

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

A I 支援型MP Sを用いたヒト i P S 由来神経細胞による神経毒性試験法の開発

(課題番号：2 2 K D 1 0 0 2)

令和 4 年度～令和 6 年度 総合研究報告書

研究代表者 安彦 行人

令和 7 (2 0 2 5) 年 5 月

目 次

I. 総合研究報告

AI 支援型 MPS を用いたヒト iPS 由来神経細胞による神経毒性試験法の開発

安彦 行人 ----- 1

II. 分担研究報告

1. MEA と BBB を統合した in vitro 試験系の開発 ----- 7

諫田 泰成、安彦 行人

2. 細胞機能の評価に着目した MPS デバイスの開発 ----- 24

松永 民秀

3. 神経細胞の形態解析に着目した AI モデルの開発 ----- 31

加藤 竜司

4. 化学物質のヒト健康影響を評価するための in vitro 代替試験法の実用化に向けた
比較・検証研究

鈴木 郁郎 ----- 39

5. In vivo 毒性評価 ----- 51

渋谷 淳

6. 化学構造によるグルーピング及びリードアクロスによる神経毒性の in silico 予測

吉成 浩一 ----- 134

7. 試験法の行政利用に向けた国際動向調査 ----- 144

小島 肇

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 150

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
（課題番号：22KD1002）
令和4-6年度総括総合報告書

AI支援型MPSを用いたヒトiPS由来神経細胞による神経毒性試験法の開発

研究代表者：安彦 行人 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 室長

研究要旨

化学物質の神経毒性はげっ歯類を用いた *in vivo* 試験により評価されているが、ヒトに対する予測性や外挿性に課題がある。動物試験の 3Rs 原則の観点からも、ヒト細胞を用いた *in vitro* 試験、カテゴリーアプローチ等を用いた *in silico* 予測の活用が期待される。2023年に発表された OECD の発達神経毒性（DNT）*in vitro* testing battery（DNT-IVB）ガイダンスには 17 種類の *in vitro* 試験法がリストされている。その一つにラット神経細胞を用いた多点電極アレイ（MEA）システムによる評価法が記載されているが、実験の再現性やキネティクス の反映、ヒトの予測性が課題である。また DNT-IVB の段階的なアプローチにおいて Tier0 に computational approach が記載されているが、具体的な *in silico* 手法は検証されていない。従って、ヒトにおける化学物質のハザードやリスク評価には、化学物質の構造情報とヒト細胞により DNT を統合的に評価する必要がある。

本研究では、キネティクスを考慮した神経毒性評価のため、血液脳関門（BBB）と神経細胞をマイクロ流路により連結した生体模倣システムを新たに構築し、灌流下で MEA 計測が可能であることを明らかにした。MEA のエンドポイントに関して、独自の MEA パラメータを用いた AI モデルにより精度良く神経毒性予測を行えること、神経毒性の作用機序ごとのグループ分けが可能であることを見出した。実験の再現性を確保するため、神経細胞画像からの特徴量抽出手法を確立し、AI モデル構築へ向け MEA パラメータと関連する特徴量を見出した。より生理的なモデルとしてヒト iPS 細胞由来脳オルガノイドについても検討を行い、高密度電極 MEA により長期に安定したネットワーク活動計測が行えることを明らかにした。

化学構造情報を用いた *in silico* 手法に関しては、分子記述子によるクラスタリングで神経毒性を示す物質がグループ化されることを見出した。またリードアクロスにおいて、比較する類似物質数や類似度の閾値の適切な設定、構造類似度による陽性・陰性情報の重みづけ、*in silico* 生物活性予測の活用により予測性を向上できることが示唆された。

さらに *in vitro* と *in vivo* の橋渡しを考慮するうえで、フッ化ナトリウム、過塩素酸アンモニウム、イミダクロプリドのラット DNT 試験を実施した。海馬における神経炎症と酸化ストレス、またストレスに対する感受性上昇が発達神経毒性を引き起こすメカニズムが示唆され、このような毒性をメカニズムベースに検出する *in vitro* 試験系の重要性が示唆された。

これらの成果は欧米やアジアの動物実験代替法関連学会、OECD の DNT ワークショップなど関連学会・会議で発表した。また、OECD の *in vitro* DNT ガイダンスの意見募集に対しコメントを提出し OECD・DNT 専門家会議などで DNT-IVB ガイダンスの作成や改訂に向けて意見交換を実施した。

以上のように、班全体で連携しながら統合的に DNT を評価可能なシステムの開発を進め、DNT 専門家会議や国内外の関連団体との連携のもと、新規 *in vitro* および *in silico* 手法の検証を行い、国際発信を行った。

研究分担者：諫田 泰成
国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 部長

研究分担者：松永 民秀
名古屋市立大学医薬学総合研究院（薬学）教授

研究分担者：鈴木 郁郎
東北工業大学 大学院工学研究科 電気工学専攻・教授

研究分担者：加藤 竜司
名古屋大学大学院 創薬科学研究科 准教授

研究分担者：渋谷 淳
国立大学法人東京農工大学 大学院・農学研究院・教授

研究分担者：吉成 浩一
静岡県立大学 薬学部 教授

研究分担者：小島 肇
国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 特別研究員

A. 研究目的

現在、化学物質の発達神経毒性は主にげっ歯類を用いた行動試験により評価されているが、ヒトへの外挿性や予測性に課題がある。動物試験における3Rsの観点からも、オルガノイド等ヒト生体環境に近いin vitro評価系や、コンピューターを活用したin silico予測手法の開発が望まれる。

OECDの発達神経毒性in vitro testing battery (DNT-IVB)ガイダンスに培養神経細胞を用いた多点電極アレイ (MEA) システムによる評価法が記載されているが、ヒトの予測性や実験の再現性、キネティクスの反映が課題である。またDNT-IVBの段階的アプローチにおいてTier 0にcomputational approachが記載されているが、具体的なin silico手法の検証が必要不可欠である。ヒトに対する予測性向上には、化学構造に基づくin silico予測とin vitro神経毒性を統合的に評価する必要がある。

本研究は、ヒトiPS細胞由来神経細胞および脳オルガノイドを用いた精度の高いin vitro毒性評価法の開発、及びin vitroとin silico手法の統合によるin vivo神経毒性予測の精度向上を目的とする。

この目的のため、in vitro評価系の開発として、血液脳関門 (BBB) を統合したMEAシステムの開発、細胞画像のAI解析によるin vitro系の品質評価法、MEAデータのAIモデルによる解析手法、ヒトiPS細胞由来脳オルガノイドを用いた神経毒性評価系樹立のためのMEA計測手法を進めた。

またin silico手法として分子記述子による化学物質のグルーピング及びリードアクロスによる神経毒性予測手法の開発を進めるとともに、In silicoおよびin vitro手法によるin vivo発達神経毒性の予測性向上のため、発達神経毒性情報が不足する物質のin vivo毒性評価を進めた。

さらに、研究成果を国際ガイダンスとして確立することを目指し、研究成果を国際学会にて発表するとともに、試験法の行政利用に向けた国際動向調査を進めた。

B. 研究方法

(1) ヒトiPS細胞由来神経細胞及び脳オルガノイドを用いたin vitro発達神経毒性評価法の開発

①BBBとMEAを統合したin vitro神経毒性試験系の開発

分担研究者の松永らが樹立したヒトiPS細胞由来BBBを2機関で培養し、経内皮電気抵抗 (TEER) 測定により機能確認しプレバリデーションを行った。BBB機能を維持しつつ神経細胞との共培養が可能な培地の開発を進めた。

2層灌流デバイスとMEAをマイクロ流路にて連結し

たMEA連結型MPSの開発を行った。この装置の評価のため、既存データが豊富なラット初代培養大脳皮質神経細胞を利用するための培養プロトコルを検討した。

②MEAのためのヒトiPS細胞由来神経細胞培養手順の開発

ヒトiPS細胞由来神経細胞を用いたMEA計測の標準的プロトコル作成を進めた。MEAシステムとしては、多くの企業で利用されている16電極マルチウェル型のMaestro (米国Axion社)、高密度電極MEAシステムであるMaxOne (スイスMaxwell社)を使用した。細胞として、米国NeuCyte社のヒトiPS細胞由来神経細胞を使用して研究を進めたが、研究期間途中にて安定供給に問題が生じ入手が不可能となったため、別メーカー (富士フィルムCDI社) のヒトiPS細胞由来神経細胞についても培養およびMEA計測手順の検討を行った。

③細胞品質評価のための画像解析AIモデルの開発

ヒトiPS細胞由来神経細胞を培養し、MEA測定 (Maestroシステム) と画像撮影をセットで行いデータを集積した。画像撮影はBioRevoオールインワン顕微鏡 (キーエンス) を用い、3.5μm間隔のZ-stack撮影とした。深層学習モデルによる学習により、コンフルエント状態の細胞画像から特徴量を抽出するアルゴリズムを開発した。画像予測AIモデルロバスタ化のための各種処理の最適化およびノイズデータ影響の検証と最適化を行った。コンフルエントな細胞画像からの特徴量抽出のために、変分オートエンコーダ (VAE) モデルについての開発環境整備と実装を行い。最適なモデル化環境とハイパーパラメータの最適化を進めた。

④MEAデータ解析AIモデルの開発

ヒトiPS細胞由来神経細胞をMEAプレート上で培養し、培養4-5週目に自発活動および薬剤累積投与後の細胞外電位を取得した。得られた急性毒性のMEAデータを解析し、15の神経活動関連パラメータを算出した。得られたMEAパラメータを用いて、毒性予測AIモデルを作成し、陰性対照化合物に対する毒性スコアの標準偏差を基準とした毒性判定閾値を決定した。次に、未学習データおよび未学習化合物に対して、作成したAIによる毒性判定を実施し、精度検証を実施した。

⑤脳オルガノイドを用いたMEAによる神経毒性評価

ヒトiPS細胞RIKEN-1Aから、培養液キットStemDiff cerebral organoid kit (米国STEMCELL Technologies社) を用いて脳オルガノイドの樹立を行った。脳オルガノイド神経ネットワーク活動の検出には高密度電極のMaxOneシステムを使用した。脳オルガノイドを電極チップ1基あたり1-2個播種し、週に2回の培養液交換、週に1回のMEA計測を実施した。

MEAデータからのネットワーク活動関連パラメータの算出はScopeソフトウェア（スイスMaxwell社）により行った。

（２）化学構造の類似性に基づくin silico発達神経毒性予測

In silico毒性予測手法開発のための物質データベースとして、発達神経毒性に関する総説(Mundy et al., Neurotoxicol Teratol, 52:25-35, 2015)に記載された361の化学物質、また食品安全委員会が構築している農薬評価書のラット反復投与毒性試験（90日間、2年間）の結果を約1000のエンドポイント（EP）として整理した独自のデータベース（DB）から、90日間試験の結果がある350の農薬を利用した。alvaDescソフトウェア（Alvascience, ver 2.0.12）により分子記述子を計算し、データベース物質の中での最大値が1、最小値が0となるように標準化し、物質相互間のユークリッド距離をRソフトウェアにより算出した。物質間距離は理論上の最大距離（使用した分子記述子数の平方根）で除して相対距離に変換し、物質間の類似性の指標とした。また約8000種を超える生物活性を予測可能なPASSソフトウェアを使用し、生物活性予測値を算出して利用した。

評価対象のエンドポイントとして、CE01（脳コリンエステラーゼ（ChE）活性低下、赤血球ChE活性低下、血中ChE活性低下、の3つをまとめたChE関連所見）、NV01（神経毒性と関連すると考えられる外観・行動の33所見をまとめたもの）の2グループを設定した。

リードアクロスは、350農薬から1物質を予測対象物質（ターゲット物質）として選択し、残りの物質を類似物質（ソース物質）の候補物質とする解析を全350農薬について実施した。毒性判定では、ソース物質の陽性率がDB全体の陽性率を上回った場合を陽性予測とし、最終的に350物質全体の感度、特異度、balanced accuracy（BA）を予測精度の指標として算出した。

（３）in vitroとin silico手法の統合によるin vivo発達神経毒性の予測性の向上

発達神経毒性のメカニズムが明らかでない化学物質としてフッ化ナトリウム、過塩素酸アンモニウム、イミダクロプリドに着目し、OECD発達神経毒性試験ガイドライン(TG426)に従いラット発達期ばく露を行った。児動物脳について、免疫組織学的検索、遺伝子発現解析を実施した。またTG426に従い行動試験を行った。

（４）試験法の行政利用に向けた国際動向調査

JacVAM資料編纂委員会の協力のもとOECD in vitro DNTのガイダンス初稿に対する意見募集に対応（意見集約と提出）を行った。さらに、DNT専門家会

議やワークショップなどでガイダンス改訂に向けて議論を行っている。またOECDの拡張世代生殖発生毒性試験ガイドライン(TG443)の改訂に参画した。

米国、韓国等の動物実験代替法関連学会に参加し、ここまでの成果を発表して海外規制機関の関係者とのディスカッションを行う等、国内外の関連学会に参加し情報収集を行った。

（倫理面の配慮）

本研究で用いたヒトiPS細胞由来神経細胞は、細胞バンクに集積された匿名化ドナー由来細胞から作製されており、個人情報の取扱いが生じていない。

また動物実験については、実験を実施した国立大学法人 東京農工大学の動物実験等に関する規定ならびに動物実験指針に従った。投与方法は飲水投与を主体として動物の苦痛を最小限に留め、動物はすべてCO₂/O₂深麻酔下での灌流固定ならびに放血により屠殺し動物に与える苦痛を最小限に留めた。

C. 研究結果

（１）ヒトiPS細胞由来神経細胞及びオルガノイドを用いたin vitro発達神経毒性評価法の開発

①BBBとMEAを統合したin vitro神経毒性試験系の開発

ヒトiPS細胞由来BBBの輸送安定性やバリア機能に関するプレバリデーションを行い、良好なバリア機能を得られる培養のプロトコルを確立した。培地成分の検討を行った結果、神経細胞の発火、BBBのバリア機能をともに保つことができる培地の候補を見出した。

MaxOneシステムにおいてラット神経細胞は、培養2週間で安定したネットワーク活動を示した。これをもとに、BBBを培養する灌流装置とラット神経細胞を播種したMEA装置をマイクロ流路により連結し、培養液の灌流下でMEA計測が可能であることを明らかにした。MEAデータに培養液の灌流に伴うと考えられるノイズが観察されたが、培養液を灌流するチューブの改良により、ノイズを軽減することができた。

②MEAのためのヒトiPS細胞由来神経細胞培養手順の開発

ヒトiPS細胞由来神経細胞の培養により、培養開始後4～5週間でネットワークバーストが観察されたものの、多くのウェルで強い凝集が観察された。培養手順を検討し、細胞解凍の際、神経細胞を顕微鏡下ですべて単一細胞として観察できるまでピペッティングにより分散させるようにしたところ、凝集はほぼ見られなくなった。これらの情報をSOPとしてまとめる予定である。

③細胞品質評価のための画像解析AIモデルの開発

化学物質神経毒性試験にMEAを活用するにあたり、

培養した細胞の品質を担保する客観的な指標が必要である。非侵襲的かつ簡便に細胞品質をモニタリングするため、MEAデータと細胞画像特徴量の相関をAIにより解析する手法の検討を進めた。その結果、模様関連特徴量であるmean-homogeneity、変動パターン関連特徴量であるSD-bias frequencyが、異なる実験間やプレート間でも共通してMEAパラメータとの相関を示した。MEAデータでは電極間で想像以上に大きな変動(CV>0.4)が生じ、経時的に増大することが確認された。ガウス分布による最尤推定、階層ベイズモデルによる逸脱スパイク数データの定量化により、ノイズデータをin silicoで削減することによって、より安定なMEA解析が可能になることが示唆された。一方、撮影データの増加にしたがって、画像中の輝度ノイズや細胞形態の変化が大きく、特定の画像処理アルゴリズムだけでは安定した数値化ができない問題にも直面した。このため、深層学習技術の一つである変分オートエンコーダ(VAE)を用いて画像全体に共通する特徴量を潜在特徴量としてのモデル化する技術の開発を行った。この結果、これまでの解析アルゴリズムでは、細胞種やデータが変更された際に大きく解析パイプラインを変更する必要があった処理の一部が、安定して共通化できることが見出された。

④MEAデータ解析AIモデルの開発

MEAを用いた神経毒性評価はDNT-IVBにも記載されているが、用いるパラメータ等の具体的手法や毒性判定のクライテリアは明確になっていない。MEAパラメータを用いた主成分分析により、神経毒性判定の閾値設定を行うことができた。12種の農薬について急性毒性データの主成分分析を行った結果、MEAパラメータの変動パターンを各農薬の神経作用機序ごとにグループ分けできることを見出した。また、MEAデータ9パラメータの機械学習により構築したAIモデルにより、12種類の農薬について主成分分析で得られるのと同様の神経毒性判定の閾値が得られた。

さらに、独自に最大発火周波数を計算し、最大発火周波数と関連する新規パラメータ4つを算出して、Maestro標準の11パラメータと合わせてAIモデルによる予測精度を検証した。未学習データおよび未学習化合物に対する毒性スコア予測を行ったところ、陰性対照化合物では、濃度に関わらず低い毒性スコアを維持した。試験化合物では、未学習データおよび未学習化合物いずれにおいても濃度依存的に毒性スコアが上昇する傾向が観察された。

⑤脳オルガノイドを用いたMEAによる神経毒性評価

近年、より生理的なモデルとして脳オルガノイドに着目されているが、化学物質影響の解析のための手法

やエンドポイントは確立されていない。ヒトiPS細胞より樹立された脳オルガノイドは直径数mmと大きく、Maestroシステムで用いられる電極(1mm四方の範囲に16電極)では十分にカバーできなかったことから、本研究では26400電極により4mm x 3mmの範囲をカバーできる高密度電極MEAシステムであるMaxOneシステムを用いた。オルガノイド作製プロトコルの改良を進めた結果、3週間にわたり安定したネットワークバーストを得ることに成功した。

(2) 化学構造の類似性に基づくin silico発達神経毒性予測

構造記述子により化学構造や物性の類似した物質をグループ化できるクラスタリング手法を開発した。その結果、in vivo発達神経毒性が陽性の物質や類似した構造を持つ物質が集積したクラスターが得られ、開発したクラスタリング手法が適切であることが示唆された。リードアクロスにおいて、比較する物質数や類似度に適切な閾値を設けることで、神経毒性の予測性を向上させられることが示唆された。

構造的に類似する物質の毒性スコアを構造的類似度で重みづけして合計する手法により、農薬の毒性を良好な制度で予測することができた。またin silico生物活性予測値の活用により予測性が改善することが示唆された。

(3) in vitroとin silico手法の統合によるin vivo発達神経毒性の予測性の向上

In silico手法との統合に有用なin vitro実験を見出す方法として、毒性メカニズムが不明な化学物質のin vivo実験によるメカニズム情報の集積が考えられる。発達神経毒性のメカニズムが明らかでない化学物質としてフッ化ナトリウム、過塩素酸アンモニウム、イミダクロプリドに着目し、in vivo発達神経毒性評価を実施した結果、海馬歯状回において神経幹細胞の増殖抑制や神経炎症が生じていることを見出した。化学物質曝露が海馬において神経炎症と酸化ストレス、またストレスに対する感受性を上昇させ、成体期における多動的行動と進行性の神経新生抑制を引き起こすメカニズムが示唆された。このような毒性メカニズムを検出するin vitro評価系の重要性が示唆された。

(4) 試験法の行政利用に向けた国際動向調査

OECDのin vitro DNTガイドランスの意見募集に対し、神経細胞分化や神経突起伸長といったエンドポイントの生物学的な意味づけ、またin vivoでの行動異常との対応づけについてのコメントを提出した。またOECDの拡張世代生殖発生毒性試験ガイドライン(TG443)の改訂に参画し、発達神経毒性試験に関する改訂はほぼ無かったものの、内容の確認を行った。

欧米、アジアの動物実験代替法関連学会に参加し、MEAデータによる神経毒性予測や化学構造に基づくin silico毒性予測とin vitro評価の統合等の成果を報告した。また、OECDのDNTワークショップにおいて日本におけるDNT-IVBに関する取り組みについての講演も行い、海外規制機関の関係者とのディスカッションと情報収集を行った。

D. 考察

OECDのDNT-IVBガイダンスにラット神経細胞を用いたMEAシステムによる評価法が記載されているが、in vivo神経毒性の予測性については課題が残されている。DNT-IVBガイダンスでも指摘されているように、化学物質の中枢神経作用を評価するうえでBBBの影響は重要である。また、ヒト細胞としてヒトiPS細胞由来神経細胞の利用も期待されている。本研究では、ヒトiPS細胞由来BBBの培養について施設間プレバリデーションを行った上で、BBBの培養を行う灌流培養装置と神経細胞のMEA装置を灌流培養装置により連結し、培養液灌流下でのMEA計測を行えることを明らかにした。これによりMEAとBBBを統合した新たな生体模倣システムの完成に大きく前進したと考えられる。今後、適切な化学物質を用いて本システムの有用性を検証する必要がある。

ヒトiPS細胞由来神経細胞の株間差も重要な課題である。株間差、ラットとヒトの種差はExcitatory neuronとInhibitory neuronの比率(E/Iバランス)の違いだけでは説明できていないことから、株間差を克服できる評価指標の選定が必要と考えられる。本研究により、ヒトiPS細胞由来神経細胞の培養において、解凍した細胞を単一細胞まで分散させる操作が凝集防止に重要であることを見出した。これは細胞供給元のプロトコルには記載のない工程であり、実験データの再現性に重要であると考えられる。今後、本研究で得られた知見をもとに標準的プロトコルの作成を目指す。

同一のヒトiPS細胞由来神経細胞を用いたMEA評価で化学物質の投与前の神経ネットワーク活動にばらつきが認められることから、標準化のネックとなっている(ALTEX, 37:121-135, 2020)。本研究ではAI画像解析による細胞状態のモニタリング手法の開発を進めてきた。本研究によりMEAデータと関連の強い画像特徴量の抽出、解析のロバスト化のためのノイズデータ除去や深層学習モデルの導入を行った。これらの開発の結果、実験データごとに安定した細胞画像の定量化を行うことができる可能性が示唆された。

MEAデータを用いたAIモデルによる毒性予測について、MEAシステム標準のパラメータに加え、独自に算出したパラメータを加えることで高い予測性が得ら

れることを見出した。パラメータAIは入力パラメータの数値情報となるため、MEAデータに限らず、その他の評価系による解析値をパラメータとして追加することが可能であり、MEAデータによる神経機能情報に加えて、その他評価系による情報を含有した統合的な毒性評価が可能となり、評価対象とできる化合物範囲が非常に広くなることが推測できる。今後、慢性毒性MEAデータに関してもAIのアプローチが期待されており、EPAでも同様のモデルを構築していることから、引き続き連携して取り組む必要がある。

近年、より生理的なモデルとして脳オルガノイドの活用が期待されているが、化学物質影響の解析のための手法は確立されていない。脳オルガノイドのMEA計測においては、測定ごとにデータの変動が大きく、試験のためのタイムウィンドウを見出すことが課題であった。本研究にて、オルガノイド作製プロトコルの最適化を進めた結果、長期に安定したネットワークバーストが見られるオルガノイドを得ることに成功した。今後、今回の作製手順やオルガノイドのデータをふまえ、標準的なプロトコルの検討や満たすべき項目の選定などを進める。

化学物質の構造情報の活用によって、in vivo発達神経毒性の予測性の向上が期待されることから、OECDにおける発達神経毒性評価の段階的アプローチでも、Tier 0としてin silico手法の活用が議論されている。しかし具体的なアプローチの検討は未だなされていないことから、本研究では分子記述子を用いたリードアクロス手法を開発した。類似性評価及び毒性判定に関する条件検討を行い、ソース物質数の設定が予測精度に与える影響を検討したが、評価する毒性エンドポイントにより予測精度には差が見られた。コリンエステラーゼ阻害などメカニズムの明らかな毒性に比べ、外観や行動などメカニズムが多様と考えられるエンドポイントでは、構造情報からの予測精度が低くなることが示唆された。今後は、化学構造情報から生物活性を予測するソフトウェアを利用してDB内の物質について各種生物活性の予測値を算出し、それらを利用した類似性評価に基づくソース物質の選択により、リードアクロスの精度向上が可能かを検討する。DNT専門家会議でも議論されているが、引き続き、in vivoのデータについても収集を進めながら検討する必要がある。

本研究により、海馬における神経炎症と酸化ストレス、またストレスに対する感受性の上昇が、成体期における多動的行動と進行性の神経新生抑制を引き起こすメカニズムが存在することが示唆された。DNT-IVBガイドラインには神経の分化、軸索伸長、ネットワーク形成等をカバーする17の実験系が記載されており、一つの試験系でもヒットすればハザードとして用いる

ことになっている。神経毒性の作用点に関する知見の蓄積をもとに、in vitro試験法の改良など、DNT-IVBに貢献することが期待される。

以上のように、研究班全体で連携して神経毒性評価法の開発を進め、成果を上げた。今後、これらの成果をもとに、OECD 発達神経毒性の専門家会議や国内外の関連団体との連携のもと、新規試験法として国際発信を目指す。

E. 結論

本研究において、BBBとMEAを連結した生体模倣システムの開発を行った。これにより、キネティクスを反映した新たなin vitro試験法の構築が期待される。MEAを用いた神経ネットワーク解析法のAIによる予測モデルを構築した。これによりin vitro神経毒性評価

の予測性向上が期待される。さらに、化学構造に基づくin silico予測とin vitroデータを統合的に活用することにより、in vivo発達神経毒性の予測性が向上することが期待される。

F. 研究発表

各分担研究者の報告にある通り、多数の論文発表および学会発表を行った。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
（課題番号：22KD1002）
令和4-6年度総合報告書

AI支援型MPSを用いたヒトiPS由来神経細胞による神経毒性試験法の開発

研究代表者 安彦行人 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 室長

分担課題：MEAを用いたin vitro神経毒性試験系の開発

研究分担者：諫田 泰成 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部長

研究分担者：安彦 行人 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 室長

研究要旨

化学物質の神経毒性はげっ歯類を用いたin vivo試験により評価されているが、ヒトへの外挿性や3Rsの観点から、ヒト細胞を用いたin vitro試験の活用が期待される。2023年に発表されたOECDの発達神経毒性（DNT）in vitro testing battery（DNT-IVB）ガイダンスは17種類のin vitro試験法がリストされている。その一つにラットを用いた多点電極アレイ（MEA）システムによる神経毒性評価法が記載されているが、実験の再現性やキネティクスの反映、ヒトの予測性が課題である。本分担研究では、キネティクスを反映させた予測性の高いMEA解析のため、ラット神経細胞、ヒトiPS細胞由来神経細胞およびヒトiPS細胞由来脳オルガノイドについて、培養・解析の標準的プロトコルの開発、またヒトiPS細胞由来血液脳関門（BBB）と神経細胞MEAを接続した生体模倣システム（MPS）の開発を行った。

研究班内の2施設でヒトiPS細胞由来BBBの培養を行い、経内皮電気抵抗値（TEER）によりバリア機能を確認し、高いバリア機能が得られる培養プロトコルを確認した。開発した新規MEA試験系の評価およびヒトiPS細胞由来神経細胞との比較のため、ラット初代培養大脳皮質神経細胞の培養系を検討し、灌流下で安定したMEA実験が行えることを確認した。ヒトiPS細胞由来神経細胞の解凍や播種について、良好な培養を得るためのプロトコルの検討を進めた。さらにヒトiPS細胞由来脳オルガノイドについて、作製およびMEA計測手順の検討により、高密度電極MEAを用いて安定したネットワーク活動計測が行えることを確認した。欧米、アジアの動物実験代替法関連学会に参加し成果を報告した。また、OECDのDNTワークショップにて海外規制機関の関係者とのディスカッションと情報収集を行った。

以上の結果から、ヒトiPS細胞由来神経細胞及び脳オルガノイドを用いたMEAによる神経毒性評価系、さらにBBBを統合したMPSの開発の基盤を構築できたと考える。

A. 研究目的

現在、化学物質の発達神経毒性は主にげっ歯類を用いた行動試験により評価されているが、ヒトへの外挿性や予測性に課題がある。動物試験における3Rsの観点からも、ヒト生体環境に近い細胞や組織を活用したin vitro評価系の開発が望まれる。本研究は、ヒトiPS細胞由来神経細胞を用いた新たなin vitro発達神経毒性評価法の開発を目的として実施した。

化学物質による発達神経毒性のin vitro評価系として、現在、OECDのin vitro testing battery（DNT-IVB）ガイダンスに多点電極アレイ（MEA）システムによる神経毒性評価法が記載されているが、施設間・実験間の再現性や、キネティクスの反映、細胞の株間差等が課題である。本研究では、MEAによるin vitro神経毒性評価にキネティクスを解析可能な生体模倣システム（MPS）の開発を目標とした。

血液脳関門（BBB）とヒトiPS細胞由来神経細胞の共培養法を検討した。ヒトiPS細胞由来BBBのバリア機能について2施設でプレバリデーションを実施した。血液脳関門BBBを統合したMEAシステムの開発へ向け、BBBバリア機能と神経機能を共に保つことのできる培地の開発を進めた。既存データが豊富なラット初代培養大脳皮質神経細胞を利用するための培養プロトコルを検討した上で、灌流培養装置を接続したMEA装置による神経ネットワーク活動の計測を実施した。

ヒトiPS細胞由来神経細胞のプロトコル作成について、研究期間中に市販細胞の供給に問題が生じた例も踏まえ、複数のヒトiPS細胞由来神経細胞製品を用いて培養およびMEA計測手順の検討を行った。MEAシステム上の培養細胞の状態を非侵襲的に評価し管理することを目指し、細胞画像から神経ネットワーク活動を予測できる方法の開発に取り組んだ。さらにヒトiPS

細胞由来脳オルガノイドの作製、及びそれを用いた神経毒性評価系樹立のための MEA 計測手法の開発を進めた。

B. 研究方法

①ヒトiPS細胞由来BBBの培養

ヒトiPS細胞由来BBBは、分担研究者の松永らが樹立したものを、液体室素温度で国立医薬品食品衛生研究所に輸送し、液体室素中に保存した (Yamashita et al. Fluids Barriers CNS (2020) 17:36)。

24 ウェルプレートのウェルに、セルカルチャーインサート (Merck, PIHP01250) をセットし、Fibronectin 及び Cellmatrix Type IV (それぞれ 100µg/ml 及び 400µg/ml) により 4℃、一晚コーティングした。コーティング溶液を除去した後、セルカルチャーインサートをセットしたウェル内に 600µl、セルカルチャーインサート内に 200µl の播種培地を注入し、37℃で保温した。培地の組成は前掲のYamashitaらの文献に従った。

凍結BBB細胞を液体室素から取り出し、バイアル内に 37℃に温めた播種培地 1mlを加え、10 回程度ピペッティングして解凍した。得られた細胞懸濁液を 8ml の播種培地に加え、100 x g、5 分、室温にて遠心した。細胞ペレットを 1ml の播種培地に懸濁してトリパンブルー染色の上で細胞数をカウントし、細胞の生存率が 80%以上であることを確認した。細胞懸濁液の細胞密度を 2.7×10^6 cells/ml に調整し、セルカルチャーインサートあたり 200µl (5.4×10^5 cells) を添加した。各セルカルチャーインサート内の液を、400µl にセットしたピペッターで 1 回ピペッティングして均一化し、37℃、5% CO₂ にて静置培養した。

血管内皮細胞培地 (米国 Thermo Fisher Scientific 社) をベースとした培養液で培養を行い、Endohm-6 カップ型電極 (米国 World Precision Instruments 社) を用いて経内皮電気抵抗値 (TEER) によりバリア機能を解析した。TEER 確認は国立医薬品食品衛生研究所、名古屋市立大学の 2 か所で実施した。培養液の比較検討においては、同時に播種した BBB を培養 5 日目に群分け (1 群 2-3 ウェル) し、比較を行う培養液に交換後、経時的に TEER 測定を行った。経内皮電気抵抗 (TEER) は、測定器 EVOM (World Precision Instruments) にカップ型電極 EndOhm 6G (World Precision Instruments) を接続し、電極カップ内にセルカルチャーインサートをセットして測定した。

②MEAによる急性神経毒性評価プロトコルの検証

ヒトiPS細胞由来神経細胞として、OECD の in vitro 神経毒性評価系の国際的なバリデーションに用いられ

ている市販細胞培養キット (米国 Neucyte 社、SynFire® MEA kit) を用いた。本キットはヒトiPS細胞から分化誘導された Glutamatergic neuron、GABAergic neuron および Astrocyte からなり、メーカープロトコルに従い 14:6:7 の数比で混合培養した。細胞の解凍、播種についてもメーカープロトコルに従った。

細胞は MEA システム MAESTRO (米国 Axion 社) の測定プレート上で培養した。播種後 4 週間、Neucyte 社供給の専用培地を週 2 回半量交換し、交換翌日に MEA により神経活動のベースライン計測を実施した。測定プレートを MAESTRO にセット後、10 分間静置した上、15 分間の MEA 計測を実施した。得られたデータから AxIS ソフトウェア (Axion 社) でスパイクを抽出後、Neural Metric tools ソフトウェア (Axion 社) を使用してネットワークバースト等、各種ネットワーク活動パラメータを取得した。

また週一回 (培地交換前)、細胞画像 AI 解析 (加藤の分担研究を参照) のため、全ウェルの細胞画像撮影を実施した。BioRevo BZ9000 オールインワン顕微鏡 (Keyence) を使用し、ソフトウェア BZ-II により画像の撮影および合成を行った。1 視野で 3 x 3 のタイリング撮影を行い、それぞれ Z 軸方向に 3.5µm 間隔で積層的に撮影してベストフォーカス合成を行った。MEA データへの影響を最小限とするため、画像撮影後に培地交換を行い、MEA 測定はその 1 日後に実施した。

化学物質の投与は細胞播種後 5 週目に行った。4 種の化学物質 (Chlorpyrifos, Diazinon, Deltamethrin, Cypermethrin) について、蓄積的に 5 段階に分けて行い、最終濃度は 4 物質とも 30µM とした。各化学物質 14 ウェル分の MEA データについて、「発火電極数 8 以上」「バースト電極数 5 以上」の二つの条件でデータの選別を行い、データのばらつきに関し、選別が無い場合との比較を行った。

Deltamethrin, Cypermethrin の全スパイク数データを用いて、BMDS ソフトウェア (US EPA) により半量阻害ベンチマーク濃度 (BMC₅₀) を算出し、先行研究の慢性曝露により得られた値との比較を行った。

③灌流装置におけるラット神経細胞のMEA計測

ラット皮質由来の神経細胞は米国 LONZA 社の市販凍結品 (R-Cx-500, CryoCells, Rat Brain Cortex) を使用した。凍結細胞バイアルを 37℃ 温浴中で 2.5 分加温して解凍し、トリパンブルー染色により生細胞をカウントし、播種した。

MEA システムは Maestro (米国 Axion 社) および高密度電極の MaxOne (スイス Maxwell 社) を使用した。Maestro での計測のため、48 ウェル MEA プレート (Axion 社) に 1 ウェル当たり 3.4×10^4 個の割合で生細胞

胞を播種し、週に 2 回の培地交換、3 回のMEA計測を実施した。プレートを装置にセットして 10 分間静置後、15 分間の計測を行った。計測データをAxISソフトウェア (Axion社) で処理してスパイク数、バースト数等のパラメータを算出した。またMEA計測実施後、BioRevo オールインワン顕微鏡 (Keyence社) により細胞の Z-stack画像を取得し、AI画像解析に供した (加藤の項を参照のこと)。

MaxOneシステムでは、上記と同じラット神経細胞を高密度微小電極アレイチップに 3x104 個の割合で播種した。週に 2 回の培地交換、3 回のMEA計測を実施した。電極チップを装置にセットし 5 分間静置後、5 分間のActivity scan、5 分間の計測を行った。MEAデータからのネットワーク活動関連パラメータの算出はScopeソフトウェア (Maxwell社) により行った。培養 19-20 日目に灌流培養装置との接続実験を実施した (松永の項を参照のこと)。

④ラット神経細胞を用いた慢性曝露MEA計測

48 ウェルMEAプレート (Axion社) にラット神経細胞 (LONZA社) を①と同様に播種した。DNT-IVB記載の慢性曝露プロトコル (Fig.3A) に従い、DMSO (溶媒対照) と化学物質の曝露、MEA計測を実施した。化学物質としては、DNT陽性対照物質としてハロペリドール (0-30 μ M)、陰性対照物質としてアセトアミノフェン (0-300 μ M) を使用した。化学物質はDMSOに最終濃度の 1,000 倍濃度で溶解し、培地に 1/1000 量を混合した (最終DMSO濃度 0.1%)。各化学物質の最大用量は、ヒトにおけるCmaxをもとに安全係数を 30 とし、算出した。播種日をDIV (Days In Vitro)=0 とし、播種日から化学物質を含む培地で培養を行った。DIV5, 9, 12, 14 にMEA計測を実施し、MEA計測後、化学物質を含む培地にて培地交換 (全量) を行った。

⑤MEAのためのヒトiPS細胞由来神経細胞培養手順の開発

ヒトiPS細胞由来グルタミン酸作動性神経細胞iCell glutaneuron (米国iCell社) を 37 $^{\circ}$ C温浴中で正確に 2 分間加温して解凍し、トリパンブルー染色により生細胞を計数した。48 ウェルMEAプレート (Axion社) に 1 ウェル当たり 7.3x10⁴ 個の割合で生細胞を播種し、週に 2 回の培地交換を行った。iCell glutaneuronの解凍と同日に、ヒトiPS細胞由来アストログリア細胞iCell astrocyte v2.0 (iCell社) を 37 $^{\circ}$ C温浴中で正確に 2 分間加温して解凍し、10cm細胞培養ディッシュに 1 枚当たり 5x10⁵ 個の割合で播種して 7 日間培養した。培養 7 日目にiCell astrocyteを回収し、iCell glutaneuronを培養しているウェルに 1 ウェル当たり 1.2x10⁴ 個の割合

で重層した。以後、週に 2 回の培地交換およびMEA計測を実施した。MEA計測はAxionシステムを使用し、ラット神経細胞と同様に行った。

⑥MEAのためのヒトiPS細胞由来脳オルガノイドの作製・計測方法の開発

ヒトiPS細胞 RIKEN-1A から、培養液キット StemDiff cerebral organoid kit (米国STEMCELL Technologies社) を用いて脳オルガノイドの樹立を行った。MEAによる脳オルガノイド神経ネットワーク活動の検出にはMaxOneシステムを使用した。脳オルガノイド (直径 2-4mm) を、ラミニンコートした電極チップ 1 基あたり 1-2 個播種し、週に 2 回のOrganoid maturation medium (Stemcell社) 培養液交換、MEA計測を実施した。MEAデータからのネットワーク活動関連パラメータの算出はScopeソフトウェア (Maxwell社) により行った。

⑦試験法の行政利用に向けた国際動向調査

欧米、アジアの動物実験代替法関連学会に参加し、ここまでの成果を発表して海外規制機関の関係者とのディスカッションを行う等、国内外の関連学会に参加し情報収集を行った。またOECDの拡張一世代生殖発生毒性試験ガイドライン(TG443)の改訂に参画した。

(倫理面の配慮)

本研究で用いたヒトiPS細胞由来神経細胞は、細胞バンクに集積された匿名化ドナー由来細胞から作製されており、個人情報の取扱いには生じない。また動物実験については、実験を実施した国立大学法人 東京農工大学の動物実験等に関する規定ならびに動物実験指針に従った。投与方法は飲水投与を主体として動物の苦痛を最小限に留め、動物はすべてCO₂/O₂深麻酔下での灌流固定ならびに放血により屠殺し動物に与える苦痛を最小限に留めた。

C. 研究結果

①ヒトiPS細胞由来BBBの培養

BBBを用いた毒性評価系の樹立へ向けたプレバリデーションとして、国立医薬品食品衛生研究所と名古屋市立大学の 2 か所でBBBの培養とTEER測定を実施し、双方とも良好なバリア機能を有すると考えられる 500 Ω cm² 以上のTEERが得られることを確認した (Fig.1)。

キネティクスを考慮した化学物質神経毒性の解析のためBBBを神経細胞と共培養する場合、BBBのバリア機能が良好に保たれる条件を見出すことが重要となる。培地成分の検討を行った結果、神経細胞の発火、BBB

のバリア機能をともに保つことができる培地の候補を見出した (Fig.2)。

②MEAによる急性神経毒性評価プロトコルの検証

化学物質影響のMEA解析に供する細胞培養ウェルの選択にあたり、ベースラインのMEAパラメータに閾値を設ける方法が従来用いられている。閾値として先行研究では「発火電極数 8 以上」「バースト電極数 5 以上」の二つが主に見られた。1 群 14 ウェルからなる 6 群について両クライテリアを適用したところ、「発火電極数 8 以上」では使用可能なウェルが 1 など極めて少なくなる群が生じた。「バースト電極数 5 以上」では全ての群において少なくとも 3 ウェル分の使用可能データが得られた。「バースト電極数 5 以上」クライテリアで得られた陰性化合物(DMSO)データはウェル間のばらつきも少なかった (Fig.3)。

In silico神経毒性予測 (分担研究、吉成の項) において予測性が低かった有機リン剤について、MEAによりヒト iPS 細胞由来神経細胞への影響を解析した。Chlorpyrifos、DiazinonでMEAパラメータに変動が見られ、ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いたMEAにより神経毒性を検出していることが示唆された。また、両剤とも Network burst 数の増加や Burst 持続時間、Burstあたり Spike 数の減少等に関して類似したパラメータ変化を示しており、共通のメカニズムによる影響が示唆された (Fig.4)。

OECD DNT-IVB では慢性曝露による Neural network forming assayが記載されているが、神経毒性の検出に慢性曝露が必要か、急性曝露でも可能かは結論が出ていない。ヒト iPS 細胞由来神経細胞への毒性が報告されているDeltamethrin、Cypermethrinについて、急性曝露による神経活動への影響を解析したところ、先行研究にて同一の細胞を用いて行われた慢性曝露実験より低い半量阻害ベンチマーク濃度(BMC₅₀)が得られた (Fig.5)。急性曝露により、慢性曝露より高感度で神経毒性評価が行えることが示唆された。

③灌流装置におけるラット神経細胞のMEA計測

MEAシステムMaestroにより計測されたラット神経細胞の全スパイク数、ネットワークバースト数の経時変化をFig.6に示す。全スパイク数、ネットワークバースト数とも培養開始後 1 週間で増加が始まり、培養開始後 2 週間でプラトーに達するプロファイルが得られた。DNT-IVBガイダンスに記載のプロトコルでは、ラットから単離した神経細胞を凍結せずにそのまま用いているが、本研究では検証試験の観点から市販の凍結ラット神経細胞を使用したところ、ネットワーク活動が見られるまでの期間に両細胞間で特に差は見られな

かった。

MaxOneシステムにラット神経細胞を播種し、神経活動の指標として、多電極アレイ上でスパイクを検出した電極 (Active電極) の割合を経時的に計測した (Fig.7)。Active電極の割合(%)は、培養開始後 1 週間で増加し、培養後 3 週間目までにプラトーに達していると思われた。ラット神経細胞を搭載したMaxOne電極を灌流培養装置と接続してMEA計測を行った結果、培養液流動に伴うと考えられるノイズが見られたものの、ネットワーク活動の計測に成功した (松永の項を参照のこと)。

④ラット神経細胞を用いた慢性曝露MEA計測

DMSO (0.1%)の曝露は、MEAデータに影響を及ぼさなかった。全スパイク数に対するDMSO曝露の結果をFig. 8Bに示す。DIV7-14 のハロペリドール曝露は 3 μ M 以上の濃度でスパイクを消失させた (Fig.8C上)。これに対し、アセトアミノフェン慢性曝露はいずれの濃度でも全スパイク数に影響を与えなかった (Fig.8C下)。

⑤MEAのためのヒトiPS細胞由来神経細胞培養手順の開発

iCell glutaneuronとAstrocyteの重層培養により、培養開始後 4~5 週間でネットワークバーストが観察されたものの、多くのウェルで強い凝集が観察された (Fig.9A)。細胞解凍の際、iCell glutaneuronを、顕微鏡下ですべて単一細胞として観察できるまでピペッティングして分散させるようにしたところ、凝集はほぼ見られなくなった (Fig.9B)。

⑥MEAのためのヒトiPS細胞由来脳オルガノイドの作製・計測方法の開発

近年、より生理的なモデルとして脳オルガノイドに着目されているが、化学物質影響の解析のための手法やエンドポイントは確立されていない。再現性の良いオルガノイドのMEA評価法を目指し、本研究ではオルガノイドの作製プロトコルの改良を行った。具体的には、神経誘導時に細胞を包埋するマトリゲルを、ES細胞用 (米国Corning社、カタログ番号 354277) からオルガノイド作製用に最適化されたマトリゲル基底膜マトリックス フェノールレッドフリー オルガノイド形成用 (Corning社、カタログ番号 356255) に変更した。またMEA計測をより早い時点 (令和 5 年度: オルガノイド作製開始後 260 日以降、令和 6 年度: 同 113 日以降) に変更した。

ヒト iPS 細胞より作製した脳オルガノイドは直径 2mm 以上と大きく、Maestroシステムで用いられる電極 (1mm 四方の範囲に 16 電極) では十分にカバーで

きなかったことから、26,400 電極により 4mm x 3mm の範囲をカバーできる高密度MEAシステムMaxOneを用いた。各 1-2 個の脳オルガノイドを播種した 8 基のMaxOne電極チップのうち、2 個で播種後 1 週間目からネットワークバーストが検出された。令和 5 年度までの研究では、測定ごとにネットワークバーストの検出に大きな変動が生じていたが、令和 6 年度は 1 個のオルガノイド（直径約 2mm）について、培養 3 週間にわたりほぼ安定したネットワークバーストを観察できた（Fig.10）。

⑦試験法の行政利用に向けた国際動向調査

欧米、アジアの動物実験代替法関連学会に参加し、MEAデータによる神経毒性予測や化学構造に基づく *in silico* 毒性予測と *in vitro* 評価の統合等の成果を報告した。また、OECDのDNTワークショップにおいて日本におけるDNT-IVBに関する取り組みについての講演も行い、海外規制機関の関係者とのディスカッションと情報収集を行った。OECDの拡張一世代生殖発生毒性試験ガイドライン(TG443)の改訂に参画し、発達神経毒性試験に関する改訂はほぼ無かったものの、内容の確認を行った。

D. 考察

OECDのDNT-IVBガイダンスでも指摘されているように、化学物質の中樞神経作用を評価するうえでBBBの影響は重要であり、3Rsの観点からヒト細胞を用いた試験系の樹立が望まれる。前年度までに、ヒトiPS細胞由来BBBの複数施設におけるプレバリデーションを実施し、バリア機能を安定して発揮できることを確認した。今後、作製したMPSにより、統合的な神経毒性リスク評価法につながることを期待される。Maxwell社のシステムは、灌流培養装置との接続など拡張性が高く、キネティクスを考慮したMEA計測には利点が多いと考えられる。一方、神経ネットワーク活動を記録するパラメータはMaxOneとMaestroなどでシステムごとに独自のものが用いられており、異なるシステムで得られたMEAデータを比較するためには、パラメータの対応付けなど機種間差を検討する必要がある。

これまでEPAでは、ラット神経細胞を用いたMEAにより、多くの化学物質について急性・慢性影響のデータが蓄積 (<https://comptox.epa.gov/dashboard/>) されており、現在、OECDやEFSAなどでは適切な対照化合物の選定と技術移転を進めている。これらの手法の予測性を明らかにするためには、MEAなど *in vitro* のデータを *in vivo* に外挿する IVIVE (*in vitro-in vivo extrapolation*) が重要である。ヒト、ラットそれぞれの体内濃度と毒性影響が明確な対照物質を用いて、ヒト

細胞とラット神経細胞でMEAパラメータの選定と曝露マージンなどを比較する必要がある。本研究では、陽性対照物質としてハロペリドール、陰性対照物質としてアセトアミノフェンを使用し、ラット神経慢性曝露評価系の検証を行った。ハロペリドールは 3 μ M以上の濃度でスパイクを完全に消失させることが観察され、EPAのデータ（10 μ Mでスパイクを 100%抑制）と一致する結果が得られた。今後、更に化学物質を増やして、ラット神経細胞を用いた慢性曝露系の再現性などを検証する必要があると考えられる。

化学物質の発達神経毒性評価に関して、2023 年 4 月にOECDの*in vitro* testing battery (DNT-IVB) ガイダンスが承認され、国際的な議論が進められている。その中でMEAによる神経ネットワーク活動の評価法が記載されているが、同一のヒトiPS細胞由来神経細胞を用いたMEA評価で化学物質の投与前の神経ネットワーク活動にばらつきが認められることから、標準化のネックとなっている (ALTEX, 37:121-135, 2020)。現在、EFSAの予算をもとに、欧米ではCROに技術移転を検討している。ヒトiPS細胞由来神経細胞に関しては、培養手順の標準化に関する検討を進め、解凍した細胞を単一細胞まで分散させることが、凝集防止に重要であることを見出した。これは細胞供給元のプロトコルには記載のない工程であり、実験データの再現性に重要であると考えられる。また、これまで使用してきた市販ヒトiPS細胞由来神経細胞の供給が停止する事態が生じたこと等も踏まえ、使用するヒトiPS細胞由来神経細胞の株間差も重要な課題である。細胞の株間差を克服できる評価指標の選定が必要と考えられるが、今のところ、MEAのパラメータからは選定できていない。今後、トランスクリプトーム解析などを実施し、MEAデータと細胞の品質との相関をさらに検討する必要がある。

さらに近年、より生理的なモデルとして脳オルガノイドに着目され、MEAによる脳オルガノイドの神経活動解析が数多く報告されている (Sun Y et al. Cell Stem Cell. 2025) が、化学物質影響の解析のための手法は確立されていない。本研究の第 2 年度までに、大脳オルガノイドからネットワーク活動を示すMEAデータを得ることに成功したが、測定ごとにデータの変動が大きく、試験のためのタイムウィンドウを見出すことが課題であった。第 3 年度にて、オルガノイド作製のための包埋材（マトリゲル）や培養期間を調整することで、3 週間にわたり安定したネットワークバーストが見られるオルガノイドを得ることに成功した。オルガノイドの安定したMEA計測には、マトリゲルなどの材料の選択や培養期間の最適化、オルガノイドのサイズなどが重要という知見を得ることができた。

E. 結論

本研究において、新たにMEA試験系を灌流装置につなぐことに成功し、BBBと神経の臓器連関モデルの基盤となる技術を構築できた。また、ラット神経細胞やヒトiPS細胞由来神経細胞、ヒトiPS細胞由来大脳オルガノイドの作製についても安定した結果が得られたことから、今後、標準プロトコルの確立に役立つと考えられる。以上の成果をもとに、DNT-IVBの改訂の議論を進めることにより、ガイダンスに貢献したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. **諫田泰成, 安彦行人**: 化学物質のインビトロ発達神経毒性評価—甲状腺ホルモンの影響評価の取り組み, 第49回日本毒性学会学術年会, 北海道, 2022年7月2日, 口頭, 国内.
2. Shigeru Yamada, **Yukuto Yasuhiko, Yasunari Kanda**: Tributyltin inhibits neural induction via mitochondrial dysfunction in human iPS cells, 第8回国際メタロミクス学会, 石川, 2022年7月12日, ポスター, 国内.
3. **安彦行人**, 山田茂, **諫田泰成**: 多点電極アレイシステム (MEA) を用いたヒト iPS 由来神経細胞によるピレスロイド発達神経毒性の評価, 第62回日本先天異常学会学術集会, 石川, 2022年7月29日, 口頭, 国内.
4. **諫田泰成, 安彦行人**: インビトロ神経毒性評価法の現状と課題, 日本動物実験代替法学会第35回大会, 静岡, 2022年11月19日, 口頭, 国内.
5. **Yukuto Yasuhiko**, Shigeru Yamada, **Yasunari Kanda**: ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた多点電極アレイシステムによるピレスロイド系農薬の神経毒性評価, 第96回日本薬理学会年会, 神奈川, 2022年11月30日, ポスター, 国内.
6. **安彦行人**, 山田茂, 花尻瑠理, **諫田泰成**: ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた解離性麻酔剤の神経毒性評価, 第143回日本薬学会年会, 北海道, 2023年3月27日, ポスター, 国内.
7. **諫田泰成**: ヒト iPS 細胞を用いた発達神経毒性ガイダンスと今後の展望. 第63回日本先天異常学会学術集会シンポジウム, 2023年7月28日, 茨城.
8. **Kanda Y, Yasuhiko Y**: Predictive toxicology using human iPS cells. 12th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences WC12, Aug. 27-31, 2023. Niagara Falls, Canada.
9. **Kanda Y**: Recent progress of alternatives to animal testing from regulatory science in Japan. 12th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences WC12, Aug. 27-31, 2023. Niagara Falls, Canada.
10. **Yasuhiko Y**, Yoshinari K, **Kanda Y**: Prediction of developmental neurotoxicity using a read across approach. 12th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences WC12, Aug. 27-31, 2023. Niagara Falls, Canada.
11. **安彦 行人, 諫田 泰成**: ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いたマンガン化合物の神経毒性評価. 日本毒性学会・生体金属部会メタルバイオサイエンス研究会 2023, 2023年10月6日, 岐阜.
12. **諫田泰成**: 化学物質の発達神経毒性評価と甲状腺影響評価の取り組み. 日本動物実験代替法学会第36回大会シンポジウム, 2023年11月29日, 千葉.
13. **安彦 行人**, 村上 真菜, **諫田 泰成**: ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた多点電極アレイシステムによるフルオキシセチンの神経毒性評価. 第97回日本薬理学会年会, 2023年12月14日, 兵庫.
14. **Kanda Y, Yasuhiko Y**, Yoshinari K, Suzuki I. Japanese perspectives. DNT5 workshop., April 7, 2024. Konstanz, Germany.
15. **Yasuhiko Y**: Neurotoxicity assessment of pesticides using human iPSC-derived neurons with multi-electrode array system. 21st Korean Society for Alternative to Animal Experiment Annual Meeting, Jul. 14-16, 2024. Busan, Korea.
16. **Yasuhiko Y, Kanda Y**: Neurotoxicity assessment of pesticides by acute administration to human iPSC-derived neurons using multi-electrode array systems. 13th American Society for Cellular and Computational Toxicology Annual Meeting, Oct. 27-31, 2023. North Carolina, USA.
17. **Kanda Y**. Evaluation of neurotoxicity for pesticide-related compounds in human iPS cell-derived neurons using MEA: Japanese experience. OECD Workshop on critical innovations in pesticides safety testing and chemical risk assessment for DNT, Oct. 30, 2024. Paris, France.
18. **安彦 行人, 諫田 泰成**: ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた多点電極アレイシステムによる農薬の

神経毒性評価. 第 61 回全国衛生科学技術協議会年会, 2024 年 11 月 22 日, 大阪

19. **諫田 泰成**: NAMs による食品安全性評価の現状と今後の展望, 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会, 2024 年 12 月 1 日, 栃木
 20. **Kanda Y, Yasuhiko Y**: Predictive toxicology using human iPS cells. 12th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences WC12, Aug. 27-31, 2023. Niagara Falls, Canada.
 21. **Kanda Y**: Recent progress of alternatives to animal testing from regulatory science in Japan. 12th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences WC12, Aug. 27-31, 2023. Niagara Falls, Canada.
 22. **Yasuhiko Y, Yoshinari K, Kanda Y**: Prediction of developmental neurotoxicity using a read across approach. 12th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences WC12, Aug. 27-31, 2023. Niagara Falls, Canada.
 23. **安彦 行人, 村上 真菜, 諫田 泰成**: ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた多点電極アレイシステムによるフルオキセチンの神経毒性評価. 第 97 回日本薬理学会年会, 2023 年 12 月 14 日, 兵庫
 24. **安彦 行人, 諫田 泰成**: ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いたマンガン化合物の神経毒性評価. 日本毒性学会・生体金属部会メタルバイオサイエンス研究会 2023, 2023 年 10 月 6 日, 岐阜
 25. **諫田泰成**: ヒト iPS 細胞を用いた発達神経毒性ガイドランスと今後の展望. 第 63 回日本先天異常学会学術集会シンポジウム, 2023 年 7 月 28 日, 茨城
 26. **諫田泰成**: 化学物質の発達神経毒性評価と甲状腺影響評価の取り組み. 日本動物実験代替法学会第 36 回大会シンポジウム, 2023 年 11 月 29 日, 千葉
 27. **Kanda Y, Yasuhiko Y, Yoshinari K, Suzuki I**. Japanese perspectives. DNT5 workshop, April 7, 2024. Konstanz, Germany.
 28. **Yasuhiko Y**: Neurotoxicity assessment of pesticides using human iPSC-derived neurons with multi-electrode array system. 21st Korean Society for Alternative to Animal Experiment Annual Meeting, Jul 15, 2024. Busan, Korea.
 29. **Kanda Y**: Regulatory science using New Approach and Methodologies. Aug 25, 2024. TSSCR. Taipei, Taiwan.
 30. S. Yoshida, T. K. S. Tiong, Y. Nomura, **Y. Kanda**: Glyphosate exposure in utero induced social behavior alteration and neuronal cell death, which could be rescued with postnatal butyrate administration. EuroTox2024, Denmark, 2024/9/9, poster.
 31. T. Nakanishi, K. Ishida, K. Tatsumi, D. Matsumaru, H. Nagase, **Y. Kanda**, K. Takuma. Utilizing neuronal differentiation reporter mice for in vivo detection of developmental neurotoxicity. EuroTox2024, Denmark, 2024/9/9, poster.
 32. **Yasuhiko Y, Kanda Y**: Neurotoxicity assessment of pesticides by acute administration to human iPSC-derived neurons using multi-electrode array systems. 13th American Society for Cellular and Computational Toxicology Annual Meeting, Oct 29, 2024. North Carolina, USA.
 33. **Kanda Y**. Evaluation of neurotoxicity for pesticide-related compounds in human iPS cell-derived neurons using MEA: Japanese experience. OECD Workshop on critical innovations in pesticides safety testing and chemical risk assessment for DNT, Oct 30, 2024. Paris, France.
 34. **諫田泰成**: ヒト細胞を活用した代替法の国際動向. 第 10 回細胞凝集研究会, 2024 年 7 月 12 日, 佐賀
 35. **安彦 行人, 諫田 泰成**: ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた多点電極アレイシステムによる農薬の神経毒性評価. 第 61 回全国衛生科学技術協議会年会, 2024 年 11 月 22 日, 大阪
 36. **諫田 泰成**: NAMs による食品安全性評価の現状と今後の展望, 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会, 2024 年 12 月 1 日, 栃木
 37. **諫田 泰成**: ヒト細胞を用いた医薬品評価法の開発と標準化. 第 8 回ニューロン研究会, 2025 年 1 月 24 日, 東京
 38. 貫野 頌悟, **諫田 泰成**, 吉田 祥子: Effects of in utero exposure to organophosphate pesticide and dimethyl sulfoxide on cerebellar development, 日本薬学会, 2025 年 3 月 30 日, 福岡
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

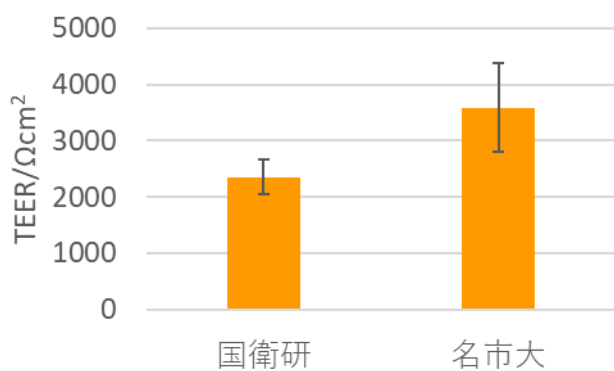


Fig.1 ヒト iPS 細胞由来 BBB のバリア機能に関する施設間プレバリデーション。
ヒト iPS 細胞由来 BBB をセルカルチャーインサートに播種し、播種後 3 日目にバリア機能 (TEER) の計測を行った。データは平均値 ± 標準偏差を示す。N=6 (国衛研)、3 (名市大)。

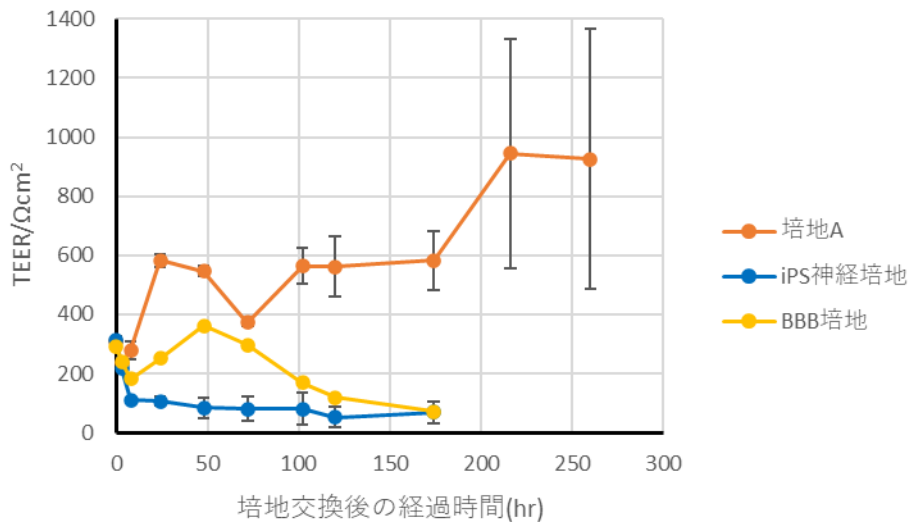


Fig.2 ヒト iPS 細胞由来神経細胞と BBB の共培養のための培地の探索。

ヒト iPS 細胞由来 BBB をセルカルチャーインサートに播種し、播種後 5 日目に検討する各培地への培地交換を行った後、バリア機能(TEER)を経時的に計測した。横軸は培地交換後の経過時間。データは平均値±標準偏差を示す。N=3 (培地 A、iPS 培地)、2 (BBB 培地)。BBB 培地の TEER は平均値のみ示した。

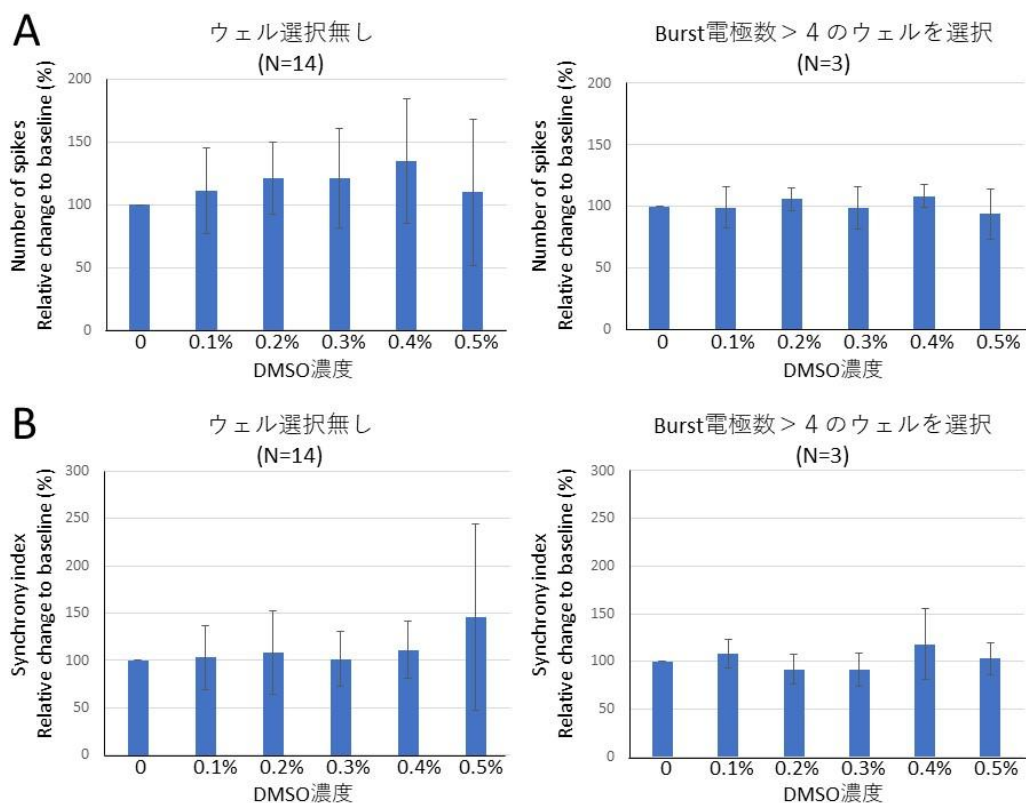


Fig.3 バースト電極(Bursting electrode)数によるウェル選択が MEA データのばらつきに与える効果。

Synfire iPS neuron に溶媒(DMSO)を 0.1%から 0.5%まで累積投与し、各濃度における Number of Spikes (A)、Synchrony index (B)を MEA により計測した。横軸は培地中 DMSO の濃度を示す。縦軸は DMSO 不添加(0%)を 100%とした全スパイク数の相対値を示す。データは平均値±標準偏差を示す。

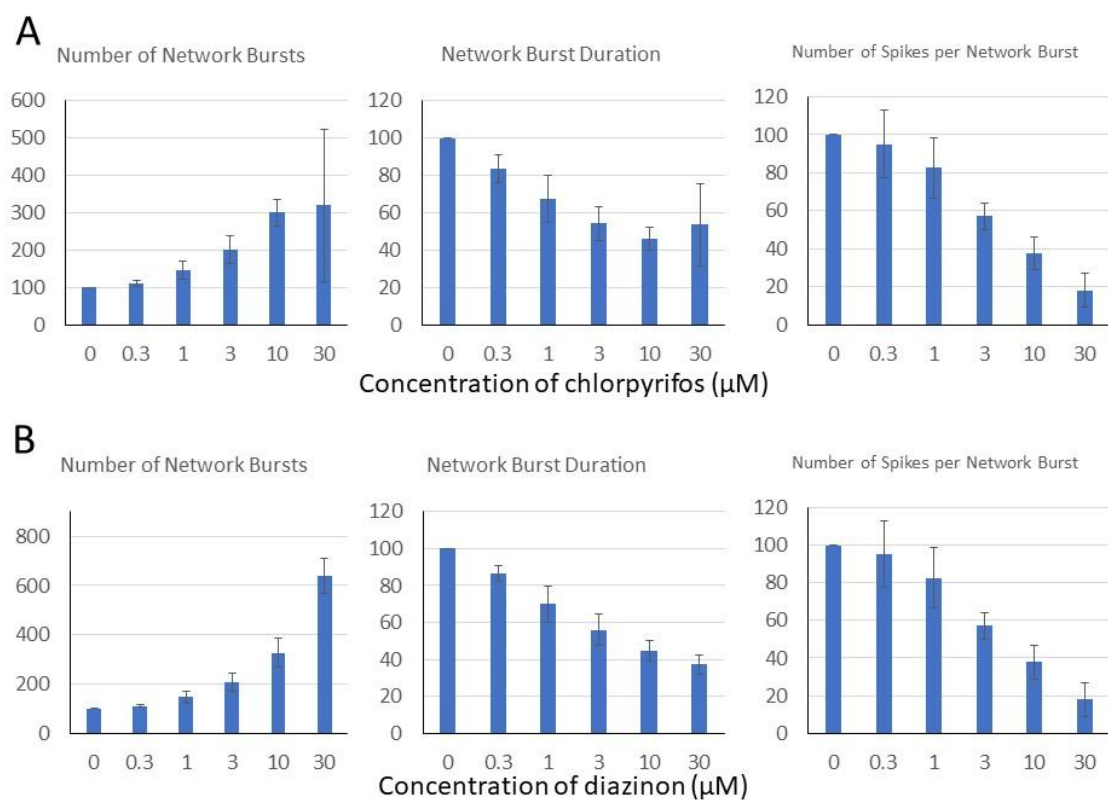


Fig.4 有機リン系農薬2剤によるヒト iPS 細胞由来神経細胞 MEA パラメータ変化。

Synfyre iPS neuron に Chlorpyrifos (A)、Diazinon (B)を累積投与し、MEA によりネットワーク関連パラメータを取得した。横軸は各剤の培地中濃度を示す。縦軸は溶媒添加(0 μM)を 100%とした各パラメータの相対値を示す。データは平均値 $\pm$ 標準偏差を示す。N=7 (Chlorpyrifos)、5 (Diazinon)。

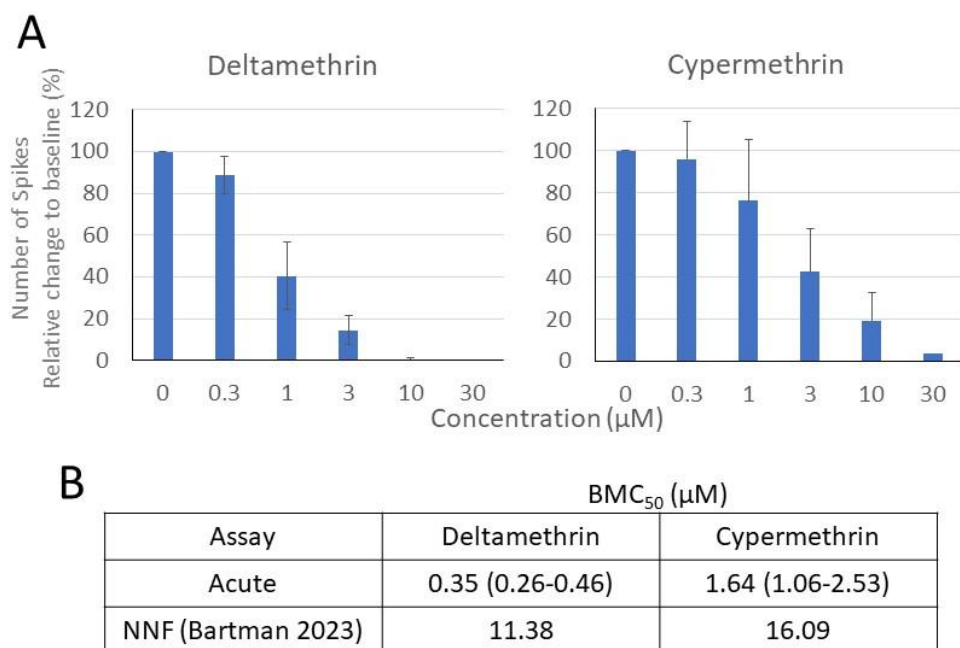


Fig.5 ピレスロイド系農薬 2 剤の急性(Acute)曝露による神経毒性評価。

A. Deltamethrin、Cypermethrin を 5 段階で累積投与し、各濃度での全スパイク数(Number of Spikes)を MEA により計測した。横軸は培地中の Deltamethrin、Cypermethrin の濃度を示す。縦軸は DMSO 不添加(0%)を 100%とした全スパイク数の相対値を示す。データは平均値±標準偏差を示す。N=7 (Deltamethrin)、10 (Cypermethrin)。

B. BMDS 3.3.2 ソフトウェア (米国 EPA) により半量阻害ベンチマーク濃度(BMC₅₀)を算出した (Acute の欄)。カッコ内は 95%信頼区間を示す。「NNF(Bartman 2023)」は同種のヒト iPS 細胞由来神経細胞を使用した慢性投与実験 Neural Network Forming (NNF)アッセイにより算出された BMC₅₀を示す。

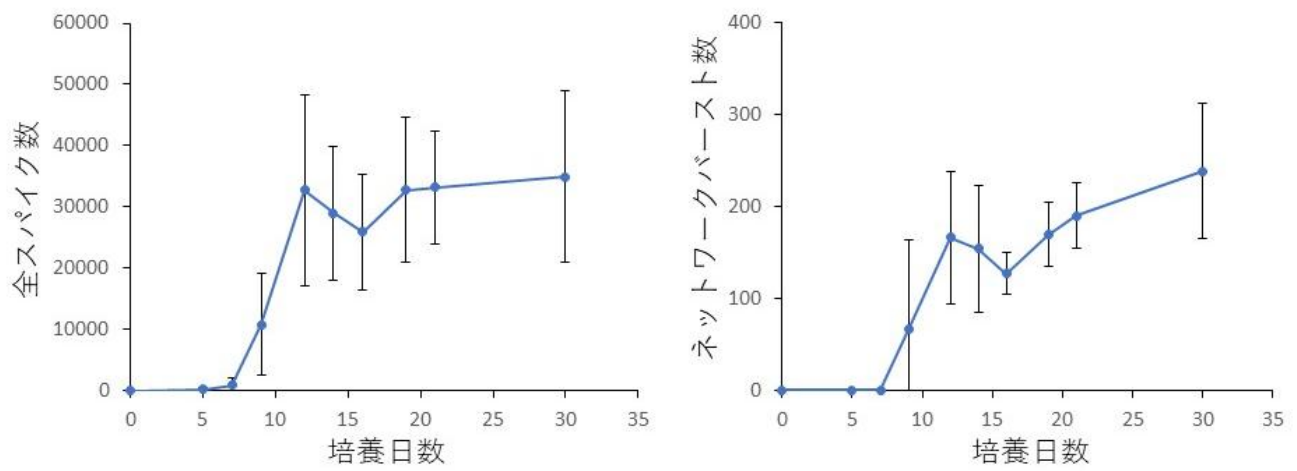


Fig.6 Maestro MEA システムによるラット神経細胞のネットワーク活動の経時変化

48well MEA プレートに凍結ラット神経細胞を解凍して播種後、経時的に全スパイク数（左）およびネットワークバースト数（右）を計測した。いずれも N=4、平均値±標準偏差を示す。

