

Table 16**Body and organ weights at the prepubertal and terminal necropsies of offspring exposed to ochratoxin A during gestation and lactation**

		OTA in diet (ppm)			
		0 (Control)	0.12	0.6	3.0
Male offspring on PND 21					
	No. of animals examined	10	10	10	10
	Body weight (g)	59.5±4.0 ^a	62.8±5.2	60.3±5.8	56.7±2.6
Brain weight	Absolute (g)	1.50±0.04	1.52±0.06	1.52±0.04	1.52±0.03
	Relative (g/100g BW)	2.54±0.16	2.45±0.08	2.51±0.21	2.69±0.10**
Kidney weight	Absolute (g)	0.62±0.06	0.62±0.05	0.65±0.05	0.55±0.02*
	Relative (g/100g BW)	1.05±0.07	1.01±0.05	1.06±0.05	0.96±0.03*
Female offspring on PND 21					
	No. of animals examined	10	10	10	10
	Body weight (g)	57.0±4.3	58.9±3.7	59.7±4.7	55.8±2.7
Brain weight	Absolute (g)	1.48±0.04	1.47±0.05	1.47±0.06	1.45±0.04
	Relative (g/100g BW)	2.62±0.20	2.51±0.18	2.47±0.20	2.60±0.11
Kidney weight	Absolute (g)	0.62±0.06	0.62±0.06	0.67±0.05	0.56±0.03*
	Relative (g/100g BW)	1.11±0.09	1.06±0.07	1.13±0.08	1.01±0.07*
Male offspring on PND 77					
	No. of animals examined	10	10	10	10
	Body weight (g)	483.5±29.3	497.5±35.8	454.4±41.9	493.8±32.9
Brain weight	Absolute (g)	2.08±0.06	2.09±0.10	2.07±0.09	2.10±0.08
	Relative (g/100g BW)	0.43±0.02	0.42±0.03	0.46±0.04	0.43±0.02
Kidney weight	Absolute (g)	3.16±0.39	3.05±0.27	2.94±0.45	2.93±0.33
	Relative (g/100g BW)	0.65±0.06	0.61±0.03	0.65±0.08	0.59±0.05
Female offspring on PND 77					
	No. of animals examined	10	10	10	10
	Body weight (g)	286.9±27.2	299.0±24.2	290.8±22.5	293.8±32.8
Brain weight	Absolute (g)	1.94±0.10	1.96±0.08	1.95±0.09	1.99±0.07
	Relative (g/100g BW)	0.68±0.05	0.66±0.05	0.67±0.05	0.69±0.08
Kidney weight	Absolute (g)	1.88±0.17	1.86±0.19	1.86±0.14	1.77±0.24
	Relative (g/100g BW)	0.66±0.05	0.62±0.05	0.64±0.02	0.60±0.06

Abbreviations: BW, body weight; OTA, ochratoxin A; 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 17**Histopathological findings of dams exposed to ochratoxin A from gestation day 6 to day 21 after delivery**

		OTA in diet (ppm)			
		0 (Control)	0.12	0.6	3.0
Dams					
	No. of animals examined	10	10	10	10
Brain					
	Abnormalities detected	0 ^a	0	0	0
Renal proximal tubular epithelial cells					
Cortical tubules					
	Apoptosis	0 (0/0/0) ^b	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)
	Karyomegaly	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)
	Cytoplasmic vacuolar degeneration	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)
OSOM tubules					
	Apoptosis	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)
	Karyomegaly	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	3 (3/0/0)
	Cytoplasmic vacuolar degeneration	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	1 (1/0/0)	2 (2/0/0)

Abbreviations: OSOM, outer stripe of outer medulla; OTA, ochratoxin A; 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.

Table 18

Histopathological findings of PND 21 offspring exposed to ochratoxin A during gestation and lactation

	OTA in diet (ppm)			
	0 (Control)	0.12	0.6	3.0
Male offspring				
No. of animals examined	10	10	10	10
Brain				
Abnormalities detected	0 ^a	0	0	0
Renal proximal tubular epithelial cells				
Cortical tubules				
Apoptosis	0 (0/0/0) ^b	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	4 (4/0/0) [†]
Karyomegaly	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)
Cytoplasmic vacuolar degeneration	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	4 (4/0/0) [†]	1 (1/0/0)
OSOM tubules				
Apoptosis	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	7** (6/1/0) ^{††}
Karyomegaly	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	10** (10/0/0) ^{††}	10** (0/10/0) ^{††}
Cytoplasmic vacuolar degeneration	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)
Female offspring				
No. of animals examined	10	10	10	10
Renal proximal tubular epithelial cells				
Cortical tubules				
Apoptosis	0 (0/0/0)	1 (1/0/0)	1 (1/0/0)	5 (5/0/0) [†]
Karyomegaly	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)
Cytoplasmic vacuolar degeneration	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	2 (2/0/0)	0 (0/0/0)
OSOM tubules				
Apoptosis	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	1 (1/0/0)	8** (8/0/0) ^{††}
Karyomegaly	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	7** (7/0/0) ^{††}	10** (1/9/0) ^{††}
Cytoplasmic vacuolar degeneration	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)

Abbreviations: OSOM, outer stripe of the outer medulla; OTA, ochratoxin A; 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.

** $P < 0.01$, 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.

Table 19

Histopathological findings of PND 77 offspring exposed to ochratoxin A during gestation and lactation

	OTA in diet (ppm)			
	0 (Control)	0.12	0.6	3.0
Male offspring				
No. of animals examined	10	10	10	10
Brain				
Abnormalities detected	0 ^a	0	0	0
Renal proximal tubular epithelial cells				
Cortical tubules				
Apoptosis	0 (0/0/0) ^b	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)
Karyomegaly	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)
Cytoplasmic vacuolar degeneration	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)
OSOM tubules				
Apoptosis	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)
Karyomegaly	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	7** (7/0/0) ^{††}	10** (0/10/0) ^{††}
Cytoplasmic vacuolar degeneration	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)
Male offspring on PND 77				
No. of animals examined	10	10	10	10
Renal proximal tubular epithelial cells				
Cortical tubules				
Apoptosis	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)
Karyomegaly	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)
Cytoplasmic vacuolar degeneration	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)
OSOM tubules				
Apoptosis	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)
Karyomegaly	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	4 (4/0/0) ^{††}	10** (0/10/0) ^{††}
Cytoplasmic vacuolar degeneration	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)

Abbreviations: OSOM, outer stripe of the outer medulla; OTA, ochratoxin A; PND, postnatal day.

