

厚生労働科学研究費補助金

(食品の安全確保推進研究事業)

国際的に問題となる食品中のかび毒の安全性確保に関する研究

平成 28 年度分担研究報告書

分担研究者 渋谷 淳 東京農工大学大学院 農学研究院 動物生命科学部門 教授

かび毒の発達神経毒性評価

研究要旨 本研究は、発達神経毒性が懸念されているかび毒について、実験病理学的に発達神経毒性影響を検討する。平成 28 年度はペニシリウム属やアスペルギルス属の真菌により産生されるかび毒であり、実験的に神経毒性を誘発することが知られているシトレオビリジン (citroviridin) について、マウスを用いて発達期神経毒性影響を検討した。10 ppm を高用量として選択し、公比 3 で投与群 (0、1、3、10 ppm) を設定し、妊娠 ICR マウスを用いて発達期曝露試験 (各群 10 匹) を行った。妊娠 6 日目から離乳時 (出生後 21 日目) まで母動物に対して混餌投与することにより、児動物に発達期曝露し、出生後 21 日目と 77 日目にそれぞれ解剖を行った。母動物は 10 ppm で分娩後 21 日目に摂餌量の低値と、3 ppm で摂水量の高値が認められた。また、病理組織学的に 10 ppm で肝細胞の壊死が認められた。それ以外にシトレオビリジンによる影響と思われる変化は認められなかった。児動物では、出生後 21 日目および 77 日目で一般状態や臓器重量などにシトレオビリジンによる影響と思われる変化は認められなかった。雄児動物を対象とした脳海馬歯状回における神経新生の解析の結果、曝露終了時に 10 ppm で脳の顆粒細胞層下帯における細胞増殖の増加と神経新生制御系の発現変動を特徴とする神経新生障害を示唆する変化が認められた。成熟後には曝露終了時に発現変動を示した遺伝子の殆どが逆の発現変動を示し、免疫組織化学的に顆粒細胞系譜と GABA 性介在ニューロンの分布に変動を認めなかったことから、曝露終了時に観察された影響がフィードバック機序により打ち消される結果と判断され、離乳時の障害が恒常性維持機構により修復されることが示唆された。一方で、NMDA 型グルタミン酸受容体 NR2D をコードする *Grin2d* の遺伝子発現が離乳時から成熟後まで持続して減少を示したことから、シトレオビリジンの発達期曝露の影響は不可逆である可能性が示唆された。児動物の神経新生障害に基づいた無毒性量は 3 ppm (0.42–1.51 mg/kg 体重/日) と判断された。

A. 研究目的

近年、農作物へのかび毒等自然毒の汚染が国際的に深刻な問題となっており、かび毒の国際的成分規格を設定する動きが活発になってきている。かび毒の健康被害を防ぐには、基準値策定が最も効果的であり、それに向けた国際的取り組みがなされている。すでに近年、木の実を対象とした総アフラトキシン、穀物のオクラトキシン A (OTA) の新たな規格基準が設定され、更にはフモニシン、デオキシニバレノールの毒性再評価が行われている。今後さらに対象のかび毒が増えることが予想される。このような状況にあって、輸入大国の

我が国としては、国際動向に準じた基準値策定は急務であることから、我が国の食品中のかび毒汚染実態および国民の曝露実態を正確に把握する必要がある。また、輸入食品を汚染するかび毒産生菌の種およびかび毒産生を考慮に入れた予防対策を構築する必要がある。

本研究では、神経毒性影響の懸念ないし報告のあるかび毒を対象として、高感受性集団である胎児・乳幼児を想定した神経発達に対するリスク評価を目的とする。我々は、記憶や学習の中核であり、生後もニューロンを産生し続ける海馬歯状回に着目し、顆粒細胞層下帯 (SGZ) における顆粒

細胞系譜の各種分化指標と歯状回門に分布して顆粒細胞の分化や移動を制御する介在ニューロンの分布を検討することで、数々の神経毒性物質が神経新生を障害することを見出している。

平成 28 年度は、穀物汚染が危惧されているペニシリウム属やアスペルギルス属の真菌によって産生されるシトレオビリジン (citreoviridin) を評価対象とした。シトレオビリジンについては日本ならびにコーデックス委員会においても食品中の基準値は策定されておらず、リスク管理措置の検討のためより多くの毒性データが必要とされている。そこでシトレオビリジンの発達期神経毒性影響を明らかにすることを目的として母動物に混餌投与することにより、妊娠 6 日目から出生後 21 日目 (離乳時) まで経胎盤、経乳的に児動物に対して曝露させ、曝露終了時ならびに出生後 77 日目に解剖して神経新生に対する影響を検討し、離乳時における影響ならびにその回復性を評価することとした。

B. 研究方法

妊娠 ICR マウス (妊娠 1 日で入手、日本エスエルシー) を、一群を 10 匹ずつとして計 4 群に分け、シトレオビリジンを 0、1、3、10 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。最高用量は予備的に 0、10 ppm を設定して母動物に対して混餌投与した際に、10 ppm で児動物の体重減少と肝臓重量の減少が認められたため、母動物への軽度な毒性とともに妊娠の維持が期待される 10 ppm に設定した。シトレオビリジンの乳汁移行に関して、生後 14 日目に予備試験の 10 ppm 投与群の児動物の胃から乳汁を採取し、シトレオビリジンの濃度を LC-MS/MS 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=9 または 10) に雄 7 例、雌 3 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、摂餌量および摂水量を週に 2 回の頻度で測定した。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 (離乳時) に児動物の半数を解剖に供した。各群 12 例の雄児動物を CO₂/O₂ 麻酔下で 4% paraformaldehyde (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 15 ~ 22 例、雌 10 例の児動物は CO₂/O₂ 麻酔下で放血し、脳、肝臓、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、その他の臓器は 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定した。PFA 灌流固定脳標本については大脳の Bregma の後方約 -3.5 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 2 に示した条件で以下の各分子に対する抗体を用いて、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段階指標である glial fibrillary acidic protein (GFAP)、sex determining region Y (SRY)-box 2 (SOX2)、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)、アポトーシス活性の指標として TUNEL 染色を行った。GFAP、SOX2、TBR2、DCX、PCNA および TUNEL 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単位長さ当たりの陽性細胞数を算出した。一方、reelin、PVALB、CALB1、CALB2 および NeuN 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。