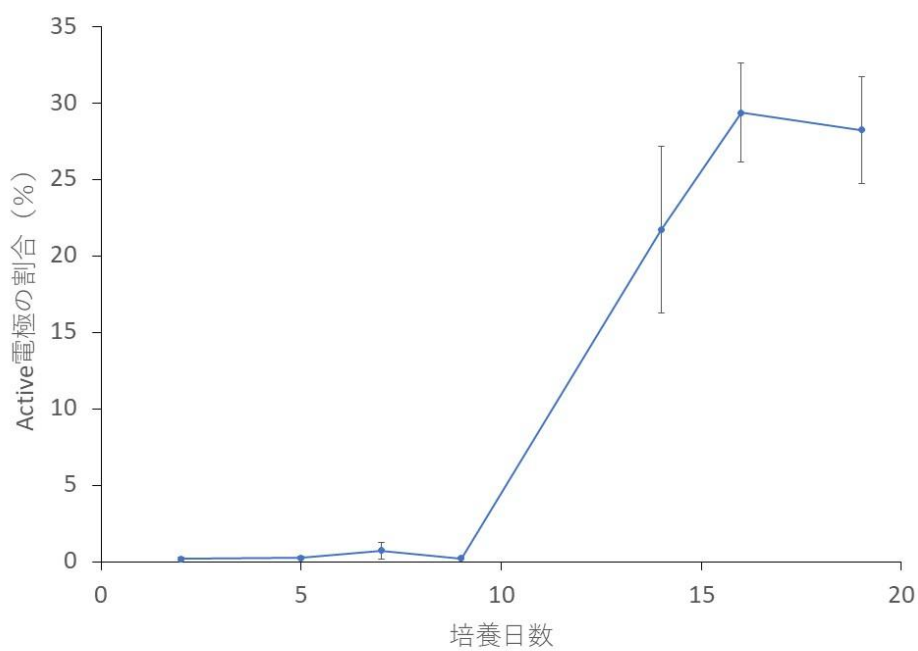


Fig.7 MaxOne MEA システムによるラット神経細胞のネットワーク活動の経時変化

多点電極 MEA システム MaxOne の電極チップに凍結ラット神経細胞を解凍して播種後、経時的に Active 電極の割合 (%) を計測した。N=4、平均値±標準偏差を示す。

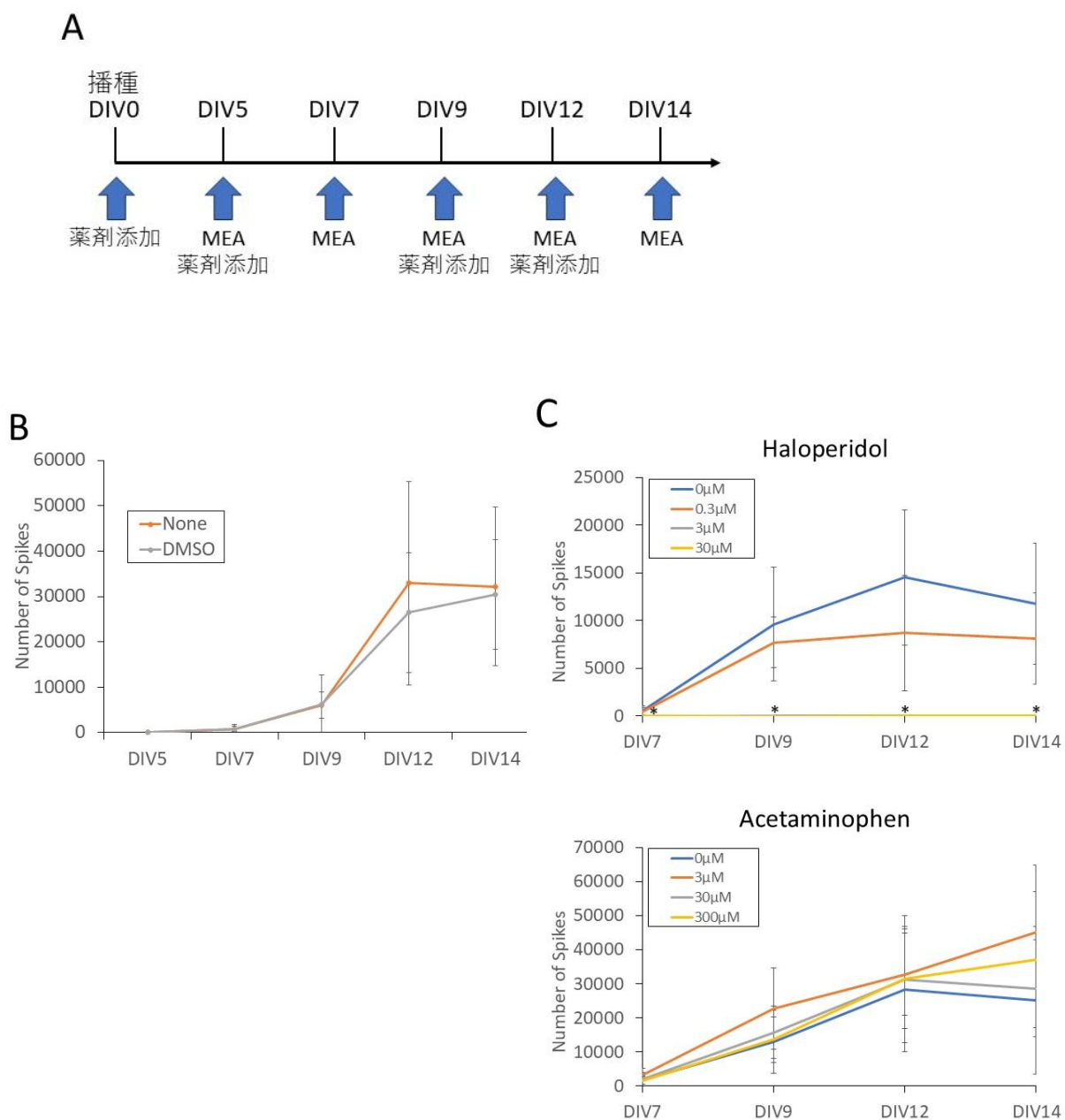


Fig.8 薬剤慢性曝露によるラット神経細胞活動の変化

48well MEA プレートに凍結ラット神経細胞を解凍して播種後、経時的に全スパイク数を計測した。
A. 実験手順 (DNT-IVB 収載の慢性曝露プロトコルに従った)。**B.** ベースラインに対する溶媒(DMSO)添加の影響。N=4、平均値±標準偏差。**C.** 全スパイク数に対するハロペリドール (上) およびアセトアミノフェン (下) 慢性曝露の経時的影響。ハロペリドール 3 μ M 以上の投与ではスパイクが消失した (*)。N=4、平均値±標準偏差。

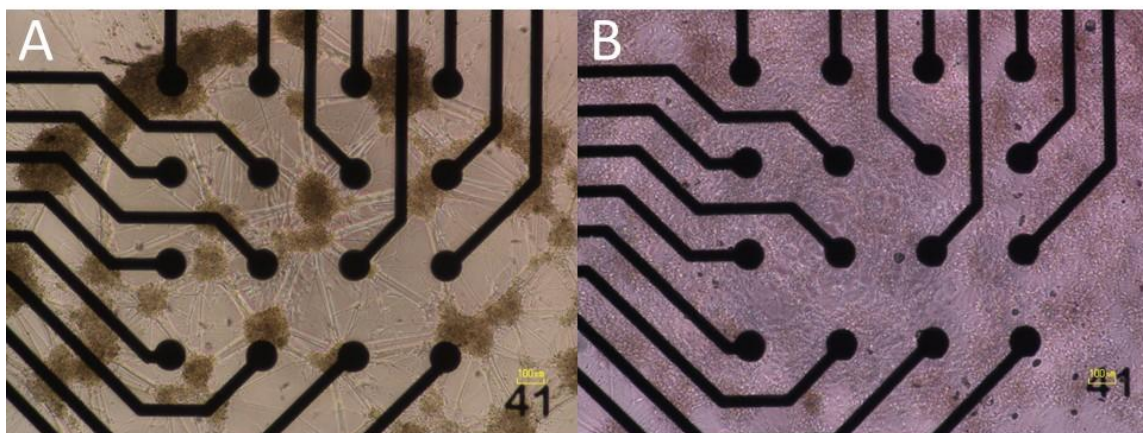


Fig.9 iCell glutaneuron、astrocyte 混合培養のプロトコル整備

- A. Glutaneuron を解凍後、顕微鏡観察で細胞数個～10 個程度の塊が見える状態で播種したもの（培養 28 日目撮影）
- B. Glutaneuron を解凍後、顕微鏡観察で完全に細胞が single cell になるまでピペティングで分散させて播種したもの（培養 32 日目撮影）

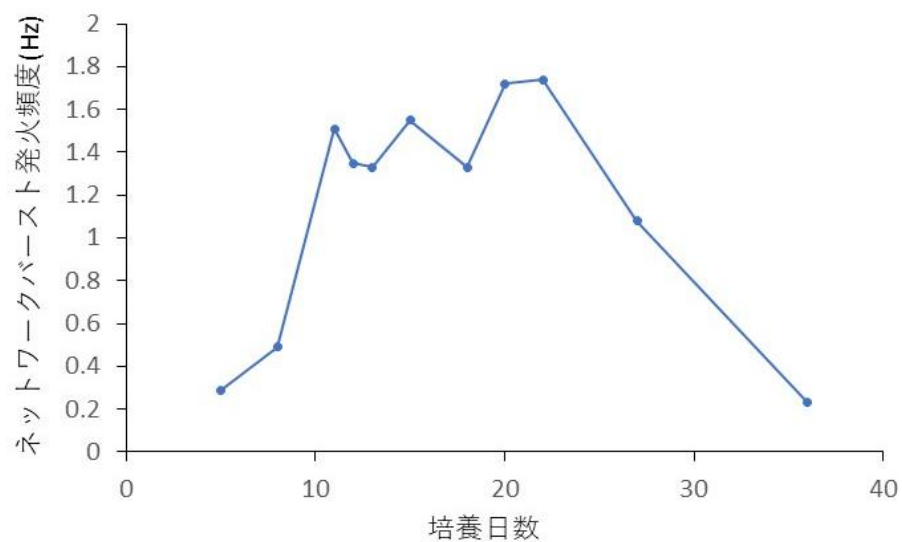


Fig.10 MaxOne によるヒト iPS 細胞由来脳オルガノイドの神経ネットワーク活動の計測

StemDiff kit を用いて作製したヒト iPS 細胞由来脳オルガノイド（培養 108 日目、直径約 2mm）のネットワークバーストを MEA システム MaxOne で計測した。8 個の電極チップ中、安定してネットワークバーストが計測された 1 個の結果を示す。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
（課題番号：22KD1002）
令和4-6年度総合報告書

AI支援型MPSを用いたヒトiPS由来神経細胞による神経毒性試験法の開発

研究代表者 安彦行人 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 室長

分担課題：細胞機能の評価に着目したMPSデバイスの開発

研究分担者：松永民秀 名古屋市立大学 特任教授

研究要旨

血液脳関門（BBB）は脳毛細血管内皮細胞、脳ペリサイト、アストロサイトから構成されている。これまで、どのような化学物質がBBBを通過して神経毒性を示すのかを評価するための *in vitro* システムは皆無に等しかった。そこで本研究では、ヒトiPS細胞由来神経細胞を播種した多電極アレイ（MEA）とヒトiPS細胞由来BBB細胞を播種したセルカルチャーインサートをMicrophysiological System（MPS）デバイスに搭載し、メカニズムベースに予測性の高い化学物質のBBB透過性と神経毒性の評価を開発することを目的としている。本研究の中で我々は、MPSに搭載する細胞株選択および培養条件の検討を担っており、特にヒトiPS細胞由来BBB細胞を構築しMPSに搭載、多電極アレイ（MEA）と統合することを目標としている。

A. 研究目的

MPS上でのヒトiPS細胞由来BBB細胞の培養条件の検討およびヒトiPS細胞由来BBB細胞を搭載したMPSとMEAの統合に向けた開発を目的とした。初年度（R4年度）においては、スタンディングタイプのセルカルチャーインサート上においても、高い経内皮的電気抵抗（TEER）値を維持した培養が可能かどうかを調べることを目的とした。次年度（R5年度）においては2層灌流デバイス上においてヒトiPS細胞由来脳血管内皮細胞にシエアストレスをかけた場合における遺伝子・タンパク質発現の変化、透過性試験の開発、BBBを構成するアストロサイトおよび脳ペリサイトとの共培養実験を行い、ヒトiPS細胞由来BBB細胞を搭載したMPSの開発を目標とした。最終年度（R6年度）においては2層灌流デバイスにMEAを連結できる方法を開発、灌流時における神経細胞への影響を調査し、デバイスを改良することを目指した。

B. 研究方法

【R4年度】

ヒトiPS細胞由来脳毛細血管内皮細胞をスタンディングタイプのセルカルチャーインサートに播種し、チップスティック型の測定器を用いて経内皮的電気抵抗（TEER）値を測定した。また、ルシファアーイエローを用いた透過性試験により、傍細胞経路輸送についても確認した。

【R5年度】

ヒトiPS細胞由来脳毛細血管内皮細胞を2層灌流デバイス上に播種し、48時間シエアストレスをかけた後、RNA抽出を行いBBBマーカーにおける遺伝子発現について解析を行った。また、2層灌流デバイスの上層部をルシファアーイエローにて満たした後、上層部および下層部を様々な流速で灌流し、経時的（20、40、60分）に下層部の溶液を回収することで、細胞間隙による透過性を解析した。また、ヒトiPS細胞由来脳毛細血管内皮細胞を長期間にわたって、高い経内皮電気抵抗（TEER）値を維持できる培地が研究代表者によって発見されたことに伴い、同様に高いTEER値を維持したまま培養で

きるかどうかを測定した。

【R6年度】

開発してきた2層灌流デバイスに既存のMEA（MaxWell Biosystems社）を連結し、MEA側に播種したラット初代培養神経細胞に灌流の影響がでないか神経活動電位を長時間測定した。灌流培養用ポンプには圧力駆動型ポンプ（Fluigent社製）を用い、20、40、80 $\mu\text{L}/\text{min}$ の流速で灌流を行った。

C. 研究結果

既存のセルカルチャーインサートと同様に、スタンディングタイプのセルカルチャーインサートにおいても、TEER値を測定できることを確認した。また、得られたTEER値は、既存のセルカルチャーインサートよりもやや低い値ではあったものの、 $1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ を超える値を示したことから、タイトジャンクション機能を十分に備えていることが示された。また、ルシファアーイエローを用いた透過性試験においても、 $2.2 \times 10^{-5} \text{ cm}/\text{sec}$ の値を示し、TEER値同様、高いタイトジャンクション機能を有していることが確認できた（図1）。

2層灌流デバイス上にヒトiPS細胞由来脳毛細血管内皮細胞を播種し24時間静置培養から流速を徐々に上げながら、培地を灌流することで細胞にシエアストレスを48時間かけた。その結果、タイトジャンクションマーカーであるZO-1や生体内の脳毛細血管内皮細胞にて高発現しているGLUT-1が発現していることが示された（図2）。さらに、シエアストレスをかけることで、静置培養と比較して排泄トランスポーターであるP-gpやGLUT-1の遺伝子発現が有意に高くなることが示された（図3）。また、デバイスの下チャネルのみ19 $\mu\text{L}/\text{min}$ の流速で灌流を行いながらルシファアーイエローによる透過性試験を行ったところ、いずれにおいても静置培養時と同様の $2.0 \times 10^{-6} \text{ cm}/\text{sec}$ 程度の透過係数を得た。このことから、タイトジャンクション機能が十分に機能し、細胞間隙による透過は認められないことが確認できた（図4）。

2層灌流デバイスにMEAを搭載したデバイスの開発を

進めてきたが、既存のMEAと2層灌流デバイスを一体化させる方法が困難を極め、一体型デバイスの開発を断念した。そこで、2層灌流デバイスとMEAを配管にて連結したMEA連結型BBB-on-a-chipの開発を行い（図5）、既存のMEA側にシリコン製のカバーを被せ、上部を厚めの蓋で押さえつけることで灌流できる装置を開発した。当初、MEA側に取り付けた配管の入口側と出口側の高さを培地液面と同様にして灌流操作を行った。その結果、電極すべてにノイズが生じ神経活動電位を測定することが困難であった。

次にMEA側に取り付けた入口側の配管の高さを短くし、培地液面と接しないように改良した。その結果、灌流培養を行いながら神経活動電位を測定することに成功した。しかし、同じ間隔でノイズが生じる現象も生じたため、灌流速度を20, 40, 80 $\mu\text{L}/\text{min}$ の3通りで測定を行ったところ、ノイズが生じる間隔が灌流速度の増加に伴い短くなることが判明した。

D. 考察

スタンディングタイプのセルカルチャーインサートを用いた場合においても高いタイトジャンクション機能を有することが確認できた。

ヒトiPS細胞由来脳血管内皮細胞を播種した2層灌流デバイスを用いた結果、細胞間隙におけるタイトジャンクション機能は静置培養と同程度であることが示された。さらに、細胞にシエアストレスをかけることでトランスポーターなどの遺伝子発現が有意に増加したことから、灌流によるシエアストレスは細胞における機能を増加させることが示された。

MEAにおいて灌流ができるように改良した装置では、MEA内の液培地液面と入口側および出口側の配管が繋がってしまったことで、MEA内に電流が流れ込み実測値にノイズが生じる結果となった。そこで、改良型では入口側の配管を培地液面より高くすることで培地との接地を避ける構造にした。その結果、全ての電極にノイズが生じることはなくなったが、一定間隔でノイズが生じる現象が生じるようになった。灌流速度を変更したところ、灌流速度依存的にノイズ間隔が短くなることが判明し、入口側の配管で生じている液滴がMEA内の培地液面に落ちる際にノイズが生じていると考察された。

E. 結論

2層灌流デバイスを用いることにより、静置培養と同等またはそれ以上の機能を有することが示された。また、MEA側に配管をつなげることで、神経細胞上で灌流を生じさせることに成功した。一方、神経活動電位の測定には、ノイズを生じさせない方法が必要であることも判明した。本研究にて得られた課題をもとに、これらの課題を解決したMEA連結型BBB-on-a-chipの開発へと繋げていく。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

竹内規晃、山下美紗季、坡下真大、岩尾岳洋、常喜祥子、広瀬賢一、山中誠、小柳博、畠山健治、松永民秀. ヒトiPS細胞由来脳毛細血管内皮細胞を用いたBBB-on-a-chipの開発. 日本薬学会 第143年会, 2023年3月26日.

竹内規晃, 西川斗偉, 坡下真大, 岩尾岳洋, 常喜祥子, 広瀬賢一, 山中 誠, 小柳 博, 畠山健治, 松永民秀.

ヒトiPS細胞由来脳毛細血管内皮細胞を用いたBBB-on-a-chipの開発. 合同会社メドテックコンサルティング創業記念学術集会, 東京, 2023年7月3日.

Hiroyuki Sato, Kaho Nakai, Yuri Ikeda, Nagae Kazue, Tadahiro Hashita, Takahiro Iwao, Tamihide Matsunaga. Evaluation of receptor-mediated uptake and transcytosis using human iPS cell-derived brain microvascular endothelial-like cells, 2024 International Society for the Study of Xenobiotics/The Japanese Society for the Study of Xenobiotics, Hawaii, 2024年9月15日.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし」

(図表は以下、1ページに1点でお願いいたします。)

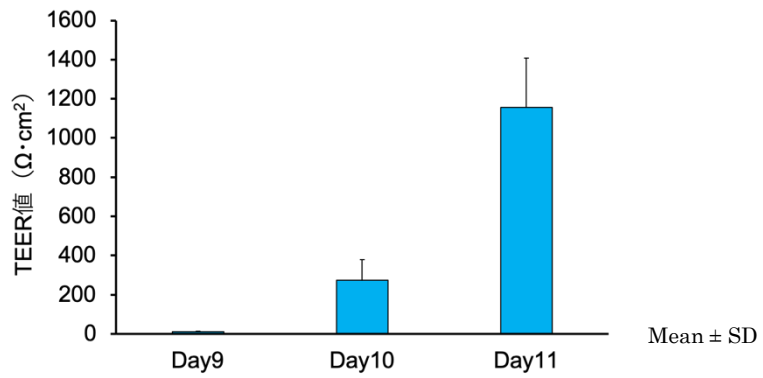


図1 スタンディングインサート上に播種したヒトiPS細胞由来脳毛細血管内皮細胞の経内皮的電気抵抗値

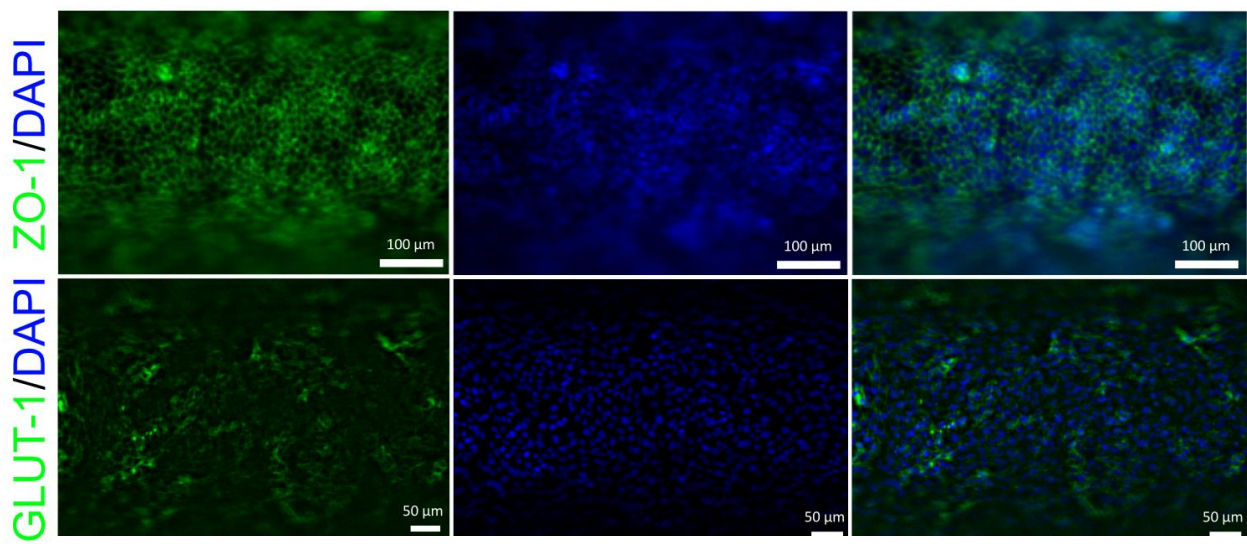


図2 2層灌流デバイスに播種したヒト iPS 細胞由来脳毛細血管内皮細胞におけるタンパク質発現

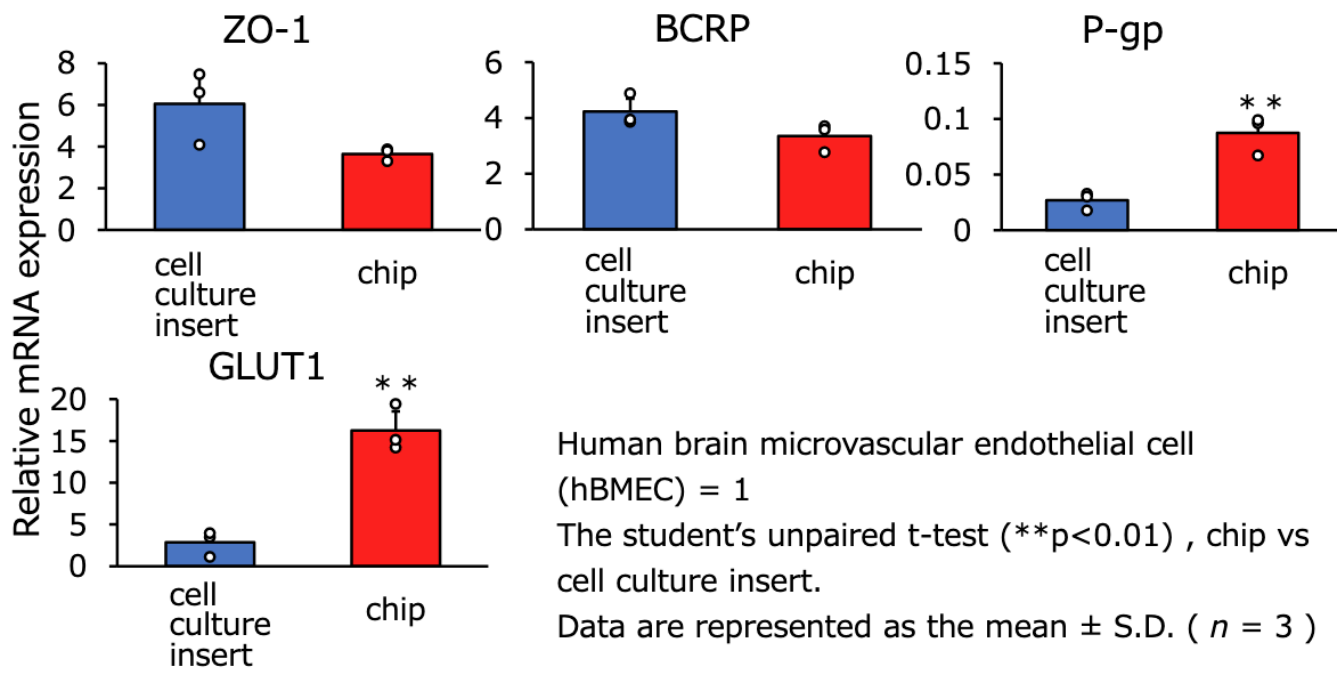


図3 2層灌流デバイスに播種したヒト iPS 細胞由来脳毛細血管内皮細胞と静置培養における遺伝子発現の変化

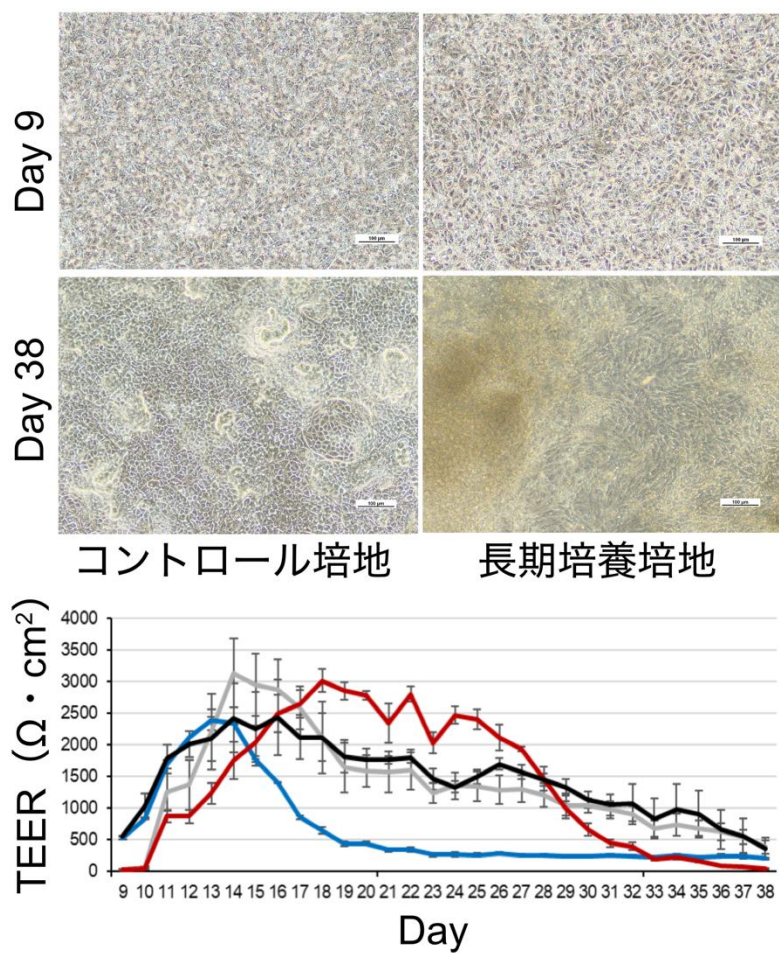


図 4 長期培養培地によるヒトiPS細胞由来脳毛細血管内皮細胞のタイトジャンクション機能と細胞形態の変化

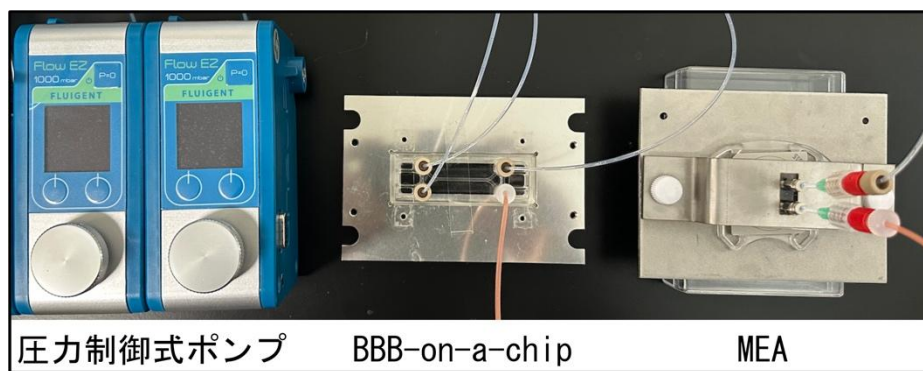


図 5 開発中の MEA 連結型 BBB-on-a-chip

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
（課題番号：22KD1002）
令和4-6年度総合報告書

AI支援型MPSを用いたヒトiPS由来神経細胞による神経毒性試験法の開発
研究代表者 安彦行人 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 室長

神経細胞の形態解析に着目したAIモデルの開発
研究分担者：（加藤竜司）（国立大学法人東海国立大学機構）（准教授）

研究要旨

本研究は、ヒトiPS細胞由来神経細胞を用いたMPS（Microphysiological Systems）とマルチ電極アレイ（MEA）を組み合わせ、神経毒性評価の精度と再現性を向上させるために、AIによる細胞画像解析技術の開発と応用を行った。目的は、従来のスパイク数やバースト頻度といったMEA出力に依存した指標に加え、神経細胞の形態情報を活用した新たな非破壊的評価基準を構築することである。

初年度には、細胞画像からの安定的な特徴量抽出に向けて、深層学習（U-net）を用いた細胞セグメンテーション技術や、画像の焦点評価アルゴリズムを整備し、解析のための基盤技術を確立した。

次年度には、自動MEA区画化アルゴリズムを開発し、各電極に対応する細胞領域からの画像特徴量を抽出。細胞間隙や被覆状態とスパイク応答との間に明確な相関関係があることを初めて定量的に示した。さらに、画像特徴量のみを用いたAIによるスパイク数予測モデルの構築を行い、条件によっては高い予測精度が得られる一方、プレート間でのばらつきやバイアスの影響も顕在化した。

最終年度には、各電極の周辺細胞量を定量化する「周辺細胞領域値」を導入し、この指標によりスパイク未検出電極を効果的に除外することで、MEAデータの信頼性と均質性を向上させることに成功した。また、階層ベイズモデルによる異常スパイク検出や、VAE（Variational Auto-Encoder）による潜在特徴量の抽出により、異なる細胞種や培養条件でもロバストな画像解析が可能となった。

以上の成果は、神経毒性評価における画像情報の活用を高度化し、従来のMEA解析を補完・強化する新たな指標群の提案につながるものであり、将来的な標準化や多施設間評価にも対応可能な技術基盤を提供する。

A. 研究目的

本研究は、神経毒性（特に急性毒性）の安定かつ定量的なin vitro評価モデルとして、ヒトiPS細胞由来神経細胞を用いたMPS（Microphysiological Systems）による評価法の確立を目指したものである。従来の神経毒性試験に代わり得る国際的に有効な試験法を確立するため、以下の2つの技術開発を主軸とした：

1. 神経細胞の品質判定のための画像AI解析技術の開発
2. 神経毒性物質に対する神経細胞の形態応答を定量化する画像AI解析技術の開発

これらを通じて、MEA（マルチ電極アレイ）解析を補完し、より生物学的意味のある指標を抽出することを目的とした。

開発項目（1）ではヒトiPS細胞由来神経細胞の品質判定画像AI解析技術を目指し、研究分担者・加藤がこれまで様々な細胞の非破壊的画像品質判定を実現してきた非破壊的画像細胞品質判定技術『細胞形態情報解析』を応用し、MPS薬剤評価を安定に実現するための神経細胞品質を判定する画像AI解析技術を開発する。

開発項目（2）では、神経毒性物質への神経細胞応答表現型の定量化を実現する画像AI解析技術を目指し、MPS中で薬剤に応答する神経細胞の形態応答変化の特

徴量解析から、MEA解析を補完する深い生物学的理解のための情報として細胞毒性及び細胞機能障害と連動する表現型特徴量の抽出技術開発と、特徴量の分析・特定を行う。

B. 研究方法

本研究では、ヒトiPS細胞由来神経細胞を用いたMPS評価系において、AI画像解析を活用した神経毒性評価手法の確立を目指し、3年間にわたって段階的に技術開発を行った。各年度での取り組みは以下の通りである。

【2022年度】

2022年度は、AI技術の実装に必要な基礎データの収集と、画像解析パイプラインの基盤構築を主眼とした。まず、研究代表者との連携により、MPS上で培養されたSynFire細胞の顕微鏡画像およびMEAデータを取得する環境と手順を整備した。これに基づき、画像の撮影条件（ピント、光量、視野の安定性など）に関するスコアリングアルゴリズムを開発し、安定した特徴量抽出のための前処理系を確立した。

技術面では、コンフルエント状態にある神経細胞画像のセグメンテーション技術として、深層学習モデルU-netを導入し、手動教師データとの照合に基づく評価を行った。さらに、得られた領域情報とテキスト情報を併用し、密集細胞の分布状態を特徴量として定量化するアルゴリズムを構築した。併せて、MEAから得られる多次元信号特徴量の蓄積と教師なし学習による次元削減を実施し、計測の安定性に寄与する指標の選別作業を行っ

た。

【2023年度】

2023年度は、前年度の基盤技術を発展させ、本年度は画像特徴量とMEA出力（spike数）との関係性を定量的に評価し、AIモデルによる応答予測を目指した。まず、MEAプレート上の電極位置に対応する画像領域を自動的にクロップする「自動MEA区画化アルゴリズム」を開発し、各電極における細胞被覆状況を正確に評価可能な画像処理環境を整備した。

この画像から抽出された26種の形態特徴量に基づき、spike数との相関解析を行ったところ、細胞間隙が増加するとspike頻度が低下することが明確化された。また、ウェル全体における被覆密度や不均質性の統計量とspike応答の相関性が高いことが判明し、電極単位の情報だけでは予測が困難であることも明らかとなった。これらの解析結果に基づき、複数のウェルデータを用いて画像特徴量のみからspike数を予測するAIモデル（Lasso回帰、ランダムフォレスト等）を構築したが、特定のプレートに対する過学習傾向が認められた。

このため、バイアスの影響やプレート間変動の要因を明らかにするための追加実験と、より汎化性の高いモデル構築に向けた手法選定が次年度課題として設定された。

【2024年度】

2024年度は、2023年度に構築した画像予測モデルのロバスト性向上と、実験データ間の変動要因の抽出・補正を目的とした。まず、各電極の周辺細胞領域を定量化し、この値を基に電極を5段階に分類。周辺細胞領域が小さい電極ではスパイク未検出率が高いことを明らかにし、電極ごとの信頼性評価指標としての有用性が示された。また、スパイク未検出電極を除去する閾値処理により、平均スパイク数が増加し、Well間のばらつき（CV）が減少する傾向が確認された。この分析により、周辺細胞情報に基づく電極選別が、より安定したMEAデータ取得に寄与することが示唆された。

さらに、実験間バラツキや異常値の影響を抑制するため、階層ベイズモデルやVAE（Variational Auto-Encoder）を導入。特にVAEは、画像全体から抽出される潜在特徴量として細胞状態を抽象化できる点で有用であり、細胞種や条件が変更された場合にも解析パイプラインを維持できるモデル設計が可能となった。階層ベイズによるスパイク数の逸脱値検出もあわせて実施し、in silicoでのノイズ除去技術として有望な成果を得た。

C. 研究結果

本研究では、3年間にわたり神経毒性試験における画像AI解析技術の確立に向けた開発を段階的に進め、複数の技術的成果を得た。

【2022年度】

2022年度は、画像解析技術の基盤構築に焦点を当て、神経細胞のコンフルエント画像に対して適用可能なセグメンテーション手法として深層学習モデル（U-net）を実装した。これは、神経細胞の密集領域から構造的な特徴量を抽出し、電極位置に依存しない細胞分布情報の可視化と定量化を可能にした。また、MPSから得られる多次元MEAデータについても、教師なし学習を用いた次元削減・特徴量抽出を試み、安定性に欠ける特徴量の抽出や、冗長な指標群の整理に成功した。

焦点スコアリングアルゴリズム（図1）を開発したことで、画像撮影の標準化と最適化が進み、以降のAI学習データの品質向上にも貢献した。これらの結果により、画像データとMEAデータの同時取得・解析を行う体制が

確立され、次年度以降の予測モデル構築に向けた技術基盤が整えられた。

【2023年度】

2023年度は、画像から抽出される細胞形態特徴量とMEA出力との関係をより詳細に分析することを目的とし、得られた知見は画像AI予測モデルの構築に直結した。とくに、自動MEA区画化アルゴリズム（図2）の開発により、各電極領域を個別に切り出して解析することが可能となり、細胞被覆の不均質性を定量的に測定できるようになった。

画像中の26種類の形態特徴量のうち、spike頻度と強い負の相関を示す指標（例：細胞間隙面積など）が明らかとなり、これまで経験的に知られていた「細胞の疎密と神経活動の関連」が定量的に裏付けられた（図3）。さらに、電極単位よりもウェル全体で集約した形態統計量がスパイク応答と高い相関を示すことから、局所情報よりも全体傾向の方が評価指標として有効である可能性が示唆された。

これらの特徴量を用いて、画像のみからスパイク数を回帰予測するAIモデル（LASSO回帰、Random Forestなど）を複数構築した。一定の条件下では高い予測精度を示したが、特定プレートでは精度が著しく低下するなど、データバイアスの影響が顕在化した。

【2024年度】

2024年度は、これまでの知見を基に画像AIモデルのロバスト性向上とノイズ除去技術の確立に注力した。まず、各電極の周囲に存在する細胞量（周辺細胞領域値）を定量化し、これをもとに電極を5段階に分類。スパイク未検出電極の割合を分析した結果、細胞量が少ない領域ほどスパイク検出率が低下する明確な傾向が確認され、電極単位での信頼性評価指標として周辺細胞領域値が有効であることを実証した（図4）。

さらに、この周辺細胞領域値を閾値としてフィルタリングを実施したところ、平均スパイク数が上昇し、Well間ばらつき（CV）が減少する結果が得られた。閾値設定によりデータの均質性が高まり、神経細胞活動の定量的評価が可能となった（図4）。

また、データのロバスト性向上に向けて、階層ベイズモデルを用いた異常スパイク値の検出と除去法の開発（図5）を行い、外れ値の除去によって画像特徴量とスパイク応答の相関性が向上することが確認された。さらに、VAEを用いた潜在特徴量抽出モデルを開発し、細胞種や撮影条件が変化しても再学習を必要とせず、共通の特徴空間で細胞状態を記述可能とする汎用的AIパイプラインの構築に成功した。

D. 考察

本研究では、神経毒性試験における画像情報活用の可能性を3年にわたり体系的に検証した。初年度は、MEAと画像を同時解析するための撮影・蓄積・前処理基盤を構築し、次年度には画像形態情報からの予測モデル開発へと進展させた。最終年度には、実験環境間での変動を補正しうる高度なAI手法（VAE、階層ベイズなど）を導入し、ロバストな解析パイプラインへの統合を実現した。得られた知見の中でも特に重要なのは、電極周辺の細胞情報とスパイク検出率との関係が定量的に明らかとなり、電極単位での信頼性評価が可能となった点である。従来の神経毒性評価では、ウェル全体の平均応答やバースト頻度などが主な評価指標であったが、本研究はそれらを補完し、局所的な構造的背景に基づく定量的・非侵襲的な指標導入の可能性を示した。

また、細胞間隙や被覆率などの形態特徴量が、神経活動の低下と強い負の相関を持つことは、画像情報に基づ

く品質管理が神経毒性評価の信頼性向上に寄与しうることを示す科学的根拠となる。VAEによる特徴量抽出も、細胞種や条件が変わっても共通指標として用いることができる可能性を提示しており、今後の標準化や多施設間比較にも耐えうる設計が期待される。

E. 結論

本研究を通じて、ヒトiPS細胞由来神経細胞を用いたMPS神経毒性試験において、画像AI解析を活用した品質評価および機能予測の新たな枠組みが提案・実証された。特に、細胞の局所的形態情報に基づいてスパイク未検出電極を定量的に除外し、MEAデータの均質性と再現性を向上させる技術は、今後の神経毒性評価系において標準化の一翼を担うと考えられる。

また、VAEや階層ベイズといった高度なモデルにより、異なる条件下でも対応可能な解析パイプラインを実現できたことは、単なる技術開発にとどまらず、神経毒性評価の国際的な信頼性向上と普及に資する成果である。今後はさらに多様な条件・細胞株・施設において本手法の妥当性を検証し、標準試験法の一部として定着させることを将来目指すことが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

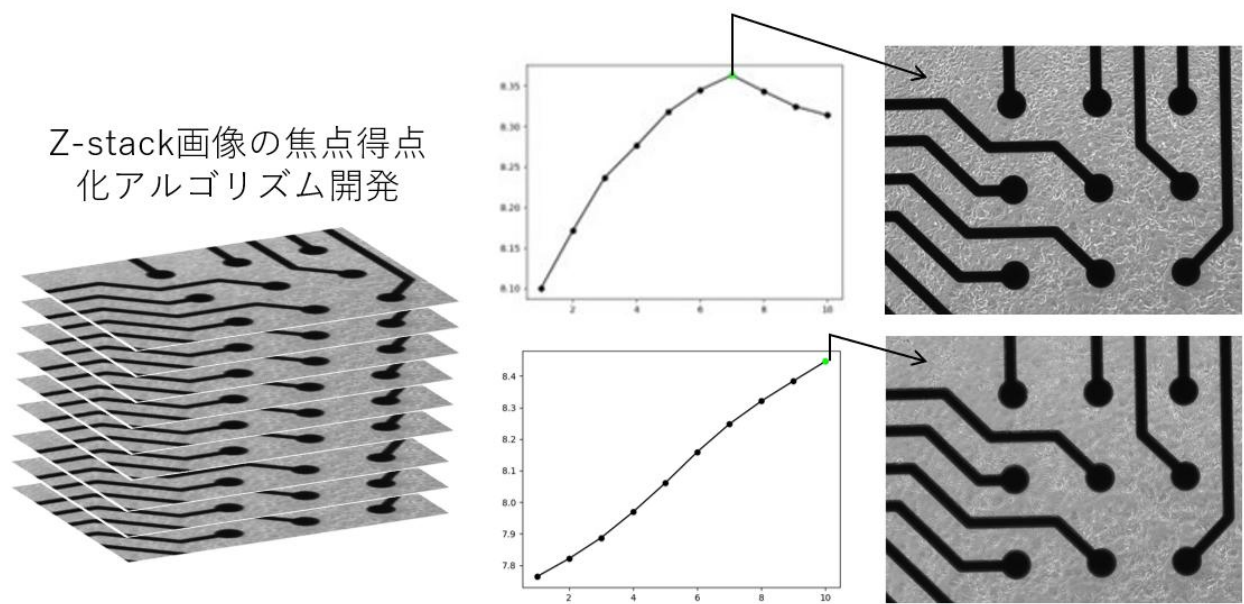
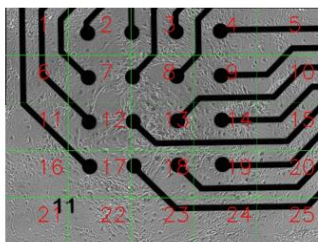
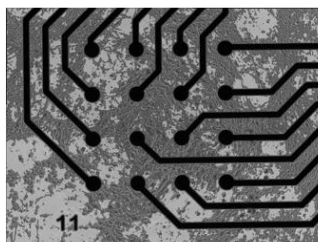


図1：神経細胞撮影条件最適化アルゴリズムの開発

- ① 画像を5×5分割
- ② 分割された画像で数値化する



- ③ 電極をセグメント
- ④ 細胞間隙をセグメント



- ⑤ 電極以外の領域だけでcell free areaを計算
- ⑥ 電極以外の領域だけでGLCM指標 (5指標)を計算
- ⑦ 電極以外の領域だけでFFT指標 (7指標)を計算

Region	cell free area	GLCM contrast	FFT frequency_bias
1	0.16	256	3045
2	0.27	382	2800
3	0.40	403	4854
4	9.12	390	3012

図2：自動MEA区画化アルゴリズムの概要

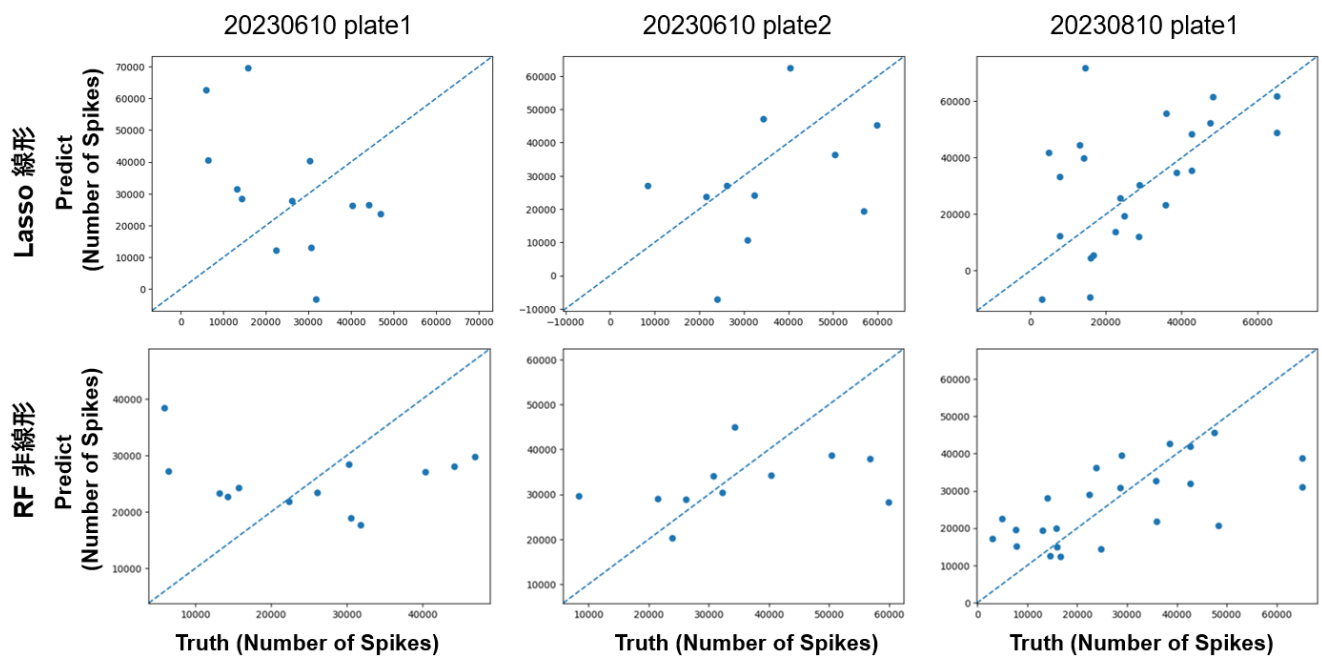


図3：画像特徴量のみを用いた予測AIモデル

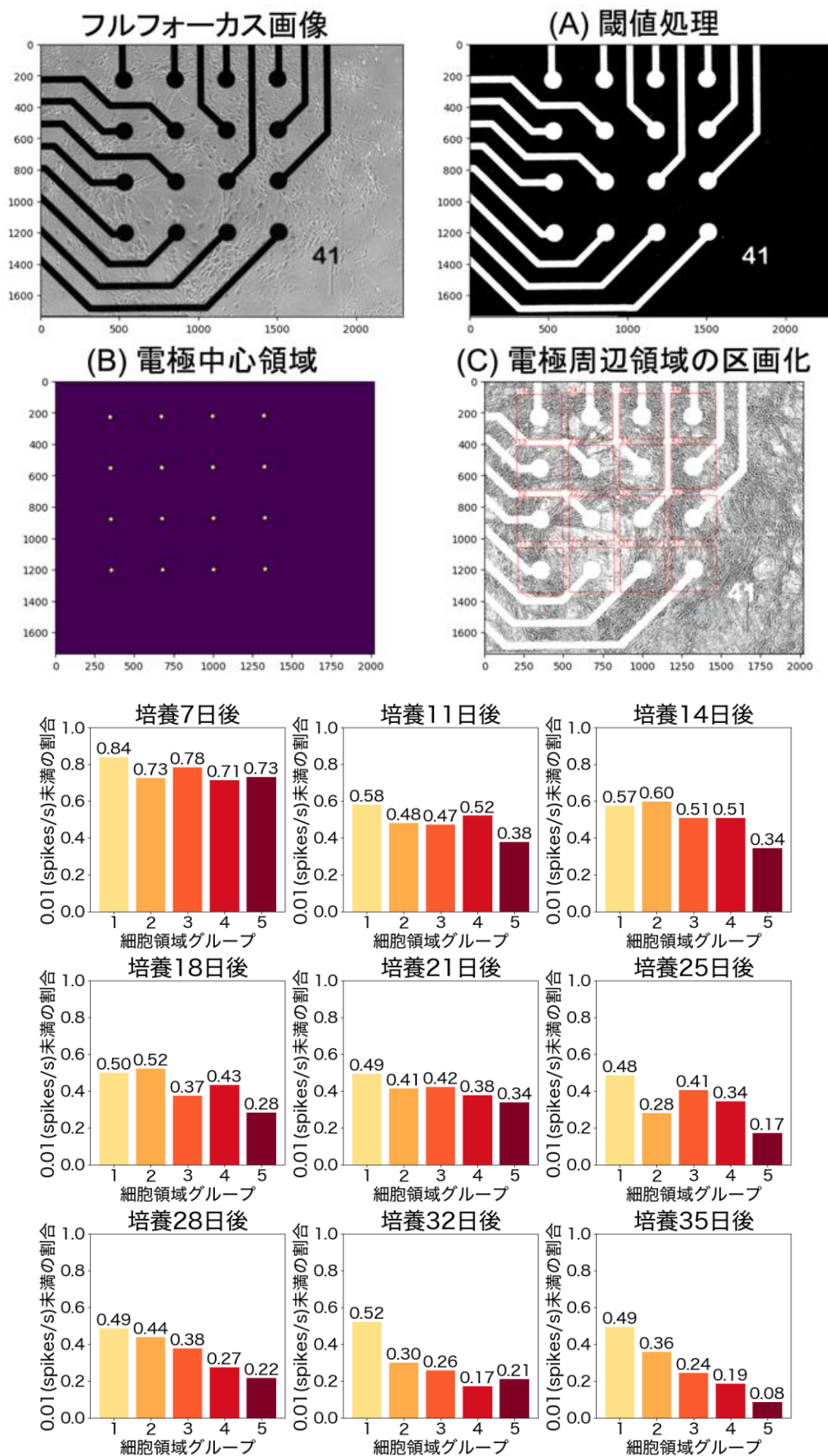


図4：MEA区画化アルゴリズムと評価結果

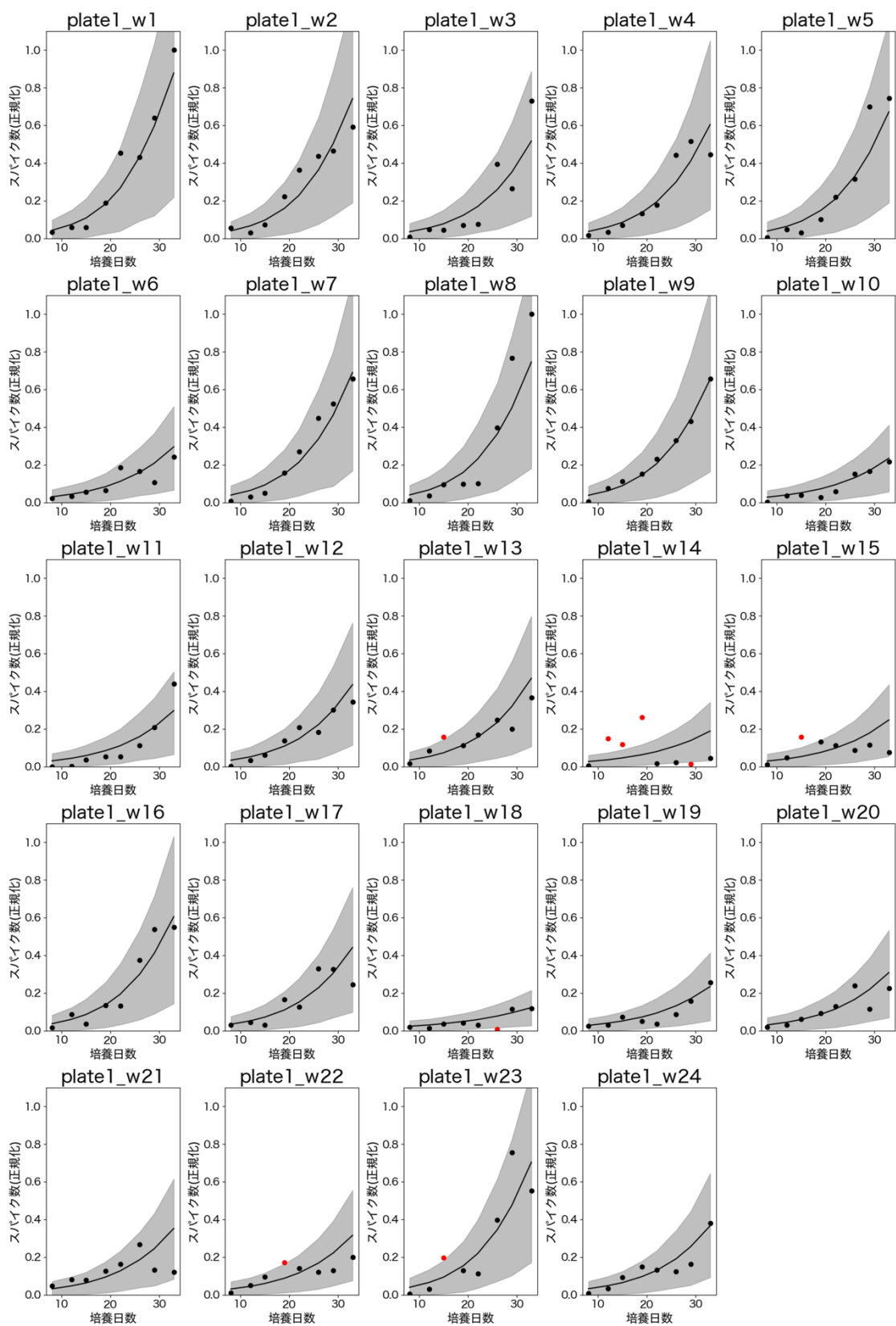


図5：階層ベイズを用いたノイズデータ検出の例

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
 （課題番号：22KD1002）
 令和4-6年度総合報告書

AI支援型MPSを用いたヒトiPS由来神経細胞による神経毒性試験法の開発

研究代表者 安彦行人 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 室長

分担課題：化学物質のヒト健康影響を評価するためのin vitro代替試験法の
 実用化に向けた比較・検証研究

研究分担者：鈴木郁郎 東北工業大学工学部 教授

研究要旨

ヒト誘導多能性幹細胞（iPSC）由来ニューロンを使用したin vitro微小電極アレイ（MEA）評価は、毒性評価の方法として有望である。我々はラスタプロット画像の特徴量を学習したAIを用いた毒性リスク検出法を開発してきたが、特徴量に基づく判定結果の解釈が難しいという問題があることから、より単純なバースト関連パラメータを用いた機械学習手法を構築することにより、これらの問題解決を検討してきた。パラメータAIは入力パラメータの数値情報となるため、MEAデータに限らず、その他の評価系による解析値をパラメータとして追加することが可能であり、MEAデータによる神経機能情報に加えて、その他評価系による情報を含有した統合的な毒性評価が可能となる。本研究では、MEA上に培養したヒトiPS細胞から取得したバースト関連パラメータを用いたone-class SVM（support-vector machine）モデル、および、NN（neural network）モデルを構築し、ヒトへの健康影響が報告されている化学物質、および、陰性対照化合物の毒性予測を実施した。SVMモデルは、5種類の陽性化合物中3種類の化合物、および8種類の農薬中7種類の化合物のリスクを検出可能であり、すべての化合物の濃度依存的なリスク上昇を検出できたことから、毒性リスク予測手法としての可能性を秘めていると考えられる。偽陽性のリスクを考慮する必要があるが、予測モデルに学習させるパラメータを検討することで、予測精度の向上が期待できる結果が得られた。バースト関連パラメータを用いた毒性予測NNモデルではSVMモデルを上まわる精度で毒性を予測することができた。

A. 研究目的

ヒト誘導多能性幹細胞（iPSC）由来ニューロンを使用したin vitro微小電極アレイ（MEA）評価は、毒性評価の方法として有望である。我々はラスタプロット画像の特徴量を学習したAIを用いた毒性リスク検出法を開発してきたが、特徴量に基づく判定結果の解釈が難しいという問題があることから、より単純なバースト関連パラメータを用いた機械学習手法を構築することにより、これらの問題解決を検討してきた。パラメータAIは入力パラメータの数値情報となるため、MEAデータに限らず、その他の評価系による解析値をパラメータとして追加することが可能であり、MEAデータによる神経機能情報に加えて、その他評価系による情報を含有した統合的な毒性評価が可能となる。本研究では、パラメータAI（SVMモデル、NNモデル）による神経毒性評価方法の構築と精度検証のために、MEA上に培養したヒトiPS細胞から取得した神経活動パラメータを使用して、ヒトへの健康影響が報告されている化学物質および、陰性対照化合物の毒性予測を実施した。

B. 研究方法

Human iPSC-derived cortical neurons（Neucyte Inc.）あるいは、iCell Glutaneurons（FUJIFILM Cellular Dynamics Inc.）を24-well MEAプレートおよび48-well MEAプレート上に培養し、培養4-5週目に自発活動および薬剤累積投与後の細胞外電位を取得した。

SVMモデルの検討として、薬剤は5つの痙攣陽性化合物と4つの陰性化合物および8つの農薬を使用した。痙攣陽性化合物として、4-AP, Kainic Acid, Pilocarpine, Picrotoxin, PTZ, 陰性化合物として、Acetaminophen, Amoxicilline, Aspirin, 農薬として、Cypermethrin, Deltamethrin, Dieldrin, Fenamidone, Lindane, Permethrin, Acetamiprid, Aldicarbを使用した。NNモデルの1回目の検討として、薬剤は12種類の農薬関連化合物と4つの陰性化合物を使用した。農薬関連化合物は、Cypermethrin, Deltamethrin, Permethrin, Dieldrin, Fenamidone, Fipronil, Lindane, Permethrin, Acetamiprid, Aldicarb, Carbaryl, Clothianidinを使用した。陰性対照化合物として、Acetaminophen, Amoxicilline, Aspirinを使用した。NNモデルの2回目の検討として、薬剤は11種類のヒトへの健康影響が報告されている化学物質と2つの陰性化合物を使用した。試験化合物は、Bisphenol A, Chlorpyrifos, Fipronil, Fluoxetine, Haloperidol, Tebuconazole, Tributyltin, Deltamethrin, Rotenone, β -Cyfluthrin, Metaflumizoneを使用した。陰性対照化合物として、Acetaminophen, Aspirinを使用した。すべての薬剤の溶媒にはDMSOを使用した。

取得した細胞外電位からスパイクを検出し、スパイク時系列データのバースト解析を行った。バースト関連パラメータとして、①総発火数、②同期バースト数、③バースト間隔、④バースト持続時間、⑤バースト内発火数、⑥最大発火周波数、⑦最大発火周波数の変動係数、⑧最大発火周波数点の間隔、⑨最大発火周波数点の間隔の変動係数、⑩バースト間隔の変動係数、⑪バースト持続時間の変動係数、⑫バースト内発火数の

変動係数、⑬バーストの規則性、⑭バースト持続時間の四分位範囲、⑮バースト持続時間の最大値を算出した。SVMモデルには、バースト内発火数、バースト内の最大発火周波数、最大発火周波数の変動係数、最大発火周波数間隔の変動係数を使用した。1回目のNNモデルには、①総発火数、②同期バースト数、③バースト間隔、④バースト持続時間、⑤バースト内発火数、⑥最大発火周波数、⑦最大発火周波数の変動係数、⑧最大発火周波数点の間隔、⑨最大発火周波数点の間隔の変動係数を使用し、2回目のNNモデルには、①～⑯の全てのパラメータを使用した。

それぞれのパラメータAIは、陰性対照化合物を陰性データ、ヒトへの健康影響が報告されている化学物質・農薬・痙攣陽性化合物の高濃度を陽性データとして、毒性予測AIモデルを作成し、未学習wellのデータに対して、作成したAIによる毒性判定を実施し、精度検証を実施した。

C. 研究結果

1. SVMモデルの検討

作製したSVMモデルの痙攣陽性化合物と痙攣陰性化合物の予測結果を図1に示す。リスクスコアは、陰性化合物データの外れ値($p \leq 0.05$)からの距離を示し、正のスコアは外れ値(毒性リスク)であること示している。作製したSVMは、陰性化合物を91%の精度で陰性と判定し、5つの陽性化合物のうち3化合物を毒性と判定した。また、毒性判定できなかったPilocarpineとPTZも用量依存的にリスクスコアの上昇がみられた。

次に、SVMモデルの農薬の予測結果を図2に示す。未学習のDMSOをすべて陰性と判定した。8種類の農薬の内、7種類を毒性と判定した。また、毒性判定できなかったAldicarbも用量依存的にリスクスコアの上昇がみられた。

2. NNモデルの検討 (1回目)

作成した毒性予測AIモデルによる学習データのROC曲線を図3に示す。ROC曲線のAUCは0.91であり、学習した化合物の毒性判定を高い精度で実現していることが示された。学習データに対する判定精度が最も高くなるpositive score = 0.585を毒性判定閾値として決定した。作成した毒性予測AIモデルによる未学習wellに対する毒性判定結果を図4、図5に示す。前述のとおり、positive score = 0.585を毒性判定閾値として使用すると、すべての陰性対照化合物で低濃度から高濃度にかけて毒性は検出されず、正しく陰性判定することができた。農薬関連化合物については、Acetamiprid, Aldicarb, Carbaryl, Cypermethrin, Deltamethrin, Dieldrin, Fenamidone, Lindane, Permethrinで濃度依存的に毒性判定された。Clothianidin, Fipronilは毒性判定されず、Tributyltinは低濃度から同期バーストが消失した為、毒性判定を実施できなかった。

毒性予測AIモデルによる毒性判定結果表を図6に示す。前述のClothianidin, Fipronilではいずれの濃度においても毒性判定されなかったものの、その他の化合物では、同期バースト発火の消失も毒性とみなすことで濃度依存的に毒性判定されていることが示された。結果として、陰性対照化合物4種類および、農薬関連化合物12種類の合計16化合物中14化合物を正しく毒性予測することができた。

2. NNモデルの検討 (2回目)

2回目の検討では、使用する細胞、パラメータの種類、化学物質の種類を拡充し、NNモデルの適応可能な範囲

を検討した。ヒトへの健康影響が報告されている化学物質および陰性対照化合物による神経活動パラメータの変化をヒートマップを作成することで確認した(図7)。11種類の試験化合物のうち10種類の化合物で濃度依存的に発火数および同期バースト数が減少する傾向が観察された。また化合物によって各々複数のパラメータで濃度依存的な変化が観察された。ただし、陰性対照化合物であるAcetaminophen, Aspirinにおいても複数のパラメータで変化が認められたため、試験化合物と陰性対照化合物の変化の差異を見極められるAI作成が重要となる。

作成した毒性予測AIモデルが予測した未学習データおよび未学習化合物に対する毒性スコアを図8に示す。陰性対照化合物では、濃度に関わらず低い毒性スコアを維持した。試験化合物では、未学習データおよび未学習化合物いずれにおいても濃度依存的に毒性スコアが上昇する傾向が観察された。

毒性予測AIモデルによる毒性判定結果表を図9に示す。陰性対照化合物に対する毒性スコアの2SDを毒性判定閾値として使用すると、すべての未学習データで低濃度から高濃度にかけて毒性検出することができた。また、陰性対照化合物では低濃度から高濃度にかけて毒性が誤検出されず、正しく陰性判定することができた。さらに、未学習化合物に対しても低濃度から高濃度にかけて毒性検出することができた。

結果として、陰性対照化合物2種類および、ヒトへの健康影響が報告されている化学物質11種類の合計13化合物すべてで毒性を予測することができた。

D. 考察

バースト関連パラメータを用いたone-class SVMでは、陽性化合物と陰性化合物のリスク評価は達成されたが、AmoxicillineとAspirinの一部濃度は陽性と判定された。さらに、Pilocarpine, PTZの毒性リスクは検出できなかった。しかし、陽性化合物のリスクスコアは濃度依存的に増加し、農薬の毒性リスクも検出できたことから、毒性リスク予測手法としての可能性を秘めていると考えられる。ただし、陰性化合物の一部は陽性と判定されたため、偽陽性のリスクを考慮する必要がある。今回の検証では4つのバースト関連パラメータのみを使用した。パラメータ数を増やすことで予測精度が向上する可能性があると考えられる。

バースト関連パラメータを用いた毒性予測NNモデルでは、16化合物中14化合物を正しく毒性予測することができた。この検証では9つのバースト関連パラメータのみを使用した。パラメータ数を増やすことで予測精度が向上する可能性がある。

続けて実施した2回目の毒性予測NNモデルでは、13化合物の毒性を予測することができた。1回目の検証では9つのバースト関連パラメータのみを使用した。2回目の検証では6つのパラメータを追加した計15パラメータを使用した。以前の検証では毒性を検出できない化合物があったが、今回の検証ではすべての化合物で毒性を予測できたことから、パラメータ数を増やすことで予測精度が向上することが示された。

パラメータAIは入力がパラメータの数値情報となるため、MEAデータに限らず、その他の評価系による解析値をパラメータとして追加することが可能であり、MEAデータによる神経機能情報に加えて、その他評価系による情報を含有した統合的な毒性評価が可能となり、評価対象とできる化合物範囲が非常に広がる。今後MEAデータ以外の評価系パラメータを含有した統合的な毒性評価AIの構築を目指す。また、

他施設で取得したMEAデータを本研究で構築したパラメータAIに入力し、毒性予測結果の再現性を検証すると共に、複数施設で構築したデータベースを学習したパラメータAIを作成し、本研究のAIと毒性予測の精度を比較する。

E. 結論

本研究により、ヒトiPS細胞由来神経ネットワークのバースト関連パラメータを用いた毒性予測AIモデルの化合物毒性予測法としての有効性が示唆された。またパラメータ数を増やすことで予測精度が向上する結果が得られたことから、今後複数の評価系データを学習することでMEAデータ以外の評価系パラメータを含有した統合的な毒性評価AIの構築に期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yuto Ishibashi, Nami Nagafuku, Yasunari Kanda, Ikuro Suzuki, Evaluation of neurotoxicity for pesticide-related compounds in human iPS cell-derived neurons using microelectrode array, Toxicology in Vitro, Volume 93, 105668, 2023

2. 学会発表

1. 鈴木郁郎, ヒトiPS神経のMEA計測による化合物毒性リスク予測, 情報計算法学生物学会 (CBI学会) 2022年大会
2. 鈴木郁郎, In vitro神経活動に基づいた化学物質の神経毒性評価, シンポジウム「発達神経毒性の現状と今後の課題」第35回日本動物実験代替法学会
3. 石橋勇人, 永福菜美, 鈴木郁郎, ヒトiPS細胞由来ニューロンの電気活動を指標とした化合物の毒性

リスク評価法の検討, 第13回スクリーニング学研究会

4. Yuto Ishibashi, Nami Nagafuku, Ikuro Suzuki, Toxicity risk assessment method for compounds using human iPS cell-derived neurons, Neuroscience 2022

5. 石橋勇人, 永福菜美, 鈴木郁郎, ヒトiPS細胞由来ニューロンのMEAデータを用いた殺虫剤の神経毒性評価, 第50回日本毒性学会学術年会

6. 石橋勇人, 永福菜美, 鈴木郁郎, MEAシステムによる痙攣化合物および殺虫剤の神経毒性評価と作用機序推定, 第6回医薬品毒性機序研究会

7. 松田直毅, 永福菜美, 石橋勇人, 鈴木郁郎, 機械学習を用いたヒトiPSニューロンのMEA計測における神経毒性評価法, 第15回スクリーニング学研究会

8. 松田直毅, 永福菜美, 石橋勇人, 鈴木郁郎, ヒトiPS細胞由来ニューロンのMEA計測における殺虫剤の神経毒性評価と作用機序予測, 第50回日本毒性学会学術年会

3. 総説

1. 鈴木郁郎, 「ヒトiPS神経の電気活動に基づいた化合物の毒性及び作用機序予測」 谷本学校 毒性質問箱 第24号, 2022, 20-31

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

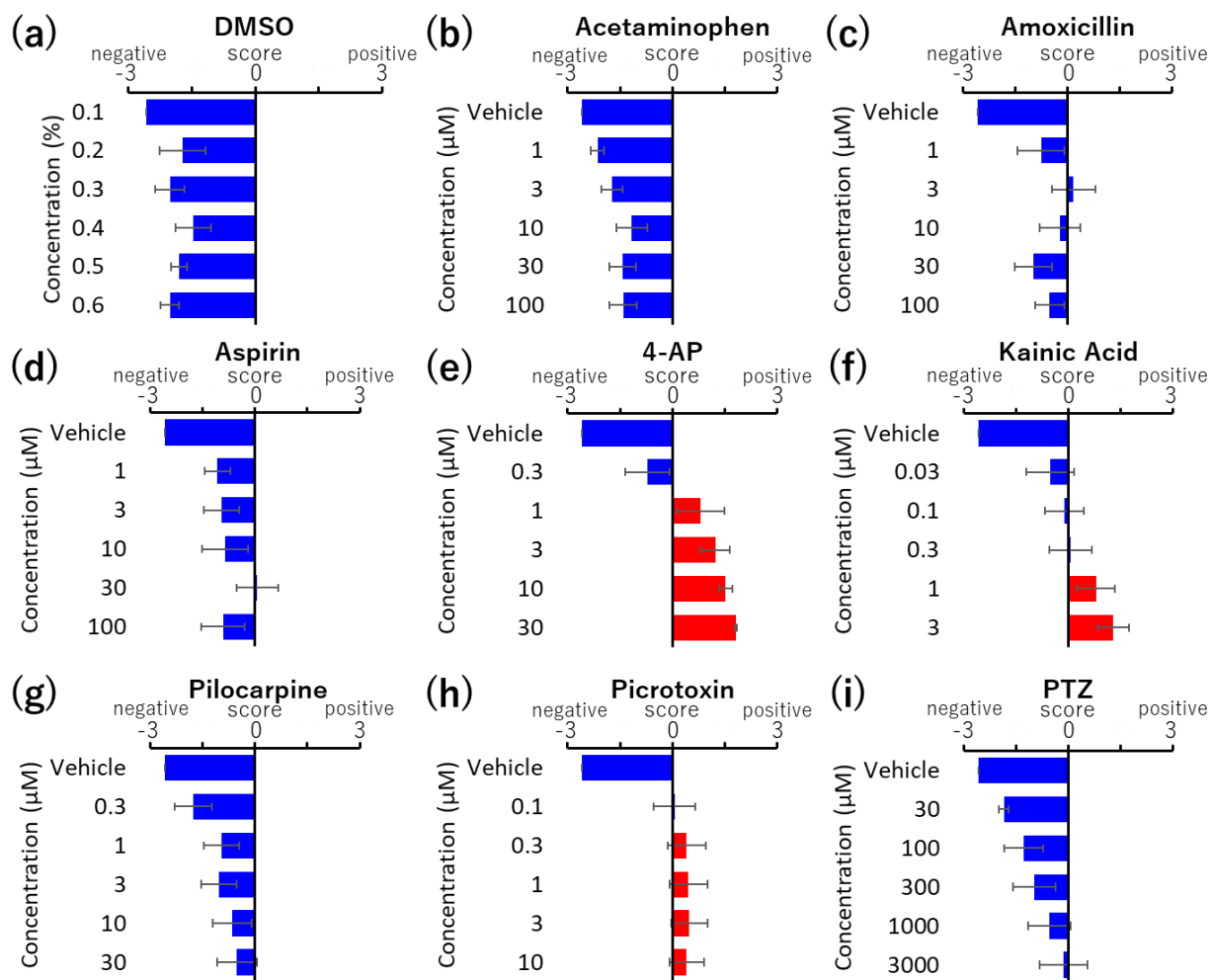


図 1. バースト関連パラメータ SVM による陽性化合物の毒性リスク予測
 (a) DMSO, (b) Acetaminophen, (c) Amoxicillin, (d) Aspirin, (e) 4-AP, (f) Kainic Acid, (g) Pilocarpine, (h) Picrotoxin, (i) PTZ. 青色：陰性判定された濃度、赤色：毒性判定された濃度

