第1回 マイコトキシン研究会一般講演要約

東京大学医科学研究所（昭和50年1月18日）

鳥取県日南町周辺の仔牛中毒死に関する研究
特に飼料のミクロフローラについて

角田 広・岸 菊子*1・上野芳夫*2・大久保薫*3・斉藤 守*4

H. TSUNODA, K. KISHI*1, Y. UENO*2, K. OKUBO*3, and M. SAITO*4:
Studies on the fatal poisoning of calves in Nichinan-cho, Tottori
An investigation on the mycoflora of feed

近年鳥取県日南町周辺で、主として和牛の生後1～6ヶ月の間に奇声を出し急死する病気が発生し、その病状観察したものはただ1人にすぎず、剖検の結果はただ心臓が膨大しているだけで、他に異状は認められない。まだ母乳で生育中であるから乳腺を通じて分泌された毒性物質による中毒死と判断される。われわれは1973～1974年の間にわたり、現地におもむき投与している飼料を採取して、微生物学的調査研究を始めた。

日南町の地形及び飼育状況

日南町は鳥取県と岡山県の県境に近く日野川上流に位置し、古生層の急伏著しき山間で日照時間短かく、多湿の地であり微生物の発育には好適地である。牛舎は本家と連結しているもの多く、内部は暗所で黒牛を見い出すに困難を感じるところが多い。夏期は山間、畦畔の草を主に少量の米糠、麴、大豆などを加え、冬期は稲藁、干草、豆殻などに濃厚飼料を加え飼育している。

1974年の仔牛中毒死状況

飼料採取に先だち、日南町で仔牛が斃死した農家を

*1 群馬大学教育学部（前橋市荒牧）

*2 東京理科大学薬学部（東京都新宿区市ヶ谷船河原町12）

*3 埼玉医科大学第一病理学教室（埼玉県入間郡毛呂山町）

*4 東京大学医科学研究所（東京都港区白金台4-6-1）

調査し、その飼料採取適当と思われる農家を表示すれば表1の通りである。

表1 飼料採取状況

No.	飼 育 主	生年月日	斃死月日	生存日数
1	高橋 久夫	1974. 3. 26	1974. 4. 1	6
2	坪倉 利夫	4. 27	4. 30	5
3	石橋とみ子	6. 25	6. 24	1
4	坪倉 富章	5. 1	5. 9	8
5	田辺 猛	1. 14	5. 7	123
6	加藤 和輝	10. 16	2. 13	120
7	宇田 正義	1. 23	1. 30	7
8	片岡 照	6. 17	6. 20	3

表1の通り、生後1～123日生存した牛を選び、現に投与している飼料を採取した。

飼料寄生カビの検定

1973年は秋に採取、1974年は8月上旬に採取を行なった。採取品目は稲藁、豆殻、菜豆殻、大豆殻、切藁、圧片麦、生大豆、大豆粕、干草、ペレット、虫害米、米糠、麴、配合飼料など30余検体であった。

検定方法：1973年は Czapek 寒天培地をもって行い、1974年は Czapek 寒天培地 1/ 当り 1～2g の酵母エキスを添加した培地をもって行なった。試料は培養前2～3時間10,000倍の achromycin 液に漬け細菌を抑制

表 2 鳥取県日南町における家畜飼料のミクロフローラ (1973.11)

採取場所 品名 菌名	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16															
	岸 庄片麦	8 岸 豆	8-2 豆	別所17 小豆殻	別所17 稻	別所17 粟	別所17 玄米	日南19 米	日南19 大豆	日南19 玄米	日南19 米	村上20 豆	村上20 乾草	村上20 小豆殻	古都20 大豆	古都22 稻
1 <i>Cladosporium</i>	6		3			9	5	4	3		2	9	8		6	
2 <i>Fusarium</i>	4	8	8	1		9	5	1	4		9	2	9	6		9
3 <i>Curularia</i>	3															4
4 <i>Epicoccum</i>							3						1			
5 <i>Sclerotinia</i>				9										9		
6 <i>Alternaria</i>							4		5	9						3
7 <i>Penicillium</i>													9			
8 <i>Aspergillus</i>								1								
9 <i>Trichoderma</i>								2								
10 <i>P. cyclospium</i>												9				
11 <i>A. versicolor</i>													9		1	
12 <i>Scopulariopsis</i>															1	
13 その他																

数字：9検体中の発現数

採取場所 品名 菌名	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11										
	岸 庄片麦	8 岸 豆	8-2 豆	別所17 小豆殻	別所17 稻	別所17 粟	別所17 玄米	日南19 米	日南19 大豆	日南19 玄米	村上20 豆
1 <i>A. candidus</i>	1,200	12,000						50,000			
2 <i>Monilia</i>		600,000						57,000			
3 不明糸状菌				4,000							
4 <i>A. versicolor</i>					1,500			100			
5 <i>A. ruber</i>					1,500						
6 <i>A. versicolor</i>								560,000			
7 <i>P. citreoviride</i>								100			
8 <i>P. urticae</i>								34,000			

数字：試料1g中の生菌数

した。有形飼料は基部を 0.5 cm の長さに切り、一皿に 3～5 ケ並べ、無形飼料は 1 g 単位で稀釈により流込培養をもって生菌数を出した。

実験結果

飼料中のカビ菌調査の結果は表 2 の通りである。

この表で見るように稲藁は *Fusarium*, *Absidia*, *Epicothium*, *Nigrospora*, *Sclerotinia*, *Mucor*, *Cladosporium* 属に *P. ochraceum* の出現が多く、干草、ペレットは *A. repens*, *A. pseudo-glaucus* が多く、飼料は黄変していた。米糠は特種の *A. candidus*, *Monilia* が最多を示し、Czapek 培地では発育が悪い。麩は *P. brevi-*

compactum が多く、表 2 では米糠（村上）から 1 g 当たり 100 ケの *P. citreo-viride* が検出できたが、表 3 では検出できなかった。

考 察

仔牛の急死の原因として mycotoxic に考えられることは citreoviridin 及び最近名取氏の報告にある、*A. candidus* が産出する A-trimethyl ether が関係あるように考えられる。しかしその他の *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* group などにありても、mycotoxin 産生株多く、これらの相乗作用も考慮しなければならないので、今後の研究をまつ。

