

## 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 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日と77日目に解剖し、免疫組織学的検索、遺伝子発現解析のため脳を採材した。現在までの解析で、NaFでは離乳時において神経幹細胞及び分化前期の神経前駆細胞の増加と顆粒細胞のシナプス可塑性の増加が確認できた。AP曝露により離乳時において、神経幹細胞の自己複製の抑制が確認できた。IMI曝露で離乳時において分化後期の神経前駆細胞の増殖抑制を認めた。IMIでは神経炎症の誘導も確認された。今後、障害が検出された場合、関連する神経新生関連因子（コリン作動性・グルタミン酸作動性入力、神経成長因子制御系、細胞増殖制御系、アポトーシス制御系など）に関して、遺伝子発現解析を行いメカニズムの同定を行う。

### 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、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、摂餌量および摂水量を週に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CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>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CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>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。IMIの実験では各群6匹以上の雄児動物について脳内酸化ストレス(MDA)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CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>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CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>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。

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。切片は顆粒細胞系譜の分化段階の指標 [GFAP, BLBP, TBR2, DCX, TUBB3, NeuN]、介在ニューロンの指標 [RELN, PVALB]、細胞増殖活性の指標 (PCNA)、アポトーシスの指標 (TUNEL)、神経可塑性の指標 (ARC, FOS, COX2) および神経炎症 (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における単位面積当たりの陽性細胞数を算出した。

メタカーン固定脳は、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。今後、そこからtotal RNAを抽出し、cDNAを合成、RT-PCRにより遺伝子発現解析を実施する。

(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CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>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曝露では、繁殖パラメーター(表1)、母動物と児動物の体重、摂餌量、飲水量の推移(図1)に変動が認められなかった。PND 21およびPND 77の解剖時における体重、脳重量に関しては、PND 77の低用量群で脳重量の増加を認めた以外は変動を認めなかった(表2)。PND 21の海馬MDA及びGSHレベルは変動しなかった(表3)。海馬歯状回の免疫組織学的解析により、PND 21に、100 ppm群において顆粒細胞系譜のGFAP陽性細胞及びSOX2陽性細胞が増加し、DCX陽性細胞が減少傾向を示した(表4)。シナプス可塑性関連ではARC陽性顆粒細胞が増加した。

AP曝露により、繁殖パラメーター(表5)、母動物の体重、摂餌、飲水量、児動物の体重、摂餌、飲水量の推移(図2)、剖検時の母動物と児動物における体重と脳重量(表6, 7)に明らかな変動は認められなかった。PND 21の海馬MDA及びGSHレベルも変動しなかった(表8)。PND 21において、甲状腺の肉眼的腫大の有無を確認した結果、AP曝露の両群で母動物における軽度腫大と児動物における中度腫大が認められ、母動物、児動物共に、病理組織学的に濾胞上皮の肥大とコロイドの減少を認めた(表9: 児動物)。PND 21において、AP曝露の両群で児動物の血清T3, T4レベルが減少し、高用量群で統計学的に有意であった(表10)。実施中の免疫組織化学的解析では、PND 21において、顆粒細胞系譜のうち、顆粒細胞層下帯で、AP曝露によりGFAP陽性細胞数とPCNA陽性細胞が減少ないし減少傾向を示した(図3)。また、SOX2陽性細胞及びTBR2陽性細胞も用量依存的な減少傾向を示した。介在ニューロンでは、高用量でPVALB陽性細胞およびRELN陽性細胞数が減少傾向を示した。シナプス可塑性関連では、ARC陽性顆粒細胞の用量依存的な減少傾向を認めた。

