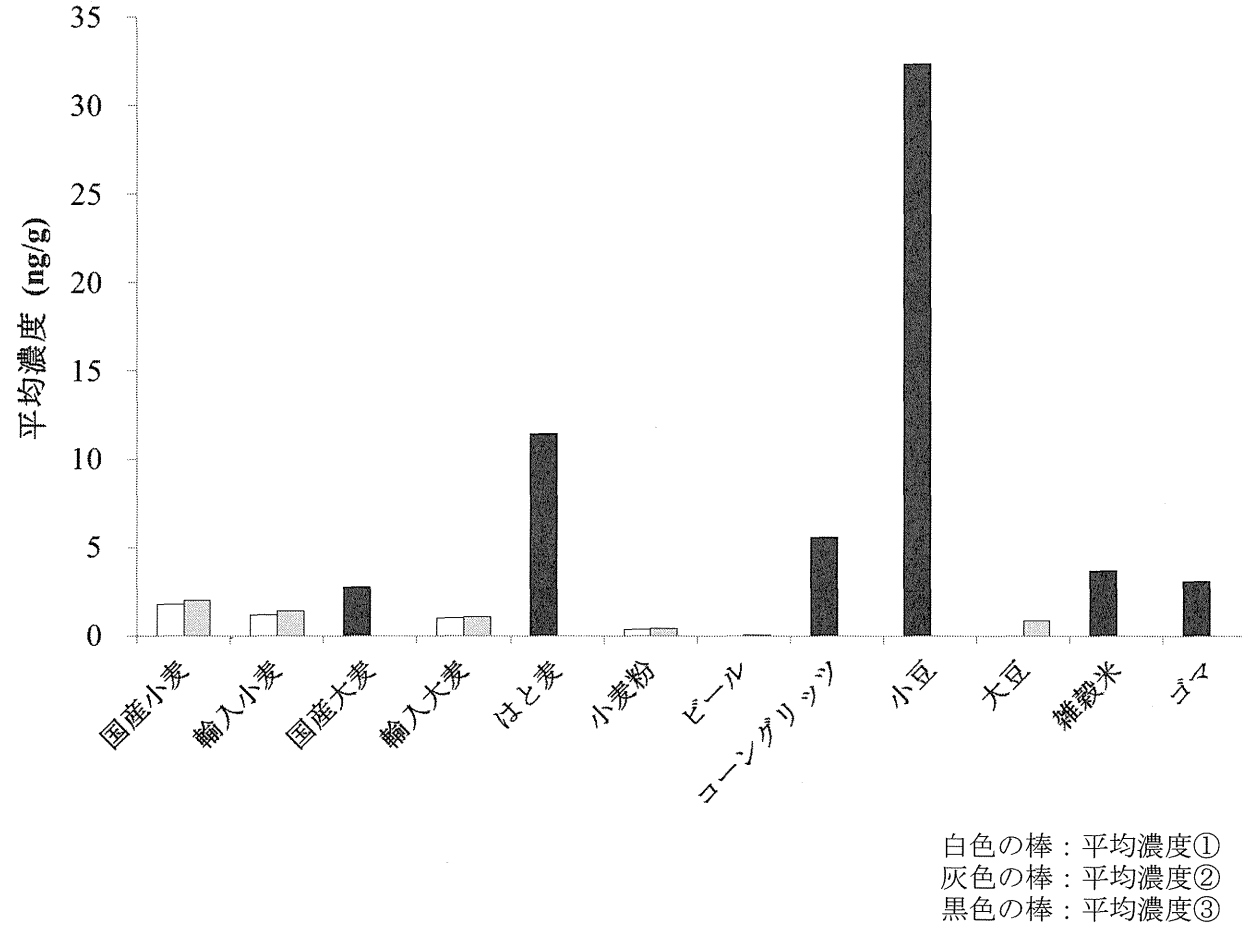


図4 ゼアラレノンの汚染実態



# 厚生労働科学研究費補助金研究事業

## (食品の安全確保推進研究事業)

### 総合研究報告書

#### T-2 トキシンの循環器影響に関する研究

分担研究者 局 博一

東京大学大学院農学生命科学研究科附属食の安全研究センター特任教授

#### 研究要旨

T-2 トキシンは免疫抑制、造血障害、嘔吐作用などの生体影響を起こすことが知られている。平成 22 年度から 24 年度にかけて T-2 トキシンによる循環機能影響を調べた結果、不整脈の誘発および自律神経機能に影響を及ぼすことが明らかになった。循環器影響に関する知見は 1980 年代に断片的に報告されていた T-2 トキシンの循環器作用をより系統的な研究によって、より詳細に明らかにしたものである。また、同様の影響がデオキシニバレノールにおいても認められたことから、循環器影響はフザリウム毒素の代表であるトリコテセンタイプ A、B に共通した性質である可能性がある。また、本研究によって T-2 トキシンおよびデオキシニバレノールの循環器影響の機序の一部として、ミトコンドリアの電子伝達系阻害作用が関わっている可能性があることが示唆された。一方、T-2 トキシンの投与によって血液中の活性酸素種が増加することが明らかになった。活性酸素種の増加は組織傷害に由来するものと推測されるが、このことが二次的にミトコンドリア機能などを阻害する可能性も考えられる。

#### A. 研究目的

フザリウム属のカビ毒の摂取による生体影響に関する研究は、免疫系、造血系、消化器系および嘔吐を中心になされている。1980 年代から報告数は少ないものの、循環器系における影響が述べられている。しかしながら、これらの報告は断片的なものが多く、フザリウム属毒素による循環器影響の全体像が不明である。心臓血管系は生命活動の維持において直接重要な役割を担っていることから、より詳細かつ全体的な研究を行う必要がある。本研究では、心臓血管系および自律神経系に及ぼす T-2 トキシンの影響を、生体レベル (*in vivo*) および細胞レベル (*in vitro*) の両方から調べることにより、T-2 トキシンの循環器影響を総合的に評価することを目的とした。また、同様の方法によってデオキシニバレノールの影響を調べ、T-2 トキシンの影響の強

さをデオキシニバレノールの影響の強さと比較した。

#### B. 研究方法

##### I. テレメトリー心電図記録による心拍数、不整脈、自律神経機能への影響評価

(1) 心拍数、不整脈、自律神経機能影響  
成熟雄ラット (Slc:Wistar; 8 週齢; 12 匹) に小型テレメーター送信機を埋入し、1 週間の手術回復期の後、T-2 トキシンを 0.1 mg/kg (n=5), 0.5 mg (n=5), 1.0 mg/kg (n=5) の投与量で 3 グループに分けて投与した。心電図は 24 時間連続記録を 2 週間以上にわたって実施した。心電図記録をもとに、不整脈の発現性、心拍数 (HR)、心拍変動解析 (HRV)、心電図波形分析 (PR 間隔、QT 間隔、QRS 持続時間) を測定した。

## (2) 自律神経遮断薬の効果

供試ラットを以下の 4 群に分けた。すなわち、T-2 0.1 mg/kg 群 (n=6)、T-2 0.5 mg/kg 群 (n=5)、T-2 0.5 mg/kg + アトロピン群 (n=5) および T-2 0.5 mg/kg + プロプラノロール群 (n=5) とした。アトロピン (副交感神経遮断薬) およびプロプラノロール (交感神経遮断薬) は、体内埋め込み用の浸透圧型ミニポンプを使用して持続的投与を行った。上記の 4 群では、対照溶液 (オリーブ油 0.2 ml) を皮下投与した後、3 日間の対照記録を取得した後に、アトロピンまたはプロプラノロール溶液が充填された浸透圧型ミニポンプ (model 2ML1, Alzet) をラットの腹腔内に埋入した。アトロピンおよびプロプラノロールは、上記のポンプからそれぞれ 20mg/kg/日、100 mg/kg/日の割合で持続的に投与されるように設定した。アトロピンの投与開始後 2 日目に T-2 トキシン (0.5 mg/kg) を皮下投与し、その後 3 日間にわたって心電図を連続記録した。なお、T-2 0.1 mg/kg 群、T-2 0.5 mg/kg 群では、3 日間の間隔で T-2 トキシンを 2 回投与した。

