現プロファイル：第一標的としての即時早期発現遺伝子

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)への曝露は、*in vitro* 及び *in vivo* とも免疫機能を変化させる。DON の免疫毒性効果の洞察をさらに深めるため、このマイコトキシンへの急性曝露によりマウス脾臓の遺伝子発現プロファイルがどのように変調されるかを判断するマイクロアレイを実施した。B6C3F1 マウスに対し、25mg/kg 体重 DON を経口投与し、2 時間後にマイクロアレイ分析のため脾臓を採取した。局所線形回帰モデルを用いて正規化した後、1176 の遺伝子中 116 の発現が、全投与群の平均発現レベルに比し有意な変化を示した。投与群間の発現プロファイルの比較をしやすくするため、遺伝子をオントロジーツリー内に配置したところ、DON は主に、免疫、炎症及び走化性関連の遺伝子を変調することがわかった。実時間ポリメラーゼ連鎖反応を用い、選択された遺伝子の変調を確認した。DON は、サイトカインであるインターロイキン IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 及び IL-11 を誘導することが明らかになった。同様の様式で DON は、ケモカインであるマクロファージ阻止蛋白質 2(MIP-2)、サイトカイン誘導性化学誘引蛋白質-1(CINC-1)、単球化学誘引蛋白質(MCP)-1, MCP-3 及びサイトカイン応答遺伝子-2(CRG-2)の発現のアップレギュレーションを行なった。c-Fos, Fra-, c-Jun 及び Jun B というアクチベータ蛋白質-1(AP-1)転写因子複合体の成分は、別の転写因子 NR4A1 と同様に DON により誘導された。マイトジエン活性化蛋白質キナーゼホスファターゼ 1(MKP1)、触媒サブユニット  $\beta$  イソフォーム(CnA $\beta$ )、蛋白質チロシンホスファターゼ受容体型 J (Ptprj)及び蛋白質チロシンホスファターゼ非受容体型 8 (Ptpn8)の 4 種のヒドロラーゼは DON によりアップレギュレーションされることが見出され、その一方 3 種のヒドロラーゼすなわち、ミクロソームエポキシドヒドロラーゼ(Eph)1、ヒスチジン三つ組ヌクレオチド結合蛋白質(Hint)及びプロテアソームサブユニット  $\beta$  型 8 (Psmb8)は毒素により有意に低下した。最後に、シグナル関連遺伝子である高システイン蛋白質 61(CRP61)及び熱ショック蛋白質 40 (Hsp40)は増加したが、Jun キナーゼ 2 (JNK2)は低下した。データを総合すると DON は、その多くが DON および他のトリコテセン類について報告された複雑な免疫効果に寄与すると思われる、複数の即時早期遺伝子の発現をアップレギュレートすることが示唆された。

## (n-3)多価不飽和脂肪酸摂取マウスの脾臓におけるデオキシニバレノール誘導性の最初期遺伝子応答の遮断

一般的な食物由来マイコトキシンであるデオキシニバレノール(DON)の急性曝露により、マウスリンパ組織では免疫機能に影響を及ぼすと考えられる多数の最初期遺伝子が誘導されることが、その発現プロファイルから既に明確にされている。本試験は、魚油にみられる(n-3)多価不飽和脂肪酸(PUFA)の摂取により、DON誘導性の最初期遺伝子の発現が阻害されるとの仮説について検討することを目的とした。マウスに1%コーン油(CO)+6%オレイン酸含有AIN-93G飼料(対照群)、または1%CO+(n-3)-PUFAであるドコサヘキサエン酸およびエイコサペンタエン酸濃縮 2%魚油+4%オレイン酸含有飼料のいずれかを給餌した。12週間後マウスにDON 25mg/kgを強制経口投与し、脾臓の最初期遺伝子発現動態を実時間ポリメラーゼ鎖反応(PCR)により8時間にわたり監視した。デオキシニバレノール投与により、サイトカイン(IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-11)、ケモカイン(MCP-1、MCP-3、CINC-1、MIP-2)、転写因子アクチベーター蛋白質1(AP-1)複合体の構成成分(c-Fos、Fra-2、c-Jun、JunB)、および2種類の加水分解酵素(MKP1、CnA $\beta$ )の発現誘導が直ちに認められた。これらの遺伝子発現は一過性であり、2~4時間以内にピークに達した後低下したが、唯一の例外としてIL-11については8時間後も上昇した。(n-3)-PUFAの摂取により、DON誘導性IL-1 $\alpha$ 、IL-6、IL-11、MCP-1、MCP-3、MIP-2、およびFra-2の8時間後の発現は有意に抑制された。これとは対照的に、(n-3)-PUFA給餌マウスは、MKP1およびCnA $\beta$ の有意な発現上昇を示した。これらを総合すると、上記データから、先述した免疫グロブリンA(IgA)産生を含む免疫機能の破壊能をもたらしうるDONに対するサイトカイン、ケモカイン、および転写因子が示す発現応答は、(n-3)-PUFAの飼料添加により早期に遮断されたことを示唆する。これらの遺伝子発現の多くはマイトジェン活性化蛋白質キナーゼ(MAPK)の活性化と結びつくため、(n-3)-PUFA給餌マウスにおいて、MAPKの負の調節因子であるMKP1の発現増強が本抑制作作用に寄与したと考えられる。

## 初代培養におけるヒト近位尿細管細胞及び肺線維芽細胞でのマイコトキシンデオキシニバレノールの細胞毒性、代謝及び細胞内取込

動物全体レベルで、マイコトキシンであるデオキシニバレノール(DON)の毒性効果は、下痢、嘔吐、胃腸炎症から複数組織壊死を引き起こすなどの範囲に亘っている。DONは又、免疫機能にも影響し、腎病巣を形成する。ヒト及び動物の各種細胞株におけるDONの細胞毒性を検討してきたが、これらの試験は細胞株の不都合な状況（例：不死化、腫瘍起源、長期培養）のため限定されたものであり、必ずしも正常細胞の反応を反映するものとはいえない。この問題を解決し、ヒトの状況に近づけるため、初代培養のヒト腎上皮細胞（腎近位尿細管上皮細胞、RPTEC）及びヒト肺線維芽細胞（正常ヒト肺線維芽細胞、NHLF）におけるDONの効果を検討した。細胞生存性、細胞アポトーシス及び壊死、コラーゲンI、III及びIV並びにフィブロネクチン分泌について判定した。DONはヒト初代細胞に対し顕著な細胞毒性効果を有することが実証された。生存率低下は両細胞型にみられ、線維芽細胞は反応の感度がより高かった。さらにDONは、腎細胞で主に壊死を引き起こし、線維芽細胞では主にアポトーシスを引き起こした。DONはRPTEC細胞のコラーゲン分泌には作用を示さなかった。NHLFでコラーゲン分泌は一部低下を示した。両細胞型で曝露の5日後、フィブロネクチン分泌が低下した。又、LC-MS/MSを用いてDONの代謝及び細胞内取込を検討した。DONは近位尿細管細胞と線維芽細胞いずれにおいても代謝されなかった。DONは細胞に取込まれ、腎細胞内DON量は線維芽細胞より高かった。DONの細胞内蓄積は生じなかった。

## マイコトキシンデオキシニバレノールがヒト初代培養肝細胞に及ぼす影響

動物にみられるマイコトキシンデオキシニバレノール(DON)による毒性作用は、下痢、嘔吐、胃腸の炎症から複数組織の壊死まで多岐にわたる。これまでに DON が複数種の動物の肝細胞に及ぼす細胞毒性について検討が行われてきた。しかし、これらの試験で用いた細胞は動物に限定されている。ヒト肝細胞を用いた試験は入手不能である。ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 についてさらに検討するのは、細胞株として不都合(例えば、不死化、腫瘍誘導、長期培養)であるため制限を受けると考えられ、必ずしもヒト正常細胞の応答を反映するとは限らない。本問題を克服し、本来のヒトの状態に近づけるため、著者等は DON がヒト初代培養肝細胞に及ぼす影響を検討し、そのデータを HepG2 細胞株に及ぼす影響と比較した。細胞生存率、アポトーシス性細胞死および壊死性細胞死、アルブミン分泌、ならびに代謝活性について測定した。DON は、ヒト初代培養肝細胞に顕著な細胞毒性作用を有することが示された。細胞生存率、蛋白質含量、およびアルブミン分泌については用量依存的に低減した。アポトーシス誘導性の主要酵素であるカスパーゼ-3 が活性化する一方、長期培養後でのみ二次壊死に起因する LDH 放出が生じた。さらに、我々は LC-MS/MS を用いて DON の代謝について検討した。DON は、ヒト初代培養肝細胞および HepG2 細胞株のいずれによっても代謝されなかった。

## 食物由来 *Fusarium* 属マイコトキシンが乳牛の生産性、代謝、および免疫に及ぼす影響

食物由来 *Fusarium* 属マイコトキシンが乳牛の生産性、代謝、および免疫に及ぼす影響についてはほとんど明らかにされていない。泌乳中期のホルスタイン種ウシ 18 頭(平均乳生産量 33kg/日)を対象に、*Fusarium* 属マイコトキシンの自然汚染を受けた配合飼料を含有する完全混合飼料(TMR)を 56 日間与えた。ウシは完全無作為化法により、1)対照飼料群、2)汚染飼料群、3)汚染飼料+0.2%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)群の 3 処置群に割り付け、繰り返し各種測定を行った。本試験に用いた汚染飼料は、コムギ、トウモロコシ、および牧草とした。主要汚染物質はデオキシニバレノールであり、TMR 内濃度は最大  $3.6 \mu\text{g/g}$  乾燥物だった。体重、体調スコア、乾燥物摂取量、正味エネルギー平衡、乳生産量、乳成分、体細胞数、血清生化学的検査値、血液学的検査値、血清 Ig 濃度、血液凝固特性を測定した。乾燥物摂取量、体重、乳生産量、乳成分、SCC は飼料による影響を受けなかった。42 日後の血清総蛋白値およびグロブリン値は、対照飼料給餌ウシに比べ、汚染 TMR 給餌ウシの方が有意に上昇したが、アルブミン：グロブリン比については低下した。血清尿素値は、対照飼料給餌ウシに比べ、汚染飼料給餌ウシの方が実験期間全体を通じて有意に上昇した。36 日給餌後の血清 IgA 値は、汚染 TMR 給餌ウシにおいて有意に低下した。GMA を与えた場合にはこれらの影響を抑制した。血清ナトリウム値および浸透圧レベルは、実験期間全体を通じてすべての汚染飼料給餌ウシで上昇した。*Fusarium* 属マイコトキシンにより自然汚染された飼料は、乳牛の代謝パラメータおよび免疫に影響を及ぼす可能性があり、GMA によりこれらの影響を一部抑制する可能性があると結論した。

## 温水処理が Fusarium 属に感染した麦芽用オオムギの安全性および品質に及ぼす影響

Fusarium 属に感染した麦芽用オオムギを用いると、麦芽のマイコトキシン汚染および麦芽品質の低下をもたらすおそれがある。温水処理により、安全性および品質の低下を防止または軽減し、カビを除けば良質のオオムギを使用できると考えられる。我々は、温水処理により、オオムギ麦芽の特性を維持する一方、Fusarium 属の増殖を防止およびマイコトキシン産生を防止できるかどうか調べた。種々のデオキシニバレノール(DON)濃度のオオムギ 4 ロットを用いて、45°C または 50°C の温水で 0 分、1 分、5 分、12 分、20 分処理した。処理したオオムギをパイロット試験用の麦芽製造ユニットで麦芽処理した。オオムギおよび麦芽について、Fusarium 感染(FI)、発芽力(GE)、好気性平板菌数(APC)、カビ数および酵母数(MYC)、ならびに DON を分析した。麦芽品質パラメータは、麦芽エキス、可溶性蛋白質、麦汁色度、麦汁粘度、遊離アミノ窒素、 $\alpha$ -アミラーゼ、糖化力とした。すべてのオオムギ試料について、45°C(41~66%)および 50°C(51~69%)の両温度で 1 分以内に FI の有意な低下が認められた。両温度で 5 分後にオオムギの APC(1.0~1.8log)および MYC(1.7~1.8log)に有意な減少が認められた。45°C(79~93%)および 50°C(84~88%)の両温水で 20 分処理したオオムギから調製した麦芽では、DON が最大の減少を示した。GE および麦芽品質パラメータのほとんどは、オオムギを 50°C で 12 分および 20 分処理した場合にのみ影響を受けた。本結果は、温水処理により軽度 FHB 感染麦芽用オオムギへの処置が可能であることを示唆する。

## Fusarium マイコトキシン類の組合せによる高分子合成阻害、マロンジアルデヒド値、DNA メチル化/断片化及び Caco-2 細胞生存性に及ぼす効果

Fusarium マイコトキシン類 (デオキシニバレノール(DON)、ゼアラレノン(ZEA)及びフモニシン B1 (FB)) の 2 成分又は 3 成分混合物のヒト腸細胞株 Caco-2 に及ぼす相互作用効果を、マロンジアルデヒド (MDA) 产生、蛋白質/DNA 合成阻害、DNA メチル化、DNA 断片化及び、ニュートラルレッド(NR) 試験で測定した細胞生存性などのエンドポイントを用いて検討した。

NR 試験の結果、マイコトキシン混合物は細胞生存性を以下の昇順で減少しした : [FB1+ZEA]<[FB1+DON]<[ZEA+DON]<[FB1+DON+ZEA]。

FB1 はエストロゲン様のゼアラレノンの作用に拮抗するため、エストラジオールに対抗する FB1 を測定した。NR 法では、FB1 およびエストラジオールおよび/または ZEA により Caco-2 細胞の生存率が単独の場合より改善した。

ZEA または FB1 および DON の混合物は、脂質過酸化で相乗作用を示す。

毒素の DNA 合成阻害能は、ZEA、DON 及び FB1 10  $\mu$  M で各々 45%、70% 及び 43% であった。これらの 2 成分混合物(各 10  $\mu$  M)は DNA 合成を各々、35%、62% 及び 65% 阻害し、相加効果より大幅に低かった。驚いたことに、3 成分混合物(各 10  $\mu$  M)は DNA 合成を 25% 阻害したのみであった。

ZEA、DON 及び FB1 は単独で、DNA 断片化を誘発する。しかし、これらマイコトキシン混合物は常により大幅に DNA を損傷する。

各マイコトキシン(10  $\mu$  M)は単独で、DNA 内の 5-メチルシトシン ( $m^5dC$ ) の割合(%)を 4.5% から 9% まで上昇させるが、これらを組合せてもその割合はそれ以上増加しない。全体としてデータをまとめると、Fusarium 毒素混合物は、Caco-2 細胞中の脂質過酸化、DNA 損傷、DNA 断片化、DNA メチル化及び細胞毒性を誘発することから、ヒト腸細胞におけるプロモーター効果の可能性が示唆される。

## ヒト腸細胞株 Caco-2 におけるデオキシニバレノール、ゼアラレノン 又はフモニシン B1 誘発の細胞毒性及び酸化的ストレスに関する比 較試験

穀物への *Fusarium* 種の侵入は世界的現象である。デオキシニバレノール(DON)、ゼアラレノン(ZEN)及びフモニシンB1(FB1)などの*Fusarium* 毒素は、動物において多種の毒性効果を引き起こすことが知られており、ヒの疾患との因果関係も疑われている。

文献と機構的視点から、DONはリボソームのペプチジルトランスフェラーゼに結合し、特異的に蛋白質合成を阻害することによりDNAを阻害する。遺伝毒性が知られるZENは、 $17\beta$ -エストラジオール受容体に結合し、脂質過酸化、細胞死を誘発し、蛋白質及びDNA合成を阻害する。FB1はスフィンゴ脂質代謝を破壊し、脂質過酸化を誘発して、細胞膜を変化させ細胞死を生じさせる。

本試験では、ヒト腸細胞株におけるDON、ZEA及びFB1(1-150  $\mu$ M)の細胞毒性効果及び、細胞死に至る、酸化的ストレス及び高分子合成に関連した経路を比較し、各々の潜在的毒性に従い、暫定的に分類を行なった。

比較の結果、全3種マイコトキシンとも、程度は異なるが、脂質過酸化の誘発能を有し(MDA産生)、10  $\mu$ M以上で降順に示すと FB1>DON>ZENに分類された。この効果は、MTT検査で明らかのように共通標的すなわちミトコンドリアに関連するものと思われ、FB1関連のスフィンゴイド蓄積が関与するとは思われなかつた。

FB1とは対照的に、DON及びZENは又リソソームに対する有害作用を示す。

3種のマイコトキシンは蛋白質合成を阻害し、IC50はDON、FB1及びZENで各々5、8.8及び19  $\mu$ Mで、蛋白質合成がDONの特異的標的であることが確認された。

DNA合成はDON、ZEN及びFB1により阻害され、IC50は各々1.7、10及び20  $\mu$ Mであった。しかし、それより高濃度になると、FB1及びDONではDNA合成が回復すると思われ、プロモーター効果が示唆された。

まとめると、Caco-2細胞内の高分子阻害における3種マイコトキシンの効果はDON>ZEN>FB1である。FB1はむしろ脂質過酸化を通じて、DONはDNA及び蛋白質合成を通じて作用するものと思われる。

## 低値食餌性デオキシニバレノール及び急性運動ストレスは BALB/c マウスにおいて免疫毒性を生じる

急性運動ストレスにより、食餌性デオキシニバレノール(DON)への亜急性曝露の免疫抑制作用が悪化するとの仮説を立てた。雄 BALB/c マウスに 0 または 2mg DON/kg 含有食餌を 14 日間与えた後 (用量毎に 12 回)、トレッドミル上で疲労するまで運動させた。マウスを断頭により安楽死させ、体幹血液及び脾臓を採取した。脾臓細胞の単個細胞浮遊液を用い、溶血ブラーク法及びコンカナバリン A (ConA)刺激によるリンパ球増殖試験により免疫機能を測定した。酵素免疫測定法により血清コルチコステロン値を判定した。有意な脾臓細胞増殖抑制を認めたのは非運動 DON 摂取マウスのみで、非運動対照群の  $32.9 \pm 17.9\%$  であった ( $p = 0.021$ )。運動対照及び DON 摂取運動マウスは、非運動対照群の 68~75% の脾臓細胞増殖を認めた。T 依存性抗原であるヒツジ赤血球に対する抗体応答は、対照群に比し運動 DON 摂取マウスで有意に低かった ( $p = 0.031$ )。血清コルチコステロン値は、両運動群とも非運動群に比し有意に高かった ( $p < 0.001$ )。マイトジエン活性化脾臓細胞からの IL-4 分泌は DON のみにより上昇したが ( $p < 0.05$ )、IL-2 は運動負荷を伴う DON 曝露により上昇した ( $p < 0.05$ )。著者等の仮説は、T リンパ球依存性の抗体産生の点では実証されたが、脾臓細胞増殖の点では実証されなかった。DON 仲介の脾細胞増殖抑制は運動負荷により無効化されたが、これは恐らく DON によるサイトカイン発現変化に拮抗するストレスホルモン上昇が誘導されたためと思われる。

## 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* 真菌によって産生される。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。

## ヒトにおけるマイコトキシンの研究

本試験は、エクアドルにおけるアフラトキシン発生を調査するものである。初期の研究者はヒト及び動物用食物におけるアフラトキシンの存在を実証したが、データの混乱のため、食物中のアフラトキシン及びその他のマイコトキシン並びにヒトの健康との関連性を研究する研究チームが、エクアドルの Guayaquil 大学及び Agrarian 大学に別々に 2 つ結成された。マイコトキシン中毒の概念は、異なる種のカビから生じる二次代謝物が様々な臨床パターンを引起す結果であることから、本研究チームは、肺アスペルギルス腫患者の尿中に認める *Aspergillus* 代謝物を対象に組み入れた。著者等は生体自体が二次代謝物を産生し得ると考えた。特定反応成分を有するマイコトキシンを検出するため、会社のアッセイ法を用いて ELISA を実施した。これにより、24 時間採尿した尿中の上記代謝物の定量が可能である。患者は、臨床検査、放射線検査及びアフラトキシン検査後、イトラコナゾールの 9 月間投与を受けた。又、第 2 段階の栄養失調小児中の症例でボミトキシンのみ検出された他、*Aspergillus niger* による耳真菌症例を 3 例検討したところ 1 例のみ、アフラトキシンの痕跡を認めた。