ニンニクの腐敗病に関する研究

角 田 広・岸 菊 子*1

H. TSUNODA and K. KISHI*1: Studies on the dry rot diseases of garlic bulbs

貯蔵中の塊根、塊茎に寄生する *Penicillium* 属菌の被害で既知のものはグラジオラスの *P. gladioli*, フリージアの *P. canescens*, チュリップの *P. cyclopium*, ナガイモの *P. sclerotigenum*, ユリ及びスイセンの *Penicillium* sp. が報告されている。ニンニクについては今のところ報告が見当たらないので研究を進めた。前橋附近でニンニクを購入すると、外見は健全に見えるが、剥皮すると 1 kg 中無病のものは 14～15 個にすぎず、大部分のものが青カビの寄生を受け著しいものは調理に使用できないものがある。本品は調味料としてかなり広く使用されているので、本病を mycotoxin の立場から研究を進めてみた。

自然の病徴

軽度のものは塊茎の部位はきまらないが縦に長い、湿性茶褐色の斑点を形成している。重度のものは塊茎の一部または全部が湿性茶褐色を呈して、皺のあるもの落窪のあるものありて、寄生点を中心にして、結束枝の輪紋をえがき、輪紋部は灰緑色の分生孢子を形成している。香気は変化しないが、食用にはならない。病塊は乾燥状態となり固化するので dry rot disease と称す。

病原菌の分離

ニンニク塊の病斑部を切り取り Czapek yeast extract 寒天培地上におけば 1 週間程度で青カビを得る。輪紋上の孢子を培地上に塗布すれば同様青カビが得られる。これと同時に *Aspergillus*, *Trichothecium* が少数であるが得られる。

分離菌の同定

分離した *Penicillium* は 25°, 7 日で菌叢面は平滑で直径 4.2 cm に発育し、集落の中央は基面より高い、外縁は湿性色でその内側は白色顆粒状で分生孢子層を作る。その内側は鮮明な靑色を呈す。内部は灰味緑色で所々に緑色の濃き分生孢子が点在する。内側の孢子層はピロード状である。裏面は中央部が黄色強く、外縁は淡緑黄色を呈する。

本菌の形態は、conidiophores は 200×4 μ 内外、branches は 30×3 μ 内外、metulae は 15×3 μ 内外、sterigmata は 8×2.5 μ 内外、conidia は亜円形で 3～4 μ あり、conidiophores は束状を呈しているのて、Asymmetrica-Fasciculata に入り *Penicillium viridicatum* と決定した。

同時に分離した *Aspergillus* は菌叢中に菌核を形成し、*Sterigmatocystis* であり、緑色味強きところから

*1 群馬大学教育学部（前橋市荒牧）

Fig. 1. 上横列 自然病ニンニク
中横列 接種病ニンニク
下横列 無病ニンニク

Aspergillus terricola (*A. wentii* 群) に入る。三株目のカビは *Trichothecium roseum* に該当す。

接種試験

無病ニンニク茎に有傷の場合でも、無傷の場合でも、先に分離した、*P. viridicatum* の分生胞子を散布すれば2週間程度で発病が認められる。初めは湿性茶褐色で病徴が進むと少しく落窪み、結束枝の輪紋を形成し、徐々に乾燥して干腐病を呈す。病菌が蔓延して菌核状となるも、香気に変化はない。

結 び

(1) 前橋周辺で入手したニンニク塊茎は大部分が青

Fig. 2. *Penicillium viridicatum* 形態

カビで汚染されて、病徴は徐々に進行し、乾燥状の茶褐色カビ塊になる。

(2) 病塊茎から *Penicillium viridicatum* を分離することができ、有傷でも無傷でも接種ができ、簡単に自然にある病塊とおなじものを作ることができる。同時に *Aspergillus terricola*, *Trichothecium roseum* が分離できるが、前者と共同寄生はするが、単独では病徴が進まない。

(3) ニンニク腐敗菌は、*Penicillium viridicatum* と決定し、dry rot disease of garlic bulbs と称する。

日本国内土壤中における aflatoxin 生産菌の分布について

高鳥 浩介*1・高橋 恵子*1・宇田川 俊一*2・倉田 浩*2

K. TAKATORI*1, K. TAKAHASHI*1, S. UDAGAWA*2, and H. KURATA*2:
Distribution of aflatoxin-producing fungi in Japanese soils

土壤は食品を変質する真菌が由来する環境汚染源と

して、最も重要なものの1つである。とくに、*Asper-*

*1 食品薬品安全センター Food & Drug Research Center (東京都豊島区高田 3-41-8)

*2 国立衛生試験所 National Institute of Hygienic Sciences, Tokyo (東京都世田谷区上用賀 1-18-1)

gillus flavus などアフラトキシン (以下 AF と略す) 生産菌については落花生に特異的高率に発見されること, また落花生由来の *A. flavus* が強力な AF 生産力を示す株の多いこと¹⁾からも, 土壌が有力な汚染源となっていることがうかがわれる。すでに, Maggon *et al.*²⁾ はインド土壌からの分離 *A. flavus* について AF 生産性を報告し, わが国においても沖縄県土壌から鶴田, 木村³⁾ が AF 生産菌の分離を資料として提出している。AF 強力生産株が主として熱帯産であることは, 以前より指摘されてきたことであるが, わが国における肝癌多発地域特殊性の指標として畑地土壌中の AF 生産菌の分布について検索を行った。

土壌試料は北海道, 群馬, 神奈川, 山梨, 長野, 福岡, 長崎, 宮崎, 鹿児島, 沖縄の10地域から集めた297点で, 主として畑地表層土をもちいた。菌分離には Warcup⁴⁾ の soil plate 法により, 麦芽寒天培地をもちい, 25°, 5~10日間培養を行った。*A. flavus* 菌群に属する出現菌を集め純粋分離後, Rec-assay 法により突然変異誘起活性を指標として AF 生産性を検索した。被検菌は *Bacillus subtilis* 17A Rec+ 株および 45T Rec- 株, 培養条件はショ糖一酵母エキス-麦芽エキス液体培地 (2% YES+malt extract 10 g/L), 25°, 7日間静置培養で, 対照 AF 生産菌としては *A. parasiticus*

