

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1回/週の頻度で測定した。出生後77日目に各群10例の雄児動物を離乳時と同様に4% PFAによる灌流固定に供した。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採取し、10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。

母動物各10例の脳、胸腺、脾臓、肝臓、胃並びに出生後21日及び77日目の児動物雌雄各10例の脳、胸腺、脾臓、肝臓はHE染色標本作製し、観察を行った。児動物の胸腺についてはTdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色 (ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, EMD Millipore, Inc.) によりアポトーシスを検出し、胸腺細胞数あたりの陽性細胞数比率を算出した。

PFA灌流固定脳標本については大脳のBregmaの後方約-2.2 mmの1カ所で冠状断面を作製して、その前後の対称面(2切面)が薄切面となるようにパラフィン包埋し、3 µm厚の連続切片を作製した。切片はTable S1に示した条件で以下の各分子に対する抗体を用いて免疫染色を行った。顆粒細胞層における新生ニューロンの分化ステージ指標であるglial fibrillary acidic protein (GFAP)、brain lipid binding protein (BLBP)、paired box 6 (PAX6)、T box brain 2 (TBR2)、doublecortin (DCX)、介在ニューロンの指標であるreelin、parvalbumin (PVALB)、calbindin-D-28K

(CALB1)、calbindin-D-29K (Calretinin、CALB2)、成熟ニューロンの指標であるNeuN、細胞増殖活性の指標であるproliferating cell nuclear antigen (PCNA)、酸化ストレスの指標として過酸化脂質malondialdehyde (MDA) 及び4-hydroxynonenal (4-HNE)、幹細胞因子であるstem cell factor (SCF) をDAB発色にてABC法 (VECTASTAIN ABC Elite kit, Vector Laboratories) により染色した。アポトーシス活性の指標としてTUNEL染色を行った。MDA、4-HNE、SCFについては出生後21日目についてのみ検討した。GFAP、BLBP、PAX6、TBR2、DCX、PCNA、TUNEL、MDA、4-HNE 及びSCF陽性細胞数について海馬歯状回SGZの単位長さ当りの陽性細胞数を算出した。reelin、PVALB、CALB1、CALB2、NeuN陽性細胞については、海馬歯状回門における単位面積当りの陽性細胞数の検索を行った。NeuN陽性細胞に関しては顆粒細胞層(GCL)における計数も行い、SGZの単位長さ当りの陽性細胞数を算出した。

出生後21日の0及び9 ppm群のメタカーン固定脳標本を用いて大脳のBregmaの後方約-2.2 mmの2 mm厚切片より海馬歯状回部分を採取し、QIAzol (Qiagen) 及びRNeasy Mini kit (Qiagen) を用いてtotal RNAを抽出した。2 µgのtotal RNAからSuperScript® III Reverse Transcriptase (Life Technologies) を用いてcDNAを合成し、real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR, StepOnePlus Real-time PCR System, Life Technologies) により遺伝子発現解析を行った。

<アフラトキシンM<sub>1</sub>のラットにおける発達期曝露影響評価>

妊娠SDラット(妊娠1日で入手、日本

チャールズリバー) を、一群を 12 匹ずつとして計 4 群に分け、AFB<sub>1</sub> を 0、0.1、0.3、1.0 ppm の用量で妊娠 6 日目から分娩後 21 日目まで混餌投与した。最高用量は 0、0.1、0.5 ppm の濃度で母動物に対して混餌投与した予備実験において、0.5 ppm で児動物の一時的な低体重が認められ、0.1 ppm では母動物の肝臓において AFB<sub>1</sub> の代謝酵素である *Cyp1a2* の RNA 発現量の高値がみられたため、より明確に児動物の体重への影響が期待される 1.0 ppm に設定した。AFM<sub>1</sub> の乳汁移行に関して、生後 14 日目に予備試験の 0.5 ppm 投与群の児動物の胃から乳汁を採取し、AFM<sub>1</sub> 濃度を HPLC 法により測定した(日本食品分析センター)。本実験では出生後 4 日目に間引きを行い、各母動物 (n=10~12) に雄 6 例、雌 2 例を確保するよう児動物数を調整した。投与期間中、一般状態は 1 日 1 回観察し、体重及び摂餌量を 2 回/週、摂水量を 1 回/週の頻度で測定した。混餌飼料の調製は 2 週間を超えない頻度で行った。出生後 21 日目に児動物の半数を解剖に供した。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り灌流固定を行った。各群雄 33~41 例、雌 12~16 例の児動物は CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔下で放血し、脳、肝臓重量(雄のみ)を測定後、脳はメタカーンもしくはブアン固定液、肝臓は 10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。肝臓の一部は液体窒素により凍結し、保存した。残り半数の児動物は出生後 77 日目まで AFB<sub>1</sub> 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 日目に各群 10 例の雄児動物を離乳時と同様に 4% PFA による灌流固定に供した。各群雄 18~20 例、雌 10 例の児動物は CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔下で放血し、脳、肝臓重量(雄のみ)を測定後、脳はメタカーンもしくはブアン固定

液、肝臓は 10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。肝臓の一部は液体窒素により凍結し、保存した。母動物は分娩後 22 日目に CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔下で放血し、脳、肝臓重量を測定後、脳はブアン固定液、肝臓は 10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。肝臓の一部は液体窒素により凍結し保存した。

母動物、出生後 21 日及び 77 日目の児動物雌雄各 10 例の脳、肝臓は HE 染色標本を作製し観察を行った。

PFA 灌流固定脳標本については大脳の Bregma の後方約-3.0 mm (出生後 21 日目)、または約-3.5 mm (出生後 77 日目) の 1 カ所で冠状断面を作製して、その前後の対称面(2 切面)が薄切面となるようにパラフィン包埋し、3 µm 厚の連続切片を作製した。切片は Table S1 に示した条件で以下の各分子に対する抗体を用いて免疫染色を行った。顆粒細胞層における新生ニューロンの分化指標である PAX6、TBR2、DCX、beta III tubulin、介在ニューロンの指標である reelin、PVALB、CALB1、CALB2、成熟ニューロンの指標である NeuN、細胞増殖活性の指標である PCNA、アセチルコリン作動性レセプターである cholinergic receptor、nicotinic、alpha 7 (CHRNA7) を DAB 発色にて ABC 法により染色した。アポトーシス活性の指標として TUNEL 染色を行った。PAX6、TBR2、DCX、beta III tubulin、PCNA 及び TUNEL 陽性細胞数について海馬歯状回 SGZ の単位長さ当りの陽性細胞数を算出した。reelin、PVALB、CALB1、CALB2、NeuN 及び CHRNA7 については、海馬歯状回門における単位面積当りの陽性細胞数の検索を行った。

出生後 21 日目の 0 及び 1.0 ppm 群のメタカーン固定脳標本を用いて大脳の Bregma の後方約-3.0 mm の 2 mm 厚切片より海馬部分を採取し、QIAzol (Qiagen) 及び RNeasy Mini

kit (Qiagen) を用いて total RNA を抽出した。また 0、0.1、0.3、1.0 ppm 各群の母動物及び雄児動物の凍結肝臓サンプルより RNeasy Mini kit (Qiagen) を用いて total RNA を抽出した。海馬、肝臓いずれも 2 µg の total RNA から cDNA を合成し、real-time RT-PCR 法により遺伝子発現解析を行った。

