

グリシドールを例としたニューロン発達指標の  
確立による神経毒性評価に関する研究

2013 年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科

赤根弘敏

## 【目次】

序論	-----	4
第1章 ラットの脳部位特異的な網羅的解析を可能とするメタカーン全脳固		
定法の検討	-----	7
諸言	-----	8
材料及び方法	-----	10
結果	-----	15
考察	-----	18
小括	-----	20
第2章 グリシドールのラット母動物暴露による母動物と子動物の神経系に対		
する影響	-----	21
諸言	-----	22
材料及び方法	-----	24
結果	-----	31
考察	-----	35
小括	-----	39
第3章 グリシドールのラットへの 28 日間反復投与による神経系に対する影		
響	-----	40
諸言	-----	41
材料及び方法	-----	42
結果	-----	48
考察	-----	52
小括	-----	56

総合考察	-----	57
結論	-----	61
謝辞	-----	63
参考文献	-----	64
要旨	-----	76
Abstract	-----	79
図表	-----	83

## 序 論

成熟動物に現れる神経毒性の多くは神経病理学的、機能学的評価によって検出が可能であるが、多様な測定項目における総合的評価を要し、毒性の判断が困難な場合がある。また、発達神経毒性は未知な点が多く、特にニューロンやグリアの分化に与える影響は不可逆的影響も懸念されるため、毒性評価上のエンドポイントとして重要性を増している。発達期神経毒性試験は高次試験に属し、その現行のガイドラインの一つである経済協力開発機構（OECD）の TG426（60）では、その評価に多くの時間と動物が必要な大規模な試験の実施が要求されるため、小規模な試験で検出可能なより迅速なスクリーニング評価システムの構築が求められている分野の一つである。一方、神経突起形成、シナプス形成や髄鞘形成などの神経系の発達過程と神経の生存・維持は同等の機序を利用する場合が多く、成熟期の神経毒性物質が発達期に影響をもたらす可能性が高い。特に、成熟後にもニューロン新生を続ける部位は、発達期のみならず成熟後の暴露によっても神経発達に影響を及ぼす物質の標的となる可能性が想定される。これらの脳部位に着目して、遺伝子やたんぱく質の発現量や分布の変動を評価することで、成熟期神経毒性物質によるこれまで見逃されていた高感受性の作用点や、成熟動物を用いた発達神経毒性検出の可能性を明らかにできると考えられる。

海馬歯状回は学習や記憶、モチベーションなどの高次脳機能において重要な役割を担う。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部位として知られている（16, 34）。SGZ でのニューロン新生の過程では、神経幹細胞から type-1 神経前駆細胞を生じ、type-2a, type-2b, type-3 前駆細胞、未熟顆粒細胞の順で分化し、最終的に成熟した顆粒細胞となる（26, 34, 35）。これら一連の分化、成熟過程は、神経幹細胞の自己複製、前駆細胞の増殖や分化、神経突起形成やシナプス形成などの顆粒細胞の成熟過程を含む（26, 34, 35）。そのため、軸索末端あるいはシナプトソーム



を標的とする神経毒性物質は、同様の機序により、ニューロン新生部位で発達中の神経を標的とする毒性物質にもなりうるものと考えられる。

海馬歯状回門に存在する介在ニューロンは、成熟中の顆粒細胞に投射してニューロン新生を調節する機能を有する (13, 51)。海馬歯状回門の  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) 性介在ニューロンにはいくつかのサブポピュレーションが存在しており (27), GABA 性介在ニューロンが分泌する reelin は、分化過程における顆粒細胞の成熟や移動に関する重要な役割を担う (10, 21, 47, 72)。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検索は、SGZ におけるニューロン新生の評価に重要な情報を与えるものと期待される。以上より、SGZ における神経前駆細胞の分布を指標としたニューロン新生の検索や歯状回門における介在ニューロンの検索は、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。

マイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイリングは、疾患や化学物質の暴露による毒性発現の機序に関連した組織特異的变化についての網羅的な情報、さらに毒性評価に適用できる新しい細胞マーカーを獲得する手段となりうる。一方、中枢神経組織は解剖学的な構成が精緻で部位特異性が高いため、遺伝子発現解析を利用した化学物質の評価には、解剖学的構造、細胞分布あるいは機能に基づいた特定脳部位ごとの評価が必要である。しかし、毒性試験における動物解剖の作業時間内では脳の特定領域の採材に困難を伴うため、適切な採材方法の開発が必要となる。

本研究では、28 日間反復投与試験の枠組みにおける発達神経毒性の検出を視野に入れ、神経発達指標を利用した全く新規の神経毒性評価手法の確立を目指す。そのために、成熟後も継続して神経の発達・成熟過程の観察が可能な、海馬におけるニューロン新生に着目し、モデル物質としてげっ歯類への投与によって神経への影響が報告されているグリシドールを用い、成熟及び発達期の神経に対する毒性標的性を明らかにする。さらには脳における影響を捉えるために、大脳と小脳の異なる脳部位での遺伝子の網羅的発現プロファイリングを通じて、発達期と成熟動物の反応性を検索する。

第1章では、各脳部位特異的な網羅的遺伝子及びたんぱく質解析に適う組織採材手法の確立を目指した。ラットの全脳をメタカーン固定し、パンチ生検デバイスを用いた簡便な採材を行い、生体高分子の品質及び発現データの未固定組織に対する忠実性について検討した。第2章では、グリシドールのラット母動物を介した発達期暴露を行い、母動物に対する神経毒性及び神経毒に対する感受性がより高いと考えられる子動物の海馬歯状回におけるニューロン新生への影響を検索し、それらの標的性に対する毒性発現機序の共通性を検討した。また、第1章にて検討した脳部位特異的な脳組織採材方法を用いて、子動物の海馬歯状回、脳梁、帯状回及び小脳皮質について発達期神経毒性にかかる遺伝子発現変動プロファイルの獲得を行った。第3章では、グリシドールのラットを用いた28日間反復投与試験を行い、海馬歯状回におけるニューロン新生への影響を検討し、第2章における子動物への影響と比較した。これによって神経発達指標を利用した成熟及び発達期神経毒性の検出性の有無について検討した。また、海馬歯状回、脳梁、帯状回及び小脳皮質について、神経毒性プロファイルを獲得し、免疫組織化学的検索による発現分布解析を行い、反応指標の検討を行った。

## 第 1 章

ラットの脳部位特異的な網羅的解析を可能とするメタカーン全脳固定法の検討

## 緒 言

遺伝子発現プロファイルを発達期と成熟期の神経毒性評価に利用する前提条件として、標的とする脳部位の発現データのばらつきを最小限に抑えた組織部位特異的な採材を可能にする方法を取り入れる必要がある。中枢神経組織は解剖学的な構成が精緻であり、ニューロンやグリア細胞分布の部位特性が高い。そのため、網羅的手法による遺伝子及びたんぱく質解析のためには各脳部位を個別に採材する必要がある。一方、げっ歯類を用いた動物試験の解剖時における複数の脳部位の手作業での採材は時間を要し、解剖後にみられる RNA 等の生体高分子の分解は、分子生物学的解析データの質の低下をもたらす。それを解決する方法として全脳固定法の利用が挙げられる。全脳固定により解剖後の採材の実施が可能となるものの、高精度な解析を実施するためには DNA, RNA 及びたんぱく質等の生体高分子の品質を保持したまま組織を固定する必要がある。また、近年特定脳部位の遺伝子及びたんぱく質解析にマイクロダイセクション技術が利用されている (5, 63, 95)。しかし、その実施には作業に時間と労力を要する。適切な時間内での一貫した採材は、手作業による採材が簡便であり、そのためにも脳組織固定の利用が適すると考えられる。これらのことより、脳部位特異的な高精度の網羅的分子解析のためには、抽出分子の品質を高く保持できる固定法を利用した、簡便かつ正確な採材方法の確立が必要であると考えられる。

メタカーン固定法は、有機溶媒を用いたたんぱく質沈殿を固定原理としている (54, 71)。固定後のパラフィン包埋組織を用いた組織学的評価において組織形態の保持が可能であり (12, 83)、免疫組織化学的解析においても、ホルムアルデヒドを利用した架橋固定液と比較して抗原性の維持によって優れた結果が得られる (2, 64, 74)。固定後の採材でも、DNA, RNA 及びたんぱく質の品質を高く保持できるため、全脳固定による特定脳部位の採材に利用できると考えられる。実際にメタカーン固定法を利用したパラフィン包埋組織でのゲノム DNA の配列解析、転写産物の real-time RT-PCR やマイクロアレイ解析、たんぱく質分子のウェスタンブロッティング解析法が確立され、網羅的解析に利用されている (79, 80, 86, 92)。

本章は、各脳部位特異的な網羅的遺伝子及びたんぱく質解析に適う組織採材手法の確立のために、ラットの全脳のメタカーン固定組織からパンチ生検デバイスを用いて特定脳部位を採材し、抽出した total RNA 及びポリペプチドの品質ならびに発現データの忠実性を評価した。そのために、未固定組織及びしばしば分子生物学的解析に利用されているアセトン固定組織（20, 96）との比較を行った。解析には、化学物質の一般毒性試験での投与終了時期として、28 日間反復投与毒性試験における 9 週齢（生後 63 日齢）動物及び発達期神経毒性試験における生後 21 日齢動物を用いた。これによって全脳のメタカーン固定法を用いた特定脳部位における網羅的発現解析の有用性の有無を明らかにした。

## 材料及び方法

### 供試動物及び実験デザイン

妊娠 2 日齢（プラグ確認日を妊娠 0 日として起算）の Sprague-Dawley 系 SPF ラット及び 7 週齢の同系統の雄性ラットを日本チャールス・リバー株式会社（神奈川）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  $55\pm 15\%$ 、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収容した。妊娠動物は 1 匹ずつ、分娩後は母子共に同一ケージに、また 7 週齢の雄動物は 3 から 4 匹ずつ収容した。動物は基礎飼料 CRF-1 及び水道水を自由に摂取させた。

### 実験 1

7 週齢の雄性ラットを用い、1 週間の馴化飼育後、8 週齢の動物に精製水を 5 ml/kg にて 7 日間強制経口投与した。投与開始日及び剖検日に体重を測定した。最終投与翌日に、9 週齢（生後 63 日齢）の動物を 3 群（未固定群：4 匹、メタカーン固定群及びアセトン固定群：各 8 匹）に無作為に群分けし、全例を剖検して遺伝子発現解析及びたんぱく質解析に供した。全ての動物は  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  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。

### 実験 2

妊娠ラットを用いた。分娩後 4 日に、1 腹雄各 8 匹になるよう無作為に選抜して子数の調整を行った。1 腹の雄子動物が 8 匹に満たない場合は、1 腹 8 匹となるように雌子動物を残して調整した。生後 21 日に、雄子動物 20 匹（1 腹各 2 匹）を無作為に選抜し、3 群（未固定群：8 匹、メタカーン固定群及びアセトン固定群：各 16 匹、各群 1 腹各 1-2 匹）に群分けし、剖検して遺伝子発現解析及びたんぱく質解析に供した。全ての動物は  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  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。

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）を遵守した。

## 組織の固定及び特定脳部位の採取

メタカーン液は使用前に、メタノール、クロロホルム及び酢酸を 6:3:1 の組成で混和して調製した。メタカーン液及びアセトンを使用時まで 4°C にて保存した。剖検時、固定群は全脳をメタカーン液あるいはアセトンに浸漬し、4°C で 5 時間振盪して固定した。その後、99.5%エタノールにて 1 時間おきに 3 回脱水し、4°C で一晩振盪した。未固定群は、全脳採取後、氷冷した生理食塩液中で直ちにサンプリングを行った。

大脳は脳鋳型（ブレインマトリックス：室町機械株式会社，東京）を用いて厚さ 2 mm の冠状断スライスを作製し、小脳は厚さ 2 mm の矢状断スライスを作製した。1 mm 径の生検トレパン（カイインダストリーズ株式会社，岐阜）を用いて、帯状回，小脳皮質，海馬歯状回及び脳梁組織の 4 部位をくり抜いて採取した。未固定群は 3 mm 径の生検トレパンを用いて、同様の部分から帯状回及び小脳皮質組織をくり抜いて採取した。採取したサンプルのうち、固定組織は 99.5%エタノールに浸漬し、-80°C にて保存した。未固定組織の RNA 解析用サンプルは RNeasy<sup>TM</sup> (Qiagen, Inc., Austin, TX, USA) に浸漬して 4°C にて 24 時間保存後、-80°C に保存した。未固定組織のたんぱく質解析用サンプルは液体窒素にて凍結し、直ちに -80°C に保存した。

## RNA 抽出及びマイクロアレイ解析

採取した組織サンプルから、QIAzol (Qiagen, Valencia, CA, USA) 及び RNeasy kit (Qiagen) を用いて製造元のプロトコールに従って total RNA を抽出し、NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) を用いて濃度を測定した。生後 63 日齢の動物は各群 4 匹，21 日齢の動物は各群 8 匹について、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) を用いて RNA Integrity Number (RIN) を求め、RNA の品質を評価した。

生後 63 日齢及び 21 日齢の動物とも各脳部位 3 例について、Agilent Rat Oligo arrays (Agilent Technologies, Inc.) を用いて、網羅的遺伝子発現解析を行った。サンプルの処理及びマイク

ロアレイ実験は製造元のプロトコールに従って行った。コントロール RNA (Agilent One-Color RNA Spike-In kit) に 100 ng の total RNA を加え, Agilent Low Input Quick Amp Labeling kit (one-color) を用いて Cy3 ラベル cRNA を作製後, RNeasy mini kit (Qiagen) を用いて精製, in situ hybridization kit (Agilent Technologies, Inc.) を用いて断片化し, ハイブリダイゼーションを行った。G4900DA scanner (Agilent Technologies, Inc.) 及び Agilent Feature Extraction software (version 11.7.1.1) を用いて遺伝子発現データを取得した。マイクロアレイデータの解析は Gene Spring GX (version 11.5.1) software (Agilent Technologies, Inc.) を用いて行った。

### **ポリペプチド抽出, SDS-PAGE, 2D-DIGE 及び MS 解析**

生後 63 日齢の動物の各固定群 4 匹の各脳部位について, lysis buffer (4% (w/v) 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio] propanesulfonate, 2 M thiourea, 8 M urea, 10 mM Tris-HCl; pH 8.8) 中で, 採取した組織をホモジナイズしてポリペプチドを抽出し, 解析に供した。

抽出したポリペプチドについて Hoefer Mighty Small Gel System (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) を用いて, SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。5 µg のポリペプチドを用いて Cy5 ラベルし, SDS buffer (2% SDS, 20% glycerol, 0.01% bromphenol blue, 50 mM Tris-HCl, 0.1 M dithiothreitol, pH 6.8) に加えて, 15-25% gradient acrylamide gel (コスモバイオ株式会社, 東京) にアプライした。ゲルのイメージ解析は Typhoon (GE Healthcare) 及び Image Quant TL v2005 (GE Healthcare) を用いて行った。

抽出したポリペプチドを用いて二次元ディファレンスゲル電気泳動 (2D-DIGE) を行った。製造元のプロトコールに従って Cy2, Cy3 及び Cy5 (GE Healthcare) ラベルし, Pharmalytes pH 3-10 (GE Healthcare) と混合して固定化 pH 勾配ストリップゲル (pH 3-10; 24cm) にアプライした。イメージ解析は Typhoon 9400 (GE Healthcare) 及び Decyder<sup>®</sup> software Ver7.5 (GE Healthcare) を用いて行った。



600  $\mu\text{g}$  のポリペプチドを用いて mass spectrometry (MS) 解析のための 2D-DIGE を行った。目的のスポットを automated spot picker (GE Healthcare) を使用して 2 次元ゲルから採取し、12.5 ng/ $\mu\text{l}$  trypsin (Promega Corporation, Madison, WI, USA) 中でペプチドを溶出し、0.1 v/v% ギ酸に溶解させた。MS 解析は LC-MS/MS によって実施した。ペプチドは automated MS-to-MS/MS スイッチプロトコルを搭載した tandem mass spectrometric sequencing で分析した。データベース検索は MASCOT Deamon (Matrix Science, London, UK) (15, 48, 66, 69) を使用した。

### **$\alpha$ -カゼインの溶解性分析**

複数のリン酸化パターンを持ち、二次元電気泳動によって複数のスポットに分離するたんぱく質である  $\alpha$ -カゼインについて、各固定液及びメタカーン液の構成液への溶解性を評価した。5 mg の  $\alpha$ -カゼイン ( $\alpha$ -casein from bovine milk; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) を 500  $\mu\text{l}$  の 50 mM 重炭酸アンモニウムに溶解させた。溶解させた  $\alpha$ -カゼイン溶液 (1 mg/100  $\mu\text{l}$ ) を乾燥させ、600  $\mu\text{l}$  のメタカーン液、メタノール及びクロロホルム混合液 (6 : 3) , アセトン、クロロホルムあるいはメタノールに 4°C で 5 時間溶解した。20,000 $\times$ g, 2 時間, 4°C で遠心後、沈殿物として非溶解  $\alpha$ -カゼインを、上清を乾燥させて溶解  $\alpha$ -カゼインを採取し、各重量から溶解性を測定した。得られた溶解及び非溶解  $\alpha$ -カゼインを用いて、上述のとおり 2D-DIGE 解析に供した。

### **統計解析**

未固定組織の帯状回及び小脳皮質間の RIN の比較は、F 検定を用いて分散分析を行った後、Student の t 検定 (等分散) もしくは Aspin-Welch の t 検定 (不等分散) を用いて行った。各固定組織の各脳部位間または帯状回及び小脳皮質における未固定及び各固定間の RIN の比較は、Bartlett 検定を用いた分散分析を行った後に、Tukey 検定 (等分散) もしくは Steel-Dwass 検定 (不等分散) を行った。2D-DIGE 中のスポット容積の変化については未固定及び各固

定組織間で Student の  $t$  検定もしくは ANOVA 検定を行った。

## 結 果

### Total RNA の品質

未固定脳組織（帯状回及び小脳皮質）及びメタカーンあるいはアセトン固定組織（帯状回、小脳皮質、海馬歯状回及び脳梁）の各部位から抽出された total RNA について RIN 値を比較した。未固定組織において、小脳皮質の total RNA の RIN 値は帯状回のそれよりも高値を示した。メタカーン固定組織の total RNA の RIN 値は生後 63 日齢及び 21 日齢共に各脳部位で同程度の値を示した。アセトン固定組織では、小脳皮質の total RNA の RIN 値は帯状回または脳梁と比較して生後 63 日齢で有意な高値を示した。生後 21 日齢では、小脳皮質の total RNA の RIN 値は脳梁と比較して有意な高値を示した（Fig. 1-1A）。

帯状回の total RNA の RIN 値の平均値は、生後 63 日齢において未固定及びメタカーン固定組織で同程度の値を示したが、生後 21 日齢において未固定組織はメタカーン固定組織よりも有意な高値を示した。未固定帯状回組織の total RNA の RIN 値の平均値は、生後 63 日齢及び 21 日齢共にアセトン固定組織よりも有意な高値を示した。メタカーン固定帯状回組織の total RNA の RIN 値の平均値は生後 63 日齢においてアセトン固定組織よりも有意な高値を示した。さらに生後 21 日齢においてメタカーン及びアセトン固定帯状回組織には変化は認められなかった。小脳皮質の total RNA の RIN 値の平均値はメタカーンまたはアセトン固定組織よりも未固定組織の方が生後 63 日齢及び 21 日齢共に高値を示した。RIN 値の平均値は生後 63 日齢及び 21 日齢共にメタカーン及びアセトン固定小脳皮質組織において変化は認められなかった（Fig. 1-1B）。

### マイクロアレイデータのばらつき

生後 63 日齢における同じ固定組織内の各動物の脳 4 部位のマイクロアレイ遺伝子発現データの散布図の代表例を Fig. 1-2 に示した。全ての脳部位においてメタカーン固定組織とアセトン固定組織で mRNA 発現データの高い相関が認められた。生後 63 及び 21 日齢の各脳

部位のメタカーンとアセトン固定組織における決定係数の平均値とそのばらつきの指標である変動係数を比較した (Table 1-1)。各脳部位においてメタカーン固定組織はアセトン固定組織より高い決定係数を示した。変動係数もまたメタカーン固定組織はアセトン固定組織と比較して常に低値であった。

## ポリペプチドの品質

生後 63 日齢において、帯状回及び小脳皮質の未固定組織、メタカーン固定及びアセトン固定組織間で、ポリアクリルアミドゲル中のポリペプチドバンドのパターン及びそれらのシグナル強度は同程度であった (Fig. 1-3)。

## 2D-DIGE によるたんぱく質発現解析

生後 63 日の組織を用いて 2D-DIGE 解析を行った結果、帯状回及び小脳皮質の未固定組織、メタカーン固定及びアセトン固定組織間で、ポリアクリルアミドゲル中でのポリペプチドスポットのパターンに差は認められなかった (Fig. 1-4)。二次元ゲル中で認められたおよそ 2,100~2,300 のポリペプチドスポットについて、ほぼ全てのスポット容積で未固定及び各固定組織間に差は認められなかった (Fig. 1-4)。

未固定組織及び各固定組織間のポリペプチド発現量の差を、未固定組織とメタカーン固定あるいはアセトン固定組織のスポット容積の比によって評価した。帯状回では、未固定組織と比較して、メタカーン固定組織では 7 ポリペプチド、アセトン固定組織では 10 ポリペプチドで有意な変動が認められた (Table 1-2)。小脳皮質では、未固定組織と比較して、メタカーン固定組織では 1 ポリペプチド、アセトン固定組織では 3 ポリペプチドで有意な差が認められた (Table 1-3)。帯状回及び小脳皮質とも、メタカーン固定による発現量の変動はアセトン固定よりも小さかった。いくつかのポリペプチドスポットを選択して MS 解析を行った結果、Phosphoglycerate mutase 1 及び Triosephosphate isomerase について、2D-DIGE において等電点の違いによって 3 スポットへの分離が認められた (Fig. 1-5)。両たんぱく質とも、アセ

トン固定組織において、分離した3スポットのうちの1つで、未固定組織と比較してスポット容積の低値がみられた (Fig. 1-5, 1-6)。一方、メタカーン固定組織では、分離された3スポット容積は全て未固定組織と同等であった。

### ポリペプチドの固定液への溶解性

各固定液及びメタカーン液の構成溶媒への $\alpha$ -カゼインの溶解性を測定した結果、メタカーン液への溶解性は極めて低値であった (Table 4)。2D-DIGEにおいて、リン酸化パターンに応じた等電点の違いによって6つに分離された $\alpha$ -カゼインのポリペプチドスポット (Fig. 1-7) について、アセトンでは1つのスポット (スポット番号3) で他の5つのポリペプチドと比較して、溶解性に差がみられた。6つのスポットのメタカーン液への溶解性に差はみられなかった (Fig. 1-7, 1-8)。

## 考 察

固定組織中での網羅的な遺伝子ないし分子解析には、抽出した分子の品質の保持 (18, 84) と共に、発現データの未固定組織に対する忠実性の高さが重要であると考えられる。ホルムアルデヒドを用いた固定組織から抽出した total RNA の品質は一般に低く (6, 17) , 有機溶媒を用いたたんぱく質沈殿を原理とした固定では、より高い total RNA の品質が保持できる (20, 80, 83)。マイクロアレイ解析では、RIN 値は 7.0 以上が必要であると考えられている (29, 90)。本章では、メタカーン及びアセトン固定組織から抽出した total RNA の RIN 値の平均値はいずれも 8.0 以上であったが、メタカーン固定組織がより高値を示した。さらに、アセトン固定組織の RIN 値は、部位間で有意な差がみられたが、メタカーン固定組織での各部位における RIN 値は同程度であった。このことより、メタカーン固定は各脳部位間での発現量の比較にも有用であることが示唆された。

マイクロアレイデータに関するメタカーン及びアセトン固定組織間での比較において、メタカーン固定組織でアセトン固定組織に比べて、生後 63 日齢及び 21 日齢共に検索した全ての脳部位において、個体間データの散布図における高い相関性が得られた。さらに、メタカーン固定組織での個体間の発現データのばらつきの低さは、total RNA のより高い RIN 値で示される抽出した RNA の品質の高さを反映していることが考えられる。特定脳部位における遺伝子発現解析には、マイクロダイセクション技術を用いた採材が推奨される (5) が、本研究におけるパンチ生検デバイスを用いた手作業による簡便な採材によっても個体間でのデータの小さいばらつきが実現できた。以上のことより、メタカーン固定脳からの本採材方法はサンプル間のばらつきの小さい、ハイスループットなデータ収集に有用であると示唆された。

抽出したたんぱく質の 2D-DIGE 解析において、ホルマリン固定組織は未固定組織と比較し、スポット容積の減少やスポット位置のシフトを引き起こす (88)。本章において、SDS-PAGE によるポリペプチドバンドのパターンやその強度に、未固定組織、メタカーン固

定及びアセトン固定組織間で明らかな差はみられず、どちらの固定もポリペプチドの品質に影響を与えなかった。2D-DIGE 解析において、およそ 2,100~2,300 のポリペプチドのほとんど全てで、スポット容積及びスポット位置に未固定組織、メタカーン固定及びアセトン固定組織間で明らかな差はみられず、どちらの固定もプロテオーム解析が適応可能であることが示唆された。少数のポリペプチドについて未固定組織と固定組織間でスポット容積の差がみられたが、影響を受けたポリペプチドの数はメタカーン固定組織の方がアセトン固定組織と比較して少なかった。さらに、アセトン固定組織では、翻訳後修飾の影響でスポットが 3 つに分離する 2 つのポリペプチドにおいて、共に 3 つのうちの 1 スポットでスポット容積の変動がみられたが、メタカーン固定組織ではそれらのスポット容積に影響はみられなかった。

組織固定液中に組織のポリペプチドが溶出する可能性に関して、2D-DIGE においてリン酸化のパターンの違いによってスポットの分離が認められるたんぱく質の代表として選択した  $\alpha$ -カゼインについて、アセトン及びメタカーン液の構成溶媒への軽度な溶解性が確認されたが、メタカーン液への溶解はほとんど認められなかった。溶解及び非溶解  $\alpha$ -カゼインの 2D-DIGE によって分離した 6 つのスポットのうちの 1 つで、他の 5 スポットと比較してアセトンへの溶解性に差がみられた。このことより、アセトン固定によりポリペプチドの発現レベルがリン酸化の状況によって影響を受ける可能性が示唆された。

## 小 括

遺伝子発現プロファイルを発達期と成熟期の神経毒性評価に利用する前提条件として、標的とする脳部位のばらつきの少ない選択的な採材を可能にする方法を取り入れる必要がある。本章では各脳組織部位特異的な網羅的遺伝子及びたんぱく質解析に適う組織採材手法確立のために、ラットの全脳のメタカーン固定組織からパンチ生検デバイスを用いて特定脳部位を採材し、抽出した total RNA 及びポリペプチドの品質や発現データの忠実性を評価した。

その結果、メタカーン固定脳から抽出した totalRNA 及びポリペプチドは、生後 63 日齢及び 21 日齢共に品質及び発現データの忠実性に関して、網羅的発現解析に適う程度を保持していることが明らかになった。メタカーン固定脳から抽出した total RNA の RIN 値は、各脳部位間の比較においても同程度であり、メタカーン全脳固定法は固定による RNA の保存に関して迅速で効果的な方法であると考えられた。また、ポリペプチドのメタカーン液への溶出性は非常に低く、発現データへの固定による影響はほとんどないと考えられた。

以上より、メタカーン全脳固定法は、げっ歯類を用いた毒性試験の枠組みにおける特定脳部位の網羅的な遺伝子及びたんぱく質解析において、生後 63 日齢（9 週齢）及び 21 日齢（3 週齢）共に、有用であると判断された。



## 第 2 章

グリシドールのラット母動物暴露による母動物と子動物の神経系に対する影響

## 緒 言

本章では神経毒性物質であるグリシドールをモデル物質として、成熟動物の神経に対する障害と、神経毒に対する感受性がより高いと考えられる発達期のニューロン新生に対する影響を検索し、それらの標的性に対する毒性発現機序の共通性について検討することを目的とした。

グリシドールはエポキシドアルコールの一つであり、室温でやや粘性のある液体である。医薬品や化学物質の製造に使用され、ビニルポリマーの製造における安定剤として、また油の添加剤としても用いられる (59)。グリシドールは発がん性 (28) を示すことが知られている。ラット及びマウスのグリシドール 13 週間反復経口投与毒性試験において小脳の壊死が報告がされている (59) が、神経毒性発現機序は未だ明らかになっていない。グリシドールは食用油や乳児用ミルクに含まれるグリシドール脂肪酸エステルから消化管での加水分解によって生成される可能性があり (1, 4) , 食品からの暴露は近年世界的関心事となっていることから、成人及び発達期の神経毒性について更なる情報が必要とされている。

第 2 章では、グリシドールを母動物に妊娠・授乳期に暴露し、母動物における神経毒性機序を明らかにすると共に、子動物の海馬歯状回への影響とその可逆性の有無について検索した。また、子動物の脳における影響を捉えるために、第 1 章にて確立した採材方法を用いて各脳部位における遺伝子発現プロファイルの獲得を行った。子動物の海馬歯状回における評価では、SGZ の細胞増殖とアポトーシスならびに顆粒細胞系譜の検索と歯状回門における介在ニューロンの分布の検索を、暴露時と成熟後に免疫組織化学的解析により行った。さらに、甲状腺ホルモンはニューロン新生を含む脳の発達に不可欠であり、毒性試験でしばしばその血中レベルの変動が知られている。そこで、グリシドールの脳への影響に対する甲状腺機能の関与の有無を検索するため、母及び子動物の血清中甲状腺関連ホルモンの測定を行った。

化学物質の神経毒性評価には、可能な限り多くの脳部位を解析することが望ましいが、マ

マイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイリングには解剖学的構造、細胞分布あるいは機能に基づいた代表的な脳部位を選択する必要がある。そのため、大脳皮質の代表として帯状回、ニューロン新生部位の代表として海馬歯状回、また大脳白質の代表として脳梁、小脳の代表として小脳皮質を選択した。

## 材料及び方法

### 化学物質

グリシドール (CAS No. 556-52-5) は、和光純薬工業株式会社 (東京) より購入し、実験に供した。

### 供試動物

妊娠 2 日齢 (プラグ確認日を妊娠 0 日として起算) の Sprague-Dawley 系 SPF ラットを日本チャールス・リバー株式会社から購入して実験に供した。動物は温度  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度  $55\pm 15\%$ 、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、分娩後は母子共に同一ケージに収容した。母動物は妊娠 2 日から分娩後 21 日 (分娩日を生後 0 日として起算) の離乳まで、基礎飼料 CRF-1 を自由に摂取させた。飲料水は妊娠 2 日から 6 日までは水道水を与え、妊娠 6 日から分娩後 21 日までは後述の被験飲料水を自由に摂取させた。離乳後の子動物はプラスチック製ケージに 3 から 4 匹ずつ収容し、基礎飼料 CRF-1 及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) を遵守した。

### 実験デザイン

グリシドールは母動物の飲料水を介して子動物に暴露させた。NTP によるグリシドールの 13 週間反復経口投与試験の報告 (59) を参考に、母動物の軽微な体重減少が引き起こされると予想される 1,000 ppm を高用量に設定し、中及び低用量は 1,000 ppm を公比約 3 で除して 300 及び 100 ppm に設定した。

妊娠ラットを 1 群当たり 12 匹ずつの 4 群に無作為に群分けし、グリシドールを 0 (無処置

対照群) , 100, 300 及び 1,000 ppm の濃度で精製水に混じて妊娠 6 日から分娩後 21 日 (離乳時) まで自由に摂取させた。

神経学的異常の評価のため、母動物の歩行異常を次の 4 つのカテゴリーに基づきスコア付けた。グレード 0 : 正常歩行, グレード 1 : 軽度の歩行異常 (軽度の引きずり歩行) , グレード 2 : 中等度の歩行異常 (中等度の引きずり歩行) , グレード 3 : 重度の歩行異常 (体重を支えられず, 四肢が広がった状態を含む)。評価はプレキシガラス製ボックス (90 cm × 90 cm × 20 cm) 内で 3 分間, 1 匹ずつ盲検下で実施した。

母動物は、投与期間中、体重を週 2-3 回、摂餌量及び摂水量を週 2 回の頻度で測定した。生後 4 日に、1 腹雄各 6 匹、雌各 2 匹になるよう無作為に選抜して子数の調整を行った。1 腹の雄子動物が 6 匹に満たない場合は、1 腹 8 匹となるように雌子動物を残して調整した。子動物は、体重を授乳期間中は週 2 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。

分娩後 21 日に母動物全例を剖検し、病理組織学的解析、免疫組織化学的解析及び血清中ホルモン濃度測定に供した。子動物は生後 21 日に各腹雄各 2-3 匹 (各群 30-33 匹) , 雌各 1 匹 (各群 11 匹) を無作為に選抜して剖検し、遺伝子発現解析、病理組織学的解析、免疫組織化学的解析、アポトーシスの検索及び血清中ホルモン濃度測定に供した。残りの子動物は継続飼育して生後 77 日に各腹雄各 2-3 匹 (各群 31-33 匹) , 雌各 1 匹 (各群 11 匹) を剖検し、病理組織学的解析、免疫組織化学的解析及びアポトーシスの検索に供した。

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 (67) , 雌の生後 21 及び 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。母動物及び子動物の生後 21 及び 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 CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 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。

#### 血清中ホルモン濃度測定

全ての母動物及び生後 21 日の各腹 1 匹の雄子動物について CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔下で開腹し、腹大動脈から採血した。遠心分離 (3,000 r.p.m.×10 分) により血清試料を採取し、-80°C で凍結保存した。thyroid-stimulating hormone (TSH) , triiodothyronine (T<sub>3</sub>) 及び thyroxine (T<sub>4</sub>) を rodent ELISA test kit (Endocrine Technologies, Newark, CA, USA) 及びマイクロプレートリーダー (FLUOstar Optima, BMG Labtechnologies, Durham, NC, USA) を用いて測定した。

### 遺伝子発現解析用特定脳部位の採取

剖検時, 0 (対照群) , 300 及び 1,000 ppm 群の各腹 1 匹の雄子動物について、採取した全脳をメタカーン液に浸漬し、4°C で 5 時間振盪して固定した。その後、99.5%エタノールにて 1 時間おきに 3 回脱水し、4°C で一晩振盪した。

大脳は脳鋳型 (ブレインマトリックス：室町機械株式会社, 東京) を用いて厚さ 2 mm の冠状断スライスを作製し、小脳は厚さ 2 mm の矢状断スライスを作製した。1 mm 径の生検トレパン (カイインダストリーズ株式会社, 岐阜) を用いて、帯状回、小脳皮質、海馬歯状回及び脳梁組織の 4 部位をくり抜いて採取した (Fig. 2-1)。採取したサンプルは、99.5%エタノールに浸漬し、-80°C にて保存した。

### マイクロアレイ解析

生後 21 日齢の子動物のメタカーン固定脳から採取した各脳部位の組織サンプルから、QIAzol (Qiagen, Valencia, CA, USA) 及び RNeasy Mini kit (Qiagen) を用いて製造元のプロトコールに従って total RNA を抽出し、NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) を用いて濃度を測定した。0 (対照群) , 300 及び 1,000 ppm 群の各群 3 匹 (各腹雄各 1 匹) の各脳部位について、61,657 プローブを含む Agilent Whole Rat Genome array Toxplus 60Kx8 (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。サンプルの処理及びマイクロアレイ実験は製造元のプロトコールに従って行った。コントロール RNA (Agilent One-Color RNA Spike-In Kit) に各組織より抽出した 200 ng の total

RNA を加え, Agilent Low Input Quick Amp Labeling kit (one-color) を用いて Cy3 ラベル cRNA を作製後, RNeasy mini kit (Qiagen) を用いて精製, in situ hybridization kit (Agilent Technologies, Inc.) を用いて断片化し, ハイブリダイゼーションを行った。G2505C scanner (Agilent Technologies, Inc.) 及び Agilent Feature Extraction software (version 11.7.1.1) を用いて遺伝子発現データを取得した。マイクロアレイデータの解析は Gene Spring GX (version 11.5.1) software (Agilent Technologies, Inc.) を用いて行った。

### Real-time RT-PCR 解析

0 (対照群) 及び 1,000 ppm 群の生後 21 日齢の子動物の各 6 匹 (各腹雄各 1 匹) の海馬歯状回, 脳梁及び帯状回について, 1 µg の total RNA より SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) を用いて cDNA を合成した。Table 2-1 に示した遺伝子について, mRNA 発現の定量解析を実施した。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 2-1) 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 *Hprt* 及び *Gapdh* 遺伝子の検量線を求め,  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method (43) にて算出した。

