

行った。各群雄 31~35 例、雌 13~20 例の児動物は CO₂/O₂ 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。残り半数の児動物は出生後 77 日目まで 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 CO₂/O₂ 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 日目に CO₂/O₂ 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 日目及び 77 日目の児動物雌雄各 10 例の脳、胸腺、脾臓、肝臓は HE 染色標本を作製し、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 日目の 0、1、3 並びに 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。

2. アフラトキシン B₁ 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、AFB₁ 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 AFB₁ 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。AFM₁ 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、AFM₁ 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 CO₂/O₂ 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 CO₂/O₂ 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 AFB₁ 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 CO₂/O₂ 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 CO₂/O₂ 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 日目及び 77 日目の児動物雌雄各 10 例の脳、肝臓は HE 染色標本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 (TUBB) 3、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受容体である 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、TUBB3、PCNA 及び TUNEL 陽性細胞数について海馬歯状回 SGZ の単位長さ当たりの陽性細胞数を算出した。reelin、PVALB、CALB1、CALB2、NeuN 及び CHRNA7 陽性細胞数については、海馬歯状回門における単位面積当た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 μ g 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。

3. オクラトキシン A 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、OTA を 0、0.12、0.6、3.0 ppm の用量で妊娠 6 日から分娩後 21 日目まで混餌投与した。最高用量の決定に関しては、0、1.0、3.0 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、3.0 ppm で離乳時の児動物に脳絶対重量の低値が認められたため、最高用量を 3.0 ppm に設定した。OTA の乳汁移行について、予備試験において、生後 14 日目に 3.0 ppm 投与群の児動物の胃から乳汁を採取し、OTA 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=11) 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 CO₂/O₂ 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 29 例、雌 12 例の児動物は CO₂/O₂ 麻酔下で放血し、脳、腎臓重量を測定後、脳はメタカーンもしくはブアン固定液、腎臓は 10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。残り半数の児動物は出生後 77 日目まで OTA 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 17 例、雌 10 例の児動物は CO₂/O₂ 麻酔下で放血し、脳、腎臓重量を測定後、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。母動物は分娩後 22 日目に CO₂/O₂ 麻酔下で放血し、脳、腎臓重量を測定後、脳はブアン固定液、腎臓は 10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。

母動物、出生後 21 日及び 77 日目の児動物雌雄各 10 例の脳、腎臓は 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 切片) が薄切面となるようにパラフィン包埋し、3 μ m 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の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

GFAP、PAX6、TBR2、DCX、TUBB3、介在ニューロンの指標である RELN、PVALB、CALB1、CALB2、somatostatin (SST)、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受容体である cholinergic receptor、nicotinic、beta 2 (CHRN2)、酸化ストレスの指標として過酸化脂質 MDA 及び 4-HNE 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。MDA、4-HNE については出生後 21 日目についてのみ検討した。GFAP、PAX6、TBR2、DCX、TUBB3、PCNA、TUNEL、4-HNE、MDA 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。RELN、PVALB、CALB1、CALB2、SST、NeuN 及び CHRN2 陽性細胞数については、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 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 日目の 0 及び 3.0 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、AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen) を用いて total RNA を抽出した。1 μ g 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、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 CO₂/O₂ 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

1) 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 トキシシ濃度：

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

体重、飲水量、摂餌量：

母動物は、9 ppmで体重低値が分娩後7～14日にかけて、摂餌量の低値が分娩後5, 18, 21日目に、摂水量の低値が14及び21日目に認められた (Figure 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、離乳後も出生後77日目まで体重低値が継続した (Figure 2)。

着床数、産仔数：

着床数、産仔数にT-2毒素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 1)。

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 2)。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日目では雌9 ppmで肝臓、胸腺の絶対重量低値がみられた。

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 3)。また9 ppmでは脾臓の髄外造血、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 4)。

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で低値がみられた。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 3)。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 4)。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 5)。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で減少した (Figures 6, 7)。

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*ReIn*はいずれも9 ppmで発現量が増加した (Table 5)。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3 ppmから増加した。また、SCFをコードする*Kit1*の発現量減少が9 ppmでみられた。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のトランスポーター*Slc17a6*の発現減少が3 ppmから、AMPA型受

容体 *Gria2* の発現減少が 9 ppm でみられた一方で、NMDA 型受容体である *Grin2a* の発現増加が 9 ppm でみられた。また、アセチルコリンの受容体である *Chrna4* の発現量減少が 9 ppm で、*Chrn2* の発現量減少が 3 ppm からみられた。

