

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20405042

研究課題名(和文) 研究課題名(和文) タイにおけるカビ毒分解酵素の探索と家畜カビ毒疾病防除に関する研究

研究課題名(英文) The study on mycotoxin detoxification and protection of animal mycotoxicoses in Thailand.

研究代表者 熊谷 進(KUMAGAI SUSUMU)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：60109965

研究成果の概要(和文)：カビ毒高濃度汚染地域であるタイにおいて、カビ毒を代謝し解毒する微生物や動物組織を探索するために、タイのカセサート大学と共同で収集したカッサバ栽培農地を中心とした土壌から分離した細菌と真菌のカビ毒代謝活性を調べた。カビ毒としてアフラトキシン(AF)、オクラトキシンA(OA)、ゼアラレノン(ZEA)を各試料に添加し培養した後、培養物を分析に供した。その結果、一部の菌によってAFB1とOAが代謝変換されることが認められた。また、タイ中央部において飼育されているウマ・ヒツジ・ブタの糞便および糞便に由来する嫌気性菌による上記カビ毒の代謝も合わせ調べたが、明瞭な代謝変換は認められなかった。動物組織に関しては、ブタやニワトリ等の家畜ならびにマウス等の実験動物の肝臓組織によるAFB2の代謝およびヤギ組織におけるゼアラレノンの代謝を検討したところ、各種動物の肝臓分画によるAFB2からAFB1への代謝の可能性が示唆され、ヤギの諸臓器におけるゼアラレノンからゼアラレノールへの代謝が認められた。

研究成果の概要(英文)：In order to find metabolic detoxification by micro-organisms in soil of Thailand, where heavy contamination with mycotoxins has been observed, bacteria and fungi isolated from Cassava farms in Thailand were examined for their activities to metabolize aflatoxin, ochratoxin A and zearalenone. The result demonstrated some bacteria and fungi to metabolize aflatoxin B1 and ochratoxin A. Feces of horse, sheep and pig living in the central region of Thailand, and anaerobic bacteria isolated from the feces, were also examined for their metabolic activities toward mycotoxins, but clear metabolism was not found. With regard to animal tissues, a possible conversion of aflatoxin B2 to B1 by the liver tissues from various animals was suggested. Also tissues of various organs of goat were demonstrated to metabolize zearalenone to alpha- and beta-zearalenols.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2009年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2010年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
総計	13,300,000	3,990,000	17,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学獣医学・応用獣医学

キーワード：アフラトキシン、ゼアラレノン、タイ、家畜、分解

1. 研究開始当初の背景

カビ毒は穀物等農作物を広く汚染し、飼

料や食品の汚染を招来する。カビ毒による家畜の被害および人への健康影響は甚大

であり、2004年と2005年にケニアで相ついで多数の死者を伴うアフラトキシン中毒事例が発生するなど、現在に至るも世界各地でヒトと家畜の急性中毒事例が報告されている。アフリカおよび中国においてはアフラトキシンによるヒトの肝臓がんの発生が、南アフリカや米国においてはフモニシンによるヒトの食道がんやウマの白質脳症の発生が認められている。カビ毒汚染を防止するために農作物の生産および流通において様々な方法が試みられてきたが、いずれも目に見える効果を発揮できず、広く実用化されるには至っていないため、被害防止のための手段として規制値を設定し汚染飼料や汚染食料品を廃棄せざるを得ない。しかし、食料資源として穀物の約1/4をカビ毒汚染によって廃棄せざるを得ない実態（WHO推定）などから、カビ毒によるヒトや家畜の健康危害を低減するためのさらなる強力な手段と方策が望まれている。

