

## 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

##### 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した。胎児および乳幼児が曝露される可能性があるかび毒として、シトレオピリジン (CIT)、ジアセトキシシルペノール (DAS)、ステリグマトシスチン (STC) を選択し、マウスあるいはラットを用いた発達期曝露実験を実施した。曝露終了時における雄児動物の海馬歯状回顆粒細胞層下帯 (SGZ) での神経新生への影響を解析した結果、CIT は type-1 神経幹細胞の緩やかな減少と type-2 および type-3 神経前駆細胞の緩やかな増加を認め、DAS は type-1 神経幹細胞から未熟顆粒細胞、STC は 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が認められた。CIT では、離乳時において GABA 性介在ニューロンの細胞数変化とシナプス可塑性の亢進を認め、離乳時で観察された神経新生制御系の遺伝子発現変化が成熟時でほとんどが反転し、恒常性維持作用が示唆された。DAS では、GABA 性介在ニューロンの細胞数減少と酸化ストレス亢進によるアポトーシス増加を認め、神経新生障害への関与が示唆された。また、成熟時には神経移動と可塑性の増強による神経新生障害に対する回復性の変化が示唆された。STC では、離乳時に神経新生障害に対する修復性の反応として GABA 性介在ニューロン数の増加を認めた。神経新生部位で DNA 傷害の他、細胞周期チェックポイント機能の低下、アセチルコリン受容体発現変動、BDNF による PVALB 陽性介在ニューロンの増数を介した神経新生障害からの回復性が示唆された。いずれのかび毒においても、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、CIT で 1.0 ppm (0.13–0.51 mg/kg 体重/日)、DAS で 0.6 ppm (0.09–0.29 mg/kg 体重/日)、STC 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、T-2 トキシン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。

本研究では、胎児および乳幼児が曝露される可能性のあるかび毒を対象とし、平成 28 年度はシトレオビリジン (CIT)、平成 29 年度はジアセトキシシルペノール (DAS)、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チン (STC) を評価対象とした。いずれのかび毒についても日本ならびにコーデックス委員会において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。そこでこれら 3 種のかび毒による発達期神経毒性影響を明らかにすることを目的として、ICR マウスあるいは SD ラットを用いた発達期曝露実験を実施し、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

### < CIT のマウスにおける発達期曝露影響評価 >

妊娠 ICR マウス (妊娠 1 日で入荷、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、CIT 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。CIT 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、CIT 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 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 15 ~ 22 例、雌 10 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)、tubulin, beta 3 class III (TUBB3)、doublecortin (DCX)、介在ニューロンの指標である reelin (RELN)、parvalbumin (PVALB)、calbindin-D-28K (CALB1)、calbindin-D-29K (calretinin, CALB2)、somatostatin (SST)、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として TUNEL 染色、シナプス可塑性の指標である activity-regulated cytoskeleton-associated protein (ARC)、cyclooxygenase-2 (COX2)、グルタミン酸受容体の指標である glutamate receptor, ionotropic, AMPA1 (alpha 1) (GRIA1)、glutamate receptor ionotropic, NMDA 2D (GRIN2D) を行った。GFAP、SOX2、TBR2、DCX、PCNA、TUNEL、ARC および COX2 陽性細胞数について海馬歯状回の SGZ 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、CALB1、CALB2、SST、NeuN、GRIA1 および GRIN2D 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 CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 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 CIT 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 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 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。

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、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<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。

#### <DAS のマウスにおける発達期曝露影響評価>

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 を最高用量として設定した。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 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り灌流固定を行った。各群雄 15~22 例、雌 10 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、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 7 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 GFAP、SOX2、TBR2、DCX、介在ニューロンの指標である RELN、PVALB、SST、成熟ニューロンの指標である NeuN、細胞増殖活性の指標である PCNA、アポトーシス活性の指標である TUNEL、シナプス可塑性の指標である ARC および COX2、FOS、酸化ストレス指標である MDA、4-HNE および metallothionein-I/II (MT-I/II)、DNA 二重鎖切断の指標である gamma-H2A histone family member X (phospho Ser139) ( $\gamma$ -H2AX)、細胞周期関連分子である cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21<sup>CIP1/WAF1</sup>) の各免疫染色を行った。GFAP、SOX2、TBR2、DCX、PCNA、TUNEL、ARC、COX2、FOS、MDA、4-HNE、MT-I/II、 $\gamma$ -H2AX および p21<sup>CIP1/WAF1</sup> 陽性細胞数については海馬歯状回の SGZ 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 SST 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。また、ARC、COX2、FOS および p21<sup>CIP1/WAF1</sup> 陽性細胞数については、SGZ および顆粒細胞層 (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 CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 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 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 10~13 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、

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。

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  $\mu$ g の total RNA から SuperScript<sup>®</sup> III Reverse Transcriptase (Life Technologies) を用いて cDNA を合成し、RT-PCR (StepOnePlus Real-time PCR System、Life Technologies) により遺伝子発現解析を行った。

#### <STC のラットにおける発達期曝露影響評価>

妊娠 SD ラット (妊娠 1 日で入手、日本エスエルシー) 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事が期待される 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%

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 12 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 GFAP、SOX2、TBR2、DCX、介在ニューロンの指標である RELN、PVALB、CALB1、成熟ニューロンの指標である NeuN、細胞増殖活性の指標である PCNA、ア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 SGZ 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。

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、RT-PCR (StepOnePlus Real-time PCR System、Life Technologies)により遺伝子発現解析を行った。

#### (統計学的解析)

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。2 群間の比較においては各群の分散を *F* 検定により比較し、等分散の場合は Student の *t* 検定、不等分散の場合は Aspin-Welch の *t* 検定により対照群と各投与群との検定を行った。

#### (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

### <CIT のマウスにおける発達期曝露影響評価> 児動物胃内乳汁の CIT 濃度

0 ppm 群の胃内乳汁に CIT は検出されず(定量下限 0.005 ppm)、10 ppm 群の胃内乳汁における CIT 濃度は 0.13 ppm であった。

### 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ピリ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 CIT による影響は認められなかった (Table 2)。

### 臓器重量：

臓器重量に CIT 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、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、RELN 陽性介在ニューロン、PVALB 陽性介在ニューロン、CALB2 陽性介在ニューロン、SST 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)。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 (Fig. 5)。GCL において ARC (シナプス可塑性マーカー) 陽性細胞が 3 および 10 ppm で統計学的に優位に増加した (Fig. 6)。歯状回門部において、GRIA1 (グルタミン酸受容体マーカー) 陽性細胞が 10 ppm で統計学的に有意に増加した (Fig. 7)。

### 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 *Gfap*、*Sox2*、*Eomes* (*Tbr2*)、*Neurod1*、*Dcx*、GABA 性介在ニューロンで発現が認められる *Sst*、脳由来神経栄養因子とその受容体をコードする *Bdnf*、*Ntrk2*、シナプス可塑性関連マーカーをコードする *Arc*、海馬に inputs 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、GABA 性介在ニューロンで発現が認められる *Pvalb*、グルタミン酸のトランスポーターをコードする *Slc17a6*、NMDA 型グルタミン酸受容体をコードする *Grin2d*、コリン作動性入力受容体をコードする *Chrna4*、*Chrb2* 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、*Gfap*、*Sox2*、*Eomes*、*Neurod1*、*Dcx*、*Bdnf*、*Fos*、*Slc17a7*、*Gria1*、*Gria2*、*Grin2a*、*Grin2d*、*Chrna7* で有意に発現減少、*Pvalb*、*Sst*、*Chrna4*、*Chrb2* で有意に発現増加が認められた (Table 6)。

### <DAS のマウスにおける発達期曝露影響評価> 児動物胃内乳汁の DAS 濃度

0 ppm 群の胃内乳汁に DAS は検出されず(定量下限 0.005 ppm)、8 ppm 群の胃内乳汁における DAS 濃度は 0.006 ppm であった。

### 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. 8)。

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11日目まで、および18日目から77日目まで連続して体重の低値が認められた (Fig. 9)。

### 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 8)。

### 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 (Table 8)。児動物は、曝露終了時の剖検で、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 (Table 9)。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 9)。

### 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. 10)、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. 11)。また、SGZにおいて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. 12)。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. 10)、海馬歯状回ではARC 陽性細胞が6.0 ppmで有意に減少し (Fig. 13)、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. 11)。離乳時のSGZにおいては、酸化ストレスの指標であるMDA 陽性細胞、酸化ストレスや神経障害に起因して増加するMT-I/II 陽性細胞と、DNA 二本鎖切断の指標である $\gamma$ -H2AX の増加を認めた (Fig. 14, 15, 16)。

### 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*、グルタミン酸トランスポーターをコードする*Slc17a7*、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*、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 10)。一方、グルタミン酸トランスポーターをコードする*Slc17a6* の発現増加を認めた (Table 10)。神経成長因子および酸化関連遺伝子群には発現変動は認められなかった (Table 10)。成熟時では、グルタミン酸受容体をコードする*Gria1* と *Gria2*、RELN 受容体をコードする*Itsn1* の発現増加を認めた (Table 11)。

### <STCのラットにおける発達期曝露影響評価>

#### 児動物胃内乳汁のSTC濃度

0 ppm群の胃内乳汁にSTCは検出されず (定量下限0.005 ppm)、12 ppm群の胃内乳汁におけるSTC濃度は0.014 ppmであった。

### 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. 17)。

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. 18)。

#### 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 13)。

#### 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 13)。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 14)。

#### 免疫組織学的変化：

離乳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、SGZにおいてDCX (type-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. 19)、PCNA (細胞増殖指標)の陽性細胞が15.0 ppm群で有意に減少した (Fig. 21)。また、歯状回門では、GABA性介在ニューロンであるPVALBおよびCALB1陽性細胞が15.0 ppm群で有意に増加した (Fig. 20)。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および介在ニューロンの変化は全て回復した (Fig. 19, 20)。

#### 遺伝子発現解析：

離乳時の雄児動物の脳における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*Erccl*、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 15)。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 (Table 15)。

#### D. 考察

##### < CIT のマウスにおける発達期曝露影響評価 >

CIT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、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種類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、GFAP陽性のtype-1神経幹細胞の減少傾向と、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。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ったものの、介在ニューロン指標遺伝子である*Pvalb*の発現低下も認められた。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。CIT 発達期曝露は、曝露終了時において主に神経新生制御系への影響を示す事が示唆された。

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 日目の変化から反転した。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（Yamasaki et al., 2014）<sup>1)</sup>、発達期の脳では、主に PVALB 陽性細胞に発現が認められる（von Engelhardt et al., 2015）<sup>2)</sup>。本研究では、*Pvalb* の遺伝子発現の減少が離乳時に認められているが、PVALB 陽性細胞の数には変化を認めなかった。これらの結果から、CIT 曝露による *Grin2d* 遺伝子発現減少は、離乳時における個々の PVALB 陽性細胞の機能低下を示唆している。活性型 PVALB 陽性介在ニューロンは神経幹細胞プールの増殖および分化を抑制する（Song et al., 2013）<sup>3)</sup>。CIT 曝露による PVALB 陽性細胞の活性低下は、type-1 神経幹細胞減少に対する代償性作用として、神経幹細胞の増殖および分化促進に寄与している事を示唆していると考えた。

#### <DAS のマウスにおける発達期曝露影響評価>

DAS 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、2.0 と 6.0 ppm において海馬 SGZ における type-1 神経幹細胞から type-2 および type-3 神経前駆細胞、更には未熟顆粒細胞までの細胞が減少した。一方で、6.0 ppm で SGZ 細胞のアポトーシスの増加を認め、6.0 ppm で検索した脂質過酸化最終産物の一つである MDA に陽性を示す SGZ 細胞の増数を認めた。また、6.0 ppm で MT-I/II 陽性 SGZ 細胞の増数も認めた。我々は DAS と化学構造が類似するトリコテセン系の A タイプのマイコトキシンである T-2 toxin の発達期曝露研究で、type-1 stem cell から type-2b 前駆細胞までの傷害性を見出し（Tanaka et al., 2016）<sup>4)</sup>、更に MI-I/II 陽性 SGZ 細胞の増数は、MI-I/II 陽性 astrocyte の増数と共に、酸化性ストレスに対する細胞保護作用の表れであることを報告している（Nakajima et al., 2019）<sup>5)</sup>。以上の結果から、トリコテセン系の A タイプのマイコトキシンは共通して、顆粒細胞系譜のうち、type-1 stem cell に始まる細胞集団で、少なくとも type-2b 前駆細胞までの細胞標的性を示すことが示唆された。それには、T-2 toxin による発達期の神経新生毒性で考察したように、SGZ における酸化性ストレス亢進によるアポトーシスの増加が関与することが示された。現在までに DAS による酸化性ストレス誘発性に関する報告はないが、本研究で DAS による酸化性ストレスに由来する DNA 損傷の修復酵素である *Ogg1* と *Parp1* の遺伝子発現レベルの減少を認め、酸化的 DNA 損傷に対する易損性の増加が示唆された（Mohanty et al., 2017）<sup>6)</sup>。

マウスの SGZ において、*Kitlg* 遺伝子によりコードされる stem cell factor (SCF) は type-1 神経幹細胞以外の顆粒細胞系譜で発現し、type-1 神経幹細胞及び type-2 神経前駆細胞に発現する KIT 受容体に結合して、それらの細胞の増殖及び分化を促進することが知られている（Jin et al., 2012）

Sun et al., 2004)<sup>7,8)</sup>。本研究では、6.0 ppm の DAS 曝露により、歯状回における *Kit* の遺伝子発現の有意な減少が認められた。また、統計学的に有意ではないものの、*Kitl* mRNA の発現増加を認めた。この結果は、DAS の発達期曝露が KIT の下方制御を介した細胞増殖及び分化を抑制し、この抑制が type-1 から type-2 の細胞集団の減少の原因となり得る事を示唆している。さらに、マウス神経堤細胞の初代培養における SCF/KIT 相互作用による生存機能を遮断することによりアポトーシスが誘導された (Ito et al., 1999)<sup>9)</sup> ことから、本実験における DAS 発達期曝露によるアポトーシスの増加には、SGZ における酸化性ストレスの増加の他に、SFC/KIT 相互作用の低下が関与することが示唆された。

DAS の 6.0 ppm 用量で、発達期曝露終了時の SGZ において、DNA の 2 本鎖切断指標である  $\gamma$ H2AX の陽性細胞が最高用量で増数した。DNA の 2 本鎖切断は、強い変異原性を誘発するアルキル化剤などの遺伝毒性発がん物質の投与や電離放射線照射で見られる現象であり、その修復の過程で、欠失や点突然変異を高頻度に誘発する (Kavanagh et al., 2013; Han and Yu, 2010)<sup>10,11)</sup>。DAS のマウスへの発達期曝露による催奇形性が認められているが (Mayura et al., 1987)<sup>12)</sup>、DAS による遺伝毒性に関する報告は限られている。その中で、*in vivo* のマウスを用いた報告で、DAS は染色体の数的および構造的異常と共に強い DNA 合成阻害を誘発して細胞周期や有糸分裂を阻害することが示されている (Hassanane et al., 2000)<sup>13)</sup>。このことから、DAS による SGZ 細胞に対する clastogenic な作用から、DNA の 2 本鎖切断が生じた可能性がある。一方、DNA の 2 本鎖切断関連遺伝子の mRNA 発現レベルには変動を認めなかった。このことに関しては、 $\gamma$ H2AX 陽性細胞は無処置動物でも一定レベルで存在すること、 $\gamma$ H2AX 陽性細胞数の増数がかなり少ないこと、mRNA 発現レベルが歯状回全体に含まれる細胞