#### (統計学的解析)

母動物及び離乳後の児動物の体重ならびに臓器重量、摂餌量、摂水量、免疫組織化学染色、TUNEL 染色における陽性細胞のカウント数、遺伝子発現解析結果は群平均及び標準偏差を算出した。離乳までの児動物の体重及び臓器重量、免疫組織化学染色、TUNEL 染色における陽性細胞のカウント数については母動物ごとに平均値を算出し、さらに群平均及び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、陽性細胞数、遺伝子発現解析結果について、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 の方法により対照群と各投与群との検定を行った。2 群間の比較においては各群の分散を  $F$  検定により比較し、等分散の場合は Student の  $t$  検定、不等分散の場合は Aspin-Welch の  $t$  検定により対照群と各投与群との検定を行った。病理組織学的所見 (カテゴリカルデータ) については、Mann-Whitney's  $U$ -test により対照群と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各投与群で比較した。

#### (倫理面への配慮)

投与実験はいずれも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

### <T-2 トキシンのマウスにおける発達期曝露影響評価>

#### 胃内乳汁の T-2 トキシンの濃度：

0 ppm 群の胃内乳汁に T-2 トキシンは検出されず (定量下限 0.05 ppm)、12 ppm 群の胃内乳汁における T-2 トキシン濃度は 0.08 ppm であった。

#### 病理組織学的変化および免疫組織学的変化：

母動物では 3 ppm より前胃の扁平上皮過形成、9 ppm でびらんの頻度ないし程度の増加がみられた (Table 1)。また 9 ppm では脾臓の髓外造血、胸腺の萎縮の程度及び頻度が増加した。児動物では出生後 21 日目の雄 3 ppm より胸腺のリンパ球アポトーシスの増加が TUNEL 陽性細胞数の増加とともに認められた。その他の器官及び出生後 77 日目の児動物では所見はみられなかった (Table 2)。

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 GFAP 陽性細胞 (type-1 幹細胞) 数及び BLBP 陽性細胞 (type-1 幹細胞～type-2b 前駆細胞に発現) 数が 9 ppm で、PAX6 陽性細胞 (type-1 幹細胞～type-2a 前駆細胞) 数及び TBR2 陽性細胞 (type-2b 前駆細胞) 数が 3 ppm の低値がみられた。DCX 陽性細胞 (type-2b 前駆細胞～未熟顆粒細胞) 数及び NeuN 陽性細胞 (成熟顆粒細胞) 数には変化がみられなかった (Figure 1)。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、その他の介

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 (Figure 2)。顆粒細胞層下帯では細胞増殖活性の指標であるPCNA陽性細胞数には変動が見られなかったが、アポトーシスの指標であるTUNEL陽性細胞数の増加ないし増加傾向が3 ppmより認められた (Figure 3)。これらの変化はいずれも出生後77日目では消失した。また過酸化脂質であるMDA陽性細胞数が9 ppmで増加し、幹細胞の増殖分化の制御に関わるSCF陽性細胞数が9 ppmで低下した (Figures 4, 5)。

#### 遺伝子発現解析：

顆粒細胞の分化マーカーをコードする *Pax6*、*Eomes*、*Dcx*、*reelin* をコードする *Reln* はいずれも9 ppmで発現量が増加した (Table 3)。アポトーシスに関連する遺伝子群ではミトコンドリア経路における制御因子である *Bax* の発現が増加した。また、SCFをコードする *Kitl* の低下がみられた。海馬に入力する神経伝達物質の一つであるグルタミン酸トランスポートター *Slc17a6* とAMPA型レセプター *Gria2* の発現低下がみられた一方でNMDA型レセプターである *Grin2a* の発現量増加がみられた。アセチルコリンのレセプターである *Chrna4* 及び *Chrn2* の発現量低下がみられた。

#### <アフラトキシン M<sub>1</sub> のラットにおける発達期曝露影響評価>

##### 胃内乳汁のAFM<sub>1</sub>濃度：

0.5 ppm 群の胃内乳汁におけるAFM<sub>1</sub>濃度は26 ppbであった。

##### 体重、飲水量、摂餌量：

母動物では、体重、摂餌量、摂水量への影響は認められなかった (Figure 6)。児動物

では雄1.0 ppmで出生後14日目に有意な体重低値がみられた (Table 4, 5)。

##### 着床数、産仔数：

着床数、産仔数にAFB<sub>1</sub>による影響は認められなかった (Table 6)。

##### 臓器重量：

母動物では1.0 ppmで肝臓の絶対及び相対重量の高値が認められた。(Table 6)。

児動物では離乳時及び出生後77日目のいずれにおいても脳及び肝臓重量に変化はみられなかった (Table 7)。

##### 病理学的変化および免疫組織学的変化：

母動物及び児動物 (離乳時、出生後77日目) のいずれにおいても脳及び肝臓に病理組織学的所見はみられなかった (Table 8)。

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DCX陽性細胞 (type-2b 前駆細胞～未熟顆粒細胞) 数が0.3 ppmより減少した (Figure 7)。PAX6陽性細胞 (type-1 幹細胞～type-2a 前駆細胞) 数、TBR2陽性細胞 (type-2b 前駆細胞) 数、beta III tubulin陽性細胞 (未熟顆粒細胞) 数に変動はみられなかった。歯状回門部では、*reelin*、PVALB、CALB1、CALB2を発現するいずれの介在ニューロンやNeuN陽性成熟ニューロン数にも変動を認めなかった (Figure 8)。SGZにおけるアポトーシス活性には変動が見られなかったが、細胞増殖活性の指標であるPCNA陽性細胞数の減少が1.0 ppmで認められた (Figure 9)。またアセチルコリンレセプターの一つであるCHRNA7陽性細胞数の減少が0.3 ppmから認められた (Figure 10)。これらの変化はいずれも出生後77日目では消失した。

#### 遺伝子発現解析：

アセチルコリンの合成に関わる転移酵素をコードする *Chat* の増加及びレセプターである *Chrna7* の減少が認められた (Table 9)。DNA 傷害を修復する遺伝子群の発現量に変動はみられなかった。

肝臓サンプルを用いた遺伝子発現解析では、母動物の 1.0 ppm で AFB<sub>1</sub> の代謝に関わる *Cyp1a2* の発現量が増加した (Table 10)。児動物においては AFM<sub>1</sub> の代謝に関わると考えられるいずれの遺伝子にも変動はみられなかった。

#### D. 考察

##### <T-2 トキシンのマウスにおける発達期曝露影響評価>

平成 24 年度に報告した児動物の胸腺重量の低下に加えて組織学的にリンパ球のアポトーシス増加が雄 3 ppm より認められた。また母動物では T-2 トキシンの反復投与で報告されている造血毒性、免疫毒性、前胃への刺激性を反映した所見が脾臓、胸腺、前胃に認められた。母動物、児動物ともに免疫系への影響が最も鋭敏に認められた。

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、平成 24 年度に報告した TBR2 陽性細胞 (type-2b 前駆細胞) の減少 ( $\geq 3$  ppm) に加えて、GFAP 陽性細胞 (type-1 幹細胞) 数及び BLBP 陽性細胞 (type-1 幹細胞～type-2a 前駆細胞) 数が 9 ppm で、PAX6 陽性細胞 (type-1 幹細胞から type-2a 前駆細胞) 数が 3 ppm から減少しており、T-2 トキシンによるニューロン新生障害では 3 ppm では type-2 前駆細胞、9 ppm ではさらに type-1 幹細胞が標的となると考えられた。遺伝子発現解析ではこれらの分化マーカーをコードする *Pax6*、*Eomes* (*Tbr2*)、*Dcx* の発現が増加したが、T-2 トキシンで報