^a Total number of animals which exhibited abnormality.

^b 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.

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

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

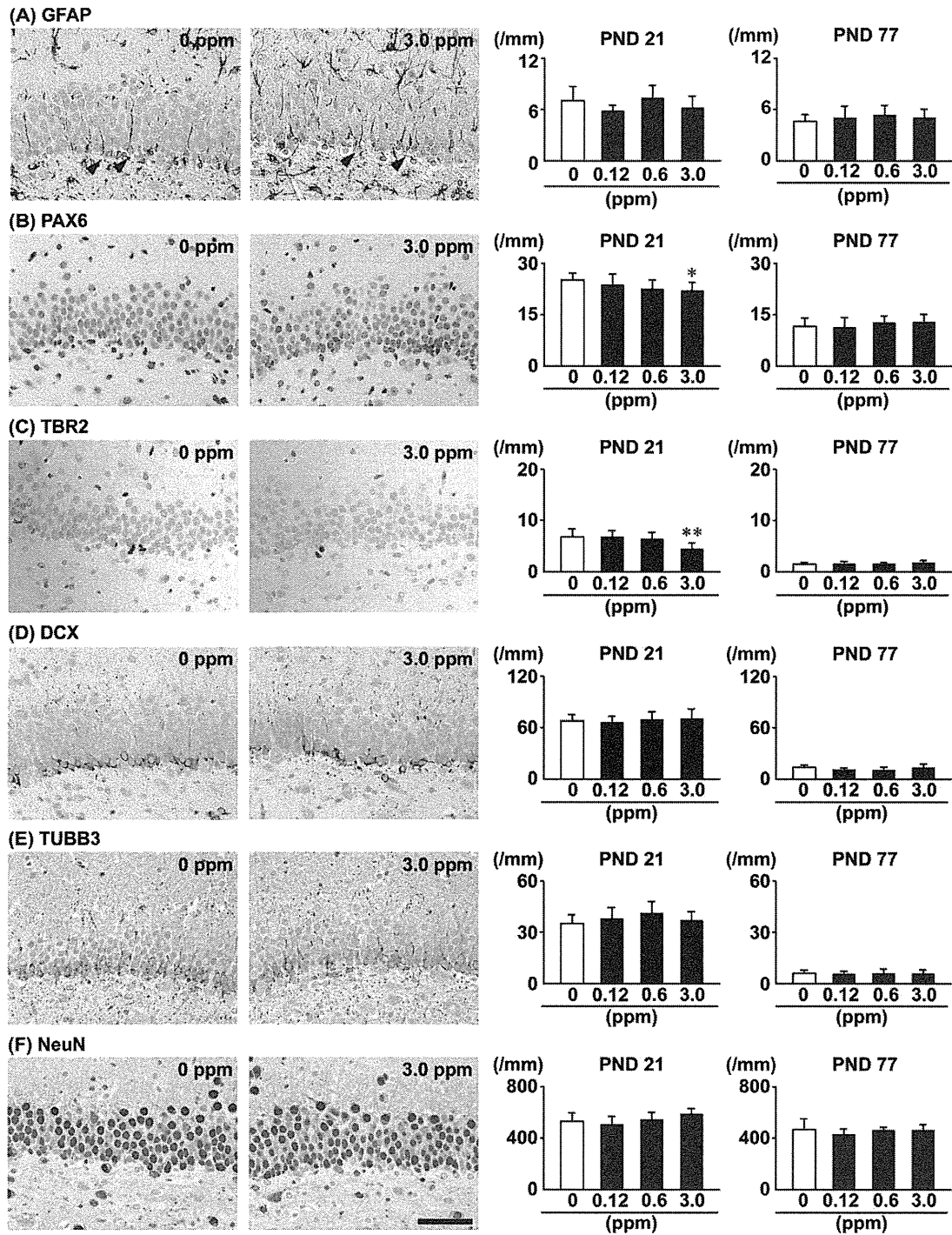


Figure 14

Distribution and number of immunoreactive cells for neuronal stage-defining markers of granule cell lineages in the SGZ of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to ochratoxin A. (A) Glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the SGZ. (B) Paired box 6 (PAX6) in the SGZ. (C) T box brain 2 (TBR2) in the SGZ. (D) Doublecortin (DCX) in the SGZ. (E) Tubulin, beta 3 class III (TUBB3) in the SGZ. (F) Neuron-specific nuclear protein (NeuN) in the GCL. Representative

images from 0-ppm controls and the 3.0-ppm group at PND 21 are shown. Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification: 400×; bar = 50 μ 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 = 10/group. * P < 0.05, ** P < 0.01, significantly different from 0-ppm controls by the Dunnett's test or Steel's test.

