

投与実験は混餌ないしは飲水による経口投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべてエーテル深麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物飼育・管理にあたっては、国立大学法人東京農工大学動物実験等に関する規定、米国国立保健研究所(NIH)が推奨している動物倫理に関するガイドラインに従った。

C. 研究結果

< Mn を用いた発達期暴露影響評価 >

ラット：

昨年度に報告した結果の概要としては、母動物及び児動物の体重並びに摂餌量、児動物の臓器重量に影響は見られなかったこと、小脳組織中 Mn 濃度が母動物では変動は見られなかったが、児動物で暴露終了時(生後 21 日)に 32 ppm 以上で上昇が認められ、生後 77 日で対照群との差が消失したことである。

22 年度に得られた結果を以下に示す。

海馬歯状回門での GABA 性介在ニューロン及び成熟ニューロンの検索では、Reelin 陽性細胞数は離乳時に 800 ppm で有意な増加を示したが、生後 77 日では差は見られなかった。GAD67 及び NeuN 陽性細胞数は、離乳時、生後 77 日目共に変化は見られなかった (Table 2, 3)。

海馬歯状回門でのミクログリアの検索では、Iba1 陽性細胞数の有意な増加及び Cox2 陽性細胞数の有意な増加あるいは増加傾向が 32 ppm 以上で見られたが、生後 77 日目では差は見られなかった (Table 2, 3)。

海馬歯状回顆粒細胞層下帯での新生ニューロン分化指標の検索では、DCX 陽性細胞数の有意な増加が生後 21 日目の 800 ppm に見られたが、生後 77 日目では差は見られなかった。Tbr2 及び GFAP 陽性細胞数は、離乳時、生後 77 日目共に変化は見られなかった (Table 4, 5)。

海馬歯状回顆粒細胞層下帯でのアポトーシス及び細胞増殖の検索では、TUNEL 陽性細胞数及び PCNA 陽性細胞数に変化は見られなかった (Table 6, 7, 8, 9)。

生後 21 日目の児動物の海馬の real-time RT-PCR 解析では、IL-1 α 、IL-6、NOS2、TNF- α の mRNA の発現レベルの有意な増加が 800 ppm に見られた (Table 10)。

甲状腺関連ホルモン測定では、母動物では変動は見られなかったが、児動物では暴露終了時(生後 21 日)に 800 及び 1600 ppm で T3 及び T4 の有意な減少が見られ、800 ppm では TSH の有意な増加も認められた。生後 77 日目の児動物では対照群と差は見られなかった (Table 11)。

マウス：

昨年度に報告した結果の概要としては、母動物の体重の低値傾向 (160 ppm 以上の分娩後 8 日以降)

及び摂餌量の有意な低値 (800 ppm の妊娠 15 日目及び分娩後 8-21 日)、児動物の体重の有意な低値 (雄の 160 ppm 以上の生後 21 日目及び 4-9 週、800 ppm では加えて生後 17 日目と 10 週目、雌では 800 ppm の生後 21 日目)、離乳時の肝臓 (雄の 32 ppm 以上、雌の 800 ppm) 及び腎臓 (雄の 160 ppm 以上、雌の 800 ppm) の絶対重量の有意な低値、児動物の小脳 Mn 濃度の離乳時 (160 ppm 以上) 及び生後 77 日 (32 ppm 以上) の有意な増加、海馬歯状回門での Reelin 陽性細胞数 (離乳時の 160 ppm 以上、生後 77 日目の 800 ppm)、NeuN 陽性細胞数 (離乳時、生後 77 日目共に 800 ppm) 及び GAD67 陽性細胞数 (離乳時の 800 ppm) の有意な増加、海馬歯状回顆粒細胞層下帯での TUNEL 染色によるアポトーシス細胞数の有意な増加 (離乳時の 800 ppm) 並びに海馬歯状回門での GFAP 陽性細胞数の有意な増加 (離乳時の 800 ppm) である。

22 年度に得られた結果を以下に示す。

海馬歯状回門での GABA 性介在ニューロンの検索では、新たに Reelin 及び NeuN の二重染色を行った結果、Reelin 陽性/NeuN 弱陽性～陰性細胞及び Reelin 陰性/NeuN 陽性細胞の増加が離乳時及び生後 77 日目の 800 ppm に見られた (Fig. 5)。

海馬歯状回顆粒細胞層下帯での新生ニューロン分化指標の検索では、800 ppm において TUC4 陽性細胞数の有意な減少が生後 21 日目に見られたが、生後 77 日目では逆に有意な増加を示した。Pax6、Tbr2 及び NeuroD1 陽性細胞数は、離乳時、生後 77 日目共に変化は見られなかった (Fig. 6, 7)。

生後 21 日目の児動物の海馬における real-time RT-PCR 解析では、Reelin、ApoER2 及び GAD67 の mRNA の発現レベルの有意な増加並びに TUC4 の mRNA の発現レベルの有意な減少が 800 ppm で見られた (Table 12)。

ゲノムのメチレーション解析では、CGI アレイによる解析の結果、対照群に比べ 800 ppm において 1.5 倍以上高い変動を示した過メチル化遺伝子が 29 遺伝子検出された。このうち 7 遺伝子 (Table 13) を選択してメチレーション特異的 qPCR 解析を行った結果、Pvalb、Mid1、Atpla3 及び Nr2f1 の過メチル化が確認された (Fig. 8)。また、この 7 遺伝子について real-time RT-PCR 解析により mRNA の発現レベルを検討した結果、Pvalb、Mid1、Atpla3 及び Nr2f1 の mRNA の発現レベルの有意な減少が認められた (Fig. 8)。

更に、このうち 0 ppm と 800 ppm Mn 暴露児動物を用いて Parvalbumin 及び MID1 について行った免疫染色の結果では、海馬歯状回門における Parvalbumin 陽性介在ニューロン細胞数の有意な減少が生後 21 日目の 800 ppm に、MID1 陽性顆粒細胞数の有意な減少が生後 21 及び 77 日目の 800 ppm に見られた (Fig. 9, 10)。

甲状腺関連ホルモン測定では、800 ppm で弱いながらも T4 の有意な減少が見られた (Table 14)。

<CPF を用いた発達期暴露影響評価>

母動物の体重は分娩後 11 日目に一過性の有意な高値が全ての投与群に認められた (Table 15)。摂餌量 (g/animal/day) では、妊娠 14 日及び 20 日目に 14 ppm のみにおいて、妊娠 17 日目は 14 ppm 及び 70 ppm において有意な高値が認められた (Table 16)。

児動物の体重では、14 ppm のみにおいて雄で生後 7 から 21 日目、雌で生後 4~17 日目に有意な高値が見られた (Table 17)。摂餌量 (g/animal/day) では変化は見られなかった (Table 18)。

児動物の臓器重量は、生後 21 日目では肝臓の相対重量の有意な低値が 70 ppm の雌雄に、卵巣の絶対及び相対重量の有意な低値が 70 ppm の雌に見られた。他に腎臓の相対重量の有意な低値が 2.8 ppm の雄に見られたが、用量に応じた変化ではなかった。生後 77 日目では脳の相対重量の有意な低値及び腎臓の絶対重量の有意な高値が 70 ppm の雌に見られた (Table 19)。

ChE 活性の測定では、暴露終了時の母動物では血漿及び赤血球中 ChE 活性の有意な低値が 2.8 ppm 以上に、脳内 ChE 活性の有意な低値が 70 ppm に見られた。生後 21 日目の児動物では血漿中 ChE 活性の有意な低値が 14 ppm 以上に、赤血球中及び脳内 ChE 活性の有意な低値が 70 ppm に見られた。生後 77 日目の児動物では変化は見られなかった (Table 20)。

甲状腺関連ホルモン測定では、母動物の 14 ppm で T3 の有意な増加が見られた他は、変化は見られなかった (Table 21)。

海馬歯状回門での GABA 性介在ニューロン及び成熟ニューロンの検索では、生後 21 日目の Reelin 及び NeuN 陽性細胞数には変化は見られなかった (Table 22)。

海馬歯状回顆粒細胞層下帯での新生ニューロン分化指標の検索では、Tbr2 陽性細胞数の有意な減少が生後 21 日目の 70 ppm に見られた。DCX 陽性細胞数には変化は見られなかった (Table 23)。

海馬歯状回顆粒細胞層下帯でのアポトーシス及び細胞増殖の検索では、PCNA 陽性細胞数の有意な減少が生後 21 日目の 70 ppm に見られた。TUNEL 陽性細胞数には変化は見られなかった (Table 24、25)。

<ACR を用いた発達期暴露影響評価>

母動物では、分娩後 21 日目の体重及び肝臓重量において低値傾向及び有意な低値が 100 ppm に見られたが、実験期間中の歩行異常及び生殖発生毒性影響は見られず、摂餌量及び摂水量も対照群とほぼ同様に推移した (Table 26)。

児動物は、飲水投与 (Experiment 1) では歩行異常を含む一般状態に異常は見られなかったが、100 ppm において生後 21 及び 77 日目の体重及び脳の絶対重量が有意な低値を示した。腹腔内投与

(Experiment 2) では、生後 15 日目で降歩行異常のスコアに有意差が見られたが、生後 28 日目には回復に転じ、生後 63 日目にはその差は消失した (Fig. 11)。

ACR 腹腔内投与群の生後 21 及び 77 日目の体重及び脳の絶対重量は対照群を有意に下回った (Table 27)。

海馬歯状回門での GABA 性介在ニューロン及び成熟ニューロンの検索では、飲水投与において Reelin 及び NeuN 陽性細胞数の増加傾向及び有意な増加が生後 21 日目の 20 及び 100 ppm に見られた。生後 77 日目では Reelin 陽性細胞数に差は見られなかったものの、NeuN 陽性細胞数の有意な増加が 20 及び 100 ppm に見られた (Table 28、Fig.12)。腹腔内投与では、Reelin 及び NeuN 陽性細胞数の有意な増加が ACR 投与群に見られ、生後 77 日目では Reelin 陽性細胞数に差はなかったものの、NeuN 陽性細胞数の有意な増加が見られた (Table 28)。

海馬歯状回顆粒細胞層下帯でのアポトーシス及び細胞増殖の検索では、飲水投与において PCNA 陽性細胞数 (細胞増殖) の有意な減少及び Cresyl Violet 染色によるアポトーシス小体の減少傾向が生後 21 日目の 20 ppm 以上に見られたが、生後 77 日目では差は見られなかった (Table 29、Fig. 13)。なお、生後 21 日目のアポトーシスについては、更に TUNEL 染色により確認を行ったが、ほぼ同様な結果であった (Table 30)。腹腔内投与では、PCNA 陽性細胞数 (細胞増殖) の有意な減少が生後 21 日目の ACR 投与群に見られたが、アポトーシスに差は見られず、生後 77 日目ではいずれにおいても差は見られなかった (Table 29)。

海馬歯状回顆粒細胞層下帯での新生ニューロン分化指標の検索では、飲水投与において DCX 及び Dpysl3 (TUC4) 陽性細胞数の有意な減少が生後 21 日目の 100 ppm に見られたが (Table 31、Fig. 14)、生後 77 日目では差は見られなかった (Table 32)。なお、生後 21 日目の NeuroD1、Tbr2 及び Pax6 陽性細胞数に変化は見られなかった (Table 31、Fig. 14)。

なお、生後 4 日目の雌児動物について Reelin の免疫染色を、離乳時屠殺した母動物について Reelin 及び PCNA の免疫染色を行ったが、いずれも影響は認められなかった (Table 33、34)。

海馬歯状回門の面積及び歯状回顆粒細胞層下帯の長さについて解析を行った結果、飲水投与において歯状回門面積の有意な減少が生後 21 日目の 100 ppm に見られたが、顆粒細胞層下帯の長さには明らかな影響は見られなかった。生後 77 日目ではいずれも差は見られなかった。腹腔内投与では、歯状回門面積の有意な減少が生後 21 日目及び 77 日目に見られたが、顆粒細胞層下帯の長さには影響は見られなかった (Table 35)。