2) アフラトキシン B₁ のラットにおける発達期曝露影響評価

胃内乳汁の AFM₁ 濃度：

0.5 ppm 群の胃内乳汁における AFM₁ 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 8)。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 6, 7)。

着床数、産仔数：

着床数、産仔数に AFB₁ による影響は認められなかった (Table 8)。

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 8)。

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 9)。

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 10)。

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 9)。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、TUBB3 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 10)。SGZ におけるアポトーシス数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 11)。またアセチルコリン受容体の一つである *CHRNA7* の陽性細胞数の減少が 0.3 ppm から認められた (Figure 12)。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* の増加及び受容体である *Chrna7* の減少が認められた (Table 11)。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 AFB₁ の代謝に関わる *Cyp1a2* の発現量が増加した (Table 12)。児動物においては AFM₁ 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。

3) オクラトキシン A のラットにおける発達期曝露影響評価

胃内乳汁の OTA 濃度：

3.0 ppm 投与児動物の胃内乳汁における

OTA 濃度は 1000 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 13)。児動物では 3.0 ppm で雄の出生後 28 及び 35 日目に、雌の出生後 28 日目に有意な体重低値がみられた (Table 13, 14)。

着床数、産仔数：

着床数、産仔数に OTA 曝露による影響は認められなかった (Table 15)。

臓器重量：

母動物の脳重量、腎臓重量に変化はみられなかった (Table 15)。

児動物では離乳時に 3.0 ppm で雄の脳相対重量の高値、雌雄の腎臓相対重量及び腎臓絶対重量の低値がみられた (Table 16)。出生後 77 日目では脳及び腎臓重量に変化はみられなかった。

病理学的変化および免疫組織学的変化：

母動物の腎臓では統計学的有意ではないものの、髄質外帯外層 (outer stripe of the outer medulla; OSOM) 近位尿細管の巨大核、空胞変性の増加が 3.0 ppm で認められた (Table 17)。児動物の腎臓においては離乳時に、0.6 ppm から OSOM 近位尿細管の巨大核、3.0 ppm で OSOM 及び皮質の近位尿細管におけるアポトーシスの有意な増加が雌雄でみられた (Table 18)。OSOM 近位尿細管の巨大核増加は出生後 77 日目でも認められた (Table 19)。一方で、母動物、児動物ともに脳では所見はみられなかった。

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、SGZ において 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 3.0 ppm で減少した (Figure 14)。GFAP 陽性細胞 (type-1 神経幹細胞) 数、DCX 陽性細胞 (type-2b 前駆細胞～未熟顆粒細胞) 数、TUBB3 陽性細胞 (未熟顆粒細胞) 数、NeuN 陽性細胞 (成熟顆粒細胞) 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が、SST を発現する GABA 性介在ニューロン数の減少が 3.0 ppm でみられた (Figure 15)。SGZ におけるアポトーシス数、細胞増殖活性には変化がみられなかった (Figure 16)。またアセチルコリン受容体の一つである CHRN2 の陽性細胞数の減少が 3.0 ppm で認められた (Figure 17)。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 陽性細胞数が離乳時の児動物 SGZ において 3.0 ppm で増加した (Figure 18)。

遺伝子発現解析：

Type-2b 神経前駆細胞を中心に発現する転写因子 TBR2 をコードする *Eomes*、ソマトスタチンをコードする *Sst*、脳由来神経成長因子 BDNF をコードする *Bdnf* の発現量が 3.0 ppm で増加した。アセチルコリン受容体である CHRN2 をコードする *Chrn2* の発現が減少する一方で、グルタミン酸 AMPA 型受容体をコードする *Gria1*、*Gria2*、NMDA 型受容体をコードする *Grin2a*、セロトニン合成酵素をコードする *Tph2*、セロトニン受容体をコードする *Htr1a* 及び *Htr4* はいずれも発現量が増加した。また DNA 傷害修復に関連する遺伝子群では

