

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 30 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 30 年度はステリグマトシスチン (Sterigmatocystin: STC) について検討した。各群 12 匹の妊娠 SD ラットを用いて、妊娠 6 日目から分娩後 21 日目まで母動物に対して 0、1.7、5.0、15.0 ppm の用量で混餌投与し、児動物について出生後 21 日目 (離乳時) と 77 日目 (成熟時) に解剖を行った。母動物では試験期間を通じて体重、摂餌量および摂水量に変化は認められなかったが、剖検時には 15.0 ppm で肝臓の絶対重量の低値を認めた。一方、児動物では、雌雄ともに対照群と STC 曝露群の間で体重と臓器重量に差は認められなかった。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、曝露終了時に 15.0 ppm で顆粒細胞層下帯における顆粒細胞系譜分化後期にある神経前駆細胞の増殖抑制による type-2b 前駆細胞～未熟顆粒細胞の減少を特徴とする神経新生障害と、それに対する修復性の反応として歯状回門における神経新生制御系である CALB1 陽性および PVALB 陽性 GABA 性介在ニューロン数の増加を認めた。DNA 修復関連遺伝子は発現増加を示し、神経新生部位での DNA 傷害が示唆された。一方、細胞周期関連遺伝子の発現変動結果から、G<sub>1</sub>/S ないし G<sub>2</sub>/M チェックポイント機能の低下による代償性の増殖性の反応が示唆された。コリン作動性入力に関連する受容体発現変動から、SGZ における細胞増殖抑制やそれに対する代償性の増殖性の反応が示唆された。また、*Bdnf* は発現高値を示したことから、顆粒細胞から分泌された BDNF が PVALB<sup>+</sup> 介在ニューロンの増数に機能して成熟時における神経新生障害からの回復に寄与した可能性が示唆された。成熟後では、顆粒細胞系譜の変化および GABA 性介在ニューロンの変化は消失したことから、STC の発達期曝露による神経新生障害は可逆的であることが示唆された。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 5.0 ppm (0.34-0.85 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 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。分担研究者らは、記憶や学習の中枢であり、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発生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 30 年度は、*Aspergillus* 属の真菌により産生されるアフラトキシン B<sub>1</sub> の前駆物質であり、酸化的 DNA 損傷誘発性と共に弱い発がん性が報告されているかび毒であるステリグマトシスチン (Sterigmatocystin: STC) を評価対象とした。STC 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 STC 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曝露させ、曝露終了時 (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 SD ラット (妊娠 1 日で入手、日本エスエルシー) を、一群あたり 12 匹ずつとし

て 4 群に分け、STC を 0、1.7、5.0、15.0 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、6、12 ppm を設定して母動物に対して混餌投与した際に、12 ppm の児動物で PND 5 ~ PND 12 にかけて、用量依存的な体重減少が認められたが、母動物には影響が認められなかったため、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ことが期待される 15.0 ppm に設定した。STC の乳汁移行に関して、生後 14 日目に予備試験の 12 ppm 投与群の児動物の胃から乳汁を採取し、STC 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=11; 2 群: n=12; 3、4 群: n=10) 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、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 1 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 ~ 12 例の雄児動物を CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 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 30 ~ 40 例、雌 11 ~ 18 例の児動物は CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔下で放血し、脳、肝臓、腎臓および肺重量を測定後、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 1 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)、calbindin-D-28K (CALB1)、成熟ニューロンの指標である neuronal nuclei (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 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、PVALB および CALB1 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 SGZ 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。

母動物は分娩後 21 日に CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔下で放血し、脳、肝臓、腎臓、肺重量を測定後、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 STC 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 10~12 例の雄児動物を CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔下で 4%PFA / 0.1M リン酸バッファーによる灌流固定を行った。各群雌雄各 10~12 例の児動物は CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔下で放血し、脳、肝臓、腎臓、肺重量を測定後、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 15.0 ppm 群のメタカーン固定脳を用いて、大脳の Bregma の後方約 -2.2 mm の 2 mm 厚スライス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<sup>®</sup> 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 CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 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、摂餌量、摂水量：

母動物は、体重、摂餌量および摂水量に STC の影響と思われる変化は認められなかった (Fig. 1)。

また、児動物の体重も、曝露終了時および成熟時ともに、STCの影響と思われる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STCによる影響は認められなかった (Table 2)。

#### 臓器重量：

母動物は、15.0 ppmで肝臓の絶対重量が高値を示した (Table 2)。児動物は、曝露終了時と成熟時の剖検で、雌雄いずれの臓器重量にも変化は認められなかった (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DCX (type-2b, 3神経前駆細胞～未熟顆粒細胞)の陽性細胞数が15.0 ppm群で有意に減少し (Fig. 3)、PCNA (細胞増殖指標)の陽性細胞数が15.0 ppm群で有意に減少した (Fig. 5)。また、歯状回門では、GABA性介在ニューロンであるCALB1およびPVALB陽性細胞が15.0 ppm群で有意に増加した (Fig. 4)。一方、成熟時の雄児動物を対象とした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および介在ニューロンの変化は全て回復した (Fig. 3, 4)。

#### 遺伝子発現解析：

離乳時の雄児動物の海馬歯状回における15.0 ppmでの遺伝子発現解析の結果、神経栄養因子をコードする*Bdnf*、細胞周期関連遺伝子である*Ccnd2*、DNA修復関連遺伝子である*Apex1*と*Ercc1*、およびアセチルコリン受容体をコードする*Chrna7*の発現増加を認めた (Table 4)。一方、神経栄養因子受容体をコードする*Ntrk2*、細胞周期関連分子をコ

ードする*Cdk1*、*Cdk2*、*Cdkn1a*、*Cdkn1b*、*Cdkn1c*、*Cdkn2b*、DNA修復関連遺伝子である*Brip1*、アセチルコリン受容体をコードする*Chrn2*およびドパミン受容体をコードする*Drd2*の発現減少を認めた。

#### D. 考察

STCのラット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、15.0 ppmにおいてSGZにおける顆粒細胞系譜分化後期にある神経前駆細胞の増殖抑制によるtype-2b前駆細胞～未熟顆粒細胞の減少を特徴とする神経新生障害と、それに対する修復性の反応として海馬歯状回門における神経新生制御系であるCALB1陽性およびPVALB陽性GABA性介在ニューロン数の増加を認めた。

