

平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

化学物質の子どもへの影響評価に関する研究

- 発生・発達期の脳や免疫系が示す高感受性の責任標的の同定と、
それに基づく試験スキームの最適化 -

(H23-化学-一般-002)

分担研究報告書

-げっ歯類一生涯試験の検証-

研究分担者 太田亮 (財)食品薬品安全センター秦野研究所 毒性部長

研究協力者 根倉司、大向英夫、香取輝美、新藤智子 (財)食品薬品安全センター秦野研究所

研究要旨

ビスフェノール A (BPA) またはジエチルスチルベストロール (DES) を新生児期に経口投与したマウスを用いて、遅発性の低用量影響を検索した。初年度に実施した性成熟観察に加え、本年度は 14 週齢で免疫学的検査、24 週齢から性周期を観察し、さらに 50 週齢で再度、免疫学的検査を実施した。これまでのところ性周期への影響は観察されていないが、BPA および DES 投与群の雄マウスに体重増加抑制、雌マウスに体重増加傾向が遅発性に認められ、免疫学検査では BPA 投与群のみに T 細胞分化への影響が観察されている。

A. 研究目的

化学物質の子どもへの有害性評価法の確立を目的に、内分泌かく乱作用を確定する「齧歯類一生涯試験法」の開発を行ってきた。子どもの発達期は、受容体シグナルをかく乱する程度の低用量暴露により、神経-内分泌-免疫系に不可逆的な変化を及ぼす可能性が示唆されており、化学物質の低用量域での子どもに対する有害性評価法の確立は重要である。本研究は、「厚生労働省内分泌かく乱化学物質試験スキーム」(試験スキーム)の拡充と確定試験法の確立を目的に、これまで「齧歯類一生涯試験法」により見出された性周期、免疫機能および体重における遅発影響の再現性を確認する実験を試みた。得られた結果は、OECD が提唱する延長一世代試験(TG415)のガイドラインにも情報提供ができるものと期待される。

B. 研究方法

1. 投与物質

ビスフェノール A (略称: BPA、CAS 番号: 80-05-7、純度: 99.9%、ロット番号: 009X1493、入手先: 関東化学工業株式会社) およびジエチルスチルベストロール (略称: DES、CAS 番号: 56-53-1、純度: 99.5%、ロット番号: 096K1041、入手先: シグマアルドリッチジャパン株式会社)

2. 使用動物

C57BL/6J マウス (入手先: 日本チャールス・リバー社、購入数: 妊娠雌 60 匹、群数および母動物数: 5 群、12 匹/群)

3. 飼育条件

温度 21.0~25.0°C、湿度 40.0~75.0%、明暗サイクル 7 時点灯、19 時消灯の条件下で、床敷としてペパークリーン (日本エスエルシー社) を入れた TPX 樹脂

製ケージ(143W×293D×148H mm、日本チャールス・リバー)に収容した。固型 Phytoestrogen-low diet (PLD)および 水道水(秦野市水道局給水)を自由摂取させた。

4. 動物愛護

全ての実験操作は、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」および「厚生労働省が所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」を遵守し、「財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所動物実験に関する指針」に基づき実施した(動物実験承認番号:1110278A)。

5. 投与方法

投与量、群構成は以下の通りで、生後 1 日～生後 5 日まで 1 日 1 回、マイクロシリンジおよび新生児用胃管を用いて強制的に経口投与した。

投与物質	投与量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	投与容量 (mL/kg)	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
オリーブ油	0	10	0
BPA	5	10	0.5
BPA	50	10	5
DES	0.002	10	0.0002
DES	0.02	10	0.002

6. 試験操作・検査・測定

- 1) 哺育児体重: 哺育 1～5(毎日)、7、14、21 日に litter 重量を測定した。
- 2) 同腹児数の調整: 実施しなかった。
- 3) 離乳: 哺育 21 日に母動物から全哺育児を離乳させ、以下の検査に供した。
- 4) 一般状態: 毎日 1 回観察した。
- 5) 体重: 3 週齢以降 10 週齢時まで毎週 1 回、10 週齢以降は隔週 1 回、24 週齢以降は 4 週間毎に測定した。
- 6) 性成熟: 膣開口は、生後 26 日から完成するまで毎日観察し、完成日に体重を測定した。包皮分離は、生後 28 日から完成するまで毎日観察し、完成日に体重を測定した。

7) 性周期: 24 週齢から 2 週間間隔で連日 2 週間、膣スメア標本を作製し、49 週齢まで性周期を観察した。

8) 免疫学検査 I : 14 および 50 週齢の各時期に、雌雄とも 6 匹以上/群(原則として各腹から雌雄各 1 匹)について、ヒツジ赤血球 (SRBC) を静脈内投与し、血中の SRBC 抗体価を測定した。

9) 免疫学検査 II : 14 および 50 週齢の各時期に、雌雄とも 6 匹以上/群(原則として各腹から雌雄各 1 匹)について、以下の検査を行った。

①器官重量: 胸腺および脾臓の重量を測定した。

②イムノフェノタイピング: 胸腺あるいは脾臓の細胞を CD4 抗体および抗 CD8 抗体で染色し、フローサイトメーターを用いて測定した。

③リンパ球幼若化反応: 胸腺あるいは脾臓の細胞をマイトジェン添加培養液中中で培養し、細胞増殖活性を調べた。

④白血球数: 採取した血液の白血球数及び白血球百分率の検査を行った。

⑤サイトカイン測定: 脾臓および胸腺の細胞を ConA 添加培養液中中で 72 時間培養し、培養液中の IFN- γ 、IL-4 濃度を、ELISA キットを用いて測定した。

C. 研究結果

生後 1 日から 24 週齢までの体重推移に、BPA あるいは DES 投与の影響は認められなかった。

雌の膣開口および雄の陰茎包皮分離の時期に、対照群と BPA あるいは DES 投与群との間で有意差は認められなかった。

28 週齢以降の体重は、BPA および DES 投与群の雄マウスに体重増加抑制(Fig.1)、雌マウスに体重増加傾向(Fig.2)が観察された。

24 週齢～49 週齢まで実施した性周期観察では、BPA あるいは DES 投与の影響を示唆する変化は認められなかった(Fig.3)。

14 週齢で実施した免疫学検査では、BPA 投与群

の雌マウスに胸腺細胞の T 細胞分化への影響が示唆されたが、DES 投与群には同様の変化は認められなかった(Fig.4)。

D. 考察・結論

子どもの発達期における低用量暴露が、成長後の性周期、免疫機能および体重推移に及ぼす「遅発影響」を検証するために、5または50 µg/kgのBPA、あるいは0.02または0.002 µg/kgのDESをC56BL/6Jマウスの新生児期に強制経口投与した。

