

ラットを用いた発達期からの抗酸化物質曝露が
学習機能に及ぼす影響に関する研究

2020 年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科
(東京農工大学)

増渕 康哲

ラットを用いた発達期からの抗酸化物質曝露が 学習機能に及ぼす影響に関する研究

増渕 康哲

目次

序論	3
第1章 発達期の甲状腺機能低下により誘発される海馬神経新生障害に対する抗酸化物質曝露効果の検討	
緒言	7
材料および方法	11
結果	18
考察	25
小括	32
第2章 α グリコシルイソクエルシトリンによる恐怖記憶消去学習促進効果発現に必要な曝露期間の検討	
緒言	34
材料および方法	37
結果	47
考察	54
小括	61
第3章 α グリコシルイソクエルシトリンによる恐怖記憶消去学習促進効果に対する自発的運動ないし環境エンリッチメントの修飾作用の検討	

緒言.....	63
材料および方法	64
結果.....	70
考察.....	72
小括.....	75
総合考察	76
結論.....	84
謝辞.....	86
引用文献.....	87
要旨	104
Abstract	107
図表	111

序論

ヒトなどの生物の表現型を決定する要素として、遺伝要因及び環境要因の2つが関与している。このうち、環境要因には栄養状態等を含む生活習慣及びストレス等を含む外的刺激がある。胎児期や幼児期の栄養条件等の環境要因は、成長の遅延等の可逆的な変化だけでなく、成熟後の性格、体質及び疾病のなりやすさ等に生涯にわたる不可逆的な影響を与えることが知られており、ヒトでは成人後の精神疾患や生活習慣病のリスク要因となると考えられている [40]。食品由来の抗酸化物質であるフラボノイド類は、直接的な抗酸化作用以外に神経細胞の保護作用、神経炎症の抑制作用ないし認知機能の修飾作用など様々な効果が報告されているが [94, 110], これらの発達期曝露による効果は不明な点が多い。本研究では、発達期からの抗酸化物質の曝露が生後の動物の神経構造や機能に及ぼす作用を明らかにすることを目的とし、正常な状態あるいは病的な状態のラットに対して抗酸化物質を曝露し、その効果を検討した。

第1章では、発達期の甲状腺機能低下によって生後に引き起こされる海馬歯状回における神経新生障害に酸化性ストレスが関与する可能性があるという報告に着目し、抗甲状腺剤である 6-プロピル-2-チオウラシル (PTU) の発達期曝露による神経新生障害が、抗酸化物質の共曝露により抑制されるかを検討した。この目的のため、フラボノイド系抗酸化物質として α グリコシルイソクエルシトリン (AGIQ) を、非フラボノイド系抗酸化物質として α リポ酸 (ALA) を選択した。PTU を 12 ppm の濃度で妊娠ラットに妊娠 6 日目から分娩後 21 日まで飲

水投与するとともに AGIQ を 5,000 ppm, ALA を 2,000 ppm の濃度で混餌投与し経胎盤的・経乳的に児動物に曝露した。PTU 曝露終了時の出生後 21 日目及び成熟後の出生後 77 日目の雄性児動物の脳を用いて、免疫組織化学的解析及び遺伝子発現解析を行い、神経新生障害に対する抗酸化物質の効果を検討した。

第 2 章では、正常な動物の神経発達に対する抗酸化物質の作用を検討した。所属研究室では、AGIQ ないし ALA を 5,000 ppm ないし 2,000 ppm の濃度でラットに妊娠 6 日目から生後 77 日目まで継続的曝露すると、AGIQ を曝露した児動物でのみ、成熟後に文脈的恐怖条件付け試験の消去学習テストにおいて消去学習効率の促進を示すことを見出している。そこでこの促進効果の得られる AGIQ の有効な曝露時期の決定と脳内機序の解明を目的として、異なる曝露時期を設定して神経行動テストを実施した。即ち、AGIQ の曝露時期を発達期曝露 (妊娠 6 日目から生後 30 日目まで)、離乳後曝露 (出生後 30 日目から成熟期まで) ないし全期間曝露 (妊娠 6 日目から成熟期まで) の 3 つの期間に分けて成熟後の学習機能に対する修飾作用を検討した。行動試験は、自発的運動及び不安様行動の検査としてオープンフィールド試験を、非空間記憶の検査として新奇物体探索試験を、情動記憶の検査として文脈的恐怖条件付け試験を、性成熟前 (出生後 23 日目から出生後 29 日目) および成熟期 (出生後 58 日目から出生後 79 日目) に行った。

第 3 章では、第 2 章で恐怖記憶の消去学習促進効果が確認された AGIQ の発達期から成熟期までの継続曝露と、認知機能改善効果が広く知られている自発的運動条件ないし環境エンリッチメント条件を組み合わせることによる、ラットの認知機能への修飾作用を検討するこ

とを目的とした実験を実施した。即ち, AGIQ を 5,000 ppm の濃度で妊娠 6 日目から成熟期まで継続的に混餌投与し, 出生後 21 日目の離乳時に無処置対照群および AGIQ 曝露群をそれぞれ, 通常ケージ飼育, 回転ケージ飼育ないし環境エンリッチメントケージ飼育に分け成熟期まで飼育した。行動試験は, 自発的運動及び不安様行動の検査としてオープンフィールド試験, 非空間記憶の検査として新奇物体探索試験, 空間記憶の検査として新奇位置探索試験, 情動記憶の検査として文脈的恐怖条件付け試験を成熟期 (出生後 60 日目から出生後 77 日目) に行った。

第 1 章

発達期の甲状腺機能低下により誘発される海馬神経新生障害に対する

抗酸化物質曝露効果の検討

緒言

海馬歯状回における顆粒細胞層下帯 (SGZ) では、神経新生と呼ばれる新しいニューロンの産生が生後に始まり、この神経新生は生涯にわたり継続する (Fig.1-1) [39, 91]。SGZにおける神経新生は、神経幹細胞の自己複製と娘神経前駆細胞の産出、前駆細胞の増殖、分化と最終有糸分裂、有糸分裂後の未熟顆粒細胞の成熟顆粒細胞への分化及び顆粒細胞層 (GCL) への移動を含む複数の発達段階から成る [39, 91]。顆粒細胞層に接する海馬歯状回門では、 γ -aminobutyric acid (GABA) 作働性の各種介在ニューロンが顆粒細胞層における顆粒細胞系譜の各細胞に投射しており、神経新生を制御している [91, 24]。また、GABA 作働性の入力以外にも、様々な種類のニューロンが海馬歯状回のニューロンに出力している。例えば、嗅内皮質のグルタミン酸作働性ニューロンは海馬歯状回に投射し、中隔核やブローカの対角帯核におけるコリン作働性ニューロンは海馬歯状回門へ投射しており [54]、これらの入力は SGZ における顆粒細胞系譜の適切な増殖及び分化の維持に重要であることが分かっている [24]。

甲状腺ホルモンは胎児期及び新生児期の脳発達に必要不可欠なホルモンで、ニューロンの増殖、移動、軸索の伸長、シナプス形成及びミエリン形成に重要な役割を果たしている [67]。先行研究では、ラット発達期の甲状腺機能障害が脳発達異常を引き起こし、固有の脳構造及び機能を損なうことが報告されている [67]。また、甲状腺機能障害はニューロンの移動を障害して脳梁における皮質下帯状異所性灰白質形成を誘発すると共に、軸索の髄鞘形成不全及び成熟希突起膠細胞の減少を伴った白質形成不全を引き起こす [89, 87]。ヒトでは、母体の甲

甲状腺ホルモンレベルが生まれてくる子供の認知機能と深く関係しており、母体の甲状腺機能低下が子供の自閉症スペクトラム障害 (ASD) の発症に関与していると考えられている [67]。ASD のような神経発達障害の病態形成において、神経新生、軸索伸長、シナプス形成及びシナプス可塑性などのニューロンの発達に関わるキーププロセスの関与が注目されている [28]。従って、実験的に発達期の甲状腺機能障害を誘発することで、実験的な ASD モデルとなる可能性がある [84]。

酸化ストレスは生体内における活性酸素種 (ROS) の産生と抗酸化防御機構の間の不均衡と定義され、神経変性疾患の病態や悪性腫瘍の形成に関与している。また、神経毒性物質による中枢ないし末梢の神経傷害の中には、酸化ストレスの誘導が深く関与するものが知られているが、神経毒性物質がどのように酸化ストレスを発生させ、どのように神経毒性を引き起こすのかといったメカニズムは明らかにされていない。海馬歯状回の SGZ における神経新生では、神経前駆細胞が高い増殖能及び分化能を示して高酸素要求性であることから、正常でも ROS を産生することが知られている [107]。このことより、海馬に酸化ストレスが誘導されるような状況下では、神経新生部位に ROS が強く誘導される可能性がある。甲状腺機能低下による脳組織への影響としては、発達期にあるラットないし成熟ラットに抗甲状腺剤を投与すると海馬における酸化ストレスが誘導されることが報告されている [15, 16]。更に、薬用植物である *Nigella sativa* の抽出物と抗甲状腺剤の PTU を胎児期から成熟期までラットに共曝露することで、PTU を単独曝露した場合と比較して海馬歯状回、アンモン角 (CA) 1 領域及び CA3 領域におけるアポトーシス細胞が減少することが報告されている [3]。従って、母体が甲

甲状腺機能を維持できない状況下で抗酸化物質投与を受けると、子供は甲状腺機能低下によって生じる海馬の傷害から保護を受ける可能性がある。

本章では、発達期のPTU曝露によって誘導された甲状腺機能低下に関連した海馬における神経新生障害を、発達期の抗酸化物質共曝露が抑制するかどうかを検討することを目的として実験を行った。この目的のため、抗酸化物質としてAGIQ及びALAを選択した。AGIQは酵素処理イソクエルシトリンとしても知られ、ルチンの酵素によるグルコシル化によって作られるフラボノイド配糖体である。ルチンは、そば (*Fagopyrum esculentum* Moench), ヘンルーダ (*Ruta graveolens* L.) 及びエンジュ (*Sophora Japonica* L.) 等の植物に豊富に含まれている天然のフラボノイドである。AGIQはイソクエルシトリンと1~10個ないしそれ以上の直鎖状グルコース分子によって α グルコシル化されたイソクエルシトリンの混合物であり、優れた水溶性及びバイオアベイラビリティを示す [2]。AGIQは抗酸化作用 [72] 以外にも、抗炎症作用 [45], 抗高血圧作用 [23], 抗アレルギー作用 [58], 及び発がん抑制作用を示すことが報告されている [72, 25, 26]。ALAはチオクト酸とも呼ばれる、生物の体内に存在する天然の抗酸化物質である [33]。ALA及びその還元型であるジヒドロリポ酸 (DHLA) は、直接的な抗酸化作用に加えて、生体内において酸化されたグルタチオン、ビタミンC、ビタミンE及びコエンザイムQ10の還元型への再生に関与する [6]。更に、DHLAは細胞のシステイン取り込みを促進することによりグルタチオン合成を促進する。つまり、DHLAは抗酸化酵素の再生を通して酸化ストレスの抑制に寄与している [6]。ALAは抗酸化作用によって心血管障害、糖尿病に伴う網膜症や末梢神経障害の合併症及び高血圧の予防ないし改善に効果を示すことが報

告されている [83]。体内に吸収された AGIQ 及び ALA は血液脳関門を通過し、脳に分布することが報告されており [102, 30], 脳内で抗酸化作用を発揮することが期待される。所属研究室の先行研究では、ラットの胎児期から成熟期までの継続的な AGIQ 曝露により、成熟後の文脈的恐怖条件付け試験において恐怖記憶の消去学習が促進することを見出し、それと関連して消去学習に関わる脳部位でのシナプス可塑性の増強を示唆する変化を捉えている [75]。ALA では、メチオニン及びコリン欠乏による脳の酸化ストレスを ALA が改善することが報告されている [105]。従って、発達期の甲状腺機能低下によって引き起こされる海馬歯状回の神経新生障害に酸化ストレスが関与しているならば、AGIQ ないし ALA の共曝露が海馬歯状回の神経新生障害を抑制する可能性があると考え、共曝露実験を企画した。

材料および方法

化学物質および供試動物

PTU (純度 >99%; CAS No. 51-52-5) は MilliporeSigma (St. Louis, MO, USA) から購入した。

AGIQ (純度 >97%) は三栄源エフ・エフ・アイ株式会社 (大阪, 日本) より提供された。

DL-ALA (純度 \geq 99%; CAS No. 1077-28-7) は東京化成工業株式会社 (東京, 日本) から購入した。50匹の交尾確認済み雌 Slc:SD ラットを妊娠 1 日目で日本エスエルシー株式会社 (浜松, 日本) より購入した。交尾確認済みのラットを, 入荷時から分娩後 21 日目まで温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 相対湿度 $55 \pm 15\%$, 照明条件 12 時間の明暗サイクルで個別にポリカーボネート製ケージに紙製床敷を入れ, 個別飼育した。PTU, AGIQ 及び ALA の投与開始までは, 基礎飼料 (CRF-1, 粉末, オリエンタル酵母株式会社, 東京, 日本) 及び飲料水を自由に摂取させた。児動物は出生後 21 日目 (出生日を 0 日目とする) に離乳させ, それ以降, 児動物は 3~5 匹/ケージで, 基礎飼料 (CRF-1, 粉末) 及び飲料水の自由摂食・自由飲水下で飼育した。

実験デザイン

交尾確認済みラットは妊娠 5 日目の体重を元に 4 群に分け, 基礎飼料及び飲料水のみ (14 匹, 無処置対照群), 基礎飼料及び 12 ppm の PTU を含む飲料水 (12 匹, PTU 単独群), 5,000 ppm の AGIQ を含む基礎飼料及び 12 ppm の PTU を含む飲料水 (12 匹, PTU + AGIQ 群), 2,000 ppm の ALA を含む基礎飼料及び 12 ppm の PTU を含む飲料水 (12 匹, PTU + ALA 群) を妊娠 6 日

目から出産後 21 日目まで混餌ないし飲水投与した。PTU 濃度は、所属研究室の先行研究で児動物の海馬に明らかな神経発達異常を認めた 12 ppm を選択した [85]。AGIQ 濃度及び ALA 濃度は、所属研究室の先行研究でラットの二段階肝発がんモデルにおいて前がん病変形成の抑制を示した 5,000 ppm 及び 2,000 ppm を選択した [25, 26]。

母動物は、妊娠 6 日目から出産後 21 日目まで体重、摂餌量及び摂水量を週に 2 回の頻度で測定した。出生後 4 日目に児動物の間引きを行い、各母動物に 8 匹の児動物 (6 匹ないし 7 匹の雄と 1 匹ないし 2 匹の雌) になるように調整した。雄の数が 6 匹に満たない母動物には、児動物数が 8 匹となるように雌動物で充当した。全ての母動物及び児動物は、体重測定の際に一般状態の観察を行った。母動物は出産後 21 日目に CO₂/O₂ 麻酔下で腹大動脈切断によって放血し、安楽死させた。

神経新生は性周期によるステロイドホルモンレベルの変動に影響を受けるため、本研究では雄性児動物を免疫組織化学的解析及び遺伝子発現解析に使用した [78]。出生後 21 日目に、各群 10 匹の雄性児動物 (1 匹／母動物) について、免疫組織学的検討のため、CO₂/O₂ 麻酔下で氷冷した 4% (w/v) paraformaldehyde (PFA)／0.1M リン酸バッファー (pH 7.4) により灌流固定を行った (流速 10 mL／分)。遺伝子発現解析のため、各群 6 匹の雄性児動物 (1 匹／母動物) を CO₂/O₂ 麻酔下で腹大動脈切断による放血で安楽死させ、脳を摘出し 4°C のメタカーンで 4 時間、固定した。脂質過酸化レベルの検討のため、各群 6～8 匹の雄性児動物 (1 匹／母動物) を CO₂/O₂ 麻酔下で腹大動脈切断による放血で安楽死させ、脳を摘出後、脳から両側の海馬を採取し-80°C にて保存した。残りの雄性児動物は出生後 77 日目まで PTU, AGIQ ないし ALA

を含まない基礎飼料により飼育し、体重、摂餌量及び摂水量を1回／週の頻度で測定した。

出生後 77 日に、各群 8～10 匹の雄児動物 (1 匹／母動物) について、免疫組織学的検討のため、CO₂/O₂ 麻酔下で氷冷した 4% (w/v) PFA／0.1M リン酸バッファー (pH 7.4) により灌流固定を行った (流速 35 mL／分)。遺伝子発現解析のため、各群 6～8 匹の雄性児動物 (1 匹／母動物) を CO₂/O₂ 麻酔下で腹大動脈切断による放血で安楽死させ、脳を摘出し 4°C のメタカーン (メタノール：クロロホルム：酢酸 = 6 : 3 : 1) で 4 時間固定した。

本研究における PTU 曝露のタイミングと期間、及び剖検時期は、当研究室の先行研究と同様に [89], 経済開発協力機構の試験ガイドライン 426 (発達神経毒性試験) に従って設定した [74]。すべての動物実験計画は、国立大学法人東京農工大学の動物実験倫理委員会に提出して承認を受け、動物飼育、管理にあつては、国立大学法人 東京農工大学の実験取扱い倫理規定に従った。

免疫組織学的解析及びアポトーシス細胞の検出

4% PFA バッファー灌流固定を行った出生後 21 日目及び 77 日目の雄性児動物から脳を摘出し、同じ固定液を用いて 4°C で一昼夜固定した。無処置対照群では、脳の bregma の後方約 3.0 mm (出生後 21 日目) 及び約 3.5 mm (出生後 77 日目) の 1 箇所で冠状断面を作製し、そこから前後に 3 mm 厚のスライスを作製した。PTU を曝露した群では、脳が小さいことが判明したため、無処置対照群と相対的に同じ位置になるようにスライス (冠状断) を作製した。脳スライスは 4% PFA バッファーを用いて 4°C で更に一昼夜固定し、標準プロトコールに従って

パラフィン包埋した後, 3 μm 厚の連続切片を作製した。切片は Table 1-1 に示した条件で以下の抗原に対する一次抗体 (4°C, 一晚) を用いて免疫染色を行った。細胞増殖活性の指標である proliferating cell nuclear antigen (PCNA), SGZ における type-1 神経幹細胞 (放射状グリア細胞) の指標及びアストロサイトの指標である glial fibrillary acidic protein (GFAP) [91], SGZ における type-1 神経幹細胞及び type-2a 神経前駆細胞の指標である SRY box 2 (SOX2) [39], SGZ における type-2b 神経前駆細胞の指標である T-box brain 2 (TBR2) [39], SGZ 及び GCL における type-2b 及び type-3 神経前駆細胞及び未熟顆粒細胞の指標である doublecortin (DCX) [91], SGZ 及び GCL における未熟及び成熟顆粒細胞の指標である neuronal nuclei (NeuN) [91], 海馬歯状回門における GABA 性介在ニューロンの指標である reelin (RELN), parvalbumin (PVALB), calbindin-D-29K (CALB2), somatostatin (SST) [24], シナプス可塑性に関与する最初期遺伝子である activity-regulated cytoskeleton-associated protein (ARC), Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit (FOS) 及び cyclooxygenase 2 (COX2) [36, 17] について免疫染色を実施した。内因性ペルオキシダーゼの不活化には 0.3% (v/v) 過酸化水素水を含むメタノール溶液 (室温, 30 分) を用いた。シグナル検出は VECTASTAIN[®] Elite ABC Kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) を用いて製造元のプロトコールに従って実施し, 免疫反応は 3,3'-diaminobenzidine (DAB)/H₂O₂ を用いて可視化した後, ヘマトキシリンにより対比染色した。各分子について, 1 個体につき 1 切片を免疫染色に供した。

海馬歯状回の SGZ におけるアポトーシス検出のため, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL) 染色を, ApopTag[®] Peroxidase *In situ* Apoptosis Detection kit

(MilliporeSigma; St. Louis, MO, USA) を用いて製造元のプロトコールに従って実施し、DAB/H₂O₂ を用いて可視化した。TUNEL 染色について、1 個体につき 1 切片を染色に供した。

免疫組織化学染色および TUNEL 染色陽性細胞数の定量解析

SGZ 及び／ないし GCL における PCNA⁺, GFAP⁺, SOX2⁺, TBR2⁺, DCX⁺, NeuN⁺, ARC⁺, FOS⁺, COX2⁺ 及び TUNEL⁺ 細胞数は、脳の両側でカウントし SGZ の単位長当たりの陽性細胞数を算出した (Fig. 1-1)。海馬歯状回門に分布する RELN⁺, PVALB⁺, CALB2⁺, SST⁺ 及び NeuN⁺ 細胞数は、脳の両側でカウントし海馬歯状回門の単位面積当たりの陽性細胞数を算出した (Fig. 1-1)。その際、海馬歯状回門における CA3 領域の錐体ニューロンは陽性細胞のカウントから除外した。GCL における NeuN⁺ 細胞を除き、各陽性細胞ないし TUNEL⁺ アポトーシス細胞は BX53 システム生物顕微鏡 (オリンパス株式会社, 東京, 日本) を用いて手作業でカウントした。GCL における NeuN⁺ 細胞は、BX53 システム生物顕微鏡に装着した DP72 デジタルカメラシステム (オリンパス株式会社) で撮影した 200 倍の倍率の写真から、WinROOF 画像解析ソフト (バージョン 5.7; 三谷商事株式会社, 福井, 日本) を用いて陽性細胞数をカウントした。SGZ の長さ及び海馬歯状回門の面積は 40 倍の倍率の顕微鏡画像を用いて cellSens Standard (バージョン 1.9; オリンパス株式会社) を用いて測定した。

遺伝子発現解析

出生後 21 日及び 77 日目の児動物海馬歯状回における転写レベルをリアルタイム逆転写ポ

リメーラゼ連鎖反応 (RT-PCR) を用いて解析した。脳組織はメタカーンを用いた全脳固定法に従って採取した [1]。大脳の Bregma の後方約 3.0 mm の 1 箇所でも冠状断面を作製し、そこから後方に 2 mm 厚のスライス (冠状断) を作製し、1 mm 径の生検トレパン (貝印株式会社, 岐阜, 日本) を用いて海馬歯状回組織を採取した。AllPrep DNA/RNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて total RNA を抽出した (n = 6/群)。20 ないし 200 ng の total RNA から SuperScript® III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて cDNA を合成した。Table 1-2 に示した遺伝子の転写レベル解析に用いるプライマーは、Primer Express software (Version 3.0; Thermo Fisher Scientific) で設計した。リアルタイム PCR は SYBR®Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) 及び Step One Plus™ Real-time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用いて製造元のプロトコールに従って実施した。各遺伝子の転写レベルは、目的の遺伝子の C_T 値及び内因性コントロールである hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*Hprt1*) ないし glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) の C_T 値から ΔC_T 値を算出し、次いで無処置対照群と各処置群の間で $\Delta\Delta C_T$ 値を算出して比較した [57]。

脂質過酸化測定

生後 21 日目の雄性児動物の海馬 (6~8 匹/群, 1 匹/母動物) における脂質過酸化レベルを推定するために、Malondialdehyde Assay Kit (Northwest Life Science Specialties, LLC, Vancouver, WA, USA) を用いて製造元のプロトコールに従ってチオバルビツール酸反応性物質

(TBARS) レベルを測定した。マロンジアルデヒド濃度は 532 nm の吸光度を測定して決定した。マロンジアルデヒド量は nmol MDA/g organ weight として示した。

統計学的解析

母動物の体重及び脳重量は個体ごとの値を実験単位として群平均値及び標準偏差を算出した。児動物の体重、脳重量、免疫組織化学染色及び TUNEL 染色における陽性細胞のカウント数及び遺伝子発現解析結果についてはひと腹を実験単位として母動物ごとに平均値を算出し、更に群平均値及び標準偏差を算出した。統計解析では、体重、摂餌量、摂水量、脳重量、免疫染色及び TUNEL 染色における各種陽性細胞カウント数及び遺伝子発現解析結果について、まず Levene 検定により分散性の検定を行い、等分散の場合は Tukey 検定を用いて、不等分散の場合は Bonferroni 補正をした Aspin-Welch の t 検定を用いて、無処置対照群と各処置群の間ならびに PTU 単独群と各抗酸化物質併用群の間で対比較を行った。全ての統計解析は、IBM SPSS Statistics (ver. 25; IBM Corporation, Armonk, NY, USA) を用いて行い、それぞれの検定の有意水準は $P<0.05$ とした。

結果

母動物への影響

PTU + AGIQ 群の 1 例に未妊娠動物がみられたため実験から除外した。これにより，無処置対照群, PTU 単独群, PTU + AGIQ 群, PTU + ALA 群の母動物数はそれぞれ 14, 12, 11 及び 12 例となった。着床痕数及び産仔数について，無処置対照群と各処置群の間ないし PTU 単独群と各抗酸化物質併用群の間に有意な変化はなかった (Table 1-3)。体重では, PTU 単独群は出産後 4 日目～9 日目に, PTU + ALA 群は妊娠 21 日目～出産後 21 日目に, 無処置対照群と比較して低値を示した (Table 1-4)。また, PTU + ALA 群は妊娠 21 日目～出産後 21 日目に PTU 単独群と比較して体重の低値を示した (Table 1-4)。摂餌量では, PTU 単独群及び PTU + AGIQ 群は妊娠 14 日目～17 日目及び出産後 1 日目～20 日目に, PTU + ALA 群は妊娠 6 日目～出産後 20 日目に, 無処置対照群と比較して低値を示した (Table 1-5)。また, PTU + ALA 群は妊娠 10 日目, 出産後 6 日目及び出産後 13 日目～20 日目に PTU 単独群と比較して摂餌量の低値を示した (Table 1-5)。摂水量では, PTU 単独群及び PTU + AGIQ 群は出産後 1 日目～20 日目に, PTU + ALA 群は妊娠 6 日目～14 日目及び出産後 1 日目～20 日目に, 無処置対照群と比較して低値を示した (Table 1-6)。また, PTU + ALA 群は妊娠 10 日目, 妊娠 14 日目, 出産後 6 日目及び出産後 13 日目～20 日目に PTU 単独群と比較して摂水量の低値を示した (Table 1-6)。出産後 21 日目の剖検時の体重では, PTU + ALA 群は無処置対照群及び PTU 単独群のいずれと比較した場合も低値を示した (Table 1-3)。摂水量の群内平均値を元に算出される PTU 単独群, PTU +

AGIQ 群ないし PTU + ALA 群における一日あたりの PTU 摂取量は、妊娠期間ではそれぞれ 1.34, 1.37 及び 1.18 mg/kg 体重/日、授乳期間ではそれぞれ 2.29, 2.30 及び 2.19 mg/kg 体重/日であった。抗酸化物質の摂取量については、妊娠期間では AGIQ が 274.7 mg/kg 体重/日, ALA が 96.9 mg/kg 体重/日、授乳期間では AGIQ が 544.5 mg/kg 体重/日, ALA が 205.8 mg/kg 体重/日であった。

児動物への影響

出生後 21 日目及び出生後 77 日目の雄性児動物の体重及び脳重量では、PTU 単独群、PTU + AGIQ 群及び PTU + ALA 群が、無処置対照群と比較して低値を示した (Table 1-7)。また、PTU + ALA 群では、PTU 単独群と比較して出生後 21 日目の雄性児動物の体重の低値を認めた (Table 1-7)。

雄性児動物の SGZ 及び GCL における顆粒細胞系譜の細胞数の変動

出生後 21 日目の PTU 単独群では、無処置対照群と比較して、GFAP⁺細胞数及び TBR2⁺細胞数並びに NeuN⁺細胞数が減少したが、一方で、SOX2⁺細胞数及び DCX⁺細胞数について有意な変動はなかった (Fig. 1-2, 1-3)。PTU + AGIQ 群では、無処置対照群と比較して、DCX⁺細胞数が減少した (Fig. 1-2, 1-3)。各抗酸化物質併用群では、PTU 単独群と比較して、GFAP⁺細胞数、SOX2⁺細胞数、TBR2⁺細胞数、DCX⁺細胞数及び NeuN⁺細胞数のいずれについても有意な変動はなかった (Fig. 1-2, 1-3)。

出生後 77 日目の PTU 単独群では、無処置対照群と比較して、TBR2⁺細胞数が減少したが、一方で、GFAP⁺細胞数、SOX2⁺細胞数、TBR2⁺細胞数並びに NeuN⁺細胞数について有意な変動はなかった (Fig. 1-2, 1-4)。各抗酸化物質併用群では、PTU 単独群と比較して、GFAP⁺細胞数、SOX2⁺細胞数、TBR2⁺細胞数、DCX⁺細胞数及び NeuN⁺細胞数のいずれについても有意な変動はなかった (Fig. 1-2, 1-4)。

雄性児動物の歯状回門における成熟ニューロンおよび介在ニューロンの分布

出生後 21 日目の PTU 単独群では、無処置対照群と比較して、PVALB⁺細胞数が減少したが、一方で、RELN⁺細胞数、CALB2⁺細胞数、SST⁺細胞数及び NeuN⁺細胞数について有意な変動はなかった (Fig. 1-2, 1-5)。各抗酸化物質併用群では、PTU 単独群と比較して、PVALB⁺細胞数、RELN⁺細胞数、CALB2⁺細胞数、SST⁺細胞数及び NeuN⁺細胞数のいずれについても有意な変動はなかった (Fig. 1-2, 1-5)。

出生後 77 日目の PTU 単独群では、無処置対照群と比較して、歯状回門における PVALB⁺細胞数が減少したが、一方で、RELN⁺細胞数、CALB2⁺細胞数、SST⁺細胞数及び NeuN⁺細胞数の変動はなかった (Fig. 1-2, 1-6)。各抗酸化物質併用群では、PTU 単独群と比較して PVALB⁺細胞数、RELN⁺細胞数、CALB2⁺細胞数、SST⁺細胞数及び NeuN⁺細胞数のいずれについても有意な変動はなかった (Fig. 1-2, 1-6)。

雄児動物の SGZ 及び GCL における細胞増殖活性およびアポトーシス細胞数の変動

出生後 21 日目及び出生後 77 日目の PTU 単独群では、無処置対照群と比較して、SGZ における PCNA⁺細胞数及び SGZ 及び GCL における TUNEL⁺細胞数のいずれについても有意な変動はなかった (Fig. 1-7, 1-8, 1-9)。各抗酸化物質併用群では、PTU 単独群と比較して、PCNA⁺細胞数及び TUNEL⁺細胞数のいずれについても有意な変動はなかった (Fig. 1-7, 1-8, 1-9)。

雄児動物の GCL におけるシナプス可塑性関連分子陽性細胞数の変動

出生後 21 日目の PTU 単独群では、無処置対照群と比較して、GCL における ARC⁺細胞数及び FOS⁺細胞数が減少した (Fig. 1-7, 1-10)。PTU + AGIQ 群では、無処置対照群と比較して、COX2⁺細胞数が減少した (Fig. 1-7, 1-10)。各抗酸化物質併用群では、PTU 単独群と比較して、ARC⁺細胞数、FOS⁺細胞数及び COX2⁺細胞数のいずれについても有意な変動はなかった (Fig. 1-7, 1-10)。

出生後 77 日目の PTU 単独群では、無処置対照群と比較して、ARC⁺細胞数、FOS⁺細胞数及び COX2⁺細胞数のいずれについても有意な変動はなかった (Fig. 1-7, 1-11)。各抗酸化物質併用群では、PTU 単独群と比較して、ARC⁺細胞数、FOS⁺細胞数及び COX2⁺細胞数のいずれについても有意な変動はなかった (Fig. 1-7, 1-11)。

雄児動物の海馬歯状回における遺伝子発現解析

出生後 21 日目の PTU 単独群では、無処置対照群と比較して、顆粒細胞系譜の分化指標をエンコードする *Sox2* 及び *Dcx* 発現については有意な変動はなかったが、一方で、*Eomes* (別

名：*Tbr2*) 発現は減少した (Table 1-8)。各抗酸化物質併用群では、PTU 単独群と比較して、*Sox2* 発現の有意な変動はなかったが、PTU + AGIQ 群では *Dcx* 発現が増加し、PTU + ALA 群では *Eomes* 及び *Dcx* 発現が増加した (Table 1-8)。GABA 性介在ニューロン指標では、PTU 単独群で、無処置対照群と比較して、*Pvalb* 発現の減少を認めた (Table 1-8)。*Reln* 及び *Sst* については、PTU 単独群と無処置対照群の間に有意な変動はなかった (Table 1-8)。各抗酸化物質併用群では、PTU 単独群と比較して、*Pvalb* 発現の有意な変動はなかったが、*Reln* 及び *Sst* 発現の増加を認めた (Table 1-8)。グルタミン酸受容体サブユニットをエンコードする遺伝子では、PTU 単独群で、無処置対照群と比較して、*Gria1* 及び *Gria2* 発現の有意な変動はなかったが、*Gria3*, *Grin2a* 及び *Grin2b* 発現の減少を認めた (Table 1-8)。各抗酸化物質併用群では、PTU 単独群と比較して、*Gria1*, *Gria2*, *Gria3*, *Grin2a* 及び *Grin2b* 発現が増加した (Table 1-8)。アセチルコリン受容体サブユニットをエンコードする *Chrna7* では、PTU 単独群と無処置対照群の間に有意な変動はなかった (Table 1-8)。PTU + AGIQ 群では、PTU 単独群と比較して、*Chrna7* 発現が増加した (Table 1-8)。神経栄養因子及びその受容体をエンコードする *Bdnf* 及び *Ntrk2* については、PTU 単独群と無処置対照群の間に発現の有意な変動はなかった (Table 1-8)。各抗酸化物質併用群では、PTU 単独群と比較して、*Bdnf* 発現が増加した (Table 1-8)。シナプス可塑性に関わる遺伝子では、PTU 単独群で、無処置対照群と比較して、*Arc*, *Efnb3*, *Ephb1* 及び *Ptgs2* 発現の有意な変動はなかったが、一方で、*Fos*, *Epha4* 及び *Ephb2* 発現の減少を認めた (Table 1-8)。各抗酸化物質併用群では、PTU 単独群と比較して、*Arc*, *Epha4* 及び *Ptgs2* 発現が増加した (Table 1-8)。PTU + AGIQ 群では、PTU 単独群と比較

して, *Efnb3* 発現が増加し, *Ephb1* 発現が減少した (Table 1-8)。幹細胞因子及びその受容体をエンコードする *Kitlg* 及び *Kit* について, PTU 単独群と無処置対照群の間で有意な変動はなかった (Table 1-8)。各抗酸化物質併用群では, PTU 単独群と比較して, *Kitlg* 発現が減少し, *Kit* 発現が増加した (Table 1-8)。インスリン様成長因子の受容体をエンコードする *Igf1r* 及び *Igf2r* について, PTU 単独群と無処置対照群の間に有意な変動はなかった (Table 1-8)。各抗酸化物質併用群では, PTU 単独群と比較して, *Igf2r* 発現が増加した (Table 1-8)。PTU + ALA 群では, PTU 単独群と比較して, *Igf1r* 発現が増加した (Table 1-8)。細胞増殖の指標である *Pcna* では, PTU 単独群と無処置対照群の間ないし各抗酸化物質併用群と PTU 単独群の間で有意な変動はなかった (Table 1-8)。PTU 単独群では, 無処置対照群と比較して, 細胞周期の制御に関わる *Cdkn1a* 発現が減少した (Table 1-8)。各抗酸化物質併用群では, PTU 単独群と比較して, *Cdkn1a* 発現が減少した (Table 1-8)。アポトーシスに関わる遺伝子については, *Casp3*, *Casp6*, *Bcl2* 及び *Bax* のいずれについても, PTU 単独群と無処置対照群の間ないし各抗酸化物質併用群と PTU 単独群の間で有意な変動はなかった (Table 1-8)。

出生後 77 日目では, PTU 単独群では, 無処置対照群と比較して, *Arc* 発現が減少したが, *Gria1*, *Gria3*, *Grin2a*, *Grin2b*, *Bdnf*, *Efnb3*, *Kitlg* 及び *Kit* 発現の有意な変動はなかった (Table 1-9)。各抗酸化物質併用群では, PTU 単独群と比較して, *Arc* 及び *Efnb3* 発現の有意な変動はなかったが, *Gria1*, *Gria3*, *Grin2a*, *Grin2b* 及び *Bdnf* の発現が増加した (Table 1-9)。PTU + ALA 群では, PTU 単独群と比較して, *Kitlg* の発現が増加した (Table 1-9)。

雄児動物の海馬における脂質過酸化レベル

出生後 21 日目の雄性児動物海馬において、脂質過酸化指標である MDA レベルについて、PTU 単独群と無処置対照群の間ないし各抗酸化物質併用群と PTU 単独群の間で有意な変動はなかった (Fig. 1-12)。

考察

本章では、発達期の甲状腺機能低下に関連した海馬歯状回における神経新生障害が、抗酸化物質の併用により抑制されるかどうかを検討した。抗酸化物質として AGIQ 及び ALA を選択し、抗甲状腺剤の PTU と共にラットに発達期曝露した。曝露終了時の出生後 21 日目及び性成熟後の出生後 77 日目において、海馬歯状回における神経新生に対する影響を免疫組織学的解析および遺伝子発現解析を用いて検討した。

所属研究室の先行研究では、母動物に対する 10 ppm の PTU 曝露によって生じる児動物の甲状腺機能低下と関連して、PTU 曝露終了直後の出生後 21 日目の児動物で、海馬歯状回の SGZ において type-1 神経幹細胞である GFAP⁺細胞の数が減少すること、SGZ ないし GCL において type-2b 及び type-3 神経前駆細胞並びに未熟顆粒細胞に相当する DCX⁺細胞の数が減少することを報告した [89]。本実験では、12 ppm の PTU の発達期曝露により先行研究と一致して、SGZ における GFAP⁺細胞数の減少、SGZ 及び GCL における DCX⁺細胞数の減少傾向を認めた。更に本実験では、type-2b 神経前駆細胞である TBR2⁺細胞数の減少及び未熟顆粒細胞及び成熟顆粒細胞に相当する NeuN⁺細胞数の減少も認めたが、これは、先述した先行研究よりも高濃度の PTU を曝露したことにより、甲状腺機能低下と関連した神経新生障害への影響が増大したことが原因となった可能性がある。海馬歯状回の顆粒細胞系譜において、甲状腺ホルモン受容体 $\alpha 1$ は type-2b 以降の神経前駆細胞及び顆粒細胞に発現しており、これらの細胞の生存や分化を制御することが報告されている [46]。つまり、先行研究では 10 ppm の PTU 曝露の

影響が DCX⁺細胞数の減少のみに止まったのに対し [89], 本研究では 12 ppm の PTU 曝露によって TBR2⁺細胞から NeuN⁺細胞まで細胞数の減少を認めており, 先行研究よりも広範囲の分化障害が生じた可能性がある。更に, 出生後 77 日では, 10 ppm の PTU を曝露した先行研究では顆粒細胞系譜における変化の殆どが消失したのに対し, 12 ppm の PTU を曝露した本研究では引き続き TBR2⁺細胞数の減少を認めた。この結果は, PTU 曝露量の増大によって神経新生障害の一部が成熟後まで残存したことを示唆する。

GABA 性介在ニューロンの分布について, 所属研究室の先行研究では 10 ppm の PTU の発達期曝露により出生後 21 日目に RELN⁺細胞, CALB2⁺細胞及び SST⁺細胞数の増加並びに PVALB⁺細胞数の減少を認めた [89]。先行研究と一致して, 本研究では PTU 単独群で出生後 21 日目に海馬歯状回門における PVALB⁺細胞数の減少を認めたが, RELN⁺細胞, CALB2⁺細胞及び SST⁺細胞数の変動を認めなかった。先行研究の結果の一部が再現されなかった原因は明らかでないが, PTU 曝露による発達の抑制が神経細胞の分布に影響を与えた可能性がある。本研究における出生後 21 日目の PTU 単独群の雄性児動物の体重は, 先行研究で 10 ppm の PTU を曝露した群の雄性児動物と比べて約 18%小さかった [89]。出生後 21 日目の PTU 単独群の雄性児動物で認められた海馬歯状回門における PVALB⁺細胞数の減少は, 先行研究と一致して出生後 77 日目にも引き続き認められた [29]。シナプス可塑性に関わるタンパク質の陽性細胞の分布について, 所属研究室の先行研究では 10 ppm の PTU の発達期曝露により, 出生後 21 日目に ARC⁺細胞数及び COX2⁺細胞数の減少を認めた [89, 88]。本研究では PTU 単独群で出生後 21 日目に ARC⁺細胞数及び FOS⁺細胞数の減少を認め, COX2⁺細胞数は変動を認めなかつ

た。本研究と先行研究の結果が一致しなかった原因は明らかでなかったが、GABA 性介在ニューロンと同様に発達の抑制がシナプス可塑性に関わるタンパク質の発現変動にも影響した可能性がある。出生後 21 日目の PTU 単独群の雄性児動物で認められた ARC^{+} 細胞数ないし FOS^{+} 細胞数の減少は、出生後 77 日目には無処置対照群と同程度まで回復した。

甲状腺ホルモンの重要な機能のひとつは細胞のエネルギー代謝の促進であり、結果として脳を含む様々な器官で活性酸素種の産生に関与する [48, 104]。しかしながら、500 ppm の PTU をラットに出生時から出生後 25 日目までは母動物を介して、出生後 25 日目の離乳時から出生後 30 日目までは児動物に直接曝露すると、出生後 7 日目、15 日目及び 30 日目の雄性児動物の脳皮質における脂質過酸化レベルが低下する、あるいは変動しないことが報告されている [5]。この報告の PTU 投与量や解析部位は本研究とは異なるものの、発達期の甲状腺機能低下が発達中の脳において酸化ストレスを発生させないことを示唆している。一方で、授乳期の母ラットへの 500 ppm の PTU 曝露によって出生後 15 日目の雄性児動物の海馬における脂質過酸化レベルが僅かに上昇したという報告もある [16]。本研究では、母動物を介した 12 ppm の PTU 曝露による児動物の甲状腺機能低下が、出生後 21 日目の PTU 曝露終了時の海馬における脂質過酸化レベルを変化させないことを明らかにした。この結果は、本実験条件では酸化ストレスは発達期の甲状腺機能低下に起因する海馬の神経新生障害に本質的には関与しないことを示唆する。 $PVALB^{+}$ GABA 性介在ニューロンは甲状腺ホルモン受容体 $\alpha 1$ を発現しており、それらの介在ニューロンの発達や機能は甲状腺ホルモンに高度に依存していることが報告されている [34]。 $PVALB^{+}$ GABA 性介在ニューロンが海馬の神経新生を制御してい

ることを考慮すると [24, 101], 本研究の結果は甲状腺機能低下による神経新生障害の原因が発達期の海馬における酸化ストレスではなく, 甲状腺ホルモンの欠乏自体であることを示唆している。

本研究では, PTU と AGIQ ないし ALA の共曝露が免疫組織化学的解析における海馬の神経新生障害を抑制しなかった。しかし, PTU 曝露によって出生後 21 日目の海馬で認めた *Eomes* (別名 : *Tbr2*), *Gria3*, *Grin2a*, *Grin2b* 及び *Epha4* の発現減少が, AGIQ ないし ALA の共曝露によって転写レベルでは回復することを明らかにした。TBR2 は海馬の神経新生において神経前駆細胞の運命決定に重要な役割を果たす転写因子のひとつである [39]。 *Gria3* は alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid (AMPA) 型グルタミン酸受容体サブユニットのひとつをエンコードしている [32]。AMPA 型グルタミン酸受容体は脳の広範な領域に分布しており, Ca^{2+} のニューロンへの流入を制御することでシナプス可塑性を制御している [20]。 *Grin2a* 及び *Grin2b* は N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) 型グルタミン酸受容体サブユニットの GluN2A 及び GluN2B をそれぞれエンコードしている。これらのグルタミン酸受容体サブユニットは海馬における長期増強ないし長期抑圧と呼ばれる異なる種類のシナプス可塑性に関与している [82]。NMDA 受容体は海馬における神経新生を制御することが知られている [14]。 *Epha4* は EPH 受容体のひとつをエンコードしており, 海馬においてニューロンの樹状突起におけるスパイン形成や神経新生を制御する [70, 90]。従って, AGIQ ないし ALA の PTU との共曝露によってこれらの遺伝子発現が回復したことは, 海馬におけるシナプス可塑性亢進ないし神経新生の促進を示唆する。これらの変化と一致して, 本研究では抗酸化物

質の共曝露により PTU 単独投与と比べて出生後 21 日目の海馬歯状回で、シナプス可塑性に関与することが報告されている *Gria1*, *Gria2*, *Bdnf*, *Arc*, *Efnb3* 及び *Ptgs2* 発現レベルの上昇を認めた [46, 20, 106, 81, 42]。更に、本研究では AGIQ ないし ALA の PTU との共曝露によって出生後 21 日目の海馬歯状回で、PTU 単独曝露と比べて *Dcx*, *Reln*, *Sst*, *Kit*, *Igf1r* 及び *Igf2r* 発現レベルの上昇並びに *Kitlg* 発現レベルの減少を認めた。DCX は神経前駆細胞ないし未熟顆粒細胞に発現し、細胞の移動に関与する [9]。RELN は抑制性の介在ニューロンに発現し、神経前駆細胞の移動の制御に関与する [31]。従って、DCX 及び RELN の発現上昇は神経前駆細胞の移動を含め、神経新生の促進に関与している可能性がある。SST は、GABA 作働性の抑制性介在ニューロンで発現するタンパク質で、神経回路の活動に重要な役割を果たしている [49]。また、ラット大脳皮質ニューロンの初代培養細胞を用いた実験では、BDNF の一過性過剰発現により *Sst* 発現レベルが上昇することが報告されている [86]。BDNF は海馬の顆粒細胞によって産生される神経栄養因子で、TRKB 受容体活性化を介した海馬歯状回門の介在ニューロンの成長促進効果を発揮し、SGZ の神経前駆細胞の分化と成熟を促進する [109]。先述したように、本研究では抗酸化物質の共曝露によって出生後 21 日目の海馬歯状回で *Bdnf* 及び *Sst* 発現レベル上昇を認めた。これらの結果は、*Sst* 発現レベルの上昇が、BDNF-TRKB シグナルによって引き起こされ、type-1 神経幹細胞数の減少に対する代償的反応を反映している可能性があることを示唆している。*Kit* は幹細胞成長因子の受容体である KIT をエンコードしており、*Kitlg* は幹細胞成長因子の SCF をそれぞれエンコードしている。*Kit* を介した SCF シグナルは、*in vitro* 及び *in vivo* とともに神経新生を促進することが知られている [44]。本研究における *Kit*

発現レベルの上昇は、抗酸化物質共曝露による神経前駆細胞の増殖促進を反映した変化の可能性がある。*Igf1r* 及び *Igf2r* はそれぞれインスリン様成長因子受容体の IGF1R 及び IGF2R をエンコードしており、海馬における神経新生を制御する [71, 7]。従って、これらの受容体遺伝子の発現レベル上昇は SGZ におけるインスリン様成長因子を介した増殖シグナルに対する感度の上昇を示唆している。