曝露終了時において、歯状回門におけるGABA性介在ニューロンのうち、PVALB陽性細胞とCALB1陽性細胞の数が15.0 ppm群で増加を示した。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<sup>1)</sup> (Song et al., 2013)、type-3神経前駆細胞の数の回復のために増加していた可能性がある。また、PVALBおよびCALB1はcalcium-buffering proteinとも呼ばれ、カルシウムの恒常性を維持することにより、成体神経新生に対して神経保護的に働くとされている<sup>2)</sup> (Verdaguer et al., 2015)。そのため、PVALBおよびCALB1陽性細胞の増加は、STC発達期曝露による神経新生障害に対する神経保護的機構を示している事が示唆された。SGZにおける免疫組織化学的解析でPCNA陽性細胞の減少を認めているものの、遺伝子発現解析では、細胞周期関連遺伝子の多くで細胞増殖に向かう方向での発現変動

が認められたことから、STC 発達期曝露によって生じた神経新生における細胞増殖抑制に対し、発達期曝露が終了する時期で代償性の機序が作用して神経新生の回復性の変化が始まっている可能性が示唆された。

曝露終了時の歯状回での遺伝子発現解析において、0 ppm 対照群と 15.0 ppm 群の比較において、DNA 修復関連遺伝子の *Apex1* と *Ercc1* で発現の増加を認めたことから、STC の発達期曝露により神経新生部位での DNA 傷害が示唆された。SGZ では PCNA 陽性細胞数が 15.0 ppm で減少しており、STC により type-2b から type-3 の増殖活性を示す神経前駆細胞の細胞増殖が抑制されたものと考えられた。一方、15 ppm の STC により、G<sub>1</sub> 期あるいは G<sub>2</sub> 期の進行に機能するサイクリン依存性キナーゼ (cyclin-dependent kinase; CDK) や細胞周期関連分子をコードする遺伝子の発現が減少を示した。このことから、STC の曝露終了時では G<sub>1</sub>/S ないし G<sub>2</sub>/M チェックポイント機能の低下が示唆され、減少した神経前駆細胞の数を補うための増殖性の反応が生じていることが示唆された。更に、CDK に結合しこれを活性化する補助因子であるサイクリンをコードする *Ccnd2* が STC 曝露により発現増加していた。D 型サイクリンは、各種分裂促進因子 (マイトジェン) などの刺激に呼応して発現し、CDK4 または CDK6 と結合し、その cyclin D-CDK4/6 複合体は細胞周期の標的タンパク質をリン酸化し、細胞周期を G<sub>1</sub> 期から S 期へと移行させる<sup>3)</sup> (Malumbres & Barbacid, 2009) ことが知られている。よって、*Ccnd2* の発現増加も同様に細胞増殖の抑制により減少した神経細胞数を回復させるための恒常性維持機構の変化をとらえたものと考えられた。15.0 ppm 群でアセチルコリン作動性入力の一部の受容体遺伝子とドパミン作動性入力の受容

体遺伝子の発現減少を認めているが、どちらも type-3 神経前駆細胞に入力し細胞増殖と分化 (樹状突起の伸長) に関与することが知られている<sup>4)</sup> (Campbell et al., 2010) ことから、STC 発達期曝露によるアセチルコリン作動性およびドパミン作動性入力の減少が、顆粒細胞系譜の中で分化後期にあたる細胞の減少に関連した変動を示した可能性が示唆された。具体的には、CHRNA7 と CHRNB2 はコリン作動性入力の投射を受ける海馬歯状回のニューロンに発現する代表的なイオンチャンネル型ニコチン作動性アセチルコリン受容体であり<sup>5)</sup> (Kaneko et al., 2006) 其中で CHRNB2 は GABA 性介在ニューロンに発現しており、SGZ に分布する神経前駆細胞の増殖に必須の役割を果たすことが知られている<sup>6)</sup> (Harrist et al., 2004)。ラットの海馬歯状回では、外部からのコリン作動性入力が CHRNB2 を発現する GABA 性介在ニューロンを興奮させることが知られている<sup>7)</sup> (Pitler and Alger, 1992)。本研究では、15 ppm の STC 曝露により *Chrn2* の発現が低値を示したことから、*Chrn2* を発現するいずれかの GABA 性介在ニューロンの投射の抑制により、SGZ における細胞増殖抑制を生じた可能性がある。CHRNA7 は歯状回の顆粒細胞や GABA 性介在ニューロンに発現することが知られており、特に後者に強く発現して、SGZ における顆粒細胞系譜の増殖や神経保護の役割を担う<sup>8)</sup> (Liu and Wu, 2006)。本研究では、15 ppm の STC 曝露により *Chrna7* の発現が高値を示したことから、*Chrna7* を発現するいずれかの GABA 性介在ニューロンの投射の促進により、SGZ における細胞増殖抑制に対して代償性の増殖シグナルを与えた可能性がある。ドパミン作動性入力に関しては、D2 受容体の活性化による海馬の神経新生の促進に毛様体神経栄養因子 (CNTF) の関与が

知られている<sup>9)</sup> (Yang et al., 2008)。一方で、D2 様ドパミン受容体のアゴニストは SGZ の顆粒細胞系譜の増殖や分化に影響を与えないとの報告がある<sup>10)</sup> (Takamura et al., 2014)。更には、歯状回門における GABA 性介在ニューロンは ChAT を発現しており<sup>11)</sup> (Mahalik et al., 1988)、ラットに対して D2 受容体のアンタゴニストであるハロペリドールの投与により ChAT の発現を増加させるとの報告がある<sup>12)</sup> (Levey et al., 1984)。以上より、今後、*Drd2* の発現減少については CNTF や ChAT との関連で更なる検討が必要であると考えられる。介在ニューロンは *trkB* 受容体を発現しており<sup>13)</sup> (Altar et al., 1994)、その中で、PVALB<sup>+</sup> 介在ニューロンは歯状回の顆粒細胞から分泌される BDNF の刺激に応じて増殖・分化を受けることが知られている<sup>14,15)</sup> (Danzer and McNamara, 2004; Waterhouse et al., 2012)。本研究では、15 ppm の STC 曝露により *Bdnf* の発現が高値を示したことは、顆粒細胞から分泌された BDNF が PVALB<sup>+</sup> 介在ニューロンの増数に機能し、成熟時における神経新生障害の回復に関連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および歯状回門における GABA 性介在ニューロンの変化は消失したことから、STC の発達期曝露による神経新生障害は可逆的であることが示唆された。