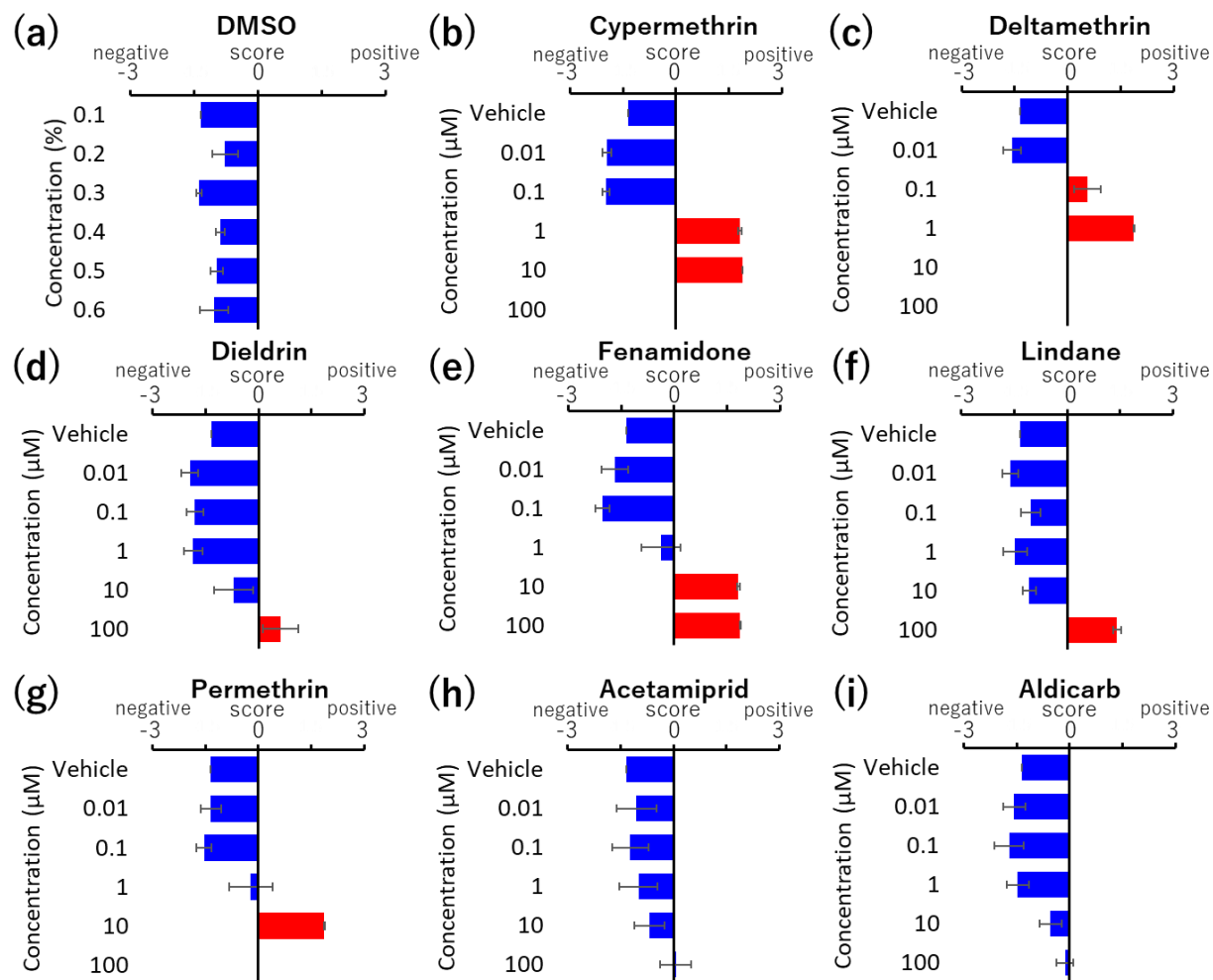


図 2. バースト関連パラメータ SVM による農薬の毒性リスク予測

(a) DMSO, (b) Cypermethrin, (c) Deltamethrin, (d) Dieldrin, (e) Fenamidone, (f) Lindane, (g) Permethrin, (h) Acetamiprid, (i) Aldicarb. 青色：陰性判定された濃度、赤色：毒性判定された濃度

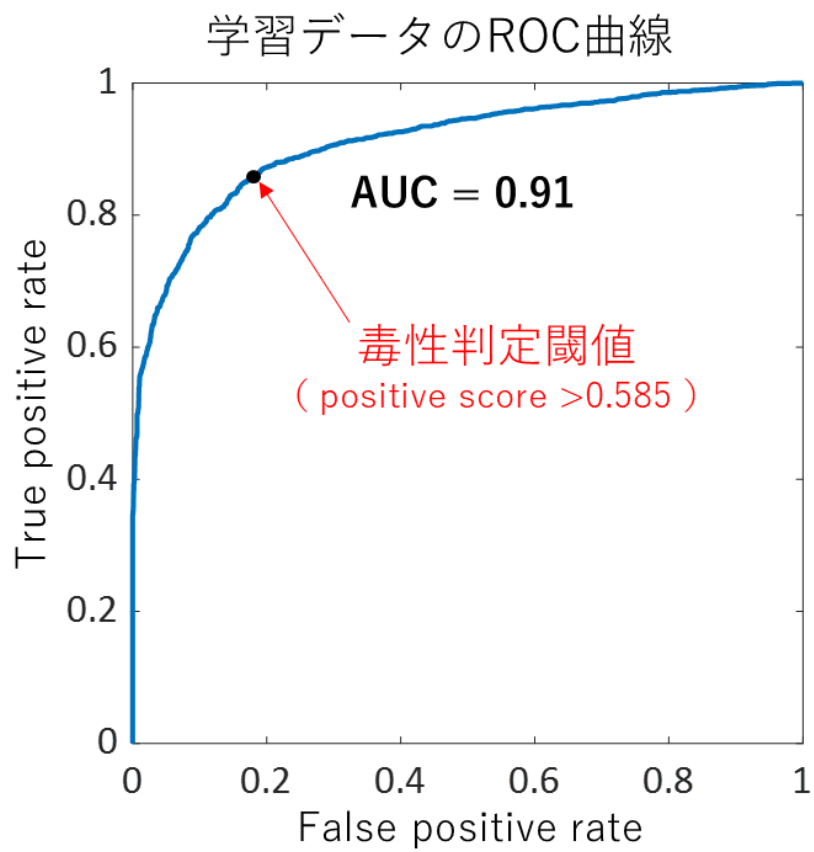
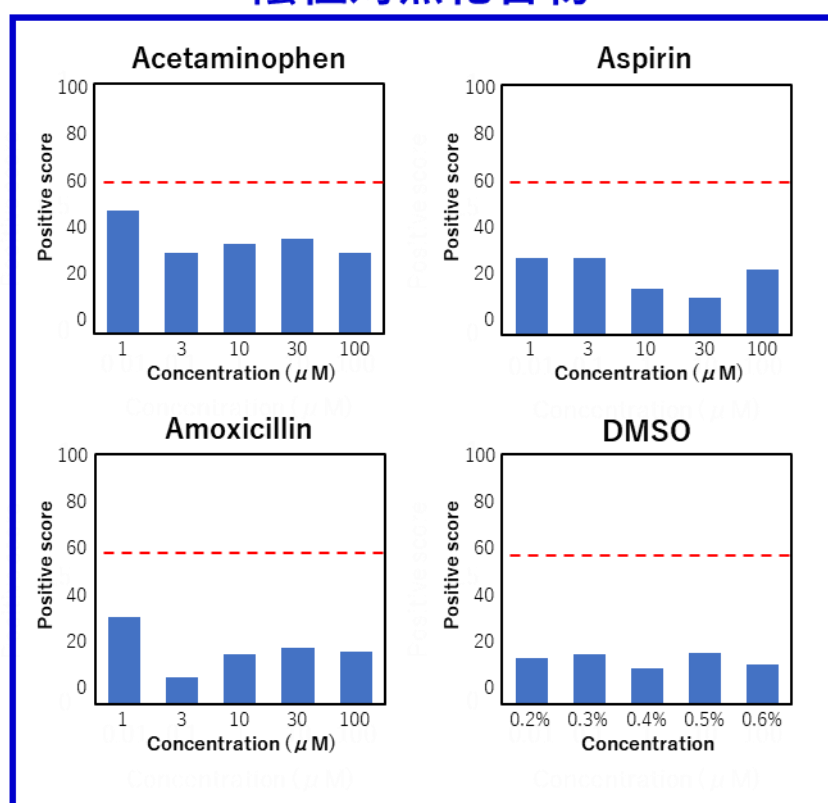


図 3. 毒性予測 AI モデルによる学習データの ROC 曲線
学習データに対する判定精度が最も高くなる positive score = 0.585 を毒性判定閾値として決定した。

陰性対照化合物



--- : 毒性ライン

図 4. 毒性予測 AI モデルによる陰性対照化合物に対する毒性判定結果

Positive score = 0.585 を毒性判定閾値として使用した。すべての陰性対照化合物で低濃度から高濃度にかけて毒性は検出されず、正しく陰性判定された。

農薬関連化合物

--- : 毒性ライン

※ : バースト消失

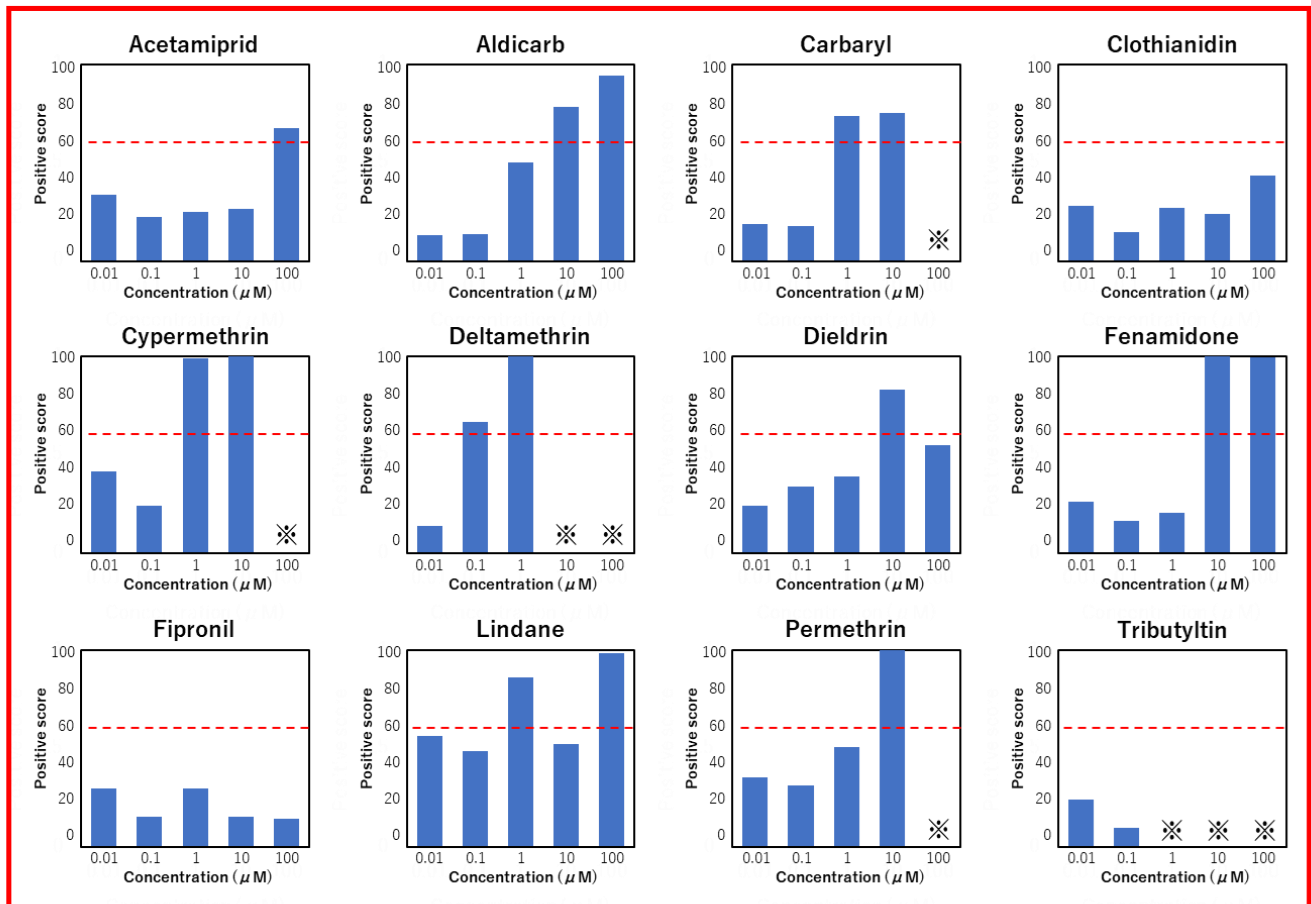


図 5. 毒性予測 AI モデルによる農薬関連化合物に対する毒性判定結果

Positive score = 0.585 を毒性判定閾値として使用した。Acetamiprid, Aldicarb, Carbaryl, Cypermethrin, Deltamethrin, Dieldrin, Fenamidone, Lindane, Permethrin で濃度依存的に毒性判定された。Clothianidin, Fipronil は毒性判定されず、Tributyltin は低濃度から同期バーストが消失した。

	Concentration (μM)				
	0	0.1	1	10	100
Acetamiprid					
Clothianidin					
Aldicarb					
Carbaryl					—
Fipronil					
Deildrim					
Lindane					
Cypermethrin					—
Deltamethrin				—	—
Permethrin					—
Tributyltin			—	—	—
Fenamidone					

■ 毒性なし ■ 毒性あり
■ 同期バースト消失

図 6. 毒性予測 AI モデルによる毒性判定結果

陰性対照化合物 4 種類および、農薬関連化合物 12 種類の合計 16 化合物中 14 化合物が正しく毒性予測された。

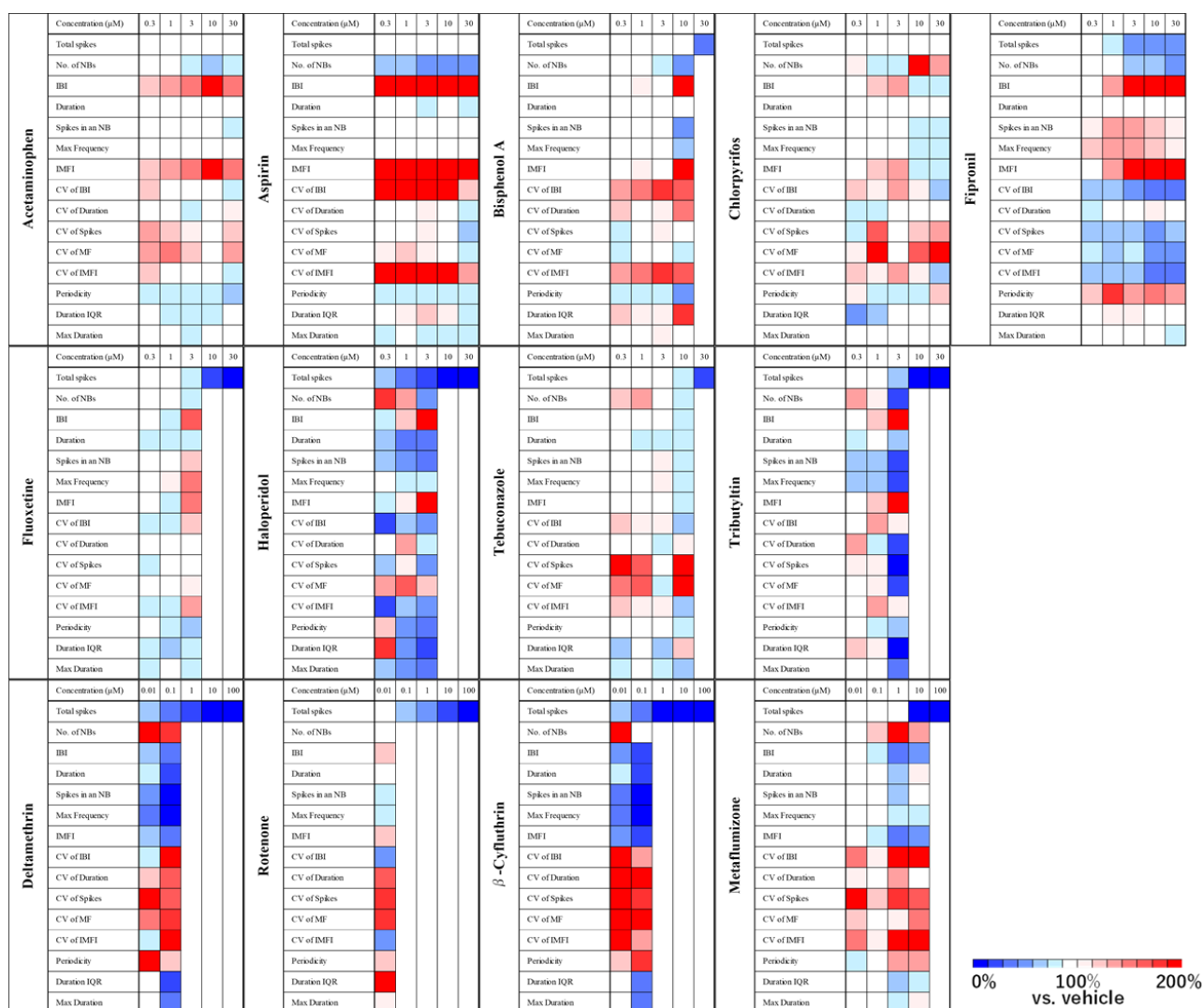


図7. 化学物質および陰性対照化合物による神経活動パラメータのヒートマップ

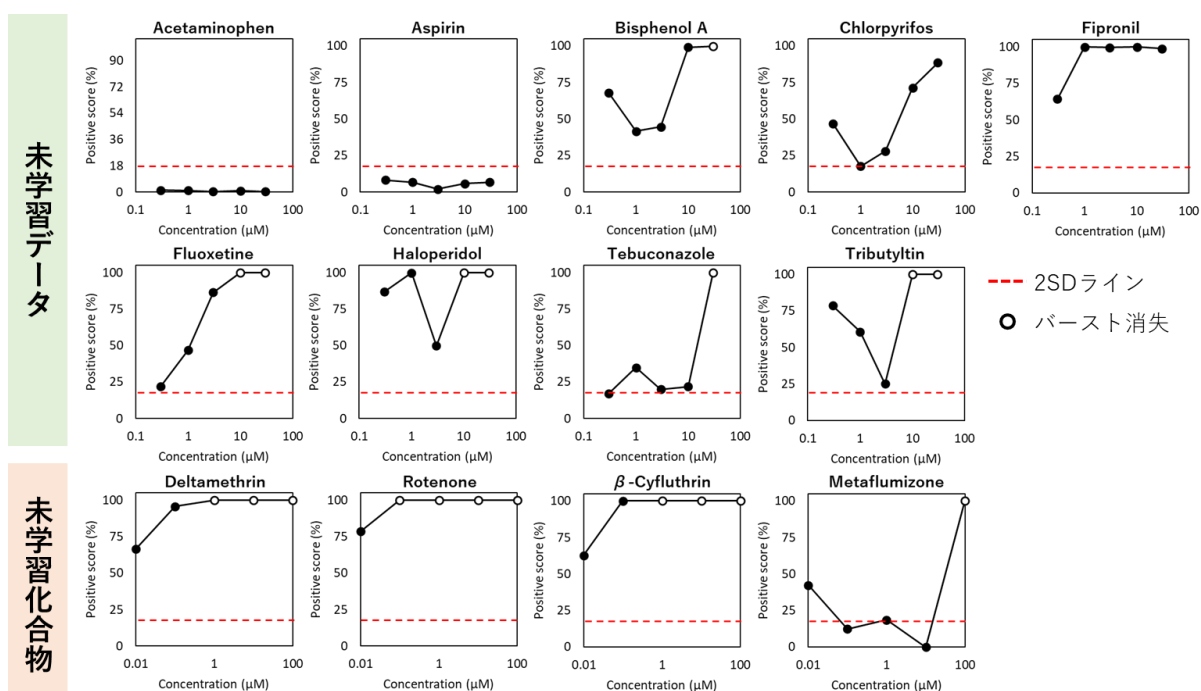


図8. 毒性予測AIモデルによる未学習データおよび未学習化合物に対する毒性スコア

	Concentration (μM)				
	0.3	1	3	10	30
Acetaminophen					
Aspirin					
Bisphenol A					—
Chlorpyrifos					
Fipronil					
Fluoxetine				—	—
Haloperidol				—	—
Tebuconazole					—
Tributyltin				—	—
Deltamethrin			—	—	—
Rotenone		—	—	—	—
β-Cyfluthrin			—	—	—
Metaflumizone					—

Low risk
 Medium risk
 High risk

—

 disappearance of NB

図9. 毒性予測AIモデルによる毒性判定結果

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
（課題番号：22KD1002）
令和 4-6 年度総合報告書

AI 支援型 MPS を用いたヒト iPS 由来神経細胞による神経毒性試験法の開発

研究代表者 安彦行人 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 室長

分担課題：In vivo 毒性評価

研究分担者：渋谷 淳 国立大学法人東京農工大学 大学院 農学研究院 動物生命科学部門 教授

研究要旨

本分担研究では、化学物質のインビトロ神経毒性評価法の開発を目的とし、OECD と共有している化学物質のリストをもとに動物実験による神経毒性評価を行う。対象物質はヒトに対する重要脳発達障害物質であるフッ化ナトリウム (NaF) と過塩素酸アンモニウム (AP) 及びヒトでの発達神経毒性が懸念されているネオニコチノイド系農薬の 1 つであるイミダクロプリド (IMI) として、ラットを用いて妊娠 6 日目から分娩後 21 日目まで発達期曝露を行い、児動物の海馬歯状回における神経新生に対する影響を不可逆性も含めて検討する。文献データを参考に、NaF は 0, 30, 100 ppm、AP は 0, 300, 1000 ppm の濃度で飲水投与し、IMI は 0, 83, 250, 750 ppm の濃度で混餌投与した。児動物を出生後 21 日目 (PND 21) と成体期の PND 77 に解剖し、免疫組織学的検索、遺伝子発現解析のため脳を採材した。NaF 曝露では、PND 21 に 100 ppm で type-3 神経前駆細胞 (NPC) の減少、type-1 神経幹細胞 (NSC) と type-2a NPC の代償的增加を示した。歯状回門部においては、GluR2⁺である苔状細胞の用量依存的な増加傾向を示し、代償的な神経新生反応への関与が示唆された。また、NaF は用量依存的に ARC⁺顆粒細胞数を増加させ、100 ppm で歯状回の *Ptgs2* の転写産物レベルを増加させたことから、顆粒細胞のシナプス可塑性の増加が示唆された。100 ppm NaF では顆粒細胞系譜指標遺伝子 (*Nes*, *Eomes*, *Rbfox3*) と抗アポトーシス遺伝子 (*Bcl2*) の発現上昇を示し、神経新生障害に対する保護機構が示唆された。更に、100 ppm NaF では酸化的リン酸化関連遺伝子 (*Atp5f1b* と *Sdh*) が発現低下し、解糖関連遺伝子 (*Hk3*) が発現上昇したことから、神経新生細胞での代謝シフトが示唆された。PND 77 になると、顆粒細胞系譜の変化はもはや検出されなくなり、GABA 作動性介在ニューロンの指標遺伝子 (*Calb2* と *Reln*) が発現上昇したことから、顆粒細胞系譜での保護反応の持続が示唆された。以上より、NaF の発達期曝露は海馬神経新生を一過性に抑制し、その代償反応として代謝シフトを誘導することが示唆された。AP 曝露では PND 21 には、1000 ppm で血清 T3 及び T4 濃度が低下し、300 ppm 以上で甲状腺濾胞上皮細胞が過形成を示した。海馬神経新生では、300 ppm 以上で神経新生細胞の増殖抑制により type-1 NSC と type-2a NPC が減少した。更に、1000 ppm では SST⁺ GABA 作動性介在ニューロンの増加と ARC⁺顆粒細胞の減少傾向が観察された。歯状回門部では CNPase⁺成熟オリゴデンドロサイト (OL) の数が減少した。PND 77 では甲状腺の変化は消失したが、1000 ppm では NSCs の減少と SST⁺介在ニューロンの増加が持続し、CCK⁺介在ニューロンが増加し、白質組織面積が減少した。IMI 曝露では、PND 21 に、750 ppm の曝露で NPCs の増殖と ERK1/2-FOS を介した顆粒細胞のシナプス可塑性を抑制することにより、分化後期段階にある NPCs と最終分裂後の未成熟顆粒細胞の数を減少させた。Reelin のシグナル伝達が抑制されたことが、観察された神経新生とシナプス可塑性の減少の原因かもしれない。PND 77 においては、250 ppm 以上の曝露は、神経幹細胞の増殖を抑制しアポトーシスを増加させることにより神経幹細胞数を減少させ、成熟顆粒細胞数は NPC 分化の抑制により減少した。行動テストでは、成体期において 750 ppm で自発活動の亢進が認められた。IMI は海馬のアセチルコリンエステラーゼ活性と歯状回でのアセチルコリン受容体の *Chrn2* 遺伝子転写産物レベルを離乳期および成体期に低下させた。IMI は離乳期に歯状回門における astrocyte と M1 型 microglia 数を増加させ、神経炎症と酸化ストレス関連遺伝子を発現上昇させた。成体期においては、IMI は malondialdehyde レベルと M1 型 microglia 数を増加させ、神経炎症と酸化ストレス関連遺伝子の発現を低下させた。以上より、AP 発達期曝露により曝露終了時に甲状腺機能低下症が誘発され、それによる海馬の神経新生抑制（神経新生の初期過程を標的とした抑制と、介在ニューロンの代償性反応を伴う顆粒細胞のシナプス可塑性の低下）と OL の成熟抑制が示唆された。成体期になっても神経新生抑制は持続し、白質の低形成も明らかになった。観察された脳の変化は発達期甲状腺機能低下症によるものと類似しており、AP による発達神経毒性は甲状腺機能低下症に起因する可能性が示唆された。IMI は持続的にコリン作動性シグナル伝達に影響を及ぼし、IMI 曝露中は海馬において神経炎症と酸化ストレスを誘導し、曝露後は海馬の酸化ストレスに対する感受性を上昇させ、成体期における多動的行動と進行性の神経新生抑制を引き起こすことが示唆された。児動物の行動と海馬の神経新生に対する IMI の NOAEL は 83 ppm (5.5~14.1 mg/kg 体重/日) となった。

A. 研究目的

化学物質のインビトロ神経毒性評価法の開発を目的

として、OECD と共有している化学物質のリストをもとに動物実験による神経毒性評価を行う。分担研究者

は、動物実験で発達期の神経毒性評価を行う。

神経発達には神経幹細胞の自己複製に始まり、神経前駆細胞の増殖・分化、移動、成熟の各段階から構成され、神経細胞系譜が標的となる発達神経毒性ではこれらの過程のいずれかが障害を受ける。神経新生はそれら全ての発達過程を含むため、生後に始まる海馬の神経新生は様々な発達神経毒性物質の発達期曝露に対して感受性を示す可能性が高い。また、成体でのニューロンの生存や維持に関わる分子機序には、神経発達における神経突起やシナプスの形成、髄鞘形成の機序と共通する部分が多い。そのため、成熟神経に対する毒性物質は発達神経毒性を示す可能性がある。

令和4年度はヒトに対する重要脳発達障害物質であるフッ化ナトリウム(NaF)と過塩素酸アンモニウム (AP) 及びヒトでの発達神経毒性が懸念されているネオニコチノイド系農薬の1つであるイミダクロプリド (IMI) についてラットを用いて発達期曝露を行い、海馬歯状回の神経新生に対する影響を不可逆性も含めて検討を開始した。令和5年度はNaFとAPの発達期曝露結果について報告した。令和6年度はIMIの発達期曝露結果について報告する。

B. 研究方法

動物への曝露実験として、OECD の発達神経毒性試験ガイドライン 426 に準じ、妊娠 SD ラット（妊娠 1 日で入手、日本エスエルシー）に対して、一群あたり 12 匹ずつとして、妊娠 6 日目から分娩後 21 日目までの期間、NaF は 0, 30, 100 ppm、AP は 0, 300, 1000 ppm の濃度で飲水投与した。IMI は 0, 83, 250, 750 ppm の濃度で混餌投与した。NaF と IMI の最高用量は、過去の文献報告をもとに、母動物への軽度な毒性とともに妊娠の維持と児動物への重篤な毒性が出ない濃度に設定した。AP の最高用量は文献データを参考に 母動物と児動物に甲状腺機能低下を誘発することが知られている用量とした。本実験では、出生後 4 日目に間引きを行い、各母動物に 8 匹を確保するよう児動物数を調整した。投与期間中、一般状態は 1 日 1 回観察し、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 21 日目（離乳時; PND 21）に児動物の半数を解剖に供した。各群 10 匹以上の雄児動物を CO₂/O₂ 麻酔下で 4%PFA/0.1M リン酸バッファーにより灌流固定を行い、免疫組織学的検討に供した。各群 6 匹以上の雄児動物を CO₂/O₂ 麻酔下で放血し、脳をメタカーン液にて固定し、遺伝子発現解析に供した。AP 曝露実験では、血清甲状腺ホルモン測定及び甲状腺組織の病理組織学的評価のため、各群 12 匹の雌児動物について CO₂/O₂ 麻酔下で腹部大動脈から採血し、甲状腺組織を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定した。更に各群 6 匹以上の雄児動物について脳内酸化ストレス [malondialdehyde (MDA) レベル] 及び AChE 活性値の測定のため、生理食塩水にて灌流固定を行い、海馬を採材した。

残り半数の児動物は、NaF ないし AP 曝露実験では、PND 77 まで被験物質を含まない飲料水により飼育し、一般状態を 1 日 1 回観察し、体重を週に 1 回の割合で測定した。PND 77 に各群 10 匹以上の雄児動物を CO₂/O₂

麻酔下で 4%PFA/0.1M リン酸バッファーにより灌流固定を行い、免疫組織学的検討に供した。各群 6 匹以上の雄児動物を CO₂/O₂ 麻酔下で放血し、脳をメタカーン液にて固定し、遺伝子発現解析に供した。AP 曝露実験では、甲状腺組織の病理組織学的評価のため、各群 8 匹の雌児動物について甲状腺組織を摘出・固定した。IMI 曝露実験では、PND 77 ないし PND 79 まで IMI を含まない飼料により飼育し、一般状態を 1 日 1 回観察し、体重を週に 1 回の割合で測定した。PND 77 及び PND 79 に各群 10 匹以上の雄児動物を CO₂/O₂ 麻酔下で PFA バッファーにより灌流固定を行い、免疫組織学的検討に供した。行動試験実施動物は PND 79 に行動試験の最終試行の 90 分後に灌流固定を実施した。各群 6 匹以上の雄児動物を CO₂/O₂ 麻酔下で放血し、脳をメタカーン固定し、遺伝子発現解析に供した。

NaF ないし AP 曝露実験では、PND 21 と PND 77 の PFA 灌流固定脳については大脳の bregma の後方約-3.5 mm の 1 カ所で冠状断面を作製して、その前後の対称面（2 切面）が薄切面となるようにパラフィン包埋し、3 µm 厚の連続切片を作製した。切片は顆粒細胞層下帯（SGZ）から顆粒細胞層（GCL）に分布する顆粒細胞系譜の分化段階の指標（GFAP, BLBP, TBR2, DCX, TUBB3, NeuN）、歯状回門部に分布する介在ニューロンの指標（CCK, SST, RELN, PVALB, CALB2, GAD67）、苔状細胞の指標（GluR2）、SGZ での細胞増殖活性の指標（PCNA）、SGZ でのアポトーシスの指標（TUNEL）、神経可塑性の指標（p-ERK1/2, ARC, FOS, COX2）、ミクログリア指標（Iba1, CD68, CD163）、及び AP 曝露実験では、オリゴデンドロサイト（OL）系譜指標（OLIG2, NG2, CNPase）に対する抗体を用いて、DAB 発色にて ABC 法による免疫染色を行った。海馬歯状回の SGZ において単位長さ当たりの陽性細胞数または海馬歯状回門部における単位面積当たりの陽性細胞数を算出した。IMI 曝露実験では、海馬における免疫組織学的解析のため、PND 21（行動試験非実施動物）と PND 77（行動試験非実施動物）ないし PND 79（行動試験実施動物）の PFA 灌流固定脳について、NaF ないし AP 曝露実験と同様に、3 µm 厚の連続切片を作製した。切片は顆粒細胞系譜指標（GFAP, BLBP, TBR2, DCX, TUBB3, NeuN）、介在ニューロンの指標（CCK, SST, RELN, PVALB, CALB2, GAD67）、歯状回門部での苔状細胞の指標（GluR2）、細胞増殖活性指標（PCNA）、SGZ と GCL でのアポトーシス指標（TUNEL）、GCL での神経可塑性の指標（p-ERK1/2, ARC, FOS, COX2）、歯状回門部における microglia 指標（Iba1, CD68, CD163）に対する抗体を用いて、DAB 発色にて ABC 法による免疫染色を行った。海馬歯状回の SGZ において単位長さ当たりの陽性細胞数または海馬歯状回門部における単位面積当たりの陽性細胞数を算出した。神経可塑性の指標については、行動試験非実施の PND 21 動物と行動試験実施の PND 79 動物を対象とした。

全ての曝露実験で、海馬における遺伝子発現解析のため、PND 21 と PND 77 のメタカーン固定脳を用いて、大脳の bregma の後方約-2.2 mm の 2 mm 厚スライスより生検パンチを用いて海馬歯状回部分を採取した。その後、採取組織から total RNA を抽出し、cDNA を合成、

リアルタイム RT-PCR により遺伝子発現解析を実施した。即ち、RNeasy[®]ミニキット (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて、0 ppm 対照群と最高用量 (750 ppm) 群の歯状回組織から total RNA を抽出した。抽出した total RNA の濃度と純度を測定し、6 ng/ μ L の cDNA を SuperScript[™] III First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) にて合成した。Il6 以外のプライマー配列は Primer Express (ver. 3.0; Thermo Fisher Scientific Inc.) または Primer-BLAST ツール (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) を用いて設計した。Il6 のプライマー配列は、以前の研究で報告されたものを用いた。全てのリアルタイム RT-PCR は、1 μ L の cDNA と 19 μ L の Power SYBR[®] Green PCR Master mix [10 μ L Power SYBR[®] Green (Thermo Fisher Scientific Inc.), 0.4 μ L のプライマー(forward と reverse), 8.2 μ L UltraPure[™] Distilled Water (Thermo Fisher Scientific Inc.)] を含む 20 μ L の全量で、StepOnePlus[™] Real-time PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて行った。PCR サイクル条件は、95°C で 10 分間の初期変性、95°C で 15 秒間の変性、60°C で 1 分間のプライマーアニーリング、メルトカーブステップからなる 40 回の増幅サイクルとした。750 ppm 群の 0 ppm 対照群に対する相対的な転写産物レベルは、同じサンプルの内因性対照遺伝子として用いた glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) または hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*Hprt1*) の閾値サイクル (C_T) 値を用いて正規化した。その後、 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法によりコントロール C_T 値に対する相対値を算出し、値を補正した。

全ての曝露実験で、PND 21 ないし PND 77 の海馬における脂質過酸化レベルは、Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit (Abcam plc) を用いたチオバルビツール酸法により測定し、チオバルビツール酸反応性物質の蓄積を測定し、malondialdehyde (MDA) レベルとして表した。海馬組織サンプルは、TissueLyser II (Qiagen) を用いて溶解バッファーで溶解し、13,000 $\times$ g で 10 分間遠心分離して上清を分離し、その後の分析に用いた。MDA-チオバルビツール酸付加物を n-ブタノールを用いて抽出し、サンプルの吸光度をマルチ検出マイクロプレートリーダー(Powerscan[®] HT)を用いて 532 nm で分光光度計により測定した。各組織溶解液中のタンパク質濃度は、BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) を使用して推定し、サンプル中の MDA 濃度 (nmol/mg 組織タンパク質) の正規化を行った。

NaF ないし AP 曝露実験では、PND 21 の海馬のグルタチオンレベルについて GSSG/GSH 定量キット (GSSG はグルタチオンジスルフィド、GSH は還元型グルタチオン、同仁堂研究所) を用いて測定し、還元型と酸化型の比で表した。海馬組織を 5%5-アミノサリチル酸溶液で溶解し、ホモジネートを 8000 $\times$ g で 10 分間遠心分離した後、上清をキットの手順に従って分析に用いた。サンプルの吸光度は、Powerscan[®] HT マイクロプレートリーダーで 405 nm で分光光度計により測定した。GSH 濃度は、測定した総グルタチオン濃度と GSSG 濃度から算出した。

IMI曝露実験では、PND 21とPND 77の海馬における

ACHe活性は、ACHe Assay Kit (Abcam plc, Cambridge, UK)を用いて測定した。秤量した海馬組織 (20 mg、各群 N=6) を400 μ Lのタンパク質溶解バッファーでホモジナイズした。ホモジネートを600 $\times$ gで10分間、室温で遠心した。次に、アセチルチオコリン反応混合物50 μ Lを、96ウェルプレート中の同容量のACHe標準およびサンプル上清に添加した。室温で30分間インキュベートした後、マルチ検出マイクロプレートリーダーを用いて410 nmの吸光度を読み取った。ACHe活性はサンプル中のタンパク質濃度で正規化した (mU/mgタンパク質)。

AP 曝露実験では、PND 21 の雌の児動物 (N=12/群) において、甲状腺ホルモンの血清濃度を測定した。血清検体は T3 及び T4 ELISA キット (Cusabio Technology LLC) のプロトコールに従って処理し、Varioskan LUX Multimode Microplate Reader (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用い、600 nm を補正波長として 450 nm の吸光度を分光光度計で測定した。

AP 曝露実験では、PND 21 (N=12/群) と PND 77 (N=8/群) の雌動物から甲状腺を摘出し、中性緩衝 10%ホルマリン (pH 7.4) で一晩固定した。翌日、固定した組織をトリミングし、パラフィン包埋処理し、病理組織学的評価のためのヘマトキシリン・エオジン染色及び濾胞上皮の細胞増殖評価のための PCNA 免疫組織化学染色を実施した。

IMI曝露実験では、すべての行動試験において、行動試験用に選抜された雄の子動物 (各群 N=10) を動物飼育室から行動試験室に1時間移動させ、試験開始前に順化させた。各試験動物が試験を受ける前の時間間隔で、器具を70%エタノール溶液で十分に洗浄し、残留臭気を除去した。試験終了後すぐに、試験動物はホームケージに戻され、その後動物飼育室に戻された。すべての実験は午前8時から午後19時の間に実施し、各行動試験における偏りを避けるため、試験動物の選択順序と試験時間間隔を群間で逆バランスとした。試験デザインはOECDの発達神経毒性試験ガイドライン (Test No.426) を参考にした。

オープンフィールド試験はPND 18 (離乳期)、PND 38 (青年期)、PND 62 (成体期) に実施し、運動活性と不安様行動を評価した。装置は、表面が黒色ポリビニル樹脂製のステンレス製正方形トレイ (幅 900 mm) と、黒色プラスチック製壁4面、深さ 500 mm (小原産業株式会社、東京) で組み立てた。照度は中心部で20ルクスに保った。中心領域は壁から180 mm離れた正方形とした。各被験動物は装置の同じコーナーに壁に向かって単独で置かれ、フィールド中央上方に設置されたCCDカメラ (WAT-902B; 株式会社ワテック、鶴岡) を用いて10分間の総移動距離と移動時間、平均移動速度、および中央領域率を記録した。パラメータはTimeOFCR1ソフトウェア (小原産業株式会社) を用いて自動測定した。中心領域率は、中心領域率 = [(中心領域滞在時間) $\div$ 10分] $\times$ 100の式で算出した。

短期空間記憶を評価するためにY迷路テストをPND 27に実施した。装置は3本のアーム (長さ600 mm、奥行き250 mm、上部の幅250 mm、下部の幅60 mm) の間の角度が120°のY字型で、装置全体はマットグレーのポリビニルプラスチック製であった。照度は装置中央で5ル

クスに保った。3本のアームをそれぞれ領域A、B、Cとした。被験動物を壁に向かって、予め決めてある片方のアームの位置に置き、直ちにカメラ (WAT-902B; 株式会社ワテック、鶴岡) に8分以内の各アームへのエントリの順番と総数を記録した。その軌跡と自発交替率は、TimeYM1ソフトウェア (小原産業株式会社) によって自動的に解析された。交替は、3つの異なるアームに連続して入ることと定義した (例えば、ABC、BCA、CABの組み合わせはカウントしたが、BCB、ACA、BABはカウントから除外した)。交替率は以下の式で算出した: 交替率 = [(交替総数) / (総アーム数-2)] × 100。

文脈的恐怖条件付け試験は、PND 75およびPND 79の成体期に実施した。「恐怖条件付け段階」、「恐怖記憶獲得段階」、「恐怖記憶消去1日目」、「恐怖記憶消去2日目」、「恐怖記憶消去3日目」の順で5回の試行を行った。試験動物は、透明プレキシガラス製観察ケージ (30×37×25 cm) と、ショックジェネレーター (SGA-200; 小原産業) を連結した21本のロープで組まれた鉄格子床からなる音響減衰室 (CL-4211; 小原産業株式会社) 内で試験を行った。環境は50dBのホワイトノイズと200ルクスの照度に設定した。

恐怖条件付け試験 (PND 75) では、被験動物を個々に観察ケージに入れ、鉄棒の床から2秒間のフットショックを与えた (強度0.3 mA、時間ポイント88、148、238秒、計3回)。最後のフットショックから1分後、被験動物をホームケージに戻した。したがって、1匹あたりの合計時間は5分間であった。

恐怖獲得日 (PND 76) および恐怖記憶消去日1-3日 (PND77-PND79) の試行では、フットショックを与えず、同じ環境・順序で5分間同じ観察ケージに入れた。動物の行動とフリージング時間はCCDカメラ (WAT-902B; 小原産業株式会社) で記録し、TimeFZ2ソフトウェア (小原産業株式会社) で自動解析した。フリージング時間は5分間の試行中、動物が2秒以上動かなかった累積時間とした。フリージング時間率は以下の式で算出した: フリージング時間率 = [(総フリージング時間) / (300秒)] × 100。また、1-3日目の相対フリージング率は、フリージング時間率を取得時のフリージング時間で割った値とした。

恐怖記憶消去3日目 (PND 79) の試行において、被験動物を恐怖記憶消失の最終試行から90分後に安楽死させ、GCLにおけるシナプス可塑性関連タンパク質の発現を免疫組織化学的解析により検出し、行動刺激に応じた発現の最大誘導を検討した。

統計分析に関連して、数値データは NaF ないし AP 曝露実験では平均値 ± SD で示し、IMI 曝露実験では平均値 ± SEM で示した。母動物の体重、摂餌量、摂水量、及び臓器重量は、個体単位を実験単位として解析した。児動物の体重及び臓器重量、各抗原に対する免疫反応細胞数、TUNEL⁺アポトーシス細胞数、酸化ストレスレベル、AChE 活性レベル、血清甲状腺ホルモンレベルに関するデータは、同腹仔グループを実験単位として解析した。0 ppm 対照群と各処置群間の有意差は以下のように評価した。データは分散の均質性について Levene の検定を用いて分析した。分散が均一であれば、数値データは Dunnett 検定を用いて評価した。不均一なデータにつ

いては、ボンフェローニ補正を伴う Aspin-Welch's の *t*-検定を適用した。2つの標本群からなる数値データは、群間で分散が均一な場合は Student's の *t*-検定を用いて分析し、データが不均一な場合は Aspin-Welch's の *t*-検定を行った。多重比較の場合は 0 ppm 対照群と各投与群との間で、2群間比較の場合は 0 ppm 対照群と 1000 ppm 群との間で比較を行った。すべての分析は、IBM SPSS Statistics ver. 25 (IBM 社, Armonk, NY, USA) を用い、*P* < 0.05 を統計的に有意とみなした。

(倫理面の配慮)

投与方法は飲水投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべて CO₂/O₂ 深麻酔下での灌流固定ならびに放血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物飼育、管理にあつては、国立大学法人 東京農工大学の動物実験等に関する規定ならびに動物実験指針に従った。

C. 研究結果

<NaF 曝露実験>

・NaF-1 母体パラメータ

100-ppm NaF 群の1頭の母動物は出産しなかったため、実験から除外した。従って、0, 30, 100 ppm 群の有効母動物数はそれぞれ 12, 12, 11 匹であった。生殖パラメータ、すなわち着床部位数、出産時生仔数、雄児動物比はいずれの NaF 群においても数値に変化は見られなかった (Supplementary Table 1)。動物実験期間中、いずれの NaF 群においても体重及び摂餌量に有意差は認められなかった (Fig. 1A 及び B)。飲水量は、30 ppm 群では GD 7、GD 10、GD 17 及び PND 2 で、100 ppm 群では GD 7、GD 10 及び PND 6 で有意に増加した (Fig. 1C)。いずれの NaF 群でも母動物の歩行や行動に異常は見られなかった。また、娩出後 21 日目の剖検では、いずれの NaF 群でも母動物の体重及び脳重量に変化はなかった (Supplementary Table 2)。

平均飲水量に基づくと、母動物あたりの NaF の 1 日摂取量は、30 及び 100 ppm 群は、妊娠期間中、それぞれ 4.0 及び 13.0 mg NaF/kg 体重/日であった。泌乳期間中では、30 及び 100 ppm 群の母動物はそれぞれ 6.6 及び 21.3 mg NaF/kg 体重/日を消費した。

・NaF-2 雄児動物の実験期間内パラメータ及び剖検データ

生後期間中の児動物の体重及び離乳後の摂餌・飲水量はいずれの NaF 群においても変化しなかった (Supplementary Fig. 1)。PND 21 の剖検では、いずれの NaF 群でも体重及び脳重量に変化はなかった (Supplementary Table 3)。PND 77 の剖検では、脳重量は 30 ppm 群で有意に増加したが、体重はいずれの NaF 群でも変化しなかった。いずれの曝露群においても、PND 21 の剖検前及び離乳後の歩行や行動に異常は認められなかった。

・NaF-3 雄児動物の歯状回における免疫染色陽性細胞数及びアポトーシス細胞数

・NaF-3.1 SGZ 及び/または GCL における顆粒細胞系譜

PND 21 において、SGZ における type-1 NSCs の指標である GFAP 及び type-1 NSCs と type-2a NPCs の指標である SOX2 の免疫染色陽性細胞数は、100 ppm NaF 群で有意に増加した (Fig. 2, Supplementary Table 4)。SGZ における type-2b NPC の指標である TBR2、未成熟顆粒細胞の指標である TUBB3、未成熟及び成熟顆粒細胞の指標である NeuN の免疫染色陽性細胞数はいずれの NaF 群でも有意な変動をしなかった。

PND 77 では、GFAP⁺細胞数、SOX2⁺細胞数、TBR2⁺細胞数、DCX⁺細胞数、TUBB3⁺細胞数、NeuN⁺細胞数はいずれの NaF 群でも有意な変化をしなかった (Fig. 2, Supplementary Fig. 2, Supplementary Table 5)。

・NaF-3.2 歯状回門部における GABA 作動性介在ニューロン数と苔状細胞数

PND 21 と PND 77 のいずれにおいても、PVALB⁺介在ニューロン、RELN⁺介在ニューロン、CALB2⁺介在ニューロン、SST⁺介在ニューロン、GAD67⁺介在ニューロン、CCK-8⁺介在ニューロン、GluR2⁺苔状細胞の数は、NaF 群のいずれにおいても有意な変化は認められなかった (Fig. 3, Supplementary Fig. 3, Supplementary Table 4 及び 5)。

・NaF-3.3 GCL におけるシナプス可塑性関連タンパク質陽性細胞数

PND 21 において、ARC⁺細胞数は 100 ppm NaF 群で有意に増加したが、FOS⁺細胞数、COX2⁺細胞数、p-ERK1/2⁺細胞数はいずれの NaF 群でも有意な変化はなかった (Fig. 4, Supplementary Table 4)。PND 77 では、ARC⁺細胞数と COX2⁺細胞数は 30 ppm NaF 群で有意に増加したが、FOS⁺細胞数と p-ERK1/2⁺細胞数はいずれの NaF 群でも有意な変化は認められなかった (Fig. 4, Supplementary Fig. 4, Supplementary Table 5)。

・NaF-3.4 SGZ 及び/または GCL における細胞増殖活性及びアポトーシス細胞数

PND 21 及び PND 77 のいずれにおいても、SGZ における PCNA⁺陽性細胞数及び TUNEL⁺細胞数は、いずれの NaF 群においても有意な変化は認められなかった (Fig. 5, Supplementary Fig. 5, Supplementary Table 4 及び 5)。

・NaF-3.5 歯状回門部におけるグリア細胞数

PND 21 では、GFAP⁺アストロサイト、Iba1⁺ミクログリア、CD68⁺ミクログリア、CD163⁺ミクログリアの数はいずれの NaF 群でも有意な変化はなかった (Fig. 6, Supplementary Table 4, Supplementary Fig. 6)。PND 77 では、CD163⁺細胞数は 100 ppm NaF 群で有意に増加したが (Fig. 6, Supplementary Fig. 7, Supplementary Table 5)、GFAP⁺アストロサイト数、Iba1⁺ミクログリア数、CD68⁺ミクログリア数はいずれの NaF 群でも有意な変化を示さなかった。

・NaF-4 雄児動物の歯状回における転写産物レベルの発現変化

PND 21 及び PND 77 における歯状回の転写産物レベ

ルについて、100 ppm NaF 群と無処置対照群を比較したリアルタイム RT-PCR の結果をそれぞれ Table 1 及び Table 2 に示す。PND 21 において、顆粒細胞系譜指標遺伝子のうち *Nes* の転写産物レベルは、*Gapdh* 及び *Hprt1* で正規化した後、100 ppm NaF で有意に増加した。*Eomes* と *Rbfox3* の転写産物レベルは、*Hprt1* で正規化した後、100 ppm の NaF で有意に増加した。シナプス可塑性関連遺伝子に関しては、*Ptgs2* の転写産物レベルは *Gapdh* と *Hprt1* で正常化した後、100 ppm NaF で有意に増加した。アポトーシス関連遺伝子に関しては、*Bcl2* の転写産物レベルは *Gapdh* と *Hprt1* で正規化した後、100 ppm NaF で有意に増加した。酸化ストレス関連遺伝子に関しては、*Sod1* の転写産物レベルは *Gapdh* で正規化した後、100 ppm NaF で有意に減少した。解糖関連遺伝子に関しては、*Hk3* の転写産物レベルは *Hprt1* で正規化した後、100 ppm NaF で有意に増加した。酸化的リン酸化 (OXPHOS) 関連遺伝子に関しては、*Atp5f1b* の転写産物レベルは *Gapdh* 及び *Hprt1* で正規化した後、100 ppm NaF で有意に減少した。*Sdh* の転写産物レベルは、*Hprt1* で正規化した後、100 ppm NaF で有意に減少した。GABA 作動性介在ニューロン指標遺伝子、ニューロトロフィン関連遺伝子、細胞増殖指標遺伝子、グルタミン酸受容体・トランスporter 関連遺伝子、神経分化関連遺伝子、ケミカルメディエーター遺伝子のいずれについても、転写産物レベルの有意な変化は観察されなかった。

PND 77 において、顆粒細胞系譜指標遺伝子に関しては *Gapdh* で正規化した後、100 ppm の NaF で *Nes* の転写産物レベルが有意に増加した。GABA 作動性介在ニューロンの指標遺伝子に関しては、*Calb2* の転写産物レベルは *Gapdh* と *Hprt1* で正規化した後、100 ppm NaF で有意に増加した。*Reln* の転写産物レベルは、*Gapdh* で正規化した後、100 ppm NaF で有意に増加した。ケミカルメディエーター遺伝子に関しては、*Il18* の転写産物レベルは *Gapdh* 及び *Hprt1* で正規化した後、100 ppm NaF で有意に増加した。*Il6* の転写産物レベルは、*Hprt1* で正規化した後、100 ppm の NaF で有意に減少した。ニューロトロフィン関連遺伝子、細胞増殖指標遺伝子、シナプス可塑性関連遺伝子、神経分化関連遺伝子、解糖関連遺伝子、OXPHOS 関連遺伝子のいずれにも有意な変化は認められなかった。

・NaF-5 海馬の酸化ストレスレベル

PND 21 において、海馬の MDA 及び GSH 濃度は、いずれの NaF 群においても有意な変化を示さなかった (Supplementary Table 6)。

<AP 曝露実験>

・AP-1 母体パラメータ

0 ppm の対照群では 2 匹の母動物が出産しなかった。300 ppm では、1 匹の母動物は出産せず、2 匹の母動物は出産時に出生児の全てが死亡した。従って、0 ppm 対照群、300 ppm 群、1000 ppm 群の有効母動物数はそれぞれ 10, 9, 11 であった。動物実験中、母動物の歩行や行動に異常は見られなかった。実験期間中、どの曝露群でも体重と摂餌量に変化はなかった (Fig. 7A 及び B)。水消費量は 300 ppm では GD 7 に、1000 ppm では GD 7

と GD 21 に有意に増加した (Fig. 7C)。繁殖パラメーター (子宮内着床部位数、出産時生存数、及び雄児動物比) は、0 ppm の対照群と各曝露群の間で変化しなかった (Supplementary Table 7)。分娩後 21 日目の剖検では、どの曝露群も 0-ppm 対照群と比較して体重及び脳重量に変化はなかった (Supplementary Table 8)。

・AP-2 雄子供の生体パラメータ及び剖検データ

授乳期及び離乳後 PND 77 までの期間中、どの曝露群でも歩行や行動に異常は観察されなかった。PND 77 までの生後期間中、どの投与群でも児動物の体重、摂餌量、飲水量に変化は観察されなかった (Supplementary Fig. 8)。PND 21 及び PND 77 の剖検では、どの曝露群でも児動物の体重及び脳重量に変化は観察されなかった (Supplementary Table 9)。

・AP-3 雌児動物における血清甲状腺ホルモン濃度と甲状腺病理組織学的検査

PND 21 の剖検では、両曝露群とも肉眼観察で甲状腺組織の腫大が認められた。病理組織学的に甲状腺組織は両曝露群で濾胞上皮細胞の過形成と濾胞コロイドの減少を示した。これらの所見の発現率及び重症度は、AP の両用量で有意に増加した (Fig. 8A, Supplementary Table 10)。血清中甲状腺ホルモン濃度は用量依存的に T3 及び T4 濃度の低下を示し、1000 ppm で統計学的に有意な差がみられた (Fig. 8B, Supplementary Table 11)。全濾胞上皮細胞あたりの PCNA⁺細胞の割合は用量依存的に増加し、1000 ppm で統計的に有意な差がみられた (Fig. 8C, Supplementary Table 10)。

PND 77 の剖検では、肉眼的観察では両曝露群とも甲状腺腫大は認められなかった。病理組織学的には、いずれの曝露群でも病理組織学的所見は認められなかった (Supplementary Fig. 9, Supplementary Table 10)。PCNA⁺細胞の割合も AP 曝露によって変化しなかった (Supplementary Fig. 9, Supplementary Table 10)。

・AP-4 雄児動物の歯状回における免疫染色陽性細胞数及びアポトーシス細胞数

・AP-4.1 SGZ 及び/または GCL における顆粒細胞系譜

PND 21 において、SGZ の GFAP⁺細胞数は用量依存的に減少し、1000 ppm で統計学的に有意な差が認められた (Fig. 9, Supplementary Table 12)。SGZ の SOX2⁺細胞数及び TBR2⁺細胞数、SGZ 及び/または GCL の DCX⁺細胞数、TUBB3⁺細胞数及び NeuN⁺細胞数は、いずれの曝露群においても有意な変化は認められなかった。

PND 77 では、SGZ の GFAP⁺細胞数は用量依存的に減少し、1000 ppm で統計学的に有意な差が認められた (Fig. 9, Supplementary Fig. 10, Supplementary Table 13)。SGZ の SOX2⁺細胞数及び TBR2⁺細胞数、SGZ 及び/または GCL の DCX⁺細胞数、TUBB3⁺細胞数、NeuN⁺細胞数は、いずれの曝露群においても有意な変化は認められなかった。

・AP-4.2 SGZ 及び/または GCL における細胞増殖活性及びアポトーシス細胞数

PND 21 では、PCNA⁺細胞数は両投与群で有意に減少

した (Fig. 10, Supplementary Table 12)。TUNEL⁺細胞の数は、いずれの曝露群でも有意な変化はなかった。

PND 77 では、PCNA⁺細胞数及び TUNEL⁺細胞数は、いずれの曝露群でも有意な変化はなかった (Fig. 10, Supplementary Fig. 11, Supplementary Table 13)。

・AP-4.3 歯状回門部における GABA 作動性介在ニューロン数と苔状細胞数

PND 21 において、SST⁺介在ニューロンの数は 1000 ppm で有意に増加した (Fig. 11, Supplementary Table 12)。CCK⁺、RELN⁺、PVALB⁺、CALB2⁺、GAD67⁺介在ニューロンの数と GluR2⁺苔状細胞の数は、どの曝露群でも有意な変化はなかった (Fig. 11, Supplementary Fig. 12, Supplementary Table 12)。

PND 77 では、CCK⁺及び SST⁺介在ニューロンの数は 1000 ppm で有意に増加した (Fig. 11, Supplementary Fig. 13, Supplementary Table 13)。RELN⁺、PVALB⁺、CALB2⁺、GAD67⁺介在ニューロンの数と GLUR2⁺苔状細胞の数は、どの曝露群でも有意な変化は見られなかった。

・AP-4.4 GCL におけるシナプス可塑性関連タンパク質陽性細胞数

PND 21 と PND 77 のいずれにおいても、p-ERK1/2⁺、FOS⁺、ARC⁺、COX2⁺成熟顆粒細胞の数は、どの曝露群でも有意な変化は見られなかった (Fig. 12, Supplementary Fig. 14, Supplementary Table 12 と 13)。

・AP-4.5 歯状回門部におけるグリア細胞数

PND 21 及び PND 77 のいずれにおいても、GFAP⁺アストロサイトの数、及び Iba1⁺、CD68⁺、CD163⁺ミクログリア/マクローファージの数は、いずれの投与群においても有意に変化しなかった (Fig. 13, Supplementary Fig. 15, Supplementary Table 12 及び 13)。

・AP-4.6 歯状回門部における OL 系譜

PND 21 において、OLIG2⁺ OL 系譜細胞と NG2⁺ OPCs の数は、どの曝露群でも有意な変化は見られなかった (Fig. 14, Supplementary Table 12)。CNPase⁺ OL 細胞数は、AP の両曝露群で有意に減少した。

PND 77 では、OLIG2⁺ OL 系譜細胞、NG2⁺ OPC、CNPase⁺ OL の数は、どの曝露群でも有意な変化はなかった (Fig. 14, Supplementary Fig. 16, Supplementary Table 13)。

・AP-5 GCL、歯状回門部、及び脳梁とそれに隣接する帯状束の領域の定量

PND 21 では、GCL と歯状回門部の面積、及び脳梁と隣接する帯状束の合計の面積は、どの曝露群でも有意な変化はなかった (Fig. 15, Supplementary Fig. 17, Supplementary Table 14)。

PND 77 では、GCL と歯状回門部の面積はどの曝露群でも有意な変化はなかった (Supplementary Table 14)。一方、脳梁とそれに隣接する帯状束の合計面積は、AP 群で用量に関連した減少を示し、1000 ppm で統計的に有意な差が認められた (Fig. 15, Supplementary Table 14)。

・AP-6 雄児動物の歯状回における転写産物レベルの発現変化

PND 21 及び PND 77 における 1000 ppm 群と 0 ppm 群の遺伝子の相対転写産物レベルをそれぞれ Table 3 及び Table 4 に示す。

PND 21 において、GABA 作動性介在ニューロン関連遺伝子のうち、*Pdgfrb* の転写産物レベルは 1000-ppm AP で有意に増加した (Table 3)。神経栄養因子関連遺伝子では、*Ntrk2* の転写産物レベルが 1000-ppm AP で有意に増加した。神経幹細胞/前駆細胞制御遺伝子のうち、*Efnb3* の転写産物レベルは 1000-ppm AP で有意に増加した。NPC/神経芽細胞増殖関連遺伝子のうち、*Vegfa* の転写産物レベルは 1000-ppm AP で有意に増加した。神経細胞移動関連遺伝子のうち、*Arhgef2* と *Robo3* の転写産物レベルは 1000-ppm AP で有意に増加した。神経分化関連遺伝子では、*Baiap2* の転写産物レベルが 1000-ppm AP で有意に増加した。グルタミン酸受容体及びトランスポーターをコードする遺伝子のうち、*Gria2*、*Gria3* 及び *Grin2b* の転写産物レベルは 1000-ppm AP で有意に増加した。顆粒細胞系譜指標遺伝子、シナプス可塑性指標遺伝子、酸化ストレス関連遺伝子、ケミカルメディエーター遺伝子、グリア細胞指標遺伝子、OL 系譜関連遺伝子、髄鞘形成関連遺伝子のいずれの転写産物レベルも、1000-ppm AP で有意な変化は見られなかった。

PND 77 では、顆粒細胞系譜指標遺伝子のうち、*Nes* の転写産物レベルは 1000-ppm AP で有意に増加した (Table 4)。GABA 作動性介在ニューロン関連遺伝子のうち、*Pdgfrb* の転写産物レベルは 1000-ppm AP で有意に増加した。神経幹細胞/前駆細胞制御遺伝子のうち、*Notch1*、*Dll4*、*Thrsp* の転写産物レベルは 1000-ppm AP で有意に増加した。NPC/神経芽細胞増殖関連遺伝子のうち、*Fzd9* の転写産物レベルは 1000-ppm AP で有意に増加した。神経細胞移動関連遺伝子のうち、*Sema3c* の転写産物レベルは 1000-ppm AP で有意に減少し、*Robo3* の転写産物レベルは 1000-ppm AP で有意に増加した。酸化ストレス関連遺伝子のうち、*Gpx1* の転写産物レベルは 1000-ppm AP で有意に減少した。神経栄養因子関連遺伝子、神経分化関連遺伝子、シナプス可塑性指標遺伝子、ケミカルメディエーター遺伝子、グルタミン酸受容体・輸送体遺伝子、グリア細胞指標遺伝子、OL 系列関連遺伝子、髄鞘形成関連遺伝子の転写産物レベルは、いずれも 1000-ppm AP で有意な変化は見られなかった。

・AP-7 雌児動物における海馬の MDA と GSSG/GSH レベル

PND 21 において、海馬の MDA 及び GSSG/GSH レベルは、いずれの投与群においても有意な変化は認められなかった (Supplementary Table 15)。

<IMI 曝露実験>

・IMI-1 母体パラメータ

250 ppm 群の 2 匹の母動物は、分娩後 21 日目に子宮内への胚着床の兆候が観察されなかったため、妊娠していないと判断された。従って、有効母動物数は 0、83、250、750 ppm 群でそれぞれ 12、12、10、12 匹であった。動物試験期間中、各投与群の母動物の体重に

有意な変動は認められなかった (Supplementary Fig. 18A, Supplementary Table 16)。摂餌量は 750 ppm 群で GD 6、GD 10、GD 17 にそれぞれ 21、21、14%有意に減少したが、83 ppm 群では PND 19 に 0 ppm 対照群と比較して 20%有意に増加した (Supplementary Fig. 18B, Supplementary Table 16)。飲水量は 750 ppm 群では GD 6、GD 17、PND 9、PND 16 でそれぞれ 17、16、13、15%有意に減少し、250 ppm 群では PND 16 で 0 ppm 対照群と比較して 15%有意に減少した (Supplementary Fig. 18C, Supplementary Table 16)。母動物の日常観察では、いずれの投与群においても歩行や哺育行動に異常は認められなかった。繁殖パラメータに関しては、着床部位数および生子数に有意な変動は認められなかったが、雄比は 83 および 250 ppm 群で有意に増加した (Supplementary Table 17)。

83、250、750 ppm 群の母動物は、妊娠期間中に IMI をそれぞれ平均 5.5 ± 0.1 、 16.8 ± 0.3 、 42.5 ± 1.1 mg/kg 体重/day を摂取した (SEM を含む)。分娩後離乳までの日数において、83、250、750 ppm 群の母動物は IMI をそれぞれ平均 14.1 ± 0.5 、 39.7 ± 1.4 、 116.5 ± 3.0 mg/kg 体重/日を摂取した。

・IMI-2 雄児動物の生体パラメータおよび剖検データ

体重は、750 ppm 群で PND 9 から PND 21 まで有意に減少した (0 ppm 対照群より約 9–11% 減少; Supplementary Fig. 19A, Supplementary Table 18)。750 ppm 群では PND 33 で摂餌量と摂水量が有意に減少し、それぞれ 0 ppm 対照群より 19%と 12%少なかった (Supplementary Fig. 19B, 19C, Supplementary Table 18)。PND 21 の剖検では、体重は 750 ppm 群で有意に減少した (Supplementary Table 19)。PND 21 および PND 77 の剖検では、いずれの投与群でも脳重量に有意な変動は認められなかった。日常観察では、いずれの投与群でも歩行や行動に異常は認められなかった。

・IMI-3 雄児動物の歯状回における免疫反応細胞数とアポトーシス細胞数

・IMI-3-1 SGZ/GCL における顆粒細胞系マーカー

PND 21 において、SGZ および GCL の DCX⁺細胞数および TUBB3⁺細胞数は 750 ppm 群で有意に減少したが、SGZ および GCL の GFAP⁺細胞数、SOX2⁺細胞数、TBR2⁺細胞数および NeuN⁺細胞数はいずれの投与群においても変動しなかった (Fig. 16, Supplementary Table 20)。

PND 77 において、IMI は 250 ppm 以上の群で SGZ の GFAP⁺ type-1 NSCs および SGZ と GCL の NeuN⁺有糸分裂後顆粒細胞数を有意に減少させたが、SGZ および/または GCL の SOX2⁺、TBR2⁺、DCX⁺、TUBB3⁺細胞数はどの投与群でも変動しなかった (Fig. 16, Supplementary Table 21)。

・IMI-3-2 歯状回門部における GABA 作動性介在ニューロンマーカー

PND21 において、歯状回門部の RELN⁺介在ニューロン数は 750 ppm 群で有意に減少したが、PVALB⁺、SST⁺、GAD67⁺介在ニューロン数はどの投与群でも有意な変

動はなかった (Fig. 17, Supplementary Table 20)。

PND77 では、RELN⁺細胞、PVALB⁺細胞、SST⁺細胞、GAD67⁺細胞の数はどの投与群でも変動しなかった (Fig. 17, Supplementary Table 21)。

・IMI-3-3 GCLにおけるシナプス可塑性関連遺伝子産物

PND 21 において、GCL の FOS⁺および p-ERK1/2⁺顆粒細胞数は 750 ppm 群で有意に減少したが、ARC⁺および COX2⁺顆粒細胞数はいずれの投与群においても有意な変動は認められなかった (Fig. 18, Supplementary Table 20)。

PND 79 では、FOS⁺、p-ERK1/2⁺、ARC⁺および COX2⁺顆粒細胞数は、どの投与群でも変動しなかった (Fig. 18, Supplementary Table 21)。

・IMI-3-4 SGZ および/または GCL における増殖細胞またはアポトーシス細胞

PND 21 において、SGZ の PCNA⁺増殖細胞数は 750 ppm 群で有意に減少したが、SGZ または GCL の TUNEL⁺アポトーシス細胞数はどの投与群でも有意な変動はなかった (Fig. 19, Supplementary Table 20)。

PND 77 では、SGZ の TUNEL⁺アポトーシス細胞数は 750 ppm 群で有意に増加したが、SGZ の PCNA⁺増殖細胞数および GCL の TUNEL⁺アポトーシス細胞数はどの投与群でも変動しなかった (Fig. 19, Supplementary Table 21)。

・IMI-3-5 歯状回門部におけるグリア細胞亜集団の数

PND 21 において、歯状回門部の CD68⁺ M1/M2 型 microglia/macrophage 数は 83 ppm 以上で有意に増加し、GFAP⁺ astrocyte 数と Iba1⁺ microglia/macrophage 数は 750 ppm 群で有意に増加した (Fig. 20, Supplementary Table 20)。しかし、CD163⁺ M2 型 microglia/macrophage 数は、どの投与群でも有意な変動はみられなかった。

PND 77 では、CD68⁺ M1/M2 型 microglia/macrophage 数は 750 ppm 群で有意に増加したが、GFAP⁺ astrocyte、Iba1⁺ microglia/macrophage、CD163⁺ M2 型 microglia/macrophage の数はどの投与群でも変動しなかった (Fig. 20, Supplementary Table 21)。

・IMI-4 雄児動物の歯状回における転写産物レベルの発現変化

PND 21 において、顆粒細胞系譜マーカー遺伝子のうち、*Dpysl3* と *Tubb3* の転写産物レベルは、750 ppm 群では *Gapdh* で正規化した後、有意に減少した (Table 5)。Reelin シグナル伝達関連遺伝子 *Vldlr* の転写産物レベルは、750 ppm 群では *Hprt1* で正規化した後に有意に増加した。神経栄養因子関連遺伝子 *Ntrk2* の転写産物レベルは、750 ppm 群で *Gapdh* と *Hprt1* で正規化した後に有意に増加した。コリン作動性受容体および酵素遺伝子のうち、*Chat* の転写産物レベルは 750 ppm 群で有意に増加し、*Chrn2* の転写産物レベルは *Gapdh* および/または *Hprt1* による正規化後に有意に減少した。神経炎症および酸化ストレス関連遺伝子に関しては、*Gfap* および *Aif1* (グリア細胞マーカー遺伝子)、*Il4*、*Il6*、

Tnf、*Tgfb1* および *Nfkb* (ケミカルメディエーターおよび関連分子)、ならびに *Hmox1*、*Nfe2l2*、*Mt1*、*Mt2a* および *Gpx4* (酸化ストレス関連遺伝子) の転写産物レベルは、750 ppm 群において、*Gapdh* および/または *Hprt1* による正規化後に有意に増加した。GABA 作動性介在ニューロン関連遺伝子、細胞増殖マーカー遺伝子、シナプス可塑性関連最初期遺伝子 (IEG)、グルタミン酸受容体およびトランスポーター遺伝子の転写産物レベルは 750 ppm 群で有意な変動はなかった。

PND 77 において、顆粒細胞系譜関連遺伝子のうち、*Nes* の転写産物レベルは 750 ppm 群で *Gapdh* と *Hprt1* で正規化した後、有意に減少した (Table 6)。細胞増殖マーカー遺伝子 *Pcna* および抗アポトーシス遺伝子 *Bcl2l1* の転写産物レベルは、750 ppm 群で *Gapdh* および *Hprt1* による正常化後に有意に減少した。コリン作動性受容体および酵素遺伝子のうち、*Chrn2* の転写産物レベルは、750 ppm 群では *Hprt1* で正規化した後に有意に減少した。シナプス可塑性関連 IEGs のうち、*Ptgs2* の転写産物レベルは、750 ppm 群では *Gapdh* と *Hprt1* で正規化した後に有意に増加した。神経炎症および酸化ストレス関連遺伝子に関しては、*Il6* および *Tgfb1* (ケミカルメディエーターおよび関連分子)、ならびに *Hmox1*、*Nrf2* および *Gpx1* (酸化ストレス関連遺伝子) の転写産物レベルは、750 ppm 群では *Gapdh* および/または *Hprt1* で正規化した後に有意に減少した。GABA 作動性介在ニューロン関連遺伝子、神経栄養因子関連遺伝子、グルタミン酸受容体およびトランスポーター遺伝子、グリア細胞マーカー遺伝子の転写産物レベルは、750 ppm 群では有意に変動しなかった。

・IMI-5 雄児動物の海馬生化学データ

PND 21 において、海馬 AChE 活性レベルは 750 ppm 群で有意に低下した (Fig. 21, Supplementary Table 22)。どの投与群でも海馬 MDA レベルには有意な変動は認められなかった。

PND 77 では、海馬 MDA 値は 750 ppm 群で有意に増加し、海馬 AChE 活性値は 750 ppm 群で減少傾向を示した (P=0.06)。

・IMI-6 雄児動物の行動検査スコア

・IMI-6-1 オープンフィールド試験

PND 18 の離乳期および PND 38 の春期発動期のいずれにおいても、運動活性に関する総移動距離、総移動時間、平均移動速度、および不安様行動を反映する中心領域率には、いずれの投与群においても投与に関連した統計学的有意な変動は認められなかった (Fig. 22, Supplementary Table 23)。一方、PND 62 の成体期では、750 ppm 投与群では総移動距離の増加傾向に伴い平均移動速度が有意に増加した (P=0.07) が、総移動時間および中心領域率についてはいずれの投与群においても投与に関連した有意な変動は認められなかった。

・IMI-6-2 Y 迷路試験

Y 迷路試験は PND 27 に実施され、総交替率および総アーム部進入率については、いずれの投与群においても投与に関連した有意な変動は認められなかった

(Supplementary Table 24)。

・IMI-6-3 文脈的恐怖条件付け試験

PND 75からPND 79の成体期において、全試行におけるフリージング時間比は、いずれの投与群においても投与に関連した有意な変動は認められなかった (Supplementary Fig. 20, Supplementary Table 25)。

D. 考察

<NaF 曝露実験>

本研究では、NaF を 100 ppm (F-として 45 ppm) 含む脱イオン水中のフッ素濃度は 44 ppm と測定され、調製後 7 日目の室温で安定であった。ラットやマウスで 100 ppm の NaF に発達期から曝露後、海馬の神経毒性とそれに関連する行動異常を示す報告がいくつかある。しかし、これらの研究では、母動物や児動物への毒性影響は報告されていない (Li et al., 2022; Sun et al., 2018; Shivarajashankara et al., 2002)。NaF を妊娠期 1 日目から分娩後 22 日目まで飲料水中に 20 ppm で持続曝露すると、母動物は分娩後 30 日目まで、児動物は生後 30 日目で体重と脳重量が減少し、生後 21 日目と生後 30 日目で運動活性が抑制された (Kumar et al., 2020)。しかし、本研究では、母体が NaF に 30 ppm 及び 100 ppm の用量で曝露しても、母体や児動物の実験気管内パラメータや剖検パラメータには影響を与えなかった。投与期間中、NaF 群では飲水量の散発的な増加が認められたのみであった。児動物は生後 77 日目の剖検で 30 ppm でのみ脳重量の増加を示した。これらの結果から、本研究の実験条件下では、飲料水中に 100 ppm までの NaF 曝露を行っても、母動物や児動物に明らかな毒性は認められないことが示唆された。

本研究において、100 ppm の NaF 曝露は、生後 21 日目において顆粒細胞系譜のうち GFAP⁺細胞と SOX2⁺細胞数を増加させた。海馬の神経新生ニッチでは、GFAP⁺細胞は type-1 NSCs であり、SOX2⁺細胞は type-1 NSCs と type-2a NPCs であり (Garcia et al., 2004; Zhao et al., 2008)、100 ppm の NaF は離乳期の発達曝露終了時に type-1 NSCs と type-2a NPCs を増加させたことが示唆された。また、変化は統計学的に有意ではなかったが、この時期の DCX⁺細胞、すなわち type-2b 及び type-3 NPCs と未熟顆粒細胞の数が用量依存的に減少する傾向が観察された。TBR2⁺細胞、すなわち type-2b NPC や TUBB3⁺細胞、すなわち未熟顆粒細胞の数に変化がないことから (Hodge et al., 2008; von Bohlen Und Halbach, 2007)、これらの結果は、100 ppm の NaF 曝露が離乳期に type-3 NPC を減少させた可能性を示唆している。また、離乳期における type-1 NSCs と type-2a NPCs の増加は、type-3 NPCs の減少に対する代償反応である可能性も示唆された。SGZ の細胞の増殖とアポトーシスはこの時点では影響を受けなかったため、顆粒細胞系譜細胞のこれらの変化は離乳前の NaF 曝露中に生じたのかもしれない。歯状回における NSC 指標である *Nes* (Mignone et al., 2004)、TBR2 をコードする *Eomes* (Mihalas and Hevner, 2017)、NeuN をコードする *Rbfox3* (Darnell, 2013)、内因性アポトーシス経路の抗アポトーシス遺伝子である *Bcl2* (Leber et al., 2007) の転写レベルの増加は、神経新生の