IMI曝露により母動物の体重に変動は認めなかったものの、750 ppmで妊娠期間中の摂餌量の減少、250 ppm以上で妊娠、授乳期間で摂水量の低値が認められた(図4)。雄児動物では摂餌量、摂水量の変動を認めなかったが、750 ppmでPND 9からPND 21の体重が低値を示した。PND 21とPND 77の剖検時の脳重量は変動しなかった。海馬のAchE活性は離乳時の750 ppm群で有意に低値を示したが、MDAレベルは成熟後の750 ppm群で有意に高値を示した(図5)。海馬神経新生に関しては、PND 21の解析で、免疫組織化学的に750 ppm群でDCX<sup>+</sup>細胞数とPCNA<sup>+</sup>細胞数、歯状回門部におけるRELN<sup>+</sup>細胞数の減少を認めた(図6)。また、グリア細胞に関しては全てのIMI群でCD68<sup>+</sup>陽性細胞が増加したが、CD163<sup>+</sup>細胞数は変動しなかった。顆粒細胞のシナプス可塑性に変動はなかった。

## D. 考察

NaFの発達期曝露により、生後21日目の海馬神経新生においてtype-1神経幹細胞及びtype-2a神経前駆細胞の増加と顆粒細胞のシナプス可塑性の増加がみられた。これはtype-3神経前駆細胞の減少を示唆するDCX陽性細胞の減少傾向に対する代償性の神経新生及び新生ニューロンのシナプス可塑性の増強を示唆した。

APの発達期曝露により、既に報告してある抗甲状腺剤投与による変化と同様に、曝露終了時での顆粒細胞系譜の増殖抑制に伴うtype-1神経幹細胞からtype-2b神経前駆細胞数の減少、ARC依存性のシナプス可塑性の低下及びPVALB<sup>+</sup>介在ニューロンの減数を認めた。一方で、一致しない変化としてRELN<sup>+</sup>介在ニューロン数が減少し、幹細胞の静止・維持の抑制への関与が示唆された。

IMIの発達期曝露により、750 ppmでは顆粒細胞系譜マーカーの免疫反応細胞集団のうちDCX陽性細胞、顆粒細胞層下帯でのPCNA陽性増殖細胞、介在ニューロンのうちのRELN陽性細胞数が減少し、RELNシグナル抑制による後期神経前駆細胞の増殖抑制と新生顆粒細胞のシナプス可塑性の低下が示唆された。歯状回門部では、IMIはM1型ミクログリアが増加し、神経炎症と酸化ストレス反応の誘導が示唆された。さらに、750 ppmのIMIは、海馬のアセチルコリンエステラーゼのレベルを低下させた。これらの結果は、IMIの発達期曝露により、神経炎症と酸化ストレスの誘導を伴う海馬のニコチン作動性シグナル伝達と神経新生障害を誘導することが示唆された。

今後、障害が検出された場合、関連する神経新生関連因子(コリン作動性・グルタミン酸作動性入力、神経成長因子制御系、細胞増殖制御系、アポトーシス制御系など)に関して、遺伝子発現解析を行い原因分子の特定を行う。

## E. 結論

NaF, AP, IMIのラットを用いた発達期曝露を行い、海馬の神経新生影響を検討し、現在、離乳時での解析を実施している。今後は、休薬後の成体期での解析を進め、変動に応じたメカニズム解析を進める。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 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., Ojiro, 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., Ojiro, 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., Ojiro, 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.

## 2. 学会発表

尾城 椋太, 高橋 康徳, 山下 理紗子, 清水 沙織, 前田 夏乃, 岡野 拓, 高嶋 和巳, 唐 倩, 小澤 俊介, 吉田 敏則, 渋谷 淳: グリホサートの発達期曝露によるラットの海馬神経新生に対する影響. 第9回日本獣医病理学専門家協会(JCVP)学術集会, 札幌 (WEB 開催), 第9回日本獣医病理学専門家協会(JCVP)学術集会講演要旨集: P-39, p.56, 3月25日-4月3日, 2022

尾城 椋太, 岡野 拓, 高嶋 和巳, 高橋 康徳, 唐 倩, 小澤 俊介, 鄒 昕羽, 渋谷 淳: グリホサート原体及びグリホサート系除草剤の発達期曝露によるラットの脳発達への影響. 第5回医薬品毒性機序研究会, 東京, 第5回医薬品毒性機序研究会プログラム集: P-12, pp.50, 12月8-9日, 2022.