以前、新生児期に0.005~5 µg/kgのDESをマウスに経口投与して実施した一生涯試験においては、0.05 µg/kg以上の投与群の雌マウスに、過剰な体重増加が観察されたが、今回の試験においても、BPA投与群およびDES投与群の雌マウスに遅発性の体重増加傾向が観察され、さらにBPA投与群およびDES投与群の雄マウスにおいては、遅発性の体重増加抑制がみられた。これらの結果から、新生児期の化学物質暴露は、成長後の体重推移に影響を及ぼす可能性が示唆された。

今回の実験では24週齢~49週齢までの性周期観察において、BPAあるいはDES投与の影響を示唆する変化は認められなかった。したがって、今回使用した被験物質の濃度は、性周期に遅発性影響を及ぼさない量と推察された。

以前、実施した新生児期にDESを投与したマウスでは、IgM抗体産生能が用量に依存して低下し、0.5 µg/kg以上のDES投与群で有意差が認められているが、今回の免疫学検査においては、現在までのところDES投与の影響は認められていない。しかしながら、BPA投与群では、14週齢の雌マウスにT細胞分化への影響が示唆されたことから、DESとは機序の異なる影響が、免疫機能に及んでいるものと推察された。今後、50週齢で実施した免疫学検査の結果を分析し、14週齢で認められた変化の再現性と遅発性影響について確認し、これらの指標が、化学物質の低用量影響

を評価する上で有用な手段となるかを検証したいと考えている。

F. 発表論文, 学会発表

太田亮、大沢基保：周産期のアレルギ－
Developmental Immunotoxicology (DIT)、周産期医学、41:5:609-613 (2011)

Ohta R, Ohmukai H, Marumo H, Shindo T, Nagata T, Ono H. Delayed reproductive dysfunction in female rats induced by early life exposure to low-dose diethylstilbestrol. *Reprod Toxicol.* 34(3):323-330. (2012)

Ohta R, Takagi A, Ohmukai H, Marumo H, Ono A, Matsushima Y, Inoue T, Ono H, Kanno J. Ovariectomized mouse uterotrophic assay of 36 chemicals. *J Toxicol Sci.* 37(5):879-89. (2012)

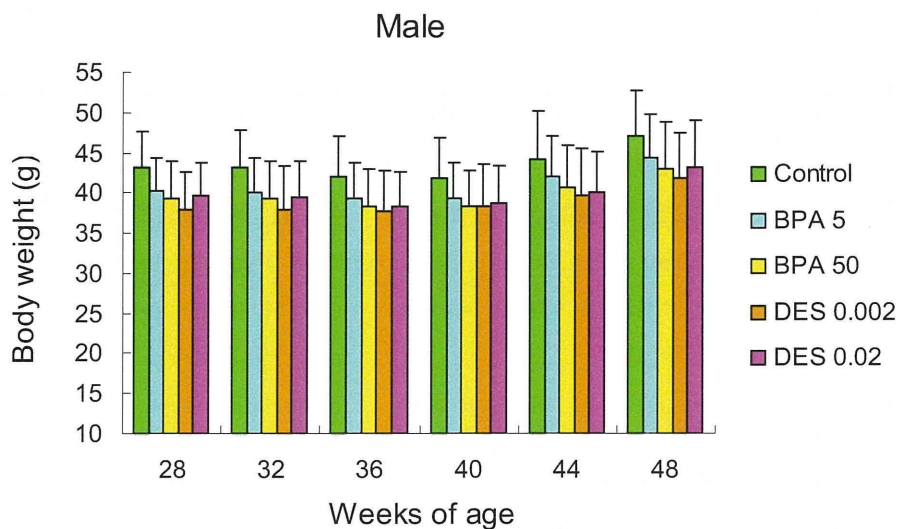


Fig. 1 ビスフェノール A (BPA) またはジエチルスチルベストロール (DES) を新生児期に経口投与した雄マウスの体重推移

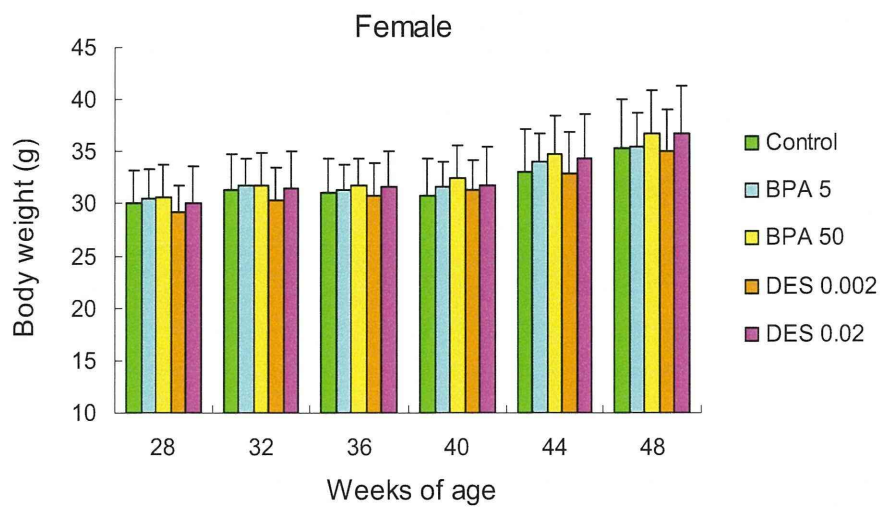
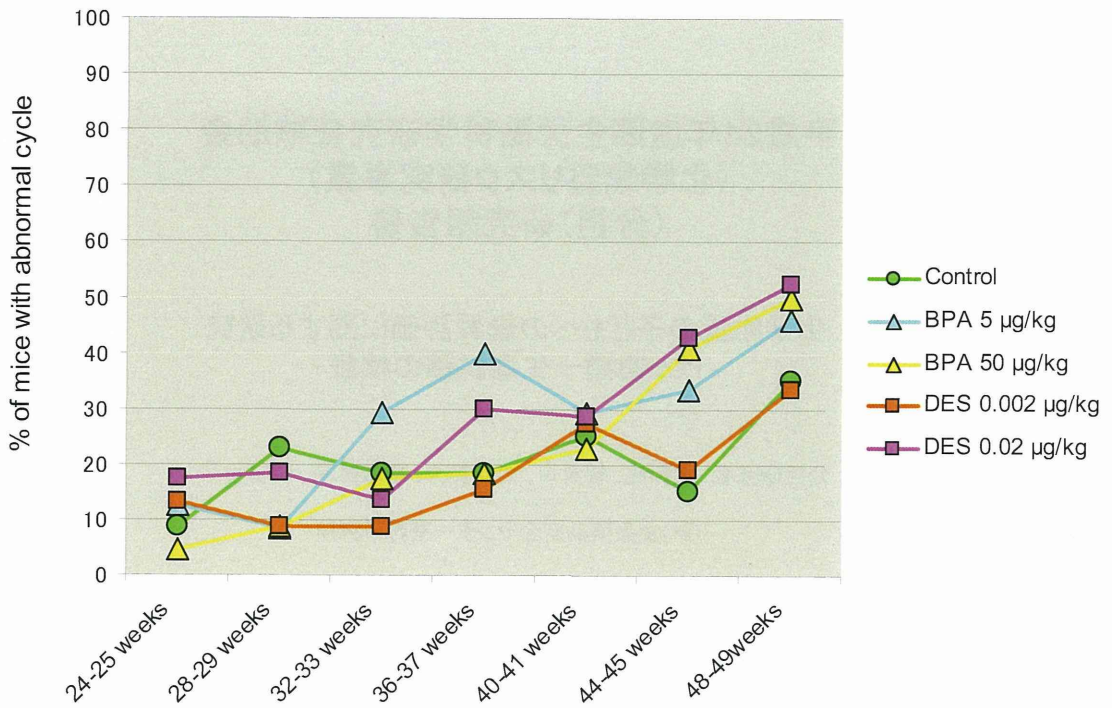