Ogg1, *Sirt1*, *Tp53* の発現量増加がみられた (Table 20)。

D. 考察

1) T-2 トキシンのマウスにおける発達期曝露影響評価

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 日目から分娩後 21 日目まで混餌投与することで、児動物に経胎盤、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。その結果、母動物は 9 ppm で分娩後 7~14 日目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 で前胃粘膜の扁平上皮過形成とびらんの増加が認められ、摂餌量ならびに摂水量の減少に影響した可能性が考えられた。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 日目まで体重低値が継続した。また、離乳時の脳絶対重量低値が 3 ppm から認められ、T-2 トキシンによる発達障害が示唆されたが、出生後 77 日目の児動物では離乳時と比較して変化の程度が小さく、回復性のある変化であると考えられた。母動物では造血毒性、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。児動物では胸腺重量の減少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。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 (≥ 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¹⁾により、これらの分子を発現する細胞数は変化しないか減少したと考えられた。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、酸化ストレスの増加により 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、*Kit1* 遺伝子の発現が減少したことから、酸化ストレスの増加に加えて SCF による幹細胞分化制御の減少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受容体である *Slc17a6*, *Gria2* の発現量減少は type-1 幹細胞及び type-2 前駆細胞数の減少を反映した可能性に加えて、グルタミン酸作動性入力の減少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²⁾、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増加したものと考えられた。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³⁾、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。また、アセチルコリンのニコチン型受容体である*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作動性入力が増加されたことにより、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3ppmよりみられたことから1ppm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。

2. アフラトキシンB₁のラットにおける発達期曝露影響評価

妊娠SDラットにAFB₁を1.0ppm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AFB₁を代謝する*Cyp1a2*の発現量増加がみられ、酵素誘導を反映したと考えられる肝重量増加が1.0ppm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3ppm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、AFB₁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受容体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*遺伝子の発現量が増加したことから受容体の発現が減少し、代償的にアセチルコリンの合成が増加している可能性が考えられた。AFB₁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減少が1.0ppmで認められており、コリン作動性入力の減少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。離乳時の児動物におけるニューロン新生障害がみられた0.3ppmにおける乳汁中AFM₁濃度は約26μg/kgであり、コーデックス委員会における規制値の約50倍の値であった⁴⁾。

3. オクラトキシンAのラットにおける発達期曝露影響評価

妊娠SDラットにOTAを3.0ppmを最高用量として妊娠6日から分娩後21日目まで混餌投与することで、児動物に経胎盤、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。母動物の腎臓ではOTAのげっ歯類への反復投与で報告されている⁵⁾OSOM近位尿細管の巨大核の形成、空胞変性の増加が3.0ppmで認められたが、離乳時の児動物では同様の所見が0.6ppmからみられ、OTA発達期曝露による腎臓への影響は児動物でより感受性が高いと考えられた。OSOM近位尿細管の巨大核の誘発性は出生後77日目の児動物でも認められており、OTA発

達期曝露による児動物腎臓への影響は回復性に乏しいと考えられた。

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、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) 数の減少が離乳時に 3.0 ppm で認められ、GFAP 陽性細胞 (type-1 神経幹細胞) 数、DCX 陽性細胞 (type-2b 前駆細胞～未熟顆粒細胞) 数、TUBB3 陽性細胞 (未熟顆粒細胞) 数、NeuN 陽性細胞 (成熟顆粒細胞) 数に影響がみられなかったことから、OTA によるニューロン新生障害は type-2a 及び type-2b 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ソマトスタチンを発現する GABA 性介在ニューロンとアセチルコリン受容体 *CHRN2* 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 *Chrn2* 遺伝子発現量が減少し、グルタミン酸受容体やセロトニン受容体をコードする遺伝子群の発現量が増加したことからアセチルコリンを介した神経伝達が減少し、代償性にグルタミン酸やセロトニンによる神経伝達が増加していると考えられた。ニューロン新生を促進する脳由来神経栄養因子である BDNF をコードする *Bdnf* の発現量が増加し、ソマトスタチンをコードする *Sst*、TBR2 をコードする *Eomes* の発現量が増加したが、これらの遺伝子がコードするタンパクの発現は減少していた。このことから BDNF を含めて複数の機構が代償性にニューロン新生を亢進させているが、OTA で報告されている蛋白合成阻害作用により⁶⁾、これらの分子を発現する細胞数が減少したと考えられた。また、過酸化脂質の蓄積を示す MDA 陽性細胞数が 3.0 ppm で増加し、DNA 傷害に対する修復系遺伝子の発現が増加したことから、酸化ストレ

スによる DNA 障害によりニューロン新生が障害された可能性が考えられた。

本実験における児動物のニューロン新生障害に基づく無毒性量は 0.6 ppm、腎臓への影響に基づく無毒性量は 0.12 ppm と判断された。ニューロン新生障害に基づく無毒性量における曝露は、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腎毒性発現曝露量と比較して 25 倍から 50 倍程度高い値であった。

