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6年度研究成果報告書

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 ッ化ナトリウムと過塩素酸アンモニウム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。最終年度の今年度 は IMI の発達期曝露結果について報告する。文献データを参考に、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。 離乳期 (PND 21) に、海馬の神経新生ニッチにおいて、750 ppm の IMI 曝露は、神経前駆細胞(NPC)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、後期 NPC と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。休薬後の成体期 (PND 77) においては、250 ppm 以上の IMI 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 Chrnb2 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。これらの結果から、 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 フッ化ナトリウムと過塩素酸アンモニウム及びヒトで 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、IMI は 0.83.250.750 ppm の濃度で混餌投与した (Fig. 1)。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。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。 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(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 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 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。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、脳をメタカーン液にて固定し、遺伝子発現解 析に供した。

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 脳については、 大脳の bregma の後方約-3.5 mm の1カ 所で冠状割面を作製して、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)、歯状回門部での 苔状細胞の指標(GluR2)、SGZ での細胞増殖活性の指 標(PCNA)、SGZ と GCL でのアポトーシスの指標 (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 (Supplementary Fig. 1 and Supplementary Table 1)。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。

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/μL O cDNA & SuperScriptTM III First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) にて合成した。II6 以外のプライマー配列は Primer Express (ver. 3.0; Thermo Fisher Scientific Inc.) または ツ Primer-BLAST ル (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)を用い て設計した(Supplementary Table 2)。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 µl Power SYBR® Green (Thermo Fisher Scientific Inc.), 0.4 µl のプライマー

(forward と reverse), 8.2 µl UltraPureTM Distilled Water (Thermo Fisher Scientific Inc.)] を含む 20 µl の全量で、 StepOnePlusTM 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^{-ΔΔC}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。

PND 21 と 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×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。

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 μL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×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 μL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)。

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 (Fig. 1)。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)÷10分]×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600mm、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 リー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。0ppm 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、管理にあっ 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

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. 2A and Supplementary Table 3)。 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. 2B and Supplementary Table 3)。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. 2C and Supplementary Table 3)。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 4).

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。

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. 3A and Supplementary Table 5)。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. 3B, 3C and Supplementary Table 5)。 PND 21 の剖検では、体重は 750 ppm 群で有意に減少し た(Supplementary Table 6)。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。

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

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. 2, Supplementary Table 7)。

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. 2, Supplementary Table 8)。

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. 3, Supplementary Table 7)。

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. 3, Supplementary Table 8)。

② 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. 4, Supplementary Table 7)。

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. 4, Supplementary Table 8)。

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. 5, Supplementary Table 7)。

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. 5, Supplementary Table 8)。

(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. 6, Supplementary Table 7)。 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. 6, Supplementary Table 8)。

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 1)。 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、Chrnb2の転写産物レベルは Gapdh および/また は Hprtl 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 Aifl (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 2)。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Bcl211 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、Chrnb2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、II6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。

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. 7, Supplementary Table 9)。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)。

雄児動物の行動検査スコア

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. 8, Supplementary Table 10)。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。

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 11)。

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. 4 and Supplementary Table 12)。

D. 考察

本試験における 750 ppm の IMI 曝露に応答して、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 一遺伝子 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 Bcl211 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 Chrnb2 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、 α7-nAChR と β2-nAChR を発現しており、それぞれ Chrna7 と Chrnb2 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、Chrnb2 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 Chrnb2 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Aifl)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II6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*II4とTgfb1*の発現上昇も観察された。TGF-β1は、活性 化astrocyteによって誘導されう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(II1b、II6、Tnf)と抗炎症性(II10、II4、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、貪食活性、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 (Badgujar 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 免疫に加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α7-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 (Shytle 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α7-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*Chma7* (α7-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に曝露された雄の児動物において、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。Bcl211 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)。Bcl2ll 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 Chrnb2 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

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

得られた結果から、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
- Ojiro, R., Ozawa, S., Zou, X., Tang, Q., Woo, G-H., <u>Shibutani, M.</u>: 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., <u>Shibutani, M.</u>: 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., <u>Shibutani, M.</u>: 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., <u>Shibutani, M.</u>: Metabolic shift as a compensatory response to impaired hippocampal neurogenesis after developmental exposure to sodium fluoride in rats. Acta Histochem. 126(8), 152204, 2024.
- Zou, X., Ebizuka, Y., Sakamaki, Y., Shobudani, M., Tang, Q., Kobayashi, M., Kigata, T., <u>Shibutani, M.</u>: 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

- Xinyu Zou, Qian Tang, Ryota Ojiro, Shunsuke Ozawa, Yuri Ebizuka, Toshinori Yoshida, <u>Makoto Shibutani</u>: 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.
- Xinyu Zou, Shunsuke Ozawa, Yuri Ebizuka, <u>Makoto</u> <u>Shibutani</u>: 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。



Fig. 1 Experimental design on developmental exposure study of imidacloprid (IMI) using mated female rats.



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 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 ×400; bar 50 μ m. Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the SGZ and/or GCL. Values are expressed as mean \pm SEM. N = 10/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.



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 ×200; bar 100 µm. Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the hilar region. Values are expressed as mean ± 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.



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 ×400; bar 50 μ m. Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the GCL. Values are expressed as mean ± 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.



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 ×400; bar 50 μ m. Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the SGZ. 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.



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 ×200; bar 100 μ m. Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the hilus. Values are expressed as mean \pm SEM. N = 10/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 1	
Transcript-level expression changes of neurogenesis-related genes in the hippocampal dentate gyrus of	male offspring
on PND 21	

