

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

第一報. ニバレノールの単離精製と
新代謝物; 脱エポキシニバレノールの同定

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) I. PURIFICATION OF NIVALENOL AND IDENTIFICATION OF NEW METABOLITE OF NIVALENOL, DEEPOXYNIVALENOL

YOSHIKI ONJI

Department of Public Health, Nara Medical University

Received July 27, 1990

Summary: Large amounts of two mycotoxins, nivalenol and fusarenon-X were produced from *Fusarium graminearum* F-1465 cultured on pressed barley. The centrifugal partition chromatography (CPC) using two-phase solvent systems n-butanol-water and chloroform-methanol-water could be applied to a preparative purification of nivalenol and fusarenon-X. Starting from the *Fusarium* grown on 1kg of pressed barley substrate, 0.34g of nivalenol and 0.78g of fusarenon-X were obtained by recrystallization of CPC fraction from hot methanol. Fusarenon-X was converted to nivalenol by alkaline hydrolysis giving to 0.55g of crystalline nivalenol.

A new metabolite of nivalenol was detected in the feces of rats when nivalenol was administered orally. The new metabolite was identified as 3,4,7,15-tetrahydroxytrichothec-9, 12-dien-8-one, or deepoxynivalenol, on the basis of mass spectrometry and ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy.

In repeated oral administration, the deepoxy metabolite was detected in feces at 80% and in urine at 1% of total dose, and the parent compound was detected in feces at 7% and in urine at 1%, respectively.

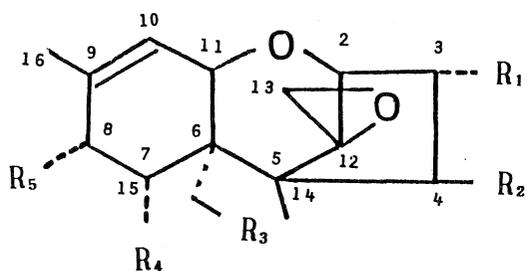
Index Terms

trichothecene mycotoxin, nivalenol, deepoxynivalenol

緒 言

ニバレノール (12, 13-epoxy-3,4,7,15-tetrahydroxy-trichotec-9-en-8-one) は辰野ら¹⁾によって1968年赤カ

ビ *Fusarium nivale* の培養物から分離精製されたマイコトキシンの一種である。Fig. 1に示すように12, 13-位のエポキシ環を有するトリコテセン骨格をもつことから、T-2トキシン、ジアセトキシニシルペノール、デオキ



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
nivalenol	OH	OH	OH	OH	O=
fusarenol-X	OH	OAc	OH	OH	O=
deoxynivalenol	OH	H	OH	OH	O=
T-2 toxin	OH	OAc	OAc	H	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ C(O)O
diacetoxyscirpenol	OH	OAc	OAc	H	H

Fig. 1. Chemical structure of trichothecene mycotoxins.

シニバレノールなどとともにトリコテセン系マイコトキシンに分類される²⁾。これらのトリコテセン系マイコトキシンは強い炎症作用を示し³⁾、生化学的にはポリソームの崩壊によるタンパク合成障害²⁾があり、嘔吐⁵⁾、下痢⁶⁾、成長阻害や白血球の減少⁷⁾、免疫抑制⁸⁾等の様々な毒性を示すことが知られているが²⁾、それらのメカニズムの詳細は不明な点が多い。

トリコテセン系マイコトキシンのなかでもニバレノールとデオキシニバレノールは大麦、小麦、トウモロコシ等の穀類を広範に汚染しており⁹⁾⁻¹²⁾、それらを原料とする食品にも残留していることが知られている¹³⁾。ニバレノールの毒性はデオキシニバレノールよりも強いとされているが²⁾、その慢性毒性や生体内での挙動についてはほとんど解明されていない現状である。それは、主に代謝、毒性等の研究に必要な十分量の純粋なニバレノールを得ることが困難であったことによるものである。今回、著者は赤カビ *Fusarium graminearum* の大量培養後ニバレノールの大量精製に成功するとともに、ニバレノールの新代謝物を投与動物の排泄物中より見だし構造決定したので報告する。

材料および方法

1. 試薬

トリメチルシリクロリド、トリメチルシリルイミダゾールは㈱東京化成製を、酢酸エチル、アセトニトリル、クロロホルム、メタノール等の有機溶媒は㈱和光純薬製残留農薬試験用を、標準ニバレノールは㈱和光純薬製マイコトキシン試験用を、シリカゲルは㈱和光純薬製ワコーゲルC-200(100-200メッシュ)を活性化せず、またア

ンバーライト XAD-2 樹脂 (Rohm & Haas, USA) はメタノールで洗浄後、水洗し、それぞれ使用した。DEAE-セファデックス A-25 (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden) は、メタノール、次いで水による洗浄を2回繰り返した後、メタノール水(1:6)で平衡化したのちに使用した。

2. カビの培養

押し麦 500 g を水に1時間浸漬後、水きりして1 l 容のビーカーに移し、表面が浸る程度に蒸留水を加えて120℃で1時間オートクレーブにて滅菌した。底に網を敷いたステンレス皿(30×30 cm)に、約40℃まで放冷した押し麦を拡げ、カビ菌株 *Fusarium graminearum* F-1465¹⁴⁾(国立衛生試験所一戸正勝博士から供与された)を植菌した。ステンレス皿の底に滅菌蒸留水 300 ml を加え、培地の乾燥を防ぐため表面をプラスチックフィルムで覆い、25℃で2週間培養した。

