

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

奈良県立医科大学公衆衛生学教室

陰 地 義 樹

STUDIES ON METABOLISM AND TOXICITIES OF NIVALENOL (MYCOTOXIN) II. ABSORPTION, METABOLISM, EXCRETION, AND TOXICITIES OF NIVALENOL IN RATS

YOSHIKI ONJI

Department of Public Health, Nara Medical University

Received July 27, 1990

Summary: Absorption, distribution, and excretion of nivalenol and its major metabolite, deepoxynivalenol, were investigated in male rats after a single intraperitoneal (1mg/Kg) or oral (5mg/Kg) administration. After intraperitoneal administration, nivalenol and deepoxynivalenol excreted by the rats in urine were 48.3% and 3.8% of the total dose given respectively, and those excreted in feces were 10.0% and 25.5% of the dose, respectively, within 72 hr. On the contrary, in oral administration, nivalenol and deepoxynivalenol excreted in urine were 9.9% and 5.6% of the dose, respectively, and those excreted in feces were 5.4% and 18.7% of the dose, respectively, in 72 hr. Deepoxynivalenol was excreted in feces to a higher extent than in urine and later than nivalenol.

The levels of nivalenol detected in serum, liver and kidney were much lower than in urine or feces even 1 hr after oral dosing and were rapidly lowered. Deepoxynivalenol was not detected in serum, liver, or kidney at any time within 24 hr. The major metabolic pathways of nivalenol in rats are considered to be the deepoxidation at 12,13-epoxide ring in the gastrointestinal tract.

The effect of feeding diets containing 0, 10, and 50 $\mu\text{g/g}$ of nivalenol for 8 weeks on the growth rate, hematology, and histopathology were also examined. In 50 $\mu\text{g/g}$ nivalenol dosing group, body-weight gain was significantly reduced and weak erythrocytopenia was observed. Histopathologically, mucosal necrosis and the disruption of gut epithelium, and an increase of erythroid series in bone marrow was observed. However, in 10 $\mu\text{g/g}$ nivalenol dosing group, no significant change was observed in comparison with the control group.

Index Terms

trichothecene mycotoxin, nivalenol, absorption, metabolism, excretion, toxicity

緒 言

赤カビ、フザリウム属菌が産生するトリコテセン系マイコトキシンは炎症、嘔吐、下痢、造血機能障害をもたらすと報告されている¹⁾²⁾。その代謝、排泄、毒性については、T-2トキシシン^{3)~8)}、デオキシニバレノール^{9)~11)}、フザレノン-X¹²⁾¹³⁾に関して多くの報告があるが、ニバレノールについてはほとんど明らかにされていない。分子骨格が共通であるにもかかわらずこれらのトリコテセン系マイコトキシンの毒性は異なり、例えば、マウスの腹腔内投与でのLD₅₀値はT-2トキシシン5.2 mg/kg、デオキシニバレノール70.0 mg/kg¹⁾、ニバレノール7.4 mg/kg¹⁴⁾と報告されている。これは個々のトリコテセン系マイコトキシンの側鎖の化学構造によって生体成分との親和性、吸収率、代謝様式、生体内での分布が異なることと密接な関係があると考えられる。

著者は、第一報でニバレノールを反復経口投与したラットの糞中に多量に検出された新代謝物が脱エポキシニバレノールであることを報告した¹⁵⁾。

そこで、本研究ではラットにニバレノールを腹腔内および経口的に単回投与した後、ニバレノールとその脱エポキシ代謝物の尿および糞への排泄量と血中および組織分布量を測定することにより、ニバレノールの化学構造と吸収、代謝の関係を考察した。また、ニバレノールを添加した餌でラットを8週間飼育し、ラットの体重変化、8週後の末梢血球像および各臓器の病理組織学的観察をおこない、ニバレノールの長期投与の成長におよぼす影響について検討した。

材料および方法

1. 試薬および投与ニバレノールの調製

有機溶媒とトリメチルシリル (TMS) 化剤は第一報¹⁵⁾と同じ試薬を使用した。ニバレノールは第一報¹⁵⁾で述べた方法で単離精製した。純度は99.5%以上でありフザレノン-Xおよび脱エポキシニバレノールの混入はなかった。ニバレノールを超音波振動下にて(シャープ製超音波洗浄器, 28KHz, 150W), 生理的食塩水で500 μ g/mlに溶解し、さらに生理的食塩水で希釈して100 μ g/mlに調製した。また、長期投与実験にはニバレノールをメノウ乳鉢で粉碎し、少量の標準粉末飼料MF(オリエンタル酵母製)と均一になるように混合して、最終的に10 μ g/gと50 μ g/gのニバレノール添加飼料を調製した。

2. 実験動物およびニバレノール投与方法

(1)代謝実験：腹腔内投与および経口投与における代謝実験には8週齢のWistar系雄性ラット(体重210 \pm 20g)を使用し、1匹ずつ代謝ケージに入れ、室温23 \pm 2 $^{\circ}$ C, 12時間サイクル照明下で飼育し、尿と糞を分別採取した。粉末標準飼料MF中にはニバレノールおよびその他のマイコトキシンが混入していないことを確認後使用した。ニバレノールの投与は次のようにおこなった。