E. 結論

乳児が曝露される可能性が高いかび毒の発達神経発達毒性影響を評価することを目的として、T-2 トキシン、AFB₁、OTA を選択し、マウスあるいはラットを用いた発達期曝露実験を行った。離乳時における海馬歯状回 SGZ におけるニューロン分化指標を検索した結果、T-2 トキシンでは type-1 幹細胞及び type-2 前駆細胞、AFB₁ では type-3 前駆細胞、OTA では type-2 神経前駆細胞が標的となるニューロン新生障害が認められた。障害の機序として、いずれのかび毒においてもアセチルコリン作動性入力への減少が示唆されたが、それぞれ異なるサブタイプのアセチルコリン受容体発現が減少しており、異なる分化段階のニューロンが障害される結果につながったと考えられた。加えて、T-2 トキシン及び OTA では蛋白合成阻害作用を示唆する遺伝子発現増加と対応する分子発現減少、SGZ における酸化ストレス増加が認められ、T-2 トキシンでは幹細胞因子の減少を伴うアポトーシス亢進がニューロン新生障害に関与していると考えられた。遺伝毒性が知られる AFB₁ において、海馬歯状回では DNA 傷害を示唆する変化は検出

されなかった。以上のようにいずれのかび毒も複数の機序によってニューロン新生を障害したが、出生後 77 日目の児動物では影響が消失しており、回復性が認められた。この原因として、ニューロン新生を亢進することが知られている reelin、BDNF の発現増加やグルタミン酸やセロトニンによる神経伝達の増加を示唆する結果が得られていることから、代償性のニューロン新生保護作用が働いたためと考えられた。

児動物のニューロン新生障害に基づいた無毒性量は T-2 トキシンで 1 ppm、AFB₁ で 0.1 ppm、OTA で 0.6 ppm と判断された。T-2 トキシン及び OTA の無毒性量における曝露量は、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毒性発現用量と比較して、それぞれ 5~15 倍、25~50 倍高い値であった。ニューロン新生障害がみられた乳汁中 AFM₁ 濃度は約 26 μ g/kg であり、コーデックス委員会における規制値の約 50 倍の値であった。

F. 参考文献

- 1) Middlebrook, J.L., Leatherman, D.L. 1989. Binding of T-2 toxin to eukaryotic cell ribosomes. *Biochem Pharmacol* 38, 3103–3110.
- 2) Qiu, S., Weeber, E.J. 2007. Reelin signaling facilitates maturation of CA1 glutamatergic synapses. *J. Neurophysiol* 97, 2312–2321.
- 3) Pujadas, L., Gruart, A., Bosch, C., Delgado, L., Teixeira, C.M., Rossi, D., de Lecea, L., Martínez, A., Delgado-García, J.M., Soriano, E. 2010. Reelin regulates postnatal neurogenesis and enhances spine hypertrophy and long-term potentiation. *J Neurosci* 30,

4636–4649.

- 4) Henry, S.H., Whitaker, T., Rabbani, I., Bowers, J., Park, D., Price, W., Bosch, F.X., 2001. Aflatoxin M₁. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), 47.
- 5) Rached, E., Hard, G.C., Blumbach, K., Weber, K., Draheim, R., Lutz, W.K., Ozden, S., Steger, U., Dekant, W., Mally, A., 2007. Ochratoxin A: 13-week oral toxicity and cell proliferation in male F344/N rats. *Toxicol. Sci.* 97, 288–298.
- 6) Creppy, E.E., Chakor, K., Fisher, M.J., Dirheimer, G., 1990. The mycotoxin ochratoxin A is a substrate for phenylalanine hydroxylase in isolated rat hepatocytes and in vivo. *Arch. Toxicol.* 64, 279–284.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanaka T, Abe H, Kimura M, Onda N, Mizukami S, Yoshida T, Shibutani M. Developmental exposure to T-2 toxin reversibly affects postnatal hippocampal neurogenesis and reduces neural stem cells and progenitor cells in mice. *Arch Toxicol.* 2016 (in press).
- 2) Tanaka T, Mizukami S, Hasegawa-Baba Y, Onda N, Sugita-Konishi Y, Yoshida T, Shibutani M. Developmental exposure of aflatoxin B₁ reversibly affects hippocampal neurogenesis targeting late-stage neural progenitor cells through suppression of cholinergic signaling in rats. *Toxicology.* 2015 336:59-69.

