

ニューロン新生に着目した化学物質の発達期神
経毒性評価法の確立に関する研究

2013 年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科

大石 巧

【目次】

序論	-----	4
第1章 低栄養性脳発達遅延のラット海馬歯状回ニューロン新生に対する影 響評価	-----	7
諸言	-----	8
材料および方法	-----	9
結果	-----	13
考察	-----	16
小括	-----	19
第2章 ニューロン傷害性金属であるマンガンの発達期暴露によるラット 海馬歯状回ニューロン新生に対する影響	-----	20
諸言	-----	21
材料および方法	-----	23
結果	-----	30
考察	-----	33
小括	-----	37
第3章 コリンエステラーゼ阻害剤であるクロルピリフォスの発達期暴露によ るラット海馬歯状回ニューロン新生に対する影響	-----	38
諸言	-----	39
材料および方法	-----	41
結果	-----	48
考察	-----	51
小括	-----	54

第4章 コリン作動性物質であるニコチンの発達期暴露による発達期暴露によ	
るラット海馬歯状回ニューロン新生に対する影響	-----55
諸言	-----56
材料および方法	-----57
結果	-----63
考察	-----66
小括	-----69
総合考察	-----70
結論	-----74
謝辞	-----75
参考文献	-----76
要旨	-----86
Abstract	-----89
図表	-----93

序 論

発達神経毒性（Developmental Neurotoxicity: DNT）は、胎児期から生後発達期における化学物質曝露に起因する神経系の構造および機能に対する有害作用である。妊娠・授乳期の母体が化学物質に曝露されたときに胎盤や母乳を介して胎児や乳児の神経発達が影響を受け、学習・記憶や感覚・運動機能などに不可逆的な障害の生じることが懸念される。わが国では、有機水銀による胎児性水俣病やヒ素混入によるヒ素ミルク中毒事件といった、母体を介した曝露や乳児期の曝露により重篤な神経機能障害を有する子供が生ずる不幸な事例を経験しており、発達神経毒性の重大性が広く認められている（34）。また、近年では注意欠陥/多動性障害（Attention Deficit Hyperactivity Disorder: ADHD）や反社会性人格障害

（Anti-Social Personality Disorder: ASPD）など成長後の思春期の心の発達障害も胎児期の影響である可能性を示唆する報告がなされている（7）。したがって、我々が日常曝露されている化学物質の発達神経毒性の評価は、特に次世代のヒトの健康を守るために非常に重要であると考えられている。

現在、発達神経毒性を評価するためのガイドラインとして経済協力開発機構（OECD）のTG426 および米国環境保護局（EPA）のOPPTS 870.6300 が発効され、評価に用いられている（54, 80）。しかし、いずれも母動物および子動物を合わせると 700 匹以上のラットを使用し、評価に約 1 年を要する大規模な試験であり、発達神経毒性の評価は遅々として進んでいない。したがって、多数の新しい化学物質をスクリーニングするためには、使用動物数を減らし、効率的に発達神経毒性を評価することのできる小規模の短期実験系を確立する必要があると考えられている（17）。

海馬歯状回は学習や記憶などの高次脳機能において重要な役割を担い、同部位の形成不全や機能不全は神経・精神障害と関連があることが報告されている（27, 66）。また、海馬歯状回は顆粒細胞層下帯（subgranular zone : SGZ）において生涯にわたってニューロン新生が

行われるユニークな部位として知られている (6, 26, 44, 69) が、抗甲状腺剤などの各種の化学物質の標的となりやすい (88)。歯状回の SGZ は、神経幹細胞を含む増殖の場であり、神経幹細胞から type-1 神経前駆細胞を生じ、type-2a, type-2b, type-3 の順で中期神経前駆細胞を生成していく。type-3 細胞は最終の有糸分裂を経て、未熟顆粒細胞に分化し、最終的に成熟した顆粒細胞となる (39, 44)。SGZ におけるニューロン新生は、うつ病、心的外傷後ストレス障害 (PTSD) およびパーキンソン病では減少し、てんかん発作、脳虚血、アルツハイマー病およびハンテントン病では増加するなど、様々な神経疾患で変動することが知られている (2, 89)。したがって、同部位におけるニューロン新生の検索は、神経障害を検出するための有用なエンドポイントとして期待される。また、海馬歯状回門に存在する介在ニューロンは SGZ のニューロン新生を調節する機能を有することが報告されている (49, 65, 78)。Reelin は海馬歯状回門の γ -aminobutyric acid (GABA) 性介在ニューロンが分泌する細胞外基質糖タンパクであるが、脳発達期のニューロンの移動と位置決定に決定的な役割を担う (18)。生後間もない時期では、Reelin の合成・分泌は歯状回の GABA 性介在ニューロンで行われ、その細胞集団は歯状回で顆粒細胞層内側にある SGZ に沿って高い密度で分布し (40)、成長後も維持されていく (60, 68)。分泌された Reelin は生後も引き続き正常な海馬顆粒細胞層を維持するために顆粒細胞の前駆細胞の移動と正しい位置決め機能している (32)。したがって、海馬歯状回門における介在ニューロンとその関連分子の挙動の検索は、SGZ のニューロン新生の検索の機序解明に重要な情報を与えるものと期待される。

本研究は、短期スクリーニングに適う新たな発達神経毒性評価法を確立することを目的とする。そのため、ニューロンの自己複製とそれによって出来た前駆細胞の増殖、分化、成熟の過程が全て含まれ、生後も持続する海馬のニューロン新生と新生ニューロンの分化発達にターゲットを当てて、それに関わる細胞の変動の神経病理学的解析に特化して研究を実施した。具体的には、母動物の全身毒性に起因する子動物の脳発達遅延と、発達神経毒性が懸念される代表的な物質の発達期曝露による、ニューロン新生に与える影響と介在ニューロンの反応性を検討し、ニューロン新生影響評価系の確立を図った。すなわち、第 1 章で

は、ラットの子宮内成長遅延 (intrauterine growth restriction : IUGR) モデル (36, 86) を利用して、発達期に低たん白食を与えることにより低栄養による脳発達遅延を作出し、海馬歯状回でのニューロン新生と介在ニューロンの挙動に対する非特異的な脳発達遅延の影響の解明を目的とした検討を行った。すなわち、本研究が提案する評価系において、化学物質曝露によってしばしばみられる母体毒性に伴う子動物の低栄養性の非特異的脳発達遅延の影響と化学物質特異的な発達神経毒性の影響を弁別することが可能か否かを検討した。第2章では、ドーパミン作動性ニューロン傷害性のパーキンソニズム様の症状を引き起こすことで知られる神経毒マンガン、第3章では、アセチルコリンエステラーゼ阻害作用を有する有機リン系殺虫剤であるクロルピリフォス、第4章では、妊娠期喫煙影響のリスク要因であるコリン作動性神経毒ニコチンを用いて、それぞれラットに発達期曝露を行い、海馬歯状回におけるニューロン新生と介在ニューロンへの影響を検討した。

OECD の TG426 では、各群 20 匹の妊娠母動物を用いてその子動物について解析を実施するが、神経病理学的解析については各群 10 匹/性の子動物を解析するよう規定されている。そこで、本研究では各群 10 匹の子動物の神経病理学的解析を実施するために必要な最低数の母動物（各群 8～12 匹）を使用した群設定を行った。さらに、性周期中のステロイドホルモンの変動によりニューロン新生が影響を受けることが報告されている雌を神経病理学的解析から除外した (58)。これにより、使用動物数の削減と解析の効率性の向上を実現可能とした。また、神経病理学的解析に分化指標分子を導入して免疫組織学的な検討を行うことにより、鋭敏な検出性を有する定量評価系の構築を目指した。

第 1 章

低栄養性脳発達遅延のラット海馬歯状回ニューロン新生 に対する影響評価

緒 言

海馬歯状回は SGZ において生涯にわたってニューロン新生が行われるユニークな部位として知られ (26, 44) , 歯状回門の GABA 性介在ニューロンが Reelin などを分泌してニューロン新生の制御に関わっている (49)。Reelin はニューロンの移動と位置制御に重要な役割を果たす糖タンパクとして知られており (18) , うつ病やてんかんなどのいくつかの神経疾患において、歯状回の Reelin 伝達の変動することが報告されている。一方、歯状回は発達期の甲状腺機能低下の標的となることが知られている (88)。三枝らは妊娠・授乳期に抗甲状腺剤を曝露させた発達期甲状腺機能低下モデルにおいて、歯状回 SGZ でのニューロン新生の低下とアポトーシスの増加、歯状回門での Reelin を分泌する GABA 性介在ニューロン増加を見出しており、これらの変化の一部は成長後まで持続することが確認されている (65)。しかしながら、発達期甲状腺機能低下は同時に発達遅延・成長抑制を誘発することから (65, 72) , 非特異的な毒性影響である全身性の低栄養性発達遅延に起因する脳発達遅延が海馬歯状回のニューロン発達に影響を及ぼす可能性が考えられる。同様の非特異的な低栄養性発達遅延は種々の化学物質を発達期曝露したとき母体毒性に伴ってしばしば認められることから、海馬歯状回のニューロン発達障害性に着目した発達期神経影響評価の検出系を確立するためには、化学物質による脳への作用と母体毒性を介した非特異的な低栄養性脳発達遅延の影響を弁別しなくてはならない。

本章では、化学物質による母体毒性を介した非特異的な低栄養性脳発達遅延がニューロン新生に影響を与えるかどうかを検証する目的で、IUGR モデルを利用して発達期に低たん白食を母動物に与えることにより低栄養性の脳発達遅延の子動物を作出し、海馬歯状回でのニューロン新生への影響を検討した。

材料および方法

供試動物、飼料および実験デザイン

20 匹の妊娠 1 日齢（プラグ確認日を妊娠 0 日として起算）の Sprague-Dawley 系 SPF ラット [CrI:CD(SD)] を日本チャールス・リバー株式会社から購入し、9 日間の検疫・馴化飼育の後、一般状態に異常のない動物を妊娠 10 日齢で実験に供した。動物は温度 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $45\pm 10\%$ 、照明サイクル 12 時間明/12 時間暗条件の飼育室で、ブラケット式ステンレス製網ケージに 1 匹ずつ収容し、飼料および飲料水（水道水）を自由に摂取させた。ただし、妊娠 17 日から分娩後 21 日までは床敷を入れたプラスチック製ケージに母子ともに収容した。

妊娠ラットは、妊娠 1 から 10 日までの検疫馴化期間中は固形飼料 CRF-1（オリエンタル酵母工業株式会社、東京）を自由に摂取し、妊娠 10 日に 1 群当たり 8 匹の通常たん白食群と低たん白食群の 2 群に分け、妊娠 10 日から分娩後 21 日まで正常たん白食群は 20% カゼイン含有飼料を、低たん白食群は 10% カゼイン含有飼料を自由に摂取させた（Table 1-1）。

出生子は生後 4 日（出生日を生後 0 日として起算）に 1 腹 8 匹（雌雄各 4 匹）になるよう無作為に選抜し子数の調整を行った。生後 21 日に各腹雌雄各 1～2 匹を選抜し、各群雌雄各 10 匹を剖検に供した。残りの各腹雌雄各 2 匹は生後 77 日まで継続飼育した。子動物は生後 21 から 77 日まで固形飼料 CRF-1 および飲料水（水道水）を自由に摂取させた。生後 77 日に各群雌雄各 10 匹について剖検を行った。

母動物・子動物ともに定期的に体重および摂餌量の測定を行った。子動物は生後 21 日の剖検時に脳および肝臓、生後 77 日に脳、肝臓、腎臓、精巣および卵巣の重量を測定した。全ての動物はエーテル麻酔下で腹大動脈切断による放血致死により安楽死させ、剖検に供した。性周期におけるステロイドホルモンの周期的変動によりニューロン新生が影響を受けることが報告されていることから (58)、雌の生後 21 および 77 日の試料は保存のみとし、以降の解析は実施しなかった。

動物実験計画は実験施設（株式会社ボゾリサーチセンター）の動物実験委員会の承認を

受け、全ての動物実験操作は「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」（日本学術会議，平成 18 年 6 月 1 日）を遵守し，実験施設の標準操作手順書に準拠して実施した。

行動学的解析

各腹雌雄各 2 匹の子動物について，初期行動発達検査，詳細な一般状態観察，機能検査，握力測定，自発運動量測定および複式水 T 迷路検査を実施した。

初期行動発達検査は，平面正向反射を生後 10 日，空中正向反射を生後 15 日，瞳孔反射，Preyer 反射および疼痛反射を生後 21 日に実施した。平面正向反射は仰臥位から正常な姿勢に戻るまでの時間を測定した。空中正向反射は約 300 mm の高さから仰臥位でクッションの上に落下させ，正常な腹臥位で着地するか否かを確認した。瞳孔反射は光を眼に近づけ正常な縮瞳の有無を確認した。Preyer 反射はガルトン笛の音に対する正常な耳介の運動あるいは全身性の驚愕反応の有無を確認した。疼痛反射は尾をピンセットで挟まれた時に逃げたり鳴いたりする正常な反応の有無を確認した。

詳細な一般状態観察は生後 30, 44 および 72 日に実施した。ケージ内観察では，姿勢，痙攣および異常行動について観察した。ハンドリングの観察では，ケージからの取り出しやすさ，被毛および皮膚の状態，眼および鼻の分泌物，眼球突出，眼瞼閉鎖状態，可視粘膜，流涙，立毛，瞳孔径，流涎，異常呼吸およびハンドリングに対する発声と反応について観察した。

機能検査は生後 72 日に実施した。聴覚反応はクラックに対する正常な驚愕性反応を確認した。接近反応は鼻先に近づけたペンに対する匂いを嗅いだり逃げたりする正常な反応の有無を確認した。接触反応は腹部にペンで触れた時に逃げたり小さく発声したりする正常な反応の有無を確認した。痛覚反応は尾をピンセットで掴んだ時の素早く逃げたり鳴いたりする正常な反応の有無を確認した。着地開脚幅は約 300 mm の高さから正常な腹臥位で落下させたときの両後肢の幅を測定した。瞳孔反射および空中正向反射については前述の初期行動発達検査と同様に実施した。

握力測定は生後 72 日に実施した。CPU ゲージ MODEL-RX-5（アイコーエンジニアリング株式会社, 大阪）を用いて前肢および後肢の握力を測定した。

自発運動量測定は生後 72 日に実施した。実験動物用自発運動センサー NS-AS01（株式会社ニューロサイエンス, 東京）を用いて自発運動量を測定した。測定時間は 1 時間とし, 10 分間隔および 0~60 分の測定値を集計した。

複式水 T 迷路検査は生後 55 から 58 日に実施した。検査は Biel の装置 (Fig. 1-1) を用いて実施した (11, 37)。すなわち, 1 日目に直線水路を 3 試行行って水泳能力の確認を行い, 2, 3 および 4 日目に水 T 迷路を 1 日 3 試行行ってゴールまでの所要時間およびエラー回数（エラー域に全身が入った回数）を調べることで学習能力の評価を実施した。なお, 1 試行 3 分を限度とし, 3 分でゴールに到達しなかった試行に関しては統計解析から除外した。

病理組織学的解析, 免疫組織化学的解析およびアポトーシスの検索

生後 21 日および 77 日の子動物の脳をブアン液に固定した。大脳は Bregma の後方約-3.0 mm および 3.5 mm の 1 カ所で冠状断面を, 小脳は正中の 1 カ所で矢状断面を作製して, パラフィン包埋し, 3 μ m 厚の連続切片を作製した。1 切片についてはヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施して組織学的検索を行った。残りの切片については免疫組織化学的解析に供した。抗マウス Reelin 抗体 (clone G10, mouse IgG1, 1:1,000; Novus Biologicals, Inc., Littleton, CO, U.S.A.), 抗マウス NeuN 抗体 (neuron-specific nuclear protein, clone A60, mouse IgG1, 1:100, Millipore Corporation, Temecula, CA, U.S.A.), 抗マウス Calbindin-D-28K 抗体 (Calb-D-28K, clone CB-955, mouse IgG1, 1:500; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.), 抗マウス GAD67 抗体 (glutamic acid decarboxylase 67, clone 1G10.2, mouse IgG2a, 1:50, Millipore Corporation), 抗ウサギ Forkhead Box G1 抗体 (Foxg1, rabbit IgG, 1:800; LifeSpan Bioscience, Inc., Seattle, WA, U.S.A.), 抗マウス proliferating cell nuclear antigen 抗体 (PCNA, clone PC10, mouse IgG2a, 1:200, Dako, Glostrup, Denmark) と一晩 (4°C) 反応させ, 3,3'-diaminobenzidine/H₂O₂ 発色を用いて ABC 法 (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA,

U.S.A.) による免疫染色を行った。また、アポトーシスの評価のために TUNEL 法 (Apop Tag[®] *in situ* apoptosis detection kit, Millipore Corporation) による検出を行った。GABA 性介在ニューロンに発現する分子の Reelin, Calb-D-28K, GAD67 および Foxg1 ならびに成熟ニューロンの指標である NeuN については、海馬歯状回門における陽性細胞数の検索を行った (Fig. 1-2)。一方、増殖細胞の指標である PCNA 陽性細胞数と TUNEL 陽性アポトーシス細胞数については、海馬歯状回の SGZ における陽性細胞数の検索を行った。細胞数の計測は両側の海馬について 100 倍の倍率で行った。

これらの解析は、同じ個体 (各ステージ各群 10 匹の雄子動物, 各腹 1 または 2 匹の雄) の標本を用いて実施した。

統計解析

母動物のデータは各個体の数値を、子動物のデータは各腹 (母動物) の平均値を統計解析に用いた。

定量データは、F 検定により各群の分散の均一性の検定を行い、分散が均一な場合は Student の *t*-検定、分散が均一でない場合は Aspin-Welch の *t*-検定を用いて正常たん白食群と低たん白食群の差の検定を実施した。

頻度データは、Fisher の直接確率法を用いて検定を実施した。

グレードのある頻度データについては、Mann-Whitney の *U*-test を用いて検定を実施した。

結 果

母動物への影響

妊娠期間中は体重および摂餌量ともに低たん白食群と正常たん白食群の間に差はみられなかった。授乳期間中では体重が分娩後 11 から 21 日、摂餌量が分娩後 4 から 21 日に低たん白食群が正常たん白食群を有意に下回って推移した (Fig. 1-3)。

子動物の体重および摂餌量への影響

授乳期間および離乳後の期間を通じて、雌雄ともに低たん白食群の体重は正常たん白食群を有意に下回って推移した (Table 1-2)。

摂餌量については、1 匹当たり摂餌量が雄で生後 35 から 77 日、雌で生後 56 から 77 日に低たん白食群が正常たん白食群を有意に下回ったのに対し、体重当たり摂餌量では雄で生後 35 から 63 日および 77 日、雌で生後 35 から 49 日に低たん白食群が正常たん白食群を有意に上回った (Table 1-3)。

子動物の器官重量への影響

生後 21 日では、低たん白食群の雌雄の脳および肝臓の絶対重量が正常たん白食群のそれを有意に下回った。しかし、低たん白食群の雌雄の脳および肝臓の相対重量は正常たん白食群のそれを有意に上回った。生後 77 日では、低たん白食群の雌雄の腎臓、雄の肝臓および精巣の絶対重量が正常たん白食群のそれを有意に下回った。しかし、低たん白食群の雌雄の脳の相対重量は正常たん白食群のそれを有意に上回った (Table 1-4)。

病理組織学的変化

生後 21 日では、低たん白食群の小脳外顆粒細胞層の残存の程度が、正常たん白食群に比べ有意な高値を示した (Table 1-5)。

生後 77 日では、低たん白食群と正常たん白食群の間に差はみられなかった。

免疫組織化学的解析

生後 21 日では、Reelin は歯状回門のニューロン細胞質内に発現していた。NeuN は SGZ を除く顆粒細胞の核内にのみ発現し、さらに歯状回門内にも陽性細胞がみられ、これらは核に加え細胞質にも発現していた (81)。Calb-D-28K は顆粒細胞および歯状回門のニューロンの核と細胞質内に発現していた。GAD67 は歯状回門のニューロンと顆粒細胞層にまばらに存在するニューロンの細胞質内に発現していた。FoxG1 は歯状回門のニューロンと SGZ を除く顆粒細胞の細胞質内に発現していた。海馬歯状回門に分布する Reelin, NeuN, Calb-D-28K, GAD67 および FoxG1 陽性細胞数は、低たん白食群と正常たん白食群の間で差はみられなかった (Fig. 1-4)。

生後 77 日では、各分子の細胞分布は生後 21 日とほぼ同様であったが、SGZ が減少していることが、同部位の NeuN および FoxG1 陰性細胞が減少していることから確認された。各分子の歯状回門における陽性細胞数はいずれも生後 21 日に比べ減少していた。生後 21 日と同様に、海馬歯状回門に分布する Reelin, NeuN, Calb-D-28K, GAD67 および FoxG1 陽性細胞数は、低たん白食群と正常たん白食群の間で差はみられなかった (Fig. 1-5)。

SGZ におけるアポトーシスと細胞増殖の検索

生後 21 日では、TUNEL 陽性アポトーシス細胞は SGZ にごく少数認められたが、低たん白食群と正常たん白食群の間で差はみられなかった。また、PCNA 陽性細胞数にも低たん白食群と正常たん白食群の間で差はみられなかった (Fig. 1-6)。

生後 77 日では、TUNEL 陽性アポトーシス細胞は、正常たん白食群の 1 例で 1 個みられたのみで、低たん白食群ではみられなかった。また、PCNA 陽性細胞数は、生後 21 日と同様に低たん白食群と正常たん白食群の間で差はみられなかった (Fig. 1-6)。

行動学的解析

初期行動発達検査では、低たん白食群と正常たん白食群の間で雌雄ともに統計学的有意差はみられなかったが、雄の低たん白食群の空中正向反射指数は、正常たん白食群のそれに比べ低値を示した (Table 1-6)。

詳細な一般状態観察では、低たん白食群と正常たん白食群の間に差はみられなかった (Table 1-7)。

機能検査でも低たん白食群と正常たん白食群の間に差はみられなかった (Table 1-8)。

握力測定では、雄の低たん白食群の前肢および後肢の握力が正常たん白食群のそれに比べ、有意な低値を示した。雌では低たん白食群と正常たん白食群の間に差はみられなかった (Table 1-9)。

自発運動量測定では、雌の低たん白食群の 0-10 分および 30-40 分の自発運動量ならびに 0-60 分の総自発運動量が正常たん白食群を有意に上回った。雄では低たん白食群と正常たん白食群の間に差はみられなかった (Table 1-10)。

複式水 T 迷路検査では低たん白食群と正常たん白食群の間に差はみられなかった (Table 1-11)。

考 察

本章では、母動物を介した発達期低栄養では生後 21 および 77 日のいずれにおいても海馬歯状回門における Reelin, Calb-D-28K および GAD67 陽性細胞の分布に影響を与えないことが明らかとなった。これは発達期低栄養が生後 77 日まで海馬歯状回門における Reelin を産生する GABA 性介在ニューロンの挙動に影響を与えないことを示している。この結果は発達期甲状腺機能低下における結果と異なっている。すなわち、発達期甲状腺機能低下では、海馬歯状回門において Reelin を産生する未熟な GABA 性介在ニューロンの増加と NeuN 陽性の成熟した GABA 性介在ニューロンの増加が生後 77 日まで継続してみられることが確認されている (65)。さらに、発達期低栄養では海馬歯状回門における NeuN 陽性ニューロンおよび SGZ における細胞増殖やアポトーシスの変動は生後 21 および 77 日のいずれにおいてもみられていないが、発達期甲状腺機能低下では離乳時にニューロン新生障害を示す細胞増殖の減少とアポトーシスの増加がみられており、この点でも発達期低栄養と発達期甲状腺機能低下の結果は異なっている (65)。また、発達期低栄養では FoxG1 陽性細胞にも変動はみられなかった。FoxG1 は生後の海馬のニューロン新生を調節していること (70) および SGZ における細胞増殖およびアポトーシスに変動がみられなかったことを考慮すると発達期低栄養は GABA 性介在ニューロンに変動がないことを反映し、海馬歯状回の生後のニューロン新生に影響を与えないと考えられた。

発達期甲状腺機能低下では子ラットに全身性の成長抑制が引き起こされる (15)。我々も抗甲状腺剤のプロピオチオウラシルの 12 ppm またはメチマゾールの 200 ppm を妊娠 10 日から離乳時まで母ラットに飲水投与することにより離乳時の子ラットで甲状腺関連ホルモンの変動を引き起こし、同様の発達期甲状腺機能低下がもたらされることを確認している (72)。甲状腺機能低下の場合では、離乳時の子動物の体重は無処置動物のその 64.2–68.8%であったが、本実験の発達期低栄養でも同程度の体重抑制がみられ、正常たん白食群の 65.5–65.8%の体重であった。一方、離乳時の脳重量では発達期甲状腺機能低下の場合、弱

い抑制がみられる程度でプロピオチオウラシルの 12 ppm またはメチマゾールの 200 ppm の発達期曝露で無処置群の 94.5–97.9%であったが、発達期低栄養ではより大きな減少がみられ、それは正常たん白食群の 91.7–92.9%であった。同様の発達期低栄養による脳重量の減少は他にも報告されている (51, 83)。発達期低栄養ではさらに離乳時に小脳外顆粒層の残存の増大がみられ、全身性の成長抑制による脳発達の遅延を示す結果がみられた。しかしながら、全身性の成長抑制による脳発達の遅延は離乳時の Reelin を産生する GABA 性介在ニューロンの分布とニューロン新生に影響を与えるものではなかった。この結果は、我々のこれまでの実験で確認された発達期甲状腺機能低下による離乳時の脳の変化はもっぱら発達期の脳における不適切な甲状腺ホルモン伝達によるものであり、甲状腺機能低下によって生じた全身性の成長抑制による二次的な脳発達遅延は小さく、脳の変化に関係していないと考えられた。以前著者らが実施した発達期抗甲状腺剤曝露の実験 (72) では、生後 77 日まで継続して体重の低値がみられ、生後 77 日におけるプロピオチオウラシルの 12 ppm またはメチマゾールの 200 ppm 処理群の体重は無処置群の 73.5–87.9%であった。妊娠および授乳期の母動物へのたん白質抑制は同様の成長後まで継続する体重増加抑制を引き起こすことが知られている (20, 57, 87)。本実験でも同様の体重抑制が雌雄にみられ、生後 77 日における低たん白食群の体重は正常たん白食群の 84.0–89.3%であった。興味深いことに、授乳期エネルギー抑制の母動物から生まれる子ラットでは、離乳時では成長抑制を示すものの、成長すると対照群に比べ高体重を示すことが報告されている (20)。メカニズムは不明であるが、発達期低栄養と発達期甲状腺機能低下は同様の機序で成長後までみられる子動物の体重増加抑制を引き起こしているかもしれない。発達期甲状腺機能低下実験の雄の子動物では、生後 77 日においてプロピオチオウラシルの 12 ppm またはメチマゾールの 200 ppm 処理群で脳絶対重量の明らかな低値を示したが、これとは対照的に発達期低栄養の本実験では生後 77 日には脳絶対重量は回復していた。発達期甲状腺機能低下のケースでは、脳発達遅延というよりはむしろ脳白質の低形成が脳絶対重量の低値に関与しているのかもしれない

(Schoonover CM *et al.*, 2004; 72)。発達期低栄養では、白質の低形成はみられておらず、この

違いが発達期低栄養における生後 77 日の脳絶対重量の回復を示唆するものと考えられた。

発達期甲状腺機能低下では未熟なタイプの **Reelin** 産生 **GABA** 性介在ニューロンの増加が生後 77 日まで持続的にみられることを確認している (65)。対照的に、発達期低栄養では生後 77 日まで **GABA** 性介在ニューロンの分布に影響はみられなかった。これらの結果は、全身性の成長抑制は生後 77 日まで **Reelin** 産生 **GABA** 性介在ニューロンの分布に影響を与えるものではないことを示唆している。

小 括

母動物の低栄養は、生後 77 日まで継続する全身性の成長遅延と離乳時における脳発達遅延を引き起こすことが確認された。しかしながら、海馬歯状回門における Reelin 産生 GABA 性介在ニューロンの分布と SGZ における生後のニューロン新生には生後 77 日まで影響を与えないことが確認された。発達期甲状腺機能低下では子ラットに成長抑制と同時に神経発達障害を引き起こすことを確認しているが (65) , 今回の実験結果から、発達期甲状腺機能低下で引き起こされる神経発達障害は脳内の甲状腺ホルモンシグナル伝達の不足によるものであり全身性の成長遅延は影響を与えるものではないことを示している。海馬歯状回門における Reelin 産生 GABA 性介在ニューロンの持続的な増加は、ニューロン新生と移動の障害が持続していることに対する反応性の調節を指し示しているが (65) , Reelin 産生介在ニューロンの挙動の観察はニューロン新生と移動に影響を与える発達神経毒を検出するための有用な手段となり、母動物および子動物の全身毒性に起因した全身性成長遅延に影響を受けないと判断された。

第 2 章

ニューロン傷害性金属であるマンガンの発達期暴露による

ラット海馬歯状回ニューロン新生に対する影響

緒 言

第1章の結果から、海馬歯状回門における Reelin 産生 GABA 性介在ニューロンの分布と SGZ における生後のニューロン新生は母動物および子動物の全身性成長遅延に影響を受けるものではないということが確認され、これらの挙動を観察することは発達神経毒を検出するための有用な手段となる可能性が示された。

本章では、ドーパミン作動性ニューロン傷害性のパーキンソニズム様の症状を引き起こすことで知られる神経毒マンガンを（Mn）を用いて検討を行った。

マンガンは必須微量元素として知られ、免疫機能、血糖調節、生殖、消化、骨成長およびフリーラジカルに対する防御機構の補助的役割などに必要といわれている（8）。マンガンの過剰な暴露はマンガニズムとして知られるパーキンソン病に似た症状を引き起こす神経障害を引き起こす（21, 25）。

マンガンの推定安全必須食事摂取量（ESADDI）は、7-12 箇月齢児で約 0.6 mg/day, 1-3 歳児で約 1.2 mg/day, 4-8 歳児で約 1.5 mg/day, 成人で約 2-5 mg/day と見積もられている。一方、新生児の ESADDI は成人や小児に比べ著しく低く、0.003 mg/day と見積もられている（8, 25）。Dorman らは、幼若ラットでは消化管からの Mn 吸収の増加、新生子ラットの不完全な血液脳関門および離乳時まで実質的に排出機構が欠如していることなどが関連することにより、成獣に比べ脳内 Mn 濃度増加しやすく、いくつかの動物実験の行動検査や神経化学検査では、マンガンの神経毒性に対して新生子動物の方が成獣に比べ、脆弱であることが報告されている（22）。しかし、出生前後におけるマンガンの神経毒性のリスクに対する関心は低く、病理組織学的評価を用いた実験は少ない。

マンガンはまた、甲状腺ホルモンにも影響を及ぼすことが指摘されている（76）。甲状腺ホルモンは中枢神経系の成長、発達および機能に非常に関与していることが知られている（72）。発達期甲状腺機能低下モデルラットを用いた実験では、海馬歯状回門における未熟なタイプの Reelin 産生 GABA 性介在ニューロンの増加および SGZ におけるニューロン新生

障害を示す細胞増殖の減少とアポトーシスの増加が成長後の動物まで持続的にみられることが確認されている (65)。したがって、マンガンの発達期曝露では甲状腺関連ホルモンの変動に関連したニューロン新生への影響が懸念される。

第2章では、ドーパミン作動性ニューロン傷害性のマンガンの神経発達毒性の有無を明らかにし、その病理発生を基盤とした評価系を確立することを目的に、マンガンを発達期曝露した際の、海馬ニューロン新生に対するマンガンの標的性や可逆性の有無を検討した。すなわち、妊娠および授乳期にマンガンの曝露を受けた子ラットを用いて歯状回 SGZ における細胞増殖とアポトーシスならびに顆粒細胞の系譜の検索と歯状回門における Reelin 産生介在ニューロンの分布の検索を曝露終了時と成熟後で行った。さらに、マンガンによる脳への影響に対する甲状腺機能の関連を明らかにするため、子ラットの血清中甲状腺関連ホルモンの測定を行った。

材料および方法

化学物質

塩化マンガン($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; CAS No. 13446-34-9) は, Sigma-Aldrich Japan K.K. (Tokyo, Japan)より購入し, 実験に供した。

供試動物

妊娠 1 日齢 (プラグ確認日を妊娠 0 日として起算) の Sprague-Dawley 系 SPF ラット [CrI:CD(SD)]を日本チャールス・リバー株式会社から購入し実験に供した。動物は温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 相対湿度 $45 \pm 10\%$, 照明サイクル 12 時間明/12 時間暗条件の飼育室で, ブラケット式ステンレス製網ケージに 1 匹ずつ収容した。ただし, 妊娠 17 日から分娩後 21 日までは床敷を入れたプラスチック製ケージに母子ともに収容した。妊娠 1 から 10 日までの検疫馴化期間の妊娠ラットおよび生後 21 日 (出生日を生後 0 日として起算) 以降の離乳後の子ラットは基礎飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業株式会社, 東京) および飲料水 (水道水) を自由に摂取させた。基礎飼料中のマンガン濃度は $7.27 \text{ mg}/100 \text{ g}$ であり, 飲料水中のマンガン検出下限未満であった。

全ての動物実験計画は実験施設 (株式会社ボゾリサーチセンター) の動物実験委員会の承認を受け, 全ての動物実験操作は「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(日本学術会議, 平成 18 年 6 月 1 日)を遵守し, 実験施設の標準操作手順書に準拠して実施した。

実験デザイン

予備実験

Dorman らの報告 (2000) を参考に用量設定のための実験を行った。投与量は 0, 500 および 800 ppm ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ としての濃度) とし, 1 群 3 匹の妊娠ラットに妊娠 10 日から分娩後 21 日まで基礎飼料に混じて摂取させた。その結果, 800 ppm において子動物の軽微な体重

減少がみられたものの、母動物の体重および摂餌量には影響はみられなかった。

実験 1

予備実験の結果を基に投与量を 0（無処置対照群）、32, 160 および 800 ppm の 4 群に設定し、1 群当たり 8 匹の妊娠ラットに妊娠 10 日から分娩後 21 日まで CRF-1 基礎飼料に混じて自由に摂取させた。母動物は、実験期間中、定期的に体重および摂餌量を測定した。

出生子の子数調整および剖検時の子動物については Table 2-1 に概要を示した。生後 4 日に、1 腹雌雄各 4 匹になるよう無作為に選抜し子数の調整を行った。子動物は定期的に体重を測定した。生後 21 日に各腹雌雄各 2 匹（各群雌雄各 16 匹）を選抜して剖検し、免疫組織化学的解析、脳内 Mn 濃度測定および real-timeRT-PCR 測定に供した。残りの各腹雌雄各 2 匹は生後 77 日まで継続飼育し、定期的に体重および摂餌量を測定した。なお、前述のとおり、生後 21 日の離乳後以降の子ラットは基礎飼料 CRF-1 および飲料水を自由に摂取させた。生後 77 日に残りの各腹雌雄各 2 匹（各群雌雄各 16 匹）を剖検し、免疫組織化学的解析および脳内 Mn 濃度測定に供した。生後 21 および 77 日のいずれの剖検においても、脳、肝臓、腎臓、精巣および卵巣の重量を測定した。性周期におけるステロイドホルモンの周期的変動によりニューロン新生が影響を受けることが報告されていることから（58）、雌の生後 21 および 77 日の試料は保存のみとし、これ以降の解析は行わなかった。全ての動物はエーテル麻酔下で腹大動脈切断による放血致死により安楽死させ、剖検に供した。子動物の外表分化は、耳介展開を生後 4 日、切歯萌出を生後 11 および 14 日、眼瞼開裂を生後 14 および 17 日、脰開口を生後 35 および 42 日、陰茎亀頭包皮分離を生後 42 および 49 日に観察した。これらの観察時期は、この系統のラットの背景資料（56）を参考に決定した。

実験 2

MnCl₂·4H₂O の発達期曝露による血清中甲状腺関連ホルモン濃度への影響を検討するため追加実験を行った。投与量を 0（無処置対照群）、800 および 1600 ppm の 3 群に設定し、1 群当たり 6 匹の妊娠ラットに実験 1 と同様に妊娠 10 日から分娩後 21 日まで CRF-1 基礎飼料

に混じて自由に摂取させた。生後 4 日に、1 腹雌雄各 4 匹になるよう無作為に選抜き子数の調整を行った。生後 21 日に全母動物と各群 10 匹の雄子動物（各腹 1 または 2 匹の雄）をエーテル麻酔下で開腹し、ホルモン測定用に腹大動脈から血液を採取した。さらに、各群 10 匹の雄子動物（各腹 1 または 2 匹の雄）を継続飼育し、生後 77 日に同様にエーテル麻酔下でホルモン測定用に腹大動脈から血液を採取した。採血後、全ての動物はエーテル麻酔下で腹大動脈切断による放血致死により安楽死させた。

脳内 Mn 濃度測定

Mn 濃度を測定するため、実験 1 の全母動物および生後 21 ならびに 77 日の雄の子動物（各ステージ各群 6 例）の小脳を摘出して重量を測定し、液体窒素で急速凍結させた後、 -80°C で凍結保存させた。凍結小脳組織はマイクロウェーブ(MARS5, CEM Corp., Matthews, NC, USA)で溶解させ、溶解試料液を ICP-MS (HP-7500; Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA, USA)を用いて質量電荷比 (m/z)を Mn 用に 55 に設定して測定した。

ホルモン測定

実験 2 で得られた血液試料から血清を得て、 -80°C で凍結保存させた。thyroid-stimulating hormone (TSH), triiodothyronine (T_3)および thyroxine (T_4)を DPC IMMULYZE (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Deerfield, IL, USA)を用いて化学発光酵素免疫測定法（CLEIA 法, chemiluminescent enzyme immunoassay method）により、測定した。

行動学的解析

実験 1 において、授乳期間中各腹雌雄各 2 匹の子動物について初期行動発達検査を、離乳後各腹雌雄各 1 匹の子動物について詳細な一般状態観察、機能検査、握力測定、自発運動量測定および複式水 T 迷路検査を実施した。

初期行動発達検査では、平面正向反射を生後 10 日に行い、仰臥位から正常な姿勢に戻る

までの時間を測定した。空中正向反射は生後 15 日行い、約 300 mm の高さから仰臥位でクッションの上に落下させ、正常な腹臥位で着地するか否かを確認した。瞳孔反射、Preyer 反射および疼痛反射は生後 21 日に実施した。瞳孔反射は光を眼に近づけ正常な縮瞳の有無を確認した。Preyer 反射はガルトン笛の音に対する正常な耳介の運動あるいは全身性の驚愕反応の有無を確認した。疼痛反射は尾をピンセットで挟まれた時に逃げたり鳴いたりする正常な反応の有無を確認した。

詳細な一般状態観察は生後 29, 43 および 71 日に実施した。ケージ内観察では、姿勢、痙攣および異常行動について観察した。ハンドリングの観察では、ケージからの取り出しやすさ、被毛および皮膚の状態、眼および鼻の分泌物、眼球突出、眼瞼閉鎖状態、可視粘膜、流涙、立毛、瞳孔径、流涎、異常呼吸およびハンドリングに対する発声と反応について観察した。

機能検査は生後 71 日に実施した。聴覚反応はクラックに対する正常な驚愕性反応を確認した。接近反応は鼻先に近づけたペンに対する匂いを嗅いだり逃げたりする正常な反応の有無を確認した。接触反応は腹部にペンで触れた時に逃げたり小さく発声したりする正常な反応の有無を確認した。痛覚反応は尾をピンセットで掴んだ時の素早く逃げたり鳴いたりする正常な反応の有無を確認した。着地開脚幅は約 300 mm の高さから正常な腹臥位で落下させたときの両後肢の幅を測定した。瞳孔反射および空中正向反射については前述の初期行動発達検査と同様に実施した。

握力測定は生後 71 日に実施した。CPU ゲージ MODEL-RX-5（アイコーエンジニアリング株式会社）を用いて前肢および後肢の握力を測定した。

自発運動量測定は生後 71 日に実施した。実験動物用自発運動センサー NS-AS01（株式会社ニューロサイエンス、東京）を用いて自発運動量を測定した。測定時間は 1 時間とし、10 分間隔および 0~60 分の測定値を集計した。

複式水 T 迷路検査は生後 55 から 57 日に実施した。検査は Biel の装置（Fig. 1-1）を用いて実施した（11, 37）。すなわち、連続 3 日間、水 T 迷路を 1 日 3 試行行ってゴールまでの所

要時間およびエラー回数（エラー域に全身が入った回数）を調べることで学習能力の評価を実施した。各試行は約 5 から 10 分間隔で実施した。なお, 1 試行 3 分を限度とし, 3 分でゴールに到達しなかった試行に関しては統計解析から除外した。なお, 1 日目の測定の前日に直線水路を 3 試行行って水泳能力の確認を行い, 異常がないことを確認した。