## トリコテセン類の骨髓毒性及びアポトーシス：ヒト臍帯血 CD34<sup>+</sup>造血祖先細胞に関する *in vitro* 試験

過去の試験により、ヒトにおけるトリコテセン中毒関連の血液学的疾患は造血阻害から生じることが明らかにされた。最も高頻度に認めるトリコテセン系マイコトキシンは T-2 毒素で、強力なのはデオキシニバレノール(DON)である。この 2 種毒素によるアポトーシス誘発について、ヒト造血祖先細胞(CD34<sup>+</sup>細胞)を用いる *in vitro* 試験で検討した。フローサイトメトリーでのヘキスト染色、DNA 断片化及びアネキシン V/PI 標識により、T-2 毒素は DON とは異なり、CD34<sup>+</sup>細胞中でアポトーシスを誘導することが示された。T-2 毒素の効果は用量及び時間依存性で、10<sup>-7</sup>M でインキュベーションの 3 時間後、早くもアポトーシスを起こした細胞数が有意に増加し、12 時間で最大値に達した。この結果は、T-2 毒素に対する造血祖先細胞の高感受性を実証するものである。T-2 毒素誘導アポトーシスが汎カスパーゼ阻害剤(Z-VAD-fmk)により抑制されることから、カスパーゼの関与が示唆された。T-2 毒素濃度と共にカスパーゼ 3(DEVD アーゼ)の比活性が比例的に上昇することから、その過程における役割が確認された。アポトーシスを誘導した条件で CD34<sup>+</sup>細胞を T-2 毒素とインキュベート後、単球顆粒球、赤血球及び巨核球前駆細胞のクローン性増殖が用量依存的に阻害された。従って、T-2 毒素によるマイコトキシン中毒で認めた血液学的作用には、アポトーシスによる造血阻害が関与する可能性がある。さらに解明すべき機構として、DON の骨髓毒性が挙げられる。

## フランスにおける最初の 1 日摂取量調査から推定される主要食品における食事性マイコトキシン曝露

本研究では、フランスにおける最初の 1 日摂取量調査(FTDS)から推定される食事性マイコトキシン曝露について報告し、本推定結果とマイコトキシンの現在の 1 日許容摂取量、および過去のフランスの研究中に算出された 1 日許容摂取量との比較を行う。フランス人の食事において、(摂取量当たり)主要なマイコトキシンに曝露するフランス人集団を推定するため、個別の 2280 試料から複合性の 456 試料を調製し、アフラトキシン、オクラトキシン A、トリコテセン類、ゼアラレノン、フモニシン類、パツリンの解析を実施した。摂取量の平均値および高値の百分率を、成人、小児、菜食主義者を対象に種々の食事パターンを考慮して算出した。「摂取量当たり」で検討した食品にみられる汚染レベルについては、現行の欧州の法律を完全に満たしていることが認められた。しかし、小児および菜食主義者/自然食主義者等特定集団のグループについては、曝露に対し特に注意を払う必要がある。これらのグループでは、特定のマイコトキシンについて、1 日許容摂取レベルを超過する量、または毎週 1 日摂取レベルを超過する量を曝露する可能性がある。今回の結果では、オクラトキシン A、デオキシニバレノール、およびゼアラレノンに関し顕著な関連性が認められる。これらのマイコトキシンについて、主に高曝露に寄与していたのは、穀類および穀類加工品であった。

## 高分子グルコマンナンマイコトキシン吸着剤使用条件下および非使用条件下において食物由来 *Fusarium* マイコトキシンが成熟イヌの摂餌量、栄養素消化率、体重および身体的臨床病理学的評価項目に及ぼす影響

目的 – *Fusarium* マイコトキシンに自然汚染された穀類ベース飼料の給餌がイヌに及ぼす影響を調べると共に、高分子グルコマンナンマイコトキシン吸着剤 (GMA) の *Fusarium* マイコトキシン症予防効果を評価する。

動物 – 成熟した雌性ビーグル犬 12 頭

方法 – 非汚染飼料（対照飼料）、汚染穀類含有飼料、GMA を 0.2% 含む同じ汚染穀類含有飼料の 3 種類の穀類ベース飼料をそれぞれ 14 日間イヌに与えた。汚染物質は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、ゼアラレノン、およびフザリン酸であった。給餌期間中のイヌの摂餌量、栄養素消化率、体重、血圧、心拍数および臨床病理学的評価項目を定期的に評価した。

結果 – GMA 非含有汚染飼料を摂取したイヌの摂餌量および体重は、対照飼料摂取時に比べて有意に減少した。血圧；心拍数；総蛋白質、グロブリンおよびフィブリノーゲンの血清濃度；アルカリホスファターゼおよびアミラーゼの血清活性の低下、ならびに血中単球数および平均赤血球容積の増加が認められた。GMA 摂取は *Fusarium* マイコトキシンの作用を緩和しなかった。GMA 含有飼料では対照飼料に比べて炭水化物、蛋白質および脂質の消化率が有意に高く、摂餌量減少に対してイヌが生理学的に適応した可能性がある。

結論および臨床との関連性 – 結果は、*Fusarium* マイコトキシンで自然汚染された穀類の摂取は、イヌの摂餌行動および代謝に悪影響を及ぼす可能性がある。食品添加物としての GMA は、イヌにおける *Fusarium* マイコトキシン症予防に有効でなかった。

## ヒト赤カビ中毒の先行エピソードを伴う中華人民共和国河南省のある地域に由来するコムギ中の *Fusarium* 毒素

ヒト赤カビ中毒が先に報告された中華人民共和国河南省、濮陽地域に由来する 1998 年および 1999 年収穫の小麦試料で、トリコテセン類およびゼアラレン (ZEA) についての分析を行った。1998 年濮陽収穫分ではデオキシニバレノール (DON) が検出量および検出頻度の点で支配的な毒素で、31 コムギ試料中 30 (97%) において最大  $14\,000 \mu\text{g kg}^{-1}$  (平均  $2850 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) までの含有量で検出された。そのうち 21 試料 (70%) の DON 含有量が中国の規制基準  $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$  を超えた。ニバレノール (NIV) および 15·アセチル-DON (15·ADON) もそれぞれ  $578 \mu\text{g kg}^{-1}$  (1 試料) および  $59\sim1800 \mu\text{g kg}^{-1}$  (平均  $365 \mu\text{g kg}^{-1}$ 、20 試料) で認められた。21 試料には ZEA も  $9\sim1400 \mu\text{g kg}^{-1}$  (平均  $209 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) 含まれていた。同じ河南省でもヒト赤カビ中毒の履歴がない駐馬店地域に由来する 25 のコムギ試料 (89%) は DON を低含有率で含んでおり ( $53\sim1240 \mu\text{g kg}^{-1}$ 、平均  $223 \mu\text{g kg}^{-1}$ )、7 試料 (25%) がさらに ZEA ( $10\sim217 \mu\text{g kg}^{-1}$ 、平均  $108 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) に共汚染されていた。15·ADON および NIV などの試料からも検出されなかつた。DON、15·ADON および ZEA 濃度には、両地域間で有意差が認められた。1999 年収穫の濮陽コムギ試料でも DON ( $<1000 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) および ZEA ( $5\sim113 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) が検出された。*Fusarium* 属が越冬できる適切な環境条件に開花期の異常降雨が重なったことが、1998 年収穫の濮陽コムギにおける *Fusarium* マイコトキシン濃度の上昇をもたらした。

## 腸内レオウイルス感染に対するマウス宿主応答のトリコテセンデオキシニバレノールによる変調

腸管関連リンパ組織及び IgA 産生を標的とするデオキシニバレノール(DON)の既知の作用に基づき、このマイコトキシンが腸内レオウイルス感染に対する免疫応答を妨害するという仮説を立てた。マウスに対し、まず 25mg/kg bw DON、その後レオウイルス血清型 1 (Lang 株(T1/L)) を 2 時間又は 12 時間後に強制経口投与したところ、5 日後の胃腸管のウイルス価は、対照群より 10 倍高かった。10 日後、ウイルスは投与群及び対照群とも腸組織からほぼ完全に消失した。実時間 PCR により、感染対照マウスでは、DON 前投与の感染マウスの糞便 1g 当たりレオウイルス L2 コアスピック(L2 遺伝子)RNA は第 1、3 及び 5 日で、感染のみのマウスより有意に高かった。レオウイルス感染マウスでは、DON 10 及び 25mg/kg bw 投与は糞便中 L2 RNA を増加させたが、2 及び 5mg/kg bw では増加せず、DON 低用量 2mg/kg でもペイエル板(PP)の L2 RNA 増加を認めた。DON 投与マウスの糞便中レオウイルス特異的 IgA 値は有意に上昇し、固有層及び PP 断片培養での特異的 IgA 応答も上昇した。同様の効果が、血清 IgA 及び IgG でも認められた。DON は第 3 及び 5 日に、PP におけるレオウイルスに対する IFN- $\gamma$  応答を感染対照群より強く抑制したが、IL-2 mRNA 濃度に対する影響はなかった。レオウイルス単独では PP 中の Th2 サイトカイン mRNA を誘発しなかったが、感染期間中の様々な時点で、DON 曝露により IL-4、IL-6 及び IL-10 mRNA 発現が有意に増加した。ELISPOT により、mRNA 発現データは、DON 投与マウスから得た PP 培養物中の INF- $\gamma$  産生細胞応答の抑制及び IL-4 産生細胞応答の強化を示すものであることが認められた。総合すると、これらのデータにより、DON は一時的にレオウイルス感染の重症度を増し、レオウイルス IgA の応答上昇と共に、糞便中への排泄を増大する。この作用は Th1 サイトカイン発現抑制及び Th2 サイトカイン発現強化に相当する。

## マクロファージにおけるリシン及びトリコテセン系デオキシニバレノール及び T-2 毒素による 28S リボソーム RNA 切断誘導の比較

リボソーム不活性化蛋白質(RIP)及びセスキテルペノイドのトリコテセン系マイコトキシンは、真核細胞リボソームに結合し、翻訳を抑制して、マイトイエン活性化蛋白質キナーゼを活性化させることが知られている。本報告では、RIP リシンの 28S リボソーム RNA(rRNA)切断促進能を、トリコテセンであるデオキシニバレノール(DON)及び T-2 毒素(T-2)のそれと比較した。無細胞モデルで、リシン 300ng/ml への 30 分間曝露により酵母 28S rRNA の脱プリン化が生じたが、DON ( $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ ) と T-2 ( $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ ) のいずれにおいてもこの N-グリコシダーゼ活性を示さなかった。しかし、RAW 264.7 マクロファージをリシン (20~320ng/ml)、DON (250~5000ng/ml) 又は T-2 (2~80ng/ml) と 6 時間インキュベートしたところ、マウス 28S rRNA の 3'末端近くの切断部位に一致する 28S rRNA 特異的産物が產生された。処理済 RAW 264.7 細胞のオリゴヌクレオチド伸長による解析では、 $\alpha$ -サルシン/リシン(S/R)-ループ(A4256)の 1 部位及びペプチジルトランスフェラーゼ活性中心の他 2 部位 (A3560 及び A4045) でリシンが 28S rRNA を損傷することがわかった。DON 又は T-2 はいずれも S/R ループを損傷しなかつたが、これらトリコテセンは A3560 及び A4045 での切断を促進した。さらに、細胞をリシン ( $\geq 20\text{ng/ml}$ )、DON ( $\geq 250\text{ng/ml}$ ) 又は T-2 ( $\geq 10\text{ng/ml}$ ) とインキュベートしたところ、RN アーゼ活性及び RN アーゼ L mRNA 及び蛋白質発現を誘導した。これらのデータにより、リシンのみが無細胞状態下で 28S rRNA を直接損傷したが、一方リシン、DON 及び T-2 は、内因性 RN アーゼの作用の促進、および/または RN アーゼ発現のアップレギュレーションにより細胞内 28S rRNA 切断を促進したものと思われる。

## スペイン産農産物由来 *Fusarium* 属分離株による B 型トリコテセン類生合成に環境因子が及ぼす影響

*Fusarium* 菌属には、食物を汚染してヒトおよび動物の健康リスクとなりうる各種トリコテセン系マイコトキシンの產生能がある。本論文において、著者等は全要因計画を利用し、スペイン産農産物由来の *Fusarium graminearum* の 3 分離株および *Fusarium culmorum* の 3 分離株によるトウモロコシ穀粒培養物中のデオキシニバレノール (DON)、ニバレノール (NIV) および 3-アセチルデオキシニバレノール (3-AcDON) の產生量に培養温度、水分活性 ( $a_w$ ) および分離株タイプが及ぼす影響を調べた。試験温度は 15、20、28 および 32°C であった。 $a_w$  値は 0.960、0.970 および 0.980 であった。培養物の水分（試験範囲内）はトリコテセン類產生量に有意に影響しなかったが、温度はマイコトキシン產生量に有意に影響し、DON、NIV および 3-AcDON 產生の至適値はそれぞれ 28、20 および 15°C であった。別の *F. graminearum* の 4 分離株および *F. culmorum* の 2 分離株を使い、これらの至適温度で各マイコトキシンの產生量を調べた。*F. graminearum* の 7 分離株のうち 4 株が DON (0.88~3.97 $\mu\text{g/g}$ )、7 株が NIV (1.53~124 $\mu\text{g/g}$ )、3 株が 3-AcDON (0.65~10.6 $\mu\text{g/g}$ ) を產生した。*F. culmorum* の 5 分離株のうち 4 株が DON (1.20~4.93 $\mu\text{g/g}$ )、4 株が NIV (6.94~701 $\mu\text{g/g}$ )、4 株が 3-AcDON (0.83~7.70 $\mu\text{g/g}$ ) を產生した。実質的にすべての分離株が NIV ケモタイプに属するようである。これは、スペイン産農産物由來のこれら 2 菌種の分離株による B 型トリコテセン產生について菌株と生態学的変数との相互作用を調べた最初の研究である。

## 4種の Fusarium 毒素（フモニシン B<sub>1</sub>、 $\alpha$ -ゼアラレノール、ニバレノール及びデオキシニバレノール）のブタ全血液細胞増殖に及ぼす効果

4種の Fusarium 毒素（フモニシン B<sub>1</sub>(FB<sub>1</sub>)、 $\alpha$ -ゼアラレノール( $\alpha$ -ZEA)、ニバレノール(NIV)及びデオキシニバレノール(DON)）のマイトジエン誘導細胞増殖に対する *in vitro* 効果を、ブタ全血液細胞培養を使用して判定した。単独及び併用効果とも十分な毒性学的データが存在しない点からみて、*in vitro* 試験は上記毒素のリスク評価に有用と思われる。FB<sub>1</sub>濃度を上昇させながらインキュベートしたところ、増殖に関する結果は認められなかったのに対し、 $\alpha$ -ZEA、NIV 及び DON は阻害作用を示した。各マイコトキシンの用量応答曲線を作成した。NIV が最も強力な毒素であることが明らかになり、その後に DON、 $\alpha$ -ZEA と続いた。FB<sub>1</sub>+ $\alpha$ -ZEA 及び NIV+DON 混合物の効果についても解析し、その相互作用の可能性を検討した。その結果、FB<sub>1</sub>+ $\alpha$ -ZEA の組合せにより相乗的にブタ細胞増殖が抑制された；一方 DON と NIV 間には試験濃度範囲で、ブタ全血液細胞増殖に対する相互作用を認めなかつた。

## ブタにおける *Fusarium* 毒素ゼアラレノンおよびデオキシニバレノールへの卵母細胞曝露は異数性および胚発生異常を引き起こす

*Fusarium* 属の真菌類は食物および飼料に感染し、マイコトキシンであるゼアラレノン (ZEA) およびデオキシニバレノール (DON) を産生する。これらの毒素はどちらも妊娠性を低下させると報告されていることから、ZEA および DON による卵母細胞成熟阻害の機序を調べた。ZEA (エストロゲン様活性を有するマイコトキシン)、17 ベータ-エストラジオール、および DON (いずれも  $3.12\mu\text{mol/L}$ ) の存在下でブタ卵母細胞を成熟させた。ゼアラレノン、17 ベータ-エストラジオールおよび DON は卵母細胞成熟を阻害し、約 34% の卵母細胞で紡錘体の異常形成を引き起こした。ZEA : DON 比を変えても卵母細胞成熟阻害の増強はなかった。どちらのマイコトキシンも減数分裂紡錘体の異常形成を引き起こした。マイコトキシン存在下に成熟させた卵母細胞の発生能を *in vitro* 授精後にさらに調べた。成熟中の ZEA ( $3.12\mu\text{mol/L}$ ) の存在は、卵割して胚盤胞を形成する卵母細胞の割合を 12% 程度まで減らしたのに対し、対照卵母細胞では 25% であった。等モル濃度 DON の存在下における成熟では胚発生が起らなかった。マイコトキシン曝露卵母細胞由来の胚盤胞の割球における倍数性を蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションにて解析した。対照群の胚盤胞を含むすべての胚盤胞が異数性の割球を 1 つ以上含んでいたが、マイコトキシン曝露された卵母細胞由来胚では異数性割球の割合の変動が有意に大きかった。ZEA および DON は卵母細胞妊娠性の低下および異数性胚を生じる紡錘体形成異常を引き起こし、ZEA および DON の作用は相乗的でないと結論づけられる。

## マイコトキシンであるデオキシニバレノールはヒト腸上皮細胞における栄養素吸収に影響する

デオキシニバレノール (DON) は、動物において下痢や体重減少といったさまざまな毒性作用を発揮するトリコテセンファミリーに属すマイコトキシンである。著者等は、*in vitro* モデルとしてヒト腸上皮細胞系 HT-29-D4 を用いて、糖、アミノ酸および脂質など異なる栄養素クラスの取り込みに DON が及ぼす影響を調べた。DON は低濃度 (10 $\mu$ mol/L 以下) で腸輸送体活性を選択的に変調させ、阻害率の高いほうからナトリウム依存性 D-グルコース/D-ガラクトース輸送体 (SGLT1) (DON 10 $\mu$ mol/L で 50% 阻害、P<0.05)、D-フルクトース輸送体 GLUT5 (10 $\mu$ mol/L で 42% 阻害、P<0.001)、能動的および受動的 L-セリン輸送体 (10 $\mu$ mol/L でそれぞれ 30% および 38% 阻害、P<0.05) の順にマイコトキシンによって阻害された。受動的 D-グルコース輸送体 (GLUT) が DON によってわずかに阻害された (DON 1 $\mu$ mol/L で 15% 阻害、P<0.01) のに対し、パルミチン酸輸送は DON 10 $\mu$ mol/L で 35% 増加した (P<0.001)。一方、コレステロールの取り込みはこのマイコトキシンによる影響を受けなかった。高濃度 (100 $\mu$ mol/L) では SGLT1 活性が 76% 阻害された (P<0.01) のに対し、他のすべての輸送体の活性は高まった。DON の腸輸送体に対するこの選択性的作用は、シクロヘキシミドおよびデオキシコール酸により模擬され、蛋白質合成阻害およびアポトーシス誘導が腸細胞における DON 毒性の主要機序であることが示唆された。

直接及び間接効果はヒト腸上皮における腸病原性マイコトキシンの向炎症性を説明する：インターロイキン 8 分泌の刺激、インターロイキン 1 $\beta$  効果の強化、及び共生細菌の上皮透過の増大

マイコトキシンは、動物及びヒトにおける食物仲介の中毒の原因となる真菌の二次代謝物である。デオキシニバレノール、オクラトキシン A 及びパツリンは最もよく知られる腸病原性マイコトキシンで、腸機能を変化させ、in vivo で栄養失調、下痢、嘔吐及び腸炎を引き起こす。これらのマイコトキシンの腸障壁及び輸送活性に及ぼす作用は広く明らかにされているが、向炎症作用の機序についてはまだ十分に解明されていない。本試験では、モデルとして分化した Caco-2 細胞、腸炎の指標としてインターロイキン 8 (IL-8) を用いて、マイコトキシン誘発性腸炎が、ヒト腸上皮細胞に対するこれらのマイコトキシンの直接的及び/又は間接的向炎症作用によるものか否かを検討した。デオキシニバレノールは IL-8 分泌を直接的に増大させる (10~15 倍増加) 唯一のマイコトキシンだった。著者等は又、これらマイコトキシンが (i) インターロイキン 1 $\beta$  (IL- $\beta$ ) などの向炎症性分子の作用変調及び又は、(ii) 非侵襲的な共生細菌 Escherichia coli の上皮透過の増大により、間接的に IL-8 分泌を刺激するか否かを検討した。その結果、デオキシニバレノール、オクラトキシン A 及びパツリンはいずれも、IL-8 分泌に及ぼす IL-1 $\beta$  の作用を強化し (35%~138% の増加)、共生細菌の上皮透過を増大させた (12~1544 倍増大)。従って、これらのマイコトキシンは、確定した腸炎を悪化させる可能性に加え、in vivo での敗血症及び腸炎の誘発に関与すると思われる。総合した結果、腸病原性マイコトキシンの向炎症性は直接的及び間接的作用により仲介されることが示唆される。