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 トキシンの発達期曝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 T-2 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 M₁ のラット発達期曝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
- 4) 田中 猛、阿部 一、白木彩子、板橋 恵、木村真之、水上さやか、渡邊洋祐、寒川祐見、吉田敏則、渋谷 淳: オクラトキシン A の発達期曝露によるラット海馬歯状回における生後のニューロン新生に対する影響, 第42回日本毒性学会学術年会, 神戸, 第42回日本毒性学会学術年会要旨集: O-21, p.S185, 6月29-7月1日, 2015
- 5) Takeshi Tanaka, Hajime Abe, Masayuki Kimura, Sayaka Mizukami, Ayako Shiraki, Yousuke watanabe, Yasuko Hasegawa-Baba, Toshinori Yoshida and Makoto Shibutani: Maternal Exposure Effect of Ochratoxin A on Hippocampal Neurogenesis in Rat Offspring, Surrey-United Kingdom 22-25 September 2015, 13th European Congress of Toxicologic Pathology.
- H. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

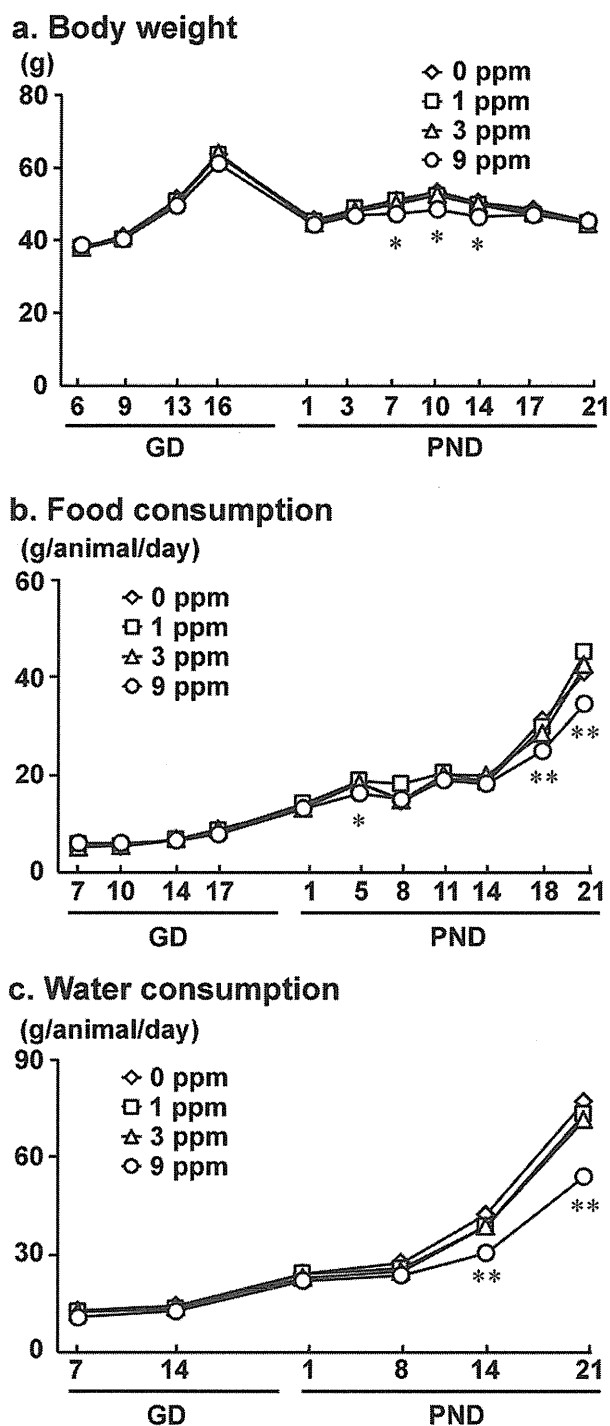


Figure 1

In life parameters of dams exposed to T-2 toxin from GD 6 to PND 21 on weaning of offspring. (a) Body weight. **(b)** Food consumption. **(c)** Water consumption. Mean values are plotted. 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

