

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に関する研究

平成28年度から平成30年度

総合・分担研究報告書

研究代表者 小西 良子

令和元年（2019）年 5月

目 次

I . 総合研究報告

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

-----1

小西 良子

資料 4,15-ジアセトキシスシルペノールのJECFA ---19
評価書 (抜粋和訳)

II . 分担研究総合報告

1 . ステリグマトシスチンと 4,15-ジアセトキシ

スシルペノールの汚染実態調査 -----31

吉成知也

2 . かび毒の発達神経毒性評価 -----46

渋谷 淳

3 . 培養によらないかび毒産生菌種検出法の開発 -----106

小西 良子

III . 研究成果の刊行に関する一覧表 -----124

I . 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金研究事業

(食品の安全確保推進研究事業)

総合研究報告書

**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に関する研究**

(2016～2018年度)

研究代表者

小西良子(麻布大学)

研究要旨：2016年のJECFAで4,15-ジアセトキシシルペノール(4,15-DAS)、ステリグマトシスチン(STC)のリスク評価が行われたことを受けて、我が国でもリスク評価に資する知見を収集することを目的に、本事業が始まった。本事業は我が国での実態調査およびばく露評価、いままでかび毒では研究されていない発達神経毒性の評価、輸入食品のかび毒検査に適應できる簡便、迅速な測定法の開発を軸におこなった。

ばく露評価の基礎となる実態調査は2016～2018年の3年間に亘り、日本に流通する食品を対象に、STC及び4,15-DASの汚染調査を行った。まず、それぞれの試験法に関して、分析法の妥当性試験を行い、実態調査に適した分析法を確立した。STCについては、11食品群計583検体の調査を行い、116検体(20%)から定量限界値以上のSTCが検出された。4,15-DASについては、12食品群計461検体の調査を行った。ハト麦加工品、ソルガム及びコーンフラワーから検出され、陽性率はそれぞれ57%、33%及び8%であった。これらの調査結果からモンテカルロシミュレーション法により、日本人における小麦加工品からのSTCばく露量を推定した。90%タイル値は0.05～0.08、95%タイル値は0.08～0.12 ng/kg 体重/日であり、日本人のSTC平均摂取量からMOEを算出した結果、4,000,000～5,300,000であった。

胎児および乳幼児がばく露される可能性があるかび毒として、おもに主食である米、小麦に汚染するかび毒であるシトレオピリジン(CIT)、4,15-DAS、STCを選択し、マウスあるいはラットを用いた発達期ばく露実験を実施した。ばく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、4,15-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。いずれにおいても、発達期ばく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)、4,15-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。

食品を汚染するかび毒産生菌の迅速検出法の開発を目的として、培養を行わずにかび毒産生菌を効率よく検出する方法の開発を行った。今後コーデックス規格基準が設定される可能性が高いSTCおよび4,15-DASを対象とし、それぞれ産生菌種のみを培養なしに検出する方法の開発を試みた。1年目は、STC産生菌の有無を、培養を経ずに検出する手法を確立した。2年目は、1年目に確立した技術的基盤をもとに、1年目の手法を使って玄米から実証試験にも成功し、スクリーニング法としての有効性を示した。3年目は、*Fusarium*属菌のうちDAS産生菌種のみを検出することに成功した。これらの手法はSTCまたはDAS汚染のスクリーニング検査として有効な手法となることが期待される。

研究協力者

脇 ますみ 神奈川県衛生研究所
橋口 成喜 川崎市健康安全研究所
佐藤 英子 川崎市健康安全研究所
谷口 賢 名古屋市衛生研究所
中島 正博 名古屋市衛生研究所
竹内 浩 三重県保健環境研究所
藤吉 智治 (一財) 食品分析開発センター-SUNATEC
森田 剛史 (一財) 日本穀物検定協会
本田 俊一 (一財) 日本食品検査
七戸 八重子 (一財) 日本食品検査
伊佐川 聡 (一財) 日本食品分析センター
飯塚 誠一郎 (一財) 日本食品分析センター
猪之鼻 修一 (一財) 日本食品分析センター
小杉 正樹 (一財) 日本食品分析センター
笛木 周平 (一財) 日本食品分析センター
宮崎 光代 (一財) 日本食品分析センター
小林 直樹 (麻布大学)
渡辺 麻衣子 (国立医薬品食品衛生研究所)
窪崎 敦隆 (国立医薬品食品衛生研究所)

A. 研究目的

かび毒は、世界的に汚染が報告されておりヒトや動物に対して健康被害を引き起こすため、国際的に対応が急がれている食品の危害物質である。そのためかび毒の世界的汚染および規制値の動向の情報を集めるとともに我が国独自の調査研究を行い、今後の施策策定の根拠とすることは、食の安全性確保において不可欠な課題である。厚労科研補助金による主要な食品汚染かび毒を対象とした調査研究は平成 13 年から行われており、我が国でのリスク評価に必要なデータを得ている。

本研究課題では前述の研究事業で構築した研究組織および手法を用いて、JECFA でのリスク評価が終わり CODEX 委員会で討論されているステリグマトシスティン (STC) と、JECFA で T-2 トキシンと同等の毒性があるとされた 4,15-デアセトキシシルペノール (4,15-DAS) を対象に調査研究を行った。

研究実施経過は 3 つの柱、すなわち 1. 分析法の開発と妥当性評価、実態調査とばく露評価 2. 今まで十分な毒性評価がなされていないかび毒を対象とした毒性評価 3. 輸入食品中の汚染かび毒産生性真菌から汚染かび毒の有無を予測する遺伝子的測定法の確立に対して以下の結果となった。1 では、初年度は実態調査に用いる分析法を LC-MS/MS および HPLC で確立し、かつ複数機関での妥当性試験を行った。我が国で流通している食品の実態調査を通年でいき、ばく露評価のデータを集積し、最終年はモンテカルロ確率手法で STC のばく露評価を行った。2 では、毒性評価が不十分であるシトリオビリジン (初年度) 4,15-DAS (次年度) そして STC (最終年度) を対象に発達期ばく露実験を行い、発達神経毒性の無毒性量を推定した。3 初年度は STC 産生菌をモデルとして、玄米から培養なしにかび毒産生遺伝子のみを検出できる系を作成し、次年度はその有効性を STC 汚染玄米を用いて実証した。最終年度は DAS 産生菌を小麦から検出する遺伝子測定法を確立した。

B. 研究方法

(1) STC および DAS の実態調査および STC のばく露評価

1) 試料

検体は日本各地の小売店などからランダムに購入したものをを用いた。

2) 分析法

STC 及び 4,15-DAS の分析は、3 年間同じ方法を用いた。分析法の妥当性は 2016 年度に複数機関で評価し、かび毒試験法評価委員会でその妥当性が評価させた方法を用いた。

2-1) STC の分析法

粉状の検体、ビール及びワイン以外の検体については、破砕機で粉末状に破砕した。ビールとワイン以外の試料からの STC 抽出は、試料 25 g に抽出溶媒アセトニトリル：水（85：15）100 mL を加え、30 分間振盪することで行った。精製はイムノアフィニティーカラム（IAC、堀場製作所社製 AFLAKING）を用いた。

2-2) 4,15-DAS の汚染実態調査

抽出は、試料 25 g に抽出溶媒アセトニトリル：水（85：15）100 mL を加え、30 分間振盪することで行った。精製は多機能カラム（昭和電工社製 Autoprep MF-T 1500）を用いた。平均値については、検出限界値（LOD）未満の値は 0 に、検出限界値以上定量限界値（LOQ）未満の値は検出限界値に置き換えて算出した。中央値は陽性率が 50%以上であった試料においてのみ算出した。

3) ばく露量推定

摂取量は、2005～2007 年に実施された食品摂取量・摂取頻度調査の結果を用いた。対象食品から小麦加工品 139 種を選抜した。Crystal Ball（（株）構造計画研究所）を用いてモデルの探索を行った結果、対数正規分布が適合した（二乗検

定）。曝露量として Lower bound および Upper bound を求めた。

(2) 発達期曝露影響評価

1) 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、最高用量は予備実験の結果を踏まえて 10 ppm に設定したのち、本試験では 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。CIT の乳汁移行は、LC-MS/MS 法により測定した。

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 例の雄児動物を灌流固定した。各群雄 15～22 例、雌 10 例の児動物は脳、肝臓、腎臓重量を測定後、組織切片を作成した。切片は、DAB 発色にて ABC 法（による免疫染色を行った。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顆粒細胞層下帯（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 日に脳、肝臓、腎臓重量を測定後、組織切片を作成した。

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 例の雄児動物を灌流固定した。各群雌

雄各 10 例の児動物は、脳、肝臓、腎臓重量を測定後、組織切片を作成した。

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、total RNA を抽出した。RT-PCR により遺伝子発現解析を行った。

2) 4,15-DAS のマウスにおける発達期ばく露影響評価

妊娠 ICR マウス（妊娠 1 日で入手、日本エスエルシー）を、最高用量は予備実験の結果から、6.0 ppm を最高用量として一群あたり 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。DAS の乳汁移行に関して、4,15-DAS の濃度を LC-MS/MS 法により測定した。組織切片の作成および免疫染色の方法は (2)-1) に準じた。用いた抗体は (2)-1) で用いたものおよび 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) (γ-H2AX)、細胞周期関連分子である cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21^{CIP1/WAF1}) を加えた。陽性細胞数の算出方法は (2)-1) に準じた。

母動物は分娩後 22 日に脳、肝臓、腎臓重量を測定後、組織切片を作成した。

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、組織切片の作成および免疫染色の方法は (2)-1) に準じた。

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、(2)-1) に準じて遺伝子発現解析を行った。

3) STC のラットにおける発達期ばく露影響評価

妊娠 SD ラット（妊娠 1 日で入手、日本エスエルシー）を、最高用量は、予備実験の結果から 15.0 ppm に設定し、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。STC の乳汁移行に関して、LC-MS/MS 法により測定した（日本食品分析センター）。

児動物の組織切片、陽性細胞数の算出方法は (2)-1) に準じた。

母動物は分娩後 22 日に脳、肝臓、腎臓重量を測定後、組織切片を作成した。

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、組織切片の作成および免疫染色の方法は (2)-1) に準じた。

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、(2)-1) に準じて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群平均ならびに標準偏差を算出した。統計学的解析は、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。

(3) 培養によらないかび毒産生菌検出の開発

1) 供試菌株

STC 産生菌種およびその近縁種として、食品および環境から分離した *Aspergillus section Versicolores* 株を合計 60 株供試した。DAS 産生菌種およびその近縁種として以下の 15 菌種 15 株を用いた。

2) 米検体

米は STC 汚染を含む平成 27 年度産の国産玄米 9 検体および平成 25 年度産国産玄米 4 検体を用いた。

3) 培養真菌からのゲノム DNA 抽出

胞子をポテトデキストロース液体培地 (PDB) で培養し、菌糸体を回収後、DNA の抽出は SDS 法または DNeasy plant mini kit (QIAGEN) を用いて行った。

4) 分子生物学的手法による菌種同定

-tubulin 遺伝子部分配列 (377 bp) を PCR により増幅し、PCR 産物をエタノール沈殿により精製し、シーケンス反応を行った。シーケンシングは塩基配列を決定したのち、供試菌株の塩基配列を登録配列と共にアライメントした。登録配列は *Aspergillus section Versicolores* に含まれる 14 種および外群 2 種 39 株の登録配列を NCBI のデータベースからダウンロードして使用した。このアライメントを基に MEGA6.0 を用い、近隣結合法により系統樹を作成し、菌種の同定を行っ

た。

5) Thin-layer chromatography (TLC) による STC 産生能の確認

本試験に使用した株の STC 産生能は、TLC により確認した。

6) RNA polymerase 2 遺伝子部分配列の比較

Aspergillus section Versicolores に含まれる種の登録配列を NCBI のデータベースからダウンロードして使用し、MEGA6.0 を用い、ClustalW によりアライメントを行った。

7) 米付着カビ胞子からの直接 DNA 抽出

玄米 500 mg (20 粒程度) から、市販抽出キット (NucleoSpin Soil: TaKaRa) を用い、添付のプロトコルに従い、DNA を抽出した。抽出した DNA は使用するまで -20 °C で保存した。

8) 菌種特異的検出 PCR

6) で作成したアライメントを基に、標的菌種の塩基配列がその他の菌種と異なる部分にプライマーを設計し、HiDi DNA polymerase を用い、PCR を行った。

9) α -tubulin 遺伝子部分配列の比較

DAS 産生性 *Fusarium* 属菌種およびその近縁種の登録配列を NCBI のデータベースからダウンロードし、MEGA6.0 を用いて ClustalW によりアライメントを行った。

10) Lys2 遺伝子部分配列の比較

4,15-DAS 産生性 *Fusarium* 属菌種およびその近縁種の登録配列を NCBI のデータベースからダウンロードし、MEGA6.0 を用いて ClustalW によりアライメントを行った。

C. 研究結果

(1) STC および DAS の実態調査および STC のばく露評価

1) STC の汚染実態

3 年間の調査結果をまとめると 583 検体から 116 検体 (20%) で定量限界値以上の STC が検出された。STC 濃度の平均値が比較的高かったのは、ハト麦加工品 (0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、ライ麦粉 (0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 及び国産小麦粉 (0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) であった。

2) 4,15-DAS の汚染実態

3 年間の調査結果をまとめると、計 461 検体の調査を行い、4,15-DAS はハト麦加工品、ソルガム及びコーンフラワーから検出された。平均濃度はハト麦加工品の 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ が最も高く、ソルガムとコーンフラワーではそれぞれ 0.3 及び 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、ハト麦加工品と比べると非常に低かった。最大濃度はハト麦加工品の 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。

3) ばく露量推定

モンテカルロシミュレーションに用いて小麦粉の摂取量の分布および小麦粉の STC 汚染量の分布を推定した。日本人における小麦加工品からの STC ばく露量を推定した結果は、50%タイル値は 0.01~0.02、80%タイル値は 0.03~0.05、90%タイル値は 0.05~0.08、95%タイル値は 0.08~0.12 ng/kg 体重/日であり、また平均値は 0.03~0.04 ng/kg 体重/日であった。

2016 年に行われた JECFA による STC のリスク評価の際に採用された BMDL_{10} 0.16 mg/kg 体重/日に基づき、日本人の STC 平均摂取量から MOE を算出した結果、4,000,000~5,300,000 であった。

(2) 発達期ばく露影響評価

1) CIT のマウスにおける発達期曝露影響評価

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。着床数、産仔数、臓器重量 CIT による影響は認められなかった。

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。SGZ において PCNA (細胞増殖活性マーカー) 陽性細胞が 10 ppm で、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、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。

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*、海馬に入力する神経伝達物質の一つであるグルタミン酸のトランスポーターをコードする *Slc17a7*、AMPA 型受容体をコードする *Gria2*、*Gria3* はいずれも 10 ppm で発現量が有意に増加した。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*、コリン作動性入力の受容体をコードする *Chrna4*、*Chrnb2* 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*、*Chrnb2* で有意に発現増加が認められた。

2) 4, 15-DAS のマウスにおける発達期ばく露影響評価

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。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。

母動物は、6.0 ppm で胸腺重量の低値と肝臓および腎臓の高値を示した。児動物は、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。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。

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、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。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。海馬歯状回では ARC 陽性細胞が 6.0 ppm で有意に減少し、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。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-1/11 陽性細胞と、DNA 二本鎖切断の指標である γ -H2AX の増加を認めた。

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、グルタミン酸トランスポーター、グルタミン酸受容体、NMDA 型グルタミン酸受容体およびアセチルコリン受容体をコードする遺伝子の発現減少を認めた。一方、グルタミン酸トランスポーターをコードする遺伝子の発現増加を認めた。成熟時には、グルタミン酸受容体、RELN 受容体をコードする遺伝子の発現増加を認めた。

3) STC のラットにおける発達期ばく露影響評価

母動物の体重、摂餌量および摂水量、着床数、産仔数および児動物の体重に STC の影響と思われる変化は認められなかった。母動物は、15.0 ppm で肝臓の絶対重量が高値を示した。児動物は、変化は認められなかった。

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)、PCNA (細胞増殖指標) の陽性細胞数が 15.0 ppm 群で有意に減少した。一方、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。

(3) 培養によらないかび毒産生菌検出法の開発

1) 国内に分布する *Aspergillus section Versicolores* の分離、同定および STC 産生能

食品及び環境から分離された合計 60 株について、 α -tubulin 遺伝子部分配列 (377 bp) を決定し、配列データを得た。その結果、全ての登録配列は単系統群を形成した。60 株の分離・同定を行った結果、*Aspergillus section Versicolores* に属する 14 菌種の内、10 菌種の株を得ることができた。

2) 培養を経ずに標的菌種のみを特異的に検出する PCR 法の確立

玄米に付着したカビからの DNA 検出方法を検討した。DNA 抽出は、玄米付着カビ胞子から直接 DNA を抽出でき、PCR によりカビを検出することが可能であると考えられた。特異性の高い PCR 法の開発のため改変型 DNA 合成酵素 (HiDi DNA polymerase) を活用した検出方法を検討した。その結果、標的カビ以外の DNA の混入があっても菌種特異的な検出が可能であることが確認できた。

以上より、食材に付着したカビ由来の DNA を回収し、非特異的な増幅を回避しながら ST 産生能を持つ菌種のみを検出することができることが示され、食品を汚染するかび毒産生菌の迅速検出法の技術的基盤を確立することができた。

3) *Aspergillus creber* 特異的検出 PCR

2) で確立した HiDi DNA polymerase を用いた PCR により、*A. creber* のみを特異的に増幅する系を検討した。*A. creber* 特異的に増幅が見られ、HiDi DNA

polymerase を用いた PCR により国内の主要な STC 産生菌種と考えられる *A. creber* を特異的に検出することが可能であることが示された。

4) *Aspergillus sydowii* を除く *Aspergillus section Versicolores* 検出 PCR

A. sydowii を除く *Aspergillus section Versicolores* の他菌種をまとめて検出することで効率よく STC 産生菌を検出する系を検討した。3) と同様に、*RPB2* 遺伝子において、*A. sydowii* のみで特異的に他の菌種と配列が異なるサイトをターゲットに、*A. sydowii* 以外の菌種の塩基配列と一致するプライマーセットを設計したところ、*A. sydowii* では増幅が見られず、その他の菌種では全て目的のサイズの増幅が観察された。

以上の結果から、STC 産生菌種を多く含む *Aspergillus section Versicolorese* の中で STC 非産生菌種である *A. sydowii* 以外の菌種を特異的に増幅することが可能であることが確認された。

5) 玄米における STC 産生菌の検出

4) で検討した PCR の系を用い、玄米からの STC 産生菌の検出を行った。その結果、STC が検出された玄米については全てにおいて目的サイズの増幅産物が確認された。

6) *Lys2* 遺伝子部分配列を基にした

4,15-DAS 産生菌種特異的検出 PCR

4,15-DAS 産生菌種特異的検出 PCR の開発では、2 種類の方法を用いたが、より汎用性の高い方法として *Lys2* 遺伝子を用いた PCR が確立された。

Lys2 遺伝子において 4,15-DAS 産生菌

種 8 菌種のうち *F. poae* を除く 6 菌種にのみ共通するサイトが存在したため、当該サイトにプライマーを設計した。併せて、*F. poae* 特異的なサイトにプライマーを設計した。この際、Forward 側のプライマーを同じ位置に設計することで、Reverse 側のプライマーを混合して用いるマルチプレックス PCR の系とする事とした。この方法は、4,15-DAS 非産生菌種においては増幅が見られなかった。以上より、設計したマルチプレックス PCR の系により、4,15-DAS 産生菌種を特異的に検出することが可能であることが明らかとなった。

D. 考察

(1) STC および DAS の実態調査および STC のばく露評価

1) STC について

2013~2014 年にヨーロッパ 9 カ国で実施された汚染調査の結果では、STC は大麦、トウモロコシ、ライ麦及び小麦など穀類から検出され、平均濃度はそれぞれ 0.032、0.059、0.024 及び 0.015 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。中国で 2016 年に小麦 32 検体を対象とした調査では、STC の陽性率は 53.1%、平均濃度は 0.07 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。我々の 3 年間の調査結果における STC 汚染レベルはこれら海外の報告と同等であった。今回算出された我が国の STC のばく露量をアフラトキシン B₁ のばく露量と比較すると、約 20~30 倍高かったことから、発がん性がアフラトキシン B₁ よりも低いことを考慮に入れてもかび毒による肝臓ガン発症のリスク評価を実施する際には STC も加えて算出する必要性があると考えられる。一方で、平均的な日本人における STC の

MOE は 10,000 を上回っていることから、すぐに健康影響が出るレベルではないといえる。

2) 4,15-DAS について

4,15-DAS は T-2 トキシンと化学構造が非常に似た類縁体であることから、T-2 トキシンが検出された食品種を対象に実態調査を行ったが、4,15-DAS が検出された食品はハト麦加工品のみであった。ヨーロッパでもほとんどの小麦、大麦、ライ麦やオーツ麦から 4,15-DAS は検出されず、検出されたものも濃度は 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 未満であった。

これらのことから、4,15-DAS が汚染する食品は非常に限られており、4,15-DAS を単独で摂取することによる健康リスクは低いと考えられるものの、JECFA では一日耐容摂取量を T-2 トキシンと HT-2 トキシンとともにグループ PMTDI 0.06 $\mu\text{g}/\text{kg}$ としていることは現状にあった設定と言える。今後は T-2 トキシン、HT-2 トキシン及び 4,15-DAS の 3 種まとめて汚染調査を行い、汚染濃度や頻度の違いを明らかにし、健康リスクを評価する必要があると考える。

(2) 発達期曝露影響評価

1) CIT のマウスにおける発達期曝露影響評価

発達期曝露後の雄児動物を対象とした海馬歯状回の免疫組織化学的解析から、出生後 21 日目で、10 ppm において 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 *Chrn2*、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、発達期の脳では、主に PVALB 陽性細胞に発現が認められる。CIT 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とから、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起こすことが示唆された。この活性低下は、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。

2) 4,15-DAS のマウスにおける発達期ばく露影響評価

4,15-DAS の発達期曝露後 雄児動物の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-1/11 陽性 SGZ 細胞の増数も認めた。DAS と同じ構造を有する T-2 トキシンを用いた発達期曝露影響においても同様の結果が得られたことから、トリコセセン系の A タイプ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 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。また本研究で 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。

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が、6.0 ppm の 4,15-DAS 曝露により *Kit* の遺伝子発現の有意な減少が認められた。この結果は、4,15-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。4,15-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。

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。T-2 toxin を用いた以前の我々の研究とは異なった結果となったが、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 4,15-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が、これは 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。

3)STC のラットにおける発達期曝露影響評価

STC ではラットを用いて実験を行った。雄児動物の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と、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。この増加は、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。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_1 期あるいは G_2 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_1/S ないし G_2/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。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で *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。また、*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。さらに、15 ppm で *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。

(3) 培養によらないかび毒産生菌検出法の開発

本研究では、食品において今後モニタリングを強化していくべきかび毒として STC および 4,15-DAS に着目し、これらのかび毒産生菌種の迅速検出法の開発を目的に、培養を経ずにかび毒産生菌を検出できる方法の開発を行った。

まず、土壌や堆積物から微量の微生物等の DNA を効率よく抽出可能な市販のキットを用い、玄米に付着するカビからの DNA 抽出を試みた。その結果、食品中のカビを直接検出するための DNA 抽出法として有効であることが示された。目的 DNA 以外の DNA の混入による非特異的増幅を防ぐため、改変型 DNA 合成酵素である HiDi DNA polymerase を用いて、より特異的な増幅反応を示す PCR を検討した。

次に、確立した系を基に STC 産生菌種の特異的な検出法の開発を行った。国内の食品および環境から *A. spergillus* section *Versicolores* に属する菌株の分布と STC 産生能を検討したところ、*A. sydowii* を除いた *Aspergillus* section *Versicolores* に属する菌種をまとめて検出する系の開発を試みた。*RPB2* 遺伝子上にプライマーを設計することで、目的の特定菌種のみを増幅して検出する方法を確立することができた。

さらに、*A. sydowii* を増幅させずに他の菌種をまとめて検出する系を用い、玄米からの STC 産生菌の直接検出を試みた

ところ、STC 汚染が確認された玄米では、全てにおいて STC 産生菌種が検出されたことから、培養を行わずに STC 産生菌種を効率的に検出する方法を確立することができた。

4,15-DAS 産生菌種の迅速検出法の開発においては 4,15-DAS 産生菌種および近縁の 4,15-DAS 非産生菌種について *-tubulin* 遺伝子および *Lys2* 遺伝子の塩基配列を用いて 2 種類の方法を比較検討した。その結果 *Lys2* 遺伝子においてはマルチプレックス PCR により、全ての 4,15-DAS 産生菌種を検出することに成功した。

E. 結論

STC 及び 4,15-DAS の我が国の実態調査から、STC は小麦等に汚染があり、その汚染濃度は諸外国とほぼ同じ程度であることがわかった。一方 4,15-DAS では、はと麦以外の食品汚染は検出されず、汚染があっても限られた食品で、かつ低レベルであることが明らかになった。そのため、我が国のばく露評価は STC において行うことにした。モンテカルロ手法により 95% タイル値で 0.08 ~ 0.12 ng/kg 体重/日と推定された。この値は同じ遺伝毒性発がん性物質であるアフラトキシン B1 のばく露量よりも数十倍高い値であるが、発がん毒性が低いことから、すぐに健康被害を起こすことは考えにくいと思われた。

CIT、4,15-DAS、STC の発達神経毒性影響の結果、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、4,15-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、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。4,15-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。

いずれのかび毒においても、発達期ばく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。これらの毒性評価から、無毒性量は、CIT で 1 ppm (0.13-0.51 mg/kg 体重/日)、4,15-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。

簡便迅速スクリーニング法として食品または飼料に付着したカビ由来の DNA を回収し、培養を行わずに PCR によって STC 産生菌種および 4,15-DAS 産生菌種を効率的に検出する方法を開発することができた。

輸入食品のかびを直接チェックすることから、規制値が設定される可能性の高いかび毒に汚染されやすい食品、原産国も調べることができ、モニタリングに有用であると考えられる。いままで産かびを検出するためには培養法が一般的であったが、結果を得るまでに 5 日から 14 日

程度必要であったが、今回開発した手法では 4 時間程度で STC および 4,15-DAS を産生するカビの検出が可能であり、STC および 4,15-DAS 汚染のスクリーニング検査として有効な手法となることが期待される。

F. 研究業績

1. 論文発表

- 1) 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) Onami J[†], Watanabe M[†], Yoshinari T, Hashimoto R, Kitayama M, Kobayashi N, Sugita-Konishi Y, Kamata Y, Takahashi H, Kawakami H, Terajima J: Fumonisin-production by *Aspergillus* section *Nigri* isolates from Japanese Foods and Environments. *Food Safety* (2018) 6: 74-82 (†筆頭著者同等貢献者)
- 3) Yoshinari T et al. Development of an Analytical Method for Simultaneous Determination of the Modified Forms of 4,15-Diacetoxyscirpenol and their Occurrence in Japanese Retail Food. *Toxins*. 2018;10(5):E178.
- 4) 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.

- 5) Kobayashi, N, Kubasaki, A, Takahashi, Y, Yanai, M., Konuma, R, Uehara, S, Chiba, T, Watanabe, M, Terajima, J and Sugita-Konishi, Y: Distribution of sterigmatocystin-producing *Aspergilli* in Japan. *Food Safety* (2018) 6: 67-73
- 6) Shiratori, N†, Kobayashi, N†, Tulayakul, P, Sugiura, Y, Takino, M, Endo, O and Sugita-Konishi Y: Occurrence of *Penicillium brocae* and *Penicillium citreonigrum*, related to mutagenic and toxic metabolites, respectively, in commercially available rice grains of Thailand. *Toxins* (2017) 9: E194 (†筆頭著者同等貢献者)

2. 学会発表

- 1) Sugita-Konishi Y, Takeda N, Watanabe M, Kobayashi N and Yoshinari T. Development of an Analytical Method for Simultaneous Determination of the Modified 4,15-Diacetoxyscirpenol and their Occurrence in Japanese Retail Food. SOT 58th annual meeting (2019, 3, Baltimore)
- 2) 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

- 3) 吉成知也、小杉正樹、佐藤英子、七戸八重子、竹内浩、谷口賢、藤吉智治、脇ますみ、小西良子、大西貴弘、工藤由起子 : 国内流通食品におけるステリグマトシスチンの汚染実態調査 第 83 回日本マイコトキシン学会学術講演会 (2019 年 1 月)
- 4) 加田睦月、内ヶ島美岐子、吉成知也、三宅司郎、小林直樹、小西良子. ステリグマトシスチンの ELISA によるスクリーニング法の開発. 日本マイコトキシン学会第 83 回学術講演会 (2019, 1, 川崎)
- 5) 佐藤和貴、吉成知也、窪崎敦隆、小林直樹、小西良子、工藤由起子、渡辺麻衣子. 国内流通穀類におけるステリグマトシスチン産生菌の分布に関する研究. 日本マイコトキシン学会第 83 回学術講演会 (2019, 1, 川崎)
- 6) 小林直樹、古川優奈、佐藤悠人、渡辺麻衣子、栗林尚志、島津徳人、小西良子. Change of fungal microflora in the house by dogs. 平成 30 年室内環境学会学術大会 (2018, 12, 東京)
- 7) 小池義浩、吉成知也、中川博之、上垣隆一、高橋治男、清水公德、工藤由起子、渡辺麻衣子. *Fusarium* 属菌におけるフモニシン類産生性に関する分類学的

- 検討. 日本マイコトキシン学会第 82 回
 学術講演会 (2018, 8, 帯広)
- 8) Watanabe M, Onami J, Yoshinari T, Hashimoto R, Kitayama M, Kamata Y, Takahashi H, Kawakami H, Terajima J. Study on fumonisin-productivity of isolates of *Aspergillus* section *Nigri* derived from foods in Japanese markets and environment UJNR 2018 (2018, 5, Yokohama)
- 9) 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
- 10) 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
- 11) Nakajima,K., Ito, Y., Masubuchi, Y., Kikuchi, S., Yoshida, T., Sugita-Konishi,Y., 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 5-8th, 2018
- 12) 中島康太, 伊藤優子, 増淵康哲, 菊地聡美, 小西良子, 吉田敏則, 渋谷淳 : かび毒シトレオビリジンとジアセトキシシルペノールのマウス発達期曝露による生後の海馬神経新生に対する影響の比較、第161回日本獣医学会学術集会、つくば、第161回日本獣医学会学術集会講演要旨集 : B0-33、P. 309、9月11-13日、2018
- 13) 小林直樹、藤江雄大、鹿嶋直哉、渡辺麻衣子、小西良子. 国内で分離された *Apergillus ochraceus* の再同定とその OTA 産生性. 日本マイコトキシン学会第 81 回学術講演会(2018, 1, 東京)
- 14) 窪田祐恵、尾畑瑠衣、内藤千秋、大仲賢二、石崎直人、小林直樹、小西良子. 野菜由来乳酸菌のアフラトキシン類への結合能と胃内環境での挙動. 日本マイコトキシン学会第 81 回学術講演会 (2018, 1, 東京)
- 15) 尾畑瑠衣、窪田祐恵、内藤千秋、大仲賢二、石崎直人、小林直樹、小西良子. アフラトキシン結合能を有する野菜由来乳酸菌の探索と消化液での安定性に関する研究. 日本食品衛生学会第 113 回学術講演会 (2017, 11, 東京)
- 16) 小林直樹、藤江雄大、鹿嶋直哉、渡辺麻衣子、小西良子. *Aspergillus ochraceus* sensu lato における OTA 産生と OTA 生合成関連遺伝子の保有状況. 日本食品衛生学会第 113 回学術講演会 (2017, 11, 東京)
- 17) 窪崎敦隆、小林直樹、高橋治男、吉

- 成知也、高鳥浩介、寺嶋淳、小西良子、渡辺麻衣子。高度識別型 DNA 合成酵素を用いた玄米汚染真菌の検出。第44回日本防菌防黴学会（2017, 9, 大阪）
- 18) 小林直樹、窪崎敦隆、渡辺麻衣子、小沼ルミ、上原さとみ、高橋由美、矢内美幸、寺嶋淳、高橋治男、高鳥浩介、小西良子。 *Aspergillus* section *Versicolores* におけるステリグマトシスチン産生菌種の分子生物学的検出方法の開発。日本マイコトキシン学会第80回学術講演会（2017, 7, 東京）
- 19) 吉成知也、竹田名菜水、小西良子、寺嶋淳：4,15-ジアセトキシスシルベノールのモディファイド化合物の汚染実態 第80回日本マイコトキシン学会学術講演会（2017年7月）
- 20) 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：シトレオビ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
- 21) Watanabe M, Suzuki Y, Takahashi H, Yoshinari T, Kobayashi N, Sugita-Konishi Y, Goto K and Terajima J: Comparative study including fumonisin production on the phylogenetic tree of kuro-koji molds and their relatives isolated from Japanese fermented foods. UJNR (2017, 5, Washington DC)
- 22) Kobayashi N, Kubosaki A, Shiratori N, Watanabe M, Terajima J and Sugita-Konishi Y: Classification and sterigmatocystin-production of *Aspergillus* section *Versicolores* from Japanese foods and environments. UJNR (2017, 5, Washington DC)
- 22) 小林直樹、渡辺麻衣子、吉成知也、矢内美幸、杉浦義紹、高橋治男、寺嶋淳、小西良子：*Aspergillus versicolor* の系統分類とステリグマトシスチン産生能の検討。日本進化学会第18回大会（2016, 8, 東京）
- 23) 小林直樹：様々な由来の *Aspergillus versicolor* におけるステリグマトシスチン産生性に関する分子生物学的検討。かび毒研究連絡会（2016, 8, 滋賀）
- 24) 田形卓巳、白鳥望美、杉浦義紹、小林直樹、小西良子： *Penicillium citreonigrum* 株間におけるシトレオビリジン産生能の比較と毒素産生条件。第37回日本食品微生物学会学術総会（2016, 9, 東京）
- 24) 鈴木佑奈、宮原彩花、吉成知也、小林直樹、小西良子、寺嶋淳、後藤慶一、高橋治男、渡辺麻衣子：発酵食品から分離された黒麹菌と近縁菌の系統分類学的研究。第37回日本食品微生物学会学術総会（2016, 9, 東京）
- 25) 白鳥望美、滝埜昌彦、遠藤治、Phitsanu Tulayakul、杉浦義紹、小林直樹、小西良子：エンドファイティックなカビ *Penicillium brocae* による汚染米の安全性について。第112回日本食品衛生学会学術講演会（2016, 10, 川崎）