先述したように、本研究では PTU の発達期曝露終了時の海馬で脂質過酸化レベルの変動を認めなかった。また、AGIQ ないし ALA の共曝露によっても海馬の脂質過酸化レベルは変動しなかった。これらの結果は、AGIQ ないし ALA の共曝露による出生後 21 日目の海馬における多くの遺伝子の発現変動が、酸化ストレスに対する抗酸化作用とは異なる未知のメカニズムによるものであることを示唆する。現在、神経系におけるフラボノイドのような天然の抗酸化物質による生物学的作用は、直接的な（古典的な）抗酸化作用ではなく [94]、むしろ様々なシグナル伝達経路を介したニューロンの保護作用、神経機能の亢進作用、神経組織の再生促進作用及び神経新生の促進作用等であると考えられている [94, 111]。

本研究では、発達期の甲状腺機能低下に対し AGIQ ないし ALA を共曝露することで、免疫組織化学的解析では効果が明らかではなかったものの、転写レベルでは海馬歯状回におけるシナプス可塑性増強及び神経新生促進を示唆する変動を捉えた。甲状腺ホルモンは細胞骨格の再構築を介して mRNA の安定化や翻訳の促進に関与することが報告されている [92]。従って、本研究では AGIQ ないし ALA の共曝露によって増加した転写産物が、甲状腺機能低下によって効率的に翻訳されなかった可能性がある。出生後 77 日目には、AGIQ ないし ALA 共曝

露によって PTU 単独曝露と比べて *Gria1*, *Gria3*, *Grin2a*, *Grin2b*, *Bdnf* 及び *Kitlg* 発現レベル上昇を認めた。これらの変動は、成熟後にも TBR2⁺細胞数及び PVALB⁺細胞数の減少が継続していることに対する代償的な反応の可能性はある。

結論として、発達期の甲状腺機能低下に起因する海馬の神経新生障害が、AGIQ ないし ALA の共曝露によって抑制されないことを明らかとなった。また、発達期の甲状腺機能低下及び抗酸化物質の共曝露は、海馬における脂質過酸化レベルを変化させないことが明らかとなった。これらの結果は、発達期の甲状腺機能低下に起因する海馬の神経新生障害に対して酸化ストレスは基本的には関与していないことを示唆する。発達期の甲状腺機能低下に対する抗酸化物質の併用により、曝露終了時の海馬歯状回で様々な機能の遺伝子の発現レベルが上昇したことは、抗酸化作用よりもむしろ神経保護作用によるものである可能性が高い。抗酸化物質の併用により様々な機能の遺伝子の発現レベルが上昇したものの、神経新生障害の抑制を認めなかったことは、甲状腺機能低下による mRNA 不安定化ないし翻訳障害によることが示唆された。

小括

第 1 章では、発達期の甲状腺機能低下による海馬の神経新生障害が、抗酸化物質の共曝露によって抑制されるかどうかを検討した。この目的のため、ラットに妊娠 6 日目から出生後 21 日目まで抗甲状腺剤の PTU を 12 ppm の濃度で飲水投与し、同時に、抗酸化物質として AGIQ ないし ALA をそれぞれ 5,000 ppm ないし 2,000 ppm の濃度で混餌投与する発達期曝露実験を行った。その結果、出生後 21 日目の PTU を曝露した雄性児動物では、海馬歯状回における広範な顆粒細胞系譜の細胞数の減少及び一部の GABA 性介在ニューロン数の減少を認めた。PTU との AGIQ ないし ALA の共曝露によって様々な機能を含む多くの遺伝子の発現レベル上昇を認め、海馬歯状回におけるシナプス可塑性増強及び神経新生の促進が示唆されたが、免疫組織学的解析では神経新生障害の抑制は認めなかった。PTU 単独曝露及び PTU と抗酸化物質共曝露のいずれでも海馬における脂質過酸化レベルの変動を認めなかったことから、発達期の甲状腺機能低下による神経新生障害に酸化ストレスは一時的には関与せず、甲状腺ホルモンの枯渇自体が原因である可能性が考えられた。抗酸化物質の共曝露による多くの遺伝子の発現レベル上昇は、直接的な抗酸化作用ではなく抗酸化物質による神経保護的な作用によるものかも知れない。多くの遺伝子の発現レベルが上昇したにも関わらず神経新生障害の抑制がみられなかった原因は、甲状腺機能低下による mRNA の翻訳効率の低下であることが示唆された。

第 2 章

α グリコシルイソクエルシトリンによる恐怖記憶消去学習促進効果発現に必要な

曝露期間の検討

緒言

所属研究室の先行研究では, AGIQ ないし ALA を 5,000 ppm ないし 2,000 ppm の濃度でラットに妊娠 6 日目から生後 77 日目まで継続的曝露すると, AGIQ を曝露した場合のみ, 文脈的恐怖条件付け試験において恐怖記憶の消去学習効率の促進を示すことを見出している [75]。また, AGIQ 曝露終了時の海馬歯状回において *Fos* および kinesin family member 21B (KIF21B) をエンコードする *Kif21b* 発現上昇および FOS⁺顆粒細胞数の増加, 扁桃体では NMDA 型グルタミン酸受容体サブユニット 2D (GRIN2D) をエンコードする *Grin2d* の転写レベルの上昇を認めた [75]。*Fos* は最初期遺伝子のひとつで, 海馬の顆粒細胞におけるシナプス可塑性に関与している [36]。GRIN2D は長期記憶に関わるシナプス可塑性に機能することが知られている [38]。これらの結果は, FOS⁺顆粒細胞数の増加及び *Grin2d* 発現の上昇がシナプス可塑性増強に関わっており, これらの変化が恐怖記憶の消去学習促進につながったことを示唆する。また, KIF21B は最近記憶の上書きに関与することが明らかにされた分子で [69], *Kif21b* 発現上昇が海馬歯状回で認められたことは, これが消去学習促進に関与していることを示唆する。しかし, これらの変化は行動解析を経験していないラットにおける構成的な遺伝子発現レベル及び免疫組織化学染色陽性細胞数であり, 行動試験後のラット脳における学習と関連した変化を検討すべきだと考える。

恐怖記憶は海馬, 前辺縁皮質, 下辺縁皮質及び扁桃体の間の相互作用によって制御されている [60]。恐怖条件付けにおいて, 海馬は文脈記憶の形成と貯蔵に, 前辺縁皮質及び下辺縁皮

質は前頭前野皮質の一部でそれぞれ恐怖反応の促進ないし抑制に関与している [60]。扁桃体
は情動記憶の中核であり恐怖条件付け、恐怖の発現及び恐怖の抑制に関して中心的な役割を
果たしている [60]。記憶の形成は各神経回路におけるシナプス可塑性によって制御されてお
り、シナプス可塑性の程度は学習実験等の刺激に対する最初期遺伝子の発現レベルを通して
推定することが可能である [64]。従って、グルタミン酸受容体／トランスポーターをはじめ
とした脳内のシグナル伝達に機能するシナプス可塑性増強と関連した最初期遺伝子発現の誘
導は、恐怖記憶の消去学習の促進に直接関与している可能性がある。この意味において、恐怖
記憶を制御している脳領域の最初期遺伝子産物を免疫組織化学により解析することで、AGIQ
によって誘導される恐怖記憶の消去学習の促進のメカニズムに関する重要な知見を得られる
可能性がある。特に、最後の消去学習後の最初期遺伝子産物の誘導パターンは、消去学習の促
進に関連してシナプス可塑性が増強している脳領域の特定に有用である。

最近、いくつかのポリフェノール系抗酸化物質が心的外傷後ストレス症候群 (PTSD) の動
物モデルにおいて障害の改善効果を示すことが報告された [53, 113]。他の研究では、驚くべ
きことに、ポリフェノール系抗酸化物質であるクルクミンをラットに 5 日間摂取させるだけ
で、恐怖記憶の固定化及び再固定化が阻害されることが報告されている [66]。抗酸化物質曝
露に対する感受性はライフステージによって異なる可能性があるため、障害を予防ないし改
善するための適切な AGIQ 曝露期間を検討する必要があると考える。

以上より、第 2 章ではいくつかの AGIQ 曝露期間を設け、恐怖記憶の消去学習促進に十分
な期間を特定し、消去学習に関わる脳領域における対応する分子変動について検討すること

を目的とした。この目的のため, AGIQ の曝露時期を離乳後曝露, 発達期曝露及び全期間曝露の 3 つに分けて効果を検討した。行動解析は性成熟前及び性成熟後に実施した。ヒトの PTSD 等の不安障害治療では恐怖記憶の回復防止が重要であるため [98], AGIQ を全期間曝露した動物では, 恐怖記憶の消去学習テスト後に 7 日間の間隔を置き恐怖記憶の自発的回復についても検討した。自発的回復テスト後の動物では, 恐怖記憶に関わる脳領域における最初期遺伝子産物とその制御因子の免疫組織化学染色陽性細胞数及び遺伝子発現の構成的変化について, 各曝露期間の間で比較した。AGIQ を全期間曝露した動物では, 構成的発現の変化と比較するために, 最後の消去学習テスト後に同様の解析を行い消去学習と関連した変化について検討した。

材料および方法

化学物質および供試動物

AGIQ (純度 >97%) は三栄源エフ・エフ・アイ株式会社 (大阪, 日本)より提供された。36 匹の交尾確認済み雌 Slc:SD ラットを妊娠 1 日目で日本エスエルシー株式会社 (浜松, 日本)より購入した。交尾確認済みラットは, 入荷時から分娩後 21 日目まで温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 相対湿度 $55 \pm 15\%$, 照明条件 12 時間の明暗サイクルで個別にポリカーボネート製ケージに紙製の床敷を入れ, 個別飼育した。AGIQ の投与開始までは, 基礎飼料 (CRF-1, 粉末, オリエンタル酵母株式会社) 及び飲料水を自由に摂取させた。児動物は出生後 21 日目に離乳させ, それ以降, 2 匹/ケージで, 基礎飼料 (CRF-1, 粉末) ないし AGIQ を含む基礎飼料 (CRF-1, 粉末) 及び飲料水の自由摂食・自由飲水下で飼育した。

実験デザイン

交尾確認済みラットは 2 群に分け, 基礎飼料 (18 匹, 無処置対照群) ないし 5,000 ppm の AGIQ を含む基礎飼料 (18 匹, AGIQ 群) を妊娠 6 日目から出産後 21 日目まで混餌投与した。AGIQ 濃度は, 所属研究室の先行研究で胎児期からの継続曝露により恐怖記憶の消去学習促進を示した 5,000 ppm を選択した [75]。

母動物について, 妊娠 6 日目から出産後 21 日目まで体重, 摂餌量及び摂水量を 3~4 日に 1 回の頻度で測定した。出生後 4 日目に児動物の間引きを行い, 各母動物に 8 匹の児動物 (6 匹

ないし 7 匹の雄と 1 匹ないし 2 匹の雌) になるように調整した。児動物について出生後 21 日目まで体重を 3~4 日に 1 回の頻度で測定した。母動物及び雌性児動物は出産後 (出生後) 22 日目に CO₂/O₂ 麻酔下で腹大動脈切断によって放血し、安楽死させた。動物の行動は性周期によるステロイドホルモンレベルの変動に影響を受けるため、本研究では雄性児動物を免疫組織化学的解析及び遺伝子発現解析に使用した [63, 68, 77]。出生後 21 日目以降、無処置対照群と AGIQ 群の雄性児動物には、引き続き、それぞれ基礎飼料と AGIQ を含む基礎飼料を与えた。性成熟前の行動解析を行った動物は、出生後 30 日に別実験のために剖検し脳採材を行った。

出生後 30 日に無処置対照群の雄性児動物を無処置対照群 (32 匹) ないし AGIQ 離乳後曝露群 (32 匹) の 2 群に、AGIQ 曝露群の雄性児動物を AGIQ 発達期曝露群 (32 匹) ないし AGIQ 全期間曝露群 (32 匹) の 2 群にそれぞれ分け、以降、無処置対照群及び AGIQ 発達期曝露群には基礎飼料を、AGIQ 離乳後曝露群及び AGIQ 全期間曝露群には 5,000 ppm の AGIQ を含む基礎飼料を与え自由に摂取させた。出生後 30 日から実験終了まで全てのラットについて体重、摂餌量及び摂水量を週 1 回の頻度で測定した。

出生後 76 日目 (成熟期実験 1) 及び 79 日目 (成熟期実験 2) に、成熟期の行動解析を終えた後の動物の脳採材を行った。各群 10 匹の雄性児動物 (1 匹/母動物) について、免疫組織学的検討のため、CO₂/O₂ 麻酔下で氷冷した 4% (w/v) PFA/0.1M リン酸バッファー (pH 7.4) により灌流固定を行った (流速 35 mL/分)。遺伝子発現解析のため、各群 6 匹の雄性児動物 (1 匹/母動物) を CO₂/O₂ 麻酔下で腹大動脈切断による放血で安楽死させ、脳を摘出し 4°C のメタカーンで 5 時間固定した。

全ての母動物及び児動物について、一般状態（歩行や行動の異常がないか）の観察を毎日行った。本研究におけるすべての動物実験計画は、国立大学法人東京農工大学の動物実験倫理委員会に提出して承認を受け、動物飼育、管理にあつては、国立大学法人 東京農工大学の実験取扱い倫理規定に従った。

行動解析

性成熟前実験（無処置対照群及び AGIQ 曝露群）及び成熟期実験 1（無処置対照群, AGIQ 発達期曝露群, AGIQ 離乳後曝露群及び AGIQ 全期間曝露群）の動物に対し、オープンフィールド試験、新奇物体探索試験及び文脈的恐怖条件付け試験（性成熟前実験：獲得テスト及び消去学習テスト；成熟期実験 1：獲得テスト、消去学習テスト及び自発的回復テスト）を行った。成熟期実験 2（無処置対照群及び AGIQ 全期間曝露群）では文脈的恐怖条件付け試験（獲得テスト及び消去学習テスト）を行った。

動物を各行動解析開始の 1～2 時間前に動物飼育室から行動解析室へ運搬し、待機させた。各行動解析終了後、動物を速やかに飼育ケージへ戻し動物飼育室へ運搬した。行動解析機器は各実験の前後に 70%エタノールを用いて清掃した。全ての行動解析は 08:00 から 19:00 の間に実施し、実施時刻が群間で偏ることを避けるため、動物選択の順番は実験時間全体でカウンターバランスをとった。

オープンフィールド試験

出生後 23 日目及び 24 日目 (性成熟前実験) 並びに出生後 58 日目及び 61 日目 (成熟期実験 1) にオープンフィールド試験を行い、自発運動及び不安様行動を評価するとともに翌日に新奇物体探索試験で使用する実験箱にラットを馴化させた。実験箱は、ステンレス製トレイとトレイの四方を囲むステンレス製の壁からなっており、壁面と床面は黒のつや消し加工された塩化ビニルだった (幅 900 mm × 奥行き 900 mm × 高さ 500 mm, 小原医科産業株式会社, 東京, 日本) (Fig. 2-1)。照明条件は、実験箱の中央部表面で 20 Lux に設定した。動物を実験箱の隅に、頭を壁側に向けて配置し、実験箱内を 10 分間自由に探索させた。動物の行動は、行動解析室の天井に設置した CCD カメラ (WAT-902B; ワテック株式会社, 鶴岡, 日本) を用いて記録し、ビデオ画像解析装置 (TimeOFCR1 ソフトウェア; 小原医科産業株式会社) を用いて動物の総移動距離及びフィールドの中央区画及び周辺区画の滞在時間を記録した。ビデオ画像解析では、実験箱内のフィールドが 25 個の正方形領域に均等に分割され、中央の 9 つの領域を中央区画と定義した。中央区画率は実験時間中に動物が中央区画に滞在した時間の割合と定義した。

新奇物体探索試験

出生後 24 日目及び 25 日目 (性成熟前実験) 並びに出生後 59 日目から 62 日目 (成熟期実験 1) に新奇物体探索試験を行い、非位置記憶について評価した。本実験はオープンフィールド試験で用いたものと同じ実験箱を使用した (Fig. 2-2)。本実験は馴化、獲得試行及びテスト試行の 3 工程とした。馴化試行の 24 時間後、2 つの同一の物体をフィールドに配置し、動物に 5

分間自由に探索させた (獲得試行) (Fig. 2-2)。所定の時間間隔 (性成熟前試験では 1 時間ないし 4 時間, 成熟期実験 1 では 1 時間ないし 24 時間) の後, 2 つの物体のうち 1 つを新奇物体に変えて, 動物に 3 分間自由に探索させた (テスト試行) (Fig. 2-2)。獲得試行及びテスト試行では, 動物をフィールド内の壁沿いの中央部に頭を壁側に向けて配置した。物体は動物の背後の左右等距離の位置に配置した (Fig. 2-2)。照明条件は, 実験箱の中央部表面で 20 Lux になるよう設定した。物体は, 白と黒の荒い縞模様で滑らかな表面の塩化ビニル製の四角柱を使用した (Fig. 2-2)。新奇物体は, ステンレス製の先端を持ち灰色で表面が粗い塩化ビニル製の円錐を使用した (Fig. 2-2)。各物体は実験中に動物によって動かされないように, 十分な重さのものを使用した。動物の行動は行動解析室の天井に設置した CCD カメラ (WAT-902B; ワテック株式会社) を用いて記録し, ビデオ画像解析装置 (TimeSSI ソフトウェア; 小原医科産業株式会社) を用いて解析した。ビデオ画像解析では, 動物の総移動距離及び各物体に対する探索時間を記録した。各物体に対する「探索」については, ラットの鼻から物体までの距離が 3 cm まで近づいた時にビデオ画像解析ソフトにより自動的に「探索」と判定され, 総探索時間が記録された。テスト試行では, 動物は新奇物体に次第に慣れて新奇性が薄れてしまい, 新奇物体に対する探索時間が時間経過に伴い減少していくため, 初めの 2 分間のみビデオ画像解析を行った。新奇物体探索試験における識別指数は以下の式を用いて算出した:

$$\text{識別指数} = \text{新奇物体の探索時間} / (\text{旧物体の探索時間} + \text{新奇物体の探索時間})$$

文脈的恐怖条件付け試験

出生後 26 日目から 29 日目 (性成熟前実験), 出生後 65 日目から 76 日目 (成熟期実験 1) 及び出生後 71 日目から 79 日目 (成熟期実験 2) に文脈的恐怖条件付け試験を行い, 情動記憶について評価した (Fig. 2-3)。

恐怖条件付け及びその後のテストは防音箱 (CL-4211; 小原医科産業株式会社) 内に設置したアクリル製の実験箱 (幅 300 mm × 奥行き 370 mm × 高さ 250 mm; CL-3001; 小原医科産業株式会社) で行った (Fig. 2-4)。実験箱の床は 21 本のスチール製の格子から成り, フットショック時にはショックジェネレーター (SGA-2020; 小原医科産業株式会社) からのスクランブル電流を実験箱の床に流した (Fig. 2-4)。実験中, 防音箱は常時換気し, 背景音は 50 dB のホワイトノイズに設定し, 照明は白色発光ダイオードを用い実験箱の中が 200 Lux になるよう設定した (Fig. 2-4)。動物の行動は, 防音箱の天井に設置した CCD カメラ (WAT-902B; ワテック株式会社) を用いて記録し, ビデオ画像解析装置 (TimeFZ4 ソフトウェア; 小原医科産業株式会社) を用いて解析した (Fig. 2-4)。解析では, 恐怖反応として動物の不動 (フリーズング) 時間を測定した。フリーズング率は実験時間のうち動物がフリーズングを示した時間の割合とした。

文脈的恐怖条件付け: 動物を実験箱に入れ, 138 秒後に 2 秒間のフットショック (0.5 mA) を与え, 100 秒の間を空けてもう一度 2 秒間のフットショック (0.5 mA) を与えた。2 回目のフットショックの 60 秒後に動物を取り出し飼育ケージに戻した (合計 5 分間)。

獲得テスト, 消去テスト及び自発的回復テスト: 動物を再び恐怖条件付けと同じ文脈の実験箱に入れ, フットショック無しで 5 分間行動を記録した。成熟期実験 1 及び 2 において, 各

動物は最後のテスト（自発的回復テストないし消去テスト 3）の 90 分後に免疫組織化学染色
ないし遺伝子発現解析用に安楽死させた。

免疫組織化学的染色

急性の刺激に対する最初期遺伝子産物の産生は、刺激後 90 分～120 分にピークに達するため [51]、動物は文脈的恐怖条件付け試験の最後のテスト後 90 分に灌流固定のために安楽死させた。4% PFA バッファー灌流固定を行った雄性児動物から脳を摘出し、同じ固定液を用いて 4°C で一昼夜固定した。その後、大脳の bregma の後方約 3.0 mm の位置で冠状断面を作製し、そこから後方に 3 mm 厚のスライスを作製した。次に、大脳の bregma の前方約 2.0 mm の位置で冠状断面を作製し、そこから前方に 3 mm 厚のスライスを作製した。脳スライスは 4% PFA バッファーを用いて 4°C で更に一昼夜固定し、標準プロトコールに従ってパラフィン包埋した後、3 µm 厚の連続切片を作製した。切片は Table 2-1 に示した条件で、以下の抗原に対する一次抗体（4°C、一晚）を用いて免疫染色を行った。切片はシナプス可塑性に関わる最初期遺伝子産物である ARC, FOS, COX2 [36, 17] 及び mitogen-activated protein kinase (MAPK) ファミリーのメンバーでリン酸化により活性化し *Arc* や *Fos* の発現誘導に関わる phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 (p-ERK1/2) [8] に対する一次抗体を用いて免疫染色を実施した。内因性ペルオキシダーゼの不活化には 0.3% (v/v) 過酸化水素水を含むメタノール溶液（室温、30 分）を用いた。シグナル検出は VECTASTAIN[®] Elite ABC Kit (Vector Laboratories Inc.) を用いて製造元のプロトコールに従って実施し、免疫反応は 3,3'-diaminobenzidine

(DAB)/H₂O₂ を用いて可視化した後、ヘマトキシリンにより対比染色した。各分子について、1 個体につき 1 切片を免疫染色に供した。

免疫組織化学染色陽性細胞数の定量解析

GCL における ARC⁺, FOS⁺, COX2⁺ 及び p-ERK1/2⁺ 細胞数は、脳の両側でカウントし SGZ の単位長当たりの陽性細胞数を算出した (Fig. 2-5)。前辺縁皮質、下辺縁皮質、扁桃体外側部、扁桃体基底外側部及び扁桃体中心核に分布する免疫組織化学的な陽性細胞数は、脳の両側でカウントし各領域の単位面積当たりの陽性細胞数を算出した (Fig. 2-6, 2-7)。各陽性細胞は BX53 システム生物顕微鏡 (オリンパス株式会社, 東京, 日本) を用いて手作業でカウントした。各領域の位置や形は、免疫組織化学染色した切片に隣り合う切片のクレシルバイオレット染色像及びラット脳のアトラスを元に決定した [79]。各陽性細胞のカウントは盲検法により行った。SGZ の長さ並びに前辺縁皮質、下辺縁皮質、扁桃体外側部、扁桃体基底外側部及び扁桃体中心核の面積は 25 倍ないし 40 倍の倍率の顕微鏡画像を用いて cellSens Standard (バージョン 1.9; オリンパス株式会社) を用いて測定した。

遺伝子発現解析

成熟期実験 1 及び成熟期実験 2 の児動物の海馬歯状回、前辺縁皮質、下辺縁皮質及び扁桃体における転写レベルをリアルタイム RT-PCR を用いて解析した。脳組織はメタカーン (メタノール : クロロホルム : 酢酸 = 6 : 3 : 1) を用いた全脳固定法に従って採取した [1]。海馬歯

状回及び扁桃体組織を採取するために、大脳の Bregma の後方約 3.0 mm の 1 箇所でも冠状断面を作製し、そこから後方に 2 mm 厚のスライスを作製し、1 mm 径の生検トレパン（貝印株式会社）を用いて海馬歯状回組織を採取した（Fig. 2-8）。前辺縁皮質及び下辺縁皮質を採取するために、大脳の Bregma の前方約 2.0 mm の 1 箇所でも冠状断面を作製し、そこから前方に 2 mm 厚のスライスを作製し、1 mm 径の生検トレパン（貝印株式会社）を用いて脳組織を採取した（Fig. 2-8）。RNeasy Mini kit（Qiagen）を用いて total RNA を抽出した（n = 6/群）。1 µg の total RNA から SuperScript® III Reverse Transcriptase（Thermo Fisher Scientific）を用いて cDNA を合成した。Table 2-2 に示した遺伝子の転写レベル解析に用いるプライマーは、Primer Express software（Version 3.0; Thermo Fisher Scientific）で設計した。リアルタイム PCR は SYBR®Green PCR Master Mix（Thermo Fisher Scientific）及び Step One Plus™ Real-time PCR System（Thermo Fisher Scientific）を用いて製造元のプロトコールに従って実施した。各遺伝子の転写レベルは、目的の遺伝子の C_T 値及び内因性コントロールである *Hprt1* ないし *Gapdh* の C_T 値から ΔC_T 値を算出し、次いで無処置対照群と各処置群の間で $\Delta\Delta C_T$ 値を算出して比較した [57]。

統計解析

出生後 30 日目以降の児動物の体重、臓器重量、行動試験、免疫組織化学染色及び遺伝子発現解析結果は個体別値を元に群平均および標準偏差を算出した。4 群間の統計学的解析では、各群の分散を Levene 法で検定し、等分散の場合は Dunnett 検定、不等分散の場合は Bonferroni 補正した Aspin-Welch の t 検定により無処置対照群と各群との検定を行った。2 群間の統計学

的解析では、2 群間の分散を Levene 法で検定し、等分散の場合は Student の t 検定、不等分散の場合は Aspin-Welch の t 検定により無処置対照群と処置群の検定を行った。全ての統計解析は、IBM SPSS Statistics (ver. 25; IBM Corporation) を用いて行い、それぞれの検定の有意水準は $P<0.05$ とした。

文脈的恐怖条件付け試験において、一部の動物は消去学習抵抗性を示したため、各群の外れ値を検出するために Smirnov-Grubbs 検定を行った。検出された動物は異常動物として消去学習テスト、自発的回復テスト、免疫組織学的解析及び遺伝子発現解析から除外した。この検定はエクセル統計 2013 (version 2.02; 株式会社社会情報サービス, 東京, 日本) を用いて行い、有意水準は $P<0.05$ とした。

結果

母動物への影響

AGIQ 群で未妊娠動物が 1 例みられたため試験から除外した。そのため、無処置対照群及び AGIQ 群の母動物はそれぞれ 18 例及び 17 例となった。摂餌量の平均値から算出された AGIQ の摂取量は妊娠期間で 333.9 mg/kg 体重/日、授乳期間で 656.5 mg/kg 体重/日であった。

児動物の剖検結果

出生後 30 日目の剖検時の AGIQ 曝露群及び出生後 76 日目ないし出生後 79 日目の剖検時の AGIQ 離乳後曝露群、AGIQ 発達期曝露群及び AGIQ 全期間曝露群は、無処置対照群と比較して体重、絶対脳重量及び相対脳重量の変動を認めなかった (Table 2-3, 2-4)。摂餌量の平均値から算出された AGIQ の摂取量は、出生後 21 日目から出生後 30 日目までの AGIQ 曝露群で 693.9 mg/kg 体重/日、それ以降の AGIQ 離乳後曝露群及び AGIQ 全期間曝露群でそれぞれ 415.7 mg/kg 体重/日及び 425.4 mg/kg 体重/日であった。

行動解析

オープンフィールド試験

性成熟前実験では、無処置対照群と AGIQ 曝露群の間で総移動距離及び中央区画率の有意

な変動を認めなかった (Table 2-5)。

成熟期実験 1 では、無処置対照群と各 AGIQ 曝露群の間で総移動距離及び中央区画率の有意な変動を認めなかった (Table 2-6)。

新奇物体探索試験

性成熟前実験では、無処置対照群と AGIQ 曝露群の間で総移動距離及びサンプル試行後 1 時間ないし 4 時間後の識別指数に有意な差を認めなかった (Table 2-7)。

成熟期実験 1 では、無処置対照群と各 AGIQ 曝露群の間で総移動距離及びサンプル試行後 1 時間ないし 24 時間後の識別指数に有意な差を認めなかった (Table 2-8)。

文脈的恐怖条件付け試験

性成熟前実験では、無処置対照群と AGIQ 曝露群の間で獲得テスト及び消去テストにおけるフリージング率の有意な差を認めなかった (Table 2-9)。

成熟期実験 1 では、AGIQ 全期間曝露群は無処置対照群と比較して、2 回目の消去テストでフリージング率の有意な低値を示した (Fig. 2-9, Table 2-10)。一方で、AGIQ 離乳後曝露群及び AGIQ 発達期曝露群では無処置対照群と比較して、いずれの検査でもフリージング率の有意な変動を認めなかった (Fig. 2-9, Table 2-10)。自発的回復テストでは、無処置対照群と比較して、いずれの AGIQ 曝露群でも有意な差を認めなかった (Fig. 2-9, Table 2-10)。

成熟期実験 2 では、AGIQ 全期間曝露群は無処置対照群と比較して、1 回目の消去テストでフ

リージング率の有意な低値を示した (Fig. 2-9, Table 2-11)。

シナプス可塑性と関連した最初期遺伝子産物及びその制御因子の陽性細胞数

海馬歯状回 GCL

成熟期実験 1 では、いずれの分子についても無処置対照群と各 AGIQ 曝露群の間に有意な細胞数の変動を認めなかった (Fig. 2-10, Table 2-12)。

成熟期実験 2 では、いずれの分子についても無処置対照群と AGIQ 全期間曝露群の間に有意な細胞数の変動を認めなかった (Fig. 2-11, Table 2-13)。

前頭前野皮質

成熟期実験 1 の前辺縁皮質では、いずれの分子についても無処置対照群と各 AGIQ 曝露群の間に有意な陽性細胞数の変動を認めなかった (Fig. 2-12, Table 2-12)。下辺縁皮質では、無処置対照群と比較して、AGIQ 全期間曝露群で FOS⁺細胞数の増加を認めた (Fig. 2-13, Table 2-12)。下辺縁皮質におけるその他の分子については、いずれも無処置対照群と各 AGIQ 曝露群の間に有意な陽性細胞数の変動を認めなかった (Fig. 2-13, Table 2-12)。

成熟期実験 2 の前辺縁皮質では、無処置対照群と比較して、AGIQ 全期間曝露群で p-ERK1/2⁺細胞数の増加を認めた (Fig. 2-11, Table 2-13)。前辺縁皮質におけるその他の分子については、いずれも無処置対照群と AGIQ 全期間曝露群の間に有意な陽性細胞数の変動を認めなかった (Fig. 2-11, Table 2-13)。下辺縁皮質では、無処置対照群と比較して、AGIQ 全期間曝露群で FOS⁺

細胞数及び p-ERK1/2⁺細胞数の増加を認めた (Fig. 2-11, Table 2-13)。下辺縁皮質におけるその他の分子については、いずれも無処置対照群と各 AGIQ 曝露群の間に有意な陽性細胞数の変動を認めなかった (Fig. 2-11, Table 2-13)。

扁桃体

扁桃体外側部、扁桃体基底外側部及び扁桃体中心核では、切片上に ARC⁺細胞は全くあるいはほとんどみられなかった。扁桃体基底外側部及び扁桃体中心核では、切片上に COX⁺細胞は全くあるいはほとんどみられなかった。成熟期実験 2 では、いずれの分子についても無処置対照群と AGIQ 全期間曝露群の間に有意な細胞数の変動を認めなかった (Fig. 2-14, Table 2-13)。

遺伝子発現解析

海馬歯状回

成熟期実験 1 の AGIQ 離乳後曝露群では、無処置対照群と比較していずれの遺伝子についても発現変動を認めなかった (Fig. 2-15, Table 2-14)。AGIQ 発達期曝露群では、無処置対照群と比較して *Grin2c*, *Slc17a6*, *Fos*, *Flt1*, *Kdr*, *Vegfa*, *Pcna*, *Nos3* 及び *Elmo1* の発現上昇並びに *Efnb3*, *Epha4*, *Ephb2*, *Gria1*, *Gria2*, *Gria3*, *Grin2a*, *Grin2b*, *Slc17a7*, *Bdnf*, *Arc*, *Egr1*, *Mapk1*, *Ptgs2* 及び *Nos1* の発現低下を認めた (Fig. 2-15, Table 2-14)。AGIQ 全期間曝露群では、無処置対照群と比較して *Ephb1*, *Fos*, *Flt1*, *Kdr*, *Notch1*, *Vegfa*, *Pcna*, *Nos2*, *Nos3*, *Kif21b* 及び *Elmo1* の発現上昇

並びに *Efnb3*, *Epha4*, *Ephb2*, *Gria1*, *Gria2*, *Gria3*, *Grin2a*, *Grin2b*, *Slc17a7*, *Bdnf*, *Mapk1*, *Ptgs2* 及び *Nos1* の発現低下を認めた (Fig. 2-15, Table 2-14)。

成熟期実験 2 の AGIQ 全期間曝露群では、無処置対照群と比較して *Efnb3*, *Epha4*, *Ephb2*, *Gria1*, *Gria2*, *Gria3*, *Grin2a*, *Grin2b*, *Grin2c*, *Slc17a7*, *Egr1*, *Mapk1* 及び *Kif21b* の発現上昇並びに *Grin2d* の発現低下を認めた (Table 2-15)。

Figure 2-16 に、成熟期実験 1 及び成熟期実験 2 における、無処置対照群と比較した AGIQ 全期間曝露群の遺伝子発現変動の概略をそれぞれ示した。ほとんどの遺伝子が成熟期実験 1 及び成熟期実験 2 の間で異なる発現変動パターンを示しており、多くの遺伝子が成熟期実験 1 及び成熟期実験 2 で真逆の発現変動パターンを示した。また、いくつかの遺伝子は成熟期実験 1 ないし成熟期実験 2 のいずれか一方でのみ発現上昇ないし発現減少を示した。記憶の上書きに関与するモータータンパク質をエンコードする *Kif21b* は成熟期実験 1 及び成熟期実験 2 の両方で発現上昇を示した。

前辺縁皮質

成熟期実験 1 の AGIQ 離乳後曝露群では、無処置対照群と比較して *Fos* の発現増加並びに *Grin2d* の発現低下を認めた (Fig. 2-15, Table 2-16)。AGIQ 発達期曝露群では、無処置対照群と比較して *Efnb3*, *Ephb1*, *Ephb2*, *Gria1*, *Grin2d*, *Slc17a6*, *Mapk1*, *Notch1*, *Nos1* 及び *Nos2* の発現上昇並びに *Egr1* 及び *Flt1* の発現低下を認めた (Fig. 2-15, Table 2-16)。AGIQ 全期間曝露群では、

無処置対照群と比較して *Efnb3*, *Ephb2*, *Gria1*, *Gria2*, *Grin2c*, *Slc17a6*, *Mapk1*, *Nos1* 及び *Nos3* の発現上昇並びに *Egr1* の発現低下を認めた。

成熟期実験 2 の AGIQ 全期間曝露群では、無処置対照群と比較して *Ephb2*, *Grin2a*, *Grin2b*, *Grin2c* 及び *Slc17a6* の発現上昇を認めた (Table 2-17)。

Figure 2-16 に、成熟期実験 1 及び成熟期実験 2 における、無処置対照群と比較した AGIQ 全期間曝露群の遺伝子発現変動の概略をそれぞれ示した。*Ephb2*, *Grin2c* 及び *Slc17a6* が両方の実験で発現上昇を示したが、その他の多くの遺伝子は成熟期実験 1 ないし成熟期実験 2 のみで発現上昇ないし発現低下を示した。

下辺縁皮質

成熟期実験 1 の AGIQ 離乳後曝露群では、無処置対照群と比較して *Grin2d* の発現低下を認めた (Fig. 2-15, Table 2-18)。AGIQ 発達期曝露群では、無処置対照群と比較して *Efnb3*, *Gria1*, *Slc17a6* 及び *Pcna* の発現上昇並びに *Epha4* 及び *Bdnf* の発現低下を認めた (Fig. 2-13, Table 2-18)。AGIQ 全期間曝露群では、無処置対照群と比較して *Efnb3*, *Ephb1*, *Ephb2*, *Gria1*, *Gria2*, *Gria3*, *Grin2b*, *Grin2c*, *Slc17a6*, *Slc17a7*, *Ntrk2*, *Flt1*, *Kdr*, *Notch1*, *Vegfa*, *Pcna*, *Nos2* 及び *Nos3* の発現上昇並びに *Bdnf* の発現低下を認めた (Fig. 2-15, Table 2-18)。

成熟期実験 2 の AGIQ 全期間曝露群では、無処置対照群と比較して *Efnb3*, *Ephb1* 及び *Ephb2* の発現上昇並びに *Egr1* の発現低下を認めた (Table 2-19)。

Figure 2-16 に、成熟期実験 1 及び成熟期実験 2 における、無処置対照群と比較した AGIQ 全期間曝露群の遺伝子発現変動の概略をそれぞれ示した。*Efnb3*, *Ephb1* 及び *Ephb2* が両方の実験で発現上昇を示したが、その他の多くの遺伝子は成熟期実験 1 のみで発現上昇を示した。

扁桃体

成熟期実験 1 の AGIQ 離乳後曝露群では、無処置対照群と比較して *Grin2d* の発現低下を認めた (Fig. 2-13, Table 2-20)。AGIQ 発達期曝露群では、無処置対照群と比較して *Egr1* 及び *Ptgs2* の発現上昇を認めた (Fig. 2-15, Table 2-20)。AGIQ 全期間曝露群では、無処置対照群と比較して *Gria3*, *Grin2a*, *Grin2b*, *Slc17a7*, *Bdnf*, *Arc*, *Egr1* 及び *Ptgs2* の発現上昇並びに *Grin2d* 及び *Vegfa* の発現低下を認めた (Fig. 2-15, Table 2-20)。

成熟期実験 2 の AGIQ 全期間曝露群では、無処置対照群と比較して *Efnb3*, *Ephb2*, *Grial1*, *Gria2*, *Gria3*, *Grin2a*, *Grin2b*, *Grin2c*, *Slc17a6* 及び *Fos* の発現上昇を認めた (Table 2-21)。

Figure 2-16 に、成熟期実験 1 及び成熟期実験 2 における、無処置対照群と比較した AGIQ 全期間曝露群の遺伝子発現変動の概略をそれぞれ示した。*Gria3*, *Grin2a* 及び *Grin2b* が両方の実験で発現上昇を示したが、その他の多くの遺伝子は成熟期実験 1 ないし成熟期実験 2 のみで発現上昇ないし発現低下を示した。

考察

第2章では, AGIQ 曝露による恐怖記憶の消去学習促進作用に着目し, どの期間の AGIQ 曝露が認知機能の修飾作用に必要なかを特定するために, AGIQ の曝露時期を離乳後曝露, 発達期曝露及び胎児期から成熟期までの全期間曝露の3つに分けて効果を検討した。また, 恐怖記憶の消去学習促進に関連した脳の分子変動を明らかにするため, 文脈的恐怖条件付け試験後のラット脳を用いて恐怖記憶の消去学習に関わる脳領域の免疫組織化学的陽性細胞数及び遺伝子発現の変動について検討した。

成熟期実験1では, 所属研究室の先行研究と一致して AGIQ 全期間曝露が文脈的恐怖条件付け試験における消去学習を促進したが [75], それ以外の行動試験には効果を示さなかった。一方, AGIQ 離乳後曝露及び AGIQ 発達期曝露はいずれの行動試験でも明らかな効果を示さなかった。また, AGIQ 発達期曝露後に行った性成熟前実験でも, AGIQ 曝露はいずれの行動試験でも効果を示さなかった。これらの結果は, 消去学習促進のためには AGIQ の胎児期から成熟後までの曝露が必要であり, AGIQ 曝露は他の種類の行動や記憶に影響しない可能性があることを示唆している。

成熟期実験1の結果から, AGIQ の離乳後曝露が, 本研究で解析を行った殆どの遺伝子の発現レベルに対して影響しないことが明らかとなった。それとは逆に, AGIQ の発達期曝露及び全期間曝露後に, 特に海馬歯状回及び前辺縁皮質において, 類似した遺伝子発現変動パターンを認めた。これらの結果は, 発達期の AGIQ 曝露が, たとえ休薬期間後の成熟期でも遺伝子

発現に影響を与えることを示唆する。ケルセチンやレスベラトロール等のポリフェノール類は、エピジェネティックな作用を介して様々な疾病の予防効果を発揮することが知られている [4]。発達中の細胞では、大規模なエピジェネティック変動が生じることから、AGIQ の発達期曝露がエピジェネティックな影響を与えた可能性がある。一方で、AGIQ 全期間曝露後には、特に下辺縁皮質及び扁桃体において、AGIQ の発達期曝露よりも多くの遺伝子の発現変動を認めた。AGIQ の発達期曝露は、いずれの行動解析についても効果を示さなかったことから、AGIQ の発達期曝露後に認めた遺伝子発現変動は、動物の行動を変化させるには十分でなかった可能性が高い。つまり、AGIQ の発達期曝露でのみ発現変動を示した遺伝子が消去学習の促進に関わっている可能性が高い。

成熟期実験 1 及び成熟期実験 2 で、AGIQ 発達期曝露後の下辺縁皮質における FOS⁺ニューロン数の増加を認めた。成熟期実験 1 で、恐怖反応の自発的回復を認めなかった原因は明らかでないが、AGIQ の全期間曝露が自発的回復に対して影響を与えなかったことから、自発的回復に関わる神経回路が活性化されなかった可能性が高い。また、この結果は自発的回復テスト後の遺伝子発現レベルは行動試験を経験していない動物における構成的発現レベルと同等であることを示唆している。この観点から、下辺縁皮質における FOS⁺ニューロンの増加は、行動試験の刺激によって誘導されたものではなく、AGIQ 曝露によって誘導された下辺縁皮質のシナプス可塑性の基礎的なレベルの増強を反映する構成的な発現上昇を示している可能性がある。一方で、成熟期実験 2 では前辺縁皮質及び下辺縁皮質の両方で p-ERK1/2⁺ニューロンの増加を認めた。シナプス可塑性増強ないし様々な刺激によって誘導される最初期遺伝子群

の発現は、シナプス活性化に対して迅速かつ一過性に反応し、学習によって生じる記憶痕跡の形成に関与することが知られている [64]。従って、シナプス可塑性に関わる最初期遺伝子とその制御因子である p-ERK1/2 は、学習試行後に発現ないし活性の変化を示し、恐怖記憶の消去学習の促進に関与している可能性がある。特に、成熟期実験 1 ではなく成熟期実験 2 でのみ発現上昇ないし活性化を示す分子が恐怖記憶の消去学習促進に重要な役割を果たしている可能性が高い。ERK1/2 は、刺激に応答してリン酸化されることで迅速に活性化し、最初期遺伝子発現を誘導することが知られている [27]。従って、成熟期実験 2 の前頭前野皮質でのみ認めた ERK1/2 の活性化が、シナプス可塑性の増強を介した恐怖記憶の消去学習促進に重要な役割を果たしている可能性がある。これまで、前辺縁皮質及び下辺縁皮質はそれぞれ恐怖反応の促進及び抑制に関与すると考えられてきたが [60]、最近、下辺縁皮質に投射している前辺縁皮質ニューロンの活性化が恐怖記憶の消去学習を促進することが報告された [59]。従って、本研究における免疫組織化学的解析の結果は、前辺縁皮質及び下辺縁皮質における ERK1/2 の学習試行依存的な活性化が、胎児期から成熟期までの継続的な AGIQ 曝露による恐怖記憶の消去学習促進に寄与することを示唆している。あるいは、恐怖記憶の形成は心理的な毒性傷害と言い換えることができ、AGIQ 曝露は心理的毒性傷害を消去するように機能する新しい学習と関連した神経回路を前辺縁皮質及び下辺縁皮質に確立する可能性がある。

成熟期実験 1 の下辺縁皮質において、AGIQ 全期間曝露は発達期曝露と比べて *Gria2*, *Gria3*, *Grin2b*, *Grin2c*, *Slc17a7*, *Ntrk2*, *Flt1*, *Kdr*, *Notch1*, *Vegfa*, *Nos2* 及び *Nos3* を含む多くの遺伝子の発現を上昇させた。*Gria* は AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニットをエンコードしている遺

伝子ファミリーで、これらの受容体は脳全体の興奮性シナプスに発現している [76]。 *Slc17a7* は VGLUT の主要なアイソフォームである VGLUT1 をエンコードしている [55]。 BDNF/TrkB シグナルは発達期の VGLUT 発現を制御することが報告されており、その影響は長期増強におけるグルタミン酸放出の促進に寄与する可能性がある [62]。 また、BDNF/TrkB シグナルは *Gria1*, *Gria2* 及び *Gria3* 発現を促進しシナプス可塑性を増強する [13, 50]。 *Grin2* は NMDA 型グルタミン酸受容体の GluN2 サブユニットをエンコードしている。 NMDA 型グルタミン酸受容体は 2 つの GluN1 と 2 つの GluN2 から成る 4 量体あるいは 2 つの GluN1 と GluN2 と GluN3 ひとつずつからなる 4 量体を形成している [112]。 NMDA 型グルタミン酸受容体は長期増強の誘導に不可欠であることが知られている [112]。 更に、D-サイクロセリンによる恐怖記憶の消去学習促進では、前辺縁皮質及び下辺縁皮質において FOS⁺ニューロン数が増加すること及び NMDA 型受容体が発現上昇することが報告されている [35]。 本研究では下辺縁皮質でのみ FOS⁺ニューロンの増加を認めたが、遺伝子発現解析の結果も下辺縁皮質におけるグルタミン酸作働性シグナルの増強によるシナプス可塑性の基礎的なレベルの強化を示唆している。 *Flt1*, *Kdr*, *Notch1*, *Vegfa* 及び *Nos3* は血管新生ないし血管拡張を介して脳の血流増加に関与することが報告されている [80, 96, 100]。 フラボノイド類は *Nos3* によってエンコードされる nitric oxide synthase 3 (NOS3) を活性化することが知られている [95]。 *Nos2* によってエンコードされる nitric oxide synthase 2 (NOS2) はニューロンやグリア細胞で発現している [37]。 一酸化窒素は、ニューロンのシナプス可塑性を調節する細胞内神経伝達物質として働く [37]。 また、NOS2 の阻害は、マウス的大脑新皮質における自発的及び誘発されたシナプス活動を減少させること

が報告されている [12]。従って、これらの遺伝子発現変動は下辺縁皮質における基礎レベルのシナプス可塑性の強化及び血流の増加を示唆している。

成熟期実験 1 の扁桃体では, AGIQ の全期間曝露は発達期曝露と比べて *Gria3*, *Grin2a*, *Grin2b*, *Slc17a7*, *Bdnf* 及び *Arc* の発現を上昇させた。先述したように, BDNF/TrkB シグナルは *Gria3* や *Slc17a7* 発現を上方制御する [62, 13]。ARC はエンドサイトーシス機構に作用して AMPA 型グルタミン酸受容体の輸送を制御し, シナプス可塑性に寄与することが報告されている [18]。従って、これらの結果は扁桃体におけるシナプス可塑性の基礎的なレベルの強化を示唆している。