母動物は児動物と同じく分娩後 21 日に CO₂/O₂ 麻酔下で放血し、脳、肝臓、腎臓重量を測定後、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。

残り半数の児動物は出生後 77 日までシトレオビリジ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CO₂/O₂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CO₂/O₂麻酔下で放血し、脳、肝臓、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、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器官重量、摂餌量、摂水量は母動物ごとに集計し、群平均および標準偏差を算出した。児動物の体重および臓器重量、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。

出生後21日目および77日目の0並びに10 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、AllPrep DNA/RNA 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。

(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

体重、摂水量、摂餌量：

母動物は、摂餌量の低値が10 ppm 群で、摂水量の高値が3 ppm 群で分娩後21日目に認められた (Fig. 1)。児動物は雌雄ともにシトレオビリジンによる影響と思われる体重の変化は認められなかった (Fig. 2)。

着床数、産仔数：

着床数、産仔数にシトレオビリジンによる影響は認められなかった (Table 1)。

臓器重量：

臓器重量にシトレオビリジンによる影響は認められなかった (Table 3)。

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組織学的な所見として、肝臓における肝細胞壊死が全投与群で認められ、統計学的に有意な発生頻度の増加が10 ppm で認められた (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 PCNA (細胞増殖活性マーカー) 陽性細胞が10 ppm で統計学的に有意に増加したが (Fig. 5)、顆粒細胞系譜の各分化段階マーカーの陽性細胞は有意な変動を示さなかった (Fig. 3)。また、歯状回門部では、GABA 性介在ニューロンである CALB1 陽性細胞が10 ppm で減少したが、CALB2 陽性介在ニューロン、reelin 陽性介在ニューロン、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 (Fig. 4)。

遺伝子発現解析：

出生後21日目の児動物の脳では、顆粒細胞の分化マーカーをコードする *Sox2*、*Eomes*(*Tbr2*)、*Dcx*、脳由来神経栄養因子をコードする *Bdnf*、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をコードする *Slc17a7*、

AMPA 型受容体をコードする *Gria2*、*Gria3* はいずれも 10 ppm で発現量が有意に増加した (Table 5)。一方、コリン作動性入力を受容体をコードする *Chrna4*、*Chrnb2*、GABA 性介在ニューロンで発現が認められる *Pvalb*、NMDA 型グルタミン酸受容体をコードする *Grin2d*、グルタミン酸トランスポーターをコードする *Slc17a6* では発現量が有意に減少した。出生後 77 日目の児動物の脳では、*Sox2*、*Tbr2*、*Dcx*、*Bdnf*、*Gria1*、*Gria2*、*Grin2d*、*Chrna7* で有意に発現減少、*Chrna4*、*Chrnb2*、*Pvalb* で有意に発現増加が認められた (Table 6)。

D. 考察

シトレオビリジンのマウスに対する発達期曝露後の雄児動物を対象とした海馬歯状回における免疫組織化学的解析の結果、出生後 21 日目で、10 ppm において SGZ における細胞増殖活性の増加を反映した PCNA 陽性細胞の有意な増加が認められた。一方、歯状回での遺伝子発現解析において、0 ppm 対照群と 10 ppm 群の比較において、10 ppm 群で顆粒細胞系譜の神経幹細胞・神経前駆細胞指標のうち、*Sox2* (type-1 神経幹細胞 ~ type-2b 神経前駆細胞)、*Eomes* (type-2b ~ type-3 神経前駆細胞)、*Dcx* (type-2b 神経前駆細胞 ~ 未熟顆粒細胞) の発現増加及び神経新生の促進に関わる *Bdnf* とグルタミン酸作動性入力の各種受容体の発現増加が認められた。また、免疫組織化学的には、統計学的な有意差は認められないものの、10 ppm 群において、SOX2 陽性細胞、TBR2 (EOMES と同義) 陽性細胞、DCX 陽性細胞、TUBB3 陽性細胞 (未熟顆粒細胞) のいずれも増加傾向を認めた。GFAP 陽性の type-1 神経幹細胞の数に明らかな変動を認めなかったことから、SGZ における増殖活性の増加は type 2 神経前駆細胞 ~ 未熟顆粒細胞の増加を反映した変化であると考えられた。一方、歯状回門における GABA 性介在ニューロンのうち、CALB1 陽性ニューロン数が 10 ppm 群で減少を示した。また、免疫組織化学的には陽性細胞分布に変動を認めなかつ

たものの、介在ニューロン指標遺伝子である *Pvalb* の発現低下も認めている。CALB1 陽性ニューロン及び PVALB 陽性介在ニューロンの総数は共に少ないものの、神経前駆細胞の分化促進に機能することが知られていることから、顆粒細胞系譜の分化に抑制がかかったため、系譜を構成する細胞の統計学的に有意な増加にまで及ばずに、それぞれの前駆細胞における前駆細胞指標の発現増加を示した可能性が示唆された。また、コリン作動性入力を受容体をコードする *Chrna4* や *Chrnb2*、NMDA 型グルタミン酸受容体をコードする *Grin2d*、グルタミン酸トランスポーターをコードする *Slc17a6* の発現量低下も顆粒細胞系譜の分化抑制に寄与しているものと考えられた。