Relative transcript level normalized to Image matters Granule cell large matters $Mert$ $Gapdh$ $Hprtl$ Granule cell large matters Nex $1.03 \pm 0.12^{\circ}$ 1.02 ± 0.09 1.18 ± 0.17 1.40 ± 0.27 Sov2 1.02 ± 0.09 1.03 ± 0.14 1.19 ± 0.16 1.31 ± 0.14 Decx 1.02 ± 0.09 1.02 ± 0.09 1.07 ± 0.11 1.19 ± 0.16 Dysl3 1.01 ± 0.06 1.01 ± 0.05 $0.82 \pm 0.05^{\circ}$ 1.06 ± 0.16 ABA ergic intermeuron-related genes $Pvidb$ 1.02 ± 0.012 1.10 ± 0.06 1.10 ± 0.08 Pvidb 1.07 ± 0.14 1.07 ± 0.14 1.32 ± 0.12 1.26 ± 0.02 Reln 1.05 ± 0.14 1.07 ± 0.08 0.87 ± 0.05 0.39 ± 0.05 Neurotrophic factor-related genes $Vidlr$ 1.00 ± 0.06 1.07 ± 0.08 0.26 ± 0.02 Bdrif 1.01 ± 0.06 $0.07 \pm 0.05^{\circ}$ $1.34 \pm 0.08^{\circ}$ $0.3 \pm 0.05^{\circ}$ Cell proliferation marker $Pcon 1.02 \pm 0.09 1.02 \pm 0.02^{\circ} 1.03 \pm 0.13^{\circ} $		0 (Controls) 750 ppm IMI		n IMI	
	R	elative transcript level	normalized to	.	
Granule cell lineage makers $1,07$ 3000 $1,07$ 1000 Nes $1.03 \pm 0.12^{\pm}$ 1.02 ± 0.09 1.18 ± 0.17 1.40 ± 0.27 Sor2 1.02 ± 0.09 1.03 ± 0.14 1.04 ± 0.14 1.19 ± 0.16 Derc 1.02 ± 0.09 1.07 ± 0.11 1.31 ± 0.14 Dex 1.02 ± 0.09 1.07 ± 0.11 1.31 ± 0.14 Dysl 1.01 ± 0.06 1.00 ± 0.02 $0.86 \pm 0.04^{4*}$ 1.01 ± 0.09 Ribrid 1.00 ± 0.04 1.00 ± 0.08 0.04^{4*} 1.11 ± 0.02 Reln 1.05 ± 0.14 1.07 ± 0.16 1.22 ± 0.08 1.26 ± 0.12 Reln 1.05 ± 0.14 1.07 ± 0.16 1.22 ± 0.08 1.22 ± 0.08 1.26 ± 0.12 Reln 1.00 ± 0.05 1.00 ± 0.05 1.19 ± 0.05^{5} 0.90 ± 0.02 Viltr 1.00 ± 0.05 1.00 ± 0.05 1.09 ± 0.05^{5} 0.90 ± 0.02 New Corbin Extor related genes Nerk2 1.02 ± 0.09 1.02 ± 0.08 1.02 ± 0.08 1.02 ± 0.08 Merd	<u>.</u>	Gandh	Hnrt1	Gandh	Hnrt1
$\begin{tabular}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	Granule cel	Il lineage markers	11/11	Supun	11/11
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	Nes	1.03 ± 0.12^{a}	1.02 ± 0.09	1.18 ± 0.17	1.40 ± 0.27
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	Sor?	1.03 ± 0.12 1.02 ± 0.09	1.02 ± 0.09 1.03 ± 0.11	1.10 ± 0.17 1.26 ± 0.23	1.40 ± 0.27 1.45 ± 0.36
$ \begin{array}{c} \text{Lones} & 1.02 \pm 0.019 & 1.012 \pm 0.019 & 1.012 \pm 0.011 & 1.012 \pm 0.011 \\ \text{Dex} & 1.02 \pm 0.019 & 1.012 \pm 0.019 & 1.012 \pm 0.018 & 1.012 \pm 0.016 \\ \text{Dpys13} & 1.01 \pm 0.06 & 1.01 \pm 0.05 & 0.82 \pm 0.08^{\circ} & 1.06 \pm 0.09 \\ \text{Tubb3} & 1.01 \pm 0.009 & 1.10 \pm 0.02 & 0.08 \pm 0.04^{\circ} & 1.15 \pm 0.12 \\ \text{GABAcregic interneuron-related genes \\ Pvalb & 1.07 \pm 0.18 & 1.06 \pm 0.16 & 1.20 \pm 0.011 & 1.30 \pm 0.012 \\ \text{Reln} & 1.05 \pm 0.14 & 1.07 \pm 0.14 & 1.33 \pm 0.12 & 1.26 \pm 0.12 \\ \text{Reln} & 1.05 \pm 0.14 & 1.07 \pm 0.14 & 1.33 \pm 0.12 & 1.26 \pm 0.12 \\ \text{Reln} & 1.05 \pm 0.14 & 1.07 \pm 0.14 & 1.03 \pm 0.21 & 1.18 \pm 0.25 & 1.27 \pm 0.23 \\ \text{Neurotophic factor-related genes \\ \text{Dubd} & 1.10 \pm 0.06 & 1.00 \pm 0.06 & 1.12 \pm 0.08 & 1.34 \pm 0.08^{\circ*} \\ \text{Dubd} & 1.10 \pm 0.06 & 1.00 \pm 0.06 & 1.19 \pm 0.05^{\circ} & 1.34 \pm 0.08^{\circ*} \\ \text{Cell proliferation marker \\ Print & 1.02 \pm 0.09 & 1.02 \pm 0.09 & 1.21 \pm 0.14 & 1.36 \pm 0.24 \\ \text{Chainergic receptor and arzyme genes \\ Chrind7 & 1.02 \pm 0.08 & 1.01 \pm 0.06 & 1.07 \pm 0.10 & 1.16 \pm 0.09 \\ \text{Chart} & 1.03 \pm 0.13 & 1.04 \pm 0.14 & 1.99 \pm 0.25^{\circ**} & 2.06 \pm 0.23^{\circ*} \\ \text{Chrind} & 1.02 \pm 0.01 & 1.04 \pm 0.14 & 1.90 \pm 0.25^{\circ**} & 2.06 \pm 0.23^{\circ*} \\ \text{Chrind} & 1.02 \pm 0.01 & 1.02 \pm 0.09 & 1.012 \pm 0.09 & 1.01 \pm 0.06 \\ \text{Chart} & 1.03 \pm 0.13 & 1.04 \pm 0.14 & 1.99 \pm 0.13 & 1.03 \pm 0.13 \\ \text{Chrind} & 1.02 \pm 0.01 & 1.02 \pm 0.09 & 0.01 \\ \text{Mark} & 1.12 \pm 0.27 & 1.15 \pm 0.30 & 1.36 \pm 0.14 & 1.42 \pm 0.15 \\ \text{Fos} & 1.02 \pm 0.11 & 1.02 \pm 0.09 & 0.94 \pm 0.09 \pm 0.10 \\ \text{Synaptic plasticity related IEGS} \\ \text{Arc} & 1.12 \pm 0.27 & 1.15 \pm 0.30 & 1.36 \pm 0.14 & 1.42 \pm 0.08 \\ \text{Pgs2} & 1.02 \pm 0.08 & 1.02 \pm 0.09 & 0.96 \pm 0.11 & 1.00 \pm 0.13 \\ \text{Grinda} & 1.04 \pm 0.15 & 1.06 \pm 0.17 & 0.99 \pm 0.13 & 1.03 \pm 0.13 \\ \text{Grinda} & 1.04 \pm 0.15 & 1.06 \pm 0.17 & 0.99 \pm 0.13 & 1.03 \pm 0.13 \\ \text{Grinda} & 1.04 \pm 0.15 & 1.06 \pm 0.17 & 0.99 \pm 0.08 & 0.99 \pm 0.10 \\ \text{Synaptic plasticity related IEGS} \\ \text{Arc} & 1.12 \pm 0.27 & 1.15 \pm 0.21 & 0.98 \pm 0.01 & 1.03 \pm 0.13 \\ \text{Grinda} & 1.04 \pm 0.15 & 1.06 \pm 0.17 & 0.99 \pm 0.13 \\ \text{Grinda} & 1.04 \pm 0.15 & 1.06 \pm 0.17 & 0.99 \pm 0.21$	50x2 Fomes	1.02 ± 0.09 1.05 ± 0.14	1.03 ± 0.11 1.04 ± 0.14	1.20 ± 0.23 1 10 + 0 10	1.43 ± 0.30 1.31 ± 0.14
$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	Der	1.03 ± 0.14 1.02 ± 0.09	1.04 ± 0.14 1.02 ± 0.09	1.17 ± 0.10 1.07 ± 0.11	1.31 ± 0.14 1 10 + 0 16
$ \begin{array}{c} \mbox{Derivation} 1 & 0.03 & 1.03 \pm 0.03 & 1.03 \pm 0.03 & 1.03 \pm 0.03 \\ \mbox{Rbfor3} & 1.10 \pm 0.04 & 1.00 \pm 0.02 & 0.86 \pm 0.04* & 1.01 \pm 0.03 \\ \mbox{Rbfor3} & 1.10 \pm 0.04 & 1.00 \pm 0.02 & 0.86 \pm 0.04* & 1.01 \pm 0.03 \\ \mbox{Rbfor3} & 1.10 \pm 0.14 & 1.07 \pm 0.14 & 1.33 \pm 0.12 & 1.26 \pm 0.12 \\ \mbox{Reh} & 1.05 \pm 0.14 & 1.07 \pm 0.14 & 1.33 \pm 0.12 & 1.26 \pm 0.12 \\ \mbox{Reh} & 1.05 \pm 0.14 & 1.07 \pm 0.14 & 1.33 \pm 0.12 & 1.26 \pm 0.08* \\ \mbox{Dab} & 1.10 \pm 0.05 & 1.00 \pm 0.04 & 1.12 \pm 0.08 & 1.26 \pm 0.08* \\ \mbox{Dab} & 1.10 \pm 0.05 & 1.00 \pm 0.04 & 1.12 \pm 0.08 & 1.26 \pm 0.08* \\ \mbox{Dab} & 1.10 \pm 0.06 & 1.01 \pm 0.06 & 0.87 \pm 0.05 & 0.90 \pm 0.05 \\ \mbox{Nrk2} & 1.00 \pm 0.06 & 1.00 \pm 0.04 & 1.19 \pm 0.05* & 1.34 \pm 0.08** \\ \mbox{Cell proliferation marker} & & & & & & & & & & & & & & & & & & &$	Drys13	1.02 ± 0.05 1.01 ± 0.06	1.02 ± 0.05	$0.82 \pm 0.05*$	1.17 ± 0.10 1.06 ± 0.09
$ \begin{array}{c} hlpo2 & 1.01 \pm 0.09 & 1.01 \pm 0.02 & 0.00 \pm 0.09 & 1.01 \pm 0.03 \\ Bdpo2 & 1.01 \pm 0.09 & 1.01 \pm 0.02 & 0.08 \pm 0.08 & 1.15 \pm 0.12 \\ GABAergic intermeuron-related genes \\ Valb & 1.05 \pm 0.14 & 1.07 \pm 0.14 & 1.33 \pm 0.12 & 1.26 \pm 0.12 \\ Reln significar-related genes \\ Vallr & 1.00 \pm 0.05 & 1.00 \pm 0.04 & 1.12 \pm 0.08 & 1.26 \pm 0.08 \\ Vallr & 1.00 \pm 0.05 & 1.00 \pm 0.04 & 1.12 \pm 0.08 & 1.26 \pm 0.08 \\ Vallr & 1.00 \pm 0.05 & 1.00 \pm 0.04 & 1.12 \pm 0.08 & 1.26 \pm 0.08 \\ Vallr & 1.00 \pm 0.06 & 1.01 \pm 0.06 & 0.87 \pm 0.05 & 0.99 \pm 0.05 \\ Nrk2 & 1.00 \pm 0.06 & 1.00 \pm 0.05 & 1.19 \pm 0.05^{**} & 1.34 \pm 0.08^{***} \\ Cell proliferation marker \\ Pcna & 1.02 \pm 0.09 & 1.02 \pm 0.09 & 1.21 \pm 0.14 & 1.36 \pm 0.24 \\ Choninergic receptor and enzyme genes \\ Chrm2 & 1.02 \pm 0.08 & 1.01 \pm 0.06 & 1.07 \pm 0.10 & 1.16 \pm 0.09 \\ Chrmb2 & 1.02 \pm 0.10 & 1.04 \pm 0.13 & 0.77 \pm 0.04^{**} & 0.94 \pm 0.06 \\ Chrm1 & 1.07 \pm 0.20 & 1.06 \pm 0.17 & 0.17 & 0.15 & 1.15 \pm 0.13 \\ Chrm1 & 1.07 \pm 0.20 & 1.06 \pm 0.17 & 0.17 & 0.15 & 1.15 \pm 0.13 \\ Chrm1 & 1.07 \pm 0.22 \pm 0.10 & 1.02 \pm 0.09 & 1.01 \pm 0.07 & 1.16 \pm 0.08 \\ Pigs2 & 1.02 \pm 0.11 & 1.02 \pm 0.10 & 1.11 \pm 0.07 & 1.16 \pm 0.08 \\ Pigs2 & 1.02 \pm 0.11 & 1.02 \pm 0.10 & 1.11 \pm 0.07 & 1.16 \pm 0.08 \\ Pigs2 & 1.02 \pm 0.08 & 1.02 \pm 0.09 & 0.96 \pm 0.11 & 1.03 \pm 0.13 \\ Grin2 & 1.04 \pm 0.15 & 1.06 \pm 0.17 & 0.99 \pm 0.13 & 1.03 \pm 0.13 \\ Grin2 & 1.04 \pm 0.15 & 1.06 \pm 0.17 & 0.99 \pm 0.13 & 1.03 \pm 0.13 \\ Grin2 & 1.04 \pm 0.15 & 1.06 \pm 0.17 & 0.99 \pm 0.13 & 1.03 \pm 0.13 \\ Grin2 & 1.04 \pm 0.15 & 1.06 \pm 0.17 & 0.99 \pm 0.13 & 1.03 \pm 0.13 \\ Grin2 & 1.04 \pm 0.15 & 1.06 \pm 0.17 & 0.99 \pm 0.13 & 1.03 \pm 0.13 \\ Grin2 & 1.04 \pm 0.15 & 1.06 \pm 0.17 & 0.99 \pm 0.13 & 1.03 \pm 0.13 \\ Grin2 & 1.04 \pm 0.15 & 1.06 \pm 0.17 & 0.99 \pm 0.13 & 1.03 \pm 0.13 \\ Grin2 & 1.04 \pm 0.15 & 1.06 \pm 0.17 & 0.99 \pm 0.06 & 0.93 \pm 0.06 \\ Giltatmate receptors and transporters \\ Gria1 & 1.04 \pm 0.15 & 1.06 \pm 0.17 & 0.99 \pm 0.06 & 0.93 \pm 0.06 \\ Giltal cell markers \\ Grig & 1.02 \pm 0.08 & 1.02 \pm 0.08 & 1.01 \pm 0.13 & 0.64 \pm 0.12 \\ Hill & 1.06 \pm 0.16 & 1.07 \pm 0.13 & 0.64 \pm 0.12 \\ Hill & 1.06 \pm 0.16 & 1.07 \pm 0.13 & 0.64 \pm$	Dpysi5 Tubh3	1.01 ± 0.00 1.00 ± 0.04	1.01 ± 0.03 1.00 ± 0.02	$0.82 \pm 0.03^{\circ}$	1.00 ± 0.09 1.01 ± 0.05
$ \begin{array}{c} \mbox{Rel} \mb$	Rhfor3	1.00 ± 0.04 1.10 ± 0.09	1.00 ± 0.02 1.10 + 0.08	0.80 ± 0.04	1.01 ± 0.03 1.15 ± 0.12
$ \begin{array}{c} Control of the interval of the class is set of the class is the class is the class is set of the class is the class $	GABAergi	1.10 ± 0.07	1.10 ± 0.00	0.87 ± 0.08	1.13 ± 0.12
$ \begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $	Pwalh	1.07 ± 0.18	1.06 ± 0.16	1.20 ± 0.11	1.30 ± 0.12
Action 1.03 \pm 0.14 1.03 \pm 0.12 1.03 \pm 0.12 1.03 \pm 0.12 Reln signaling-related genes 1.00 \pm 0.02 1.08 \pm 0.21 1.18 \pm 0.25 1.27 \pm 0.23 Neurotrophic factor-related genes 1.00 \pm 0.06 1.01 \pm 0.06 0.87 \pm 0.05 0.90 \pm 0.05 Neurotrophic factor-related genes 1.00 \pm 0.06 1.01 \pm 0.06 0.87 \pm 0.05 0.90 \pm 0.05 Cell proliferation marker 1.02 \pm 0.09 1.21 \pm 0.14 1.36 \pm 0.24 Choinergic receptor and enzyme genes 1.01 \pm 0.06 1.07 \pm 0.10 1.16 \pm 0.09 Chrml 1.02 \pm 0.08 1.01 \pm 0.06 1.07 \pm 0.14 1.36 \pm 0.24 Chrml 1.07 \pm 0.13 1.04 \pm 0.14 1.90 \pm 0.25 2.06 \pm 0.23*** Chrml 1.07 \pm 0.16 1.07 \pm 0.17 0.79 \pm 0.08 0.90 \pm 0.10 Synaptic plasticity-related IEGs 1.02 \pm 0.09 0.16 \pm 0.14 1.42 \pm 0.15 Gria2 1.02 \pm 0.08 1.02 \pm 0.09 0.87 \pm 0.11 1.00 \pm 0.13 Gria2 1.02 \pm 0.08 1.02 \pm 0.08 1.01 \pm 0.03 0.13	Roln	1.07 ± 0.10 1.05 ± 0.14	1.00 ± 0.10 1.07 ± 0.14	1.20 ± 0.11 1 33 + 0.12	1.30 ± 0.12 1.26 + 0.12
