第2回 マイコトキシン研究会一般講演要約

エーザイ 本社講堂 (昭和50年9月27日)

***Aspergillus candidus* の toxin A (terphenyllin),
B (xanthoascins) の産生について**高橋千加子・関田 節子・義平 邦利・名取 信策
宇田川俊一・坂部 フミ・倉田 浩*1C. TAKAHASHI, S. SEKITA, K. YOSHIHARA, S. NATORI, S. UDAGAWA,
F. SAKABE, and H. KURATA*1: Bioproduction of Toxin A
(terphenyllin) and B (xanthoascins) by *Aspergillus candidus*

Aspergillus candidus LINK は穀類の汚染菌としては、もっともありふれたものの一つであるが、従来その毒性はあまり問題にされていず、わずかに角田¹⁾, Marasas ら²⁾, Semeniuk ら³⁾ によって本菌のマイコトキシン産生の可能性が指摘されていたにすぎない。我々は東大医科研斎藤教授らとの食品由来菌の毒性検索に対する共同研究の過程で、本菌の4株に HeLa 細胞の核小体を著明に縮小する作用があることを知り⁴⁾, その1株 (67-SA-156=NHL 5107, 長野県佐久市で収集の小麦粉より分離) を用いて研究を進めたところ、その培養米は実験動物にも特異な毒性を示すことが判り^{5,6)}, 一方その代謝物として A, B, C (ergosterol), D, E と仮称した物質を分離し、そのうちAが細胞毒性の原因物質、Bが実験動物に対する毒性物質であることを明らかにした^{7,8)}。

次に我々はこれらの化学構造について研究を進め、A (terphenyllin と命名) はI式で示される terphenyl 誘導体であることを、その物理定数、trimethyl ether の合成などから決定し、微量代謝物である E はAの deoxy 体 (II) であることを推定し、これらの構造と特徴的な細胞毒性の関係についても考察を行った⁹⁾。なお、terphenyllin は Vining ら⁹⁾ によっても最近分離

されている。B (xanthoascins と命名) の構造については、イソニトリル基を持つ diphenylbutadiene 誘導体、すなわち xanthocillin のグループに属する III 式であることを、ごく最近明らかにすることができた¹⁰⁾。

従来報告されている本菌の代謝産物としては、kojic acid,¹¹⁾ citrinin,¹²⁾ 菌類のフラボンとして他に例のない chlorflavonin^{9,13,14)} (V), dechlorochlorflavonin^{9,14)} (IV) が知られているが、その内 citrinin の産生株は本菌ではなく *Aspergillus niveus* であるとされている¹⁵⁾ ので、I~Vの代謝物はすべて shikimic acid 由来の化合物と考えられ、その意味で本菌は *Aspergillus* として特異なものといえよう。

たまたま、マレーシアのセキンチャン地区の食品の菌類相の比較によって、同地区のコメが高率に本菌で汚染されていることが明らかにされた(本号10頁参照) ので toxin A (terphenyllin), B (xanthoascins) が特定の菌株のみが代謝するものか、あるいは広く *A. candidus* 一般の代謝物であるかを知ることは食品衛生の立場から必要と考えられたので、これについての予試験的検索を行った。

検索は薄層クロマトグラフィー (TLC) によった。標品としては、A(I), B(III), D, E(II) のほか、flavone (IV, V) を用い、薄層板には silica-gel HF₂₅₄ または GF₂₅₄ を、展開溶剤にはクロロホルム-酢酸エチル (6 : 1) およびベンゼン-メタノール (10 : 1) を、検出

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

には UV ランプ (254 nm) を用いた。

まず、マレーシア分離菌 91 株について、potato-dextrose 寒天斜面培地に 25°, 16 日間培養したもののについて、斜面上にクロロホルムを加え 2 日間放置後、そのエキスについて TLC を行ったところ、B の産生は確認できなかったが 91 株全部に A の産生が認められ、うち 18 株に微量の D あるいは E と一致するスポットを認めた。ついで、これらのうちから A の産生が多いと考えられる 10 株を選び、水洗した白米各 200 g を加え滅菌したルーフラスコに接種して 25°, 3 週間培養し、そのうち 3 株については 2 週間目に一部の培養米を無菌的にとりだし、これらをクロロホルム抽出してエキスとし同様に TLC で試験したところ、2 週目では 3 株の全部に A、B と微量の D または E が、3 週目では 10 株の全部に A と微量の D または E とその他が、6 株には確実に B の産生が確認された。しかしながらフラボン類 (IV, V) の産生は、これらのいずれの場合にも認められなかった。

先に米培養によって代謝物の分離を行った時の収量は、100 g の白米につき A 20 mg, B 8 mg であったが⁸⁾、今回の菌株については A はどの菌株についてもほとんど同量であるが、B は 0~30 mg と推定される。

この結果から、マレーシアの米から分離された菌株に限っては、A (terphenyllin) は共通の代謝物であり、その産生は条件にあまり左右されないが、B (xanthoascins) の産生は菌株によって差があるだけでなく、培養条件に可成り支配されるようであるが、決して特定の菌株に限った代謝物ではないことが明らかになった。

従って、これらの代謝物、とくに B の毒性が注目すべきものであれば、本菌は今後マイコトキシン産生菌として注目すべきものの一つと考えてよい。

本研究の一部に協力して頂いた服部澄江、風間法子両嬢に感謝する。

引用文献

- 1) Tsunoda, H.: "Proc. 1st U. S.-Japan Conf. on Toxic Microorganisms," p. 143 (1970), UJNR and U.S. Dept. of Interior, Washington, D.C.
- 2) Marasas, W. F. O., Smalley, E. B.: J. Vet. Res., **39**, 1 (1972).
- 3) Semeniuk, G., Harshfield, G. S., Covlson, C. W., Hesseltine, C. W., Kwolek, W. F.: Mycopathol. Mycol. Appl., **43**, 137 (1971).
- 4) Saito, M., Ishiko, T., Enomoto, M., Ohtsubo, K., Umeda, M., Kurata, H., Udagawa, S., Taniguchi, S., Sekita, S.: Japan. J. Exptl. Med., **44**, 63 (1974).
- 5) Umeda, M., Yamashita, T., Saito, M., Sekita, S., Takahashi, C., Yoshihira, K., Natori, S., Kurata, H., Udagawa, S.: Ibid., **44**, 83 (1974).
- 6) Ohtsubo, K., Enomoto, M., Ishiko, T., Saito, M., Sakabe, F., Udagawa, S., Kurata, H.: Ibid., **44**, 477 (1974).
- 7) Takahashi, C., Yoshihira, K., Natori, S., Umeda, M., Ohtsubo, K., Saito, M.: Experientia, **30**, 529 (1974).
- 8) Takahashi, C., Yoshihira, K., Natori, S., Umeda, M.: Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), **24**, 印刷中 (1976).
- 9) Marchelli, R., Vining, L. C.: J. Chem. Soc., Chem. Comm., **1973**, 555; Marchelli, R., Vining, L. C.: J. Antibiotics, **28**, 328 (1975).
- 10) Takahashi, C., Sekita, S., Yoshihira, K., Natori, S.: Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), **24**, 投稿中 (1976).
- 11) Yabuta, T.: J. Chem. Soc., **125**, 575 (1924).
- 12) Timonin, M. I.: Science, **96**, 494 (1942).
- 13) Richards, M., Bird, A. E., Munden, J. E.: J. Antibiotics, **22**, 389 (1969); Bird, A. E., Marshall, A. C.: J. Chem. Soc. (C), **1969**, 2418; Munden,

- J. E., Butterworth, B., Hanscomb, G., Verrall, M. S.: Appl. Microbiol., **19**, 718 (1970).
- 14) Marchelli, R., Vining, L. C.: Canad. J. Biochem., **51**, 1624 (1973).
- 15) Raper, K. B., Fennell, D. I.: "The Genus *Aspergillus*," p. 356 (1965), Williams & Wilkins Co., Baltimore.

配合飼料による栃木県下の若ヒナ中毒に関する研究

角田 広*1・岸 菊子*1・上野 芳夫*2・大久保 薫*3

H. TSUNODA*1, K. KISHI*1, Y. UENO*2, and K. OKUBO*3: Studies on the poisoning of broilers by commercial feed in Tochigi Prefecture

研究の目的: 1975年5月頃、栃木県下で某飼料会社製の配合飼料を若ヒナに投与し、多数下痢症状で斃死したので、我々は飼料に寄生したカビ生産物が原因ではなかろうかと、菌学、化学、病理学的方面から追求してみた。

材料: 我々の入手した材料は現地で中毒再現のために使用した飼料の1部で、ハイブローラー G. Lot. No. 0.3~86~91~5, 1974年12月製造で、1975年6月12日に入手した。

培養検定: 培養に用いた培地は Czapek-yeast ex. 寒天で、細菌抑制のために抗生物質アクロマイシン(1/10,000)を用い、流込培養法をもって生菌数を求めた。材料1g中の生菌数は次表の通りである。

本試料は菌学的に非常にきれいであるので、飼料に加用してある抗生物質により寄生菌が滅菌されているのであろうとの推定の下に2,3飼料に混入すると思われる他の中毒物質を調べてみた。

粗脂肪は7%強で脂肪酸価は10.2を示し、若ヒナの

表1 配合飼料の生菌数

菌名*	第1回 分離	第2回 分離	第3回 分離	抗生物質 無添加	生産物
<i>A. flavus</i>	200				aflatoxin+
<i>A. candidus</i>		100	300		toxic?
<i>A. repens</i>		700			
<i>A. echinulatus</i>		100			
<i>A. umbrinosus</i>		100	100		
<i>A. amstelodami</i>			400		
<i>P. ochraceum</i>	400		100		penicillic acid+
<i>P. citrinum</i>	100				citrinin+
<i>P. carneo-lutescens</i>	100				toxic (構造不詳)
<i>Penicillium</i> sp.		100			
<i>Cladosporium</i>		200	100		
<i>Mucor</i>	800	100			
<i>Fusarium solani</i>			100		不明
Bacteria				600	

* A: *Aspergillus*, P: *Penicillium*

*1 群馬大学教育学部(前橋市荒牧) Gunma Univ.