腹腔内投与：5匹のラットに、100 μ g/mlの濃度のニバレノール-生理食塩水を1mg/kg体重で腹腔内に1回投与した。実験中は、標準粉末飼料MF, 水道水を自由に摂取させて3日間飼育した。

経口投与：5匹のラットに、500 μ g/mlのニバレノール-生理食塩水を5mg/kg体重でゾンデを使用して強制的に単回経口投与した。また、血中と臓器中ニバレノールおよびその代謝物を測定するため、1群3匹で7群のラットに同量のニバレノールを単回経口投与した。実験中は、標準粉末飼料MF, 水道水を自由に摂取させ3日間飼育した。

(2)毒性試験：4週齢のWistar系雄性ラット(体重55~79g)3~5匹ずつを金網ケージ(縦350 \times 横200 \times 高さ180mm)に入れ、1群5~8匹を、ニバレノール添加飼料(0, 10, 50 μ g/g)と水道水を自由に摂取させ、8~10週間飼育した。

3. 尿、糞、血清、臓器中のニバレノールおよびその代謝物濃度の測定

腹腔内および経口投与ラットの尿、糞はニバレノール投与後、3, 6, 9, 24, 48, 72時間経過時に分別採取し、直ちに-20 $^{\circ}$ Cで凍結保存した。血液および臓器はニバレノールを投与してから、1, 2, 3, 6, 10, 15, 24, 72時間後にエーテル麻酔下に、腹部大動脈から採血し、直ちに、生理食塩水で還流後肝臓と腎臓を摘出した。尿、糞、血液、臓器中のニバレノールおよびその代謝物は以下の方法で抽出し、その抽出液を40 $^{\circ}$ C窒素気流下で完全に濃縮乾固後、第一報¹⁵⁾に述べた方法で、トリメチルシリル(TMS)誘導体とし、ガスクロマトグラフィーで定量した。

(1)尿：尿0.2mlにメタノール0.8mlを加えて、2500rpm, 15分間遠心後、上清0.5mlをTMS化した。

(2)糞：糞2gをメタノール-水(1:1)10mlで2回抽出し、抽出液を2500rpm, 15分間遠心後、上清1mlをTMS化した。

(3)血清：採血後直ちに血清を分離し、凍結乾燥して、その50 mgに蒸留水1 ml加えて、超音波抽出した後、C₈カートリッジカラム (Analytichem International 製 BOND ELUT®, 500mg) に吸着させ、水3 mlでカラムを洗浄、メタノール1.5 mlでニバレノール画分を溶出し、これをTMS化した。

(4)肝臓および腎臓：臓器重量の4倍量の蒸留水を加えてホモジナイズし、5℃にて5000rpm 10分間遠心、上清を90℃、3分間加熱した後急冷し、5℃にて12000rpm 15分間遠心し、除蛋白した。この上清2 mlを、C₈カートリッジカラムで精製してTMS化した。

4. ニバレノールおよび脱エポキシ代謝物のグルクロン酸抱合体の検索

Corley⁹⁾等の方法に準じ、 β -glucuronidaseによる抱合開裂反応前後の尿および糞中のニバレノール量をガスクロマトグラフィーによって測定し、グルクロン酸抱合体の検索をおこなった。

5. ニバレノールの *in vitro* での小腸粘膜透過性と蛋白結合性

4週齢ラットの反転小腸(空腸上部、長さ5 cm)を用いて、粘膜側に240 μ g/mlのニバレノール-Ringer phosphate buffer saline (PBS) 11mlを、漿膜側にRinger PBS 0.6mlを満らし、酸素を供給しながら、37℃、90分間インキュベートした。その後、粘膜側と漿膜側液中のニバレノール濃度をHPLCで測定しニバレノールの小腸粘膜透過性を調べた。ニバレノールの蛋白結合性については、ラット血清0.5 mlおよび43 mg/ml牛血清アルブミン-0.01M PBS (Sigma Chemical Co., Fraction V) 1mlを37℃で20分間プレインキュベーション後、ニバレノールを58 μ g添加し37℃で10分間インキュベートし、ウルトラフリーC3GC (Millipore Co.製、分画10000) を使用して遠心限外ろ過法で蛋白非結合ニバレノールと結合ニバレノールを分離し、それぞれをHPLCで測定した。

6. 毒性試験

(1)飼料の摂取量および体重測定：飼料の摂取量は飼育ケージを単位として1-2日毎に計量し、ラットの体重は3-4日毎に測定した。

(2)血液学的検査：8週間経口投与終了後、エーテル麻酔下に腹部大動脈からEDTA採血してCoulter Counter S型 (Coulter Co.製) を用いて赤血球数(RBC)、ヘモグロビン量(Hb)、ヘマトクリット値(Hct)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCC)および白血球数(WBC)を測定した。

(3)組織病理学的検査：採血後、摘出した臓器は、直ちに重量を測定し、10%ホルマリン-リン酸緩衝液中で48時間浸透固定後、パラフィン包埋し、2 μ m厚の切片を製作した。これにヘマトキシリン-エオジン染色を施し、光顕的に観察した。