尾城 椋太, 岡野 拓, 高嶋 和巳, 高橋 康徳, Qian Tang, 小澤 俊介, Xinyu Zou, 渋谷 淳: グリホサート原体及びグリホサート系除草剤の発達期曝露はラットの脳発達に類似した影響を及ぼす. 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会, 東京 (ハイブリッド開催), 第39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25-26日, 2023.

## 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

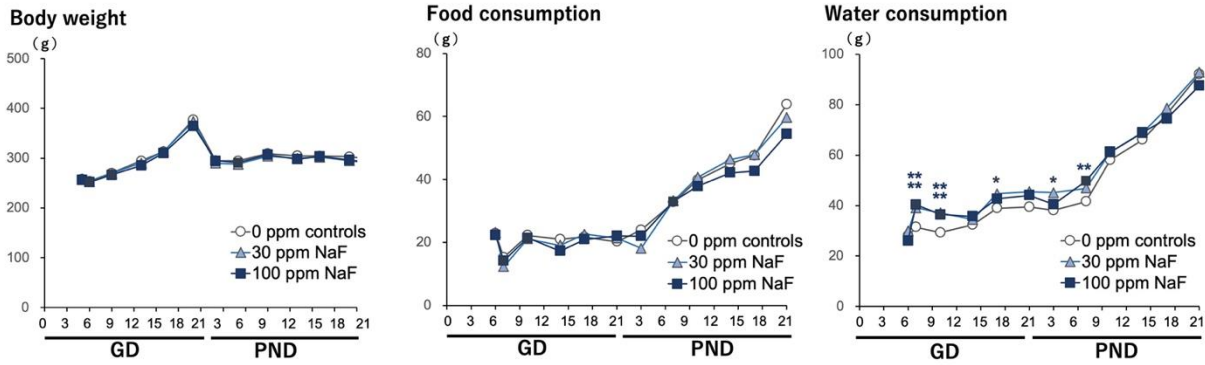
**表 1. Maternal reproductive parameters in NaF study**

	NaF in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	30	100
No. of dams examined	12	12	11
No. of implantation sites	12.4 ± 1.8	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

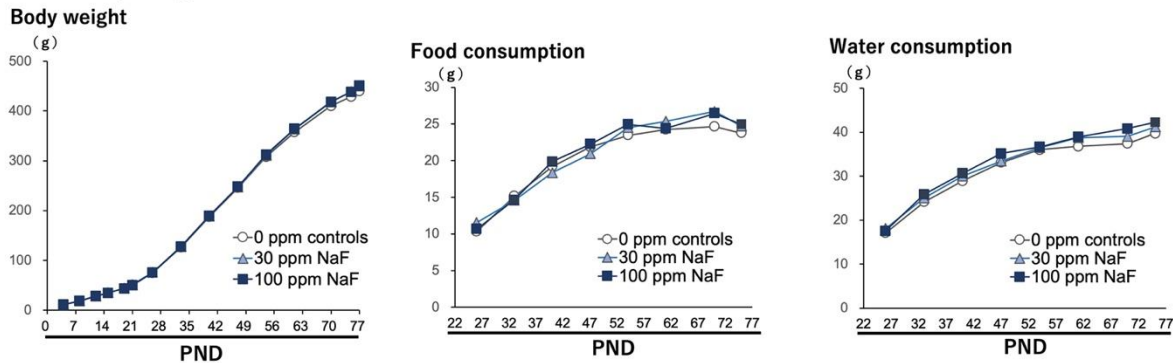
Abbreviation: NaF, sodium fluoride.

<sup>a</sup> Mean ± S.D.

**Dams**



**Male offspring**



**图 1. Body weight and food and water consumption of dams and male offspring in NaF study**

**表 2. Body and brain weight changes in male offspring at necropsies on PND 21 and PND 77 in NaF study**

	NaF in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	30	100
<b>PND 21</b>			
No. of offspring examined	10	10	10
Body weight (g)	51.7 ± 4.0 <sup>a</sup>	50.4 ± 4.0	49.8 ± 4.3
Brain weight (g)	1.51 ± 0.06	1.47 ± 0.05	1.53 ± 0.05
<b>PND 77</b>			
No. of offspring examined	12	12	12
Body weight (g)	434.5 ± 37.1	442.5 ± 17.0	450.9 ± 32.2
Brain weight (g)	2.09 ± 0.05	2.16 ± 0.07*	2.12 ± 0.06

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

<sup>a</sup> Mean ± S.D.