*2 東京理科大学薬学部(東京都新宿区市谷船河原町) Tokyo Univ. of Sci.

*3 埼玉医科大学(埼玉県入間郡毛呂山町) Saitama Medical School

下痢はこれによるものと思える。CN 及び $N(CH_3)_3$ は共に検出できなかった。

動物試験：飼料の1部をマウスに全量投与、2～3週目に殺し、組織学的に検討した結果は次の通りである。

全例共に脳、肺、心、胃及び腸には特記すべき所見なく、主病変は肝に周辺性肝細胞の濃染、再生、肝小葉内の単細胞壊死、核内空胞形成等が観察され、脾臓及びリンパ節においてT型リンパ球の流出、減数及びろ胞の萎縮が認められ、卵巣の小泡性変性の初期と副腎髄質の色素の減少が認められた。以上の所見は aflatoxin 中毒に似ている関係から飼料中に aflatoxin またはこれに近い肝障害性毒素が混入していることを暗示させた。

他方、国立衛試の一戸氏の検定では、本試料は細菌、

カビ共に検出少なく、その中で *A. flavus* について aflatoxin 生産能の結果は検出株の2/3が aflatoxin B₁, B₂ を生産するといわれ、本試料から検出できる *A. flavus* には aflatoxin 生産株が多いことがわかった。

結び：(1) 本飼料は菌学的に非常にきれいであるが、低率ではあるが mycotoxin 生産菌が6種検出でき、その中 *A. flavus* は aflatoxin 生産菌が多く検出できた。

(2) CN, $N(CH_3)_3$ は検出できないが、脂肪酸価は少し高いようである。

(3) 病理学的所見では aflatoxin 中毒障害によく似ているので aflatoxin またはこれに近い毒性物質の障害であろうと思える。

(4) 本飼料から細菌及びカビの検出が少ないのは添加した抗生物質による滅菌と考えられる。

異菌種混合着生メイズでの Mycotoxin の産生について

鶴田 理*1・杉本 貞三*2・南沢 正敏*2

O. TSURUTA*1, T. SUGIMOTO*2, and M. MINAMISAWA*2: Mycotoxin production on contaminated maize by several fungal species

自然界の穀物が mycotoxin 汚染を受ける時、それが mycotoxin 産生菌の単独着生であっても、環境によっては、その菌株のもつ産生能力を十分示さないであろうし、まして当然考えられる異菌種との混合着生では、mycotoxin 産生は複雑に影響することが推測される。こうした場合を想定して基質に玄米を用い、*A. parasiticus* と異菌種を組合せ、複合着生させて aflatoxin (以下 Af) の産生状態を Boller ら^{1,2)} が最近報告している。我々は飼料用穀物の備蓄構想の一環としてメイズを用い、付着もしくは着生の Af, sterigmatocystin (以下 St) 産生菌が単独あるいは異菌種と混合着生した際の mycotoxin 汚染量の差異を調べた。

実験方法

試料の調製：温度 (18°, 28°), 相対湿度 (81%, 93%) を調製の容器内にガス殺菌のメイズを入れて湿気平衡を計ったのち、単独菌種接種区には Af 産生の *A. flavus*, St 産生の *A. versicolor* を接種、混合菌種接種区には上記 mycotoxin 産生能をもつ2菌種のほか、*A. ochraceus* と穀物貯蔵中に着生度の高まることが多い *A. restrictus*, *E. chevalieri* を同時に接種した。1菌種宛の接種菌数は 82×10^4 に近似する量で揃えた。

Mycotoxin の分析：Af の分析は Method of A.O. A.C. ナッツ類、第1法に順じ (検出限度 5 ppb), St の分析は真鍋ら^{3,4)} の方法に順じ (検出限度 50 ppb) している。

結果

単独菌種接種メイズの場合 (1) 28°, a_w 0.93 のメイズでは、5～10日目頃より Af, St の汚染が認められるようになり、以後日数経過に伴って汚染量を増し、Af では24日付近の 7,700 ppb をピークに下向をたどる傾向を示したが、St では60日経過で 8,300 ppb

*1 農林省食品総合研究所(東京都江東区塩浜1-4-12) National Food Research Institute, Ministry of Agriculture and Forestry. (1-4-12 Shiohama, Kouto-ku, Tokyo)

*2 財団法人日本穀物検定協会中央研究所(東京都江東区佐賀1-8-13) Japan Grain Inspection Association, Central Research Laboratory. (1-8-13 Saga, Koto-ku, Tokyo)

を示したのちも下向していない。(2) 18°, a_w 0.93 のメイズでは St 汚染量のみ 28°, a_w 0.93 の時と類似の汚染傾向を認めたが, Af 汚染量は僅かで60日経過後でも 450 ppb にとどまっていた。(3) メイズの a_w が 0.81 に低下すると 28°, 18° とともに菌種の生育限界域との関連から, *A. flavus* では150日を経過しても着生がみられず, 生育した *A. versicolor* でも汚染日数の現われが遅く汚染量も 750 ppb 以下と僅かで, 100日付近から下向をたどっている。

混合菌種接種メイズの場合 (1) 単独菌種着生の際にかなりの汚染量を認めた 28°, a_w 0.93 のもとで, Af 汚染はみられなかった。また, St 汚染も20日を経過する時点での 3,000 ppb 程度よりやや横ばいとなり, 18°, a_w 0.93 でも40日目頃まで単独菌種着生時と類似の汚染量経過をたどったが, その後は下向している。(2) 18°, 28° の a_w 0.81 のもとでは, 単独菌種着生時でも St 汚染は僅かであったが, より長期の日数を要し

て 500 ppb 以下の汚染量を示し, そのち下向している。

こうしたことから, 自然界でメイズが Af 産生の *A. flavus*, St 産生の *A. versicolor* の着生環境におかれた場合, 異菌種との混合着生が考えられるので, mycotoxin 汚染量は単独菌種により想定される量に比べてかなり軽減するが, その度合は St より Af の方が強いことを知った。

引用文献

- 1) Boller, R. A., Schroeder, H. W.: Phytopathology, **63**, 1507 (1973).
- 2) Boller, R. A., Schroeder, H. W.: Phytopathology, **64**, 121 (1974).
- 3) 真鍋 勝, 南沢正敏, 松浦慎治: 日農化, **45**, 565 (1971).
- 4) 真鍋 勝, 南沢正敏, 松浦慎治: 日農化, **47**, 209 (1973).

自然罹病穀類中の毒性物質に関する研究 (第4報)

昭和50年度産麦類より Trichothecene の検出

芳沢 宅実・土谷 幸生・寺浦 優・諸岡 信一*

T. YOSHIZAWA, Y. TSUCHIYA, M. TERAURA, and N. MOROOKA: Studies on the toxic substances in the infected cereals. IV. Trichothecene from *Fusarium*-infected wheat in the crop field of Kagawa in 1975

Field fungi による穀物汚染を収穫時点 (収穫直後から乾燥まで) で, 迅速にモニタリングすることは食糧の安全性を評価し, 自然汚染穀物の流通を未然に防止する上で重要な課題である。農家では古来から, 収穫穀物を乾燥後, 唐箕選別 (風選) することにより劣悪穀粒を除去し, 品質管理につとめてきた。篩別された劣悪粒のカビ汚染度は高く, これに含まれるマイコトキシンを検知することは比較的容易であり, この結果から市場に流通する農産物のマイコトキシン汚染度を推定することが可能と思われる。本報では, 穀物

中の trichothecene (deoxynivalenol, DN と略す) の分析法を確立し, 農産物収穫段階でのモニタリングへの応用の可能性について, 本年度産麦類を試料として検討した結果を述べる。

実験方法

農家が唐箕選別した劣悪裸麦粉末 300 g を 50% 含水メタノール抽出し, これを n -ヘキサン, 次いで酢酸エチル抽出する。抽出物を TLC により酢酸エチル-ヘン (3:1) およびクロロホルム-アセトン (3:2) を用いて 2 回クリーンアップ後, DN 分画を TMS 誘導体として GLC 分析した。(GLC 条件: 3% OV-1; 3mm×1m ステンレスカラム: カラム温度, 150–280° at 10°/min; N₂ ガス流量, 40 ml/min.)