- 26) Watanabe, M.: Evaluation of molecular markers for identification of *Aspergillus* and *Fusarium* spp. ISMYCO2016 (2016, 12, Tokyo)
- 27) Suzuki, Y., Takahashi, H., Yoshinari, T., Kobayashi, N., Sugita-Konishi, Y., Terajima, J., Goto, K. and Watanabe, M.: Phylogenic studies on saccharifying activity and fumonisin production in the strains of Kuro-koji molds and their relatives isolated from fermented foods. ISMYCO2016, Tokyo (2016, 12)
- 27) Shiratori, N., Takino, M., Endo, O., Tulayakul, P., Kobayashi, N. and Sugita-Konishi, Y.: Risk potential of rice grains contaminated with an endophytic fungus *Penicillium brocae*. ISMYCO2016, Tokyo (2016, 12)
- 28) 吉成知也、竹田名菜水、寺嶋淳、小林直樹、小西良子：発がん性を有するかび毒ステリグマトシスチンの我が国に流通する食品における汚染実態 第112回日本食品衛生学会学術講演会 (2016年10月)

G. 知的財産権の出願登録状況

JECFA 抜粋 (参考文献含む)

WHO Technical Report Series

Evaluation of certain contaminants in food

Eighty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives

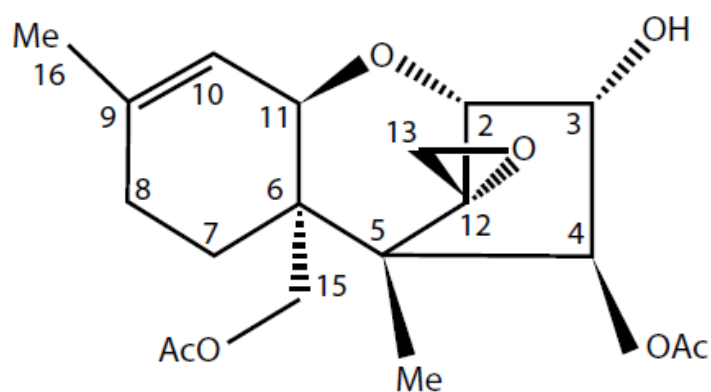
4,15 - diacetoxyscirpenol

4,15 - diacetoxyscirpenol (4,15-DAS); (3)

,4-3-hydroxy-12,13-epoxy-tricothec-9-one-4,15-diyl diacetate; Chemical Abstracts Service [CAS] No.2270-40-8) または anguidin は主に *Fusarium langsethiae*, *F.poa*, *F.sambucinum* が産生するかび毒である。すべてのトリコテセンは 12-13-epoxytrichotec-9-one 構造を持っている。4,15-DAS は T-2 toxin および HT-2 toxin と同様 タイプ A トリコテセンに属している。

4,15-DAS が汚染している食品群は、穀類と穀類加工品、たとえば小麦、大麦、米、ライ麦、トウモロコシおよびソルガムである。またコーヒー豆からも検出されている。

4,15-DAS は、いままで JECFA で評価されたことはないが、構造的に似ている T-2 toxin および HT-2 toxin はすでに 56 回 JECFA 会議で評価されている。



4,15-DAS

< 生化学的性質 >

ゲラチンカプセルに入れて豚に摂取させた場合、4,15-DAS は速やかに吸収され、2つの代謝物、15-monoacetoxyscirpenol (15-MAS)と scirpenol (SCP)は、30-60分で血清中のピークを迎え、48時間後には体内では検出以下の値になっていた。放射性物質標識した

4,15-DAS を投与した場合、腸管内、肝、腎、リンパ組織、造血組織（脾臓、胸腺、大骸骨髄）に検出された。おおむね投与量の 90-94%が尿および糞便に 24 時間以内に排出された。投与量の 3%ほどは約 6 日間体内にとどまり、造血組織に比較的多く残ることが報告されている。4,15-DAS の経口投与におけるバイオアベイラビリティやこれらの汚染が起こす範囲はわかっていない。豚においては、4,15-DAS のほとんどは糞中に排泄され、尿には少しの割合しか排泄されない。しかしマウスやラットではほとんどの 4,15-DAS は尿に排泄される。

In vitro の実験系で、腸内細菌により 4,15-DAS は分解を受け 15-MAS, SCP, de-epoxy SCP がラット、牛、豚では観察されている。de-epoxy 化合物の生成はトリコテセンにとって重要な解毒化合物であるが、トリヤイヌではその生成が認められていない。4,15-DAS の代謝経路をまとめると Phase I では水酸化を経ての脱アセチル化、水酸化が起こり Phase II ではグルクロン抱合体の形成が起こることが、トリ以外の動物で報告されている。

< 毒性学研究 >

LD₅₀ はマウス、ラット、トリでは 2-15 mg/kg bw である。トリでは低用量で LD₅₀ を示しているが、解毒作用が起こりにくいためと考えられる。

マウス、ラット、トリおよび豚の急性毒性としては沈滞、下痢、嘔吐と皮膚の赤面、腸管細胞および造血細胞の壊死が見られる。

構造的相似から、その代謝物の細胞毒性とタンパク合成阻害などへの毒性は、親化合物に比べて低いと推察される。しかし 4,15-DAS と 15-MAS は同様の毒性があると考えられ、また、腸管内で 4,15-DAS は 15-MAS に速やかに転換されることから、15-MAS も含めて 4,15-DAS の毒性を評価できる。

4,15-DAS のデータは限られているので、JECFA 委員会は他の A タイプトリコテセン、T-2 toxin および HT-2 toxin の毒性評価データを比較対象に用いて総合作用を評価した。特に 4,15-DAS の DNA 合成阻害、タンパク合成阻害、T 細胞のアポトーシスなどが T-2 toxin および HT-2 toxin のそれらと同様であった。

4,15-DAS のヒト血液細胞への影響を T-2 toxin と比較すると、T-2 toxinの方がポテンシャルは高い。ブタに対する短期間毒性実験では T-2 toxin は白血球、ヘモグロビン、赤血球数を減少させ、マイトージェン刺激下でのリンパ球増殖を 0.03mg/kg bw/day で抑えているが、4,15-DASで行ったところ血液細胞への影響は 0.4 mg/kg bw/day においても見られなかった。しかし、他の動物での研究において 4,15-DAS は T-2 toxin と同等のリンパ球および造血細胞への影響を経口投与で及ぼすことが報告されている。すなわち、T-2 toxin は in vivo, in vitro の両方で 4,15-DAS より毒性ポテンシャルは高いが、十分なエビデンスとは言えない。4,15-DAS と T-2 toxin の共汚染では、タンパク合成阻害、リンパ球増殖抑制、急性毒性や食欲不振、産卵数減少などの症状が観察されている。

< ヒトにおける知見 >

ヒトに対する食中毒事例は報告されていないが、抗がん剤 (anguidin という名称がつかわれていた) として治験がされている。治験では十分な制癌効果は見られず、血小板減少、嘔吐、低血圧などが 81 μ g/kg bw で見られ、軽微な悪心が 41-65 μ g/kg bw で観察されている。

< 分析法 >

ヒトのバイオマーカーの研究として、4,15-DAS、4,15-DAS の代謝物、4,15-DAS の修飾化合物などのスクリーニングと定量が報告されている。また 4,15-DAS の抗体を使った方法も確立されているが、多くの交差反応を起こすことも知られている。4,15-DAS、15-MAS-3-glucoside、15-MAS-4-glucoside、DAS-3-glucoside がとうもろこしから LC-Orbitrap MS を用いて検出されている。

< 食品汚染レベルとパターン >

JECFA 委員会は GEMS/Food contaminants データベースに提出されている報告と 2000 年から 2016 年までにパブリッシュされた 80 報の論文を基に評価した。GEMS/Food contaminants データベースからの情報では、4,15-DAS の汚染は比較的 low、陽性率も 2.3% ほどであった。4,15-DAS の主な汚染食品は穀類とその加工品であった。アフリカのソルガムでは比較的高い汚染率であり (14%)、最も汚染濃度が高いもので 109 μ g/kg であった。これらの結果から、4,15-DAS の流行と汚染レベルは世界的に見て低いといえる。主な汚染食品は穀類、穀類加工品およびコーヒー豆であった。

< ばく露評価 >

JECFA 委員会は GEMS/Food contaminants データベースからの情報をレビューした。

International estimates of exposure to 4,15-DAS via food for adults^a

Regional area	LB mean exposure (ng/kg bw per day)	UB mean exposure (scenario 1/2/3) (ng/kg bw per day)	LB-UB P90 exposure ^b (scenario 1/2/3) (ng/kg bw per day)	Left-censorship (%)
Africa (Burkina Faso, Ethiopia, Mali)	1.4	20.3/20.3/5	2.8-40.6/40.6/10	86
Americas (Canada)	0	154/na/na	0-308/na/na	100
Eastern Mediterranean (Sudan)	0.4	17/17/4	0.8-34/34/8	96
Europe (Czech Republic, Finland, France, Germany, Slovenia, United Kingdom)	2.8	363/69/41	5.6-726/138/82	98.3
Western Pacific (China [Hong Kong Special Adminis- trative Region], New Zealand, Japan)	0.4	239/57/6.5	0.8-478/114/13	99.4

na: not able to be calculated; P90: 90th percentile

^a Body weight used is 60 kg.

^b P90 exposure is estimated by the Committee as twice the mean exposure (87).

上の図に示すように、ほとんどが検出限界以下であったため（アフリカで 86%、アメリカで 100%）、Lower level bound と Upper level bound の平均値により行った。もっとも信頼のできる国際的な結果としては、アフリカでは 1.4-5 ng/kg bw/day、アメリカでは 0 - 154 ng/kg bw/day、地中海東岸では 0.4-4 ng/kg bw/day、ヨーロッパでは 2.8-41 ng/kg bw/day、西海岸では 0.4-6.5 ng/kg bw/day とした。委員会では censorship を LOD/LOQ 以下と定義している。

< 総合評価 >

JECFA 委員会は、4,15-DAS 単独の評価ができるほど、十分な毒性評価がないと結論付けた。そのため、4,15-DAS と T-2 /HT-2 toxin が構造的に類似している、生化学的にも細胞レベルにおいても in vivo の毒性が類似しており、これらの化合物の共汚染は相加作用をするというエビデンスがある。そのため、このエビデンスを基に 4,15-DAS を T-2 /HT-2 toxin のグループ PMTDI に含めることを支持した。

T-2 /HT-2 toxin の単独または複合 PMTDI は 0.06 µg/kg bw であり、これは豚の 3 週間投与実験の結果白血球数の減少を起こす 0.03 mg/kg bw を基に、安全係数 500 として算出している。4,15-DAS を加えても 0.06 µg/kg bw としたのは T-2 toxin のポテンシャルが 4,15-DAS のそれより高いからである。

また、委員会は、4,15-DAS の汚染実態調査の検出限界(LOQ)の高さにも言及しており、そのために検出限界以下のデータが多いことから、ばく露評価の不確実性が高いとしている。委員会はヨーロッパにおける Lower level bound に基づいたばく露評価から T-2 /HT-2 toxin と 4,15-DAS の合算を適応した。これらの予測値では、4,15-DAS 単独のばく露では 0.0028 µg/kg bw/day(上限)であり、T-2 /HT-2 toxin のばく露が 0.016 µg/kg bw/day

であることから、合算しても平均値として 0.019 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/day であり、高値（平均値の2倍）をとっても 0.038 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/day となり、委員会としては この値は3つのかび毒のグループ PMTDI 0.06 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/day を下回ると結論付けている。

< リスク評価に関連する参考文献 >

1. Shams M, Mitterbauer R, Corradini R, Wiesenberger G, Dall'Asta C, Schuhmacher R et al. Isolation and characterization of a new less-toxic derivative of the *Fusarium* mycotoxin diacetoxyscirpenol after thermal treatment. J Agric Food Chem. 2011;59:9709–14.
2. Tamura M, Mochizuki N, Nagatomi Y, Harayama K, Toriba A, Hayakawa K. A method for simultaneous determination of 20 *Fusarium* toxins in cereals by high-resolution liquid chromatography–Orbitrap mass spectrometry with a pentafluorophenyl column. Toxins. 2015;7:1664–82.
3. Lysoe E, Frandsen RJN, Divon HH, Terzi V, Orru L, Lamontanara A et al. Draft genome sequence and chemical profiling of *Fusarium langsethiae*, an emerging producer of type A trichothecenes. Int J Food Microbiol. 2016;221:29–36.
4. Thrane U, Adler A, Clasen PE, Galvano F, Langseth W, Logrieco A et al. Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae*, and *Fusarium sporotrichioides*. Int J Food Microbiol. 2004;95:257–66.
5. GEMS/Food contaminants database. Geneva: World Health Organization, 2013.
6. Serrano AB, Font G, Ruiz MJ, Ferrer E. Co-occurrence and risk assessment of mycotoxins in food and diet from Mediterranean area. Food Chem. 2012;135:423–9.
7. Schollenberger M, Muller HM, Ruffle M, Suchy S, Plank S, Drochner W. Natural occurrence of 16 *Fusarium* toxins in grains and feedstuffs of plant origin from Germany. Mycopathologia. 2006;161:43–52.
8. Garcia-Moraleja A, Font G, Manes J, Ferrer E. Analysis of mycotoxins in coffee and risk assessment in Spanish adolescents and adults. Food Chem Toxicol. 2015;86:225–33.
9. Bauer J, Bollwahn W, Gareis M, Gedek B, Heinritzi K. Kinetic profiles of

- diacetoxyscirpenol and two of its metabolites in blood serum of pigs. *Appl Environ Microbiol.* 1985;49:842–5.
10. Wang J-S, Busby WF Jr, Wogan GN. Comparative tissue distribution and excretion of orally administered [3H]diacetoxyscirpenol (anguidine) in rats and mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1990;103:430–40.
11. Bauer J, Gareis M, Gedek B. Metabolism of the trichothecenes T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, and deoxynivalenol by farm animals. In: Chelkowski J, editor. *Topics in secondary metabolism, vol. 2. Fusarium: mycotoxins, taxonomy and pathogenicity.* Amsterdam: Elsevier; 1989:139–65.
12. Swanson SP, Nicoletti J, Rood HDJ, Buck WB, Cote LM, Yoshizawa T. Metabolism of three trichothecene mycotoxins, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol and deoxynivalenol, by bovine rumen microorganisms. *J Chromatogr.* 1987;414:335–42.
13. Swanson SP, Helaszek C, Buck WB, Rood HDJ, Haschek WM. The role of intestinal microflora in the metabolism of trichothecene mycotoxins. *Food Chem Toxicol.* 1988;26:823–9.
14. Yang S, De Boevre M, Zhang H, De Ruyck K, Sun F, Wang Z et al. Unraveling the in vitro and in vivo metabolism of diacetoxyscirpenol in various animal species and human using ultrahigh-performance liquid chromatography–quadrupole/time-of-flight hybrid mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2015;407:8571–83.
15. Richardson KE, Hamilton PB. Comparative toxicity of scirpentriol and its acetylated derivatives. *Poult Sci.* 1990;69(3):397–402.
16. Young JC, Zhou T, Yu H, Zhu H, Gong J. Degradation of trichothecene mycotoxins by chicken intestinal microbes. *Food Chem Toxicol.* 2007;45:136–43.
17. 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;16:53–64.
18. Ueno Y. General toxicology. In: Ueno Y, editor. *Developments in food science. IV. Trichothecenes – Chemical, biological and toxicological aspects.* Tokyo/Amsterdam: Kodansha/Elsevier; 1983:125–46.

19. Ueno Y. Mode of action of trichothecenes. *Pure Appl Chem.* 1977;49:1737–45.
20. Thompson WL, Wannemacher RW Jr. Structure–function relationships of 12,13-epoxytrichothecene mycotoxins in cell culture: comparison to whole animal lethality. *Toxicon.* 1986;24(10):985–94.
21. Mirocha CJ, Pawlowsky RJ, Zhu TX, Lee YW. Chemistry and biological activity of *Fusarium roseum* mycotoxins. In: Lacey J, editor. *Trichothecenes and other mycotoxins.* Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.; 1985:291–305.
22. Richardson KE, Hamilton PB. Comparative toxicity of scirpentriol and its acetylated derivatives. *Poult Sci.* 1990;69(3):397–402.
23. Ademoyero AA, Hamilton PB. Mouth lesions in broiler chickens caused by scirpenol mycotoxins. *Poult Sci.* 1991;70:2082–9.
24. Tscherne JS, Pestka S. Inhibition of protein synthesis in intact HeLa cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 1975;8:479–87.
25. Mizuno S. Mechanism of inhibition of protein synthesis initiation by diacetoxyscirpenol and fusarenon X in the reticulocyte lysate system. *Biochim Biophys Acta.* 1975;377:207–14.
26. Cundliffe E, Davies JE. Inhibition of initiation, elongation, and termination of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins. *Antimicrob Agents Chemother.* 1977;11:491–9.
27. Cooray R. Effects of some mycotoxins on mitogen-induced blastogenesis and SCE frequency in human lymphocytes. *Food Chem Toxicol.* 1984;22:529–34.
28. Lee DH, Park T, Kim HW. Induction of apoptosis by disturbing mitochondrial-membrane potential and cleaving PARP in Jurkat T cells through treatment with acetoxyscirpenol mycotoxin. *Biol Pharm Bull.* 2006;29(4):648–54.
29. Nasri T, Bosch RR, Voorde ST, Fink-Gremmels J. Differential induction of apoptosis by type A and B trichothecenes in Jurkat T-lymphocytes. *Toxicol In Vitro.* 2006;20:832–40.
30. Jun DY, Kim JS, Park HS, Song WS, Bae YS, Kim YH. Cytotoxicity of diacetoxyscirpenol is associated with apoptosis by activation of caspase-8 and interruption of cell cycle progression by down-regulation of cdk4 and cyclin B1 in human Jurkat T cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007;222:190–201.

31. Parent-Massin D, Fuselier R, Thouvenot D. In vitro toxicity of trichothecenes on human haematopoietic progenitors. *Food Addit Contam.* 1994;11:441–7.
32. Parent-Massin D, Thouvenot D. In vitro toxicity of trichothecenes on rat haematopoietic progenitors. *Food Addit Contam.* 1995;12:41–9.
33. Rio B, Lautraite S, Parent-Massin D. In vitro toxicity of trichothecenes on human erythroblastic progenitors. *Hum Exp Toxicol.* 1997;16:673–9.
34. Thuvander A, Wikman C, Gadhasson I. In vitro exposure of human lymphocytes to trichothecenes: individual variation in sensitivity and effects of combined exposure on lymphocyte function. *Food Chem Toxicol.* 1999;37:639–48.
35. Froquet R, Sibiril Y, Parent-Massin D. Trichothecene toxicity on human megakaryocyte progenitors (CFU-MK). *Hum Exp Toxicol.* 2001;20:84–9.
36. Rafai P, Tuboly S, Bata A, Tilly P, Vanyi A, Papp Z et al. Effect of various levels of T-2 toxin in the immune system of growing pigs. *Vet Rec.* 1995;136:511–4.
37. Harvey RB, Kubena LF, Elissalde MH, Corrier DE, Huff WE, Rottinghaus GE et al. Co-contamination of swine diets by aflatoxin and diacetoxyscirpenol. *J Vet Diagn Invest.* 1991;3:155–60.
38. Weaver GA, Kurtz HJ, Bates FY, Mirocha CJ, Behrens JC, Hagler WM. Diacetoxyscirpenol toxicity in pigs. *Res Vet Sci.* 1981;31:131–5.
39. Ziprin RL, Corrier DE. Listeriosis in diacetoxyscirpenol-treated mice. *Am J Vet Res.* 1987;48:1516–9.
40. Corrier DE, Ziprin RL. Immunotoxic effects of T-2 toxin on cell-mediated immunity to listeriosis in mice: comparison with cyclophosphamide. *Am J Vet Res.* 1986;47(9):1956–86.
41. Janse van Rensburg DF, Thiel PG, Jaskiewicz K. Short-term effects of two *Fusarium* toxins, diacetoxyscirpenol and neosolaniol monoacetate, in male Wistar rats. *Food Chem Toxicol.* 1987;25:767–71.
42. Hoerr FJ, Carlton WW, Yagen B. Mycotoxicosis caused by a single dose of T-2 toxin or diacetoxyscirpenol in broiler chickens. *Vet Pathol.* 1981;18:652–64.

43. Diaz GJ, Squires EJ, Julian RJ, Boermans HJ. Individual and combined effects of T-2 toxin and DAS in laying hens. *Br Poult Sci.* 1994;35:393–405.
44. Galhardo M, Birgel EH, So-Ares LMV, Furlani RPZ, Birgel EH. Intoxicacao por Diacetoxiscirpenol em bovinos alimentados com polpa citrica no Estado de Sao Paulo, Brasil. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 1997;34(2):90–1.
45. Konjevic D, Srebocan E, Gudan A, Lojkic I, Severin K, Sokolovic M. A pathological condition possibly caused by spontaneous trichothecene poisoning in Brahma poultry: first report. *Avian Pathol.* 2004;33:377–80.
46. Murphy WK, Burgess MA, Valdivieso M, Livingston RB, Bodey GP, Freireich EJ. Phase I clinical evaluation of anguidine. *Cancer Treat Rep.* 1978;62:1497–1502.
47. DeSimone PA, Greco FA, Lessner HF. Phase I evaluation of a weekly schedule of anguidine. Southeastern Cancer Study Group Committee on Gastrointestinal Malignancies. *Cancer Treat Rep.* 1979;63:2015–7.
48. DeSimone PA, Greco FA, Lessner HF, Bartolucci A. Phase II evaluation of anguidine (NSC 141537) in 5-day courses in colorectal adenocarcinoma. A Southeastern Cancer Study Group Trial. *Am J Clin Oncol.* 1986;9:187–8.
49. Beardall JM, Miller JD. Diseases in humans with mycotoxins as possible causes. In: Miller JD, Trenholm HL, editors. *Mycotoxins in grain: compounds other than aflatoxins.* St Paul (MN): Eagan Press; 1994:487–539.
50. Toxicology and occurrence of nivalenol, fusarenon X, diacetoxyscirpenol, neosolaniol and 3- and 15-acetyldeoxynivalenol: a review of six trichothecenes. Bilthoven: National Institute for Public Health and the Environment (RIVM); 2002.
51. Hack R, Klaffer U, Terplan G. A monoclonal-antibody to the trichothecene mycotoxin diacetoxyscirpenol. *Lett Appl Microbiol.* 1989;8:71–5.
52. Tangni EK, Motte JC, Callebaut A, Pussemier L. Cross-reactivity of antibodies in some commercial deoxynivalenol test kits against some fusariotoxins. *J Agric Food Chem.* 2010;58:12625–33.
53. Lopez P, de Rijk T, Sprong RC, Mengelers MJB, Castenmiller JJM, Alewijn M.

- A mycotoxin-dedicated total diet study in the Netherlands in 2013: Part II – Occurrence. *World Mycotoxin J.* 2016;9:89–108.
54. Nakagawa H, Sakamoto S, Sago Y, Nagashima H. Detection of type A trichothecene di-glucosides produced in corn by high-resolution liquid chromatography–Orbitrap mass spectrometry. *Toxins.* 2013;5:590–604.
55. Heyndrickx E, Sioen I, Huybrechts B, Callebaut A, De Henauw S, De Saeger S. Human biomonitoring of multiple mycotoxins in the Belgian population: results of the BIOMYCO study. *Environ Int.* 2015;84:82–9.
56. Rodriguez-Carrasco Y, Font G, Molto JC, Berrada H. Quantitative determination of trichothecenes in breadsticks by gas chromatography–triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2014;31:1422–30.
57. Mycotoxin sampling tool (Version 1.1). Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2016.
58. General standard for contaminants and toxins in food and feed. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Codex Alimentarius Commission; 1995:65 (CODEX STAN 193-1995).
59. European Commission. Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *O J.* 2006;L70:12–3
60. Jouany JP. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Anim Feed Sci Technol.* 2007;137:342–62.
61. Risk assessment of mycotoxins in cereal grain in Norway. VKM-Norwegian Scientific Committee for Food Safety; 2013 (Document no. 10-004-4-Final: 62-81).
62. Oldenburg E, Valenta H, Sator C. [Risk assessment and avoidance strategies in feed production.] In: Danicke S, Oldenburg E, editors. [Risk factors for *Fusarium* toxin formation and prevention strategies in feed production and feeding.] *Landbauforschung Volkenrode, Sonderheft no. 216*;2000:5–34 (in German).
63. Eeckhout M, Haesaert G, Landschoot S, Deschuyffeleer N, De Laethauwer S.

- Guidelines for prevention and control of mould growth and mycotoxin production in cereals. Mycohunt. Annex 1 to D8.1. Report guidelines on prevention measures; 2013.
64. Hofer K, Barmeier G, Schmidhalter U, Habler K, Rychlik M, Huckelhoven R et al. Effect of nitrogen fertilization on *Fusarium* head blight in spring barley. *Crop Prot.* 2016;88:18–27.
65. Ferrigo D, Raiola A, Causin R. Plant stress and mycotoxin accumulation in maize. *Agrochimica.* 2014;58:116–27.
66. Cabral LC, Pinto VF, Patriarca A. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *Int J Food Microbiol.* 2013;166:1–14.
67. Ng LC, Ngadin A, Azhari M, Zahari NA. Potential of *Trichoderma* spp. as biological control agents against bakanae pathogen (*Fusarium fujikuroi*) in rice. *Asian J Plant Pathol.* 2015;9(2):46–58.
68. Pagnussatt FA, Ponte EMD, Garda-Bufferon J, Badiale-Furlong E. Inhibition of *Fusarium graminearum* growth and mycotoxin production by phenolic extract from *Spirulina* sp. *Pestic Biochem Physiol.* 2014;108:21–6.
69. Goral T, Stuper-Szablewska K, Busko M, Boczkowska M, Walentyn-Goral D, Wisniewska H et al. Relationships between genetic diversity and *Fusarium* toxin profiles of winter wheat cultivars. *Plant Pathol J.* 2015;31:226–44.
70. Kottapalli B, Wolf-Hall CE, Schwarz P. Effect of electron-beam irradiation of the safety and quality of *Fusarium*-infected malting barley. *Int J Food Microbiol.* 2006;110:224–31.
71. Young JC, Zhu H, Zhou T. Degradation of trichothecene mycotoxins by aqueous ozone. *Food Chem Toxicol.* 2006;44:417–24.
72. Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety. Parma: European Food Safety Authority; 2009.
73. Schollenberger M, Muller HM, Ernst K, Sondermann S, Liebscher M, Schlecker C et al. Occurrence and distribution of 13 trichothecene toxins in naturally contaminated maize plants in Germany. *Toxins.* 2012;4:778–87.
74. Garcia-Moraleja A, Font G, Manes J, Ferrer E. Simultaneous determination of mycotoxin in commercial coffee. *Food Control.*

2015;57:282–92.

75. Hussein HM, Franich RA, Baxter M, Andrew IG. Naturally occurring *Fusarium* toxins in New Zealand maize. *Food Addit*

Contam. 1989;6(1):49–57.

76. Lincy SV, Latha R, Chandrashekar A, Manonmani HK. Detection of toxigenic fungi and quantification of type A trichothecene

levels in some food and feed materials from India. *Food Control.* 2008;19:962–6.

77. Khatoon S, Hanif NQ, Tahira I, Sultana N, Sultana K, Ayub N. Natural occurrence of aflatoxins, zearalenone and trichothecenes

in maize grown in Pakistan. *Pak J Bot.* 2012;44(1):231–6.

78. Kononenko GP, Burkin AA, Gavrilova OP, Gagkaeva TY. Fungal species and multiple mycotoxin contamination of cultivated

grasses and legumes crops. *Agric Food Sci.* 2015;24(4):323–30.

79. Reports on tasks for scientific cooperation. Report of experts participating in Task 3.2.10. Collection of occurrence data

of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU Member States. Directorate-General

Health and Consumer Protection; 2003.

80. Rodriguez-Carrasco Y, Ruiz MJ, Font G, Berrada H. Exposure estimates to *Fusarium* mycotoxins through cereals intake.

Chemosphere. 2013;93:2297–2303.

81. FAO/WHO. Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food. A joint publication of the Food and

Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization. Geneva: World Health Organization;

2009 (Environmental Health Criteria 240).