生後 21 日目の児動物の海馬における real-time RT-PCR 解析では、有意差が散見されるものの飲水投与及び腹腔内投与のいずれにおいても、対照群の 1.5 倍を超える mRNA の発現レベルを示す遺伝子はなく、明らかな影響は見られなかった (Table 36)。

D. 考察

< Mn を用いた発達期暴露影響評価 >

ラットを用いた実験では、海馬歯状回顆粒細胞層下帯における DCX 陽性細胞数の増加が生後 21 日目の 800 ppm に見られた。DCX は type 2b、type 3 前駆細胞 及び幼若顆粒細胞に発現する分子として知られるが、type 2a 及び 2b 前駆細胞に発現する分子である Tbr2 に変動は見られなかったことから、今回見られた DCX 陽性細胞の増加は type 3 前駆細胞あるいは幼若顆粒細胞の増加を示すものと考えられ、このステージにおける分化障害を示唆するものと考えられた。更に、同じ生後 21 日目の 800 ppm において海馬歯状回門における Reelin 陽性細胞数の増加も認められた。Reelin は同部位において GABA 性介在ニューロンが分泌することが知られており、顆粒細胞系譜の移動に関与することが報告されている。従って、Reelin 分泌 GABA 性介在ニューロンの増加は、顆粒細胞層下帯における前駆細胞の分化障害に関連した変動であると推測された。一方、海馬歯状回門においてミクログリアの活性化を示唆する Iba1 及び Cox2 陽性細胞数の増加が生後 21 日目の 32 ppm 以上で見られた。Mn は in vitro でミクログリアを直接的に活性化することが報告されている。昨年度報告した通り、脳内の Mn 濃度は生後 21 日目の児動物のみにおいて 32 ppm 以上で上昇を示している。従って、今回見られたミクログリアの活性化は脳内 Mn 濃度の増加に伴う変化と考えられた。更に、生後 21 日目の児動物の海馬を用いた real-time RT-PCR 解析では、IL-1 α 、IL-6、NOS2、TNF- α といった炎症誘発性サイトカイン mRNA の発現レベルの増加が 800 ppm で認められている。ミクログリアはこれらの炎症誘発性サイトカインを放出することが知られていることから、炎症誘発性サイトカイン mRNA の発現レベルの増加は、脳内 Mn 濃度の増加に伴うミクログリアの活性化に関連するものと推測された。甲状腺関連ホルモン測定では、800 ppm で生後 21 日目の児動物のみにおいて弱いながらも T3 及び T4 の減少ならびに TSH の増加が見られており、Mn 発達期暴露の影響が考えられた。

マウスを用いた実験では、Reelin 及び NeuN の二重染色の結果、海馬歯状回門において Reelin 陽性/NeuN 弱陽性～陰性細胞の増加が 800 ppm に認められた。前述の通り、Reelin 陽性細胞の増加は Reelin 分泌 GABA 性介在ニューロンの増加を示すものであるが、成熟ニューロンのマーカーである NeuN に関して弱陽性～陰性を示していることから、未熟な Reelin 分泌 GABA 性介在ニューロンの増加を示唆するものと考えられた。一方、歯状回顆粒細胞層下帯では TUC4 陽性細胞数の増加あるいは減少が生後 21 日目及び 77 日目の 800 ppm に見られた。TUC4 は幼若顆粒細胞に発現する分子として知られており、幼若顆粒細胞の減少を招く分化障害を示唆するものと考えられた。生後 21 日目の児動物の海馬を用いた real-time RT-PCR 解析では、TUC4 の mRNA の発現

レベルの減少が 800 ppm に見られ、前述の免疫染色の結果を裏付ける結果が得られた。また、Reelin、GAD67 及び ApoER2 (Reelin 受容体) の mRNA の発現レベルの増加が見られたが、昨年報告した通り、免疫染色において Reelin 及び GAD67 陽性細胞の増加が見られており、同様に免疫染色結果を裏付ける内容であった。前駆細胞の分化障害及び Reelin 分泌 GABA 性介在ニューロンの増加はラットでも見られたが、ラットと異なりマウスでは生後 77 日目でも見られており、不可逆的な永続性が示唆された。

ゲノムのメチレーション解析では、800 ppm で Pvalb、Mid1、Atpla3 及び Nr2f1 の過メチル化及び mRNA の発現レベルの減少が見られ、Mn 投与により過メチル化を受け、転写が抑制される 4 遺伝子が同定された。このうち、Parvalbumin 及び MID1 は免疫染色においても、それぞれ介在ニューロン、顆粒細胞層 (下帯を含む) に陽性細胞を認め、Mn 投与により陽性細胞数が減少を示し、後者は成熟後まで持続することが確認された。このことより、発達期の Mn 暴露によって、ニューロン新生に関連する遺伝子発現のエピジェネティックな発現制御による修飾が成熟後まで続く可能性が見出された。甲状腺関連ホルモン測定では、T4 の減少が見られたが T3 及び TSH では明らかな変動は見られず、限定的な変化であると判断され、ニューロン新生に対する Mn の影響に抗甲状腺作用を介した機序の関与は限局的であると判断された。

< CPF を用いた発達期暴露影響評価 >

本年度、ラットを用いた CPF の暴露実験を実施し、母動物については体重では一過性的変動が見られたものの明らかな変化は見られなかった。摂餌量では 14 ppm のみで高値が妊娠後期に見られたがその程度は軽度であった。児動物では 14 ppm のみにおいて体重の高値が生後 4～21 日目に見られた。同様の用量反応性を欠く児動物体重の高値は、過去に実施された試験でも報告されており、同様の変化と考えられた。ChE 活性の測定では、暴露終了時の血漿及び赤血球中 ChE 活性の低値が母動物では 2.8 ppm 以上に見られたが、児動物では 14 ppm 以上にあるいは 70 ppm のみであった。しかし、血漿及び赤血球中 ChE 活性は母動物よりも反応性は低かったにもかかわらず、脳内 ChE 活性は母動物及び児動物とも 70 ppm に変動が見られ、同等の反応性を示した。

海馬歯状回顆粒細胞層下帯での検索では、Tbr2 陽性細胞数の減少及び PCNA 陽性細胞数 (細胞増殖) の減少が生後 21 日目の 70 ppm に見られた。前述の通り、Tbr2 は type 2 前駆細胞に発現する分子であるが、type 2 前駆細胞はニューロンの性質を部分的に保持しながら分裂を繰り返す細胞であることが報告されている。従って、今回得られた結果は、やがてニューロンとなるべき細胞増殖能を持った type 2 前駆細胞が影響を受けていることを示唆するものと考えられた。

<ACRを用いた発達期暴露影響評価>

昨年の予備検討と同様に児動物の発達遅延を示唆する体重及び脳重量の低値が飲水投与の100 ppm及び腹腔内投与の生後21及び77日目に見られたが、歩行異常を示したのは腹腔内投与のみであった。

海馬歯状回顆粒細胞層下帯での細胞増殖の検索では、生後21日目にPCNA陽性細胞数（細胞増殖）の減少が発達遅延のない20 ppmにも見られたが、生後77日目には消失し可逆性が示唆された。

一方、海馬歯状回門における検索では、生後21日目にReelin及びNeuN陽性細胞数の増加が20 ppm以上に見られ、更にNeuNの変化については生後77日目まで継続して見られており、Reelinの変化は可逆的であったが、NeuNの変化は不可逆的であった。前述の通り、Reelinは新生ニューロンの移動に関与する分子であることから、細胞増殖の減少に関連してReelin分泌GABA性介在ニューロンの増加が生じているものと推測された。また、生後77日目ではNeuNの変化のみ不可逆的であったことから、生後21日目において増加したGABA性介在ニューロンが、生後77日目では細胞増殖の回復によりReelinは分泌しなくなり、そのまま残存しているものと推測された。

海馬歯状回顆粒細胞層下帯でのアポトーシスの検索では減少傾向が生後21日目の20 ppm以上に見られた。前述の通り、同群では細胞増殖の減少や後述するように顆粒細胞系譜の障害が見られていることから、ACRによるニューロン新生障害に対する神経保護作用の生じている可能性が考えられた。

海馬歯状回顆粒細胞層下帯での新生ニューロン分化指標の100 ppm投与群での検索では、DCX及びDpysl3 (TUC4)陽性細胞数の減少が生後21日目に見られた。これらは、type 2b、type 3前駆細胞及び幼若顆粒細胞に発現する分子として知られているが、Pax6 (type 1-type 2aマーカー)、Tbr2 (type 2a及び2bマーカー)、NeuroD1 (type 2b、type 3マーカー)に変動は見られなかったことから、今回見られたDCX及びDpysl3 (TUC4)陽性細胞数の減少は幼若顆粒細胞の減少を示すものと考えられ、ACRはtype 3前駆細胞を標的として増殖抑制を生じ、その結果、幼若顆粒細胞が減少したものと考えられた。

E. 結論

神経発達影響評価系の確立を分担課題として、本年度明らかになったこととして、マウスのMn暴露実験では、ニューロン新生に関連する遺伝子のエピジェネティックな発現修飾が成熟後まで続く可能性を見出した。一方、顆粒細胞層下帯では、Mnは前駆細胞の永続的な分化障害を誘発し、これに伴ってニューロン移動に機能するReelinの持続的な分泌を生じるものと考えられた。ラットにおいても同様のtype 3前駆細胞から幼若顆粒細胞の減少を招く分化障害及びReelin分泌GABA性介在ニューロンの増加

が見られたが、変化は可逆的であった。ラットでは更に脳内免疫の活性化を示唆するミクログリアやサイトカインmRNAの変化が見出された。CPFでは脳内ChE阻害作用の確認された用量でtype 2前駆細胞が標的となる可能性が示唆された。ACRに関しては、可逆的な細胞増殖の減少及びこれに関連するReelin分泌GABA性介在ニューロンの増加が見出された。また、type 3前駆細胞がACRの標的となつて増殖抑制を受け、その結果、幼若顆粒細胞の減少することが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Saegusa, Y., Woo, G-H., Fujimoto, H., Inoue, K., Takahashi, M., Hirose, M., Igarashi, K., Kanno, J., Mitsumori, K., Nishikawa, A., Shibutani, M.: Gene expression profiling and cellular distribution of molecules with altered expression in the hippocampal CA1 region after developmental exposure to anti-thyroid agents in rats. *J.Vet. Med. Sci.* 72(2): 187-195, 2010.

Saegusa, Y., Woo, G-H., Fujimoto, H., Kemmochi, S., Shimamoto, K., Hirose, M., Mitsumori, K., Nishikawa, A., Shibutani, M.: Sustained production of Reelin-expressing interneurons in the hippocampal dentate hilus after developmental exposure to anti-thyroid agents in rats. *Reprod. Toxicol.* 29(4): 407-414, 2010.

Ohishi, T., Wang, L., Ogawa, B., Fujisawa, K., Taniai, E., Hayashi, H., Mitsumori, K., Shibutani, M.: No effect of sustained systemic growth retardation on the distribution of Reelin-expressing interneurons in the neuron-producing hippocampal dentate gyrus in rats. *Reprod. Toxicol.* 30(4): 591-599, 2010.

Hachisuka, A., Nakamura, R., Sato, Y., Nakamura, R., Shibutani, M., Teshima, R. [Effects of perinatal exposure to the brominated flame-retardant hexabromocyclododecane (HBCD) on the developing immune system in rats]. *Kokuritsu Iyakuin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku.* 128:58-64, 2010, Japanese.

Fujimoto, H., Woo, G-H., Inoue, K., Takahashi, M., Hirose, M., Nishikawa, A., Shibutani, M.: Impaired oligodendroglial development by decabromodiphenyl ether in rat offspring after maternal exposure from mid-gestation through lactation. *Reprod. Toxicol.* 31(1): 86-94, 2011.