Fig. 2 ビスフェノール A (BPA) またはジエチルスチルベストロール (DES) を新生児期に経口投与した雌マウスの体重推移



経口投与した雌マウスの性周期

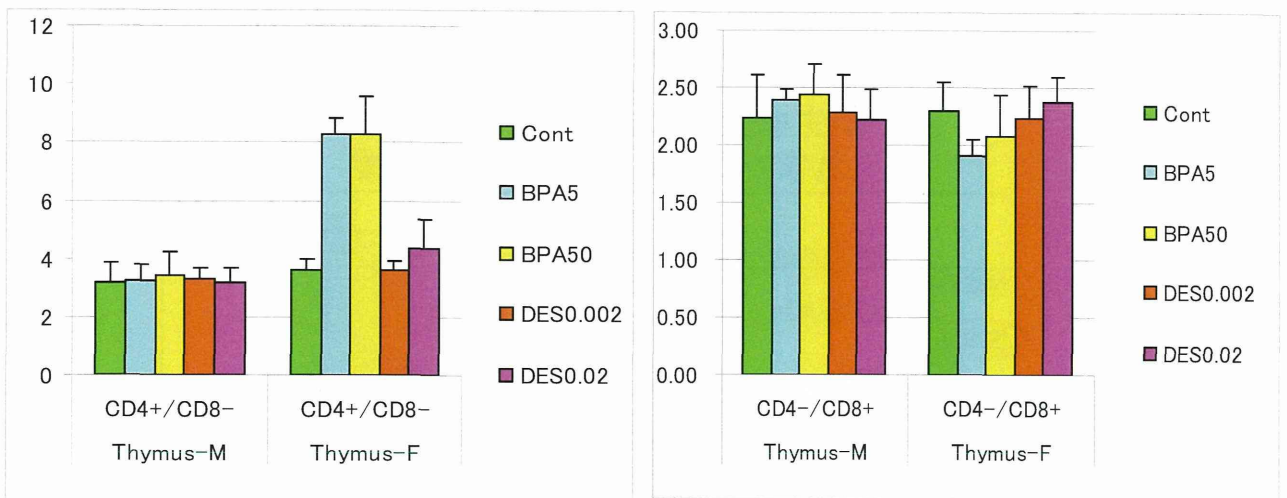


Fig. 4 ビスフェノール A(BPA)またはジエチルスチルベストロール (DES)を新生児期に経口投与したマウスの免疫学検査結果

平成24年度厚生労働科学研究費補助金
 (化学物質リスク研究事業)
 (分担)研究報告書

化学物質の子どもへの影響評価に関する研究
 -げっ歯類一生涯試験の検証-

分担研究者 太田亮、根倉司、大向英夫、香取輝美、新藤智子
 (財)食品薬品安全センター-秦野研究所

新生児投与による一生涯試験で
 これまでに認められたDESの影響

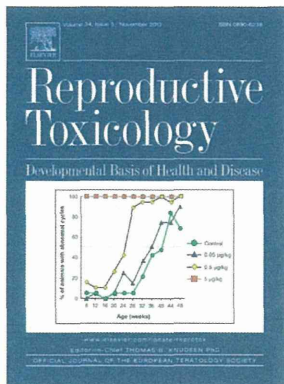
用量 (µg/kg)	マウス				ラット		
	0.005	0.05	0.5	5	0.05	0.5	5
性成熟							
陰開口の遅延/早熟	-	-	-	▽	-	-	△
性周期							
連続発情	-	-	-	●	-	-	●
遅発性の性周期異常	-	-	●	-	-	●	-
体重推移							
雌の体重増加	-	☆	☆	☆	-	-	-
免疫検査							
雌の抗体産生能低下	-	-	●	●	●	●	●
生存率							
雌の生存日数短縮	-	●	●	●	-	-	●
腫瘍							
下垂体腫瘍の早発	-	-	●	●	-	-	●

: 低用量域
△: マウス-ラット間で結果が逆転した影響
●: マウス-ラット間で結果が一致した影響
☆: マウスのみで見られた影響



Delayed reproductive dysfunction in female rats induced by early life exposure to low-dose diethylstilbestrol

Ryo Ohta*, Hideo Ohmukai, Hideki Marumo, Tomoko Shindo, Tomoko Nagata, Hiroshi Ono
 *Hattori Research Institute, Food and Drug Safety Center, 729-5 Ochiai, Hadama, Kanagawa 257-8523, Japan