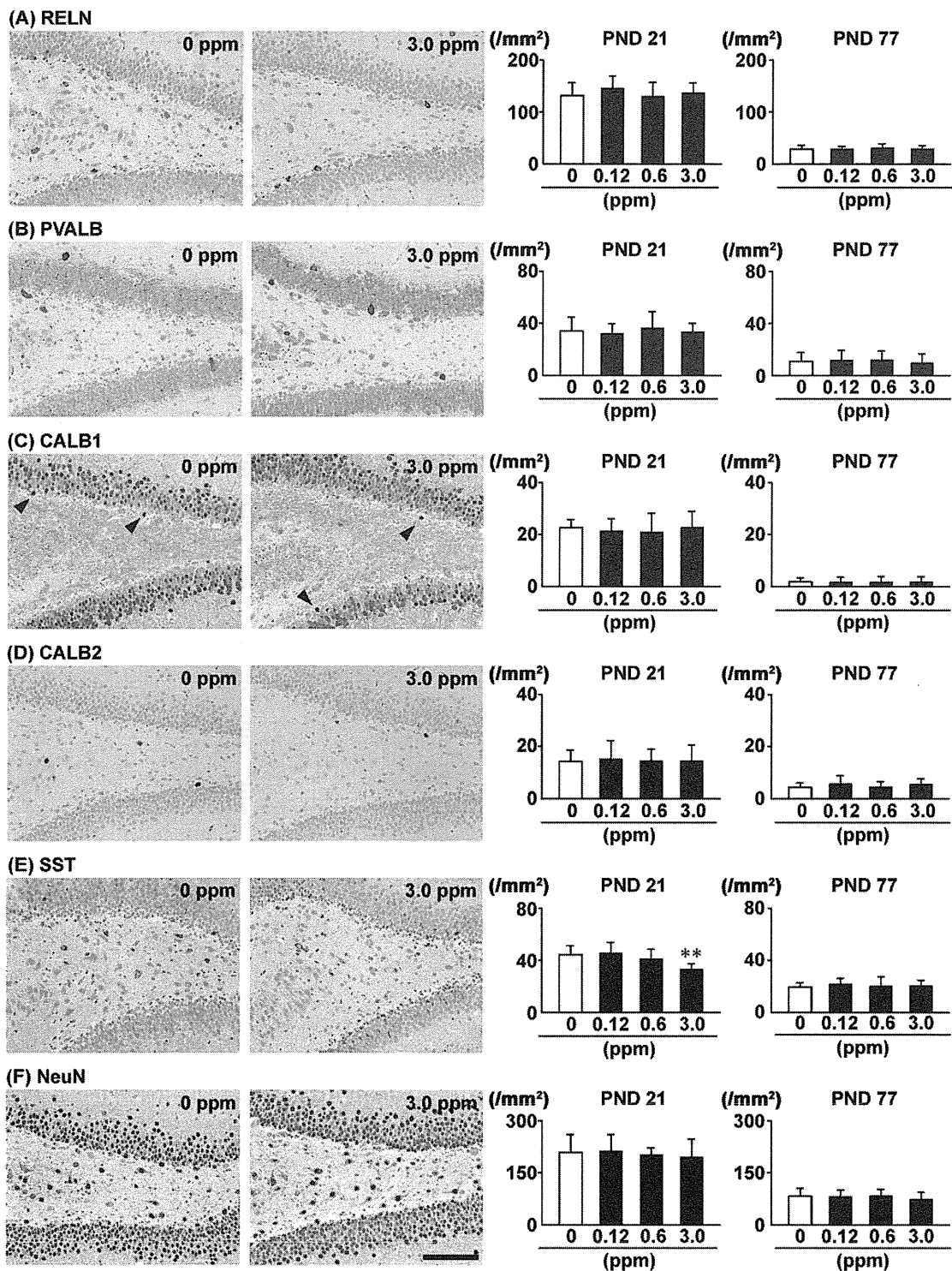


Figure 15

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 ochratoxin A. (A) Reelin (RELN). (B) Parvalbumin (PVALB). (C) Calbindin (CALB1). (D) Calretinin (CALB2). (E) Somatostatin (SST). (F) NeuN. Representative images from

0-ppm controls and the 3.0-ppm group at PND 21 are shown. Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification: 200×; bar = 100 μm. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit area (mm²) of the hilus of bilateral hemispheres. Values are expressed as the mean + SD. N = 10/group. ** P < 0.01, significantly different from 0-ppm controls by the Dunnett's test or Steel's test.

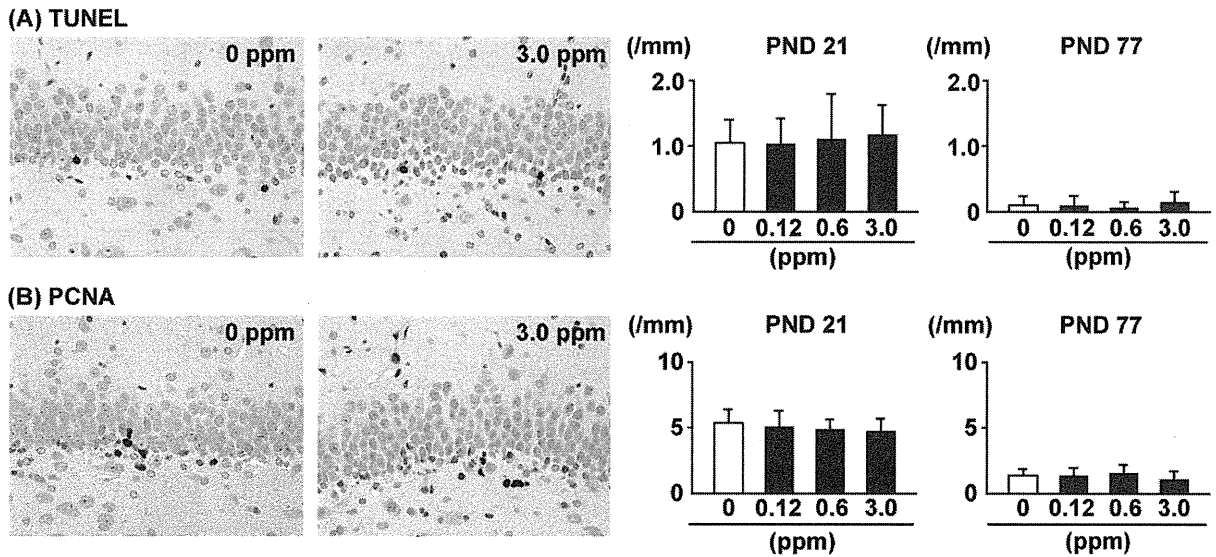


Figure 16

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 ochratoxin A. (A) Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL). (B) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA).