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

**表 3. Changes in oxidative stress parameters of the hippocampal tissue in male offspring on PND 21 in NaF study**

	NaF in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	30	100
No. of offspring examined	6	6	6
MDA concentration(nmol/mg protein)	0.68±0.10 <sup>a</sup>	0.76 ± 0.07	0.8 ± 0.10
GSH concentration (μmol/L)	17.9±0.9	18.7 ± 0.7	18.0 ± 1.2

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

<sup>a</sup>Mean ± S.D.

**表 4. Number of immunoreactive or TUNEL<sup>+</sup> cells in the SGZ/GCL or hilar region of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on PND 21 in NaF study**

	NaF in drinking water		
	0 ppm (Control)	30 ppm	100 ppm
No. of animals examined	10	10	10
PND 21			
Granule cell lineage subpopulations (No./mm SGZ length)			
GFAP	2.27 ± 0.51 <sup>a</sup>	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	480.76 ± 60.06	508.63 ± 48.69	512.11±51.54
Interneuron subpopulation (No./mm <sup>2</sup> hilar region)			
PVALB	19.45 ± 7.70	23.39 ± 10.23	23.48±8.31
Cell proliferation and apoptosis (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 (No./mm SGZ length)			
COX2	25.27 ± 8.26	32.50 ± 7.43	29.24±12.23
FOS	3.50 ± 0.98	3.42 ± 1.24	3.79±1.23
ARC	1.43 ± 0.75	2.39 ± 1.41	3.68±1.05**
p-ERK1/2	1.29 ± 1.00	1.40 ± 1.33	2.26±1.38
Astrocytes and microglia (No./mm <sup>2</sup> hilar region)			
Iba1	68.95 ± 14.97	62.6 ± 20.82	71.1±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
GFAP	384.18 ± 66.97	344.06 ± 47.21	396.71±92.1

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; GFAP, glial fibrillary acidic protein; Iba1, ionized calcium-binding adaptor molecule 1; IEGs, immediate-early genes; NaF, 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; SGZ, subgranular zone; SOX2, SRY-box transcription factor 2; 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.

<sup>a</sup>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.

**表 5. Maternal reproductive parameters in AP study**

	AP in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	300	1000
No. of dams examined	10	9	11
No. of left implantation sites	5.5±2.3 <sup>a</sup>	5.0±1.0	6.2±1.6
No. of right implantation sites	7.0±1.3	8.1±1.2	6.5±1.4
No. of all implantation sites	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 persulfate.

<sup>a</sup>Mean ± S.D.