告されている蛋白合成阻害作用により、これらの分子を発現する細胞数は変化しないか低下したと考えられた。SGZ では TUNEL 陽性細胞数が 3 ppm より増加しており、遺伝子発現解析では *Bax* 遺伝子の発現量増加がみられたことから内因性経路によるアポトーシスが誘導されたと考えられた。過酸化脂質の蓄積を示す MDA 陽性細胞数が 9 ppm で増加していることから、酸化ストレスの上昇により type-1 幹細胞ないし type-2 前駆細胞のアポトーシスを誘導したと考えられた。また SGZ では type-1 幹細胞及び type-2 前駆細胞の分化、生存に関わる因子である SCF 陽性細胞数の減少がみられ、*Kitl* 遺伝子の発現が低下したことから、酸化ストレスの上昇に加えて SCF による幹細胞分化制御の低下がアポトーシスの誘導に関わっていると考えられた。神経伝達物質であるグルタミン酸のトランスポーター及びレセプターである *Slc17a6*、*Gria2* の発現量低下は type-1 幹細胞及び type-2 前駆細胞数の低下を反映した可能性に加えて、グルタミン酸作動性入力の低下によりニューロン新生が抑制された可能性を示すものと考えられた。*Grin2a* は神経分化段階において *reelin* によって発現が増加することが知られており、顆粒細胞層における前駆細胞の移動異常を反映して介在ニューロンからの *reelin* 産生が増加した結果発現が上昇したのと考えられた。また、*reelin* は DCX 陽性細胞数を増加させることが知られており、T-2 トキシンの障害に対して分化中期以降の顆粒細胞減少から保護している可能性が考えられた。アセチルコリンのニコチン型レセプターである *Chrna4* 及び *Chrn2* の発現量が減少したことからアセチルコリン作動性の入力が増加し、歯状回門から SGZ の type-2 前駆細胞への GABA 作動性入力が抑制されたことにより、type-2 前駆細胞を標

的としたニューロン新生障害をもたらした可能性が考えられた。

本実験における児動物の無毒性量はニューロン新生障害及び胸腺のアポトーシス増加が3 ppmよりみられたことから1 ppmと判断され、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議による暫定最大1日耐容摂取量を設定する根拠となったブタにおける造血器毒性発現曝露量と比較して5倍から15倍程度高い値であった。

#### <アフラトキシン M<sub>1</sub> のラットにおける発達期曝露影響評価>

妊娠 SD ラットに AFB<sub>1</sub> を 1.0 ppm を最高用量として妊娠 6 日目から分娩後 21 日目まで混餌投与することで、児動物に AFM<sub>1</sub> として経胎盤、経乳的に曝露させ、曝露終了時ならびに出生後 77 日目における影響について解析した。母動物の肝臓では AFB<sub>1</sub> を代謝する *Cyp1a2* の発現量上昇がみられ、酵素誘導を反映したと考えられる肝重量増加が 1.0 ppm で認められた。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、DCX 陽性細胞 (type-2b 前駆細胞～未熟顆粒細胞) 数の減少が離乳時に 3 ppm より認められ、TBR2 陽性細胞 (type-2b 前駆細胞) 数、beta III tubulin 陽性細胞 (未熟顆粒細胞) 数に影響がみられなかったことから、AFM<sub>1</sub> によるニューロン新生障害は type-3 前駆細胞を標的とすることが明らかとなった。同用量では歯状回門におけるアセチルコリンレセプター-CHRNA7 を発現する介在ニューロンの減少が認められた。遺伝子発現解析において *Chrna7* 遺伝子発現量が減少し、合成酵素である *Chat* 遺伝子の発現量が上昇したことからレセプターの発現が低下し、代償性にアセチルコリンの合成が上昇している可能性が考えられた。AFM<sub>1</sub> で知られている DNA

障害に対する修復系遺伝子の変動はみられず、ニューロン新生障害に DNA 障害が関与する可能性は低いと考えられた。SGZ では細胞増殖活性の低下が 1.0 ppm で認められており、コリン作動性入力の低下によりニューロン新生が障害されている可能性が考えられた。

#### E. 結論

T-2 トキシンのマウスにおける発達期曝露により、児動物の海馬歯状回では type-1 幹細胞及び type-2 前駆細胞の障害が離乳時に認められた。酸化ストレスの上昇、幹細胞因子の減少、グルタミン作動性入力及びコリン作動性入力の複数の機序によりこれらの分化段階の異なる顆粒細胞のアポトーシスが誘導されたと考えられた。児動物の無毒性量は胸腺及びニューロン新生への影響が 3 ppm で見られたことから 1 ppm と判断された。

AFM<sub>1</sub> のラットにおける発達期曝露により、児動物の海馬歯状回ではコリン作動性入力の減少及び細胞増殖活性の低下を伴う type-3 前駆細胞の減少が 0.3 ppm で認められた。児動物のニューロン新生障害における無毒性量は 0.1 ppm と判断された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

1) 田中 猛、板橋 恵、阿部一、Wang Liyun、村上智亮、吉田敏則、渋谷 淳: T-2 トキシンの発達期暴露によるマウス海馬歯状回における離乳時ニューロン新生に対する影響, 第 41 回日本毒性学会学術年会, 神戸, 第 41 回日本毒性学会学術年会要旨集: P-17, p.251, 7月 2-4 日, 2014

2) Takeshi Tanaka, Hajime Abe, Megu Itahashi, Masayuki Kimura, Sayaka Mizukami, Tomoaki Murakami, Toshinori Yoshida and, Makoto Shibutani: Maternal exposure effect of T2-toxin on hippocampal neurogenesis in mouse offspring. XVIII International Congress of Neuropathology, Rio de Janeiro-Brazil 14-18 September 2014, Special Issue: Abstracts of the XVIII International Congress of Neuropathology, Brain Pathology (2014), 24 (Suppl. 1), p68 (P19-04).

3) 田中 猛、阿部 一、板橋 恵、白木彩子、吉田敏則、渋谷 淳: アフラトキシン M<sub>1</sub> のラット発達期暴露による離乳時での海馬歯状回ニューロン新生に対する影響, 第31回日本毒性病理学会学術年会, 東京, 第31回日本毒性学会学術年会講演要旨集:P-03, p.53, 1月29-30日, 2015

## 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

**Table 1****Histopathological findings of dams exposed to T-2 toxin from gestation day 6 to day 21 after delivery**

	T-2 toxin in diet (ppm)			
	0 (Control)	1	3	9
No. of dams examined	9	10	10	10
<b>Forestomach</b>				
Squamous cell hyperplasia	0 <sup>a</sup> (0/0/0) <sup>b</sup>	0 (0/0/0)	4 (4/0/0) <sup>†</sup>	5* (1/2/2) <sup>†</sup>
Erosion	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	1 (1/0/0)	4 (1/3/0) <sup>†</sup>
<b>Brain</b>				
Abnormalities detected	0 <sup>a</sup>	0	0	0
<b>Liver</b>				
Abnormalities detected	0	0	0	0
<b>Spleen</b>				
Extramedullary hematopoiesis	0 (0/0/0)	1 (1/0/0)	1 (0/1/0)	6* (2/3/1) <sup>††</sup>
<b>Thymus</b>				
Atrophy	0 (0/0/0)	1 (1/0/0)	0 (0/0/0)	5* (2/3/0) <sup>†</sup>

<sup>a</sup> Total number of animals that exhibited abnormality.