Representative images from 0-ppm controls and the 3.0-ppm group at PND 21 are shown. Magnification: 400×; bar = 50 μ m. Graphs show the number of positive cells/unit length (mm) of the SGZ of the bilateral sides. Values are expressed as the mean + SD. N = 10/group.

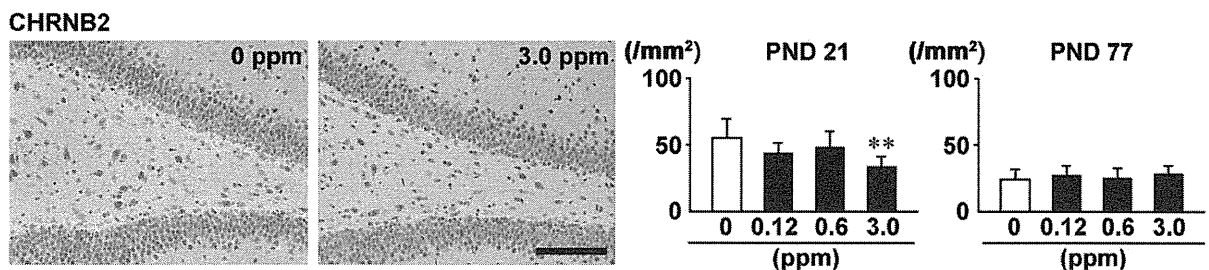


Figure 17

Distribution and number of immunoreactive cells for cholinergic receptor, nicotinic, beta 2 (neuronal) (CHRN2) in the hilus of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to ochratoxin A. Representative images from 0-ppm controls and the 3.0-ppm group at PND 21 are shown. Magnification: 200×; bar = 100 μ m. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit area (mm²) of the hilus of bilateral hemispheres. Values are expressed as the mean + SD. N = 10/group. ** $P < 0.01$, significantly different from 0-ppm controls by the Dunnett's test or Steel's test.

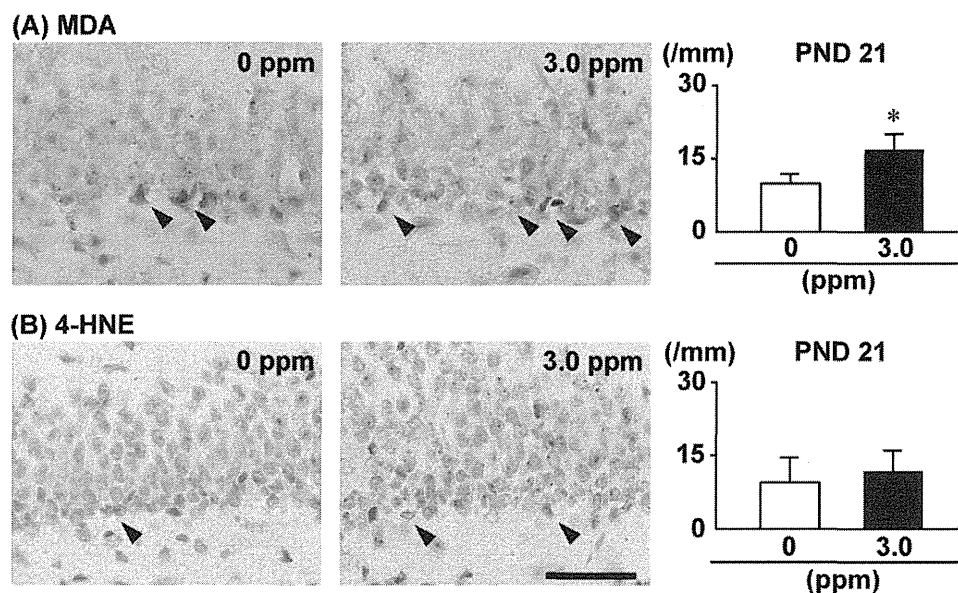


Figure 18

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 ochratoxin A. (A)

Malondialdehyde (MDA). (B) 4-Hydroxynonenal (4-HNE). Representative images from 0-ppm controls and the 3.0-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 = 10/group. ** $P < 0.01$, significantly different from 0-ppm controls by the Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test.

Table 20**Transcript levels in the hippocampal dentate gyrus of PND 21 offspring exposed to ochratoxin****A**

	OTA in diet (ppm)			
	0 (Control)		3.0	
	Relative transcript level normalized to		Relative transcript level normalized to	
	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
No. of animals examined	6	6	6	6
Neuronal stage-defining markers in granule cell lineages				
<i>Pax6</i>	1.01± 0.12 ^a	1.01 ± 0.18	1.63 ± 0.72	1.44 ± 0.4 6
<i>Eomes</i>	1.03± 0.28	1.04 ± 0.29	9.66 ± 5.18**	8.55 ± 3.7 1**
Interneuron-related gene				
<i>Sst</i>	1.03± 0.26	1.02 ± 0.23	3.54 ± 1.93*	3.10 ± 1.3 7*
Neurotrophic factor-related gene				
<i>Bdnf</i>	1.01± 0.16	1.01 ± 0.13	2.22 ± 0.55**	2.03 ± 0.5 4**
Glutamatergic receptors				
<i>Gria1</i>	1.02± 0.20	1.02 ± 0.19	4.39 ± 1.29**	3.95 ± 1.0 4**
<i>Gria2</i>	1.03± 0.24	1.02 ± 0.21	3.30 ± 0.84**	2.97 ± 0.6 0**
<i>Grin2a</i>	1.00± 0.10	1.01 ± 0.14	3.11 ± 0.77**	2.82 ± 0.7 2**
Acetylcholine-synthesizing enzyme and cholinergic receptors				
<i>Chat</i>	1.00± 0.49	1.09 ± 0.46	1.25 ± 0.68	1.10 ± 0.6 3
<i>Chrna7</i>	1.03± 0.24	1.02 ± 0.20	1.43 ± 0.39	1.29 ± 0.3 1
<i>Chrn2</i>	1.02± 0.22	1.03 ± 0.28	0.65 ± 0.13**	0.59 ± 0.1 4**
Serotonin-synthesizing enzyme and serotonergic receptors				
<i>Tph2</i>	1.00± 0.11	1.01 ± 0.15	5.02 ± 1.58**	4.58 ± 1.5 2**
<i>Htr1a</i>	1.02± 0.23	1.01 ± 0.17	4.55 ± 1.76**	4.19 ± 1.5 0**
<i>Htr4</i>	1.04± 0.30	1.04 ± 0.30	2.73 ± 0.82**	2.57 ± 0.7 5**
DNA repair-related genes				