出生後 77 日目では、顆粒細胞系譜の免疫組織化学的解析による分布に変動を認めなかったものの、*Sox2*、*Eomes*、*Dcx* の遺伝子発現の減少が認められた。また、検索した神経新生制御系 (グルタミン作動性、コリン作動性、及び GABA 作動性入力) の遺伝子のうち、グルタミン酸受容体の一つである *Grin2d* 以外の遺伝子の発現が 21 日目と逆の変動を示した。このことから、曝露終了時に観察された影響がフィードバック機序により打ち消される結果と判断され、離乳時の障害が恒常性維持機構により修復されることが示唆された。また、*Grin2d* の遺伝子発現が離乳時から持続して減少を示していた。その蛋白質である NMDA 型グルタミン酸受容体 NR2D は GABA 性介在ニューロンに分布することが知られており、得られたデータからは、シトレオビリジンの神経新生に与える影響は不明であるものの、不可逆的影響であることが示唆された。現在、神経新生制御系に関連する蛋白質分子の細胞分布の変動は解析中である。

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毒性影響を評価することを目的として、マウスを用いたシトレオビリジンの発達期曝露実験

を行った。母動物と児動物への影響は曝露終了時において 10 ppm で認められた。母動物では 10 ppm で肝細胞の壊死がみられ、児動物では曝露終了時に 10 ppm で脳の海馬歯状回の SGZ における細胞増殖の増加と神経新生制御系の発現変動を特徴とする神経新生障害を示唆する変化が認められた。成熟後には曝露終了時に発現変動を示した遺伝子の殆どが逆の発現変動を示し、免疫組織化学的に顆粒細胞系譜と GABA 性介在ニューロンの分布に変動を認めなかったことから、曝露終了時に観察された影響がフィードバック機序により打ち消される結果と判断され、離乳時の障害が恒常性維持機構により修復されることが示唆された。一方で、NMDA 型グルタミン酸受容体 NR2D をコードする *Grin2d* の遺伝子発現が離乳時から成熟後まで持続して減少を示したことから、シトレオビリジンの発達期曝露の影響は不可逆的である可能性が示唆された。児動物の神経新生障害に基づいた無毒性量は母動物の摂取量で 3 ppm (0.42–1.51 mg/kg 体重/日) と判断さ

れた。

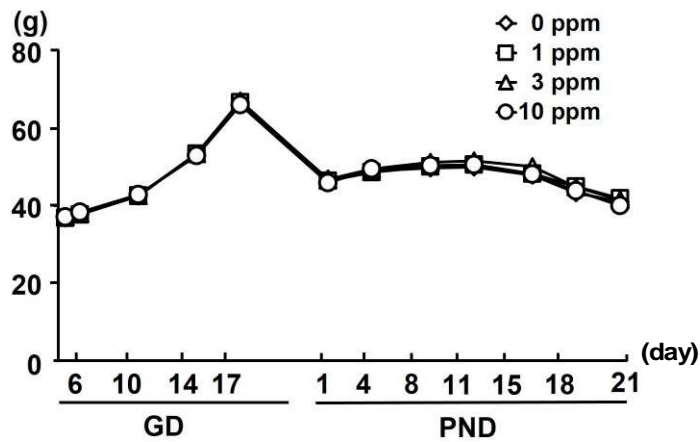
G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

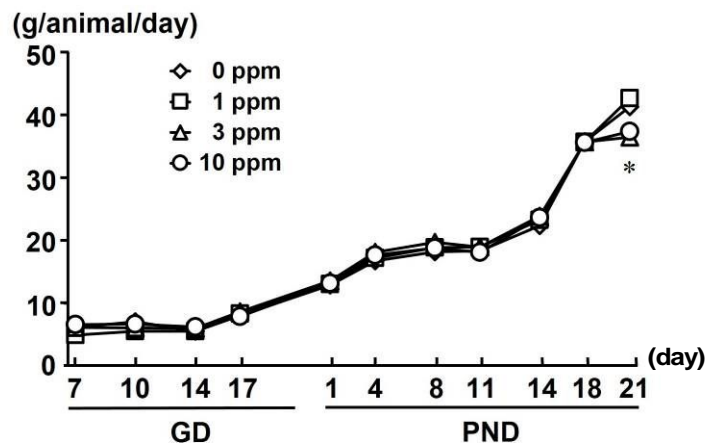
H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

A. Body weight



B. Food consumption



C. Water consumption

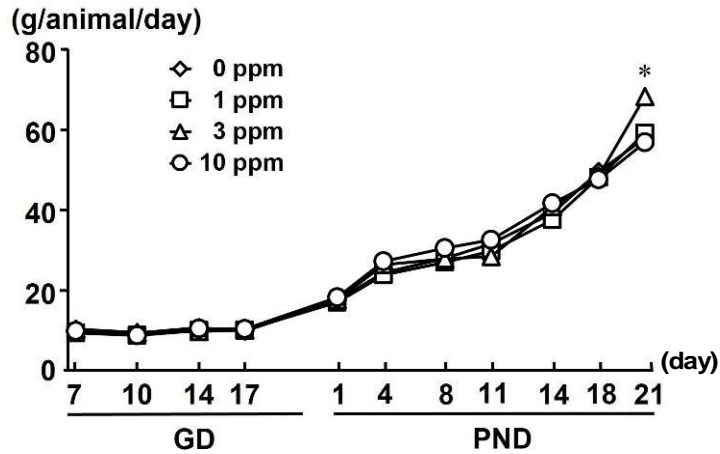
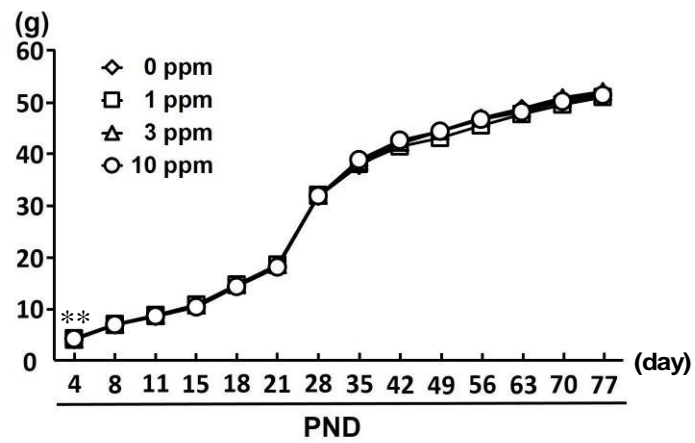


Figure 1. Body weight, food consumption and water consumption of dams given citreoviridin from GD 6 to PND 21 in the diet.

