

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

AI支援型MPSを用いたヒトiPS由来神経細胞による神経毒性試験法の開発

研究代表者 安彦行人 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 室長

分担課題：In vivo 毒性評価

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

研究要旨

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

A. 研究目的

化学物質のインビトロ神経毒性評価法の開発を目的

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

は、動物実験で発達期の神経毒性評価を行う。

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

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

B. 研究方法

動物への曝露実験として、OECD の発達神経毒性試験ガイドライン 426 に準じ、妊娠 SD ラット (妊娠 1 日で入手、日本エスエルシー) に対して、一群あたり 12 匹ずつとして、妊娠 6 日目から分娩後 21 日目までの期間、NaF は 0, 30, 100 ppm、AP は 0, 300, 1000 ppm の濃度で飲水投与した。IMI は 0, 83, 250, 750 ppm の濃度で混餌投与した。NaF と IMI の最高用量は、過去の文献報告をもとに、母動物への軽度な毒性とともに妊娠の維持と児動物への重篤な毒性が出ない濃度に設定した。AP の最高用量は文献データを参考に母動物と児動物に甲状腺機能低下を誘発することが知られている用量とした。本実験では、出生後 4 日目に間引きを行い、各母動物に 8 匹を確保するよう児動物数を調整した。投与期間中、一般状態は 1 日 1 回観察し、体重、摂餌量及び摂水量を週に 2 回の頻度で測定した。出生後 21 日目 (離乳時; PND 21) に児動物の半数を解剖に供した。各群 10 匹以上の雄児動物を CO₂/O₂ 麻酔下で 4%PFA/0.1M リン酸バッファーにより灌流固定を行い、免疫組織学的検討に供した。各群 6 匹以上の雄児動物を CO₂/O₂ 麻酔下で放血し、脳をメタカーン液にて固定し、遺伝子発現解析に供した。AP 曝露実験では、血清甲状腺ホルモン測定及び甲状腺組織の病理組織学的評価のため、各群 12 匹の雌児動物について CO₂/O₂ 麻酔下で腹部大動脈から採血し、甲状腺組織を摘出し、10% 中性緩衝ホルマリン溶液で固定した。更に各群 6 匹以上の雄児動物について脳内酸化ストレス [malondialdehyde (MDA) レベル] 及び AChE 活性値の測定のため、生理食塩水にて灌流固定を行い、海馬を採材した。

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

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

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

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

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

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

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

IMI曝露実験では、PND 21 と PND 77 の海馬における

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

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

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

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

オープンフィールド試験は PND 18 (離乳期)、PND 38 (青年期)、PND 62 (成体期) に実施し、運動活性と不安様行動を評価した。装置は、表面が黒色ポリビニル樹脂製のステンレス製正方形トレイ (幅 900 mm) と、黒色プラスチック製壁 4 面、深さ 500 mm (小原産業株式会社、東京) で組み立てた。照度は中心部で 20ルクスに保った。中心領域は壁から 180 mm 離れた正方形とした。各被験動物は装置の同じコーナーに壁に向かって単独で置かれ、フィールド中央上方に設置された CCD カメラ (WAT-902B; 株式会社ワテック、鶴岡) を用いて 10 分間の総移動距離と移動時間、平均移動速度、および中央領域率を記録した。パラメータは TimeOFER1 ソフトウェア (小原産業株式会社) を用いて自動測定した。中心領域率は、中心領域率 = [(中心領域滞在時間) \div 10分] \times 100 の式で算出した。

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

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

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

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

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

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

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

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

(倫理面の配慮)

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

C. 研究結果

<NaF 曝露実験>

• NaF-1 母体パラメータ

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

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

• NaF-2 雄児動物の実験期間内パラメータ及び剖検データ

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

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

• NaF-3.1 SGZ 及び/または GCL における顆粒細胞系譜

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

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

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

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

・NaF-3.3 GCL におけるシナプス可塑性関連タンパク質陽性細胞数

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

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

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

・NaF-3.5 歯状回門部におけるグリア細胞数

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

・NaF-4 雄児動物の歯状回における転写産物レベルの発現変化

PND 21 及び PND 77 における歯状回の転写産物レベ

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

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

・NaF-5 海馬の酸化ストレスレベル

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

<AP 曝露実験>

・AP-1 母体パラメータ

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

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

• AP-2 雄子供の生体パラメータ及び剖検データ

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

• AP-3 雌児動物における血清甲状腺ホルモン濃度と甲状腺病理組織学的検査

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

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

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

• AP-4.1 SGZ 及び/または GCL における顆粒細胞系譜

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

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

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

PND 21 では、PCNA⁺細胞数は両投与群で有意に減少

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

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

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

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

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

• AP-4.4 GCL におけるシナプス可塑性関連タンパク質陽性細胞数

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

• AP-4.5 歯状回門部におけるグリア細胞数

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

• AP-4.6 歯状回門部における OL 系譜

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

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

• AP-5 GCL、歯状回門部、及び脳梁とそれに隣接する帯状束の領域の定量

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

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

・AP-6 雄児動物の歯状回における転写産物レベルの発現変化

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

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

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

・AP-7 雌児動物における海馬の MDA と GSSG/GSH レベル

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

<IMI 曝露実験>

・IMI-1 母体パラメータ

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

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

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

・IMI-2 雄児動物の生体パラメータおよび剖検データ

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

・IMI-3 雄児動物の歯状回における免疫反応細胞数とアポトーシス細胞数

・IMI-3-1 SGZ/GCL における顆粒細胞系マーカー

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

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

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

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

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

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

・IMI-3-3 GCLにおけるシナプス可塑性関連遺伝子産物

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

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

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

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

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

・IMI-3-5 歯状回門部におけるグリア細胞叢集団の数

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

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

・IMI-4 雄児動物の歯状回における転写産物レベルの発現変化

PND 21 において、顆粒細胞系譜マーカー遺伝子のうち、*Dpysl3* と *Tubb3* の転写産物レベルは、750 ppm 群では *Gapdh* で正規化した後、有意に減少した (Table 5)。Reelin シグナル伝達関連遺伝子 *Vldlr* の転写産物レベルは、750 ppm 群では *Hprt1* で正規化した後に有意に増加した。神経栄養因子関連遺伝子 *Ntrk2* の転写産物レベルは、750 ppm 群で *Gapdh* と *Hprt1* で正規化した後に有意に増加した。コリン作動性受容体および酵素遺伝子のうち、*Chat* の転写産物レベルは 750 ppm 群で有意に増加し、*Chrb2* の転写産物レベルは *Gapdh* および/または *Hprt1* による正規化後に有意に減少した。神経炎症および酸化ストレス関連遺伝子に関しては、*Gfap* および *Aif1* (グリア細胞マーカー遺伝子)、*Il4*、*Il6*、

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

PND 77 において、顆粒細胞系譜関連遺伝子のうち、*Nes* の転写産物レベルは 750 ppm 群で *Gapdh* と *Hprt1* で正規化した後、有意に減少した (Table 6)。細胞増殖マーカー遺伝子 *Pcna* および抗アポトーシス遺伝子 *Bcl2l1* の転写産物レベルは、750 ppm 群で *Gapdh* および *Hprt1* による正常化後に有意に減少した。コリン作動性受容体および酵素遺伝子のうち、*Chrb2* の転写産物レベルは、750 ppm 群では *Hprt1* で正規化した後に有意に減少した。シナプス可塑性関連 IEGs のうち、*Ptgs2* の転写産物レベルは、750 ppm 群では *Gapdh* と *Hprt1* で正規化した後に有意に増加した。神経炎症および酸化ストレス関連遺伝子に関しては、*Il6* および *Tgfb1* (ケミカルメディエーターおよび関連分子)、ならびに *Hmox1*、*Nrf2* および *Gpx1* (酸化ストレス関連遺伝子) の転写産物レベルは、750 ppm 群では *Gapdh* および/または *Hprt1* で正規化した後に有意に減少した。GABA 作動性介在ニューロン関連遺伝子、神経栄養因子関連遺伝子、グルタミン酸受容体およびトランスポーター遺伝子、グリア細胞マーカー遺伝子の転写産物レベルは、750 ppm 群では有意に変動しなかった。

・IMI-5 雄児動物の海馬生化学データ

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

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

・IMI-6 雄児動物の行動検査スコア

・IMI-6-1 オープンフィールド試験

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

・IMI-6-2 Y 迷路試験

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

(Supplementary Table 24).

・IMI-6-3 文脈的恐怖条件付け試験

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

D. 考察

<NaF 曝露実験>

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<AP 曝露実験>

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<IMI 曝露実験>

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

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

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

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

における顆粒細胞のシナプス可塑性の抑制とも関連している可能性が示唆された。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

AChE はコリン作動性システムの重要な構成要素であり、その恒常性の乱れは常に行動障害につながる (Ansari et al., 2012)。注意欠陥・多動性障害 (ADHD) は、最も一般的な神経発達障害のひとつであり、多動性が中核的な特徴であり、過剰な運動とじっとしていることの困難さを指す (Kus 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 *Chrb2* の発現低下を伴っていた。本研究の結果と一致して、妊娠マウスに IMI を投与すると、児動物の成体期における運動活性が上昇した。従って、IMI によるコリン作動性システムの破壊が成体期での運動亢進を引き起こしたと推測される。さらに、酸化ストレス状態の不均衡や免疫系の障害は ADHD と関連している (Verlaet et al., 2018)。したがって、IMI によって誘発される児動物の多動性の特異的なメカニズムを明らかにするためには、さらなる研究が必要である。

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

E. 結論

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

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

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

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

F. 研究発表

1. 論文発表

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

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

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

2. 学会発表

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

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

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

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

<NaF 曝露実験>

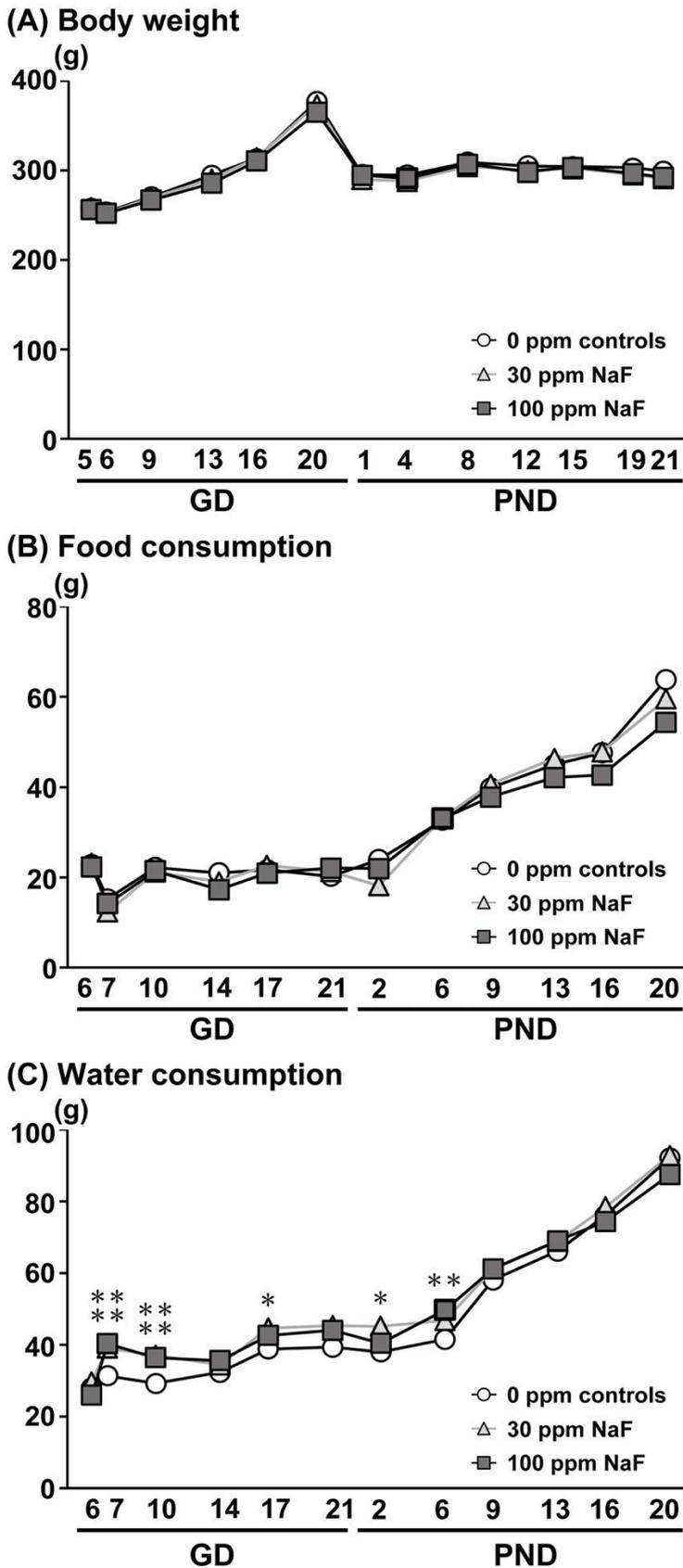


Fig. 1 Body weight and food and water consumption of dams during the exposure period in the sodium fluoride study. (A) Body weight, (B) food consumption, and (C) water consumption. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the untreated controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