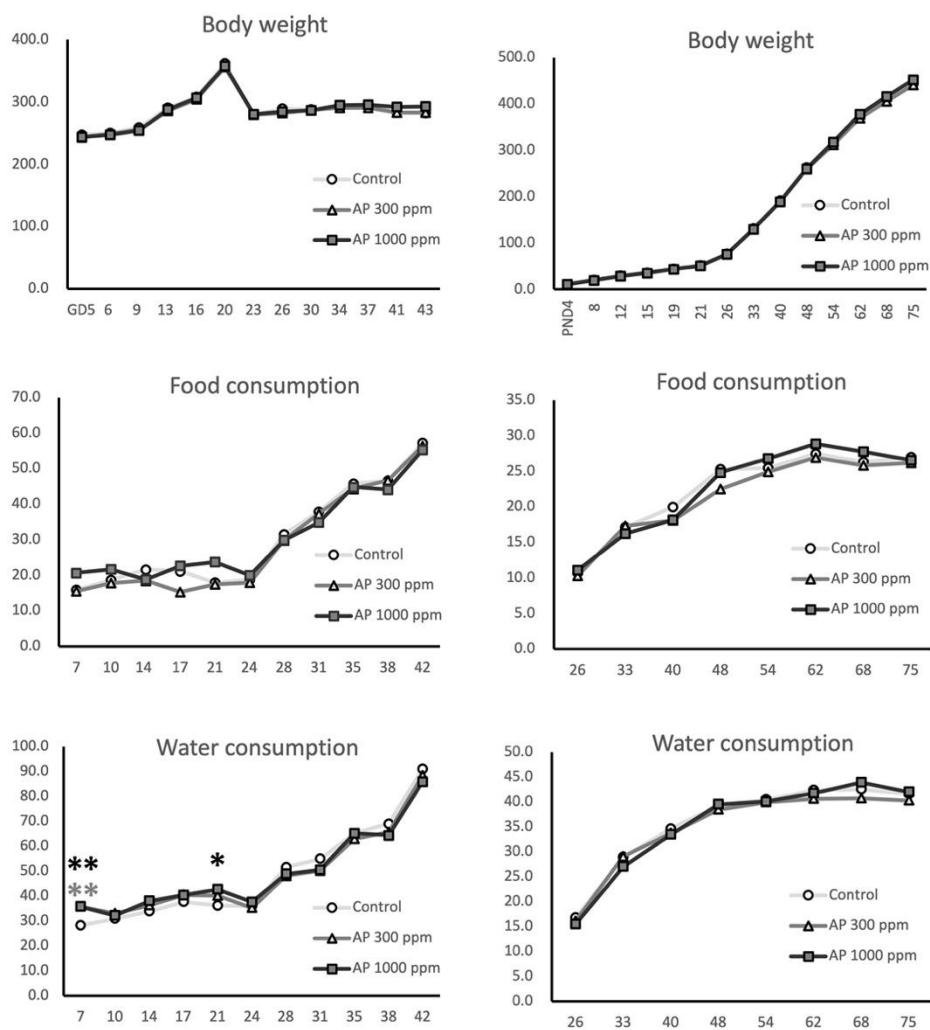


图2. Body weight and food and water consumption of dams and male offspring in AP study

表 6. Body and brain weights of dams on day 21 post-delivery in 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 <sup>a</sup>	283.4±12.3	292.7±16.8
Brain weight (g)	1.9±0.1	1.9±0.1	1.9±0.1

Abbreviation: AP, ammonium persulfate.

<sup>a</sup> Mean ± S.D.

表 7. Body and brain weight changes in male offspring at necropsies on PND 21 and PND 77 in AP study

	AP in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	300	1000
<b>PND 21</b>			
No. of offspring examined	19	19	19
Body weight (g)	52.5±2.9 <sup>a</sup>	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
<b>PND 77</b>			
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)	2.1±0.13	2.1±0.03	2.2±0.21

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

<sup>a</sup> Mean ± S.D.

**表 8. Changes in oxidative stress parameters in female offspring on PND 21 in 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 <sup>a</sup>	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 persulfate; GSH, glutathione; MDA, malondialdehyde; PND, postnatal day.

<sup>a</sup>Mean ± S.D.

**表 9. Histopathological changes in the thyroid in female offspring on PND 21 in AP study**

	AP in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	300	1000
No. of offspring examined	12	12	12
Decrease in follicular colloids (+/+/+++)	0 (0/0)	12** (6/6) <sup>††</sup>	12** (0/12) <sup>††</sup>
Follicular cell hypertrophy (+/+/+++)	0 (0/0)	12** (12/0) <sup>††</sup>	12** (6/6) <sup>††</sup>

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

\*\* $P < 0.01$ , compared with the vehicle controls by Fisher's exact test.

<sup>††</sup> $P < 0.01$ , compared with the vehicle controls by Mann-Whitney's  $U$ -test.

**表 10. Serum thyroid hormone changes in female offspring on PND 21 in AP study**

	AP in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	300	1000
No. of offspring examined	8	8	8
T3 (ng/ml)	1.52±0.18 <sup>a</sup>	1.50±0.19	1.37±0.14*
T4 (ng/ml)	49.2±8.28	45.2±7.38	32.6±5.75**

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

<sup>a</sup>Mean ± S.D.