こうした背景の下に申請者らは、カビ毒汚染の実態とその機構、カビ毒の動物体内における代謝様式とその支配因子、カビ毒の毒性発現等の研究を行ってきた。平成14-15年度に基盤研究（一般）（B）「動物におけるアフラトキシン解毒機構の研究」により、アフラトキシンの動物体内解毒機構について、とくに新たにブタにおいてグルタチチオンSトランスフェラーゼが主たる解毒代謝に関わる酵素であることを見出したことから、この酵素を含めてカビ毒の解毒代謝に関わる酵素群の制御を通じた毒性軽減化方法の開発に向けた研究を行なうこととした。さらに、平成15-17年度の基盤研究（海外）（B）「タイ国における飼料中のカビ毒自然汚染の家畜家禽疾病発生に及ぼす影響に関する研究」により、

タイの土壌と農作物、飼料のカビ毒汚染の実態、とくにブタにおいてゼアラレノンおよびアフラトキシンによると推定される疾病事故が発生している実態をそれぞれ見出したことから、カビ毒濃厚汚染モデル地域としてのタイにおいて、カビ毒生産菌と共生しているカビ毒分解酵素を有する微生物を土壌と動物糞便から探索するとともに、高濃度カビ毒に暴露されてきた歴史をもつ動物からカビ毒分解酵素を探索することを考え、本研究を企画した。

2. 研究の目的

カビ毒を代謝不活化する酵素の発見およびそれを利用したカビ毒の毒性低減の開発に役立つ知見を得ることを目標に、

- （1）カビ毒濃厚汚染地域であるタイの土壌からカビ毒不活化活性を持つ真菌と細菌を、また、家畜等の動物糞便からカビ毒解毒代謝活性を持つ細菌を見出す。また、
- （2）タイの土壌と水域に生息する魚貝、節足動物等の無脊椎動物におけるカビ毒代謝を究明し、カビ毒解毒酵素を探索する。
- （3）家畜等の動物組織によるカビ毒の解毒代謝を究明する。なお、カビ毒としては、世界的にヒトや家畜への被害が大きいアフラトキシン、オクラトキシン、ゼアラレノンに焦点を当てる。

3. 研究の方法

（1）土壌等によるカビ毒代謝

これまで進めてきた研究により、タイにおいてはカッサバ、ヒマワリ、トウモロコシに比較的高いアフラトキシンまたはゼアラレノンの汚染が認められたことから、主にそれら農作物生産農場の土壌を、タイ東北部、北部、及び中央部において採取した。

家畜・家禽の糞便は、カンペンサンキャ

ンパスで飼育している品種から採取した。

北部はチェンマイ大学(カセサート大学から依頼してもらう)、東北部はカセサート大学サコナコンキャンパス、中央部はカセサート大学バンケンおよびカンペンサンキャンパスをサンプリング拠点とし、各拠点周辺部から土壌試料を採取した。アリ土壌・糞便サンプルによるアフラトキシンB1 (AFB1)、オクラトキシンA、およびゼアラレノンの代謝のスクリーニングは、サンプルと概知量のカビ毒をインキュベーションした後に有機溶剤(主に酢酸エチル)で抽出し、抽出物を薄層クロマト(TLC)で分析することによって行なった。スクリーニングによってカビ毒減少が認められたサンプルについては、有機溶剤抽出物および水溶性分画をHPLCに供し、概知代謝物については、必要に応じてLC/MSでの確認を行った。アフラトキシンに関しては、3H-AFB1を基質として用い、反応生成物の酢酸エチル抽出画分と水溶性画分をフローシンチレーションカウンターに連結したHPLCで分析することによって代謝産物の有無を確認した。

土壌からは、ポテトデキストロース寒天培地等を用いて、とくに本研究で対象とするカビ毒生産菌である *Aspergillus* と *Fusarium* 属の真菌、およびそれらと同一培地上に出現した真菌を優先的に分離した。細菌についてはR2A培地を用いて、出現したコロニーを採取した。分離した菌の代謝活性は、上記と同様にカビ毒とともに液体培養した後に抽出し、TLCまたはHPLCで代謝物の存否を調べた。