II . 分担研究総合報告

厚生労働科学研究費補助金研究事業
(食品の安全確保推進研究事業)
総合研究報告書

ステリグマトシスチンと 4,15-ジアセトキシシルペノールの汚染実態調査
(2016~2018 年度)

分担研究者

吉成知也 (国立医薬品食品衛生研究所)

研究要旨：本研究においては、2016~2018 年の 3 年間に亘り、日本に流通する食品を対象に、STC 及び 4,15-DAS の汚染調査を行った。両かび毒ともに国際的な関心が高まっており、STC については欧州食品安全機関 (EFSA) により 2013 年にリスク評価、2015 年に汚染実態調査の結果が報告され、さらに 2016 年に JECFA においてリスク評価が実施された。4,15-DAS は 2016 年の JECFA で評価され、さらに EFSA においても 2018 年にリスク評価の結果が公表された。

STC については、11 食品群計 583 検体の調査を行った。116 検体 (20%) から定量限界値以上の STC が検出された。陽性率が比較的高かった試料は国産小麦粉、ハト麦加工品及びライ麦粉であった。陽性の 116 検体のうち、91 検体 (76%) において STC 濃度は 0.05 ~ 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の範囲であった。ライ麦粉 2 検体において、5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の濃度の STC が検出された。STC 濃度の平均値が比較的高かったのは、ハト麦加工品 (0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、ライ麦粉 (0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 及び国産小麦粉 (0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) であった。

4,15-DAS については、12 食品群計 461 検体の調査を行った。4,15-DAS はハト麦加工品、ソルガム及びコーンフラワーから検出され、陽性率はそれぞれ 57%、33% 及び 8% であった。平均濃度はハト麦加工品の 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ が最も高く、ソルガムとコーンフラワーではそれぞれ 0.3 及び 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、ハト麦加工品と比べると非常に低かった。最大濃度はハト麦加工品の 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。

モンテカルロシミュレーション法により、日本人における小麦加工品からの STC ばく露量を推定した。50%ile 値は 0.01 ~ 0.02、80%ile 値は 0.03 ~ 0.05、90%ile 値は 0.05 ~ 0.08、95%ile 値は 0.08 ~ 0.12 ng/kg 体重/日であり、また平均値は 0.03 ~ 0.04 ng/kg 体重/日であった。JECFA による STC のリスク評価の際に採用された BMDL_{10} 0.16 mg/kg 体重/日に基づき、日本人の STC 平均摂取量から MOE を算出した結果、4,000,000 ~ 5,300,000 であった。今回算出された STC のばく露量は、過去に推定されたアフラトキシン B_1 の 20 ~ 30 倍であり、STC の毒性がアフラトキシン B_1 よりも低いとされていることを勘案しても、日本人におけるかび毒による肝臓ガン発症のリスク評価を実施するには STC も考慮に入れる必要性があると考えられる。一方で、平均的な日本人における STC の MOE は 10,000 を上回っており、健康に対する影響は少ないと考えられる。

研究協力者

脇 ますみ 神奈川県衛生研究所
橋口 成喜 川崎市健康安全研究所
佐藤 英子 川崎市健康安全研究所
谷口 賢 名古屋市衛生研究所
中島 正博 名古屋市衛生研究所
竹内 浩 三重県保健環境研究所
藤吉 智治 (一財)食品分析開発センター

SUNATEC

森田 剛史 (一財)日本穀物検定協会
本田 俊一 (一財)日本食品検査
七戸 八重子 (一財)日本食品検査
伊佐川 聡 (一財)日本食品分析センター
飯塚 誠一郎 (一財)日本食品分析センター
猪之鼻 修一 (一財)日本食品分析センター
小杉 正樹 (一財)日本食品分析センター
笛木 周平 (一財)日本食品分析センター
宮崎 光代 (一財)日本食品分析センター

A. 研究目的

世界的に汚染頻度が高く、健康被害が予測されるかび毒は、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (JECFA) で毒性評価が行われ、コーデックス委員会で規格策定が行われている。我が国はコーデックス委員会の加盟国であることから、コーデックス規格を食品の規格基準に採用することが厚生労働省の方針として決められている。

厚生労働省は、リンゴジュース中のパツリン、小麦玄麦中のデオキシニバレノール、全食品中の総アフラトキシン及び乳中のアフラトキシン M₁ に対して規制を行っている。また、コーデックス規格が定められているオクラトキシン A やフモニシンに関しては、本研究事業で実態調査が行われており、それらについては食品安全委員会において我が国におけるリスク評価が実施され

た。また、JECFA において毒性評価が行われた T-2 トキシン、HT-2 トキシン及びゼアラレノンの 3 種のフザリウムトキシンについても汚染実態調査を行った。

本事業が研究対象とするステリグマトシスチン (STC) と 4,15-ジアセトキシシルペノール (4,15-DAS) については、日本に流通する食品における汚染実態はほとんどわかっていない。一方で、STC については欧州食品安全機関 (EFSA) により 2013 年にリスク評価、2015 年に汚染実態調査の結果が報告され^{1,2)}、また、2016 年に JECFA においてリスク評価が実施された³⁾。4,15-DAS は 2016 年の JECFA で評価され、さらに EFSA においても 2018 年にリスク評価の結果が公表された⁴⁾。このような背景からこの 2 種のかび毒に対する関心が国際的に高くなってきている。

本研究においては、2016~2018 年の 3 年間に亘り、日本に流通する食品を対象に、STC 及び 4,15-DAS の汚染調査を行った。これらの結果は、我が国におけるヒトへのばく露評価に用いられ、国民が摂取しているかび毒が健康被害を起こすレベルであるか否かを判断する科学的根拠となる。

B. 研究方法

1. 試料

検体は日本各地の小売店などからランダムに購入したものをを用いた。

2. 分析法

STC 及び 4,15-DAS の分析は、3 年間同じ方法を用いた。分析法の妥当性は 2016 年度に複数機関で評価した。

2-1. STC の分析法

粉状の検体、ビール及びワイン以外の検体については、破砕機で粉末状に破砕した。ビールとワイン以外の試料からの STC 抽出

は、試料 25 g に抽出溶媒アセトニトリル：水 (85 : 15) 100 mL を加え、30 分間振盪することで行った。添加回収試験の場合は STC の標準溶液を添加し (終濃度 0.5 又は 5.0 µg/kg) 暗所に 1 時間放置した後に抽出を行った。遠心分離 (1410g、10 分間) により抽出液を分離した。

精製はイムノアフィニティーカラム (IAC、堀場製作所社製 AFLAKING) を用いた。抽出液 5.0 mL をピペッターで 50 mL のメスフラスコにとり、PBS で 50 mL にメスアップした後、ガラス繊維ろ紙でろ過した。ビール (一晩置いて脱気した) とワインについては、検体 5.0 g を 50 mL のメスフラスコにとり、PBS で 50 mL にメスアップした。希釈液 20 mL (ビールとワインは 5 mL) を IAC に添加し、PBS 10 mL と蒸留水 10 mL で洗浄後、アセトニトリル 3 mL で溶出した。溶出液を窒素気流により乾固後、残渣をアセトニトリル 0.5 mL で溶解後、さらに蒸留水 0.5 mL を加えてから混合したものを試験溶液とした。

< LC-MS/MS の測定条件 >

HPLC

カラム : InertSustain C18

2.1×150 mm, 3 µm

カラム温度 : 40

移動相 : A 2 mmol/L 酢酸アンモニウム

B メタノール

分離条件 : 0 分 A : B = 60 : 40

13 分 A : B = 10 : 90

流速 : 0.2 mL/分

注入量 : 10 µL

MS

イオン化 : ESI positive

モニタリングイオン : 325[M+H]⁺>281

2-2. 4,15-DAS の汚染実態調査

抽出は、試料 25 g に抽出溶媒アセトニトリル：水 (85 : 15) 100 mL を加え、30 分間振盪することで行った。添加回収試験の場合は試料中の 4,15-DAS 濃度が 5 又は 50 µg/kg となるよう標準品を添加し、暗所に 1 時間放置した後に抽出を行った。遠心分離 (1410g、10 分間) により抽出液を分離した。

精製は多機能カラム (昭和電工社製 Autoprep MF-T 1500) を用いた。抽出液約 10 mL をカラムに入れ、最初の流出液 3 mL は捨て、次いで流出する約 2.4 mL を試験管に採った。その溶出液から 2.0 mL を別の試験管に正確にとり、窒素気流により乾固後、残渣をアセトニトリル：水 (1 : 9) 0.5 mL で溶解したものを試験溶液とした。

ハト麦茶については、製品の作り方に記載された量の沸騰水でティーバックからお茶を煮出したものを試料とした。2 mL のアセトニトリルと 2 mL の蒸留水で前処理した固相カラム (Biotage 社製 ISOLUTE Myco 60mg) に試料 2 g を供した。蒸留水 3 mL と 10% アセトニトリル 3 mL でカラムを洗浄後、アセトニトリル 2 mL で溶出した。溶出液を窒素気流により乾固後、残渣をアセトニトリル：水 (1 : 9) 1 mL で溶解したものを試験溶液とした。

< LC-MS/MS の測定条件 >

HPLC

カラム : InertSustain C18

2.1×150 mm, 3 µm

カラム温度 : 40

移動相：A 2 mmol/L 酢酸アンモニウム
B メタノール

分離条件：0分 A：B = 80：20
8分 A：B = 10：90
12分まで保持

流速：0.2 mL/分

注入量：10 μ L

MS

イオン化：ESI positive

モニタリングイオン：384[M+H]⁺>307

平均値については、検出限界値（LOD）未満の値は0に、検出限界値以上定量限界値（LOQ）未満の値は検出限界値に置き換えて算出した。中央値は陽性率が50%以上であった試料においてのみ算出した。

3. ばく露量推定

摂取量は、2005～2007年に実施された食品摂取量・摂取頻度調査の結果を用いた。対象食品から小麦加工品139種を選抜した。それぞれ的小麦加工品の摂取量に対し、小麦の含有量を掛け、さらに麺類についてはDONの残存率0.289を掛けた。のべ40364人のデータに対し、同一人物のデータを平均化することにより、4506人の摂取量データとした。各個人における139種の小麦摂取量を足し合わせ、総小麦摂取量とした。Crystal Ball（株）構造計画研究所）を用いてモデルの探索を行った結果、対数正規分布が適合した（二乗検定）。

DONの汚染量は2016～18年度の国産小麦粉72件と輸入小麦粉61件の結果を用いた。輸入小麦粉のデータ数を8倍（488件）に複製し、国産小麦粉の約7倍になるようデータセットを作った。Lower boundを求め

る際には、検出限界値未満の値を0、検出限界値以上定量限界値未満の値を0.02に置き換えた。合計560件のうち343件が0であるため、そのデータを除いた217件のデータを用いた。モデルの探索を行ったが適合するものが無かったため、個々の数値を用いたカスタム分布とした。STC濃度と摂取量を掛け合わせた後（試行回数100000）0.3875を掛けた値をばく露量とした。Upper boundを求める際には、検出限界値未満の値を0.02、検出限界値以上定量限界値未満の値を0.05に置き換えた。輸入小麦粉のデータ数を8倍（488件）に複製し、国産小麦粉の約7倍になるようデータセットを作った。モデル探索を行ったが、適合するものが無かったため、個々の数値を用いたカスタム分布とした。試行回数は100000回とした。

C. 研究結果

1. STCの汚染実態

表1に3年間の調査結果のまとめを示した。計583検体の調査を行い、116検体（20%）から定量限界値以上のSTCが検出された。陽性率が比較的高かった試料は国産小麦粉（44%）、ハト麦加工品（42%）、ライ麦粉（30%）、米（23%）であった。輸入小麦粉、そば粉、ホワイトソルガム、大麦加工品、小豆及びコーンフラワーからもSTCは検出されたが、陽性率は4～16%の範囲で比較的低かった。陽性の116検体のうち、91検体（76%）においてSTC濃度は0.05～0.5 μ g/kgの範囲であった。ハト麦加工品4検体、ライ麦粉2検体及び国産小麦粉1検体において、1.5～5 μ g/kgの濃度範囲のSTCが検出された。ライ麦粉2検体において、5 μ g/kg以上の濃度のSTCが検出された（5.1及び

7.1 µg/kg) ）、STC 濃度の平均値が比較的高かったのは、ハト麦加工品 (0.3 µg/kg) ）、ライ麦粉 (0.3 µg/kg))及び国産小麦粉 (0.1 µg/kg))であった。

2. 4,15-DAS の汚染実態

表 2 に 3 年間の調査結果のまとめを示した。計 461 検体の調査を行い、4,15-DAS はハト麦加工品、ソルガム及びコーンフラワーから検出された。ライ麦粉、国産及び輸入小麦粉、米、そば粉、エン麦、大麦加工品、小豆、ビール及びハト麦茶からは定量限界値 (0.5 µg/kg) 以上の濃度の 4,15-DAS は検出されなかった。ハト麦加工品の陽性率が 57%と最も高く、次いでソルガムの 33%、コーンフラワーの 8%であった。平均濃度はハト麦加工品の 10 µg/kg が最も高く、ソルガムとコーンフラワーではそれぞれ 0.3 及び 0.1 µg/kg であり、ハト麦加工品と比べると非常に低かった。最大濃度はハト麦加工品の 70 µg/kg であった。

3. ばく露量推定

モンテカルロシミュレーションに用いた小麦粉の摂取量の分布を図 1 に、小麦粉の STC 汚染量の分布を図 2 に示した。日本人における小麦加工品からの STC ばく露量を推定した結果を図 3 及び表 3 に示した。50%ile 値は 0.01 ~ 0.02、80%ile 値は 0.03 ~ 0.05、90%ile 値は 0.05 ~ 0.08、95%ile 値は 0.08 ~ 0.12 ng/kg 体重/日であり、また平均値は 0.03 ~ 0.04 ng/kg 体重/日であった。

2016 年に行われた JECFA による STC のリスク評価の際に採用された BMDL₁₀ 0.16 mg/kg 体重/日に基づき、日本人の STC 平均摂取量から MOE を算出した結果、4,000,000

~ 5,300,000 であった。

D. 考察

1. STC について

日本以外の地域における STC の食品汚染については近年情報が集まっている。2013 ~ 2014 年にヨーロッパ 9 カ国で実施された汚染調査の結果では、STC は穀類から主に検出された²⁾。大麦、トウモロコシ、ライ麦及び小麦における平均濃度はそれぞれ 0.032、0.059、0.024 及び 0.015 µg/kg であった。中国で 2016 年に小麦 32 検体を対象とした調査では、STC の陽性率は 53.1%、平均濃度は 0.07 µg/kg であった⁵⁾。中国のビール 101 検体からは STC は不検出であった⁶⁾。我々の 3 年間の調査結果における STC 汚染レベルはこれら海外の報告と同等であった。一方でサブサハラアフリカ地域産のホワイトソルガム 1533 検体を対象とした調査では、15%の検体から STC が検出され、濃度範囲は 2.5 ~ 1189 µg/kg であった⁷⁾。またナイジェリア産の米 38 検体の調査結果では 17 検体から STC が検出され、平均濃度が 18.99 µg/kg、最高濃度が 124.95 µg/kg であった⁸⁾。我々の調査においては、これらアフリカの検体で認められたような高濃度汚染の検体は存在しなかった。

3 年間の調査結果において STC は小麦粉、はと麦加工品及びライ麦粉で主に検出された。2005 ~ 2007 年に実施された食品摂取量・摂取頻度調査の結果から小麦加工品、ハト麦加工品及びライ麦加工品の 1 日当たりの摂取量を算出したところ、それぞれ 3、0.0003 及び 0.009 g/体重であり、小麦加工品と比較してハト麦とライ麦加工品の摂取量は著しく低かった。よって STC のばく露量推定には小麦加工品のみを用いることとした。2004 ~ 06 年に厚生労働科学研究で実施

された日本に流通する食品中のアフラトキシン B₁ の汚染実態調査結果を基に、ばく露量推定が行われた。その結果、80%ile 値は 0、90%ile 値は 0.001、95%ile 値は 0.003 ~ 0.004 ng/kg 体重/日であった⁹⁾。ばく露量推定に用いた食品の種類やモンテカルロシミュレーションの方法が STC とアフラトキシン B₁ では異なることから単純な比較は出来ないが、今回算出された STC のばく露量はアフラトキシン B₁ の 20 ~ 30 倍であった。STC の毒性がアフラトキシン B₁ よりも低いとされていることを勘案しても、日本人におけるかび毒による肝臓ガン発症のリスク評価を実施するには STC も考慮に入れる必要があると考えられる。一方で、平均的な日本人における STC の MOE は 10,000 を上回っており、健康に対する影響は少ないと考えられる。今後、小麦加工品における STC の汚染実態を調べ、より正確なばく露量を推定するためのデータを得る必要があると考える。

2. 4,15-DAS について

2010 ~ 2015 年度に実施した T-2 トキシンの汚染調査の結果では、小麦、大麦、ライ麦、ソバ、ハト麦加工品、小豆など多様な食品から検出された¹⁰⁾。4,15-DAS は T-2 トキシンの化学構造が非常に似た類縁体であることから、T-2 トキシンと同様に様々な食品種から検出されることが予想された。しかし、3 年間で 12 種の食品群の調査を行った結果、4,15-DAS が T-2 トキシンと同レベルで検出された食品はハト麦加工品のみで、小麦や大麦といった日本人における摂取量が比較的多い食品では全く検出されなかった。EFSA が 2018 年に公表したリスク評価書では、2000 年以降に発表されたヨーロッパにおける 4,15-DAS の汚染調査に関する

報告がまとめられた⁴⁾。ドイツ、フランス、イギリス、フィンランドやデンマークでの調査では、ほとんどの小麦、大麦、ライ麦やオーツ麦から 4,15-DAS は検出されず、検出されたものも濃度は 1 µg/kg 未満であった。ソルガム、コーヒー、芋製品などで数 10 µg/kg 検出されたとの報告もあるが、件数は極めて少なかった。

このように 4,15-DAS が汚染する食品は非常に限られており、4,15-DAS を単独で摂取することによる健康リスクは低いと考えられる。ただ、2016 年の第 83 回 JECFA 会議において、これまで T-2 トキシンと HT-2 トキシンに設定されていたグループ PMTDI 0.06 µg/kg に 4,15-DAS も加えられた³⁾。このことより国際的には 3 種のかび毒をまとめて評価する流れが主流になっていることが予想される。今後は T-2 トキシン、HT-2 トキシン及び 4,15-DAS の 3 種まとめて汚染調査を行い、汚染濃度や頻度の違いを明らかにし、健康リスクを評価する必要があると考える。

参考文献

- 1) EFSA. Scientific Opinion on the risk for public and animal health related to the presence of sterigmatocystin in food and feed. EFSA Journal. 2013;11(6):3254.
- 2) EFSA. Survey on sterigmatocystin in food. EFSA Supporting Publications. 2015; 12(3):774E.
- 3) WHO. Evaluation of certain contaminants in food. WHO Technical Report Series. 2017; No.1002
- 4) EFSA. Risk to human and animal health related to the presence of 4,15 diacetoxyscirpenol in food and feed. EFSA

- Journal. 2018;(16)8: e05367.
- 5) Zhao Y et al. Wang Q, Huang J, Ma L, Chen Z, Wang F. 2018. Aflatoxin B₁ and sterigmatocystin in wheat and wheat products from supermarkets in China. Food Addit. Contam. Part B. 2018; 1(1):9-14.
 - 6) Zhao Y et al. Aflatoxin B₁ and sterigmatocystin survey in beer sold in China. Food Addit. Contam. Part B. 2017;10(1):64-68.
 - 7) Ssepuuya G et al. Mycotoxin contamination of sorghum and its contribution to human dietary exposure in four sub-Saharan countries. Food Addit. Contam. Part A. 2018;35(7):1384-1393.
 - 8) Rofiat A-S et al. Fungal and bacterial metabolites associated with natural contamination of locally processed rice (*Oryza sativa* L.) in Nigeria. Food Addit. Contam. Part A. 2015;32(6):950-959.
 - 9) Sugita-Konishi Y et al. Exposure to aflatoxins in Japan: risk assessment for aflatoxin B₁. Food Addit. Contam. Part A. 2010;27(3):365-372.
 - 10) Yoshinari T et al. Occurrence of four *Fusarium* mycotoxins, deoxynivalenol, zearalenone, T-2 toxin, and HT-2 toxin, in wheat, barley, and Japanese retail food. J. Food Prot. 2014;77(11):1940-1946.

4,15-Diacetoxyscirpenol and their Occurrence in Japanese Retail Food. Toxins. 2018;10(5):E178.

【学会発表】

- 1) 吉成知也、竹田名菜水、寺嶋淳、小林直樹、小西良子：発がん性を有するかび毒ステリグマトシスチンの我が国に流通する食品における汚染実態
第112回日本食品衛生学会学術講演会(2016年10月)
- 2) 吉成知也、竹田名菜水、小西良子、寺嶋淳：4,15-ジアセトキシシルベノールのモディファイド化合物の汚染実態
第80回日本マイコトキシン学会学術講演会(2017年7月)
- 3) 吉成知也、小杉正樹、佐藤英子、七戸八重子、竹内浩、谷口賢、藤吉智治、脇ますみ、小西良子、大西貴弘、工藤由起子：国内流通食品におけるステリグマトシスチンの汚染実態調査
第83回日本マイコトキシン学会学術講演会(2019年1月)

G.知的財産権の出願登録状況
なし

F. 研究業績

【論文発表】

- 1) Yoshinari T et al. Development of an Analytical Method for Simultaneous Determination of the Modified Forms of

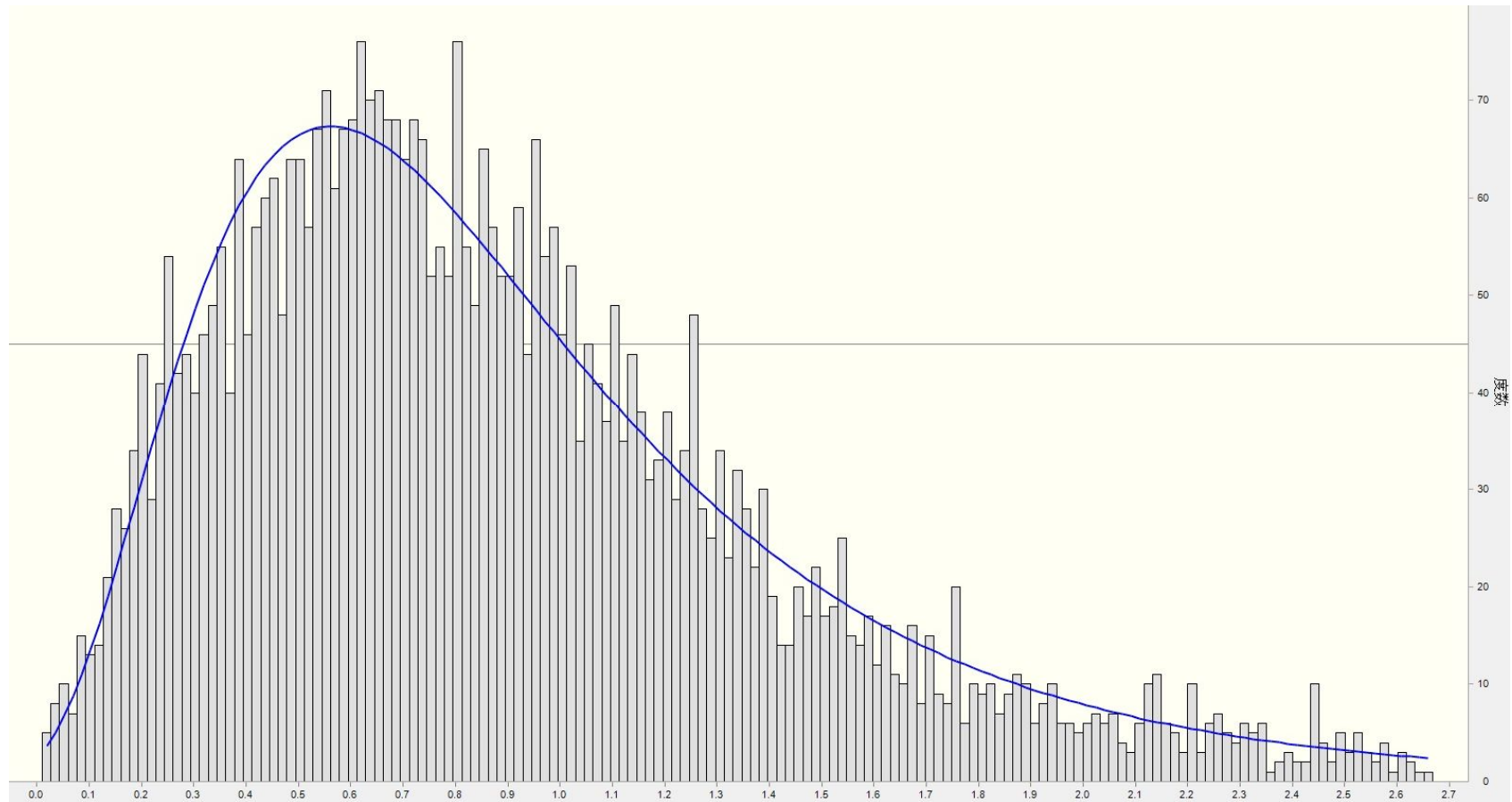
表1 食品中のSTCの汚染実態結果(2016~18年度)

食品	調査数 N	陽性		0.05-0.5 μg/kg		0.5-1.5 μg/kg		1.5-5 μg/kg		> 5 μg/kg		平均値 (μg/kg)	最大値 (μg/kg)
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%		
国産小麦粉	72	32	44%	28	39%	3	4%	1	1%			0.1	2.4
ハト麦加工品	72	30	42%	16	22%	10	14%	4	6%			0.3	4.1
ライ麦粉	87	26	30%	18	21%	4	5%	2	2%	2	2%	0.3	7.1
米	40	9	23%	9	23%							0.04	0.4
輸入小麦粉	61	10	16%	10	16%							0.02	0.1
そば粉	25	2	8%	1	4%	1	4%					0.04	0.6
ホワイトソルガム	12	1	8%	1	8%							0.03	0.3
大麦加工品	35	2	6%	2	6%							0.01	0.1
小豆	39	2	5%	2	5%							0.004	0.07
コーンフラワー	47	2	4%			2	4%					0.05	1.5
ワイン	30	0	0%									-	-
ビール	63	0	0%									-	-
合計	583	116	20%	87	16%	20	3%	7	1%	2	0.3%		

表2 食品中の4,15-DASの汚染実態結果(2016~18年度)

	調査数	陽性率(%)	平均値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	最大値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
ハト麦加工品	68	57	10	70
ソルガム	12	33	0.3	1
コーンフラワー	48	8	0.1	1
ライ麦粉	62	0	-	-
国産小麦粉	72	0	-	-
輸入小麦粉	72	0	-	-
米	20	0	-	-
そば粉	17	0	-	-
エン麦	10	0	-	-
大麦加工品	15	0	-	-
小豆	33	0	-	-
ビール	20	0	-	-
ハト麦茶	12	0	-	-

図1 日本人における小麦粉の摂取量の分布



対数正規分布（青線）を適用した。

X軸の単位は g/kg 体重/日

図2 小麦粉におけるSTC汚染濃度の分布

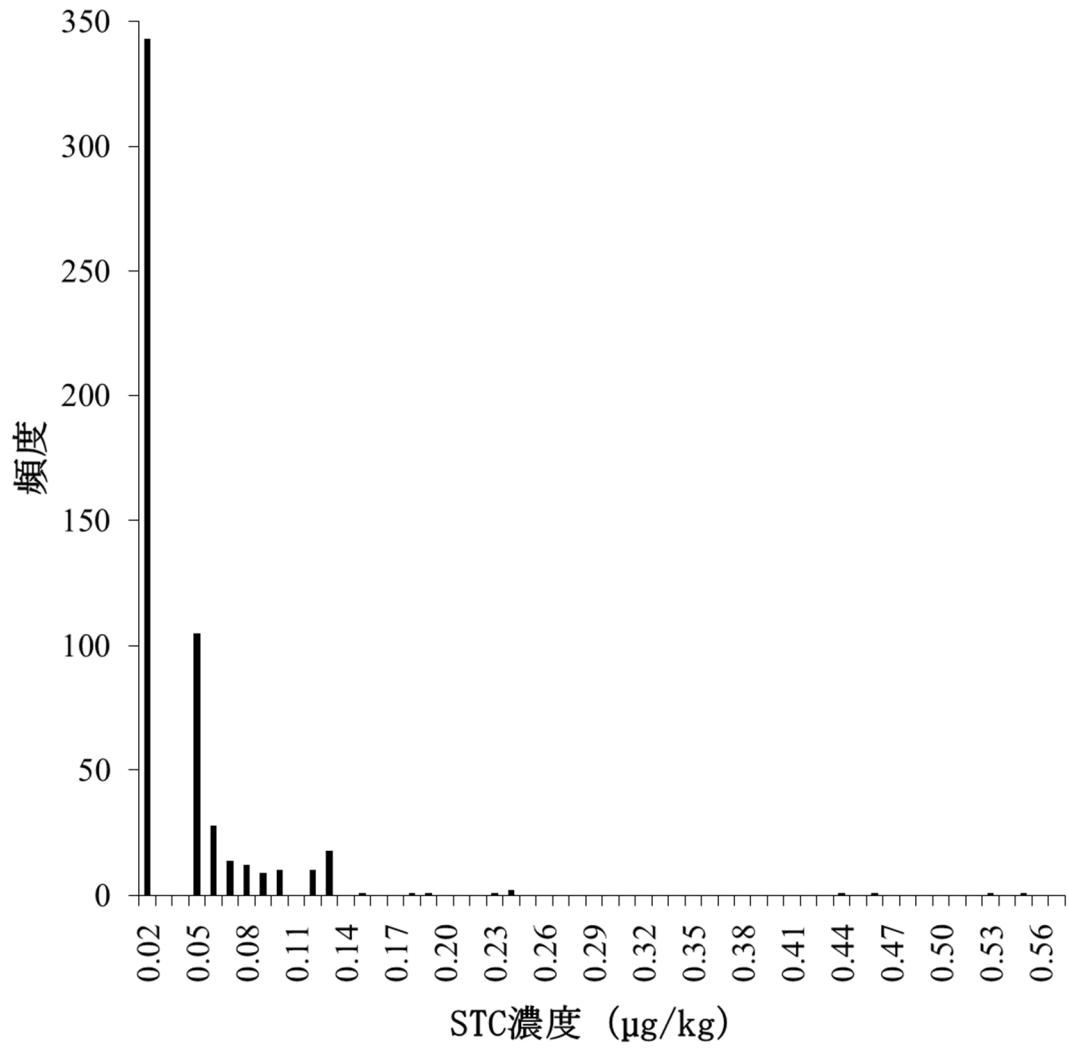
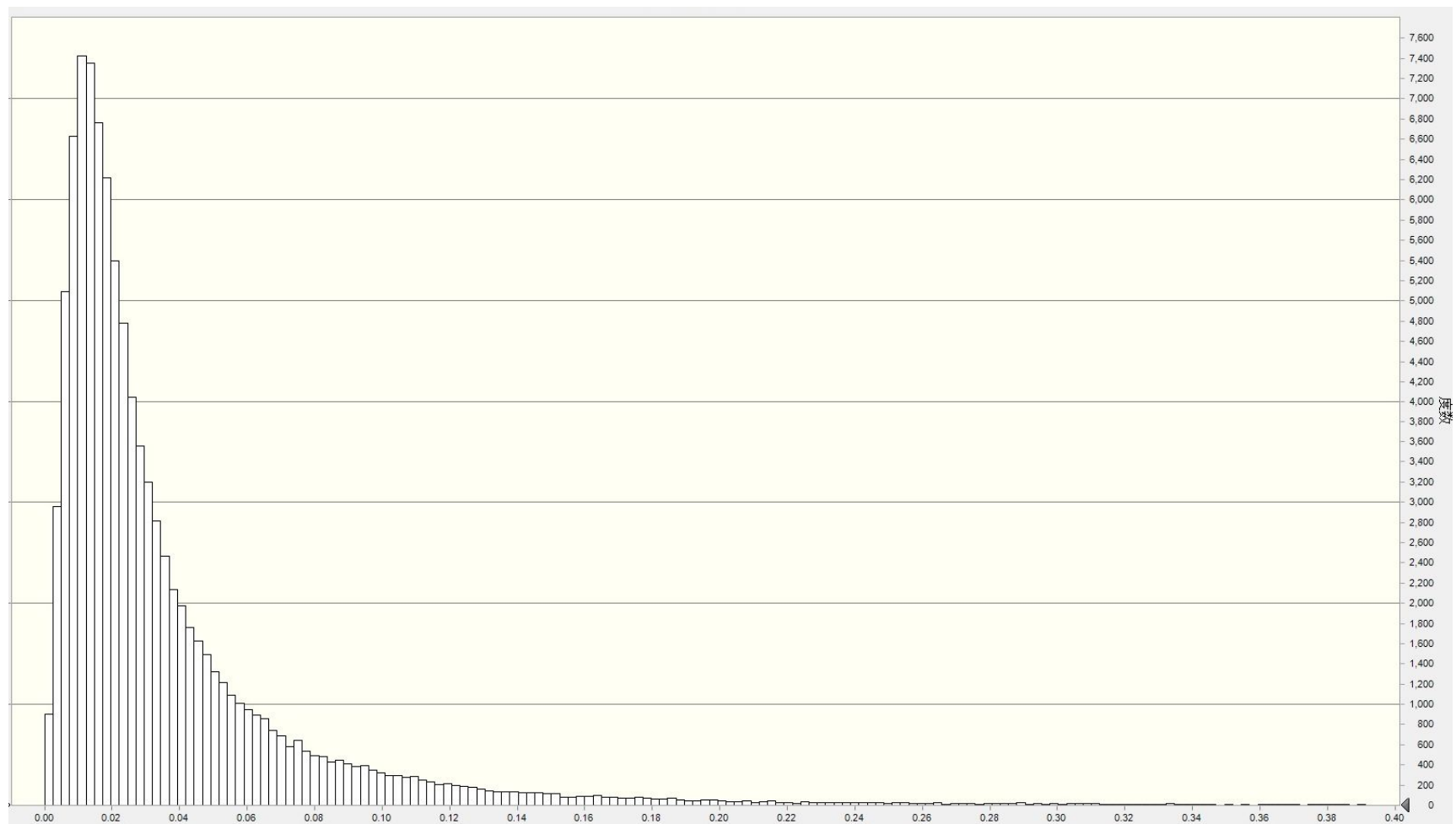


図3 日本人における小麦粉からのSTCばく露量の分布



横軸（ばく露量）の単位は ng/kg 体重/日

表 3 日本人における小麦粉からの STC ばく露量

	ばく露量 (ng/kg 体重/日)	
	Lower bound	Upper bound
50%ile	0.01	0.02
60%ile	0.02	0.03
70%ile	0.02	0.04
80%ile	0.03	0.05
90%ile	0.05	0.08
95%ile	0.08	0.12
99%ile	0.22	0.30

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 B₁ 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 CO₂/O₂ 麻酔下で 4% paraformaldehyde (PFA) / 0.1M リン酸バッファーにより灌流固定を行った。各群雄 15 ~ 22 例、雌 10 例の児動物は CO₂/O₂ 麻酔下で放血し、脳、肝臓、腎臓重量を測定後、脳はメタカーンもしくはブアン固定液、その他の臓器は 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定した。PFA 灌流固定脳については大脳の 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 CO₂/O₂ 麻酔下で放血し、脳、肝臓、腎臓重量を測定後、脳はブアン固定液、その他の臓器は 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定した。

残り半数の児動物は出生後 77 日まで 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 CO₂/O₂ 麻酔下で 4%PFA / 0.1M リン酸バッファーによる灌流固定を行った。各群雌雄各 10 例の児動物は CO₂/O₂ 麻酔下で放血し、脳、肝臓、腎臓重量を測定後、脳はメタカーンもしくはブアン固定液、その他の臓器は 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定した。

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[®] 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 CO₂/O₂ 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 CO₂/O₂ 麻酔下で放血し、脳、肝臓、腎臓、脾臓、胸腺重量を測定後、脳はメタカーンもしくは 10% 中性緩衝ホルマリン液、その他の臓器は 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定した。PFA 灌流固定脳については大脳の 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) (γ -H2AX)、細胞周期関連分子である cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21^{CIP1/WAF1}) 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、 γ -H2AX および p21^{CIP1/WAF1} 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^{CIP1/WAF1} 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 CO₂/O₂ 麻酔下で放血し、脳、肝臓、腎臓、脾臓、胸腺重量を測定後、10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定した。

残り半数の児動物は出生後 77 日まで DAS を含まない通常飼料により飼育し、一般状態を 1 日 1 回観察し、体重を週に 1 回の割合で測定した。出生後 77 日に各群 10~13 例の雄児動物を CO₂/O₂ 麻酔下で 4% PFA / 0.1M リン酸バッファーによる灌流固定を行った。各群雌雄各 10~13 例の児動物は CO₂/O₂ 麻酔下で放血し、脳、肝臓、腎臓、

脾臓、胸腺重量を測定後、脳はメタカーンもしくは 10% 中性緩衝ホルマリン液、その他の臓器は 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定した。

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 μ g の total RNA から SuperScript[®] 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 CO₂/O₂ 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 CO₂/O₂ 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 CO₂/O₂ 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 CO₂/O₂ 麻酔下で 4% PFA / 0.1M リン酸バッファーによる灌流固定を行った。各群雌雄各 10 ~ 12 例の児動物は CO₂/O₂ 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[®] 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 CO₂/O₂ 深麻酔下での灌流固定ならびに腹大動脈および後大静脈からの放血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物飼育、管理にあつては、国立大学法人東京農工大学の実験取扱い倫理規定に従った。

C. 研究結果

< 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 γ -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*Ercc1*、およびアセチルコリン受容体をコードする*Chrna7*の発現増加を認めた (Table 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日目で、10 ppmにおいてSGZにおける細胞増殖活性の増加を反映したPCNA陽性細胞の有意な増加が認められた。一方、歯状回での遺伝子発現解析において、0 ppm対照群と10 ppm群の比較において、10 ppm群で顆粒細胞系譜の神経幹細胞・神経前駆細胞指標のうち、*Sox2* (type-1神経幹細胞～type-2b神経前駆細胞)、*Eomes* (type-2b～type-3神経前駆細胞)、*Dcx* (type-2b神経前駆細胞～未熟顆粒細胞)の発現増加及び神経新生の促進に関わる*Bdnf*とグルタミン酸作動性入力の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 *Chrbn2*、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）¹⁾、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）²⁾。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）³⁾。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）⁴⁾、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）⁵⁾。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）⁶⁾。

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)^{7,8)}。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)⁹⁾ 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 γ 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)^{10,11)}。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)¹²⁾、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)¹³⁾。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、 γ 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、 γ 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^{INK4a}-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 γ 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)^{14,15)}。

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)⁴⁾。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)^{16,17)}、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)¹⁸⁾。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)¹⁹⁾。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)²⁰。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)²¹。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)²²。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あると考えられ、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)²³、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)²⁴。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)²⁵、*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)³、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)²⁶。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、G₁ 期あるいは G₂ 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 G₁/S ないし G₂/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 G₁ 期から S 期へと移行させる (Malumbres & Barbacid, 2009)²⁷⁾ 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)²⁸⁾ 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)²⁹⁾、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)³⁰⁾。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)³¹⁾。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)³²⁾。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)³³⁾。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)³⁴⁾。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)³⁵⁾、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)³⁶⁾。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)³⁷⁾、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)^{38,39)}。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、G₁/S ないし G₂/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^{swe}/PS1^{dE9} 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, 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.
- 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 5-8th, 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 ^a	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, USA)
Calbindin-D-28K	CALB1	Mouse	Monoclonal IgG ₁	CB-955	1:500	Microwaving, pH 6.0 ^b	Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
Calbindin-D-29K (Calretinin)	CALB2	Mouse	Monoclonal IgG ₁	CRT01/O.N.40	1:100	Microwaving, pH 6.0	LifeSpan Biosciences, Inc. (Seattle, WA, USA)
Cyclooxygenase-2	COX2	Mouse	Monoclonal IgG ₁	33/Cox-2	1:200	Autoclaving, pH 9.0 ^c	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 ₁	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 ₁	A60	1:100	None	EMD Millipore
Parvalbumin	PVALB	Mouse	Monoclonal IgG ₁	PARV-19	1:1000	Microwaving, pH 6.0	EMD Millipore
Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	Mouse	Monoclonal IgG _{2a}	PC10	1:200	None	Dako (Glostrup, Denmark)
Reelin	RELN	Mouse	Monoclonal IgG ₁	G10	1:1000	None	Novus Biologicals, Inc. (Littleton, CO, USA)
Sex determining region Y (SRY)-box 2	SOX2	Mouse	Monoclonal IgG ₁	9-9-3	1:4000	None	Abcam Inc.
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 _{2a}	TuJ-1	1:500	Microwaving, pH 6.0	Abcam Inc.