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

A. Male offspring



B. Female offspring

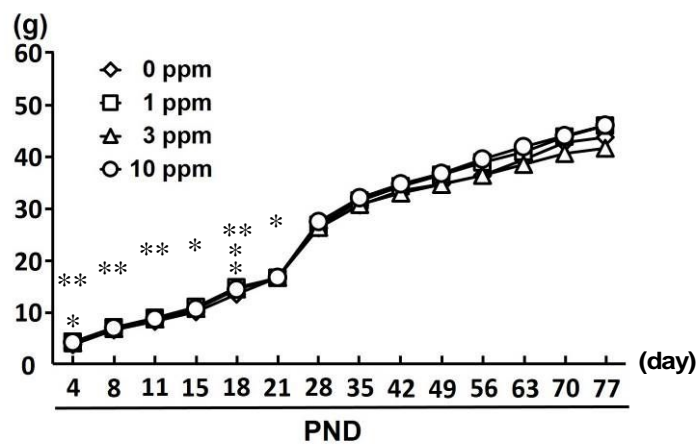


Figure 2. Body weight of male and female offspring exposed to citreoviridin at postnatal day. (A) Male offspring. (B) Female offspring.

*,** 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 citreoviridin from GD 6 to PND 21

| | No. of dams | Citreoviridin (ppm) | | | |
|--|-------------|---------------------|------------|------------|------------|
| | | 0 (Control) | 1 | 3 | 10 |
| Reproductive parameters | | | | | |
| No. of implantation sites | | 14.75±1.39 | 14.80±1.55 | 15.33±2.06 | 13.89±2.09 |
| No. of live offspring | | 13.78±2.22 | 13.30±1.25 | 13.56±1.81 | 13.33±1.58 |
| Mean body weight (GD, g) | | 46.49±4.75 | 47.36±3.12 | 47.53±3.37 | 47.39±3.68 |
| Mean body weight (PND, g) | | 46.76±2.53 | 47.18±2.69 | 47.82±2.70 | 46.81±2.58 |
| Food intake (GD, g/animal/day) ^a | | 6.63±0.82 | 6.04±0.42 | 6.68±0.70 | 6.80±1.48 |
| Food intake (PND, g/animal/day) ^a | | 23.63±1.21 | 24.22±1.39 | 24.05±1.22 | 23.47±1.59 |
| Water consumption (GD, g/animal/day) ^a | | 9.89±0.86 | 9.56±1.13 | 9.96±1.15 | 9.98±1.15 |
| Water consumption (PND, g/animal/day) ^a | | 35.46±5.37 | 34.67±3.81 | 36.82±3.47 | 36.40±4.18 |
| Citreoviridin intake | | | | | |
| GD, mg/kg body weight/day ^a | | 0 | 0.13±0.01 | 0.42±0.05 | 1.46±0.43 |
| PND, mg/kg body weight/day ^a | | 0 | 0.51±0.02 | 1.51±0.11 | 5.02±0.37 |

Mean±SD.

^a Mean value of each week.

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

Table 2. Primary antibodies and experimental conditions used in immunohistochemistry

| Antigen | Abbreviated name | Host species | Clonality | Clone number | Dilution | Antigen retrieval condition | Manufacturer |
|---|------------------|--------------|---------------------------------|------------------|----------|----------------------------------|---|
| Calbindin-D-28K | CALB1 | Mouse | Monoclonal IgG ₁ | CB-955 | 1:500 | Microwaving, pH 6.0 ^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, pH 6.0 | LifeSpan Biosciences, Inc. (Seattle, WA, USA) |
| Cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 2 | Chrn2 | Rabbit | Polyclonal | n.a. | 1:300 | Autoclaving ^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 | EMD Millipore (Billerica, MA, USA) |
| Neuron-specific nuclear protein | NeuN | Mouse | Monoclonal IgG ₁ | A60 | 1:100 | None | EMD Millipore |
| Parvalbumin | PVALB | Mouse | Monoclonal IgG ₁ | PARV-1 9 | 1:1000 | Microwaving, pH 6.0 | EMD Millipore |
| Proliferating cell nuclear antigen | PCNA | Mouse | Monoclonal IgG _{2a} | PC10 | 1:200 | None | Dako (Glostrup, Denmark) |
| Reelin | – | Mouse | Monoclonal IgG ₁ | G10 | 1:1000 | None | Novus Biologicals, Inc. (Littleton, CO, USA) |
| Sex determining region Y (SRY)-box 2 | SOX2 | Mouse | Monoclonal IgG ₁ | 9-9-3 | 1:4000 | None | Abcam Inc. |
| T box brain 2 | TBR2 | Rabbit | Polyclonal IgG | n.a. | 1:500 | Autoclaving, pH 6.0 | 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).