### 病理組織学的解析

剖検時, 各群 11 匹の母動物より脳, 三叉神経, 坐骨神経及び脊髄を採取し, 病理組織学的解析に供した。坐骨神経は, 採取前 3 分間ブアン液を浸漬させて in situ 固定を行った。脊髄は頸部, 胸部及び腰部について, 椎骨と一括して採取した。採取した組織はブアン液に浸漬し, 4°C で一晩振盪して固定し, 断面を作製した。脊髄は, 固定後ブラン-クリュクロ液に浸漬し, 室温で 48 時間振盪して脱灰した後, 5%硫酸ナトリウム液に浸漬し, 室温で 48 時間振

盪して中和した。子動物は生後 21 日及び 77 日の各ステージ各群 11 匹（各腹 1 匹）の脳を採取し、母動物と同様にブアン液で固定し、割面を作製した。大脳は生後 21 日の子動物は Bregma の後方約-3.0 mm の 1 カ所で、母動物と生後 77 日の子動物は Bregma の後方約-3.5 mm の 1 カ所で冠状断割面を作製し、小脳及び延髄はいずれの動物も矢状断割面を作製した。組織はパラフィン包埋し、3 µm 厚の切片を作製した。切片はヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

### 免疫組織化学的解析及びアポトーシスの検索

各群 11 匹の母動物及び生後 21 日ならびに 77 日の各ステージ各群 11 匹の雄子動物（各腹 1 匹の雄）の組織切片を用いて、解析を行った。

各ステージの子動物の脳組織切片については、Table 2-2 に示した抗体を用いて免疫組織化学的染色を行った。母動物の脳組織切片については抗 neurofilament-L (NF-L) 抗体 (Table 2-2) を用いて免疫組織化学的染色を行った。さらに、母動物の三叉神経組織切片について、抗 phosphorylated neurofilament-H (p-NF-H) 抗体 (Table 2-2) を用いて免疫組織化学的染色を行った。各一次抗体は一晩 (4°C) 反応させ、3,3'-diaminobenzidine/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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、クエン酸緩衝液 (10 mM, pH 6.0) を用いて、T box brain 2 (Tbr2) についてはオートクレーブ処理 (121°C, 10 分) , calbindin-D-28K (Calb1) , calretinin (Calb2) , parvalbumin (Pvalb) 及び beta III tubulin についてはマイクロウェーブ処理 (90 °C, 10 分) による抗原の賦活化処理を行った。

また、生後 21 及び 77 日の子動物の脳について抗 neuron-specific nuclear protein (NeuN) 抗体と抗 reelin 抗体による二重染色を実施し、reelin は 3,3'-diaminobenzidine/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 Inc.) の発色を用いて ABC 法 (ABC-AP kit, Vector Laboratories Inc.) により行った。また、抗 reelin 抗体と抗 Calb2 抗体による二重染色を実施



し, Calb2 は 3,3'-diaminobenzidine/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 発色, reelin は Vector Red Alkaline Phosphate Substrate Kit I の発色を用いて同様に行った。

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, cleaved caspase-3 抗体を用いた免疫組織学的解析に加えて, TUNEL 法 (Apop Tag<sup>®</sup> *in situ* apoptosis detection kit, Millipore Corporation) を用いて製造元のプロトコールに従って検出を行った。

標本はヘマトキシリンにより対比染色を施した。

これらの子動物解析は, 同じ個体 (各ステージ各群 11 匹の雄子動物, 各腹 1 匹の雄) の標本を用いて実施した。

海馬歯状回 SGZ において, 顆粒細胞の系譜である dihydropyrimidinase-like 3 (TUC-4) , doublecortin (DCX) , Tbr2, paired box 6 (Pax6) 及び glial fibrillary acidic protein (GFAP) 陽性細胞数, アポトーシスの指標である cleaved caspase-3 及び TUNEL 陽性細胞数, 増殖細胞の指標である proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 陽性細胞数の検索を左右について行い, SGZ の長さを用いてノーマライズした (Fig. 2-2)。海馬歯状回門において, GABA 性介在ニューロンに発現する分子の reelin, Calb1, Calb2 及び Pvalb ならびに成熟ニューロンの指標である NeuN について陽性細胞数の検索を左右について行い, 歯状回門の面積を用いてノーマライズした (Fig. 2-2)。

## 統計解析

母動物の体重, 摂餌量, 摂水量, 脳重量, 免疫組織化学的解析及びホルモン測定 of データならびに子動物の real-time RT-PCR, 免疫組織化学的解析, TUNEL 解析及びホルモン測定 of 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, 摂餌量及び脳重量のデータは各腹 (母動物) の平均値を統計解析に用いた。

体重, 摂餌量, 摂水量, 脳重量, 免疫組織化学的解析及びホルモン測定 of データは, 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。real-time RT-PCR 解析における 2 群間の比較

は, F 検定により各群の等分散性の検定を行い, 等分散の場合は Student の t 検定, 不等分散の場合は Aspin-Welch の t 検定を用いて対照群と投与群の差を検定した。マイクロアレイ解析のデータは Welch の t 検定を用いて対照群と投与群の差を検定した。歩行異常のスコア及び病理組織学的解析における病変の程度は, Mann-Whitney の U 検定により検定を行った。

## 結 果

### 母動物の一般状態、体重、摂餌量、摂水量及び脳重量

剖検時の着床痕の解析において各群1匹で非妊娠動物がみられ、これらの母動物は評価から除いた。着床痕数は対照群と投与群の間に差はみられず、生存子動物数及び子動物の雌雄比にグリシドール投与による影響は認められなかった (Table 2-3)。1,000 ppm 群で、分娩後 11 日から 21 日まで歩行異常 (ひきずり歩行) がみられた (Table 2-4)。分娩後 14 日以降、対照群と比較して有意な差が認められ、分娩後 21 日には 1,000 ppm 群の全例で歩行異常がみられた。0, 100 及び 300 ppm 群では異常は認められなかった。体重は、300 ppm 群で分娩後 21 日に、1,000 ppm 群で妊娠 10 日から分娩後 21 日まで対照群と比較して有意な低値を示した (Fig. 2-3)。摂餌量は、100 ppm 群で分娩後 2 日に、300 ppm 群で分娩後 2 日から 14 日までならびに 21 日に、1,000 ppm 群で妊娠 8 日から分娩後 21 日まで対照群と比較して有意な低値を示した (Fig. 2-3)。摂水量は、300 ppm 群で妊娠 16 日から分娩後 21 日まで、1,000 ppm 群で妊娠 8 日から分娩後 21 日まで対照群と比較して有意な低値を示した (Fig. 2-3)。脳重量は、1,000 ppm 群で対照群と比較して絶対重量の有意な低値及び相対重量の有意な高値が認められた (Table 2-5)。

### 子動物の一般状態、体重、摂餌量及び脳重量

生後 77 日までの観察期間を通じて全例で一般状態に異常はみられなかった。体重は、雄では 300 ppm 群で生後 11 日から 35 日まで、1,000 ppm 群で生後 4 日から 77 日まで対照群と比較して有意な低値を示した (Table 2-6)。雌では 1,000 ppm 群で生後 4 日から 77 日まで対照群と比較して有意な低値を示した (Table 2-6)。摂餌量は、雄では 300 ppm 群で生後 35 日から 49 日まで、1,000 ppm 群で生後 28 日から 77 日まで対照群と比較して有意な低値を示した (Table 2-7)。雌では各投与群間に有意な差は認められなかった (Table 2-7)。脳重量は、1,000 ppm 群では、生後 21 日に雌雄の絶対重量の有意な低値及び相対重量の有意な高値が認めら

れた (Table 2-8)。生後 77 日に同様の変化が雄の絶対及び相対重量ならびに雌の絶対重量で認められた。300 ppm 群では、雄の相対重量の高値及び雌の絶対重量の低値が認められたが、生後 77 日では対照群と比較して差はみられなかった (Table 2-8)。

### 血清中甲状腺関連ホルモン濃度

母動物では TSH の有意な高値が 1,000 ppm 群で、TSH、T<sub>3</sub> 及び T<sub>4</sub> の有意な高値が 300 ppm 群で認められた。T<sub>3</sub> 及び T<sub>4</sub> に 1,000 ppm 群と対照群の間で差はみられなかった (Table 2-9)。生後 21 日の子動物では、T<sub>3</sub> の有意な高値が 1,000 ppm 群で認められた (Table 2-9)。

### マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析結果を Table 2-10～2-17 に示した。

海馬歯状回では、軸索形成及び神経突起形成に関わる遺伝子群の発現量変動 (*Frzb*, *Fzd6*, *Cntn3*, *Nfasc*, *Ncam2* 及び *Mag* 等)、髄鞘形成に関わる遺伝子群の発現量変動 (*Mal*, *Opalin*, *Mrf* 及び *Ugt8* 等)、細胞増殖に関わる遺伝子群の発現量変動 (*Aurkb*, *Mcm10*, *Cdkn1* 及び *Ndc80* 等) が 1,000 ppm 群で認められ、ほとんどの遺伝子は発現減少を示した。これらのうち、*Nfasc*, *Mal*, *Mrf*, *Ugt8*, *Aurkb* 及び *Ndc80* は 300 ppm 群でも同様の変動がみられた。

脳梁では、髄鞘形成に関わる遺伝子群の発現量の減少 (*Kl*, *Igf2* 及び *Igf2bp2*) が 1,000 ppm 群でのみ認められた。

帯状回では、軸索形成及び神経突起形成に関わる遺伝子群の発現量の増加 (*Cntn3*, *Efnb3*, *Tnc* 及び *Cd44*) が 1,000 ppm 群で認められた。これらのうち *Tnc* は 300 ppm 群でも同様の変動がみられた。

小脳皮質では、軸索形成及び神経突起形成に関わる遺伝子 (*Cntn3*) の発現量の増加及びシナプス伝達に関わる遺伝子群の発現量の減少 (*Thbs2* 及び *Ccl2*) が 1,000 ppm 群でのみ認められた。

## Real-time RT-PCR 解析

マイクロアレイ解析による遺伝子発現プロファイルを検証するため、各脳部位において 1,000 ppm 群で発現変動がみられた遺伝子の中からニューロンの発達や可塑性、髄鞘形成に関連するものをいくつか選択し、real-time RT-PCR による遺伝子発現解析を実施した。海馬歯状回における *Mag*, *Ncam2*, *Mal* 及び *Cdkn1* 及び帯状回における *Cd44*, *Efnb3* 及び *Nr4a2* でマイクロアレイデータと同様の有意な変動を示した。その他の遺伝子には発現量に有意な差は認められなかったが、マイクロアレイデータと同様の増加あるいは減少の傾向がみられた (Table 2-18)。

また、アポトーシス及び細胞増殖マーカーにおいては、いずれも発現量の変動はみられなかった (Table 2-19)。

## 病理組織学的検査

### 母動物

1,000 ppm 群において、三叉神経の神経節細胞で中心性色質融解、坐骨神経で軸索変性がみられ (Fig. 2-4) , いずれも病変の程度は対照群と比較して統計学的に有意であった (Table 2-20)。100 及び 300 ppm 群ではこれらの変化はみられなかった。

1,000 ppm 群の全例に、小脳の顆粒細胞層及び延髄背索で NF-L 陽性のスフェロイド形成が認められた (Fig. 2-5)。1,000 ppm 群で p-NF-H 陽性神経節細胞の有意な減少が認められた (Fig. 2-6)。100 及び 300 ppm 群ではスフェロイド形成及び p-NF-H 陽性神経節細胞の変化は認められなかった。

### 子動物

抗 NF-L 抗体及び抗 beta III tubulin 抗体を用いた免疫染色において、海馬歯状回、脳梁、帯状回、小脳皮質及び延髄での神経細胞体、神経突起及び軸索の形態に、対照群と比較して 1,000 ppm 群での変化はみられなかった。

### SGZ における免疫組織化学的解析による顆粒細胞の分化系譜の検索

生後 21 日では, 1,000 ppm 群で TUC-4 陽性細胞数の有意な減少が認められた。GFAP, Pax6, Tbr2 及び DCX 陽性細胞数に変化はみられなかった (Fig. 2-7)。生後 77 日では, GFAP, Pax6, Tbr2, DCX 及び TUC-4 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. 2-7)。

### 海馬歯状回門における免疫組織化学的解析によるニューロン分布の検索

生後 21 日では 1,000 ppm 群で NeuN, reelin 及び Calb2 陽性細胞数の有意な増加が認められた (Fig. 2-8)。Calb1 及び Pvalb 陽性細胞数に変化はみられなかった。生後 77 日では, 300 及び 1,000 ppm 群で NeuN 及び reelin 陽性細胞数, また, 1,000 ppm 群で Calb2 陽性細胞数の有意な増加が認められた。Calb1 及び Pvalb 陽性細胞数に変化はみられなかった (Fig. 2-8)。

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 NeuN と reelin の二重染色では, 1,000 ppm 群で生後 21 及び 77 日に reelin 陽性/NeuN 陰性から弱陽性細胞数の有意な増加が認められた。reelin 陽性/NeuN 陽性細胞数はいずれのステージでも変化はみられなかった (Fig. 2-9)。また, reelin と Calb2 の二重染色では 1,000 ppm 群で生後 21 及び 77 日に reelin 陰性/Calb2 陽性細胞数及び reelin 陽性/Calb2 陰性細胞数の有意な増加が認められたが, reelin 陽性/Calb2 陽性細胞数はいずれのステージでも変化はみられなかった (Fig. 2-9)。

### SGZ におけるアポトーシス及び細胞増殖の検索

生後 21 及び 77 日共, TUNEL 陽性アポトーシス細胞, cleaved caspase-3 陽性細胞及び PCNA 陽性細胞数に対照群と投与群の間に差はみられなかった (Fig. 2-10)。

## 考 察

本実験におけるグリシドールの飲水添加による摂水量から算出される摂取量は、100 ppm で 18.5 mg/kg body weight/day, 300 ppm で 48.8 mg/kg body weight/day 及び 1,000 ppm で 108.8 mg/kg body weight/day であった。グリシドールエステル類からの消化によって 100%の効率でグリシドールが生成する場合を想定して算出した、成人におけるグリシドールの推定1日摂取量は、1.33 µg/kg/day（1日最大 80g の脂質を摂取した場合）とされる（1）。本実験での NOAEL は母動物では 300 ppm (48.8 mg/kg body weight/day)、子動物では 100 ppm (18.5 mg/kg body weight/day) であり、成人での推定1日摂取量のそれぞれ約 35,000 及び 15,000 倍である。しかし、日本において開発されたジアシルグリセロールを高濃度で含む食用油には、他の精製油に比べて 12～40 倍のグリシドール脂肪酸エステルが含まれており（52）、ヒトへのリスクの増加が示唆される。

母動物の延髄背索また小脳でみられたスフェロイド形成は軸索障害を示唆する変化と考えられた。軸索の障害は末梢神経でも認められた。中枢及び末梢神経系において遠位軸索変性を誘発することが知られているアクリルアミド、エチレンオキシド、*n*-ヘキサンあるいはγ-ジケトンの暴露でも、同様の変化がみられることが報告されている（22, 39, 44, 45）。本障害の形態的特徴として、NF を蓄積した軸索の腫脹とその結果遠位末端から生じる軸索変性が挙げられる（44, 45, 46, 82）。アクリルアミドやエチレンオキシドは NF に付加されることで NF を満たした軸索の腫脹を誘発する（22）。エチレンオキシド及びグリシドールは共にエポキシド構造を持つため、これらの物質は同様の機序で NF の機能に影響を及ぼすことが推測される。また、NF のリン酸化異常は、アルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症のような神経変性疾患で認められる（41）。したがって、母動物の三叉神経で認められた p-NF-H 陽性神経節細胞の減少及び中心性色質融解からも、グリシドールによる末梢神経に対する神経障害性が示唆された。

アクリルアミドのラットへの発達期暴露実験において、母動物に神経毒性を示す用量の



暴露によっても子動物に対して明らかな軸索障害はみられていないが (87) , 子動物の SGZ で未熟顆粒細胞を標的としたニューロン新生の後期過程の障害が検出されている (61, 62)。本章におけるグリシドールの発達期暴露は, 生後 21 日の 1,000 ppm 群で海馬歯状回 SGZ の TUC-4 の発現分布に影響を及ぼすことが確認された。TUC-4 は未熟顆粒細胞で発現することが知られていることから (35) , 未熟顆粒細胞の減少が示唆された。GFAP は type-1 神経幹細胞で, Pax6 は type-1 神経幹細胞から type-2a 前駆細胞まで, Tbr2 は type-2b 前駆細胞で, また, DCX は type-2b 前駆細胞から未熟顆粒細胞までで発現する分子であり (26, 34) , これら前期ニューロン新生の指標の変動は認められなかった。未熟顆粒細胞は既に神経突起成長円錐及び基底樹状突起を有している (73)。また, 神経の発達過程におけるニューロン移動を制御する分子機序は, 軸索ガイダンスや神経突起形成と類似性が認められている (58)。以上のことから, 成熟動物での軸索障害性を考慮すると, グリシドールが発達神経毒として新生神経末端に直接影響することで未熟顆粒細胞の分化を障害することが推測された。しかしながら, 海馬歯状回における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。

一方, 海馬歯状回門ではアクリルアミドや抗甲状腺剤の発達期暴露実験の報告 (62, 76, 81) と同様, reelin 陽性細胞, Calb2 陽性細胞及び NeuN 陽性細胞の増加が生後 21 日の 1,000 ppm 群で確認された。歯状回門の Calb2 陽性介在ニューロンは, 顆粒細胞に投射する他の GABA 性ニューロンと相互に連絡して活性を制御することで, 海馬全体の活性を調整する (23)。また, 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を調節する役割を担っていることが報告されている (10, 21, 47, 72)。したがって, GABA 性介在ニューロンにおける, 顆粒細胞の新生の障害とそれに引き続く神経移動障害を反映する変動を検出したものと考えられる。さらに, reelin 陽性介在ニューロンは NeuN 陰性または弱陽性であった。NeuN の低発現は未熟なニューロンであることを示しており (78) , TUC-4 陽性未熟顆粒細胞の減少を反映して reelin を発現する未熟ニューロンの増加を引き起こすものと推測された。未熟顆粒細胞数の変動は生後 21 日のみであったが, 介在



ニューロンの変動は成熟まで続くものであることが確認され、ニューロン新生や移動障害の継続性を示すものと推測された。

甲状腺関連ホルモンは脳の発達に重要である(3)。本章では、 $T_3$ の増加が生後21日の1,000 ppmの子動物でみられた。成熟ラットでの甲状腺機能亢進はシナプス可塑性や記憶障害を引き起こすことから(89)、ニューロン新生にも影響を及ぼす可能性が考えられる。1,000 ppm群の子動物においても、ニューロン新生に影響を与える甲状腺ホルモンの異常が誘発された可能性が考えられるが、母動物では $T_3$ 及び $T_4$ 濃度への影響なしに軸索障害が誘発されたことから、グリシドール自体の軸索障害性が子動物における新生神経末端の障害性を介したニューロン新生障害を誘発したと推測される。

一方、生後21日の子動物の海馬歯状回における遺伝子発現解析において、1,000 ppm群で主に *Ncam2*, *Nfasc*, *Mrf*, *Mal* 及び *Ugt8* など神経可塑性、髄鞘形成に関与する遺伝子群(14, 36, 37, 77, 94)の発現量減少が確認された。これらは、海馬歯状回SGZでのニューロン新生の後期における軸索や神経突起の伸張活性を有する未熟顆粒細胞の減少と関連した、神経突起の成長やそれに続く神経回路形成の抑制を示唆する変動と考えられる。また、海馬歯状回における免疫組織化学的解析によってPCNA陽性増殖細胞に変動はみられなかったが、遺伝子発現解析によって1,000 ppm群で *Aurkb*, *Ndc80* 及び *Cdk1* などの細胞増殖関連遺伝子(9, 75)の発現量減少が確認され、細胞周期の抑制が示唆された。細胞増殖活性阻害の機序は明らかでないが、ニューロン新生障害を反映した変動であると推測される。帯状回では *Tnc*, *Cd44* 及び *Efnb3* などの軸索形成関連遺伝子(31, 42, 53)の発現量増加が、小脳皮質では *Ccl2* 及び *Thbs2* などのシナプス関連遺伝子(7, 100)の発現量減少がみられた。これらもグリシドール暴露による神経可塑性への影響を反映するものと示唆された。また、脳梁では、*Kl*, *Igf2* 及び *Igfbp2* などの髄鞘形成に関わる遺伝子(8, 38)の発現量減少がみられ、軸索形成、シナプス形成への影響を反映した髄鞘関連遺伝子の変動として検出されたものと示唆された。各脳部位における発現変動遺伝子のうち、*Cntn3*は1,000 ppm群で4つの脳部位に共通して上方制御された。これは神経接着分子として知られ、神経突起成長活性を有し、歯状回顆粒細胞

胞、小脳プルキンエ細胞及び大脳皮質の表層に分布するニューロンなどで発現しており

(97)、グリシドール発達期暴露による毒性を現す標的遺伝子としてあげられると考えられた。これらの海馬歯状回で変動がみられた遺伝子群のうち、*Nfasc*, *Mrf*, *Mal*, *Aukb* 及び *Ndc80* など多くの遺伝子は 300 ppm 群でも同様の変動がみられたが、他の 3 部位ではほとんどが 1,000 ppm 群のみの変動であった。海馬歯状回は成熟後までニューロン新生を続けることから、4 部位の中で遺伝子発現解析による発達神経毒性影響の検出に関して最も感受性の高い部位であることが示唆された。本実験において、1,000 ppm 群の母動物の中樞神経では小脳及び延髄背索でスフェロイド形成が見られたが、子動物の脳では、NF-L 及び beta III tubulin の免疫染色による形態的評価では軸索及び神経突起の障害は明らかでなかった。しかし、特定脳部位における遺伝子発現解析によって獲得した軸索形成やシナプス形成に関連する遺伝子クラスターは、発達期暴露による神経可塑性への影響に関連するものと示唆された。

## 小 括

第2章では、グリシドールをモデル物質として用いて、成熟動物の神経障害及び子動物の海馬歯状回におけるニューロン新生への影響について検索し、それらの標的性に対する毒性発現機序の共通性を検討した。また、子動物の各脳部位における遺伝子発現プロファイルを獲得した。

グリシドールのラットを用いた発達期暴露で、108.8 mg/kg body weight/day に相当する1,000 ppm のレベルにおいて、母動物の中枢及び末梢神経系に軸索障害を誘発することを見出した。また、同用量において、可逆的ながら子動物の海馬歯状回 SGZ での分化後期における神経突起形成を標的とした、ニューロン新生の後期過程への影響を見出した。

子動物の脳部位別の遺伝子発現解析では、主に軸索形成、神経突起形成、髄鞘形成及びシナプス関連遺伝子の発現量の変動が評価に用いた脳4部位で確認され、海馬歯状回 SGZ で見出した神経突起形成への標的性と関連した神経回路の可塑性への影響を示す遺伝子クラスターとして検出されたものと考えられた。また、海馬歯状回では300 ppm 群においても1,000 ppm 群と同様の遺伝子発現変動が確認されたが、他の3部位ではほとんどの遺伝子が1,000 ppm 群のみの変動であった。このことは、成熟後もニューロン新生を続ける海馬歯状回が、本物質の神経毒性の標的として最も感受性の高い部位であることが推測された。

上述のように、本研究によりグリシドールによる成熟動物における軸索変性と発達中動物のニューロン新生の後期過程を標的とした発達神経毒性が見出され、合わせて子動物の脳における神経回路の可塑性への影響を示す遺伝子クラスターの獲得により、グリシドールの毒性機序として、成熟した軸索と発達中の神経突起に対して共通の標的性を持つことが推測された。

### 第 3 章

グリシドールのラットへの 28 日間反復投与による神経系に対する影響

## 緒 言

第2章では、グリシドールの毒性機序として、成熟動物の神経系と発達期の動物のニューロン新生における幼若な新生神経末端に対して、共通の標的性を持った障害性が示唆された。

ニューロン新生は成熟動物の海馬歯状回 SGZ でもみられ、発達神経毒性物質の標的ともなりうることが考えられる。抗甲状腺剤として知られるメチマゾールは、ラット発達期暴露において、海馬歯状回 SGZ での type-1 神経幹細胞から未熟顆粒細胞までの広い範囲の顆粒細胞系譜の減少及びそれを反映した歯状回門の GABA 性介在ニューロン分布の変動によってニューロン新生障害性が見出されている (81)。さらに成熟ラットへのメチマゾールの投与によっても、同様の GABA 性介在ニューロンの分布変動が認められていることより (81)、発達期及び成熟期の動物において同様のニューロン新生障害を誘発することが示唆される。そのため、SGZ における顆粒細胞系譜を指標としたニューロン新生の検索や歯状回門における介在ニューロンの検索によって、成熟動物を用いた短期一般毒性試験において発達期及び成熟期の神経への影響を共に評価できる可能性が考えられる。

本章では、成熟動物に対する軸索障害性物質であることが明らかになったグリシドールによる、成熟動物のニューロン新生への影響を確認し、子動物でみられた影響と比較した。この目的のために、グリシドールの 28 日間強制経口投与後に、海馬歯状回 SGZ の細胞増殖とアポトーシスならびに顆粒細胞系譜の検索と歯状回門における介在ニューロンの分布の検索を、免疫組織化学的解析により実施した。さらに、軸索障害物質による成熟動物の脳への影響を捕らえるために、帯状回、海馬歯状回、脳梁及び小脳皮質における網羅的遺伝子発現プロファイルの獲得を行った。また、獲得した発現プロファイルを元に、発現変動分子の発現細胞分布を免疫組織化学的解析によって検索した。

## 材料及び方法

### 化学物質

グリシドール (CAS No. 556-52-5) は、和光純薬工業株式会社 (東京) より購入し、実験に供した。

### 供試動物

4 週齢の雄性 Sprague-Dawley 系 SPF ラットを日本チャールス・リバー株式会社から購入して実験に供した。動物は温度  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度  $55\pm 15\%$ 、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 3 から 4 匹ずつ収容し、基礎飼料 CRF-1 及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) を遵守した。

### 実験デザイン

NTP によるグリシドールの 13 週間反復経口投与試験の報告 (59) を参考に、軽微な体重減少が引き起こされると予想される 200 mg/kg を高用量に設定し、30 mg/kg を低用量に設定した。

1 週間の馴化飼育後、5 週齢の動物を 1 群当たり 16 匹ずつの 3 群に無作為に群分けし、0 (媒体対照群)、30 及び 200 mg/kg の用量でグリシドールを 28 日間強制経口投与した。グリシドールは精製水に溶解して 6 及び 40 mg/ml 液を調製し、最新の体重を基に 5 ml/kg にて投与した。神経学的異常の評価のため、動物の歩行異常を次の 4 つのカテゴリーに基づきスコア付けした。グレード 0: 正常歩行、グレード 1: 軽度の歩行異常 (軽度の引きずり歩行)、グレード 2: 中等度の歩行異常 (中等度の引きずり歩行)、グレード 3: 重度の歩行異常 (体

重を支えられず、四肢が広がった状態を含む)。評価はプレキシガラス製ボックス (90 cm × 90 cm × 20 cm) 内で3分間、1匹ずつ盲検下で実施した。投与期間中、体重及び摂餌量を週に1-2回測定した。最終投与翌日に全例を剖検し、遺伝子発現解析、病理組織学的解析、免疫組織化学的解析、アポトーシスの検索及び血清中ホルモン濃度測定に供した。剖検時、脳重量を測定した。全ての動物はCO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>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。

### 血清中ホルモン濃度測定

各群10例について最終投与翌日にCO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>麻酔下で開腹し、腹大動脈から血液を採取した。遠心分離 (3,000 r.p.m.×10分) により血清試料を採取し、-80°Cで凍結保存した。thyroid-stimulating hormone (TSH)、triiodothyronine (T<sub>3</sub>) 及び thyroxine (T<sub>4</sub>) を rodent ELISA test kit (Endocrine Technologies, Newark, CA, USA) 及びマイクロプレートリーダー (FLUOstar Optima, BMG Labtechnologies, Durham, NC, USA) を用いて測定した。

### 遺伝子発現解析用特定脳部位の採取

剖検時、各群6例より採取した全脳をメタカーン液に浸漬し、4°Cで5時間振盪して固定した。その後、99.5%エタノールにて1時間おきに3回脱水し、4°Cで一晩振盪した。

大脳は脳鋳型 (ブレインマトリックス：室町機械株式会社、東京) を用いて厚さ2 mmの冠状断スライスを作製し、小脳は厚さ2 mmの矢状断スライスを作製した。1 mm径の生検トレパン (カイインダストリーズ株式会社、岐阜) を用いて、帯状回、小脳皮質、海馬歯状回及び脳梁組織の4部位をくり抜いて採取した (Fig. 3-1)。採取したサンプルは、99.5%エタノールに浸漬し、-80°Cにて保存した。

### マイクロアレイ解析

メタカーン固定脳から採取した各脳部位の組織サンプルから、QIAzol (Qiagen, Valencia,

CA, USA) 及び RNeasy Mini kit (Qiagen) を用いて製造元のプロトコールに従って total RNA を抽出し, NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) を用いて濃度を測定した。各群 3 例の各脳部位について, 61,657 プローブを含む Agilent Whole Rat Genome array Toxplus 60Kx8 (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。サンプルの処理及びマイクロアレイ実験は製造元のプロトコールに従って行った。コントロール RNA (Agilent One-Color RNA Spike-In Kit) に各組織より抽出した 200 ng の total RNA を加え, Agilent Low Input Quick Amp Labeling (one-color) を用いて Cy3 ラベル cRNA を作製後, RNeasy mini kit (Qiagen) を用いて精製, in situ hybridization Kit (Agilent Technologies, Inc.) を用いて断片化し, ハイブリダイゼーションを行った。G2505C scanner (Agilent Technologies, Inc.) 及び Agilent Feature Extraction software (version 11.7.1.1) を用いて遺伝子発現データを取得した。マイクロアレイデータの解析は Gene Spring GX (version 11.5.1) software (Agilent Technologies, Inc.) を用いて行った。

### Real-time RT-PCR 解析

0 (対照群) 及び 200 mg/kg 群の各 6 例の各脳部位について, 1 µg の total RNA より SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) を用いて cDNA を合成した。Table 3-1 に示した遺伝子について, mRNA 発現の定量解析を実施した。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 3-1) 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 *Hprt* 及び *Gapdh* 遺伝子の検量線を求め,  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method (43) にて算出した。

### 病理組織学的解析



剖検時、各群 10 匹より脳、三叉神経、坐骨神経及び脊髄を採取し、病理組織学的解析に供した。坐骨神経は、採取前 3 分間ブアン液を浸漬させて *in situ* 固定を行った。脊髄は頸部、胸部及び腰部について、椎骨と一括して採取した。採取した組織はブアン液に浸漬し、4°C で一晩振盪して固定し、断面を作製した。脊髄は、固定後プラン-クリュクロ液に浸漬し、室温で 48 時間振盪して脱灰した後、5%硫酸ナトリウム液に浸漬し、室温で 48 時間振盪して中和した。大脳は Bregma の後方約-3.5 mm の 1 カ所で冠状断断面を作製し、小脳及び延髄は矢状断断面を作製した。組織はパラフィン包埋し、3µm 厚の切片を作製した。切片はヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

#### 免疫組織化学的解析及びアポトーシスの検索

各群 10 匹の脳組織切片について、Table 3-2 に示した抗体を用いて免疫組織化学的染色を行った。さらに、各群 10 匹の三叉神経組織切片について、抗 p-NF-H 抗体 (Table 3-2) を用いて免疫組織化学的染色を行った。各一次抗体は一晩 (4°C) 反応させ、3,3'-diaminobenzidine/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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、クエン酸緩衝液 (10 mM, pH 6.0) を用いて、Tbr2 及び activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc) についてはオートクレーブ処理 (121 °C, 10 分), Calb1, Calb2 及び Pvalb についてはマイクロウェーブ処理 (90 °C, 10 分) による抗原の賦活化処理を行った。

また、抗 DCX 抗体と抗 TUC-4 抗体による二重染色を実施した。TUC-4 は 3,3'-diaminobenzidine/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 発色を用いて ABC 法 (Elite ABC kit, Vector Laboratories Inc.) により、DCX は Vector Red Alkaline Phosphate Substrate Kit I (Vector Laboratories Inc.) の発色を用いて 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、cleaved caspase-3 抗体を用いた免疫組織学的解析に加えて、TUNEL 法 (Apop Tag<sup>®</sup> *in situ* apoptosis detection kit, Millipore Corporation) を用いて製造元のプロトコールに従って検出を行った。

標本はヘマトキシリンにより対比染色を施した。

海馬歯状回 SGZ において、顆粒細胞の系譜である TUC-4, DCX, Tbr2, Pax6 及び GFAP 陽性細胞数、アポトーシスの指標である cleaved caspase-3 及び TUNEL 陽性細胞数、増殖細胞の指標である PCNA 陽性細胞数の検索を左右について行い、SGZ の長さを用いてノーマライズした (Fig. 3-2)。海馬歯状回の顆粒細胞層において、NeuN 陽性細胞数の検索を左右について行い、SGZ の長さあるいは顆粒細胞層の面積を用いてノーマライズした (Fig. 3-2)。海馬歯状回門において、GABA 性介在ニューロンに発現する分子の reelin, Calb1, Calb2 及び Pvalb ならびに成熟ニューロンの指標である NeuN について陽性細胞数の検索を左右について行い、歯状回門の面積を用いてノーマライズした (Fig. 3-2)。海馬歯状回の顆粒細胞層において、Arc, FBJ osteosarcoma oncogene (Fos) 及び jun proto-oncogene (Jun) 陽性細胞数の検索を左右について行い、顆粒細胞層の長さを用いてノーマライズした (Fig. 3-3)。また、帯状回に分布する Arc 陽性細胞数を、脳梁及び帯状束で囲まれた領域で検索し、面積でノーマライズした (Fig. 3-4)。小脳顆粒細胞層に分布する Fos 陽性細胞数を、10<sup>th</sup> folium で検索し、面積でノーマライズした (Fig. 3-5)。

海馬歯状回の顆粒細胞層における Arc, Fos 及び Jun 陽性細胞数、帯状回に分布する Arc 陽性細胞数及び小脳顆粒細胞層に分布する Fos 陽性細胞数は、第 2 章にて行った発達期暴露実験にて得られた生後 21 及び 77 日の雄子動物の脳切片を用いても同様に免疫染色を行い、解析を行った。

## 統計解析

体重、摂餌量、脳重量、免疫組織化学的解析及びホルモン測定のパラメータは、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。real-time RT-PCR 解析及び免疫組織化学的解析における 2 群間の比較は、F 検定により各群の等分散性の検定を行い、等分散の場合は Student の t 検定、不等分散の場合は Aspin-Welch の t 検定を用いて対照群と投与群の差を検定した。マ

マイクロアレイ解析のデータは Welch の t 検定を用いて対照群と投与群の差を検定した。歩行異常のスコア及び病理組織学的解析における病変の程度は, Mann-Whitney の U 検定により検定を行った。

## 結 果

### 一般状態、体重、摂餌量及び脳重量

200 mg/kg 群で、投与第 18 日から剖検日まで歩行異常（ひきずり歩行）がみられた。投与第 21 日以降、対照群と比較して有意な差が認められ、剖検日には 200 mg/kg 群の全例でみられた。0, 30 mg/kg 群では異常は認められなかった（Table 3-3）。体重は、200 mg/kg 群で投与第 3 日から投与第 28 日まで、対照群と比較して有意な低値を示した（Table 3-4）。摂餌量は、200 mg/kg 群で投与第 3 日から投与第 28 日まで、対照群と比較して有意な低値を示した（Table 3-4）。脳重量は、200 mg/kg 群で絶対重量の有意な低値及び相対重量の有意な高値が認められた（Table 3-5）。

### 血清中甲状腺関連ホルモン濃度

TSH 及び T<sub>3</sub> の有意な高値が 200 mg/kg 群で認められた（Table 3-6）。T<sub>4</sub> の有意な高値が 30 mg/kg 群で認められたが、200 mg/kg 群と対照群との間に差はみられなかった（Table 3-6）。

### マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析結果を Table 3-7～3-14 に示した。

海馬歯状回では、ニューロン新生、軸索形成及び神経突起形成に関わる遺伝子群の発現量変動（減少：*Bmp4*, *Bdnf*, *Kdr* 及び *Atf3*, 増加：*Runx3* 及び *Cxcl12*）及びシナプス伝達に関わる遺伝子の変動（減少：*Crh*）が 200 mg/kg 群で認められた。