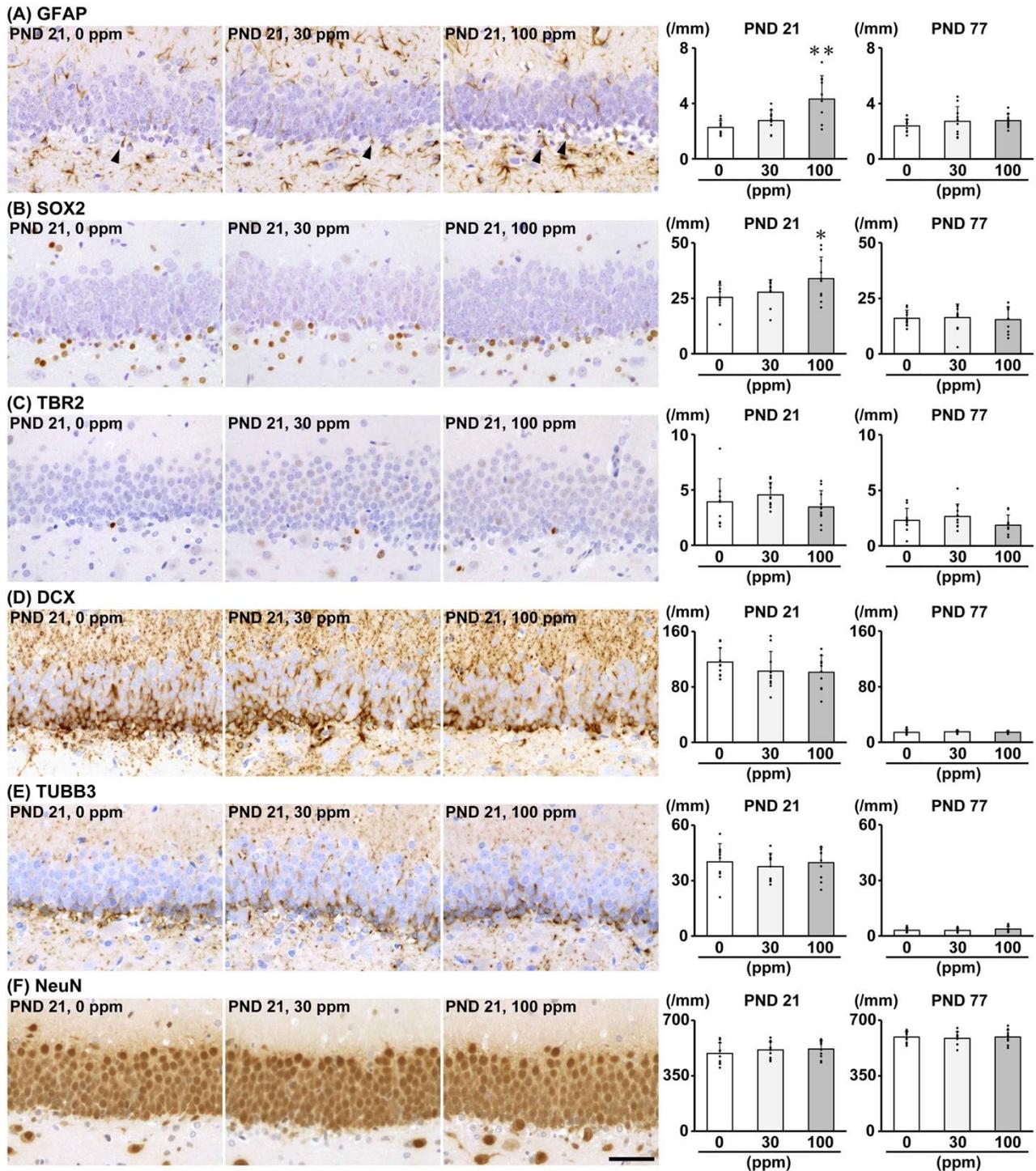


Fig. 2

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

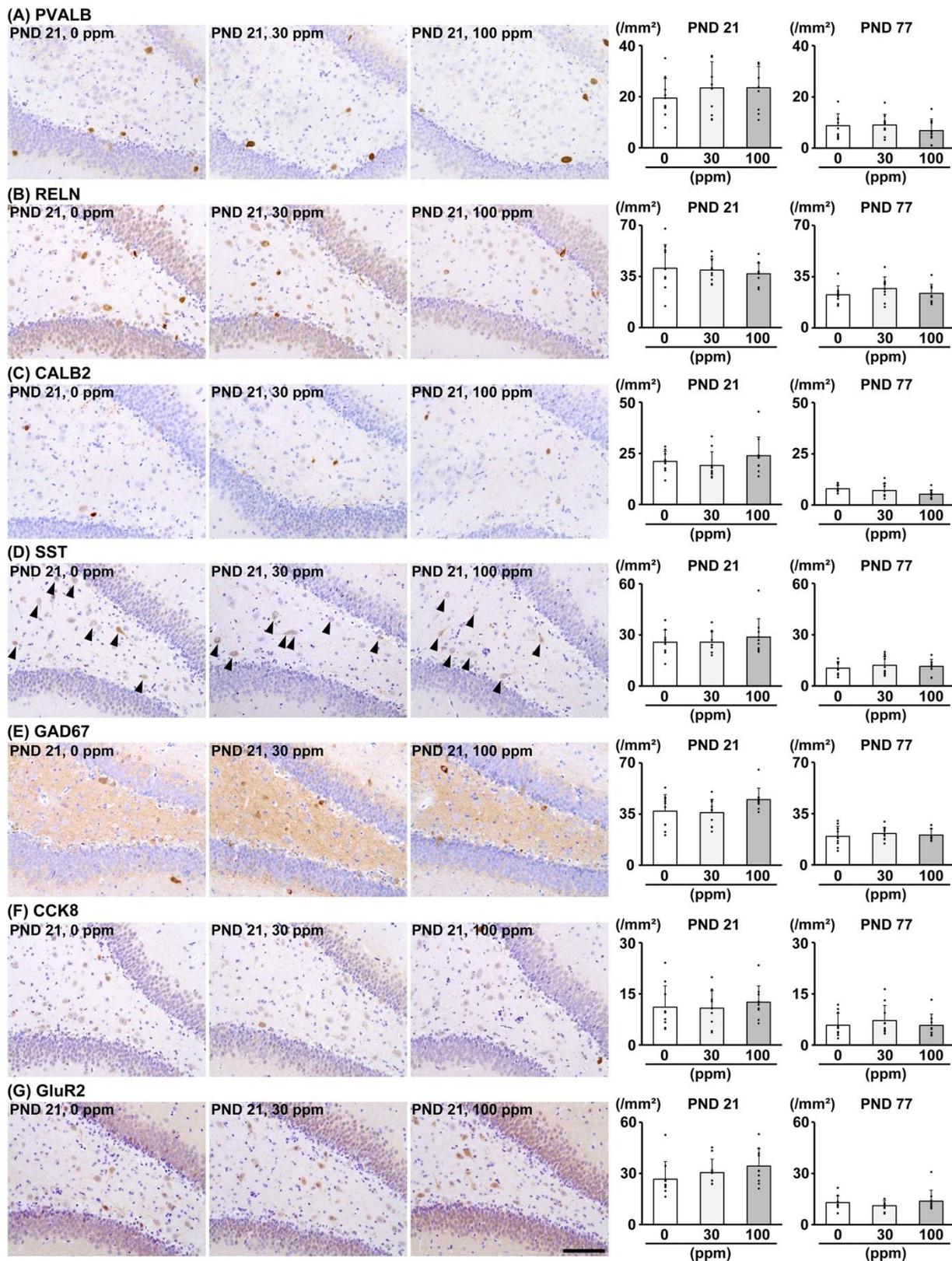


Fig. 3

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

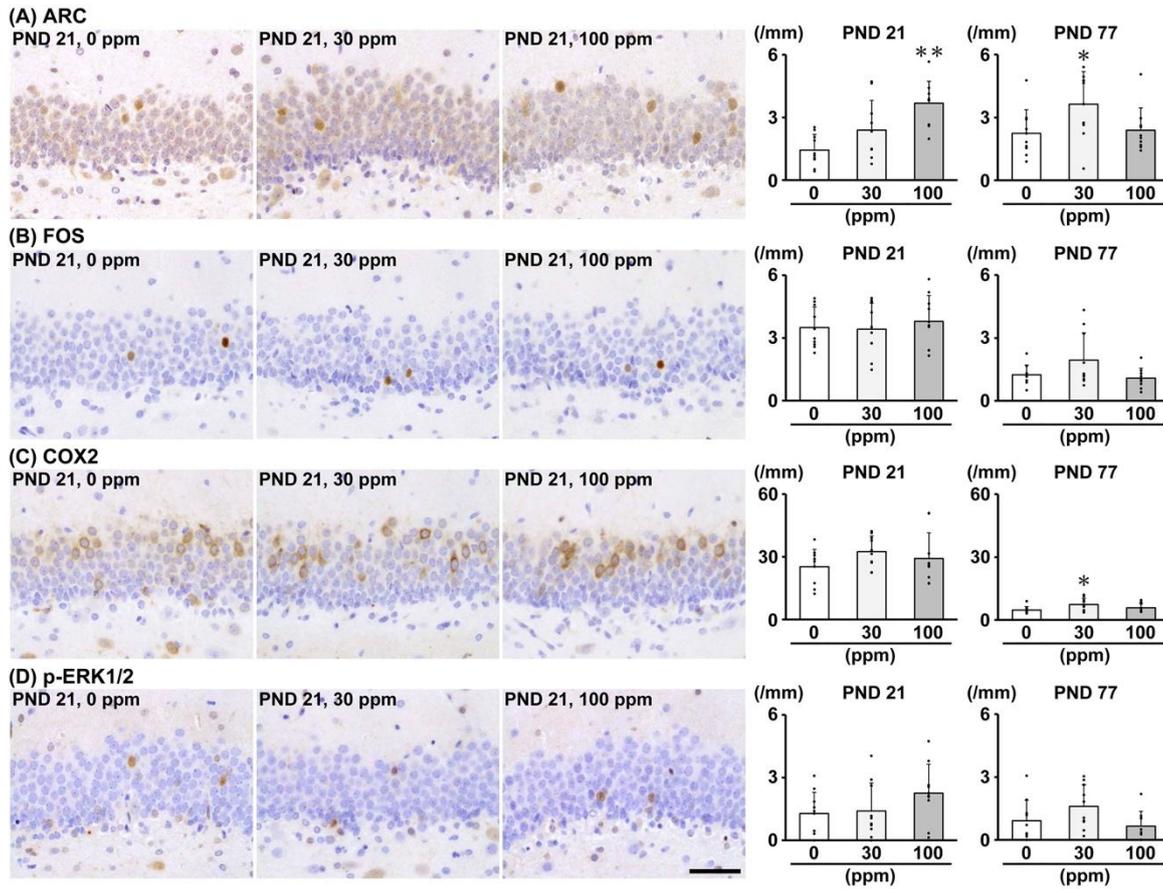


Fig. 4

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

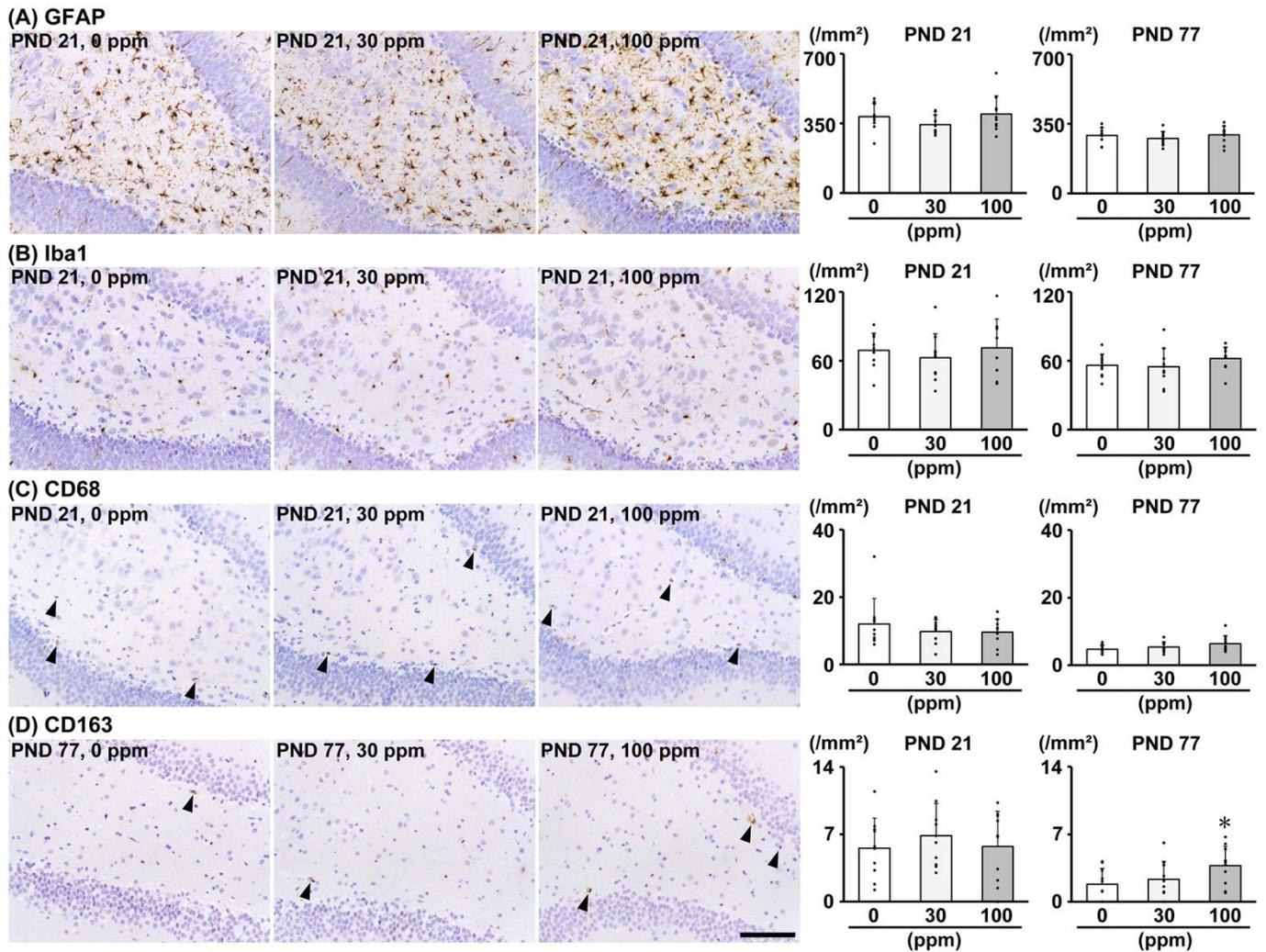


Fig. 5

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

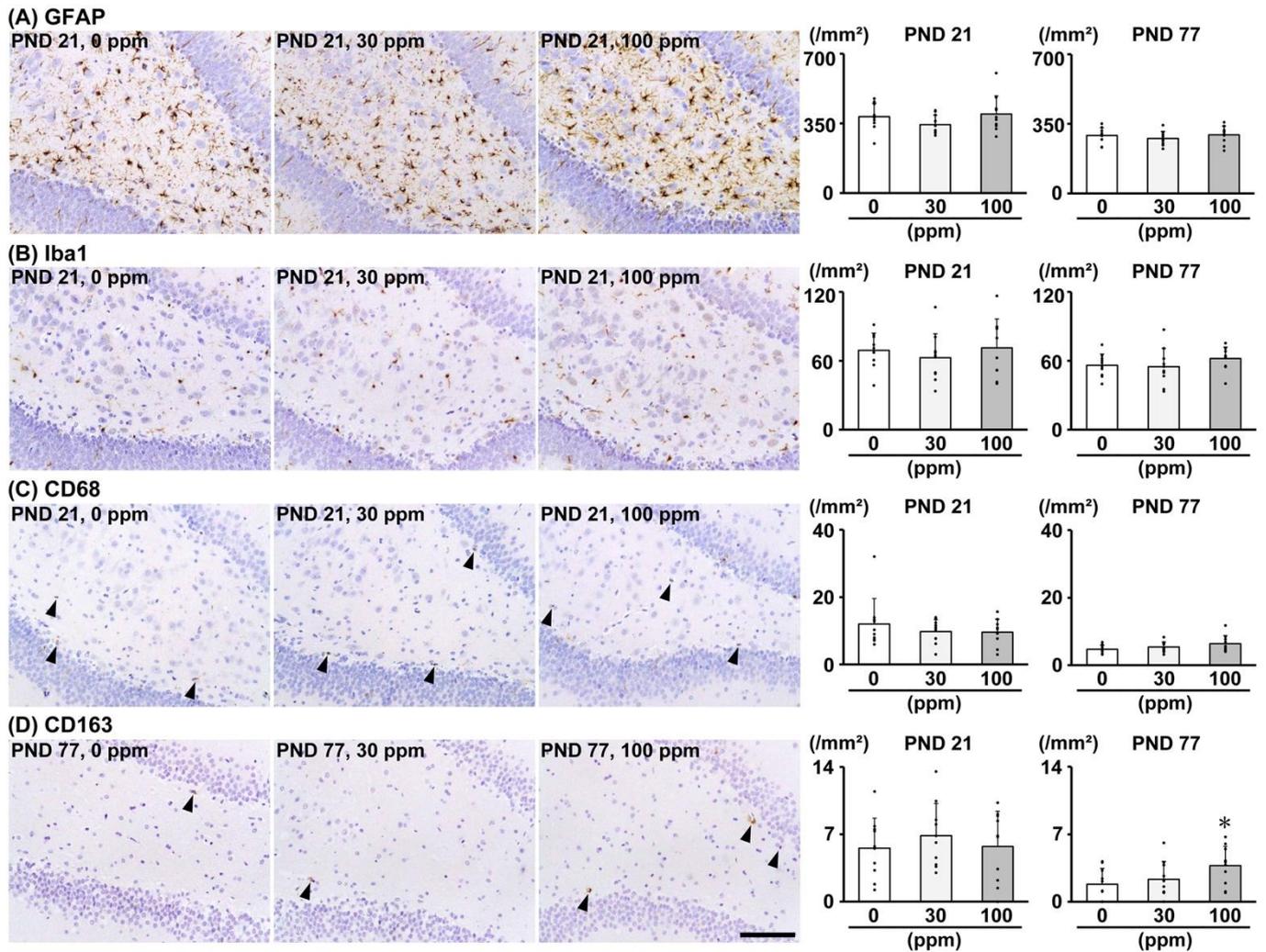


Fig. 6

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

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

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

Chemical mediator genes

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

Abbreviations: *Arc*, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; *Atp5f1b*, ATP synthase F1 subunit beta; *Atp5po*, ATP synthase peripheral stalk subunit OSCP; *Bak1*, BCL2 antagonist/killer 1; *Bax*, BCL2 associated X, apoptosis regulator; *Bcl2*, BCL2 apoptosis regulator; *Bcl2l1*, BCL2 like 1, *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Calb2*, calbindin 2 (also known as calbindin-D-29K and calretinin); *Casp3*, caspase 3; *Casp6*, caspase 6; *Casp8*, caspase 8; *Casp9*, caspase 9; *Cat*, catalase; *Creb1*, cyclic AMP-responsive element-binding protein 1; *Dcx*, doublecortin; *Dppyl3*, dihydropyrimidinase-like 3 (also known as TUC4: TOAD-64/Ulip/CRMP protein 4b); *Eomes*, eomesodermin (also known as TBR2: T-box brain protein 2); *Fos*, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; *Fzd9*, frizzled class receptor 9; GABA, γ -aminobutyric acid; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Gpx1*, glutathione peroxidase 1; *Gria1*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1; *Gria2*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2; *Gria3*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3; *Grin2a*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A; *Grin2b*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B; *Grin2d*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D; *Hes5*, Hes family BHLH transcription factor 5; *Hk1*, hexokinase 1; *Hk2*, hexokinase 2; *Hk3*, hexokinase 3; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Il1b*, interleukin 1 beta; *Il6*, interleukin 6; *Il18*, interleukin 18; *Mt1*, metallothionein 1; *Mt2a*, metallothionein 2A; NaF, sodium fluoride; *Ndufc1*, ubiquinone oxidoreductase subunit C1; *Nes*, nestin; *Ntrk2*, neurotrophic receptor tyrosine kinase 2; OXPHOS, oxidative phosphorylation; *Pcna*, proliferating cell nuclear antigen; *Pkm*, pyruvate kinase M1/2; PND, postnatal day; *Ptgs2*, prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (also known as COX2: cyclooxygenase-2); *Pvalb*, parvalbumin; *Rbfox3*, RNA binding fox-1 homolog 3 (also known as NeuN: neuronal nuclei); *Reln*, reelin; *Sdhb*, succinate dehydrogenase complex subunit D; *Slc17a6*, solute carrier family 17 member 6; *Slc17a7*, solute carrier family 17 member 7; *Sod1*, superoxide dismutase 1; *Sox2*, SRY-box transcription factor 2; *Sst*, somatostatin; *Tfap2c*, transcription factor AP-2 gamma; *Tmem70*, transmembrane protein 70; *Tnf*, tumor necrosis factor; *Tubb3*, tubulin, beta 3 class III.

^a Mean ± SD.

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

Table 2**Transcript-level expression changes in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on PND 77 in the NaF study**

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

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

^a Mean ± SD.

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

Supplementary Table 1
Maternal reproductive parameters in the NaF study

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

Abbreviation: NaF, sodium fluoride.

^a Mean ± SD.

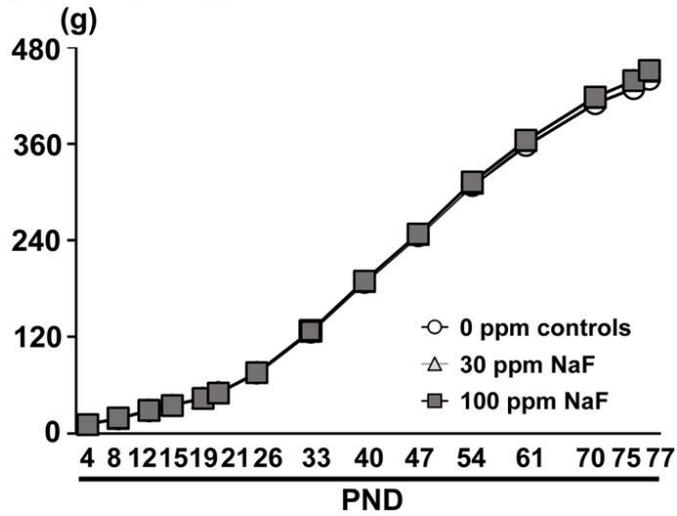
Supplementary Table 2
Body and brain weights of dam in the NaF study

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

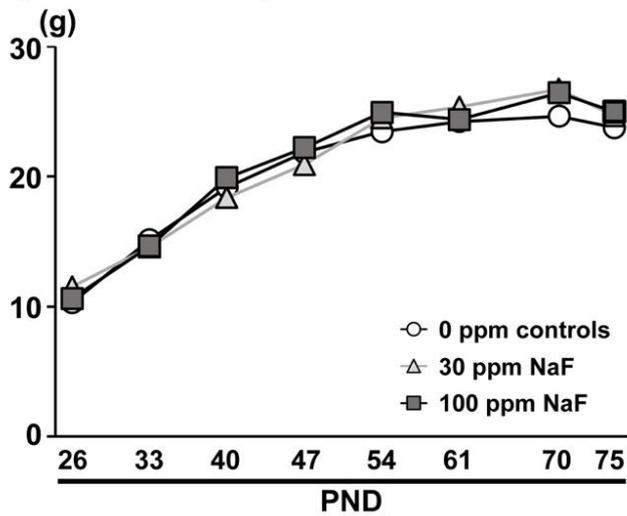
Abbreviation: NaF, sodium fluoride.

^a Mean ± SD.

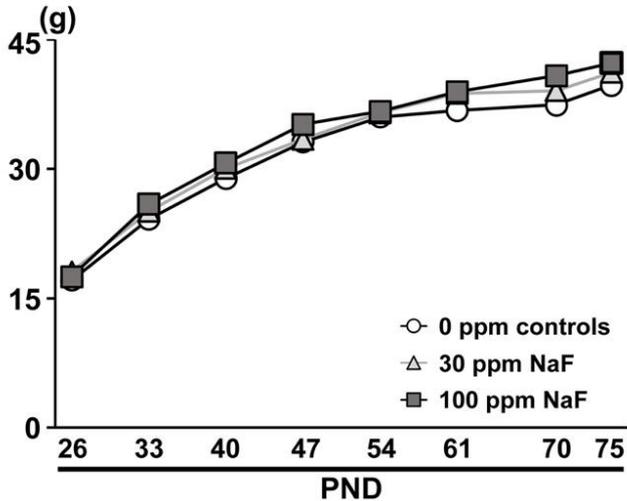
(A) Body weight



(B) Food consumption



(C) Water consumption



Supplementary Fig. 1

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

Supplementary Table 3

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

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

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

^a Mean ± SD.