<i>Ogg1</i>	1.02±0.21	1.02 ± 0.24	1.79 ± 0.42**	1.62 ±0.28**
<i>Sirt1</i>	1.01±0.13	1.01 ± 0.14	1.48 ± 0.28**	1.33 ±0.17**
<i>Tp53</i>	1.03±0.24	1.04 ± 0.27	1.96 ± 0.57**	1.75 ±0.33**

Abbreviations: *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Chrna7*, cholinergic receptor, nicotinic, alpha 7 (neuronal); *Chrn2*, cholinergic receptor, nicotinic, beta 2 (neuronal); *Eomes*, eomesodermin; *Gapdh*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *Gria1*, glutamate receptor, ionotropic, AMPA1 (alpha 1); *Gria2*, glutamate receptor, ionotropic, AMPA2 (alpha 2); *Grin2a*, glutamate receptor, ionotropic, NMDA2A (epsilon 1); *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Htr1a*, 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A, *Htr2a*, 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A, G protein-coupled; *Htr3a*, 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3A, ionotropic; *Htr4*, 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 4, G protein-coupled; *Ogg1*, 8-oxoguanine DNA glycosylase; OTA, ochratoxin A; *Pax6*, paired box 6; *Sirt1*, sirtuin 1; *Sst*, somatostatin; *Tph2*, tryptophan hydroxylase 2; G protein-coupled; *Tp53*, tumor protein p53.

^a Mean ± SD.

**P* < 0.05, ** *P* < 0.01, significantly different from 0-ppm controls by Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test.

Table S1**Primary antibodies and experimental conditions used in immunohistochemistry**

Antigen	Abbreviated name	Host species	Clonality	Clone number	Dilution	Antigen retrieval condition	Manufacturer
Beta III Tubulin	TUBB3	Mouse	Monoclonal IgG _{2a}	TUJ-1	1:500	Microwaving, pH 6.0 ^a	Abcam Inc. (Cambridge, UK)
Brain lipid binding protein	BLBP	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:300	None	Abcam Inc.
Calbindin-D-28K	CALB1	Mouse	Monoclonal IgG ₁	CB-955	1:500	Microwaving, pH6.0 ^a	Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
Calbindin-D-29K (Calretinin)	CALB2	Mouse	Monoclonal IgG ₁	CRT01/ O.N.40	1:100	Microwaving, pH6.0	LifeSpan Biosciences, Inc. (Seattle, WA, USA)
Cholinergic receptor, nicotinic, alpha 7	CHRNA7	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1: 200	Microwaving, pH 6.0	Abcam Inc.
Cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 2	CHRN2	Rabbit	Polyclonal	n.a.	1:300	Autoclaving, pH6.0 ^b	Bioss Inc. (Woburn, Massachusetts, USA)
Doublecortin	DCX	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:1000	None	Abcam Inc.
Glial fibrillary acidic protein	GFAP	Mouse	Monoclonal IgG ₁	GA5	1:200	None	Millipore Corporation (Temecula, CA, USA)
4-Hydroxynonenal	4-HNE	Mouse	Monoclonal IgG _{1κ}	HNE-J2	1:100	Autoclaving, pH 9.0 ^c	Japan Institute for the Control of Aging (Shizuoka, Japan)
Malondialdehyde	MDA	Mouse	Monoclonal, IgG ₂	1F83	1:200	Autoclaving, pH 9.0	Japan Institute for the Control of Aging
Neuron-specific nuclear protein	NeuN	Mouse	Monoclonal IgG ₁	A60	1:100	None	Millipore Corporation
Paired box 6	PAX6	Rabbit	Polyclonal	n.a.	1:200	Autoclaving, pH6.0	LifeSpan

			IgG ₁				Biosciences, Inc.
Parvalbumin	PVALB	Mouse	Monoclonal IgG ₁	PARV-1 9	1:1000	Microwaving, pH6.0	Millipore Corporation
Phospho-TrkB (phospho Y816)	p-TRKB	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:1000	Microwaving, pH6.0	Osenses (Keswick, Australia)
Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	Mouse	Monoclonal IgG _{2a}	PC10	1:200	None	Dako (Glostrup, Denmark)
Reelin	RELN	Mouse	Monoclonal IgG ₁	G10	1:1000	None	Novus Biologicals, Inc. (Littleton, CO, USA)
Somatostatin	SST	Rabbit	Polyclonal	n.a.	1:600	Microwaving, pH6.0	Abcam Inc.

Table S1 (continued)

Primary antibodies and experimental conditions used in immunohistochemistry

Antigen	Abbreviated name	Host species	Clonality	Clone number	Dilution	Antigen retrieval condition	Manufacturer
Stem cell factor	SCF	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:2000	None	Abcam Inc.
T box brain 2	TBR2	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:500	Autoclaving, pH6.0	Abcam Inc.
Tubulin, beta 3 class III	TUBB3	Mouse	Monoclonal IgG _{2a}	TuJ-1	1:500	Microwaving, pH6.0	Abcam Inc.

^a Microwaving at 90°C for 10 min in 10 mM citrate buffer (pH 6.0).

^b Autoclaving at 121°C for 10 min in 10 mM citrate buffer (pH 6.0).

^c Autoclaving at 121 °C for 10 min in Target Retrieval Solution (pH 9.0; Dako).