で検索している点から、検出感度に問題があり、検出できなかった可能性がある。また、酸化的 DNA 損傷指標である *Ogg1* と *Parp1* の遺伝子発現レベルの減少と共に、DAS 曝露により *Cdkn2a*、*Rb1*、*Tp53* の発現も減少をしている。これらの結果から、DAS 曝露により p16<sup>INK4a</sup>-RB 経路と p53 シグナル経路が抑制されて DNA の易損性が増加し、その結果として  $\gamma$ H2AX 陽性細胞の増加に繋がったものと考えられた (Okamura and Nohara, 2016; Piekna-Przybylska et al., 2017)<sup>14,15)</sup>。

DAS の曝露により、6.0 ppm で GABA 性介在ニューロンのうち、PVALB 陽性細胞の有意な減数が認められた。以前の我々の研究で、化学構造の類似する同じトリコセセン系の A タイプである T-2 toxin では、PVALB 陽性介在ニューロンの変動は認められず、顆粒細胞系譜の変化は type-1 から type-2b までの集団に留まり、今回の DAS で認められたような type-3 前駆細胞には傷害性を示さなかった (Tanaka et al., 2016)<sup>4)</sup>。PVALB 陽性介在ニューロンは type-2 前駆細胞の分化を促進することが知られていることから (Freund and Buzsáki, 1996; Tozuka et al., 2005)<sup>16,17)</sup>、この介在ニューロンの減数は TBR2 陽性細胞から DCX 陽性細胞への分化障害を示唆し、DCX 陽性細胞の減数に繋がったものと解釈できる。更に、6.0 ppm の DAS 曝露で、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る *Chrna7* の遺伝子発現が減少を示した。SGZ の新生ニューロンを介してコリン作動性入力を受けており、細胞増殖性のある神経前駆細胞集団であると考えられている (Kaneko et al., 2006)<sup>18)</sup>。また、神経突起伸展を始める type-3 神経前駆細胞はコリン作動性入力の抑制で障害を受けることが報告されている (Campbell et al., 2010)<sup>19)</sup>。以上より、DAS 曝露により生じた CHRNA7 受容体を介したコリン作動性入力の抑制は type-3 神経前駆細胞の特異的な減少に作用した可能性が指摘できる。

RELN は細胞移動と正しい位置への導きを制御する細胞外分泌糖タンパク質である (Gong et al., 2007)<sup>20</sup>。また、強力な神経毒性物質として知られるトリメチルスズのラット発達期曝露により、海馬における RELN の発現が持続的に増加しており、脳損傷に対する組織応答として海馬の神経新生の調節に RELN が関与している可能性があると報告されている (Toesca et al., 2016)<sup>21</sup>。本研究では、曝露終了時では変動を示さなかったものの、成熟後において DAS の 2.0 ppm 以上で RELN 陽性細胞の増加を示した。顆粒細胞系譜に関しては、曝露終了時に 2.0 ppm 以上の群で type-1 神経幹細胞から type-3 前駆細胞の減少を示したが、成熟後ではそれらは回復を示した。RELN は幹細胞の自己複製活性を制御して、顆粒細胞系譜の増殖を制御している (Sibbe et al., 2015)<sup>22</sup>。このことから、成熟後で認められた RELN 陽性細胞の増数は曝露終了時で見られた type-1 神経幹細胞の減少に対応した変化が成熟後まで残ったものと考えられ、後には解消される一過性のものであると判断された。一方で、シナプス可塑性を制御する ARC の陽性細胞数が 6.0 ppm 群で減少を示し、他のシナプス可塑性に関わる最初期遺伝子産物である FOS や COX2 に陽性を示す顆粒細胞も 0.6 ppm から減少傾向を示した。RELN シグナルにより成熟顆粒細胞における ARC の合成が活性化され (Dong et al., 2003)<sup>23</sup>、ARC は顆粒細胞の生存と成熟に強く関わる事が知られている (Kuipers et al., 2009)<sup>24</sup>。DAS による最初期遺伝子産物陽性細胞の減少ないし減少傾向の生じた理由は不明であるが、成熟後で認められた RELN 陽性細胞の増数は、少なくとも 6.0 ppm で認められた神経可塑性の減少に対する代償性の反応である可能性が示唆された。成熟後には *Itsn1* 遺伝子の発現増加も認められた。*Itsn1* 遺伝子のコードする intersectin 1 は、RELN シグナル分子の一つであり、海馬におけるニューロン移動やシナプス可塑性の調節に関わっていると

報告されているため (Jakob et al., 2017)<sup>25</sup>、*Itsn1* の発現増加は ARC 陽性顆粒細胞の減少に対応した代償性の変化であると判断された。

#### <STC のラットにおける発達期曝露影響評価>

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 (Song et al., 2013)<sup>3</sup>、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 (Verdaguer et al., 2015)<sup>26</sup>。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 (Malumbres & Barbacid, 2009)<sup>27)</sup> 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 (Campbell et al., 2010)<sup>28)</sup> 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

CHRN2 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 (Kaneko et al., 2006)<sup>29)</sup>、その中で CHRN2 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 (Harrist et al., 2004)<sup>30)</sup>。ラットの海馬歯状回では、外部からのコリン作動性入力に CHRN2 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 (Pitler and Alger, 1992)<sup>31)</sup>。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 (Liu and Wu, 2006)<sup>32)</sup>。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 (Yang et al., 2008)<sup>33)</sup>。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 (Takamura et al., 2014)<sup>34)</sup>。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 (Mahadik et al., 1988)<sup>35)</sup>、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 (Levey et al., 1984)<sup>36)</sup>。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(Altar et al., 1994)<sup>37)</sup>、その中で、PVALB 陽性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 (Danzer and McNamara, 2004; Waterhouse et al., 2012)<sup>38,39)</sup>。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 陽性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、CIT、DAS、STC を選択し、マウスあるいはラットを用いた発達期曝露実験を行った。曝露終了時における雄児動物の海馬歯状回 SGZ での神経新生への影響を解析した結果、CIT では type-1 神経幹細胞の緩やかな減少と type-2 および type-3 神経前駆細胞の緩やかな増加を認め、DAS では type-1 神経幹細胞から未熟顆粒細胞、STC では 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が認められた。

CIT では、離乳時における GABA 性介在ニューロンの細胞数変化とシナプス可塑性の亢進を認め、遺伝子発現解析では、離乳時で観察された神経新生制御系の発現変化が成熟時でほとんどが反転し、恒常性維持作用が示唆された。DAS では、GABA 性介在ニューロンの細胞数減少と酸化ストレス亢進によるアポトーシス増加を認め、神経新生障害への関与が示唆された。また、成熟時には神経移動と可塑性の増強による神経新生

障害に対する回復性の変化が示唆された。STC では、離乳時に神経新生障害に対する修復性の反応として GABA 性介在ニューロン数の増加を認めた。遺伝子発現解析では、神経新生部位での DNA 傷害、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、コリン作動性入力に関連する受容体発現変動による細胞増殖抑制やそれに対する代償性の増殖性の反応、BDNF による PVALB 陽性介在ニューロンの増数を介した神経新生障害からの回復性が示唆された。

いずれのかび毒においても、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、CIT で 1 ppm (0.13–0.51 mg/kg 体重/日)、DAS で 0.6 ppm (0.09–0.29 mg/kg 体重/日)、STC で 5.0 ppm (0.34–0.85 mg/kg 体重/日) と判断された。

## 参考文献

- 1) Yamasaki M, Okada R, Takasaki C, Toki S, Fukaya M, Natsume R, Sakimura K, Mishina M, Shirakawa T, Watanabe M. Opposing role of NMDA receptor GluN2B and GluN2D in somatosensory development and maturation. *J Neurosci.* 2014; 34(35): 11534–11548.
- 2) von Engelhardt J, Bocklisch C, Tönges L, Herb A, Mishina M, Monyer H. GluN2D-containing NMDA receptors mediate synaptic currents in hippocampal interneurons and pyramidal cells in juvenile mice. *Front Cell Neurosci.* 2015; 9: 95.
- 3) 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.
- 4) Tanaka T, Abe H, Kimura M, Onda N, Mizukami S, Yoshida T, Shibutani M. Developmental

- exposure to T-2 toxin reversibly affects postnatal hippocampal neurogenesis and reduces neural stem cells and progenitor cells in mice. *Arch Toxicol.* 2016; 90(8): 2009–2024.
- 5) 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.
  - 6) Mohanty K, Dada R, Dada T. Oxidative DNA damage and reduced expression of DNA repair genes: Role in primary open angle glaucoma (POAG). *Ophthalmic Genet.* 2017; 38(5): 446–450.
  - 7) Jin K, Mao XO, Sun Y, Xie L, Greenberg DA. Stem cell factor stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *J Clin Invest.* 2002; 110(3): 311–319.
  - 8) Sun L, Lee J, Fine HA. Neuronally expressed stem cell factor induces neural stem cell migration to areas of brain injury. *J Clin Invest.* 2004; 113(9): 1364–1374.
  - 9) Ito M, Kawa Y, Ono H, Okura M, Baba T, Kubota Y, Nishikawa SI, Mizoguchi M. Removal of stem cell factor or addition of monoclonal anti-c-KIT antibody induces apoptosis in murine melanocyte precursors. *J Invest Dermatol.* 1999; 112(5): 796–801.
  - 10) Kavanagh JN, Redmond KM, Schettino G, Prise KM. DNA double strand break repair: a radiation perspective. *Antioxid Redox Signal.* 2013; 18(18): 2458–2472.
  - 11) Han W, Yu NK. Ionizing radiation, DNA double strand break and mutation. 2010. *Advances in Genetics Research.* Vol.4. chapter 7. 1–13.
  - 12) Mayura K, Smith EE, Clement BA, Harvey RB, Kubena LF, Phillips TD. Developmental toxicity of diacetoxyscirpenol in the mouse. *Toxicology.* 1987; 45(3): 245–255.
  - 13) Hassanane M, Abdalla E, El-Fiky S, Amer M, Hamdy A. Mutagenicity of the mycotoxin diacetoxyscirpenol on somatic and germ cells of mice. *Mycotoxin Res.* 2000; 16(1): 53–64.
  - 14) Okamura K, Nohara K. Long-term arsenite exposure induces premature senescence in B cell lymphoma A20 cells. *Arch Toxicol.* 2016; 90(4): 793–803.
  - 15) Piekna-Przybylska D, Sharma G, Maggirwar SB, Bambara RA. Deficiency in DNA damage response, a new characteristic of cells infected with latent HIV-1. *Cell Cycle.* 2017; 16(10): 968–978.
  - 16) Freund TF, Buzsáki G. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus.* 1996; 6(4): 347–470.
  - 17) Tozuka Y, Fukuda S, Namba T, Seki T, Hisatsune T. GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron.* 2005; 47(6): 803–815.
  - 18) 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.
  - 19) Campbell NR, Fernandes CC, Half 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.
  - 20) Gong C, Wang TW, Huang HS, Parent JM. Reelin regulates neuronal progenitor migration in intact and epileptic hippocampus. *J Neurosci.* 2007; 27(8): 1803–1811.
  - 21) Toesca A, Geloso MC, Mongiovi AM, Furno A,

- Schiattarella A, Michetti F, Corvino V. Trimethyltin Modulates Reelin Expression and Endogenous Neurogenesis in the Hippocampus of Developing Rats. *Neurochem Res.* 2016; 41(7): 1559–1569.
- 22) Sibbe M, Kulik A. GABAergic Regulation of Adult Hippocampal Neurogenesis. *Mol Neurobiol.* 2017; 54: 5497–5510.
- 23) Dong E, Caruncho H, Liu WS, Smalheiser NR, Grayson DR, Costa E, Guidotti A. A reelin-integrin receptor interaction regulates Arc mRNA translation in synaptoneuroosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(9): 5479–5484.
- 24) Kuipers SD, Tiron A, Soule J, Messaoudi E, Trentani A, Bramham CR. Selective survival and maturation of adult-born dentate granule cells expressing the immediate early gene Arc/Arg3.1. *PLoS One.* 2009; 4(3): e4885.
- 25) Jakob B, Kochlamazashvili G, Jäpel M, Gauhar A, Bock HH, Maritzen T, Haucke V. Intersectin 1 is a component of the Reelin pathway to regulate neuronal migration and synaptic plasticity in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017; 114(21): 5533–5538.
- 26) 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 APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mouse model of Alzheimer disease together with disruption of hippocampal neurogenesis. *Exp Gerontol.* 2015; 69: 176–188.
- 27) Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9(3): 153–166.
- 28) 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.
- 29) 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.
- 30) 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.
- 31) Pitler TA, Alger BE. Cholinergic excitation of GABAergic interneurons in the rat hippocampal slice. *J Physiol.* 1992; 450: 127–142.
- 32) 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.
- 33) 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.
- 34) 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.
- 35) 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.
- 36) 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.