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

Supplementary Table 4

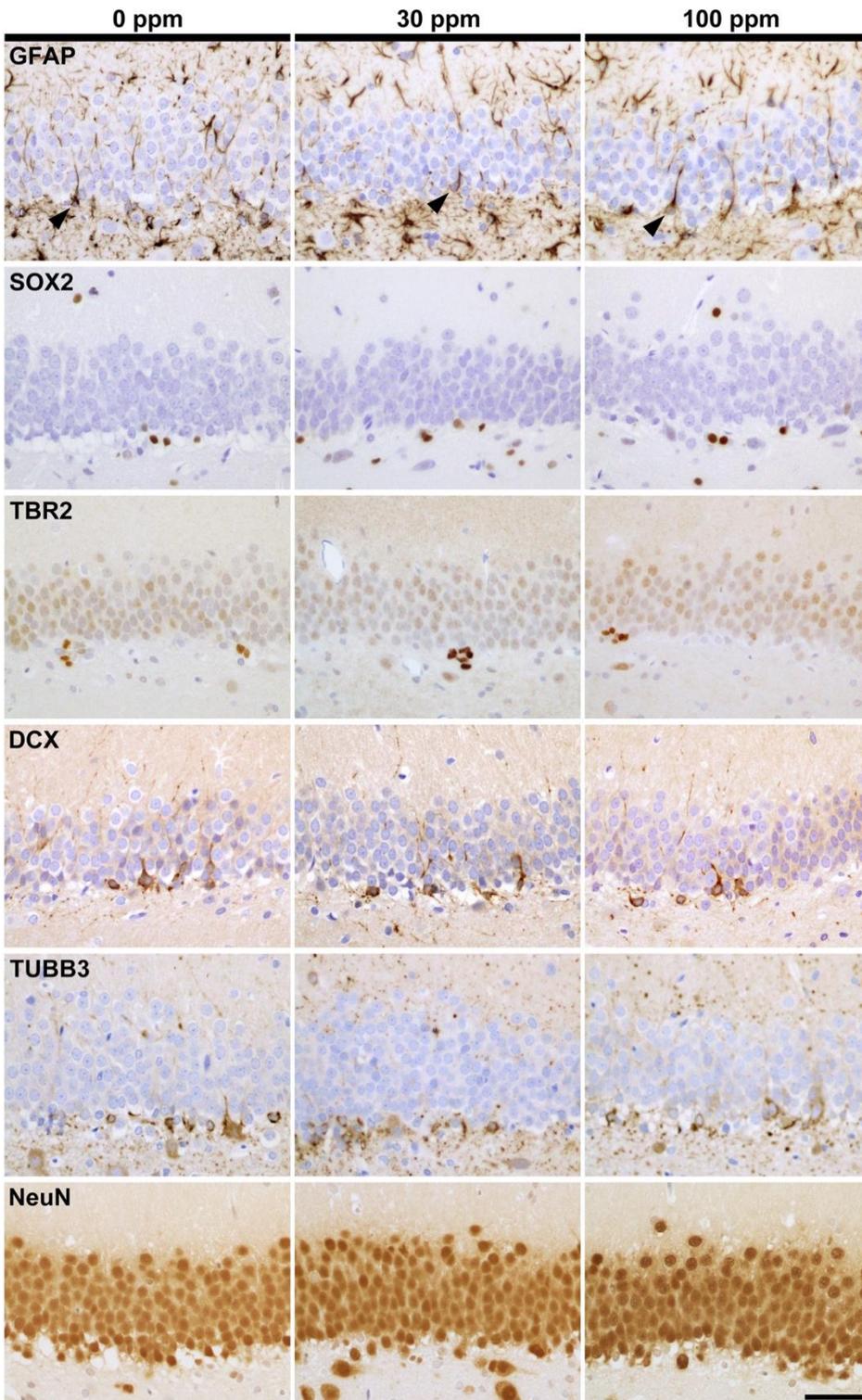
Number of immunoreactive or TUNEL⁺ cells in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on PND 21 in the NaF study

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

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

^a Mean ± SD.

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



Supplementary Fig. 2

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

Supplementary Table 5

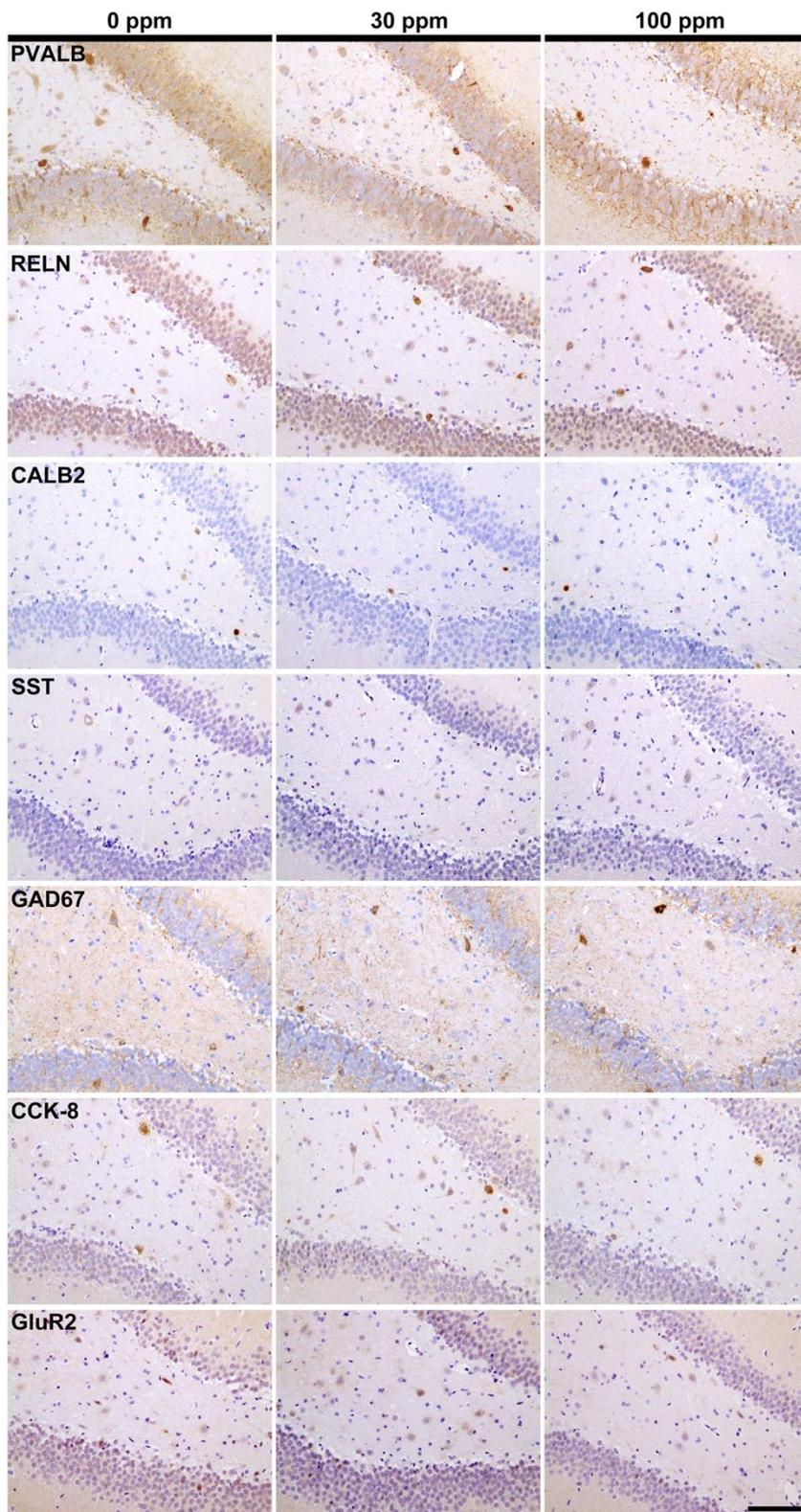
Number of immunoreactive or TUNEL⁺ cells in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on PND 77 in the NaF study

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

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

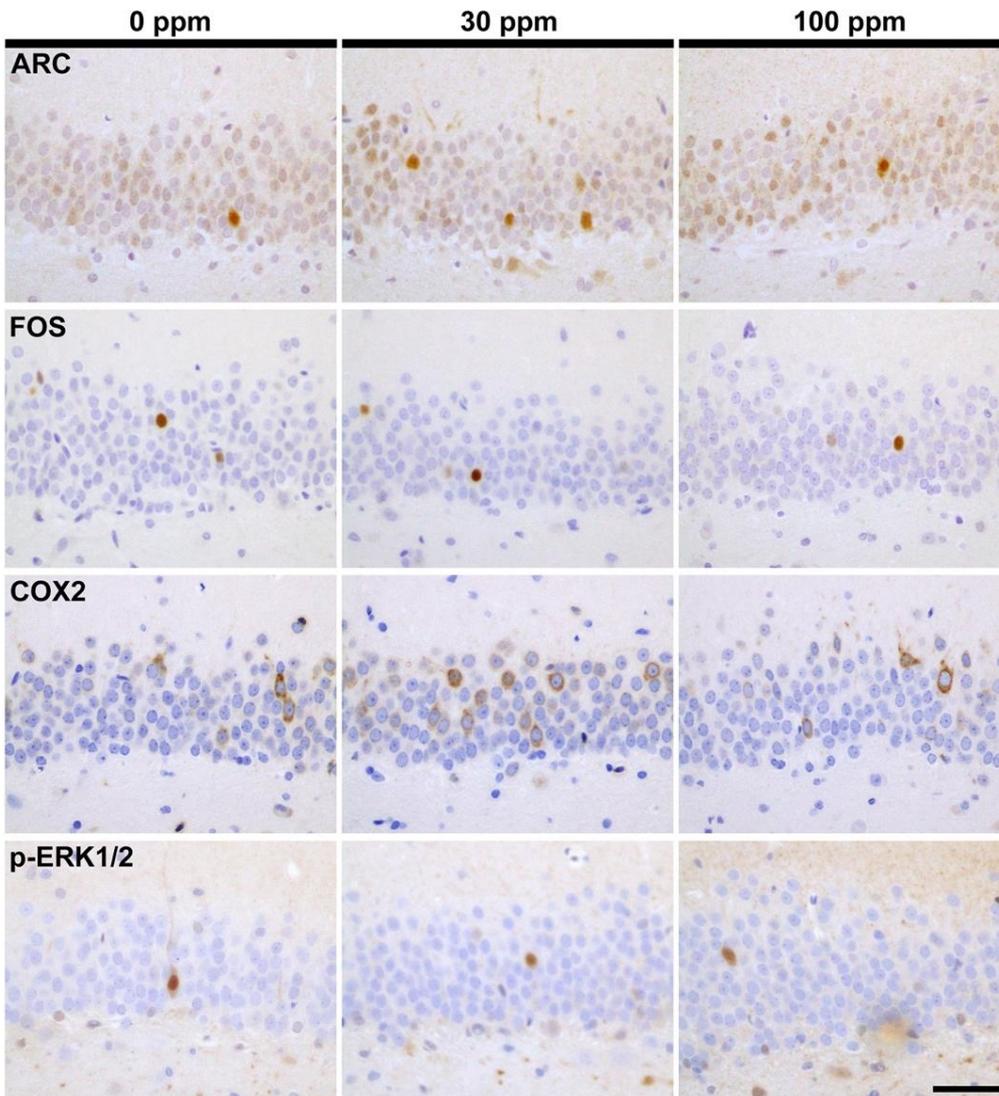
^a Mean ± SD.