Ogawa, B., Ohishi, T., Wang, L., Takahashi, M., Taniai, E., Hayashi, H., Mitsumori, K., Shibutani, M.: Disruptive neuronal development by acrylamide in the hippocampal dentate hilus after developmental exposure in rats. *Arch. Toxicol.* (in press).

Takahashi, M., Inoue, K., Koyama, N., Yoshida, M., Irie, K., Morikawa, T., Shibutani, M., Honma, M., Nishikawa, A.: Life stage-related differences in susceptibility to acrylamide-induced neural and testicular toxicity. Arch. Toxicol. (in press).

2. 学会発表

小川文一郎、三枝由紀恵、大石 功、Wang Liyun、高橋美和、中東 淳、三森国敏、渋谷 淳：アクリルアミドの発達期暴露によるラット海馬歯状回でのGABA性介在ニューロンの反応。第26回日本毒性病理学会学術集会、金沢、第26回日本毒性病理学会学術集会講演要旨集、p. 56 (O-15), 2月3,4日, 2010

三枝由紀恵、禹 桂炯、富士本仁、剣持 明、嶋本 敬介、広瀬雅雄、三森国敏、西川秋佳、渋谷 淳：ラットの発達期甲状腺機能低下に起因して海馬歯状回に増加するReelin陽性細胞の特性。第26回日本毒性病理学会学術集会、金沢、第26回日本毒性病理学会学術集会講演要旨集、p. 102 (P-84), 2月3,4日, 2010

Masamitsu Honma, Naoki Koyama, Manabu Yasui, Shigeaki Takami, Miwa Takahashi, Kaori Inoue, Midori Yoshida, Kenichi Masumura, Takehiko Nohmi, Shuichi Masuda, Naohide Kinae, Takuya Suzuki, Tomonari Matsuda, Makoto Shibutani, Toshio Imai: Difference of acrylamide inducing genotoxicity and adduct formation between child and adult rats. 49th Annual Meeting of Society of Toxicology (SOT) 2010, Salt Lake City, March 7-11, 2010.

渋谷 淳：発達期と化学物質。厚生労働省 化学物質リスク研究推進事業 シンポジウム「化学物質と環境・健康」2010年2月18日（於 仙台）、3月2日（於 東京）

三枝 由紀恵、禹 桂炯、富士本 仁、剣持 明、嶋本 敬介、広瀬 雅雄、三森 国敏、西川 秋佳、渋谷 淳：ラットの発達期甲状腺機能低下に起因して海馬歯状回に増加するReelin陽性細胞の特性、神経組織の成長・再生・移植研究会 第25回学術集会、平成22年5月22日、大阪

大石 巧、三枝由紀恵、小川文一郎、Wang Liyun、藤沢賢一、嶋本敬介、剣持 明、三森国敏、渋谷 淳：低栄養に起因する脳発達遅延は海馬歯状回ニューロン発達に影響を及ぼさない。第37回日本トキシコロジー学会学術年会、沖縄、2010年6月16-18日、第37回日本トキシコロジー学会学術年会プログラム・要旨集、p. 212 (P-151)

三枝由紀恵、富士本仁、禹 桂炯、剣持 明、嶋本敬介、広瀬雅雄、西川秋佳、三森国敏、渋谷 淳：発達期神経毒暴露に起因するニューロン分布異常に対する影響評価の確立- 小脳片葉小節葉の顆粒細胞層に

おけるReelin陽性細胞の検討- 第37回日本トキシコロジー学会学術年会、沖縄、2010年6月16-18日、第37回日本トキシコロジー学会学術年会プログラム・要旨集、p. 213 (P-154)

Wang Liyun, 三枝由紀恵、小川文一郎、大石 巧、嶋本敬介、剣持 明、三森国敏、渋谷 淳：マウスの発達期マンガン暴露によりニューロン移動の異常とグリア増殖が誘発される。第37回日本トキシコロジー学会学術年会、沖縄、2010年6月16-18日、第37回日本トキシコロジー学会学術年会プログラム・要旨集、p. 215 (P-157)

Yukie Saegusa, Gye-Hyeong Woo, Hitoshi Fujimoto, Sayaka Kemmochi, Keisuke Shimamoto, Liyun Wang, Akiyoshi Nishikawa, Kunitoshi Mitsumori, Makoto Shibutani: Sustained production of Reelin-expressing interneurons in the hippocampal dentate hilus after developmental hypothyroidism in rats. AETOX (Spanish Association of Toxicology) with the collaboration of EUROTOX (European Societies of Toxicology) in the name of IUTOX (the International Union of Toxicology), Barcelona-Spain 19-23 July 2010 Abstracts of the XII International Congress of Toxicology, S227 (P207-034).

小川 文一郎、大石 巧、Wang Liyun、桑田 和倫、盛田 怜子、三森 国敏、渋谷 淳：アクリルアミド (ACR) の発達期暴露によるラット海馬歯状回でのニューロン発達障害の回復性とその標的細胞について、第150回日本獣医学術集会、帯広、日本獣医病理学会抄録：p. 175 (B-42), 9月16-18日, 2010

大石 巧、Wang Liyun、小川文一郎、井上彩子、佐藤 彬、五十嵐良明、三森国敏、渋谷 淳：マンガンの発達期暴露によるラット海馬歯状回におけるニューロン及びグリアへの影響。第27回日本毒性病理学会学術集会、大阪、第27回日本毒性病理学会学術集会講演要旨集：P-007, p.92, 1月27-28日, 2011

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

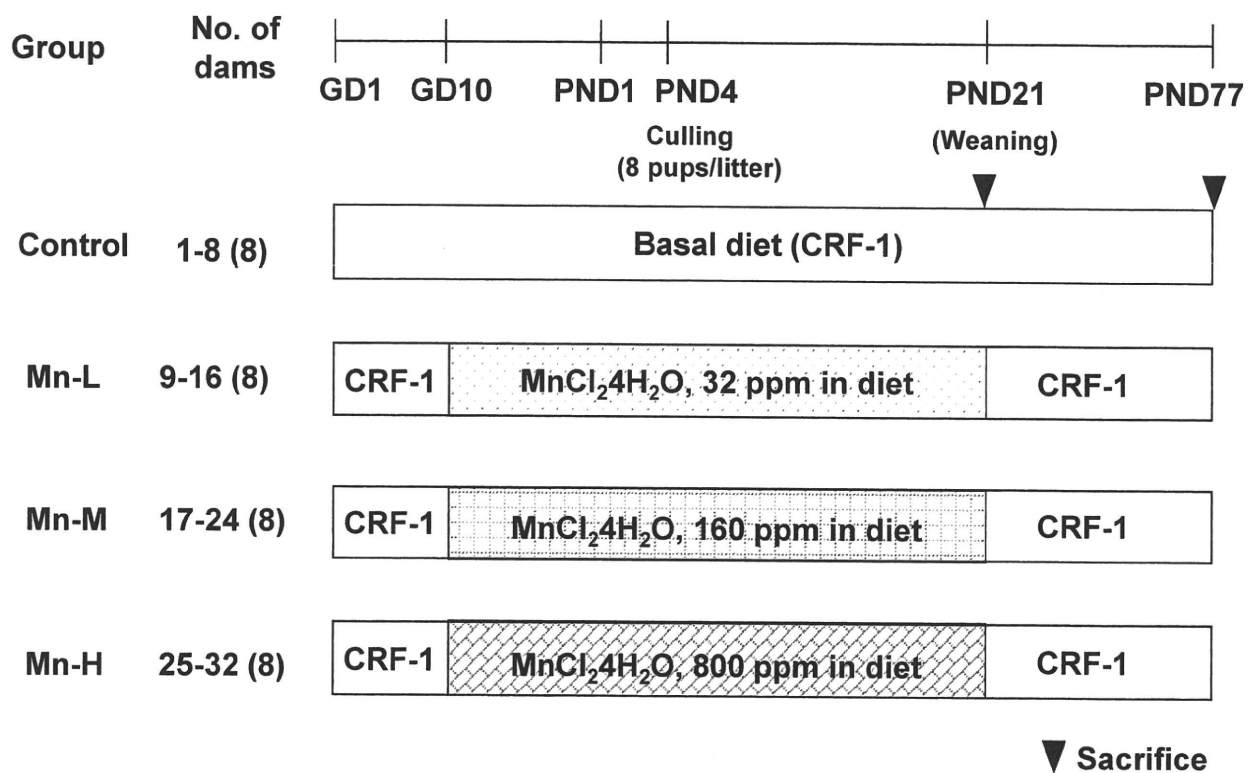


Fig. 1.
Developmental exposure study of MnCl₂·4H₂O in SD:IGS rats to examine the effect on neuronal development.

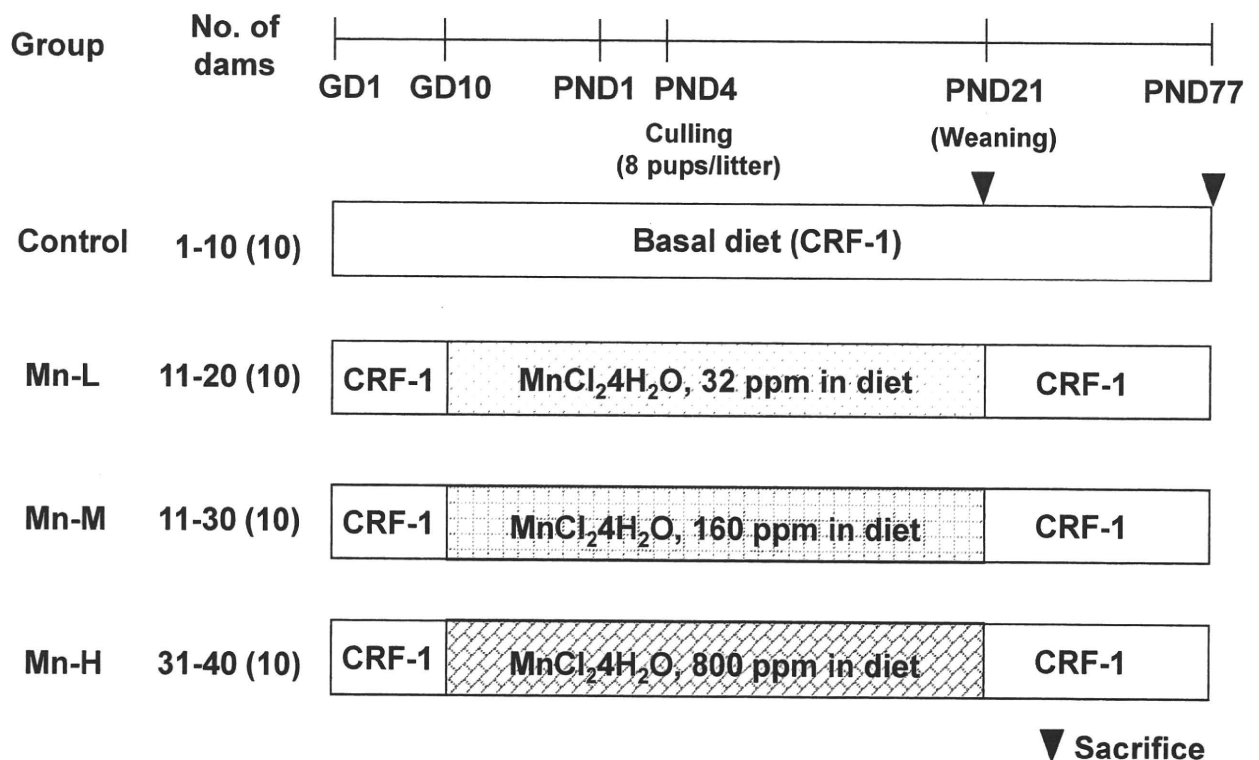


Fig. 2
Developmental exposure study of MnCl₂·4H₂O in ICR mice to examine the effect on neuronal development.

