

小麦のデオキシニバレノール汚染低減のための乾燥調製法

小麦の二段乾燥において、無通風での半乾貯留中、小麦中の DON 濃度は増加する確率が高く、貯留期間を短く設定して DON 濃度の増加を回避する必要がある。比重選別機の調節に市販のエライザキットと容積重測定装置を用い、短時間に目標 DON 濃度への低減を行うことができる。

小麦中のデオキシニバレノール分析法の複数機関による評価研究

平成14年に小麦玄麦中のデオキシニバレノール(DON)の暫定基準値が設定されたことを受けて、DON分析法の開発を行った。本分析法は、小麦玄麦および小麦粉を対象とし、多機能カラムを用いて精製し、UV-HPLCで分析するものである。この分析法の妥当性を評価する目的で12機関による協同試験を行った。また、DONの簡易分析法として、ELISA法による数種の分析キットが市販されているが、このELISA法の初期スクリーニング法としての妥当性を評価するために、農林水産省の協力を得て14機関による協同試験も行ったので合わせて報告する。

倒伏はムギの赤かび病かび毒汚染リスクを高める

赤かび病菌が感染したムギでは、倒伏により、本菌が産生するかび毒であるデオキシニバレノールおよびニバレノールの子実汚染濃度が高くなる。

麦赤かび病の毒ニバレノール

抄録なし

発癌性マイコトキシンの作用機構

抄録なし

カビ毒の食品汚染実態とその制御に関する研究

抄録なし

トリコテセンの毒性影響としての腎障害

一部のマイコトキシンによって家畜およびヒトのさまざまな種類の腎毒性が誘発されるという事実はよく知られている。例えば、オクラトキシン A (OTA) によってバルカン腎症 (BEN) が誘発されると考えられている。フモニシン、シトリニン、ルブラトキシン B、その他の数種類のマイコトキシンも腎毒性を有すると考えられている。最近の報告によると、トリコテセンマイコトキシンに属するニバレノール (NIV) およびデオキシニバレノール (DON) によって、日本で最も一般的な慢性糸球体腎炎であるヒト IgA 腎症 (IgAN) に類似したマウスの腎臓の病理学的変化が実験的に誘発される。実際、IgAN は粘膜免疫系の調節障害を誘発するある種の外来性抗原によって引き起こされるという仮説 (粘膜免疫指向仮説) に基づいて、筆者等はマイコトキシンである NIV によって経口的に誘発される再現可能な IgAN のマウスモデルを作成した。NIV 12 ppm を 8 週間にわたって給餌されたすべての C3H/HeN マウス、C3H/HeJ マウス、BALB/c マウス (NIV モデル) において、糸球体中の著しい IgA 沈着ならびに血清 IgA 値の顕著な上昇が再現性良く誘発された。マウスにおけるヒト IgAN に類似した病理学的変化ならびに血清 IgA 値の上昇の程度は、経口投与された NIV の投与量および投与期間に関連していた。12 ヶ月にわたる NIV の長期投与によって、マウスにおける糸球体 IgA 沈着の程度ならびに血清 IgA 値は時間の経過とともに有意に増強ないし上昇した。さらに、NIV モデルマウスのパイエル板 (PP) リンパ球 (PPL) に対する酵素結合免疫スポット法によって IgA 産生細胞の有意な増加が実証された。これらの細胞において IFN- γ および IL-2 (Th1 型サイトカイン) ならびに IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、TGF- β (Th2 型サイトカイン) に特異的な mRNA を顕著な高値で検出するサイトカイン特異的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応によって、モデルマウスの PP においても CD4⁺T 細胞の上方調節が明らかにされた。アルコールまたはリン酸緩衝生理食塩水で希釈した NIV を C3H/HeN マウスの十二指腸に注射して腸壁の病理組織学的変化を検討したところ、NIV を注射されたマウスでは対照と比べて、24 時間後に小腸における PAS 陽性の杯細胞 (GC) 数が減少したように見受けられたのみならず、特に陰窩周辺の小腸絨毛のパネート細胞および上皮細胞の壊死性・変性性の損傷も観察された。結論として、ヒト IgAN における病理学的変化に類似したマウスの病理学的変化が NIV によって再現可能な形で系統非特異的に誘発される。マウスにおける IgAN 様変化は NIV の投与に伴い時間の経過とともに期間依存的に悪化した。NIV 誘発性 IgAN において PPL に免疫学的な調節障害が生じていること、ならびに粘膜免疫系のこの種の上方調節は IgAN の病因