デオキシニバレノールおよびサトラトキシン G はマクロファージにおいて *Listeria* および *Salmonella* による炎症性サイトカインおよびマクロファージ阻害蛋白質 2 の誘導を促進する

食物および環境中の病原性微生物および毒素による健康リスクは常に世界的な関心事である。今回の研究目的は、トリコテセン系マイコトキシンが食物由来病原菌への炎症反応を増強するという仮説を検証することである。著者等は RAW 264.7 マウスマクロファージを用いて、*Listeria monocytogenes* および *Salmonella typhimurium* により誘導されるケモカインおよび炎症性サイトカインの産生に対するデオキシニバレノール (DON) およびサトラトキシン G (SG) の増強能を評価した。マクロファージをこれらの病原菌の照射死菌懸濁液と 24 時間培養したときの、マクロファージ阻害蛋白質 2 (MIP-2)、インターロイキン-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、IL-6 および腫瘍壞死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 誘導に必要な *Listeria* の最小濃度はそれぞれ 0.01、0.01、1.0 および 1.0 $\mu$ g/ml ( $P<0.05$ )、*Salmonella* の最小濃度はそれぞれ 0.01、0.01、0.1 および 0.1 $\mu$ g/ml ( $P<0.05$ ) であった。両病原菌による 4 種類すべてのメディエーター誘導が DON (100 および 250ng/ml) によって増強され、観察された応答は予測された相加的応答よりも有意に大きかった ( $P<0.05$ )。SG (2 および 5ng/ml) も *Listeria* および *Salmonella* 双方による IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  誘導を有意に増強した ( $P<0.05$ )。これら結果は、*Fusarium* 汚染食物に含まれる DON および *Stachybotrys* 汚染屋内環境に由来する SG が食物由来細菌性病原菌への生得的な炎症反応を増強しうることを示す。

## Fusarium graminearum の Tri1 は P450 オキシゲナーゼをコードする

*Gibberella zeae* (無性世代 *Fusarium graminearum*) は北米におけるコムギ赤カビ病およびトウモロコシ雌穂腐敗病の主な原因菌で、デオキシニバレノールおよび類縁トリコテセン系マイコトキシンによる穀類汚染を引き起こす。新たなトリコテセン生合成遺伝子を同定するため、培養物および植物体におけるトリコテセン誘導条件下で培養真菌から cDNA ライブラリーを作成した。これらの条件下で高度に発現された LH1 遺伝子は、既知のトリコテセン生合成チトクローム P450 と中等度 (59%) の相似性しか示さなかった。LH1 の機能を調べるため、遺伝子破壊株を作成し、トリコテセン産生量を評価した。遺伝子破壊株は 7 位炭素 (C-7) および C-8 が酸素化されている 15-アセチルデオキシニバレノールを產生せず、C-7 または C-8 のどちらかが酸素化されていないカロネクトリンおよび 3-デアセチルカロネクトリンが蓄積した。これらの結果は、これらの位置の一方または両方における酸素化に関与するチトクローム P450 を LH1 遺伝子がコードすることを示す。DNA 配列およびアミノ酸配列の相似性は比較的低いものの、*G. zeae* の LH1 はおそらく *F. sporotrichioides* において C-8 酸素化に必要なチトクローム P450 をコードしている Tri1 の相同遺伝子である。

## ヒトリンパ球増殖およびサイトカイン産生のデオキシニバレノール

### 誘導性免疫変調

マイコトキシンは、さまざまな真菌属によって產生される構造的に多様な一群の二次代謝物で、デオキシニバレノール (DON)、T-2 トキシン、アフラトキシン B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) およびフモニシン B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) などがある。広範囲のヒト曝露および動物における強力な免疫変調作用にもかかわらず、それらがヒト免疫系に及ぼす影響はまだ明らかになっていない。今回の研究では、これらの毒素がヒトリンパ球の増殖に及ぼす影響が MTT アッセイで評価された。さらに DON がサイトカインプロファイルに及ぼす影響も調べられた。216ng/ml の DON 濃度で細胞増殖の 50% 阻害が認められた。T-2 トキシンはもっと強力で、50% 阻害濃度は 1~5ng/ml であった。AFB<sub>1</sub> および FB<sub>1</sub> では無視しうる程度の影響しか認められず、AFB<sub>1</sub> および FB<sub>1</sub> のどちらかと DON を混合してもこのアッセイでは相乗作用が認められなかった。PHA 刺激リンパ球を DON (100、200 および 400ng/ml) で短時間処理したところ、IL-2、IL-4 および IL-6 産生の動力学が変化した。処理後 72 時間の IL-2 レベルは、200 および 400ng/ml の毒素濃度で対照レベルの 12 倍まで高まった ( $P<0.05$ )。これらの DON 濃度において IL-4 レベルはわずかしか上昇せず、IL-6 レベルはわずかに阻害された。DON 濃度が 200 および 400ng/ml のときのサイトカイン産生動力学が 8~9 日の長期にわたって追跡された。相対的に低い DON 濃度 (200ng/ml) では IL-2 レベルが 17~25 倍に上昇し、IFN-γ も同時に軽度上昇を示した。先行実験と同様に、IL-6 レベルはこの濃度の DON によってわずかに抑制された。400ng/ml では IL-2 レベルが処理後 6 日まで有意に上昇した ( $P<0.05$ ) 一方、IL-4 および IL-6 への影響はあまり顕著でなかった。これらのデータは、DON がヒトリンパ球のサイトカイン産生に強力に作用し、曝露されたヒト集団でこのサイトカイン産生を調査するとよいことを示唆する。

## デオキシニバレノールのヒト曝露の尿中バイオマーカーの開発

デオキシニバレノール (DON) は、穀類汚染物質としてよく認められるマイコトキシンで、汚染穀類が大量に消費される発展途上国では健康被害の原因とされることがある。著者等はこの毒素へのヒト曝露のバイオマーカー候補についての方法論を確立する基礎として、ラットにおける DON の代謝を調べ、潜在的な高度汚染集団に由来する尿検体を使ってこの方法論を試験した。Sprague-Dawley ラットに [<sup>14</sup>C]DON ( $5.0 \pm 0.1 \text{mg/kg}$  体重、 $5.5 \pm 0.1 \mu\text{Ci/kg}$ ) を単回投与し、体液中の DON 分布を 72 時間にわたって調べた。ラット血漿中に DON およびその代謝物が最も高いレベルで認められたのは 8 時間後で、その時点における血漿蛋白質結合率は約 9% であった。投与された DON の 37% が尿中に排泄され、 $\beta$ -グルクロニダーゼ処理およびスルファターゼ処理試料の逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に基づき、DON-グルクロニドが主要な尿中代謝物と思われた。その後、尿中ヒトバイオマーカーの確立を視野に入れて、尿中代謝物を測定するためのイムノアフィニティカラム (IAC)-HPLC 法が開発された。食道癌 (OC) リスクが高く、DON 曝露が高度な可能性のある中国 Linxian 郡および中国の低リスク地域である Gejiu の住民女性から尿サンプルを採取した。 $\beta$ -グルクロニダーゼ処理および IAC 濃縮後の 15 検体すべてから、質量分析によって DON と確認された物質が検出された。中国の高曝露と考えられる地域および低曝露地域から得られた DON 平均レベルは、それぞれ 37ng/ml (範囲 14~94ng/ml) および 12ng/ml (範囲 4~18ng/ml) であった。これは 1 日あたりそれぞれ 1.1~7.4 $\mu\text{g/kg}$ /日および 0.3~1.4 $\mu\text{g/kg}$ /日の曝露に相当すると推定される。これは、動物およびヒトにおける DON の尿中バイオマーカー測定の初めての報告であり、このマイコトキシンと疾患との関連性についての疫学研究がこれによって促されるであろう。

## 小穀粒およびトウモロコシ中のマイコトキシン：古くからの問題と 新たな挑戦

この論文では、小穀粒およびトウモロコシのデオキシニバレノールおよび類縁化合物フモニシンによる慢性的な汚染、および寒冷酪農地域におけるサイロ貯蔵穀類の利用に関する問題を総説する。デオキシニバレノールおよびフモニシンの耐容 1 日摂取量についての不確かさが、現行規制値に影響を及ぼす可能性があるため、これらの不確かさについて論じる。さらに気候変動はこれまで以上に極端な降雨および旱魃をもたらしているが、これらはそれぞれデオキシニバレノールおよびフモニシンの形成に適している。気象データからマイコトキシン蓄積を予測するモデルの開発および精緻化は、これらの事象の管理に欠かせないツールになるだろう。またこうしたモデルは、特に小児における急性中毒発生率が高い発展途上国へのタイムリーな食糧援助提供にも重要である。経済的な影響および牛乳の純度への潜在的影響から見て、一部の地域におけるある種の *Penicillium* 毒素による貯蔵牧草の慢性汚染に対し、もっと注意を払うべきである。

## ヒト赤白血病細胞株中のマイコトキシン類ニバレノール、デオキシニバレノール、及びフモニシン B<sub>1</sub>誘発性の毒性及びアポトーシス

K562 ヒト赤白血球細胞株に対するマイコトキシン類ニバレノール(NIV)、デオキシニバレノール(DON)、及びフモニシン B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>)の毒性を検討するにあたり、細胞毒性、細胞代謝及び細胞増殖について各々、トリパンブルー染色、MTT 及び BrdU 取込解析を実施した。ヨウ化プロピジウムによる核染色及びフローサイトメトリーによる DNA 解析を実施し、アポトーシス及び細胞周期分布を同定した。MTT 及び BrdU 試験では、NIV 及び DON とも FB<sub>1</sub>より 1 衍以上有意に毒性が強く、ID<sub>50</sub>は NIV の 0.5 μM から FB<sub>1</sub>の 70 μM の範囲だった。MTT 試験により、NIV は DON より有意に（約 4 倍）毒性が高いことが示された。対照的に、トリパンブルー染色では、マイコトキシン曝露の効果は認められず、試験濃度範囲では NIV、DON 及び FB<sub>1</sub>は細胞膜損傷による細胞毒性を誘発しないことが示された。細胞周期解析により、アポトーシス細胞毒性が示唆され、NIV 及び DON の最高濃度では細胞残屑 100% を示し、FB<sub>1</sub>最高濃度では対照の残屑の約 2.9 倍であった。より毒性の強い NIV 及び DON は FB<sub>1</sub>よりも、より後期段階のアポトーシス事象を生じるように、アポトーシスの形態学的証拠は上記物質の毒性と関連性を示した。本試験では、ヒト血液細胞がマイコトキシンへの曝露に高感受性を示すが、NIV は DON より毒性が高く、DON は FB<sub>1</sub>より毒性が高いこと及び、観察された細胞毒性が細胞膜損傷や壊死ではなく DNA 損傷やアポトーシスに起因することが示された。

シクロオキシゲナーゼ-2 は in vitro および in vivo でボミトキシン  
(デオキシニバレノール) によるインターロイキン-6 アップレギュ  
レーションを仲介する

インターロイキン-6 (IL-6) は、トリコテセン系ボミトキシン (VT) 曝露に  
関連する免疫毒性の中心的メディエーターである。今回の研究目的は、誘導性  
シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) およびその代謝物が VT 誘導 IL-6 アップレ  
ギュレーションに寄与するという仮説を検証することである。100~250ng/ml  
の VT は、RAW 264.7 マウスマクロファージ細胞系において COX-2 蛋白質発現  
を迅速に誘導した。これらの細胞におけるリポ多糖 (LPS) 仲介 IL-6 産生の VT  
による超誘導が COX 阻害剤であるインドメタシンおよび NS-398 によって有意  
に抑制されたのに対し、こうした阻害剤は LPS 単独による IL-6 の直接誘導に影  
響しなかった。5 および 25mg /kg の VT が強制経口投与されたマウスでは、パ  
イエル板および脾臓における COX-2 mRNA 発現が増加し、VT 曝露 2 時間後に  
誘導がピークに達した。IL-6 mRNA も VT により in vivo 誘導されたが、発現  
のピークは毒素曝露の 2~4 時間後で、COX-2 遺伝子の最大アップレギュレー  
ションが IL-6 遺伝子の最大アップレギュレーションに先行したか、それと同時  
であったことが示唆された。また、COX-2 が寄与するという推定に整合するよ  
うに、COX 阻害剤であるインドメタシンまたは NS-398 のマウスへの前処理に  
より、VT による脾臓 IL-6 mRNA および血清中 IL-6 の両方の誘導が有意に抑  
制された。最後に、COX-2 ノックアウトマウスでは、その親の野生型に比べて  
VT 経口曝露に対する脾臓 IL-6 mRNA および血清中 IL-6 の応答が有意に低下  
した。これらの in vitro および in vivo データを総合すると、VT 誘導 COX-2 遺  
伝子発現および結果として生じる COX-2 代謝物が、VT 仲介免疫毒性の既知特  
性である IL-6 遺伝子発現の引続くアップレギュレーションに部分的に寄与した  
ものと考えられる。

## 魚油により抑制されるマウスにおけるデオキシニバレノール誘導性 マイトジエン活性化蛋白質キナーゼリン酸化および IL-6 発現

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、マウスにおいてヒト IgA 腎症 (IgAN) の初期段階に似た IgA レベルの過剰な上昇およびメサンギウム IgA 沈着を誘導する。この疾患の潜在的メディエーターの中でもインターロイキン-6 (IL-6) は IgA 上昇および疾患増悪に特に重要な役割を果たすようである。食用魚油 (FO) が DON 誘導 IgAN を抑制するという先行知見に基づき、著者等は FO が *in vivo* および *in vitro* で本マイコトキシンによる IL-6 発現の誘導を阻害するという仮説を立てた。7% トウモロコシ油 (CO) または 1% CO+6% ニシン FO を加えた修飾 AIN 93G 飼料を 8 週間まで与えたマウスに DON を強制的に急性経口投与した。8 週間 FO 摂取マウスにおける血漿中 IL-6 および脾臓 mRNA の DON 誘導上昇は、CO 摂取群に比べて有意に抑制された。IL-6 アップレギュレーションに決定的に重要な上流トランスデューサーであるマイトジエン活性化蛋白質キナーゼ (MAPK) のリン酸化に対する FO の作用も評価した。FO 摂取マウスの脾臓では、細胞外シグナル調節蛋白質キナーゼ 1 および 2 (ERK1/2) ならびに c-Jun N 末端キナーゼ 1 および 2 (JNK1/2) の DON 誘導リン酸化が有意に抑制され、p38 リン酸化は抑制されなかった。DON 誘導 IL-6 を増強することがすでに明らかになっている脾臓 COX-2 mRNA 発現も FO によって有意に減少した一方、COX-2 代謝物であるプロスタグラランジン E<sub>2</sub> の血漿中レベルに変化はなかった。In vivo 知見を確認するため、FO に含まれる 2 つの主要な n-3 多価不飽和脂肪酸 (PUFA) であるエイコサペンタエン酸 (20:5[n-3]; EPA) およびドコサヘキサエン酸 (22:6[n-3]; DHA) による前処理が、LPS 処理 RAW 264.7 マクロファージ細胞における DON 誘導 IL-6 発現に及ぼす影響を評価した。In vivo 知見と整合して、EPA および DHA はどちらも DON による IL-6 超誘導を有意に抑制すると共に、ERK1/2 および JNK1/2 の DON 誘導リン酸化を阻害した。一方、n-6 PUFA であるアラキドン酸 (20:4[n-3]) のこうした MAPK への作用は著しく小さかった。総合すると、IL-6 の発現ならびに ERK 1/2 および JNK1/2 の活性化に対する FO およびその成分である n-3 PUFA の抑制能は、報告されているこれらの脂質の DON 誘導 IgA 腎症抑制作用を部分的に説明すると思われる。

マクロファージにおけるボミトキシン誘導シクロオキシゲナーゼ-2  
遺伝子発現にはマイトジエン活性化蛋白質キナーゼ ERK および  
p38 活性化が関与するが JNK 活性化は関与しない

ボミトキシン (VT) および他のトリコテセン系マイコトキシンは、白血球における炎症関連遺伝子の誘導を介して広範囲の免疫毒性作用を仲介する。今回の研究目的は、VT がマクロファージにおけるシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) 遺伝子発現を誘導し、これはマイトジエン活性化蛋白質キナーゼ (MAPK) のレベルで調節され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細胞系 RAW 264.7 を VT 50~250ng/ml に 24 時間曝露したところ、COX-2 の主要代謝物であるプロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 産生が顕著に増強された。VT 处理細胞では、PGE<sub>2</sub> 上昇に先立って COX-2 mRNA (2 時間) および COX-2 蛋白質 (15 時間) が増加した。VT は細胞外シグナル調節蛋白質キナーゼ 1 および 2 (ERK1/2) ならびに p38 MAPK の迅速 (15 分) で持続的な (240 分まで) リン酸化を誘導し、c-Jun N 末端キナーゼ 1 および 2 (JNK1/2) の迅速 (15 分) なリン酸化も誘導したが、これらは一過性 (60 分まで) であった。ERK 阻害剤である PD98059 および p38 阻害剤である SB203580 が PGE<sub>2</sub> および COX-2 蛋白質の VT 誘導発現を抑制したのに対し、ドミナントネガティブ (dn) JNK ベクターの一過性トランスフェクションによる JNK 機能障害は COX-2 蛋白質発現に何ら影響しなかった。これに関連して、COX-2 プロモーター・ルシフェラーゼ構築物をトランスフェクトした細胞では PD98059 处理および SB203580 处理が VT 誘導ルシフェラーゼ転写を抑制したのに対し、dnJNK 处理はこの転写を抑制しなかった。また VT は COX-2 mRNA の安定性を高めたが、この作用は PD98059 によって抑制され、SB203580 では抑制されなかった。総合するとこれらの結果は、VT によって誘導される PGE<sub>2</sub> 産生および COX-2 発現が転写活性および mRNA 安定性の増強によるものであることを示す。転写活性の増強が ERK および p38 シグナル伝達経路によって変調されたのに対し、mRNA の安定性はもっぱら VT 活性化 p38 リン酸化によって促進された。これらのデータは、VT および他のトリコテセンが炎症遺伝子をアップレギュレートし、免疫毒性をもたらす一般的な機序についての洞察を提供する。

