

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 29 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 29 年度はフザリウム属の真菌により産生されるかび毒であり、神経毒性を誘発することが懸念されるジアセトキシシルペノール (Diacetoxyscirpenol: DAS) 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。6.0 ppm を高用量として選択し、公比 3 で投与群 (0、0.6、2.0、6.0 ppm) を設定し、妊娠 ICR マウスを用いて発達期暴露試験 (各群 13 匹) を行った。妊娠 6 日目から分娩後 21 日目まで母動物に対して混餌投与することにより、児動物に発達期暴露し、出生後 21 日目 (離乳時) と 77 日目 (成熟時) にそれぞれ解剖を行った。母動物は 6.0 ppm で分娩後 18 日および 21 日目に摂餌量の低値が認められた。また、剖検時には 6.0 ppm で胸腺重量の低値と肝臓および腎臓の高値を認めた。一方、児動物では、6.0 ppm で雌雄ともに生後 4 日目から 77 日目までの間、断続的な体重の低値を認めた。暴露終了時の剖検時には、雄児動物で脳絶対重量および肝臓、脾臓、腎臓の絶対及び相対重量が低値を示し、雌児動物では脳絶対重量および肝臓重量が低値を示した。また、出生後 77 日には雌雄ともに脳絶対重量の低値を示し、雄では腎臓の低値を認めた。雄児動物を対象とした海馬歯状回における神経新生への影響を解析した結果、暴露終了時に 2.0 および 6.0 ppm で顆粒細胞層下帯における type-1 神経幹細胞から type-3 神経前駆細胞までの減少を認めた。また、6.0 ppm で海馬歯状回門における PVALB 陽性の GABA 性介在ニューロンの減少を認めた。成熟時には暴露終了時の顆粒細胞系譜の変化は回復したが、海馬歯状回の顆粒細胞層では 6.0 ppm で ARC 陽性細胞の減少、歯状回門では 2.0 および 6.0 ppm で RELN 陽性細胞の増加を示し、DAS による神経新生障害が不可逆的である可能性が示唆された。さらに、離乳時における 6.0 ppm での遺伝子発現解析の結果、アポトーシス関連遺伝子 (*Casp9* と *Casp12*)、AMPA 型グルタミン酸受容体をコードする *Gria3*、NMDA 型グルタミン酸受容体をコードする *Grin2a*、グルタミン酸トランスポーターをコードする *Slc17a7*、およびアセチルコリン受容体をコードする *Chrna7* の発現減少、*Slc17a6* の発現増加を認めた。児動物の神経新生障害に基づいた無毒性量は 0.6 ppm (0.09–0.29 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、基準値設定によるかび毒に高濃度に汚染された食品の排除が効果的であり、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 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暴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その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。神経新生部位は、神経幹細胞の自己複製、神経前駆細胞の増殖および分化(神経突起伸展や髄鞘形成)、神経細胞移動などの神経成熟の全ての過程を含み、発達神経毒性を検出できる可能性を示している。

平成 29 年度は、穀物汚染が危惧されているフザリウム属の真菌によって産生され、神経毒性が懸念されているジアセトキシシルペノール (Diacetoxyscirpenol: DAS) を評価対象とした。DAS 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 DAS 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 日目から分娩後 21 日目まで経胎盤、経乳的に児動物に対して暴露させ、暴露終了時(離乳時)ならびに出生後 77 日目(成熟時)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、一群あたり 13 匹ずつとして計 4 群に分け、DAS を 0、0.6、2.0、6.0 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。最高用量は予備的に 0、8、16 ppm を設定して母動物に対して混餌投与した際に、16 ppm で全例が死産、8 ppm で児動物の体重減少と脳、肝臓、腎臓重量の減少、少数個体に吻端の矮小化が認められたため、母動物への軽度な毒性とともに妊娠の維持と児動物への重篤な毒性が出ない事が期待される 6.0 ppm に設定した。DAS の乳汁移行に関して、生後 14 日目に予備試験の 8 ppm 投与群の児動物の胃から乳汁を採取し、DAS 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(1 群: n=10; 2、3 群: n=13; 4 群: n=11)に雄 6 例、雌 4 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 10~13 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、脾臓、胸腺重量を測定後、脳はメタカーンもしくは 10% 中性緩衝ホルマリン液、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 カ所で冠状断面を製作して、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 厚の連続切片を製作した。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 (RELN)、parvalbumin (PVALB)、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である TUNEL、シナプス可塑性の指標として activity-regulated cytoskeleton-associated protein (ARC) および cyclooxygenase 2 (COX2) の各免疫染色を行った。GFAP、SOX2、TBR2、DCX、PCNA および TUNEL 陽性細胞数については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、RELN および PVALB 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を算出した。なお、NeuN 陽性細胞数については、海馬歯状回顆粒細胞層下帯における単位長さ当たりの陽性細胞数と、海馬歯状回門における単位面積当たりの陽性細胞数の両方について検討した。また、ARC および COX2 陽性細胞数については、顆粒細胞層 (GCL) における計測を行い、SGZ の単位長さ当たりの陽性細胞数を算出した。

母動物は分娩後 22 日に CO₂/O₂ 麻酔下で放血し、脳、肝臓、腎臓、脾臓、胸腺重量を測定後、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 DAS 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 ~ 13 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 ~ 13 例の児動物は CO₂/O₂ 麻酔下で放血し、脳、肝臓、腎臓、脾臓、胸腺重量を測定後、脳はメタカーンもしくは 10% 中性緩衝ホルマリン液、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 6.0 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 -2.2 mm の 2 mm 厚切片より海馬歯状回部分を採取し、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。

(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腹大動脈および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 6.0 ppm 群で分娩後 18 日および 21 日目に認められた。摂水量の高値が 0.6 ppm 群と 2.0 ppm 群で分娩後 1 日および 15 日目に認められた。体重には DAS の影響と思われる変化は認められなかった (Fig. 1)。