脳梁では、グリア細胞の成熟及び機能に関わる遺伝子群の発現量変動（減少：*Cntf* 及び *Tnc*, 増加：*Ptprc*）が 200 mg/kg 群で認められた。

帯状回では、軸索形成及び神経突起形成に関わる遺伝子群の発現量変動（*Nr4a3*, *Btg2*, *Plxnd1*, *Slitrk2*, *Rasgrfl*, *Bhlhe22*, *Atf3*, *Klf4*, *Cyr61* 及び *Sema5a*）及びシナプス伝達に関わる遺伝子群の発現量変動（*Cartpt*, *Slc17a6*, *Arc* 及び *Grik3*）が 200 mg/kg 群で認められ、ほとんど

で減少した。これらのうち *Cyr61* 及び *Btg2* の発現量減少は 30 mg/kg 群でもみられた。

小脳皮質では、ニューロン新生、軸索形成及び神経突起形成に関わる遺伝子群の発現量変動 (*Bmp4*, *Nr4a3*, *Tiam1*, *Nrep*, *Ntf3* 及び *Grik3*) 及びシナプス伝達に関わる遺伝子群の発現量変動 (*Ptgs2*, *Rims3* 及び *Camk4*) が 200 mg/kg 群で認められ、ほとんどで減少した。

### Real-time RT-PCR 解析

マイクロアレイ解析による遺伝子発現プロファイルを検証するため、各脳部位において 200 mg/kg 群で発現変動がみられた遺伝子の中からニューロンの発達や可塑性に関連するものをいくつか選択し、real-time RT-PCR による遺伝子発現解析を実施したところ、いずれの遺伝子もマイクロアレイデータと同様の有意な変動を示した (Table 3-15)。

また、海馬歯状回のニューロン可塑性及び髄鞘形成関連遺伝子の発現解析では、*Mag*, *Ncam2* 及び *Mal* の発現量の有意な増加が 200 mg/kg 群で認められた (Table 3-16)。アポトーシス、細胞増殖及び顆粒細胞の分化系譜マーカーにおいては、いずれも発現量の変動はみられなかった (Table 3-16)。

### 病理組織学的検査

200 mg/kg 群において、三叉神経の神経節細胞で中心性色質融解が、坐骨神経で軸索変性がみられ (Fig. 3-6) , いずれも病変の程度は対照群と比較して統計学的に有意であった (Table 3-17)。30 mg/kg 群ではこれらの変化はみられなかった。

200 mg/kg 群の全例に、小脳の顆粒細胞層及び延髄背索で NF-L 陽性のスフェロイド形成が認められた (Fig. 3-7)。200 mg/kg 群で p-NF-H 陽性神経節細胞の有意な減少が認められた (Fig. 3-8)。30 mg/kg 群ではスフェロイド形成及び p-NF-H 陽性神経節細胞の変化は認められなかった。

### SGZ における免疫組織化学的解析による顆粒細胞の分化系譜の検索

200 mg/kg 群で DCX 及び TUC-4 陽性細胞数の有意な減少が認められた。GFAP, Pax6 及び Tbr2 陽性細胞数に変化はみられなかった (Fig. 3-9)。

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 TUC-4 と DCX の二重染色では、200 mg/kg 群で TUC-4 陽性/DCX 陽性細胞数及び TUC-4 陰性/DCX 陽性細胞数の有意な減少が認められたが、TUC-4 陽性/DCX 陰性細胞数に変化はみられなかった (Fig. 3-10)。

### 海馬歯状回門における免疫組織化学的解析によるニューロン分布の検索

200 mg/kg 群で NeuN, reelin 及び Calb2 陽性細胞数の有意な増加が認められた。Calb1 及び Pvalb 陽性細胞数に変化はみられなかった (Fig. 3-11)。

### SGZ におけるアポトーシス、細胞増殖及び海馬顆粒細胞層における成熟ニューロンの検索

SGZ の TUNEL 陽性アポトーシス細胞, cleaved caspase-3 陽性細胞及び PCNA 陽性細胞数に対照群と投与群の間に差はみられなかった (Fig. 3-12)。また、顆粒細胞層の NeuN 陽性成熟ニューロン数に対照群と 200 mg/kg 群の間で差はみられなかった (Table 3-18)。

### 海馬顆粒細胞層、帯状回及び小脳皮質における Arc, Fos 及び Jun 陽性ニューロンの検索

海馬歯状回の顆粒細胞層中の Arc, Fos 及び Jun 陽性細胞数の有意な減少が 200 mg/kg 群で認められた (Fig. 3-13~3-15)。Fos 陽性細胞数の減少は 30 mg/kg 群でもみられた (Fig. 3-14)。帯状回の Arc 陽性細胞数の有意な減少が 200 mg/kg 群で認められた (Fig. 3-13)。また、小脳顆粒細胞層中の Fos 陽性細胞数の有意な減少が 30 及び 200 mg/kg 群で認められた (Fig. 3-14)。第 2 章で行った発達期暴露実験における解析で得られた雄子動物の脳では、生後 21 日にはいずれの脳部位でも Arc, Fos 及び Jun 陽性細胞数に変化はみられなかった。生後 77 日には海馬歯状回の顆粒細胞層中の Arc 陽性細胞数の有意な増加が 1,000 ppm 群で、Fos 陽性細胞数の有意な増加が 300 及び 1,000 ppm 群で認められた (Fig. 3-13, 3-14)。帯状回及び小脳皮質

では変化はみられなかった。

## 考 察

グリシドールの28日間反復投与の結果、軸索障害を誘発した200 mg/kg群で、海馬歯状回SGZのDCXまたはTUC-4陽性細胞の減少を引き起こした。DCXはType-2b前駆細胞から未熟顆粒細胞の範囲の細胞で発現するマーカー分子であるが(34, 35), Type-2b前駆細胞で発現するTbr2陽性細胞(26)数に変動がないことから、Type-2b前駆細胞への影響はないものと判断された。また、二重染色によって確認されたDCX陽性/TUC-4陽性及びDCX陽性/TUC-4陰性細胞の減少からもType-3前駆細胞及び未熟顆粒細胞に対する影響であると示唆された。しかし、NeuN陽性成熟顆粒細胞数に影響を及ぼさないことが確認され、本実験における投与期間では、Type-3前駆細胞から未熟顆粒細胞数の減少は、成熟顆粒細胞の減少にまで影響しないことが示唆された。

第2章における発達期暴露では、海馬歯状回SGZのTUC-4陽性細胞の減少のみを見出し、グリシドールが発達神経毒として幼若な神経末端への標的性によって未熟顆粒細胞を直接傷害することが推測された。本章における28日間投与では、投与量や投与期間の違いが影響すると考えられるが、DCX陽性細胞の減少も確認されたことから発達期暴露と比較してより強いニューロン新生障害が示唆された。DCXは微小管を安定化し、神経突起伸長やニューロンの移動を制御することから(12, 30), DCX発現細胞は新生神経末端への標的性を示す物質の影響を受けることが考えられる。病理学的解析及び免疫組織化学的解析における形態的評価によって海馬歯状回における軸索変性は確認できなかったが、発達期暴露時に確認された軸索形成や髄鞘形成に関与する*Mag*, *Ncam2* 及び *Mal* 等の遺伝子発現量の減少は28日間投与後の海馬歯状回でも確認され、SGZにおけるニューロン新生の後期に生じる神経突起形成に関連した神経可塑性への影響として検出されたものと示唆された。以上のことから、グリシドールは成熟動物であっても、発達期暴露時と同様に神経突起形成過程を含むニューロン新生の後期での異常を引き起こすことが示され、すなわち成熟ニューロンの軸索末端を標的とする神経毒が、同様の細胞標的機序によって成熟動物のニューロン新生を



障害することが示唆された。

さらに、成熟期でのグリシドール暴露でも *reelin* 陽性、または *Calb2* 陽性介在ニューロンの増加が確認され、第 2 章における発達期暴露実験と同様の変化が検出された。げっ歯類の海馬歯状回門では、ニューロンの半数が GABA 性介在ニューロンとされる (27)。*NeuN* 陽性成熟ニューロンの増加は *reelin* あるいは *Calb2* 陽性細胞の増加を反映すると考えられる。以上より、これらの GABA 性介在ニューロンの変化は、動物の成熟段階に関わらず、ニューロン新生障害を示唆する指標となることが示され、海馬歯状回顆粒細胞系譜の検索と組み合わせることで有効なツールとなることが示唆された。

甲状腺関連ホルモンに関して、TSH 及び  $T_3$  の増加が 200 mg/kg 群でみられた。ラットへの  $T_4$  の投与による血清  $T_4$  レベルの 4 倍の上昇は、海馬顆粒細胞の神経突起の分岐の短縮及び減少を引き起こす報告があるが (49)、第 2 章における発達期暴露時の母動物では  $T_3$  及び  $T_4$  の変動なしに軸索障害を誘発していることから、グリシドール自身の新生神経末端の障害機序が甲状腺ホルモン影響よりもニューロン新生障害に関与していると推測された。

一方、遺伝子発現解析を行った各脳部位において、軸索形成やシナプス関連遺伝子の変動が確認され、200 mg/kg 群でみられた変化の多くは発現量の減少であった。そのうち、海馬歯状回、帯状回及び脳梁における *Atf3* 及び *Cyr61*、帯状回及び小脳皮質における *Nr4a1* 及び *Nr4a3* など、複数の部位で共通した変動を示した遺伝子も見出された。免疫組織化学的検索により 200 mg/kg 群の小脳皮質では軸索障害を示唆する NF-L 陽性スフェロイドを検出したことに対して、帯状回及び海馬歯状回では軸索障害は見られなかったが、得られた発現変動はグリシドール暴露に対する軸索や神経突起を維持するための神経可塑性の抑制を示唆する変化として検出されたものと考えられた。また、海馬歯状回 SGZ でみられた神経突起形成抑制の反映を示唆するニューロン新生後期過程への影響からも、海馬歯状回の発現量変動は神経突起形成抑制と関連する変化を検出したものと推測された。脳梁では、*Cntf* 及び *Ptprc* など、グリア細胞の成熟、機能に関連する遺伝子 (40, 57, 93) の変動が 200 mg/kg 群で確認され、これらも軸索突起やシナプス形成の抑制を反映した変動であると推測された。

グリシドールの 200 mg/kg 投与によって、帯状回における *Arc*、帯状回及び小脳皮質における *Fos*、小脳皮質における *Jun* について発現量減少が見出され、さらに免疫組織化学的検索でこれらの発現細胞数の減少が確認された。*Arc* は後シナプスタンバク質であり (33)、シナプスの恒常性及び可塑性を制御している (65)。*Arc*、*Fos* 及び *Jun* は前初期遺伝子として同定されている (24, 56, 91)。海馬ニューロンにおけるこれら前初期遺伝子の発現は、学習に関連した神経活動によって制御され、経験を長期記憶として蓄積するための神経回路の安定化に関係している (25)。海馬歯状回において顆粒細胞の前初期遺伝子の発現は、顆粒細胞の神経ネットワークへの統合を意味している (85)。*Arc* ノックアウトマウスでは記憶の障害を引き起こし (91)、中枢神経系での *Fos* の欠損は空間及び文脈付け長期記憶能力を低下させる (19)。以上の報告より、グリシドール暴露による前初期遺伝子発現ニューロン数の減少は、軸索及び樹状突起を維持するための神経可塑性の抑制と関連していることが示唆された。

転写因子である cyclic AMP-responsive element-binding protein (CREB) は *Fos*、*Arc* 及び *Bdnf* のような前初期遺伝子の転写を制御し (91)、PKA や  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin kinase (CaMKs) のようないくつかのシグナル伝達経路によって活性化する (32, 55)。グリシドール暴露によって *Camk4* は小脳皮質において、*Bdnf* は海馬歯状回において発現量の減少がみられた。核内カルシウムシグナル伝達の阻害は *Atf3*、*Nr4a1*、*Cyr61*、*Btg2*、*Junb*、*Ptgs2*、*Npas4*、*Bdnf* 及び *Arc* のようなシナプス活動誘発性の遺伝子発現を阻害することが知られているが (99)、これらの遺伝子もグリシドール暴露によって発現量が減少し、いくつかは前述の通り複数の脳部位で検出された。*Atf3* は海馬ニューロンで *Camk4* を介した CREB による発現の誘導が起こり (98)、*Jun* 介在性の神経突起発芽を増加させる (68)。一方、CREB によって発現が誘導される *Nr4a1* のノックダウンによる *in vitro* での神経突起伸長の抑制が報告され (50)、CREB 依存的に転写される *Nr4a3* は軸索ガイダンスと関係している (70)。以上の報告から、グリシドール暴露は CaMK 依存シグナル伝達への影響に関与することが推測され、また神経可塑性の抑制に関連したシナプス伝達障害とそれに続く神経活動に重要な細胞内カルシウムシグナルの

異常を誘発することが示唆された。

28 日間投与と対照的に、発達期暴露後の子動物の成熟後に、海馬歯状回で Arc あるいは Fos 陽性ニューロン数が増加した。生後 21 日での影響はなかった。第 2 章の発達期暴露では、歯状回門でニューロン新生障害を反映した Calb2 あるいは reelin 陽性介在ニューロンの成熟後まで継続した変動がみられている。28 日間投与による Arc, Fos または Jun 発現ニューロンの減少は、神経可塑性の抑制を反映した変化と考えられるが、発達期暴露後の成熟期における Arc または Fos 発現ニューロンの増加は、ニューロン新生障害に応答した回復性機序としての神経可塑性の遅延した増強を反映した変化と推測された。

## 小 括

第3章では、成熟動物における軸索障害及び発達期動物における海馬歯状回 SGZ のニューロン新生障害を誘発するグリシドールを用いて、成熟動物への投与による海馬ニューロン新生への影響を検討した。また、各脳部位における遺伝子発現プロファイルを獲得し、神経毒性機序との関連を検討した。

ラットへのグリシドール 28 日間強制経口投与により、中枢及び末梢神経系で軸索障害を引き起こす 200 mg/kg の用量で、神経突起形成障害の反映を示唆するニューロン新生後期過程の障害とそれに伴う歯状回門の介在ニューロンの分布変動を見出した。これらの変動は、第2章のグリシドール発達期暴露実験における子動物の海馬歯状回での変動と本質的に同等のものであった。脳部位別の遺伝子発現解析では、主に軸索形成、シナプス関連遺伝子の発現量減少が各脳部位で確認され、さらに変動が確認された分子の免疫組織学的発現分布解析にて、前初期遺伝子である Arc, Fos または Jun 発現ニューロンの減少が、帯状回、小脳皮質または海馬歯状回で見出された。これら発現量解析及び発現分布解析で見出した変動はグリシドールによる神経可塑性の抑制を反映する変化として検出されたものと考えられた。一方で、発達期暴露された子動物の成熟後に、海馬歯状回で Arc 及び Fos 発現ニューロンの増加が見出され、ニューロン新生異常に対する回復性の機序として、神経可塑性の遅延した増強を反映する変化と推測された。

以上のことより、グリシドールの成熟動物への投与によって、海馬歯状回 SGZ での神経突起伸長過程を含むニューロン新生の後期過程の障害を、発達期神経毒性試験と同等に検出可能であることが示された。このことは、28 日間反復毒性試験の枠組みでの海馬歯状回におけるニューロン新生影響の評価は、成熟期及び発達期神経毒性の検出に有用な解析手段であることを示すものと考えられた。

## 総合考察

本研究では、神経毒性物質として既知であるものの標的性が不明であったグリシドールをモデル物質として、成熟動物でもみられるニューロン新生に対する影響の評価あるいは網羅的遺伝子発現プロファイリングの利用を通して神経毒性機序を検討し、さらに発達期及び成熟期動物に対する反応性を検索、比較することで、28日間反復投与試験の枠組みでの神経発達指標を利用した成熟期及び発達期神経毒性の検出性を明らかにすることを目的とした。

第1章では、各脳部位での網羅的発現解析に利用可能な採材方法の確立を目指し、ラット全脳をメタカーン固定後、パンチ生検デバイスを用いて特定脳部位を採材し、抽出した total RNA 及びポリペプチドの品質や発現データの未固定組織に対する忠実性を評価した。その結果、メタカーン固定脳から抽出した total RNA 及びポリペプチドは、生後 63 日齢及び 21 日齢共に品質及び発現データの忠実性に関して、網羅的発現解析に適う程度を保持していることが明らかになった。また、ポリペプチドのメタカーン液への溶出性は非常に低く、固定による発現データへの影響はほとんどないと考えられた。以上より、メタカーン全脳固定法は、げっ歯類を用いた毒性試験の枠組みにおける特定脳部位の網羅的な遺伝子及びたんぱく質解析において、生後 63 日齢及び 21 日齢共に、有用であると判断された。

第2章では、28日間反復投与試験の枠組みでの神経発達指標を利用した神経毒性の検出性の検討を目指し、第1段階として、成熟動物への神経毒性の報告があるものの詳細な毒性機序の解明が進んでいないグリシドールを用いて、成熟動物の神経障害性及び子動物のニューロン新生への影響について検索した。ニューロン新生評価では海馬歯状回 SGZ における顆粒細胞系譜の検索と歯状回門における介在ニューロンの分布の検索を行った。また、子動物の各脳部位における遺伝子発現プロファイルを獲得した。その結果、108.8 mg/kg body weight/day に相当する 1,000 ppm のレベルにおいて、母動物の中枢及び末梢神経系に軸索障害を誘発することを見出した。また、同用量において、可逆的ながら子動物の海馬歯状回

SGZ での分化後期における神経突起形成を標的としたニューロン新生の後期過程に対する影響を見出した。さらに、歯状回門における介在ニューロン分布の成熟後まで継続した変動が確認された。

子動物の脳部位別の遺伝子発現解析では、主に軸索形成、神経突起形成、髄鞘形成及びシナプス伝達関連遺伝子の発現量の変動が評価に用いた脳の 4 部位で確認され、海馬歯状回 SGZ で見出した神経突起形成への標的性と関連した神経回路の可塑性への影響を示す遺伝子クラスターとして検出されたものと考えられた。また、海馬歯状回では 300 ppm 群においても 1,000 ppm 群と同様の遺伝子発現変動が確認されたが、他の 3 部位ではほとんどの遺伝子が 1,000 ppm 群のみの変動であったことは、成熟後もニューロン新生を続ける海馬歯状回が、発達神経毒性影響の検出に関して最も感受性の高い部位であることが推測された。

上述のように本研究により、グリシドールによる成熟動物における軸索変性と発達中動物のニューロン新生の後期過程を標的とした発達神経毒性が見出され、合わせて子動物の脳における神経回路の可塑性への影響を示す遺伝子クラスターの獲得により、グリシドールの毒性機序として、成熟ニューロンの軸索と発達中の神経突起に対して共通の標的性を持つことが推測された。重要なことに、神経突起形成、シナプス形成や髄鞘形成などの神経系の発達過程と神経の生存、維持は同等の機序を利用する場合が多い (58)。さらに、海馬歯状回 SGZ でのニューロン新生過程では、神経幹細胞の自己複製から増殖、分化、神経突起伸長やシナプス形成、さらには顆粒細胞の分化を調節する介在ニューロンの髄鞘形成が含まれている (26, 34, 35)。以上のことから、海馬歯状回 SGZ のニューロン新生過程の細胞は、軸索障害物質であるグリシドールの他にも様々な毒性機序を持った神経毒性物質の標的となることが示唆される。

第 3 章では、28 日間反復投与試験の枠組みでの神経毒性検出性の検討の第 2 段階として、グリシドールの 5 週齢の動物への 28 日間反復投与を行い、子動物で検出された変化と比較した。発達期暴露と同様に海馬歯状回 SGZ における顆粒細胞系譜の検索と歯状回門における介在ニューロン分布の検索を行い、各脳部位における遺伝子発現プロファイルを獲得し



た。

その結果、中枢及び末梢神経系に軸索障害を誘発した 200 mg/kg での投与により、海馬歯状回 SGZ での分化後期における神経突起形成を標的としたニューロン新生の後期過程への影響を見出した。また、歯状回門における介在ニューロン分布の変動が確認された。これらの変動は、子動物の海馬歯状回でみられた影響と本質的に同様のものであった。

脳部位別の遺伝子発現解析では、主に軸索形成、シナプス関連遺伝子の発現量の減少が各脳部位で確認され、グリシドールによる神経可塑性の抑制を反映する変化として検出されたものと考えられた。発現量の変動が見られた遺伝子のうち、前初期遺伝子である Arc, Fos または Jun 発現ニューロンの減少が、帯状回、小脳皮質または海馬歯状回で確認された。Arc, Fos 及び Jun は前初期遺伝子として知られ (24, 56, 91)、神経活動依存的に発現し、長期増強に関わる分子であることから (25)、毒性試験における成熟動物への暴露によって神経可塑性への影響を検出する指標として、神経毒性評価に利用できる可能性が示唆される。一方で、発達期暴露された子動物の成熟後に、海馬歯状回で Arc 及び Fos 発現ニューロンの増加が見出され、ニューロン新生障害に対する回復性の機序として、神経可塑性の遅延した増強を反映する変化であると推測された。

脳における病理組織学的あるいは免疫組織化学的解析にて軸索障害を見出したのは成熟動物の小脳のみであり、海馬歯状回及び帯状回ではグリシドールによる軸索や神経突起への影響は検出されなかったが、ニューロン新生への影響や神経可塑性の抑制が検出された、海馬歯状回 SGZ の顆粒細胞系譜と歯状回門の GABA 性介在ニューロンの変動解析及び各脳部位での遺伝子発現解析は、神経毒性の検出及びその標的性の推測において有用なツールであることが示されたと考えられる。また上述のように、グリシドールの 5 週齢の動物への投与で、海馬歯状回 SGZ での神経突起伸長過程を含むニューロン新生の後期過程の障害を、発達期神経毒性試験と同等に検出可能であることが示された。このことは 28 日間反復毒性試験の枠組みでの海馬歯状回におけるニューロン新生影響の評価は、成熟期及び発達期神経毒性の検出に有用な解析手段であることを示すものと考えられる。神経毒性物質の標的性

としてはグリシドールを代表とする軸索障害性の他、シナプス障害物質、脱髄誘発物質など様々である。これら様々な毒性発現機序を持つ物質を暴露した場合の反応性の違いについて今後検討を重ねることで、様々な毒性機序の標的となるであろうニューロン新生への影響の評価あるいは網羅的遺伝子発現プロファイリングの利用による、迅速かつ検出力の高い神経毒性評価法の構築が可能になると考えられる。



## 結 論

本研究では、成熟動物でもみられる海馬におけるニューロン新生に対する影響の評価あるいは遺伝子や分子の網羅的発現プロファイリングの利用を通し、28 日間反復投与試験の枠組みでの神経発達指標を利用した新たな神経毒性評価手法の有用性を検討した。

メタカーンによるラット全脳固定法を用いた特定脳部位採材方法の有用性の検討では、抽出した total RNA 及びポリペプチドは、生後 63 日齢及び 21 日齢共に品質及び発現データの未固定組織に対する忠実性に関して網羅的発現解析に適う程度を保持しており、げっ歯類を用いた毒性試験の枠組みにおける網羅的な遺伝子及びたんぱく質解析において有用な方法であると判断された。

グリシドールの発達期暴露では、母動物の中枢及び末梢神経系における軸索障害が見いだされ、子動物の各脳部位での神経回路の可塑性の抑制を示唆する軸索形成、神経突起形成、髄鞘形成、シナプス伝達関連遺伝子の発現量の変動、ならびに海馬歯状回 SGZ での可逆的な未熟顆粒細胞の減少と歯状回門での Calb2 陽性または未熟な reelin 陽性 GABA 性介在ニューロンの成熟後まで継続した増加、すなわち神経突起形成時期を標的としたニューロン新生の後期過程に対する影響が検出された。

グリシドールの 28 日間反復投与では、各脳部位で主に軸索、神経突起及びシナプス機能関連遺伝子の発現量減少がみられ、前初期遺伝子である Arc, Fos あるいは Jun 発現ニューロンが帯状回、小脳皮質あるいは海馬歯状回で減少し、軸索や神経突起を維持するための神経可塑性の抑制を示唆するものと考えられた。また海馬歯状回 SGZ での type-3 前駆細胞から未熟顆粒細胞の減少で示されるニューロン新生の後期過程の障害及び reelin 及び Calb2 陽性 GABA 性介在ニューロンの増加が検出された。

以上、メタカーンによる全脳固定法を用いた採材方法を利用した遺伝子発現解析にて、発達期及び成熟動物におけるグリシドールの神経毒性機序を反映する遺伝子クラスターが得られた。グリシドールは成熟ニューロンの軸索末端と発達中の神経突起に対して共通の標的

性を持つことが推測され、成熟動物の神経に対する毒性物質がニューロン新生に影響を及ぼすことが示唆された。また、海馬歯状回で検出された影響は、発達期暴露後と 28 日間投与後で本質的に同様であり、グリシドールの成熟動物への投与によってニューロン新生障害を発達期神経毒性試験と同等に検出可能であることが示された。以上のことは 28 日間反復毒性試験の枠組みでの海馬歯状回におけるニューロン新生影響の評価は、成熟及び発達期神経毒性の検出に有用な解析手段であることを示すものと考えられる。

## 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に心から感謝いたします。

## 参考文献

1. Bakhiya, N., Abraham, K., Gürtler, R., Appel, K. E. and Lampen, A. (2011). Toxicological assessment of 3-chloropropane-1,2-diol and glycidol fatty acid esters in food. *Mol. Nutr. Food Res.* 55, 509~521.
2. Banks, P. M. (1979). Diagnostic applications of an immunoperoxidase method in hematopathology. *J. Histochem. Cytochem.* 27, 1192~1194.
3. Bernal, J. and Nunez, J. (1995). Thyroid hormones and brain development. *Eur. J. Endocrinol.* 133, 390~398.
4. BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung). (2009). Initial evaluation of the assessment of levels glycidol fatty acid esters detected in refined vegetable fats. BfR Opinion No. 007/2009.
5. Böhm, C., Newrzella, D. and Sorgenfrei, O. (2005). Laser microdissection in CNS research. *Drug Discov. Today* 10, 1167~1174.
6. Bussolati, G., Annaratone, L., Medico, E., D'Armento, G. and Sapino, A. (2011). Formalin fixation at low temperature better preserves nucleic acid integrity. *PLoS One* 6, e21043.
7. Cáceres, M., Suwyn, C., Maddox, M., Thomas, J. W. and Preuss, T. M. (2007). Increased cortical expression of two synaptogenic thrombospondins in human brain evolution. *Cereb. Cortex* 17, 2312~2321.
8. Chen, C. D., Sloane, J. A., Li, H., Aytan, N., Giannaris, E. L., Zeldich, E., Hinman, J. D., Dedeoglu, A., Rosene, D. L., Bansal, R., Luebke, J. I., Kuro-o, M. and Abraham, C. R. (2013). The antiaging protein Klotho enhances oligodendrocyte maturation and myelination of the CNS. *J. Neurosci.* 33, 1927~1939.
9. Chen, Y. Q., Hsieh, J. T., Yao, F., Fang, B., Pong, R. C., Cipriano, S. C. and Krepulat, F. (1999). Induction of apoptosis and G2/M cell cycle arrest by DCC. *Oncogene* 18, 2747~2754.

10. D'Arcangelo, G., Nakajima, K., Miyata, T., Ogawa, M., Mikoshiba, K. and Curran, T. (1997).  
Reelin is a secreted glycoprotein recognized by the CR-50 monoclonal antibody. *J. Neurosci.* 17,  
23~31.
11. Dehmelt, L. and Halpain, S. (2007). Neurite outgrowth: a flick of the wrist. *Curr. Biol.* 17,  
R611~R614.
12. Delfour, C., Roger, P., Bret, C., Berthe, M. L., Rochaix, P., Kalfa, N., Raynaud, P., Bibeau, F.,  
Maudelonde, T. and Boulle, N. (2006). RCL2, a new fixative, preserves morphology and  
nucleic acid integrity in paraffin-embedded breast carcinoma and microdissected breast tumor  
cells. *J. Mol. Diagn.* 8, 157~169.
13. Duveau, V., Laustela, S., Barth, L., Gianolini, F., Vogt, K. E., Keist, R., Chandra, D., Homanics,  
G. E., Rudolph, U. and Fritschy, J. M. (2011). Spatiotemporal specificity of GABAA  
receptor-mediated regulation of adult hippocampal neurogenesis. *Eur. J. Neurosci.* 34, 362~  
373.
14. Emery, B., Agalliu, D., Cahoy, J. D., Watkins, T. A., Dugas, J. C., Mulinyawe, S. B., Ibrahim,  
A., Ligon, K. L., Rowitch, D. H. and Barres, B. A. (2009). Myelin gene regulatory factor is a  
critical transcriptional regulator required for CNS myelination. *Cell* 138, 172~185.
15. Eng, J. K., McCormack, A. L. and Yates, J. R. 3rd. (1994). An approach to correlate tandem  
mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J. Am. Soc.  
Mass Spectrom.* 11, 976~989.
16. Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C. and Peterson, D.  
A. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* 4, 1313~1317.
17. Farragher, S. M., Tanney, A., Kennedy, R. D. and Paul Harkin, D. (2008). RNA expression  
analysis from formalin fixed paraffin embedded tissues. *Histochem. Cell Biol.* 130, 435~445.
18. Finke, J., Fritzen, R., Ternes, P., Lange, W. and Dölken, G. (1993). An improved strategy and a  
useful housekeeping gene for RNA analysis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by

PCR. *Biotechniques* 14, 448~453.

19. Fleischmann, A., Hvalby, O., Jensen, V., Strekalova, T., Zacher, C., Layer, L. E., Kvello, A., Reschke, M., Spanagel, R., Sprengel, R., Wagner, E. F. and Gass, P. (2003). Impaired long-term memory and NR2A-type NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in mice lacking c-Fos in the CNS. *J. Neurosci.* 8, 9116~9122.
20. Goldsworthy, S. M., Stockton, P. S., Trempus, C. S., Foley, J. F. and Maronpot, R. R. (1999). Effects of fixation on RNA extraction and amplification from laser capture microdissected tissue. *Mol. Carcinog.* 25, 86~91.
21. Gong, C., Wang, T. W., Huang, H. S. and Parent, J. M. (2007). Reelin regulates neuronal progenitor migration in intact and epileptic hippocampus. *J. Neurosci.* 27, 1803~1811.
22. Graham, D. G. (1999). Neurotoxicants and the cytoskeleton. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 733~737.
23. Gulyás, A. I., Hájos, N. and Freund, T. F. (1996). Interneurons containing calretinin are specialized to control other interneurons in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* 16, 3397~3411.
24. Guzowski, J. F. (2002). Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. *Hippocampus* 12, 86~104.
25. Guzowski, J. F., Timlin, J. A., Roysam, B., McNaughton, B. L., Worley, P. F. and Barnes, C. A. (2005). Mapping behaviorally relevant neural circuits with immediate-early gene expression. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 599~606.
26. Hodge, R. D., Kowalczyk, T. D., Wolf, S. A., Encinas, J. M., Rippey, C. and Enikolopov, G. (2008). Intermediate progenitors in adult hippocampal neurogenesis: Tbr2 expression and coordinate regulation of neuronal output. *J. Neurosci.* 28, 3707~3717.
27. Houser, C. R. (2007). Interneurons of the dentate gyrus: an overview of cell types, terminal fields and neurochemical identity. *Prog. Brain Res.* 163, 217~232.

28. IARC (International Agency for Research on Cancer). (2000). Some industrial chemicals.  
IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol.77,  
International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, pp. 469~486.
29. Imbeaud, S., Graudens, E., Boulanger, V., Barlet, X., Zaborski, P., Eveno, E., Mueller, O.,  
Schroeder, A. and Auffray, C. (2005). Towards standardization of RNA quality assessment  
using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res.*  
33, e56.
30. Jin, J., Suzuki, H., Hirai, S., Mikoshiba, K. and Ohshima, T. (2010). JNK phosphorylates  
Ser332 of doublecortin and regulates its function in neurite extension and neuronal migration.  
*Dev. Neurobiol.* 70, 929~942.
31. Jones, L. L., Liu, Z., Shen, J., Werner, A., Kreutzberg, G. W. and Raivich, G. (2000).  
Regulation of the cell adhesion molecule CD44 after nerve transection and direct trauma to the  
mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 426, 468~492.
32. Kasahara, J., Fukunaga, K. and Miyamoto, E. (2001). Activation of  
calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV in long term potentiation in the rat  
hippocampal CA1 region. *J. Biol. Chem.* 276, 24044~24050.
33. Kelly, M. P. and Deadwyler, S. A. (2002). Acquisition of a novel behavior induces higher  
levels of Arc mRNA than does overtrained performance. *Neuroscience* 110, 617~626.
34. Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B. and Kronenberg, G. (2004). Milestones of neuronal  
development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci.* 27, 447~452.
35. Knoth, R., Singec, I., Ditter, M., Pantazis, G., Capetian, P. and Meyer, R. P. (2010). Murine  
features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years.  
*PLoS One* 5, e8809.

36. Koul, O., Chou, K. H. and Jungalwala, F. B. (1980). UDP-galactose-ceramide galactosyltransferase in rat brain myelin subfractions during development. *Biochem. J.* 186, 959~969.
37. Kriebel, M., Wuchter, J., Trinks, S. and Volkmer, H. (2012). Neurofascin: a switch between neuronal plasticity and stability. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 694~697.
38. Kühl, N. M., De Keyser, J., De Vries, H. and Hoekstra, D. (2002). Insulin-like growth factor binding proteins-1 and -2 differentially inhibit rat oligodendrocyte precursor cell survival and differentiation in vitro. *J. Neurosci. Res.* 69, 207~216.
39. Lee, K. Y., Shibutani, M., Kuroiwa, K., Takagi, H., Inoue, K., Nishikawa, H., Miki, T. and Hirose, M. (2005). Chemoprevention of acrylamide toxicity by antioxidative agents in rats--effective suppression of testicular toxicity by phenylethyl isothiocyanate. *Arch. Toxicol.* 79, 531~541.
40. Linker, R. A., Mäurer, M., Gaupp, S., Martini, R., Holtmann, B., Giess, R., Rieckmann, P., Lassmann, H., Toyka, K. V., Sendtner, M. and Gold, R. (2002). CNTF is a major protective factor in demyelinating CNS disease: a neurotrophic cytokine as modulator in neuroinflammation. *Nat. Med.* 8, 620~624.
41. Liu, Q., Xie, F., Siedlak, S. L., Nunomura, A., Honda, K., Moreira, P. I., Zhua, X., Smith, M. A. and Perry, G. (2004). Neurofilament proteins in neurodegenerative diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 3057~3075.
42. Liu, X., Hawkes, E., Ishimaru, T., Tran, T. and Sretavan, D. W. (2006). EphB3: an endogenous mediator of adult axonal plasticity and regrowth after CNS injury. *J. Neurosci.* 26, 3087~3101.
43. Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods* 25, 402~408.
44. LoPachin, R. M. (2004). The changing view of acrylamide neurotoxicity. *Neurotoxicology* 25, 617~630.



45. LoPachin, R. M. and DeCaprio, A. P. (2004).  $\gamma$ -Diketone neuropathy: axon atrophy and the role of cytoskeletal protein adduction. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 15, 20~34.
46. LoPachin, R. M. Jr. and Lehning, E. J. (1994). Acrylamide-induced distal axon degeneration: a proposed mechanism of action. *Neurotoxicology* 15, 247~259.
47. Lussier, A. L., Caruncho, H. J. and Kalynchuk, L. E. (2009). Repeated exposure to corticosterone, but not restraint, decreases the number of reelin-positive cells in the adult rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 460, 170~174.
48. Mann, M. and Wilm, M. (1994). Error-tolerant identification of peptides in sequence databases by peptide sequence tags. *Anal. Chem.* 66, 4390~4399.
49. Martí-Carbonell, M. A., Garau, A., Sala-Roca, J. and Balada, F. (2012). Effects of adult dysthyroidism on the morphology of hippocampal granular cells in rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 72, 230~239.
50. Maruoka, H., Sasaya, H., Shimamura, Y., Nakatani, Y., Shimoke, K., Ikeuchi, T. (2012). Dibutyryl-cAMP up-regulates nur77 expression via histone modification during neurite outgrowth in PC12 cells. *J. Biochem.* 148, 93~101.
51. Masiulis, I., Yun, S. and Eisch, A. J. (2011). The interesting interplay between interneurons and adult hippocampal neurogenesis. *Mol. Neurobiol.* 44, 287~302.
52. Masukawa, Y., Shiro, H., Nakamura, S., Kondo, N., Jin, N., Suzuki, N., Ooi, N. and Kudo, N. (2010). A new analytical method for the quantification of glycidol fatty acid esters in edible oils. *J. Oleo Sci.* 59, 81~88.
53. Michele, M. and Faissner, A. (2009). Tenascin-C stimulates contactin-dependent neurite outgrowth via activation of phospholipase C. *Mol. Cell. Neurosci.* 41, 397~408.
54. Mitchell, D., Ibrahim, S. and Gusterson, B. A. (1985). Improved immunohistochemical localization of tissue antigens using modified methacarn fixation. *J. Histochem. Cytochem.* 33, 491~495.