Table 3. Body and organ weights at the prepubertal and terminal necropsies of offspring

| | | Citreoiviridin in diet (ppm) | | | |
|-----------------------------------|----------------------|------------------------------|--------------|------------|------------|
| | | 0 (Control) | 1 | 3 | 10 |
| Male offspring on PND 21 | | | | | |
| No. of animals examined | | 19 | 22 | 19 | 15 |
| Body weight (g) | | 18.58±1.44 ^a | 18.74±1.16 | 18.80±1.09 | 17.43±1.75 |
| Brain weight | Absolute (g) | 0.45±0.02 | 0.45±0.02 | 0.46±0.02 | 0.44±0.02 |
| | Relative (g/100g BW) | 2.43±0.16 | 2.42±0.12 | 2.44±0.15 | 2.55±0.23 |
| Liver weight | Absolute (g) | 0.96±0.11 | 0.99±0.08 | 1.01±0.10 | 0.93±0.11 |
| | Relative (g/100g BW) | 5.19±0.51 | 5.26±0.32 | 5.35±0.43 | 5.32±0.17 |
| Kidneys weight | Absolute (g) | 0.13±0.01 | 0.13±0.01 | 0.14±0.01 | 0.13±0.02 |
| | Relative (g/100g BW) | 0.72±0.06 | 0.71±0.05 | 0.74±0.05 | 0.74±0.06 |
| Female offspring on PND 21 | | | | | |
| No. of animals examined | | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Body weight (g) | | 16.98±0.82 | 17.47±0.89 | 17.86±1.86 | 17.05±2.19 |
| Brain weight | Absolute (g) | 0.44±0.01 | 0.45±0.02 * | 0.45±0.02 | 0.44±0.02 |
| | Relative (g/100g BW) | 2.57±0.11 | 2.60±0.17 | 2.53±0.22 | 2.64±0.29 |
| Liver weight | Absolute (g) | 0.79±0.07 | 0.81±0.12 | 0.81±0.08 | 0.78±0.12 |
| | Relative (g/100g BW) | 4.67±0.31 | 4.62±0.60 | 4.56±0.15 | 4.56±0.19 |
| Kidneys weight | Absolute (g) | 0.12±0.01 | 0.14±0.02 * | 0.13±0.02 | 0.12±0.01 |
| | Relative (g/100g BW) | 0.70±0.04 | 0.79±0.06 ** | 0.71±0.05 | 0.73±0.05 |
| Male offspring on PND 77 | | | | | |
| No. of animals examined | | 12 | 11 | 12 | 12 |
| Body weight (g) | | 51.68±3.91 | 50.89±2.13 | 52.02±3.88 | 51.27±5.05 |
| Brain weight | Absolute (g) | 0.48±0.02 | 0.50±0.02 * | 0.49±0.02 | 0.49±0.02 |
| | Relative (g/100g BW) | 0.96±0.07 | 1.00±0.09 | 0.96±0.11 | 0.94±0.09 |
| Liver weight | Absolute (g) | 2.40±0.19 | 2.24±0.29 | 2.26±0.38 | 2.29±0.42 |
| | Relative (g/100g BW) | 4.79±0.46 | 4.45±0.28 | 4.37±0.49 | 4.38±0.45 |
| Kidneys weight | Absolute (g) | 0.36±0.03 | 0.37±0.03 | 0.36±0.05 | 0.36±0.02 |
| | Relative (g/100g BW) | 0.73±0.08 | 0.73±0.08 | 0.69±0.08 | 0.70±0.06 |
| Female offspring on PND 77 | | | | | |
| No. of animals examined | | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Body weight (g) | | 43.63±6.19 | 45.88±3.32 | 41.57±3.64 | 45.93±5.77 |
| Brain weight | Absolute (g) | 0.49±0.03 | 0.51±0.03 | 0.50±0.02 | 0.50±0.02 |
| | Relative (g/100g BW) | 1.13±0.19 | 1.11±0.13 | 1.17±0.10 | 1.13±0.17 |
| Liver weight | Absolute (g) | 1.90±0.46 | 1.98±0.21 | 1.70±0.23 | 1.90±0.20 |
| | Relative (g/100g BW) | 4.23±0.66 | 4.32±0.30 | 3.95±0.43 | 4.26±0.49 |
| Kidneys weight | Absolute (g) | 0.23±0.03 | 0.25±0.03 | 0.24±0.02 | 0.24±0.01 |
| | Relative (g/100g BW) | 0.52±0.06 | 0.54±0.08 | 0.55±0.07 | 0.54±0.09 |

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 4. Histopathological findings of dams exposed to citreoviridin from gestation day 6 to day 21 after delivery

| | Citreoviridin in diet (ppm) | | | |
|------------------------|-------------------------------------|-----------|-----------|------------------------|
| | 0 (Control) | 1 | 3 | 10 |
| No. of dams examined | 9 | 10 | 10 | 10 |
| Brain | | | | |
| Abnormalities detected | 0 ^a | 0 | 0 | 0 |
| Liver | | | | |
| Abnormalities detected | 0 ^a (0/0/0) ^b | 2 (2/0/0) | 3 (2/1/0) | 4 (2/2/0) [†] |
| Kidney | | | | |
| Abnormalities detected | 0 | 0 | 0 | 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 Mann–Whitney’s *U*-test.