3. トキシンの抽出および精製

押し麦 1 kg 分の赤カビ培養物にアセトニトリル 2 l を加えて15分間ホモジナイズした。大型ロートで綿濾過し、残渣にアセトニトリル 1.5 l を加えて再度抽出した。抽出液を濃縮乾固しメタノール 150 ml 加え、これにシリカゲルC-200を150 g 加えて攪拌しながら濃縮凝固した。これを予めシリカゲル 100 g を湿式充填した直径 5 cm のガラスカラムに積層充填して、クロロホルム-メタノール(3:2, v/v) 1 l で溶出した。溶出液を濃縮乾固し、n-ブタノール-水系の2相液(上層 300 ml, 下層 200 ml)に溶かし、CPC-LLI型(ローターセル容量 6.8 l, 三鬼エンジニアリング社製, 京都)を用いて、流速 50 ml/min, ローター回転数 400 rpm, 下降法で遠心型液液分配クロマトグラフィー(CPC)を行い、ニバレノールを含む 1-5 l の画分とフザレノン-Xを含む 5-15 l の画分に分けた。

ニバレノール画分を濃縮乾固後、クロロホルム-メタノール-水(65:65:40, v/v)の展開溶媒(上層 30 ml, 下層 20 ml)に溶かしてCPC-L型(カートリッジセル容量 1 l, 三鬼エンジニアリング社製, 京都)を用い、流速 6 ml/min, ローター回転数 800 rpm, 操作温度 25℃で再びCPCをおこなった。254 nm の吸光度をモニターしながら、下降法にて1900 mlまで展開後、上昇法の反転溶出で1000 ml展開した。ニバレノールの溶出位置をTLCで確認して、反転溶出における450-650 mlの画分を濃縮乾固後熱メタノール(60℃)から再結晶した。一方、フザレノン-X画分は濃縮乾固後にニバレノールの場合と同じ展開溶媒で上昇法にて1300 mlまで展開後、下降法の反転溶出に切り換えた後450-720 mlの画分を濃縮乾固して

フザレノン-Xの結晶を得た。得られたフザレノン-XはRood¹⁵⁾の方法に準じてアルカリ加水分解法によりニバレノールに変換し、上述と同様に熱メタノールから再結晶した。

4. 実験動物およびトキシンの投与方法

10週齢のWistar系雄性ラット5匹を、1匹ずつ代謝ケージ内で飼育し、蒸留水に溶かしたニバレノール(600 μ g/ml)を5mg/kg体重、2日おきにゾンデを使用して強制的に12回経口投与した。尿および糞は毎日分別収集し、-20 $^{\circ}$ Cで凍結保存しておき、最終投与終了後に全部混合してニバレノールおよび代謝物の排泄量を測定した。また、ニバレノールの投与期間中は粉末標準飼料MF(オリエンタル酵母工業製、東京)および水道水を自由に摂取させた。なお、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ガスクロマトグラフィーで確認した。

5. 代謝物の抽出および精製

ラットの糞約1kgを4分割し、それぞれ、アセトニトリル750mlを加えてホモジナイズしてから綿濾過し、残渣に、再びアセトニトリル750mlを加えて再抽出して同様に濾過した。濾液を集めて20mlまで濃縮し、酢酸エチル-水(3:7,500ml)で分配し、水層を50mlまで濃縮後、アンバーライトXAD-2カラム(内径2cm \times 高さ25cm)に吸着させた。これを水380mlで洗浄後、メタノール250mlで溶出した。溶出液は5mlまで濃縮してから、さらにDEAE-セファデックスA-25カラム(1.2 \times 15cm)に吸着させメタノール-水(1:6, v/v)200mlで溶出した。この溶出液を減圧濃縮後、15%メタノールによる高速液体クロマトグラフィー(HPLC, LC-6A;島津製作所製、京都)を繰り返しおこない、ニバレノールと代謝物の画分に分けた。代謝物画分を濃縮乾固後、少量の温水に溶かし冷却放置して結晶化し、化学構造決定のための試料とした。

6. 化学分析

(1)マイコトキシンの微量定量分析:培養物および尿、糞の抽出液中のトキシンおよびその代謝物は抽出液の一定量を加温しながら窒素気流下で完全に濃縮乾固後、上村¹⁶⁾らの方法に準じて、トリメチルシリルクロロド-トリメチルシリルイミダゾール-酢酸エチル(0.2:1:9)混液0.5ml加え室温で15分間反応させ、トリメチルシリル(TMS)誘導体とした。反応液にヘキサン2ml加え、このヘキサン層を水洗したのち、0.5mlに濃縮してガスクロマトグラフィー(GC, 5890A ⁶³Ni-ECD, Hewlett Packard社製, USA)で微量定量分析(検出下限は10pg)をおこなった。

(2)薄層クロマトグラフィー(TLC)による定性分析:シリカゲルプレート(HPTLC, 250 μ m, 10 \times 10cm, E. Merck社製)に培養物、尿および糞の抽出液をスポットし、クロロホルム-メタノール(7:1, v/v)で展開した。ニバレノールおよびフザレノン-Xの検出は、塩化アルミニウム法¹⁶⁾、4-(p-ニトロベンジル)ピリジン法¹⁷⁾、クロモトロボ酸法¹⁸⁾を併用した。