に関連している可能性があることが示唆された。筆者等はまた、NIV、DONなどのマイコトキシンは腸壁などの粘膜系に対して免疫学的に、組織病理学的に損傷を与える可能性があり、少なくともある種の糸球体腎炎において何らかの病因的役割を果たしている可能性があるということも提唱した。

Nivalenol(NIV)によって惹起される IgA 腎症モデルにおける gut-associated lymphoid tissue(GALT)の関与について

NIVの経口投与により作成したIgA腎症モデル(NIV model)におけるPeyer's patch lymphocyte(PPL)の免疫異常について検討した。ELISPOT法によるPPLの抗体産生細胞数の検討では非投与群に比しNIV modelの方が有意にIgA産生細胞が多かった。また、RT-PCRによる検討ではNIV model PPLのIL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TGF- β のmRNA発現は有意に増強していた。以上より、PPLのIgA産生亢進とTh2型サイトカイン産生T細胞の活性化が確認されGALTの異常がIgA腎症の成因に関与していることが示唆された。

中国肝癌多発地域海門におけるトウモロコシのマイコトキシン複合汚染調査

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

トリコテセン系マイコトキシンによるヒトの中毒事例

Fusarium 種とそれらのマイコトキシンで、トリコテセン類に関連した数種類のヒト中毒については、国際化学物質安全性計画 (IPCS、WHO)、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (JECFA)、国際癌研究機関 (IARC、WHO) による評価が行われている。これら事例のうち、旧ソ連の食中毒性無白血球症 (ATA) ならびに日本、中華人民共和国、インドの赤カビ中毒について簡単に概説する。

DON 研究 30 年の軌跡

過去 30 年間に筆者等の実験室において実施されたデオキシニバレノール (DON) と関連トリコテセン類に関する研究について概観した。本稿では以下の点について論じた： i) 新規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)の発見、ii) 致死毒性および亜致死毒性を含む DON の毒物学的特性、iii) 動物における DON および T-2 トキシンの代謝運命、ならびに脱エポキシ化代謝産物および水酸化代謝産物の同定、iv) 日本産コムギ・オオムギにおける DON および NIV の自然発生の地理的差異に関する化学的・真菌学的研究、v) 東アジア・東南アジア各国における DON およびその他の *Fusarium* マイコトキシンの自然発生。

重要穀類に感染する多犯性病原糸状菌に関する研究

抄録なし

遺伝子変化を最終指標とした環境化学物質による発がんリスク評価

とその機作研究のための方法開発

がん遺伝子や腫瘍抑制遺伝子の突然変異に関するいろいろな根拠が蓄積されているが、それらの根拠に基づく仮説によると、がんは複数の突然変異により引き起こされる。いろいろな変異原が誘発する突然変異のタイプが分子疫学において重要な役割を果たし、環境による発がんの原因を決定する。環境化学物質による特定の突然変異像に関する情報を蓄積する目的で、トランスジェニックマウス突然変異分析により評価される生体内突然変異発生について研究した。容易に配列決定できる新規標的遺伝子「*cII*」を使い、突然変異を同定した。遺伝子毒性物質の分子署名を明らかにする目的で、突然変異を同定するために容易に配列決定できる新規標的遺伝子「*cII*」の突然変異像を分析した。30種類以上の化学物質の生体内変異原性を分析し、その突然変異像の特徴を示した。最も一般的なタイプの突然変異はGCからTAへの塩基転換であり、その転換はある種の芳香族化合物が引き起こした。キノリンは非常に特異な化合物であり、GCからCGへの塩基転換を誘発する。ニトロサミンは多様な突然変異を示し、その突然変異はアルカリ性構造により異なる。縦列タイプの突然変異は極めて稀な突然変異であり、モノクロタリンや分裂促進因子Cによる指標突然変異である可能性がある。内在遺伝子の変異原物質特異的な突然変異を検出する感度の高い方法の開発を試みた。対立遺伝子特異的なPCRにより、マウスp53遺伝子のCCからTTへの突然変異は 10^{-5} ~ 10^{-6} のレベルで検出できる。