$\begin{array}{llllllllllllllllllllllllllllllllllll$	Reln signal	ing_related genes	1.07 ± 0.14	1.55 ± 0.12	1.20 ± 0.12
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	Widle	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.04	1.12 ± 0.08	$1.26 \pm 0.08*$
$ \begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $	Dahl	1.00 ± 0.03 1.10 ± 0.24	1.00 ± 0.04 1.08 ± 0.21	1.12 ± 0.08 1.18 ± 0.25	$1.20 \pm 0.03^{\circ}$ $1.27 \pm 0.23^{\circ}$
$\begin{array}{c} \mbodule lation preduce genes \\ \mbodule lation preduce genes \\ \mbodule lation latis lation lation lation lation $	Neurotroph	1.10 ± 0.24	1.03 ± 0.21	1.10 ± 0.25	1.27 ± 0.23
$\begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $	<i>Pduf</i>	1.01 ± 0.06	1.01 ± 0.06	0.87 ± 0.05	0.00 + 0.05
$\begin{array}{c} 1.0.2 \pm 0.00 & 1.00 \pm 0.00 & 1.00 \pm 0.00 & 1.01 \pm 0.00 & 1.02 \pm 0.00 \\ \mbox{Cell proliferation marker} \\ Pena & 1.02 \pm 0.09 & 1.02 \pm 0.09 & 1.21 \pm 0.14 & 1.36 \pm 0.24 \\ \mbox{Choinergic receptor and enzyme genes} \\ \mbox{Chrm}2 & 1.02 \pm 0.01 & 1.04 \pm 0.13 & 0.77 \pm 0.04 & 0.94 \pm 0.06 \\ \mbox{Chrm}2 & 1.02 \pm 0.10 & 1.04 \pm 0.14 & 1.90 \pm 0.25^{**} & 2.06 \pm 0.23^{**} \\ \mbox{Chrm}1 & 1.07 \pm 0.20 & 1.06 \pm 0.17 & 1.05 \pm 0.15 & 1.15 \pm 0.13 \\ \mbox{Chrm}1 & 1.07 \pm 0.20 & 1.06 \pm 0.17 & 0.79 \pm 0.08 & 0.90 \pm 0.10 \\ \mbox{Synaptic plasticity-related IEGs} \\ \mbox{Arc} & 1.12 \pm 0.27 & 1.15 \pm 0.30 & 1.36 \pm 0.14 & 1.42 \pm 0.15 \\ \mbox{For} & 1.02 \pm 0.01 & 1.02 \pm 0.09 & 0.87 \pm 0.10 & 0.90 \pm 0.10 \\ \mbox{Synaptic plasticity-related IEGs} \\ \mbox{Arc} & 1.12 \pm 0.27 & 1.15 \pm 0.30 & 1.36 \pm 0.14 & 1.42 \pm 0.15 \\ \mbox{For} & 1.02 \pm 0.01 & 1.02 \pm 0.09 & 0.87 \pm 0.10 & 0.90 \pm 0.10 \\ \mbox{Giral} & 1.04 \pm 0.15 & 1.06 \pm 0.17 & 0.99 \pm 0.13 & 1.03 \pm 0.13 \\ \mbox{Grial} & 1.02 \pm 0.08 & 1.02 \pm 0.09 & 0.96 \pm 0.11 & 1.00 \pm 0.11 \\ \mbox{Grial} & 1.02 \pm 0.08 & 1.02 \pm 0.08 & 1.01 \pm 0.13 & 1.05 \pm 0.13 \\ \mbox{Grin2} & 1.02 \pm 0.06 & 1.07 \pm 0.19 & 0.98 \pm 0.11 & 1.02 \pm 0.13 \\ \mbox{Grin2} & 1.00 \pm 0.22 & 1.09 \pm 0.20 & 0.76 \pm 0.08 & 0.79 \pm 0.08 \\ \mbox{Slc17a6} & 1.61 \pm 0.70 & 1.50 \pm 0.63 & 0.71 \pm 0.13 & 0.64 \pm 0.12 \\ \mbox{Slc17a7} & 1.02 \pm 0.08 & 1.02 \pm 0.08 & 1.16 \pm 0.15 & 1.40 \pm 0.14^* \\ \mbox{Aif} & 1.09 \pm 0.20 & 0.76 \pm 0.08 & 0.79 \pm 0.08 \\ \mbox{Slc17a6} & 1.61 \pm 0.70 & 1.50 \pm 0.63 & 0.71 \pm 0.13 & 0.64 \pm 0.12 \\ \mbox{Slc17a7} & 1.02 \pm 0.08 & 1.02 \pm 0.08 & 1.16 \pm 0.15 & 1.40 \pm 0.14^* \\ \mbox{Aif} & 1.09 \pm 0.21 & 1.16 \pm 0.25 & 2.3 \pm 0.42 & 2.16 \pm 0.48 \\ \mbox{Hlb} & 1.17 \pm 0.27 & 1.14 \pm 0.24 & 1.18 \pm 0.19 & 1.31 \pm 0.24 \\ \mbox{Hl} & 1.06 \pm 0.16 & 1.077 \pm 0.17 & 1.47 \pm 0.15 & 1.62 \pm 0.18 \\ \mbox{Hlb} & 1.17 \pm 0.27 & 1.14 \pm 0.24 & 1.18 \pm 0.19 & 1.31 \pm 0.24 \\ \mbox{Hl} & 1.06 \pm 0.16 & 1.07 \pm 0.17 & 1.47 \pm 0.05 & 1.32 \pm 0.04^* \\ \mbox{Mjkbl} & 1.01 \pm 0.06 & 1.01 \pm 0.06 & 1.37 \pm 0.06 & 1.32 \pm 0.04^* \\ \mbox{Mjkbl} & 1.01 \pm 0.07 & 1.02 \pm 0.08 & 1.1$	Dunj Ntrk?	1.01 ± 0.00 1.00 ± 0.06	1.01 ± 0.00 1.00 ± 0.05	1.10 ± 0.05	0.90 ± 0.03 1 34 + 0.08**
$ \begin{array}{c} Cent product addition (additional constraints) \\ Price a 1.02 \pm 0.09 & 1.02 \pm 0.09 & 1.21 \pm 0.14 & 1.36 \pm 0.24 \\ Cholinergic receptor and enzyme genes \\ Chrinologic receptor and enzyme genes \\ Chrinologic additional constraints (Christian (Chris$	Cell prolife	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.05	1.17 ± 0.05	1.54 ± 0.06
$\begin{array}{c} 1.21 \pm 0.14 & 1.30 \pm 0.03 & 1.04 \pm 0.03 & 1.21 \pm 0.14 & 1.30 \pm 0.24 \\ \mbox{Choinergic receptor and enzyme genes} \\ \mbox{Chrma}{7} & 1.02 \pm 0.00 & 1.04 \pm 0.01 & 0.06 & 1.07 \pm 0.01 & 1.16 \pm 0.09 \\ \mbox{Chrmb}{2} & 1.02 \pm 0.10 & 1.04 \pm 0.13 & 0.77 \pm 0.04^{*} & 0.94 \pm 0.06 \\ \mbox{Chrm}{1} & 1.07 \pm 0.20 & 1.06 \pm 0.17 & 1.05 \pm 0.15 & 1.15 \pm 0.13 \\ \mbox{Chrm}{1} & 1.07 \pm 0.20 & 1.06 \pm 0.17 & 1.05 \pm 0.15 & 1.15 \pm 0.13 \\ \mbox{Chrm}{1} & 1.07 \pm 0.21 & 1.15 \pm 0.30 & 1.36 \pm 0.14 & 1.42 \pm 0.15 \\ \mbox{Form}{1} & 1.04 \pm 0.14 & 1.02 \pm 0.10 & 1.11 \pm 0.07 & 1.16 \pm 0.08 \\ \mbox{Prgs2} & 1.02 \pm 0.11 & 1.02 \pm 0.10 & 1.11 \pm 0.07 & 1.16 \pm 0.08 \\ \mbox{Prgs2} & 1.02 \pm 0.01 & 1.02 \pm 0.10 & 0.99 \pm 0.13 & 1.03 \pm 0.13 \\ \mbox{Grial} & 1.04 \pm 0.15 & 1.06 \pm 0.17 & 0.99 \pm 0.13 & 1.03 \pm 0.13 \\ \mbox{Grial} & 1.02 \pm 0.08 & 1.02 \pm 0.09 & 0.96 \pm 0.11 & 1.00 \pm 0.11 \\ \mbox{Grial} & 1.02 \pm 0.06 & 1.01 \pm 0.08 & 1.01 \pm 0.13 & 1.05 \pm 0.13 \\ \mbox{Grin2a} & 1.05 \pm 0.16 & 1.07 \pm 0.19 & 0.98 \pm 0.11 & 1.02 \pm 0.13 \\ \mbox{Grin2a} & 1.05 \pm 0.16 & 1.07 \pm 0.19 & 0.98 \pm 0.11 & 1.02 \pm 0.13 \\ \mbox{Grin2b} & 1.01 \pm 0.06 & 1.01 & 0.08 & 1.00 \pm 0.14 & 1.05 \pm 0.15 \\ \mbox{Grin2b} & 1.01 \pm 0.06 & 1.01 & 0.08 & 1.00 \pm 0.14 & 1.05 \pm 0.15 \\ \mbox{Grin2b} & 1.01 \pm 0.02 & 1.09 \pm 0.20 & 0.76 \pm 0.08 & 0.79 \pm 0.08 \\ \mbox{Skc17a7} & 1.02 \pm 0.09 & 1.03 \pm 0.11 & 0.89 \pm 0.06 & 0.93 \pm 0.06 \\ \mbox{Glial cell markers} \\ \mbox{Glial cell markers} \\ \mbox{Glial cell markers} \\ \mbox{HI} & 1.16 \pm 0.26 & 1.16 \pm 0.25 & 2.03 \pm 0.42 & 2.16 \pm 0.18 \\ \mbox{HI} & 1.17 \pm 0.27 & 1.14 \pm 0.24 & 1.18 \pm 0.19 & 1.31 \pm 0.24 \\ \mbox{HI} & 1.09 \pm 0.13 & 1.05 \pm 0.16 & 1.07 \pm 0.15 \pm 0.04 \\ \mbox{HI} & 1.04 \pm 0.13 & 1.05 \pm 0.14 & 1.38 \pm 0.14 & 1.49 \pm 0.18 \\ \mbox{Themical mediators} \\ \mbox{HI} & 1.01 \pm 0.06 & 1.02 \pm 0.08 & 1.17 \pm 0.05 & 1.28 \pm 0.08 \\ \mbox{Mi} & 1.01 \pm 0.06 & 1.02 \pm 0.08 & 1.17 \pm 0.05 & 1.28 \pm 0.08 \\ \mbox{Mi} & 1.01 \pm 0.06 & 1.02 \pm 0.08 & 1.17 \pm 0.05 & 1.28 \pm 0.08 \\ \mbox{Mi} & 1.01 \pm 0.06 & 1.02 \pm 0.08 & 1.17 \pm 0.05 & 1.28 \pm 0.08 \\ \mbox{Mi} & 1.01 \pm 0.06 & 1.02 \pm 0.$	Pona	1.02 ± 0.00	1.02 ± 0.00	1.21 ± 0.14	1.36 ± 0.24
$\begin{array}{c} \text{Chrmad} \\ \text{Chrmad} & 1.02 \pm 0.08 & 1.01 \pm 0.06 & 1.07 \pm 0.10 & 1.16 \pm 0.09 \\ \text{Chrmb2} & 1.02 \pm 0.10 & 1.04 \pm 0.13 & 0.77 \pm 0.04* & 0.94 \pm 0.06 \\ \text{Chat} & 1.03 \pm 0.13 & 1.04 \pm 0.14 & 1.90 \pm 0.25** & 2.06 \pm 0.23** \\ \text{Chrml} & 1.07 \pm 0.20 & 1.06 \pm 0.17 & 1.05 \pm 0.15 & 1.15 \pm 0.13 \\ \text{Chrml} & 1.07 \pm 0.27 & 1.15 \pm 0.30 & 1.36 \pm 0.14 & 1.42 \pm 0.15 \\ \text{Fos} & 1.02 \pm 0.27 & 1.15 \pm 0.30 & 1.36 \pm 0.14 & 1.42 \pm 0.15 \\ \text{Fos} & 1.02 \pm 0.08 & 1.02 \pm 0.09 & 0.87 \pm 0.10 & 0.90 \pm 0.10 \\ \text{Gluamate receptors and transporters} \\ \text{Grial} & 1.04 \pm 0.15 & 1.06 \pm 0.17 & 0.99 \pm 0.13 & 1.03 \pm 0.13 \\ \text{Gria2} & 1.02 \pm 0.08 & 1.02 \pm 0.09 & 0.96 \pm 0.11 & 1.00 \pm 0.11 \\ \text{Gria3} & 1.01 \pm 0.06 & 1.02 \pm 0.09 & 0.96 \pm 0.11 & 1.00 \pm 0.11 \\ \text{Gria3} & 1.01 \pm 0.06 & 1.02 \pm 0.09 & 0.96 \pm 0.11 & 1.00 \pm 0.13 \\ \text{Grin24} & 1.05 \pm 0.16 & 1.07 \pm 0.19 & 0.98 \pm 0.11 & 1.02 \pm 0.13 \\ \text{Grin24} & 1.00 \pm 0.06 & 1.00 \pm 0.03 & 0.014 & 1.05 & 0.15 \\ \text{Gria24} & 1.10 \pm 0.22 & 1.09 \pm 0.20 & 0.76 \pm 0.08 & 0.79 \pm 0.08 \\ \text{Slc17a6} & 1.61 \pm 0.70 & 1.50 \pm 0.63 & 0.71 \pm 0.13 & 0.64 \pm 0.12 \\ \text{Slc17a7} & 1.02 \pm 0.08 & 1.02 \pm 0.08 & 1.16 \pm 0.15 & 1.40 \pm 0.14* \\ \text{Alj1} & 0.98 \pm 0.08 & 0.98 \pm 0.09 & 1.34 \pm 0.11* & 1.49 \pm 0.18* \\ \text{Chemical mediators} \\ \text{H10} & 1.16 \pm 0.26 & 1.16 \pm 0.25 & 2.03 \pm 0.42 & 2.16 \pm 0.48 \\ \text{H11b} & 1.17 \pm 0.27 & 1.14 \pm 0.24 & 1.18 \pm 0.19 & 1.31 \pm 0.24 \\ \text{H4} & 1.06 \pm 0.16 & 1.07 \pm 0.17 & 1.51 \pm 0.21 & 1.62 \pm 0.18 \\ \text{H11b} & 1.17 \pm 0.27 & 1.14 \pm 0.24 & 1.18 \pm 0.19 & 1.31 \pm 0.24 \\ \text{H4} & 1.06 \pm 0.16 & 1.07 \pm 0.17 & 1.04 \pm 0.05 & 1.32 \pm 0.04* \\ \text{Migh1} & 1.01 \pm 0.06 & 1.02 \pm 0.08 & 1.17 \pm 0.05 & 1.28 \pm 0.08 \\ \text{Oxidative stres-related genes} \\ \text{Hmax} & 1.01 \pm 0.07 & 1.02 \pm 0.08 & 1.17 \pm 0.05 & 1.28 \pm 0.08* \\ \text{Oxidative stres-related genes} \\ \text{Hmax} & 1.01 \pm 0.07 & 1.02 \pm 0.08 & 1.07 \pm 0.10* & 1.52 \pm 0.18 \\ \text{Migh1} & 1.01 \pm 0.08 & 1.02 \pm 0.08 & 1.07 \pm 0.05 & 1.33 \pm 0.04* \\ \text{Migh1} & 1.01 \pm 0.08 & 1.02 \pm 0.09 & 1.54 \pm 0.16* & 1.77 \pm 0.20* \\ \text{Migh1} & 1.01 \pm 0.08 & 1.02 \pm 0.09 & 1.54 \pm 0.16* & 1.77 \pm 0.20* \\ \text{Migh2} & 1.07$	Cholinergi	1.02 ± 0.07 recentor and enzyme of	1.02 ± 0.07	1.21 ± 0.14	1.30 ± 0.24