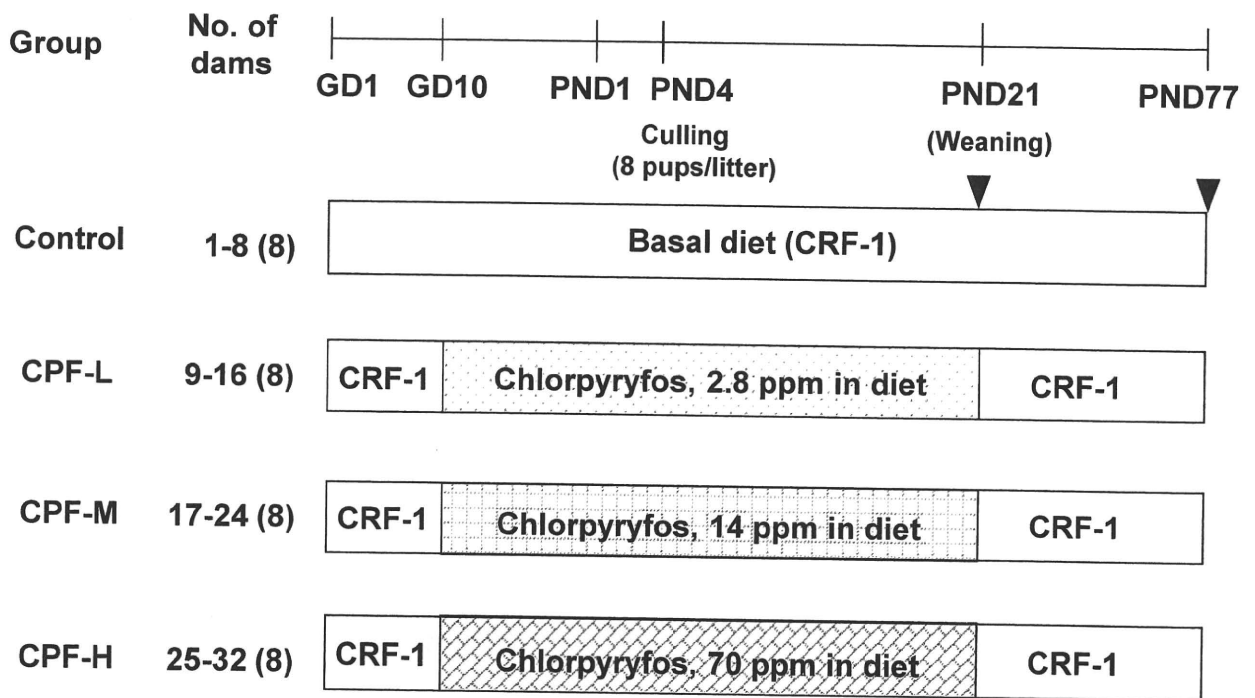


Fig. 3 ▼ Sacrifice
 Developmental exposure study of chlorpyrifos in SD:IGS rats to examine the effect on neuronal development.

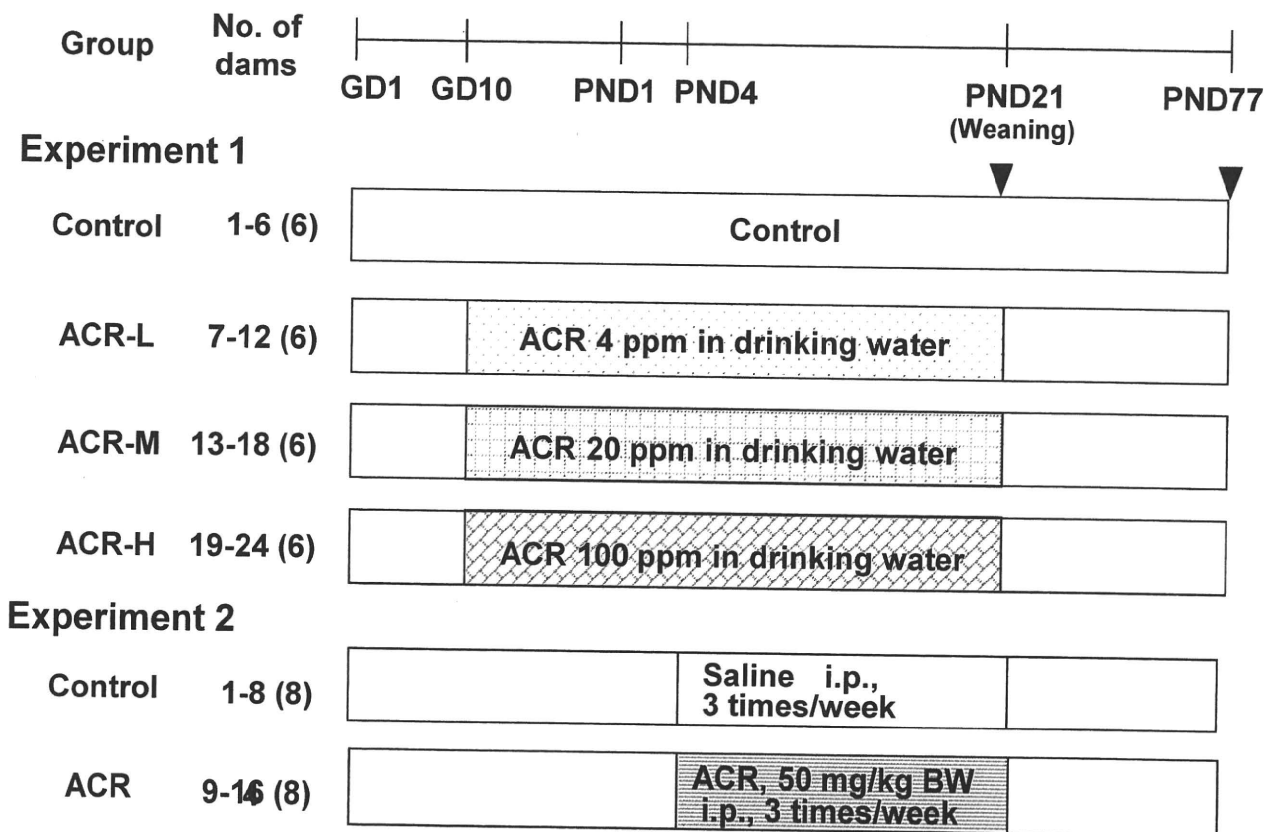
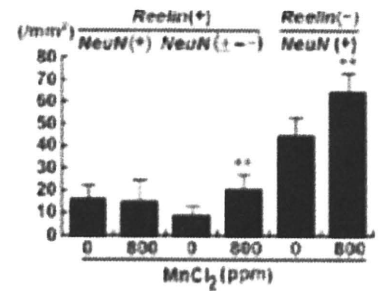
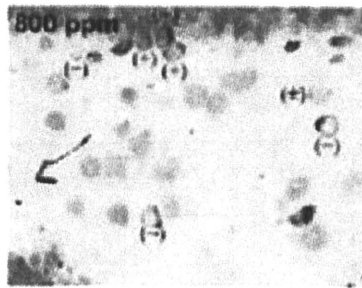
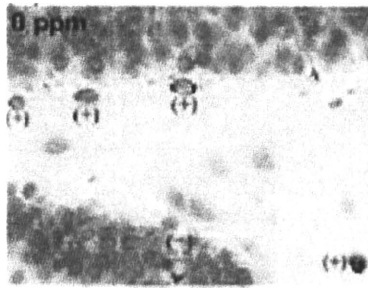


Fig. 4. ▼ Sacrifice
 Developmental exposure study of acrylamide in Slc:SD rats to examine the effect on neuronal development.

PND 21



PND 77

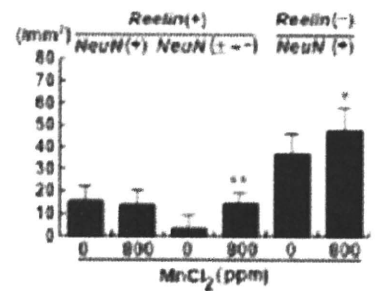
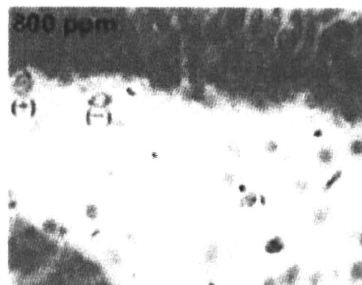
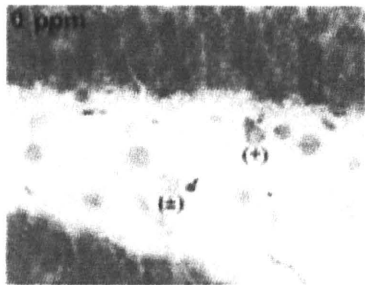


Fig. 5. Distribution of double staining cells of Reelin and NeuN in the hilus of the hippocampal dentate gyrus in male offspring at PND 21 and PND 77 after maternal exposure to $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ from GD 10 to PND 21 in mice.

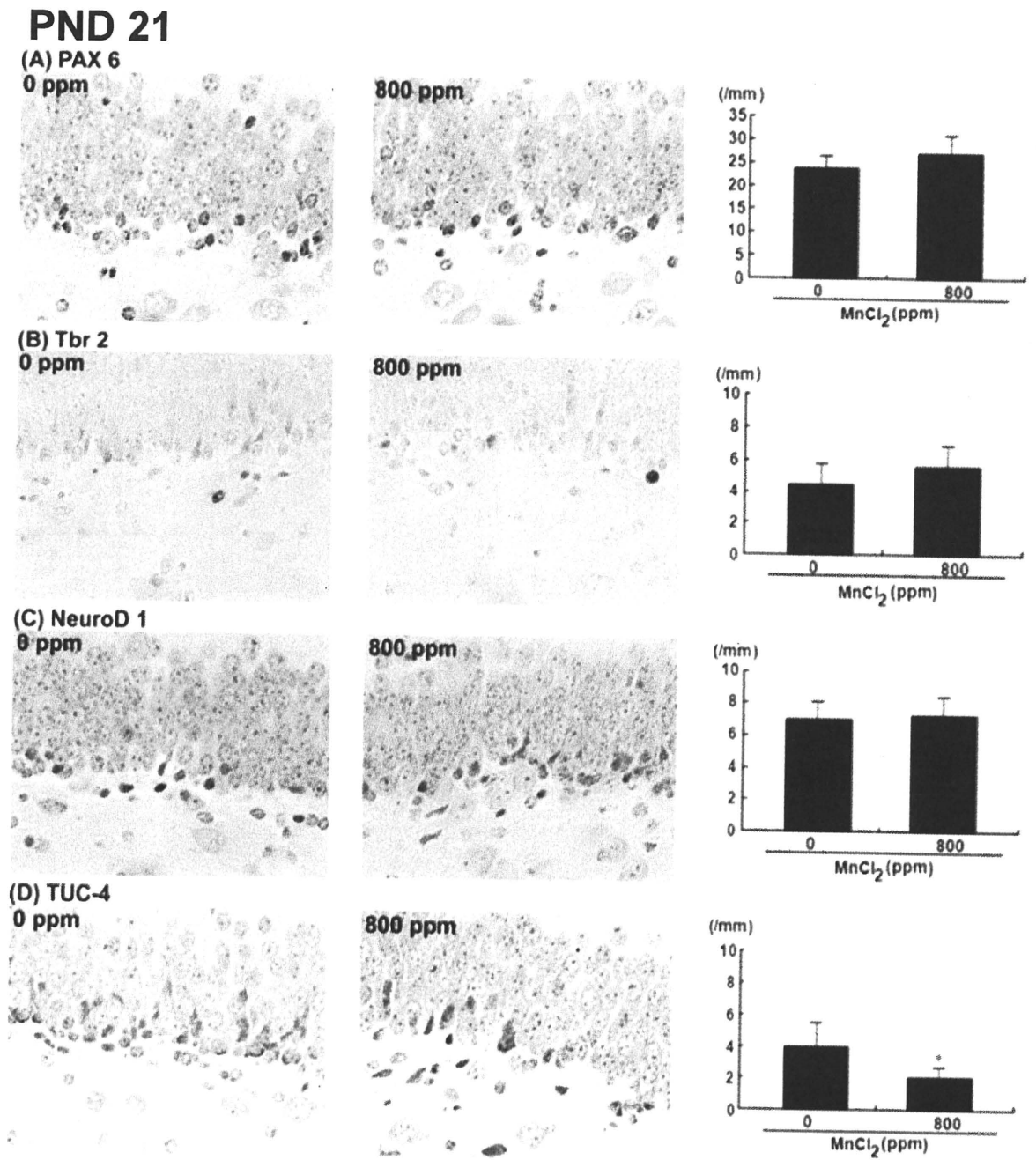


Fig. 6. Distribution of PAX6, Tbr2, NeuroD1 and TUC4-immunoreactive cells in the dentate subgranular zone of male offspring at PND 21 after maternal exposure to $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ from GD 10 to PND 21 in mice.