成熟期実験 2 の AGIQ 全期間曝露は、特に海馬歯状回及び扁桃体において、多くの遺伝子発現を上昇させたが、これらの遺伝子は成熟期実験 1 では発現変動しないか発現が低下した。海馬歯状回では *Efnb3*, *Epha4*, *Ephb2*, *Grial*, *Gria2*, *Gria3*, *Grin2a*, *Grin2b*, *Grin2c*, *Slc17a7*, *Egr1* 及び *Mapk1* の発現上昇を認めた。Efn 及び Eph はそれぞれ Ephrin リガンド及び Eph 受容体ファミリーをエンコードしており, Ephrin 及び Eph はそれぞれ EphrinA 又は EphrinB 及び EphA 又は EphB の 2 つのサブグループに分類される [21]。EphA4 及び EphB2 は NMDA 型グルタミン酸受容体及び AMPA 型グルタミン酸受容体の機能とニューロンの形態の調節を介して記憶形成に関与している [21]。所属研究室の以前の研究では、母ラットを介した PTU 曝露によって誘発された児動物の発達期甲状腺機能低下モデル実験において、PTU の曝露終了時に海馬 GCL において EphA4⁺顆粒細胞数の減少を認め、休薬後の成熟時に海馬 GCL において EphA4⁺顆粒細胞数の増加及び ARC⁺顆粒細胞数の増加を認めた [89]。これらの結果は、ARC

を介したシナプス可塑性増強に伴って *Eph* が誘導された可能性を示唆する。先述したように, AMPA 受容体, NMDA 受容体及び VGLUT1 はシナプス可塑性に関与している。*Egr1* は最初期遺伝子のひとつでシナプス可塑性の制御に関与している [36, 22]。*Mapk1* は MAPK ファミリータンパク質のひとつである ERK2 をエンコードしており, シナプス可塑性の制御に重要な役割を果たしている [99]。扁桃体では, 扁桃体と海馬歯状回の両方で発現上昇を認めた *Efnb3*, *Ephb2*, *Gria1*, *Gria2* 及び *Grin2c* に加えて, *Slc17a6* 及び *Fos* の発現上昇を認めた。*Slc17a6* はグルタミン酸作働性ニューロンにおけるグルタミン酸トランスポーターである VGLUT の主要なアイソフォームである VGLUT2 をエンコードしている [55]。従って, 特に成熟期実験 2 の海馬歯状回及び扁桃体で上方制御された遺伝子は, AGIQ 曝露による学習依存的なシナプス可塑性の増強に関与している可能性がある。

所属研究室の先行研究では, AGIQ の全期間曝露後に海馬歯状回における *Fos* の発現上昇及び FOS⁺細胞数の増加並びに扁桃体における *Grin2d* の発現上昇を認めた [75]。その先行研究では, 行動試験を経験していない動物の免疫組織化学的解析及び遺伝子発現解析を行った。本研究では, 成熟期実験 1 の AGIQ 全期間曝露後に *Fos* の発現上昇及び統計学的に有意ではなかったものの FOS⁺顆粒細胞数の増加を認めた。これらの結果は先行研究と一致するものであった [75]。しかし, 成熟期実験 1 及び成熟期実験 2 の扁桃体における *Grin2d* の発現レベルは無処置対照群と比べて変化がないか低く, 先行研究の結果と一致しなかった。扁桃体における *Grin2d* の発現上昇が再現されなかった原因は不明だが, 他の NMDA 受容体サブユニット

をエンコードする遺伝子は、本研究の成熟期実験 1 及び成熟期実験 2 の両方で発現上昇を認めた。

所属研究室の先行研究では、AGIQ 全期間曝露後に海馬歯状回において *Kif21b* の発現上昇を認めた [75]。先行研究と一致して、本研究では、成熟期実験 1 及び成熟期実験 2 の両方で *Kif21b* 発現上昇を認めた。これは、*Kif21b* の構成的発現上昇を示唆している。更に、成熟期実験 1 の AGIQ 全期間曝露後では *Elmo1* の発現上昇を認めた。*Elmo1* は engulfment and cell motility 1 (ELMO1) をエンコードしており、KIF21B と共に海馬における RAC1 の活性化／不活性化サイクル調節を通じて長期抑制の制御に関与することが報告されている [69]。従って、これらの結果は ELMO1 及び KIF21B の上方制御が RAC1 の活性化／不活性化サイクルの促進を介して恐怖記憶消去学習の促進に寄与する可能性があることを示唆している。

結論として、第 2 章では胎児期から成熟期までの継続的な AGIQ 曝露が成熟後の恐怖記憶の消去学習促進に必要であることを明らかにした。免疫組織学的解析及び遺伝子発現解析により、恐怖記憶の消去学習促進には、恐怖記憶の制御に関わる脳領域におけるシナプス可塑性関連遺伝子／タンパク質の、構成的及び学習依存的な上方制御が関与している可能性が高いことを明らかにした。特に、本研究の結果は、恐怖記憶の消去を促進するための学習と関連した新しい神経回路が前頭前野皮質で確立される可能性があることを示唆している。

小括

第2章では、恐怖記憶の消去学習促進に必要な AGIQ の曝露期間の同定とその脳内機序の解明を目的として、AGIQ を離乳後から成熟期まで、胎児期から離乳後までないし胎児期から成熟期までラットに 5,000 ppm の濃度で混餌曝露した。性成熟前ないし成熟後にオープンフィールド試験、新奇物体探索試験及び文脈的恐怖条件付け試験を行い、動物の記憶・行動に対する修飾作用を検討した。その結果、AGIQ 全期間曝露でのみ成熟後の文脈的恐怖条件付け試験において消去学習の促進を認めた。この結果は、恐怖記憶の消去学習促進には胎児期から成熟期までの継続的な AGIQ 曝露が必要であることを示唆している。AGIQ 発達期曝露及び AGIQ 全期間曝露は、海馬歯状回及び前辺縁皮質におけるシナプス可塑性に関わる遺伝子が似た構成的発現パターンを示した。一方で、下辺縁皮質及び扁桃体では、AGIQ 全期間曝露は AGIQ 発達期曝露よりも多くの遺伝子で構成的発現レベルの上昇を示した。AGIQ 全期間曝露ラットでは、最後の消去学習テスト後の海馬歯状回及び扁桃体で多くのシナプス可塑性に関わる遺伝子 (Eph/Ephrin, グルタミン酸受容体/トランスポーター, 最初期遺伝子及びその制御因子である ERK2) の発現上昇を認めた。更に、AGIQ 全期間曝露では前辺縁皮質及び下辺縁皮質における p-ERK1/2⁺ニューロンの増加を認めた。これらの結果は、恐怖記憶を制御する脳領域における構成的及び学習依存的なシナプス可塑性遺伝子／タンパク質の発現上昇が様々な形で消去学習の促進に関与している可能性を示唆している。つまり、恐怖記憶の消去学習促進のための学習と関連した新たな神経回路が前頭前野皮質に形成された可能性ある。

第3章

α グリコシルイソクエルシトリンによる恐怖記憶消去学習促進効果に対する自発的運動

ないし環境エンリッチメントの修飾作用の検討

緒言

第2章では、胎児期から成熟期までの継続的な AGIQ 曝露が成熟期の文脈的恐怖条件付け試験において恐怖記憶の消去学習促進に必要であることを明らかにした。また、消去学習後に消去学習に関わる脳領域でシナプス可塑性に関わる遺伝子／タンパク質の発現が上昇することを明らかにした [61]。この結果により、恐怖記憶の消去学習に関わる神経回路における学習と関連したシナプス可塑性の増強が示唆された。一方で、AGIQ 曝露は不安様行動、物体認識記憶及び恐怖記憶の獲得に対しては効果を示さなかった。

自発的運動や環境エンリッチメントは空間記憶 [103, 43] 及び非空間記憶 [41, 10] に対して改善効果を示すことが知られている。自発的運動や環境エンリッチメントによる効果には BDNF シグナルが重要な役割のひとつであると考えられている [19, 73]。また、BDNF シグナルは海馬機能、シナプス可塑性、学習及びうつへの制御に重要な役割を果たすことが知られている [52]。従って、自発的運動ないし環境エンリッチメントによる BDNF シグナルが AGIQ 曝露によるシナプス可塑性増強を更に促進する可能性が高く、動物の学習／記憶ないし行動に対しても相乗的な効果を示す可能性がある。

第3章では、胎児期から成熟期までの継続的な AGIQ 曝露と自発的運動及び環境エンリッチメントを組み合わせることで、成熟後のラットの学習／記憶ないし行動に対して修飾効果を示すかどうかを検討した。行動試験として、成熟後にオープンフィールド試験、新奇物体探索、新奇位置探索及び文脈的恐怖条件付け試験を行った。

材料および方法

化学物質および供試動物

AGIQ (純度 >97%) は三栄源エフ・エフ・アイ株式会社 (大阪, 日本) より提供された。24 匹の交尾確認済み雌 Iar:Long-Evans ラットを妊娠 3 日目で日本エスエルシー株式会社 (浜松, 日本) より購入した。交尾確認済みラットは, 入荷時から分娩後 21 日目まで温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 相対湿度 $55 \pm 15\%$, 照明条件 12 時間の明暗サイクルで個別にポリカーボネート製ケージに紙製床敷を入れ, 個別飼育した。AGIQ の投与開始までは, 基礎飼料 (CRF-1, 粉末, オリエンタル酵母株式会社) 及び飲料水を自由に摂取させた。児動物は出生後 21 日目 (出生日を 0 日目とする) に離乳させ, それ以降, 児動物は 2 匹/ケージで, 基礎飼料 (CRF-1, 粉末) ないし AGIQ を含む基礎飼料 (CRF-1, 粉末) 及び飲料水の自由摂食・自由飲水下で飼育した。

実験デザイン

交尾確認済みラットは 2 群に分け, 基礎飼料 (12 匹, 無処置対照群) ないし 5,000 ppm の AGIQ を含む基礎飼料 (12 匹, AGIQ 群) を妊娠 6 日目から出産後 21 日目まで混餌投与した。AGIQ 濃度は, 所属研究室の先行研究で胎児期から成熟期までの継続曝露により恐怖記憶の消去学習促進を示した 5,000 ppm を選択した [75]。

母動物について, 妊娠 6 日目から出産後 21 日目まで体重, 摂餌量及び摂水量を 3~4 日に 1 回の頻度で測定した。出生後 4 日目に児動物の間引きを行い, 各母動物に 8 匹の児動物 (5 匹

ないし 6 匹の雄と 2 匹ないし 3 匹の雌) になるように調整した。児動物について出生後 21 日目まで体重を 3~4 日に 1 回の頻度で測定した。母動物及び雌性児動物は出産後 (出生後) 21 日目に CO₂/O₂ 麻酔下で腹大動脈切断によって放血し、安楽死させた。動物の行動は性周期によるステロイドホルモンレベルの変動に影響を受けるため、本研究では雄性児動物を行動試験に使用した [63, 68, 77]。

出生後 21 日目以降、無処置対照群及び AGIQ 群の雄性児動物は引き続き母動物と同じ基礎飼料ないし AGIQ を含む基礎飼料を与えた。出生後 21 日に無処置対照群の雄性児動物を基礎飼料+標準ケージ群 (28 匹), 基礎飼料+回転ケージ群 (16 匹) 及び基礎飼料+環境エンリッチメントケージ群 (18 匹) の 3 群, AGIQ 群の雄性児動物を AGIQ+標準ケージ群 (30 匹), AGIQ+回転ケージ群 (16 匹) 及び AGIQ+環境エンリッチメント群 (18 匹) の 3 群にそれぞれ分けた。標準ケージ条件では、標準ケージ (内径, 幅 204 mm × 奥行き 363 mm × 高さ 196 mm) に紙製床敷きを入れ、環境エンリッチメントを入れずに飼育した (Fig. 3-1)。回転ケージ条件では、回転輪 (幅 85 mm × 直径 310 mm) を取り付けた回転ケージ (内径, 幅 200 mm × 奥行き 355 mm × 高さ 195 mm, 株式会社メルクエスト, 富山, 日本) に紙製床敷きを入れ、自由に運動をさせて飼育した (Fig. 3-1)。環境エンリッチメントケージ条件では、大型のケージ (内径, 幅 440 mm × 奥行き 275 mm × 高さ 180 mm) に 2 種類の床敷き, 隠れ家, 巣材, 玩具 (プラスチック製玩具, 木製玩具, 鎖, ロープ, ガラガラないし梯子) を入れ、動物を飽きさせないため 1 回/週の頻度で新しいものに入れ替えた (Fig. 3-1)。ラットは実験終了まで体重, 摂餌量及び摂水量を週 1 回の頻度で測定した。

出生後 76 日目及び出生後 81 日目に、行動解析を終えた後の動物 (16～18 匹／群) の脳採材を行った (その後の解析は行わなかった)。出生後 77 日に基礎飼料+標準ケージ群の雄性児動物 10 匹及び AGIQ+標準ケージ群の雄性児動物 12 匹の脳採材を行った (その後の解析は行わなかった)。

全ての母動物及び児動物について、一般状態 (歩行や行動の異常がないか) の観察を毎日行った。本研究におけるすべての動物実験計画は、国立大学法人東京農工大学の動物実験倫理委員会に提出して承認を受け、動物飼育、管理にあつては、国立大学法人 東京農工大学の実験取扱い倫理規定に従った。

行動解析

基礎飼料+標準ケージ群 (18 匹), 基礎飼料+回転ケージ群 (16 匹), 基礎飼料+環境エンリッチメントケージ群 (18 匹), AGIQ+標準ケージ群 (18 匹), AGIQ+回転ケージ群 (16 匹) 及び AGIQ+環境エンリッチメントケージ群 (18 匹) に対してオープンフィールド試験, 新奇物体探索試験, 新奇位置探索試験及び文脈的恐怖条件付け試験を行った。動物を各行動解析開始の 1～2 時間前に動物飼育室から行動解析室へ運搬し, 待機させた。各行動解析終了後, 動物を速やかに飼育ケージへ戻し動物飼育室へ運搬した。行動解析機器は各実験の前後に 70%エタノールを用いて清掃した。全ての行動解析は 08:00 から 19:00 の間に実施し, 実施時刻が群間で偏ることを避けるため, 動物選択の順番は実験時間全体でカウンターバランスをとった。

オープンフィールド試験

出生後 60 日目, 64 日目及び 68 日目にオープンフィールド試験を行い, 第 2 章と同様の方法で自発運動及び不安様行動を評価するとともに翌日に新奇物体探索試験で使用する実験箱にラットを馴化させた (Fig. 3-2)。

新奇物体探索試験及び新奇位置探索試験

新奇物体探索試験を出生後 61 日目, 62 日目, 65 日目, 66 日目, 69 日目及び 70 日目に行い非位置記憶について評価した。新奇位置探索試験を出生後 63 日目, 67 日目及び 71 日目に行い位置記憶について評価した。本実験はオープンフィールド試験で用いたものと同じ実験箱を使用し, 第 2 章と同様の方法で行った (Fig. 3-3)。本実験は馴化, 獲得試行, 新奇物体探索のテスト試行 (獲得試行の 24 時間後) 及び新奇位置探索のテスト試行 (新奇物体探索のテスト試行の 24 時間後) の 4 過程とした。新奇位置探索試験のテスト試行では, 2 つの物体のうち 1 つの位置だけをフィールドの反対側へ移動させ, 動物に 3 分間自由に探索させた (Fig. 3-3)。物体は, 黒い貨幣状の滑らかな塩化ビニル片を表面に多数貼り付けた, 白い滑らかな表面の塩化ビニル製の球体を使用した (Fig. 3-3)。新奇物体は, ステンレス製の先端を持つ灰色で表面が粗い塩化ビニル製の円錐を使用した (Fig. 3-3)。

新奇物体探索試験及び新奇位置探索試験における識別指数は以下の式を用いて算出した：

識別指数 = $\frac{\text{新奇物体ないし新奇位置の探索時間}}{(\text{旧物体ないし旧位置の探索時間} + \text{新奇物体ないし新奇位置の探索時間})}$

文脈的恐怖条件付け試験

出生後 72 日目から 76 日目及び出生後 77 日目から 81 日目に文脈的恐怖条件付け試験を行い、第 2 章と同様の方法で、恐怖記憶の獲得及び消去学習について評価した。文脈的恐怖条件付け試験は、条件付け、獲得テスト及び 3 回の消去テストとし、それぞれの試行は 24 時間の間隔で行った。

統計解析

出生後 21 日目までの児動物データは同腹仔を解析単位として扱った。出生後 21 日目以降の児動物の体重、臓器重量、行動試験結果は個体別値を解析単位として扱った。6 群間の統計学的解析では、各群の分散を Levene 法で検定し、等分散の場合は Tukey-Kramer 検定、不等分散の場合は Steel-Dwass 検定を行った。対比較では、基礎飼料+標準ケージ群と基礎飼料+回転ケージ群、基礎飼料+環境エンリッチメント群、AGIQ+標準ケージ群、AGIQ+回転ケージ群ないし AGIQ+環境エンリッチメント群の 2 群間、AGIQ+標準ケージ群と AGIQ+回転ケージ群ないし AGIQ+環境エンリッチメント群の 2 群間、基礎飼料+回転ケージ群と AGIQ+回転ケージ群の 2 群間あるいは基礎飼料+環境エンリッチメント群と AGIQ+環境エンリッチメント群の 2 群間で検定を行った。2 群間の統計学的解析では、2 群間の分散を F 検定で算出し、等分散の場合は Student の t 検定、不等分散の場合は Aspin-Welch の t 検定により無処置対照群と AGIQ 群の検定を行った。

文脈的恐怖条件付け試験において、一部の動物は消去学習抵抗性を示したため、各群の外れ値を検出するために Smirnov-Grubbs 検定を行った。検出された動物は異常動物として消去学習テストから除外した。

全ての検定はエクセル統計 2013 (version 2.02; 株式会社社会情報サービス) を用いて行い、有意水準は $P<0.05$ とした。

結果

母動物の AGIQ 摂取量

摂餌量の平均値から算出された AGIQ の摂取量は妊娠期間で 426.6 mg/kg 体重/日, 授乳期間で 843.7 mg/kg 体重/日であった。

児動物への影響

授乳期の AGIQ 群では, いずれの動物にも歩行や行動の異常を認めなかった。出生後 5 日目から出生後 21 日目までの AGIQ 群の体重は無処置対照群と同様に推移した (Table 3-1)。

離乳後から実験終了まで, 各処置群のいずれの動物にも歩行や行動の異常を認めなかった。出生後 75 日目の基礎飼料+回転ケージ群では基礎飼料+標準ケージ群と比べて体重の低値を認めた (Table 3-2)。出生後 26 日目の AGIQ+回転ケージ群では AGIQ+標準ケージ群と比べて体重の低値を認めた (Table 3-2)。その他のいずれの時点でも, いずれの群間の比較でも体重の有意な変動を認めなかった (Table 3-2)。

摂餌量の平均値から算出された雄性児動物の AGIQ の摂取量は AGIQ+標準ケージ群, AGIQ+回転ケージ群及び AGIQ+環境エンリッチメント群でそれぞれ 400.6, 488.8 及び 417.4 mg/kg 体重/日であった。

行動解析

オープンフィールド試験

基礎飼料+回転ケージ群では基礎飼料+標準ケージ群と比べて総移動距離の低値を認めた (Table 3-3)。AGIQ+回転ケージ群では AGIQ+標準ケージ群と比べて総移動距離の低値を認めた (Table 3-3)。その他のいずれの群間の比較でも総移動距離の有意な変動を認めなかった。いずれの群間の比較でも中央区画率の変動を認めなかった (Table 3-3)。

新奇物体探索試験

新奇物体探索及び新奇位置探索試験のテスト試行において、いずれの群間の比較でも総移動距離及び識別指数の有意な変動を認めなかった (Table 3-3)。

文脈的恐怖条件付け試験

恐怖記憶の獲得テスト及び消去テストにおいて、いずれの群間の比較でもフリージング率の有意な変動を認めなかった (Table 3-3)。

考察

第3章では,AGIQの胎児期から成熟期までの継続曝露と自発的運動ないし環境エンリッチメントの組み合わせが,成熟後の動物の学習／記憶ないし行動に対してどのような修飾作用を示すか検討した。その結果,統計学的に有意ではなかったものの,標準ケージ条件でAGIQを継続曝露した後に,文脈的恐怖条件付け試験における3回目の消去学習テストで消去学習の促進を示した。しかし,回転ケージ条件ないし環境エンリッチメントケージ条件でAGIQを継続曝露した場合,同じ飼育条件でAGIQを曝露しなかった場合と比較してほとんどあるいは全く消去学習の促進を認めなかった。一方で,環境エンリッチメントケージ条件ではAGIQ曝露の有無に関わらず,標準ケージ条件でAGIQを曝露しなかった場合と比べて,統計学的には有意ではなかったものの全ての消去学習テストで消去学習の促進を認めた。これらの結果は,継続的なAGIQ曝露及び環境エンリッチメントケージ条件はそれぞれ恐怖記憶の消去学習を促進するが,相乗的な効果は無い可能性が高いことを示唆する。

本研究の回転ケージ条件では,AGIQの有無に関わらず,標準ケージ条件と比べてオープンフィールド試験における総移動距離の低値を認めた。自発的運動が動物の不安様行動を誘発し,オープンフィールドにおける探索行動が減少することが報告されていることから [11],本研究の結果は先行研究と同様に,自発的運動による効果であることが示唆された。自発的運動は,空間記憶 [103],非空間記憶 [41] 及び恐怖記憶 [56] 等の学習／記憶に対して有益な効果を示すことが報告されている。しかしながら,本研究では回転ケージ条件はいずれの

行動解析のパラメータにも効果を示さず、その原因も明らかではなかった。

本研究では、環境エンリッチメントケージ条件は、恐怖記憶の消去学習の促進傾向を除いて、いずれの行動解析にも効果を示さなかった。環境エンリッチメントは、空間記憶 [43] 及び非空間記憶 [10] 等の学習／記憶に対して有益な効果を示すことが報告されている。環境エンリッチメント実験では、環境エンリッチメントの定義や方法が研究施設によって大きく異なることが報告されている [93]。また、環境エンリッチメント実験では、動物の自発的運動量が環境エンリッチメントの程度に依存して変動することが報告されている [111]。従って、動物の学習／記憶の機能に対する環境エンリッチメントの効果も、環境エンリッチメントの程度に依存する可能性がある。

本研究の回転ケージ条件では、AGIQの有無に関係なく、標準ケージ条件と比べて、体重の低値傾向あるいは統計学的に有意な体重の低値を認めた。体重の低値は単純に自発的運動によるエネルギー消費による変動の可能性がある。

本研究では、出生後 5 日目から出生後 21 日目まで、AGIQ 曝露による体重の変動を認めなかった。出生後 26 日目から出生後 75 日目まで、いずれの飼育条件でも AGIQ 曝露による体重変動を認めなかった。更に AGIQ は、恐怖記憶の消去学習促進傾向を除き、いずれの飼育条件でも行動試験の成績に影響を与えなかった。これらの結果は、胎児期から成熟期までの継続的な 5,000 ppm の AGIQ 曝露は、いずれの飼育条件でも動物の健康状態に影響を与えないことを示唆する。

結論として、胎児期から成熟期までの継続的な AGIQ 曝露と自発的運動ないし環境エンリ

ッチメントの組み合わせは動物の学習／記憶ないし行動に対して修飾作用を示さないことが明らかとなった。体重、剖検時の脳重量及び行動試験パラメータに対し AGIQ 曝露と自発的運動ないし環境エンリッチメントの組み合わせが有益な作用も有害な作用も示さないことを明らかにした。

小括

第3章では、継続的な AGIQ 曝露と自発的運動ないし環境エンリッチメントを組み合わせることで、動物の学習／記憶ないし行動に対して修飾作用を示すかどうか検討するため、AGIQ を妊娠 6 日目から出生後 21 日目の離乳まで母動物に混餌投与し、離乳後は雄性児動物を標準ケージ条件、回転ケージ条件ないし環境エンリッチメントケージ条件に分け、実験終了まで継続的に AGIQ を混餌投与した。成熟後に、自発的運動及び不安様行動の検査としてオープンフィールド試験を、空間記憶の検査として新奇物体探索試験を、非空間記憶の検査として新奇位置探索試験を、情動記憶の検査として文脈的恐怖条件付け試験を行った。環境エンリッチメントケージ条件で AGIQ を曝露しなかった場合、標準ケージ条件で AGIQ を曝露した場合と同様に、恐怖記憶の消去学習の促進傾向を認めたが、AGIQ 曝露と環境エンリッチメント条件は相乗効果を示さなかった。自発的運動は、AGIQ 曝露の有無に関わらずオープンフィールド試験における総移動距離を低下させたのみで、自発的運動によって不安様行動が誘発されたものと考えられた。

総合考察

本研究では、抗酸化物質の中樞神経系に対する有益な作用を明らかにする目的で、病的な状態に対する保護作用及び健康な状態に対する修飾作用について検討を行った。

第 1 章では、病的な状態の中樞神経に対する抗酸化物質の保護作用について検討した。所属研究室の先行研究で、母動物に対して抗甲状腺剤である PTU の曝露によって生じる児動物の甲状腺機能低下と関連して、PTU 曝露終了時の出生後 21 日目の児動物海馬における神経新生障害が生じることを見出している [88, 89]。そこで本研究では PTU と共に抗酸化物質である AGIQ ないし ALA をラットに発達期曝露し、児動物の神経新生障害が抑制されるかどうかを検討した。その結果、PTU の発達期曝露により、出生後 21 日目の海馬歯状回において type-1 幹細胞, type-2b 前駆細胞, type-3 前駆細胞, 未熟顆粒細胞及び成熟顆粒細胞の数が減少し、海馬歯状回門では PVALB⁺ GABA 性介在ニューロンの数が減少した。発達期の甲状腺機能低下によって児動物の海馬における脂質過酸化レベルが上昇することが報告されているが[16], 本研究では、PTU の発達期曝露終了時の海馬で脂質過酸化レベルの変動を認めなかった。これらの結果は、発達期の甲状腺機能低下による神経新生障害に対し酸化ストレスが本質的には関与しないことを示唆している。また、抗酸化物質である AGIQ ないし ALA の共曝露は神経新生障害を抑制しなかった。この結果も発達期の甲状腺機能低下による神経新生障害に酸化ストレスが本質的に関与しないことを支持する。

海馬歯状回の顆粒細胞系譜では、type-2b 以降の神経前駆細胞及び顆粒細胞で発現している

甲状腺ホルモン受容体 $\alpha 1$ が、甲状腺ホルモンのシグナルを介してこれらの細胞の生存や分化を制御している [46]。特に、type-2b 及び type-3 神経前駆細胞は甲状腺機能低下の主な標的と考えられており [47]、本研究で type-2b 前駆細胞以降の分化段階の細胞が減少した原因は甲状腺ホルモンの欠乏自体である可能性が高い。また、発達期の甲状腺機能低下は GABA 性介在ニューロンの成熟障害を引き起こすことが知られており [28]、本研究で PTU の発達期曝露後の海馬歯状回門における PVALB⁺ GABA 性介在ニューロン減少の原因として発達期の甲状腺機能低下が関与している可能性が示唆された。海馬歯状回門の GABA 性介在ニューロンは、顆粒細胞層下帯における神経幹細胞の増殖と分化を制御しており [91]、この GABA 性介在ニューロンの成熟障害が海馬歯状回における type-1 神経幹細胞の減少と関連している可能性が高い。

遺伝子発現解析では、PTU 曝露終了時の海馬歯状回で減少した *Eomes*, *Gria3*, *Grin2a*, *Grin2b* 及び *Epha4* の遺伝子発現が、AGIQ ないし ALA の共曝露によって転写レベルでは回復することを明らかにした。また、AGIQ ないし ALA の共曝露によって PTU のみを曝露した場合と比べて、シナプス可塑性に関与する遺伝子及び神経新生促進に関与する遺伝子の発現上昇を認めた。これらの結果は、AGIQ ないし ALA の共曝露による海馬歯状回におけるシナプス可塑性増強及び神経新生促進を示唆するが、これらの変化は免疫染色結果には反映されなかった。

甲状腺ホルモンは細胞骨格の再構築を介して mRNA の安定化や翻訳の促進に関与することが報告されている [92]。また、甲状腺ホルモンはリボソームの合成やタンパク質の翻訳に関与する mammalian Target Of Rapamycin (mTOR) の発現を促進することが報告されている [65]。

実際に、メチマゾールの曝露ないしヨウ素欠乏飼料による発達期ラットの甲状腺機能低下によって海馬 CA1 領域におけるシナプス可塑性の低下及び Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR シグナル経路の活性化が抑制されることが報告されている [108]。従って、AGIQ ないし ALA の共曝露によって増加した転写産物が、甲状腺機能低下によってタンパク質へ効率的に翻訳されなかった可能性がある。

AGIQ 及び ALA の共曝露は発達期の甲状腺機能低下による神経新生障害をタンパク質レベルでは抑制しなかったが、転写レベルではシナプス可塑性に関与する遺伝子及び神経新生促進に関与する遺伝子の発現上昇を示し、病的な状態の中枢神経における潜在的な保護作用を示したと考える。所属研究室では、PTU の発達期曝露終了後に AGIQ ないし ALA を離乳後から成熟期まで曝露すると、PTU 曝露後に何も投与しなかった場合と比べて神経新生障害の回復が促進することを見出している [97]。従って、AGIQ や ALA 等の抗酸化物質は、甲状腺機能低下による神経新生障害には有効ではなかったものの、どのような疾病モデルに有効なのか、更なる探索が期待される。

第 2 章では、健康な状態のラットに対する抗酸化物質の学習／記憶に対する効果について検討した。所属研究室では、AGIQ をラットに胎児期から成熟期まで継続的に曝露することで、成熟後に文脈的恐怖条件付け試験において恐怖記憶の消去学習促進を示すことを明らかにした [75]。そこで、本研究ではどの時期の AGIQ 曝露が消去学習の促進に必要なかを明らかにするために、AGIQ の曝露時期を発達期曝露、離乳後曝露及び胎児期から成熟期まで継続的に曝露する全期間曝露の 3 つに分け、動物の学習／記憶ないし行動に対する効果を検討した。ま

た、恐怖記憶の消去学習促進に脳内のどのような分子変動が関与しているかについて免疫組織化学的解析及び遺伝子発現解析により検討した。その結果, AGIQ を全期間曝露した動物でのみ成熟後の文脈的恐怖条件付け試験において恐怖記憶の消去学習促進を認めたが、その他の行動試験では明らかな効果を認めなかった。AGIQ の発達期曝露ないし AGIQ の離乳後曝露は、いずれの行動試験でも効果を示さなかった。これらの結果は、胎児期から成熟期までの継続的な AGIQ 曝露が消去学習促進に必要である事を示唆する。

遺伝子発現解析の結果から, AGIQ 離乳後曝露は解析した殆どの遺伝子の発現レベルに対して影響しないことが明らかとなった。それとは逆に, AGIQ 発達期曝露及び AGIQ 全期間曝露では、海馬歯状回及び前辺縁皮質においてシナプス可塑性に関わる遺伝子が似たような構成的発現変動パターンを示した。これらの結果は、発達期の AGIQ 曝露が、投与を終えてから長期間経過した成熟後の脳の遺伝子発現に影響を与える事を示唆する。ケルセチンやレスベラトロール等のポリフェノール類は、エピジェネティックな作用を介して様々な疾病の予防効果を発揮することが知られている [4]。従って, AGIQ の発達期曝露でも、大規模なエピジェネティックな変動が生じている発達中の細胞に対してエピジェネティックな影響を与えた可能性がある。一方で、下辺縁皮質及び扁桃体では、AGIQ 全期間曝露は AGIQ 発達期曝露よりも多くの遺伝子の構成的発現レベルの上昇を示した。AGIQ 発達期曝露はいずれの行動試験でも効果を示さなかったことから, AGIQ 発達期曝露後に認めた遺伝子発現変動は動物の行動を変化させるには十分でなかった可能性が高い。本研究では AGIQ の発達期曝露は成熟後の動物の行動に対して影響を与えなかったものの、発達期の曝露が成熟後の遺伝子発現を変動さ

せたことは興味深い。発達期の AGIQ 曝露がラット脳のニューロンにどのような作用を発揮しているのか、更なる研究が期待される。

AGIQ 全期間曝露ラットでは、最後の消去学習テスト後の海馬歯状回及び扁桃体で多くのシナプス可塑性に関わる遺伝子 (Eph/Ephrin, グルタミン酸受容体/トランスポーター, 最初期遺伝子及びその制御因子である ERK2) の発現上昇を認めた。更に, AGIQ 全期間曝露では前辺縁皮質及び下辺縁皮質における p-ERK1/2⁺ニューロンの増加を認めた。これらの結果は、恐怖記憶を制御する脳領域における構成的及び学習依存的なシナプス可塑性遺伝子／タンパク質の発現上昇が様々な形で消去学習の促進に関与している可能性を示唆している。

第3章では、AGIQ の胎児期から成熟期までの継続曝露と、動物の学習／記憶あるいは行動に対して有益な作用を示すことが知られている自発的運動ないし環境エンリッチメントを組み合わせることで動物の学習／記憶あるいは行動にどのような効果を示すか検討した。その結果, AGIQ 曝露及び環境エンリッチメント条件はそれぞれ文脈的恐怖条件付け試験における恐怖記憶の消去学習促進傾向を示したが、環境エンリッチメント条件で AGIQ を曝露した場合と AGIQ を曝露しなかった場合を比較すると殆どあるいは全く効果を認めなかった。従って継続的な AGIQ 曝露と環境エンリッチメント条件には相乗的に働かないと考えられた。

自発的運動条件では、オープンフィールド試験における総移動距離の低値を認め、不安様行動の誘発が示唆されたが、それ以外の学習／記憶ないし行動に対する修飾作用を認めなかった。自発的運動は、空間記憶 [103], 非空間記憶 [41] 及び恐怖記憶 [56] 等の学習／記憶の修飾作用を示すことが報告されているが、本研究では回転ケージ条件はいずれの行動解析の

パラメータにも効果を示さず、その原因も明らかではなかった。環境エンリッチメントケージ条件は、空間記憶 [43] 及び非空間記憶 [10] 等の学習／記憶に対して有益な効果を示すことが報告されているが、本研究では恐怖記憶の消去学習の促進傾向を除いて、いずれの行動解析にも効果を示さなかった。環境エンリッチメント実験では、環境エンリッチメントの定義や方法が研究施設によって大きく異なることが報告されている [93]。また、環境エンリッチメント実験では、動物の自発的運動量が環境エンリッチメントの程度に依存して変動することが報告されている [111]。従って、動物の学習／記憶の機能に対する環境エンリッチメントの効果も、環境エンリッチメントの程度に依存する可能性がある。

第 1 章から第 3 章までの結果から、病的な状態のラットに対する AGIQ の発達期曝露による神経保護作用あるいは健康なラットに対する胎児期から成熟期までの AGIQ の継続的曝露による学習／記憶に対する修飾作用には、いずれも中枢神経において多様な遺伝子の発現変動が関与している可能性が高いことが明らかとなり、AGIQ 曝露は健康ないし病的な状態を問わず有益な作用を示す可能性が示された。AGIQ を含むフラボノイド類の作用機序には、直接的な抗酸化作用以外に、様々なシグナル伝達経路を介したシナプス可塑性に関わるタンパク質の発現誘導、抗酸化酵素及び神経修復に関わるタンパク質の発現誘導、脳血流量の増加及び炎症やアポトーシス等の抑制によるニューロンの保護作用が関与していると考えられている [94, 111]。第 1 章では、PTU と共に AGIQ を発達期曝露することで、海馬歯状回において PTU 単独の発達期曝露と比べてシナプス可塑性の増強に関わる遺伝子の発現上昇を認め、第 2 章では、AGIQ の胎児期から成熟期までの継続曝露により恐怖記憶の消去学習促進とともに

恐怖記憶の制御に関わる領域においてシナプス可塑性の増強に関わる遺伝子をはじめとした様々な遺伝子の構成的あるいは学習依存的な発現の上昇を認めた。また、第 1 章では PTU と共に AGIQ を発達期曝露した後の海馬において脂質過酸化レベルの変動を認めなかった。これらの結果より、AGIQ の作用には、直接的な抗酸化作用よりも様々なシグナル伝達経路を介したシナプス可塑性の増強、脳血流量の増加ないし炎症やアポトーシスの抑制によるニューロンの保護作用が関与している可能性が高いと考えられた。

第 1 章及び第 2 章では発達期の AGIQ 曝露後に長期間の休薬を経た成熟後のラット脳において複数の遺伝子の発現レベルの変動を認めた。この原因は明らかではなかったが、ヒトでは胎児期や幼児期の栄養条件等の環境要因が、エピジェネティックな変動を介して成人後の健康状態に影響を与えると考えられており[40, 94], AGIQ の発達期曝露がエピジェネティックなリプログラミングを介して成熟後の遺伝子発現レベルの変動を引き起こした可能性がある。ニューロンの核内におけるヒストンのアセチル化及び脱アセチル化の適正なバランスはニューロンが正常に機能するために必要であり、神経変性の際にはアセチル化のバランスが崩れて遺伝子発現の異常が生じると考えられている [4]。また、エピジェネティックな機構は学習／記憶等の認知機能の調節に必要不可欠な因子であり、加齢に伴う記憶障害やアルツハイマー病における記憶障害に関与している [4]。近年、食品由来のポリフェノール類が DNA メチル化やヒストンアセチル化に対する修飾効果を示し、がん、神経炎症、神経変性疾患、糖尿病ないし加齢に対して予防あるいは軽減効果を示すことが多数報告されている [4]。ケルセチンはヒストン脱アセチル化酵素である HDAC1 の阻害作用及び HDAC ファミリータンパク

質のひとつであるサーチュイン 1 (SIRT1) の促進作用を示すことが知られており [4], ケルセチンの一種である AGIQ も同様の作用を示す可能性が高い。従って, AGIQ の発達期曝露が加齢による認知機能の低下, 神経変性疾患ないし神経毒性物質等による神経系に対する有害作用などを予防ないし抑制効果を発揮する可能性があり, 今後の更なる有効性の探索に期待が持てるものと考えられた。

結論

第1章では、PTUのラットに対する発達期曝露によって誘発された発達期の甲状腺機能低下に起因する海馬歯状回における顆粒細胞系譜の細胞数減少及び歯状回門におけるGABA性介在ニューロン数の減少をAGIQないしALAの共曝露は抑制しないことが明らかとなった。しかし、AGIQないしALAの共曝露によって様々な機能を含む多くの遺伝子の発現レベル上昇を認め、海馬歯状回におけるシナプス可塑性増強及び神経新生促進の可能性が示唆された。PTU単独曝露及びPTUと抗酸化物質共曝露のいずれでも海馬における脂質過酸化レベルの変動を認めなかったことから、発達期の甲状腺機能低下による神経新生障害の原因は酸化ストレスではなく、甲状腺ホルモンの枯渇自体である可能性が考えられた。抗酸化物質の共曝露による多くの遺伝子の発現レベル上昇は、直接的な抗酸化作用とは異なる機序による潜在的な神経保護作用の可能性を示唆しており、更なる有効性の検討が期待される。

第2章では、AGIQを発達期、離乳後ないしその両方の期間ラットに曝露したところ、成熟期のAGIQ全期間曝露でのみ文脈的恐怖条件付け試験において消去学習の促進を認めた。この結果は、恐怖記憶の消去学習促進のためには胎児期から成熟期までの継続的なAGIQ曝露が必要であることを示唆している。免疫組織学的解析及び遺伝子発現解析により、恐怖記憶の消去学習促進には、恐怖記憶の制御に関わる脳領域におけるシナプス可塑性関連遺伝子／タンパク質の構成的及び学習依存的な上方制御が関与している可能性が高いことを明らかにした。AGIQの継続的曝露が学習に関わる神経回路のシナプス可塑性増強に関与することは、

AGIQ 曝露が恐怖記憶の消去学習以外の学習／記憶に効果を示す可能性を秘めており、更なる検討が期待される。

第 3 章では、健康なラットに対する胎児期から成熟期までの継続的な AGIQ 曝露と、離乳後の自発的運動ないし環境エンリッチメントを組み合わせ、動物の学習／記憶ないし行動に対する修飾作用について検討した。その結果、継続的な AGIQ 曝露と自発的運動ないし環境エンリッチメントは相乗的な効果を示さなかった。健康な動物に対する相乗効果を示さなかった原因は明らかではなかったが、今後の展開として、病的な状態の動物に対する継続的な AGIQ 曝露と自発的運動ないし環境エンリッチメントの組み合わせによる神経組織の保護作用の検討が待たれる。

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，東京農工大学大学院農学研究院動物生命科学部門 吉田 敏則 准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，東京農工大学農学部共同獣医学科 佐々木 一昭 准教授，帯広畜産大学獣医学ユニット 古林 与志安 教授，岩手大学農学部共同獣医学科 佐藤 洋 教授，岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科 酒井 洋樹 教授に謹んで深謝の意を表します。

研究・実験に際し，御指導・御協力賜りました，株式会社ボゾリサーチセンターの皆様，実験にご協力下さいました，同教室諸氏に心から感謝いたします。

引用文献

1. Akane, H., Saito, F., Yamanaka, H., Shiraki, A., Imatanaka, N., Akahori, Y., Morita, R., Mitsumori, K. and Shibutani, M. (2013). Methacarn as a whole brain fixative for gene and protein expression analyses of specific brain regions in rats. *J. Toxicol. Sci.* 38, 431–443.
2. Akiyama, T., Washino, T., Yamada, T., Koda, T. and Maitani, T. (2000). Constituents of enzymatically modified isoquercitrin and enzymatically modified rutin (extract). *Food Hyg. Safe. Sci.* 41, 46–60.
3. Asiaei, F., Fazel, A., Rajabzadeh, A.A., Hosseini, M., Beheshti, F. and Seghatoleslam, M. (2017). Neuroprotective effects of *Nigella sativa* extract upon the hippocampus in PTU-induced hypothyroidism juvenile rats: A stereological study. *Metab. Brain Dis.* 32, 1755–1765.
4. Ayissi, V.B.O., Ebrahimi, A., Schluesenner, H. (2014). Epigenetic effects of natural polyphenols: a focus on SIRT1-mediated mechanisms. *Mol. Nutr. Food Res.* 58, 22–32.
5. Bhanja, S. and Jena, S. (2013). Modulation of antioxidant enzyme expression by PTU-induced hypothyroidism in cerebral cortex of postnatal rat brain. *Neurochem. Res.* 38, 42–49.
6. Biewenga, G.P., Haenen, G.R. and Bast, A. (1997). The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen. Pharmacol.* 29, 315–331.
7. Bracko, O., Singer, T., Aigner, S., Knobloch, M., Winner, B., Ray, J., Clemenson, G.D. Jr., Suh, H., Couillard-Despres, S., Aigner, L., Gage, F.H., Jessberger, S. (2012). Gene expression

- profiling of neural stem cells and their neuronal progeny reveals IGF2 as a regulator of adult hippocampal neurogenesis. *J. Neurosci.* 32, 3376–3387.
8. Brami-Cherrier, K., Roze, E., Girault, J.A., Betuing, S., Caboche, J. (2009). Role of the ERK/MSK1 signalling pathway in chromatin remodelling and brain responses to drugs of abuse. *J. Neurochem.* 108, 1323–1335.
 9. Brown, J.P., Couillard-Després, S., Cooper-Kuhn, C.M., Winkler, J., Aigner, L., Kuhn, H.G. (2003). Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J. Comp. Neurol.* 467, 1–10.
 10. Bruel-Jungerman, E., Laroche, S. and Rampon, C. (2005). New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *Eur. J. Neurosci.* 21, 513–521.
 11. Burghardt, P.R., Fulk, L.J., Hand, G.A. and Wilson, M.A. (2004). The effects of chronic treadmill and wheel running on behavior in rats. *Brain. Res.* 1019, 84–96.
 12. Buskila, Y., Amitai, Y. (2010). Astrocytic iNOS-dependent enhancement of synaptic release in mouse neocortex. *J. Neurophysiol.* 103, 1322–1328.
 13. Caldeira, M.V., Melo, C.V., Pereira, D.B., Carvalho, R., Correia, S.S., Backos, D.S., Carvalho, A.L., Esteban, J.A., Duarte, C.B. (2007). Brain-derived neurotrophic factor regulates the expression and synaptic delivery of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor subunits in hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* 282, 12619–12628.

14. Cameron, H.A., McEwen, B.S., Gould, E. (1995). Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. *J. Neurosci.* 15, 4687–4692.
15. Cano-Europa, E., Pérez-Severiano, F., Vergara, P., Ortiz-Butrón, R., Ríos, C., Segovia, J. and Pacheco-Rosado, J. (2008). Hypothyroidism induces selective oxidative stress in amygdala and hippocampus of rat. *Metab. Brain Dis.* 23, 275–287.
16. Cattani, D., Goulart, P.B., Cavalli, V.L., Winkelmann-Duarte, E., Dos Santos, A.Q., Pierozan, P., de Souza, D.F., Woehl, V.M., Fernandes, M.C., Silva, F.R., Gonçalves, C.A., Pessoa-Pureur, R. and Zamonier, A. (2013). Congenital hypothyroidism alters the oxidative status, enzyme activities and morphological parameters in the hippocampus of developing rats. *Mol. Cell Endocrinol.* 375, 14–26.
17. Chen, C., Magee, J.C. and Bazan N.G. (2002). Cyclooxygenase-2 regulates prostaglandin E₂ signaling in hippocampal long-term synaptic plasticity. *J. Neurophysiol.* 87, 2851–2857.
18. Chowdhury, S., Shepherd, J.D., Okuno, H., Lyford, G., Petralia, R.S., Plath, N., Kuhl, D., Huganir, R.L., Worley, P.F. (2006). Arc/Arg3.1 interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking. *Neuron* 52, 445–459.
19. Cotman, C.W., Berchtold, N.C. and Christie, L.A. (2007). Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci.* 30, 464–472.
20. Cull-Candy, S., Kelly, L., Farrant, M. (2006). Regulation of Ca²⁺-permeable AMPA receptors: synaptic plasticity and beyond. *Curr. Opin. Neurobiol.* 16, 288–297.

21. Dines, M., Lamprecht, R. (2016). The Role of Ephs and Ephrins in Memory Formation. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 19, pyv106.
22. Duclot, F., Kabbaj, M. (2017). The Role of Early Growth Response 1 (EGR1) in Brain Plasticity and Neuropsychiatric Disorders. *Front. Behav. Neurosci.* 11, 35.
23. Emura, K., Yokomizo, A., Toyoshi, T. and Moriwaki, M. (2007). Effect of enzymatically modified isoquercitrin in spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 53, 68–74.
24. Freund, T.F. and Buzsáki, G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6, 347–470.
25. Fujii, Y., Kimura, M., Ishii, Y., Yamamoto, R., Morita, R., Hayashi, S.M., Suzuki, K. and Shibutani, M. (2013a). Effect of enzymatically modified isoquercitrin on preneoplastic liver cell lesions induced by thioacetamide promotion in a two-stage hepatocarcinogenesis model using rats. *Toxicology* 305, 30–40.
26. Fujii, Y., Segawa, R., Kimura, M., Wang, L., Ishii, Y., Yamamoto, R., Morita, R., Mitsumori, K. and Shibutani, M. (2013b). Inhibitory effect of α -lipoic acid on thioacetamide-induced tumor promotion through suppression of inflammatory cell responses in a two-stage hepatocarcinogenesis model in rats. *Chem. Biol. Interact.* 205, 108–118.
27. Gao, Y.J., Ji, R.R. (2009). c-Fos and pERK, which is a better marker for neuronal activation and central sensitization after noxious stimulation and tissue injury? *Open Pain J.* 2, 11–17.
28. Gilbert, J. and Man, H.Y. (2017). Fundamental elements in autism: from neurogenesis and neurite growth to synaptic plasticity. *Front. Cell Neurosci.* 11, 359.