## トリコテセン構造とマクロファージにおける COX-2 誘導との関係 : B型 (8-ケト) トリコテセン類の選択的作用

トリコテセン系マイコトキシンであるデオキシニバレノール (DON、ボミトキシン) は部分的に細胞毒性を発揮する濃度において、マイトジエン活性化蛋白質キナーゼ (MAPK) 情報伝達経路を介した転写活性および mRNA 安定性の促進を通じてシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) 発現を誘導する。今回の研究目的は、トリコテセンが COX-2 遺伝子発現に及ぼす影響には差異が認められ、そうした作用は MAPK 活性化に関係するという仮説を検証することであった。3つの主要なトリコテセンファミリー (A、B および D) の代表的メンバー間で RAW 264.7 マウスマクロファージ細胞系における COX-2 誘導能を比較した。3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニル-テトラゾリウムプロミド (MTT) 生存応答を 20% 阻害する濃度 (IC<sub>20</sub>) で細胞を処理したところ、DON、15-アセチル-DON、3-アセチル-DON およびフザレノン X といった B 型トリコテセンは COX-2 mRNA 発現を効果的に誘導するが、同程度の毒性の A 型および D 型トリコテセンのそうした作用は顕著に弱いことがわかった。COX-2 遺伝子転写促進および mRNA 安定化の作用を比較するため、遺伝子のそれぞれ 5'-プロモーター領域または 3'-非翻訳領域を含むルシフェラーゼレポーターベクターを RAW 264.7 細胞にトランスフェクトし、各種トリコテセンがルシフェラーゼ活性に及ぼす影響を測定した。MTT IC<sub>50</sub>までの濃度の B 型毒素はルシフェラーゼ活性を高め、A 型および D 型毒素は高めなかつた。これは本トリコテセン亜集合が COX-2 転写活性化および mRNA 安定化に優先的に働くことを示す。また B 型トリコテセンはそれぞれの IC<sub>20</sub>において、3つの主要な MAPK ファミリーを有意に活性化したのに対し、A 型および D 型トリコテセンにそうした作用はなかつた。化学的阻害剤による ERK および p38 の阻害は B 型トリコテセン誘導 COX-2 発現を有意に抑制した。JNK は別の情報伝達モデルにおいて COX-2 発現に寄与すると報告されているが、ドミナントネガティブ JNK ベクターのトランスフェクションは COX-2 発現を抑制しなかつた。総合すると、B 型トリコテセンは COX-2 遺伝子の転写および安定性を選択的に強化し、これは ERK1/2 および p38 情報伝達経路によって仲介された。COX-2 への選択的な作用は、B 型トリコテセン仲介免疫毒性に伴う特有の症状発現に寄与すると思われる。

ヒト上皮腸 407 細胞におけるリボトキシンであるデオキシニバレノール（ボミトキシン）による ERK1/2 を介した早期増殖応答遺伝子 1 およびインターロイキン・8 の発現変調

上皮は体外毒素の攻撃を感じし、上皮炎症性疾患など広範囲の粘膜反応を再プログラムするための監視シグナルを細胞に送る。今回の研究目的は、リボトキシンである DON が上皮監視シグナルを誘発し、これがヒト上皮細胞における炎症性サイトカインインターロイキン・8 に寄与するという仮説を検証することであった。DON 処理は、ヒト上皮腸 407 細胞におけるインターロイキン・8 産生を強化した。リボトキシン DON はとりわけ、DON 誘導インターロイキン・8 (IL-8) 産生を仲介するマイトジエン活性化蛋白質キナーゼ (MAPK) である細胞外シグナル調節タンパク質キナーゼ 1 および 2 (ERK1/2) のリン酸化を顕著に増加させた。DON 活性化 ERK1/2 はこの上皮細胞系において早期増殖応答遺伝子 1 (EGR-1) の産生も仲介し、EGR-1 はこの上皮細胞においてインターロイキン・8 産生に対する陽性調節作用を示した。総合すると、DON は上皮細胞の MAPK 監視シグナルを活性化し、それがインターロイキン・8 産生およびその陽性の変調因子である EGR-1 を促進した。これらの知見は、リボトキシン攻撃による早期の上皮炎症に関連する機序についての洞察をもたらすであろう。

## NF- $\kappa$ B 経路に依存しないヒト胚性腸上皮 407 細胞中のインターロイキン-8 産生の低応答性：エンドトキシンおよびリボトキシンデオキシニバレノールからの新しい教訓

粘膜上皮は外来毒物による障害を感じ、上皮細胞内部に危険信号を伝達して、広範囲の炎症応答を賦活する。しかし、共生エンドトキシンに予備曝露されると炎症耐性が誘導され、過剰免疫応答なしにホメオスタシスが維持され得る。著者等は最近、リボトキシンのデオキシニバレノール (DON) およびその誘導体がヒト上皮細胞において粘膜障害として向炎症応答を引き出すと報告した。この知見を考慮して著者等は、エンドトキシンに予備曝露するとリボトキシン誘発性の上皮インターロイキン-8 (IL-8) 産生が耐性機序を介して軽減され得るという仮説を検証した。エンドトキシンに予備曝露すると IL-8 放出および遺伝子発現が抑制された。しかし、炎症耐性は、LPS 仲介 Toll 様受容体 (TLR) 情報伝達経路の主要仲介因子として一般に認識されている NF- $\kappa$ B 賦活の軽減によっては仲介されなかった。その代わりに、エンドトキシンへの予備曝露はペルオキシソーム増殖因子賦活受容体  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) の誘導遅延を引起し、これがヒト上皮細胞中の IL-8 産生低下に寄与することが観測された。さらに、内因性 PPAR- $\gamma$  作動薬は毒物仲介インターロイキン-8 産生および IL-8 mRNA 安定性を抑制した。総合すると、エンドトキシンはヒト上皮細胞中の向炎症性サイトカイン IL-8 の産生低下を誘導し、それは事前に存在するエンドトキシンによる PPAR- $\gamma$  発現の遅延賦活と関連していた。

## T-2 毒素によるアポトーシス誘導：HL-60 細胞におけるチトクローム c のサイトゾル放出を介したカスパーーゼ-9、カスパーーゼ-3 および DFF-40/CAD の活性化

ヒト白血病 HL-60 細胞を使い、T-2 毒素誘導アポトーシスに関与する分子を調べた。又クレオソーム間 DNA 断片化を誘導するトリコテセン系マイコトキシンの力価は、強いほうから T-2、サトラトキシン G、ロリジン A》ジアセトキシルペノール>バッカリン B-5》ニバレノール、デオキシニバレノール、3-アセチルデオキシニバレノール、フザレノン-X、バッカリン B-4=担体対照であることがわかった。T-2 処理細胞におけるカスパーーゼ-3 のウェスタンプロット分析は、その 17-kDa の触媒活性断片が現れることを明確に示した。カスパーーゼ-3 活性上昇は、蛍光発生基質 DEVD-AMC を使っても検出された。次に、T-2 への細胞曝露は 116-kDa の天然型 PARP の切断による 85-kDa 断片形成を促した。さらに T-2 処理によって DFF-45/ICAD の切断が起こり、12.5-kDa 断片が生じた。T-2 はミトコンドリアからサイトゾルへのチトクローム c 放出を引き起こした。カスパーーゼ-9 の LEHD-AMC に対する酵素活性の増強が認められた。これらのデータは、T-2 誘導アポトーシスにはカスパーーゼ-9 活性化と共にチトクローム c のサイトゾル蓄積を通じたカスパーーゼ-3 および DFF-40/CAD の活性化が関与することを示す。

## 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。

## マイコトキシン規制問題に関する米国の展望

数多くの食品および基礎食品に付く特定のカビによって產生される避けることのできない天然汚染物質アフラトキシンについて食品医薬品局（FDA）が定めた管理プログラムは、規制当局によるリスク評価および管理戦略に影響を及ぼす拘束力の一例である。もっと最近では、アフラトキシンと同様にフモニシン、デオキシニバレノール、オクラトキシン A、ゼアラレノン、およびパツリンについての国際食品基準を設けようとする国際規模の活動によって、世界規模で消費者の健康を守り、公正な取引を保証するための規則および/または基準を作成することの複雑さが明らかになった。アフラトキシンに関する現行の FDA 規則は、さまざまな商品および用途を対象とした、基本食品、牛乳中の残留、および動物用飼料における潜在的汚染に関する公衆衛生上の懸念に対応している。汚染産物についての規制値、サンプリングおよび分析の方法、除染および/またはよりリスクの小さい用途への転用がマイコトキシン管理プログラムの構成成分である。デオキシニバレノール、フモニシン、およびパツリンに関する規制管理を確立しようとする FDA の現在の努力は、マイコトキシンに関する行動レベルおよび勧告の作成に安全性およびリスク評価方法が果たす役割についての新たな洞察を追加する。

Toll 様受容体プライミングはデオキシニバレノールおよび他の毒物による向炎症性サイトカイン遺伝子誘導に対してマクロファージを感作性にする

先天性免疫系を賦活すると宿主を毒物誘起炎症にかかりやすくする可能性がある。In vitro マクロファージモデルを使用して、トリコテセン系マイコトキシンデオキシニバレノール (DON) および他の毒物による向炎症性サイトカイン遺伝子発現の誘導に及ぼす Toll 様受容体 (TLR) 作動薬への予備曝露の効果を検討した。マウス RAW 264.7 マクロファージ系統またはマウス腹腔マクロファージを 100ng/ml の TLR4 作動薬リポ多糖体 (LPS) によって 4、8 および 16 時間プライミングしたところ、DON 誘導性 IL-1 $\beta$ 、IL-6 および TNF- $\alpha$  mRNA 発現が LPS または DON 単独より著しく増加した。両細胞型の感作のための最小 LPS 濃度は 1ng/ml であった。LPS をプライミングするとヒト全血培養物中の DON による IL-1 $\beta$  mRNA 誘導も強化され、マウス知見との関連が示唆された。RAW267.4 細胞は、ザイモサン (TLR2)、ポリ (I:C) (TLR3)、フラジエリン (TLR5)、R848 (TLR7/8)、および ODN1826 (TLR9) を含む TLR 作動薬に予備曝露されると、LPS で観測されたと同様に DON が誘発する向炎症性遺伝子発現に対して感作性になった。微生物毒素であるサトラトキシン G、シガトキシン、およびゼアラレノンならびに人為的毒物である塩化ニッケル、トリフェニルスズ、2,4-ジニトロクロロベンゼン、および 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾダイオキシンに曝露された LPS 感作 RAW264.7 細胞中で向炎症性 mRNA 発現増幅が同様に実証された。これらの結果は、多様な作用機序を通して、事前 TLR 賦活が、生体異物によるその後の炎症誘発性遺伝子発現の誘導に対して、マクロファージを高感作性にする可能性を示唆した。

## デオキシニバレノールが誘導する IgA 産生および IgA 腎症 – 全身波及を伴う異常な粘膜免疫応答

一般的な食物由来マイコトキシンであるデオキシニバレノール (DON) への食物を通じた曝露は、マウスにおいて多量体が多くを占める血清免疫グロブリン A (IgA) を選択的にアップレギュレートし、粘膜免疫系が主な標的であることを示唆する。DON は経口摂取でアジュバント特性や抗原特性を示さないが、イソ型特異的にポリクローナル IgA 合成および血清レベル上昇を誘導する。これによる過剰上昇 IgA は多特異性、自己反応性で、免疫複合体形成および腎メサンギウム沈着に関与すると思われる。後者の作用は、最も一般的なヒト糸球体腎炎である IgA 腎症に似ている。DON は細胞レベルで T ヘルパーサイトカイン産生をアップレギュレートし、IgA 分泌のための T 細胞ヘルプを増強する。Ex vivo 再構成試験および抗体除去試験、および IL-6 欠失マウスを使った実験に基づく特に重要なことに、類似の作用はマクロファージにおいて IL-6 で認められている。DON によるサイトカインのアップレギュレーションは、転写活性化および mRNA 安定性の両方の増強に関与しており、これらはマイトジエン活性化蛋白質キナーゼの活性化によって仲介される。興味深いことに、食物に含まれるオメガ-3 脂肪酸はこれらのプロセスをダウンレギュレートし、DON 誘導 IgA 腎症を軽減しうる。腸粘膜免疫毒性学の観点から見ると、これらの研究は化学物質の粘膜免疫応答への影響が全身的波及を引き起こしうること、そして適切な食事療法によってそうした作用が変調され得ることを明らかにしている。

## デオキシニバレノールによって誘導される遺伝子発現およびアポトーシスの機序

デオキシニバレノール (DON) および他のトリコテセン系マイコトキシンの産生を伴う *Fusarium* 菌属のコムギ、オオムギおよびトウモロコシといった穀類への感染が次第に世界共通の問題になってきている。飼料摂取を通じた DON への慢性曝露は、実験動物において嘔吐のほかに体重増加率の低下、食欲不振、飼料効率の低下および免疫調節異常を引き起こす。トリコテセン類は用量、曝露頻度、曝露期間、および免疫機能アッセイのタイプによって免疫刺激作用と免疫抑制作用の両方を示す。免疫系の T リンパ球、B リンパ球に加え、単球、マクロファージが DON およびトリコテセン類の標的細胞となりうる。低濃度トリコテセンへの *in vitro* 曝露はサイトカイン、ケモカインおよび炎症遺伝子の転写発現および転写後発現の両方をアップレギュレートすると同時に免疫を刺激し、高濃度への曝露は白血球アポトーシスを促進すると同時に免疫を抑制する。DON および他のトリコテセンは、「リボ毒性ストレス応答」として知られている機序を介してリボソームに結合し、マイトジエン活性化蛋白質キナーゼ (MAPK) を速やかに活性化する。MAPK は免疫応答およびアポトーシスに関する下流情報伝達事象の重要なトランスデューサーである。クローン化マクロファージを使い、DON 誘導 MAPK 活性化に決定的に重要な 2 つの上流トランスデューサーが同定されている。一方は二本鎖 RNA (dsRNA) 活性化蛋白質キナーゼ (PKR) で、これは広く発現し、dsRNA やインターフェロンなどによって活性化されるセリン/トレオニン蛋白質キナーゼである。もう一方は非受容体型 Src 癌遺伝子ファミリーキナーゼである造血細胞キナーゼ (Hck) である。薬理学的阻害剤および遺伝子抑制試験は、Hck および PKR が DON 誘導の遺伝子発現およびアポトーシスに寄与することを明らかにしている。PKR、Hck および他のキナーゼはリボソームに結合し、DON との相互作用後に活性化される。今後の試験では、こうした上流キナーゼの選択的活性化をもたらすリボソームレベルの分子逐次事象が今後の研究の焦点になるだろう。

## デオキシニバレノールへの急性経口曝露後の組織分布および向炎症性サイトカイン遺伝子発現：離乳マウスと成体マウスとの比較

デオキシニバレノール (DON) が穀類系食品中に高頻度で存在し、小児がこれらの食品を多く摂取するため、このマイコトキシンが引き起こす悪影響に対するこの年齢集団の相対感受性が特に懸念される。著者等は、5mg/kg 体重での経口 DON 曝露の後、雌の離乳マウス (3-4 週) と若年成体マウス (8-10 週) との間で毒物動態と向炎症性サイトカイン遺伝子発現の両者が異なるという仮説を検証した。DON は急速に取り込まれ、成体マウス中の最大血漿濃度は 15 分で  $1.0 \mu\text{g/ml}$  に達したが、これらの時間における離乳マウス中の DON レベルは約 2 倍にも達した。DON は離乳マウスでも成体マウスでも急速に除去され、2 時間後の濃度はピークレベルの 78% より 81% にそれぞれ低下した。脾臓、肝臓、肺および腎臓中の DON の蓄積および消失は血漿の場合と同様な速度論に従い、組織負荷も成体マウスの組織負荷の 2 倍に達した。脾臓（全身性向炎症性サイトカインの主要源）中の TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  および IL-6 mRNA を DON の効果のバイオマーカーとして用いたとき、これらの mRNA の離乳マウス中での発現は成体マウスより 2 から 3 倍大きかった。しかし、肝臓や肺では、向炎症性サイトカイン発現の差異は頑健ではないかまたは表れなかった。総合すると、これらのデータは、若年マウスが成体マウスより DON の悪影響を若干受けやすく、これはトキシン組織負荷が大きいためである可能性を示唆した。

## 経口曝露後のマウス中のデオキシニバレノール組織内分布の免疫化学評価

デオキシニバレノール (DON またはボミトキシン) は、穀物中に普通に見いだされるトリコテセンマイコトキシンであり、実験動物の成長および免疫機能に悪影響を及ぼす。競合的酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) を用いて、25mg/kg 体重の毒素を経口投与した若年成体 B6C3F1 雄マウスの組織中の DON の分布および除去の速度論を測定した。DON は血漿、肝臓、脾臓および脳中で 5 分から 24 時間、心臓および腎臓中で 5 分から 8 時間まで検出可能であった。最高 DON 血漿濃度は投与後 5-15 分 ( $12 \mu\text{g/mL}$ ) で観測された。2 成分速度論 ( $t_{1/2} \alpha = 20.4$  分、 $t_{1/2} \beta = 11.8$  時間) に従う急速な除去があり、8 時間後および 24 時間後に最大血漿 DON 濃度の 5% および 2% がそれぞれ残存した。他の組織中の DON 分布および除去速度論は、血漿の場合と同様であった。5 分における  $\mu\text{g/g}$  で表した DON 濃度は、肝臓中  $19.5 \pm 1.9$ 、腎臓中  $7.6 \pm 0.5$ 、脾臓中  $7.3 \pm 0.8$ 、心臓中  $6.8 \pm 0.9$  および脳中  $0.8 \pm 0.1$  であった。ELISA による組織中 DON の回収率は、 $^3\text{H-DON}$  および 25mg/kg 体重 DON 用量を使用した以前の研究と同程度であった。さらに、ELISA は食餌によってこの毒素に曝露されたマウスの血漿中の DON の検出に適用可能であった。この手法は、用量、種、齢、性別、遺伝的背景および曝露の経路／持続期間が DON 摂取および除去にどのように影響するかという齧歯類における関連する疑問に答えるために用いることができる簡単な戦略を提供する。

## デオキシニバレノール：ヒトに対する毒物学および潜在的な影響

デオキシニバレノール (DON) は世界中で穀類系食品を普通に汚染するマイコトキシンである。分子レベルで、DON はリボソームへ結合して蛋白質合成を阻害することによって、ならびに増殖、分化およびアポトーシスに関連する情報伝達に関する重要な細胞キナーゼを賦活することによって、正常な細胞機能を攪乱する。毒性に関して顕著な種間差があり、ブタが DON に対して最も敏感で、続いて齧歯類>犬>猫>鶏>反芻動物である。低レベルの DON 曝露に最も敏感な生理パラメータは催吐薬応答であり、豚および犬ではわずか 0.05～0.1mg/kg 体重 (bw) でも嘔吐を誘発する。中国での疫学調査によると DON はヒトでも催吐効果をもたらし得ると示唆される。慢性効果に関しては、動物の成長（食欲不振および栄養効率低下）、免疫機能（亢進および抑制）および生殖（一腹仔数減少）も DON の悪影響を受けるが、新生組織形成の発生は影響されない。既存の慢性毒性データと、食品中の人為添加物／汚染物に使用される標準安全係数とを用いて災害評価を行い、1～5 μg/kg 体重の範囲の許容 1 日摂取量 (TDI) を得た。DON の潜在的な健康影響に関してデータギャップがなお存在すると考えると、本マイコトキシンの健康悪影響の評価能力を改善するためにさらに研究が必要である。今後の DON 研究にとって重要な分野は、毒性の根底にある分子機構、他の種と比較したヒト細胞／組織の感受性、靈長類における催吐効果、ヒトにおける胃腸炎および慢性疾患との疫学的関連、ならびに世界中の穀類の監視を含む。

デオキシニバレノールによる Jurkat ヒト T 細胞中のアポトーシス  
およびサイトカイン産生の誘導：マイトジエン活性化蛋白質キナーゼの役割および他の 8-ケトトリコテセン類との比較

Jurkat T 細胞系統を用いてデオキシニバレノール (DON) および関連 8-ケトトリコテセン類のヒト免疫機能に及ぼす潜在的影響を調べた。DON (250-1000ng/ml) は Jurkat 細胞でカスパーゼ-3 およびアポトーシスを迅速に誘導した。DON (62.5-500ng/ml) は、ホルボールミリストアセタートおよびイオノマイシンによる前刺激の後の IL-2 および IL-8 産生も有意に上方調節した。DON は、p38、JNK 1/2、および ERK2 のリン酸化を著しく誘導した。p38 の特異的阻害剤 SB203580 は DON 誘発アポトーシスを減少させた。ERK 活性を遮断する MEK1 阻害剤 PD98059 は DON 誘起アポトーシスに対して小さな阻害効果しかなく、一方 JNK 阻害剤 SP600125 は効果がなかった。p38 を阻害すると IL-2 の DON 誘発上方調節は軽減したが、3 つの MAPK 阻害剤はすべて IL-8 上方調節を抑制した。DON の効果を他の 8-ケトトリコテセン類と比較すると、それぞれ、50%アポトーシスをもたらす DON、3-アセチルデオキシニバレノール (3-ADON)、15-アセチルデオキシニバレノール (15-ADON)、ニバレノール (NIV) およびフサレノン X (FX) の濃度はそれぞれ 0.6、0.5、0.5、0.5 および  $7.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  であった。IL-2 上方調節に関して FX は抑制性であったが、3-ADON、15-ADON および NIV は 62.5-500ng/ml の濃度で効果がなかった。対照的に、15-ADON は 62.5-500ng/ml で、3-ADON は 625-5000ng/ml で IL-8 産生を上方調節したが、FX および NIV は効果がなかった。総合すると、これらのデータは、アポトーシスおよびサイトカイン産生に及ぼす DON の効果が MAPK により異なる調節を受けていていることを示唆する。DON はアポトーシスを誘導し、IL-8 産生を増強する能力を他の 8-ケトトリコテセン類と共有するが、IL-2 を上方調節するその能力は独自のようであった。