別の取り組みで、遺伝子発現分析用のオリゴヌクレオチドマイクロアレーを使用した。オリゴヌクレオチドマイクロアレーは遺伝子毒の作用様式分類に有望な特性を有する。各々の化学物質について遺伝子発現データを集めると、未知化学物質の遺伝子毒特性と機作の決定に役立つ。ヒトリンパ芽細胞による生体外遺伝子毒および生体内マウス肝臓による遺伝子毒が誘発する遺伝子発現の変化を分析した。異なる化学物質による共通変化と個々の独特の変化を決定した。これらの共通変化は遺伝子毒の遺伝マーカーとして使える。遺伝子発現変化は生体内よりも生体内において大きかった。これらの結果が示すように、遺伝子発現分析はがん発生分子機構の研究に強力な手段である。

ニバレノールの経口投与がマウスにおよぼす胚毒性

最終ニバレノール (NIV) レベルが 0, 6, 12 および 30 ppm になるようにカビの生えたコメ粉と混合した餌を妊娠期間を通して ICR マウスに与えた。また、0、1、5、10 および 20 mg/kg の精製 NIV を胃管栄養法により妊娠 7 日目から 15 日目まで与えた。投与期間中に、20 mg/kg 群の 5 匹中の 4 匹が死んだ。母親の体重減と関係する胚毒性が 30 ppm と 10 mg/kg の 2 群に見られた。子宮内成長抑制が 12 ppm と 5 mg/kg マウス群の出産期の胎児に観察された。NIV は、肉眼観察でわかる奇形、骨格奇形および内臓奇形の発生率には統計的に有意な悪影響を及ぼさなかった。

ニバレノール (カビ毒) の代謝と毒性に関する研究 I. ニバレノールの精製およびニバレノールの新規代謝物デエポキシニバレノールの同定

圧搾オオムギで培養した *Fusarium graminearum* F-1456 は 2 種類のカビ毒、ニバレノールとフザレノン-X、を多量に生産した。n-ブタノール-水およびクロロフォルム-メタノール-水の 2 相溶媒系を使った遠心分配クロマトグラフィー (CPC) を応用してニバレノールとフザレノン-X を精製調製できた。圧搾オオムギ基質 1 kg で培養した *Fusarium* から、熱メタノールの CPC 画分の再結晶により 0.34 g のニバレノールと 0.78 g のフザレノン-X が得られた。アルカリ性加水分解によりフザレノン-X をニバレノールに変換し、0.55 g のニバレノール結晶を得た。

ニバレノールを経口投与したラットの便中にニバレノールの新規代謝物を検出した。マススペクトロメトリーと ^1H および ^{13}C 核磁気共鳴スペクトロメトリーにより、新規代謝物は 3,4,7,15-tetrahydroxytrichotec-9,12-dien-8-one すなわちデエポキシニバレノールと同定された。

反復経口投与により、デエポキシ代謝物は全投与量の 80% が便にそして 1% が尿に検出され、もともとのニバレノールは便に 7% そして尿に 1% 検出された。

ニバレノール (マイコトキシン) の代謝と毒性機構に関する研究第二報：ラットにおけるニバレノールの吸収、代謝、排泄、および毒性について

ニバレノールとその主要代謝物である脱エポキシニバレノールの吸収、分布、および排泄について、雄性ラットを用いて単回の腹腔内 (1 mg/Kg) または経口 (5 mg/Kg) 投与によって調べた。腹腔内投与の後、72 時間でラットの尿から排泄されたニバレノールと脱エポキシニバレノールは、全投与量のそれぞれ 48.3%と 3.8%で、糞からはそれぞれ 10.0%と 25.5%であった。一方経口投与では、72 時間でラットの尿から排泄されたニバレノールと脱エポキシニバレノールは、全投与量のそれぞれ 9.9%と 5.6%で、糞からはそれぞれ 5.4%と 18.7%であった。脱エポキシニバレノールは、尿中よりも糞中に高い率で排泄され、ニバレノールも遅く排出された。