児動物は、6.0 ppm 群の雌雄児動物において、出生後 4 日目から 15 日目までは断続的に、18 日目から 77 日目までは連続して体重の低値が認められた (Fig. 2)。

着床数、産仔数：

着床数、産仔数に DAS による影響は認められなかった (Table 1)。

臓器重量：

母動物は、6.0 ppm で胸腺重量の低値と肝臓および腎臓の高値を示した。児動物は、暴露終了時の剖検で、雄児動物において脳絶対重量および肝臓、脾臓、腎臓の重量が低値を示し、雌児動物では脳絶対重量および肝臓重量が低値を示した。また、成熟時には雌雄ともに脳絶対重量の低値および雄では腎臓の低値を認めた。脳重量の低値は出生後 77 日目にも持続して認められた。(Table 3)。

免疫組織学的変化：

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 (type-1 神経幹細胞)、SOX2 (type-1 神経幹細胞 ~ type-2b 神経前駆細胞)、TBR2 (type-2b ~ type-3 神経前駆細胞)、DCX (type-3 神経前駆細胞 ~ 未熟顆粒細胞) の陽性細胞数が 2.0 および 6.0 ppm 群で有意に減少し (Fig. 3)、TUNEL (アポトーシス) の陽性細胞が 6.0 ppm 群で有意に増加した (Fig. 5)。また、歯状回門では、GABA 性介在ニューロンである PVALB 陽性細胞が 6.0 ppm 群で有意に減少した (Fig. 4)。一方、成熟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、離乳時の顆粒細胞系譜の変化は全て回復したが (Fig. 3)、海馬歯状回では ARC 陽性細胞が 6.0 ppm で有意に減少し (Fig. 6)、歯状回門では RELN 陽性細胞数が 2.0 および 6.0 ppm 群で有意に増加した (Fig. 4)。

遺伝子発現解析：

離乳時の雄児動物の脳における 6.0 ppm での遺伝子発現解析の結果、アポトーシス関連遺伝子である *Casp9* と *Casp12*、AMPA 型グルタミン酸

受容体をコードする *Gria3*、NMDA 型グルタミン酸受容体をコードする *Grin2a*、グルタミン酸トランスポートをコードする *Slc17a7*、およびアセチルコリン受容体をコードする *Chrna7* の発現減少を認めた (Table 4)。一方、グルタミン酸トランスポートをコードする *Slc17a6* の発現増加を認めた (Table 4)。神経成長因子および抗酸化関連遺伝子群には発現変動は認められなかった。

D. 考察

DAS のマウスに対する発達期暴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、2.0 と 6.0 ppm において脳の SGZ における type-1 神経幹細胞から type-3 神経前駆細胞までの減少と海馬歯状回門における神経新生制御系の発現減少を特徴とする神経新生障害が認められた。一方、歯状回での遺伝子発現解析において、0 ppm 対照群と 6.0 ppm 群の比較において、6.0 ppm 群でグルタミン酸作動性入力の種類受容体とアセチルコリン作動性入力の一部の受容体で発現低下が認められたことから、DAS による神経新生障害は 2.0 ppm 以上で type-1 神経幹細胞から type-3 神経前駆細胞までの広い細胞標的性と、6.0 ppm ではさらに介在ニューロンの標的性が示唆された。SGZ では TUNEL 陽性細胞数が 6.0 ppm で増加しており、DAS によりアポトーシスが誘導されたと考えられたが、遺伝子解析ではアポトーシス関連遺伝子に変化は見られず、誘導されたアポトーシスの経路について、さらなる検索が必要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、PVALB 陽性細胞数が 6.0 ppm 群で減少を示した。PVALB 陽性介在ニューロンは神経前駆細胞、特に type-2 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り、type-3 神経前駆細胞における前駆細胞指標の発現低下を示した可能性が示唆された。また、出生後の神経新生

の促進に関わるとされるグルタミン酸受容体¹⁾ およびトランスポーターをコードする *Gria3*、*Grin2a*、*Slc17a7* や、神経新生と神経細胞の分化に関わるとされるアセチルコリン受容体²⁾をコードする *Chrna7* の発現量低下も顆粒細胞系譜の減少に寄与しているものと考えられた。

出生後 77 日目では、離乳時に認められた顆粒細胞系譜の変化は消失したが、海馬歯状回において 6 ppm でシナプス可塑性に関わる ARC³⁾陽性細胞の減少を認め、歯状回門においては神経細胞の移動や神経突起伸長などに関わる RELN⁴⁾陽性細胞の増加を認めたことから、DAS の発達期暴露により成熟後の神経突起伸長の異常が示唆され、その修復応答として RELN の発現が増加したものと考えられた。これらの結果より、神経新生障害は不可逆的であることが示唆された。現在、DAS による神経新生障害に関するメカニズムについて検索中である。

E. 結論

乳児が暴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 DAS の発達期暴露実験を行った。母動物は、6.0 ppm で胸腺重量の低値と肝臓および腎臓重量の高値を認めた。児動物は、暴露終了時において 2.0 ppm と 6.0 ppm で海馬顆粒細胞層下帯における type-1 神経幹細胞から type-3 神経前駆細胞までの減少と、6.0 ppm で海馬歯状回門における神経新生制御系である PVALB 陽性 GABA 性介在ニューロン数の減少を特徴とする神経新生障害が認められた。また、暴露終了時の遺伝子発現検索では、神経新生制御系の発現低下を認め、免疫染色結果の顆粒細胞系譜の減少を支持する結果となった。成熟時には暴露終了時の顆粒細胞系譜の変化は回復したが、海馬歯状回では 6.0 ppm で ARC 陽性細胞の減少、歯状回門では 2.0 および 6.0 ppm で RELN 陽性細胞の増加を示し、DAS による神経新生障害が不可逆的である可能