ATCC 15517 株をもちいた。培養液 0.2 ml を検液とし, 既報⁵⁾に準じて突然変異誘起性を検索した。

表1に示すように, 関東以北では全く *A. flavus* 群の分離がみられず, 九州, 沖縄地方でのみ各々18, 24%, 平均14.5%の試料に *A. flavus* が発見され, 関西, 中国, 四国地方暖地については今後の研究を必要とするが, 温暖な亜熱帯地域に生息することが認められた。共存菌としては, *A. niger*, *A. terreus*, *Paecilomyces lilacinus*, その他 *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma* の諸属が主要であった。

A. flavus 群検出の44試料から *A. flavus* 群68株を分離し, AF 生産性を Rec-assay 法により検定した結果, 表1のように15株が明らかな活性を, 6株が微弱な活性を示した。陽性株の出現率は平均22%, 地域的には長崎県五島列島福江島が最高で13株, 鹿児島, 沖縄県からも陽性株を得た。これらの結果は AF 生産菌の分布が亜熱帯圏から温帯圏南部に及んでいることを示す。菌学的観察では, 陽性株はいずれも *A. flavus* に属し, *A. parasiticus* の4株はいずれも活性微弱であった。*A. flavus* は菌核形成, 非形成の2群に細分されたが, いずれの菌群からも陽性株が認められた。今後, 化学的方法により AF 生産性の確認と生産力の定量を行い, AF 強力生産菌株の分布を追求したい。

Table 1. Distribution of *A. flavus* group on soil samples collected from various districts in Japan and their aflatoxin-producing potentiality

District	Isolation of <i>A. flavus</i>			Aflatoxin-producing potentiality of <i>A. flavus</i>	
	Number of soil samples surveyed	Number of soil samples detected	Frequency (%)	Number of strains surveyed	Number of strains showing positive activity*2
Northern Japan					
Hokkaido	22	0	0	—	—
Central Japan					
Gunma	11	0	0	—	—
Kanagawa	7	0	0	—	—
Yamanashi	5	0	0	—	—
Nagano	43	0	0	—	—
Southern Japan					
Fukuoka	6	1	18	1	0
Nagasaki	80	22		35	13 (2)*3
Miyazaki	17	1		1	0
Kagoshima	32	2		3	1
Okinawa	74	18	24.5	28	1 (4)
Total	297	44	14.5*1	68	15 (6)

*1: Frequency (%) for total samples,

*2: By Rec-assay method,

*3: Slightly positive

引用文献

- 1) Schroeder, H. W., Boller, R. A.: Appl. Microbiol., **25**, 885 (1973).
- 2) Maggon, K. K., Viswanathan, L., Venkatasubramanian, T. A., Mukerji, K. G.: J. gen. Microbiol., **59**, 119 (1969).
- 3) 鶴田理, 木村広: “昭和 48 年度特別研究資料” p. 41 (1974) 農林水産技術会議事務局.
- 4) Warcup, J. H.: Nature, Lond., **166**, 117 (1950).
- 5) 高鳥浩介ほか: 日本食品衛生学会第26回大会講演 (1973).

Penicillium tardum の毒性代謝産物の研究

辰野 高司*1・小林 知子*1・角田 広*2

T. TATSUNO*1, N. KOBAYASHI*1, H. TSUNODA*2: Studies on the toxic metabolites of *Penicillium tardum*

P. tardum は肝障害性の rugulosin の他, 無毒の skyrin を生産する菌種として報告されている¹⁾.

角田は米に接種培養した人工かび米を飼料としてマウスを飼育した結果, 肝と共に腎に強い障害を認めた. 我々は腎障害が rugulosin による肝障害の結果, 二次的に惹起されるものか, 或は従来未知の腎障害性の物質が, *P. tardum* の代謝産物中に混在するものであるかを決定する目的で研究を行なった.

材料及び探究方法

角田により純培養された *P. tardum* 乾燥菌蓋 (Czapek 培地, 2 週間, 25° 静置培養) を原料とし, *n*-hexane でステロール, 脂質を分離した後 acetone, ethyl acetate, *n*-butanol で抽出しうる粗色素を集め,

ethyl acetate に溶解した後, NaHCO₃ aq, Na₂CO₃ aq で順次抽出して強酸性分画, 弱酸性分画に分ち, 更に結晶化, MgCl₂ aq 抽出, 薄層クロマトグラフィーを行なって, 純品をえた.

分画を行なうごとに HeLa-細胞, F.L. 細胞を用いた組織培養細胞増殖阻害作用を検討²⁾した.

えられた純品についても同様の生理試験を行なうと同時に, Mass spectre, IR, UV, NMR 等の機器分析を行なうと同時に, 誘導体の合成, 混融試験を行なって, 標品との同定を行なった.

分画の系統図を, Fig. 1, えられた純品代謝産物の組織培養細胞増殖阻止試験結果, 物理化学的性質は夫々 Table 1, Table 2, Table 3 に示し, マウス腹腔内注射による肝機能検討の結果は Table 4 に示した.