<sup>b</sup> Number of animals with each grade (grade 1/grade 2/grade 3). The degree of abnormalities: grade 1, slight; grade 2, moderate; grade 3, marked.

\* $P < 0.05$ , significantly different from 0-ppm controls by the Fisher's exact probability test.

<sup>†</sup> $P < 0.05$ , <sup>††</sup> $P < 0.01$ , significantly different from 0-ppm controls by the Mann-Whitney's  $U$ -test.



**Table 2****Histopathological findings of offspring exposed to T-2 toxin during gestation and lactation**

	T-2 toxin in diet (ppm)			
	0 (Control)	1	3	9
<b>Male offspring on PND 21</b>				
No. of animals examined	10	10	10	10
Thymus				
Lymphocytic apoptosis	1 <sup>a</sup> (1/0/0) <sup>b</sup>	0 (0/0/0)	6 (5/1/0) <sup>†</sup>	10 <sup>**</sup> (1/9/0) <sup>††</sup>
Apoptotic cell ratio (%) <sup>c</sup>	0.9±0.2 <sup>d</sup>	0.9 ± 0.3	1.3 ± 0.5 <sup>‡</sup>	1.8 ± 0.4 <sup>‡‡</sup>
Brain, liver and spleen				
Abnormalities detected	0 <sup>a</sup>	0	0	0
<b>Female offspring on PND 21</b>				
No. of animals examined	10	10	10	10
Thymus				
Lymphocytic apoptosis	2 (2/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	5 (5/0/0)
Apoptotic cell ratio (%)	1.1±0.2	1.1 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.3 ± 0.4
Brain, liver and spleen				
Abnormalities detected	0	0	0	0
<b>Male offspring on PND 77</b>				
No. of animals examined	10	10	10	10
Brain, liver, spleen and thymus				
Abnormalities detected	0	0	0	0
<b>Female offspring on PND 77</b>				
No. of animals examined	10	10	10	10
Brain, liver, spleen and thymus				
Abnormalities detected	0	0	0	0

*Abbreviation:* PND, postnatal day.

<sup>a</sup>Total number of animals which exhibited abnormality.

<sup>b</sup>Number of animals with each grade (grade 1/grade 2/grade 3). The degree of abnormalities: grade 1, slight; grade 2, moderate; grade 3, marked.

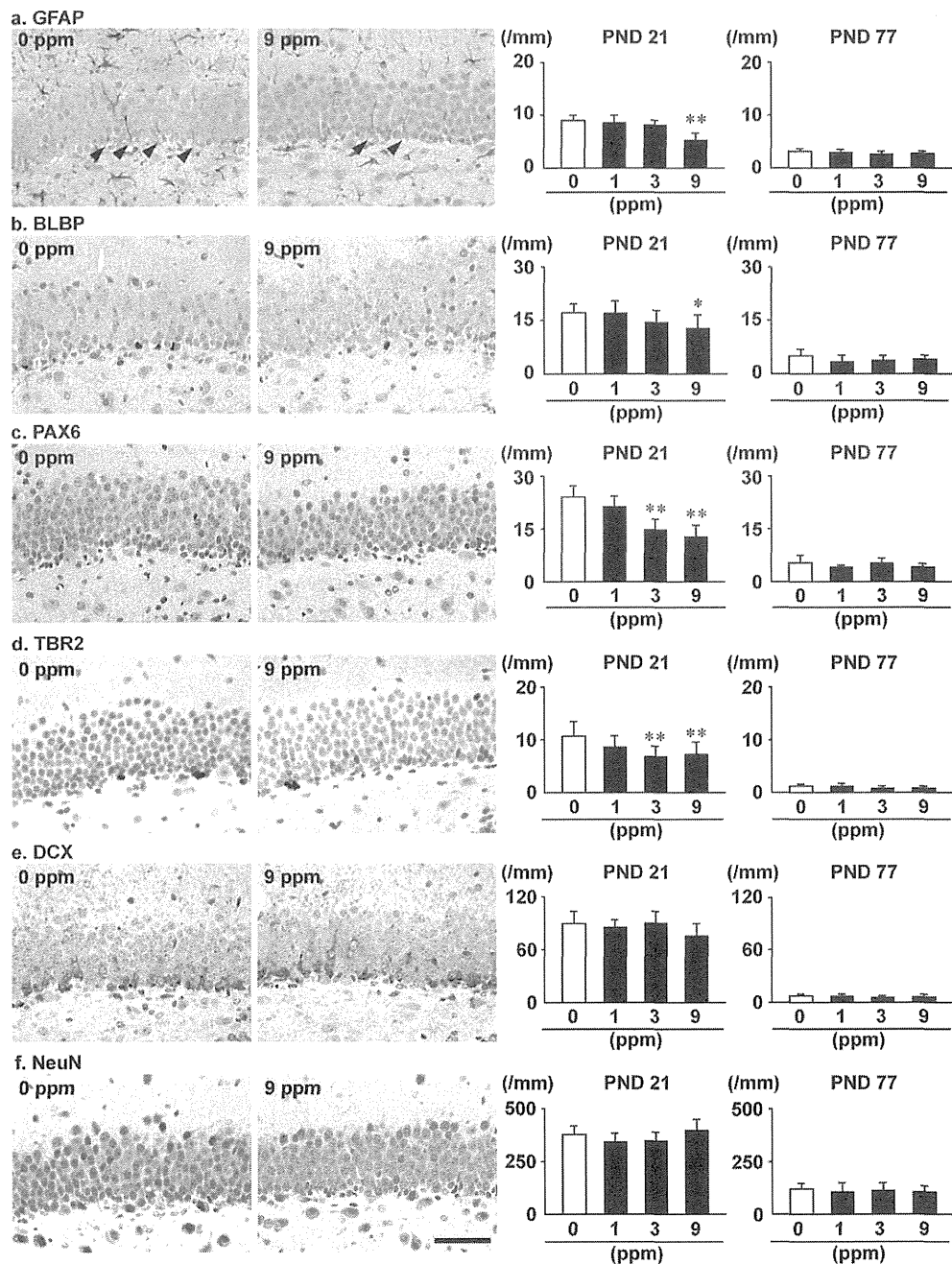
<sup>c</sup>Percentage of immunoreactive cells in terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling assay per total cells.

<sup>d</sup>Mean ± SD.

<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , significantly different from 0-ppm controls by the Fisher's exact probability test.