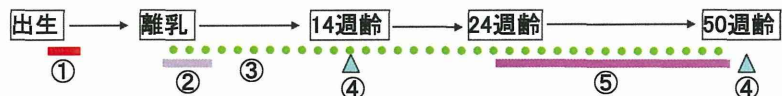


子宮内・経乳汁暴露による一生涯試験で これまでに報告された性周期への影響

動物	投与物質	用量(µg/kg)	性周期への影響
ラット	BPA	5, 50, 40000, 400000	7ヶ月齢で性周期異常 (5~400000 µg/kg)
ラット	BPA	0.5, 5, 50	Pre-middle age で性周期異常 (0.5~50 µg/kg)
ラット	DES	0.0002, 0.002, 0.02	異常性周期の早期化 (0.002~0.02 µg/kg)
ラット	ゲニスタイン	40, 200, 1000	性周期に異常なし

マウスを用いた低用量化学物質の 新生児投与による免疫毒性試験

【方法】 動物種、系統 マウス、C57BL/6J
経路 新生児経口投与
投与物質と投与量 BPA 5、50 µg/kg
DES 0.002、0.02 µg/kg

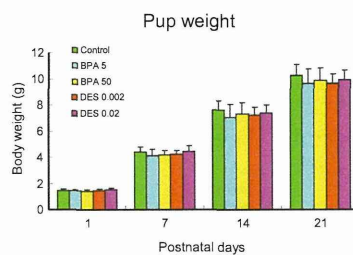


- ① 投与 生後1～5日 新生児に強制経口投与
- ② 性成熟 3～6週齢 膣開口時期、陰茎包皮分離を観察
- ③ 体重 3～48週齢 3～10週齢まで毎週1回、10週齢以降は隔週、24週齢以降は4週間毎に測定
- ④ 免疫検査 14、50週齢 ヒツジ赤血球に対する抗体産生能、
イムノフェタイング、リンパ球幼若化反応など
- ⑤ 性周期 24～48週齢 2週間間隔で連日2週間観察

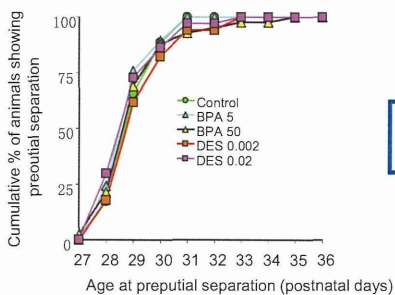
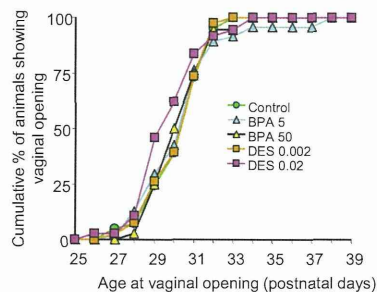
新生児経口投与



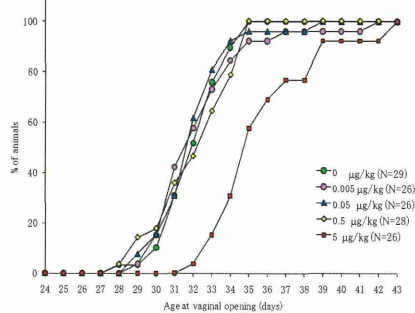
新生児に強制経口投与



性成熟

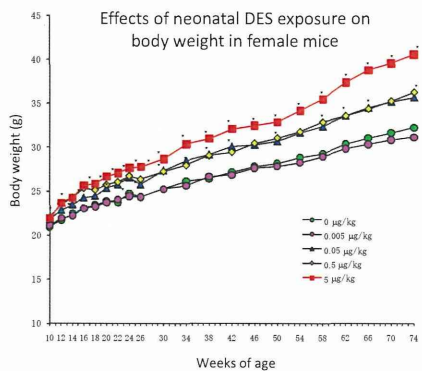
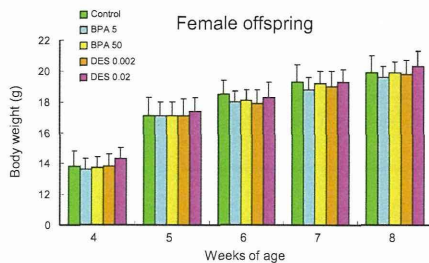
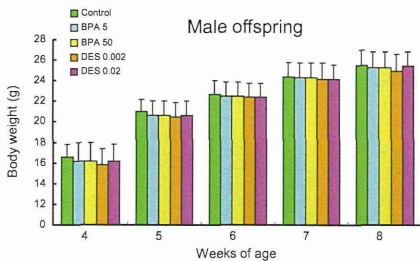