罹病麦中の毒性物質の有無を検討するために, 劣悪

*1 香川大学農学部食品学科 (香川県木田郡三木町池戸)

Faculty of Agriculture, Kagawa University (Miki-cho, Kagawa, 761-07)

Fig. 1. Analysis of deoxynivalenol in the infected barley

Fig. 2. Analysis by GLC of TMS ether of deoxynivalenol in the *Fusarium*-infected barley

A: heavily infected grains

B: moderately infected grains

麦粉 5 kg の含水アルコール浸出液を酢酸エチル抽出し、これをシリカゲルカラム(クロロホルム-アセトン、3 : 2)により6分画し、マウス毒性 (i.p. 投与) を検索した。また香川、愛媛両県下から採取した麦類(立穂)より、Czapek-Dox、寒天培地を用い寄生カビを分離し、ペプトン添加 Czapek-Dox、25°, 18日間静置培養後、汙液およびその酢エチ抽出物の毒性を調べた。

結果と考察

四国地方における本年度産麦類の赤カビ病穂率は約20%であり、収穫時点で唐箕選別した劣悪粒の比率は約3%であった。Fig. 1の分析法によるDNの回収率は85%、劣悪麦粒中のDN量は4.2 ppmであった(Fig. 2)。したがって、出荷麦穀中には0.15 ppm前後のDNの混入が推定される。この点については今後更に詳細な検討を加えたいが、収穫時に選別した劣悪穀類中のマイコトキシンを分析することにより、穀類汚染のモニターリングが可能と思われる。

被害麦粒からえた抽出物のマウス毒性結果では、第4分画(DN分画)以外に見るべき毒性がないことから、他の毒性物質の存在は否定される。一方、小麦、大麦からの分離カビ46株の毒物産生能はTable 1に示すごとくであり、13株の汙液に毒性が示され、そのうち酢エチ可溶の毒性は3株(*Fusarium 2*, *Aspergillus*

Table 1. Isolation of toxic fungi from naturally infected cereals

Origin	Habitat	No. of isolates	No. of toxic strains	
			Filtrate	AcOEt extract
barley (rye)	Ehime, Saijo	7	4	0
wheat	Ehime, Saijo	10	2	0
barley (rye)	Ehime, Saijo	6	1	1
barley (rye)	Kagawa, Miki	8	2	2
wheat	Kagawa, Miki	8	1	0
wheat	Kagawa, Miki	7	3	0
Total		46	13	3

1) であった。有毒 *Fusarium* 株の毒性は butenolide であり、DN のごとき trichothecene は検出されなかった。Trichothecene 生産菌の分離は不成功に終わったが、麦粒中に検出された DN は、既に1970年四国地方から^{1,2)}、1972年米国から³⁾ 分離され、また *F. roseum* により monoacetate 体から DN に変換されること⁴⁾ を考えると、本マイコトキシンにより麦類等が恒常的に汚染されている可能性が示唆される。

謝辞：試料採取と赤カビ発生の実態について有益なご助言をいただいた愛媛県東予病害虫防除所 上田進所長に深謝する。

引用文献

- 1) 諸岡信一, 裏辻憲昭, 芳沢宅実, 山本弘幸: 食衛誌, **13**, 368 (1972).
- 2) Yoshizawa, T., Morooka, N.: Agr. Biol. Chem., **37**, 2933 (1973).
- 3) Vesonder, R. F., Ciegler, A., Jensen, A. H.: Appl. Microbiol., **26**, 1008 (1973).
- 4) Yoshizawa, T., Morooka, N.: Appl. Microbiol., **29**, 54 (1975).

強度の伝染性萎縮性鼻炎病変をもつ豚の鼻腔から分離した 真菌の生産するマイコトキシンについて

松前 昭広*1・津田 悠介*2・星野 寿雄*1・中瀬 安清*1・呂 栄修*3

A. MATSUMAE*1, Y. TSUDA*2, M. HOSHINO*1, Y. NAKASE*1, and Y. S. LU*3:

Mycotoxins of Fungi isolated from Nasal Cavities of a Pig with
Atrophic Rhinitis

1974年台湾省淡水家畜衛生試験所に診断依頼のあった5カ月令のランドレース雑種牝幼豚が、*Bordetella bronchiseptica* 感染によると思われる極重症の伝染性

*1,2 北里研究所 細菌研究部*1, 食品衛生課*2 (東京都港区白金5-9-1)

The Kitasato Institute, Section of Bacteriology*1 and Food and Hygiene Section*2. (5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108)

*3 台湾省家畜衛生試験所

Taiwan Prov. Res. Institute for Animal Health

萎縮性鼻炎 (Atrophic rhinitis 以下 AR と略す) を呈し、解剖したところ鼻甲骨骨欠損部分から節骨附近に至る鼻腔粘膜全域に灰青白色の真菌様集落が密生しているのを認めた。病理組織学的に鼻粘膜上皮は剝離脱落し、表面に *Aspergillus* の特徴のある菌糸、分生子及び梗子、頂囊及び分生子柄などの胞子形成器官が認められ、線維性に肥厚した粘膜表層には壊死がみられた。肺は化膿性病変があり、病理組織学的には、*Aspergillus* による気管支肺炎と小膿瘍がみられた。

血液寒天培地および普通寒天培地を用いて、鼻甲介骨欠損部および肺から特徴ある *Aspergillus* がほぼ純培養にえられた。これを AR-1 株とした。しかし、鼻腔からの分離平板には他の真菌がごく少数認められた。これらを夫々 AR-1-A-2, AR-2-1, および AR-3 株とし、*Acremonium* sp. *Monosporium* sp. および *A. tamarii* 群と同定したが何れもごく少数で、感染防御能の欠けた鼻腔からのみ分離され、混入雑菌と考えられる。

AR-1 株は、純培養的に分離された菌株でその集落は Potato-glucose agar (Po-agar), MY-20 agar, Sabouraud's agar (Sb agar) および Czapek's agar (Cz agar) で緑色を主色とした集落で、その色調の変化は白色→黄緑色→帯オリブ灰緑色又は帯茶緑色でうすい黄色からうすい茶色の可溶性色素を示し、Cz agar の表面は黄味茶色～赤味緑色を示した。頂囊は棍棒状、二段梗子を認めず、分生子柄は無色、滑面で、分生子は $2\sim3\mu$ で滑面を示した。培養日数のたった培地上で分生子頭は長円柱状であった。これらの性質から *A.*

fumigatus 群と同定した。

これら 4 菌株を各種の液体培地に接種し、 27° で 7 日間振盪培養後にその培養液 0.5 ml を ddH 系のマウスの腹腔に注射したところ、AR-1 株の ammonium-nitrate 液体培地の培養液のみが、マウスに対し毒性作用を強く示した。

AR-1 株の培養液を pH 酸性とし、 CHCl_3 で抽出し、濃縮した CHCl_3 液 (F-1) を Thin-Layer Chromatography を用い CHCl_3 -acetone (9:1) で分離し、UV 366 nm 照射下でしらべたところ緑と青のスポットが数多く出現した。Rf=0.55 で緑と青の螢光度の一番強い fraction を F-B とし、これを更に toluene-isoamyl alcohol-MeOH (90:32:3) で再クロマトして Rf 値 0.76, 0.64 および 0.50 の区分を FB_1G_1 , FG_2 , 及び FG_3 とした。この中での主成分 FB_1G_1 を CHCl_3 -acetone (9:1) 系で再クロマトしたところ Rf 値 0.60, 0.46 の 2 区分を分離し、 FB_1 および FG_1 とした。これらの物質の生物学的および物理化学的特徴は表に示した。(Table 1).

Table 1.

Substance	Broth	F-1	F-2	F-B	$\text{F-B}_1\text{G}_1$	F-G_2	F-G_3	F-B_1	F-G_1
Color under UV 360 nm				Blue-green	Blue-green	Green	Green	Blue	Green
UV absorbance						228 277 283	218 277 285 290	226 278 285 292	225 274 283 291
Rf value*									
① C:A (9:1)				0.55				0.60	0.45
② T:I:M (90:32:3)					0.76	0.64	0.50		
Antimicrobial-activity									
① Gram positive bact.	±	++	++	—	±	—	—	—	
② Gram negative bact.	±	+	+	—	—	—	—	—	
③ Yeast	—	—	—	—	—	—	—	—	
④ Filamentous fungi	—	—	—	—	—	—	—	—	
⑤ HeLa cell									
6.25 $\mu\text{g/ml}$				—	+	+			
12.5 $\mu\text{g/ml}$					+	+			
25 $\mu\text{g/ml}$				—	+	+			
50 $\mu\text{g/ml}$				—	+	+			
⑥ Chick-embryo 10 $\mu\text{g/egg}$	—	—	—	—	—	—	—		
⑦ Ehrlich Carcinoma 1 mg/mice	±	+	+	—	±	—	—		

* C: CHCl_3 T: toluene
A: $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ I: isoamyl alcohol
M: methyl alcohol

F-1, F-2 は 1.25 mg/mouse で Ehrlich 腹水癌, gram 陽陰性菌に有効であり, 液体培地は HeLa 細胞に有効でないが, F-B₁G₁ は 31.2~6.25 μ g/ml で HeLa 細胞の発育を阻止し, これを分離した. FG₂, FG₃ は, 更に有効で 12.5 μ g/ml で発育を阻止した. 孵化鶏卵には 5-10 μ g/egg でどの fraction も作用を示さない. これらの物質の紫外線吸収曲線の最大値は 226, 277,

284 として或るものは 292 nm で分子構造に indole 骨格を有すると思われる. なお, F-B₁G₁ 50 mg/kg 腹腔内注射で, マウスは死亡した.

培養菌体を MeOH で抽出し, M-1 とし, 更に菌体を CHCl₃ および H₂O で抽出を行い, M-2 および M-3 としたが, 生物学的活性は少しも示さなかった.

Trichothecene 系 mycotoxins の代謝に関する研究 (第 1 報)

T-2 toxin の酵素的脱アセチル化反応について

太田 稔*¹・上野 芳夫*¹

M. OHTA*¹ and Y. UENO*¹: Studies on the metabolism of trichothecene mycotoxins. I. Enzymatic deacetylation of T-2 toxin

赤カビ汚染食品の摂取による人畜の中毒症の原因化合物に trichothecene mycotoxins がある. そのひとつである T-2 toxin のラット肝における代謝について *in vitro* で, 代謝産物, 代謝速度, 酵素活性の細胞内局在性, 補酵素の要求性, フェノバルビタールまたは 3-メチルコランズレンによる誘導性, 脱アセチル化酵素の K_m 値などを検討した.

方法

酵素として, 雄性ウィスター系ラットの肝の 1.19% KCl または 0.25 M sucrose 溶液による 20% homogenate を調製し, この 9,000 g 上清 (S-9) または 100,000 g 沈殿 (microsome) を調製し, 活性の測定に用いた. 反応生成物の測定は, 反応を冷 CHCl₃ で止めその CHCl₃ 抽出液を濃縮乾固し, そのアセトン可溶分画を TMSi 化して GLC で定量分析した.

結果

T-2 toxin のラット肝における代謝産物は, GLC, TLC, NMR, IR で HT-2 toxin と同定された. この反応は T-2 toxin の 4 位のアセチル基の水解反応で, この反応の酵素活性はラット肝細胞内の microsome 分画に存在していた. T-2 toxin のラット肝 microsome による脱アセチル化反応において, 残存 T-2 toxin 量

と生成 HT-2 toxin 量の和は添加 T-2 toxin 量にほぼ等しい. microsome の酵素活性を上昇させる薬物であるフェノバルビタール 40 mg/kg または 3-メチルコランズレン 15 mg/kg を 1 日目 1 回, 2~4 日間 2 回ずつ合計 7 回投与したラットの肝の S-9 分画で, T-2 toxin 脱アセチル化酵素活性を検討したところ活性は上昇していた. また, NADPH 系の添加による酵素活性の上昇はなく, この時も HT-2 toxin 以外の代謝産物は検出されなかった. この酵素の K_m 値は, 2.7×10^{-4} (M) 程度であった.

Fig. 1. GLC analysis of metabolite of T-2 toxin incubated with rat liver microsomes

*¹ 東京理科大学薬学部微生物化学教室 (東京都新宿区市ヶ谷船河原町12)
Tokyo Univ. of Sci., Tokyo (12, Ichigaya-funagawara-machi Shinjuku-ku, Tokyo)

Fig. 2. Time-course of C-4deacetylation of T-2 toxin by liver microsomes of rat

考 察

ラット肝の S-9 分画または microsome 分画によって T-2 toxin は 4 位で脱アセチル化され、より極性の高い HT-2 toxin に代謝される。GLC および TLC 分析で、microsome 由来のピーク以外に T-2 toxin と HT-2 toxin のみが検出されたこと、また残存 T-2 toxin 量と生成 HT-2 toxin 量の和が添加 T-2 toxin 量にほぼ等しいことから T-2 toxin は、ラット肝の *in vitro* の系でその大半が HT-2 toxin に代謝されると思われる。なお GLC および抽出操作上の誤差が 10% 程

度であることから、他の代謝産物が存在する可能性は否定できない。

T-2 toxin と HT-2 toxin の毒性にほとんど差がないこと、および T-2 toxin は *in vitro* でラット肝によりかなり早い速度で代謝され HT-2 toxin になることから、T-2 toxin は *in vivo* において、HT-2 toxin に代謝された上で毒性を発現しているものと考察される。今後、4 位における脱アセチル化反応の基質特異性、および脱アセチル化酵素の特性について検討したい。

Aspergillus fumigatus から分離された痙れん性代謝産物の化学

山崎 幹夫・藤本 治宏・河崎 孝男*1

M. YAMAZAKI, H. FUJIMOTO, and T. KAWASAKI: On the chemical structure of tremorgenic toxins from *Aspergillus fumigatus*

カビの生産する痙れん性代謝産物についてはすでに 1964 年に *Aspergillus flavus* からの分離の報告がある¹⁾。

*1 千葉大学生物活性研究所活性天然物化学研究部 (習志野市泉町3-9-1) Research Institute for Chemobiodynamics, Chiba University (Izumi-cho 3-9-1, Narashino-shi)

米国においては実際にヒツジ、ウマ、ウシ等の痙れんをとまう中毒死事件の発生が報告され、Wilson²⁾、Ciegler³⁾ らはその原因物質として *Penicillium cyclopium*, *P. crustosum*, *P. palitans* 等から痙れん性物質を単離したと報告した。しかし、それ等の構造に

についてはなんら知る処がなかった。

我々は本邦産米を汚染する有害糸状菌を検索するうちにマウス、ラット等に強い瘧れんを与える *Aspergillus fumigatus* を分離し、その作用本体として4種のインドール化合物 (FTA, B, C, D) を単離した⁴⁾。作用はそのうち FTA および B (fumitremorgin A および B と命名) によることが判ったが、FTA, B は共に 6-methoxyindole を含む tryptophan と proline の diketopiperazine であり、その構造は UV, IR, mass, NMR スペクトルデータの解析及び2, 3の化学反応の結果解明された。FTB についてはX線解析の結果、絶対配位を含む立体構造を決定することもできた。FTA は peroxide 鎖を含む特異的8員環構造を有することが認められた。

一方、FTC, D は得られたスペクトルデータより、極く最近に至り Büchi⁵⁾ らによってX線解析にもとづき、構造決定された *A. clavatus* の成分 tryptoquivaline

と性質極似し、直接比較の結果 acetyl 基の位置に関する異性体であることが判明した。従って FTC は isotryptoquivaline と命名され、構造が解明された。FTD は C に比較して分子量は14少なく、methyl 基1個を欠く。従って norisotryptoquivaline と命名され構造が推定された。我々の研究結果を端緒として現在一連の構造類似の瘧れん性カビ毒の構造が解明され、更に探索が続けられていることは興味深い。

研究の一部は日本薬学会年会及び Tetrahedron Letters 誌上に発表した⁴⁾。研究費の一部は厚生省科学研究助成金によった。

引用文献

- 1) Wilson, B. J., Wilson, C. H.: Science, **144**, 177 (1964).
- 2) Wilson, B. J., Wilson, C. H., Hayes, A. W.: Nature, **220**, 77 (1968).
- 3) Hou, C.T., Ciegler, A., Hesseltine, C.W.: Can.

- J. Microbiol., **17**, 599 (1971).
 4) Yamazaki, M., Fujimoto, H., Kawasaki, T.: Tetrahedron Letters, 1241 (1975), and references cited therein.
 5) Clardy, J., Springer, J. P., Büchi, G., Matsuo, K., Wightman, R.: J. Am. Chem. Soc., **97**, 663(1975).

T₂-toxin のウニ卵割におよぼす影響

諸岡 信一*1・芳沢 宅実*1・納 寿一郎*2

N. MOROOKA*1, T. YOSHIZAWA*1, and J. OSAME*2: Effect of T₂-toxin on the early stage of the development of sea urchin egg

私達は Trichothecene 系マイコトキシンの部分修飾、修飾された物質の毒性変化、またこれらの研究と同時に各種生体に対する特異反応、感受性などを比較検討してきた。

今回はウニ卵（閉鎖型）を用い、T₂-toxin の初期発生（卵割）に対する影響を形態変化を中心に観察した。比較薬物として puromycin, cycloheximide, actinomycin-D, 4-nitroquinoline-N-oxide, colchicine などを用いた。そしてこれらの物質によって引き起される卵割抑制作用は発生学的手法により比較検討した。その結果、T₂-toxin の卵割に対する特異的な阻害のあることを知り得たので報告する。

実験材料と方法

ウニ卵はパフンウニ (*Paraechinus pulcherrinus*) を主に、ムラサキウニ (*Anthodiaris crassispina*)、サンショウウニ (*Temnopleurus treumaticus*) などを用い、正常時のウニ卵発生を対照として仕事を進めた。

予備試験として①ウニ精子の T₂-toxin 処理による受精能の可否、②未受精卵の T₂-toxin 処理、③受精卵の T₂-toxin 処理などによる卵割におよぼす影響を順次検討し、これらの試験結果を基にして T₂-toxin と上記薬物との卵割抑制の力価比較、並びに特異性を形態変化を中心にして比較検討した。

ウニ精子・卵は M/2 KCl で常法に従い、雌雄を分け

て放精、放卵させた。卵は人工海水で三回洗浄を繰り返し、軽度の遠心分離を行い、沈澱した卵を実験に用いた。

(1) 受精能の失活試験：精子の受精能失活を見るために精子の T₂-toxin 処理試験を行った。T₂-toxin の濃度は最終濃度を 5 μ/ml, 2.5 μ/ml, 1 μ/ml に調整し、各々 5 分間処理し、卵は無処理のものを用いて受精能を観察した。

一方卵の処理は未受精時・受精直後の 2 区に分け T₂-toxin（濃度は前記に同じ）に 5 分間処理、受精のための精子は無処理のものを用いた。これらの試験区と対照とを時を追って発生の進行を比較した。その結果を一括して表 1 とした。