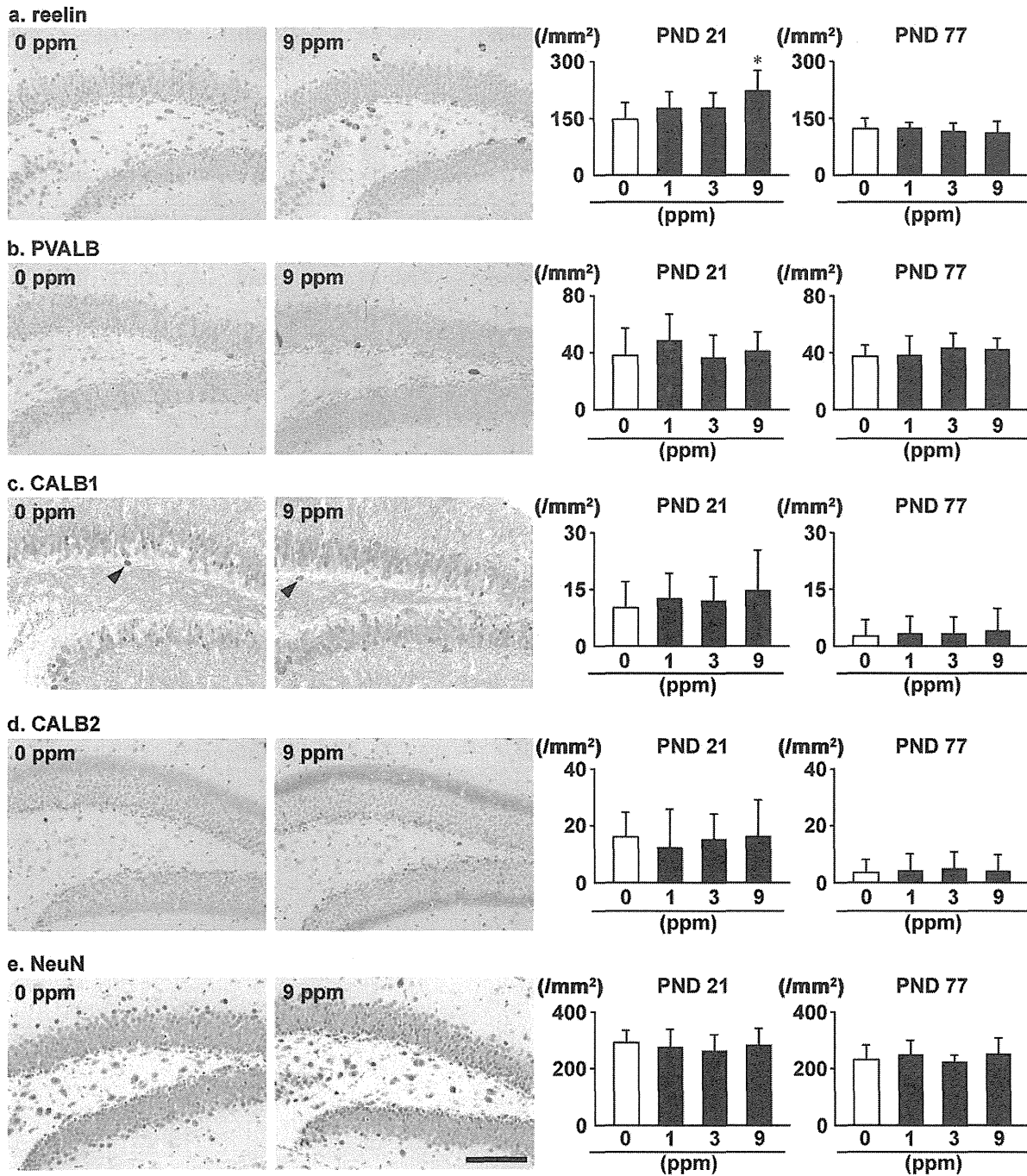
<sup>†</sup> $P < 0.05$ , <sup>††</sup> $P < 0.01$ , significantly different from 0-ppm controls by the Mann-Whitney's *U*-test.

<sup>‡</sup> $P < 0.05$ , <sup>‡‡</sup> $P < 0.01$ , significantly different from 0-ppm controls by the Dunnett's test or Steel's test.



**Figure 1**

**Distribution and number of immunoreactive cells for neuronal stage-defining markers of granule cell lineages in the subgranular zone (SGZ), and a mature neuronal marker in the granule cell layer (GCL) of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to T-2 toxin.** (a) Glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the SGZ, arrowheads indicate immunoreactive cells. (b) Brain lipid-binding protein (BLBP) in the SGZ. (c) Paired box 6 (PAX6) in the SGZ. (d) T box brain 2 (TBR2) in the SGZ. (e) Doublecortin (DCX) in the SGZ. (f) Neuron-specific nuclear protein (NeuN) in the GCL. Representative images from 0-ppm controls and the 9-ppm group at PND 21 are shown. Magnification: 400 $\times$ ; bar = 50  $\mu$ m. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit length (mm) of the SGZ or GCL of the bilateral sides. Values are expressed as mean + SD. N = 9–10/group (0 ppm controls, 9; 1, 3, and 9 ppm T-2 toxin, 10). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , significantly different from 0-ppm controls by the Dunnett's test or Steel's test

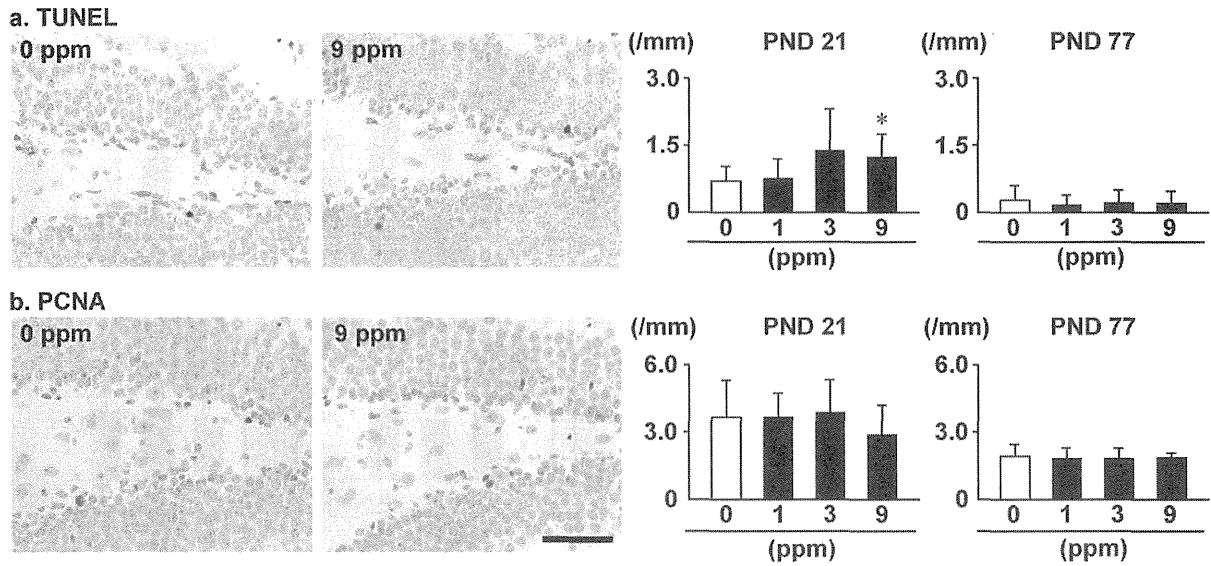


**Figure 2**

**Distribution and number of immunoreactive cells for interneuronal markers and a mature neuronal marker in the hilus of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to T-2 toxin. (a)**