$\begin{array}{c} Chrmbol & 1.02 \pm 0.00 & 1.04 \pm 0.13 & 1.07 \pm 0.10 & 1.10 \pm 0.09 \\ Chrat & 1.03 \pm 0.13 & 1.04 \pm 0.13 & 0.77 \pm 0.04^* & 0.94 \pm 0.06 \\ Chat & 1.03 \pm 0.13 & 1.04 \pm 0.13 & 1.07 \pm 0.04^* & 0.94 \pm 0.06 \\ Chrml & 1.07 \pm 0.20 & 1.06 \pm 0.17 & 1.05 \pm 0.15 & 1.15 \pm 0.13 \\ Chrml & 1.07 \pm 0.20 & 1.06 \pm 0.17 & 1.05 \pm 0.15 & 1.15 \pm 0.13 \\ Chrml & 1.07 \pm 0.27 & 1.15 \pm 0.30 & 1.36 \pm 0.14 & 1.42 \pm 0.15 \\ Fos & 1.02 \pm 0.11 & 1.02 \pm 0.10 & 1.11 \pm 0.07 & 1.16 \pm 0.08 \\ Ptgs2 & 1.02 \pm 0.11 & 1.02 \pm 0.10 & 1.11 \pm 0.07 & 1.16 \pm 0.08 \\ Ptgs2 & 1.02 \pm 0.11 & 1.02 \pm 0.10 & 1.11 \pm 0.07 & 1.16 \pm 0.08 \\ Ptgs2 & 1.02 \pm 0.08 & 1.02 \pm 0.09 & 0.87 \pm 0.10 & 0.90 \pm 0.10 \\ Ghtamate receptors and transporters \\ Grial & 1.04 \pm 0.15 & 1.06 \pm 0.17 & 0.99 \pm 0.13 & 1.03 \pm 0.13 \\ Gria2 & 1.02 \pm 0.08 & 1.02 \pm 0.08 & 1.01 \pm 0.13 & 1.05 \pm 0.13 \\ Grin2a & 1.05 \pm 0.16 & 1.07 \pm 0.19 & 0.98 \pm 0.11 & 1.02 \pm 0.13 \\ Grin2b & 1.01 \pm 0.06 & 1.01 & 0.08 & 1.00 \pm 0.14 & 1.05 & 0.15 \\ Grin2a & 1.05 \pm 0.16 & 1.07 \pm 0.19 & 0.98 \pm 0.11 & 1.02 \pm 0.13 \\ Grin2b & 1.01 \pm 0.06 & 1.01 & 0.08 & 1.00 \pm 0.14 & 1.05 & 0.15 \\ Grin2d & 1.01 \pm 0.22 & 1.09 \pm 0.20 & 0.76 \pm 0.08 & 0.79 \pm 0.08 \\ Slc17a6 & 1.61 \pm 0.70 & 1.50 \pm 0.63 & 0.71 \pm 0.13 & 0.64 \pm 0.12 \\ Slc17a6 & 1.61 \pm 0.70 & 1.50 \pm 0.63 & 0.71 \pm 0.13 & 0.64 \pm 0.12 \\ Mill & 1.17 \pm 0.27 & 1.14 \pm 0.24 & 1.18 \pm 0.19 & 1.31 \pm 0.24 \\ Hla & 1.06 \pm 0.16 & 1.07 \pm 0.17 & 1.51 \pm 0.21 & 1.62 \pm 0.18 \\ Hla & 1.16 \pm 0.26 & 1.16 \pm 0.25 & 2.03 \pm 0.42 & 2.16 \pm 0.48 \\ Hlb & 1.17 \pm 0.27 & 1.14 \pm 0.24 & 1.18 \pm 0.19 & 1.31 \pm 0.24 \\ Hla & 1.06 \pm 0.16 & 1.07 \pm 0.17 & 1.47 \pm 0.15 & 1.60 \pm 0.13 \\ Ho & 1.06 \pm 0.16 & 1.07 \pm 0.17 & 1.47 \pm 0.15 & 1.60 \pm 0.13 \\ Ho & 1.06 \pm 0.16 & 1.07 \pm 0.17 & 1.47 \pm 0.05 & 1.28 \pm 0.08 \\ Ngkb1 & 1.01 \pm 0.06 & 1.02 \pm 0.08 & 1.17 \pm 0.05 & 1.28 \pm 0.08 \\ Ngkb1 & 1.01 \pm 0.07 & 1.02 \pm 0.08 & 1.17 \pm 0.05 & 1.28 \pm 0.08 \\ Ngkb1 & 1.01 \pm 0.07 & 1.02 \pm 0.08 & 1.17 \pm 0.05 & 1.28 \pm 0.08 \\ Ngkb1 & 1.01 \pm 0.07 & 1.02 \pm 0.08 & 1.17 \pm 0.05 & 1.28 \pm 0.08 \\ Ngkb1 & 1.01 \pm 0.07 & 1.01 \pm 0.06 & 1.37 \pm 0.10 \\ Ngc21 & 1.01 \pm 0.07 & 1.01 \pm 0.06 $	Chrna7	1.02 ± 0.08	1.01 ± 0.06	1.07 ± 0.10	1.16 ± 0.00
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	Chruh?	1.02 ± 0.00 1.02 ± 0.10	1.01 ± 0.00 1.01 ± 0.12	0.77 ± 0.10	0.07 ± 0.07
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	Chinto2	1.02 ± 0.10 1.02 ± 0.12	1.04 ± 0.13	$1.00 \pm 0.25 **$	0.94 ± 0.00
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	Chui Chrm1	1.03 ± 0.13 1.07 ± 0.20	1.04 ± 0.14 1.06 ± 0.17	$1.90 \pm 0.23^{++}$ $1.05 \pm 0.15^{++}$	$2.00 \pm 0.23^{++}$ 1 15 ± 0 13
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	Chrm2	1.07 ± 0.20 1.06 ± 0.16	1.00 ± 0.17	1.05 ± 0.13	1.13 ± 0.13
$ \begin{array}{llllllllllllllllllllllllllllllllllll$	Synantic pl	1.00 ± 0.10	1.07 ± 0.17	0.79 ± 0.08	0.90 ± 0.10
Arc 1.12 ± 0.27 1.13 ± 0.30 1.30 ± 0.14 1.42 ± 0.13 Fos 1.02 ± 0.01 1.11 ± 0.07 1.16 ± 0.08 Pigs2 1.02 ± 0.08 1.02 ± 0.09 0.87 ± 0.10 0.99 ± 0.13 Grial 1.04 ± 0.15 1.06 ± 0.17 0.99 ± 0.13 1.03 ± 0.13 Gria2 1.02 ± 0.08 1.02 ± 0.08 1.01 ± 0.13 1.05 ± 0.13 Grin2a 1.01 ± 0.06 1.02 ± 0.08 1.01 ± 0.13 1.05 ± 0.13 Grin2b 1.01 ± 0.06 1.01 ± 0.08 1.00 ± 0.11 1.00 ± 0.13 Grin2d 1.01 ± 0.22 1.09 ± 0.20 0.76 ± 0.08 0.79 ± 0.08 Slc17a7 1.02 ± 0.09 1.03 ± 0.11 0.89 ± 0.06 0.93 ± 0.06 Glap 1.02 ± 0.08 1.02 ± 0.08 1.16 ± 0.15 $1.40 \pm 0.14^*$ AlfI 0.98 ± 0.08 0.98 ± 0.09 $1.34 \pm 0.11^*$ $1.49 \pm 0.18^*$ Chemical mediators IIIa 1.09 ± 0.21 1.51 ± 0.21 1.62 ± 0.18 IIIb 1.17 ± 0.27 1.14 ± 0.24 1.18 ± 0.19 1.31 ± 0.24 IIIb <td>Synaptic pi</td> <td>asticity-related IEOs 1.12 ± 0.27</td> <td>1.15 ± 0.20</td> <td>1.26 ± 0.14</td> <td>1.42 ± 0.15</td>	Synaptic pi	asticity-related IEOs 1.12 ± 0.27	1.15 ± 0.20	1.26 ± 0.14	1.42 ± 0.15
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	Eas	1.12 ± 0.27 1.02 ± 0.11	1.13 ± 0.30 1.02 ± 0.10	1.30 ± 0.14 1.11 ± 0.07	1.42 ± 0.13 1.16 ± 0.09
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	rus Dtas?	1.02 ± 0.11 1.02 ± 0.08	1.02 ± 0.10 1.02 ± 0.00	1.11 ± 0.07 0.87 ± 0.10	1.10 ± 0.08
Grial 1.04 ± 0.151.06 ± 0.170.99 ± 0.131.03 ± 0.13Grial1.01 ± 0.061.02 ± 0.090.96 ± 0.111.00 ± 0.11Gria31.01 ± 0.061.02 ± 0.081.01 ± 0.131.05 ± 0.13Grin2a1.05 ± 0.161.07 ± 0.190.98 ± 0.111.02 ± 0.13Grin2b1.01 ± 0.061.01 0.081.00 ± 0.141.05 0.15Grin2d1.10 ± 0.221.09 ± 0.200.76 ± 0.080.79 ± 0.08Slc17a61.61 ± 0.701.50 ± 0.630.71 ± 0.130.64 ± 0.12Slc17a71.02 ± 0.091.03 ± 0.110.89 ± 0.060.93 ± 0.06Glial cell markersGrap1.02 ± 0.081.02 ± 0.081.16 ± 0.151.40 ± 0.14*Aifl0.98 ± 0.091.34 ± 0.11*1.49 ± 0.18*Chemical mediators1.10 ± 0.261.16 ± 0.252.03 ± 0.422.16 ± 0.48Ill01.08 ± 0.191.09 ± 0.211.51 ± 0.211.62 ± 0.18Ill101.08 ± 0.191.09 ± 0.211.51 ± 0.211.66 ± 0.13*Ill61.06 ± 0.161.07 ± 0.171.47 ± 0.151.60 ± 0.13*Ill61.06 ± 0.151.06 ± 0.161.52 ± 0.181.64 ± 0.14*Thf1.04 ± 0.131.05 ± 0.141.38 ± 0.141.49 ± 0.11*Sight1.01 ± 0.061.02 ± 0.081.17 ± 0.051.28 ± 0.08*Oxidative stress-related genes1.00 ± 0.071.02 ± 0.081.17 ± 0.051.28 ± 0.08*Hmox11.01 ± 0.051.00 ± 0.071.05 ± 0.061.15 ± 0.07Cat1.01 ±	Glutamata	1.02 ± 0.00	1.02 ± 0.09	0.87 ± 0.10	0.90 ± 0.10
$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	Crial	1.04 ± 0.15	1.06 ± 0.17	0.00 ± 0.12	1.02 ± 0.12
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	Gria?	1.04 ± 0.13 1.02 ± 0.08	1.00 ± 0.17	0.99 ± 0.13	1.03 ± 0.13 1.00 + 0.11
$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	Gria3	1.02 ± 0.06 1.01 ± 0.06	1.02 ± 0.09 1.02 ± 0.08	0.90 ± 0.11 1.01 \pm 0.13	1.00 ± 0.11 1.05 ± 0.13
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	Grin2a	1.01 ± 0.00 1.05 ± 0.16	1.02 ± 0.03 1.07 ± 0.19	1.01 ± 0.13	1.03 ± 0.13 1.02 ± 0.13
$Grin2D$ 1.01 ± 0.03 1.01 ± 0.03 1.01 ± 0.14 1.03 ± 0.13 $Grin2D$ 1.61 ± 0.70 1.50 ± 0.63 0.76 ± 0.08 0.79 ± 0.08 $Slc17a6$ 1.61 ± 0.70 1.50 ± 0.63 0.71 ± 0.13 0.64 ± 0.12 $Slc17a7$ 1.02 ± 0.09 1.03 ± 0.11 0.89 ± 0.06 0.93 ± 0.06 Gial cell markers $Giap$ 1.02 ± 0.08 1.02 ± 0.08 1.16 ± 0.15 $1.40 \pm 0.14^*$ $Aif1$ 0.98 ± 0.08 0.98 ± 0.09 $1.34 \pm 0.11^*$ $1.49 \pm 0.18^*$ Chemical mediators $I.16 \pm 0.26$ 1.16 ± 0.25 2.03 ± 0.42 2.16 ± 0.48 $II1a$ 1.16 ± 0.26 1.16 ± 0.25 2.03 ± 0.42 2.16 ± 0.48 $II1a$ 1.06 ± 0.16 1.07 ± 0.17 1.47 ± 0.15 $1.60 \pm 0.13^*$ $I6$ 1.06 ± 0.15 1.06 ± 0.16 1.52 ± 0.18 $1.64 \pm 0.14^*$ $II4$ 1.06 ± 0.15 1.06 ± 0.16 1.52 ± 0.18 $1.64 \pm 0.14^*$ $II4$ 1.06 ± 0.15 1.06 ± 0.16 1.52 ± 0.18 $1.64 \pm 0.14^*$ $II6$ 1.06 ± 0.15 1.06 ± 0.16 1.52 ± 0.18 $1.64 \pm 0.14^*$ $IIff$ 1.01 ± 0.06 1.02 ± 0.08 $1.16 \pm 0.04^*$ $1.28 \pm 0.08^*$ Oxidative stress-related genes $III7 \pm 0.05$ $1.28 \pm 0.05^*$ $I.34 \pm 0.06$ $I.30 \pm 0.10$ $ImaxI$ 1.01 ± 0.07 1.02 ± 0.08 1.17 ± 0.05 $1.28 \pm 0.05^*$ $KeapI$ 1.01 ± 0.07 1.01 ± 0.07 1.05 ± 0.06 1.15 ± 0.07 $Grad$ 1.02 ± 0.10 <td>Grin2h Crin2h</td> <td>1.03 ± 0.10 1.01 ± 0.06</td> <td>1.07 ± 0.19</td> <td>0.98 ± 0.11</td> <td>1.02 ± 0.13</td>	Grin2h Crin2h	1.03 ± 0.10 1.01 ± 0.06	1.07 ± 0.19	0.98 ± 0.11	1.02 ± 0.13
Orm241.101.0.221.091.0.200.700.700.700.790.03 $Slc17a7$ 1.021.001.501.630.711.0130.640.12 $Slc17a7$ 1.021.001.031.010.891.030.641.12 $Gfap$ 1.021.020.081.020.081.160.151.401.44 $Aif1$ 0.980.080.980.091.340.11*1.490.14* $Aif1$ 0.980.080.980.091.340.11*1.490.14* $Chemical mediators$ 1101.080.191.090.211.510.211.620.18 $I11a$ 1.160.261.160.252.030.422.160.48 $I11b$ 1.170.271.140.241.180.191.310.24 $I14$ 1.060.151.060.161.520.181.640.14* $I16$ 1.060.151.061.020.051.320.04* $I16$ 1.040.131.050.141.380.141.490.11* $Tgfb1$ 1.010.061.020.081.171.040.131.02 $Nfkb1$ 1.010.051.000.041.020.051.320.06 $Nfkb1$ 1.010.051.000.041.020.051.130.06 $Nfe2l2$ 1.010.051.01<	Grin2d	1.01 ± 0.00 1.10 ± 0.22	1.01 0.08 1.09 ± 0.20	1.00 ± 0.14 0.76 ± 0.08	1.03 0.13 0.70 ± 0.08
$Slc17a0$ 1.01 ± 0.70 1.03 ± 0.03 0.11 ± 0.13 0.04 ± 0.12 $Slc17a7$ 1.02 ± 0.09 1.03 ± 0.11 0.89 ± 0.06 0.93 ± 0.06 Gfap 1.02 ± 0.08 1.02 ± 0.08 1.16 ± 0.15 $1.40 \pm 0.14^*$ $Aifl$ 0.98 ± 0.08 0.98 ± 0.09 $1.34 \pm 0.11^*$ $1.49 \pm 0.18^*$ Chemical mediators 1.16 ± 0.26 1.16 ± 0.25 2.03 ± 0.42 2.16 ± 0.48 $I11a$ 1.16 ± 0.27 1.14 ± 0.24 1.18 ± 0.19 1.31 ± 0.24 $I14$ 1.06 ± 0.16 1.07 ± 0.17 1.47 ± 0.15 $1.60 \pm 0.13^*$ $I16$ 1.06 ± 0.15 1.06 ± 0.16 1.52 ± 0.18 $1.64 \pm 0.14^*$ $I16$ 1.06 ± 0.15 1.06 ± 0.16 1.52 ± 0.18 $1.64 \pm 0.14^*$ Inf 1.04 ± 0.13 1.05 ± 0.14 1.38 ± 0.14 $1.49 \pm 0.11^*$ $Tyfol$ 1.01 ± 0.06 1.02 ± 0.08 $1.16 \pm 0.04^*$ $1.28 \pm 0.08^*$ $Nfkb1$ 1.01 ± 0.05 1.00 ± 0.04 1.02 ± 0.05 $1.32 \pm 0.04^*$ $Nfkb1$ 1.01 ± 0.05 1.00 ± 0.06 $1.37 \pm 0.10^*$	Sla17a6	1.10 ± 0.22 1.61 ± 0.70	1.09 ± 0.20 1 50 ± 0.63	0.70 ± 0.03 0.71 ± 0.13	0.79 ± 0.08 0.64 ± 0.12
Solution 1.02 \pm 0.031.03 \pm 0.110.03 \pm 0.030.03 \pm 0.03Glial cell markersGfap1.02 \pm 0.081.16 \pm 0.151.40 \pm 0.14*Aif10.03 \pm 0.031.05 \pm 0.030.03 \pm 0.030.03 \pm 0.030.03 \pm 0.03Gfap1.02 \pm 0.081.16 \pm 0.151.40 \pm 0.14*Aif10.98 \pm 0.091.34 \pm 0.11*1.49 \pm 0.14*Aif10.98 \pm 0.091.34 \pm 0.11*1.49 \pm 0.18*Chemical mediators1.16 \pm 0.252.03 \pm 0.422.16 \pm 0.18III $=$ 0.17 \pm 0.141.34 \pm 0.191.31 \pm 0.24III $=$ 0.13 \pm 0.14 \pm 1.16 \pm 0.141.40 \pm 0.13*II61.52 \pm 0.181.60 \pm 0.13*II61.02 \pm 0.061.16 \pm 0.04*1.28 \pm 0.05*IIII0.16 \pm 0.141.32 \pm 0.04*IIII1.16 \pm 0.041.28 \pm 0.04*IIII \pm 0.141.32 \pm 0.04*IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII	Sle17a7	1.01 ± 0.70 1.02 ± 0.00	1.30 ± 0.03 1.03 ± 0.11	0.71 ± 0.13	0.04 ± 0.12 0.03 ± 0.06