## 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毒性影響を評価することを目的として、ラットを用いた STC の発達期曝露実験を行った。その結果、曝露終了時で、15.0 ppm において SGZ における顆粒細胞系譜分化後期にある神経前駆細胞の増殖抑制による type-2b 前駆細胞～未熟顆粒細胞の減少を特

徴とする神経新生障害と、それに対する修復性の反応として歯状回門における神経新生制御系である CALB1 陽性および PVALB 陽性 GABA 性介在ニューロン数の増加を認めた。DNA 修復関連遺伝子は発現増加を示し、神経新生部位での DNA 傷害が示唆された。一方、細胞周期関連遺伝子の発現変動結果から、G<sub>1</sub>/S ないし G<sub>2</sub>/M チェックポイント機能の低下による代償性の増殖反応が示唆された。コリン作動性入力に関連する受容体発現変動から、SGZ における細胞増殖抑制やそれに対する代償性の増殖性の反応が示唆された。また、*Bdnf* は発現高値を示したことから、顆粒細胞から分泌された BDNF が PVALB<sup>+</sup> 介在ニューロンの増数に機能して成熟時における神経新生障害からの回復に寄与した可能性が示唆された。成熟後では、顆粒細胞系譜の変化および GABA 性介在ニューロンの変化は消失したことから、STC の発達期曝露による神経新生障害は可逆的であることが示唆された。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 5.0 ppm (0.34-0.85 mg/kg 体重/日) と判断された。

## 参考文献

- 1) Song J, Sun J, Moss J, Wen Z, Sun GJ, Hsu D, Zhong C, Davoudi H, Christian KM, Toni N, Ming GL, Song H. Parvalbumin interneurons mediate neuronal circuitry-neurogenesis coupling in the adult hippocampus. *Nat Neurosci.* 2013; 16(12): 1728–1730.
- 2) Verdaguer E, Brox S, Petrov D, Olloquequi J, Romero R, de Lemos ML, Camins A, Auladell C. Vulnerability of calbindin, calretinin and parvalbumin in a transgenic/knock-in

- APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer disease together with disruption of hippocampal neurogenesis. *Exp Gerontol.* 2015; 69: 176–188.
- 3) Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9(3): 153–166.
  - 4) Campbell NR, Fernandes CC, Halff AW, Berg DK. Endogenous signaling through alpha7-containing nicotinic receptors promotes maturation and integration of adult-born neurons in the hippocampus. *J Neurosci.* 2010; 30(26): 8734–8744.
  - 5) Kaneko N, Okano H, Sawamoto K. Role of the cholinergic system in regulating survival of newborn neurons in the adult mouse dentate gyrus and olfactory bulb. *Genes Cells.* 2006; 11(10): 1145–1159.
  - 6) Harrist A, Beech RD, King SL, Zanardi A, Cleary MA, Caldarone BJ, Eisch A, Zoli M, Picciotto MR. Alteration of hippocampal cell proliferation in mice lacking the beta 2 subunit of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Synapse.* 2004; 54(4): 200–206.
  - 7) Pitler TA, Alger BE. Cholinergic excitation of GABAergic interneurons in the rat hippocampal slice. *J Physiol.* 1992; 450: 127–142.
  - 8) Liu Q, Wu J. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors serve as sensitive targets that mediate beta-amyloid neurotoxicity. *Acta Pharmacol Sin.* 2006; 27(10): 1277–1286.
  - 9) Yang P, Arnold SA, Habas A, Hetman M, Hagg T. Ciliary neurotrophic factor mediates dopamine D2 receptor-induced CNS neurogenesis in adult mice. *J Neurosci.* 2008; 28(9): 2231–2241.
  - 10) Takamura N, Nakagawa S, Masuda T, Boku S, Kato A, Song N, An Y, Kitaichi Y, Inoue T, Koyama T, Kusumi I. The effect of dopamine on adult hippocampal neurogenesis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2014; 50: 116–124.
  - 11) Mahadik SP, Laev H, Korenovsky A, Karpiak SE. Haloperidol alters rat CNS cholinergic system: enzymatic and morphological analyses. *Biol Psychiatry.* 1988; 24(2): 199–217.
  - 12) Levey AI, Wainer BH, Rye DB, Mufson EJ, Mesulam MM. Choline acetyltransferase-immunoreactive neurons intrinsic to rodent cortex and distinction from acetylcholinesterase-positive neurons. *Neuroscience.* 1984; 13(2): 341–353.
  - 13) Altar CA, Boylan CB, Fritsche M, Jackson C, Hyman C, Lindsay RM. The neurotrophins NT-4/5 and BDNF augment serotonin, dopamine, and GABAergic systems during behaviorally effective infusions to the substantia nigra. *Exp Neurol.* 1994; 130(1): 31–40.
  - 14) Danzer SC, McNamara JO. Localization of brain-derived neurotrophic factor to distinct

terminals of mossy fiber axons implies regulation of both excitation and feedforward inhibition of CA3 pyramidal cells. J Neurosci. 2004; 24(50): 11346–11355.

- 15) Waterhouse EG, An JJ, Orefice LL, Baydyuk M, Liao GY, Zheng K, Lu B, Xu B. BDNF promotes differentiation and maturation of adult-born neurons through GABAergic transmission. J Neurosci. 2012; 32(41): 14318–14330.

## F. 健康危機情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Nakajima K, Masubuchi Y, Ito Y, Inohana M, Takino M, Saegusa Y, Yoshida T, Sugita-Konishi Y, Shibutani M. Developmental exposure of citreoviridin transiently affects hippocampal neurogenesis targeting multiple regulatory functions in mice. Food Chem Toxicol. 2018; 120: 590-602.
- 2) Nakajima K, Tanaka T, Masubuchi Y, Ito Y, Kikuchi S, Woo GH, Yoshida T, Shibutani M. Developmental Exposure of Mice to T-2 Toxin Increases Astrocytes and Hippocampal Neural Stem Cells Expressing Metallothionein. Neurotox Res. 2019; 35(3): 668-683.