免疫組織化学的解析およびアポトーシスの検索

実験 1 の生後 21 日および 77 日の各ステージ各群 10 匹の雄子動物（各腹 1 または 2 匹の雄）の脳をブアン液に固定した。大脳の Bregma の後方約-3.0 mm および 3.5 mm の 1 カ所で冠状断面を作製してパラフィン包埋し, 3 μ m 厚の連続切片を作製した。

免疫組織化学的解析では, 抗ウサギ Dcx (doublecortin, rabbit IgG, 1:1000, Abcam, Cambridge, UK), 抗ウサギ Tbr2 抗体(T box brain 2, rabbit IgG, 1:500, Abcam), 抗マウス GFAP 抗体(glial fibrillary acidic protein, clone GA5, mouse IgG1, 1:200, Millipore Corporation, Temecula, CA, USA), 抗マウス Reelin 抗体 (clone G10, mouse IgG1, 1:1,000; Novus Biologicals, Inc., Littleton, CO, U.S.A.), 抗マウス NeuN 抗体(neuron-specific nuclear protein, clone A60, mouse IgG1, 1:100, Millipore Corporation, Temecula, CA, U.S.A.) , 抗マウス GAD67 抗体 (glutamic acid decarboxylase 67, clone 1G10.2, mouse IgG2a, 1:50, Millipore Corporation) および抗マウス proliferating cell nuclear antigen 抗体 (PCNA, clone PC10, mouse IgG2a, 1:200, Dako, Glostrup, Denmark) と一晩 (4°C) 反応させ, 3,3'-diaminobenzidine/H₂O₂ 発色を用いて ABC 法 (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, U.S.A.) による免疫染色を行った。なお, Tbr2 についてはクエン酸緩衝液 (10 mM, pH 6.0) を用いて, オートクレーブ処理 (121 °C, 15 分) による抗原の賦活化処理を行った。

海馬歯状回の SGZ におけるアポトーシスの評価については, TUNEL 法 (Apop Tag[®] *in situ* apoptosis detection kit, Millipore Corporation) による検出を行った。

標本はヘマトキシリンにより対比染色を施した。

顆粒細胞の系譜である Dcx, Tbr2 および GFAP 陽性細胞数, TUNEL 陽性アポトーシス細胞

数ならびに増殖細胞の指標である PCNA 陽性細胞数については SGZ における陽性細胞数の検索を行った。GABA 性介在ニューロンに発現する分子の Reelin および GAD67 ならびに成熟ニューロンの指標である NeuN については、海馬歯状回門における陽性細胞数の検索を行った (Fig. 1-2)。細胞数の計測は両側の海馬について 100 倍の倍率で行った。

これらの解析は、同じ個体 (各ステージ各群 10 匹の雄子動物、各腹 1 または 2 匹の雄) の標本を用いて実施した。

Real-time RT-PCR 解析

実験 1 の生後 21 日の剖検で得られた雄子動物 (各群 5 または 6 例) の大脳をメタカン固定液で固定した (4 °C, 8 時間) (71) 後、海馬を摘出し、-80 °C でエタノール中に保存した。Table 2-2 に示した遺伝子について、海馬組織中の mRNA 発現の定量解析を実施した。*Dcx*, *Neurod1*, *Pax6* および *Dpysl3* はニューロンの分化ステージをコードする遺伝子を示すマーカー分子である (13, 45, 39)。*Reln*, *Vldlr*, *Lrp8* および *Dab1* は, reelin をコードする遺伝子とそのレセプター (*Vldlr*, *Lrp8*) と細胞内アダプター (*Dab1*) をコードする遺伝子である (35)。

海馬組織から RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて total RNA を抽出した。得られた 2 μg total RNA について cDNA を合成した。PCR 反応は SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) を用い、Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems Inc.) にて、製造元のプロトコールに従って実施した。用いたプライマー (Table 2-2) は、Primer Express software (Version 3.0; Applied Biosystems Japan Ltd.)を用いて設計した。各遺伝子の mRNA 発現量は対照群での発現値に対する相対値として求め、内因性コントロールとして beta actin (*Actb*) gene の検量線を求め、 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method (48) にて算出した。

統計解析

母動物の体重、摂餌量、脳内 Mn 濃度およびホルモン測定データのデータは各個体の数値を統計

解析に用いた。子動物の体重、摂餌量、器官重量、行動解析の定量項目、免疫組織化学的解析、real-time RT-PCR、脳内 Mn 濃度およびホルモン測定データは各腹（母動物）の平均値を統計解析に用いた。解析は、Bartlett 法により各群の等分散性の検定を行い、等分散の場合は Dunnett 法、不等分散の場合は Steel 法を用いて対照群と各投与群の差を検定した。

行動解析の頻度データは各個体の数値を用いて、Fisher の直接確率法により検定を行った。

結 果

母動物への影響（実験 1）

妊娠および授乳期間中ともに体重に有意な差は認められなかった(Fig. 2-3)。摂餌量では妊娠期間中は有意な差はみられなかった(Fig. 2-3)。授乳期間では分娩後 11 日に 160 および 800 ppm, 14 日に 800 ppm, 17 日に 160 ppm で有意な差が認められたが、いずれも軽微な変動であった(Fig. 2-3)。投与期間中（妊娠 10 日から分娩後 21 日まで）の母動物の $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 摂取量は, 32 ppm で 4.05 mg/kg body weight/day, 160 ppm で 20.62 mg/kg body weight/day, 800 ppm で 105.14 mg/kg body weight/day であった。なお, 実験 2 におけるそれらは, 800 ppm で 100.84 mg/kg body weight/day, 1600 ppm で 210.04 mg/kg body weight/day であった。

子動物の体重, 摂餌量, 外表分化および器官重量（実験 1）

子動物の体重 (Fig. 2-3), 摂餌量 (Fig. 2-4), 外表分化 (Table 2-3)および生後 21 ならびに 77 日の器官重量 (Table 2-4)のいずれにおいても影響は認められなかった。

母動物および子動物の脳内 Mn 濃度（実験 1）

暴露終了時（分娩後 21 日）の母動物の小脳 Mn 濃度では, 対照群と投与群の間に差はみられなかった (Fig. 2-5)。生後 21 日の子動物では, 160 および 800 ppm の小脳 Mn 濃度が有意な高値を示した (Fig. 2-5)。しかし, 生後 77 日の子動物の小脳 Mn 濃度では, 対照群と投与群の間に差はみられなかった (Fig. 2-5)。

血清中甲状腺関連ホルモン濃度（実験 2）

母動物では, T_3 , T_4 および TSH のいずれにおいても対照群と投与群の間に差はみられなかった (Fig. 2-6)。生後 21 日の子動物では, 800 および 1600 ppm の T_3 および T_4 が有意な低値がみられた。800 ppm の TSH は有意な高値を示したが 1600 ppm では差はみられなかった

(Fig. 2-6)。生後 77 日の子動物では、T₃、T₄および TSH のいずれにおいても対照群と投与群の間に差はみられなかった (Fig. 2-6)。

行動学的解析（実験 1）

初期行動発達検査では、平面正向反射において雄の 32 ppm で有意な短縮が認められたが、雌雄の 160 および 800 ppm ならびに雌の 32 ppm では差はみられなかった。空中正向反射では有意な低値が雄の 160 ppm および雌雄の 800 ppm に認められた。瞳孔反射、Preyer 反射および疼痛反射に差はみられなかった (Table 2-5)。

握力測定では、雄の 32 および 160 ppm で前肢の握力の低値がみられたが、800 ppm では差はみられなかった。雌では、いずれにも差はみられなかった (Table 2-6)。

複式水 T 迷路検査では、800 ppm において雄の 1 日目の第 1 試行の遊泳時間の有意な短縮、雌の 1 日目の第 1 試行の遊泳時間およびエラー回数が有意な延長あるいは増加が認められた (Fig. 2-7)。

詳細な一般状態観察 (Table 2-7, 2-8, 2-9)、機能検査 (Table 2-10)および自発運動量 (Table 2-11)では、対照群と投与群の間に差はみられなかった。

SGZ における免疫組織化学的解析（実験 1）

Dcx の発現は SGZ の多数の細胞質中に観察された (Fig. 2-8A)。Tbr2 の発現は SGZ の少数の細胞核中に観察された (Fig. 2-8B)。GFAP の発現は SGZ の少数の細胞質中に観察された (Fig. 2-8C)。また、GFAP はアストロサイトにも観察された。

生後 21 日では、SGZ の Dcx 陽性細胞数の有意な増加が 800 ppm にみられた。Tbr2 および GFAP 陽性細胞数については、対照群と投与群の間に差はみられなかった (Fig. 2-8)。

生後 77 日では、SGZ の Dcx、Tbr2 および GFAP 陽性細胞数のいずれにおいても対照群と投与群の間に差はみられなかった (Fig. 2-8)。

海馬歯状回門における免疫組織化学的解析（実験 1）

Reelin の発現は海馬歯状回門中のニューロンの細胞質中に観察された (Fig. 2-9A)。NeuN の発現は海馬歯状回門中のニューロンの細胞核中に観察された (Fig. 2-9B)。また、顆粒細胞の核と細胞質の両方にも発現がみられた。GAD67 の発現は海馬歯状回門および顆粒細胞層に散在するニューロンの細胞質中に観察された (Fig. 2-9C)。

生後 21 日では、海馬歯状回門中の Reelin 陽性細胞数の有意な増加が 800 ppm にみられた。NeuN および GAD67 陽性細胞数については、対照群と投与群の間に差はみられなかった (Fig. 2-9)。

生後 77 日では、海馬歯状回門中の Reelin, NeuN および GAD67 陽性細胞数のいずれにおいても対照群と投与群の間に差はみられなかった (Fig. 2-9)。

SGZ におけるアポトーシスおよび細胞増殖（実験 1）

生後 21 および 77 日のいずれにおいても、SGZ の TUNEL 陽性アポトーシス細胞および PCNA 陽性細胞では対照群と投与群の間に差はみられなかった (Fig. 2-10)。

Real-time RT-PCR 解析（実験 1）

ニューロン発達関連分子の転写産物レベルを調べるために、生後 21 日における子動物の海馬の *Dcx*, *Neurod1*, *Pax6* および *Dpysl3* の mRNA レベルを real-time RT-PCR により解析したが、いずれも転写産物レベルの変動はみられなかった (Table 2-12)。さらに、Reelin 関連分子の転写産物レベルを調べるために、生後 21 日における子動物の海馬の *Reln*, *Vldlr*, *Lrp8* および *Dab1* の mRNA レベルを解析したが、いずれも転写産物レベルの変動はみられなかった (Table 2-12)。

考 察

本章では、ドーパミン作動性ニューロン傷害性の神経毒マンガンをを用いて検討を行った。

本実験における $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ の飼料添加による摂取量から算出される Mn の摂取量は, 32 ppm で 1.13 mg/kg body weight/day, 160 ppm で 5.73 mg/kg body weight/day, 800 ppm で 29.21 mg/kg body weight/day および 1600 ppm で 58.37 mg/kg body weight/day であった。しかし, げっ歯類の基礎飼料 (CRF-1) 中の Mn 濃度は比較的高く (7.27 mg/100 g), これを加えた総 Mn 摂取量は, 32 ppm で 10.34 mg/kg body weight/day, 160 ppm で 15.10 mg/kg body weight/day, 800 ppm で 38.76 mg/kg body weight/day および 1600 ppm で 67.91 mg/kg body weight/day であった。Mn の推定安全必須食事摂取量 (ESADDI) は, 7-12 箇月齢児で約 0.6 mg/day, 1-3 歳児で約 1.2 mg/day, 4-8 歳児で約 1.5 mg/day, 成人で約 2-5 mg/day と見積もられているが, 新生児の ESADDI は成人や小児に比べ著しく低く, 0.003 mg/day と見積もられている (8, 25)。したがって, げっ歯類の実験では Mn の基礎摂取量は人間のそれに比べ, はるかに高い。成人の摂取量を体重 50 kg として換算すると, 1 日の Mn 摂取量は 0.04-0.1 mg/kg である。すなわち, 本実験の低濃度群 (32 ppm) の総 Mn 摂取量は, 成人の ESADDI の約 100 倍である。

Mn の発達期曝露は SGZ の Dcx の発現分布に影響を及ぼすことが, 生後 21 日の 800 ppm で確認された。Dcx は type-2b および type-3 神経前駆細胞ならびに未成熟ニューロンにおいて発現することが知られているが (44), type-2 神経前駆細胞で発現を示す Tbr2 では陽性細胞数に変動はみられなかった (39)。したがって, Dcx 陽性細胞数の増加に type-2b 細胞は関与しておらず, type-3 細胞または未熟顆粒細胞の増加を示唆するものと考えられた。一方, 海馬歯状回門では Reelin 陽性細胞の増加が生後 21 日の 800 ppm で確認された。Reelin は GABA 性介在ニューロンから分泌され, 海馬歯状回において生後のニューロン新生の調節する役割を担っており, Dcx 陽性の未熟顆粒細胞の増加を引き起こすことが報告されている (63)。Reelin は, メチルアゾキシメタノールや抗甲状腺剤またはアクリルアミドの発達期曝露による異常な生後のニューロン新生時に誘導されることが示されている (65, 38, 55)。したがっ

て、マンガンの発達期曝露による Reelin 陽性細胞の増加は GABA 性介在ニューロンにおける Reelin の上方制御を反映しているものと考えられ、これが顆粒細胞の分化異常を示唆する Dcx 陽性細胞の増加を引き起こしているものと推測された。興味深いことに、アストロサイト-ニューロンの共培養による *in vitro* の実験において、 $MnCl_2$ はアストロサイトが海馬神経前駆細胞の神経突起の伸長を促進する機能を阻害することが報告されている (31)。未熟顆粒細胞は既に樹状突起成長円錐および基底樹状突起を有していることから (64), type-3 神経前駆細胞が Mn の標的となり、未熟顆粒細胞への分化が抑制されている可能性が示唆された。しかしながら、これらの変化は生後 77 日では認められず、可逆性の変化であった。免疫組織化学的解析では Dcx および Reelin 陽性細胞の増加がみられたが、real-time RT-PCR 解析では Dcx および *Reln* を含む各分子の転写産物レベルに変動はみられなかった。免疫組織化学的解析では SGZ または歯状回門で部位特異的な解析により変化を検出したのに対し、real-time RT-PCR 解析では海馬全体を試料として用いたことが、両解析における変化の有無の差異をもたらす原因になったと推測された。

空中正向反射において、雄の 160 ppm および雌雄の 800 ppm に低値が認められた。Tran らは、高濃度の Mn を混餌曝露させた新生子ラットにおいて、平面正向反射の時間の延長を報告している (79)。したがって、空中正向反射の低値は Mn 曝露の影響かもしれない。しかしながら、本実験では平面正向反射を含む他の感覚、反射機能検査に影響は認められなかったことから、Mn の発達期曝露が反射機能に影響を及ぼすかどうかは判断できなかった。また、複式水 T 迷路検査において 800 ppm の雄の 1 日目の第 1 試行の遊泳時間の短縮、雌の 1 日目の第 1 試行の遊泳時間の延長およびエラー回数の増加が認められたが、いずれもほぼ対照群の 3 回の試行の変動範囲内の変化であり、第 2, 3 試行では変化はなく、雌雄で逆の変化であったことから、偶発的な変化と判断した。したがって、本実験では学習記憶機能を含む行動学的な解析において、Mn の発達期曝露による明らかな影響を確認することはできなかった。

脳内 Mn 濃度では生後 21 日の 160 および 800 ppm の子動物において増加がみられたが、そ

の母動物では変動はみられなかった。 MnSO_4 を経胎盤、経乳的に吸入曝露させたラットでは母動物で脳内 Mn 濃度の変動がない濃度であっても、子動物の小脳および基底核の Mn 濃度の増加することが報告されている (23)。また、 MnCl_2 を用いたいくつかの動物実験においても、同じ投与量で比較したとき発達期のラットの方が成獣ラットよりも脳内 Mn 濃度の高くなることが報告されている (22, 77)。Mn を経乳的に生後 4 から 21 日まで曝露させると子動物の小脳、中脳、基底核、皮質および海馬に Mn の蓄積することが報告されている (28)。これらの子動物の脳内 Mn 濃度増加について、Dorman らは、幼若ラットにおける消化管からの Mn 吸収の増加、新生子ラットの不完全な血液脳関門および離乳時まで実質的に排出機構が欠如していることなどが関連しているだろうと推測している (22)。また、多くの Mn 塩は胎盤を速やかに通過し、胚胎子に毒性を発揮する (30)。これらのことは成獣では摂取した Mn に対し保護機能を有しているのに対し、胎児や新生子動物では Mn 曝露に対し脆弱であることを示している。したがって、子動物だけが母動物を介した高濃度 Mn の曝露によって生じる異常なニューロン分化異常を含む神経毒性のリスクに曝される可能性が示唆される。

甲状腺関連ホルモンでは、 T_3 および T_4 の減少と TSH の増加が生後 21 日の 800 ppm のみの子動物でみられた。 MnSO_4 を添加した飼料で 5 週間飼育したラットでは T_3 , T_4 および TSH の減少することが報告されている (76)。また、Mn を 2 年間曝露したマウスでは Mn の抗甲状腺作用を示唆する甲状腺の濾胞の過形成および拡張がみられている (76)。甲状腺ホルモンは脳発達に決定的な役割を果たすことが知られている (72)。実験的には、発達期の甲状腺機能障害は神経障害と様々な行動、学習機能障害を生じる (3, 15)。6-プロピル-2 チオウラシルのような抗甲状腺剤を曝露したラットの子動物では、ニューロン移動の異常と共に、軸索の髄鞘形成の抑制およびオリゴデンドロサイトの減少に伴う白質の形成不全がみられる (33, 67)。我々のこれまでの研究では、発達期に抗甲状腺剤を曝露させたラットの子動物が生後 77 日まで持続的に海馬歯状回門における未熟なタイプの Reelin 産生 GABA 性介在ニューロンの増加を示すことを見出している (65)。これらの結果は、神経発達におけるニ

ニューロン新生とそれに引き続く移動の障害が持続していることに対する反応性の調節を指示している。したがって、高用量の Mn の発達期曝露は子動物の甲状腺ホルモンの恒常性に影響を及ぼしニューロン新生に影響を与えるかもしれない。しかしながら、抗甲状腺剤を用いた実験のような持続的な成長抑制や身体発達の遅延といった発達期甲状腺機能低下を示唆する特徴 (72) を本実験では欠いていることから、甲状腺ホルモン恒常性に及ぼす影響は軽度もしくは無視でき得るものと考えられた。また、ホルモン濃度の変化は生後 77 日にはみられず、持続的な影響はみられなかった。

上述の如く、行動学的解析では Mn 曝露の影響を明らかにすることはできなかったが、海馬歯状回の SGZ を観察では後期分化を標的としたニューロン新生への影響が検出され、Mn の発達期曝露による影響が確認された。このことは、神経病理に特化した海馬歯状回 SGZ を観察は、従来の行動学的解析よりも感度の高い有用な解析手段あることを示すものと考えられた。

小 括

第2章では、ドーパミン作動性ニューロン傷害性のパーキンソンニズム様の症状を引き起こすことで知られる神経毒 Mn を用いてニューロン新生影響の検討を行った。

Mn のラットを用いた発達期曝露は、Mn として 38.76 mg/kg/day に相当する $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ の 800 ppm のレベルにおいて軽度で可逆的ながら子動物の海馬歯状回の後期分化を標的としたニューロン新生への影響を示すことを見出した。この Mn のレベルは成人（体重 50 kg）の推定安全必須食事摂取量（0.04-0.1 mg/kg/day）の約 380-970 倍に相当する。発達期の脳における Mn の蓄積の直接的な影響が発達期のニューロン新生の異常に関係しており、甲状腺ホルモンを介した間接的な影響は小さいと推測された。本研究の実施により、今回新たに Mn によるニューロン新生の後期分化を標的とした可逆性の発達神経毒性が見出されたことから、ニューロン傷害性物質による発達神経毒性の解析には、曝露終了時と成熟後での海馬歯状回顆粒細胞系譜と GABA 性介在ニューロンの変動解析が有効であることが示された。

第 3 章

コリンエステラーゼ阻害剤であるクロルピリフォスの発達期暴露によるラット

海馬歯状回ニューロン新生に対する影響

緒 言

第3章では、アセチルコリンエステラーゼ阻害作用を有する有機リン系殺虫剤であるクロルピリフォス（CPF）を用いてラットに発達期暴露を行い、海馬歯状回におけるニューロン新生と介在ニューロンへの影響を検討した。

CPFはコリンエステラーゼ（ChE）阻害剤の一つであり、世界中で広く用いられている有機リン系農薬の一つである（24）。CPFは1965年に発売され、過去40年以上にわたって世界的規模で使われ続けており、2002年から2006年の間の全世界における平均年間使用量は約24,000,000 kg（有効成分として）である（24）。米国において、仮にCPFが利用できなくなったとすると約150,000,000ドルの経済的損失が生じると試算されている（85）。CPFの世界的規模の高使用量のため、環境汚染による予期せぬCPF曝露のリスクは高い。日本における食品からのCPFの推定国民平均摂取量は0.72 µg/kg/dayと推計されている。同様に妊娠女性では0.66 µg/kg/day、1-6歳の幼児では1.34 µg/kg/dayと推計されている（61）。幼児では成人に比べ体重当たりの食物摂取量が多いため、CPF摂取量も高い。したがって、発達段階にある子供たちは成人に比べCPF曝露のリスクがより高い。

CPFの毒性実験および発達毒性実験は非常に多く実施されている。アメリカ環境保護局の定める農薬評価ガイドラインに基づいて実施された試験が1つあるが、この中ではCPFを母動物を介して曝露したラット子動物において発達神経毒性を示す知見は得られていない（53）。しかしながら、様々な投与量や投与経路、投与期間で実施した他の報告ではCPFの発達神経毒性を示す知見が得られている（24）。一例としては、CPFを生後1-4日に1 mg/kgの投与量で曝露させたラットにおいて、成長後に不安に関連した行動および自発運動量に影響がみられることが示されている（5）。このような相反する知見が得られている状況を考慮するとCPFの発達神経毒性に関する情報をより蓄積していく必要があると思われる。ニューロン新生に着目したスクリーニング系が発達神経毒性に有用な情報をもたらすであろうと考えられる。

本章では、コリンエステラーゼ阻害作用のある CPF の神経発達毒性の有無を明らかにし、その病理発生を基盤とした評価系を確立することを目的に、CPF を発達期曝露した際の、海馬ニューロン新生に対するマンガンの標的性や可逆性の有無を検討した。すなわち、CPF を妊娠期および授乳期に曝露した子動物中の歯状回 SGZ における顆粒細胞系譜の分布、増殖およびアポトーシスならびに海馬歯状回門における Reelin 産生介在ニューロンの分布を曝露終了時と成熟後で解析した。

材料および方法

化学物質

クロルピリフォス (CPF, 純度 : 99.8%) は, Dow Chemical Japan Ltd. (Tokyo, Japan) から提供された。

供試動物

妊娠 1 日齢（プラグ確認日を妊娠 0 日として起算）の Sprague-Dawley 系 SPF ラット [CrI:CD(SD)] を日本チャールス・リバー株式会社から購入し実験に供した。動物は温度 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 相対湿度 $45\pm 10\%$, 照明サイクル 12 時間明/12 時間暗条件の飼育室で, ブラケット式ステンレス製網ケージに 1 匹ずつ収容した。ただし, 妊娠 17 日から分娩後 21 日までは床敷を入れたプラスチック製ケージに母子ともに収容した。妊娠 1 から 10 日までの検疫馴化期間の妊娠ラットおよび生後 21 日（出生日を生後 0 日として起算）以降の離乳後の子ラットは基礎飼料 CRF-1（オリエンタル酵母工業株式会社, 東京）および飲料水（水道水）を自由に摂取させた。

全ての動物実験計画は実験施設（株式会社ボゾリサーチセンター）の動物実験委員会の承認を受け, 全ての動物実験操作は「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」（日本学術会議, 平成 18 年 6 月 1 日）を遵守し, 実験施設の標準操作手順書に準拠して実施した。

実験デザイン

CPF は母動物の飼料を介して子動物に曝露させた。Breslin らの報告 (12) を基に子動物の軽微な体重減少が引き起こされると予想される 70 ppm を高用量に設定した。中および低用量は ADI（許容一日摂取量）の算出に必要とされるヒトの暴露量の 100-1000 倍高い範囲の暴露量をカバーできるように 70 ppm を公比 5 で除して, 14 および 2.8 ppm に設定した。母動物を 1 群当たり 8 匹ずつの 4 群に無作為に群分けし, 0（無処置対照群）, 2.8, 14 および

70 ppm の CPF を CRF-1 基礎飼料に混じて妊娠 10 日から分娩後 21 日まで自由に摂取させた。母動物は、体重を妊娠期間中は毎日、授乳期間中は 3-4 日に 1 回、摂餌量を妊娠・授乳期間中に 3-4 日に 1 回の頻度で測定した。生後 4 日に、1 腹雌雄各 4 匹になるよう無作為に選抜き子数の調整を行った。出生子の子数調整および剖検時の子動物については Table 3-1 に概要を示した。子動物は、体重を授乳期間中は 3-4 日に 1 回、離乳後は週 1 回、摂餌量を離乳後に週 1 回の頻度で測定した。生後 21 日に各腹雌雄各 2 匹（各群雌雄各 16 匹）を選抜き剖検し、免疫組織化学的解析、アポトーシスの検索および脳内コリンエステラーゼ (ChE) 活性測定に供した。残りの各腹雌雄各 2 匹は生後 77 日まで継続飼育し、基礎飼料 CRF-1 および飲料水を自由に摂取させた。生後 77 日に残りの各腹雌雄各 2 匹（各群雌雄各 16 匹）を剖検し、免疫組織化学的解析、アポトーシスの検索および脳内コリンエステラーゼ (ChE) 活性測定に供した。

性周期におけるステロイドホルモンの周期的変動によりニューロン新生が影響を受けることが報告されていることから (58) , 雌の生後 21 および 77 日の試料は保存のみとし、以降の解析は実施しなかった。

子動物の外表分化は、耳介展開を生後 4 日、切歯萌出を生後 11 および 14 日、眼瞼開裂を生後 14 および 17 日、脛開口を生後 35 および 42 日、陰茎龟头包皮分離を生後 42 および 49 日に観察した。これらの観察時期は、この系統のラットの背景資料 (56) を参考に決定した。

生後 21 および 77 日のいずれの剖検においても、脳、肝臓、腎臓、精巣および卵巣の重量を測定した。全ての動物はエーテル麻酔下で腹大動脈切断による放血致死により安楽死させた。

ChE 活性測定

全ての母動物（各群 8 匹）および生後 21 ならびに 77 日の雄の子動物（各ステージ各群 6 匹）を検索に供した。

血液試料は、エーテル麻酔下で開腹し、腹大動脈からヘパリンナトリウム加採血管に採

取した。血液の一部を分取し、全血中の ChE 活性測定用試料のために 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan)を含む蒸留水と混和して溶血させた。さらに、赤血球中の ChE 活性を算出するために、血液の一部を用いてヘマトクリット値を総合血液学検査装置 Advia 120 (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Tokyo, Japan)で測定した。残りの血液は遠心分離 ($1,600 \times g$, 10 分) し、血漿を得た。

脳は前頭葉を採取し、重量を測定し、液体窒素で急速凍結させた後、 -80°C で凍結保存させた。脳組織は 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan)を含む蒸留水中でホモジナイズし、測定に供した。

全血、血漿および脳中の ChE 活性は臨床化学自動分析装置 TBA-120FR (Toshiba Medical Systems Corporation, Tochigi, Japan)を用いて、ヨウ化アセチルチオコリンを基質として測定した。

ホルモン測定

上述の ChE 活性測定で得られた血漿試料について thyroid-stimulating hormone (TSH), triiodothyronine (T_3)および thyroxine (T_4)を DPC IMMULYZE (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Deerfield, IL, USA)を用いて化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA 法, chemiluminescent enzyme immunoassay method) により測定した。

行動学的解析

各腹雌雄各 1 匹の子動物について初期行動発達検査、詳細な一般状態観察、機能検査、握力測定、自発運動量測定および複式水 T 迷路検査を実施した。

初期行動発達検査では、平面正向反射を生後 10 日に行い、仰臥位から正常な姿勢に戻るまでの時間を測定した。空中正向反射は生後 15 日行い、約 300 mm の高さから仰臥位でクッションの上に落下させ、正常な腹臥位で着地するか否かを確認した。瞳孔反射, Preyer 反射および疼痛反射は生後 21 日に実施した。瞳孔反射は光を眼に近づけ正常な縮瞳の有無を

確認した。Preyer 反射はガルトン笛の音に対する正常な耳介の運動あるいは全身性の驚愕反応の有無を確認した。疼痛反射は尾をピンセットで挟まれた時に逃げたり鳴いたりする正常な反応の有無を確認した。

詳細な一般状態観察は生後 29, 48 および 71 日に実施した。ケージ内観察では、姿勢、痙攣および異常行動について観察した。ハンドリングの観察では、ケージからの取り出しやすさ、被毛および皮膚の状態、眼および鼻の分泌物、眼球突出、眼瞼閉鎖状態、可視粘膜、流涙、立毛、瞳孔径、流涎、異常呼吸およびハンドリングに対する発声と反応について観察した。

機能検査は生後 71 日に実施した。聴覚反応はクラックに対する正常な驚愕性反応を確認した。接近反応は鼻先に近づけたペンに対する匂いを嗅いだり逃げたりする正常な反応の有無を確認した。接触反応は腹部にペンで触れた時に逃げたり小さく発声したりする正常な反応の有無を確認した。痛覚反応は尾をピンセットで掴んだ時の素早く逃げたり鳴いたりする正常な反応の有無を確認した。着地開脚幅は約 300 mm の高さから正常な腹臥位で落下させたときの両後肢の幅を測定した。瞳孔反射および空中正向反射については前述の初期行動発達検査と同様に実施した。

握力測定は生後 71 日に実施した。CPU ゲージ MODEL-RX-5（アイコーエンジニアリング株式会社）を用いて前肢および後肢の握力を測定した。

自発運動量測定は生後 71 日に実施した。実験動物用自発運動センサー NS-AS01（株式会社ニューロサイエンス、東京）を用いて自発運動量を測定した。測定時間は 1 時間とし、10 分間隔および 0~60 分の測定値を集計した。

複式水 T 迷路検査は生後 56 から 58 日に実施した。検査は Biel の装置 (Fig. 1-1) を用いて実施した (11, 37)。すなわち、連続 3 日間、水 T 迷路を 1 日 3 試行行ってゴールまでの所要時間およびエラー回数（エラー域に全身が入った回数）を調べることで学習能力の評価を実施した。各試行は約 5 から 10 分間隔で実施した。なお、1 試行 3 分を限度とし、3 分でゴールに到達しなかった試行に関しては統計解析から除外した。なお、1 日目の測定の前

日に直線水路を 3 試行行って水泳能力の確認を行ったが、雄の 2.8 および 70 ppm において第 1 試行の遊泳時間の有意な延長がみられた (Table 3-2)。しかし、第 2 および第 3 試行では雌雄のいずれの投与群も差はみられず、また、握力検査および詳細な一般状態観察を含む検査において麻痺などの関連する変化はみられなかったことから、直線水路の第 1 試行の遊泳時間の変動は偶発的な変動であり、水泳能力に問題はないと判断された。

免疫組織化学的解析およびアポトーシスの検索

生後 21 日および 77 日の各ステージ各群 10 匹の雄子動物（各腹 1 または 2 匹の雄）の脳をブアン液に固定した。大脳の Bregma の後方約 -3.0 mm（生後 21 日）および 3.5 mm（生後 77 日）の 1 カ所で冠状断面を作製してパラフィン包埋し、3 μ m 厚の連続切片を作製した。

免疫組織化学的解析では、抗ウサギ Tbr2 抗体 (T box brain 2, rabbit IgG, 1:500, Abcam), 抗ウサギ Dcx (doublecortin, rabbit IgG, 1:1000, Abcam), 抗マウス GFAP 抗体 (glial fibrillary acidic protein, clone GA5, mouse IgG1, 1:200, Millipore Corporation), 抗マウス Reelin 抗体 (clone G10, mouse IgG1, 1:1,000; Novus Biologicals, Inc.), 抗マウス NeuN 抗体 (neuron-specific nuclear protein, clone A60, mouse IgG1, 1:100, Millipore Corporation, Temecula) および抗マウス proliferating cell nuclear antigen 抗体 (PCNA, clone PC10, mouse IgG2a, 1:200, Dako) と一晩 (4°C) 反応させ、3,3'-diaminobenzidine/H₂O₂ 発色を用いて ABC 法 (Vector Laboratories Inc.) による免疫染色を行った。なお、Tbr2 についてはクエン酸緩衝液 (10 mM, pH 6.0) を用いて、オートクレーブ処理 (121 °C, 15 分) による抗原の賦活化処理を行った。

SGZ の前駆細胞はコリン性の投射を受けるためにアセチルコリン受容体を発現しており、コリン性の神経支配により海馬のニューロン新生が調節されていると考えられている (14)。そこで、SGZ のニューロン新生におけるコリン性の刺激の影響を検討するために、生後 21 日の子動物について抗ウサギ NACHR α 7 抗体 (nicotinic acetylcholine receptor alpha 7; rabbit IgG, 1:200; Abcam) および抗マウス NeuN 抗体の二重染色を実施した。NACHR α 7 は CPF の標的となることが報告されている (73)。なお、クエン酸緩衝液 (10 mM, pH 6.0) を用いて、

マイクロウェーブ処理（90 °C, 20 分）による抗原の賦活化処理を行った。NACHRa7 は 3,3'-diaminobenzidine/H₂O₂ 発色を用いて ABC 法（Elite ABC kit, Vector Laboratories Inc.）により, NeuN は Vector Red Alkaline Phosphate Substrate Kit I (Vector Laboratories)の発色で ABC 法（ABC-AP kit, Vector Laboratories Inc.）により行った。

海馬歯状回の SGZ におけるアポトーシスの評価については, TUNEL 法（Apop Tag[®] *in situ* apoptosis detection kit, Millipore Corporation）による検出を行った。

標本はヘマトキシリンにより対比染色を施した。

顆粒細胞の系譜である Dcx, Tbr2 および GFAP 陽性細胞数, TUNEL 陽性アポトーシス細胞数ならびに増殖細胞の指標である PCNA 陽性細胞数については SGZ における陽性細胞数の検索を左右について行った (Fig. 1-2)。GABA 性介在ニューロンに発現する分子の Reelin および成熟ニューロンの指標である NeuN については, 海馬歯状回門における陽性細胞数の検索を行った (Fig. 1-2)。SGZ におけるニューロン前駆細胞に対するコリン性の刺激の影響を検討するために, NACHRa7 陽性かつ NeuN 陰性の細胞の検索を行った (Fig. 1-2)。顆粒細胞層における NeuN 陽性細胞は postmitotic の顆粒細胞を示しており, SGZ における NeuN 陰性細胞はニューロン前駆細胞を示している (44)。細胞数の計測は両側の海馬について 100 倍の倍率で行った。

これらの解析は, 同じ個体（各ステージ各群 10 匹の雄子動物, 各腹 1 または 2 匹の雄）の標本を用いて実施した。

統計解析

母動物の体重, 摂餌量, ChE 活性およびホルモン測定データのデータは各個体の数値を統計解析に用いた。子動物の体重, 摂餌量, 器官重量, 行動解析の定量項目, 免疫組織化学的解析, ChE 活性およびホルモン測定データのデータは各腹（母動物）の平均値を統計解析に用いた。解析は, Bartlett 法により各群の等分散性の検定を行い, 等分散の場合は Dunnett 法, 不等分散の場合は Steel 法を用いて対照群と各投与群の差を検定した。

行動解析の頻度データは各個体の数値を用いて、Fisher の直接確率法により検定を行った。

結 果

母動物への影響

妊娠期間中は体重に有意な差は認められなかった (Table 3-3)。授乳期間中は分娩後 11 日に 14 および 70 ppm で有意な高値がみられたが、一過性の変動であった。摂餌量では、妊娠 14 日に 14 ppm, 17 日に 14 および 70 ppm, 20 日に 14 ppm で有意な高値がみられたが、いずれも軽微な変動であった (Table 3-4)。授乳期間中での有意な差はみられなかった。

投与期間中（妊娠 10 日から分娩後 21 日まで）の母動物の CPF 摂取量は、2.8 ppm で 0.36 mg/kg body weight/day, 14 ppm で 1.86 mg/kg body weight/day, 70 ppm で 9.18 mg/kg body weight/day であった。

子動物の体重、摂餌量、外表分化および器官重量

体重では 14 ppm の雄で生後 7 および 21 日、雌で生後 4 および 17 日に有意な高値が認められたが、2.8 および 70 ppm では有意差はみられなかった (Table 3-5)。摂餌量では離乳（生後 21 日）から生後 77 日まで有意な差はみられなかった (Fig. 3-1)。外表分化では、14 ppm で切歯萌出、2.8 および 14 ppm で眼瞼開裂の早期化がみられたが、70 ppm ではいずれの項目でも有意な差はみられなかった (Table 3-6)。器官重量では生後 21 および 77 日のいずれにおいても有意な差は認められなかった (Table 3-7)。

母動物および子動物の ChE 活性

母動物（分娩後 21 日）では、赤血球中 ChE 活性の有意な低値が 2.8 ppm 以上の投与群、血漿中 ChE 活性の有意な低値が 14 ppm 以上の投与群、脳中 ChE 活性の有意な低値が 70 ppm にみられた (Fig. 3-2)。生後 21 日の子動物では、血漿中 ChE 活性の有意な低値が 14 ppm 以上の投与群、赤血球中および脳中 ChE 活性の有意な低値が 70 ppm にみられた (Fig. 3-2)。生後 77 日の子動物では、血漿、赤血球および脳中 ChE 活性のいずれにおいても有意な差はみ

られなかった (Fig. 3-2)。

血漿中甲状腺関連ホルモン濃度

母動物では T_3 の有意な高値が 14 ppm のみにみられた。 T_4 および TSH では有意な差はみられなかった (Fig. 3-3)。生後 21 および 77 日の子動物では、 T_3 , T_4 および TSH のいずれにおいても対照群と投与群の間に差はみられなかった (Fig. 3-3)。

行動学的解析

自発運動量測定では、14 ppm の雄において 0-10 分での有意な増加および 40-50 分での有意な減少がみられた (Table 3-8)。2.8 および 70 ppm では有意な差はみられなかった。

複式水 T 迷路検査では、2.8 ppm の雄において 2 日目の第 2 試行のエラー回数の有意な減少がみられた (Table 3-9, 3-10)。14 および 70 ppm では有意な差はみられなかった。

初期行動発達検査 (Table 3-11)、握力測定 (Table 3-12)、詳細な一般状態観察 (Table 3-13, 3-14, 3-15) および機能検査 (Table 3-16) では、対照群と投与群の間に差はみられなかった。

SGZ におけるアポトーシスおよび細胞増殖

生後 21 日では SGZ の PCNA 陽性細胞の有意な減少が 70 ppm にみられた。TUNEL 陽性アポトーシス細胞では対照群と投与群の間に差はみられなかった。生後 77 日では SGZ の TUNEL 陽性アポトーシス細胞および PCNA 陽性細胞のいずれも対照群と投与群の間に差はみられなかった (Fig. 3-4)。

SGZ における免疫組織化学的解析

生後 21 日では SGZ の Tbr2 陽性細胞数の有意な減少が 70 ppm にみられた。Dcx および GFAP 陽性細胞数については、対照群と投与群の間に差はみられなかった。生後 77 日では SGZ の Tbr2, Dcx および GFAP 陽性細胞数のいずれにおいても対照群と投与群の間に差はみ

られなかった(Fig. 3-5)。

海馬歯状回門における免疫組織化学的解析

生後 21 および 77 日のいずれにおいても海馬歯状回門中の Reelin および NeuN 陽性細胞数では対照群と投与群の間に差はみられなかった (Fig. 3-6)。

SGZ における二重染色による免疫組織化学的解析

NAChR α 7 陽性/NeuN 陰性細胞は, SGZ にまばらに観察された (Fig. 3-7)。SGZ の NAChR α 7 陽性/NeuN 陰性細胞に対照群と投与群の間に差はみられなかった (Fig. 3-7)。

考 察

本章では、コリンエステラーゼ阻害作用のある CPF を用いて検討を行った。

本実験の低用量の 2.8 ppm における母動物の CPF の摂取量は 0.36 mg/kg/day であり、これは日本における妊娠女性の食品からの CPF の推定国民平均摂取量 (0.00066 mg/kg/day) の約 500 倍に相当する (61)。母動物では 2.8 ppm 以上で赤血球中, 14 ppm 以上で血漿中, 70 ppm で脳内の ChE 活性が低下した。しかし、母動物の体重および摂餌量に明らかな変化はみられず, 14 および 70 ppm で軽度な一過性の体重増加がみられたのみであった。子動物では低および中用量の両方またはいずれかで、体重増加と外表分化の早期化がみられたが、用量反応性のない変化であった。子動物では 70 ppm で生後 21 日に脳内および赤血球中の ChE 活性の低下がみられ、同時に海馬歯状回の SGZ では PCNA および Tbr2 陽性細胞の減少が確認され、CPF による ChE 活性阻害とニューロン新生への影響の関連性を示唆するものと考えられた。行動学的解析では、自発運動量および複式水 T 迷路検査で変動がみられたものの、いずれも用量反応性のない変化であった。