7. 化学構造の解析

(1)ガスクロマトグラフィー-マススペクトロメトリー(GC-MS)およびマススペクトロメトリー(MS):TMS誘導体化したニバレノールおよび代謝物のヘキサン溶液1 μ lを2%OV-1充填カラム(ガスクロムQ 60/80メッシュ, 3mm i. d. \times 2m)を付けたGC/MS 6020(島津製作所製, 京都)に注入し、マススペクトルを測定した。カラムオープン温度は190 $^{\circ}$ C, イオン源温度は190 $^{\circ}$ C, イオン化電圧は70eV(EI)または100eV(CI, 反応ガスはイソブタン)に設定した。また、結晶化したニバレノールおよび代謝物のマススペクトルはJMS-DX 300(日本電子製, 東京)を使用し、イオン化電圧30eV, 直接導入法で測定した。

(2)核磁気共鳴スペクトロメトリー(NMR):結晶化したニバレノールおよび代謝物をアセトン-d₆に溶かし、基準物質としてはテトラメチルシランを用い、JNM-GX400(日本電子製)で¹H, ¹³C NMRスペクトルをそれぞれ400, 100MHzで測定し2次元解析をおこなった。

結 果

1. ニバレノールの大量精製

Fusarium graminearum F-1465株を1kgの押し麦培地で培養するとニバレノール0.77gと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が0.88g産生された。トキシンのCPCでの精製に先だって3種の溶

Table 1. Comparison of partition coefficients of nivalenol and fusarenol-X in three solvent systems

solvent system	partition coefficient ^{a)}	
	nivalenol	fusarenol-X
CHCl ₃ -MeOH-H ₂ O (65:65:40)	3.26	0.266
n-BuOH-H ₂ O (satd)	0.660	2.59
EtOAc-H ₂ O (satd)	0.0794	1.94

a) partition coefficient, K (upper/lower) was measured at 25 $^{\circ}$ C

媒系での分配係数を測定した結果、2つのトキシンの分配係数からCPCをおこなうのに、クロロホルム-メタノール-水系とn-ブタノール-水系が適していることが明らかになった (Table 1). そこで、粗精製物 24 g をCPC-LLI型機で分離し、その後、CPC-L型機で再クロマトグラフィーをおこなった。254nmの吸光度でモニターしたニバレノールとフザレノン-XのCPC-L型機での溶出プロフィールをFig. 2に示した。ニバレノールは不純物との分離が不完全であるためクロマトグラム上のピークの部分(450-650 ml)だけを回収し濃縮後、熱メタノールから再結晶してニバレノールを0.34 g (純度 100%) 得た。フザレノン-Xの分離は良好であり、450-720 mlの部分を回収して濃縮乾固すると、0.78 gのフザレノン-Xが得られた(純度 77%)。このフザレノン-Xを加水分解して再結晶すると0.55 g (純度 100%) のニバレノールが得られた。Table 2に精製過程でのトキシンの収率を示した。押し麦 1 kg に *Fusarium graminearum* F-1465 を植菌、培養後、トキシンを抽出、精製、さらにフザレノン-Xの加水分解によって得られたニバレノールを合わせて、最終的に0.89 gのニバレノールを純化することができた。

2. ニバレノール投与ラットの排泄物中の主代謝物の精製と構造決定

ニバレノールを5匹のラットに反復経口投与し、総量で100 mg投与した。集めた糞約1 kgをアセトニトリル抽出、酢酸エチル-水分配、アンバーライト XAD-2 およびDEAE-セファデックス A-25 カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーの精製ステップを経て20 mgの代謝物結晶を得た。これを標準品として以下の定量分析に供した。この物質は、高速液体クロマトグラム (Fig. 3) およびTMS誘導体のガスクロマトグラム (Fig. 4) 上で単一のピークを示し、その保持時間 (Rt) から、ニバレノールよりやや疎水性が大きく、同程度の分子量であると推察された。また、TLC上でもシングルスポットであり、Rf値が0.26であり、ニバレノールの0.27と近接していた。TLC上での呈色反応では塩化アルミニウムを噴霧後加熱するとC-8位カルボニルの存在を示す青色の蛍光(励起光: 365nm)を発生し、クロモトロブ酸を噴霧し、加熱するとC-6位のオキシエチル基の存在を示す紫色のスポットを示したが、4-(p-ニトロベンジル)ピリジンは反応せずC-12, 13位のエポキシ環の存在は否定された。従って、この代謝物質はC-8位