糞便からは、ハートインヒュージョン寒天培地等を用いて、好気および嫌気培養後に出現したコロニー(多数をまとめて)を分離した。分離した株またはコロニー集団を

概知量のカビ毒を含む液体培地中で培養した後に、土壌・糞便サンプルのスクリーニングで陽性になったサンプルについて優先的に、抽出物をTLCまたはHPLCに供しカビ毒の代謝を調べた。

(2) 動物臓器によるカビ毒代謝

3-6才の雌雄シバヤギの肝臓、腎臓、脳等の臓器を麻酔下で取り出し、液体窒素で急速凍結した後に -80°C に保存した。各臓器のミクロゾームとサイトゾールを常法にしたがって分離し、各分画をNADPH存在下でゼアラレノンとともに 37°C 下でインキュベーションした後にクロロフォルムで抽出し、抽出物中のゼアラレノンとその代謝物をHPLCで分析した。

In vitroで認められた代謝がin vivoで生起しているかどうかを知るために、2.5-6才の雌雄シバヤギにゼアラレノンを静脈注射した後に、頸動脈に装着したカニューレから採血し、血漿のクロロフォルム抽出物をHPLC分析に供することによって、代謝物の存否を調べた。

4. 研究成果

(1) 土壌試料

2008年に、カンチャナブリおよびチョンブリの各地域のカッサバ農場およびサトウキビ農場ならびにチェンマイ市近辺のトウモロコシ農場およびピーナッツ農場より土壌を採取し、それらのカビ毒代謝活性をTLCを用いて調べ、代謝活性の認められた試料から分離された細菌属を同定した。その結果、3箇所のカッサバ農場、2箇所のサトウキビ農場、1ヶ所のトウモロコシ農場の土壌にAFB1とAFG1に対する代謝活性が認められた(図1)。それら土壌からは *Pseudomonas* spp が最も高頻度に分離され、その他に *Alcaligenes* spp, *Acinetobacter* spp が分離された。オクラトキシンAとゼアラレノンに対しては明確な代

謝活性を検知することができなかった。

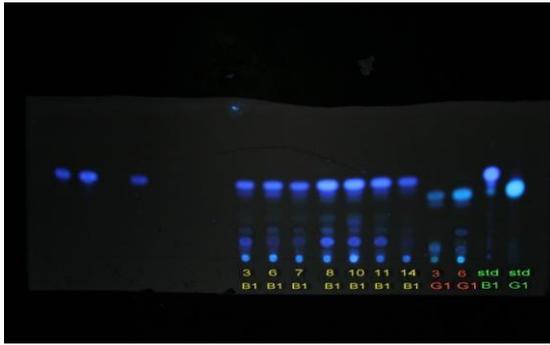
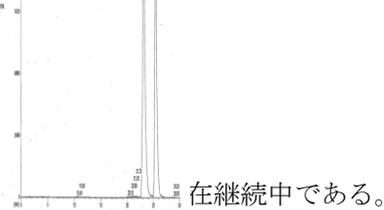