Grap1.02 \pm 0.081.16 \pm 0.151.40 \pm 0.14* <i>Gfap</i> 1.02 \pm 0.080.98 \pm 0.091.34 \pm 0.11*1.49 \pm 0.14* <i>Aif1</i> 0.98 \pm 0.080.98 \pm 0.091.34 \pm 0.11*1.49 \pm 0.18* <i>Chemical mediators</i> 1101.08 \pm 0.191.09 \pm 0.211.51 \pm 0.211.62 \pm 0.18 <i>Il1a</i> 1.16 \pm 0.261.16 \pm 0.252.03 \pm 0.422.16 \pm 0.48 <i>II1b</i> 1.17 \pm 0.271.14 \pm 0.241.18 \pm 0.191.31 \pm 0.24 <i>Il4</i> 1.06 \pm 0.161.07 \pm 0.171.47 \pm 0.151.60 \pm 0.13* <i>Il6</i> 1.06 \pm 0.151.06 \pm 0.161.52 \pm 0.181.64 \pm 0.14* <i>Inf</i> 1.04 \pm 0.131.05 \pm 0.141.38 \pm 0.141.49 \pm 0.11* <i>Tgfb1</i> 1.01 \pm 0.081.02 \pm 0.081.16 \pm 0.04*1.28 \pm 0.08*Oxidative stress-related genes1.17 \pm 0.051.28 \pm 0.05*1.28 \pm 0.05* <i>Keap1</i> 1.01 \pm 0.051.01 \pm 0.061.37 \pm 0.10*1.52 \pm 0.18* <i>Sod1</i> 1.13 \pm 0.181.13 \pm 0.181.18 \pm 0.061.30 \pm 0.10 <i>Sod2</i> 1.01 \pm 0.071.02 \pm 0.091.54 \pm 0.16*1.70 \pm 0.20* <i>Mtl</i> 1.01 \pm 0.081.02 \pm 0.091.54 \pm 0.16*1.70 \pm 0.20* <i>Mtl</i> 1.01 \pm 0.081.02 \pm 0.091.54 \pm 0.16*1.70 \pm 0.20* <i>Mila</i> 1.01 \pm 0.081.02 \pm 0.091.54 \pm 0.16*1.70 \pm 0.20* <i>Mila</i> 1.01 \pm 0.081.02 \pm 0.09 <td>Glial cell r</td> <td>1.02 ± 0.09</td> <td>1.03 ± 0.11</td> <td>0.89 ± 0.00</td> <td>0.95 ± 0.00</td>	Glial cell r	1.02 ± 0.09	1.03 ± 0.11	0.89 ± 0.00	0.95 ± 0.00
$O(q)$ 1.02 ± 0.03 1.02 ± 0.03 1.102 ± 0.03 1.10 ± 0.13 $1.40 \pm 0.14^{\circ}$ $AifI$ 0.98 ± 0.08 0.98 ± 0.09 $1.34 \pm 0.11^{\circ}$ $1.49 \pm 0.18^{\circ}$ $Chemical mediators$ 1.10 ± 0.21 1.51 ± 0.21 1.62 ± 0.18 $IIIa$ 1.16 ± 0.26 1.16 ± 0.25 2.03 ± 0.42 2.16 ± 0.48 $IIIb$ 1.17 ± 0.27 1.14 ± 0.24 1.18 ± 0.19 1.31 ± 0.24 $II4$ 1.06 ± 0.16 1.07 ± 0.17 1.47 ± 0.15 $1.60 \pm 0.13^{\circ}$ $II6$ 1.06 ± 0.15 1.06 ± 0.16 1.52 ± 0.18 $1.64 \pm 0.14^{\circ}$ Inf 1.04 ± 0.13 1.05 ± 0.14 1.38 ± 0.14 $1.49 \pm 0.11^{\circ}$ $Tuff$ 1.04 ± 0.13 1.05 ± 0.14 1.38 ± 0.14 $1.49 \pm 0.11^{\circ}$ $Tgfb1$ 1.01 ± 0.08 1.02 ± 0.08 $1.16 \pm 0.04^{\circ}$ $1.28 \pm 0.08^{\circ}$ Oxidative stress-related genes 1.10 ± 0.07 1.02 ± 0.08 1.17 ± 0.05 $1.28 \pm 0.05^{\circ}$ $HmoxI$ 1.01 ± 0.07 1.02 ± 0.08 1.17 ± 0.05 $1.28 \pm 0.05^{\circ}$ $KeapI$ 1.01 ± 0.07 1.02 ± 0.08 1.17 ± 0.05 $1.28 \pm 0.05^{\circ}$ $SodI$ 1.13 ± 0.18 1.13 ± 0.18 1.13 ± 0.16 1.30 ± 0.10 $Sod2$ 1.01 ± 0.07 1.02 ± 0.09 $1.54 \pm 0.16^{\circ}$ $1.70 \pm 0.20^{\circ}$ $Mt1$ 1.01 ± 0.08 1.02 ± 0.09 $1.54 \pm 0.16^{\circ}$ $1.70 \pm 0.20^{\circ}$ $Mt1$ 1.01 ± 0.08 1.02 ± 0.09 $1.54 \pm 0.16^{\circ}$ $1.70 \pm 0.20^{\circ}$ $Mt1$ 1	Cfan	1.02 ± 0.08	1.02 ± 0.08	1.16 ± 0.15	$1.40 \pm 0.14*$
A_{II} 0.38 ± 0.08 0.38 ± 0.09 1.34 ± 0.11^{14} 1.49 ± 0.18^{34} Chemical mediators $III0$ 1.08 ± 0.19 1.09 ± 0.21 1.51 ± 0.21 1.62 ± 0.18 $IIIa$ 1.16 ± 0.26 1.16 ± 0.25 2.03 ± 0.42 2.16 ± 0.48 $IIIb$ 1.17 ± 0.27 1.14 ± 0.24 1.18 ± 0.19 1.31 ± 0.24 $II4$ 1.06 ± 0.16 1.07 ± 0.17 1.47 ± 0.15 $1.60 \pm 0.13^*$ $II6$ 1.06 ± 0.15 1.06 ± 0.16 1.52 ± 0.18 $1.64 \pm 0.14^*$ Tnf 1.04 ± 0.13 1.05 ± 0.14 1.38 ± 0.14 $1.49 \pm 0.11^*$ $Tgfb1$ 1.01 ± 0.08 1.02 ± 0.10 1.20 ± 0.05 $1.32 \pm 0.04^*$ $Nfkb1$ 1.01 ± 0.06 1.02 ± 0.08 $1.16 \pm 0.04^*$ $1.28 \pm 0.05^*$ $Keap1$ 1.01 ± 0.07 1.02 ± 0.08 1.17 ± 0.05 $1.28 \pm 0.05^*$ $Keap1$ 1.01 ± 0.05 1.01 ± 0.06 $1.37 \pm 0.10^{**}$ $1.52 \pm 0.18^*$ $Sod1$ 1.13 ± 0.18 1.13 ± 0.18 1.18 ± 0.06 1.30 ± 0.10 $Sod2$ 1.01 ± 0.07 1.01 ± 0.07 1.05 ± 0.06 1.15 ± 0.07 Cat 1.02 ± 0.10 1.03 ± 0.12 1.07 ± 0.05 1.19 ± 0.11 $Mt1$ 1.01 ± 0.08 1.02 ± 0.09 $1.54 \pm 0.16^*$ $1.70 \pm 0.20^*$ $Mt2a$ 1.07 ± 0.17 1.06 ± 0.17 $1.61 \pm 0.17^*$ $1.77 \pm 0.19^*$ $Nos2$ 1.07 ± 0.18 1.08 ± 0.20 1.16 ± 0.14 1.24 ± 0.12 $GpxI$ 1.06 ± 0.14 1.05 ± 0.14 <td< td=""><td>0jup 1;f1</td><td>1.02 ± 0.08</td><td>1.02 ± 0.03</td><td>1.10 ± 0.13 $1.24 \pm 0.11*$</td><td>$1.40 \pm 0.14^{\circ}$ $1.40 \pm 0.18^{\circ}$</td></td<>	0jup 1;f1	1.02 ± 0.08	1.02 ± 0.03	1.10 ± 0.13 $1.24 \pm 0.11*$	$1.40 \pm 0.14^{\circ}$ $1.40 \pm 0.18^{\circ}$
Interfact inclusionsIII0 1.08 ± 0.19 1.09 ± 0.21 1.51 ± 0.21 1.62 ± 0.18 IIIa 1.16 ± 0.26 1.16 ± 0.25 2.03 ± 0.42 2.16 ± 0.48 IIIb 1.17 ± 0.27 1.14 ± 0.24 1.18 ± 0.19 1.31 ± 0.24 II4 1.06 ± 0.16 1.07 ± 0.17 1.47 ± 0.15 $1.60 \pm 0.13^*$ II6 1.06 ± 0.15 1.06 ± 0.16 1.52 ± 0.18 $1.64 \pm 0.14^*$ Trif 1.04 ± 0.13 1.05 ± 0.14 1.38 ± 0.14 $1.49 \pm 0.11^*$ Tgfb1 1.01 ± 0.08 1.02 ± 0.10 1.20 ± 0.05 $1.32 \pm 0.04^*$ Nfkb1 1.01 ± 0.06 1.02 ± 0.08 $1.16 \pm 0.04^*$ $1.28 \pm 0.08^*$ Oxidative stress-related genes $HmoxI$ 1.01 ± 0.07 1.02 ± 0.08 1.17 ± 0.05 $1.28 \pm 0.05^*$ Keap1 1.01 ± 0.05 1.00 ± 0.04 1.02 ± 0.05 1.13 ± 0.06 1.30 ± 0.10 Nfe2l2 1.01 ± 0.07 1.01 ± 0.07 1.05 ± 0.06 $1.37 \pm 0.10^*$ $1.52 \pm 0.18^*$ Sod1 1.13 ± 0.18 1.13 ± 0.18 1.18 ± 0.06 1.30 ± 0.10 Sod2 1.01 ± 0.07 1.01 ± 0.07 1.05 ± 0.06 1.15 ± 0.07 Cat 1.02 ± 0.10 1.03 ± 0.12 1.07 ± 0.05 1.19 ± 0.11 Mt1 1.01 ± 0.08 1.02 ± 0.09 $1.54 \pm 0.16^*$ $1.70 \pm 0.20^*$ Mt2a 1.07 ± 0.17 1.06 ± 0.17 $1.61 \pm 0.17^*$ $1.77 \pm 0.19^*$ Nos2 1.07 ± 0.18 1.08 ± 0.20 1.16 ± 0.14 1.24 ± 0.12	Chemical n	ediators	0.98 ± 0.09	1.54 ± 0.11	1.47 ± 0.18
$I100$ $I.00 \pm 0.17$ $I.00 \pm 0.21$ $I.01 \pm 0.21$ $I.01 \pm 0.21$ $II1a$ 1.16 ± 0.26 1.16 ± 0.25 2.03 ± 0.42 2.16 ± 0.48 $II1b$ 1.17 ± 0.27 1.14 ± 0.24 1.18 ± 0.19 1.31 ± 0.24 $II4$ 1.06 ± 0.16 1.07 ± 0.17 1.47 ± 0.15 $1.60 \pm 0.13^*$ $II6$ 1.06 ± 0.15 1.06 ± 0.16 1.52 ± 0.18 $1.64 \pm 0.14^*$ $II6$ 1.00 ± 0.13 1.05 ± 0.14 1.38 ± 0.14 $1.49 \pm 0.11^*$ $Igfb1$ 1.01 ± 0.08 1.02 ± 0.10 1.20 ± 0.05 $1.32 \pm 0.04^*$ $Nfkb1$ 1.01 ± 0.06 1.02 ± 0.08 $1.16 \pm 0.04^*$ $1.28 \pm 0.08^*$ Oxidative stress-related genes $I.02 \pm 0.08$ 1.17 ± 0.05 $1.28 \pm 0.05^*$ $Hmoxl$ 1.01 ± 0.07 1.02 ± 0.08 1.17 ± 0.05 $1.28 \pm 0.05^*$ $Keap1$ 1.01 ± 0.05 1.00 ± 0.04 1.02 ± 0.05 1.13 ± 0.06 $Nfe2l2$ 1.01 ± 0.07 1.01 ± 0.06 $1.37 \pm 0.10^{**}$ $1.52 \pm 0.18^*$ $Sod1$ 1.13 ± 0.18 1.13 ± 0.18 1.18 ± 0.06 1.30 ± 0.10 $Sod2$ 1.01 ± 0.07 1.01 ± 0.07 1.05 ± 0.06 1.15 ± 0.07 Cat 1.02 ± 0.10 1.02 ± 0.09 $1.54 \pm 0.16^*$ $1.70 \pm 0.20^*$ $Mt2a$ 1.07 ± 0.17 1.06 ± 0.17 $1.61 \pm 0.17^*$ $1.77 \pm 0.19^*$ $Nos2$ 1.07 ± 0.18 1.08 ± 0.20 1.16 ± 0.14 1.24 ± 0.12 $GpxI$ 1.06 ± 0.14 1.05 ± 0.14 1.32 ± 0.25 1.39 ± 0		1.08 ± 0.19	1.09 ± 0.21	1.51 ± 0.21	1.62 ± 0.18
$I1d$ $I.10 \pm 0.20$ $I.10 \pm 0.23$ $I.03 \pm 0.42$ $I.10 \pm 0.43$ $IIIb$ 1.17 ± 0.27 1.14 ± 0.24 1.18 ± 0.19 1.31 ± 0.24 $II4$ 1.06 ± 0.16 1.07 ± 0.17 1.47 ± 0.15 $1.60 \pm 0.13^*$ $II6$ 1.06 ± 0.15 1.06 ± 0.16 1.52 ± 0.18 $1.64 \pm 0.14^*$ Inf 1.04 ± 0.13 1.05 ± 0.14 1.38 ± 0.14 $1.49 \pm 0.11^*$ $Tgfb1$ 1.01 ± 0.08 1.02 ± 0.10 1.20 ± 0.05 $1.32 \pm 0.04^*$ $Nfkb1$ 1.01 ± 0.06 1.02 ± 0.08 1.17 ± 0.05 $1.28 \pm 0.08^*$ Oxidative stress-related genes $Hmoxl$ 1.01 ± 0.07 1.02 ± 0.08 1.17 ± 0.05 $1.28 \pm 0.05^*$ $Hmoxl$ 1.01 ± 0.05 1.00 ± 0.04 1.02 ± 0.05 1.13 ± 0.06 1.30 ± 0.10 $Nfe2l2$ 1.01 ± 0.05 1.01 ± 0.06 $1.37 \pm 0.10^{**}$ $1.52 \pm 0.18^*$ $Sodl$ 1.13 ± 0.18 1.13 ± 0.18 1.18 ± 0.06 1.30 ± 0.10 $Sod2$ 1.01 ± 0.07 1.01 ± 0.07 1.05 ± 0.06 1.15 ± 0.07 Cat 1.02 ± 0.10 1.03 ± 0.12 1.07 ± 0.05 1.19 ± 0.11 Mtl 1.01 ± 0.08 1.02 ± 0.09 $1.54 \pm 0.16^*$ $1.70 \pm 0.20^*$ $Mt2a$ 1.07 ± 0.17 1.06 ± 0.17 $1.61 \pm 0.17^*$ $1.77 \pm 0.19^*$ $Mt2a$ 1.07 ± 0.18 1.08 ± 0.20 1.16 ± 0.14 1.24 ± 0.12 $Gpxl$ 1.06 ± 0.14 1.05 ± 0.14 1.22 ± 0.25 1.39 ± 0.29 $Mt2a$ 1.07 ± 0.07		1.00 ± 0.17 1.16 ± 0.26	1.09 ± 0.21 1.16 + 0.25	2.03 ± 0.42	2.16 ± 0.18
$I10$ $I117 \pm 0.27$ $I107 \pm 0.17$ $I107 \pm 0.17$ $I107 \pm 0.17$ $I107 \pm 0.17$ $II4$ 1.06 ± 0.16 1.07 ± 0.17 1.47 ± 0.15 $1.60 \pm 0.13^*$ $II6$ 1.06 ± 0.15 1.06 ± 0.16 1.52 ± 0.18 $1.64 \pm 0.14^*$ Tnf 1.04 ± 0.13 1.05 ± 0.14 1.38 ± 0.14 $1.49 \pm 0.11^*$ $Tgfb1$ 1.01 ± 0.08 1.02 ± 0.10 1.20 ± 0.05 $1.32 \pm 0.04^*$ $Nfkb1$ 1.01 ± 0.06 1.02 ± 0.08 $1.16 \pm 0.04^*$ $1.28 \pm 0.08^*$ Oxidative stress-related genes 1.01 ± 0.07 1.02 ± 0.08 1.17 ± 0.05 $1.28 \pm 0.05^*$ Hmox1 1.01 ± 0.05 1.00 ± 0.04 1.02 ± 0.05 1.13 ± 0.06 Nfe2l2 1.01 ± 0.05 1.01 ± 0.06 $1.37 \pm 0.10^{**}$ $1.52 \pm 0.18^*$ Sod1 1.13 ± 0.18 1.13 ± 0.18 1.13 ± 0.16 1.30 ± 0.10 Sod2 1.01 ± 0.07 1.01 ± 0.07 1.05 ± 0.06 1.15 ± 0.07 Cat 1.02 ± 0.10 1.03 ± 0.12 1.07 ± 0.05 1.19 ± 0.11 Mt1 1.01 ± 0.07 1.01 ± 0.07 1.05 ± 0.06 1.15 ± 0.07 Cat 1.02 ± 0.10 1.03 ± 0.12 1.07 ± 0.05 1.19 ± 0.11 Mt2 1.07 ± 0.17 1.06 ± 0.17 $1.61 \pm 0.17^*$ $1.70 \pm 0.20^*$ Mt2a 1.07 ± 0.18 1.02 ± 0.09 $1.54 \pm 0.16^*$ $1.70 \pm 0.20^*$ Mt2a 1.07 ± 0.18 1.08 ± 0.20 1.16 ± 0.14 1.24 ± 0.12 Gpx1 1.06 ± 0.14 1.05 ± 0.14 1.22 ± 0.25 <td>IIIh</td> <td>1.10 ± 0.20 1.17 ± 0.27</td> <td>1.10 ± 0.23 1.14 ± 0.24</td> <td>1.18 ± 0.19</td> <td>131 + 0.24</td>	IIIh	1.10 ± 0.20 1.17 ± 0.27	1.10 ± 0.23 1.14 ± 0.24	1.18 ± 0.19	131 + 0.24
III $IIOI \pm 0.15$ $IIOI \pm 0.17$ $IIIII$ $IIOI \pm 0.13$ IIG $IIOI \pm 0.15$ $IIOI \pm 0.17$ $IIOI \pm 0.13$ IIG $IIOI \pm 0.13$ $IIOI \pm 0.14$ $IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII$	114	1.17 ± 0.27 1.06 ± 0.16	1.17 ± 0.27 1.07 ± 0.17	1.10 ± 0.17 1.47 ± 0.15	1.51 ± 0.24 1.60 + 0.13*