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

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

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

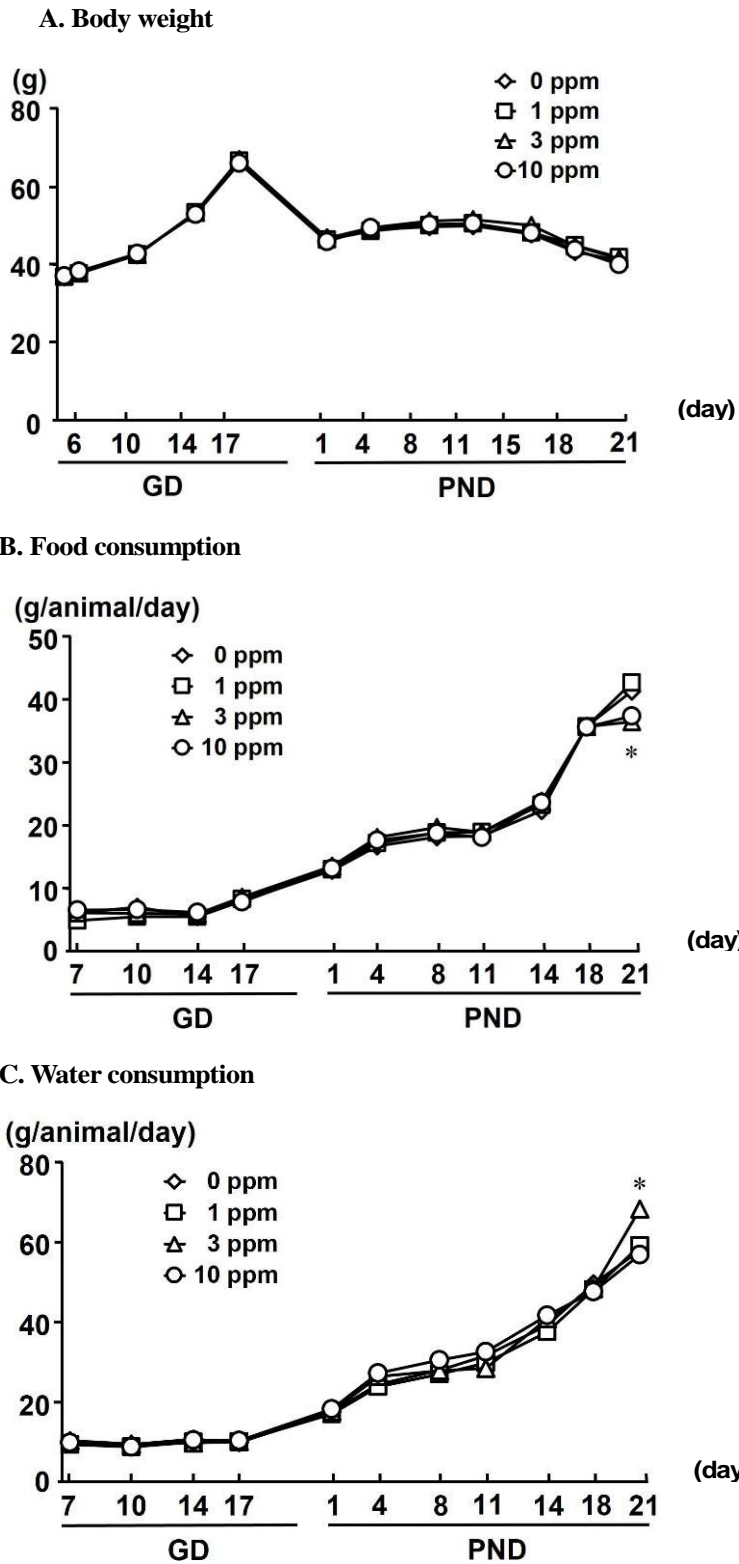


Figure 1. Body weight, food consumption and water consumption of dams given citreoviridin from GD 6 to PND 21 in the diet.

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

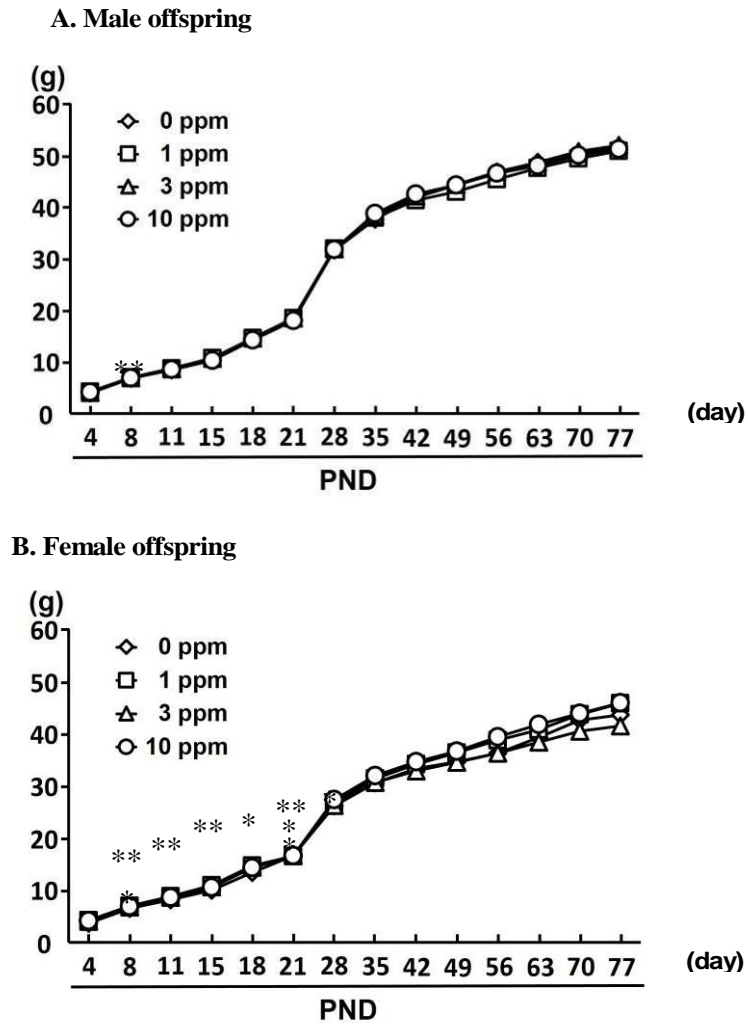


Figure 2. Body weight of male and female offspring exposed to citreoviridin at postnatal day. (A) Male offspring. (B) Female offspring.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 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) ^a		6.63±0.82	6.04±0.42	6.68±0.70	6.80±1.48
Food intake (PND, g/animal/day) ^a		23.63±1.21	24.22±1.39	24.05±1.22	23.47±1.59
Water consumption (GD, g/animal/day) ^a		9.89±0.86	9.56±1.13	9.96±1.15	9.98±1.15
Water consumption (PND, g/animal/day) ^a		35.46±5.37	34.67±3.81	36.82±3.47	36.40±4.18
Citreoviridin intake					
GD, mg/kg body weight/day ^a		0	0.13±0.01	0.42±0.05	1.46±0.43
PND, mg/kg body weight/day ^a		0	0.51±0.02	1.51±0.11	5.02±0.37

Mean ± SD.

^a Mean value of each week.

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

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

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

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

^a Mean ± SD.

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

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

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

^a Total number of animals that exhibited abnormality.

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

[†] $P < 0.05$, significantly different from 0-ppm controls by Mann–Whitney’s *U*-test.

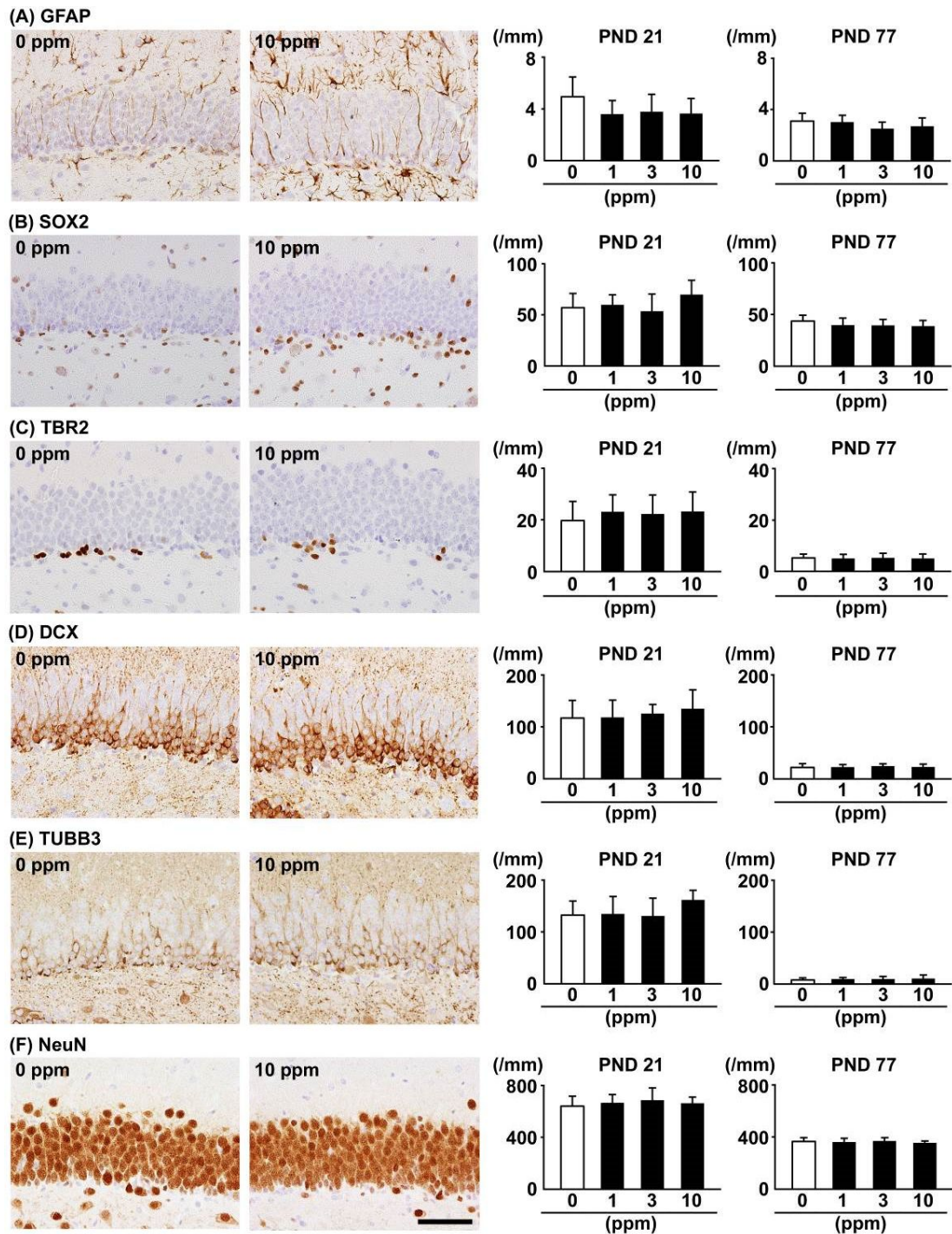


Figure 3. Distribution and number of immunoreactive cells for neuronal stage-defining markers of granule cell lineages in the subgranular zone (SGZ), and a mature neuronal marker in the granule cell layer (GCL) of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to citreoviridin. (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 μ m. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit length (mm) of the SGZ or GCL of the bilateral sides. Values are expressed as mean + SD. N = 8-10/group (0 ppm controls and 10 ppm citreoviridin 9; 1 ppm citreoviridin, 10; 3 ppm citreoviridin, 8).

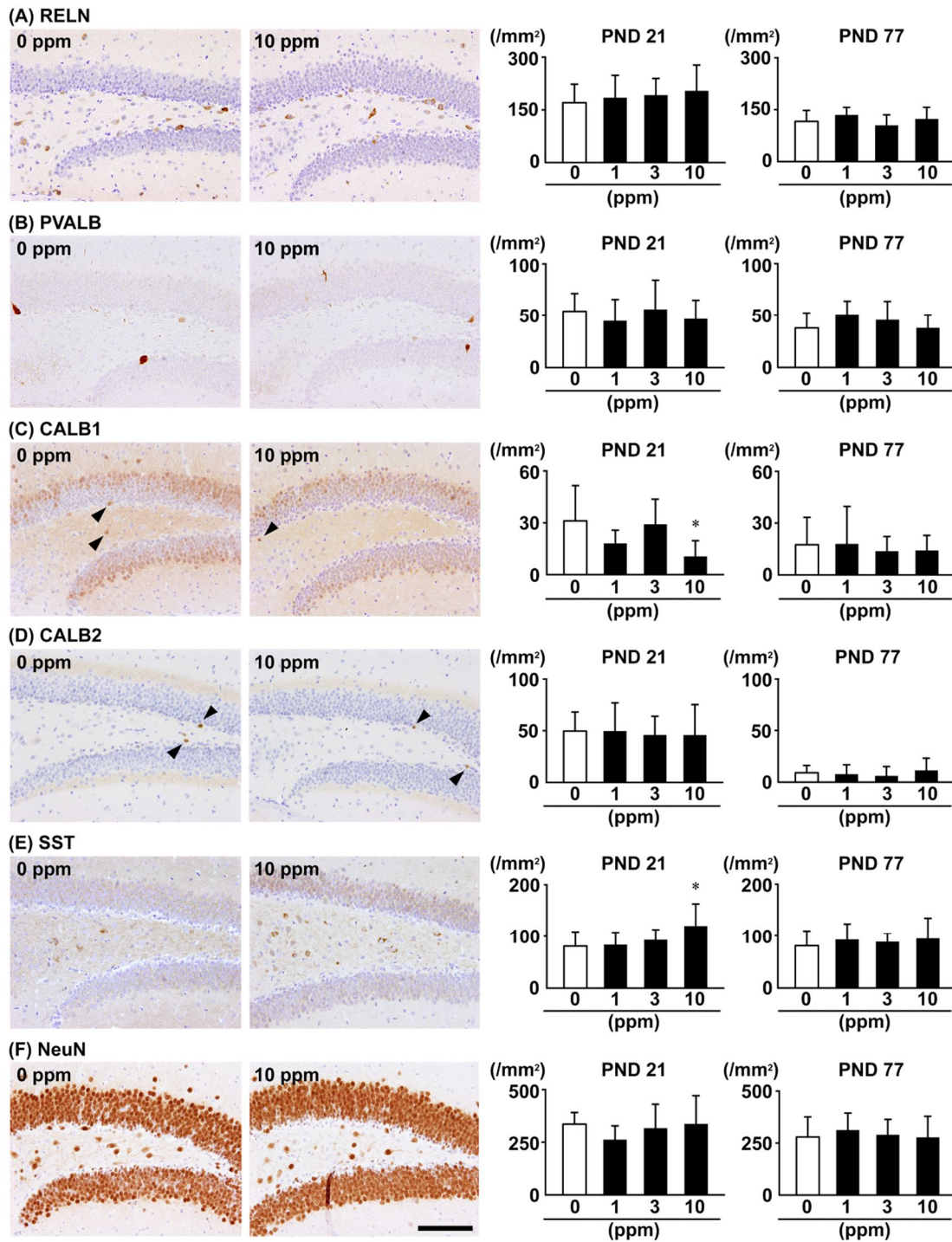


Figure 4. Distribution and number of immunoreactive cells for interneuronal markers and a mature neuronal marker in the hilus of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to citreoviridin. (A) Reelin (RELN). (B) Parvalbumin (PVALB). (C) Calbindin (CALB1), arrowheads indicate 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 μ m. Graphs show the number of

immunoreactive cells/unit area (mm²) of the hilus of bilateral hemispheres. Values are expressed as the mean + SD. N = 8-10/group (0 ppm controls and 10 ppm citreoviridin 9; 1 ppm citreoviridin, 10; 3 ppm citreoviridin, 8).

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

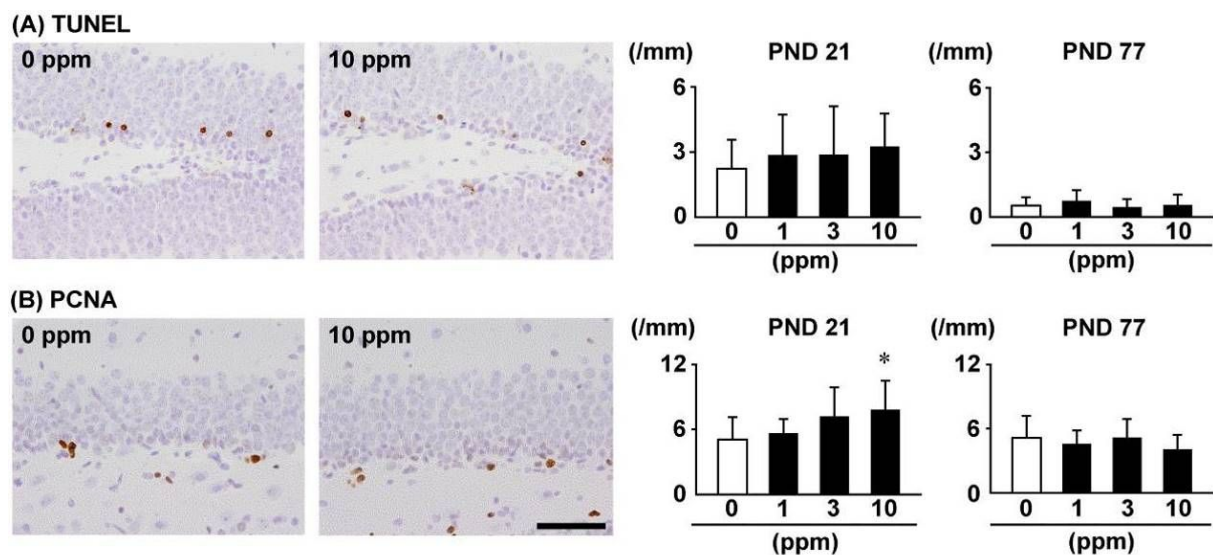


Figure 5. Distribution and number of apoptotic and proliferating cells in the SGZ of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to citreoviridin. (A) Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL). (B) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Representative images from 0 ppm controls and the 10 ppm group at PND 21 are shown. Magnification: 400 \times ; bar = 50 μ m. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit length (mm) of the SGZ of the bilateral sides. Values are expressed as the mean + SD. N = 8-10/group (0 ppm controls and 10 ppm citreoviridin 9; 1 ppm citreoviridin, 10; 3 ppm citreoviridin, 8).

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

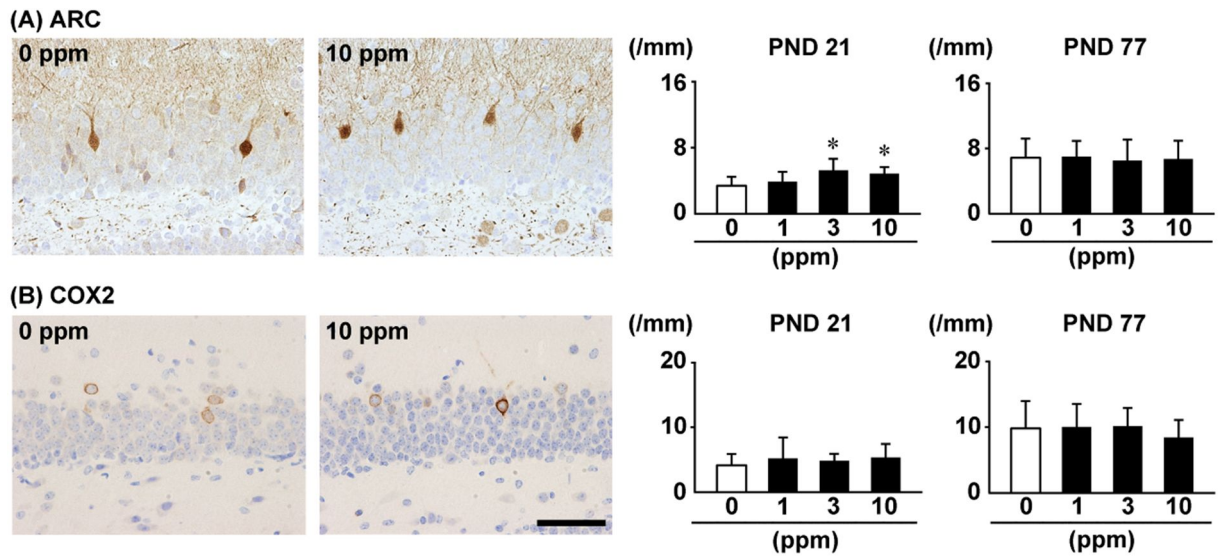


Figure 6. Distribution and number of synaptic plasticity in the GCL of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to citreoviridin. (A) Activity-regulated cytoskeleton-associated protein (ARC). (B) Cyclooxygenase-2 (COX2). Representative images from 0 ppm controls and the 10 ppm group at PND 21 are shown. Magnification: 400 \times ; bar = 50 μ m. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit length (mm) of the SGZ of the bilateral sides. Values are expressed as the mean + SD. N = 8-10/group (0 ppm controls and 10 ppm citreoviridin 9; 1 ppm citreoviridin, 10; 3 ppm citreoviridin, 8).

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

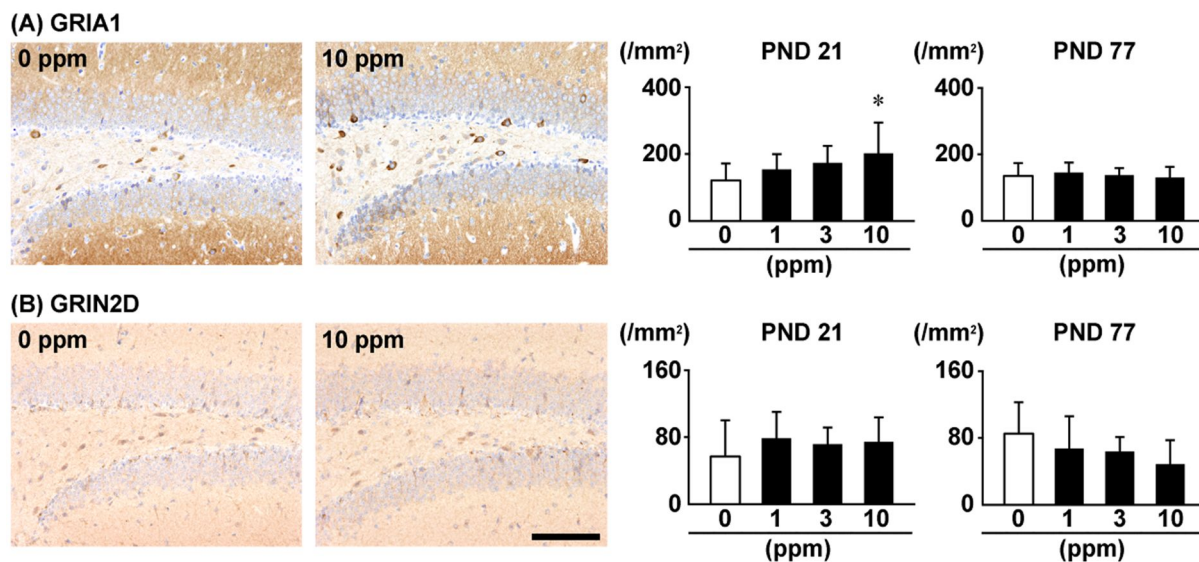


Figure 7. Distribution and number of glutamate receptors in the hilus of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to citreoviridin. (A) Glutamate receptor, ionotropic, AMPA1 (alpha 1) (GRIA1). (B) Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2D (GRIN2D). Representative images from 0 ppm controls and the 10 ppm group at PND 21 are shown. Magnification: 200 \times ; bar = 100 μ m. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit area (mm^2) 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 ^a	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.^a 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 ^a	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.

^a 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 ^a	Synaptic Systems, GmbH. (Goettingen, Germany)
Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	p21CIP1/WAF1	Mouse	Monoclonal IgG2b	CP74	1:500	Autoclaving, pH 9.0 ^b	Abcam plc
Cyclooxygenase-2	COX2	Mouse	Monoclonal IgG1	33/Cox-2	1:200	Autoclaving, pH 9.0 ^b	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)	γ -H2AX	Rabbit	Monoclonal IgG	EP854(2) Y	1:3000	Autoclaving, pH 6.0 ^c	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 κ	HNE-J2	1:100	Autoclaving, pH 9.0 ^d	Japan Institute for the Control of Aging (Shizuoka, Japan)
Malondialdehyde	MDA	Mouse	Monoclonal IgG2	1F83	1:200	Autoclaving, pH 9.0 ^d	Japan Institute for the Control of Aging
Metallothionein-I/II	MT-I/II	Mouse	Monoclonal IgG1	E9	1:100	Autoclaving, pH 6.0 ^e	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 ^a	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 ^a	Abcam plc
T box brain 2	TBR2	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:500	Autoclaving, pH 6.0 ^c	Abcam plc

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

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

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

^d Autoclaving at 121 °C for 15 min in 10 mM citrate buffer (pH 6.0).

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

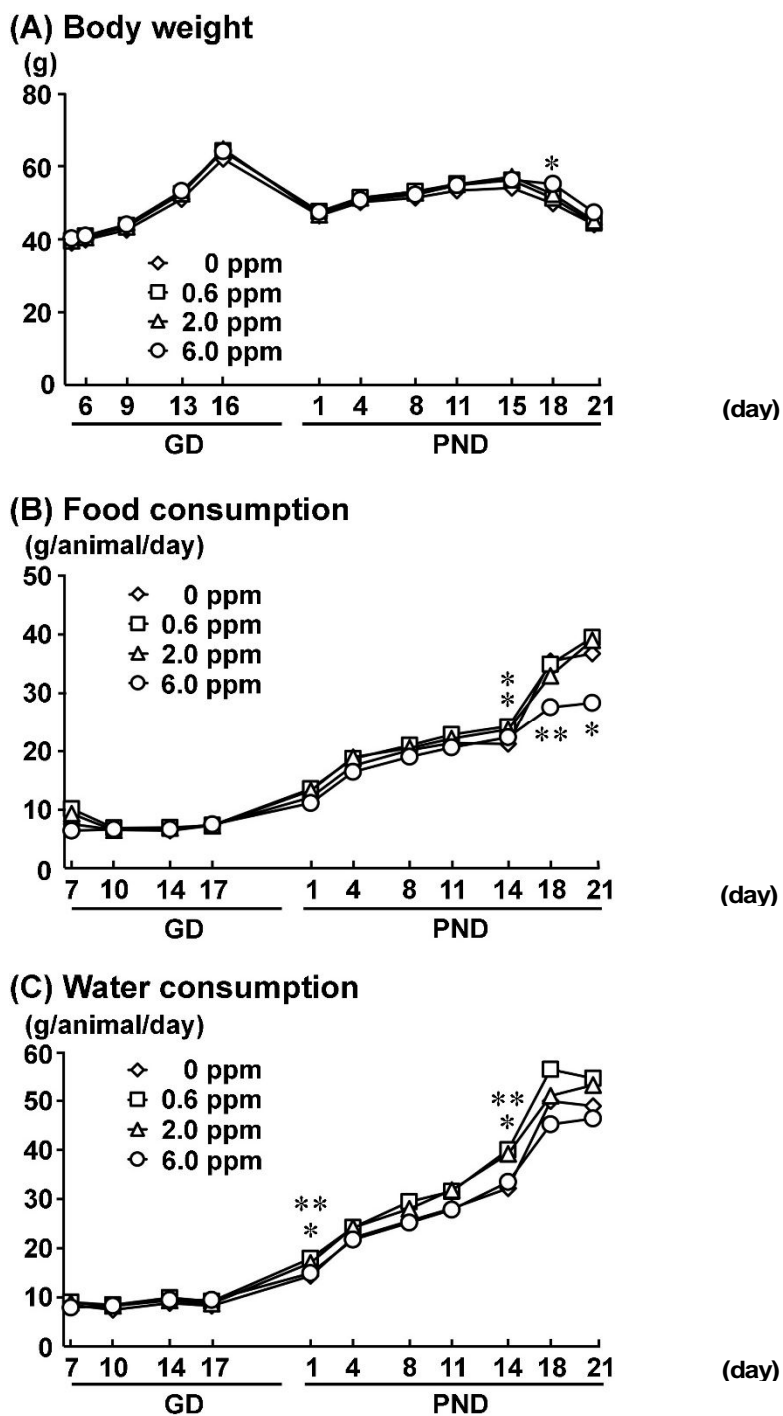


Figure 8. Body weight, food consumption and water consumption of dams given diacetoxyscirpenol from GD 6 to PND 21 in the diet.

(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.