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



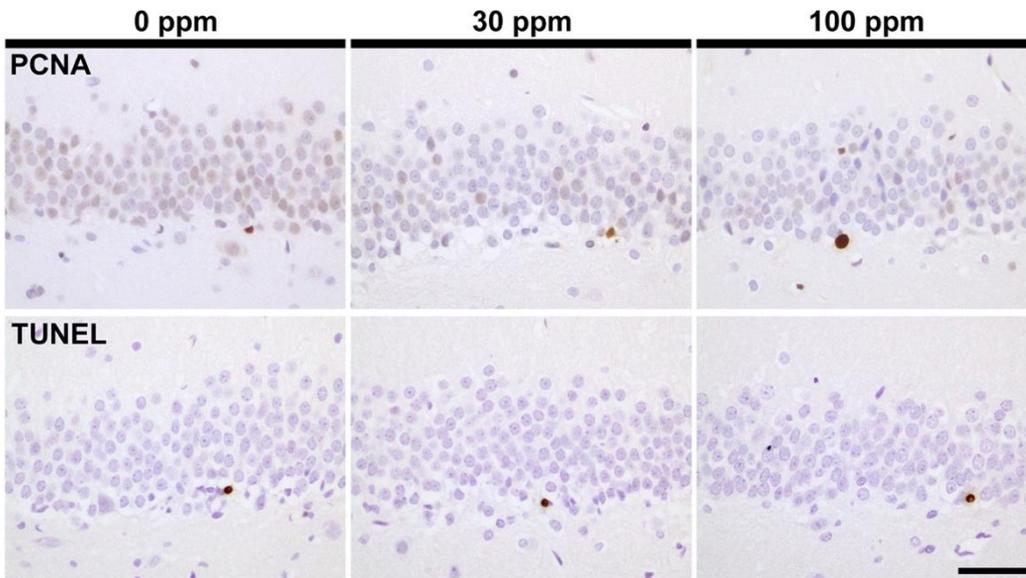
Supplementary Fig. 3

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



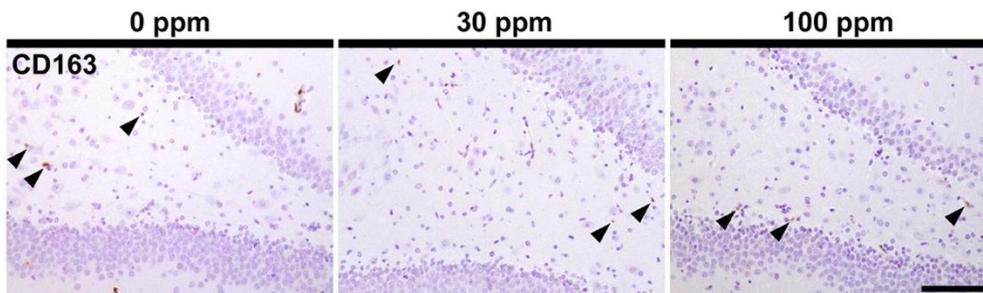
Supplementary Fig. 4

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



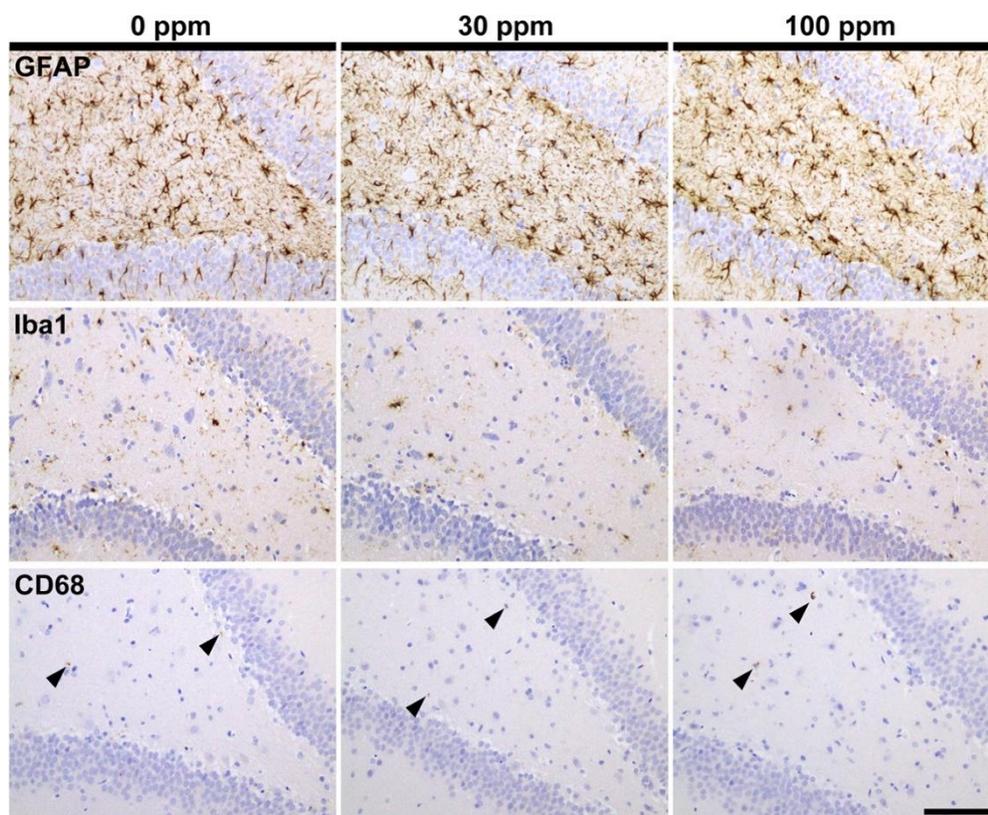
Supplementary Fig. 5

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



Supplementary Fig. 6

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



Supplementary Fig. 7

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

Supplementary Table 6

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

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

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

^a Mean \pm SD.

< AP 曝露実験 >

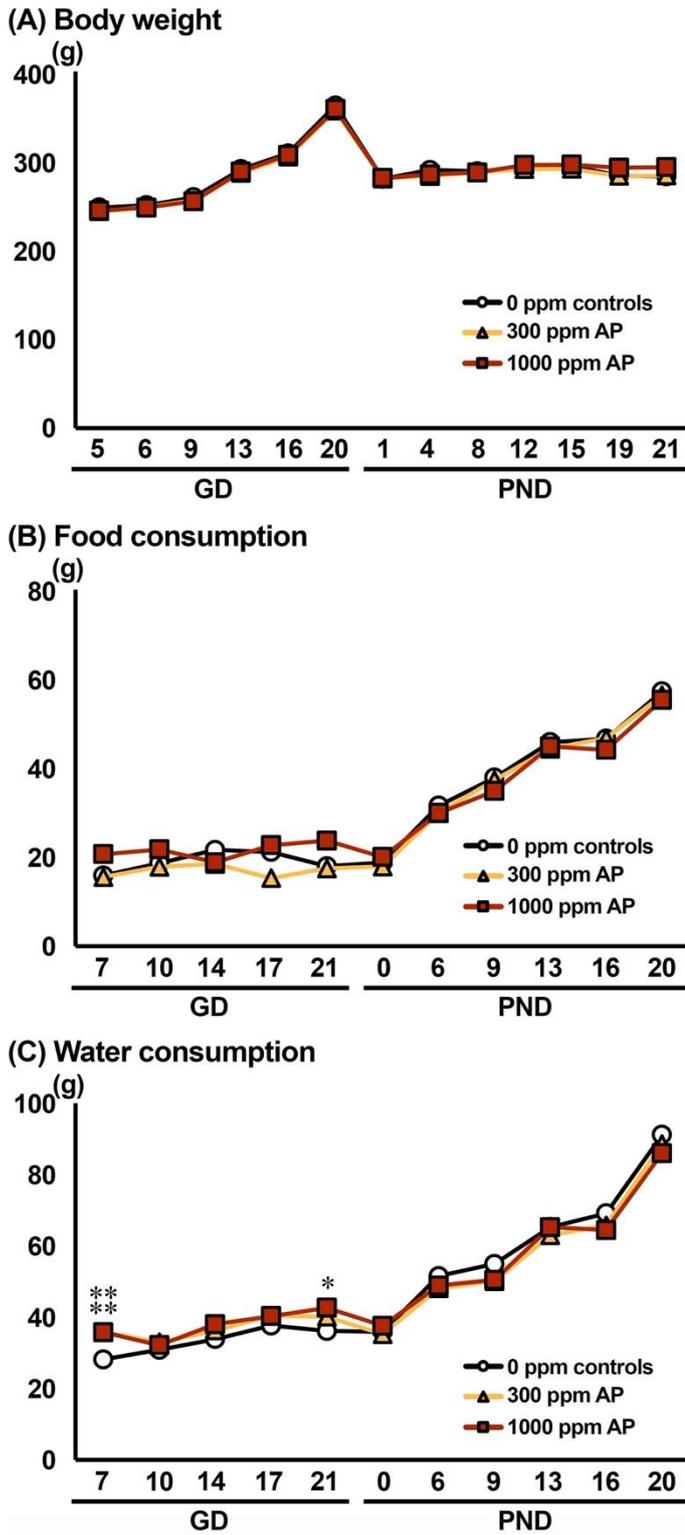


Fig. 7
 (A) Body weight, (B) food consumption, and (C) water consumption of dams during the exposure period in the ammonium perchlorate study.
 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the 0-ppm controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

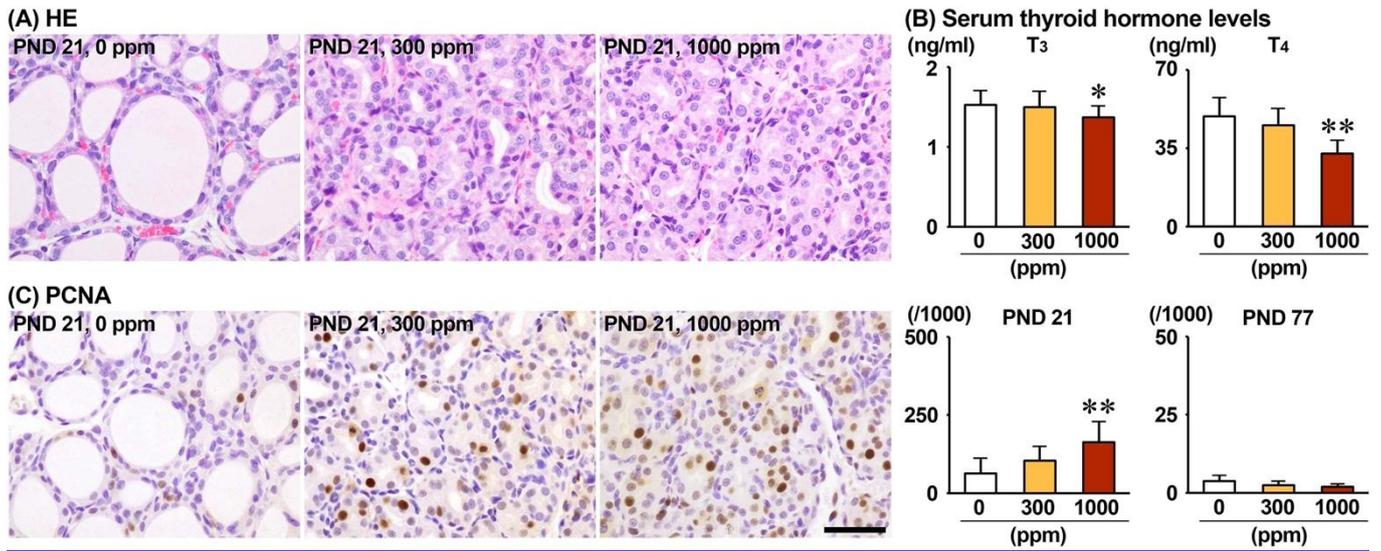


Fig. 8

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

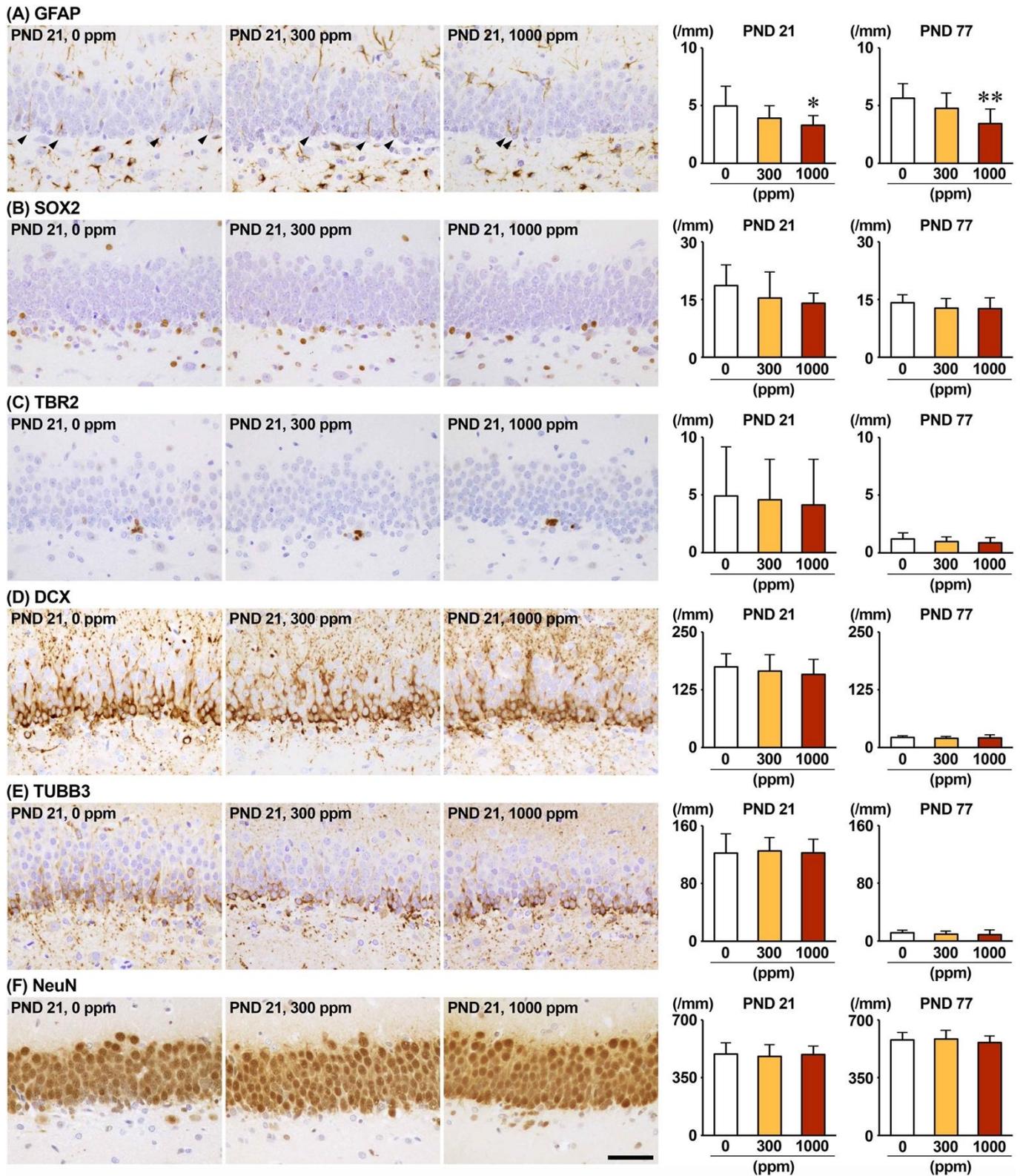


Fig. 9
 Distribution of immunoreactive cells for (A) glial fibrillary acidic protein (GFAP), (B) SRY-box transcription factor 2 (SOX2), (C) T-box brain protein 2 (TBR2), (D) doublecortin (DCX), (E) tubulin, beta 3 class III (TUBB3) and (F) neuronal nuclei (NeuN) in the subgranular zone (SGZ) and/or granule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