ChE 活性では、予想通り、血漿中、赤血球中および脳内の ChE 活性の低下がみられたが、血漿中の ChE 活性阻害はその毒性学的意義は低いと考えられている (61)。したがって、ChE 活性阻害に関して言えば、母動物では赤血球中で低下のみられた 2.8 ppm (0.36 mg/kg/day) , 子動物では 70 ppm (9.18 mg/kg/day) が毒性用量と考えられた。過去の発達神経毒性試験では、0.3 mg/kg/day の用量で投与した母動物において同様に赤血球中の ChE 活性の低下が報告されている (53)。

70 ppm の CPF の発達期曝露は生後 21 日に SGZ において PCNA および Tbr2 陽性細胞の減少を引き起こした。Type-2 前駆細胞は Tbr2 を発現することが知られている (39)。したがって、PCNA および Tbr2 陽性細胞の減少は増殖性の Type-2 前駆細胞の減少を示唆するものと考えられた。ニューロン新生に及ぼす甲状腺ホルモンの影響の可能性については、母動物で用量反応性のない T_3 の増加がみられたのみで毒性学的意義のない変動であった。一方、

SGZ のニューロン前駆細胞および新生ニューロンはコリン性の投射を受け、アセチルコリン受容体を発現しており、海馬のニューロン新生がコリン性の神経支配によって制御されているという報告がなされている (14)。そこで、CPF が ChE 活性阻害を通じて海馬のニューロン新生に影響を及ぼし、増殖性の Type-2 前駆細胞の減少を引き起こしているかどうかを検討するため、NACHR α 7 と NeuN の二重染色を実施した。しかし、NACHR α 7 陽性/NeuN 陰性細胞に変化はみられず、ニューロン前駆細胞の NACHR α 7 の発現に影響がないことが示唆された。したがって、SGZ における増殖性の Type-2 前駆細胞の減少は ChE 活性阻害によって引き起こされたコリン性の刺激の抑制とは関連がないと推測された。一方、Slotkin らは CPF を投与した新生子ラットにおいて DNA 合成が減少することおよび脳内の細胞周期とアポトーシスに関連する遺伝子の発現が変化すること (75, 84) を報告しており、これらは ChE 活性阻害がなくても観察されたことから、コリン性の刺激の活性と関連はなく直接的な CPF の影響であると結論付けている。したがって、増殖性の Type-2 前駆細胞の減少は、CPF の DNA 合成および脳内の細胞周期に対する直接的な影響によって引き起こされたと推測された。

本実験では前駆細胞に対する CPF 曝露の影響は生後 77 日には消失し、曝露期間に限定された影響であった。また、海馬歯状回門の存在ニューロンを示す Reelin および NeuN 陽性細胞の分布では生後 21 および 77 日のいずれにおいても変化はみられなかったが、これらの細胞は著者らがこれまでに実施した発達期甲状腺機能低下および発達期アクリルアミド投与で異常なニューロン新生とニューロン移動を示した時に増加を示しており、対照的な結果であった (55, 65)。

本試験ではニューロン新生に及ぼす CPF の影響がみられたが、これまでにアメリカ環境保護局のガイドラインに従って実施された発達神経毒性試験では、通常の病理組織的検索に加え形態計測も行っているが発達神経毒性を示す変化はみられておらず (53)、対照的な結果となっている。このことは、本実験で用いたような脳を構成する細胞の機能的異常の機序に基づいた病理組織学的パラメーターは短期で感受性の高い発達神経毒性スクリーニン

グ系の確立に有用であることを示していると考えられる。

本実験では用量反応性のない子動物の体重の増加が 14 ppm に、外表分化の早期化が 2.8 および 14 ppm (0.36 および 1.86 mg/kg/day) にみられた。Lassiter と Brimijoin (46) は、母動物を介した CPF の曝露で、2.5 mg/kg/day の雄の子動物が体重増加を示すことを報告している。CPF を含む有機リンの若齢期の曝露は成長後に糖尿病や肥満を引き起こすと考えられている (74)。しかしながら、本実験でみられた体重および外表分化の変化は散発性で軽度であり、70 ppm では変化はみられていないことから、CPF 投与に関連した変化ではないと考えられた。

本実験では、自発運動量の軽微な変化が 14 ppm の雄にみられた。Aldridge らは新生子期に CPF を曝露させたラットにおいて成熟後に不安関連行動および自発運動量に変化が生じることを報告しており、セロトニン欠乏のうつ病モデル動物に類似していることを指摘している (5)。しかしながら、本実験でみられた自発運動量の変化は散発性で軽度であり、70 ppm では変化はみられていないことから、CPF 投与に関連した変化ではないと考えられた。

甲状腺関連ホルモンでは CPF の発達期曝露による子動物への明らかな影響はみられなかった。一方、マウスでは生後の CPF の発達期曝露によって成長後に血清中の T_4 レベルが減少することが報告されている (19)。この結果の違いは、投与経路が本実験では混餌であるのに対し、上述のマウス実験では皮下注射であり CPF の影響がより強く出たものと考えられた。

小 括

第3章では、アセチルコリンエステラーゼ阻害作用を有する有機リン系殺虫剤であるクロルピリフォス（CPF）を用いて検討を行った。

CPFの発達期曝露は、9.18 mg/kg/day に相当する 70 ppm において可逆的ながら子動物の海馬歯状回の SGZ おける増殖性の Type-2 前駆細胞の減少を引き起こした。これは日本における妊娠女性の食品からの CPF の推定国民平均摂取量 (0.00066 mg/kg/day) の約 12,000-14,000 倍に相当する。一方、ニューロン前駆細胞の NChR α 7 の発現に変動はみられなかったことから、CPF によるニューロン新生への影響はコリン性の刺激を介したものではないと考えられた。母動物に対する CPF の最小毒性量は赤血球中の ChE 活性の低下がみられた 2.8 ppm (0.36 mg/kg/day) と考えられた。子動物については、70 ppm で増殖性の Type-2 前駆細胞の減少と赤血球中および脳内で低下 ChE 活性のみられたことから、CPF の子動物に対する無毒性量は 14 ppm (1.86 mg/kg/day) と考えられた。日本における妊娠女性の食品からの CPF の推定国民平均摂取量と比較すると、母動物の赤血球中 ChE 活性の低下に基づいて算出された最小毒性量は約 500 倍高く、子動物の影響に基づいて算出された無毒性量は約 2800 倍高い。以上より、CPF のラットを用いた発達期曝露は子動物の海馬歯状回の中期分化を標的とした可逆的なニューロン新生への影響を示すことが明らかとなった。本研究の実施により、今回新たに CPF によるニューロン新生の中期分化を標的とした可逆性の発達神経毒性が見出されたことから、コリンエステラーゼ阻害剤による発達神経毒性の解析には、曝露終了時と成熟後での海馬歯状回顆粒細胞系譜と GABA 性介在ニューロンの変動解析が有効であることが示された。

上述の如く、行動学的解析では CPF 曝露の影響を明らかにすることはできなかったが、海馬歯状回の SGZ を観察では増殖性の Type-2 前駆細胞の減少が検出され、CPF の発達期曝露による影響が確認された。このことは、神経病理に特化した海馬歯状回 SGZ を観察は、従来の行動学的解析よりも感度の高い有用な解析手段あることを示すものと考えられた。

第4章

コリン作動性物質であるニコチンの発達期暴露による発達期暴露によるラット

海馬歯状回ニューロン新生に対する影響

緒 言

第4章では、妊娠期喫煙影響のリスク要因であるコリン作動性神経毒のニコチンを用いてラットに発達期暴露を行い、海馬歯状回におけるニューロン新生と介在ニューロンへの影響を検討した。

ニコチンはタバコの葉から得られるアルカロイドであり、タバコ煙の主要な構成成分である。ニコチンは強い急性毒性を持ち、ラットにおける LD₅₀（半数致死量）は単回静脈内投与で 1 mg/kg、単回経口投与で 50–60 mg/kg と報告されている（43）。しかし、社会的にニコチンで最も大きな問題となるのは慢性毒性である。ニコチンはニコチン性アセチルコリン受容体（NACHRs）を介して依存症を引き起こすことが知られている（10）。NACHR の活性化はアセチルコリンの放出を促し、さらに、ドパミン、GABA、セロトニン、ノルエピネフリンおよび β -エンドルフィンの放出も促進する（9）。したがって、発達期の脳ではニコチンによる様々な有害作用が懸念されている。母親を介したニコチン曝露が注意欠陥/多動性障害（Attention Deficit Hyperactivity Disorder: ADHD）、行為障害および反社会行動の原因となり得ることが報告されている（29, 82）。したがって、ニコチンの発達神経毒性に関する更なる研究が必要とされている。

本章では、コリン作動性神経毒であるニコチンの神経発達毒性の有無を明らかにし、その病理発生を基盤とした評価系を確立することを目的に、ニコチンを発達期曝露した際の、海馬ニューロン新生に対するニコチンの標的性や可逆性の有無を検討した。すなわち、ニコチンを妊娠期および授乳期に曝露した子動物中の歯状回 SGZ における顆粒細胞系譜の分布、増殖およびアポトーシスならびに海馬歯状回門における GABA 性介在ニューロンの分布を曝露終了時と成熟後で解析・評価した。

材料および方法

化学物質

ニコチン塩[(-)-ニコチン酒石酸水素酸塩, (-)-NIC hydrogen tartrate salt; CAS No. 65-31-6] は, Sigma-Aldrich Japan K.K. (Tokyo, Japan)より購入し, 実験に供した。ニコチン塩は苦味を有するため, 味を隠すため 1%の濃度でサッカリン (Sigma-Aldrich Japan K.K. Tokyo, Japan) を溶解させた蒸留水に溶解させて動物に与えた。対照群には同様に 1%サッカリン水に L-(+)- 酒石酸(L-(+)-tartaric acid, Sigma-Aldrich Japan K.K. Tokyo, Japan)に溶解させて動物に与えた。

供試動物

妊娠 1 日齢 (プラグ確認日を妊娠 0 日として起算) の Sprague-Dawley 系 SPF ラットを日本エスエルシーから購入し実験に供した。動物は温度 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 相対湿度 $45\pm 10\%$, 照明サイクル 12 時間明/12 時間暗条件の飼育室で, 床敷を入れたプラスチック製ケージに 1 匹ずつ収容し, 基礎飼料 MF (オリエンタル酵母工業株式会社, 東京) および飲料水を自由に摂取させた。分娩後は母子ともに同一ケージに収容し, 生後 21 日 (出生日を生後 0 日として起算) の離乳まで, 同様に基礎飼料および飲料水を自由に摂取させた。全ての母動物は妊娠 1-6 日は 1%サッカリン水を与えた。妊娠 6 日から分娩後 21 日までは後述の被験飲料水 (ニコチン塩水) を与えた。離乳後の子動物は基礎飼料 MF および水道水を自由に摂取させた。

全ての動物実験計画は実験施設 (東京農工大学) の動物実験委員会の承認を受け, 全ての動物実験操作は「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(日本学術会議, 平成 18 年 6 月 1 日) を遵守し, 実験施設の標準操作手順書に準拠して実施した。

実験デザイン

予備実験

Liu らの報告 (47) を参考に用量設定のための実験を行った。投与量は 0 (100 ppm 酒石酸), 50 および 100 ppm とし, 1 群 3 匹の妊娠ラットに妊娠 6 日から分娩後 21 日までニコチン塩を 1% のサッカリンを添加した飲料水に溶解させて摂取させた。その結果, 100 ppm では子動物の強い体重増加抑制と母動物の強い体重, 摂餌量および摂水量の減少がみられた。50 ppm では子動物の軽度な体重増加抑制と母動物の軽度な体重, 摂餌量および摂水量の減少がみられた。したがって, 軽度な毒性変化が認められた 50 ppm が本実験の高用量とすべきと考えられた。

本実験

予備実験の結果を基に投与量を 0 (50 ppm 酒石酸), 2, 10 および 50 ppm の 4 群に設定し, 1 群当たり 12 匹の妊娠ラットに妊娠 6 日から分娩後 21 日までニコチン塩を 1% のサッカリンを添加した飲料水に溶解させて摂取させた。しかし, 未分娩動物がみられ, 妊娠 25 日に剖検を行い, 着床痕がみられなかったことから, 未分娩動物については評価から除外した。その結果, 各群の母動物数は 0 ppm が 9 例, 2 ppm が 8 例, 10 ppm が 10 例および 50 ppm が 12 例であった。

母動物は, 3-4 日に 1 回の頻度で体重, 摂餌量および摂水量を測定した。生後 4 日に, 1 腹雌雄各 4 匹になるよう無作為に選抜し子数の調整を行った。出生子の子数調整および剖検時の子動物については Table 4-1 に概要を示した。子動物は, 体重を授乳期間中は 3-4 日に 1 回, 離乳後は週 1 回, 摂餌量を離乳後に週 1 回の頻度で測定した。生後 21 日に各腹雌雄各 2 匹 (各群雌雄各 16-24 匹) を選抜して剖検し, 免疫組織化学的解析 (各群雌雄各 10-12 匹), アポトーシスの検索および real-timeRT-PCR 測定 (各群雌雄各 6 匹) に供した。残りの各腹雌雄各 2 匹は生後 77 日まで継続飼育し, 基礎飼料 MF および水道水を自由に摂取させた。生後 77 日に残りの各腹雌雄各 2 匹 (各群雌雄各 16-24 匹) を剖検し, 免疫組織化学的解析およびアポトーシスの検索 (各群雌雄各 10-12 匹) に供した。

性周期におけるステロイドホルモンの周期的変動によりニューロン新生が影響を受けることが報告されていることから (58), 雌の生後 21 および 77 日の試料は保存のみとし, 以

降の解析は実施しなかった。

生後 21 および 77 日のいずれの剖検においても、脳重量を測定した。全ての動物はエーテル麻酔下で腹大動脈切断による放血致死により安楽死させた。

尿中コチニン濃度測定

尿中のコチニン濃度を測定するために分娩後 19 日（生後 19 日）に母動物および子動物から新鮮尿サンプルを採取した。解析は、母動物およびその子動物の両方からサンプルを採取できた各群 5 例を対象とした。10 μ L の尿サンプルを cotinine direct ELISA kit (Calbiotech Inc., Spring Valley, CA, USA)を用いて反応させ、マイクロプレートリーダー Synergy™ HT (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)を用いて 450 nm の波長で吸光度を測定した。

ホルモン測定

全ての母動物および各群 8 例の雄子動物（各腹 1 匹の雄）について生後 21 および 77 日にエーテル麻酔下で開腹し、腹大動脈から血液を採取した。遠心分離（1,600 \times g, 10 分）により、血清試料を採取し、thyroid-stimulating hormone (TSH), triiodothyronine (T_3)および thyroxine (T_4)を DPC IMMULYZE (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Deerfield, IL, USA)を用いて化学発光酵素免疫測定法（CLEIA 法, chemiluminescent enzyme immunoassay method）により測定した。

免疫組織化学的解析およびアポトーシスの検索

生後 21 日および 77 日の各ステージ各群 10 または 12 匹の雄子動物（各腹 1 または 2 匹の雄）の脳をブアン液に固定した。大脳の Bregma の後方約-3.0 mm（生後 21 日）および 3.5 mm（生後 77 日）の 1 カ所で冠状断面を作製してパラフィン包埋し、3 μ m 厚の連続切片を作製した。

抗ウサギ Dcx 抗体 (doublecortin, rabbit IgG, 1:1000, Abcam), 抗ウサギ Tbr2 抗体 (T box

brain 2, rabbit IgG, 1:500, Abcam), 抗マウス GFAP 抗体 (glial fibrillary acidic protein, clone GA5, mouse IgG1, 1:200, Millipore Corporation), 抗ウサギ TUC4 抗体 (Dihydropyrimidinase like 3, rabbit IgG, 1:1000, Millipore Corporation, Temecula) , 抗マウス Reelin 抗体 (clone G10, mouse IgG1, 1:1,000; Novus Biologicals, Inc.) , 抗マウス NeuN 抗体 (neuron-specific nuclear protein, clone A60, mouse IgG1, 1:100, Millipore Corporation, Temecula) , 抗マウス GAD67 抗体 (glutamic acid decarboxylase 67, clone 1G10.2, mouse IgG2a, 1:50, Millipore Corporation) および抗マウス proliferating cell nuclear antigen 抗体 (PCNA, clone PC10, mouse IgG2a, 1:200, Dako) と一晩 (4°C) 反応させ, 3,3'-diaminobenzidine/H₂O₂ 発色を用いて ABC 法 (Vector Laboratories Inc.) による免疫染色を行った。なお, Tbr2 についてはクエン酸緩衝液 (10 mM, pH 6.0) を用いたオートクレーブ処理 (121 °C, 15 分) により抗原の賦活化処理を行った。

生後 21 日の子動物について抗ウサギ Dcx 抗体と抗ウサギ Tbr2 抗体, 抗ウサギ Dcx 抗体と抗ウサギ TUC4 抗体および抗ウサギ NACHR α 7 抗体 (nicotinic acetylcholine receptor alpha 7; rabbit IgG, 1:200; Abcam)と抗マウス NeuN 抗体による二重染色を実施した。なお, NACHR α 7 はクエン酸緩衝液 (10 mM, pH 6.0) を用いたマイクロウェーブ処理 (90 °C, 20 分) により抗原の賦活化処理を行った。Tbr2, TUC4 および NACHR α 7 は 3,3'-diaminobenzidine/H₂O₂ 発色を用いて ABC 法 (Elite ABC kit, Vector Laboratories Inc.) により, Dcx および NeuN は Vector Red Alkaline Phosphate Substrate Kit I (Vector Laboratories) の発色で ABC 法 (ABC-AP kit, Vector Laboratories Inc.) により行った。

海馬歯状回の SGZ におけるアポトーシスの評価については, TUNEL 法 (Apop Tag[®] *in situ* apoptosis detection kit, Millipore Corporation) による検出を行った。

標本はヘマトキシリンにより対比染色を施した。

顆粒細胞の系譜である Dcx, TUC4, Tbr2 および GFAP 陽性細胞数, TUNEL 陽性アポトーシス細胞数ならびに増殖細胞の指標である PCNA 陽性細胞数については SGZ における陽性細胞数の検索を行った (Fig. 1-2)。

成熟後の顆粒細胞の検索については顆粒細胞層における陽性細胞数の検索を行った。

GABA 性介在ニューロンに発現する分子の Reelin および成熟ニューロンの指標である NeuN および GAD67 については、海馬歯状回門における陽性細胞数の検索を行った。

NACHR $\alpha 7$ はニコチンの標的となることが報告されている (73)。したがって、SGZ におけるニューロン前駆細胞に対するコリン性の刺激の影響を検討するために、NACHR $\alpha 7$ 陽性かつ NeuN 陰性の細胞の検索を行った。顆粒細胞層における NeuN 陽性細胞は postmitotic の顆粒細胞を示しており、SGZ における NeuN 陰性細胞はニューロン前駆細胞を示している (44)。細胞数の計測は両側の海馬について 100 倍の倍率で行った。

これらの解析は、同じ個体(各ステージ各群 10-12 匹の雄子動物、各腹 1 または 2 匹の雄)の標本を用いて実施した。

Real-time RT-PCR 解析

生後 21 日の剖検で得られた雄子動物 (各群 6 例) の海馬歯状回をメタカン固定液で固定した (4 °C, 8 時間) (71) 後、海馬を摘出し、-80 °C でエタノール中に保存した。Table 4-2 に示した遺伝子について、海馬組織中の mRNA 発現の定量解析を実施した。*Chrna7* および *Chrn2* はニコチン性アセチルコリン受容体のサブタイプをコードする遺伝子、*Dcx* および *Dpysl3* はニューロンの分化ステージ指標分子をコードする遺伝子、*Pcna* は細胞増殖指標分子をコードする遺伝子、*Reln* は Reelin をコードする遺伝子である。

海馬組織から RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて total RNA を抽出した。得られた 2 μ g total RNA について cDNA を合成した。PCR 反応は SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) を用い、Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems Inc.) にて、製造元のプロトコールに従って実施した。用いたプライマー (Table 4-2) は、Primer Express software (Version 3.0; Applied Biosystems Japan Ltd.)を用いて設計した。各遺伝子の mRNA 発現量は対照群での発現値に対する相対値として求め、内因性コントロールとして beta actin (*Actb*) gene の検量線を求め、 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method (48) にて算出した。

統計解析

母動物の体重, 摂餌量, 摂水量, 尿中コチニン濃度およびホルモン測定データのデータは各個体の数値を統計解析に用いた。子動物の体重, 摂餌量, 摂水量, 尿中コチニン濃度, 免疫組織化学的解析, real-time RT-PCR およびホルモン測定データのデータは各腹（母動物）の平均値を統計解析に用いた。解析は, Bartlett 法により各群の等分散性の検定を行い, 等分散の場合は Dunnett 法, 不等分散の場合は Steel 法を用いて対照群と各投与群の差を検定した。

結 果

母動物への影響

体重では 50 ppm で妊娠 19 日から分娩後 21 日まで有意な低値がみられた (Fig. 4-1)。摂餌量では 50 ppm で妊娠 7 日から分娩後 21 日まで低値を示し、多くの時点で有意差も認められた。なお、2 ppm で分娩後 1 日に有意な低値がみられたが、用量反応性のない変化であり、一過性の変動であった (Fig. 4-1)。摂水量では 10 および 50 ppm で妊娠 7 日から分娩後 21 日まで低値を示し、50 ppm では多くの時点で、10 ppm では散発性に有意差が認められた (Fig. 4-1)。

投与期間中(妊娠 6 日から分娩後 21 日まで)の母動物のニコチン塩摂取量は 2 ppm で 0.26 mg/kg body weight/day, 10 ppm で 1.31 mg/kg body weight/day, 50 ppm で 5.66 mg/kg body weight/day であり、ニコチンフリー体に換算した摂取量は 2 ppm で 0.091 mg/kg body weight/day, 10 ppm で 0.46 mg/kg body weight/day, 50 ppm で 1.98 mg/kg body weight/day であった。

子動物の体重、摂餌量および脳重量

体重では 50 ppm の雌雄で生後からほとんどの時点で有意な低値がみられた。2 および 10 ppm では雄で有意な低値が散見された (Fig. 4-2)。

摂餌量では 2 ppm 以上の投与群で低値がみられ、雄では多くの測定時点、雌では散発性に有意差も認められた (Fig. 4-2)。

脳重量では生後 21 日に絶対重量の有意な低値と相対重量の有意な高値が 50 ppm の雌雄にみられた。生後 77 日では絶対重量の有意な低値が 50 ppm の雌雄にみられた (Table 4-3)。

母動物および子動物の尿中コチニン濃度

分娩後 19 日(生後 19 日)における母動物および子動物の尿中コチニン濃度は、用量に応

じた有意な増加が各ニコチン投与群で認められた (Table 4-4)。

血清中甲状腺関連ホルモン濃度

母動物では T_3 , T_4 および TSH のいずれにも有意な差はみられなかった (Fig. 4-3)。子動物では、生後 77 日において血清中 T_4 濃度の有意な増加が 2 ppm 以上の投与群にみられた。他に、 T_3 濃度の有意な増加が 10 ppm でみられたが、50 および 2 ppm では変化はみられなかった (Fig. 4-3)。

SGZ における顆粒細胞の分化系譜

生後 21 日では SGZ の Dcx 陽性細胞数の有意な増加が 10 および 50 ppm にみられた。TUC4 陽性細胞数では 2 ppm で有意な減少がみられた。10 および 50 ppm では減少傾向がみられたが、有意差は認められなかった。Tbr2 および GFAP 陽性細胞数については、対照群と投与群の間に差はみられなかった (Fig. 4-4)。

生後 77 日では SGZ の Dcx, TUC4, Tbr2 および GFAP 陽性細胞数のいずれにおいても対照群と投与群の間に差はみられなかった (Fig. 4-4)。

さらに、これらの変動をより詳細に検索するために実施した二重染色では、TUC4 と Dcx の二重染色において TUC4 陽性/Dcx 陽性細胞および TUC4 陽性/Dcx 陰性細胞の有意な減少と TUC4 陰性/Dcx 陽性細胞の有意な増加が 2 および 10 ppm にみられた。50 ppm でも同様の傾向がみられたが、有意差は認められなかった。Tbr2 と Dcx の二重染色では、Tbr24 陰性/Dcx 陽性細胞の有意な増加が 50 ppm にみられた (Fig. 4-5)。

SGZ におけるアポトーシスおよび細胞増殖と顆粒細胞層の成熟ニューロン

生後 21 および 77 日のいずれにおいても、SGZ の TUNEL 陽性アポトーシス細胞および PCNA 陽性細胞に変動はみられず、顆粒細胞層の NeuN 陽性成熟ニューロンについても変化はみられなかった (Fig. 4-6)。

海馬歯状回門における免疫組織化学的解析

生後 21 日では海馬歯状回門中の GAD67 陽性細胞数の有意な増加が 10 および 50 ppm, NeuN 陽性細胞数の有意な増加が 50 ppm にみられた (Fig. 4-7)。

生後 77 日では GAD67, Reelin および NeuN 陽性細胞数のいずれにおいても対照群と投与群の間に差はみられなかった (Fig. 4-7)。

SGZ における二重染色による免疫組織化学的解析

SGZ の NACHR α 7 陽性/NeuN 陰性細胞に対照群と投与群の間に差はみられなかった (Fig. 4-8)。

Real-time RT-PCR 解析

生後 21 日における子動物の海馬歯状回の *Chrna7*, *Chrn2*, *Dcx*, *Dpysl3*, *Pcna* および *Reln* の mRNA レベルを real-time RT-PCR により解析したが, いずれも転写産物レベルの変動はみられなかった (Table 4-5)。

考 察

本章では、妊娠期喫煙影響のリスク要因であるコリン作動性神経毒ニコチンを用いて検討を行った。

本実験では、母動物において 50 ppm で体重および摂餌量の減少、10 ppm 以上で摂水量の減少がみられた。子動物では体重の減少が 50 ppm の雌雄でみられ、2 および 10 ppm の雄でも散見された。また、摂餌量の減少が 2 ppm 以上の雌雄でみられ、脳重量の低値が生後 21 および 77 日に 50 ppm の雄でみられた。母動物および子動物の同様の变化は妊娠中にニコチンを曝露した実験でも報告されている (50)。第一章で検討したように発達期に低たん白食を与えた発達期低栄養の子動物では、生後 77 日まで継続する体重増加抑制と脳重量の低値がみられるものの、ニューロン新生には影響はみられなかった。したがって、ニコチンの発達期曝露によるニューロン新生への影響は発達期低栄養による二次的な影響ではないと考えられた。

Dcx は type-2b, type-3 前駆細胞および未成熟ニューロンに (44) , Tbr2 は type-2 前駆細胞に (39) , TUC4 は未成熟ニューロンに (45) , それぞれ発現する分子である。本実験では、生後 21 日に Dcx 陽性細胞の増加が 10 ppm 以上に、TUC4 陽性細胞の減少が 2 ppm にみられ、二重染色を用いた検討では未成熟ニューロンの減少を示唆する TUC4 陽性/Dcx 陽性または陰性細胞の減少が 2 および 10 ppm にみられた。また、同群では TUC4 陰性/Dcx 陽性細胞の増加もみられた。さらに、Tbr2 陰性/Dcx 陽性細胞の増加が 50 ppm にみられたが、Tbr2 陽性細胞に変動はみられなかった。これらの変化を総括すると Tbr2 陽性細胞に変化はみられていないことから、2 および 10 ppm の TUC4 陰性/Dcx 陽性細胞の増加ならびに 50 ppm の Tbr2 陰性/Dcx 陽性細胞の増加は type-3 前駆細胞の増加を示唆する変化と考えられた。また、SGZ における TUNEL 陽性アポトーシス細胞および PCNA 陽性増殖細胞に変動はなく、顆粒細胞層の NeuN 陽性細胞数にも変動はなかったことから、type-3 前駆細胞の増加および未成熟ニューロンの減少は、type-3 前駆細胞から未成熟ニューロンへの分化の遅延による変化である

と推測された。上述の如く、これらの変化は用量反応性が明確ではなかったが、同様の変化がニコチンを成獣ラットに処理した実験で報告されており、用量反応性のない未成熟ニューロンの減少を示す歯状回の発達遅延がみられている (1)

歯状回門のニューロンでは GAD67 陽性 GABA 性介在ニューロンと NeuN 陽性ニューロンの増加が生後 21 日にみられた。げっ歯類の歯状回門では、GABA 性介在ニューロンは他のニューロンとほぼ同数存在することが知られている (40)。アクリルアミドを発達期曝露した実験では、子動物の歯状回門で Reelin 陽性介在ニューロンと NeuN 陽性ニューロンの増加がみられており (55)、発達期甲状腺機能低下モデルラットでは成長後における GAD67 陽性介在ニューロンの増加と離乳時における calbindin-D28K 陽性介在ニューロンの増加が確認されている (65)。これらの結果は、ニューロン新生への影響のタイプと強さによって、異なるタイプの介在ニューロンが影響を受けることを示すものと考えられた。したがって、ニコチンの発達期曝露では成熟型の GABA 性介在ニューロンが一時的に増加するものと判断された。しかしながら、顆粒細胞の移動と位置決定に重要な役割を果たす reelin については、その陽性細胞に変動はみられず、アクリルアミド発達期曝露 (55) や発達期甲状腺機能低下モデル (65) とは異なる結果であった。

コリン性の刺激は GABA 性介在ニューロンを活性化し、前駆細胞への GABA の放出を介して SGZ の前駆細胞の分化を調節することが明らかにされている (78)。したがって、GABA 性介在ニューロンの変動はコリン性の刺激に変動を与え、海馬顆粒細胞の分化に影響を与える可能性がある。また、歯状回の前駆細胞と新生ニューロンは様々なタイプのアセチルコリン受容体を発現しており (14)、特に NACHR α 7 がニコチンの標的となることが示されている (73)。しかしながら、顆粒層下帯における NACHR α 7 陽性/Neun 陰性前駆細胞に変動はみられず、real-time RT-PCR による *Chrna7* および *Chrn2* の mRNA 発現にも変動はみられなかったことから、本実験では SGZ の前駆細胞が有する NACHR への直接的な刺激は海馬顆粒細胞の変動に関与していないものと考えられた。

妊娠期における喫煙は児の甲状腺機能に影響を与えることが報告されている (62) が、喫

煙に関連した甲状腺への有害作用はニコチンによるものではないことが示されている (16)。

本実験では生後 21 日の子動物に明らかな影響は認められなかった。また、生後 77 日に T_4 の変動がみられたものの同時期にニューロン新生への影響はみられておらず、本実験ではニューロン新生の変化と甲状腺関連ホルモンは関連しないものと考えられた。

コチニンは哺乳類におけるニコチンの代謝物の中で主要な代謝物である (52)。妊娠女性の喫煙はその児の尿中コチニンおよびニコチン濃度を上昇させ (41)、母乳中のコチニンおよびニコチン濃度は母親の喫煙行動と比例することが報告されている (42)。本実験でも、子動物の尿中コチニン濃度が用量に応じて上昇し、ラットにおけるコチニンの胎盤および乳汁移行が確認された。

小 括

第4章では、コリン作動性神経毒ニコチンを用いて検討を行った。

ニコチンの発達期曝露は、可逆性ではあるもののラット子動物の海馬歯状回におけるニューロン新生の後期に影響を及ぼした。この影響は2 ppm 以上の子動物にみられたことから、本実験における子動物の最小毒性量は2 ppm (ニコチンフリー体換算で0.091mg/kg/day)であった。アメリカにおける一般的な喫煙者のニコチン摂取量は0.2 mg/kg/day であり、(59)、本実験の10 ppm に相当する。したがって、一般的な喫煙者は子の体重および海馬 SGZ の後期ニューロン新生と歯状回門の GABA 性介在ニューロンへの影響が懸念される。以上より、ニコチンのラットを用いた発達期曝露は、type-3 前駆細胞から未成熟ニューロンへの分化の遅延とそれに関連した成熟型の GABA 性介在ニューロンの増加を引き起こした。本研究の実施により、今回新たにニコチンによるニューロン新生後期の分化遅延を標的とした可逆性の発達神経毒性が見出されたことから、コリン作動性神経毒による発達神経毒性の解析には、曝露終了時と成熟後での海馬歯状回顆粒細胞系譜と GABA 性介在ニューロンの変動解析が有効であることが示された。

総合考察

本研究では、短期スクリーニングに適う発達神経毒性評価系の確立を目的として、ニューロン新生に着目し、神経病理学的解析に特化した評価法の検討を実施した。

現在、発達神経毒性を評価するためのガイドラインとして OECD の TG426 および EPA の OPPTS 870.6300 が発効され、評価に用いられているが、いずれも母動物および子動物を合わせると 700 匹以上のラットを使用し、評価に約 1 年を要する大規模な高次試験であることから、小規模で短期のスクリーニング評価系を確立する必要があると考えられている (17)。

第 1 章では、IUGR モデル (36, 86) を利用して発達期に低たん白食を母動物に与えることにより低栄養性の脳発達遅延の子動物を作出し、海馬歯状回でのニューロン新生への影響を検討した。その結果、母動物を介した発達期低栄養では子動物に生後 21 および 77 日のいずれにおいても海馬歯状回門における Reelin, Calb-D-28K および GAD67 陽性細胞の分布に影響はなく、NeuN 陽性ニューロンおよび SGZ における細胞増殖やアポトーシスにも変動はみられなかった。したがって、海馬歯状回のニューロン発達障害性に着目して発達期神経影響を評価するうえで、化学物質による脳作用と母体毒性を介した非特異的な低栄養性脳発達遅延の影響を弁別することが可能であることが明らかとなった。

第 2 章では、ドーパミン作動性ニューロン傷害性のパーキンソニズム様の症状を引き起こすことで知られる神経毒マンガンの発達期曝露を行い海馬 SGZ における細胞増殖とアポトーシスならびに顆粒細胞の系譜の検索と歯状回門における Reelin 産生介在ニューロンの分布の検索を行った。その結果、Mn の発達期曝露は SGZ の Dcx の発現分布に影響を及ぼすことが生後 21 日で確認された。Dcx は type-2b および type-3 神経前駆細胞ならびに未成熟ニューロンにおいて発現することが知られているが (44) , type-2 神経前駆細胞で発現を示す Tbr2 では陽性細胞数に変動はみられなかった (39) ことから、Dcx 陽性細胞数の増加は type-3 細胞または未熟顆粒細胞の増加を示唆するものと考えられた。海馬歯状回門では Reelin 陽性細胞の増加が生後 21 日で確認された。Reelin は GABA 性介在ニューロンから分

泌され, Dcx 陽性の未熟顆粒細胞の増加を引き起こすことが報告されている (63) ことから, マンガンの発達期曝露による Reelin 陽性細胞の増加は GABA 性介在ニューロンにおける Reelin の上方制御を反映しているものと考えられ, これが顆粒細胞の分化異常を示唆する Dcx 陽性細胞の増加を引き起こしているものと推測された。したがって, Mn の発達期曝露は子動物の海馬歯状回の後期分化を標的としたニューロン新生への影響を示すことが明らかとなった。

第3章では, アセチルコリンエステラーゼ阻害作用を有する有機リン系殺虫剤であるクロルピリフォスの発達期曝露を行い海馬 SGZ における細胞増殖とアポトーシスならびに顆粒細胞の系譜の検索と歯状回門における Reelin 産生介在ニューロンの分布の検索を行った。その結果, CPF の発達期曝露は生後 21 日に SGZ において PCNA および Tbr2 陽性細胞の減少を引き起こした。Type-2 前駆細胞は Tbr2 を発現することが知られている (39)。したがって, PCNA および Tbr2 陽性細胞の減少は増殖性の Type-2 前駆細胞の減少を示唆するものと考えられた。したがって, クロルピリフォスの発達期曝露は子動物の海馬歯状回の中期分化を標的としたニューロン新生への影響を示すことが明らかとなった。

第4章では, コリン作動性神経毒ニコチンの発達期曝露を行い, SGZ における顆粒細胞系譜の分布, 増殖およびアポトーシスならびに海馬歯状回門における GABA 性介在ニューロンを検索した。その結果, 生後 21 日に Dcx 陽性細胞の増加と TUC4 陽性細胞の減少, さらに二重染色では, TUC4 陽性/ Dcx 陽性または陰性細胞の減少と TUC4 陰性/Dcx 陽性細胞の増加ならびに Tbr2 陰性/ Dcx 陽性細胞の増加がみられたが, Tbr2 陽性細胞に変動はみられなかった。これらの変化を総括すると上述の変化は type-3 前駆細胞の増加と未成熟ニューロンの減少を示唆する変化であった。また, SGZ における TUNEL 陽性アポトーシス細胞および PCNA 陽性増殖細胞に変動はなく, 顆粒細胞層の NeuN 陽性細胞数にも変動はなかったことから, type-3 前駆細胞の増加および未成熟ニューロンの減少は, type-3 前駆細胞から未成熟ニューロンへの分化の遅延による変化であると考えられた。歯状回門のニューロンでは GAD67 陽性 GABA 性介在ニューロンと NeuN 陽性ニューロンの増加が生後 21 日にみられ

た。成熟型の GABA 性介在ニューロンが一時的に増加するものと判断された。したがって、ニコチンの発達期曝露は, type-3 前駆細胞から未成熟ニューロンへの分化の遅延とそれに関連した成熟型の GABA 性介在ニューロンの増加を引き起こすことが明らかとなった。

以上の如く, SGZ における顆粒細胞系譜の分布, 増殖およびアポトーシスの状況, ならびに海馬歯状回門における GABA 性介在ニューロンの分布検索により, ニューロン傷害性神経毒, コリンエステラーゼ阻害剤, コリン作動性神経毒を例にして、ニューロン新生を標的としたこれらの物質で今まで明らかではなかった発達神経毒性が明らかとなった。本研究で用いたアプローチにより, 発達神経毒性物質の標的細胞およびその分化時期を明らかにすると共に, 影響の可逆性・不可逆性を明らかにすることが可能となった。また, これらのエンドポイントは非特異的な全身性の低栄養性脳発達遅延の影響は受けないものであった。

今回の研究において, SGZ における PCNA の免疫染色による細胞増殖活性と TUNEL 法によるアポトーシス指数が低く, PND 77 では PND 21 よりさらに低い値を示した。細胞増殖活性やアポトーシス数を増加させるような毒性物質の場合は問題が生じないと考えられるが, 抑制する場合は, 今回用いた系では検出が難しいと考えられる。細胞増殖の状況を確認する解析法としては, チミジンのアナログである BrdU を投与して抗 BrdU 抗体を用いて免疫組織化学的解析を行うことにより BrdU を取り込んだ DNA 合成細胞を検出する方法がある。

しかしながら, この解析法では BrdU を投与しなければならない。さらに BrdU は DNA に取り込まれて遺伝子傷害性を示すため, BrdU 投与に起因するニューロン新生や他の測定系への影響が懸念される。そのため, 他の検査を行う動物と同じ動物を用いて検査をすることが困難であり, 正確な細胞増殖活性の情報を得るためには, BrdU を投与するサテライト群を設定する必要がある。一方, 脳をメタカーン固定した後に海馬歯状回をサンプリングし, RNA の定量的な発現解析を行う方法が開発されている (4)。メタカーン固定液は, 組織中の DNA, RNA やポリペプチドを高品質に保持し, 特定の組織部位でこれらの解析が可能であることが見出されている (4, 71)。よって, 本研究のクロルピリフォスやニコチンで検討し

た様に RNA 発現解析用にサテライト群の設定はしなければ行けないが、この方法を用いることで細胞増殖やアポトーシスに関わる複数の遺伝子の発現変動情報を得ることが可能となり、分子メカニズムも含めたより確度の高い結果が得られるものと考えられる。

重要なこととして、ニューロン新生の過程には顆粒細胞系譜の自己複製や増殖のみならず、神経突起伸展やシナプス新生、さらには顆粒細胞分化を支える介在ニューロンの髄鞘形成過程が含まれており、これらのすべての過程がニューロン新生傷害物質の標的となり得る。このことは、成熟動物に見出される軸索傷害物質、シナプス傷害物質、脱髄誘発物質などの神経毒性物質がニューロン新生をも標的とすることを示している。このことは、これらの神経毒性物質は発達神経毒性物質になり得ることを示唆しており、軸索傷害物質、シナプス傷害物質、脱髄誘発物質などの神経毒性物質のニューロン新生傷害性の検討が今後必要であると考えられる。

最後に、本研究の実施により、病理発生を基盤としたニューロン新生に関する神経病理学的解析に特化した評価方法は、発達神経毒性検索において重要なエンドポイントを示し、短期スクリーニングに適う新たな発達神経毒性評価法の確立に有用と考えられた。

結 論

本研究では、短期スクリーニングに適う発達神経毒性評価系の確立を目的として、神経病理学的解析に特化した評価法の検討を実施した。

発達期低たん白食を用いた低栄養性の脳発達遅延では、子動物の海馬歯状回のニューロン発達に影響はなく、化学物質による脳作用と母体毒性を介した非特異的な低栄養性脳発達遅延の影響を弁別することが可能であることが明らかとなった。

マンガンの発達期曝露では、子動物の海馬歯状回の type-3 細胞または未熟顆粒細胞の増加と GABA 性介在ニューロンにおける Reelin の上方制御、すなわち後期分化を標的としたニューロン新生への可逆的な影響が検出された。

クロルピリフォスの発達期曝露では、子動物の海馬歯状回の増殖性の Type-2 前駆細胞の減少、すなわち中期分化を標的としたニューロン新生への可逆的な影響が検出された。

ニコチンの発達期曝露では、子動物の海馬歯状回の type-3 前駆細胞の増加および未成熟ニューロンの減少、すなわち type-3 前駆細胞から未成熟ニューロンへの分化の遅延と GAD67 陽性 GABA 性介在ニューロンと NeuN 陽性ニューロンの増加、すなわち成熟型の GABA 性介在ニューロンの増加が検出され、いずれも可逆的であった。

以上、SGZ における顆粒細胞系譜の分布、増殖およびアポトーシスならびに海馬歯状回門における GABA 性介在ニューロンの分布の検索により、発達神経毒性物質の標的細胞およびその分化時期を明らかにすることが可能となった。また、これらのエンドポイントは非特異的な全身性の低栄養性脳発達遅延の影響は受けないものであった。さらに、曝露終了時と成熟後での 2 時点での検索により、影響の可逆性の有無が明らかとなった。今回の検討により、メカニズムの異なる神経毒性物質による新たな発達神経毒性が見出されたことで、神経毒性物質はニューロン新生を標的とした発達神経毒性物質になりうると考えられ、ニューロン新生評価手法は発達神経毒の新たなスクリーニング手法になり得ることが期待される。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究の遂行に際して終始御指導、御鞭撻を賜りました岐阜大学大学院連合獣医学研究科ならびに東京農工大学大学院農学研究院動物生命科学部門 渋谷 淳 教授に深謝いたします。

本稿作成に際し、懇篤な御指導、御助言を賜りました、東京農工大学大学院農学研究院動物生命科学部門 下田 実 教授、帯広畜産大学基礎獣医学研究部門病態予防学分野 古林 与志安 教授、岩手大学農学部獣医学科 御領 政信 教授、岐阜大学応用生物科学部応用生物科学科 柳井 徳磨 教授に謹んで深謝の意を表します。

研究に際し、東京農工大学大学院農学研究院動物生命科学部門 鈴木 和彦 講師、実験にご協力下さりました同教室諸氏の皆様および株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所諸氏の皆様に心から感謝いたします。

参考文献

1. Abrous DN, Adriani W, Montaron MF, Aurousseau C, Rougon G, Le Moal M, Piazza PV. Nicotine self-administration impairs hippocampal plasticity. *J Neurosci* 2002;22:3656-3662.
2. Abrous DN, Koehl M, Le Moal M. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev* 2005;85:523-69.
3. Akaike M, Kato N, Ohno H, Kobayashi T. Hyperactivity and spatial maze learning impairment of adult rats with temporary neonatal hypothyroidism. *Neurotoxicology and Teratology* 1991;13:317-22.
4. Akane H, Saito F, Yamanaka H, Shiraki A, Imatanaka N, Akahori Y, Morita R, Mitsumori K, Shibutani M. Methacarn as a whole brain fixative for gene and protein expression analyses of specific brain regions in rats. *J Toxicol Sci* 2013; 38: 431-443.
5. Aldridge JE, Levin ED, Seidler FJ, Slotkin TA. Developmental exposure of rats to chlorpyrifos leads to behavioral alterations in adulthood, involving serotonergic mechanisms and resembling animal models of depression. *Environmental Health Perspectives* 2005;113:527-31.
6. Altman J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 1962;135:1127-8.
7. Anyanwu EC. Childhood environmental neurotoxic exposures and experiences: major factors in antisocial behavior. *Int. J. Disabil. Hum. Dev.* 2007;6:231-5
8. Aschner JL, Aschner M. Nutritional aspects of manganese homeostasis. *Molecular Aspects of Medicine* 2005;26:353-62.
9. Benowitz NL. Clinical pharmacology of nicotine: implications for understanding, preventing, and treating tobacco addiction. *Clin Pharmacol Ther* 2008;83:531-541.
10. Benowitz NL. Nicotine addiction. *N Engl J Med* 2010;362:2295-2303.
11. Biel WC. Early age differences in maze performance in the albino rats. *J Genet Psychol* 1940;56:439-45.