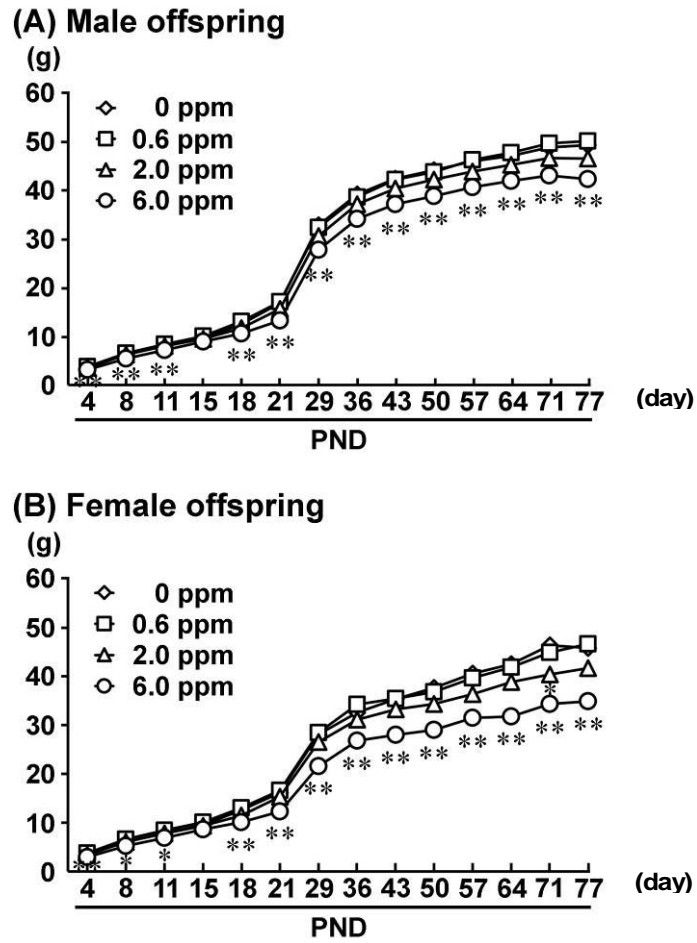


Figure 9. Body weight of male and female offspring exposed to diacetoxyscirpenol at postnatal day.

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

Mean ± SD.

^a Mean value of each week.*Abbreviation:* BW; body weight, GD; gestation day, PND; postnatal day.* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 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
Male offspring on PND 21					
	No. of animals examined	30	39	40	32
	Body weight (g)	16.85±1.37 ^a	17.13±1.67	15.59±2.12	13.26±1.28 **
Organ weight					
Brain	Absolute (g)	0.44±0.04	0.45±0.02	0.43±0.02	0.39±0.02 **
	Relative (g/100g BW)	2.69±0.29	2.67±0.23	2.94±0.48 *	3.13±0.36 **
Thymus	Absolute (g)	0.09±0.02	0.09±0.02	0.08±0.03	0.07±0.02 **
	Relative (g/100g BW)	0.56±0.14	0.55±0.12	0.54±0.12	0.54±0.11
Liver	Absolute (g)	0.87±0.13	0.86±0.14	0.75±0.12 **	0.56±0.11 **
	Relative (g/100g BW)	5.28±0.43	5.09±0.49	5.02±0.37	4.33±0.33 **
Spleen	Absolute (g)	0.14±0.04	0.13±0.03	0.12±0.04	0.09±0.02 **
	Relative (g/100g BW)	0.83±0.18	0.79±0.15	0.80±0.20	0.67±0.13 **
Kidneys	Absolute (g)	0.26±0.04	0.26±0.04	0.23±0.03 **	0.18±0.04 **
	Relative (g/100g BW)	1.57±0.17	1.54±0.15	1.54±0.14	1.39±0.17 **
Female offspring on PND 21					
	No. of animals examined	18	15	12	11
	Body weight (g)	16.19±1.14	16.66±1.44	15.34±2.09	12.37±1.68 **
Organ weight					
Brain	Absolute (g)	0.43±0.03	0.44±0.02	0.42±0.02	0.38±0.02 **
	Relative (g/100g BW)	2.88±0.27	2.71±0.19	3.09±0.48	3.20±0.33 *
Thymus	Absolute (g)	0.09±0.02	0.10±0.01	0.08±0.02	0.07±0.02 *
	Relative (g/100g BW)	0.59±0.08	0.58±0.07	0.54±0.10	0.60±0.13
Liver	Absolute (g)	0.72±0.09	0.76±0.09	0.65±0.10	0.52±0.07 **
	Relative (g/100g BW)	4.72±0.27	4.64±0.29	4.64±0.25	4.31±0.16 **
Spleen	Absolute (g)	0.13±0.02	0.14±0.02	0.12±0.04	0.09±0.02 **
	Relative (g/100g BW)	0.86±0.14	0.83±0.11	0.85±0.22	0.73±0.15
Kidneys	Absolute (g)	0.23±0.03	0.25±0.02	0.21±0.03	0.16±0.02 **
	Relative (g/100g BW)	0.70±0.04	0.79±0.06 **	0.71±0.05	0.73±0.05
Male offspring on PND 77					
	No. of animals examined	10	13	13	11
	Body weight (g)	49.26±4.46	50.15±3.55	46.48±4.49	42.32±3.18 **
Organ weight					
Brain	Absolute (g)	0.49±0.02	0.49±0.02	0.48±0.02	0.45±0.01 **
	Relative (g/100g BW)	1.02±0.11	0.99±0.07	1.06±0.11	1.06±0.11
Thymus	Absolute (g)	0.05±0.02	0.07±0.04	0.06±0.03	0.05±0.04
	Relative (g/100g BW)	0.10±0.04	0.15±0.07	0.13±0.06	0.13±0.09
Liver	Absolute (g)	2.56±0.23	2.38±0.26	2.29±0.31	2.15±0.31 *
	Relative (g/100g BW)	5.23±0.33	4.77±0.34	4.95±0.42	5.10±0.91
Spleen	Absolute (g)	0.14±0.03	0.13±0.02	0.12±0.02	0.13±0.04
	Relative (g/100g BW)	0.29±0.06	0.26±0.04	0.27±0.05	0.30±0.09
Kidneys	Absolute (g)	0.82±0.10	0.74±0.13	0.76±0.09	0.63±0.06 **
	Relative (g/100g BW)	1.53±0.09	1.51±0.07	1.55±0.16	1.33±0.09 **
Female offspring on PND 77					
	No. of animals examined	10	13	12	12
	Body weight (g)	45.86±5.82	46.69±6.18	41.75±7.51	34.90±5.36 **
Organ weight					
Brain	Absolute (g)	0.50±0.01	0.50±0.03	0.49±0.03	0.43±0.02 **
	Relative (g/100g BW)	1.11±0.13	1.09±0.13	1.20±0.20	1.26±0.19
Thymus	Absolute (g)	0.09±0.03	0.07±0.03	0.09±0.03	0.06±0.03
	Relative (g/100g BW)	0.19±0.06	0.16±0.05	0.21±0.06	0.17±0.06

Liver	Absolute (g)	1.96±0.25	2.05±0.32	1.86±0.32	1.59±0.27 *
	Relative (g/100g BW)	4.31±0.60	4.39±0.33	4.48±0.48	4.57±0.29
Spleen	Absolute (g)	0.16±0.05	0.16±0.03	0.17±0.04	0.13±0.02
	Relative (g/100g BW)	0.35±0.14	0.33±0.06	0.40±0.09	0.38±0.10
Kidneys	Absolute (g)	0.48±0.04	0.53±0.05	0.47±0.05	0.39±0.06 **
	Relative (g/100g BW)	1.07±0.17	1.14±0.12	1.16±0.19	1.13±0.14

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

^a Mean ± SD.

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

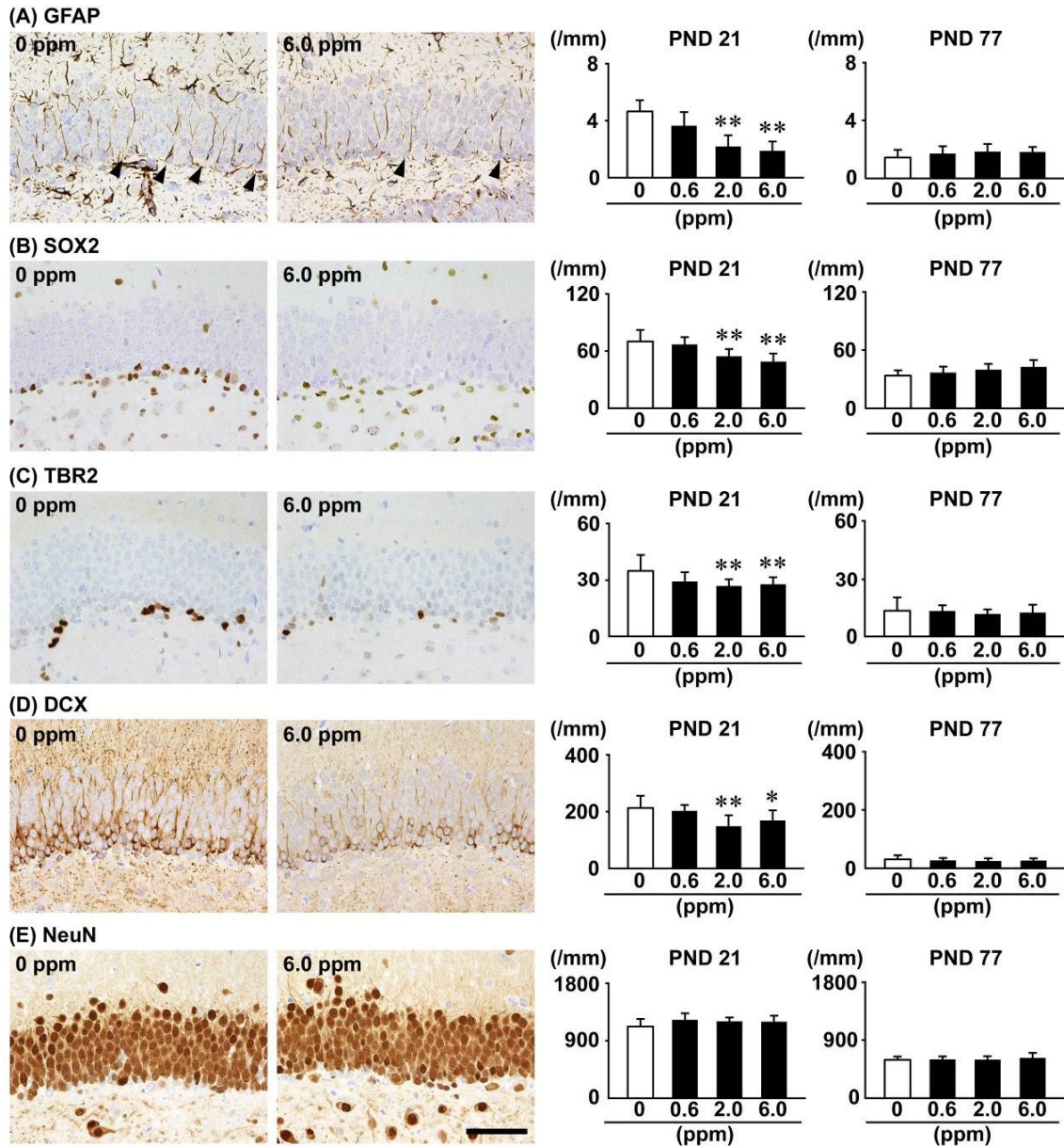


Figure 10. Distribution and number of immunoreactive cells for neuronal stage-defining markers of granule cell lineages in the subgranular zone (SGZ), and a mature neuronal marker in the granule cell layer (GCL) of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to diacetoxyscirpenol.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

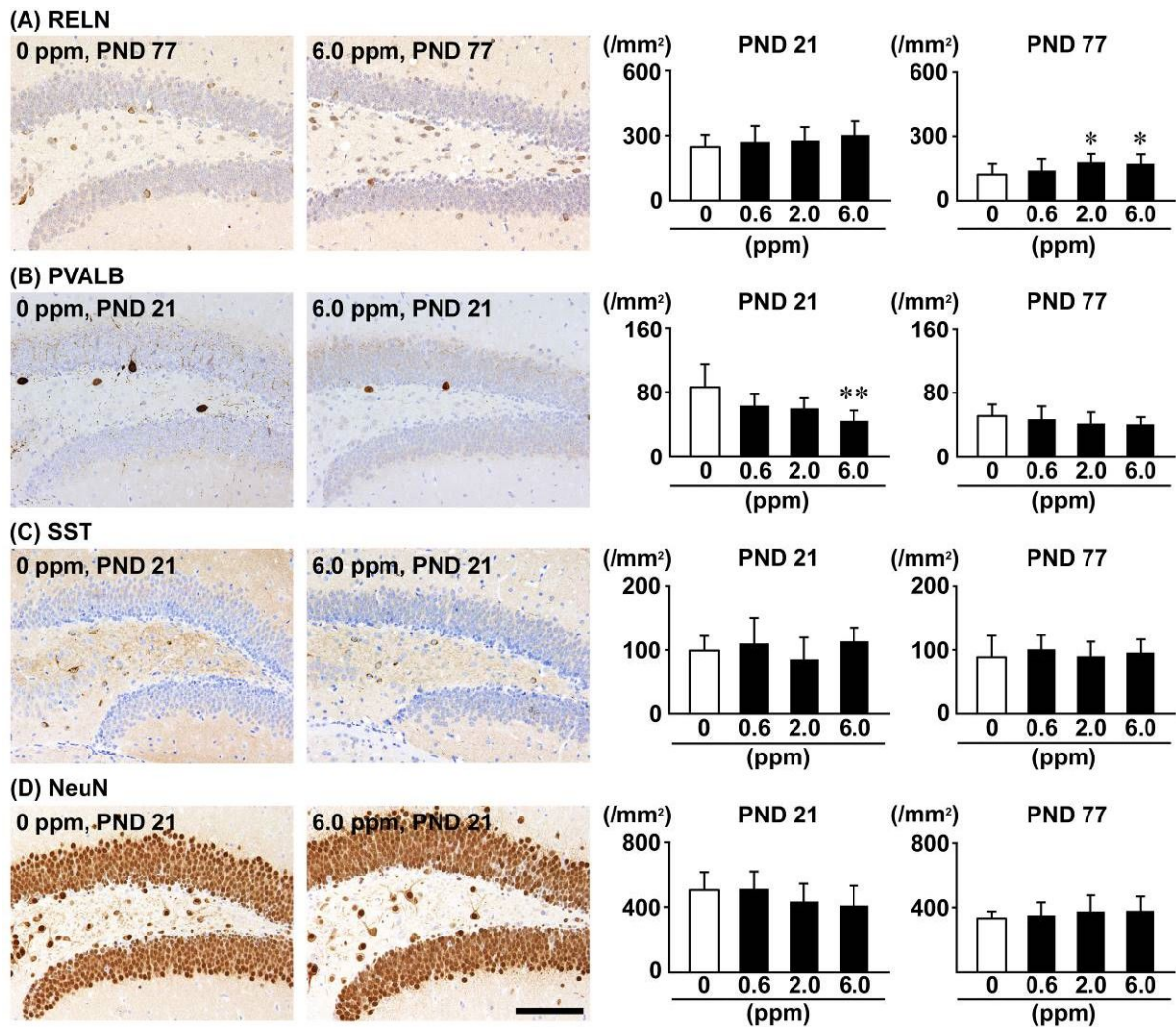


Figure 11. Distribution and number of immunoreactive cells for interneuronal markers and a mature neuronal marker in the hilus of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to diacetoxyscirpenol. (A) Reelin (RELN). (B) Parvalbumin (PVALB). (C) Somatostatin (SST). (D) NeuN. Representative images from 0 ppm control and the 6.0 ppm group at PND 21 are shown. Magnification: 200 \times ; bar = 100 μ m. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit area (mm²) of the hilus of bilateral hemispheres. Values are expressed as the mean + SD. N = 9-10/group (0 ppm control in PND 21, N=9; the other groups are N=10).

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

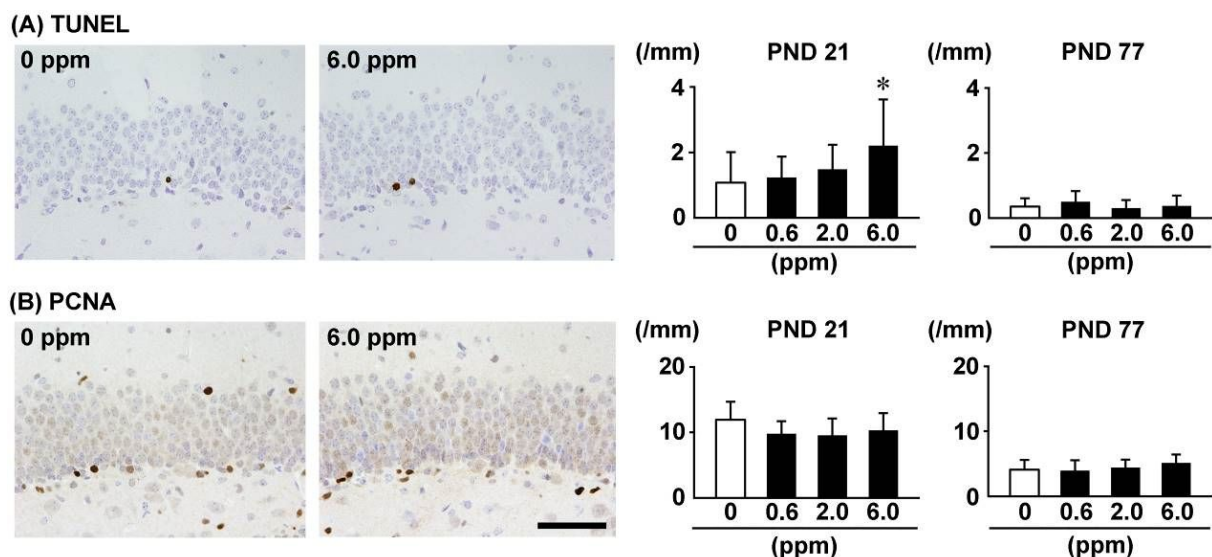


Figure 12. Distribution and number of apoptotic and proliferating cells in the SGZ of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to diacetoxyscirpenol.

(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 μ m. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit length (mm) of the SGZ of the bilateral sides. Values are expressed as the mean + SD. N = 9-10/group (0 ppm control in PND 21, N=9; the other groups are N=10).

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

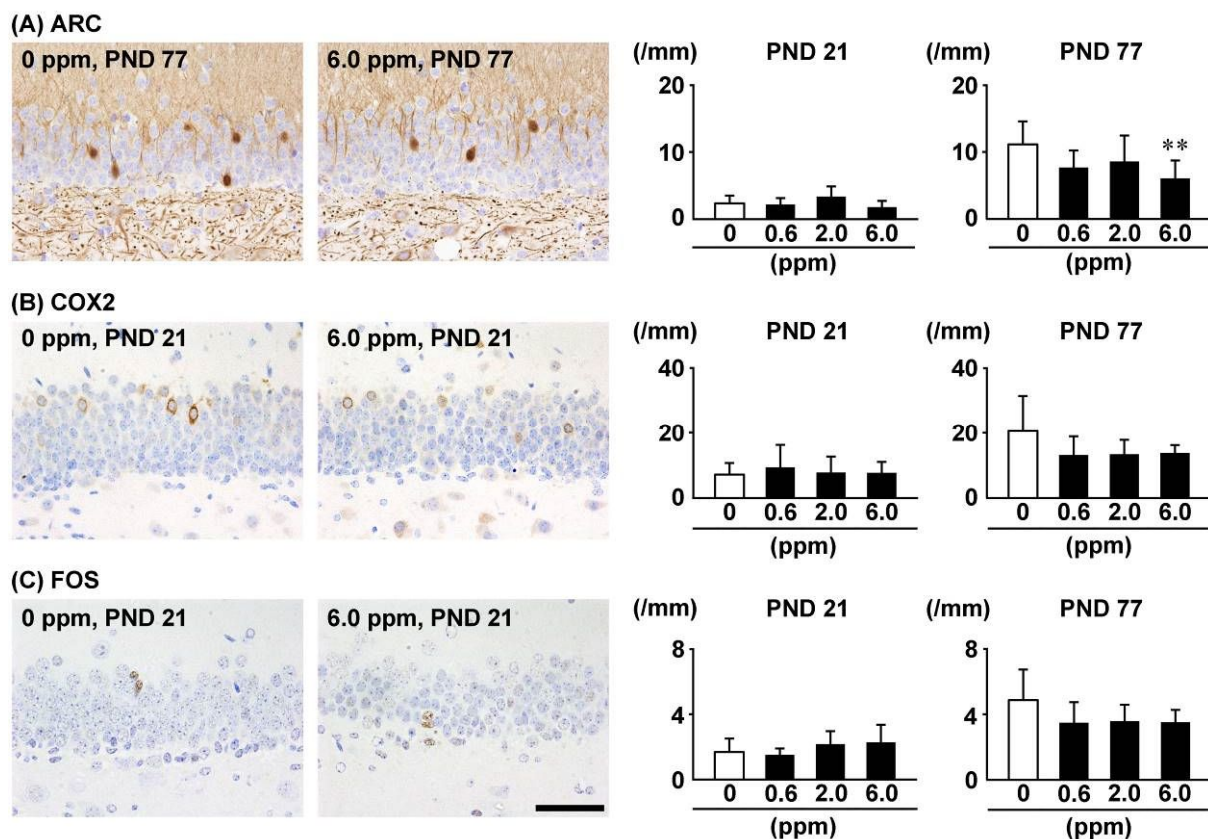


Figure 13. Distribution and number of immunoreactive cells for marker of synaptic plasticity in the SGZ and GCL of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to diacetoxyscirpenol. (A) Activity-regulated cytoskeleton-associated protein (ARC). (B) Cyclooxygenase 2 (COX2). (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 μ m. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit length (mm) of the SGZ of the bilateral sides. Values are expressed as the mean + SD. N = 9-10/group (0 ppm control in PND 21, N=9; the other groups are N=10).

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

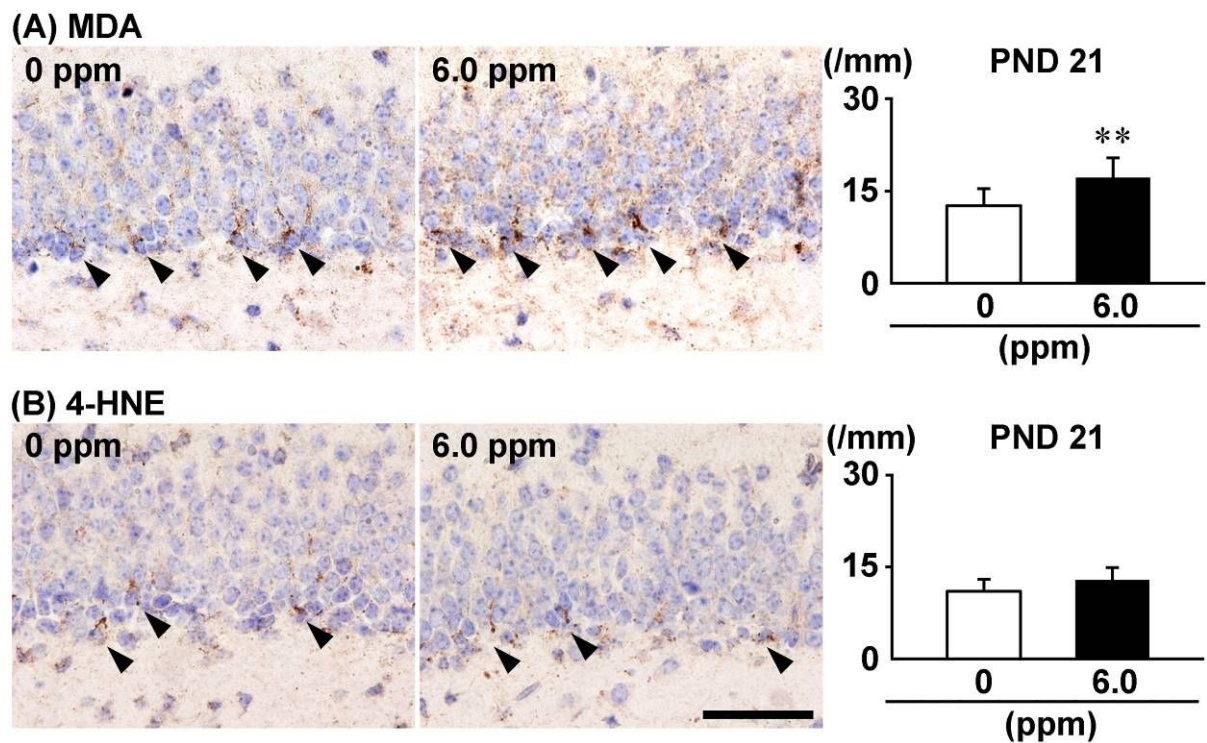


Figure 14. Distribution and number of immunoreactive cells for lipid peroxidation end products in the SGZ of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 offspring exposed to diacetoxyscirpenol.

(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 μ m. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit length (mm) of the SGZ of the bilateral sides. Values are expressed as the mean + SD. N = 9-10/group (0 ppm control in PND 21, N=9; 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.

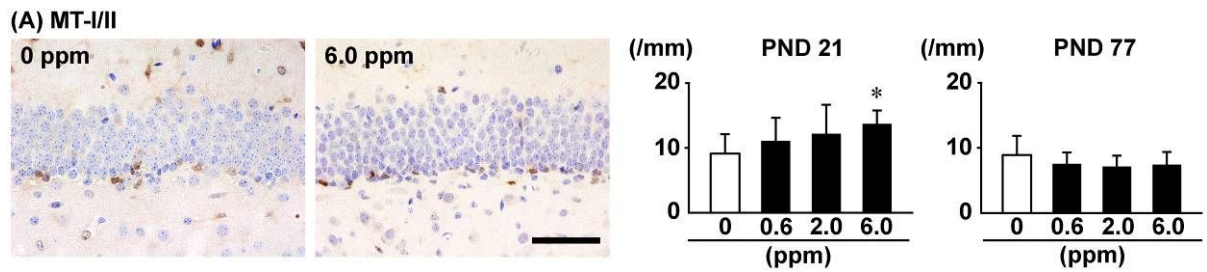


Figure 15. Distribution and number of immunoreactive cells for metallothionein-I/II in the SGZ of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to diacetoxyscirpenol. (A) Metallothionein-I/II (MT-I/II). Representative images from 0 ppm control and the 6.0 ppm group at PND 21 are shown. Magnification: 400 \times ; bar = 50 μ m. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit length (mm) of the SGZ of the bilateral sides. Values are expressed as the mean + SD. N = 9-10/group (0 ppm control in PND 21, N=9; the other groups are N=10).

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

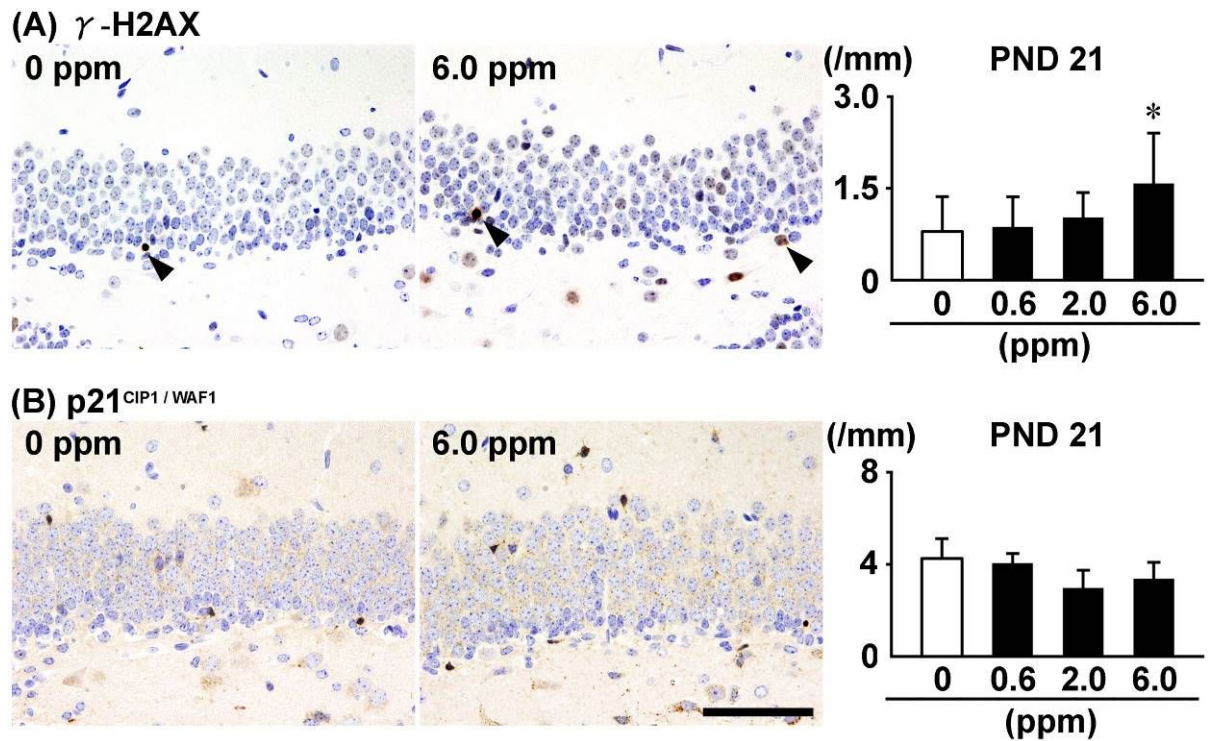


Figure 16. Distribution and number of immunoreactive cells for marker of DNA damage and cell cycle related protein in the SGZ and GCL of the hippocampal dentate gyrus of male offspring at PND 21. (A) gamma-H2A histone family, member X (γ -H2AX). (B) cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21^{CIP1/WAF1}). 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 μ m. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit length (mm) of the SGZ of the bilateral sides. Values are expressed as the mean + SD. N = 9-10/group (0 ppm control in PND 21, N=9; the other groups are N=10).

* $P < 0.05$, 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
Neurotrophin-related genes				
<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
Glutamate transporters and receptors				
<i>Slc17a6</i>	1.03±0.27	1.02±0.22	3.07±1.86 *	3.44±2.34 *
<i>Slc17a7</i>	1.02±0.24	1.04±0.34	0.50±0.29 **	0.54±0.29 *
<i>Gria1</i>	1.04±0.28	1.06±0.36	0.80±0.24	0.87±0.26
<i>Gria2</i>	1.05±0.38	1.07±0.44	1.02±0.33	1.09±0.31
<i>Gria3</i>	1.01±0.15	1.02±0.25	0.79±0.18 *	0.85±0.12
<i>Grin2a</i>	1.03±0.29	1.06±0.38	0.56±0.13 **	0.61±0.16 *
<i>Grin2b</i>	1.00±0.10	1.01±0.13	1.39±0.88	1.55±1.09
<i>Grin2d</i>	1.01±0.14	1.01±0.16	0.92±0.46	1.01±0.57
Cholinergic receptors				
<i>Chrna4</i>	1.03±0.26	1.03±0.26	1.06±0.35	1.16±0.42
<i>Chrna7</i>	1.01±0.18	1.03±0.25	0.67±0.24 *	0.72±0.25
<i>Chrn2</i>	1.01±0.12	1.00±0.09	0.77±0.23	0.83±0.19
Intrinsic pathway of apoptosis				
<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 *
Cell cycle-related genes				
<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 *
DNA double strand break-related genes				
<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
Stem cell regulators				
<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
Oxidative stress-related DNA repair gene				
<i>Ogg1</i>	1.02±0.24	1.02±0.23	0.79±0.09 *	0.85±0.11
Antioxidant-related genes				
<i>Sod1</i>	1.02±0.23	1.02±0.24	1.33±0.53	1.41±0.47
<i>Sod2</i>	1.01±0.16	1.01±0.17	0.90±0.25	0.99±0.36
<i>Cat</i>	1.03±0.27	1.03±0.24	0.75±0.18	0.82±0.22
<i>Prdx1</i>	1.03±0.24	1.02±0.20	0.99±0.18	1.07±0.20
<i>Prdx2</i>	1.02±0.19	1.01±0.13	1.14±0.29	1.23±0.24
<i>Prdx3</i>	1.01±0.14	1.00±0.07	1.06±0.18	1.14±0.14

<i>Prdx4</i>	1.02±0.22	1.02±0.21	1.20±0.47	1.29±0.45
<i>Prdx5</i>	1.01±0.16	1.02±0.22	1.18±0.27	1.28±0.31
<i>Mt1</i>	1.02±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; *Chrb2*, 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.

^a Mean ± SD.

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

t-test.

Table 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.

^a Mean ± SD.

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

Table 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 ₁	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 ₁	GA5	1:200	None	Merck KGaA
Neuron-specific nuclear protein	NeuN	Mouse	Monoclonal IgG ₁	A60	1:100	None	Merck KGaA
Parvalbumin	PVALB	Mouse	Monoclonal IgG ₁	PARV-1 9	1:1000	Microwaving, pH 6.0	Merck KGaA
Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	Mouse	Monoclonal IgG _{2a}	PC10	1:200	None	Dako (Glostrup, Denmark)
Reelin	RELN	Mouse	Monoclonal IgG ₁	G10	1:1000	None	Novus Biologicals, Inc. (Littleton, CO, USA)
Sex determining region Y (SRY)-box 2	SOX2	Mouse	Monoclonal IgG ₁	9-9-3	1:4000	None	Abcam Inc.
T box brain 2	TBR2	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:500	Autoclaving, pH 6.0 ^{b)}	Abcam Inc.