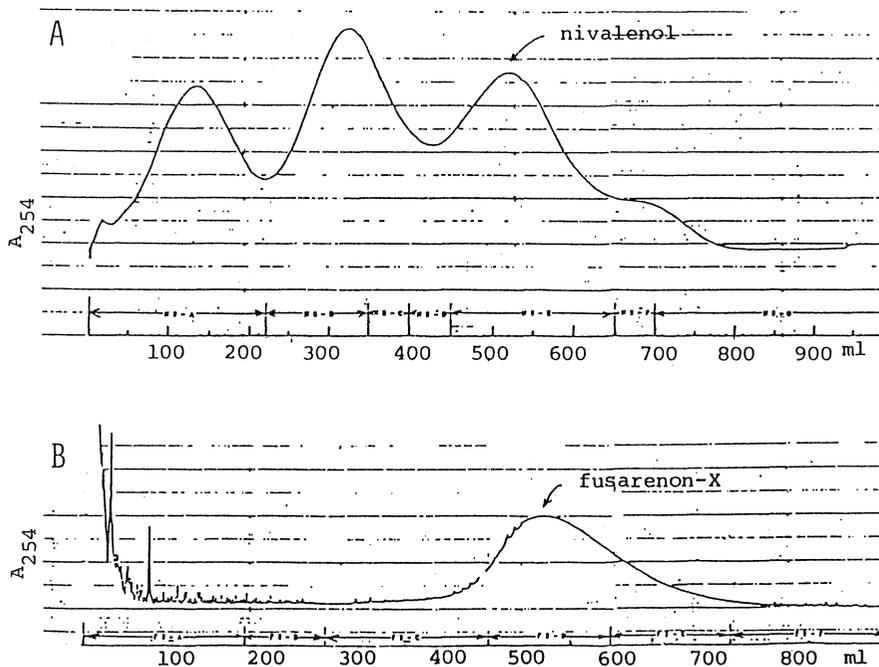


Fig. 2. CPC profiles of nivalenol (A) and fusarenon-X (B) fractions extracted from *Fusarium graminearum* cultured on pressed barley monitoring absorbance at 254 nm. Elution was carried out with chloroform-methanol-water (65:65:40, v/v) using CPC-L. Operation conditions were described in the text.

Table 2. Recovery of nivalenol and fusarenon-X in each step of isolation procedure of toxins

Procedure step	Amount, g (recovery, %)		
	Total materials	Nivalenol	Fusarenon-X
1. Extraction	90 (100)	0.77 (100)	0.88 (100)
2. Silica gel CC	24 (27)	0.77 (100)	0.88 (100)
3. CPC-LLI			
nivalenol fraction	3.87 (4.3)	nd	0
fusarenon-X fraction	3.78 (4.2)	0	nd
4. CPC-L			
nivalenol fraction	0.75 (0.8)	0.34	0
fusarenon-X fraction	0.78 (0.9)	0	0.60 (68)
5. Hydrolysis of fusarenon-X		0.55	0
	nivalenol crystal	0.89*	

nd: not determined

* 0.34 g + 0.55 g (from fusarenon-X)

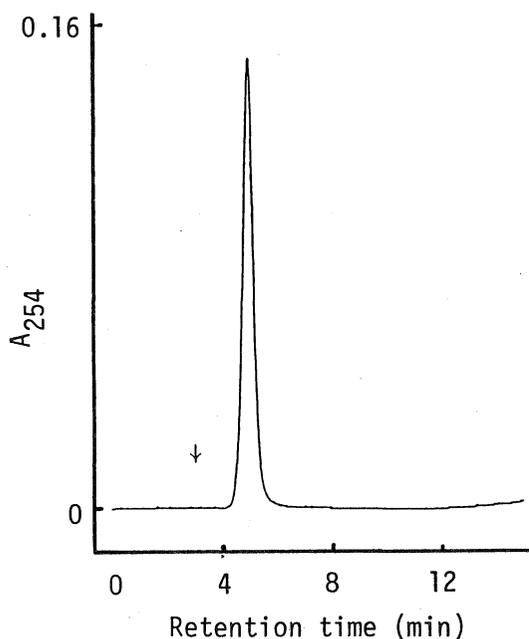


Fig. 3. High performance liquid chromatogram of a new metabolite (at retention time of 4.7 min) purified from rat feces. This peak area is equivalent to $1\mu\text{g}$ of the metabolite. Arrow represents position of nivalenol. HPLC conditions: column, Lichrosphere RP-18 ($25\text{cm}\times 4.6\text{mm}$ i.d., 7μ); mobile phase, 15% methanol; flow rate, $1.5\text{ml}/\text{min}$.

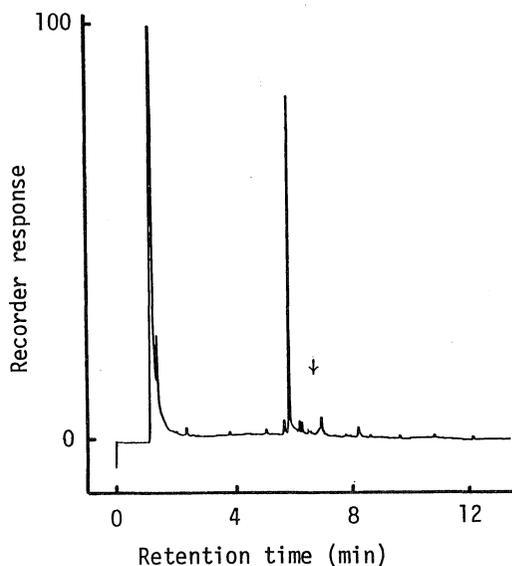


Fig. 4. Gas chromatogram of trimethylsilyl derivative of a new metabolite (at retention time of 5.7 min) purified from rat feces. Arrow represents position of nivalenol. GC conditions: column, HP-17 ($25\text{m}\times 0.2\text{mm}$ i.d., 0.17μ); column head pressure, 150 KPa; split ratio, 1:60; injection temperature, 240°C ; detector temperature, 300°C ; column oven temperature, hold at 150°C (1 min), programmed $150\text{--}270^\circ\text{C}$ at $30^\circ\text{C}/\text{min}$ and $270\text{--}290^\circ\text{C}$ at $4^\circ\text{C}/\text{min}$;