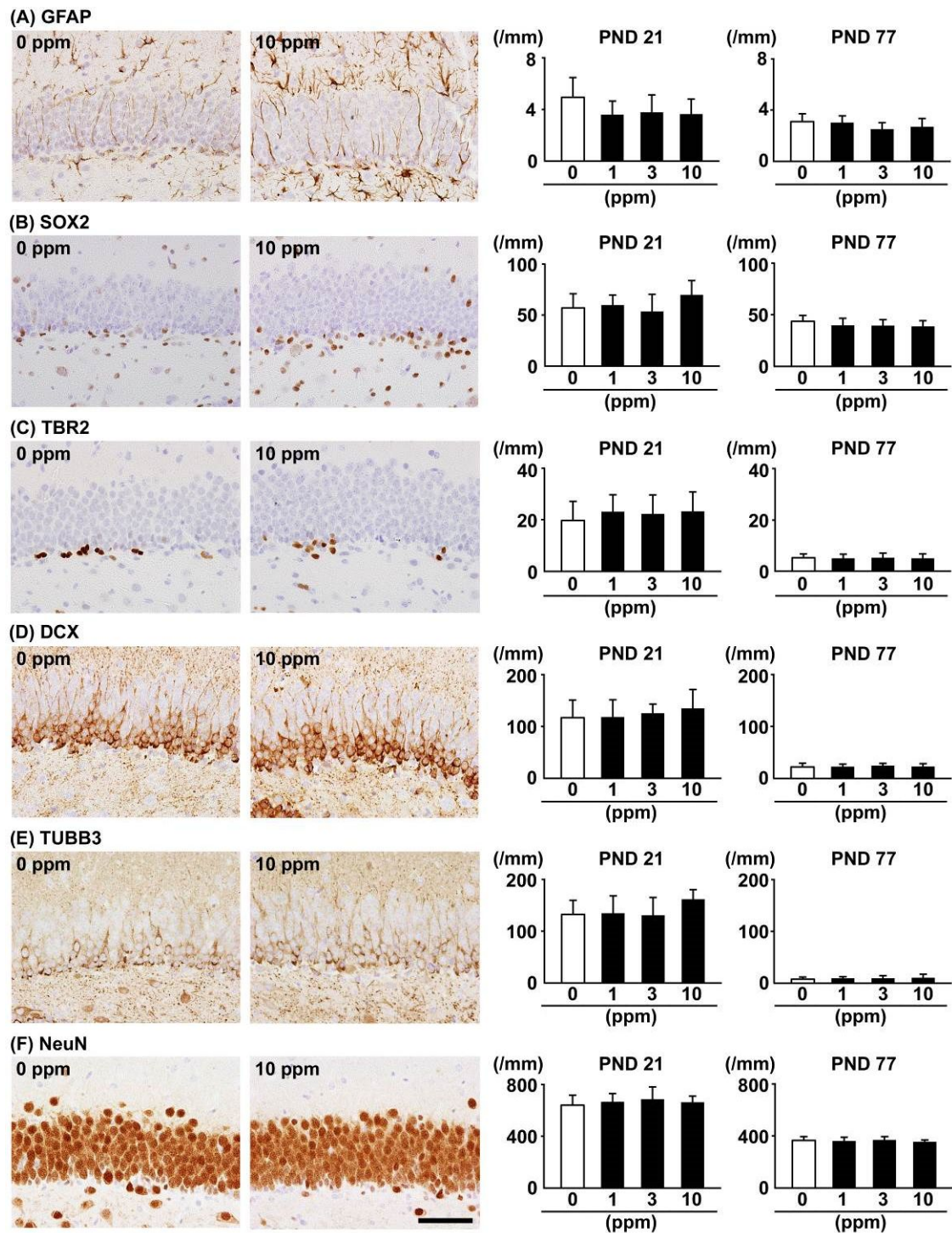


Figure 3. Distribution and number of immunoreactive cells for neuronal stage-defining markers of granule cell lineages in the subgranular zone (SGZ), and a mature neuronal marker in the granule cell layer (GCL) of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to citreoviridin. (A) Glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the SGZ, arrowheads indicate immunoreactive cells. (B) Sex determining region Y (SRY)-box 2 (SOX2) 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 10 ppm group at PND 21 are shown. Magnification: 400 \times ; 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 = 8-10/group (0 ppm controls and 10 ppm citreoviridin 9; 1 ppm citreoviridin, 10; 3 ppm citreoviridin, 8).