PND 77

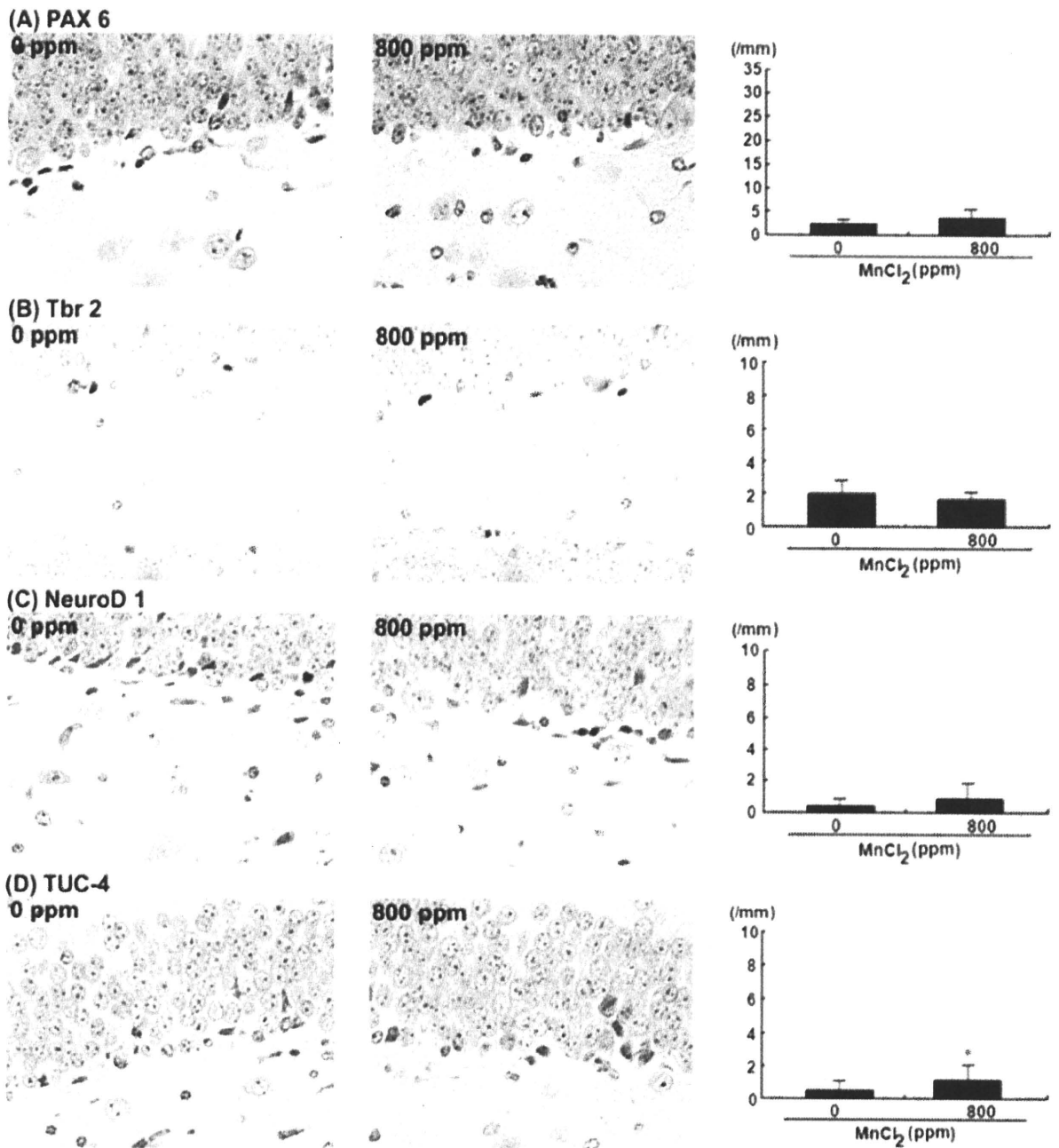


Fig. 7. Distribution of PAX6, Tbr2, NeuroD1 and TUC4-immunoreactive cells in the dentate subgranular zone of male offspring at PND 77 after maternal exposure to $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ from GD 10 to PND 21 in mice.

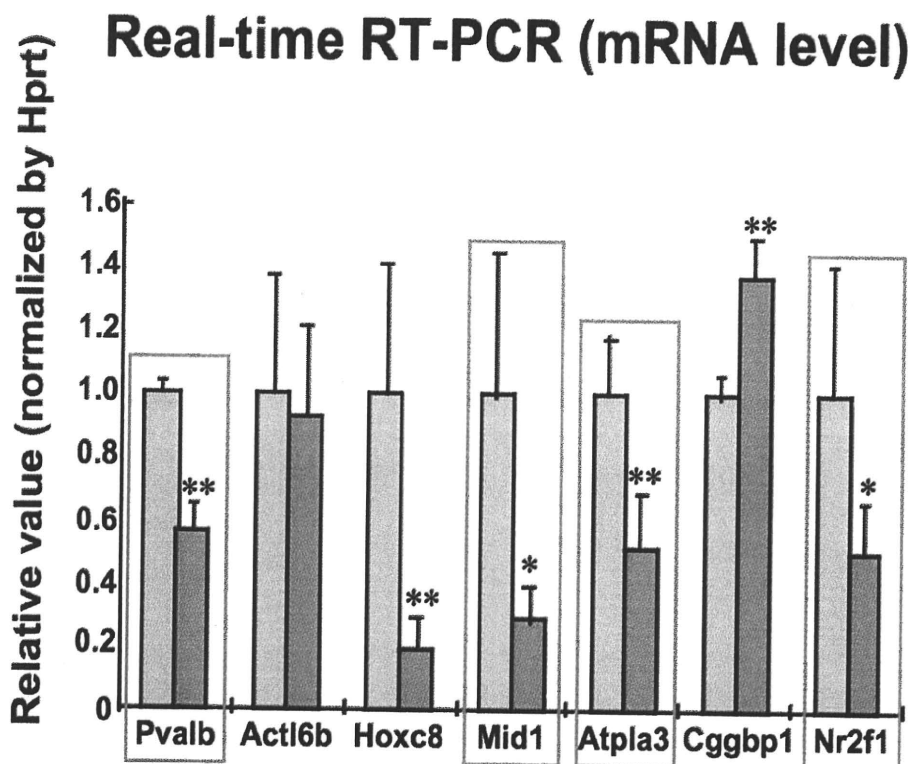
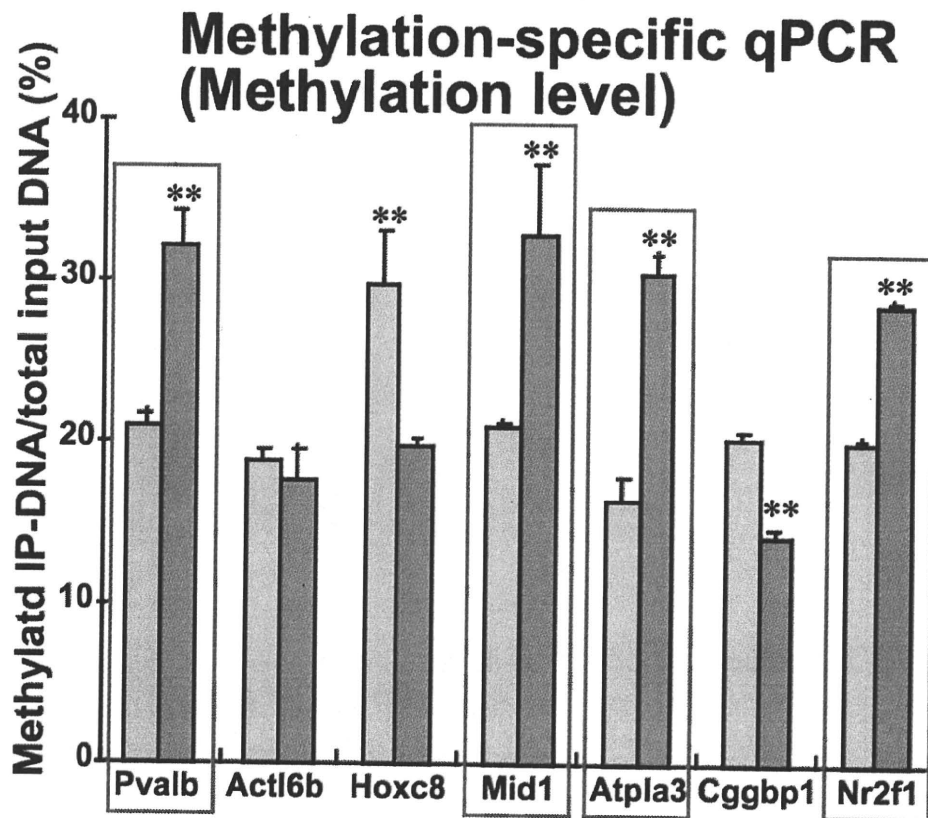


Fig. 8. Methylation-specific qPCR analysis and real-time RT-PCR analysis of male offspring at PND 21 after maternal exposure to $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ from GD 10 to PND 21 in mice.

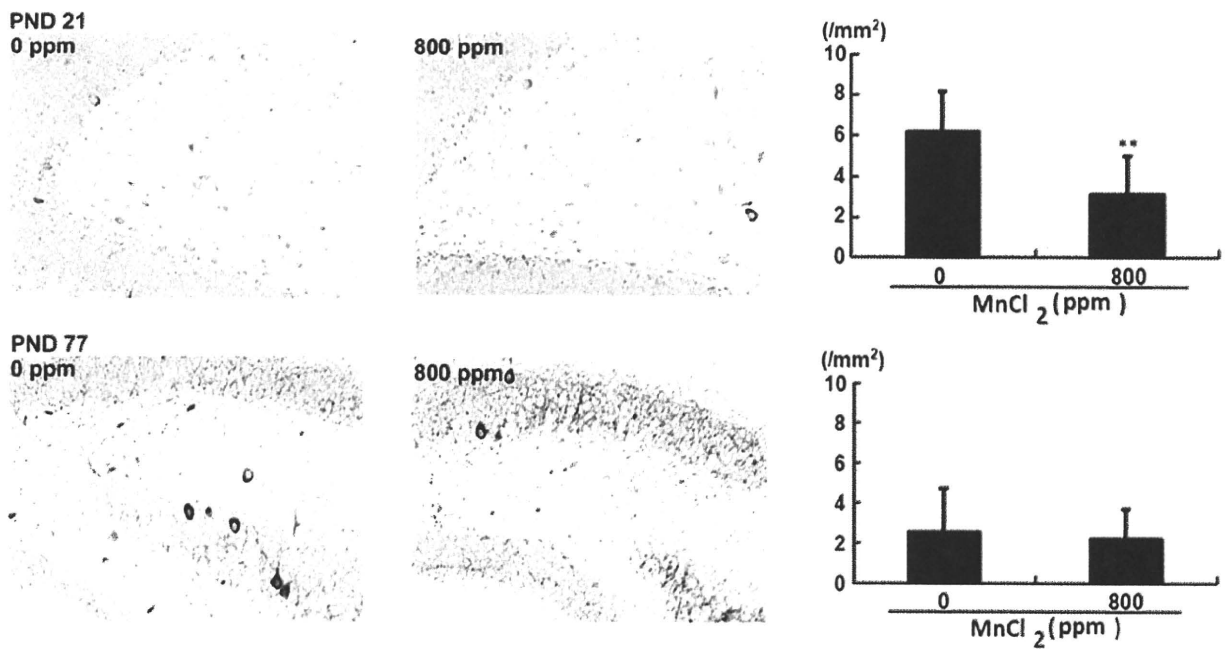


Fig. 9. Distribution of Parvalbumin-immunoreactive cells in the dentate hilus of male offspring at PND 21 and 77 after maternal exposure to MnCl₂·4H₂O from GD 10 to PND 21 in mice.