7. 統計処理

ラットの体重、臓器重量および血液学的検査の成績はF検定で等分散の検定をおこない、その結果、等分散の場合はStudentのt検定により、等分散でない場合はWelchの検定により、対照群とニバレノール投与群との比較検定をおこなった¹⁰⁾。

結 果

1. ニバレノールの尿、糞中への排泄と血清、肝臓、腎臓中濃度

(1)腹腔内投与：腹腔内にニバレノールを単回投与したときの、尿、糞中ニバレノール排泄量の経時変化をFig. 1に示した。ニバレノールの尿中への排泄は投与72時間までに投与量の48.3%が尿中に排泄されたが、糞中への排泄は少なく投与72時間までに投与量の10.0%が排泄された(Table 1)。

(2)経口投与：ニバレノールの経口投与後の尿、糞中への排泄量をFig. 2に示した。尿中へのニバレノールの排泄は少なく、72時間までに投与量の9.9%が排泄された。糞中へのニバレノールの排泄も少なく、6時間後からみられ、24時間後まで続いたが、72時間までの排泄量は投与量の5.4%であった(Table 2)。経口的に単回投与した場合の血清、肝臓、腎臓中のニバレノール量をFig. 3に示した。

血清、肝臓中のニバレノール濃度は、投与1時間後に、それぞれ67ng/ml、187ng/gと非常に低く、かつ速や

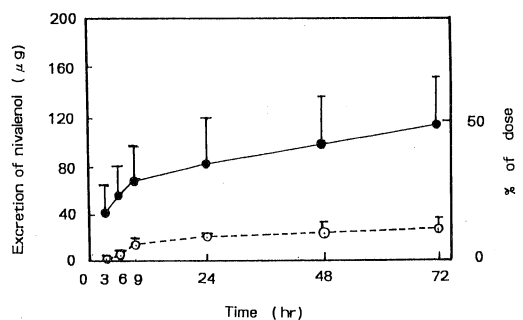


Fig. 1. Cumulative excretion of nivalenol into urine and feces after intraperitoneal administration (1 mg/Kg). — urine, feces.

Table 1. Excretion of nivalenol and deepoxynivalenol in urine and feces within 72 hours after intraperitoneal administration^a

Excreta	Recovery, μg (% of dose)		
	Nivalenol	Deepoxynivalenol	Total
Urine	110.3 \pm 45.6 (48.3)	8.6 \pm 6.1 (3.8)	118.9 \pm 48.8 (52.1)
Feces	22.8 \pm 8.9 (10.0)	57.8 \pm 38.4 (25.5)	80.6 \pm 42.3 (35.5)
Total	133.1 \pm 41.7 (58.3)	66.4 \pm 36.2 (29.3)	199.5 \pm 11.4 (87.6)

Values are mean \pm SD of five rats (n=5).

^a Rats were administered at single dose of 1 mg/Kg.

Table 2. Excretion of nivalenol and deepoxynivalenol in urine and feces within 72 hours after oral administration^a

Excreta	Recovery, μg (% of dose)		
	Nivalenol	Deepoxynivalenol	Total
Urine	96.5 \pm 30.0 (9.9)	50.4 \pm 21.3 (5.6)	145.9 \pm 29.5 (15.5)
Feces	52.0 \pm 40.0 (5.4)	166.5 \pm 36.5 (18.7)	218.5 \pm 28.2 (24.1)
Total	147.5 \pm 48.9 (15.3)	216.9 \pm 55.3 (24.3)	364.4 \pm 47.3 (39.6)

Values are mean \pm SD of five rats (n=5).

^a Rats were administered at single dose of 5 mg/Kg.

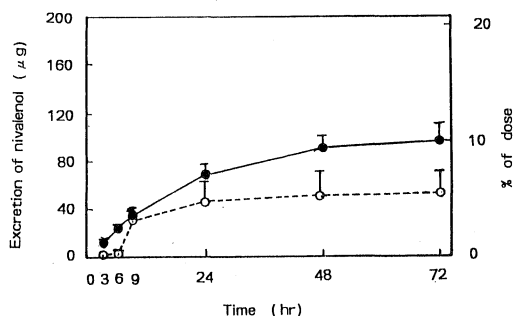


Fig. 2. Cumulative excretion of nivalenol into urine and feces after oral administration (5 mg/Kg).
— urine, - - - feces.

かに減少した。腎臓では1時間後89ng/gであり、3時間後に144ng/gに達し、以後速やかに減少した。

2. 脱エポキシニバレノールの尿、糞中への排泄

前記と同一実験におけるニバレノールの主代謝物である脱エポキシニバレノールの尿、糞への排泄量を測定した。

(1)腹腔内投与：腹腔内単回投与の場合に、尿、糞中に排泄された脱エポキシニバレノール量を Fig. 4 に示した。尿中では、投与9時間後から脱エポキシニバレノールの排泄が認められたが、投与後72時間までの排泄量は

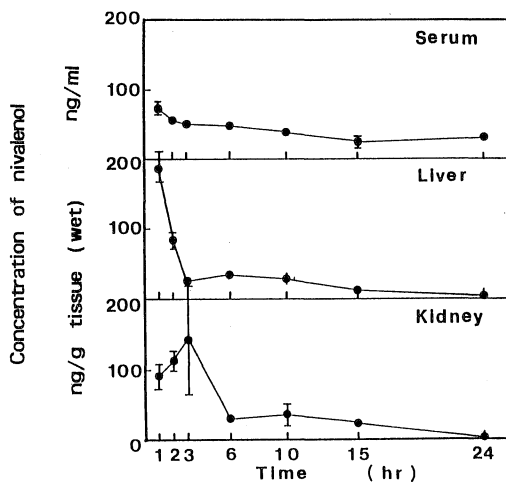


Fig. 3. Tissue level of nivalenol after single oral administration (5 mg/Kg).