29. Gilbert, M.E., Sui, L., Walker, M.J., Anderson, W., Thomas, S., Smoller, S.N., Schon, J.P., Phani, S. and Goodman, J.H. (2007). Thyroid hormone insufficiency during brain development reduces parvalbumin immunoreactivity and inhibitory function in the hippocampus. *Endocrinology*. 148, 92–102.
30. Gilgun-Shrki, Y., Melamed, E. and Offen, D. (2001). Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology* 40, 959–975.
31. Gong, C., Wang, T.W., Huang, H.S., Parent, J.M. (2007). Reelin regulates neuronal progenitor migration in intact and epileptic hippocampus. *J. Neurosci.* 27, 1803–1811.
32. Greger, I.H., Watson, J.F., Cull-Candy, S.G. (2017). Structural and functional architecture of AMPA–type glutamate receptors and their auxiliary proteins. *Neuron* 94, 713–730.
33. Gruzman, A., Hidmi, A., Katzhendler, J., Haj-Yehie, A. and Sasson, S. (2004). Synthesis and characterization of new and potent α -lipoic acid derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 12, 1183–1190.
34. Guadaño-Ferraz, A., Benavides-Piccione, R., Venero, C., Lancha, C., Vennström, B., Sandi, C., DeFelipe, J., Bernal, J. (2003). Lack of thyroid hormone receptor $\alpha 1$ is associated with selective alterations in behavior and hippocampal circuits. *Mol. Psychiatry* 8, 30–38.
35. Gupta, S.C., Hillman, B.G., Prakash, A., Ugale, R.R., Stairs, D.J., Dravid, S.M. (2013). Effect of D-cycloserine in conjunction with fear extinction training on extracellular signal-regulated kinase activation in the medial prefrontal cortex and amygdala in rat. *Eur. J. Neurosci.* 37, 1811–1822.

36. 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.
37. Hardingham, N., Dachtler, J., Fox, K. (2013). The role of nitric oxide in pre-synaptic plasticity and homeostasis. *Front. Cell Neurosci.* 7, 190.
38. Harney, S.C., Jane, D.E., Anwyl, R. (2008). Extrasynaptic NR2D-containing NMDARs are recruited to the synapse during LTP of NMDAR-EPSCs. *J. Neurosci.* 28, 11685–11694.
39. Hodge, R.D., Nelson, B.R., Kahoud, R.J., Yang, R., Mussar, K.E., Reiner, S.L. and Hevner, R.F. (2012). *Tbr2* is essential for hippocampal lineage progression from neural stem cells to intermediate progenitors and neurons. *J. Neurosci.* 32, 6275–6287.
40. Hoffman, D.J., Reynolds, R.M. and Hardy, D.B. (2017). Developmental origins of health and disease: current knowledge and potential mechanisms. *Nutr. Rev.* 75, 951-970.
41. Hopkins, M.E., Nitecki, R. and Bucci, D.J. (2011). Physical exercise during adolescence versus adulthood: differential effects on object recognition memory and brain-derived neurotrophic factor levels. *Neuroscience* 194, 84–94.
42. Hruska, M., Dalva, M.B. (2012). Ephrin regulation of synapse formation, function and plasticity. *Mol. Cell Neurosci.* 50, 35–44.

43. Hullinger, R., O'Riordan, K. and Burger, C. (2015). Environmental enrichment improves learning and memory and long-term potentiation in young adult rats through a mechanism requiring mGluR5 signaling and sustained activation of p70s6k. *Neurobiol. Learn. Mem.* 125, 126–134.
44. Jin, K., Mao, X.O., Sun, Y., Xie, L., Greenberg, D.A. (2002). Stem cell factor stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *J. Clin. Invest.* 110, 311–319.
45. Kangawa, Y., Yoshida, T., Abe, H., Seto, Y., Miyashita, T., Nakamura, M., Kihara, T., Hayashi, S.M. and Shibutani, M. (2017). Anti-inflammatory effects of the selective phosphodiesterase 3 inhibitor, cilostazol, and antioxidants, enzymatically-modified isoquercitrin and α -lipoic acid, reduce dextran sulphate sodium-induced colorectal mucosal injury in mice. *Exp. Toxicol. Pathol.* 69, 179–186.
46. Kapoor, R., van Hogerlinden, M., Wallis, K., Ghosh, H., Nordstrom, K., Vennstrom, B. and Vaidya, V.A. (2010). Unliganded thyroid hormone receptor $\alpha 1$ impairs adult hippocampal neurogenesis. *FASEB. J.* 24, 4793–4805.
47. Kapoor, R., Fanibunda S.E., Desouza, L.A., Guha, S.K. and Vaidya, V.A. (2015). Perspectives on thyroid hormone action in adult neurogenesis. *J. Neurochem.* 133, 599–616.
48. Katyare, S.S., Bangur, C.S. and Howland, J.L. (1994). Is respiratory activity in the brain mitochondria responsive to thyroid hormone action?: a critical re-evaluation. *Biochem. J.* 302, 857–860.

49. Kelsom, C., Lu, W. (2013). Development and specification of GABAergic cortical interneurons. *Cell Biosci.* 3, 19.
50. Korte, M., Kang, H., Bonhoeffer, T., Schuman, E. (1998). A role for BDNF in the late-phase of hippocampal long-term potentiation. *Neuropharmacology* 37, 553–559.
51. Kovács, K.J. (2008). Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. *J Neuroendocrinol.* 20, 665–672.
52. Kuipers, S.D. and Bramham, C.R. (2006). Brain-derived neurotrophic factor mechanisms and function in adult synaptic plasticity: New insights and implications for therapy. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 9, 580–586.
53. Lee, B., Shim, I., Lee, H., Hahm, D.H. (2018). Effects of epigallocatechin gallate on behavioral and cognitive impairments, hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysfunction, and alternations in hippocampal BDNF expression under single prolonged stress. *J. Med. Food.* 21, 979–989.
54. Leranth, C. and Hajszan, T. (2007). Extrinsic afferent systems to the dentate gyrus. *Prog. Brain Res.* 163, 63–84.
55. Liguz-Leczna, M., Skangiel-Kramska, J. (2007). Vesicular glutamate transporters (VGLUTs): the three musketeers of glutamatergic system. *Acta. Neurobiol. Exp. (Wars).* 67, 207–218.
56. Lin, T.W., Chen, S.J., Huang, T.Y., Chang, C.Y., Chuang, J.I., Wu, F.S., Kuo, Y.M. and Jen, C.J. (2012). Different types of exercise induce differential effects on neuronal adaptations and memory performance. *Neurobiol. Learn. Mem.* 97, 140–147.

57. 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.
58. Makino, T., Kanemaru, M., Okuyama, S., Shimizu, R., Tanaka, H. and Mizukami, H. (2013). Anti-allergic effects of enzymatically modified isoquercitrin (α -oligoglucosyl quercetin 3-*O*-glucoside), quercetin 3-*O*-glucoside, α -oligoglucosyl rutin, and quercetin, when administered orally to mice. *J. Nat. Med.* 67, 881–886.
59. Marek, R., Xu, L., Sullivan, R.K.P., Sah, P. (2018). Excitatory connections between the prelimbic and infralimbic medial prefrontal cortex show a role for the prelimbic cortex in fear extinction. *Nat. Neurosci.* 21, 654–658.
60. Maren, S., Phan, K.L., Liberzon, I. (2013). The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 417–428.
61. Masubuchi, Y., Nakahara, J., Kikuchi, S., Okano, H., Takahashi, Y., Takashima, K., Koyanagi, M., Maronpot, R.R., Yoshida, T., Hayashi, S.M. and Shibutani, M. (2020). Continuous exposure to α -glycosyl isoquercitrin from developmental stages to adulthood is necessary for facilitating fear extinction learning in rats. *J. Toxicol. Pathol.* (in press).
62. Melo, C.V., Mele, M., Curcio, M., Comprido, D., Silva, C.G., Duarte, C.B. (2013). BDNF regulates the expression and distribution of vesicular glutamate transporters in cultured hippocampal neurons. *PLoS One* 8, e53793.

63. Milad, M.R., Igoe, S.A., Lebron-Milad, K., Novales, J.E. (2009). Estrous cycle phase and gonadal hormones influence conditioned fear extinction. *Neuroscience* 164, 887–895.
64. Minatohara, K., Akiyoshi, M., Okuno, H. (2016). Role of Immediate-Early Genes in Synaptic Plasticity and Neuronal Ensembles Underlying the Memory Trace. *Front. Mol. Neurosci.* 8, 78.
65. Moeller, L.C., Cao, X., Dumitrescu, A.M., Seo, H. and Refetoff, S. (2006). Thyroid hormone mediated changes in gene expression can be initiated by cytosolic action of the thyroid hormone receptor β through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Nucl. Recept. Signal.* 4, e020.
66. Monsey, M.S., Gerhard, D.M., Boyle, L.M., Briones, M.A., Seligsohn, M., Schafe, G.E. (2015). A diet enriched with curcumin impairs newly acquired and reactivated fear memories. *Neuropsychopharmacology* 40, 1278–1288.
67. Moog, N.K., Entringer, S., Heim, C., Wadhwa, P.D., Kathmann, N. and Buss, C. (2017). Influence of maternal thyroid hormones during gestation on fetal brain development. *Neuroscience* 342, 68–100.
68. Mora, S., Dussaubat, N., Díaz-Véliz, G. (1996). Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats. *Psychoneuroendocrinology* 21, 609–620.
69. Morikawa, M., Tanaka, Y., Cho, H.S., Yoshihara, M., Hirokawa, N. (2018). The Molecular Motor KIF21B Mediates Synaptic Plasticity and Fear Extinction by Terminating Rac1 Activation. *Cell Rep.* 23, 3864–3877.

70. Murai, K.K., Pasquale, E.B. (2002). Can Eph receptors stimulate the mind? *Neuron* 33, 159–162.
71. Nieto-Estévez, V., Oueslati-Morales, C.O., Li, L., Pickel, J., Morales, A.V., Vicario-Abejón, C. (2016). Brain insulin-like growth factor-I directs the transition from stem cells to mature neurons during postnatal/adult hippocampal neurogenesis. *Stem Cells*. 34, 2194–2209.
72. Nishimura, J., Saegusa, Y., Dewa, Y., Jin, M., Kawai, M., Kemmochi, S., Harada, T., Hayashi, S.M., Shibutani, M. and Mitsumori, K. (2010). Antioxidant enzymatically modified isoquercitrin or melatonin supplementation reduces oxidative stress-mediated hepatocellular tumor promotion of oxfendazole in rats. *Arch, Toxicol*. 84, 143–153.
73. Novkovic, T., Mittmann, T. and Manahan-Vaughan, D. (2015). BDNF contributes to the facilitation of hippocampal synaptic plasticity and learning enabled by environmental enrichment. *Hippocampus* 25, 1–15.
74. OECD. (2007). OECD Guideline for Testing of Chemicals. Developmental Neurotoxicity Study. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France; Available at https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-426-developmental-neurotoxicity-study_9789264067394-en.
75. Okada, R., Masubuchi, Y., Tanaka, T., Nakajima, K., Masuda, S., Namamura, K., Maronpot, R.R., Yoshida, T., Koyanagi, M., Hayashi, S.M. and Shibutani, M. (2019). Continuous exposure to α -glycosyl isoquercitrin from developmental stage facilitates fear extinction learning in rats. *J. Funct. Foods* 55, 312–324.

76. Ozawa, S., Kamiya, H., Tsuzuki, K. (1998). Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 54, 581–618.
77. Paris, J.J., Frye, C.A. (2008). Estrous cycle, pregnancy, and parity enhance performance of rats in object recognition or object placement tasks. *Reproduction* 136, 105–115.
78. 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.
79. Paxinos, G., Watson, C. (2014). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 7th ed., figures 11 and 58. Academic Press, Massachusetts.
80. Plate, K.H. (1999). Mechanisms of angiogenesis in the brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58, 313–320.
81. Plath, N., Ohana, O., Dammermann, B., Errington, M.L., Schmitz, D., Gross, C., Mao, X., Engelsberg, A., Mahlke, C., Welzl, H., Kobalz, U., Stawrakakis, A., Fernandez, E., Waltereit, R., Bick-Sander, A., Therstappen, E., Cooke, S.F., Blanquet, V., Wurst, W., Salmen, B., Bösl, M.R., Lipp, H.P., Grant, S.G., Bliss, T.V., Wolfer, D.P., Kuhl, D. (2006). Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron* 52, 437–444.
82. Rauner, C., Köhr, G. (2011). Triheteromeric NR1/NR2A/NR2B receptors constitute the major *N*-methyl-D-aspartate receptor population in adult hippocampal synapses. *J. Biol. Chem.* 286, 7558–7566.

83. Rochette, L., Ghibu, S., Richard, C., Zeller, M., Cottin, Y. and Vergely, C. (2013). Direct and indirect antioxidant properties of α -lipoic acid and therapeutic potential. *Mol Nutr Food Res.* 57, 114–125.
84. Román, G.C. (2007). Autism: transient in utero hypothyroxinemia related to maternal flavonoid ingestion during pregnancy and to other environmental antithyroid agents. *J. Neurol. Sci.* 262, 15–26.
85. 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.
86. Sánchez-Muñoz, I., Sánchez-Franco, F., Vallejo, M., Fernández, A., Palacios, N., Fernández, M., Sánchez-Grande, M., Cacicedo, L. (2011). Regulation of somatostatin gene expression by brain derived neurotrophic factor in fetal rat cerebrocortical cells. *Brain Res.* 1375, 28–40.
87. Schoonover, C.M., Seibel, M.M., Jolson, D.M., Stack, M.J., Rahman, R.J., Jones, S.A., Mariash, C.N. and Anderson, G.W. (2004). Thyroid hormone regulates oligodendrocyte accumulation in developing rat brain white matter tracts. *Endocrinology* 145, 5013–5020.
88. Shiraki, A., Saito, F., Akane, H., Takeyoshi, M., Imatanaka, N., Itahashi, M., Yoshida, T. and Shibutani, M. (2014). Expression alterations of genes on both neuronal and glial development in rats after developmental exposure to 6-propyl-2-thiouracil. *Toxicol. Lett.* 228, 225–234.

89. Shiraki, A., Tanaka, T., Watanabe, Y., Saito, F., Akahori, Y., Imatanaka, N., Yoshida, T. and Shibutani, M. (2016). Immunohistochemistry of aberrant neuronal development induced by 6-propyl-2-thiouracil in rats. *Toxicol. Lett.* 261, 59–71.
90. Shu, Y., Xiao, B., Wu, Q., Liu, T., Du, Y., Tang, H., Chen, S., Feng, L., Long, L., Li, Y. (2016). The Ephrin-A5/EphA4 interaction modulates neurogenesis and angiogenesis by the p-Akt and p-ERK pathways in a mouse model of TLE. *Mol. Neurobiol.* 53, 561–576.
91. Sibbe, M. and Kulik, A. (2017). GABAergic Regulation of adult hippocampal neurogenesis. *Mol. Neurobiol.* 54, 5497–5510.
92. Silva, F.G., Giannocco, G., Luchessi, A.D., Curi, R., Nunes, M.T. (2010). T3 acutely increases GH mRNA translation rate and GH secretion in hypothyroid rats. *Mol Cell Endocrinol.* 317, 1–7.
93. Simpson, J. and Kelly, J.P. (2011). The impact of environmental enrichment in laboratory rats—Behavioural and neurochemical aspects. *Behav. Brain Res.* 222, 246–264.
94. Spencer, J.P. (2010). Beyond antioxidants: the cellular and molecular interactions of flavonoids and how these underpin their actions on the brain. *Proc. Nutr. Soc.* 69, 244–260.
95. Spencer, J.P.E., Vauzour, D., Rendeiro, C. (2009). Flavonoids and cognition: the molecular mechanisms underlying their behavioural effects. *Arch. Biochem. Biophys.* 492, 1–9.
96. Takeshita, K., Satoh, M., Ii, M., Silver, M., Limbourg, F.P., Mukai, Y., Rikitake, Y., Radtke, F., Gridley, T., Losordo, D.W., Liao, J.K. (2007). Critical role of endothelial Notch1 signaling in postnatal angiogenesis. *Circ. Res.* 100, 70–78.

97. Tanaka, T., Yasunori, M., Okada, R., Nakajima, K., Nakamura, K., Masuda, S., Nakahara, J., Maronpot, R.R., Yoshida, T., Koyanagi, M., Hayashi, S.M. and Shibutani, M. (2019). Ameliorating effect of postweaning exposure to antioxidant on disruption of hippocampal neurogenesis induced by developmental hypothyroidism in rats. *J. Toxicol. Sci.* 44, 357–372.
98. Tapias-Espinosa, C., Kádár, E., Segura-Torres, P. (2018). Spaced sessions of avoidance extinction reduce spontaneous recovery and promote infralimbic cortex activation. *Behav. Brain Res.* 336, 59–66.
99. Thomas, G.M., Huganir, R.L. (2004). MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 173–83.
100. Tousoulis, D., Kampoli, A.M., Tentolouris, C., Papageorgiou, N., Stefanadis, C. (2012). The role of nitric oxide on endothelial function. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 10, 4–18.
101. Tozuka, Y., Fukuda, S., Namba, T., Seki, T., Hisatsune, T. (2005). GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron* 47, 803–815.
102. Valentová, K., Vrba, J., Bancířová, M., Ulrichová, J. and Křen, V. (2014). Isoquercitrin: Pharmacology, toxicology, and metabolism. *Food Chem. Toxicol.* 68, 267–282.
103. van Praag, H., Christie, B.R., Sejnowski, T.J. and Gage, F.H. (1999). Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 13427–13431.

104. Venditti, P. and Di Meo, S. (2006). Thyroid hormone-induced oxidative stress. *Cell. Mol. Life. Sci.* 63, 414–434.
105. Veskovic, M., Mladenovic, D., Jorgacevic, B., Stevanovic, I., de Luka, S. and Radosavljevic, T. (2015). Alpha-lipoic acid affects the oxidative stress in various brain structures in mice with methionine and choline deficiency. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 240, 418–425.
106. Vicario-Abejón, C., Owens, D., McKay, R., Segal, M. (2002). Role of neurotrophins in central synapse formation and stabilization. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 965–974.
107. Walton, N.M., Shin, R., Tajinda, K., Heusner, C.L., Kogan, J.H., Miyake, S., Chen, Q., Tamura and K., Matsumoto, M. (2012). Adult neurogenesis transiently generates oxidative stress. *PLoS ONE* 7, e35264.
108. Wang, Y., Wei, W., Wang, Y., Dong, J., Song, B., Min, H., Teng, W. and Chen J. (2013). Neurotoxicity of developmental hypothyroxinemia and hypothyroidism in rats: Impairments of long-term potentiation are mediated by phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 271, 257–265.
109. Waterhouse, E.G., An, J.J., Orefice, L.L., Baydyuk, M., Liao, G.Y., Zheng, K., Lu, B., Xu, B. (2012). BDNF promotes differentiation and maturation of adult-born neurons through GABAergic transmission. *J. Neurosci.* 32, 14318–14330.
110. Williams, R.J., Spencer, J.P. (2012). Flavonoids, cognition, and dementia: actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 35–45.

111. Xie, H., Wu, Y., Jia, J., Liu, G., Zhang, Q., Yu, K., Guo, Z., Shen, L. and Hu, R. (2013).

Enrichment-induced exercise to quantify the effect of different housing conditions: A tool to standardize enriched environment protocols. *Behav. Brain. Res.* 249, 81–89.

112. Yamamoto, H., Hagino, Y., Kasai, S., Ikeda, K. (2015). Specific Roles of NMDA Receptor

Subunits in Mental Disorders. *Curr. Mol. Med.* 15, 193–205.

113. Zhang, Z.S., Qiu, Z.K., He, J.L., Liu, X., Chen, J.S., Wang, Y.L. (2017). Resveratrol ameliorated

the behavioral deficits in a mouse model of post-traumatic stress disorder. *Pharmacol. Biochem.*

Behav. 161, 68–76.

要旨

フラボノイド等の抗酸化物質は、抗酸化作用以外に神経組織の保護作用等の効果が報告されているが、発達期曝露による効果は不明な点が多い。本研究は抗酸化物質の発達期曝露が生後の動物の神経の構造や機能に及ぼす効果を明らかにするために、正常あるいは病的な状態の動物に対する効果を検討した。

第1章では、発達期の甲状腺機能低下が脳における酸化ストレス及び海馬歯状回における神経新生障害を誘発することに着目し、抗甲状腺剤と抗酸化物質を共曝露した場合に、神経新生障害が抑制されるかどうかについて検討した。6-プロピル-2-チオウラシル (PTU) を妊娠ラットに妊娠6日から出産後21日の離乳時まで12 ppmの用量で飲水投与するとともに、抗酸化物質として α グリコシルイソクエルシトリン (AGIQ) ないし α リポ酸 (ALA) をそれぞれ5,000 ppm ないし2,000 ppmの用量で混餌投与し、雄性児動物の海馬歯状回における発達期甲状腺機能低下に起因する神経新生障害性に対する修飾作用を検討した。その結果、出生後21日目にPTU曝露により顆粒細胞系譜の広範囲に渡る細胞数減少及びGABA性介在ニューロン数の減少を認めた。AGIQ ないしALAの共曝露により、PTU曝露で発現が低下した遺伝子を含む多くの遺伝子が発現上昇したが、神経新生障害は抑制されなかった。一方、抗酸化物質の有無に関わらずPTU曝露は海馬の脂質過酸化レベルを変動させなかった。これらの結果は、発達期の甲状腺機能低下による神経新生障害の原因は酸化ストレスではなく甲状腺ホルモンの枯渇であることを示唆する。抗酸化物質曝露が多くの遺伝子発現を上昇させた機序は

直接的な抗酸化作用とは異なる神経組織の保護作用によると考えられた。本研究で、抗酸化物質の共曝露が神経新生障害を抑制しなかった原因は、甲状腺機能低下によるタンパク質合成障害であることが示唆された。

第2章では、胎児期から成熟期までの継続的な AGIQ 曝露が成熟後のラットの文脈的恐怖条件付けにおける消去学習を促進することに着目し、どの時期の AGIQ 曝露が消去学習を促進するかについて検討した。AGIQ を胎児期から離乳時期まで (発達期曝露)、離乳時期から成熟期まで (離乳後曝露) ないし胎児期から成熟期まで (全期間曝露) 5,000 ppm の用量でラットに混餌投与し、成熟後に雄性児動物の不安様行動、非位置記憶および情動記憶について検討した。その結果、全期間曝露で消去学習促進を認めたが、発達期曝露及び離乳後曝露はいずれの行動試験でも効果を示さず、全期間曝露が消去学習促進に必要である事が示唆された。離乳後曝露では発現変動を示す遺伝子のごく限られていたが、発達期曝露では、海馬歯状回及び前辺縁皮質においてシナプス可塑性に関わる遺伝子の構成的発現が全期間曝露と似た変動パターンを示した。下辺縁皮質及び扁桃体では、全期間曝露は発達期曝露よりも多くの遺伝子の構成的発現レベルを上昇させた。全期間曝露では、最後の消去学習テスト後に海馬歯状回及び扁桃体においてシナプス可塑性に関わる多くの遺伝子 (Eph/Ephrin, グルタミン酸受容体/トランスポーター, 最初期遺伝子及びその制御因子である extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2)) の発現上昇を認めた。更に、全期間曝露では前辺縁皮質及び下辺縁皮質におけるリン酸化 ERK1/2 陽性ニューロン数の増加を認めた。これらの結果は、恐怖記憶を制御する神経回路における構成的及び学習依存的なシナプス可塑性遺伝子／タンパク質の発現上昇

が消去学習の促進に関与することを示唆した。

第3章では、胎児期から成熟期までの継続的な AGIQ 曝露と自発的運動ないし環境エンリッチメントを組み合わせることで、成熟後の動物の学習／記憶に対してどのような効果を示すのかについて検討した。AGIQ をラットに胎児期から成熟期まで 5,000 ppm の用量で混餌曝露し、離乳後からは成熟期まで標準ケージ、回転ケージないし環境エンリッチメントケージに分けて同様に AGIQ を混餌投与し、成熟後に雄性児動物の不安様行動、非位置記憶および情動記憶について検討した。その結果、AGIQ 及び環境エンリッチメントはそれぞれ文脈的恐怖条件付け試験において恐怖記憶の消去学習促進傾向を示したが、相乗的な効果を認めなかった。回転ケージでは、オープンフィールド試験において不安様行動を示唆する総移動距離の低値を認めた以外に、行動試験のパラメータの変動を認めなかった。

以上より、発達期の抗酸化物質曝露は病的な状態に対する神経組織の保護作用だけでなく学習／記憶に対する修飾作用を示すことが明らかとなり、更なる有効性の探索が期待された。また、地中海食のような抗酸化物質に富む食事の日常の摂取が、不安を学習によりため込まなくなるなど心の健康を保つ上で重要であることが判明し、今後、この方面での更なる検討が期待される。

Abstract

Antioxidants such as flavonoids have been reported to exert neuroprotective effects in addition to antioxidant effects. However, the effect and mechanism of antioxidant exposure during developmental stages are still unclear. This study investigated the exposure effect of antioxidants from developmental stages on healthy or neurally defected animals in order to clarify the effects on the neural structure and function after maturation.

In chapter 1, I investigated whether co-exposure of anti-thyroid agent and antioxidants suppresses hypothyroidism-mediated disruption of hippocampal neurogenesis, because developmental hypothyroidism is suggested to induce oxidative stress in the brain and impairs neurogenesis. Mated female Sprague Dawley rats were either untreated or treated with 12 ppm 6-propyl-2-thiouracil (PTU), an anti-thyroid agent, in drinking water from gestational day 6 to postnatal day (PND) 21, the latter group being subjected to feeding basal diet-alone or diet containing α -glycosyl isoquercitrin (AGIQ) at 5,000 ppm or α -lipoic acid (ALA) at 2,000 ppm simultaneously with PTU exposure. On PND 21, PTU-exposed offspring showed reductions in a broad range of granule cell lineage subpopulations and changes in the number of GABAergic interneuron subpopulations. Co-exposure of AGIQ or ALA with PTU altered the transcript levels of many genes across multiple functions, suggestive of enhancement of synaptic plasticity and neurogenesis. Nevertheless, immunohistochemical results did not follow these changes. PTU exposure and co-exposure of AGIQ or ALA with PTU did not alter the

hippocampal lipid peroxidation level. The obtained results suggest a possibility that thyroid hormone depletion itself primarily disrupts neurogenesis and that oxidative stress may not be involved in the disruption during development. Transcript expression changes of many genes caused by antioxidants may be the result of neuroprotective actions of antioxidants rather than their antioxidant activity. However, no preventive effect on neurogenesis suggested impairment of protein synthesis via an effect on mRNA translation due to hypothyroidism.

In chapter 2, I investigated the specific exposure period of AGIQ sufficient for inducing facilitation of fear extinction learning and the corresponding cellular mechanism in the brain in contextual fear conditioning test during adulthood. Rats were dietarily exposed to 0.5% AGIQ from the postweaning stage to adulthood (PW-AGIQ), the fetal stage to postweaning stage (DEV-AGIQ), or the fetal stage to adulthood (WP-AGIQ). Fear memory, anxiety-like behavior, and object recognition memory were assessed during adulthood. Fear extinction learning was exclusively facilitated in the WP-AGIQ rats. Synaptic plasticity-related genes showed a similar pattern of constitutive expression changes in the hippocampal dentate gyrus and prelimbic medial prefrontal cortex (mPFC) between the DEV-AGIQ and WP-AGIQ rats. However, WP-AGIQ rats revealed more genes constitutively upregulated in the infralimbic mPFC and amygdala than DEV-AGIQ rats, as well as FOS-immunoreactive(+) neurons constitutively increased in the infralimbic cortex. Ninety minutes after the last fear extinction trial, many synaptic plasticity-related genes (encoding Ephs/Ephrins, glutamate receptors/transporters, and immediate-early gene proteins and their regulator, extracellular

signal-regulated kinase 2 [ERK2]) were upregulated in the dentate gyrus and amygdala in WP-AGIQ rats. Additionally, WP-AGIQ rats exhibited increased phosphorylated ERK1/2⁺ neurons in both the prelimbic and infralimbic cortices. These results suggest that AGIQ exposure from the fetal stage to adulthood is necessary for facilitating fear extinction learning. Furthermore, constitutive and learning-dependent upregulation of synaptic plasticity-related genes/molecules may be differentially involved in brain regions that regulate fear memory. Thus, new learning-related neural circuits for facilitating fear extinction can be established in the mPFC.

In chapter 3, I investigated the combined effect of continuous exposure to AGIQ with voluntary exercise or environmental enrichment on learning and behaviors in rats. For this purpose, maternal Long-Evans rats were either untreated or treated with 0.5% AGIQ in basal diet from gestational day 6 to day 21 post-delivery. Offspring in both groups were weaned on PND 21 and reared thereafter either in a standard cage, a wheel cage or an environmental enrichment cage until the end of the experiment with or without exposure to AGIQ. Fear memory, locomotor activity and anxiety-like behavior in open field test, spatial memory and nonspatial memory were assessed in adulthood. Environmental enrichment without AGIQ exposure, as well as AGIQ exposure in standard cage, showed a tendency for facilitation of fear extinction learning. However, exposure to AGIQ and environmental enrichment did not act synergistically. Voluntary exercise only decreased the total distance traveled in the open field test in the condition with or without AGIQ exposure, suggesting induction of anxiety-like behavior.

In conclusion, I clarified that exposure to antioxidants during the developmental stage not only protects neural tissue against pathological conditions but also modifies learning / memory, and further exploration of their effectiveness is warranted. In addition, it is suggested that daily intake of antioxidant-rich diets such as the Mediterranean diet is important for maintaining mental health, such as preventing excess anxiety through learning, and further investigation is also warranted on this point.

図表

Table 1-1.

Primary antibodies and experimental conditions used in immunohistochemistry

Antigen	Abbreviated name	Host species	Clonality	Clone name	Dilution	Antigen retrieval	Manufacturer (City, State, Country)
Activity-regulated cytoskeleton-associated protein	ARC	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:2000	Microwaving ^a	Synaptic Systems GmbH (Goettingen, Germany)
Calbindin-D-29K	CALB2	Rabbit	Monoclonal IgG	EP1798	1:800	Autoclaving ^b	Abcam plc (Cambridge, UK)
Cyclooxygenase 2	COX2	Mouse	Monoclonal IgG ₁	33/Cox-2	1:200	Microwaving ^a	BD Biosciences, Inc. (San Jose, CA, USA)
Doublecortin	DCX	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:1000	None	Abcam plc
Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	FOS	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:500	None	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, USA)
Glial fibrillary acidic protein	GFAP	Mouse	Monoclonal IgG ₁	GA5	1:200	None	Merck Millipore (Burlington, MA, USA)
Neuronal nuclei	NeuN	Mouse	Monoclonal IgG ₁	A60	1:100	None	Merck Millipore
Parvalbumin	PVALB	Mouse	Monoclonal IgG ₁	PARV-19	1:1000	Microwaving ^a	Merck Millipore
Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	Mouse	Monoclonal IgG _{2a}	PC10	1:200	None	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
Reelin	RELN	Mouse	Monoclonal IgG ₁	G10	1:1000	None	Novus Biologicals (Littleton, CO, USA)
SRY-box 2	SOX2	Mouse	Monoclonal IgG ₁	9-9-3	1:4000	None	Abcam plc
Somatostatin	SST	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:600	Microwaving ^a	Abcam plc
T-box brain 2	TBR2	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:500	Autoclaving ^b	Abcam plc

Abbreviation: n.a., not applicable.

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

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

Table 1-2

Sequence of primers used for real-time RT-PCR

Gene	Accession no.	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')
<i>Arc</i>	NM_019361	AGTGTCTGAA AGGCAATGAA AAGTAG	CCTTCGGCCA TCTCTGATTC
<i>Bax</i>	NM_017059	AGGACGCATC CACCAAGAAG	CCAGTTCATC GCCAATTTCG
<i>Bcl2</i>	NM_016993	GGATGCCTTT GTGGAACATAT ATGG	CAGAGACAGC CAGGAGAAAT CAA
<i>Bdnf</i>	NM_001270630	CACTTTTGAG CACGTGATCG A	TCCGCGTCCT TATGGTTTTTC
<i>Casp3</i>	NM_012922	ACAAGCTGGA ATTCATGCAC AT	CAAATTCCTG GGCCACCTT
<i>Casp6</i>	NM_001271984	GCACGGTAGT TCCCTGGAGT T	GCGCTGAGAG ACCTTCCTGT T
<i>Cdkn1a</i>	NM_080782	ACCAGCCACA GGCACCAT	CGGCATACTT TGCTCCTGTG T
<i>Chrna7</i>	NM_012832	CGTTCGCTGG TTCCCTTTT	GGACCAGGAC CCAAACCTCA
<i>Dcx</i>	NM_053379	GGATTGTGA CGCTGTTTCT TCTG	TCAGGTCAGC CAGCAATGC
<i>Efnb3</i>	NM_001100980	ACCTGGACCT CCGCTTCAC	TCGTGGCCCC AGAGGTTAG
<i>Eomes</i>	XM_006226609	GCCGGACTAC CATGGACATC	TTTCTCCTTG GCAAGCTGAT C
<i>Epha4</i>	NM_001162411	GAGCGAGGCCAGCATCAT	CAACGCCTTCCAGGTGGAT
<i>Ephb1</i>	NM_001104528	TCTGAGCGAG GCGAGCAT	CACCTCTAG GCGAATGATG TT
<i>Ephb2</i>	NM_001127319	CGCCAACGCT GAAGAAGTG	CGCCGTCCCC GTTACA
<i>Fos</i>	NM_022197	CAACGAGCCC TCCTCTGACT	TGCTTCTCT GACTGCTCAC A
<i>Gapdh</i>	NM_017008	GGCCGAGGGC CCACTA	TGTTGAAGTC ACAGGAGACA ACCT
<i>Gria1</i>	NM_031608	GTGAGCGTCG TCCTCTTCTT	TCTTCGCTGT GCCATTTCGTA
<i>Gria2</i>	NM_017261	CATCACACCT AGCTTCCCAA CA	CTTTGAGGTC AGGTGCGATC T
<i>Gria3</i>	NM_032990	GAAACATAAA GGACGTCCAG GAA	TTCTGCTCTT CTGTCCATTT CT
<i>Grin2a</i>	NM_012573	TGAACCGCAC TGACCCTAAG A	GCGCCCCGGA CATGA
<i>Grin2b</i>	NM_012574	TCGTCAAGAC ACAAGATTAA AACCA	GGAGGATAAA GGAACGGAAG AAA
<i>Igf1r</i>	NM_052807	AGGAGTGTCC ATCAGGCTTC AT	TGGTTTTCGT TTTCTTTTCT TCATC
<i>Igf2r</i>	NM_012756	CAGGCACAG GATGAAGCA	TCGCCATCTT CCGTTTCTG
<i>Hprt1</i>	NM_012583	GTCAAGCAGT ACAGCCCCAA A	CAACACTTCG AGAGGTCCTT TTC
<i>Kit</i>	NM_022264	AATCCGACAA CCAAAGCAAC A	TCCTTCTGTG CCTTTCAATC TG
<i>Kitlg</i>	NM_021843	GCAGTATGAT GCCACGGTGT A	TTCCGCTGGT CCACATTGA
<i>Ntrk2</i>	NM_012731	GGCTTATGCT TGCTGGTCTT G	TCCTAGTGGT GCTGCATTG C
<i>Pcna</i>	NM_022381	CTCACGTCTC CTTAGTGCAG CTT	CGATCGCAGC GGTATGTGT
<i>Ptgs2</i>	NM_017232	GCTTTCTCCA ACCTCTCCTA CTACA	GGGAGTTGGG CAGTCATCAG
<i>Pvalb</i>	NM_022499	TCGACCACAA AAAGTTCTTC CA	TCTTCACATC ATCCGCACTC TT
<i>Reln</i>	NM_080394	GCCAGCTTTC GACTACCCTA TTAAC	CGTAGTGGCA CAGAAGCTAT CG
<i>Sox2</i>	NM_001109181	GCGGCAACCA GAAGAACAG	CCACACCATG AAGGCATTCA
<i>Sst</i>	NM_012659	ACCCCGGGAA CGCAAA	CAGGATGTGA ATGTCTTCCA GAAG

Abbreviations: *Arc*, activity regulated cytoskeleton-associated protein; *Bax*, BCL2 associated X, apoptosis regulator; *Bcl2*, BCL2, apoptosis regulator; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Casp3*, caspase 3; *Casp6*, caspase 6; *Cdkn1a*, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A; *Chrna7*, cholinergic receptor nicotinic alpha 7 subunit; *Dcx*, doublecortin; *Efnb3*, ephrin B3; *Eomes*, eomesodermin (also known as Tbr2: T-box brain protein 2); *Epha4*, Eph receptor A4; *Ephb1*, Eph receptor B1; *Ephb2*, Eph receptor B2; *Fos*, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Gria1*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1; *Gria2*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2; *Gria3*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3; *Grin2a*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A; *Grin2b*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B; *Igf1r*, insulin-like growth factor 1 receptor; *Igf2r*, insulin-like growth factor 2 receptor; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Kit*, KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase; *Kitlg*, KIT ligand; *Ntrk2*, neurotrophic receptor tyrosine kinase 2; *Pcna*, proliferating cell nuclear antigen; *Ptgs2*, prostaglandin-endoperoxide synthase 2; *Pvalb*, parvalbumin; *Reln*, reelin; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; *Sox2*, SRY box 2; *Sst*, somatostatin.

Table 1-3**Maternal parameters**

	Ctrl	PTU-alone	PTU + AGIQ	PTU + ALA
No. of dams examined	14	12	11	12
Reproductive parameters				
No. of implantation sites	12.7±1.8	11.9±1.7	12.2±1.4	12.8±1.1
No. of live offspring (PND 0)	12.8±2.1	11.0±1.5	11.2±1.7	11.3±1.5
Male ratio (%)	51.4±12.2	50.9±14.6	57.7±16.1	47.9±14.7
Body and organ weights at PND 21				
Body weight (g)	289.0±16.9	285.8±21.7	291.4±23.3	251.4±18.2**,††
Brain weight (g)	1.94±0.05	1.91±0.07	1.91±0.08	1.87±0.09

Abbreviations: AGIQ, α -glycosyl isoquercitrin; ALA, α -lipoic acid; Ctrl, untreated controls; PND, postnatal day; PTU, 6-propyl-2-thiouracil.

Data are expressed as mean \pm SD.

** $P < 0.01$, significantly different from untreated controls by Tukey's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

†† $P < 0.01$, significantly different from PTU-alone group by Tukey's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

Table 1-4
Body weights of dams during gestation and lactation

	Ctrl	PTU-alone	PTU + AGIQ	PTU + ALA
No. of dams examined	14	12	11	12
Body weight (g)				
GD 5	256.2±24.1	255.0±26.7	258.4 ± 26.8	257.1±24.3
GD 6	256.0±25.1	254.0±26.2	257.8 ± 26.4	256.3±24.2
GD 10	277.1±22.1	277.3±25.8	283.3 ± 27.4	267.8±22.5
GD 14	300.5±21.2	296.0±25.6	304.0 ± 29.6	284.0±22.0
GD 17	331.3±21.3	320.3±26.1	329.4 ± 29.0	306.5±22.2
GD 21	392.3±23.9	363.4±30.5	376.6 ± 26.5	348.1±22.0**
PND 1	294.1±18.7	273.0±23.7	283.8 ± 26.1	251.9±20.5**
PND 4	297.7±16.6	273.0±22.3*	285.1 ± 23.9	249.3±19.7**,†
PND 6	307.1±17.9	279.4±22.4**	292.0 ± 21.9	252.1±18.7**,††
PND 9	318.3±19.6	287.3±22.6**	299.0 ± 23.0	254.3±17.8**,††
PND 13	321.6±17.4	302.0±19.4	306.2 ± 22.5	260.2±17.0**,††
PND 16	313.1±19.5	294.7±18.3	300.8 ± 22.0	259.0±16.4**,††
PND 21	289.0±16.9	285.8±21.7	291.4 ± 23.3	251.4±18.2**,††

Abbreviations: AGIQ, α -glycosyl isoquercitrin; ALA, α -lipoic acid; Ctrl, untreated controls; GD, gestational day; PND, postnatal day; PTU, 6-propyl-2-thiouracil.

Data are expressed as mean \pm SD.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from untreated controls by Tukey's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

† $P < 0.05$, †† $P < 0.01$, significantly different from PTU-alone group by Tukey's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

Table 1-5
Food consumption of dams during gestation and lactation

	Ctrl	PTU-alone	PTU + AGIQ	PTU + ALA
No. of dams examined	14	12	11	12
Food consumption (g/day)				
GD 5	16.2±2.1	15.5±2.0	15.9±1.8	15.9±2.2
GD 6	16.4±2.7	16.0±1.2	16.4±1.3	14.2±1.3*
GD 10	18.2±2.2	17.1±1.7	16.9±2.4	11.5±2.0**,††
GD 14	20.0±2.0	16.2±2.1**	17.6±2.7*	14.1±1.7**
GD 17	21.2±1.6	16.5±1.7**	17.4±1.7**	15.2±2.2**
GD 20	17.2±4.1	15.1±2.4	15.2±3.5	12.4±3.8**
PND 1	23.1±3.1	15.5±2.5**	18.1±3.4**	13.6±1.4**
PND 6	38.0±3.2	25.2±2.6**	26.8±4.1**	20.6±1.7**,††
PND 9	46.3±4.6	34.3±3.0**	36.5±2.2**	31.0±3.9**
PND 13	49.8±4.0	36.9±2.0**	38.6±2.8**	31.3±3.3**,††
PND 16	55.9±5.3	43.4±2.8**	43.9±2.8**	36.3±3.0**,††
PND 20	53.4±3.8	31.2±1.8**	29.2±1.9**	24.5±3.5**,††

Abbreviations: AGIQ, α -glycosyl isoquercitrin; ALA, α -lipoic acid; Ctrl, untreated controls; GD, gestational day; PND, postnatal day; PTU, 6-propyl-2-thiouracil.

Data are expressed as mean \pm SD.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from untreated controls by Tukey's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

†† $P < 0.01$, significantly different from PTU-alone group by Tukey's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

Table 1-6
Water consumption of dams during gestation and lactation

	Ctrl	PTU-alone	PTU + AGIQ	PTU + ALA
No. of dams examined	14	12	11	12
Water consumption (g/day)				
GD 5	36.2±4.0	32.4±4.1	35.0±4.7	35.9±6.3
GD 6	32.4±5.2	29.2±4.1	29.9±2.5	27.3±3.9*
GD 10	36.2±4.9	31.8±4.0	36.4±6.0	22.7±6.0**,††
GD 14	38.3±5.5	34.8±6.1	35.8±5.1	26.6±7.8**,†
GD 17	48.2±4.4	42.8±8.2	44.3±5.0	37.8±12.4
GD 20	26.9±10.4	26.2±4.2	25.2±10.6	18.8±8.0
PND 1	47.4±6.4	36.1±4.2**	39.2±6.4**	33.1±3.9**
PND 6	59.2±7.0	44.5±6.9**	45.7±4.4**	36.7±4.9**,†
PND 9	77.5±8.8	59.2±6.4**	63.2±6.2**	54.0±9.6**
PND 13	83.1±9.5	59.5±6.8**	63.2±6.8**	48.9±8.3**,†
PND 16	95.0±11.0	72.1±7.1**	74.2±9.9**	58.9±11.6**,†
PND 20	104.7±9.1	57.7±6.0**	54.2±6.6**	48.0±4.3**,††

Abbreviations: AGIQ, α -glycosyl isoquercitrin; ALA, α -lipoic acid; Ctrl, untreated controls; GD, gestational day; PND, postnatal day; PTU, 6-propyl-2-thiouracil.

Data are expressed as mean \pm SD.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from untreated controls by Tukey's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

† $P < 0.05$, †† $P < 0.01$, significantly different from PTU-alone group by Tukey's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

Table 1-7**Body and organ weights at prepubertal and terminal necropsies of male offspring**

	Ctrl	PTU-alone	PTU + AGIQ	PTU + ALA
PND 21				
No. of offspring examined	28	22	26	23
Body weight (g)	52.51±4.78	31.97±1.40**	31.82±1.95**	28.28±3.04**, †
No. of offspring examined	18	12	16	13
Brain weight (g)	1.53±0.03	1.38±0.05**	1.38±0.04**	1.34±0.10**
PND 77				
No. of offspring examined	44	18	20	14
Body weight (g)	423.6±20.5	338.0±10.2**	334.3±25.8**	335.2±34.9**
No. of offspring examined	8	8	8	8
Brain weight (g)	2.03±0.04	1.94±0.05*	1.90±0.08**	1.89±0.09**

Abbreviations: AGIQ, α -glycosyl isoquercitrin; ALA, α -lipoic acid; Ctrl, untreated controls; PND, postnatal day; PTU, 6-propyl-2-thiouracil.