## 腫瘍壞死因子 1 型および 2 型受容体の欠乏がトリコテセン系ボミトキシンに曝露されたマウスの食欲不振、成長および IgA 調節異常に及ぼす影響

トリコテセン系マイコトキシンであるボミトキシン (VT) への飼料を通じたマウス曝露は食欲不振および成長障害を引き起こすほか、ヒト IgA 腎症に似た血清中 IgA 上昇および腎メサンギウム IgA 沈着を誘導する。in vivo および in vitro VT 曝露によって TNF- $\alpha$  が誘導されるという観察知見に基づき、このサイトカインがこの毒素の栄養学的および免疫学的作用に関与するという仮説が立てられた。この仮説を試験するため、既知の 2 種類の TNF- $\alpha$  細胞表面受容体 TNFR1 (p55) または TNFR2 (p75) の遺伝子が標的破壊されているホモ接合マウスと、正常な受容体機能を有するそれらの C57BL/6J 野生型 (WT) マウスとで、飼料 VT が摂餌量、体重増加率、血清中 IgA レベル、および腎メサンギウム IgA 沈着に及ぼす影響を比較した。VT は TNFR1 ノックアウト (KO) マウスおよび TNFR2-KO マウスにおいて 12 週間の給餌期間にわたり拒食または体重増加低下を引き起こし、WT マウスにおける作用に比べてその作用が劣ることはなかった。VT を摂取した WT マウスおよび TNFR-KO マウスの両方で飼料変換効率が低下 ( $P<0.05$ ) したが、驚いたことに TNFR1-KO および TNFR2-KO マウスでは対照飼料摂取か VT 飼料摂取かにかかわらず、対応する WT マウスに比べて飼料変換効率が有意に高かった ( $P<0.05$ )。VT を摂取した 3 群すべてのマウスにおいて 12 週までに血清中 IgA 濃度が対応する対照飼料摂取マウスよりも有意に上昇した ( $P<0.05$ )。VT 摂取 TNFR1-KO 群の 4、8 および 12 週における血清中 IgA レベルが VT 摂取 WT マウスより有意に低かった ( $P<0.05$ ) のに対し、TNFR2-KO 群と WT 群の間にこのパラメータにおける差は認められなかった。第 12 週に血清中 IgA 免疫複合体濃度が測定され、IgA と同一パターンを示すことが判明した。12 週間 VT 摂取した TNFR2-KO マウスおよび WT マウスの腎臓には、対照に比べて有意に多くのメサンギウム IgA 沈着があった。VT 摂取 TNFR1-KO マウスにもメサンギウム IgA 沈着のわずかな増加が認められたが、そのレベルは VT を摂取した TNFR2-KO マウスおよび WT マウスよりも有意に低かった ( $P<0.05$ )。データを総合すると、VT による食欲不振および成長抑制は TNF- $\alpha$  にほとんど依存せず、IgA 産生の VT による調節障害は TNF- $\alpha$  と TNFR1 との相互作用に一部依存することを示唆する。

## 食用魚油はマウスにおける実験的免疫グロブリン A 腎症を抑制する

食用魚油 (FO) 摂取は、世界中で最も一般的な糸球体腎炎である免疫グロブリン (Ig) A 腎症 (IgAN) 患者における腎疾患進行を遅らせると報告されている。マイコトキシンであるボミトキシン (VT) で IgAN 初期の免疫病理学的特徴を誘導した実験マウスモデルを使った 2 つの試験において、FO 摂取によるこの疾患の緩和効果を評価した。試験 1 では、トウモロコシ油 (CO) 50g/kg、CO 50g/kg+tert ブチルヒドロヒドロキノン (TBHQ) 9mg/kg、または TBHQ を 200mg/kg 含む CO 5g/kg+ニシン FO 45g/kg を含む AIN-76A 飼料を 12 週間与えたマウスにおいて、VT の IgAN 誘導能を評価した。VT+CO 摂取群では、CO 摂取対照群に比べて血清中 IgA、血清中 IgA 免疫複合体および腎メサンギウム IgA 沈着が多く、VT+FO 摂取群のこれら 3 つの測定値は有意に低かった。TBHQ にも減弱効果はあったが、VT+FO 群で認められた効果よりも有意に小さかった。試験 2 では、CO 70g/kg または CO 10g/kg+FO 60g/kg を含む修飾 AIN 93G 飼料の 20 週間摂取が VT 誘導 IgAN に及ぼす影響を比較した。ここでもやはり FO 摂取は 3 つの免疫病理学的評価項目すべてを軽減した。さらに VT+FO 群由来培養脾臓細胞による IgA 産生量は VT+CO 群由来培養細胞よりも顕著に少なかった。総合するとこれらの結果は、FO を含む食事によって VT 誘導 IgAN の早期免疫病理形成が抑制される可能性があり、これは抗酸化剤 TBHQ の存在に全く無関係であることを示唆した。

## 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。

## デオキシニバレノール (DON) 汚染飼料の摂取はワクチン免疫応答を変化させる

いくつかの *Fusarium* 種によって産生されるマイコトキシンであるデオキシニバレノール (DON) は、穀類の高頻度汚染物質である。この毒素は免疫機能を変調することが知られているが、数少ない研究がワクチン免疫応答に及ぼす DON の効果を検討したにすぎない。本実験では、24 頭のブタに対照飼料または 2.2-2.5mg DON/kg 飼料で自然汚染した飼料のどちらかを 9 週間給餌した。実験の第 4 日および第 15 日にこれらの動物をオボアルブミンで皮下免疫化した。DON 汚染食餌の消費は血液学的および生化学血液パラメータにはあまり影響しない。これに対して DON の摂取はブタの全体的および特異的な免疫応答に有意に影響する。DON は血清中の IgA 全濃度を増加させ、DON はワクチン化動物中のオボアルブミン特異的 IgA および IgG の濃度も増加させる。DON は分裂刺激後のリンパ球増殖を変調しないが、この毒素は抗原刺激後のリンパ球増殖に対して二相性効果（第 21 日における上方調節および第 35-49 日における下方調節）を有していた。サイトカインは免疫において鍵となる役割を演じるので、実験終了時にこれらの動物の脾臓、回腸および腸間膜リンパ節中の TGF- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-4 および IL-6 の発現レベルを RT-PCR によって測定した。DON を給餌された動物の腸間膜リンパ節中に、対照仔ブタと比べて著しく低い TGF- $\beta$  および IFN- $\gamma$  mRNA 発現レベルが観測される。総合すると、著者等のデータは、DON がワクチン免疫応答を変化させることを示す。これらの結果は、ワクチン免疫の破壊によって適切なワクチン化集団であっても疾病の発症がもたらされ得ることから、DON 汚染食品または飼料を消費するヒトおよび動物にとって意味があるかもしれない。

収穫コムギの不適切な貯蔵中にマイコトキシン產生真菌 (*Fusarium*,  
*Aspergillus*, *Penicillium*) がグルテン蛋白質に及ぼす影響および  
圃場菌と貯蔵菌との競合的相互作用

*Aspergillus* 属、*Penicillium* 属および *Fusarium* 属ならびにそれらのマイコトキシンであるオクラトキシン A (OTA) やデオキシニバレノール (DON) などに汚染された穀類はヒトおよび動物にとってリスクであるだけでなく、加工性や製パン性が低下する可能性もある。In situ X 線吸収端近傍構造分析 (XANES) および製パン試験にて貯蔵が不適切なコムギサンプルを調べ、これらの菌属がグルテン低分子 (LMW) サブユニットの硫黄スペシェーションに及ぼす影響を明らかにした。*Fusarium* 属の圃場菌はコムギグルテン蛋白質の硫黄スペシェーションおよび製パン特性の両方にほとんど影響しないが、*Aspergillus* 属および *Penidillium* 属の貯蔵菌は直接的な影響を及ぼす。グルテンネットワークにおけるチオール/ジスルフィド交換反応に利用できないスルホン酸状態の硫黄量増加が認められ、焼きあがり体積が大きく減る結果になった。コムギの不適切な貯蔵中に起る真菌叢組成の変化およびマイコトキシン含有量から、コムギの（不適切な）貯蔵中の真菌叢の発達およびマイコトキシン濃度には微生物の競合的な相互作用が重要な役割を果たすと結論づけられる。

## ブタ顆粒膜細胞によるステロイド産生に及ぼす Fusarium マイコトキシンの効果

トリコテセン類およびゼアラレノンなどの *Fusarium* マイコトキシンは普通の穀物および食品汚染物質である。デオキシニバレノール (DON) のようなこれらのあるものはブタの妊娠成立に悪影響を及ぼすが、DON、ゼアラレノンおよびその主代謝産物  $\alpha$ -ゼアラレノール (ZEA) の直接卵巣効果に関する証拠は乏しい。ブタ顆粒膜細胞 (GC) 増殖、ステロイド産生および遺伝子発現に及ぼす DON および ZEA の 2 マイコトキシンの効果を評価するために、小瀧胞 (1.5mm) 由来のブタ GC を 5% ウシ胎児血清および 5% ブタ血清含有培地中に 2 日間、続いて対照 (マイコトキシンなし) またはマイコトキシン (種々の用量／組み合わせ) を含む無血清培地中で 2 日間培養した。DON と ZEA との双方が IGF-I 誘発エストラジオール産生に対して二相効果を有し、小用量ではエストラジオール産生を増加させ、大用量では阻害した。ZEA は 3000ng/ml (9.37  $\mu$ M) で IGF-I 誘発プロゲステロン産生を増加させ、30ng/mL (0.0937  $\mu$ M) および 300ng/ml (0.937  $\mu$ M) では効果がなかったが、これら用量の ZEA は FSH 誘発プロゲステロン産生を増加させた。ZEA は 3000ng/ml で FSH プラス IGF-I 誘発 CYP19A1 および CYP11A1 mRNA 産生を阻害した。DON は 100ng/ml (0.337  $\mu$ M) および 1000ng/ml (3.37  $\mu$ M) でプロゲステロン産生を阻害したが、10ng/ml (0.0337  $\mu$ M) では効果がなかった。DON は 1000ng/mL (しかし 10ng/mL は否) で FSH プラス IGF-I 誘発 CYP19A1 および CYP11A1 mRNA 産生を完全阻害した。ZEA の同時処理は DON に対する用量応答にほとんど効果がなかった。DON は 10 および 100ng/mL で IGF-I 誘発細胞数を増加させ、1000ng/mL で細胞数を抑制したが、ZEA は GC 数に対して効果がなかった。DON と ZEA との複合処理だけが血清誘発性細胞増殖を増加させた。結論として、マイコトキシンには GC 増殖、ステロイド産生および遺伝子発現に対する直接的な用量依存効果がある。これらの直接卵巣効果は、飼料中の汚染性 *Fusarium* マイコトキシンがブタの生殖成績に影響を及ぼし得る一つの機序である可能性がある。

## *Fusarium*マイコトキシンに自然汚染された穀類のブレンド飼料が訓練ウマの摂餌量、代謝、および運動能力指標に及ぼす影響

*Fusarium*マイコトキシンで自然汚染された穀類の配合飼料を成熟した訓練ウマに与えたときの影響を調べ、*Fusarium*マイコトキシン症予防における高分子グルコマンナンマイコトキシン吸着剤（GM ポリマー）の効果を試験する実験を行った。平均体重 530kg の成熟した雑種雌性ウマ 6 頭を、反復  $3 \times 3$  ラテン方格デザインで 3 種類の飼料の各 21 日間摂取に割り付けた。濃縮飼料 3.5kg までとオオアワガエリ/アルファルファ干草 5.0kg を混ぜた飼料を毎日与えた（給餌ベース）。濃縮飼料は 1) 対照、2) 汚染穀類のブレンド、および 3) 汚染穀類+0.2% GM ポリマー (MTB-100, Alltech Inc., Nicholasville, KY) の 3 種類であった。汚染穀類はデオキシニバレノールを平均 11.0 ppm、15-アセチルデオキシニバレノールを 0.7 ppm、ゼアラレノンを 0.8 ppm 含んでいた（給餌ベース）。21 日間にわたって摂餌量および体重をモニターした。実験期間中、決まった訓練スケジュールを維持した。実験終了時には各ウマについて疲労までの時間を調べるトレッドミルステップテストを実施した。テスト前、テストの各ステップ、ならびにテスト 5 および 10 分後の測定で 1) 疲労までの時間、2) 心拍数、3) 血液学的検査項目、および 4) 血清中乳酸濃度を調べた。傾斜 2% の増加を伴う速足 2 分が 1 ステップで、次のステップまでの間隔を 2 分とした。汚染穀類が与えられたウマでは、実験期間を通じて対照よりも摂餌量が減少した ( $P < 0.05$ )。汚染飼料への 0.2% GM ポリマー添加は、ポリマー無添加汚染飼料と比べてウマの摂餌量を変化させなかった。濃縮飼料の種類にかかわらず、乾草はすべて摂取された。汚染穀類群では対照群と比較して 0 日から 21 日までの体重減少が認められた ( $P < 0.05$ )。運動能力の測定に使用した項目に飼料の影響は認められず、結果は健康なウマに予想される運動時の反応を示した。食欲抑制および体重減少が示すように、訓練ウマは *Fusarium*マイコトキシン症に対して敏感である。

*Fusarium*マイコトキシンに自然汚染された穀類のブレンド飼料がウマの摂餌量、血清化学、および血液学に及ぼす影響、ならびに高分子グルコマンナンマイコトキシン吸着剤の効果

*Fusarium*マイコトキシン汚染穀類の給餌はブタおよび家禽の飼育成績に悪影響を及ぼす。しかしそうしたマイコトキシン汚染穀類の給餌がウマの飼育成績に及ぼす悪影響についてはほとんど情報がない。*Fusarium*マイコトキシンに自然汚染された穀類のブレンド飼料がウマの摂餌量、血清中免疫グロブリン(Ig)濃度、血清化学、および血液学に及ぼす影響を調べる実験を行った。高分子グルコマンナンマイコトキシン吸着剤(GMポリマー)の*Fusarium*マイコトキシン症予防効果も試験した。訓練を受けていない軽量の成熟した雑種雌性ウマ9頭を3種類の飼料のいずれかの21日間摂取に無作為に割り付けた。14日間のウォッショアウト期をおいてからそれらのウマを再び無作為に割り付けて、同じ実験を繰り返した。濃縮飼料2.8kgまでとオオアワガエリ/アルファルファ干草5kgを混ぜた飼料を毎日与えた。濃縮飼料は1)対照、2)汚染穀類のブレンド(汚染コムギ36%、汚染トウモロコシ53%)、および3)汚染穀類+0.2%GMポリマーの3種類であった。汚染穀類はデオキシニバレノールを平均15.0ppm、15-アセチルデオキシニバレノールを0.8ppm、フザリン酸を9.7ppm、ゼアラレノンを2.0ppm含んでいた。実験期間を通して、汚染穀類を与えたウマすべてで対照に比べて摂餌量が減少した( $P<0.001$ )。汚染飼料への0.2%GMポリマー添加は、ポリマー無添加汚染飼料と比べてウマの摂餌量を増やした( $P=0.004$ )。汚染穀類含有飼料を与えたウマの第7日および第14日における血清中 $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ活性は対照飼料を与えたウマより高かった( $P=0.047$ および0.027)が、第21日には差がなかった( $P=0.273$ )。汚染飼料への0.2%GMポリマー添加は、ポリマー無添加汚染飼料と比べて第7日および第14日における血清中 $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ活性を低下させた( $P<0.05$ )。他の血液学検査項目ならびに血清中のIgM、IgG、およびIgAを含む血清化学検査項目に飼料の影響はなかった。*Fusarium*マイコトキシンで自然汚染された穀類の飼料は摂餌量の減少および血清中ガンマグルタミルトランスフェラーゼ活性の変化を引き起こすと結論づけられた。GMポリマーの添加はマイコトキシンによるこうした有害作用を予防した。

## いくつかの主要なマイコトキシンとそれによるマイコトキシン症

### - 総説

マイコトキシンは農耕が始まった時期から存在していたと思われるが、こうした真菌代謝物の化学的特性が判明したのは最近のことである。その存在は死海文書に書かれた時期にまでさかのぼると考えられる歴史的な証拠が存在する。昔からそれらが周期的に発生していた証拠が存在し、それは1960年初期にアフラトキシンが認識されるまで続いた。当時マイコトキシンは、穀類におけるかびの発生とそれらの副次的な代謝産物の产生を許す一種の貯蔵現象と考えられ、ヒトおよび他の動物がこの代謝産物を摂取すると毒性を發揮することが明らかになった。その後、ある種のアフラトキシンおよびマイコトキシンが畑で作物が生長する間に形成されることがわかった。既知の多くのマイコトキシンの中でどれが重要なのは、それらによる疾患の発生頻度および/または程度に基づいて判断でき、これは発癌性が明らかになっているマイコトキシンに特にあてはまる。こうした主要なグループに属するマイコトキシンは、アフラトキシン、デオキシニバレノール、フモニシン、ゼアラレノン、T-2 毒素、オクラトキシンおよびある種の麦角アルカロイドであろう。これらのマイコトキシンによって引き起こされる疾患（マイコトキシン症）は多岐にわたり、ヒトを含む感受性の高いさまざまな動物種を侵す。こうした疾患の大部分は、マイコトキシンに汚染された穀類やこうした穀類を原料とする食品の摂取後に発生するが、別の曝露経路も存在する。別の原因によって引き起こされる疾患と症状が似ているため、マイコトキシン症の診断は困難な場合がある。したがってマイコトキシン症の診断には、サンプル採取、サンプル調製および分析を含む適切なマイコトキシン検査が欠かせない。

## 核細胞に対するトリコテセン系マイコトキシンの作用：総説

穀類に付く病原性の *Fusarium* 属真菌が種特異的および時には分離株特異的に作り出すトリコテセン系マイコトキシン生合成経路の主要産物には T-2 毒素、ジアセトキシルペノール、デオキシノバレノール、ニバレノールがある。この論文では、こうしたトリコテセンの主な作用を表出形態、細胞学、真核細胞内の分子シグナル伝達の観点から簡潔に総説する。一部のトリコテセンが動物にもたらす主な毒性作用は、成長遅滞、卵巣機能の低下および生殖障害、免疫低下、拒食および嘔吐である。デオキシニバレノールの植物毒性作用は、成長遅滞ならびに播種および緑色植物再生の阻害に集約できる。トリコテセンは現在、真核細胞に対して蛋白質、DNA および RNA の合成阻害、ミトコンドリア機能の阻害、細胞分裂への作用および膜への作用などたくさんの阻害作用を持つと認識されている。動物細胞では、プログラムされた細胞死反応であるアポトーシスを誘導する。トリコテセンによって活性化される真核生物のシグナル変換カスケードおよび下流遺伝子産物に関する情報はまだ限られており、特に植物細胞についての情報は少ない。ある種のトリコテセンは哺乳動物細胞において ribotoxic ストレス応答を惹起し、分裂因子活性化蛋白質キナーゼを活性化する。DON は特異的転写因子の結合活性の調節およびその後のサイトカイン遺伝子発現誘導を通じて炎症応答を仲介する。コムギのいくつかの遺伝子はトリコテセン系マイコトキシンに反応して上方調節されるが、トリコテセンに対する宿主応答におけるこうした遺伝子の意義はまだ解明されていない。

