

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658226

研究課題名(和文)トリコテセン系かび毒へのアンモニア暴露による生成物の特定と毒性の解明

研究課題名(英文)Studies on ammonia exposure to trichothecene mycotoxin, deoxynivalenol

研究代表者

近藤 誠 (Kondo, Makoto)

三重大学・生物資源学研究科・助教

研究者番号：50432175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：トリコテセン系カビ毒であるデオキシニバレノール(DON)に対するアンモニア暴露による低減化を検証した。DONはアンモニア溶液中で減少するが、短期的(24時間)な反応では中和することで一部復元したため、この反応には可逆的と不可逆的な構造変化が混在していることが明らかとなった。また長期間(3週間)反応させることで、クロマトグラム上ではDONのピークは検出されず、さらに反応液の毒性も消失することが明らかとなった。長期的に反応させた結果、HL60細胞に対する毒性が消失したため、反応生成物にはHL60細胞に対する毒性が認められないことが推察された。

研究成果の概要(英文)：Research was conducted to determine the effect of ammonia exposure to trichothecene mycotoxin, deoxynivalenol (DON). DON concentration decreased by ammonia exposure in a dose dependent manner. DON was transformed both reversibly and irreversibly by a short period (24 h) of ammoniation. In contrast, after 3 weeks ammoniation, DON was not detected completely. Cytotoxicity to human leukemia cell line HL60 by DON-NH₃ reacted solution was present after 24 h reaction, but not detected any toxicity after 3 week reaction.

研究分野：畜産学・草地学

科研費の分科・細目：畜産学・草地学

キーワード：デオキシニバレノール アンモニア 細胞毒性

1. 研究開始当初の背景

*Fusarium graminearum*が産生するデオキシニバレノール (DON) およびニバレノール (NIV) は、トリコテセン骨格を有するかび毒で、人や動物に対する毒性として消化器系の障害(嘔吐や下痢)や造血系の機能低下(白血球減少症)などが知られている。DON や NIV は国内外の麦やトウモロコシなどの農産物や飼料でその汚染が見つかっており、家畜に対しては採食量の低下、消化器系や免疫系に対する毒性が報告されており、DON や NIV の発生量の把握と共に毒素産生の抑制方法や低減化が望まれる。先行研究では、DON の低減化方法として加熱やオートクレーブ処理や化学処理などが試みられている。それらの報告では、DON は熱に対して安定であり、オートクレーブによる減少も最大 12%にとどまっていた。また高濃度のオゾン処理や高温条件下でのNaHSO₃との反応によりDONが低減することが報告されているが、反応条件が複雑であり、より温和な条件下での低減方法が望まれる。

申請者はこれまでにアンモニアの暴露がDON や NIV の低減に有効であることを見出した。しかし、アンモニア濃度や反応時間による影響は不明であり、また、生成物の特定やその毒性については不明のままである。

2. 研究の目的

本研究ではDONのアンモニアによる低減化を目標に、DONに対するアンモニアの反応条件の検討や生成物の特定、さらには反応後の毒性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

実験 1. デオキシニバレノールの残存性に対するアンモニア濃度および反応時間の影響

1-1. DON の残存性に対するアンモニア濃度の影響

DON をアンモニア水 (アンモニア濃度 0 ~

5.6%) に溶解し、30 で 24 時間インキュベートした。反応開始時の DON の終濃度は 10mg/L とした。(以下同様)。以上の溶液をフィルターろ過後、HPLC に注入し、DON を定量し、残存性を確認した。DON の定量は ODS カラム (250mm x 4.6mm, 粒径 5 μm) を用い、移動相 (水 : メタノール : アセトニトリル = 18 : 1 : 1) を流速 1.0mL/min で流し、UV 220nm で検出した。

1-2. DON の残存性に対するアンモニア処理時間の影響

5.6%アンモニア水にDONを6, 12, 24, 48時間および3週間反応させた。フィルターろ過後、HPLC に注入し、DON を定量し、残存性を確認した。

1-3. DON の残存性に対するアンモニア処理後の中和の影響

DON をアンモニアと反応させた後、中和による可逆性を検証した。DON を 24 時間および 3 週間 5.8%アンモニア水と反応させた後、溶液を減圧乾固させ、50mM リン酸緩衝液 (pH7) に溶解させ、フィルターろ過後、HPLC に注入し、DON を定量し、残存性を確認した。