Data are expressed as mean \pm SD.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from untreated controls by Tukey's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

† $P < 0.05$, significantly different from PTU-alone group by Tukey's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

Table 1-8

Relative transcript levels in the hippocampal dentate gyrus of offspring at PND 21

	Ctrl		PTU-alone		PTU + AGIQ		PTU + ALA	
	Normalized by		Normalized by		Normalized by		Normalized by	
	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
Granule cell lineage markers								
<i>Sox2</i>	1.06 ± 0.42	1.05 ± 0.41	1.04 ± 0.34	0.98 ± 0.32	0.98 ± 0.25	0.68 ± 0.16	1.04 ± 0.33	0.72 ± 0.27
<i>Eomes</i>	1.06 ± 0.40	1.05 ± 0.36	0.52 ± 0.38	0.47 ± 0.33*	1.18 ± 0.38	0.83 ± 0.27	1.55 ± 0.54 ^{††}	1.07 ± 0.45 [†]
<i>Dcx</i>	1.04 ± 0.36	1.05 ± 0.40	1.05 ± 0.32	0.97 ± 0.23	2.14 ± 0.36 ^{*,††}	1.49 ± 0.23 [†]	2.28 ± 0.43 ^{*,††}	1.54 ± 0.26 ^{*,†}
Interneuron markers								
<i>Pvalb</i>	1.02 ± 0.20	1.02 ± 0.24	0.46 ± 0.16**	0.48 ± 0.17**	0.65 ± 0.06**	0.57 ± 0.05*	0.53 ± 0.09**	0.50 ± 0.07*
<i>Reln</i>	1.07 ± 0.50	1.07 ± 0.51	1.24 ± 0.24	1.16 ± 0.23	2.40 ± 0.48 ^{*,††}	1.67 ± 0.33*	2.45 ± 0.30 ^{*,††}	1.66 ± 0.22*
<i>Sst</i>	1.10 ± 0.51	1.12 ± 0.55	1.58 ± 0.75	1.48 ± 0.67	4.90 ± 0.71 ^{*,††}	3.41 ± 0.37 ^{*,††}	4.45 ± 0.90 ^{*,††}	3.02 ± 0.68 ^{*,††}
Glutamate receptors								
<i>Gria1</i>	1.03 ± 0.27	1.03 ± 0.27	0.77 ± 0.42	0.80 ± 0.37	1.88 ± 0.21 ^{*,††}	1.68 ± 0.26 ^{*,††}	1.64 ± 0.19 ^{*,††}	1.56 ± 0.17 ^{*,††}
<i>Gria2</i>	1.03 ± 0.25	1.03 ± 0.26	1.04 ± 0.45	1.09 ± 0.38	1.96 ± 0.12 ^{*,††}	1.75 ± 0.16 ^{*,††}	1.79 ± 0.22 ^{*,††}	1.71 ± 0.23 ^{*,††}
<i>Gria3</i>	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.15	0.70 ± 0.16**	0.73 ± 0.09**	1.12 ± 0.12 ^{††}	1.00 ± 0.11 ^{††}	1.04 ± 0.07 ^{††}	1.00 ± 0.07 ^{††}
<i>Grin2a</i>	1.01 ± 0.17	1.01 ± 0.18	0.61 ± 0.32*	0.63 ± 0.26**	1.65 ± 0.21 ^{*,††}	1.46 ± 0.16 ^{*,††}	1.54 ± 0.20 ^{*,††}	1.47 ± 0.11 ^{*,††}
<i>Grin2b</i>	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.11	0.78 ± 0.19*	0.81 ± 0.12*	1.23 ± 0.10 ^{*,††}	1.10 ± 0.11 ^{††}	1.10 ± 0.05 ^{††}	1.06 ± 0.10 ^{††}
Cholinergic receptor								
<i>Chrna7</i>	1.03 ± 0.28	1.03 ± 0.27	1.50 ± 0.75	1.56 ± 0.64	2.47 ± 0.20 ^{*,††}	2.20 ± 0.25**	2.02 ± 0.39**	1.95 ± 0.50**
Neurotrophic factor/receptor								
<i>Bdnf</i>	1.04 ± 0.31	1.05 ± 0.34	1.01 ± 0.56	1.05 ± 0.50	2.03 ± 0.19 ^{*,††}	1.82 ± 0.22 ^{*,††}	1.83 ± 0.14 ^{*,††}	1.76 ± 0.26 ^{*,††}
<i>Ntrk2</i>	1.10 ± 0.43	1.12 ± 0.46	0.63 ± 0.64	0.63 ± 0.58	0.54 ± 0.27	0.48 ± 0.22	0.66 ± 0.17	0.63 ± 0.13
Synaptic plasticity-related genes								
<i>Arc</i>	1.09 ± 0.48	1.08 ± 0.44	0.69 ± 0.28	0.74 ± 0.34	1.79 ± 0.30 ^{*,††}	1.59 ± 0.22 ^{††}	1.49 ± 0.22 ^{††}	1.44 ± 0.26 ^{††}
<i>Fos</i>	1.07 ± 0.43	1.08 ± 0.48	0.60 ± 0.15*	0.64 ± 0.18*	0.31 ± 0.09**	0.28 ± 0.09**	0.38 ± 0.18**	0.36 ± 0.16**
<i>Efnb3</i>	1.06 ± 0.37	1.05 ± 0.32	1.62 ± 0.72	1.69 ± 0.64	3.39 ± 0.44 ^{*,††}	3.02 ± 0.46 ^{*,††}	2.46 ± 0.65**	2.37 ± 0.70**
<i>Epha4</i>	1.00 ± 0.10	1.01 ± 0.13	0.76 ± 0.19*	0.79 ± 0.13**	1.01 ± 0.11 [†]	0.90 ± 0.05	0.97 ± 0.07 [†]	0.93 ± 0.08 [†]
<i>Ephb1</i>	1.02 ± 0.23	1.01 ± 0.18	0.92 ± 0.14	0.98 ± 0.20	0.64 ± 0.10 ^{*,†}	0.57 ± 0.09 ^{*,††}	0.87 ± 0.12	0.84 ± 0.14
<i>Ephb2</i>	1.02 ± 0.21	1.02 ± 0.22	0.69 ± 0.11**	0.73 ± 0.10	0.79 ± 0.08*	0.70 ± 0.04	0.81 ± 0.12	0.77 ± 0.09
<i>Ptgs2</i>	1.09 ± 0.46	1.13 ± 0.55	0.50 ± 0.28	0.46 ± 0.21	1.59 ± 0.12 ^{††}	1.11 ± 0.14 ^{††}	1.54 ± 0.31 ^{††}	1.05 ± 0.24 ^{††}
Stem cell factor/receptor								
<i>Kitlg</i>	1.03 ± 0.27	1.02 ± 0.20	0.77 ± 0.23	0.72 ± 0.21	0.31 ± 0.08 ^{*,†}	0.22 ± 0.06 ^{*,††}	0.36 ± 0.11 ^{*,†}	0.25 ± 0.08 ^{*,††}
<i>Kit</i>	1.05 ± 0.29	1.07 ± 0.35	1.91 ± 1.33	1.74 ± 1.04	5.58 ± 0.75 ^{*,††}	3.88 ± 0.34 ^{*,†}	4.81 ± 0.58 ^{*,††}	3.25 ± 0.32**
Growth factor receptors								
<i>Igf1r</i>	1.04 ± 0.31	1.04 ± 0.30	0.82 ± 0.23	0.85 ± 0.15	1.13 ± 0.20	1.00 ± 0.16	1.31 ± 0.14 ^{††}	1.26 ± 0.20 [†]
<i>Igf2r</i>	1.02 ± 0.22	1.02 ± 0.21	1.02 ± 0.25	0.94 ± 0.13	1.47 ± 0.11 ^{*,††}	1.03 ± 0.07	1.51 ± 0.08 ^{*,††}	1.03 ± 0.12
Cell proliferation marker								
<i>Pcna</i>	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.11	1.01 ± 0.14	1.07 ± 0.16	1.10 ± 0.12	0.98 ± 0.16	1.11 ± 0.20	1.07 ± 0.23
Anti-cell proliferation								
<i>Cdkn1a</i>	1.01 ± 0.18	1.01 ± 0.19	0.68 ± 0.10**	0.73 ± 0.14	0.26 ± 0.05 ^{*,††}	0.23 ± 0.03 ^{*,††}	0.35 ± 0.13 ^{*,††}	0.34 ± 0.14 ^{*,††}
Apoptosis								
<i>Casp3</i>	1.01 ± 0.11	1.00 ± 0.09	0.97 ± 0.15	1.03 ± 0.23	0.97 ± 0.13	0.86 ± 0.04*	0.92 ± 0.07	0.88 ± 0.09
<i>Casp6</i>	1.03 ± 0.28	1.02 ± 0.26	1.60 ± 0.55	1.70 ± 0.64	1.68 ± 0.14*	1.50 ± 0.16*	1.36 ± 0.35	1.32 ± 0.42
<i>Bcl2</i>	1.01 ± 0.13	1.01 ± 0.14	0.89 ± 0.16	0.95 ± 0.23	1.00 ± 0.17	0.89 ± 0.13	0.82 ± 0.06	0.79 ± 0.13
<i>Bax</i>	1.02 ± 0.20	1.01 ± 0.14	0.91 ± 0.26	0.97 ± 0.35	1.00 ± 0.06	0.90 ± 0.11	0.84 ± 0.08	0.81 ± 0.07

Abbreviations: AGIQ, α -glycosyl isoquercitrin; ALA, α -lipoic acid; *Arc*, activity regulated

cytoskeleton-associated protein; *Bax*, BCL2 associated X, apoptosis regulator; *Bcl2*, BCL2, apoptosis regulator; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Casp3*, caspase 3; *Casp6*, caspase 6; *Cdkn1a*, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A; *Chrna7*, cholinergic receptor nicotinic alpha 7 subunit; Ctrl, untreated control; *Dcx*, doublecortin; *Efnb3*, ephrin B3; *Eomes*, eomesodermin (also known as *Tbr2*: T-box brain protein 2); *Epha4*, Eph receptor A4; *Ephb1*, Eph receptor B1; *Ephb2*, Eph receptor B2; *Fos*, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Gria1*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1; *Gria2*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2; *Gria3*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3; *Grin2a*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A; *Grin2b*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Igf1r*, insulin-like growth factor 1 receptor; *Igf2r*, insulin-like growth factor 2 receptor; *Kit*, KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase; *Kitlg*, KIT ligand; *Ntrk2*, neurotrophic receptor tyrosine kinase 2; *Pcna*, proliferating cell nuclear antigen; PND, postnatal day; *Ptgs2*, prostaglandin-endoperoxide synthase 2; PTU, 6-propyl-2-thiouracil; *Pvalb*, parvalbumin; *Reln*, reelin; *Sox2*, SRY box 2; *Sst*, somatostatin.

Data are expressed as mean ± SD (N = 6/group).

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from untreated controls by Tukey's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.† $P < 0.05$, †† $P < 0.01$, significantly different from PTU-alone group by Tukey's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

Table 1-9

Relative transcript levels in the hippocampal dentate gyrus of offspring at PND 77

	Ctrl		PTU-alone		PTU + AGIQ		PTU + ALA	
	Normalized by		Normalized by		Normalized by		Normalized by	
	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
Glutamate receptors								
<i>Gria1</i>	1.02 ± 0.20	1.01 ± 0.14	1.02 ± 0.18	1.08 ± 0.16	1.58 ± 0.30 ^{**,††}	1.21 ± 0.16	1.55 ± 0.33 ^{**,†}	1.23 ± 0.23
<i>Gria3</i>	1.02 ± 0.21	1.01 ± 0.11	0.97 ± 0.10	1.03 ± 0.12	1.60 ± 0.29 ^{**,††}	1.22 ± 0.14 [*]	1.38 ± 0.24 ^{*,†}	1.09 ± 0.14
<i>Grin2a</i>	1.02 ± 0.20	1.00 ± 0.10	0.89 ± 0.17	0.94 ± 0.17	1.60 ± 0.26 ^{**,††}	1.23 ± 0.13 [†]	1.45 ± 0.31 ^{*,††}	1.14 ± 0.21
<i>Grin2b</i>	1.03 ± 0.27	1.02 ± 0.20	0.94 ± 0.14	1.00 ± 0.15	1.71 ± 0.34 ^{**,††}	1.31 ± 0.17 [†]	1.61 ± 0.27 ^{**,††}	1.28 ± 0.19
Neurotrophic factor/receptor								
<i>Bdnf</i>	1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.14	0.81 ± 0.13	0.86 ± 0.11	1.28 ± 0.25 ^{††}	0.98 ± 0.12	1.19 ± 0.21 [†]	0.94 ± 0.14
Synaptic plasticity-related genes								
<i>Arc</i>	1.03 ± 0.26	1.01 ± 0.14	0.48 ± 0.22 ^{**}	0.51 ± 0.24 ^{**}	0.72 ± 0.27	0.55 ± 0.18 ^{**}	0.62 ± 0.23 [*]	0.49 ± 0.17 ^{**}
<i>Efnb3</i>	1.04 ± 0.32	1.03 ± 0.25	1.18 ± 0.35	1.23 ± 0.31	1.63 ± 0.76	1.22 ± 0.50	1.96 ± 0.55 [*]	1.56 ± 0.40
Stem cell factor/receptor								
<i>Kitlg</i>	1.03 ± 0.30	1.01 ± 0.17	1.10 ± 0.32	1.15 ± 0.28	1.32 ± 0.52	1.00 ± 0.32	2.02 ± 0.41 ^{**,††}	1.64 ± 0.46 [*]
<i>Kit</i>	1.01 ± 0.17	1.01 ± 0.15	1.13 ± 0.20	1.19 ± 0.14	1.69 ± 0.65	1.29 ± 0.44	1.50 ± 0.33	1.18 ± 0.18

Abbreviations: AGIQ, α -glycosyl isoquercitrin; ALA, α -lipoic acid; *Arc*, activity regulated cytoskeleton-associated protein; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; Ctrl, untreated control; *Efnb3*, ephrin B3; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Gria1*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1; *Gria3*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3; *Grin2a*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A; *Grin2b*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Kit*, KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase; *Kitlg*, KIT ligand; PND, postnatal day; PTU, 6-propyl-2-thiouracil.

Data are expressed as mean ± SD (N = 6/group).

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from untreated controls by Tukey's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

[†] $P < 0.05$, ^{††} $P < 0.01$, significantly different from PTU-alone group by Tukey's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

Table 2-1**Primary antibodies and experimental conditions used in immunohistochemistry**

Antigen	Abbreviated name	Host species	Clonality	Clone name	Dilution	Antigen retrieval	Manufacturer (City, State, Country)
Activity-regulated cytoskeleton-associated protein	ARC	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:2000	Microwaving ^a	Synaptic Systems GmbH (Goettingen, Germany)
Cyclooxygenase 2	COX2	Mouse	Monoclonal IgG ₁	33/Cox-2	1:200	Microwaving ^a	BD Biosciences, Inc. (San Jose, CA, USA)
Early growth response 1	EGR1	Rabbit	Monoclonal IgG	15F7	1:200	Microwaving ^a	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	FOS	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:500	None	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, USA)
phospho-extracellular signal-regulated kinase 1/2 (Erk1/2)	p-ERK1/2	Rabbit	Monoclonal IgG	D13.14.4E	1:100	Microwaving ^a	Cell Signaling Technology

Abbreviation: n.a, not applicable.

^a90°C for 10 min in 10 mM citrate buffer (pH 6.0).

Table 2-2

Sequence of primers used for real-time RT-PCR

Gene	Accession no.	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')
<i>Arc</i>	NM_019361	AGTGTCTGAA AGGCAATGAA AAGTAG	CCTTCGGCCA TCTCTGATTC
<i>Bdnf</i>	NM_001270630	CACTTTTGAG CACGTGATCG A	TCCGCGTCCT TATGGTTTTC
<i>Efnb3</i>	NM_001100980	ACCTGGACCT CCGCTTCAC	TCGTGGCCCC AGAGGTTAG
<i>Egr1</i>	NM_012551	CGAGCGAACA ACCCTACGA	CGTTATTCAG AGCGATGTCA GAA
<i>Elmo1</i>	NM_001108415	ATGGCATTTC ACTCCTCACT CA	TCTTCTGCAA CTTCTGGTAT CGTT
<i>Epha4</i>	NM_001162411	GAGCGAGGCC AGCATCAT	CAACGCCTTC CAGGTGGAT
<i>Ephb1</i>	NM_001104528	TCTGAGCGAG GCGAGCAT	CACCTCTAG GCGAATGATG TT
<i>Ephb2</i>	NM_001127319	CGCCAACGCT GAAGAAGTG	CGCCGTCCCC GTTACA
<i>Flt1</i>	NM_019306 (NM_001309381)	CCCTCGCCAG AAGTCGTATG	GCACCGAATA GCGAGCAGAT
<i>Fos</i>	NM_022197	CAACGAGCCC TCCTCTGACT	TGCCTTCTCT GACTGCTCAC A
<i>Gapdh</i>	NM_017008	GGCCGAGGGC CACTA	TGTTGAAGTC ACAGGAGACA ACCT
<i>Gria1</i>	NM_031608	GTGAGCGTCG TCCTCTTCCT	TCTTCGCTGT GCCATTCTGA
<i>Gria2</i>	NM_017261	CATCACACCT AGCTTCCCAA CA	CTTTGAGGTC AGGTCGCATC T
<i>Gria3</i>	NM_032990	GAAACATAAA GGACGTCCAG GAA	TTCTGCCTT CTGTCCATTT CT
<i>Grin2a</i>	NM_012573	TGAACCGCAC TGACCCTAAG A	GCGCCCCGGA CATGA
<i>Grin2b</i>	NM_012574	TCGTCAAGAC ACAAGATTAA AACCA	GGAGGATAAA GGAACGGAAG AAA
<i>Grin2c</i>	NM_012575	TGGGTGATGA TGTTCTGTGAT G	GTGAGGTTCT GGTTGTAGCT GACA
<i>Grin2d</i>	NM_022797	TCGTGCTCAC ACCCAAGGA	GGTCACTGCC ACAAAGGATG T
<i>Hprt1</i>	NM_012583	GTCAAGCAGT ACAGCCCCAA A	CAACACTTCG AGAGGTCCTT TTC
<i>Kdr</i>	NM_013062	TTGGCAAATA CAACCCCTTCA GAT	CACTCAGTCA CCAACACCCT TTC
<i>Kif21b</i>	NM_001105990	GCTGTACAT CTGTACCTCC GTTA	CCAGGTGTCC AGGTCAAAGA C
<i>Mapk1</i>	NM_053842	AAAATAAGGT GCCGTGGAAC AG	ATCCAGTAAA TCCAGAGCTT TGGA
<i>Nos1</i>	NM_052799	TCCAATGTTT ACAAAAACG AGTCT	TCGGCTGGAC TTAGGGCTTT
<i>Nos2</i>	NM_012611	GGATTTTCCC AGGCAACCA	ACAATCCACA ACTCGCTCCA A
<i>Nos3</i>	NM_021838	CACCAGGAAG AAGACTTTTA AGGAA	CACACGCTTC GCCATCAC
<i>Notch1</i>	NM_001105721	TGCTGTCATC TCCGACTTCA TC	TGGCAGCATC TGAACGAGAG TA
<i>Ntrk2</i>	NM_012731	GGCTTATGCT TGCTGGTCTT G	TCCTAGTGGT GCTGCATTTG C
<i>Pcna</i>	NM_022381	CTCACGTCTC CTTAGTGCAG CTT	CGATCGCAGC GGTATGTGT
<i>Ptgs2</i>	NM_017232	GCTTTCTCCA ACCTCTCCTA CTACA	GGGAGTTGGG CAGTCATCAG
<i>Slc17a6</i>	NM_053427	GGCAGACCCT GAGGAAACAA	TCCCCGTTT CTTATCCA
<i>Slc17a7</i>	NM_053859	TTGTGGCTAC CTCCACCCTA A	CGAAGATGAC ACAGCCATAG TGA
<i>Vegfa</i>	NM_031836 (NM_001110333) (NM_001110334) (NM_001287111) (NM_001287113) (NM_001287114)	CGTCTACCAG CGGAGCTATT G	CACACAGGAC GGCTTGAAGA T

Abbreviations: *Arc*, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Efnb3*, ephrin B3; *Egr1*, early growth response 1; *Elmo1*, engulfment and cell motility 1; *Epha4*, Eph receptor A4; *Ephb1*, Eph receptor B1; *Ephb2*, Eph receptor B2; *Flt1*, FMS-related tyrosine kinase 1; *Fos*, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Gria1*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1; *Gria2*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2; *Gria3*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3; *Grin2a*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A; *Grin2b*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B; *Grin2c*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2C; *Grin2d*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Kdr*, kinase insert domain receptor; *Kif21b*, kinesin family member 21B; *Mapk1*, mitogen activated protein kinase 1; *Nos1*, nitric oxide synthase 1; *Nos2*, nitric oxide synthase 2; *Nos3*, nitric oxide synthase 3; *Notch1*, notch receptor 1; *Ntrk2*, neurotrophic receptor tyrosine kinase 2; *Pcna*, proliferating cell nuclear antigen; *Ptgs2*, prostaglandin-endoperoxide synthase 2; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; *Slc17a6*, solute carrier family 17 member 6; *Slc17a7*, solute carrier family 17 member 7; *Vegfa*, vascular endothelial growth factor A.

Table 2-3**Body and brain weights of male offspring at prepubertal necropsy on PND 30**

	Ctrl	AGIQ
No. of offspring examined	16	16
Body weight (g)	92.2 ± 8.5	91.4 ± 9.0
No. of offspring examined	6	6
Brain weight (g)	1.69 ± 0.03	1.66 ± 0.07
(g/100g body weight)	1.96 ± 0.20	1.85 ± 0.13

Abbreviations: AGIQ, α -glycosyl isoquercitrin; Ctrl, untreated controls; PND, postnatal day.
Data are expressed as mean \pm SD.

Table 2-4**Body and brain weights of male offspring at terminal necropsies on PND 76 and PND 79**

	Ctrl	PW-AGIQ	DEV-AGIQ	WP-AGIQ
PND 76				
No. of offspring examined	16	16	16	16
Body weight (g)	413.8 ± 42.5	413.3 ± 30.5	424.3 ± 27.3	409.0 ± 37.2
No. of offspring examined	6	6	6	6
Brain weight (g)	2.07 ± 0.08	2.07 ± 0.07	2.04 ± 0.07	2.02 ± 0.06
(g/100g body weight)	0.48 ± 0.04	0.48 ± 0.03	0.46 ± 0.02	0.46 ± 0.03
PND 79				
No. of offspring examined	16	16	16	16
Body weight (g)	428.2 ± 38.9	431.0 ± 31.5	413.2 ± 33.7	434.6 ± 34.5
No. of offspring examined	6	6	6	6
Brain weight (g)	2.05 ± 0.09	2.07 ± 0.05	2.04 ± 0.09	2.05 ± 0.07
(g/100g body weight)	0.47 ± 0.02	0.47 ± 0.03	0.47 ± 0.02	0.47 ± 0.03

Abbreviations: AGIQ, α -glycosyl isoquercitrin; Ctrl, untreated controls; DEV-AGIQ, developmental AGIQ-exposed group; PND, postnatal day; PW-AGIQ, postweaning AGIQ-exposed group; WP-AGIQ, whole period AGIQ-exposed group.

Data are expressed as mean ± SD.

Table 2-5

Center area rate and total distance traveled on the open field test by male offspring during the prepubertal stage test

	Ctrl	AGIQ
No. of offspring examined	16	16
Total distance (cm)	4616.2±775.5	4447.1±750.4
Center area rate (%)	13.6±5.5	14.2±5.0

Abbreviations: AGIQ, α -glycosyl isoquercitrin; Ctrl, untreated controls.
Data are expressed as mean \pm SD.

Table 2-6

Center area rate and total distance traveled on the open field test by male offspring during adult stage test 1

	Ctrl	PW-AGIQ	DEV-AGIQ	WP-AGIQ
No. of offspring examined	16	16	16	16
Total distance (cm)	4716.4±730.8	5284.7±589.0	4771.0±792.6	4812.2±571.0
Center area rate (%)	15.0±4.7	14.7±3.0	14.2±3.9	13.6±3.2

Abbreviations: AGIQ, α -glycosyl isoquercitrin; Ctrl, untreated controls; DEV-AGIQ, developmental AGIQ-exposure group; PW-AGIQ, postweaning AGIQ-exposure group; WP-AGIQ, whole period AGIQ-exposure group.

Data are expressed as mean \pm SD.

Table 2-7

Total distance traveled and the discrimination index from the object-recognition test for male offspring on the prepubertal stage test

	Ctrl	AGIQ
No. of offspring examined	8	8
1 h interval		
Total distance (cm)		
Sample phase	3481.2±403.2	3114.0 ± 403.0
Test phase	1567.1±199.3	1365.6 ± 216.7
Discrimination index		
Sample phase	0.39±0.21	0.58 ± 0.20
Test phase	0.79±0.10	0.75 ± 0.15
No. of offspring examined	8	8
4 h interval		
Total distance (cm)		
Sample phase	3469.3±384.7	3262.9 ± 488.2
Test phase	1526.1±275.7	1433.1 ± 121.6
Discrimination index		
Sample phase	0.48±0.13	0.42 ± 0.18
Test phase	0.70±0.14	0.69 ± 0.15

Abbreviations: AGIQ, α -glycosyl isoquercitrin; Ctrl, untreated controls.
Data are expressed as mean \pm SD.

Table 2-8

Total distance traveled and the discrimination index from the object-recognition test for male offspring on adult stage test 1

	Ctrl	PW-AGIQ	DEV-AGIQ	WP-AGIQ
No. of offspring examined	8	8	8	8
24 h interval				
Total distance				
Sample phase	3739.2±314.2	4069.3 ± 600.5	3467.2 ± 464.2	3604.2 ± 274.4
Test phase	1727.4±176.2	1527.2 ± 305.5	1463.7 ± 211.1	1572.9 ± 267.0
Discrimination index				
Sample phase	0.44±0.08	0.51 ± 0.12	0.49 ± 0.10	0.48 ± 0.09
Test phase	0.54±0.09	0.52 ± 0.08	0.54 ± 0.13	0.45 ± 0.10
No. of offspring examined	8	8	8	8
1 h interval				
Total distance				
Sample phase	3458.6±666.1	3566.3 ± 710.4	3494.9 ± 721.3	3417.9 ± 548.9
Test phase	1542.6±211.5	1682.7 ± 307.6	1531.1 ± 304.6	1380.2 ± 293.3
Discrimination index				
Sample phase	0.50±0.07	0.49 ± 0.09	0.51 ± 0.11	0.51 ± 0.06
Test phase	0.57±0.06	0.50 ± 0.07	0.64 ± 0.10	0.52 ± 0.08

Abbreviations: AGIQ, α -glycosyl isoquercitrin; Ctrl, untreated controls; DEV-AGIQ, developmental AGIQ-exposed group; PW-AGIQ, postweaning AGIQ-exposed group; WP-AGIQ, whole period AGIQ-exposed group.

Data are expressed as mean ± SD.

Table 2-9**Freezing rate during the contextual fear conditioning test for male offspring on the prepubertal stage test**

	Ctrl	AGIQ
No. of offspring examined	16	16
Freezing rate (%)		
Conditioning	3.5±7.6	0.9±1.2
Acquisition	27.7±24.8	34.9±23.3
No. of offspring examined	16	16
Freezing rate (%)		
Fear extinction #1	22.2±26.0	16.1±17.5
Fear extinction #2	26.4±20.7	22.0±13.5

Abbreviations: AGIQ, α -glycosyl isoquercitrin; Ctrl, untreated controls.

Data are expressed as mean \pm SD.

Table 2-10**Freezing rate during the contextual fear conditioning test for male offspring on adult stage test 1**

	Ctrl	PW-AGIQ	DEV-AGIQ	WP-AGIQ
No. of offspring examined	16	16	16	16
Freezing rate (%)				
Conditioning	14.6 ± 8.6	12.2 ± 10.0	13.2 ± 11.8	8.7 ± 5.2
Acquisition	72.2 ± 15.5	62.2 ± 28.3	72.1 ± 19.2	59.9 ± 23.3
No. of offspring examined	16	16 (14) [†]	16	16 (13) [‡]
Freezing rate (%)				
Fear extinction #1	42.4 ± 24.9	28.1 ± 23.7	43.4 ± 24.1	29.4 ± 17.8
Fear extinction #2	32.4 ± 25.0	17.1 ± 15.2	23.6 ± 19.0	11.6 ± 9.1*
Fear extinction #3	24.3 ± 22.6	10.4 ± 11.5	27.3 ± 23.8	9.2 ± 10.5
No. of offspring examined	16	16 (14) [†]	16	16 (13) [‡]
Freezing rate (%)				
Spontaneous recovery	20.0 ± 24.5	15.8 ± 19.7	24.2 ± 21.2	12.7 ± 8.0

Abbreviations: AGIQ, α -glycosyl isoquercitrin; Ctrl, untreated controls; DEV-AGIQ, developmental AGIQ-exposed group; PW-AGIQ, postweaning AGIQ-exposed group; WP-AGIQ, whole period AGIQ-exposed group.

Data are expressed as mean ± SD.

* $P < 0.05$, significantly different from untreated controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

[†]Two outliers were detected by the Smirnov-Grubbs test. They were excluded from data analysis. Numbers in parenthesis are the effective number of animals.

[‡]Three outliers were detected by the Smirnov-Grubbs test. They were excluded from data analysis. Numbers in parenthesis are the effective number of animals.

Table 2-11**Freezing rate during the contextual fear conditioning test for male offspring on adult stage test 2**

	Ctrl	WP-AGIQ
No. of offspring examined	16	16
Freezing rate (%)		
Conditioning	15.4±10.2	10.4±8.5
Acquisition	76.3±17.5	64.2±19.9
No. of offspring examined	16	16 (14) [†]
Freezing rate (%)		
Fear extinction #1	47.4±22.0	30.8±13.2*
Fear extinction #2	27.2±19.2	25.4±15.0
Fear extinction #3	17.9±16.0	9.3±6.3

Abbreviations: AGIQ, α -glycosyl isoquercitrin; Ctrl, untreated controls; WP-AGIQ, whole period AGIQ-exposed group.

Data are expressed as mean \pm SD.

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

[†]Two outliers were detected by the Smirnov-Grubbs test. They were excluded from data analysis. The number in parenthesis is the effective number of animals.

Table 2-12

Number of immunoreactive cells in the granule cell layer of the hippocampal dentate gyrus, prelimbic cortex, and infralimbic cortex of male offspring after adult stage test 1

	Ctrl	PW-AGIQ	DEV-AGIQ	WP-AGIQ
No. of offspring examined	10	10 (8) [†]	10	10 (7) [‡]
Hippocampal dentate gyrus				
Granule cell layer (No./mm)				
ARC	3.9 ± 1.7	3.9 ± 1.7	3.4 ± 1.7	5.1 ± 1.5
COX2	4.4 ± 2.3	6.8 ± 2.9	3.8 ± 1.8	3.0 ± 1.1
EGR1	4.6 ± 2.4	5.2 ± 3.1	4.3 ± 1.9	5.0 ± 1.7
FOS	3.2 ± 1.1	3.6 ± 1.8	2.9 ± 1.6	4.1 ± 2.0
p-ERK1/2	1.1 ± 0.7	0.6 ± 0.4	1.0 ± 0.8	0.8 ± 0.7
Medial prefrontal cortex				
Prelimbic cortex (No./mm ²)				
ARC	1.0 ± 1.1	1.0 ± 1.0	1.4 ± 1.6	1.2 ± 0.8
COX2	10.4 ± 5.0	11.0 ± 7.1	27.9 ± 23.6	17.4 ± 8.1
EGR1	247.4 ± 109.1	222.0 ± 110.8	202.1 ± 73.0	253.9 ± 122.3
FOS	27.4 ± 13.3	30.8 ± 14.5	28.1 ± 13.1	33.7 ± 15.4
p-ERK1/2	39.7 ± 13.7	39.9 ± 29.6	39.7 ± 16.3	55.6 ± 22.2
Infralimbic cortex (No./mm ²)				
ARC	0.3 ± 0.4	0.7 ± 1.1	1.4 ± 2.1	0.1 ± 0.3
COX2	5.3 ± 3.9	5.2 ± 2.2	11.2 ± 6.5	11.5 ± 7.1
EGR1	123.0 ± 62.0	116.0 ± 60.7	131.2 ± 42.9	140.1 ± 69.0
FOS	16.1 ± 7.3	23.0 ± 13.2	20.1 ± 11.3	31.1 ± 14.8*
p-ERK1/2	76.0 ± 26.0	68.2 ± 26.6	61.8 ± 23.1	85.1 ± 32.3

Abbreviations: AGIQ, α -glycosyl isoquercitrin; ARC, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; COX2, cyclooxygenase 2; Ctrl, untreated controls; DEV-AGIQ, developmental AGIQ-exposed group; EGR1, early growth response 1; FOS, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; p-ERK1/2, phospho-extracellular signal-regulated kinase 1/2; PW-AGIQ, postweaning AGIQ-exposed group; WP-AGIQ, whole period AGIQ-exposed group.

Data are expressed as mean ± S.D.

* $P < 0.05$, significantly different from untreated controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

[†]Two animals that were detected as fear-extinction outliers by the Smirnov-Grubbs test were excluded from data analysis. The number in parenthesis is the effective number of animals.

[‡]Three animals that were detected as fear-extinction outliers by the Smirnov-Grubbs test were excluded from data analysis. The number in parenthesis is the effective number of animals.

Table 2-13

Number of immunoreactive cells in the granule cell layer of the hippocampal dentate gyrus, prelimbic cortex, infralimbic cortex, lateral amygdala, basolateral amygdala, and central nucleus of the amygdala of male offspring after adult stage test 2

	Ctrl	WP-AGIQ
No. of offspring examined	10	10
Hippocampal dentate gyrus		
Granule cell layer (No./mm)		
ARC	3.3 ± 1.2	4.2 ± 1.2
COX2	17.5 ± 6.2	18.5 ± 6.5
EGR1	16.9 ± 5.8	18.1 ± 4.2
FOS	1.7 ± 1.0	1.6 ± 0.7
p-ERK1/2	1.1 ± 1.0	1.1 ± 0.4
Medial prefrontal cortex		
Prelimbic cortex (No./mm ²)		
ARC	4.5 ± 3.7	7.5 ± 5.8
COX2	20.7 ± 14.2	37.2 ± 21.1
EGR1	182.8 ± 80.7	182.2 ± 40.0
FOS	14.9 ± 8.0	17.5 ± 11.1
p-ERK1/2	28.6 ± 16.0	58.4 ± 20.3*
Infralimbic cortex (No./mm ²)		
ARC	2.8 ± 2.9	5.2 ± 3.8
COX2	11.8 ± 9.0	12.1 ± 5.9
EGR1	87.3 ± 44.6	107.2 ± 34.5
FOS	13.9 ± 7.7	24.0 ± 12.2*
p-ERK1/2	52.7 ± 17.3	79.1 ± 23.2*
Amygdala		
Lateral amygdala (No./mm ²)		
ARC	0 ± 0	0.3 ± 0.7
COX2	27.9 ± 20.4	49.5 ± 38.6
EGR1	297.1 ± 168.0	331.5 ± 129.2
FOS	12.0 ± 14.7	34.4 ± 43.5
p-ERK1/2	6.5 ± 8.5	16.2 ± 20.5
Basolateral amygdala (No./mm ²)		
ARC	0 ± 0	0.1 ± 0.4
COX2	2.0 ± 1.6	1.8 ± 1.8
EGR1	196.5 ± 70.2	193.6 ± 38.6
FOS	18.3 ± 15.7	26.4 ± 28.9
p-ERK1/2	8.4 ± 8.9	16.6 ± 21.8
Central nucleus of amygdala (No./mm ²)		
ARC	0.2 ± 0.7	0 ± 0
COX2	0.6 ± 1.7	0 ± 0
EGR1	95.4 ± 74.8	104.2 ± 60.1
FOS	23.8 ± 26.4	17.2 ± 24.3
p-ERK1/2	2.3 ± 3.2	1.0 ± 1.6

Abbreviations: AGIQ, α-glycosyl isoquercitrin; ARC, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; COX2, cyclooxygenase 2; Ctrl, untreated controls; EGR1, early growth response 1; FOS, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; p-ERK1/2, phospho-extracellular signal-regulated kinase 1/2; WP-AGIQ, whole period AGIQ-exposed group.

Data are expressed as mean ± SD.

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

Table 2-14

Relative transcript levels in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on PND 76 (after adult stage test 1)

	Ctrl		PW-AGIQ		DEV-AGIQ		WP-AGIQ	
	Normalized to		Normalized to		Normalized to		Normalized to	
	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
Eph/Ephrin								
<i>Efnb3</i>	1.04 ± 0.33	1.07 ± 0.43	1.24 ± 0.38	1.15 ± 0.25	0.23 ± 0.07**	0.20 ± 0.06*	0.34 ± 0.12**	0.28 ± 0.11*
<i>Epha4</i>	1.01 ± 0.12	1.00 ± 0.09	1.08 ± 0.25	0.99 ± 0.08	0.84 ± 0.10	0.71 ± 0.11**	0.97 ± 0.21	0.77 ± 0.14**
<i>Ephb1</i>	1.02 ± 0.23	1.02 ± 0.19	1.10 ± 0.33	1.01 ± 0.18	1.29 ± 0.21	1.08 ± 0.25	1.64 ± 0.43**	1.33 ± 0.43
<i>Ephb2</i>	1.00 ± 0.10	1.01 ± 0.14	1.03 ± 0.26	0.95 ± 0.11	0.75 ± 0.05**	0.63 ± 0.06**	0.82 ± 0.10*	0.66 ± 0.08**
Glutamate receptors								
<i>Gria1</i>	1.02 ± 0.26	1.04 ± 0.31	1.23 ± 0.30	1.13 ± 0.10	0.34 ± 0.14**	0.28 ± 0.12**	0.55 ± 0.22**	0.44 ± 0.17**
<i>Gria2</i>	1.02 ± 0.25	1.04 ± 0.30	1.20 ± 0.31	1.10 ± 0.11	0.48 ± 0.13**	0.40 ± 0.12**	0.68 ± 0.12*	0.55 ± 0.11**
<i>Gria3</i>	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.17	1.09 ± 0.27	1.00 ± 0.10	0.86 ± 0.06	0.72 ± 0.07**	0.96 ± 0.07	0.77 ± 0.07**
<i>Grin2a</i>	1.01 ± 0.15	1.02 ± 0.21	1.12 ± 0.26	1.04 ± 0.11	0.67 ± 0.11*	0.56 ± 0.09**	0.81 ± 0.15	0.65 ± 0.12**
<i>Grin2b</i>	1.01 ± 0.11	1.01 ± 0.12	1.05 ± 0.24	0.97 ± 0.11	1.02 ± 0.07	0.84 ± 0.07*	0.99 ± 0.05	0.79 ± 0.05**
<i>Grin2c</i>	1.04 ± 0.32	1.04 ± 0.31	0.91 ± 0.25	0.84 ± 0.12	1.61 ± 0.22**	1.33 ± 0.16	1.35 ± 0.29	1.08 ± 0.28
<i>Grin2d</i>	1.24 ± 0.79	1.21 ± 0.74	0.69 ± 0.21	0.64 ± 0.13	2.34 ± 0.47	1.93 ± 0.30	1.55 ± 0.39	1.24 ± 0.29
Glutamate transporters								
<i>Slc17a6</i>	1.35 ± 0.92	1.31 ± 0.86	0.91 ± 0.34	0.83 ± 0.25	3.75 ± 0.86**	3.08 ± 0.49**	2.42 ± 0.79	1.93 ± 0.58
<i>Slc17a7</i>	1.01 ± 0.19	1.01 ± 0.15	1.12 ± 0.26	1.04 ± 0.09	0.48 ± 0.22**	0.40 ± 0.19**	0.77 ± 0.39	0.61 ± 0.30**
Neurotrophin-related								
<i>Bdnf</i>	1.02 ± 0.19	1.03 ± 0.27	1.29 ± 0.25	1.20 ± 0.13	0.60 ± 0.12*	0.50 ± 0.12**	0.78 ± 0.29	0.62 ± 0.21**
<i>Ntrk2</i>	1.02 ± 0.20	1.01 ± 0.16	0.92 ± 0.31	0.84 ± 0.15	1.21 ± 0.12	1.01 ± 0.14	1.23 ± 0.17	0.99 ± 0.17
Synaptic plasticity-related								
<i>Arc</i>	1.07 ± 0.44	1.09 ± 0.53	1.46 ± 0.42	1.35 ± 0.27	0.60 ± 0.17	0.50 ± 0.16*	1.11 ± 0.37	0.91 ± 0.34
<i>Egr1</i>	1.01 ± 0.17	1.01 ± 0.16	1.06 ± 0.39	0.95 ± 0.19	0.78 ± 0.14	0.66 ± 0.15*	1.00 ± 0.28	0.81 ± 0.26
<i>Fos</i>	1.04 ± 0.29	1.02 ± 0.23	0.97 ± 0.20	0.90 ± 0.16	1.82 ± 0.44**	1.51 ± 0.35*	1.79 ± 0.46**	1.44 ± 0.42
<i>Mapk1</i>	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.10	1.08 ± 0.26	1.00 ± 0.05	0.71 ± 0.13*	0.59 ± 0.13**	0.88 ± 0.15	0.71 ± 0.13**
<i>Ptgs2</i>	1.03 ± 0.26	1.04 ± 0.31	1.21 ± 0.28	1.12 ± 0.10	0.33 ± 0.18**	0.28 ± 0.16**	0.67 ± 0.30	0.54 ± 0.23**
Angiogenesis-related								
<i>Flt1</i>	1.03 ± 0.28	1.02 ± 0.21	0.95 ± 0.33	0.87 ± 0.18	1.45 ± 0.14*	1.21 ± 0.19	1.44 ± 0.18*	1.16 ± 0.20
<i>Kdr</i>	1.04 ± 0.31	1.03 ± 0.27	1.03 ± 0.39	0.93 ± 0.19	1.56 ± 0.25*	1.31 ± 0.30	2.10 ± 0.32**	1.70 ± 0.37**
<i>Notch1</i>	1.04 ± 0.32	1.03 ± 0.26	1.12 ± 0.35	1.02 ± 0.19	1.46 ± 0.16	1.22 ± 0.19	1.74 ± 0.32**	1.41 ± 0.34*
<i>Vegfa</i>	1.03 ± 0.27	1.02 ± 0.22	1.03 ± 0.33	0.94 ± 0.16	1.59 ± 0.07**	1.33 ± 0.15*	1.64 ± 0.18**	1.33 ± 0.22*
Cell proliferation marker								
<i>Pcna</i>	1.02 ± 0.20	1.01 ± 0.15	1.04 ± 0.29	0.96 ± 0.13	1.40 ± 0.11*	1.17 ± 0.15	1.65 ± 0.30**	1.34 ± 0.32*
Nitric oxide synthase								
<i>Nos1</i>	1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.14	1.09 ± 0.61	0.98 ± 0.41	0.44 ± 0.11*	0.37 ± 0.11**	0.67 ± 0.14	0.54 ± 0.14**
<i>Nos2</i>	1.15 ± 0.70	1.16 ± 0.74	1.23 ± 0.48	1.13 ± 0.31	1.99 ± 0.59	1.66 ± 0.52	2.91 ± 0.98**	2.36 ± 0.88*
<i>Nos3</i>	1.08 ± 0.43	1.06 ± 0.40	1.21 ± 0.43	1.10 ± 0.26	1.73 ± 0.27*	1.45 ± 0.29	1.74 ± 0.51*	1.41 ± 0.48
Motor protein								
<i>Kif21b</i>	1.01 ± 0.17	1.00 ± 0.07	1.07 ± 0.27	0.98 ± 0.08	1.25 ± 0.11	1.04 ± 0.15	1.41 ± 0.05**	1.14 ± 0.10
Cytoskeletal rearrangement-related								
<i>Elmo1</i>	1.09 ± 0.48	1.08 ± 0.42	1.15 ± 0.53	1.04 ± 0.34	2.32 ± 0.38**	1.94 ± 0.42*	2.69 ± 0.93**	2.20 ± 0.89**

Abbreviations: AGIQ, α -glycosyl isoquercitrin; *Arc*, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; Ctrl, untreated controls; DEV-AGIQ, developmental AGIQ-exposed group; *Efnb3*, ephrin B3; *Egr1*, early growth response 1; *Elmo1*, engulfment and cell motility 1; *Epha4*, Eph receptor A4; *Ephb1*, Eph receptor B1; *Ephb2*, Eph receptor B2; *Flt1*, FMS-related tyrosine kinase 1; *Fos*, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Gria1*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1; *Gria2*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2; *Gria3*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3; *Grin2a*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A; *Grin2b*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B; *Grin2c*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2C; *Grin2d*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Kdr*, kinase insert domain receptor; *Kif21b*, kinesin family member 21B; *Mapk1*, mitogen activated protein kinase 1; *Nos1*, nitric oxide synthase 1; *Nos2*, nitric oxide synthase 2; *Nos3*, nitric oxide synthase 3; *Notch1*, notch receptor 1; *Ntrk2*, neurotrophic receptor tyrosine kinase 2; *Pcna*, proliferating cell nuclear antigen; PND, postnatal day; *Ptgs2*, prostaglandin-endoperoxide synthase 2; PW-AGIQ, postweaning AGIQ-exposed group; *Slc17a6*, solute carrier family 17 member 6; *Slc17a7*, solute carrier family 17 member 7; *Vegfa*, vascular endothelial growth factor A; WP-AGIQ, whole period AGIQ-exposed group.

Data are expressed as mean ± SD. N = 6/group.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from untreated controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

Table 2-15

Relative transcript levels in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on PND 79 (after adult stage test 2)

	Ctrl		WP-AGIQ	
	Normalized to		Normalized to	
	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
No. of offspring examined	6	6	6 (4) [†]	6 (4) [†]
Eph/Ephrin				
<i>Efnb3</i>	1.01 ± 0.18	1.01 ± 0.17	1.52 ± 0.28**	1.31 ± 0.31
<i>Epha4</i>	1.01 ± 0.12	1.00 ± 0.06	1.21 ± 0.02**	1.04 ± 0.05
<i>Ephb1</i>	1.01 ± 0.17	1.02 ± 0.25	0.90 ± 0.06	0.77 ± 0.06
<i>Ephb2</i>	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.06	1.21 ± 0.03**	1.04 ± 0.05
Glutamate receptors				
<i>Gria1</i>	1.01 ± 0.11	1.00 ± 0.05	1.46 ± 0.14**	1.25 ± 0.16**
<i>Gria2</i>	1.01 ± 0.11	1.00 ± 0.07	1.49 ± 0.18**	1.28 ± 0.22*
<i>Gria3</i>	1.01 ± 0.11	1.00 ± 0.07	1.33 ± 0.11**	1.14 ± 0.13
<i>Grin2a</i>	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.05	1.51 ± 0.08**	1.30 ± 0.13**
<i>Grin2b</i>	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.08	1.46 ± 0.10**	1.25 ± 0.14**
<i>Grin2c</i>	1.01 ± 0.11	1.01 ± 0.20	1.17 ± 0.06*	1.01 ± 0.11
<i>Grin2d</i>	1.01 ± 0.18	1.02 ± 0.23	0.82 ± 0.03*	0.70 ± 0.06*
Glutamate transporters				
<i>Slc17a6</i>	1.17 ± 0.69	1.18 ± 0.73	0.73 ± 0.06	0.63 ± 0.09
<i>Slc17a7</i>	1.01 ± 0.16	1.00 ± 0.06	1.23 ± 0.07*	1.05 ± 0.02
Neurotrophin-related				
<i>Bdnf</i>	1.01 ± 0.15	1.00 ± 0.07	1.11 ± 0.15	0.94 ± 0.08
<i>Ntrk2</i>	1.01 ± 0.11	1.01 ± 0.15	1.01 ± 0.07	0.86 ± 0.10
Synaptic plasticity-related				
<i>Arc</i>	1.03 ± 0.25	1.02 ± 0.23	1.35 ± 0.16	1.15 ± 0.11
<i>Egr1</i>	1.02 ± 0.23	1.03 ± 0.29	1.30 ± 0.05*	1.11 ± 0.08
<i>Fos</i>	1.02 ± 0.22	1.03 ± 0.29	0.92 ± 0.13	0.79 ± 0.12
<i>Mapk1</i>	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.05	1.15 ± 0.07*	0.99 ± 0.05
<i>Ptgs2</i>	1.01 ± 0.15	1.00 ± 0.09	1.08 ± 0.12	0.93 ± 0.05
Motor protein				
<i>Kif21b</i>	1.00 ± 0.09	1.01 ± 0.15	1.25 ± 0.11**	1.07 ± 0.08
Cytoskeletal rearrangement-related				
<i>Elmol</i>	1.07 ± 0.43	1.09 ± 0.51	0.66 ± 0.07	0.57 ± 0.05

Abbreviations: AGIQ, α -glycosyl isoquercitrin; *Arc*, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; Ctrl, untreated controls; *Efnb3*, ephrin B3; *Egr1*, early growth response 1; *Elmol*, engulfment and cell motility 1; *Epha4*, Eph receptor A4; *Ephb1*, Eph receptor B1; *Ephb2*, Eph receptor B2; *Fos*, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Gria1*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1; *Gria2*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2; *Gria3*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3; *Grin2a*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A; *Grin2b*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B; *Grin2c*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2C; *Grin2d*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Kif21b*, kinesin family member 21B; *Mapk1*, mitogen activated protein kinase 1; *Ntrk2*, neurotrophic receptor tyrosine kinase 2; PND, postnatal day; *Ptgs2*, prostaglandin-endoperoxide synthase 2; *Slc17a6*, solute carrier family 17 member 6; *Slc17a7*, solute carrier family 17 member 7; WP-AGIQ, whole period AGIQ-exposed group.