Effects of neonatal DES exposure on puberty in female mice



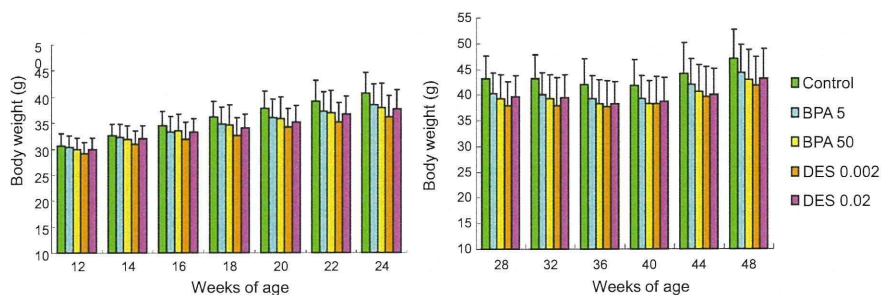
性成熟にBPAあるいはDES投与の影響は認められなかった。

体重推移



体重推移

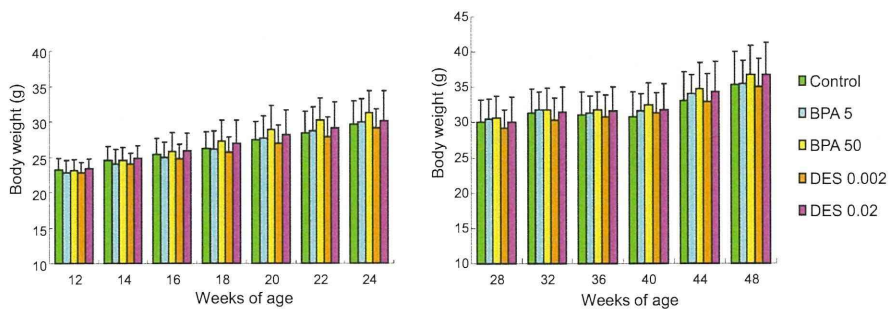
Male offspring



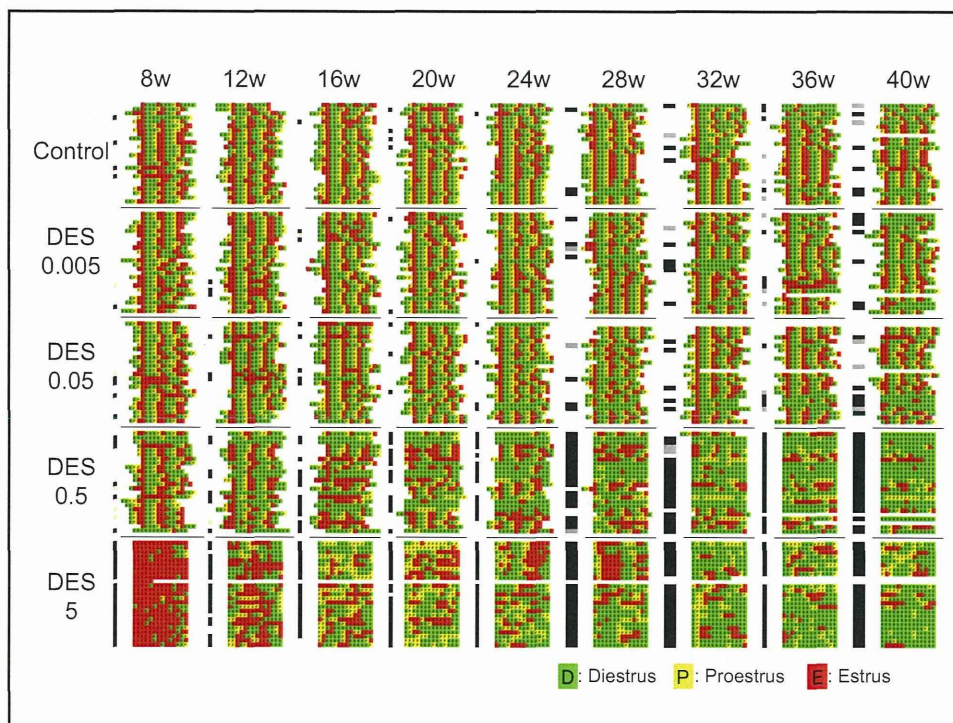
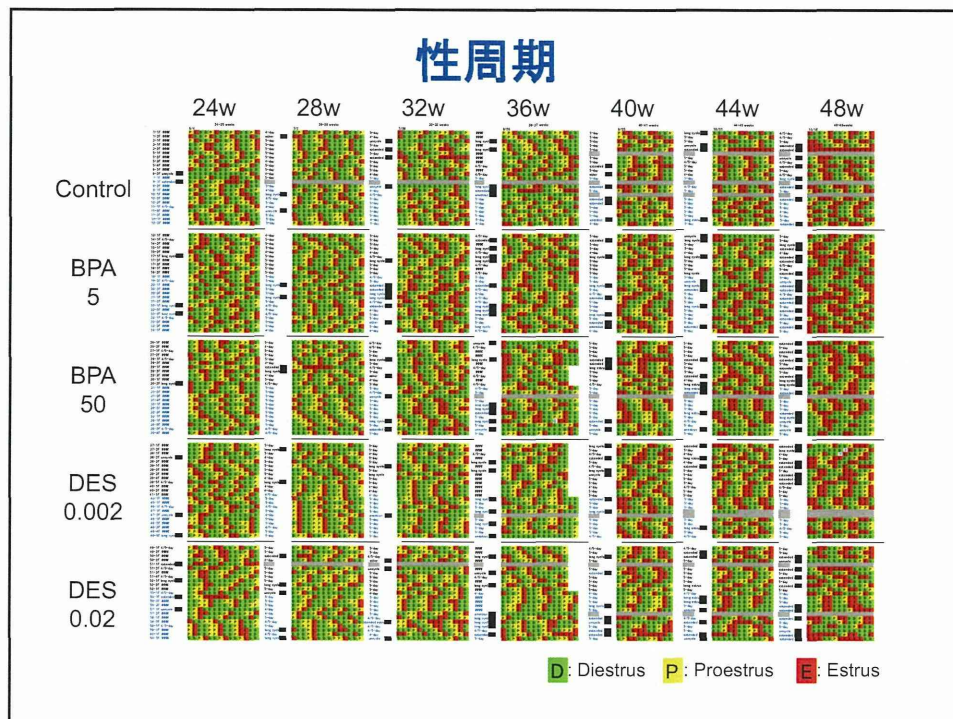
雄マウスでは、BPAおよびDES投与群で体重増加の抑制が観察された。