Fig. 1. 毒性分画の系統図

*1 理化学研究所 (埼玉県和光市広沢 2 の 1)

*2 群馬大学教育学部 (群馬県前橋市荒牧町1375)

Table 1. 組織培養細胞増殖阻害

分画 $\mu\text{g/ml}$	100,	36,	10,	3.6
R ₀	4	4	4	0
S ₀	4	1	0	0
S ₁ (emodin)	4 (4)	4 (3)	2 (1)	0 (0)
R ₁ (endocrocin)	4 (4)	4 (3)	2 (2)	1 (2)

( ) は F.L. 細胞

表示 4 : 増殖完全阻害

3 : / 殆ど阻害

2 : / 弱く阻害, 核に変化

1 : 殆ど阻害なし, 核に僅かの変化

0 : 対照と不変

Table 2. Emodin の物理恒数

S ₁ : Emodin
mp. 254~257°
UV. $\lambda_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ 252, 264, 280, 440 nm
IR. 3370, 1676 (W), 1665, 1620 (S) cm^{-1}
標品 Emodin と完全一致

Table 3. Endocrocin の物理恒数

R ₁ : Endocrocin
Mass: m/e 314(M ⁺)
296(M ⁺ -H ₂ O: M*=279.3
268 (M ⁺ -H ₂ O-CO, M*=242.6
UV. $\lambda_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ 225, 248, 268, 288, 435 nm.
IR. 3360, 1715, 1660, 1620 cm^{-1}
mp. (acetate) 215~217°
標品と混融, mp 低下なし

Table 4. Endocrocin の S-GPT テスト

Dose	(匹)	S-GPT (U/ml)
50 (mg/kg)	(2)	7 2
100	(2)	2 4
625	(1)	118 —

検討の結果と考察

P. tardum の代謝産物より, 約 60% の rugulosin, 6% の skyrin の他, 1% の emodin 及び 0.2% の endocrocin³⁾ を単離した. Table 2 に示すごとく, endocrocin と emodin は共に組織培養細胞の増殖を 36 $\mu\text{g/ml}$ ~ 10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で阻害し, endocrocin は 625 mg/kg (15 mg/animal) 腹腔内注射により Table 4 に示すごとく S-GPT を上昇せしめ, 肝機能に障害を示すと同時に, 剖検により, 腎ネフロン渦巻状小管の破壊と拡張, 及び胸腺の萎縮が認められた.

その結果, *P. tardum* の腎毒性として, endocrocin の役割が疑われることとなった.

endocrocin は 625 mg/kg の腹腔内投与で一応非致死のながら, 相当に強度の腎障害を与えることが認められたので, 今後 endocrocin と rugulosin の混合投与, 或は単独連続投与による腎障害性について検討する必要がある.

謝辞, 標品 endocrocin を分与された東京大学薬学部柴田承二教授, 組織培養試験を行なわれた横浜市立大医梅田博士, 埼玉医大大久保薫博士, 毒性試験をされた上野郁子博士, (東大医科研), 榎本真教授 (聖マリアンナ医大) に深謝する.

引用文献

1) Yamamoto, Y., Hamaguchi, A., Yamamoto, I., Imai, S.: Yakugaku Zasshi, **76**, 1428 (1956).
2) Saito, M., Ohtsubo, K., Umeda, M., Enomoto, M., Udagawa, S., Sakabe, F., Ichinoe, M.: Japan. J. Exp. Med., **41**, 1 (1971).
3) Shibata, S., Natori, S.: Pharm. Bull., **1**, 160 (1953).

アフラトキシン B₁ 単独及び 2-アセチルアミノフルオレン, リトコール酸 それそれとの併用投与によるラット消化管系の発癌動態の観察— 病理組織学的検索と腸管内マイクロフローラの検討 (第一報)

榎本 真・直江 史郎・原田 昌興・増田 弘毅・宮田 慶子*¹
林 長男・松井 直子・小沼 博隆・倉田 浩*²

M. ENOMOTO, S. NAOE, M. HARADA, H. MASUDA, K. MIYATA*¹, O. HAYASHI,
N. MATSUI, H. KONUMA and H. KURATA: Combined effects of aflatoxin
B₁ with 2-AAF and lithocholic acid in carcinogenesis of the alimentary
system—Histological and microfloral investigations

アフラトキシン B₁ は肝細胞癌の発癌因子であるが、胆汁内へも排泄され、条件によっては腸管の発癌も招くことが従来の研究で明らかにされている¹。本実験は比較的低量のアフラトキシン B₁ (10~25 µg/匹/回, 総量 870 µg) を用い、0.3~0.5% リトコール酸 (胆汁酸の一種) と低蛋白食或は 2-アセチルアミノフルオレンの N 水酸化体 (0.01~0.015% N-OH-AAF: 強力な肝癌発生因子であると共に腸癌も発生する) との併用投与による発癌初期病態及び標的臓器の変動を観察する目的でおこなった。また腸管内マイクロフローラの関与の有無を明らかにするため、小腸下部、盲腸内容物の細菌学的検索をおこなった。

ラット (SD/JCL, 6 週令, 雄) を各群 20 匹使用し、低蛋白食 (8%) 及び基本飼料 (クレア, CE-2) の対照・2 群を設けた。投与開始後 12~16 週及び 36 週後に一部ラットを屠殺し、肝の組織化学・光顕・電顕観察をおこなった。また細菌学的検索には嫌気性菌 8 種、好気性菌 5 種の培地を使用し、分離菌株はコロニーの形態、色調、カタラーゼ試験ならびに光顕観察、グラム染色により分類した。

アフラトキシン単独投与例では 36 週の段階で核異型と空胞変性を伴う肝細胞群が認められ、γ-GTP 活性

陽性反応を示したのが注目されたが、胆管増殖や結節状肥大などの変化は無い。リトコール酸 (低蛋白食) との併用投与剤では胆管の増殖がグ氏鞘で認められたが、肝細胞には特に著変を示さない点でリトコール酸 (低蛋白食) の単独投与例に似る。N-OH-AAF の単独及び併用投与例では投与後 16 週ですでに肝細胞の増生及び結節状肥大、胆管群の増殖が認められ、36 週には肝細胞癌と胆管囊胞状腺腫も観察された。これらの肝細胞及び胆管群には γ-GTP 活性の亢進が組織化学的に証明され²、血清及び肝組織における同酵素活性の上昇 (聖マリアンナ医大第 2 内科, 岡部和彦らの成績) と相関を示した点は興味深く、発癌過程と関連する同酵素の肝内誘導合成を示唆する所見として注目された。Al-P 活性は組織化学的に胆管と一部の増殖細胞群の胆毛細管に証明された。なお N-OH-AAF の単独及び併用投与例では上記の肝腫瘍のほか、前胃に乳頭腫と扁平上皮癌、十二指腸の腺癌、平滑筋肉腫などの高率発生も観察された。

腸内マイクロフローラは対照群と比較して各実験群とも大差はなかった。ただアフラトキシン B₁ 単独投与群には 36 週の時点で *Veillonella* の出現が特異的に多く認められた。これらの意義については現存飼育中の生存ラットにおける発癌成績を検討後報告したい。

文 献

- *¹ 聖マリアンナ医大, 第 2 病理 (川崎市高津区菅生 2095, 〒213)
St. Marianna Univ., School of Medicine, (Kawasaki, Takatsuku, 213).
- *² 国立衛生試験所, 衛生微生物部 (東京都世田谷区上用賀 1-18-1, 〒158)
National Institute of Hygienic Science, (Tokyo, Setagaya-ku Kamiyoga, 158).