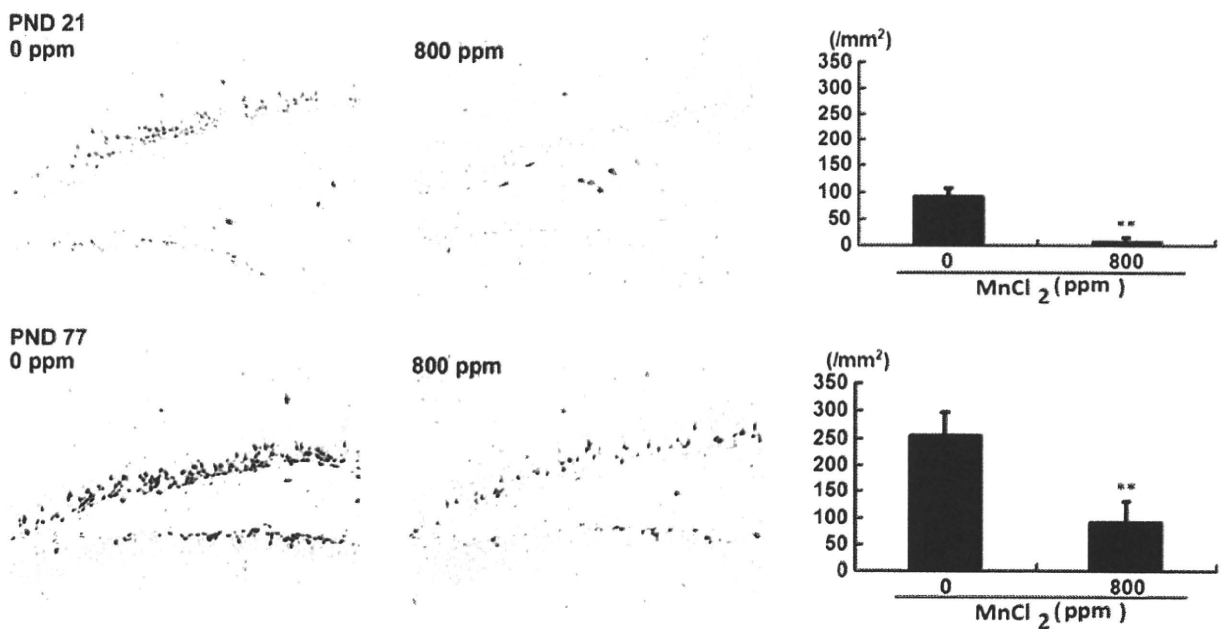


Fig. 10. Distribution of MID1-immunoreactive cells in the dentate hilus of male offspring at PND 21 and 77 after maternal exposure to MnCl₂·4H₂O from GD 10 to PND 21 in mice.

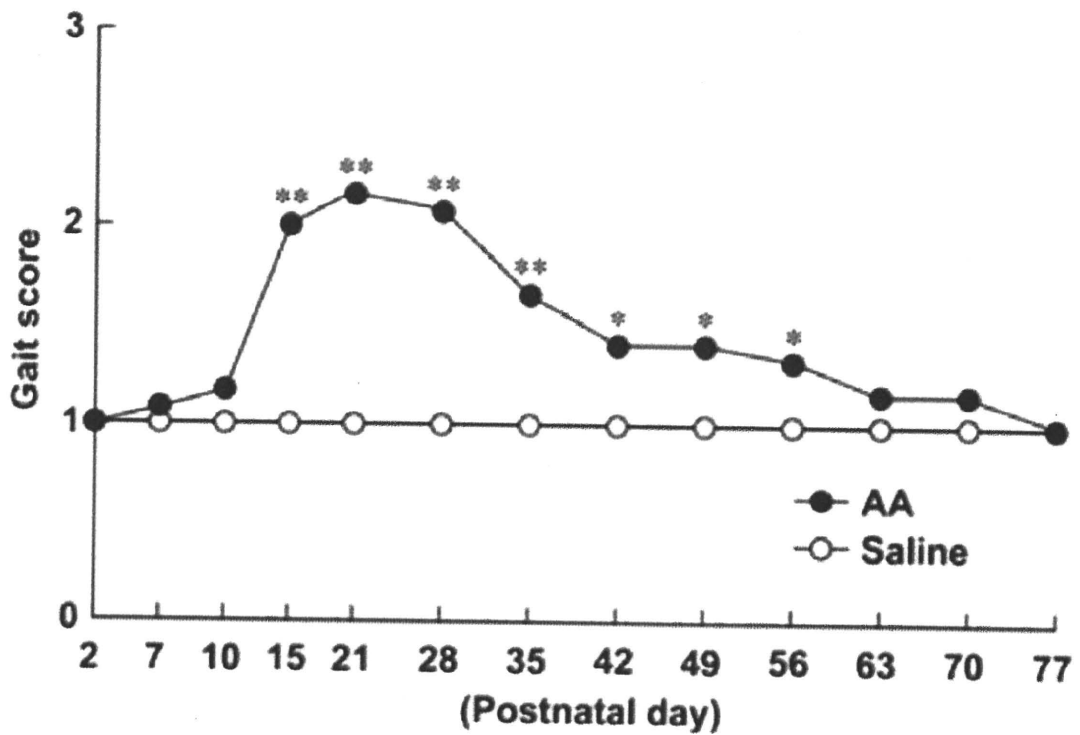


Fig. 11. Change of the average of gait score of offspring from PND2 to PND77 in Experiment 2 of the acrylamide study.

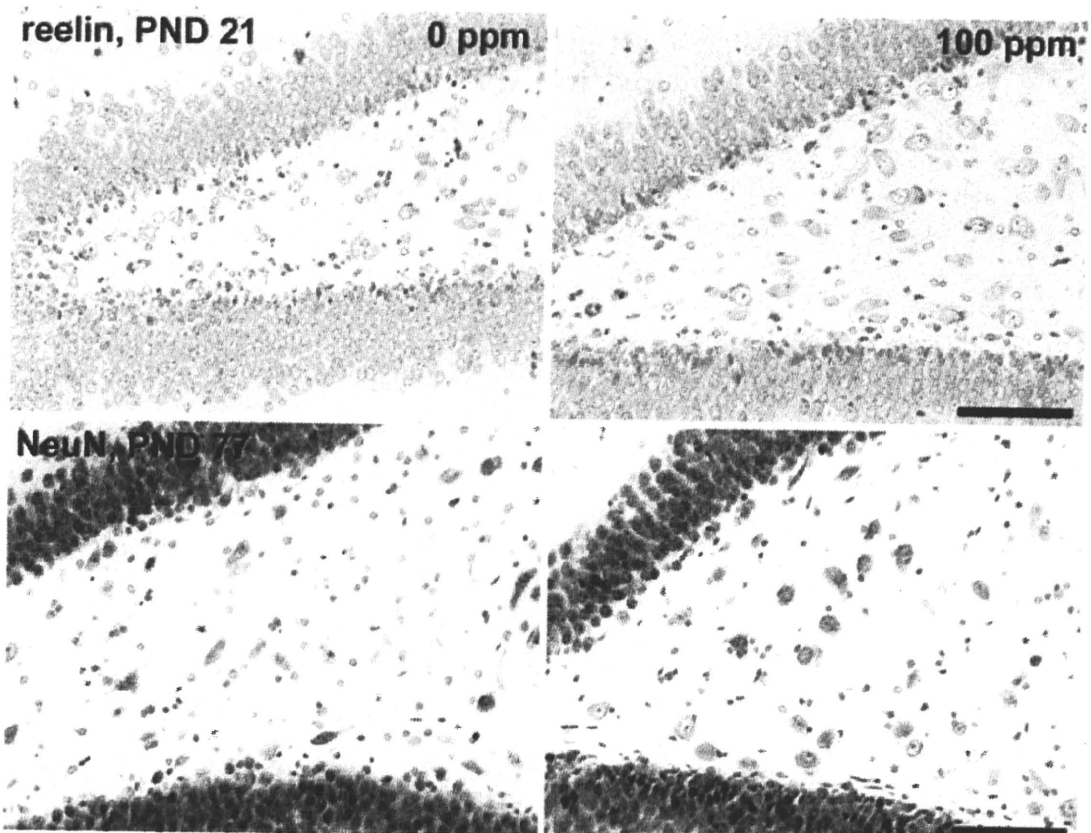


Fig. 12. Distribution of reelin- and NeuN-immunoreactive cells in the dentate hilus of pups at PND 21 and PND 77 in Experiment 1 of the acrylamide study.

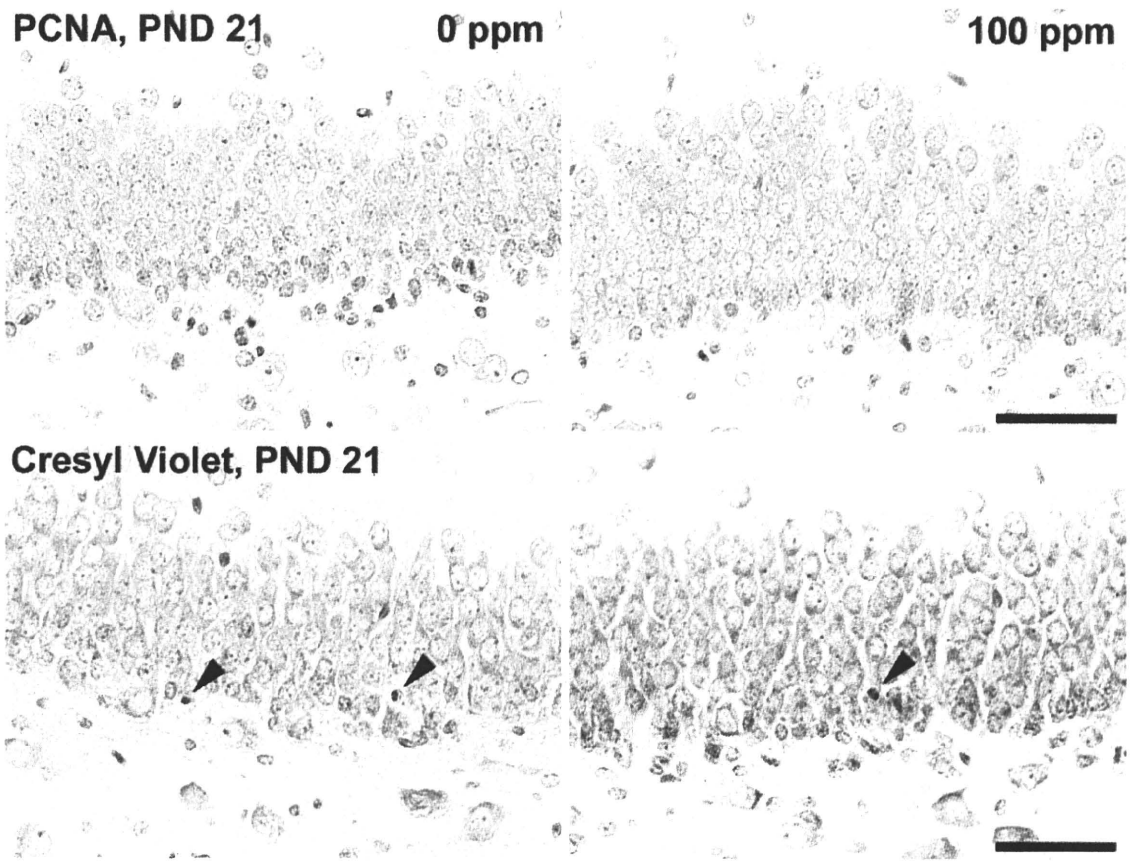


Fig. 13. Distribution of PCNA-immunoreactive proliferating cells and Cresyl Violet -positive apoptotic bodies in the SGZ of pups at PND 21 in Experiment 1 of the acrylamide study.