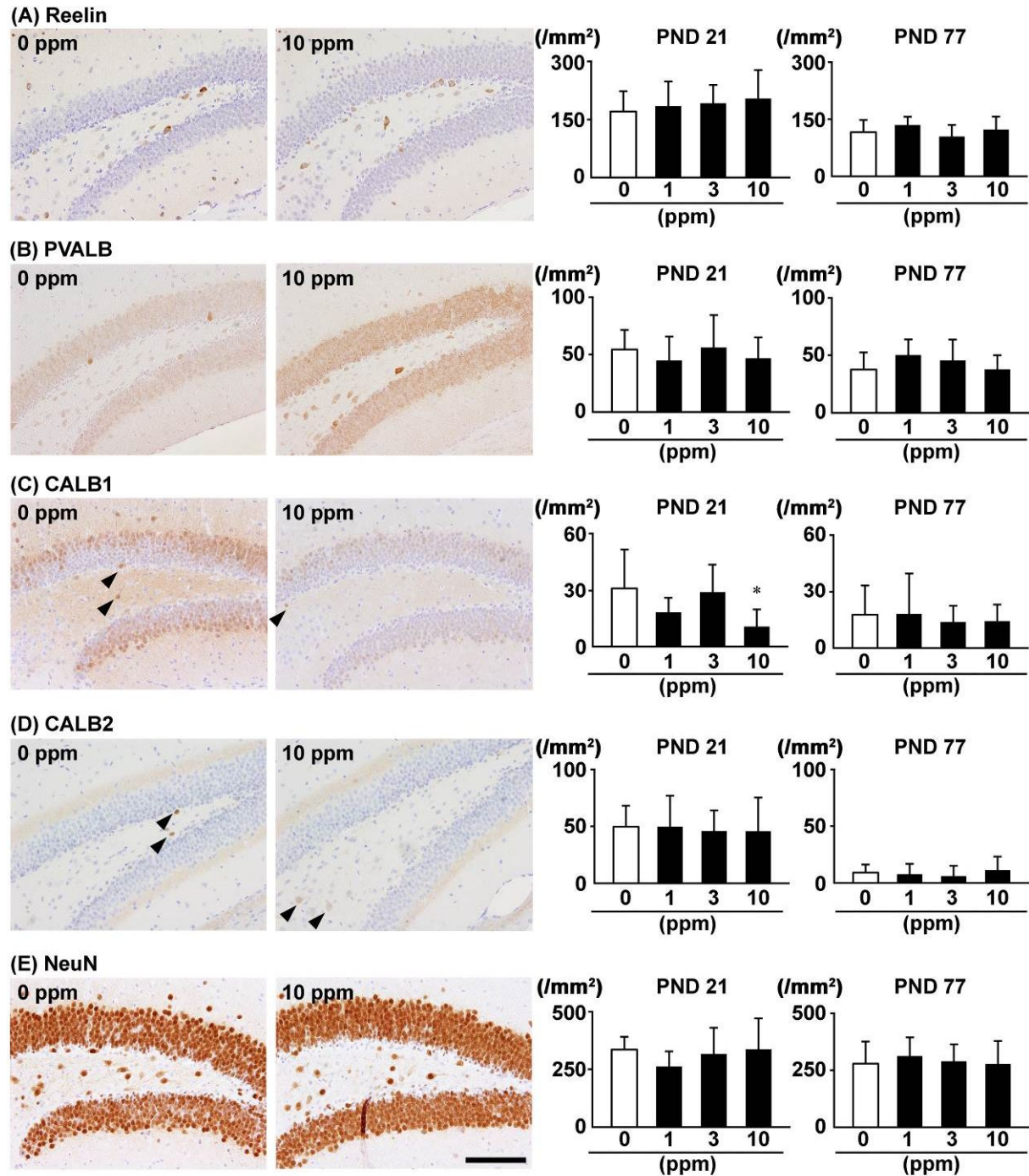


Figure 4. Distribution and number of immunoreactive cells for interneuronal markers and a mature neuronal marker in the hilus of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to citreoviridin. (A) Reelin. (B) Parvalbumin (PVALB). (C) Calbindin (CALB1), arrowheads indicate immunoreactive cells. (D) Calretinin (CALB2), arrowheads indicate immunoreactive cells. (E) NeuN. Representative images from 0 ppm controls and the 10 ppm group at PND 21 are shown. Magnification: 200 \times ; 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 = 8-10/group (0 ppm controls and 10 ppm citreoviridin 9; 1 ppm citreoviridin, 10; 3 ppm citreoviridin, 8). * $P < 0.05$, significantly different from 0-ppm controls by the Dunnett's test or Steel's test.

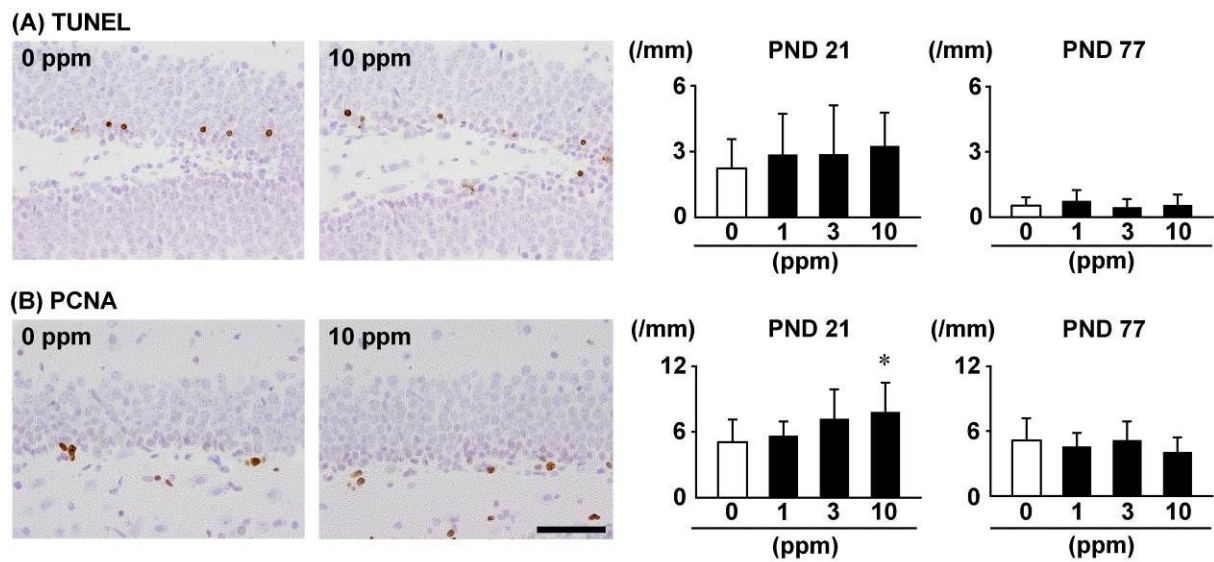


Figure 5. Distribution and number of apoptotic and proliferating cells in the SGZ of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to citreoviridin. (A) Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL). (B) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Representative images from 0 ppm controls and the 10 ppm group at PND 21 are shown. Magnification: 400 \times ; bar = 50 μ 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 = 8-10/group (0 ppm controls and 10 ppm citreoviridin 9; 1 ppm citreoviridin, 10; 3 ppm citreoviridin, 8). * $P < 0.05$, significantly different from 0-ppm controls by the Dunnett's test or Steel's test.