性が示唆された。DAS の発達期暴露の影響は不可逆的であり、成熟後の神経突起伸長に影響を及ぼす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 0.6 ppm (0.09–0.29 mg/kg 体重/日) と判断された。

F. 参考文献

- 1) Jansson LC, Åkerman KE. The role of glutamate and its receptors in the proliferation, migration, differentiation and survival of neural progenitor cells. *J Neural Transm (Vienna)*. 2014 Aug;121(8):819-36.
- 2) Yadav R, Deepshikha D, Srivastava P. Homology Modeling and Protein Interaction Map of CHRNA7 Neurogenesis Protein. *Ann Neurosci*. 2017 Jul;24(3):173-179.
- 3) Guzowski JF. Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. *Hippocampus*. 2002;12(1):86-104.
- 4) Niu S, Yabut O, D'Arcangelo G. The Reelin signaling pathway promotes dendritic spine development in hippocampal neurons. *J Neurosci*. 2008 Oct 8;28(41):10339-48.

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

中島 康太、渡邊 洋佑、水上 さやか、猪鼻 真理、吉田 敏則、小西 良子、渋谷 淳：シトロピロジンのマウス発達期曝露による海馬歯状回における神経新生障害の可逆性と制御系シグナルの発現変動、第44回日本毒性学会学術年会、横浜、第44回日本毒性学会学術年会要旨集：P-42、S 229、7月10-12日、2017

中島 康太、伊藤 優子、増淵 康哲、吉田 敏則、
渋谷 淳：T-2 toxinのマウス発達期曝露による海
馬歯状回及び小脳におけるmetallothionein発現増
加と発現細胞の同定、第34回日本毒性病理学会総
会及び学術集会、沖縄、第34回日本毒性病理学会
学術集会講演要旨集：P-56、p.93、1月25-26日、
2018

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

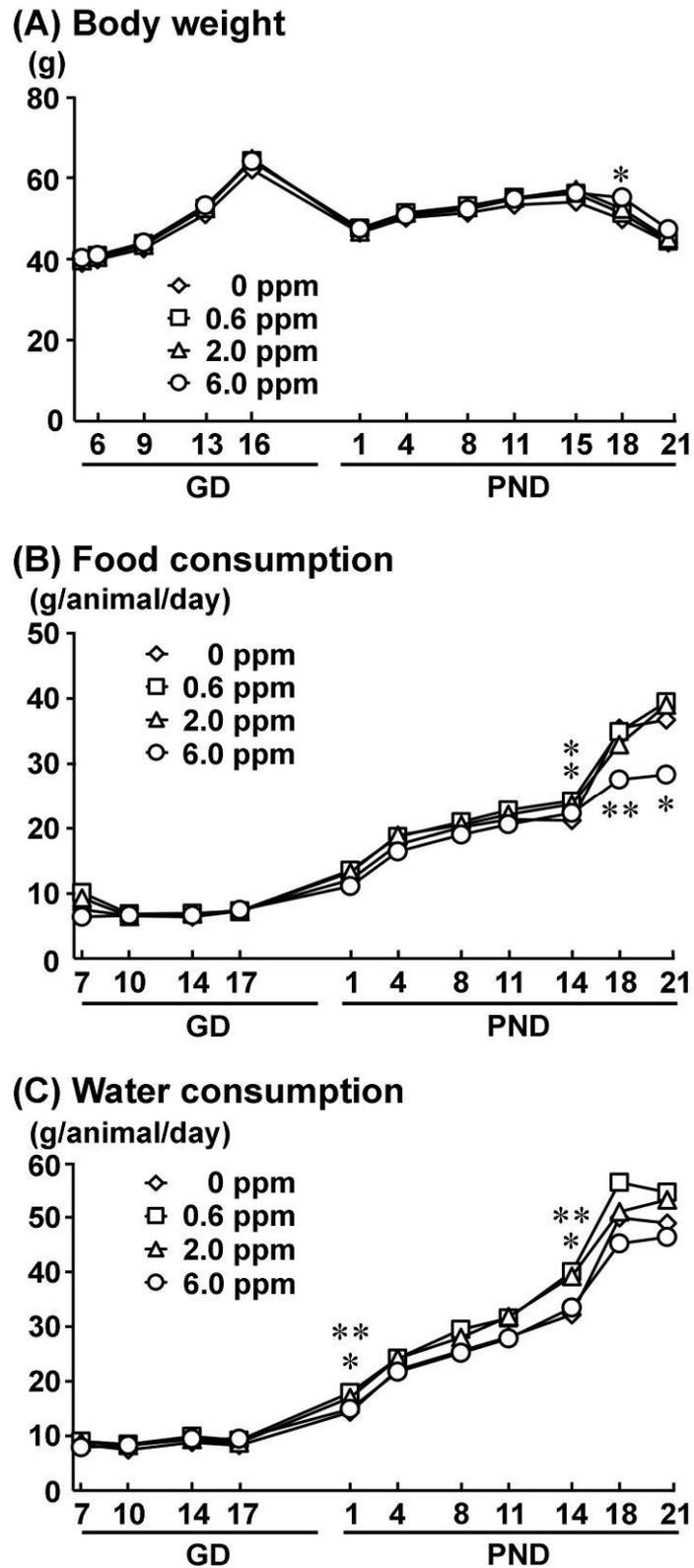


Figure 1. Body weight, food consumption and water consumption of dams given diacetoxyscirpenol from GD 6 to PND 21 in the diet.

(A) Body weight. (B) Food consumption. (C) Water consumption.