## II. ドプラー・心エコー図法による循環動態への影響評価

Wistar 系雄ラット (8 週齢、20 匹) を対照群 (N=5)、T-2 トキシン 0.02 mg/kg (N=5)、0.1 mg/kg (N=5)、0.5 mg/kg (N=5) の 4 群に分けた。T-2 トキシンまたは対照液の皮下投与後、48 時間目にカラードプラー心エコー法 (測定器 Vevo2100) による血行動態の観察を行った。観察項目は、左室駆出率、左室内径短縮率、心拍数、一回拍出量、心拍出量、左側大腿動脈・左側総頸動脈の血流速度、拍動係数、抵抗係数とした。

## III. 心筋細胞ミトコンドリア機能への影響評価

SD ラット新生子 (生後 2~3 日) の心臓より採取した心筋細胞の一次培養細胞を用いた。予めラットテールコラーゲンでコーティング

処理を行ったウェル (96 well) に  $0.5 \sim 8.0 \times 10^4$ /well の細胞数を播種し、予備試験で反応感度の良い最適な細胞数を求めた。予備試験の結果、最適細胞数を  $2.0 \times 10^4$ /well とし、48 時間および 72 時間培養後に T-2 トキシン  $6.0 \times 10^{-1} \sim 10^{-8} \mu\text{M}$  を 24 時間作用させた。培養条件は DMEM 培養液を使用して  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ -95% air とした。72 時間培養で約 80% の confluence に至った。この状態で心筋細胞はほぼ安定した拍動を示した。T-2 トキシンを 1ml DMSO (5 mg/ml) で希釈した後、DMEM を用いて最終濃度が  $6 \times 10^{-1} \sim 6 \times 10^{-7} \mu\text{M}$  (7 段階) になるように希釈した。対照液は希釈 DMSO (1%以下) とした。

心筋細胞の酸素消費量 (OCR、pMol/min) を細胞外フラックスアナライザー (Seahorse XF96) を用いて光学的に経時的に測定した。また、ミトコンドリアの電子伝達系へのストレステストをオリゴマイシン ( $3 \mu\text{M}$ ) と FCCP (カルボニルシアニド-p-トリフルオロメトキシフェニルヒドラゾン、 $1 \mu\text{M}$ ) を用いて行った。オリゴマイシンはミトコンドリアの ATP 合成酵素 (Complex V) を阻害することによって、結果的に酸素消費量を抑制し、FCCP は  $\text{H}^+$ イオノフォアの働きによって、Complex I~IVにおける電子伝達系の働きを活性化し、結果的に酸素消費量を増大させる作用があるとされる。

## IV. 酸化ストレス影響評価

ラットの総頸動脈より全血を採取して血清分離を行った後、酸化ストレス (総活性酸素活性) の指標である d-ROMs 値および抗酸化能指標である BAP 値を測定した。測定器はフリーラジカル測定装置 (Free、ウイスマー社) を用いた。

## C. 研究結果

### I. テレメトリー法による心拍数、不整脈、自律神経機能への影響評価 (平成 22-23 年度)

体内埋め込みテレメトリー装置を用いて自由行動下ラットの心電図を連続記録した。

T-2 トキシシ 0.1 mg/kg、0.5 mg/kg、1.0 mg/kg の成熟ラット (Wistar) 皮下投与で不整脈の発現が明瞭に認められた。また心拍数増加、自律神経活動の変化 (トータルパワーの低下など) も認められた (平成 22 年度)。また、自律神経遮断薬を用いた実験では、T-2 トキシシによる伝導障害性の不整脈はほとんど消失することが明らかになった (平成 23 年度)。T-2 トキシシによる心拍数変化および不整脈の発現性はデオキシニバレンールに比べてより低濃度で生じ、持続性も長かった。以下は T-2 トキシシの皮下投与による実験結果を述べる。

#### (1) 心拍数

0.1 mg/kg では、心拍数に有意な変化が認められなかったが、0.5 mg/kg では、1 回目の投与後の 3 日間において対照群にくらべて明期の心拍数の有意な増加が観察された。1.0 mg/kg では、投与後 24 時間以内の死亡個体が現れるため、測定が可能であった投与直後の明期の心拍数は対照群にくらべて明らかな増加が示された。

#### (2) 自律神経機能 (心拍変動解析)

交感神経と副交感神経の活動を示す LF パワーは、0.1 mg/kg および 0.5 mg/kg では、明期および暗期のいずれも有意な変化が認められなかったが、1.0 mg/kg では、投与後 1 日以内の明期において明らかな低下が示された。副交感神経活動を示す HF パワーは、LF パワーと同様に 0.1 mg/kg および 0.5 mg/kg では有意な変化が認められなかったが、1.0 mg/kg では、投与後 1 日以内の明期において明らかな低下が示された。

LF/HF 比 (自律神経バランス) は、いずれの投与量においても有意差が認められなかった。トータルパワーは、0.1 mg/kg では対照群との間に有意差が認められなかったが、0.5 mg/kg では、明期の値が第 1 回目および第 2 回目の投与のいずれにおいても有意な低下が示された。

#### (3) 不整脈

0.1 mg/kg および 0.5 mg/kg のいずれも最初の T-2 トキシシ投与後 6 時間以降に不整脈

が多く出現した。不整脈の種類は、房室ブロックがもっとも多く、そのほかに上室性期外収縮、洞性徐脈、心室期外収縮が観察された。不整脈の発現は 0.1 mg/kg では、投与後 2 日目にもっとも多く、3 日目にやや減少した。0.5 mg/kg では、投与後 1 日目から房室ブロックを中心にして多くの不整脈が出現し、2 日目、3 日目においても多くの不整脈が認められた。

#### (4) 刺激伝導系および心室興奮関連指標の変化

洞房結節から心筋に至る刺激伝導系の興奮伝導時間を示す PR 間隔、心筋全体の興奮時間 (脱分極時間) を示す QRS 持続時間および心筋の脱分極と再分極の合計時間を示す QT 間隔について、0.1 mg/kg、0.5 mg/kg、1.0 mg/kg のいずれの投与量においても明瞭な変化が観察されなかった。

#### (5) 自律神経遮断薬の効果

房室ブロックなどの不整脈を誘発することが明らかになっている 0.5 mg/kg を濃度として選んだ。心電図記録が可能なテレメトリー送信機をラット体内に埋め込んだ後、ラットの回復後対照液 (vehicle) を投与し、3 日後から体内埋め込み型ミニ浸透圧ポンプを用いて硫酸アトロピンを 20 mg/kg/日の割合で持続的投与を行い、その開始後 2 日目に T-2 トキシシを皮下投与した。T-2 トキシシの投与によって、房室ブロック、洞性徐脈、上室性不整脈、心室不整脈が発現したが、アトロピンの投与によって、房室ブロックおよび洞性徐脈の発現が明瞭に減少した。心室期外収縮はアトロピンでは消失せず、プロプラノロールによって消失した。T-2 トキシシの投与による心拍数の増加はプロプラノロールによって消失した。

## II. ドプラー・心エコー図法による循環動態への影響評価 (平成 24 年度)

ドプラー・心エコー法によって、T-2 トキシシ 0.02、0.1、0.5 mg/kg の皮下投与後 48 時間目の心機能、大腿動脈および総頸動脈の

血行動態を観察した。低用量の 0.02 mg/kg の投与で、総頸動脈の収縮期血流速度および心拍数の有意 ( $P<0.05$ ) な増大が、0.5 mg/kg で総頸動脈の平均血流速度の有意 ( $P<0.05$ ) な増大が認められたが、心拍出量、拍動係数、抵抗係数等に有意な変化は観察されなかった。

### Ⅲ. 心筋細胞ミトコンドリア機能への影響評価 (平成 23-24 年度)

T-2 トキシシン  $6 \times 10^{-1} \sim 6 \times 10^{-8} \mu\text{M}$  の培養心筋細胞に対する作用によって、酸素消費量 (ミトコンドリア電子伝達系機能) の濃度依存性の減少が認められた。 $6 \times 10^{-5} \mu\text{M}$  以上の濃度で有意な酸素消費量の減少が認められた。オリゴマイシンおよび FCCP に対する反応性 (ミトコンドリア・ストレステスト) に関する実験においても、 $6 \times 10^{-5} \mu\text{M}$  以上の濃度で有意な低下が観察された。本実験系は再現性が高いことが確認された。なお、デオキシニバレノールでも同様の影響が観察されたが、影響が現れる濃度は  $0.78 \mu\text{M}$  以上であり、ミトコンドリア影響の閾値としては約 13000 倍の差異があった。