1-4. DON のアンモニア処理による生成物の探索

HPLC および HPLC/MS/MS によりアンモニアとの反応により生じた生成物の探索を UV 検出および質量分析により行った。先の分析条件の移動相を水とアセトニトリルとし、割合を 98:2 ~ 2:98 まで変化させて溶出を行った。

実験 2. DON 含有コムギ穀実に対するアンモニア処理の影響

植物体に含まれる DON に対してのアンモニア処理の効果を検証するため、DON 含有コムギに対するアンモニア処理を行い、DON 残存性を確認した。*Fusarium graminearum* をコムギ

穀実に接種し、DON 汚染コムギを作成した(コムギ穀実中の DON 濃度は乾物中 8.7mg/kg)、1mm メッシュを通過するように粉碎した DON 含有コムギに各種濃度のアンモニア水を噴霧し、30℃で5日間インキュベートした。反応系のコムギの水分は 37.5%となるように設定した。コムギ中のアンモニア濃度は乾物中 0.56、1.40、2.8、5.6%とした。反応後、50℃の通風乾燥機内で乾燥させ、粉碎した。その後、84%アセトニトリルで DON を抽出し、多機能カラム (Romer Lab 社#227) により粗精製後、HPLC により DON を定量した。

実験3. アンモニア処理後の DON 溶液の残存毒性の評価

DON を 24 時間および 3 週間 5.6%アンモニア水と反応させた後、細胞毒性の評価を行った。反応液は減圧乾固させてアンモニアを除去した後、培地 (RPMI-1640) に溶解させた。細胞毒性の評価にはヒト前骨髄球白血病細胞 HL60 を用い、培地には RPMI-1640 +10% heat inactivate FBS を用いた。無処理の DON およびアンモニア処理後の DON を含む培地を各ウェルに 11 μ L 分注し、その後各ウェルに HL60 細胞を含む培地を 100 μ L 分注した。24 時間培養後、水溶性テトラゾリウム塩 (WST-8) を用いて増殖した細胞数を計測した。DON を含まない培地のみで培養した際の増殖量を基に各処理による HL60 細胞の増殖阻害率を算出した。

4. 研究成果

実験1.

1-1. DON の残存性に対するアンモニア濃度の影響

図1に示すように、アンモニアの濃度依存的に DON が減少し、終濃度 5.6%の時に約 6%まで低減した。

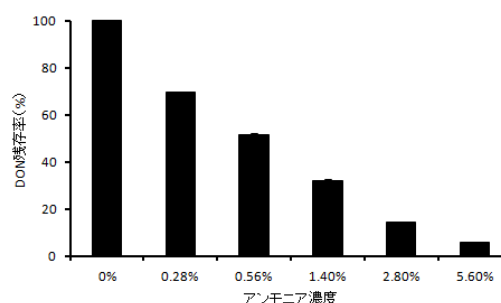


図1. アンモニア濃度に対する DON の残存率 (24 時間後)

1-2. DON の残存性に対するアンモニア処理時間の影響

終濃度 5.6%のアンモニア水で DON を反応させた結果、DON の残存率は 3、6、12、24、48 時間および 3 週間後にはそれぞれ 74、59、33、11、14、0%となった。初期の反応は 24 時間でほぼ一定となったと考えられたが、その後も徐々に反応が進行し、3 週間後には検出限界以下となった。

1-3. アンモニア処理後の中和の影響

DON を 5.6%アンモニア水で 24 時間反応させた結果、残存率は中和前で 15.7%であったのに対して、中和後には 44.4%まで回復した。一方、3 週間処理した場合には、中和によるピークの復元はクロマトグラム上認められなかった。以上のことから、DON は短期的なアンモニアとの反応では、可逆的と不可逆的な構造変化が混在していることが推察された。一方、長期的にアンモニアと反応することで、完全に反応が進み、構造が変化したことが認められた。

1-4. DON のアンモニア処理による生成物の探索

DON を 5.6%アンモニア水で 3 日間反応させたものを分析に供した。その結果、UV 220nm の検出では、対象物である DON (Rt 26.5min) より前方に 2 つのピークを、後方に 5 つのピークを確認した。