(2) 各分裂周期相におよぼす薬物の影響：卵割抑制の特異性有無を知るために卵分裂周期の三時期に T₂-toxin 処理を行った。①基相（未受精）時、②先駆相（受精直後）時、③初期相（第一分裂直前）時の 3 区に分け、比較薬物として puromycin, cycloheximide, actinomycin D, 4NQO, colchicine の各種濃度の処理試験を行った。処理時間は各々 5 分間、処理終了後、人工海水で洗浄、遠心上清を除去（3 回繰り返す）、卵浮遊液中の薬物を除去し、あらかじめ採取した精子を各区の卵浮遊海水中に少量滴下し受精を終了した。

一方、②③周期時の薬物処理はそれぞれの時期に前記同様、5 分間処理、薬物の除去を行い、それぞれ正常人工海水に移し、時を追って対照区と発生進行を比較し、卵分割遅延、卵割異常の出現有無を観察した。

実験結果の概要と考察

(1) T₂-toxin のウニ精子・卵におよぼす影響：表 1 に示すようにウニ精子は T₂-toxin 5 μ/ml 量処理のとき 99%、2.5 μ/ml 量処理のとき 95%受精能を失い、卵に受精膜を形成しなかった。1 μ/ml 量処理では 100%受精可能、卵割は正常時とほぼ同様の発生が進んだ。

*1 香川大学農学部（香川県木田郡三木町）
Faculty of Agriculture, Kagawa University (Mikicho, Kagawa, 761-07)

*2 阪大微生物病研究会、観音寺研究所（香川県観音寺市八幡町）
Kanonji Institute, Research Foundation for Microbial Diseases, Osaka University (Yahatacho, Kanonji City, Kagawa)

表1 T₂-toxin 処理による受精能の失活と卵割異常

細胞	T ₂ -toxin conc/ml		
	5 μ	2.5 μ	1 μ
精子	受精不能 99%	受精不能 95%	受精膜形式 100% 原腸胚→プルテウス
卵 (未受精)	2細胞 (卵割停止)	2細胞・異常卵割 (卵割停止)	2・3・4細胞 (異常卵割)
卵 (受精)	2細胞 (卵割停止)	2細胞・異常卵割 (卵割停止)	2細胞 (異常卵割)

一方、卵の T₂-toxin 5 μ/ml・2.5 μ/ml 処理時に未受精、受精直後処理両区で卵は全数分裂の遅延と同時に第一分裂を終了して細胞となった。その後いずれも卵割は停止した。また T₂-toxin (2.5 μ/ml, 1 μ/ml) の両区では卵割の遅延と異常な卵割が多数見られた。これらの異常卵割 (3細胞), 中心子の複製などが頻発した。

(2) 各分裂周期相におよぼす薬物の影響; 基相 (未受精時), 先駆相 (受精直後), 初期相 (第一分裂直前) の3周期相に前記薬物の処理を行った。

その結果、卵割の外観的な所見では3周期相の間に初期卵割への顕著な差を見出せなかった。

(3) 各種薬物による卵割抑制と奇形の出現; T₂-toxin と比較薬物による卵割抑制濃度 (ED₅₀) を一表にすれば表2のようである。puromycin では 10⁻⁵~10⁻⁶ M 濃度では初期卵割抑制は認められず cycloheximide の追加試験と比較して予想と異った結果を得た。一方、spindle poison といわれる colchicine の 200 ppm では卵割せず、100~10 ppm での卵割不揃いは 4NQO (SH 結合物質といわれる物質) で見られる卵割不揃いととも両者に著しく出現した。また、actinomycin D と T₂-toxin には卵割遅延と同時に不整割卵が多く外見的には中心子複製の様子がうかがえ

表2 卵割抑制作用値 (ED₅₀) と畸形の出現 (室温21°培養)

処理物質・濃度 ppm	時間(分)				ED ₅₀ 値	
	60	120	310	520	20×60	
対 照 区	2細胞 50%	4細胞 20%		廻転運動 開始	浮游運動	プルテウス
puromycin	(?)	2細胞	4細胞	廻転運動 開始	浮游運動	プルテウス (?) 10 ⁻³ M
actinomycin-D	0.50				崩壊	
	0.25		1~4細胞 不整割	3~8細胞 不整割		畸形(出現) 4×10 ⁻⁶ M
	0.10					
4NQO	10.00		1~4細胞 不整割		崩壊	
	5.00	2細胞 20%	2細胞 70%	卵割不揃	一部 浮游運動	畸形(出現) 2.5×10 ⁻⁵ M
	2.50					
T ₂ -toxin	0.50				崩壊	
	0.25			2・3細胞 不整割		畸形(出現) 0.5×10 ⁻⁶ M
	0.10					
colchicine	200.00			卵割なし	崩壊	
	100.00			2・4・8 細胞	一部浮游 運動(弱)	2.5×10 ⁻⁵ M
	50.00			卵割不揃		
	10.00					
cycloheximide	0.50					(?) 10 ⁻⁶ M
	0.25					
	0.10					

る。また、actinomycin D, 4NQO, T₂-toxin の低濃度処理卵に初期卵割段階に卵割遅延・不整割などの卵割異常をみるばかりでなく、生残卵はリチウム処理時に起る畸形胚の出現をみた。また、これらの胚は骨片形成も不能であった。

ウニ卵（閉鎖型）の初期発生の特徴を生かしてこの試験を進めてきたが蛋白合成阻害剤、puromycin, cycloheximide の不一致点は再試験の要がある。

最後に御助言の御礼を東大（理）酒井彦一先生に申しのべます。

家蚕のこうじかび病菌に関する研究 アスペルギルス・フラブス菌群のカイコに対する病原性と 経口毒性およびアフラトキシン生産性との関係

村越 重雄*¹・阿久津四良*¹・一戸 正勝*²・熊田 広子*²・倉田 浩*²

S. MURAKOSHI*¹, S. AKUTSU*¹, M. ICHINOE*², H. KUMADA*², and H. KURATA*²:

Studies on the Aspergilli from silkworm, *Bombyx mori* L.—Correlation
between the pathogenicity, oral toxicity to silkworm and
productivity of aflatoxins in isolates of *A. flavus* group

著者らはすでに、カイコに病原性を示す *Aspergillus flavus* Link の培養物がカイコ幼虫に強い経口毒性を示し、その毒性の本体がアフラトキシン（以下 AF と略記）であることを明らかにした¹⁾。さらに、数種のマイコトキシンの中ではカイコに対して AF-B₁ の経口毒性が最強であることと²⁾、AF-G₁ は特異的中毒症状を示すことを見出した³⁾。また、蚕体中から AF-B₁ の検出も行なった⁴⁾。引続き、分離源を異にする *A. flavus* 菌群のカイコに対する病原性と経口毒性および AF 生産性との関係などについて検討した結果を報告する。

材料および方法

供試菌株：1974年に神奈川県内におけるカイコ飼育所のじんあいから分離した *A. flavus* 菌群30菌株および穀類や豆類から分離した AF 産生確認済の *A. flavus* 菌群10菌株を用いた。それら分離菌株の同定は Raper, Fennell のモノグラフ⁵⁾ によった。

カイコに対する病原性と経口毒性：各菌株のカイコに対する病原性の有無は、各菌株の分生子を2齢起蚕

20頭の体表に接種し、桑葉を与えて 25° で飼育し、10日後の死亡率により判定した（死亡率70%以上を S, 5～65%を M, 0%を N と表示した）。経口毒性は人工飼料を用いた方法¹⁾ に準じて行なった。すなわち、各菌株をツァベック・ドックス氏修正培地 20ml に植菌し、25° で5日間静置培養後滅菌して菌体とろ液に分け、それぞれを人工飼料に添加して10頭の4齢起蚕に25° で連続的に与え、6日後の生育状態により判定した（死亡個体のあったものを⊕、生育阻害のみ見られたものを⊕、悪影響の無かったものを—として表示した）。なお、この際に幼虫の外観が AF-G₁ による特異的中毒症状（環節間膜がくびれて環節が隆起し、体色は黒色化する）を示したものを AF-G₁ 様症状陽性として表示した。

ホルマリン抵抗性：各菌株のホルマリン抵抗性は、ホルムアルデヒドの濃度で 0, 0.05, 0.1, 0.2% を添加したツァベック寒天培地上での生育の有無により判定した（—から⊕で表示した）。

アフラトキシンの生産性・各分離株を YES 培地（2% Difco 酵母エキス＋15% サッカロース）に植菌し、25° で6日間静置培養後のろ液を Adsorbosil-1 の TLC プレートに 10 μl ずつスポットしてクロロホルム：n-ヘキサン：アセトン（85：20：15, v/v）で展開し、長波長 UV 下で標品と同一の R_f 値、螢光色を呈する物質の有無および相対量を肉眼判定した。つ

*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-shi, Kanagawa)

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

Table 1. Biological effects to the silkworm larvae and production of aflatoxins by *Aspergillus flavus* group isolated from sericultural farm dust