障害に応答した神経保護機構の誘導を示唆している。生後 77 日目における顆粒細胞系譜の免疫組織化学的解析から、発達期の NaF 曝露による神経毒性作用は成体期には回復していることが示唆された。

本研究では、歯状回門部における GABA 作動性介在ニューロンの各集団及び GluR2⁺グルタミン酸作動性苔状細胞の免疫組織化学的解析を行ったが、GluR2⁺細胞数が用量依存的に増加する傾向を示した以外は、生後 21 日目における有意な変化は認められなかった。苔状細胞は、マウスの海馬における成体神経新生時の NSC 活性を制御することが示唆されている (Yeh et al., 2018)。このことは、NaF への発達期の曝露が、神経新生ニッチにおいて type-1 NSCs と type-2a NPCs を増加させたという今回の所見と一致する。生後 77 日目において、GABA 作動性介在ニューロンの亜集団と GluR2⁺グルタミン酸作動性苔状細胞の免疫組織化学的解析では、NaF 曝露後の有意な変化は認められなかった。しかし、CALB2 をコードする *Calb2* と RELN をコードする *Reln* の転写レベルは NaF 曝露後に増加した。歯状回の CALB2⁺介在ニューロンは他の抑制性 GABA 作動性介在ニューロンと相互接続しており (Gulyás et al., 1996)、また *Calb2* ノックアウトマウスは SGZ の NPC 増殖を抑制することが示されている (Todkar et al., 2012)。また、RELN を発現する介在ニューロンは type-1 NSCs の増殖を制御することから (Sibbe et al., 2015)、生後 77 日目において認められた *Reln* の発現低下は、生後 21 日目における type-3 NPCs の減少に対する神経保護反応の一部かもしれない。

これまでの研究から、海馬における NaF 誘発神経毒性のメカニズムには、酸化ストレス、神経炎症、シナプス可塑性の変化、ミトコンドリア機能異常の関与が示唆されている (Bartos et al., 2018; Ferreira et al., 2021; Yang et al., 2018)。例えば、成体ラットにおける NaF 曝露は、海馬において炎症性サイトカインの分泌とミクログリアの活性化を誘発し、それに伴ってシナプス可塑性が低下する (Yang et al., 2018)。本研究では、酸化ストレス関連パラメータを解析した結果、NaF 曝露は生後 21 日目における歯状回の MDA 濃度や GSH 濃度を変化させなかった。しかし、スーパーオキシドジスムターゼ 1 をコードする抗酸化遺伝子である *Sod1* (Sikandaner et al., 2017) の転写産物レベルは、この時点で NaF 曝露により低下した。これらの結果は、NaF 曝露が抗酸化防御機構を障害し、酸化ストレスに対する脆弱性を増大させることを示唆している。

神経炎症関連パラメータを解析した結果、生後 21 日目に 100 ppm の NaF に曝露した後では、歯状回門部のグリア細胞集団の数や歯状回の炎症性サイトカイン遺伝子の転写産物レベルに変化はなかった。しかし、生後 77 日目において、100 ppm の NaF は CD68⁺ミクログリアの数には影響を与えずに、CD163⁺ミクログリアの数を増加させた。CD163 は活性化された M2 ミクログリア/末梢マクロファージの指標であり、抗炎症作用を有する (Zhang et al., 2012)。CD68 は活性化された M1/M2 ミクログリアと末梢マクロファージの両方に発現する (Walker and Lue, 2015)。ことから、本研究における CD163⁺ミクログリアの増加は、生後 21 日目における酸化ストレスに対する脆弱性の増加に対する防御機構と

して、抗炎症反応の誘導を示唆している。さらに、生後 77 日目では、M1 型炎症性ミクログリアによって産生される炎症性サイトカイン遺伝子である *Il6* の転写産物レベルの低下 (Tang and Le, 2016) が観察され、炎症性反応と抗炎症性反応の両方に作用する強力なサイトカイン遺伝子である *Il18* の転写産物レベルの上昇が観察された (後者は M2 型抗炎症性ミクログリアの活性化を引き起こす) (Alboni et al., 2010; Tang and Le, 2016)。これらの結果は、*Nes* と *Reln* 遺伝子の発現上昇による神経保護をサポートするために、生後 77 日目で抗炎症反応が誘導されたことを示唆している。

本研究では、100 ppm の NaF 曝露により、生後 21 日目において ARC⁺成熟顆粒細胞数が増加し、*Ptgs2* が発現上昇した。*Arc* と *Ptgs2* はともに、新生ニューロンのシナプス可塑性に機能的に関連する最初期遺伝子である (Nikolaenko et al., 2018; Teather et al., 2002)。これらの結果は、NaF 曝露によって誘導された type-3 NPC の減少に対する代償反応として、成熟顆粒細胞におけるシナプス可塑性が増加した可能性を反映しているのかもしれない。これらの反応は用量依存的ではなかったが、30 ppm の NaF 曝露は生後 77 日目において ARC⁺細胞と COX2⁺細胞数を増加させたことから、これらは離乳期に抑制された神経新生に対する神経保護反応の結果としてみられた変化であることが示唆された。

最近の報告では、*in vivo* での NaF 曝露はマウスの海馬ニューロンにおいて解糖系を抑制し、ミトコンドリア機能を障害することが示唆されている (Li et al., 2023; Xin et al., 2023)。生後 21 日目におけるミトコンドリア OXPHOS に関連する遺伝子発現変化に関して、本研究では 100 ppm の NaF 曝露により、呼吸鎖複合体である ATP 合成酵素をコードする *Atp5f1b* (Koopman et al., 2013) と、呼吸鎖複合体の構成要素であるコハク酸デヒドロゲナーゼ複合体サブユニット D をコードする *Sdh* (Koopman et al., 2013) が発現低下を示した。逆に、100 ppm の NaF は、解糖経路の初期段階で機能するヘキソキナーゼ 3 をコードする *Hk3* を発現上昇させた (Wilson, 2003)。一般に、幹細胞は細胞増殖を維持するために、細胞構成要素の合成をサポートする解糖系経路を優先的に利用するが、分化期にはアデノシン三リン酸を生成する酸化的代謝へと代謝プロファイルがシフトする (Flores et al., 2017; Folmes et al., 2011; Gu et al., 2016)。この代謝シフトは、NSC から NPC への移行にも重要である。シングルセル RNA シーケンス研究では、成体 NSCs から NPCs への運命移行の初期段階において、解糖系遺伝子の発現が減少し、OXPHOS に関与する遺伝子の発現が上昇することが見出された (Beckervordersandforth et al., 2017; Shin et al., 2015)。従って、100 ppm の NaF への発達の曝露は、離乳期の神経新生細胞集団においてミトコンドリア呼吸鎖複合体の抑制を誘導し、その結果生じるミトコンドリア機能不全が顆粒細胞系譜における type-3 NPC の減少と関連していると考えられる。ヘキソキナーゼ 3 陽性細胞集団が、生後思春期以降までの間、海馬歯状回に一過性に出現することが報告されている (Coerver et al., 1998)。発達中の脳における *Hk3* の役割はまだ研究されていないが、本研究における 100 ppm の NaF 曝露後の *Hk3* の発現増加は、OXPHOS から解糖系

への代謝シフトが、type-1 NSCs 及び type-2a NPCs の成長を助長する細胞環境を提供することを示唆している。しかしながら、OXPHOS 及び解糖関連遺伝子の発現変化は、生後 77 日目ではもはや観察されなかった。

<AP 曝露実験>

本研究では、生後 21 日目の離乳期におけるラットの血清 T3 及び T4 レベルの用量に関連した減少が観察された。しかし、甲状腺ホルモン値の減少の程度は強くなり、300 ppm 群では統計学的有意差は得られなかった。対照的に、本研究では離乳期の甲状腺腫大が 300 ppm と 1000 ppm の両方で肉眼観察により明らかになり、病理組織学的に甲状腺濾胞上皮細胞過形成と濾胞コロイドの減少の発生頻度と重症度における統計学的に有意な変化を伴った。以上の結果は、甲状腺機能低下症の変化は血清甲状腺ホルモン値よりも甲状腺病理組織学的解析でより明らかになることを指摘した最近発表された論文の内容とよく一致している (Akane et al., 2022)。血中 TSH 値上昇を介した甲状腺濾胞上皮細胞の増殖活性の増加に関しては、我々は AP 曝露後に PCNA⁺濾胞上皮細胞数の用量依存的な増加を観察し、1000 ppm では統計的に有意であった。これらの結果は、発達期の AP 曝露 (300 ppm 以上) が甲状腺機能低下を誘発したことを示唆している。しかし、AP 曝露児動物で観察された肉眼的及び病理組織学的な甲状腺の変化、ならびに濾胞上皮細胞の増殖活性の増加は、成体期 (生後 77 日目) までには消失した。これらの結果は、妊娠期間中及び授乳期間中に AP 曝露を中止すると、成体期に甲状腺機能低下症が消失することを示唆している。

本研究では、離乳期の児動物において顆粒細胞系譜指標を免疫組織化学的に解析したところ、1000 ppm AP 曝露で GFAP⁺細胞数が減少し、SOX2⁺細胞数が減少傾向にあること、また 300 ppm 以上で PCNA⁺増殖 SGZ 細胞数が減少することが明らかになった。SGZ では、GFAP は type-1 NSCs で発現し (von Bohlen und Halbach, 2011)、SOX2 は主に type-1 NSCs、type-2a NPCs、及びごく少数の type-2b NPCs で発現する。成体期においても、GFAP⁺ type-1 NSCs の減少は 1000 ppm AP 曝露児動物において持続したことから、AP 曝露は type-1 NSCs を標的とした神経新生の持続的な抑制を成体期まで誘発したことが示唆された。我々の以前の研究では、ラットを用いた抗甲状腺剤のメチマゾールまたは PTU への発達期曝露による発達期甲状腺機能低下症は、離乳期の曝露終了時に type-1 NSCs、type-2a NPCs、及び type-3 NPCs の数を減少させた (Shiraki et al., 2012, 2016)。更に、成体になっても type-2a NPC の減少は神経新生ニッチに残っていた (Shiraki et al., 2012, 2016)。これらの所見は、今回の研究における顆粒細胞系譜に対する発達期での AP 曝露の影響が、発達期甲状腺機能低下症と関連している可能性を示唆している。しかし、発達期の AP 曝露は離乳時の type-3 NPCs の数については減少傾向しか示さず、この時点での発達期甲状腺機能低下症ではこの NPC 集団の明らかな減少を示したことは対照的であった (Shiraki et al., 2012, 2016)。強力な甲状腺機能低下症が脳の成長にも影響を与える胎児の成長遅延を引き起こすことが知られており (Gilbert et al., 2017)、我々の以前の

研究では、全身及び脳の成長遅延を引き起こす明らかな発達期甲状腺機能低下症が海馬の神経新生に影響を及ぼすことを見出している(Shiraki et al., 2012, 2014)。しかし、本研究で検討した用量での発達期の AP 曝露では、離乳時または成体期における児動物の体重や脳重量を変化させなかった (Shiraki et al., 2012, 2014, 2016)。発達期の AP 曝露によって type-3 NPCs が減少しなかった理由は不明であるが、血中甲状腺ホルモン濃度が SGZ における type-3 NPCs の細胞動態に影響を及ぼすためには、何らかの閾値があると推察される。

OL 系譜の細胞集団への影響については、本研究では 300 ppm 以上の AP 曝露により、離乳期の歯状回門部における CNPase⁺成熟 OL 数が減少した。しかし、AP 曝露はこの時点では NG2⁺ OPCs や OLIG2⁺ OL 系譜細胞の数を変化させず、CNPase⁺細胞数は成体期に回復した。このことは、発達期の AP 曝露が離乳期の OL 系譜細胞の成熟を一過性に抑制したことを示唆している。しかしながら、成体期には白質組織面積 (脳梁と隣接する帯状束の面積を合わせたもの) の用量に関連した減少が観察された。これらの結果は、発達期 AP 曝露によって誘発される離乳期の成熟 OL の減少が、OL 成熟抑制が一過性で AP 曝露停止後には消失したのにもかかわらず、成体期に明白になった白質低形成の原因である可能性を示唆している。前述のように、ラットの発達期の甲状腺機能低下症は、大脳皮質深部の CNPase⁺成熟 OL 数と脳梁の有髄軸索数を減少させる (Long et al., 2021; Salas-Lucia et al., 2020)。これらの結果は、ラットの発達期の AP 曝露が OL 成熟の一過性の抑制を引き起こし、成体期の白質低形成に結びついたことを示唆しており、これはラットの発達期に抗甲状腺剤であるプロピルチオウラシル (PTU) やメチマゾールに曝露することで引き起こされる甲状腺機能低下症による脳への影響と同様であると考えるのが妥当である (Shibutani et al., 2009; Shiraki et al., 2014)。

本研究における歯状回門部の GABA 作動性介在ニューロンの各集団と苔状細胞について、1000 ppm の AP 曝露は離乳期に SST⁺介在ニューロン数を増加させたが、他の GABA 作動性介在ニューロンの各集団と GluR2⁺苔状細胞数はこの時点では変化しなかった。成体期には、SST⁺介在ニューロンの数の増加は持続し、CCK⁺介在ニューロンの数は 1000 ppm で増加した。発達期甲状腺機能低下症が GABA 作動性介在ニューロンの各集団に及ぼす影響について、我々は以前に、PTU への発達期曝露後、成体に至るまでラット児動物の歯状回門部における SST⁺介在ニューロンの数の持続的増加を観察した (Shiraki et al., 2016)。歯状回の介在ニューロンにおける SST の発現は、発作などの神経障害状態や、環境強化などの自然刺激によって亢進する (Tallent, 2007)。歯状回門部の SST⁺介在ニューロンの機能的役割は長い間謎に包まれていたが、最近の報告では、歯状回門部の SST⁺介在ニューロンにおける血小板由来成長因子 (PDGF)-BB の発現増加が、海馬成体神経新生における NSC 増殖と新生ニューロンの樹状突起の成長を増加させることを見出されている (Li et al., 2023)。これらの結果は、離乳期と成体期の SST⁺介在ニューロンにおける PDGF を介したシグナルの活性化が、離乳期からの

type-1 NSCs の持続的減少に対する代償反応として働く可能性を示唆している。成体期における CCK⁺介在ニューロンの増加に関しては、最近の報告で、GABA 作動性介在ニューロンからの CCK 放出の増加が、グルタミン酸放出を引き起こす局所アストロサイトの活性を増加させることで NSCs の神経新生増殖を促すことが示唆されている (Asrican et al., 2020)。成体期には、アストロサイトの数の増加や、活性化を示唆する肥大化、あるいは Cck2r の発現上昇は観察されなかったが、成体期における CCK⁺介在ニューロンの増加は、離乳期からの type-1 NSCs の持続的減少に対する代償的な細胞反応である可能性が指摘できる。

我々は以前、実験的に誘発した発達期甲状腺機能低下症が、離乳期に RELN⁺ GABA 作動性介在ニューロンの数を増加させることを見いだした (Saegusa et al., 2010; Shiraki et al., 2016)。このことは、本研究で見出された発達期 AP 曝露後の離乳期に RELN⁺介在ニューロンの数に変化がない結果とは対照的である。以前考察したように、発達期甲状腺機能低下症によって誘導される RELN シグナルの増加は、type-3 NPC の減少を克服するために神経細胞の移動を促進する代償機構かもしれない (Saegusa et al., 2010; Shiraki et al., 2016)。しかし、前述のように、発達期 AP 曝露後の離乳期には type-3 NPCs の変化は観察されなかった。従って、今回の実験条件では、代償機構としての RELN シグナルは AP 曝露によって発動しなかったと考えられる。

発達期に実験的にヨウ素欠乏症または甲状腺機能低下症を誘発すると、ラット海馬ニューロン (歯状回顆粒細胞を含む) において長期増強 (LTP) が障害され、シナプス可塑性の指標である最初期遺伝子産物の発現が減少する (Dong et al., 2005)。我々は以前に、発達期に PTU を曝露すると、離乳期に海馬歯状回においてシナプス可塑性に関連する最初期遺伝子産物の ARC または COX2 に対して免疫組織化学的に陽性を示す顆粒細胞が一過性に減少することを報告した (Shiraki et al., 2014, 2016)。本研究では、発達期の AP 曝露により、離乳期の ARC⁺細胞数は用量依存的に減少傾向を示したが、他のシナプス可塑性関連指標タンパク質の免疫組織化学的な陽性細胞数は変化しなかった。これらの結果は、発達期の AP 曝露が、発達期甲状腺機能低下症の影響と関連して、ARC を介したシナプス可塑性を抑制したことを示唆している。今回の研究で注目すべきは、ARC⁺細胞数の減少傾向が AP 曝露後に成体期まで続いたことであり、以前に見出した PTU 曝露後に成体期に観察された ARC⁺細胞数の増加や COX2⁺細胞数の変化とは異なっていた (Shiraki et al., 2014, 2016)。以前の報告では、胎生期 6 日目から生後 30 日目までの飲料水による AP の発達期曝露後、成体段階における海馬のフィールド電位におけるベースラインのシナプス伝達の減少が示された (Gilbert et al., 2017)。重要なことに、ベースラインのシナプス伝達の減少は、30 ppm の最低用量レベルから用量依存的に観察されている (Gilbert and Sue, 2008)。

T3 は OL 系譜における増殖/分化スイッチの重要な決定因子であり、OPC への作用により細胞周期の終了と分化を促進する (Lee and Petratos, 2016; Pagnin et al., 2021)。また、OL 発生の後期には、T3 は最終分化と髄

鞘形成にも関与する (Younes-Rapozo et al., 2006)。前述のように、本研究では、発達期 AP 曝露を終了した離乳時に、海馬歯状回門部における CNPase⁺成熟 OL が減少することを明らかにした。我々は以前、ラットの発達期の PTU 曝露による甲状腺機能低下後、生後 77 日目に検索した大脳深部皮質において、CNPase⁺成熟 OL が減少していることを観察した。本研究では、発達期 AP 曝露を終了した離乳時に、歯状回門部における Olig2⁺ OL 系譜細胞数に変化は見られなかったが、NG2⁺ OPC 数が増加する傾向が観察された。これらの結果は、循環甲状腺ホルモンレベルの減少が OPC の分化を抑制し、その結果、OPC の数が増え、一方で、分裂終了後の OL 系譜細胞数が減少を示した可能性を示唆している。

甲状腺機能低下症による発達期の脳への影響については、発達期の PTU 曝露によりラットの海馬で酸化ストレスが誘導されることが報告されている (Cattani et al., 2013)。しかし、本研究では、発達期の AP 曝露後、離乳期の海馬の MDA 及び GSSG/GSH レベルに変化は観察されなかった。また、離乳期における歯状回の酸化化蛋白質や酸化化酵素の遺伝子転写産物レベルの変化も観察されなかった。これらの結果から、本研究で検討した用量では、発達期の AP 曝露後に明らかな酸化ストレスの誘導がないことが示唆された。この違いは、PTU と AP への曝露によって誘発される甲状腺機能低下症の強さの違いによるのかもしれない。Cattani らの研究 (2013)では、血清中の T3 及び T4 レベルの減少の大きさから判断して、本研究で用いた発達期の AP 曝露と比較して、発達期の PTU 曝露によっては強い甲状腺機能低下症が誘発されたと判断できる。本研究で検討した酸化ストレス関連遺伝子のうち、*Gpx1* の転写産物レベルが発達期 AP 曝露後の生後 77 日目で低下した。この結果は酸化ストレスに対する感受性の上昇を反映していると解釈することも可能であるが、*Gpx1* の発現量変化の大きさが小さいこと、他の酸化ストレス関連パラメータに明らかな変化がないことから、この遺伝子発現量変化の毒性学的意義は低いと考えられる。

前述のように、今回の結果は、発達期の AP 曝露を終了した離乳期において、顆粒細胞系譜のうち type-1 NSCs と type-2a NPCs が減少し、成熟顆粒細胞の ARC を介したシナプス可塑性が抑制されることを示唆している。この時点で、歯状回において *Efnb3*、*Vegfa*、*Ntrk2*、*Arhgef2*、*Robo3*、*Gria2*、*Gria3*、*Grin2b* の発現増加が観察され、*Robo3* の発現増加は生後 77 日目まで続いた。*Efnb3* はエフリン B3 リガンドをコードし、その受容体 EphB1 とともに海馬における NPC の増殖と移動を協調的に制御している (Chumley et al., 2007)。*Vegfa* は血管内皮増殖因子 A をコードし、海馬の神経新生ニッチにおける NPC の増殖を刺激できる特異的な受容体を持つリガンドである (Jin et al., 2002)。*Ntrk2* は神経栄養受容体チロシンキナーゼ 2 をコードし、神経細胞の生存、分化、シナプス可塑性、神経新生を増加させる脳由来神経栄養因子の神経栄養効果を媒介する (Qian et al., 2006)。*Robo3* はラウンドアバウトガイダンス受容体 3 をコードし、軸索誘導と神経細胞移動を制御することができる (Pak et al., 2020)。*Gria2* と *Gria3* はシナプス可塑性に関与するグルタミン酸イオノトロピック受容体 AMPA 型

サブユニット 2 または 3 をコードしている (van der Spek et al., 2022)。*Grin2b* は、海馬の N-メチル-D-アスパラギン酸受容体の主要な制御サブユニットをコードしており、長期増強や長期抑圧に不可欠な要素である (Shipton et al., 2013)。従って、生後 21 日目における顆粒細胞系譜における NSC の減少と成熟顆粒細胞のシナプス可塑性の抑制の分子メカニズムは明らかにできなかったが、この時点での *Efnb3*、*Vegfa*、*Ntrk2*、*Robo3*、*Gria2*、*Gria3*、*Grin2b* の発現増加は、type-1 NSCs と type-2a NPCs の減少とシナプス可塑性の抑制に対する代償反応の可能性が指摘できる。生後 77 日目では、type-1 NSCs の減少を示唆する遺伝子発現変化は観察されなかった。この時点では、*Robo3* の継続的な発現上昇に加えて、*Notch1* と *Dll4* の転写レベルの発現上昇が観察された。このことは、NSCs の分化を抑制し、未分化状態に維持する *Notch1* シグナル (Ohtsuka et al., 1999)が促進することで、type-1 NSCs の減少に対する代償反応を誘導している可能性を示唆している。*Nes* の発現上昇は、この時点におけるこの代償反応を説明するのかもしれない。

<IMI 曝露実験>

本試験における 750 ppm の IMI 曝露にตอบสนองして、母ラットは妊娠中の摂餌量の減少、妊娠第 1 週と第 3 週の摂水量の減少、および授乳期の第 2 週と第 3 週の摂水量の減少を示した。児動物への曝露の影響については、750 ppm の IMI 曝露後、雄児動物は PND 9 から PND 21 にかけて体重が減少し、その後回復した。しかし、母動物や児動物の歩行やその他の行動に関する臨床的徴候は観察されなかった。従って、化学物質の試験に関する OECD ガイドライン (試験番号 426: 発達神経毒性試験) の推奨に従い (OECD, 2007)、発達神経毒性を検出するための試験用量としては、飼料中 750 ppm の IMI が母動物または児動物にわずかな影響を示す妥当な最高用量であると考えられた。

本試験における IMI の成体海馬神経新生への影響については、PND 21 の 750 ppm において、DCX⁺ 細胞数および TUBB3⁺ 細胞数が減少し、*Dpysl3* および *Tubb3* の発現低下を伴っていたが、TBR2⁺ 細胞数には変動がなかった。海馬歯状回の顆粒細胞系では、DCX は主に type-2b 神経前駆細胞 (NPC) から有糸分裂終了細胞への分化後の未熟顆粒細胞までの細胞集団で発現している (Kempermann et al., 2015)。TBR2 は type-2b NPC で発現し (Hodge et al., 2008)、TUBB3 は新しく生成された未熟な有糸分裂後の顆粒細胞のマーカーであることから (von Bohlen Und Halbach, 2007)、750 ppm の IMI 曝露後、type-3 NPC および有糸分裂後の未熟な顆粒細胞が減少したことが示唆された。この用量で観察された SGZ の PCNA⁺ 増殖細胞数の減少を考慮すると、DCX⁺ 細胞および TUBB3⁺ 細胞の減少は、分化後期の NPC の増殖抑制に起因すると考えられる。しかし、PND 21 から IMI 曝露を中止した後、PND 77 の成体期には DCX⁺細胞集団や TUBB3⁺細胞集団に対する持続的な影響は観察されなかった。対照的に、GFAP⁺ type-1 NSCs と NeuN⁺有糸分裂後顆粒細胞の数は、この時点で 250 ppm 以上で減少し、750 ppm では歯状回の NSC マーカー遺伝子 *Nes* の発現低下を伴っていた。TUBB3⁺ 細胞

の数が変動しなかったことを考慮すると、IMI は海馬の神経新生を漸進的に阻害し、成体期における type-1 NSCs と成熟顆粒細胞の減少を引き起こした可能性がある。さらに、750 ppm の IMI に曝露した後、GCL ではなく SGZ で TUNEL⁺ アポトーシス細胞の数が増加し、増殖マーカー *Pcna* と抗アポトーシスに関連する *Bcl2l1* の発現低下が観察された。これらの所見は、アポトーシスを誘導し、増殖を抑制することによって、NSCs の数を減少させる IMI の遅延効果を示唆している。海馬の成体神経新生におけるニューロンの成熟過程は、げっ歯類では約 7 週間かかるので、成熟顆粒細胞の純増は、未成熟ニューロン細胞プールからのリクルートによるものである (Kempermann et al., 2015; Kozareva et al., 2019)。したがって、PND 77 で観察された成熟顆粒細胞の減少は、PND 21 で type-3 NPC と未熟顆粒細胞が減少したことによる遅延した結果であると考えるのが妥当である。

大型糖タンパク質の一種である *reelin* は、特に成体の神経新生に関連して海馬に分布する GABA 作動性介在ニューロンから分泌され、神経の増殖、分化、移動、成熟を含む神経新生の様々な局面で重要な役割を果たしている (Pesold et al., 1998)。実験的に *reelin* を欠失させると、生き残った未熟顆粒細胞の数と成熟速度が低下し、樹状突起の複雑さが減少する (Lussier et al., 2013)。さらに、*reelin* を培養液から除くと、NSC の分化が遅れ、未熟なニューロンが減少することが報告されている (Massalini et al., 2009)。今回の研究では、750 ppm の IMI が PND 21 の歯状回門部における RELN⁺ 介在ニューロンの数を有意に減少させた。したがって、PND 21 における IMI による未熟顆粒細胞と type-3 NPC の減少は、*reelin* シグナル伝達の障害によって引き起こされた、有糸分裂能のある NPC の増殖抑制と分化遅延に起因すると考えられた。さらに、海馬は学習と記憶形成の処理と制御に重要な役割を果たしており、それは主に IEG の発現を迅速かつ選択的に発現上昇することによる神経細胞の可塑性増加に依存している (Minatohara et al., 2016)。これまでの研究で、シナプスと可塑性の強度に *reelin* シグナルが重要な役割を果たしていることが示されている。*reelin* が欠乏すると、*reelin* 依存性の ERK1/2 リン酸化が阻害され、その結果、成熟神経細胞では FOS や ARC を含む ERK1/2 依存性の IEG タンパク質の発現が抑制されるという報告がある (Lee et al., 2014)。本研究では、p-ERK1/2⁺ および FOS⁺ 顆粒細胞の数は、750 ppm の IMI 曝露後の PND 21 で有意に減少した。海馬では、IEG の発現低下は、Y 迷路、新奇環境曝露、文脈的恐怖条件付けテストによって検出できる海馬依存的学習行動の異常をもたらす (Minatohara et al., 2016; Murray et al., 2021)。750 ppm の IMI 曝露後、離乳期には RELN、p-ERK1/2、FOS に免疫組織化学的な陽性細胞集団の減少と並行して、PND 27 に Y 迷路の自発的交替率が有意ではないがわずかに低下することが観察された。しかし、成体期には、*reelin* シグナル伝達と IEG 発現が回復したため、IMI 曝露は文脈的恐怖条件付けテストのパラメータに変動を与えなかった。これらの結果から、離乳期の IMI 曝露終了時点 (750 ppm) における IMI 誘発の *reelin* シグナル伝達の障害は、この時点

における顆粒細胞のシナプス可塑性の抑制とも関連している可能性が示唆された。

PND 21 に IMI 曝露を受けた児動物において、海馬歯状回の RELN⁺ 介在ニューロンが減少する具体的な理由はまだ不明であるが、エピジェネティックな遺伝子サイレンシング、特にプロモーター配列の過メチル化が *Reln* 発現低下の一因である可能性を示唆する研究もある (Grayson et al., 2005; Qin et al., 2011)。内毒素として知られ、炎症や酸化ストレス応答を誘導する自然免疫系の強力な活性化因子であるリポ多糖への出生前または新生児期の曝露が、児動物の海馬における RELN⁺ 介在ニューロンの減少を誘導したことを報告している研究がある (Nouel et al., 2012; Ardalan et al., 2022)。したがって、本研究における RELN⁺ 介在ニューロンの減少は、IMI によって誘発された神経炎症によるものであり、その後、炎症反応が PND 77 までに正常レベルに戻るとともに回復したと推測される。

本研究では、750 ppm の IMI 曝露が PND 21 と PND 77 の両方で歯状回の *Chrn2* を発現低下することを見いだした。海馬の神経原性ニッチでは、ニューロンは主に 2 種類のニコチン作動性アセチルコリン受容体、 $\alpha 7$ -nAChR と $\beta 2$ -nAChR を発現しており、それぞれ *Chrna7* と *Chrn2* によってコードされている (Hogg et al., 2003)。これらはコリン作動性シグナルに基づく神経新生の調節に重要である。例えば、*Chrn2* ノックアウトマウスでは、神経発生細胞の増殖が著しく低下する (Harrist et al., 2004)。したがって、750 ppm の IMI 曝露後の PND 21 と PND 77 で観察された *Chrn2* の発現低下は、PND 21 の NPC 増殖と PND 77 の NSC 増殖の抑制に関与している可能性がある。

本研究におけるグリア細胞集団への影響については、750 ppm の IMI は、PND 21 において GFAP⁺ astrocyte および Iba1⁺ microglia/macrophage 数を増加させ、それらをコードする遺伝子 (*Gfap* および *Aif1*) の転写産物レベルを上昇させた。脳では microglia/macrophage の活性化は不均一であり、2 つの相反する表現型に分類できる： M1 は炎症性、M2 は抗炎症性である (Okano et al., 2022; Klein et al., 2018)。本研究では、PND 21 において活性化した M1 および M2 タイプの microglia/macrophage を反映する CD68⁺ 細胞の数は、83 ppm 以上の IMI 曝露によって増加した。一方、CD163⁺ M2 タイプの microglia/macrophage の数は、IMI 曝露終了時においては変動しなかった。これらの結果から、母動物の IMI 曝露は、最低用量であっても、曝露終了時に M1 型 microglia/macrophage を活性化することによって炎症反応を誘導することが示唆された。この所見は、750 ppm の IMI 曝露後、M1 型 microglia/macrophage によって誘導される 2 つの主要な炎症性サイトカイン遺伝子である *Il6* と *Tnf* の発現上昇と一致している (Tang and Le, 2016)。インターロイキン (IL) -6 と TNF- α の発現上昇は、NPC の増殖と分化の低下に寄与しており (Keohane et al., 2010)、これらのサイトカイン因子が PND 21 で観察された NPC 増殖抑制に影響を与えた可能性が示唆された。対照的に、750 ppm の IMI では *Il4* と *Tgfb1* の発現上昇も観察された。TGF- β 1 は、活性化 astrocyte によって誘導される抗炎症性および神経保護サイトカインである (Cekanaviciute et al., 2014)。

IL-4もまた、astrocyteの神経保護活性化を誘導することができる抗炎症性サイトカインであり、これらの選択的に活性化されたastrocyteはIL-4、IL-10、TGF- β を放出する可能性がある (Kwon and Koh, 2020)。したがって、PND 21のIMI曝露終了時にM1表現型に偏極したmicroglia/macrophage集団が観察されたが、この時点における750 ppmでのGFAP⁺ astrocyteの増加は、誘導された神経炎症反応に対する神経保護反応である可能性がある。

IMI曝露を中止したPND 77では、歯状回のGFAP⁺ astrocyteとIba1⁺ microglia/macrophageの数は正常レベルに回復した。観察されたCD68⁺ M1型microglia/macrophageの増加は750 ppmで持続したが、炎症性 (*Il1b*, *Il6*, *Tnf*) と抗炎症性 (*Il10*, *Il4*, *Tgfb1*) の両サイトカイン遺伝子の転写産物レベルは、この時点で減少するか、減少する傾向にあった。この所見から、炎症性反応と抗炎症性反応の両方が抑制され、成体期の免疫系が低下したことが示唆される。本研究の結果と一致するように、げっ歯類動物を用いた実験で、IMI反復曝露後、食食活性、走化性、サイトカイン遺伝子発現の抑制、酸化ストレスの増加などの免疫抑制作用が報告されている (Badgular et al., 2013; Mohany et al., 2012)。さらに、ラットをIMIに曝露すると、発育期の免疫に年齢に依存した抑制作用が生じた (Gawade et al., 2013)。一方、AChおよびニコチンは、IMIの主要な標的受容体であるmicroglia上の $\alpha 7$ -nAChRと結合することにより、p-ERK1/2およびp38 mitogen-activated protein kinaseの活性を低下させ、microgliaによるリポ多糖誘導性のTNF- α 産生を抑制することができる (Shytile et al., 2004)。哺乳類のnAChRに対するIMIの親和性は昆虫のそれよりはるかに低いが、IMIがラット神経細胞の $\alpha 7$ -nAChRに結合して興奮作用を示すことが証明されている (Keohane et al., 2010)。本研究では、750 ppmのIMI曝露後、PND 21およびPND 77の歯状回において*Chrna7* ($\alpha 7$ -nAChRをコードする)の転写産物レベルは変動しなかったが、*Chat* (ACh合成酵素であるコリンO-アセチルトランスフェラーゼをコードする)の転写産物レベルはPND 21で上昇した。さらに、AChE活性は海馬で持続的に抑制され、AChの持続的蓄積が示唆された。発育期のIMI曝露によりAChが持続的に蓄積されると、PND 77でのサイトカイン発現が抑制されるのではないかと推測される。

化学物質による酸化ストレスが脳の抗酸化系にさまざまな反応を引き起こすことはよく知られているが、IMIはその典型的な症例であり、研究によってさまざまな結果が示されている (Wang et al., 2018)。本研究では、750 ppmのIMIに曝露された雄のげっ歯類動物において、海馬歯状回の抗酸化系が免疫系と同様の変動を示した。PND 21において、IMIは酸化ストレス関連遺伝子*Nfe2l2*, *Hmox1*, *Mt1*, *Mt2a*, *Gpx4*の発現レベルを上昇させた。メタロチオネイン-I/II (*Mt1*と*Mt2a*にコードされる) とグルタチオンペルオキシダーゼ4 (*Gpx4*にコードされる) は、フリーラジカルを消去し、その生成を防ぐことによって酸化ストレスに対応することができる (Dar et al., 2024; Ruttkay-Nedecky et al., 2013)。これらの遺伝子の発現上昇は、PND 21の海馬におけるMDA蓄積を防

ぐための抗酸化システムの作動を示している。一方、PND 77の歯状回では、海馬のMDAレベルが上昇し、*Nfe2l2*, *Hmox1*, *Gpx1*の転写産物レベルが低下しており、抗酸化能の抑制により海馬の酸化的損傷に対する脆弱性が上昇していることが示唆された。

前述のように、本研究では、PND 21の750 ppmのIMI曝露により、ケミカルメディエーター遺伝子だけでなく、多くの抗酸化関連遺伝子の発現上昇が認められた。nAChRがIMIに感受性であることを考慮すると、電位依存性カルシウムチャンネルがIMI誘発のCa²⁺上昇を増幅する役割を果たしている (Jepson et al., 2006)。イオンの不均衡やCa²⁺の上昇は酸化ストレスを引き起こし、細胞内へのCa²⁺の大幅な流入は活性酸素種 (ROS) の放出を誘発し、astrocyteやmicrogliaにおけるNrf2を活性化する (Yamazaki et al., 2015)。研究の結果、疾患の進行中、Nrf2は活性酸素産生の増加に対して最初は発現上昇で反応するが、酸化ストレスが強まるにつれてそのレベルは低下することが示された (Kanninen et al., 2008; Ma et al., 2024)。IMIによる活性酸素種産生の経時的な研究から、活性酸素種の産生は時間依存的であることが示されている (Wang et al., 2018)。抗酸化酵素の活性もまた、IMI曝露中にダイナミックに変動することが報告されており、曝露初期には高い活性を示すが、曝露後には活性が低下する (Ge et al., 2015)。したがって、本研究におけるPND 21での抗酸化関連遺伝子の発現上昇は、nAChRの過剰刺激の結果として、IMI曝露による酸化ストレス応答の初期段階を反映しているのかもしれない。

前述のように、PND 77に750 ppmのIMIに曝露された歯状回では、*Nfe2l2*, *Hmox1*, *Gpx1*の転写産物レベルが減少していた。このうち、*Nfe2l2*はNFE2 like bZIP転写因子2 (Nrf2) をコードしており、酸化ストレスに対して極めて感受性が高く、様々な抗酸化酵素や酸化ストレスに対する神経保護に関与するタンパク質の発現を制御する転写因子である (Loboda et al., 2016)。*Hmox1*は、Nrf2によって制御される重要な下流遺伝子の一つである (Loboda et al., 2016)。様々な刺激下で、発現が上昇したヘムオキシゲナーゼ1 (*Hmox1*によってコードされる) は、酸化傷害からの保護だけでなく、抗アポトーシス反応、増殖の制御、炎症の調節を含む生物学的プロセスにも関与している (Loboda et al., 2016)。本研究において、*Nfe2l2*, *Hmox1*, *Gpx1*の発現低下がMDA蓄積を引き起こす鍵となることは間違いない。さらに、PND 77では、*Bcl2l1*の発現低下に伴って、TUNEL⁺アポトーシス細胞の数がSGZで増加していた。*Bcl2l1*はBCL2-like 1をコードし、ミトコンドリアをプロアポトーシスタンパク質から保護する役割を担う抗アポトーシスタンパク質である (Boise et al., 1993)。酸化ストレスはミトコンドリアの機能障害を誘発し、細胞をアポトーシスに導く。しかし、*Hmox1*を欠損させると、酸化ストレス誘発アポトーシスに対する細胞の感受性が高まることが証明されている (Lin et al., 2012)。*Bcl2l1*の発現は酸化ストレスの増加とともに減少する (Soma et al., 2024)。したがって、IMIが活性酸素種の過剰産生と抗酸化経路の抑制を介して、ミトコンドリアの抗アポトーシスタンパク質BCL2-like 1を阻害することにより、type-1 NSCsのアポトーシスを誘

導したことは妥当であると考えられる。これらの結果は、ラットに IMI を投与すると脳内の抗酸化能が低下し、抗アポトーシス *Bcl2* の発現が減少するという以前の報告と一致している (Abd-Elhakim et al., 2018)。

AChE はコリン作動性システムの重要な構成要素であり、その恒常性の乱れは常に行動障害につながる (Ansari et al., 2012)。注意欠陥・多動性障害 (ADHD) は、最も一般的な神経発達障害のひとつであり、多動性が中核的な特徴であり、過剰な運動とじっとしていることの困難さを指す (Kuś et al., 2023)。ADHD の病因はまだわかっていないが、新生児期のコリン作動性システムの調節障害が ADHD 発症の十分な要因であることを示唆する証拠がある (Hellmer and Nyström, 2017)。例えば、母親のニコチン曝露は、ACh 経路の変化から生じる青年期の ADHD 症状の発症につながるとされる (Xavier et al., 2022)。本研究では、750 ppm の IMI 曝露後、成体期には移動速度が速くなり、オープンフィールド試験での距離が長くなる傾向がみられ、AChE 活性の持続的な抑制と *Chrn2* の発現低下を伴っていた。本研究の結果と一致して、妊娠マウスに IMI を投与すると、児動物の成体期における運動活性が上昇した。従って、IMI によるコリン作動性システムの破壊が成体期での運動亢進を引き起こしたと推測される。さらに、酸化ストレス状態の不均衡や免疫系の障害は ADHD と関連している (Verlaet et al., 2018)。したがって、IMI によって誘発される児動物の多動性の特異的なメカニズムを明らかにするためには、さらなる研究が必要である。

ラットを用いた過去の発達神経毒性試験によると、離乳前の体重増加の減少および 80 mg/kg 体重/日での運動/自発運動活性の低下に基づいて、IMI の無毒性量 (NOAEL) は 20 mg/kg 体重/日 (妊娠期間中の曝露) である (Germany, 2005)。本研究では、250 ppm における成体期の NSCs 数および有糸分裂後顆粒細胞数の減少に基づき、発達期曝露後の児動物の行動と海馬神経新生に関する IMI の NOAEL を 83 ppm と決定した (ラット母動物の曝露量 5.5~14.1 mg/kg 体重/日に相当)。カリフォルニア州の井戸水から IMI を検出した報告によると、IMI 残留量の最高値は 5.97 ppb であり、283 ppb より高い検出値は健康への懸念があると考えられている (California Department of Pesticide Regulation, 2021)。したがって、本研究の実験で発達神経毒性を引き起こすことが見出された用量は、日常生活で一般的に曝露される用量より遙かに高い。

E. 結論

NaF 曝露実験では、ラットの発達期に NaF に曝露すると type-3 NPC が減少し、離乳期には苔状細胞シグナルの増加を通じて type-1 NSCs と type-2a NPCs の代償的増加が誘導されることを示している。更に、type-3 NPCs の減少は、代償反応として成熟顆粒細胞のシナプス可塑性を増加させるかもしれない。神経新生に関連した変化は、成体期にはもはや観察されなかった。離乳期の酸化ストレスに対する脆弱性の増大に対応して、成体期に抗炎症反応が誘導されたことが、神経新生ニッチにおける神経保護の背景にあるのかもしれない。成

体期における *Calb2* と *Reln* の発現上昇は、離乳期の type-3 NPCs の減少に対する代償反応の結果を反映しているのかもしれない。離乳期におけるミトコンドリア呼吸鎖複合体に関与する遺伝子 (*Atp5f1b* と *Sdhb*) の発現減少は、type-3 NPC の減少に関与しているのかもしれない。さらに、同時に解糖系酵素遺伝子 *Hk3* が発現上昇することで、type-1 NSCs と type-2a NPCs の拡大を助長する神経新生環境が提供されるのかもしれない。これらの知見を総合すると、発達期の NaF 曝露は海馬の神経新生を一過性に阻害し、その代償反応として代謝シフトを誘導することが示唆される。

AP 曝露実験では、飲料水中に 1000 ppm までの用量を含む発達期の AP 曝露は甲状腺機能低下症を引き起こし、特に曝露終了後の離乳期に明らかになる可能性を示した。海馬の神経新生については、離乳期に神経新生の初期過程を標的とした NSC/NPC 増殖の抑制と、代償性介在ニューロン応答を伴う顆粒細胞のシナプス可塑性の低下が示唆され、神経新生の抑制は成体になるまで持続した。OL 系譜の影響から、離乳期には OL 成熟が一過性に抑制され、成体期には明瞭な白質低形成が示唆された。観察された脳の変化は、発達期甲状腺機能低下症によるものと類似しており、AP による発達神経毒性は甲状腺機能低下症によるものであることが示唆された。

IMI 曝露実験では、ラット母動物の IMI 曝露は、曝露期間中に児動物の顆粒細胞の後期分化と ERK1/2-FOS を介したシナプス可塑性を標的とすることで、海馬神経新生を抑制することが示唆された。神経新生とシナプス可塑性の抑制が観察されたのは、*reelin* のシグナル伝達の減少が原因かもしれない。休薬後の成体段階では、IMI は NSC と成熟顆粒細胞集団を双方向で減少させた。行動学的検査では、成体期における自発活動の亢進が認められた。海馬では、母親の IMI 曝露はコリン作動性シグナル伝達にも持続的な影響を及ぼし、曝露期間中は神経炎症と酸化ストレスの両方を誘発し、その後、成人期には酸化ストレスに対する感受性が上昇した。観察された海馬の変化は、成体期に観察された神経新生の進行性抑制と多動症の発生率増加の原因かもしれない。児動物の行動と神経発生に関する IMI の NOAEL は 83 ppm (5.5~14.1 mg/kg 体重/日) と決定された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ojio, R., Ozawa, S., Zou, X., Tang, Q., Woo, G-H., Shibutani, M.: Similar toxicity potential of glyphosate and glyphosate-based herbicide on cerebellar development after maternal exposure in rats. *Environ. Toxicol.* 39(5):3040-3054, 2024.
2. Zou, X., Tang, Q., Ojio, R., Ozawa, S., Shibudani, M., Sakamaki, Y., Ebizuka, Y., Jin, M., Yoshida, T., Shibutani, M.: Increased spontaneous activity and progressive suppression of adult neurogenesis in the hippocampus of rat offspring after maternal exposure

to imidacloprid. Chem. Biol. Interact. 399:111145, 2024.

3. Sakamaki, Y., Shobudani, M., Ojiro, R., Ozawa, S., Tang, Q., Zou, X., Ebizuka, Y., Karasawa, A., Woo, G.H., Yoshida, T., Shibutani, M.: Suppression of hippocampal neurogenesis and oligodendrocyte maturation similar to developmental hypothyroidism by maternal exposure of rats to ammonium perchlorate, a gunpowder raw material and known environmental contaminant. Env. Toxicol. 40(1), 30–53, 2025.
4. Shobudani, M., Sakamaki, Y., Karasawa, A., Ojiro, R., Zou, X., Tang, Q., Ozawa, S., Jin, M., Yoshida, T., Shibutani, M.: Metabolic shift as a compensatory response to impaired hippocampal neurogenesis after developmental exposure to sodium fluoride in rats. Acta Histochem. 126(8), 152204, 2024.
5. Zou, X., Ebizuka, Y., Sakamaki, Y., Shobudani, M., Tang, Q., Kobayashi, M., Kigata, T., Shibutani, M.: Progressive motor dysfunction and loss of cerebellar Purkinje and granule cells in rat offspring after maternal exposure to imidacloprid. (submitted)

2. 学会発表

1. 酒巻 友里、菖蒲谷 桃香、尾城 椋太、鄒 昕羽、唐 倩、小澤 俊介、吉田 敏則、渋谷 淳: 抗甲狀腺作用が知られている過塩素酸アンモニウムの発達期曝露によるラット海馬歯状回の神経新生に対する影響. 第 50 回日本毒性学会学術年会、第 50 回日本毒性学会学術年会プログラム・要旨集 : S122, P1-077S, 6 月 19 日–21 日, 2023.
2. Xinyu ZOU, Qian TANG, Ryota OJIRO, Shunsuke OZAWA, Momoka SHOBUDANI, Yuri SAKAMAKI, Toshinori YOSHIDA, Makoto SHIBUTANI: Sustained disruption of postnatal neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus after maternal exposure to imidacloprid in rats. 第 50 回日本毒性学会学術年会、横浜、第 50 回日本毒性学会学術年会プログラム・要旨集 : S123, P1-080S, 6 月 19 日–21 日, 2023.
3. 菖蒲谷 桃香、酒巻 友里、尾城 椋太、鄒 昕羽、唐 倩、小澤 俊介、吉田 敏則、渋谷 淳: 天然に豊富に存在する必須元素であるフッ化ナトリウムの発達期曝露によるラット海馬歯状回の神経新生

に対する影響. 第 50 回日本毒性学会学術年会、横浜、第 50 回日本毒性学会学術年会プログラム・要旨集 : S171, P2-200, 6 月 19 日–21 日, 2023.

4. Ryota Ojiro, Xinyu Zou, Qian Tang, Shunsuke Ozawa, Makoto Shibutani: Similar effects of glyphosate and glyphosate-based herbicide on brain development after developmental exposure to rats. The 10th International Congress of Asian Society of Toxicology. P146. Taipei, Taiwan. 7 月 17 日–20 日, 2023.
5. 鄒 昕羽、唐 倩、尾城 椋太、小澤 俊介、菖蒲谷 桃香、酒巻 友里、海老塚 由理、吉田 敏則、渋谷 淳: Effect of α -glycosyl isoquercitrin on maternal imidacloprid exposure-induced disruptive hippocampal neurogenesis in rats. 第 40 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京、第 40 回日本毒性病理学会総会及び学術集会要旨集 : P-03, pp. 64, 1 月 23–24 日, 2024
6. Xinyu Zou, Qian Tang, Ryota Ojiro, Shunsuke Ozawa, Yuri Ebizuka, Toshinori Yoshida, Makoto Shibutani: Effects of maternal exposure to imidacloprid on cerebellar development and behaviors of rat offspring. 第 51 回日本毒性学会学術年会、福岡、第 51 回日本毒性学会学術年会プログラム・要旨集 : p.75, P31-S, 7 月 3 日–5 日, 2024.
7. Xinyu Zou, Shunsuke Ozawa, Yuri Ebizuka, Makoto Shibutani: Assessment of developmental neurotoxicity of imidacloprid on hippocampal neurogenesis and cerebellum in rat offspring. EUROTOX 2024. 58th Congress of the European Societies of Toxicology. Copenhagen, Denmark. 9 月 8–11 日, 2024.

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

<NaF 曝露実験>

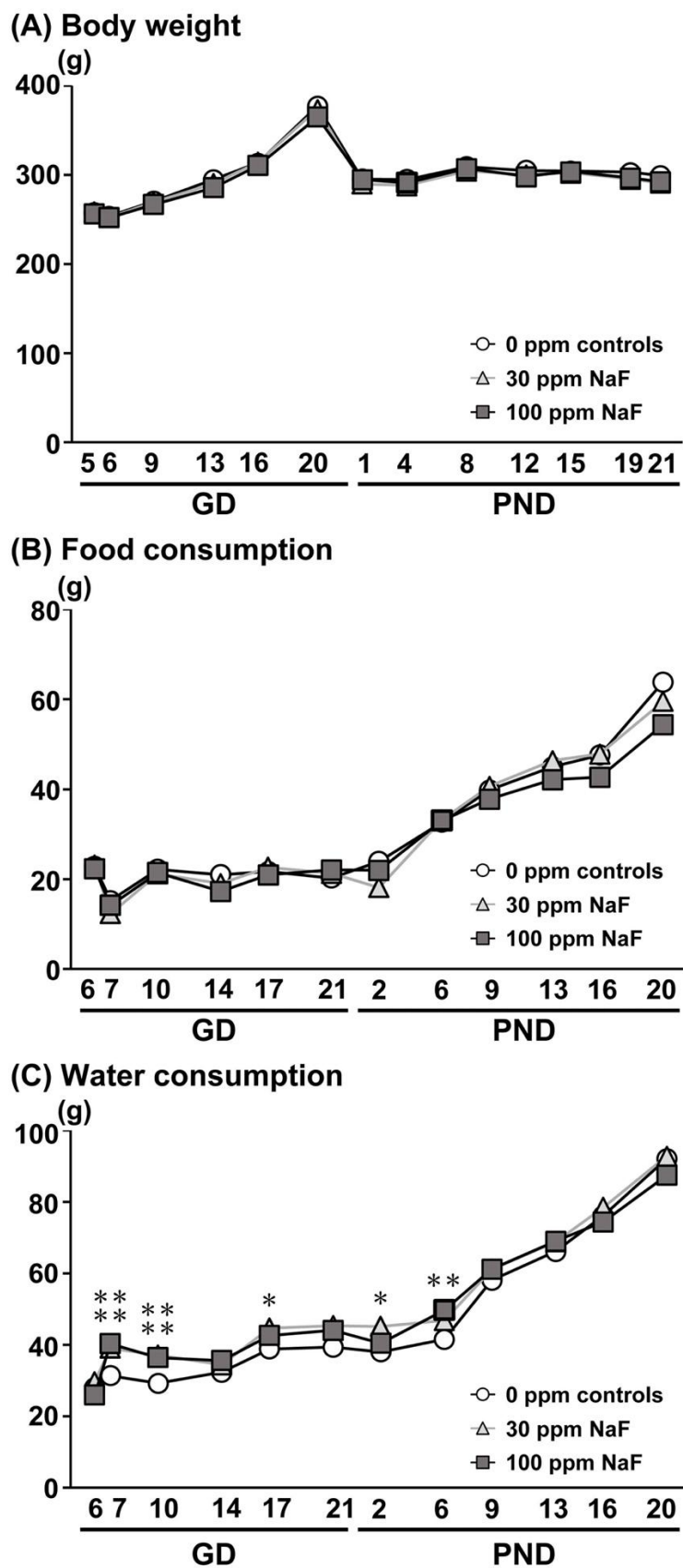


Fig. 1

Body weight and food and water consumption of dams during the exposure period in the sodium fluoride study. (A) Body weight, (B) food consumption, and (C) water consumption. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the untreated controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

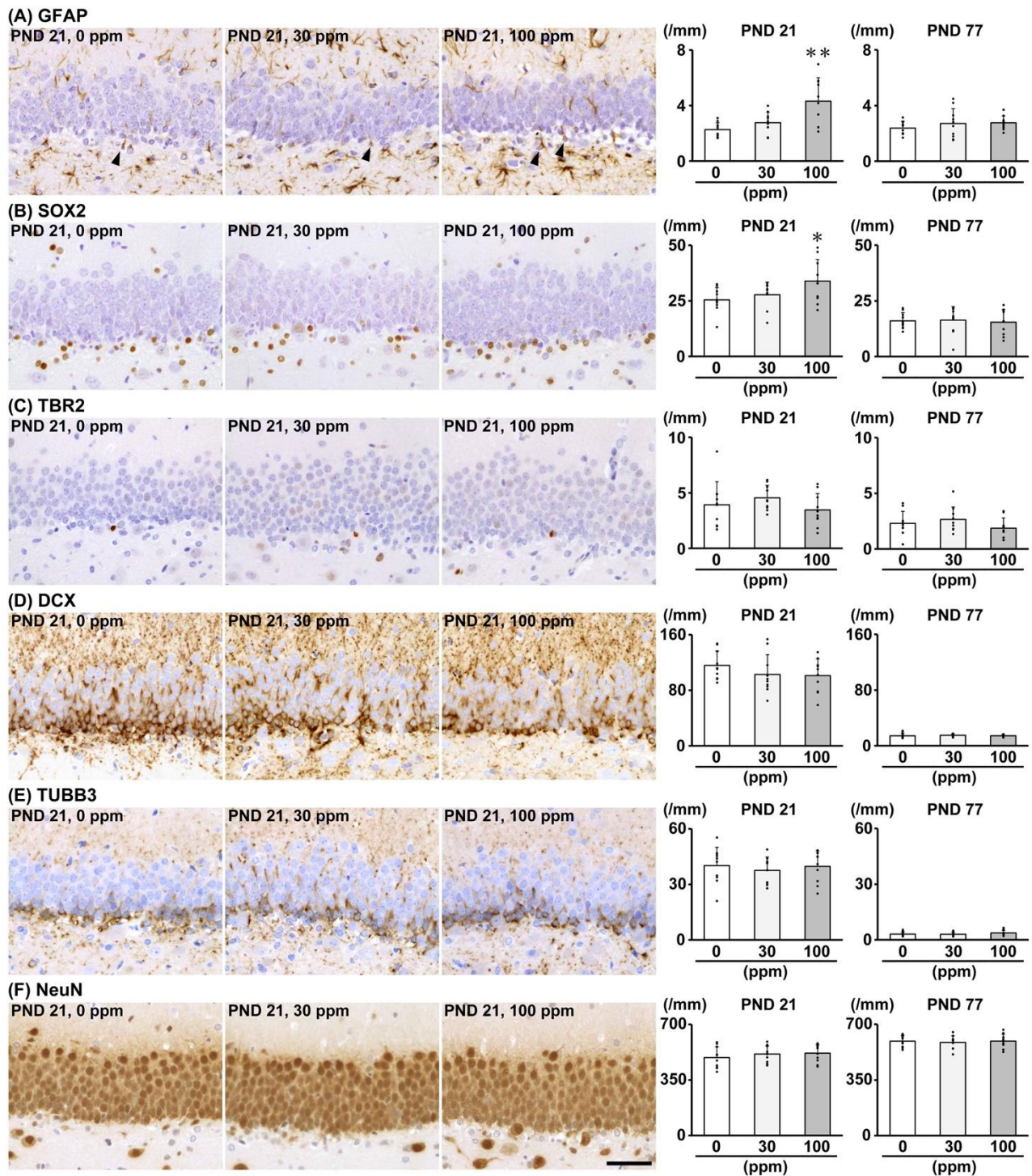


Fig. 2

Distribution of immunoreactive cells for granule cell lineage markers in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 21 and PND 77 after developmental exposure to sodium fluoride (NaF) from gestational day 6 to day 21 after delivery. (A) Glial fibrillary acidic protein (GFAP), (B) SRY-box transcription factor 2 (SOX2), or (C) T-box brain protein 2 (TBR2) in the subgranular zone (SGZ), and (D) doublecortin (DCX), (E) tubulin, beta 3 class III (TUBB3), or (F) neuronal nuclei (NeuN) in the SGZ and granule cell layer (GCL). Representative images from the untreated controls (0 ppm; left), and 30 ppm (middle) and 100 ppm (right) NaF groups on PND 21. Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification $\times 400$; bar 50 μm . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the SGZ and/or GCL. $N = 10/\text{group}$. Data are expressed as plots of individual values with their mean + SD. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, compared with the untreated controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

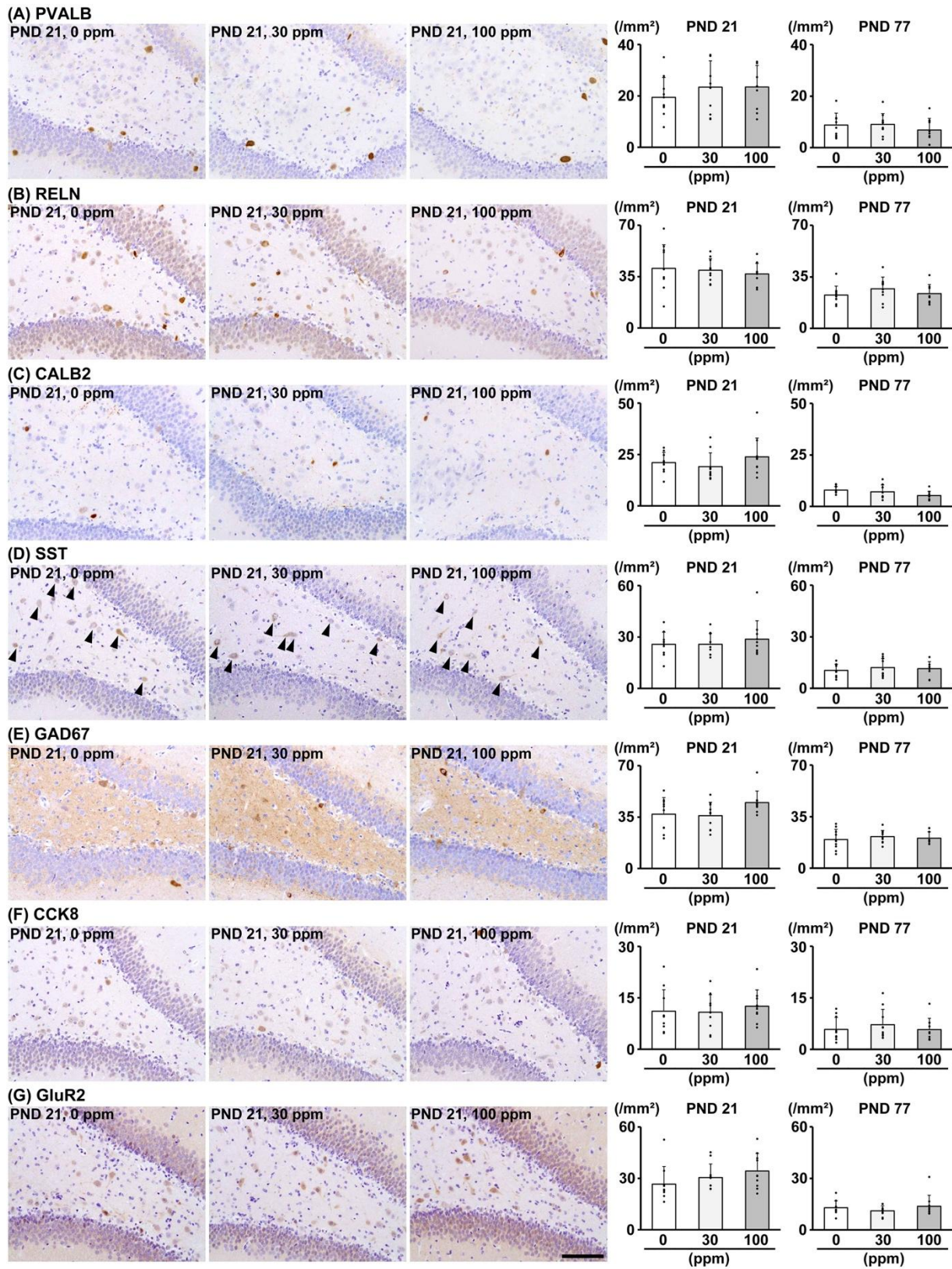


Fig. 3

Distribution of immunoreactive cells for γ -aminobutyric acid-ergic interneuron and mossy cell markers in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 21 and PND 77 after developmental exposure to sodium fluoride (NaF) from gestational day 6 to day 21 after delivery. (A) Parvalbumin (PVALB), (B) reelin (RELN), (C) calbindin-D-29K (CALB2), (D) somatostatin (SST), (E) glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67), (F) cholecystikinin-8 (CCK8), or (G) glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2 (GluR2) in the hilus of the dentate gyrus. Representative images from the untreated controls (0 ppm; left), and 30 ppm (middle) and 100 ppm (right) NaF groups on PND 21. Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification $\times 200$; bar 100 μ m. Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the hilus. $N = 10$ /group. Data are expressed as plots of individual values with their mean + SD.

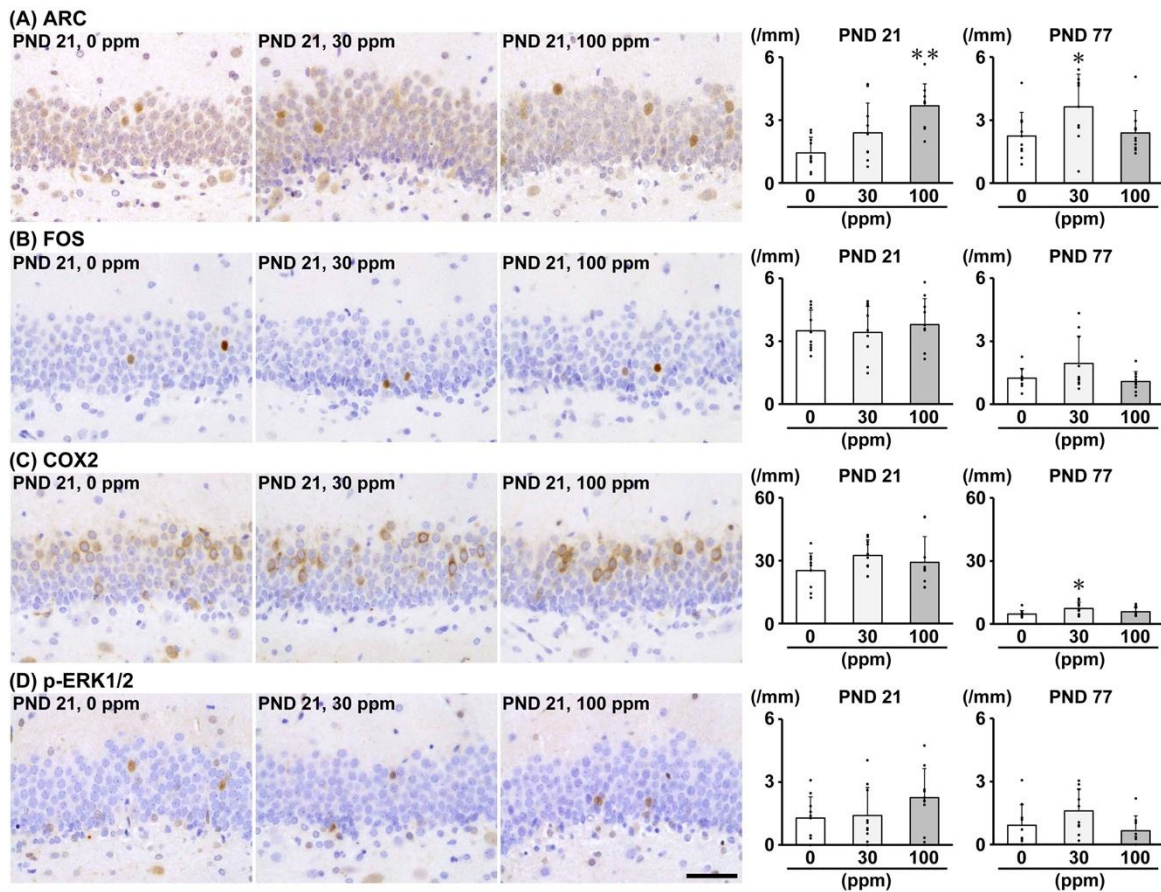


Fig. 4

Distribution of immunoreactive cells for synaptic plasticity-related gene products in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 21 and PND 77 after developmental exposure to sodium fluoride (NaF) from gestational day 6 to day 21 after delivery. (A) Activity-regulated cytoskeleton-associated protein (ARC), (B) Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit (FOS), (C) cyclooxygenase-2 (COX2), or (D) phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 (p-ERK1/2) in the granule cell layer (GCL) of the dentate gyrus. Representative images from the untreated controls (0 ppm; left), and 30 ppm (middle) and 100 ppm (right) NaF groups on PND 21. Magnification $\times 400$; bar 50 μm . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the GCL. $N = 10/\text{group}$. Data are expressed as plots of individual values with their mean $\pm$ SD. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the untreated controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

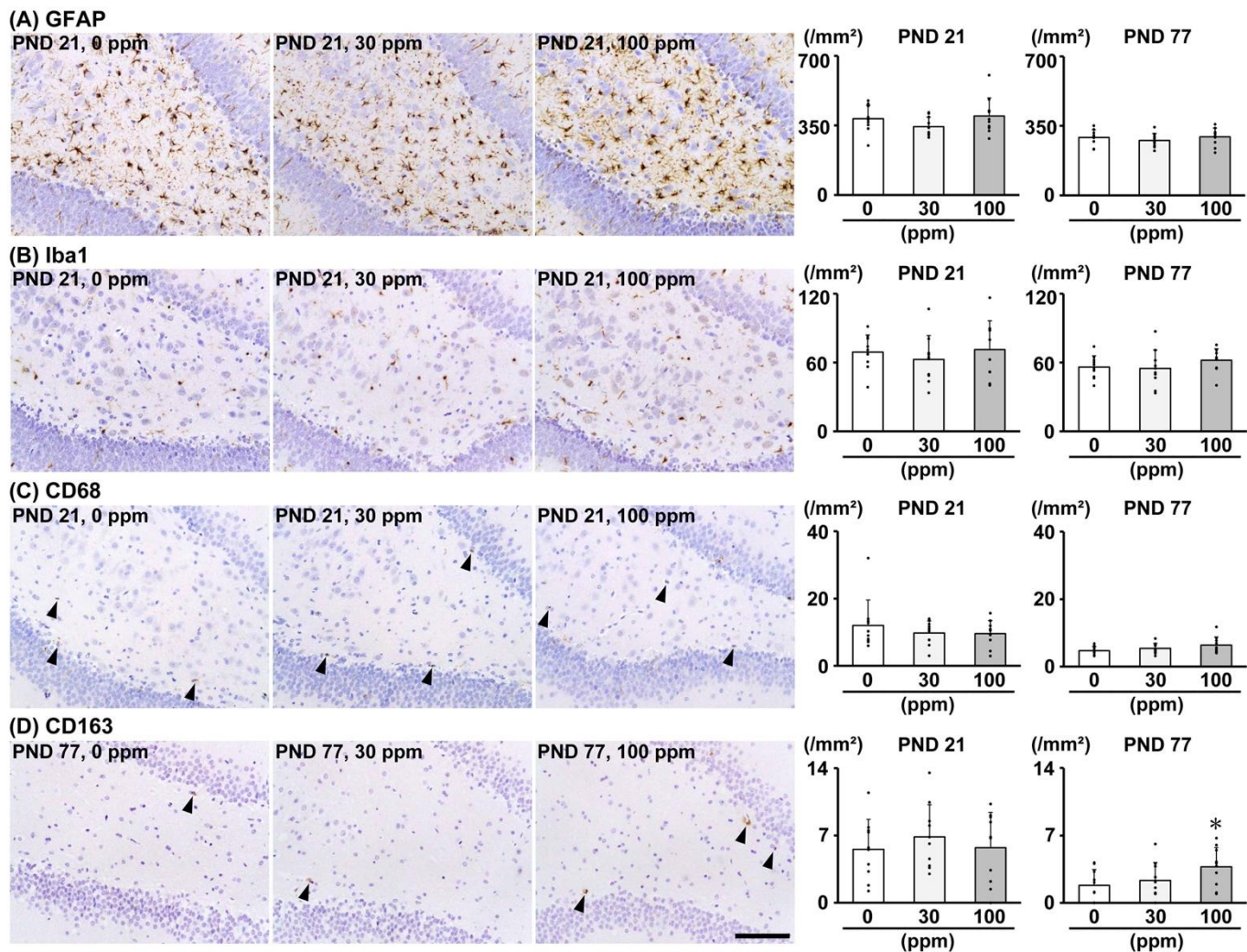


Fig. 5

Distribution of proliferating or apoptotic cells in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 21 and PND 77 after developmental exposure to sodium fluoride (NaF) from gestational day 6 to day 21 after delivery. (A) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)⁺ proliferating cells or (B) terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)⁺ apoptotic cells in the subgranular zone (SGZ). Representative images from the untreated controls (0 ppm; left), and 30 ppm (middle) and 100 ppm (right) NaF groups on PND 21. Magnification $\times 400$; bar 50 μ m. Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the SGZ. *N* = 10/group. Data are expressed as plots of individual values with their mean + SD.