12. Breslin WJ, Liberacki AB, Dittenber DA, Quast JF. Evaluation of the developmental and reproductive toxicity of chlorpyrifos in the rat. *Fundamental Applied Toxicology* 1996;29:119–30.]
13. Breunig JJ, Silbereis J, Vaccarino FM, Sestan N, Rakic P. Notch regulates cell fate and dendrite morphology of newborn neurons in the postnatal dentate gyrus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. of America* 2007;104:20558–63.
14. Bruel-Jungerman E, Lucassen PJ, Francis F. Cholinergic influences on cortical development and adult neurogenesis. *Behavioural Brain Research* 2011;221:379–88.
15. Comer CP, Norton S. Effects of perinatal methimazole exposure on a developmental test battery for neurobehavioral toxicity in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1982;63:133–41.
16. Colzani R, Fang SL, Alex S, Braverman LE. The effect of nicotine on thyroid function in rats. *Metabolism* 1998;47:154–157.
17. Crofton et al., 2011 Crofton KM, Mundy WR, Lein PJ, Bal-Price A, Coecke S, Seiler AE, et al. Developmental neurotoxicity testing: recommendations for developing alternative methods for the screening and prioritization of chemicals. *ALTEX* 2011;28:9–15.
18. D’Arcangelo G, Nakajima K, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Curran T. Reelin is a secreted glycoprotein recognized by the CR-50 monoclonal antibody. *Journal of Neuroscience* 1997;17:23–31.
19. De Angelis S, Tassinari R, Maranghi F, Eusepi A, Di Virgilio A, Chiarotti F, et al. Developmental exposure to chlorpyrifos induces alterations in thyroid and thyroid hormone levels without other toxicity signs in CD-1 mice. *Toxicological Science* 2009;108:311–9.
20. de Moura EG, Passos MC. Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism. *Biosci Rep* 2005;25:251–69.
21. Dobson AW, Erikson KM, Aschner M. Manganese neurotoxicity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2004;1012:115–28.

22. Dorman DC, Struve MF, Vitarella D, Byerly FL, Goetz J, Miller R. Neurotoxicity of manganese chloride in neonatal and adult CD rats following subchronic (21-day) high-dose oral exposure. *Journal of Applied Toxicology* 2000;20: 179–87.
23. Dorman DC, McElveen AM, Marshall MW, Parkinson CU, James RA, Struve MF, et al. Tissue manganese concentrations in lactating rats and their offspring following combined in utero and lactation exposure to inhaled manganese sulfate. *Toxicological Sciences* 2005;84:12–21.
24. Eaton DL, Daroff RB, Autrup H, Bridges J, Buffler P, Costa LG, et al. Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. *Critical Reviews in Toxicology* 2008;38(Suppl. 2):1–125.
25. Erikson KM, Syversen T, Aschner JL, Aschner M. Interactions between excessive manganese exposures and dietary iron-deficiency in neurodegeneration *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2005;19:415–21.
26. Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine* 1998;4:1313–7.
27. Frey BN, Andreazza AC, Nery FG, Martins MR, Quevedo J, Soares JC, et al. The role of hippocampus in the pathophysiology of bipolar disorder. *Behavioural Pharmacology* 2007;18:419–30.
28. Garcia SJ, Gellein K, Syversen T, Aschner M. A manganese-enhanced diet alters brain metals and transporters in the developing rat. *Toxicological Sciences* 2006;92:516–25.
29. Gatzke-Kopp LM, Beauchaine TP. Direct and passive prenatal nicotine exposure and the development of externalizing psychopathology. *Child Psychiatry Hum Dev* 2007;38:255–269.
30. Gerber GB, Léonard A, Hantson P. Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity of manganese compounds. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2002;42:25–34.

31. Giordano G, Pizzurro D, VanDeMark K, Guizzetti M, Costa LG. Manganese inhibits the ability of astrocytes to promote neuronal differentiation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2009;240:226–35.
32. Gong C, Wang TW, Huang HS, Parent JM. Reelin regulates neuronal progenitor migration in intact and epileptic hippocampus. *Journal of Neuroscience* 2007;27:1803–11.
33. Goodman JH, Gilbert ME. Modest thyroid hormone insufficiency during development induces a cellular malformation in the corpus callosum: a model of cortical dysplasia. *Endocrinology* 2007;148:2593–7.
34. Grandjean P, Landrigan PJ. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *Lancet*. 2006;368:2167-78
35. Hack I, Hellwig S, Junghans D, Brunne B, Bock HH, Zhao S, et al. Divergent roles of ApoER2 and Vldlr in the migration of cortical neurons. *Development* 2007;134:3883–91.
36. Haugaard CT, Bauer MK. Rodent models of intrauterine growth restriction. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* 2001;28:10–22.
37. Hirata-Koizumi M, Fujii S, Ono A, Hirose A, Imai T, Ogawa K, Ema M, Nishikawa A. Evaluation of the reproductive and developmental toxicity of aluminium ammonium sulfate in a two-generation study in rats. *Food Chem Toxicol.* 2011;49:1948–59
38. Hoareau C, Hazane F, Le Pen G, Krebs MO. Postnatal effect of embryonic neurogenesis disturbance on reelin level in organotypic cultures of rat hippocampus. *Brain Research* 2006;1097:43–51.
39. Hodge RD, Kowalczyk TD, Wolf SA, Encinas JM, Rippey C, Enikolopov G, et al. Intermediate progenitors in adult hippocampal neurogenesis: Tbr2 expression and coordinate regulation of neuronal output. *Journal of Neuroscience* 2008;28:3707–17.
40. Houser CR. Interneurons of the dentate gyrus: an overview of cell types, terminal fields and neurochemical identity. *Progress in Brain Research* 2007;163:217–32.

41. Kanamori K, Takahashi S, Fujita K. Effects of nicotine on embryos and fetuses of pregnant women who smoke: examination of single-sample urine and umbilical blood and state of smoking. *J Hum Nurs Stud* 2007;5:39-47 (Japanese).
42. Kanamori K, Takahashi S, Fujita K. Examination about nicotine density in the colostrum of the smoking pregnant woman. *J Hum Nurs Stud* 2008;6:17–26 (Japanese)
43. Karaconji IB. Facts about nicotine toxicity. *Arh Hig Rada Toksikol* 2005;56:363–371.
44. Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends in Neuroscience* 2004;27:447–52.
45. Knoth R, Singec I, Ditter M, Pantazis G, Capetian P, Meyer RP, et al. Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years. *PLoS One* 2010;5:e8809.
46. Lassiter TL, Brimijoin S. Rats gain excess weight after developmental exposure to the organophosphorothionate pesticide, chlorpyrifos. *Neurotoxicology and Teratology* 2008;30:125–30.
47. Liu JJ, Mohila CA, Gong Y, Govindarajan N, Onn SP. Chronic nicotine exposure during adolescence differentially influences calcium-binding proteins in rat anterior cingulate cortex. *Eur J Neurosci* 2005;22:2462–2474.
48. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta \Delta C_T}$ method. *Methods* 2001;25: 402–8.
49. Lussier AL, Caruncho HJ, Kalynchuk LE. Repeated exposure to corticosterone, but not restraint, decreases the number of reelin-positive cells in the adult rat hippocampus. *Neuroscience Letters* 2009;460:170–4.
50. Lv J, Mao C, Zhu L, Zhang H, Pengpeng H, Xu F, Liu Y, Zhang L, Xu Z. The effect of prenatal nicotine on expression of nicotine receptor subunits in the fetal brain. *Neurotoxicology* 2008;29:722–726.

51. Marín MC, De Tomás ME, Serres C, Mercuri O. Protein-energy malnutrition during gestation and lactation in rats affects growth rate, brain development and essential fatty acid metabolism. *J Nutr* 1995;125:1017–24.
52. Matta SG, Balfour DJ, Benowitz NL, Boyd RT, Buccafusco JJ, Caggiula AR, Craig CR, Collins AC, Damaj MI, Donny EC, Gardiner PS, Grady SR, Heberlein U, Leonard SS, Levin ED, Lukas RJ, Markou A, Marks MJ, McCallum SE, Parameswaran N, Perkins KA, Picciotto MR, Quik M, Rose JE, Rothenfluh A, Schafer WR, Stolerman IP, Tyndale RF, Wehner JM, Zirger JM. Guidelines on nicotine dose selection for in vivo research. *Psychopharmacology* 2007;190:269–319.
53. Maurissen JP, Hoberman AM, Garman RH, Hanley Jr TR. Lack of selective developmental neurotoxicity in rat pups from dams treated by gavage with chlorpyrifos. *Toxicological Science* 2000;57:250–63.
54. OECD, 2007; US EPA, 1998[OECD Test Guideline 426. OECD guideline for testing of chemicals. Developmental neurotoxicity study. Paris, France: Organisation for Economic Co-operation and Development; 2007. Available at <http://www.oecdbookshop.org/oecd/display.asp?K=5L4FG25MNKXS&lang=EN&sort=sortdate%2F&sf1=Title&st1=neurotoxicity&sf3=SubjectCode&st4=not+E4+or+E5+or+P5&sf4=SubVersionCode&ds=neurotoxicity%3B+All+Subjects%3B+&m=1&dc=4&plang=en>;
55. Ogawa B, Wang L, Ohishi T, Taniai E, Akane H, Suzuki K, et al. Reversible aberration of neurogenesis targeting late-stage progenitor cells in the hippocampal dentate gyrus of rat offspring after maternal exposure to acrylamide. *Archives of Toxicology* 2012;86:779–90.
56. Osanai S, Ozawa M, Hayashi H, Naito K, Fujimura T, Ota T, et al. Comparison of background data between Crj:CD (SD) IGS rats and Crj:WI (Gix/BRL/Han) IGS rats in reproductive/developmental toxicity studies. In: Maeda Y, Shibuya K, editors. *Biological*

- reference data on CD(SD)IGS rats—2002/2003. Tokyo: Best Printing Co. Ltd.; 2003. p. 141–51.
57. Passos MCF, Ramos CF, Moura EG. Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. *Nutr Res* 2000;20:1603–12.
 58. Pawluski, J. L., Brummelte, S., Barha, C. K., Crozier, T. M., and Galea, L. A. Effects of steroid hormones on neurogenesis in the hippocampus of the adult female rodent during the estrous cycle, pregnancy, lactation and aging. *Front. Neuroendocrinol.* 2009;30:343–357.
 59. Pérez-Stable EJ, Herrera B, Jacob P 3rd, Benowitz NL. Nicotine metabolism and intake in black and white smokers. *JAMA* 1998;280:152–156.
 60. Pesold C, Impagnatiello F, Pisu MG, Uzunov DP, Costa E, Guidotti A, et al. Reelin is preferentially expressed in neurons synthesizing gamma-aminobutyric acid in cortex and hippocampus of adult rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. of America* 1998;95:3221–6
 61. Pesticides Expert Committee, Food Safety Commission, Cabinet Office, Government of Japan. Evaluation report: chlorpyrifos. 3rd ed; May 2011.
 62. Pontikides N, Krassas GE Influence of cigarette smoking on thyroid function, goiter formation and autoimmune thyroid disorders. *Hormones* 2002;1:91–98.
 63. Pujadas L, Gruart A, Bosch C, Delgado L, Teixeira CM, Rossi D, et al. Reelin regulates postnatal neurogenesis and enhances spine hypertrophy and long-term potentiation. *Journal of Neuroscience* 2010;30:4636–49.
 64. Ribak CE, Korn MJ, Shan Z, Obenaus A. Dendritic growth cones and recurrent basal dendrites are typical features of newly generated dentate granule cells in the adult hippocampus. *Brain Research* 2004;1000: 195–9.
 65. Saegusa Y, Woo GH, Fujimoto H, Kemmochi S, Shimamoto K, Hirose M, et al. Sustained production of Reelin-expressing interneurons in the hippocampal dentate hilus after

- developmental exposure to anti-thyroid agents in rats. *Reproductive Toxicology* 2010;29:407–14.
66. Sato N, Hatakeyama S, Shimizu N, Hikima A, Aoki J, Endo K. MR Evaluation of the Hippocampus in Patients with Congenital Malformations of the Brain. *Am J Neuroradiol* 2001;22:389–93
67. Schoonover CM, Seibel MM, Jolson DM, Stack MJ, Rahman RJ, Jones SA, et al. Thyroid hormone regulates oligodendrocyte accumulation in developing rat brain white matter tracts. *Endocrinology* 2004;145:5013–20.
68. Scotti AL, Herrmann G. Reelin immunoreactivity in dissociated cultures of the postnatal hippocampus. *Brain Research* 2002;924:209–18.
69. Seri B, García-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *Journal of Neuroscience* 2001;21:7153–60.
70. Shen L, Nam HS, Song P, Moore H, Anderson SA. FoxG1 haploinsufficiency results in impaired neurogenesis in the postnatal hippocampus and contextual memory deficits. *Hippocampus* 2006;16:875–90.
71. Shibutani M, Uneyama C, Miyazaki K, Toyoda K, Hirose M. Methacarn fixation: a novel tool for analysis of gene expressions in paraffin-embedded tissue specimens. *Laboratory Investigation* 2000;80:199–208.
72. Shibutani M, Woo G-H, Fujimoto H, Saegusa Y, Takahashi M, Inoue K, Hirose M, Nishikawa A. Assessment of developmental effects of hypothyroidism in rats from in utero and lactation exposure to anti-thyroid agents. *Reprod Toxicol* 2009;28:297–307.
73. Slotkin TA, Southard MC, Adam SJ, Cousins MM, Seidler FJ. Alpha7 nicotinic acetylcholine receptors targeted by cholinergic developmental neurotoxicants: nicotine and chlorpyrifos. *Brain Research Bulletin* 2004;64:227–35.

74. Slotkin TA. Does early-life exposure to organophosphate insecticides lead to prediabetes and obesity? *Reproductive Toxicology* 2011;31:297–301.
75. Slotkin TA, Seidler FJ. Developmental neurotoxicity of organophosphates targets cell cycle and apoptosis, revealed by transcriptional profiles in vivo and in vitro. *Neurotoxicology and Teratology* 2012;34:232–41.
76. Soldin OP, Aschner M. Effects of manganese on thyroid hormone homeostasis: potential links. *Neurotoxicology* 2007;28:951–6.
77. Takeda A, Ishiwatari S, Okada S. Manganese uptake into rat brain during development and aging. *Journal of Neuroscience Research* 1999;56:93–8.
78. Tozuka Y, Fukuda S, Namba T, Seki T, Hisatsune T. GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron*. 2005 Sep 15;47(6):803-15.
79. Tran TT, Chowanadisai W, Crinella FM, Chicx-DeMet A, Lönnerdal B. Effect of high dietary manganese intake of neonatal rats on tissue mineral accumulation, striatal dopamine levels, and neurodevelopmental status. *Neurotoxicology* 2002;23(4–5):635–43.
80. U.S. Environmental Protection Agency (US EPA). Pesticide assessment guidelines. Subdivision F, hazard evaluation: human and domestic animals, Addendum 10, Neurotoxicity series 81, 82, and 83. Health Effects Division, Office of Pesticide Program; 1991.
81. Van Nassauw L, Wu M, De Jonge F, Adriaensen D, Timmermans JP. Cytoplasmic, but not nuclear, expression of the neuronal nuclei (NeuN) antibody is an exclusive feature of Dogiel type II neurons in the guinea-pig gastrointestinal tract. *Histochem Cell Biol* 2005;124:369–77.
82. Wakschlag LS, Pickett KE, Cook E Jr, Benowitz NL, Leventhal BL. Maternal smoking during pregnancy and severe antisocial behavior in offspring: a review. *Am J Public Health* 2002;92:966–974.

83. Wang L, Xu RJ. The effects of perinatal protein malnutrition on spatial learning and memory behaviour and brain-derived neurotrophic factor concentration in the brain tissue in young rats. *Asia Pac J Clin Nutr* 2007;16(Suppl. 1):467–72.
84. Whitney KD, Seidler FJ, Slotkin TA. Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: cellular mechanisms. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1995;134:53–62.
85. Witkowski JF, Whitney SP, Kergel TJ. The biologic and economic assessment of the field crop usage of chlorpyrifos. USDA National Agricultural Impact Assessment Program, Technical Bulletin No. 1832; 1994.
86. Zambrano E, Rodriguez-Gonzalez GL, Guzman C, Garcia-Becerra R, Boeck L, Diaz L, Menjivar M, Larrea F, Nathanielsz PW. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J Physiol* 2005(a);563:275–84.
87. Zambrano E, Martínez-Samayoá PM, Bautista CJ, Deás M, Guillén L, Rodríguez-González GL, et al. Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *J Physiol* 2005(b);566:225–36.
88. Zhang L, Blomgren K, Kuhn HG, Cooper-Kuhn CM. Effects of postnatal thyroid hormone deficiency on neurogenesis in the juvenile and adult rat. *Neurobiol Dis* 2009;34:366–74.
89. Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 2008;132:645–60.

要 旨

本研究では、短期スクリーニングに適う発達神経毒性評価系の確立を目的として、神経病理学的解析に特化した評価法の検討を実施した。現在、発達神経毒性を評価するためのガイドラインとして OECD の TG426 および EPA の OPPTS 870.6300 が発効され、評価に用いられているが、いずれも母動物および子動物を合わせると多数の動物を使用し、評価に長期間を要する大規模な試験であることから、小規模で短期のスクリーニングを目的とした評価系を確立する必要があると考えられている。OECD の TG426 では、各群 20 匹の妊娠母動物に曝露し、神経病理学的解析については各群 10 匹/性の子動物を解析するよう規定されていることから、本研究では各群 8~12 匹の母動物を使用し、各群 10 匹の子動物について神経病理学的解析を実施した。さらに、性周期中のステロイドホルモンの変動によりニューロン新生が影響を受けることが報告されている雌を神経病理学的解析から除外した。これにより、使用動物数の削減と解析の効率性の向上を実現可能とした。

第 1 章では、化学物質による母体毒性を介した非特異的な低栄養性脳発達遅延がニューロン新生に影響を与えるかどうかを検証する目的で、IUGR モデルを利用して発達期に低たん白食を母動物に与えることにより低栄養性の脳発達遅延の子動物を作出し、海馬歯状回でのニューロン新生への影響を検討した。その結果、生後 21 および 77 日のいずれにおいても海馬歯状回門における Reelin, Calb-D-28K および GAD67 陽性細胞の分布に影響はなく、NeuN 陽性ニューロンおよび顆粒細胞層下帯 (subgranular zone: SGZ) における細胞増殖やアポトーシスにも変動はみられなかった。したがって、低栄養性の脳発達遅延では海馬歯状回のニューロン新生に影響はみられなかったことから、海馬歯状回のニューロン新生の評価は母動物および子動物の全身毒性に起因した全身性成長遅延に影響を受けず、発達神経毒を検出するための有用な手段なり得ると判断された。

第 2 章では、ドーパミン作動性ニューロン傷害性のマンガンの神経発達毒性の有無を明らかにし、その病理発生を基盤とした評価系を確立することを目的に、マンガンの発達期

曝露を行い海馬 SGZ における細胞増殖とアポトーシスならびに顆粒細胞の系譜の検索と歯状回門における Reelin 産生介在ニューロンの分布の検索を行った。その結果、マンガンの発達期曝露は SGZ の type-3 細胞または未熟顆粒細胞の増加を示唆する Dcx 陽性細胞の増加が生後 21 日で確認された。海馬歯状回門では GABA 性介在ニューロンにおける Reelin の上方制御を反映した Reelin 陽性細胞の増加が生後 21 日で確認され、これが顆粒細胞の分化異常を示唆する Dcx 陽性細胞の増加を引き起こしているものと推測された。いずれの影響も生後 77 日目には認められなかった。以上より、マンガンの発達期曝露は子動物の海馬歯状回の後期分化を標的としたニューロン新生への可逆的影響を示すことが明らかとなった。

第 3 章では、コリンエステラーゼ阻害作用のあるクロルピリフォスの神経発達毒性の有無を明らかにし、その病理発生を基盤とした評価系を確立することを目的に、クロルピリフォスの発達期曝露を行い、海馬 SGZ における細胞増殖とアポトーシスならびに顆粒細胞の系譜の検索と歯状回門における Reelin 産生介在ニューロンの分布の検索を行った。その結果、クロルピリフォスの発達期曝露は生後 21 日に SGZ において増殖性の Type-2 前駆細胞の減少を示唆する PCNA および Tbr2 陽性細胞の減少を引き起こした。いずれの影響も生後 77 日目には認められなかった。したがって、クロルピリフォスの発達期曝露は子動物の海馬歯状回の中期分化を標的としたニューロン新生への可逆的影響を示すことが明らかとなった。

第 4 章では、コリン作動性神経毒であるニコチンの神経発達毒性の有無を明らかにし、その病理発生を基盤とした評価系を確立することを目的に、ニコチンの発達期曝露を行い、SGZ における顆粒細胞系譜の分布、増殖およびアポトーシスならびに海馬歯状回門における GABA 性介在ニューロンを検索した。その結果、生後 21 日に Dcx 陽性細胞の増加と TUC4 陽性細胞の減少、さらに二重染色では、TUC4 陽性/Dcx 陽性または陰性細胞の減少と TUC4 陰性/Dcx 陽性細胞の増加ならびに Tbr2 陰性/Dcx 陽性細胞の増加がみられたが、Tbr2 陽性細胞に変動はみられなかった。これら変化は type-3 前駆細胞の増加と未成熟ニューロンの減少を示唆する変化であった。また、SGZ における TUNEL 陽性アポトーシス細胞および PCNA

陽性増殖細胞に変動はなく、顆粒細胞層の NeuN 陽性細胞数にも変動はなかったことから、type-3 前駆細胞の増加および未成熟ニューロンの減少は、type-3 前駆細胞から未成熟ニューロンへの分化の遅延による変化であると考えられた。歯状回門のニューロンでは成熟型の GABA 性介在ニューロンの増加を示唆する GAD67 陽性 GABA 性介在ニューロンと NeuN 陽性ニューロンの増加が生後 21 日にみられた。いずれの影響も生後 77 日目には認められなかった。したがって、ニコチンの発達期曝露は、type-3 前駆細胞から未成熟ニューロンへの分化の遅延とそれに関連した成熟型の GABA 性介在ニューロンの増加を引き起こし、いずれも可逆的であることが明らかとなった。

以上、SGZ における顆粒細胞系譜の分布、増殖およびアポトーシスならびに海馬歯状回門における GABA 性介在ニューロンの分布の検索により、発達神経毒性物質の標的細胞およびその分化時期を明らかにすることが可能となった。また、これらのエンドポイントは非特異的な全身性の低栄養性脳発達遅延の影響を受けないものであった。今回の検討により、メカニズムの異なる神経毒性物質による新たな発達神経毒性が見出されたことで、神経毒性物質はニューロン新生を標的とした発達神経毒性物質になりうると考えられた。さらに、行動学的な解析では Mn および CPF 曝露の影響を明らかにすることはできなかったが、海馬歯状回の SGZ の観察ではニューロン新生への影響が検出され、感度の高い有用な解析手段であると考えられた。したがって、ニューロン新生評価手法は短期スクリーニングに適う発達神経毒の新たなスクリーニング手法になり得ることが期待される。

Abstract

To establish a rapid screening system for developmental neurotoxicants, we built up evaluation system focusing on neuropathological endpoints. Testing one chemical with the current guidelines OECD TG426 and EPA OPPTS 870.6300 can take a long time and requires hundreds of animals including dams and offspring. Therefore, a new, more efficient screening system that reduces the use of animals is necessary to be established. OECD TG426 requires 20 dams per group for exposure and 10 offsprings per group per sex for the analysis of neuropathology. Thus, this study was used 8-12 dams and 10 offsprings per group were subjected to the analysis of neuropathology. Because neurogenesis is influenced by circulating levels of steroid hormones during estrus cycle, females were excluded from the analysis of neuropathology. Thus, this study can reduce the number of animals and improve the efficiency of analysis.

In chapter 1, to clarify the effects of delayed brain growth through the systemic toxicity of dams on neurogenesis, pregnant rats were fed a synthetic low-protein diet to cause undernutrition in both dams and offspring utilizing an intrauterine growth restriction model and the effects of delayed brain growth on neurogenesis were examined in the hippocampal dentate gyrus. As a result, maternal protein restriction did not affect the cellular distribution of immunoreactivity for Reelin, Calbindin-D-28K, or GAD 67 or of NeuN-positive postmitotic neurons in the dentate hilus, cell proliferation or apoptosis in the subgranular zone (SGZ) of the dentate gyrus either on PND 21 or PND 77. These results suggest that the delayed brain growth due to maternal undernutrition does not induce aberration in the hippocampal neurogenesis and thus undernutrition by systemic toxicity can be distinguished from chemical-specific neurodevelopmental effects on neurogenesis. Therefore, the analysis of neurogenesis

of in the hippocampal dentate gyrus was a valuable tool for the evaluation of developmental neurotoxicant.

In chapter 2, to clarify the effects of Mn, a dopaminergic neurotoxicant, on developmental neurotoxicity and establish the screening system based on the pathology, distribution of granule cell lineages as well as their proliferation and apoptosis in the subgranular zone and reelin-producing interneurons in the hilus of the hippocampal dentate gyrus were analyzed in the offspring of rats exposed to Mn in the form manganese chloride during pregnancy and lactation periods. As a result, developmental Mn-exposure revealed increased Dcx-positive cells in the subgranular zone of the dentate gyrus on postnatal day (PND) 21, indicating an increase of type-3 progenitor or immature granule cells. In the hippocampal dentate hilus, an increase in the cellular distribution of immunoreactivity for reelin was observed on PND 21 reflecting an upregulation of reelin in the GABAergic interneurons and causing increased Dcx-positive cells. All of these changes were disappeared on PND 77. These results suggest that maternal Mn exposure transiently affects neurogenesis targeting late-stage differentiation in the hippocampal dentate gyrus of rat offspring.

In chapter 3, to clarify the effects of chlorpyrifos (CPF), a cholinesterase inhibitor, on developmental neurotoxicity and establish the screening system based on the pathology, distribution of granule cell lineages as well as their proliferation and apoptosis in the subgranular zone and reelin-producing interneurons in the hilus of the hippocampal dentate gyrus were analyzed in the offspring of rats exposed to CPF during pregnancy and lactation periods. Maternal CPF exposure resulted in decreased numbers of PCNA- and Tbr2-positive cells in the SGZ on PND 21 indicating a decrease in proliferative type-2 progenitor cells. All of these changes were disappeared on PND 77. These results suggest that maternal CPF exposure transiently affects neurogenesis

targeting intermediate-stage differentiation in the hippocampal dentate gyrus of rat offspring.

In chapter 4, to clarify the effects of nicotine, a cholinergic neurotoxicant, on developmental neurotoxicity and establish the screening system based on the pathology, distribution of granule cell lineages as well as their proliferation and apoptosis in the subgranular zone and reelin-producing interneurons in the hilus of the hippocampal dentate gyrus were analyzed in the offspring of rats exposed to nicotine during pregnancy and lactation periods. As a result, increased Dcx-positive cells and decreased TUC4-positive cells were observed on PND 21. Double immunohistochemistry revealed a decrease in the TUC4-positive cells with or without co-expression of Dcx, an increase in the TUC4-positive cells lacking expression of Dcx and an increase in the Dcx-positive cells lacking expression of Tbr2; however, there were no changes in the Tbr2-positive cells. These changes indicated an increase of type-3 progenitor cells and a decrease of immature granule cells. In addition, an increase of type-3 progenitor cells and a decrease of immature granule cells were considered to be due to the delay in the differentiation process of type 3 progenitor cells to immature granule cells because of no changes in the numbers of TUNEL-positive apoptotic cells and PCNA-positive proliferating cells in the dentate SGZ and NeuN-positive postmitotic neurons in the granule cell layer. In the dentate hilus, increases in GAD67-positive GABAergic interneurons and NeuN-positive neurons were observed only on PND 21 indicating increased the number of GABAergic postmitotic interneurons. All of these changes were disappeared on PND 77. These results suggest that maternal exposure to nicotine caused a delay in the differentiation process of type 3 progenitor cells to immature granule cells and an increase of the GABAergic postmitotic interneurons, but these effects are suggested to be transient ones.

In conclusion, the analysis of the distribution of granule cell lineages as well as their proliferation and apoptosis in the subgranular zone and distribution of GABAergic interneurons in the hilus of the hippocampal dentate gyrus was found to be effective for detection of target cell populations and their differentiation stage by developmental neurotoxicants. These endpoints were unaffected by the delayed brain growth effects caused by maternal undernutrition. Detection of developmental neurotoxicity by all neurotoxicants with different mechanisms examined in the present study suggests that neurotoxicants can also be developmental neurotoxicants targeting neurogenesis. Although there were no obvious effects of Mn and CPF exposures on behavioral analysis, the analysis in the hippocampal dentate SGZ revealed the effects on neurogenesis and were suggested to be valuable tool. Therefore, it is suggested that analysis of neurogenesis could be a promising rapid screening tool for evaluation of developmental neurotoxicants.

图 表

Table 1-1. Composition of normal and low protein diets

	Normal protein diet	Low protein diet
	(%)	(%)
Casein	20.00	10.00
L-cystine	0.30	0.30
Corn starch	39.75	47.25
α -Corn starch	13.20	15.70
Sucrose	10.00	10.00
Soy oil	7.00	7.00
Cellulose	5.00	5.00
Mineral	3.50	3.50
Vitamin	1.00	1.00
Choline	0.25	0.25
<i>tert</i> -Butylhydroquinone	0.0014	0.0014

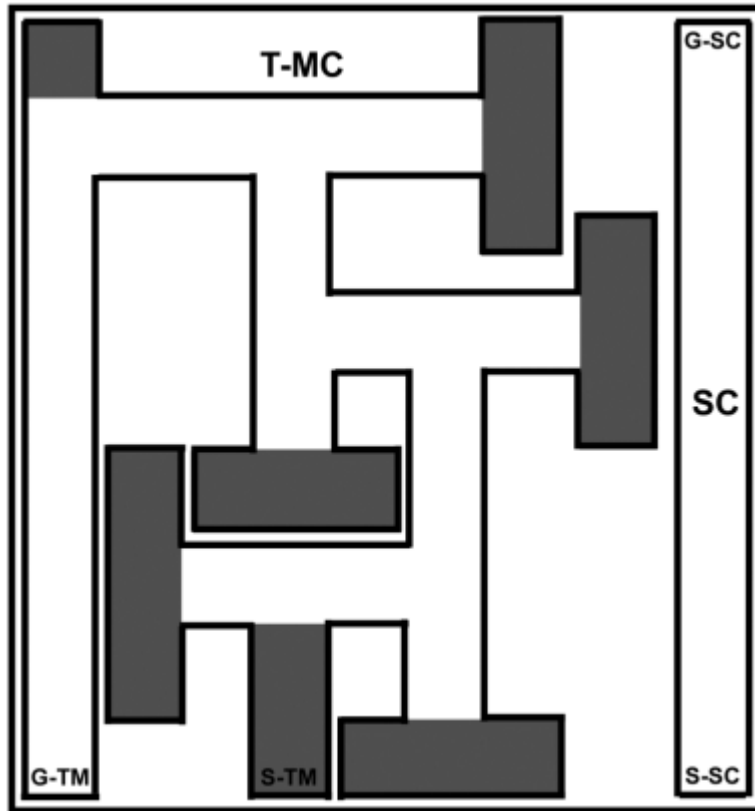


Fig. 1-1

The pattern of the water-filled multiple T-maze. Gray area indicates the area of error. To assess the learning ability, T-maze course (T-MC) was used for continuous three days. S-TM indicates the starting point and G-TM represent the goal in the T-maze course. To confirm the swimming ability, the straight course (SC) was used on the day before the 1st water-filled multiple T-maze test. S-SC indicates the starting point and G-SC represent the goal in the straight course.

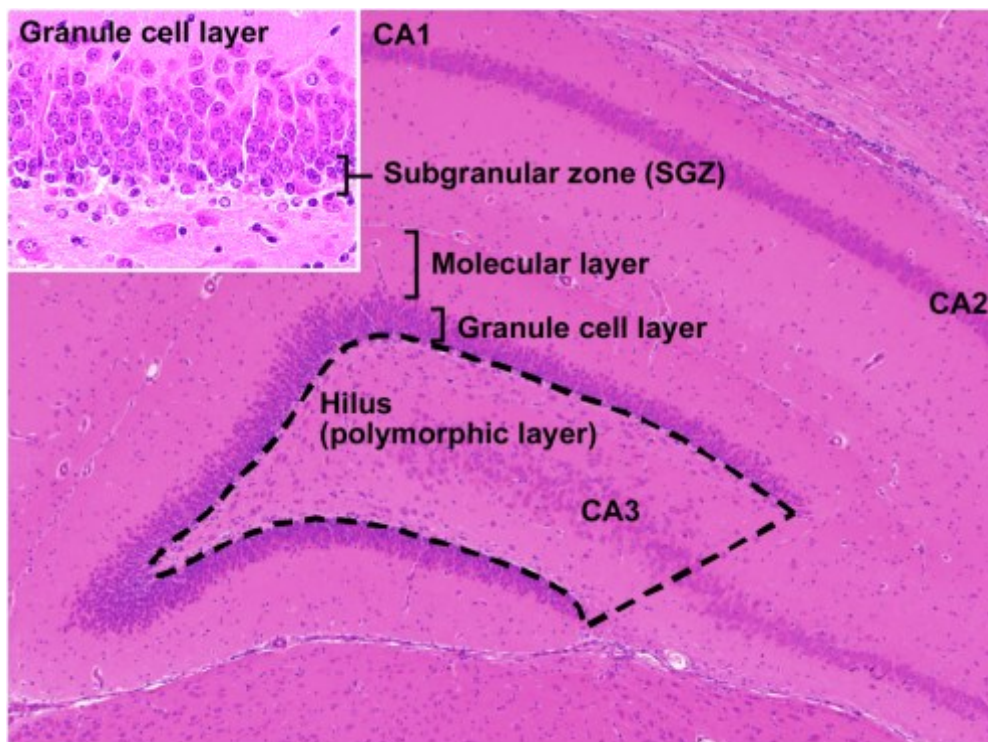


Fig. 1-2

Overview of the hippocampal formation of a male rat at PND 21 stained with hematoxylin and eosin. The numbers of cells in the hilus of the dentate gyrus (as demarcated by the dotted line) displaying immunoreactivity for reelin, GAD67, Calbindin-D-28K, Foxg1, and NeuN were counted and normalized for the unit area. Positive immunoreactivity for these antigens was restricted to small-sized neurons in this area, as larger CA3 neurons were not immunoreactive. Magnification, $\times 40$.

(Inset) Higher magnification of the granule cell layer and SGZ. Distribution of immunoreactive cells for Dcx, Tbr2, GFAP, TUC4 and NACHR $\alpha 7$ as well as apoptotic cells and proliferating cells was measured in the SGZ. As for the evaluation of postmitotic granule cells, NeuN-positive granule cells were bilaterally counted in the granule cell layer and normalized for the length of the granule cell layer. Magnification, $\times 400$.