## 健康リスク評価における免疫化学的方法：マイコトキシンデオキシニバレノールに対する抗体のデオキシニバレノール-3-グルコシドとの交差反応性

デオキシニバレノール (DON) と、他の DON 誘導体／代謝物ならびにゼアラレノン、ニバレノール、及び他のマイコトキシン（例：フモニシン類）を含む他の *Fusarium* 毒素、とが同時に存在することが食品および飼料中で高頻度に観測される。DON-3 $\beta$ -グルコピラノシド (DON-3-グルコシド) が小麦中の DON の解毒産物として記載された。このマイコトキシン抱合物はトウモロコシ、大麦、モルト、ビールおよび麦芽汁中で観測された。この抱合体の腸管中の消化は依然不明であるが、加水分解後に DON を放出する可能性によって、マスクされた潜在的マイコトキシンとみなされる。DON はさまざまな方法によって分析定量され、免疫化学的方法が用いられることがある。市販 ELISA キット中で用いられる抗 DON 抗体の DON-3-グルコシドとの特異性に関する入手可能な情報はない。

ELISA キット RIDASCREEN (商標登録) DON (独、R-Biopharm AG) で用いられている抗 DON モノクローナル抗体の予備試験によって、これらの抗体が DON-3-グルコシドと高い相対交差反応性を有するという仮説が認められた。2つの反復試験において、82 および 98% の交差反応が観測された。これらの ELISA キットによって得られた分析結果は、両方のマイコトキシンの近似和と解釈することができる。記載された交差反応性は DON 濃度の過大評価を生じる可能性がある。

これらの交差反応があるものの、免疫化学的方法は定量的スクリーニングにとって、さらには妥当な定量下限 (<50 ppb) を有する別の分析法が用いられない実際的または経済的理由がある状況では、初期曝露評価にとってさえ依然価値があると言える。

## 食品関連製品の潜在肝毒性スクリーニングのモデルとしての培養ラット肝臓クローン-9 細胞：デオキシニバレノールの肝毒性

デオキシニバレノール (DON) は、いくつかの穀物中に見いだされるマイコトキシン食品汚染物である。DON の *in vivo* 肝毒性に関する文献は矛盾し、DON の肝毒作用を明確に特性化していない。培養ラット肝臓クローン-9 細胞を DON の潜在肝毒性を評価するモデルとして用いた。96 穴プレートに接種した細胞培養物をコンフルエンス時に種々の濃度 ( $0\text{--}100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) の DON とともに 5% CO<sub>2</sub> 中 37°Cで 48 時間処理した。処理期間後、細胞毒性、二本鎖 DNA (ds-DNA) 含量、酸化ストレスおよびミトコンドリア機能を含む複数の肝毒性評価項目について細胞を評価した。0.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  で始まる測定濃度範囲全体にわたって、細胞毒性および ds-DNA 含量によって測定される DON の濃度依存的毒性が観測された。DON は 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  で始まる DON 濃度で、有意な酸化ストレスの濃度依存性増加も誘導した。処理した細胞のミトコンドリア機能は、DON 曝露濃度の増加とともに低下したが、対照値の場合と統計的な差がなかった。成体雄ラットへの DON の単回腹腔内投与 (10mg kg<sup>-1</sup> 体重) の後 3、24 および 72 時間に観測した肝臓組織病理は、初期の軽度肝毒性と一致する。本研究の総合的な結果は、急性 DON 曝露が *in vivo* で肝細胞に対して軽度の早期細胞毒性効果を有し、この効果は、*in vitro* ラット肝臓クローン-9 細胞では重度の効果として現れることを示唆する。

v-Ha-ras- トランスフェクト BALB/3T3 細胞 (Bhas 42 細胞) を使つ  
た短期形質転換アッセイにおける *Fusarium* 由来マイコトキシンお  
よび類縁物質の活性

BALB/3T3 細胞を使った細胞形質転換アッセイで、実験動物における化学発癌の 2 段階プロセスを模すことができる。Ohmori et al. によって開発され、Asada et al. によって一部変更が加えられた v-Ha-ras- トランスフェクト BALB/3T3 細胞 (Bhas 42 細胞) における短期形質転換アッセイは、プロトコールに基づく差を利用して腫瘍イニシエーターおよびプロモーターの両方をそれぞれ形質転換のイニシエーターおよびプロモーターとして検出するとされている。我々はこの新しい短期アッセイにおいて、*Fusarium* 由来マイコトキシンおよび類縁物質の形質転換イニシエーション活性およびプロモーション活性を調べた。被験物質はデオキシニバレノール、ニバレノール、フザレノン-X、T-2 毒素、フモニシン B<sub>1</sub>、フモニシン B<sub>2</sub>、ゼアラレノン、 $\alpha$ -ゼアララノール、 $\beta$ -ゼアララノール、 $\alpha$ -ゼアラレノールおよび  $\beta$ -ゼアラレノールであった。フモニシン B<sub>1</sub> および T-2 毒素はこのアッセイでプロモーション活性陽性であった。特に T-2 毒素は 0.001 ~ 0.002  $\mu$ g/mL という低い培地中濃度で活性であった。今回の試験結果および発表されている発癌性アッセイデータとの比較から、Bhas 42 細胞形質転換アッセイは実験動物を使って腫瘍プロモーション活性を推定する 2 段階発癌性試験と良好な相関を示すと予想された。

## 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。

## 陰膳方式を利用した質量分析検出を伴う毛細管ガスクロマトグラフ イーによる幼児食中のトリコテセン定量

トリコテセンは主に *Fusarium* 菌属のいくつかの真菌によって產生されるマイコトキシンで、ヒトおよび動物が摂取する広範囲の穀類を汚染する。これらは拒食、嘔吐および免疫毒性作用など、動物およびヒトにおけるさまざまな健康被害を引き起こす。質量分析検出を伴う毛細管ガスクロマトグラフィーに基づいたトリコテセン定量法を開発し、陰膳方式に基づき、幼児食に含まれる 9 種類のトリコテセンの定量について組織内バリデーションを実施した。水/エタノール (90/10) で試料マトリクスからトリコテセンを抽出した。抽出物を ChemElut®カラムおよび Mycosep®カラムで精製した、精製抽出物を蒸発によって乾燥させ、室温でトリメチルシリルエーテルに誘導体化した。残滓をイソ-オクタンに溶かし、水で洗った。最終抽出物に含まれるトリコテセンを GC-MS で定量した。反応は調べた範囲内 ( $1\sim10 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) で線形を示した。トリコテセンの回収率は 70~111%であったが、ニバレノールは例外で、回収率が低かった (34%)。どのトリコテセンについても、定量限界は  $0.4 \mu\text{g kg}^{-1}$  未満であった。陰膳試験で 74 世帯から集めた 74 幼児食サンプルを使い、開発されたこの方法でトリコテセン量を調べた。デオキシニバレノール、ニバレノール、HT-2 毒素、T-2 毒素の平均レベルはそれぞれ 5.8、0.3、0.3 および  $0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$  であった。それぞれの結果を利用して摂取量を算出した。デオキシニバレノールについては、9 世帯の値が耐容 1 日摂取量  $1 \mu\text{g kg}^{-1}\text{b. w.}$  を上回った。T-2 毒素および HT-2 毒素複合摂取の暫定的な耐容 1 日摂取量は  $0.06 \text{g kg}^{-1}\text{b. w.}$  で、9 世帯の値がこれを上回った。

## SCOOP 課題 3.2.10 報告「食物中の Fusarium 毒素の発生データの収集および EU 加盟国の住民による食事摂取の評価」

### 副課題：トリコテセン類

2001 年に SCOOP(SCOOP: Scientific Co-operation on Questions relating to Food) 課題 3.2.10 「食物中の Fusarium 毒素の発生データの収集および EU 加盟国の住民による食事摂取の評価」が開設された。当課題は 3 つの副課題（ゼアラレノン、フモニシン類およびトリコテセン類）に分かれた。

オランダが幹事国である副課題トリコテセン類の結果を提示する。

さまざまな食物および食物原材料中の 12 の異なるトリコテセン類（デオキシニバレノール（DON）、ニバレノール（NIV）、3 および 15 アセチル-デオキシニバレノール（3/15-AcDON）、フサレノン-X（FUS-X）、T-2 および HT-2 トキシン、T2-トリオール、ジアセトキシシルペノール（DAS）、ネオソラニオール（NEOSOL）、モノアセトキシシルペノール（MAS）およびベルカラール（VOL））の発生に関する約 35,000 件の結果を 12ヶ国から受け取った。

本論文には DON、NIV、T-2 および HT-2 トキシンの結果だけを含めた。データのほとんどがこれらの毒素に関するものであり、食品科学委員会 (the Scientific Committee for Food) がこれらのトリコテセン類についてだけ（暫定）許容 1 日摂取量 (t-TDI) を設定しているからである。

**発生データ：**今までのところ発生データのほとんどは小麦中の DON について得られている。穀類中ではトウモロコシがトリコテセン類による汚染の最も高いレベルを示した。

**消費データ：**国によっては消費データがはなはだしく不足している。特に、全体として乳児食品および幼児食品に関する情報が入手できない。

**摂取データ：**小麦および小麦を含む製品（パンおよびパスタ等）が上記 4 つのトリコテセン類の主要摂取源の代表である。

DON の平均摂取量は TDI 未満であるが、幼児群については平均摂取量がときに TDI に（非常に）近い。

DON について高摂取量レベルを TDI と比較すると、特に幼児群については摂取量のほとんどが TDI を超えていることが明らかである。

NIV については、（平均および高レベル）摂取量は TDI よりはるかに低い。

T-2 および HT-2 トキシン摂取量をまとめると、ほとんどの場合（平均レベル摂取量でも高レベル摂取量でも）t-TDI より高い。

## *Fusarium* 毒素汚染コムギおよび飼料摂取量が乳牛におけるゼアラレノンの代謝および持ち越しに及ぼす影響について

今回の試験目的は、*Fusarium* 毒素汚染コムギ摂取が乳牛におけるゼアラレノン (ZON) およびその代謝物の代謝および持ち越しに及ぼす影響を異なる摂餌量ごとに調べることであった。第一胃および十二指腸にろう孔を設けた乳牛 14 頭を使用した。非汚染コムギ(乾重量 1kgあたりデオキシニバレノール(DON) 0.25mg、ZON 51 μg を含む)を与える対照期、*Fusarium* 毒素汚染コムギ(乾重量 1kgあたり DON 8.21mg、ZON 91 μg を含む)を与えるマイコトキシン期からなる実験を行った。コムギは乾重量ベースで 1 日に与える濃縮飼料の約 55%を占めた。トウモロコシサイレージと牧草サイレージ(50:50)も与え、そのトウモロコシは乾重量 1kgあたり ZON 62 μg を含んでいた。給餌量をそれぞれのウシの最新の給餌量に調整した。十二指腸において、親化合物 ZON のほかに ZON 代謝物である α-ゼアラレノール (α-ZOL) および β-ゼアラレノール (β-ZOL) が回収された。摂取された ZON の ZON+α-ZOL+β-ZOL としての十二指腸における回収率は 19~247%であった。十二指腸における ZON+α-ZOL+β-ZOL 流中の ZON 割合(29~99%)が ZON 摂取量の増加に伴って有意に増加したのに対し、β-ZOL 割合(57%まで)は有意に減少した。一方、糞中の ZON(32~100%)、ZON+α-ZOL+β-ZOL 中の α-ZOL(39%まで)および β-ZOL(43%まで)は ZON 摂取量に影響されなかった。摂餌量増加に伴う第一胃における食物および毒素の滞留時間短縮が ZON の第一胃での代謝を減らしたものと思われる。ZON、α-ZOL、β-ZOL として糞中に回収される摂取 ZON の回収率が ZON 摂取量の変化にもかかわらず比較的安定していたことは、腸内細菌によって ZON がさらに減ることを示唆すると思われる。さらに、1 日の ZON 摂取量および摂取飼料乾重量がそれぞれ 75~1125 μg および 5.6~20.5 kg day<sup>-1</sup>、乳量(脂肪補正乳量、FCM)が 10~42 kg day<sup>-1</sup>ときに乳汁に含まれる ZON およびその代謝物は検出限界を下回った。

## フザリウム毒汚染コムギおよび飼料摂取量が乳牛におけるデオキシニバレノールの生体内変換および移行に及ぼす影響

さまざまな飼料摂取量でのフザリウム毒汚染コムギ（乾物 1 kg 当たりデオキシニバレノール (DON) 8.21 mg、ゼアラレノン (ZON) 0.09 mg）の給餌が乳牛における DON の生体内変換および移行に及ぼす影響を検討する目的で試験を実施した。この目的のために、第一胃および十二指腸の瘻孔を形成した乳牛 14 頭に対して、濃厚飼料 60%（コムギ部分 55%）を含有する飼料を給餌した（フザリウム毒汚染コムギ（マイコトキシン期）または対照コムギ（対照期））。飼料はトウモロコシと牧草サイレージ（乾物ベースで 50 : 50 の割合）で完成させた。マイコトキシン期の DON 1 日摂取量は、乾物摂取量が 5.6~20.5 kg の場合、16.6~75.6 mg の範囲であった。DON/飼料の摂取量にかかわらず、DON はほぼ完全に（94%~99%）デエポキシ DON に生体内変換され、フザリウム毒汚染コムギを給餌した場合、DON 摂取量に対する十二指腸での DON およびデエポキシ DON の流量は 12%~77% の範囲であった。血清検体では、デエポキシ DON はマイコトキシン期に 4~28 ng mL<sup>-1</sup> の範囲で検出されたのに対し、DON の濃度はいずれも検出限界未満であった。汚染コムギを給餌されたウシ乳中への DON およびデエポキシ DON の 1 日排泄量はそれぞれ 1~10 μg、14~104 μg の範囲であった。DON およびデエポキシ DON の乳中への 1 日排泄量と DON 摂取量の比としての総移行率は、それぞれ 0.0001~0.0002、0.0004~0.0024 の範囲であった。DON およびデエポキシ DON としての DON の乳中への総移行率は乳量の増加に伴い有意に上昇した。尿検体では、デエポキシ DON は DON と比べて優勢な物質であり、フザリウム毒汚染コムギを給餌した場合における DON とデエポキシ DON の総濃度は 96% に達したのに対し、糞中の DON とデエポキシ DON の蒸発残留物はマイコトキシン期における DON 摂取量の 2%~18% の範囲であった。デエポキシ DON のグルクロン酸抱合の程度は、血清中では約 100% であることが確認された。乳中では DON の 33%~80%、デエポキシ DON の 73%~92% がグルクロン酸抱合され、尿中では DON の 21%~92%、デエポキシ DON の 86%~100% がグルクロン酸抱合された。結論として、DON は第一胃でデエポキシ DON にきわめて急速に生体内変換され、5.6~20.5 kg day<sup>-1</sup> の乾物摂取量ならびに 10~42 kg day<sup>-1</sup> の乳量（脂肪補正乳）の範囲では、乳中に移行した DON およびデエポキシ DON の量は無視できるものであった。

## 飼料摂取量およびフザリウム毒汚染コムギがウシの血液および乳の パラメーターならびに第一胃発酵に及ぼす影響

本試験の目的は、乾物 (DM) 摂取量ならびにフザリウム毒汚染コムギの給餌が乳牛の第一胃発酵、血清化学的パラメーター、乳量に及ぼす影響と両者間に存在する可能性がある相互作用を検討することである。第一胃および十二指腸のカニューレが装着された 14 頭の乳牛の分析を行った。すべての動物に同じ飼料を給餌し、飼料の 1 日量は現時点での成績に応じて調節した。DM ベースでは、飼料はコムギ 55% (フザリウム汚染コムギ (マイコトキシン期) または対照コムギ (対照期)) を含有する濃厚飼料 60%から構成され、40%のトウモロコシおよび牧草サイレージで飼料が完成された。個々のウシに汚染コムギ (デオキシニバレノール (DON) 8.21 mg/kg DM、ゼアラレノン (ZON) 0.09 mg/kg DM) および対照コムギ (DON 0.25 mg/kg DM、ZON 51 μg /kg DM) を給餌した。予想されたように、有機物 (OM) 摂取量が多いほど各栄養素の摂取量に対する発酵性の粗栄養素の量は減少した。OM 摂取量を増加させてフザリウム毒汚染コムギを給餌した場合、対照コムギの場合と比べて、分解した粗蛋白質は増加し ( $p<0.05$ )、第一胃液中のプロピオン酸分子の割合は低下した。血清アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (ASAT,  $p<0.001$ )、グルタミン酸脱水素酵素 (GLDH,  $p<0.01$ )、 $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ ( $\gamma$ -GT,  $p<0.01$ ) の活性は OM 摂取量の増加に伴い上昇し、コムギのマイコトキシン汚染との関連は認められなかった。

## ヒト腸 Caco-2 細胞を横断するデオキシニバレノール輸送および現実的腸濃度において細胞代謝に及ぼすその効果

デオキシニバレノール (DON) はトリコテセン類ファミリーのマイコトキシンであり、DON に対するヒト曝露レベルは高いことがある。疫学調査により DON と胃腸疾患との関連が示唆されている。著者等は、DON と広くヒト腸障壁の *in vitro* モデルとして用いられている Caco-2 細胞との相互作用を検討した。DON の頂端面から側底面への輸送(吸収)および側底面から頂端面への輸送(排出)がインキュベーションの初濃度と持続時間との両方に厳密に比例することを見いだした。吸収および排出の平均速度はマンニトールの平均速度と類似し、カルシウムキレート剤 EGTA 存在下で増加した。これらのデータは、若干の受動的な経細胞拡散を除外することはできないものの、DON が密着接合部を通した傍細胞経路によって腸粘膜を通過することを示唆する。DON 輸送は、P 糖蛋白質 (PgP) にも多剤耐性関連蛋白質 (MRP) 阻害剤にも影響されなかった。DON への長期曝露はマイトジエン活性化蛋白質キナーゼ (MAPK) Erk1/2、p38 および SAPK/JNK のリン酸化、ならびに経上皮抵抗の減少を誘発し、DON が腸炎症の引き金を引くことができる事を示唆する。これらのデータは、DON 汚染食物への慢性曝露は、腸粘膜統合機能を変化させ、炎症に関係する MAPK を誘導することによって、ヒトの健康に悪影響を及ぼし得ることを暗示する。

## マウスにおけるマイコトキシン誘発性 IgA 腎症のエイコサペンタエン酸による減弱：用量反応ならびに IL-6 発現との関連性

複数の臨床試験において、ヒトの糸球体腎炎の中で最も一般的な形態である免疫グロブリン A 腎症 (IgAN) の進行は食物による (n-3) 多価不飽和脂肪酸 (PUFA) の補充によって抑制されることが明らかになっている。マウスにマイコトキシンデオキシニバレノール (DON) を給餌することによって早期 IgAN に類似した状態を再現することが可能である。本稿では、(n-3) PUFA エイコサペンタエン酸 (EPA) 摂取が DON 誘発性 IgAN に及ぼす影響を、用量依存性およびインテロイキン (IL-6) 発現との関連において評価した。この用量反応試験では、EPA 0%、0.1%、0.5%、3%を補充した 20 ppm の DON を 16 週間にわたって摂取したマウスにおいて体重増加および飼料摂取量の差は認められなかった。上位 2 つの EPA 濃度の飼料を給餌されたマウスは、脾臓 EPA、ドコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸の顕著な増加を示したのに対し、アラキドン酸は 3 つの EPA 給餌群すべてにおいて減少した。デオキシニバレノール摂取により、腎臓メサンギウムの IgA 沈着ならびに血清 IgA および IgA 免疫複合体は有意に増加しないし上昇した。EPA 3%飼料を給餌されたマウスでは 3 種類すべての IgAN マーカーの減弱が認められたが、EPA 0.1%または 0.5%飼料を給餌されたマウスでは減弱は認められなかった。対照飼料中の DON を給餌されたマウスに由来する脾臓およびペイエル板 (PP) 細胞培養において IgA 産生の増加が認められたが、EPA 0.1%、0.5%、3%を給餌されたマウスの培養では IgA 産生は減少した。DON 急性曝露によって、IgA 前駆 B 細胞の IgA 分泌への分化を促進するサイトカインである IL-6 の血清中濃度が上昇した。それに関連して、IL-6 mRNA ならびに IL-6 転写マークターである IL-6 異核 RNA の発現は脾臓および PP において増加した。EPA 3%を摂取しているマウスでは IL-6 発現を示す 3 つの指標すべてが抑制された。IL-6 の抑制は、このサイトカインの転写を調節する 2 つの因子（サイクリック AMP 応答エレメント結合蛋白質および活性化蛋白質-1）の結合活性の低下に一致していた。これらの結果は、実験的 IgAN の抑制との関連における EPA の閾値が存在すること、ならびに閾値用量は IL-6 転写の抑制に有効であることを示している。