55. Mizuno, K. and Giese, K. P. (2005). Hippocampus-dependent memory formation: do memory type-specific mechanisms exist? *J. Pharmacol. Sci.* 98, 191~197.
56. Nahm, W. K. and Noebels, J. L. (1998). Nonobligate role of early or sustained expression of immediate-early gene proteins c-fos, c-jun, and Zif/268 in hippocampal mossy fiber sprouting. *J. Neurosci.* 18, 9245~9255.
57. Nakahara, J., Seiwa, C., Tan-Takeuchi, K., Gotoh, M., Kishihara, K., Ogawa, M., Asou, H. and Aiso, S. (2005). Involvement of CD45 in central nervous system myelination. *Neurosci. Lett.* 379, 116~121.
58. Nóbrega-Pereira, S. and Marín, O. (2009). Transcriptional control of neuronal migration in the developing mouse brain. *Cereb. Cortex* 19(Suppl 1), i107~i113.
59. NTP (National Toxicology Program). (1990). Toxicology and carcinogenesis studies of glycidol (CAS No. 556-52-5) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). *Natl. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser.* 374, 1~229.
60. 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>;
61. Ogawa, B., Ohishi, T., Wang, L., Takahashi, M., Taniai, E., Hayashi, H., Mitsumori, K. and Shibutani, M. (2011). Disruptive neuronal development by acrylamide in the hippocampal dentate hilus after developmental exposure in rats. *Arch. Toxicol.* 85, 987~994.
62. Ogawa, B., Wang, L., Ohishi, T., Taniai, E., Akane, H., Suzuki, K., Mitsumori, K. and Shibutani, M. (2012). Reversible aberration of neurogenesis targeting late-stage progenitor cells in the

- hippocampal dentate gyrus of rat offspring after maternal exposure to acrylamide. *Arch. Toxicol.* 86, 779~790.
63. Ornstein, D. K., Gillespie, J. W., Paweletz, C. P., Duray, P. H., Herring, J., Vocke, C. D., Topalian, S. L., Bostwick, D. G., Linehan, W. M., Petricoin, E. F. 3<sup>rd</sup>. and Emmert-Buck, M. R. (2010). Proteomic analysis of laser capture microdissected human prostate cancer and in vitro prostate cell lines. *Electrophoresis* 21, 2235~2242.
  64. Orstavik, T. B., Brandtzaeg, P., Nustad, K. and Pierce, J. V. (1981). Effects of different tissue processing methods on the immunohistochemical localization of kallikrein in the pancreas. *J. Histochem. Cytochem.* 29, 985~988.
  65. Panford-Walsh, R., Singer, W., Rüttiger, L., Hadjab, S., Tan, J., Geisler, H. S., Zimmermann, U., Köpschall, I., Rohbock, K., Vieljans, A., Oestreicher, E. and Knipper, M. (2008). Midazolam reverses salicylate-induced changes in brain-derived neurotrophic factor and arg3.1 expression: implications for tinnitus perception and auditory plasticity. *Mol. Pharmacol.* 74, 595~604.
  66. Pappin, D. J., Hojrup, P. and Bleasby, A. J. (1993). Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr. Biol.* 3, 327~332.
  67. Pawluski, J. L., Brummelte, S., Barha, C. K., Crozier, T. M. and Galea, L. A. (2009). Effects of steroid hormones on neurogenesis in the hippocampus of the adult female rodent during the estrous cycle, pregnancy, lactation and aging. *Front. Neuroendocrinol.* 30, 343~357.
  68. Pearson, A. G., Gray, C. W., Pearson, J. F., Greenwood, J. M., During, M. J. and Dragunow, M. (2003). ATF3 enhances c-Jun-mediated neurite sprouting. *Brain res. Mol. brain res.* 120, 38~45.
  69. Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M. and Cottrell, J. S. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551~3567.

70. Pönniö, T. and Conneely, O. M. (2004). *nor-1* regulates hippocampal axon guidance, pyramidal cell survival, and seizure susceptibility. *Mol. Cell. Biol.* 24, 9070~9078.
71. Puchtler, H., Waldrop, F. S., Meloan, S. N., Terry, M. S. and Conner, H. M. (1970). Methacarn (methanol-Carnoy) fixation. Practical and theoretical considerations. *Histochemie* 21, 97~116.
72. Ramos-Moreno, T., Galazo, M. J., Porrero, C., Martínez-Cerdeño, V. and Clascá, F. (2006). Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity: immunomapping of intracellular and secreted Reelin in the adult rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 23, 401~422.
73. Ribak, C. E., Korn, M. J., Shan, Z. and Obenaus, A. (2004). Dendritic growth cones and recurrent basal dendrites are typical features of newly generated dentate granule cells in the adult hippocampus. *Brain Res.* 1000, 195~199.
74. Rognum, T. O., Brandtzaeg, P., Orjasaeter, H. and Fausa, O. (1980). Immunohistochemistry of epithelial cell markers in normal and pathological colon mucosa. Comparison of results based on routine formalin- and cold ethanol-fixation methods. *Histochemistry* 67, 7~21.
75. Ruchaud, S., Carmena, M. and Earnshaw, W. C. (2007). Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 798~812.
76. Saegusa, Y., Woo, G. H., Fujimoto, H., Kemmochi, S., Shimamoto, K., Hirose, M. Mitsumori, K., Nishikawa, A. and Shibutani, M. (2010). Sustained production of Reelin-expressing interneurons in the hippocampal dentate hilus after developmental exposure to anti-thyroid agents in rats. *Reprod. Toxicol.* 29, 407~414.
77. Schaeren-Wiemers, N., Bonnet, A., Erb, M., Erne, B., Bartsch, U., Kern, F., Mantei, N., Sherman, D. and Suter, U. (2004). The raft-associated protein MAL is required for maintenance of proper axon--glia interactions in the central nervous system. *J. Cell Biol.* 166, 731~742.
78. Seki, T. (2002). Expression patterns of immature neuronal markers PSA-NCAM, CRMP-4 and NeuroD in the hippocampus of young adult and aged rodents. *J. Neurosci. Res.* 70, 327~334.

79. Shibutani, M. and Uneyama, C. (2002). Methacarn: a fixation tool for multipurpose genetic analysis from paraffin-embedded tissues. *Methods Enzymol.* 356, 114~125.
80. Shibutani, M., Uneyama, C., Miyazaki, K., Toyoda, K. and Hirose, M. (2000). Methacarn fixation: a novel tool for analysis of gene expressions in paraffin-embedded tissue specimens. *Lab. Invest.* 80, 199~208.
81. Shiraki, A., Akane, H., Ohishi, T., Wang, L., Morita, R., Suzuki, K., Mitsumori, K. and Shibutani, M. (2012). Similar distribution changes of GABAergic interneuron subpopulations in contrast to the different impact on neurogenesis between developmental and adult-stage hypothyroidism in the hippocampal dentate gyrus in rats. *Arch. Toxicol.* 86, 1559~1569.
82. Spencer, P. S. and Schaumburg, H. H. (1978). Distal axonopathy: one common type of neurotoxic lesion. *Environ. Health Perspect.* 26, 97~105.
83. Srinivasan, M., Sedmak, D. and Jewell, S. (2002). Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am. J. Pathol.* 161, 1961~1971.
84. Stanta, G. and Schneider, C. (1991). RNA extracted from paraffin-embedded human tissues is amenable to analysis by PCR amplification. *Biotechniques* 11, 304~308.
85. Stone, S. S., Teixeira, C. M., Zaslavsky, K., Wheeler, A. L., Martinez-Canabal, A., Wang, A. H., Sakaguchi, M., Lozano, A. M. and Frankland, P. W. (2011). Functional convergence of developmentally and adult-generated granule cells in dentate gyrus circuits supporting hippocampus-dependent memory. *Hippocampus* 21, 1348~1362.
86. Takagi, H., Shibutani, M., Kato, N., Fujita, H., Lee, K. Y., Takigami, S., Mitsumori, K. and Hirose, M. (2004). Microdissected region-specific gene expression analysis with methacarn-fixed, paraffin-embedded tissues by real-time RT-PCR. *J. Histochem. Cytochem.* 52, 903~913.
87. Takahashi, M., Shibutani, M., Nakahigashi, J., Sakaguchi, N., Inoue, K., Morikawa, T., Yoshida, M. and Nishikawa, A. (2009). Limited lactational transfer of acrylamide to rat

- offspring on maternal oral administration during the gestation and lactation periods. *Arch. Toxicol.* 83, 785~793.
88. Tanca, A., Pagnozzi, D., Falchi, G., Tonelli, R., Rocca, S., Roggio, T., Uzzau, S. and Addis, M. F. (2011). Application of 2-D DIGE to formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Proteomics* 11, 1005~1011.
  89. Taşkın, E., Artis, A. S., Bitiktas, S., Dolu, N., Liman, N. and Süer, C. (2011). Experimentally induced hyperthyroidism disrupts hippocampal long-term potentiation in adult rats. *Neuroendocrinology* 94, 218~227.
  90. Thompson, K. L., Pine, P. S., Rosenzweig, B. A., Turpaz, Y. and Retief, J. (2007). Characterization of the effect of sample quality on high density oligonucleotide microarray data using progressively degraded rat liver RNA. *BMC Biotechnol.* 7, 57.
  91. Tzingounis, A. V. and Nicoll, R. A. (2006). Arc/Arg3.1: linking gene expression to synaptic plasticity and memory. *Neuron* 52, 403~407.
  92. Uneyama, C., Shibutani, M., Masutomi, N., Takagi, H. and Hirose, M. (2002). Methacarn fixation for genomic DNA analysis in microdissected, paraffin-embedded tissue specimens. *J. Histochem. Cytochem.* 50, 1237~1245.
  93. Vernerey, J., Macchi, M., Magalon, K., Cayre, M. and Durbec, P. (2013). Ciliary neurotrophic factor controls progenitor migration during remyelination in the adult rodent brain. *J. Neurosci.* 33, 3240~3250.
  94. Winther, M., Berezin, V. and Walmod, P. S. (2012). NCAM2/OCAM/RNCAM: cell adhesion molecule with a role in neuronal compartmentalization. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 441~446.
  95. Woo, G. H., Takahashi, M., Inoue, K., Fujimoto, H., Igarashi, K., Kanno, J., Hirose, M., Nishikawa, A. and Shibutani, M. (2009). Cellular distributions of molecules with altered expression specific to thyroid proliferative lesions developing in a rat thyroid carcinogenesis

- model. *Cancer Sci.* 100, 617~625.
96. Yan, F., Wu, X., Crawford, M., Duan, W., Wilding, E. E., Gao, L., Nana-Sinkam, S. P., Villalona-Calero, M. A., Baiocchi, R. A. and Otterson, G. A. (2010). The search for an optimal DNA, RNA, and protein detection by *in situ* hybridization, immunohistochemistry, and solution-based methods. *Methods* 52, 281~286.
  97. Yoshihara, Y., Kawasaki, M., Tani, A., Tamada, A., Nagata, S., Kagamiyama, H. and Mori, K. (1994). BIG-1: a new TAG-1/F3-related member of the immunoglobulin superfamily with neurite outgrowth-promoting activity. *Neuron* 13, 415~426.
  98. Zhang, S. J., Buchthal, B., Lau, D., Hayer, S., Dick, O., Schwaninger, M., Veltkamp, R., Zou, M., Weiss, U. and Bading, H. (2011). A signaling cascade of nuclear calcium-CREB-ATF3 activated by synaptic NMDA receptors defines a gene repression module that protects against extrasynaptic NMDA receptor-induced neuronal cell death and ischemic brain damage. *J. Neurosci.* 31, 4978~4990.
  99. Zhang, S. J., Zou, M., Lu, L., Lau, D., Ditzel, D. A., Delucinge-Vivier, C., Aso, Y., Descombes, P. and Bading, H. (2009). Nuclear calcium signaling controls expression of a large gene pool: identification of a gene program for acquired neuroprotection induced by synaptic activity. *PLoS Genet.* 5, e1000604.
  100. Zhou, Y., Tang, H., Liu, J., Dong, J. and Xiong, H. (2011). Chemokine CCL2 modulation of neuronal excitability and synaptic transmission in rat hippocampal slices. *J. Neurochem.* 116, 406~414.

## 要 旨

成熟動物に現れる神経毒性は、多様な測定項目における総合的評価を要し、毒性の判断が困難な場合がある。発達期神経毒性試験の現行のガイドライン（OECD TG426）では、化学物質の評価に多くの時間と動物を必要とする。そのため、より効率的な評価システムの構築が求められている。海馬歯状回の顆粒細胞層下帯（SGZ）におけるニューロン新生は、神経幹細胞の自己複製、前駆細胞の増殖や分化、神経突起形成やシナプス形成などの顆粒細胞の成熟過程を含む。そのため、軸索末端あるいはシナプトソームを標的とする神経毒性物質は、発達中の神経を標的とする毒性物質にもなりうると考えられる。本研究では神経発達指標を利用した新規の神経毒性評価手法の確立を目指し、成熟後にも継続する海馬でのニューロン新生に着目して、成熟動物の神経に対する毒性物質によるニューロン新生の障害性、また通常の 28 日間反復投与試験における発達神経毒性を示唆する影響の検出性を検討した。

マイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイリングは、疾患や化学物質の暴露による毒性発現の機序に関連する網羅的な情報、さらに毒性評価に適用できる細胞指標を獲得する手段となりうる。一方、中枢神経組織は解剖学的な構成が精緻であり、部位特性が高い。げっ歯類の特定脳部位における遺伝子発現解析には、抽出分子の高い品質かつ発現量の忠実性を適える、迅速で正確な組織採材法の開発が必要である。

第 1 章では、網羅的発現解析に適う組織採材法を検討するため、ラット全脳をメタカーン固定後、パンチ生検デバイスを用いて特定脳部位を採取し、抽出した total RNA 及びポリペプチドの品質及び発現データの忠実性を評価した。その結果、メタカーン固定組織は網羅的発現解析に十分な total RNA 及びポリペプチドの品質を保持した。マイクロアレイ解析における遺伝子発現量の個体間のばらつきは小さく、二次元電気泳動におけるポリペプチドの発現量は未固定組織とほとんど同等であり、ポリペプチドのメタカーン液への溶出性は非常に低かった。以上の結果より、メタカーン全脳固定を利用した本採材法は、遺伝子及びたんぱく質の網羅的発現解析において有用であることが明らかになった。



第2章では、神経毒性モデル物質としてグリシドールを妊娠SDラットに妊娠6日から分娩後21日まで飲水暴露し、成熟動物における神経障害性と発達期の海馬ニューロン新生への影響を検索した。子動物の海馬歯状回SGZにおける顆粒細胞系譜の分布、細胞増殖及びアポトーシスならびに歯状回門での介在ニューロン分布を免疫組織化学的に検索し、脳部位特異的な網羅的遺伝子発現解析を行った。発現解析部位には、帯状回、脳梁、海馬歯状回及び小脳皮質を選択した。その結果、1,000 ppm群で、母動物に歩行異常がみられ、中枢及び末梢神経系で軸索障害を見出した。子動物の遺伝子発現解析の結果、軸索形成、神経突起形成、髄鞘形成、シナプス伝達関連遺伝子の発現量の変動が各脳部位で確認され、グリシドール発達期暴露による神経回路の可塑性への影響が示唆された。一方、1,000 ppm群の子動物のSGZでdihydropyrimidinase-like 3 (TUC-4) 陽性未熟顆粒細胞の可逆的な減少が見出された。また、歯状回門でCalb2陽性または未熟なreelin陽性の $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) 性介在ニューロンの増加が成熟後までみられ、継続したニューロン新生や移動異常を反映した変化と示唆された。以上より、グリシドールは成熟動物での軸索障害と共通した機序により、未熟顆粒細胞の新生神経末端を標的としたニューロン新生の後期過程の障害を誘発することが推察された。

第3章では、28日間毒性試験の枠組みでの、SGZにおけるニューロン新生影響の検出可能性を検討するため、5週齢の雄性ラットにグリシドールを28日間強制経口投与した。発達期暴露実験と同様に海馬歯状回の免疫組織化学的検索を行った。また、脳部位特異的な網羅的遺伝子発現解析を4ヶ所の脳部位で行い、変動のみられた分子の発現分布を免疫組織化学的に解析した。その結果、中枢及び末梢神経系で軸索障害を誘発した200 mg/kg群で、網羅的発現解析によって軸索及びシナプス機能関連遺伝子の発現量変動が各脳部位で確認され、その多くで減少を示した。また、発現量の減少がみられた前初期遺伝子であるArc, Fos及びJun発現ニューロンが帯状回、小脳皮質あるいは海馬歯状回で減少した。これらの変動はグリシドール暴露への反応として、神経可塑性の抑制を示唆するものと考えられた。一方200 mg/kg群で、SGZでのdoublecortinまたはTUC-4陽性のtype-3前駆細胞から未熟顆粒細胞の

減少で示されるニューロン新生後期過程の障害ならびに reelin 及び Calb2 陽性 GABA 性介在ニューロンの増加が見出された。

以上、メタカーンを用いた全脳固定法は、げっ歯類を用いた毒性試験の枠組みでの脳部位特異的な発現解析に有用であると判断された。この新規の組織採材法によって、発達期及び成熟動物におけるグリシドールの神経毒性機序を反映する遺伝子クラスターが得られた。脳における病理組織学的あるいは免疫組織化学的解析にて軸索障害を見出したのは成熟動物の小脳のみだが、ニューロン新生に着目した海馬歯状回の解析及び各脳部位での遺伝子発現解析によって、ニューロン新生障害や神経可塑性の抑制が検出された。発達期暴露によって、グリシドールの毒性機序として、成熟ニューロンの軸索とニューロン新生後期過程における発達中の神経突起に対して共通の標的性を持つことが推測され、ニューロン新生が発達神経毒性物質の標的となること、さらに成熟動物の神経に対する毒性物質がニューロン新生に影響を及ぼすことが示唆された。また、成熟動物を用いた 28 日間毒性試験において SGZ での神経突起形成時期を標的としたニューロン新生後期の障害が発達期暴露試験と同様に検出された。以上より、神経発達指標を利用した本解析手法は、通常の 28 日間毒性試験の枠組みでの成熟及び発達期神経毒性物質の簡便な検出に有用な解析手段となり得ることが期待される。

## **Abstract**

Testings for developmental neurotoxicant with the current guidelines, i.e., OECD TG426, take a long time and require many animals for evaluation of one chemical. Therefore, more efficient screening system is necessary to be established. Neurogenesis in the subgranular zone (SGZ) of the hippocampal dentate gyrus consists of self-renewal of stem cells and production of progenitor cells, proliferation and differentiation of progenitor cells, and maturation involving neuritogenesis and synaptogenesis of granule cell lineages. Therefore, toxicants targeting axon terminals and synaptosomes may cause developmental neurotoxicity. This study was undertaken to confirm whether adult neurotoxicants could affect neurogenesis and to examine the effects on suggestive of developmental neurotoxicity could be detected in a standard 28-day toxicity study using rats.

Gene expression profiling using microarrays provides global view of tissue-specific changes on the mechanisms underlying disease or toxicity development following chemical exposure and will also offer opportunity to obtain new cellular markers applicable for neurotoxicity testings. The central nervous system has an anatomically elaborate architecture with region-specific differences in the distribution of neuronal and glial cell populations. For molecular analysis in anatomically-specific brain regions of rodents, it is necessary to establish a fast and accurate procedure for tissue sampling to achieve high integrity and expression fidelity of extracted molecules.

In chapter 1, I examined the suitability of the whole brain fixation procedure with methacarn solution in a scheme of regular toxicity study in combination with tissue sampling method using punch-biopsy devices for expression analysis. For this purpose, I examined the integrity and variability of expression data of extracted total RNAs and polypeptides. As a result, tissue from methacarn fixation provided high integrities of

total RNAs and polypeptides sufficient for global expression analysis. Methacarn fixation resulted in low mRNA expression variability between samples in microarray analysis. The fidelity of polypeptide expression was mostly equivalent in 2-dimensional differential in-gel electrophoresis between methacarn fixed and unfixed tissues. Extraction of polypeptides during fixation was found to be negligible with methacarn. These results suggest that whole brain fixation with methacarn retains advantages for global analyses of mRNAs and polypeptides.

In chapter 2, I investigated the neurotoxicity mechanism of glycidol and its effect on developmental hippocampal neurogenesis using rats. Animal study was performed using pregnant SD rats given drinking water containing glycidol at 0 (control), 100, 300, or 1,000 ppm from gestational day 6 until weaning on day 21 after delivery. For examination of developmental neurotoxicity, I analyzed the distribution of granule cell lineages as well as their proliferation and apoptosis in the SGZ and interneurons in the hilus of the hippocampal dentate gyrus in offspring and also performed a brain region-specific global gene expression profiling in relation with developmental neurotoxicity. Four brain regions were selected to cover cerebral and cerebellar tissues, i.e., the cingulate cortex, corpus callosum, hippocampal dentate gyrus and cerebellar vermis. As a result, dams revealed gait abnormalities as well as histopathological and immunohistochemical changes suggestive of axonal injury in the central and peripheral nervous systems at 1,000 ppm. Global gene expression analysis revealed that glycidol induced gene expression changes related to axonogenesis, neuritogenesis, myelination and synaptic transmission in different brain regions. These expression profiles suggested that developmental exposure to glycidol affected plasticity of neuronal networks in the broad brain areas. On the other hand, glycidol at 1,000 ppm reversibly decreased the number of dihydropyrimidinase-like 3 (as known as TUC-4)<sup>+</sup> immature granule cells in

the SGZ of offspring. In the dentate hilus, glycidol caused sustained increase of calbindin-2 (Calb2)<sup>+</sup> or immature reelin<sup>+</sup>  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)-ergic interneurons until postnatal day (PND) 77, which suggests a sign of continued aberrations in neurogenesis and migration. Glycidol caused axon injury in adult rats, suggesting that glycidol targets the newly generating nerve terminals of immature granule cells, resulting in the suppression of late-stage hippocampal neurogenesis.

In chapter 3, I investigated the possibility whether similar effect on neurogenesis in the SGZ can be induced by glycidol exposure in a framework of 28-day toxicity study in rats. Glycidol was orally administered to 5-week-old male rats at 0, 30 or 200 mg/kg in purified water by gavage for 28 days. I examined the distribution of granule cell lineages as well as their proliferation and apoptosis in the SGZ and interneurons in the hilus of the hippocampal dentate gyrus for examination of effects on neurogenesis. I also performed region-specific global gene expression profiling at the four brain regions, i.e., the cingulate cortex, corpus callosum, hippocampal dentate gyrus and cerebellar vermis, and following immunohistochemical analysis of representative molecules with regard to the distribution changes in immunoreactive cell populations based on the obtained gene expression profiles. At 200 mg/kg, which caused axonal changes in the central and peripheral nervous systems, expression changes of genes related to axonal and synaptic functions were mainly observed in the cingulate cortex, cerebellar vermis and hippocampal dentate gyrus, and these genes were mostly downregulated. Immunohistochemically, the number of neurons expressing immediate-early genes, i.e., Arc, Fos and Jun, were decreased in the dentate granule cell layer, cingulate cortex and cerebellar vermis. These changes were suggestive of suppression of neuronal plasticity to maintain axons and dendrites in response to glycidol exposure. On the other hand, glycidol at 200 mg/kg, animals revealed aberrations in neurogenesis at the late-stage

differentiation as evidenced by decreases of both doublecortin<sup>+</sup> and TUC-4<sup>+</sup> type-3 progenitor cells and increases of immature granule cells in the SGZ, as well as the increase of reelin<sup>+</sup> or Calb2<sup>+</sup> GABAergic interneurons in the dentate hilus.

In conclusion, whole brain fixation with methacarn is judged to be well suited for analysis of gene expression in anatomically-specific regions in the framework of toxicity testing in rodents. Using this novel high-throughput tissue sampling method, we could identify the target gene profiles based on the pathological mechanism of neurotoxicity for both developmental and adult stages. Although there were obvious effects on axons or neurites by glycidol exposure in only cerebellum through histopathological and immunohistochemical analyses, the analyses focusing on the neurogenesis in the hippocampal dentate SGZ and global gene expression on each brain region revealed the effects on neurogenesis or suppressed neuronal plasticity. Developmental exposure to glycidol suggested that the mechanism of toxicity of glycidol has common targets of both mature axon terminals and developing neurites at the late-stage neurogenesis. Therefore, it was suggested that neurogenesis could be a common target of developmental neurotoxicants, and adult neurotoxicants could affect neurogenesis. Glycidol causes aberrations in neurogenesis in the SGZ at the late stage involving the process of neurite extension in a standard regular 28-day toxicity study similar to the developmental exposure study. Therefore, it is suggested that use of neuronal developmental markers could be a promising evaluation endpoint for detection of adult and developmental neurotoxicity in a scheme of 28-day toxicity study.

图 表

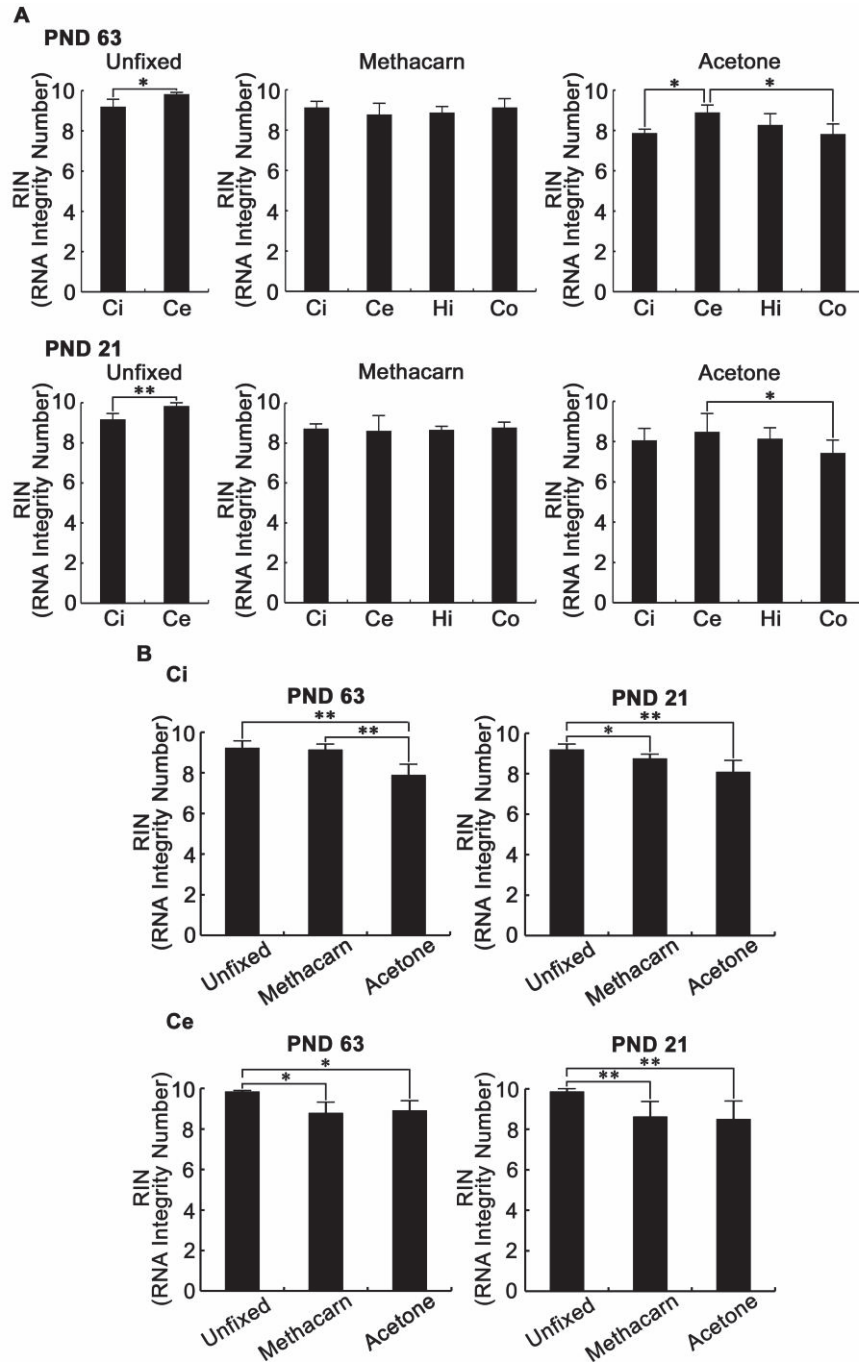
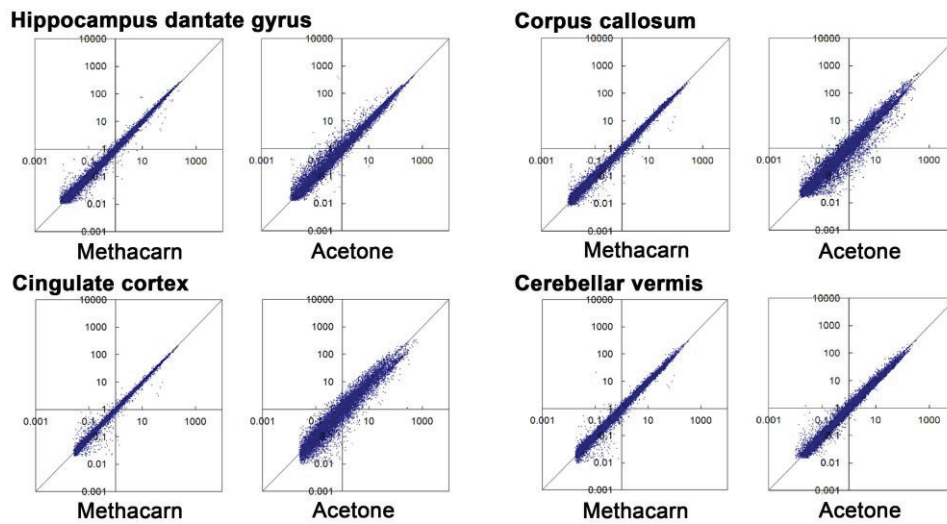


Fig. 1-1

RIN of total RNAs extracted from unfixed tissue, methacarn-fixed and acetone-fixed tissues. A. RIN values at each brain region. Data are expressed as mean + SD. Number of animals is 4 at PND 63 and 8 at PND 21 in each tissue preparation. \*, \*\*: Significantly different in each

comparison (\* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ). Abbreviations: Ci, cingulate cortex; Ce, cerebellar vermis; Hi, hippocampal dentate gyrus; Co, corpus callosum. B. Average RIN values of the cingulate cortex and cerebellar vermis. Data are expressed as mean + SD. Number of animals is 4 at PND 63 and 8 at PND 21 in each tissue preparation. \*\*: Significantly different from unfixed tissue samples ( $p < 0.01$ ).





**Fig. 1-2**

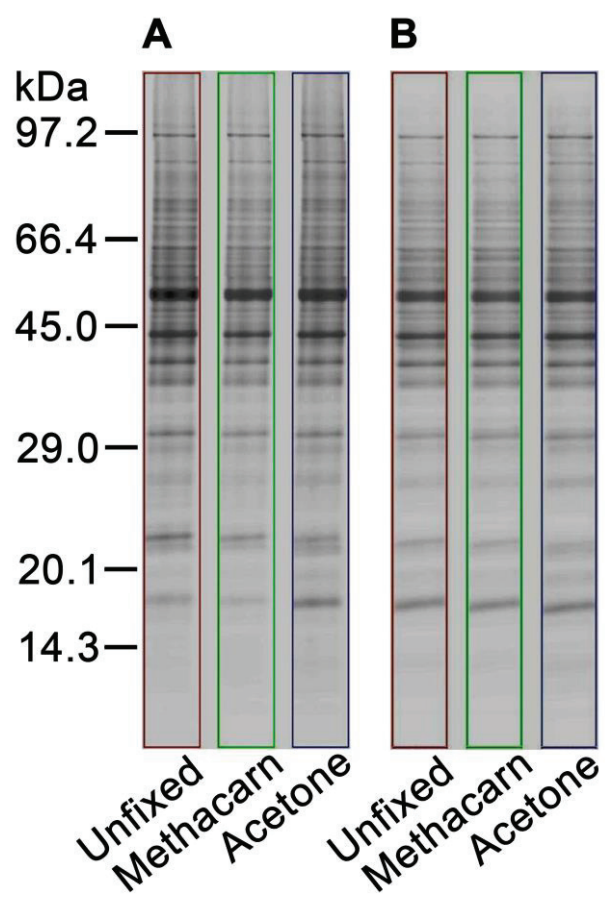
Scatter plot of individual gene expression within each fixative in four brain regions at PND 63. Three animal samples were analyzed in each brain region after fixation with methacarn or acetone.

**Table 1-1**

**Mean value of coefficients of determination and it's coefficients of variation in the scatter plot analysis of gene expressions in methacarn and acetone-fixed tissues**

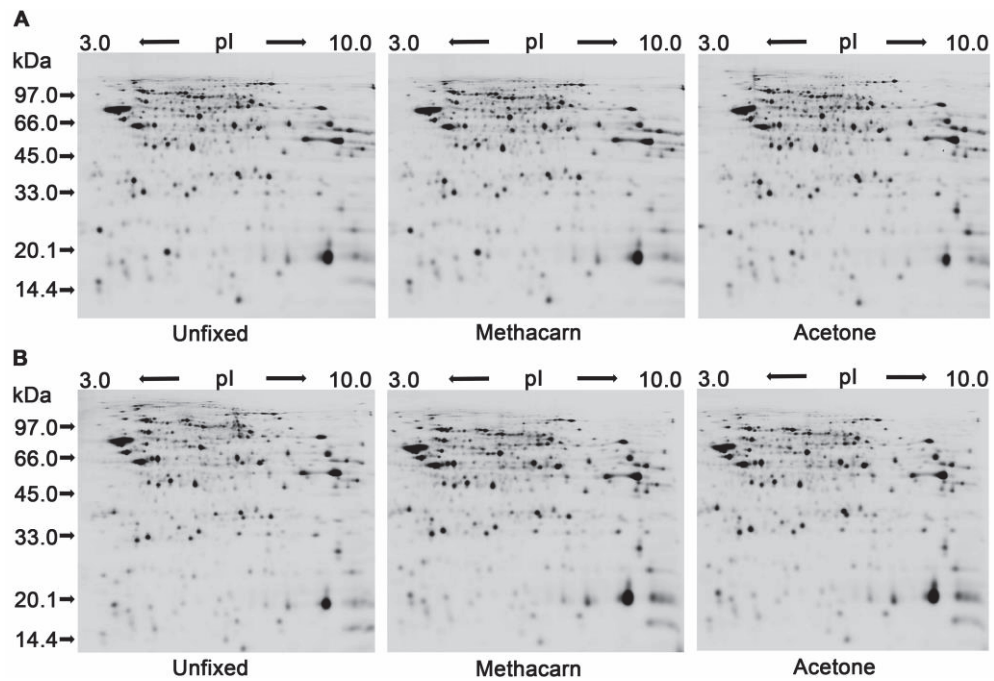
	No. of samples	Fixative			
		Methacarn		Acetone	
		C.D.	C.V.	C.D.	C.V.
PND 63 (Experiment 1)					
Hippocampal dentate gyrus	3	0.982	0.006	0.948	0.021
Corpus callosum	3	0.985	0.005	0.982	0.006
Cingulate cortex	3	0.993	0.001	0.883	0.110
Cerebellar vermis	3	0.976	0.007	0.963	0.026
PND 21 (Experiment 2)					
Hippocampal dentate gyrus	3	0.978	0.012	0.977	0.010
Corpus callosum	3	0.988	0.002	0.971	0.020
Cingulate cortex	3	0.995	0.001	0.981	0.005
Cerebellar vermis	3	0.990	0.005	0.923	0.061

Abbreviations: C.D., coefficient of determination; C.V., coefficient of variation; PND, postnatal day.



**Fig. 1-3**

Integrity of polypeptide bands in protein extracts from unfixed tissues, methacarn-fixed or acetone-fixed tissues at PND 63. A. Cingulate cortex. B. Cerebellar vermis.



**Fig. 1-4**

2D-gel image of polypeptides extracted from unfixed tissues and methacarn-fixed or acetone-fixed tissues at PND 63. A. Cingulate cortex. B. Cerebellar vermis.