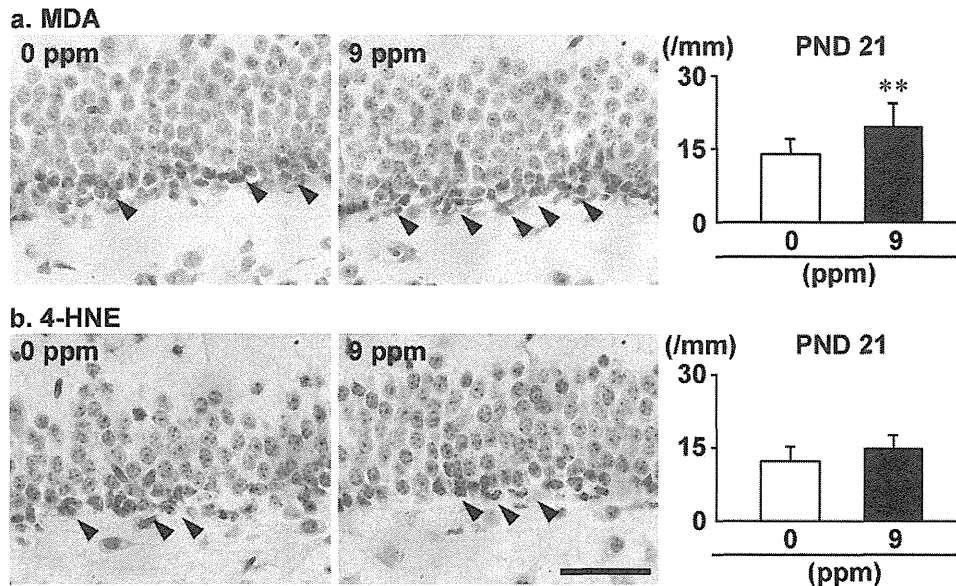
Reelin. (b) Parvalbumin (PVALB). (c) Calbindin (CALB1), arrowheads indicate immunoreactive cells. (d) Calretinin (CALB2). (e) NeuN. Representative images from 0-ppm controls and the 9-ppm group at PND 21 are shown.

Magnification: 200×; bar = 100 μm. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit area (mm<sup>2</sup>) of the hilus of bilateral hemispheres. Values are expressed as the mean + SD. N = 9–10/group (0 ppm controls, 9; 1, 3, and 9 ppm T-2 toxin, 10). \* *P* < 0.05, significantly different from 0-ppm controls by the Dunnett's test or Steel's test



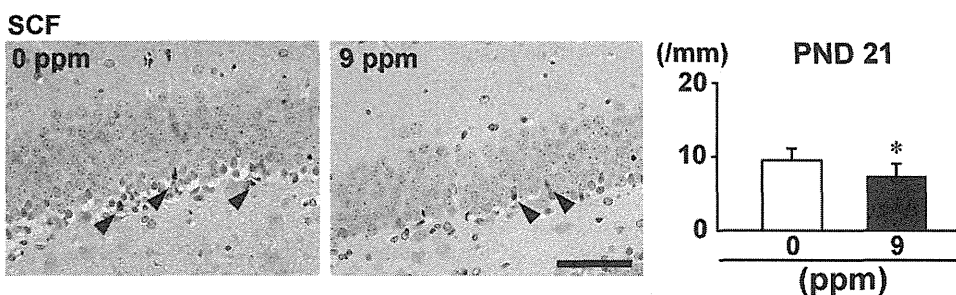
**Figure 3**

**Distribution and number of apoptotic and proliferating cells in the SGZ of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to T-2 toxin.** (a) Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL). (b) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Representative images from 0-ppm controls and the 9-ppm group at PND 21 are shown. Magnification: 400 $\times$ ; bar = 50  $\mu$ m. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit length (mm) of the SGZ of the bilateral sides. Values are expressed as the mean + SD. N = 9–10/group (0 ppm controls, 9; 1, 3 and 9 ppm T-2 toxin, 10). \*  $P < 0.05$ , significantly different from 0-ppm controls by the Dunnett's test or Steel's test



**Figure 4**

**Distribution and number of immunoreactive cells for lipid peroxidation end products in the SGZ of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 offspring exposed to T-2 toxin.** (a) Malondialdehyde (MDA). (b) 4-Hydroxynonenal (4-HNE). Representative images from 0-ppm controls and the 9-ppm group at PND 21 are shown. Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification: 600x; bar = 40 μm. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit length (mm) of the SGZ of the bilateral sides. Values are expressed as the mean + SD. N = 9-10/group (0 ppm controls, 9; 9 ppm T-2 toxin, 10). \*\* $P < 0.01$ , significantly different from 0-ppm controls by the Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test



**Figure 5**

**Distribution and number of immunoreactive cells for stem cell factor (SCF) in the SGZ of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 offspring exposed to T-2 toxin.** Representative images from 0-ppm controls and the 9-ppm group at PND 21 are shown. Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification: 400x; bar = 50 μm. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit length (mm) of the SGZ of the bilateral sides. Values are expressed as mean + SD. N = 9-10/group (0 ppm controls, 9; 9 ppm T-2 toxin, 10). \* $P < 0.05$ , significantly different from 0-ppm controls by the Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test

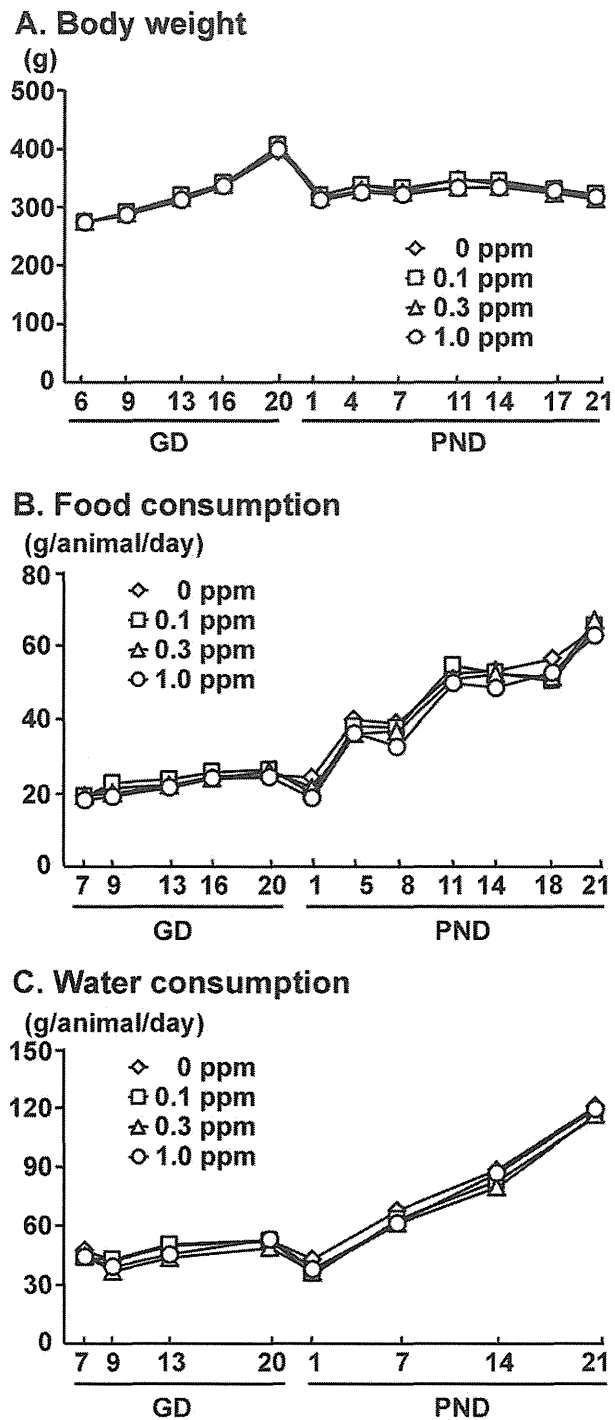
**Table 3****Transcript levels in the hippocampal dentate gyrus of PND 21 offspring exposed to T-2 toxin**