### 2. 学会発表

- 1) 中島 康太、伊藤 優子、増淵 康哲、吉田 敏則、小西 良子、渋谷 淳：ジアセ

トキシスシルペノールのマウス発達期曝露による海馬歯状回における不可逆的な神経新生障害、第45回日本毒性学会学術年会、大阪、第45回日本毒性学会学術年会要旨集：P-44、S 230、7月18-20日、2018

- 2) Kota Nakajima, Yuko Ito, Yasunori Masubuchi, Satomi Kikuchi, Toshinori Yoshida, Yoshiko Sugita-Konishi, Makoto Shibutani: Reversal effect of citreoviridin and irreversible effect of diacetoxyscirpenol on hippocampal neurogenesis by developmental exposure in mice. ESVP-ECVP Annual Meeting, Rumania, September 5-8<sup>th</sup>, 2018
- 3) 中島康太、伊藤優子、増淵康哲、菊地聡美、小西良子、吉田敏則、渋谷淳：かび毒シトレオビリジンとジアセトキシスシルペノールのマウス発達期曝露による生後の海馬神経新生に対する影響の比較、第161回日本獣医学会学術集会、つくば、第161回日本獣医学会学術集会講演要旨集：B0-33、P. 309、9月11-13日、2018
- 4) 中島 康太、伊藤 優子、増淵 康哲、菊地 聡美、吉田 敏則、小西 良子、渋谷 淳：ステリグマトシスチンのラット発達期曝露による海馬歯状回における神経新生に対する影響、第35回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京、第35回日本毒性病理学会学術集会講演要旨集：P-02、p.61、1月31-2月1日、2019

## 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



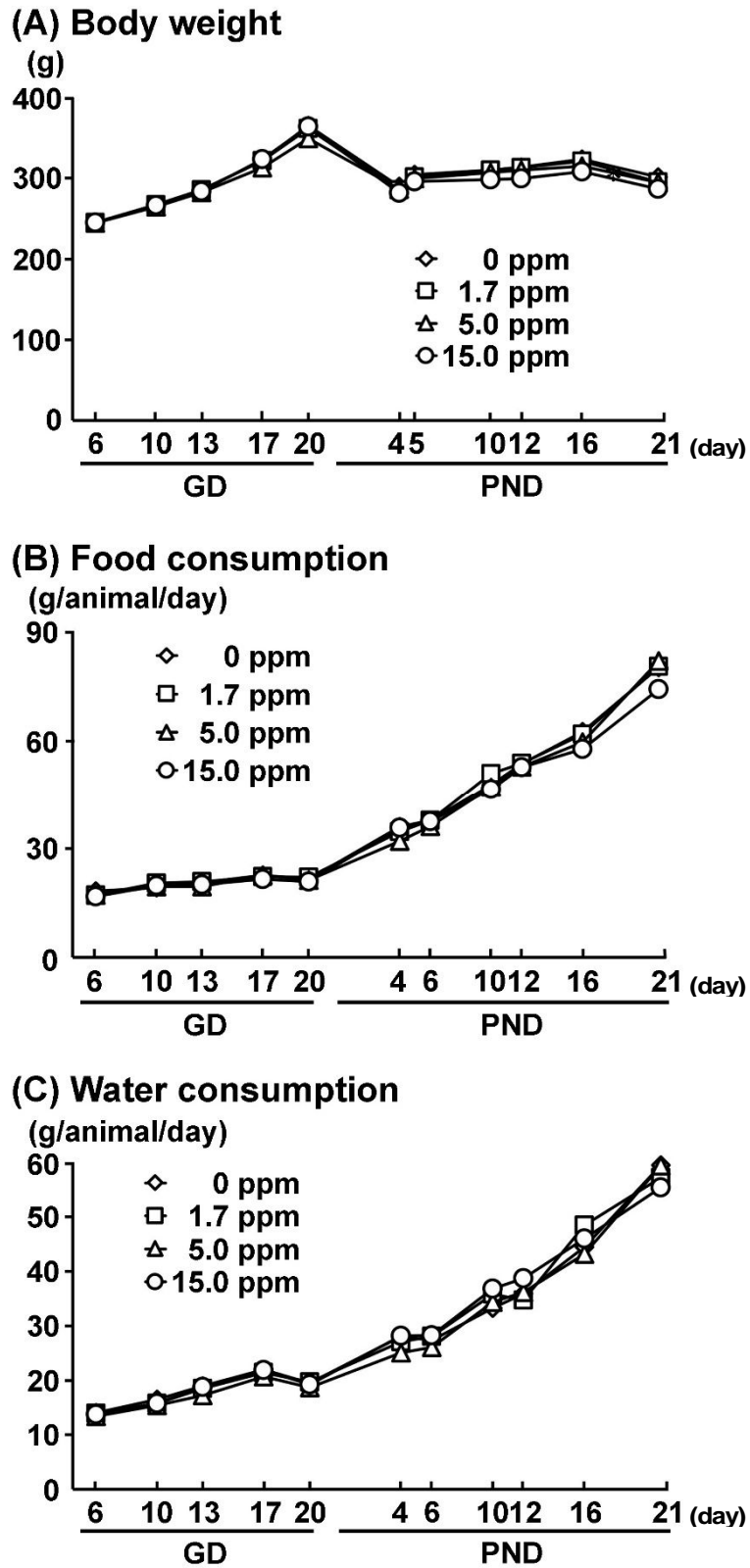
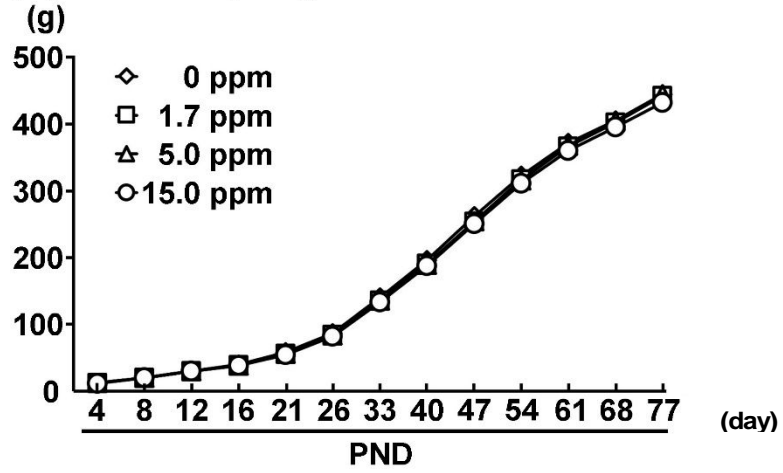
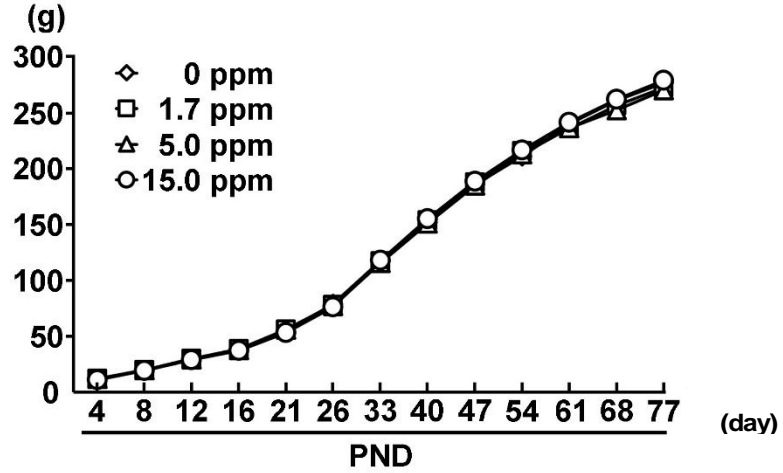