I_{00} $I_{00} \pm 0.13$ $I_{00} \pm 0.10$ $I_{02} \pm 0.16$ $I_{00} \pm 0.16$ Tnf $I_{00} \pm 0.13$ $I_{00} \pm 0.14$ $I_{38} \pm 0.14$ $I_{49} \pm 0.11^*$ $Tgfb1$ $I_{01} \pm 0.08$ $I_{02} \pm 0.10$ $I_{20} \pm 0.05$ $I_{32} \pm 0.04^*$ $Nfkb1$ $I_{01} \pm 0.06$ $I_{02} \pm 0.08$ $I_{16} \pm 0.04^*$ $I_{28} \pm 0.08^*$ Oxidative stress-related genes $I_{01} \pm 0.07$ $I_{02} \pm 0.08$ $I_{17} \pm 0.05$ $I_{28} \pm 0.05^*$ $Hmoxl$ $I_{01} \pm 0.07$ $I_{02} \pm 0.08$ $I_{17} \pm 0.05$ $I_{28} \pm 0.05^*$ $Keap1$ $I_{01} \pm 0.05$ $I_{00} \pm 0.04$ $I_{02} \pm 0.05$ $I_{13} \pm 0.06$ $Nfe2l2$ $I_{01} \pm 0.05$ $I_{01} \pm 0.06$ $I_{37} \pm 0.10^{**}$ $I_{52} \pm 0.18^*$ $SodI$ $I_{13} \pm 0.18$ $I_{13} \pm 0.18$ $I_{18} \pm 0.06$ $I_{30} \pm 0.10$ $Sod2$ $I_{01} \pm 0.07$ $I_{01} \pm 0.07$ $I_{05} \pm 0.06$ $I_{15} \pm 0.07$ Cat $I_{02} \pm 0.10$ $I_{03} \pm 0.12$ $I_{07} \pm 0.05$ $I_{19} \pm 0.11$ Mtl $I_{01} \pm 0.08$ $I_{02} \pm 0.09$ $I_{54} \pm 0.16^*$ $I_{70} \pm 0.20^*$ $Mt2a$ $I_{07} \pm 0.17$ $I_{06} \pm 0.17$ $I_{61} \pm 0.17^*$ $I_{77} \pm 0.19^*$ $Nos2$ $I_{07} \pm 0.18$ $I_{08} \pm 0.20$ $I_{16} \pm 0.14$ $I_{24} \pm 0.12$ $Grad$ $I_{01} \pm 0.07$ $I_{01} \leftarrow 0.06$ $I_{15} \pm 0.04$ $I_{22} \pm 0.25$ $I_{00} \pm 0.07$ $I_{00} \pm 0.14$ $I_{00} \pm 0.14$ $I_{00} \pm 0.26$	116	1.00 ± 0.10 1.06 ± 0.15	1.07 ± 0.17 1.06 ± 0.16	1.77 ± 0.13 1 57 + 0 18	1.60 ± 0.13 1 64 + 0 14*
T_{gfbl} 1.04 ± 0.13 1.05 ± 0.14 1.35 ± 0.14 $1.49 \pm 0.11^{\circ}$ T_{gfbl} 1.01 ± 0.08 1.02 ± 0.10 1.20 ± 0.05 $1.32 \pm 0.04^{*}$ $Nfkbl$ 1.01 ± 0.06 1.02 ± 0.08 $1.16 \pm 0.04^{*}$ $1.28 \pm 0.08^{*}$ Oxidative stress-related genes 1.01 ± 0.07 1.02 ± 0.08 1.17 ± 0.05 $1.28 \pm 0.05^{*}$ Hmoxl 1.01 ± 0.07 1.02 ± 0.08 1.17 ± 0.05 $1.28 \pm 0.05^{*}$ Keapl 1.01 ± 0.05 1.00 ± 0.04 1.02 ± 0.05 1.13 ± 0.06 Nfe2l2 1.01 ± 0.05 1.01 ± 0.06 $1.37 \pm 0.10^{**}$ $1.52 \pm 0.18^{*}$ Sodl 1.13 ± 0.18 1.13 ± 0.18 1.18 ± 0.06 1.30 ± 0.10 Sodl 1.02 ± 0.10 1.02 ± 0.07 1.05 ± 0.06 1.15 ± 0.07 Cat 1.02 ± 0.10 1.03 ± 0.12 1.07 ± 0.05 1.19 ± 0.11 Mtl 1.01 ± 0.08 1.02 ± 0.09 $1.54 \pm 0.16^{*}$ $1.70 \pm 0.20^{*}$ Mtl 1.01 ± 0.08 1.02 ± 0.09 $1.54 \pm 0.16^{*}$ $1.77 \pm 0.19^{*}$ Mt2a 1.07 ± 0.17 1.06 ± 0.17 $1.61 \pm 0.17^{*}$ $1.77 \pm 0.19^{*}$ Nos2 1.07 ± 0.18 1.08 ± 0.20 1.16 ± 0.14 1.24 ± 0.12 Gpxl 1.06 ± 0.14 1.05 ± 0.14 1.32 ± 0.25 1.39 ± 0.29	Tnf	1.00 ± 0.13 1.04 ± 0.13	1.00 ± 0.10 1.05 ± 0.14	1.32 ± 0.10 1.38 ± 0.14	$1.04 \pm 0.14^{\circ}$ 1 49 + 0 11*
N_{SD} 1.01 ± 0.05 1.02 ± 0.10 1.20 ± 0.05 $1.32 \pm 0.04^{+}$ N_{fkb1} 1.01 ± 0.06 1.02 ± 0.08 $1.16 \pm 0.04^{*}$ $1.32 \pm 0.04^{+}$ $Oxidative stress-related genes$ 1.01 ± 0.07 1.02 ± 0.08 $1.16 \pm 0.04^{*}$ $1.28 \pm 0.08^{*}$ $Hmox1$ 1.01 ± 0.07 1.02 ± 0.08 1.17 ± 0.05 $1.28 \pm 0.05^{*}$ $Keap1$ 1.01 ± 0.05 1.00 ± 0.04 1.02 ± 0.05 1.13 ± 0.06 N_{fe2l2} 1.01 ± 0.05 1.01 ± 0.06 $1.37 \pm 0.10^{**}$ $1.52 \pm 0.18^{*}$ $Sod1$ 1.13 ± 0.18 1.13 ± 0.18 1.18 ± 0.06 1.30 ± 0.10 $Sod2$ 1.01 ± 0.07 1.01 ± 0.07 1.05 ± 0.06 1.15 ± 0.07 Cat 1.02 ± 0.10 1.03 ± 0.12 1.07 ± 0.05 1.19 ± 0.11 $Mt1$ 1.01 ± 0.08 1.02 ± 0.09 $1.54 \pm 0.16^{*}$ $1.70 \pm 0.20^{*}$ $Mt2a$ 1.07 ± 0.17 1.06 ± 0.17 $1.61 \pm 0.17^{*}$ $1.77 \pm 0.19^{*}$ $Nos2$ 1.07 ± 0.18 1.08 ± 0.20 1.16 ± 0.14 1.24 ± 0.12 $Grad$ 1.06 ± 0.14 1.05 ± 0.14 1.32 ± 0.25 1.39 ± 0.29	Tofh1	1.07 ± 0.13 1.01 ± 0.08	1.03 ± 0.14 1.02 ± 0.10	1.30 ± 0.14 1.20 ± 0.05	1.77 ± 0.11 1 32 + 0.04*
Interprotect 1.02 \pm 0.00Interprotect 1.02 \pm 0.00Oxidative stress-related genesHmox11.01 \pm 0.071.02 \pm 0.081.17 \pm 0.041.28 \pm 0.05*Hmox11.01 \pm 0.071.02 \pm 0.081.17 \pm 0.051.28 \pm 0.05*Keap11.01 \pm 0.071.00 \pm 0.041.28 \pm 0.05*Nfe2l21.01 \pm 0.051.17 \pm 0.051.28 \pm 0.05*Nfe2l21.01 \pm 0.051.13 \pm 0.061.13 \pm 0.181.13 \pm 0.06Nfe2l21.01 \pm 0.061.30 \pm 0.10Sodl1.13 \pm 0.181.18 \pm 0.061.30 \pm 0.10Sodl1.13 \pm 0.061.30 \pm 0.10Sodl1.13 \pm 0.061.30 \pm 0.10Sodl1.13 \pm 0.061.15 \pm 0.07Cat1.02 \pm 0.071.01 \pm 0.071.01 \pm 0.071.07 \pm 0.051.19 \pm 0.11Mtl1.02 \pm 0.091.54 \pm 0.16*1.70 \pm 0.20*Mtl1.06 \pm 0.171.61 \pm 0.17*1.77 \pm 0.19*Nos21.07	Nfkh1	1.01 ± 0.06 1.01 ± 0.06	1.02 ± 0.10 1.02 ± 0.08	1.20 ± 0.03 1 16 + 0.04*	$1.32 \pm 0.04^{\circ}$ 1.28 + 0.08*
Number of the substruct genesHmoxl 1.01 ± 0.07 1.02 ± 0.08 1.17 ± 0.05 $1.28 \pm 0.05^*$ Keapl 1.01 ± 0.05 1.00 ± 0.04 1.02 ± 0.05 1.13 ± 0.06 Nfe2l2 1.01 ± 0.05 1.01 ± 0.06 $1.37 \pm 0.10^{**}$ $1.52 \pm 0.18^*$ Sodl 1.13 ± 0.18 1.13 ± 0.18 1.13 ± 0.06 1.30 ± 0.10 Sod2 1.01 ± 0.07 1.01 ± 0.07 1.05 ± 0.06 1.15 ± 0.07 Cat 1.02 ± 0.10 1.03 ± 0.12 1.07 ± 0.05 1.19 ± 0.11 Mtl 1.01 ± 0.08 1.02 ± 0.09 $1.54 \pm 0.16^*$ $1.70 \pm 0.20^*$ Mt2a 1.07 ± 0.17 1.06 ± 0.17 $1.61 \pm 0.17^*$ $1.77 \pm 0.19^*$ Nos2 1.07 ± 0.14 1.08 ± 0.20 1.16 ± 0.14 1.24 ± 0.12 Gpxl 1.06 ± 0.14 1.05 ± 0.14 1.32 ± 0.25 1.39 ± 0.29	Oxidative	tress-related genes	1.02 ± 0.00	1.10 ± 0.04	$1.20 \pm 0.00^{\circ}$
$Keapl$ 1.01 ± 0.07 1.02 ± 0.03 1.17 ± 0.03 $1.28 \pm 0.03^{\circ}$ $Keapl$ 1.01 ± 0.05 1.00 ± 0.04 1.02 ± 0.05 1.13 ± 0.06 $Nfe2l2$ 1.01 ± 0.05 1.01 ± 0.06 $1.37 \pm 0.10^{**}$ $1.52 \pm 0.18^{*}$ $Sodl$ 1.13 ± 0.18 1.13 ± 0.18 $1.13 \pm 0.10^{\circ}$ $1.52 \pm 0.10^{\circ}$ $Sod2$ 1.01 ± 0.07 1.01 ± 0.07 1.05 ± 0.06 $1.30 \pm 0.10^{\circ}$ $Sod2$ 1.01 ± 0.07 1.01 ± 0.07 $1.05 \pm 0.06^{\circ}$ $1.19 \pm 0.11^{\circ}$ Mtl $1.02 \pm 0.10^{\circ}$ $1.02 \pm 0.09^{\circ}$ $1.54 \pm 0.16^{*}$ $1.70 \pm 0.20^{*}$ $Mt2a$ 1.07 ± 0.17 1.06 ± 0.17 $1.61 \pm 0.17^{*}$ $1.77 \pm 0.19^{*}$ $Nos2$ 1.07 ± 0.18 $1.08 \pm 0.20^{\circ}$ 1.16 ± 0.14 1.24 ± 0.12 $Gpxl$ 1.06 ± 0.14 1.05 ± 0.14 1.32 ± 0.25 1.39 ± 0.29	Hmov1	1.01 + 0.07	1.02 ± 0.08	1.17 ± 0.05	$1.28 \pm 0.05*$
Near 1.01 ± 0.05 1.00 ± 0.04 1.02 ± 0.03 1.13 ± 0.06 Nfe2l2 1.01 ± 0.05 1.01 ± 0.06 $1.37 \pm 0.10**$ $1.52 \pm 0.18*$ Sod1 1.13 ± 0.18 1.13 ± 0.18 1.13 ± 0.06 1.30 ± 0.10 Sod2 1.01 ± 0.07 1.01 ± 0.07 1.05 ± 0.06 1.30 ± 0.10 Sod2 1.01 ± 0.07 1.01 ± 0.07 1.05 ± 0.06 1.15 ± 0.07 Cat 1.02 ± 0.10 1.03 ± 0.12 1.07 ± 0.05 1.19 ± 0.11 Mt1 1.01 ± 0.08 1.02 ± 0.09 $1.54 \pm 0.16*$ $1.70 \pm 0.20*$ Mt2a 1.07 ± 0.17 1.06 ± 0.17 $1.61 \pm 0.17*$ $1.77 \pm 0.19*$ Nos2 1.07 ± 0.18 1.08 ± 0.20 1.16 ± 0.14 1.24 ± 0.12 Gpx1 1.06 ± 0.14 1.05 ± 0.14 1.32 ± 0.25 1.39 ± 0.29	Keanl	1.01 ± 0.07 1.01 ± 0.05	1.02 ± 0.00 1.00 ± 0.04	1.17 ± 0.05 1.02 ± 0.05	$1.20 \pm 0.05^{\circ}$ 1 13 $\pm 0.06^{\circ}$
Nge2121.01 \pm 0.031.01 \pm 0.001.37 \pm 0.10 $^{-1}$ 1.32 \pm 0.18 $^{+1}$ Sod11.13 \pm 0.181.13 \pm 0.181.18 \pm 0.061.30 \pm 0.10Sod21.01 \pm 0.071.01 \pm 0.071.05 \pm 0.061.15 \pm 0.07Cat1.02 \pm 0.101.03 \pm 0.121.07 \pm 0.051.19 \pm 0.11Mt11.01 \pm 0.081.02 \pm 0.091.54 \pm 0.16*1.70 \pm 0.20*Mt2a1.07 \pm 0.171.06 \pm 0.171.61 \pm 0.17*1.77 \pm 0.19*Nos21.07 \pm 0.181.08 \pm 0.201.16 \pm 0.141.24 \pm 0.12Gpx11.06 \pm 0.141.05 \pm 0.041.20 \pm 0.29	Nfo212	1.01 ± 0.03 1.01 ± 0.05	1.00 ± 0.04 1.01 ± 0.06	1.02 ± 0.03 1 37 + 0 10**	1.13 ± 0.00 1 52 + 0 18*
Solar 1.15 ± 0.16 1.15 ± 0.16 1.16 ± 0.00 1.30 ± 0.10 Solar 1.01 ± 0.07 1.01 ± 0.07 1.05 ± 0.06 1.15 ± 0.07 Cat 1.02 ± 0.10 1.03 ± 0.12 1.07 ± 0.05 1.19 ± 0.11 Mt1 1.01 ± 0.08 1.02 ± 0.09 $1.54 \pm 0.16^*$ $1.70 \pm 0.20^*$ Mt2a 1.07 ± 0.17 1.06 ± 0.17 $1.61 \pm 0.17^*$ $1.77 \pm 0.19^*$ Nos2 1.07 ± 0.18 1.08 ± 0.20 1.16 ± 0.14 1.24 ± 0.12 Gpx1 1.06 ± 0.14 1.05 ± 0.14 1.32 ± 0.25 1.39 ± 0.29	Njeziz Sodi	1.01 ± 0.03 1.13 + 0.19	1.01 ± 0.00 1.13 ± 0.19	1.57 ± 0.10^{11} 1 18 + 0.06	$1.32 \pm 0.10^{\circ}$ 1 30 + 0 10
$Souz$ 1.01 ± 0.07 1.01 ± 0.07 1.03 ± 0.12 1.03 ± 0.00 1.13 ± 0.07 Cat 1.02 ± 0.10 1.03 ± 0.12 1.07 ± 0.05 1.19 ± 0.11 Mtl 1.01 ± 0.08 1.02 ± 0.09 $1.54 \pm 0.16^*$ $1.70 \pm 0.20^*$ $Mt2a$ 1.07 ± 0.17 1.06 ± 0.17 $1.61 \pm 0.17^*$ $1.77 \pm 0.19^*$ $Nos2$ 1.07 ± 0.18 1.08 ± 0.20 1.16 ± 0.14 1.24 ± 0.12 $Gpxl$ 1.06 ± 0.14 1.05 ± 0.14 1.32 ± 0.25 1.39 ± 0.29	Sod?	1.13 ± 0.10 1.01 ± 0.07	1.13 ± 0.10 1.01 ± 0.07	1.10 ± 0.00 1.05 ± 0.06	1.50 ± 0.10 1.15 + 0.07
Mtl 1.02 ± 0.10 1.03 ± 0.12 1.07 ± 0.03 1.19 ± 0.11 Mtl 1.01 ± 0.08 1.02 ± 0.09 $1.54 \pm 0.16^*$ $1.70 \pm 0.20^*$ $Mt2a$ 1.07 ± 0.17 1.06 ± 0.17 $1.61 \pm 0.17^*$ $1.77 \pm 0.19^*$ $Nos2$ 1.07 ± 0.18 1.08 ± 0.20 1.16 ± 0.14 1.24 ± 0.12 $Gpxl$ 1.06 ± 0.14 1.05 ± 0.14 1.32 ± 0.25 1.39 ± 0.29	Sou2 Cat	1.01 ± 0.07 1.02 ± 0.10	1.01 ± 0.07 1.03 ± 0.12	1.03 ± 0.00 1.07 ± 0.05	1.13 ± 0.07 1 10 + 0 11
M11 1.01 ± 0.05 1.02 ± 0.07 $1.34 \pm 0.16^{\circ}$ $1.70 \pm 0.20^{\circ}$ Mt2a 1.07 ± 0.17 1.06 ± 0.17 $1.61 \pm 0.17^{*}$ $1.77 \pm 0.19^{*}$ Nos2 1.07 ± 0.18 1.08 ± 0.20 1.16 ± 0.14 1.24 ± 0.12 Gpx1 1.06 ± 0.14 1.05 ± 0.14 1.32 ± 0.25 1.39 ± 0.29 Crud 1.01 ± 0.07 1.01 ± 0.06 1.15 ± 0.04 $1.20 \pm 0.26^{\circ}$	Cui M†1	1.02 ± 0.10 1.01 ± 0.08	1.03 ± 0.12 1.02 ± 0.00	1.07 ± 0.03 1 54 + 0 16*	1.17 ± 0.11 1 70 + 0 20*
Nazz 1.07 ± 0.17 1.05 ± 0.17 1.01 ± 0.17 1.77 ± 0.19 Nos2 1.07 ± 0.18 1.08 ± 0.20 1.16 ± 0.14 1.24 ± 0.12 Gpx1 1.06 ± 0.14 1.05 ± 0.14 1.32 ± 0.25 1.39 ± 0.29 Grad 1.01 ± 0.07 1.01 ± 0.07 1.02 ± 0.07	Mt2a	1.01 ± 0.00 1.07 ± 0.17	1.02 ± 0.07 1.06 ± 0.17	$1.5 + \pm 0.10^{\circ}$ 1.61 + 0.17*	$1.70 \pm 0.20^{\circ}$ 1 77 + 0 10*
$H032$ $H07 \pm 0.16$ $H06 \pm 0.20$ $H16 \pm 0.14$ $H24 \pm 0.12$ $Gpxl$ 1.06 ± 0.14 1.05 ± 0.14 1.32 ± 0.25 1.39 ± 0.29 $Grad$ 1.01 ± 0.07 1.01 ± 0.06 1.15 ± 0.04 1.20 ± 0.26	Nos?	1.07 ± 0.17 1.07 ± 0.19	1.00 ± 0.17 1.08 ± 0.20	1.01 ± 0.17	$1.77 \pm 0.19^{\circ}$ 1.24 ± 0.12
$0pA = 1.00 \pm 0.17$ 1.05 ± 0.17 1.52 ± 0.25 1.57 ± 0.27	Gnr1	1.07 ± 0.10 1.06 ± 0.14	1.06 ± 0.20 1.05 ± 0.14	1.10 ± 0.14 1 32 + 0.25	$1.2 + \pm 0.12$ 1 30 + 0 20
(10) (10) $+$ $(1$	Gpx1 Gpx4	1.00 ± 0.14 1.01 ± 0.07	1.05 ± 0.14 1.01 ± 0.06	1.52 ± 0.25 1 15 + 0.04	1.37 ± 0.27 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; *Chrma7*, cholinergic receptor nicotinic alpha 7 subunit;