- 1) Newberne, P. M., Rogers, A. E.: J. Natl. Cancer Inst., **50**, 439 (1973).
- 2) 原田昌興, 柴田和紀, 宮田慶子, 榎本真, 岡部和彦: 第 15 回組織化学会抄録, 68 頁, 昭 49 年 10 月, 東京 (1974).

カイコ幼虫に対する aflatoxin G₁ の経口投与時期と特異的中毒症状について村 越 重 雄*¹S. MURAKOSHI*¹: Correlation between the toxic symptoms and a period of oral administration of aflatoxin G₁ to the silkworm (*Bombyx mori* L.) larvae

古くから、*Aspergillus flavus* の寄生によって起るカイコの病気があることは良く知られている。筆者らは養蚕地帯より分離した *A. flavus* の多くがアフラトキシン（以下 Af と略す）を生産し、かつ、このかびのカイコに対する病原性と Af 生産能とが一致することを明らかにした¹⁾。また、各種マイコトキシンを連続投与して、カイコに対する経口毒性を比較したところ、Af-B₁ の毒性が最も強く LC₅₀ は約 1 ppm であり、Af-G₁ の LC₅₀ は約 4 ppm であることと、Af-G₁ のみの特異的中毒症状を示すことなどを見出した²⁾。そこで、さらに Af-G₁ の投与時期と中毒症状発現との関係を調べた。

実験方法：供試人工飼料は既報²⁾の組成に準じたものである。Makor Chemical 社製の Af-G₁ をクロロホルムに溶解して粉末飼料に混合、吸着させた後、クロロホルムを完全に除去して加水し、加熱、調製した。給与飼料中の Af-G₁ 濃度は 2, 4, 8 ppm とした。カイコは実用的に飼育されている 4 眠交雑種（品種名：錦秋×鐘和）の 4 齢起蚕と 5 齢起蚕を用い、1 区 10 頭を 25° の恒温器内で飼育した。Af-G₁ 含有飼料を 4 齢は各濃度共、5 齢は 8 ppm のみを脱皮直後から 1 日間ずつ与えて投与時期による差を調べた。それ以外の時期は無添加飼料を与えた。

実験結果および考察：4 齢幼虫に 1 日間ずつ Af-G₁ 飼料を与えると、脱皮直後より 1 日間投与区の特異的中毒症状（環節間膜がくびれて環節が隆起し、体色は黒色化する）の発現が最も強く、1 日後と 2 日後より投与区もかなり発現したが、3 日後と 4 日後より投与区は 4 齢ではほとんど発現しなかった（次の 5 齢で異常が見られた）。濃度との関係では 2 ppm は弱く、4 ppm と 8 ppm は強く発現した。特に、8 ppm を脱皮直後より投与区は 6 日後で半数が中毒死し、生存中

のものも環節間膜部の障害が激しかった。Af-G₁ の取込み量を調べたところ、2 ppm の場合は 1 頭当たり 0.24~0.63 µg、4 ppm の場合は 0.49~1.22 µg、8 ppm の場合は 0.93~2.01 µg であり、時期的には脱皮直後ほど少なかった。しかしながら、生体重 1 g 当りでは 2 ppm の場合は 1.23~2.18 µg、4 ppm の場合は 2.32~4.45 µg、8 ppm の場合は 3.25~8.45 µg であり、脱皮直後ほど多かった。体重増加の障害は 2 ppm ではそれほど強くなかったが、4 ppm と 8 ppm では Af-G₁ 投与期間の翌日から強く現われた。

5 齢脱皮直後より 1 日間ずつ 8 ppm 含有飼料を与えた場合にも 4 齢と同様の傾向が見られた。特に、脱皮直後と 1 日後より投与区では環節間膜部の障害が無添加飼料に切換えてから拡大し、部分的には正常の環節より広くなることが観察された。Af-G₁ 投与後の食下量は急減し、それにつれて生体重の増加が劣った。消化率も低目であり、特に、1 日後以降の投与区では翌日に急激に低下したが、場合によってはその後回復した。Af-G₁ の取込み量は Table 1 に示した通りで 4 齢と同様の傾向を示した。繭を作らないものは投与時期が早いほど多かった。Af-G₁ を与えたものは繭を作っても蛹化する個体は見られなかった。5 齢期間は 3 日後から投与区のみ若干短縮したが、その他はいずれも延長し、初期投与区ほど長かった。Af-G₁ の取込み量と延長程度は一致しなかった。繭層重はいずれも軽かったが、絹タンパクの合成は止まらなかったことを示している。5 齢期間の長短と繭層重の軽重も一致しなかった。また、環節間膜のくびれとは別に 5 日後より投与区のみ体表が吐糸時期に焼けたように変色することが観察された。以上の結果より、Af-G₁ の投与時期により、様々の中毒症状が発現することが示された。なお、Af-G₁ 投与区のカイコクチクラの組織像には顕著な変化が見られた。すなわち、エキソクチクラのくさび状構造が消え、エンドクチクラのラメラ構造も不明瞭となり、クチクラが破損している像も見られ

*¹ 神奈川県蚕業センター（海老名市中新田 2010）
Kanagawa Prefectural Institute for Sericultural Science (2010 Nakashinden, Ebina, Kanagawa)

Table 1. Toxic effects and amount of intake in the 5th instar larvae of the silkworm fed with artificial diet containing aflatoxin G₁ 8 ppm