Figure 1. Body weight, food consumption and water consumption of dams given sterigmatocystin from GD 6 to PND 21 in the diet. (A) Body weight. (B) Food consumption. (C) Water consumption.

**(A) Male offspring**



**(B) Female offspring**



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

(A) Male offspring. (B) Female offspring.

**Table 1. 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 <sub>1</sub>	CB-955	1:500	Microwaving, pH 6.0 <sup>a)</sup>	Merck KGaA (Darmstadt, Germany)
Doublecortin	DCX	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:1000	None	Abcam Inc. (Cambridge, UK)
Glial fibrillary acidic protein	GFAP	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	GA5	1:200	None	Merck KGaA
Neuron-specific nuclear protein	NeuN	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	A60	1:100	None	Merck KGaA
Parvalbumin	PVALB	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	PARV-19	1:1000	Microwaving, pH 6.0	Merck KGaA
Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	Mouse	Monoclonal IgG <sub>2a</sub>	PC10	1:200	None	Dako (Glostrup, Denmark)
Reelin	RELN	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	G10	1:1000	None	Novus Biologicals, Inc. (Littleton, CO, USA)
Sex determining region Y (SRY)-box 2	SOX2	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	9-9-3	1:4000	None	Abcam Inc.
T box brain 2	TBR2	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:500	Autoclaving, pH 6.0 <sup>b)</sup>	Abcam Inc.

<sup>a)</sup> Microwaving at 90 °C for 10 min in 10 mM citrate buffer (pH 6.0).

<sup>b)</sup> Autoclaving at 121 °C for 10 min in 10 mM citrate buffer (pH 6.0).

**Table 2. Reproductive and general parameters of dams given sterigmatocystin from GD 6 to PND****21**

	Sterigmatocystin (ppm)				
	0 (Control)	1.7	5.0	15.0	
No. of dams examined	11	12	10	10	
<b>Reproductive parameters</b>					
No. of implantation sites	12.64±2.01 <sup>a</sup>	12.08±1.62	10.90±2.33	11.91±4.06	
No. of live offspring	11.82±2.44	10.83±1.90	10.20±2.04	12.70±1.06	
<b>General parameters on GD</b>					
Mean body weight (g)	296.9±24.0	296.2±21.8	294.7±19.5	298.5±18.6	
Food intake (g/animal/day) <sup>a</sup>	20.51±2.51	20.63±1.51	20.07±1.76	19.87±1.71	
Water consumption (g/animal/day) <sup>a</sup>	36.46±5.88	35.76±4.19	34.16±3.60	35.76±4.39	
<b>General parameters on PND</b>					
Mean body weight (g)	307.2±27.6	304.4±17.6	304.9±19.9	297.3±17.3	
Food intake (g/animal/day) <sup>a</sup>	53.10±4.97	53.34±3.08	52.05±5.24	50.83±2.65	
Water consumption (g/animal/day) <sup>a</sup>	76.18±9.89	77.14±8.74	74.53±9.75	77.58±6.06	
<b>Body and organ weights at PND 21</b>					
Body weight (g)	301.4±26.5	295.2±18.7	294.7±17.8	286.9±16.6	
<b>Organ weight</b>					
Brain weight	Absolute (g)	1.91±0.06	1.90±0.10	1.92±0.09	1.90±0.07
	Relative (g/100g BW)	0.64±0.05	0.64±0.04	0.65±0.04	0.66±0.04
Liver weight	Absolute (g)	15.19±1.52	14.11±1.22	14.50±1.23	13.89±0.72*
	Relative (g/100g BW)	5.05±0.39	4.78±0.23	4.87±0.25	4.82±0.15
Lung weight	Absolute (g)	1.48±0.38	1.32±0.20	1.32±0.12	1.28±0.16
	Relative (g/100g BW)	0.49±0.11	0.45±0.07	0.44±0.04	0.44±0.04
Kidneys weight	Absolute (g)	2.13±0.19	2.14±0.19	2.04±0.12	2.09±0.16
	Relative (g/100g BW)	0.71±0.04	0.72±0.04	0.69±0.02	0.72±0.03
<b>Diacetoxyscirpenol intake (mg/kg BW/day)</b>					
GD, mg/kg body weight/day <sup>a</sup>	0	0.12±0.01	0.34±0.02	1.00±0.07	
PND, mg/kg body weight/day <sup>a</sup>	0	0.30±0.01	0.85±0.07	2.57±0.15	

Mean ± SD.

<sup>a</sup> Mean value of each week.*Abbreviation:* BW; body weight, GD; gestation day, PND; postnatal day.

\* Significantly different from the untreated controls (P&lt;0.05, Dunnett's or Steel's test).