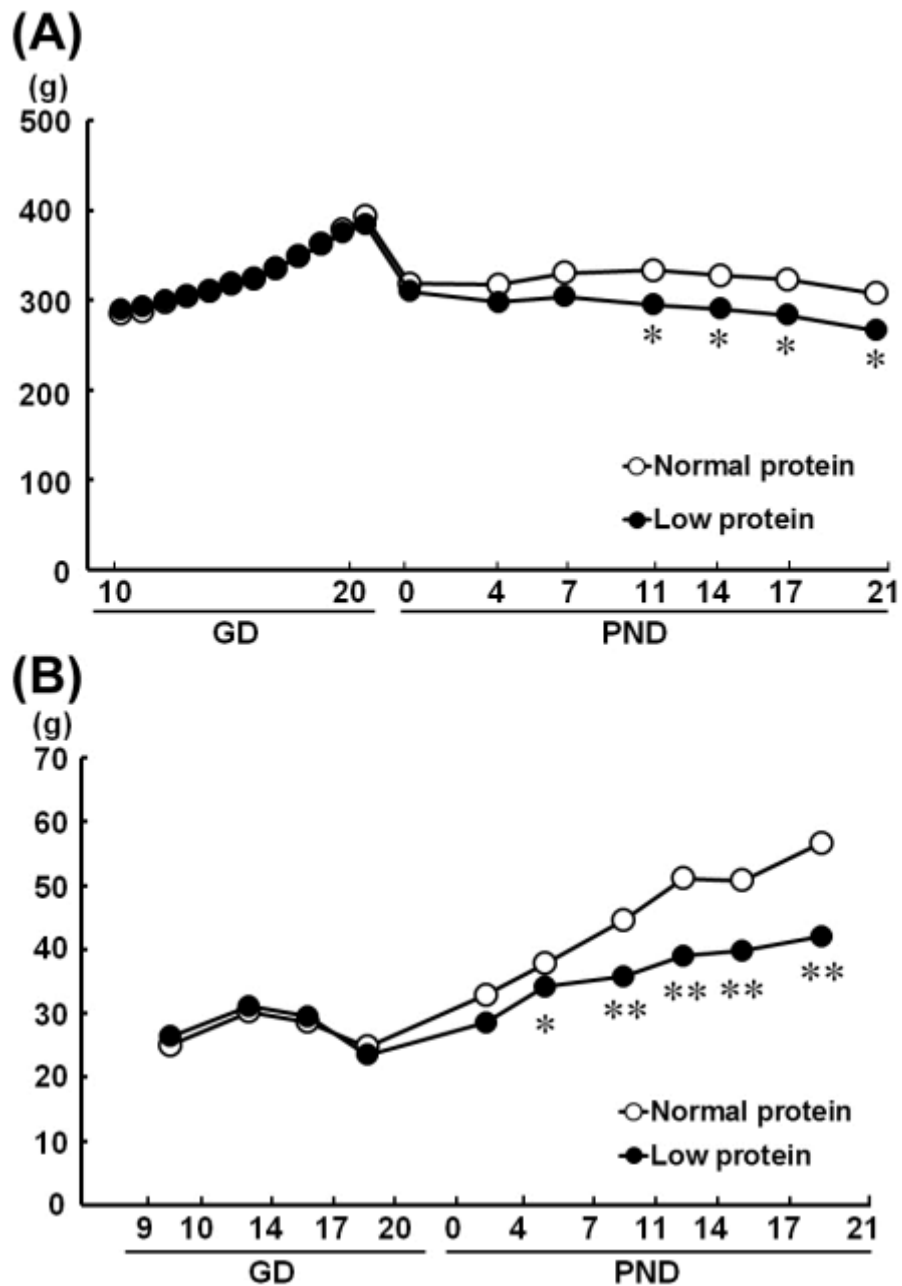


Fig. 1-3

Body weights and food consumption of dams fed either a normal or low protein diet from GD 10 to PND 21. (A) Body weight. (B) Food consumption. *,**Significantly different from the normal protein group by Student's or Aspin-Welch's t-test (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

Table 1-2. Body weight of offspring after maternal protein restriction during the second half of gestation and lactation

Casein level	Males		Females	
	Normal protein	Low protein	Normal protein	Low protein
	20%	10%	20%	10%
No. of dams	8	8	8	8
Body weight (g)				
PND 0	6.6 ± 0.6 ^a	6.3 ± 0.4**	6.1 ± 0.4	5.9 ± 0.5*
PND 4	10.9 ± 1.4	9.0 ± 1.1**	10.4 ± 1.5	8.5 ± 1.0**
PND 7	17.5 ± 2.3	13.7 ± 1.9**	16.4 ± 2.6	12.4 ± 1.8**
PND 11	28.9 ± 3.6	21.4 ± 1.6**	27.0 ± 3.7	19.2 ± 2.3**
PND 14	38.4 ± 4.4	26.6 ± 1.5**	36.2 ± 3.9	24.5 ± 2.3**
PND 17	46.5 ± 5.5	31.6 ± 1.9**	43.9 ± 4.5	29.2 ± 2.5**
PND 21	61.4 ± 7.0	40.4 ± 2.4**	58.0 ± 6.1	38.0 ± 3.6**
PND 28	102.8 ± 10.9	75.4 ± 4.7**	90.1 ± 9.6	70.8 ± 4.1**
PND 35	174.5 ± 16.3	136.5 ± 8.1**	142.3 ± 12.3	121.4 ± 6.6**
PND 42	253.0 ± 19.6	203.1 ± 9.6**	181.3 ± 12.4	160.6 ± 8.4**
PND 49	322.8 ± 21.7	263.2 ± 13.6**	206.2 ± 13.6	187.5 ± 12.1**
PND 56	382.8 ± 22.1	318.6 ± 15.0**	228.7 ± 14.4	207.2 ± 15.1**
PND 63	429.4 ± 25.9	358.9 ± 20.5**	255.4 ± 19.1	231.1 ± 18.8**
PND 70	474.5 ± 28.0	398.3 ± 23.1**	276.8 ± 23.3	247.4 ± 20.4*
PND 77	508.3 ± 30.6	427.0 ± 26.9**	285.3 ± 22.5	254.9 ± 22.6*

^a Mean ± SD.

*, ** Significantly different from the normal protein group by Student's or Aspin-Welch's *t*-test (**P*<0.05, ***P*<0.01).

Abbreviations: PND, postnatal day.

Table 1-3. Food consumption of offspring after maternal protein restriction during the second half of gestation and lactation

Casein level	Males		Females	
	Normal protein	Low protein	Normal protein	Low protein
	20%	10%	20%	10%
No. of dams	8	8	8	8
Food consumption (g/animal/day)				
PND 35	19.6 ± 1.7 ^a	17.1 ± 0.7**	16.6 ± 1.7	15.5 ± 0.9
PND 42	27.3 ± 2.0	23.4 ± 1.2**	19.9 ± 1.6	19.1 ± 1.1
PND 49	30.4 ± 2.2	25.9 ± 1.4**	20.2 ± 1.2	19.0 ± 1.2
PND 56	32.3 ± 1.9	28.0 ± 1.6**	20.6 ± 1.3	19.1 ± 1.4*
PND 63	31.6 ± 2.0	27.9 ± 1.8**	20.9 ± 1.5	19.2 ± 1.4*
PND 70	32.1 ± 2.1	27.9 ± 2.0**	22.2 ± 1.9	20.3 ± 1.3*
PND 77	31.3 ± 2.1	27.4 ± 2.4**	20.7 ± 1.9	18.9 ± 1.5*
Food consumption (g/kg body weight/day)				
PND 35	141.7 ± 5.1	161.4 ± 9.0**	143.1 ± 8.3	161.1 ± 6.4**
PND 42	127.6 ± 3.4	137.8 ± 5.7**	122.9 ± 7.8	135.0 ± 4.7**
PND 49	105.8 ± 5.2	111.0 ± 4.0**	104.3 ± 6.6	109.1 ± 4.3*
PND 56	91.5 ± 4.6	96.3 ± 4.6**	94.6 ± 4.7	96.6 ± 3.4
PND 63	77.9 ± 3.9	82.3 ± 4.1**	86.5 ± 3.9	87.7 ± 5.4
PND 70	71.1 ± 4.0	73.6 ± 3.7	83.3 ± 4.6	84.8 ± 3.2
PND 77	63.8 ± 3.2	66.3 ± 3.5*	73.6 ± 4.0	75.3 ± 3.9

^a Mean ± SD.

*, ** Significantly different from the normal protein group by Student's or Aspin-Welch's *t*-test (**P*<0.05, ***P*<0.01).

Abbreviations: PND, postnatal day.

Table 1-4. Organ weights of offspring after maternal protein restriction during the second half of gestation and lactation

Casein level		Males		Females	
		Normal protein	Low protein	Normal protein	Low protein
		20%	10%	20%	10%
PND 21					
No. of dams		8	8	8	8
Brain	(g)	1.55 ± 0.05 ^a	1.43 ± 0.03**	1.45 ± 0.05	1.34 ± 0.09**
	(g/100g BW)	2.38 ± 0.23	3.63 ± 0.40**	2.57 ± 0.19	3.98 ± 0.68**
Liver	(g)	2.56 ± 0.39	1.67 ± 0.35**	2.36 ± 0.27	1.43 ± 0.41**
	(g/100g BW)	3.88 ± 0.23	4.16 ± 0.37*	4.15 ± 0.22	4.06 ± 0.43
PND 77					
No. of dams		8	8	8	8
Brain	(g)	2.05 ± 0.06	2.01 ± 0.07	1.88 ± 0.05	1.85 ± 0.08
	(g/100g BW)	0.42 ± 0.02	0.48 ± 0.04**	0.66 ± 0.09	0.72 ± 0.06
Liver	(g)	18.30 ± 2.58	15.16 ± 1.89**	10.07 ± 2.05	9.51 ± 1.46
	(g/100g BW)	3.68 ± 0.30	3.57 ± 0.18	3.48 ± 0.21	3.67 ± 0.24
Kidneys	(g)	3.17 ± 0.50	2.83 ± 0.26*	2.07 ± 0.27	1.85 ± 0.15*
	(g/100g BW)	0.64 ± 0.07	0.67 ± 0.05	0.71 ± 0.04	0.73 ± 0.05
Testes	(g)	3.58 ± 0.30	3.20 ± 0.47*	–	–
	(g/100g BW)	0.72 ± 0.05	0.76 ± 0.09	–	–
Ovaries	(mg)	–	–	97.3 ± 17.6	83.9 ± 9.9
	(mg/100g BW)	–	–	33.9 ± 4.3	32.8 ± 5.1

^aMean ± SD.

– Not applicable.

*, ** Significantly different from the normal protein group by Student's or Aspin-Welch's *t*-test (**P*<0.05, ***P*<0.01).

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

Table 1-5. Histopathological examination of the cerebellum of male offspring at PND 21

Casein level	Normal protein	Low protein
	20%	10%
No. of dams	8	8
Cerebellum		
Increase of external granular cells (±/+) ^a	1(1/0)	5(3/2) *

^aGrade of change: (±), minimal, (+), slight.

* Significantly different from the normal protein group by Mann-Whitney's *U*-test (**P*<0.05).

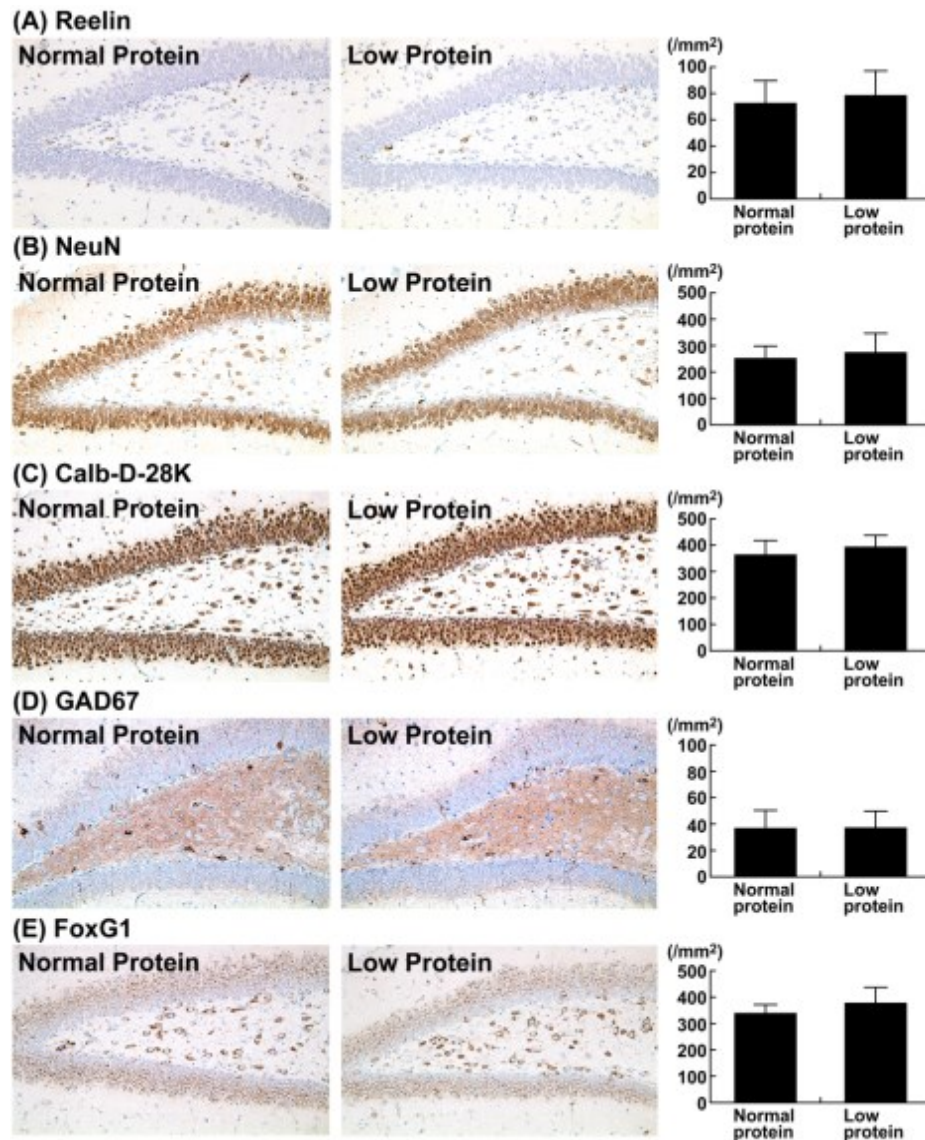


Fig. 1-4

Distribution of immunoreactive cells for Reelin, NeuN, Calb-D-28K, GAD67 and FoxG1 in the hilus of the hippocampal dentate gyrus in male offspring at PND 21 after maternal protein restriction from GD 10 to PND 21. All identical 10 male offspring from 8 dams (one or two animals per dam) were subjected to immunohistochemical analyses in each group. Statistical analysis was performed using the litter as the experimental unit, and litter mean values were subjected to analysis on two offspring samples from the same dam. (A) Reelin. (B) NeuN. (C) Calb-D-28K. (D) GAD67. (E) FoxG1. Representative image from the normal protein diet group (left) and from the low protein diet group (right). Magnification, 100× The graphs show the number of immunoreactive cells for each antigen/unit area (mm²) of the hilus of the bilateral hemispheres at PND 21.

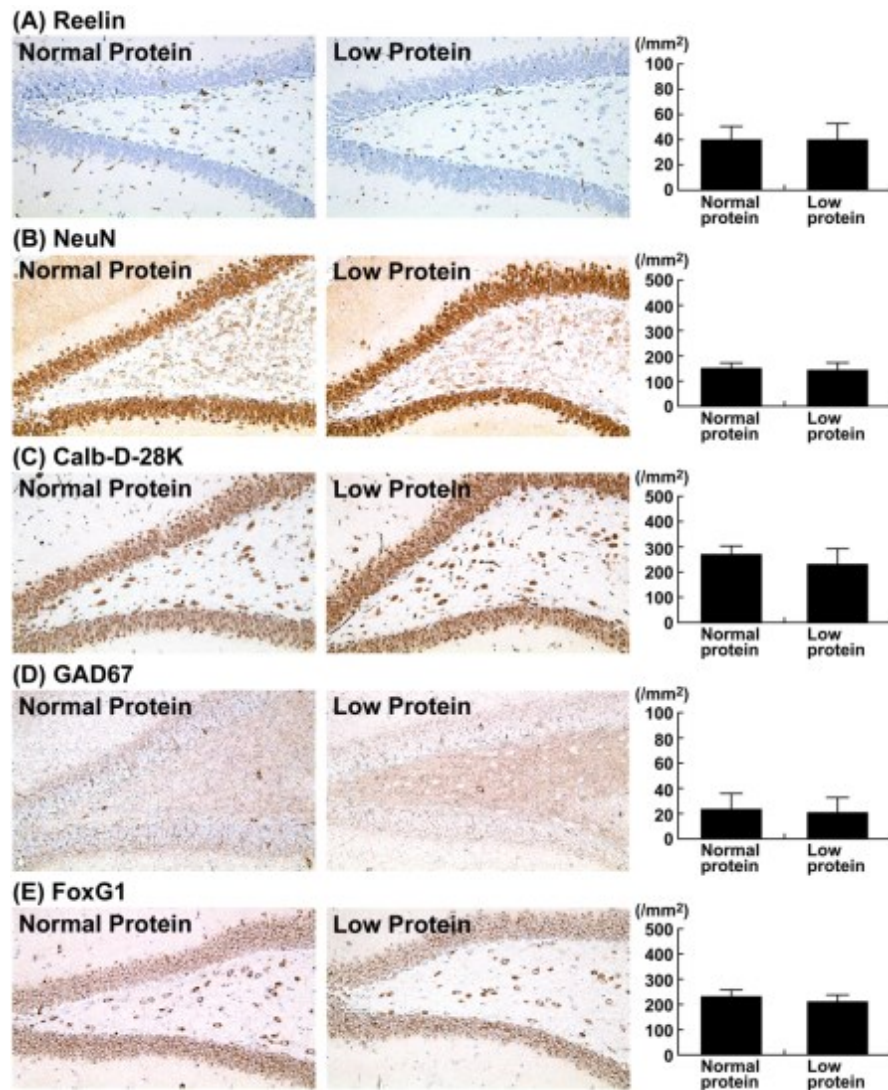


Fig. 1-5

Distribution of immunoreactive cells for Reelin, NeuN, Calb-D-28K, GAD67 and FoxG1 in the hilus of the hippocampal dentate gyrus in male offspring at PND 77 after maternal protein restriction from GD 10 to PND 21. All identical 10 male offspring from 8 dams (one or two animals per dam) were subjected to immunohistochemical analyses in each group. Statistical analysis was performed using the litter as the experimental unit, and litter mean values were subjected to analysis on two offspring samples from the same dam. (A) Reelin. (B) NeuN. (C) Calb-D-28K. (D) GAD67. (E) FoxG1. Representative image from the normal protein diet group (left) and from the low protein diet group (right). Magnification, 100 \times . The graphs show the number of immunoreactive cells for each antigen/unit area (mm²) of the hilus of the bilateral hemispheres at PND 77.

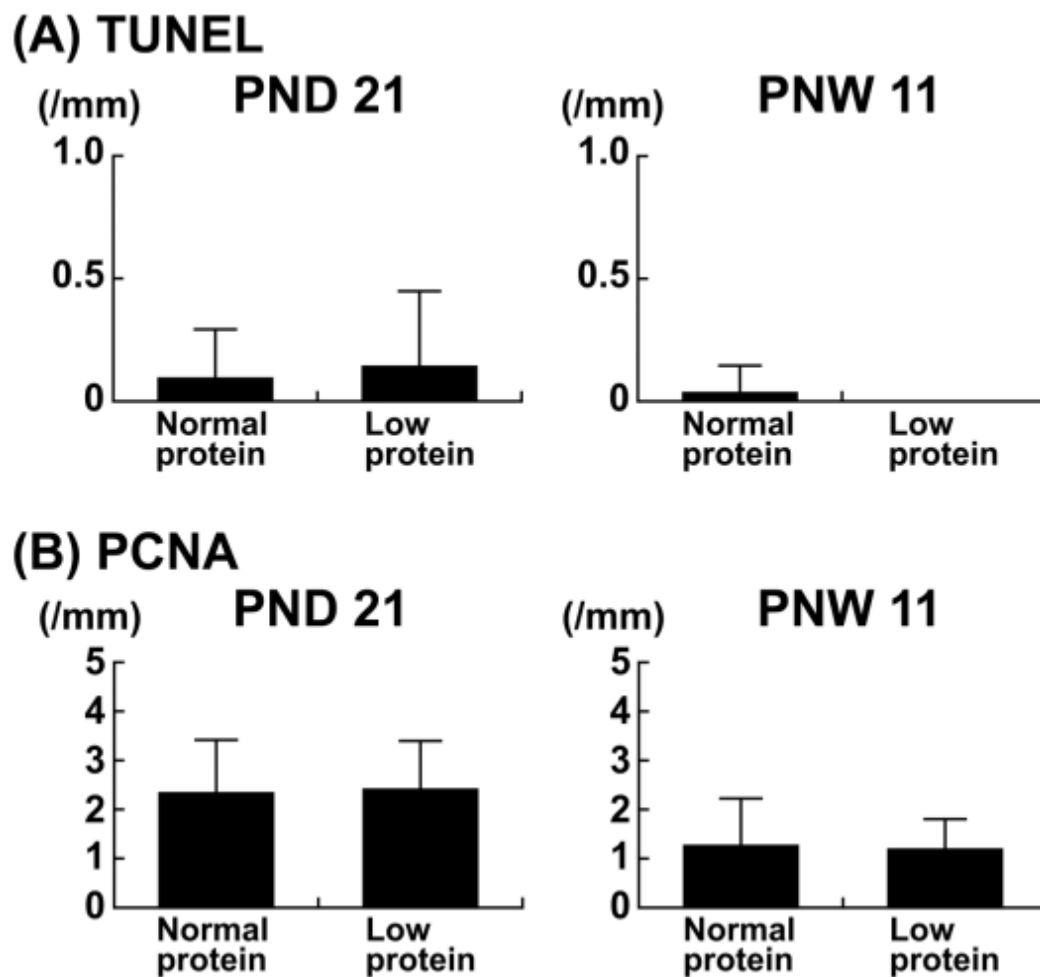


Fig. 1-6

Distribution of apoptotic cells and proliferating cells in the dentate subgranular zone of male offspring at both PND 21 and PND 77 after maternal protein restriction from GD 10 to PND 21. All identical male offspring (10 animals/group) as used in the immunohistochemical analyses on Reelin, NeuN, Calb-D-28K, GAD67 and FoxG1 at each time point were subjected to TUNEL-assay and PCNA immunohistochemistry. Statistical analysis was performed using the litter as the experimental unit, and litter mean values were subjected to analysis on two offspring samples from the same dam. (A) Number of TUNEL-positive apoptotic cells/unit length (mm) of the subgranular zone of bilateral hemispheres at PND 21 and PND 77. (B) Number of PCNA-positive cells/unit length (mm) of the subgranular zone of bilateral hemispheres at PND 21 and PND 77.

Table 1-6. Functional examination of offspring after maternal protein restriction during the second half of gestation and lactation

		Males		Females	
		Normal protein 20% ^c	Low protein 10% ^c	Normal protein 20%	Low protein 10%
No. of offspring examined ^a		16	16	16	16
Surface righting reflex (PND 10, unit: sec.)		1.6±0.8 ^b	1.7±0.9	1.9±1.2	2.3±2.0
Air righting reflex (PND 15) Normal		8	4	4	5
Pupillary reflex (PND 21) Normal		16	15	16	14
Preyer's reflex (PND 21) Normal		16	16	16	16
Pain reflex (PND 21) Normal		16	16	16	16

No significant differences between the normal and low protein groups.

^a Two male and female offspring per dam were subjected to examination.

^b Mean±SD. The values were obtained using the litter mean.

^c Casein level.

Table 1-7. Detailed clinical signs of offspring after maternal protein restriction during the second half of gestation and lactation

			Males		Females	
			Normal protein	Low protein	Normal protein	Low protein
			20% ^c	10% ^c	20%	10%
PND 30						
No. of offspring examined ^a			16	16	16	16
Home cage observation						
Posture	Normal		16	16	16	16
Convulsion	None		16	16	16	16
Abnormal behavior	None		16	16	16	16
In-the-hand observation						
Ease of removal from cage	Easy		16	16	16	16
Fur condition	Normal		16	16	16	16
Skin	Normal		16	16	16	16
Secretions-eye, nose	Absent		16	16	16	16
Exophthalmos	Absent		16	16	16	16
Palpebral closure	Normal		16	16	16	16
Mucosal membranes	Normal		16	16	16	16
Lacrimation	Normal		16	16	16	16
Piloerection	Absent		16	16	16	16
Pupil size	Normal		16	16	16	16
Salivation	None		16	16	16	16
Abnormal respiration	Absent		16	16	16	16
Vocalization	None		16	16	15	16
	Soft		0	0	1	0
Reactivity to handling	Easy		16	16	16	16
PND 44						
No. of offspring examined ^a			16	16	16	16
Home cage observation						
Posture	Normal		16	16	16	16
Convulsion	None		16	16	16	16
Abnormal behavior	None		16	16	16	16
In-the-hand observation						
Ease of removal from cage	Easy		16	16	16	16
Fur condition	Normal		16	16	16	16
Skin	Normal		16	16	16	16
Secretions-eye, nose	Absent		16	16	16	16
Exophthalmos	Absent		16	16	16	16
Palpebral closure	Normal		16	16	16	16
Mucosal membranes	Normal		16	16	16	16
Lacrimation	Normal		16	16	16	16
Piloerection	Absent		16	16	16	16
Pupil size	Normal		16	16	16	16
Salivation	None		16	16	16	16
Abnormal respiration	Absent		16	16	16	16
Vocalization	None		15	16	14	15
	Soft		1	0	2	1
Reactivity to handling	Easy		16	16	16	16
PND 72						
No. of offspring examined ^a			16	16	16	16
Home cage observation						
Posture	Normal		16	16	16	16
Convulsion	None		16	16	16	16
Abnormal behavior	None		16	16	16	16
In-the-hand observation						
Ease of removal from cage	Easy		16	16	16	16

Fur condition	Normal	16	16	16	16
Skin	Normal	16	16	16	16
Secretions-eye, nose	Absent	16	16	16	16
Exophthalmos	Absent	16	16	16	16
Palpebral closure	Normal	16	16	16	16
Mucosal membranes	Normal	16	16	16	16
Lacrimation	Normal	16	16	16	16
Piloerection	Absent	16	16	16	16
Pupil size	Normal	16	16	16	16
Salivation	None	16	16	16	16
Abnormal respiration	Absent	16	16	16	16
Vocalization	None	16	16	16	16
Reactivity to handling	Easy	16	16	16	16

No significant differences between the normal and low protein groups.

^a Two male and female offspring per dam were subjected to examination.

^b Mean±SD.

^c Casein level.

Table 1-8. Manipulative test of offspring after maternal protein restriction during the second half of gestation and lactation

		Males		Females	
		Normal protein	Low protein	Normal protein	Low protein
		20% ^c	10% ^c	20%	10%
No. of offspring examined ^a		16	16	16	16
Auditory response	Normal	16	16	16	16
Approach response	Normal	16	16	16	16
Touch response	Normal	16	16	16	16
Tail pinch response	Normal	16	16	16	16
Pupillary reflex	Normal	16	16	16	16
Air righting reflex	Normal	16	16	16	16
Landing foot splay (mm)		86 ± 13 ^b	91 ± 15	66 ± 23	65 ± 9

No significant differences between the normal and low protein groups.

^a Two male and female offspring per dam were subjected to examination.

^b Mean ± SD. The values were obtained using the litter mean.

^c Casein level.

Table 1-9. Grip strength of offspring after maternal protein restriction during the second half of gestation and lactation

		Males		Females	
		Normal protein20% ^c	Low protein10% ^c	Normal protein20%	Low protein10%
No. of offspring examined ^a		16	16	16	16
Fore limb (g)		1297 ± 167 ^b	1107 ± 159*	932 ± 172	992 ± 142
Hind limb (g)		899 ± 69	778 ± 122*	673 ± 55	612 ± 104

*, **Significantly different from the normal protein group by Student's or Aspin-Welch's t-test (**P* < 0.05, ***P* < 0.01).

^a Two male and female offspring per dam were subjected to examination.

^b Mean ± SD. The values were obtained using the litter mean.

^c Casein level.

Table 1-10. Motor activity of offspring after maternal protein restriction during the second half of gestation and lactation

		Males		Females	
		Normal protein20% ^c	Low protein10% ^c	Normal protein20%	Low protein10%
No. of offspring examined ^a		16	16	16	16
Total (0-60 minutes)		2319 ± 125 ^b	2410 ± 188	1960 ± 168	2241 ± 171**
0-10 minutes		452 ± 23	446 ± 27	379 ± 35	434 ± 26**
10-20 minutes		404 ± 18	424 ± 41	344 ± 49	389 ± 40
20-30 minutes		386 ± 42	415 ± 45	330 ± 35	366 ± 41
30-40 minutes		359 ± 28	379 ± 41	310 ± 51	398 ± 61**
40-50 minutes		374 ± 38	371 ± 64	303 ± 47	328 ± 50
50-60 minutes		344 ± 47	375 ± 39	295 ± 45	326 ± 70

*, **Significantly different from the normal protein group by Student's or Aspin-Welch's t-test (**P* < 0.05, ***P* < 0.01).

^a Two male and female offspring per dam were subjected to examination.

^b Mean ± SD. The values were obtained using the litter mean.

^c Casein level.

Table 1-11. Water-filled multiple T-maze test of offspring after maternal protein restriction during the second half of gestation and lactation

		Males		Females	
		Normal protein 20% ^c	Low protein 10% ^c	Normal protein 20%	Low protein 10%
No. of offspring examined ^a					
1st day (Straight maze)					
1st trial	No. of animals that reached the goal	16	16	16	16
	Elapsed time (sec.)	14.7±3.4 ^b	12.9±3.3	15.7±2.4	17.9±3.8
2nd trial	No. of animals that reached the goal	16	16	16	16
	Elapsed time (sec.)	6.6±0.8	8.6±2.9	7.6±1.9	9.1±4.6
3rd trial	No. of animals that reached the goal	16	16	16	16
	Elapsed time (sec.)	7.3±3.2	6.8±2.3	6.9±2.7	5.3±0.5
2nd day (T-maze)					
1st trial	No. of animals that reached the goal	16	16	16	16
	Elapsed time (sec.)	51.1±22.2	44.5±13.8	57.1±19.4	61.8±22.7
	Counts of error	3.7±1.5	2.8±0.6	4.5±1.0	4.6±1.9
2nd trial	No. of animals that reached the goal	16	15	16	16
	Elapsed time (sec.)	45.9±9.1	61.9±32.2	45.5±13.8	41.8±22.8
	Counts of error	3.3±0.8	4.4±2.8	3.4±1.4	3.1±2.1
3rd trial	No. of animals that reached the goal	16	16	16	16
	Elapsed time (sec.)	28.6±10.0	34.3±23.2	21.9±8.5	26.6±13.8
	Counts of error	1.8±0.8	1.9±1.5	0.9±1.0	1.7±1.5
3rd day (T-maze)					
1st trial	No. of animals that reached the goal	16	16	16	16
	Elapsed time (sec.)	32.3±22.8	26.0±9.5	23.9±6.9	23.6±8.5
	Counts of error	2.3±2.2	1.9±1.2	2.1±0.9	2.0±1.4
2nd trial	No. of animals that reached the goal	16	15	16	16
	Elapsed time (sec.)	16.5±2.7	18.3±3.1	20.6±6.1	15.6±5.7
	Counts of error	0.8±0.5	0.8±0.3	1.3±0.7	0.6±0.6
3rd trial	No. of animals that reached the goal	16	16	16	16
	Elapsed time (sec.)	14.3±1.8	15.1±1.8	19.0±5.5	14.6±3.1
	Counts of error	0.3±0.4	0.5±0.5	0.9±0.6	0.4±0.4
4th day (T-maze)					
1st trial	No. of animals that reached the goal	16	16	16	16
	Elapsed time (sec.)	13.8±4.0	24.1±19.4	20.9±13.4	16.5±4.1
	Counts of error	0.7±0.7	1.8±2.6	1.3±2.1	0.8±0.7
2nd trial	No. of animals that reached the goal	16	16	16	16
	Elapsed time (sec.)	14.3±2.8	17.1±5.5	22.3±9.9	19.5±6.6
	Counts of error	0.5±0.4	0.7±1.2	1.1±1.2	0.8±0.8
3rd trial	No. of animals that reached the goal	16	16	16	16
	Elapsed time (sec.)	14.5±3.8	14.6±1.6	16.5±3.2	15.4±4.2
	Counts of error	0.5±0.5	0.3±0.3	0.3±0.4	0.3±0.4

No significant differences between the normal and low protein groups.

^a Two male and female offspring per dam were subjected to examination.

^b Mean±SD. The values were obtained using the litter mean.

^c Casein level.

Table 2-1. Culling and number of animals examined in Experiment 1

	Per litter	Per group (Dams=8)
PND 4		
Culling	Kept 4 males and 4 females	Kept 32 males and 32 females
PND 21		
Animals subjected to necropsy	2 males and 2 females	16 males and 16 females
Immunohistochemical analysis	1 or 2 males	10 males
Analyses of Mn concentrations and real-time RT-PCR	1 male	6 males
PND 77		
Animals subjected to necropsy	2 males and 2 females	16 males and 16 females
Immunohistochemical analysis	1 or 2 males	10 males
Analysis of Mn concentrations	1 male	6 males

Abbreviations: PND, postnatal day.

Table 2-2. Primer sequence for RT-PCR analysis

Gene	Accession No.	Forward primer (5'→3') Reverse primer (5' →3')	Molecular function
<i>Dcx</i>	NM_053379	GGATTGTGTA CGCTGTTTCT TCT TCAGGTCAGC CAGCAATGC	A microtubule binding protein expressed in the type-2b and type-3 progenitor cells and immature neurons
<i>Neurod1</i>	NM_019218	TTTGGTGGCT GGCTGCTT CATTCTGCTC AGGCAAGAAA GTC	A transcription factor expressed in type-3 progenitor cells and immature neurons
<i>Pax6</i>	NM_013001	GCCCTCACCA ACACGTACAG T GGTTATTTGC CATGGTGAAG CT	A transcription factor expressed in earlier stage progenitor cells
<i>Dpysl3</i>	NM_012934	CATGTGGTAC CTGAACCTGA GTCTA GCCCACTCAC GCCACTTTT	An early postmitotic neuronal marker of immature granule cells
<i>Reln</i>	NM_080394	GCCAGCTTTC GACTACCCTAT TAAC CGTAGTGGCA CAGAAGCTAT CG	A secreted extracellular matrix glycoprotein playing a role in neuronal migration and positioning during neuronal development
<i>Vldlr</i>	NM_013155	ATGTAGCGCG GATGAGTTCA C TCATCCTGTCC ATTGCACACA	A lipoprotein receptor of reelin
<i>Lrp8</i>	XM_342877	CTGCACCAAC TCCCGAAGA TAGAACAGAG AGAGCTTGCA CTTGA	A lipoprotein receptor of reelin
<i>Dab1</i>	NM_153621	AGCAACCCTGGCCAACGTG TGGCAGCTGGTAAAGGCATA	An intracellular adaptor of reelin signal
<i>Actb</i>	NM_031144	CCCTGGCTCCTAGCACCAT AGAGCCACCAATCCACACAGA	The housekeeping gene encoding β -actin

Abbreviations: *Dcx*, doublecortin; *Neurod1*, neurogenic differentiation 1; *Pax6*, paired box 6; *Dpysl3*, dihydropyrimidinase-like 3; *Reln*, reelin; *Vldlr*, very low density lipoprotein receptor; *Lrp8*, low density lipoprotein receptor-related protein 8; *Dab1*, disabled homolog 1; *Actb*, beta-actin.

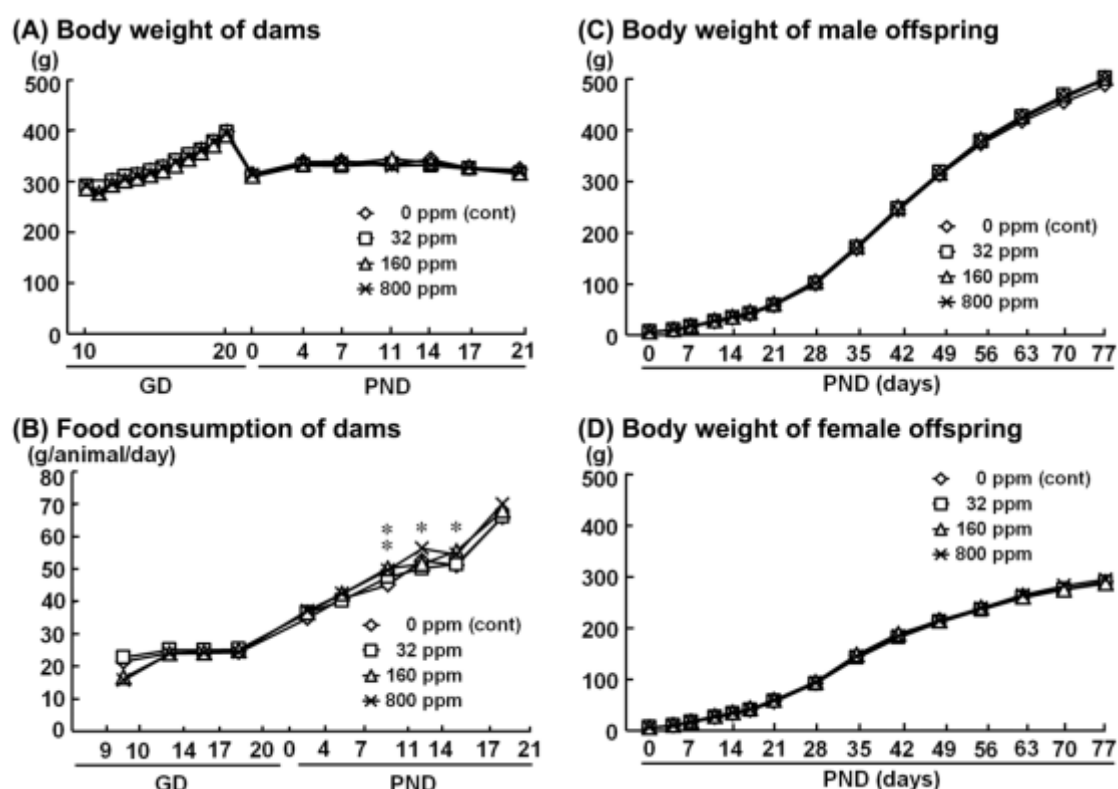


Fig. 2-3

Body weights and food consumption of dams and body weight of offspring exposed maternally to $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ from GD 10 through to day 21 after delivery. (A) Body weight of dams. (B) Food consumption of dams. (C) Body weight of male offspring. (D) Body weight of female offspring. *Significantly different from the untreated controls by Dunnett's test or Steel's test ($P < 0.05$).

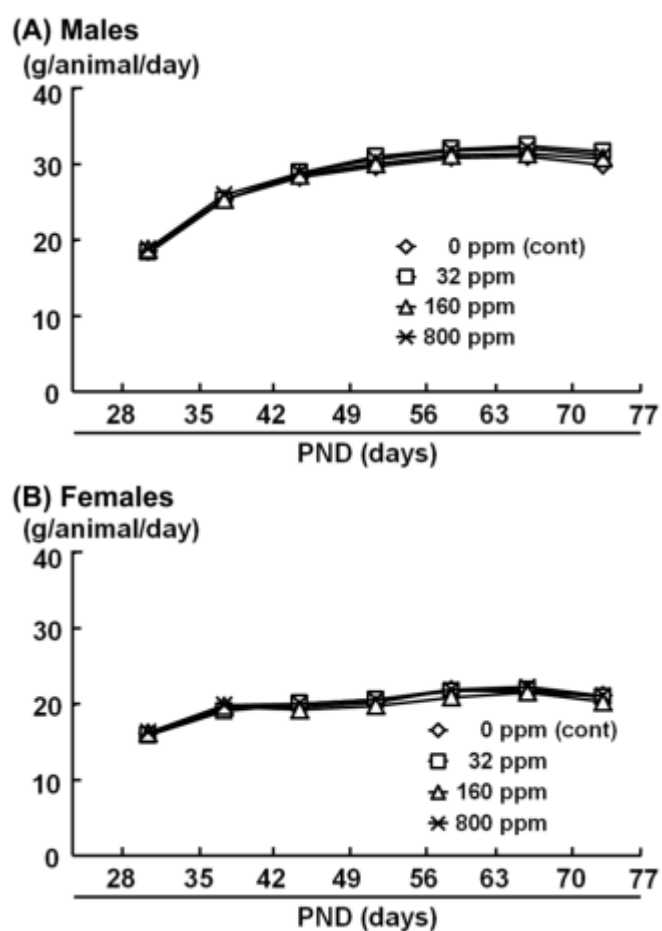


Fig. 2-4

Food consumption of offspring exposed to $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ from GD 10 through to day 21 after delivery. (A) Males (B) Females.

Table 2-3. External differentiation of offspring exposed to $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ during the second half of gestation and lactation periods

	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ in the diet			
	0 ppm (Control)	32 ppm	160 ppm	800 ppm
Pinna detachment				
No. of offspring examined (males and females)	100	108	91	102
No. of offspring differentiated on PND 4	100	108	91	102
Eruption of lower incisor				
No. of offspring examined (males and females)	64	64	64	64
No. of offspring differentiated on PND 11	39	36	48	42
No. of offspring differentiated on PND 14	64	64	64	64
Opening of eyelid				
No. of offspring examined (males and females)	64	64	64	64
No. of offspring differentiated on PND 14	59	60	57	52
No. of offspring differentiated on PND 17	64	64	64	64
Opening of vagina				
No. of offspring examined (females)	16	16	16	16
No. of offspring differentiated on PND 35	15	16	16	16
No. of offspring differentiated on PND 42	16	16	16	16
Cleavage of the balanopreputial gland				
No. of offspring examined (males)	16	16	16	16
No. of offspring differentiated on PND 42	15	14	15	13
No. of offspring differentiated on PND 49	16	16	16	16

No statistically significant differences in any treatment group from the untreated controls.
Abbreviations: PND, postnatal day.