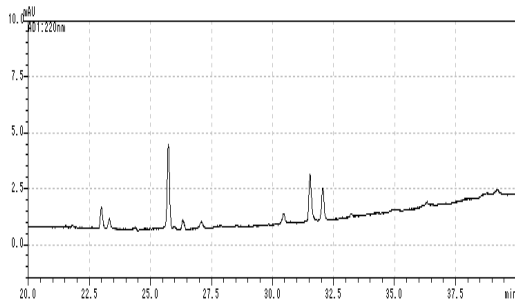


図 2 . アンモニア処理した DON の HPLC クロマトグラム

HPLC/MS/MS 分析により未同定ピークの分子量の推定を試行したが、未解明であり更なる検討が必要である。

実験 2. DON 含有コムギ穀実に対するアンモニア処理の影響

コムギ穀実中に含まれる DON 濃度はアンモニア濃度を高めることで減少したが、コムギ中のアンモニア濃度が 2.8 5.6% でそれぞれ DON は 75%、28% 残存した (図 3)。実験 1 で行った水溶液中の反応と比較して、低減割合が小さい原因として、植物体中では水溶液中と比べて溶媒となる水が少ないこと、アンモニアが植物体中の他の分子と反応すること、植物体中の緩衝作用によりアンモニアが中和されることなどが考えられた。

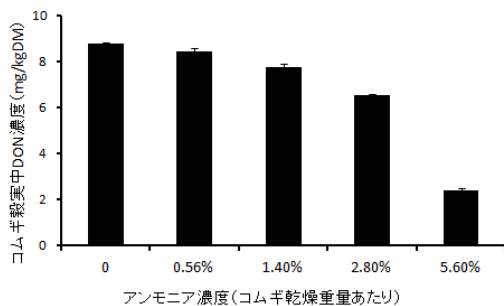


図 3 . アンモニア処理によるコムギ穀実中 DON 濃度の低減

実験 3. アンモニア処理後の DON 溶液の残存毒性の評価

48 時間ならびに 3 週間アンモニアで反応させた DON 溶液に残存する細胞毒性を、HL60 細胞の増殖阻害活性により評価した。HL60 細胞は無処理の DON では終濃度 1, 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ においてそれぞれ 88, 68% 増殖阻害を受けた。DON を 5.6% アンモニア水で 48 時間処理したことで、増殖阻害活性は 77, 56% とわずかに低減したが、3 週間反応させた DON 溶液では、増殖阻害は認められなかった。

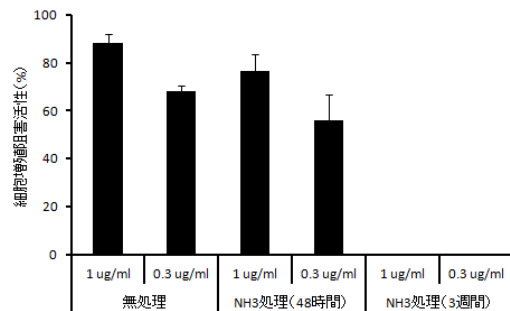


図 4 無処理およびアンモニア処理をした DON による HL60 細胞増殖阻害活性

以上の結果より、DON はアンモニア処理により低減するが、短期的 (24 時間) な反応には可逆的と不可逆的な構造変化が混在していることが明らかとなった。また長期間 (3 週間) 反応させることで、クロマトグラム上では DON のピークは検出されず、さらに反応液の毒性も消失することが明らかとなった。新たに生成した化合物の特定には至らなかったが、長期的に反応させた結果、HL60 細胞に対する毒性が消失したため、新規生成物も HL60 細胞に対する毒性は弱いあるいは認められないことが推察される。

家畜飼料へのアンモニア処理は、窒素付加と繊維の消化率向上のため 1950 年代から実用化された技術であり、反芻家畜の生産性が向上することがわかっているが、このアンモニア処理には DON の低減化の効果も有ることが期待された。

(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0件)

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

近藤 誠 (KONDO, Makoto) 三重大学・大学

院生物資源学研究科・助教

研究者番号：50432175

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし