

(x1000 倍、IgG、Millipore Corporation) を用いて、DAB 発色にて ABC 法

(VECTASTAIN ABC Elite kit、Vector Laboratories) による免疫染色を行った。新生ニューロンの分化指標である Sox2、Tbr2 及び doublecortin 陽性細胞数について海馬歯状回の顆粒細胞層下帯において検索を行った。一方、GABA 性介在ニューロンの指標である reelin 及び parvalbumin、成熟ニューロンの指標である NeuN については、海馬歯状回門における陽性細胞数の検索を行った。

母動物は分娩後 22 日に CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔下で放血し、脳、肝臓、胸腺、脾臓重量を測定後、脳はメタカーンもしくはブアン固定液、その他の臓器は 10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。また T-2 トキシンの慢性毒性試験で病理変化が報告されている胃についても同時に採取した。

残り半数の児動物は出生後 77 日まで T-2 トキシンを含まない通常飼料により飼育し、一般状態を 1 日 1 回観察し、体重を週に 1 回の割合で測定した。出生後 77 日に各群 10 例の雄児動物を CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔下で 4%PFA/0.1M リン酸バッファーによる灌流固定を行った。各群雌雄各 10 例の児動物は CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔下で放血し、脳、肝臓、胸腺、脾臓重量を測定後、脳はメタカーンもしくはブアン固定液、その他の臓器は 10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。

母動物の体重ならびに期間重量、摂餌量、摂水量は母動物ごとに集計し、群平均及び標準偏差を算出した。児動物の体重及び臓器重量、免疫組織化学染色における陽性細胞のカウント数については児動物の群平均ならびに標準偏差を算出した。統計学的解析は、体重、摂餌量、摂水量、臓器重量、免疫染色における陽性細胞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 Dunnett、不等分散の場合は Steel の方法により検定を行った。

(倫理面への配慮)

投与実験は混餌投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物は全て CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 深麻酔下での灌流固定ならびに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：

母動物は、体重低値が 9 ppm 群で分娩後 7～14 日にかけて、摂餌量の低値が 9 ppm 群で分娩後 5, 18, 21 日目に、摂水量の低値が 9 ppm 群で 14, 18, 21 日目に、3 ppm 群で 18 日目に認められた (Fig. 1)。児動物は雌雄とも 9 ppm で投与期間を通じて体重低値を示し、離乳後もこの群で出生後 77 日目まで体重低値が継続した (Fig. 2, 3、Table 1)。雌では、1 及び 3 ppm で出生後 35 日目以降体重の低値傾向を示し、3 ppm では 56 及び 63 日目で、1 ppm では 63 日目で低値が統計学的に有意であった (Fig. 3)。

### 着床数、産仔数：

着床数、産仔数に T-2 トキシンによる影響は認められなかった (Table 1)。

### 臓器重量：

母動物では 1 ppm から胸腺絶対重量の低値が認められ、相対重量の低値も 1 及び 9 ppm で認められた。9 ppm では肝臓の絶対重量及び相対重量の高値が認められた (Table 2)。

児動物では離乳時に雌雄共に 3 ppm から脳絶対重量の低値がみられ、9 ppm では肝臓、

胸腺、脾臓の絶対重量の低値がみられた

(Table 3)。雄では胸腺の絶対重量の低値が 3 ppm から認められた。出生後 77 日では雌 9 ppm で肝臓、胸腺の絶対重量低値がみられた (Table 4)。

#### 病理学的変化および免疫組織学的変化：

母動物の剖検時における肉眼的な所見として、前胃粘膜の肥厚が 3 ppm より認められ、発現数は用量に相関して増加した (Table 5)。

離乳時の雄児動物を対象とした脳海馬歯状回における免疫染色の結果、SGZ において Tbr2 (Type2 前駆細胞に発現) 陽性細胞が 3 ppm から減少したが、Sox2 (主に type 1 幹細胞と type 2a 前駆細胞に発現) ないし doublecortin 陽性細胞は統計学的有意な変動を示さなかった (Table 6)。また、歯状回門部では、介在ニューロンから産生され、ニューロンの移動制御に機能することが知られている reelin 陽性細胞が 9 ppm で増加したが、parvalbumin 陽性介在ニューロンや NeuN 陽性成熟ニューロン数には変動を認めなかった。

#### D. 考察

妊娠 ICR マウスに T-2 トキシンを 9 ppm を最高用量として妊娠 6 日から分娩後 21 日まで混餌投与することで、児動物に経胎盤、経乳的に暴露させ、暴露終了時ならびに出生後 77 日における影響について解析した。その結果、母動物は 9 ppm で分娩後 7~14 日にかけて体重低値を示し、主に 9 ppm で分娩後 21 日目までの間に摂餌量、摂水量の低値を認めた。また、9 ppm で前胃粘膜の過形成を示唆する肥厚性変化が認められ、摂餌量ならびに摂水量の低下に影響した可能性が考えられた。一方、1 ppm から胸腺重量の低値がみられ、9 ppm では肝臓重量の高値がみられ

た。このことから母動物では、一般毒性的変化は 9 ppm に集中的に見られたものの、免疫系への影響は最も鋭敏に認められた。児動物では、9 ppm で投与期間を通じて体重低値を示し、離乳後も出生後 77 日まで体重低値が継続した。一方、離乳時の児動物では脳絶対重量の低値が 3 ppm から認められ、9 ppm での体重や諸臓器の重量低値と併せて T-2 トキシンによる発達障害が示唆された。出生後 77 日の児動物では雌 9 ppm で臓器重量低値がみられたが、出生時と比較して変化の程度は小さく、雄では出生時の変化が消失していることから、回復性のある変化であると考えられた。

離乳時の雄児動物を対象とした脳海馬歯状回における免疫染色の結果、Tbr2 (Type2 前駆細胞に発現) 陽性細胞が 3 ppm から減少し、T-2 トキシンによるニューロン新生障害が起きているものと考えられた。9 ppm でみられた reelin 陽性細胞の増加は前駆細胞の移動異常を反映して介在ニューロンからの産生が増加した可能性が考えられた。

#### E. 結論

T-2 トキシンの発達期暴露により、母動物と児動物への影響は主に 9 ppm で認められたが、母動物では 1 ppm より胸腺重量の低下がみられ、児動物では 3 ppm より脳の絶対重量の低値と海馬歯状回における type2 前駆細胞を標的とするニューロン新生障害を示唆する変化が認められた。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

**G. 知的財産権の出願・登録状況**

1. 特許取得

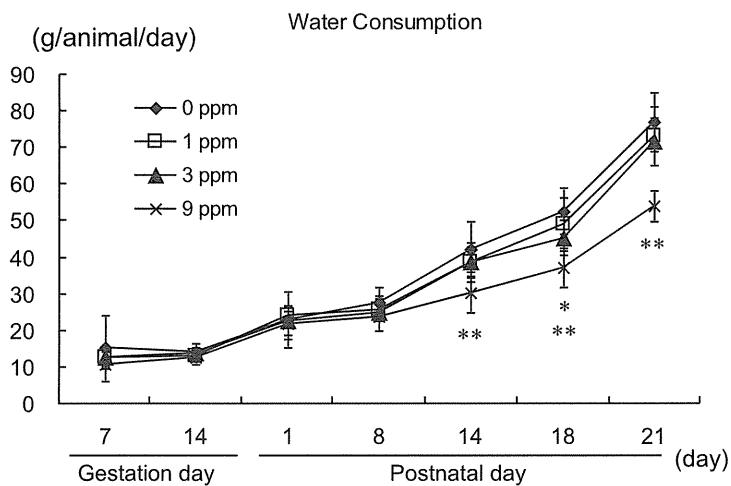
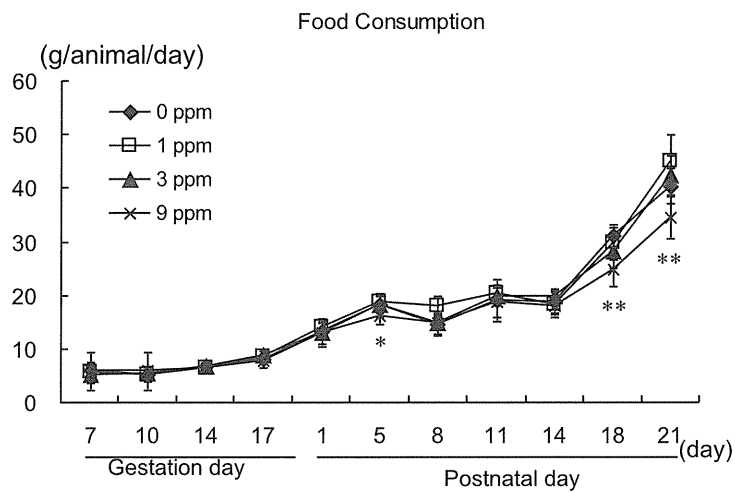
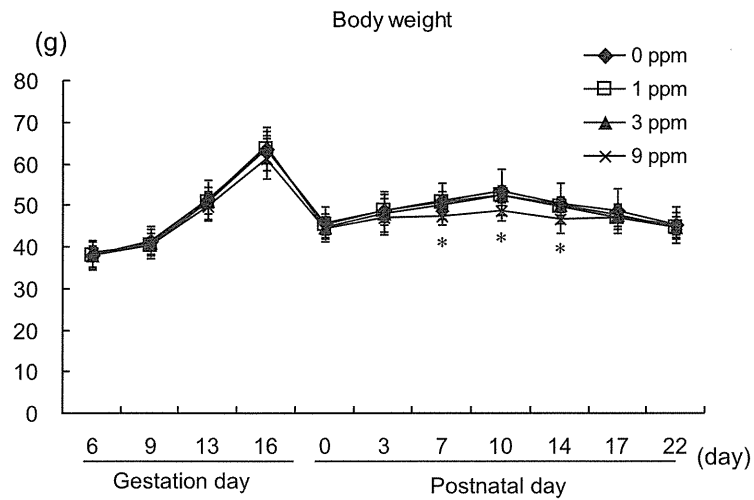
なし

2. 実用新案登録

なし

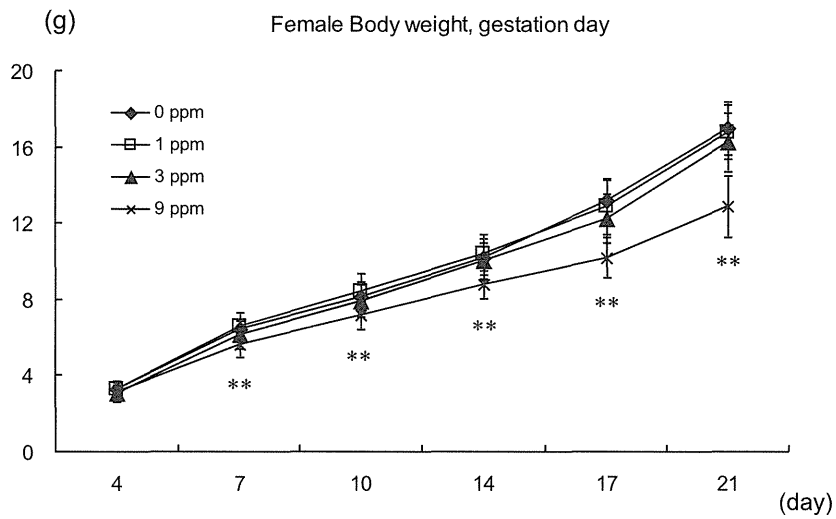
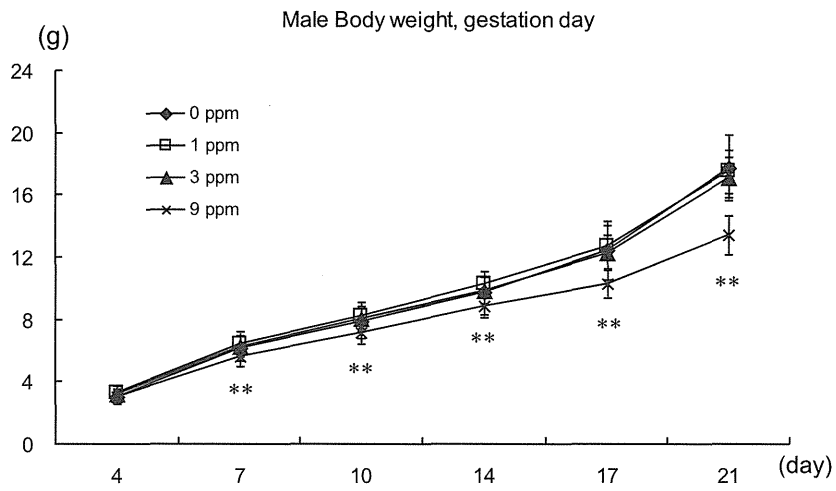
3. その他

なし



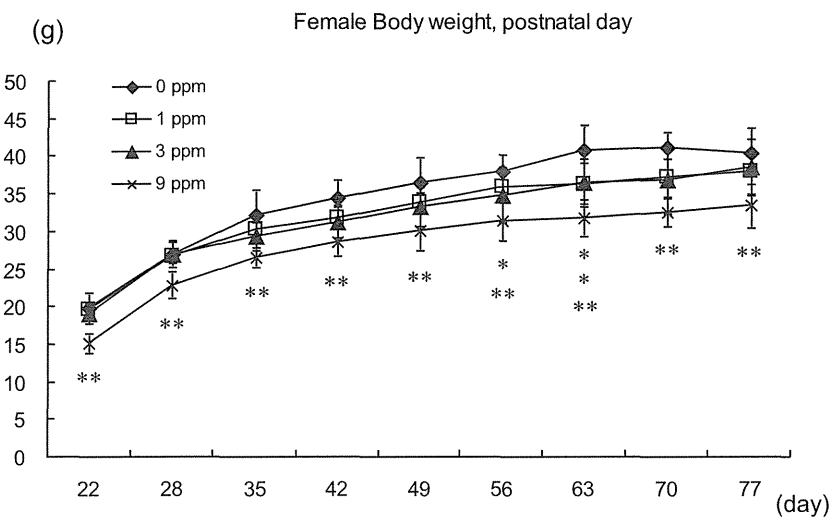
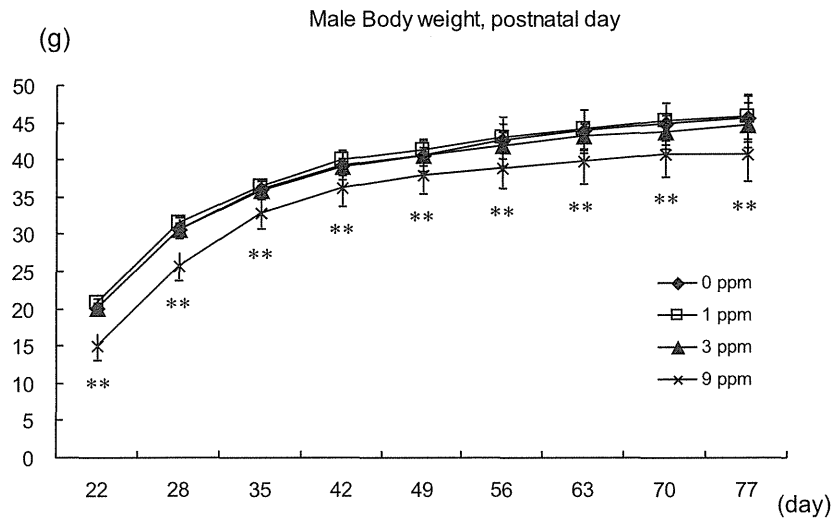
**Figure 1. Body weight, food consumption and water consumption of dams given T-2 Toxin from GD 6 to PND 22 in the diet.**

\*,\*\* Significantly different from the untreated controls (P<0.05, P<0.01, Dunnett's or Steel's test).



**Figure 2. Body weight of male and female offspring at gestation day.**

\*\* Significantly different from the untreated controls ( $P < 0.01$ , Dunnett's or Steel's test).



**Figure 3. Body weight of male and female offspring at postnatal day.**

\*,\*\* Significantly different from the untreated controls (P<0.05, P<0.01, Dunnett's or Steel's test).

**Table 1. Reproductive and general parameters of dams given T-2 Toxin from GD 6 to PND 22**

	T-2 Toxin (ppm)			
	0 (Control)	1	3	9
No. of dams	9	10	10	10
No. of implantation sites	15.30±1.77	16.33±1.87	16.15±1.41	15.50±2.65
No. of live offspring	14.36±2.50	14.50±2.07	14.92±1.19	13.75±2.34
Mean body weight (GD, g)	48.37±3.53	48.06±2.33	48.78±2.51	47.85±3.43
Mean body weight (PND, g)	49.12±4.52	48.44±1.74	48.58±1.75	46.67±1.76
Food intake (GD, g/animal/day) <sup>a</sup>	6.48±0.69	6.61±0.84	6.57±0.58	6.77±1.92
Food intake (PND, g/animal/day) <sup>a</sup>	22.61±1.63	23.51±1.77	22.55±1.54	20.09±1.51**
Water consumption (GD, g/animal/day) <sup>a</sup>	13.85±2.59	12.94±1.47	13.44±1.58	11.78±1.27*
Water consumption (PND, g/animal/day) <sup>a</sup>	44.25±5.00	42.12±4.11	40.89±4.10	33.58±3.45**
T-2 Toxin intake (GD, mg/kg body weight/day) <sup>a</sup>	0	0.14±0.02	0.40±0.03	1.18±0.25
T-2 Toxin intake (PND, mg/kg body weight/day) <sup>a</sup>	0	0.49±0.03	1.39±0.07	3.79±0.24

Mean±SD.

<sup>a</sup> Mean value of each week.

\*, \*\* Significantly different from the untreated controls (P<0.05, P<0.01, Dunnett's or Steel's test).

Abbreviation: GD; gestation day, PND; postnatal day.

**Table 2. Organ weights of dams at PND 22**

		T-2 Toxin (ppm)			
		0 (Control)	1	3	9
No. of animals		9	10	10	10
Final body weight (g)		45.30 ± 4.38	44.78 ± 1.61	44.71 ± 2.53	45.39 ± 2.92
Brain	Absolute (g)	0.50 ± 0.03	0.50 ± 0.02	0.49 ± 0.02	0.49 ± 0.02
	Relative (g/100g BW)	1.11 ± 0.06	1.11 ± 0.03	1.10 ± 0.05	1.07 ± 0.06
Liver	Absolute (g)	2.91 ± 0.33	2.89 ± 0.36	2.96 ± 0.23	3.45 ± 0.30**
	Relative (g/100g BW)	6.43 ± 0.35	6.45 ± 0.69	6.63 ± 0.46	7.60 ± 0.50**
Thymus	Absolute (g)	0.094 ± 0.013	0.070 ± 0.020**	0.073 ± 0.016*	0.031 ± 0.011**
	Relative (g/100g BW)	0.209 ± 0.029	0.158 ± 0.046*	0.164 ± 0.040	0.069 ± 0.011**
Spleen	Absolute (g)	0.164 ± 0.029	0.157 ± 0.025	0.211 ± 0.064	0.207 ± 0.093
	Relative (g/100g BW)	0.360 ± 0.043	0.350 ± 0.050	0.470 ± 0.126	0.451 ± 0.183

Mean±SD.

\*, \*\* Significantly different from the untreated controls (P<0.05, P<0.01, Dunnett's or Steel's test).

Abbreviation: BW; body weight, PND; postnatal day.



**Table 3. Organ weights of offspring at PND 21**

		T-2 Toxin (ppm)			
		0 (Control)	1	3	9
No. of male animals		31	35	32	32
Final body weight (g)		17.98 ± 1.78	17.63 ± 1.44	17.13 ± 1.33	13.61 ± 1.22**
Brain	Absolute (g)	0.441 ± 0.025	0.433 ± 0.016	0.425 ± 0.019**	0.411 ± 0.022**
	Relative (g/100g BW)	2.467 ± 0.232	2.477 ± 0.198	2.491 ± 0.176	3.033 ± 0.227**
Liver	Absolute (g)	1.03 ± 0.14	1.02 ± 0.12	0.98 ± 0.13	0.71 ± 0.10**
	Relative (g/100g BW)	5.69 ± 0.36	5.79 ± 0.42	5.73 ± 0.43	5.25 ± 0.40**
Thymus	Absolute (g)	0.12 ± 0.03	0.11 ± 0.02	0.10 ± 0.02**	0.08 ± 0.02**
	Relative (g/100g BW)	0.67 ± 0.16	0.64 ± 0.11	0.60 ± 0.10	0.58 ± 0.13**
Spleen	Absolute (g)	0.14 ± 0.03	0.14 ± 0.02	0.14 ± 0.03	0.09 ± 0.02**
	Relative (g/100g BW)	0.79 ± 0.18	0.78 ± 0.10	0.79 ± 0.15	0.66 ± 0.13**
No. of female animals		13	17	20	19
Final body weight (g)		16.99 ± 1.37	16.81 ± 1.40	16.27 ± 1.54	12.89 ± 1.62**
Brain	Absolute (g)	0.433 ± 0.027	0.422 ± 0.014	0.414 ± 0.018*	0.410 ± 0.020**
	Relative (g/100g BW)	2.556 ± 0.167	2.524 ± 0.189	2.561 ± 0.224	3.218 ± 0.350**
Liver	Absolute (g)	0.88 ± 0.12	0.92 ± 0.10	0.87 ± 0.11	0.64 ± 0.11**
	Relative (g/100g BW)	5.16 ± 0.37	5.45 ± 0.33	5.35 ± 0.42	4.98 ± 0.38
Thymus	Absolute (g)	0.12 ± 0.03	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.08 ± 0.02**
	Relative (g/100g BW)	0.69 ± 0.13	0.67 ± 0.12	0.69 ± 0.15	0.62 ± 0.13
Spleen	Absolute (g)	0.14 ± 0.02	0.13 ± 0.03	0.13 ± 0.02	0.09 ± 0.03**
	Relative (g/100g BW)	0.83 ± 0.12	0.80 ± 0.15	0.78 ± 0.15	0.72 ± 0.19

Mean±SD.

\*, \*\* Significantly different from the untreated controls (P<0.05, P<0.01, Dunnett's or Steel's test).

Abbreviation: PND; postnatal day, BW; body weight.

**Table 4. Organ weights of offspring at PND 77**

		T-2 Toxin (ppm)			
		0 (Control)	1	3	9
No. of male animals		10	10	10	10
Final body weight (g)		45.96 ± 5.47	46.60 ± 5.19	43.71 ± 4.95	40.75 ± 3.78**
Brain	Absolute (g)	0.515 ± 0.090	0.502 ± 0.016	0.487 ± 0.017	0.494 ± 0.021
	Relative (g/100g BW)	1.128 ± 0.182	1.087 ± 0.113	1.126 ± 0.123	1.222 ± 0.121
Liver	Absolute (g)	2.198 ± 0.347	2.244 ± 0.337	2.154 ± 0.158	2.191 ± 0.263
	Relative (g/100g BW)	4.960 ± 0.423	4.984 ± 0.536	5.079 ± 0.505	5.314 ± 0.387
Thymus	Absolute (g)	0.056 ± 0.019	0.050 ± 0.010	0.045 ± 0.014	0.047 ± 0.020
	Relative (g/100g BW)	0.126 ± 0.039	0.112 ± 0.027	0.105 ± 0.031	0.113 ± 0.045
Spleen	Absolute (g)	0.134 ± 0.025	0.134 ± 0.025	0.139 ± 0.022	0.134 ± 0.036
	Relative (g/100g BW)	0.307 ± 0.069	0.299 ± 0.048	0.332 ± 0.080	0.325 ± 0.077
No. of female animals		10	10	10	10
Final body weight (g)		40.70 ± 3.55	38.00 ± 3.63	38.55 ± 3.74	33.43 ± 2.94**
Brain	Absolute (g)	0.525 ± 0.022	0.515 ± 0.018	0.505 ± 0.015	0.504 ± 0.020
	Relative (g/100g BW)	1.296 ± 0.102	1.362 ± 0.105	1.321 ± 0.138	1.517 ± 0.120**
Liver	Absolute (g)	2.082 ± 0.387	1.858 ± 0.269	1.672 ± 0.575	1.690 ± 0.211*
	Relative (g/100g BW)	5.095 ± 0.725	4.885 ± 0.486	4.349 ± 1.403	5.069 ± 0.577
Thymus	Absolute (g)	0.080 ± 0.020	0.071 ± 0.010	0.074 ± 0.011	0.063 ± 0.017*
	Relative (g/100g BW)	0.197 ± 0.043	0.188 ± 0.031	0.193 ± 0.034	0.187 ± 0.038
Spleen	Absolute (g)	0.175 ± 0.051	0.177 ± 0.059	0.178 ± 0.041	0.166 ± 0.047
	Relative (g/100g BW)	0.425 ± 0.104	0.465 ± 0.159	0.462 ± 0.092	0.494 ± 0.123

<sup>a</sup> Mean ± SD.

\*, \*\* Significantly different from the untreated controls (P < 0.05, P < 0.01, Dunnett's or Steel's test).

Abbreviation: PND; postnatal day, BW; body weight.

**Table 5. Macroscopical finding with dams at PND 22**

		T-2 Toxin (ppm)			
		0 (Control)	1	3	9
No. of animals		12	11	13	13
Forestomach					
	Thickening of mucosa	0	0	2	7

Abbreviation: PND; postnatal day.

**Table 6. Immunohistochemical data in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on PND 21**

	T-2 Toxin (ppm)			
	0 (Control)	1	3	9
No. of animals	9	10	10	10
Number of positive cells at subgranular zone (/mm)				
Sox2	37.3 ± 3.3	38.6 ± 3.4	40.5 ± 2.5	36.2 ± 2.9
Tbr2	10.68 ± 2.84	8.71 ± 2.04	6.91 ± 1.82**	7.33 ± 2.25**
doublecortin	89.7 ± 14.0	86.1 ± 8.0	90.8 ± 12.3	76.1 ± 13.7
Number of positive cells at hilus (/mm <sup>2</sup> )				
reelin	147.7 ± 44.1	177.5 ± 42.7	178.8 ± 39.0	224.0 ± 53.6**
NeuN	291.7 ± 43.0	277.2 ± 61.5	263.1 ± 56.0	283.6 ± 58.4
parvalbumin	37.9 ± 19.5	49.0 ± 18.2	36.8 ± 15.9	41.7 ± 13.1

Mean±SD.

\*\* Significantly different from the untreated controls (P<0.01, Dunnett's or Steel's test).

Abbreviation: PND; postnatal day, Sox2; SRY (sex determining region Y)-box 2, Tbr 2; T box brain 2, NeuN; neuron-specific nuclear protein.

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)

基準値の策定に資する食品汚染カビ毒の実態調査と  
生体影響評価に関する研究

分担研究報告書

T-2 トキシンの経口摂取による心拍・体温・活動量への影響

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よく知られている。一方、T-2 トキシンの循環器（心臓血管系）影響に関する知見は乏しい。平成 22 年度から 24 年度にかけて T-2 トキシンの循環機能影響を詳細に調べた結果、正常ラットへの T-2 トキシンの皮下投与（0.1 mg/kg 以上）によって房室伝導障害や心室期外収縮などの不整脈が誘発されること、また自律神経機能に影響を及ぼすこと、また投与後 1 日目の測定では血中の活性酸素レベルが上昇することなどが明らかになった。また、*in vitro* の実験では、ラット一次培養心筋細胞への T-2 トキシンの作用によってミトコンドリア機能が抑制されることが明らかになった。

本年度は上記の知見に関連した生体影響が T-2 トキシンの経口摂取によって生じるかどうかを明らかにするために以下の実験を行った。すなわち、T-2 トキシンの経口摂取（5 日間）による全身機能（循環機能、体温および活動量）に及ぼす影響を自由行動下のラットのテレメトリー観察によって行った。摂取群は 3 群（0 ppm、6 ppm、12 ppm；各群 6 匹）とした。その結果、12 ppm・T-2 トキシンの摂取群および 6 ppm・T-2 トキシンの摂取群で、摂取期間中に心拍数、活動量および体温のレベルおよび日周リズムへの影響が摂取開始の翌日から認められ、その影響は 12 ppm・T-2 トキシンの摂取群は 6 ppm・T-2 トキシンの摂取群に比べて大きい傾向がみられた。これらの変化は T-2 トキシンの摂取を中止すると摂取前の状態近くまで回復した。これらの試験結果から、少なくとも 6 ppm～12 ppm の T-2 トキシンの短期間経口摂取によって循環機能を始めとした全身性、可逆性の機能的影響が生じることが明らかになった。

A. 研究目的

T-2 トキシンの循環器影響に関する研究報告は 1980 年代から断片的になされている。

我々は T-2 トキシンの心臓血管系および自律神経系に及ぼす影響を、全身レベル（*in vivo*）および細胞レベル（*in vitro*）の両面から観察している。これまでの研究で、T-2 ト

キシンを 0.1 mg/kg 以上の用量でラットに皮下投与すると、心拍数の変化に加えて房室伝導障害や心室期外収縮などの不整脈が誘発され、それらの背景要因として自律神経機能変化による影響と自律神経機能に影響されない心筋固有の異常性が関与する可能性が示唆された。一方、細胞レベルの研究では、T-2 ト

キシンの作用によって心筋細胞ミトコンドリア機能（電子伝達系機能）の低下が生じることが明らかになった。

上記の研究経緯をふまえ、今年度は T-2 トキシンの自由経口摂取による全身影響を明らかにするために、代表的な観察指標である心電図、体温、活動量の変化を自由行動下のラットを用いて観察した。

## B. 研究方法

### 1. T-2 トキシンの経口摂取試験

#### I. 実験群の構成

実験群は、①12 ppm-T-2 トキシンの群（6匹）、②6 ppm-T-2 トキシンの群（6匹）、③0 ppm-T-2 トキシンの群（対照群）（6匹）とした。

#### II. T-2 トキシンの混餌作製

T-2 トキシンは T-2 トキシン標準品（和光純薬）を用いた。ラット用粉末飼料（オリエンタル酵母、MF）を用いて、上記 T-2 トキシンの最終含有濃度が 12 ppm および 6 ppm になるように飼料（T-2 トキシン混餌）を作製した。T-2 トキシン混餌の作製後、使用直前まで-20℃の冷凍庫内で保存した。T-2 トキシン混餌は粉餌専用給餌器（夏目製作所、KN-675-4）に所定量を入れてケージ内で自由摂食させた。

#### III. 試験プロトコルおよびデータ取得

すべての実験群で成熟雄ラット（Slc:Wistar; 8週齢）にラット用小型テレメーター送信機（DSI社、TA11CTA-F40）を全身麻酔下で外科手術によって皮下に埋入した。1週間の術後回復期の後、3日間、通常餌の条件下で心電図、皮下体温、活動量の記録（投与前対照記録）を行った後、T-2 トキシン摂取群では T-2 トキシン混餌を5日間にわたって連続給与した。その後 T-2 トキシンを含まない通常粉餌に切り替えさらに5日間飼育した。また、対照群では全期間で T-2 トキシンを含まない通常餌のみで飼育した。この期間中、上記の指標の記録を連続して行った。デ

ータは各ラットで5分間の間隔で10秒間ずつの自動サンプリングを専用のデータ取得・解析システム（Dataquest A.R.T）を用いて行った。また、同時に心電図専用解析ソフト（ソフトロン社、SBP2000U）を用いて心電図波形を連続記録した。なお、摂餌、飲水は自由摂取とし、専用飼育チャンバー内の温度を23℃、明暗周期は8:00（点灯）-20:00（消灯）に維持した。通常餌と T-2 トキシン混餌との間の切り替えは11:00~12:00の時間帯に行った。

#### III. 統計学的有意差検定

12 ppm-T-2 トキシン群、6 ppm-T-2 トキシン群、0 ppm-T-2 トキシン群（対照群）の各群内において、T-2 トキシン摂取前、摂取中、摂取後の値（各個体の平均値）の有意差検定を一元配置分散分析（対応あり）および Bonferroni test によって行った。また、上記3群間における T-2 トキシン摂取前、摂取中、摂取後の値の有意差検定を二元配置分散分析（対応あり）および Tukey テストによって行った。いずれも P<0.05 で有意差ありとした。

## C. 研究結果

### 1. T-2 トキシンの経口摂取試験

12 ppm-T-2 トキシン群、6 ppm-T-2 トキシン群および0 ppm-T-2 トキシン群（対照群）における心拍数、活動量、皮下温（体温）の経時的変化を図1~3に示す。これらの測定指標はいずれも暗期に高く、明期に低い日リズムを示した。しかしながら、T-2 トキシンを摂取した群では、摂取期間中において心拍数の日リズムの変動幅が摂取前に比べて減弱した。とくに12 ppm-T-2 トキシン群ではその変化が明瞭であった。活動量は T-2 トキシン摂取期間中にやや減少する傾向がみられ、体温レベルは明期に低下する個体も認められたが、全体的にはほぼ安定した経過が示された。

各指標のより詳細な変化を下に述べる。

#### 1) 心拍数レベルの変化

暗期および明期を通じた全体の平均心拍数

を T-2 トキシンの摂取前、摂取中、摂取後で比較すると 12 ppm-T-2 トキシン群ではそれぞれ 420.4 bpm、411.5 bpm、381.8 bpm を示した。また、6 ppm-T-2 トキシン群では 408.9 bpm、406.8 bpm、383.2 bpm を示した。両群とも心拍数は日数の経過とともに減少する傾向があり、これらの変化は有意差 ( $P = 0.001$ ) が存在した。摂取経過に関係した比較では、摂取前 (3 日間) と摂取中 (5 日間) との間での有意差はなく、摂取前 (3 日間) と摂取後 (5 日間) および摂取中 (5 日間) と摂取後 (5 日間) において有意差 ( $P < 0.01$ ) が認められた。

観察期間全体を通じて心拍数は日数の経過に伴って減少する傾向があったが、T-2 トキシン摂取群では対照群に比べて減少の度合いが大きかった (図 4)。一方、0 ppm-T-2 トキシン群では、摂取前、摂取中、摂取後に相当する期間の平均心拍数は、409.0 bpm、410.7 bpm、400.3 bpm を示し、減少傾向があるものの有意な変化ではなかった ( $P = 0.12$ )。

## 2. 明期および暗期ごとの心拍数、体温、活動量の変化

### 1) 平均心拍数の変化

#### 12 ppm-T-2 トキシン群 :

暗期では、T-2 トキシンの摂取前 (3 日間)、摂取中 (5 日間)、摂取後 (5 日間) でそれぞれ平均 442.8 bpm、423.9 bpm、404.7 bpm を示し、明期では、395.9 bpm、394.4 bpm、355.1 bpm を示した。T-2 トキシンの摂取開始後 2 日間における明期の心拍数は摂取前に比較して増加する傾向があり、この期間だけの平均心拍数は 408.7 bpm を示した。この 2 日間における明期の心拍数は対照群および 6 ppm-T-2 トキシン群の同じ時期の心拍数と比較して有意差がみられた ( $P < 0.05$  vs 6 ppm-T-2 トキシン群、 $P < 0.001$  vs 0 ppm-T-2 トキシン群) (図 5)。

一方、摂取後の期間では 12 ppm-T-2 トキシン群および 6 ppm-T-2 トキシン群は 0 ppm-T-2 トキシン群に比べて明期の心拍数が

少なく有意差 (12 ppm,  $P < 0.005$ ; 6 ppm,  $P < 0.05$ ) が示された (図 5)。

#### 6 ppm-T-2 トキシン群 :

暗期では、T-2 トキシンの摂取前 (3 日間)、摂取中 (5 日間)、摂取後 (5 日間) で平均 433.4 bpm、422.9 bpm、403.0 bpm を示し、明期では、386.6 bpm、389.2 bpm、360.1 bpm であった。T-2 トキシンの摂取開始後 2 日間の明期の心拍数は 12 ppm 群と同様に摂取前に比較して増加する傾向があり、この期間だけの心拍数は 393.7 bpm を示した。

#### 0 ppm-T-2 トキシン群 (対照群) :

暗期では、T-2 トキシンの摂取前、摂取中、摂取後に対応する期間中にそれぞれ 429.6 bpm、436.3 bpm、423.5 bpm を示し、明期では、388.4 bpm、384.7 bpm、375.2 bpm であった。

### 2) 平均体温の変化

#### 12 ppm-T-2 トキシン群 :

暗期の体温は T-2 トキシン摂取前、摂取中、摂取後で 37.1°C、36.8°C、36.7°C を示した。明期では 36.1°C、35.8°C、35.8°C を示した。

#### 6 ppm-T-2 トキシン群 :

暗期の体温は T-2 トキシン摂取前、摂取中、摂取後で 37.2°C、37.1°C、36.9°C を示した。明期では 36.3°C、36.1°C、36.0°C を示した。

#### 0 ppm-T-2 トキシン群 (対照群) :

暗期の体温は T-2 トキシン摂取前、摂取中、摂取後に対応する期間で 37.0°C、36.7°C、36.7°C を示した。明期では 36.2°C、36.1°C、35.9°C を示した。

### 3) 最低体温の変化 :

12 ppm-T-2 トキシン群では、T-2 トキシン摂取前の最低体温は平均 35.7°C であったが、T-2 トキシン摂取期間中の最低体温は平均 35.5°C (摂取 1 日目) から 35.0°C (摂取 5 日目) までに進行性に低下した。T-2 トキシンの摂取終了後は一端 35.5°C に戻った。6 ppm-T-2 トキシン群においても、最低体温は T-2 トキシン摂取前の 35.8°C から、T-2 トキ

シン摂取期間中は 35.8°C(1 日目)から 35.3°C(5 日目)まで低下した。T-2 トキシン摂取終了後 2 日間は最低体温が低下したが、その後は上昇し 35.6°C以上にまで戻った。

#### 4)平均活動量の変化

##### 12 ppm-T-2 トキシン群 :

明期と暗期を合わせた活動量は、T-2 トキシンの摂取期間中は減少する傾向が示された。(摂取前 3.89 counts/min、摂取中 3.35 counts/min、摂取後 3.61 counts/min)。

##### 6 ppm-T-2 トキシン群 :

12 ppm-T-2 トキシンと同様に T-2 トキシンの摂取期間中は減少する傾向が示された(摂取前 4.55 counts/min、摂取中 3.38 counts/min、摂取後 3.42 counts/min)。

##### 0 ppm-T-2 トキシン群 (対照群) :

明期および暗期を合わせた活動量には上記の T-2 トキシン摂取群にみられた減少傾向は認められなかった(摂取前 1.43 counts/min、摂取中 1.36 counts/min、摂取後 1.36 counts/min)。

#### 5) 心拍数、体温、活動量の日周リズムの変化

心拍数 : いずれの実験群も T-2 トキシン混餌の摂取前は明暗周期に同調した明瞭な日周リズムを示した。すなわち心拍数は暗期に増加、明期に減少する規則正しい周期性が観察された。しかしながら、12 ppm-T-2 トキシン群および 6 ppm-T-2 トキシン群において、T-2 トキシン混餌の摂取開始日より心拍数レベルおよび心拍数の周期性に変化が認められた(図 6)。

T-2 トキシン混餌の摂取前 3 日間における自己相関係数曲線(コレログラム)では約 24 時間の規則的なピークが観察された。すなわち、12 ppm-T-2 トキシン群における自己相関係数(正)の第 1 ピークは 24.0 時間、第 2 ピークは 46.2 時間、第 3 ピークは 66.8 時間に現れ、自己相関係数は第 1 ピークで 0.48 であった。また、6 ppm-T-2 トキシン群では

それぞれ 24.1 時間、48.4 時間、67.4 時間であった。自己相関係数は第 1 ピークで 0.43 であった(表 1)。

T-2 トキシン混餌の摂取期間中は多くの個体で自己相関係数の減少と周期性の変化が観察された。自己相関係数の明瞭なピークが認められず本来の規則的な周期性が消失した個体も出現した。その個体数は 12 ppm-T-2 トキシン群では 6 匹中 2 匹、6 ppm-T-2 トキシン群では 6 匹中 1 匹であった(表 1)。

自己相関係数(コレログラム)の分析では T-2 トキシン投与群で周期性が乱れる傾向が示された。周期性が消失した個体の自己相関係数を仮に 0 として、T-2 トキシンの摂取前、摂取中、摂取後の期間において統計的に比較すると、12 ppm-T-2 トキシン群では、3 期間の間で有意差(一元配置分散分析、 $P < 0.01$ )が認められ、T-2 トキシン摂取中の自己相関係数は摂取前および摂取後に比較して有意に低かった(対摂取前  $P < 0.01$ 、対摂取後  $P < 0.01$ )。また 6 ppm-T-2 トキシン群では、T-2 トキシンの摂取期間中に有意差ではないものの自己相関係数の減少傾向がみられた(一元配置分散分析、 $P = 0.08$ )。

対照群では T-2 トキシン混餌の摂取前、摂取中、摂取後に相当する同じ時期の心拍数の周期性は 24.0 時間、23.8 時間、24.1 時間を示した。自己相関係数はそれぞれ 0.44、0.48、0.44 であり、周期性が正常に維持されており特異的な変化は認められなかった(表 1)。

活動量 : 自己相関係数コレログラムの第 1 ピークだけをみると、12 ppm-T-2 トキシン群では T-2 トキシン摂取前、摂取中、摂取後の周期性は 23.5 時間、15.5 時間、21.0 時間を示し、自己相関係数(第 1 ピーク)は 0.33、0.27、0.28 であった(表 2)。12 ppm-T-2 トキシン摂取期間中に活動リズムが大きく乱れる個体が 6 匹中 3 匹存在した。6 ppm-T-2 トキシン群では T-2 トキシン摂取前、摂取中、摂取後の周期性は 24.0 時間、20.5 時間、19.2 時間を示した。また自己相関係数はそれぞれ 0.29、

0.25、0.31 が示された。

対照群では T-2 トキシン混餌の摂取前、摂取中、摂取後に相当する同じ時期の活動量の周期性は 23.8 時間、23.7 時間、24.4 時間を示し、自己相関係数は 0.29、0.29、0.27 であった (表 2)。

体温：自己相関係数コレログラムの第 1 ピークだけをみると、12 ppm-T-2 トキシン群では T-2 トキシン摂取前、摂取中、摂取後の周期性は 23.9 時間、23.8 時間、23.7 時間を示し、自己相関係数はそれぞれ 0.57、0.47、0.46 であった。6 ppm-T-2 トキシン群では T-2 トキシン摂取前、摂取中、摂取後の周期性は 24.0 時間、23.8 時間、24.0 時間を示した。また自己相関係数はそれぞれ 0.58、0.46、0.43 が示された (表 3)。

対照群では T-2 トキシン混餌の摂取前、摂取中、摂取後に相当する同じ時期の体温の周期性は 23.9 時間、23.9 時間、23.9 時間を示し、自己相関係数は 0.50、0.58、0.51 であった。

#### 5) 摂食量および体重

T-2 トキシン摂食期間中の摂食量は 12 ppm-T-2 トキシン群、6 ppm-T-2 トキシン群、0 ppm-T-2 トキシン群 (対照群) で、それぞれ  $9.81 \pm 0.78$  g/日、 $12.9 \pm 1.99$  g/日、 $14.0 \pm 0.77$  であった。体重は実験終了時に 12 ppm-T-2 トキシン群で  $240.0 \pm 13.1$  g、6 ppm-T-2 トキシン群で  $247.7 \pm 2.5$  g、対照群で  $259.5 \pm 16.5$  g であった。

#### D. 考察

過去の我々の研究では、一定量の T-2 トキシンの皮下投与によって、心拍数の変化に加えて房室ブロックなどの伝導障害や心室期外収縮などの不整脈の発現性が高まること、また自律神経機能に対する明瞭な影響も存在することが明らかにされてきた。今回の経口自由摂取において上記の変化が生じるか否かに関しては現在詳細な分析を行っている。

本研究ではラットの各個体において心電図、活動量および体温を同時記録する方法 (テレメトリー法) が用いられた。T-2 トキシン摂取前の通常の餌条件下では心拍数、活動量 (ラットの水平移動量) および体温 (皮下温) はいずれも暗期 (20:00-8:00) に高く、明期 (8:00-20:00) に低くなる日周リズムを発現した。それらのリズムは明暗周期に同調しておよそ 24 時間の周期性を有していた。心拍数についてみると、T-2 トキシンの摂取期間中に上記の正常な周期性が消失する個体が 12 ppm-T-2 トキシン群と 6 ppm-T-2 トキシン群においてそれぞれ 2 匹 (33.3%)、1 匹 (16.7%) 認められた。また周期性が認められた残りの個体においても周期性の乱れが認められ、周期が短縮する傾向が観察された。T-2 トキシン経口摂取による心拍数の日周リズムの乱れは自己相関係数 (コレログラム) においても明瞭に観察された。このような心拍数リズムの乱れの一要因として、活動量の変化に起因する自律神経機能の変化が関与する可能性が考えられる。有意差ではないものの、T-2 トキシン摂取の影響とみられる活動量の変化が観察された。この活動量の変化は主に暗期における活動量の減少として観察された。このような活動量の変化が心拍数のリズム形成に影響を及ぼす可能性がある。しかしながら、個体ごとに詳細に分析すると、T-2 トキシン摂取期間中の心拍数の変化が必ずしも活動量の変化と一致していない個体もみられるため、活動量の変化とは別に T-2 トキシンによる自律神経系への直接作用が影響した可能性も否定できない。T-2 トキシンはヒトやブタなどの動物では激しい催吐性を有すことから、嘔吐動物ではないもののラットにおいても T-2 トキシンによる神経系影響の可能性が考えられる。我々のこれまでの研究では、T-2 トキシンの皮下投与直後の数時間以内に自律神経バランスの明瞭な変化 (LF/HF 比の低下) が生じることや、投与後数日間にわたって発現する房室伝導障害性の不整脈が自律神経遮断薬 (アトロピン) でほぼ消失したこ



とから、T-2 トキシンは自律神経系を介した心機能影響を有すものと考えられる。

本実験では、T-2 トキシンの経口摂取開始後の2日間にわたって心拍数の増加（主に明期の心拍数増加）が観察されていることから、経口摂取においても比較的早い段階から循環機能影響が生じることが明らかになった。この影響は6 ppm に比べて12 ppm のT-2 トキシンでより明瞭であったことから、濃度依存性が存在するものと思われる。

体温変化に関しては、T-2 トキシンの摂取期間中、とくに後半において明期の最低体温が低下する傾向が認められた。体温が低下する要因としては、①活動量の減少、②基礎代謝の低下、③自律神経機能低下（交感神経緊張の低下、副交感神経緊張の上昇）などが考えられる。今回の実験条件においては、これらの要因のいずれもが関与しうる可能性がある。我々のこれまでの研究および他の研究者の研究では、T-2 トキシンはミトコンドリア電子伝達系機能を抑制する作用があることが明らかになっている。そのためT-2 トキシン摂取によって細胞におけるエネルギー産生能力の抑制が生じていることも推測される。また消化器障害を生じた場合にはそれによる全身影響（活動抑制など）の可能性も考えられる。

本実験において、心拍数および体温の全体的なレベルは時間の経過とともに徐々に低下する傾向が示された。これは本実験に用いたラットは比較的若齢であったため、成長（加齢）に伴う変化がベースに存在したことが推測される。しかしながら、一方で、この経時的な変化は12 ppm-T-2 トキシン群、6 ppm-T-2 トキシン群、0 ppm-T-2 トキシン群（対照群）の順に強く現れているように見えることから、T-2 トキシンの摂取による影響が潜在する可能性がある。また、摂食量および体重は、12 ppm-T-2 トキシン群、6 ppm-T-2 トキシン群、0 ppm-T-2 トキシン群（対照群）の順に小さかった。本報告書分担研究者の渋谷らのマウスへの経口摂取試験において

も9 ppmのT-2 トキシンで体重および摂食量の低値が観察されている。

今後はより低濃度のT-2 トキシン経口摂取による影響の有無を観察する必要がある。また、全個体の心電図波形解析を行い、房室伝導障害（房室ブロック）や心室期外収縮などの心電図異常を伴う不整脈の発現性についても明らかにしたい。

## E. 結論

12 ppm および6 ppm のT-2 トキシンを含む粉餌を自由経口摂取したラットにおいて、摂取期間中に心拍数、活動量および体温（最低体温）レベルの変化、心拍数や活動量の日周リズムの変化が生じることが明らかになった。また、12 ppm は6 ppm に比べて影響の度合いが大きかった。心拍数や活動量の日周リズムは餌をT-2 トキシンを含まない通常の餌に戻すことによって回復する傾向が示された。これらの結果から少なくとも6 ppm 以上のT-2 トキシンの短期間経口摂取によって自由行動下のラットにおいて循環系を始めとする全身機能におそらくは可逆性の影響が生じることが明らかになった。

## 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) Ngampongsa S, Ito K, Kuwahara M, Kumagai S, Tsubone H. (2011): Arrhythmias and alterations in autonomic nervous function induced by deoxynivalenol (DON) in unrestrained rats. *J Toxicol Sci.* 36(4):453-460.
- 8) Ngampongsa S, Ito K, Kuwahara M, Ando K, Tsubone H. (2012): 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: 662-673.
- 9) Ngampongsa S, Hanafusa M, Ando K, Ito K, Kuwahara M, Yamamoto Y, Yamashita M, Tsuru Y, Tsubone H.: Toxic effects of T-2 toxin and deoxynivalenol on the mitochondrial electron transport system of cardiomyocytes in rats. *J Toxicol Sci.* 38(3): 495-502. 2013.
- 10) Pace, J.G. (1983): Effect of T-2 Mycotoxin on rat liver mitochondria electron transport system. *Toxicon.* 21, 675-680.
- 11) 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.
- 12) Yarom, R. et al. (1983): T-2 toxin effect on isolated perfused rat hearts. *Basic Res Cardiol.* 78(6):623-630.
- 13) Yarom, R. et al. (1986): T-2 toxin effect on cultured myocardial cells. *Toxicol Lett.* 31(1):1-8.
- 13) 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) 局 博一、スチトラ・ガンボンサ：T-2 トキシンおよびデオキシニバレノールの心筋細胞ミトコンドリア機能に及ぼす影響。日本マイコトキシン学会第 73 回学術講演会（2013 年 9 月 13 日、於大阪府立大学）
- 【論文発表】  
1) Ngampongsa S, Hanafusa M, Ando K, Ito K, Kuwahara M, Yamamoto Y, Yamashita M, Tsuru Y, Tsubone H.: Toxic effects of T-2 toxin and deoxynivalenol on the mitochondrial electron transport system of cardiomyocytes in rats. *J Toxicol Sci.* 38(3): 495-502. 2013.
- 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