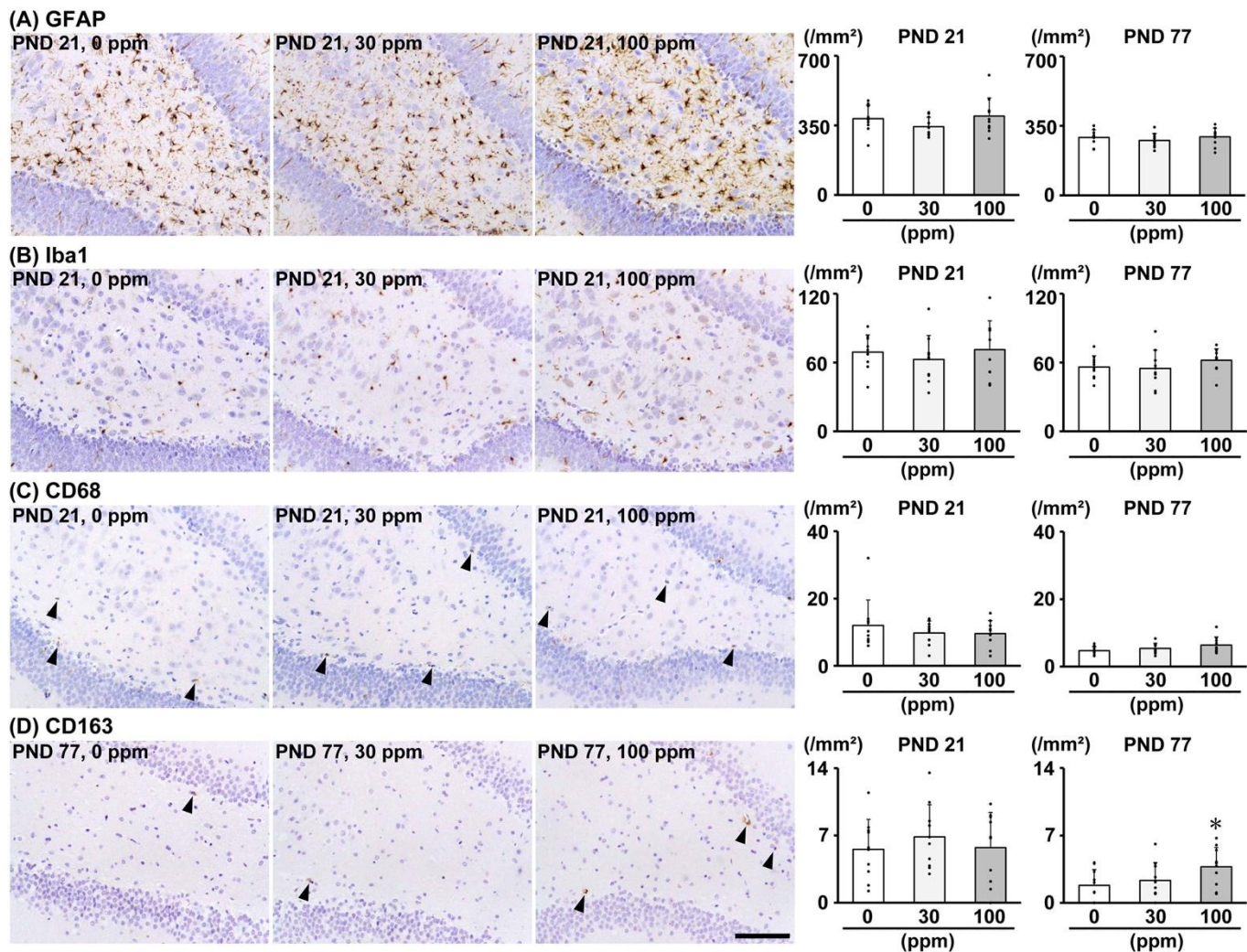


Fig. 6

Distribution of immunoreactive cells for glial cell marker proteins in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 21 and PND 77 after developmental exposure to sodium fluoride (NaF) from gestational day 6 to day 21 after delivery. (A) Glial fibrillary acidic protein (GFAP), (B) ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1), (C) cluster of differentiation (CD) 68, or (D) CD163 in the hilus of the dentate gyrus. Representative images from the untreated controls (0 ppm; left), and 30 ppm (middle) and 100 ppm (right) NaF groups on PND 21 (GFAP, Iba1, and CD68) or PND 77 (CD163). Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification $\times 200$; bar 100 μm . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the hilus. $N = 10/\text{group}$. Data are expressed as plots of individual values with their mean $\pm$ SD. $*P < 0.05$, compared with the untreated controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

Table 1**Transcript-level expression changes in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on PND 21 in the NaF study**

No. of animals examined	NaF in drinking water (ppm)			
	0 (Control)		100	
	6		6	
Normalization control	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
Granule cell lineage marker genes				
<i>Nes</i>	1.02 ± 0.21 ^a	1.02 ± 0.20	1.42 ± 0.22**	1.34 ± 0.09**
<i>Sox2</i>	1.03 ± 0.26	1.02 ± 0.23	0.88 ± 0.15	0.84 ± 0.12
<i>Eomes</i>	1.03 ± 0.28	1.01 ± 0.17	1.37 ± 0.33	1.30 ± 0.24*
<i>Dcx</i>	1.02 ± 0.22	1.01 ± 0.13	1.06 ± 0.12	1.01 ± 0.08
<i>Tubb3</i>	1.00 ± 0.08	1.01 ± 0.18	0.95 ± 0.11	0.90 ± 0.04
<i>Dpysl3</i>	1.01 ± 0.12	1.01 ± 0.15	0.95 ± 0.14	0.90 ± 0.09
<i>Rbfox3</i>	1.02 ± 0.20	1.01 ± 0.13	1.24 ± 0.17	1.18 ± 0.10*
GABAergic interneuron marker genes				
<i>Calb2</i>	1.45 ± 1.47	1.65 ± 1.98	0.77 ± 0.61	0.72 ± 0.54
<i>Pvalb</i>	1.09 ± 0.39	1.06 ± 0.32	1.32 ± 0.32	1.25 ± 0.30
<i>Reln</i>	1.05 ± 0.31	1.03 ± 0.26	1.16 ± 0.25	1.10 ± 0.25
<i>Sst</i>	1.04 ± 0.29	1.02 ± 0.20	1.15 ± 0.22	1.10 ± 0.19
Neurotrophin-related genes				
<i>Bdnf</i>	1.02 ± 0.18	1.01 ± 0.11	1.06 ± 0.06	1.01 ± 0.11
<i>Ntrk2</i>	1.00 ± 0.11	1.02 ± 0.19	0.96 ± 0.16	0.91 ± 0.11
Cell proliferation marker gene				
<i>Pcna</i>	1.03 ± 0.23	1.03 ± 0.27	1.11 ± 0.09	1.06 ± 0.09
Synaptic plasticity-related genes				
<i>Arc</i>	1.12 ± 0.45	1.08 ± 0.38	1.41 ± 0.47	1.34 ± 0.36
<i>Fos</i>	1.02 ± 0.25	1.06 ± 0.44	1.06 ± 0.22	1.00 ± 0.20
<i>Ptgs2</i>	1.03 ± 0.24	1.01 ± 0.14	1.46 ± 0.08**	1.39 ± 0.12**
Glutamate receptor genes				
<i>Gria1</i>	1.05 ± 0.29	1.02 ± 0.20	1.25 ± 0.16	1.20 ± 0.19
<i>Gria2</i>	1.03 ± 0.24	1.01 ± 0.15	1.24 ± 0.23	1.18 ± 0.18
<i>Gria3</i>	1.02 ± 0.21	1.01 ± 0.12	1.27 ± 0.24	1.21 ± 0.20
<i>Grin2a</i>	1.04 ± 0.27	1.01 ± 0.17	1.21 ± 0.22	1.15 ± 0.17
<i>Grin2b</i>	1.02 ± 0.19	1.00 ± 0.10	1.19 ± 0.21	1.13 ± 0.16
<i>Grin2d</i>	1.09 ± 0.51	1.16 ± 0.74	0.91 ± 0.23	0.86 ± 0.20
Glutamate transporter genes				
<i>Slc17a6</i>	1.42 ± 1.62	1.64 ± 2.21	0.70 ± 0.42	0.66 ± 0.37
<i>Slc17a7</i>	1.03 ± 0.26	1.01 ± 0.18	1.14 ± 0.15	1.09 ± 0.12
Apoptosis-related genes				
<i>Bak1</i>	1.00 ± 0.10	1.01 ± 0.18	1.18 ± 0.27	1.11 ± 0.20
<i>Bax</i>	1.00 ± 0.10	1.02 ± 0.22	1.12 ± 0.20	1.06 ± 0.14
<i>Bcl2</i>	1.07 ± 0.33	1.04 ± 0.27	1.50 ± 0.33*	1.41 ± 0.20*
<i>Casp3</i>	1.01 ± 0.17	1.01 ± 0.19	1.12 ± 0.23	1.06 ± 0.11
<i>Casp6</i>	1.01 ± 0.19	1.02 ± 0.23	1.06 ± 0.27	0.99 ± 0.20
<i>Casp8</i>	1.03 ± 0.30	1.02 ± 0.22	1.42 ± 0.48	1.34 ± 0.41
<i>Casp9</i>	1.01 ± 0.12	1.00 ± 0.07	1.18 ± 0.21	1.12 ± 0.15
<i>Bcl2l1</i>	1.01 ± 0.11	1.00 ± 0.05	0.99 ± 0.14	0.93 ± 0.06
Oxidative stress-related genes				
<i>Sod1</i>	1.01 ± 0.17	1.04 ± 0.32	0.78 ± 0.18*	0.75 ± 0.18
<i>Mt1</i>	1.02 ± 0.22	1.01 ± 0.12	0.92 ± 0.09	0.87 ± 0.12
<i>Mt2a</i>	1.06 ± 0.38	1.01 ± 0.11	0.85 ± 0.18	1.06 ± 0.06
<i>Gpx1</i>	1.01 ± 0.13	1.02 ± 0.20	0.91 ± 0.15	0.86 ± 0.11
<i>Cat</i>	1.00 ± 0.06	1.01 ± 0.12	1.03 ± 0.13	0.97 ± 0.05
Neural differentiation-related genes				
<i>Creb1</i>	1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.16	1.00 ± 0.14	0.95 ± 0.08
<i>Fzd9</i>	1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.12	1.20 ± 0.20	1.15 ± 0.16
<i>Tfap2c</i>	1.09 ± 0.47	1.05 ± 0.36	1.17 ± 0.24	1.11 ± 0.25
<i>Hes5</i>	1.01 ± 0.16	1.02 ± 0.19	0.95 ± 0.15	0.91 ± 0.19
Glycolysis-related genes				
<i>Hk1</i>	1.01 ± 0.15	1.00 ± 0.07	1.04 ± 0.08	0.99 ± 0.05
<i>Hk2</i>	1.01 ± 0.19	1.01 ± 0.18	1.07 ± 0.19	1.01 ± 0.11
<i>Hk3</i>	1.04 ± 0.28	1.02 ± 0.22	1.43 ± 0.33	1.34 ± 0.22*
<i>Pkm</i>	1.00 ± 0.06	1.01 ± 0.16	1.04 ± 0.07	0.99 ± 0.08
OXPHOS-related genes				
<i>Atp5f1b</i>	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.11	0.88 ± 0.05**	0.85 ± 0.10*
<i>Ndufc1</i>	1.00 ± 0.11	1.01 ± 0.14	0.91 ± 0.04	0.87 ± 0.09
<i>Sdhb</i>	1.01 ± 0.14	1.00 ± 0.11	0.88 ± 0.08	0.83 ± 0.07**
<i>Atp5po</i>	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.10	0.93 ± 0.06	0.89 ± 0.09
<i>Tmem70</i>	1.01 ± 0.12	1.01 ± 0.15	1.04 ± 0.15	0.99 ± 0.08

Chemical mediator genes

<i>Tnf</i>	1.02 ± 0.23	1.02 ± 0.22	1.16 ± 0.17	1.10 ± 0.12
<i>Il1b</i>	1.08 ± 0.47	1.07 ± 0.45	0.63 ± 0.25	0.61 ± 0.26
<i>Il6</i>	2.42 ± 1.51	2.40 ± 1.42	6.09 ± 4.69	5.87 ± 4.70
<i>Il18</i>	1.01 ± 0.17	1.02 ± 0.22	1.31 ± 0.29	1.25 ± 0.26

Abbreviations: *Arc*, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; *Atp5f1b*, ATP synthase F1 subunit beta; *Atp5po*, ATP synthase peripheral stalk subunit OSCP; *Bak1*, BCL2 antagonist/killer 1; *Bax*, BCL2 associated X, apoptosis regulator; *Bcl2*, BCL2 apoptosis regulator; *Bcl2l1*, BCL2 like 1; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Calb2*, calbindin 2 (also known as calbindin-D-29K and calretinin); *Casp3*, caspase 3; *Casp6*, caspase 6; *Casp8*, caspase 8; *Casp9*, caspase 9; *Cat*, catalase; *Creb1*, cyclic AMP-responsive element-binding protein 1; *Dcx*, doublecortin; *Dpysl3*, dihydropyrimidinase-like 3 (also known as TUC4: TOAD-64/Ulip/CRMP protein 4b); *Eomes*, eomesodermin (also known as TBR2: T-box brain protein 2); *Fos*, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; *Fzd9*, frizzled class receptor 9; GABA, γ -aminobutyric acid; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Gpx1*, glutathione peroxidase 1; *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; *Grin2d*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D; *Hes5*, Hes family BHLH transcription factor 5; *Hk1*, hexokinase 1; *Hk2*, hexokinase 2; *Hk3*, hexokinase 3; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Il1b*, interleukin 1 beta; *Il6*, interleukin 6; *Il18*, interleukin 18; *Mt1*, metallothionein 1; *Mt2a*, metallothionein 2A; NaF, sodium fluoride; *Ndufc1*, ubiquinone oxidoreductase subunit C1; *Nes*, nestin; *Ntrk2*, neurotrophic receptor tyrosine kinase 2; OXPHOS, oxidative phosphorylation; *Pcna*, proliferating cell nuclear antigen; *Pkm*, pyruvate kinase M1/2; PND, postnatal day; *Ptgs2*, prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (also known as COX2: cyclooxygenase-2); *Pvalb*, parvalbumin; *Rbfox3*, RNA binding fox-1 homolog 3 (also known as NeuN: neuronal nuclei); *Reln*, reelin; *Sdhb*, succinate dehydrogenase complex subunit D; *Slc17a6*, solute carrier family 17 member 6; *Slc17a7*, solute carrier family 17 member 7; *Sod1*, superoxide dismutase 1; *Sox2*, SRY-box transcription factor 2; *Sst*, somatostatin; *Tfap2c*, transcription factor AP-2 gamma; *Tmem70*, transmembrane protein 70; *Tnf*, tumor necrosis factor; *Tubb3*, tubulin, beta 3 class III.

^a Mean ± SD.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the untreated controls by Student's *t*-tests or Aspin-Welch's *t*-test.

Table 2

Transcript-level expression changes in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on PND 77 in the NaF study

No. of animals examined	NaF in drinking water (ppm)			
	0 (Control)		100	
	6		6	
Normalization control	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
Granule cell lineage marker genes				
<i>Nes</i>	1.03 ± 0.24 ^a	1.01 ± 0.16	1.40 ± 0.30*	1.26 ± 0.31
<i>Sox2</i>	1.02 ± 0.24	1.02 ± 0.21	1.32 ± 0.33	1.17 ± 0.26
<i>Eomes</i>	1.09 ± 0.47	1.06 ± 0.45	1.21 ± 0.52	1.08 ± 0.43
<i>Dcx</i>	1.03 ± 0.27	1.01 ± 0.15	1.26 ± 0.16	1.12 ± 0.11
<i>Tubb3</i>	1.02 ± 0.22	1.00 ± 0.09	1.12 ± 0.13	1.00 ± 0.08
<i>Dpysl3</i>	1.03 ± 0.24	1.00 ± 0.09	1.17 ± 0.11	1.04 ± 0.08
<i>Rbfox3</i>	1.04 ± 0.27	1.01 ± 0.18	1.17 ± 0.16	1.04 ± 0.12
GABAergic interneuron marker genes				
<i>Calb2</i>	1.04 ± 0.32	1.05 ± 0.33	2.49 ± 1.14**	2.24 ± 1.00**
<i>Pvalb</i>	1.05 ± 0.30	1.01 ± 0.18	1.10 ± 0.19	0.99 ± 0.17
<i>Reln</i>	1.02 ± 0.19	1.01 ± 0.18	1.30 ± 0.13**	1.17 ± 0.13
<i>Sst</i>	1.02 ± 0.22	1.01 ± 0.11	1.19 ± 0.23	1.06 ± 0.16
Neurotrophin-related genes				
<i>Bdnf</i>	1.04 ± 0.29	1.02 ± 0.23	1.09 ± 0.15	0.97 ± 0.12
<i>Ntrk2</i>	1.03 ± 0.24	1.01 ± 0.18	1.09 ± 0.18	0.98 ± 0.18
Cell proliferation marker gene				
<i>Pcna</i>	1.02 ± 0.21	1.00 ± 0.09	1.08 ± 0.15	0.96 ± 0.10
Synaptic plasticity-related genes				
<i>Arc</i>	1.09 ± 0.43	1.06 ± 0.38	1.09 ± 0.27	0.98 ± 0.23
<i>Fos</i>	1.09 ± 0.48	1.07 ± 0.45	1.41 ± 0.28	1.25 ± 0.21
<i>Ptgs2</i>	1.05 ± 0.33	1.03 ± 0.28	1.09 ± 0.15	0.97 ± 0.09
Neural differentiation-related genes				
<i>Creb1</i>	1.03 ± 0.24	1.00 ± 0.10	1.17 ± 0.19	1.04 ± 0.16
<i>Fzd9</i>	1.03 ± 0.26	1.01 ± 0.15	1.19 ± 0.19	1.06 ± 0.16
<i>Tfap2c</i>	1.07 ± 0.35	1.02 ± 0.22	1.15 ± 0.11	1.03 ± 0.05
<i>Hes5</i>	1.06 ± 0.38	1.04 ± 0.33	1.16 ± 0.14	1.04 ± 0.12
Glycolysis-related genes				
<i>Hk1</i>	1.03 ± 0.23	1.01 ± 0.13	1.07 ± 0.13	0.95 ± 0.08
<i>Hk2</i>	1.10 ± 0.42	1.05 ± 0.33	1.19 ± 0.24	1.07 ± 0.23
<i>Hk3</i>	1.04 ± 0.34	1.05 ± 0.37	1.54 ± 0.53	1.37 ± 0.42
<i>Pkm</i>	1.03 ± 0.25	1.01 ± 0.12	1.07 ± 0.17	0.95 ± 0.11
OXPHOS-related genes				
<i>Atp5f1b</i>	1.03 ± 0.23	1.01 ± 0.15	1.19 ± 0.25	1.06 ± 0.19
<i>Ndufc1</i>	1.03 ± 0.25	1.01 ± 0.14	1.10 ± 0.18	0.98 ± 0.12
<i>Sdh</i>	1.04 ± 0.28	1.01 ± 0.13	1.09 ± 0.17	0.98 ± 0.12
<i>Atp5po</i>	1.03 ± 0.26	1.00 ± 0.11	1.11 ± 0.23	0.99 ± 0.16
<i>Tmem70</i>	1.03 ± 0.28	1.02 ± 0.23	1.20 ± 0.13	1.07 ± 0.10
Chemical mediator genes				
<i>Tnf</i>	1.06 ± 0.40	1.05 ± 0.38	1.26 ± 0.38	1.12 ± 0.32
<i>Il1b</i>	1.37 ± 1.23	1.38 ± 1.23	1.83 ± 1.00	1.67 ± 1.01
<i>Il6</i>	1.14 ± 0.60	1.09 ± 0.47	0.47 ± 0.44	0.44 ± 0.44*
<i>Il18</i>	1.03 ± 0.23	1.01 ± 0.17	1.40 ± 0.20*	1.26 ± 0.18*

Abbreviations: *Arc*, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; *Atp5f1b*, ATP synthase F1 subunit beta; *Atp5po*, ATP synthase peripheral stalk subunit OSCP; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Calb2*, calbindin 2 (also known as calbindin-D-29K and calretinin); *Creb1*, cyclic AMP-responsive element-binding protein 1; *Dcx*, doublecortin; *Dpysl3*, dihydropyrimidinase-like 3 (also known as TUC4: TOAD-64/Ulip/CRMP protein 4b); *Eomes*, eomesodermin (also known as TBR2: T-box brain protein 2); *Fos*, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; *Fzd9*, frizzled class receptor 9; GABA, γ -aminobutyric acid; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Hes5*, Hes family BHLH transcription factor 5; *Hk1*, hexokinase 1; *Hk2*, hexokinase 2; *Hk3*, hexokinase 3; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Il1b*, interleukin 1 beta; *Il6*, interleukin 6; *Il18*, interleukin 18; NaF, sodium fluoride; *Ndufc1*, ubiquinone oxidoreductase subunit C1; *Nes*, nestin; *Ntrk2*, neurotrophic receptor tyrosine kinase 2; OXPHOS, oxidative phosphorylation; *Pcna*, proliferating cell nuclear antigen; *Pkm*, pyruvate kinase M1/2; PND, postnatal day; *Ptgs2*, prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (also known as COX2: cyclooxygenase-2); *Pvalb*, parvalbumin; *Rbfox3*, RNA binding fox-1 homolog 3 (also known as NeuN: neuronal nuclei); *Reln*, reelin; *Sdh*, succinate dehydrogenase complex subunit D; *Sox2*, SRY-box transcription factor 2; *Sst*, somatostatin; *Tfap2c*, transcription factor AP-2 gamma; *Tmem70*, transmembrane protein 70; *Tnf*, tumor necrosis factor; *Tubb3*, tubulin, beta 3 class III.

^a Mean ± SD.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the untreated controls by Student's *t*-tests or Aspin-Welch's *t*-test.

Supplementary Table 1**Maternal reproductive parameters in the NaF study**

	NaF in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	30	100
No. of dams examined	12	12	11
No. of all implantation sites	12.4 ± 1.8 ^a	12.2 ± 2.2	11.6 ± 4.0
No. of live offspring	11.6 ± 3.2	12.0 ± 2.3	10.4 ± 4.4
Male ratio (%)	53.4 ± 19.4	50.7 ± 12.2	62.8 ± 21.8

Abbreviation: NaF, sodium fluoride.

^a Mean ± SD.

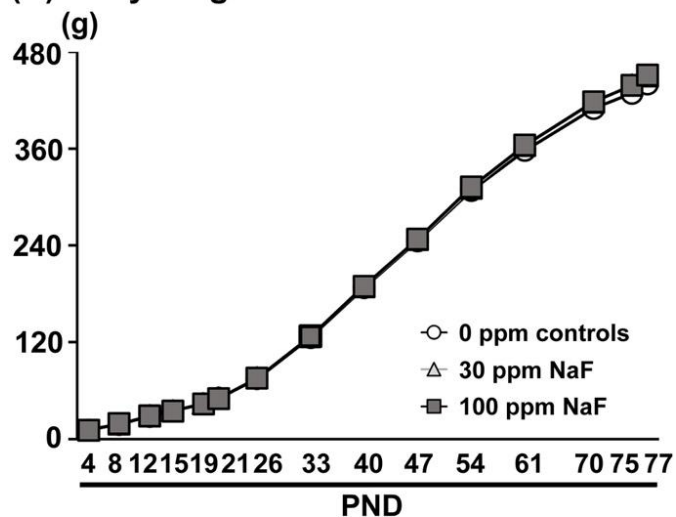
Supplementary Table 2**Body and brain weights of dam in the NaF study**

	NaF in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	30	100
No. of dams examined	12	12	11
Body weight (g)	299.0 ± 28.0 ^a	290.8 ± 20.8	292.3 ± 24.1
Brain weight (g)	1.95 ± 0.08	1.93 ± 0.09	1.92 ± 0.07

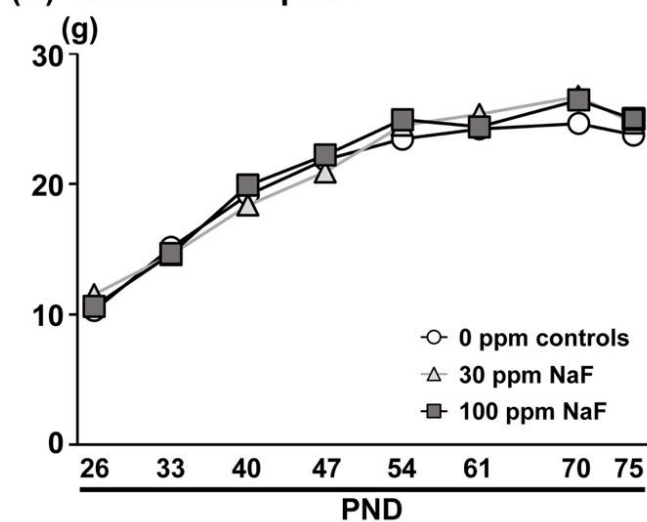
Abbreviation: NaF, sodium fluoride.

^a Mean ± SD.

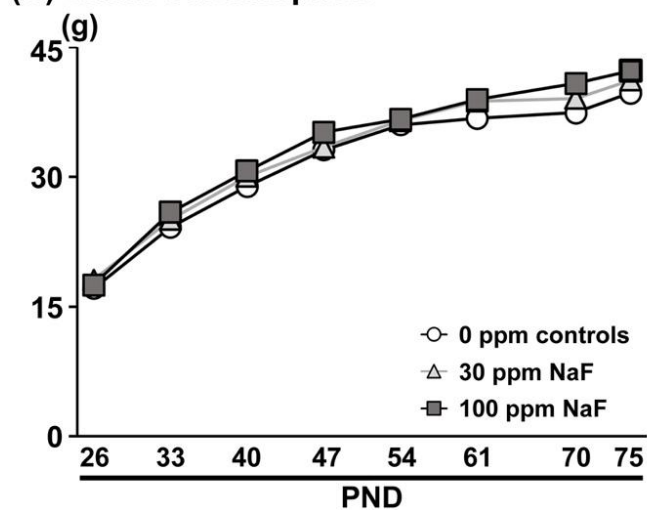
(A) Body weight



(B) Food consumption



(C) Water consumption



Supplementary Fig. 1

Body weight and food and water consumption of male offspring in the NaF study.

Supplementary Table 3**Body and brain weights of offspring at necropsies on PND 21 and PND 77 in the NaF study**

	NaF in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	30	100
PND 21			
No. of offspring examined	66	66	58
Body weight (g)	50.7 ± 4.4 ^a	51.8 ± 3.3	49.8 ± 4.7
No. of offspring examined	10	10	10
Brain weight (g)	1.51 ± 0.06	1.47 ± 0.05	1.53 ± 0.05
PND 77			
No. of offspring examined	28	29	28
Body weight (g)	439.9 ± 35.7	450.2 ± 22.3	451.1 ± 32.7
No. of offspring examined	12	12	12
Brain weight (g)	2.09 ± 0.05	2.16 ± 0.07*	2.12 ± 0.06

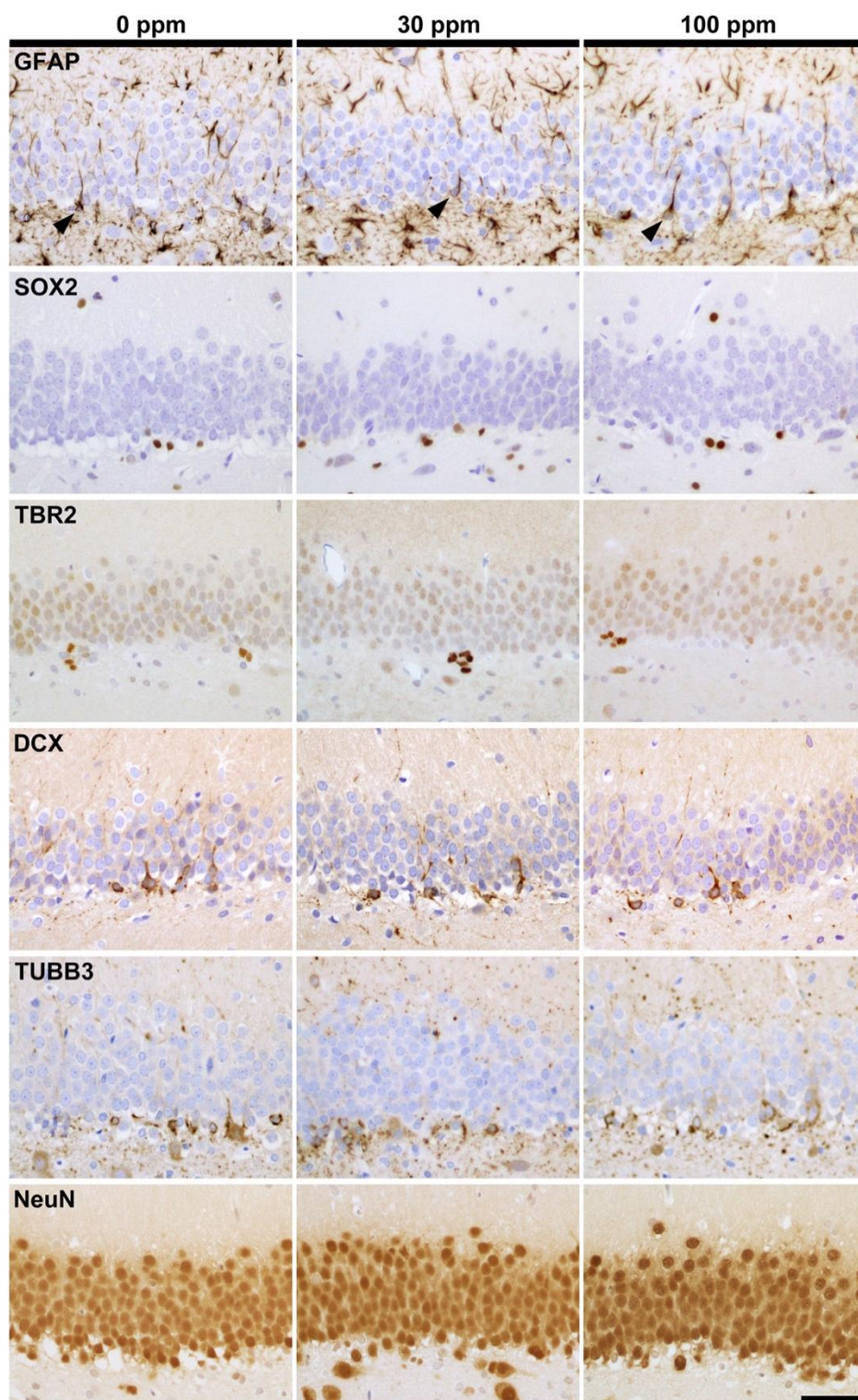
Abbreviations: NaF, sodium fluoride; PND, postnatal day.

^a Mean ± SD.**P* < 0.05, compared with the untreated controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's *t*-test with Bonferroni correction.**Supplementary Table 4****Number of immunoreactive or TUNEL⁺ cells in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on PND 21 in the NaF study**

	NaF in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	30	100
No. of animals examined	10	10	10
Granule cell lineage subpopulations in the SGZ/GCL (No./mm SGZ length)			
GFAP	2.27 ± 0.51 ^a	2.77 ± 0.75	4.32 ± 1.68**
SOX2	25.44 ± 5.58	27.73 ± 5.70	33.88 ± 9.76*
TBR2	3.92 ± 2.08	4.55 ± 1.11	3.45 ± 1.47
DCX	115.83 ± 20.68	102.75 ± 28.42	101.09 ± 24.08
TUBB3	40.19 ± 9.77	37.54 ± 7.26	39.70 ± 8.40
NeuN	486.63 ± 66.61	507.30 ± 51.45	512.02 ± 54.66
GABAergic interneuron subpopulations in the DG hilus (No./mm² hilar region)			
PVALB	19.46 ± 7.70	23.39 ± 10.23	23.48 ± 8.31
RELN	40.61 ± 16.08	39.35 ± 7.83	36.80 ± 7.20
CALB2	21.08 ± 4.91	19.12 ± 6.62	23.91 ± 9.06
SST	25.73 ± 7.12	25.74 ± 6.39	28.74 ± 10.73
GAD67	36.97 ± 11.28	36.02 ± 9.11	44.83 ± 7.86
CCK-8	11.08 ± 6.29	10.78 ± 5.12	12.55 ± 4.78
GluR2	26.63 ± 10.24	30.47 ± 7.87	34.26 ± 10.30
Cell proliferation and apoptosis in the SGZ (No./mm SGZ length)			
PCNA	5.12 ± 3.07	4.54 ± 2.01	4.90 ± 2.13
TUNEL	0.69 ± 0.13	0.74 ± 0.32	0.80 ± 0.19
Synaptic plasticity-related IEGs in the GCL (No./mm SGZ length)			
ARC	1.43 ± 0.75	2.39 ± 1.41	3.68 ± 1.05**
FOS	3.50 ± 0.98	3.42 ± 1.24	3.79 ± 1.23
COX2	25.27 ± 8.26	32.50 ± 7.43	29.24 ± 12.23
p-ERK1/2	1.29 ± 1.00	1.40 ± 1.33	2.26 ± 1.38
Astrocytes and microglia in the DG hilus (No./mm² hilar region)			
GFAP	384.18 ± 66.97	344.06 ± 47.21	396.71 ± 92.10
Iba1	68.95 ± 14.97	62.60 ± 20.82	71.10 ± 25.27
CD68	12.01 ± 7.57	9.78 ± 3.55	9.62 ± 3.86
CD163	5.57 ± 3.11	6.85 ± 3.35	5.73 ± 3.66

Abbreviations: ARC, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; CALB2, calbindin 2 (also known as calbindin-D-29K and calretinin); CCK8, cholecystokinin-8; CD68, cluster of differentiation 68; CD163, cluster of differentiation 163; COX2, cyclooxygenase-2; DCX, doublecortin; DG, dentate gyrus; FOS, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; GABA, γ -aminobutyric acid; GAD67, glutamic acid decarboxylase 67; GCL, granule cell layer; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GluR2, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2; Iba1, ionized calcium-binding adaptor molecule 1; NaF, sodium fluoride; NeuN, neuronal nuclei; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; p-ERK1/2, phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2; PND, postnatal day; PVALB, parvalbumin; RELN, reelin; SGZ, subgranular zone; SOX2, SRY-box transcription factor 2; SST, somatostatin; TBR2, T-box brain protein 2; TUBB3, tubulin, beta 3 class III (also known as Tuj-1); TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling.

^a Mean ± SD.**P* < 0.05, ***P* < 0.01, compared with the untreated controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's *t*-test with Bonferroni correction.



Supplementary Fig. 2

Distribution of immunoreactive cells for glial fibrillary acidic protein (GFAP), SRY-box transcription factor 2 (SOX2) or T-box brain protein 2 (TBR2) in the subgranular zone (SGZ), and doublecortin (DCX), tubulin, beta 3 class III (TUBB3; also known as Tuj-1) or neuronal nuclei (NeuN) in the SGZ and/or granule cell layer of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 77 after developmental exposure to sodium fluoride (NaF) from gestational day 6 to PND 21. Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification $\times 400$; bar 50 μm .

Supplementary Table 5

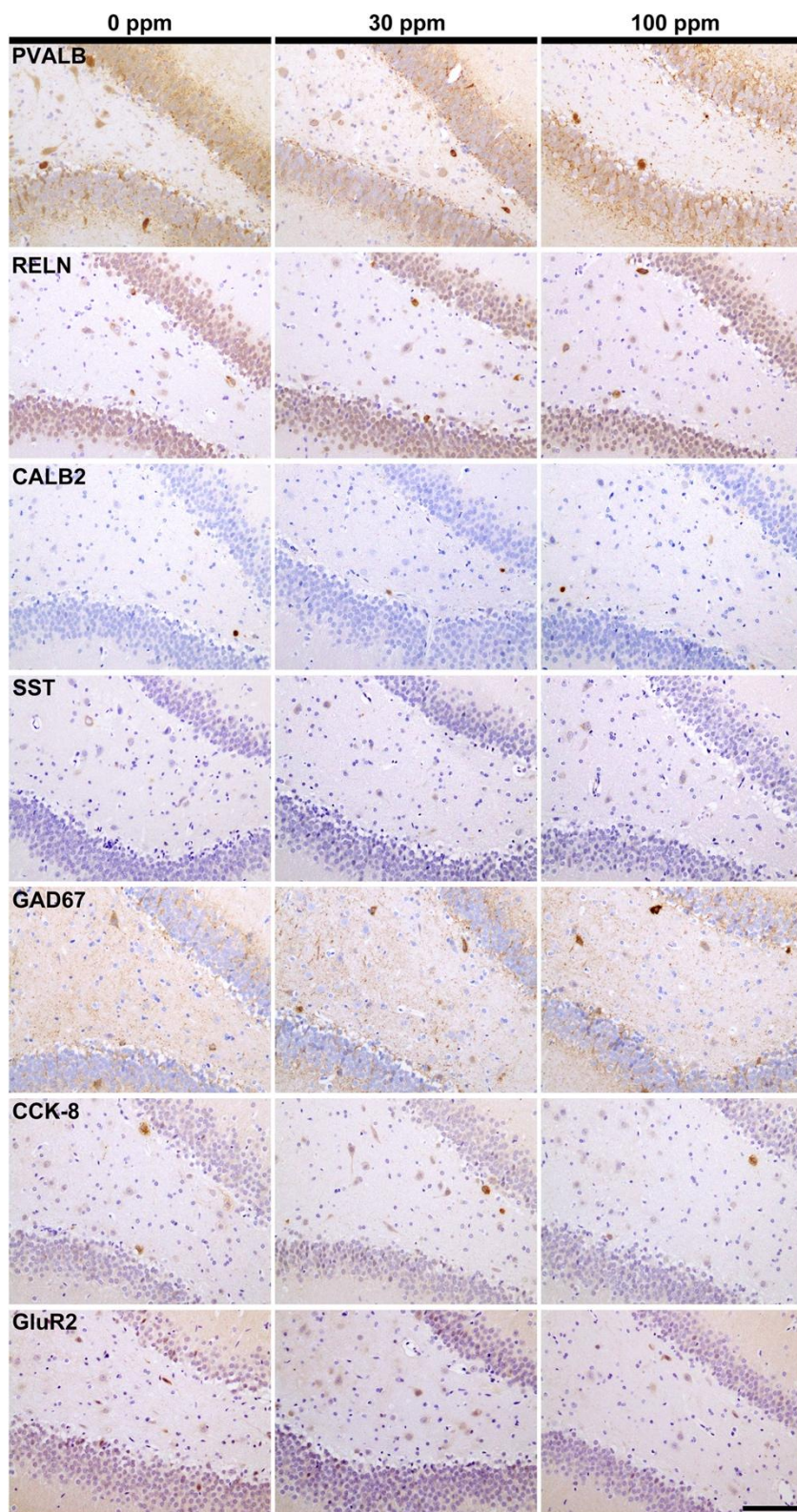
Number of immunoreactive or TUNEL⁺ cells in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on PND 77 in the NaF study

	NaF in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	30	100
No. of animals examined	10	10	10
Granule cell lineage subpopulations in the SGZ/GCL (No./mm SGZ length)			
GFAP	2.38 ± 0.48 ^a	2.72 ± 1.05	2.76 ± 0.48
SOX2	16.03 ± 3.61	16.36 ± 6.01	15.43 ± 5.71
TBR2	2.30 ± 1.08	2.64 ± 1.12	1.86 ± 0.92
DCX	14.25 ± 3.90	14.95 ± 1.90	14.25 ± 1.87
TUBB3	3.06 ± 1.23	3.02 ± 1.18	3.70 ± 1.41
NeuN	593.79 ± 35.61	585.65 ± 41.40	594.83 ± 42.89
GABAergic interneuron subpopulations in the DG hilus (No./mm ² hilar region)			
PVALB	8.80 ± 4.59	9.02 ± 4.16	6.85 ± 4.56
RELN	22.62 ± 6.10	26.93 ± 7.92	23.57 ± 6.21
CALB2	7.96 ± 1.75	7.12 ± 3.30	5.30 ± 2.03
SST	10.47 ± 3.62	12.06 ± 5.30	11.40 ± 4.09
GAD67	19.52 ± 6.84	21.37 ± 4.30	20.36 ± 4.34
CCK-8	5.82 ± 3.49	7.18 ± 4.43	5.75 ± 3.27
GluR2	12.88 ± 4.04	11.10 ± 2.89	13.75 ± 6.40
Cell proliferation and apoptosis in the SGZ (No./mm SGZ length)			
PCNA	3.00 ± 1.07	3.18 ± 0.76	2.98 ± 0.87
TUNEL	0.06 ± 0.08	0.10 ± 0.14	0.10 ± 0.10
Synaptic plasticity-related IEGs in the GCL (No./mm SGZ length)			
ARC	2.25 ± 1.12	3.63 ± 1.55*	2.39 ± 1.06
FOS	1.24 ± 0.47	1.95 ± 1.29	1.08 ± 0.47
COX2	4.74 ± 1.61	7.36 ± 2.97*	5.78 ± 2.09
p-ERK1/2	0.92 ± 0.97	1.60 ± 1.04	0.65 ± 0.70
Astrocytes and microglia in the DG hilus (No./mm ² hilar region)			
GFAP	291.39 ± 38.23	276.60 ± 34.52	294.88 ± 44.03
Iba1	56.06 ± 9.95	54.88 ± 16.04	62.01 ± 9.91
CD68	4.71 ± 1.24	5.38 ± 1.54	6.35 ± 2.41
CD163	1.82 ± 1.64	2.34 ± 1.86	3.75 ± 2.00*

Abbreviations: ARC, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; CALB2, calbindin 2 (also known as calbindin-D-29K and calretinin); CCK8, cholecystokinin-8; CD68, cluster of differentiation 68; CD163, cluster of differentiation 163; COX2, cyclooxygenase-2; DCX, doublecortin; DG, dentate gyrus; FOS, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; GABA, γ -aminobutyric acid; GAD67, glutamic acid decarboxylase 67; GCL, granule cell layer; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GluR2, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2; Iba1, ionized calcium-binding adaptor molecule 1; NaF, sodium fluoride; NeuN, neuronal nuclei; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; p-ERK1/2, phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2; PND, postnatal day; PVALB, parvalbumin; RELN, reelin; SGZ, subgranular zone; SOX2, SRY-box transcription factor 2; SST, somatostatin; TBR2, T-box brain protein 2; TUBB3, tubulin, beta 3 class III (also known as Tuj-1); TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling.

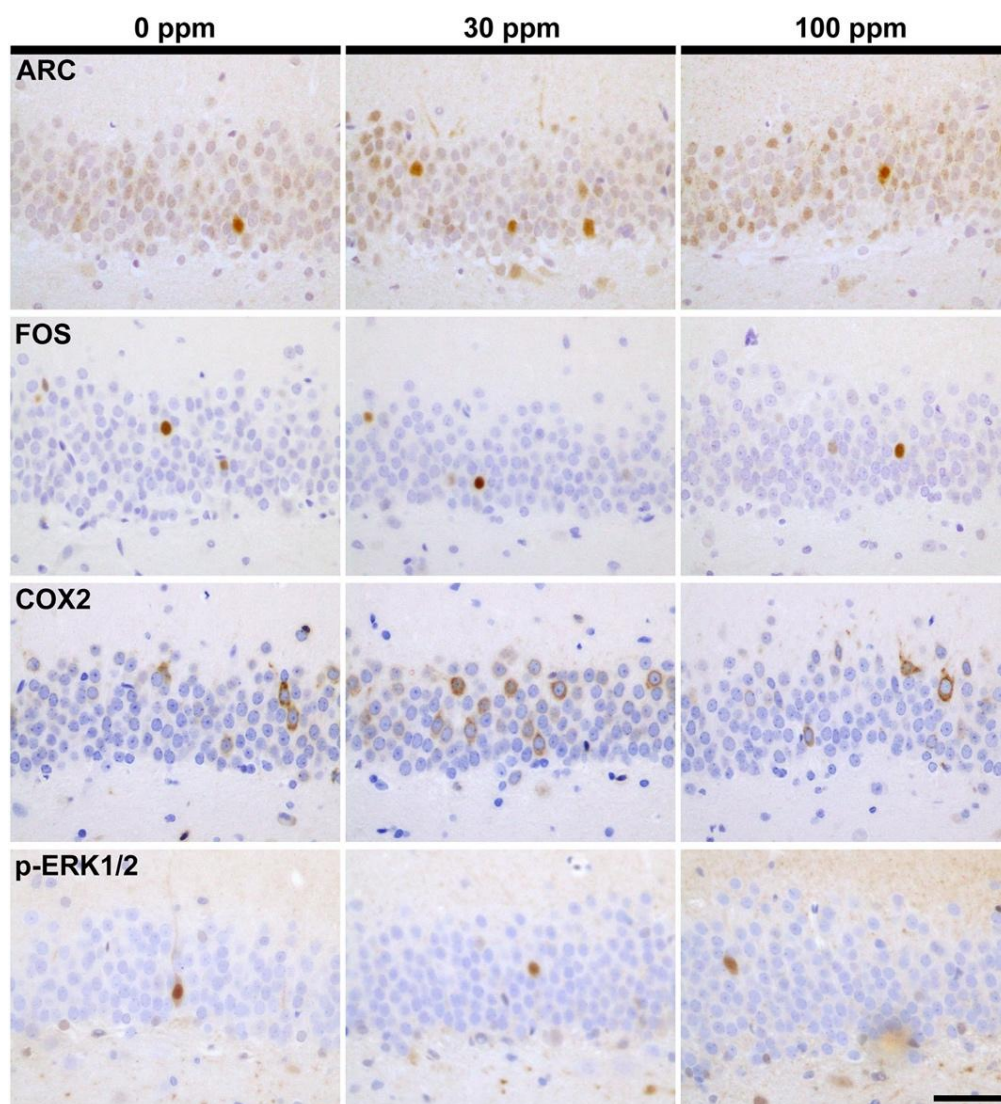
^a Mean ± SD.

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



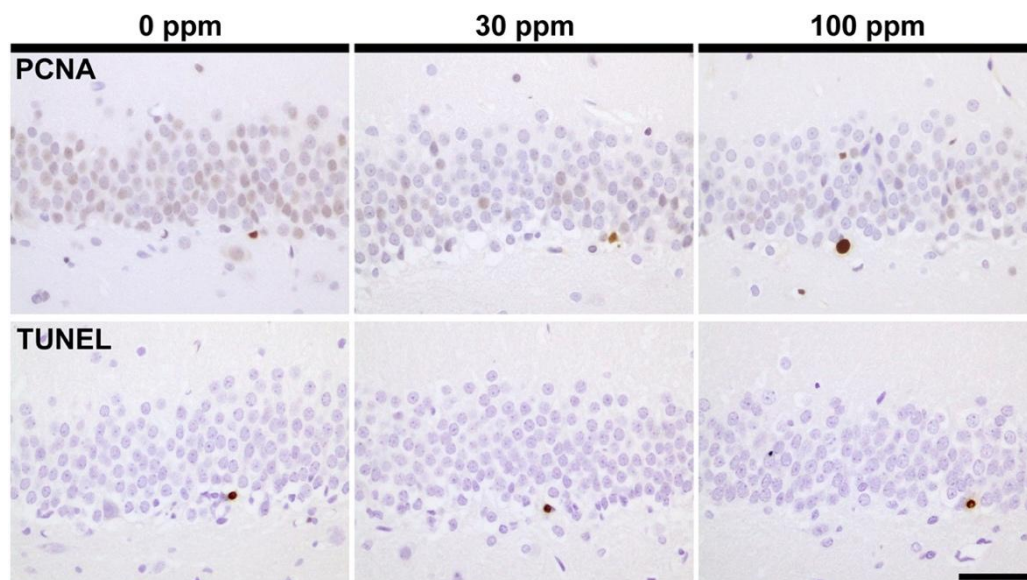
Supplementary Fig. 3

Distribution of immunoreactive cells for parvalbumin (PVALB), reelin (RELN), calbindin-D-29K (CALB2), somatostatin (SST), or glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67), cholecystokinin-8 (CCK8), or glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2 (GluR2) in the hilus of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 77 after developmental exposure to sodium fluoride (NaF) from gestational day 6 to PND 21. Magnification $\times 200$; bar 100 μm .



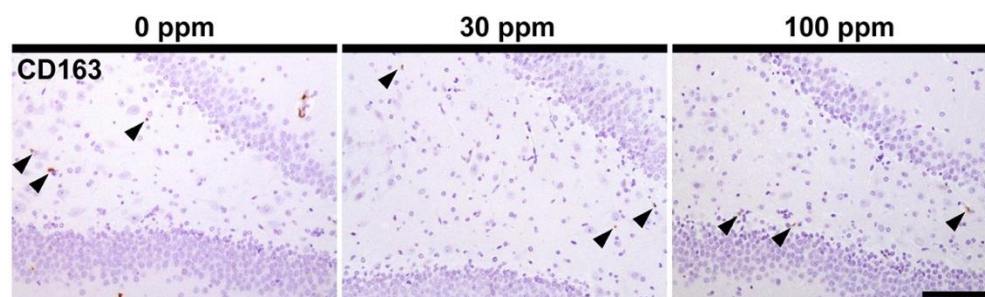
Supplementary Fig. 4

Distribution of immunoreactive cells for activity-regulated cytoskeleton-associated protein (ARC), Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit (FOS), cyclooxygenase-2 (COX2), or phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 (p-ERK1/2) in the granule cell layer of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 77 after developmental exposure to sodium fluoride (NaF) from gestational day 6 to PND 21. Magnification $\times 400$; bar 50 μm .



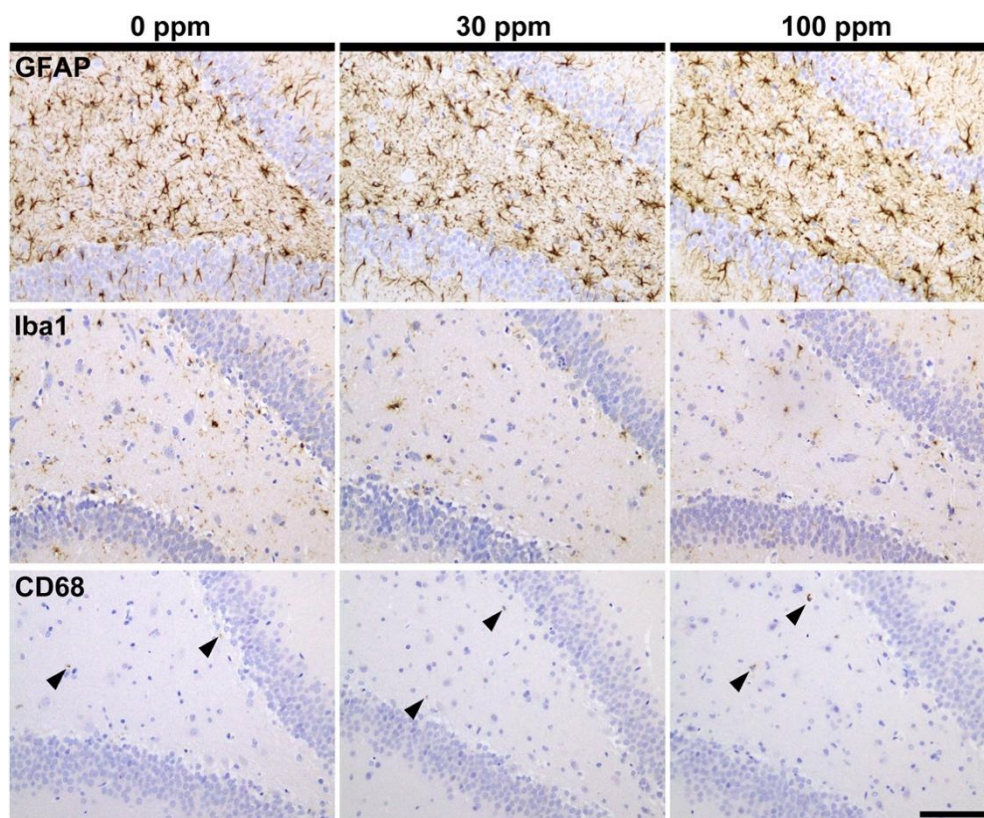
Supplementary Fig. 5

Distribution of immunoreactive cells for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) or terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)⁺ apoptotic cells in the subgranular zone of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 77 after developmental exposure to sodium fluoride (NaF) from gestational day 6 to PND 21. Magnification $\times 400$; bar 50 μm .



Supplementary Fig. 6

cluster of differentiation (CD) 163 in the hilus of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 21 after developmental exposure to sodium fluoride (NaF) from gestational day 6 to PND 21. Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification $\times 200$; bar 100 μm .



Supplementary Fig. 7

Distribution of immunoreactive glial cells for glial fibrillary acidic protein (GFAP), ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1), cluster of differentiation (CD) 68 in the hilus of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 77 after developmental exposure to sodium fluoride (NaF) from gestational day 6 to PND 21. Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification $\times 200$; bar 100 μm .

Supplementary Table 6

Oxidative stress levels in the hippocampus of male offspring on PND 21 in the NaF study

	NaF in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	30	100
No. of dams examined	6	6	6
MDA concentration (nmol/mg tissue protein)	0.68 ± 0.06^a	0.76 ± 0.07	0.75 ± 0.06
GSH concentration ($\mu\text{mol/L}$)	17.92 ± 0.89	18.65 ± 0.73	18.37 ± 1.20

Abbreviations: GSH, glutathione; MDA, malondialdehyde; NaF, sodium fluoride; PND, postnatal day.

^a Mean $\pm$ SD.

< AP 曝露実験 >

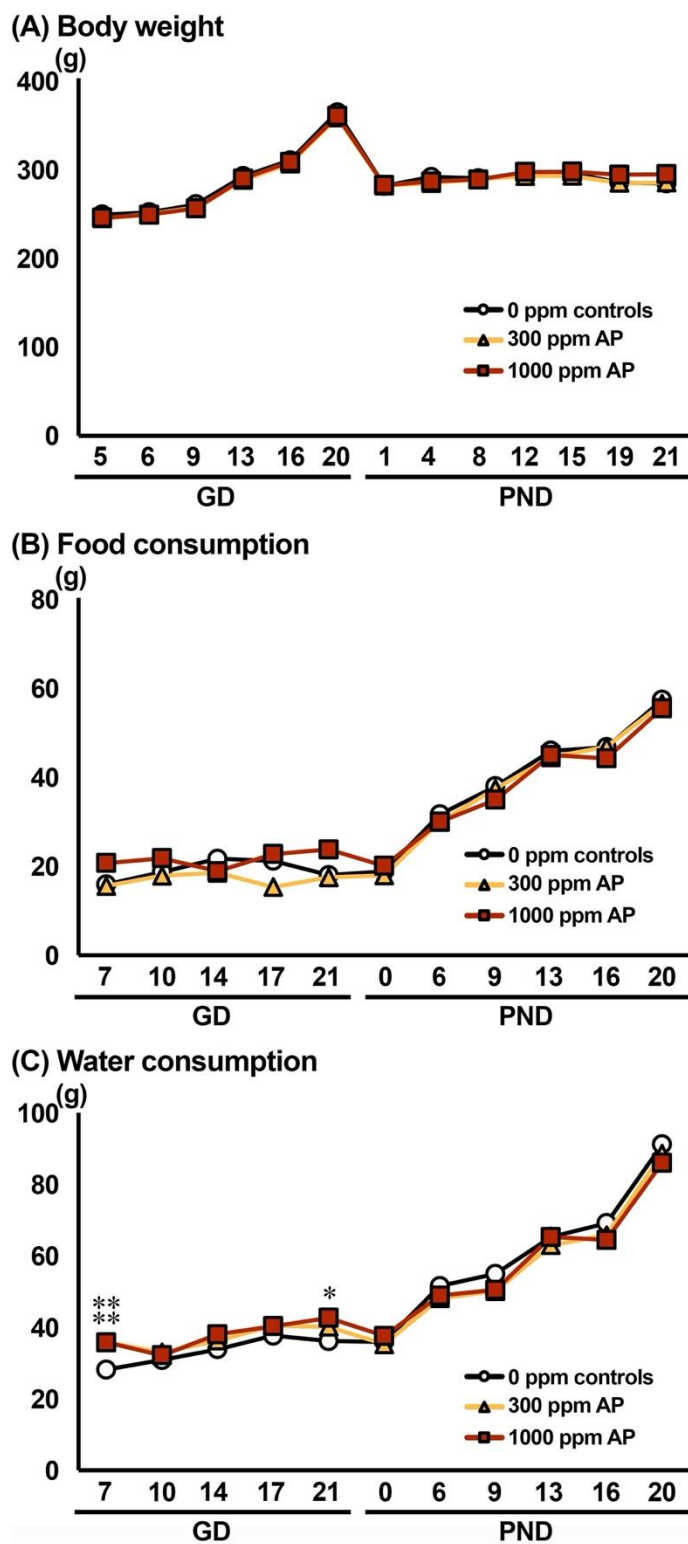


Fig. 7
 (A) Body weight, (B) food consumption, and (C) water consumption of dams during the exposure period in the ammonium perchlorate study.
 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the 0-ppm controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

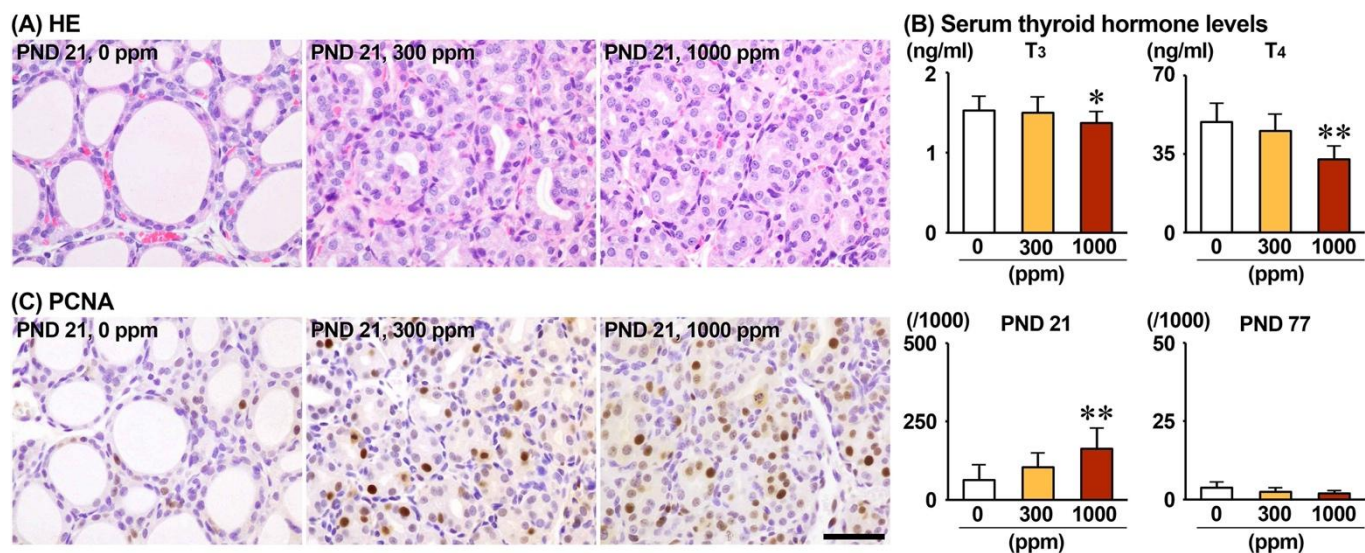


Fig. 8

(A) Histopathological changes in the thyroid on postnatal day (PND) 21, (B) changes in serum thyroid hormone levels on PND 21, and (C) distribution of immunoreactive cells for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the thyroid on PND 21 and PND 77 in female offspring after developmental exposure to ammonium perchlorate. Representative images from the 0-ppm controls (left), 300-ppm group (middle), and 1000-ppm group (right). Magnification $\times 400$; bar 50 μm . (C) Graphs show the numbers of immunoreactive cells. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, compared with the 0-ppm controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

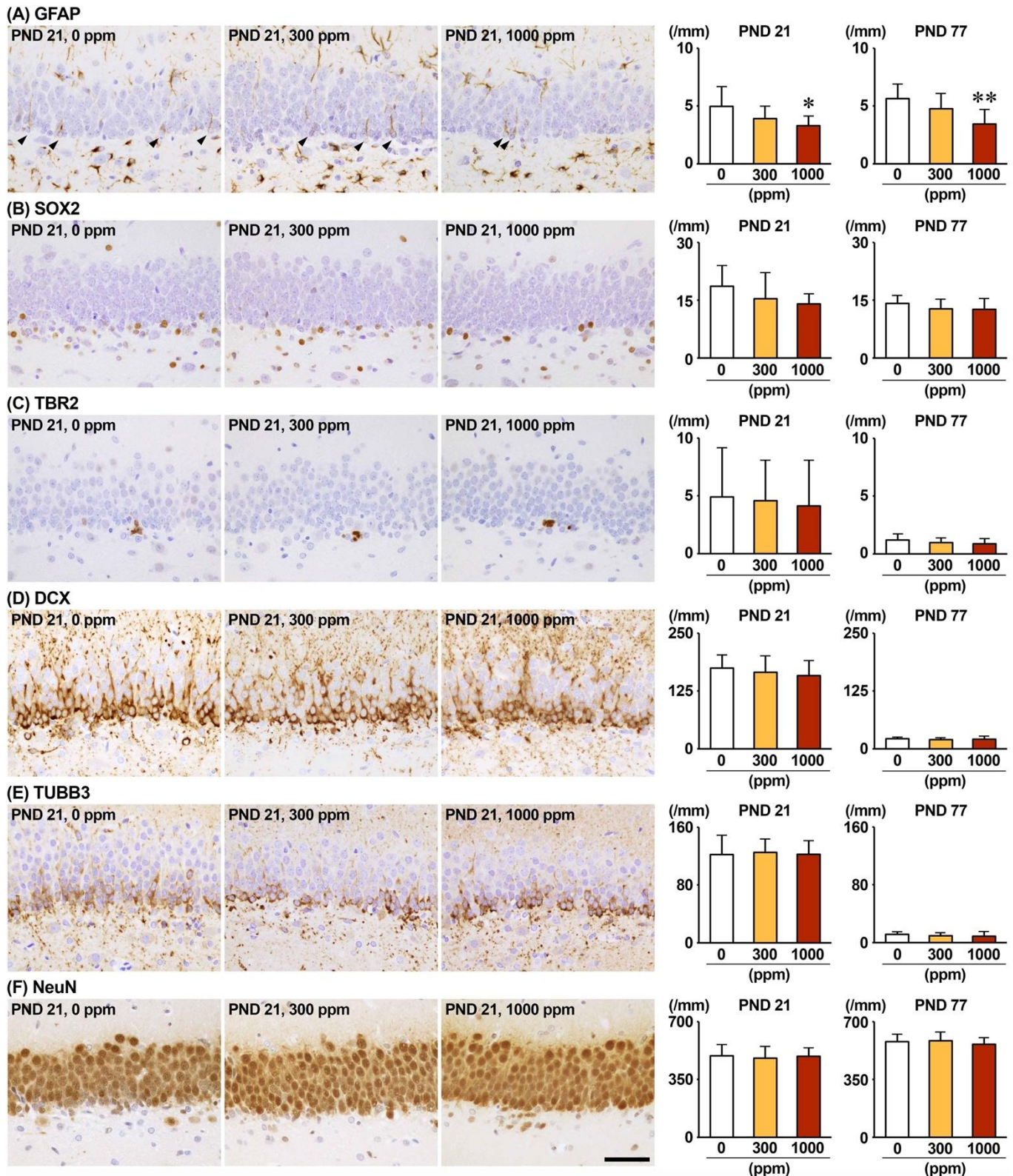


Fig. 9

Distribution of immunoreactive cells for (A) glial fibrillary acidic protein (GFAP), (B) SRY-box transcription factor 2 (SOX2), (C) T-box brain protein 2 (TBR2), (D) doublecortin (DCX), (E) tubulin, beta 3 class III (TUBB3) and (F) neuronal nuclei (NeuN) in the subgranular zone (SGZ) and/or granule cell layer (GCL) of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 21 and PND 77 after developmental exposure to ammonium perchlorate. Representative images from the 0-ppm controls (left), 300-ppm group (middle), and 1000-ppm group (right). Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification $\times 400$; bar 50 μm . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the SGZ and/or GCL. $N = 10/\text{group}$, except for $N = 9$ in 300-ppm for TUBB3 and NeuN, and in 1000-ppm group for SOX2 and TBR2, and $N = 8$ in 1000-ppm group for NeuN at PND 21. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the 0-ppm controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

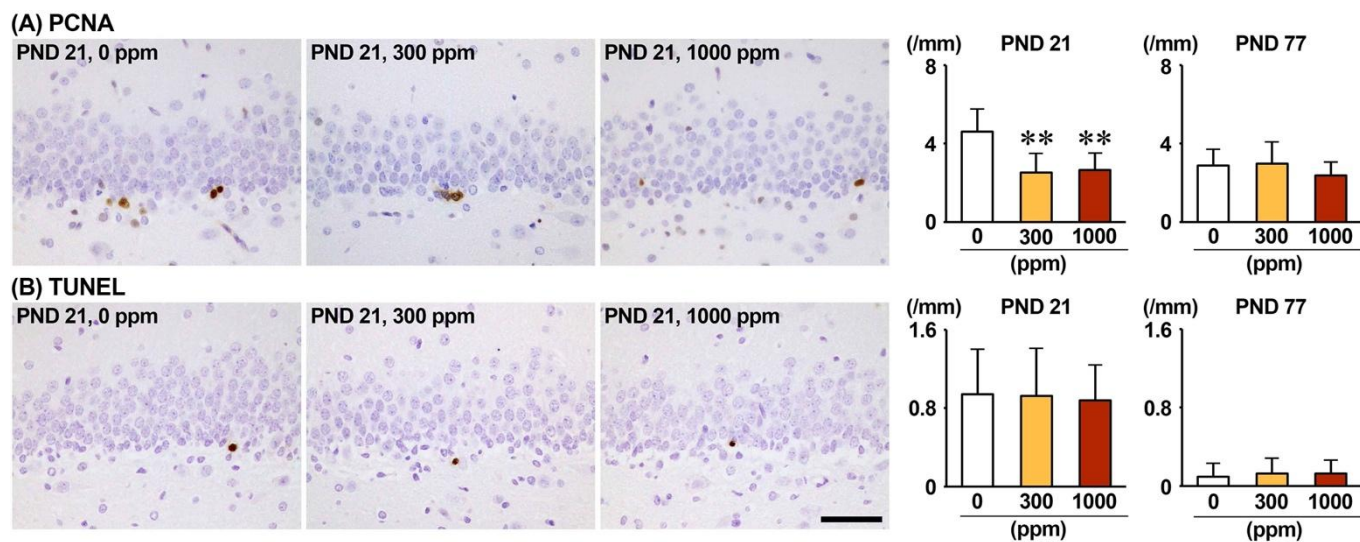


Fig. 10

Distribution of (A) proliferating cell nuclear antigen (PCNA)⁺ proliferating cells and (B) terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)⁺ apoptotic cells in the subgranular zone (SGZ) of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 21 and PND 77 after developmental exposure to ammonium perchlorate. Representative images from the 0-ppm controls (left), 300-ppm group (middle), and 1000-ppm group (right). Magnification $\times 400$; bar 50 μm . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the SGZ. $N = 10/\text{group}$. ** $P < 0.01$, compared with the 0-ppm controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

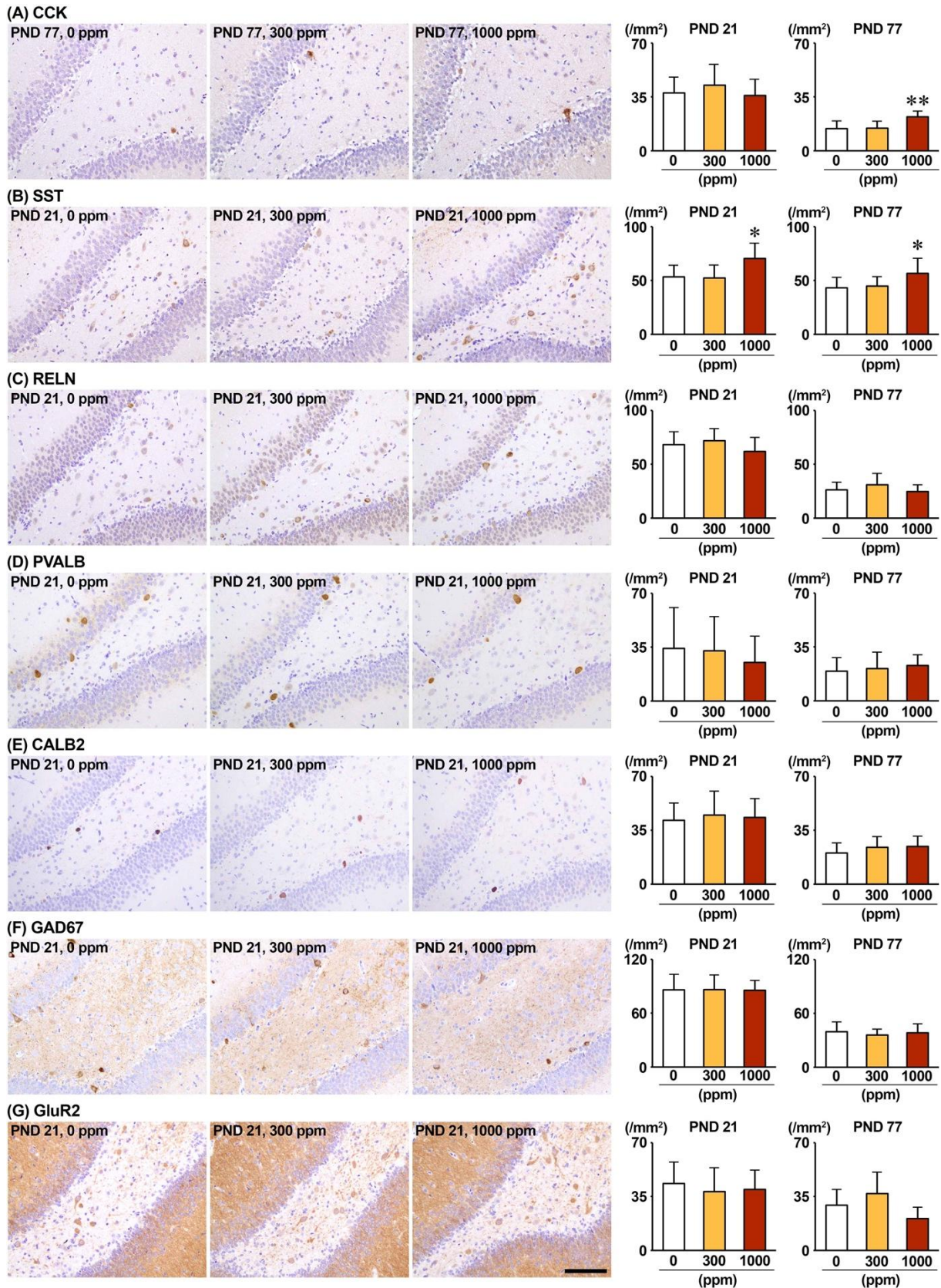


Fig. 11

Distribution of immunoreactive cells for (A) cholecystokinin (CCK8), (B) somatostatin (SST), (C) reelin (RELN), (D) parvalbumin (PVALB), (E) calbindin-D-29K (CALB2), (F) glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67) and (G) glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2 (GluR2) in the hilus of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 21 and PND 77 after developmental exposure to ammonium perchlorate. Representative images from the 0-ppm controls (left), 300-ppm group (middle), and 1000-ppm group (right). Magnification $\times 200$; bar 100 μm . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the hilus area. $N = 10/\text{group}$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the 0-ppm controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

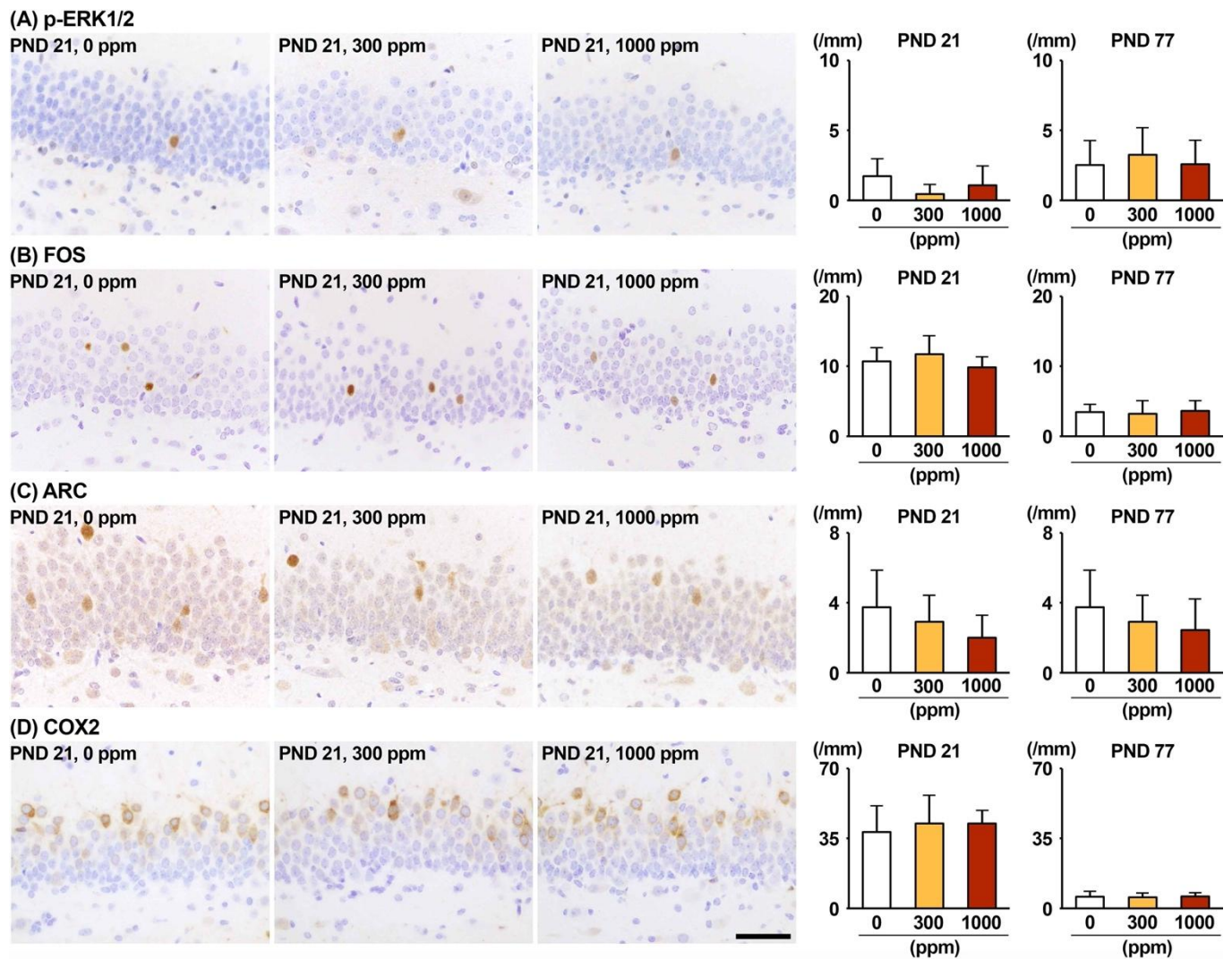


Fig. 12

Distribution of immunoreactive cells for (A) phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 (p-ERK1/2), (B) Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit (FOS), (C) activity-regulated cytoskeleton-associated protein (ARC), and (D) cyclooxygenase-2 (COX2) in the subgranular zone (SGZ) of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 21 and PND 77 after developmental exposure to ammonium perchlorate. Representative images from the 0-ppm controls (left), 300-ppm group (middle), and 1000-ppm group (right). Magnification $\times 400$; bar 50 μm . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the hilus area. $N = 10/\text{group}$, except for $N = 9$ for ARC and $N = 8$ for COX2 in 1000-ppm group at PND 21.