**Table 1-2**

**Average ratio of standardized abundance of polypeptides in methacarn or acetone-fixed tissue to that of unfixed tissue from the cingulate cortex**

Average ratio of standardized abundance		
Methacarn / Unfixed	Acetone / Unfixed	Protein
1.82 <sup>a</sup>	2.32*	Heat shock cognate 71kDa protein
2.35*	3.17*	Undetermined polypeptide #1
-2.29*	-1.40	Serum albumin
1.51	2.62*	Dihydropyrimidinase-related protein 2
1.71	2.16*	Undetermined polypeptide #2
2.44*	3.73*	Actin-related protein 3
1.70*	2.79*	Alpha-enolase
1.74*	2.27*	Undetermined polypeptide #3
2.16*	1.03	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I
1.40	2.04*	NAD-dependent deacetylase sirtuin-2
-1.54*	-5.20*	Phosphoglycerate mutase 1
1.09	-2.05*	Triosephosphate isomerase

<sup>a</sup> Standardized abundance of each polypeptide was estimated by measuring the ratio of spot volume in each of unfixed frozen, or methacarn- or acetone-fixed samples to the spot volume of pooled samples of all unfixed and fixed tissues. Average log ratio of standardized abundance in fixed samples per unfixed sample was then calculated. Number of animals examined is 4 in each tissue preparation.

\* Significantly different between methacarn or acetone-fixed tissue samples and unfixed tissue samples ( $P < 0.01$ ).

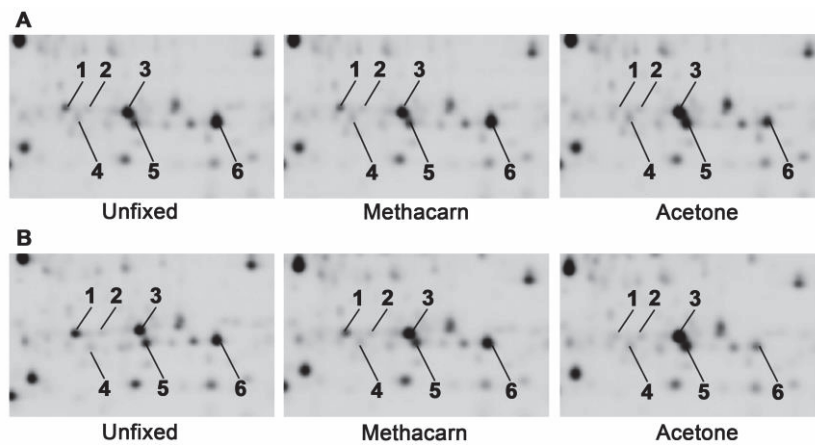
**Table 1-3**

**Average ratio of standardized abundance of polypeptides in methacarn or acetone-fixed tissue to that of unfixed tissue from the cerebellar vermis**

Average ratio of standardized abundance		
Methacarn / Unfixed	Acetone / Unfixed	Protein
2.00 <sup>a</sup>	3.56*	Actin-related protein 3
-1.48*	-4.11*	Phosphoglycerate mutase 1
-1.29	-2.42*	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
1.10	-2.20*	Triosephosphate isomerase

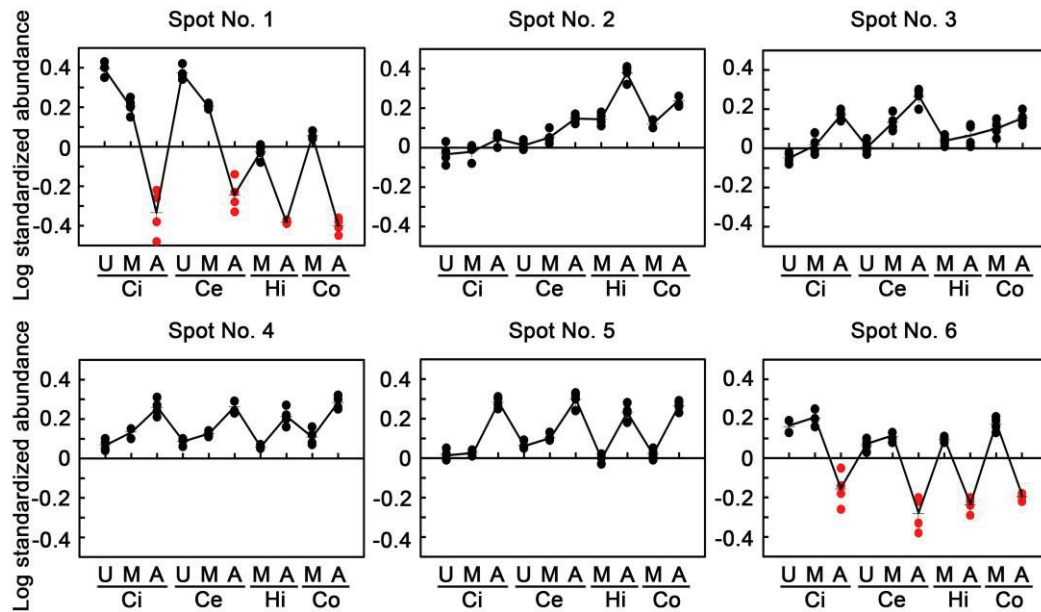
<sup>a</sup> Standardized abundance of each polypeptide was estimated by measuring the ratio of spot volume in each of unfixed frozen, or methacarn- or acetone-fixed samples to the spot volume of pooled samples of all unfixed and fixed tissues. Average log ratio of standardized abundance in fixed samples per unfixed sample was then calculated. Number of animals examined is 4 in each tissue preparation.

\* Significantly different between methacarn or acetone-fixed tissue samples and unfixed tissue samples ( $P < 0.01$ ).



**Fig. 1-5**

2D-gel image of polypeptides extracted from unfixed tissues and methacarn-fixed or acetone-fixed tissues at PND 63. Representative spots of phosphoglycerate mutase 1 (spot No. 1-3) and triosephosphate isomerase (spot No. 4-6), each consisting of three spots. Reductions of spot volume of one of three spots (spot No. 1 of phosphoglycerate mutase 1 and spot No.6 of triosephosphate isomerase) are evident in acetone-fixed tissue as compared to that in unfixed tissue. A. Cingulate cortex. B. Cerebellar vermis.



**Fig. 1-6**

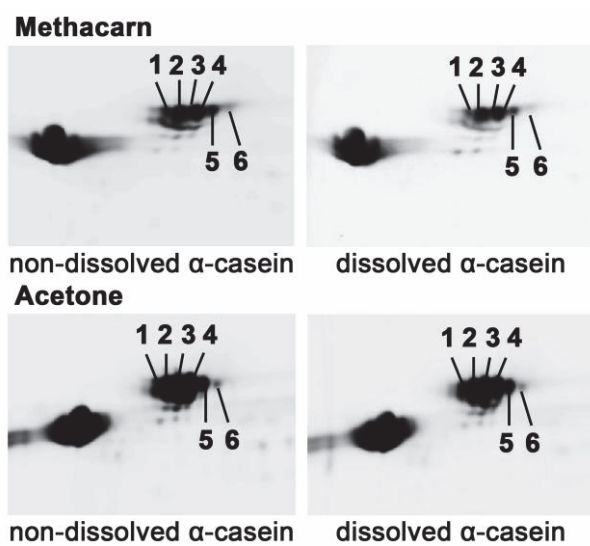
Log standardized abundance of each six spots of phosphoglycerate mutase 1 (spot No. 1-3) and triosephosphate isomerase (spot No. 4-6) shown in Fig. 5. Number of animals is 4 for each tissue preparation. In acetone-fixed tissue, log standardized abundance of spot 1 of phosphoglycerate mutase 1 and spot 6 of triosephosphate isomerase are decreased as compared to that in unfixed tissue. In methacarn-fixed tissue, three spot volumes of each protein are equivalent to unfixed tissue. Abbreviations: U, unfixed tissue; M, methacarn-fixed tissue; A, acetone-fixed tissue; Ci, cingulate cortex; Ce, cerebellar vermis; Hi, hippocampal dentate gyrus; Co, corpus callosum.

**Table 1-4****Solubility of  $\alpha$ -casein to fixatives or solvents consisting of methacarn solution**

Solvent	Solubility of $\alpha$ -casein (%)
Methacarn	0.2 <sup>a</sup>
Acetone	8.7
Methanol:chloroform (6:3)	10.1
Methanol	5.2
Chloroform	9.5

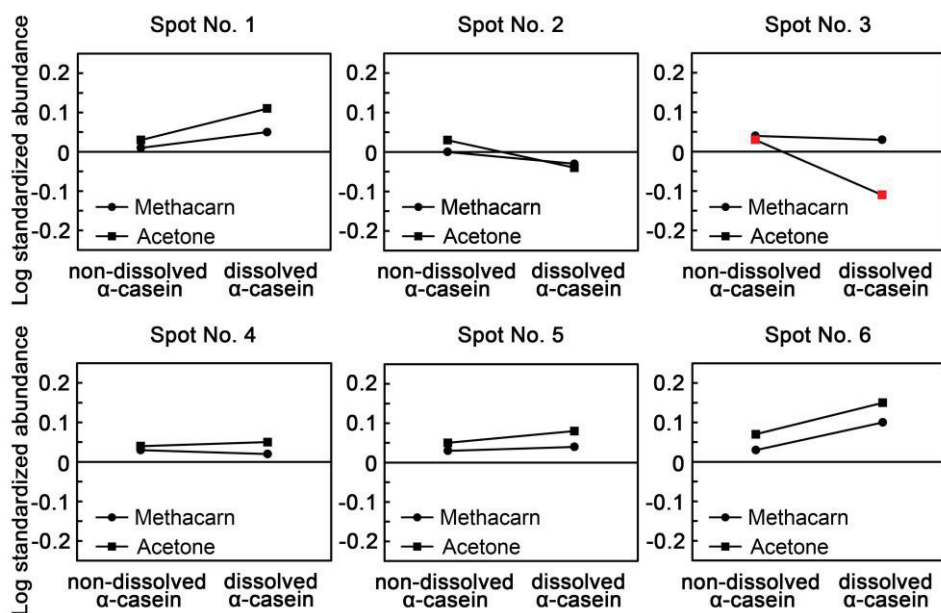
<sup>a</sup>Number of examination is one.





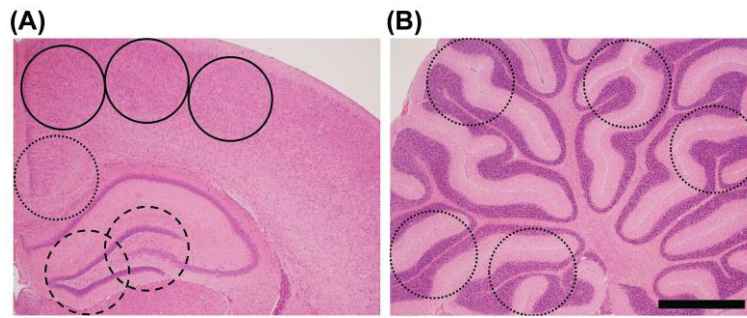
**Fig. 1-7**

2D-gel image of dissolved and non-dissolved  $\alpha$ -casein to methacarn solution or acetone.



**Fig. 1-8**

Log standardized abundance of each six spots of  $\alpha$ -casein shown in Fig. 7. Number of sample pair is one. By extraction with acetone, log standardized abundance of the spot 3 of dissolved  $\alpha$ -casein is decreased as compared to that of non-dissolved  $\alpha$ -casein. By extraction with methacarn solution, there were no spots showing variability in the solubility.



**Fig. 2-1**

Overview of the dissected brain areas of rat offspring stained with hematoxylin and eosin.

Sampling was made using punch-biopsy devices bilaterally. (A) The cerebrum. Dashed line circles: the hippocampal dentate gyrus; Dotted line circles: the corpus callosum; Continuous line circles: the cingulate cortex. (B) The cerebellum. Dotted line circles: the cerebellar vermis.

Magnification  $\times 20$ ; bar 1 mm.

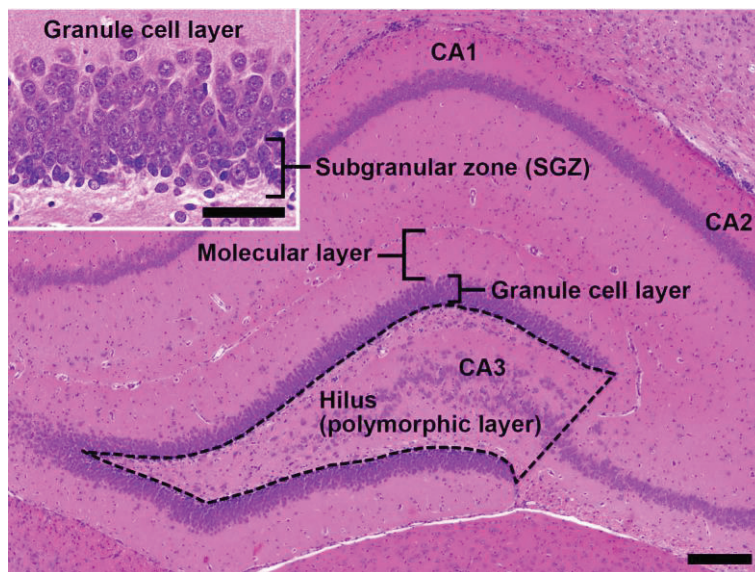
**Table 2-1**  
**Primer sequences for real-time RT-PCR analysis**

Genes	Accession No.	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>Bax</i>	NM_017059	TGGAGCTGCAGAGGATGATTG	AGCTGCCACCCGGAAGA
<i>Bcl2</i>	NM_016993	GGCATCTGCACACCTGGAT	GAGACAGCCAGGAGAAATCAAAC
<i>Casp12</i>	NM_130422	TCCTCCGACAGCACATTCTT	CACCCACAGATTCTTCCA
<i>Casp3</i>	NM_012922	GCTGTCAGTCAGAGCGTAAGGA	CTCAAACCATCTTCTCTCCAATCA
<i>Casp8</i>	NM_022277	GCCAGGAGAGCAAGAGAGTGA	AGACAGTACCCCCGAGGTTTG
<i>Casp9</i>	NM_031632	CATGGTGGAGGTGAAGAACGA	TGCGCCATCTCCATCAAAG
<i>Cav3</i>	NM_019155	GTGAAGGTGGATTTGAAGATGTG	CGCCATCGAAGCTGTAAGTG
<i>Cd44</i>	NM_012924	ACAACCCCCAGACCACTCTTT	TAAGTACCAACTGGCTTGCGAAA
<i>Cdkn1c</i>	NM_001033757	AGAGGAATGGTTGTTGAGTAAAAGC	TGGAGGACACTGTCAGCTAACTG
<i>Cldn1</i>	NM_031699	CGTGACTGCTCAGGCCATCT	CGGTGCTTTGCGAAACG
<i>Efnb3</i>	NM_001100980	GCTCAGCCTCCTTCAATCACTAC	ACCGTTCCACCCCTACTCT
<i>ErbB3</i>	NM_017218	TTGACCCCTGGCATAAGATACC	TGATCTCCCGGACTGTTCTGA
<i>Fadd</i>	NM_152937	ATCTGTGAGCAAGAGTGATGATAC	CGGGCTTGTCAGGGTGTTT
<i>Gapdh</i>	NM_017008	GGCCGAGGGCCCACTA	TGTTGAAGTCACAGGAGACAACCT
<i>Hprt</i>	NM_012583	GCCGACCGTTCTGTTCAT	TCATAACCTGGTTCATCATCTAATC
<i>Lmx1a</i>	NM_001105967	GAGGACGGCAAGGACCATAA	TTGAATGCTCTCCTCTGTGAGT
<i>Mag</i>	NM_017190	CCCCTGCCGTTTCGACTT	GTTGAAATACCAGACGCCATGTAC
<i>Mal</i>	NM_012798	GTGGCTACTCTGCTCTACGTGATC	CCCAATCTGCTGTCTATGAAGA
<i>Mcm3</i>	XM_001070728	AGATACCCGGATTTATGAGAAGCA	CGCTCACCATCTTCTCCCTTT
<i>Mdk</i>	NM_030859	GACCCAGCGCATCCATTG	TCGGCTCCAACTCCTTCTTC
<i>Mmp2</i>	NM_031054	CGGTTTATTTGGCGGACAGT	AGAATGTGGCCACCAGCAA
<i>Ncam2</i>	AY495696	TGGAGGTGTGCCATTTCAT	GCGTACTATCTTCCAGGTTTCTGAT
<i>Nfasc</i>	NM_001160315	AGAGCGTCATTTGCCATATGTCT	TTGATGTTACCCAAATGCTTATC
<i>Nr4a2</i>	NM_019328	TGCCTTCTCCTGCATTGCT	GTTCTTGAGCCCGTGTCTCT
<i>Otx2</i>	NM_001100566	CTTGACGTCTTGGAAGCTCTGTT	GCTACCTCCTCCCGCATGA
<i>Pcna</i>	NM_022381	CTCACGTCTCCTTAGTGCAG CTT	CGATCGCAGCGGTATGTGT
<i>Tnfrsf10b</i>	NM_001108873	CAAATGGCTCTCACCACAACAC	CCAGCAACTTCCTTCCTAATGG
<i>Tnfsf10</i>	NM_145681	CGGAGAGGGCATTCAATTTCTC	ATACAGGCCCTCCTCCTGGAT
<i>TopIIa</i>	NM_022183	GAAACAGGCTGCCAGTCAAAG	AGAGCGTTCCTCAGTTTCATCA
<i>Tspan2</i>	NM_022589	GGACCTCGCTGGCACTGT	ATGGAAAAACAATGAGGAAAGTATGTAAAC

Abbreviations: *Bax*, Bcl2-associated X protein; *Bcl2*, B-cell CLL/lymphoma 2; *Casp3*, caspase 3; *Casp8*, caspase 8; *Casp9*, caspase 9; *Casp12*, caspase 12; *Cav3*, caveolin 3; *Cd44*, Cd44 molecule; *Cdkn1c*, cyclin-dependent kinase inhibitor 1C; *Cldn1*, claudin 1; *Efnb3*, ephrin B3; *ErbB3*, v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian); *Fadd*, Fas (TNFRSF6)-associated via death domain; *Gapdh*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *Hprt*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Lmx1a*, LIM homeobox transcription factor 1 alpha; *Mag*, myelin-associated glycoprotein; *Mal*, mal, T-cell differentiation protein; *Mcm3*, minichromosome maintenance complex component 3; *Mdk*, midkine; *Mmp2*, matrix metalloproteinase 2; *Ncam2*, neural cell adhesion molecule 2; *Nfasc*, neurofascin; *Nr4a2*, nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2; *Otx2*, orthodenticle homeobox 2; *Pcna*, proliferating cell nuclear antigen; *Tnfrsf10b*, tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b; *Tnfsf10*, tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10; *TopIIa*, topoisomerase (DNA) II alpha; *Tspan2*, tetraspanin 2.

**Table 2-2**  
**Antibodies for immunohistochemistry**

Antigen	Abbreviated name	Host species	Dilution	Manufacturer (City, State, Country)
reelin	-	mouse	1:1,000	Novus Biological, Inc. (Littleton, CO, USA)
calbindin-D-28K	Calb1	mouse	1:500	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
calretinin	Calb2	mouse	1:100	LifeSpan Biosciences Inc. (Seattle, WA, USA)
parvalbumin	Pvalb	mouse	1:1,000	Millipore Corporation (Billerica, MA, USA)
neuron-specific nuclear protein	NeuN	mouse	1:100	Millipore Corporation
proliferating cell nuclear antigen	PCNA	mouse	1:200	Dako (Glostrup, Denmark)
cleaved caspase-3	-	rabbit	1:300	Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, MA, USA)
dihydropyrimidinase-like 3	TUC-4	rabbit	1:1,000	Millipore Corporation
doublecortin	DCX	rabbit	1:1,000	Abcam Inc. (Cambridge, UK)
T box brain 2	Tbr2	rabbit	1:500	Abcam Inc.
paired box 6	Pax6	mouse	1:500	Abcam Inc.
glial fibrillary acidic protein	GFAP	mouse	1:200	Millipore Corporation
neurofilament-L	NF-L	mouse	1:100	Dako
beta III tubulin	-	mouse	1:300	Abcam Inc.
phosphorylated neurofilament-H	p-NF-H	mouse	1:100	Abcam Inc.



**Fig. 2-2**

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 NeuN, reelin, Calb1, Calb2, and Pvalb 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  $\times 40$ ; bar 200  $\mu\text{m}$ . (Inset) Higher magnification of the granular cell layer and SGZ. Distribution of immunoreactive cells for TUC-4, DCX, Tbr2, Pax6 and GFAP as well as apoptotic cells and proliferating cells was measured in the SGZ. Magnification  $\times 400$ ; bar 50  $\mu\text{m}$ .

**Table 2-3**  
**Reproductive parameters**

	Glycidol in the drinking water (ppm)			
	0 (Control)	100	300	1,000
No. of dam measured	11	11	11	11
No. of implantation sites	15.09±1.12	13.18±2.99	13.27±3.55	14.82±1.60
No. of live offspring	14.36±1.29	12.27±2.76	12.73±3.17	13.64±2.20
Male ratio (%)	50.44±16.3	49.49±18.43	46.57±14.14	57.00±11.21

Data are expressed as mean ± SD.

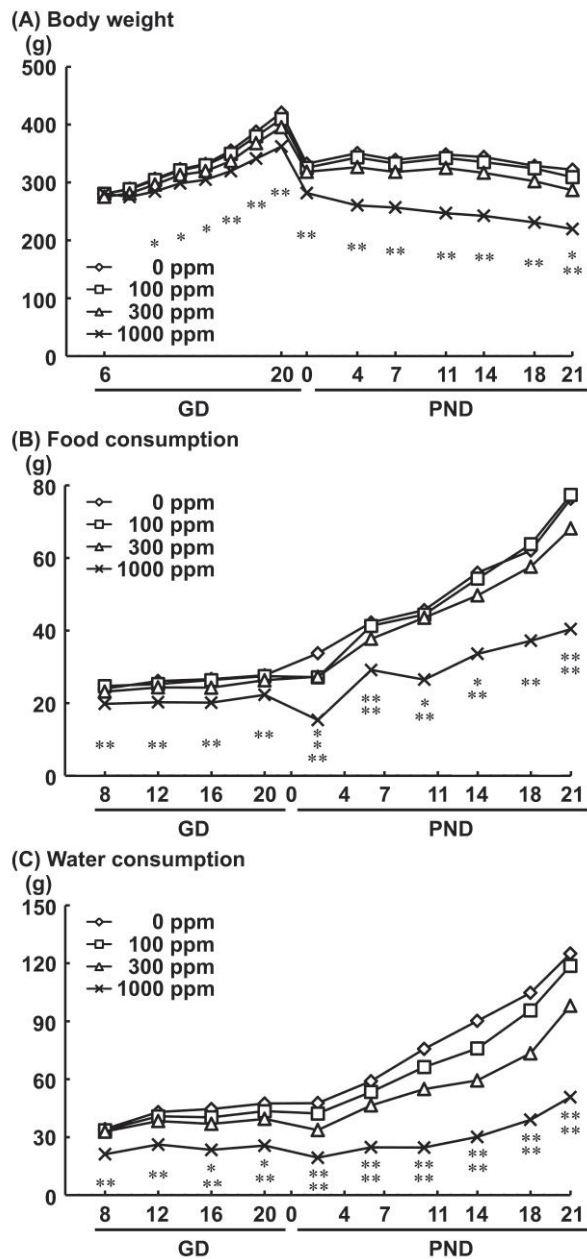
**Table 2-4**  
**Gait scores of dams exposed to glycidol**

	Glycidol in the drinking water (ppm)			
	0 (Control)	100	300	1,000
GD 8	11/0/0/0 <sup>a</sup>	11/0/0/0	11/0/0/0	11/0/0/0
GD 15	11/0/0/0	11/0/0/0	11/0/0/0	11/0/0/0
PND 1	11/0/0/0	11/0/0/0	11/0/0/0	11/0/0/0
PND 4	11/0/0/0	11/0/0/0	11/0/0/0	11/0/0/0
PND 7	11/0/0/0	11/0/0/0	11/0/0/0	11/0/0/0
PND 11	11/0/0/0	11/0/0/0	11/0/0/0	9/2/0/0
PND 14	11/0/0/0	11/0/0/0	11/0/0/0	0/6/5/0**
PND 18	11/0/0/0	11/0/0/0	11/0/0/0	0/5/3/3**
PND 21	11/0/0/0	11/0/0/0	11/0/0/0	0/2/4/5**

GD, gestational day; PND, postnatal day.

\*\* $P < 0.01$  significantly different from the 0 ppm controls.

<sup>a</sup> Number of animals with each grade (grade 0/grade 1/grade 2/grade 3). The degree of abnormalities: grade 0, normal gait; grade 1, slightly abnormal gait with slight degrees of shuffling; grade 2, moderately abnormal gait with moderate degrees of shuffling; grade 3, severely affected gait including inability to support the body weight and spreading of all limbs.



**Fig. 2-3**

Body weights and food and water consumption of dams during the exposure period. (A) Body weight. (B) Food consumption. (C) Water consumption. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , compared with the 0 ppm controls by Dunnett's test or Steel's test.



**Table 2-5****Brain weights of dams exposed to glycidol during gestation and lactation**

	Glycidol in the drinking water (ppm)			
	0 (Control)	100	300	1,000
No. of dam examined	11	11	11	11
Brain weight (g)	1.95±0.06	1.95±0.09	1.89±0.07	1.81±0.06**
(g/100g BW)	0.61±0.03	0.63±0.05	0.65±0.05	0.83±0.08**

Data are expressed as mean ± SD.

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

**Table 2-6****Body weights of offspring exposed to glycidol during gestation and lactation**

	Glycidol in the drinking water (ppm)			
	0 (Control)	100	300	1,000
<b>Males</b>				
No. of offspring examined	66	61	61	65
PND 0	6.54±0.22	6.87±0.52	6.76±0.40	6.24±0.42
PND 4	11.29±0.46	12.02±0.75	11.58±0.96	9.65±0.91**
PND 7	19.68±0.96	20.57±1.22	19.18±0.50	15.24±1.31**
PND 11	31.70±1.84	31.57±2.40	29.22±0.97**	21.01±1.88**
PND 14	39.97±1.42	40.38±3.13	37.49±1.24**	24.98±2.48**
PND 18	50.57±1.72	51.30±4.29	47.69±1.65**	31.02±3.27**
PND 21	64.41±2.49	65.44±4.50	59.85±2.46*	37.47±4.01**
No. of offspring examined	33	30	30	32
PND 28	109.0±4.1	110.9±6.5	102.8±4.1*	77.7±6.0**
PND 35	176.2±6.4	175.4±10.8	166.1±7.0*	134.0±9.2**
PND 42	240.5±14.3	239.8±15.5	230.3±7.8	191.9±11.4**
PND 49	303.7±13.0	304.1±22.6	294.5±8.9	249.6±12.4**
PND 56	360.8±15.7	357.8±23.2	353.1±9.9	304.9±12.9**
PND 63	407.3±18.6	403.1±26.2	397.7±12.6	346.5±14.1**
PND 70	445.8±21.9	442.1±30.0	436.0±15.5	380.5±17.1**
PND 77	462.1±46.2	453.7±33.6	455.2±19.3	401.2±17.7**
<b>Females</b>				
No. of offspring examined	22	22	22	22
PND 0	6.31±0.29	6.67±0.47	6.44±0.49	6.11±0.40
PND 4	10.97±0.61	11.77±0.85	11.03±1.14	9.19±0.97**
PND 7	18.47±1.04	19.79±1.12	18.49±1.12	14.90±1.49**
PND 11	29.56±1.45	30.12±2.02	28.55±1.74	20.69±2.08**
PND 14	38.34±1.54	38.78±1.93	36.53±1.79	24.55±1.97**
PND 18	48.47±1.98	50.36±3.65	46.90±2.38	30.49±2.91**
PND 21	61.62±2.64	62.65±3.98	58.07±3.39	36.96±3.49**
No. of offspring examined	11	11	11	11
PND 28	98.8±5.9	100.9±7.5	93.4±5.7	72.3±4.8**
PND 35	144.5±9.4	147.9±12.1	138.5±7.6	117.4±5.1**
PND 42	179.1±10.6	185.2±16.4	174.3±8.5	151.8±8.7**
PND 49	208.7±12.0	215.7±18.6	202.1±10.5	183.5±10.0**
PND 56	235.1±12.8	244.3±21.1	230.6±14.2	209.9±11.8**
PND 63	256.3±13.3	267.0±24.3	251.2±14.7	229.9±17.0**
PND 70	273.6±13.9	285.1±26.3	273.1±14.8	248.2±19.2**
PND 77	292.0±16.1	301.8±25.3	288.6±17.1	263.8±21.9*

Data are expressed as mean ± SD.

PND, postnatal day.

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

**Table 2-7****Food consumption in offspring exposed to glycidol during gestation and lactation**

	Glycidol in the drinking water (ppm)			
	0 (Control)	100	300	1,000
<b>Males</b>				
No. of offspring examined	33	30	30	32
PND 28	9.89±0.70	10.36±0.51	9.78±0.47	8.44±0.52**
PND 35	18.28±0.86	17.88±0.59	17.23±0.76*	15.34±0.62**
PND 42	22.54±0.79	22.79±1.08	21.75±0.39*	18.79±3.00**
PND 49	25.63±1.21	25.12±1.33	24.24±0.63*	22.13±0.66**
PND 56	24.13±1.06	23.26±2.71	23.44±1.24	22.55±0.72*
PND 63	24.97±1.01	24.81±1.71	22.38±3.95	22.48±1.04**
PND 70	25.12±0.93	25.32±1.63	24.91±1.52	23.15±0.65**
PND 77	20.05±1.05	15.39±5.75	18.78±1.40	17.91±0.59**
<b>Females</b>				
No. of offspring examined	11	11	11	11
PND 28	8.39±0.54	8.74±0.32	8.40±0.75	7.79±0.19
PND 35	14.47±0.50	14.23±1.07	13.80±0.57	13.06±0.16
PND 42	16.68±0.50	16.72±0.74	16.17±0.89	15.22±1.36
PND 49	15.73±4.88	17.47±1.23	16.43±1.06	16.90±0.64
PND 56	16.80±1.23	16.86±0.52	18.30±3.43	16.22±0.97
PND 63	17.34±0.87	18.35±0.86	18.75±3.77	16.05±1.82
PND 70	17.80±0.64	18.10±1.38	17.31±1.02	17.56±2.11
PND 77	15.59±4.19	11.09±3.67	15.46±2.85	14.75±1.82

Data are expressed as mean ± SD.

PND, postnatal day.

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

**Table 2-8**  
**Brain weights of offspring exposed to glycidol during gestation and lactation**

	Glycidol in the drinking water (ppm)			
	0 (Control)	100	300	1,000
PND 21				
Males				
No. of offspring examined <sup>a</sup>	33	31	31	33
Body weight (g)	64.38 ± 2.97	64.92 ± 4.11	59.78 ± 3.18*	37.02 ± 4.05**
Brain weight (g)	1.53 ± 0.04	1.54 ± 0.03	1.50 ± 0.05	1.38 ± 0.04**
(g/100g BW)	2.36 ± 0.13	2.39 ± 0.15	2.52 ± 0.19*	3.76 ± 0.36**
Females				
No. of offspring examined	11	11	11	11
Body weight (g)	61.21 ± 2.72	61.45 ± 3.93	57.82 ± 4.76	36.96 ± 3.74**
Brain weight (g)	1.49 ± 0.08	1.50 ± 0.03	1.42 ± 0.03*	1.36 ± 0.04**
(g/100g BW)	2.43 ± 0.10	2.45 ± 0.18	2.48 ± 0.23	3.70 ± 0.36**
PND 77				
Males				
No. of offspring examined	33	30	30	32
Body weight (g)	462.1 ± 46.2	453.7 ± 33.6	455.2 ± 19.3	401.2 ± 17.7**
Brain weight (g)	2.03 ± 0.04	2.12 ± 0.09	2.03 ± 0.04	1.93 ± 0.07**
(g/100g BW)	0.44 ± 0.02	0.47 ± 0.04	0.45 ± 0.02	0.48 ± 0.03**
Females				
No. of offspring examined	11	11	11	11
Body weight (g)	292.0 ± 16.1	301.8 ± 25.3	288.6 ± 17.1	263.8 ± 21.9*
Brain weight (g)	1.90 ± 0.07	1.94 ± 0.05	1.88 ± 0.07	1.82 ± 0.08*
(g/100g BW)	0.66 ± 0.03	0.65 ± 0.05	0.65 ± 0.03	0.70 ± 0.05

Data are expressed as mean ± SD.

PND, postnatal day.

<sup>a</sup> One offspring of each sex per dam ( $n = 11$  per group) were subjected to measurement at each time point.

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

**Table 2-9**  
**Serum concentrations of thyroid-related hormones**

	Glycidol in the drinking water (ppm)			
	0 (Control)	100	300	1,000
Dam				
No. of dam measured	11	11	11	11
T <sub>3</sub> (ng/ml)	0.60±0.37	1.19±0.83	2.08±0.77**	1.27±1.08
T <sub>4</sub> (ng/ml)	12.25±3.43	13.26±3.67	16.29±3.88*	8.74±3.94
TSH (ng/ml)	1.87±0.60	2.49±1.53	4.72±2.48*	4.59±3.03*
Offspring (PND 21)				
No. of offspring measured	11	11	11	11
T <sub>3</sub> (ng/ml)	0.67±0.29	0.86±0.41	1.01±0.34	1.34±0.36**
T <sub>4</sub> (ng/ml)	10.11±2.19	8.59±2.74	7.98±3.72	9.89±4.58
TSH (ng/ml)	1.62±0.83	1.18±0.46	2.27±1.61	1.50±0.59

Data are expressed as mean ± SD.

PND, postnatal day; T<sub>3</sub>, triiodothyronine; T<sub>4</sub>, thyroxine; TSH, thyroid-stimulating hormone.

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

**Table 2-10**

**List of upregulated genes in the hippocampal dentate gyrus of rat offspring after maternal exposure to glycidol as determined by microarray analysis ( $\geq 1.5$ -fold)**

Accession No.	Gene title	Symbol	Glycidol (ppm)	
			300	1,000
Nervous system development				
NM_001107961	diencephalon/mesencephalon homeobox 1	Dmbx1	2.83	4.30**
NM_001100527	frizzled-related protein	Frzb	1.65	2.19*
NM_001130536	frizzled family receptor 6	Fzd6	1.34	1.66*
Neuron differentiation				
NM_001170482	atonal homolog 7 (Drosophila)	Atoh7	1.34**	1.76**
Axonogenesis, neuritogenesis, neuron projection				
NM_019329	contactin 3 (plasmacytoma associated)	Cntn3	1.27	1.71*
Synaptic transmission				
NM_032065	solute carrier family 1 (high affinity aspartate/glutamate transporter), member 6	Slc1a6	1.38	1.58*
Cell proliferation				
NM_023962	platelet-derived growth factor, D polypeptide	Pdgfd	1.31	1.73*
NM_012774	glypican 3	Gpc3	1.67	1.70*
NM_031577	growth hormone releasing hormone	Ghrh	1.14	1.55*
Apoptosis				
NM_138826	metallothionein 1a	Mt1a	1.22	1.50*

Values are fold change with the expression level in the 0 ppm controls set as 1.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the 0 ppm controls.