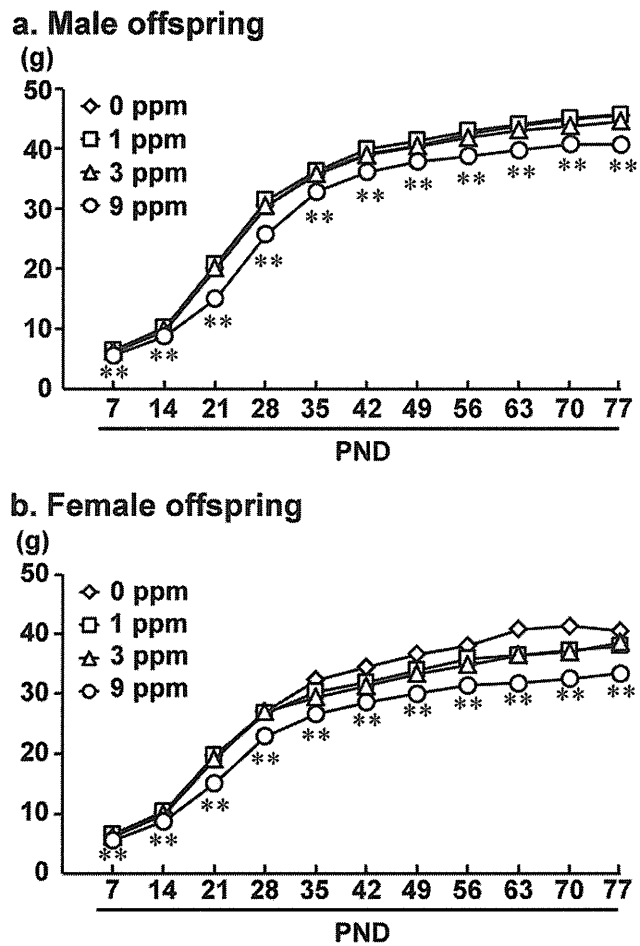


Figure 2
Body weight of offspring maternally exposed to T-2 toxin from PND 7 to PND 77. (a) Male offspring. (b) Female offspring. Mean values are plotted. N = 9–10/group (0 ppm controls, 9; 1, 3, and 9 ppm T-2 toxin, 10). ** $P < 0.01$, significantly different from 0-ppm controls by the Dunnett's test or Steel's test

Table 1**Reproductive parameters, body and organ weights of dams exposed to T-2 toxin from early gestation to the end of lactation**

	T-2 toxin in diet (ppm)			
	0 (Control)	1	3	9
No. of dams examined	9	10	10	10
Reproductive parameters				
No. of implantation sites	15.30±1.77 ^a	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
Body and organ weights at PND 22				
Body weight (g)	45.30±4.38	44.78±1.61	44.71±2.53	45.39±2.92
Brain weight	Absolute (g)	0.50±0.03	0.50±0.02	0.49±0.02
	Relative (g/100g BW)	1.11±0.06	1.11±0.03	1.11±0.05
Liver weight	Absolute (g)	2.91±0.33	2.89±0.36	2.96±0.24
	Relative (g/100g BW)	6.43±0.35	6.45±0.69	6.63±0.46
Thymus weight	Absolute (g)	0.09±0.01	0.07±0.02**	0.07±0.02*
	Relative (g/100g BW)	0.21±0.03	0.16±0.05*	0.16±0.04
Spleen weight	Absolute (g)	0.16±0.03	0.16±0.03	0.21±0.06
	Relative (g/100g BW)	0.36±0.04	0.35±0.05	0.47±0.13
T-2 toxin intake (mg/kg BW/day)				
Gestation period	0	0.14±0.02	0.40±0.03	1.18±0.25
Postnatal period	0	0.49±0.03	1.39±0.07	3.79±0.24

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

^a Mean ± SD.

P* < 0.05, *P* < 0.01, significantly different from 0-ppm controls by the Dunnett's test or Steel's test.