Table 2-4. Organ weight of offspring exposed to $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ during the second half of gestation and lactation periods

		$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ in the diet			
		0 ppm (Control)	32 ppm	160 ppm	800 ppm
PND 21					
Males					
No. of offspring examined ^a		10	10	10	10
Brain	(g)	1.51 ± 0.05 ^a	1.56 ± 0.05	1.48 ± 0.05	1.51 ± 0.04
	(g/100g BW)	2.70 ± 0.30	2.74 ± 0.23	2.54 ± 0.19	2.47 ± 0.17
Liver	(g)	2.15 ± 0.30	2.17 ± 0.19	2.16 ± 0.17	2.21 ± 0.23
	(g/100g BW)	3.79 ± 0.17	3.79 ± 0.17	3.67 ± 0.22	3.59 ± 0.17
Kidneys	(g)	0.64 ± 0.07	0.64 ± 0.06	0.66 ± 0.04	0.66 ± 0.06
	(g/100g BW)	1.13 ± 0.07	1.13 ± 0.04	1.12 ± 0.07	1.08 ± 0.05
Testes	(g)	0.26 ± 0.02	0.24 ± 0.03	0.26 ± 0.02	0.25 ± 0.03
	(g/100g BW)	0.45 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.45 ± 0.04	0.41 ± 0.02
Females					
No. of offspring examined ^a		10	10	10	10
Brain	(g)	1.48 ± 0.05	1.54 ± 0.06	1.50 ± 0.04	1.47 ± 0.04
	(g/100g BW)	2.75 ± 0.24	2.75 ± 0.18	2.56 ± 0.19	2.55 ± 0.25
Liver	(g)	2.06 ± 0.19	2.08 ± 0.18	2.23 ± 0.20	2.10 ± 0.27
	(g/100g BW)	3.82 ± 0.20	3.71 ± 0.15	3.81 ± 0.20	3.60 ± 0.16
Kidneys	(g)	0.63 ± 0.07	0.64 ± 0.05	0.67 ± 0.05	0.67 ± 0.07
	(g/100g BW)	1.17 ± 0.08	1.14 ± 0.06	1.15 ± 0.05	1.14 ± 0.06
Ovaries	(mg)	16.68 ± 1.70	16.94 ± 1.89	17.01 ± 3.52	16.14 ± 2.22
	(mg/100g BW)	30.94 ± 2.41	30.35 ± 4.36	29.30 ± 7.29	27.87 ± 4.08
PND 77					
Males					
No. of offspring examined ^a		10	10	10	10
Brain	(g)	2.04 ± 0.06	2.07 ± 0.06	2.00 ± 0.07	2.03 ± 0.06
	(g/100g BW)	0.42 ± 0.03	0.42 ± 0.03	0.41 ± 0.04	0.42 ± 0.03
Liver	(g)	18.09 ± 2.16	18.81 ± 2.85	18.11 ± 2.65	17.48 ± 2.14
	(g/100g BW)	3.74 ± 0.28	3.77 ± 0.33	3.69 ± 0.26	3.59 ± 0.24
Kidneys	(g)	3.08 ± 0.35	3.20 ± 0.38	3.18 ± 0.18	3.22 ± 0.29
	(g/100g BW)	0.64 ± 0.05	0.64 ± 0.05	0.65 ± 0.05	0.66 ± 0.03
Testes	(g)	3.46 ± 0.30	3.16 ± 0.21	3.28 ± 0.32	3.36 ± 0.27
	(g/100g BW)	0.72 ± 0.08	0.64 ± 0.05	0.68 ± 0.09	0.69 ± 0.07
Females					
No. of offspring examined ^a		10	10	10	10
Brain	(g)	1.90 ± 0.05	1.90 ± 0.06	1.84 ± 0.05	1.87 ± 0.08
	(g/100g BW)	0.67 ± 0.07	0.66 ± 0.07	0.66 ± 0.07	0.65 ± 0.04
Liver	(g)	9.70 ± 1.43	9.67 ± 1.41	9.25 ± 1.52	9.66 ± 0.55
	(g/100g BW)	3.38 ± 0.27	3.33 ± 0.27	3.28 ± 0.22	3.38 ± 0.15
Kidneys	(g)	1.90 ± 0.14	1.88 ± 0.25	1.81 ± 0.14	1.91 ± 0.13
	(g/100g BW)	0.67 ± 0.05	0.65 ± 0.05	0.65 ± 0.07	0.67 ± 0.05
Ovaries	(mg)	84.18 ± 11.37	81.06 ± 12.56	88.98 ± 17.50	93.70 ± 8.69
	(mg/100g BW)	29.46 ± 3.16	28.06 ± 3.42	31.58 ± 3.91	32.83 ± 3.01

No statistically significant differences in any treatment group from the untreated controls.

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

^a One or two offspring of each sex per dam ($n = 8/\text{group}$) were subjected to autopsy and organ weight measurement at each time point. Statistical analysis was performed using the litter as the experimental unit, and mean values were estimated as a litter value when two offspring were examined from the same dam.

^b Mean ± SD.

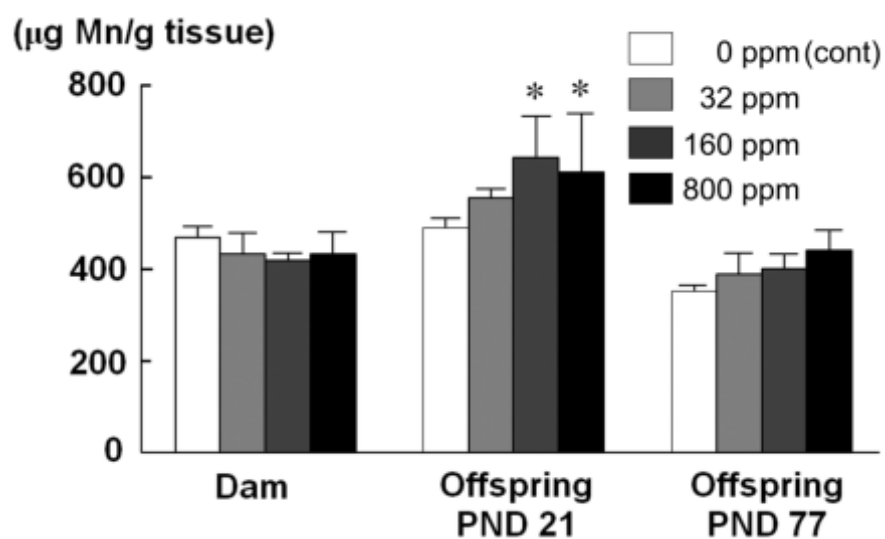


Fig. 2-5

Manganese concentrations in the cerebellum of dams and male offspring at PND 21 and 77 after maternal exposure to $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ from GD 10 to PND 21. All eight dams and six male offspring (one animal per dam) were subjected to analysis in each group. *Significantly different from the untreated controls by Dunnett's test ($P < 0.05$).

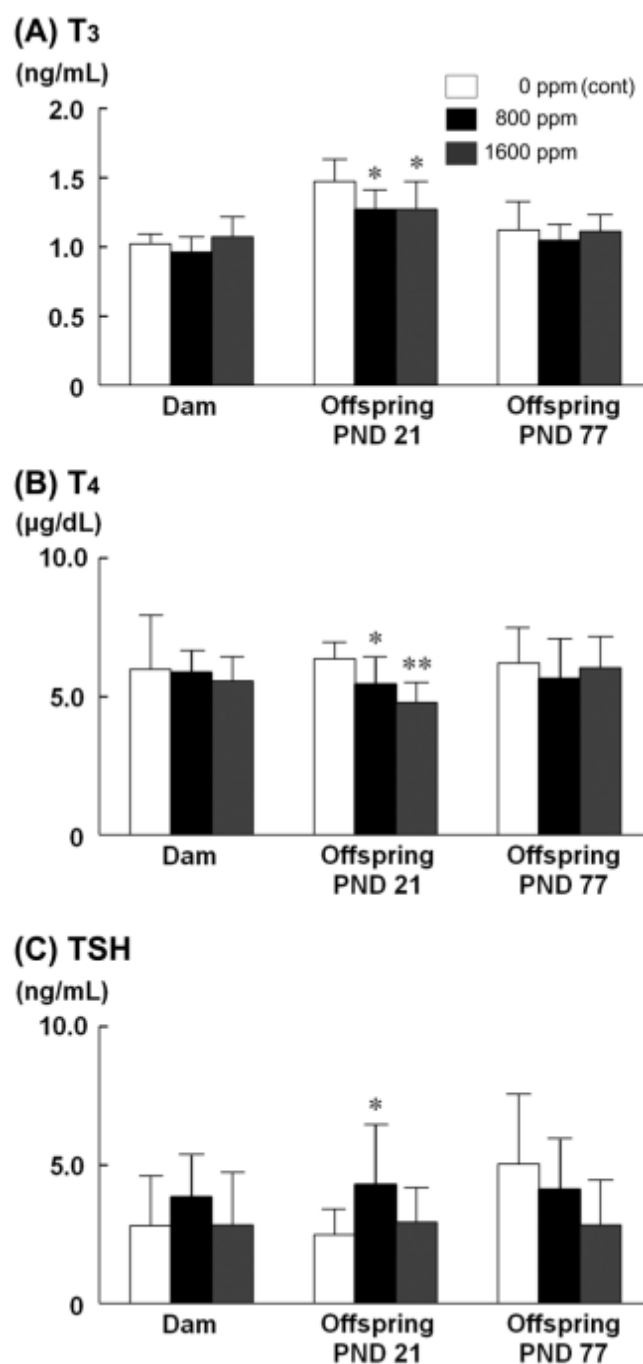


Fig. 2-6

Serum concentrations of thyroid-related hormones of dams and male offspring at PND 21 and 77 after maternal exposure to $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ from GD 10 to PND 21. All eight dams and 10 male offspring (one or two animals per dam) were subjected to hormone analysis in each group. Statistical analysis was performed using the litter as the experimental unit, and litter mean values were subjected to analysis on two offspring samples from the same dam. *, ** Significantly different from the untreated controls by Dunnett's test or Steel's test (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$).

Table 2-5. Functional examination of offspring exposed to $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ during the second half of gestation and lactation periods

		$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ in the diet			
		0 ppm (Control)	32 ppm	160 ppm	800 ppm
Males					
No. of offspring examined ^a		16	16	16	16
Surface righting reflex (PND 10, unit: sec.)		1.7±0.7 ^b	1.1±0.3*	1.9±1.0	1.3±0.2
Air righting reflex (PND 15)	Normal	12	7	6 [#]	4 ^{##}
Pupillary reflex (PND 21)	Normal	16	16	16	16
Preyer's reflex (PND 21)	Normal	16	16	16	16
Pain reflex (PND 21)	Normal	16	16	16	16
Females					
No. of offspring examined ^a		16	16	16	16
Surface righting reflex (PND 10, unit: sec.)		1.8±0.8	2.3±2.0	1.7±0.8	2.0±1.4
Air righting reflex (PND 15)	Normal	10	8	5	3 [#]
Pupillary reflex (PND 21)	Normal	16	16	16	16
Preyer's reflex (PND 21)	Normal	16	16	16	16
Pain reflex (PND 21)	Normal	16	16	16	16

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

[#], ^{##} Significantly different from the control group by Fisher's exact test ([#] P <0.05, ^{##} P <0.01).

Abbreviations: PND, postnatal day.

^a Two male and female offspring per dam were subjected to examination.

^b Mean±SD.

Table 2-6. Grip strength of offspring exposed to $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ during the second half of gestation and lactation periods

		$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ in the diet			
		0 ppm (Control)	32 ppm	160 ppm	800 ppm
Males					
No. of offspring examined ^a		8	8	8	8
Forelimb (g)		1347 ± 157 ^b	1170 ± 123*	1113 ± 149**	1216 ± 139
Hindlimb (g)		879 ± 205	810 ± 130	703 ± 248	755 ± 120
Females					
No. of offspring examined ^a		8	8	8	8
Forelimb (g)		1050 ± 98	1078 ± 49	1162 ± 160	1107 ± 75
Hindlimb (g)		741 ± 62	719 ± 137	822 ± 107	787 ± 71

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

^a One male and female offspring per dam were subjected to examination.

^b Mean±SD.

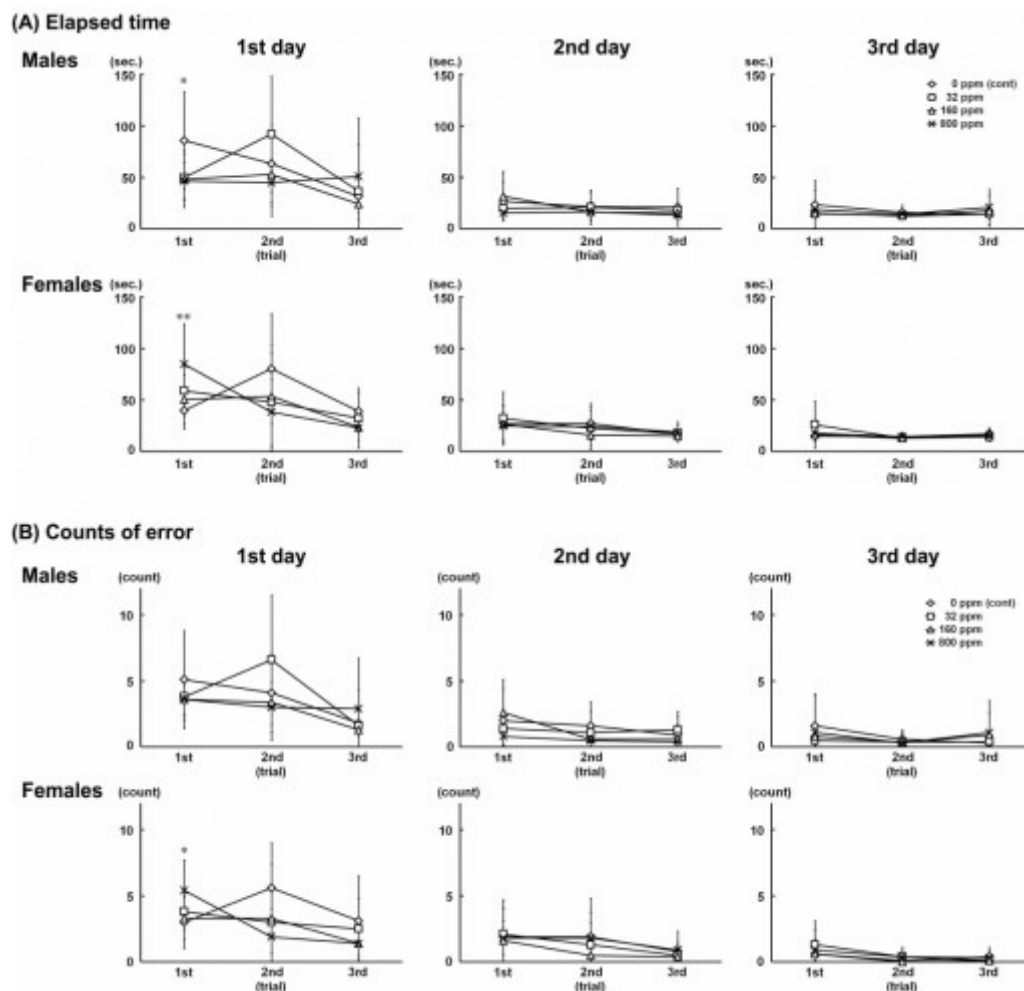


Fig. 2-7

Water-filled multiple T-maze test conducted on PND 55, 56 and 57 in offspring after maternal exposure to $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ from GD 10 to PND 21. Eight male and eight female offspring (one male and one female animals per dam) were subjected to the examination in each group. (A) Elapsed time. (B) Counts of error. *, ** Significantly different from the untreated controls by Dunnett's test or Steel's test (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$).

Table 2-7. Detailed clinical signs of offspring exposed to $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ during the second half of gestation and lactation periods. Examination at postnatal day 29.

		MnCl ₂ ·4H ₂ O in the diet			
		0 ppm (Control)	32 ppm	160 ppm	800 ppm
Males					
No. of offspring examined ^a		8	8	8	8
Home cage observation					
Posture	Normal	8	8	8	8
Convulsion	None	8	8	8	8
Abnormal behavior	None	8	8	8	8
In-the-hand observation					
Ease of removal from cage	Easy	8	8	8	8
Fur condition	Normal	8	8	8	8
Skin	Normal	8	8	8	8
Secretions-eye, nose	Absent	8	8	8	8
Exophthalmos	Absent	8	8	8	8
Palpebral closure	Normal	8	8	8	8
Mucosal membranes	Normal	8	8	8	8
Lacrimation	Normal	8	8	8	8
Piloerection	Absent	8	8	8	8
Pupil size	Normal	8	8	8	8
Salivation	None	8	8	8	8
Abnormal respiration	Absent	8	8	8	8
Vocalization	None	8	8	8	8
Reactivity to handling	Easy	8	8	8	8
Females					
No. of offspring examined ^a		8	8	8	8
Home cage observation					
Posture	Normal	8	8	8	8
Convulsion	None	8	8	8	8
Abnormal behavior	None	8	8	8	8
In-the-hand observation					
Ease of removal from cage	Easy	8	8	8	8
Fur condition	Normal	8	8	8	8
Skin	Normal	8	8	8	8
Secretions-eye, nose	Absent	8	8	8	8
Exophthalmos	Absent	8	8	8	8
Palpebral closure	Normal	8	8	8	8
Mucosal membranes	Normal	8	8	8	8
Lacrimation	Normal	8	8	8	8
Piloerection	Absent	8	8	8	8
Pupil size	Normal	8	8	8	8
Salivation	None	8	8	8	8
Abnormal respiration	Absent	8	8	8	8
Vocalization	None	6	8	7	8
	Soft	2	0	1	0
Reactivity to handling	Easy	8	7	8	8
	Slightly awkward	0	1	0	0

No significant differences in any treated group from the untreated controls.

^a One male and female offspring per dam were subjected to examination.

Table 2-8. Detailed clinical signs of offspring exposed to $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ during the second half of gestation and lactation periods. Examination at postnatal day 43.

		$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ in the diet			
		0 ppm (Control)	32 ppm	160 ppm	800 ppm
Males					
No. of offspring examined ^a		8	8	8	8
Home cage observation					
Posture	Normal	8	8	8	8
Convulsion	None	8	8	8	8
Abnormal behavior	None	8	8	8	8
In-the-hand observation					
Ease of removal from cage	Easy	8	8	8	8
Fur condition	Normal	8	8	8	8
Skin	Normal	8	8	8	8
Secretions-eye, nose	Absent	8	8	8	8
Exophthalmos	Absent	8	8	8	8
Palpebral closure	Normal	8	8	8	8
Mucosal membranes	Normal	8	8	8	8
Lacrimation	Normal	8	8	8	8
Piloerection	Absent	8	8	8	8
Pupil size	Normal	8	8	8	8
Salivation	None	8	8	8	8
Abnormal respiration	Absent	8	8	8	8
Vocalization	None	7	8	8	8
	Soft	1	0	0	0
Reactivity to handling	Easy	8	8	8	8
Females					
No. of offspring examined ^a		8	8	8	8
Home cage observation					
Posture	Normal	8	8	8	8
Convulsion	None	8	8	8	8
Abnormal behavior	None	8	8	8	8
In-the-hand observation					
Ease of removal from cage	Easy	8	8	8	8
Fur condition	Normal	8	8	8	8
Skin	Normal	8	8	8	8
Secretions-eye, nose	Absent	8	8	8	8
Exophthalmos	Absent	8	8	8	8
Palpebral closure	Normal	8	8	8	8
Mucosal membranes	Normal	8	8	8	8
Lacrimation	Normal	8	8	8	8
Piloerection	Absent	8	8	8	8
Pupil size	Normal	8	8	8	8
Salivation	None	8	8	8	8
Abnormal respiration	Absent	8	8	8	8
Vocalization	None	7	8	6	8
	Soft	1	0	2	0
Reactivity to handling	Easy	7	8	8	8
	Slightly awkward	1	0	0	0

No statistically significant differences in any treated group from the untreated controls.

^a One male and female offspring per dam were subjected to examination.

Table 2-9. Detailed clinical signs of offspring exposed to $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ during the second half of gestation and lactation periods. Examination at postnatal day 71.

		MnCl ₂ ·4H ₂ O in the diet			
		0 ppm (Control)	32 ppm	160 ppm	800 ppm
Males					
No. of offspring examined ^a		8	8	8	8
Home cage observation					
Posture	Normal	8	8	8	8
Convulsion	None	8	8	8	8
Abnormal behavior	None	8	8	8	8
In-the-hand observation					
Ease of removal from cage	Easy	8	8	8	8
Fur condition	Normal	8	8	8	8
Skin	Normal	8	8	8	8
Secretions-eye, nose	Absent	8	8	8	8
Exophthalmos	Absent	8	8	8	8
Palpebral closure	Normal	8	8	8	8
Mucosal membranes	Normal	8	8	8	8
Lacrimation	Normal	8	8	8	8
Piloerection	Absent	8	8	8	8
Pupil size	Normal	8	8	8	8
Salivation	None	8	8	8	8
Abnormal respiration	Absent	8	8	8	8
Vocalization	None	8	8	8	8
Reactivity to handling	Easy	8	8	8	8
Females					
No. of offspring examined ^a		8	8	8	8
Home cage observation					
Posture	Normal	8	8	8	8
Convulsion	None	8	8	8	8
Abnormal behavior	None	8	8	8	8
In-the-hand observation					
Ease of removal from cage	Easy	8	8	8	8
Fur condition	Normal	8	8	8	8
Skin	Normal	8	8	8	8
Secretions-eye, nose	Absent	8	8	8	8
Exophthalmos	Absent	8	8	8	8
Palpebral closure	Normal	8	8	8	8
Mucosal membranes	Normal	8	8	8	8
Lacrimation	Normal	8	8	8	8
Piloerection	Absent	8	8	8	8
Pupil size	Normal	8	8	8	8
Salivation	None	8	8	8	8
Abnormal respiration	Absent	8	8	8	8
Vocalization	None	8	8	8	8
Reactivity to handling	Easy	8	8	8	8

No statistically significant differences in any treated group from the untreated controls.

^a One male and female offspring per dam were subjected to examination.

Table 2-10. Manipulative test of offspring exposed to $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ during the second half of gestation and lactation periods

		0 ppm (Control)	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ in the diet		
			32 ppm	160 ppm	800 ppm
Males					
No. of offspring examined ^a		8	8	8	8
Auditory response	Normal	8	8	8	8
Approach response	Normal	8	8	8	8
Touch response	Normal	8	8	8	8
Tail pinch response	Normal	8	8	8	8
Pupillary reflex	Normal	8	8	8	8
Air righting reflex	Normal	8	8	8	8
Landing foot splay (mm)		95 ± 24 ^b	83 ± 17	75 ± 30	105 ± 11
Females					
No. of offspring examined ^a		8	8	8	8
Auditory response	Normal	8	8	8	8
Approach response	Normal	8	8	8	8
Touch response	Normal	8	8	8	8
Tail pinch response	Normal	8	8	8	8
Pupillary reflex	Normal	8	8	8	8
Air righting reflex	Normal	8	8	8	8
Landing foot splay (mm)		59 ± 19	70 ± 18	65 ± 22	70 ± 18

No statistically significant differences in any treated group from the untreated controls.

^a One male and female offspring per dam were subjected to examination.

^b Mean ± SD.

Table 2-11. Motor activity of offspring exposed to $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ during the second half of gestation and lactation periods

		0 ppm (Control)	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ in the diet		
			32 ppm	160 ppm	800 ppm
Males					
No. of offspring examined ^a		8	8	8	8
Total (0-60 min)		2170 ± 307 ^b	2249 ± 222	2291 ± 182	2268 ± 129
0-10 min		438 ± 44	439 ± 25	454 ± 33	463 ± 30
10-20 min		441 ± 35	424 ± 23	409 ± 22	406 ± 51
20-30 min		354 ± 39	364 ± 46	390 ± 41	385 ± 32
30-40 min		328 ± 51	334 ± 68	347 ± 51	358 ± 55
40-50 min		325 ± 111	327 ± 73	356 ± 42	343 ± 56
50-60 min		315 ± 139	361 ± 50	336 ± 62	314 ± 78
Females					
No. of offspring examined ^a		8	8	8	8
Total (0-60 min)		1937 ± 352	1844 ± 331	2053 ± 126	1883 ± 326
0-10 min		399 ± 44	385 ± 56	422 ± 33	422 ± 49
10-20 min		335 ± 48	350 ± 56	394 ± 42	371 ± 55
20-30 min		333 ± 67	333 ± 66	355 ± 37	358 ± 53
30-40 min		310 ± 106	280 ± 100	342 ± 34	266 ± 100
40-50 min		253 ± 122	234 ± 107	268 ± 97	233 ± 126
50-60 min		308 ± 65	262 ± 103	273 ± 85	233 ± 85

No statistically significant differences in any treated group from the untreated controls.

^a One offspring per dam was subjected to examination.

^b Mean ± SD.

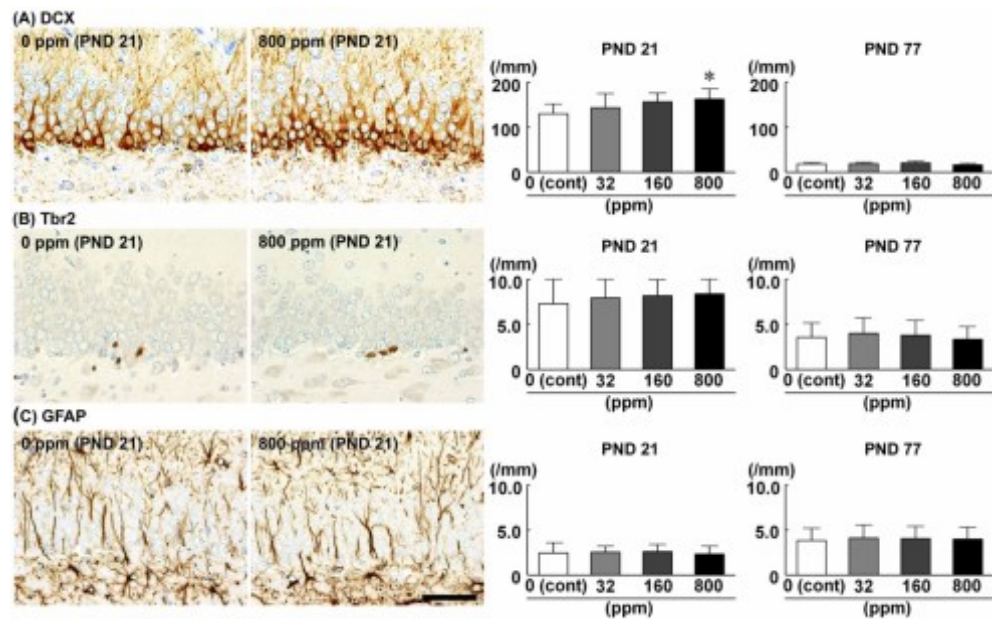


Fig. 2-8

Distribution of immunoreactive cells for Dcx, Tbr2 and GFAP in the dentate subgranular zone of male offspring at PND 21 and 77 after maternal exposure to $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ from GD 10 to PND 21. All identical 10 male offspring from eight dams (one or two animals per dam) were subjected to immunohistochemical analyses in each group. (A) Dcx. (B) Tbr2. (C) GFAP. Representative images from 0 ppm group (left) and from 800 ppm group (right) at PND 21 (bar = 50 μm). *Significantly different from the untreated controls by Dunnett's test ($P < 0.05$).

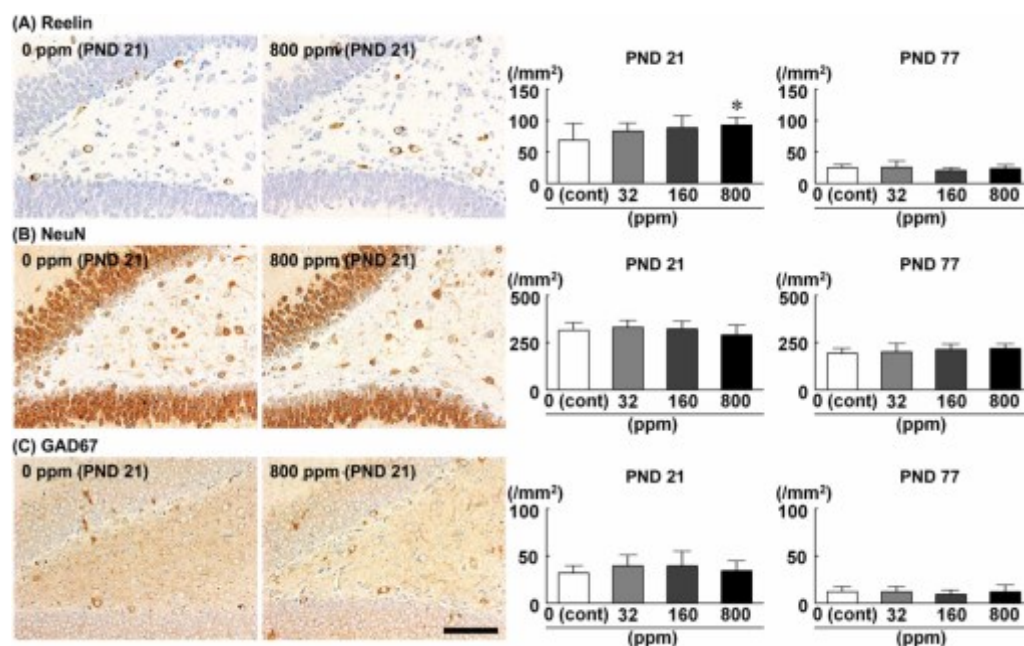


Fig. 2-9

Distribution of immunoreactive cells for reelin, NeuN and GAD67 in the hilus of the hippocampal dentate gyrus in male offspring at PND 21 and 77 after maternal exposure to $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ from GD 10 to PND 21. All identical 10 male offspring from eight dams (one or two animals per dam) were subjected to immunohistochemical analyses in each group. (A) Reelin. (B) NeuN. (C) GAD67. Representative images from 0 ppm group (left) and from 800 ppm group (right) at PND 21 (bar = 100 μm). * Significantly different from the untreated controls by Dunnett's test ($P < 0.05$).

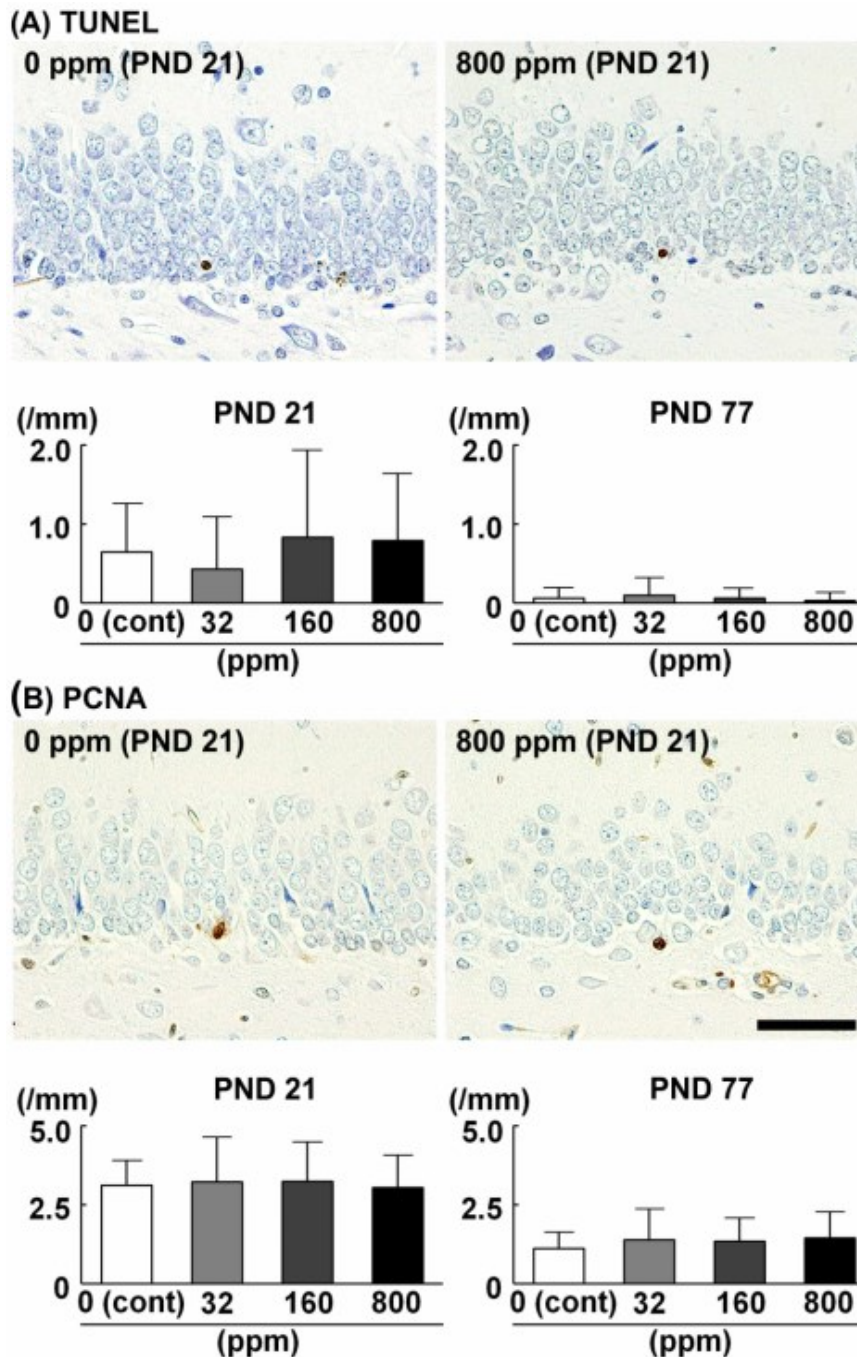


Fig. 2-10

Distribution of apoptotic cells and proliferating cells in the dentate subgranular zone of male offspring at PND 21 and 77 after maternal exposure to $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ from GD 10 to PND 21. All identical 10 male offspring from eight dams (one or two animals per dam) as used in the immunohistochemical analysis were subjected to TUNEL-assay and PCNA-immunohistochemistry in each group. Statistical analysis was performed using the litter as the experimental unit and litter mean values were subjected to analysis on two offspring samples from the same dam. (A) TUNEL. (B) PCNA. Representative images from 0 ppm group (left) and from 800 ppm group (right) at PND 21 (bar = 50 μm).

Table 2-12. Real-time PCR analysis in the hippocampus of offspring exposed to $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ during the second half of gestation and lactation periods. Examination at postnatal day 21.

	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ in the diet			
	0 ppm (Control)	32 ppm	160 ppm	800 ppm
No. of offspring examined ^a	6	6	6	5
<i>Dcx</i>	1.02 ± 0.25 ^b	1.06 ± 0.32	0.93 ± 0.11	0.87 ± 0.14
<i>Neurod1</i>	1.00 ± 0.10	1.03 ± 0.18	1.08 ± 0.13	1.23 ± 0.26
<i>Pax6</i>	1.03 ± 0.28	0.76 ± 0.12	1.05 ± 0.26	1.24 ± 0.41
<i>Dpysl3</i>	1.01 ± 0.18	0.98 ± 0.17	0.88 ± 0.09	0.86 ± 0.13
<i>Reln</i>	1.03 ± 0.29	1.04 ± 0.12	0.91 ± 0.21	0.86 ± 0.17
<i>Vldlr</i>	1.02 ± 0.26	1.12 ± 0.25	0.88 ± 0.18	0.83 ± 0.07
<i>Lrp8</i>	1.03 ± 0.30	0.99 ± 0.15	0.93 ± 0.15	0.88 ± 0.14
<i>Dab1</i>	1.02 ± 0.21	0.96 ± 0.12	1.03 ± 0.36	0.96 ± 0.28

No statistically significant differences in any treated group from the untreated controls.

^a One male offspring per dam ($n = 5$ or $6/\text{group}$) was subjected to analysis.

^b Mean ± SD.

Abbreviations: *Dcx*, doublecortin; *Neurod1*, neurogenic differentiation 1; *Pax6*, paired box 6; *Dpysl3*, dihydropyrimidinase-like 3; *Reln*, reelin; *Vldlr*, very low density lipoprotein receptor; *Lrp8*, low density lipoprotein receptor-related protein 8; *Dab1*, disabled homolog 1.

Table 3-1. Summary of culling and selection of animals at necropsy

	Per Litter	Per Group (N=8)
PND 4		
Culling	Leaving 4 males and 4 females	Leaving 32 males and 32 females
PND 21		
Pre-pubertal sampling of the brain	2 males and 2 females	16 males and 16 females
Pre-pubertal immunohistochemistry	1 or 2 males	10 males
ChE activity	1 male	6 males
PND 77		
Sampling of the brain	2 males and 2 females	16 males and 16 females
Immunohistochemistry	1 or 2 males	10 males
ChE activity	1 male	6 males

PND, postnatal day.

Table 3-2. Elapsed time in the straight course of water-filled multiple T-maze test in offspring exposed to chlorpyrifos during the second half of gestation and lactation

		Chlorpyrifos in diet (ppm)			
		0 (Control)	2.8	14	70
Males					
No. of offspring examined ^a		8	8	8	8
1st trial	Elapsed time (s)	10.4±2.1 ^b	17.8±6.4*	13.9±4.3	24.0±14.8**
2nd trial	Elapsed time (s)	6.3±0.9	6.5±1.1	7.4±2.5	6.4±0.9
3rd trial	Elapsed time (s)	5.9±1.2	6.4±1.1	7.8±4.5	5.4±0.9
Females					
No. of offspring examined ^a		8	8	8	8
1st trial	Elapsed time (s)	18.0±7.6	21.1±8.1	19.6±6.4	14.9±2.9
2nd trial	Elapsed time (s)	7.1±2.3	7.3±2.1	9.8±5.5	7.6±1.2
3rd trial	Elapsed time (s)	6.0±1.1	5.8±1.2	6.6±1.2	6.6±1.8

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

All animals reached the goal.

^a One male and one female offspring per dam was subjected to examination.

^b Mean±SD.

Table 3-3. Body weight of dams exposed to chlorpyrifos during the second half of gestation and lactation

	Chlorpyrifos in the diet			
	Control	2.8 ppm	14 ppm	70 ppm
No. of dam examined	8	8	8	8
Body weight (g)				
GD 10	283.4 ± 24.3 ^a	289.4 ± 17.2	290.1 ± 17.0	289.6 ± 14.2
GD 11	291.5 ± 25.4	298.3 ± 17.0	298.4 ± 15.8	296.5 ± 12.9
GD 12	297.3 ± 24.3	305.3 ± 16.9	306.4 ± 17.5	303.1 ± 14.4
GD 13	301.3 ± 23.7	310.4 ± 17.2	311.4 ± 18.2	308.5 ± 15.2
GD 14	307.0 ± 23.8	315.6 ± 17.0	317.9 ± 18.1	316.3 ± 14.5
GD 15	314.5 ± 27.4	324.4 ± 19.2	326.9 ± 17.6	325.9 ± 16.0
GD 16	324.0 ± 26.8	335.0 ± 16.9	336.5 ± 16.7	335.3 ± 14.5
GD 17	337.9 ± 29.6	347.9 ± 18.2	349.9 ± 18.5	347.3 ± 15.3
GD 18	350.0 ± 29.2	361.9 ± 18.2	365.4 ± 16.5	360.9 ± 16.7
GD 19	368.1 ± 29.2	377.6 ± 17.7	382.6 ± 16.8	379.3 ± 16.7
GD 20	383.4 ± 33.8	392.8 ± 18.8	401.3 ± 17.8	393.5 ± 17.5
PND 0	291.8 ± 21.9	312.9 ± 25.2	309.3 ± 17.7	300.3 ± 14.2
PND 4	311.5 ± 26.0	330.6 ± 21.8	325.4 ± 17.1	324.3 ± 15.1
PND 7	319.8 ± 20.9	328.6 ± 22.0	330.4 ± 16.8	322.5 ± 8.3
PND 11	303.6 ± 13.9	327.9 ± 26.7	325.4 ± 9.2*	326.0 ± 13.2*
PND 14	317.4 ± 18.8	328.6 ± 23.6	322.6 ± 8.2	315.9 ± 12.7
PND 17	322.0 ± 22.0	326.0 ± 22.8	331.8 ± 12.9	316.3 ± 18.5
PND 21	308.0 ± 24.0	315.5 ± 17.3	312.6 ± 10.7	303.9 ± 17.8

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

^a Mean ± SD.