## 選択された雄生殖評価項目に及ぼすデオキシニバレノールの効果の特徴化

ラットにおいて雄生殖機能に及ぼすデオキシニバレノール (DON) 曝露の効果を評価した。雄ラットを対照群 ( $n=15$  ラット) と 4 投与群 (DON 0.5mg/kg,  $n=15$ ; 1.0mg/kg,  $n=15$ ; 2.5mg/kg,  $n=15$  および 5.0mg/kg,  $n=16$ ) とに分け、胃挿管によって 28 日間毎日 DON に曝露した。5.0mg/kg 投与群の動物の体重増加および最終体重と、2.5mg/kg および 5.0mg/kg 投与群の動物の飼料消費量との両方が対照群と比較して有意に減少した。いずれの投与群でも水分消費量は影響されなかった。体重および脳重量グラムあたりで表した精巣上体重量および精嚢重量は対照重量と比較して 2.5 および 5.0mg/kg 投与群からの動物中で有意に減少したが、脳重量および体重グラムあたりで表した前立腺重量は 5.0mg/kg 投与群でだけ対照群より有意に低かった。ホモジエナズ抵抗性精巣精子細胞計数、精子細胞数、絶対精巣上体尾部精子数および精巣上体尾部グラムあたり精巣上体尾部精子数の統計的に有意な投与量関連減少が DON 5.0mg/kg 投与群で観測された。5.0 mg/kg 投与群の精子尾部異常 (尾部破損) は対照群中より有意に高かった。精子遊泳速度 (VSL および VCL) は 2.5 mg/kg 投与群でだけ有意に増加した。すべての処置群全体で血清 FSH および LH 濃度が投与量に依存して増加したが、血清テストステロン濃度はすべての投与群全体で投与量に関連して減少した。2.5mg/kg および 5.0mg/kg 投与群において生殖細胞変性、精子保持、および異常核形態の増加が観測された。処置関連効果は、5.0mg/kg 投与群における非腺胃の損傷、胸腺リンパ球欠乏および脾造血を含んでいた。

## 兵器としてのマイコトキシンの脅威評価：急性毒性の分子機構

マイコトキシンは戦術兵器としては実用的でないが、小規模の貧弱なテロ組織が食物や水源を汚染するために使用したり、混雑した閉鎖領域に放出したりすることができる。十分に成長させた菌培養の天然濃縮エキスや乾燥エキスは兵器として使用することが可能である。菌兵器の生産には、菌を成長させるための精巧な施設、毒素を精製するための高度の機器、高度のトレーニングを受けたスタッフは必要ない。アフラトキシンB1、フモニシンB1、オクラトキシンA、トリコテセンT-2毒素、デオキシニバレノールはバイオテロリストの用途で兵器化することが可能である。中毒症状およびマイコトキシンの生化学的作用機序に関する知識は、毒素の迅速な特定、予防的解毒剤の開発、被災者に対する有効な治療のデザインに必要である。デオキシニバレノールを除くこれらのマイコトキシンはいずれも発癌物質である (Stark, A. A., Annu. Rev. Microbiol. 34:235-262, 1980; Stark, A. A., p. 435-445, in P. S. Steyn and R. Vleggaar, ed., Mycotoxins and phycotoxins, 1986; Stark, A. A., p. 47-60, in C. L. Wilson and S. Droby, ed., Microbial food contamination, 2000; Stark, A. A., and N. Paster, p. 60-64, in M. L. Wahlqvist, A. S. Truswell, R. Smith, and P. L. Nestel, ed., Nutrition in a sustainable environment, 1994)。即時の広範囲にわたる死、疾病またはパニックがバイオテロリストの目標であることから、本稿ではマイコトキシンが急性毒性を発揮する機構を中心に論じる。

## ルーメンシミュレーション技法を用いて評価した *Fusarium* 汚染飼料に対するルーメン微生物群の多様性応答

マイコトキシン産生真菌 *Fusarium culmorum* は農業家畜における主要飼料損失の原因であるが、ルーメン生息微生物群の構造多様性に及ぼす *F. culmorum* 汚染飼料の効果は理解されていない。本研究は動物実験を避け、ルーメンシミュレーション技法 (Rusitec) を用いて実施された。定量的ポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) によって測定した細菌および古細菌の小サブユニット (SSU) rRNA 遺伝子コピー数は汚染消化飼料と非汚染消化飼料との間で差異を示さなかったが、*F. culmorum* 自体に帰することができない汚染飼料中の真菌性コピー数は  $2.3 \times 10^9 \text{ g}^{-1}$  乾燥重量と約 4 倍に増加した。PCR 増幅した部分 SSU rRNA 遺伝子の一本鎖高次構造多型プロファイルは Fibrobacterales および Clostridiales の系統発生クラスタを包含するプロファイルにおいて汚染飼料と非汚染飼料との間の単一ではあるが明らかな差異を示した。古細菌および真菌類のプロファイルにおいてもわずかな定量的差異が見られた。真菌性 rRNA 遺伝子コピー数と種々の栄養源の分解性との間に正の相関が見いだされたが、主要マイコトキシン汚染物質デオキシニバレノールの分解速度とは相関がなかった。従って、*F. culmorum* 汚染飼料に対する微生物群の多様性応答は、直接のマイコトキシン性によるものではなく、むしろ真菌によって誘発された飼料品質変化によって引き起こされた。

## ミニレビュー

### 環境中のトリコテセン：ヒトの健康との関連性

トリコテセンはヒトの健康に関連のある農業上重要なマイコトキシンである。トリコテセンを产生する能力を有する菌類は世界中で見つかり、フザリウム、ミロテシウム、スタキボトリスの特定種がこれに含まれる。これらの毒素產生種によるマイコトキシンの產生は、遺伝要因ならびに毒素產生種の成長の環境条件によって決定される。トリコテセンの環境動態はトリコテセンを解毒する能力を持つ他の微生物の影響を受けることがある。デオキシニバレノールおよび T-2 毒素は、市販食品ならびに特定の農業製品中における天然の不可避の汚染物質として検出可能なトリコテセンの例である。ヒトの疾病の歴史的な流行が高度に汚染された穀物由来の食物の摂取との関連において報告されることはまれであったが、デオキシニバレノールおよび T-2 毒素への食事性曝露の現在の推定値は実験動物試験において報告されている有害作用の閾値を下回っていた。トリコテセンの毒物動力学的特性には蛋白合成および免疫調節作用の阻害が含まれる。ヒトにおけるトリコテセンの毒物動態および毒物動力に関する情報はほとんど存在しない。食事がヒトのトリコテセン曝露の重要な原因となっていることについては一般的に合意されているものの、現在入手可能な疫学データが限られているため、食事以外の曝露経路のリスク評価は難しくなっている。

デオキシニバレノール（ボミトキシン）およびその他の 8-ケトトリコテセンによって產生される TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 のヒトマクロファージモデルにおける特異的なアップレギュレーション

デオキシニバレノール (DON またはボミトキシン) ならびに密接に関連した 4 種類の 8-ケトトリコテセンが炎症誘発性サイトカインおよびケモカインの產生に及ぼす影響をクローン性ヒトマクロファージモデルにおいて評価した。ヒトの単球様組織球性リンパ腫に相当する U-937 細胞は、フォルボール-12-ミリスチート-13-アセテート (PMA) を用いたプレインキュベーションによってマクロファージに分化した。分化したマクロファージをリポ多糖類 (LPS) の存在下または不存在下において DON で培養するとともに、炎症誘発性サイトカインであるインターロイキン 6 (IL-6) および腫瘍壞死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ならびにケモカインであるインターロイキン-8 (IL-8) について酵素結合性免疫吸着検定法 (ELISA) により上清を分析した。LPS の不存在下において、DON 500 ng/mL または 1,000 ng/mL では早くも 3 時間後に TNF- $\alpha$  產生の上方制御が認められ、6 時間後まで持続したのに対し、DON 100~1,000 ng/mL では IL-6 の產生は 3~24 時間後、IL-8 の產生は 6~48 時間後に有意に増加した。LPS 0.2  $\mu$ g/mL で同時刺激した細胞においては、DON 500 ng/mL または 1,000 ng/mL で TNF- $\alpha$  および IL-8 の產生が顕著に超誘導された。DON 100 ng/mL では LPS 誘発性の IL-6 產生は増強されたものの、DON 500 ng/mL または 1,000 ng/mL では LPS 誘発性の IL-6 反応が抑制された。他の 4 種類の 8-ケトトリコテセン (ザレノン X、ニバレノール、3-アセチル DON、15-アセチル DON) も DON とほぼ同等の濃度で TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 の產生を上方制御または抑制する能力を有していた。全体として、DON およびその他の 8-ケトトリコテセンは細胞毒性である毒素濃度でもヒトマクロファージにおける炎症誘発性のサイトカインおよびケモカインの発現を直接的に誘導および超誘導する能力を有することをこれらの結果は示唆している。

## ヒトの便を含む培養物における B 型トリコテセンの脱エポキシ化の 欠如

トリコテセンである 3-アセチルデオキシニバレノールおよびニバレノールを変換させるヒト消化管微生物の能力について検討した。ヒトの便検体を嫌気的条件下でこれらの毒素とともに 48 時間培養した。次に検体を抽出し、トリコテセンおよび代謝産物の分析を実施した。3-アセチルデオキシニバレノールは培養期間中にデオキシニバレノールに代謝された。ラット、マウス、ブタなどの他の種についての報告とは対照的に、便培養中に脱エポキシ化代謝産物は検出されなかった。トリコテセンを変換させる腸の能力にみられる種間差の毒性学的意義は不明である。

## デオキシニバレノール、ニバレノール、それらのアセチル化誘導体、 脱エポキシ代謝産物の比較細胞毒性

トリコテセンニバレノール (NIV) およびデオキシニバレノール (DON) の脱エポキシ代謝産物の細胞毒性を評価するとともに、完全なエポキシ基を有する個々の毒素ならびにそれらのアセチル化誘導体の細胞毒性との比較を行った。DNA 合成を評価する 5-ブロモ-2'-デオキシリジン (BrdU) 取り込みアッセイを用いて細胞毒性作用を評価した。DNA 合成の 50%が阻害される濃度 ( $IC_{50}$ ) として表される NIV および DON の毒性は、ほぼ同等のマイクロモル濃度で発現していた ( $1.19 \pm 0.06 \mu M$  および  $1.50 \pm 0.34 \mu M$ )。アッセイにおけるフザレノン X (4-アセチル NIV) の毒性は NIV の毒性とほぼ同等であり、15-AcDON の毒性は DON の毒性と同等であった。3-AcDON は DON および 15-AcDON より毒性が低かった。アッセイにおける脱エポキシ DON の  $IC_{50}$  は DON の  $IC_{50}$  の 54 倍であったのに対し、脱エポキシ NIV の  $IC_{50}$  は NIV の  $IC_{50}$  の 55 倍であった。これらの結果は、脱エポキシ化は解毒反応であるというこれまでの知見が実証するものである。

## *Fusarium* 属マイコトキシンにより自然汚染された穀類配合飼料がブロイラーの生産および代謝に及ぼす影響

1 日齢雄ブロイラー雛 360 羽に、*Fusarium* 属マイコトキシンにより自然汚染された穀類含有飼料を 56 日間与えた。与えた飼料は 4 種類であり、対照穀類(デオキシニバレノール 0.14mg/kg、フザリン酸 18mg/kg、ゼアラレノン 0.1mg/kg 未満)、低濃度汚染穀類(デオキシニバレノール 4.7mg/kg、フザリン酸 20.6mg/kg、ゼアラレノン 0.2mg/kg)、高濃度汚染穀類(デオキシニバレノール 8.2mg/kg、フザリン酸 20.3mg/kg、ゼアラレノン 0.56mg/kg)、高濃度汚染穀類(デオキシニバレノール 9.7mg/kg、フザリン酸 21.6mg/kg、ゼアラレノン 0.8mg/kg)+*Saccharomyces cerevisiae*<sup>1026</sup> 由来 0.2%エステル化グルコマンナンポリマー(E-GM)とした。体重増加および飼料消費量に関しては、仕上期中の汚染穀類含有飼料に対し、有意な二次曲線的反応を示した。しかし、飼料利用効率に関しては、与えた飼料による影響を認めなかった。仕上期の汚染穀類給餌により、赤血球数および血清尿酸値の有意な直線的増大、ならびに血清リパーゼ活性の有意な直線的低下も認められた。汚染穀類含有飼料により、血清アルブミン値および $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ活性に有意な二次曲線的影響をもたらした。一方、血中ヘモグロビン値および胆汁 IgA 濃度に関しては、有意な直線的、二次曲線的反応を示した。E-GM の添加により、*Fusarium* 属マイコトキシンによる汚染穀類が引き起こす血液パラメータの変化のほとんどは相殺され、胸筋の発赤が軽減した。結論として、種々のマイコトキシンを含有する自然汚染穀類を与えた場合、ブロイラーは *Fusarium* 属マイコトキシン症に感受性を示すと考えられる。

## *Fusarium* 属マイコトキシンにより自然汚染された穀類配合飼料が離乳期のブタおよびプロイラーの脳領域神経化学に及ぼす影響

*Fusarium* 属マイコトキシンにより自然汚染された穀類配合飼料の給餌が離乳期のブタおよびプロイラーの脳領域神経化学に及ぼす影響を比較するため、2種類の実験を実施した。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(GMポリマー)による*Fusarium* 属マイコトキシン症抑制の有効性についても検討した。実験1では、離乳期のブタ計150頭(当初体重=9.3±1.1kg)に、5種類の飼料(6区[1区5頭]/飼料)を21日間与えた。飼料(食餌中)は、対照穀類、17%汚染穀類、24.5%汚染穀類、24.5%汚染穀類+0.2%GMポリマー、24.5%汚染穀類投与ブタとの比較用対照穀類とした。実験2では、1日齢雄プロイラー雛360羽に、ブタに与えたものと同一の汚染穀類を含有する4種類の飼料中1種類を56日間与えた。飼料は、対照穀類、37%汚染穀類、58%汚染穀類、58%汚染穀類+0.2%GMポリマーとした(食餌中)。大脳皮質、視床下部、脳橋の神経伝達物質濃度をHPLCにより解析した。脳神経伝達物質については、以下の変化が認められた( $P \leq 0.05$ )。ブタの場合、汚染穀類含有飼料による変化は次の3点である。1) 大脳皮質の5-ヒドロキシトリプタミン(5HT、セロトニン)濃度が直線的上昇を示す一方、視床下部のトリプトファン濃度は直線的低下を示した。2) 視床下部および脳橋の5-ヒドロキシインドール酢酸(5HIAA):5HTの比が二次曲線的上昇を示す一方、大脳皮質における比は直線的低下を示した。3) 視床下部の3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸濃度:ドバミン(DA)濃度の比が直線的上昇を示す一方、視床下部のノルエピネフリン(NRE)濃度、ならびに脳橋のDAおよびホモバニリン酸(HVA)濃度は直線的低下を示した。プロイラーの場合、汚染穀類含有飼料の給餌による変化は次の3点である。1) 脳橋の5HTおよび5HIAA濃度、ならびに大脳皮質の5HT濃度が直線的上昇を示した。2) 5HIAA:5HTの比が直線的低下を示した。3) 脳橋のNRE濃度、3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニルエチレンギリコール濃度、DA濃度、およびHVA濃度が直線的上昇を示した。汚染飼料へのGMポリマー添加により、ブタの大脳皮質の5HTおよび5HIAA濃度が低下した( $P < 0.05$ )。結論として、脳神経化学物質濃度の変化に差異がみられるのは、*Fusarium* 属マイコトキシンによる飼料摂取拒絶の重度に対する種差によるものと説明することができる。

*Fusarium* 属マイコトキシンにより自然汚染された穀類配合飼料がブタの反応、脳領域神経化学、および血清生化学検査値に及ぼす影響、ならびに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の有効性

汚染されたブタの飼料に *Fusarium* 属マイコトキシンが同時に発生すると、個々の毒物の毒性を上回る相乗的毒性をもたらすことが認められる。実験により、*Fusarium* 属マイコトキシンにより自然汚染された穀類配合飼料が離乳期のブタの成長、脳領域神経化学、血清免疫グロブリン(Ig)濃度、血清生化学的検査値、血液学的検査値、および臓器重量に及ぼす影響を検討した。3種類の濃度のグルコマンナンポリマー(GM ポリマー、酵母細胞壁抽出物、Alltech Inc.)を用い、*Fusarium* 属マイコトキシン症の克服に関する有効性も検討した。離乳期のブタ計 175 頭(当初体重  $10 \pm 1.1\text{kg}$ )を供試し、5種類の飼料(7区[1区5頭]/飼料)を 21 日間与えた。飼料は、(1)対照穀類、(2)汚染穀類配合飼料、(3)汚染穀類+0.05%GM ポリマー、(4)汚染穀類+0.10%GM ポリマー、(5)汚染穀類+0.20%GM ポリマーとした。汚染穀類含有飼料の平均値は、デオキシニバレノール 5.5ppm、15-アセチルデオキシニバレノール 0.5ppm、フザリン酸 26.8ppm、ゼアラレノン 0.4ppm であった。すべての汚染穀類給餌ブタが、本実験全体を通じ、対照群に比べ飼料摂取量および体重増加の有意な減少を示した。体重に占める割合として示した肝臓および腎臓の重量は、対照飼料給餌ブタよりも汚染飼料給餌ブタの方が低値であった。汚染穀類の給餌により、視床下部および橋のドパミン濃度、ならびに橋のジヒドロキシフェニル酢酸濃度およびノルエピネフリン濃度の有意な低下が認められた。しかし、視床下部および橋の 5-ヒドロキシインドール酢酸とセロトニンとの比は上昇した。また、汚染穀類の給餌により、血清 IgM および IgA 濃度が上昇する一方、血清 IgG 濃度は変化を示さなかった。GM ポリマーの添加により、脳神経伝達物質および血清 Ig 濃度について、マイコトキシンによる変化の一部が抑制された。要約すると、*Fusarium* 属マイコトキシンにより自然汚染された穀類の給餌により、離乳期のブタでは成長低下、脳領域神経化学物質濃度の変化、血清 Ig 濃度の上昇、および臓器重量の減少が認められた。*Fusarium* 属マイコトキシンによる神経化学物質濃度および血清 Ig 濃度の変化の一部は、酵母細胞壁ポリマーを適切な濃度で給餌することにより抑制可能であるが、本実験条件下で酵母細胞壁ポリマーを用いても成長率の上昇に

は反映されなかつた。

## デオキシニバレノールの短期投与により生じるラットの代謝障害

デオキシニバレノール(DON)は複数の *Fusarium* 種により産生され、飼料の汚染により動物の飼料消費量の減少、飼料利用効率の低下、体重増加の減少、およびそれ以外の好ましくない変化を引き起こす場合がある。こうした有害作用について、ホルモンおよび代謝の変化への関与も検証するため、成長中 Wistar ラットを用いて DON が血中インスリン、グルカゴン、レプチン、および代謝パラメータに及ぼす影響を検討した。ラットに DON 1mg/kg bw を皮下投与した。3 日後、ラットでは、対照群に比べ血中インスリン、グルコース、および遊離脂肪酸の有意な増加が認められた。DON 投与により、筋肉におけるグリコーゲン貯蔵量の増加、およびトリグリセリド含有量の減少がもたらされた。単離脂肪細胞を検討したところ、DON(20 μmol/L)により基礎的な脂肪生成がわずかに促進したが、インスリン誘導性の脂肪生成および脂肪分解については変化を示さなかった。DON 皮下投与後得られた結果から、ラットにおけるこうした有害作用の一部は、本マイコトキシンがもたらす代謝障害に起因しうることが認められる。