- 37) 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.
- 38) 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.
- 39) 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、渡邊 洋佑、水上 さやか、猪鼻 真理、吉田 敏則、小西 良子、渋谷 淳：シトレオピリ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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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：かび毒シトレオピ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：BO-33、P. 309、9月  
11-13日、2018

- 6) 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

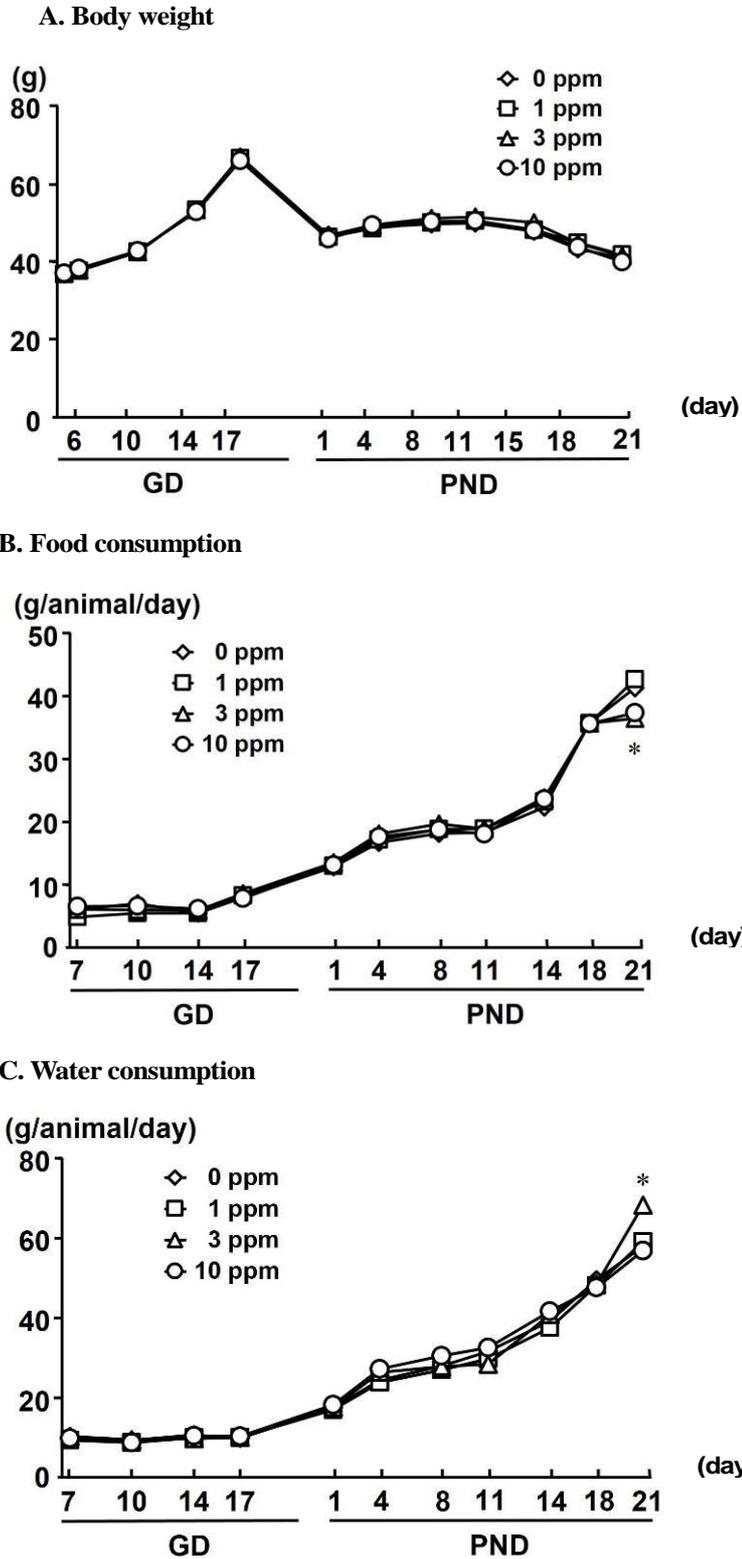
**Table 1. Primary antibodies and experimental conditions used in immunohistochemistry**

Antigen	Abbreviated name	Host species	Clonality	Clone number	Dilution	Antigen retrieval condition	Manufacturer
Activity-regulated cytoskeleton-associated protein	ARC	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:300	Autoclaving, pH 6.0 <sup>a</sup>	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, USA)
Calbindin-D-28K	CALB1	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	CB-955	1:500	Microwaving, pH 6.0 <sup>b</sup>	Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
Calbindin-D-29K (Calretinin)	CALB2	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	CRT01/O.N.40	1:100	Microwaving, pH 6.0	LifeSpan Biosciences, Inc. (Seattle, WA, USA)
Cyclooxygenase-2	COX2	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	33/Cox-2	1:200	Autoclaving, pH 9.0 <sup>c</sup>	BD Biosciences, Inc. (San Jose, CA, USA)
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	EMD Millipore (Billerica, MA, USA)
Glutamate receptor 1 (AMPA subtype)	GRIA1	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:1000	Autoclaving, pH 6.0	Abcam Inc.
Glutamate receptor – ionotropic (NMDA receptor)	GRIN2D	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:100	Autoclaving, pH 9.0	LifeSpan Biosciences, Inc.
Neuron-specific nuclear protein	NeuN	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	A60	1:100	None	EMD Millipore
Parvalbumin	PVALB	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	PARV-19	1:1000	Microwaving, pH 6.0	EMD Millipore
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.
Somatostatin	SST	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:500	Microwaving, pH 6.0	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 <sub>2a</sub>	TuJ-1	1:500	Microwaving, pH 6.0	Abcam Inc.

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

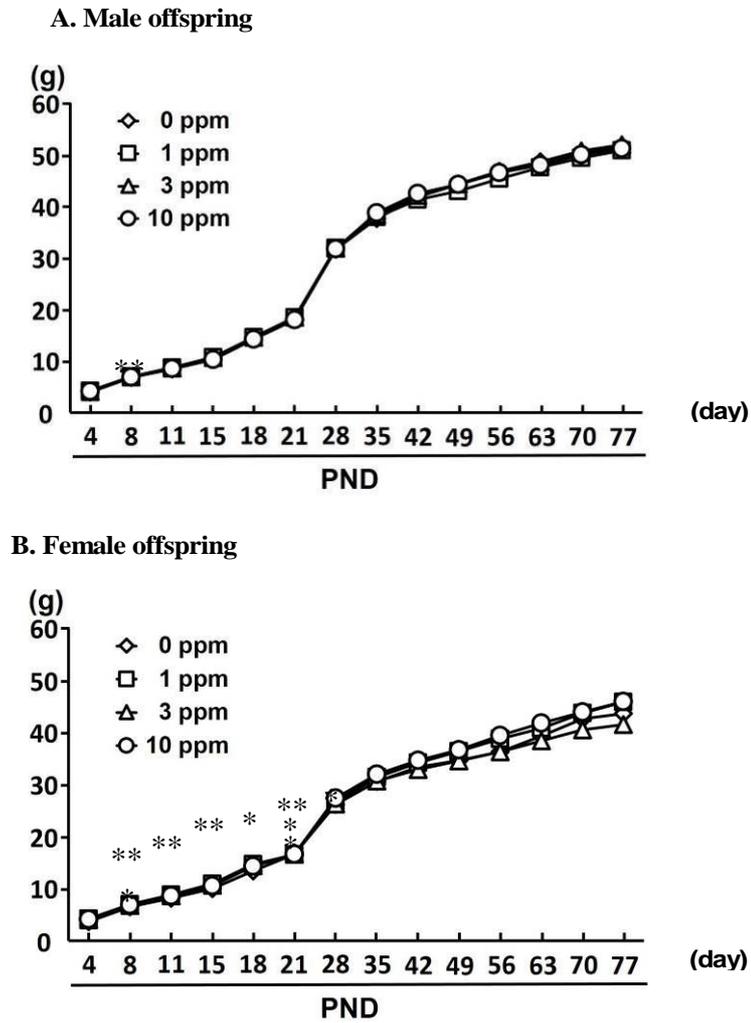
<sup>b</sup> Microwaving at 90°C for 10 min in 10 mM citrate buffer (pH 6.0).

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



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

\*  $P < 0.05$ , significantly different from untreated controls by Dunnett's or Steel's test.



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

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , significantly different from untreated controls by Dunnett's or Steel's test.

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

	No. of dams	Citreoviridin (ppm)			
		0 (Control)	1	3	10
		9	10	10	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) <sup>a</sup>		6.63±0.82	6.04±0.42	6.68±0.70	6.80±1.48
Food intake (PND, g/animal/day) <sup>a</sup>		23.63±1.21	24.22±1.39	24.05±1.22	23.47±1.59
Water consumption (GD, g/animal/day) <sup>a</sup>		9.89±0.86	9.56±1.13	9.96±1.15	9.98±1.15
Water consumption (PND, g/animal/day) <sup>a</sup>		35.46±5.37	34.67±3.81	36.82±3.47	36.40±4.18
Citreoviridin intake					
GD, mg/kg body weight/day <sup>a</sup>		0	0.13±0.01	0.42±0.05	1.46±0.43
PND, mg/kg body weight/day <sup>a</sup>		0	0.51±0.02	1.51±0.11	5.02±0.37

Mean ± SD.

<sup>a</sup> Mean value of each week.

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

**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 <sup>a</sup>	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 <sup>*</sup>	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 <sup>*</sup>	0.13±0.02	0.12±0.01
	Relative (g/100g BW)	0.70±0.04	0.79±0.06 <sup>**</sup>	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 <sup>*</sup>	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.

<sup>a</sup> Mean ± SD.

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

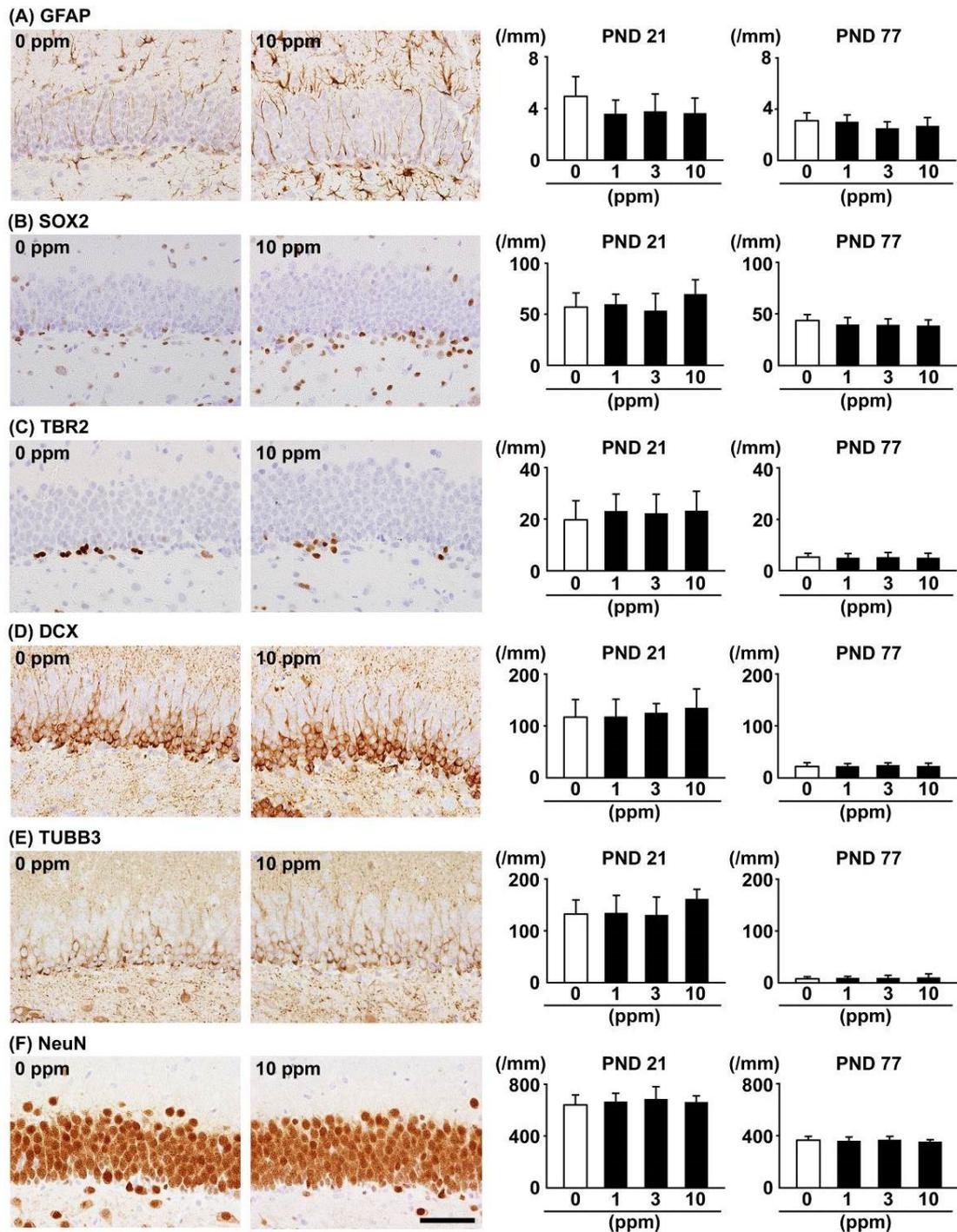
**Table 4. Histopathological findings of dams exposed to citreoviridin from gestation day 6 to day 21 after delivery**

	Citreoviridin in diet (ppm)			
	0 (Control)	1	3	10
No. of dams examined	9	10	10	10
Brain				
Abnormalities detected	0 <sup>a</sup>	0	0	0
Liver				
Abnormalities detected	0 <sup>a</sup> (0/0/0) <sup>b</sup>	2 (2/0/0)	3 (2/1/0)	4 (2/2/0) <sup>†</sup>
Kidney				
Abnormalities detected	0	0	0	0

<sup>a</sup> Total number of animals that exhibited abnormality.

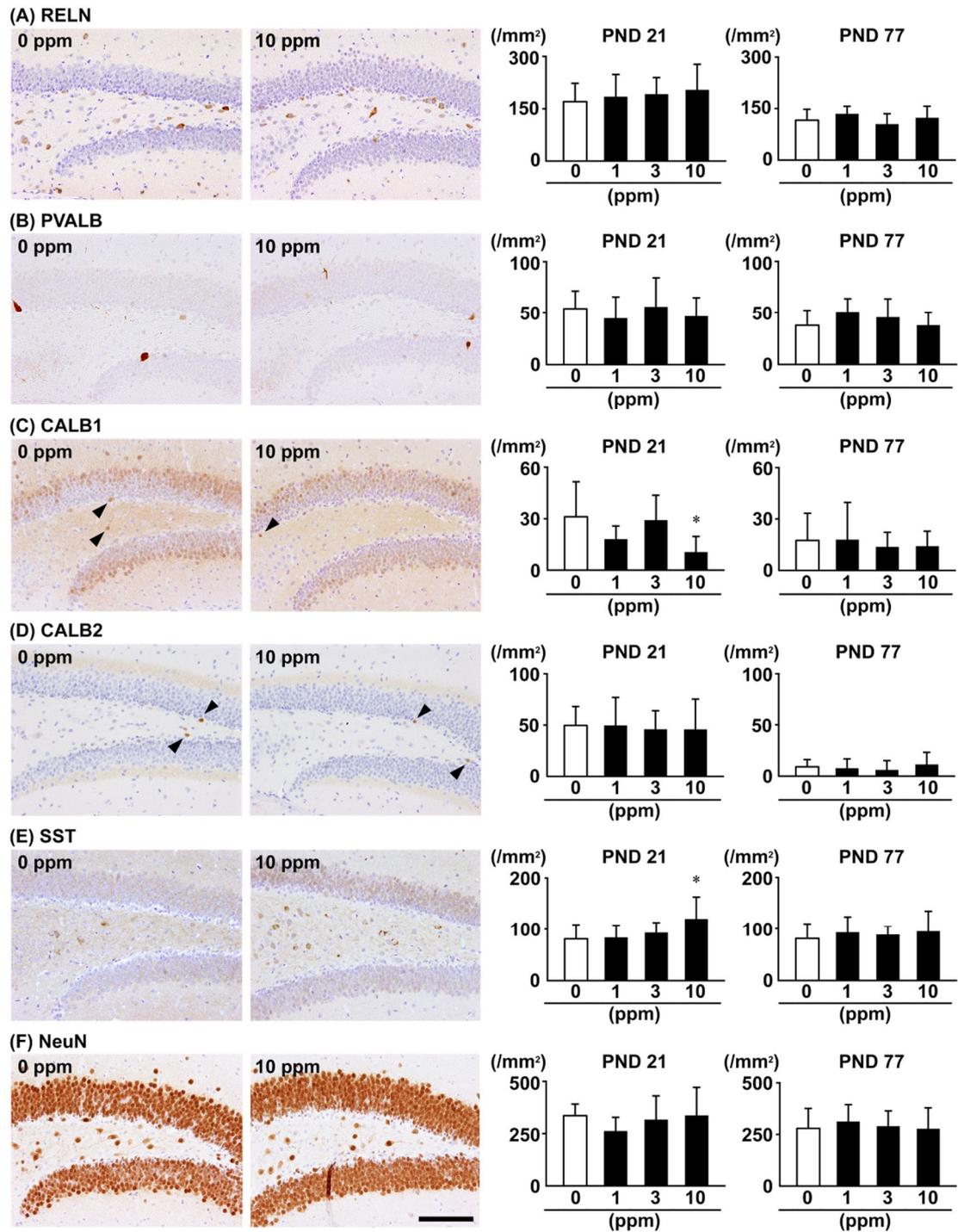
<sup>b</sup> Number of animals with each grade (grade 1/grade 2/grade 3). The degree of abnormalities: grade 1, slight; grade 2, moderate; grade 3, marked.