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

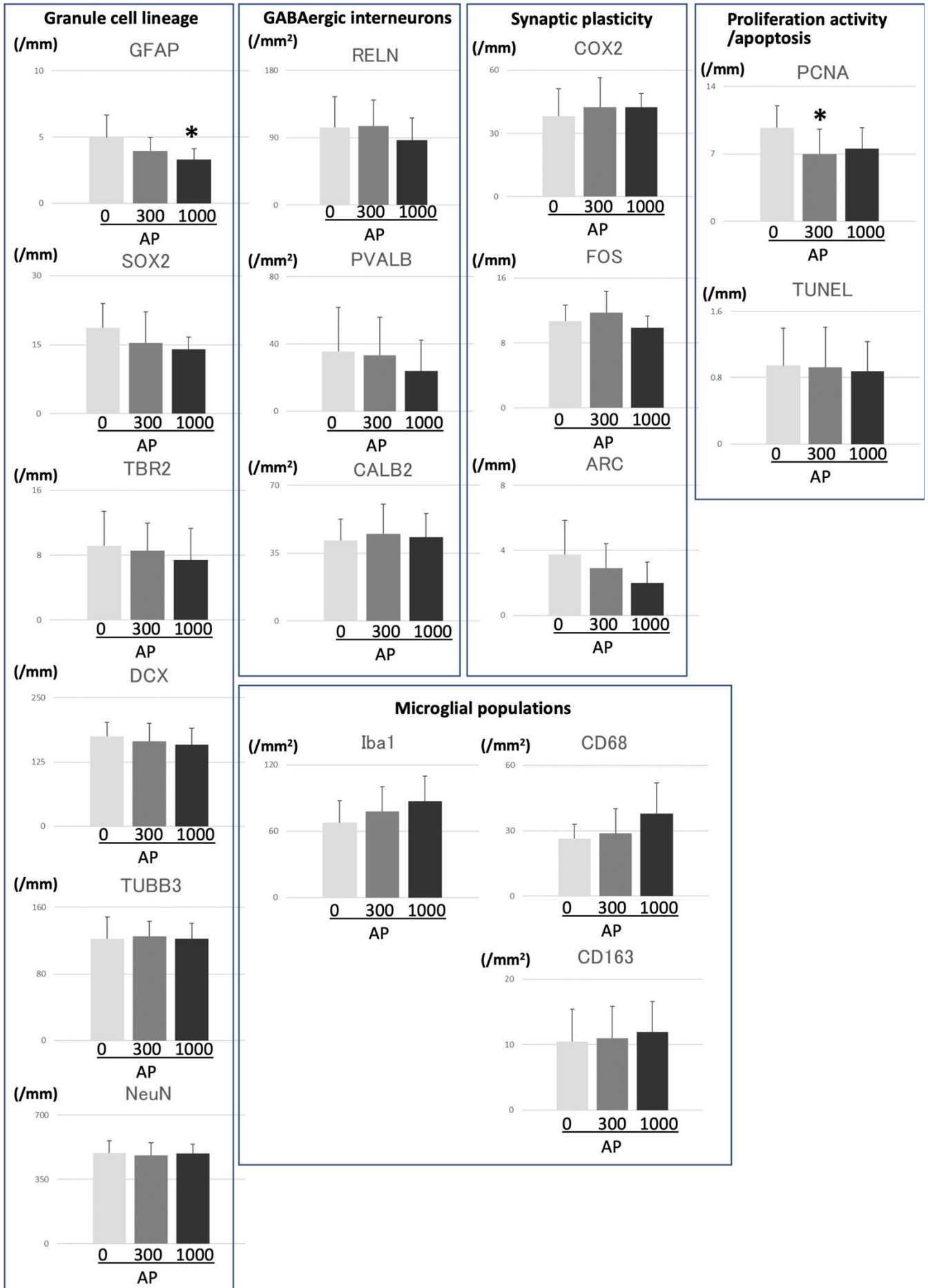
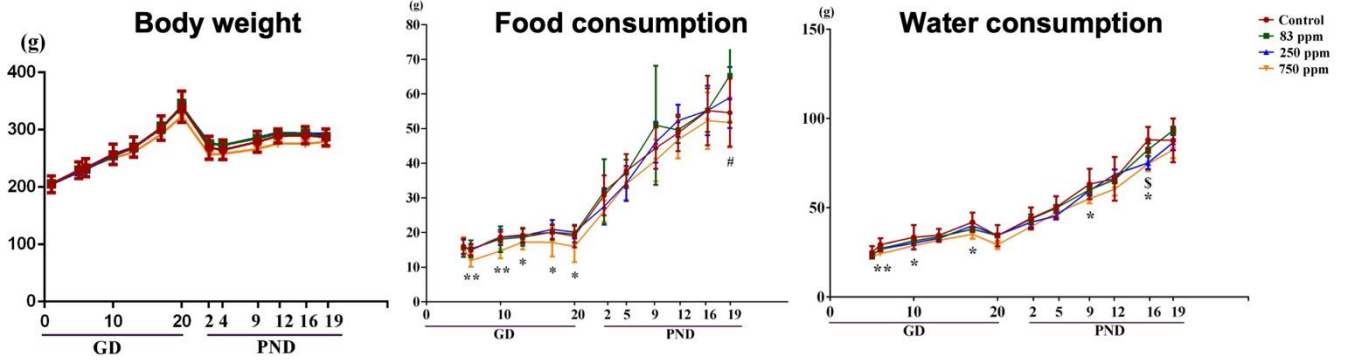