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

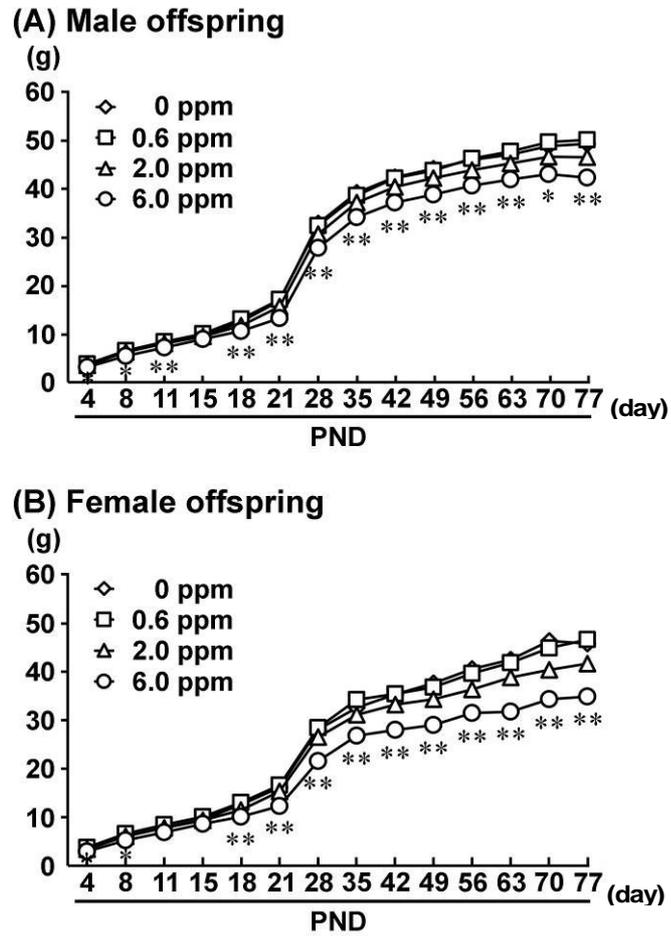


Figure 2. Body weight of male and female offspring exposed to diacetoxyscirpenol at postnatal day.

(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 diacetoxyscirpenol from GD 6 to PND 21

	Diacetoxyscirpenol (ppm)				
	0 (Control)	0.6	2.0	6.0	
No. of dams examined	10	13	13	12	
Reproductive parameters					
No. of implantation sites	13.20±2.44	13.92±2.66	14.92±1.93	15.33±2.87	
No. of live offspring	11.70±2.45	12.85±2.48	14.08±2.22	13.00±2.09	
General parameters on GD					
Mean body weight (g)	46.86±4.39	48.16±3.18	48.12±3.29	48.48±5.18	
Food intake (g/animal/day) ^a	6.98±0.61	7.00±0.73	7.16±1.19	6.77±1.12	
Water consumption (g/animal/day) ^a	8.23±1.04	9.10±1.81	8.80±0.99	8.74±1.82	
General parameters on PND					
Mean body weight (g)	49.87±3.32	51.27±2.89	51.45±2.90	51.99±4.57	
Food intake (g/animal/day) ^a	23.47±1.84	24.92±1.48	23.84±2.09	20.76±2.30	
Water consumption (g/animal/day) ^a	31.57±1.87	36.31±4.82	34.91±4.53	30.64±4.90	
Body and organ weights at PND 22					
Body weight (g)	43.97±3.89	44.43±3.25	44.98±3.10	47.34±5.57	
Brain weight	Absolute (g)	0.48±0.02	0.50±0.01	0.50±0.03	0.50±0.02
	Relative (g/100g BW)	1.11±0.07	1.12±0.09	1.11±0.10	1.06±0.11
Thymus weight	Absolute (g)	0.07±0.02	0.06±0.02	0.07±0.02	0.04±0.01**
	Relative (g/100g BW)	0.15±0.03	0.14±0.04	0.15±0.04	0.09±0.02**
Liver weight	Absolute (g)	2.90±0.29	3.09±0.39	2.99±0.36	3.57±0.82*
	Relative (g/100g BW)	6.59±0.53	6.96±0.75	6.64±0.47	7.48±0.98*
Spleen weight	Absolute (g)	0.15±0.05	0.13±0.02	0.15±0.02	0.16±0.04
	Relative (g/100g BW)	0.34±0.09	0.30±0.06	0.32±0.04	0.33±0.08
Kidney weight	Absolute (g)	0.57±0.03	0.57±0.05	0.61±0.06	0.69±0.08**
	Relative (g/100g BW)	1.31±0.11	1.28±0.11	1.35±0.11	1.47±0.15**
Diacetoxyscirpenol intake (mg/kg BW/day)					
GD, mg/kg body weight/day ^a	0	0.09±0.01	0.30±0.04	0.84±0.15	
PND, mg/kg body weight/day ^a	0	0.29±0.02	0.93±0.10	2.40±0.26	

Mean±SD.

^a Mean value of each week.

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

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

Table 2. Primary antibodies and experimental conditions used in immunohistochemistry

Antigen	Abbreviated name	Host species	Clonality	Clone number	Dilution	Antigen retrieval condition	Manufacturer
Activity-regulated cytoskeleton-associated protein	ARC	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:1000	Microwaving, pH 6.0 ^{a)}	Synaptic Systems (Goettingen, Germany)
Cyclooxygenase 2	COX2	Mouse	Monoclonal IgG ₁	33	1:200	Autoclaving, pH 6.0 ^{b)}	BD Transduction Laboratories
Doublecortin	DCX	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:1000	None	Abcam Inc. (Cambridge, UK)
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	RELN	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.