### Ⅳ. 酸化ストレス影響評価 (平成 24 年度)

T-2 トキシシンの皮下投与後 48 時間目に測定した血清中の活性酸素活性 (d-ROMs; 平均  $\pm$ SD; 単位 U.CARR) は、対照群  $315.2 \pm 44.1$  に対して、0.02 mg/kg 群  $359.0 \pm 30.8$ 、0.1 mg/kg 群  $373.6 \pm 30.0$ 、0.5 mg/kg  $420.0 \pm 44.8$  であり、用量依存性に有意な相違 (ANOVA,  $P<0.005$ ) が示された。d-ROMs 値は T-2 トキシシンの投与量に対して用量依存性の増大 (相関係数  $r=0.891$ ) を示した。対照群との比較では、T-2 トキシシン 0.1 mg/kg 以上で対照群に対して有意な増大が認められた (0.1 mg/kg,  $P<0.05$ ; 0.5 mg/kg,  $P<0.01$ )。一方、抗酸化能 (BAP) は、T-2 トキシシンの投与群はいずれの投与量でも対照群との間で有意差を示さなかった。活性酸素に対する抗酸化能の比率 (BAP/d-ROMs) は、T-2 トキシシン投与群では 0.5 mg/kg の投与量でのみ対

照群に対して有意な増大 ( $P<0.05$ ) を示した。

## D. 考察

### I. テレメトリー法による心拍数、不整脈、自律神経機能への影響評価 (平成 22-23 年度)

T-2 トキシシン (トリコテセン系 A グループ) の生体影響として代表的なものは、嘔吐、免疫系細胞のアポトーシス、造血系組織の障害などである。一方、T-2 トキシシンには循環器影響も存在することも指摘されている。イヌの心筋乳頭細胞の活動電位への影響 (Feuerstein G, 1985)、ラットの血管傷害 (Wilson CA, 1982; Yarom R, 1987)、心筋細胞の拍動停止と細胞死 (Yarom R, 1986)、心電図異常と収縮力低下 (Yarom R, 1983) などの報告がある。これらの研究は高濃度 T-2 トキシシンの急性実験あるいは麻酔下での実験にもとづくものである。最近、同じトリコテセン系のマイコトキシシンであるデオキシニバレノール (トリコテセン系 B グループ) において、無麻酔、無拘束下のラットで催不整脈作用があることを研究代表者らが報告している。これらのことから、フザリウム毒素の循環器影響に関する系統的な研究を詳細に行う必要がある。

T-2 トキシシンは 0.1 mg/kg 以上の濃度で明らかな心機能の変化、すなわち心拍数の増加、QRS 持続時間の延長などの心電図変化、房室ブロック、心室期外収縮などの不整脈の発現が認められた。このことから、T-2 トキシシンは少なくとも 0.1 mg/kg の濃度で心臓障害をもたらすことが明らかとなった。第 2 度房室ブロックや洞性徐脈といった伝導障害は副交感神経遮断薬であるアトロピンによって大部分が消失し、またその他の不整脈の多くは交感神経遮断薬であるプロプラノロールによって消失したことから、T-2 トキシシン投与直後数日間の急性期における心機能異常の大部分は自律神経活動と関連して生じることが示唆された。しかしながら、これらの不整脈は自律神経活動の変化だけで誘発されるとは限らず、刺激伝導系や心筋細胞そのものが不整脈

を起こしやすくする不整脈基質が T-2 トキシンの作用によって形成されている可能性が否定できない。

## II. ドプラー・心エコー図法による循環動態への影響評価 (平成 24 年度)

ドプラー・心エコー検査は、心臓のポンプ機能、末梢血管血流、血管抵抗など心臓を中心にした循環動態を把握する上で有益な観察方法である。平成 22~23 年度の研究で T-2 トキシンは 0.1 mg/kg 以上の皮下投与で不整脈を発現させ、少なくとも 3 日間にわたって持続的に観察されたことから、本研究では、0.02 mg/kg、0.1 mg/kg、0.5 mg/kg の投与後 2 日目で検査を行った。最高用量の 0.5 mg/kg 投与においても心拍出量 (1 回拍出量×心拍数)、拍動係数、抵抗係数等に有意な変化は観察されなかったことから、投与後 2 日目では心臓血管系における循環動態は全体としては正常範囲に維持されているものと考えられた。

## III. 心筋細胞ミトコンドリア機能への影響評価

ラット一次培養心筋細胞を用いた基本酸素消費量の測定およびミトコンドリア・ストレステストを行った結果、 $6 \times 10^{-5} \mu\text{M}$  で有意なミトコンドリア機能低下が認められた。このようなミトコンドリア機能影響は、不整脈基質の形成など心機能に対して様々な影響を及ぼす可能性が推測される。なお、上記の閾値濃度は、デオキシニバレノールによる閾値の約 13000 倍低い濃度である。本実験はあくまでも、細胞に対する直接作用を *in vitro* の実験系で調べたものである。食品中のカビ毒は消化器内部で他の物質によって捕捉 (吸着)、分解を受け、一部が腸から吸収される。吸収されたカビ毒はさらに肝臓や血液中の酵素によって解毒、代謝を受けるため、実際に細胞に作用する有効量は非常に小さくなるものと思われる。

## IV. 酸化ストレス影響評価

T-2 トキシンは投与後 48 時間目の検査で血液中の活性酸素を有意に増大させることが明らかになった。T-2 トキシン投与群では用量依存性の活性酸素種の増加が認められ、有意差が認められたのは 0.5 mg/kg 以上の濃度であったものの、0.02 mg/kg の低用量においても増加傾向 (114 %) が示されたことから、T-2 トキシンは全身の酸化ストレスを増大させることが明らかである。活性酸素種は筋肉運動など生理的な刺激によっても増加するが、一般的には同時に抗酸化系酵素などの作用による抗酸化能も高まるため、相対的な酸化ストレス度はそれほど上昇しない。しかしながら、今回の実験では T-2 トキシンでは血液中の抗酸化能増大の傾向は認められなかった。T-2 トキシンの投与によるフリーラジカルの増加の機序は明らかではないが、本トキシンによる組織傷害が二次的にフリーラジカルの産生を高める可能性があるものと思われる。また、ミトコンドリア内でフリーラジカルが異常に増加した場合には電子伝達系機能を阻害し、アポトーシスなど様々な障害を引き起こす誘因となることも推測される。

## E. 結論

平成 22 年度から 3 年間にかけて T-2 トキシンによる循環機能影響を調べた結果、T-2 トキシンは免疫抑制、造血障害、嘔吐作用などのほかに、不整脈の誘発および自律神経機能に影響を及ぼすことが明らかになった。この知見は 1980 年代に断片的に報告されていた T-2 トキシンの循環器作用をより系統的な研究によってより詳細に明らかにしたものである。また、同様の影響がデオキシニバレノールにおいても認められたことから、循環器影響はフザリウム毒素の代表であるトリコセセン類に共通した性質である可能性が考えられる。T-2 トキシンおよびデオキシニバレノールの循環器影響の機序の一部として、ミトコンドリアの電子伝達系阻害作用が関わっている可能性が高いと考えられる。

## 参考文献

- 1) Bubien, J.K. and Woods W. T. Jr.(1987): Direct and reflex cardiovascular effects of trichothecene mycotoxins. *Toxicol.* 25(3): 325-331.
  - 2) Fang, H., Wu, Y., Guo, J., Rong, J., Ma, L., Zhao, Z., Zuo, D., Peng, S. (2012): T-2 toxin induces apoptosis in differentiated murine embryonic stem cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. *Apoptosis*. 17, 895-907.
  - 3) Feuerstein, G. et al. (1985): Cardiorespiratory, sympathetic and biochemical responses to T-2 toxin in the guinea pig and rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 232(3): 786-794.
  - 4) Koshinsky, H., Honour, S., Khachatourians, G., (1988): T-2 toxin inhibits mitochondrial function in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151, 809-814.
  - 5) Ma, Y., Zhang, A., Shi, Z., He, C., Ding, J., Wang, X., Ma, J. Zhang, H.(2012): A mitochondria-mediated apoptotic pathway induced by deoxynivalenol in human colon cancer cells. *Toxicol. in Vitro*. 26, 414-420.
  - 6) Magnuson, B. A. et al. (1987): Cardiovascular effects of mycotoxin T-2 after topical application in rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65, 799-802.
  - 7) Pace, J.G. (1983): Effect of T-2 Mycotoxin on rat liver mitochondria electron transport system. *Toxicol.* 21, 675-680.
  - 8) Wilson, C. A. et al. (1982): Blood pressure changes and cardiovascular lesions found in rats given T-2 toxin, a trichothecene secondary metabolite of certain *Fusarium microfungi*. *Toxicol Lett.* 10(1):35-40.
  - 9) Yarom, R. et al. (1983): T-2 toxin effect on isolated perfused rat hearts. *Basic Res Cardiol.* 78(6):623-630.
  - 10) Yarom, R. et al. (1986): T-2 toxin effect on cultured myocardial cells. *Toxicol Lett.* 31(1):1-8.
  - 11) Yarom, R. et al. (1987): T-2 toxin effect on rat aorta: cellular changes *in vivo* and growth of smooth muscle cells *in vitro*. *Exp Mol Pathol.* 47(2):143-153.
- F. 健康危険情報  
なし。
- G. 研究業績  
【学会発表】
- 1) スチトラ・ガンポンサ (Suchitra Ngampongsa)、伊藤公一、桑原正貴、局 博一: T-2 トキシンの心機能作用における自律神経遮断薬の効果. 日本マイコトシン学会第70回学術講演会 (2012年1月6日、於船堀)
  - 2) 局 博一、スチトラ・ガンポンサ (Suchitra Ngampongsa)、伊藤公一、桑原正貴: T-2 トキシンのラット心筋細胞の呼吸機能に及ぼす影響. 日本マイコトシン学会第70回学術講演会 (2012年1月6日、於船堀) .
  - 3) 局 博一、Suchitra Ngampongsa、伊藤公一、桑原正貴、安東賢太郎、山本有希子、水流功春: カビ毒 T-2 トキシンの心電図、自律神経機能および心筋細胞呼吸機能の変化に関する研究 (第29回日本心電学会学術集会、千葉市、2012. 10. 12-13)
- 【論文発表】
- 1) Suchitra NGAMPONGSA, Koichi ITO, Masayoshi KUWAHARA, Susumu KUMAGAI, Hirokazu TSUBONE : Arrhythmias and alterations in autonomic nervous function induced by deoxynivalenol (DON) in unrestrained rats. *J. Toxicol. Sci.*, 2011.
  - 2) Ngampongsa S, Ito K, Kuwahara M, Ando K, Tsubone H. : Reevaluation of arrhythmias and alterations of the autonomic nervous activity induced by T-2 toxin through telemetric

measurements in unrestrained rats. Toxicol  
Mech Methods. 22(9):662-673, 2012.

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



厚生労働科学研究費補助金  
(食品の安全確保推進研究事業)

分担研究報告書

シトリンの Maus 臓器および全身影響に関する研究

分担研究者 渋谷 淳 東京農工大学農学研究院動物生命科学部門 教授

研究要旨

本研究は、ペニシリウム属毒素のシトリン (Citrinin: CTN) について、実験動物に対する毒性プロファイルを明らかにすることを目的として実施した。平成 22 年度は、雌 BALB/c マウスを用いた CTN の飲水投与実験 (0、1.25、7.5 ppm) を 70 日間実施した。その結果、子宮粘膜の組織学的変化として、1.25 ppm 以上で発情期の子宮内膜組織像を示す個体が多い傾向が認められ、卵巣相対重量が 7.5 ppm で有意に増加した。腎臓では、尿細管上皮での細胞増殖活性の亢進が 1.25 ppm 以上で見出され、極低用量の CTN による卵巣毒性と腎臓がんの誘発の可能性が示唆された。23 年度は、腎尿細管と卵巣の微弱な変化をより明らかにする目的で、用量を 22 年度の高用量である 7.5 ppm の 2-4 倍として、雌 BALB/c マウスを用いた CTN の飲水投与実験 (0、15、30 ppm) を 90 日間実施した。その結果、腎臓に明らかな変化は認められなかったが、30 ppm で膈と子宮内粘膜の発情後期の組織像を示す個体が多い傾向が認められ、15 ppm 以上で大型卵胞数と卵巣重量 (絶対値及び相対値) の増加が認められた。以上の結果より、大型卵胞の増加と卵巣重量の変化を CTN の影響と判断し、LOAEL が 15 ppm (2.25 mg/kg body weight/day) となった。24 年度は 23 年度で求めた LOAEL である 15 ppm を高用量とし、雌 BALB/c マウスを用いた CTN の飲水投与実験 (0、1.6、5、15 ppm) を 90 日間実施した。その結果、肝臓重量 (絶対値及び相対値) が 1.6 ppm 以上で低値を示したものの、有意な組織変化を伴わなかった。更に卵巣重量の変動及び膈、子宮内粘膜、卵巣の組織学的変化は認められなかった。以上の結果より平成 23 年度に認められた卵巣変化 (大型卵胞の増加と卵巣重量増加) は再現されず、生殖器系に対する影響はあったとしても軽微である可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年、カビ毒を対象に国際的成分規格を設定する動きが活発化している。我が国は輸入大国であることから、食の安全を確保するためには、食品の成分規格に対する国際的動向に対応できる体制が必要である。また国際的には問題とならないカビ毒でも、わが国の風土や食習慣に関わるカビ毒などは、重大な危害物質となりうる。本研究は、米汚染が危

惧されているペニシリウム属毒素のシトリン (Citrinin: CTN) について、実験動物に対する毒性プロファイルを明らかにすることを目的とした。CTN には様々な染色体異常が報告されており、ヒトリンパ球を用いた試験では小核出現率の増加 (Dnmez-Altuntas et al. 2007)、HEK293 細胞株では数的染色体異常 (Chang et al. 2011) が報告されている。またマウスに CTN 112

mg/kgを単回経口投与した急性毒性試験では腎尿細管毒性 (Jordon et al. 1977) が、雄性F344ラットに0.1%CTNを最大80週間混餌投与した試験においては、40週以上生存したラットの72.9%で腎腺腫の発現が報告されている (Arai et al. 1983)。更にCTNには雌性生殖器への影響も報告されており、マウスに5  $\mu$ M CTNを4日間飲水投与した実験では卵母細胞の成熟遅延 (Chan et al. 2008) が、*ex vivo*でのマウス胚盤胞を用いた実験では15及び30  $\mu$ M CTNによりアポトーシスの増加、また着床率の抑制を示すなど発生毒性も報告されている。しかしながら、発がん性に関しては非常に高濃度の反応であり、その他、精製されたCTNによる*in vivo*毒性に関する報告は乏しい。よって、本研究ではCTNの雌性生殖器を含む*in vivo*毒性を明らかにする目的で、雌性BALB/cマウスを用いた反復投与試験を実施した。

## B. 研究方法

平成22年度は4週齢の雌BALB/cマウス (日本エスエルシー)を1週間の馴化期間後、一群を15匹ずつとして計3群に群分けし、CTNを0、1.25、7.5 ppm (0、5、30  $\mu$ M)の用量で70日間飲水投与した。CTNの投与用量に関しては、マウス飲水投与の実験において、5  $\mu$ Mで卵母細胞の成熟遅延 (*in vivo*, Chan et al. 2008)、また胚盤胞を用いた実験において、15~30  $\mu$ Mで発生毒性 (*ex vivo*, Chan et al. 2007) が認められたため、低用量群を1.25 ppm (5  $\mu$ M)、高用量群を7.5 ppm (30  $\mu$ M)と設定した。投与期間中、一般状態を3~4日に1回観察し、週に一度の割合で体重及び摂餌量、3~4日に一度、CTNの交換および摂水量の測定を行った。動物は全て、投与期間終了時にエーテル麻酔下で放血を

行い、放血後に屠殺した。得られた血液について血清分離を行い、株式会社エスアールエルに依頼して血清中IgG及びIgA濃度の測定を行い、株式会社三菱化学メディエンスに依頼して血液生化学検査を行った。なお、分離血清は、測定時まで-80°Cにて保存した。解剖時には、腎臓、肝臓、卵巣及び子宮を摘出し、腎臓および肝臓の重量を測定後、腎臓、肝臓、卵巣及び子宮を10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。卵巣及び子宮は固定後重量測定を行った。固定標本は、定法に従って、パラフィン包埋後薄切、ヘマトキシリンエオジン染色を行った。また、腎臓および卵巣に関しては、proliferation cell nuclear antigen (PCNA) 染色を行った。PCNA染色では、mouse-on-mouse immunodetection kit (Vector Laboratories Burlingame, CA, USA)を用い、一次抗体としてPCNA (mouse monoclonal antibody, clone PC10, 1:800 dilution; Dako, Glostrup, Denmark)、発色には3,3'-diaminobenzidine (DAB)を用いた。賦活化はマイクロウェーブ (97°C、15分)で行った。卵巣におけるPCNA染色切片を用いて、原始卵胞、一次卵胞、二次卵胞、黄体及び閉鎖卵胞の数をカウントし、卵巣全体の面積あたりの数を算出した。

腎臓におけるPCNA染色切片を用いて、近位尿細管における陽性細胞数は、各個体100倍視野で左右腎臓につき、それぞれランダムに皮質で2か所及び髓質1か所、計6か所観察し、陽性細胞/尿細管上皮細胞をカウントした。

平成23年度は4週齢の雌BALB/cマウス (日本エスエルシー)を1週間の馴化期間後、一群を15匹ずつとして計3群に分け、CTNを0、15、30 ppm (0、60、120  $\mu$ M)の用量で90日間飲水投与した。投与期間中、一般状態を3~4日に1回観察し、週に一度の割

合で体重及び摂餌量、3～4日に一度、CTNの交換および摂水量の測定を行った。また、4週に一度の割合で尿試験紙(ウロペーパーⅢ/栄研化学株式会社)を用いて尿検査を行った。動物は全て、投与期間終了時にエーテル麻酔下で放血を行い、放血後に屠殺した。得られた血液について血清分離を行い、株式会社三菱化学メディエンスに依頼して血液生化学検査を行った。なお、分離血清は、測定時まで-80℃にて保存した。解剖時には、腎臓、肝臓、卵巣、子宮、膈、脾臓、胸腺、心臓、肺、膵臓、消化管、脳、下垂体、副腎、大動脈、三叉神経、骨格筋、骨、腸間膜リンパ節、食道、気管及び甲状腺を摘出し、腎臓、肝臓、脾臓、胸腺、心臓、肺及び脳の重量を測定後、10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。卵巣及び子宮は固定後重量測定を行った。固定標本は、定法に従って、パラフィン包埋後薄切、ヘマトキシリンエオジン染色を行った。また、腎臓、肝臓および卵巣に関しては、PCNA染色を行った。PCNA染色の方法は22年度に準じた。卵巣におけるPCNA染色切片を用いて、小型卵胞、中型卵胞、大型卵胞、黄体及び閉鎖卵胞の数をカウントし、卵巣全体の面積あたりの数を算出した。腎臓におけるPCNA染色切片を用いて、尿細管における陽性細胞数を、各個体200倍視野で左右腎臓につき、それぞれランダムに皮質～髄質外帯で片側5か所、計10か所観察し、陽性細胞数/尿細管上皮細胞数をカウントした。肝臓におけるPCNA染色切片を用いて、陽性細胞数を、各個体100倍視野で計5か所観察し、陽性細胞数/肝細胞数をカウントした。

平成24年度は4週齢の雌BALB/cマウス(日本エスエルシー)を1週間の馴化期間後、一群を15匹ずつとして計4群に分け、CTNを0、1.6、5、15ppmの用量で90日間飲水投与した。実験方法、解析方法は23年度に

準じた。

統計学的解析は、体重、臓器重量、血液生化学検査値(Creatinine、BUN、ALP、AST、ALT、Albumin、TP)、血清IgG・IgA濃度、腎/肝PCNAカウント値について、各群の分散をBartlettの方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、不等分散の場合はKruskal-Wallisの方法により検定を行った。尿検査の値(カテゴリカルデータ)について、Mann-Whitney's *U*-testにより対照群とCTN各投与群で比較した。病理組織学的変化の発生頻度はFisherの直接確率法により対照群とCTN各投与群で比較した。

#### (倫理面への配慮)

すべての投与実験は飲水投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、平成22、23年度は動物は全てエーテル深麻酔下で、24年度はCO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>麻酔下で後大静脈からの放血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物飼育、管理にあつては、国立大学法人 東京農工大学の実験取扱い倫理規定に従った。

### C. 研究結果

体重、飲水量、摂餌量：

平成22年度は1.25、7.5ppm群のいずれも無処置対照群に比べて、体重、飲水量および摂餌量に有意な変化は認められなかった(Fig. 1、Table 1)。平成23年度は30ppm群において、投与1、2週間で、体重が対照群に比べて有意な低値を示した(Fig. 2)。飲水量は、15ppm群で投与5週目に有意な低値を示した。摂餌量は投与期間を通じて明らかな変化を示さなかった(Fig. 2、Table 2)。平成24年度はCTN投与群において、投与期間を通じて体重は明らかな変化を示さなかった(Fig. 3、Table 3)。飲水量は、5、15ppm

群で投与8、10週目、および5 ppm群で12週目に有意な低値を示した (Fig. 3)。摂餌量は5 ppm群で投与8、12週目に有意な低値を示した (Fig. 3)。

#### 尿検査値：

平成23年度の尿蛋白、潜血検査では、CTN投与群で無処置対照群に比べて差がなかった (Table 4)。尿pH値は投与8週目において、15 ppm群で有意な高値を示した (Table 4)。平成24年度の尿蛋白、尿pH、尿潜血検査では、CTN投与群で無処置対照群に比べて差がなかった (Table 5)。

#### 臓器重量：

平成22年度において腎臓、肝臓及び子宮の重量は、1.25及び7.5 ppm群のいずれも無処置対照群に比べて差が認められなかった (Table 6)。一方、7.5 ppm群では、卵巢相対重量の有意な増加が認められた。平成23年度において卵巢重量 (絶対値及び相対値) が15、30 ppm群で用量に関連して有意に増加した (Table 7)。また、肝相対重量が15 ppm群で有意に減少した (Table 7)。その他の臓器については、CTN投与群で無処置対照群に比べて明らかな変化を示さなかった。平成24年度において肝臓重量 (絶対値及び相対値) が1.6 ppm以上で有意に減少した (Table 8)。卵巢を含むその他の臓器については、CTN投与群で無処置対照群に比べて明らかな変化を示さなかった。

#### 血液生化学検査および免疫グロブリン値測定：

平成22年度はCreatinine、BUN、AST、ALP、ALT、TP、albuminのいずれの値もCTN投与群と無処置対照群との間に差が認められなかった (Table 9)。また、免疫グロブリン (IgG、

IgA) についても全ての群間で有意差のある変化が認められなかった。平成23年度は検査項目のうち、BUN及びALTは用量に依存しないものの、30 ppm群で有意に減少ないし増加した (Table 10)。Creatinine、AST、ALP、TP及びalbuminはCTN投与群と無処置対照群との間に差がなかった。平成24年度は検査項目のうち、BUNが1.6 ppm投与群で有意に増加し、ALTが5 ppm群で有意に減少した (Table 11)。Creatinine、AST、ALP、TP及びalbuminはCTN投与群と無処置対照群との間に差がなかった。

#### 病理組織変化および免疫組織学的変化：

平成22年度は病理組織学的変化として、CTN投与群で、肝臓に肝細胞の単細胞壊死を伴う微小肉芽腫が認められた。また、CTN投与群で、肝臓における胆管周囲の炎症細胞浸潤の増加傾向が認められた。その他、腎臓における再生尿細管、尿細管上皮の空胞化、水腎症が認められたが、CTN投与に関連した変化ではなかった (Table 12)。子宮粘膜の変化として、発情期の組織像を示す個体が多い傾向が認められた (Table 12)。しかし、一次卵胞、二次卵胞、黄体、閉鎖卵胞数をカウントしたところ、群間で明らかな違いは認められなかった (Table 13)。腎臓では、尿細管等に明らかな病理変化は認められなかったが、PCNA染色の結果、尿細管上皮の陽性細胞率が1.25及び7.5 ppm群で用量依存的に有意に増加した (Table 13)。平成23年度はCTN投与群で腎臓における限局性の再生尿細管の増加傾向が認められたが、無処置対照群との差は認められなかった。肝臓に肝細胞の単細胞壊死、及び胸腺に好酸球の浸潤が各1例に認められた。その他、肝臓における胆管周囲の炎症細胞浸潤、肝臓における微小肉芽腫、限局性単核細胞浸潤、限局性肝細

胞凝固壊死、心臓における外膜への鉍質沈着、脾臓における色素沈着を伴う肉芽腫、胃における粘膜下の炎症細胞浸潤、小腸における粘膜上皮の限局性過形成が認められたが、CTN投与に関連した変化ではなかった (Table 14)。子宮粘膜の変化として、30 ppm 群で発情後期の組織像を示す個体が多い傾向が認められたが、卵巣、子宮、膣の形態で正常性周期を逸脱するものは認められなかった (Table 14)。一方、卵巣において小型卵胞、中型卵胞、大型卵胞、新世代黄体、旧世代黄体、閉鎖卵胞数をカウントしたところ、15 ppm 以上で用量依存的に大型卵胞数が増加した (Table 15)。腎臓では、PCNA 染色の結果、尿細管上皮の陽性細胞率に明らかな違いは認められなかった (Table 15)。更に肝臓においても、肝細胞の PCNA 染色陽性率の明らかな違いは認められなかった (Table 15)。平成 24 年度では肝臓における胆管周囲の炎症細胞浸潤、肝臓における微小肉芽腫、限局性単核細胞浸潤、限局性肝細胞凝固壊死、腎臓における限局性の再生尿細管、心臓における外膜への鉍質沈着、胃、小腸、膀胱における粘膜下への好中球やリンパ球浸潤が認められたが、CTN 投与に関連した変化ではなかった (Table 16)。子宮、膣の組織像で正常性周期を逸脱するものは認められなかった (Table 16)。また、卵巣において小型卵胞、中型卵胞、大型卵胞、新世代黄体、旧世代黄体、閉鎖卵胞数をカウントしたところ、対照群との違いは認められなかった (Table 17)。腎臓では、PCNA 染色の結果、尿細管上皮の陽性細胞率に明らかな違いは認められなかった (Table 17)。肝臓において、肝細胞の PCNA 染色陽性率が 5 ppm 群で有意に増加していた (Table 17)。

#### D. 考察

平成 22 年度の研究において BALB/c マウスを用いた CTN の飲水投与実験 (0、1.25、7.5 ppm) を 70 日間実施したところ、1.25 ppm 以上で、卵巣において卵胞数や黄体数の変化を伴わないものの、発情期を示す個体が多く認められた。また 7.5 ppm 投与群において、卵巣相対重量の増加が認められた。Chan ら (2008) により、21 日齢の ICR マウスを用いた飲水投与の実験で、卵成熟が遅延することが報告されている。また、同グループの胚盤胞を用いた実験では (2007)、15 及び 30  $\mu$ M CTN によりアポトーシスが増加し、また胚着床後の吸収率の増加や胎児の体重減少を示すなど発生毒性も報告されている。これらのことから、なんらかの生殖器影響が示唆され、今後投与量ないし、投与期間を変更した再試験が必要と考えられた。また、免疫組織学的検査においては、腎臓の PCNA 染色により、用量依存的に皮質から髓質にかけて腎尿管上皮の陽性細胞数が増加し、増殖活性の軽度増加が認められた。CTN には様々な染色体異常が報告されており、ヒトリンパ球を用いた試験では小核出現率の増加

(Dnmez-Altuntas et al. 2007)、HEK293 細胞株では数的染色体異常 (Chang et al. 2011) が報告されている。更に雄性 F344 ラットに 0.1%CTN を最大 80 週間混餌投与した試験においては、40 週以上生存したラットの 72.9% で腎腺腫の発現が報告されている (Arai et al. 1983)。また培養細胞を用いた実験では活性酸素種を発生させることで細胞をアポトーシスへ導くこと (Chang et al. 2007)、またスーパーオキシドアニオンを形成し、抗酸化酵素を阻害することで酸化ストレスを引き起こすこと (Ribeiro et al. 1997) が報告されている。これらのことから CTN が何らかの尿細管毒性を示す可能性が示唆され

た。また 22 年度においては、明らかな病理変化は認めなかったものの、1.25 ppm 以上で腎臓尿細管上皮の増殖活性の増加が認められたことから、なんらかの受容体を介した細胞増殖シグナルの活性化が示唆され、より高用量域での再現性の検討を行う必要が示唆された。

よって、平成 23 年度の実験では用量を 22 年度の高用量である 7.5 ppm の 2-4 倍に設定し、BALB/c マウスに CTN 0、15、30 ppm を飲水にて 90 日間投与した。その結果、腎臓における PCNA 陽性細胞数の明らかな変動は認められなかった。また CTN 投与群で再生尿細管の増加傾向がみられたが、無処置対照群と比較して有意な差は認められなかった。生殖器においては、30 ppm 群で、発情後期を示す個体が多く認められた。また 15 ppm 以上で、卵巣重量（絶対値及び相対値）の増加と大型卵胞数の増加が認められた。卵巣中の黄体数に関しては明らかな違いは認められなかった。よって大型卵胞数の増加が卵巣重量増加に寄与している可能性が考えられた。Chan ら（2008）により、21 日齢の ICR マウスを用いた CTN の飲水投与実験で、卵成熟の減少することが報告されており、同グループの胚細胞を用いた実験では（2007）、15  $\mu$ M 及び 30  $\mu$ M CTN によりアポトーシスが増加し、また胚着床後の吸収率の増加や胎児の体重減少を示すなど発生毒性も報告されている。これらのことから、22 年度の投与実験と同様に生殖器影響が示唆された。

平成 24 年度は 23 年度で求めた LOAEL である 15 ppm を高用量とし、BALB/c マウスに CTN 0、1.6、5、15 ppm を飲水にて 90 日間投与した。5、15 ppm 群において投与 8、10 週目、及び CTN 5 ppm 群において投与 12 週目で、飲水量の低値が認められた。これに関しては忌避による飲水量低下と考えられたが体重

に差が認められなかったことから毒性学的な意義は低いと考えられた。肝臓重量（絶対値及び相対値）が 1.6 ppm 以上で低値を示した。また肝細胞の PCNA 染色陽性率が 5 ppm 群で軽度増加していた。肝臓では微小肉芽腫、門脈への炎症細胞浸潤、限局性単核細胞浸潤、限局性凝固壊死などの自然発生性変化が散見されたが、それらの発生率に無処置対照群との間に差は認められず、CTN の影響とは判断できなかった。23 年度の投与実験において、15 ppm 以上の CTN 投与群で卵巣重量（絶対値及び相対値）の増加が認められたが、24 年度の投与実験では 15 ppm を含む全投与群において明らかな変動は認めなかった。病理組織学的検査においても、各種卵胞や黄体数は無処置対照群との差は認められず、膈および子宮内粘膜の変化として、発情周期における偏りも認められなかった。よって、CTN 1.6~15 ppm 濃度での飲水投与による生殖器系に対する影響はあったとしても軽微である可能性が示唆され、その他の臓器への影響はないものと判断された。

## E. 結論

平成 22 年度の研究において 7.5 ppm 投与群で卵巣相対重量の増加及び 1.25 ppm 以上で発情期を示す個体の増加傾向が認められ、1.25 ppm 以上で腎臓尿細管上皮での増殖活性の軽度増加が認められたことから極低用量の CTN による卵巣毒性と腎臓がん誘発の可能性が考えられた。よって、卵巣毒性と腎臓毒性を明らかにするため、23 年度はより高用量の CTN 投与群を設定し、より長期間（90 日間）飲水投与実験を実施した。その結果、腎臓に CTN の明らかな影響は認められなかったが、15 ppm、30 ppm 以上で卵巣変化（大型卵胞の増加と卵巣重量の増加）が認められ