Data are expressed as mean ± SD.

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

[†]Two animals that were detected as fear-extinction outliers by the Smirnov-Grubbs test were excluded from data analysis. The numbers in parenthesis are the effective number of animals.

Table 2-16

Relative transcript levels in the prelimbic cortex of male offspring on PND 76 (after adult stage test 1)

	Ctrl		PW-AGIQ		DEV-AGIQ		WP-AGIQ	
	Normalized to		Normalized to		Normalized to		Normalized to	
	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
Eph/Ephrin								
<i>Efnb3</i>	1.02 ± 0.22	1.02 ± 0.20	0.90 ± 0.18	1.00 ± 0.26	1.79 ± 0.21**	1.90 ± 0.27**	1.66 ± 0.26**	1.71 ± 0.27**
<i>Epha4</i>	1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.18	1.04 ± 0.12	1.15 ± 0.12	0.90 ± 0.22	0.94 ± 0.20	0.88 ± 0.09	0.91 ± 0.08
<i>Ephb1</i>	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.05	0.96 ± 0.12	1.06 ± 0.15	1.18 ± 0.10*	1.24 ± 0.13	1.27 ± 0.40	1.31 ± 0.37
<i>Ephb2</i>	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.08	0.94 ± 0.07	1.04 ± 0.10	1.11 ± 0.09*	1.17 ± 0.06*	1.11 ± 0.08*	1.15 ± 0.12*
Glutamate receptors								
<i>Gria1</i>	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.10	0.93 ± 0.07	1.03 ± 0.11	1.28 ± 0.06**	1.35 ± 0.10**	1.37 ± 0.16**	1.41 ± 0.16**
<i>Gria2</i>	1.00 ± 0.10	1.01 ± 0.13	0.94 ± 0.11	1.03 ± 0.10	1.08 ± 0.13	1.14 ± 0.10	1.17 ± 0.08*	1.21 ± 0.10*
<i>Gria3</i>	1.01 ± 0.11	1.01 ± 0.14	0.96 ± 0.09	1.06 ± 0.08	0.95 ± 0.01	1.01 ± 0.06	1.05 ± 0.08	1.09 ± 0.14
<i>Grin2a</i>	1.01 ± 0.11	1.01 ± 0.14	0.97 ± 0.07	1.07 ± 0.10	0.88 ± 0.13	0.93 ± 0.10	0.90 ± 0.06	0.93 ± 0.11
<i>Grin2b</i>	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.08	0.92 ± 0.12	1.02 ± 0.21	1.13 ± 0.17	1.19 ± 0.14	1.06 ± 0.04	1.10 ± 0.10
<i>Grin2c</i>	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.09	1.01 ± 0.13	1.13 ± 0.21	1.21 ± 0.17	1.28 ± 0.16	1.43 ± 0.53*	1.47 ± 0.49*
<i>Grin2d</i>	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.10	0.77 ± 0.10*	0.85 ± 0.10	1.23 ± 0.18*	1.30 ± 0.16**	1.04 ± 0.15	1.08 ± 0.18
Glutamate transporters								
<i>Slc17a6</i>	1.02 ± 0.20	1.01 ± 0.15	1.10 ± 0.10	1.22 ± 0.20	1.91 ± 0.42**	2.04 ± 0.52*	2.13 ± 0.50**	2.20 ± 0.44**
<i>Slc17a7</i>	1.00 ± 0.06	1.01 ± 0.11	0.96 ± 0.09	1.06 ± 0.08	1.03 ± 0.07	1.09 ± 0.08	1.09 ± 0.10	1.13 ± 0.14
Neurotrophin-related								
<i>Bdnf</i>	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.08	0.98 ± 0.17	1.08 ± 0.18	0.85 ± 0.16	0.89 ± 0.12	0.85 ± 0.12	0.88 ± 0.12
<i>Ntrk2</i>	1.01 ± 0.13	1.01 ± 0.17	0.91 ± 0.10	1.01 ± 0.13	1.14 ± 0.11	1.21 ± 0.09	1.07 ± 0.17	1.11 ± 0.18
Synaptic plasticity-related								
<i>Arc</i>	1.02 ± 0.22	1.02 ± 0.25	1.11 ± 0.29	1.22 ± 0.27	0.68 ± 0.22	0.72 ± 0.20	0.72 ± 0.20	0.75 ± 0.22
<i>Egr1</i>	1.00 ± 0.10	1.01 ± 0.12	0.98 ± 0.11	1.08 ± 0.08	0.78 ± 0.15*	0.82 ± 0.12	0.78 ± 0.19*	0.82 ± 0.23
<i>Fos</i>	1.01 ± 0.17	1.01 ± 0.18	1.16 ± 0.20	1.28 ± 0.19*	0.91 ± 0.23	0.96 ± 0.20	0.91 ± 0.13	0.94 ± 0.13
<i>Mapk1</i>	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.08	0.91 ± 0.08	1.01 ± 0.12	1.22 ± 0.09**	1.29 ± 0.08**	1.22 ± 0.08**	1.26 ± 0.05**
<i>Ptgs2</i>	1.02 ± 0.19	1.02 ± 0.19	1.08 ± 0.24	1.19 ± 0.27	0.89 ± 0.27	0.93 ± 0.24	0.89 ± 0.13	0.92 ± 0.13
Angiogenesis-related								
<i>Flt1</i>	1.00 ± 0.07	1.01 ± 0.11	0.95 ± 0.08	1.04 ± 0.08	0.85 ± 0.09*	0.90 ± 0.08	1.01 ± 0.17	1.05 ± 0.21
<i>Kdr</i>	1.00 ± 0.10	1.01 ± 0.16	1.04 ± 0.13	1.16 ± 0.20	1.03 ± 0.15	1.09 ± 0.17	1.19 ± 0.22	1.24 ± 0.24
<i>Notch1</i>	1.01 ± 0.11	1.01 ± 0.13	0.96 ± 0.10	1.07 ± 0.15	1.33 ± 0.17*	1.41 ± 0.19**	1.54 ± 0.68	1.58 ± 0.62
<i>Vegfa</i>	1.00 ± 0.09	1.01 ± 0.12	0.99 ± 0.11	1.10 ± 0.17	1.12 ± 0.13	1.18 ± 0.14	1.15 ± 0.12	1.19 ± 0.13
Cell proliferation marker								
<i>Pcna</i>	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.06	0.95 ± 0.14	1.05 ± 0.11	1.16 ± 0.15	1.23 ± 0.19	1.35 ± 0.45	1.38 ± 0.39
Nitric oxide synthase								
<i>Nos1</i>	1.02 ± 0.19	1.01 ± 0.18	0.94 ± 0.24	1.05 ± 0.30	2.14 ± 0.39**	2.26 ± 0.37**	2.00 ± 0.80**	2.04 ± 0.71**
<i>Nos2</i>	1.02 ± 0.23	1.02 ± 0.21	1.35 ± 0.36	1.50 ± 0.43	1.70 ± 0.46*	1.79 ± 0.46*	2.08 ± 1.26	2.10 ± 1.16
<i>Nos3</i>	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.09	1.07 ± 0.21	1.19 ± 0.31	1.23 ± 0.28	1.29 ± 0.26	1.46 ± 0.42*	1.51 ± 0.40*

Abbreviations: AGIQ, α -glycosyl isoquercitrin; *Arc*, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; Ctrl, untreated controls; DEV-AGIQ, developmental AGIQ-exposed group; *Efnb3*, ephrin B3; *Egr1*, early growth response 1; *Epha4*, Eph receptor A4; *Ephb1*, Eph receptor B1; *Ephb2*, Eph receptor B2; *Flt1*, FMS-related tyrosine kinase 1; *Fos*, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Gria1*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1; *Gria2*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2; *Gria3*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3; *Grin2a*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A; *Grin2b*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B; *Grin2c*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2C; *Grin2d*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Kdr*, kinase insert domain receptor; *Mapk1*, mitogen activated protein kinase 1; *Nos1*, nitric oxide synthase 1; *Nos2*, nitric oxide synthase 2; *Nos3*, nitric oxide synthase 3; *Notch1*, notch receptor 1; *Ntrk2*, neurotrophic receptor tyrosine kinase 2; *Pcna*, proliferating cell nuclear antigen; PND, postnatal day; *Ptgs2*, prostaglandin-endoperoxide synthase 2; PW-AGIQ, postweaning AGIQ-exposed group; *Slc17a6*, solute carrier family 17 member 6; *Slc17a7*, solute carrier family 17 member 7; *Vegfa*, vascular endothelial growth factor A; WP-AGIQ, whole period AGIQ-exposed group.

Data are expressed as mean ± SD. N = 6/group.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from untreated controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

Table 2-17

Relative transcript levels in the prelimbic cortex of male offspring on PND 79 (after adult stage test 2)

	Ctrl		WP-AGIQ	
	Normalized to		Normalized to	
	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
No. of offspring examined	6	6	6 (4) [†]	6 (4) [†]
Eph/Ephrin				
<i>Efnb3</i>	1.02 ± 0.23	1.01 ± 0.17	1.07 ± 0.08	1.11 ± 0.06
<i>Epha4</i>	1.01 ± 0.17	1.01 ± 0.12	1.07 ± 0.03	1.12 ± 0.06
<i>Ephb1</i>	1.01 ± 0.12	1.00 ± 0.09	1.04 ± 0.08	1.09 ± 0.08
<i>Ephb2</i>	1.01 ± 0.17	1.00 ± 0.11	1.17 ± 0.07	1.22 ± 0.07**
Glutamate receptors				
<i>Gria1</i>	1.02 ± 0.20	1.01 ± 0.12	1.00 ± 0.02	1.05 ± 0.04
<i>Gria2</i>	1.01 ± 0.18	1.00 ± 0.11	1.06 ± 0.06	1.11 ± 0.09
<i>Gria3</i>	1.02 ± 0.19	1.00 ± 0.10	0.99 ± 0.01	1.04 ± 0.02
<i>Grin2a</i>	1.02 ± 0.19	1.00 ± 0.10	1.10 ± 0.03	1.15 ± 0.06*
<i>Grin2b</i>	1.01 ± 0.16	1.00 ± 0.08	1.14 ± 0.08	1.19 ± 0.10*
<i>Grin2c</i>	1.01 ± 0.15	1.01 ± 0.12	1.15 ± 0.08	1.20 ± 0.08*
<i>Grin2d</i>	1.02 ± 0.21	1.01 ± 0.15	0.84 ± 0.10	0.87 ± 0.10
Glutamate transporters				
<i>Slc17a6</i>	1.01 ± 0.12	1.01 ± 0.15	1.21 ± 0.20	1.26 ± 0.19*
<i>Slc17a7</i>	1.02 ± 0.19	1.00 ± 0.09	0.94 ± 0.03	0.98 ± 0.04
Neurotrophin-related				
<i>Bdnf</i>	1.03 ± 0.27	1.02 ± 0.23	1.04 ± 0.08	1.08 ± 0.05
<i>Ntrk2</i>	1.02 ± 0.18	1.00 ± 0.09	0.97 ± 0.04	1.01 ± 0.03
Synaptic plasticity-related				
<i>Arc</i>	1.04 ± 0.30	1.03 ± 0.26	0.84 ± 0.20	0.87 ± 0.21
<i>Egr1</i>	1.02 ± 0.17	1.00 ± 0.10	0.87 ± 0.07	0.91 ± 0.08
<i>Fos</i>	1.03 ± 0.26	1.02 ± 0.25	1.11 ± 0.10	1.15 ± 0.11
<i>Mapk1</i>	1.01 ± 0.15	1.00 ± 0.07	0.97 ± 0.05	1.02 ± 0.06
<i>Ptgs2</i>	1.02 ± 0.23	1.01 ± 0.19	1.04 ± 0.07	1.08 ± 0.07

Abbreviations: AGIQ, α -glycosyl isoquercitrin; *Arc*, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; Ctrl, untreated controls; *Efnb3*, ephrin B3; *Egr1*, early growth response 1; *Epha4*, Eph receptor A4; *Ephb1*, Eph receptor B1; *Ephb2*, Eph receptor B2; *Fos*, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Gria1*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1; *Gria2*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2; *Gria3*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3; *Grin2a*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A; *Grin2b*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B; *Grin2c*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2C; *Grin2d*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Mapk1*, mitogen activated protein kinase 1; *Ntrk2*, neurotrophic receptor tyrosine kinase 2; PND, postnatal day; *Ptgs2*, prostaglandin-endoperoxide synthase 2; *Slc17a6*, solute carrier family 17 member 6; *Slc17a7*, solute carrier family 17 member 7; WP-AGIQ, whole period AGIQ-exposed group.

Data are expressed as mean ± SD.

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

[†]Two animals that were detected as fear-extinction outliers by the Smirnov-Grubbs test were excluded from data analysis. The numbers in parenthesis are the effective number of animals.

Table 2-18

Relative transcript levels in the infralimbic cortex of male offspring on PND 76 (after adult stage test 1)

	Ctrl		PW-AGIQ		DEV-AGIQ		WP-AGIQ	
	Normalized to		Normalized to		Normalized to		Normalized to	
	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
Eph/Ephrin								
<i>Efnb3</i>	1.01±0.17	1.03±0.26	0.94±0.12	1.01±0.16	1.48±0.15**	1.38±0.16*	1.54±0.40**	1.29±0.20
<i>Epha4</i>	1.01±0.18	1.01±0.13	0.82±0.21	0.87±0.23	0.85±0.14	0.79±0.12*	1.01±0.13	0.85±0.06
<i>Ephb1</i>	1.00±0.11	1.01±0.16	0.99±0.25	1.04±0.16	1.31±0.25	1.23±0.27	1.51±0.46*	1.26±0.27
<i>Ephb2</i>	1.00±0.08	1.01±0.14	0.97±0.22	1.02±0.10	1.25±0.11	1.17±0.15	1.36±0.28*	1.15±0.13
Glutamate receptors								
<i>Gria1</i>	1.00±0.07	1.01±0.12	0.90±0.07	0.97±0.14	1.29±0.11**	1.20±0.11*	1.46±0.24*	1.23±0.11*
<i>Gria2</i>	1.01±0.14	1.00±0.08	0.89±0.13	0.94±0.10	1.16±0.19	1.08±0.16	1.48±0.33**	1.24±0.12**
<i>Gria3</i>	1.01±0.15	1.00±0.09	1.01±0.21	1.07±0.15	1.19±0.17	1.10±0.14	1.49±0.27**	1.26±0.17*
<i>Grin2a</i>	1.02±0.19	1.01±0.12	0.90±0.21	0.95±0.15	0.99±0.09	0.92±0.07	1.14±0.18	0.96±0.08
<i>Grin2b</i>	1.01±0.12	1.01±0.20	0.90±0.12	0.96±0.16	1.12±0.12	1.04±0.11	1.25±0.24*	1.05±0.10
<i>Grin2c</i>	1.01±0.16	1.02±0.23	0.98±0.18	1.04±0.15	1.27±0.22	1.19±0.23	1.60±0.48**	1.34±0.29
<i>Grin2d</i>	1.00±0.09	1.00±0.07	0.69±0.08**	0.75±0.20	1.20±0.11	1.11±0.11	1.03±0.23	0.87±0.14
Glutamate transporters								
<i>Slc17a6</i>	1.02±0.21	1.04±0.30	1.27±0.39	1.34±0.33	2.13±0.25**	1.99±0.31**	2.62±0.87*	2.17±0.45**
<i>Slc17a7</i>	1.00±0.06	1.00±0.09	0.95±0.09	1.02±0.11	1.05±0.08	0.98±0.06	1.22±0.22*	1.03±0.13
Neurotrophin-related								
<i>Bdnf</i>	1.02±0.20	1.01±0.13	0.89±0.21	0.94±0.14	0.80±0.06	0.75±0.04**	0.90±0.15	0.75±0.05**
<i>Ntrk2</i>	1.00±0.09	1.01±0.11	0.86±0.14	0.91±0.07	1.13±0.09	1.05±0.08	1.35±0.25**	1.13±0.09
Synaptic plasticity-related								
<i>Arc</i>	1.10±0.53	1.07±0.43	1.45±0.72	1.46±0.57	0.97±0.21	0.90±0.18	1.04±0.23	0.88±0.20
<i>Egr1</i>	1.02±0.19	1.01±0.13	1.02±0.32	1.06±0.17	0.91±0.09	0.85±0.07	0.97±0.22	0.82±0.18
<i>Fos</i>	1.01±0.17	1.01±0.12	1.18±0.32	1.23±0.18	1.05±0.08	0.98±0.07	1.19±0.11	1.01±0.06
<i>Mapk1</i>	1.00±0.06	1.01±0.12	0.81±0.09	0.87±0.12	1.09±0.08	1.02±0.08	1.16±0.23	0.98±0.10
<i>Ptgs2</i>	1.05±0.35	1.03±0.27	0.93±0.29	0.98±0.29	0.91±0.17	0.84±0.15	1.13±0.15	0.96±0.15
Angiogenesis-related								
<i>Flt1</i>	1.01±0.17	1.01±0.11	0.98±0.26	1.03±0.21	1.14±0.22	1.06±0.20	1.46±0.28*	1.24±0.24
<i>Kdr</i>	1.01±0.19	1.01±0.15	1.05±0.22	1.11±0.19	1.31±0.20	1.22±0.23	1.71±0.34**	1.45±0.28**
<i>Notch1</i>	1.01±0.19	1.03±0.26	0.93±0.29	0.98±0.21	1.43±0.32	1.34±0.36	1.79±0.74*	1.49±0.46
<i>Vegfa</i>	1.01±0.11	1.01±0.12	0.94±0.20	0.99±0.14	1.13±0.17	1.06±0.18	1.37±0.35*	1.15±0.16
Cell proliferation marker								
<i>Pcna</i>	1.00±0.11	1.02±0.22	0.96±0.26	1.01±0.17	1.48±0.19**	1.39±0.24	1.80±0.68	1.50±0.40*
Nitric oxide synthase								
<i>Nos1</i>	1.04±0.33	1.07±0.46	0.80±0.08	0.87±0.25	1.43±0.23	1.33±0.20	1.64±0.44	1.37±0.25
<i>Nos2</i>	1.06±0.43	1.11±0.60	1.58±0.86	1.63±0.68	2.12±0.82	2.00±0.86	2.73±1.27*	2.27±0.92*
<i>Nos3</i>	1.01±0.14	1.02±0.23	1.24±0.49	1.29±0.35	1.46±0.31	1.37±0.33	1.89±0.62**	1.58±0.41*

Abbreviations: AGIQ, α -glycosyl isoquercitrin; *Arc*, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; Ctrl, untreated controls; DEV-AGIQ, developmental AGIQ-exposed group; *Efnb3*, ephrin B3; *Egr1*, early growth response 1; *Epha4*, Eph receptor A4; *Ephb1*, Eph receptor B1; *Ephb2*, Eph receptor B2; *Flt1*, FMS-related tyrosine kinase 1; *Fos*, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Gria1*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1; *Gria2*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2; *Gria3*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3; *Grin2a*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A; *Grin2b*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B; *Grin2c*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2C; *Grin2d*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Kdr*, kinase insert domain receptor; *Mapk1*, mitogen activated protein kinase 1; *Nos1*, nitric oxide synthase 1; *Nos2*, nitric oxide synthase 2; *Nos3*, nitric oxide synthase 3; *Notch1*, notch receptor 1; *Ntrk2*, neurotrophic receptor tyrosine kinase 2; *Pcna*, proliferating cell nuclear antigen; PND, postnatal day; *Ptgs2*, prostaglandin-endoperoxide synthase 2; PW-AGIQ, postweaning AGIQ-exposed group; *Slc17a6*, solute carrier family 17 member 6; *Slc17a7*, solute carrier family 17 member 7; *Vegfa*, vascular endothelial growth factor A; WP-AGIQ, whole period AGIQ-exposed group.

Data are expressed as mean \pm SD. N = 6/group.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from untreated controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

Table 2-19

Relative transcript levels in the infralimbic cortex of male offspring on PND 79 (after adult stage test 2)

	Ctrl		WP-AGIQ	
	Normalized to		Normalized to	
	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
No. of offspring examined	6	6	6 (4) [†]	6 (4) [†]
Eph/Ephrin				
<i>Efnb3</i>	1.01 ± 0.17	1.01 ± 0.15	1.17 ± 0.03	1.26 ± 0.04**
<i>Epha4</i>	1.04 ± 0.29	1.02 ± 0.21	0.95 ± 0.05	1.03 ± 0.05
<i>Ephb1</i>	1.01 ± 0.17	1.01 ± 0.15	1.17 ± 0.01	1.27 ± 0.02**
<i>Ephb2</i>	1.01 ± 0.15	1.00 ± 0.11	1.06 ± 0.06	1.15 ± 0.07*
Glutamate receptors				
<i>Gria1</i>	1.02 ± 0.19	1.01 ± 0.14	1.04 ± 0.02	1.12 ± 0.02
<i>Gria2</i>	1.02 ± 0.18	1.00 ± 0.04	0.98 ± 0.05	1.05 ± 0.04
<i>Gria3</i>	1.01 ± 0.16	1.00 ± 0.09	0.96 ± 0.09	1.04 ± 0.09
<i>Grin2a</i>	1.01 ± 0.16	1.00 ± 0.07	0.92 ± 0.05	1.00 ± 0.04
<i>Grin2b</i>	1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.13	1.06 ± 0.02	1.15 ± 0.03
<i>Grin2c</i>	1.03 ± 0.25	1.02 ± 0.21	1.14 ± 0.11	1.23 ± 0.13
<i>Grin2d</i>	1.03 ± 0.27	1.01 ± 0.19	0.81 ± 0.07	0.87 ± 0.06
Glutamate transporters				
<i>Slc17a6</i>	1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.05	1.09 ± 0.06
<i>Slc17a7</i>	1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.05	1.09 ± 0.06
Neurotrophin-related				
<i>Bdnf</i>	1.04 ± 0.31	1.02 ± 0.21	0.98 ± 0.07	1.06 ± 0.07
<i>Ntrk2</i>	1.02 ± 0.20	1.00 ± 0.11	0.90 ± 0.02	0.98 ± 0.02
Synaptic plasticity-related				
<i>Arc</i>	1.04 ± 0.33	1.04 ± 0.29	0.70 ± 0.19	0.76 ± 0.19
<i>Egr1</i>	1.02 ± 0.21	1.01 ± 0.13	0.73 ± 0.12*	0.79 ± 0.12*
<i>Fos</i>	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.11	0.97 ± 0.10	1.05 ± 0.10
<i>Mapk1</i>	1.01 ± 0.17	1.01 ± 0.12	1.01 ± 0.04	1.08 ± 0.03
<i>Ptgs2</i>	1.05 ± 0.33	1.02 ± 0.25	0.88 ± 0.14	0.95 ± 0.15

Abbreviations: AGIQ, α -glycosyl isoquercitrin; *Arc*, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; Ctrl, untreated controls; *Efnb3*, ephrin B3; *Egr1*, early growth response 1; *Epha4*, Eph receptor A4; *Ephb1*, Eph receptor B1; *Ephb2*, Eph receptor B2; *Fos*, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Gria1*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1; *Gria2*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2; *Gria3*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3; *Grin2a*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A; *Grin2b*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B; *Grin2c*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2C; *Grin2d*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Mapk1*, mitogen activated protein kinase 1; *Ntrk2*, neurotrophic receptor tyrosine kinase 2; PND, postnatal day; *Ptgs2*, prostaglandin-endoperoxide synthase 2; *Slc17a6*, solute carrier family 17 member 6; *Slc17a7*, solute carrier family 17 member 7; WP-AGIQ, whole period AGIQ-exposed group.

Data are expressed as mean ± SD.

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

[†]Two animals that were detected as fear-extinction outliers by the Smirnov-Grubbs test were excluded from data analysis. The numbers in parenthesis are the effective number of animals.

Table 2-20

Relative transcript levels in the amygdala of male offspring on PND 76 (after adult stage test 1)

	Ctrl		PW-AGIQ		DEV-AGIQ		WP-AGIQ	
	Normalized to		Normalized to		Normalized to		Normalized to	
	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
Eph/Ephrin								
<i>Efnb3</i>	1.01±0.12	1.01±0.15	0.84±0.11	0.97±0.12	1.09±0.17	0.96±0.06	1.03±0.10	0.86±0.11
<i>Epha4</i>	1.02±0.20	1.01±0.11	1.03±0.31	1.19±0.30	1.09±0.13	0.97±0.12	1.04±0.17	0.85±0.10
<i>Ephb1</i>	1.06±0.40	1.04±0.32	0.91±0.36	1.02±0.29	1.08±0.22	0.97±0.19	0.84±0.12	0.70±0.10
<i>Ephb2</i>	1.01±0.15	1.00±0.07	0.91±0.16	1.04±0.06	1.21±0.16	1.07±0.07	1.17±0.15	0.98±0.16
Glutamate receptors								
<i>Gria1</i>	1.01±0.12	1.01±0.15	0.90±0.13	1.04±0.16	1.18±0.18	1.04±0.11	1.22±0.24	1.00±0.09
<i>Gria2</i>	1.02±0.20	1.01±0.15	0.89±0.13	1.03±0.17	1.07±0.16	0.95±0.10	1.21±0.24	0.99±0.08
<i>Gria3</i>	1.01±0.15	1.02±0.19	1.01±0.12	1.17±0.19	1.21±0.26	1.08±0.24	1.59±0.25**	1.31±0.12*
<i>Grin2a</i>	1.01±0.12	1.01±0.14	0.96±0.22	1.09±0.14	1.16±0.13	1.04±0.13	1.38±0.23**	1.14±0.11
<i>Grin2b</i>	1.00±0.11	1.01±0.14	0.93±0.18	1.06±0.12	1.08±0.13	0.96±0.09	1.23±0.16*	1.02±0.16
<i>Grin2c</i>	1.01±0.17	1.01±0.13	0.84±0.18	0.95±0.06	1.03±0.15	0.92±0.11	1.06±0.21	0.88±0.16
<i>Grin2d</i>	1.01±0.16	1.00±0.08	0.65±0.09**	0.75±0.11**	1.09±0.28	0.96±0.16	0.94±0.12	0.78±0.13*
Glutamate transporters								
<i>Slc17a6</i>	1.02±0.20	1.00±0.09	1.14±0.69	1.28±0.66	1.32±0.34	1.17±0.29	1.22±0.23	1.02±0.25
<i>Slc17a7</i>	1.03±0.27	1.06±0.37	0.98±0.24	1.13±0.27	1.20±0.27	1.07±0.26	1.75±0.35**	1.45±0.26
Neurotrophin-related								
<i>Bdnf</i>	1.03±0.24	1.05±0.34	1.01±0.27	1.14±0.18	1.36±0.15	1.22±0.17	1.60±0.26**	1.32±0.16
<i>Ntrk2</i>	1.01±0.14	1.00±0.08	0.84±0.13	0.97±0.12	1.11±0.14	0.99±0.10	1.16±0.14	0.97±0.10
Synaptic plasticity-related								
<i>Arc</i>	1.00±0.07	1.01±0.13	1.16±0.34	1.35±0.40	1.35±0.35	1.22±0.39	1.44±0.18*	1.20±0.14
<i>Egr1</i>	1.01±0.16	1.01±0.16	1.12±0.27	1.27±0.22	1.39±0.16*	1.25±0.26	1.38±0.22*	1.15±0.20
<i>Fos</i>	1.04±0.32	1.02±0.23	1.01±0.19	1.15±0.15	1.11±0.12	0.99±0.17	1.09±0.15	0.91±0.15
<i>Mapk1</i>	1.00±0.08	1.01±0.13	0.88±0.15	1.01±0.13	1.04±0.17	0.92±0.15	1.19±0.28	0.97±0.08
<i>Ptgs2</i>	1.02±0.21	1.02±0.21	0.99±0.21	1.16±0.28	1.38±0.21*	1.23±0.17	1.49±0.28**	1.23±0.13
Angiogenesis-related								
<i>Flt1</i>	1.01±0.14	1.00±0.05	0.88±0.16	1.00±0.11	1.05±0.13	0.93±0.12	1.24±0.27	1.01±0.07
<i>Kdr</i>	1.01±0.17	1.00±0.09	0.86±0.16	0.99±0.14	1.13±0.19	1.02±0.25	1.31±0.30	1.08±0.15
<i>Notch1</i>	1.03±0.25	1.01±0.16	0.86±0.18	0.99±0.10	1.14±0.19	1.01±0.12	1.10±0.22	0.91±0.15
<i>Vegfa</i>	1.02±0.19	1.00±0.09	0.87±0.17	0.99±0.08	1.04±0.13	0.93±0.08	1.04±0.21	0.85±0.11*
Cell proliferation marker								
<i>Pcna</i>	1.01±0.18	1.00±0.07	0.86±0.15	0.99±0.07	1.11±0.16	0.99±0.10	1.08±0.15	0.90±0.09
Nitric oxide synthase								
<i>Nos1</i>	1.01±0.17	1.00±0.10	0.93±0.25	1.05±0.13	0.96±0.16	0.86±0.12	1.06±0.16	0.88±0.14
<i>Nos2</i>	1.06±0.36	1.04±0.28	1.00±0.22	1.13±0.04	1.46±0.30	1.29±0.25	1.44±0.32	1.17±0.08
<i>Nos3</i>	1.03±0.26	1.01±0.18	0.97±0.23	1.09±0.09	1.16±0.16	1.04±0.13	1.22±0.18	1.02±0.19

Abbreviations: AGIQ, α -glycosyl isoquercitrin; *Arc*, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; Ctrl, untreated controls; DEV-AGIQ, developmental AGIQ-exposed group; *Efnb3*, ephrin B3; *Egr1*, early growth response 1; *Epha4*, Eph receptor A4; *Ephb1*, Eph receptor B1; *Ephb2*, Eph receptor B2; *Flt1*, FMS-related tyrosine kinase 1; *Fos*, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Gria1*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1; *Gria2*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2; *Gria3*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3; *Grin2a*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A; *Grin2b*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B; *Grin2c*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2C; *Grin2d*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Kdr*, kinase insert domain receptor; *Mapk1*, mitogen activated protein kinase 1; *Nos1*, nitric oxide synthase 1; *Nos2*, nitric oxide synthase 2; *Nos3*, nitric oxide synthase 3; *Notch1*, notch receptor 1; *Ntrk2*, neurotrophic receptor tyrosine kinase 2; *Pcna*, proliferating cell nuclear antigen; PND, postnatal day; *Ptgs2*, prostaglandin-endoperoxide synthase 2; PW-AGIQ, postweaning AGIQ-exposed group; *Slc17a6*, solute carrier family 17 member 6; *Slc17a7*, solute carrier family 17 member 7; *Vegfa*, vascular endothelial growth factor A; WP-AGIQ, whole period AGIQ-exposed group.

Data are expressed as mean \pm SD. N = 6/group.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from untreated controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's *t*-test with Bonferroni correction.

Table 2-21

Relative transcript levels in the amygdala of male offspring on PND 79 (after adult stage test 2)

	Ctrl		WP-AGIQ	
	Normalized to		Normalized to	
	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
No. of offspring examined	6	6	6 (4) [†]	6 (4) [†]
Eph/Ephrin				
<i>Efnb3</i>	1.01 ± 0.19	1.00 ± 0.10	1.29 ± 0.03*	1.12 ± 0.04
<i>Epha4</i>	1.03 ± 0.25	1.01 ± 0.16	1.32 ± 0.11	1.15 ± 0.11
<i>Ephb1</i>	1.04 ± 0.29	1.02 ± 0.22	1.46 ± 0.30	1.26 ± 0.22
<i>Ephb2</i>	1.01 ± 0.17	1.00 ± 0.10	1.31 ± 0.09*	1.14 ± 0.14
Glutamate receptors				
<i>Gria1</i>	1.02 ± 0.20	1.00 ± 0.07	1.28 ± 0.05*	1.11 ± 0.05*
<i>Gria2</i>	1.01 ± 0.16	1.00 ± 0.06	1.30 ± 0.09*	1.13 ± 0.09*
<i>Gria3</i>	1.02 ± 0.22	1.01 ± 0.12	1.31 ± 0.12*	1.14 ± 0.15
<i>Grin2a</i>	1.02 ± 0.22	1.01 ± 0.12	1.36 ± 0.07*	1.18 ± 0.10*
<i>Grin2b</i>	1.02 ± 0.18	1.00 ± 0.06	1.38 ± 0.10**	1.20 ± 0.11**
<i>Grin2c</i>	1.02 ± 0.20	1.00 ± 0.07	1.39 ± 0.09**	1.20 ± 0.11**
<i>Grin2d</i>	1.01 ± 0.19	1.02 ± 0.19	1.02 ± 0.14	0.88 ± 0.13
Glutamate transporters				
<i>Slc17a6</i>	1.02 ± 0.22	1.02 ± 0.25	1.40 ± 0.13*	1.22 ± 0.15
<i>Slc17a7</i>	1.05 ± 0.37	1.04 ± 0.32	1.09 ± 0.32	0.95 ± 0.31
Neurotrophin-related				
<i>Bdnf</i>	1.03 ± 0.26	1.01 ± 0.15	1.04 ± 0.30	0.91 ± 0.29
<i>Ntrk2</i>	1.01 ± 0.18	1.00 ± 0.06	1.08 ± 0.04	0.94 ± 0.02
Synaptic plasticity-related				
<i>Arc</i>	1.05 ± 0.33	1.02 ± 0.23	1.14 ± 0.21	0.99 ± 0.21
<i>Egr1</i>	1.03 ± 0.25	1.01 ± 0.14	1.08 ± 0.08	0.94 ± 0.11
<i>Fos</i>	1.04 ± 0.29	1.02 ± 0.20	1.44 ± 0.10*	1.25 ± 0.09*
<i>Mapk1</i>	1.02 ± 0.18	1.00 ± 0.08	1.18 ± 0.08	1.02 ± 0.02
<i>Ptgs2</i>	1.05 ± 0.37	1.04 ± 0.32	1.27 ± 0.22	1.11 ± 0.26

Abbreviations: AGIQ, α -glycosyl isoquercitrin; *Arc*, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; Ctrl, untreated controls; *Efnb3*, ephrin B3; *Egr1*, early growth response 1; *Epha4*, Eph receptor A4; *Ephb1*, Eph receptor B1; *Ephb2*, Eph receptor B2; *Fos*, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Gria1*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1; *Gria2*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2; *Gria3*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3; *Grin2a*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A; *Grin2b*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B; *Grin2c*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2C; *Grin2d*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Mapk1*, mitogen activated protein kinase 1; *Ntrk2*, neurotrophic receptor tyrosine kinase 2; PND, postnatal day; *Ptgs2*, prostaglandin-endoperoxide synthase 2; *Slc17a6*, solute carrier family 17 member 6; *Slc17a7*, solute carrier family 17 member 7; WP-AGIQ, whole period AGIQ-exposed group.

Data are expressed as mean \pm SD.

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

[†]Two animals that were detected as fear-extinction outliers by the Smirnov-Grubbs test were excluded from data analysis. The numbers in parenthesis are the effective number of animals.

Table 3-1**Body weight changes of male offspring from PND 5 to PND 21**

	Ctrl	AGIQ
No. of offspring examined	63	69
Body weight (g)		
PND 5	13.5± 0.6	14.1± 1.0
PND 8	19.9± 1.0	21.0± 1.6
PND 12	30.6± 1.9	31.4± 2.4
PND 15	37.8± 2.2	38.5± 2.8
PND 19	47.6± 2.9	48.7± 3.1
PND 21	56.2± 3.5	57.6± 3.3

Abbreviations: AGIQ, α -glycosyl isoquercitrin; Ctrl, untreated controls; PND, postnatal day.
Data are expressed as mean \pm S.D.

Table 3-2

Body weight changes of male offspring from PND 26 to PND 75 and body and brain weights of male offspring at the terminal necropsy on PND 81

	BD + SC	BD + WC	BD + EC	AGIQ + SC	AGIQ + WC	AGIQ + EC
No. of offspring examined	28	16	18	30	16	18
Body weight (g)						
PND 26	83.9 ± 4.5	81.1 ± 5.8	82.7 ± 7.0	86.4 ± 6.3	81.2 ± 4.7 [†]	87.7 ± 4.5
PND 33	137.7 ± 10.7	134.6 ± 9.6	135.0 ± 12.2	138.1 ± 8.3	136.4 ± 7.1	141.9 ± 8.0
PND 40	197.6 ± 14.6	194.8 ± 15.5	191.5 ± 18.0	194.4 ± 13.3	197.5 ± 9.7	199.6 ± 12.1
PND 47	255.0 ± 18.7	250.3 ± 19.5	248.2 ± 22.4	252.6 ± 17.8	258.1 ± 14.2	259.4 ± 17.7
PND 54	302.0 ± 21.6	293.1 ± 20.7	295.1 ± 23.1	301.6 ± 21.9	301.3 ± 17.3	309.1 ± 22.5
PND 61	343.1 ± 24.6	328.3 ± 22.0	336.5 ± 26.1	346.1 ± 24.2	337.1 ± 21.2	353.6 ± 26.2
PND 68	378.3 ± 27.8	358.6 ± 23.5	371.8 ± 27.3	383.5 ± 27.3	370.0 ± 21.3	388.3 ± 29.7
PND 75	409.0 ± 31.2	380.1 ± 27.5*	402.2 ± 28.3	417.2 ± 29.0	394.6 ± 23.9	417.9 ± 33.0
No. of offspring examined	8	6	8	8	6	8
Body weight (g)						
PND 81	426.3 ± 28.4	383.5 ± 28.5	414.9 ± 27.5	439.7 ± 28.8	414.1 ± 18.5	434.6 ± 31.0
Brain weight (g)						
PND 81	2.10 ± 0.03	2.18 ± 0.06	2.18 ± 0.06	2.17 ± 0.07	2.16 ± 0.09	2.16 ± 0.05

Abbreviations: AGIQ, α -glycosyl isoquercitrin; BD, basal diet; EC, environmental enrichment cage; PND, postnatal day; SC, standard cage; WC, wheel cage.

Data are expressed as mean ± S.D.

* $P < 0.05$, significantly different from BD + SC by Tukey-Kramer's test or Steel-Dwass's test.

[†] $P < 0.05$, significantly different from AGIQ + SC by Tukey-Kramer's test or Steel-Dwass's test.

Table 3-3**Changes in parameters of the behavioral tests of male offspring**

	BD + SC	BD + WC	BD + EC	AGIQ + SC	AGIQ + WC	AGIQ + EC
Open field test						
No. of offspring examined	18	16	18	18	16	18
Total distance (cm)	5614±551	4531±978**	5707±1113	5831±615	4787±1054 ^{††}	5560±793
Center area rate (%)	10.7±4.1	14.0±8.8	13.6±6.2	13.1±4.1	10.4±5.5	13.3±5.3
Object recognition test						
No. of offspring examined	18	16	18	18	16	18
Total distance (cm)						
sample phase	3326±514	2987±627	3526±391	3730±489	3269±564	3529±451
test phase	1563±226	1363±338	1634±294	1602±174	1486±333	1626±221
Discrimination index						
sample phase	0.47±0.10	0.48±0.13	0.49±0.09	0.47±0.06	0.47±0.11	0.46±0.09
test phase	0.54±0.14	0.60±0.13	0.57±0.16	0.58±0.10	0.48±0.17	0.57±0.12
Object location test						
No. of offspring examined	18	16	18	18	16	18
Total distance (cm)						
test phase	1489±204	1364±344	1614±195	1647±155	1443±279	1311±399
Discrimination index						
test phase	0.49±0.16	0.55±0.14	0.50±0.12	0.48±0.12	0.47±0.16	0.52±0.23
Contextual fear conditioning test						
No. of offspring examined	18	16	18	18	16	18
Freezing rate (%)						
Conditioning	40.8±8.7	33.8±12.1	39.5±9.7	40.7±11.2	34.0±11.8	39.9±12.2
Acquisition	74.2±13.5	63.6±20.2	72.7±13.9	58.8±22.6	61.5±14.3	67.6±17.2
No. of offspring examined	18 (17) [‡]	16	18 (16) [§]	18	16 (15)	18 (17) [¶]
Freezing rate (%)						
Fear extinction #1	33.4±18.1	33.9±20.9	24.9±14.0	30.0±23.0	28.9±19.9	27.6±15.9
Fear extinction #2	18.0±14.1	16.6±9.2	10.7±6.7	14.7±13.5	12.7±9.3	12.1±6.7
Fear extinction #3	13.4±12.3	14.3±7.7	5.9±7.0	8.8±7.3	12.1±7.8	6.9±5.8

Abbreviations: AGIQ, α -glycosyl isoquercitrin; BD, basal diet; EC, environmental enrichment cage; SC, standard cage; WC, wheel cage.

Data are expressed as mean \pm SD.

** $P < 0.01$, significantly different from BD + SC by Tukey-Krammer's test or Steel-Dwass's test.

^{††} $P < 0.01$, significantly different from AGIQ + SC by Tukey-Krammer's test or Steel-Dwass's test.

[‡]An outlier was detected by Smirnov-Grubbs test. It was excluded from data analysis. Number in parenthesis is effective number of animals.

[§]Two outliers were detected by Smirnov-Grubbs test. They were excluded from data analysis. Number in parenthesis is the effective number of animals.

^{||}An outlier was detected by Smirnov-Grubbs test. It was excluded from data analysis. Number in parenthesis is the effective number of animals.

[¶]An outlier was detected by Smirnov-Grubbs test. It was excluded from data analysis. Number in parenthesis is the effective number of animals.

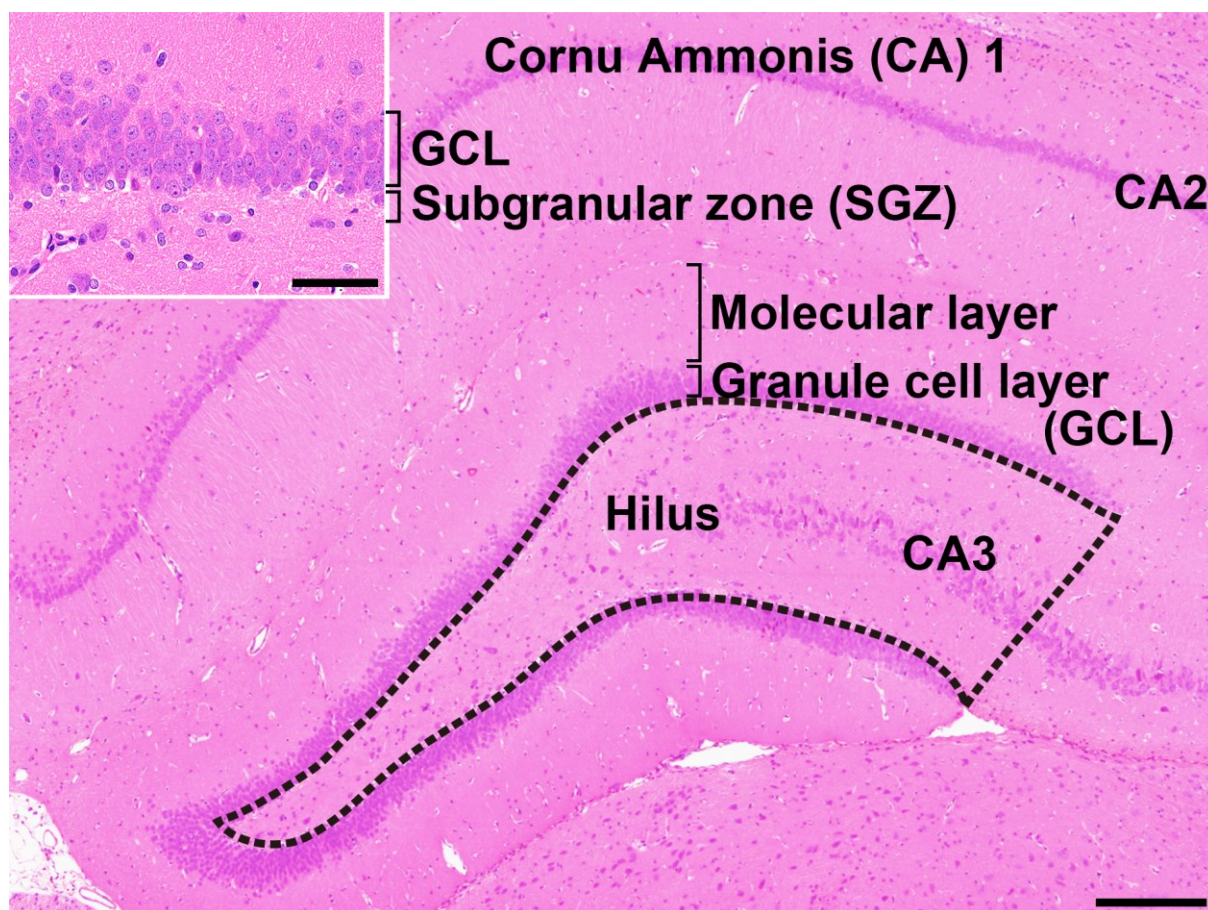


Fig. 1-1

Overview of the hippocampal formation of a male rat stained with hematoxylin and eosin. The number of cells in the hilus of the dentate gyrus (as enclosed by the dotted line) displaying immunoreactivity for parvalbumin (PVALB), reelin (RELN), calbindin-D-29K (CALB2), somatostatin (SST) or neuronal nuclei (NeuN) was counted and normalized for the unit area. Only small-sized cells with positive immunoreactivity for these antigens were counted, and larger Cornu Ammonis (CA) 3 neurons were excluded. (Inset) Higher magnification of the granule cell layer (GCL) and subgranular zone (SGZ). The distribution of immunoreactive cells for glial fibrillary acidic protein (GFAP), SRY box 2 (SOX2), T-box brain 2 (TBR2), doublecortin (DCX), NeuN, activity-regulated cytoskeleton-associated protein (ARC), Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit (FOS) or cyclooxygenase 2 (COX2), and proliferating cells or apoptotic cells were measured in the SGZ and/or GCL. Magnification $\times 40$; bar 200 μm . (Inset) Higher magnification of the granule cell layer. Magnification $\times 400$; bar 50 μm .