^{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

		Diacetoxyscirpenol in diet (ppm)			
		0 (Control)	0.6	2.0	6.0
Male offspring on PND 21					
No. of animals examined		30	39	40	32
Body weight (g)		16.85±1.37 ^a	17.13±1.67	15.59±2.12	13.26±1.28 **
Organ weight					
Brain	Absolute (g)	0.44±0.04	0.45±0.02	0.43±0.02	0.39±0.02 **
	Relative (g/100g BW)	2.69±0.29	2.67±0.23	2.94±0.48 *	3.13±0.36 **
Thymus	Absolute (g)	0.09±0.02	0.09±0.02	0.08±0.03	0.07±0.02 **
	Relative (g/100g BW)	0.56±0.14	0.55±0.12	0.54±0.12	0.54±0.11
Liver	Absolute (g)	0.87±0.13	0.86±0.14	0.75± ^{0.12} _{**}	0.56±0.11 **
	Relative (g/100g BW)	5.28±0.43	5.09±0.49	5.02±0.37	4.33±0.33 **
Spleen	Absolute (g)	0.14±0.04	0.13±0.03	0.12±0.04	0.09±0.02 **
	Relative (g/100g BW)	0.83±0.18	0.79±0.15	0.80±0.20	0.67±0.13 **
Kidneys	Absolute (g)	0.26±0.04	0.26±0.04	0.23± ^{0.03} _{**}	0.18±0.04 **
	Relative (g/100g BW)	1.57±0.17	1.54±0.15	1.54±0.14	1.39±0.17 **
Female offspring on PND 21					
No. of animals examined		18	15	12	11
Body weight (g)		16.19±1.14	16.66±1.44	15.34±2.09	12.37±1.68 **
Organ weight					
Brain	Absolute (g)	0.43±0.03	0.44±0.02	0.42±0.02	0.38±0.02 **
	Relative (g/100g BW)	2.88±0.27	2.71±0.19	3.09±0.48	3.20±0.33 *
Thymus	Absolute (g)	0.09±0.02	0.10±0.01	0.08±0.02	0.07±0.02 *
	Relative (g/100g BW)	0.59±0.08	0.58±0.07	0.54±0.10	0.60±0.13
Liver	Absolute (g)	0.72±0.09	0.76±0.09	0.65±0.10	0.52±0.07 **
	Relative (g/100g BW)	4.72±0.27	4.64±0.29	4.64±0.25	4.31±0.16 **
Spleen	Absolute (g)	0.13±0.02	0.14±0.02	0.12±0.04	0.09±0.02 **
	Relative (g/100g BW)	0.86±0.14	0.83±0.11	0.85±0.22	0.73±0.15
Kidneys	Absolute (g)	0.23±0.03	0.25±0.02	0.21±0.03	0.16±0.02 **
	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		10	13	13	11
Body weight (g)		49.26±4.46	50.15±3.55	46.48±4.49	42.32± ^{3.18} _{**}
Organ weight					
Brain	Absolute (g)	0.49±0.02	0.49±0.02	0.48±0.02	0.45±0.01

					**
	Relative (g/100g BW)	1.02±0.11	0.99±0.07	1.06±0.11	1.06±0.11
Thymus	Absolute (g)	0.05±0.02	0.07±0.04	0.06±0.03	0.05±0.04
	Relative (g/100g BW)	0.10±0.04	0.15±0.07	0.13±0.06	0.13±0.09
Liver	Absolute (g)	2.56±0.23	2.38±0.26	2.29±0.31	2.15±0.31 *
	Relative (g/100g BW)	5.23±0.33	4.77±0.34	4.95±0.42	5.10±0.91
Spleen	Absolute (g)	0.14±0.03	0.13±0.02	0.12±0.02	0.13±0.04
	Relative (g/100g BW)	0.29±0.06	0.26±0.04	0.27±0.05	0.30±0.09
Kidneys	Absolute (g)	0.82±0.10	0.74±0.13	0.76±0.09	0.63± ^{0.06} _{**}
	Relative (g/100g BW)	1.53±0.09	1.51±0.07	1.55±0.16	1.33± ^{0.09} _{**}
Female offspring on PND 77					
	No. of animals examined	10	13	12	12
Body weight (g)		45.86±5.82	46.69±6.18	41.75±7.51	34.90±5.36 **
Organ weight					
Brain	Absolute (g)	0.50±0.01	0.50±0.03	0.49±0.03	0.43±0.02 **
	Relative (g/100g BW)	1.11±0.13	1.09±0.13	1.20±0.20	1.26±0.19
Thymus	Absolute (g)	0.09±0.03	0.07±0.03	0.09±0.03	0.06±0.03
	Relative (g/100g BW)	0.19±0.06	0.16±0.05	0.21±0.06	0.17±0.06
Liver	Absolute (g)	1.96±0.25	2.05±0.32	1.86±0.32	1.59±0.27 *
	Relative (g/100g BW)	4.31±0.60	4.39±0.33	4.48±0.48	4.57±0.29
Spleen	Absolute (g)	0.16±0.05	0.16±0.03	0.17±0.04	0.13±0.02
	Relative (g/100g BW)	0.35±0.14	0.33±0.06	0.40±0.09	0.38±0.10
Kidneys	Absolute (g)	0.48±0.04	0.53±0.05	0.47±0.05	0.39±0.06 **
	Relative (g/100g BW)	1.07±0.17	1.14±0.12	1.16±0.19	1.13±0.14

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

^a Mean ± SD.