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)

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 トキシンの経口摂取による全身影響を定性的、定量的に評価することを目的として実験を行った。T-2 トキシンを 0 ppm (対照群)、3 ppm、4.5 ppm、6 ppm または 12 ppm の濃度で含む餌 (混餌) をラットに 5 日間自由摂取させ、摂取前、摂取中、摂取後の心電図、体温および運動量の変化をテレメトリー法を用いて継時的に連続記録した。その結果、3 ppm および 0 ppm では、上記の指標に変化が認められなかったが、4.5 ppm 以上の濃度では濃度依存性に心拍数と体温のレベル、およびそれらの日周リズムに影響が認められた。これらの観察指標による無毒性量を 3 ppm として、T-2 トキシン摂取期間中の平均摂食量から耐容一日摂取量 (TDI) を求めたところ 0.4 μ g/体重 kg/日 (不確実係数=500) であった。

A. 研究目的

平成 22~24 年度の研究において、T-2 トキシン溶液を皮下投与されたラットでは、投与後に不整脈が頻発することが明らかになっている。不整脈としては洞性徐脈、第 II 度房室ブロック、心室期外収縮 (ショートラン含む) などが多く観察されている。これらの不整脈の多くは、自律神経遮断薬の同時持続投与によって減少したが、一部の心室期外収縮は消失することなく、残存した。このことから T-2 トキシン溶液の皮下投与によって誘発される不整脈の発現には自律神経機能の変化が強く関与することが示唆される一方、自律神経系によらない心筋自体への影響による不整脈の発現の可能性も考えられた。心筋細胞への直

接影響の有無を明らかにするために、ラット一次培養心筋細胞のミトコンドリア電子伝達系機能に及ぼす T-2 トキシンの作用効果を調べたところ、低濃度から濃度依存性の抑制効果が生じることがわかった。上記の実験結果から、T-2 トキシンには自律神経系および心筋への直接作用を通じて心臓に影響を及ぼす性質があることが明らかになった。そこで、平成 25~27 年度は、より自然な投与ルートである自由経口摂取したラットにおいて、心機能を含む全身の生理的活動への影響の有無と量-反応関係を明らかにする目的で実験を行った。

B. 研究方法

1. T-2 トキシン経口摂取試験

I. 実験群の構成

実験群は、①12 ppm-T-2 トキシン群 (6 匹)、②6 ppm-T-2 トキシン群 (6 匹)、③4.5 ppm-T-2 トキシン群 (6 匹)、④3 ppm-T-2 トキシン群 (6 匹)、⑤0 ppm-T-2 トキシン群 (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、6 ppm、4.5 ppm、3 ppm、0 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。対照期間、T-2 トキシン摂取期間、T-2 トキシン摂取後において摂食量 (g) を測定した。

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 3~5 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、ラットは専用飼育チャンバー内で飼育され、餌および水は自由摂取とした。専用飼育チャンバー内の温度は 23°C、明暗周期は L:D=12:12 (8:00 点灯、20:00 消灯) で維持した。通常餌と T-2 トキシン混餌の餌箱の交換は 11:00~12:00 の時間帯に行った。

IV. 統計処理

心拍数、体温、運動量について、各 T-2 トキシン濃度における 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、各期間における群間比較のための有意差検定を二元配置分散分析および Tukey テストによって行った。摂食量あるいは体重と曝露濃度との関係は、一元配置分散分析 (対応なし) を用い、対照群との有意差検定は Dunnett test を用いた。いずれも $P < 0.05$ で有意差ありとした。

C. 研究結果

I. 心拍の変化

A. 心拍数レベル

各濃度の摂取群における心拍数の継時的変化を図 1 に示す。12 ppm、6 ppm、4.5 ppm では T-2 トキシン混餌摂取開始後 2 日目で対照群に比較して軽度に心拍数が増加した (12 ppm, $P < 0.01$ 、6 ppm, $P=0.35$ 、4.5 ppm $P < 0.05$) が、その後時間の経過とともに減少した。T-2 トキシン摂取開始後 5 日目における心拍数は、摂取開始前日 (Pre 3) に比べて、12 ppm で 94.1 %、6 ppm で 96.8 %、4.5 ppm

で 96.2 %、3 ppm で 97.9 %、0 ppm で 99.1 % であった。また、T-2 トキシン摂取終了後 3 日目における心拍数は、12 ppm で 89.6 %、6 ppm で 90.6 %、4.5 ppm で 94.4 %、3 ppm で 97 %、0 ppm で 95.3 % であり、対照群 (0 ppm 群) と比較して、12 ppm、6 ppm、4.5 ppm の各群では有意な減少がみられた。概して曝露濃度が高いほど T-2 トキシン摂取期間中および摂取後の心拍数の減少度が大きかった。

暗期における心拍数変化：全曝露濃度グループの二元配置分散分析では T-2 トキシン摂取前、摂取中、摂取後の変化に関して有意差 ($P=0.0001$) が、また摂取濃度間で有意差 ($P=0.01$) が示された。

12 ppm では T-2 トキシン摂取期間中 (5 日間平均) の心拍数は摂取前の心拍数に比較して有意に減少した ($P < 0.005$)。各濃度群において T-2 トキシン摂取終了後の心拍数は摂取前の心拍数に比較して有意に減少した (12 ppm、 $P < 0.0001$; 6 ppm、 $P < 0.001$; 4.5 ppm、 $P < 0.001$; 3 ppm、 $P < 0.01$) が、対照群 (0 ppm) では有意な減少ではなかった ($P = 0.3$)。明期における心拍数変化：T-2 トキシン摂取期間中における明期の心拍数はいずれの濃度においても有意な変化は示されなかった。一方、T-2 トキシン摂取終了後の心拍数は、各群で有意差 (12 ppm、 $P < 0.0001$; 6 ppm、 $P < 0.01$; 4.5 ppm、 $P < 0.001$; 3 ppm、 $P < 0.005$; 0 ppm、 $P < 0.05$) がみられた。