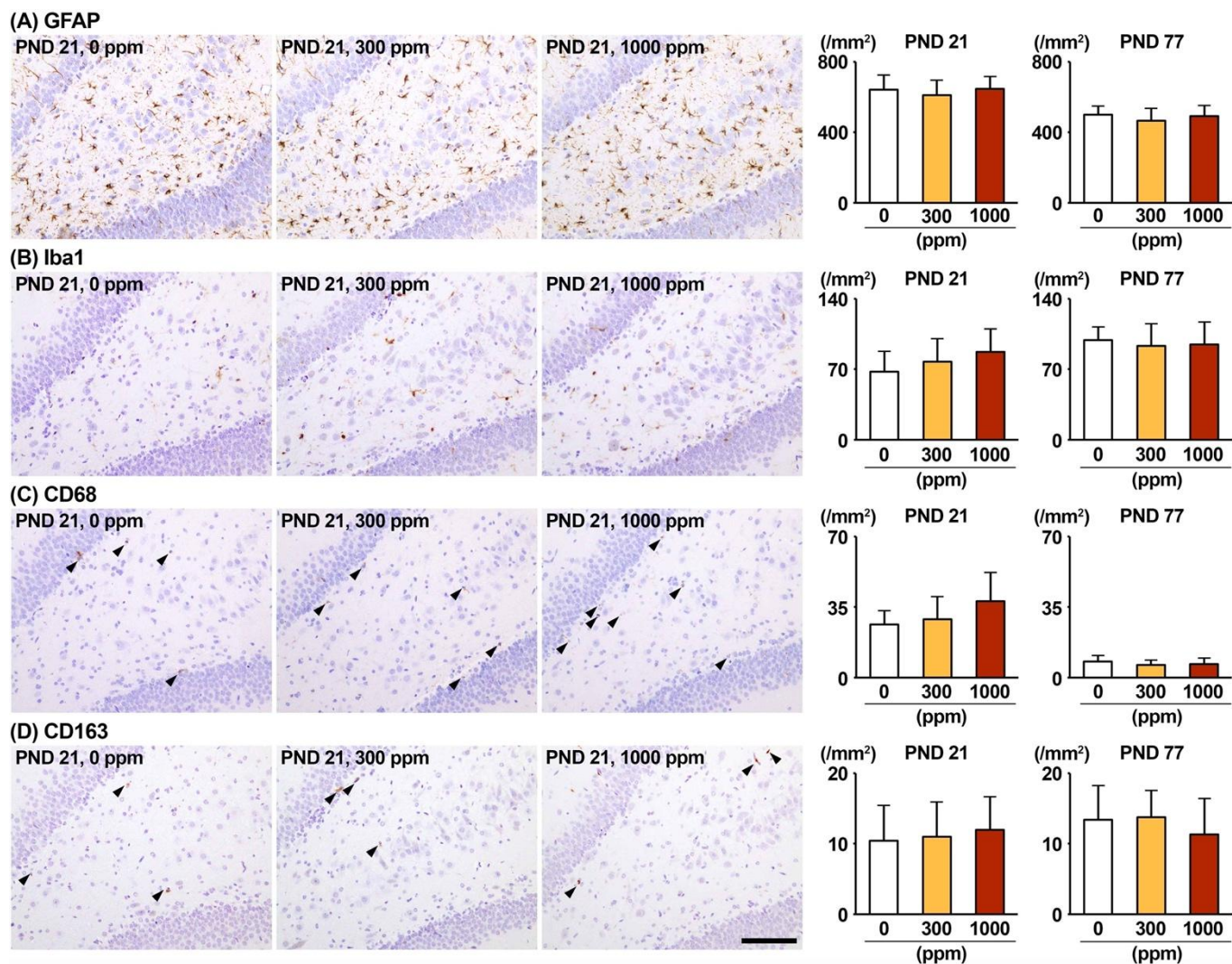


Fig. 13

Distribution of immunoreactive cells for (A) glial fibrillary acidic protein (GFAP), (B) ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1), (C) cluster of differentiation (CD) 68, (D) CD163 in the hilus of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 21 and PND 77 after developmental exposure to ammonium perchlorate. Representative images from the 0-ppm controls (left), 300-ppm group (middle), and 1000-ppm group (right). Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification $\times 200$; bar 100 μm . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the hilus area. $N = 10/\text{group}$, except for $N = 9$ in 300-ppm group for GFAP and in 1000-ppm group for GFAP, Iba1, CD68 and CD163 at PND 21.

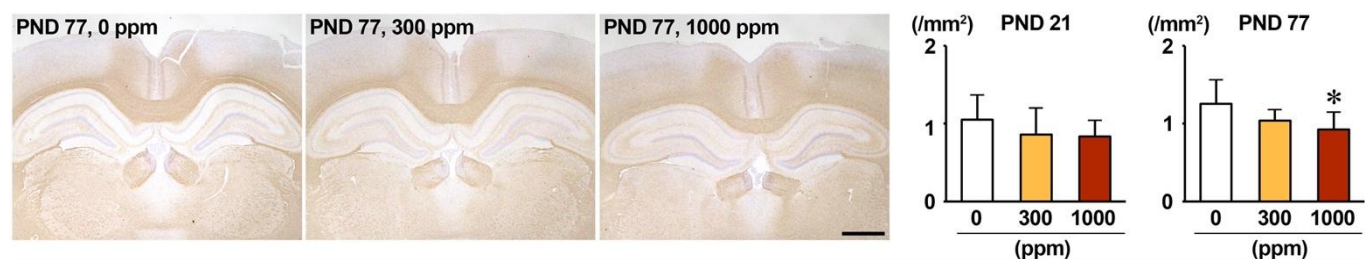
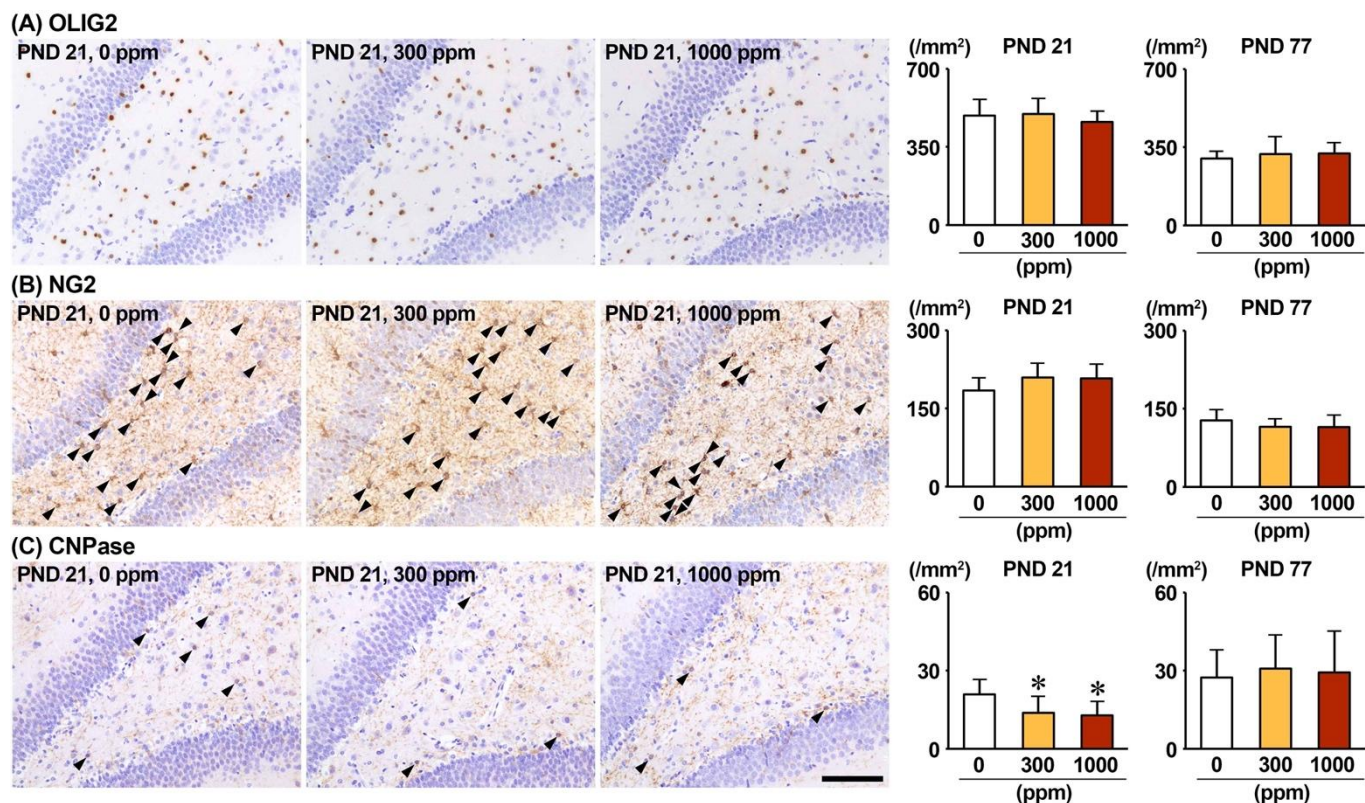


Table 3

Transcript-level expression changes in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on PND 21 in the AP study

AP in drinking water (ppm)					
	0 (Control)		1000		
	No. of animals examined	6	6		
	Normalization control	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>		
			<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	
Granule cell lineage markers					
<i>Nes</i>		1.00 ± 0.11 ^a	1.02 ± 0.24	0.88 ± 0.14	0.83 ± 0.15
<i>Sox2</i>		1.01 ± 0.15	1.04 ± 0.30	1.06 ± 0.17	1.00 ± 0.19
<i>Eomes</i>		1.04 ± 0.32	1.06 ± 0.40	0.91 ± 0.30	0.86 ± 0.33
<i>Dcx</i>		1.01 ± 0.18	1.01 ± 0.18	1.08 ± 0.19	1.02 ± 0.23
<i>Tubb3</i>		1.00 ± 0.06	1.02 ± 0.20	0.92 ± 0.10	0.86 ± 0.04
<i>Dpysl3</i>		1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.18	1.01 ± 0.20	0.94 ± 0.17
<i>Rbfox3</i>		1.01 ± 0.17	1.01 ± 0.17	1.15 ± 0.09	1.07 ± 0.06
GABAergic interneuron-related genes					
<i>Cck</i>		1.01 ± 0.20	1.02 ± 0.25	1.03 ± 0.12	1.00 ± 0.13
<i>Cckbr</i>		1.02 ± 0.23	1.01 ± 0.18	1.20 ± 0.36	1.16 ± 0.29
<i>Pvalb</i>		1.04 ± 0.32	1.05 ± 0.35	1.26 ± 0.31	1.19 ± 0.33
<i>Reln</i>		1.02 ± 0.20	1.02 ± 0.19	1.20 ± 0.16	1.12 ± 0.15
<i>Calb2</i>		1.44 ± 1.21	1.50 ± 1.29	0.51 ± 0.21	0.47 ± 0.18
<i>Sst</i>		1.05 ± 0.33	1.03 ± 0.27	1.31 ± 0.17	1.23 ± 0.18
<i>Pdgfa</i>		1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.09	0.99 ± 0.12	0.95 ± 0.08
<i>Pdgfb</i>		1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.05	1.04 ± 0.07	1.01 ± 0.07
<i>Pdgfra</i>		1.01 ± 0.18	1.01 ± 0.12	1.01 ± 0.15	0.95 ± 0.14
<i>Pdgfrb</i>		1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.09	1.14 ± 0.07*	1.10 ± 0.07
Neurotrophic factor-related genes					
<i>Bdnf</i>		1.01 ± 0.13	1.02 ± 0.21	0.97 ± 0.17	0.91 ± 0.16
<i>Ntrk2</i>		1.01 ± 0.15	1.02 ± 0.19	1.23 ± 0.14*	1.15 ± 0.16
Neural stem/progenitor cell regulatory genes					
<i>Pcna</i>		1.01 ± 0.15	1.01 ± 0.18	1.10 ± 0.17	1.03 ± 0.16
<i>Ephb1</i>		1.01 ± 0.12	1.01 ± 0.17	0.94 ± 0.15	0.88 ± 0.13
<i>Ephb2</i>		1.02 ± 0.21	1.01 ± 0.18	1.05 ± 0.14	0.99 ± 0.14
<i>Efnb3</i>		1.20 ± 0.79	1.20 ± 0.75	2.36 ± 0.28**	2.22 ± 0.35*
<i>Notch1</i>		1.02 ± 0.22	1.02 ± 0.19	0.93 ± 0.27	0.88 ± 0.27
<i>Dll4</i>		1.02 ± 0.21	1.03 ± 0.26	1.13 ± 0.12	1.07 ± 0.19
<i>Hes5</i>		1.00 ± 0.09	1.02 ± 0.20	1.08 ± 0.10	1.02 ± 0.14
<i>Thrsp</i>		1.02 ± 0.20	1.01 ± 0.16	1.09 ± 0.24	1.03 ± 0.26
<i>Wnt7b</i>		1.04 ± 0.31	1.02 ± 0.24	1.33 ± 0.17	1.25 ± 0.12
Neural progenitor cell/neuroblast proliferation-related genes					
<i>Fzd9</i>		1.00 ± 0.10	1.01 ± 0.15	1.12 ± 0.15	1.06 ± 0.17
<i>Numbl</i>		1.02 ± 0.20	1.02 ± 0.19	1.10 ± 0.21	1.02 ± 0.14
<i>Vegfa</i>		1.01 ± 0.19	1.02 ± 0.24	1.27 ± 0.16*	1.19 ± 0.15
Neuronal migration-related genes					
<i>Arhgef2</i>		1.01 ± 0.13	1.01 ± 0.17	1.25 ± 0.09**	1.17 ± 0.09
<i>Cntn2</i>		1.01 ± 0.13	1.02 ± 0.21	1.00 ± 0.13	0.94 ± 0.10
<i>Sema3c</i>		1.02 ± 0.20	1.01 ± 0.14	1.17 ± 0.22	1.10 ± 0.26
<i>Fgf13</i>		1.01 ± 0.17	1.02 ± 0.21	1.12 ± 0.15	1.05 ± 0.12
<i>Robo3</i>		1.20 ± 0.88	1.17 ± 0.79	2.58 ± 0.82*	2.42 ± 0.75*
Neuronal differentiation-related genes					
<i>Acsl4</i>		1.01 ± 0.17	1.00 ± 0.10	1.04 ± 0.13	0.97 ± 0.07
<i>Baiap2</i>		1.02 ± 0.24	1.01 ± 0.17	1.26 ± 0.14	1.18 ± 0.08*
<i>Tfap2c</i>		1.02 ± 0.21	1.01 ± 0.18	1.15 ± 0.29	1.09 ± 0.32
Synaptic plasticity marker genes					
<i>Fos</i>		1.02 ± 0.21	1.06 ± 0.40	0.95 ± 0.26	0.90 ± 0.25
<i>Arc</i>		1.05 ± 0.33	1.03 ± 0.26	1.29 ± 0.40	1.20 ± 0.33
<i>Ptgs2</i>		1.00 ± 0.10	1.02 ± 0.21	1.02 ± 0.17	0.96 ± 0.12
Oxidative stress-related genes					
<i>Cat</i>		1.02 ± 0.21	1.01 ± 0.17	0.93 ± 0.13	0.87 ± 0.12
<i>Mt1</i>		1.03 ± 0.27	1.02 ± 0.22	1.14 ± 0.17	1.07 ± 0.20
<i>Mt2</i>		1.03 ± 0.29	1.02 ± 0.24	1.23 ± 0.32	1.15 ± 0.28
<i>Sod1</i>		1.01 ± 0.16	1.05 ± 0.34	1.04 ± 0.15	0.98 ± 0.17
<i>Sod2</i>		1.00 ± 0.09	1.02 ± 0.25	0.96 ± 0.14	0.89 ± 0.10
<i>Gpt1</i>		1.01 ± 0.13	1.01 ± 0.18	1.01 ± 0.10	0.95 ± 0.09
Chemical mediators					
<i>Tnf</i>		1.10 ± 0.53	1.09 ± 0.47	1.10 ± 0.24	1.07 ± 0.24

<i>Il1b</i>	1.37 ± 1.06	1.40 ± 1.10	1.50 ± 0.53	1.45 ± 0.49
<i>Il6</i>	1.17 ± 0.68	1.14 ± 0.61	1.83 ± 1.13	1.76 ± 1.04
<i>Il18</i>	1.01 ± 0.17	1.02 ± 0.19	1.03 ± 0.13	1.00 ± 0.12
Glutamatergic receptors and glutamate transporters				
<i>Gria1</i>	1.02 ± 0.24	1.01 ± 0.17	1.22 ± 0.07	1.18 ± 0.09
<i>Gria2</i>	1.01 ± 0.19	1.01 ± 0.14	1.35 ± 0.11**	1.31 ± 0.10**
<i>Gria3</i>	1.01 ± 0.19	1.02 ± 0.19	1.30 ± 0.19*	1.22 ± 0.17
<i>Grin2a</i>	1.02 ± 0.25	1.02 ± 0.21	1.26 ± 0.14	1.18 ± 0.13
<i>Grin2b</i>	1.1 ± 0.17	1.01 ± 0.11	1.22 ± 0.05*	1.19 ± 0.03**
<i>Grin2d</i>	1.03 ± 0.27	1.04 ± 0.31	0.90 ± 0.15	0.87 ± 0.14
Glial cell markers				
<i>Gfap</i>	1.07 ± 0.42	1.04 ± 0.31	1.19 ± 0.32	1.12 ± 0.35
<i>Fgf2</i>	1.01 ± 0.18	1.02 ± 0.22	1.06 ± 0.05	1.00 ± 0.12
<i>Ror2</i>	1.03 ± 0.29	1.04 ± 0.30	0.83 ± 0.12	0.78 ± 0.12
OL lineage-related genes				
<i>Cspg4</i>	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.16	1.04 ± 0.13	0.97 ± 0.10
<i>Vim</i>	1.02 ± 0.25	1.02 ± 0.22	0.94 ± 0.24	0.89 ± 0.23
<i>Kl</i>	1.17 ± 0.65	1.22 ± 0.77	0.51 ± 0.19	0.48 ± 0.22
<i>Id2</i>	1.01 ± 0.15	1.02 ± 0.19	1.16 ± 0.14	1.09 ± 0.17
<i>Shh</i>	1.06 ± 0.40	1.07 ± 0.39	0.88 ± 0.25	0.82 ± 0.19
Myelination-related genes				
<i>Cnp</i>	1.02 ± 0.25	1.04 ± 0.30	0.89 ± 0.12	0.84 ± 0.08
<i>Mbp</i>	1.03 ± 0.27	1.05 ± 0.37	0.89 ± 0.16	0.83 ± 0.12
<i>Plp1</i>	1.03 ± 0.24	1.07 ± 0.41	0.97 ± 0.16	0.91 ± 0.14

Abbreviations: *Acs14*, acyl-CoA synthetase long chain family member 4; AP, ammonium perchlorate; *Arc*, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; *Arhgef2*, Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor 2; *Baiap2*, BAR/IMD domain containing adaptor protein 2; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Calb2*, calbindin 2 (also known as calbindin-D-29K and calretinin); *Cat*, catalase; *Cck*, cholecystokinin; *Cckbr*, cholecystokinin B receptor; *Cnp*, 2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase; *Cntn2*, contactin 2; *Cspg4*, chondroitin sulfate proteoglycan 4; *Dcx*, doublecortin; *Dll4*, delta like canonical Notch ligand 4; *Dpysl3*, dihydropyrimidinase-like 3; *Efnb3*, ephrin B3; *Eomes*, eomesodermin (also known as TBR2: T-box brain protein 2); *Ephb1*, Eph receptor B1; *Ephb2*, Eph receptor B2; *Fgf13*, fibroblast growth factor 13; *Fgf2*, fibroblast growth factor 2; *Fos*, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; *Fzd9*, frizzled class receptor 9; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Gfap*, glial fibrillary acidic protein; *Gpx1*, glutathione peroxidase 1; *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; *Grin2d*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D; *Hes5*, hes family bHLH transcription factor 5; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Id2*, inhibitor of DNA binding 2; *Il18*, interleukin 18; *Il1b*, interleukin 1 beta; *Il6*, interleukin 6; *Kl*, Klotho; *Mbp*, myelin basic protein; *Mt1*, metallothionein 1; *Mt2a*, metallothionein 2A; *Nes*, nestin; *Notch1*, notch receptor 1; *Ntrk2*, neurotrophic receptor tyrosine kinase 2; *Numb1*, NUMB-like, endocytic adaptor protein; *Pcna*, proliferating cell nuclear antigen; *Pdgfa*, platelet derived growth factor subunit A; *Pdgfb*, platelet derived growth factor subunit B; *Pdgfra*, platelet derived growth factor receptor alpha; *Pdgfrb*, platelet derived growth factor receptor beta; *Plp1*, proteolipid protein 1; PND, postnatal day; *Ptgs2*, prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (also known as COX2: cyclooxygenase-2); *Pvalb*, parvalbumin; *Rbfox3*, RNA binding fox-1 homolog 3 (also known as NeuN: neuronal nuclei); *Reln*, reelin; *Robo3*, roundabout guidance receptor 3; *Ror2*, receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2; *Sema3c*, semaphorin 3C; *Shh*, sonic hedgehog signaling molecule; *Sod1*, superoxide dismutase 1; *Sod2*, superoxide dismutase 2; *Sox2*, SRY-box transcription factor 2; *Sst*, somatostatin; *Tfap2c*, transcription factor AP-2 gamma; *Thrsp*, thyroid hormone responsive; *Tnf*, tumor necrosis factor; *Tubb3*, tubulin, beta 3 class III; *Vegfa*, vascular endothelial growth factor A; *Vim*, vimentin; *Wnt7b*, Wnt family member 7B.

^a Mean ± SD.

P* < 0.05, *P* < 0.01, compared with the 0-ppm controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's *t*-test with Bonferroni correction.

Table 4

Transcript-level expression changes in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on PND 77 in the AP study

	AP in drinking water (ppm)			
	0 (Control)		1000	
	No. of animals examined	6	6	
Normalization control	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
Granule cell lineage markers				
<i>Nes</i>	1.01 ± 0.11 ^a	1.00 ± 0.11	1.23 ± 0.19*	1.28 ± 0.20*
<i>Sox2</i>	1.02 ± 0.20	1.02 ± 0.20	1.06 ± 0.11	1.10 ± 0.16
<i>Eomes</i>	1.02 ± 0.21	1.02 ± 0.22	1.28 ± 0.38	1.35 ± 0.47
<i>Dcx</i>	1.01 ± 0.19	1.01 ± 0.17	0.96 ± 0.09	1.01 ± 0.14
<i>Tubb3</i>	1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.17	1.04 ± 0.04	1.08 ± 0.08
<i>Dpysl3</i>	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.09	1.05 ± 0.08	1.09 ± 0.11
<i>Rbfox3</i>	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.09	0.99 ± 0.09	1.03 ± 0.14
GABAergic interneuron-related genes				
<i>Cck</i>	1.01 ± 0.17	1.01 ± 0.18	1.05 ± 0.13	1.10 ± 0.20
<i>Cckbr</i>	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.10	1.03 ± 0.20	1.08 ± 0.25
<i>Pvalb</i>	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.13	0.98 ± 0.12	1.02 ± 0.14
<i>Reln</i>	1.01 ± 0.15	1.01 ± 0.14	1.14 ± 0.26	1.17 ± 0.24
<i>Calb2</i>	1.07 ± 0.44	1.07 ± 0.42	0.99 ± 0.37	1.01 ± 0.32
<i>Sst</i>	1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.15	1.05 ± 0.12	1.08 ± 0.12
<i>Pdgfa</i>	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.08	1.07 ± 0.08	1.12 ± 0.14
<i>Pdgfb</i>	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.06	1.06 ± 0.10	1.10 ± 0.14
<i>Pdgfra</i>	1.01 ± 0.12	1.01 ± 0.12	1.04 ± 0.13	1.08 ± 0.12
<i>Pdgfrb</i>	1.01 ± 0.13	1.01 ± 0.13	1.18 ± 0.21	1.22 ± 0.18*
Neurotrophic factor-related genes				
<i>Bdnf</i>	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.14	0.91 ± 0.13	0.94 ± 0.16
<i>Ntrk2</i>	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.07	0.98 ± 0.05	1.02 ± 0.07
Neural stem/progenitor cell regulatory genes				
<i>Pcna</i>	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.05	0.93 ± 0.07	0.97 ± 0.08
<i>Ephb1</i>	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.08	1.07 ± 0.06	1.11 ± 0.11
<i>Ephb2</i>	1.01 ± 0.17	1.01 ± 0.16	0.96 ± 0.07	1.00 ± 0.12
<i>Efnb3</i>	1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.16	1.00 ± 0.21	1.04 ± 0.25
<i>Notch1</i>	1.01 ± 0.15	1.01 ± 0.15	1.19 ± 0.19	1.23 ± 0.19*
<i>Dll4</i>	1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.16	1.23 ± 0.19	1.28 ± 0.25*
<i>Hes5</i>	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.08	1.05 ± 0.16	1.09 ± 0.22
<i>Thrsp</i>	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.07	1.11 ± 0.12	1.15 ± 0.13*
<i>Wnt7b</i>	1.01 ± 0.15	1.01 ± 0.15	1.02 ± 0.17	1.06 ± 0.17
Neural progenitor cell/neuroblast proliferation-related genes				
<i>Fzd9</i>	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.04	1.15 ± 0.13*	1.20 ± 0.20
<i>Numbl</i>	1.01 ± 0.11	1.01 ± 0.12	1.02 ± 0.09	1.07 ± 0.16
<i>Vegfa</i>	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.10	1.08 ± 0.19	1.12 ± 0.18
Neuronal migration-related genes				
<i>Arhgef2</i>	0.86 ± 0.02	0.87 ± 0.03	0.84 ± 0.04	0.87 ± 0.10
<i>Cntn2</i>	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.11	1.09 ± 0.12	1.12 ± 0.09
<i>Sema3c</i>	1.01 ± 0.13	1.01 ± 0.14	0.79 ± 0.14*	0.82 ± 0.16
<i>Fgf13</i>	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.09	0.98 ± 0.04	1.02 ± 0.09
<i>Robo3</i>	1.04 ± 0.36	1.04 ± 0.35	1.50 ± 0.16*	1.57 ± 0.23*
Neuronal differentiation-related genes				
<i>Acsf4</i>	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.07	1.01 ± 0.06	1.05 ± 0.11
<i>Baiap2</i>	0.82 ± 0.05	0.83 ± 0.05	0.80 ± 0.04	0.83 ± 0.08
<i>Tfap2c</i>	1.01 ± 0.18	1.01 ± 0.17	0.91 ± 0.19	0.94 ± 0.18
Synaptic plasticity marker genes				
<i>Fos</i>	1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.16	1.00 ± 0.22	1.04 ± 0.27
<i>Arc</i>	1.01 ± 0.17	1.01 ± 0.18	1.17 ± 0.42	1.22 ± 0.45
<i>Ptgs2</i>	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.07	0.94 ± 0.08	0.98 ± 0.14
Oxidative stress-related genes				
<i>Cat</i>	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.09	0.95 ± 0.09	0.99 ± 0.10
<i>Mt1</i>	1.02 ± 0.21	1.01 ± 0.20	1.11 ± 0.18	1.15 ± 0.19
<i>Mt2</i>	1.01 ± 0.17	1.01 ± 0.16	0.95 ± 0.18	0.98 ± 0.19
<i>Sod1</i>	1.01 ± 0.13	1.01 ± 0.12	0.92 ± 0.09	0.96 ± 0.13
<i>Sod2</i>	1.01 ± 0.12	1.01 ± 0.11	0.98 ± 0.08	1.02 ± 0.11
<i>Gpx1</i>	1.01 ± 0.13	1.01 ± 0.12	0.87 ± 0.06*	0.90 ± 0.06
Chemical mediators				
<i>Tnf</i>	1.03 ± 0.28	1.03 ± 0.29	1.45 ± 0.60	1.52 ± 0.70
<i>Il1b</i>	1.19 ± 0.55	1.19 ± 0.55	1.09 ± 0.74	1.13 ± 0.72
<i>Il6</i>	1.19 ± 0.58	1.19 ± 0.58	1.08 ± 0.70	1.12 ± 0.71
<i>Il18</i>	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.07	1.19 ± 0.20	1.24 ± 0.27
Glutamatergic receptors and glutamate transporters				

<i>Gria1</i>	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.09	0.99 ± 0.12	1.03 ± 0.17
<i>Gria2</i>	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.06	1.04 ± 0.08	1.08 ± 0.12
<i>Gria3</i>	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.09	0.99 ± 0.09	1.03 ± 0.14
<i>Grin2a</i>	1.00 ± 0.11	1.01 ± 0.11	1.00 ± 0.12	1.04 ± 0.15
<i>Grin2b</i>	1.01 ± 0.13	1.01 ± 0.13	1.04 ± 0.09	1.08 ± 0.13
<i>Grin2d</i>	1.01 ± 0.13	1.01 ± 0.12	0.92 ± 0.16	0.95 ± 0.12
Glial cell markers				
<i>Gfap</i>	1.01 ± 0.12	1.00 ± 0.11	1.11 ± 0.22	1.15 ± 0.20
<i>Fgf2</i>	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.06	1.04 ± 0.14	1.08 ± 0.15
<i>Ror2</i>	1.01 ± 0.13	1.01 ± 0.13	1.18 ± 0.25	1.24 ± 0.32
OL lineage-related genes				
<i>Cspg4</i>	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.13	1.09 ± 0.11	1.13 ± 0.09
<i>Vim</i>	1.02 ± 0.25	1.02 ± 0.22	0.94 ± 0.24	0.89 ± 0.23
<i>Kl</i>	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.13	1.13 ± 0.39	1.19 ± 0.46
<i>Id2</i>	1.01 ± 0.13	1.01 ± 0.12	0.94 ± 0.15	0.98 ± 0.15
<i>Shh</i>	1.11 ± 0.56	1.11 ± 0.55	1.20 ± 0.59	1.12 ± 0.52
Myelination-related genes				
<i>Cnp</i>	1.01 ± 0.20	1.01 ± 0.19	0.99 ± 0.11	1.02 ± 0.10
<i>Mbp</i>	1.01 ± 0.20	1.01 ± 0.19	1.10 ± 0.09	1.14 ± 0.06
<i>Plp1</i>	1.01 ± 0.20	1.01 ± 0.19	0.99 ± 0.10	1.03 ± 0.07

Abbreviations: *Acs14*, acyl-CoA synthetase long chain family member 4; *AP*, ammonium perchlorate; *Arc*, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; *Arhgef2*, Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor 2; *Baiap2*, BAR/IMD domain containing adaptor protein 2; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Calb2*, calbindin 2 (also known as calbindin-D-29K and calretinin); *Cat*, catalase; *Cck*, cholecystokinin; *Cckbr*, cholecystokinin B receptor; *Cnp*, 2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase; *Cntn2*, contactin 2; *Cspg4*, chondroitin sulfate proteoglycan 4; *Dcx*, doublecortin; *Dll4*, delta like canonical Notch ligand 4; *Dpysl3*, dihydropyrimidinase-like 3; *Efnb3*, ephrin B3; *Eomes*, eomesodermin (also known as TBR2: T-box brain protein 2); *Ephb1*, Eph receptor B1; *Ephb2*, Eph receptor B2; *Fgf13*, fibroblast growth factor 13; *Fgf2*, fibroblast growth factor 2; *Fos*, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; *Fzd9*, frizzled class receptor 9; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Gfap*, glial fibrillary acidic protein; *Gpx1*, glutathione peroxidase 1; *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; *Grin2d*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D; *Hes5*, hes family bHLH transcription factor 5; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Id2*, inhibitor of DNA binding 2; *Il18*, interleukin 18; *Il1b*, interleukin 1 beta; *Il6*, interleukin 6; *Kl*, Klotho; *Mbp*, myelin basic protein; *Mt1*, metallothionein 1; *Mt2a*, metallothionein 2A; *Nes*, nestin; *Notch1*, notch receptor 1; *Ntrk2*, neurotrophic receptor tyrosine kinase 2; *Numbl*, NUMB-like, endocytic adaptor protein; *Pcna*, proliferating cell nuclear antigen; *Pdgfa*, platelet derived growth factor subunit A; *Pdgfb*, platelet derived growth factor subunit B; *Pdgfra*, platelet derived growth factor receptor alpha; *Pdgfrb*, platelet derived growth factor receptor beta; *Plp1*, proteolipid protein 1; PND, postnatal day; *Ptgs2*, prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (also known as COX2: cyclooxygenase-2); *Pvalb*, parvalbumin; *Rbfox3*, RNA binding fox-1 homolog 3 (also known as NeuN: neuronal nuclei); *Reln*, reelin; *Robo3*, roundabout guidance receptor 3; *Ror2*, receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2; *Sema3c*, semaphorin 3C; *Shh*, sonic hedgehog signaling molecule; *Sod1*, superoxide dismutase 1; *Sod2*, superoxide dismutase 2; *Sox2*, SRY-box transcription factor 2; *Sst*, somatostatin; *Tfap2c*, transcription factor AP-2 gamma; *Thrsp*, thyroid hormone responsive; *Tnf*, tumor necrosis factor; *Tubb3*, tubulin, beta 3 class III; *Vegfa*, vascular endothelial growth factor A; *Vim*, vimentin; *Wnt7b*, Wnt family member 7B.

^a Mean ± SD.

P* < 0.05, *P* < 0.01, compared with the 0-ppm controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's *t*-test with Bonferroni correction.

Supplementary Table 7**Maternal reproductive parameters in the AP study**

	AP in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	300	1000
No. of dams examined	10	9	11
No. of implantation sites in the uterus	12.5±2.0	13.1±1.4	12.7±2.4
No. of live offspring	12.0±2.6	12.0±2.8	11.0±3.3
Male ratio (%)	58.4±18.1	40.0±20.1	48.1±13.2

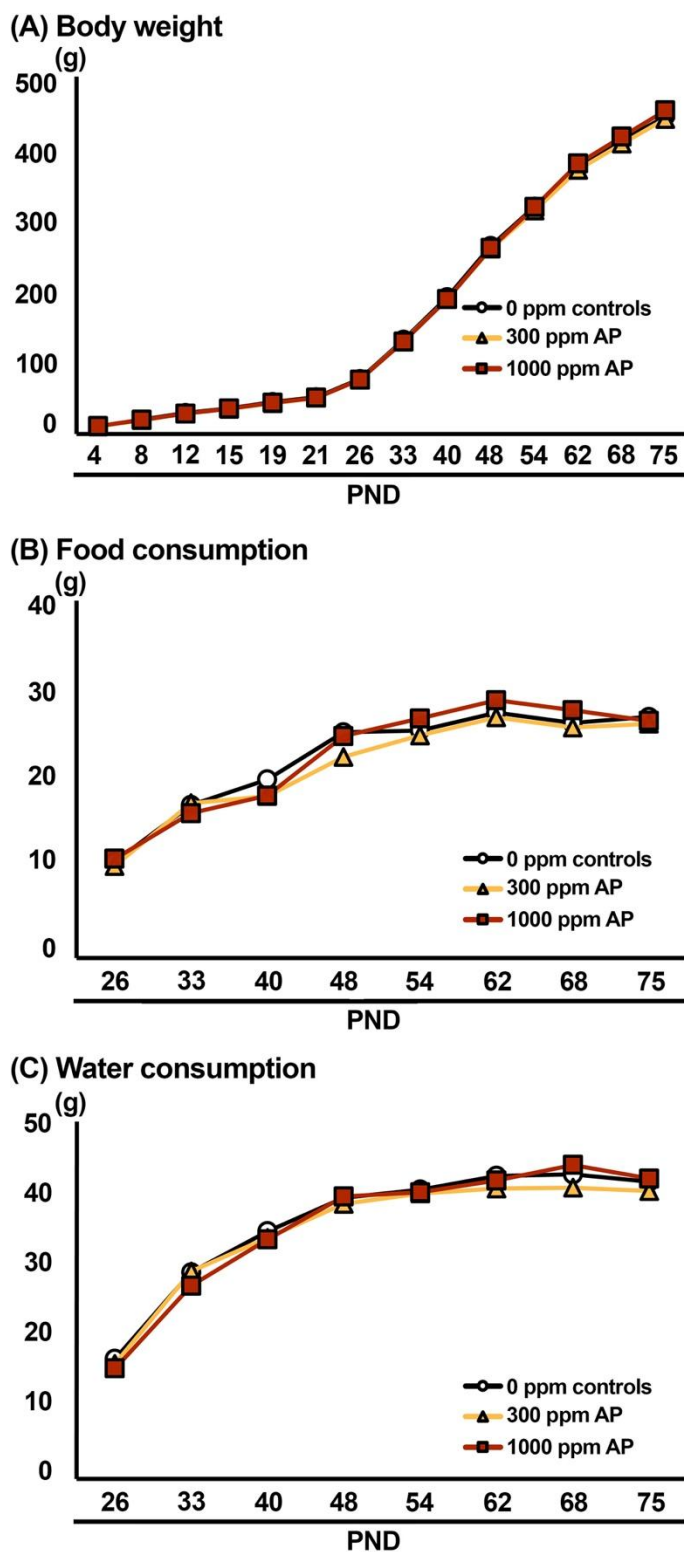
Abbreviation: AP, ammonium perchlorate.

^a Mean ± S.D.**Supplementary Table 8****Body and brain weights of dams in the AP study**

	AP in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	300	1000
No. of dams examined	10	9	11
Body weight (g)	282.6±20.8 ^a	283.4±12.3	292.7±16.8
Brain weight (g)	1.86±0.11	1.87±0.06	1.86±0.09

Abbreviation: AP, ammonium perchlorate.

^a Mean ± S.D.



Supplementary Fig. 8

(A) Body weight, (B) food consumption, and (C) water consumption of male offspring in the AP study. Abbreviations: AP, ammonium perchlorate; PND, postnatal day.

Supplementary Table 9**Body and brain weights of male offspring in the AP study**

		AP in drinking water (ppm)		
		0 (Control)	300	1000
PND 21				
	No. of offspring examined	19	19	19
	Body weight (g)	52.5±2.9 ^a	51.1±3.0	50.1±3.6
	No. of offspring examined	8	8	8
	Brain weight (g)	1.50±0.08	1.50±0.05	1.50±0.05
PND 77				
	No. of offspring examined	19	19	19
	Body weight (g)	451.8±30.6	450.4±21.2	459.7±29.3
	No. of offspring examined	8	8	8
	Brain weight (g)	2.10±0.13	2.10±0.03	2.20±0.21

Abbreviations: AP, ammonium perchlorate; PND, postnatal day.

^a Mean ± S.D.**Supplementary Table 10****Histopathological changes and proliferation activity in the thyroid tissues of female offspring in the AP study**

		AP in drinking water (ppm)		
		0 (Control)	300	1000
PND 21				
	No. of offspring examined	12	12	12
	Decrease in follicular colloids (++/+++) ^a	0 (0/0)	12** (6/6) ^{††}	12** (0/12) ^{††}
	Follicular cell hyperplasia (++/+++)	0 (0/0)	12** (12/0) ^{††}	12** (6/6) ^{††}
	Number of PCNA ⁺ cells (/1000)	63.60 ± 42.53 ^b	104.38 ± 39.58	162.80 ± 65.67 ^{##}
PND 77				
	No. of offspring examined	8	8	8
	Decrease in follicular colloids (++/+++)	0 (0/0)	0 (0/0)	0 (0/0)
	Follicular cell hyperplasia (++/+++)	0 (0/0)	0 (0/0)	0 (0/0)
	Number of PCNA ⁺ cells (/1000)	3.74 ± 1.79	2.44 ± 1.25	1.97 ± 0.83

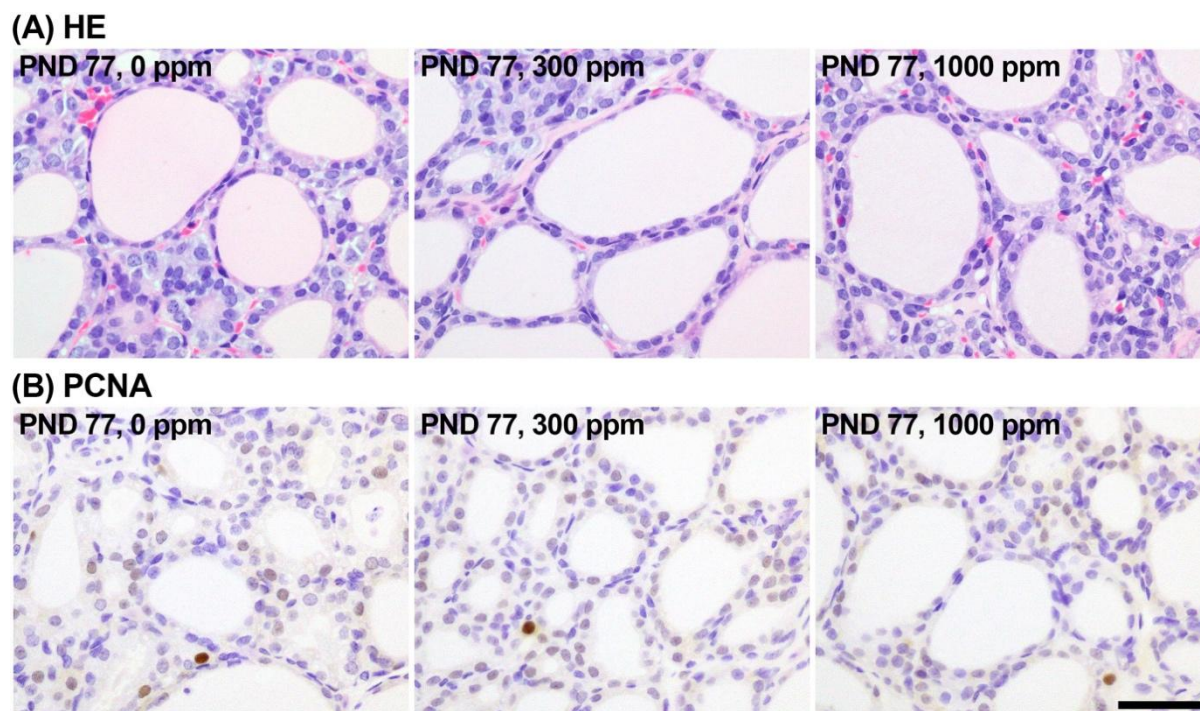
^a Grade of change: (++) , moderate; (+++), marked.^b Mean ± S.D.

Abbreviations: AP, ammonium perchlorate; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PND, postnatal day.

P* < 0.01, compared with the 0-ppm controls by Fisher's exact test.††*P* < 0.01, compared with the 0-ppm controls by Mann-Whitney's *U*-test.##*P* < 0.01, compared with the 0-ppm controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's *t*-test with Bonferroni correction.**Supplementary Table 11*Serum thyroid hormone changes in female offspring on PND 21 in the AP study**

		AP in drinking water (ppm)		
		0 (Control)	300	1000
PND 21				
	No. of offspring examined	12	12	12
	T ₃ (ng/ml)	1.52±0.18 ^a	1.50 ± 0.19	1.37±0.14*
	T ₄ (ng/ml)	49.2±8.28	45.2 ± 7.38	32.6±5.75**

Abbreviations: AP, ammonium perchlorate; PND, postnatal day; T₃, triiodothyronine; T₄, thyroxine.^a Mean ± S.D.**P* < 0.05, ***P* < 0.01, compared with the 0-ppm controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's *t*-test with Bonferroni correction.



Supplementary Fig. 9

(A) Histopathological changes and (B) distribution of immunoreactive cells for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the thyroid of female offspring on postnatal day (PND) 77 after developmental exposure to ammonium perchlorate. Magnification $\times 400$; bar 50 μm .

Supplementary Table 12**Number of immunoreactive or TUNEL⁺ cells in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on PND 21 in the AP study**

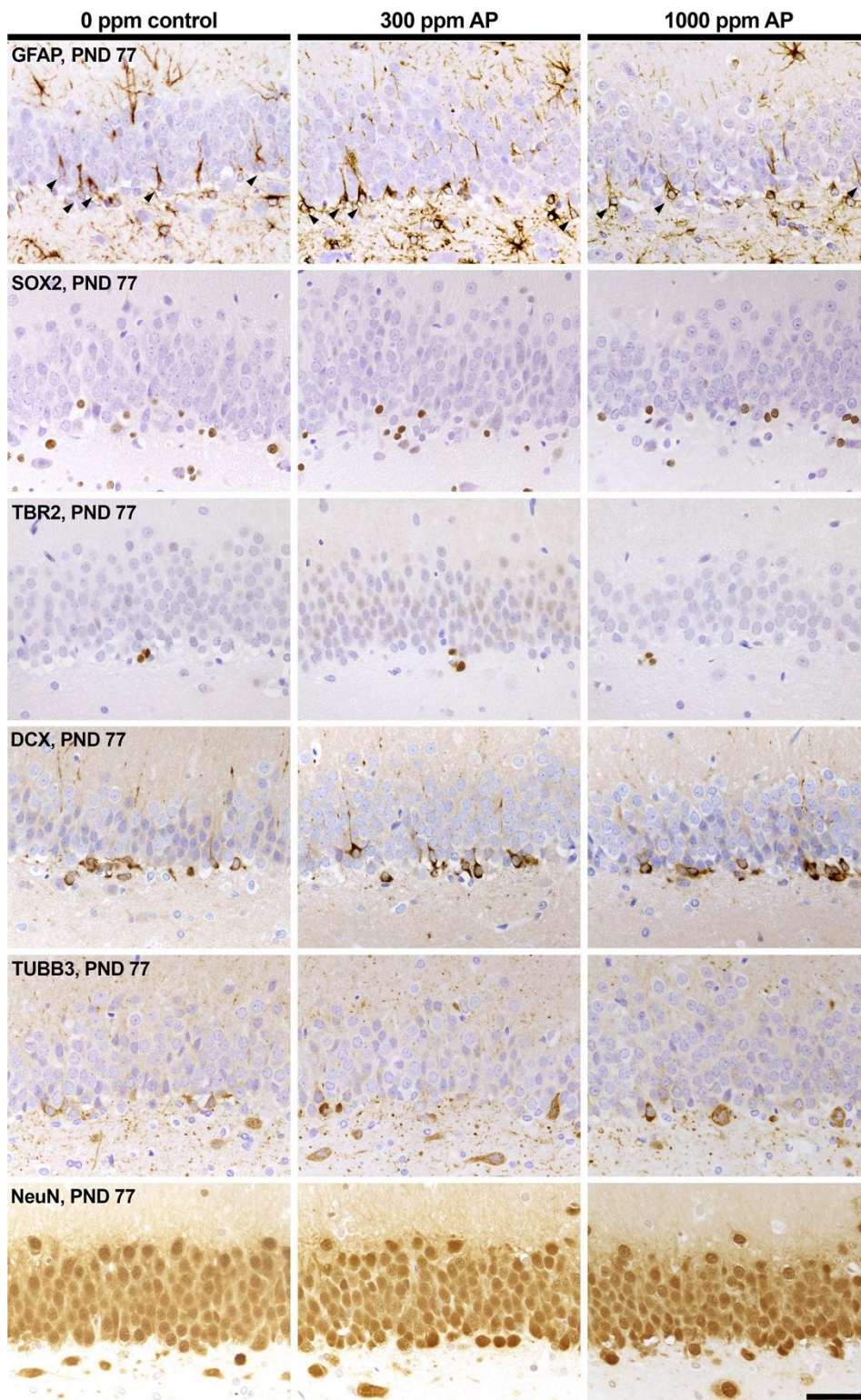
	AP in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	300	1000
Granule cell lineage subpopulations (No./mm SGZ length)			
GFAP	4.97 ± 1.77 ^a	3.92 ± 1.10	3.31 ± 0.86*
SOX2	18.62 ± 5.61	15.39 ± 7.09	14.16 ± 2.61
TBR2	9.17 ± 4.46	8.52 ± 3.65	8.43 ± 5.12
DCX	174.71 ± 29.13	163.58 ± 39.96	158.83 ± 34.10
TUBB3	122.07 ± 27.85	124.95 ± 19.51	122.46 ± 19.34
NeuN	493.32 ± 70.60	479.32 ± 72.76	490.27 ± 53.46
Cell proliferation and apoptosis (No./mm SGZ length)			
PCNA	4.60 ± 1.20	2.52 ± 1.03**	2.65 ± 0.90**
TUNEL	0.94 ± 0.48	0.92 ± 0.51	0.88 ± 0.37
Interneuron subpopulations (No./mm ² hilar region)			
CCK8	27.34 ± 10.25	28.28 ± 12.11	23.87 ± 10.02
SST	53.42 ± 11.06	52.29 ± 12.54	70.44 ± 14.71*
RELN	103.69 ± 43.06	105.53 ± 36.32	86.70 ± 31.34
PVALB	35.53 ± 27.49	33.25 ± 23.75	23.95 ± 19.33
CALB2	41.47 ± 11.70	44.86 ± 16.20	43.28 ± 12.72
GAD67	85.90 ± 17.03	86.17 ± 16.03	85.40 ± 10.75
GluR2	43.38 ± 13.85	38.24 ± 15.31	39.62 ± 12.34
Synaptic plasticity markers (No./mm SGZ length)			
p-ERK1/2	1.73 ± 1.29	0.64 ± 0.88	1.09 ± 1.43
FOS	10.70 ± 2.04	11.72 ± 2.75	9.85 ± 1.53
ARC	4.00 ± 1.93	3.02 ± 2.37	2.60 ± 2.03
COX2	38.12 ± 13.77	42.41 ± 14.95	42.50 ± 6.84
Astrocytes and microglia (No./mm ² hilar region)			
GFAP	641.10 ± 86.70	609.85 ± 89.15	645.96 ± 72.12
Iba1	71.86 ± 27.59	90.15 ± 29.74	96.83 ± 24.42
CD68	26.42 ± 6.93	28.88 ± 11.73	37.92 ± 14.19
CD163	10.44 ± 5.20	10.97 ± 5.14	11.69 ± 4.70
Oligodendrocyte (No./mm ² hilar region)			
OLIG2	489.35 ± 76.76	496.95 ± 72.21	461.03 ± 50.59
NG2	184.41 ± 23.71	209.19 ± 27.29	207.56 ± 26.99
CNPase	20.95 ± 5.83	13.81 ± 6.56*	12.88 ± 5.45*

Abbreviations: AP, ammonium perchlorate; ARC, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; CALB2, calbindin-D-29K (calretinin); CCK8, cholecystokinin 8; CD68, cluster of differentiation 68; CD163, cluster of differentiation 163; CNPase, 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase; COX2, cyclooxygenase-2; DCX, doublecortin; FOS, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; GAD67, glutamic acid decarboxylase 67; GCL, granule cell layer; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GluR2, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2; Iba1, ionized calcium-binding adaptor molecule 1; IEGs, immediate-early genes; NeuN, neuronal nuclei; NG2, NG2 chondroitin sulfate proteoglycan; OLIG2, oligodendrocyte lineage transcription factor 2; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; p-ERK1/2, phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 (p44/p42 MAP kinase); PND, postnatal day; PVALB, parvalbumin; RELN, reelin; SGZ, subgranular zone; SOX2, SRY-box transcription factor 2; SST, somatostatin; TBR2, T-box brain protein 2; TUBB3, tubulin, beta 3 class III; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling.

N = 10/group, except for N = 9 in 300-ppm for TUBB3, NeuN and GFAP (astrocytes), and in 1000-ppm group for SOX2, TBR2, ARC, GFAP (astrocytes), Iba1, CD68 and CD163, and N = 8 in 1000-ppm group for NeuN and COX2.

^a Mean ± SD.

P* < 0.05, *P* < 0.01, compared with the 0-ppm controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's *t*-test with Bonferroni correction.



Supplementary Fig. 10

Distribution of immunoreactive cells for glial fibrillary acidic protein (GFAP), SRY-box transcription factor 2 (SOX2), T-box brain protein 2 (TBR2), doublecortin (DCX), tubulin, beta 3 class III (TUBB3) and neuronal nuclei (NeuN) in the subgranular zone and/or granule cell layer of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 77 after developmental exposure to ammonium perchlorate (AP). Representative images from the 0-ppm controls (left), 300-ppm group (middle), and 1000-ppm group (right). Arrowheads indicate immunoreactive cells Magnification $\times 400$; bar 50 μm .

Supplementary Table 13

Number of immunoreactive or TUNEL⁺ cells in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on PND 77 in the AP study

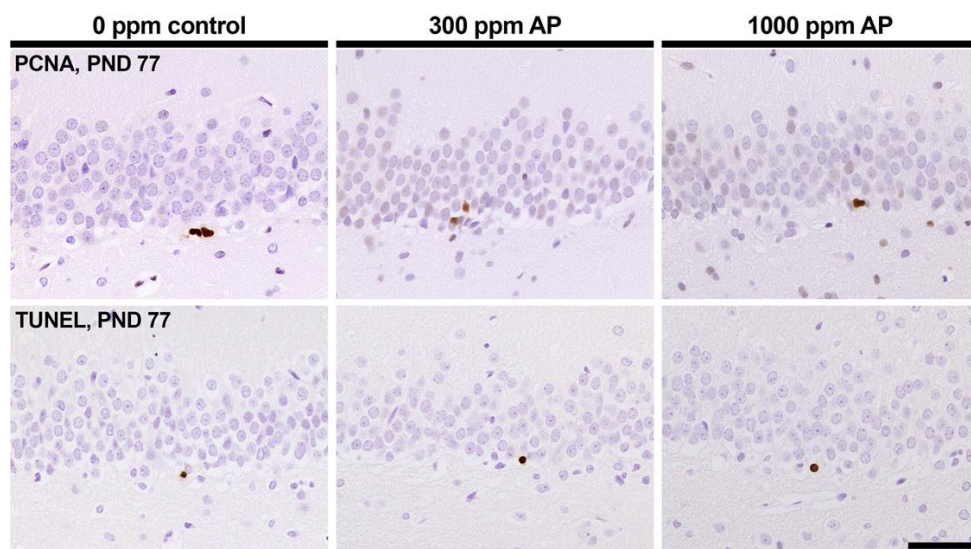
	No. of animals examined	AP in drinking water (ppm)		
		0 (Control)	300	1000
		10	10	10
Granule cell lineage subpopulations (No./mm SGZ length)				
GFAP		5.64 ± 1.31 ^a	4.77 ± 1.37	3.44 ± 1.30**
SOX2		14.18 ± 2.09	12.75 ± 2.61	12.64 ± 2.90
TBR2		3.59 ± 1.66	2.96 ± 1.20	2.64 ± 1.34
DCX		21.96 ± 1.89	19.72 ± 3.13	20.96 ± 5.41
TUBB3		11.41 ± 3.63	9.55 ± 4.20	9.00 ± 6.36
NeuN		577.88 ± 46.40	584.39 ± 53.10	563.20 ± 40.15
Cell proliferation and apoptosis (No./mm SGZ length)				
PCNA		2.89 ± 0.85	2.78 ± 1.27	2.38 ± 0.70
TUNEL (in the SGZ)		0.10 ± 0.14	0.13 ± 0.15	0.13 ± 0.14
Interneuron subpopulations (No./mm ² hilar region)				
CCK8		12.60 ± 3.60	12.64 ± 3.78	17.71 ± 3.78**
SST		43.16 ± 9.97	44.41 ± 8.65	56.52 ± 14.65*
RELN		103.69 ± 43.06	105.53 ± 36.31	86.70 ± 31.34
PVALB		13.61 ± 7.64	12.56 ± 6.97	15.79 ± 6.50
CALB2		20.18 ± 6.76	22.48 ± 8.30	24.57 ± 6.78
GAD67		39.67 ± 11.20	37.12 ± 7.21	38.30 ± 10.41
GluR2		35.93 ± 13.45	42.11 ± 15.94	26.04 ± 8.68
Synaptic plasticity markers (No./mm SGZ length)				
p-ERK1/2		8.91 ± 8.07	10.71 ± 6.50	9.50 ± 6.76
FOS		3.45 ± 1.15	3.24 ± 1.92	3.64 ± 1.51
ARC		3.75 ± 2.21	2.92 ± 1.58	2.44 ± 1.85
COX2		5.81 ± 2.72	5.61 ± 2.01	5.96 ± 1.87
Astrocytes and microglia (No./mm ² hilar region)				
GFAP		499.01 ± 50.58	466.16 ± 72.43	491.07 ± 61.78
Iba1		98.95 ± 13.34	92.27 ± 21.78	94.66 ± 23.03
CD68		7.96 ± 2.98	6.29 ± 2.22	6.75 ± 2.97
CD163		13.39 ± 5.05	13.33 ± 3.98	11.31 ± 5.33
Oligodendrocyte (No./mm ² hilar region)				
OLIG2		299.32 ± 32.70	319.07 ± 80.93	322.38 ± 48.92
NG2		127.67 ± 21.34	115.61 ± 15.27	114.68 ± 24.07
CNPase		27.40 ± 10.99	30.78 ± 13.45	29.33 ± 16.63

Abbreviations: AP; ammonium perchlorate, ARC, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; CALB2, calbindin-D-29K (calretinin); CCK8, cholecystokinin 8; CD68, cluster of differentiation 68; CD163, cluster of differentiation 163; CNPase, 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase; COX2, cyclooxygenase-2; DCX, doublecortin; FOS, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; GAD67, glutamic acid decarboxylase 67; GCL, granule cell layer; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GluR2, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2; Iba1, ionized calcium-binding adaptor molecule 1; IEGs, immediate-early genes; NeuN, neuronal nuclei; NG2, NG2 chondroitin sulfate proteoglycan; OLIG2, oligodendrocyte lineage transcription factor 2; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; p-ERK1/2, phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 (p44/p42 MAP kinase); PND, postnatal day; PVALB, parvalbumin; RELN, reelin; SGZ, subgranular zone; SOX2, SRY-box transcription factor 2; SST, somatostatin; TBR2, T-box brain protein 2; TUBB3, tubulin, beta 3 class III; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling.

N = 10/group.

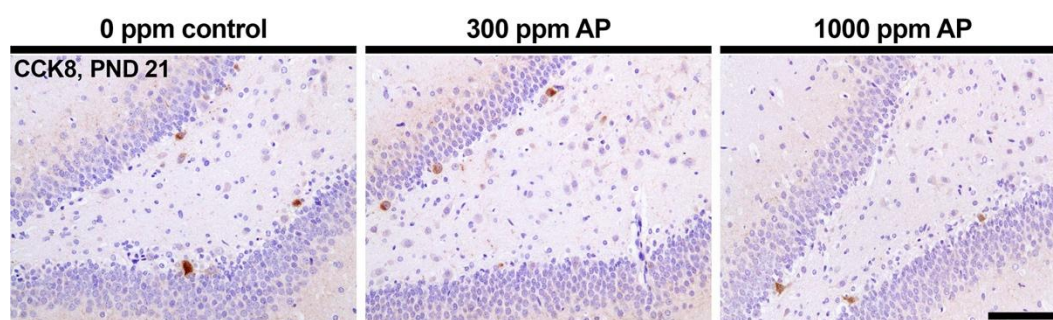
^a Mean ± SD.

P* < 0.05, *P* < 0.01, compared with the 0-ppm controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's *t*-test with Bonferroni correction.



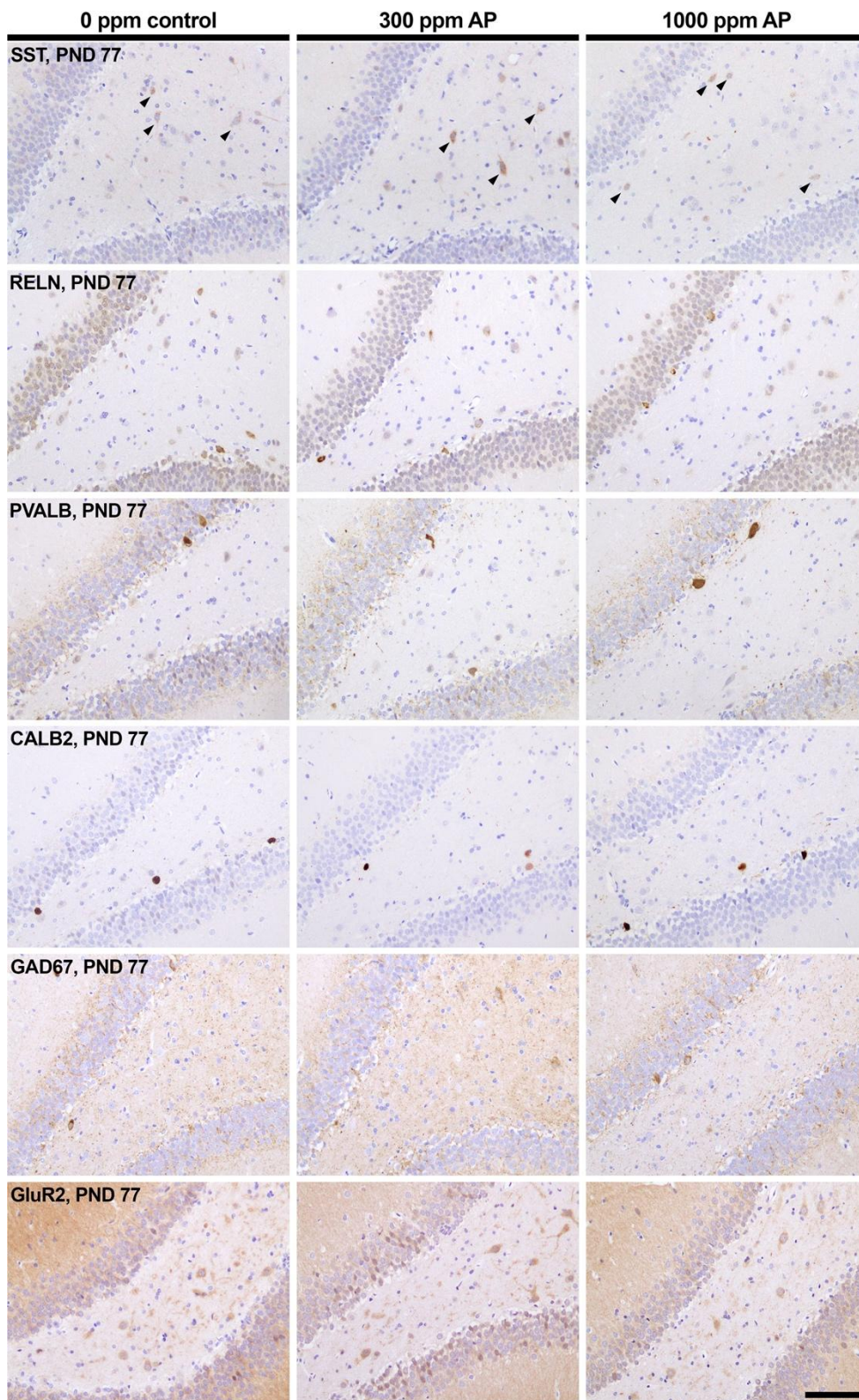
Supplementary Fig. 11

Distribution of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)⁺ proliferating cells and terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)⁺ apoptotic cells in the subgranular zone of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 77 after developmental exposure to ammonium perchlorate (AP). Representative images from the 0-ppm controls (left), 300-ppm group (middle), and 1000-ppm group (right). Magnification $\times 400$; bar 50 μm .



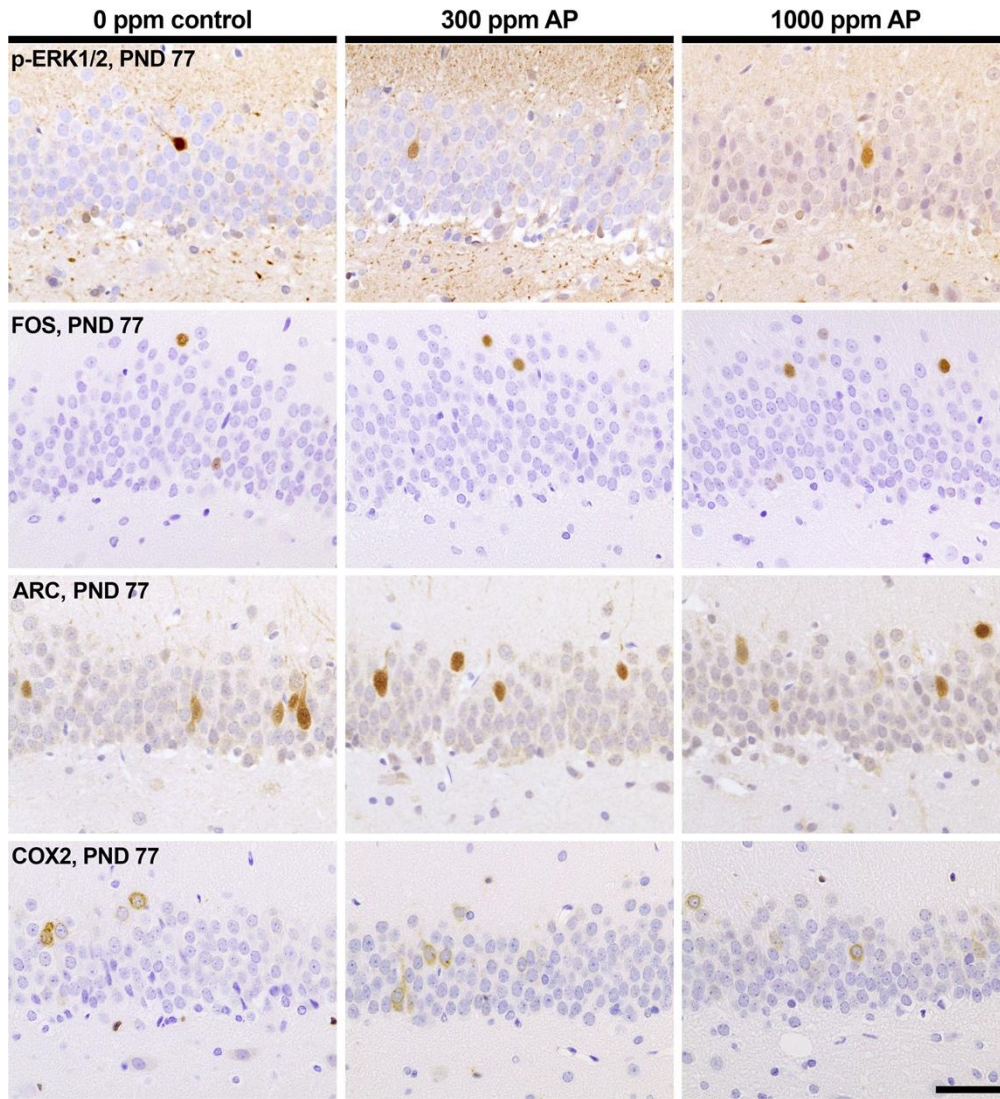
Supplementary Fig. 12

Distribution of immunoreactive cells for cholecystokinin 8 (CCK8) in the hilus of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 21 after developmental exposure to ammonium perchlorate (AP). Representative images from the 0 ppm controls (left), 300-ppm group (middle), and 1000-ppm group (right). Magnification $\times 200$; bar 100 μm .



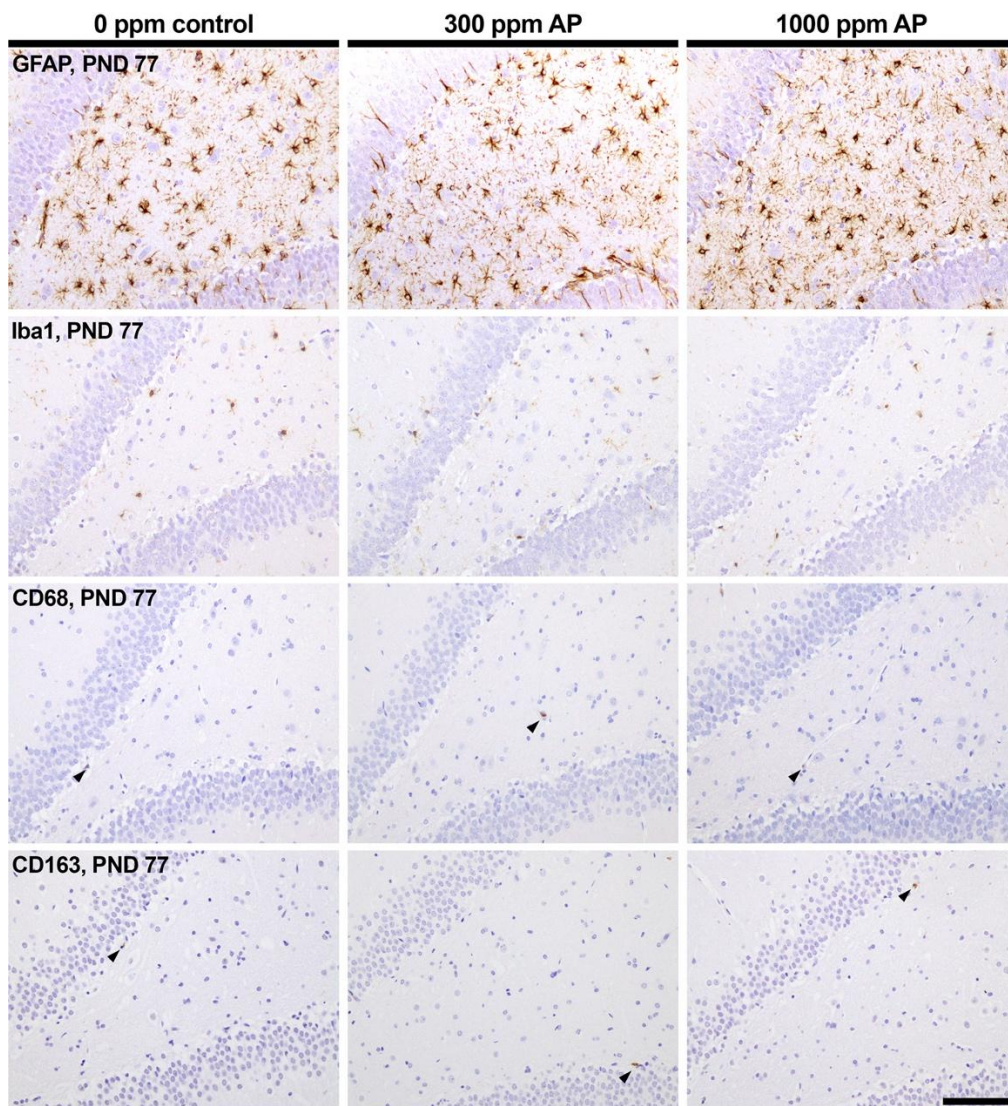
Supplementary Fig. 13

Distribution of immunoreactive cells for somatostatin (SST), reelin (RELN), parvalbumin (PVALB), calbindin-D-29K (CALB2), glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67) and glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2 (GluR2) in the hilus of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 77 after developmental exposure to ammonium perchlorate (AP). Representative images from the 0-ppm controls (left), 300-ppm group (middle), and 1000-ppm group (right). Arrowheads indicate immunoreactive cells Magnification $\times 200$; bar 100 μm .



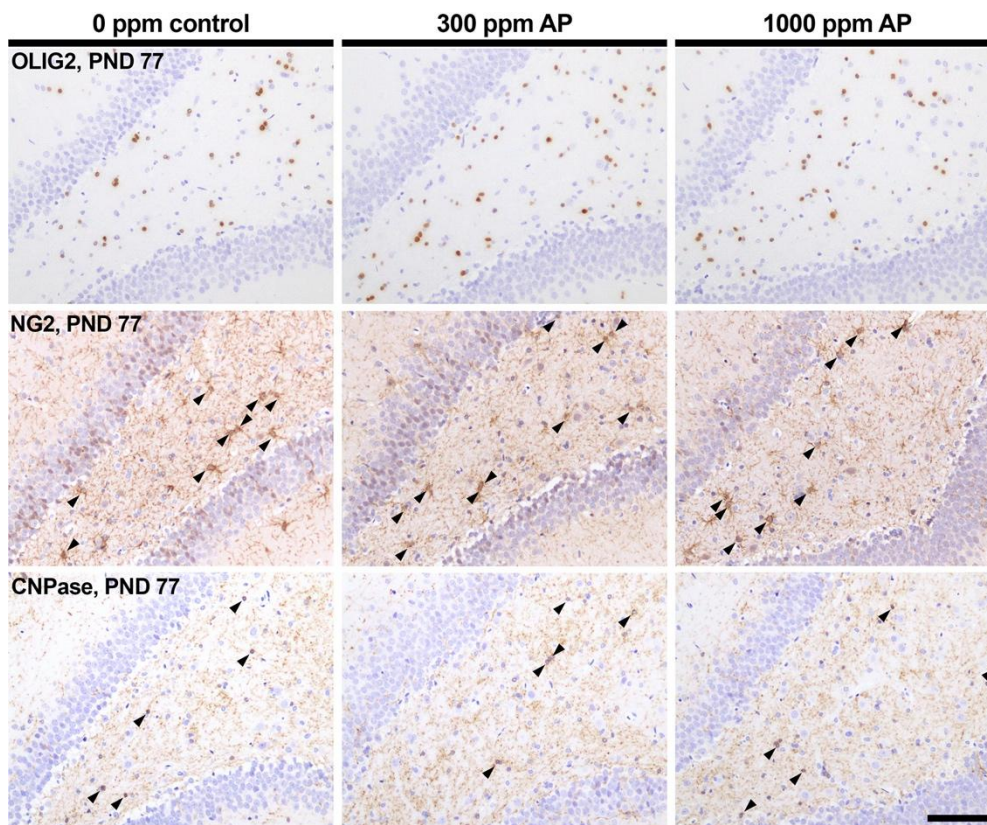
Supplementary Fig. 14

Distribution of immunoreactive cells for phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 (p-ERK1/2), Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit (FOS), activity-regulated cytoskeleton-associated protein (ARC), and cyclooxygenase-2 (COX2) in the granule cell layer of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 77 after developmental exposure to ammonium perchlorate (AP). Representative images from the 0-ppm controls (left), 300-ppm group (middle), and 1000-ppm group (right). Magnification $\times 400$; bar 50 μm .



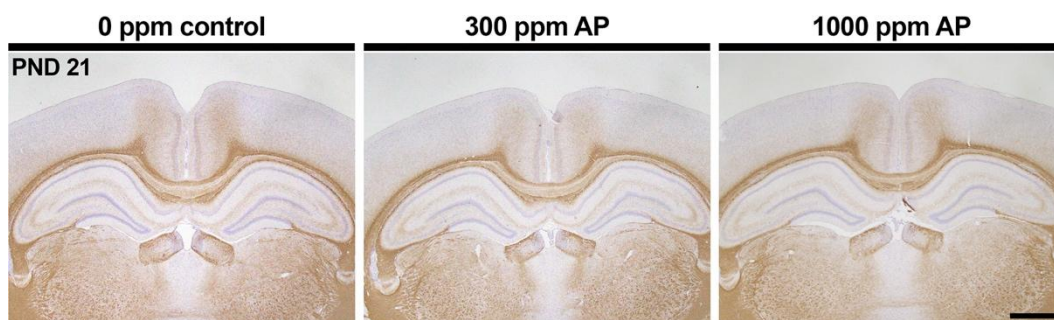
Supplementary Fig. 15

Distribution of immunoreactive cells for glial fibrillary acidic protein (GFAP), ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1), cluster of differentiation (CD) 68, CD163 in the hilus of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 77 after developmental exposure to ammonium perchlorate (AP). Representative images from the 0-ppm controls (left), 300-ppm group (middle), and 1000-ppm group (right). Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification $\times 200$; bar 100 μm .



Supplementary Fig. 16

Distribution of immunoreactive cells for oligodendrocyte lineage transcription factor 2 (OLIG2), NG2 chondroitin sulfate proteoglycan (NG2), and 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) in the hilus of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 77 after developmental exposure to ammonium perchlorate (AP). Representative images from the 0-ppm controls (left), 300-ppm group (middle), and 1000-ppm group (right). Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification $\times 200$; bar 100 μm .



Supplementary Fig. 17

Distribution of immunoreactive cells for 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) in the brain of male offspring on postnatal day (PND) 21 after developmental exposure to ammonium perchlorate (AP). Representative images from the 0-ppm controls (left), 300-ppm group (middle), and 1000-ppm group (right). Magnification $\times 12.5$; bar 1 mm.