血清、肝臓、および腎臓に検出されたニバレノールの量は、経口投与の 1 時間でも尿や便の中よりも遥かに低く、急速に低下した。脱エポキシニバレノールは 24 時間内のどの時期でも血清、肝臓、および腎臓に検出されなかった。ラットにおけるニバレノールの主要代謝経路は、胃腸内での 12,13 エポキシド環の脱エポキシ化であると考えられる。

ニバレノールを 0、10、50 $\mu\text{g/g}$ 含む飼料を 8 週間給餌することの成長速度、血液学、および組織病理学に与える影響も調べた。50 $\mu\text{g/g}$ ニバレノール給餌グループで体重増加が有意に減退し、若干の赤血球減少が観察された。組織病理学的には、粘膜壊死と腸上皮組織の破壊、および骨髄での赤血球系の増加が観察された。しかしながら、10 $\mu\text{g/g}$ ニバレノール給餌グループでは、対照グループと比較して有意な変化は認められなかった。

ニバレノール産生型麦類赤かび病菌における試験研究用菌株の選定

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

実験動物のカビ問題

カビの産生する有毒二次代謝産物：マイコトキシン

抄録なし

肝中期発癌試験によるアフラトキシン B₁ 発癌性のニバレノールによる亢進作用

諸種の *Fusarium* 菌が産生するトリコテセン系化合物[nivalenol(NIV), T-2 toxin(T-2)]についてラット肝中期発癌試験を行い、発癌性や発癌プロモーター作用の有無を検索した。すなわち肝前癌病変マーカーである GST-P 陽性巣の発現を指標とし、AFB₁ や diethylnitrosamine(DEN)による化学発癌の早期前癌病変に対するトリコテセンの影響を検討した。

有害化学物質のバイオコントロールによる小麦製品の高度安全性確保の研究

抄録なし

糸状菌由来のヤセウツボ種子発芽阻害物質

寄生根植物である *Striga* spp. と *Orobanche* spp. は穀草類とマメ類の穀物に対して経済的に大きな害を与える雑草である。筆者らは予備バイオアッセイで *Orobanche minor* の発芽を阻害する 3 種類の菌 (Y-1、Y-2、Y-3) を単離した。培養ブロスからの抽出物はすべて、種子発芽に対して強い阻害を示した。本研究においては、阻害活性物質の精製、構造解明、および評価について記述する。Y-2 が産生する 2 つの阻害物質がその培養ブロスの EtOAc 可溶フラクションからクロマトグラフ分離で単離された。それらの構造は、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、および GC/MS のスペクトルデータより 4,15-ジアセトキシシルペノールと 4,15-ジアセトキシニバレノールであると同定された。バイオアッセイで、これら化合物は 0.5 ppm の濃度で種子の発芽を完全に阻害した。

食品中のカビ毒の毒性および暴露評価に関する研究

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

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

ニバレノールの毒性影響と毒性学的同等性

ニバレノールはトリコテセン系マイコトキシンの一種であり、我が国では国内汚染があることからその健康被害が危惧されている。しかし、デオキシニバレノールに比べて汚染地域が限られていることから毒性に関する知見が少なく JECFA などの国際機関やヨーロッパ連合の食品技術専門家会議では、その毒性評価は行われていない。我が国では国産小麦においてデオキシニバレノールとニバレノールの共汚染が高い頻度で見られるため、早急の対策が求められている。本研究ではニバレノールの毒性評価に一環として、90 日間短期毒性試験を行い、その免疫系への影響を抗体価の変動およびナチュラルキラー活性を指標として検討した。その結果、脾臓免疫担当細胞に対する短期免疫毒性を見いだした。特に脾臓リンパ球のうち、細胞障害性 T 細胞のニバレノールに対する高い感受性を観察した。又、高濃度のニバレノール暴露によってナチュラルキラー活性担当細胞への細胞毒性が観察される一方、低濃度ではナチュラルキラー活性の上昇が見られた。抗体価においては IgM に変動が観察された。これらの知見は、人に対するニバレノールの免疫毒性を考える上で重要な知見を与えるものである。