Chrnb2, 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 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; *Nfe21*, 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.

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

	0 (Cont	rols)	750 pp	m IMI
]	Relative transcript level no	ormalized to		
-	Gapdh	<i>Hprt1</i>	Gapdh	<i>Hprt1</i>
Granule c	ell lineage markers	1	1	1
Nes	1.04 ± 0.14^{a}	1.03 ± 0.12	$0.72 \pm 0.04*$	$0.75 \pm 0.03*$
Sox2	1.26 ± 0.44	1.20 ± 0.37	0.73 ± 0.06	0.75 ± 0.04
Eomes	1.08 ± 0.18	1.09 ± 0.23	0.67 ± 0.04	0.70 ± 0.04
Dcx	1.01 ± 0.05	1.02 ± 0.10	0.90 ± 0.05	0.94 ± 0.04
Dpysl3	1.01 ± 0.05	1.00 ± 0.04	0.91 ± 0.02	0.95 ± 0.03
Tubb3	1.02 ± 0.08	1.01 ± 0.05	0.96 ± 0.04	1.00 ± 0.02
Rbfox3	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.04	0.90 ± 0.04	0.94 ± 0.03
GABAerg	ic interneuron-related gen	es		
Pvalb	1.07 ± 0.21	1.05 ± 0.17	0.92 ± 0.06	0.92 ± 0.03
Reln	1.04 ± 0.13	1.03 ± 0.11	1.06 ± 0.12	1.07 ± 0.12
Neurotrop	bhic factor-related genes			
Bdnf	1.01 ± 0.05	1.00 ± 0.03	1.01 ± 0.02	1.04 ± 0.06
Ntrk2	1.02 ± 0.09	1.01 ± 0.07	0.99 ± 0.08	1.01 ± 0.06
Cell prolit	teration and apoptosis relat	ted	0.02 0.02*	0.07 0.04*
Pcna	1.01 ± 0.06	1.00 ± 0.04	$0.83 \pm 0.03^{\circ}$	$0.8/\pm 0.04^*$
Casp3	1.08 ± 0.18	1.10 ± 0.23	0.79 ± 0.21	0.75 ± 0.18
Casp1	1.10 ± 0.21	1.10 ± 0.23	1.06 ± 0.13	1.10 ± 0.09
Casp9 Ban	1.02 ± 0.09	1.02 ± 0.10	0.97 ± 0.02	1.01 ± 0.03 1.02 + 0.06
Dax $P_{a}12$	1.01 ± 0.08 1.02 ± 0.10	1.01 ± 0.08 1.04 ± 0.11	1.02 ± 0.03	1.05 ± 0.06
B_{c}	1.03 ± 0.10 1.00 ± 0.04	1.04 ± 0.11 1.00 ± 0.04	0.91 ± 0.04	0.91 ± 0.00 0.86 ± 0.03**
Cholinera	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.04	0.08 ± 0.02	0.00 ± 0.03
Chrna7	1.01 ± 0.05	1.01 + 0.05	1.02 ± 0.05	1.00 ± 0.05
Chrnh?	1.01 ± 0.05 1.01 ± 0.06	1.01 ± 0.05 1.00 ± 0.04	0.90 ± 0.03	$0.88 \pm 0.03^{\circ}$
Chat	1.20 ± 0.31	1.22 ± 0.37	0.92 ± 0.15	0.89 ± 0.12
Synaptic 1	plasticity-related IEGs		0.72 - 0.12	0.07 = 0.12
Arc	1.07 ± 0.18	1.09 ± 0.22	1.06 ± 0.14	1.02 ± 0.08
Fos	1.07 ± 0.17	1.06 ± 0.16	1.11 ± 0.07	1.10 ± 0.09
Ptgs2	1.01 ± 0.07	1.00 ± 0.05	$1.20 \pm 0.05*$	$1.20 \pm 0.06*$
Glutamate	e receptors and transporters	8		
Grin2a	1.01 ± 0.07	1.01 ± 0.07	1.04 ± 0.05	1.04 ± 0.10
Grin2b	1.01 ± 0.05	1.01 0.05	1.05 ± 0.04	1.05 0.08
Grin2d	1.04 ± 0.12	1.03 ± 0.12	0.91 ± 0.08	0.91 ± 0.11
Slc17a6	1.52 ± 0.61	1.45 ± 0.56	0.71 ± 0.14	0.71 ± 0.16
Slc17a7	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.03	1.01 ± 0.08	1.01 ± 0.10
Glial cell	markers			0.00
Gfap	1.05 ± 0.14	1.06 ± 0.16	0.93 ± 0.09	0.90 ± 0.06
Atf1 Charrian1	1.08 ± 0.14	1.14 ± 0.15	1.00 ± 0.10	1.02 ± 0.08
Chemical	1.10 ± 0.26	1.12 ± 0.22	0.65 + 0.08	0.65 + 0.06
$\frac{110}{11a}$	1.10 ± 0.20 1.25 ± 0.37	1.13 ± 0.33 1.33 ± 0.46	0.03 ± 0.08	0.03 ± 0.00 1.03 ± 0.24
III IIIb	1.25 ± 0.57 1.15 + 0.26	1.33 ± 0.40 1 11 + 0 24	0.33 ± 0.22 0.71 + 0.14	1.03 ± 0.24 0.79 ± 0.14
1110 114	1.13 ± 0.20 1.08 ± 0.19	1.11 ± 0.24 1.10 ± 0.24	0.71 ± 0.14 0.70 + 0.05	0.79 ± 0.14 0.74 + 0.06
116	1.13 ± 0.25	1.10 ± 0.24 1.14 ± 0.29	$0.51 \pm 0.10^{*}$	0.53 ± 0.09
Tnf	1.08 ± 0.20	1.13 ± 0.26	0.72 + 0.04	0.70 ± 0.05
Tefh1	1.05 ± 0.15	1.03 ± 0.12	0.73 ± 0.04	$0.77 \pm 0.03^{*}$
Nfkb1	1.01 ± 0.06	1.02 ± 0.09	0.88 ± 0.04	0.92 ± 0.03
Öxidative	stress-related genes			
Hmoxl	1.03 ± 0.11	1.03 ± 0.11	$0.76 \pm 0.05*$	$0.76 \pm 0.04*$
Keap 1	1.01 ± 0.05	1.02 ± 0.09	0.95 ± 0.03	0.98 ± 0.04
Nfe2l2	1.02 ± 0.08	1.03 ± 0.12	$0.79 \pm 0.05*$	0.88 ± 0.04
Sod1	1.01 ± 0.05	1.01 ± 0.05	0.93 ± 0.05	0.95 ± 0.05
Sod2	1.01 ± 0.05	1.00 ± 0.04	0.93 ± 0.04	0.94 ± 0.03
Cat	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.04	0.94 ± 0.03	0.96 ± 0.04
Mt1	1.02 ± 0.09	1.02 ± 0.09	0.91 ± 0.07	0.91 ± 0.06
Mt2a	1.02 ± 0.10	1.06 ± 0.18	0.92 ± 0.12	0.86 ± 0.08
Nos2	1.14 ± 0.20	1.16 ± 0.22	0.93 ± 0.17	1.09 ± 0.25
Gpx1 Crm4	1.01 ± 0.00	1.01 ± 0.07 1.02 ± 0.11	$0.80 \pm 0.03^{\circ}$	0.88 ± 0.02
<i>Gpx</i> 4	1.02 ± 0.09	1.03 ± 0.11	0.00 ± 0.04	0.00 ± 0.03

Table 2Transcript-level expression changes of neurogenesis-related genes in the hippocampal dentate gyrus of male offspringon PND 77

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; *Bcl211*, 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; *Chrnb2*, 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 **PND 21 PND 77** 50 400 (mU/mg protein) (mU/mg protein) * 25 200 0 0 83 250 750 0 250 0 83 750 (ppm) (ppm) (B) MDA concentration **PND 21 PND 77** 15.0 15.0 * (nmol/mg protein) (nmol/mg protein) 7.5 7.5 0 0 250 250 0 83 750 0 83 750 (ppm) (ppm)



Fig. 7

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/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.



rig. d

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 Table 1

Antibodies used in this study

Antigen	Abbreviated name	Host species	Clonality	Clone name	Dilution	Antigen retrieval	Manufacturer (City, State, Country)
Activity-regulated cytoskeleton-associated protein	ARC	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:2000	Microwaving ^a	Synaptic Systems GmbH (Göttingen, Germany)
Cluster of differentiation 68	CD68	Mouse	Monoclonal IgG ₁	ED1	1:500	Autoclaving ^b	BMA Biomedicals (Augst, Switzerland)
Cluster of differentiation 163	CD163	Mouse	Monoclonal IgG ₁	ED2	1:500	Protein digesting ^c	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
Cyclooxygenase-2	COX2	Mouse	Monoclonal IgG1	33/Cox-2	1:200	Microwaving ^d	Abcam plc (Cambridge, UK)
Doublecortin	DCX	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:1000	Autoclaving b	Abcam plc
Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	FOS	Mouse	Monoclonal IgG ₁	2H2	1:1000	Microwaving ^e	Abcam plc
Glutamic acid decarboxylase 67	GAD67	Mouse	Monoclonal IgG _{2a}	1G10.2	1:200	Autoclaving ^b	MilliporeSigma (Burlington, MA, USA)
Glial fibrillary acidic protein	GFAP	Mouse	Monoclonal IgG1	GA5	1:200	None	MilliporeSigma
Ionized calcium-binding adaptor molecule 1	Iba1	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:300	Autoclaving ^b	Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation (Osaka, Japan)
Neuronal nuclei	NeuN	Rabbit	Monoclonal IgG	EPR12763	1:500	Autoclaving ^b	Abcam plc
Parvalbumin	PVALB	Mouse	Monoclonal IgG1	PARV-19	1:1000	Microwaving ^a	MilliporeSigma
phosphorylated Extracellular	p-ERK1/2	Rabbit	Monoclonal IgG	137F5	1:100	Microwaving ^a	Cell Signaling Technology, Inc.
1/2 (p44/p42 MAP kinase)							(Danvers, MA, USA)
Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	Mouse	Monoclonal IgG _{2a}	PC10	1:200	Microwaving ^a	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
Reelin	RELN	Rabbit	Monoclonal IgG1 ^{kappa}	G10	1:1000	Autoclaving ^b	Novus Biologicals (Littleton, CO, USA)
SRY-box transcription factor 2	SOX2	Mouse	Monoclonal IgG1	9-9-3	1:4000	None	Abcam plc
Somatostatin	SST	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:200	Microwaving a	Abcam plc
T-box brain protein 2	TBR2	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:1000	Autoclaving ^b	Abcam plc
Tubulin, beta 3 class III	TUBB3	Mouse	Monoclonal IgG ₁	TU-20	1:500	Microwaving ^a	Abcam plc

Abbreviation: n.a, not applicable.