Supplementary Table 14**Areas of the GCL and hilus of the hippocampal DG and corpus callosum on PND 21 and PND 77 in the AP study**

	AP in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	300	1000
PND 21			
No. of offspring examined	10	9	10
DG GCL area (mm ²)	0.227 ± 0.033	0.203 ± 0.045	0.204 ± 0.032
DG hilus area (mm ²)	0.368 ± 0.028	0.333 ± 0.039	0.336 ± 0.039
Combined area of the corpus callosum and adjacent cingulum bundle (mm ²)	1.049 ± 0.333	0.858 ± 0.359	0.836 ± 0.214
PND 77			
No. of offspring examined	10	9	10
DG GCL area (mm ²)	0.268 ± 0.046	0.256 ± 0.030	0.278 ± 0.035
DG hilus area (mm ²)	0.472 ± 0.046	0.463 ± 0.053	0.449 ± 0.037
Combined area of the corpus callosum and adjacent cingulum bundle (mm ²)	1.253 ± 0.305	1.037 ± 0.139	0.924 ± 0.220*

Abbreviations: AP, ammonium perchlorate; DG, dentate gyrus; GCL, granule cell layer; PND, postnatal day.

* $P < 0.05$ compared with the 0-ppm controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

Supplementary Table 15**Changes in oxidative stress parameters in the hippocampus of female offspring on PND 21 in the AP study**

	AP in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	300	1000
No. of offspring examined	6	6	6
MDA (nmol/mg protein)	2.96 ± 0.38 ^a	2.84 ± 0.21	2.88 ± 0.49
GSH (μmol/L)	14.9 ± 1.44	15.9 ± 0.80	14.6 ± 1.08

Abbreviations: AP, ammonium perchlorate; GSH, glutathione; MDA, malondialdehyde; PND, postnatal day.

^a Mean ± S.D.

<IMI 曝露実験>

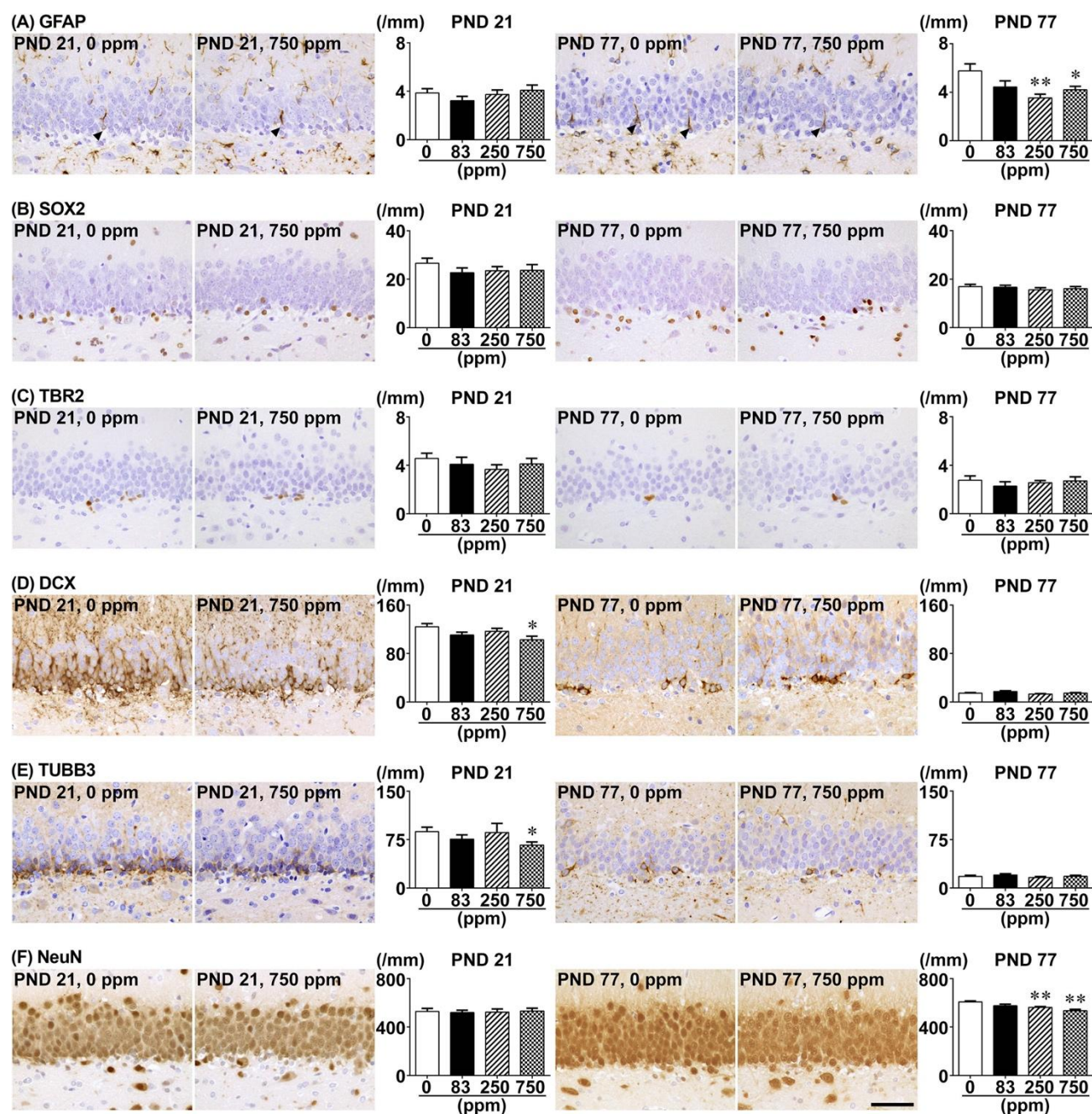


Fig. 16

Distribution of immunoreactive cells for granule cell lineage markers in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 21 and PND 77 after maternal exposure to imidacloprid (IMI) from gestational day 6 to PND 21. (A) Glial fibrillary acidic protein (GFAP), (B) SRY-box transcription factor 2 (SOX2), or (C) T box brain protein 2 (TBR2) in the subgranular zone (SGZ), and (D) doublecortin (DCX), (E) tubulin, beta 3 class III (TUBB3), or (F) neuronal nuclei (NeuN) in the SGZ and/or granule cell layer (GCL). Representative images from the 0-ppm controls and 750-ppm group on PND 21 (left) and PND 77 (right). Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification $\times 400$; bar 50 μm . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the SGZ and/or GCL. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. $N = 10/\text{group}$. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, compared with the 0-ppm controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

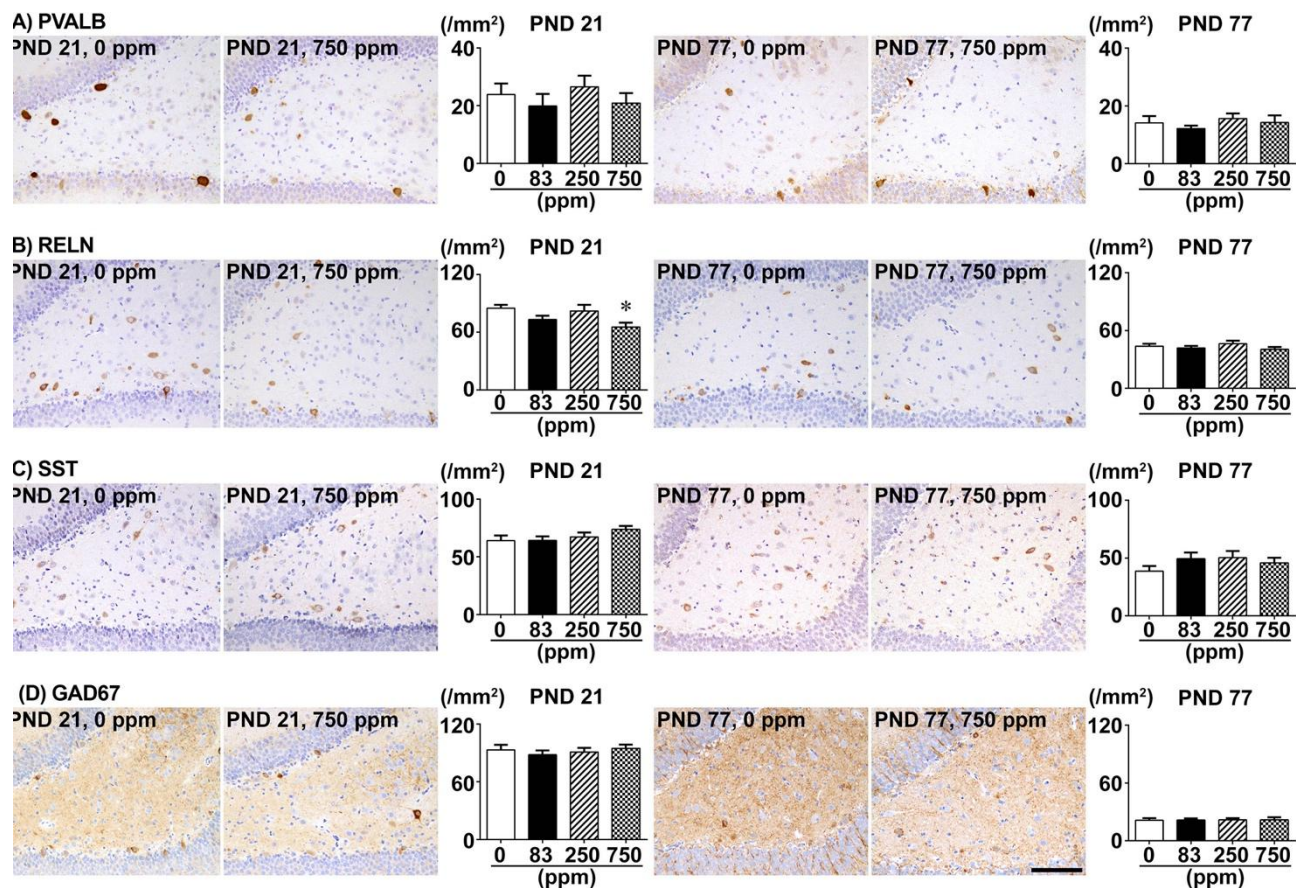


Fig. 17

Distribution of immunoreactive cells for γ -aminobutyric acid-ergic interneuron markers in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 21 and PND 77 after maternal exposure to imidacloprid (IMI) from gestational day 6 to PND 21. (A) Parvalbumin (PVALB), (B) reelin (RELN), (C) somatostatin (SST), or (D) glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67) in the hilus of the dentate gyrus. Representative images from the 0-ppm controls and 750-ppm group on PND 21 (left) and PND 77 (right). Magnification $\times 200$; bar 100 μ m. Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the hilar region. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. N = 10/group. * $P < 0.05$, compared with the 0-ppm controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

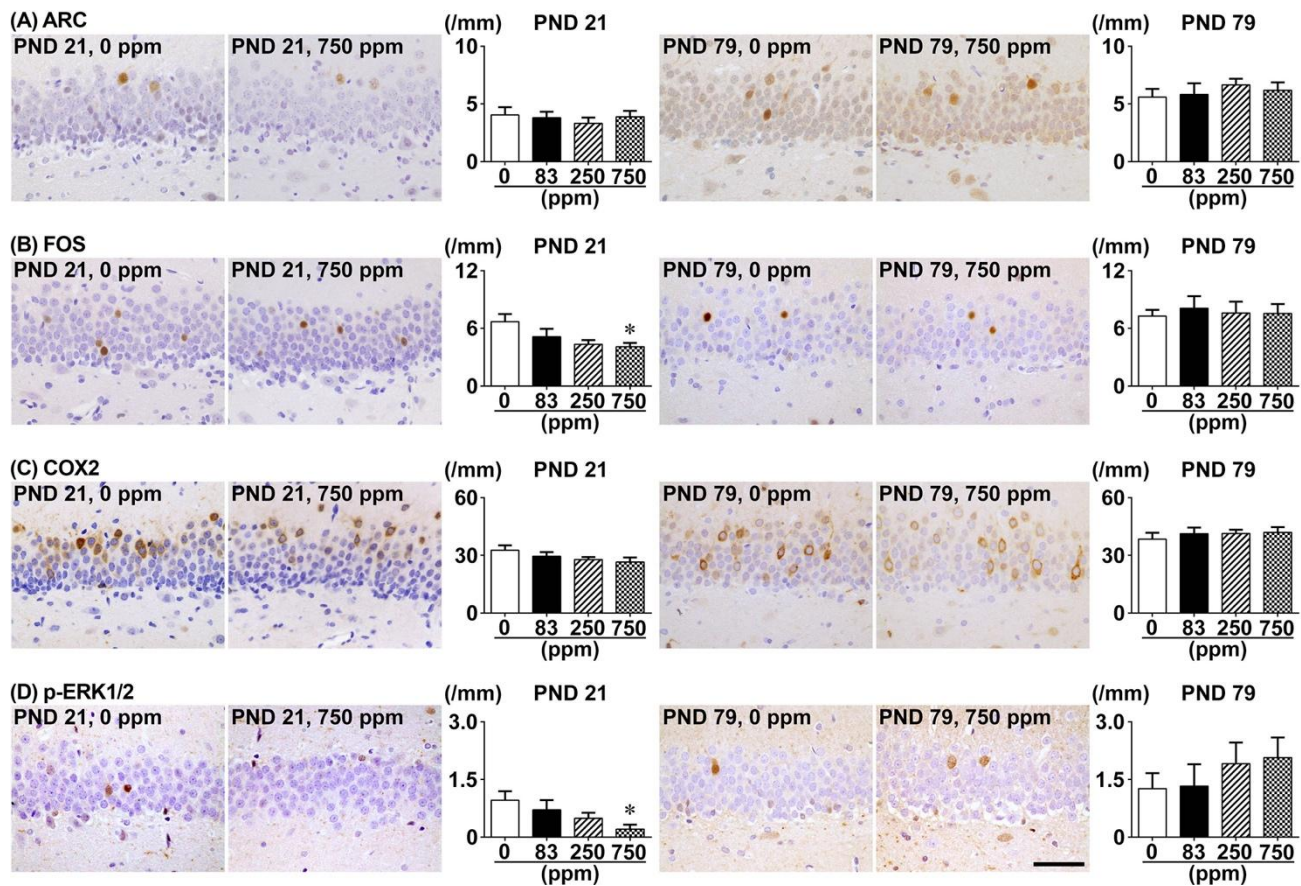


Fig. 18

Distribution of immunoreactive cells for synaptic plasticity-related proteins in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 21 and PND 79 after maternal exposure to imidacloprid (IMI) from gestational day 6 to PND 21. (A) Activity-regulated cytoskeleton-associated protein (ARC), (B) Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit (FOS), (C) cyclooxygenase 2 (COX2), or (D) phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 (p-ERK1/2) in the granule cell layer (GCL) of the dentate gyrus. Representative images from the 0-ppm controls and 750-ppm group on PND 21 (left) and PND 77 (right). Magnification $\times 400$; bar 50 μm . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the GCL. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. $N = 10/\text{group}$. * $P < 0.05$, compared with the 0-ppm controls (0 ppm) by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

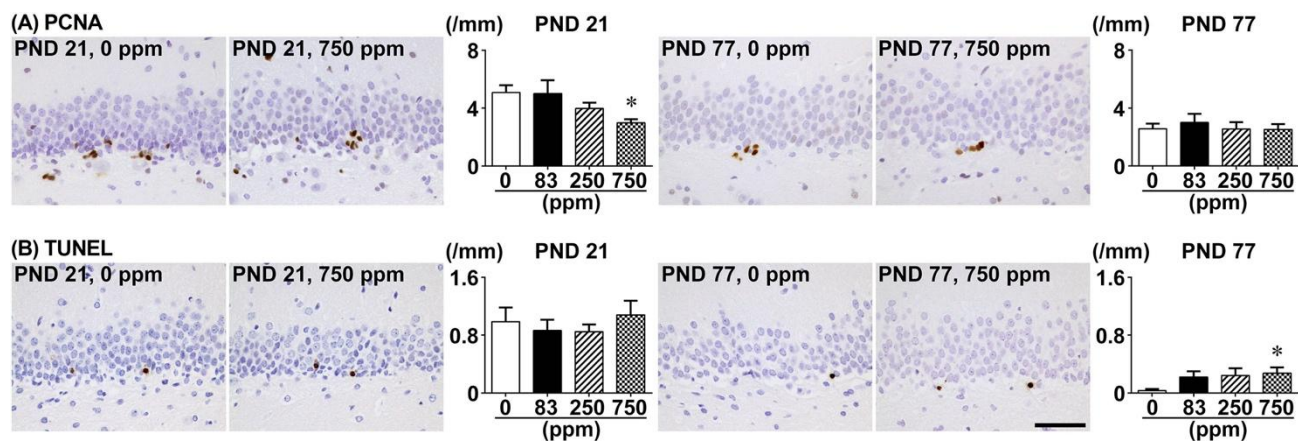


Fig. 19

Distribution of proliferating or apoptotic cells in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 21 and PND 77 after maternal exposure to imidacloprid (IMI) from gestational day 6 to PND 21. (A) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)⁺ proliferating cells or (B) terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)⁺ apoptotic cells in the subgranular zone (SGZ). Representative images from the 0-ppm controls and 750-ppm group on PND 21 (left) and PND 77 (right). Magnification $\times 400$; bar 50 μm . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the SGZ. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. $N = 10/\text{group}$. * $P < 0.05$, compared with the 0-ppm controls (0 ppm) by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

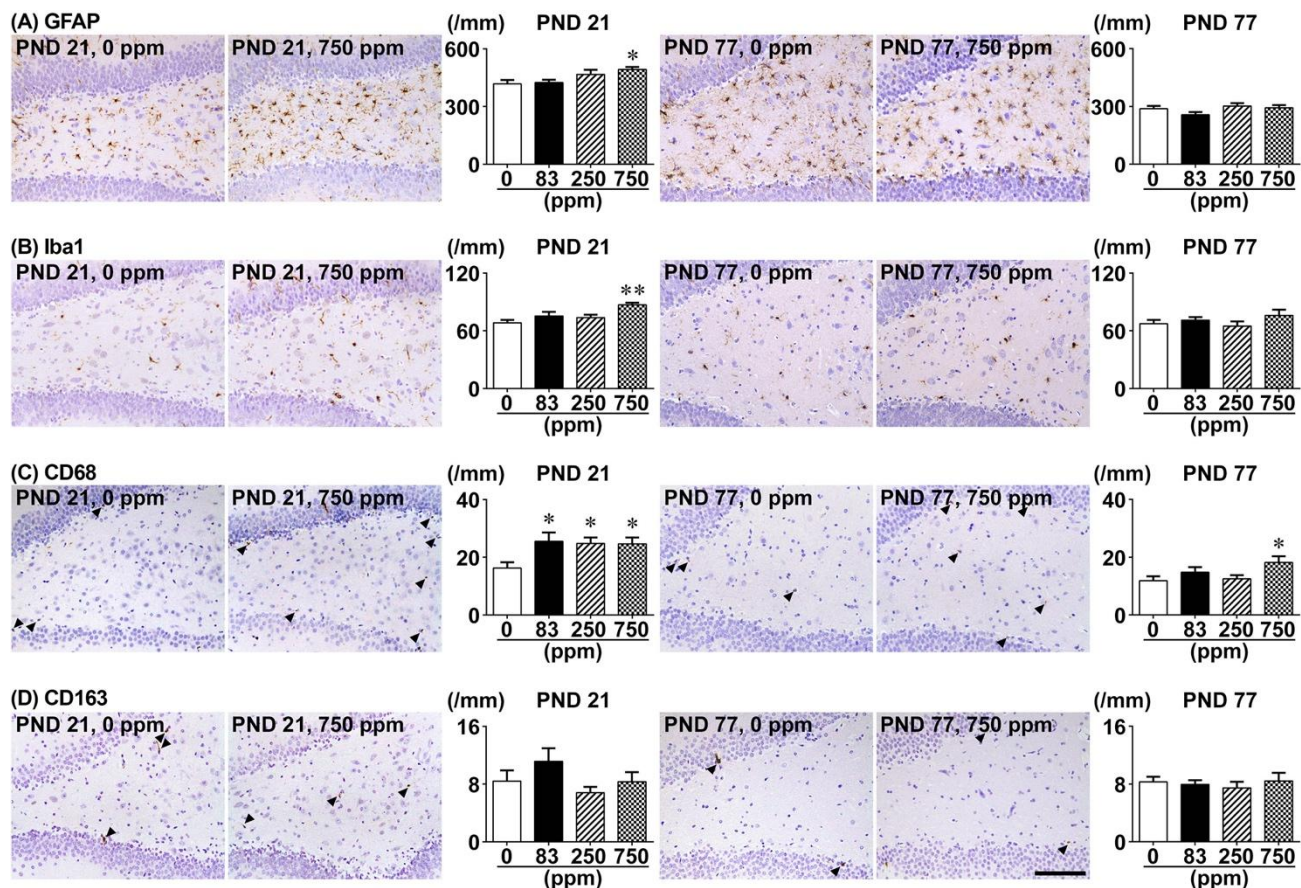


Fig. 20

Distribution of immunoreactive cells for glial cell markers in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 21 and PND 77 after maternal exposure to imidacloprid (IMI) from gestational day 6 to PND 21. (A) glial fibrillary acidic protein (GFAP), (B) ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1), (C) cluster of differentiation (CD) 68, or (D) CD163 in the hilus of the dentate gyrus. Representative images from the 0-ppm controls and 750-ppm group on PND 21 (left) and PND 77 (right). Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification $\times 200$; bar 100 μm . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the hilus. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. $N = 10/\text{group}$. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, compared with the 0-ppm controls (0 ppm) by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

Table 5

Transcript-level expression changes of neurogenesis-related genes in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on PND 21 in the IMI study

	0 (Controls)		750 ppm IMI	
	Relative transcript level normalized to			
	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
Granule cell lineage markers				
<i>Nes</i>	1.03 ± 0.12 ^a	1.02 ± 0.09	1.18 ± 0.17	1.40 ± 0.27
<i>Sox2</i>	1.02 ± 0.09	1.03 ± 0.11	1.26 ± 0.23	1.45 ± 0.36
<i>Eomes</i>	1.05 ± 0.14	1.04 ± 0.14	1.19 ± 0.10	1.31 ± 0.14
<i>Dcx</i>	1.02 ± 0.09	1.02 ± 0.09	1.07 ± 0.11	1.19 ± 0.16
<i>Dpysl3</i>	1.01 ± 0.06	1.01 ± 0.05	0.82 ± 0.05*	1.06 ± 0.09
<i>Tubb3</i>	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.02	0.86 ± 0.04*	1.01 ± 0.05
<i>Rbfox3</i>	1.10 ± 0.09	1.10 ± 0.08	0.89 ± 0.08	1.15 ± 0.12
GABAergic interneuron-related genes				
<i>Pvalb</i>	1.07 ± 0.18	1.06 ± 0.16	1.20 ± 0.11	1.30 ± 0.12
<i>Reln</i>	1.05 ± 0.14	1.07 ± 0.14	1.33 ± 0.12	1.26 ± 0.12
<i>Reln</i> signaling-related genes				
<i>Vldlr</i>	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.04	1.12 ± 0.08	1.26 ± 0.08*
<i>Dab1</i>	1.10 ± 0.24	1.08 ± 0.21	1.18 ± 0.25	1.27 ± 0.23
Neurotrophic factor-related genes				
<i>Bdnf</i>	1.01 ± 0.06	1.01 ± 0.06	0.87 ± 0.05	0.90 ± 0.05
<i>Ntrk2</i>	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.05	1.19 ± 0.05*	1.34 ± 0.08**
Cell proliferation marker				
<i>Pcna</i>	1.02 ± 0.09	1.02 ± 0.09	1.21 ± 0.14	1.36 ± 0.24
Cholinergic receptor and enzyme genes				
<i>Chrna7</i>	1.02 ± 0.08	1.01 ± 0.06	1.07 ± 0.10	1.16 ± 0.09
<i>Chrn2</i>	1.02 ± 0.10	1.04 ± 0.13	0.77 ± 0.04*	0.94 ± 0.06
<i>Chat</i>	1.03 ± 0.13	1.04 ± 0.14	1.90 ± 0.25**	2.06 ± 0.23**
<i>Chrm1</i>	1.07 ± 0.20	1.06 ± 0.17	1.05 ± 0.15	1.15 ± 0.13
<i>Chrm2</i>	1.06 ± 0.16	1.07 ± 0.17	0.79 ± 0.08	0.90 ± 0.10
Synaptic plasticity-related IEGs				
<i>Arc</i>	1.12 ± 0.27	1.15 ± 0.30	1.36 ± 0.14	1.42 ± 0.15
<i>Fos</i>	1.02 ± 0.11	1.02 ± 0.10	1.11 ± 0.07	1.16 ± 0.08
<i>Ptgs2</i>	1.02 ± 0.08	1.02 ± 0.09	0.87 ± 0.10	0.90 ± 0.10
Glutamate receptors and transporters				
<i>Gria1</i>	1.04 ± 0.15	1.06 ± 0.17	0.99 ± 0.13	1.03 ± 0.13
<i>Gria2</i>	1.02 ± 0.08	1.02 ± 0.09	0.96 ± 0.11	1.00 ± 0.11
<i>Gria3</i>	1.01 ± 0.06	1.02 ± 0.08	1.01 ± 0.13	1.05 ± 0.13
<i>Grin2a</i>	1.05 ± 0.16	1.07 ± 0.19	0.98 ± 0.11	1.02 ± 0.13
<i>Grin2b</i>	1.01 ± 0.06	1.01 ± 0.08	1.00 ± 0.14	1.05 ± 0.15
<i>Grin2d</i>	1.10 ± 0.22	1.09 ± 0.20	0.76 ± 0.08	0.79 ± 0.08
<i>Slc17a6</i>	1.61 ± 0.70	1.50 ± 0.63	0.71 ± 0.13	0.64 ± 0.12
<i>Slc17a7</i>	1.02 ± 0.09	1.03 ± 0.11	0.89 ± 0.06	0.93 ± 0.06
Glial cell markers				
<i>Gfap</i>	1.02 ± 0.08	1.02 ± 0.08	1.16 ± 0.15	1.40 ± 0.14*
<i>Aif1</i>	0.98 ± 0.08	0.98 ± 0.09	1.34 ± 0.11*	1.49 ± 0.18*
Chemical mediators				
<i>Il10</i>	1.08 ± 0.19	1.09 ± 0.21	1.51 ± 0.21	1.62 ± 0.18
<i>Il1a</i>	1.16 ± 0.26	1.16 ± 0.25	2.03 ± 0.42	2.16 ± 0.48
<i>Il1b</i>	1.17 ± 0.27	1.14 ± 0.24	1.18 ± 0.19	1.31 ± 0.24
<i>Il4</i>	1.06 ± 0.16	1.07 ± 0.17	1.47 ± 0.15	1.60 ± 0.13*
<i>Il6</i>	1.06 ± 0.15	1.06 ± 0.16	1.52 ± 0.18	1.64 ± 0.14*
<i>Tnf</i>	1.04 ± 0.13	1.05 ± 0.14	1.38 ± 0.14	1.49 ± 0.11*
<i>Tgfb1</i>	1.01 ± 0.08	1.02 ± 0.10	1.20 ± 0.05	1.32 ± 0.04*
<i>Nfkb1</i>	1.01 ± 0.06	1.02 ± 0.08	1.16 ± 0.04*	1.28 ± 0.08*
Oxidative stress-related genes				
<i>Hmox1</i>	1.01 ± 0.07	1.02 ± 0.08	1.17 ± 0.05	1.28 ± 0.05*
<i>Keap1</i>	1.01 ± 0.05	1.00 ± 0.04	1.02 ± 0.05	1.13 ± 0.06
<i>Nfe2l2</i>	1.01 ± 0.05	1.01 ± 0.06	1.37 ± 0.10**	1.52 ± 0.18*
<i>Sod1</i>	1.13 ± 0.18	1.13 ± 0.18	1.18 ± 0.06	1.30 ± 0.10
<i>Sod2</i>	1.01 ± 0.07	1.01 ± 0.07	1.05 ± 0.06	1.15 ± 0.07
<i>Cat</i>	1.02 ± 0.10	1.03 ± 0.12	1.07 ± 0.05	1.19 ± 0.11
<i>Mt1</i>	1.01 ± 0.08	1.02 ± 0.09	1.54 ± 0.16*	1.70 ± 0.20*
<i>Mt2a</i>	1.07 ± 0.17	1.06 ± 0.17	1.61 ± 0.17*	1.77 ± 0.19*
<i>Nos2</i>	1.07 ± 0.18	1.08 ± 0.20	1.16 ± 0.14	1.24 ± 0.12
<i>Gpx1</i>	1.06 ± 0.14	1.05 ± 0.14	1.32 ± 0.25	1.39 ± 0.29
<i>Gpx4</i>	1.01 ± 0.07	1.01 ± 0.06	1.15 ± 0.04	1.20 ± 0.06*

Abbreviations: *Aif1*, allograft inflammatory factor 1 (also known as *Iba1*: ionized calcium binding adapter protein 1); *Arc*, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Cat*, catalase; *Chat*, choline *O*-acetyltransferase; *Chrm1*, cholinergic receptor, muscarinic 1; *Chrm2*, cholinergic receptor, muscarinic 2; *Chrna7*, cholinergic receptor nicotinic alpha 7 subunit;

Chrn2, cholinergic receptor nicotinic beta 2 subunit; *Dab1*, DAB adaptor protein 1; *Dcx*, doublecortin; *Dpysl3*, dihydropyrimidinase-like 3 (also known as TUC4: TOAD-64/Ulip/CRMP protein 4b); *Eomes*, eomesodermin (also known as TBR2: T-box brain protein 2); *Fos*, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Gfap*, glial fibrillary acidic protein; *Gpx1*, glutathione peroxidase 1; *Gpx4*, glutathione peroxidase 4; *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; *Grin2d*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D; *Hmox1*, heme oxygenase 1; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; IEG, immediate early gene; IMI, imidacloprid; *Il1a*, interleukin 1 alpha; *Il1b*, interleukin 1 beta; *Il4*, interleukin 4; *Il6*, interleukin 6; *Il10*, interleukin 10; *Keap1*, Kelch-like ECH-associated protein 1; *Mt1*, metallothionein 1; *Mt2a*, metallothionein 2A; *Nes*, nestin; *Nfkb1*, nuclear factor kappa B subunit 1; *Nos2*, nitric oxide synthase 2; *Nfe2l2*, NFE2 like bZIP transcription factor 2; *Pcna*, proliferating cell nuclear antigen; PND, postnatal day; *Ptgs2*, prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (also known as COX2: cyclooxygenase-2); *Pvalb*, parvalbumin; *Rbfox3*, RNA binding fox-1 homolog 3 (also known as NeuN: neuronal nuclei); *Reln*, reelin; *Slc17a6*, solute carrier family 17 member 6; *Slc17a7*, solute carrier family 17 member 7; *Sod1*, superoxide dismutase 1; *Sod2*, superoxide dismutase 2; *Sox2*, SRY-box transcription factor 2; *Tgfb1*, transforming growth factor, beta 1; *Tnf*, tumor necrosis factor; *Tubb3*, tubulin, beta 3 class III; *Vldlr*, very low density lipoprotein receptor.

^a Mean $\pm$ SEM.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the 0-ppm controls by Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test.

Table 6

Transcript-level expression changes of neurogenesis-related genes in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on PND 77 in the IMI study

	0 (Controls)		750 ppm IMI	
	Relative transcript level normalized to			
	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
Granule cell lineage markers				
<i>Nes</i>	1.04 ± 0.14 ^a	1.03 ± 0.12	0.72 ± 0.04*	0.75 ± 0.03*
<i>Sox2</i>	1.26 ± 0.44	1.20 ± 0.37	0.73 ± 0.06	0.75 ± 0.04
<i>Eomes</i>	1.08 ± 0.18	1.09 ± 0.23	0.67 ± 0.04	0.70 ± 0.04
<i>Dcx</i>	1.01 ± 0.05	1.02 ± 0.10	0.90 ± 0.05	0.94 ± 0.04
<i>Dpysl3</i>	1.01 ± 0.05	1.00 ± 0.04	0.91 ± 0.02	0.95 ± 0.03
<i>Tubb3</i>	1.02 ± 0.08	1.01 ± 0.05	0.96 ± 0.04	1.00 ± 0.02
<i>Rbfox3</i>	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.04	0.90 ± 0.04	0.94 ± 0.03
GABAergic interneuron-related genes				
<i>Pvalb</i>	1.07 ± 0.21	1.05 ± 0.17	0.92 ± 0.06	0.92 ± 0.03
<i>Reln</i>	1.04 ± 0.13	1.03 ± 0.11	1.06 ± 0.12	1.07 ± 0.12
Neurotrophic factor-related genes				
<i>Bdnf</i>	1.01 ± 0.05	1.00 ± 0.03	1.01 ± 0.02	1.04 ± 0.06
<i>Ntrk2</i>	1.02 ± 0.09	1.01 ± 0.07	0.99 ± 0.08	1.01 ± 0.06
Cell proliferation and apoptosis related				
<i>Pcna</i>	1.01 ± 0.06	1.00 ± 0.04	0.83 ± 0.03*	0.87 ± 0.04*
<i>Casp3</i>	1.08 ± 0.18	1.10 ± 0.23	0.79 ± 0.21	0.75 ± 0.18
<i>Casp1</i>	1.10 ± 0.21	1.10 ± 0.23	1.06 ± 0.13	1.10 ± 0.09
<i>Casp9</i>	1.02 ± 0.09	1.02 ± 0.10	0.97 ± 0.02	1.01 ± 0.03
<i>Bax</i>	1.01 ± 0.08	1.01 ± 0.08	1.02 ± 0.05	1.03 ± 0.06
<i>Bcl2</i>	1.03 ± 0.10	1.04 ± 0.11	0.91 ± 0.04	0.91 ± 0.06
<i>Bcl2l1</i>	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.04	0.88 ± 0.02*	0.86 ± 0.03**
Cholinergic receptor and enzyme genes				
<i>Chrna7</i>	1.01 ± 0.05	1.01 ± 0.05	1.02 ± 0.05	1.00 ± 0.05
<i>Chrn2</i>	1.01 ± 0.06	1.00 ± 0.04	0.90 ± 0.03	0.88 ± 0.03*
<i>Chat</i>	1.20 ± 0.31	1.22 ± 0.37	0.92 ± 0.15	0.89 ± 0.12
Synaptic plasticity-related IEGs				
<i>Arc</i>	1.07 ± 0.18	1.09 ± 0.22	1.06 ± 0.14	1.02 ± 0.08
<i>Fos</i>	1.07 ± 0.17	1.06 ± 0.16	1.11 ± 0.07	1.10 ± 0.09
<i>Ptgs2</i>	1.01 ± 0.07	1.00 ± 0.05	1.20 ± 0.05*	1.20 ± 0.06*
Glutamate receptors and transporters				
<i>Grin2a</i>	1.01 ± 0.07	1.01 ± 0.07	1.04 ± 0.05	1.04 ± 0.10
<i>Grin2b</i>	1.01 ± 0.05	1.01 ± 0.05	1.05 ± 0.04	1.05 ± 0.08
<i>Grin2d</i>	1.04 ± 0.12	1.03 ± 0.12	0.91 ± 0.08	0.91 ± 0.11
<i>Slc17a6</i>	1.52 ± 0.61	1.45 ± 0.56	0.71 ± 0.14	0.71 ± 0.16
<i>Slc17a7</i>	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.03	1.01 ± 0.08	1.01 ± 0.10
Glial cell markers				
<i>Gfap</i>	1.05 ± 0.14	1.06 ± 0.16	0.93 ± 0.09	0.90 ± 0.06
<i>Aif1</i>	1.08 ± 0.14	1.14 ± 0.15	1.00 ± 0.10	1.02 ± 0.08
Chemical mediators				
<i>Il10</i>	1.10 ± 0.26	1.13 ± 0.33	0.65 ± 0.08	0.65 ± 0.06
<i>Il1a</i>	1.25 ± 0.37	1.33 ± 0.46	0.99 ± 0.22	1.03 ± 0.24
<i>Il1b</i>	1.15 ± 0.26	1.11 ± 0.24	0.71 ± 0.14	0.79 ± 0.14
<i>Il4</i>	1.08 ± 0.19	1.10 ± 0.24	0.70 ± 0.05	0.74 ± 0.06
<i>Il6</i>	1.13 ± 0.25	1.14 ± 0.29	0.51 ± 0.10*	0.53 ± 0.09
<i>Tnf</i>	1.08 ± 0.20	1.13 ± 0.26	0.72 ± 0.04	0.70 ± 0.05
<i>Tgfb1</i>	1.05 ± 0.15	1.03 ± 0.12	0.73 ± 0.04	0.77 ± 0.03*
<i>Nfkb1</i>	1.01 ± 0.06	1.02 ± 0.09	0.88 ± 0.04	0.92 ± 0.03
Oxidative stress-related genes				
<i>Hmox1</i>	1.03 ± 0.11	1.03 ± 0.11	0.76 ± 0.05*	0.76 ± 0.04*
<i>Keap1</i>	1.01 ± 0.05	1.02 ± 0.09	0.95 ± 0.03	0.98 ± 0.04
<i>Nfe2l2</i>	1.02 ± 0.08	1.03 ± 0.12	0.79 ± 0.05*	0.88 ± 0.04
<i>Sod1</i>	1.01 ± 0.05	1.01 ± 0.05	0.93 ± 0.05	0.95 ± 0.05
<i>Sod2</i>	1.01 ± 0.05	1.00 ± 0.04	0.93 ± 0.04	0.94 ± 0.03
<i>Cat</i>	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.04	0.94 ± 0.03	0.96 ± 0.04
<i>Mt1</i>	1.02 ± 0.09	1.02 ± 0.09	0.91 ± 0.07	0.91 ± 0.06
<i>Mt2a</i>	1.02 ± 0.10	1.06 ± 0.18	0.92 ± 0.12	0.86 ± 0.08
<i>Nos2</i>	1.14 ± 0.20	1.16 ± 0.22	0.93 ± 0.17	1.09 ± 0.25
<i>Gpx1</i>	1.01 ± 0.06	1.01 ± 0.07	0.86 ± 0.03*	0.88 ± 0.04
<i>Gpx4</i>	1.02 ± 0.09	1.03 ± 0.11	0.86 ± 0.04	0.88 ± 0.03

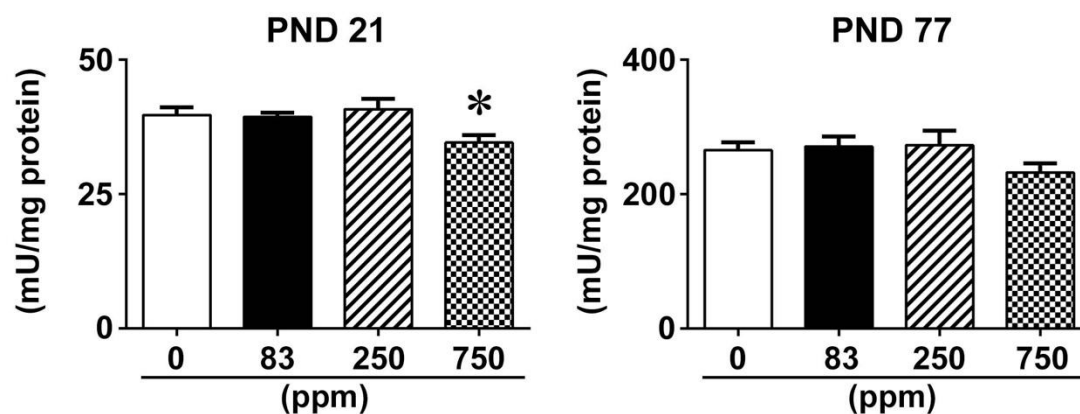
Abbreviations: *Aif1*, allograft inflammatory factor 1 (also known as Iba1: ionized calcium binding adapter protein 1); *Arc*, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; *Bax*, BCL2 associated X, apoptosis regulator; *Bcl2*, BCL2, apoptosis regulator; *Bcl2l1*, Bcl2-like 1; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Casp1*, caspase 1; *Casp3*, caspase 3; *Casp9*, caspase 9; *Cat*, catalase; *Chat*, choline O-acetyltransferase; *Chrna7*, cholinergic receptor nicotinic alpha 7 subunit; *Chrn2*, cholinergic receptor nicotinic beta 2 subunit; *Dcx*, doublecortin; *Dpysl3*,

dihydropyrimidinase-like 3 (also known as TUC4: TOAD-64/Ulip/CRMP protein 4b); *Eomes*, eomesodermin (also known as TBR2: T-box brain protein 2); *Fos*, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Gfap*, glial fibrillary acidic protein; *Gpx1*, glutathione peroxidase 1; *Gpx4*, glutathione peroxidase 4; *Grin2a*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A; *Grin2b*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B; *Grin2d*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D; *Hmox1*, heme oxygenase 1; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; IEG, immediate early gene; IMI, imidacloprid; *Il1a*, interleukin 1 alpha; *Il1b*, interleukin 1 beta; *Il4*, interleukin 4; *Il6*, interleukin 6; *Il10*, interleukin 10; *Keap1*, Kelch-like ECH-associated protein 1; *Mt1*, metallothionein 1; *Mt2a*, metallothionein 2A; *Nes*, nestin; *Nfkb1*, nuclear factor kappa B subunit 1; *Nfe2l2*, NFE2 like bZIP transcription factor 2; *Nos2*, nitric oxide synthase 2; *Pcna*, proliferating cell nuclear antigen; PND, postnatal day; *Ptgs2*, prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (also known as COX2: cyclooxygenase-2); *Pvalb*, parvalbumin; *Rbfox3*, RNA binding fox-1 homolog 3 (also known as NeuN: neuronal nuclei); *Reln*, reelin; *Sod1*, superoxide dismutase 1; *Sod2*, superoxide dismutase 2; *Sox2*, SRY-box transcription factor 2; *Tgfb1*, transforming growth factor, beta 1; *Tnf*, tumor necrosis factor; *Tubb3*, tubulin, beta 3 class III.

^a Mean $\pm$ SEM.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the 0-ppm controls by Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test.

(A) AChE activity



(B) MDA concentration

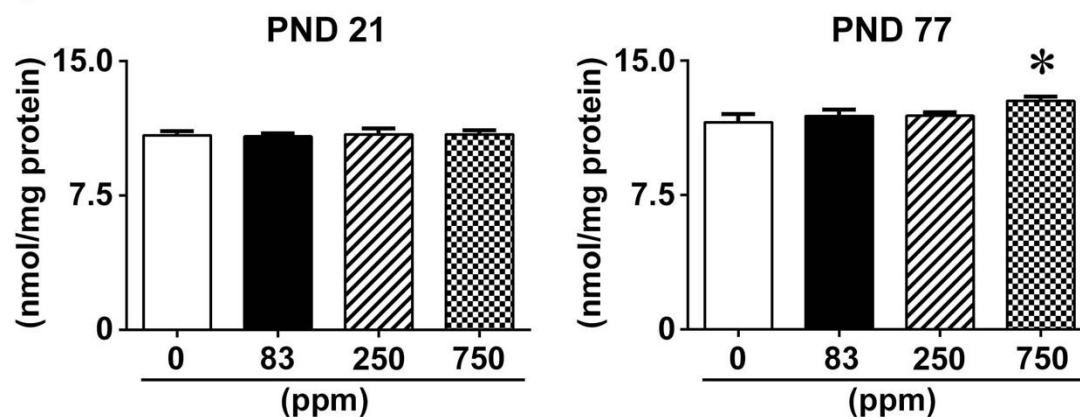


Fig. 21

Acetylcholinesterase (AChE) activities and malondialdehyde (MDA) concentrations in the hippocampus of male offspring on postnatal day (PND) 21 and PND 77 after maternal exposure to imidacloprid (IMI) from gestational day 6 to PND 21. (A) AChE activities on PND 21 (left) and PND 77 (right), or (B) MDA concentrations on PND 21 (left) and PND 77 (right). Values are expressed as mean $\pm$ SEM. $N = 6/\text{group}$. * $P < 0.05$, compared with the 0-ppm controls (0 ppm) by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

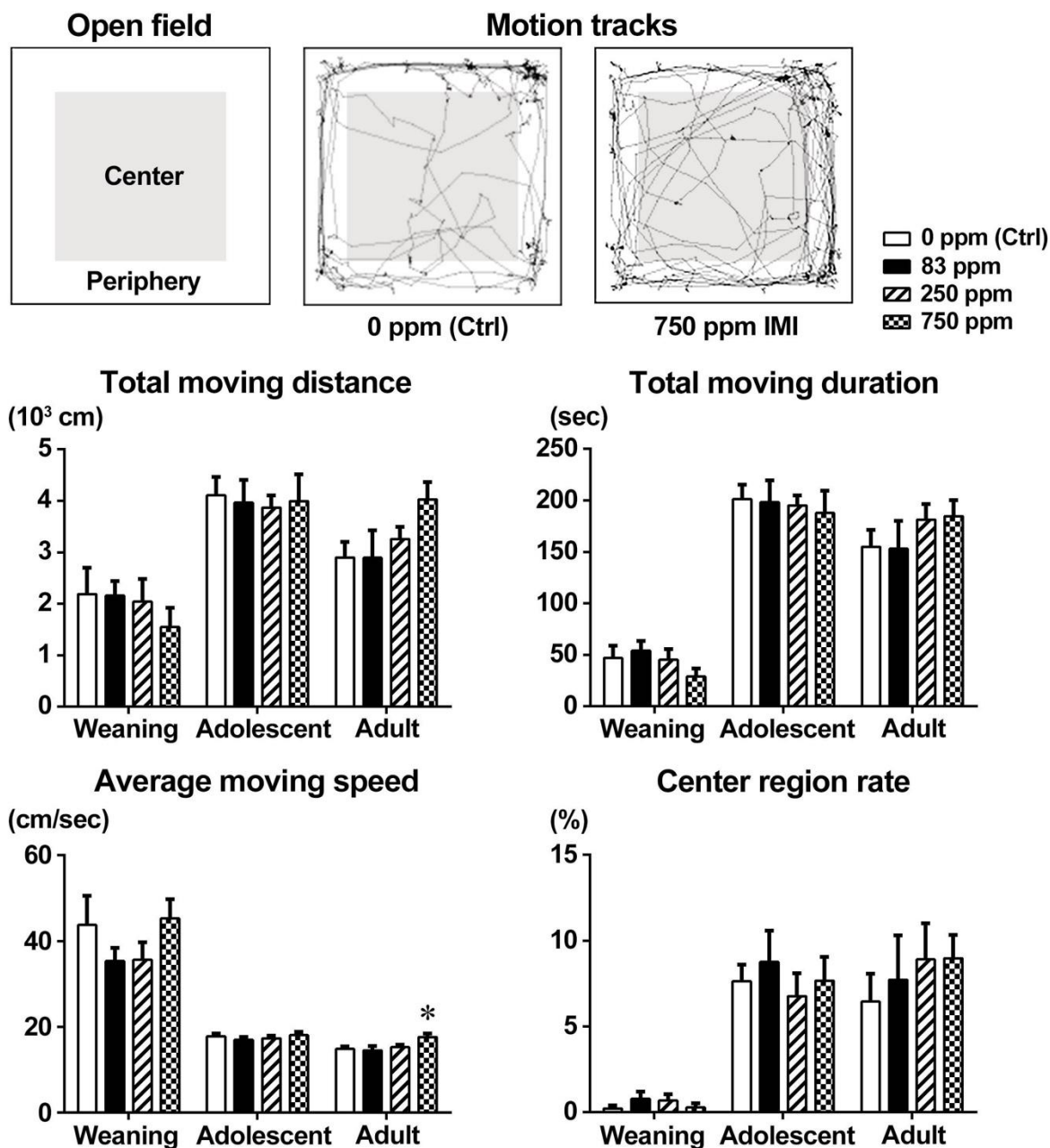
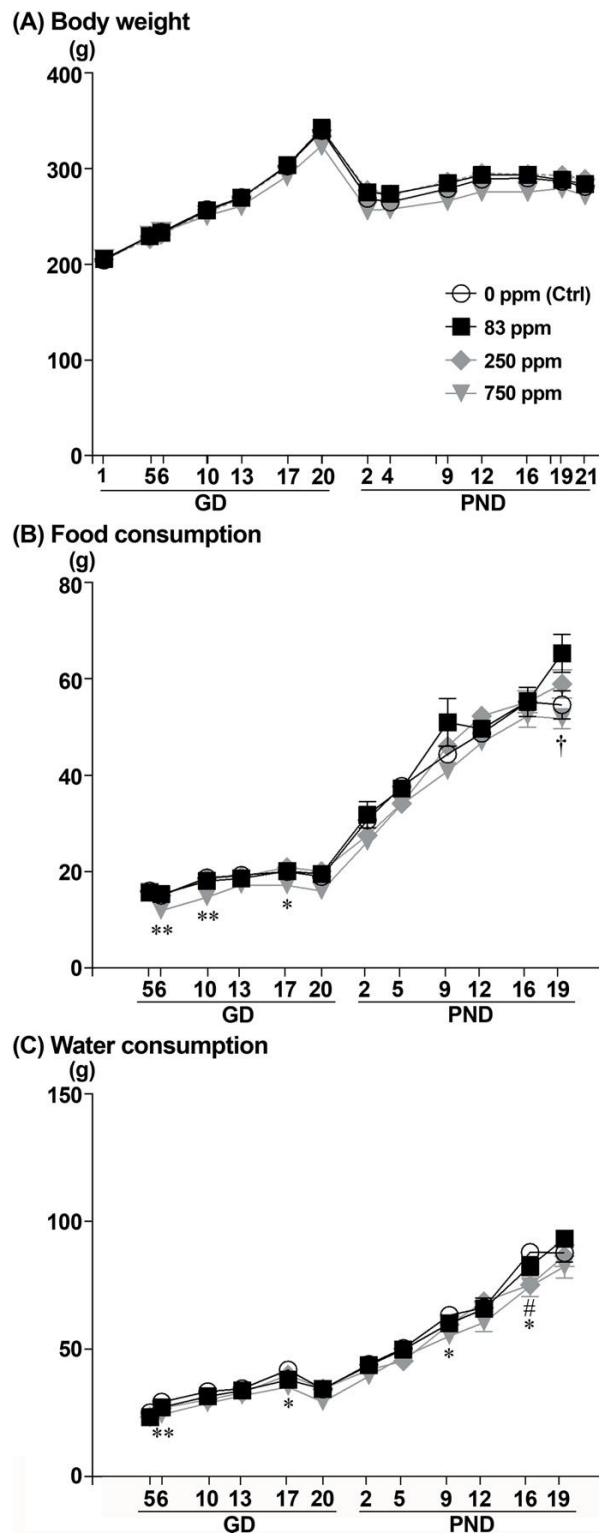


Fig. 22 Open field test in male offspring on postnatal day (PND) 18 (weaning stage), PND 38 (adolescent stage), and PND 62 (adult stage) after maternal exposure to imidacloprid (IMI) from gestational day 6 to PND 21. Upper panel shows representative examples of animal track in the 0-ppm controls and 750-ppm group. Lower panel shows graph data of the total moving distance, total moving duration, average moving speed, and percent of time in the center region. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. N = 10/group. * P < 0.05, compared with the 0-ppm controls (0 ppm) by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with



Bonferroni correction.

Supplementary Fig. 18

Body weight, food and water consumption of dams during the exposure period of imidacloprid (IMI). (A) Body weight, (B) food consumption, and (C) water consumption. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the 0-ppm controls in the 750-ppm IMI group; # $P < 0.05$, compared with the 0-ppm controls in the 250-ppm IMI group; † $P < 0.05$, compared with the 0-ppm controls in the 83-ppm IMI group by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

Supplementary Table 16

Maternal body weight and consumption of food and water in the IMI study

	IMI in diet (ppm)						
	0 (Control)	83		250		750	
No. of dams examined	12	12		10		12	
Gestational day							
Body weight (g)							
GD 1	204.37 ± 4.24 ^a	205.58 ± 5.49	(-1%) ^b	202.51 ± 3.90	(1%)	205.02 ± 5.09	(0%)
GD 5	229.41 ± 4.26	229.55 ± 5.29	(0%)	226.59 ± 4.48	(1%)	229.58 ± 5.19	(0%)
GD 6	233.54 ± 4.50	232.88 ± 5.49	(0%)	231.12 ± 4.60	(1%)	233.41 ± 5.46	(0%)
GD 10	257.11 ± 5.07	256.09 ± 6.29	(0%)	254.44 ± 5.49	(1%)	250.85 ± 5.60	(2%)
GD 13	269.83 ± 5.12	269.65 ± 6.51	(0%)	268.92 ± 5.38	(0%)	260.95 ± 6.05	(3%)
GD 17	302.59 ± 6.23	303.36 ± 8.14	(0%)	302.00 ± 6.32	(0%)	292.13 ± 5.50	(3%)
GD 20	339.69 ± 7.90	341.37 ± 9.85	(0%)	340.14 ± 7.32	(0%)	323.84 ± 8.29	(5%)
Food consumption (g)							
GD 5	16.03 ± 0.65	15.63 ± 0.77	(2%)	15.92 ± 0.64	(1%)	15.83 ± 0.81	(1%)
GD 6	15.08 ± 0.48	15.33 ± 0.69	(-2%)	14.98 ± 0.51	(1%)	11.91 ± 0.51**	(21%)
GD 10	18.72 ± 0.43	18.08 ± 1.07	(3%)	18.64 ± 0.70	(0%)	14.72 ± 0.61**	(21%)
GD 13	19.28 ± 0.59	18.64 ± 0.70	(3%)	19.05 ± 0.69	(1%)	17.27 ± 0.60	(10%)
GD 17	20.05 ± 0.60	20.13 ± 0.63	(0%)	20.90 ± 0.86	(-4%)	17.18 ± 1.19*	(14%)
GD 20	18.97 ± 0.94	19.55 ± 0.68	(-3%)	20.11 ± 0.58	(-6%)	15.98 ± 1.29	(16%)
Water consumption							
GD 5	25.05 ± 1.00	23.29 ± 1.26	(7%)	23.44 ± 0.93	(6%)	22.93 ± 0.92	(8%)
GD 6	29.29 ± 1.05	27.23 ± 1.26	(7%)	26.87 ± 1.00	(8%)	24.29 ± 0.62**	(17%)
GD 10	33.43 ± 1.96	31.44 ± 1.29	(6%)	30.21 ± 1.04	(10%)	28.79 ± 1.02	(14%)
GD 13	34.57 ± 1.05	33.73 ± 1.41	(2%)	32.89 ± 1.61	(5%)	31.76 ± 1.08	(8%)
GD 17	41.87 ± 1.56	37.99 ± 1.27	(9%)	39.87 ± 1.94	(5%)	35.17 ± 2.57*	(16%)
GD 20	34.33 ± 1.72	34.44 ± 1.42	(0%)	34.57 ± 1.40	(-1%)	29.24 ± 2.24	(15%)
Postnatal day							
Body weight (g)							
PND 2	268.76 ± 5.72	275.08 ± 7.09	(-2%)	277.10 ± 6.65	(-3%)	256.38 ± 8.37	(5%)
PND 4	264.97 ± 4.93	273.44 ± 7.02	(-3%)	272.98 ± 6.41	(-3%)	257.71 ± 6.85	(3%)
PND 9	278.95 ± 5.36	284.76 ± 6.69	(-2%)	286.19 ± 6.24	(-3%)	266.39 ± 7.47	(5%)
PND 12	289.01 ± 3.69	293.20 ± 7.13	(-1%)	294.95 ± 7.09	(-2%)	275.98 ± 7.83	(5%)
PND 16	290.09 ± 4.54	293.39 ± 6.50	(-1%)	293.97 ± 6.23	(-1%)	275.58 ± 7.64	(5%)
PND 19	286.67 ± 4.41	288.19 ± 6.57	(-1%)	292.84 ± 6.83	(-2%)	279.16 ± 8.62	(3%)
PND 21	281.20 ± 4.81	283.69 ± 5.24	(-1%)	288.94 ± 5.30	(-3%)	272.13 ± 7.97	(3%)
Food consumption (g)							
PND 2	30.71 ± 1.74	31.79 ± 2.70	(-4%)	27.54 ± 1.67	(10%)	26.17 ± 0.90	(15%)
PND 5	37.74 ± 1.47	37.22 ± 1.11	(1%)	34.16 ± 1.79	(9%)	34.10 ± 1.24	(10%)
PND 9	44.38 ± 1.72	50.98 ± 4.96	(-15%)	46.05 ± 1.85	(-4%)	40.83 ± 1.75	(8%)
PND 12	48.74 ± 1.58	49.61 ± 1.14	(-2%)	52.29 ± 1.45	(-7%)	46.78 ± 1.56	(4%)
PND 16	55.23 ± 3.02	55.32 ± 1.81	(0%)	55.23 ± 2.26	(0%)	52.28 ± 2.35	(5%)
PND 19	54.61 ± 2.95	65.33 ± 3.93*	(-20%)	58.97 ± 2.93	(-8%)	51.75 ± 2.08	(5%)
Water consumption (g)							
PND 2	44.04 ± 1.77	43.70 ± 2.49	(1%)	41.86 ± 2.89	(5%)	39.35 ± 1.64	(11%)
PND 5	50.31 ± 1.79	49.87 ± 1.74	(1%)	45.41 ± 2.01	(10%)	47.02 ± 2.08	(7%)
PND 9	63.27 ± 2.48	60.09 ± 2.09	(5%)	59.66 ± 2.62	(6%)	55.10 ± 2.61*	(13%)
PND 12	66.22 ± 3.70	65.77 ± 2.14	(1%)	68.65 ± 2.75	(-4%)	60.41 ± 3.60	(9%)
PND 16	87.99 ± 2.19	82.54 ± 3.57	(6%)	75.16 ± 3.61*	(15%)	74.59 ± 4.00*	(15%)
PND 19	87.77 ± 3.70	93.31 ± 2.03	(-6%)	86.56 ± 4.27	(1%)	82.46 ± 4.70	(6%)

Abbreviations: GD, gestational day; IMI, imidacloprid; PND, postnatal day.

^a Mean ± SEM.^b (%) decrease compared to 0-ppm controls.**P* < 0.05, ***P* < 0.01, compared with the 0-ppm controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's *t*-test with Bonferroni correction.

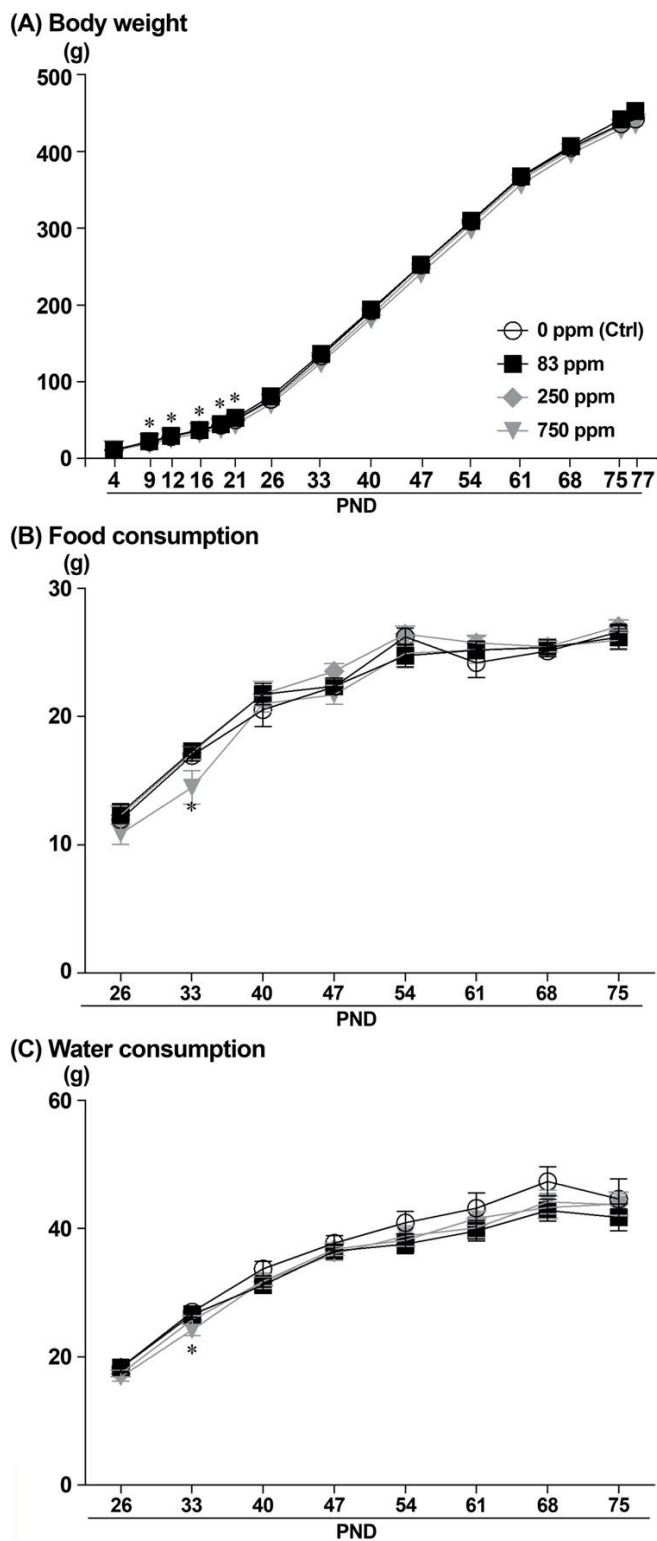
Supplementary Table 17**Maternal reproductive parameters in the IMI study**

	IMI in diet (ppm)			
	0 (Control)	83	250	750
No. of dams examined	12	12	10	12
No. of implantation sites in the uterine horns	13.75 ± 0.98	11.92 ± 2.84	12.70 ± 1.42	12.42 ± 1.38
No. of live offspring	11.75 ± 1.09	12.00 ± 1.95	11.30 ± 2.79	11.92 ± 1.68
Male ratio (%)	34.80 ± 2.99	61.36 ± 4.62**	51.15 ± 12.31**	39.03 ± 21.48

Abbreviation: IMI, imidacloprid.

^a Mean ± SEM.

****** $P < 0.01$, compared with the untreated controls by Dunnett's test or Aspin–Welch's t -test with Bonferroni correction.



Supplementary Fig. 19

Body weight, food and water consumption of male offspring during the exposure period of imidacloprid (IMI). (A) Body weight, (B) food consumption, and (C) water consumption. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$, compared with the 0-ppm controls in the 750-ppm IMI group by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

Supplementary Table 18

Offspring body weight and consumption of food and water in the IMI study

	IMI in diet (ppm)						
	0 (Control)	83		250		750	
Body weight (g)							
PND 4	11.04 ± 0.44 ^a	11.32 ± 0.18	(-3%) ^b	11.11 ± 0.30	(-1%)	10.37 ± 0.37	(6%)
PND 9	21.81 ± 0.48	22.33 ± 0.35	(-2%)	21.61 ± 0.64	(1%)	19.46 ± 0.75*	(11%)
PND 12	28.54 ± 0.49	29.27 ± 0.46	(-3%)	28.35 ± 0.78	(1%)	25.87 ± 1.02*	(9%)
PND 16	36.81 ± 0.68	37.33 ± 0.66	(-1%)	36.32 ± 0.78	(1%)	33.32 ± 1.46*	(9%)
PND 19	43.39 ± 0.73	44.63 ± 0.83	(-3%)	42.72 ± 1.16	(2%)	38.89 ± 1.79*	(10%)
PND 21	50.46 ± 0.85	52.92 ± 0.96	(-5%)	49.73 ± 1.32	(1%)	44.77 ± 1.98*	(11%)
PND 26	77.13 ± 1.08	81.24 ± 1.34	(-5%)	75.06 ± 1.92	(3%)	71.46 ± 3.34	(7%)
PND 33	133.47 ± 2.05	136.50 ± 2.85	(-2%)	128.71 ± 2.89	(4%)	124.73 ± 4.89	(7%)
PND 40	192.30 ± 2.94	194.13 ± 3.93	(-1%)	186.93 ± 4.01	(3%)	182.52 ± 5.76	(5%)
PND 47	252.19 ± 4.19	252.44 ± 5.58	(0%)	247.54 ± 4.85	(2%)	241.13 ± 7.03	(4%)
PND 54	308.70 ± 4.74	309.88 ± 6.81	(0%)	305.76 ± 5.44	(1%)	298.66 ± 8.18	(3%)
PND 61	366.43 ± 5.70	367.67 ± 8.29	(0%)	363.24 ± 6.53	(1%)	357.21 ± 9.73	(3%)
PND 68	404.76 ± 5.70	407.14 ± 9.04	(-1%)	402.12 ± 6.95	(1%)	397.17 ± 10.69	(2%)
PND 75	435.53 ± 6.38	441.76 ± 10.13	(-1%)	433.93 ± 7.38	(0%)	429.05 ± 11.97	(1%)
PND 77	441.87 ± 4.48	452.79 ± 7.50	(-2%)	444.70 ± 5.80	(-1%)	435.64 ± 8.44	(1%)
Food consumption (g)							
PND 26	11.97 ± 0.32	12.49 ± 0.73	(-4%)	12.32 ± 0.71	(-3%)	10.87 ± 0.84	(9%)
PND 33	16.96 ± 0.41	17.31 ± 0.40	(-2%)	17.19 ± 0.42	(-1%)	13.76 ± 1.54*	(19%)
PND 40	18.26 ± 2.56	21.76 ± 0.81	(-19%)	21.77 ± 0.96	(-19%)	21.01 ± 0.64	(-15%)
PND 47	22.34 ± 0.32	22.37 ± 0.64	(0%)	23.55 ± 0.59	(-5%)	21.70 ± 0.74	(3%)
PND 54	26.23 ± 0.67	24.76 ± 0.89	(6%)	26.44 ± 0.62	(-1%)	24.94 ± 1.14	(5%)
PND 61	24.21 ± 1.16	25.19 ± 0.68	(-4%)	25.76 ± 0.57	(-6%)	25.20 ± 1.02	(-4%)
PND 68	25.11 ± 0.44	25.40 ± 0.58	(-1%)	25.46 ± 0.41	(-1%)	25.44 ± 0.64	(-1%)
PND 75	26.60 ± 0.59	26.19 ± 0.91	(2%)	27.05 ± 0.48	(-2%)	25.96 ± 0.78	(2%)
Water consumption (g)							
PND 26	18.36 ± 0.62	18.32 ± 0.76	(0%)	17.40 ± 0.48	(5%)	16.89 ± 0.70	(8%)
PND 33	27.01 ± 0.92	26.60 ± 0.75	(2%)	25.76 ± 0.58	(5%)	23.82 ± 1.03*	(12%)
PND 40	33.74 ± 1.13	31.23 ± 1.04	(7%)	31.77 ± 0.65	(6%)	31.79 ± 1.11	(6%)
PND 47	37.77 ± 1.15	36.52 ± 1.04	(3%)	36.80 ± 1.00	(3%)	36.10 ± 1.09	(4%)
PND 54	40.92 ± 1.73	37.61 ± 1.53	(8%)	38.20 ± 0.95	(7%)	38.83 ± 1.57	(5%)
PND 61	43.19 ± 2.39	39.64 ± 1.59	(8%)	41.60 ± 1.10	(4%)	40.13 ± 1.50	(7%)
PND 68	47.34 ± 2.27	42.86 ± 1.70	(9%)	43.30 ± 1.77	(9%)	44.19 ± 1.85	(7%)
PND 75	44.61 ± 3.11	41.74 ± 2.06	(6%)	43.87 ± 1.87	(2%)	43.73 ± 1.65	(2%)

Abbreviation: IMI, imidacloprid; PND, postnatal day.

^a Mean ± SEM.^b (%) decrease compared to 0-ppm controls.**P* < 0.05, compared with the 0-ppm controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's *t*-test with Bonferroni correction.

Supplementary Table 19**Body and brain weights of offspring at necropsies on PND 21 and PND 77 in the IMI study**

	IMI in diet (ppm)			
	0 (Control)	83	250	750
PND 21				
No. of offspring examined	51	75	56	58
Body weight (g)	50.46 ± 0.85 ^a	52.92 ± 0.96	49.73 ± 1.32	44.77 ± 1.98*
No. of offspring examined	7	10	7	8
Brain weight (g)	1.49 ± 0.06	1.53 ± 0.04	1.51 ± 0.08	1.46 ± 0.10
PND 77				
No. of offspring examined	23	28	27	28
Body weight (g)	441.87 ± 4.48	452.79 ± 7.50	444.70 ± 5.80	435.64 ± 8.44
No. of offspring examined	7	8	8	8
Brain weight (g)	2.06 ± 0.02	2.07 ± 0.03	2.01 ± 0.03	2.06 ± 0.01

Abbreviation: IMI, imidacloprid; PND, postnatal day.

^a Mean ± SEM.

* $P < 0.05$, compared with the untreated controls by Dunnett's test or Aspin–Welch's t -test with Bonferroni correction.

Supplementary Table 20

Number of immunoreactive or TUNEL⁺ cells in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on PND 21 in the IMI study

	IMI in diet (ppm)			
	0 (Controls)	83	250	750
No. of animals examined	10	10	10	10
Granule cell lineage subpopulations in the SGZ/GCL (No./mm SGZ length)				
GFAP	3.86 ± 0.36 ^a	3.23 ± 0.34	3.73 ± 0.38	4.09 ± 0.42
SOX2	26.62 ± 2.02	22.68 ± 1.96	23.5 ± 1.67	23.69 ± 2.32
TBR2	4.56 ± 0.43	4.08 ± 0.58	3.66 ± 0.39	4.11 ± 0.46
DCX	124 ± 5.31	110.54 ± 4.64	116.51 ± 5.12	102.72 ± 5.88*
TUBB3	91.15 ± 6.4	75.84 ± 6.51	75.31 ± 8.59	66.45 ± 4.81*
NeuN	528.48 ± 24.87	519.08 ± 18.84	523.06 ± 25.36	532.32 ± 23.43
GABAergic interneuron subpopulations in the DG hilus (No./mm ² hilar region)				
PVALB	23.87 ± 3.8	19.88 ± 4.16	23.88 ± 4.36	20.90 ± 3.49
RELN	84.99 ± 3.43	73.19 ± 3.9	82.04 ± 6.51	65.41 ± 4.51*
SST	64.01 ± 4.52	64.14 ± 3.55	67.2 ± 3.87	73.74 ± 3.08
GAD67	93.15 ± 5.37	88.03 ± 4.45	90.81 ± 4.38	94.70 ± 4.01
Synaptic plasticity-related IEGs in the GCL (No./mm SGZ length)				
ARC	4.04 ± 0.68	3.80 ± 0.52	3.31 ± 0.50	3.88 ± 0.51
FOS	6.51 ± 0.73	5.13 ± 0.83	4.35 ± 0.44	4.10 ± 0.39*
COX2	32.62 ± 2.54	29.54 ± 2.18	27.82 ± 1.26	26.52 ± 2.40
p-ERK1/2	0.96 ± 0.23	0.71 ± 0.25	0.49 ± 0.14	0.21 ± 0.12*
Cell proliferation and apoptosis in the SGZ/GCL (No./mm SGZ length)				
PCNA in the SGZ	5.07 ± 0.51	5.01 ± 0.92	3.97 ± 0.41	2.98 ± 0.26*
TUNEL in the SGZ	0.99 ± 0.20	0.86 ± 0.15	0.85 ± 0.10	1.08 ± 0.20
TUNEL in the GCL	0.99 ± 0.20	0.86 ± 0.15	0.85 ± 0.10	1.08 ± 0.20
Astrocytes and microglia in the DG hilus (No./mm ² hilar region)				
GFAP	417.57 ± 20.52	424.31 ± 14.22	467.21 ± 23.85	492.15 ± 13.25*
Iba1	68.36 ± 2.88	75.33 ± 4.23	73.73 ± 3.07	86.94 ± 2.30**
CD68	16.24 ± 2.04	25.5 ± 3.09*	24.78 ± 2.10*	24.64 ± 2.19*
CD163	8.41 ± 1.48	11.15 ± 1.83	6.82 ± 0.80	8.33 ± 1.32

Abbreviations: ARC, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; CD68, cluster of differentiation 68; CD163, cluster of differentiation 163; COX2, cyclooxygenase 2; DCX, doublecortin; FOS, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; GAD67, glutamic acid decarboxylase 67; GCL, granule cell layer; GFAP, glial fibrillary acidic protein; Iba1, ionized calcium-binding adaptor molecule 1; IEGs, immediate-early genes; IMI, imidacloprid; NeuN, neuronal nuclei; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; p-ERK1/2, phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2; PND, postnatal day; PVALB, parvalbumin; RELN, reelin; SGZ, subgranular zone; SOX2, SRY-box transcription factor 2; SST, somatostatin; TBR2, T-box brain protein 2; TUBB3, tubulin, beta 3 class III (also known as Tuj-1); TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling.

^a Mean ± SEM.

P* < 0.05, *P* < 0.01, compared with the untreated controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's *t*-test with Bonferroni correction.