アフラトキシン B₁ の肝発癌性に対するニバレノールの影響

食品中のニバレノール (NIV) が癌の進行を調整するかどうかを調べるために、1 週齢の C57BL/C3H の F₁ マウスに対して 6 mg/kg の AFB₁ を腹腔内に単回注射し、その 6 週後に 0、6、または 12 ppm の NIV を含む餌を 65 週与えた。

AFB₁ を腹腔内注射したすべての雄性マウスは肝腫瘍を発現し、その発生率は NIV 含有飼料を与えても変化しなかった。一方雌性において、肝腫瘍の発生率は、対照、AFB₁ 単独、AFB₁+6 ppm NIV、AFB₁+12 ppm NIV の各グループでそれぞれ、0、31、20、0% であった。これらの所見は、NIV が AFB₁ 誘発の肝細胞癌の発生率を雌性マウスにおける増殖期に抑制する能力を持つことを暗示した。

麦赤かび病の毒ニバレノール

食品の安全性は日本人の大きな関心事である。食品の安全性を脅かすものは、大きく分けて生物ハザードと化学ハザードがあるが、化学ハザードの代表の一つがカビのつくる毒(マイコトキシン)である。マイコトキシンはカビのつくる二次代謝産物で、現在まで 300 種類以上が知られている。微生物毒にはボツリヌス菌毒素や破傷風菌毒素、大腸菌 0157 のベロ毒素などタンパク質性のものも多く知られているが、マイコトキシンは非タンパク質性で、分子量 1,000 以下の低分子量物質である。ちなみに本稿で紹介するニバレノールは分子量 312 である。表 1 に代表的なマイコトキシンを挙げた。表 1 にあるとおり、マイコトキシンによって穀類が汚染されることが多い。日本人にとって幸運なことに、他の穀類に比べるとコメの汚染は少ない。マイコトキシン汚染が厄介なのは、多くのマイコトキシンが熱に安定なことであり、加熱加工後カビは死滅しているのにマイコトキシンが毒性を保った状態で食品中に残存することである。また、マイコトキシンはカビから分泌されるので、カビの生えた部分だけ削り取っても除ききれない。本稿では麦の病気である赤かび病に関連するマイコトキシンについて紹介する。また、筆者らの研究成果を紹介する中で、多くの食品研究者には馴染みのない毒性研究の一端について紹介したい。

発癌性マイコトキシンの作用機構

諸種発癌性マイコトキシンの中で、アフラトキシン B₁(AFB₁)は B 型肝炎ウイルス(HBV)と共に東南アジアやアフリカにおいてヒト肝細胞癌(HCC)の発生の一因であることが推定されている。また、バルカン諸国で発生しているヒトの腎炎患者(BEN:Balkan Endemic Nephropathy)で腎癌などの発生率が高く、この原因物質はオクラトキシン A(OTA)であると考えられている。さらに最近、フモニシン B₁(FB₁),FB₂ およびトリコテセン系マイコトキシンであるニパレノール(NIV)が発癌の促進活性を有することが明らかにされ、ヒト肝癌や喉頭癌の発生に関与している可能性が高い。

本解説においては、ヒトへの暴露を証明する手法が導入され、分子レベルの疫学研究や作用機構が解析されている上記マイコトキシンを取り上げて紹介する。

Nivalenol(NIV)によって惹起される IgA 腎症モデルにおける gut-associated lymphoid tissue(GALT)の関与について