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

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

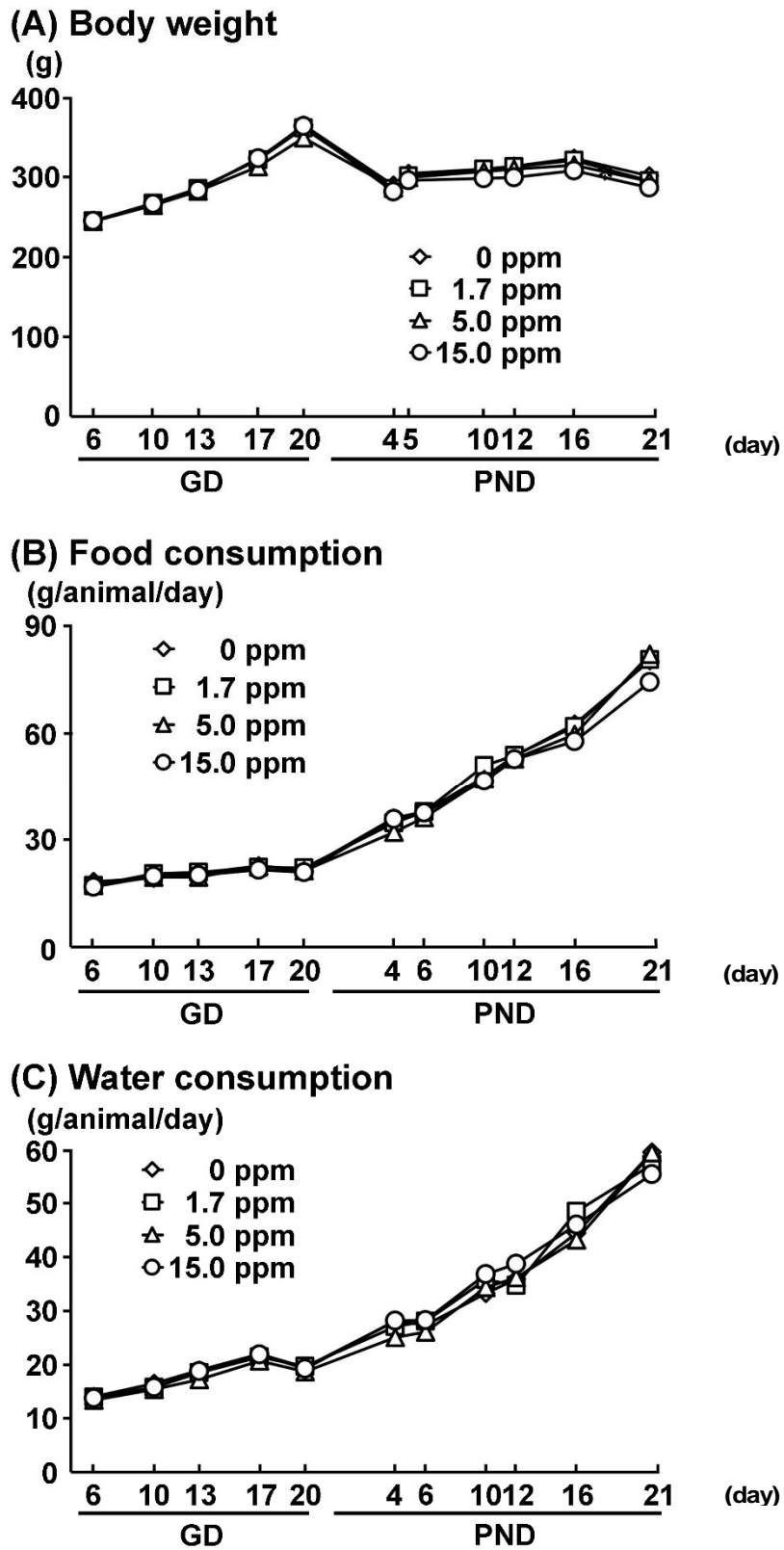
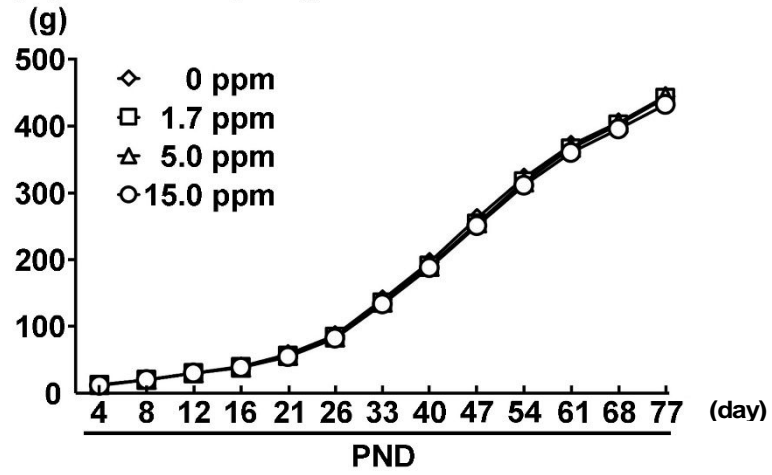


Figure 17. Body weight, food consumption and water consumption of dams given sterigmatocystin from GD 6 to PND 21 in the diet. (A) Body weight. (B) Food consumption. (C) Water consumption.

(A) Male offspring



(B) Female offspring

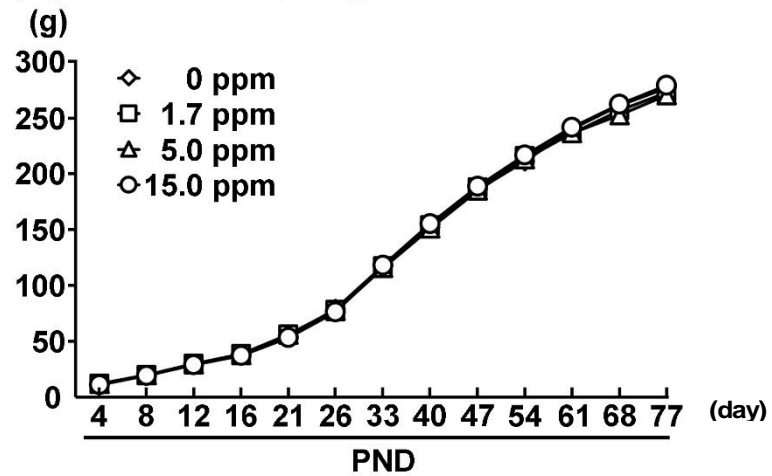


Figure 18. Body weight of male and female offspring exposed to sterigmatocystin at postnatal day.

(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	
Reproductive parameters					
No. of implantation sites	12.64±2.01 ^a	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	
General parameters on GD					
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) ^a	20.51±2.51	20.63±1.51	20.07±1.76	19.87±1.71	
Water consumption (g/animal/day) ^a	36.46±5.88	35.76±4.19	34.16±3.60	35.76±4.39	
General parameters on PND					
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) ^a	53.10±4.97	53.34±3.08	52.05±5.24	50.83±2.65	
Water consumption (g/animal/day) ^a	76.18±9.89	77.14±8.74	74.53±9.75	77.58±6.06	
Body and organ weights at PND 21					
Body weight (g)	301.4±26.5	295.2±18.7	294.7±17.8	286.9±16.6	
Organ weight					
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
Diacetoxyscirpenol intake (mg/kg BW/day)					
GD, mg/kg body weight/day ^a	0	0.12±0.01	0.34±0.02	1.00±0.07	
PND, mg/kg body weight/day ^a	0	0.30±0.01	0.85±0.07	2.57±0.15	

Mean ± SD.

^a 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 ^a	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.

^a Mean ± SD.

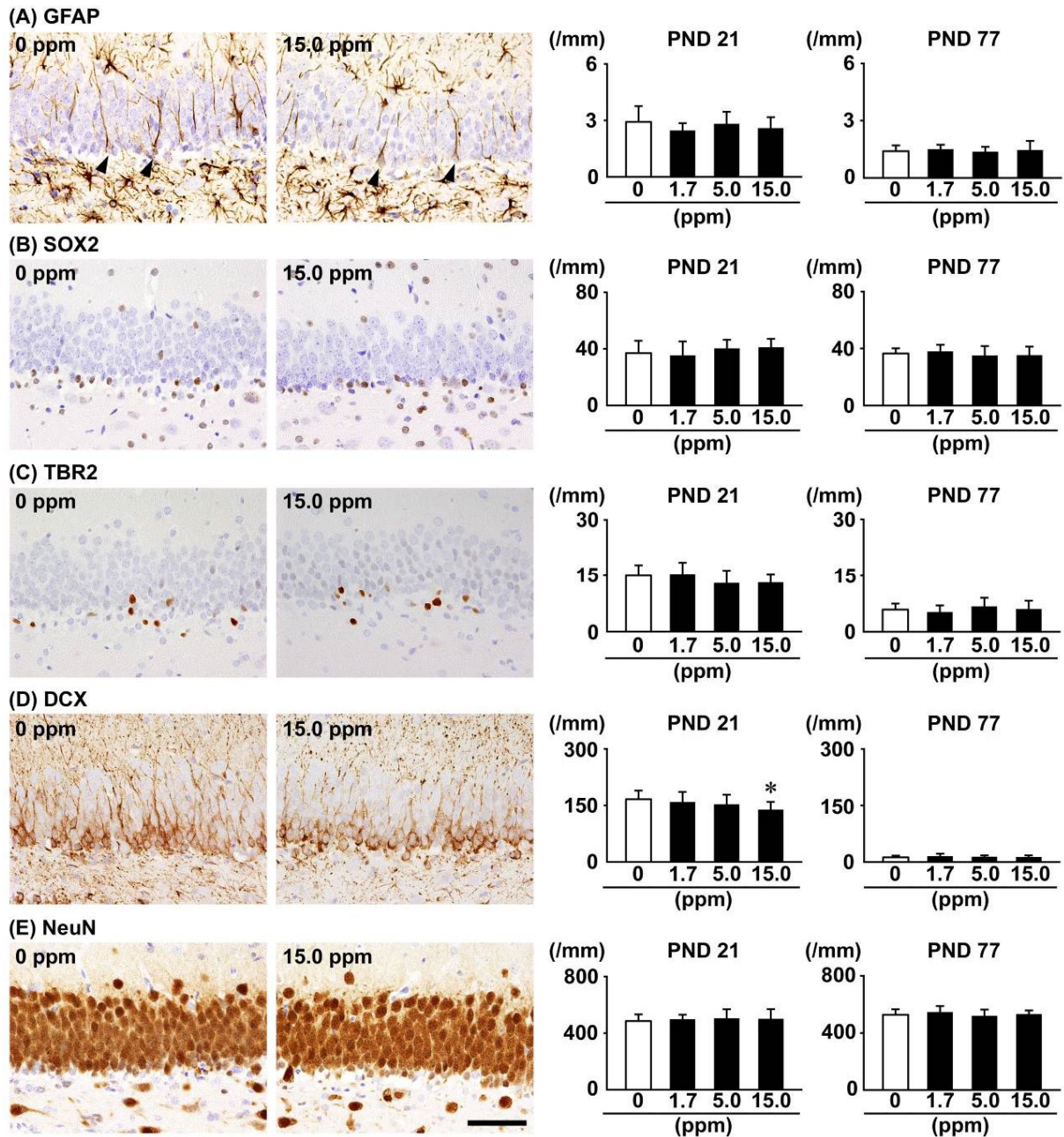


Figure 19. Distribution and number of immunoreactive cells for neuronal stage-defining markers of granule cell lineages in the subgranular zone (SGZ), and a mature neuronal marker in the granule cell layer (GCL) of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to sterigmatocystin. (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 μ m. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit length (mm) of the SGZ or GCL of the bilateral sides. Values are expressed as mean + SD. N = 10/group.

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

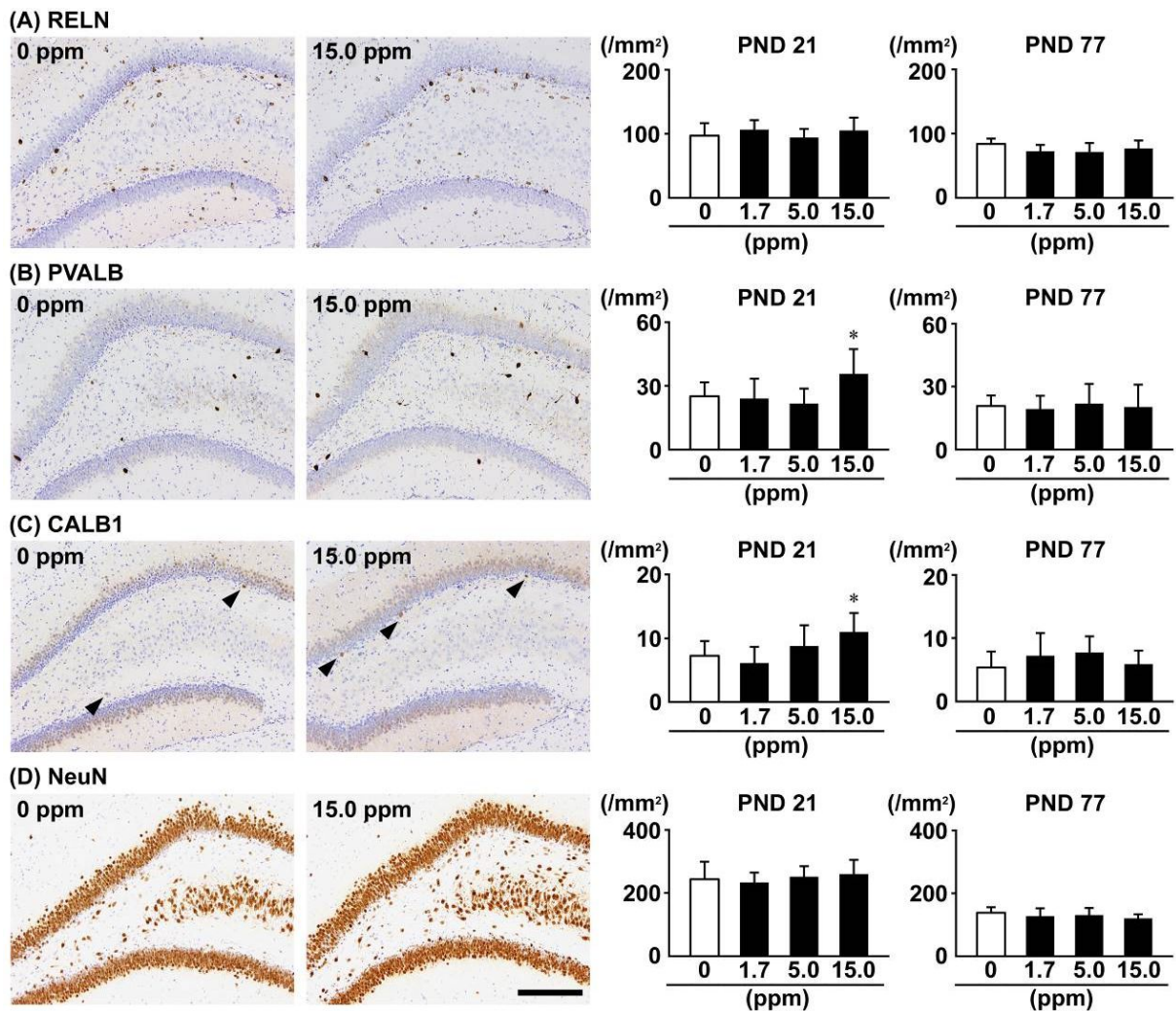


Figure 20. Distribution and number of immunoreactive cells for interneuronal markers and a mature neuronal marker in the hilus of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to sterigmatocystin. (A) Reelin (RELN). (B) Parvalbumin (PVALB). (C) Calbindin-D-28K (CALB1). (D) 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 μ m. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit area (mm²) of the hilus of bilateral hemispheres. Values are expressed as the mean + SD. N = 10/group.

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

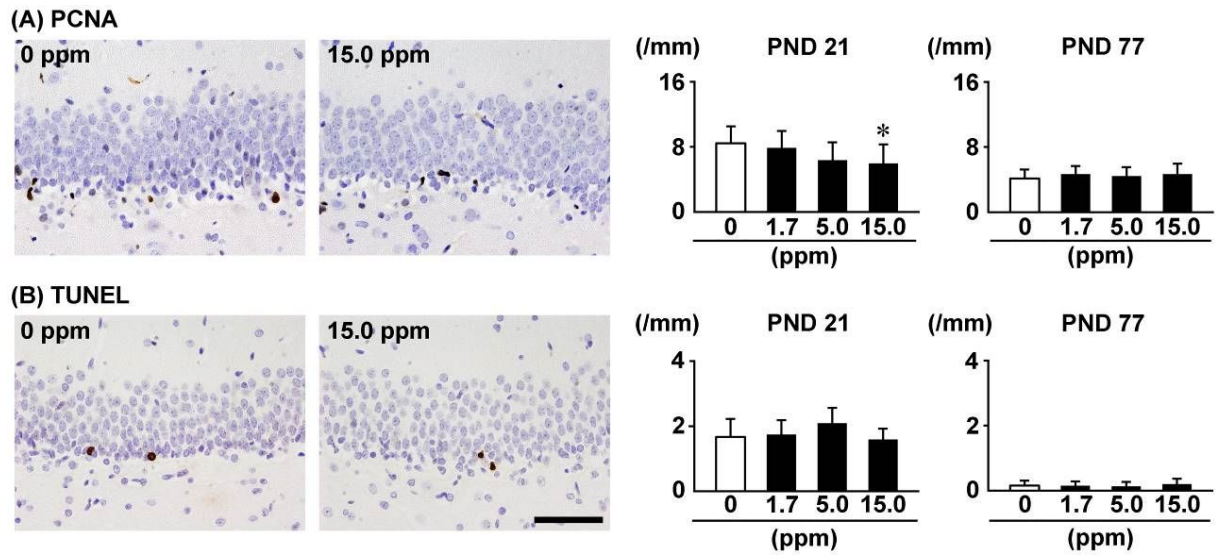


Figure 21. Distribution and number of apoptotic and proliferating cells in the SGZ of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to sterigmatocystin. (A) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA). (B) Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL). Representative images from 0 ppm control and the 15.0 ppm group at PND 21 are shown. Magnification: 400 \times ; bar = 50 μ m. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit length (mm) of the SGZ of the bilateral sides. Values are expressed as the mean + SD. N = 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.

^a 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.

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)
総合研究報告書

分担研究報告書

培養によらないかび毒産生菌種検出法の開発

研究分担者 小西 良子 (麻布大学)
研究協力者 小林 直樹 (麻布大学)
研究協力者 渡辺 麻衣子 (国立医薬品食品衛生研究所)
研究協力者 窪崎 敦隆 (国立医薬品食品衛生研究所)

研究要旨

食品を汚染するかび毒産生菌の迅速検出法の開発を目的として、培養を行わずにかび毒産生菌を効率よく検出する方法の開発を行った。今後モニタリングを強化していくべきかび毒として、ステリグマトシスチン (STC) およびジアセトキシシルペノール (DAS) を取り上げ、それぞれ産生菌種のみを検出する方法の開発を試みた。1年目は、食品に付着したカビ由来の DNA を回収し、改変型 DNA 合成酵素を用いた特異的な PCR 法により、培養を経ずに標的菌種のみを増幅する手法を確立した。2年目は、1年目に確立した技術的基盤をもとに、配列特異性の高い改変型酵素を用いた PCR 法により、STC 産生菌種を多く含む *Aspergillus section Versicolores* において培養を経ずに STC 産生菌種を効率よく検出する系の開発を行った。その結果、国内において主要な STC 産生菌種である *Aspergillus creber* を特異的に検出する系、および、*Aspergillus section Versicolores* の中で分離頻度が高いものの STC 非産生菌種である *A. sydowii* を除いた残りの当該 section に属する菌種をまとめて検出することで効率よく STC 産生菌種を検出する系、これらの PCR 法の系の確立に成功した。さらに、開発した系を使用して、玄米から培養を行わずに STC 産生菌種を検出することに成功し、スクリーニング法としての有効性を示した。3年目は、*Fusarium* 属菌のうち DAS 産生菌種のみを検出する方法の開発を試みた。昨年度までに確立した玄米に付着したカビ由来の DNA 抽出法および PCR 法により、同様に、培養を経ずに標的菌種のみを検出できる迅速検出法の開発を行った。その結果、 β -tubulin 遺伝子および *Lys2* 遺伝子の塩基配列に設計したプライマーを用いて、供試した全ての DAS 産生菌種を検出することに成功した。以上の結果から、食品または飼料から、培養を行わずに STC または DAS 産生菌種を効率的に検出する方法を確立することができた。これまでカビを検出するために行われる培養法では、結果を得るまでに 5 日から 14 日程度必要であったが、今回開発した手法では 4 時間程度で STC または DAS を産生するかびの検出が可能であり、STC または DAS 汚染のスクリーニング検査として有効な手法となることが期待される。

A. 研究目的

食品や飼料のかび毒による汚染は、食品および飼料中に存在するかび毒産生菌が増殖し、かび毒を産生することで起こる。栽培、貯蔵、流通等の環境が不適切であった場合には、かび毒産生菌が付着、増殖し、汚染が生じる。かび毒が検出されていない食品や飼料においても、保存が不適切であった場合には、かび毒産生菌が増殖し、汚染が生じる可能性がある。例えば、米や麦などの貯蔵穀物においては、生産時にかび毒による汚染が検出されない場合にもかび毒産生菌種が存在していると、貯蔵中に増殖してかび毒が産生され、かび毒により汚染される恐れがある。輸入食品においては、長時間の輸送時および輸入後の貯蔵がなされ、またその貯蔵環境は、貯蔵の前後または貯蔵中に大きく変化する可能性がある。したがって、食品や飼料のかび毒汚染を真にコントロールするためには、産生されて蓄積されたかび毒を検出するだけでなく、食品そのものや周辺環境におけるかび毒産生菌による汚染の有無を調べることにより、菌汚染のルートや増殖の原因を解明し、汚染防止に努めることが重要である。

一般に、かび毒産生菌を食品から検出するためには菌を培養する必要があり、カビの培養は5日から2週間程度の時間を要するため、迅速に検出することは困難である。食品から、培養を経ずに直接かび毒産生菌の存在の有無が判定できる手法が求められる。そこで、本研究では、培養を経ずに食品からかび毒産生菌を直接検出できる迅速で簡便な方法を遺伝子レベルで開発することを目的とした。輸送・貯蔵の間にカビが死滅している可能性もあるが、かび毒はかび毒産生菌が死滅した後も食品中に残存する。遺伝子レベルで検出を行うことで、食品中のカビがすでに死滅していたとしても検出することが可能となる。

本研究では、特に、輸入食品において今後モ

ニタリングを強化していくべきかび毒として、ステリグマトシスチン (STC) 産生菌およびジアセトキシシルペノール (DAS) 産生菌に着目した検討を行った。

2016年度および2017年度に、STC産生菌種の代表菌種である *Aspergillus versicolor* に着目し、当該菌種およびその近縁種を含む *Aspergillus* section *Versicolores* において STC 産生性菌種のみを検出する遺伝子検出法の技術的基盤を開発した。さらに、開発した検出法を使用しての玄米から培養を行わない STC 産生菌種の検出を試み、スクリーニング法としての有効性を検討した。2018年度には、*Aspergillus* section *Versicolores* において確立した検出法にならない、*Fusarium* 属菌のうち DAS 産生菌種のみを検出する培養を行わない遺伝子検出法の開発を試みた。

B. 研究方法

1. 供試菌株

STC産生菌種およびその近縁種として、食品および環境から分離した *Aspergillus* section *Versicolores* 株を合計60株供試した。DAS産生菌種およびその近縁種として以下の15菌種15株を用いた。DAS産生菌種：*F. acuminatum* (MAFF236716)、*F. equiseti* (MAFF236434)、*F. graminearum sensu stricto* (MAFF240270)、*F. langsethiae* (FRC T-1000)、*F. longipes* (IFM50036)、*F. poae* (MAFF305947)、*F. scirpi* (CBS448.84)、*F. semitectum* (MAFF236521)、*F. sporotrichioides* (ATCC34914)、DAS非産生菌種：*F. avenaceum* (ATCC200255)、*F. crookwellense* (MAFF101144)、*F. culmorum* (IFM50210)、*F. kyushuense* (MAFF237645)、*F. lateritium* (MAFF235344)、*F. tritinctum* (ATCC38183)。

2. 米検体

米は平成27年度産の国産玄米9検体および平

成 25 年度産国産玄米 4 検体を用いた。平成 27 年度産玄米の 1 検体(検体番号 9)および平成 25 年度産玄米 4 検体(検体番号 10~13)は STC による汚染が検出された検体である。

3 . 培養真菌からのゲノム DNA 抽出

胞子をポテトデキストロース液体培地(PDB)に接種して 25 ℃ で 2 日間培養し、その後菌糸体を回収した。ゲノム DNA の抽出は SDS 法¹⁾または DNeasy plant mini kit (QIAGEN)を用いて添付のプロトコルに従って行った。抽出した DNA は使用するまで-20 ℃ で保存した。

4 . 分子生物学的手法による菌種同定

まず、 β -tubulin 遺伝子部分配列(377 bp)を PCR により増幅した。PCR には Forward 用プライマーとして bt2a (5'- GGTAACCAAATCGGT GCTGCTTTC -3'), Reverse 用プライマーとして bt2b (5'- ACCCTCAGTG TAGTGACCCTTGGC -3')を用いた²⁾。PCR 条件は、95 ℃ で 3 分間熱変性を行った後、95 ℃ 15 秒、60 ℃ 45 秒、72 ℃ 60 秒を 1 サイクルとして 35 サイクル行い、72 ℃ で 120 秒間最終伸長を行った。その後、PCR 産物をエタノール沈殿により精製し、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いてシーケンシング反応を行った。シーケンシングは ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社)を用いて行い、塩基配列を決定した。決定した供試菌株の塩基配列を登録配列と共にアライメントした。登録配列は *Aspergillus section Versicolores* に含まれる 14 種³⁾および外群 2 種 39 株の登録配列を NCBI のデータベースからダウンロードして使用した。このアライメントを基に MEGA6.0⁴⁾を用い、近隣結合法により系統樹を作成し、菌種の同定を行った。

5 . Thin-layer chromatography (TLC)による STC

産生能の確認

胞子をポテトデキストロース寒天培地(PDA)に接種し、25 ℃ で 2 週間培養した。1-mL チップを用いてコロニーを寒天ごとくり抜き、サンプルチューブに移し、メタノール:クロロホルム(1:2)を 1 mL 加えて振盪した。得られた素抽出物を、Silica gel 60 薄層版(Merck 社)にスポットした。メタノール:クロロホルム(2:98)を用いて展開し、366 nm の光の下でシグナルを確認した。STC 標準品(Major Chemicals)と同じ移動度に現れるスポットを STC のシグナルと判断した。

6 . RNA polymerase 2 遺伝子部分配列の比較

Aspergillus section Versicolores に含まれる種の登録配列を NCBI のデータベースからダウンロードして使用し、MEGA6.0 を用い、ClustalW によりアライメントを行った。使用した RNA polymerase 2 (*RPB2*) 遺伝子登録配列のアクセッション番号は、以下の通り: JN853831.1 (*A. creber*)、JN853811.1 (*A. tennesseensis*)、JN853809.1(*A. jensenii*)、EF652178.1(*A. versicolor sensu stricto*)、EF652214.1 (*A. tabacinus*)、JN853841.1 (*A. protuberus*)、JN853803.1 (*A. venenatus*)、JN853823.1 (*A. puulaauensis*)、EF652187.1 (*A. sydowii*)

7 . 米付着カビ胞子からの直接 DNA 抽出

玄米 500 mg (20 粒程度)から、市販抽出キット(NucleoSpin Soil: TaKaRa)を用い、添付のプロトコルに従い、DNA を抽出した。抽出した DNA は使用するまで-20 ℃ で保存した。

8 . 菌種特異的検出 PCR

6 で作成したアライメントを基に、標的菌種の塩基配列がその他の菌種と異なる部分にプライマーを設計し、HiDi DNA polymerase (myPOLLS Biotec GmbH)を用い、添付のプロトコルに従っ

て PCR を行った。

9 . β -tubulin 遺伝子部分配列の比較

DAS 産生性 *Fusarium* 属菌種およびその近縁種の登録配列を NCBI のデータベースからダウンロードし、MEGA6.0 を用いて ClustalW によりアライメントを行った。使用した β -tubulin 遺伝子登録配列のアクセッション番号は以下の通り：AB587072 (*F. poae*)、AB587071 (*F. langsethiae*)、AB587036 (*F. semitectum*)、AB587076 (*F. sporotrichioides*)、AB587049 (*F. acuminatum*)、AB587047 (*F. equiseti*)、AB820716 (*F. longipes*)、AB587040 (*F. graminearum*)、AB820714 (*F. camptoceras*)、AB587077 (*F. tricinctum*)、AB587052 (*F. lateritium*)、AB820709 (*F. culmorum*)、AB587067 (*F. kyushuense*)、AB587059 (*F. verticillioides*)

10 . Lys2 遺伝子部分配列の比較

DAS 産生性 *Fusarium* 属菌種およびその近縁種の登録配列を NCBI のデータベースからダウンロードし、MEGA6.0 を用いて ClustalW によりアライメントを行った。使用した Lys2 遺伝子登録配列のアクセッション番号は以下の通り：AB586973 (*F. poae*)、AB586953 (*F. acuminatum*)、AB586972 (*F. langsethiae*)、AB586975 (*F. sporotrichioides*)、AB586944 (*F. graminearum*)、AB586951 (*F. equiseti*)、AB586940 (*F. semitectum*)、AB586968 (*F. kyushuense*)、AB586969 (*F. crookwellense*)、AB586942 (*F. culmorum*)、AB586954 (*F. lateritium*)、AB586979 (*F. tricinctum*)、AB586965 (*F. avenaceum*)

C. 研究結果

(1) 国内に分布する *Aspergillus* section *Versicolores* の分離、同定および STC 産生能

STC 産生菌種の迅速検出法の開発を行うにあ

たり、まず国内の食品および環境から *Aspergillus* section *Versicolores* を多数分離し、分子生物学的手法を用いて菌種の同定を行った。食品及び環境から分離された合計 60 株について、 β -tubulin 遺伝子部分配列 (377 bp) を決定し、配列データを得た。データベースに配列が登録されている *Aspergillus* section *Versicolores* の 14 菌種および外群 2 菌種 (計 28 株) と共に系統樹を作成し、菌種の同定を行った (図 1)。その結果、全ての登録配列は単系統群を形成した。それぞれの菌株が含まれるクレードの登録配列の菌種をもとに同定を行った。供試菌株には、*A. amoenus* が 1 株、*A. creber* が 12 株、*A. jensenii* が 4 株、*A. protuberus* が 2 株、*A. puulaauensis* が 1 株、*A. sydowii* が 22 株、*A. tabacinus* が 1 株、*A. tennesseensis* が 10 株、*A. venenatus* が 3 株、*A. versicolor sensu stricto* が 4 株含まれた。60 株の分離・同定を行った結果、*Aspergillus* section *Versicolores* に属する 14 菌種の内、10 菌種の株を得ることができた。

また、供試した 60 株について STC 産生能を TLC により調べた結果、*A. creber* の 12 株中 8 株、*A. jensenii* の 4 株中 2 株、*A. tennesseensis* 10 株中 4 株、*A. venenatus* の 3 株中 1 株、*A. versicolor sensu stricto* の 4 株中 3 株で STC 産生能が確認された。*A. amoenus* (1 株)、*A. protuberus* (2 株)、*A. puulaauensis* (1 株)、*A. sydowii* (22 株) および *A. tabacinus* (1 株) においては、STC 産生株は検出されなかった。

(2) 培養を経ずに標的菌種のみを特異的検出する PCR 法の確立

食材に付着したカビ胞子を培養することなく直接検出することを目的に、玄米に付着したカビからの DNA 検出方法を検討した。微量と考えられる付着カビ胞子からの検出を行うにあたり、土壌や堆積物中のバクテリアや真菌、藻類などから効率よく DNA 抽出することができる市販

キットの適用を検討した。その結果、玄米付着カビ胞子から直接 DNA を抽出でき、PCR によりカビを検出することが可能であると考えられた。一方で、一部の米については非特異的と考えられる増幅が見られたため、特異性の高い PCR 法の検討を行った。プライマーの 3' 末端の 1 塩基の違いを認識し、完全一致しない場合は増幅効率が著しく低下することが報告された改変型 DNA 合成酵素(HiDi DNA polymerase) を活用した検出法を検討した。その結果、標的の菌種 DNA においては目的サイズの増幅が観察されたのに対し、プライマーの 3' 末端の 1 塩基が異なるカビの DNA からは増幅が起らず、標的カビ以外の DNA の混入があっても菌種特異的な検出が可能であることが確認できた(図 2)。以上より、食材に付着したカビ由来の DNA を回収し、非特異的な増幅を回避しながら ST 産生能を持つ菌種のみを検出することが示され、食品を汚染するかび毒産生菌の迅速検出法の技術的基盤を確立することができた。

(3) *Aspergillus creber* 特異的検出 PCR

(1) の結果より、国内において分離される *Aspergillus section Versicolores* の中で *A. creber* は分離頻度が高く、且つ STC 産生菌株の頻度が高い菌種であることが明らかとなった。そこで、(2) で確立した菌種特異的増幅を可能とする HiDi DNA polymerase を用いた PCR により、*A. creber* のみを特異的に増幅する系を検討した。

RPB2 遺伝子における *A. creber* に特徴的な塩基配列を基に当該菌種のみを標的とするプライマーセットを設計し(図 3A)、培養菌株から抽出したゲノム DNA をテンプレートに PCR を行った。その結果、*A. creber* 特異的に増幅が見られ(図 3B)、HiDi DNA polymerase を用いた PCR により国内の主要な STC 産生菌種と考えられる *A. creber* を特異的に検出することが可能である