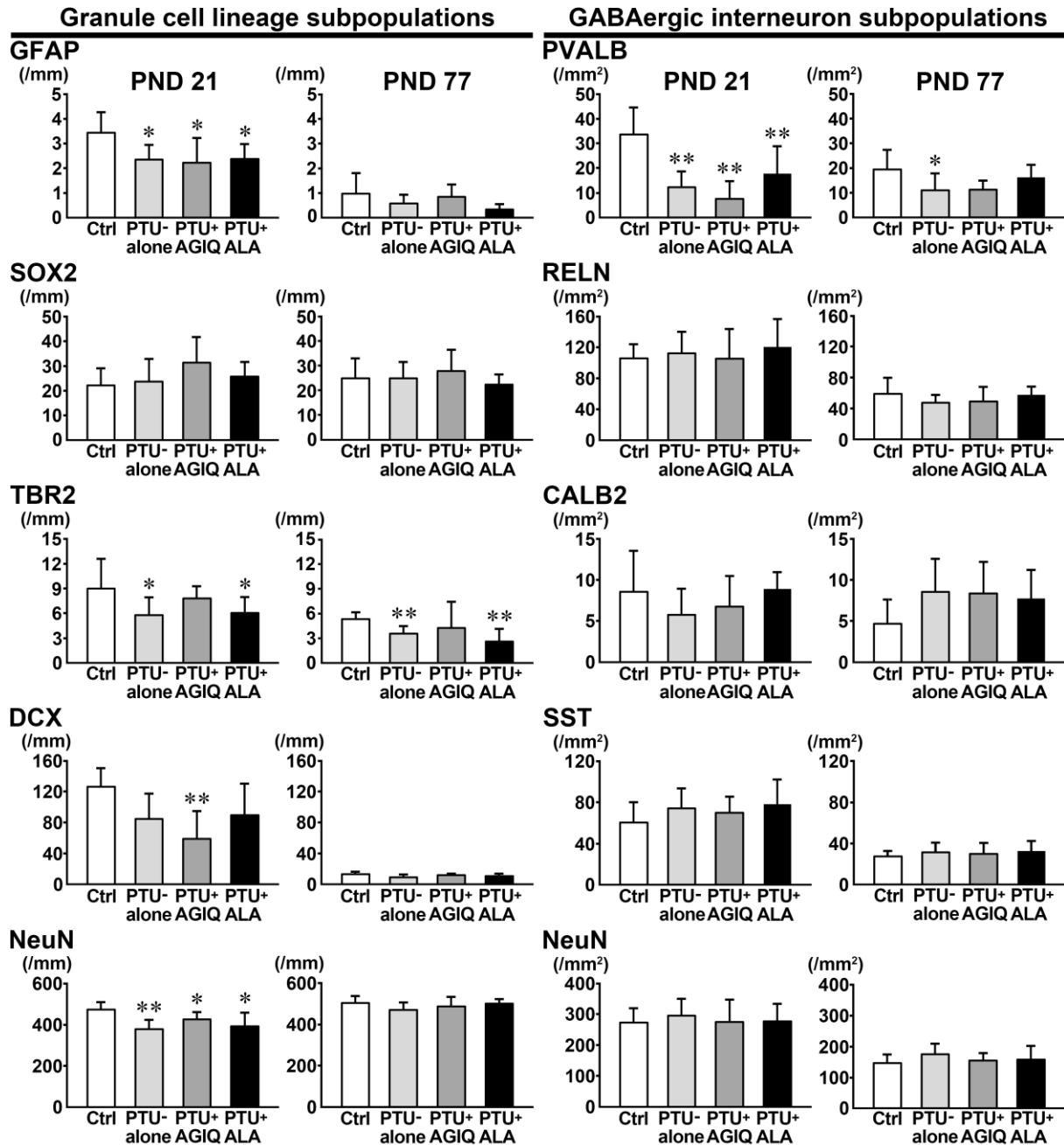


Fig. 1-2

The number of granule cell lineage subpopulations immunoreactive for GFAP, SOX2, and TBR2 in the SGZ, DCX and NeuN in the SGZ and GCL, and the number of GABAergic interneurons immunoreactive for PVALB, RELN, CALB2 and SST, and NeuN-immunoreactive postmitotic neurons in the hilus of the dentate gyrus of male offspring on PND 21 and PND 77. Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the SGZ, GCL and/or hilus. Data are expressed as mean + SD. N = 10/group at PND 21, and N = 8-10 at PND 77 (untreated controls, 10; PTU-alone group, 10; PTU + AGIQ group, 9; PTU + ALA group, 8). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from untreated controls by Tukey's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

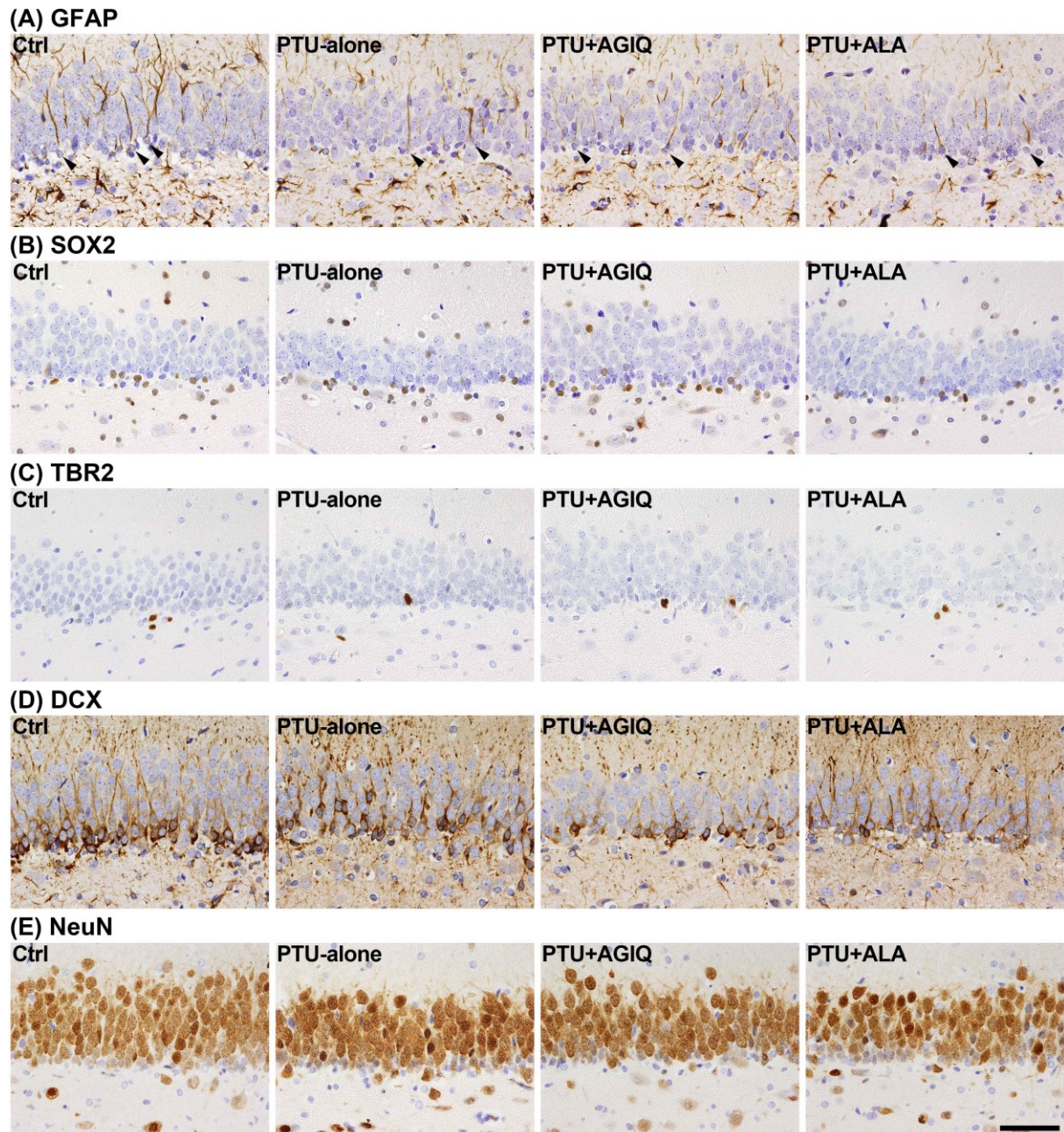


Fig. 1-3

Distribution of immunoreactive cells for (A) GFAP, (B) SOX2 and (C) TBR2 in the SGZ, and (D) DCX and (E) NeuN in the SGZ and GCL of male offspring on PND 21. Representative images from untreated controls (Ctrl; left), PTU-alone group (center left), PTU + AGIQ group (center right) and PTU + ALA group (right). Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification $\times 400$; bar 50 μm .

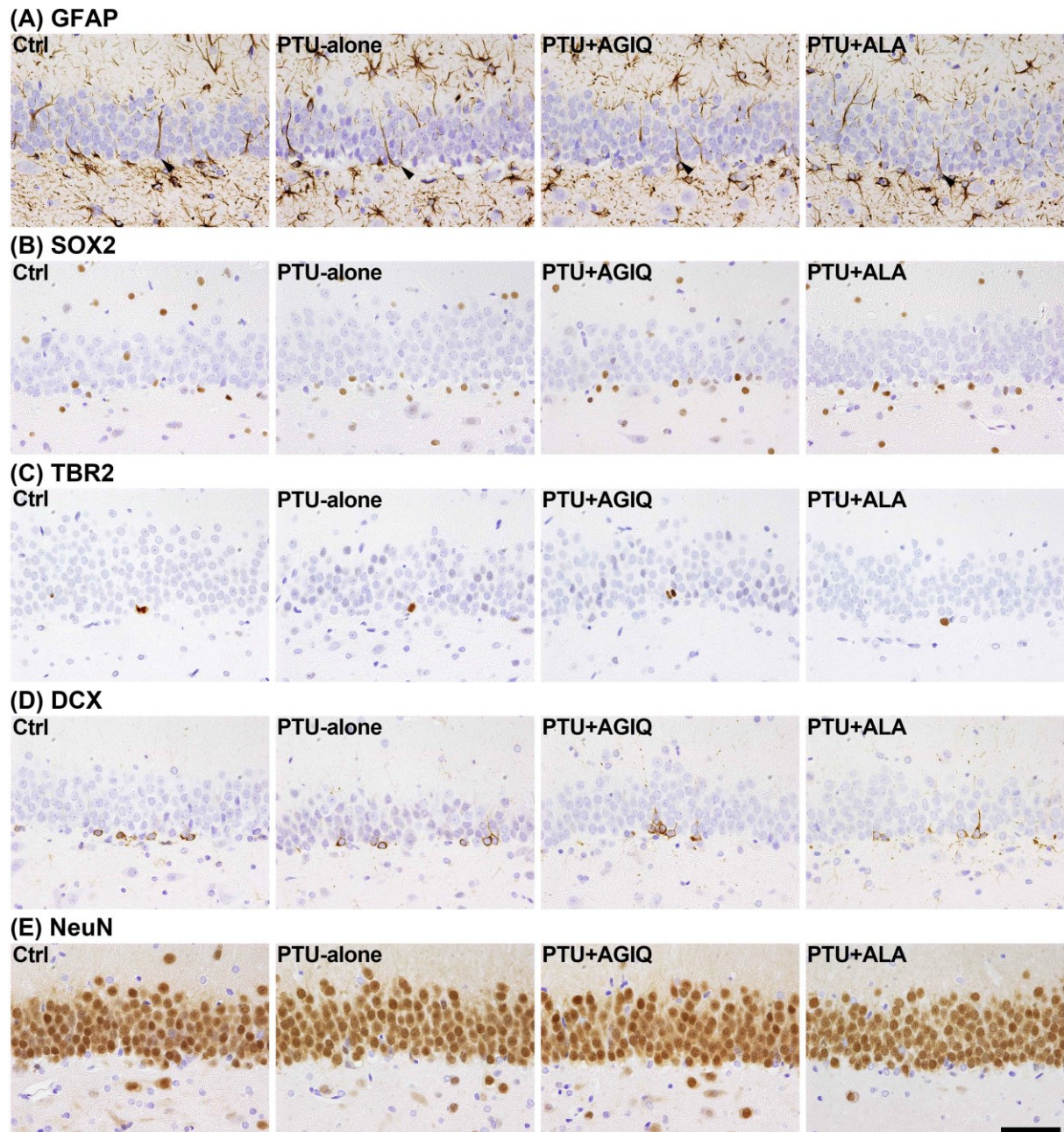


Fig. 1-4

Distribution of immunoreactive cells for (A) GFAP, (B) SOX2 and (C) TBR2 in the SGZ, and (D) DCX and (E) NeuN in the SGZ and GCL of male offspring at PND 77. Representative images from untreated controls (Ctrl; left), PTU-alone group (center left), PTU + AGIQ group (center right) and PTU + ALA group (right).

Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification $\times 400$; bar 50 μm .

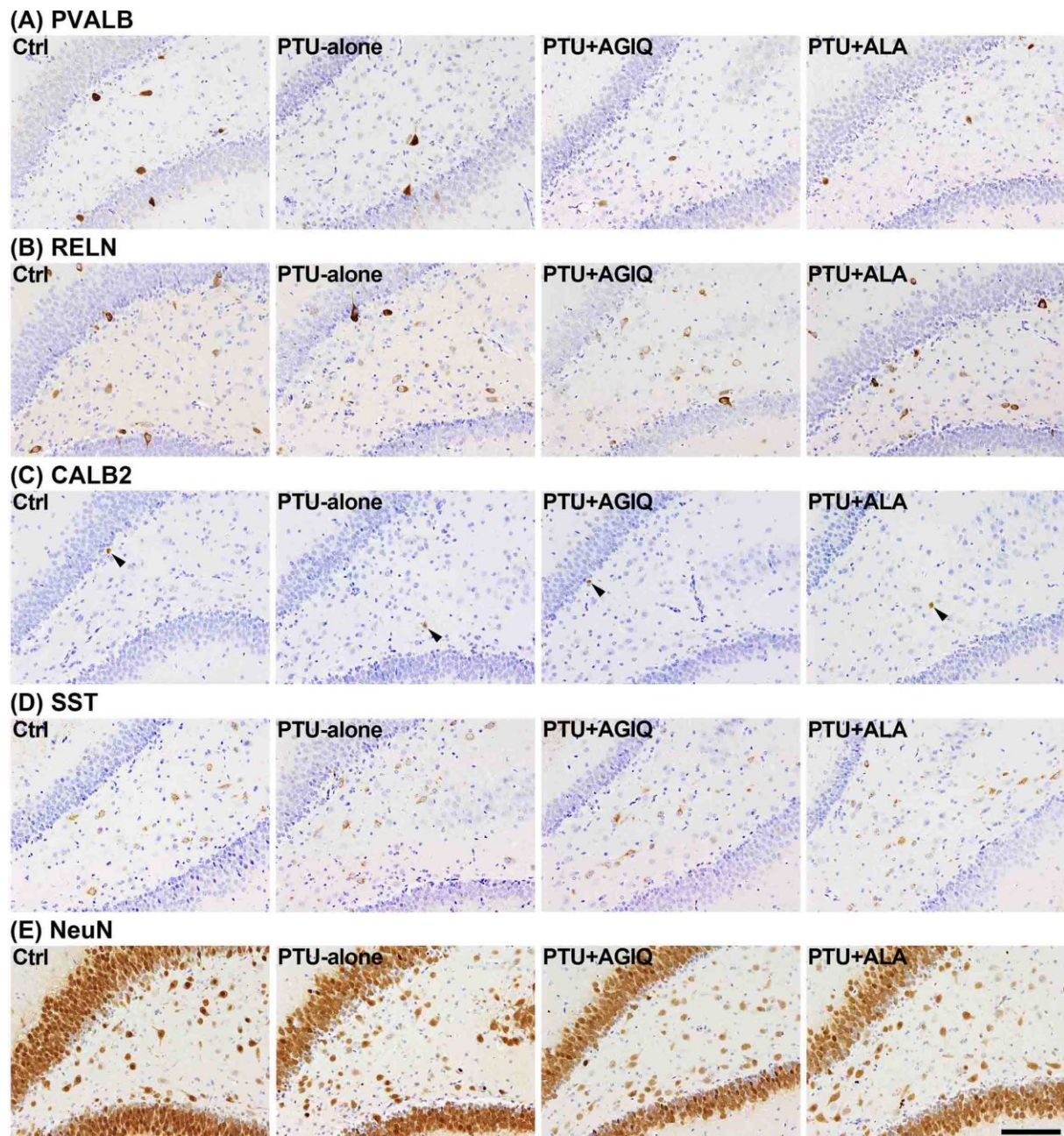


Fig. 1-5

Distribution of immunoreactive cells for (A) PVALB, (B) RELN, (C) CALB2, (D) SST and (E) NeuN in the hilus of the hippocampal dentate gyrus of male offspring at PND 21. Representative images from untreated controls (Ctrl; left), PTU-alone group (center left), PTU + AGIQ group (center right) and PTU + ALA group (right). Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification $\times 200$; bar 100 μm .

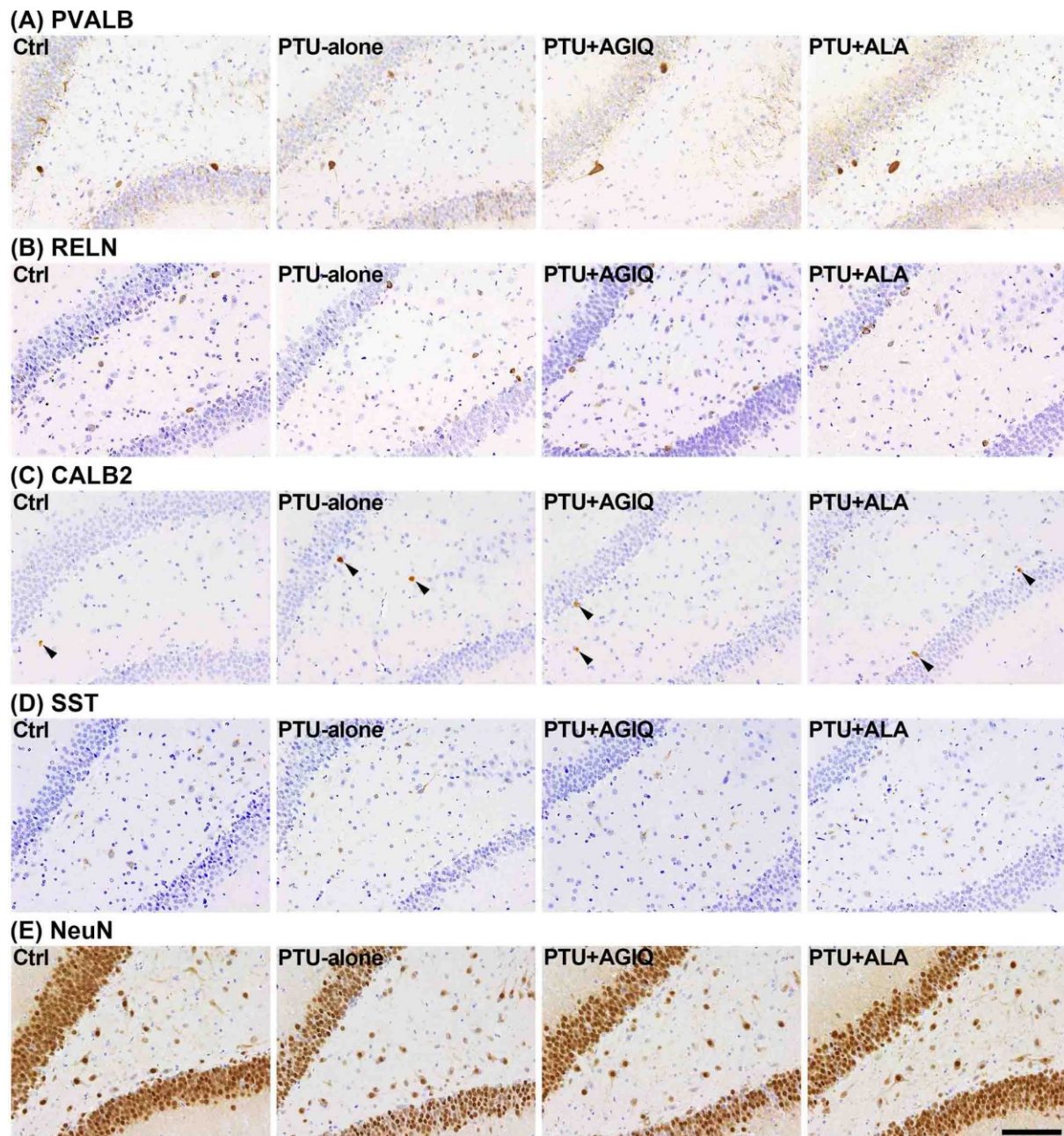


Fig. 1-6

Distribution of immunoreactive cells for (A) PVALB, (B) RELN, (C) CALB2, (D) SST and (E) NeuN in the hilus of the hippocampal dentate gyrus of male offspring at PND 77. Representative images from untreated controls (Ctrl; left), PTU-alone group (center left), PTU + AGIQ group (center right) and PTU + ALA group (right). Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification $\times 200$; bar 100 μm .

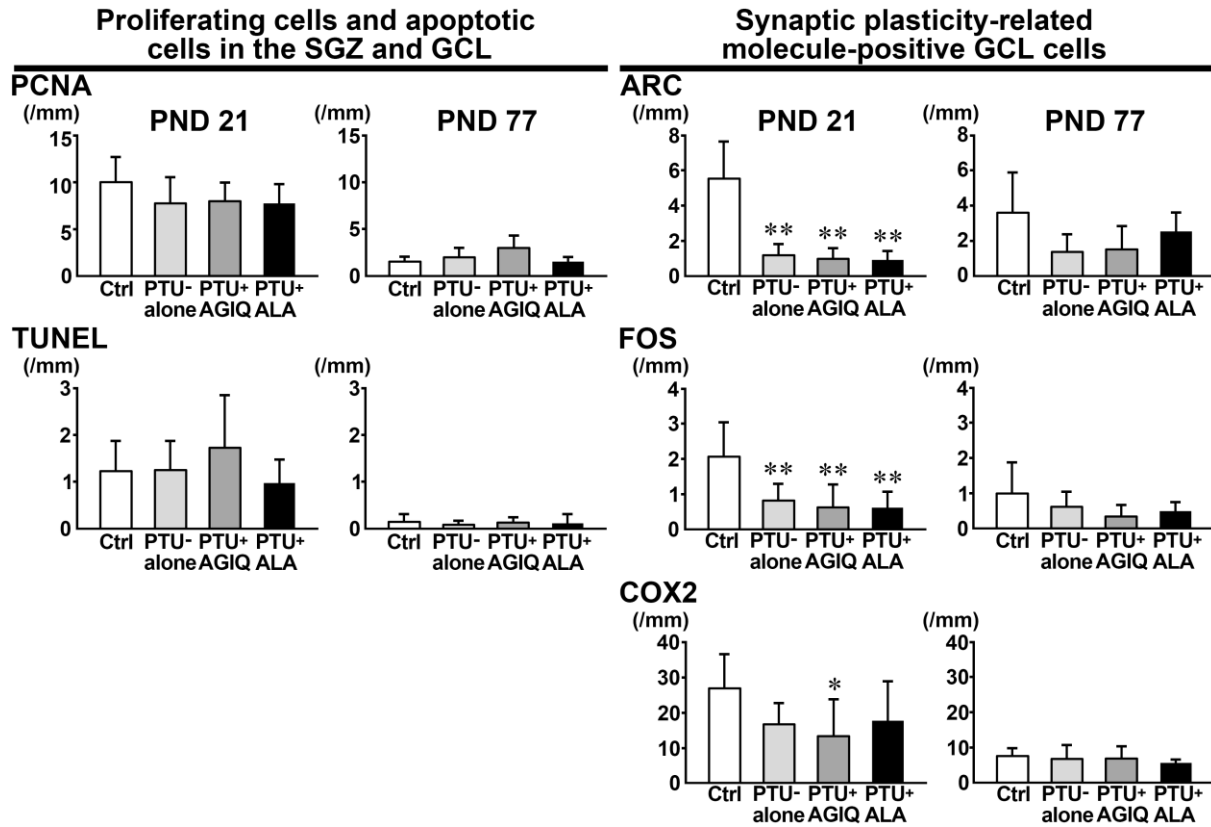


Fig. 1-7

The number of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)⁺ proliferating cells in the SGZ, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)⁺ apoptotic cells in the SGZ and GCL, and immunoreactive cells for ARC, FOS, and COX2 in the GCL of male offspring at PND 21 and PND 77. Data are expressed as mean \pm SD. N = 10/group at PND 21, and N = 8-10 at PND 77 (untreated controls, 10; PTU-alone group, 10; PTU + AGIQ group, 9; PTU + ALA group, 8). * P < 0.05, ** P < 0.01, significantly different from untreated controls by Tukey's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

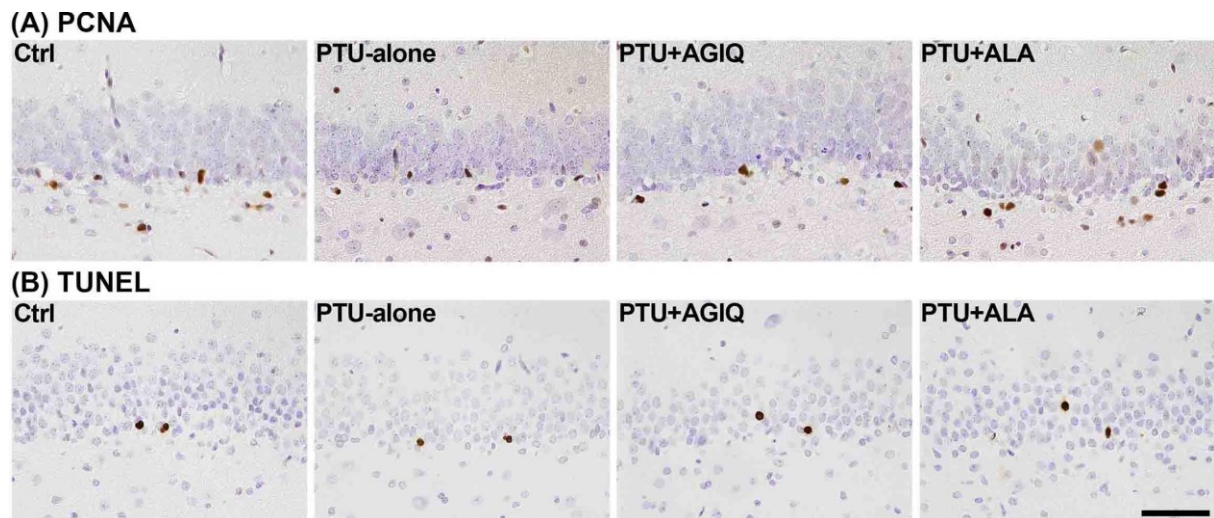


Fig. 1-8

Distribution of (A) PCNA⁺ proliferating cells in the SGZ and (B) TUNEL⁺ apoptotic cells in the SGZ and GCL at PND 21. Representative images from untreated controls (Ctrl; left), PTU-alone group (center left), PTU + AGIQ group (center right) and PTU + ALA group (right). Magnification $\times 400$; bar 50 μm .

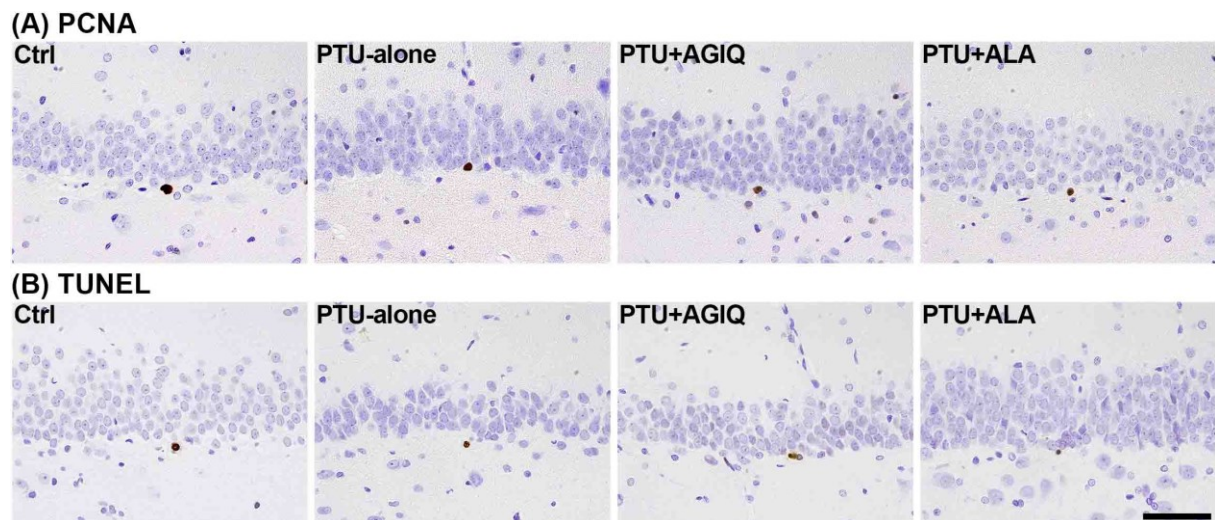


Fig. 1-9

Distribution of (A) PCNA⁺ proliferating cells in the SGZ and (B) TUNEL⁺ apoptotic cells in the SGZ and GCL at PND 77. Representative images from untreated controls (Ctrl; left), PTU-alone group (center left), PTU + AGIQ group (center right) and PTU + ALA group (right). Magnification $\times 400$; bar 50 μm .

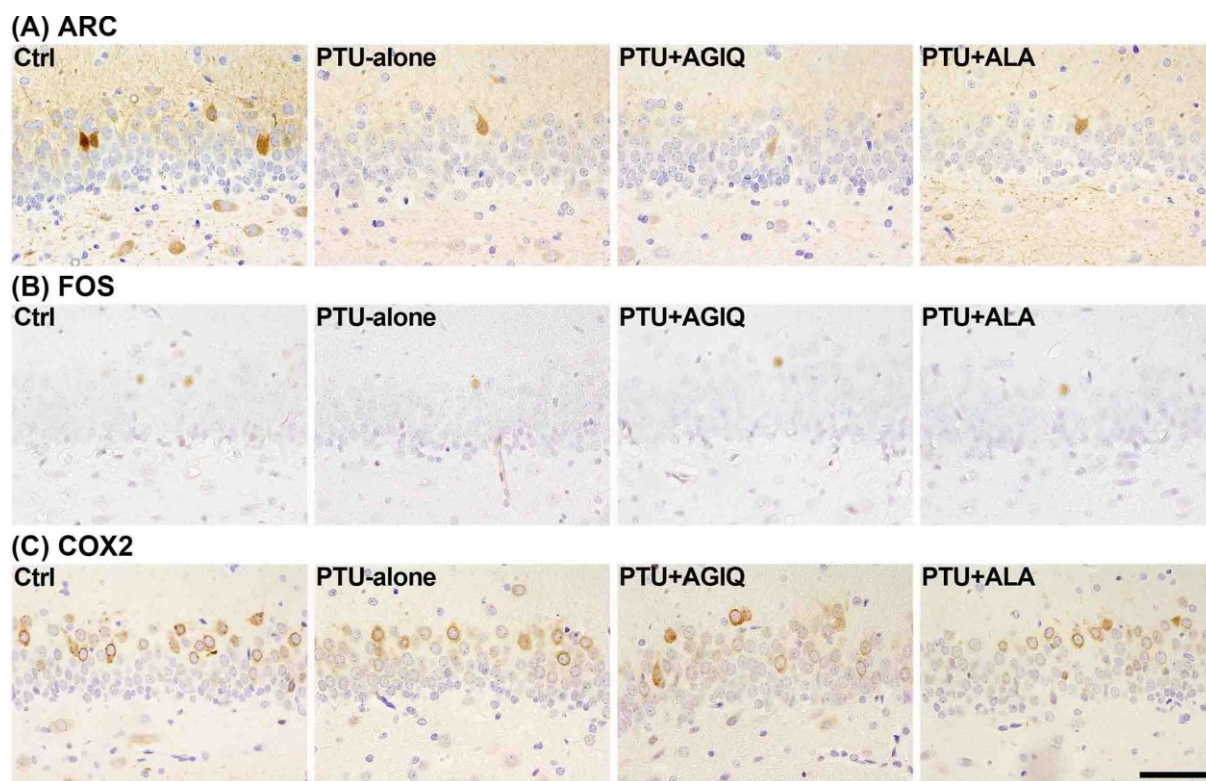


Fig. 1-10

Distribution of immunoreactive cells for (A) ARC, (B) FOS and (C) COX2 in the GCL of male offspring at PND 21. Representative images from untreated controls (Ctrl; left), PTU-alone group (center left), PTU + AGIQ group (center right) and PTU + ALA group (right). Magnification $\times 400$; bar 50 μm .

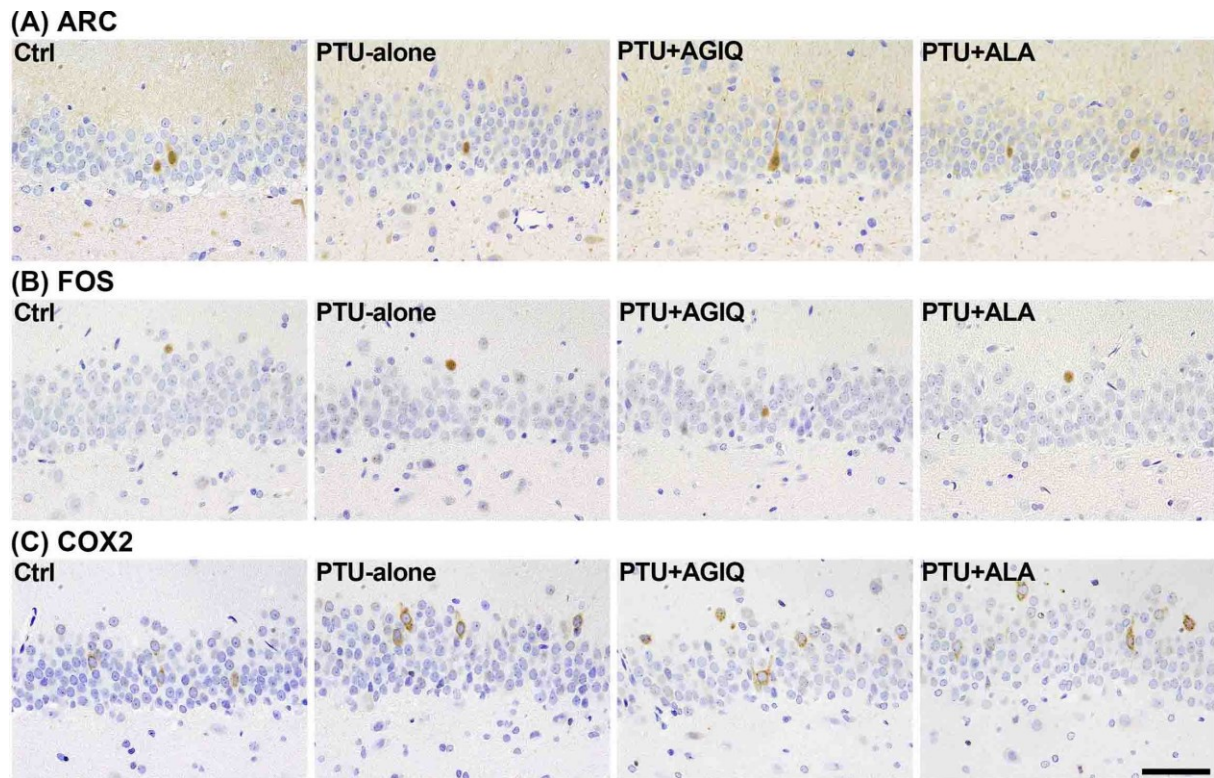


Fig. 1-11

Distribution of immunoreactive cells for (A) ARC, (B) FOS and (C) COX2 in the GCL of male offspring at PND 77. Representative images from untreated controls (Ctrl; left), PTU-alone group (center left), PTU + AGIQ group (center right) and PTU + ALA group (right). Magnification $\times 400$; bar 50 μm .

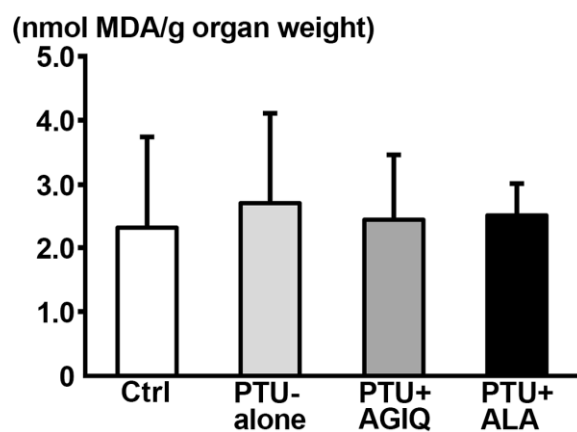


Fig. 1-12

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) level as measured by the amount of malondialdehyde (MDA) of the dissected hippocampal tissue in male offspring on PND 21. Data are expressed as mean + SD. N = 6-8 (untreated controls, 8; PTU-alone group, 6; PTU + AGIQ group, 7; PTU + ALA group, 7).



Fig. 2-1

The arena used in the open field testing. The arena comprised a square stainless-steel tray with a matte black polyvinyl plastic surface and stainless-steel walls surrounding a tray with a matte black polyvinyl plastic surface (900 mm width \times 900 mm depth \times 500 mm height).

(A) Sample phase



(B) Test phase



(C) Sample object and novel object

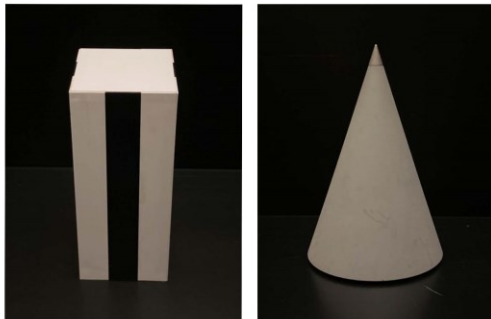


Fig. 2-2

Experimental set up of the object recognition testing. The object recognition test was conducted in the same arena that was used in the open field test. In the sample and test phases, the animals were placed in the middle of the wall along the inside of the field with their heads facing the wall. Objects were placed equidistant to this location to the right and left sides behind the animal in the arena. (A) Sample phase. The animals were allowed to explore the arena for 5 min with two identical sample objects. (B) Test phase. The animals were allowed to explore the arena for 3 min with one familiar sample object and one novel object. (C) Sample object and novel object. The sample object was a black and white striped quadrangular prism with smooth polyvinyl plastic surfaces. The novel object was a gray cone of polyvinyl plastic with a rough surface and a stainless-steel tip. Asterisk indicate the position to place the animals at the start of each test.

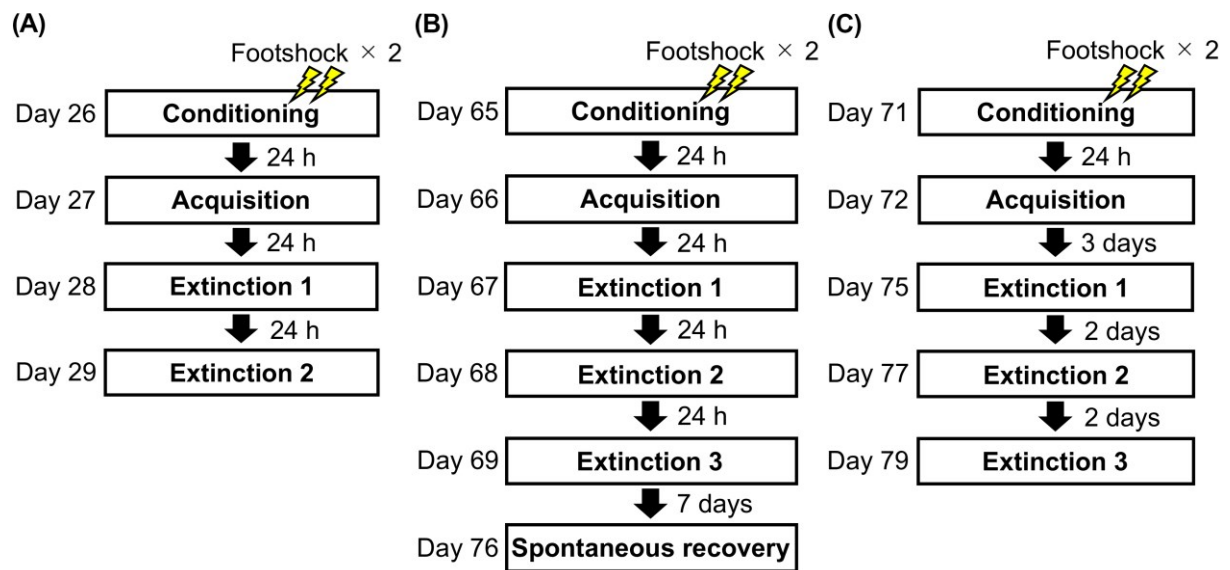


Fig. 2-3

Experimental design of the contextual fear conditioning test. (A) Prepubertal-stage test. (B) Adult-stage test 1. (C) Adult-stage test 2.

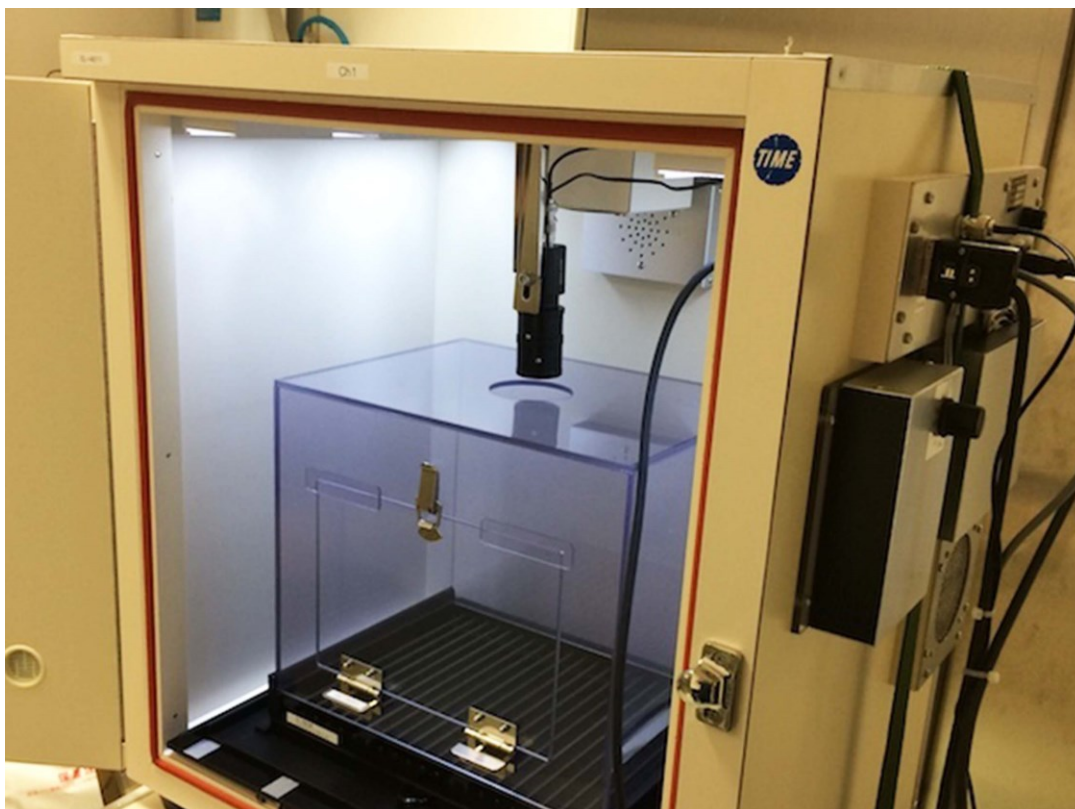


Fig. 2-4

Experimental set up of the contextual fear conditioning testing. The rodent observation cage (300 mm width × 370 depth × 250 mm height) was placed in a sound-attenuating chamber. The side walls and door of the observation cage were constructed of Plexiglas. The floor comprised 21 steel rods through which a scrambled footshock from a shock generator could be delivered. During experiments, the chamber was ventilated, kept at a background white noise level of 50 dB, and illuminated at 200 Lux by white light-emitting diode bulbs. Animal behavior was video recorded by the CCD camera above the observation cage.

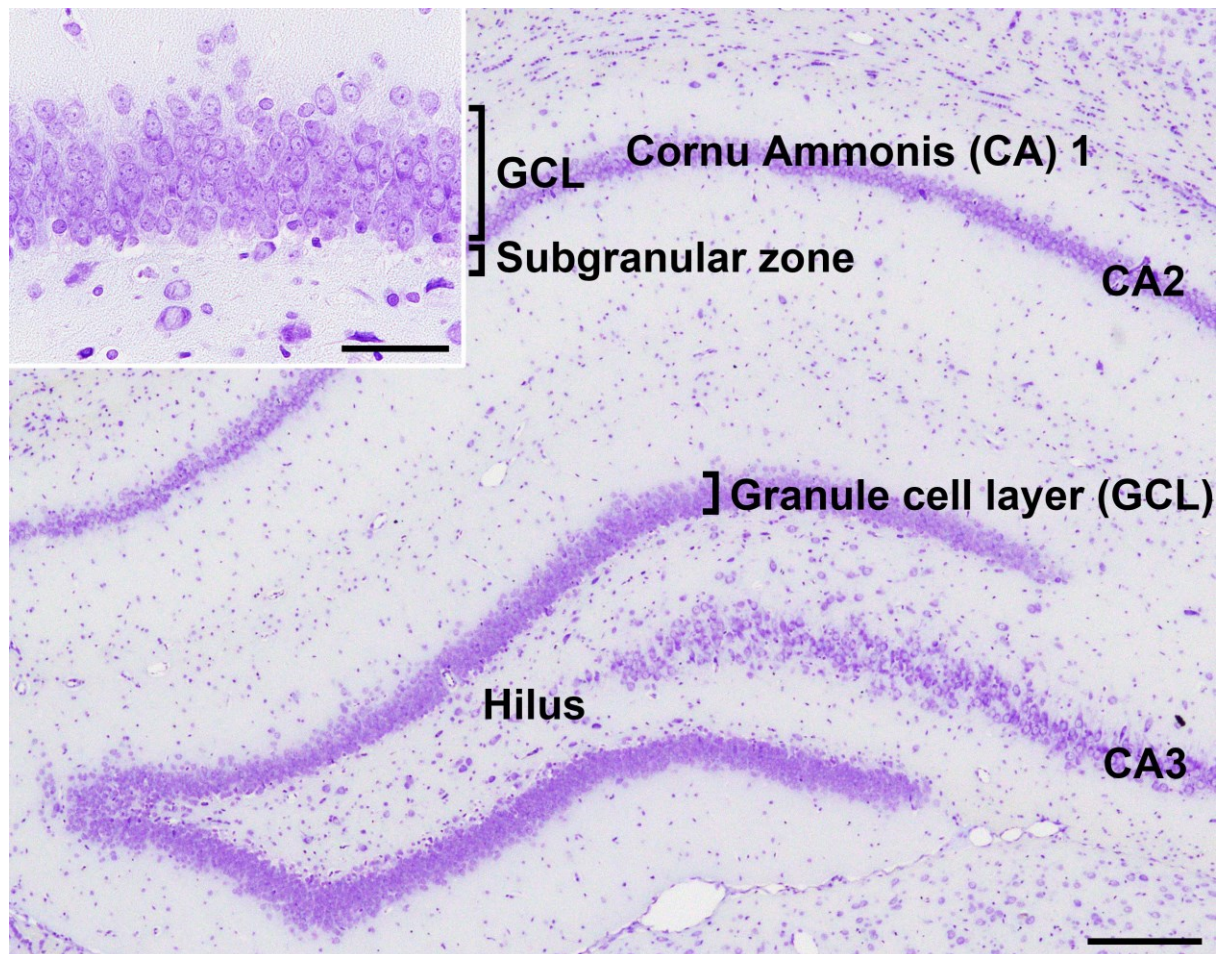


Fig. 2-5

Overview of the hippocampal formation of a male rat on PND 79 stained with cresyl violet. (Inset) Higher magnification of the GCL. The numbers of cells for ARC, COX2, early growth response 1 (EGR1), FOS and phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 (p-ERK1/2) were measured in the GCL. Magnification, $\times 40$; bar, 200 μm . (Inset) Magnification, $\times 400$; bar, 50 μm .