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

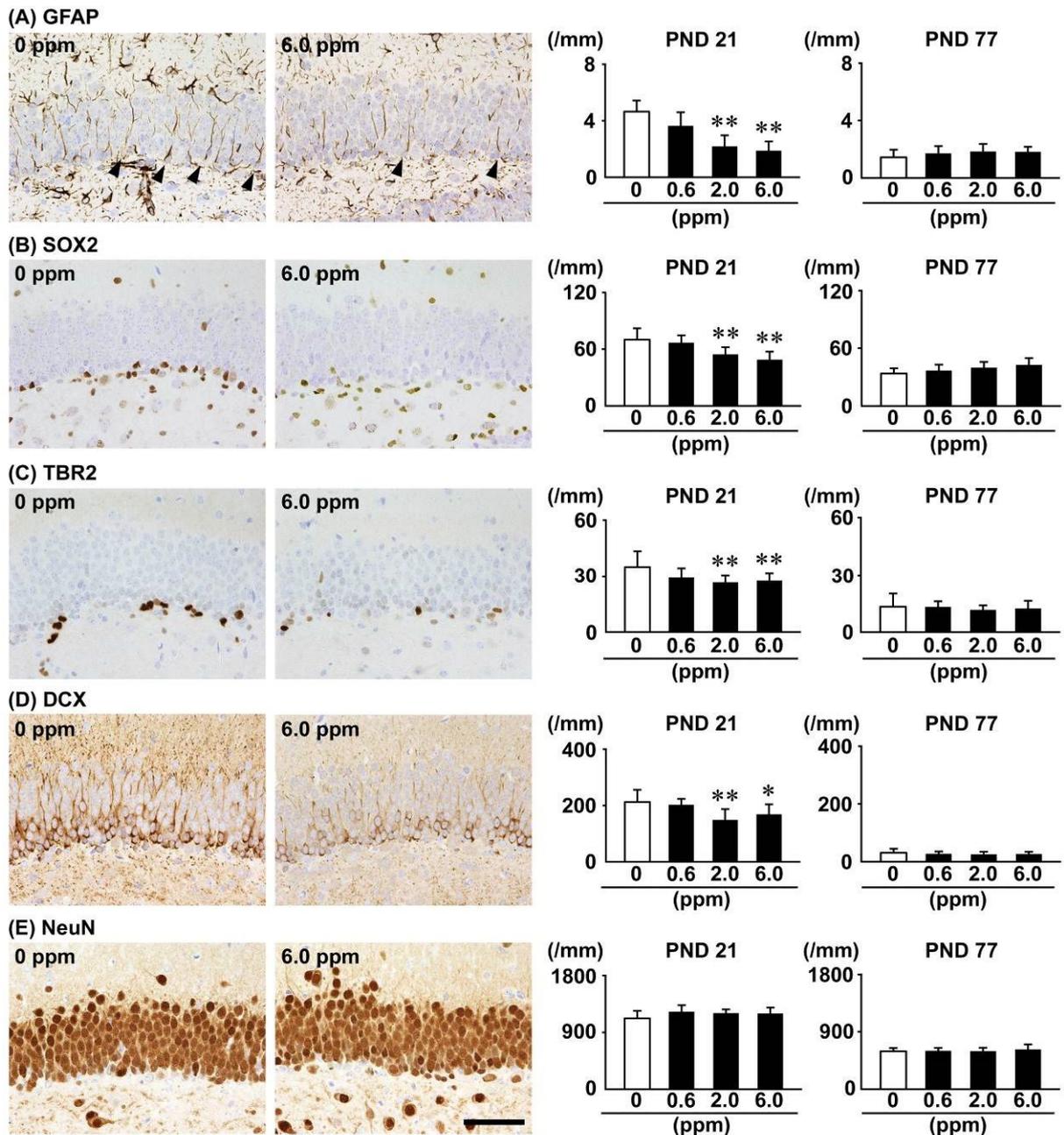


Figure 3. Distribution and number of immunoreactive cells for neuronal stage-defining markers of granule cell lineages in the subgranular zone (SGZ), and a mature neuronal marker in the granule cell layer (GCL) of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to diacetoxyscirpenol. (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) Neuron-specific nuclear protein (NeuN) in the GCL. Representative images from 0 ppm control and the 6.0 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 = 9-10/group (0 ppm control in PND 21, N=9; the other groups are N=10).