<sup>†</sup>  $P < 0.05$ , significantly different from 0-ppm controls by 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

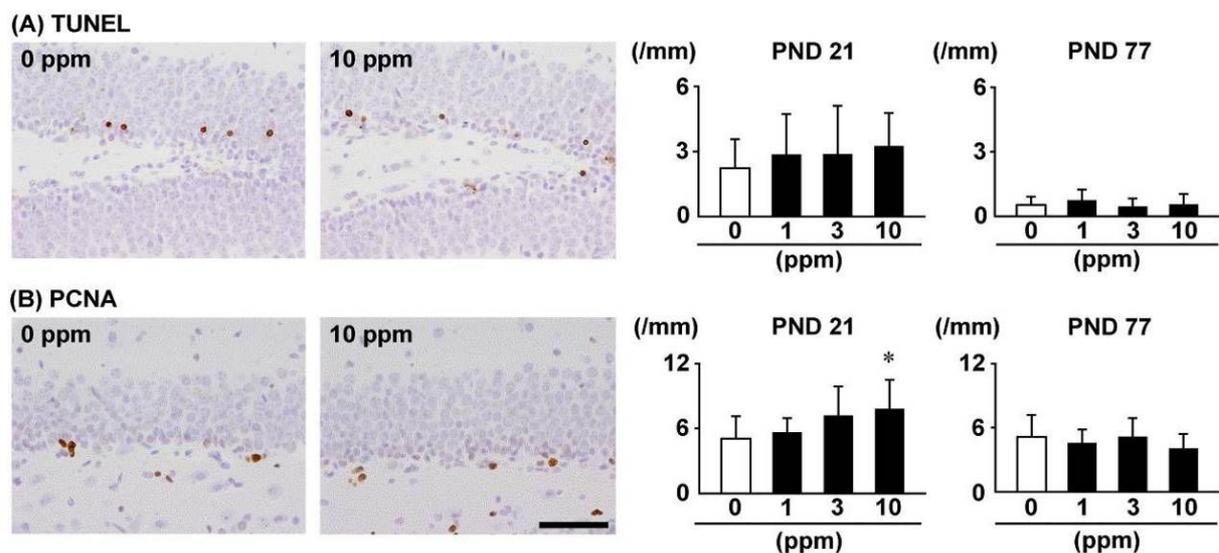
SGZ. (F) Neuron-specific nuclear protein (NeuN) in the GCL. Representative images from 0 ppm controls and the 10 ppm group at PND 21 are shown. Magnification: 400 $\times$ ; bar = 50  $\mu$ m. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit length (mm) of the SGZ or GCL of the bilateral sides. Values are expressed as mean + 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 (RELN). (B) Parvalbumin (PVALB). (C) Calbindin (CALB1), arrowheads indicate immunoreactive cells. (D) Calretinin (CALB2), arrowheads indicate immunoreactive cells. (E) Somatostatin (SST). (F) NeuN. Representative images from 0 ppm controls and the 10 ppm group at PND 21 are shown. Magnification: 200 $\times$ ; bar = 100  $\mu$ m. Graphs show the number of

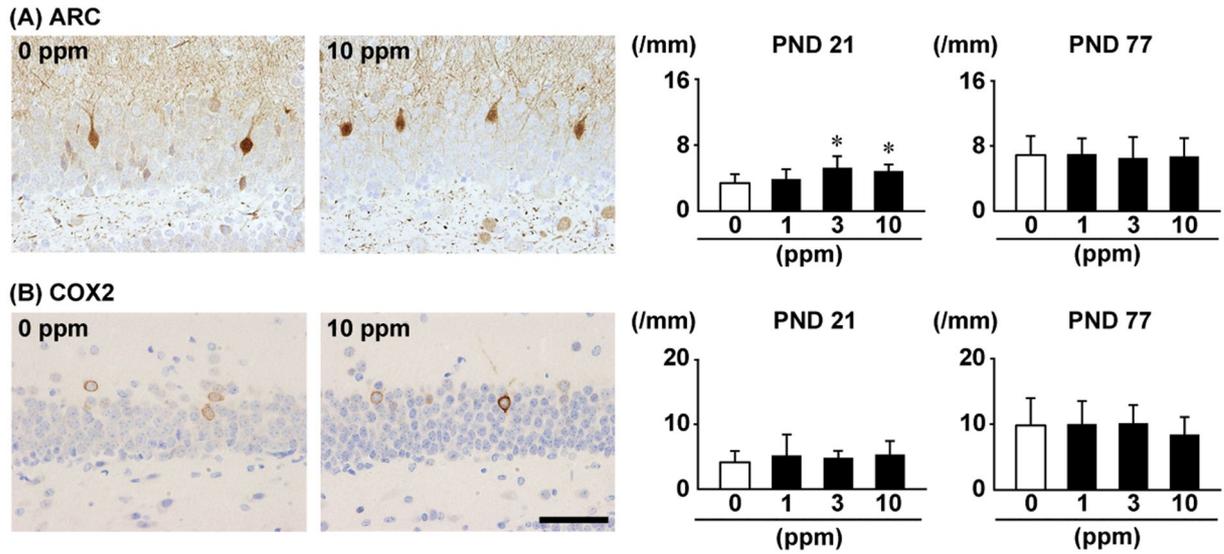
immunoreactive cells/unit area (mm<sup>2</sup>) of the hilus of bilateral hemispheres. Values are expressed as the mean + SD. N = 8-10/group (0 ppm controls and 10 ppm citreoviridin 9; 1 ppm citreoviridin, 10; 3 ppm citreoviridin, 8).

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



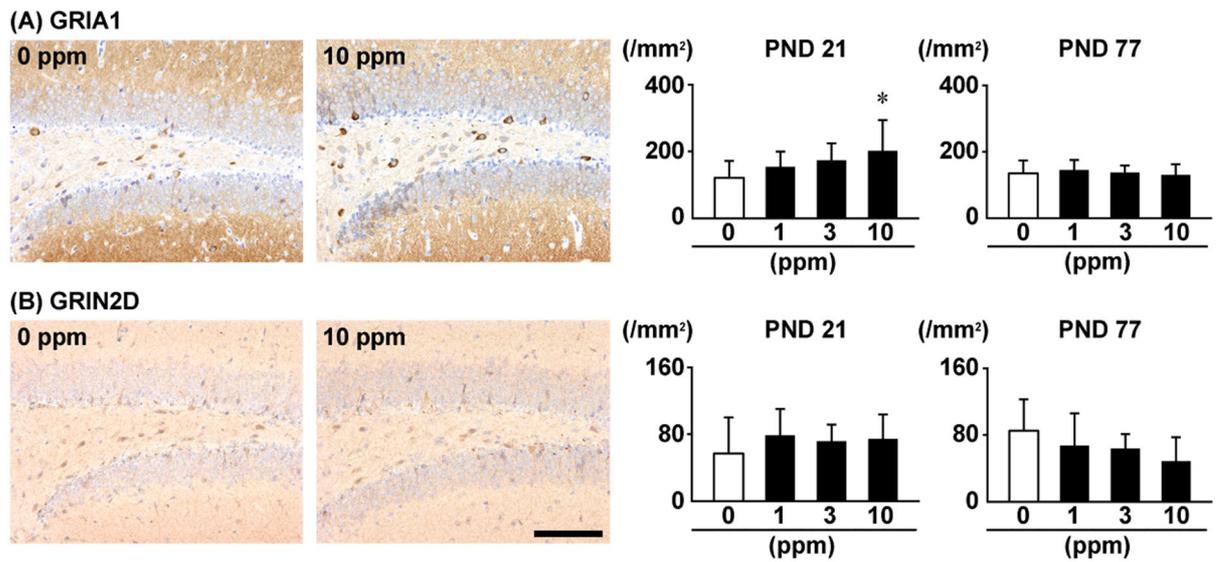
**Figure 5. Distribution and number of apoptotic and proliferating cells in the SGZ of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to citreoviridin.** (A) Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL). (B) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Representative images from 0 ppm controls and the 10 ppm group at PND 21 are shown. Magnification: 400 $\times$ ; bar = 50  $\mu$ m. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit length (mm) of the SGZ of the bilateral sides. Values are expressed as the mean + 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 Dunnett's test or Steel's test.



**Figure 6. Distribution and number of synaptic plasticity in the GCL of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to citreoviridin.** (A) Activity-regulated cytoskeleton-associated protein (ARC). (B) Cyclooxygenase-2 (COX2). Representative images from 0 ppm controls and the 10 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 + 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 Dunnett's test or Steel's test.



**Figure 7. Distribution and number of glutamate receptors in the hilus of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to citreoviridin.** (A) Glutamate receptor, ionotropic, AMPA1 (alpha 1) (GRIA1). (B) Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2D (GRIN2D). Representative images from 0 ppm controls and the 10 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 the 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 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>Gfap</i>	1.01±0.15 <sup>a</sup>	1.05±0.32	1.40±0.22 **	1.73±0.30 **
<i>Sox2</i>	1.03±0.23	1.01±0.18	1.12±0.20	1.38±0.19 **
<i>Pax6</i>	1.16±0.66	1.12±0.59	1.44±0.67	1.81±0.90
<i>Dpysl3</i>	1.01±0.18	1.03±0.24	0.94±0.17	1.16±0.22
<i>Eomes</i>	1.08±0.43	1.13±0.51	3.70±1.24 **	4.51±1.39 **
<i>Neurod1</i>	1.07±0.35	1.11±0.42	1.70±0.45 *	2.12±0.63 **
<i>Dcx</i>	1.02±0.19	1.02±0.18	1.59±0.30 **	1.99±0.51 **
Interneuron and mossy cell markers				
<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
<i>Calb1</i>	1.04±0.33	1.04±0.30	1.08±0.27	1.34±0.36
<i>Sst</i>	1.02±0.23	1.05±0.33	1.55±0.31 **	1.91±0.39 **
Neurotrophin-related markers				
<i>Bdnf</i>	1.04±0.31	1.02±0.23	1.34±0.37	1.68±0.52 **
<i>Ntrk2</i>	1.00±0.06	1.01±0.18	1.14±0.13 *	1.41±0.23 **
Synaptic plasticity-related markers				
<i>Arc</i>	1.08±0.43	1.15±0.55	2.03±0.77 *	2.51±0.86 **
<i>Fos</i>	1.04±0.34	1.04±0.31	1.00±0.54	1.27±0.77
<i>Ptgs2</i>	1.08±0.40	1.03±0.25	1.15±0.47	1.42±0.58
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>Chrn2</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:* *Arc*, activity regulated cytoskeletal-associated protein; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Calb1*, calbindin 1; *Chrna4*, cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 4; *Chrna7*, cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 7; *Chrn2*, cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 2 (neuronal); *Dcx*, doublecortin; *Dpysl3*, dihydropyrimidinase-like 3, also known as *Tuc4*; *Eomes (Tbr2)*, eomesodermin homolog; *Fos*, FBJ osteosarcoma oncogene; *Gapdh*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *Gfap*, grail fibrillary acidic protein; *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 phosphoribosyl transferase; *Neurod1*, neurogenic

differentiation 1; *Ntrk2*, neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type2; *Ptgs2*, prostaglandin-endoperoxide synthase 2; *Pax6*, paired box 6; PND, postnatal day; *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*, SRY (sex determining region Y)-box 2; *Sst*, somatostatin.<sup>a</sup> Mean  $\pm$  SD. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from 0-ppm control by 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>Gfap</i>	1.01±0.18 <sup>a</sup>	1.01±0.13	0.66±0.16 **	0.78±0.13 *
<i>Sox2</i>	1.01±0.11	1.00±0.09	0.75±0.24 *	0.88±0.19
<i>Pax6</i>	1.02±0.21	1.01±0.11	0.71±0.14 *	0.85±0.16
<i>Dpysl3</i>	1.02±0.20	1.02±0.22	0.92±0.15	1.10±0.16
<i>Eomes</i>	1.27±0.99	1.27±1.04	0.25±0.44 *	0.28±0.49
<i>Neurod1</i>	1.07±0.39	1.06±0.33	0.39±0.17 **	0.46±0.16 **
<i>Dcx</i>	1.02±0.25	1.02±0.21	0.63±0.17 **	0.74±0.11 *
Interneuron and mossy cell markers				
<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
<i>Calb1</i>	1.01±0.14	1.00±0.08	0.58±0.24 *	0.68±0.22
<i>Sst</i>	1.05±0.38	1.06±0.40	1.46±0.50	1.74±0.54 *
Neurotrophin-related markers				
<i>Bdnf</i>	1.05±0.35	1.03±0.26	0.35±0.15 **	0.41±0.13 **
<i>Ntrk2</i>	1.01±0.16	1.01±0.17	0.94±0.15	1.12±0.17
Synaptic plasticity-related markers				
<i>Arc</i>	1.14±0.67	1.13±0.68	0.64±0.43	0.74±0.45
<i>Fos</i>	1.04±0.33	1.05±0.37	0.61±0.15 *	0.73±0.21
<i>Ptgs2</i>	1.05±0.12	1.00±0.03	0.90±0.22	1.08±0.27
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>Grin2a</i>	1.04±0.35	1.03±0.25	0.66±0.16 *	0.78±0.14
<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>Chrnb2</i>	1.01±0.12	1.01±0.16	1.42±0.19 **	1.70±0.27 **

*Abbreviations:* *Arc*, activity regulated cytoskeletal-associated protein; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Calb1*, calbindin 1; *Chrna4*, cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 4; *Chrna7*, cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 7; *Chrnb2*, cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 2 (neuronal); *Dcx*, doublecortin; *Dpysl3*, dihydropyrimidinase-like 3, also known as *Tuc4*; *Eomes (Tbr2)*, eomesodermin homolog; *Fos*, FBJ osteosarcoma oncogene; *Gapdh*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *Gfap*, grail fibrillary acidic protein; *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; *Neurod1*, neurogenic differentiation 1; *Ntrk2*, neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type2; *Ptgs2*, prostaglandin-endoperoxide synthase 2; *Pax6*, paired box 6; PND, postnatal day; *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; *Sox2*, SRY (sex determining region Y)-box 2; *Sst*, somatostatin.

<sup>a</sup> Mean  $\pm$  SD.