Species	Number of strain	Pathogenicity*	Toxicity	AF-G ₁ like symptom	Tolerance to formalin	Aflatoxins**			
						B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
<i>A. flavus</i> var. <i>columnaris</i>	1	M	+	—	++	—	—	—	—
	6	N	—	—	—	—	—	—	—
<i>A. flavus</i>	1	M	—	—	—	—	—	—	—
	1	S	++	+	++	TR	—	TR	—
	1	S	++	+	++	+	TR	+	TR
	1	S	+	+	++	+	TR	+	TR
	5	S	++	+	++	+	TR	+	TR
	7	S	++	+	++	++	TR	++	TR
	2	S	++	+	++	++	+	++	+
	3	S	++	+	++	++	+	++	+
<i>A. parasiticus</i>	1	M	—	—	++	—	—	—	—
<i>A. tamarii</i>	1	M	+	—	—	—	—	—	—

* M: 70%, S: 5~65%, N: 0%, ** TR: trace

ぎに、AF 産生の認められた代表的菌株（各10株）を 25°, 6 日間米培養し、クロロホルム抽出後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより clean up を行ない、蛍光デンシトメーターにより AF-B₁ と G₁ を定量した。

実験結果

カイコ飼育所のじんあいより分離した30菌株についての実験結果を Table 1 に示した。21株は *A. flavus*, 7株が *A. flavus* var. *columnaris* であった。他に各1株の *A. parasiticus* と *A. tamarii* が見出された。*A. flavus* と同定された21株のうち1株を除いて、いずれも経口毒性と病原性が強く、AF-G₁ 様症状を示し、これらの菌株は液体培養で AF-B グループおよび G グループを必ず産生していた。なお、この20株はいずれも強いホルマリン抵抗性を示した。また、代表株

の米培養における AF-B₁ の生産量は 13.5-354.0 µg/g であり、100 µg/g を越えるものは10菌株中5株に達した。AF-G₁ は 29.7-1,391.0 µg/g であり、500 µg/g を越える菌株は4株に達した。なお、*A. flavus* 以外の菌株では、AF の産生を示すものは認められなかった。

つぎに、穀類や豆類から分離した10菌株についての実験結果を Table 2 に示した。10株の AF 生産株のうち7株が *A. flavus* であり、そのうち6株は AF-B₁, B₂ のみを産生したが、1株 (75-As-126) はカイコ飼育所由来株と同様に AF-B₁, B₂ とともに G₁, G₂ の産生も認められた。残り3菌株は *A. parasiticus* であり、いずれも AF-B₁, B₂ とともに G₁, G₂ を産生した。カイコに対する病原性はほとんどの菌株で中程度であったが、先の 75-As-126 のみは強かった。AF-G₁ 様症状は4株で見られたが、これらは AF-G₁ の産生と良

Table 2. Biological effects to the silkworm larvae and production of aflatoxins by *Aspergillus flavus* group isolated from various kinds of seed grains

Species	Number of strain	Pathogenicity*	Toxicity	AF-G ₁ like symptom	Tolerance to formalin	Aflatoxins			
						B ₁	B ₂	G ₁	G ₁
<i>A. flavus</i>	2	M	+	—	—	+	+	—	—
	1	M	+	—	—	++	++	—	—
	1	M	++	—	—	++	++	—	—
	1	M	++	—	+	++	++	—	—
	1	M	++	—	—	++	++	—	—
	1	S	++	+	++	++	+	++	+
<i>A. parasiticus</i>	1	M	++	+	—	++	++	+	+
	1	M	++	+	—	++	+	++	++
	1	M	++	+	—	++	++	++	++

* M: 70%, S: 5~65%

く一致した。ホルマリン抵抗性は2株で見られたが、残り8株においてはまったく見られなかった。米培養における AF-B₁ の生産は 5.2-83.6 µg/g, AF-G₁ は 22.3-244.5 µg/g であった。

考 察

従来より, *Aspergillus flavus* 菌群の AF 産生菌のうち *A. flavus* では AF-B₁, B₂ のみを産生し, *A. parasiticus* は AF-B₁, B₂, G₁, G₂ を産生することが一般的であるとされている^{6), 7), 8)}。しかしながら, カイコ飼育所のじんあいから分離した *A. flavus* では大部分のものが AF-B₁, B₂ とともに G₁, G₂ も生産していることが, 前回の調査⁹⁾ および本実験の結果から明らかになった。一方, AF 産生菌株ではいずれもカイコに対する病原性および経口毒性が認められたが, その程度は概してカイコ飼育所のじんあいから分離した菌株の方が強かった。ホルマリン抵抗性はカイコ飼育所のじんあいから分離した AF 産生菌株ではいずれも強かったが, 穀類や豆類から分離した菌株では2株を除いてまったく見られなかった。豆類から分離した 75-As-126 株は病原性, ホルマリン抵抗性の諸点において, じんあいから分離した *A. flavus* と類似していた。以上のことから, カイコこうじかび病菌として優勢な AF-B₁, B₂, G₁, G₂ 生産性の *A. flavus* は元来,

自然界に低率に分布していたものから, 多くの過程を経てカイコ飼育所の内外に定着したものと考えられるが, これら菌株の定着を支えている要因として, カイコに対する病原性そのものとともに, ホルマリン抵抗性などの一面も重要であることが示唆されよう。

本研究を行なうにあたり, 終始べんたつを与えられた蚕業センター森井謙介病理化学科長に深謝する。

引 用 文 献

- 1) 村越重雄, 杉山純多, 大友俊允: 日蚕雑, **40**, 167 (1971).
- 2) 村越重雄, 大友俊允, 倉田 浩: 食衛誌, **14**, 65 (1973).
- 3) 村越重雄: Proc. Jap. Assoc. Mycotoxicol., **1**, 25 (1975).
- 4) Ohtomo, T., Murakoshi, S., Sugiyama, J., Kurata, H.: Appl. Microbiol., In Press.
- 5) Raper, K. B., Fennell, D. I.: "The Genus *Aspergillus*," Williams and Wilkins, Baltimore (1965).
- 6) Hesseltine, C. W., Shotwell, O. L., Smith, M., Ellis, J. J., Vandergraft, E. E., Shannon, G.: Proc. Ist U.S.-Japan conf. Toxic Microorganisms. U.S. Dept. of Interior and U.J.N.R. Panels on Toxic Microorganisms. p. 202 (1968).
- 7) Lillard, H. S., Hanlin, R. T., Lillard, D. A.: Appl. Microbiol., **20**, 128 (1970).
- 8) 鶴田 理, 真鍋 勝: 日菌報, **16**, 190 (1975).

マイコトキシンによる脂質代謝阻害

黒田 正夫・丹沢和比古・遠藤 章^{*1}

M. KURODA, K. TANZAWA, and A. ENDO^{*1}: Inhibition of lipid metabolism by mycotoxins

我々は脂質代謝の研究の過程でシトリニンを初めとする数種のマイコトキシンが *in vitro* においてコレステロールの生合成を阻害することを見出したので以下簡単に報告する。

酵素はラット肝臓から Knauss らの方法¹⁾で調製し, コレステロール合成は基質として ¹⁴C-acetate, ¹⁴C-acetyl-CoA, ¹⁴C-mevalonate を用いて不ケン化物へのとり込み量として測定した。Acetoacetyl-CoA thiolase,

HMG-CoA synthase²⁾ としてラット肝臓ホモジネートの 100,000×g 上清を用い, HMG-CoA reductase としてミクロソーム³⁾ と可溶化酵素⁴⁾ を用いた。シトリニンは *P. citrinum* の培養濾液から調製し, 他は Makor 製品を使用した。

表1は種々のマイコトキシンのコレステロール合成を50%阻害するのに必要な濃度を示している。アフラトキシンやステリグマトシスチンは全く阻害を示さないが, オクラトキシン, ルブラトキシン, パツリン, シトリニン, ペニシリン酸には強力な阻害作用がある。なかでもシトリニンが最も強いので以下シトリニンに

^{*1} 三共(株)醸酵研究所(東京都品川区広町1-2-58)
Fermentation Research Laboratories, Sankyo Co., Ltd.

Table 1. Inhibition of cholesterol biosynthesis by mycotoxins

Mycotoxin	I ₅₀ (μg/ml)*
aflatoxin B ₁	>100(+)**
aflatoxin B ₂	>100(+)
aflatoxin G ₁	>100(+)
aflatoxin G ₂	>100(+)
ochratoxin A	55
rubratoxin B	21
patulin	39
sterigmatocystin	>100(-)***
citrinin	8.5
penicillic acid	34

* concentration required for 50% inhibition

** slightly inhibited

*** not inhibited

ついて調べた。

コレステロールは酢酸から20数段階の反応を経て合成される。その中でシトリニンがどの段階を阻害しているか大まかに調べたところ、¹⁴C-acetyl-CoA のとり込みに対しては acetate のとり込みに対するのと同じ阻害パターンを示し、¹⁴C-mevalonate のとり込みに対しては全く阻害を示さなかった。これは acetyl-CoA と mevalonate の間、つまり acetoacetyl-CoA thiolase, HMG-CoA synthase, HMG-CoA reductase にシトリニンの阻害部位が存在することを示している。三つの酵素を調べたところ、acetoacetyl-CoA thiolase は 0.3 mM で、HMG-CoA reductase は 0.5 mM で50%阻害されることがわかった。HMG-CoA synthase は全く阻害されなかった (Fig. 1)。HMG-CoA reductase はコレステロール合成系の律速酵素であると言われている⁹⁾。

次にシトリニンによる HMG-CoA reductase 阻害の機構について調べたところ、基質のない状態における preincubation により、阻害が非常に強く現われることがわかった。preincubation の後、シトリニンの濃度を下げても活性の回復がみられないことから酵素は不可逆的な失活を受けるものと考えられる。

一方、preincubation による不活性化は非常に短時間に起り、最終的な阻害率はシトリニンの濃度により

Fig. 1. Biosynthetic pathway of cholesterol

Fig. 2. Rapid inactivation of soluble HMG-CoA reductase by citrinin

規定されていることがわかった。

引用文献

- 1) Knauss, H. J., Porter, W. J., Wasson, G.: J. Biol. Chem., **234**, 2835 (1959).
- 2) Clinkenbeard, K. D., Sugiyama, T., Moss, J., Read, W. J., Lane, M. D.: J. Biol. Chem., **248**, 2275 (1973).
- 3) Shapiro, D. J., Imbrum, R. L., Rodwell, V. W.: Anal. Biochem., **31**, 383 (1969).
- 4) Heller, R. A., Gould, R. G.: J. Biol. Chem., **249**, 5254 (1974).
- 5) Dempsey, M. E.: Ann. Rev. Biochem., **43**, 871 (1974).