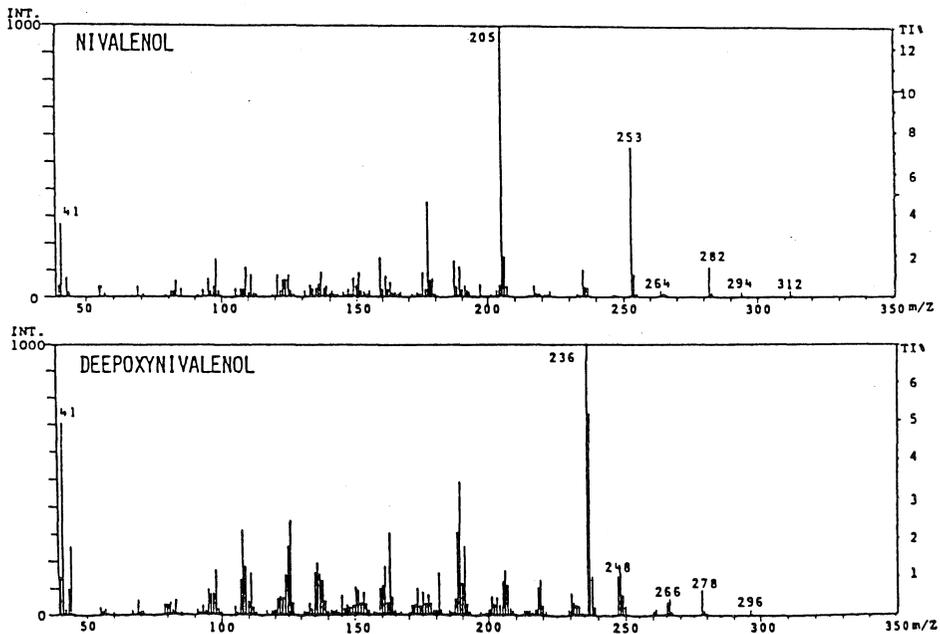


Fig. 5. Mass spectra of nivalenol and its new metabolite (deepoxynivalenol) at 30 eV ionization voltage by direct insertion method.

のカルボニル基とC-6位のオキシエチル基は保持しておりC-12, 13位のエポキシ環を持たないが、ニバレノールとは類似構造をしていることが定性的に推定された。この代謝物とニバレノールのマススペクトルをFig. 5に示した。それぞれの分子イオンピークは、 m/z 296(計算値: $C_{15}H_{20}O_6 = 296.1260$)と m/z 312(計算値: $C_{15}H_{20}O_7 = 312.1209$)であり、同一パターンのフラグメンテーションがみられた。代謝物のピークマッチング法による精密マススペクトルにおいて296.1265(ニバレノールは312.1212)の分子イオンピークが観測された。また、この物質のTMS誘導体のGC-MSでも、EIマススペクトル上で m/z 584(計算値: $C_{27}H_{52}O_6Si_4 = 584.28$)、CIマススペクトル上で m/z 585(計算値: $C_{27}H_{53}O_6Si_4 = 585.29$)に、TMS基が4つ結合したTMS誘導体の分子イオンピークが観測された。

以上より、この代謝物の元素組成は $C_{15}H_{20}O_6$ 、分子量は296.1260であることが確定された。

この代謝物の化学構造を決定するために、純化した代謝物の結晶をアセトン- d_6 に溶かし、NMRスペクトルを測定した。Table 3にニバレノールとこの代謝物の 1H NMRスペクトルを、Table 4に ^{13}C NMRスペクトルのシグナルとその帰属を示した。この物質の 1H NMRスペクトルで δ 5.17と4.92のシグナルはC-13位のプロト

ンによるものである。C-2位とC-14位のプロトンはニバレノールと比較して低磁場へのシフトが見られる。 ^{13}C NMRスペクトルでもC-12, C-13位のシグナルが低磁場へ大きくシフトしている。Fig. 6に 1H および ^{13}C のスピニング結合の様子を示した。このシフト相関からTable 3, 4に示したシグナルの帰属が完全であることが確認できた。これらの結果から、この物質はFig. 7に示した化学構造を有する脱エポキシニバレノール、すなわち、3, 4, 7, 15-tetrahydroxytrichothec-9, 12-dien-8-oneであると決定した。

本研究において、ニバレノールの代謝物の精製と構造決定のため5匹のラットに総量で100 mgのニバレノールを経口的に反復投与したものであるが、ニバレノールとその代謝物脱エポキシニバレノールの糞、尿中への排泄比をみると、脱エポキシニバレノールとして投与量の80%が糞中に、1%が尿中排泄された。他方、未変化体のニバレノールは非常に少なく糞中に7%が、尿中に1%が排泄された。

考 察

トリコセシン系マイコトキシンを産生する *Fusarium* 属菌の培養方法については、これまでに液体培地¹⁹⁾²⁰⁾や、固形培地^{21)~24)}を用いた方法が種々報告されている。固形

Table 3. ^1H NMR chemical shift assignments and coupling constants for nivalenol and its new metabolite, deepoxynivalenol