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

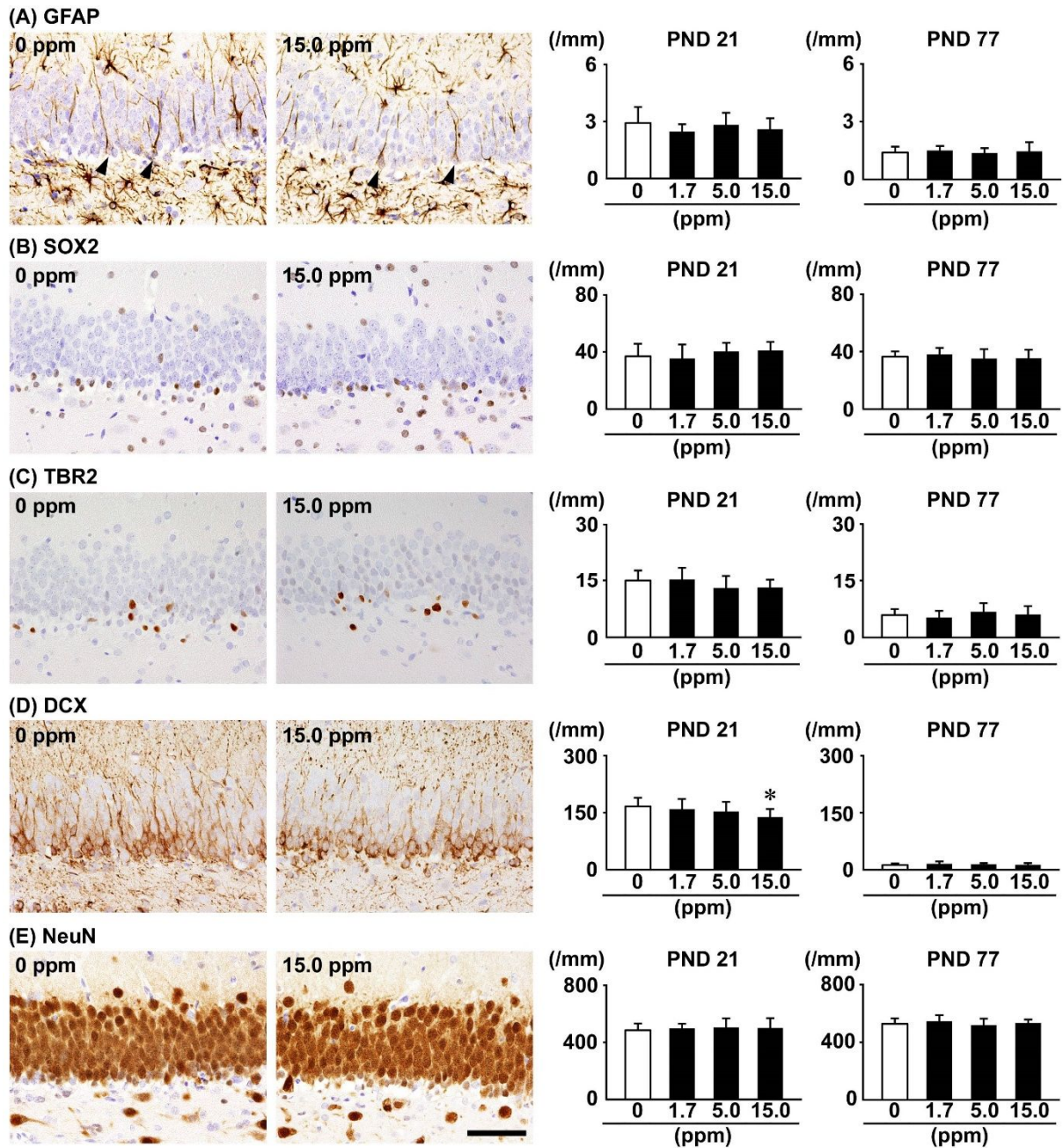
		Sterigmatocystin in diet (ppm)			
		0 (Control)	1.7	5.0	15.0
<b>Male offspring on PND 21</b>					
No. of animals examined		11	12	10	10
Body weight (g)		58.95±5.13 <sup>a</sup>	56.93±4.05	56.66±4.33	55.34±4.74
<b>Organ weight</b>					
Brain	Absolute (g)	1.56±0.04	1.56±0.03	1.56±0.03	1.56±0.04
	Relative (g/100g BW)	2.72±0.24	2.75±0.18	2.77±0.22	2.83±0.22
Liver	Absolute (g)	2.42±0.21	2.33±0.22	2.45±0.24	2.31±0.21
	Relative (g/100g BW)	4.18±0.23	4.08±0.16	4.32±0.16	4.18±0.13
Lung	Absolute (g)	1.00±0.25	1.03±0.23	0.96±0.32	0.93±0.20
	Relative (g/100g BW)	1.72±0.42	1.80±0.36	1.67±0.48	1.68±0.38
Kidneys	Absolute (g)	0.65±0.06	0.66±0.05	0.64±0.07	0.62±0.05
	Relative (g/100g BW)	1.12±0.04	1.15±0.04	1.13±0.06	1.13±0.03
<b>Female offspring on PND 21</b>					
No. of animals examined		11	12	10	10
Body weight (g)		54.53±9.27	56.06±4.50	56.25±3.64	53.47±4.68
<b>Organ weight</b>					
Brain	Absolute (g)	1.47±0.12	1.52±0.04	1.52±0.05	1.50±0.05
	Relative (g/100g BW)	2.75±0.38	2.72±0.21	2.72±0.22	2.83±0.21
Liver	Absolute (g)	2.23±0.22	2.18±0.22	2.30±0.20	2.23±0.25
	Relative (g/100g BW)	4.17±0.68	3.89±0.13	4.09±0.21	4.16±0.15
Lung	Absolute (g)	0.70±0.19	0.74±0.12	0.76±0.19	0.72±0.19
	Relative (g/100g BW)	1.30±0.31	1.32±0.13	1.36±0.32	1.36±0.34
Kidneys	Absolute (g)	0.61±0.09	0.62±0.05	0.64±0.06	0.61±0.06
	Relative (g/100g BW)	1.13±0.13	1.11±0.03	1.13±0.05	1.14±0.06
<b>Male offspring on PND 77</b>					
No. of animals examined		11	12	10	10
Body weight (g)		441.56±27.44	455.14±27.74	457.84±18.13	444.88±31.75
<b>Organ weight</b>					
Brain	Absolute (g)	2.12±0.07	2.12±0.04	2.11±0.03	2.11±0.11
	Relative (g/100g BW)	0.48±0.03	0.47±0.03	0.46±0.02	0.48±0.04
Liver	Absolute (g)	18.96±1.84	19.21±2.05	19.75±1.20	19.37±2.36
	Relative (g/100g BW)	4.29±0.24	4.21±0.27	4.32±0.25	4.35±0.37
Lung	Absolute (g)	2.00±0.64	1.94±0.42	2.41±0.49	1.90±0.14
	Relative (g/100g BW)	0.45±0.12	0.43±0.09	0.53±0.11	0.43±0.04
Kidneys	Absolute (g)	2.79±0.22	2.75±0.20	2.86±0.17	2.71±0.20