Supplementary Table 21

Number of immunoreactive or TUNEL⁺ cells in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on PND 77 or PND 79 in the IMI study^a

	IMI in diet (ppm)			
	0 (Controls)	83	250	750
No. of animals examined	10	10	10	10
Granule cell lineage subpopulations in the SGZ/GCL (No./mm SGZ length)				
GFAP	5.76 ± 0.58 ^b	4.44 ± 0.50	3.54 ± 0.31**	4.21 ± 0.28*
SOX2	16.92 ± 0.92	16.67 ± 0.83	15.63 ± 0.88	16.11 ± 0.84
TBR2	2.76 ± 0.36	2.28 ± 0.35	2.56 ± 0.19	2.71 ± 0.34
DCX	14.57 ± 1.08	17.25 ± 1.19	12.96 ± 0.82	14.53 ± 1.13
TUBB3	18.01 ± 1.66	20.24 ± 1.74	16.31 ± 1.52	18.22 ± 1.68
NeuN	607.82 ± 7.96	574.95 ± 13.08	561.33 ± 7.35**	534.83 ± 11.89**
GABAergic interneuron subpopulations in the DG hilus (No./mm ² hilar region)				
PVALB	14.16 ± 2.34	12.18 ± 0.97	15.65 ± 1.74	14.24 ± 2.45
RELN	43.76 ± 2.67	42.01 ± 2.13	46.40 ± 3.11	40.56 ± 2.31
SST	38.66 ± 4.45	49.43 ± 5.30	50.31 ± 5.87	45.77 ± 4.55
GAD67	21.32 ± 2.16	21.55 ± 1.67	21.73 ± 1.72	21.83 ± 2.67
Synaptic plasticity-related proteins in the GCL (No./mm SGZ length)				
ARC	5.59 ± 0.71	5.82 ± 0.96	6.64 ± 0.54	6.17 ± 0.69
FOS	7.27 ± 0.65	8.09 ± 1.27	7.59 ± 1.20	7.55 ± 0.98
COX2	38.40 ± 3.39	41.24 ± 3.20	41.34 ± 2.02	41.97 ± 2.74
p-ERK1/2	1.26 ± 0.41	1.33 ± 0.57	1.91 ± 0.55	2.07 ± 0.52
Cell proliferation and apoptosis in the SGZ/GCL (No./mm SGZ length)				
PCNA in the SGZ	2.57 ± 0.35	3.00 ± 0.60	2.55 ± 0.47	2.53 ± 0.36
TUNEL in the SGZ	0.03 ± 0.02	0.22 ± 0.08	0.24 ± 0.10	0.26 ± 0.08*
TUNEL in the GCL	0.07 ± 0.04	1.05 ± 0.72	0.72 ± 0.37	0.69 ± 0.26
Astrocytes and microglia in the DG hilus (No./mm ² hilar region)				
GFAP	288.49 ± 14.39	256.54 ± 14.25	302.28 ± 15.19	292.81 ± 14.16
Iba1	67.34 ± 4.04	71.07 ± 3.18	64.96 ± 4.76	75.97 ± 5.86
CD68	11.83 ± 1.55	14.78 ± 1.79	12.52 ± 1.23	18.18 ± 2.14*
CD163	8.30 ± 0.72	7.94 ± 0.58	7.47 ± 0.86	8.43 ± 1.11

Abbreviations: ARC, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; CD68, cluster of differentiation 68; CD163, cluster of differentiation 163; COX2, cyclooxygenase 2; DCX, doublecortin; FOS, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; GAD67, glutamic acid decarboxylase 67; GCL, granule cell layer; GFAP, glial fibrillary acidic protein; Iba1, ionized calcium-binding adaptor molecule 1; IEG, immediate-early gene; IMI, imidacloprid; NeuN, neuronal nuclei; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; p-ERK1/2, phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2; PND, postnatal day; PVALB, parvalbumin; RELN, reelin; SGZ, subgranular zone; SOX2, SRY-box transcription factor 2; SST, somatostatin; TBR2, T-box brain protein 2; TUBB3, tubulin, beta 3 class III (also known as Tuj-1); TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling.

^a Synaptic plasticity-related proteins were immunohistochemically examined using animals of behavioral test groups euthanized on PND 79. Other marker antigens were immunohistochemically examined using animals euthanized on PND 77 without subjected to behavioral tests.

^b Mean ± SEM.

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

Supplementary Table 22**Levels of acetylcholinesterase activity and malondialdehyde in the hippocampus of male offspring on PND 21 and PND 77 in the IMI study**

		IMI in diet (ppm)			
		0 (Control)	83	250	750
PND 21					
	No. of offspring examined	6	6	6	6
	MDA concentration (nmol/mg tissue protein)	10.86 ± 0.23 ^a	10.80 ± 0.17	10.90 ± 0.33	10.91 ± 0.22
	AchE activity (mU/mg tissue protein)	39.69 ± 1.42	39.37 ± 0.78	40.79 ± 1.90	34.55 ± 1.40*
PND 77					
	No. of offspring examined	6	6	6	6
	MDA concentration (nmol/mg tissue protein)	11.55 ± 0.45	11.90 ± 0.37	11.92 ± 0.19	12.74 ± 0.25*
	AchE activity (mU/mg tissue protein)	261.49 ± 9.72	263.84 ± 14.44	267.10 ± 20.19	225.55 ± 13.67

Abbreviations: AchE, acetylcholinesterase; IMI, imidacloprid; MDA, malondialdehyde; PND, postnatal day.

^a Mean ± SEM.**P* < 0.05, compared with the untreated controls by Dunnett's test or Aspin–Welch's *t*-test with Bonferroni correction.

Supplementary Table 23
Changes in open field test of male offspring in the IMI study

	IMI in diet (ppm)			
	0 (Control)	83	250	750
Weaning stage (PND 18)				
No. of offspring examined	10	10	10	10
Total moving distance (10 ³ cm)	2.19 ± 0.51 ^a	2.16 ± 0.28	2.04 ± 0.45	1.55 ± 0.37
Total moving duration (sec)	46.95 ± 11.94	54.06 ± 9.52	45.22 ± 10.34	29.06 ± 7.70
Average moving speed (cm/sec)	43.77 ± 6.80	35.40 ± 3.05	35.66 ± 4.04	45.27 ± 4.46
Center region rate (%)	0.23 ± 0.17	0.79 ± 0.42	0.70 ± 0.35	0.28 ± 0.24
Adolescent stage (PND 38)				
No. of offspring examined	10	10	10	10
Total moving distance (10 ³ cm)	4.11 ± 0.35	3.97 ± 0.44	3.87 ± 0.24	4.00 ± 0.52
Total moving duration (sec)	201.33 ± 14.10	198.44 ± 20.90	195.14 ± 9.88	187.78 ± 21.57
Average moving speed (cm/sec)	17.85 ± 0.63	16.98 ± 0.65	17.31 ± 0.61	18.10 ± 0.82
Center region rate (%)	7.63 ± 0.96	8.78 ± 1.81	6.76 ± 1.34	7.67 ± 1.38
Adult stage (PND 62)				
No. of offspring examined	10	10	10	10
Total moving distance (10 ³ cm)	2.90 ± 0.30	2.90 ± 0.53	3.26 ± 0.23	4.03 ± 0.38
Total moving duration (sec)	155.10 ± 16.12	153.14 ± 27.18	181.41 ± 15.15	184.68 ± 15.58
Average moving speed (cm/sec)	14.86 ± 0.56	14.55 ± 0.98	15.28 ± 0.56	17.63 ± 0.87*
Center region rate (%)	6.45 ± 1.63	7.72 ± 2.60	8.91 ± 2.10	8.97 ± 1.36

Abbreviations: IMI, imidacloprid; PND, postnatal day.

^a Mean ± SEM.

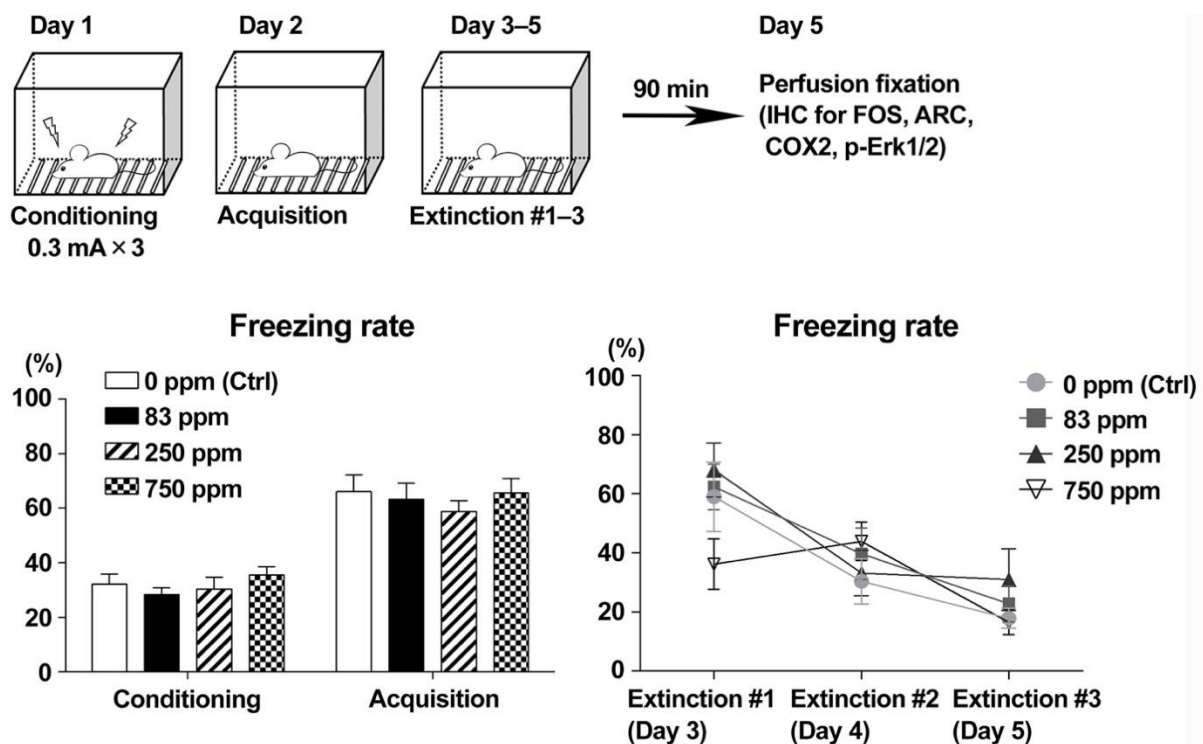
**P* < 0.05, compared with the untreated controls by Dunnett's test or Aspin–Welch's *t*-test with Bonferroni correction.

Supplementary Table 24**The alteration in spatial short-term memory in Y-maze test of male offspring on PND 27 in the IMI study**

	IMI in diet (ppm)			
	0 (Control)	83	250	750
No. of offspring examined	10	10	10	10
Alternation rate (%)	57.51 ± 3.60 ^a	57.82 ± 7.21	57.02 ± 5.24	46.48 ± 5.34
Total arm entries	17.20 ± 1.92	15.30 ± 1.70	15.80 ± 1.21	23.40 ± 3.56

Abbreviations: IMI, imidacloprid; PND, postnatal day.

^a Mean ± SEM.



Supplementary Fig. 20

Contextual fear conditioning test of male offspring during the period from postnatal day (PND) 75 until PND 79 after maternal exposure to imidacloprid (IMI) from gestational day 6 to PND 21. Graphs show the rate of the freezing time in the fear conditioning, fear acquisition and fear extinction in animals of untreated controls (0 ppm) and each exposure group. Upper panel shows the summary of experimental design. Lower panel shows the rate of the freezing time in the fear acquisition and fear conditioning, or the rate of the freezing time in the day 1, day 2 and day 3 extinction trials. Values are expressed as the mean + SEM. N = 10/group.

Supplementary Table 25**Changes in contextual fear conditioning test of male offspring in the IMI study**

	IMI in diet (ppm)			
	0 (Control)	83	250	750
Adult stage (PND 75-79)				
No. of offspring examined	10	10	10	10
Freezing rate (%)				
Fear conditioning	32.24±3.55 ^a	28.39±2.44	30.41±4.19	35.57±2.88
Fear acquisition	65.93±6.20	63.24±5.86	58.73±3.92	65.50±5.32
Fear extinction #1	59.03±11.74	62.37±7.77	68.11±9.16	36.24±8.47
Fear extinction #2	30.45±7.70	39.70±8.69	33.22±7.70	43.91±6.47
Fear extinction #3	17.99±3.46	22.90±6.08	31.03±10.43	16.59±4.17

Abbreviations: IMI, imidacloprid; PND, postnatal day.

^a Mean ± SEM.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
（課題番号：22KD1002）
令和4-6年度総合報告書

AI支援型MPSを用いたヒトiPS由来神経細胞による神経毒性試験法の開発
研究代表者 安彦行人 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 室長
分担課題：化学構造によるグルーピング及びリードアクロスによる神経毒性のin silico予測

研究分担者：吉成浩一 静岡県立大学 教授

研究要旨

化学物質の神経毒性や発達神経毒性（DNT）を動物実験で評価するには多大なコストと時間を要する。また、近年動物福祉の観点から、実験動物を用いた安全性試験の代替法の開発が求められている。そこで本研究では、インシリコ手法を活用したDNT及び神経毒性の予測手法の開発を目指した。まず、DNTに関する文献情報をもとに361物質からなるデータセットを構築した。これらを用いた解析の結果、化学構造情報（分子記述子）を利用した化学物質間の類似性評価に基づくリードアクロスにより、化学構造からある程度の精度でDNTを予測できることが示唆された。一方で、使用したデータセット内物質の毒性評価の不確実性が予測結果に大きな影響を与えていることも明らかになった。そこでより毒性情報の精度が高い食品安全委員会が公開している農薬評価書のラット90日間反復投与毒性試験結果を利用して350物質のデータセットを構築し、コリンエステラーゼ活性阻害関連所見や神経毒性と関連する外観・行動変化を対象として分子記述子と生物活性予測値を利用したリードアクロスを行った。その結果、神経毒性と関連するエンドポイントのリードアクロスを利用した予測においては、化学構造情報に加えて適切な数の生物活性予測値を変数として利用することが有用であることが示唆された。さらに、DNTのデータセットを利用した解析により、新たなインシリコDNTリスク予測手法を考案した。本手法は、類似物質数、類似性の高さ、並びにその組み合わせにより、被験物質のDNTリスクをランク付けすることが可能であった。

A. 研究目的

化学物質の神経毒性や発達神経毒性（DNT）を動物実験で評価するには多大なコストと時間を要する。また、近年動物福祉の観点から、実験動物を用いた安全性試験の代替法の開発が求められている。しかし、DNTに関しては、公的に利用可能な毒性試験データベースがないことなどの理由から研究が遅れている。そこで我々は、DNT評価におけるインシリコ手法の有用性を提案するために、既存情報からDNT予測のためのデータセットを構築し、DNTを示す物質のグルーピング解析やリードアクロス手法によるDNT評価手法の開発に向けた基礎検討を行ってきた。本研究では、化学構造情報を数値化した分子記述子を利用して化学物質の類似性を評価し、その結果に基づいたグルーピングやリードアクロスを行い、使用する分子記述子の種類、毒性予測に利用する類似物質の数などの検討を行った。さらに、食品安全委員会が公開されている農薬評価書を利用して異なるデータセットを作成し、分子記述子を利用したリードアクロスの予測性、並びに生物活性情報の追加が予測精度に与える影響を解析した。他方、これらのデータベースを活用して、DNTリスクが高い物質を化学構造情報からインシリコ手法で簡便にスクリーニングする方法の開発を試みた。

B. 研究方法

1) 文献情報を利用した解析

データセット：文献（*Neurotoxicol Teratol*, 52:25-35, 2015）から、DNTを示す物質及びDNT情報がない物

質を選択し、前者を「DNT陽性物質」（164物質）、後者を「DNT不明物質」（197物質）として使用した。データセットのDNT陽性率は0.454である。

分子記述子：alvaDescソフトウェア（Alvascience, ver 2.0）を利用して分子記述子を計算した。解析には、搭載されている33ブロックに分類された5,666記述子のうち、化学構造との関連を理解しやすい6ブロック（Constitutional indices、Ring descriptors、P_VSA-like descriptors、Functional group counts、Atom-centred fragments、Molecular properties）に含まれ、被験物質で計算可能であった376記述子（セットA：6b all）を解析に利用した。また、これらから以下の方法でさらに選択した。セットB～D：セットAの分子記述子のうち、相関係数の閾値を0.99、0.95又は0.90に設定し、相関する分子記述子ペアの片方を削除したセットをそれぞれセットB（ $r < 0.99$ 、311種）、セットC（ $r < 0.95$ 、288種）、セットD（ $r < 0.90$ 、261種）とした。セットE～G：376種について、DNT陽性物質と陰性物質の間でWelchのt検定を行い、得られたp値が0.2、0.1、0.05であった分子記述子のセットをそれぞれセットE（ $p < 0.2$ 、173種）、セットD（ $p < 0.1$ 、129種）、セットG（ $p < 0.05$ 、81種）とした。

リードアクロス：各分子記述子を最大値が1、最小値が0となるように標準化したのち、物質間のユークリッド距離を計算した。物質間距離は理論上の最大距離（使用した分子記述子数の平方根）で除して相対距離とした。本解析では、データセット内の全物質を被験物質として解析に用いた。リードアクロスと予測精度の算出の概略は以下の通りである。ある物質（予測対象物

質/被験物質)について、残りの360物質から相対距離が近い順に一定数の物質を選択して「ソース物質」とし、ソース物質におけるDNT陽性物質の割合がデータセットの陽性率(0.454)より大きかった場合に被験物質を陽性と判定し、小さかった場合は陰性と判定した。これらの予測を全361物質で実施し、361物質の感度、特異度、一致率及びbalanced accuracy (BA、感度と特異度の平均値)を算出した。

2) 農薬評価書を利用した解析

データセット: 食品安全委員会により公開されている農薬評価書のラット90日間反復投与毒性試験を基に構築した独自のデータベースに含まれる350農薬を利用した。

評価対象エンドポイント: 本研究では、脳、赤血球、血中のコリンエステラーゼ (ChE) 活性低下をまとめたグループエンドポイント (gEP) (CE01と定義)、並びに神経毒性と関連すると考えられる外観・行動の33所見をまとめたgEP (NV01と定義)の2つを評価対象とした(表1)。これらの陽性物質数(陽性率)はそれぞれ35農薬(10.0%)及び59農薬(16.9%)であった。

化学物質の類似性評価: 分子記述子はalvaDesc、生物活性予測値はPASSソフトウェア(geneXplain社、ver. 2022Standard)を利用して計算した。これらの値は最大値が1、最小値が0となるように正規化した。相対距離の計算は前述の通り行った。

リードアクロスの実施: 350物質から1物質を予測対象物質(被験物質)として選択し、残りの物質をソース物質の候補物質とする解析を全350農薬について実施した。毒性判定は、以下に示したWeighted sum (WS) ruleを用いて行った。なお、近傍物質数(k)は先行研究に従い、350の平方根の最大奇数である17とした。

- 1) k -近傍物質に対する近傍スコアを次式で算出した。
(近傍スコア) = $1/\log_2(1+k)$
- 2) 陽性スコアと陰性スコアをそれぞれ第1近傍から第17近傍に対するスコアの和(総陽性スコア及び総陰性スコア)として算出した。
- 3) 得られた総陽性スコアと総陰性スコアから、下式により毒性判定スコアを算出し、これらの値がデータベース全体の陽性率を上回った場合、被験物質をgEP陽性と判定した。
(毒性判定スコア) = 総陽性スコア / (総陽性スコア + 総陰性スコア)
- 4) 350物質の判定結果について感度、特異度、BAを予測精度の指標として算出した。

3) DNTリスクのインシリコスクリーニング手法の開発

データセット: 1) で使用した「DNT陽性物質」(164物質)及び「DNT陰性物質」(197物質)を使用し、後者を「DNT不明物質」と再定義した。

化学物質の類似性評価: 1) で用いたalvaDescソフトウェアの計算値を使用した。各分子記述子について、最大値が1、最小値が0となるように正規化したのち、物質間のユークリッド距離を計算した。物質間距離は理論上の最大距離(使用した分子記述子数の平方根)で除して相対距離とした。

C. 研究結果

1) 文献情報を利用した解析

(解析1) AからGの7つの分子記述子セットを利用して全物質間の相対距離をそれぞれ算出し、各物質について近傍の1、4、6、8、10、12、14又は16物質をソース物質として毒性判定を行った。その結果、全分子記述子(セットA)を用いた場合、10~14物質をソース物質

とした際に、感度と特異度の差が小さく、比較的精度の高い予測結果が得られた。相関係数に基づいて関連性の高い分子記述子を削減した場合は、BAに大きな変化は認められなかったが、削減数が増えると感度と特異度の差が大きくなり、BAが低下するケースも認められた(セットB~D)。DNTとの関連性により分子記述子を選択した場合は(セットE~G)、8又は10物質をソース物質とした際に0.65を超えるBAが得られ、これはセットAからEで得られた値よりも高かった。ソース物質数を増やすと、特異度は上昇したが、感度が著しく低下した。以上の結果より、毒性学的に関連性の高い分子記述子を選択して使用することで、リードアクロスの精度が向上すること、またソース物質数を10物質程度とすることで感度と特異度のバランスがよい精度が得られることが示された。

(解析2) ソース物質数を固定した解析では、被験物質と近傍物質の距離が考慮されず、それほど類似性が高くない物質もソース物質に含まれてしまう。そこで次に、一定距離内にソース物質が存在しない物質を解析対象外として予測精度を算出した。具体的には、上記と同様に近傍10物質をソース物質として選択し、最も遠い10番目の物質が設定した閾値内に含まれる場合にのみリードアクロスによる評価を行い、閾値内に含まれない場合には解析対象外として精度の算出から除外した。全376分子記述子を利用した場合(セットA)、閾値の設定によりBAは0.05程度上昇した。閾値を狭くすることで10種のソース物質が閾値内に含まれない解析対象外物質数が増え、特異度の上昇は認められたが、感度が低下し、BAや一致率に大きな変化は認められなかった。相関性に基づいて削除した分子記述子セットを用いた場合(セットB~E)も全分子記述子を用いた場合とほぼ同様の結果が得られた。一方、DNTと関連がある分子記述子セット(セットE~G)を利用した場合には、「 $p<0.2$ 」セットで閾値の設定により特異度が上昇し、その結果BAも0.02程度上昇したが、その他のセットでは顕著な上昇は認められなかった。以上の結果から、閾値の設定の効果が認められる分子記述子セットは、解析1とは異なることが明らかになった。

(解析3) 毒性予測においては感度と特異度のバランスが重視されるが、DNTの毒性学的な重要性を考えると、偽陰性が少ない予測手法が必要かもしれない。そこで次に、ソース物質数を10に固定し、判定基準を「データセットの陽性率(0.454)以上で陽性」から「10物質中 n 物質の陽性物質が存在すれば陽性」に変更し、 n を1から10まで1ずつ変化させて予測精度を算出した。その結果、解析1で最も良い精度が認められたセットG($p<0.05$)の分子記述子を用いた場合での結果を見ると、ソース物質10物質中1、2又は3物質以上が存在した場合を陽性と判断する条件において、感度がそれぞれ0.98、0.96、0.90と高い値を示した。このときの特異度はそれぞれ0.06、0.20、0.32であった。

(解析4) 予測結果の詳細を確認すると共に、分子記述子セットG($p<0.05$)の選択による予測精度向上の理由を解析することを目的として、データセットのDNT陽性物質、陰性物質それぞれについて、セットA及びGの分子記述子を用いた場合のソース物質10物質中の陽性物質数を調べた。その結果、多少のゆがみはあるが、正規分布曲線に近い形状のヒストグラムが得られた。DNT陽性物質について見ると、セットA(6b a11)とセットG($p<0.05$)では、感度はともに0.63程度と変わらなかったが、陽性物質が7物質以上であった物質数は、セットGではセットAの37物質から42物質に増加していた。予測結果が一致しなかった物質については、いず

れの記述子セットにおいても陽性物質数が3または4である物質が多かった。

DNT陰性物質について見ると、セットAに比べてセットGの分子記述子を用いた場合の特異度が0.60から0.69に大きく上昇したと一致して、ヒストグラムが全体的に左側にシフトしていた。特に、ソース物質10物質中、陽性物質が1物質以下しか含まれない被験物質数は、15（セットA）から40（セットG）に大きく増加した。

予測が難しい物質の特徴を明らかにするために、セットG ($p < 0.05$) の分子記述子を用いた場合に、ソース物質に陽性物質が0または1物質しか含まなかった陽性物質並びに陽性物質が8物質含まれた陰性物質を抽出し、それらの化学構造を確認した。陽性物質では比較的単純な構造を有する物質がほとんどであったのに対し、陰性物質では構造が複雑で分子量の大きな物質が多く含まれていた。

以上の結果より、本研究で用いた手法において、少なくともソース物質を10物質とした場合には、DNT陽性物質、陰性物質共に大きく予測が外れている物質はそれほど多くないことが明らかになった。さらに、DNTと関連した分子記述子を選択することで、陽性物質同士の距離を縮める効果はあまり認められないが、陰性物質と陽性物質の距離が離れ、陰性物質同士の距離が近くなると考えられた。また、化学構造が比較的小さい、または大きい物質の予測が困難であることが示された。

【解析5】 解析4で示唆された「DNTと関連した分子記述子を選択することで陰性物質同士の距離が近くなる」という仮説を検証するために、データセット中の各物質について、各記述子セットを用いた場合のソース物質10物質中における毒性（DNT）が一致するソース物質との距離の平均値を算出した。そして、全DNT陽性物質および陰性物質について、平均距離の分布を比較したところ、陽性物質同士の距離並びに陰性物質同士の距離は、セットAの分子記述子を使用した場合に比べて、セットD～Gの分子記述子を使用した場合でともに減少したが、その程度は陰性物質間の距離でより大きく、解析4の結果を支持していた。

2) 農薬評価書を利用した解析

【解析1】 まず、gEPと統計学的に関連する分子記述子を選択することで予測精度が向上するか否かを解析した。CE01又はNV01の陽性及び陰性で物質を2群に分け、Wilcoxonの順位と検定を用いて比較し、 $p < 0.05$ となった記述子（CE01：801種、NV01：170種；以下「 $p < 0.05$ 記述子」）、 p 値が小さい順に選択した350記述子（以下「n350記述子」）を用いた。また、対照として相関係数が0.99以上の分子記述子を削除した1889記述子（以下「 $r < 0.05$ 記述子」）を用いた。その結果、CE01ではBAが0.75程度の高い精度が得られたのに対して、NV01では、BAは0.56程度で分子記述子のみのでは高い精度の予測は困難であった。また、両gEPにおいて、記述子の選択による感度、特異度及びBAの大きな変化は認められなかった。以上のことから、毒性と関連する記述子の選択は予測精度の向上に繋がらないことが示唆された。

【解析2】 次に、分子記述子に加えて生物学的な情報を追加することで予測精度が向上するか否かを解析した。本解析では、約8000種を超える生物活性を予測可能なPASSソフトウェアの予測値（生物活性予測値）を利用した。具体的には、分子記述子と生物活性予測値を組み合わせ、相関係数が0.99を超える変数の一方を削除した変数のセット（ $r < 0.99$ ）、Wilcoxonの順位と

検定にてCE01又はNV01の陽性・陰性と有意な関連が認められた変数のセット（ $p < 0.05$ ）、並びにWilcoxonの順位と検定の p 値が低い上位350位の変数のセット（n350）を使用して物質間のユークリッド距離を計算し、同様の手法でリードアクロスを行った（表2、図1）。

CE01においては、分子記述子のみを用いた場合に比べて、生物活性予測値を追加した場合に、程度はわずかであったが、感度、特異度及びBAのいずれも向上した。n350セットを用いた場合に最も高い感度が、 $p < 0.05$ を用いた場合に最も高い特異度が得られた。NV01においては、n350セットを用いた場合において、分子記述子のみを用いた場合に比べて感度の大きな向上（0.47→0.56）が認められ、BAも0.56から0.63に向上した。以上の結果から、PASSで求めた生物活性予測値を変数に追加することで予測精度が向上すること、さらにその際には対象とするgEPとの関連性が高い変数を絞り込んで利用することが精度向上に寄与することが示唆された。

【解析3】 リードアクロスに関する先行研究では、化学構造に基づいてソース物質候補を選択した後に生物活性に基づいてソース物質を絞り込むことで予測精度が向上する可能性が示されている。そこで本研究においても類似の手法の有用性を検討した。

具体的には、①分子記述子による物質間距離と生物活性予測値による物質間距離に基づいて物質を2次元空間にプロットし（被験物質は原点に位置）、原点からの距離に基づいてソース物質を選択する手法（「2次元リードアクロス」）並びに②分子記述子による物質間距離に基づいてソース物質候補を選択し、その後生物活性の一致度に基づいて最終ソース物質を選択する手法（「2段階リードアクロス」）、の有用性を解析した。

2次元リードアクロスでは、表2に記載した変数を利用して2次元における被験物質とソース物質の物質間距離を計算し、各被験物質について、17種のソース物質を選定した。

2段階リードアクロスでは、まず、ソース物質の絞り込みに用いる生物活性を選定した。具体的には、各gEPの陽性・陰性に基づいて物質を2群に分け、Wilcoxonの順位と検定を行った。その結果、各gEPにおいて最も p 値が小さかった生物活性、すなわちCE01では「Pyruvate dehydrogenase kinase 1 inhibitor」、NV01では「Cognition disorders treatment」を選択した。また、CE01及びNV01はChE活性の阻害に起因する可能性が高いことから、PASSに含まれるChE関連生物活性のうち、 p 値が最も小さかった生物活性として、CE01では「Butyrylcholinesterase inhibitor」、NV01では「Acetylcholinesterase stimulant」を選択した。PASSでは、生物活性予測値はPa-Piの-1～1の値として算出されることから、 $(Pa-Pi) \geq 0$ の場合にその活性は陽性、 $(Pa-Pi) < 0$ の場合には陰性として判定し、判定が被験物質と一致したものだけをソース物質の候補とした。

ソース物質の選択は、まず前述の「 $r < 0.99$ 記述子」を利用して計算物質間相対距離に基づいて順位付けを行い、その後第1近傍から順に、被験物質と生物活性予測が一致した物質のみを17物質選択した。得られた結果を図1に示した。CE01については、2次元リードアクロスにおいて $p < 0.05$ セット及びn350セットを用いた場合にこれまでの方法に比べて高い予測精度が得られ、感度は0.71、特異度は0.88、BAは0.80であった。一方、2段階リードアクロスでは、いずれの変数を用いた場合もBAは0.75程度と高いものの、分子記述子のみを用いた場合と同程度であり、向上は認められな

った。NV01については、n350セットの変数を用いた2次元リードアクロスでは分子記述子のみを用いた場合に比べるとよい精度は得られたが、分子記述子と生物活性予測値を組み合わせた場合と同程度の精度であった。また、2段階リードアクロスでは分子記述子のみを用いた場合に比べて精度の向上は認められなかった。

3) DNTリスクのインシリコスクリーニング手法の開発

(解析1) 1) の解析で用いた164種のDNT陽性物質について、それぞれの最近傍物質との相対距離セットのうち、90%が含まれる値を閾値として設定した。次に、197種のDNT不明物質それぞれについて、全陽性物質(164種)との相対距離を算出し、横軸にDNT不明物質、縦軸に陽性物質との相対距離をプロットした。この図を元に、各DNT不明物質について、閾値内に含まれた物質数をカウントした。その結果、全197物質の最低値は0、最大値は56、平均値は16.1、中央値は14であった。約30%の物質は、0~3物質しか含まない一方で、12物質は、陽性物質の25%(41物質)以上を含んでおり、後者の物質は、非常に多くのDNT陽性物質と化学構造が類似していることからDNTを示す可能性が高いと考えられた。これら12物質にはカルバメート系農薬が2物質、他に抗てんかん薬(paramethadione)、オピオイド(t ramadol)が含まれていた。

(解析2) 上記の解析では、近傍物質数でDNTリスクを予測していることから、用いたDNT陽性物質セットの構造的な偏りに左右される可能性が高い。すなわち、あるDNT陽性物質と非常に類似しているにもかかわらず、類似する化学物質の数が少ない場合には、DNTリスクは小さく(ランクが低く)判定される。そこで次に、各DNT不明物質について、最も構造が類似しているDNT陽性物質との相対距離(最近傍相対距離)に着目し、その最近傍相対距離の短さによりDNTリスクをランク付けした。

その結果、距離が短い15物質の化学構造を確認すると、pentane、propyleneoxide、isopropyl alcoholのような比較的分子量から、isotretinoinや α -noralcety l methadolのような比較的大きな分子までが含まれていた。また、いずれも最近傍のDNT陽性物質とはメチル基等の官能基1つ程度の違いしかなく、化学構造が非常に類似していたことから、DNTを示す可能性が非常に高いと考えられた。実際、神経毒性を示すと考えられる有機リン系農薬が2物質、枯葉剤の成分である2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid(別名2,4,5-T)、抗てんかん薬paramethadione、レチノイン酸異性体のisotretinoin、中枢神経毒性が知られているメトキシ酢酸の関連物質2-methoxyethanolなどが含まれていた。解析1で着目した12物質と共通していたのは、paramethadioneの1物質のみであった。

(解析3) 解析1と解析2では1物質しか重複しなかったことから、両手法は異なる物質群を高DNTリスクと予測していると考えられた。そこで、これらの解析を組み合わせた予測を行うために、両手法でのDNTリスクを低い順にランクをつけ、2つのランクの値の積を「DNTリスクスコア」として算出した。図2に物質数によるDNTリスク予測ランクと最近傍相対距離によるDNTリスク予測ランクをそれぞれ縦軸、横軸とした散布図を示した。その結果、両者のランクには有意な正の相関が認められた(Spearmanの ρ 値:0.794, $p < 0.001$)。また、リスクの上位15物質もほぼ右上の領域に含まれていた。

D. 考察

1) 文献情報を利用した解析

リードアクロスによる毒性評価においては、毒性試験結果がある物質をソース物質として選択して被験物質の毒性を予測する。そのため、適切なソース物質の選択が高い予測精度を得るための鍵となる。解析1の結果から、分子記述子を利用したリードアクロスによるDNT評価においては、統計学的にDNTと関連する分子記述子を選択して使用することで、より高い予測精度が得られることが明らかになった。これは、使用する分子記述子計算ソフトウェアのバージョンならびにソース物質の選択方法が異なる当研究室の以前の解析結果と一致しており、得られた結果は妥当かつ普遍的であると考えられた。

一方で、BAは高くても0.65程度であり、予測精度としては十分とは言えなかった。その理由として、本研究ではデータセットを固定し、その中の全物質を解析対象としていることから、必ずしもデータセット内に構造的に類似する物質が存在しないために予測が外れる物質が存在する可能性が考えられた。そこでソース物質の選択に条件(距離の閾値)を設定して解析した結果、全分子記述子を用いた場合や相関係数で選択した記述子セットを用いた場合には、閾値の設定による予測精度の向上が認められた。しかし、解析1で良い精度を示したDNTと関連する分子記述子セットを使用した場合にはそのような効果は認められなかった。これは、事前に適切な分子記述子を選択していない場合には、閾値を設定することで不適切なソース物質が選択される被験物質が解析から除外され、結果的に予測精度の向上が認められたが、DNTと関連する分子記述子を使用した場合には、その選択に伴いソース物質の選択が比較的適切に行われたため、閾値の設定による解析に不適切な被験物質の除外効果が認められなかったためではないかと考えられた。

インシリコ手法による評価は、コンピュータ上での評価が可能であり、スループットに優れていることから、体系的なDNT評価における初期スクリーニングに有用と考えられる。そのような評価では高い感度が必要であると推察されることから、上記解析で決定した条件(分子記述子セット、ソース物質数)において、ソース物質に基づく判定条件を変化させて、感度を高めた際の全体の予測精度を確認したところ、10物質中3物質が陽性の場合に陽性と判定する条件において、感度が0.90と高い判定精度が得られた。一方、この条件における特異度は0.32、一致率は0.59であり、初期スクリーニングに利用した場合、陰性物質の約7割を偽陽性としてしまうと考えられた。

最後に、予測結果の詳細を確認するために、DNT陽性物質と陰性物質について、それぞれにおけるソース物質中の陽性物質数をヒストグラムとして可視化したところ、一致率が20%未満などの予測がひどく外れている物質数が多いわけではないこと、またDNT関連記述子の選択は、陰性物質同士の距離の短縮に寄与していることが明らかになった。さらに、構造が小さい陽性物質、大きい陰性物質の予測が難しいことが示された。おそらく、データセット内に類似物質が少なく、ソース物質の選択時に適切な参照物質が存在しなかったことが原因と考えられる。

2) 農薬評価書を利用した解析

文献情報に基づくデータセットとは異なるデータセットとして農薬のラット90日間反復投与毒性試験結果を利用して、神経毒性と関連する2つのEPを対象としたリードアクロスを実施した。また予測における生物

活性予測値の有用性を検討した。その結果、化学構造情報を反映する分子記述子に加えて、市販のソフトウェアで計算可能な生物活性予測値を用いることで予測精度が向上すること、また生物活性予測値を利用する際には毒性学的な関連性を考慮した上で変数を絞り込む必要があることが明らかになった。

本研究で用いたPASSでは、約8000種の生物活性を予測可能であるが、入力情報は化学構造情報であり、分子記述子計算ソフトと同様である。しかしながら、生物活性予測値を追加して変数を選択することでリードアクロスによる予測精度はCE01及びNV01のいずれにおいても上昇した。この理由は明確ではないが、PASSに利用されている生物活性予測モデルを介することで、分子記述子とは異なる特徴をもった変数が創出されたと考えられる。

さらに、 $p < 0.05$ セットと $n350$ セットの予測結果を比較すると、NV01においては $n350$ で高い予測精度が得られた。分子記述子のみを用いた場合には変数選択の効果は認められなかったこととは異なる結果ではあるが、 $p < 0.05$ セットでは生物活性予測値の変数数が物質数に対して過剰と考えられたことから、より毒性EPとの関連が強い変数の選択が精度向上につながった可能性が考えられる。

対象とした2つのgEPで比較すると、いずれの変数セットを用いた場合もNV01に比べてCE01で予測精度は高かった。この理由として、CE01に含まれる所見はいずれもChE阻害であり、構造的に類似した物質が陽性になると考えられること、また、用いたデータセットの中にChEを阻害することが知られている有機リン系農薬が多く含まれていること、などから、CE01では化学構造やそれに基づく生物活性予測値を利用したリードアクロスによる予測が比較的用意であったのではないかと考えられる。一方で、NV01に含めた所見は、ChE阻害や神経毒性と関連するとは考えられるが、化学物質による間接的影響を反映するEPであることから、このことが予測精度の低さにつながったと考えられる。しかしながら、反復投与毒性試験で認められる所見の多くは間接的なものであり、Adverse Outcome Pathwayのスキームで考えると、molecular initiating event (MIE)ではなく、key event (KE)やadverse outcome (AO)の予測が、動物実験代替法や新たなNew Approach Methodology (NAM)の開発には重要である。したがって、今後、変数の追加や予測条件のさらなる検討が必要と考えられる。

近年、リードアクロスのケーススタディが多く報告され、その中にはフィンガープリントなどを利用した構造一致性に基づいてソース物質の候補を選択したのち、被験物質との生物学的特徴の一致性によりソース物質を絞り込むことでリードアクロスの精度が向上することが報告されている。そのため、本研究においてもこの方法論に基づく2段階リードアクロスを実施した。しかしながら、CE01及びNV01のいずれにおいても予測精度の向上は認められず、精度は分子記述子のみを用いた場合と同程度かそれ以下であった。本研究では単一の試験結果に基づいて生物活性の特徴を判定し、ソース物質の絞り込みを行っていたことが原因となっている可能性は否定できないことから、今後は複数の変数を利用した絞り込みを検討する必要がある。

一方で、本研究では、分子記述子と生物活性予測値を同程度のウェイトで利用することを目的として、両者の値に基づいて2次元に物質をプロットすることで被験物質からの距離を算出し、それを類似度の指標としてソース物質を選択する二次元リードアクロスを実

施したところ、CE01では用いた条件のうち、最も高い予測精度が得られた。NV01でも変数の数を350に絞ることで分子記述子のみを利用した場合に比べて高い予測精度が得られた。精度が向上した正確な理由は不明であるが、上述のようにリードアクロスにおいては生物学的特徴の利用が有用であることが報告されており、2段階リードアクロスでは単一の試験のみを利用してのに対してこの解析では多数の変数を利用したことが効果的であった可能性がある。今後、さらなる変数選択や異なるEPへの適応などを検討し、本結果の検証を行う予定である。

3) DNTリスクのインシリコスクリーニング手法の開発

項目1)の解析において、文献情報を用いて構築したデータセットを利用して、リードアクロスによるDNT予測手法の検討を行った結果、6割程度の物質の判別が可能であったが、様々な条件検討を行ってもそれ以上の精度向上は認められなかった。その理由として、データセットには、複数のDNT陽性物質と化学構造が類似したDNT陰性物質が多く含まれており、それらが「偽陽性」として判定されること、また分子量が100未満程度の小さな化学物質や500を超える大きな化学物質についてはデータセットに類似物質がほとんど存在しないことなどが、主要な原因であると考えられた。実際、前者の「偽陽性」と判定された物質が「真陽性」である可能性については、共同研究者のインビトロ試験結果からも示唆されている。そのため、これまでに使用してきたDNT陰性物質は、実際にはDNT陽性物質を多く含む可能性が考えられた。また、この一連の過程により、インシリコ手法によるDNT懸念物質のスクリーニングとインビトロ試験による検証という組み合わせは、DNT評価の動物実験代替法として有用であることが示唆された。項目3)では、これまでの「DNT陰性物質群」を「DNT不明物質」として再定義し、既知のDNT陽性物質の情報から「DNT不明物質」のDNTリスクの予測を試みた。すなわち、本項目では、164種のDNT陽性物質を活用して、それらの類似性からDNT不明物質のDNTリスクを3つのアプローチにより予測した。第1に、DNT陽性物質間での類似性(物質間相対距離)から、類似物質を定義する物質間相対距離の閾値を定義し、各DNT不明物質についてその閾値内に含まれるDNT陽性物質数による予測、第2に、各DNT不明物質と最も類似している(相対距離が近い)DNT陽性物質との相対距離による予測、そして第3に、これら2つの手法を掛け合わせた予測である。

第1の手法によりDNTリスクが高いと予測された12物質を確認したところ、カルバメート系農薬や抗てんかん薬、オピオイドなど、神経毒性を示すと考えられる物質が多く含まれていた。また、第2の手法においてDNTリスクが高いと予測された上位15物質についてその化学構造を確認したところ、既知の陽性物質との類似性が非常に高い物質が多数見出された。例えば、高用量曝露により催奇形性を示すall-trans-レチノイン酸(tretinoin)の異性体であるisotretinoin、有機リン系農薬、枯葉剤成分、神経毒性を示すメトキシ酢酸の関連物質などが含まれていた。これらの結果から、2つの基準によるDNTリスク予測は共にある程度の精度でDNTリスクの高い化学物質を同定できていると考えられた。

一方で、構造を確認した化学物質数は限られているものの、両手法で共通して同定された物質は抗てんかん薬のparamethadioneのみであった。DNT陽性物質であるtretinoinの異性体であるisotretinoinについては、

最近傍相対距離による予測では検出されたが、類似物質数による予測では検出されなかった。これは、DNT陽性物質群中に、tretinoinやisotretinoinと類似した物質がほとんど含まれないことを示唆しており、実際、isotretinoinは閾値内にDNT陽性物質を2物質しか含まなかった。逆に、類似物質数による予測でDNTリスクが高いと予測されたカルバメート系農薬や枯葉剤成分の2,4,5-trichlorophenoxyacetic acidは、最近傍相対距離による予測では検出されなかった。これらのDNT不明物質は、その化学構造や既知情報からDNT陽性である可能性が非常に高いと考えられることから、2つの基準を用いた予測は共に有用であるものの、いずれの手法もDNTリスクが高い物質を見落とす可能性があることが示唆された。

そこで、両基準を加味した予測を行うために、両予測で算出された値をDNTリスクとしてランク化し、両ランクの値の積を「DNTリスクスコア」として定義し、予測に用いた。リスクが高かった上位15物質を確認したところ、1位～11位及び14位の12物質は、単独の基準による予測のいずれかで同定された物質であり、総合評価による予測で同定された物質は3物質であった。これらの結果から、統合予測は有用であると考えられた。

一方で、isotretinoinは197物質中102位となり、比較的低リスクであると予測された。今回の解析では、ランク値の積を用いたことから、一方の指標が著しく低い場合には、総合評価では上位に入る可能性は低くなる。これらの問題点を克服するために、今後、2つ指標（図2の縦軸及び横軸の値）を複数のクラスに分類してマトリクス化することで、全DNT不明物質やデータセット外の物質のDNTリスクを複数のクラスに分類できるのではないかと考えている。さらには、DNTリスクが高いと予測された物質について、共同研究者の協力を得ながらDNT関連インビトロ試験等で検証することで、本予測手法の妥当性を検証したいと考えている。

E. 結論

DNTに関する文献情報に基づいてデータセットを作成し、化学構造情報を利用したリードアクロス手法の確立に向けて基礎検討を行った結果、分子記述子を利用したリードアクロスにおけるソース物質の選択においては、DNTと関連する分子記述子を選択して使用することで、予測精度が向上することが示唆された。

農薬評価書のラット反復投与毒性試験結果における神経毒性と関連するエンドポイントのリードアクロスに関する解析では、化学構造情報だけでなく生物活性予測値の利用がリードアクロスの精度向上に有用であることが示唆された。また、それらの変数を組み合わせる際には、変数の選択手法や組み合わせ方の種類により予測精度に差が出る可能性が示された。

最後に、DNT陽性物質の化学構造情報を活用した新たなインシリコDNTリスク予測手法を考案した。本手法は、①類似物質数、②類似性の高さ、並びに③その組み合わせにより、被験物質のDNTリスクをランク付けすることが可能であり、実際に神経毒性が知られている有機リン系農薬やカルバメート系農薬、抗てんかん薬、中枢神経毒性物質などを検出することができた。本手法は、簡便に既知のDNT陽性物質の類似物質を検出することが可能であり、DNTリスクのスクリーニング手法としての活用が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 大村奈央、志津怜太、保坂卓臣、菅野裕一朗、吉成浩一：発達神経毒性を予測するためのリードアクロス手法の検討、日本動物実験代替法学会第35回大会、2022年11月18日～20日、静岡市
- 2) 吉成浩一：化学構造情報を用いたリードアクロスによる発達神経毒性の評価、日本動物実験代替法学会第35回大会、2022年11月18日～20日、静岡市
- 3) 大村奈央、志津怜太、保坂卓臣、菅野裕一朗、吉成浩一：リードアクロスによる発達神経毒性評価手法の開発：分子記述子を用いた類似物質選択の有効性、第49回日本毒性学会学術年会、2022年6月29日～7月2日、札幌市
- 4) 吉成浩一：化学構造情報を利用したリードアクロスによる化学物質の毒性予測、第49回日本毒性学会学術年会、2022年6月29日～7月2日、札幌市
- 5) 高村真弥、大村奈央、保坂卓臣、志津怜太、竹下潤一、吉成浩一：分子記述子を用いたリードアクロスによる発達神経毒性予測手法の開発、フォーラム2023 衛生薬学・環境トキシコロジー、2023年9月13日、広島市

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

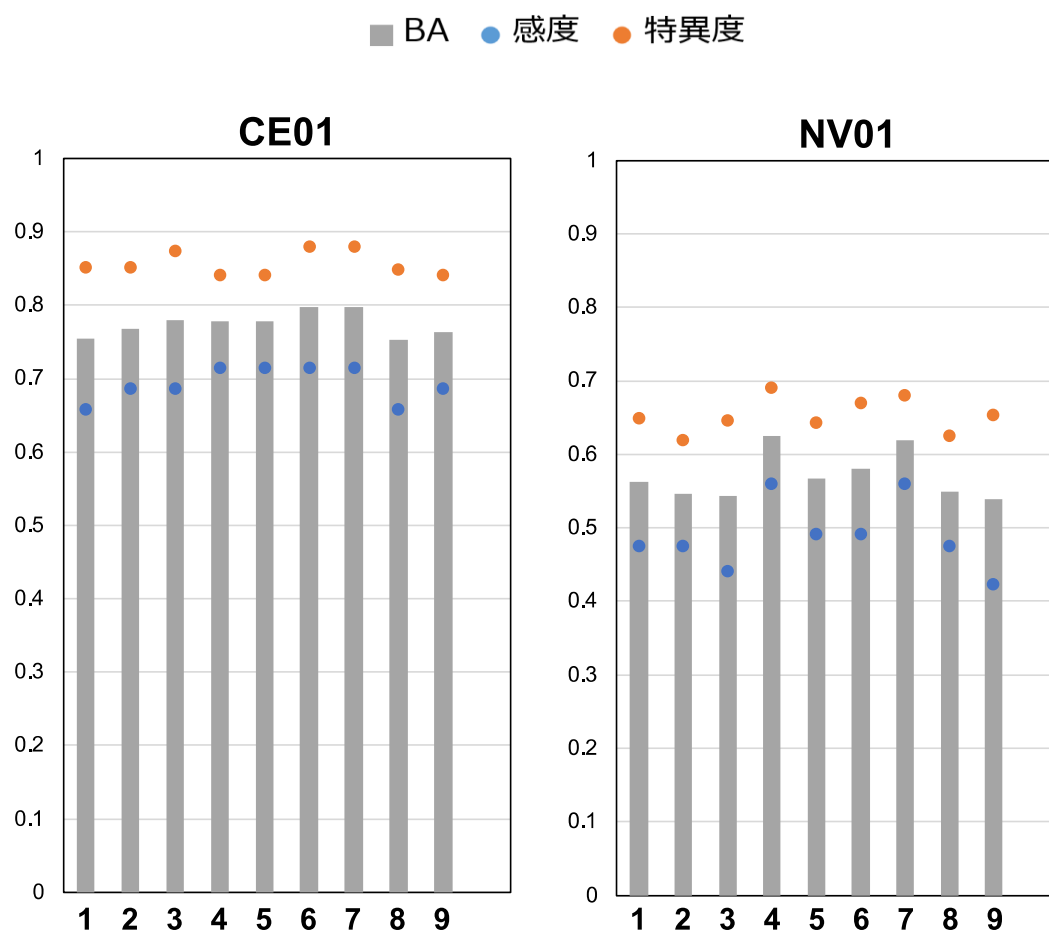
なし

表 1 解析対象としたgEPとそれらに含まれる個別所見

gEP	CE01	NV01
含まれる 所見	中枢神経-ChE活性阻害-脳 血液学-赤血球ChE活性-減少 血液生化学-ChE-減少	外観/行動-一般状態-消瘦
		外観/行動-一般状態-流涎
		外観/行動-汚れ-下腹部
		外観/行動-汚れ-顔
		外観/行動-汚れ-尾
		外観/行動-眼-眼瞼痙攣
		外観/行動-筋肉-筋緊張低下
		外観/行動-筋肉-筋緊張亢進
		外観/行動-呼吸-その他
		外観/行動-呼吸-緩徐呼吸
		外観/行動-呼吸-呼吸困難
		外観/行動-筋肉-その他
		外観/行動-行動-異常発声
		外観/行動-行動-自発運動低下/鎮静
		外観/行動-行動-自発運動亢進/興奮
		外観/行動-行動-身づくろいの減少
		外観/行動-行動-歩行異常
		外観/行動-行動-その他
		外観/行動-姿勢-円背位
		外観/行動-姿勢-側臥位
		外観/行動-姿勢-腹臥位
		外観/行動-姿勢-その他
		外観/行動-神経系-筋攣縮
		外観/行動-神経系-振戦
		外観/行動-神経系-反応異常
		外観/行動-神経系-痙攣
		外観/行動-体温-低下
		外観/行動-被毛-粗毛
		外観/行動-被毛-立毛
		観-眼球突出
		眼-その他-瞳孔
		耳-その他-平衡感覚
		便-性状-軟便

表2 リードアクロスに利用した変数

変数セット	CE01			NV01		
	分子記述子	生物活性予測値	合計	分子記述子	生物活性予測値	合計
r<0.99	1926	8008	9934	1926	8008	9934
p<0.05	803	3813	4616	184	3006	3190
n350	56	294	350	29	321	350



レーン	使用変数
1	分子記述子のみ (r<0.99)
2	分子記述子+生物活性予測値 (r<0.99)
3	分子記述子+生物活性予測値 (p<0.05)
4	分子記述子+生物活性予測値 (n350)
5	2次元リードアクロス (r<0.99)
6	2次元リードアクロス (p<0.05)
7	2次元リードアクロス (n350)
8	2段階リードアクロス (最小p値)
9	2段階リードアクロス (ChE阻害関連)

図1 分子記述子と生物活性予測値を利用したリードアクロスの予測精度

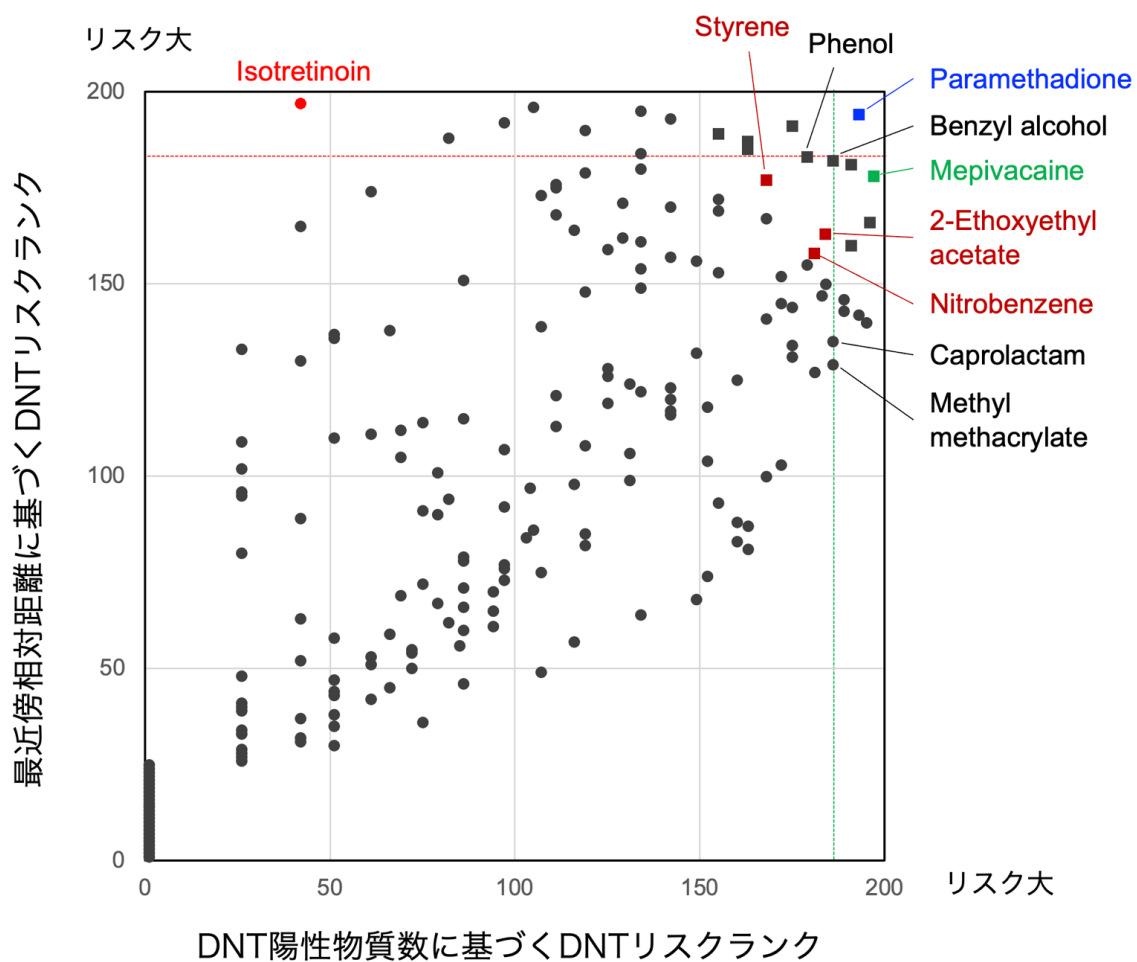


図2 2種類のDNTリスク予測ランクにおけるDNT不明物質の分布

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
AI 支援型 MPS を用いたヒト iPS 由来神経細胞による神経毒性試験法の開発

令和 4～6 年度総合研究報告書

試験法の行政利用に向けた国際動向調査

研究分担者 小島 肇
国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 特別研究員

研究要旨

本研究の目的は、ヒト人工多能性幹細胞 (iPS: Induced pluripotent stem cell) 細胞由来神経細胞を用いて、人工知能 (AI: Artificial Intelligence) による細胞形態評価と多点電極アレイ (MEA: MicroElectrode Arrays) による神経機能評価を組み込んだ人体模倣システム (MPS: Microphysiological system) を開発し、予測性が高い新たな神経毒性評価法を確立することである。メカニズムベースの神経毒性評価が可能となり、化審法・毒劇法の化学的基盤の確立に資するとともに、将来的には神経毒性試験のガイドライン化を目指している。本研究班の中で、試験法の行政利用の視点で、開発の現状に関する発表および情報交換、情報収集を行うとともに、本研究班における情報発信を担当した。

昨年度までに、新たな評価法の比較対照となる経済協力開発機構 (OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development) に提案された TG443 拡張一世代生殖毒性試験 (EOGRTS : Extended One- Generation Reproductive Toxicity Study) の改定に向けた総説をもとにした *in vivo* DNT (Developmental Neurotoxicity) のコホート研究の現状をまとめた。今年度、改定 TG433 及び GD151 (TG433 補助文書) に関する情報を収集した。結果として、2025 年 4 月に TG433 改定案は採択されたが、*in vivo* DNT (Developmental Neurotoxicity) に関する改定はなされなかった。

A. 研究目的

本研究の目的は、ヒト人工多能性幹細胞 (iPS: Induced pluripotent stem cell) 細胞由来神経細胞を用いて、人工知能 (AI: Artificial Intelligence) による細胞形態評価と多点電極アレイ (MEA: MicroElectrode Arrays) による神経機能評価を組み込んだ人体模倣システム (MPS: Microphysiological system) を開発し、予測性が高い新たな神経毒性評価法を確立することである。メカニズムベースの神経毒性評価が可能となり、化審法・毒劇法の化学的基盤の確立に資するとともに、将来的には神経毒性試験のガイドライン化を目指している。本研究班の中で、試験法開発の現状に関する発表および情報交換、情報収集を行うとともに、本研究班における情報発信を担当した。

令和 5 年度までに、新たな評価法の比較対照となる経済協力開発機構 (OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development) に提案された試験法ガイドライン (TG) 443 拡張一世代生殖毒性試験 (EOGRTS : Extended One- Generation Reproductive Toxicity Study) の改定に向けた総説をもとに *in vivo* DNT (Developmental Neurotoxicity) のコホート研究の現状を調査した。令和 6 年度、改定 TG433 及び GD151 (TG433 補助文書) に関する情報を収集した。

B. 研究方法

OECD に提案された TG443 EOGRTS の改定案は、欧州化学品庁 (ECHA: European Chemicals Agency) により、2023 年 3 月に発表された EOGRTS 総説をもとにしている¹⁾。この総説中の *in vivo* DNT のコホート研究の動向に着目して、情報をまとめた。

また、改定 TG433 案は、OECD の TG プログラム各国調整官作業班 (WNT) にて議論されてきた。2025 年 4 月に改定案が

WNT にて合意されるまでの過程をまとめた。

倫理面への配慮

実験を伴わないことから、倫理的問題は無いと考える。

C. 研究結果

C-1. ECHA 総説

ECHA により設立された EOGRTS 評価プロジェクトは 2021 年 3 月から 2 年間活動し、2023 年 3 月に総説が発表されている。本プロジェクトの目的は、REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) で施行されている TG433 の性能を評価し、有害性評価に関連する情報が適切に提供されているか、REACH 登録ドシエにおける EOGRTS の性能の特異的な側面を評価しているかであった。

総説の中には、7 つの主要な問題点が示され¹⁾、その一つとして、DNT 調査の特異的な問題点が挙げられている。具体的には、55 の研究報告書から、24 の DNT コホート研究が評価され、性能の改善が求められており、方法、解析、報告書に欠点を抱えているとされている。

総説中に以下の記載がなされている。DNT コホート研究の中で、多くの試験施設が報告書の中で EOGRTS の詳細を記載していない。その結果、解釈を妨げる欠陥がかなりの頻度で見つかった。

すべての研究において、必須である陽性対照および過去の対照データが不足していた。陽性対照のデータがないため、試験施設の化学物質の曝露による発達期に続く異常な事象を検出することが難しかった。また、生物学的に関連する変化の程度をより適切に解釈できるテストシステムのダイナミックレンジに関する情報も提供されていなかった。

さらに、過去の対照データがないため、報告書内の対照データが以前の測定と一致しているか不明であった。なぜなら、DNT 調査の統計的検出力はグループあたりの動物の数が少ないと特に低くなるからである。他の試験や公表されたデータと比較した過度のばらつきは、試験施設における試験条件において適切な対照がなかったことを示している。同時に、陽性対照や過去の陰性対照データの不足は、偽陰性を生み出す可能性がある。

また、統計解析が不十分だったことも不備の一つであった。最も一般的なこととして、性別はモデルに含まれていなかった。その結果、性特異的な影響、またはその欠如の結論を導くことはできなかった。

正しい統計解析がないため、雄と雌の異なる小さな影響を、関連する限界と見なすべきではない。これに対処するには、組み合わせと性別固有の両方を評価することが推奨されている。組み合わせの場合、統計的検出力が高くなるので、性別特異的な事象を見落とさないことになる。統計解析の不備は、NOAEL 値の不確実性につながり、適切な結論を妨げる可能性がある。不十分な統計解析が行われた場合、適切な結論を導き出すために統計学的再解析が必要になる場合がある。

プロジェクト中で評価された事例では、脳の重量と脳の形態測定が最も敏感なパラメータとして観察される。一般に、脳の有害性は脳の重量、寸法、形態測定および組織病理学の変化により検出される。

全体的に、提供されたデータの独立的な評価により、次のようないくつかの課題が提起されている。これらの研究は、多数の試験における固有の方法の不備、または異なる試験に共通する不備により結論を確認できていなかった。

さらに、全研究の中で一部の研究報告には、必要な情報が限定されていた。偏りがない動物実験同様、使用する機器に関する情報、無関係な実験要因の対照、試験実施時刻など、報告書では詳細な項目が重要である。

最後に、プロジェクトの調査結果は、発達神経毒性に関連する EU 規則に参照される最新の OECD TG および OECD/EU ガイダンス文書で報告されている方法と結果に関与しておらず、重要な改良が必要としている。正規とランダム観測値を含むすべての観測値が報告され、観察は十分な感度で行われることが必須である。

C-2.OECD TG433 の改定案

ECHA は EOGRTS 総説をもとに、OECD に TG433 および GD151 (TG433 補助文書) を改定するプロジェクトの提案を行った。OECD に提案された目的は、EOGRTS の計画、施行、解析および報告書の改良である。

OECD WNT は、このプロジェクトを認める条件として、専門家グループで TG433 や GD151 の改定を議論するだけでなく、2024 年の後半に OECD WNT 主催のワークショップを開き、EOGRTS の予期せぬ／課題について議論することを推奨した。

TG433 改定案は 2024 年 11 月に ECHA より提示され、WNT で意見募集が開始された。主な改定点は、発達免疫毒性に関するコホート研究の記載変更に焦点が当てられ、DNT に関する変更はなかった。この理由として、DNT コホート研究の中で、多くの試験施設が報告書の中で EOGRTS の詳細を記載しておらず、解釈を妨げる欠陥がかなりの頻度で見つかった。プロジェクトの調査結果は、発達神経毒性に関連する EU 規則に参照される最新の OECD TG および OECD/EU ガイダ

ンス文書として報告されている方法と結果に関与しておらず、重要な改良が必要としているものの、結果がない以上、TGの改定には至らなかったことによる。

2025年4月のWNT会議では、動物実験における被験物質のコード化についての議論がなされた。コード化により、評価者によるバイアスを減らし、再現性が増すとされている。コード化については、記載されているTGは少ないが、TG426およびTG443には以下の記載がある。

TG426のパラ 23 :

The animals should be observed outside the home cage by trained technicians who are **unaware of the animals'** treatment, using standardized procedures to minimise animal stress and observer bias, and maximise inter-observer reliability.

TG426のパラ 29 :

The offspring (at least one pup/sex/litter) should be observed by trained technicians who are **unaware of the animals'** treatment, using standardized procedures to minimise bias and maximise inter observer reliability.

TG433のパラ 50 :

All animals should be observed carefully by trained observers who are **unaware of the animals'** treatment status, using standardized procedures to minimize observer variability.

これらの議論や日本からも本研究班の安彦代表研究者などからも意見などを取り込み、WNTはTG433の改定を2025年4月に採択した。

C-3. GD151 の改定

2024年4月にECHA主導で、EOGRTSに関するCROとの検討会議が開かれ、4つの事例報告がなされた。

これを受け、OECDのWNTが11月に会議を開催し、4事例について議論した。

2事例は、被験物質の発生毒性を評価するために重要な、物質適用が適切な段階でなされたのかの議論であった。

次の事例は、一世代だけでなく、二世代まで拡張すべき事例であった。

最後に、DNTに形態観察を導入したという事例であった。MRI（磁気共鳴画像法）を用いることにより、工程による影響の削減、観察者のばらつきを減らせる利点が挙げられている。

これらの内容をもとに、GD151は来年の改定に向け、WNTで議論が続くことになった。

D. 考察

今後の専門家間の議論やOECDワークショップを経て、国際的な合意がなされた上で、GD151の改定がなされることを期待している。DNTはEOGRTSコホート研究の重要な指標であると考えられ、今後の動向には注意が必要と考えている。この改定は対照となる*in vivo*データの信頼性に関わるものであるとともに、新たな*in vitro* DNT法の開発にも関係してくると思われる。本改定に関する継続的な動向把握は必須であると考ええる。

E. 健康危険情報

特になし

F. 結論

ECHAによるEOGRTS総説をもとに、OECDにTG433が2025年4月に改定された。ただし、*in vivo* DNTに関する改定はなかった。

DNTに関する新規評価法を開発する上でも、このTGの改定動向には今後も注目していくべきと考える。

G. 参考文献

- 1) OECD (2018) No. 443, Guideline for the testing of Chemicals, Extended One Generation Reproductive Toxicity Study, OECD, Paris
- 2) OECD (2011), Guidance Document supporting TG 443: Extended One Generation Reproductive Toxicity Study, Series on Testing and Assessment, No. 151, OECD, Paris
- 3) ECHA, Final report of the EOGRTS review project, Evaluating results from 55 extended one-generation reproductive toxicity studies under REACH, 2023

H. 研究発表

H-1. 論文発表

1. Piersma AH, Baker NC, Daston GP, Flick B, Fujiwara M, Knudsen TB, Spielmann H, Suzuki N, Tsaioun K, Kojima H: Pluripotent stem cell assays: Modalities and applications for predictive developmental toxicity, *Current Research in Toxicology*, 2022;3, 100074.
2. Anklaam E, Bahl MI, Ball R, Beger RD, Cohen J, Fitzpatrick S, Kojima H, et al. Emerging technologies and their impact on regulatory science. *Exp Biol Med* (Maywood). 2022;247(1):1-75.
3. Strickland J, Haugabrooks E, Allen DG, Balottin LB, Hirabayashi Y, Kleinstreuer NC, Kojima H, Nishizawa C, Prieto P, Ratzlaff DE, Jeong J, Lee J, Yang Y, Lin P, Sullivan K, Casey W: International regulatory uses of acute systemic toxicity data and integration of new approach methodologies, *Crit Rev Toxicol*. 2023;53(7):385-411.
4. 小島肇夫: 動物実験代替法の歴史、*Cosmetic Science*, 2024, 10, 56-63.

5. Mathisen GH, Bearth A, Jones LB, Hoffmann S, Vist GE, Ames HM, Husøy T, Svendsen C, Tsaioun K, Ashikaga T, Bloch D, Cavoški A, Chiu WA, Davies HG, Giusti A, Hartung T, Hirabayashi Y, Hogberg HT, Joglekar R, Kojima H, Krishnan K, Kwon S, Osborne OJ, Roggen E, Rooney AA, Rousselle C, Sass JB, Sepai O, Simanainen U, Thayer KA, Tong W, Wikoff D, Wright F, Whaley P: Time for CHANGE: system-level interventions for bringing forward the date of effective use of NAMs in regulatory toxicology, *Arch Toxicol*, 2024 Jun 14. doi: 10.1007/s00204-024-03802-6.

6. Kojima H, History of the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) test guidelines for non-animal test methods in Japan. *Genes Environ*. 2025 Jan 29;47(1):3. doi: 10.1186/s41021-024-00323-7.

H-2. 学会発表

1. 小島肇: MPS の標準化のための国際戦略, 第 29 回 HAB 研究機構学術年会 (2022.5.19)
2. Kojima H: Approach to New Approach Methods developed by Japan in OECD WNT, ICCA-LRI Workshop 2022 (2022.6.20-21)
3. 小島肇: 3 Rs を取り巻く国際動向と課題, 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.7.2)
4. 小島肇: 医薬品等の薬効及び安全性評価を支える in vitro 試験の未来, 日本組織培養学会第 94 回大会 (2022.7.8)
5. 小島肇: 代替法に関する国内外の状況について代替法全般の最新動向, 日本動物実験代替法学会企画委員会主催講習会 (2022.8.25)

6. 小島肇: OECD テストガイダンス作成の経験から見たツールガイダンス整備の課題, 日本学術会議公開シンポジウム (2022.11.19)
7. 小島肇: Computational Toxicology の利用の実際と将来展望, 第 96 回日本薬理学会年会 (2022.11.30)
8. 三ヶ島史人、真木一茂、小島肇、栗形麻樹子、大久保佑亮、星野裕紀子、片桐龍一、石黒司、渡部一人、角崎英志、下村和裕：医薬品の生殖発生毒性試験及び生殖発生毒性評価代替法に係る状況調査、第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.7.5)
9. 小島肇：動物実験代替法から New Approach Methodologies (NAM) への変遷, 第 14 回レギュラトリーサイエンス学会 (2024.9.13)
10. Hajime Kojima, International progress on the development and regulatory application of NAMs/Alternatives Symposium on Innovative Collaboration in Toxicology Alternative Methods in Shanghai (2024.11.2)
11. 小島肇：JaCVAM の成果と今後の課題, 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.30)

I. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

I-1. 特許取得

該当なし

I-2. 実用新案登録

該当なし

I-3. その他

該当なし

別添 4

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ojiro, R., Ozawa, S., Zou, X., Tang, Q., Woo, G-H., Shibutani, M	Similar toxicity potential of glyphosate and glyphosate-based herbicide on cerebellar development after maternal exposure in rats.	Environ. Toxicol.	39(5)	3040-3054	2024
Zou, X., Tang, Q., Ojiro, R., Ozawa, S., Shobudani, M., Sakamaki, Y., Ebizuka, Y., Jin, M., Yoshida, T., Shibutani, M	Increased spontaneous activity and progressive suppression of adult neurogenesis in the hippocampus of rat offspring after maternal exposure to imidacloprid.	Chem. Biol. Interact.	399	111145	2024
Sakamaki, Y., Shobudani, M., Ojiro, R., Ozawa, S., Tang, Q., Zou, X., Ebizuka, Y., Karasawa, A., Woo, G.H., Yoshida, T., Shibutani, M	Suppression of hippocampal neurogenesis and oligodendrocyte maturation similar to developmental hypothyroidism by maternal exposure of rats to ammonium perchlorate, a gunpowder raw material and known environmental contaminant.	Env. Toxicol.	40(1)	30-53	2025
Shobudani, M., Sakamaki, Y., Karasawa, A., Ojiro, R., Zou, X., Tang, Q., Ozawa, S., Jin, M., Yoshida, T., Shibutani, M.	Metabolic shift as a compensatory response to impaired hippocampal neurogenesis after developmental exposure to sodium fluoride in rats.	Acta Histochem.	126(8)	152204	2024

Mathisen GH, Bearth A, Jones LB, Hoffmann S, Vist GE, Ames HM, Husøy T, Svendsen C, Tsaion K, Ashikaga T, Bloch D, Cavoski A, Chiu WA, Davies HG, Giusti A, Hartung T, Hirabayashi Y, Hogberg HT, Joglekar R, Kojima H, Krishnan K, Kwon S, Osborne OJ, Roggen E, Rooney AA, Rousselle C, Sass JB, Sepai O, Simanainen U, Thayer KA, Tong W, Wikoff D, Wright F, Whaley P.	Time for CHANGE: system-level interventions for bringing forward the date of effective use of NAMs in regulatory toxicology.	Arch Toxicol.	98(8)	2299-2308	2024
Kojima H.	History of the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) test guidelines for non-animal test methods in Japan.	Genes Environ.	47(1)	3	2025
Yuto Ishibashi, Nami Nagafuku, Yasunari Kanda, Ikuro Suzuki.	Evaluation of neurotoxicity for pesticide-related compounds in human iPS cell-derived neurons using microelectrode array.	Toxicology in Vitro	93	105668	2023
Ojiro, R., Okano, H., Takahashi, Y., Takashima, K., Tang, Q., Ozawa, S., Zou, X., Woo, G.H., Shibutani, M.	Comparison of the effect of glyphosate and glyphosate-based herbicide on hippocampal neurogenesis after developmental exposure in rats.	Toxicology	483	153369	2023

Maeda, N., Shimizu, S., Takahashi, Y., Kubota, R., Uomoto, S., Takesue, K., Takashima, K., Okano, H., Ojio, R., Ozawa, S., Tang, Q., Jin, M., Ikarashi, Y., Yoshida, T., Shibutani, M.	Oral exposure to lead acetate for 28 days reduces the number of neural progenitor cells but increases the number and synaptic plasticity of newborn granule cells in adult hippocampal neurogenesis of young-adult rats.	Neurotox. Res.	40(6)	2203-2220	2022
Takahashi, Y., Okano, H., Takashima, K., Ojio, R., Tang, Q., Ozawa, S., Ogawa, B., Woo, G.H., Yoshida, T., Shibutani, M.	Oral exposure to high-dose ethanol for 28 days in rats reduces neural stem cells and immediate nascent neural progenitor cells as well as FOS-expressing newborn granule cells in adult hippocampal neurogenesis.	Toxicol. Lett.	360	20-32	2022
Shimizu, S., Maeda, N., Takahashi, Y., Uomoto, S., Takesue, K., Ojio, R., Tang, Q., Ozawa, S., Okano, H., Takashima, K., Woo, G.H., Yoshida, T., Shibutani, M.	Oral exposure to aluminum chloride for 28 days suppresses neural stem cell proliferation and increases mature granule cells in adult hippocampal neurogenesis of young-adult rats.	J. Appl. Toxicol.	42(8)	1337-1353	2022
Piersma AH, Baker NC, Daston GP, Flick B, Fujiwara M, Knudsen TB, Spielmann H, Suzuki N, Tsaioun K, Kojima H.	Pluripotent stem cell assays: Modalities and applications for predictive developmental toxicity.	Current Research in Toxicology	3	100074	2022
Anklam E, Bahl MI, Ball R, Beger RD, Cohen J, Fitzpatrick S, Kojima H, et al.	Emerging technologies and their impact on regulatory science.	Exp Biol Med (Maywood)	247(1)	1-75	2022
鈴木郁郎	ヒトiPS神経の電気活動に基づいた化合物の毒性及び作用機序予測	谷本学校毒性質問箱	第24号	20-31	2022

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
鈴木郁郎	第4章 発達神経毒性評価	小島肇夫	動物実験代替法とNew approach Methodologiesの開発・利用動向	シーエムシー出版	日本	2023	296