Proton	^1H chemical shifts, $^a\delta$ (coupling constants, J)	
	Nivalenol	Deepoxynivalenol
2	3.53 ($J_{2,3}=5.0$)	4.16 ($J_{2,3}=4.8$)
3	4.16 ($J_{3,2}=5.0$; $J_{3,4}=5.0$; $J_{3,\text{OH}}=4.0$)	3.85 ($J_{3,2}=4.8$; $J_{3,4}=3.2$)
3 OH	4.48	
4	4.55 ($J_{4,3}=5.0$, $J_{4,\text{OH}}=3.5$)	4.54 ($J_{4,3}=3.2$)
4 OH	3.85	
7	4.82 ($J_{7,\text{OH}}=2.7$)	4.59 ^b
10	6.57 ($J_{10,11}=6.0$; $J_{10,16}=1.5$)	6.54 ($J_{10,11}=6.0$; $J_{10,16}=1.5$)
11	4.72 ($J_{11,10}=6.0$)	4.75 ($J_{11,10}=6.0$)
13	2.93 ($J_{\text{AB}}=4.5$)	5.17 ($J_{\text{AB}}=1.0$)
	2.90	4.92
14	1.08 (s) ^c	1.36 (s) ^c
15	3.84 ($J_{\text{AB}}=11.5$; $J_{15,\text{OH}}=5.0$)	3.85 ($J_{\text{AB}}=11.5$)
	3.74	3.76
15 OH	3.76	
16	1.79 ($J_{16,10}=1.5$; $J_{16,11}=1.0$)	1.78 ($J_{16,10}=1.5$; $J_{16,11}=1.0$)

^a ppm from tetramethylsilane. ^b coupling could not be detected because of the contamination of trace salts. ^c singlet signal.

Table 4. ^{13}C NMR chemical shifts assignments for nivalenol and its new metabolite, deepoxynivalenol

Carbon	^{13}C chemical shifts ^a , δ	
	Nivalenol	Deepoxynivalenol
No.		
2	81.19	81.44
3	81.13	81.51
4	81.03	80.96
5	45.14	53.92
6	50.20	54.48
7	74.93	74.86
8	200.65	201.27
9	135.79	135.53
10	139.65	140.09
11	70.25	70.04
12	65.65	154.10
13	45.70	107.92
14	8.24	12.77
15	61.63	61.46
16	15.23	15.30

^a ppm from tetramethylsilane.

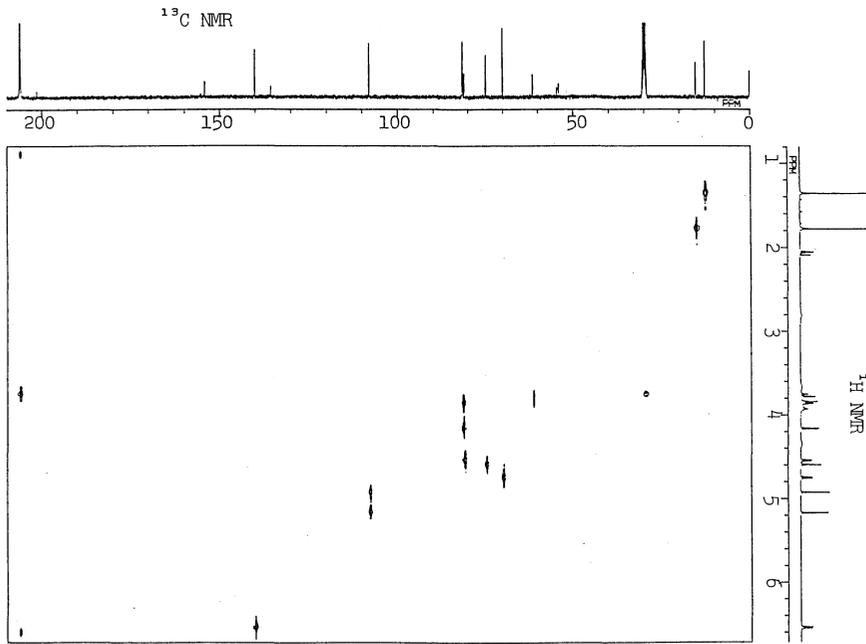


Fig. 6. Counter plot of the $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ correlation spectrum of deepoxynivalenol. ^1H and ^{13}C NMR spectra were measured in acetone- d_6 at 400 and 100 MHz, respectively.

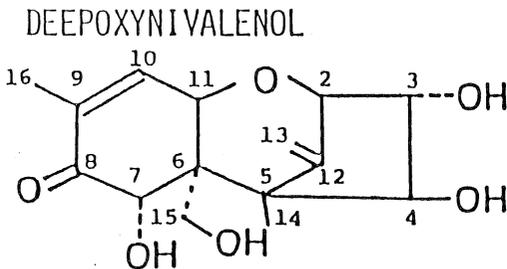


Fig. 7. Structure of deepoxynivalenol.

培地の基質として米²¹⁾²³⁾, トウモロコシ²²⁾, 麦²⁴⁾などが使用されているが, いずれもマイコトキシンの収率, 操作の簡便さ, 培養期間等に問題があった. 今回, 著者は合成液体培地や米を使用した固形培地よりも表面積が大きく, 収率が2~3倍高い押し麦を使用した固形培地による方法を開発した. 培養容器に関しても, 簡便さや真菌の増殖性を考慮して, 酸素の供給が十分おこなえる浅型ステンレス皿による平面培養法を採用した. 我が国で分離された *Fusarium graminearum* 菌株はデオキシニバレノールおよび3-アセチルデオキシニバレノール産生型とニバレノールおよびフザレノン-X産生型に分類されるが¹⁴⁾, 今回, この方法で *Fusarium graminearum* F-

1465株を培養すると1kgの押し麦培地で0.77gのニバレノールおよび0.88gのフザレノン-Xが産生された. この培養方法での毒素の産生量は培地1kg当りニバレノール, フザレノン-Xあわせると 2.0 ± 0.9 g (n=6)であり, 毒性試験などに必要な量のニバレノールを大量に得ることが可能になった.

次に *Fusarium* 属菌培養物からニバレノールを収率良く, しかも高純度で精製する方法を検討し, CPCによる新しい精製法を試みた.