体重推移

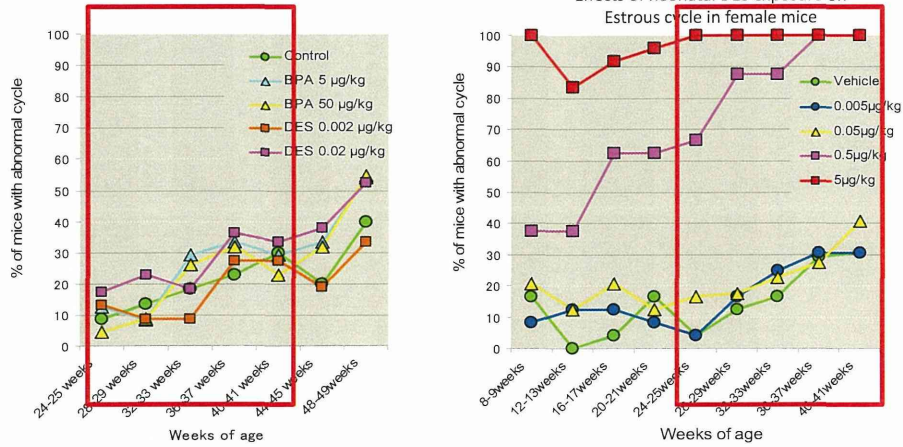
Female offspring



雌マウスでは、BPAおよびDES投与群で体重増加傾向が観察された。

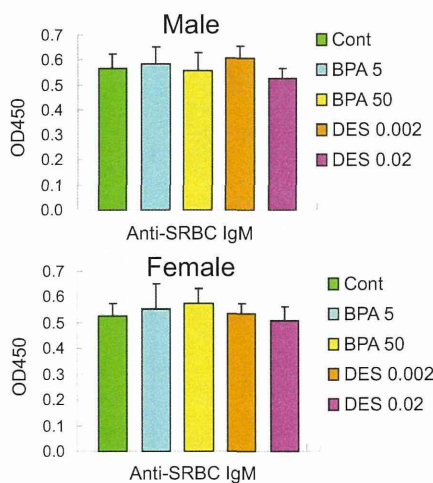


性周期



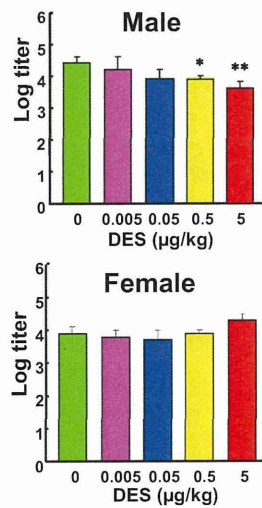
性周期観察では、BPAあるいはDES投与の影響を示唆する変化は認められなかった。

免疫検査(抗体産生能,14週齢)

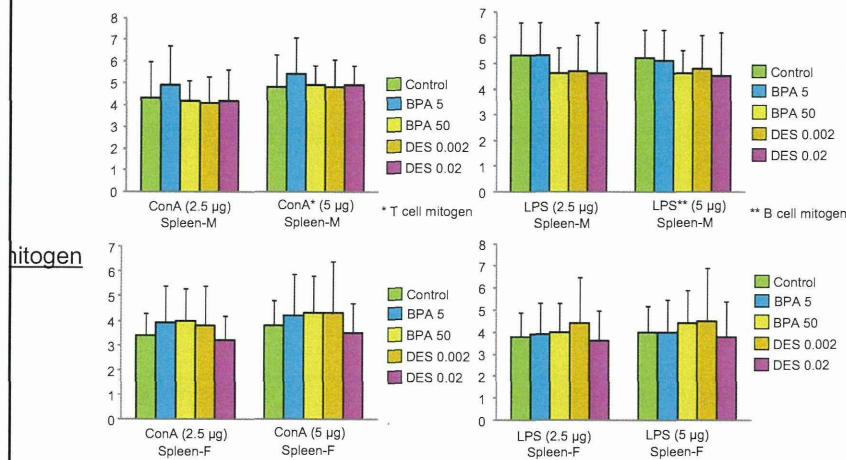


抗体産生能に、BPAあるいはDES投与の影響は認められなかった。

Effects of neonatal DES exposure on Antibody response to SRBC in mice

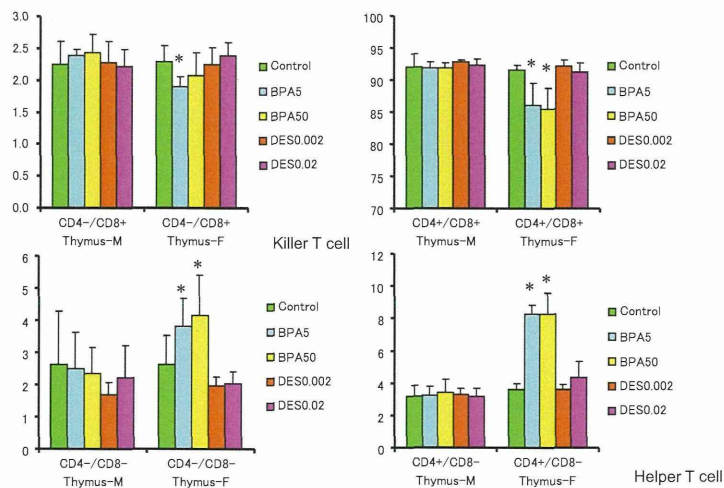


免疫検査(リンパ球幼若化反応,14週齢)



リンパ球幼若化反応に、BPAあるいはDES投与の影響は認められなかった。

免疫検査(免疫フェノタイプ,14週齢)



BPA投与群の雌マウスに胸腺細胞のT細胞分化への影響が示唆された。DES投与群には同様の変化は認められなかった。

まとめ

1. 新生児期の化学物質暴露は、成長後の体重推移に影響を及ぼす可能性が示唆された。
2. 今回使用した投与物質の濃度では、性周期に遅発性影響を及ぼさないと推察された。
3. BPA投与群では、雌マウスにT細胞分化への影響が示唆されたことから、DESとは機序の異なる影響が、免疫機能に及んでいるものと推察された。



今後、50週齢で実施した免疫学検査の結果を分析して、14週齢で認められた変化の再現性と遅発性影響について確認し、これらの指標が、化学物質の低用量影響を評価する上で有用な手段となるかを検証する。

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Nagao T, Komada M, Kagawa N.	Newly developed mouse newborn behavioral testing method for evaluating the risk of neurotoxicity of environmental toxicants.	J Appl Toxicol.		doi:10.1002/jat.2802.	2012
Nagao T, Kagawa N, Saito Y, Komada M.	Developmental effects of oral exposure to diethylstilbestrol on mouse placenta.	J Appl Toxicol.		doi:10.1002/jat.2766.	2012
Komada M, Asai Y, Morii M, Matsuki M, Sato M, Nagao T.	Maternal bisphenol A oral dosing relates to the acceleration of neurogenesis in the developing neocortex of mouse fetuses.	Toxicology	295	31-38	2012
Ishimaru N, Yamada A, Nitta T, Arakaki R, Lipp M, Takahama Y, Hayashi Y.	CCR7 with S1P1 signaling through AP-1 for migration of Foxp3+ regulatory T-cells controls autoimmune exocrinopathy.	Am J Pathol	180	199-208	2012
Izawa T, Kondo T, Kurosawa M, Oura R, Matsumoto K, Tanaka E, Yamada A, Arakaki R, Kudo Y, Hayashi Y, Ishimaru N.	Fas-independent T-cell apoptosis by dendritic cells controls autoimmune arthritis in MRL/lpr mice.	PLoS One	7(12)	e48798	2012
Oura R, Arakaki R, Yamada A, Kudo Y, Tanaka E, Hayashi Y, Ishimaru N.	Induction of rapid T cell death and phagocytic activity by Fas-deficient <i>lpr</i> macrophages.	J Immunol		doi:10.4049/jimmunol.1103794.	2012
Miyagawa S, Yatsu R, Sudo T, Igarashi K, Kanno J, Iguchi T.	Irreversible effect of diethylstilbestrol on reproductive organs and current approach for epigenetic effects of endocrine disrupting chemicals.	Toxicol Epigenet.		in press	2012
Kakuta H, Tanaka M, Chambon P, Watanabe H, Iguchi T, Sato T.	Involvement of gonadotropins in the induction of hypertrophy-hyperplasia in the interstitial tissues of ovaries in neonatally diethylstilbestrol-treated mice.	Reprod Toxicol.	33	35-44	2012
Maekawa T, Sakuma A, Taniuchi S, Ogo Y, Iguchi T, Takeuchi S, Takahashi S.	Transforming growth factor- α mRNA expression and its possible roles in mouse endometrial stromal cells.	Zool Sci.	29	377-383	2012
Nakajima T, Iguchi T, Sato T.	Hedgehog signaling plays roles in epithelial cell proliferation in the neonatal mouse uterus and vagina.	Cell Tiss Res.	348	239-247	2012
Nakamura T, Miyagawa S, Katsu Y, Mizutani T, Sato T, Takeuchi T, Iguchi T, Ohta Y.	P21 and Notch signalings in the persistently altered vagina induced by neonatal diethylstilbestrol exposure in mice.	J Vet Med Sci.		doi:10.1292/jvms.12-0182.	2012
Nakamura T, Miyagawa S, Katsu Y, Sato T, Iguchi T, Ohta Y.	Sequential changes in the expression of Wnt- and Notch-related genes in the vagina and uterus of ovariectomized mice after estrogen exposure.	In Vivo	26	899-906	2012