Table 2**Body and organ weights at the prepubertal and terminal necropsies of offspring exposed to T-2 toxin during gestation and lactation**

		T-2 toxin in diet (ppm)			
		0 (Control)	1	3	9
Male offspring on PND 21					
No. of animals examined		31	35	32	32
Body weight (g)		17.98±1.78 ^a	17.63±1.44	17.13±1.33	13.61±1.22**
Brain weight	Absolute (g)	0.44±0.03	0.43±0.02	0.43±0.02**	0.41±0.02**
	Relative (g/100g BW)	2.47±0.23	2.48±0.20	2.49±0.18	3.03±0.23**
Liver weight	Absolute (g)	1.03±0.14	1.02±0.12	0.98±0.13	0.72±0.10**
	Relative (g/100g BW)	5.70±0.36	5.79±0.42	5.73±0.43	5.25±0.40**
Thymus weight	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±0.11	0.58±0.13**
Spleen weight	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**
Female offspring on PND 21					
No. of animals examined		13	17	20	19
Body weight (g)		16.99±1.37	16.81±1.40	16.27±1.54	12.89±1.62**
Brain weight	Absolute (g)	0.43±0.03	0.42±0.01	0.41±0.02*	0.41±0.02**
	Relative (g/100g BW)	2.56±0.17	2.52±0.19	2.56±0.22	3.22±0.35**
Liver weight	Absolute (g)	0.88±0.12	0.92±0.11	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 weight	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 weight	Absolute (g)	0.14±0.02	0.14±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
Male offspring on PND 77					
No. of animals examined		10	10	10	10
Body weight (g)		45.96±5.47	46.60±5.19	43.71±4.95	40.75±3.78**
Brain weight	Absolute (g)	0.52±0.09	0.50±0.02	0.49±0.02	0.49±0.02
	Relative (g/100g BW)	1.13±0.18	1.09±0.11	1.13±0.12	1.22±0.12
Liver weight	Absolute (g)	2.20±0.35	2.24±0.34	2.15±0.16	2.19±0.26
	Relative (g/100g BW)	4.96±0.42	4.98±0.54	5.08±0.51	5.31±0.39
Thymus weight	Absolute (g)	0.06±0.02	0.05±0.01	0.05±0.01	0.05±0.02
	Relative (g/100g BW)	0.13±0.04	0.11±0.03	0.11±0.03	0.11±0.05
Spleen weight	Absolute (g)	0.13±0.03	0.13±0.03	0.14±0.02	0.13±0.04
	Relative (g/100g BW)	0.31±0.07	0.30±0.05	0.33±0.08	0.33±0.08
Female offspring on PND 77					
No. of animals examined		10	10	10	10
Body weight (g)		40.70±3.55	38.00±3.63	38.55±3.74	33.43±2.94**
Brain weight	Absolute (g)	0.53±0.02	0.52±0.02	0.51±0.02	0.50±0.02
	Relative (g/100g BW)	1.30±0.10	1.36±0.11	1.32±0.14	1.52±0.12**
Liver weight	Absolute (g)	2.08±0.39	1.86±0.27	1.67±0.58	1.69±0.21*
	Relative (g/100g BW)	5.10±0.73	4.89±0.49	4.35±1.40	5.07±0.58
Thymus weight	Absolute (g)	0.08±0.02	0.07±0.01	0.07±0.01	0.06±0.02*
	Relative (g/100g BW)	0.20±0.04	0.19±0.03	0.19±0.03	0.19±0.04
Spleen weight	Absolute (g)	0.18±0.05	0.18±0.06	0.18±0.04	0.17±0.05
	Relative (g/100g BW)	0.43±0.10	0.47±0.16	0.46±0.09	0.49±0.12

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

^a Mean ± SD. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, significantly different from 0-ppm controls by the Dunnett's test or Steel's test.

Table 3**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
Forestomach				
Squamous cell hyperplasia	0 ^a (0/0/0) ^b	0 (0/0/0)	4 (4/0/0) [†]	5* (1/2/2) [†]
Erosion	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	1 (1/0/0)	4 (1/3/0) [†]
Brain				
Abnormalities detected	0 ^a	0	0	0
Liver				
Abnormalities detected	0	0	0	0
Spleen				
Extramedullary hematopoiesis	0 (0/0/0)	1 (1/0/0)	1 (0/1/0)	6* (2/3/1) ^{††}
Thymus				
Atrophy	0 (0/0/0)	1 (1/0/0)	0 (0/0/0)	5* (2/3/0) [†]

^aTotal number of animals that exhibited abnormality.

^bNumber 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.

[†] $P < 0.05$, ^{††} $P < 0.01$, significantly different from 0-ppm controls by the Mann-Whitney's *U*-test.

Table 4**Histopathological findings of offspring exposed to T-2 toxin during gestation and lactation**

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

Abbreviation: PND, postnatal day.

^aTotal number of animals which exhibited abnormality.

^bNumber of animals with each grade (grade 1/grade 2/grade 3). The degree of abnormalities: grade 1, slight; grade 2, moderate; grade 3, marked.