CPCは互いに溶け合わない2相液の間で液液分配が高速で繰り返されるように設計された分配クロマトグラフィーである. 3種の溶媒系でのニバレノールとフザレノン-Xの分配係数を測定し (Table 1), CPCでの毒素の精製に適した溶媒系を検討した結果, n-ブタノール-水系は使用溶媒の回収が可能であることから予備精製に, クロロホルム-メタノール-水系は3成分系であるため組成比を変えることにより毒素の溶出パターンを任意にコントロールできることから分離精製に採用した. n-ブタノール-水系での予備精製では毒素は約7倍純化され, クロロホルム-メタノール-水系でのCPCでさらに5倍純化され, 再結晶の操作だけで純粋なニバレノールを得ることができた. マイコキシンの精製に

は従来から種々のカラムクロマトグラフィーが採用されているがCPCは分配係数を測定することで分離の条件がほぼ正確に予想できるうえに、固定相に充填剤を使用しないため試料を完全に回収できる点、多量の試料を一度に負荷できる点、そして操作が短時間で終了する点から大量のマイコトキシンを分離精製するのにきわめて利用価値の高い方法と考える。

マイコトキシンは真菌の第2次代謝産物として比較的分子量の有機化合物であり、生体内において代謝を受け不活性化されたりあるいは活性化されてより強い作用因子となる。そのために、マイコトキシンがもつ生理活性を明らかにするには代謝反応の解析が重要になる。このような観点から、著者は、実験動物におけるニバレノールの主要代謝物の分離精製と化学構造の決定を最初の目的とした。

純化したニバレノールをラットに1ヶ月間反復経口投与すると、排泄物中にニバレノールよりも分子量が16小さい代謝物が多量に存在することをGC/MSによって見いだした。精製し結晶化した代謝物は、TLC上での呈色反応で他のトリコテセン系マイコトキシンの脱エポキシ代謝物^{25)~27)}と同様の反応を示すことと、TMS誘導体のマススペクトルから脱エポキシニバレノールであることが推定されたので、精密マススペクトル、¹Hおよび¹³C NMRスペクトルの測定をおこなった。精密マススペクトルでは、分子量の実測値(296.1265)が計算値(296.1260)と非常に良く一致し、同時に元素組成がC₁₅H₂₀O₆であることが確認された。

¹Hおよび¹³Cの高分解能NMRスペクトルでは正確な化学シフト値とスピンスピン結合定数が観測された。並行して測定したニバレノールのNMRスペクトルと比較して、C-12、C-13位のエポキシ環の還元的開裂の結果、C-13位の¹HおよびC-12、C-13位の¹³Cの化学シフト値が低磁場側に大きく移動している(Table 3, 4)。この現象は、他のトリコテセン系マイコトキシンの脱エポキシ代謝物の場合にも観測されている^{25)~27)}。他方、隣接するC-2、C-14位でも化学シフト値がわずかに変化しているが分子全体としては構造上の大きな変化は見られなかった。このことは、両物質の化学的性質が類似していることを示している。Fig. 6に示した2次元NMRスペクトルにおいて、¹Hと¹³Cの良好なシフト相関がみられ、それによって、Table 3, 4のシグナルの帰属が完全であることが裏付けられた。ニバレノール以外のトリコテセン系マイコトキシンのNMRスペクトルの測定とシグナルの帰属は、これまでに、代謝物も含めてほぼ完全に成されており²⁸⁾、今回の結果はそれらとも良く一

致している。以上の結果から、ニバレノールの代謝物がFig. 7に示した化学構造を持つ脱エポキシニバレノールであると決定した。

この脱エポキシニバレノールは著者等により、またデオキシニバレノール²⁵⁾、T-2トキシシン²⁶⁾、ジアセトキシシルベノール²⁷⁾についてはすでに脱エポキシ代謝物が発見されていることから脱エポキシ化がトリコテセン系マイコトキシンの主要な代謝経路であると考えられる。本研究において、ニバレノールの連続経口投与実験では、投与量の大部分が脱エポキシニバレノールとして糞中に排泄され、未変化のニバレノールは糞中に投与量のわずか7%、尿中には1%排泄されただけであった。このエポキシ環の還元的開裂が腸内細菌によって起こるのか、あるいは腸管から吸収されて代謝されるのかは明らかでない。しかし、投与量の80%が脱エポキシニバレノールとして糞中に検出され、尿中にはわずか1%に過ぎなかった。もしニバレノールが吸収された後、肝臓で代謝されて脱エポキシニバレノールとして排泄されたとすると、脱エポキシニバレノールが尿中に非常に少ないことを説明できない。したがって、腸内細菌によってニバレノールの大部分が脱エポキシ化されると考える方が妥当であろう。

結 語

1. 赤カビ *Fusarium graminearum* F-1465 を押し麦培地 (1 kg) で培養し、アセトニトリル抽出後シリカゲルカラムクロマトグラフィー、遠心型液液分配クロマトグラフィーにより純粋なニバレノールの結晶 0.89 g を得た。

2. ニバレノール (総量 100 mg) をラットに反復経口投与し、排泄物中に多量の新代謝物を見だし、精製して 20 mg の結晶を得た。マススペクトル、¹Hおよび¹³C高分解能NMRスペクトルの解析から、この代謝物は脱エポキシニバレノール、すなわち、3, 4, 7, 15-tetrahydroxytrichothec-9, 12-dien-8-one であることが同定確認された。