	Relative (g/100g BW)	0.63±0.05	0.61±0.03	0.63±0.05	0.61±0.04
Female offspring on PND 77					
	No. of animals examined	11	12	10	10
	Body weight (g)	277.14±25.31	273.01±28.11	270.77±19.06	279.41±19.65
Organ weight					
Brain	Absolute (g)	1.96±0.06	1.98±0.05	1.98±0.06	1.98±0.08
	Relative (g/100g BW)	0.71±0.05	0.73±0.07	0.73±0.05	0.71±0.04
Liver	Absolute (g)	10.29±1.14	9.96±1.43	9.59±1.05	10.40±0.71
	Relative (g/100g BW)	3.71±0.19	3.64±0.25	3.54±0.22	3.73±0.13
Lung	Absolute (g)	1.29±0.13	1.38±0.16	1.57±0.40	1.30±0.17
	Relative (g/100g BW)	0.47±0.05	0.51±0.04	0.58±0.13	0.47±0.04
Kidneys	Absolute (g)	1.77±0.20	1.71±0.15	1.71±0.16	1.72±0.13
	Relative (g/100g BW)	0.64±0.04	0.63±0.03	0.63±0.04	0.62±0.03

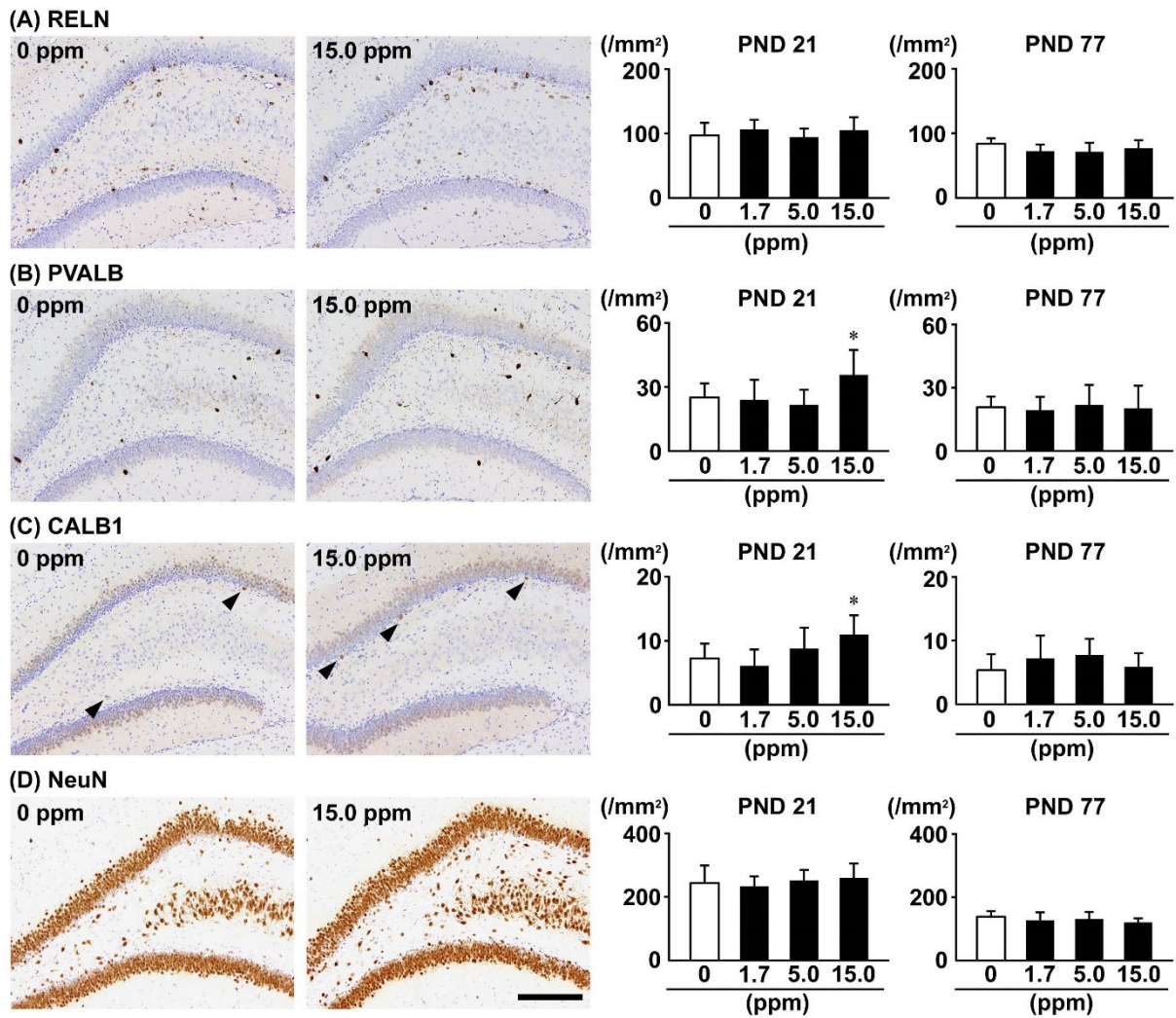
*Abbreviations:* BW, body weight; PND, postnatal day.

<sup>a</sup> Mean ± SD.