Table 5. Transcript levels in the hippocampal dentate gyrus of PND 21 offspring exposed to citreoviridin

| | Citreoviridin in diet (ppm) | | | |
|--|---|-------------|---|--------------|
| | 0 (Control) | | 10 | |
| | 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>Sox2</i> | 1.03±0.23 ^a | 1.01±0.18 | 1.12±0.20 | 1.38±0.19 ** |
| <i>Eomes</i> | 1.08±0.43 | 1.13±0.51 | 3.70±1.24 ** | 4.51±1.39 ** |
| <i>Dcx</i> | 1.02±0.19 | 1.02±0.18 | 1.59±0.30 ** | 1.99±0.51 ** |
| Interneuron subpopulations | | | | |
| <i>Pvalb</i> | 1.06±0.35 | 1.02±0.23 | 0.61±0.28 * | 0.73±0.28 |
| <i>Reln</i> | 1.02±0.22 | 1.02±0.19 | 0.97±0.21 | 1.22±0.38 |
| Stem cell regulators | | | | |
| <i>Bdnf</i> | 1.04±0.31 | 1.02±0.23 | 1.34±0.37 | 1.68±0.52 ** |
| Glutamate transporters and receptors | | | | |
| <i>Slc17a6</i> | 1.05±0.34 | 1.01±0.14 | 0.48±0.32 * | 0.59±0.33 * |
| <i>Slc17a7</i> | 1.06±0.33 | 1.12±0.49 | 1.53±0.31 * | 1.89±0.42 * |
| <i>Gria1</i> | 1.03±0.29 | 1.05±0.33 | 1.21±0.29 | 1.52±0.46 |
| <i>Gria2</i> | 1.03±0.26 | 1.03±0.25 | 1.21±0.34 | 1.51±0.46 * |
| <i>Gria3</i> | 1.01±0.15 | 1.02±0.20 | 1.16±0.29 | 1.45±0.42 * |
| <i>Grin2a</i> | 1.03±0.23 | 1.07±0.38 | 1.29±0.52 | 1.61±0.67 |
| <i>Grin2d</i> | 1.06±0.33 | 1.03±0.26 | 0.60±0.10 ** | 0.74±0.16 * |
| Cholinergic receptors | | | | |
| <i>Chrna4</i> | 1.04±0.27 | 1.04±0.33 | 0.62±0.27 * | 0.75±0.27 |
| <i>Chrna7</i> | 1.01±0.14 | 1.03±0.25 | 0.89±0.20 | 1.10±0.27 |
| <i>Chrb2</i> | 1.04±0.27 | 1.03±0.24 | 0.77±0.11 * | 0.96±0.15 |
| Antioxidant enzymes | | | | |
| <i>Sod1</i> | 1.04±0.29 | 1.03±0.27 | 0.87±0.18 | 1.08±0.23 |
| <i>Sod2</i> | 1.02±0.22 | 1.01±0.17 | 0.76±0.14 | 0.95±0.22 |

Abbreviations: *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Chrna4*, cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 4; *Chrna7*, cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 7; *Chrb2*, 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, *Gria3*, glutamate receptor, ionotropic, AMPA3 (alpha 3); *Grin2a*, glutamate receptor, ionotropic, NMDA2A (epsilon 1); *Grin2d*, glutamate receptor, ionotropic, NMDA2D (epsilon 4); *Hprt*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase; *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; *Sod1*, superoxide dismutase 1, soluble; *Sod2*, superoxide dismutase 2, mitochondrial;

^a Mean ± SD. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, significantly different from 0-ppm controls by the Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test.

Table 6. Transcript levels in the hippocampal dentate gyrus of PND 77 offspring exposed to citreoviridin

| | Citreoviridin in diet (ppm) | | | |
|--|---|-------------|---|--------------|
| | 0 (Control) | | 10 | |
| | 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>Sox2</i> | 1.01±0.11 ^a | 1.00±0.09 | 0.75±0.24 * | 0.88±0.19 |
| <i>Eomes</i> | 1.27±0.99 | 1.27±1.04 | 0.25±0.44 * | 0.28±0.49 |
| <i>Dcx</i> | 1.02±0.25 | 1.02±0.21 | 0.63±0.17 ** | 0.74±0.11 * |
| Interneuron subpopulations | | | | |
| <i>Pvalb</i> | 1.14±0.69 | 1.17±0.78 | 3.06±0.84 ** | 3.73±1.26 ** |
| <i>Reln</i> | 1.10±0.55 | 1.10±0.58 | 0.84±0.64 | 0.96±0.65 |
| Stem cell regulators | | | | |
| <i>Bdnf</i> | 1.05±0.35 | 1.03±0.26 | 0.35±0.15 ** | 0.41±0.13 ** |
| Glutamate transporters and receptors | | | | |
| <i>Slc17a6</i> | 1.18±0.72 | 1.21±0.80 | 1.59±0.49 | 1.95±0.72 |
| <i>Slc17a7</i> | 1.07±0.42 | 1.05±0.33 | 0.57±0.20 * | 0.67±0.21 * |
| <i>Gria1</i> | 1.02±0.20 | 1.01±0.11 | 0.44±0.13 ** | 0.50±0.09 ** |
| <i>Gria2</i> | 1.02±0.24 | 1.01±0.16 | 0.60±0.27 * | 0.69±0.23 * |
| <i>Gria3</i> | 1.01±0.16 | 1.00±0.06 | 0.97±0.14 | 1.16±0.17 |
| <i>Grin2d</i> | 1.05±0.40 | 1.02±0.26 | 0.65±0.14 * | 0.77±0.13 |
| Cholinergic receptors | | | | |
| <i>Chrna4</i> | 1.06±0.40 | 1.08±0.46 | 1.81±0.26 ** | 2.22±0.64 ** |
| <i>Chrna7</i> | 1.03±0.27 | 1.01±0.16 | 0.47±0.13 ** | 0.55±0.09 ** |
| <i>Chrb2</i> | 1.01±0.12 | 1.01±0.16 | 1.42±0.19 ** | 1.70±0.27 ** |

Abbreviations: *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Chrna4*, cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 4; *Chrna7*, cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 7; *Chrb2*, 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, *Gria3*, glutamate receptor, ionotropic, AMPA3 (alpha 3); *Grin2d*, glutamate receptor, ionotropic, NMDA2D (epsilon 4); *Hprt*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase; *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; *Sod1*, superoxide dismutase 1, soluble; *Sod2*, superoxide dismutase 2, mitochondrial; *Sox2*, sex determining region Y (SRY)-box 2; *Tbr2*, T box brain 2.

^a Mean ± SD. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, significantly different from 0-ppm controls by the Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test.