B. 心拍数の周期性 (自己相関係数、周期)

全濃度における心拍数の周期性に関する分析結果を表 1 および図 5 に示す。12 ppm、6 ppm および 4.5 ppm では、T-2 トキシン摂取前に比べて摂取期間中の自己相関係数は減少傾向が見られたが、12 ppm でのみ有意差が示された (表 1、図 5)。心拍数の周期 (2π) に関し

ては、T-2 トキシンの摂取期間中に周期性が認められた個体の平均値としては、12 ppm、6 ppm、4.5 ppm、3 ppm、0 ppm の各群でそれぞれ、23.79 時間、23.55 時間、23.83 時間、23.32 時間、23.82 時間を示し、摂取濃度間での差は観察されなかった。一方、異常を示した個体数の観点からの結果では、自己相関係数が T-2 トキシン摂取前に比べて 30 %以上の低下を示した個体数および周期性が消失した個体は表 2 に示すとおり 4.5 ppm 以上で認められ、3 ppm および 0 ppm (対照群) では異常個体は認められなかった。また、異常個体数は曝露濃度が高い 6 ppm および 12 ppm で増加する傾向が示された。

II. 体温の変化

すべての群における体温の変化を図 6 に示す。体温は心拍数と同様に暗期に高く明期に低いリズムを示した。T-2 トキシンの摂取期間中の暗期における体温の変化は小さい一方、明期では摂取開始後 3~5 日目では 4.5 ppm 以上の濃度で体温の低下が示された。T-2 トキシン摂取前 3 日間→摂取開始後 3~5 日目の 3 日間の明期平均体温は、12 ppm で $36.10^{\circ}\text{C} \rightarrow 35.66^{\circ}\text{C}$ 、6 ppm で $36.28^{\circ}\text{C} \rightarrow 36.03^{\circ}\text{C}$ 、4.5 ppm で $36.57^{\circ}\text{C} \rightarrow 36.40^{\circ}\text{C}$ 、3 ppm で $36.14^{\circ}\text{C} \rightarrow 36.26^{\circ}\text{C}$ 、0 ppm で $36.24^{\circ}\text{C} \rightarrow 36.09^{\circ}\text{C}$ であった。これらの平均体温差 ($\Delta^{\circ}\text{C}$) は二元配置分散分析の結果、濃度間で有意差 ($P = 0.015$) が示された。体温リズムの自己相関係数および周期の変化を表 3 に示す。4.5 ppm 群の 1 匹で T-2 トキシン摂取後の体温リズムが消失し自己相関係数および周期が不明瞭となったが、全体的にはすべての曝露濃度で体温リズムに明瞭な変化は認められなかった。

明期における体温低下が明瞭な T-2 トキシン摂取期間中の 3 日目~5 日目の明期平均体

温が T-2 トキシン摂取前の 3 日間にくらべて 0.3°C 以上低下した個体数は、12 ppm で 6 匹中 5 匹 (83.3 %)、6 ppm で 3 匹 (50.0 %)、4.5 ppm で 1 匹 (16.7%) であったが、3 ppm および 0 ppm では 0 匹であった。

III. 運動量の変化

T-2 トキシン摂取中は自己相関係数が 12 ppm 群および 6 ppm 群でやや低下する傾向が示されたが有意差ではなかった (12 ppm で $P=0.34$)。また周期は各濃度群で明瞭な変化は認められなかった (表 4)。

IV. 摂食量および体重の変化

T-2 トキシン摂取期間中の 1 日平均摂食量 (g、平均値±標準偏差; $n=6$) は、対照群、3 ppm、4.5 ppm、6 ppm、12 ppm の各曝露群でそれぞれ 13.9±0.9、14.5±2.5、13.4±5.1、12.9±2.0、9.8±0.8 であった。T-2 トキシン摂取群では摂食量の軽度の減少がみられたが、対照群との間の有意差は 12 ppm T-2 トキシン群でのみ認められた ($P<0.05$)。T-2 トキシン摂取期間中の体重測定は、動物へのハンドリングによる心拍数や体温に影響を及ぼすことが危惧されたため実施されなかったが、実験終了時 (T-2 トキシン摂取終了後 5 日目) における体重は T-2 トキシン濃度との間に有意差が認められなかった ($P>0.05$)。

V. 最小毒性量 (LOAEL)、無毒性量 (NOAEL)、耐容一日摂取量 (TDI)

上記の心拍数および体温の変化に関する観察結果から、本実験における T-2 トキシンの LOAEL は 4.5 ppm、NOAEL は 3 ppm であることがわかった。NOAEL の濃度と T-2 トキシン摂取期間中の摂食量に基づいて耐容一日摂取量 (TDI) を求めたところ、0.4 $\mu\text{g}/\text{体重 kg}/\text{日}$ (不確実係数=500) であった。

D. 考察

我々はこれまでの研究においてトリコテセン系カビ毒である T-2 トキシンおよびデオキシニバレノール (DON) の一定量をラットに皮下投与した場合、心拍数の変化、不整脈の発現および自律神経活動の変化が生じることを明らかにしている^{1, 2)}。また、ラット一次培養心筋細胞に、T-2 トキシンあるいは DON を直接作用させた場合、心筋細胞のミトコンドリア機能を反映する酸素消費速度 (oxygen consumption rate) の低下やミトコンドリア電子伝達系の予備力 (reserve capacity) の低下が濃度依存性に低下することがわかっている³⁾。細胞レベルにおけるこのような変化は抗酸化剤の同時作用によって著減することから、酸化ストレスが強く関与していることが示唆される (文献)。

本研究課題では、より自然な投与ルートである経口摂取によって、どの程度の濃度レベルから全身的な影響が生じるかを *in vivo* の実験系を用いて明らかにすることを主目的として実施された。そのため、全身機能の代表的な指標である心電図 (心拍数)、体温および運動量 (活動量) を選び、これらの指標の変化をラットの自由行下でテレメトリー法を用いて連続記録した。T-2 トキシンを含む混餌中の T-2 トキシン濃度は 12 ppm、6 ppm、4.5 ppm、3 ppm とし、0 ppm (対照) の場合と比較した。4.5 ppm を設けたのは 6 ppm で混餌摂取の影響がみられ、3 ppm では影響が観察されなかったため、より正確な最小毒性量 (LOAEL) を知る必要性から両濃度の中間を選んだものである。