Period of admin. (Day)	Intake of AF-G ₁		Num. of cocooning	Num. of pupation	Period of 5th instar (Rate)	Cocoon shell wt. (Rate)
	μg per larvae	μg per g of body wt.				
Cont.	—	—	10	10	151hr (100)	187mg (100)
0-1	5.6	9.7	1	0	240 (159)	— (—)
1-2	7.0	7.3	4	0	240 (159)	40 (21)
2-3	10.8	7.0	6	0	168 (111)	109 (58)
3-4	12.3	5.5	8	0	145 (96)	96 (51)
4-5	13.8	5.4	9	0	158 (105)	130 (70)
5-6	9.7	3.5	10	0	163 (108)	153 (82)

た。これは環節間膜部の障害がクチクラの組織変化によって起ったことを示唆している。これらクチクラへの変化が Af-G₁ のみで見られたことは興味深い。すでに、イエバエ成虫に対する不妊作用が Af-G₁ では非常に強かったという報告³⁾ も見られるので、化学構造と生理活性との関係という点からもさらに検討を要する。なお、Af-G₂ も 400 ppm 含有飼料を連続投与すると Af-G₁ の 2ppm より若干強い環節間膜のくびれが見られた。

本研究を行なうにあたり、終始御べんたつ下さった 国立衛生試験所 倉田浩博士、蚕業センター 森井謙

介病理化学科長ならびに御協力いただいた蚕糸試験場 阿部芳彦技官、蚕業センター 滝口義夫技師の各位に厚く感謝します。

文 献

- 1) 村越重雄, 大友俊允, 杉山純多: 日蚕雄, **40**, 167 (1971).
- 2) 村越重雄, 大友俊允, 倉田浩: 食衛誌, **14**, 65 (1973).
- 3) Al-Adil, K. M., Kilgore, W. W., Painter, R. R.: J. Econ. Entomol., **65**, 375 (1972).

Sterigmatocystin の急性毒性と吸収・排泄

山崎 幹夫・高野 勝・鈴木 重紀・寺尾 清*¹

M. YAMAZAKI, M. TAKANO, S. SUZUKI and K. TERAQ*¹: Relationships of the absorption and excretion to the acute toxicity of sterigmatocystin

Aflatoxin (以下 afl) は種々の生物に対する強い急性毒性と、今迄にない強い発癌性を示す化合物として知られる。afl と構造的関連を有する sterigmatocystin (以下 stg) は確実な発癌性を示すが、急性毒性に関しては afl と大きな差を示す。我々はまず、stg の毒性発現には afl との比較から bisdihydrofuran 環とキサントン骨格が必須の因子になると考え、bisdihydrofuran 環の二重結合、キサントン骨格中の水酸基等に

よる作用への影響等を考慮し、数種の stg 誘導体を合成した。これら誘導体を数種の *A. versicolor* 副代謝産物と共にラットに腹腔内投与した際の肝臓の組織変化、鶏胚肝培養細胞における核小体の変化及び培養細胞 L-5178Y での核酸合成阻害等を調べた。その結果、合成した O-acetylsterigmatocystin (以下 O-Ac-stg) は、ラットの肝臓に対して stg には見られなかった強いネクロシスを与えた。一方、ラットを用いた O-Ac-stg の LD₅₀ 値は 11.3 mg、鶏胚には 0.81 μg/egg で afl B₁ の 7 mg/kg, 0.82 μg/egg と同程度であった。stg 関連化合物は一般に著しく難溶性であり、試みに stg, O-

*¹ 千葉大学生物活性研究所 (習志野市泉町3-9-1)
Research Institute for Chemobiodynamics, Izumicho, Narashino, Chiba

Ac-stg の有機溶媒, リン酸緩衝液などに対する溶解性を調べると, 両者の溶解性には差がみられた. 生体内の薬物の吸収, 移動という現象には, その物質の水溶性, 脂溶性のバランス等が影響すると思われ, 溶解性の変化は, それらの現象に対して影響を与える因子の一つであると考えられる. そこでラットを用いて, 実際に stg, O-Ac-stg の吸収, 排泄を検討した. まず, Na-acetate-1-¹⁴C を *A. versicolor* の培養液に加え, 生合成的に ¹⁴C-ラベル stg を作成し, それをアセチル化して ¹⁴C-ラベル O-Ac-stg を作成した. ¹⁴C-ラベル

stg, ¹⁴C-ラベル O-Ac-stg を CMC 懸濁液及び DMF 溶液として, ラットに経口投与した際の糞, 尿の分析から吸収, 排泄を調べた. その結果, O-Ac-stg は stg より吸収され易く, さらに CMC の場合より DMF を溶媒として用いた場合の方が吸収され易いことが判った. In vitro においては, stg 自体も培養細胞に対してかなりの毒性を示すことから, afl と比較した stg の毒性発現を考える場合, 化学構造自体からくる本質的要因の他に, 生体内での吸収, 移動等の差による影響が無視できない要因として存在すると考えられよう.

Sterigmatocystin によるラットの急性及び亜急性障害像について

斉藤 守*1・上野 郁子*1・木村 裕則*2

M. SAITO*1, I. UENO*1, H. KIMURA*2: Acute and subacute injuries in rat by sterigmatocystin

Sterigmatocystin の急性及び亜急性中毒量を検討するため, 各種投与量の sterigmatocystin を経口的に与えラットの示す障害像を肝臓を中心に, その他臓器組織を含めて病理組織学的に検索した.

実験方法

Sterigmatocystin は鳥取大学農学部初田教授より供与を受けたものを用いた. 動物は Sprague-Dawley (S. D.), Donryu, Wistar 系雄ラット (体重 100~200 g) を用いた. Sterigmatocystin はオリーブ油に懸濁し 2000, 1600, 800, 400, 200, 100, 50, 25 mg/kg 量を 1 回から最高 43 回にわたり胃チューブを用い経口的に投与した. 投与途中の死亡例はすべて剖検し, 生存例については 15 日目あるいは 54 日目には屠殺し採取した臓器について病理学的検索を行った.