	T-2 toxin in diet (ppm)			
	0 (Control)		9	
	Relative transcript level normalized to		Relative transcript level normalized to	
	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt</i>
No. of animals examined	6	6	6	6
Neuronal stage-defining markers of granule cell lineages				
<i>Pax6</i>	1.03±0.24 <sup>a</sup>	1.01±0.13	1.75±0.97	1.30±0.33*
<i>Eomes</i>	1.11±0.49	1.16±0.63	2.75±1.35*	3.22±1.67
<i>Dcx</i>	1.03±0.26	1.05±0.33	2.01±0.97 *	2.19±1.81
Interneuron subpopulations				
<i>Pvalb</i>	1.07±0.44	1.04±0.36	1.27±0.84	0.97±0.48
<i>Reln</i>	1.11±0.57	1.13±0.61	2.68±1.84*	2.09±0.86*
Intrinsic pathway of apoptosis				
<i>Bad</i>	1.03±0.24	1.02±0.19	1.23±0.55	0.95±0.19
<i>Bak</i>	1.01±0.14	1.01±0.12	1.01±0.10	0.88±0.33
<i>Bax</i>	1.01±0.14	1.00±0.04	1.53±0.63*	1.22±0.38
<i>Bcl2</i>	1.01±0.12	1.01±0.11	1.23±0.54	0.98±0.30
<i>Bid</i>	1.01±0.13	1.01±0.15	1.13±0.32	0.95±0.32
<i>Casp2</i>	1.01±0.15	1.00±0.08	1.41±0.67	1.07±0.15
<i>Casp3</i>	1.01±0.14	1.00±0.10	1.43±0.61	1.11±0.20
<i>Casp9</i>	1.01±0.13	1.01±0.14	0.91±0.09	0.78±0.32
<i>Casp12</i>	1.04±0.33	1.07±0.46	1.54±1.24	1.10±0.53
Stem cell regulators				
<i>Kitl</i>	1.09±0.52	1.07±0.40	0.58±0.15*	0.52±0.26*
<i>Kit</i>	1.05±0.33	1.05±0.33	1.15±0.52	0.98±0.54
<i>Notch1</i>	1.06±0.36	1.04±0.31	1.09±0.23	0.98±0.51
Glutamate transporters and receptors				
<i>Slc17a6</i>	1.02±0.19	1.00±0.10	0.61±0.37*	0.56±0.36*
<i>Slc17a7</i>	1.01±0.19	1.02±0.25	1.05±0.33	0.97±0.66
<i>Gria1</i>	1.01±0.16	1.02±0.23	1.06±0.38	0.98±0.73
<i>Gria2</i>	1.02±0.23	1.01±0.16	0.68±0.14*	0.62±0.31*
<i>Gria3</i>	1.04±0.31	1.06±0.38	1.77±0.78	1.43±0.60
<i>Grin2a</i>	1.02±0.23	1.04±0.29	2.11±1.14*	1.61±0.54*
<i>Grin2d</i>	1.01±0.20	1.01±0.13	1.47±0.69	1.14±0.39
Cholinergic receptors				
<i>Chrna4</i>	1.01±0.15	1.01±0.11	0.65±0.33*	0.63±0.40
<i>Chrna7</i>	1.02±0.20	1.03±0.26	1.56±0.68	1.31±0.69
<i>Chrnb2</i>	1.01±0.17	1.01±0.12	0.68±0.19*	0.62±0.31*

*Abbreviations:* *Bad*, BCL2-associated agonist of cell death; *Bak*, BCL2-antagonist/killer 1; *Bax*, Bcl2-associated X protein; *Bcl2*, B-cell CLL/lymphoma 2; *Bid*, BH3 interacting domain death agonist; *Casp2*, caspase 2; *Casp3*, caspase 3; *Casp9*, caspase 9; *Casp12*, caspase 12; *Chrna4*, cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 4; *Chrna7*, cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 7; *Chrnb2*, cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 2 (neuronal); *Dcx*, doublecortin; *Eomes (Tbr2)*, eomesodermin homolog; *Gapdh*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *Gria1*, glutamate receptor, ionotropic, AMPA1 (alpha 1); *Gria2*, glutamate receptor, ionotropic, AMPA2 (alpha 2); *Gria3*, glutamate receptor, ionotropic, AMPA3 (alpha 3); *Grin2a*, glutamate receptor, ionotropic, NMDA2A (epsilon 1); *Grin2d*, glutamate receptor, ionotropic, NMDA2D (epsilon 4); *Hprt*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase; *Kit*, kit oncogene; *Kitl*, kit ligand; *Notch1*, notch 1; *Pax6*, paired box 6; *Pvalb*, parvalbumin; *Reln*, reelin; *Slc17a6*, solute carrier family 17 (sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter), member 6; *Slc17a7*, solute carrier family 17 (sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter), member 7.

<sup>a</sup> Mean ± SD.

\**P* < 0.05, significantly different from 0-ppm controls by the Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test.



**Figure 6**

In life parameters of dams exposed to Aflatoxin B<sub>1</sub> from GD 6 to PND 21 on weaning of offspring. (A) Body weight. (B) Food consumption. (C) Water consumption. Mean values are plotted. N = 10–12/group (0 ppm controls, 10; 0.1 ppm AFB<sub>1</sub>, 11; 0.3, and 1.0 ppm AFB<sub>1</sub>, 12).

**Table 4****Body weight changes of male offspring exposed to Aflatoxin M<sub>1</sub>**

	AFB <sub>1</sub> in diet (ppm)			
	0 (Control)	0.1	0.3	1.0
No. of offspring examined	10	11	12	12
PND 1	7.8±0.7 <sup>a</sup>	7.6±0.5	7.6±0.7	7.7±0.8
PND 4	11.7±0.9	11.3±0.7	11.0±1.2	11.1±1.0
PND 7	19.2±1.2	18.8±0.9	18.4±1.7	18.5±1.5
PND 11	30.5±2.1	29.7±1.6	28.9±2.0	28.3±2.0
PND 14	38.7±2.8	38.0±1.8	37.0±2.5	36.8±2.5*
PND 18	50.3±4.1	48.1±2.9	47.8±2.7	47.7±2.9
PND 21	64.5±5.0	63.0±3.4	61.9±3.6	60.7±4.6
No. of offspring examined	29	31	31	31
PND 28	108.6±9.6	108.1±5.9	107.0±7.6	106.2±6.9
PND 35	169.6±15.5	171.0±9.2	171.0±12.1	168.5±12.2
PND 42	235.0±20.8	239.7±14.6	239.9±17.7	237.0±18.6
PND 49	305.6±27.3	311.0±23.6	313.3±22.2	315.1±26.0
PND 56	363.3±27.7	370.4±28.3	371.7±25.4	374.2±31.6
PND 63	401.2±33.6	411.2±33.1	410.0±28.2	414.5±36.0
PND 70	439.2±37.6	451.6±37.1	450.2±32.7	458.2±41.4
PND 77	464.1±40.0	475.9±31.6	472.9±36.4	483.4±46.2

*Abbreviations:* AFB<sub>1</sub>, Aflatoxin B<sub>1</sub>; PND, postnatal day.

<sup>a</sup> Mean ± S.D.

\**P* < 0.05, significantly different from 0-ppm controls by the Dunnett's test or Steel's test.