Citrinin によるラット腎毒性の病理組織学的機序について

大久保 薫・菅又 昌雄・和島 修*¹

K. OKUBO*¹, M. SUGAMATA*¹, and O. WAJIMA*¹: On the mechanisms of pathogenesis of nephropathy of rats by citrinin

1928年 Larsen⁶⁾ はかびの寄生した飼料を摂取した1群の肉豚がその腎臓に慢性の変性を発した事故について、そのかびが生じたライムギを実験的にブタに給与して腎臓病変を再現せしめ、かびによる腎毒性の存在を立証した。1955年酒井⁹⁾ は黄変米から分離した *Penicillium citrinum* Thom の代謝産物である citrinin を用い、nephron 摘出法を応用し citrinin の腎毒作用を組織学的に始めて証明した。しかし1957年永井⁷⁾ は citrinin を用いた中毒実験を行ない、この物質は腎臓のほか肝臓にも障害を与えると報告した。これに対して Friis ら²⁾ (1969) および Krogh ら⁴⁾ (1970) は *P. viridicatum* Westling から分離精製した citrinin を用いて、ブタに経口中毒実験を行ない、組織学的観察の結果、腎臓以外には全く変化がなく、永井⁷⁾ の成績は基質に肝毒性かびの汚染があったことによると考察し、また腎病変は近位尿細管の刷子縁の消失から尿細管の拡張が発生すると述べた。

荒井¹⁾ (1974) は腎病変は遠位尿細管の拡張や、蛋白様物質の貯溜によって発生すると記載した。

実験方法

群馬大学角田広教授によって *P. implicatum* Bio-urge から分離、精製された淡黄色結晶状の citrinin 各 20.0 mg を 2.0 ml の olive oil に添加して、平均体重 124.5 g の Wistar 系ラット10匹に注射器を用いて胃内に注入した。同数の対照群ラットには、同量 olive oil だけを投与した。実験および対照群のラット各1匹ずつを所定の時日に殺処分して剖検を行ない、病理組織学的に検討し、初期病変に関しては電子顕微鏡的でも観察した。同様な実験は3回にわたり実験して確認した。

実験結果

A. 一般的所見

*¹ 埼玉医科大学第一病理学教室 (埼玉県入間郡毛呂山町)
1st Dept. of Pathology, Saitama Medical School
(Moroyama-cho, Iruma-gun, Saitama Prefecture)

体重は Fig. 1, のように初期、明らかな低下をきたしたが、48時間後から逐次上昇を始め、5~10日になって対照群とほぼ平行状態を保つような所見を示した。

剖検上、腎臓の退色および腫大は肉眼的に明白でなかったが、その重量は Fig. 2 のように24時間目から急速に増量し始め、3日目を頂点として、以後なだらかに減量し、7日目からは実験群のものは対照群のものよりやや減量を示した。これら腎包膜下における皮質内の空胞形成は全例共に認められなかった。心臓および肝臓は3日間の急性中毒期に軽微な腫脹をきたしたに過ぎなかった。

B. 組織学的所見

実験および対照群の全身主要臓器について組織学的に観察したが、病変は腎臓に主座していた。

1. 腎臓病変について

Citrinin を胃内に注入されたラットは2時間後にその糸球体が空胞状に膨化し始め、4時間目には明らかな糸球体の破壊を示す部位も認められた (Fig. 3)。近位尿細管は3~4時間目より、少量の蛋白様物質を含有し、微かに拡張し、上皮細胞は核の染色性が不良なものを混じ、細胞質内に大小種々の空胞が出現して粗造となっている。4時間目には皮質の内層部および髓質外層部における尿細管は一樣に多量の蛋白様物質で充満し、上皮細胞は核が淡染するものが多く、原形質は著明に混濁し、固有膜から剥離するものも少なく、細胞の境界が不明となっている。このような変化は6~12時間目において著明であった。

24時間目には Fig. 4 のように糸球体はやや富核となり、稀に僅かの白血球を混じ、内葉およびメサンギウム細胞の細胞質は粗造となって膨化し、近位尿細管の一部は軽度拡張し、上皮細胞はやや萎縮、管腔面の刷子縁は消失して内腔との境界が明確となり、所々で上皮細胞が管腔内に突出し、時にはこん棒状をなす。これらの変化は糸球体の周辺にのみ散見された。その他、皮質内層の尿細管上皮は著明な混濁をきたし、著

しく粗造であるが、上皮細胞の染色性はほぼ正常に近い像を示す。

2日目になると管腔が拡張し、上皮細胞が萎縮し、刷子縁を消失した尿細管は尿流により下流に拡大し、混濁腫脹した尿細管の好酸性がやや減退しており、その間に核が不整形をなし濃染した壊死上皮細胞が点在している。糸球体は充血し、縮小したものが多く出現し、Bowmanのうの壁がやや肥厚したものが多く出現している。

3日目になると切片は赤味を減じ、やや広範囲に亘って巣状に近位尿細管が淡染している。遠位尿細管ないしヘレン係蹄上皮細胞は著しく水腫状に腫大し、一部は剥離、脱落し、また核を消失している。髄質外帯の尿細管内に少数の脱落細胞を混じた蛋白円柱を含有しており、不整形を呈する核濃縮細胞も認められる。

5日目になると腎臓は巣状に淡染し、尿細管は所々連続的にやや拡張し、管腔内に少数の剥離細胞を含有する部もあるが、多くは中空で上皮細胞はやや扁平と

なり、固有層に結合組織増殖する部位も認められた。この尿細管の拡張は被膜直下の尿細管には認められなかった。髄質外帯において Fig. 5 のように少数の白血球を混じた脱落壊死細胞塊が停滞して尿流を閉鎖している。この閉鎖は一部、小腎杯付近に発生し、尿細管上皮の破壊・再生をきたし、また周囲間質に線維化をきたしている。

1週目には Fig. 6 のように、のう胞状に拡張した尿細管にさらに著明に広範囲に亘り、皮質は海绵状を呈している。この拡張は皮質および髄質外帯に多く発生し、稀に被膜下皮質表面に達する部位にも出現した。これら拡張した尿細管周囲の線維化はなお軽度である。10日目はほぼ7日目同様であるが、2週目になると尿細管の拡張は前記のものと同程度であるが、尿細管周囲間質の線維化は更に著明となり、Fig. 7 のように巣状の腎硬化症の像を呈している。また髄質において Fig. 8 のように尿細管の上皮が不規則に増生をきたし、周囲の結合組織が著明に増殖して小結節を形成し、付近

Fig. 1. Curves of increasing body weights tested and control rats

Fig. 2. Average weights of kidney per body of tested and control animals

Fig. 3. T-17: sacrificed after 4 hr of administration. Coarsening of glomerulus, vacuolation of the epithelial cells of proximal tubules. H. E. stain, $\times 400$

Fig. 4. T-1: sacrificed after 24 hr of administration. Degeneration of epithelial cells of proximal tubules, partly lost of brush border and atrophy of epithelial cells. H. E. stain, $\times 200$

Fig. 5. T-4: sacrificed after 5 d. of administration. Obstruction of distal tubules by the degenerated cells and marked fibrosis at the medullary substance. H. E. stain, $\times 200$

Fig. 6. T-3: sacrificed after 7 d. of administration. Dilatation of the proximal tubules with fibrosis of interstitium. Silver impregnation, $\times 200$

Fig. 7. T-7: sacrificed after 2 w. of administration. Dilatation of proximal tubules with colloidal casts containing few necrotic cells and marked fibrosis around them. H. E. stain, $\times 100$

Fig. 8. T-7: sacrificed at 2 w. after administration. Proliferation of epithelial cells of the distal tubules with marked fibrosis around them. H. E. stain, $\times 100$

Fig. 9. T-2: sacrificed at 2 d. after administration, electron micro-photo. Vacuoles formation in the cytoplasm of proximal tubules containing degenerated and destroyed organelles. $\times 5,200$

Fig. 10. T-5: died after 5 d. of the administration, electron micro-photo. Loss of the brush border with degeneration and destruction of organelles. $\times 3,300$