実験結果

主な病理組織学的所見

〔肝臓〕 1 回大量投与 (S.D., Donryu 2000 mg/kg それぞれ 9 日 13 日目死亡例 Wistar 1600, 800 mg/kg そ

れぞれ 13 日 8 日目死亡例) あるいは頻回投与 (S. D., Donryu, Wistar 400 mg/kg それぞれ 9, 10, 2~20 回投与, 10, 12, 3~24 日目死亡例) で肝小葉周辺部肝細胞の壊死を主徴としそれに伴う胆管細胞の増生が認められた. また, Wistar 系ラット 1600 mg/kg 1 回投与 13 日目死亡例では G 氏鞘周辺に線維症の発生が認められた. 次に Donryu 2000 mg/kg 1 回投与 15 日目屠殺例, Wistar 1600 mg/kg 1 回投与 13 日目死亡例ならびに中量頻回投与 (Wistar 100, 50 mg/kg 43 回投与 54 日目屠殺例) で肝小葉周辺部肝細胞の細胞質は腫大し好酸性の染色傾向を示し, 核 ploidy の増加も認められることが多い. さらに肝小葉周辺部から中間部には散在する肝細胞の好酸性壊死とそれに伴う細胞浸潤が認められた. さらに少量投与時 (Wistar 25 mg/kg 43 回投与 54 日目屠殺例) にも肝小葉周辺部肝細胞は腫大し, 小葉中心部肝細胞の細胞質が好塩基性の染色傾向を示すのに比べ周辺部肝細胞の細胞質は好酸性の染色傾向を示す.

〔精巣〕 1 回大量投与 (Wistar 1600, 800 mg/kg) あるいは頻回投与 (Wistar 400, 200 mg/kg, Donryu 400 mg/kg) で精子形成過程の各細胞の変性, 多核巨細胞の出現, それに伴う精子形成障害などが認められた. しかしそれ以下の投与 (Wistar 100, 50, 25 mg/kg) では変化は認められない.

*1 東京大学医科学研究所 (東京都港区白金台 4 丁目 6-1)

*2 東京理科大学薬学部 (東京都新宿区市ヶ谷船河原町 12)

〔腸〕 比較的敏感な臓器の一つで、各投与量において腺窩細胞の変性あるいは壊死が認められた。

〔その他〕 投与量によっては胃の扁平上皮の増殖 (Donryu 400 mg/kg, Wistar 400, 200 mg/kg) 脾臓胸腺の萎縮 (Donryu 2000 mg/kg, Wistar 800, 400, 200, 100 mg/kg) などが認められた。

考 察

ラットにおける sterigmatocystin の急性及び亜急性時の標的性障害作用は主に肝臓の周辺部肝細胞、精巢の精子形成過程の各細胞、腸の腺窩細胞などに対する障害である。動物の系統差について見ると障害性は

Wistar > Donryu > Sprague-Dawley であった。前癌的病変としては 50 mg/kg 投与例に肝小葉周辺部、異型小型細胞の結節を認めた。動物当りの総投与量は 215 mg であった。我々の研究室の他の sterigmatocystin 長期投与実験で Donryu ラットを用い 200 ppm 含有飼料、255 日投与例にヘパトーマを認めた。この時の総投与量は 765 mg であった。また Purchase らの実験で Wistar を用いヘパトーマ発生例の sterigmatocystin 総投与量は動物当たり約 126 mg であった。本実験で用いている量の大量投与群では発癌量をこえているが期間の点で明瞭なヘパトーマの発生は認められない。今後さらに発癌の成り立つ条件を検討したい。

新生仔マウスを使用した発癌実験 Sterigmatocystin の癌原性について

藤井 敬二*1・小田嶋成和*2・初田 勇一*3

K. FUJII*1, S. ODASHIMA*2, and Y. HATSUTA*3: Tumor induction of sterigmatocystin by a single subcutaneous administration to new born mice

発癌性マイコトキシンとして、アフラトキシンと並び、近年注目されているものに、ステリグマトシスティンがある。この物質は、我国の初田により *Aspergillus versicolor* の第二次代謝産物として発見された。その他のカビ類、*A. nidulans*, *A. rugulosus*, *Bipolaris* sp. などからも産生されることが知られている。

本報告は、ステリグマトシスティンを新生仔期のマウスに、一回だけ皮下に注射し、その後マウスを約1ヶ月経過観察し、腫瘍発生を中心に検索した結果である。

実験材料及び方法

1. ステリグマトシスティン (St): 鳥取大学初田より、国立衛生衛生微生物部倉田博士を通じて供給され

*1 筑波大学医学専門学群基礎医学系病理
School of Medicine, University of Tsukuba (茨城県新治郡桜村)

*2 国立衛生試験所薬品病理部
National Institute of Hygienic Sciences (東京都世田谷区上用賀1-18-1)

*3 鳥取大学農学部
University of Tottori (鳥取市湖山町)

た。

2. マウス: (BALB/c × DBA/2) F₁ マウス (CDF₁). 東京大学医科研繁殖室鈴木潔博士より供給された。

3. 実験方法: CDF₁ マウス、誕生から24時間以内のものに、St を 1% gelatin に懸濁したもの 0.03 ml を、動物の背部皮下に一回注射した。注射した動物のうちで注射漏れの著しいものは実験群から除外した。注射した動物は、直ちに母親に戻して授乳し、約1ヶ月で離乳した。動物は離乳の際、各性別に分けて、木屑を床敷にした合成樹脂製マウス飼育箱で飼育した。食餌は固型餌料 CE-II (日本クレア製)、水は水道水を自由に摂取させた。動物は約1年 (52週) 飼育観察した。途中病弱になったものは可及的早期に剖検した。屠殺した動物は肉眼所見を記録した後、各臓器は中性ホルマリンで固定し、型の如く組織切片を作製し、病理組織学的に検索した。

結果及び考按

CDF₁ マウス、誕生後24時間以内に St を最大耐量、その 1/5 量、1/10 量投与した動物の生残率は 171/177 (96.6%) でほとんどの動物は生残した。この動物を