**Table 5**  
**Body weight changes of female offspring exposed to Aflatoxin M<sub>1</sub>**

	AFB <sub>1</sub> in diet (ppm)			
	0 (Control)	0.1	0.3	1.0
No. of offspring examined	10	11	12	12
PND 1	7.5±0.5 <sup>a</sup>	7.2±0.5	7.1±0.8	7.4±0.7
PND 4	11.5±1.0	10.7±1.1	10.7±1.1	11.0±0.9
PND 7	18.7±1.4	17.9±2.0	17.7±1.6	18.0±1.0
PND 11	29.7±2.2	28.6±2.7	28.0±2.1	27.8±1.5
PND 14	37.8±2.7	37.2±1.8	35.8±2.4	36.0±1.6
PND 18	48.9±3.8	47.0±2.4	46.5±3.3	46.7±2.1
PND 21	61.8±4.9	60.4±2.9	59.7±4.4	59.6±3.5
No. of offspring examined	10	10	10	10
PND 28	101.2±4.0	96.9±4.5	97.0±6.6	98.3±7.4
PND 35	150.9±5.8	144.2±7.1	144.5±8.8	145.2±9.4
PND 42	187.6±9.4	182.8±9.9	181.8±10.9	182.3±12.5
PND 49	219.8±12.6	212.7±10.2	226.1±33.0	219.8±16.7
PND 56	247.9±15.1	240.1±12.8	240.8±17.4	245.4±21.6
PND 63	263.6±17.9	252.4±13.7	254.7±20.6	263.2±23.8
PND 70	279.8±16.7	272.6±15.0	272.7±21.3	283.7±26.0
PND 77	292.9±17.9	285.2±16.2	280.8±23.8	293.6±28.0

*Abbreviations:* AFB<sub>1</sub>, Aflatoxin B<sub>1</sub>; PND, postnatal day.

<sup>a</sup>Mean ± S.D.

**Table 6****Reproductive parameters, body and organ weights of dams exposed to Aflatoxin B<sub>1</sub> from early gestation to the end of lactation**

	AFB <sub>1</sub> in diet (ppm)			
	0 (Control)	0.1	0.3	1.0
No. of dams examined	10	11	12	12
<b>Reproductive parameters</b>				
No. of implantation sites	12.5±1.6 <sup>a</sup>	13.4±1.4	13.9±1.4	13.6±1.8
No. of live offspring (PND 0)	12.0±2.0	13.1±1.8	13.4±2.1	12.7±1.8
<b>Body and organ weights at PND 22</b>				
Body weight (g)	315.3±18.8	322.2±23.8	313.4±21.2	314.8±16.2
Brain weight	Absolute (g)	1.98±0.09	1.98±0.09	2.01±0.08
	Relative (g/100g BW)	0.63±0.04	0.62±0.04	0.64±0.04
Liver weight	Absolute (g)	13.63±1.50	14.75±1.13	14.53±1.51
	Relative (g/100g BW)	4.34±0.54	4.58±0.25	4.63±0.32
<b>AFB<sub>1</sub> intake (µg/kg BW/day)</b>				
Gestation period	0	7.1±0.6	20.7±1.2	66.7±5.7
Postnatal period	0	13.6±1.0	41.7±2.8	132.7±7.5

*Abbreviations:* AFB<sub>1</sub>, Aflatoxin B<sub>1</sub>; BW, body weight; PND, postnatal day.

<sup>a</sup>Mean ± SD.

\*\**P* < 0.01, significantly different from 0-ppm controls by the Dunnett's test or Steel's test.

**Table 7****Body and organ weights at the prepubertal and terminal necropsies of offspring exposed to Aflatoxin M<sub>1</sub> during gestation and lactation**

		AFB <sub>1</sub> in diet (ppm)			
		0 (Control)	1	3	9
<b>Male offspring on PND 21</b>					
	No. of animals examined	10	11	12	12
Body weight (g)		60.9 ± 5.2 <sup>a</sup>	62.1 ± 4.6	61.0 ± 5.6	59.6 ± 4.6
Brain weight	Absolute (g)	1.53 ± 0.05	1.55 ± 0.04	1.52 ± 0.06	1.52 ± 0.05
	Relative (g/100g BW)	2.53 ± 0.17	2.50 ± 0.15	2.51 ± 0.17	2.56 ± 0.14
Liver weight	Absolute (g)	2.43 ± 0.25	2.48 ± 0.29	2.51 ± 0.30	2.20 ± 0.18
	Relative (g/100g BW)	3.97 ± 0.26	4.02 ± 0.17	4.02 ± 0.25	3.78 ± 0.23
<b>Female offspring on PND 21</b>					
	No. of animals examined	10	11	12	12
Body weight (g)		62.5 ± 7.1	60.4 ± 3.4	59.5 ± 5.4	59.7 ± 3.7
Brain weight	Absolute (g)	1.48 ± 0.07	1.47 ± 0.05	1.49 ± 0.06	1.47 ± 0.07
	Relative (g/100g BW)	2.47 ± 0.19	2.44 ± 0.15	2.53 ± 0.19	2.48 ± 0.11
<b>Male offspring on PND 77</b>					
	No. of animals examined	11	11	12	12
Body weight (g)		467.3 ± 36.3	474.8 ± 30.2	479.4 ± 37.6	485.3 ± 48.5
Brain weight	Absolute (g)	2.06 ± 0.05	2.11 ± 0.16	2.09 ± 0.07	2.10 ± 0.09
	Relative (g/100g BW)	0.44 ± 0.03	0.44 ± 0.05	0.44 ± 0.03	0.44 ± 0.03
Liver weight	Absolute (g)	19.05 ± 2.37	18.82 ± 1.74	19.08 ± 1.86	18.37 ± 1.45
	Relative (g/100g BW)	4.04 ± 0.29	3.97 ± 0.21	4.00 ± 0.26	3.96 ± 0.16
<b>Female offspring on PND 77</b>					
	No. of animals examined	10	10	10	10
Body weight (g)		292.9 ± 17.9	285.2 ± 16.2	280.8 ± 23.8	293.6 ± 28.0
Brain weight	Absolute (g)	1.98 ± 0.10	1.95 ± 0.06	1.96 ± 0.10	1.92 ± 0.08
	Relative (g/100g BW)	0.68 ± 0.04	0.68 ± 0.04	0.70 ± 0.05	0.66 ± 0.05

*Abbreviations:* AFB<sub>1</sub>, Aflatoxin B<sub>1</sub>; BW, body weight; PND, postnatal day.

<sup>a</sup>Mean ± SD.

**Table 8****Histopathological findings of dams exposed to Aflatoxin B<sub>1</sub> from gestation day 6 to day 21 after delivery and offspring exposed to Aflatoxin M<sub>1</sub> during gestation and lactation**

		AFB <sub>1</sub> in diet (ppm)			
		0 (Control)	0.1	0.3	1.0
<b>Dams</b>					
	No. of animals examined	10	10	10	10
Brain and liver					
	Abnormalities detected	0 <sup>a</sup>	0	0	0
<b>Male offspring on PND 21</b>					
	No. of animals examined	10	10	10	10
Brain and liver					
	Abnormalities detected	0	0	0	0
<b>Female offspring on PND 21</b>					
	No. of animals examined	10	10	10	10
Brain					
	Abnormalities detected	0	0	0	0
<b>Male offspring on PND 77</b>					
	No. of animals examined	10	10	10	10
Brain and liver					
	Abnormalities detected	0	0	0	0
<b>Female offspring on PND 77</b>					
	No. of animals examined	10	10	10	10
Brain					
	Abnormalities detected	0	0	0	0

*Abbreviations:* AFB<sub>1</sub>, Aflatoxin B<sub>1</sub>; PND, postnatal day.

<sup>a</sup>Total number of animals which exhibited abnormality.