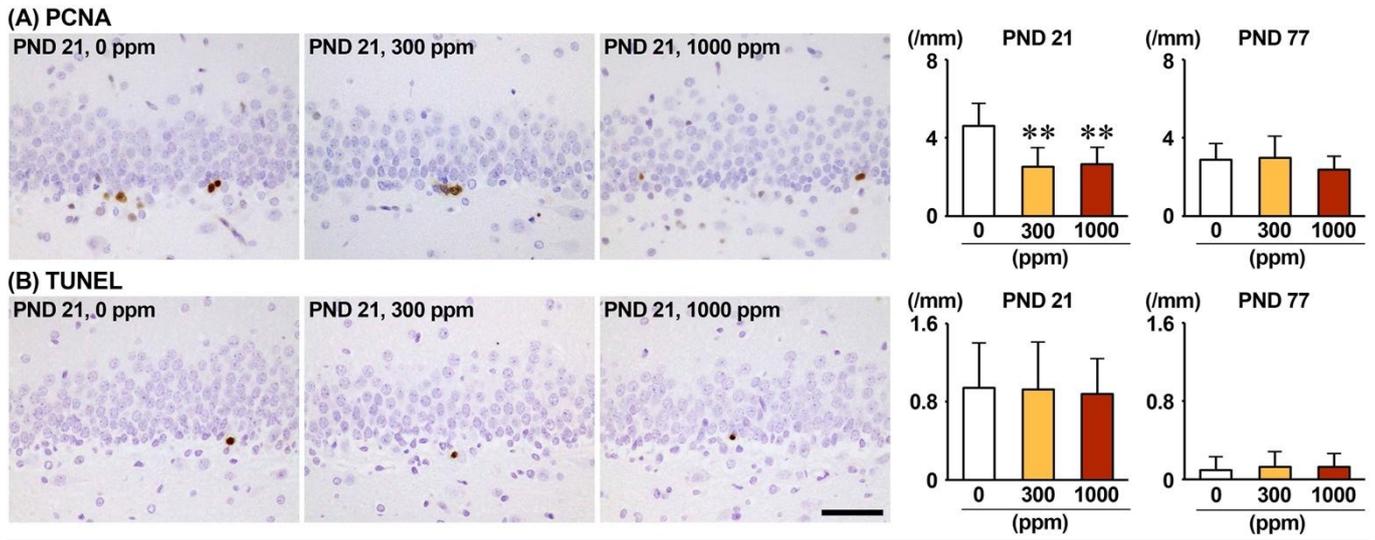


Fig. 10

Distribution of (A) proliferating cell nuclear antigen (PCNA)⁺ proliferating cells and (B) terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)⁺ apoptotic cells in the subgranular zone (SGZ) of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 21 and PND 77 after developmental exposure to ammonium perchlorate.

Representative images from the 0-ppm controls (left), 300-ppm group (middle), and 1000-ppm group (right). Magnification $\times 400$; bar 50 μm . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the SGZ. $N = 10/\text{group}$. ** $P < 0.01$, compared with the 0-ppm controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