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

**Table 7. 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.	1:2000	Microwaving, pH 6.0 <sup>a</sup>	Synaptic Systems, GmbH. (Goettingen, Germany)
Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	p21CIP1/WAF1	Mouse	Monoclonal IgG2b	CP74	1:500	Autoclaving, pH 9.0 <sup>b</sup>	Abcam plc
Cyclooxygenase-2	COX2	Mouse	Monoclonal IgG1	33/Cox-2	1:200	Autoclaving, pH 9.0 <sup>b</sup>	BD Biosciences, Inc. (San Jose, CA, USA)
Doublecortin	DCX	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:1000	None	Abcam plc (Cambridge, UK)
FBL osteosarcoma oncogene	FOS	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:500	None	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, USA)
Gamma-H2A histone family member X (phospho Ser139)	$\gamma$ -H2AX	Rabbit	Monoclonal IgG	EP854(2) Y	1:3000	Autoclaving, pH 6.0 <sup>c</sup>	Abcam plc
Glial fibrillary acidic protein	GFAP	Mouse	Monoclonal IgG1	GA5	1:200	None	Merck Millipore (Burlington, MA, USA)
4-Hydroxynonenal	4-HNE	Mouse	Monoclonal IgG1 $\kappa$	HNE-J2	1:100	Autoclaving, pH 9.0 <sup>d</sup>	Japan Institute for the Control of Aging (Shizuoka, Japan)
Malondialdehyde	MDA	Mouse	Monoclonal IgG2	1F83	1:200	Autoclaving, pH 9.0 <sup>d</sup>	Japan Institute for the Control of Aging
Metallothionein-I/II	MT-I/II	Mouse	Monoclonal IgG1	E9	1:100	Autoclaving, pH 6.0 <sup>e</sup>	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
Neuron-specific nuclear protein	NeuN	Mouse	Monoclonal IgG1	A60	1:100	None	Merck Millipore
Parvalbumin	PVALB	Mouse	Monoclonal IgG1	PARV-19	1:1000	Microwaving, pH 6.0 <sup>a</sup>	Merck Millipore
Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	Mouse	Monoclonal IgG2a	PC10	1:200	None	Agilent Technologies
Reelin	RELN	Mouse	Monoclonal IgG1	G10	1:1000	None	Novus Biologicals, Inc. (Littleton, CO, USA)
Sex determining region Y (SRY)-box 2	SOX2	Mouse	Monoclonal IgG1	9-9-3	1:4000	None	Abcam plc
Somatostatin	SST	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:500	Microwaving, pH 6.0 <sup>a</sup>	Abcam plc
T box brain 2	TBR2	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:500	Autoclaving, pH 6.0 <sup>c</sup>	Abcam plc

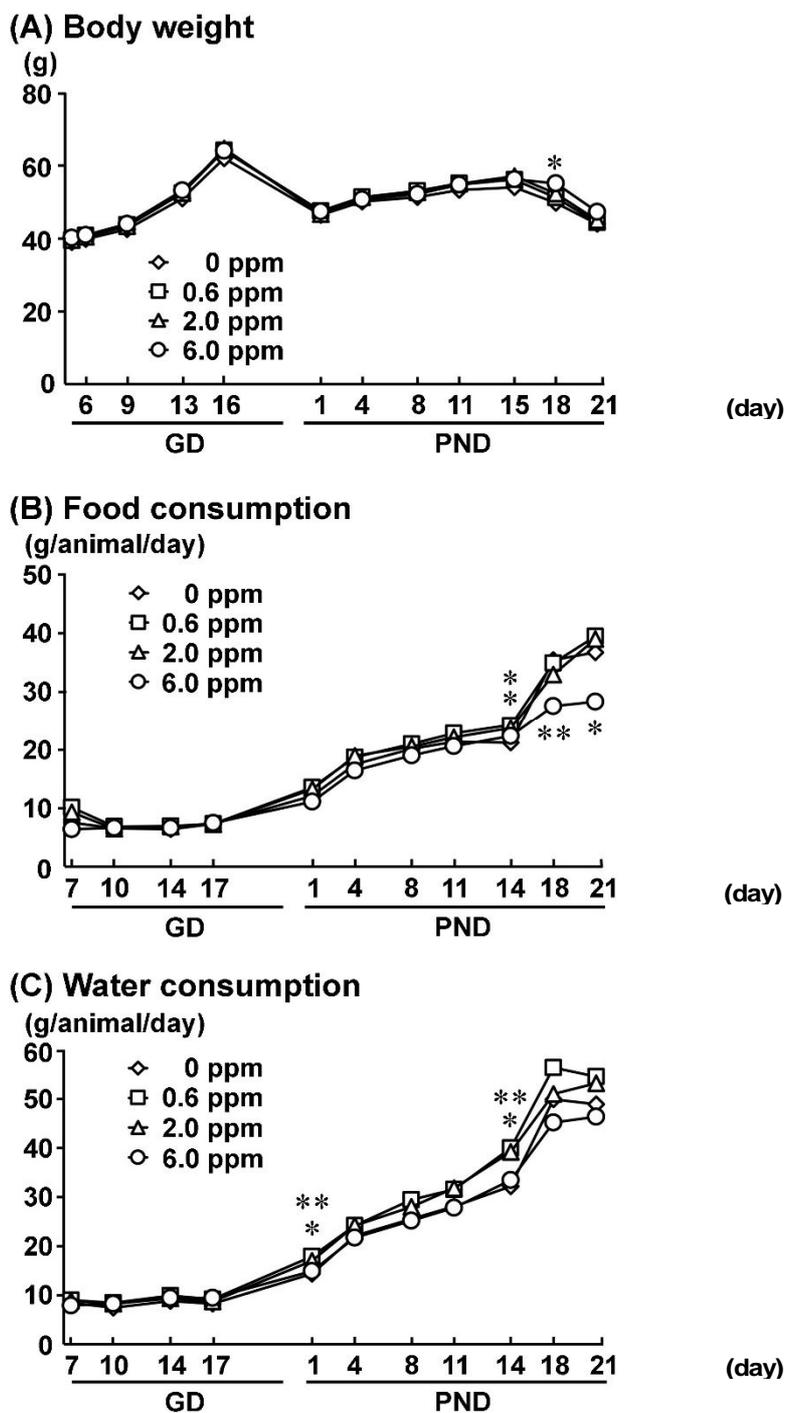
<sup>a</sup> Microwaving at 90°C for 10 min in 10 mM citrate buffer (pH 6.0).

<sup>b</sup> Autoclaving at 121 °C for 10 min in Target Retrieval Solution (pH 9.0; Dako).

<sup>c</sup> Autoclaving at 121 °C for 6 min in Target Retrieval Solution (pH 9.0; Dako).

<sup>d</sup> Autoclaving at 121 °C for 15 min in 10 mM citrate buffer (pH 6.0).

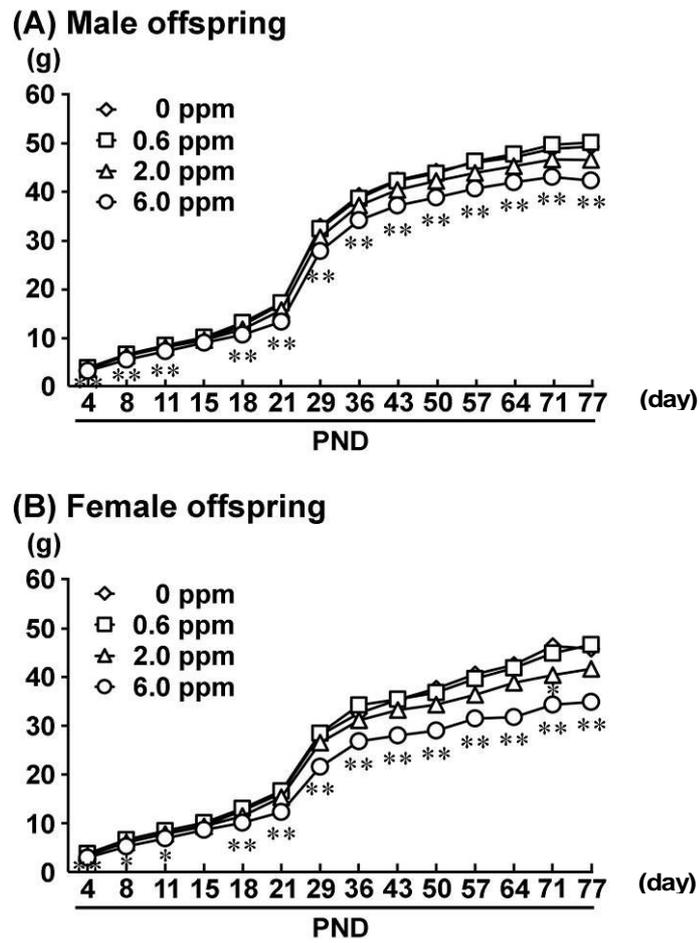
<sup>e</sup> Autoclaving at 121 °C for 10 min in 10 mM citrate buffer (pH 6.0).



**Figure 8. 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.

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , significantly different from untreated controls by Dunnett's or Steel's test.



**Figure 9. Body weight of male and female offspring exposed to diacetoxyscirpenol at postnatal day.**

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

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , significantly different from untreated controls by Dunnett's or Steel's test.

**Table 8. Reproductive and general parameters of dams given diacetoxyscirpenol from GD 6 to PND****21**

	No. of dams examined	Diacetoxyscirpenol (ppm)			
		0 (Control)	0.6	2.0	6.0
	10	13	13	12	
<b>Reproductive parameters</b>					
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
<b>General parameters on GD</b>					
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) <sup>a</sup>		6.98±0.61	7.00±0.73	7.16±1.19	6.77±1.12
Water consumption (g/animal/day) <sup>a</sup>		8.23±1.04	9.10±1.81	8.80±0.99	8.74±1.82
<b>General parameters on PND</b>					
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) <sup>a</sup>		23.47±1.84	24.92±1.48	23.84±2.09	20.76±2.30
Water consumption (g/animal/day) <sup>a</sup>		31.57±1.87	36.31±4.82	34.91±4.53	30.64±4.90
<b>Body and organ weights at PND 22</b>					
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**
<b>Diacetoxyscirpenol intake (mg/kg BW/day)</b>					
GD, mg/kg body weight/day <sup>a</sup>		0	0.09±0.01	0.30±0.04	0.84±0.15
PND, mg/kg body weight/day <sup>a</sup>		0	0.29±0.02	0.93±0.10	2.40±0.26

Mean ± SD.

<sup>a</sup> Mean value of each week.*Abbreviation:* BW; body weight, GD; gestation day, PND; postnatal day.\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , significantly different from untreated controls by Dunnett's or Steel's test.

**Table 9. Body and organ weights at the prepubertal and terminal necropsies of offspring**

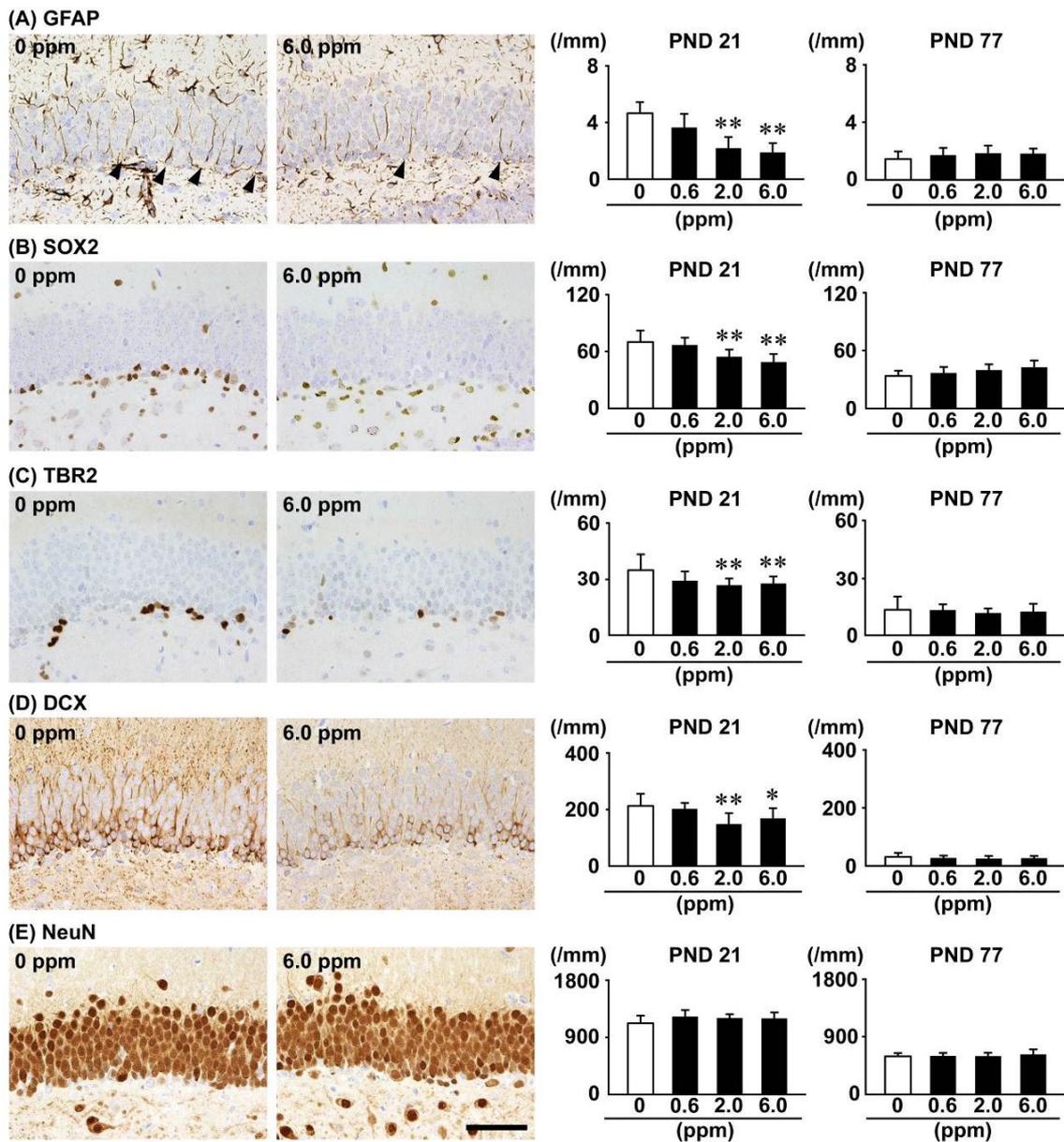
		Diacetoxyscirpenol in diet (ppm)			
		0 (Control)	0.6	2.0	6.0
<b>Male offspring on PND 21</b>					
No. of animals examined		30	39	40	32
Body weight (g)		16.85±1.37 <sup>a</sup>	17.13±1.67	15.59±2.12	13.26±1.28 **
<b>Organ weight</b>					
Brain	Absolute (g)	0.44±0.04	0.45±0.02	0.43±0.02	0.39±0.02 **
	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 **
<b>Female offspring on PND 21</b>					
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 **
<b>Organ weight</b>					
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
<b>Male offspring on PND 77</b>					
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 **
<b>Organ weight</b>					
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 **
<b>Female offspring on PND 77</b>					
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 **
<b>Organ weight</b>					
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