Nakamura T, Miyagawa S, Katsu Y, Watanabe H, Mizutani T, Sato T, Morohashi K, Takeuchi T, Iguchi T, Ohta Y.	WNT family genes and their modulation in the ovary-independent and persistent vaginal epithelial cell proliferation and keratinization induced by neonatal diethylstilbestrol exposure in mice.	Toxicology	296	13-19	2012
Taylor J.A, Richter C.A, Suzuki A, Watanabe H, Iguchi T, Coser K.R, Shioda T, vom Saal F.S.	Dose-related estrogen effects on gene expression in fetal mouse prostate mesenchymal cells.	PLoS One	7(10)	e48311	2012
Ohta R, Ohmukai H, Marumo H, Shindo T, Nagata T, Ono H.	Delayed reproductive dysfunction in female rats induced by early life exposure to low-dose diethylstilbestrol.	Reprod Toxicol.	34(3)	323-330	2012
Ohta R, Takagi A, Ohmukai H, Marumo H, Ono A, Matsushima Y, Inoue T, Ono H, Kanno J.	Ovariectomized mouse uterotrophic assay of 36 chemicals.	J Toxicol Sci.	37(5)	879-89	2012

IV. 研究成果の刊行物・別刷り

Newly developed mouse newborn behavioral testing method for evaluating the risk of neurotoxicity of environmental toxicants

Tetsuji Nagao^{a*}, Nao Kagawa^b and Munekazu Komada^c

ABSTRACT: Although there have been a vast number of behavioral toxicology studies carried out on adult mice and rats, there have been few neurobehavioral studies utilizing their newborn animals. Thus, we developed a mouse newborn behavioral testing method for evaluating the risk of neurotoxicity of chemicals, by means of determining the newborn's activity using the tare function of an analytical balance. The unstable weighing values resulting from movement of the newborn on the balance recorded by a personal computer every 0.1 s, and the total activities of a newborn from the start time of weighing to individual times of evaluation were calculated. In addition, we confirmed the usefulness of our method by determining the activity of mouse newborns with microcephaly induced by prenatal exposure to a neurotoxicant, methylnitrosourea. Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: behavioral test; mouse newborn; neurotoxicity; activity; electric balance

Introduction

The estimated frequencies of neurodevelopmental disorders, including autism, dyslexia, attention-deficit hyperactivity disorder, decreased intelligence and mental retardation, in children are relatively high, i.e. around 12% (Hass, 2006). The central nervous system appears to be especially susceptible to toxic insults during development and there is evidence that functional changes can be induced at a lower exposure level than those resulting in toxicity in adults (Kimmel, 1988; Bearer, 2000). The tragic methyl mercury poisoning of humans in Minamata Bay in the 1950s led to animal research on the general neurotoxicity and prenatal effects of methyl mercury. The results showed that the embryo/fetus was more susceptible to exposure than adult animals, and that exposed animals exhibited similar adverse effects as those reported in humans (Burbacher *et al.*, 1990).

Some of the developmental neurotoxicants are structural teratogens as well, but the behavioral dysfunctions may be more serious than the structural defects. Investigations demonstrate that, under certain circumstances, neurobehavioral dysfunction in children can be detected at a lower dose than congenital malformations (ethanol) or in the complete absence of malformations (polychlorinated biphenyl) (Francis *et al.*, 1990).

Although there have been a vast number of animal toxicology studies carried out on pregnant animals including embryos/fetuses and mature animals, there is a paucity of reports on animal toxicology studies utilizing newborn, infant and juvenile animals. Thus, we developed a mouse newborn neurobehavioral testing method; it involves quantitative determination of a newborn animal's activity automatically using the tare function of an analytical balance, in order to evaluate the risks of neurotoxicities of various environmental toxicants including low-dose endocrine-disrupting chemicals.

Materials and Methods

Animals

ICR mice at 8 weeks old purchased from CLEA (Osaka, Japan) were used after acclimation for 2 weeks. The experimental protocols were approved by the Animal Care and Use Committee of Kinki University. Mice were kept under SPF conditions and housed in polycarbonate cages in a room in which the temperature (23 ± 1 °C), humidity ($50 \pm 5\%$), and light cycle (12:12 h light–dark cycle; lights on at 7 a.m.) were maintained. Mice were allowed food (Certified Rodent Chow CE-2, CLEA, Osaka, Japan) and drinking water *ad libitum*. Ten-week-old virgin female mice were cohabited for 2 h (7–9 a.m.) on a 1:1 basis with males aged 11 weeks or older. Females were checked for the presence of a vaginal plug immediately thereafter, and 8 a.m. was defined as the time of conception if a plug was found. Pregnant mice were allowed to give birth and nurse their pups until postnatal day (PND) 5. In the morning on PND 1, the number of pups in a litter was adjusted to four males and four females. Pups were weighed on PNDs 1 and 5,

*Correspondence to: Tetsuji Nagao, Laboratory of Developmental Biology, Department of Life Science, Kinki University, 3-4-1 Kowakae, Higashiosaka, Osaka, 577-8502, Japan.
E-mail: tnagao@life.kindai.ac.jp

^aLaboratory of Developmental Biology, Department of Life Science, Kinki University, 3-4-1 Kowakae, Higashiosaka, Osaka, 577-8502, Japan

^bLaboratory of Animal Genetics, Department of Life Science, Kinki University, 3-4-1 Kowakae, Higashiosaka, Osaka, 577-8502, Japan

^cDivision of Molecular Cell Biology and Medicine, Department of Clinical Pharmacy, The University of Tokushima Graduate School, 1-78-1 Shouchi, Tokushima, 770-8505, Japan

the number of pups in each litter during the lactation period was recorded, and viability on PND 5 after adjustment of the number was determined.