心拍数は自律神経活動の作用を受けて明瞭な日周リズムを有しているが、その増減は全身の好氣的代謝レベルの変化を強く反映して

いる。したがって、心拍数の変化を観察することは全身の健康状態を知る上で極めて有益である。また、心拍数計測の元になる心電図は様々な原因による不整脈の出現性を知る上でも有益である。体温も自律神経活動、とくに交感神経活動によって影響を受けている。心拍数と同様に体温も全身の代謝を反映して変化することから重要な全身指標である。本テレメトリー法による体温測定は送信機本体に内蔵されている温度センサーによるもので、送信器の埋め込み部位が背部皮下であるため皮下温を測定していることになる。運動量は全身の運動活性を示すが、本テレメトリー法による測定は主にラットの水平方向の移動量をカウントしているものでグルーミングや立ち上がり行動は捉えていないが、全身の活動性の変化を観察する上では十分有益な指標である。

本研究で観察された心拍数、体温および運動量は明瞭な日周リズムを有していた。このことから、これらの指標の解析では絶対値の変化のみならず、日周リズムへの影響を解析することも有意義と考えられた。日周リズムの解析は自己相関係数（コログラム）および周期（ 2π ）を測定することで行った。自己相関係数は反復の規則性が高いほど値が1に近く、周期は健常な動物では24時間に近い値を示す。T-2 トキシン混餌の摂取期間は高濃度曝露では影響が強く現れる可能性が考えられたため、全個体が死亡することのない5日間とした。

本研究課題で実施した全ての曝露濃度における心拍数、体温、運動量への影響を俯瞰的にみた場合、濃度依存性に影響が強く現れる傾向がみられ、その影響は4.5 ppm以上で観察された。

心拍数はT-2 トキシン摂取開始後2日間増加する傾向がみられた。これは明期における心拍数増加が影響している。時間的なスケールは異なるが、T-2 トキシンの皮下投与実験においても投与後に明期の明瞭な心拍数増加が観察されている。一方、今回の経口摂取実験では、その後の摂取時間の経過に伴って、心拍数は漸減し4.5 ppm~12 ppmではその傾向が明瞭に示された。また、4.5 ppm~12 ppmではT-2 トキシン摂取終了後も心拍数の減少が持続した。なお、対照群（0 ppm群）では、すべての期間を通じて心拍数が時間経過に伴って漸減したが、これは加齢に伴う心拍数の自然減少であり一般的に観察される現象である。心拍数の周期性に関する結果では、自己相関係数がT-2 トキシン摂取前に比較して有意に減少したのは12 ppm群だけであったが、自己相関係数の明瞭な低下を示す個体数の点では4.5 ppm以上で濃度依存性の増加が認められ、日周リズムの消失を示す個体も4.5 ppm以上で認められた。心拍数に関するこれらの結果から、4.5 ppm以上の濃度のT-2 トキシンの経口摂取は循環系や自律神経系に好ましくない影響を及ぼすことが明らかであるといえる。

体温の変化に関しては、日周リズムはほぼ正常に維持されたが、4.5 ppm以上では明期における体温低下がT-2 トキシン摂取開始後3~5日目にかけて認められた。この時期は上記の心拍数の減少がT-2 トキシン摂取期間の後半に減少してくる時期と重なる。しかしながら、心拍数の減少はT-2 トキシン摂取終了後も認められるのに対して体温はT-2 トキシン摂取終了後に回復していることから、心拍数と体温は必ずしも同じ原因による影響を受けているとは言えない。

運動量（活動量）に関しては、12 ppm など高濃度曝露群の一部で抑制傾向が認められる個体も存在したが、曝露群全体を通じて一定した傾向は認められなかった。このことから、上述の心拍数や体温における変化には運動量の変化が直接影響している可能性は低いと考えられた。

本研究で算出された TDI の $0.4 \mu\text{g}/\text{体重 kg}/\text{日}$ （不確実係数=500）は、豚の T-2 トキシン経口摂取試験（LOAEL=2 ppm で血球変化）による $0.06 \mu\text{g}/\text{体重 kg}/\text{日}$ （不確実係数=500）⁴⁾よりも高く、また本研究課題分担研究者によるマウスの実験結果（LOAEL=1 ppm で胸腺変化）から求められた $0.28 \mu\text{g}/\text{体重 kg}/\text{日}$ （不確実係数=500）よりも高かった。本研究で用いられた指標は最終的な全身影響を反映するものであり、これらの指標の変化はかなり強い影響と思われる。そのため、臓器レベルあるいは細胞レベルでの変化とは影響閾値レベルに差が生じる可能性がある。

E. 結論

3 ppm～12 ppm の T-2 トキシンを含む混餌を自由摂取したラットにおいて 4.5 ppm 以上の濃度で全身性の機能的影響が認められた。この結果から、無毒性量を 3 ppm とし耐容 1 日摂取量（TDI）を求めたところ $0.4 \mu\text{g}/\text{体重 kg}/\text{日}$ （不確実係数=500）であった。

参考文献

- 1) 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.
- 2) 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.

- 3) 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.
- 4) Rafai P, Tuboly S, Bata A, Tilly P, Ványi A, Papp Z, Jakab L, Túry E. : Effect of various levels of T-2 toxin in the immune system of growing pigs. *Vet. Rec.* 136(20): 511-514. 1995.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究業績

【学会発表】

- 1) 局 博一・花房真和：T-2 トキシン混餌摂取ラットにおける心拍、体温、運動量の変化。第 77 回日本マイコトキシン学会。2015 年 9 月 15 日（山形県鶴岡市）。
- 2) 局 博一：マイコトキシンの毒性評価。第 77 回日本マイコトキシン学会。2016 年 1 月 8 日（神奈川県川崎市）。

【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):