图3. 免疫组化数据在男性后代在PND 21在AP研究



## Dams



## Male offspring

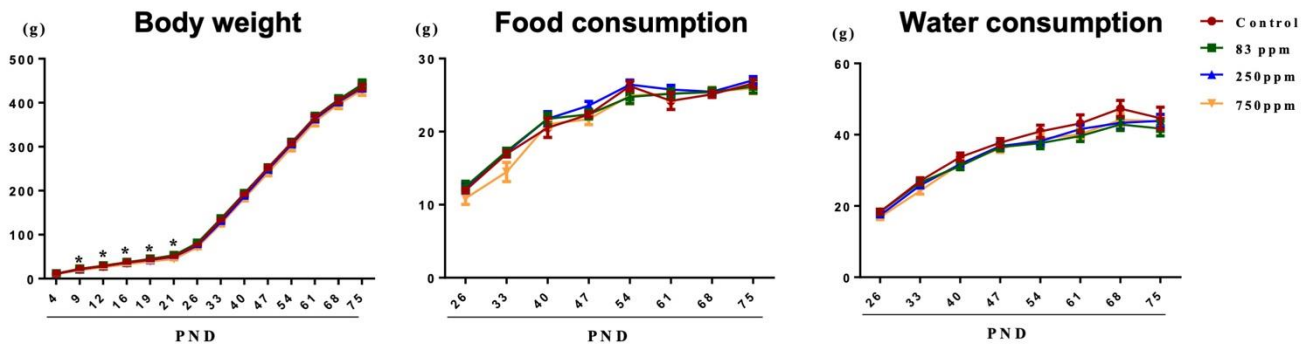
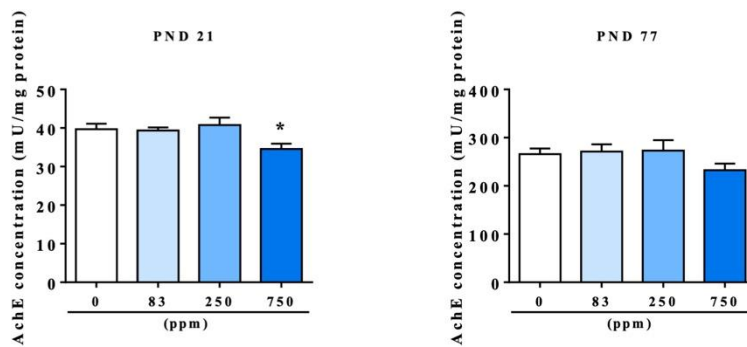