Determination of Newborn Activity Using an Electric Balance

An electric balance [Tuning-fork analytical balance, HTR-80, Shinko Denshi Co. Ltd, Tokyo, capacity 80 g, readability 0.0001 g, repeatability (σ) 0.0001 g, interface RS232C, D-SUB9P] on a shock-proof stage was used to evaluate the absolute values obtained from the range of fluctuations between weighing values resulting from the movement (walking/righting, tremor) of newborns on PND 1, 2 or 3 at 10 a.m., 12, 2, 4 and 6 p.m.. The absolute value was defined as the activity of a newborn, and the total activity of a newborn was the sum total of the absolute values during the period evaluated. The unstable weighing values obtained by the movement of the newborn in the plastic dish (94/16, Greiner Bio-One GmbH, Austria) on the pan of the balance were recorded by a personal computer every 0.1 s via WinCT (Windows Communication Tools) software (version 3.00, A&D Company Ltd, Tokyo, Japan). The possibility of reflection was checked using a fixed weight (5 g) on the balance for 3 min before the measurement of newborn activity in order to ensure that the weights of newborns on the balance did not reflect drift in the value of the balance. The room in which the measurement was carried out was maintained under the same experimental conditions, such as temperature and humidity, as the animal room.

Table 1 shows representative data for a mouse newborn weight sent from the balance every 0.1 s, and the method of quantitative determination of newborn activity by Microsoft Excel 2007. *B* shows the real time and the time after the start of measurement; *C* is newborn weight (weighing value) that was sent from a balance every 0.1 s; *D* shows the difference between the weighing value and that 0.1 s beforehand ($D = C_n - C_{n-1}$); *E* is the absolute value of *D* ($E = |D|$).

Subsequently, in order to determine the total activity (*F*) of a newborn from the start time of weighing to an individual time (*B*), each *E* value was added up ($E_n + F_{n-1}$; Fig. 1(B)), and total activities for 6 min ($0.1 \text{ s} \times 600 \times 6$) were determined and are shown in Fig. 1(A).

Exposure of Pregnant Dams to MNU and Determination of MNU-Treated Newborn Activities by the Newly Developed Testing Method

N-Methyl-*N*-nitrosourea (MNU) was purchased from Sigma Chemical (St Louis, MO, USA), dissolved in distilled water, and administered intraperitoneally on day 13 of gestation because this embryonic day is a part of the organogenesis period of the mouse cerebral cortex and the peak of neurogenesis in the primordium (Komada *et al.*, 2010). Dose solution was prepared prior to dosing. Five mice administered distilled water (10 ml kg^{-1} body weight) were used as controls. Five mice were administered MNU at 10 mg kg^{-1} . Administration occurred at a defined time (12:00–12:10 p.m.), and pregnant mice were allowed to give birth and nurse their newborns until PND 5. Subsequently, the activities of newborns were determined for 6 min from 12 p.m. on PND 1. The number of pups used in this study was 20 males and 20 females per group (four males and four females per litter).

For the effects of MNU, the data were analyzed via two-way analysis of variance (ANOVA) with treatment and gender (male vs female) as the factors. Whether the repeated measure ANOVA detected significant interactions or not, one-way ANOVA was followed by tests for simple main effects, and detailed multiple comparisons were made with Tukey's honestly significant difference *post hoc* tests, given corresponding significant *F*-values. Statistical analyses were performed using StatView (version 5.0; SAS Institute, Cary, NC, USA). All data used the litter average as the statistical unit, and statistical significance was assumed for probability levels of 0.05 or less.

Results and Discussion

Comparison of Activity between the Newborns on Different PNDs or between the Newborns at Different Starting Times of Measurement in a Day

The activity was determined on PND 1, 2 or 3 using the intact mouse newborns. The activities of individual newborns on PND 2 and 3 showed wide variation compared with those on PND 1. In addition, activities of individual newborns determined at 12 p.m. on any PND did not vary widely from those at 10 a.m., 2, 4 and 6 p.m. on any PND (data not shown). Using these results obtained from the intact newborns, the activities were compared between the control and MNU-treated newborns at 12 p.m. on PND 1.

The activities of mouse newborns analyzed in the present study include relatively large movements, such as righting and walking, and small movements, such as tremors specific to newborns. Of particular importance is evaluation of these types of movement separately. In the testing method developed in this study, the weighing values for the large movements of the newborns showed large absolute values (Table 1, column *E*). We defined the large movements (righting and walking) of the newborns as activities showing an absolute value (*E*) of 0.0002 or more (Table 2). Bold entries (*E*53–59) and nonbold entries (*E*50–52, *E*60–64) in this table show the large movements and small movements, respectively, of newborns. An integration of absolute values (*E*) showing 0.0002 or more for 6 min is shown in Fig. 2. The gray area in this figure shows the large movements of newborn. Of particular interest is a comparison of the changing patterns, such as this figure comparing the control group and a chemical-treated group for evaluation or identification of various kinds of neurotoxicants that exist in the environment.

How to determine the newborn activity separately according to the types of movement will be described in elsewhere. Namely, the precise distinction between the absolute values (*E*60, 61) of 0.0001 contained in the weighing values of the large movement (Table 2) and the absolute values (*E*15) of 0.0001 in the small movement (Table 1) is needed for further analyses of the rodent newborn activity in the test method.

Maternal and Developmental Effects of Prenatal MNU Exposure

No adverse effects on the general conditions, such as decreased body weight gain, death, moribund state, loss of spontaneous activity, crouching and piloerection in maternal animals were observed in the MNU-treated group. All of the pregnant mice delivered normally by 12:00 p.m. on day 19 of gestation. No significant differences in the number and the viability of newborns on PND 1 were found between the MNU-treated