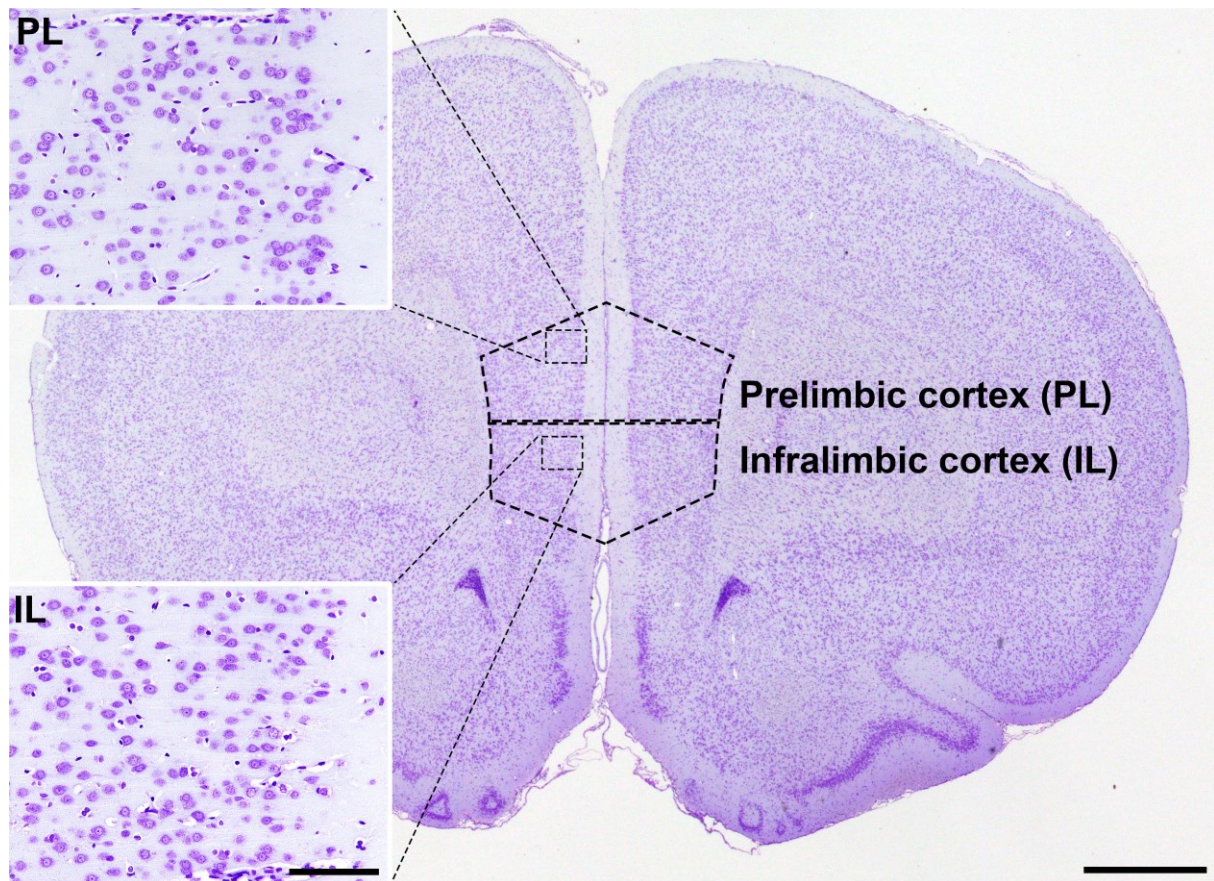


Fig. 2-6

Overview of the prefrontal cortex of a male rat on PND 79. The section includes the prelimbic cortex and infralimbic cortex stained with cresyl violet. (Inset) Higher magnification of the prelimbic cortex and infralimbic cortex. The numbers of cells in the prelimbic and infralimbic cortices (as enclosed by the dotted lines) displaying immunoreactivity for ARC, COX2, EGR1, FOS and p-ERK1/2 were counted and normalized for the unit area. Magnification, $\times 15$; bar, 1 mm. (Inset) Magnification, $\times 200$; bar, 100 μm .

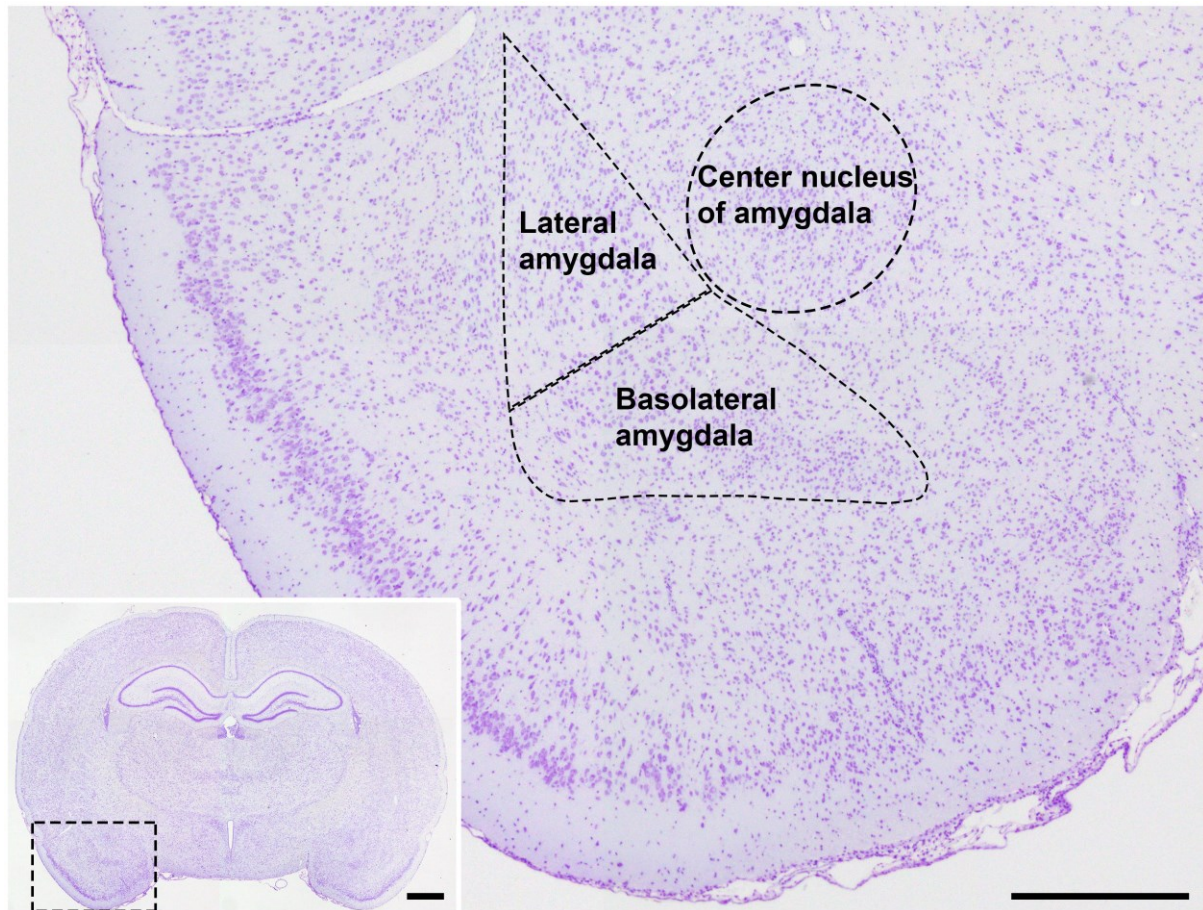


Fig. 2-7

Overview of the amygdala of a male rat on PND 79 stained with cresyl violet. This field of view is located in the area enclosed by the dotted line in the inset. (Inset) Lower magnification of the coronal section. The numbers of cells in the lateral amygdala, basolateral amygdala, and center nucleus of the amygdala (as enclosed by the dotted line) displaying immunoreactivity for ARC, COX2, EGR1, FOS and p-ERK1/2 were counted and normalized for the unit area. Magnification, $\times 40$; bar, 500 μm . (Inset) Magnification, $\times 15$; bar, 1 mm.

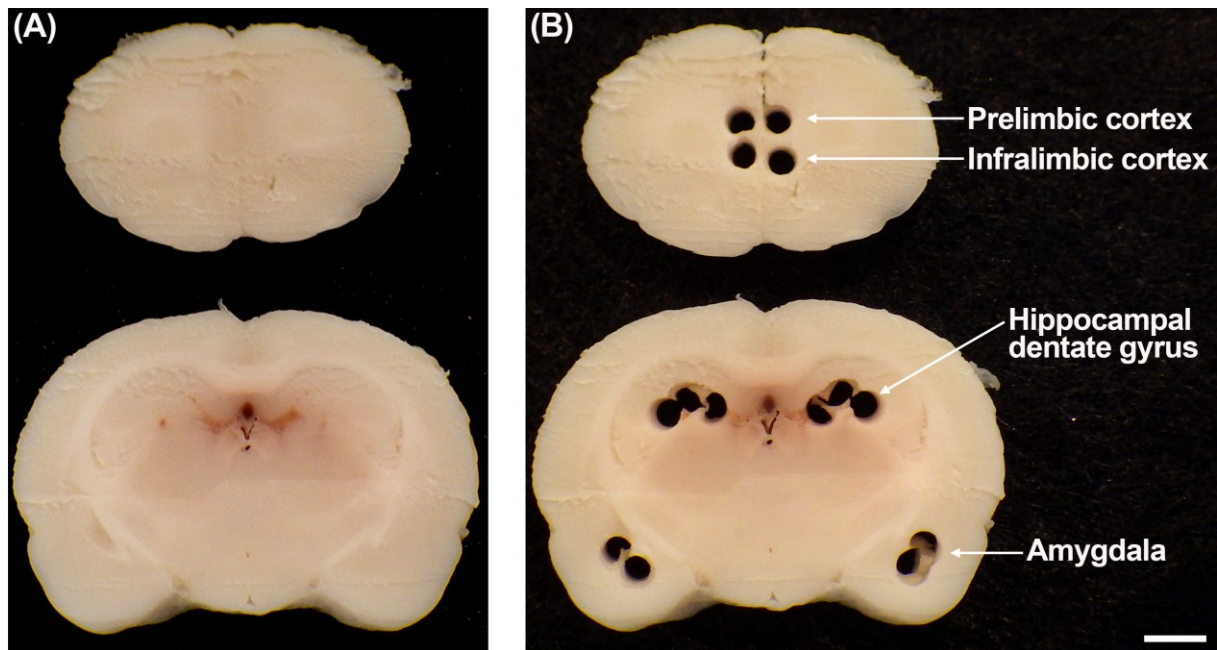


Fig. 2-8

Overview of the dissected brain areas used for transcript expression analysis of rat offspring on PND 79.

Sampling was made bilaterally from methacarn-fixed brain tissue slices using punch-biopsy devices. For sampling of the tissues of prelimbic cortex and infralimbic cortex, a 2 mm-thick slice anterior to the coronal cerebral plane at +2.0 mm from the bregma was prepared. For sampling of the tissues of hippocampal dentate gyrus and amygdala, a 2 mm-thick slice posterior to the -2.0 mm coronal plane from the bregma was prepared.

(A) The coronal cut surface views at +3.0 mm and -3.0 mm from bregma before dissection. (B) An identical surface view to panel (A) after dissecting the prelimbic cortex, infralimbic cortex, hippocampal dentate gyrus, and amygdala. Bar, 2 mm.

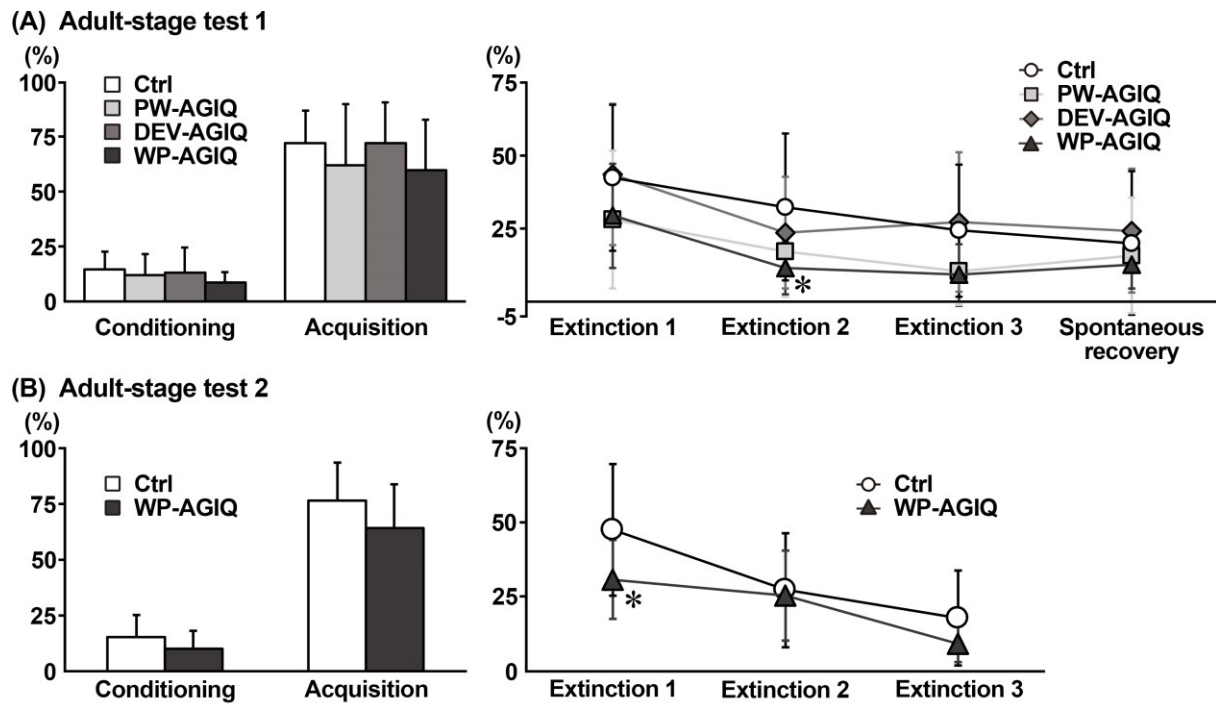


Fig. 2-9

Freezing rate (%) during the fear conditioning, fear acquisition, fear extinction, and spontaneous recovery tests in untreated controls and each AGIQ-exposed group at adult-stage tests 1 and 2. (A) Adult stage test 1. (B) Adult stage test 2. Values are expressed as mean + SD or mean \pm SD. $n = 13$ – 16 /group for adult-stage test 1 (conditioning and acquisition: Ctrl, 16; PW-AGIQ, 16; DEV-AGIQ, 16; WP-AGIQ, 16; fear extinction 1–3 and spontaneous recovery: Ctrl, 16; PW-AGIQ, 14; DEV-AGIQ, 16; WP-AGIQ, 13). $n = 14$ – 16 /group for adult-stage test 2 (conditioning and acquisition: Ctrl, 16; WP-AGIQ, 16; fear extinction 1–3: Ctrl, 16; WP-AGIQ, 14). * $P < 0.05$, significantly different from untreated controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction (adult stage test 1), or significantly different from untreated controls by Student's t -test or Aspin-Welch's t -test (adult stage test 2).

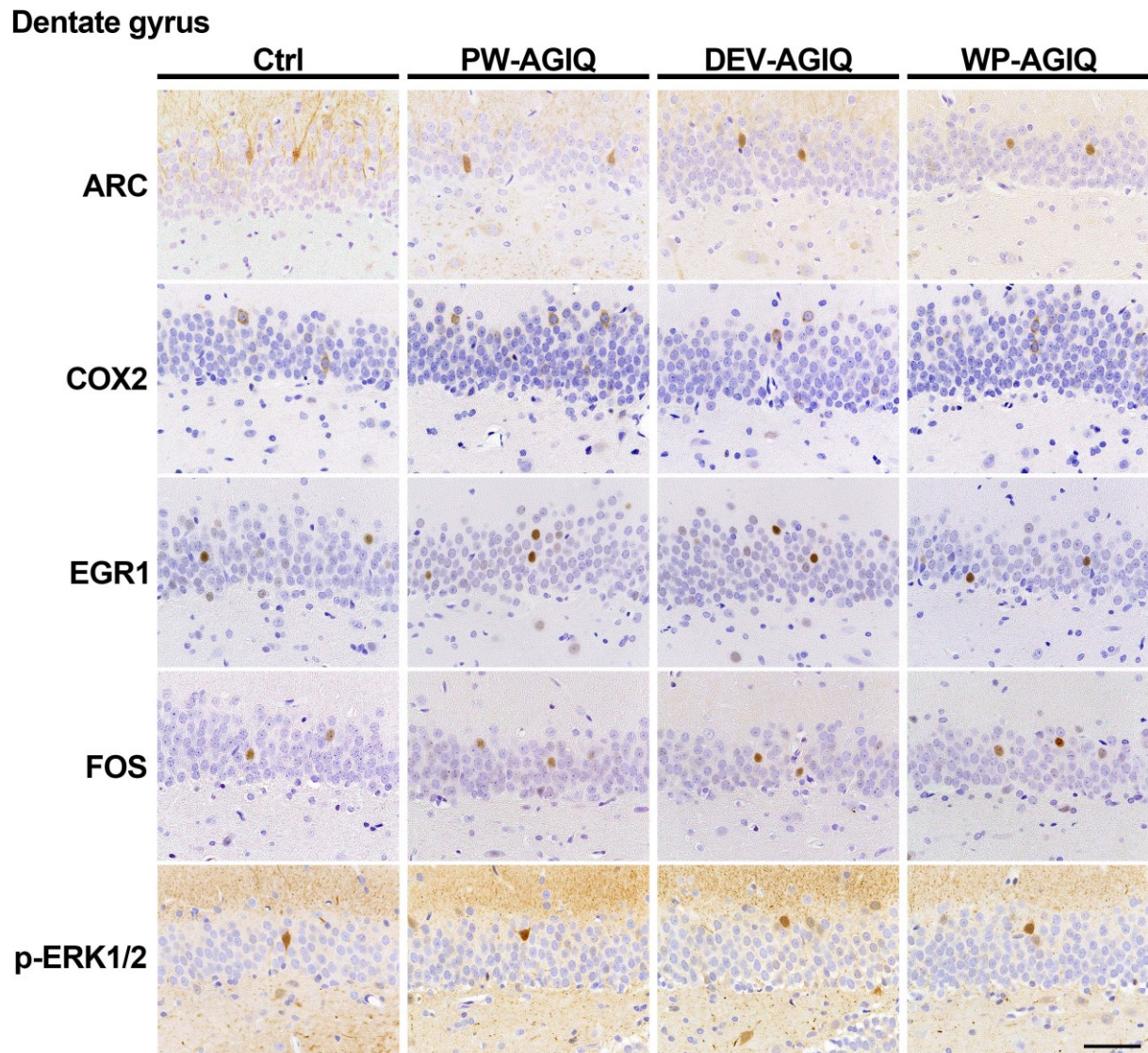


Fig. 2-10

Distribution of cells immunoreactive to ARC, COX2, EGR1, FOS and p-ERK1/2 in the GCL of the hippocampal dentate gyrus of a male offspring after the spontaneous recovery test at adult stage test 1. Representative images from Ctrl (left), PW-AGIQ (center left), DEV-AGIQ (center right), and WP-AGIQ (right) rats are shown.

Magnification, $\times 400$; bar, 50 μm .

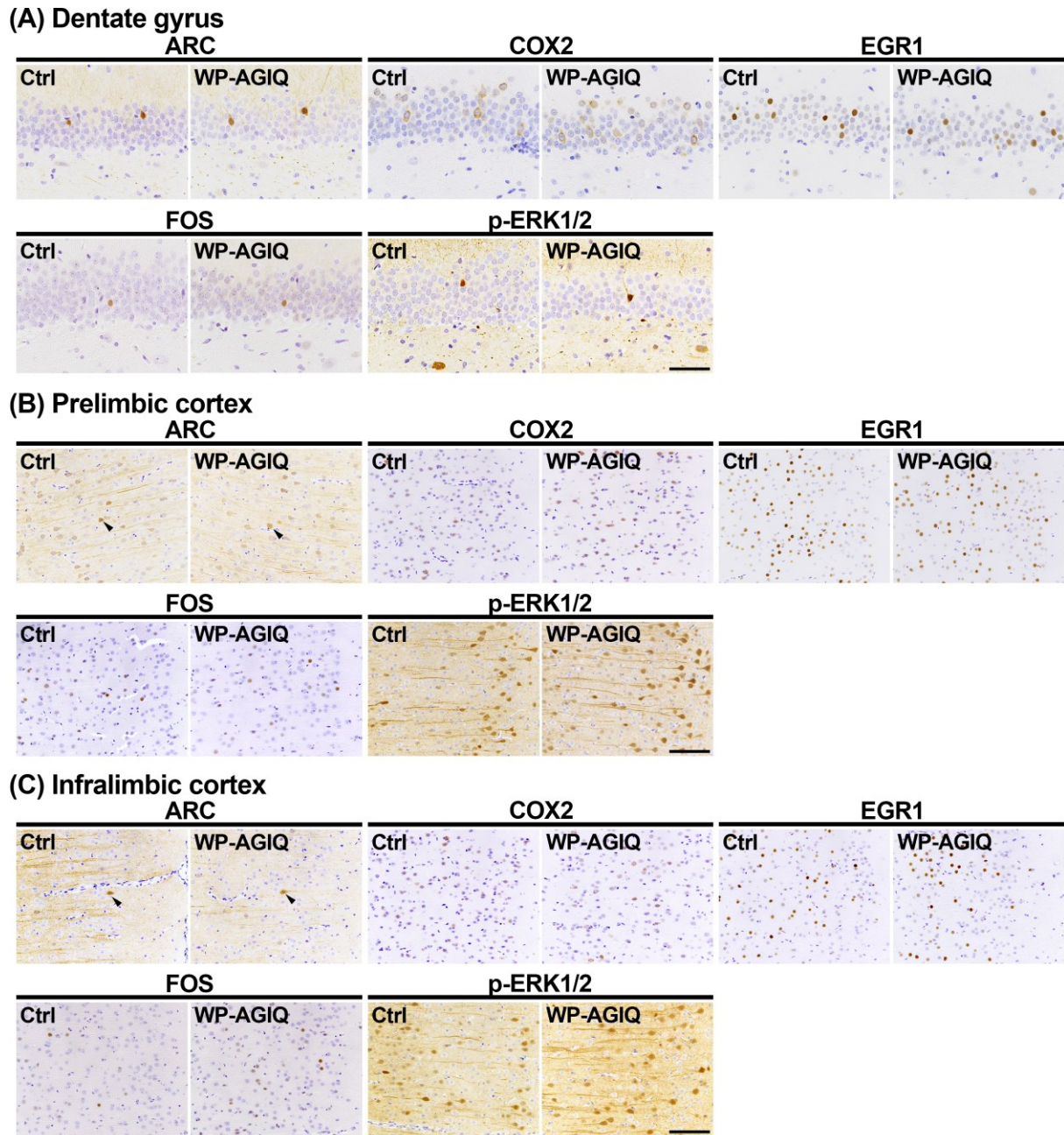


Fig. 2-11

Distribution of immunoreactive cells for ARC, COX2, EGR1, FOS, and p-ERK1/2 in the respective brain regions of a male offspring after the last trial of the fear extinction test at adult stage test 2. (A) GCL of the hippocampal dentate gyrus. (B) Prelimbic cortex. (C) Infralimbic cortex. Representative images from Ctrl (left) and WP-AGIQ (right) rats. Arrowheads indicate immunoreactive cells.

Magnifications: (A) ×400; bar, 50 μm. (B) and (C) ×200; bar, 100 μm.

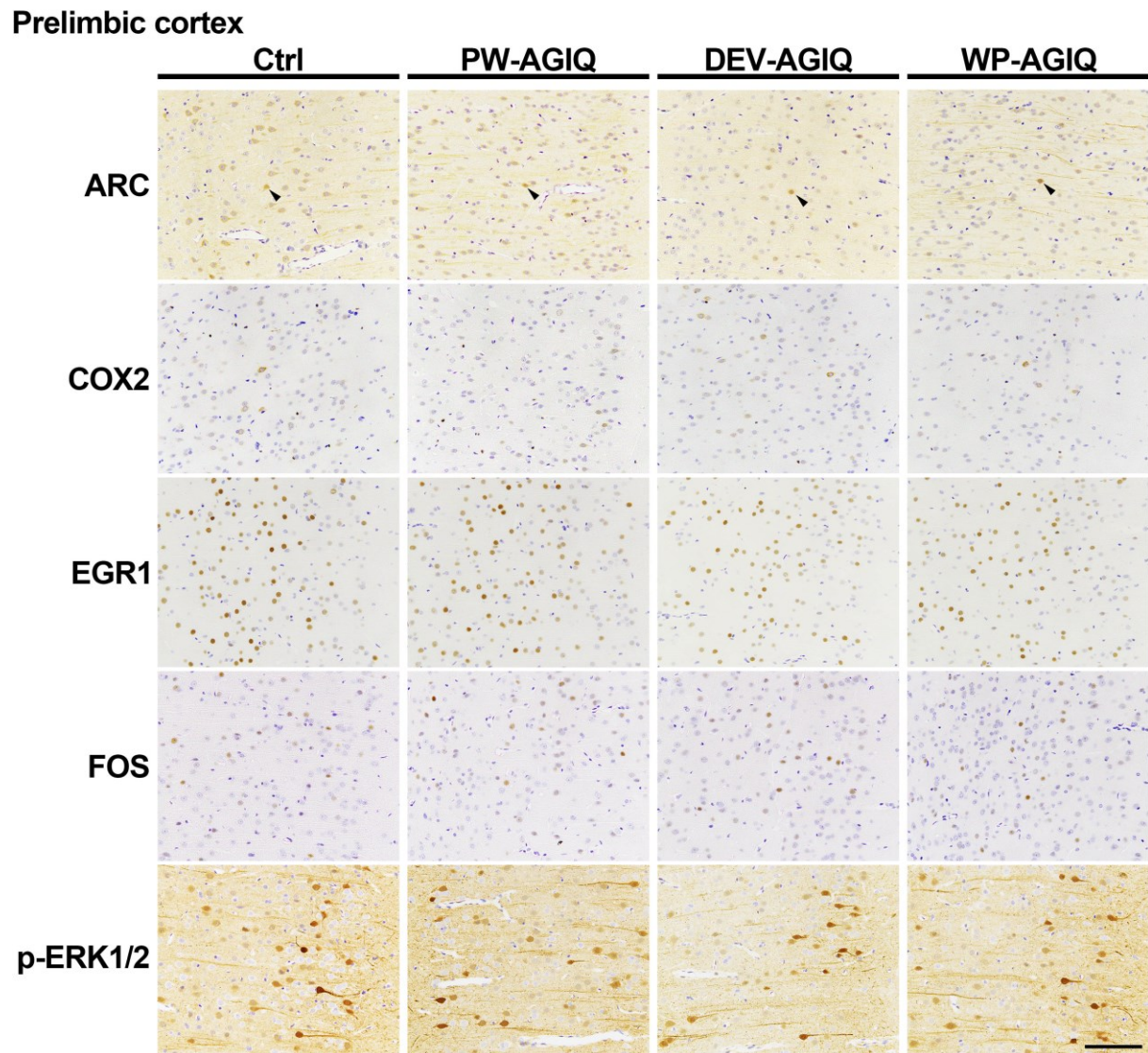


Fig. 2-12

Distribution of cells immunoreactive to ARC, COX2, EGR1, FOS and p-ERK1/2 in the prelimbic cortex of a male offspring after the spontaneous recovery test at adult stage test 1. Representative images from Ctrl (left), PW-AGIQ (center left), DEV-AGIQ (center right), and WP-AGIQ (right) rats are shown. Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification, $\times 200$; bar, 100 μm .

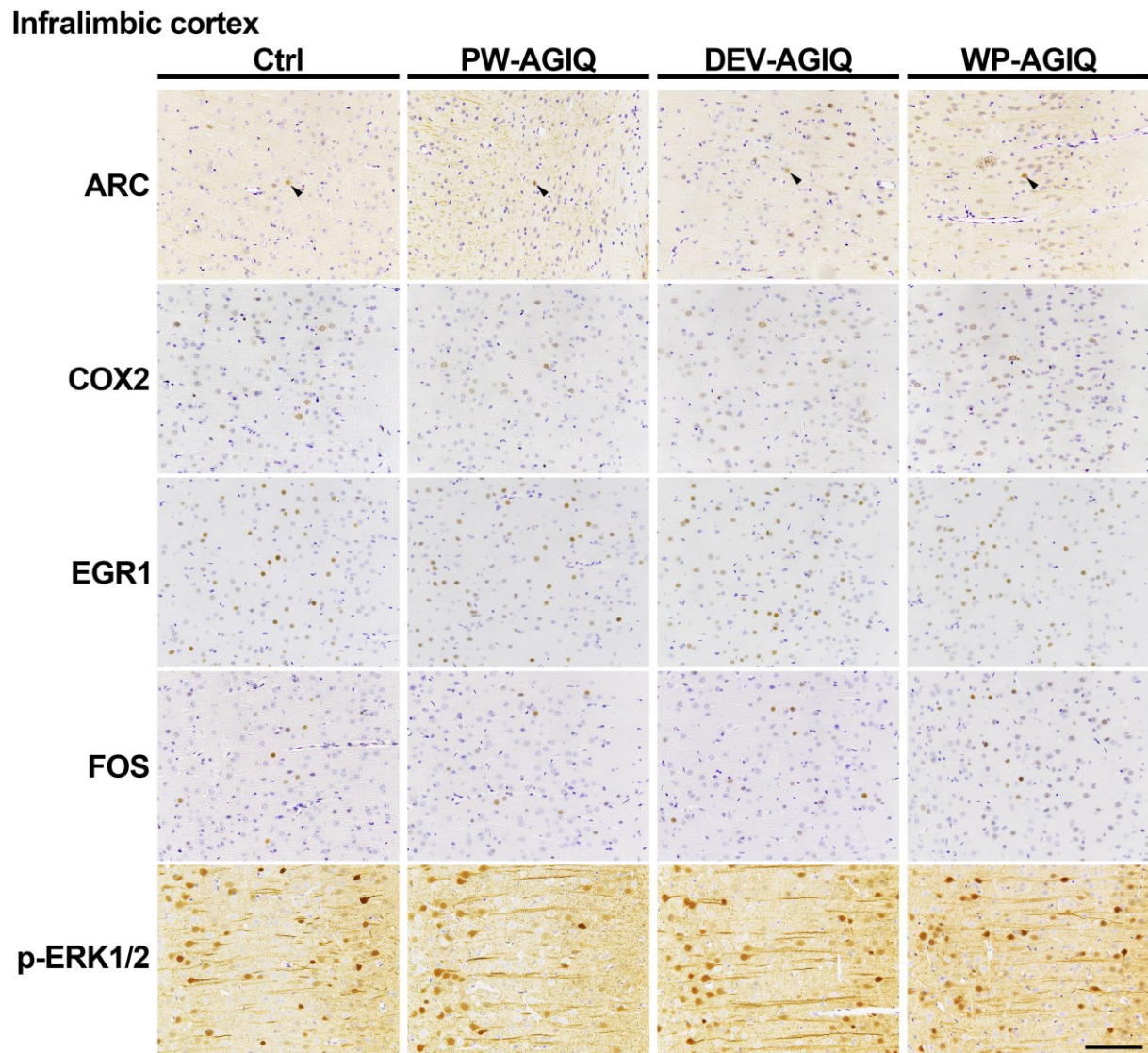


Fig. 2-13

Distribution of cells immunoreactive to ARC, COX2, EGR1, FOS and p-ERK1/2 in the infralimbic cortex of a male offspring after the spontaneous recovery test at adult stage test 1. Representative images from Ctrl (left), PW-AGIQ (center left), DEV-AGIQ (center right), and WP-AGIQ (right) rats are shown. Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification, $\times 200$; bar, 100 μm .

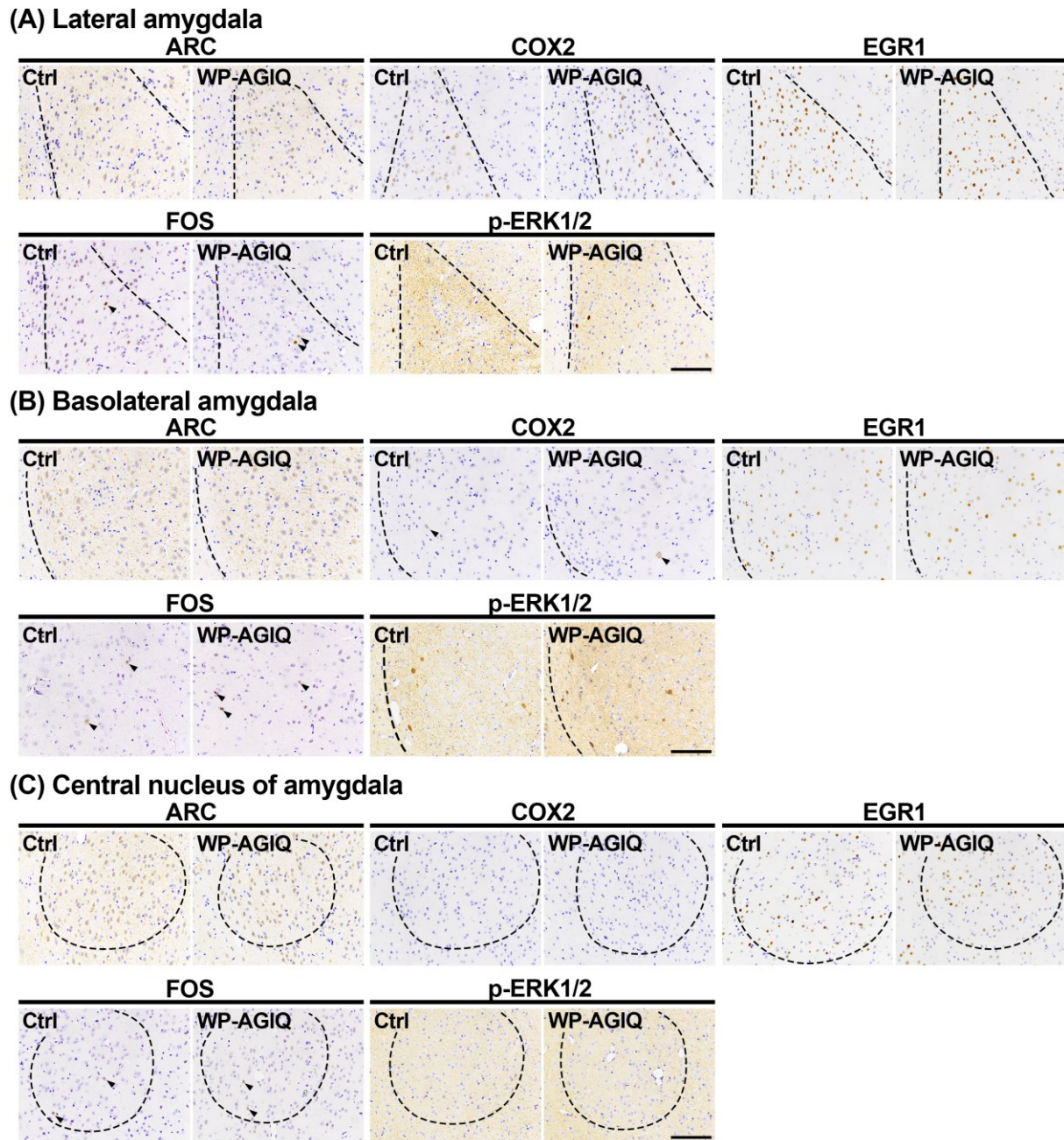


Fig. 2-14

Distribution of immunoreactive cells for ARC, COX2, EGR1, FOS, and p-ERK1/2 in subregions of the amygdala of a male offspring after the last trial of the fear extinction test at adult stage test 2. (A) Lateral amygdala. (B) Basolateral amygdala. (C) Central nucleus of the amygdala. Representative images from Ctrl (left) and WP-AGIQ (right) rats. Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification, $\times 200$; bar, 100 μm .

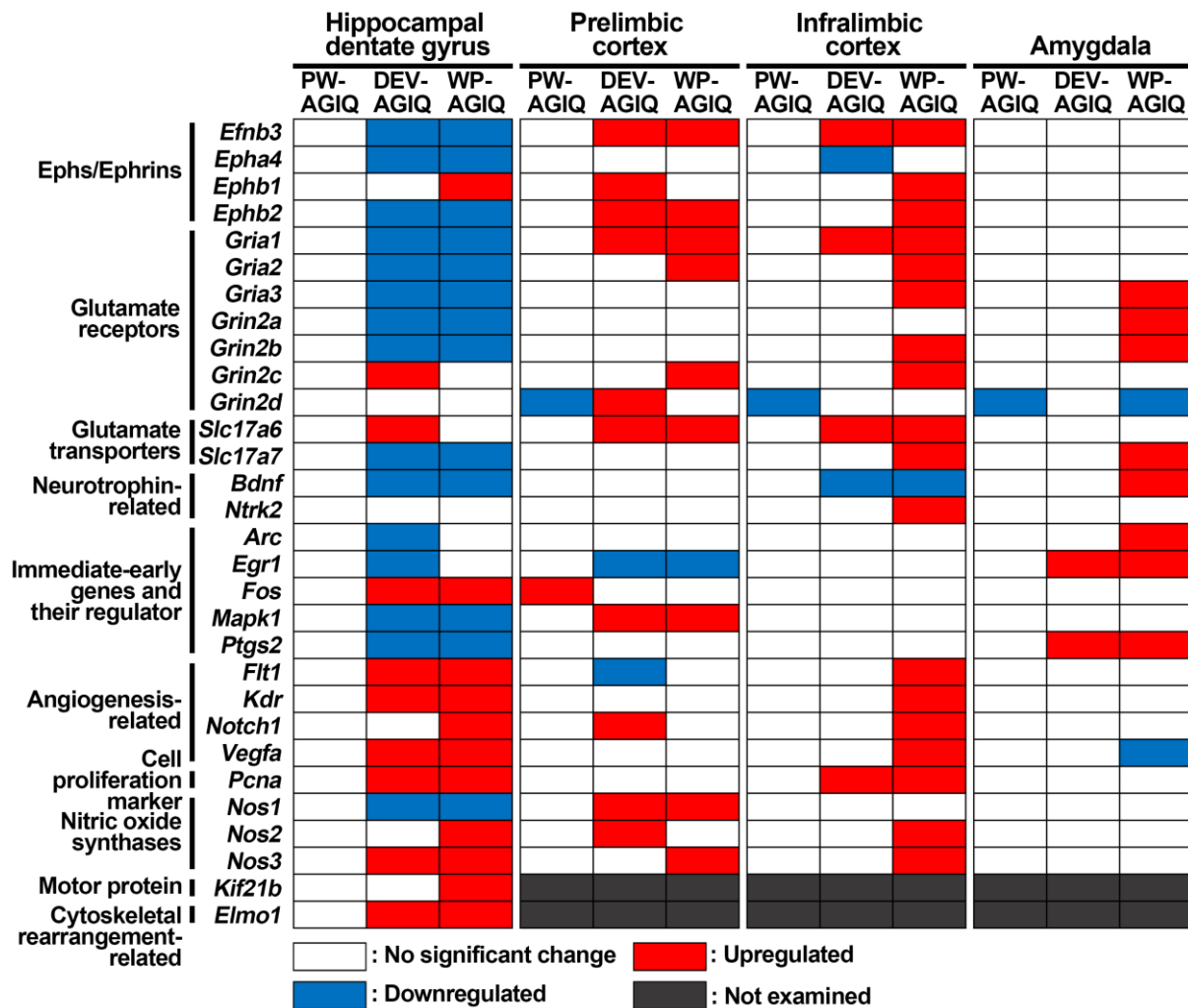


Fig. 2-15

Summary of the changes in gene expression in specified brain regions after adult stage test 1. Genes with higher or lower transcript expression levels than those in the untreated controls after normalization with either or both glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) and hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*Hprt1*) were judged to be upregulated or downregulated, respectively.

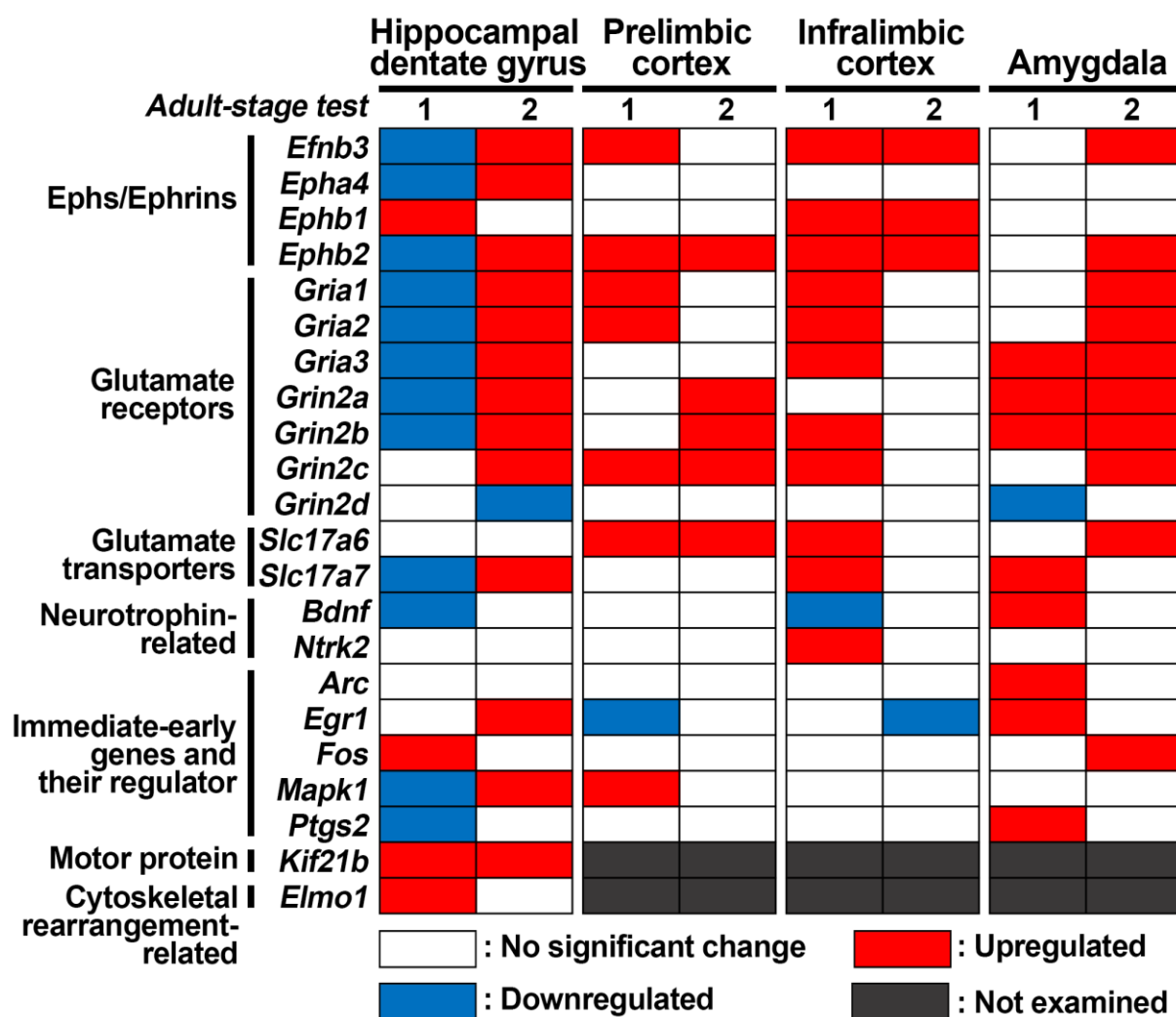


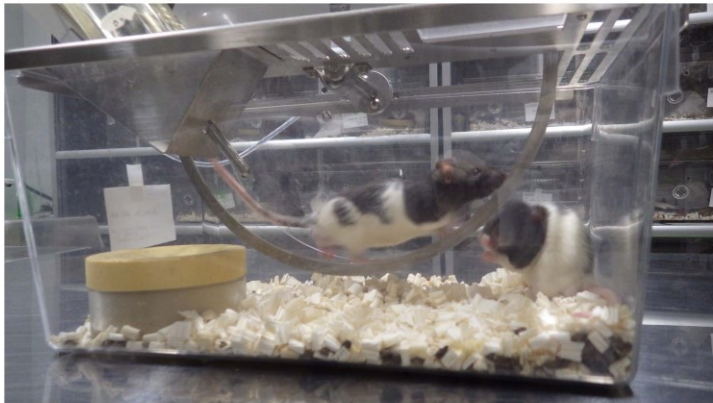
Fig. 2-16

Comparison of changes in transcript levels between adult stage tests 1 and 2 in specified brain regions of whole period AGIQ-exposed group (WP-AGIQ) rats. Genes with higher or lower transcript expression levels than those in the untreated controls after normalization with either or both glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) and hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*Hprt1*) were judged to be upregulated or downregulated, respectively.

(A) Standard cage



(B) Wheel cage



(C) Environmental enrichment cage



Fig. 3-1

Housing condition of male offspring from PND 21 onwards. Photograph show the rearing cages at 6 weeks of age. (A) Standard cage (inner dimension, 204 mm width × 363 mm depth × 196 mm height). (B) Wheel cage (inner dimension, 200 mm width × 355 mm depth × 195 mm height) with a running wheel (85 mm width × 310 mm diameter) for voluntary exercise. (C) Environmental enrichment cage (inner dimension, 440 mm width × 275 mm depth × 180 mm height) contained enrichment objects, and the items were replaced ones weekly to new ones.



Fig. 3-2

The arena used in the open field testing. The arena comprised a square stainless-steel tray with a gray polyvinyl plastic surface and stainless-steel walls surrounding a tray with a matte black polyvinyl plastic surface (900 mm width \times 900 mm depth \times 500 mm height).

(A) Sample phase



(B) Test phase (object recognition test)



(C) Test phase (object location test)



(D) Sample object and novel object



Fig. 3-3

Experimental set up of the object recognition testing and object location testing. These tests were conducted in the same arena that was used in the open field test. The animals were placed in the middle of the wall along the inside of the field with their heads facing the wall. In the object recognition test, objects were placed equidistant to this location to the right and left sides behind the animal in the arena. In the object location test, one object was moved to opposite side of the arena. (A) Sample phase. The animals were allowed to explore the arena for 5 min with two identical sample objects. (B) Test phase (object recognition test). The animals were allowed to explore the arena for 3 min with one familiar sample object and one novel object. (C) Test phase (object location test). The animals were allowed to explore the arena for 3 min with one object on the same location and the other object on the different location. (D) Sample object and novel object. The sample objects were white smooth-surfaced polyvinyl plastic sphere with some coin-shaped small black smooth polyvinyl plastic pieces attached to the surface. The novel object was a gray cone of polyvinyl plastic with a rough surface and a stainless-steel tip. Asterisk indicate the position to place the animals at the start of each test.