**Table 2-11****List of downregulated genes in the hippocampal dentate gyrus of rat offspring after maternal exposure to glycidol as determined by microarray analysis ( $\leq 0.67$ -fold)**

Accession No.	Gene title	Symbol	Glycidol (ppm)	
			300	1,000
Nervous system development				
NM_001106209	T, brachyury homolog (mouse)	T	0.18*	0.16**
NM_001161835	brachyury 2	T2	0.60**	0.38**
NM_053666	delta-like 3 (Drosophila)	Dll3	0.64*	0.62*
Neuron differentiation				
BC168962	epithelial cell transforming sequence 2 oncogene	Ect2	0.76	0.61**
NM_021775	sphingosine-1-phosphate receptor 5	S1pr5	0.65**	0.67**
Axonogenesis				
NM_017218	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)	ErbB3	0.67	0.64*
AY495696	neural cell adhesion molecule 2	Ncam2	0.74	0.66*
NM_017190	myelin-associated glycoprotein	Mag	0.68	0.67*
NM_001160315	Neurofascin	Nfasc	0.64*	0.64*
Myelination				
BC078859	myelin protein zero	Mpz	0.62	0.51*
NM_022589	tetraspanin 2	Tspan2	0.70**	0.60*
NM_012798	mal, T-cell differentiation protein	Mal	0.65*	0.61*
NM_001017386	oligodendrocytic myelin paranodal and inner loop protein	Opalin	0.51	0.61*
NM_001170487	myelin gene regulatory factor	Mrf	0.65*	0.62*
NM_019175	kallikrein related-peptidase 6	Klk6	0.55*	0.65*
NM_019276	UDP glycosyltransferase 8	Ugt8	0.62**	0.67*
Synaptic transmission				
NM_001169138	thrombospondin 2	Thbs2	0.65	0.52*
NM_019274	collagen-like tail subunit (single strand of homotrimer) of asymmetric acetylcholinesterase	Colq	0.66	0.56*
NM_024369	follistatin-like 1	Fstl1	0.77**	0.67**
Cell proliferation				
NM_053749	aurora kinase B	Aurkb	0.35**	0.25**
NM_013069	Cd74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain	Cd74	0.51*	0.36**
NM_001107529	protein regulator of cytokinesis 1	Prc1	0.60*	0.50*
NM_001004264	TRAF4 associated factor 1	Traf4af1	0.64*	0.54*
NM_022183	topoisomerase (DNA) II alpha	Top2a	0.65*	0.54*
NM_001107366	minichromosome maintenance complex component 10	Mcm10	0.81	0.56*
NM_001033757	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C	Cdkn1c	0.84	0.58*
NM_001079937	PDZ binding kinase	Pbk	0.81	0.58**
NM_001014033	sepin 10	Sept10	0.63**	0.59*
NM_001070657	Centromere protein W	Cenpw	0.74	0.59*
NM_001169112	kinesin family member 11	Kif11	0.73	0.59*
NM_001108662	maternal embryonic leucine zipper kinase	Melk	0.71	0.59*
NM_019296	cyclin-dependent kinase 1	Cdk1	0.76	0.60*
NM_001107669	polo-like kinase 4	Plk4	0.62	0.60*

NM_201418	NS5A (hepatitis C virus) transactivated protein 9	Ns5atp9	0.81	0.61**
XM_342494	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog, beta (S. cerevisiae)	Bub1b	0.77	0.61**
NM_001039019	kinesin family member 18B	Kif18b	0.69	0.62*
NM_017187	high mobility group box 2	Hmgb2	0.76	0.63**
NM_001169139	cytoskeleton associated protein 2	Ckap2	0.77**	0.63*
XM_217737	centrosomal protein 72	Cep72	0.72	0.63*
NM_001107796	family with sequence similarity 83, member D	Fam83d	0.81	0.64*
NM_001126270	NDC80 homolog, kinetochore complex component (S. cerevisiae)	Ndc80	0.67**	0.64**
NM_001025740	ribonucleotide reductase M2	Rrm2	0.70**	0.64**
NM_001085369	kinesin family member 2C	Kif2c	0.72	0.64**
NM_001007648	cell division cycle associated 3	Cdca3	0.78	0.65*
NM_013153	hyaluronan synthase 2	Has2	0.82	0.65*
NM_001106536	myeloblastosis oncogene-like 2	Mybl2	0.67*	0.65**
NM_001100827	centromere protein F	Cenpf	0.77	0.66*
Apoptosis				
NM_203410	interferon, alpha-inducible protein 27	Ifi27	0.66	0.30*
NM_001011987	GLI pathogenesis-related 1	Glpr1	0.54*	0.58*

Values are fold change with the expression level in the 0 ppm controls set as 1.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the 0 ppm controls.



**Table 2-12**

**List of upregulated genes in the corpus callosum of rat offspring after maternal exposure to glycidol as determined by microarray analysis ( $\geq 1.5$ -fold)**

Accession No.	Gene title	Symbol	Glycidol (ppm)	
			300	1,000
Nervous system development				
NM_031059	msh homeobox 1	Msx1	1.75	2.09*
NM_030859	Midkine	Mdk	1.81	1.81*
Axonogenesis, neuritogenesis, neuron projection				
NM_012544	angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1	Ace	3.97	4.99**
NM_023970	transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 4	Trpv4	3.46	3.71**
NM_019329	contactin 3 (plasmacytoma associated)	Cntn3	1.53*	1.87**
NM_031054	matrix metalloproteinase 2	Mmp2	1.63	1.85*
Myelination				
NM_031336	Klotho	Kl	54.19	65.65**
NM_017174	phospholipase A2, group V	Pla2g5	5.11	7.50*
NM_013122	insulin-like growth factor binding protein 2	Igfbp2	1.78	1.77*
NM_031511	insulin-like growth factor 2	Igf2	1.53	1.50*
Synaptic transmission				
NM_032073	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1	Kcnq1	1.57	1.78*
NM_022938	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 7	Htr7	0.82	1.62*
Cell proliferation				
NM_019155	caveolin 3	Cav3	1.99	2.27*
NM_138541	epithelial cell adhesion molecule	Epcam	1.31	1.61*
Apoptosis				
XM_001054396	desmoglein 2	Dsg2	1.55	1.65*
NM_138826	metallothionein 1a	Mt1a	1.26	1.58*

Values are fold change with the expression level in the 0 ppm controls set as 1.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the 0 ppm controls.

**Table 2-13**

**List of downregulated genes in the corpus callosum of rat offspring after maternal exposure to glycidol as determined by microarray analysis ( $\leq 0.67$ -fold)**

Glycidol as determined by microarray analysis ( $\pm$ 0.05 fold)				
Accession No.	Gene title	Symbol	Glycidol (ppm)	
			300	1,000
Nervous system development				
BC161802	angiotensin II receptor, type 2	Agtr2	0.74	0.21**
Apoptosis				
NM_203410	interferon, alpha-inducible protein 27	Ifi27	0.67	0.29*
NM_145765	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15	Tnfsf15	0.94	0.51*

Values are fold change with the expression level in the 0 ppm controls set as 1.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the 0 ppm controls.

**Table 2-14**

**List of upregulated genes in the cingulate cortex of rat offspring after maternal exposure to glycidol as determined by microarray analysis ( $\geq 1.5$ -fold)**

Accession No.	Gene title	Symbol	Glycidol (ppm)	
			300	1,000
Neuron differentiation				
NM_013058	inhibitor of DNA binding 3	Id3	1.38**	1.54*
NM_019328	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	Nr4a2	1.12	1.51*
Axonogenesis, neuritogenesis, neuron projection				
NM_053861	tenascin C	Tnc	1.92*	2.35*
NM_012924	Cd44 molecule	Cd44	1.12	1.58*
EF094477	glial fibrillary acidic protein	Gfap	1.22	1.56**
NM_019329	contactin 3 (plasmacytoma associated)	Cntn3	1.42	1.55*
NM_001100980	ephrin B3	Efnb3	1.31	1.54*
Synaptic transmission				
NM_001108967	neurotensin receptor 1	Ntsr1	1.33	1.96*
Cell proliferation				
XM_001058257	baculoviral IAP repeat-containing 7	Birc7	1.38	1.70*
NM_001107669	polo-like kinase 4	Plk4	1.12	1.61*
NM_012907	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 1	Apobec1	1.13	1.50*
Apoptosis				
NM_138826	metallothionein 1a	Mt1a	1.40	1.74*
NM_057130	harakiri, BCL2 interacting protein (contains only BH3 domain)	Hrk	1.22	1.59*

Values are fold change with the expression level in the 0 ppm controls set as 1.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the 0 ppm controls.

**Table 2-15**

**List of downregulated genes in the cingulate cortex of rat offspring after maternal exposure to glycidol as determined by microarray analysis ( $\leq 0.67$ -fold)**

Accession No.	Gene title	Symbol	Glycidol (ppm)	
			300	1,000
Neuron differentiation				
NM_017091	homeo box D3	Hoxd3	0.61	0.59*
Myelination				
NM_031699	claudin 1	Cldn1	0.94	0.66**
Cell proliferation				
NM_001107535	tyrosinase	Tyr	0.75	0.58**
NM_001106928	fer (fms/fps related) protein kinase, testis specific 2	Fert2	0.79	0.64*
Apoptosis				
AF107048	dynamnin 1-like	Dnm11	0.79	0.65*

Values are fold change with the expression level in the 0 ppm controls set as 1.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the 0 ppm controls.

**Table 2-16**

**List of upregulated genes in the cerebellar vermis of rat offspring after maternal exposure to glycidol as determined by microarray analysis ( $\geq 1.5$ -fold)**

Glycidol as determined by mercuric analysis (– 10 fold)				
Accession No.	Gene title	Symbol	Glycidol (ppm)	
			300	1,000
Axonogenesis, neuritogenesis, neuron projection				
NM_019329	contactin 3 (plasmacytoma associated)	Cntn3	1.39	1.86**
Apoptosis				
NM_001025685	Cd5 molecule-like	Cd5l	2.65	1.57*
NM_138826	metallothionein 1a	Mt1a	1.24	1.57*

Values are fold change with the expression level in the 0 ppm controls set as 1.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the 0 ppm controls.

**Table 2-17**

**List of downregulated genes in the cerebellar vermis of rat offspring after maternal exposure to glycidol as determined by microarray analysis ( $\leq 0.67$ -fold)**

Accession No.	Gene title	Symbol	Glycidol (ppm)	
			300	1,000
Synaptic transmission				
NM_031530	chemokine (C-C motif) ligand 2	Ccl2	0.76	0.37**
NM_001169138	thrombospondin 2	Thbs2	0.67	0.57**
Cell proliferation				
NM_001106134	spindle and kinetochore associated complex subunit 1	Ska1	0.86	0.56**
NM_001107273	cell division cycle associated 2	Cdca2	0.78	0.58*
Apoptosis				
NM_001106526	angiopoietin 4	Angpt4	0.70	0.62*

Values are fold change with the expression level in the 0 ppm controls set as 1.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the 0 ppm controls.

**Table 2-18****Real-time RT-PCR analysis in offspring exposed to glycidol during gestation and lactation**

	0 ppm Glycidol (Control)		1,000 ppm Glycidol		Microarray data
	Relative transcript level normalized to		Relative transcript level normalized to		
	<i>Hprt</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt</i>	<i>Gapdh</i>	
No. of offspring examined	6	6	6	6	3
Hippocampal dentate gyrus					
<i>Cdkn1c</i>	1.03±0.26 <sup>a</sup>	1.03±0.28	0.58±0.12**	0.64±0.06*	0.58 <sup>b</sup>
<i>Dll3</i>	1.09±0.48	1.07±0.42	0.82±0.19	0.90±0.23	0.62
<i>ErbB3</i>	1.06±0.41	1.04±0.32	0.72±0.16	0.81±0.14	0.64
<i>Mag</i>	1.07±0.43	1.03±0.26	0.84±0.15	0.70±0.07*	0.67
<i>Mal</i>	1.06±0.37	1.03±0.28	0.69±0.12	0.75±0.12*	0.61
<i>Nfasc</i>	1.03±0.27	1.01±0.19	0.81±0.15	0.91±0.16	0.64
<i>Ncam2</i>	1.01±0.17	1.01±0.14	0.73±0.09**	0.82±0.06*	0.66
<i>Tspan2</i>	1.04±0.33	1.02±0.24	0.78±0.14	0.85±0.11	0.60
Corpus callosum					
<i>Cav3</i>	1.24±1.05	1.30±1.24	2.60±2.54	2.67±2.33	2.27
<i>Cldn1</i>	1.52±1.86	1.61±2.15	3.07±3.86	3.10±3.55	2.95
<i>Lmx1a</i>	3.48±6.24	3.78±7.12	10.12±14.69	10.14±13.65	25.88
<i>Mdk</i>	1.23±1.08	1.23±1.08	2.25±2.25	2.16±2.18	1.81
<i>Mmp2</i>	1.12±0.70	1.12±0.70	1.74±1.48	1.67±1.43	1.85
<i>Otx2</i>	4.34±7.99	4.31±7.97	13.99±21.47	13.34±20.88	22.12
Cingulate cortex					
<i>Cd44</i>	1.00±0.08	1.01±0.14	1.35±0.26*	1.53±0.32**	1.58
<i>Efnb3</i>	1.01±0.15	1.01±0.17	1.27±0.20*	1.44±0.20**	1.54
<i>Nr4a2</i>	1.02±0.22	1.02±0.23	1.21±0.21	1.37±0.19*	1.51

<sup>a</sup> Real-time RT-PCR data are expressed as the mean ± SD.<sup>b</sup> Microarray data are expressed as fold change with the expression level in the 0 ppm controls set as 1.\**P*<0.05, \*\**P*<0.01, significantly different from the 0 ppm controls.

Abbreviations: *Cav3*, caveolin 3; *Cd44*, Cd44 molecule; *Cdkn1c*, cyclin-dependent kinase inhibitor 1C; *Cldn1*, claudin 1; *Dll3*, delta-like 3 (Drosophila); *Efnb3*, ephrin B3; *ErbB3*, v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian); *Gapdh*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *Hprt*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Lmx1a*, LIM homeobox transcription factor 1 alpha; *Mag*, myelin-associated glycoprotein; *Mal*, mal, T-cell differentiation protein; *Mdk*, midkine; *Mmp2*, matrix metalloproteinase 2; *Ncam2*, neural cell adhesion molecule 2; *Nfasc*, neurofascin; *Nr4a2*, nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2; *Otx2*, orthodenticle homeobox 2; *Tspan2*, tetraspanin 2.

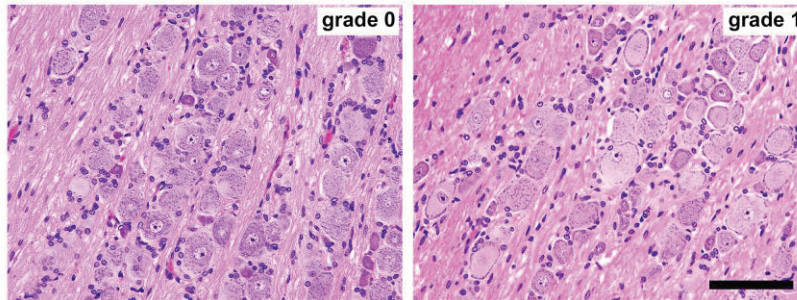
**Table 2-19****Real-time RT-PCR analysis of cell proliferation or apoptosis-related genes in the hippocampal dentate gyrus of offspring on PND 21**

	0 (Control) ppm Glycidol		1,000 ppm Glycidol	
	Relative transcript level normalized to		Relative transcript level normalized to	
	<i>Hprt</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt</i>	<i>Gapdh</i>
No. of offspring examined	6	6	6	6
Cell proliferation-related genes				
<i>Pcna</i>	1.01±0.18	1.01±0.14	0.91±0.11	1.03±0.10
<i>Mcm3</i>	1.04±0.31	1.02±0.21	0.88±0.14	0.88±0.10
<i>TopIIa</i>	1.08±0.48	1.05±0.37	0.71±0.04	0.72±0.05
Apoptosis-related genes				
<i>Bax</i>	1.01±0.13	1.00±0.09	0.97±0.15	1.09±0.12
<i>Bcl2</i>	1.01±0.18	1.01±0.13	0.84±0.08	0.94±0.04
<i>Tnfrsf10</i>	1.04±0.37	1.04±0.33	0.76±0.12	0.76±0.10
<i>Tnfrsf10b</i>	1.06±0.36	1.05±0.32	1.05±0.29	1.07±0.31
<i>Fadd</i>	1.00±0.11	1.00±0.07	0.99±0.11	0.99±0.05
<i>Casp3</i>	1.22±0.59	1.16±0.53	0.56±0.79	0.63±0.89
<i>Casp8</i>	1.02±0.22	1.02±0.22	0.83±0.22	0.84±0.08
<i>Casp9</i>	1.01±0.13	1.01±0.13	1.06±0.08	0.95±0.12
<i>Casp12</i>	1.01±0.19	1.02±0.23	0.79±0.19	0.78±0.19

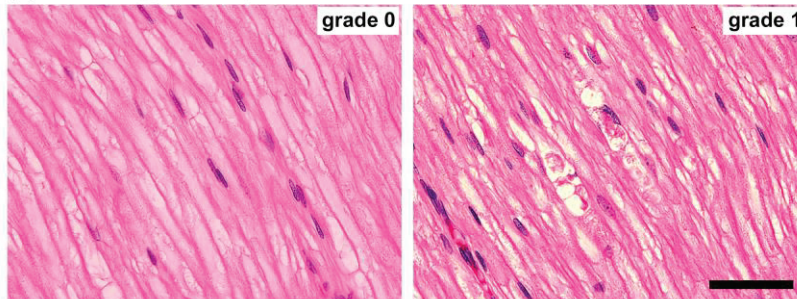
Data are expressed as mean ± SD.

Abbreviations: *Bax*, Bcl2-associated X protein; *Bcl2*, B-cell CLL/lymphoma 2; *Casp3*, caspase 3; *Casp8*, caspase 8; *Casp9*, caspase 9; *Casp12*, caspase 12; *Fadd*, Fas (TNFRSF6)-associated via death domain; *Gapdh*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *Hprt*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Mcm3*, minichromosome maintenance complex component 3; *Pcna*, proliferating cell nuclear antigen; *Tnfrsf10b*, tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b; *Tnfrsf10*, tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10; *TopIIa*, topoisomerase (DNA) II alpha.

**(A) Central chromatolysis, trigeminal nerve ganglion cells**



**(B) Axonal degeneration, sciatic nerve**



**Fig. 2-4**

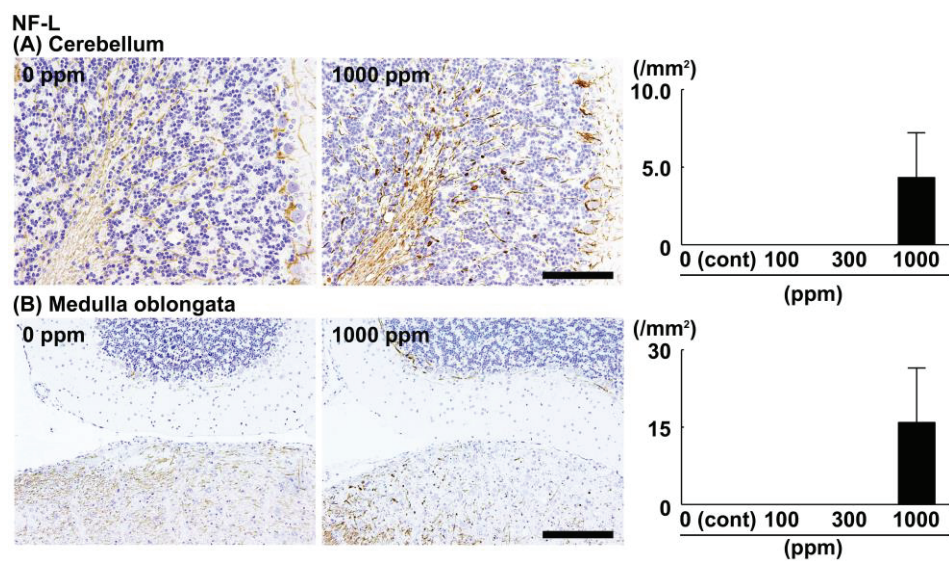
Histopathological changes of the peripheral nervous system and their grade of damage after exposure to glycidol. (A, B) Representative images from the 0 ppm controls (left) and the 1,000 ppm group (right). (A) Central chromatolysis of the trigeminal nerve ganglion cells. Magnification  $\times 200$ ; bar 100  $\mu\text{m}$ . (B) Axonal degeneration of the sciatic nerve. Magnification  $\times 400$ ; bar 50  $\mu\text{m}$ .

**Table 2-20**  
**Histopathological findings in dams exposed to glycidol**

	Glycidol in the drinking water (ppm)			
	0 (Control)	100	300	1,000
No. of offspring examined	11	11	11	11
Trigeminal nerve ganglion cells				
Central chromatolysis	11/0/0/0 <sup>a</sup>	11/0/0/0	11/0/0/0	0/11/0/0**
Sciatic nerve				
Axonal degeneration	11/0/0/0	11/0/0/0	11/0/0/0	2/9/0/0**

\*\* $P < 0.01$ , significantly different from the 0 ppm controls.

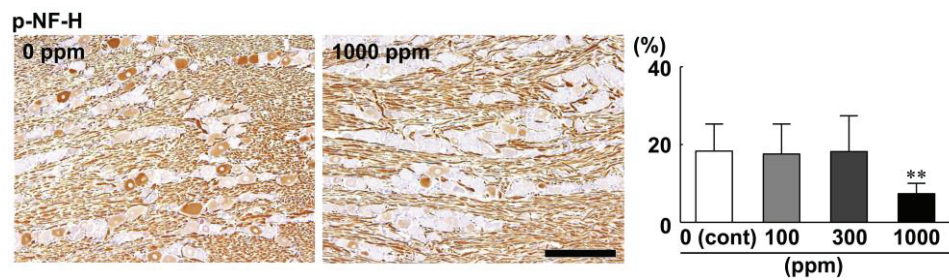
<sup>a</sup> Number of animals with each grade (grade 0/grade 1/grade 2/grade 3). The degree of abnormalities: grade 0, no change; grade 1, slight; grade 2, moderate; grade 3, marked.



**Fig. 2-5**

NF-L<sup>+</sup> spheroids in dam tissues after exposure to glycidol. (A) Cerebellum. (B) Dorsal funiculus of the medulla oblongata. Representative images from the 0 ppm controls (left) and the 1,000 ppm group (right). For full color figures, please see online version. Magnification (A)  $\times 100$ , (B)  $\times 40$ ; bar (A) 100  $\mu\text{m}$ , (B) 500  $\mu\text{m}$ . The graph shows the density of NF-L<sup>+</sup> spheroids per area unit. N = 11 in each group.

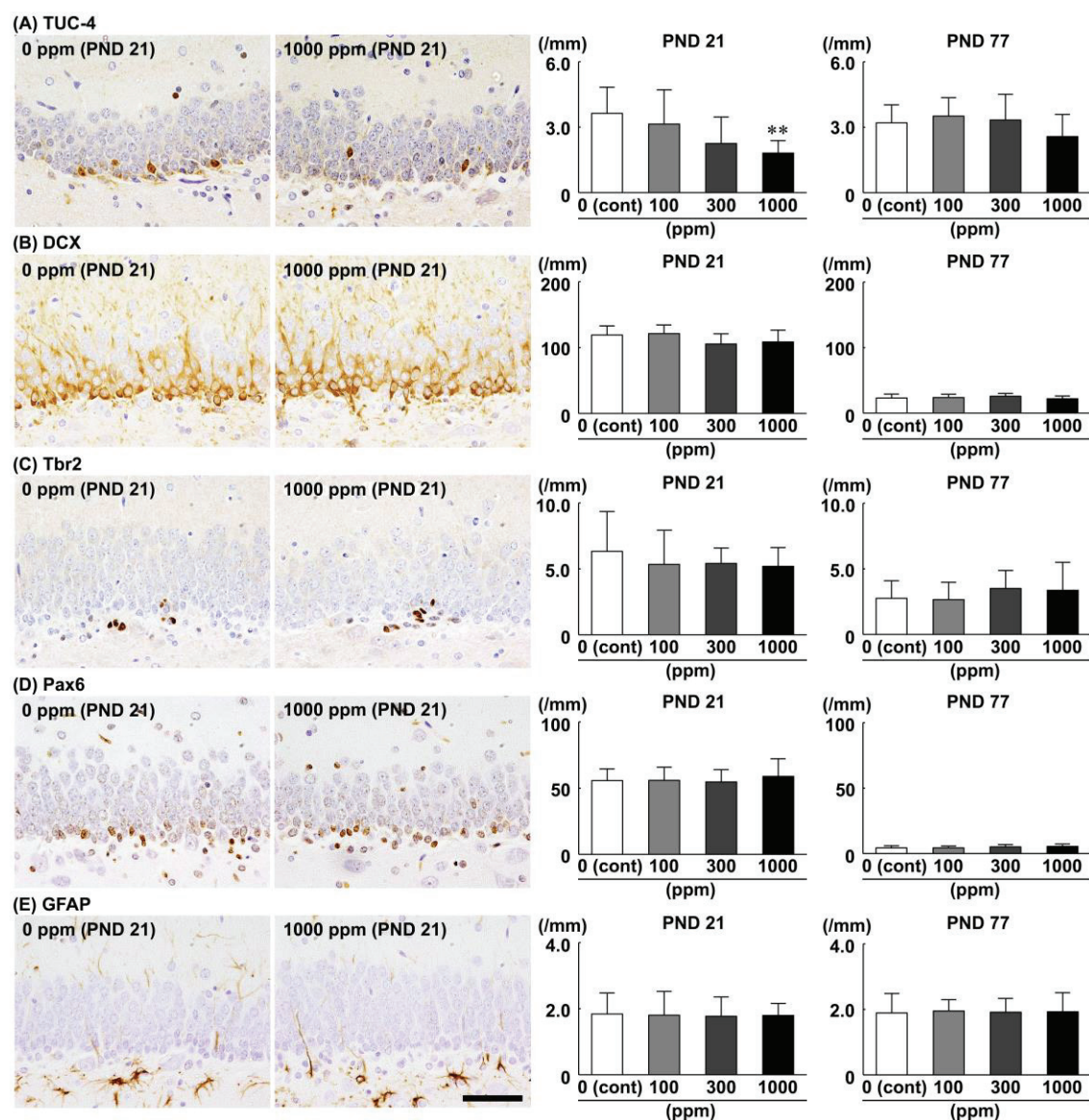




**Fig. 2-6**

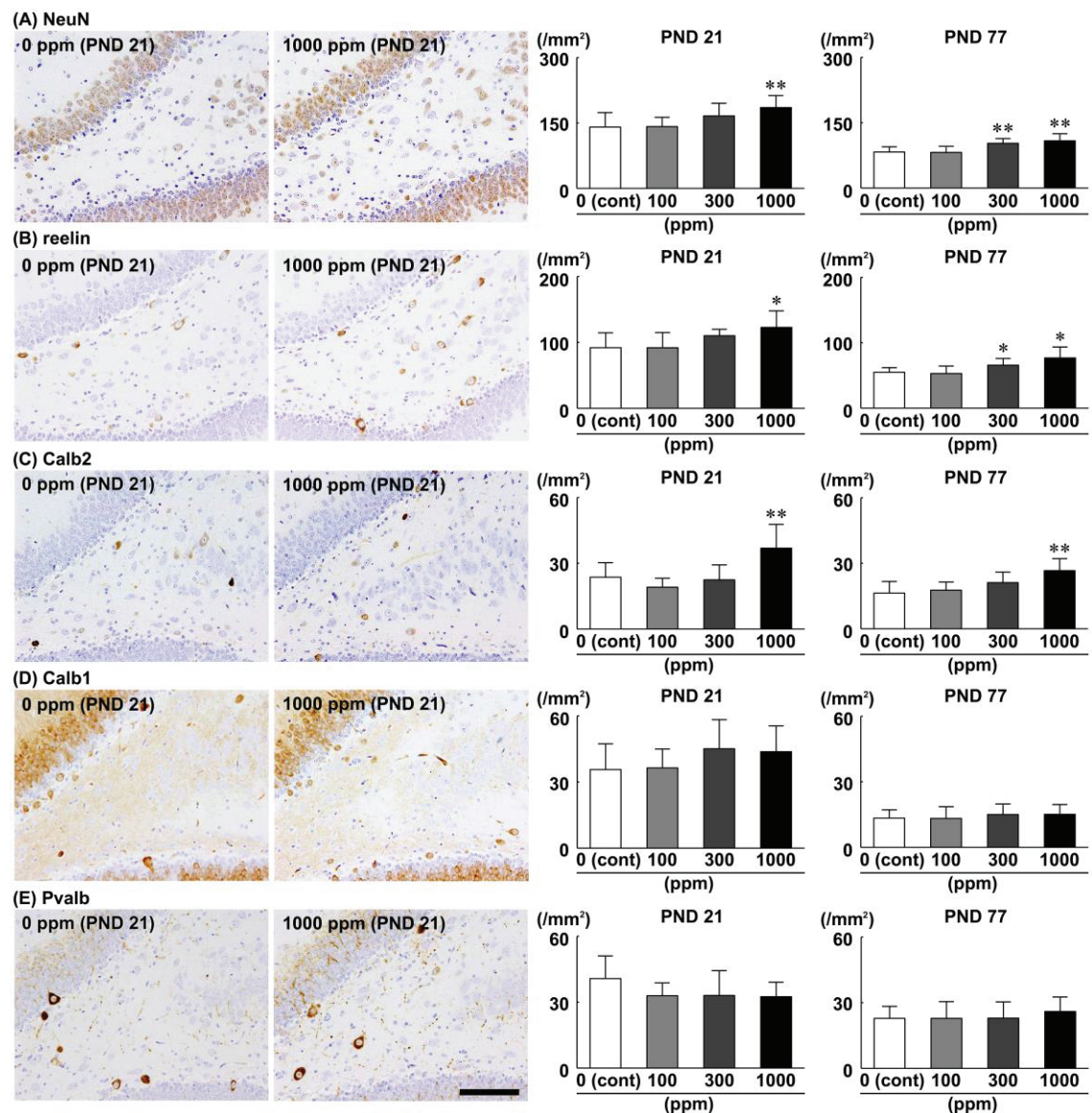
p-NF-H<sup>+</sup> ganglion cells in the trigeminal nerves of dams after exposure to glycidol.

Representative images from the 0 ppm controls (left) and the 1,000 ppm group (right). For full color figures, please see online version. Magnification  $\times 200$ ; bar 100  $\mu\text{m}$ . The graph shows the ratio of immunoreactive cells to trigeminal nerve cells. N = 11 in each group. \*\* $P < 0.01$  compared with the 0 ppm controls by Steel's test.



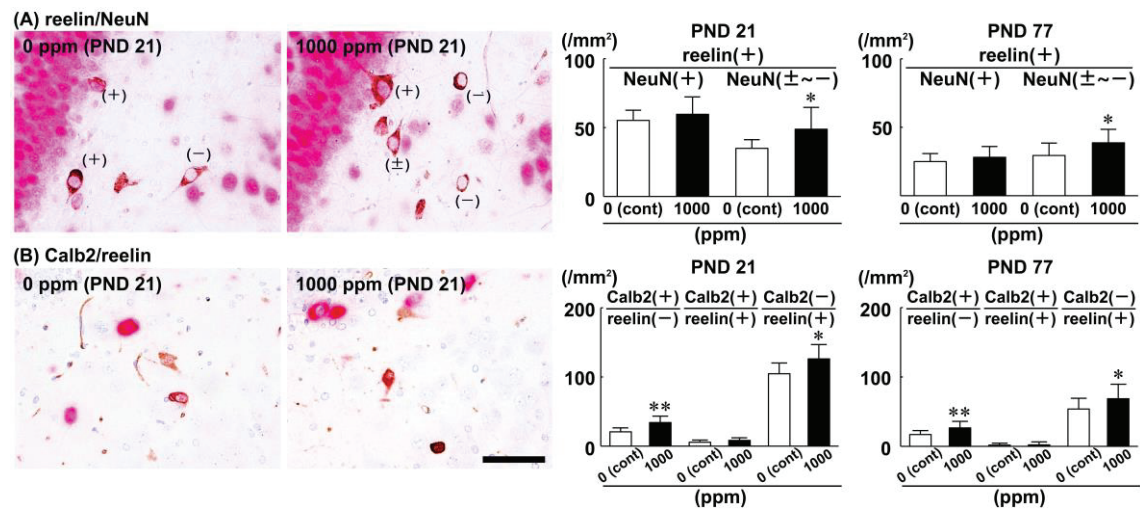
**Fig. 2-7**

Distribution of immunoreactive cells for TUC-4, DCX, Tbr2, Pax6 and GFAP in the SGZ of male offspring at PND 21 and 77 after maternal exposure to glycidol from GD 6 to PND 21. (A) TUC-4. (B) DCX. (C) Tbr2. (D) Pax6. (E) GFAP. Representative images from the 0 ppm controls (left) and the 1,000 ppm group (right) at PND 21. For full color figures, please see online version. Magnification  $\times 400$ ; bar 50  $\mu\text{m}$ . The graphs show the numbers of immunoreactive cells in the SGZ.  $N = 11$  in each group (one animal per dam).  $**P < 0.01$  compared with the 0 ppm controls by Steel's test.



**Fig. 2-8**

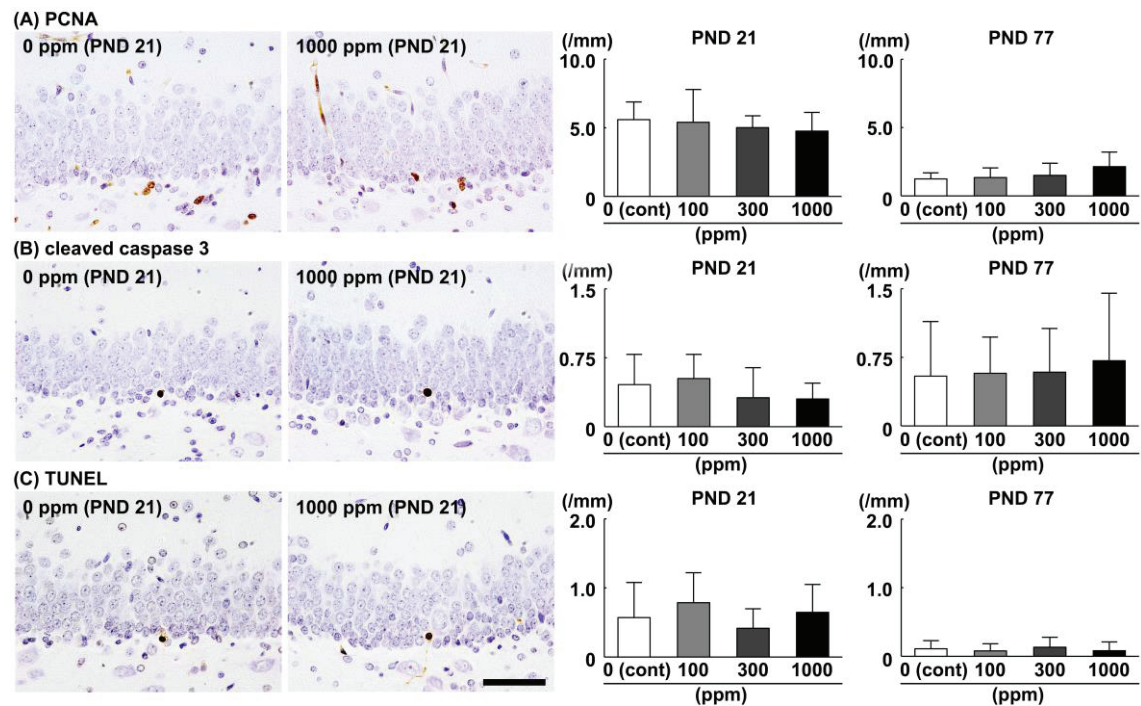
Distribution of immunoreactive cells for NeuN, reelin, Calb2, Calb1 and Pvalb in the hilus of the hippocampal dentate gyrus of male offspring at PND 21 and PND 77 after maternal exposure to glycidol from GD 6 to PND 21. (A) NeuN. (B) Reelin. (C) Calb2. (D) Calb1. (E) Pvalb. Representative images from the 0 ppm controls (left) and the 1,000 ppm group (right) at PND 21. For full color figures, please see online version. Magnification  $\times 200$ ; bar 100  $\mu\text{m}$ . The graphs show the densities of immunoreactive cells in the hilus. N = 11 in each group (one animal per dam). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with the 0 ppm controls by Dunnett's test or Steel's test.



**Fig. 2-9**

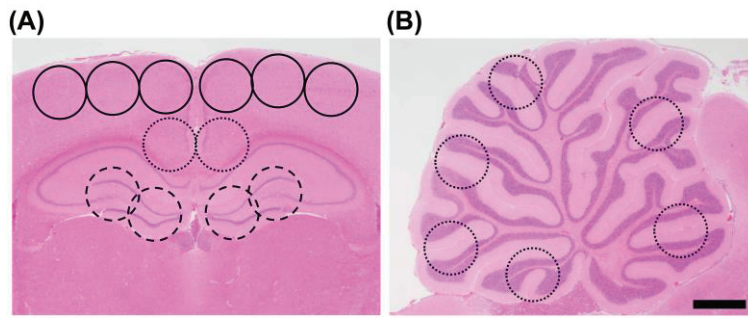
Double staining for reelin and NeuN, and Calb2 and reelin in the hilus of the hippocampal dentate gyrus of male offspring at PND 21 and PND 77 after maternal exposure to glycidol from GD 6 to PND 21. (A) Reelin (brown) and NeuN (red). (B) Calb2 (brown) and reelin (red). Representative images from the 0 ppm controls (left) and the 1,000 ppm group (right) at PND 21. For full color figures, please see online version. Magnification  $\times 400$ ; bar 50  $\mu\text{m}$ . The graphs show the densities of immunoreactive cells in the hilus.  $N = 11$  in each group (one animal per dam). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with the 0 ppm controls by Student's  $t$ -test or Aspin-Welch's  $t$ -test.