^cPercentage of immunoreactive cells in terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling assay per total cells.

^dMean ± SD.

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

[†] $P < 0.05$, ^{††} $P < 0.01$, significantly different from 0-ppm controls by the Mann-Whitney's *U*-test.

[‡] $P < 0.05$, ^{‡‡} $P < 0.01$, significantly different from 0-ppm controls by the Dunnett's test or Steel's test.

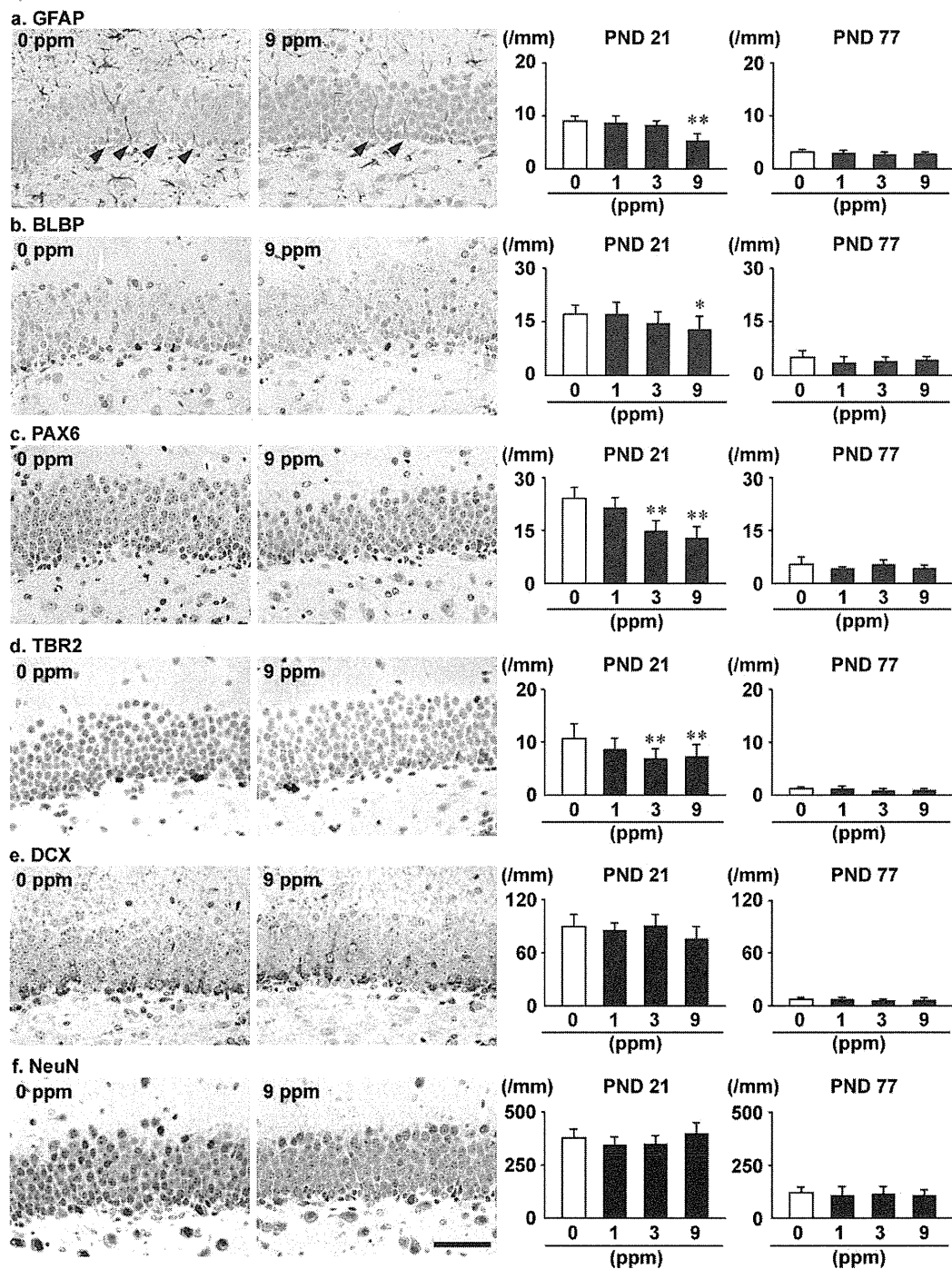


Figure 3

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×; bar = 50 μm. 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