ことが示された。

(4) *Aspergillus sydowii* を除く *Aspergillus section Versicolores* 検出 PCR

さらに、(1) の結果より *A. sydowii* は国内で最も高頻度に分離される *Aspergillus section Versicolores* であるが、STC を産生しない菌種であることが示された。そこで、*A. sydowii* を除く *Aspergillus section Versicolores* の他菌種をまとめて検出することで効率よく STC 産生菌を検出する系を検討した。(3) と同様に、*RPB2* 遺伝子において、*A. sydowii* のみで特異的に他の菌種と配列が異なるサイトをターゲットに、*A. sydowii* 以外の菌種の塩基配列と一致するプライマーセットを設計したところ(図 4A)、*A. sydowii* では増幅が見られず、その他の菌種では全て目的のサイズの増幅が観察された(図 4B)。以上の結果から、STC 産生菌種を多く含む *Aspergillus section Versicolores* の中で STC 非産生菌種である *A. sydowii* 以外の菌種を特異的に増幅することが可能であることが確認された。

(5) 玄米における STC 産生菌の検出

(4) で検討した *A. sydowii* 以外の菌種をまとめて増幅する PCR の系を用い、玄米からの STC 産生菌の検出を行った。STC による汚染が確認された玄米 5 検体と STC が検出されていない玄米 8 検体に付着するカビから DNA を抽出し、PCR を行った。

その結果、STC が検出された玄米については全てにおいて目的サイズの増幅産物が確認された(図 5)。また、STC が未検出の玄米についても、8 検体中 7 検体で増幅産物が確認された。

(6) β -tubulin 遺伝子部分配列を基にした DAS 産生菌種特異的検出 PCR

STC 産生菌種を対象に開発した「改変型 DNA 合成酵素を使用した PCR 技術」を基に目的の特

定菌種のみを増幅して検出する方法を応用し、DAS 産生菌種を特異的に検出する PCR 法の開発を行った。先行研究⁵⁾のデータを基に、DAS 産生性 *Fusarium* 属菌種 9 菌種 (*F. acuminatum*、*F. equiseti*、*F. graminearum* s. str.、*F. langsethiae*、*F. longipes*、*F. poae*、*F. scirpi*、*F. semitectum*、*F. sporotrichioides*) および DAS を産生することが知られていないそれらの近縁種 6 菌種 (*F. avenaceum*、*F. crookwellense*、*F. culmorum*、*F. kyushuense*、*F. lateritium*、*F. tritinctum*)、合計 15 菌種を対象とした。

まず、対象菌種の内、 β -tubulin 遺伝子の配列がデータベースに登録されていた DAS 産生性菌種 8 菌種および非産生菌種 5 菌種について塩基配列を比較した。その結果、DAS 産生菌種 8 菌種のうち *F. graminearum* s. str.を除く 7 菌種にのみ共通するサイトが存在したため、当該サイトにプライマーを設計した(図 6A)。併せて、*F. graminearum* s. str.特異的なサイトにプライマーを設計し(図 6B)、二つの PCR を行うことで DAS 産生菌種を特異的に検出する系の確立を試みた。培養菌株から抽出したゲノム DNA をテンプレートに PCR を行なったところ、前者のプライマーセットでは DAS 産生菌種 9 菌種のうち *F. graminearum* s. str.を除く 8 菌種において特異的な増幅が得られ(図 7A)、後者のプライマーセットでは *F. graminearum* s. str.特異的な増幅が得られた(図 7B)。以上より、これら二つの PCR を組み合わせることで、DAS 産生菌種を特異的に検出することが可能であることが明らかとなった。

(7) Lys2 遺伝子部分配列を基にした DAS 産生菌種特異的検出 PCR

次に、対象菌種の内、Lys2 遺伝子の配列がデータベースに登録されていた DAS 産生性菌種 7 菌種および非産生菌種 6 菌種について塩基配列を比較した。その結果、DAS 産生菌種 8 菌種の

うち *F. poae* を除く 6 菌種にのみ共通するサイトが存在したため、当該サイトにプライマーを設計した(図 8A)。併せて、*F. poae* 特異的なサイトにプライマーを設計した(図 8B)。この際、Forward 側のプライマーを同じ位置に設計することで、Reverse 側のプライマーを混合して用いるマルチプレックス PCR の系とすることとした。培養菌株から抽出したゲノム DNA をテンプレートにマルチプレックス PCR を行なったところ、*F. poae* ではおよそ 220 bp の増幅産物が得られ、そのほかの DAS 産生菌種 8 菌種においてはおよそ 400 bp の増幅産物が得られた(図 9)。DAS 非産生菌種においては増幅が見られなかった。以上より、設計したマルチプレックス PCR の系により、DAS 産生菌種を特異的に検出することが可能であることが明らかとなった。

D. 考察

本研究では、食品において今後モニタリングを強化していくべきかび毒として STC および DAS に着目し、これらのかび毒産生菌種の迅速検出法の開発を目的に、培養を経ずにかび毒産生菌を検出できる方法の開発を行った。

まず、培養を経ずに食材に付着したカビを直接検出する方法の検討を行うため、土壌や堆積物から微量の微生物等の DNA を効率よく抽出可能な市販のキットを用い、玄米に付着するカビからの DNA 抽出を試みた。その結果、食品中のカビを直接検出するための DNA 抽出法として有効であることが示された。一方で、食材自体や環境由来細菌等の DNA の混入による非特異的増幅と思われる増幅産物が検出される検体が見られた。そのため、プライマーの 3' 末端の 1 塩基の違いを認識し、完全一致しない場合は増幅効率が著しく低下することが報告された改変型 DNA 合成酵素である HiDi DNA polymerase を用いて、より特異的な増幅反応を

示す PCR を検討した。その結果、標的とする菌種のみで目的とする産物長の増幅が確認され、標的とするカビ以外の DNA の混入があっても特異的な検出が可能な系を確立できた。

次に、確立した系を基に STC 産生菌種の特異的な検出法の開発を行った。国内の食品および環境から *Aspergillus* section *Versicolores* に属する菌株の分布と STC 産生能を検討したところ、*A. creber* が国内の主要な STC 産生菌種であることが明らかとなった。そこで、当該菌種のみを検出する系の開発をおこなった。また一方で、*A. sydowii* は国内で頻繁に検出される STC 非産生菌種であるため、*A. sydowii* を除いた *Aspergillus* section *Versicolores* に属する菌種をまとめて検出する系の開発も試みた。いずれの系についても、*RPB2* 遺伝子上にプライマーを設計することで、目的の特定菌種のみを増幅して検出する方法を確立することができた。

さらに、*A. sydowii* を増幅させずに他の菌種をまとめて検出する系を用い、玄米からの STC 産生菌の直接検出を試みたところ、STC 汚染が確認された玄米では、全てにおいて STC 産生菌種が検出された。以上の結果から、食品または飼料から培養を行わずに STC 産生菌種を効率的に検出する方法を確立することができた。

最後に、STC 産生菌種において確立された標的菌種を特異的に検出することが可能な PCR 法を基に、DAS 産生菌種の迅速検出法の開発を行った。DAS 産生菌種および近縁な DAS 非産生菌種について β -tubulin 遺伝子および *Lys2* 遺伝子の塩基配列を比較し、DAS 産生菌種特異的な塩基配列にプライマーを設計し、種特異的な検出 PCR の系の確立を試みた。 β -tubulin 遺伝子においては、二つの PCR を組み合わせることで供試した全ての DAS 産生菌種を検出することができ、*Lys2* 遺伝子においてはマルチプレックス PCR により、全ての DAS 産生菌種を検出することに成功した。

E. 結論

以上の結果から、食品または飼料に付着したカビ由来の DNA を回収し、培養を行わずに PCR によって STC 産生菌種および DAS 産生菌種を効率的に検出する方法を開発することができた。さらに STC 産生菌種の検出法については、実際に玄米における STC 産生菌種による汚染のスクリーニング法としての有効性を確認した。

これまでカビを検出するために行われる培養法では、結果を得るまでに 5 日から 14 日程度必要であったが、今回開発した手法では 4 時間程度で STC および DAS を産生するカビの検出が可能であり、STC および DAS 汚染のスクリーニング検査として有効な手法となることが期待される。

F. 参考文献

- 1) Watanabe M, Lee K, Goto K, Kumagai S, Sugita-Konishi Y, Hara-Kudo Y: Rapid and effective DNA extraction method with bead grinding for a large amount of fungal DNA. *Journal of Food Protection* (2010) 73: 1077–1084
- 2) Glass NL and Donaldson GC: Development of Primer Sets Designed for Use with the PCR To Amplify Conserved Genes from Filamentous Ascomycetes. *Microbiology* (1994) 61: 1323-1330
- 3) Jurjevic Z, Peterson SW and Horn BW: *Aspergillus* section *Versicolores*: nine new species and multilocus DNA sequence based phylogeny. *IMA Fungus* (2012) 3: 759–795
- 4) Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A and Kumar S: MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* (2013) 30: 2725–2729
- 5) Watanabe M, Yonezawa T, Sugita-Konishi Y and

Kamata Y: Utility of the phylotoxigenic relationships among trichothecene-producing *Fusarium* species for predicting their mycotoxin-producing potential. *Food Addit Contam Part A* (2013) 30: 1370–1381

G. 研究業績

【論文発表】

- 1) Onami J[†], Watanabe M[†], Yoshinari T, Hashimoto R, Kitayama M, Kobayashi N, Sugita-Konishi Y, Kamata Y, Takahashi H, Kawakami H, Terajima J: Fumonisin-production by *Aspergillus* section *Nigri* isolates from Japanese Foods and Environments. *Food Safety* (2018) 6: 74-82 (†筆頭著者同等貢献者)
- 2) Kobayashi, N, Kubasaki, A, Takahashi, Y, Yanai, M., Konuma, R, Uehara, S, Chiba, T, Watanabe, M, Terajima, J and Sugita-Konishi, Y: Distribution of sterigmatocystin-producing *Aspergilli* in Japan. *Food Safety* (2018) 6: 67-73
- 3) Shiratori, N[†], Kobayashi, N[†], Tulayakul, P, Sugiura, Y, Takino, M, Endo, O and Sugita-Konishi Y: Occurrence of *Penicillium brocae* and *Penicillium citreonigrum*, related to mutagenic and toxic metabolites, respectively, in commercially available rice grains of Thailand. *Toxins* (2017) 9: E194 (†筆頭著者同等貢献者)
- 4) 加田睦月、内ヶ島美岐子、吉成知也、三宅司郎、小林直樹、小西良子. ステリグマトシステインの ELISA によるスクリーニング法の開発. 日本マイコトキシン学会第 83 回学術講演会 (2019, 1, 川崎)
- 5) 佐藤和貴、吉成知也、窪崎敦隆、小林直樹、小西良子、工藤由起子、渡辺麻衣子. 国内流通穀類におけるステリグマトシステチン産生菌の分布に関する研究. 日本マイコトキシン学会第 83 回学術講演会(2019, 1, 川崎)
- 6) 小林直樹、古川優奈、佐藤悠人、渡辺麻衣子、栗林尚志、島津徳人、小西良子. Change of fungal microflora in the house by dogs. 平成 30 年室内環境学会学術大会 (2018, 12, 東京)
- 7) 小池義浩、吉成知也、中川博之、上垣隆一、高橋治男、清水公德、工藤由起子、渡辺麻衣子. *Fusarium* 属菌におけるフモニシン類産生性に関する分類学的検討. 日本マイコトキシン学会第 82 回学術講演会 (2018, 8, 帯広)
- 8) Watanabe M, Onami J, Yoshinari T, Hashimoto R, Kitayama M, Kamata Y, Takahashi H, Kawakami H, Terajima J. Study on fumonisin-productivity of isolates of *Aspergillus* section *Nigri* derived from foods in Japanese markets and environment UJNR 2018 (2018, 5, Yokohama)
- 9) Watanabe M, Suzuki Y, Takahashi H, Yoshinari T, Kobayashi N, Sugita-Konishi Y, Goto K and Terajima J: Comparative study including fumonisin production on the phylogenetic tree of kuro-koji molds and their relatives isolated from Japanese fermented foods. UJNR (2017, 5, Washington DC)
- 10) Kobayashi N, Kubosaki A, Shiratori N, Watanabe M, Terajima J and Sugita-Konishi Y: Classification and sterigmatocystin-production of *Aspergillus* section *Versicolores* from

【学会発表】

- 1) Sugita-Konishi Y, Takeda N, Watanabe M, Kobayashi N and Yoshinari T. Development of an Analytical Method for Simultaneous Determination of the Modified 4,15-Diacetoxyscirpenol and their Occurrence in Japanese Retail Food. SOT 58th annual meeting (2019, 3, Baltimore)

- Japanese foods and environments. UJNR (2017, 5, Washington DC)
- 9) 窪崎敦隆、小林直樹、高橋治男、吉成知也、高鳥浩介、寺嶋淳、小西良子、渡辺麻衣子. 高度識別型 DNA 合成酵素を用いた玄米汚染真菌の検出. 第 44 回日本防菌防黴学会(2017, 9, 大阪)
 - 10) 小林直樹、窪崎敦隆、渡辺麻衣子、小沼ルミ、上原さとみ、高橋由美、矢内美幸、寺嶋淳、高橋治男、高鳥浩介、小西良子. *Aspergillus section Versicolores* におけるステリグマトシスチン産生菌種の分子生物学的検出方法の開発. 日本マイコトキシン学会第 80 回学術講演会(2017, 7, 東京)
 - 11) 小林直樹、藤江雄大、鹿嶋直哉、渡辺麻衣子、小西良子. 国内で分離された *Apergillus ochraceus* の再同定とその OTA 産生性. 日本マイコトキシン学会第 81 回学術講演会(2018, 1, 東京)
 - 12) 窪田祐恵、尾畑瑠衣、内藤千秋、大仲賢二、石崎直人、小林直樹、小西良子. 野菜由来乳酸菌のアフラトキシン類への結合能と胃内環境での挙動. 日本マイコトキシン学会第 81 回学術講演会(2018, 1, 東京)
 - 13) 尾畑瑠衣、窪田祐恵、内藤千秋、大仲賢二、石崎直人、小林直樹、小西良子. アフラトキシン結合能を有する野菜由来乳酸菌の探索と消化液での安定性に関する研究. 日本食品衛生学会第 113 回学術講演会(2017, 11, 東京)
 - 14) 小林直樹、藤江雄大、鹿嶋直哉、渡辺麻衣子、小西良子. *Aspergillus ochraceus sensu lato* における OTA 産生と OTA 生合成関連遺伝子の保有状況. 日本食品衛生学会第 113 回学術講演会(2017, 11, 東京)
 - 15) 小林直樹、渡辺麻衣子、吉成知也、矢内美幸、杉浦義紹、高橋治男、寺嶋淳、小西良子: *Aspergillus versicolor* の系統分類とステリグマトシスチン産生能の検討. 日本進化学会第 18 回大会(2016, 8, 東京)
 - 16) 小林直樹: 様々な由来の *Aspergillus versicolor* におけるステリグマトシスチン産生性に関する分子生物学的検討. かび毒研究連絡会(2016, 8, 滋賀)
 - 17) 田形卓巳、白鳥望美、杉浦義紹、小林直樹、小西良子: *Penicillium citreonigrum* 株間におけるシトレオビリジン産生能の比較と毒素産生条件. 第 37 回日本食品微生物学会学術総会(2016, 9, 東京)
 - 18) 鈴木佑奈、宮原彩花、吉成知也、小林直樹、小西良子、寺嶋淳、後藤慶一、高橋治男、渡辺麻衣子: 発酵食品から分離された黒麹菌と近縁菌の系統分類学的研究. 第 37 回日本食品微生物学会学術総会(2016, 9, 東京)
 - 19) 白鳥望美、滝埜昌彦、遠藤治、Phitsanu Tulayakul、杉浦義紹、小林直樹、小西良子: エンドファイティックなカビ *Penicillium brocae* による汚染米の安全性について. 第 112 回 日本食品衛生学会学術講演会(2016, 10, 川崎)
 - 20) Watanabe, M.: Evaluation of molecular markers for identification of *Aspergillus* and *Fusarium* spp. ISMYCO2016 (2016, 12, Tokyo)
 - 21) Suzuki, Y., Takahashi, H., Yoshinari, T., Kobayashi, N., Sugita-Konishi, Y., Terajima, J., Goto, K. and Watanabe, M.: Phylogenetic studies on saccharifying activity and fumonisin production in the strains of Kuro-koji molds and their relatives isolated from fermented foods. ISMYCO2016, Tokyo (2016, 12)
 - 22) Shiratori, N., Takino, M., Endo, O., Tulayakul, P., Kobayashi, N. and Sugita-Konishi, Y.: Risk potential of rice grains contaminated with an endophytic fungus *Penicillium brocae*. ISMYCO2016, Tokyo (2016, 12)

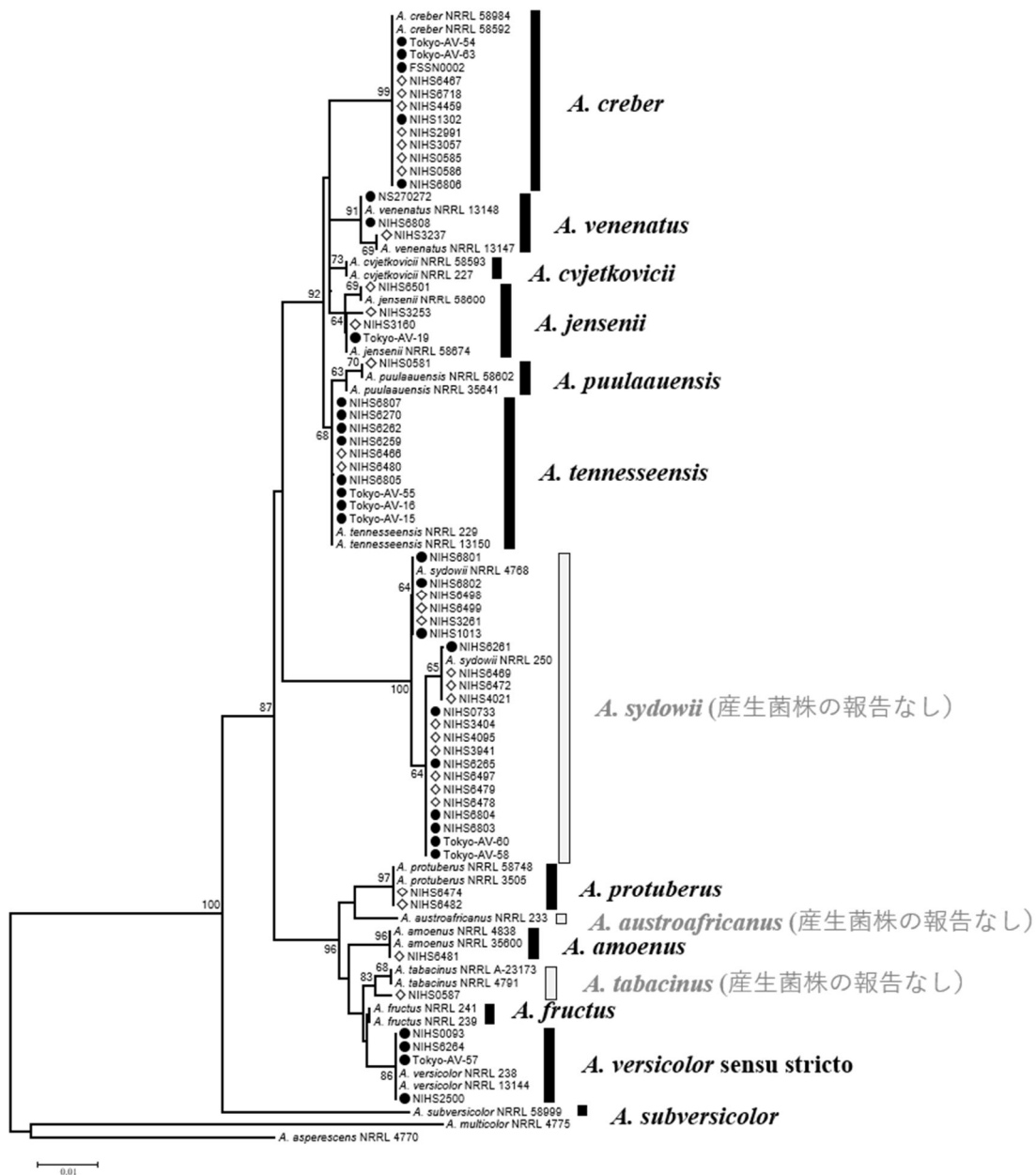
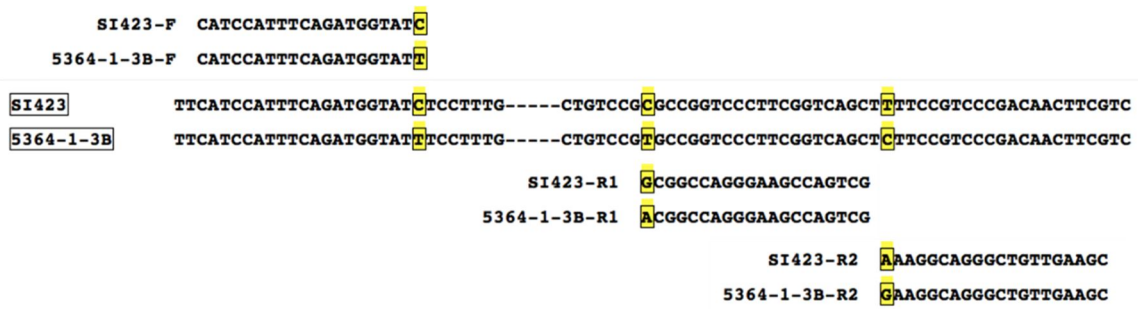


図 1. β -tubulin 遺伝子部分配列による系統樹

供試菌株 60 株の配列データとデータベース登録配列から 39 配列データを使用して近隣結合法 (NJ 法) により系統樹を作成した. 各枝上の数字はブートストラップ確率を示している. ● : 食品由来株, ○ : 環境由来株.

A.



B.

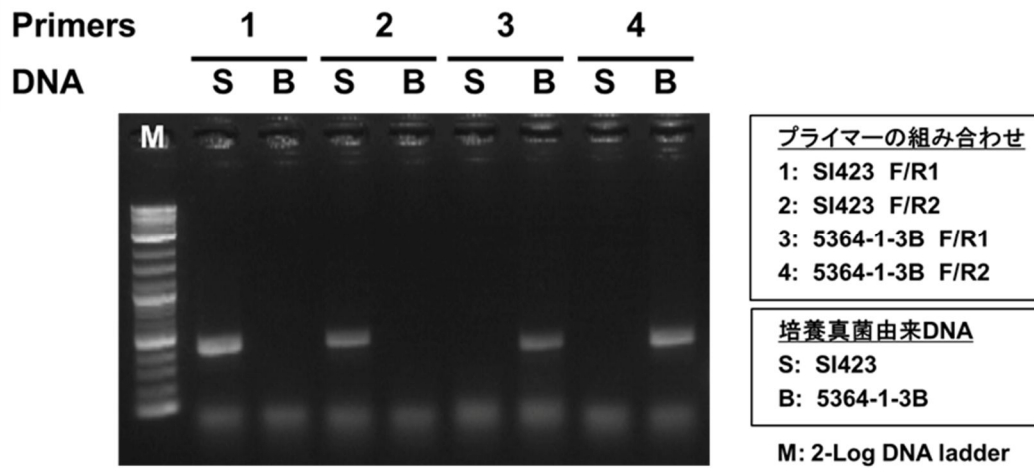
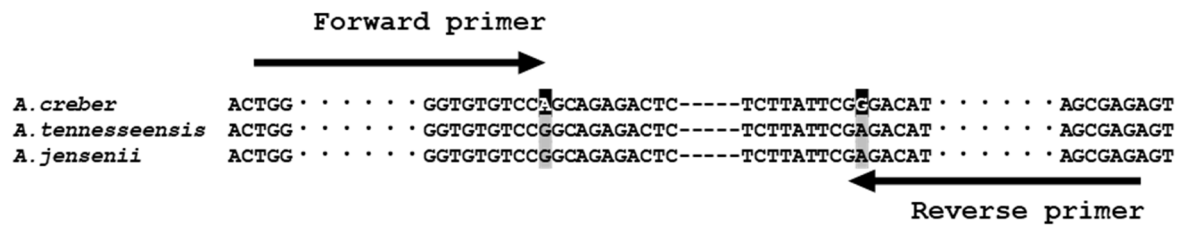


図 2. 特異的 PCR 法の検討

A：使用したプライマーのアニーリング部位．B：特異的増幅酵素を用いた β -tubulin 遺伝子部分配列の増幅結果．

A.



B.

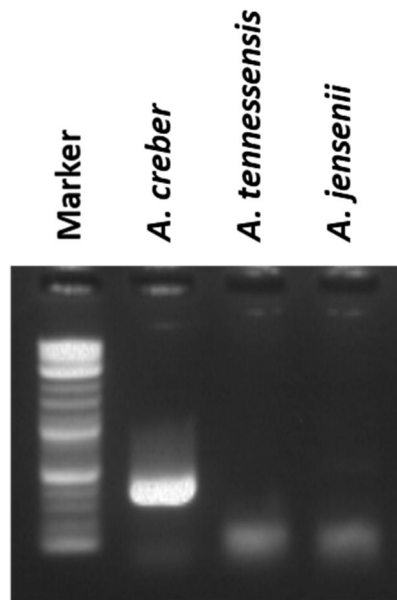
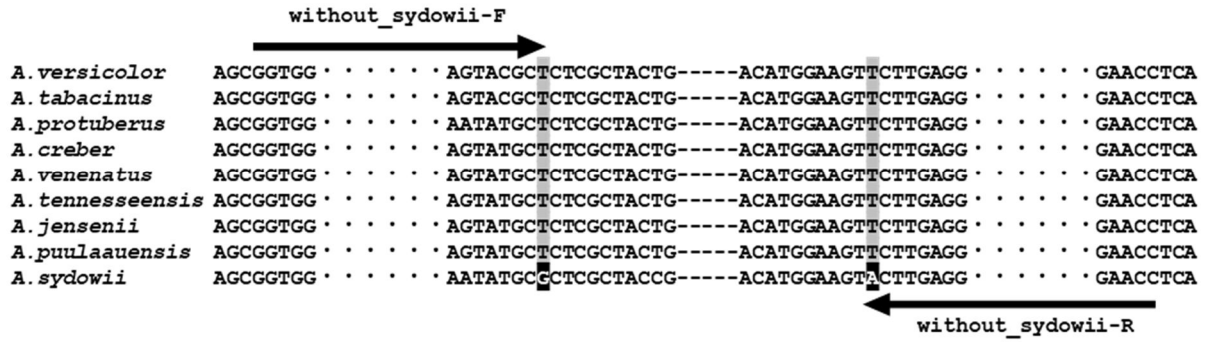


図 3. *Aspergillus creber* 特異的検出用プライマーの検討

A : RPB2 遺伝子塩基配列のアライメントと使用したしたプライマーのアニール
ング部位 . B : HiDi DNA polymerase を用いた PCR の結果 .

A.



B.

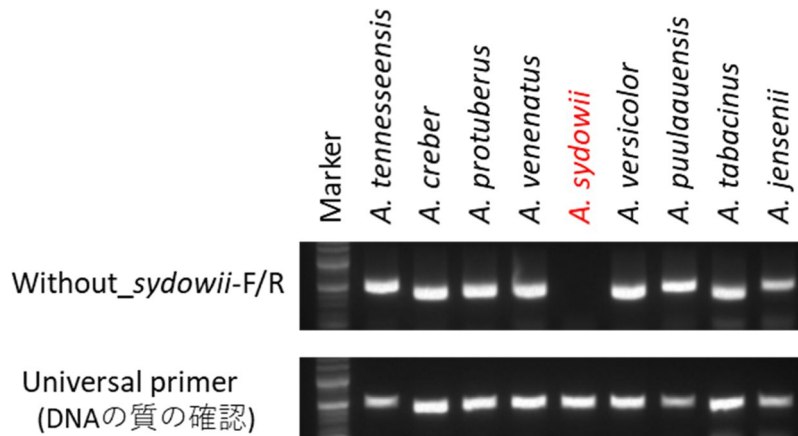
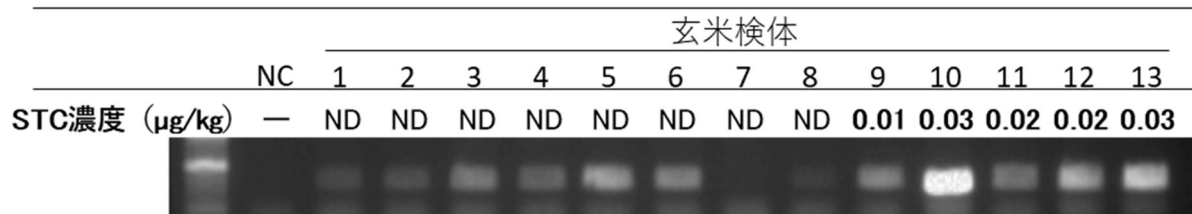


図 4. *Aspergillus sydowii* を除く菌種検出用プライマーの検討

A : RPB2 遺伝子塩基配列のアライメントと使用したしたプライマーのアニーリング部位 . B : HiDi DNA polymerase を用いた PCR の結果 .



ND : Not detected

図 5 . 玄米付着カビからの抽出 DNA における *Aspergillus sydowii* を除く *Aspergillus section Versicolores* の検出

検体 1 ~ 9 : 平成 27 年度産国産玄米、検体 10 ~ 13 : 平成 25 年度産国産玄米、NC: negative control (陰性対照).

A.

	Forward primer 1 →	Reverse primer 1 ←
<i>F. poae</i>	ACTGGGCC ····TACTGAGGGAGCTG-----	CCTCTTACGGCGACT ····TCTCCGCC
<i>F. langsethiae</i>	ACTGGGCC ····TACTGAGGGAGCTG-----	CCTCTTACGGCGACC ····TCTCCGCC
<i>F. sporotrichioides</i>	ACTGGGCC ····TACTGAGGGAGCTG-----	CCTCTTACGGCGACC ····TCTCCGCC
<i>F. acuminatum</i>	ACTGGGCG ····TACTGAGGGAGCTG-----	CCTCTTACGGCGACC ····TCTCCGCC
<i>F. graminearum</i>	ACTGGGCC ····TACACGAGGGGTGCTG-----	CCTCTTACGGCGACC ····TCTCTGCC
<i>F. equiseti</i>	ACTGGGCC ····TACTGAAGGAGCTG-----	CCTCTTACGGCGACT ····TCTCCGCC
<i>F. longipes</i>	ACTGGGCC ····TACTGAAGGAGCTG-----	CCTCTTACGGCGACT ····TCTCCGCT
<i>F. semitectum</i>	ACTGGGCC ····TACTGAAGGAGCTG-----	CCTCTTACGGCGACT ····TCTCCGCC

<i>F. kyushuense</i>	ACTGGGCC ····TACTGAGGGAGCTG-----	CCTCTTATGGGAGACC ····TCTCCGCC
<i>F. culmorum</i>	ACTGGGCC ····TACACGAGGGGTGCTG-----	CCTCTTACGGCGACC ····TCTCTGCC
<i>F. lateritium</i>	ACTGGGCC ····TACTGAGGGGTCCG-----	CATCCTACGGGAGACC ····TCTCCGCT
<i>F. tricinctum</i>	ACTGGGCG ····TACACGAGGGAGCTG-----	CCTCCTACGGGAGACC ····TCTCCGCT
<i>F. avenaceum</i>	ACTGGGCG ····TACTGAGGGAGCTG-----	CCTCCTACGGGAGACC ····TCTCCGCT

B.