Figure 4. Body weight and food and water consumption of dams and male offspring in IMI study

## AchE activity



## MDA level

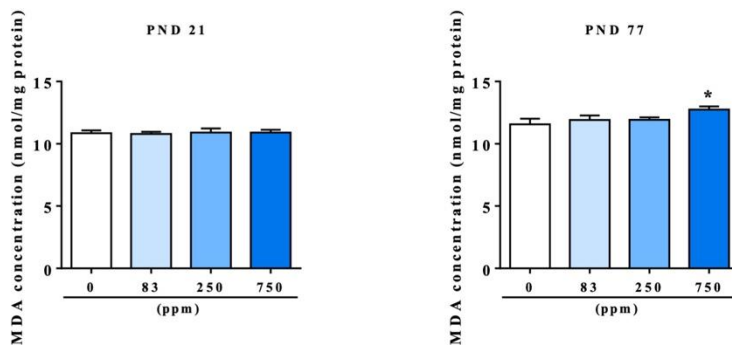
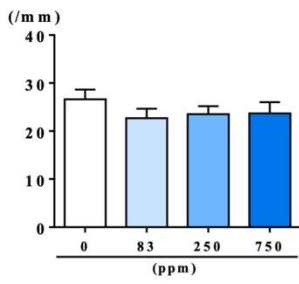
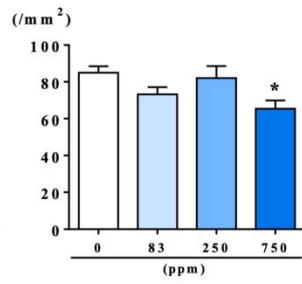


Figure 5. AchE activity and MDA level in male offspring in IMI study

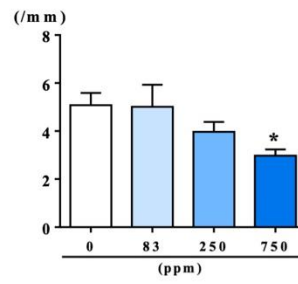
**Granule cell lineage  
SOX2**



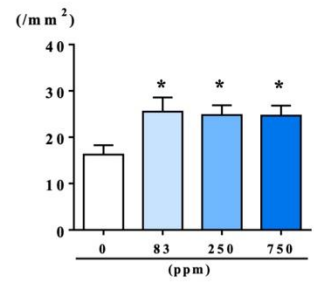
**GABAergic interneurons  
RELN**



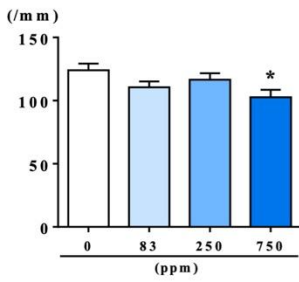
**Proliferation activity  
PCNA**



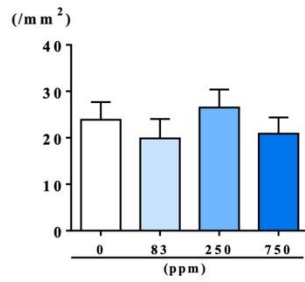
**Glial populations  
CD68**



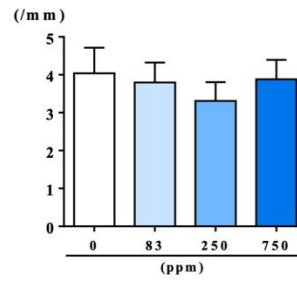
**DCX**



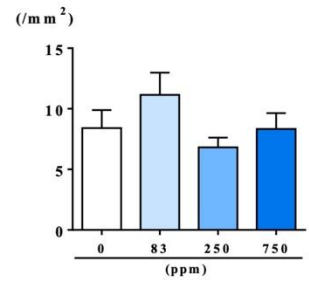
**PVALB**



**Synaptic plasticity  
ARC**



**CD163**



**Figure 6. Immunohistochemistry data in male offspring on PND 21 in IMI study**