3. ニバレノールをラットに1ヶ月間反復経口投与すると、投与量の80%が糞中に、1%が尿中に脱エポキシニバレノールとして排泄された。他方、未変化体のニバレノールは7%が糞中に、1%が尿中に排泄された。この事実は腸内細菌による脱エポキシ化を強く示唆している。

稿を終えるにあたり、ご指導、御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、御教示を賜りました土肥祥子助教授に感謝するとともに、*Fusarium* 菌の培養等に協力いただきました奈良県衛生研究所青木善也博士はじめ公衆衛生学教室の諸先生方、菌株を分与していただきました国立衛生試験所一戸正勝博士、NMR スペクトロメーターおよびマススペクトロメーターの使用に便宜を計ってくださいました摂南大学薬学部榎本 隆教授に感謝します。

本論文の要旨の一部は IInd COLLOQUIUM ON CENTRIFUGAL PARTITION CHROMATOGRAPHY (KYOTO, 1988) において発表した。

文 献

- 1) Tatsuno, T., Saito, M., Enomoto, M. and Tsunoda, H.: Chem. Pharm. Bull. 16: 2519-2520, 1968.
- 2) Ueno, Y.: in Advances in Nutritional Research (Draper, H. H., ed.). Vol. 3, Plenum Publishing Coop., New York, p301-353, 1983.
- 3) Matsumoto, Y. and Kubota, K.: Toxicol. Appl. Pharmacol. 91: 333-340, 1987.
- 4) Ueno, Y., Nakajima, M., Sakai, K. and Shimada, M.: J. Biochem. 74: 285-296, 1973.
- 5) Ueno, Y., Ishii, K., Sato, N. and Ohtsubo, K.: Japan J. Exp. Med. 44: 123-127, 1974.
- 6) Matsuoka, Y. and Kubota, K.: Toxicol. Appl. Pharmacol. 57: 293-301, 1981.
- 7) Forsell, J. H., Witt, M. F., Tai, J. H., Jensen, R. and Pestka, J. J.: Fd. Chem. Toxic. 24: 213-219, 1986.
- 8) Obara, T., Masuda, E., Takemoto, T. and Tatsuno, T.: in Toxicogenic Fungi Their Toxins and Health Hazard (Kurata, H. and Ueno, Y., eds.). Elsevier, Amsterdam, p301-311, 1984.
- 9) Yoshizawa, T. and Hosokawa, H.: J. Food Hyg. Soc. Japan 24: 413-415, 1983.
- 10) 土肥祥子, 四月朔日富司子, 北井博, 小坂菊枝, 一戸正勝, 大場邦弘: 食衛誌. 25: 1-9, 1984.
- 11) Tanaka, T., Hasegawa, A., Yamamoto, S., Lee, U-S., Sugiura, Y. and Ueno, Y.: J. Agric. Food Chem. 36: 979-983, 1988.
- 12) Jelinek, C. F., Pohland, A. E. and Wood, G. E.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 72: 223-230, 1989.
- 13) 陰地義樹, 宇野正清, 永美大志, 土肥祥子, 森山忠重: 食衛誌. 28: 50-54, 1987.
- 14) Ichinoe, M., Uchiyama, S., Amano, R. and Kurata, H.: in Trichothecens and Other Mycotoxins (Lacey, J., ed.). John Wiley & Sons Ltd, London, p21-32, 1985.
- 15) Rood, H. D., Buck, W. B. and Swanson, S. P.: J. Agric. Food Chem. 36: 74-79, 1988.
- 16) Kamimura, K., Nishijima, M., Yasuda, K., Saito, K., Ibe, A., Nagayama, T., Ushiyama, H. and Naoi, Y.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 64: 1067-1073, 1981.
- 17) Takitani, S., Asabe, Y., Kato, T., Suzuki, M. and Ueno, Y.: J. Chromatogr. 172: 335-342, 1979.
- 18) Baxter, J. A., Temhune, S. J. and Qureshi, S. A.: J. Chromatogr. 261, 130-133, 1983.
- 19) Ueno, Y., Sawano, M. and Ishii, K.: Appl. Microbiol. 30: 4-9, 1975.
- 20) 諸角 聖, 和宇慶朝昭, 一言 広, 工藤康雄: 食品と微生物 5: 131-136, 1988.
- 21) Ehrlich, K. C. and Lillehoj, E. B.: Appl. Environ. Microbiol. 48: 1053-1054, 1984.
- 22) Scott, P. M., Lawrence, G. A., Telli, A. and Iyenger, J. R.: J. Assoc. off. Anal. Chem. 67: 32-34, 1984.
- 23) Lee, Y-W. and Mirocha, C. J.: Appl. Environ. Microbiol. 48: 857-858, 1984.
- 24) Ichinoe, M., Uchiyama, S., Amano, R. and Kurata, H.: in Trichothecenes and Other Mycotoxins (Lacey, J., ed.). John Wiley & Sons Ltd., p21-32, 1985.
- 25) Yoshizawa, T., Takeda, H. and Ohi, H.: Agric. Biol. Chem. 47: 2133-2135, 1983.
- 26) Chatterjee, K., Visconti, A. and Mirocha, C. J.: J. Agric. Food Chem. 34: 695-697, 1986.
- 27) Sakamoto, T., Swanson, S. P., Yoshizawa, T. and Buck, W. B.: J. Agric. Food Chem. 34: 698-701, 1986.
- 28) Blackwell, B. A., Greenhalgh, R. and Bain, A. D.: J. Agric. Food Chem. 32: 1078-1083, 1984.