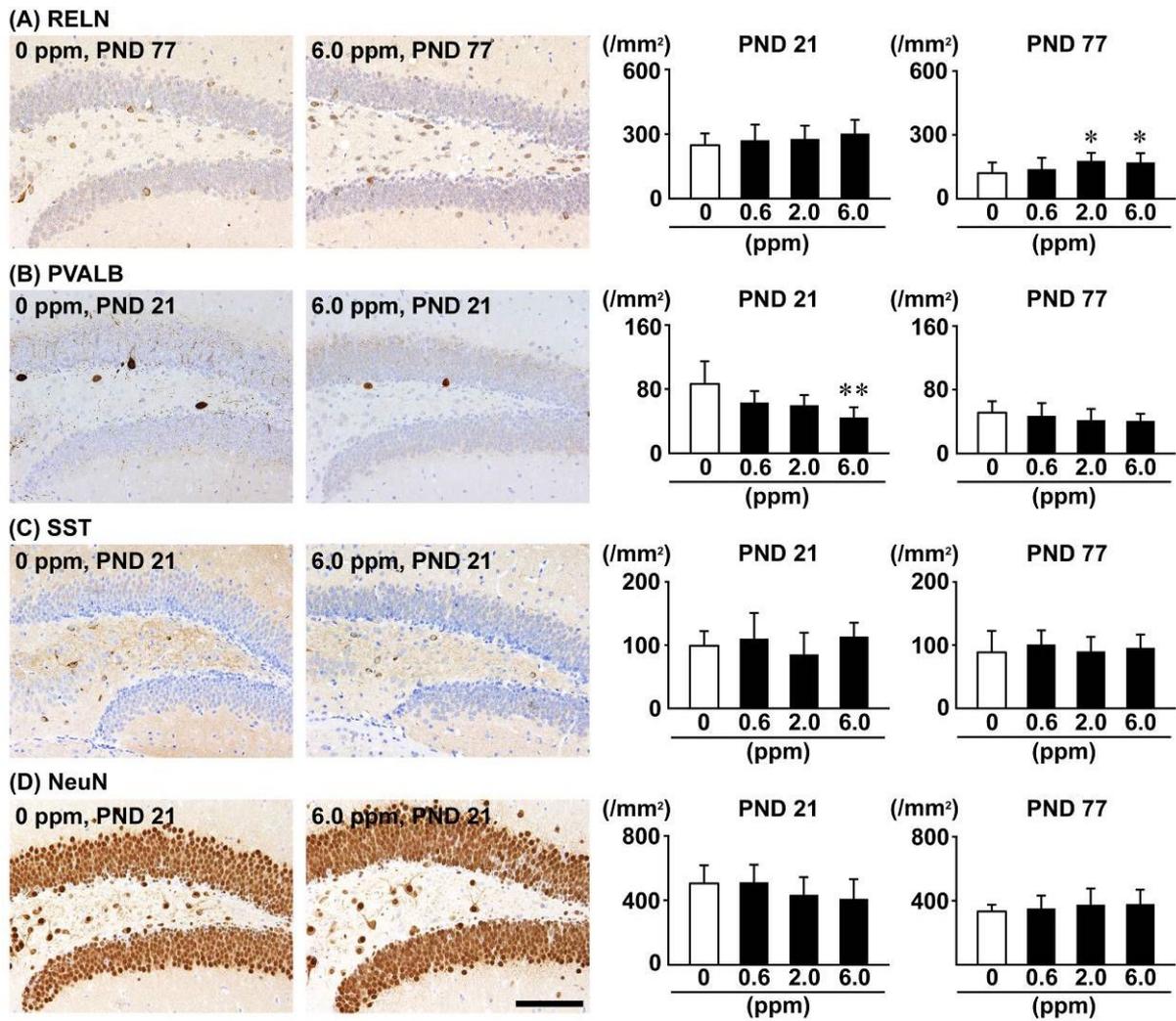
*Abbreviations:* BW, body weight; PND, postnatal day.

<sup>a</sup> Mean ± SD.

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , significantly different from untreated controls by Dunnett's or Steel's test.

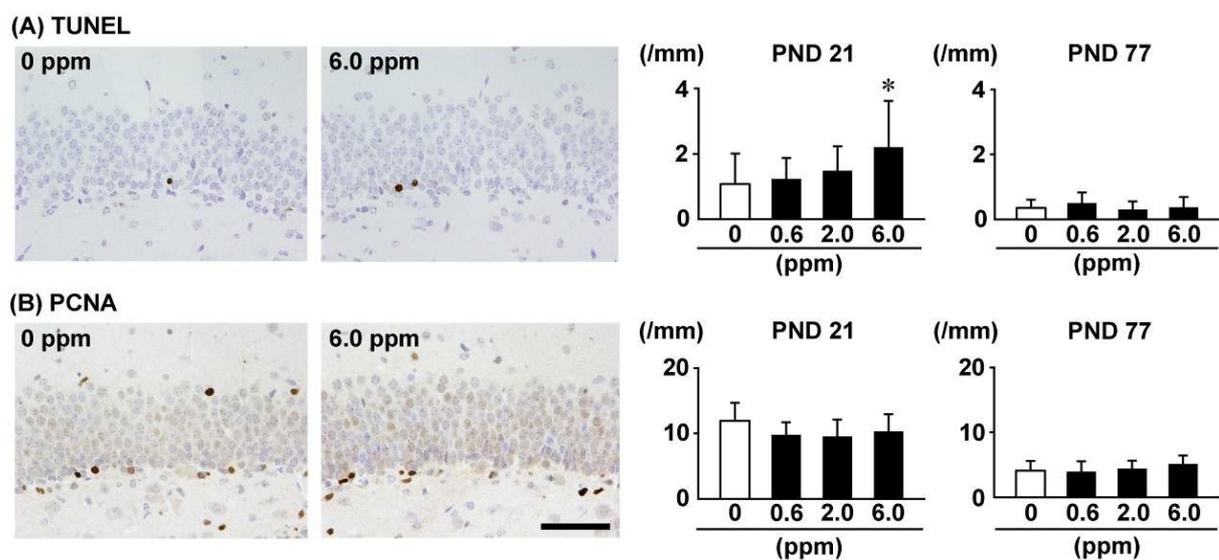


**Figure 10. Distribution and number of immunoreactive cells for neuronal stage-defining markers of granule cell lineages in the subgranular zone (SGZ), and a mature neuronal marker in the granule cell layer (GCL) of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to diacetoxyscirpenol.** (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  $\mu$ 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 + SD. N = 9-10/group (0 ppm control in PND 21, N=9; the other groups are N=10). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , significantly different from untreated controls by Dunnett's or Steel's test.



**Figure 11. 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) Somatostatin (SST). (D) NeuN. Representative images from 0 ppm control and the 6.0 ppm group at PND 21 are shown. Magnification: 200 $\times$ ; bar = 100  $\mu$ m. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit area ( $\text{mm}^2$ ) 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).

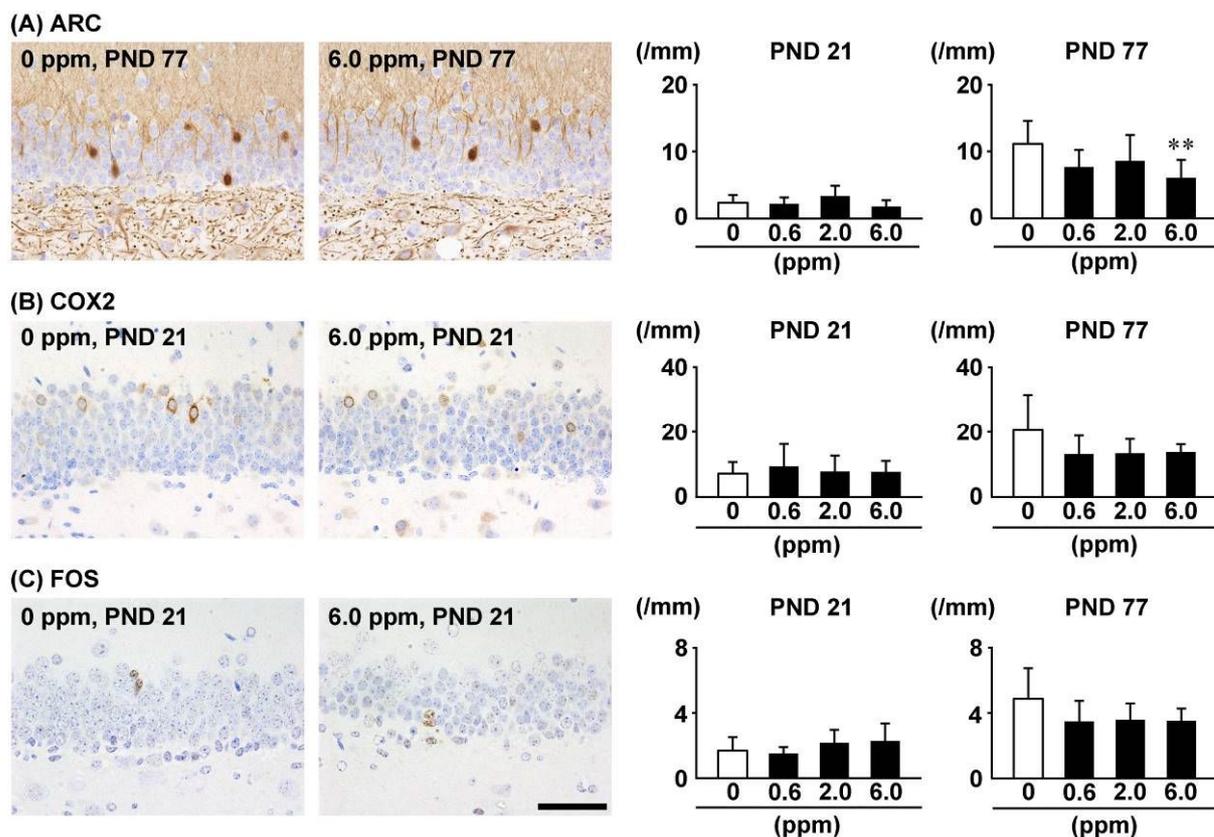
\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , significantly different from untreated controls by Dunnett's or Steel's test.



**Figure 12. 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.**

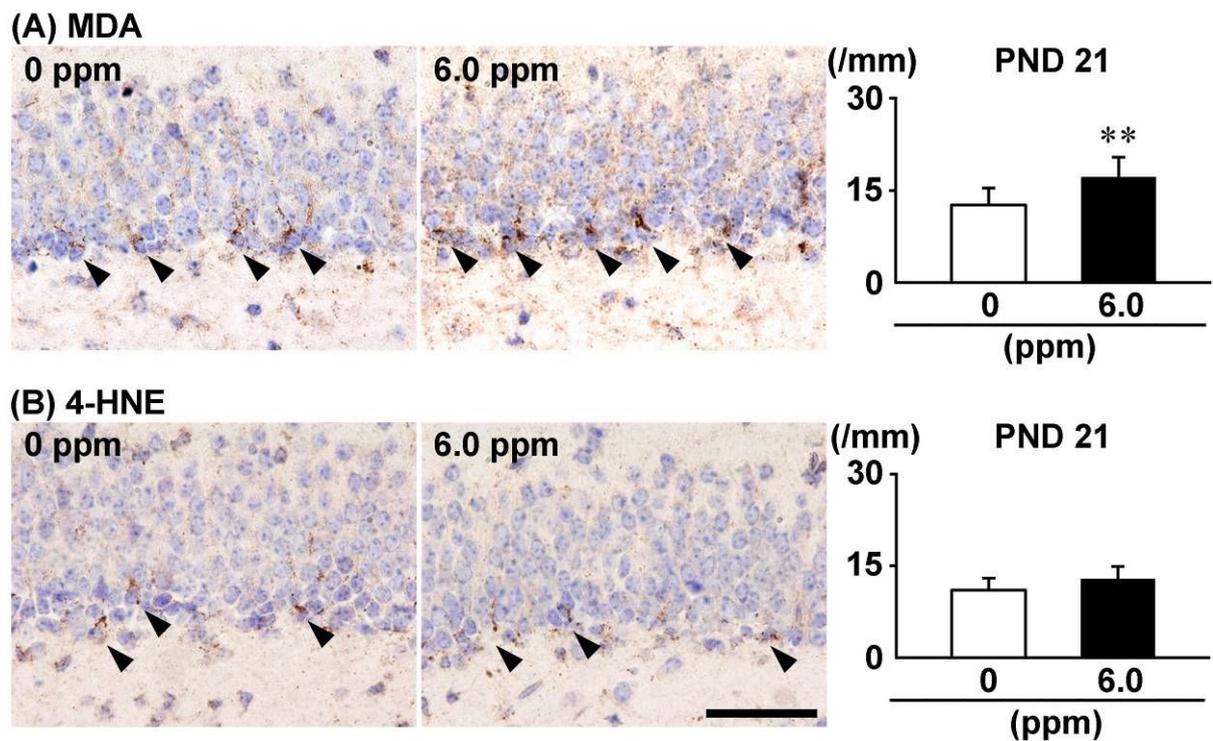
(A) Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL). (B) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Representative images from 0 ppm control and the 6.0 ppm group at PND 21 are shown. Magnification: 400 $\times$ ; bar = 50  $\mu$ m. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit length (mm) of the SGZ of the bilateral sides. Values are expressed as the mean + SD. N = 9-10/group (0 ppm control in PND 21, N=9; the other groups are N=10).

\*  $P < 0.05$ , significantly different from untreated controls by Dunnett's or Steel's test.



**Figure 13. 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). (C) FBL osteosarcoma oncogene (FOS). Representative images from 0 ppm control and the 6.0 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 + SD. N = 9-10/group (0 ppm control in PND 21, N=9; the other groups are N=10).

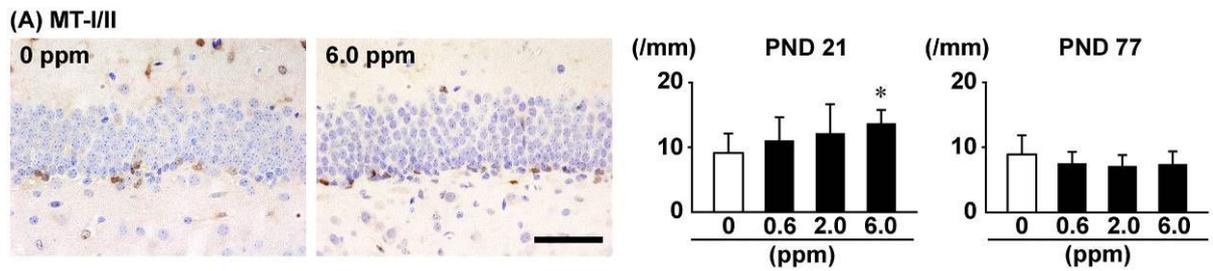
\*\*  $P < 0.01$ , significantly different from untreated controls by Dunnett's or Steel's test.