## 各種市販食品中のオクラトキシン A、B およびシトリニンの汚染実態 調査

市販食品中のオクラトキシン A(OTA)、オクラトキシン B(OTB)、およびシトリニン(CIT)を、高速液体クロマトグラフ(HPLC)および高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計(LC/MS/MS)を用いて、同時に測定および確認した。供試試料は、穀類加工品、果実加工品、コーヒー加工品、カカオ加工品とした。OTA、OTB、CIT の定量下限( $S/N \geq 10$ )は  $0.1 \mu\text{g/kg}$  以下であった。アフラトキシン(AF)、デオキシニバレノール(DON)、およびフモニシンについても調査を行った。157 試料について調査したところ、44 試料が  $0.11 \sim 4.0 \mu\text{g/kg}$  のレベルで OTA の汚染を受けていた。汚染検出試料のうち少なくとも 2 試料は国産と表示されていた。OTA による汚染検出レベルが最も高い試料でも  $1 \mu\text{g/kg}$  以下の低レベルであった。OTA が最も高頻度に検出された試料はカカオパウダー(10/12)であり、次いでインスタントコーヒー(5/7)、ココア(5/8)、レーズン(6/13)の順であった。OTB は、比較的高レベルの OTA を含む果実加工品およびカカオ加工品に認められた。OTA、CIT、DON が同時に検出された試料は穀類加工品であり、OTA および AF が同時に検出されたのはカカオ加工品であった。ペーパードリップで抽出した場合、焙煎コーヒー豆中自然汚染を受けた OTA の約 30%が抽出液に移行した。

## 複数の *Fusarium* マイコトキシン間に起こりうる相互作用を探すための段階的アプローチにおける統計的にデザインされた実験

ここでは、L929 細胞を使った DNA 合成阻害アッセイによって複数のマイコトキシン間の複合作用を検出する試験戦略を紹介する。*Fusarium* マイコトキシンである T-2 毒素 (T2)、デオキシニバレノール (DON)、ニバレノール (NIV)、ゼアラレノン (ZEA) およびフモニシン (FB1) の複合作用を段階的なアプローチで調べた。第 1 段階では、これら 5 マイコトキシンを混合物または個々のマイコトキシンとして試験した。最高用量の混合物の作用は個々の 5 マイコトキシンの作用の和よりも明らかに小さく、低用量で相加的な挙動を示した。第 2 段階では、混合物中の特定のマイコトキシン間の相互作用を検出する中心複合計画を用いて最初の実験で確認された非相加性をさらに解析した。この実験は、試験した混合物のうち 5 つの作用が相加作用を下回ることを確認した。しかしマイコトキシン間の有意な相乗的相互作用も 4 つ明らかになった。最後に第 2 段階で確認された 2 つの相互作用を、マイコトキシン 2 つの全要因計画でさらに調べた。中心複合計画で認められた相互作用のうち一方は抽出されたが、もう一方の 2 要因相互作用は抽出されなかった。複数のクラスのマイコトキシンが混合物として同時に存在すると相互作用を示すおそれがあると結論づけられた。個々のマイコトキシンの作用だけから混合物の作用を予測することはできない。

*Fusarium*マイコトキシンであるデオキシニバレノールのウシおよび  
ブタ好中球化学発光に対する抑制作用：ある *in vitro* 試験

ルミノール依存性化学発光およびアガロース法に基づく random migration という 2 種類の機能パラメータを利用し、*Fusarium*マイコトキシンであるデオキシニバレノールのウシおよびブタの好中球に対する免疫毒性を *in vitro* で評価した。2 時間の DON 処理はウシおよびブタ細胞の化学発光を抑制し、抑制率は DON 濃度  $10^{-5}M$  でそれぞれ 42% および 35% (平均)、 $10^{-6}M$  でそれぞれ 19% および 26% だった。 $10^{-6}M$  より低い濃度で認められた抑制はわずかであった。しかし両動物の好中球 random migration には、最高濃度 ( $10^{-5}M$ ) DON への 18 時間処理後でも影響がなかった。さらに広範囲の試験が必要であるが、これは我々が知る限り DON が好中球機能に影響しうることを *in vitro* で明らかにした最初の試験である。

## 米におけるマイコトキシン

米におけるマイコトキシン汚染はコムギやトウモロコシよりも少ないので普通である。しかしアフラトキシン B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> (AFS)、シトリニン、デオキシニバレノール (DON)、フモニシン B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub> (FMS)、フザレノン-X (Fus. -X)、ニバレノール (NIV)、オクラトキシン A (OTA)、ステリグマトシスチン (STE) およびゼアラレノンといったマイコトキシンによる米汚染がいくつか報告されている。日本の米は湿度および温度が調節されている倉庫で保存される。したがって収穫後の真菌増殖によるマイコトキシン汚染は非常にまれである。最近、我々の研究室で米に含まれるトリコテセン、アフラトキシンおよび STE を分析した。日本では 1998 年に台風が収穫前の稻を襲い、茶色の玄米が見つかった。サンプルを採取し、トリコテセンの有無を調べた。GC-MS でマイコトキシン DON、Fus. -X および NIV を検出し、確認した。GC-ECD でトリコテセン定量を実施した。STE は *Aspergillus versicolor* および他のいくつかの真菌によって產生される発癌性マイコトキシンである。我々の研究室では 1973 年から米の STE 汚染を調べている。STE 定量に GC-MS、LC-MS、LC-MS/MS および LC-UV 法を試し、光ダイオードアレイ検出器を用いる LC-UV 法で良好な結果を得た。米からの各種 STE 抽出法も検討した。最終的に茶変米を挽いた米粉からアセトニトリル-水で抽出を行った。AFS および STE の精製には Autoprep MF-A 1000 カラムを使用した。HPLC-UV で精製抽出物を分析した。分析した 48 サンプルの茶変米に STE 汚染は見つからなかった。これらの米サンプルを使って AFS および FMS の分析も行ったが、どのサンプルにも汚染はなかった。日本の農林水産省は適切な機関にマイコトキシン分析法の開発、ならびに米のほか、コムギ、トウモロコシおよび他のいくつかの穀類におけるマイコトキシン汚染の調査を実施させている。

## 妊娠ブタのマイコトキシン汚染飼料摂取とその影響を受けない胎仔 および母動物の肝臓におけるインスリン様成長因子系遺伝子の転写

インスリン様成長因子 (IGF) 系は胎仔および胎盤の成長を調節する。これは食物因子の影響を受ける可能性があるが、マイコトキシン摂取が IGF 系の肝レベルに及ぼす影響についてはほとんどわかっていない。今回の研究目的は、(1)異なる妊娠期において胎仔および母親の肝臓における主要な IGF 遺伝子の正常な転写を調べ、(2) マイコトキシンであるデオキシニバレノール (DON) およびゼアラレノン (ZON) が転写物濃度に影響するかどうかを明らかにすることであった。妊娠ブタに妊娠第 35～75 日（実験 1）または妊娠第 75～110 日（実験 2）にわたって自然汚染飼料または対照飼料を与えた。定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) にて妊娠第 70 日および 110 日の胎仔肝 IGF 転写物ならびに妊娠第 70 日の母動物肝 IGF 転写物を定量した。母動物では IGF-I 転写物が最高レベルで認められた。これに対し、妊娠第 70 日の胎仔では主に IGF-II が発現した。IGF-IR および IGFBP-3 の発現が妊娠満期に向けて減少した一方、IGFBP-2 の発現は増加した。胎仔における IGF-IIR および IGFBP-1 の発現に妊娠期の違いによる差はなかった。母動物の肝臓における IGF-IIR レベルは低かった。DON 汚染飼料および ZON 汚染飼料は実験 2 において母動物の体重増加率を有意に低下させ、胎仔の体重増加率も低下傾向を示したが、どちらの実験でも肝 IGF 転写物レベルへの影響は認められなかった。これは、マイコトキシン汚染飼料が主要な IGF 遺伝子の肝における転写に影響することなく妊娠期にあるブタの成長抑制を誘導することを示唆する。

妊娠第 35 日から第 70 日の雌豚および胎児の脾臓および肝臓に及ぼすデオキシニバレノール (DON) およびゼアラレノン (ZON) で自然汚染した食餌の給餌効果

対照食餌 (CON、食餌 kgあたり 0.15mg デオキシニバレノール (DON) および 0.0035mg ゼアラレノン (ZON)) または 15% の Fusarium トキシン汚染ライ小麦を含む食餌 (MYCO、食餌 kgあたり DON 4.42mg および ZON 0.048mg) を妊娠第 35-70 日間の雌豚に給餌した。研究全体にわたって同一量の飼料 (2000g/d) による制限給餌計画に従ってすべての雌豚に給餌した。実験の終了時に帝王切開によって胎児を取り上げ、安樂死させた雌豚および胎児の脾臓および肝臓の試料を分析した。最終剖検では雌豚また胎児のどの器官にも巨視的な病変は認められなかった。組織病理データは、35 日給餌後の MYCO 群の雌豚脾臓の赤色脾髄中での鉄染色増加においてのみ有意な変化を示した。透過型電子顕微鏡検討によって、および脾臓中の Fe<sup>2+</sup>濃度増加によって脾臓切片中にヘモジデリン粒子が存在することを確認した。実験群中の胎児肝細胞中のグリコーゲン増加 ( $p<0.05$ ) が見いだされた。総合すると、これらの結果は、Fusarium トキシン汚染小麦を給餌された雌豚の脾臓機能障害 (ヘモジデリン沈着症) の証拠を示すが、臨床的な徵候はない。母豚が MYCO 食餌を消費したとき胎児肝臓中にグリコーゲン増加およびミトコンドリア損傷があった。

## 2 種類の *Fusarium* 毒素でさまざまな程度に汚染された穀類を含む飼料が雌性ブタの脾臓における免疫学的組織学的評価項目に及ぼす影響

*Fusarium* 毒素がブタ脾臓細胞に及ぼす免疫学的作用の原因を明らかにする目的で、*Fusarium* 毒素で汚染されたコムギを含む飼料を使った給餌実験を実施した。未成熟の Lndrace 雌性ブタ 36 頭に 35 日間汚染飼料を与えた。指標毒素であるデオキシノバレノール (DON) およびゼアラレノン (ZON) の含有率 (給餌ベース) は、それぞれ 210 および  $4 \mu\text{g/kg}$  (対照 - I 群)、3,070 および  $88 \mu\text{g/kg}$  (II 群)、6,100 および  $235 \mu\text{g/kg}$  (III 群)、ならびに 9,570 および  $358 \mu\text{g/kg}$  (IV 群) であった。飼料を通じた投与によるエストロゲン過剰徵候および子宮肥大作用は認められなかった。マイコトキシン汚染飼料摂取動物の脾臓に肉眼的病理所見は認められなかった。In vivo では血中リンパ球のコンカナバリン A 刺激に関して抑制作用は認められなかつたが、DON/ZON 含有率が最も高い飼料を摂取したブタでは脾臓細胞の増殖率が低下した ( $P < 0.05$ )。in vitro 試験では、DON に曝露した血中リンパ球および脾臓細胞の増力率低下が認められた。II 群のブタにおける血清中 IgA 濃度が DON/ZON 飼料摂取前のベースライン値に比べて上昇した ( $P < 0.05$ )。組織病理学的データは、飼料を 35 日間摂取した雌性ブタの脾臓で I 群から IV 群にかけて赤脾髄の鉄染色性が上昇すること ( $P < 0.05$ ) を示した。脾臓切片におけるヘモジデリン粒子の存在が透過型電子顕微鏡検査で確認された。総合するとこれらの結果は、特に *Fusarium* 毒素を比較的高い含有率で含む汚染コムギを摂取したブタ (III 群および IV 群) における臨床徵候を伴わない脾臓機能不全 (ヘモジデリン沈着症) の証拠を提供している。

## 雌ブタ肝臓の選択された酵素および組織パラメータに及ぼす段階的 レベルの 2 つの Fusarium トキシン汚染穀物による食餌の影響

ブタ肝細胞に及ぼす Fusarium トキシンの酵素効果および組織病理効果の発病機序を明らかにするために Fusarium トキシン汚染小麦を含む食餌による給餌実験を行った。合計 36 頭の思春期前雌ブタを 4 群に分け、増加する比率の Fusarium トキシン汚染小麦を小麦全比率 40% で有する食餌を 35 日間にわたって給餌した。HPLC 法によって分析した指標トキシン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 I ~ IV 群に給餌した食餌中でそれぞれ 210/4、3070/88、6100/235 および 9570/358  $\mu\text{g}/\text{kg}$  であった。マイコトキシン汚染食餌を給餌してもこれら動物の肝臓中に肉眼的病理所見は生じなかつた。肝臓組織を酵素、組織および超微細構造検査に付した。AnalySIS 3.4 システムを用いて過ヨウ素酸-Schiff (PAS)、Berlin-Blue および Masson Goldner の三色染色における染色面積の百分率を計算した。II、III および IV 群の肝細胞中のグリコーゲン減少およびヘモジデリン粒子増加において種々の度合いの変化の有意な組織病理知見が見いだされた。III および IV 群の肝細胞中の小葉間結合組織隔膜の厚さが有意に増加した。III および IV 群の雌ブタの肝細胞中に定性的な超微細構造変化が観測された。食餌中のマイコトキシン濃度に依存して、肝細胞は用量に依存する多数の滑面小胞体を発達させ、リボソームの低下を示し、脂肪および自己貪食液胞の数増加を得た。しかし、血清トランスアミナーゼの顕著な高活性によって測定される肝損傷は検出されなかつた。総合すると、組織病理の結果は、特に高濃度の Fusarium トキシン汚染小麦を給餌されたブタにおいて、臨床徵候を伴わない肝機能障害の証拠を示す。

デオキシニバレノールおよびゼアラレノンに自然汚染された飼料を  
摂取した妊娠ブタおよび満期摘出子ブタの脾臓および肝臓における  
変化

*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) に自然汚染されたコムギを妊娠した Randrace ブタに 35 日間与えた。妊娠第 110 日に実施した帝王切開で取り出した子ブタをただちに屠殺し、その肝臓と脾臓を調べた。母ブタおよび子ブタのどちらの臓器にも、剖検で肉眼的病変は認められなかつた。汚染飼料摂取群の母ブタ組織の組織病理評価では肝臓および脾臓の組織に変化が認められたが、子ブタの同じ組織に有意な変化は認められなかつた。母ブタに血清中の著明なトランスアミナーゼ活性上昇で測定される肝損傷は認められなかつた。母ブタの *Fusarium* 毒素に対する感受性には個体差があつた。結論として、DON および ZON の含有率がそれぞれ 9570 および  $358 \mu\text{g/kg}$  までの飼料の母動物による摂取は、満期産子ブタの肝臓および脾臓に悪影響を及ぼさないと考えられる。

雌性ブタの各種非生殖臓器および生殖臓器にマイコトキシンであるゼアラレノンおよびデオキシニバレノールが *in vivo* および *in vitro* で及ぼす影響

これは、マイコトキシンであるゼアラレノン (ZON)、その代謝物、およびデオキシニバレノール (DON) が雌性ブタの生殖臓器および非生殖臓器に関する各種パラメータに及ぼす影響についての毒性学的データをまとめた総説である。ZON 含有率  $22\text{mg kg}^{-1}$  の飼料は *in vivo* で子宮を含むブタの生殖管に変化を引き起こし、卵胞および胚の発達に悪影響を及ぼす。ZON およびその代謝物は *in vitro* 系においてエストロゲン受容体に競合的に結合することが明らかになっている。DON 含有率  $9\text{mg kg}^{-1}$  の飼料摂取は用量、曝露および機能的免疫アッセイのタイミングに応じて蛋白質合成ならびに液性および細胞性免疫応答に作用し、肝臓および脾臓の細胞構造に悪影響を及ぼしうる。こうした作用に加え、ブタの妊娠性における変化も認められた。DON への *in vivo* および *in vitro* 曝露はどちらも卵母細胞および胚の発達を抑制した。子宮細胞への *in vitro* DON 適用は子宮細胞増殖率を低下させ、*in vivo* 適用とは異なる分子レベルで転写プロセスを変化させる。組織病理学的結果は、特に *Fusarium* 毒素含有率の比較的高い汚染コムギを摂取したブタにおける臨床徴候を伴わない脾臓および肝臓の機能不全の証拠を提供している。未成熟雌性ブタは妊娠ブタに比べ、DON>ZON 汚染飼料への感受性が高かった。肝臓ではグリコーゲン減少や葉間コラーゲン取り込みといった組織病理学的变化が未成熟雌性ブタでしか認められなかつたのに対し、ヘモジデリン増強は未成熟雌性ブタおよび妊娠ブタの両方で認められた。この総説は ZON および DON のブタにおける生理活性についての最新情報の一部を紹介している。総合すると、ZON はエストロゲン活性を有するためにブタの生殖に最も大きな影響を及ぼす。しかし DON は摂餌量減少などの間接的な影響を介してブタの生殖に影響し、成長抑制や肝臓および脾臓といった必須臓器の機能障害を引き起こす。

## 培養ブタ子宮内膜細胞の細胞周期にマイコトキシンである $\alpha$ -ゼアラレノール、 $\beta$ -ゼアラレノールおよびデオキシニバレノールが及ぼす影響

フローサイトメトリーを利用し、濃度 7.5、15 および  $30\mu\text{M}$  の  $\alpha$ -ゼアラレノール ( $\alpha$ -ZOL) および  $\beta$ -ゼアラレノール ( $\beta$ -ZOL)、濃度 0.94、1.88 および  $3.76\mu\text{M}$  のデオキシニバレノール (DON) が細胞周期分布 (ヨウ化プロピジウム (PI) 染色) および核内増殖抗原 (PCNA) に及ぼす影響を調べた。 $30\mu\text{M}$   $\alpha$ -ZOL がブタ子宮細胞の生存率に影響しなかったのに対し、 $30\mu\text{M}$   $\beta$ -ZOL および  $3.76\mu\text{M}$  DON は細胞数を有意に減らした。一部の細胞には、ミトコンドリアの腫脹、細胞膜の破綻および多くの空胞といった細胞死に特徴的な超微細構造が見られた。 $\alpha$ -ZOL (7.5、15 または  $30\mu\text{M}$ ) への 24 および 48 時間曝露後でも細胞周期分布は対照群と変わらなかった。S 期における有意な減少および  $G_0/G_1$  期における細胞の停止により、 $\beta$ -ZOL および DON の抗増殖作用が検出された。結果は、 $\beta$ -ZOL (7.5、15 または  $30\mu\text{M}$ ) および DON (0.94、1.88 または  $3.76\mu\text{M}$ ) が細胞周期の S 期を減らし、 $G_0/G_1$  期で細胞を停止させることによって細胞周期の進行を抑制することを示す。増殖マーカーである PCNA 発現量の有意な減少は、 $\beta$ -ZOL および DON が細胞周期を阻止することを示す。我々は、 $\alpha$ -ZOL がブタ子宮細胞質エストロゲン受容体に対して相対的な結合親和性を有することを確認した。

## デオキシニバレノール：尿中バイオマーカー開発の根拠とその用途 のための理論

マイコトキシンは世界中のほとんどの地域で一般的な食物汚染物質である。各種マイコトキシンファミリーへの曝露頻度は、食事の多様性および食糧充足率にかかわる地理的な位置、国富ならびに関連する農業および規制のインフラストラクチャーに左右されることが多い。デオキシニバレノール (DON) は温帯地域でコムギ、トウモロコシおよびオオムギを高頻度に汚染する *Fusarium* マイコトキシンである。多くの急性中毒が DON 汚染食物に関連づけられており、低レベル DON への慢性曝露が多くの地域で予測されている。DON は動物に対する強力な毒素で、ヒトにおける曝露は胃腸炎、成長抑制および免疫毒性を引き起こすおそれがある。ヒトの健康への潜在的影響を十分に理解するには、個人レベルで正確な曝露評価を実施できなければならない。今のところ DON を含む多くの重要なマイコトキシンについて、こうした曝露バイオマーカーは存在しない。DON への曝露を個人レベルでさらによく評価するため、我々はイムノアフィニティーカラム (IAC) 濃縮と LC-MS 検出を組み入れた頑健な尿アッセイを開発した。内部標準として <sup>13</sup>C-DON を組み入れることによってこの尿アッセイの精緻化を図り、英国内で試験した。DON は尿中に高頻度で検出され、穀類摂取に有意に関連づけられた。食事療法試験は、食事でコムギの摂取を避けねば尿中 DON レベルが顕著に低下することを明らかにした。さらにバリデーションが必要であるが、我々の初期データはこのバイオマーカーがこの一般的な環境毒素の健康への潜在的影響に関する疫学研究において有用なツールになりうることを示唆する。