投与ニバレノール量の3.8%とわずかであった。糞中では投与6時間後から排泄され、48時間までに多量の脱エポキシニバレノールが排泄され、72時間までに投与ニバレノール量の25.5%が排泄された (Table 1)。

(2)経口投与：経口的に単回投与した場合、尿、糞中に排泄された脱エポキシニバレノール量の経時変化を Fig. 5 に示した。尿中では、脱エポキシニバレノールは

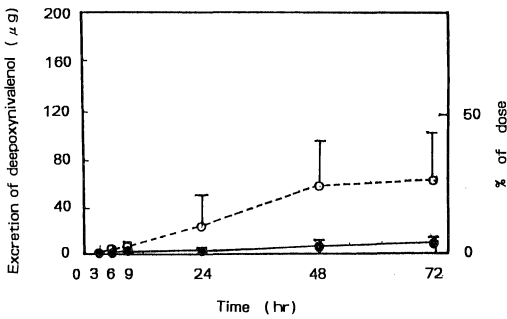


Fig. 4. Cumulative excretion of deepoxynivalenol into urine and feces after single intraperitoneal administration (1 mg/Kg).
— urine, ---- feces.

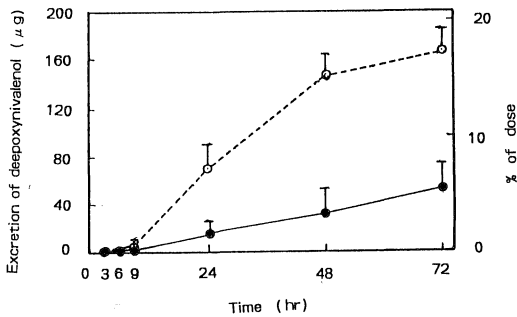


Fig. 5. Cumulative excretion of deepoxynivalenol into urine and feces after single oral administration (5 mg/Kg).
— urine, ---- feces.

投与9時間後から検出されるようになり、72時間以降も排泄が続いた。糞中では、6時間後から脱エポキシニバレノールが検出され、48時間後が濃度がピークとなり72時間以後にも少量ながら排泄が続いた。72時間までに尿、糞中に排泄された脱エポキシニバレノールは、それぞれ、投与ニバレノール量の5.6%および18.7%であった (Table 2)。72時間後の血清、肝臓、腎臓中では脱エポキシニバレノールは検出されなかった。

3. グルクロン酸抱合体の検索

尿、糞中にはニバレノールのグルクロン酸抱合体は認められなかった。

4. ニバレノールの *in vitro* での小腸粘膜透過性と蛋白結合性

90分間で粘膜側から漿膜側に移行したニバレノール量は3.6%とわずかであった。また、ラット血清および牛血清アルブミンと結合したニバレノールは少なく、77.9%および87.6%が遊離型であった。

5. 8週連続経口投与におけるニバレノールのラットに対する毒性

(1)餌摂取量および体重増加：ニバレノール50 μ g/g添加飼料群の餌摂取量は対照群に比べて13%の抑制が見られた (Table 3)、体重増加も対照群とくらべて有意に抑制されて、投与開始後8週では、対照群の82%の体重であった (Fig. 6)。ニバレノールの10 μ g/g添加飼料群では餌摂取量の減少はみられず、体重増加の有意な抑制もみられなかった (Fig. 6, Table 3)。

(2)血液学的検査：ニバレノール50 μ g/g添加飼料群では対照群とくらべてRBC, Hb, Hctの有意味な減少がみられたが、MCV, MCH, MCC, WBCについては有意な差はみられなかった。ニバレノール10 μ g/g添加飼料群で

Table 3. Body weights, feed consumption, and relative tissue weights of nivalenol treated rats fed nivalenol for 8 weeks

	Nivalenol (μ g/g)		
	0	10	50
Initial body weight (g)	73.1 \pm 2.8	63.8 \pm 9.2	70.1 \pm 15.6
Body weight at 8 weeks (g)	415.8 \pm 34.2	383.6 \pm 37.6	341.0 \pm 26.5**
Feed consumption (g/day/rat)	17.8	17.1	15.4
Relative organ weight ^a (mg/g body weight)			
Liver	40.1 \pm 2.2	36.4 \pm 1.0*	39.7 \pm 1.8
Kidney	7.3 \pm 0.8	6.3 \pm 0.4*	7.4 \pm 0.3
Thymus	1.3 \pm 0.1	1.3 \pm 0.2	1.3 \pm 0.2
Spleen	2.2 \pm 0.4	2.0 \pm 0.1	2.2 \pm 0.4

Values are mean \pm SD.