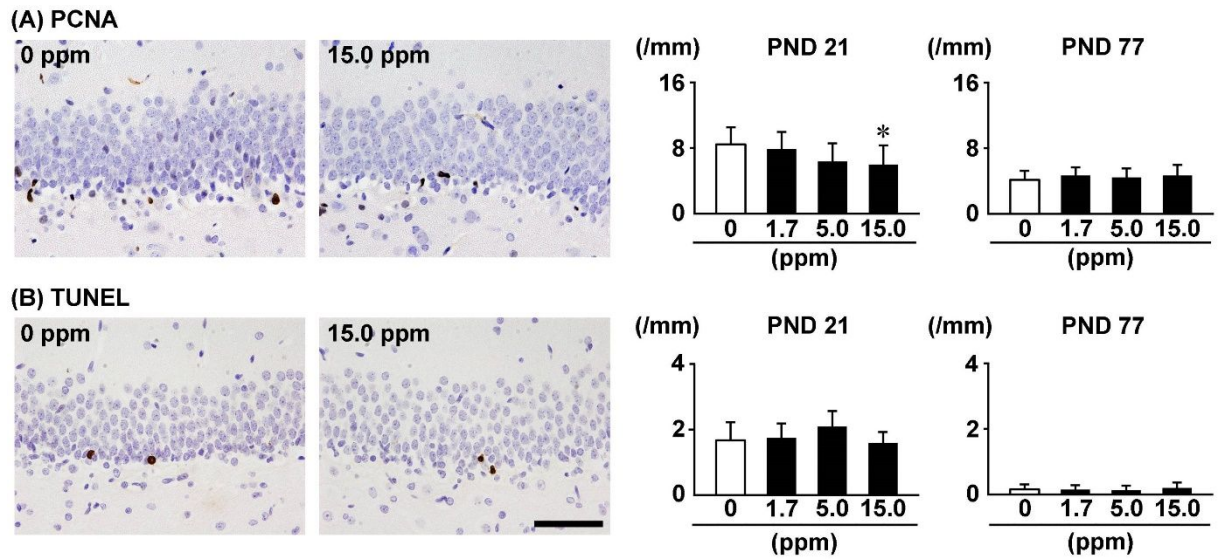


**Figure 3. Distribution and number of immunoreactive cells for neuronal stage-defining markers of granule cell lineages in the subgranular zone (SGZ), and a mature neuronal marker in the granule cell layer (GCL) of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to sterigmatocystin.** (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 15.0 ppm group at PND 21 are shown. Magnification: 400 $\times$ ; bar = 50  $\mu$ m. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit length (mm) of the SGZ or GCL of the bilateral sides. Values are expressed as mean  $\pm$  SD. N = 10/group. \* Significantly different from the untreated controls ( $P < 0.05$ , 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 sterigmatocystin.** (A) Reelin (RELN). (B) Parvalbumin (PVALB). (C) Calbindin-D-28K (CALB1). (D) Neuron-specific nuclear protein (NeuN). Representative images from 0 ppm control and the 15.0 ppm group at PND 21 are shown. Magnification: 200 $\times$ ; bar = 100  $\mu$ m. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit area (mm<sup>2</sup>) of the hilus of bilateral hemispheres. Values are expressed as the mean + SD. N = 10/group.

\* Significantly different from the untreated controls ( $P < 0.05$ , 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 sterigmatocystin.** (A) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA). (B) Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL). Representative images from 0 ppm control and the 15.0 ppm group at PND 21 are shown. Magnification: 400 $\times$ ; bar = 50  $\mu$ m. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit length (mm) of the SGZ of the bilateral sides. Values are expressed as the mean  $\pm$  SD. N = 10/group.

\* 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 sterigmatocystin**

	Sterigmatocystin in diet (ppm)			
	0 (Control)		15.0	
	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
<b>Neurotrophin-related genes</b>				
<i>Bdnf</i>	1.08±0.47	1.03±0.28	2.07±0.18**	1.49±0.12**
<i>Ntrk2</i>	1.02±0.22	1.00±0.08	0.98±0.25	0.70±0.15**
<b>Cell cycle regulators</b>				
<i>Ccnd2</i>	1.08±0.42	1.06±0.35	1.98±0.40**	1.41±0.23
<i>Cdk1</i>	1.06±0.38	1.03±0.29	0.81±0.47	0.57±0.31*
<i>Cdk2</i>	1.03±0.25	1.01±0.15	1.10±0.28	0.78±0.16*
<i>Cdkn1a</i>	1.03±0.26	1.02±0.24	0.52±0.27**	0.37±0.18**
<i>Cdkn1b</i>	1.02±0.21	1.00±0.10	0.91±0.24	0.65±0.15**
<i>Cdkn1c</i>	1.02±0.25	1.02±0.19	0.88±0.18	0.63±0.10**
<i>Cdkn2b</i>	1.02±0.19	1.00±0.06	1.09±0.23	0.78±0.12**
<i>Cdkn2c</i>	1.02±0.22	1.01±0.11	1.16±0.34	0.82±0.19
<b>DND repair-related genes</b>				
<i>Apex1</i>	1.02±0.23	1.00±0.05	1.32±0.18*	0.94±0.08
<i>Brip1</i>	1.02±0.20	1.01±0.17	1.14±0.24	0.81±0.12*
<i>Chek1</i>	1.15±0.61	1.10±0.49	1.35±0.62	0.97±0.43
<i>Ercc1</i>	1.01±0.18	1.01±0.15	1.32±0.27*	0.94±0.13
<b>Cholinergic receptors</b>				
<i>Chrna7</i>	1.03±0.25	1.00±0.09	1.75±0.23**	1.26±0.17**
<i>Chrn2</i>	1.01±0.11	1.01±0.15	0.84±0.14*	0.60±0.08**
<b>Dopaminergic receptor</b>				
<i>Drd2</i>	1.09±0.46	1.08±0.41	0.45±0.43*	0.32±0.29**

*Abbreviations:* *Apex1*,apurinic/aprimidinic endonuclease 1; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Brip1*, BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1; *Ccnd2*, cyclin D1; *Cdk1*, cyclin-dependent kinase 1; *Cdk2*, cyclin-dependent kinase 2; *Cdkn1a*, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21); *Cdkn1b*, cyclin-dependent kinase inhibitor 1B; *Cdkn1c*, cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (P57); *Cdkn2b*, cyclin dependent kinase inhibitor 2B; *Cdkn2c*, cyclin dependent kinase inhibitor 2C; *Chek1*, checkpoint kinase 1; *Chrna7*, cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 7; *Chrn2*, cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 2 (neuronal); *Drd2*, dopamine receptor D2; *Ercc1*, excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1; *Gapdh*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *Hprt*, hypoxanthine phosphoribosyl transferase; *Ntrk2*, neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2.

<sup>a</sup> Mean ± 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.