たことから、LOAELが15 ppm(2.25 mg/kg body weight/day)となった。24年度はNOAELを決定するため23年度で求めたLOAELである15 ppmを高用量とし、CTNの飲水投与実験を23年と同期間実施した。その結果、全身臓器にCTNの影響と考えられる明らかな変化は認められず、23年度に確認された15及び30 ppm群での卵巣変化も再現されなかったため、BALB/cマウスを用いたCTN 1.6~15 ppm濃度の90日間飲水投与では生殖器系に対する影響はあったとしても軽微である可能性が示唆された。

#### 参考文献

- 1) Arai M., Hibino T.: Tumorigenicity of citrinin in male F344 rats. *Cancer Lett.* 17:281-287 (1983)
- 2) Chang C.H., Yu F.Y., Wu T.S., Wang L.T., Liu B.H.: Mycotoxin citrinin induced cell cycle G2/M arrest and numerical chromosomal aberration associated with disruption of microtubule formation in human cells. *Toxicol. Sci.* 119:84-92 (2011)
- 3) Chan W.H.: Effects of citrinin on maturation of mouse oocytes, fertilization, and fetal development in vitro and in vivo. *Toxicology Lett.* 180:28-32 (2008)
- 4) Chan W.H., Shiao N.H.: Effect of citrinin on mouse embryonic development in vitro and in vivo. *Reprod. Toxicol.* 24:120-125 (2007)
- 5) Chan W.H.: Citrinin induces apoptosis via a mitochondria-dependent pathway and inhibition of survival signals in embryonic stem cells, and causes developmental injury in blastocysts. *Biochem. J.* 404:317-326 (2007)
- 6) Dönmez-Altuntas H., Dumlupinar G., Imamoglu N., Hamurcu Z., Liman B.C.: Effects of the mycotoxin citrinin on

micronucleus formation in a cytokinesis-block genotoxicity assay in cultured human lymphocytes. *J. Appl. Toxicol.* 27:337-341 (2007)

- 7) Jordan, W.H., Carlton, W.W. and Sansing, G.A.: Citrinin mycotoxicosis in the mouse. *Food Cosmet. Toxicol.* 15: 29-34 (1977)
- 8) Ribeiro S.M., Chagas G.M., Campello A.P., Klüppel M.L.: Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. V. Effect on the homeostasis of the reactive oxygen species. *Cell Biochem. Funct.* 15:203-209 (1997)

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Hayashi H., Itahashi M., Taniai E., Yafune A., Sugita-Konishi Y., Mitsumori K., Shibutani M.: Induction of ovarian toxicity in a subchronic oral toxicity study of citrinin in female BALB/c mice. *J. Toxicol. Sci.* 37:1177-1190 (2012)

##### 2. 学会発表

- 1) 板橋 恵、林 仁美、谷合枝里子、盛田怜子、赤根弘敏、鈴木和彦、小西良子、三森国敏、渋谷 淳: シトリニンの雌BALB/cマウスを用いた90日間反復投与試験. 第39回日本毒性学会学術集会, 仙台, 第39回日本毒性学会学術集会講演要旨集: P-40, p. S176, 7月17-19日, 2012

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

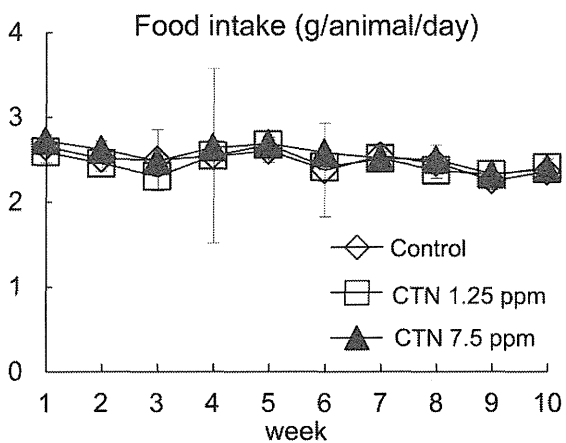
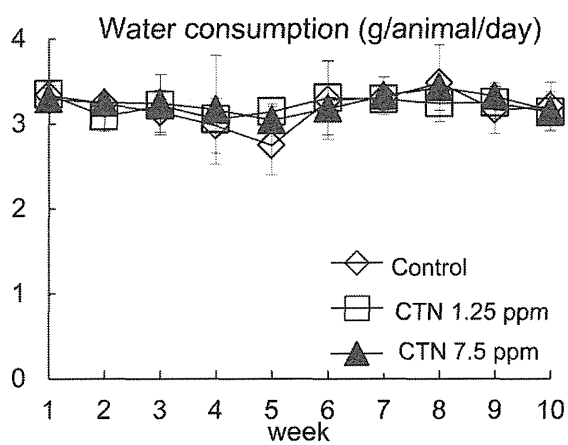
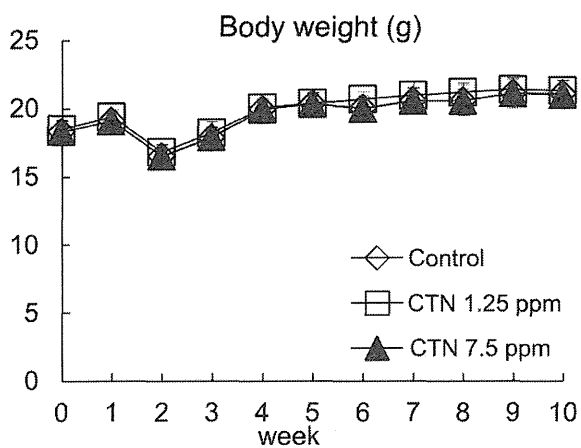


Fig. 1

**Fig. 1. Body weight, water consumption and food intake of female BALB/c mice given CTN in the drinking water for 70 days in 2010. Abbreviation: CTN, citrinin.**