**Figure 14. 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 diacetoxyscirpenol.**

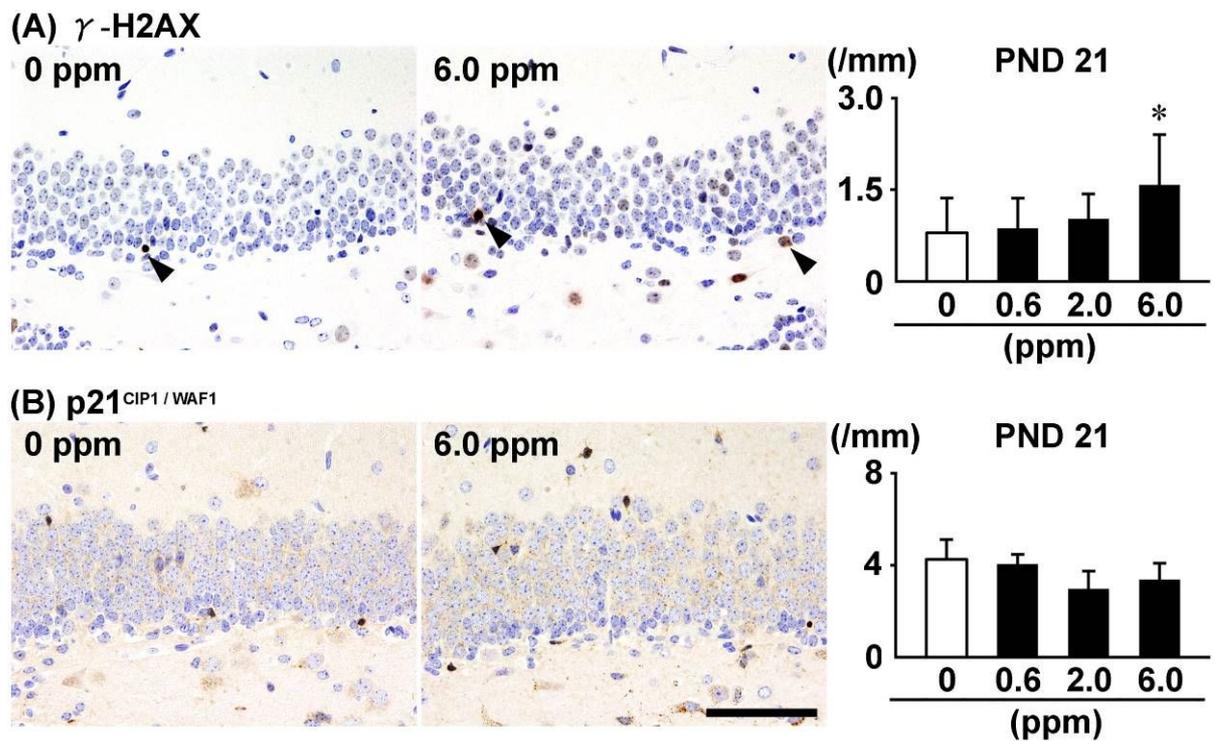
(A) Malondialdehyde (MDA). (B) 4-Hydroxynonenal (4-HNE). Representative images from 0 ppm control and the 6.0 ppm group at PND 21 are shown. Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification: 600 $\times$ ; bar = 40  $\mu$ m. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit length (mm) of the SGZ of the bilateral sides. Values are expressed as the mean + SD. N = 9-10/group (0 ppm control in PND 21, N=9; 6.0 ppm group in PND 21, N=10).

\*\*  $P < 0.01$ , significantly different from untreated controls by Student's  $t$ -test or Aspin-Welch's  $t$ -test.



**Figure 15. Distribution and number of immunoreactive cells for metallothionein-I/II in the SGZ of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to diacetoxyscirpenol.** (A) Metallothionein-I/II (MT-I/II). Representative images from 0 ppm control and the 6.0 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 + SD. N = 9-10/group (0 ppm control in PND 21, N=9; the other groups are N=10).

\*  $P < 0.05$ , significantly different from untreated controls by Dunnett's or Steel's test.



**Figure 16. Distribution and number of immunoreactive cells for marker of DNA damage and cell cycle related protein in the SGZ and GCL of the hippocampal dentate gyrus of male offspring at PND 21.** (A) gamma-H2A histone family, member X ( $\gamma$ -H2AX). (B) cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21<sup>CIP1/WAF1</sup>). Representative images from 0 ppm controls and the 6-ppm group at PND 21 are shown. Arrowheads indicate immunoreactive cells. 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 + SD. N = 9-10/group (0 ppm control in PND 21, N=9; the other groups are N=10).

\*  $P < 0.05$ , significantly different from untreated controls by Dunnett's or Steel's test.

**Table 10. Transcript levels in the hippocampal dentate gyrus of PND 21 offspring exposed to diacetoxyscirpenol**

	DAS in diet (ppm)			
	0 (Control)		6.0	
	Relative transcript level normalized to		Relative transcript level normalized to	
No. of animals examined	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt</i>
	6	6	6	6
<b>Neurotrophin-related genes</b>				
<i>Bdnf</i>	1.06±0.37	1.08±0.44	0.83±0.54	0.90±0.55
<i>Ntrk2</i>	1.03±0.27	1.03±0.25	0.83±0.13	0.90±0.18
<b>Glutamate transporters and receptors</b>				
<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
<b>Cholinergic receptors</b>				
<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
<b>Intrinsic pathway of apoptosis</b>				
<i>Bak</i>	1.02±0.20	1.01±0.15	0.94±0.16	1.02±0.19
<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>Casp3</i>	1.04±0.33	1.03±0.27	1.02±0.21	1.11±0.21
<i>Casp8</i>	1.02±0.22	1.02±0.18	0.82±0.13	0.89±0.11
<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 *
<b>Cell cycle-related genes</b>				
<i>Ccnb1</i>	1.07±0.40	1.04±0.32	0.54±0.14 **	0.58±0.12**
<i>Cdk4</i>	1.02±0.20	1.02±0.18	0.77±0.15 *	0.83±0.12
<i>Cdkn1a</i>	1.02±0.25	1.04±0.31	1.06±0.24	1.13±0.17
<i>Cdkn1b</i>	1.02±0.23	1.02±0.21	0.93±0.22	1.00±0.17
<i>Cdkn2a</i>	1.07±0.41	1.04±0.31	0.47±0.14 **	0.50±0.11**
<i>Parp1</i>	1.01±0.17	1.02±0.24	0.74±0.23 *	0.79±0.19
<i>Rb1</i>	1.01±0.13	1.02±0.18	0.61±0.16 **	0.66±0.12**
<i>Tp53</i>	1.02±0.20	1.02±0.20	0.73±0.12 *	0.79±0.10 *
<b>DNA double strand break-related genes</b>				
<i>Atm</i>	1.01±0.13	1.01±0.16	0.85±0.14	0.92±0.17
<i>Mre11a</i>	1.01±0.17	1.02±0.19	0.82±0.15	0.89±0.15
<i>Nbn</i>	1.01±0.15	1.01±0.17	0.88±0.21	0.94±0.15
<i>Rad50</i>	1.01±0.19	1.02±0.19	0.79±0.39	0.83±0.37
<i>Tp53bp1</i>	1.02±0.19	1.03±0.26	0.87±0.23	0.94±0.24
<i>Xrcc5</i>	1.03±0.25	1.02±0.20	0.86±0.19	0.93±0.13
<b>Stem cell regulators</b>				
<i>Kit</i>	1.03±0.29	1.04±0.32	0.73±0.11 *	0.79±0.09
<i>Kitl</i>	1.06±0.40	1.06±0.37	1.77±0.86	1.98±1.06
<i>Igf1r</i>	1.02±0.20	1.02±0.20	0.87±0.14	0.94±0.18
<i>Insr</i>	1.01±0.17	1.02±0.20	0.91±0.11	0.98±0.10
<b>Oxidative stress-related DNA repair gene</b>				
<i>Ogg1</i>	1.02±0.24	1.02±0.23	0.79±0.09 *	0.85±0.11
<b>Antioxidant-related genes</b>				
<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>	1.02±0.23	1.02±0.22	1.02±0.06	1.12±0.17
<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</i>	1.02±0.20	1.02±0.19	0.80±0.16	0.87±0.21

**Abbreviations:** *Atm*, ataxia telangiectasia mutated; *Bak*, BCL2-antagonist/killer 1; *Bax*, BCL2-associated X protein; *Bcl2*, B cell leukemia/lymphoma 2; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Casp3*, caspase 3; *Casp8*, caspase 8; *Casp9*, caspase 9; *Casp12*, caspase 12; *Cat*, catalase; *Cnd1*, cyclin B1; *Cdk4*, cyclin-dependent kinase 4; *Cdkn1a*, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A; *Cdkn1b*, cyclin-dependent kinase inhibitor 1B; *Cdkn2a*, cyclin-dependent kinase inhibitor 2A; *Chrna4*, cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 4; *Chrna7*, cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 7; *Chrnb2*, cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 2 (neuronal); DAS, diacetoxyscirpenol; *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; *Insr*, insulin receptor; *Igf1r*, insulin-like growth factor I receptor; *Keap1*, kelch-like ECH-associated protein 1; *Kit*, KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase; *Kitl*, kit ligand; *Mre11a*, MRE11A homolog A, double strand break repair nuclease; *Mt1*, metallothionein 1; *Mt2*, metallothionein 2; *Mt3*, metallothionein 3; *Nbn*, nibrin; *Nfe2l2*, nuclear factor, erythroid derived 2, like 2; *Ntrk2*, neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2; *Ogg1*, 8-oxoguanine DNA glycosylase; *Parp1*, poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1; *Prdx1*, peroxiredoxin 1; *Prdx2*, peroxiredoxin 2; *Prdx3*, peroxiredoxin 3; *Prdx4*, peroxiredoxin 4; *Prdx5*, peroxiredoxin 5; *Rad50*, DNA repair protein RAD50; *Rb1*, RB transcriptional corepressor 1; *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; *Tp53bp1*, transformation related protein 53 binding protein 1; *Xrcc5*, X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5.

<sup>a</sup> 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 11. Transcript levels in the hippocampal dentate gyrus of PND 77 offspring exposed to diacetoxyscirpenol**

	DAS 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>	1.07±0.42	1.10±0.43	1.44±0.34	1.44±0.25
<i>Ntrk2</i>	1.01±0.16	1.02±0.24	1.05±0.06	1.07±0.13
Glutamate transporters and receptors				
<i>Slc17a6</i>	1.06±0.43	1.06±0.43	1.52±0.39	1.60±0.67
<i>Slc17a7</i>	1.12±0.49	1.17±0.56	1.31±0.27	1.32±0.21
<i>Gria1</i>	1.01±0.18	1.02±0.19	1.23±0.27	1.23±0.14 *
<i>Gria2</i>	1.03±0.26	1.00±0.08	1.16±0.22	1.17±0.09 **
<i>Gria3</i>	1.01±0.14	1.01±0.17	1.09±0.18	1.10±0.10
<i>Grin2a</i>	1.05±0.34	1.08±0.41	1.28±0.27	1.28±0.19
<i>Grin2b</i>	1.02±0.21	1.02±0.24	1.22±0.07	1.24±0.16
<i>Grin2d</i>	1.02±0.19	1.03±0.26	1.19±0.09	1.22±0.13
Cholinergic receptors				
<i>Chrna4</i>	1.03±0.27	1.05±0.33	1.23±0.29	1.29±0.51
<i>Chrna7</i>	1.02±0.22	1.03±0.25	1.27±0.30	1.27±0.16
<i>Chrn2</i>	1.01±0.15	1.02±0.20	1.12±0.09	1.15±0.23
Intrinsic pathway of apoptosis				
<i>Bax</i>	1.03±0.27	1.04±0.28	0.93±0.10	0.94±0.12
<i>Bcl2</i>	1.16±0.76	1.13±0.57	1.20±0.24	1.21±0.21
<i>Bak</i>	1.02±0.20	1.05±0.34	1.05±0.11	1.07±0.17
<i>Casp3</i>	1.02±0.20	1.03±0.27	1.06±0.14	1.08±0.10
<i>Casp8</i>	1.03±0.29	1.04±0.28	1.11±0.11	1.14±0.16
<i>Casp9</i>	1.01±0.17	1.02±0.22	1.19±0.17	1.21±0.14
<i>Casp12</i>	1.07±0.46	1.04±0.32	1.08±0.23	1.18±0.38
Reelin and reelin-related receptors				
<i>Dab1</i>	1.01±0.19	1.04±0.30	1.24±0.25	1.24±0.10
<i>Itsn1</i>	1.02±0.20	1.01±0.16	1.25±0.17	1.27±0.21 *
<i>Lrp8</i>	1.01±0.15	1.02±0.22	1.11±0.17	1.14±0.22
<i>Reln</i>	1.20±0.91	1.10±0.58	0.80±0.09	0.83±0.17
<i>Vldlr</i>	1.01±0.17	1.03±0.28	1.07±0.27	1.08±0.25
Stem cell regulators				
<i>Kit</i>	1.02±0.19	1.03±0.31	1.17±0.20	1.18±0.16
<i>Kitl</i>	1.13±0.62	1.10±0.48	1.37±0.79	1.49±1.13

**Abbreviations:** *Atm*, ataxia telangiectasia mutated; *Bak*, BCL2-antagonist/killer 1; *Bax*, BCL2-associated X protein; *Bcl2*, B cell leukemia/lymphoma 2; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Casp3*, caspase 3; *Casp8*, caspase 8; *Casp9*, caspase 9; *Casp12*, caspase 12; *Chrna4*, cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 4; *Chrna7*, cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 7; *Chrn2*, cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 2 (neuronal); *Dad1*, disabled 1; DAS, diacetoxyscirpenol; *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; *Itsn1*, intersectin 1; *Kit*, KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase; *Kitl*, kit ligand; *Lrp8*, low density lipoprotein receptor-related protein 8, apolipoprotein e receptor; *Ntrk2*, neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2; *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; *Vldlr*, very low-density lipoprotein receptor.

<sup>a</sup> 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 12. 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	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-1 9	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).