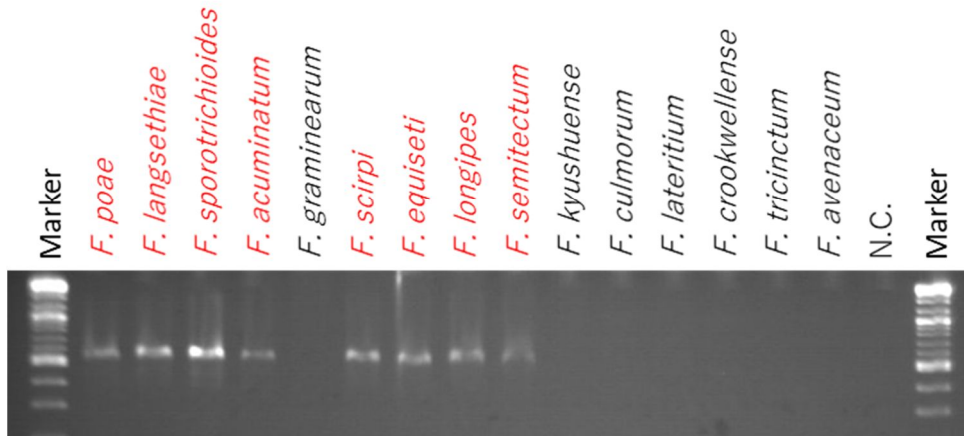
	Forward primer 2 →	Reverse primer 2 ←
<i>F. poae</i>	CTTCAACG ····TCACTGTTGTACGAA-----	ACACTGAGGGAGCTG ····CCAAGTTCT
<i>F. langsethiae</i>	CTTCAACG ····TCACTCCTGCCACGAA-----	ACACTGAGGGAGCTG ····CCAAGTTCT
<i>F. sporotrichioides</i>	CTTCAACG ····TCACTCCTGCCACGAA-----	ACACTGAGGGAGCTG ····CCAAGTTCT
<i>F. acuminatum</i>	CTTCAACG ····CCACTCATTCACGAA-----	ACACTGAGGGAGCTG ····CCAAGTTCT
<i>F. graminearum</i>	CTTCAACG ····TCACTACTGCCACGAA-----	ACACCGAGGGGTGCTG ····CCAAGTTCT
<i>F. equiseti</i>	CTTCAACG ····TCACTCCTGCCACGAA-----	ACACTGAAGGAGCTG ····CCAAGTTCT
<i>F. longipes</i>	CTTCAACG ····TCACTCCTGCCACGAA-----	ACACTGAAGGAGCTG ····CAACGTCCT
<i>F. semitectum</i>	CTTCAACG ····TCACTCCTGCCACGAA-----	ACACTGAAGGAGCTG ····CAACGTCCT

<i>F. kyushuense</i>	CTTCAACG ····TCATTCCACACGAAA-----	ACACTGAGGGAGCTG ····CCAAGTTCT
<i>F. culmorum</i>	CTTCAACG ····TCACTCCTGCCACGAA-----	ACACCGAGGGGTGCTG ····CCAAGTTCT
<i>F. lateritium</i>	CTTCAACG ····ACATTGATTGCAAGAA-----	ACACTGAGGGGTCCG ····CCAGGTCCT
<i>F. tricinctum</i>	CTTCAACG ····ACACTGATTGCAAGGA-----	ACACCGAGGGAGCTG ····CCAGGTCCT
<i>F. avenaceum</i>	CTTCAACG ····ATATTGATTTGAGAA-----	ACACTGAGGGAGCTG ····CCAGGTCCT

図 6. DAS 産生菌種特異的検出用プライマーの検討 (β-tubulin)

β-tubulin 遺伝子塩基配列のアライメントと使用したしたプライマーのアニールング部位を示す。A : DAS 産生菌種 8 菌種の内、*Fusarium graminearum* を除く 7 菌種特異的な領域 B : *Fusarium graminearum* 特異的な領域 .

A.



B.

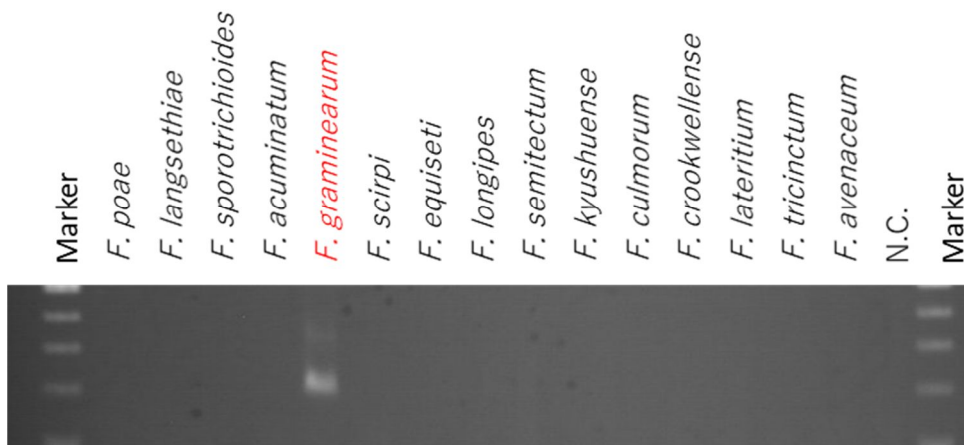
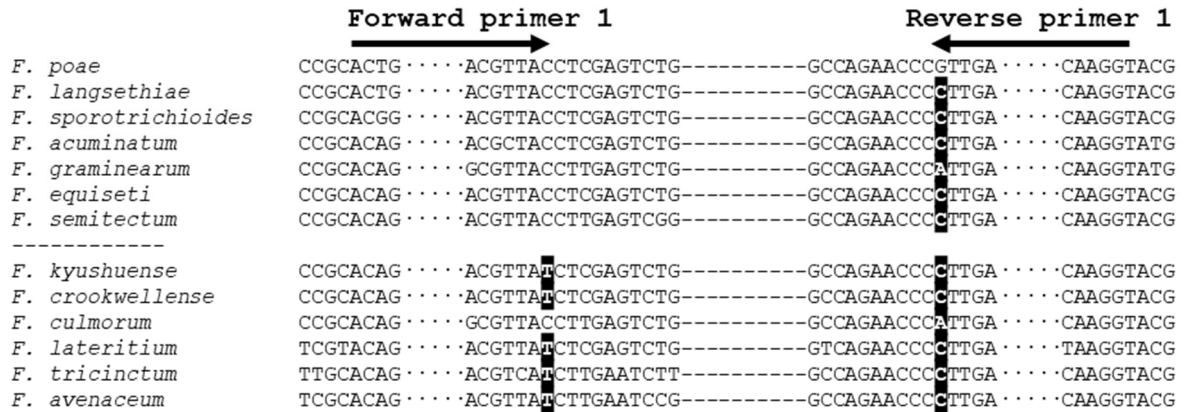


図 7. DAS 産生菌種特異的検出 PCR (β -tubulin)

A : DAS 産生菌種 9 菌種の内、*Fusarium graminearum* を除く 8 菌種特異的な増幅。 B : *Fusarium graminearum* 特異的な増幅。

A.



B.

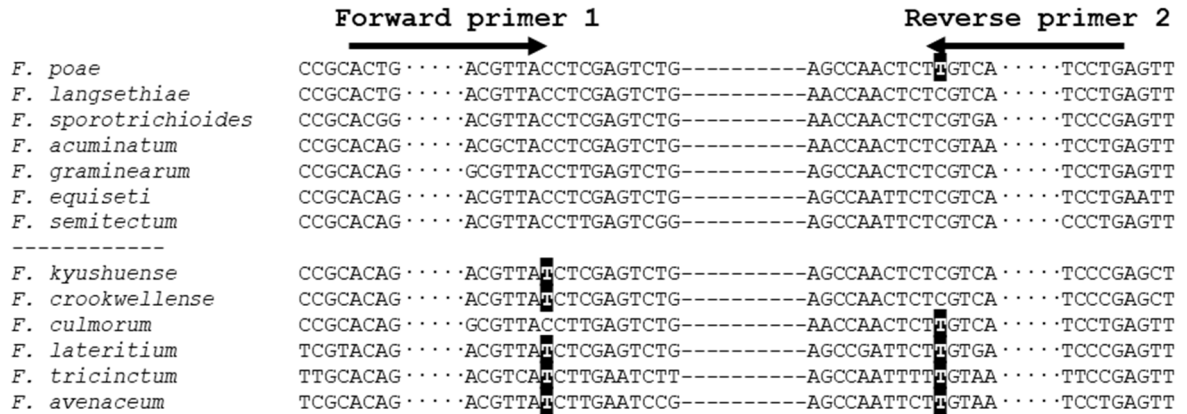


図 8. DAS 産生菌種特異的検出用 Primer の検討 (Lys2)

Lys2 遺伝子塩基配列のアライメントと使用したしたプライマーのアニーリング部位を示す. A: *Fusarium poae* 特異的な領域. B: DAS 産生菌種 7 菌種の内、*Fusarium poae* を除く 6 菌種特異的な領域.

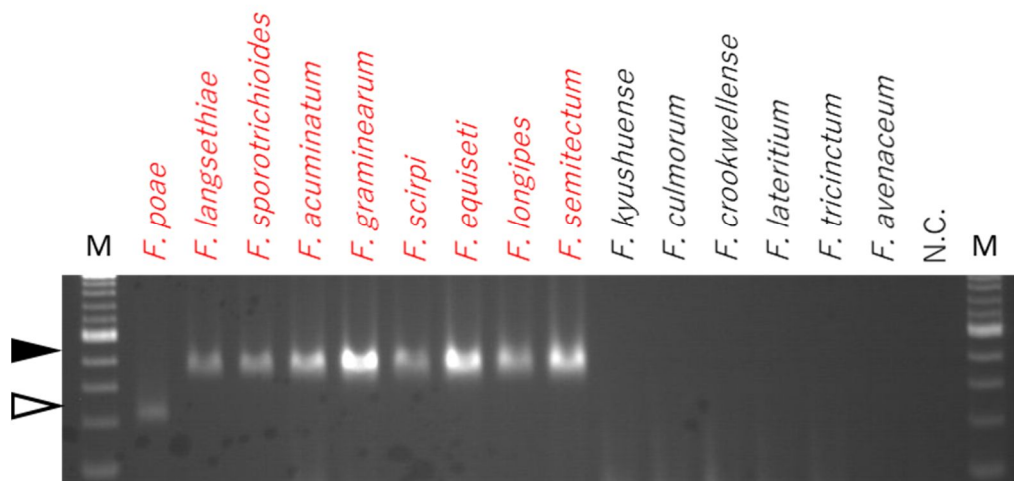


図 9. DAS 産生菌種特異的検出 PCR (lys2)

DAS 産生菌種 9 菌種の内、*Fusarium poae* において約 220 bp の増幅産物 (白矢頭) が検出され、他の 8 種の DAS 産生菌種において約 400 bp の増幅産物 (黒矢頭) が検出された。

。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.	35(3)	668-683	2019
Onami, J†, Watanabe, M†, Yoshinari, T, Hashimoto, R, Kitayama, M, Kobayashi, N, Sugita-Konishi, Y, Kamata, Y, Takahashi, H, Kawakami, H, Terajima, J(†筆頭著者同等貢献者)	Fumonisin-production by <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> isolates from Japanese Foods and Environments.	Food Safety	6	74-82	2018
Kobayashi, N, Kubasaki, A, Takahashi, Y, Yanai, M., Konuma, R, Uehara, S, Chiba, T, Watanabe, M, Terajima, J, Sugita-Konishi, Y	Distribution of sterigmatocystin-producing <i>Aspergilli</i> in Japan.	Food Safety	6	67-73	2018

Shiratori, N†, Kobayashi, N†, Tulayakul, P, S ugiura, Y, Taki no, M, Endo, O and Sugita-Ko nishi Y(†筆頭著 者同等貢獻者)	Occurrence of <i>Penicillium</i> <i>brocae</i> and <i>Penicillium c</i> <i>sitreonigrum</i> , related to m utagenic and toxic metab olites, respectively, in co mmercially available rice grains of Thailand.	Toxins	9	E194	2017
--	---	--------	---	------	------

東京農工大学動物実験計画書

東京農工大学学長 殿

新規 変更・年度更新

提出年月日 2016年 7月 26日 受付年月日 2016年 7月 26日 受付番号

28-65

研究課題	マウスにおける母動物を介したシトレオビリジン曝露による児動物の発達期神経毒性試験
------	--

研究目的	かび毒の発達神経毒性リスク評価の一環として、妊娠マウスにシトレオビリジンを妊娠期・授乳期曝露し、児動物の海馬歯状回におけるニューロン新生及び分化状況と介在ニューロンへの影響を離乳時と成熟後で検討する。
------	--

動物実験責任者名 (選択項目を■)	フリガナ	シブタニ マコト	部局名	職	動物実験の経験等
	氏名	渋谷 淳	獣医病理学研究室	教授	教育訓練受講の■有□無
	e-mail	mshibuta@cc.tuat.ac.jp	連絡先TEL: 042-367-5771		
動物実験実施者名 (括弧内にフリガナ、 選択項目を■)	フリガナ	中島 康太 (ナカジマ コウタ)	獣医病理学研究室	D1	教育訓練受講の■有□無
		knakaji@m2.tuat.ac.jp	連絡先TEL: 042-367-5874		
	フリガナ	渡邊 洋祐 (ワタナベ ヨウスケ)	獣医病理学研究室	D2	教育訓練受講の■有□無
		ywatana@cc.tuat.ac.jp	連絡先TEL: 042-367-5874		
	フリガナ	河嶋 将司 (カワシマ マサシ)	獣医病理学研究室	B6	教育訓練受講の■有□無
		s118126z@st.go.tuat.ac.jp	連絡先TEL: 042-367-5874		

実験実施期間	承認後 ~ 20(16)年 12月	中止・終了等	20()年 月 日
--------	---------------------	--------	------------

飼養保管施設 及び 実験室	飼養保管施設	4号館1階動物室	実験室	獣医病理学研究室(4号館)
---------------	--------	----------	-----	---------------

使用動物	動物種	系統	性別	匹数	微生物学的品質	入手先(導入機関名)	備考
	マウス	ICR	雌	40	SPF	日本SLC株式会社	妊娠1日目で入荷
	マウス	ICR	児動物	400			

研究計画と方法	<p>研究概要 (研究計画と方法について、その概要を記入する。)</p> <p>マウスを用いてかび毒であるシトレオビリジンの経胎盤・経乳的な発達期曝露を行い、児動物の脳海馬歯状回におけるニューロン新生及び分化状況と介在ニューロンへの影響を離乳時と成熟後で解析を行い、リスク評価の一助とする。</p>
	<p>実験方法 (動物に加える処置、使用動物数の根拠を具体的に記入し、「想定される苦痛のカテゴリー」や「動物の苦痛軽減・排除方法」等と整合性をもたせる。)</p> <p>発達神経毒性試験ガイドライン、OECD TG426 に準じ、シトレオビリジン(CIT)を妊娠6日から生後21日目までの約34日間、母マウスに混餌投与し、母動物の一般状態および産児数、児動物の発育を観察する。投与濃度は0、1、3及び10 ppmの4群構成とする。投与濃度の設定根拠として、先行して実施した予備実験(試験番号28-26)において、CITを0及び10 ppmの濃度で母動物に妊娠6日から生後21日目まで混餌投与した結果、10 ppmで母動物の摂餌量低下及び児動物の体重増加抑制が生後21日目まで軽度認められた。よって本実験では、母動物に軽微な影響が出ると予想される投与量として、10 ppmを高用量群とし、公比3で除した3及び1 ppmを低用量群として設定する。</p> <p>各群の母動物と児動物の半数を生後21日目に、残り半数の児動物は生後77日目で解剖し検査に供する。生後21日から77日目まではCITの投与は行わない。解剖時の安楽死は、炭酸ガスによる深麻酔下で腹大動脈からの放血により行う。本実験で評価を予定している解剖部位である海馬歯状回ニューロン新生部位は、エストロジェンの影響を受けるため雌動物が解析に不向きであることから、生後間引きする。</p> <p>使用する母動物は40匹とし、1用量当たりの母動物数は発達毒性で推奨される10匹/群とする。全動物が妊娠し、かつ、各母動物から児動物が10匹産まれると仮定した場合、使用動物数は母動物40匹+児動物400匹で計440匹となる。</p> <p>CITはマウスにおける亜急性毒性は明らかになっていないが、予備試験で重篤な毒性は認められておらず、本実験の用量及び投与期間では、各所臓器での亜急性毒性が発現する可能性は極めて低く、動物に与える苦痛やストレスはごく軽度であると推測される。</p>

特殊実験区分 (該当項目をすべて■)	<input type="checkbox"/> 1. 感染実験 安全度分類: <input type="checkbox"/> BSL1 <input type="checkbox"/> BSL2 <input type="checkbox"/> BSL3 <input type="checkbox"/> 2. 遺伝子組換え動物使用実験 区分: <input type="checkbox"/> P1A <input type="checkbox"/> P2A <input type="checkbox"/> P3A <input type="checkbox"/> 3. 放射性同位元素・放射線使用実験 <input type="checkbox"/> 4. 化学発癌・重金属実験		
動物実験の種類 (選択項目を■)	<input checked="" type="checkbox"/> 1. 試験・研究 <input type="checkbox"/> 2. 教育・訓練 <input type="checkbox"/> 3. その他	動物実験を 必要とする理由 (選択項目を■)	<input checked="" type="checkbox"/> 1. 検討したが、動物実験に替わる手段がなかった。 <input type="checkbox"/> 2. 検討した代替手段の精度が不十分だった。 <input type="checkbox"/> 3. その他(理由:)

想定される 苦痛の категория (選択項目を■)	<input type="checkbox"/> B. 脊椎動物を用い、動物に対してほとんどあるいはまったく不快感を与えないと思われる実験。 <input checked="" type="checkbox"/> C. 脊椎動物を用い、動物に対して軽度のストレスまたは痛み(短時間持続するもの)を伴うと思われる実験。 <input type="checkbox"/> D. 脊椎動物を用い、回避できない重度のストレスまたは痛み(長時間持続するもの)を伴うと思われる実験。 <input type="checkbox"/> E. 無麻酔下の脊椎動物に、耐えうる限界に近い またはそれ以上の痛みを与えらると思われる実験。
動物の苦痛軽減、 排除の方法 (該当項目をすべて■)	<input checked="" type="checkbox"/> 1. 短時間の保定・拘束および注射など、軽微な苦痛の範囲であり、特に処置を講ずる必要はない。 <input type="checkbox"/> 2. 科学上の目的を損なわない苦痛軽減方法は存在せず、処置できない。 <input type="checkbox"/> 3. 麻酔薬・鎮痛薬等を使用する。 (具体的薬剤名及びその投与量・経路を記入) <input checked="" type="checkbox"/> 4. 動物が耐えがたい痛みを伴う場合、適切な時期に安楽死措置をとるなどの人道的エンドポイントを考慮する。 <input type="checkbox"/> 5. その他(具体的に記入:)
安楽死の方法 (該当項目をすべて■)	<input type="checkbox"/> 1. 麻酔薬等の使用(具体的薬剤名及びその投与量・経路を記入: 4%イソフルラン吸入麻酔) <input checked="" type="checkbox"/> 2. 炭酸ガス <input type="checkbox"/> 3. 中枢破壊(具体的に記入:) <input type="checkbox"/> 4. 安楽死させない(その理由を記入:) <input type="checkbox"/> 5. その他(具体的に記入:)
動物死体の処理方法 (選択項目を■)	<input checked="" type="checkbox"/> 1. 外部業者に依託 <input type="checkbox"/> 2. その他(具体的に記入:)
その他必要または 参考事項	(過去の動物実験計画書承認実績、学内の関連委員会への申請状況、飼養保管施設・実験室の承認状況、実験動物の週齢などを記入する。) 過去の動物実験計画書の承認番号 28-26

委員会記入欄	審査終了: 20(16)年 8月 19日
	修正意見等
審査結果 <input checked="" type="checkbox"/> 本実験計画は、東京農工大学における動物実験規程等に適合する。 (条件等 <input type="checkbox"/> 遺伝子組換え実験安全委員会の承認後、実験を開始すること。) <input type="checkbox"/> 本実験計画は、東京農工大学における動物実験規程等に適合しない。	

学長承認欄	承認: 20(16)年 8月 19日
	本実験計画を承認します。 承認番号: 第 28-65 号 東京農工大学長

1711

東京農工大学動物実験計画書

東京農工大学学長 殿

■ 新規 □ 変更・年度更新

提出年月日

2017年 8月 21日

受付年月日

2017年 8月 21日

受付番号

29-55

研究課題	マウスにおける母動物を介したジアセトキシスシルペノール曝露による児動物の発達期神経毒性試験
------	---

研究目的	かび毒の発達神経毒性リスク評価の一環として、妊娠マウスにジアセトキシスシルペノールを妊娠期・授乳期曝露し、児動物の海馬歯状回におけるニューロン新生及び分化状況と介在ニューロンへの影響、メカニズム、無毒性量の決定を目的とし、離乳時と成熟後で検討する。
------	--

動物実験責任者名 (選択項目を■)	フリガナ	シブタニ マコト	部局名	職	動物実験の経験等
	氏名	渋谷 淳	獣医病理学研究室	教授	教育訓練受講の■有□無
	e-mail	mshibuta@cc.tuat.ac.jp	連絡先TEL: 042-367-5771		
動物実験実施者名 (括弧内にフリガナ、 選択項目を■)	中島 康太 (ナカジマ コウタ)	knakaji@m2.tuat.ac.jp	獣医病理学研究室	D2	教育訓練受講の■有□無
	増淵 康哲 (マスブチ ヤスリ)	y-masubuchi@m2.tuat.ac.jp	獣医病理学研究室	D1	教育訓練受講の■有□無
	水上 さやか (ミズカミ サヤカ)	smizuka@cc.tuat.ac.jp	獣医病理学研究室	D4	教育訓練受講の■有□無
	伊藤 優子 (イウ ユウコ)	yitoh@m2.tuat.ac.jp	獣医病理学研究室	D1	教育訓練受講の■有□無
			連絡先TEL: 042-367-5874		

実験実施期間	承認後 ~ 20(17)年 12月			中止・終了等	20()年 月 日		
飼養保管施設 及び 実験室	飼養保管施設	4号館1階動物室		実験室	獣医病理学研究室(4号館)		
使用動物	動物種	系統	性別	匹数	微生物学的品質	入手先(導入機関名)	備考
	マウス	ICR	雌	52	SPF	日本SLC株式会社	妊娠1日目で入荷
	マウス	ICR	児動物	520			

研究計画と方法	<p>研究概要 (研究計画と方法について、その概要を記入する。)</p> <p>マウスを用いてかび毒であるジアセトキシスシルペノールの経胎盤・経乳的な発達期曝露を行い、児動物の脳海馬歯状回におけるニューロン新生及び分化状況と介在ニューロンへの影響を離乳時と成熟後で解析を行い、リスク評価の一助とする。</p>
	<p>実験方法 (動物に加える処置、使用動物数の根拠を具体的に記入し、「想定される苦痛のカテゴリー」や「動物の苦痛軽減・排除方法」等と整合性をもたせる。)</p> <p>発達神経毒性試験ガイドライン(OECD TG426)に準じ、ジアセトキシスシルペノール(DAS)を妊娠6日から生後21日目までの約34日間、母マウスに混餌投与し、母動物の一般状態および産児数、児動物の発育を観察する。投与濃度は0、0.6、2.0 および6.0 ppm の4群構成とする。投与濃度の根拠として、先行して実施した予備試験(試験番号29-40)において、DASを0、8及び16 ppmの濃度で母動物に妊娠6日から生後21日目まで混餌投与した結果、16 ppmでは全例が死産で、産まれてきた児動物の多くに奇形を認めた。一方8 ppmでは、対照群と比較して児動物の体重は減少し、出生後の児動物にも吻端部の矮小化や死亡例が一部で認められた。しかし、多くの個体はおおむね良好に発育した。よって本実験では、母動物に軽微な影響が出ると予想され、出生児に対して神経毒性の適切な評価ができなくなるような過度の毒性(胎児期や新生児期の死亡または奇形)を生じさせない最大量の投与量として、6.0 ppmを高用量群とし、公比3で除した2.0 および0.6 ppmを中用量群及び低用量群として設定する。</p> <p>各群の母動物と、児動物の半数を生後21日目に、残りの半数の児動物は生後77日目で解剖し検査に供する。生後21日から77日まではDASの投与は行わない。解剖時の安楽死は、CO₂/O₂ガスによる深麻酔下で腹大動脈からの放血により行う。本実験で評価を予定している解剖部位である海馬歯状回ニューロン新生部位は、エストロジェンの影響を受けるため雌動物が解析に不向きであることから、生後4日目で間引きする。</p> <p>使用する母動物は52匹とし、1用量当たりの母動物数は発達毒性で推奨される10匹/群に不妊動物の予備を考慮して、13匹/群とする。全動物が妊娠し、かつ、各母動物から児動物が10匹産まると仮定した場合、使用動物数は母動物52匹+児動物520匹で計572匹となる。</p> <p>DASはマウスにおける胎児毒性および催奇形性を示すことが知られており、さらに各種動物において免疫毒性や遺伝毒性が報告されているが、本実験の用量および投与期間では、各諸臓器での急性および亜急性毒性が発現する可能性は低く、動物に与える苦痛やストレスはごく軽度であると推測される。なお、実験期間中に重篤な神経症状が認められた場合、人道的エンドポイント処置として当該動物をCO₂/O₂ガスによる深麻酔下で腹大動脈からの放血により安楽死させる。</p>

特殊実験区分 (該当項目をすべて■)	<input type="checkbox"/> 1. 感染実験 安全度分類: <input type="checkbox"/> BSL1 <input type="checkbox"/> BSL2 <input type="checkbox"/> BSL3 <input type="checkbox"/> 2. 遺伝子組換え動物使用実験 区分: <input type="checkbox"/> P1A <input type="checkbox"/> P2A <input type="checkbox"/> P3A <input type="checkbox"/> 3. 放射性同位元素・放射線使用実験 <input type="checkbox"/> 4. 化学発癌・重金属実験		
動物実験の種類 (選択項目を■)	<input checked="" type="checkbox"/> 1. 試験・研究 <input type="checkbox"/> 2. 教育・訓練 <input type="checkbox"/> 3. その他	動物実験を 必要とする理由 (選択項目を■)	<input checked="" type="checkbox"/> 1. 検討したが、動物実験に替わる手段がなかった。 <input type="checkbox"/> 2. 検討した代替手段の精度が不十分だった。 <input type="checkbox"/> 3. その他(理由:)

想定される 苦痛の 카테고리 (選択項目を■)	<input type="checkbox"/> B. 脊椎動物を用い、動物に対してほとんどあるいはまったく不快感を与えないと思われる実験。 <input checked="" type="checkbox"/> C. 脊椎動物を用い、動物に対して軽度のストレスまたは痛み(短時間持続するもの)を伴うと思われる実験。 <input type="checkbox"/> D. 脊椎動物を用い、回避できない重度のストレスまたは痛み(長時間持続するもの)を伴うと思われる実験。 <input type="checkbox"/> E. 無麻酔下の脊椎動物に、耐えうる限界に近い またはそれ以上の痛みを与えると思われる実験。
動物の苦痛軽減、 排除の方法 (該当項目をすべて■)	<input checked="" type="checkbox"/> 1. 短時間の保定・拘束および注射など、軽微な苦痛の範囲であり、特に処置を講ずる必要はない。 <input type="checkbox"/> 2. 科学上の目的を損なわない苦痛軽減方法は存在せず、処置できない。 <input type="checkbox"/> 3. 麻酔薬・鎮痛薬等を使用する。 (具体的薬剤名及びその投与量・経路を記入) <input checked="" type="checkbox"/> 4. 動物が耐えがたい痛みを伴う場合、適切な時期に安楽死措置をとるなどの人道的エンドポイントを考慮する。 <input type="checkbox"/> 5. その他 (具体的に記入:)
安楽死の方法 (該当項目をすべて■)	<input type="checkbox"/> 1. 麻酔薬等の使用 (具体的薬剤名及びその投与量・経路を記入:) <input type="checkbox"/> 2. 炭酸ガス <input type="checkbox"/> 3. 中枢破壊 (具体的に記入:) 法) <input type="checkbox"/> 4. 安楽死させない (その理由を記入:) <input checked="" type="checkbox"/> 5. その他(具体的に記入: CO ₂ /O ₂ ガスによる深麻酔下での放血致死)
動物死体の処理方法 (選択項目を■)	<input checked="" type="checkbox"/> 1. 外部業者に依託 <input type="checkbox"/> 2. その他 (具体的に記入:)
その他必要または 参考事項	(過去の動物実験計画書承認実績、学内の関連委員会への申請状況、飼養保管施設・実験室の承認状況、実験動物の週齢などを記入する。) 過去の動物実験計画書の承認番号

委員会記入欄	審査終了: 20(17)年 8月 24日
	修正意見等
	審査結果 <input checked="" type="checkbox"/> 本実験計画は、東京農工大学における動物実験規程等に適合する。 (条件等 <input type="checkbox"/> 遺伝子組換え実験安全委員会の承認後、実験を開始すること。) <input type="checkbox"/> 本実験計画は、東京農工大学における動物実験規程等に適合しない。

学長承認欄	承認: 20(17)年 8月 24日
	本実験計画を承認します。 承認番号: 第 29-55 号 <div style="text-align: right;">東京農工大学長</div>

東京農工大学動物実験計画書

東京農工大学学長 殿

■ 新規 □ 変更・年度更新

提出年月日 2018年 5月 17日 受付年月日 2018年 5月 18日 受付番号 30-71

研究課題	ラットにおける母動物を介したステリグマトシスチン曝露による児動物の発達期神経毒性試験
------	--

研究目的	かび毒の発達神経毒性リスク評価の一環として、妊娠ラットにステリグマトシスチンを妊娠期・授乳期曝露し、児動物の海馬歯状回におけるニューロン新生及び分化状況と介在ニューロンへの影響、メカニズム、無毒性量の決定を目的とし、離乳時と成熟後で検討する。
------	---

動物実験責任者名 (選択項目を■)	フリガナ	シブタニ マコト	部局名	職	動物実験の経験等
	氏名	渋谷 淳	獣医学部生理学研究室	教授	教育訓練受講の■有□無
	e-mail	mshibuta@cc.tuat.ac.jp	連絡先TEL: 042-367-5771		
動物実験実施者名 (括弧内にフリガナ、 選択項目を■)	フリガナ	中島 康太 (ナカジマ コウタ)	獣医学部生理学研究室	D3	教育訓練受講の■有□無
		knakaji@m2.tuat.ac.jp	連絡先TEL: 042-367-5874		
	フリガナ	増淵 康哲 (マズブチ ヤスリ)	獣医学部生理学研究室	D2	教育訓練受講の■有□無
		y-masubuchi@m2.tuat.ac.jp	連絡先TEL: 042-367-5874		
	フリガナ	伊藤 優子 (イトウ ヨウコ)	獣医学部生理学研究室	D2	教育訓練受講の■有□無
	yitoh@m2.tuat.ac.jp	連絡先TEL: 042-367-5874			
フリガナ	菊地 聡美 (キクチ サトミ)	獣医学部生理学研究室	D1	教育訓練受講の□有■無	
	satomi-kikuchi@m2.tuat.ac.jp	連絡先TEL: 042-367-5874			

実験実施期間	承認後 ~ 20(18)年 9月	中止・終了等	20()年 月 日				
飼養保管施設 及び 実験室	飼養保管施設	4号館1階動物室	実験室				
			獣医学部生理学研究室(4号館)				
使用動物	動物種	系統	性別	匹数	微生物学的品質	入手先(導入機関名)	備考
	ラット	SD	雌	49	SPF	日本SLC株式会社	妊娠1日目で入荷
	ラット	SD	児動物	392			

研究計画と方法	<p>研究概要 (研究計画と方法について、その概要を記入する。)</p> <p>ラットを用いてかび毒であるステリグマトシスチンの経胎盤・経乳的な発達期曝露を行い、児動物の脳海馬歯状回におけるニューロン新生及び分化状況と介在ニューロンへの影響を離乳時と成熟後で解析を行い、リスク評価の一助とする。</p>
	<p>実験方法 (動物に加える処置、使用動物数の根拠を具体的に記入し、「想定される苦痛のカテゴリー」や「動物の苦痛軽減・排除方法」等と整合性をもたせる。)</p> <p>発達神経毒性試験ガイドライン(OECD TG426)に準じ、ステリグマトシスチン(STC)を妊娠6日から生後21日目までの約38日間、母ラットに混餌投与し、母動物の一般状態および産児数、児動物の発育を観察する。投与濃度は0、1.7、5.0および15.0 ppmの4群構成とする。投与濃度の根拠として、先行して実施した予備試験(試験番号30-22)において、STCを0、6及び12 ppmの濃度で母動物に妊娠6日から生後21日目まで混餌投与した結果、母動物では明らかな毒性影響は認められなかった。児動物では、12 ppmで対照群と比較して体重が生後12日目まで一時的に減少したが、その後対照群と同等まで回復して良好に発育した。よって本実験では、母動物に軽微な影響が出ると予想され、出生児に対して神経毒性の適切な評価ができなくなるような過度の毒性(胎児期や新生児期の死亡または奇形)を生じさせない最大量の投与量として、15.0 ppmを高用量群とし、公比3で除した5.0および1.7 ppmを中用量群及び低用量群として設定する。</p> <p>各群の母動物と、児動物の半数を生後21日目に、残りの半数の児動物は生後77日目まで解剖し検査に供する。生後21日目から77日目まではSTCの投与は行わない。解剖時の安楽死は、CO₂/O₂ガスによる深麻酔下で腹大動脈からの放血により行う。本実験で評価を予定している解剖部位である海馬歯状回ニューロン新生部位は、エストロジェンの影響を受けるため雌動物が解析に不向きであることから、生後4日目で間引きする。</p> <p>使用する母動物は49匹とし、1用量当たりの母動物数は発達毒性で推奨される10匹/群を確実に確保するために、不妊動物の予備を考慮して、対照群を13匹、投与群を12匹/群とする。全動物が妊娠し、かつ各母動物から児動物が8匹産まれると仮定した場合、使用動物数は母動物49匹+児動物392匹で計441匹となる。</p> <p>STCはラットおよび各種動物において発がん性や遺伝毒性が報告されているが、本実験の用量および投与期間では、各諸臓器での急性および亜急性毒性、あるいは発がん性を発現する可能性は低く、動物に与える苦痛やストレスはごく軽度であると推測される。なお、実験期間中に重篤な神経症状が認められた場合、人道的エンドポイント処置として当該動物をCO₂/O₂ガスによる深麻酔下で腹大動脈からの放血により安楽死させる。</p>