^a Organ weight was measured after 8-10 weeks feeding.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ statistically significant differences from control.

は、RBC, Hb, Hct, MCV, MCH, MCC, WBCのいずれも対照群との有意な差はみられなかった (Table 4).

(3)病理組織学的検索：連続経口投与8週後のラットの組織の光顕的観察の結果、ニバレノール50 $\mu\text{g/g}$ 添加飼料群では全例に小腸上皮の壊死と脱落が観察され

(Plate 1-b)、骨髄の赤芽球系細胞のわずかな増加がみられたが有意なものではなかった。しかし、胃、肝、腎、脾、胸腺のいずれにも対照群と対比して組織形態学的な変化は認め得なかった。ニバレノール10 $\mu\text{g/g}$ 添加飼料群の全例では小腸、胃、骨髄、肝、腎、脾、胸腺のいずれの組織においても組織形態学の変化は認められなかった。

考 察

ニバレノールの吸収、組織分布、代謝、排泄等の動物体内での動態に関する研究はこれまでほとんどなされておらず、ニバレノールのモノアセチル前駆体であるフザレノン-Xを皮下投与したマウスでの体内分布と排泄の研究¹²⁾があるのみである。また、ニバレノールの毒性についてもマウスでのLD₅₀等の急性毒性¹⁴⁾、粗製ニバレノールによる成長および造血組織に対する亜急性¹⁴⁾¹⁷⁾・慢性毒性¹⁷⁾と、ラットでのLD₅₀等の急性毒性と低投与量での成長および病理組織学的所見に対する急性毒性の報告¹⁸⁾があるのみである。したがって、動物体内でのニバレノールの動態と毒性との関係についての知見は皆無に等し

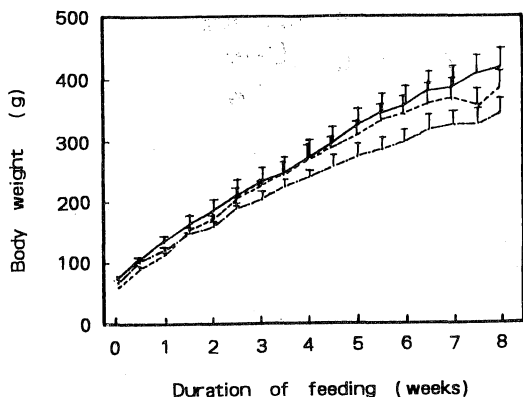


Fig. 6. Cumulative body weight gains in Wistar rats fed 0 (—), 10 (.....), and 50 (-.-.-) $\mu\text{g/g}$ of nivalenol for 8 weeks.

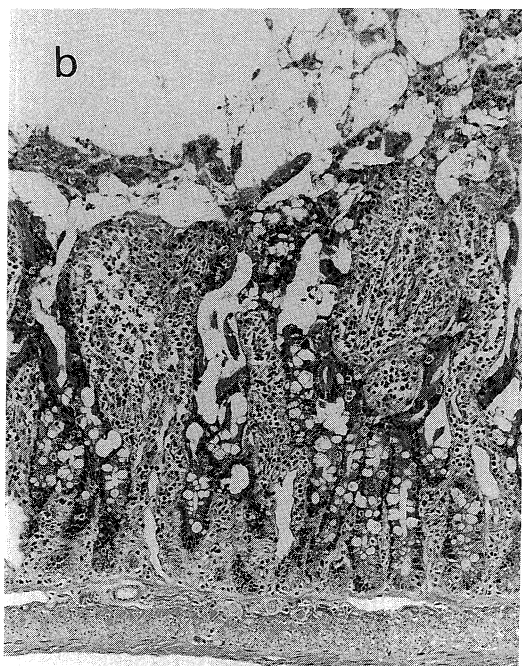
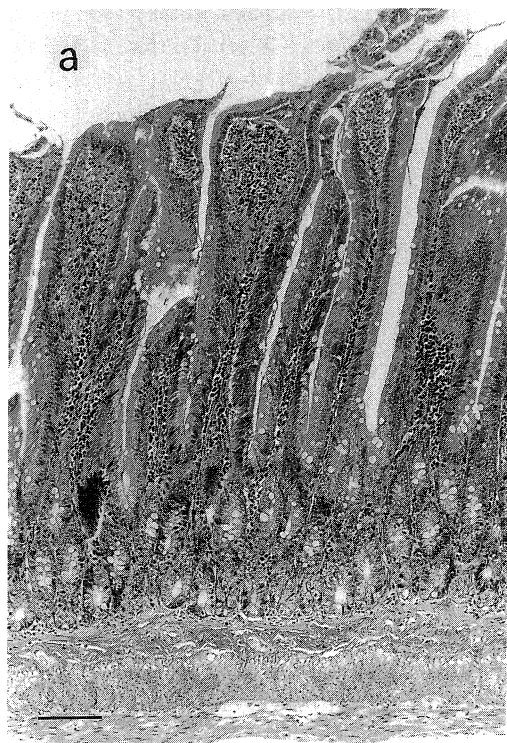


Plate 1. Histopathological picture of small intestine from (a) control and (b) a rat fed diets containing 50 $\mu\text{g/g}$ of nivalenol for 8 weeks (H. E.). Bars represent 10 μm .