の尿管を圧迫している。3週・4週目においても2週同様の線維化が軽度に行進している状況を示した。

2. 腎臓以外の病変について

a. 肝臓所見

肝臓は全例について観察を行ったが、全例共に混濁腫脹が見られたほか、3日目の肝臓は中心性脂肪変性が認められたのみであった。

b. リンパ系臓器の所見

実験群の脾臓重量は対照群に比して2・3日目は著明に、7日目においても多少減少していた。組織学的には脾小節はやや粗造な像を伴っているが、腫大した胚中心を有している。また、胸腺の皮質は拡張して皮質細胞が髄質内に侵入増生している。

考 察

Citrinin を olive-oil に懸濁しラットの胃内に注入し、経時的に殺処分し組織学的に観察も行い、つぎの所見を得た。

1. Citrinin 注入後数時間で糸球体は空胞状に膨化し、部分的破壊をきたし、近位尿管上皮細胞内に空胞が出現し、核が染色不良となり、細胞質が粗造となる。引続き下流の主尿管に多量の蛋白様物質を含み上皮細胞は高度に変性するが、12時間以後やや軽減し、上皮の脱落をきたす。

2. 24時間目には近位尿管上皮細胞は萎縮し刷子縁を消失し、管腔内に突出し少数細胞は剝離、脱落をきたし、2・3日目には尿流に従って蔓延する。

3. 5日目には尿管内に脱落壊死細胞塊が形成され尿流が閉ざされ、周囲に線維化を伴い、皮質に巣状に尿管の著明な拡張をきたし、周囲に線維化がはじまる。

4. 7日目には皮質に間質の線維化を伴ったのう胞状の尿管拡張をきたすが、時間の経過と共に線維化が行進し、2週以後には巣状の腎硬化症ないし線維性小結節を形成する。この線維化結節は髄質外帯にも発生している。

5. 腎実質の障害は3日迄が最も著明で、5日目からはその後遺病変により排尿障害をきたし、7日目より線維化が著明となり4週以後にも残存する。

6. 肝臓には4週まで、混濁腫脹以外特殊の病変が認められなかったが、リンパ系組織には増生が認められた。

以上の所見から2, 3の考察を巡らす。

a. Citrinin の毒作用について

今回の実験成績を模式的に表示するとつぎのようである。近位尿管上皮細胞の萎縮と刷子縁の消失の初

期変化はすでに Krogh らの指摘したところであるが、我々もその形態は確実に観察することが出来た。しかし今回の実験においては糸球体の空胞状膨化から起こり、近位尿管上皮の変化は空胞形成を初期変化とすることを確認した。この事実は別稿で報告するが、その電顕写真は Fig. 9 および Fig. 10 に示すように先ずゴルジ装置や小胞体等の小器官が変性に陥り、これを中心に空胞が形成され、その後刷子縁の消失をきたしている。その後、直尿管ないしヘレン係蹄に糸球体および近位尿管からの剝離・脱落細胞が貯留して始めて皮質尿管のう胞様拡張をきたし、上皮は消失して尿管周囲間質に著明な線維化が生じ、さらに進行して線維性小結節を形成し周囲の尿管を圧迫して尿管の拡張を促進すると考えられる。また Krogh らは近位尿管上皮細胞に変形（化生）が発生すると述べているが、今回の実験では Fig. 8 のように局所性増生が見られたに過ぎなかった。

b. 自然界における腎毒性かび中毒および発がんについて

既に文献に示されたように肉豚や馬匹に本症が発生して、多渴・ひん尿を示したという。Citrinin の場合、伊藤⁹⁾によれば単独では発がんが証明されなかったと報告されているが、前記のように局所性増生が認められるため、肉豚に多発する胎児性腎臓腫にはこのかび毒の関与が考えられるので、妊娠動物を用いて実験を再開する必要を痛感している。

稿を終るにあたり、謹みて埼玉医科大学第一病理学教室 吉井隆博教授に敬意を表し、種々御援助を載いた教室員諸彦に深く感謝します。本研究の一部は厚生省ガン研究助成金の援助を受けた、併せて感謝する。

文 献

- 1) 荒井昌之, 杉原誠一, 牧原幸男, 平尾和也, 伊東信行: 日病理誌, **63**, 188 (1974).
- 2) Friis, P., Hassellager, E., Krogh, P.: Acta Path. Microbiol. Scand., **77**, 559 (1969).
- 3) 伊東信行: 私信 (1975).
- 4) Krogh, P., Hassellager, E., Friis, P.: Acta Path. Microbiol. Scand., **78**, 401 (1970).
- 5) Krogh, P., Hald, Benedicte, Pedersen, E. Jones: Acta Path. Microbiol. Scand., **81**, 689 (1973).
- 6) Larsen, S.: Manedsskr. Dyr., **40**, 259 (1928) cited from Krough, P. et al.: Acta Path. Microbiol. Scand., **78**, 401 (1970).
- 7) 永井諄爾, 林 正彦, 溝部カズ子: 福岡医学, **48**, 311 (1957).
- 8) Purchase, I. F. H., Theron, J. J.: Food Cosmet. Toxicol., **6**, 479 (1968).
- 9) 酒井文徳: 日薬理誌, **51**, 431 (1955).

Citrinin と Streptozotocin によるラット腎発癌に関する病理組織学的研究

篠原 良孝・平尾 和也・福島 昭治・中西 敬介・伊東 信行*1

Y. SHINOHARA, K. HIRAO, S. FUKUSHIMA, K. NAKANISHI and N. ITO*1: Histopathological studies on the kidney tumorigenesis in rats by citrinin and streptozotocin

はじめに

近年我々の生活環境に密接したカビ毒の発癌性についての研究が進められているが、今回我々は腎に影響を及ぼすとされている *Penicillium citrinum* Thom より得た citrinin (Cit) と *Streptomyces achromogans* より得た streptozotocin (Stz) を、腎障害状態を化学物質により起させたラットに投与、これらカビ毒の腎に対する発癌性を検索した。

実験材料と方法

動物：S-D系雄ラット、体重170g前後使用

化学物質：N-nitrosodimethylamine (DMN), N-(3,5-dichlorophenyl) succinimide (NDPS), streptozotocin, citrinin (群馬大 角田博士より提供頂く), nicotinamide (NCA)

投与方法：上記化学物質をそれぞれの濃度にオリエンタルM粉末飼料に混じ自由な経口摂取させた。ただし、Stz は 65 mg/kg を静脈注、NCA は 350 mg/kg を腹腔内注した。

実験計画：全動物を下記の14の実験群に分け飼育観察した。なお、() 内の数字は投与期間の週を表す。

第I群：0.05% Cit (48), 第II群：0.02% Cit (48), 第III群：0.05% DMN (2) 基礎食(2)→0.05% Cit (20), 第IV群：0.05% DMN (2)→基礎食 (2)→0.02% Cit (20), 第V群：0.05% DMN(2)→基礎食 (22), 第VI群：0.5% NDPS (8)→0.02% Cit (20), 第VII群：0.5% NDPS (8)→0.02% Cit (40), 第VIII群：0.5% NDPS (8)→基礎食 (20), 第IX群：Stz i.v.→基礎食(40), 第X群：Stz i.v.→基礎食 (2)→0.5% NDPS (8)→基礎食 (30), 第XI群：0.5% NDPS (8)→基礎食 (2)→Stz i.v.→基礎食 (30), 第XII群：Stz i.v.+NCA i.p.→基礎食 (40), 第XIII群：NCA i.p.→基礎食 (40), 第XIV群：基礎食 (40)。以上、各群共週1回体重測定し、実験終了時エーテルにて屠殺後、腎を中心に病理組織学的に検索した。

結 果

体重は、Cit 投与群において抑制傾向が軽度のみられ、DMN 併用群ではさらに強くなり、反対に Stz 投与群では増加の傾向にあった。肝、腎重量では特に著明な変化は見られなかった。次に、組織学的に腎腫瘍を、腎細胞腫、腎芽腫、血管内皮腫に分け検索したところ、Cit 単独ではいずれの濃度でも腫瘍発生を示さ

Fig. 1. Adenoma in the kidney of a rat treated with NDPS and then treated with citrinin for 40 weeks. $\times 200$ H-E

Fig. 2. Adenoma in the kidney of a rat treated with Stz and NDPS. $\times 100$ H-E

*1 名古屋市立大学医学部第1病理学教室 (名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄1)

1st Department of Pathology, Nagoya City University Medical School (1-Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467, Japan)

ず、DMN 単独では腎細胞腫2/14(14%)、腎芽腫8/14(57.1%)で、これに Cit が加わるとそれぞれ 13/15(86.7%)~18/19(94.7%) 及び 9/15(60.0%)~14/19(73.7%) と腎腫瘍発生率が増加し、しかも腎細胞腫の発生が高率となった。NDPS と Cit (20週) で腎細胞腫が 4/18(22.2%)、Cit (40週) で 8/16(50.0%) と高率に発生した (Fig. 1)。Stz 単独及び NCA との併用で、腎細胞腫が1/9(11.0%)及び2/17(11.8%)、Stz 後 NDPS 併用群で腎細胞腫 4/11(36.4%) (Fig. 2)。

腎芽腫3/11(27.3%) 発生したが、NDPS 後 Stz 投与した群は早期に急性中毒死した。

ま と め

病的状態の腎に対し Cit は発腫瘍性を示し、DMN 腎癌の組織学的変化と、腫瘍発生率を増大した。同様の変化が Stz においても見られた。すなわち標的臓器の発癌はその病的状態によって極めて強く影響を受けることが示唆された。