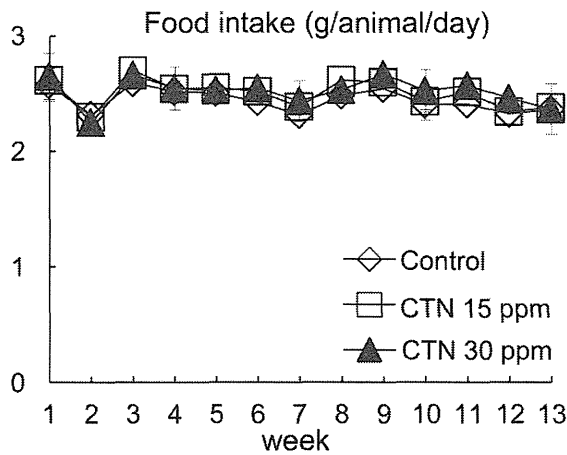
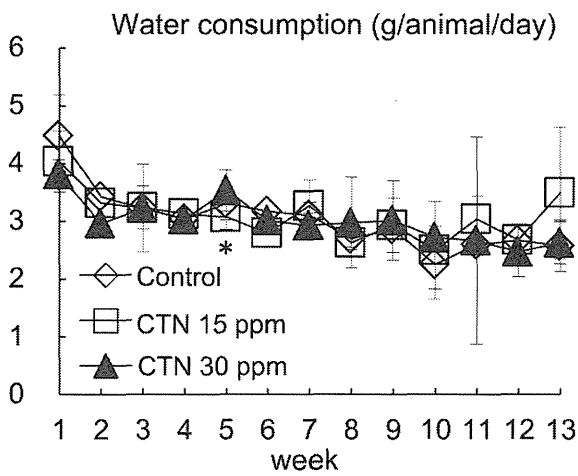
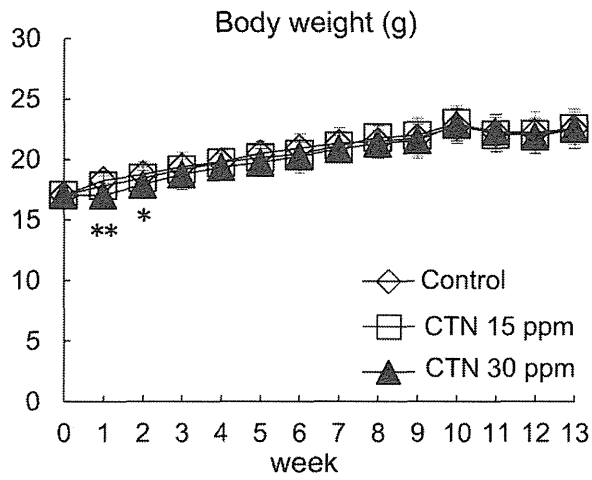
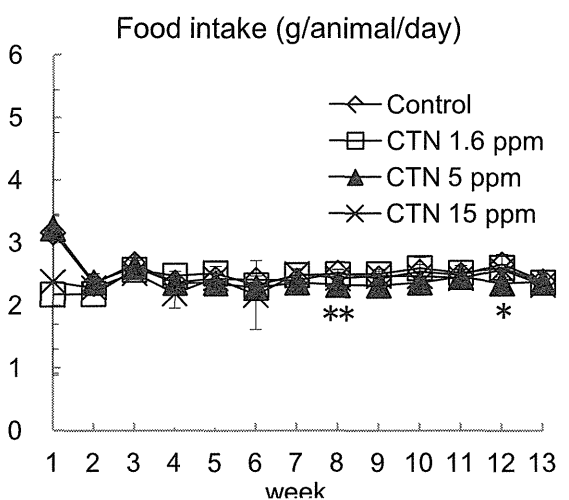
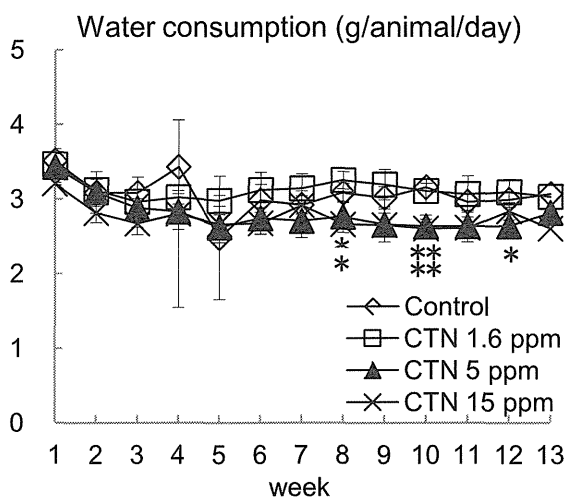
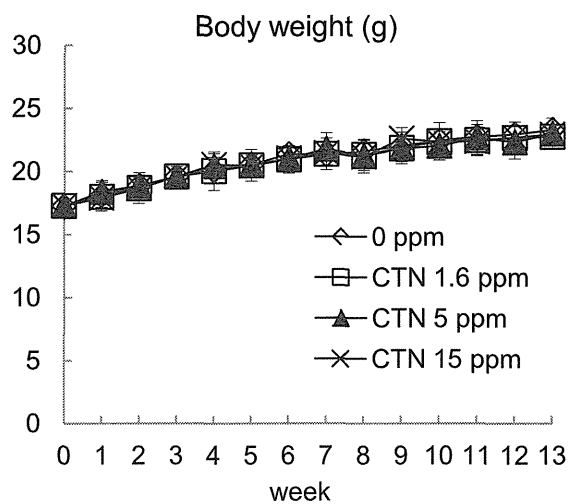


Fig. 2

Fig. 2. Body weight, water consumption and food intake of female BALB/c mice given CTN in the drinking water for 90 days in 2011. \*, \*\* Significantly different from the untreated controls ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ , Dunnett's multiple test or Steel's test). Abbreviation: CTN, citrinin.



**Figure 3. Body weight, water consumption and food intake of BALB/c mice given CTN in the drinking water for 90 days in 2012.**

\*,\*\*Significantly different from the untreated controls ( $P < 0.01, P < 0.05$ , Dunnett's multiple test or Steel's test). Abbreviation: CTN, citrinin.

Table 1. Final body weights, food intake, water consumption and CTN intake of BALB/c mice given CTN in the drinking water for 70 days in 2010.

	CTN (ppm)		
	0 (Control)	1.25	7.5
No. of animals	15	15	15
Final body weight (g)	21.33 ± 0.95 <sup>c</sup>	21.07 ± 0.75	21.31 ± 0.82
Food intake (g/animal/day) <sup>a</sup>	2.48 ± 0.12	2.46 ± 0.12	2.54 ± 0.13
Water consumption (g/animal/day) <sup>b</sup>	3.20 ± 0.24	3.21 ± 0.16	3.24 ± 0.17
CTN intake (mg/kg body weight/day)	0	0.20 ± 0.01	1.23 ± 0.11

<sup>a, b</sup> Mean value of each week. <sup>c</sup> Mean±SD. Abbreviation: CTN, citrinin.

Table 2. Final body weights, food intake, water consumption and CTN intake of BALB/c mice given CTN in the drinking water for 90 days in 2011.

	CTN (ppm)		
	0 (Control)	15	30
No. of animals	15	15	15
Final body weight (g)	22.56 ± 1.67 <sup>c</sup>	22.62 ± 1.32	22.47 ± 1.56
Food intake (g/animal/day) <sup>a</sup>	2.44 ± 0.10	2.50 ± 0.10	2.52 ± 0.12
Water consumption (g/animal/day) <sup>b</sup>	3.03 ± 0.55	3.09 ± 0.41	3.00 ± 0.37
CTN intake (mg/kg body weight/day)	0	2.25 ± 0.46	4.47 ± 0.94

<sup>a, b</sup> Mean value of each week. <sup>c</sup> Mean±SD. Abbreviation: CTN, citrinin.

Table 3. Final body weights, food intake, water consumption and CTN intake of BALB/c mice given CTN in the drinking water for 90 days in 2012.

	CTN (ppm)			
	0 (Control)	1.6	5	15
No. of animals	15	15	15	15
Final body weight (g)	23.29 ± 1.17 <sup>c</sup>	22.74 ± 1.28	23.01 ± 1.22	22.92 ± 0.96
Food intake (g/animal/day) <sup>a</sup>	2.52 ± 0.22	2.45 ± 0.14	2.44 ± 0.25	2.40 ± 0.12
Water consumption (g/animal/day) <sup>b</sup>	3.06 ± 0.24	3.12 ± 0.13	2.80 ± 0.23	2.75 ± 0.17
CTN intake (mg/kg body weight/day)	0	0.23 ± 0.03	0.67 ± 0.10	1.98 ± 0.26

<sup>a, b</sup> Mean value of each week. <sup>c</sup> Mean±SD. Abbreviation: CTN, citrinin.

Table 4. Urinalysis of BALB/c mice given CTN in the drinking water for 90 days in 2011.

	Time point (week)	Criteria	CTN (ppm)		
			0 (Control)	15	30
Urinary protein	4	No. of animals	14 <sup>a</sup>	12 <sup>a</sup>	15
		-	0	0	0
		±	1	0	0
		+	11	9	15
		++	2	3	0
	+++	0	0	0	
	8	No. of animals	15	15	15
		-	0	0	0
		±	0	0	0
		+	15	13	15
		++	0	2	0
	+++	0	0	0	
	12	No. of animals	12 <sup>a</sup>	13 <sup>a</sup>	14 <sup>a</sup>
		-	0	0	0
		±	0	0	0
+		12	12	13	
++		0	0	0	
+++	0	1	1		
pH	4	No. of animals	13 <sup>a</sup>	12 <sup>a</sup>	15
		6	9	5	12
		6.5	0	3	0
		7	4	2	0
		8	0	2	3
	9	0	0	0	
	8	No. of animals	15	13 <sup>a</sup> *	15
		6	11	3	7
		6.5	0	0	0
		7	3	10	5
		8	1	0	3
	9	0	0	0	
	12	No. of animals	12 <sup>a</sup>	13 <sup>a</sup>	14 <sup>a</sup>
		6	6	5	6
		6.5	0	0	0
7		4	5	2	
8		2	1	5	
9	0	2	1		
Occult blood	4	No. of animals	14 <sup>a</sup>	12 <sup>a</sup>	15
		-	14	12	15
		±	0	0	0
		+	0	0	0
		++	0	0	0
	+++	0	0	0	
	8	No. of animals	15	14 <sup>a</sup>	15
		-	14	14	15
		±	1	0	0
		+	0	0	0
		++	0	0	0
	+++	0	0	0	
	12	No. of animals	13 <sup>a</sup>	14 <sup>a</sup>	14 <sup>a</sup>
		-	12	12	13
		±	1	1	1
+		0	0	0	
++		0	0	0	
+++	0	1	0		