Table 3-4. Food consumption of dams exposed to chlorpyrifos during the second half of gestation and lactation

	Chlorpyrifos in the diet			
	Control	2.8 ppm	14 ppm	70 ppm
No. of dam examined	8	8	8	8
Food consumption (g/animal/day)				
GD 10	19.6 ± 2.6 ^a	20.3 ± 2.6	20.0 ± 2.9	20.0 ± 1.3
GD 14	22.8 ± 1.6	23.9 ± 1.6	24.6 ± 1.4*	24.1 ± 1.1
GD 17	23.4 ± 1.3	24.6 ± 1.6	25.4 ± 1.6*	25.4 ± 1.8*
GD 20	24.5 ± 1.1	24.9 ± 1.8	26.4 ± 1.3*	25.6 ± 1.4
PND 4	34.5 ± 4.9	35.8 ± 2.4	36.9 ± 2.4	37.8 ± 2.8
PND 7	41.3 ± 2.7	40.6 ± 2.6	43.3 ± 2.3	41.6 ± 1.9
PND 11	45.4 ± 1.5	47.8 ± 2.9	48.4 ± 3.4	47.9 ± 3.1
PND 14	53.4 ± 4.6	54.5 ± 4.0	54.5 ± 3.2	52.1 ± 2.7
PND 17	58.1 ± 3.8	57.1 ± 5.3	59.6 ± 4.7	55.1 ± 4.7
PND 21	68.3 ± 3.0	69.0 ± 3.5	71.4 ± 3.9	68.0 ± 4.5
Food consumption (g/kg body weight/day)				
GD 10	69.4 ± 8.7	74.0 ± 13.7	73.0 ± 15.2	69.0 ± 2.8
GD 14	74.3 ± 5.0	75.7 ± 4.0	77.5 ± 1.5	76.3 ± 1.7
GD 17	69.4 ± 3.8	70.8 ± 3.9	72.6 ± 3.7	73.0 ± 2.8
GD 20	64.2 ± 4.0	63.4 ± 3.7	65.8 ± 4.0	65.2 ± 3.2
PND 4	110.7 ± 12.2	108.8 ± 13.1	113.6 ± 9.8	116.7 ± 11.1
PND 7	129.2 ± 8.4	124.4 ± 12.9	131.3 ± 10.4	129.2 ± 8.7
PND 11	149.7 ± 9.2	146.5 ± 15.1	148.6 ± 9.1	147.1 ± 11.4
PND 14	168.3 ± 12.0	167.2 ± 22.9	169.0 ± 10.2	165.4 ± 12.9
PND 17	180.7 ± 7.3	176.1 ± 21.9	179.7 ± 12.1	174.4 ± 11.9
PND 21	222.6 ± 17.8	219.6 ± 20.4	228.4 ± 12.5	224.6 ± 22.3

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

^a Mean ± SD.

Table 3-5. Body weight of offspring exposed to chlorpyrifos during the second half of gestation and lactation

	Chlorpyrifos in the diet			
	Control	2.8 ppm	14 ppm	70 ppm
Body weight (g)				
Males				
No. of offspring examined ^a	16	16	16	16
PND 0	6.6 ± 0.3 ^b	6.9 ± 0.5	6.9 ± 0.4	6.7 ± 0.2
PND 4	10.7 ± 1.1	10.9 ± 0.9	11.4 ± 0.5	10.9 ± 0.7
PND 7	17.2 ± 1.6	17.6 ± 1.8	18.8 ± 0.5*	18.0 ± 0.6
PND 11	26.2 ± 1.3	27.4 ± 3.0	29.1 ± 1.1**	27.4 ± 1.2
PND 14	33.2 ± 2.1	34.8 ± 3.1	36.6 ± 1.4**	34.3 ± 1.5
PND 17	41.0 ± 2.7	42.5 ± 3.5	44.3 ± 2.1*	41.1 ± 1.9
PND 21	57.8 ± 3.1	60.5 ± 4.3	63.1 ± 2.8*	57.2 ± 3.1
PND 28	100.6 ± 4.4	103.9 ± 5.1	107.1 ± 7.4	99.4 ± 4.8
PND 35	171.1 ± 8.7	174.5 ± 6.3	179.3 ± 11.5	168.3 ± 8.4
PND 42	245.1 ± 14.7	251.3 ± 9.9	256.4 ± 17.5	243.1 ± 12.2
PND 49	315.6 ± 18.6	321.9 ± 13.1	327.3 ± 23.5	314.9 ± 16.8
PND 56	375.4 ± 21.2	384.7 ± 19.5	391.4 ± 28.3	380.6 ± 19.1
PND 63	422.4 ± 21.6	435.1 ± 26.8	440.3 ± 28.8	429.3 ± 21.1
PND 70	464.5 ± 23.5	477.3 ± 31.3	485.0 ± 33.0	474.1 ± 23.2
PND 77	496.6 ± 25.9	514.7 ± 34.6	520.5 ± 33.6	508.3 ± 25.9
Females				
No. of offspring examined ^a	16	16	16	16
PND 0	6.2 ± 0.3	6.5 ± 0.7	6.6 ± 0.4	6.3 ± 0.2
PND 4	9.9 ± 1.2	10.4 ± 1.0	11.1 ± 0.8*	10.1 ± 0.9
PND 7	15.9 ± 1.8	16.8 ± 1.9	17.8 ± 1.2*	16.6 ± 0.9
PND 11	24.3 ± 2.0	26.1 ± 2.6	27.5 ± 1.8**	25.6 ± 1.5
PND 14	31.2 ± 2.9	33.3 ± 2.6	34.8 ± 2.0*	32.5 ± 1.7
PND 17	38.6 ± 3.1	40.4 ± 3.1	42.3 ± 2.5*	39.0 ± 2.4
PND 21	54.3 ± 4.0	57.1 ± 3.5	58.6 ± 3.6	54.2 ± 3.6
PND 28	88.0 ± 7.2	91.6 ± 3.3	95.3 ± 9.5	89.6 ± 5.0
PND 35	138.3 ± 8.9	141.8 ± 6.0	143.6 ± 11.9	142.8 ± 7.2
PND 42	176.6 ± 13.1	180.5 ± 7.6	183.4 ± 14.7	183.4 ± 6.6
PND 49	202.9 ± 13.7	208.9 ± 10.5	213.5 ± 15.3	215.4 ± 8.2
PND 56	226.4 ± 17.5	233.0 ± 14.3	239.3 ± 18.9	241.3 ± 10.0
PND 63	251.4 ± 20.3	255.8 ± 16.5	260.4 ± 22.5	265.8 ± 9.9
PND 70	268.9 ± 22.8	273.1 ± 16.8	281.4 ± 22.8	286.0 ± 10.1
PND 77	279.8 ± 23.8	287.3 ± 15.9	296.8 ± 22.6	300.6 ± 12.3

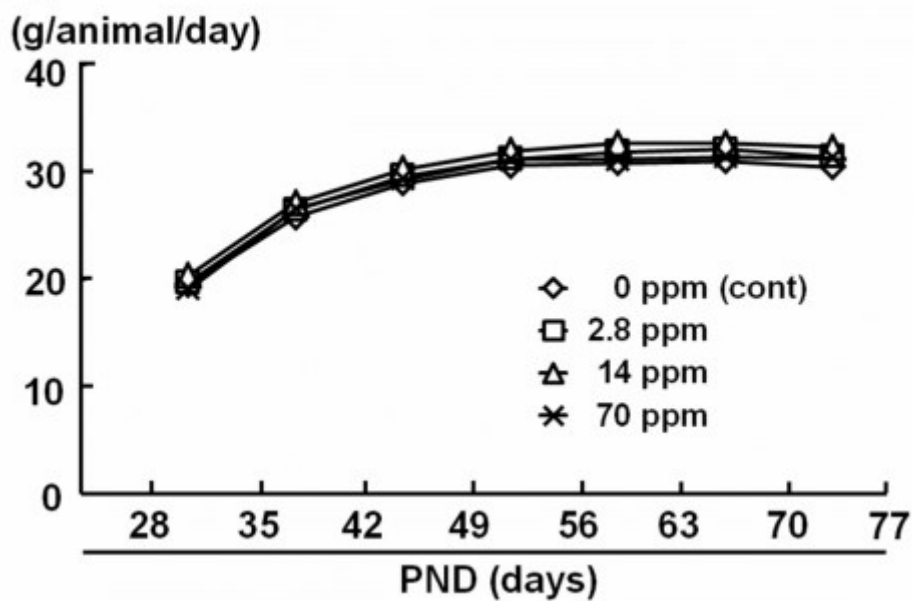
*, ** Significantly different from the control group by Dunnett's test or Steel's test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

Abbreviations: PND, postnatal day.

^a Identical two male and two female offspring per dam ($n = 8$ /group) were used for body weight measurement throughout the experiment.

^b Mean ± SD.

(A) Males



(B) Females

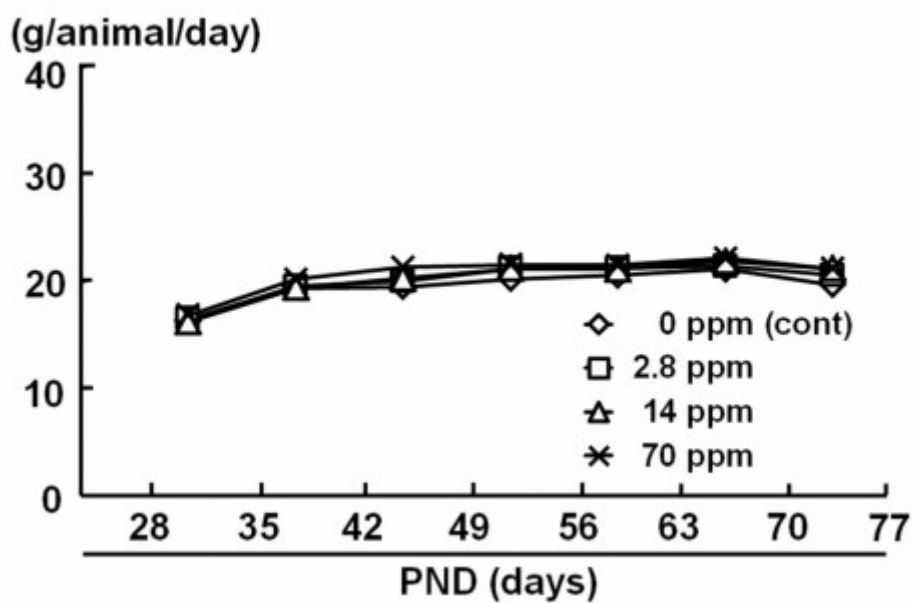


Fig. 3-1

Food consumption of offspring exposed maternally to CPF from GD 10 through to day 21 after delivery. (A) Males. (B) Females.

Table 3-6. External differentiation of offspring exposed to chlorpyrifos during the second half of gestation and lactation

		Chlorpyrifos in diet (ppm)			
	0 (Control)	2.8	14	70	
Pinna detachment					
No. of offspring examined (males and females)	102	95	95	105	
No. of offspring differentiated on PND 4	102	95	95	105	
Eruption of lower incisor					
No. of offspring examined (males and females)	64	64	64	64	
No. of offspring differentiated on PND 11	39	48	56**	44	
No. of offspring differentiated on PND 14	64	64	64	64	
Opening of eyelid					
No. of offspring examined (males and females)	64	64	64	64	
No. of offspring differentiated on PND 14	46	62**	59**	53	
No. of offspring differentiated on PND 17	64	64	64	64	
Opening of vagina					
No. of offspring examined (females)	16	16	16	16	
No. of offspring differentiated on PND 35	16	16	16	16	
No. of offspring differentiated on PND 42	16	16	16	16	
Cleavage of the balanopreputial gland					
No. of offspring examined (males)	16	16	16	16	
No. of offspring differentiated on PND 42	14	15	16	14	
No. of offspring differentiated on PND 49	16	16	16	16	

** Significantly different from the control group by Fisher's exact test (** $P<0.01$).
PND, postnatal day.

Table 3-7. Organ weights of offspring exposed to chlorpyrifos during the second half of gestation and lactation

		Chlorpyrifos in diet (ppm)			
		0 (Control)	2.8	14	70
PND 21					
Males					
No. of offspring examined ^a		10	10	10	10
Brain	(g)	1.51 ± 0.05 ^a	1.56 ± 0.05	1.48 ± 0.05	1.51 ± 0.04
	(g/100g BW)	2.70 ± 0.30	2.74 ± 0.23	2.54 ± 0.19	2.47 ± 0.17
Liver	(g)	2.15 ± 0.30	2.17 ± 0.19	2.16 ± 0.17	2.21 ± 0.23
	(g/100g BW)	3.79 ± 0.17	3.79 ± 0.17	3.67 ± 0.22	3.59 ± 0.17
Kidneys	(g)	0.64 ± 0.07	0.64 ± 0.06	0.66 ± 0.04	0.66 ± 0.06
	(g/100g BW)	1.13 ± 0.07	1.13 ± 0.04	1.12 ± 0.07	1.08 ± 0.05
Testes	(g)	0.26 ± 0.02	0.24 ± 0.03	0.26 ± 0.02	0.25 ± 0.03
	(g/100g BW)	0.45 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.45 ± 0.04	0.41 ± 0.02
Females					
No. of offspring examined ^a		10	10	10	10
Brain	(g)	1.48 ± 0.05	1.54 ± 0.06	1.50 ± 0.04	1.47 ± 0.04
	(g/100g BW)	2.75 ± 0.24	2.75 ± 0.18	2.56 ± 0.19	2.55 ± 0.25
Liver	(g)	2.06 ± 0.19	2.08 ± 0.18	2.23 ± 0.20	2.10 ± 0.27
	(g/100g BW)	3.82 ± 0.20	3.71 ± 0.15	3.81 ± 0.20	3.60 ± 0.16
Kidneys	(g)	0.63 ± 0.07	0.64 ± 0.05	0.67 ± 0.05	0.67 ± 0.07
	(g/100g BW)	1.17 ± 0.08	1.14 ± 0.06	1.15 ± 0.05	1.14 ± 0.06
Ovaries	(mg)	16.7 ± 1.70	16.9 ± 1.89	17.0 ± 3.52	16.1 ± 2.22
	(mg/100g BW)	30.9 ± 2.41	30.4 ± 4.36	29.3 ± 7.29	27.9 ± 4.08
PND 77					
Males					
No. of offspring examined ^a		10	10	10	10
Brain	(g)	2.04 ± 0.06	2.07 ± 0.06	2.00 ± 0.07	2.03 ± 0.06
	(g/100g BW)	0.42 ± 0.03	0.42 ± 0.03	0.41 ± 0.04	0.42 ± 0.03
Liver	(g)	18.09 ± 2.16	18.81 ± 2.85	18.11 ± 2.65	17.48 ± 2.14
	(g/100g BW)	3.74 ± 0.28	3.77 ± 0.33	3.69 ± 0.26	3.59 ± 0.24
Kidneys	(g)	3.08 ± 0.35	3.20 ± 0.38	3.18 ± 0.18	3.22 ± 0.29
	(g/100g BW)	0.64 ± 0.05	0.64 ± 0.05	0.65 ± 0.05	0.66 ± 0.03
Testes	(g)	3.46 ± 0.30	3.16 ± 0.21	3.28 ± 0.32	3.36 ± 0.27
	(g/100g BW)	0.72 ± 0.08	0.64 ± 0.05	0.68 ± 0.09	0.69 ± 0.07
Females					
No. of offspring examined ^a		10	10	10	10
Brain	(g)	1.90 ± 0.05	1.90 ± 0.06	1.84 ± 0.05	1.87 ± 0.08
	(g/100g BW)	0.67 ± 0.07	0.66 ± 0.07	0.66 ± 0.07	0.65 ± 0.04
Liver	(g)	9.70 ± 1.43	9.67 ± 1.41	9.25 ± 1.52	9.66 ± 0.55
	(g/100g BW)	3.38 ± 0.27	3.33 ± 0.27	3.28 ± 0.22	3.38 ± 0.15
Kidneys	(g)	1.90 ± 0.14	1.88 ± 0.25	1.81 ± 0.14	1.91 ± 0.13
	(g/100g BW)	0.67 ± 0.05	0.65 ± 0.05	0.65 ± 0.07	0.67 ± 0.05
Ovaries	(mg)	84.2 ± 11.37	81.1 ± 12.56	89.0 ± 17.50	93.7 ± 8.69
	(mg/100g BW)	29.5 ± 3.16	28.1 ± 3.42	31.6 ± 3.91	32.8 ± 3.01

No statistically significant differences were found between the untreated controls and any of the treatment groups.

BW, body weight; PND, postnatal day.

^a One or two offspring of each sex per dam ($n = 8$ per group) were subjected to autopsy and organ weight measurement at each time point. Statistical analysis was performed using the litter as the experimental unit, and mean values were estimated as a litter value when two offspring were examined from the same dam.

^b Mean ± SD.

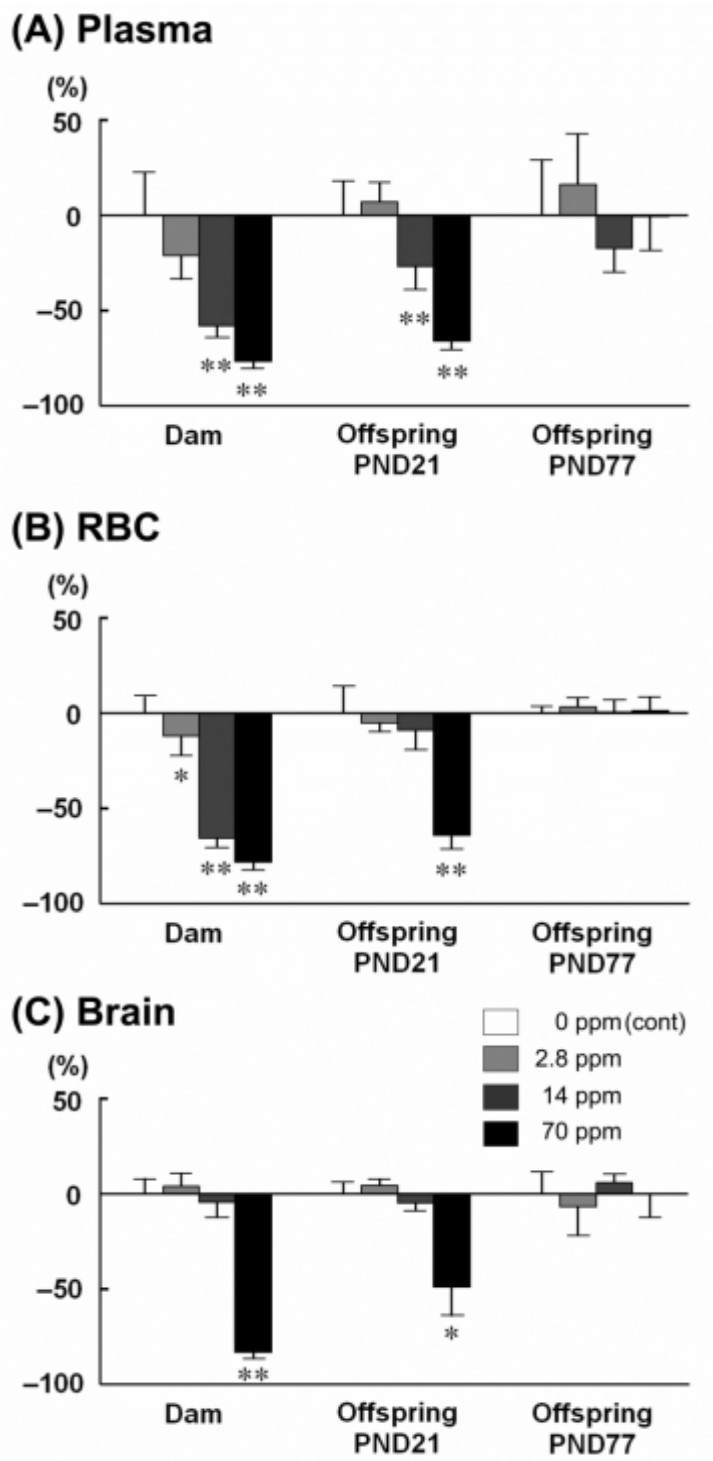


Fig. 3-2

ChE activities in plasma, RBC and brain of dams and male offspring at PND 21 and PND 77. (A) Plasma, (B) RBC, (C) Brain. All eight dams and six male offspring from six dams (one animal per dam) were subjected to analysis in each group. Data are presented as the percentage of change from corresponding control mean values and are expressed as the mean±SD. * ** Significantly different from the untreated controls by Dunnett's test or Steel's test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

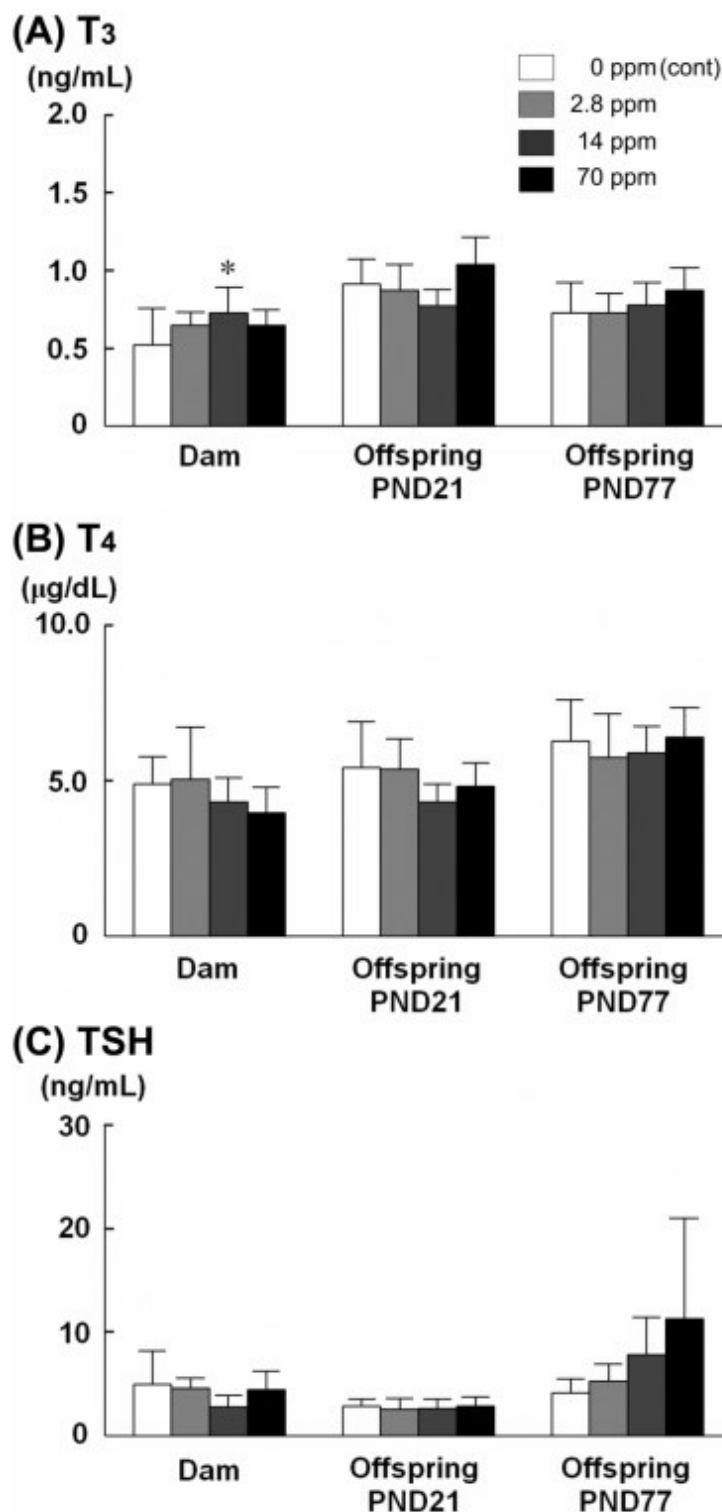


Fig. 3-3

Plasma concentrations of thyroid-related hormones of dams and male offspring at PND 21 and PND 77. (A) T₃, (B) T₄, (C) TSH. All eight dams and six male offspring from six dams (one animal per dam) were subjected to hormone analysis in each group. Values are expressed as the mean+SD. * Significantly different from the untreated controls by Dunnett's test or Steel's test ($P<0.05$).

Table 3-8. Motor activity of offspring exposed to chlorpyrifos during the second half of gestation and lactation

	Chlorpyrifos in diet (ppm)			
	0 (Control)	2.8	14	70
Males				
No. of offspring examined ^a	8	8	8	8
Total (0-60 min)	2155 ± 184 ^b	2187 ± 231	1898 ± 227	1892 ± 242
0-10 min	398 ± 42	435 ± 32	441 ± 33*	438 ± 20
10-20 min	398 ± 41	388 ± 44	358 ± 31	386 ± 67
20-30 min	341 ± 52	365 ± 68	335 ± 32	346 ± 58
30-40 min	349 ± 65	340 ± 82	318 ± 64	300 ± 89
40-50 min	348 ± 27	349 ± 25	211 ± 121**	262 ± 119
50-60 min	322 ± 40	310 ± 58	235 ± 100	162 ± 145
Females				
No. of offspring examined ^a	8	8	8	8
Total (0-60 min)	1759 ± 378	1919 ± 226	1861 ± 315	1819 ± 365
0-10 min	346 ± 97	378 ± 39	374 ± 46	412 ± 18
10-20 min	330 ± 76	332 ± 45	332 ± 53	358 ± 20
20-30 min	320 ± 69	328 ± 55	286 ± 68	328 ± 45
30-40 min	236 ± 103	327 ± 40	278 ± 66	288 ± 116
40-50 min	257 ± 63	301 ± 56	313 ± 84	188 ± 136
50-60 min	270 ± 101	252 ± 90	279 ± 80	244 ± 154

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

^a One offspring per dam was subjected to examination.

^b Mean ± SD.

Table 3-9. Water-filled multiple T-maze test of male offspring exposed to chlorpyrifos during the second half of gestation and lactation

			Chlorpyrifos in diet (ppm)		
		0 (Control)	2.8	14	70
Females					
No. of offspring examined ^a		8	8	8	8
1st day					
1st trial	No. of animals that reached the goal	8	7	6	8
	Elapsed time (s)	76.6±51.7	56.9±25.9	71.8±44.1	62.5±45.9
	Counts of error	5.8±3.7	4.3±1.5	4.3±2.5	4.1±2.7
2nd trial	No. of animals that reached the goal	8	6	7	8
	Elapsed time (s)	60.0±26.7	33.3±17.7	33.6±16.5	63.8±32.5
	Counts of error	5.0±2.7	2.0±1.7*	2.4±1.4	5.0±2.5
3rd trial	No. of animals that reached the goal	8	8	8	8
	Elapsed time (s)	45.9±26.5	40.5±18.6	52.6±40.4	47.8±24.9
	Counts of error	3.6±2.1	2.9±1.2	3.6±3.5	3.5±1.9
2nd day					
1st trial	No. of animals that reached the goal	8	8	8	8
	Elapsed time (s)	34.0±19.7	44.1±29.5	64.6±19.2	48.3±27.2
	Counts of error	3.0±2.2	3.5±3.4	3.0±2.0	4.1±3.2
2nd trial	No. of animals that reached the goal	8	8	8	8
	Elapsed time (s)	18.0±4.7	33.1±20.0	26.0±10.0	20.8±8.6
	Counts of error	1.0±0.9	2.1±2.0	2.0±1.4	1.3±1.3
3rd trial	No. of animals that reached the goal	8	8	8	8
	Elapsed time (s)	18.5±7.9	24.6±14.1	18.9±6.1	20.5±7.6
	Counts of error	0.6±0.9	1.3±1.4	0.6±0.7	1.4±1.4
3rd day					
1st trial	No. of animals that reached the goal	8	8	8	8
	Elapsed time (s)	23.6±20.0	26.9±20.3	35.4±52.4	26.6±14.0
	Counts of error	1.4±2.4	1.4±1.6	2.3±4.2	2.6±2.0
2nd trial	No. of animals that reached the goal	8	8	8	8
	Elapsed time (s)	18.4±5.8	21.5±9.4	20.4±7.4	17.1±5.3
	Counts of error	0.8±0.7	0.8±0.9	0.9±1.0	0.6±0.7
3rd trial	No. of animals that reached the goal	8	8	8	8
	Elapsed time (s)	17.1±5.6	17.3±9.4	15.3±5.4	14.9±3.0
	Counts of error	0.5±0.8	0.9±1.7	0.3±0.5	0.4±0.5

No statistically significant differences were found between the untreated controls and any of the treatment groups.

^a One offspring per dam was subjected to examination.

^b Mean±SD.

Table 3-10. Water-filled multiple T-maze test of female offspring exposed to chlorpyrifos during the second half of gestation and lactation

		Chlorpyrifos in diet (ppm)			
		0 (Control)	2.8	14	70
Females					
No. of offspring examined ^a		8	8	8	8
1st day					
1st trial	No. of animals that reached the goal	8	8	8	8
	Elapsed time (s)	48.3±14.4	59.5±23.4	62.8±23.4	47.6±31.9
	Counts of error	3.6±1.4	5.1±2.5	4.9±2.3	3.4±2.8
2nd trial	No. of animals that reached the goal	7	8	8	7
	Elapsed time (s)	69.4±28.4	55.6±33.6	45.1±26.3	74.3±39.1
	Counts of error	5.1±1.8	3.4±2.4	3.5±2.4	5.6±3.9
3rd trial	No. of animals that reached the goal	7	8	8	8
	Elapsed time (s)	26.0±8.3	24.3±8.9	25.1±16.8	37.5±17.5
	Counts of error	1.5±1.2	1.3±1.3	1.1±1.1	2.8±2.3
2nd day					
1st trial	No. of animals that reached the goal	8	8	8	8
	Elapsed time (s)	24.8±16.7	22.9±7.6	17.3±6.2	24.9±20.4
	Counts of error	1.5±1.5	1.3±1.0	0.5±0.8	1.1±1.4
2nd trial	No. of animals that reached the goal	8	8	8	8
	Elapsed time (s)	15.1±4.1	16.1±4.5	19.0±7.9	33.1±51.0
	Counts of error	0.4±0.5	0.4±0.5	1.0±1.6	2.3±5.2
3rd trial	No. of animals that reached the goal	8	8	8	8
	Elapsed time (s)	14.5±2.1	16.4±5.5	17.0±6.4	17.5±7.8
	Counts of error	0.3±0.5	0.3±0.5	0.6±1.2	0.4±0.5
3rd day					
1st trial	No. of animals that reached the goal	8	8	8	8
	Elapsed time (s)	18.6±13.9	18.3±6.1	20.6±12.4	35.6±46.9
	Counts of error	0.6±1.4	0.9±1.1	0.9±1.4	2.9±5.2
2nd trial	No. of animals that reached the goal	8	8	8	8
	Elapsed time (s)	18.5±9.0	17.0±5.0	14.3±4.4	21.3±13.5
	Counts of error	0.3±0.5	0.4±0.5	0.1±0.4	0.8±1.0
3rd trial	No. of animals that reached the goal	8	8	8	8
	Elapsed time (s)	18.8±7.2	16.3±4.8	15.3±3.0	24.1±22.6
	Counts of error	0.5±0.8	0.3±0.7	0.1±0.4	0.9±2.1

No statistically significant differences were found between the untreated controls and any of the treatment groups.

^a One offspring per dam was subjected to examination.

^b Mean±SD.

Table 3-11. Functional examination of offspring exposed to chlorpyrifos during the second half of gestation and lactation

			Chlorpyrifos in diet (ppm)			
			0 (Control)	2.8	14	70
Males						
No. of offspring examined ^a			8	8	8	8
Surface righting reflex (PND 10, unit: s)			3.2±4.9	1.3±0.2	1.8±0.8	1.3±0.3
Air righting reflex (PND 15)	Normal		2	0	1	1
Pupillary reflex (PND 21)	Normal		8	8	8	8
Preyer's reflex (PND 21)	Normal		8	8	8	8
Pain reflex (PND 21)	Normal		8	8	8	8
Females						
No. of offspring examined ^a			8	8	8	8
Surface righting reflex (PND 10, unit: s)			1.4±0.4 ^b	1.8±0.9	3.4±3.2	1.8±0.6
Air righting reflex (PND 15)	Normal		1	0	0	0
Pupillary reflex (PND 21)	Normal		8	8	8	8
Preyer's reflex (PND 21)	Normal		8	8	8	8
Pain reflex (PND 21)	Normal		8	8	8	8

No statistically significant differences were found between the untreated controls and any of the treatment groups.
PND, postnatal day.

^a One male and female offspring per dam were subjected to examination.

^b Mean±SD.

Table 3-12. Grip strength of offspring exposed to chlorpyrifos during the second half of gestation and lactation

	Chlorpyrifos in diet (ppm)			
	0 (Control)	2.8	14	70
Males				
No. of offspring examined ^a	8	8	8	8
Forelimb (g)	1168 ± 189 ^b	1072 ± 159	1098±219	1055±186
Hindlimb (g)	714 ± 56	740 ± 130	667±220	748±165
Females				
No. of offspring examined ^a	8	8	8	8
Forelimb (g)	734 ± 135	715 ± 127	787±117	788±153
Hindlimb (g)	581 ± 100	569 ± 77	534±67	584±95

No statistically significant differences were found between the untreated controls and any of the treatment groups.

^aOne male and female offspring per dam were subjected to examination.

^bMean±SD.

Table 3-13. Detailed clinical parameters of offspring exposed to chlorpyrifos during the second half of gestation and lactation. Examination at postnatal day 29

			Chlorpyrifos in diet (ppm)			
			0 (Control)	2.8	14	70
Males						
No. of offspring examined ^a			8	8	8	8
Home cage observation						
Posture	Normal		8	8	8	8
Convulsion	None		8	8	8	8
Abnormal behavior	None		8	8	8	8
In-the-hand observation						
Ease of removal from cage	Easy		8	8	7	8
	Some resistance/avoidance		0	0	1	0
Fur condition	Normal		8	8	8	8
Skin	Normal		8	8	8	8
Secretions-eye, nose	Absent		8	8	8	8
Exophthalmos	Absent		8	8	8	8
Palpebral closure	Normal		8	8	8	8
Mucosal membranes	Normal		8	8	8	8
Lacrimation	Normal		8	8	8	8
Piloerection	Absent		8	8	8	8
Pupil size	Normal		8	8	8	8
Salivation	None		8	8	8	8
Abnormal respiration	Absent		8	8	8	8
Vocalization	None		8	8	8	8
	Soft		0	0	1	0
Reactivity to handling	Easy		8	8	8	8
Females						
No. of offspring examined ^a			8	8	8	8
Home cage observation						
Posture	Normal		8	8	8	8
Convulsion	None		8	8	8	8
Abnormal behavior	None		8	8	8	8
In-the-hand observation						
Ease of removal from cage	Easy		8	8	8	8
Fur condition	Normal		8	8	8	8
Skin	Normal		8	8	8	8
Secretions-eye, nose	Absent		8	8	8	8
Exophthalmos	Absent		8	8	8	8
Palpebral closure	Normal		8	8	8	8
Mucosal membranes	Normal		8	8	8	8
Lacrimation	Normal		8	8	8	8
Piloerection	Absent		8	8	8	8
Pupil size	Normal		8	8	8	8
Salivation	None		8	8	8	8
Abnormal respiration	Absent		8	8	8	8
Vocalization	None		8	8	8	8
Reactivity to handling	Easy		8	8	8	8

No significant differences were found between the untreated controls and any of the treatment groups.

^a One male and female offspring per dam were subjected to examination.

Table 3-14. Detailed clinical parameters of offspring exposed to chlorpyrifos during the second half of gestation and lactation. Examination at postnatal day 48

		0 (Control)	Chlorpyrifos in diet (ppm)		
			2.8	14	70
Males					
No. of offspring examined ^a		8	8	8	8
Home cage observation					
Posture	Normal	8	8	8	8
Convulsion	None	8	8	8	8
Abnormal behavior	None	8	8	8	8
In-the-hand observation					
Ease of removal from cage	Easy	8	8	8	8
Fur condition	Normal	8	8	8	8
Skin	Normal	8	8	8	8
Secretions-eye, nose	Absent	8	8	8	8
Exophthalmos	Absent	8	8	8	8
Palpebral closure	Normal	8	8	8	8
Mucosal membranes	Normal	8	8	8	8
Lacrimation	Normal	8	8	8	8
Piloerection	Absent	8	8	8	8
Pupil size	Normal	8	8	8	8
Salivation	None	8	8	8	8
Abnormal respiration	Absent	8	8	8	8
Vocalization	None	8	8	7	8
	Soft	0	0	1	0
Reactivity to handling	Easy	8	8	8	8
Females					
No. of offspring examined ^a		8	8	8	8
Home cage observation					
Posture	Normal	8	8	8	8
Convulsion	None	8	8	8	8
Abnormal behavior	None	8	8	8	8
In-the-hand observation					
Ease of removal from cage	Easy	8	8	8	8
Fur condition	Normal	8	8	8	8
Skin	Normal	8	8	8	8
Secretions-eye, nose	Absent	8	8	8	8
Exophthalmos	Absent	8	8	8	8
Palpebral closure	Normal	8	8	8	8
Mucosal membranes	Normal	8	8	8	8
Lacrimation	Normal	8	8	8	8
Piloerection	Absent	8	8	8	8
Pupil size	Normal	8	8	8	8
Salivation	None	8	8	8	8
Abnormal respiration	Absent	8	8	8	8
Vocalization	None	8	8	8	8
Reactivity to handling	Easy	8	8	8	8

No statistically significant differences were found between the untreated controls and any of the treatment groups.

^a One male and female offspring per dam were subjected to examination.

Table 3-15. Detailed clinical parameters of offspring exposed to chlorpyrifos during the second half of gestation and lactation. Examination at postnatal day 71

		Chlorpyrifos in diet (ppm)			
		0 (Control)	2.8	14	70
Males					
No. of offspring examined ^a		8	8	8	8
Home cage observation					
Posture	Normal	8	8	8	8
Convulsion	None	8	8	8	8
Abnormal behavior	None	8	8	8	8
In-the-hand observation					
Ease of removal from cage	Easy	8	8	8	8
Fur condition	Normal	8	8	8	8
Skin	Normal	8	8	8	8
Secretions-eye, nose	Absent	8	8	8	8
Exophthalmos	Absent	8	8	8	8
Palpebral closure	Normal	8	8	8	8
Mucosal membranes	Normal	8	8	8	8
Lacrimation	Normal	8	8	8	8
Piloerection	Absent	8	8	8	8
Pupil size	Normal	8	8	8	8
Salivation	None	8	8	8	8
Abnormal respiration	Absent	8	8	8	8
Vocalization	None	8	8	8	8
Reactivity to handling	Easy	8	8	8	8
Females					
No. of offspring examined ^a		8	8	8	8
Home cage observation					
Posture	Normal	8	8	8	8
Convulsion	None	8	8	8	8
Abnormal behavior	None	8	8	8	8
In-the-hand observation					
Ease of removal from cage	Easy	8	8	8	8
Fur condition	Normal	8	8	8	8
Skin	Normal	8	8	8	8
Secretions-eye, nose	Absent	8	8	8	8
Exophthalmos	Absent	8	8	8	8
Palpebral closure	Normal	8	8	8	8
Mucosal membranes	Normal	8	8	8	8
Lacrimation	Normal	8	8	8	8
Piloerection	Absent	8	8	8	8
Pupil size	Normal	8	8	8	8
Salivation	None	8	8	8	8
Abnormal respiration	Absent	8	8	8	8
Vocalization	None	8	8	7	8
Reactivity to handling	Soft	0	0	1	0
	Easy	8	8	7	8
	Slightly awkward	0	0	1	0

No statistically significant differences were found between the untreated controls and any of the treatment groups.

^a One male and female offspring per dam were subjected to examination.

Table 3-16. Manipulative tests of offspring exposed to chlorpyrifos during the second half of gestation and lactation

			Chlorpyrifos in diet (ppm)			
			0 (Control)	2.8	14	70
Males						
No. of offspring examined ^a			8	8	8	8
Auditory response	Normal		8	8	8	8
Approach response	Normal		8	8	8	8
Touch response	Normal		8	8	8	8
Tail pinch response	Normal		8	8	8	8
Pupillary reflex	Normal		8	8	8	8
Air righting reflex	Normal		8	8	8	8
Landing foot splay (mm)			93 ± 16 ^b	94 ± 23	96 ± 16	95 ± 15
Females						
No. of offspring examined ^a			8	8	8	8
Auditory response	Normal		8	8	8	8
Approach response	Normal		8	8	8	8
Touch response	Normal		8	8	8	8
Tail pinch response	Normal		8	8	8	8
Pupillary reflex	Normal		8	8	8	8
Air righting reflex	Normal		8	8	8	8
Landing foot splay (mm)			72 ± 24	63 ± 22	62 ± 16	67 ± 19

No statistically significant differences were found between the untreated controls and any of the treatment groups.