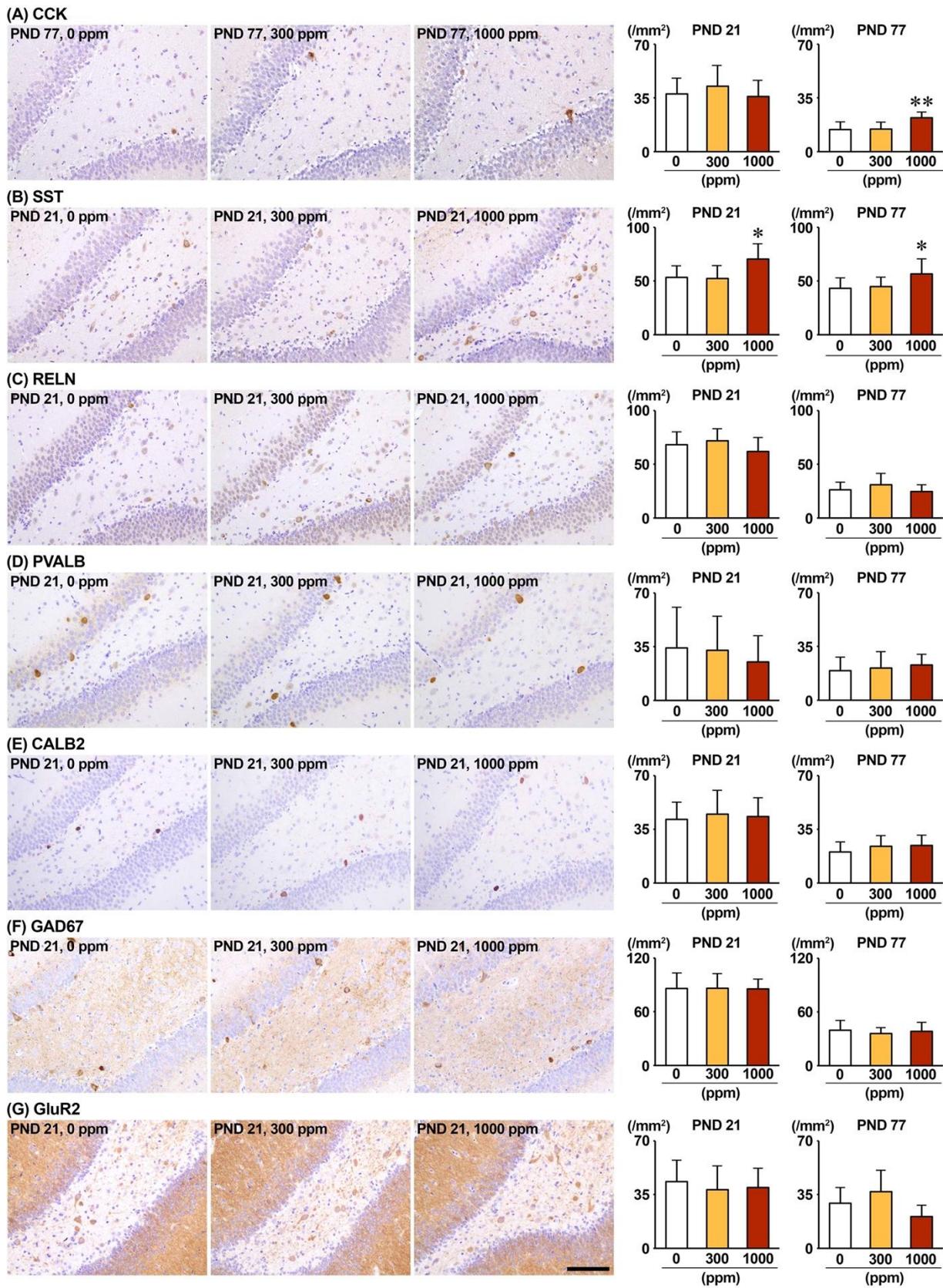


Fig. 11

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

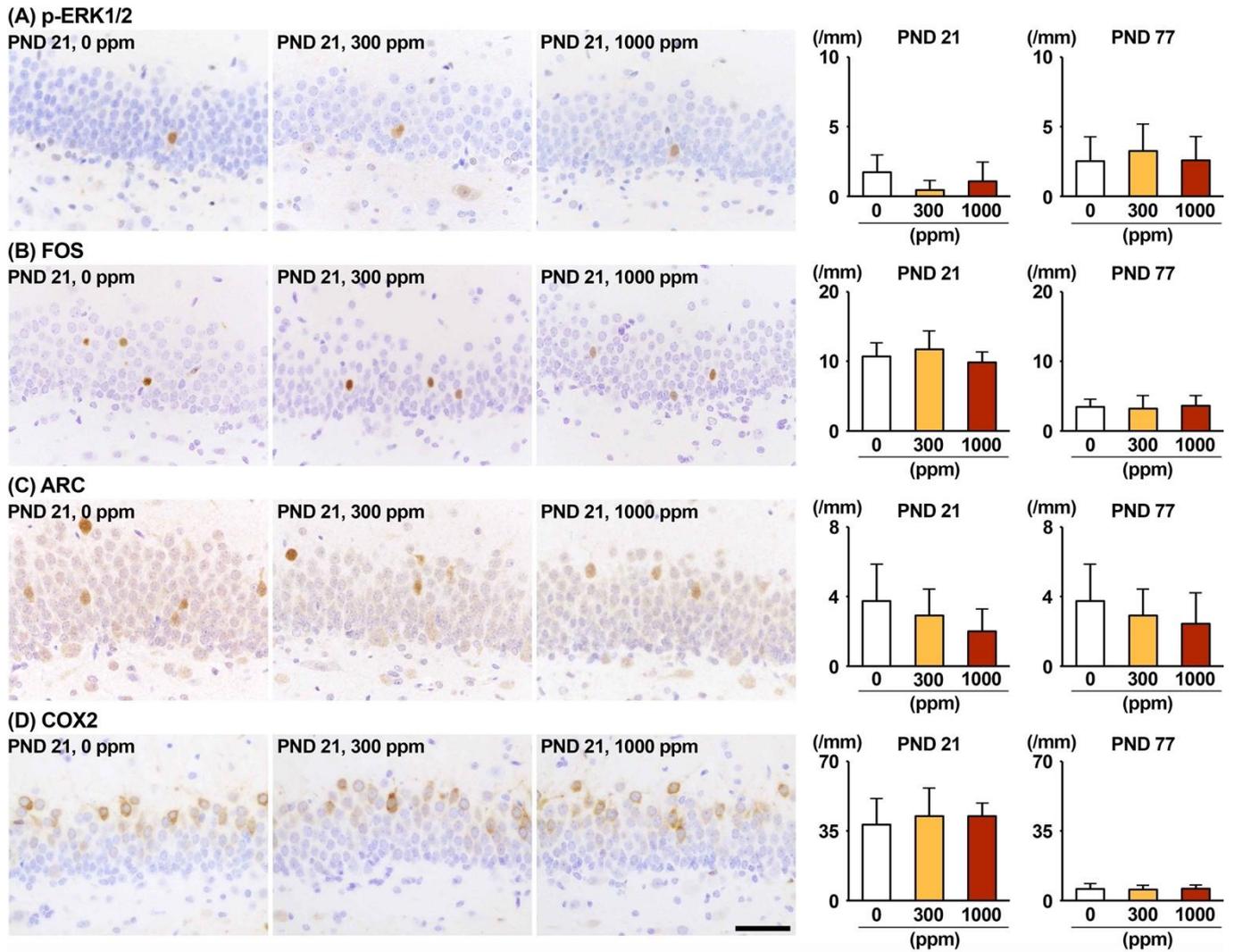


Fig. 12

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

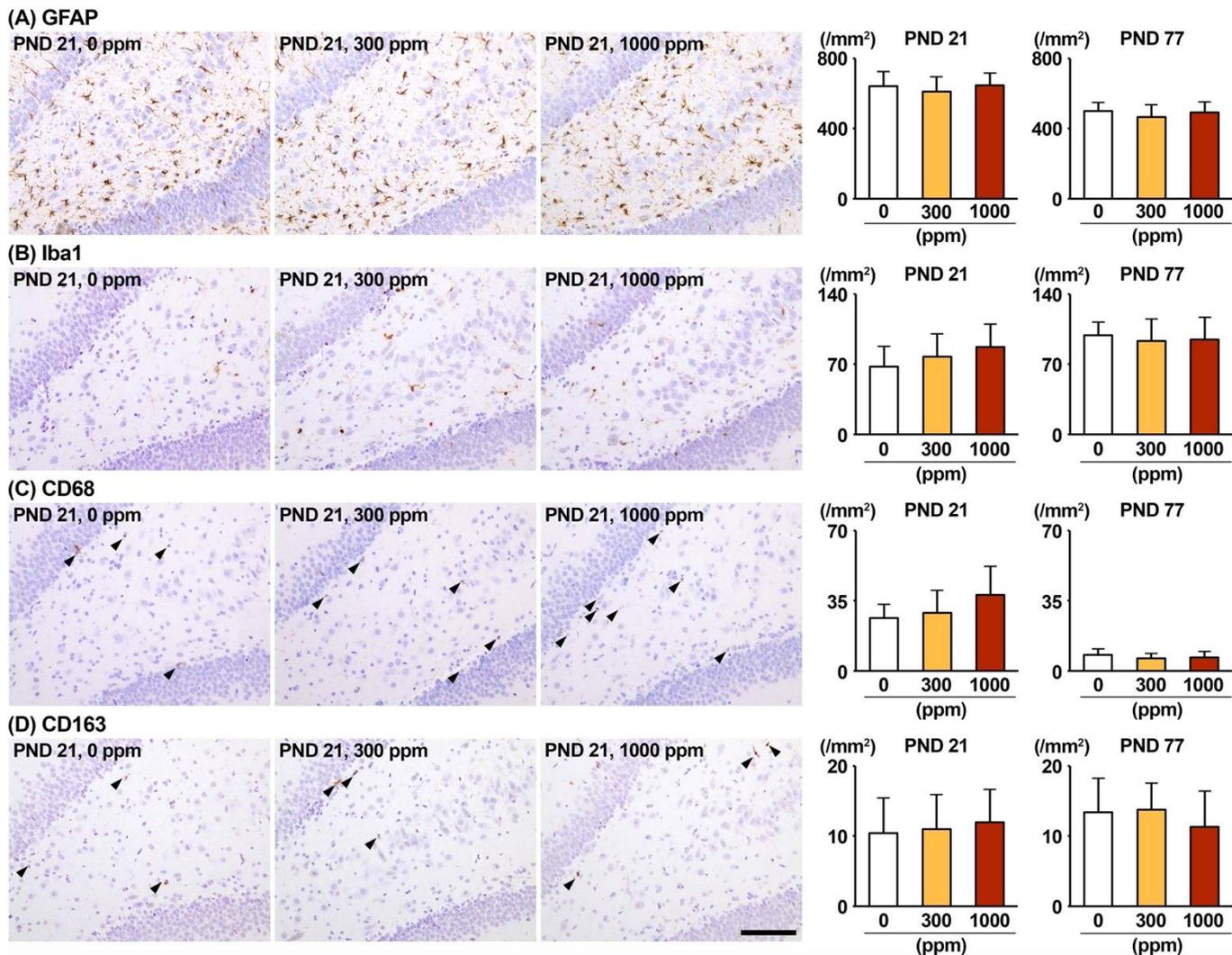


Fig. 13

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

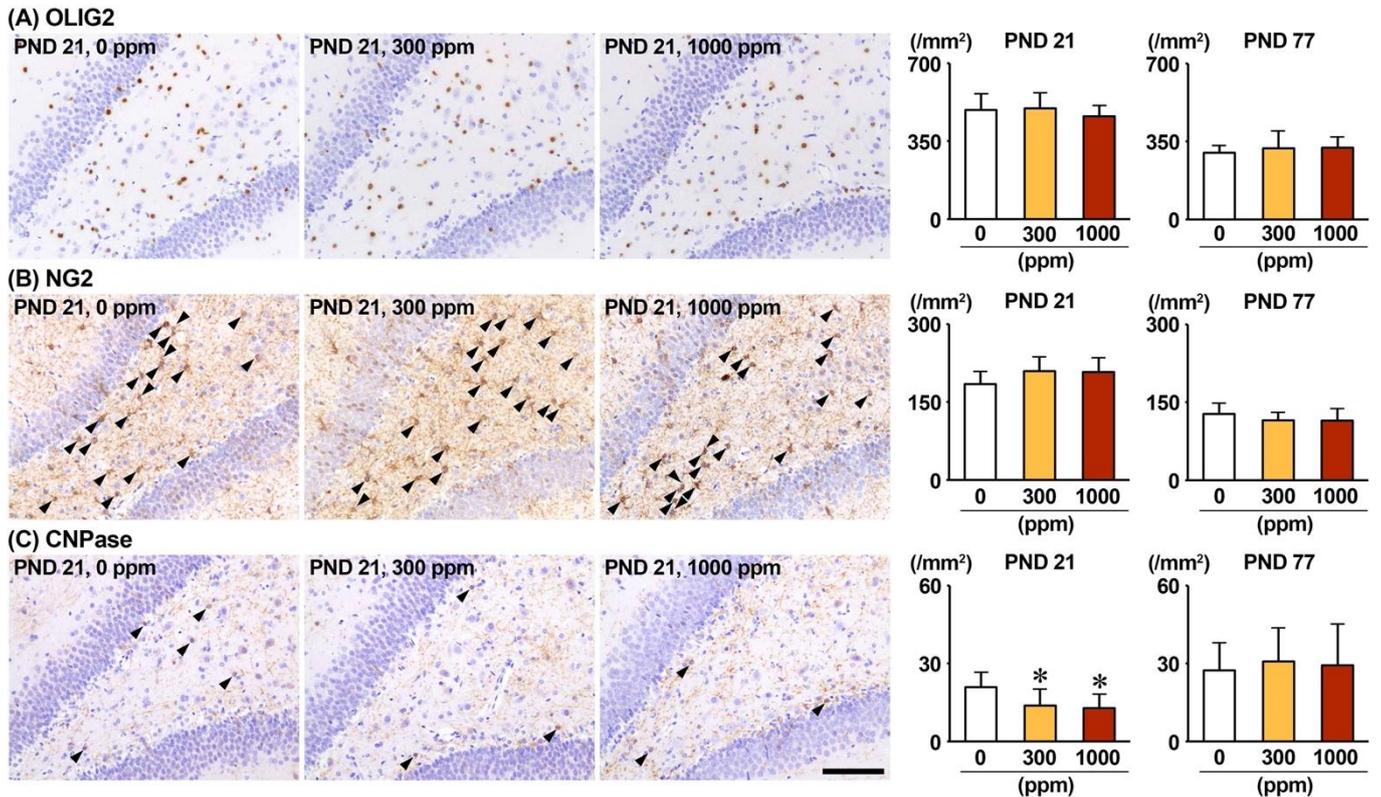


Fig. 14

Distribution of immunoreactive cells for (A) oligodendrocyte transcription factor 2 (OLIG2), (B) NG2 chondroitin sulfate proteoglycan (NG2), and (C) 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) in the hilus of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on postnatal day (PND) 21 and PND 77 after developmental exposure to ammonium perchlorate. Representative images from the 0-ppm controls (left), 300-ppm (middle), and 1000-ppm (right) groups. Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification $\times 200$; bar $100 \mu\text{m}$. Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the hilus area. $N = 10/\text{group}$. $*P < 0.05$, compared with the 0-ppm controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

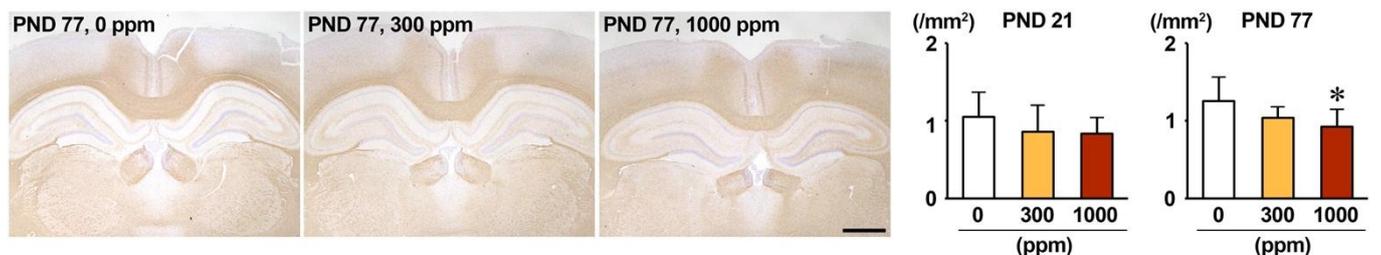


Fig. 15

Morphometrical measurement of the combined area of the corpus callosum and adjacent cingulum bundle of the cerebral hemisphere using immunostained slides for 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase in male offspring on postnatal day (PND) 21 and PND 77. Representative images from the 0-ppm controls (left), 300-ppm (middle), and 1000-ppm (right) groups. Magnification $\times 12.5$; bar 1mm . Graph shows measured area. $N = 10/\text{group}$. $*P < 0.05$, compared with the 0-ppm controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

Table 3

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

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

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

Abbreviations: *Acs14*, acyl-CoA synthetase long chain family member 4; AP, ammonium perchlorate; *Arc*, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; *Arhgef2*, Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor 2; *Baiap2*, BAR/IMD domain containing adaptor protein 2; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Calb2*, calbindin 2 (also known as calbindin-D-29K and calretinin); *Cat*, catalase; *Cck*, cholecystokinin; *Cckbr*, cholecystokinin B receptor; *Cnp*, 2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase; *Cntn2*, contactin 2; *Cspg4*, chondroitin sulfate proteoglycan 4; *Dcx*, doublecortin; *Dll4*, delta like canonical Notch ligand 4; *Dpysl3*, dihydropyrimidinase-like 3; *Efnb3*, ephrin B3; *Eomes*, eomesodermin (also known as TBR2: T-box brain protein 2); *Ephb1*, Eph receptor B1; *Ephb2*, Eph receptor B2; *Fgf13*, fibroblast growth factor 13; *Fgf2*, fibroblast growth factor 2; *Fos*, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; *Fzd9*, frizzled class receptor 9; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Gfap*, glial fibrillary acidic protein; *Gpx1*, glutathione peroxidase 1; *Gria1*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1; *Gria2*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2; *Gria3*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3; *Grin2a*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A; *Grin2b*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B; *Grin2d*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D; *Hes5*, hes family bHLH transcription factor 5; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Id2*, inhibitor of DNA binding 2; *Il18*, interleukin 18; *Il1b*, interleukin 1 beta; *Il6*, interleukin 6; *Kl*, Klotho; *Mbp*, myelin basic protein; *Mt1*, metallothionein 1; *Mt2a*, metallothionein 2A; *Nes*, nestin; *Notch1*, notch receptor 1; *Ntrk2*, neurotrophic receptor tyrosine kinase 2; *Numbl*, NUMB-like, endocytic adaptor protein; *Pcna*, proliferating cell nuclear antigen; *Pdgfa*, platelet derived growth factor subunit A; *Pdgfb*, platelet derived growth factor subunit B; *Pdgfra*, platelet derived growth factor receptor alpha; *Pdgfrb*, platelet derived growth factor receptor beta; *Plp1*, proteolipid protein 1; PND, postnatal day; *Ptgs2*, prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (also known as COX2: cyclooxygenase-2); *Pvalb*, parvalbumin; *Rbfox3*, RNA binding fox-1 homolog 3 (also known as NeuN: neuronal nuclei); *Reln*, reelin; *Robo3*, roundabout guidance receptor 3; *Ror2*, receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2; *Sema3c*, semaphorin 3C; *Shh*, sonic hedgehog signaling molecule; *Sod1*, superoxide dismutase 1; *Sod2*, superoxide dismutase 2; *Sox2*, SRY-box transcription factor 2; *Sst*, somatostatin; *Tfap2c*, transcription factor AP-2 gamma; *Thrsp*, thyroid hormone responsive; *Tnf*, tumor necrosis factor; *Tubb3*, tubulin, beta 3 class III; *Vegfa*, vascular endothelial growth factor A; *Vim*, vimentin; *Wnt7b*, Wnt family member 7B.

^a Mean ± SD.