Table 4. Hematological changes of Wistar rats fed nivalenol for 8-10 weeks^a

Nivalenol ($\mu\text{g/g}$)	N ^b	WBC ($10^3/\text{mm}^3$)	RBC ($10^6/\text{mm}^3$)	Hb (g/dl)	Hct (%)	MCV (μm^3)	MCH (pg)	MCC (%)
0	6	72 \pm 16	843 \pm 25	14.8 \pm 0.7	47.1 \pm 0.7	56 \pm 2	17.6 \pm 1.0	31.5 \pm 1.4
10	5	76 \pm 12	820 \pm 25	14.6 \pm 0.2	45.8 \pm 1.6	56 \pm 0	17.8 \pm 0.4	31.8 \pm 0.8
50	6	67 \pm 14	797 \pm 33*	14.0 \pm 0.3**	44.6 \pm 1.5**	56 \pm 1	17.6 \pm 0.6	31.4 \pm 1.2

WBC, white blood cells; RBC, red blood cells; Hb, hemoglobin; Hct, hematocrit; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCC, mean corpuscular hemoglobin concentration.

Values are means \pm SD.

^a Rats were fed for 8, 8.5, 9.5, 10 weeks.

^b N: number of animals

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ statistically significant differences from control.

いことから、著者は精製したニバレノールを用いてその体内動態と毒性について検討した。

ニバレノールをラットに経口投与すると、血液、肝臓中のニバレノール濃度は Fig. 3 に示したように 1 時間以降すみやかな減少を示し、尿中のニバレノールは投与 3 時間後から検出された (Fig. 2)。主代謝物である脱エポキシニバレノールの排泄は遅く、投与 9 時間後から検出され、糞中には尿中の 3 倍以上多く排泄された (Fig. 5)。このことは、経口投与されたニバレノールの一部が上部消化管から吸収され、肝臓で代謝されずに急速に体外に排泄されることを示唆している。ニバレノールの消化管からの吸収を検討するためにラットの反転腸管を用いてニバレノールの小腸粘膜透過性を検討した結果、小腸粘膜透過性がきわめて低いことが認められた。このことから、経口投与されたニバレノールの大部分は腸管内で脱エポキシ化され糞中に排泄されるものと考えられる。

腹腔内投与の場合、ニバレノールが尿中出现するのは速く、24 時間で投与量の 34.2% が未変化のまま尿中に排泄された。糞中のニバレノールはごくわずかであり、脱エポキシニバレノールの方が糞中に多く検出された。いずれの投与方法においてもニバレノールは糞中よりも尿中に多く、脱エポキシニバレノールは逆に尿中よりも糞中に多いことが認められた。また、腹腔内投与の場合でも糞中にニバレノールと脱エポキシニバレノールが存在することから、吸収されたニバレノールの排泄経路としては腎臓経由の他に、胆汁経由による排泄も示唆された。

著者は第一報¹⁵⁾でニバレノールが他のトリコテセン系マイコトキシンと同様に生体内で脱エポキシ化されることを初めて明らかにした。T-2 トキシン¹⁹⁾、ジアセトキシシルペノール²⁰⁾では側鎖の開裂様式が多様性から複数の脱エポキシ代謝物が確認されているのに対して、ニバ

レノールは開裂可能な側鎖を持たないため単一の脱エポキシ代謝物、すなわち、脱エポキシニバレノールしか存在しないと考えられる。今回の成績からも、ニバレノールを腹腔内および経口的に投与したラットの糞、尿中からニバレノールと脱エポキシニバレノールだけが検出され、とくに腹腔内投与の場合にはニバレノールと脱エポキシニバレノールを合わせて投与ニバレノール量の 87.6% が排泄されたことから脱エポキシニバレノールが主要な代謝物であると考えられる。単回経口投与の場合には、投与 72 時間までのラット糞、尿中からのニバレノールと脱エポキシニバレノールを合わせた排泄率が投与量の 39.6% に過ぎないことは、脱エポキシニバレノール以外に他の未確認代謝物の存在も考えられる。

T-2 トキシンをラットに経静脈的に投与すると投与量の約 40% がグルクロン酸抱合体として糞および尿中に排泄されることが報告されている⁵⁾。また、フザレン-X をマウスに皮下注射した場合にも、グルクロン酸抱合体と考えられる極性代謝物 (TLC 上での Rf=0、ただし、フザレン-X は 0.8、ニバレノールは 0.47) が尿中に存在することが報告されている¹²⁾。著者は Coley⁵⁾らの方法に準じてグルクロン酸抱合体の検索をおこなったが、ニバレノールおよび脱エポキシニバレノールのグルクロン酸抱合体はラットの尿、糞中には検出できなかった。ニバレノールがグルクロン酸抱合されないとすれば、それは、ニバレノールがトリコテセン系マイコトキシンのなかでも最も親水性が大きい ($\log P_{ow} = -0.89$) ことに起因すると考えられる。