図1. AFB1 と AFG1 の代謝

右側2レーンそれぞれ AFB1 と AFG1 の標準物質。数字は試料番号。左側数レーンも AFB1 標準物質。

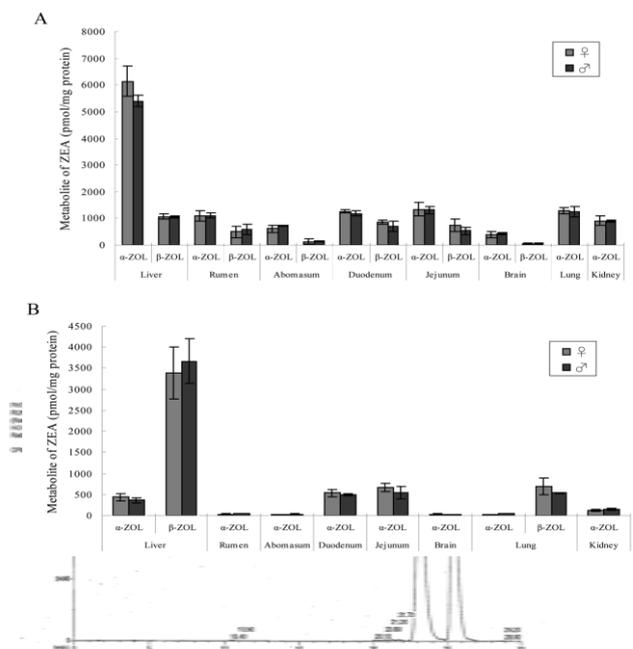
2009年に、カンチャナブリ地域のカッサバ農場、トウモロコシ農場およびサトウキビ農場ならびにサコナコン地域の米農場およびトウモロコシ農場より土壌を採取し、前年同様に分析に供した。その結果、カッサバ農場の土壌に前年よりも弱いながら AFB1 に対する代謝活性が認められた。その他の農場の土壌の代謝活性は極めて微弱であった。

2010年に、カンチャナブリ地域のカッサバ農場に絞って調査を行った。土壌に代謝活性の認められた試料に由来するポテトデキストロース寒天培地上のカビ集落および R2A 培地上の細菌集落について、AFB1 の存在下で液体培地で培養してから TLC 分析で代謝活性の有無を調べた。活性を示した集落については、3H-AFB1 の存在下で上記と同様に増菌培養してからフローシンチレーションカウンター/HPLC を用いて代謝の有無を調べた。その結果、各集落培養物の酢酸エチル抽出物に AFB1 以外の大きなピークが一つ認められた (図2)。抽出後の水溶性画分からは代謝物は認められなかった。代謝が明確に認められたカビは *Aspergillus terreus*、*Aspergillus fumigates*、*Cladosporium sp.*、*Emericella nidulans* と同定された。細菌の同定および代



(2) 動物臓器によるカビ毒代謝

ヤギの肝臓サイトゾール分画は、とくにゼアラレノン α を α -ゼアラレノールに変換する活性が高く、同ミクロソーム分画はとくに β -ゼアラレノールに変換する活性が高かった (図3)。他の臓器もゼアラレノールへの変換活性を示したが、その中では消化管サイトゾールに比較的高い活性が認められた。ゼアラレノンに比して α -ゼアラレノールはエストロゲン活性が高く、 β -ゼアラレノールは低いことが知られていることから、これら結果は、ゼアラレノンに対して各臓器が毒性の亢進と減弱の双方向の活性を持つことを示唆している。これら *in vitro* の知見を *in vivo* で確認するためにヤギにゼアラレノンを静脈注射した後に血中の代謝物の有無を調べた結果、両ゼアラレノールともに見出されたことから、*in vitro* で認められた各臓器におけるゼアラレノンの代謝は *in vivo* でも生起することが示唆された。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計13件) (全て査読あり)