NIV の経口投与により作成した IgA 腎症モデル(NIV model)における Peyer's patch lymphocyte(PPL)の免疫異常について検討した。ELISPOT 法による PPL の抗体産生細胞数の検討では非投与群に比し NIV model の方が有意に IgA 産生細胞が多かった。また、RT-PCR による検討では NIV model PPL の IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TGF- β の mRNA 発現は有意に増強していた。以上より、PPL の IgA 産生亢進と Th2 型サイトカイン産生 T 細胞の活性化が確認され GALT の異常が IgA 腎症の成因に関与していることが示唆された。

遺伝子変化を指標とした環境化学物質による発がんリスク評価および機構究明のための手法の開発に関する研究

癌遺伝子または癌抑制遺伝子における変異原性についての累積された証拠は、癌は複数の突然変異によって起こされるという仮説を支持する。各種の変異原に誘発される突然変異の型は、生活環境発癌の原因物質を確認するための分子疫学で重要な役目を果たす。生活環境化学物質による特異な突然変異スペクトルに関する知識を蓄積するために、筆者らはトランスジェニック・マウス突然変異試験で評価される生体内変異原性を研究した。筆者らは、突然変異を同定するために容易に配列決定できる新しい標的遺伝子「*cll*」を使用した。遺伝子毒性の分子署名を解明するために、筆者らは突然変異を同定するために容易に配列決定できる新しい標的遺伝子「*cll*」内の突然変異スペクトルを解析した。筆者らは生体内で 30 種類以上の化学物質を分析し、突然変異スペクトルに対するそれらの特性を明らかにした。最も普通の型の突然変異は、ある芳香族化合物によって起こされる GC から TA へのトランスポージョンであった。ニトロソアミンは多くの種類の突然変異を示し、それはアルキル化構造によって異なった。直列型突然変異は非常にまれな突然変異で、モノクロタリンとマイトマイシン C による署名突然変異ということがあり得る。筆者らは内在性遺伝子における変異源特異の突然変異を検出する感度のよい方法を開発しようと試みた。マウス P53 遺伝子での CC から TT への突然変異は、対立遺伝子特有 PCR によって $10^5 \sim 10^6$ のレベルで検出できた。

別のアプローチとして、活性の遺伝子毒性モードを特徴化できる有望な未来を持つ遺伝子発現分析のために、オリゴヌクレオチド・マイクロアレイを使用した。化学物質による遺伝子発現データの蓄積は、未知の化学物質の遺伝子毒性特性と機構を同定する上で助けになる。筆者らは、ヒトリンパ芽球様細胞とネズミ肝臓生体内での遺伝子毒性物質により誘発される遺伝子発現の変化を分析した。異なる化学物質間で共通の変化が確認され、各化学物質にいくらかの特異な変化があった。これら共通の変化は細胞毒性の遺伝子マーカーとして用いることができる。遺伝子発現の変化は試験管内よりも生体内で大きい。これら結果は、遺伝子発現解析が発癌の分子機構を研究する上で強力な武器であることを示した。

パプアニューギニアの輸入穀物におけるニバレノール、デオキシニバレノール、およびゼアラレノンの検出率

1991年にパプアニューギニアが主としてオーストラリアから輸入した穀物類におけるフザリウム属マイコトキシン — ニバレノール (NIV)、デオキシニバレノール (DON)、およびゼアラレノン (ZEN) の自然発生について、薄層クロマトグラフィー (TLC)、ガスクロマトグラフィー (GLC)、および高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による予備的調査を実施した。その結果、全粒小麦粉、全粒粟粉、トウモロコシ粉、Brown Trukai Rice (豪州 Trukai Industries 社のブランド米) など、さまざまな穀物および穀粒がこれらカビ毒により濃度の差はあるにせよ著しく汚染されていることがわかった。これらのフザリウム属マイコトキシンのうち、特に ZEN は驚くほど高濃度に検出された。本稿は、パプアニューギニアの穀物におけるフザリウム属マイコトキシンの自然発生に関する最初の報告である。