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

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

 $^{\rm c}$ Proteinase K (40 $\mu g/mL)$ at 37 $^{\rm o}C$ for 15 min.

^d 90°C for 15 min in Target Retrieval Solution (pH 9.0; Agilent Technologies).

^e 90°C for 10 min in Target Retrieval Solution (pH 9.0; Agilent Technologies).



Supplementary Fig. 1

Overview of the hippocampus of a male rat stained with hematoxylin and eosin. (A) The number of cells in the hilus of the dentate gyrus (as enclosed by the dotted line) displaying immunoreactivity for parvalbumin (PVALB), reelin (RELN), somatostatin (SST), glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67), glial fibrillary acidic protein (GFAP), ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1), cluster of differentiation 68 (CD68), or cluster of differentiation 163 (CD163) were counted. Neurons of the cornu Ammonis (CA) 3 region were excluded from counting. (Inset) Higher magnification of the granule cell layer (GCL) and subgranular zone (SGZ). The distribution of immunoreactive cells for GFAP, SRY-box transcription factor 2 (SOX2), T-box brain protein 2 (TBR2), doublecortin (DCX), tubulin, beta 3 class III (TUBB3), neuronal nuclei (NeuN), proliferating cell nuclear antigen (PCNA), activity-regulated cytoskeleton-associated protein (ARC), Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit (FOS), cyclooxygenase 2 (COX2), phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 (p-ERK1/2), as well as terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) ⁺ cells, were measured in the SGZ and/or GCL. (B) Insets show representative areas of each immunohistochemical image of the GCL/SGZ and the hilus of the dentate gyrus in Fig. 3 through Fig. 8.

Supplementary Table 2

Sequence of primers used for real-time reverse transcription-PCR

Gene	Accession no.	Forward primer $(5' \rightarrow 3')$	Reverse primer $(5' \rightarrow 3')$
Aifl	NM_017196.3	TTGTGCTATG GAACGTCTTT AAC	TGTTGCTCAC CGTCTTTAA TGAT
Arc	NM_019361.1	AGTGTCTGAA AGGCAATGAA AAGTAG	CCTTCGGCCA TCTCTGATTC
Bax	NM 017059.2	AGGACGCATC CACCAAGAAG	CCAGTTCATC GCCAATTCG
Bcl2	NM 016993.1	GGATGCCTTT GTGGAACTAT ATGG	CAGAGACAGC CAGGAGAAAT CAA
Bcl2l1	NM 171988.3	GCCAGGCCTT CAACCATTAT C	GGTTCCTCCT GAGACTGCCT TAT
Bdnf	NM 001270630	CACTTTTGAG CACGTGATCG A	TCCGCGTCCT TATGGTTTTC
Casp1	NM 012762.2	CCTGCCCAGA GCACAAGACT	CCTGGAGACC ATGAGACATG AA
Casp3	NM 012922.2	ACAAGCTGGA ATTCATGCAC AT	CAAATTCCGT GGCCACCTT
Casn9	NM_031632.1	CATGGTGGAG GTGAAGAACG A	TGCGCCATCT CCATCAAAG
Cat	NM_012520.2	ATTGCCGTCC GATTCTCC	CCAGTTACCA TCTTCAGTGT AG
Chat	NM_001170593.1	CCAGAAGGCT GAGGTGGAAA	CTCTGCTGAG GAGGCGAGAT
Chrm1	NM 080773 2	CCATCCTCTT CTGGCA ATAC CT	GGGAGAGGAA CTGGATGTAG CA
Chrm?	XM_039108421.1	CCCAGTTAAGCGGACCACAA	CCCAGAGGAT GAAGGAAAGG A
Chrna7	NM 012832	CGTTCGCTGG TTCCCTTTT	GGACCAGGAC CCAAACTTCA
Chrnh?	NM_009602.4	TGTGGACGGT GTACGCTTCA	CCTCACACTC TGGTCATCAT CTTC
Dahl	NM_153621.2		
Dav	NM_053370.3		
Dex Drysl3	NM_012034_1	CATGTGGTAC CTGA ACCTGA GTC	GCCCACTCAC GCCACTTTT
Eomos	XM_017506103.1	CCCGGACTAC CATGGACATC	TTTCTCCTTG GCA AGCTGAT C
Eomes	XM_017590195.1		
r os C an dh	NM_022197		
Gapan	NM_017008		
Gjap	NM_017009.2		
GpxI	NM_030826.4		
Gpx4	NM_001039849.3		
Grial	NM_031608		
Gria2	NM_001083811.1	CATCACACCT AGCTTCCCAA CA	
Gria3	NM_032990	GAAACATAAA GGACGTCCAG GAA	TTCCTGCCTT CTGTCCATTT CT
Grin2a	NM_012573	GGCTGTCAGC ACTGAATCCA	GGTTTAGAGA ATCCTGGCGT AGAG
Grin2b	NM_012574	TCGTCAAGAC ACAAGATTAA AACCA	GGAGGATAAA GGAACGGAAG AAA
Grin2d	NM_022797	TCGTGCTCAC ACCCAAGGA	GGTCACTGCC ACAAAGGATG T
Hmox1	NM_012580.2	GCTCTATCGT GCTCGCATGA	TCTTCTGTCA CCCTGTGCTT GA
Hprt1	NM_012583	GCCGACCGGT TCTGTCAT	TCATAACCTG GTTCATCATC ACTAATC
Illa	NM_017019.1	GAGGCCATAG CCCATGATTT AG	TGGAAGCTGT GAGGTGCTGA T
ll1b	NM_031512	TGACAGACCC CAAAAGATTA AGG	CTCATCTGGA CAGCCCAAGT C
Il4	NM_201270.1	CAGACCGCTG ACACCTCTAC A	AACAAGGAAC ACCACGGAGA
Il6	NM_012589.2	GACTTCCAGC CAGTTGCCTT CTTG	TGGTCTGTTG TGGGTGGTAT CCTC
<i>Il10</i>	NM_012854.2	TCCATCCGGG GTGACAATA	GCATGTGGGT CTGGCTGACT
Keapl	NM_057152	CAGAACAAGC CATGCCTTCT T	TCTGGTCTTC CACAAGGTCC TT
Mt1	NM_138826.4	GCTGTGCCTG AAGTGACGAA	TCTGAGTTGG TCCGGAAATT ATTT
Mt2a	NM_001137564.1	GCGTCCTCAC AATGGTGTAA ATAA	GAACCGGTCA GGGTTGTACA A
Nes	NM_001308239.1	TTGGCTTTCT GGACCCCAAG	CAGGAAGGCT GTCACAGGAG
Nfkb1	NM_001276711.1	CACTAAATCC AACACAGGCA TCAC	GGCACAATCT CTAGGCTCGT TT
Nrf2	NM_031789.2	TGCCCCTGGA AGTGTCAAA	GGCTGTACTG TATCCCCAGA AGA
Nos2	NM_012611.3	TTGGAGCGAG TTGTGGATTG TT	TAGGTGAGGG CTTGCCTGAG TG
Pcna	NM_022381.3	CTCACGTCTC CTTAGTGCAG CTT	CGATCGCAGC GGTATGTGT
Ptgs2	NM_011198	CTCAGCCAGG CAGCAAATC	ACATTCCCCA CGGTTTTGAC
Pvalb	NM_022499	TCGCCACAAA AAGTTCTTCC A	TCTTCACATC ATCCGCACTC TT
Rbfox3	NM_001134498.2	TCTCTTGTCC GTTTGCTTCC A	CCTCCATAAA TCTCAGCACC ATAA
Reln	NM_080394	GCCAGCTTTC GACTACCCTA TTAAC	CGTAGTGGCA CAGAAGCTAT CG
Slc17a6	NM_053427.1	GGCAGACCCT GAGGAAACAA	TCCCCCGTTT CTTCATCCA
Slc17a7	NM_053859.2	TTGTGGCTAC CTCCACCCTA A	CGAAGATGAC ACAGCCATAG TGA
Sod1	NM_017050.1	CATTCCATCA TTGGCCGTAC TA	TTTCCACCTT TGCCCAAGTC
Sod2	NM_017051.2	CTCCCTGACC TGCCTTACGA	CTGCATGATC TGCGCGTTA
Sox2	NM_001109181	GCGGCAACCA GAAGAACAG	CCCGCTCGCC ATGCT
Sst	NM_012659.1	ACCCCGGGAA CGCAAA	CCACACCATG AAGGCATTCA
Tgfb1	NM_021578	ATCGACATGG AGCTGGTGAA A	CGAGCCTTAG TTTGGACAGG AT
Tnf	NM_012675.3	GCCCGAGGCA ACACATCT	CCAGTTCCAC ATCTCGGATC A
Tubb3	NM_139254.2	AACGTCAAGG TAGCGGTGTG T	CGTGCTGTTG CCGATGAAG

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; Bdnf, brain-derived neurotrophic factor; Casp1, caspase 1; Casp3, caspase 3; Casp9, caspase 9; Cat, catalase; Chat, choline O-acetyltransferase; Chrm1, cholinergic receptor, muscarinic 1; Chrm2, cholinergic receptor, muscarinic 2; Chrma7, cholinergic receptor nicotinic alpha 7 subunit; Chrnb2, 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; *Il1a*, interleukin 1 alpha; 111b, interleukin 1 beta; 114, interleukin 4; 116, interleukin 6; 1110, interleukin 10; Keap1, Kelch-like ECH-associated protein 1; Mt1, metallothionein 1; Mt2a, metallothionein 2A; Nes, nestin; Nfe2l2, nuclear factor, erythroid 2 like 2 (also known as NRF2: nuclear factor erythroid 2-related factor 2); Nfkb1, nuclear factor kappa B subunit 1; Nos2, nitric oxide synthase 2; Nrf2, NFE2 like bZIP transcription factor 2; Pcna, proliferating cell nuclear antigen; 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; Sst, somatostatin; Tgfb1, transforming growth factor, beta 1; Tnf, tumor necrosis factor; Tubb3, tubulin, beta 3 class III.



Supplementary Fig. 2

Body weight, food and water consumption of dams during the exposure period. (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 3 Maternal body weight and consumption of food and water

	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%)	$14.72 \pm 0.61 ^{**}$	(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%)	$17.18 \pm 1.19^*$	(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%)	$24.29 \pm 0.62^{**}$	(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%)	$35.17 \pm 2.57*$	(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	$65.33 \pm 3.93*$	(-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%)	$55.10 \pm 2.61*$	(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%)	$75.16 \pm 3.61*$	(15%)	$74.59 \pm 4.00*$	(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.

 $^{\rm b}$ (%) 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 4 Maternal reproductive parameters

	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	$61.36 \pm 4.62^{**}$	$51.15 \pm 12.31 **$	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. 3

Body weight, food and water consumption of male offspring during the exposure period. (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 5 Offspring body weight and consumption of food and water

_	IMI in diet (ppm)						
-	0 (Control)	83		250		750	
Body weigh	nt (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%)	$19.46 \pm 0.75^*$	(11%)
PND 12	28.54 ± 0.49	29.27 ± 0.46	(-3%)	28.35 ± 0.78	(1%)	$25.87 \pm 1.02*$	(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 consu	mption (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%)	$13.76 \pm 1.54*$	(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 consu	umption (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%)	$23.82 \pm 1.03*$	(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.

 $^{\rm b}$ (%) 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.

Body and brain weights of offspring at necropsies on PND 21 and PND 77							
		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	$44.77 \pm 1.98*$			
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			

Supplementary Table 6 Body and brain weights of offspring at necronsies on PND 21 and PND 77

Abbreviation: IMI, imidacloprid; PND, postnatal day.

^a Mean \pm SEM.

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

Supplementary Table 7 Number of immunoreactive or TUNEL⁺ cells in the SGZ/GCL or hilar region of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on PND 21

		IMI in di	et (ppm)	
	0 (Controls)	83	250	750
No. of animals examined	10	10	10	10
Granule cell lineage subpopulat	ions 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	$102.72 \pm 5.88*$
TUBB3	91.15 ± 6.4	75.84 ± 6.51	75.31 ± 8.59	$66.45 \pm 4.81*$
NeuN	528.48 ± 24.87	519.08 ± 18.84	523.06 ± 25.36	532.32 ± 23.43
GABAergic interneuron subpop	oulations in the DG hild	us (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	$65.41 \pm 4.51*$
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	$4.10 \pm 0.39*$
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	$0.21 \pm 0.12*$
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	$2.98 \pm 0.26*$
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 hi	ilar region)		
GFAP	417.57 ± 20.52	424.31 ± 14.22	467.21 ± 23.85	$492.15 \pm 13.25*$
Iba1	68.36 ± 2.88	75.33 ± 4.23	73.73 ± 3.07	86.94 ± 2.30**
CD68	16.24 ± 2.04	$25.5 \pm 3.09*$	$24.78 \pm 2.10*$	$24.64 \pm 2.19*$
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 8 Number of immunoreactive or TUNEL⁺ cells in the SGZ/GCL or hilar region of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on PND 77 or PND 79 ^a

		IMI in di	iet (ppm)	
	0 (Controls)	83	250	750
No. of animals examined	10	10	10	10
Granule cell lineage subpopu	lations in the SGZ/GCL (No./mm SGZ length)		
GFAP	5.76 ± 0.58^{b}	4.44 ± 0.50	$3.54 \pm 0.31 **$	$4.21 \pm 0.28*$
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	$561.33 \pm 7.35^{**}$	$534.83 \pm 11.89 **$
GABAergic interneuron subp	opulations in the DG hilu	us (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 pro-	oteins in the GCL (No./m	m 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 apoptor	sis 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	$0.26 \pm 0.08*$
TUNEL in the GCL	0.07 ± 0.04	1.05 ± 0.72	0.72 ± 0.37	0.69 ± 0.26
Astrocytes and microglia in t	he DG hilus (No./mm ² hi	lar 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	$18.18 \pm 2.14*$
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 \pm 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 9 Levels of acetylcholinesterase activity and malondialdehyde in the hippocampus of male offspring on PND 21 and PND 77

	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	$34.55 \pm 1.40*$		
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	$12.74 \pm 0.25*$		
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 10 Changes in open field test of male offspring

	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)	$2.19\pm0.51^{\rm a}$	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)	$14.86 {\pm} 0.56$	14.55 ± 0.98	15.28 ± 0.56	$17.63 \pm 0.87*$	
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 \pm SEM.

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

Supplementary Table 11 The alteration in spatial short-term memory in Y-maze test of male offspring on PND 27

	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. 4

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 12 Changes in contextual fear conditioning test of male offspring

	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.