- 1) Watanabe M, Tsutsumi F, Lee KI, Sugita-Konishi Y, Kumagai S, Takatori K, Hara-Kudo Y, Konuma H. Enumeration of Fungi in Fruits by the Most Probable Number Method. J Food Sci. 2010 Nov;75(9):M564-M567
- 2) Nakatani Y, Satoh T, Saito S, Watanabe M, Yoshiike N, Kumagai S, Sugita-Konishi Y. Simulation of deoxynivalenol intake from wheat consumption in Japan using the Monte Carlo method. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 2011 Apr;28(4):471-6.
- 3) Watanabe M, Lee K, Goto K, Kumagai S, Sugita-Konishi Y, Hara-Kudo Y. Rapid and effective DNA extraction method with bead grinding for a large amount of fungal DNA. J Food Prot. 2010 Jun;73(6):1077-84.
- 4) Poapolathep A, Poapolathep S, Sugita-Konishi Y, Wongpanit K, Machii K, Itoh Y, Kumagai S. The effect of naringenin on the fate and disposition of deoxynivalenol in piglets. J Vet Med Sci. 2010 Oct;72(10):1289-94.
- 5) Sugita-Konishi Y, Sato T, Saito S, Nakajima M, Tabata S, Tanaka T, Norizuki H, Itoh Y, Kai S, Sugiyama K, Kamata Y, Yoshiike N, Kumagai S. Exposure to aflatoxins in Japan: risk assessment for aflatoxin B1. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 2010 Mar;27(3):365-72.
- 6) Aoyama K, Nakajima M, Tabata S, Ishikuro E, Tanaka T, Norizuki H, Itoh Y, Fujita K, Kai S, Tsutsumi T, Takahashi M, Tanaka H, Iizuka S, Ogiso M, Maeda M, Yamaguchi S, Sugiyama K, Sugita-Konishi Y, Kumagai S. Four-year surveillance for ochratoxin a and fumonisins in retail foods in Japan. J Food Prot. 2010 Feb;73(2):344-52.
- 7) Dewa Y, Kemmochi S, Kawai M, Saegusa Y, Harada T, Shimamoto K, Mitsumori K, Kumagai S, Sugita-Konishi Y, Shibutani M. Rapid deposition of glomerular IgA in BALB/c mice by nivalenol and its modifying effect on high IgA strain (HIGA) mice. Exp Toxicol Pathol. 2011 Jan;63(1-2):17-24.
- 8) Mizutani K, Kumagai S, Mochizuki N, Kitagawa Y, Sugita-Konishi Y. Determination of a yellow rice toxin, luteoskyrin, in rice by using liquid chromatography-tandem mass spectrometry with electrospray ionization. J Food Prot. 2009 Jun;72(6):1321-6.
- 9) Kumagai S, Nakajima M, Tabata S, Ishikuro E, Tanaka T, Norizuki H, Itoh Y, Aoyama K, Fujita K, Kai S, Sato T, Saito S, Yoshiike N, Sugita-Konishi Y. Aflatoxin and ochratoxin A contamination of retail foods and intake of these mycotoxins in Japan. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 2008 Sep;25(9):1101-6.

- 10) Poapolathep A, Poapolathep S, Klangkaew N, Sugita-Konishi Y, Kumagai S. Detection of deoxynivalenol contamination in wheat products in Thailand. J Food Prot. 2008 Sep;71(9):1931-3.
- 11) Dong M, Tulayakul P, Li JY, Dong KS, Manabe N, Kumagai S. Metabolic conversion of zearalenone to alpha-zearalenol by goat tissues. J Vet Med Sci. 2010 Mar;72(3):307-12.
- 12) Dong M, He XJ, Tulayakul P, Li JY, Dong KS, Manabe N, Nakayama H, Kumagai S. The toxic effects and fate of intravenously administered zearalenone in goats. Toxicon. 2010 Feb-Mar;55(2-3):523-30.
- 13) Kumagai S, Nakajima M, Tabata S, Ishikuro E, Tanaka T, Norizuki H, Itoh Y, Aoyama K, Fujita K, Kai S, Sato T, Saito S, Yoshiike N, Sugita-Konishi Y. Aflatoxin and ochratoxin A contamination of retail foods and intake of these mycotoxins in Japan. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 2008 Sep;25(9):1101-6

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊谷 進(KUMAGAI SUSUMU) 東京大学・大学院
農学生命科学研究科・教授

研究者番号:60109965

(2) 研究分担者

小西 良子(KONISHI YOSHIKO) 国立医薬品食
品衛生研究所・衛生微生物部・部長

研究者番号:10195761

作田 庄平(SAKUDA SHOHEI) 東京大学・大学
院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号: 80192087

(3) 連携研究者

高鳥浩介 (TAKATORIKOUSUKE) NPO法人カビ相
談センター・理事長

Prapeuk Tangmunkhong, Kasetsart

University, Faculty of Veterinary Medicine,
Associate Professor.

Amnart Poapolathep, Kasetsart University,
Faculty of Veterinary Medicine,

Associate Professor.