表1 新生仔期 CDE₁ マウスの皮下に sterigmatocystin を投与した際の各臓器別腫瘍発生

投与量	処置した動物数	性	離乳数	腫瘍発生部位別			
				肺	肝	リンパ組織	その他
7.5 μ g	62	♂	27	7	10	0	0
		♀	33	9	3	1	0
1.5 μ g	38	♂	15	3	4	1	0
		♀	22	2	0	0	1
0.75 μ g	77	♂	40	4	6	0	0
		♀	34	1	0	0	0
対照群	47	♂	18	2	1	0	0
		♀	18	0	0	0	0

1ヶ年経過観察し得た数は、161/171 (94.1%)、途中で死亡した動物が極めて少ないことを示している。

表1は、腫瘍発生について、各臓器別に一括したものである。表にみるように、St投与で発生してきた臓器は肺、肝であった。肺は、直径2mm以下の小結節が単発したものが大半を占め(21/26, 80.7%)、組織学的には肺線腫であった。発生率は、St投与量に依存し、量が多いと発生率が高い傾向を示した。St 0.75 μ g投与群では対照群と比較して発生率は同率で、Stによる発生であると考え難い。肝腫瘍は、肝表面からやや高まりをみせた帯黄褐色～淡赤褐色の腫瘤で、大きさは最大直径10mm以下で、腫瘤表面は静脈の怒張をみるものがあつた。腫瘤は、組織学的には、正常肝細胞より幾分小さい核をもち、正常肝細胞と類似した細胞群の増生があり正常肝組織とは明確に境されている。ときに細胞質はH.E染色で好塩基性に濃染したり、

空胞化し、構造上の異型も認められた。組織学的に肝腺腫であつた。雄に好発する傾向にある。発生率は、実験群3群の間にSt投与量と発生率の間に相関関係がみられた。この事実と、7.5 μ g群で雌にも発生を認めていること、実験群で多発したものが5/23 (21.7%)あり対照群は単発であつたことなどから、Stによる発生と推察することができる。その他の腫瘍としては、リンパ腫が散発し、1例の顎下腺腺腫が認められた。

結 論

St 7.5, 1.5, 0.75 μ g/動物、新生仔期一回投与したCDF₁マウスに、約1年後に肺、肝に腫瘍発生を認めた。この両腫瘍の発生率はSt投与量との間に相関関係があり、対照群より高い発生を示していることから、Stが癌原性を示した一つの証左であるといえよう。

微生物に対する発ガン性マイコトキシンの変異性についての研究

(I) マイコトキシンの Rec-effect について

久保田 潔*¹・麻原 康代*¹・上野 芳夫*¹

K. KUBOTA*¹, Y. ASAHARA*¹, and Y. UENO*¹: Studies on the mutagenicity of carcinogenic mycotoxins to microbial cell

(I) On the Rec-effect of mycotoxins

種々のマイコトキシンの中には、aflatoxin B₁ のように強い発ガン性を示すものがあることが知られてい

る。我々はこれら発ガン性マイコトキシンを検索することを目的として、まず枯草菌の組み換え修復欠損株 M45 と修復能を有する野性株 H17 を用いて、マイコトキシンに対する致死感受性の差を調べ、マイコトキ

*¹ 東京理科大学薬学部微生物化学教室 (〒162 東京都新宿区市ヶ谷船河原町12)

Table 1. Rec-effect and carcinogenicity of mycotoxins

Rec-effect	Carcinogenicity	Mycotoxins
(+)	(+)	aflatoxin B ₁ , aflatoxin G ₁ , patulin, penicillic acid, luteoskyrin, rugulosin, sterigmatocystin
(+)	(?)	o-acetylsterigmatocystin, zearalenone, zearalenol-b, citrinin, PR-toxin
(-)	(+)	griseofulvin, Cl-peptide
(-)	(?)	T-2 toxin, fusarenon-X, butenolide, moniliformin, aflatoxin B ₂ , aflatoxin G ₂ , emodin, erythroskyrine, rubratoxin B, ochratoxin A, citreoviridin, oosponol, cytochalasin B, zearalenol-a, fusaric acid, o-methylsterigmatocystin

シンの変異原性を検討した。検定に用いたマイコトキシン及びその関連化合物（以下、化合物）は30種である。培地の pH は 6, 7, 8 の3段階に分けて行ない、化合物は全て DMSO に溶かして用いた。

その結果、30種の化合物のうち、発ガン性マイコトキシンである aflatoxin B₁ (5 µg), aflatoxin G₁ (100 µg) luteoskyrin (100 µg), sterigmatocystin (1 µg), penicillic acid (100 µg), patulin (20 µg), rugulosin (100 µg) の7種と、まだ発ガン性が未確認の化合物 o-acetylsterigmatocystin (1 µg), zearalenone (100 µg), zearalenol-b (20 µg), citrinin (20 µg), PR-toxin (100 µg) の5種が記載の量 (disk 当り) で陽性であった。一方 griseofulvin, Cl-peptide の2種については、すでに発ガン性が実証されているにもかかわらず、結果は陰性であった (Table 1)。

なお、penicillic acid は pH 7, 8 では陰性であったが、pH 6 では陽性であった。さらに、sterigmatocystin, PR-toxin など pH 7, 8 よりも、pH 6 の方が Rec-effect がより大きかった。

次に、本法においては化合物の至適濃度が重要である。すなわち、sterigmatocystin は高濃度 (20 µg) では陰性であったが、低濃度 (1~2.5 µg) で陽性であった。また、o-acetylsterigmatocystin の Rec-effect は 1~10 µg では濃度に比例するが、それ以上では増加しない。また、aflatoxin B₁ では濃度に比例する (Fig. 1)。

この方法で陰性であった化合物については、さらに界面活性剤添加や toluen 処理などで、膜の透過性を

Fig. 1. Dose dependency of Rec-effect

高めることにより、または他の菌株の使用等により陽性となる可能性もあり検討したい。

以上の知見から、Rec-assay 法は発ガン性マイコトキシンを検索するのにかなり有効な手段の一つと思われるが、まだ発ガン性は実証されていないが Rec-assay 法で陽性となった化合物については、十分に発ガン性が疑えるので、発ガン実験を含めた慢性毒性の検討が必要と思われる。

なお、サルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) の栄養要求株と肝薬物代謝系を関与させて、これら発ガン性マイコトキシンの変異性を現在検討中である。