食道癌高リスク地域における真菌類およびカビ毒による食品汚染

食道癌の発生率が高い中国河北省磁県から産出された食料品には、真菌類およびカビ毒による汚染が見つかっている。食道癌を病因レベルで予防するための科学的根拠を確立するために、古典的な真菌培養法と高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により、磁県産食品の真菌類・カビ毒汚染を分析した。1990年から1994年まで、トウモロコシ/小麦の標本 220 検体およびトウモロコシ標本 34 検体を研究した。対照標本として、1990年に食道癌の発生率が比較的低い地域である贊皇県から産出されたトウモロコシの標本 26 検体についてカビ毒の分析を行った。その結果、トウモロコシおよび小麦の真菌汚染は深刻で、*Fusarium moniliforme* など主要汚染菌のいくつかに発癌性があることが明らかになった。HPLC の結果によれば、山間部におけるカビ毒ステリグマトシスチンの検出率 (5/8) と平均含有量 (9.14 $\mu\text{g}/\text{kg}$) は、低リスク地域の対照標本 (3/26、0.76 $\mu\text{g}/\text{kg}$) と比較しても、また丘陵地 (検出率、平均含有量共に 0) や平野部 (1/18、1.29 $\mu\text{g}/\text{kg}$) との比較でも有意に高かった。デオキシニバレノール (DON) の検出率は、平野部 (8/18) に比べて山間部および丘陵地 (それぞれ 5/8、4/8) でやや高く、DON の平均含有量は、山間部や丘陵地 (それぞれ 50.56 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、46.45 $\mu\text{g}/\text{kg}$) に比べて平野部 (90.45~170.22 $\mu\text{g}/\text{kg}$) で有意に高かった。

その後2年間で、平野部の2つの村で産出された標本からアフラトキシン AFB1 が検出された。AFB1 の平均含有量は 0.0183 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、最高含有量は 0.0497 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。山間部や丘陵地帯の標本から AFB1 は検出されなかった。また、全標本の半数以上から AFG1 が検出され、濃度は 8.77~46.51 ng/kg であった。AFG2 は検出されなかった。本研究の結果は、現時点で磁県産食品の真菌・カビ毒汚染率が非常に高いことを示唆している。

デオキシニバレノール経口暴露後のマウスにおけるサイトカイン

mRNA の示差的発現： 用量反応と経時変化

B6C3F1 マウスをボミトキシシン（デオキシニバレノール、DON）に急性経口暴露すると、マクロファージおよび T 細胞によりリンパ組織内で特徴的に産生されるサイトカインの mRNA 発現が誘発されることは既に知られている。本研究では、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-12、IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IL-12、TGF- β という各種サイトカインの mRNA 発現に DON が及ぼす影響を用量別に評価し、その反応動態を検証した。0、0.1、0.5、1、5、25 mg/kg の DON に単回経口暴露し、2 時間後に逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法（RT-PCR）とハイブリダイゼーション分析法の併用により脾臓およびパイエル板のサイトカイン mRNA 発現レベル（それぞれ、全身免疫区画および粘膜免疫区画の指標）に現れる影響を評価した。DON の暴露量が 5 mg/kg および 25 mg/kg のときには、炎症性サイトカイン IL-1 β 、IL-6、および TNF- α 、T ヘルパー1 型（Th1 型）サイトカイン IFN- γ および IL-2、T ヘルパー2 型（Th2 型）サイトカイン IL-4 および IL-10 の各 mRNA 発現が有意に誘発されたが、1 mg/kg 以下の用量では影響が認められなかった。IL-12p40 の mRNA 発現も誘発されたが、IL-12p35 の mRNA 発現には影響が現れなかった。これらの影響は、パイエル板よりも脾臓で著明に現れた。IL-5 および TGF- β の mRNA は、脾臓およびパイエル板で構成的に発現したが、DON には影響されなかった。DON 25 mg/kg への経口暴露後 1 時間目、2 時間目、4 時間目、8 時間目、24 時間目にサイトカインの mRNA レベルを測定したところ、mRNA の発現動態は、サイトカインの種類によって異なり、また脾臓とパイエル板でも差違があった。脾臓における mRNA 発現レベル上昇の持続時間は、TNF- α 、IL-6、IFN- γ 、IL-10 で 1~8 時間、IL-1 β 、IL-12p40、IL-2、IL-4 で 1~4 時間であった。パイエル板における持続時間は IL-6、IL-2、IL-10 で 1~8 時間、IL-1 β 、IL-12p40、TNF- α で 1~4 時間、IFN- γ で 1~2 時間であった。血清中の TNF- α 、IL-6、および IFN- γ のレベルは DON 25 mg/kg 暴露後 3 時間にわたり上昇したことから、脾臓およびパイエル板の mRNA 発現レベルの上昇は、全身におけるこれらサイトカインの産生量増大と相関すると考えられる。結論として、本研究の結果は、DON の単回暴露により生体内で種々のサイトカインの遺伝子発現が急速に誘発され、暴露後 24 時間以内に見かけ上は元の発現レベルに戻ることを示している。サイトカイン発現レベルの上昇は、DON およびその他のトリコテセンの病態生理学的作用に重大な役割を果たすと考えられる。