^a One male and female offspring per dam were subjected to examination.

^b Mean ± SD.

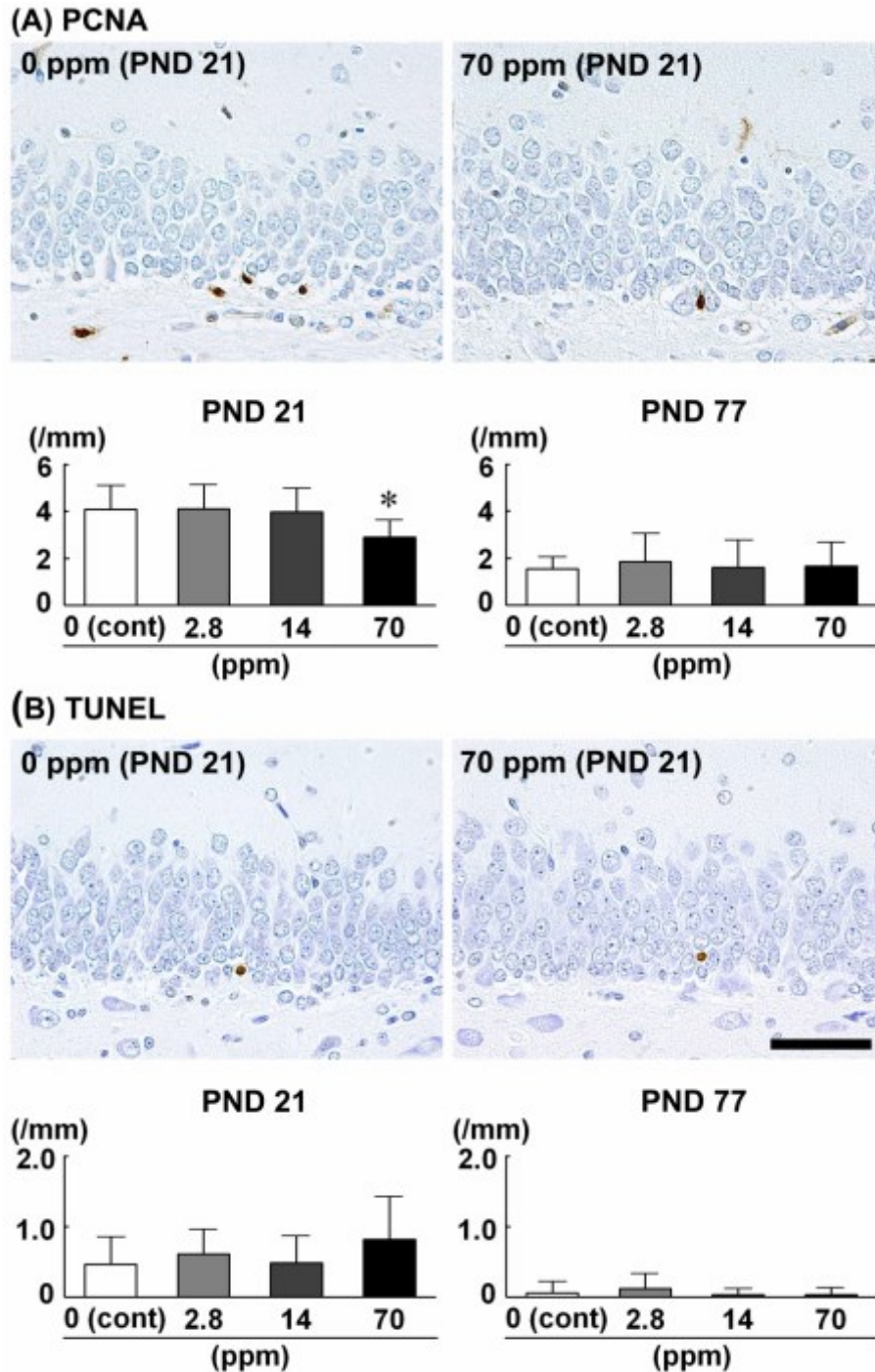


Fig. 3-4

Distribution of proliferating cells and apoptotic cells in the SGZ of male offspring at PND 21 and PND 77. (A) PCNA. (B) TUNEL. All identical 10 male offspring from eight dams (one or two animals per dam) were subjected to PCNA-immunohistochemistry and TUNEL-assay in each group. Representative images from the 0 ppm group (left) and the 70 ppm group (right) at PND 21 are shown (bar = 50 μ m). Values are expressed as the mean+SD. * Significantly different from the untreated controls by Dunnett's or Steel's test ($P<0.05$).

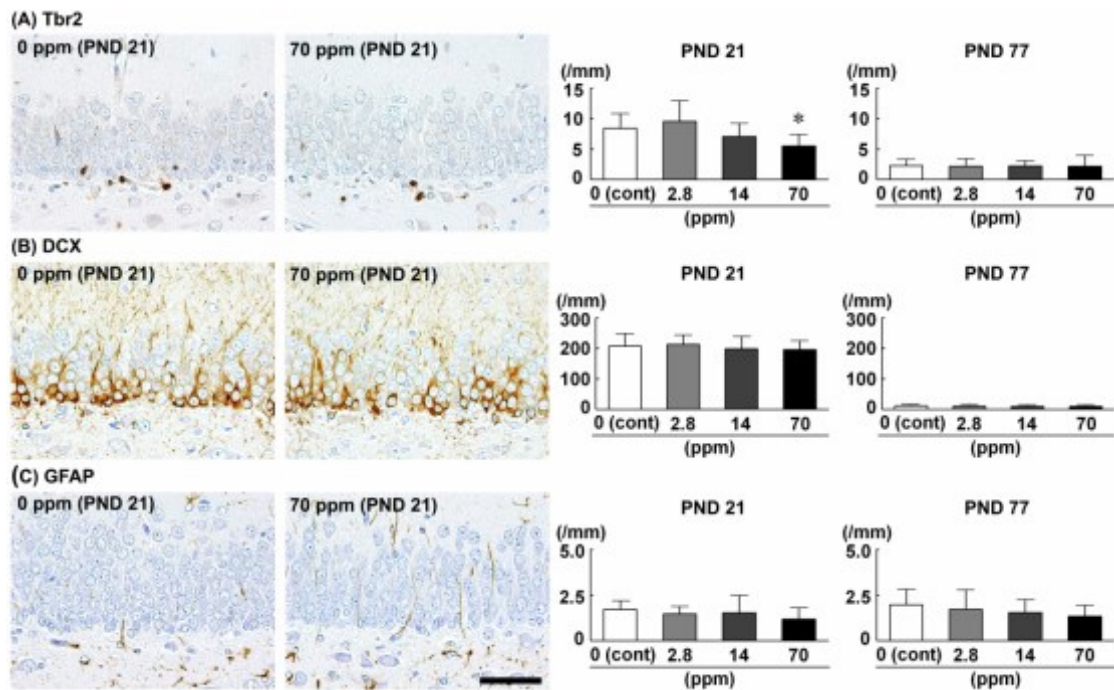


Fig. 3-5

Distribution of immunoreactive cells for Tbr2, Dcx and GFAP in the SGZ of male offspring at PND 21 and PND 77. (A) Tbr2. (B) Dcx. (C) GFAP. All identical 10 male offspring from eight dams (one or two animals per dam) were subjected to immunohistochemical analyses in each group. Representative images from the 0 ppm group (left) and the 70 ppm group (right) at PND 21 are shown (bar = 50 μ m). Values are expressed as the mean+SD. * Significantly different from the untreated controls by Dunnett's or Steel's test ($P<0.05$).

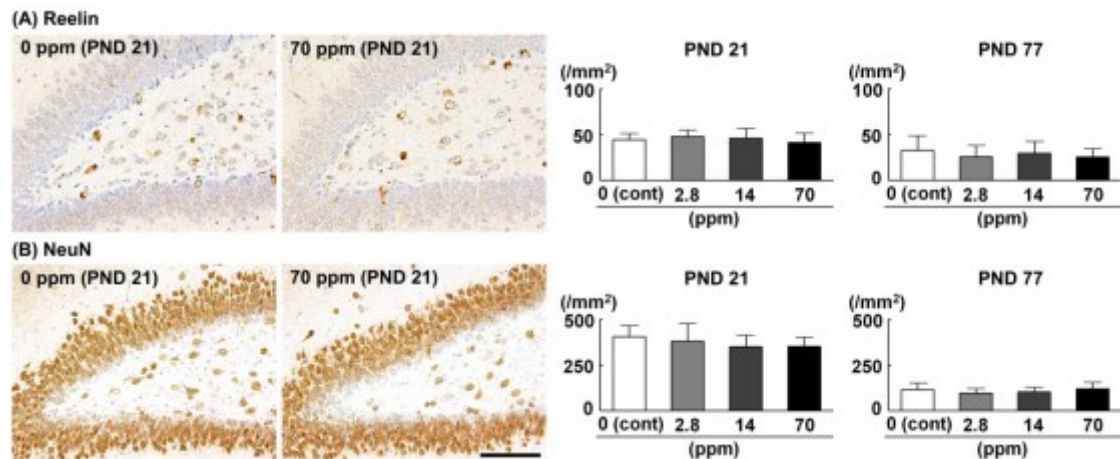


Fig. 3-6

Distribution of immunoreactive cells for reelin and NeuN in the hilus of the hippocampal dentate gyrus in male offspring at PND 21 and PND 77. (A) Reelin. (B) NeuN. All identical 10 male offspring from eight dams (one or two animals per dam) were subjected to immunohistochemical analyses in each group. Representative images from the 0 ppm group (left) and the 70 ppm group (right) at PND 21 are shown (bar = 100 μ m). Values are expressed as the mean+SD.

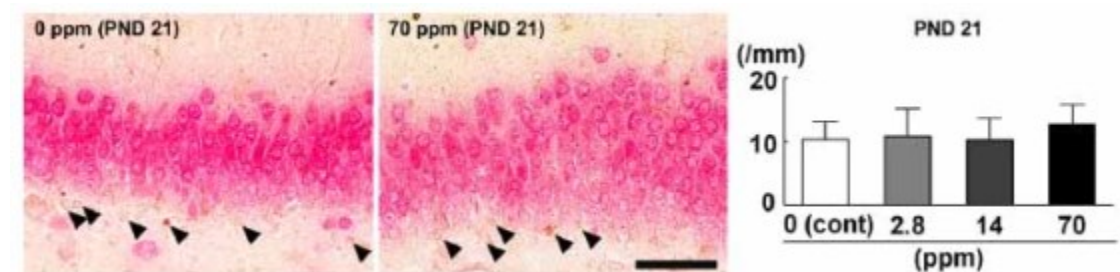


Fig. 3-7

Distribution of immunoreactive cells by double staining for NACHrá7 and NeuN in the SGZ of male offspring at PND 21. All identical 10 male offspring from eight dams (one or two animals per dam) were subjected to immunohistochemical analyses in each group. The graph shows the distribution of NACHrá7-positive and NeuN-negative cells in the SGZ. Representative images from the 0 ppm group (left) and the 70 ppm group (right) at PND 21 are shown (bar = 50 μ m). Arrowheads indicate neuronal progenitors positive for NACHrá7 and negative for NeuN. Values are expressed as the mean \pm SD.

Table 4-1
Summary of culling and selection of animals at necropsy

	Per litter	Per group (Dams=8-12)
PND 4		
Culling	Kept 4 males and 4 females	Kept 32-48 males and 32-48 females
PND 21		
Animals subjected to necropsy	2 males and 2 females	16-24 males and 16-24 females
Immunohistochemical analysis	1 or 2 males	10-12 males
Analyses of real-time RT-PCR	1 male	6 males
PND 77		
Animals subjected to necropsy	2 males and 2 females	16-24 males and 16-24 females
Immunohistochemical analysis	1 or 2 males	10-12 males

PND, postnatal day.

Table 4-2
Primer sequences for RT-PCR analysis

Gene	Accession No.	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5' →3')
<i>Chrna7</i>	NM_012832	CGTTCGCTGG TTCCCTTTT	AGGACCAGGA CCCAAACTTC A
<i>Chrn2</i>	NM_019297	GCTTCATTGC GGACCACAT	GTATTTCAG TCCTCCCTCA CACT
<i>Dcx</i>	NM_053379	GGATTGTGTA CGCTGTTTCT TCT	TCAGGTCAGC CAGCAATGC
<i>Dpysl3</i>	NM_012934	CATGTGGTAC CTGAACCTGA GTCTA	GCCCACTCAC GCCACTTTT
<i>Reln</i>	NM_080394	GCCAGCTTTC GACTACCCTAT TAAC	CGTAGTGGCA CAGAAGCTAT CG
<i>Pcna</i>	NM_022381	CTCACGTCTC CTTAGTGCAG CTT	CGATCGCAGC GGTATGTGT
<i>Hprt</i>	NM_012583	GCCGACCGGT TCTGTCAT	TCATAACCTG GTTCATCATC ACTAATC

Note. *Chrna7*, cholinergic receptor, nicotinic, alpha7; *Chrn2*, cholinergic receptor, nicotinic, beta 2; *Dcx*, doublecortin; *Dpysl3*, dihydropyrimidinase-like 3; *Reln*, reelin; *Pcna*, proliferating cell nuclear antigen; *Hprt*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1.

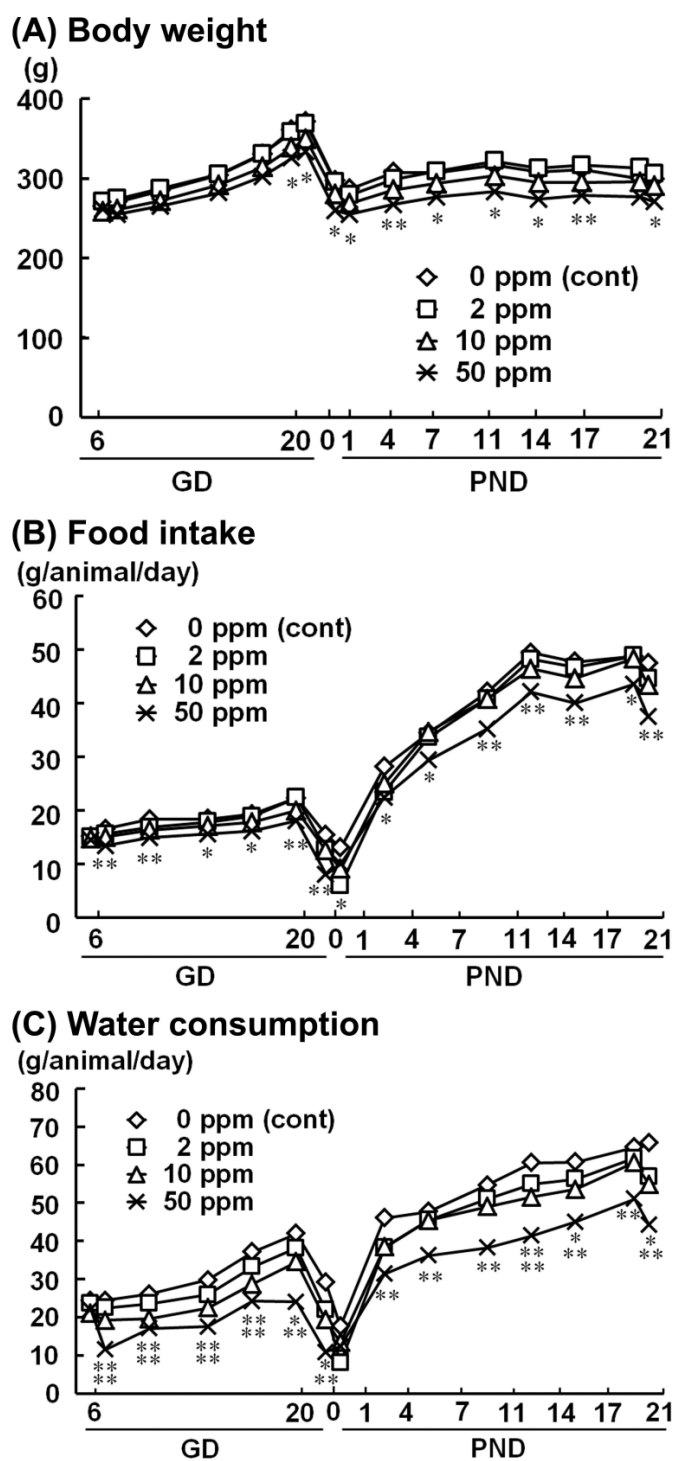


Fig. 4-1

Body weights, food intake and water consumption of dams exposed to NIC salt from GD 6 to day 21 after delivery. (A) Body weight. (B) Food intake. (C) Water consumption. * **Significantly different from the untreated controls by Dunnett's test or Steel's test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

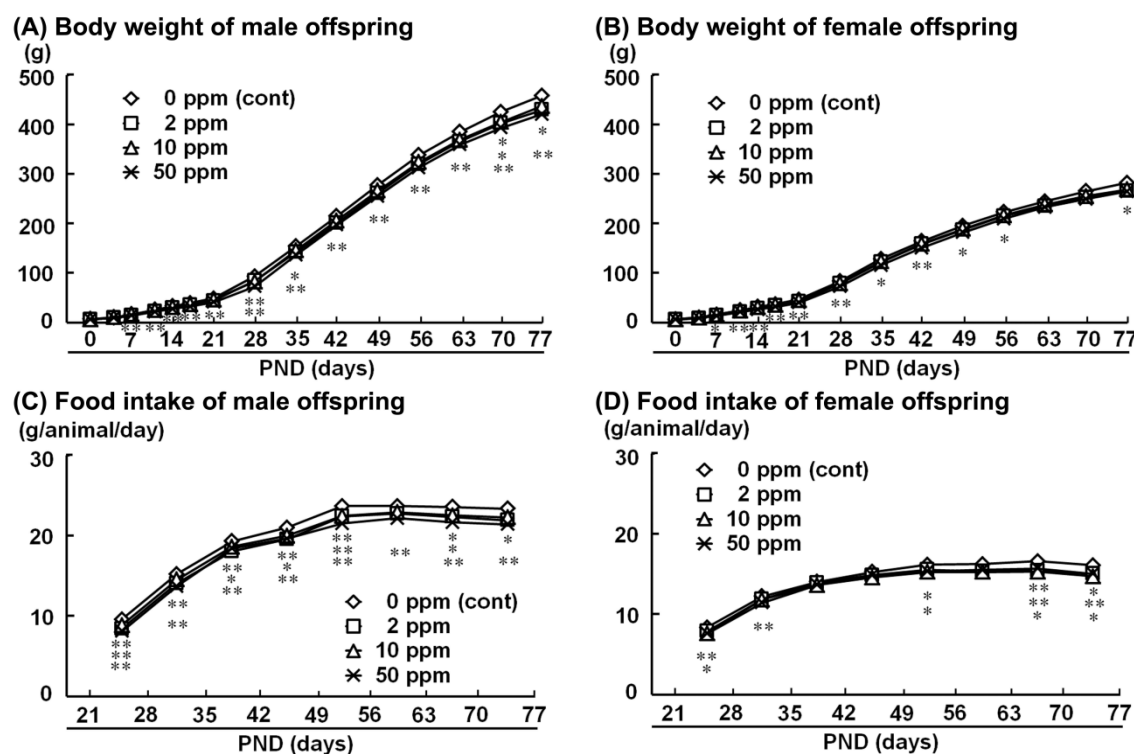


Fig. 4-2

Body weights and food intake of offspring exposed to NIC salt from GD 6 to day 21 after delivery.

(A) Body weight of male offspring. (B) Body weight of female offspring. (C) Food intake of male offspring. (D) Food intake of female offspring. * **Significantly different from the untreated controls by Dunnett's test or Steel's test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

Table 4-3**Brain weight of offspring exposed to nicotine hydrogen tartrate salt during the second half of gestation and lactation**

		Nicotine hydrogen tartrate salt in drinking water			
		0 ppm (Control)	2 ppm	10 ppm	50 ppm
PND 21					
Males					
No. of offspring examined ^a		18	16	20	24
Brain	(g)	1.50±0.03 ^a	1.46±0.04	1.50±0.05	1.44±0.06*
	(g/100g BW)	3.04±0.07	3.42±0.47	3.22±0.18	3.55±0.35**
Females					
No. of offspring examined ^a		18	16	20	24
Brain	(g)	1.44±0.03	1.40±0.04	1.45±0.03	1.40±0.05**
	(g/100g BW)	3.01±0.11	3.45±0.47	3.19±0.21	3.52±0.46**
PND 77					
Males					
No. of offspring examined ^a		18	16	20	24
Brain	(g)	2.08±0.03	2.03±0.06	2.08±0.04	1.99±0.04**
	(g/100g BW)	0.45±0.02	0.47±0.02	0.48±0.02	0.47±0.02
Females					
No. of offspring examined ^a		18	16	20	24
Brain	(g)	1.92±0.05	1.89±0.06	1.92±0.04	1.84±0.05**
	(g/100g BW)	0.68±0.04	0.72±0.03	0.72±0.05	0.70±0.04

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

BW, body weight; PND, postnatal day.

^a Two offspring of each sex per dam (*n* = 9 for 0 ppm, 8 for 2 ppm, 10 for 10 ppm, 12 for 50 ppm) were subjected to autopsy and organ weight measurement at each time point. Statistical analysis was performed using the litter as the experimental unit, and mean values were estimated as a litter value when two offspring were examined from the same dam.^b Mean±SD.**Table 4-4****Urinary cotinine level on postnatal day 19 of male offspring and dams exposed to nicotine hydrogen tartrate salt during the second half of gestation and lactation**

	Nicotine hydrogen tartrate salt in drinking water			
	0 ppm (Control)	2 ppm	10 ppm	50 ppm
Dams				
No. of dams examined	5	5	5	5
Cotinine (ng/mL)	0.2±0.3 ^b	72.7 ± 26.1 *	919.1 ± 487.6*	5833.4 ± 1772.6*
Offspring				
No. of offspring examined ^a	5	5	5	5
Cotinine (ng/mL)	2.5±0.8	41.7 ± 21.3*	233.8 ± 27.8*	1208.7 ± 1527.1*

* Significantly different from the control group by Dunnett's test or Steel's test (**P*<0.05).^a One male offspring per dam (*n* = 5 per group) was subjected to analysis.^b Mean±SD.

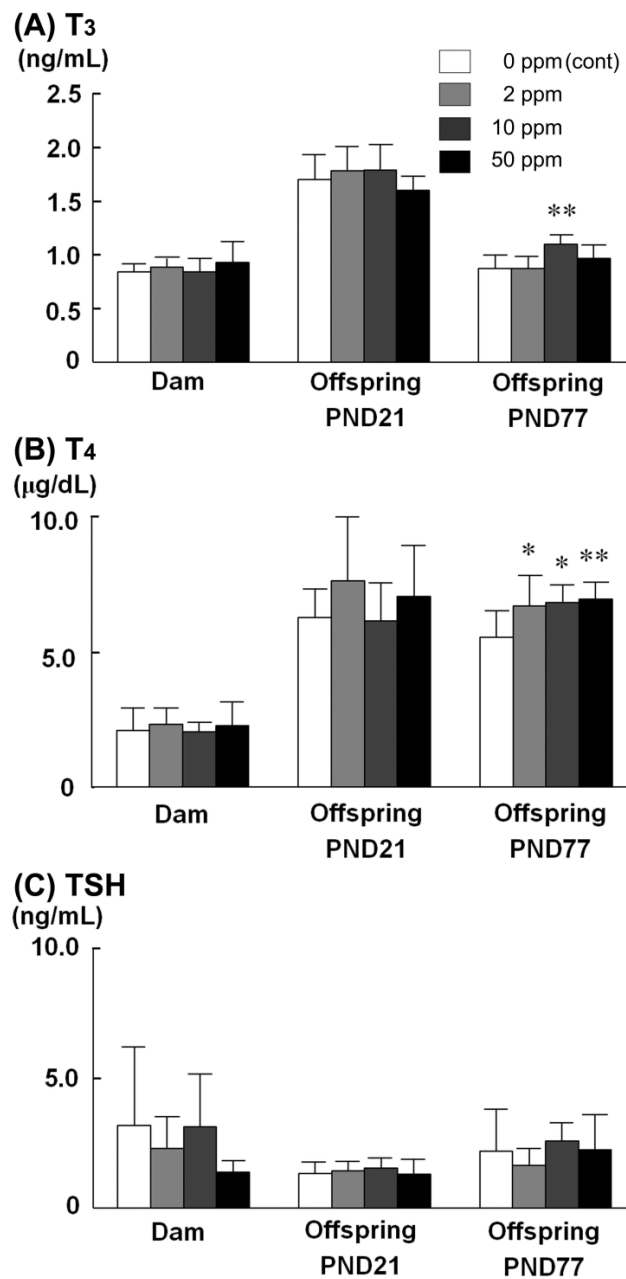


Fig. 4-3

Serum concentrations of thyroid-related hormones of dams and male offspring at PND 21 and 77 after maternal exposure to NIC salt from GD 6 to PND 21. (A) T₃. (B) T₄. (C) TSH. All dams and eight male offspring (one or two animals per dam) were subjected to hormone analysis in each group. Statistical analysis was performed using the litter as the experimental unit, and litter mean values were subjected to analysis on two offspring samples from the same dam. * ** Significantly different from the untreated controls by Dunnett's test or Steel's test (* P <0.05, ** P <0.01).

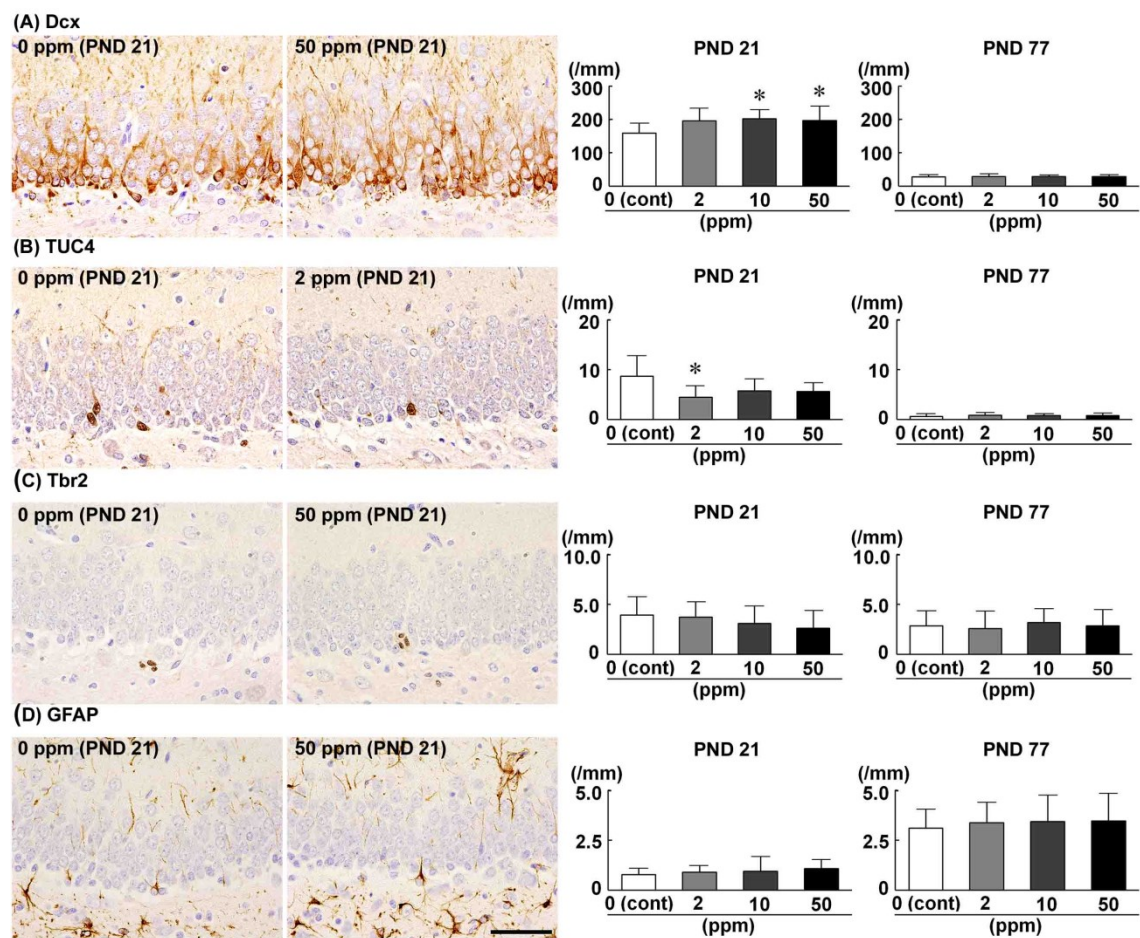


Fig. 4-4

Distribution of immunoreactive cells for Dcx, TUC4, Tbr2 and GFAP in the dentate subgranular zone of male offspring at PND 21 and 77 after maternal exposure to NIC salt from GD 6 to PND 21. All treatment groups of 10 or 12 male offspring from all dams (one or two animals per dam) were subjected to immunohistochemical analyses in each group. (A) Dcx. (B) TUC4. (C) Tbr2. (D) GFAP. Representative images from the 0 ppm group (left) and the 2 or 50 ppm group (right) at PND 21 are shown (bar = 50 μ m). * Significantly different from the untreated controls by Dunnett's test (* P <0.05).

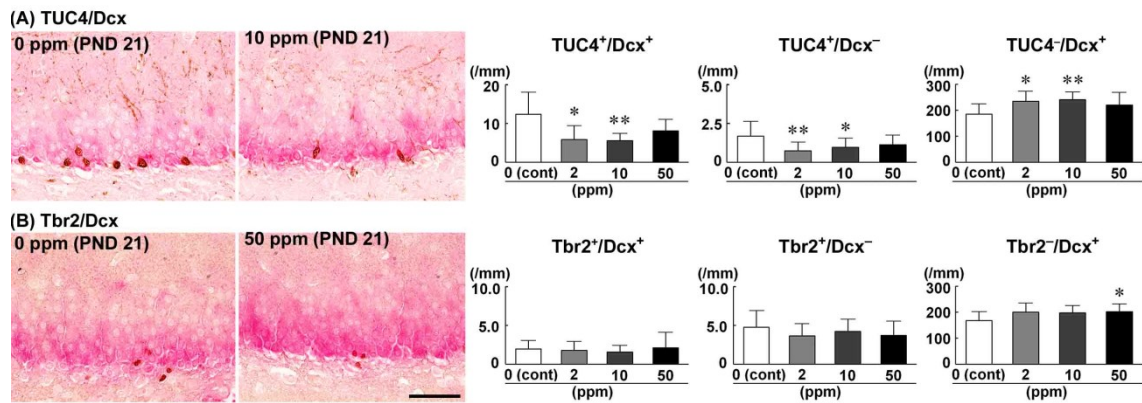


Fig. 4-5

Distribution of immunoreactive cells by double staining for Dcx and TUC4 or Tbr2 in the dentate subgranular zone of male offspring at PND 21 after maternal exposure to NIC salt from GD 6 to PND 21. All treatment groups of 10 or 12 male offspring from all dams (one or two animals per dam) were subjected to immunohistochemical analyses in each group. (A) Dcx (red) and TUC4 (brown). (B) Dcx (red) and Tbr2 (brown). Representative images from the 0 ppm group (left) and the 10 or 50 ppm group (right) at PND 21 are shown (bar = 50 μ m). * ** Significantly different from the untreated controls by Dunnett's test or Steel's test (* P <0.05, ** P <0.01).

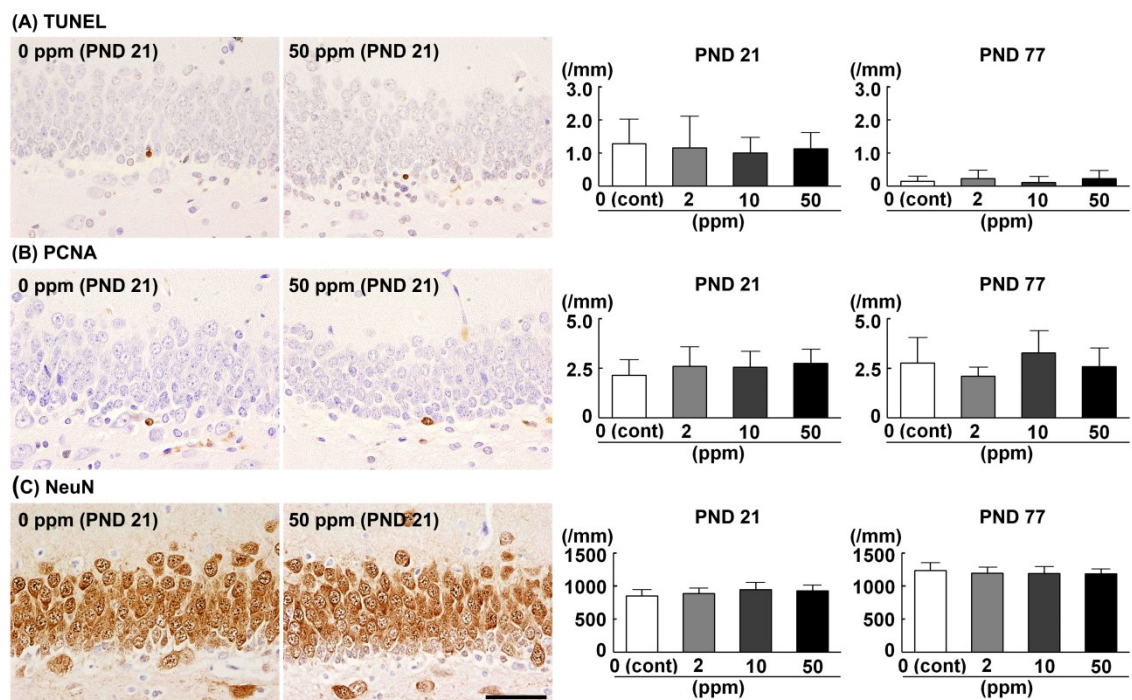


Fig. 4-6

Distribution of TUNEL⁺ apoptotic cells and PCNA⁺ proliferating cells in the dentate subgranular zone and NeuN⁺ postmitotic granule cells in granule cell layer of male offspring at PND 21 and 77 after maternal exposure to NIC salt from GD 6 to PND 21.

All treatment groups of 10 or 12 male offspring from all dams (one or two animals per dam).

Statistical analysis was performed using the litter as the experimental unit, and litter mean values were subjected to analysis on two offspring samples from the same dam. (A) TUNEL. (B) PCNA.

(C) NeuN. Representative images from the 0 ppm group (left) and the 800 ppm group (right) at PND 21 are shown (bar = 50 μ m).

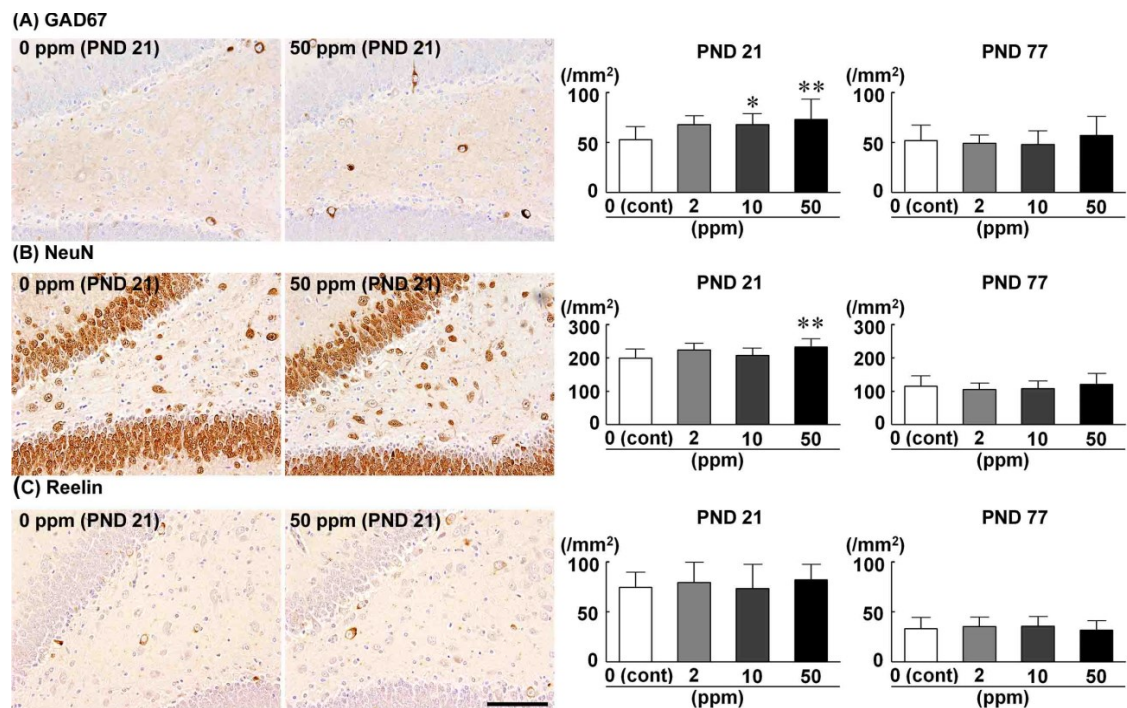


Fig. 4-7

Distribution of immunoreactive cells for GAD67, NeuN and reelin in the hilus of the hippocampal dentate gyrus in male offspring at PND 21 and 77 after maternal exposure to NIC salt from GD 6 to PND 21. All treatment groups of 10 male offspring from all dams (one or two animals per dam) were subjected to immunohistochemical analyses in each group. (A) GAD67. (B) NeuN. (C) Reelin. Representative images from the 0 ppm group (left) and the 50 ppm group (right) at PND 21 are shown (bar = 100 μ m). * ** Significantly different from the untreated controls by Dunnett's test or Steel's test (* P <0.05, ** P <0.01).

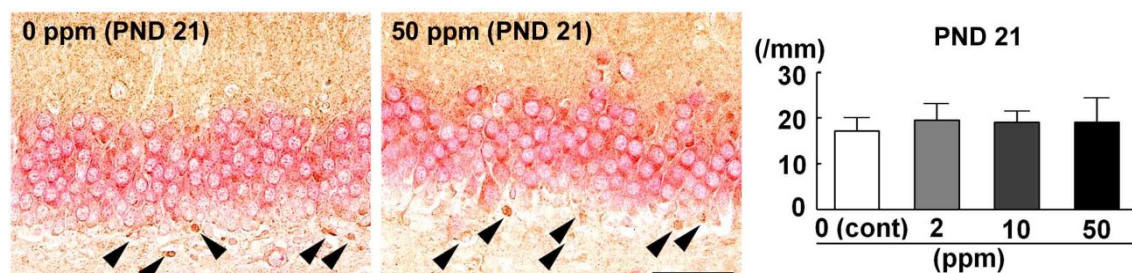


Fig. 4-8

Distribution of immunoreactive cells by double staining for NACHRα7 and NeuN in the SGZ of male offspring at PND 21. All treatment groups of 10 or 12 male offspring from all dams (one or two animals per dam) were subjected to immunohistochemical analyses in each group. Arrowheads indicate NeuN⁺ progenitor cells expressing NACHRα7. The graph shows the distribution of NACHRα7⁺ and NeuN⁺ cells in the SGZ as neuronal progenitor expressed NACHRα7. Representative images from the 0 ppm group (left) and the 50 ppm group (right) at PND 21 are shown (bar = 50 μm).

Table 4-5

RT-PCR analysis in the hippocampal dentate gyrus of offspring exposed to nicotine hydrogen tartrate salt during the second half of gestation and lactation periods

	Nicotine hydrogen tartrate salt in drinking water			
	0 ppm (Control)	2 ppm	10 ppm	50 ppm
No. of offspring examined ^a	6	6	6	5
<i>Chrna7</i>	0.93 ± 0.26 ^b	1.09 ± 0.36	1.07 ± 0.23	1.04 ± 0.15
<i>Chrn2</i>	0.99 ± 0.18	1.13 ± 0.28	1.05 ± 0.13	0.91 ± 0.18
<i>Dcx</i>	0.95 ± 0.39	0.96 ± 0.17	1.21 ± 0.14	1.04 ± 0.16
<i>Dpysl3</i>	1.00 ± 0.19	1.00 ± 0.14	1.09 ± 0.18	0.97 ± 0.15
<i>Reln</i>	0.97 ± 0.22	1.07 ± 0.38	1.10 ± 0.21	0.98 ± 0.15
<i>Pcna</i>	1.01 ± 0.19	1.02 ± 0.19	1.06 ± 0.20	0.96 ± 0.09

No statistically significant differences were found between the untreated controls and any of the treatment groups.

^a One male offspring per dam ($n = 6$ per group) was subjected to analysis.

^b Mean ± SD.

Note. *Chrna7*, cholinergic receptor, nicotinic, alpha7; *Chrn2*, cholinergic receptor, nicotinic, beta 2; *Dcx*, doublecortin; *Dpysl3*, dihydropyrimidinase-like 3; *Reln*, reelin; *Pcna*, proliferating cell nuclear antigen; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1.