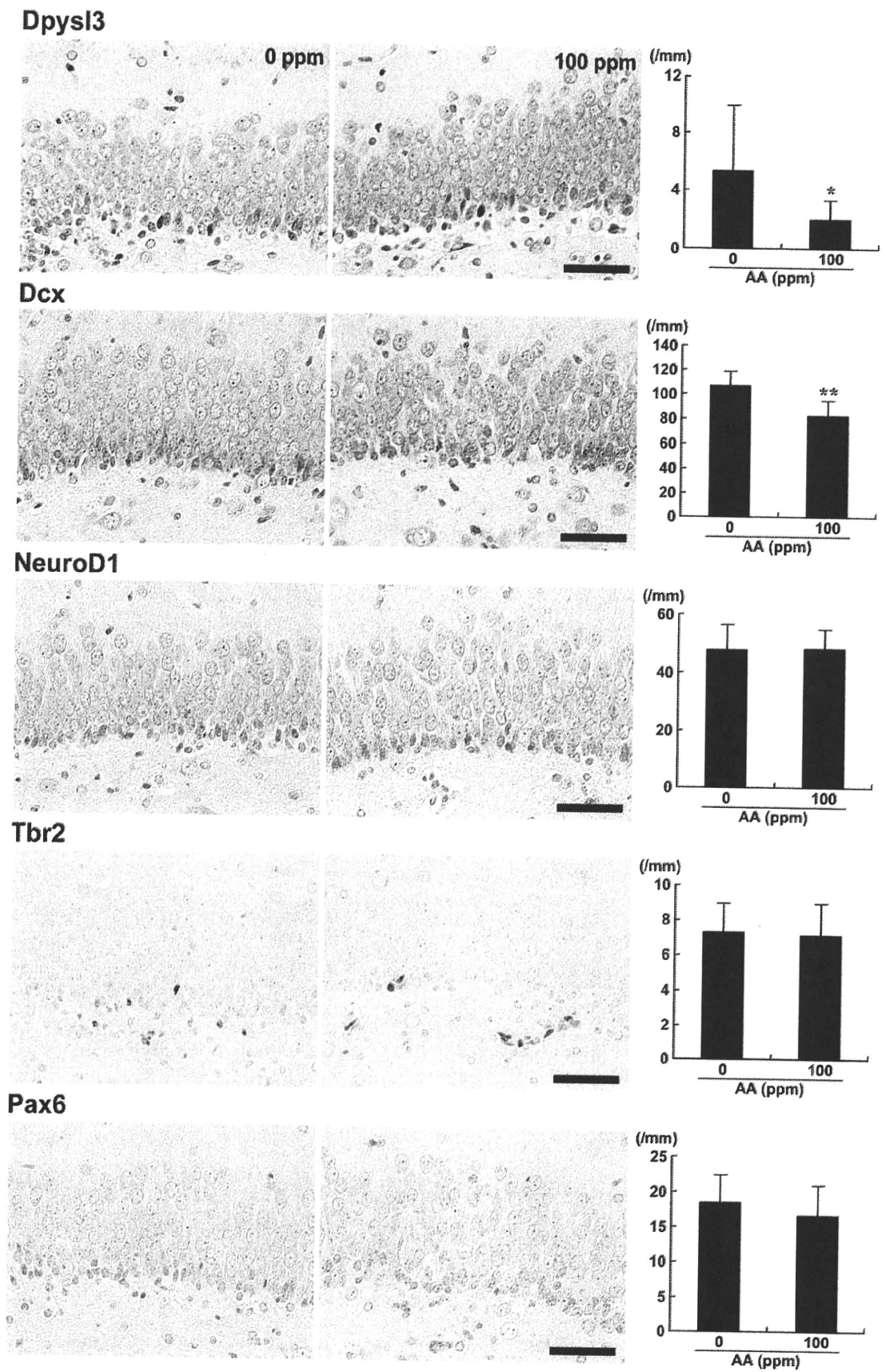


Fig. 14. Distribution of immunoreactive cells for neuronal stage-defining markers in the SGZ of pups at PND 21 in Experiment 1 of the acrylamide study.

Table 1 List of animal groups examined for immunohistochemistry and apoptosis assays in experiments of acrylamide

	Experiment 1				Experiment 2	
	AA in the drinking water (ppm)				Intraperitoneal injections	
	0 (control)	4	20	100	Saline (control)	AA
PND 21, male offspring						
reelin	T	T	T	T	T	T
NeuN	T	T	T	T	T	T
PCNA	T	T	T	T	T	T
Dpysl3	T	N.E.	N.E.	T	N.E.	N.E.
Dcx	T	N.E.	N.E.	T	N.E.	N.E.
NeuroD1	T	N.E.	N.E.	T	N.E.	N.E.
Tbr2	T	N.E.	N.E.	T	N.E.	N.E.
Pax6	T	N.E.	N.E.	T	N.E.	N.E.
Cresyl Violet staining	T	T	T	T	T	T
TUNEL-assay	S	S	S	S	S	S
PND 77, male offspring						
reelin	T	T	T	T	T	T
NeuN	T	T	T	T	T	T
PCNA	T	T	T	T	T	T
Dpysl3	S	N.E.	N.E.	S	N.E.	N.E.
Dcx	S	N.E.	N.E.	S	N.E.	N.E.
Cresyl Violet staining	T	T	T	T	T	T
PND 4, female offspring						
reelin	S	S	S	S	S	S
Dams						
reelin	T	N.E.	N.E.	T	N.A.	N.A.
PCNA	T	N.E.	N.E.	T	N.A.	N.A.

T: Stained three different sections with approximately 250 μ m interval using serial sections in each brain.

S: Stained one section in each brain.

N.E.: Not examined.

N.A.: Not applicable.

Table 2. Quantitative analysis of reelin-, GAD67-, NeuN-, Iba1- or Cox2-immunoreactive cells in the hilus of the dentate gyrus of the male offspring at PND 21 exposed to MnCl₂4H₂O during the 2nd half of gestation and lactation periods in rats.

	MnCl ₂ 4H ₂ O in the diet			
	Control	32 ppm	160 ppm	800 ppm
No. of offspring examined ^a	10	10	10	10
Reelin (+) cell count (/mm ²)	68.7 \pm 26.8 ^b	83.4 \pm 12.5	88.8 \pm 19.3	92.7 \pm 12.9*
GAD67 (+) cell count (/mm ²)	32.0 \pm 7.7	39.5 \pm 11.1	39.4 \pm 15.5	34.5 \pm 10.1
NeuN (+) cell count (/mm ²)	314.5 \pm 41.4	332.0 \pm 35.3	322.7 \pm 43.6	291.2 \pm 53.8
Iba1 (+) cell count (/mm ²)	52.6 \pm 17.7	84.9 \pm 19.2*	72.8 \pm 13.6*	81.8 \pm 19.4*
Cox2 (+) cell count (/mm ²)	43.8 \pm 9.5	56.4 \pm 12.0	59.2 \pm 15.5*	54.7 \pm 15.0

* Significantly different from the control group by Dunnett's test (* P <0.05).

^a All identical 10 male offspring from 8 dams (one or two animals per dam) were subjected to immunohistochemical analyses in each group. Statistical analysis was performed using the litter as the experimental unit, and litter mean values were subjected to analysis on two offspring samples from the same dam.

^b Mean \pm SD.

Table 3. Quantitative analysis of reelin-, GAD67-, NeuN-, Iba1- or Cox2-immunoreactive cells in the hilus of the dentate gyrus of the male offspring at PND 77 exposed to MnCl₂4H₂O during the 2nd half of gestation and lactation periods in rats.

	MnCl ₂ 4H ₂ O in the diet			
	Control	32 ppm	160 ppm	800 ppm
No. of offspring examined ^a	10	10	10	10
Reelin (+) cell count (/mm ²)	24.7 ± 5.6 ^b	26.0 ± 9.9	20.3 ± 4.6	23.6 ± 6.2
GAD67 (+) cell count (/mm ²)	12.1 ± 5.6	12.2 ± 5.4	9.5 ± 4.9	12.1 ± 7.5
NeuN (+) cell count (/mm ²)	192.9 ± 30.3	201.2 ± 46.3	214.6 ± 28.2	218.6 ± 22.8
Iba1 (+) cell count (/mm ²)	64.2 ± 15.5	62.4 ± 15.3	60.5 ± 21.3	60.2 ± 14.0
Cox2 (+) cell count (/mm ²)	43.1 ± 13.8	47.2 ± 12.4	53.6 ± 15.9	44.8 ± 11.2

No significant difference in any treated group from the control group.

^aAll identical 10 male offspring from 8 dams (one or two animals per dam) were subjected to immunohistochemical analyses in each group. Statistical analysis was performed using the litter as the experimental unit, and litter mean values were subjected to analysis on two offspring samples from the same dam.

^bMean±SD.

Table 4. Quantitative analysis of Tbr2-, DCX- or GFAP-immunoreactive cells in the subgranular zone of the dentate gyrus of the male offspring at PND 21 exposed to MnCl₂4H₂O during the 2nd half of gestation and lactation periods in rats.

	MnCl ₂ 4H ₂ O in the diet			
	Control	32 ppm	160 ppm	800 ppm
No. of offspring examined ^a	10	10	10	10
Tbr2 (+) cell count (/mm)	7.3 ± 3.1 ^b	7.9 ± 3.0	8.2 ± 2.3	8.4 ± 1.8
DCX (+) cell count (/mm)	129.9 ± 21.7	142.7 ± 32.0	156.0 ± 19.6	162.2 ± 23.0*
GFAP (+) cell count (/mm)	2.5 ± 1.2	2.5 ± 0.7	2.6 ± 0.8	2.3 ± 0.9

* Significantly different from the control group by Dunnett's test (**P*<0.05).

^aAll identical 10 male offspring from 8 dams (one or two animals per dam) were subjected to immunohistochemical analyses in each group. Statistical analysis was performed using the litter as the experimental unit, and litter mean values were subjected to analysis on two offspring samples from the same dam.

^bMean±SD.

Table 5. Quantitative analysis of Tbr2-, DCX- or GFAP-immunoreactive cells in the subgranular zone of the dentate gyrus of the male offspring at PND 77 exposed to MnCl₂4H₂O during the 2nd half of gestation and lactation periods in rats.

	MnCl ₂ 4H ₂ O in the diet			
	Control	32 ppm	160 ppm	800 ppm
No. of offspring examined ^a	10	10	10	10
Tbr2 (+) cell count (/mm)	3.6 ± 1.6 ^b	4.0 ± 1.7	3.8 ± 1.6	3.3 ± 1.4
DCX (+) cell count (/mm)	17.8 ± 4.5	18.6 ± 3.9	20.7 ± 4.9	16.4 ± 3.4
GFAP (+) cell count (/mm)	3.8 ± 1.4	4.1 ± 1.5	4.0 ± 1.4	4.0 ± 1.4

No significant difference in any treated group from the control group.