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

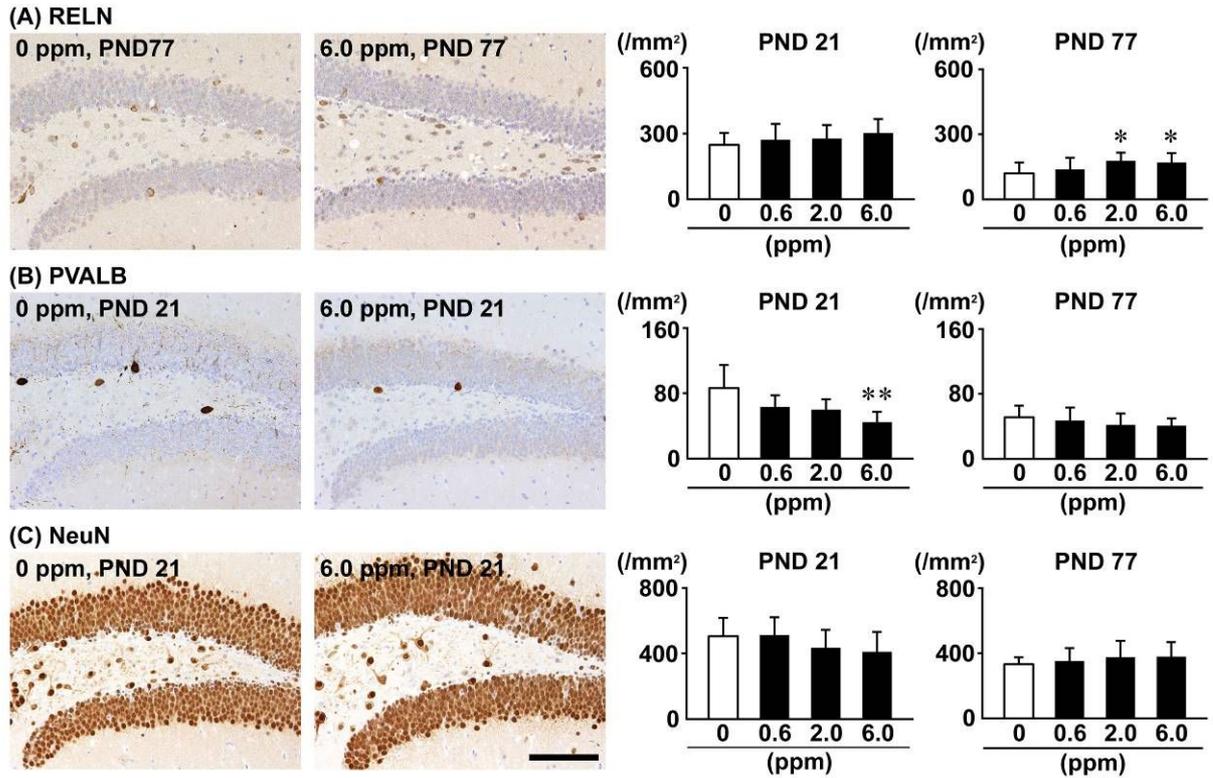


Figure 4. Distribution and number of immunoreactive cells for interneuronal markers and a mature neuronal marker in the hilus of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to diacetoxyscirpenol. (A) Reelin (RELN). (B) Parvalbumin (PVALB). (C) NeuN. Representative images from 0 ppm control and the 6.0 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 = 9-10/group (0 ppm control in PND 21, N=9; the other groups are N=10).

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

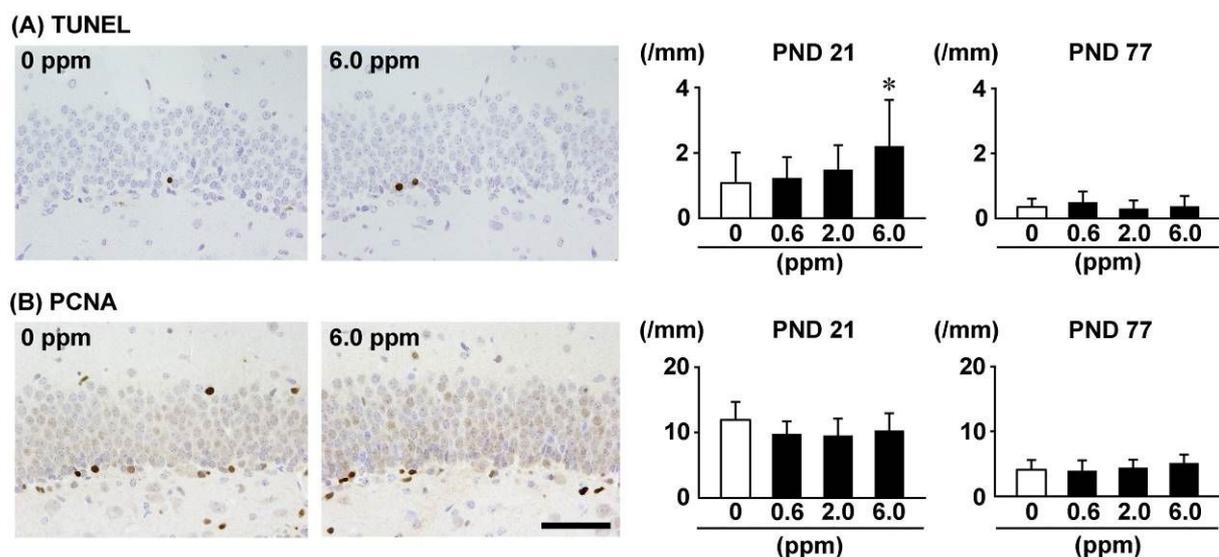


Figure 5. Distribution and number of apoptotic and proliferating cells in the SGZ of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to diacetoxyscirpenol.

(A) Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL). (B) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Representative images from 0 ppm control and the 6.0 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 = 9-10/group (0 ppm control in PND 21, N=9; the other groups are N=10).

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

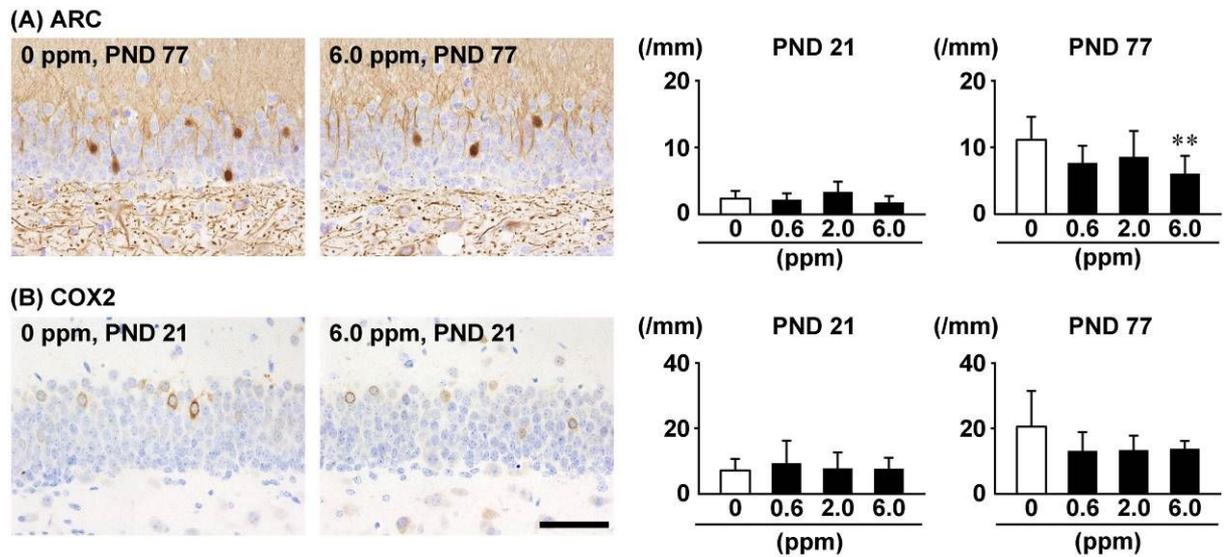


Figure 6. Distribution and number of immunoreactive cells for marker of synaptic plasticity in the SGZ and GCL of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to diacetoxyscirpenol. (A) Activity-regulated cytoskeleton-associated protein (ARC). (B) Cyclooxygenase 2 (COX2). Representative images from 0 ppm control and the 6.0 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 = 9-10/group (0 ppm control in PND 21, N=9; the other groups are N=10).