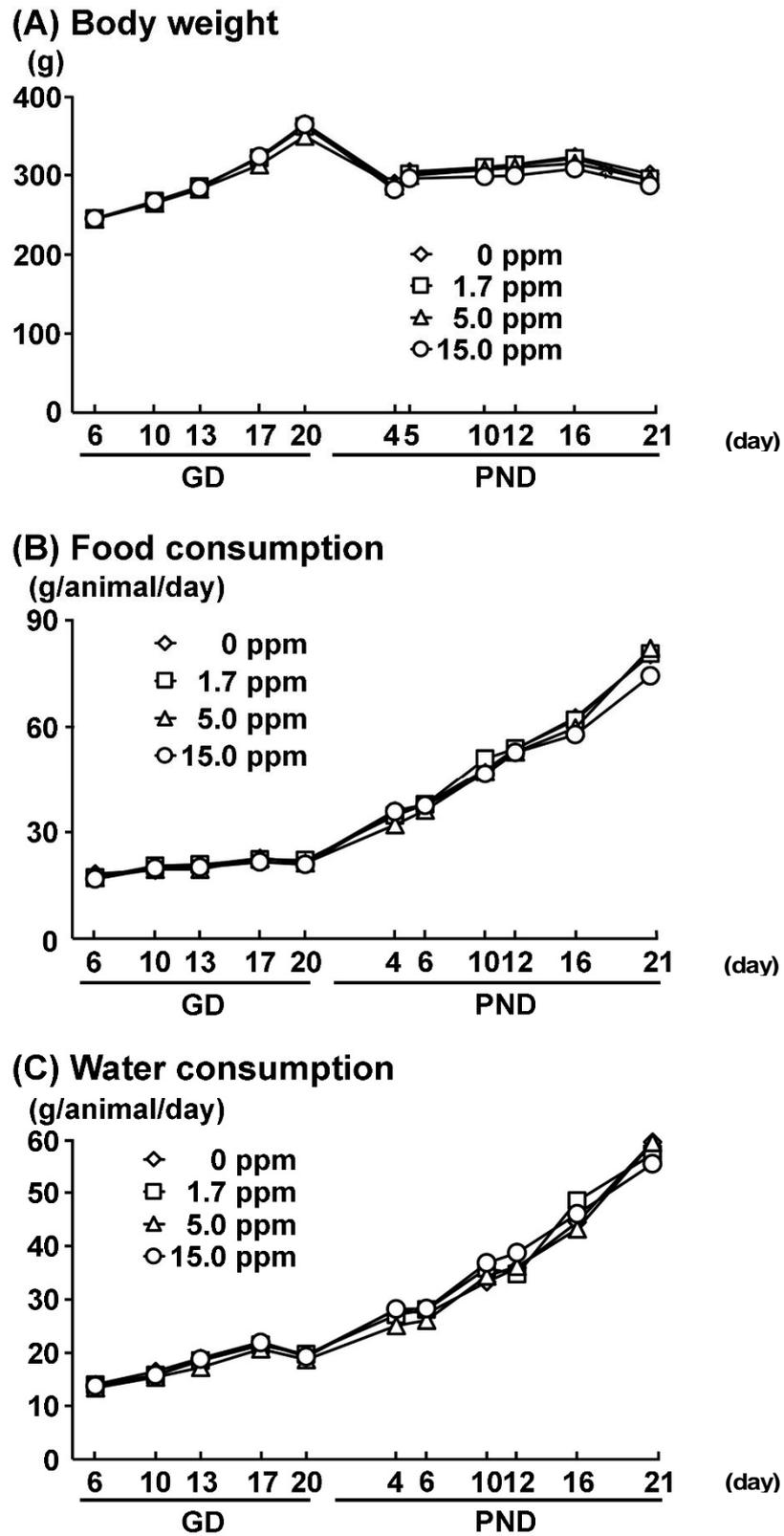
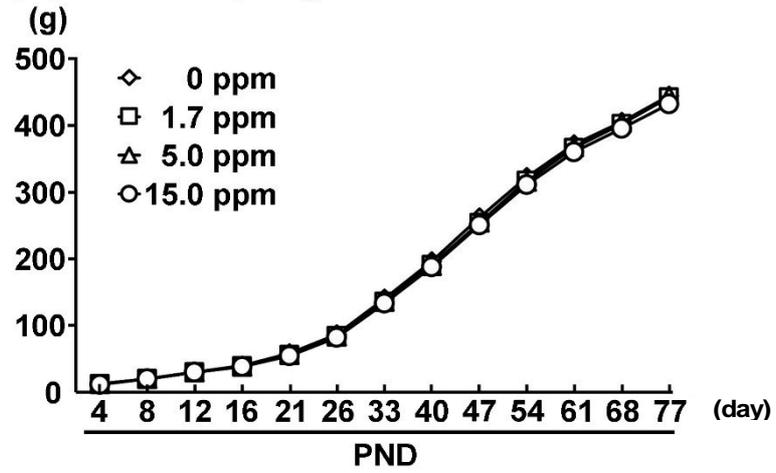
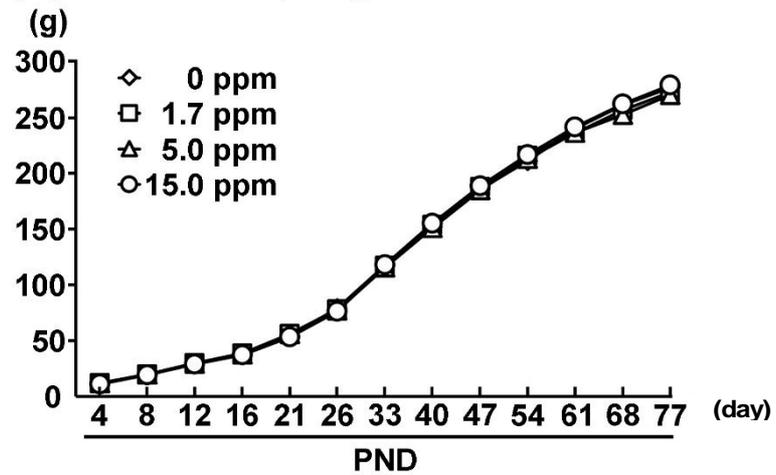


Figure 17. Body weight, food consumption and water consumption of dams given sterigmatocystin from GD 6 to PND 21 in the diet. (A) Body weight. (B) Food consumption. (C) Water consumption.

**(A) Male offspring**



**(B) Female offspring**



**Figure 18. Body weight of male and female offspring exposed to sterigmatocystin at postnatal day.**

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

**Table 13. 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.\*  $P < 0.05$ , significantly different from untreated controls by Dunnett's or Steel's test.

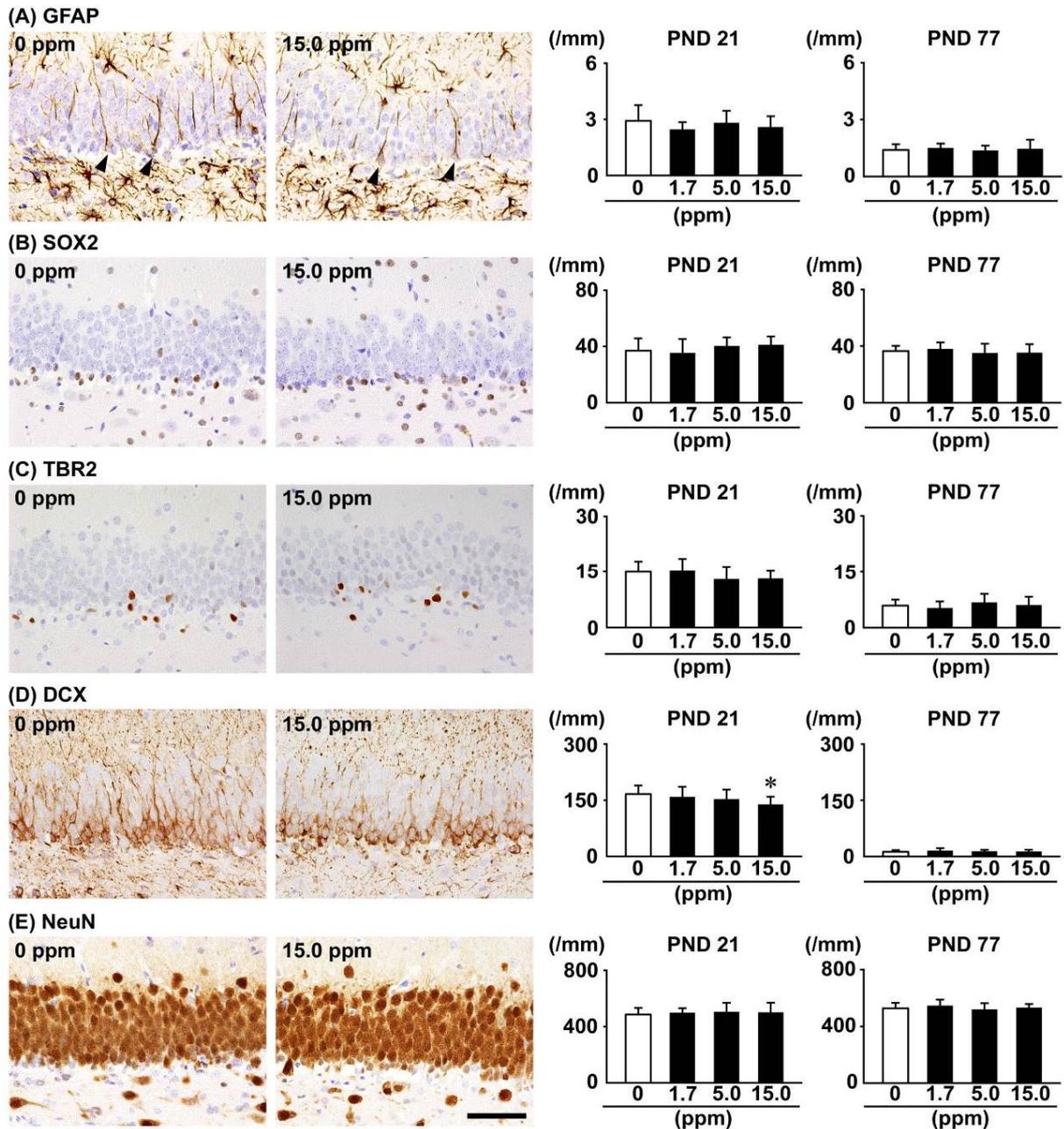
**Table 14. Body and organ weights at the prepubertal and terminal necropsies of offspring**

		Sterigmstocystin in diet (ppm)			
		0 (Control)	1.7	5.0	15.0
Male offspring on PND 21					
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
Organ weight					
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
Female offspring on PND 21					
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
Organ weight					
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
Male offspring on PND 77					
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
Organ weight					
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.

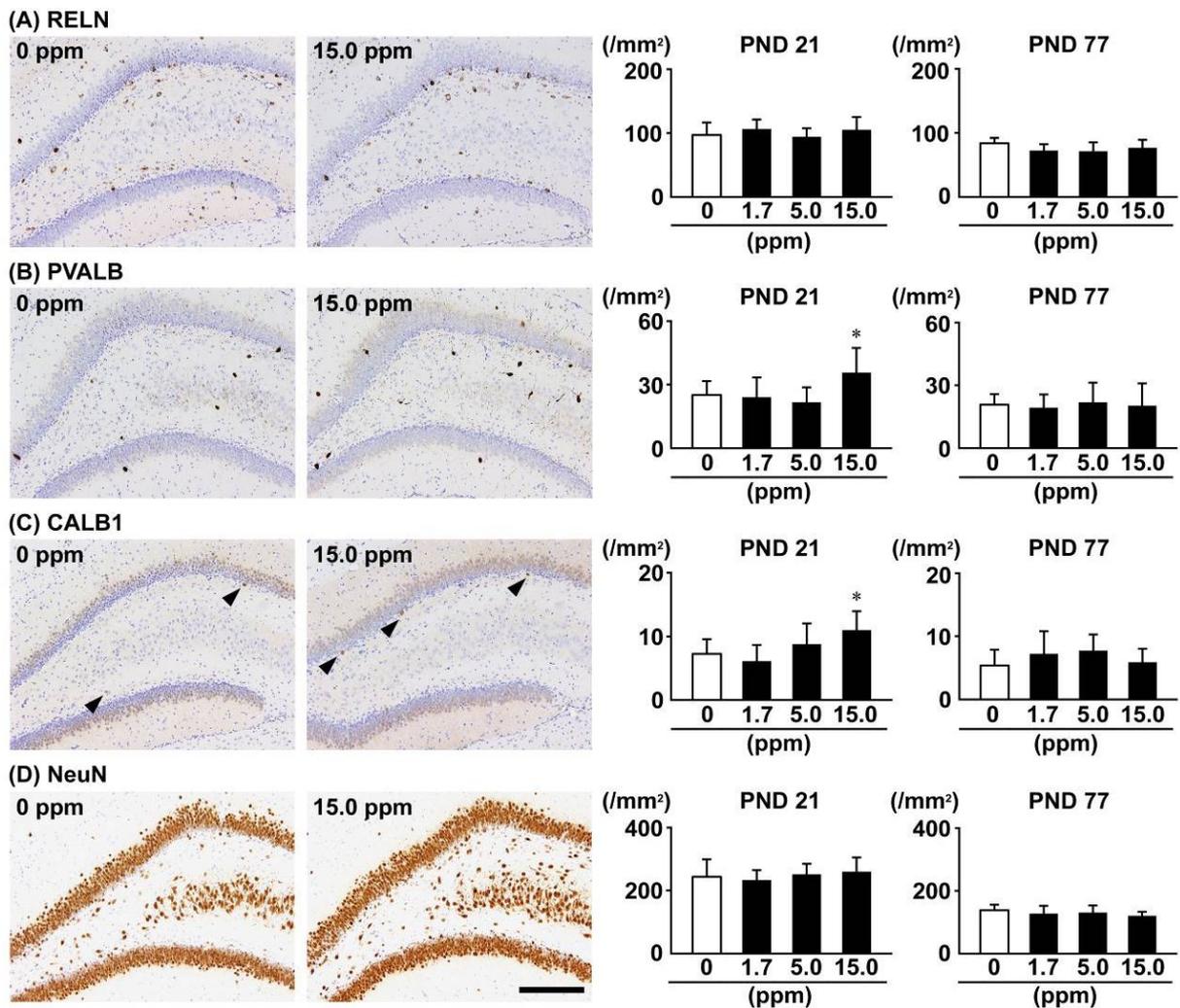
<sup>a</sup> Mean ± SD.





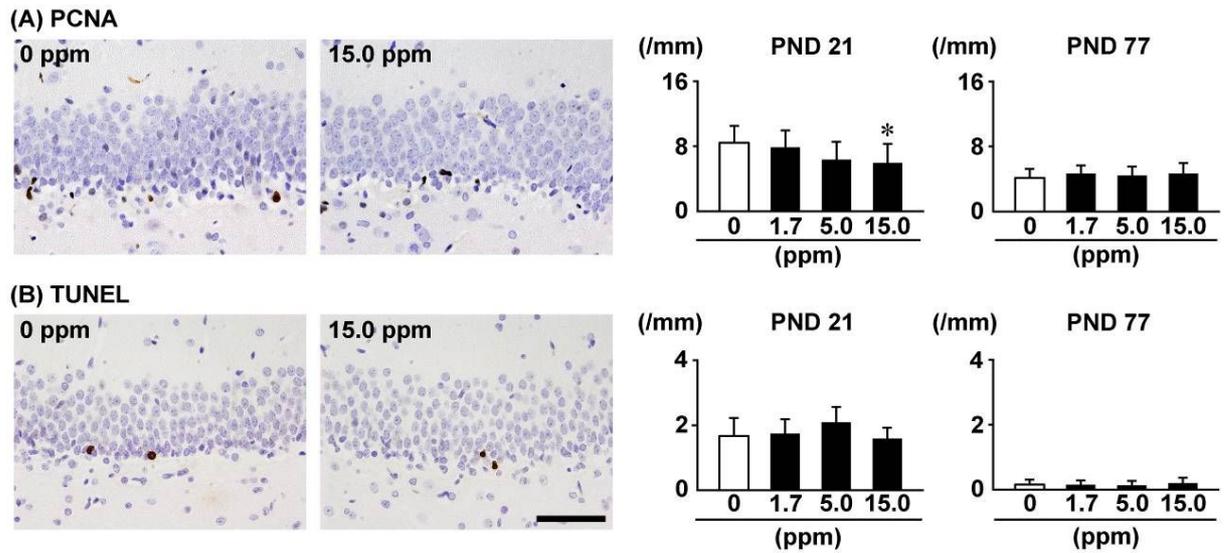
**Figure 19. Distribution and number of immunoreactive cells for neuronal stage-defining markers of granule cell lineages in the subgranular zone (SGZ), and a mature neuronal marker in the granule cell layer (GCL) of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to sterigmatocystin.** (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 + SD. N = 10/group.

\*  $P < 0.05$ , significantly different from untreated controls by Dunnett's or Steel's test.



**Figure 20. 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.

\*  $P < 0.05$ , significantly different from untreated controls by Dunnett's or Steel's test.



**Figure 21. 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 + SD. N = 10/group.

\*  $P < 0.05$ , significantly different from untreated controls by Dunnett's or Steel's test.

**Table 15. 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
Neurotrophin-related genes				
<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**
Cell cycle regulators				
<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
DND repair-related genes				
<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
Cholinergic receptors				
<i>Chrna7</i>	1.03±0.25	1.00±0.09	1.75±0.23**	1.26±0.17**
<i>Chrnb2</i>	1.01±0.11	1.01±0.15	0.84±0.14*	0.60±0.08**
Dopaminergic receptor				
<i>Drd2</i>	1.09±0.46	1.08±0.41	0.45±0.43*	0.32±0.29**

*Abbreviations:* *Apex1*, apurinic/apyrimidinic 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; *Chrnb2*, 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 Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test.