^aAll identical 10 male offspring from 8 dams (one or two animals per dam) were subjected to immunohistochemical analyses in each group. Statistical analysis was performed using the litter as the experimental unit, and litter mean values were subjected to analysis on two offspring samples from the same dam.

^bMean±SD.

Table 6. Quantitative analysis of proliferating cells as detected by nuclear immunoreactivity of PCNA in the subgranular zone of the dentate gyrus of the male offspring at PND 21 exposed to MnCl₂4H₂O during the 2nd half of gestation and lactation periods in rats.

	MnCl ₂ 4H ₂ O in the diet			
	Control	32 ppm	160 ppm	800 ppm
No. of offspring examined ^a	10	10	10	10
PCNA (+) cell count (/mm)	3.1 ± 0.8 ^b	3.2 ± 1.4	3.2 ± 1.3	3.0 ± 1.0

No significant difference in any treated group from the control group.

^aAll identical 10 male offspring from 8 dams (one or two animals per dam) were subjected to immunohistochemical analyses in each group. Statistical analysis was performed using the litter as the experimental unit, and litter mean values were subjected to analysis on two offspring samples from the same dam.

^bMean±SD.

Table 7. Quantitative analysis of proliferating cells as detected by nuclear immunoreactivity of PCNA in the subgranular zone of the dentate gyrus of the male offspring at PND 77 exposed to MnCl₂4H₂O during the 2nd half of gestation and lactation periods in rats.

	Control	MnCl ₂ 4H ₂ O in the diet		
		32 ppm	160 ppm	800 ppm
No. of offspring examined ^a	10	10	10	10
PCNA (+) cell count (/mm)	1.1 ± 0.5 ^b	1.4 ± 1.0	1.3 ± 0.8	1.4 ± 0.9

No significant difference in any treated group from the control group.

^a All identical 10 male offspring from 8 dams (one or two animals per dam) were subjected to immunohistochemical analyses in each group. Statistical analysis was performed using the litter as the experimental unit, and litter mean values were subjected to analysis on two offspring samples from the same dam.

^b Mean ± SD.

Table 8. Quantitative analysis of apoptotic cells as detected by TUNEL method in the subgranular zone of the dentate gyrus of the male offspring at PND 21 exposed to MnCl₂4H₂O during the 2nd half of gestation and lactation periods in rats.

	Control	MnCl ₂ 4H ₂ O in the diet		
		32 ppm	160 ppm	800 ppm
No. of offspring examined ^a	10	10	10	10
Apoptotic cell count (/mm)	0.65 ± 0.62 ^b	0.43 ± 0.67	0.83 ± 1.10	0.79 ± 0.86

No significant difference in any treated group from the control group.

^a All identical 10 male offspring from 8 dams (one or two animals per dam) were subjected to immunohistochemical analyses in each group. Statistical analysis was performed using the litter as the experimental unit, and litter mean values were subjected to analysis on two offspring samples from the same dam.

^b Mean ± SD.

Table 9. Quantitative analysis of apoptotic cells as detected by TUNEL method in the subgranular zone of the dentate gyrus of the male offspring at PND 77 exposed to MnCl₂4H₂O during the 2nd half of gestation and lactation periods in rats.

	Control	MnCl ₂ 4H ₂ O in the diet		
		32 ppm	160 ppm	800 ppm
No. of offspring examined ^a	10	10	10	10
Apoptotic cell count (/mm)	0.06 ± 0.13 ^b	0.10 ± 0.22	0.06 ± 0.13	0.03 ± 0.10

No significant difference in any treated group from the control group.

^a All identical 10 male offspring from 8 dams (one or two animals per dam) were subjected to immunohistochemical analyses in each group. Statistical analysis was performed using the litter as the experimental unit, and litter mean values were subjected to analysis on two offspring samples from the same dam.

^b Mean ± SD.

Table 10. Real-time RT-PCR analysis in the hippocampus of male offspring at PND 21 exposed to MnCl₂ · 4H₂O during the 2nd half of gestation and lactation periods in rats.

	MnCl ₂ 4H ₂ O in the diet			
	Control	32 ppm	160 ppm	800 ppm
No. of offspring examined ^a	6	6	6	5
Cox2	1.02 ± 0.20 ^b	1.23 ± 0.18	1.16 ± 0.15	0.85 ± 0.23
Il1α	1.02 ± 0.18	0.93 ± 0.25	1.58 ± 0.49	2.41 ± 1.37**
Il1β	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.18	1.01 ± 0.10	1.10 ± 0.17
Il6	1.01 ± 0.16	0.87 ± 0.24	1.41 ± 0.39	2.31 ± 1.17**
Nos2	1.07 ± 0.49	0.93 ± 0.30	1.35 ± 0.55	2.60 ± 1.81*
Tnfa	1.05 ± 0.36	0.82 ± 0.33	1.42 ± 0.26	2.06 ± 1.04*
DCX	1.02 ± 0.25	1.06 ± 0.32	0.93 ± 0.11	0.87 ± 0.14
NeuroD1	1.00 ± 0.10	1.03 ± 0.18	1.08 ± 0.13	1.23 ± 0.26
Pax6	1.03 ± 0.28	0.76 ± 0.12	1.05 ± 0.26	1.24 ± 0.41
TUC4	1.01 ± 0.18	0.98 ± 0.17	0.88 ± 0.09	0.86 ± 0.13
Reelin	1.03 ± 0.29 ^b	1.04 ± 0.12	0.91 ± 0.21	0.86 ± 0.17
VLDLR	1.02 ± 0.26	1.12 ± 0.25	0.88 ± 0.18	0.83 ± 0.07
ApoER2	1.03 ± 0.30	0.99 ± 0.15	0.93 ± 0.15	0.88 ± 0.14
Dab1	1.02 ± 0.21	0.96 ± 0.12	1.03 ± 0.36	0.96 ± 0.28

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

Abbreviations: Cox, cyclooxygenase; Il, interleukin; Nos2, nitric oxide synthase 2, inducible; Tnf, tumor necrosis factor; DCX, doublecortin; NeuroD1, neurogenic differentiation 1; Pax6, paired box 6; TUC4, dihydropyrimidinase-like 3; VLDLR, very low density lipoprotein receptor; ApoER2, low density lipoprotein receptor-related protein 8; Dab1, disabled homolog 1.

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

^b Mean±SD.

Table 11. Serum levels of thyroid-related hormones of male offspring and dams exposed to MnCl₂ · 4H₂O during the 2nd half of gestation and lactation periods in rats.

	MnCl ₂ 4H ₂ O in the diet		
	Control	800 ppm	1600 ppm
Dams			
No. of dams examined	6	6	6
T ₃ (ng/mL)	1.02 ± 0.06 ^b	0.96 ± 0.11	1.07 ± 0.15
T ₄ (μg/dL)	5.97 ± 1.96	5.87 ± 0.79	5.55 ± 0.88
TSH (ng/mL)	2.79 ± 1.80	3.84 ± 1.51	2.83 ± 1.88
Offspring			
PND 21			
No. of offspring examined ^a	10	10	10
T ₃ (ng/mL)	1.47 ± 0.16	1.27 ± 0.14*	1.27 ± 0.20*
T ₄ (μg/dL)	6.35 ± 0.61	5.44 ± 0.96*	4.77 ± 0.73**
TSH (ng/mL)	2.46 ± 0.93	4.29 ± 2.17*	2.92 ± 1.23
PND 77			
No. of offspring examined ^a	10	10	10
T ₃ (ng/mL)	1.12 ± 0.21	1.04 ± 0.12	1.11 ± 0.12
T ₄ (μg/dL)	6.19 ± 1.27	5.64 ± 1.44	6.03 ± 1.09
TSH (ng/mL)	5.02 ± 2.55	4.11 ± 1.83	2.83 ± 1.62

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

Abbreviations: PND, postnatal day; T₃, triiodothyronin; T₄, thyroxin; TSH, thyroid-stimulating hormone

^a One male offspring of each sex per dam (n = 6/group) were subjected to measurement at each time point.

^b Mean±SD.

Table 12. Real-time RT-PCR analysis in the hippocampus of offspring at PND 21 exposed to MnCl₂ · 4H₂O during the 2nd half of gestation and lactation periods in mice.

	0 ppm MnCl ₂ 4H ₂ O		800 ppm MnCl ₂ 4H ₂ O	
	Relative transcript level normalized by		Relative transcript level normalized by	
	Hprt	Gapdh	Hprt	Gapdh
No. of offspring examined ^a	3	3	3	3
Reelin	1.02 ± 0.23 ^b	1.23 ± 0.75	2.76 ± 0.35**	4.09 ± 0.97**
ApoER2	1.01 ± 0.14	1.08 ± 0.47	1.63 ± 0.29**	2.41 ± 0.39**
VLDLR	1.00 ± 0.05	1.10 ± 0.52	0.93 ± 0.09	1.38 ± 0.10
GAD67	1.00 ± 0.04	1.13 ± 0.58	1.86 ± 0.06**	2.76 ± 0.45**
Pax6	1.05 ± 0.40	1.03 ± 0.26	1.13 ± 0.40	1.66 ± 0.54
Tbr2	1.06 ± 0.47	1.02 ± 0.21	1.22 ± 0.48	1.80 ± 0.66
TUC4	1.00 ± 0.06	1.12 ± 0.06	0.47 ± 0.04**	0.69 ± 0.03**

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

Real-time PCR analysis of Hprt and Gapdh was performed in the analysis of each target gene.

Abbreviations: Hprt, Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; Gapdh, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; ApoER2, Apolipoprotein E receptor 2; Vldlr, very-low-density lipoprotein receptor; Pax6, paired box 6; Tbr2, t box brain 2; TUC4, dihydropyrimidinase-like 3.

^a One male offspring per dam (n = 3/group) was subjected to analysis.

^b Mean±SD.

Table 13. Hypermethylated genes, CpG island located in the transcription site, subjected to methylation-specific qPCR analysis in the hippocampus of offspring at PND 21 exposed to MnCl₂ · 4H₂O during the 2nd half of gestation and lactation periods in mice.

Probe No	Genome location	Feature	Description	Accession No.
CHR15FS078031394	Chr 15: 78031394	Pvalb	parvalbumin	MGI:97821
CHR05FS137798762	Chr 05: 137798762	Actl6b	actin-like 6B	MGI:1933548
CHR15FS102818276	Chr 15: 102818276	Hoxc8	homeo box C8	MGI:96198
CHRXFS165333432	Chr X: 165333432	Mid1	midline 1	MGI:1100537
CHR07FS024715229	Chr 7: 24715229	Atpla3	ATPase, NA+/K+ transporioning, alpha 3 polypeptide	MGI:88107
CHR16FS064793409	Chr 16: 64793409	Cggbp1	CGG triplet repeat binding protein 1	MGI:2146370
CHR13FS078662694	Chr 13: 78662694	Nr2f1	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 1	MGI:135245

Table 14. Serum levels of thyroid-related hormones of male offspring at PND 21 to MnCl₂ · 4H₂O during the 2nd half of gestation and lactation periods in mice.

	MnCl ₂ 4H ₂ O in the diet	
	Control	800 ppm
No. of pups examined ^a	40 (12)	40 (12)
T ₃ (ng/dL)	53.7 ± 7.0 ^b	48.9 ± 6.8
T ₄ (µg/dL)	3.62 ± 0.70	3.16 ± 0.48*
TSH (ng/dL)	0.011 ± 0.006	0.013 ± 0.004

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

Abbreviations: PND, postnatal day; T3, triiodothyronin; T4, thyroxin; TSH, thyroid-stimulating hormone

^a Number in parenthesis represents that of pooled samples: 3-4 animal sera/sample.

^b Mean±SD.