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

Table 4. Transcript levels in the hippocampal dentate gyrus of PND 21 offspring exposed to diacetoxyscirpenol

	Diacetoxyscirpenol in diet (ppm)			
	0 (Control)		6.0	
	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
Neurotrophin-related genes				
<i>Bdnf</i>	1.06±0.37 ^a	1.08±0.44	0.83±0.54	0.90±0.55
<i>Ntrk2 (Trkb)</i>	1.03±0.27	1.03±0.25	0.83±0.13	0.90±0.18
Intrinsic pathway of apoptosis				
<i>Bax</i>	1.03±0.30	1.04±0.35	1.17±0.39	1.25±0.38
<i>Bcl2</i>	1.04±0.31	1.02±0.21	1.18±0.27	1.30±0.41
<i>Bak1</i>	1.02±0.20	1.01±0.15	0.94±0.16	1.02±0.19
<i>Casp3</i>	1.04±0.33	1.03±0.27	1.02±0.21	1.11±0.21
<i>Casp9</i>	1.01±0.15	1.02±0.21	0.77±0.16 [*]	0.84±0.18
<i>Casp12</i>	1.06±0.41	1.04±0.35	0.61±0.16 [*]	0.67±0.21 [*]
Glutamate transporters and receptors				
<i>Slc17a6</i>	1.03±0.27	1.02±0.22	3.07±1.86 [*]	3.44±2.34 [*]
<i>Slc17a7</i>	1.02±0.24	1.04±0.34	0.50±0.29 ^{**}	0.54±0.29 [*]
<i>Gria1</i>	1.04±0.28	1.06±0.36	0.80±0.24	0.87±0.26
<i>Gria2</i>	1.05±0.38	1.07±0.44	1.02±0.33	1.09±0.31
<i>Gria3</i>	1.01±0.15	1.02±0.25	0.79±0.18 [*]	0.85±0.12
<i>Grin2a</i>	1.03±0.29	1.06±0.38	0.56±0.13 ^{**}	0.61±0.16 [*]
<i>Grin2b</i>	1.00±0.10	1.01±0.13	1.39±0.88	1.55±1.09
<i>Grin2d</i>	1.01±0.14	1.01±0.16	0.92±0.46	1.01±0.57
Cholinergic receptors				
<i>Chrna4</i>	1.03±0.26	1.03±0.26	1.06±0.35	1.16±0.42
<i>Chrna7</i>	1.01±0.18	1.03±0.25	0.67±0.24 [*]	0.72±0.25
<i>Chrn2</i>	1.01±0.12	1.00±0.09	0.77±0.23	0.83±0.19
Antioxidant related genes				
<i>Sod1</i>	1.02±0.23	1.02±0.24	1.33±0.53	1.41±0.47
<i>Sod2</i>	1.01±0.16	1.01±0.17	0.90±0.25	0.99±0.36
<i>Cat</i>	1.03±0.27	1.03±0.24	0.75±0.18	0.82±0.22
<i>Prdx1</i>	1.03±0.24	1.02±0.20	0.99±0.18	1.07±0.20
<i>Prdx2</i>	1.02±0.19	1.01±0.13	1.14±0.29	1.23±0.24
<i>Prdx3</i>	1.01±0.14	1.00±0.07	1.06±0.18	1.14±0.14
<i>Prdx4</i>	1.02±0.22	1.02±0.21	1.20±0.47	1.29±0.45
<i>Prdx5</i>	1.01±0.16	1.02±0.22	1.18±0.27	1.28±0.31
<i>Mt1</i>	1.06±0.34	1.06±0.36	1.29±0.35	1.39±0.36
<i>Mt2</i>	1.02±0.22	1.02±0.21	1.32±0.50	1.42±0.55
<i>Mt3</i>	1.18±0.59	1.18±0.63	0.94±0.58	1.04±0.70
<i>Keap1</i>	1.01±0.18	1.02±0.22	0.96±0.17	1.05±0.22
<i>Nfe2l2 (Nrf2)</i>	1.02±0.20	1.02±0.19	0.80±0.16	0.87±0.21

Abbreviations: *Bak*, BCL2-antagonist/killer 1; *Bax*, BCL2-associated X protein; *Bcl2*, B cell leukemia/lymphoma 2;

Bdnf, brain-derived neurotrophic factor; *Casp3*, caspase 3; *Casp9*, caspase 9; *Casp12*, caspase 12; *Cat*, catalase;

Chrna4, cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 4; *Chrna7*, cholinergic receptor, nicotinic, alpha

polypeptide 7; *Chrn2*, cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 2 (neuronal); *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); *Grin2b*, glutamate receptor, ionotropic, NMDA2B (epsilon 2); *Grin2d*, glutamate receptor,

ionotropic, NMDA2D (epsilon 4); *Hprt*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase; *Keap1*, kelch-like ECH-associated protein 1; *Mt1*, metallothionein 1; *Mt2*, metallothionein 2; *Mt3*, metallothionein 3; *Nfe2l2*, nuclear factor, erythroid derived 2, like 2; *Ntrk2*, neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2; *Prdx1*, peroxiredoxin 1; *Prdx2*, peroxiredoxin 2; *Prdx3*, peroxiredoxin 3; *Prdx4*, peroxiredoxin 4; *Prdx5*, peroxiredoxin 5; *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 \pm SD. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from 0 ppm control by the Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test.