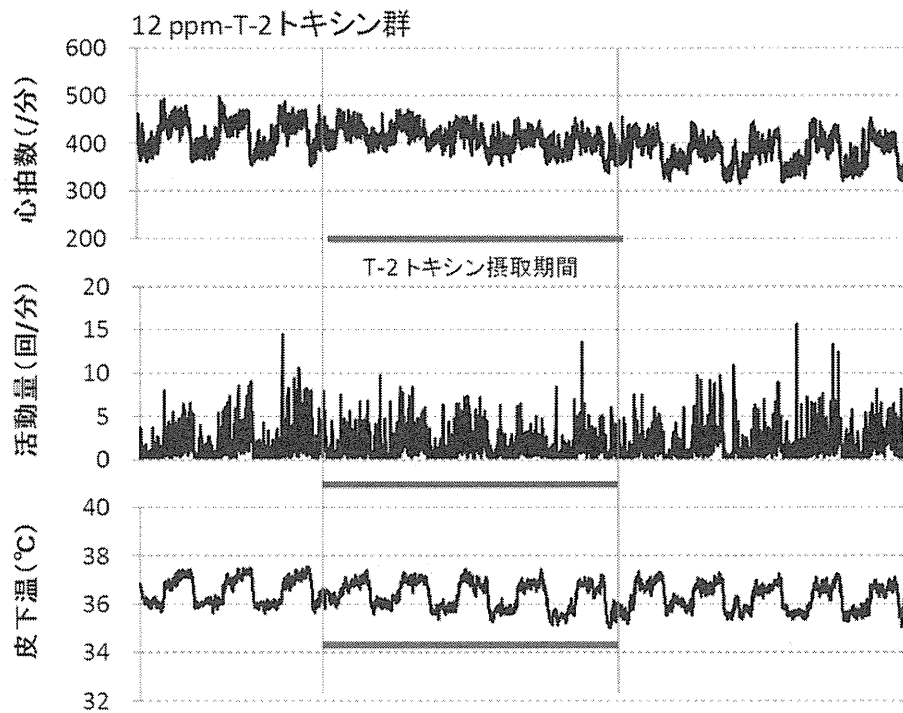


図1. 心拍数、活動量、皮下温の変化(ラット6匹の平均)

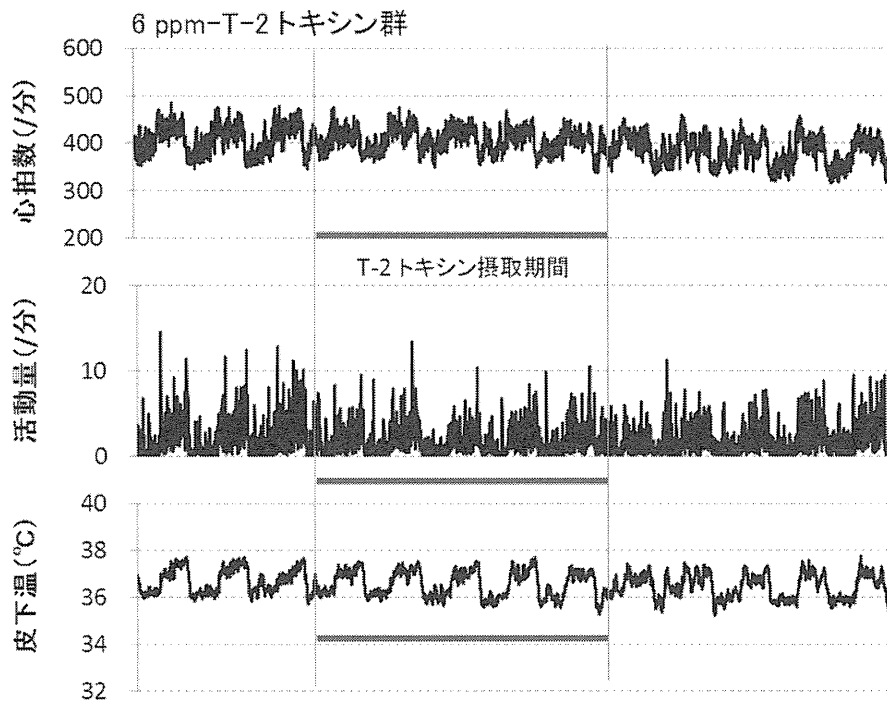


図2. 心拍数、活動量、皮下温の変化(ラット6匹の平均)

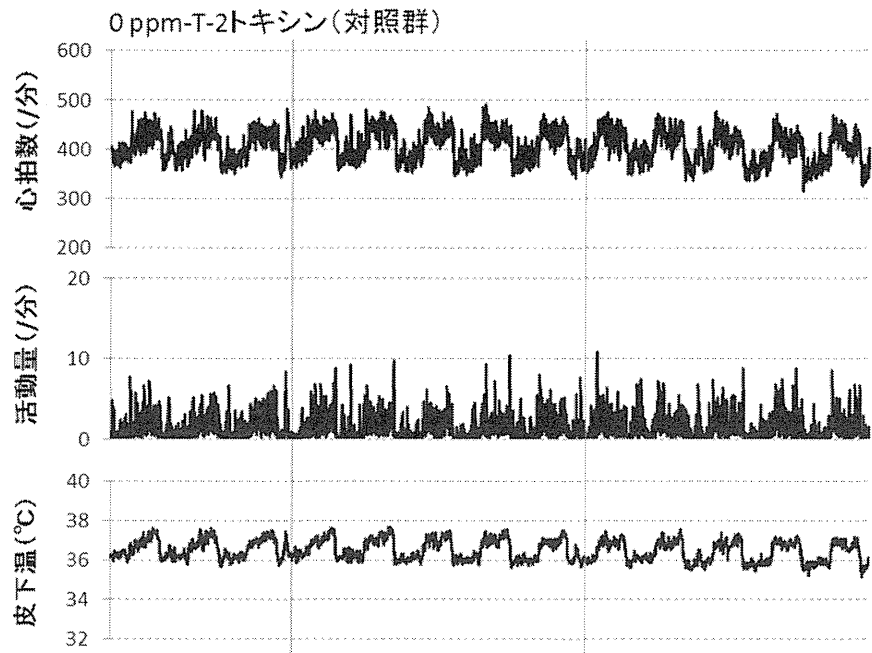


図3. 心拍数、活動量、皮下温の変化(ラット6匹の平均)

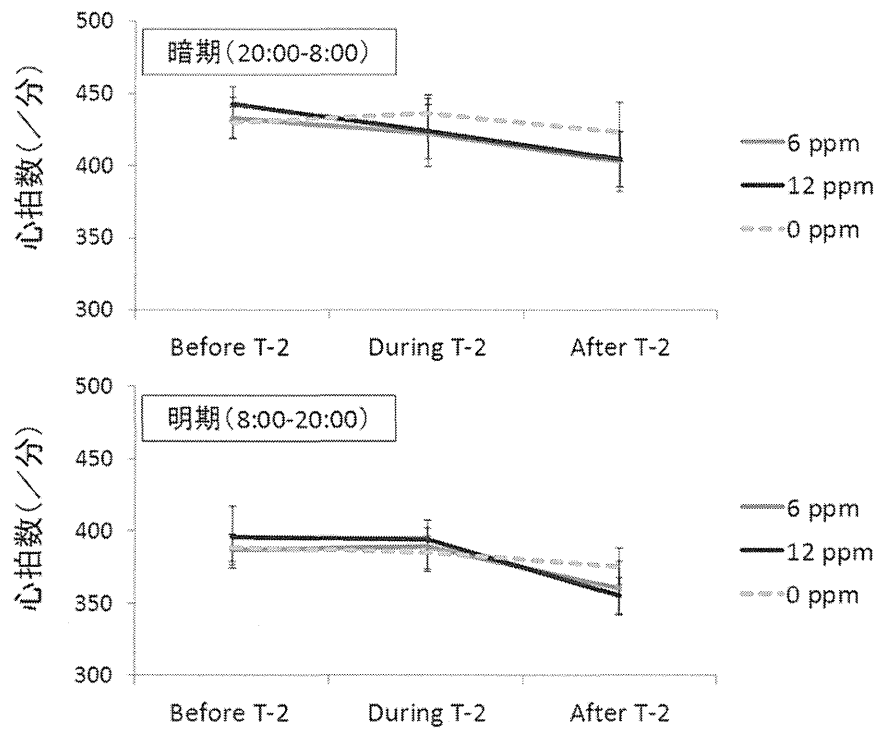


図4. T-2トキシシン摂取前、摂取中、摂取後の心拍数の変化