**Fig. 2-10**

Distribution of PCNA<sup>+</sup> proliferating cells and cleaved caspase-3<sup>+</sup> or TUNEL<sup>+</sup> apoptotic cells in the SGZ of male offspring at PND 21 and PND 77 after maternal exposure to glycidol from GD 6 to PND 21. (A) PCNA. (B) cleaved caspase-3. (C) TUNEL. Representative images from the 0 ppm controls (left) and the 1,000 ppm group (right) at PND 21. For full color figures, please see online version. Magnification  $\times 400$ ; bar 50  $\mu\text{m}$ . The graphs show the number of immunoreactive cells in the SGZ. N = 11 (one animal per dam).



**Fig. 3-1**

Overview of the dissected area of rats stained with hematoxylin and eosin. Sampling was made using punch-biopsy devices bilaterally. (A) The cerebrum. Dashed line: the hippocampal dentate gyrus; Dotted line: the corpus callosum; Continuous line: the cingulate cortex. (B) The cerebellum. Dotted line: the cerebellar vermis. Magnification  $\times 12.5$ ; bar 1 mm.

**Table 3-1**  
**Primer sequences for real-time RT-PCR analysis**

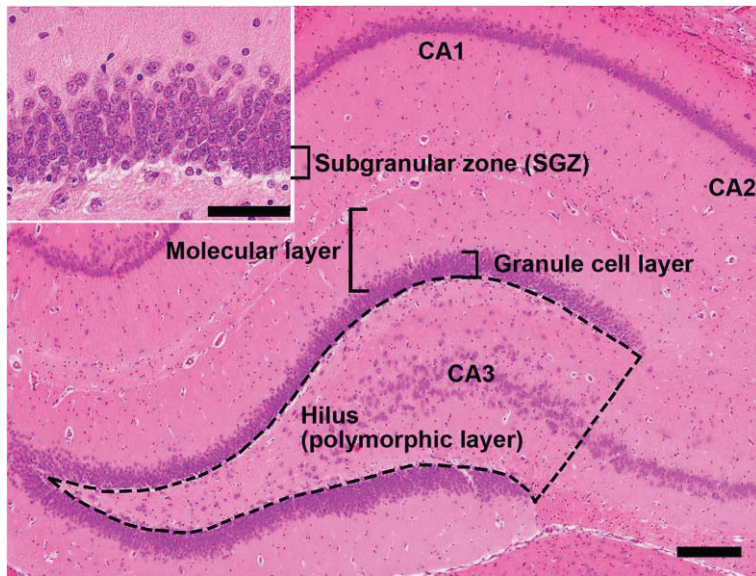
Genes	Accession No.	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>Arc</i>	NM_019361	AGTGTCTGAAAGGCAATGAAAAGTAG	CCTTCGGCCATCTCTGATTC
<i>Atf3</i>	NM_012912	GCACAACATTGGCGTGATTTT	ACCCCCAAACTCTCGGAAA
<i>Bmp4</i>	NM_012827	CAAGCGTAGTCCCAAGCATCA	GGCGACGGCAGTTCTTATTC
<i>Btg2</i>	NM_017259	CGCACTGACCGATCATTACAA	ATAGCCGGAGCCCTTGGAT
<i>Casp12</i>	NM_130422	TCCTCCGACAGCACATTCCCT	CACCCCAACAGATTCTTCCA
<i>Casp3</i>	NM_012922	GCTGTCAGTCAGAGCGTAAGGA	CTCAAACCATCTTCTCTCCAATCA
<i>Casp8</i>	NM_022277	GCCAGGAGAGCAAGAGAGTGTA	AGACAGTACCCCCGAGGTTTG
<i>Casp9</i>	NM_031632	CATGGTGGAGGTGAAGAACGA	TGCGCCATCTCCATCAAAG
<i>Cyr61</i>	NM_031327	GTTAATCGCAATTGGCAAAGG	GAGGTTCCGTGCCAAAGACA
<i>Dll3</i>	NM_053666	TGGCGGTGAAGATCCTGACT	CACAGTTAGAGCCTTGGAAGCA
<i>Fadd</i>	NM_152937	ATCTGTGAGCAAGAGTGATGATAC	CGGGCTTGTCAGGGTGTTT
<i>Fos</i>	NM_022197	CAACGAGCCCTCCTCTGACT	TGCCCTTCTGACTGCTCACA
<i>Gapdh</i>	NM_017008	GGCCGAGGGCCCACTA	TGTTGAAGTCACAGGAGACAACCT
<i>Hprt</i>	NM_012583	GCCGACCGTTCTGTCAT	TCATAACCTGGTTCATCATCTAATC
<i>Jun</i>	NM_021835	CTAACCCGCGTGAAGTGA	GCATCGTCGTAGAAGGTCGTTT
<i>Junb</i>	NM_021836	GCTTTGCGGACGGTTTTG	GGCGTCACGTGGTTCACTT
<i>Klf4</i>	NM_053713	GGAAGAGGAAGCAATTCAGGTACA	ACTCACCAGCACCATCGTTT
<i>Mag</i>	NM_017190	CCCCTGCCGTTTCGACTT	GTTGAAATACCAGACGCCATGTAC
<i>Mal</i>	NM_012798	GTGGCTACTCTGCTCTACGTGATC	CCCAATCTGCTGTCTATGAAGA
<i>Mcm3</i>	XM_001070728	AGATACCCGATTTATGAGAAGCA	CGCTCACCATCTTCTCCCTTT
<i>Ncam2</i>	AY495696	TGGAGGTGTGCCCATTCAT	GCGTACTATCTTCCAGGTTTCTGAT
<i>Npas4</i>	NM_153626	AGTTGCTATACCTGTCGGAGAGTGT	GCAACCAGATCCACCATAGAATG
<i>Nr4a1</i>	NM_024388	TTTGGTGACTGGATAGACAACATTC	CAGGAACATCAACACCCAAGCT
<i>Nr4a3</i>	NM_017352	GCTCGGAATACACCACAGAAATC	CCGTGCTACCGAGGTCCAT
<i>Nrep</i>	NM_178096	CTAAGGAAGTGAACCGCAAGAAG	GCCCGGCGGAATCAG
<i>Pcna</i>	NM_022381	CTCACGTCTCCTTAGTGCAG CTT	CGATCGCAGCGGTATGTGT
<i>Tnfrsf10b</i>	NM_001108873	CAAATGGCTCTCACCACAACAC	CCAGCAACTTCCTTCCTAATGG
<i>Tnfsf10</i>	NM_145681	CGGAGAGGGCATTCAATTTCTC	ATACAGGCCCTCCTCCTGGAT
<i>TopIIa</i>	NM_022183	GAAACAGGCTGCCAGTCAAAG	AGAGCGTTCACAGTTTCATCA

Abbreviations: *Arc*, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; *Atf3*, activating transcription factor 3; *Bmp4*, bone morphogenetic protein 4; *Btg2*, BTG family, member 2; *Casp3*, caspase 3; *Casp8*, caspase 8; *Casp9*, caspase 9; *Casp12*, caspase 12; *Cyr61*, cysteine-rich, angiogenic inducer, 61; *Dll3*, delta-like 3 (Drosophila); *Fadd*, Fas (TNFRSF6)-associated via death domain; *Fos*, FBJ osteosarcoma oncogene; *Gapdh*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *Hprt*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Jun*, jun proto-oncogene; *Junb*, jun B proto-oncogene; *Klf4*, Kruppel-like factor 4 (gut); *Mag*, myelin-associated glycoprotein; *Mal*, mal, T-cell differentiation protein; *Mcm3*, minichromosome maintenance complex component 3; *Ncam2*, neural cell adhesion molecule 2; *Npas4*, neuronal PAS domain protein 4; *Nr4a1*, nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1; *Nr4a3*, nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3; *Nrep*, neuronal regeneration related protein; *Pcna*, proliferating cell nuclear antigen; *Tnfrsf10b*, tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b; *Tnfsf10*, tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10; *TopIIa*, topoisomerase (DNA) II alpha.

**Table 3-2****Antibodies for immunohistochemistry**

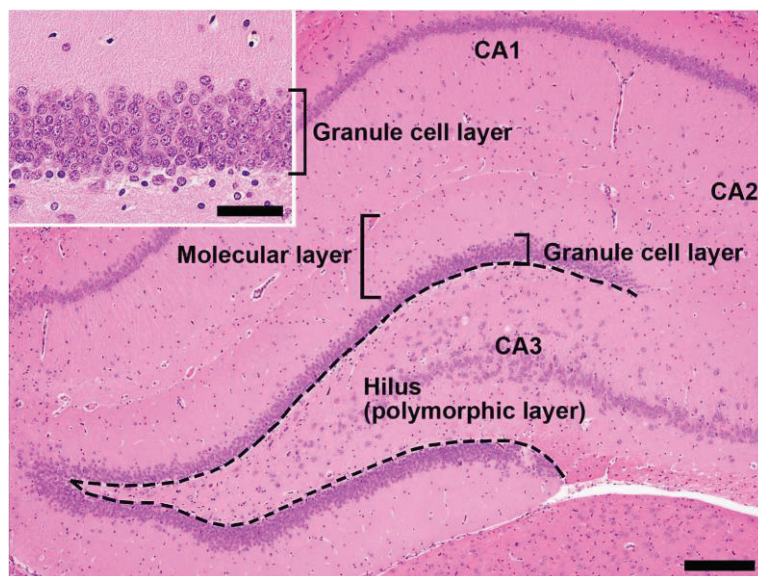
Antigen	Abbreviated name	Host species	Dilution	Manufacturer (City, State, Country)
reelin	-	mouse	1:1,000	Novus Biological, Inc. (Littleton, CO, USA)
calbindin-D-28K	Calb1	mouse	1:500	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
calretinin	Calb2	mouse	1:100	LifeSpan Biosciences Inc. (Seattle, WA, USA)
parvalbumin	Pvalb	mouse	1:1,000	Millipore Corporation (Billerica, MA, USA)
neuron-specific nuclear protein	NeuN	mouse	1:100	Millipore Corporation
proliferating cell nuclear antigen	PCNA	mouse	1:200	Dako (Glostrup, Denmark)
cleaved caspase-3	-	rabbit	1:300	Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, MA, USA)
dihydropyrimidinase-like 3	TUC-4	rabbit	1:1,000	Millipore Corporation
doublecortin	DCX	rabbit	1:1,000	Abcam Inc. (Cambridge, UK)
T box brain 2	Tbr2	rabbit	1:500	Abcam Inc.
paired box 6	Pax6	mouse	1:500	Abcam Inc.
glial fibrillary acidic protein	GFAP	mouse	1:200	Millipore Corporation
neurofilament-L	NF-L	mouse	1:100	Dako
activity-regulated cytoskeleton-associated protein	Arc	rabbit	1:300	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA)
FBJ osteosarcoma oncogene	Fos	rabbit	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
jun proto-oncogene	Jun	rabbit	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
phosphorylated neurofilament-H	p-NF-H	mouse	1:100	Abcam Inc.





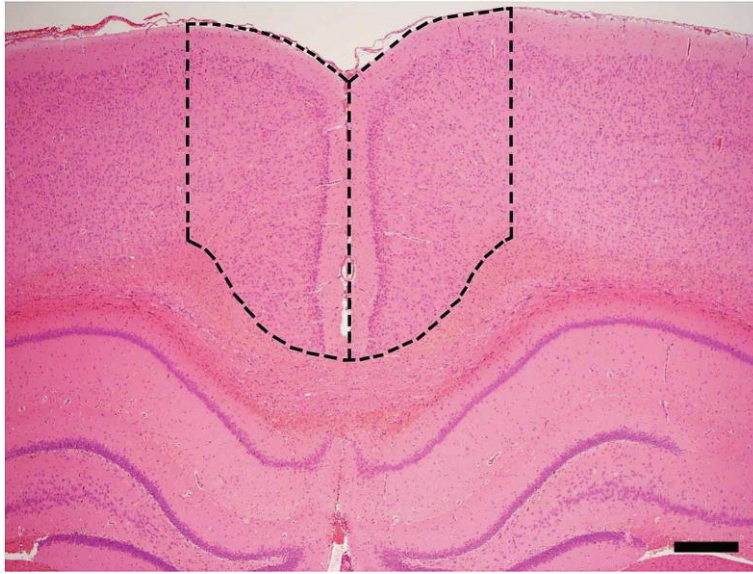
**Fig. 3-2**

Overview of the hippocampal formation of a male rat 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 NeuN, reelin, Calb1, Calb2, and Pvalb 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  $\times 40$ ; bar 200  $\mu\text{m}$ . (Inset) Higher magnification of the granular cell layer and SGZ. Distribution of immunoreactive cells for TUC-4, DCX, Tbr2, Pax6, and GFAP as well as apoptotic cells and proliferating cells were measured in the SGZ. Distribution of immunoreactive cells for NeuN counted in the granule cell layer were normalized for the length or the unit area of the granule cell layer. Magnification  $\times 400$ ; bar 50  $\mu\text{m}$ .



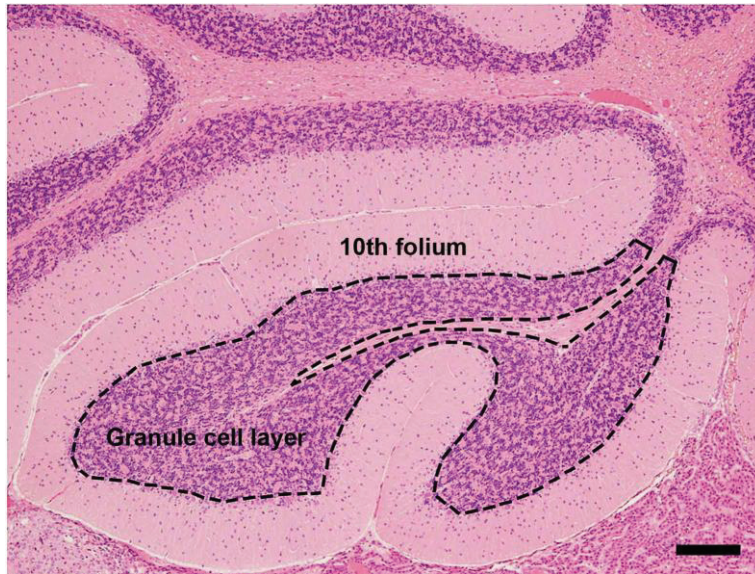
**Fig. 3-3**

Overview of the hippocampal formation of a rat stained with hematoxylin and eosin. The numbers of cells in the granule cell layer of the dentate gyrus displaying immunoreactivity for Arc, Fos and Jun were counted and normalized for the length of the granule cell layer (dashed line). Magnification  $\times 40$ ; bar 200  $\mu\text{m}$ . (Inset) Higher magnification of the granular cell layer. Magnification  $\times 400$ ; bar 50  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 3-4**

Overview of the cingulate cortex of a rat stained with hematoxylin and eosin. The numbers of cells in the area demarcated by the dashed line displaying immunoreactivity for Arc were counted and normalized for the unit area. Magnification  $\times 20$ ; bar 400  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 3-5**

Overview of the cerebellar vermis of a rat stained with hematoxylin and eosin. The numbers of cells in the 10<sup>th</sup> folium demarcated by the dashed line displaying immunoreactivity for Fos were counted and normalized for the unit area. Magnification  $\times 40$ ; bar 200  $\mu\text{m}$

**Table 3-3**  
**Gait scores of rats administered glycidol**

	Glycidol (mg/kg body weight)		
	0 (control)	30	200
Day 1	16/0/0/0 <sup>a</sup>	16/0/0/0	16/0/0/0
Day 4	16/0/0/0	16/0/0/0	16/0/0/0
Day 7	16/0/0/0	16/0/0/0	16/0/0/0
Day 11	16/0/0/0	16/0/0/0	16/0/0/0
Day 14	16/0/0/0	16/0/0/0	16/0/0/0
Day 18	16/0/0/0	16/0/0/0	15/1/0/0
Day 21	16/0/0/0	16/0/0/0	11/5/0/0*
Day 25	16/0/0/0	16/0/0/0	3/11/2/0**
Day 28	16/0/0/0	16/0/0/0	0/4/9/3**

<sup>a</sup>Number of animals with each grade (grade 0/grade 1/grade 2/grade 3). Degrees of abnormalities: grade 0, normal gait; grade 1, slightly abnormal gait with slight degrees of shuffling; grade 2, moderately abnormal gait with moderate degrees of shuffling; and grade 3, severely affected gait including inability to support the body weight and spreading of all extremities.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  significantly different from the 0 mg/kg controls by Mann-Whitney's *U*-test.

**Table 3-4**  
**Body weights and food consumption of rats administered glycidol**

	Glycidol (mg/kg body weight)		
	0 (control)	30	200
Body weight (g)			
No. of animals examined	16	16	16
Day 1	154.9 ± 6.8	153.9 ± 9.3	154.3 ± 7.7
Day 3	174.6 ± 6.9	172.4 ± 9.7	158.8 ± 9.6**
Day 7	212.0 ± 8.9	209.5 ± 12.3	174.2 ± 16.6**
Day 14	279.1 ± 11.3	274.3 ± 15.1	239.7 ± 18.5**
Day 21	338.3 ± 16.1	330.9 ± 18.3	277.7 ± 26.2**
Day 28	388.6 ± 21.0	376.1 ± 19.9	302.2 ± 28.9**
Food consumption (g)			
No. of animals examined	16	16	16
Day 1	15.2 ± 2.1	15.1 ± 2.4	14.7 ± 2.2
Day 3	17.2 ± 1.1	17.2 ± 1.0	12.7 ± 0.8**
Day 7	20.3 ± 0.5	20.1 ± 0.4	13.4 ± 3.3*
Day 14	22.6 ± 0.8	21.9 ± 0.8	20.7 ± 1.2**
Day 21	24.8 ± 0.8	23.9 ± 1.6	21.4 ± 1.9**
Day 28	25.6 ± 1.4	24.3 ± 2.2	20.2 ± 1.4**

Data are expressed as the mean ± SD.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the 0 mg/kg controls by Dunnett's test or Steel's test.

**Table 3-5**  
**Body and brain weights of rats administered glycidol**

	Glycidol (mg/kg body weight)		
	0 (control)	30	200
No. of animals examined	16	16	16
Body weight (g)	369.7 ± 20.5	358.3 ± 20.2	286.2 ± 28.5**
Brain weight (g)	1.98 ± 0.08	1.93 ± 0.07	1.82 ± 0.06**
(g/100g BW)	0.54 ± 0.03	0.54 ± 0.03	0.64 ± 0.07**

Data are expressed as the mean ± SD.

\*\* $P < 0.01$ , significantly different from the 0 mg/kg controls by Dunnett's test or Steel's test.

**Table 3-6**  
**Serum concentrations of thyroid-related hormones of rats administered glycidol**

	Glycidol (mg/kg body weight)		
	0 (control)	30	200
No. of animals examined	10	10	10
T <sub>3</sub> (ng/ml)	1.88 ± 0.37	2.16 ± 0.39	2.44 ± 0.28**
T <sub>4</sub> (ng/ml)	20.03 ± 4.93	25.75 ± 4.49*	21.58 ± 6.30
TSH (ng/ml)	1.62 ± 0.71	2.81 ± 1.84	3.94 ± 1.43**

Data are expressed as the mean ± SD.

T<sub>3</sub>, triiodothyronine; T<sub>4</sub>, thyroxine; TSH, thyroid-stimulating hormone.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the 0 mg/kg controls by Dunnett's test or Steel's test.



**Table 3-7**

**List of upregulated genes in the hippocampal dentate gyrus of rats after 28-day administration of glycidol as determined by microarray analysis ( $\geq 1.5$ -fold)**

Glycidol as determined by microarray analysis (= 1.5 fold)				
Accession No.	Gene title	Symbol	Glycidol (mg/kg)	
			30	200
Nervous system development				
NM_053744	delta-like 1 homolog (Drosophila)	Dlk1	1.55	1.99*
NM_001107673	solute carrier family 7 (anionic amino acid transporter light chain, xc- system), member 11	Slc7a11	0.99	1.99*
NM_017179	UNC homeobox	Uncx	1.41	1.74*
Axonogenesis, neuritogenesis, neuron projection				
NM_130425	runt-related transcription factor 3	Runx3	1.50	1.79*
NM_022177	chemokine (C-X-C motif) ligand 12	Cxcl12	1.36	1.56*
Synaptic transmission				
NM_012531	catechol-O-methyltransferase	Comt	1.48	1.86*
Cell proliferation				
NM_017020	interleukin 6 receptor	Il6r	0.99	1.51*
Apoptosis				
NM_057130	harakiri, BCL2 interacting protein (contains only BH3 domain)	Hrk	1.10	1.51**

Values are fold change with the expression level in the 0 mg/kg controls set as 1.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the 0 mg/kg controls.

**Table 3-8**

**List of downregulated genes in the hippocampal dentate gyrus of rats after 28-day administration of glycidol as determined by microarray analysis ( $\leq 0.67$ -fold)**

Accession No.	Gene title	Symbol	Glycidol (mg/kg)	
			30	200
Nervous system development				
NM_138846	glycoprotein m6b	Gpm6b	1.05	0.55**
Neuron differentiation				
NM_012827	bone morphogenetic protein 4	Bmp4	0.77	0.23*
NM_013058	inhibitor of DNA binding 3	Id3	0.76	0.50**
Axonogenesis				
NM_012912	activating transcription factor 3	Atf3	0.41	0.50*
NM_031327	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	Cyr61	0.87	0.43**
NM_017255	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 2	P2ry2	0.68	0.44*
NM_012513	brain-derived neurotrophic factor	Bdnf	0.87	0.66**
NM_013062	kinase insert domain receptor	Kdr	0.99	0.66*
Synaptic transmission				
NM_031019	corticotropin releasing hormone	Crh	0.86	0.63*
NM_013127	CD38 molecule	Cd38	0.99	0.67**
Cell proliferation				
NM_012874	c-ros oncogene 1 , receptor tyrosine kinase	Ros1	0.97	0.59**
NM_031804	cytokine inducible SH2-containing protein	Cish	0.73	0.59*
NM_001105720	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	Nfkbia	0.74	0.59**
NM_031972	aldehyde dehydrogenase 3 family, member A1	Aldh3a1	0.67	0.62*
XM_001054618	holocarboxylase synthetase (biotin-(propionyl-CoA-carboxylase (ATP-hydrolysing)) ligase)	Hlcs	0.96	0.67*
Apoptosis				
NM_012588	insulin-like growth factor binding protein 3	Igfbp3	0.79	0.64**

Values are fold change with the expression level in the 0 mg/kg controls set as 1.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the 0 mg/kg controls.



**Table 3-9**

**List of upregulated genes in the corpus callosum of rats after 28-day administration of glycidol as determined by microarray analysis ( $\geq 1.5$ -fold)**

Accession No.	Gene title	Symbol	Glycidol (mg/kg)	
			30	200
Nervous system development				
NM_001013181	zinc finger and BTB domain containing 16	Zbtb16	1.14	2.21**
Glial cell development, myelination				
NM_138507	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	Ptprc	1.40	1.74*
Axonogenesis, neuritogenesis, neuron projection				
NM_053517	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1	Shc1	1.24	1.50**
Synaptic transmission				
U92079	homer homolog 1 (Drosophila)	Homer1	1.43	2.35**
Cell proliferation				
NM_031567	nuclear factor I/C	Nfic	1.41	1.78*
NM_133319	TAF2 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor	Taf2	1.24	1.53**
Apoptosis				
NM_053299	ubiquitin D	Ubd	2.08	7.23**
NM_001004202	chemokine (C-C motif) ligand 6	Ccl6	1.51	2.32*

Values are fold change with the expression level in the 0 mg/kg controls set as 1.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the 0 mg/kg controls.

**Table 3-10**

**List of downregulated genes in the corpus callosum of rats after 28-day administration of glycidol as determined by microarray analysis ( $\leq 0.67$ -fold)**

Accession No.	Gene title	Symbol	Glycidol (mg/kg)	
			30	200
Nervous system development				
NM_012800	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 1	P2ry1	0.98	0.50*
NM_017268	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1 (soluble)	Hmgcs1	0.93	0.65**
NM_012827	bone morphogenetic protein 4	Bmp4	0.64	0.15*
NM_053384	Indian hedgehog	Ihh	0.49	0.46**
Glial cell development				
NM_013166	ciliary neurotrophic factor	Cntf	0.81	0.67**
NM_053861	tenascin C	Tnc	0.79	0.50*
NM_012924	Cd44 molecule	Cd44	0.77	0.51*
Axonogenesis, neuritogenesis, neuron projection				
NM_012912	activating transcription factor 3	Atf3	0.76	0.32**
NM_031327	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	Cyr61	0.69	0.33**
NM_017259	BTG family, member 2	Btg2	0.78	0.65**
Synaptic transmission				
XM_233477	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 4	Kcnq4	0.69	0.44**
NM_017142	adenylate cyclase 8 (brain)	Adcy8	0.80	0.64*
Cell proliferation				
NM_001246319	centromere protein W	Cenpw	0.81	0.51*
NM_001191607	S100 calcium binding protein A13	S100a13	0.82	0.62**
NM_001009654	SPC25, NDC80 kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae)	Spc25	0.87	0.65*
Apoptosis				
NM_012870	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b	Tnfrsf11b	1.00	0.66*

Values are fold change with the expression level in the 0 mg/kg controls set as 1.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the 0 mg/kg controls.

**Table 3-11**

**List of upregulated genes in the cingulate cortex of rats after 28-day administration of glycidol as determined by microarray analysis ( $\geq 1.5$ -fold)**

Accession No.	Gene title	Symbol	Glycidol (mg/kg)		
			30	200	
Nervous system development					
NM_001107673	solute carrier family 7 (anionic amino acid transporter light chain, xc- system), member 11	Slc7a11	0.87	1.94**	
NM_001127446	deleted in liver cancer 1	Dlc1	1.45	1.67*	
NM_001013181	zinc finger and BTB domain containing 16	Zbtb16	1.12	1.53**	
Neuron differentiation					
NM_024383	hairy and enhancer of split 5 (Drosophila)	Hes5	1.49	1.71**	
Axonogenesis, neuritogenesis, neuron projection					
NM_001107659	sema domain, seven thrombospondin repeats (type 1 and type 1-like), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 5A	Sema5a	1.30	1.58*	
NM_001108057	B-cell CLL/lymphoma 11B (zinc finger protein)	Bcl11b	1.19	1.53*	
Response to axon injury					
NM_012714	gastric inhibitory polypeptide receptor	Gipr	1.17	1.54**	
Synaptic transmission					
NM_013217	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 4	Mllt4	1.52	2.16*	
U92079	homer homolog 1 (Drosophila)	Homer1	1.06	2.14**	
NM_181373	glutamate receptor, ionotropic, kainate 3	Grik3	1.24	1.54*	
NM_019348	somatostatin receptor 2	Sstr2	1.33	1.51*	
Cell proliferation					
NM_017020	interleukin 6 receptor	Il6r	0.93	1.59**	
NM_053470	runt-related transcription factor 2	Runx2	1.10	1.51*	
NM_001024275	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 4	Rassf4	1.40	1.51*	
Apoptosis					
NM_012675	tumor necrosis factor	Tnf	1.26	1.85*	
NM_013174	transforming growth factor, beta 3	Tgfb3	1.50*	1.80*	
NM_001191711	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 20	Ddx20	1.76	1.59*	
NM_053596	endothelin converting enzyme 1	Ece1	1.23	1.54*	

Values are fold change with the expression level in the 0 mg/kg controls set as 1.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the 0 mg/kg controls.

**Table 3-12****List of downregulated genes in the cingulate cortex of rats after 28-day administration of glycidol as determined by microarray analysis ( $\leq 0.67$ -fold)**

Accession No.	Gene title	Symbol	Glycidol (mg/kg)	
			30	200
Nervous system development				
NM_012800	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 1	P2ry1	0.99	0.55**
NM_022197	FBJ osteosarcoma oncogene	Fos	0.92	0.59**
Axonogenesis, neuritogenesis, neuron projection				
NM_053713	Kruppel-like factor 4 (gut)	Klf4	0.84	0.39**
NM_012912	activating transcription factor 3	Atf3	0.74	0.04**
NM_017259	BTG family, member 2	Btg2	0.62**	0.21**
NM_017352	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	Nr4a3	0.54	0.35*
NM_024388	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	Nr4a1	1.10	0.57**
AF149299	B-cell CLL/lymphoma 2	Bcl2	0.86	0.59*
XM_001067130	nerve growth factor (beta polypeptide)	Ngf	0.71	0.59**
NM_001107881	plexin D1	Plxnd1	0.86	0.63**
AY495696	neural cell adhesion molecule 2	Ncam2	0.81	0.65**
NM_001107587	SLIT and NTRK-like family, member 2	Slitrk2	1.07	0.66**
NM_001105753	RAS protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 1	Rasgrf1	0.76	0.66**
NM_001108940	basic helix-loop-helix family, member e22	Bhlhe22	0.76	0.65**
NM_031327	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	Cyr61	0.30*	0.10**
Synaptic transmission				
NM_017110	CART prepropeptide	Cartpt	1.12	0.38*
NM_019361	activity-regulated cytoskeleton-associated protein	Arc	1.00	0.51*
NM_053427	solute carrier family 17 (sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter), member 6	Slc17a6	0.99	0.60*
NM_012869	neuropeptide Y receptor Y5	Npy5r	0.79	0.61*
CB580765	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1	Camk2n1	0.81	0.64*
Cell proliferation				
NM_021836	jun B proto-oncogene	Junb	1.03	0.50**
NM_012548	endothelin 1	Edn1	0.53	0.46*
NM_053653	vascular endothelial growth factor C	Vegfc	0.80	0.53**
NM_001105720	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	Nfkbia	0.75	0.59**
NM_001169139	cytoskeleton associated protein 2	Ckap2	0.94	0.62**
NM_001009623	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13	Tnfsf13	0.85	0.66**
NM_171991	cyclin B1	Ccnb1	1.02	0.65*
Apoptosis				
NM_001077640	growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma	Gadd45g	0.92	0.47**
NM_053769	dual specificity phosphatase 1	Dusp1	1.12	0.47**
NM_001025773	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	Tnfrsf9	1.31	0.49*
NM_053596	endothelin converting enzyme 1	Ece1	0.94	0.57**
XM_001054396	desmoglein 2	Dsg2	0.94	0.61*
NM_133546	protein phosphatase 1, regulatory subunit 15A	Ppp1r15a	0.94	0.61**
NM_012870	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b	Tnfrsf11b	0.96	0.65*

Values are fold change with the expression level in the 0 mg/kg controls set as 1.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the 0 mg/kg controls.

**Table 3-13**

**List of upregulated genes in the cerebellar vermis of rats after 28-day administration of glycidol as determined by microarray analysis ( $\geq 1.5$ -fold)**

Accession No.	Gene title	Symbol	Glycidol (mg/kg)	
			30	200
Nervous system development				
NM_001013181	zinc finger and BTB domain containing 16	Zbtb16	1.30	3.99*
NM_001107673	solute carrier family 7 (anionic amino acid transporter light chain, xc- system), member 11	Slc7a11	0.77	2.23*
NM_144740	Rho GTPase activating protein 4	Arhgap4	0.99	1.64**
NM_022620	sperm flagellar 2	Spef2	1.22	1.60*
Response to axon injury				
NM_019168	arginase type II	Arg2	1.09	1.50*
Cell proliferation				
NM_001106536	myeloblastosis oncogene-like 2	Mybl2	1.09	1.61*
NM_001130494	RecQ protein-like 4	Recql4	1.09	1.57*
XM_001078239	dopachrome tautomerase (dopachrome delta-isomerase, tyrosine-related protein 2)	Dct	1.29	1.54*
NM_017034	pim-1 oncogene	Pim1	1.37	1.51**
NM_001106170	minichromosome maintenance complex component 5	Mcm5	1.08	1.51*
NM_001127653	NK2 homeobox 6	Nkx2-6	1.39	1.51*
Apoptosis				
NM_144755	tribbles homolog 3 (Drosophila)	Trib3	1.13	1.77*
NM_012908	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	Faslg	1.19	1.64**

Values are fold change with the expression level in the 0 mg/kg controls set as 1.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the 0 mg/kg controls.

**Table 3-14**

**List of downregulated genes in the cerebellar vermis of rats after 28-day administration of glycidol as determined by microarray analysis ( $\leq 0.67$ -fold)**

Accession No.	Gene title	Symbol	Glycidol (ppm)	
			30	200
Nervous system development				
NM_022197	FBJ osteosarcoma oncogene	Fos	1.00	0.15**
NM_001107591	secreted frizzled-related protein 5	Sfrp5	0.76	0.35*
NM_012614	neuropeptide Y	Npy	0.58	0.44*
NM_020087	notch 3	Notch3	0.88	0.62*
NM_138846	glycoprotein m6b	Gpm6b	0.97	0.62*
NM_080906	DNA-damage-inducible transcript 4	Ddit4	0.87	0.64**
NM_019268	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 1	Slc8a1	0.95	0.65**
Neuron differentiation				
NM_012827	bone morphogenetic protein 4	Bmp4	0.64	0.15*
NM_019328	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	Nr4a2	1.22	0.38*
Axonogenesis, neuritogenesis, neuron projection				
NM_017352	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	Nr4a3	0.62	0.10**
NM_024388	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	Nr4a1	0.77	0.19**
NM_012738	apolipoprotein A-I	Apoa1	0.89	0.41*
NM_213626	kinesin family member 13B	Kif13b	0.79	0.45**
NM_001100558	T-cell lymphoma invasion and metastasis 1	Tiam1	0.93	0.50**
NM_178096	neuronal regeneration related protein	Nrep	1.09	0.55*
NM_031073	neurotrophin 3	Ntf3	0.93	0.66*
AB118218	mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3	Mapk8ip3	0.89	0.66**
NM_021835	jun proto-oncogene	Jun	0.97	0.58**
Synaptic transmission				
S67722	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	Ptgs2	0.90	0.42*
NM_022931	regulating synaptic membrane exocytosis 3	Rims3	0.93	0.57**
NM_022666	glutamate receptor, metabotropic 4	Grm4	1.04	0.61*
NM_012527	cholinergic receptor, muscarinic 3	Chrm3	1.09	0.64*
NM_012727	calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV	Camk4	0.94	0.66*
Myelination				
NM_012720	myelin-associated oligodendrocyte basic protein	Mobp	0.68	0.62*
Cell proliferation				
NM_053769	dual specificity phosphatase 1	Dusp1	0.83	0.32**
XM_001054618	holocarboxylase synthetase (biotin-(propionyl-CoA-carboxylase (ATP-hydrolysing)) ligase)	Hlcs	0.96	0.46*
Apoptosis				
NM_198748	scinderin	Scin	0.56	0.15**

Values are fold change with the expression level in the 0 mg/kg controls set as 1.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the 0 mg/kg controls.

**Table 3-15****Real-time RT-PCR analysis in rats after 28-day administration of glycidol**

	0 mg/kg Glycidol (Control)		200 mg/kg Glycidol		Microarray data
	Relative transcript level normalized to		Relative transcript level normalized to		
	<i>Hprt</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt</i>	<i>Gapdh</i>	
No. of offspring examined	6	6	6	6	3
Hippocampal dentate gyrus					
<i>Atf3</i>	1.01±0.15 <sup>a</sup>	1.01±0.17	0.72±0.15**	0.68±0.12**	0.50 <sup>b</sup>
<i>Bmp4</i>	1.04±0.31	1.03±0.26	0.35±0.20**	0.33±0.18**	0.23
<i>Cyr61</i>	1.01±0.14	1.01±0.18	0.45±0.06**	0.42±0.04**	0.43
Corpus callosum					
<i>Bmp4</i>	1.01±0.15	1.00±0.08	0.31±0.22**	0.32±0.21**	0.15
<i>Btg2</i>	1.03±0.27	1.02±0.25	0.59±0.05*	0.63±0.03*	0.65
<i>Cyr61</i>	1.08±0.48	1.07±0.46	0.30±0.06*	0.32±0.07*	0.33
Cingulate cortex					
<i>Arc</i>	1.01±0.15	1.01±0.14	0.77±0.21*	0.72±0.13**	0.51
<i>Atf3</i>	1.07±0.46	1.12±0.60	0.08±0.05**	0.07±0.04**	0.04
<i>Btg2</i>	1.02±0.22	1.03±0.24	0.28±0.03**	0.26±0.03**	0.21
<i>Cyr61</i>	1.15±0.67	1.16±0.68	0.13±0.03*	0.12±0.02*	0.10
<i>Junb</i>	1.03±0.29	1.04±0.30	0.72±0.16*	0.70±0.16*	0.50
<i>Klf4</i>	1.04±0.27	1.04±0.28	0.53±0.15**	0.51±0.13**	0.39
<i>Npas4</i>	1.02±0.19	1.02±0.20	0.42±0.11**	0.41±0.11**	0.34
<i>Nr4a1</i>	1.00±0.08	1.01±0.13	0.67±0.12**	0.62±0.09**	0.57
Cerebellar vermis					
<i>Bmp4</i>	1.00±0.10	1.00±0.07	0.41±0.29**	0.38±0.28**	0.15
<i>Fos</i>	1.02±0.24	1.01±0.18	0.19±0.08**	0.17±0.05**	0.15
<i>Jun</i>	1.00±0.06	1.00±0.07	0.64±0.11**	0.59±0.03**	0.58
<i>Npas4</i>	1.07±0.45	1.06±0.39	0.15±0.06**	0.14±0.05**	0.11
<i>Nr4a1</i>	1.03±0.27	1.02±0.22	0.25±0.06**	0.23±0.03**	0.19
<i>Nr4a3</i>	1.04±0.32	1.02±0.26	0.39±0.12*	0.36±0.10**	0.10
<i>Nrep</i>	1.01±0.13	1.00±0.10	0.78±0.14*	0.73±0.14**	0.55

<sup>a</sup> Real-time RT-PCR data are expressed as the mean ± SD.<sup>b</sup> Microarray data are expressed as fold change with the expression level in the 0 mg/kg controls set as 1.\**P*<0.05, \*\**P*<0.01, significantly different from the 0 mg/kg controls.