デオキシニバレノールの反復・亜慢性経口暴露後のマウスにおける サイトカイン遺伝子発現誘導： 毒素による示差的反応性低下と回 復

マウスにおけるボミトキシシン（デオキシニバレノール、DON）への単回経口暴露は、リンパ組織内でマクロファージおよび T 細胞により産生されるサイトカイン mRNA の迅速発現を誘発することは既に知られている。同じ動物モデルを使って、過去の DON 暴露歴が次の DON 暴露に対するサイトカインの反応にプラスに影響するかマイナスに影響するかを判定するために、DON の短期間経口暴露（1 日 1 回連続 2～7 日経口投与）および食事による亜慢性（4 週間）暴露がサイトカイン mRNA の発現に及ぼす影響を評価した。DON 0、5、25 mg/kg の単回経口暴露またはこれと同じ日用量で連続 2 日暴露を行い、RT-PCR 法とハイブリダイゼーション法の併用により、最終暴露から 2 時間後の脾臓のサイトカイン mRNA 発現レベルを比較した。DON 単回暴露後には強いサイトカイン mRNA 反応が起こり、2 回目の DON 投与後には、インターロイキン（IL）-6、腫瘍壊死因子（TNF）- α 、IL-1 β 、および IL-12p40 について弱いながらも有意な mRNA 発現誘導が観察された。インターフェロン（IFN）- γ 、IL-2、IL-4、IL-10 の mRNA にも同様の傾向が現れたが、その発現誘導は有意なレベルに達していなかった。血清中の TNF- α および IL-6 の蛋白発現もサイトカイン mRNA の反応パターンと酷似していたが、反応性低下はサイトカイン mRNA ほど著明ではなかった。また、マウスに DON を 1 日 0、0.5、2、または 5 mg/kg の用量で連続 2 日間、4 日間、または 7 日間投与し、最終投与から 2 時間後に脾臓およびパイエル板のサイトカイン mRNA 発現レベルを評価した。DON 2 mg/kg および 5 mg/kg の暴露群では、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-12p35、IL-12p40、IL-2、および IL-10 の mRNA の相対的発現量は暴露回数が多いほど高かったが、IFN- γ および IL-4 mRNA には影響が現れなかった。マウスに DON 0 ppm、10 ppm、25 ppm を 4 週間食餌投与したときには、特に TNF- α 、IL-2、IFN- γ 、および IL-10 の mRNA の発現レベル上昇が顕著だった。しかし、DON を食餌投与されたマウスに対して、RNA 単離の 2 時間前に 1 日摂取量相当の経口負荷試験を行ったところ、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-12p40、IL-12p35、IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-10 について活発な mRNA 反応が観察された。全般的に、脾臓はパイエル板に比べて反応性が高かった。本研究結果は、過去に DON の単回投与歴のある場合、2 回目の DON 投与に対するサイトカイン mRNA の反応は有意ながら弱いことを示している。ただし、DON に反復暴

露するにつれて、このような反応性低下は消失する。本研究のデータは、DON やその他のトリコテセン系マイコトキシンの病態生理学的・免疫学的作用にサイトカイン発現レベルの上昇が寄与しているという説の裏付けとなる。