第一報¹⁵⁾でのニバレノールの反復経口投与実験では、糞および尿中に投与量の 80% および 1% が脱エポキシ化され、7% および 1% が未変化のまま排泄された。しかし、単回経口投与では、脱エポキシニバレノールの生成量と糞、尿中の排泄量比が反復経口投与の場合と異なる結果を得た。今回行ったニバレノール添加飼料を用い

た連続投与実験においては小腸粘膜の障害や体重増加の抑制が観察されており、ニバレノールの脱エポキシ化反応は肝臓ではなく主に腸内細菌叢が関与することを示唆した Sakamoto²⁰⁾らの報告を支持する結果を得た。すなわち、ニバレノールを反復経口投与すると小腸粘膜が障害を受け、ニバレノールの消化管からの吸収が低下し、大部分のニバレノールは腸内細菌叢により、脱エポキシニバレノールに変換されると考えられる。これに加え、吸収されたニバレノールも再び胆汁とともに胆管経路で排泄され、腸内細菌叢の作用をうけることになる。このように考えると、単回投与実験より反復投与実験の場合のほうが脱エポキシニバレノールの生成量が多いことが説明できる。ところで、トリコテセン系マイコトキシンは脱エポキシ化によって無毒化されるとの報告もあり¹⁹⁾、腸内細菌叢による代謝は毒性の発現と解毒の機構解明の観点から興味深い。

近年、薬物の代謝の研究をする際、放射性同位元素による標識法が広く用いられているが、ニバレノールは化学的合成がなされるには至っていない。また、ニバレノール産生菌の培養物から放射性元素で標識したニバレノールを得ることも成功していない。したがって、著者はニバレノールとその代謝物の濃度測定をガスクロマトグラフィーを中心とした分離分析法で定量したので他の微量の代謝物を検出することはできなかった。ニバレノール以外のトリコテセン系マイコトキシンの代謝物に関する多くの研究^{9)~19)~23)}によると、生体内ではトリコテセン骨格の開裂は起こらず、側鎖の開裂と水酸化、脱エポキシ化、そしてグルクロン酸抱合だけが確認されている。本研究では、ニバレノールと脱エポキシニバレノールの定量およびそれらのグルクロン酸抱合の有無についての検討を行ったものであり、その他の代謝物の検索と投与ニバレノールの体内分布については放射性同位元素で標識したニバレノールの合成の成功後に検討したい。

ニバレノールの LD₅₀値は、マウスまたはラットを用いた実験によりすでに明らかである¹⁴⁾¹⁷⁾²⁵⁾。Ryu ら¹⁷⁾は粗ニバレノールの 24 日間投与では RBC と WBC の減少および骨髓細胞のポリゾーム崩壊を、6、12 ヶ月間の長期投与では WBC の減少と体重増加の抑制が認められたと報告している¹⁴⁾。Kawasaki¹⁹⁾らは 30 日間の投与実験では体重増加の抑制はみられなかったとしている。今回の実験結果では、体重増加の抑制、RBC、Hb、Hct の減少、小腸腸管上皮の障害が認められた。体重増加の抑制⁸⁾¹⁰⁾や下痢等をともなう小腸粘膜の炎症¹¹⁾¹³⁾²⁴⁾²⁵⁾はニバレノールのほかにも T-2 トキシン、デオキシニバレノール、フザレンソ-X によってひきおこされることが報告

されている。また、末梢血の RBC や WBC の増減はマイコトキシンの投与回数と時間に依存するものと考えられている⁸⁾¹⁰⁾¹⁴⁾¹⁷⁾。すなわち、RBC は長期にわたり減少するが WBC は初期には増加しその後減少する²⁰⁾。これまでの多くの動物実験から、トリコテセン系マイコトキシンの急性中毒として消化器および造血系組織の障害が、慢性中毒としては成長阻害のほか免疫機能障害²⁶⁾が挙げられている。造血系組織の障害と、それによってひきおこされる免疫機能への影響については今後の検討課題としたい。

結 語

1. ニバレノールをラット腹腔内に単回投与すると尿中には 72 時間でニバレノールと脱エポキシニバレノールが投与量の 48.3 および 3.8 % 排泄された。糞中へは 72 時間でニバレノールと脱エポキシニバレノールが投与量の 10.0 および 25.5 % 排泄された。

2. ニバレノールをラットに経口単回投与すると、尿中には 72 時間でニバレノールと脱エポキシニバレノールが投与量の 9.9 および 5.6 % 排泄された。糞中へは 72 時間でニバレノールと脱エポキシニバレノールが投与量の 5.4 および 18.7 % 排泄された。血清中、肝、腎中ニバレノール濃度は非常に低く、速やかに排泄された。

3. ニバレノール添加飼料でラットを 8 週間飼育して連続経口投与すると、ニバレノール 50 μg/g 添加飼料群の餌摂取量は対照群に比べて 13 % の抑制が見られ、体重増加も対照群とくらべて有意に抑制された。ニバレノール 10 μg/g 添加飼料群では餌摂取量の減少はみられず、体重増加の有意な抑制もみられなかった。また、ニバレノール 50 μg/g 添加飼料群では対照群とくらべて赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値の有意な減少がみられたが、ニバレノール 10 μg/g 添加飼料群では対照群との有意な差はみられなかった。病理組織学的検索の結果、ニバレノール 50 μg/g 添加飼料群では小腸上皮の壊死と脱落が広範に認められ、骨髓に赤芽球系細胞の増加がわずかにみられた。ニバレノール 10 μg/g 添加飼料では、いずれの組織切片においても対照群と同じ像を示した。