Abbreviations: *Arc*, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; *Atf3*, activating transcription factor 3; *Bmp4*, bone morphogenetic protein 4; *Btg2*, BTG family, member 2; *Cyr61*, cysteine-rich, angiogenic inducer, 61; *Fos*, FBJ osteosarcoma oncogene; *Jun*, jun proto-oncogene; *Junb*, jun B proto-oncogene; *Klf4*, Kruppel-like factor 4 (gut); *Gapdh*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *Hprt*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Npas4*, neuronal PAS domain protein 4; *Nr4a1*, nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1; *Nr4a3*, nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3; *Nrep*, neuronal regeneration related protein.



**Table 3-16**

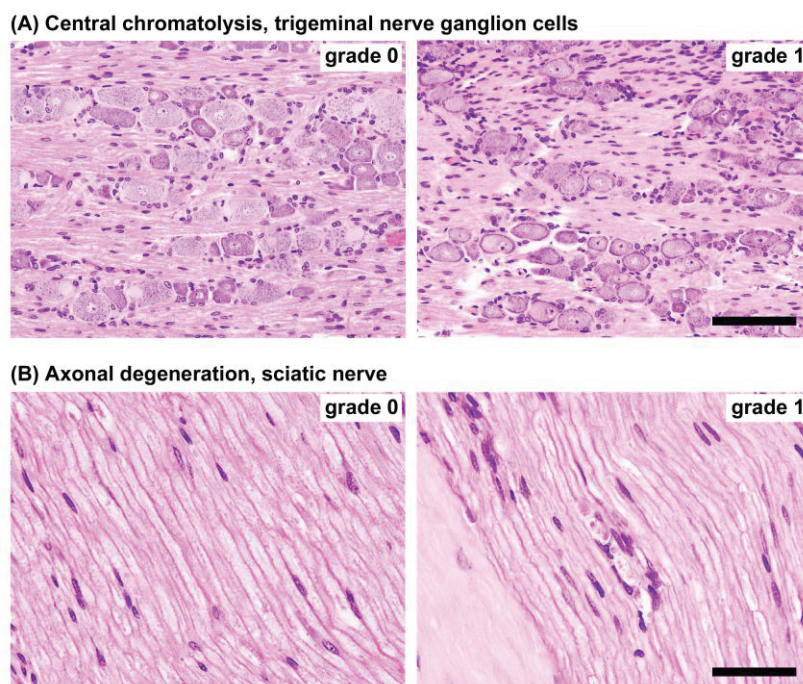
**Real-time RT-PCR analysis in the hippocampal dentate gyrus of rats administered glycidol**

	Glycidol (mg/kg body weight)			
	0 (control)		200	
	Relative transcript level normalized to		Relative transcript level normalized to	
	<i>Hprt</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt</i>	<i>Gapdh</i>
No. of offspring examined	6	6	6	6
Neuronal plasticity, Myelination				
<i>Ncam2</i>	1.00±0.07	1.00±0.04	0.94±0.09	0.88±0.08*
<i>Mag</i>	1.04±0.32	1.04±0.28	0.71±0.14*	0.66±0.12*
<i>Mal</i>	1.05±0.33	1.04±0.30	0.72±0.19	0.67±0.18*
Neuronal stage-defining genes				
<i>Pax6</i>	1.01±0.16	1.01±0.13	0.99±0.16	0.93±0.13
<i>Eomes</i>	1.05±0.35	1.05±0.35	1.45±0.31	1.37±0.21
<i>Dcx</i>	1.00±0.08	1.01±0.12	1.01±0.11	0.95±0.09
<i>Dpysl3</i>	1.00±0.05	1.00±0.06	1.05±0.10	0.99±0.08
Cell proliferation-related genes				
<i>Pcna</i>	1.00±0.08	1.00±0.07	1.05±0.13	1.00±0.15
<i>Mcm3</i>	1.02±0.20	1.01±0.15	1.03±0.11	0.97±0.06
<i>TopIIa</i>	1.05±0.33	1.03±0.28	1.01±0.17	0.95±0.15
Apoptosis-related genes				
<i>Bax</i>	1.00±0.09	1.00±0.06	1.14±0.16	1.07±0.14
<i>Bcl2</i>	1.01±0.11	1.00±0.06	0.98±0.08	0.92±0.08
<i>Tnfsf10</i>	1.04±0.33	1.03±0.28	1.09±0.13	1.04±0.17
<i>Tnfrsf10b</i>	1.08±0.45	1.08±0.43	1.20±0.29	1.15±0.31
<i>Fadd</i>	1.01±0.13	1.00±0.07	1.12±0.09	1.08±0.07
<i>Casp3</i>	1.06±0.36	1.06±0.40	0.97±0.48	0.93±0.50
<i>Casp8</i>	1.02±0.21	1.01±0.18	1.22±0.17	1.16±0.19
<i>Casp9</i>	1.01±0.18	1.01±0.14	0.99±0.08	0.93±0.04
<i>Casp12</i>	1.03±0.30	1.03±0.27	1.24±0.16	1.18±0.19

Data are expressed as the mean ± SD.

*Note.* *Bax*, Bcl2-associated X protein; *Bcl2*, B-cell CLL/lymphoma 2; *Casp3*, caspase 3; *Casp8*, caspase 8; *Casp9*, caspase 9; *Casp12*, caspase 12; *Dcx*, doublecortin; *Dpysl3*, dihydropyrimidinase-like 3 (TUC-4); *Eomes*, eomesodermin (T-box brain protein 2); *Fadd*, Fas (TNFRSF6)-associated via death domain; *Gapdh*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *Hprt*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Mag*, myelin-associated glycoprotein; *Mal*, mal, T-cell differentiation protein; *Mcm3*, minichromosome maintenance complex component 3; *Ncam2*, neural cell adhesion molecule 2; *Pax6*, paired box 6; *Pcna*, proliferating cell nuclear antigen; *Tnfrsf10b*, tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b; *Tnfsf10*, tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10; *TopIIa*, topoisomerase (DNA) II alpha.

\**P* < 0.05, significantly different from the 0 mg/kg controls by Student's *t*-tests or Aspin-Welch's *t*-test.



**Fig. 3-6**

Histopathological changes of the peripheral nervous system and their grade of male rats after 28-day administration of glycidol. (A, B) Representative images from the 0 mg/kg controls (left) and the 200 mg/kg group (right). (A) Central chromatolysis of the trigeminal nerve ganglion cells. Magnification  $\times 200$ ; bar 100  $\mu\text{m}$ . (B) Axonal degeneration of the sciatic nerve. Magnification  $\times 400$ ; bar 50  $\mu\text{m}$ .

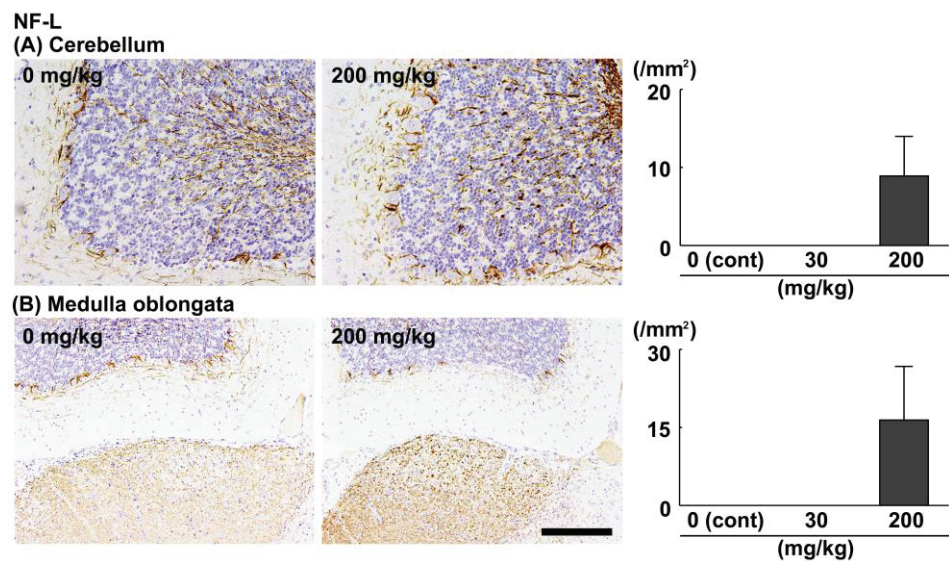
**Table 3-17**

**Histopathological findings of peripheral nerves in rats administered glycidol**

	Glycidol (mg/kg body weight)		
	0 (control)	30	200
No. of animals examined	10	10	10
Trigeminal nerve ganglion cells			
Central chromatolysis	10/0/0/0 <sup>a</sup>	10/0/0/0	0/10/0/0**
Sciatic nerve			
Axonal degeneration	10/0/0/0	10/0/0/0	1/9/0/0**

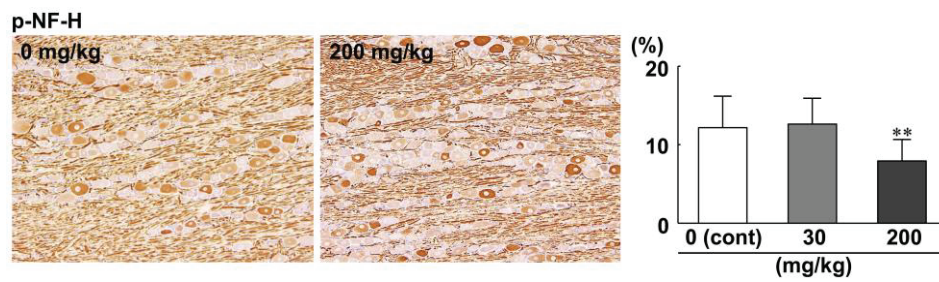
<sup>a</sup>Number of animals with each grade (grade 0/grade 1/grade 2/grade 3). Degrees of abnormalities: grade 0, no change; grade 1, slight; grade 2, moderate; grade 3, marked.

\*\* $P < 0.01$ , significantly different from the 0 mg/kg controls by Mann-Whitney's *U*-test.



**Fig. 3-7**

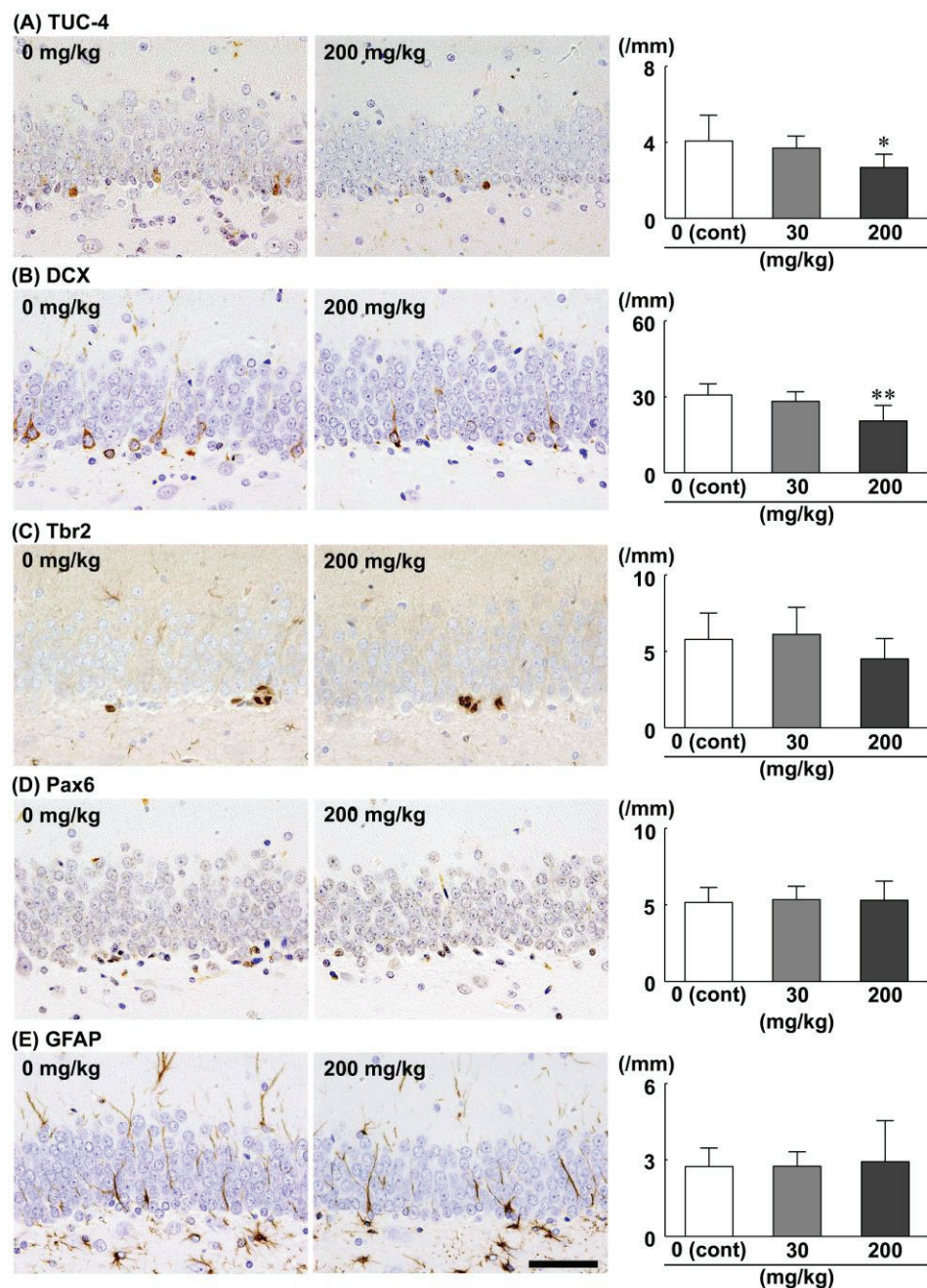
NF-L<sup>+</sup> Spheroids in the cerebellum and medulla oblongata after 28-day administration of glycidol. (A) Cerebellum. (B) Dorsal funiculus of the medulla oblongata. Representative images from the 0 mg/kg controls (left) and the 200 mg/kg group (right). For full color figures, please see online version. Magnification (A)  $\times 100$ , (B)  $\times 40$ ; bar (A) 200  $\mu\text{m}$ , (B) 500  $\mu\text{m}$ . The graph shows the density of NF-L<sup>+</sup> spheroids per area unit. N = 10 in each group.



**Fig. 3-8**

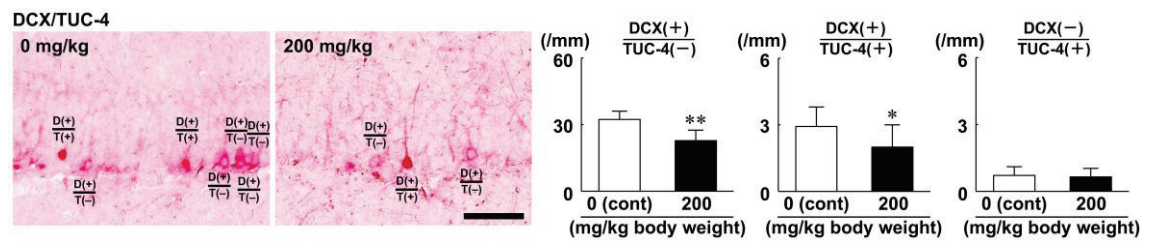
p-NF-H<sup>+</sup> ganglion cells in the trigeminal nerves after 28-day administration of glycidol. Representative images from the 0 mg/kg controls (left) and the 200 mg/kg group (right). For full color figures, please see online version. Magnification  $\times 200$ ; bar 100  $\mu\text{m}$ . The graph shows the ratio of immunoreactive cells to trigeminal nerve cells. N = 10 in each group. \*\* $P < 0.01$  compared with the 0 mg/kg controls by Steel's test.





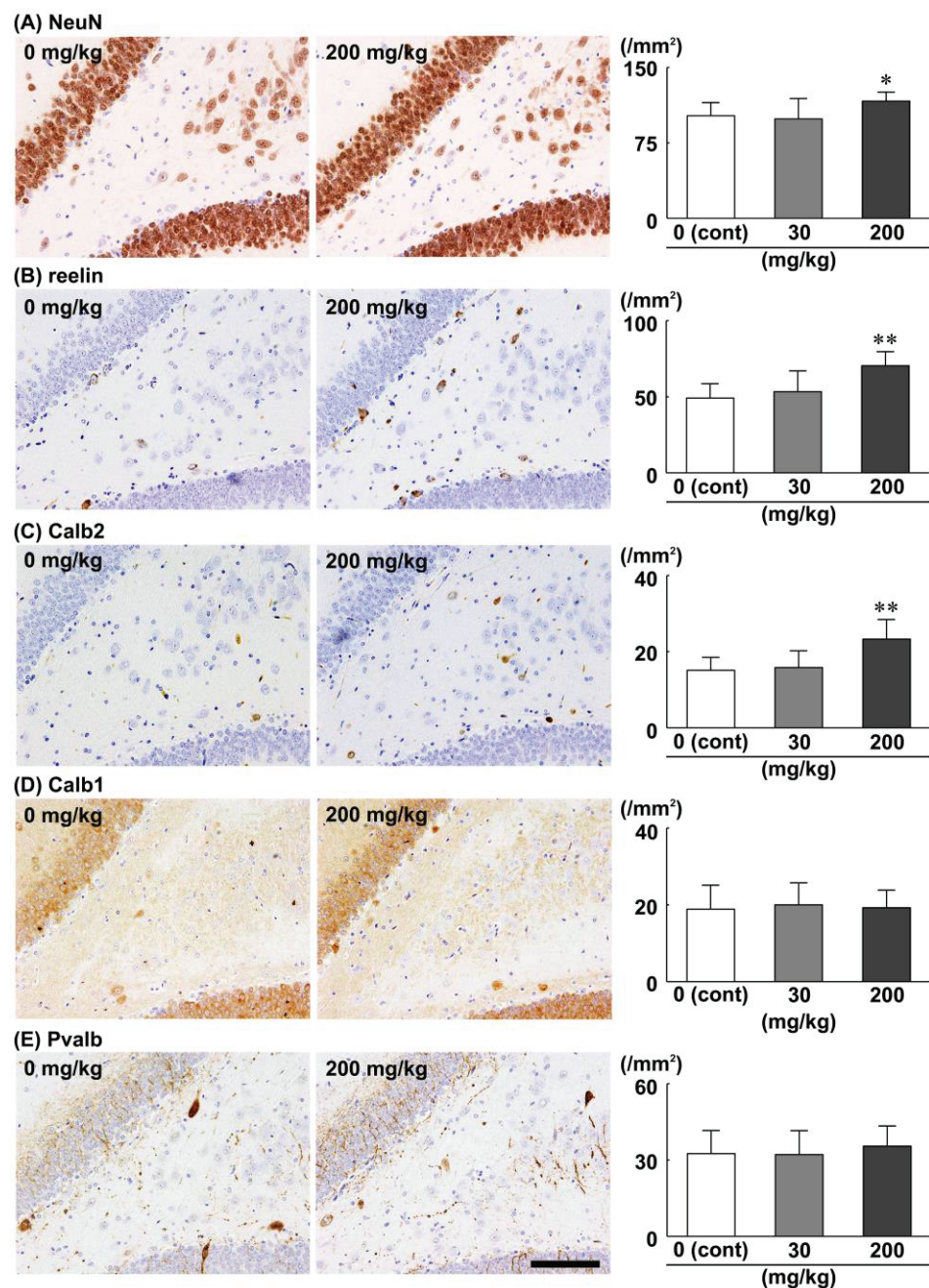
**Fig. 3-9**

Distribution of immunoreactive cells for TUC-4, DCX, Tbr2, Pax6, and GFAP in the SGZ of rats after exposure to glycidol by gavage for 28 days. (A) TUC-4. (B) DCX. (C) Tbr2. (D) Pax6. (E) GFAP. Representative images from the 0 mg/kg controls (left) and the 200 mg/kg group (right). For full color figures, please see online version. Magnification  $\times 400$ ; bar 50  $\mu\text{m}$ . The graphs show the number of immunoreactive cells in the SGZ.  $N = 10$  in each group.  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  compared with the 0 mg/kg controls by Dunnett's test or Steel's test.



**Fig. 3-10**

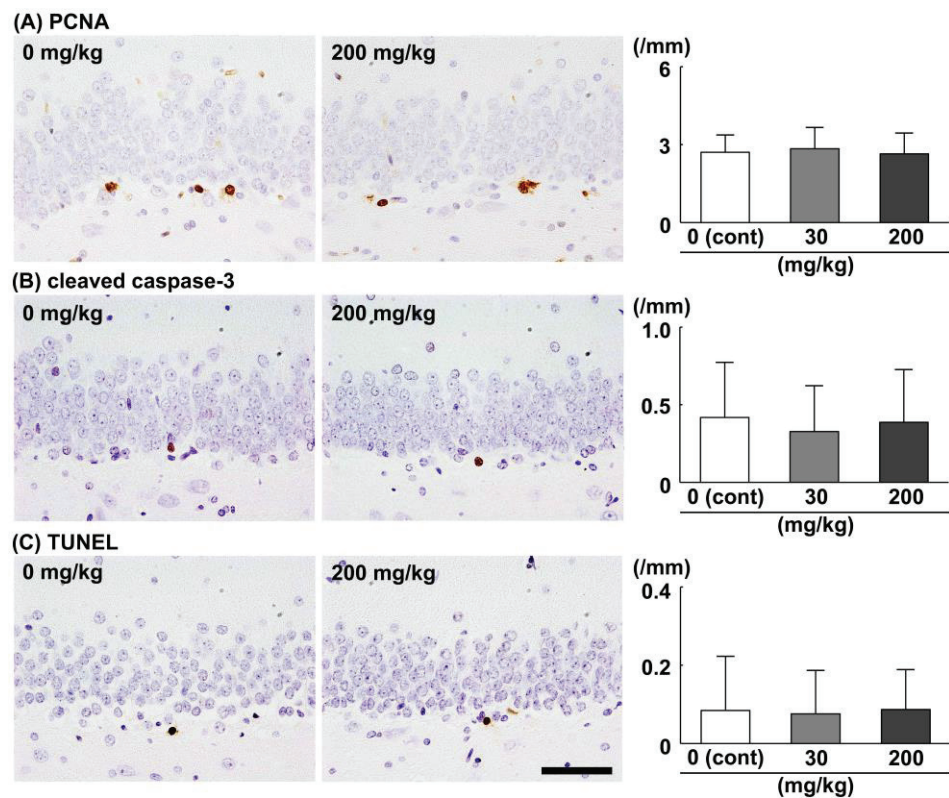
Double staining for TUC-4 and DCX in the SGZ of rats after exposure to glycidol by gavage for 28 days. Representative images from the 0 mg/kg controls (left) and the 200 mg/kg group (right). For full color figures, please see online version. Magnification  $\times 400$ ; bar 50  $\mu\text{m}$ . The graphs show the number of immunoreactive cells in the SGZ. N = 10 in each group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with the 0 mg/kg controls by Student's  $t$ -test.



**Fig. 3-11**

Distribution of immunoreactive cells for NeuN, reelin, Calb2, Calb1, and Pvalb in the hilus of the hippocampal dentate gyrus of rats after exposure to glycidol by gavage for 28 days. (A) NeuN. (B) reelin. (C) Calb2. (D) Calb1. (E) Pvalb. Representative images from the 0 mg/kg controls (left) and the 200 mg/kg group (right). For full color figures, please see online version. Magnification  $\times 200$ ; bar 100  $\mu\text{m}$ . The graphs show the density of immunoreactive cells in the hilus.  $N = 10$  in each group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with the 0 mg/kg controls by Dunnett's test or Steel's test.





**Fig. 3-12**

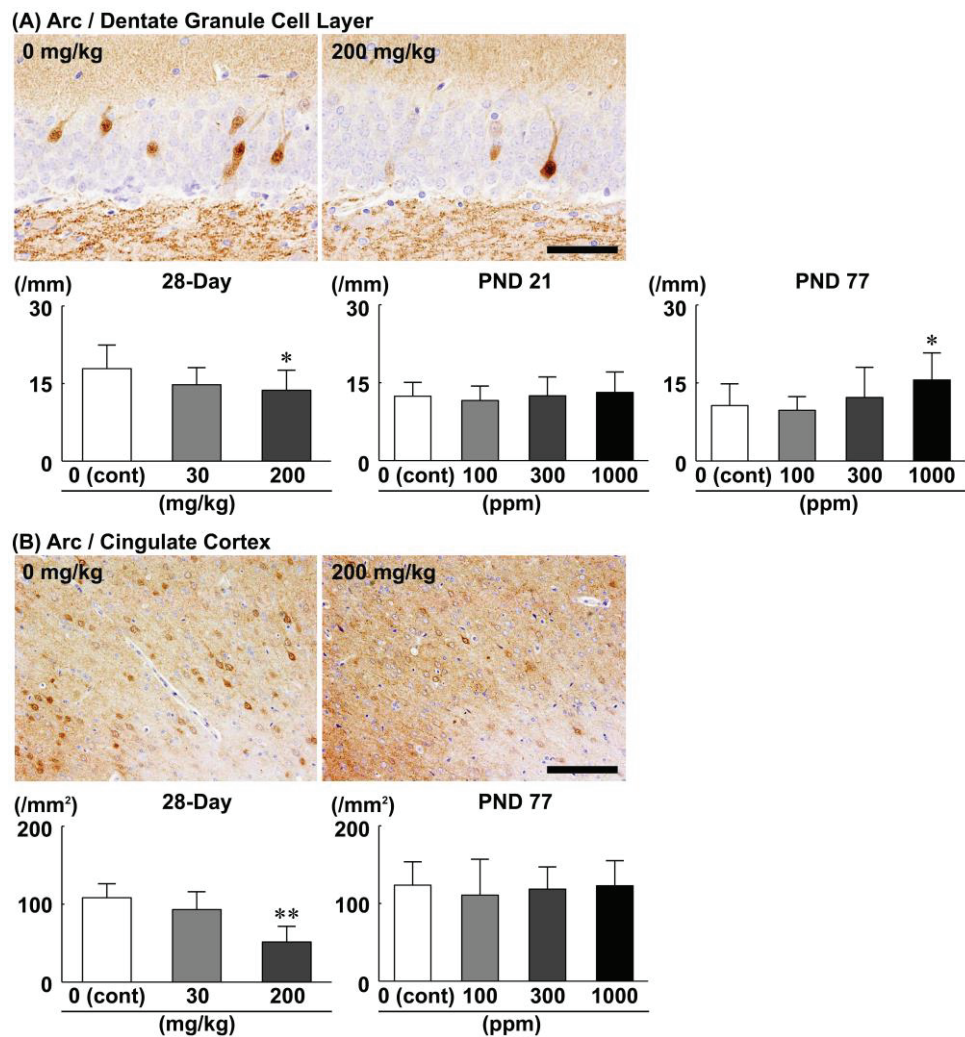
Distribution of PCNA<sup>+</sup> proliferating cells, cleaved caspase-3, and TUNEL<sup>+</sup> apoptotic cells in the SGZ of rats after exposure to glycidol by gavage for 28 days. (A) PCNA. (B) cleaved caspase-3. (C) TUNEL. Representative images from the 0 mg/kg controls (left) and the 200 mg/kg group (right). For full color figures, please see online version. Magnification  $\times 400$ ; bar 50  $\mu\text{m}$ . The graphs show the number of immunoreactive cells in the SGZ. N = 10.



**Table 3-18****Numbers of immunoreactive cells for NeuN in the granule cell layer of the hippocampal dentate gyrus of rats administered glycidol**

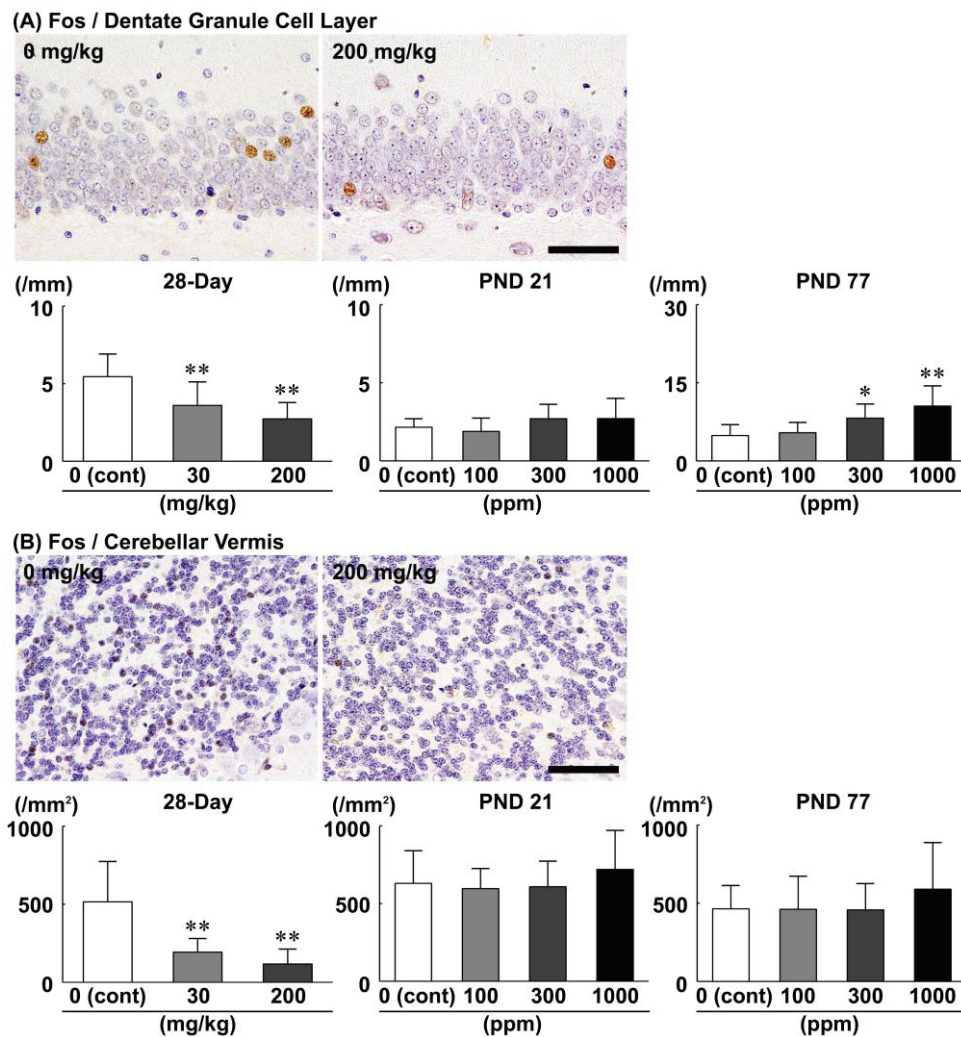
	Glycidol (mg/kg body weight)	
	0 (control)	200
No. of animals examined	10	10
normalized to the length of the SGZ (/mm)	471.6±22.0	471.4±30.5
normalized to the area of the granule cell layer (/mm <sup>2</sup> )	6835.0±375.4	6633.0±385.6

Data are expressed as the mean ± SD.



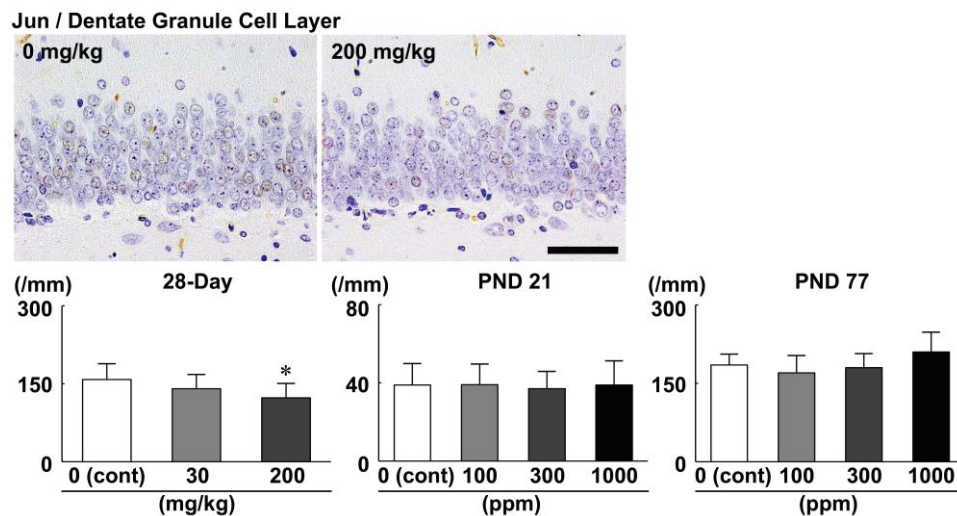
**Fig. 3-13**

Distribution of immunoreactive cells for Arc in the GCL of the hippocampal dentate gyrus and the cingulate cortex of male rats after exposure to glycidol by gavage for 28 days in Experiment 1 and male offspring after maternal exposure to glycidol from GD 6 to PND 21 in Experiment 2. (A) The GCL of the hippocampal dentate gyrus. (B) The cingulate cortex. Representative images from the 0 mg/kg controls (left) and the 200 mg/kg group (right) in (A) and (B) in Experiment 1. Magnification  $\times 400$ ; bar 50  $\mu\text{m}$  in (A) and  $\times 100$ ; bar 200  $\mu\text{m}$  in (B). The graphs show the numbers of immunoreactive cells.  $N = 10$  in each group of Experiment 1.  $N = 11$  in each group (one animal per dam) of Experiment 2.  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  compared with the controls by Dunnett's test or Steel's test.



**Fig. 3-14**

Distribution of immunoreactive cells for Fos in the GCL of the hippocampal dentate gyrus and the GCL of the cerebellar vermis of male rats after exposure to glycidol by gavage for 28 days in Experiment 1 and male offspring after maternal exposure to glycidol from GD 6 to PND 21 in Experiment 2. (A) The GCL of the hippocampal dentate gyrus. (B) The GCL of the cerebellar vermis. Representative images from the 0 mg/kg controls (left) and the 200 mg/kg group (right) in (A) and (B) in Experiment 1. Magnification  $\times 400$ ; bar 50  $\mu\text{m}$  in (A) and  $\times 100$ ; bar 200  $\mu\text{m}$  in (B). The graphs show the numbers of immunoreactive cells.  $N = 10$  in each group of Experiment 1.  $N = 11$  in each group (one animal per dam) of Experiment 2. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with the controls by Dunnett's test or Steel's test.



**Fig. 3-15**

Distribution of immunoreactive cells for Jun in the GCL of the hippocampal dentate gyrus of male rats after exposure to glycidol by gavage for 28 days in Experiment 1 and male offspring after maternal exposure to glycidol from GD 6 to PND 21 in Experiment 2. Representative images from the 0 mg/kg controls (left) and the 200 mg/kg group (right) in Experiment 1. Magnification  $\times 400$ ; bar 50  $\mu\text{m}$ . The graphs show the numbers of immunoreactive cells.  $N = 10$  in each group of Experiment 1.  $N = 11$  in each group (one animal per dam) of Experiment 2.  $*P < 0.05$  compared with the controls by Dunnett's test or Steel's test.