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました森山忠重教授に深甚の謝意を捧げますとともに、御校閲の労を賜りました生化学教室神谷知弥教授ならびに腫瘍病理学教室小西陽一教授に深謝いたします。さらに、直接のご指導、ご教示を賜りました土肥祥子助教授、組織標本の検討にご協力いただきました奈良県衛生研究所青木善也博士、第 1 内科学教室椎木英夫氏に深謝いたします。

本論文の一部は第2回薬物動態学会総会(1987年, 東京)において発表した。

文 献

- 1) 上野芳夫: 食衛誌. 14: 403-414, 1973.
- 2) Ueno, Y.: *in* Advances in Nutritional Research (Draper, H. H., ed.). Vol. 3, Plenum Publishing Coop., New York, p 301-353, 1983.
- 3) Matsumoto, H., Ito, T. and Ueno, Y.: Jpn. J. Exp. Med. 48: 393-399, 1978.
- 4) Pfeiffer, R. L., Swanson, S. P. and Buck, B.: J. Agric. Food Chem. 36: 1227-1232, 1988.
- 5) Corley, R. A., Swanson, S. P. and Buck, W. B.: J. Agric. Food Chem. 33: 1085-1089, 1985.
- 6) Robinson, T. S., Mirocha, C. J., Kurtz, H. J., Behreus, C. J., Weaver, G. A. and Chi, M. S.: J. Agric. Food Chem. 27: 1411-1413, 1979.
- 7) Schoental, R., Joffe, A. Z. and Yagen, B.: Cancer Res. 39: 2179-2189, 1979.
- 8) Fairhurst, S., Marrs, T. C., Parker, H. C., Scawin, J. W. and Swanston, D. W.: Toxicology 43: 31-49, 1987.
- 9) Yoshizawa, T., Takeda, H. and Ohi, H.: Agric. Biol. Chem. 47: 2133-2135, 1983.
- 10) Forsell, J. H., Witt, M. F., Tai, J. H., Jensen, R. and Pestka, J. J.: Fd. Chem. Toxic. 24: 213-219, 1986.
- 11) Arnold, D. L., McGuire, P. F., Nera, E. A., Karpinski, K. F., Bickis, M. G., Zawidzka, Z. Z., Ferrie, S. and Vesonder, R. F.: Fd. Chem. Toxic. 24: 935-941, 1986.
- 12) Ueno, Y., Ueno, I., Itoi, Y., Tsunoda, H., Enomoto, M. and Ohtsubo, K.: Jpn. J. Exp. Med. 41: 521-539, 1971.
- 13) Mutoh, A., Ishii, K. and Ueno, Y.: Toxicol. Letters 40: 165-174, 1988.
- 14) Ryu, J.-C., Ohtsubo, K., Izumiya, N., Nakamura, K., Tanaka, T., Yamamura, H. and Ueno, Y.: Fundam. Appl. Toxicol. 11: 38-47, 1988.
- 15) 陰地義樹: 奈医誌. 41: 325-334, 1990.
- 16) 市原清志: バイオサイエンスの統計学. 南江堂, 東京, p 72-86, 1990.
- 17) Ryu, J.-C., Ohtsubo, K., Izumiya, N., Mori, M., Tanaka, T., Yamamura, H. and Ueno, Y.: J. Toxicol. Sci. 12: 11-21, 1987.
- 18) 川崎 靖, 内田雄幸, 関田清司, 松本清司, 落合敏秋, 白井章夫, 中路幸男, 降矢 強, 黒川雄二, 戸部満寿夫: 食衛誌. 31: 144-154, 1990.
- 19) Yoshizawa, T., Okamoto, K., Sakamoto, T. and Kuwamura, K.: Proc. Jpn. Assoc. Mycotoxic. 21: 9-12, 1985.
- 20) Sakamoto, T., Swanson, S. P., Yoshizawa, T. and Buck, W. B.: J. Agric. Food Chem. 34: 698-701, 1986.
- 21) Chatterjee, K., Visconti, A. and Mirocha, C. J.: J. Agric. Food Chem. 34: 695-697, 1986.
- 22) Munger, C. E., Ivie, W., Christopher, R. J., Hammock, B. D. and Phillips, T. T.: J. Agric. Food Chem. 35: 354-358, 1987.
- 23) 芳沢宅美, 諸岡信一: 食衛誌. 15: 261-269, 1974.
- 24) Matsuoka, Y. and Kubota, K.: Toxicol. Appl. Pharmacol. 91: 333-340, 1987.
- 25) Matsuoka, Y. and Kubota, K.: Toxicol. Appl. Pharmacol. 91: 326-332, 1987.
- 26) Hugher, B. J., Hsieh, G. C., Jarvis, B. B. and Sharma, R. P.: Arch. Environ. Contam. Toxicol. 18: 388-395, 1989.