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

Table 4

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

	AP in drinking water (ppm)			
	0 (Control)		1000	
	No. of animals examined	6	6	6
Normalization control	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
Granule cell lineage markers				
<i>Nes</i>	1.01 ± 0.11 ^a	1.00 ± 0.11	1.23 ± 0.19*	1.28 ± 0.20*
<i>Sox2</i>	1.02 ± 0.20	1.02 ± 0.20	1.06 ± 0.11	1.10 ± 0.16
<i>Eomes</i>	1.02 ± 0.21	1.02 ± 0.22	1.28 ± 0.38	1.35 ± 0.47
<i>Dcx</i>	1.01 ± 0.19	1.01 ± 0.17	0.96 ± 0.09	1.01 ± 0.14
<i>Tubb3</i>	1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.17	1.04 ± 0.04	1.08 ± 0.08
<i>Dpysl3</i>	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.09	1.05 ± 0.08	1.09 ± 0.11
<i>Rbfox3</i>	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.09	0.99 ± 0.09	1.03 ± 0.14
GABAergic interneuron-related genes				
<i>Cck</i>	1.01 ± 0.17	1.01 ± 0.18	1.05 ± 0.13	1.10 ± 0.20
<i>Cckbr</i>	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.10	1.03 ± 0.20	1.08 ± 0.25
<i>Pvalb</i>	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.13	0.98 ± 0.12	1.02 ± 0.14
<i>Reln</i>	1.01 ± 0.15	1.01 ± 0.14	1.14 ± 0.26	1.17 ± 0.24
<i>Calb2</i>	1.07 ± 0.44	1.07 ± 0.42	0.99 ± 0.37	1.01 ± 0.32
<i>Sst</i>	1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.15	1.05 ± 0.12	1.08 ± 0.12
<i>Pdgfa</i>	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.08	1.07 ± 0.08	1.12 ± 0.14
<i>Pdgfb</i>	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.06	1.06 ± 0.10	1.10 ± 0.14
<i>Pdgfra</i>	1.01 ± 0.12	1.01 ± 0.12	1.04 ± 0.13	1.08 ± 0.12
<i>Pdgfrb</i>	1.01 ± 0.13	1.01 ± 0.13	1.18 ± 0.21	1.22 ± 0.18*
Neurotrophic factor-related genes				
<i>Bdnf</i>	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.14	0.91 ± 0.13	0.94 ± 0.16
<i>Ntrk2</i>	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.07	0.98 ± 0.05	1.02 ± 0.07
Neural stem/progenitor cell regulatory genes				
<i>Pcna</i>	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.05	0.93 ± 0.07	0.97 ± 0.08
<i>Ephb1</i>	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.08	1.07 ± 0.06	1.11 ± 0.11
<i>Ephb2</i>	1.01 ± 0.17	1.01 ± 0.16	0.96 ± 0.07	1.00 ± 0.12
<i>Efnb3</i>	1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.16	1.00 ± 0.21	1.04 ± 0.25
<i>Notch1</i>	1.01 ± 0.15	1.01 ± 0.15	1.19 ± 0.19	1.23 ± 0.19*
<i>Dll4</i>	1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.16	1.23 ± 0.19	1.28 ± 0.25*
<i>Hes5</i>	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.08	1.05 ± 0.16	1.09 ± 0.22
<i>Thrsp</i>	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.07	1.11 ± 0.12	1.15 ± 0.13*
<i>Wnt7b</i>	1.01 ± 0.15	1.01 ± 0.15	1.02 ± 0.17	1.06 ± 0.17
Neural progenitor cell/neuroblast proliferation-related genes				
<i>Fzd9</i>	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.04	1.15 ± 0.13*	1.20 ± 0.20
<i>Numbl</i>	1.01 ± 0.11	1.01 ± 0.12	1.02 ± 0.09	1.07 ± 0.16
<i>Vegfa</i>	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.10	1.08 ± 0.19	1.12 ± 0.18
Neuronal migration-related genes				
<i>Arhgef2</i>	0.86 ± 0.02	0.87 ± 0.03	0.84 ± 0.04	0.87 ± 0.10
<i>Cntn2</i>	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.11	1.09 ± 0.12	1.12 ± 0.09
<i>Sema3c</i>	1.01 ± 0.13	1.01 ± 0.14	0.79 ± 0.14*	0.82 ± 0.16
<i>Fgf13</i>	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.09	0.98 ± 0.04	1.02 ± 0.09
<i>Robo3</i>	1.04 ± 0.36	1.04 ± 0.35	1.50 ± 0.16*	1.57 ± 0.23*
Neuronal differentiation-related genes				
<i>Acsl4</i>	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.07	1.01 ± 0.06	1.05 ± 0.11
<i>Baiap2</i>	0.82 ± 0.05	0.83 ± 0.05	0.80 ± 0.04	0.83 ± 0.08
<i>Tfap2c</i>	1.01 ± 0.18	1.01 ± 0.17	0.91 ± 0.19	0.94 ± 0.18
Synaptic plasticity marker genes				
<i>Fos</i>	1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.16	1.00 ± 0.22	1.04 ± 0.27
<i>Arc</i>	1.01 ± 0.17	1.01 ± 0.18	1.17 ± 0.42	1.22 ± 0.45
<i>Ptgs2</i>	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.07	0.94 ± 0.08	0.98 ± 0.14
Oxidative stress-related genes				
<i>Cat</i>	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.09	0.95 ± 0.09	0.99 ± 0.10
<i>Mt1</i>	1.02 ± 0.21	1.01 ± 0.20	1.11 ± 0.18	1.15 ± 0.19
<i>Mt2</i>	1.01 ± 0.17	1.01 ± 0.16	0.95 ± 0.18	0.98 ± 0.19
<i>Sod1</i>	1.01 ± 0.13	1.01 ± 0.12	0.92 ± 0.09	0.96 ± 0.13
<i>Sod2</i>	1.01 ± 0.12	1.01 ± 0.11	0.98 ± 0.08	1.02 ± 0.11
<i>Gpx1</i>	1.01 ± 0.13	1.01 ± 0.12	0.87 ± 0.06*	0.90 ± 0.06
Chemical mediators				
<i>Tnf</i>	1.03 ± 0.28	1.03 ± 0.29	1.45 ± 0.60	1.52 ± 0.70
<i>Il1b</i>	1.19 ± 0.55	1.19 ± 0.55	1.09 ± 0.74	1.13 ± 0.72
<i>Il6</i>	1.19 ± 0.58	1.19 ± 0.58	1.08 ± 0.70	1.12 ± 0.71
<i>Il18</i>	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.07	1.19 ± 0.20	1.24 ± 0.27
Glutamatergic receptors and glutamate transporters				

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

Abbreviations: *Acsl4*, acyl-CoA synthetase long chain family member 4; AP, ammonium perchlorate; *Arc*, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; *Arhgef2*, Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor 2; *Baiap2*, BAR/IMD domain containing adaptor protein 2; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Calb2*, calbindin 2 (also known as calbindin-D-29K and calretinin); *Cat*, catalase; *Cck*, cholecystokinin; *Cckbr*, cholecystokinin B receptor; *Cnp*, 2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase; *Cntn2*, contactin 2; *Cspg4*, chondroitin sulfate proteoglycan 4; *Dcx*, doublecortin; *Dll4*, delta like canonical Notch ligand 4; *Dpysl3*, dihydropyrimidinase-like 3; *Efnb3*, ephrin B3; *Eomes*, eomesodermin (also known as TBR2: T-box brain protein 2); *Ephb1*, Eph receptor B1; *Ephb2*, Eph receptor B2; *Fgf13*, fibroblast growth factor 13; *Fgf2*, fibroblast growth factor 2; *Fos*, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; *Fzd9*, frizzled class receptor 9; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Gfap*, glial fibrillary acidic protein; *Gpx1*, glutathione peroxidase 1; *Gria1*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1; *Gria2*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2; *Gria3*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3; *Grin2a*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A; *Grin2b*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B; *Grin2d*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D; *Hes5*, hes family bHLH transcription factor 5; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Id2*, inhibitor of DNA binding 2; *Il18*, interleukin 18; *Il1b*, interleukin 1 beta; *Il6*, interleukin 6; *Kl*, Klotho; *Mbp*, myelin basic protein; *Mt1*, metallothionein 1; *Mt2a*, metallothionein 2A; *Nes*, nestin; *Notch1*, notch receptor 1; *Ntrk2*, neurotrophic receptor tyrosine kinase 2; *Numbl*, NUMB-like, endocytic adaptor protein; *Pcna*, proliferating cell nuclear antigen; *Pdgfa*, platelet derived growth factor subunit A; *Pdgfb*, platelet derived growth factor subunit B; *Pdgfra*, platelet derived growth factor receptor alpha; *Pdgfrb*, platelet derived growth factor receptor beta; *Plp1*, proteolipid protein 1; PND, postnatal day; *Ptgs2*, prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (also known as COX2: cyclooxygenase-2); *Pvalb*, parvalbumin; *Rbfox3*, RNA binding fox-1 homolog 3 (also known as NeuN: neuronal nuclei); *Reln*, reelin; *Robo3*, roundabout guidance receptor 3; *Ror2*, receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2; *Sema3c*, semaphorin 3C; *Shh*, sonic hedgehog signaling molecule; *Sod1*, superoxide dismutase 1; *Sod2*, superoxide dismutase 2; *Sox2*, SRY-box transcription factor 2; *Sst*, somatostatin; *Tfap2c*, transcription factor AP-2 gamma; *Thrsp*, thyroid hormone responsive; *Tnf*, tumor necrosis factor; *Tubb3*, tubulin, beta 3 class III; *Vegfa*, vascular endothelial growth factor A; *Vim*, vimentin; *Wnt7b*, Wnt family member 7B.

^a Mean ± SD.

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

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

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

Abbreviation: AP, ammonium perchlorate.

^a Mean ± S.D.

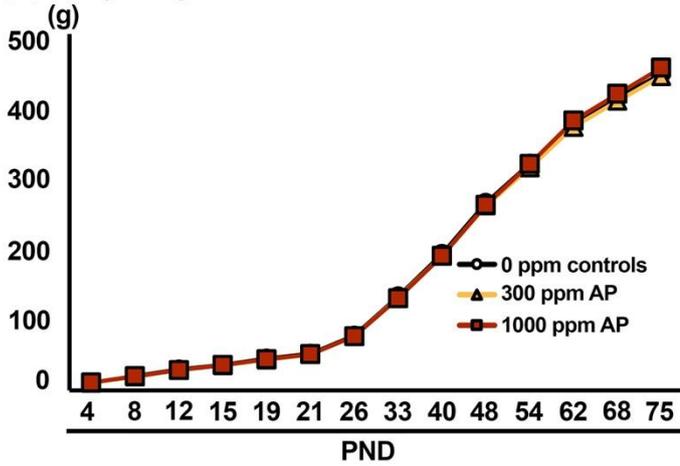
Supplementary Table 8**Body and brain weights of dams in the AP study**

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

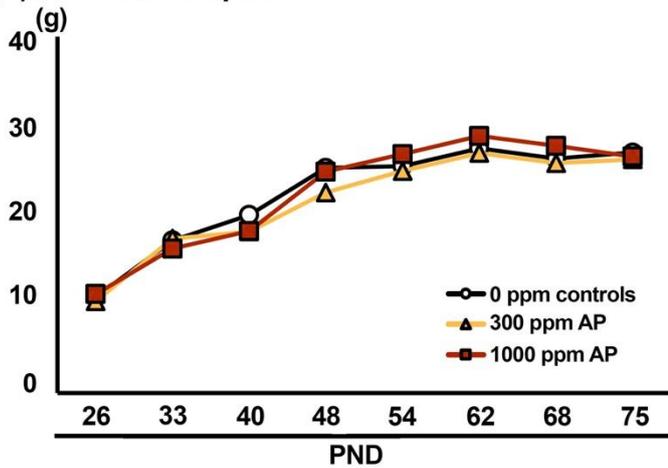
Abbreviation: AP, ammonium perchlorate.

^a Mean ± S.D.

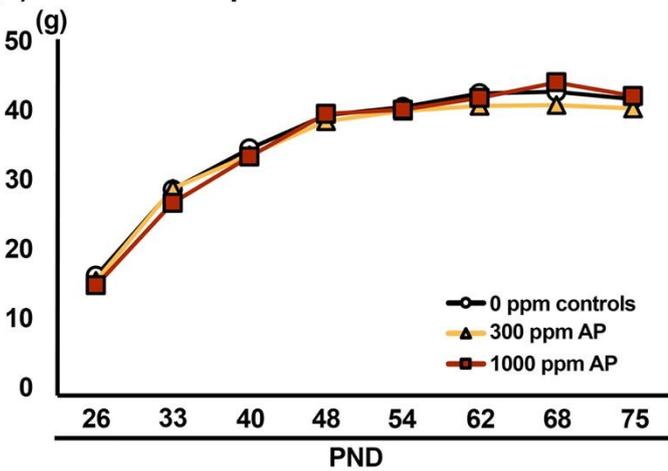
(A) Body weight



(B) Food consumption



(C) Water consumption



Supplementary Fig. 8

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

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

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

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

^aMean ± S.D.

Supplementary Table 10**Histopathological changes and proliferation activity in the thyroid tissues of female offspring in the AP study**

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

^aGrade of change: (++) , moderate; (+++), marked.

^bMean ± S.D.

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

** $P < 0.01$, compared with the 0-ppm controls by Fisher's exact test.

^{††} $P < 0.01$, compared with the 0-ppm controls by Mann-Whitney's *U*-test.

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

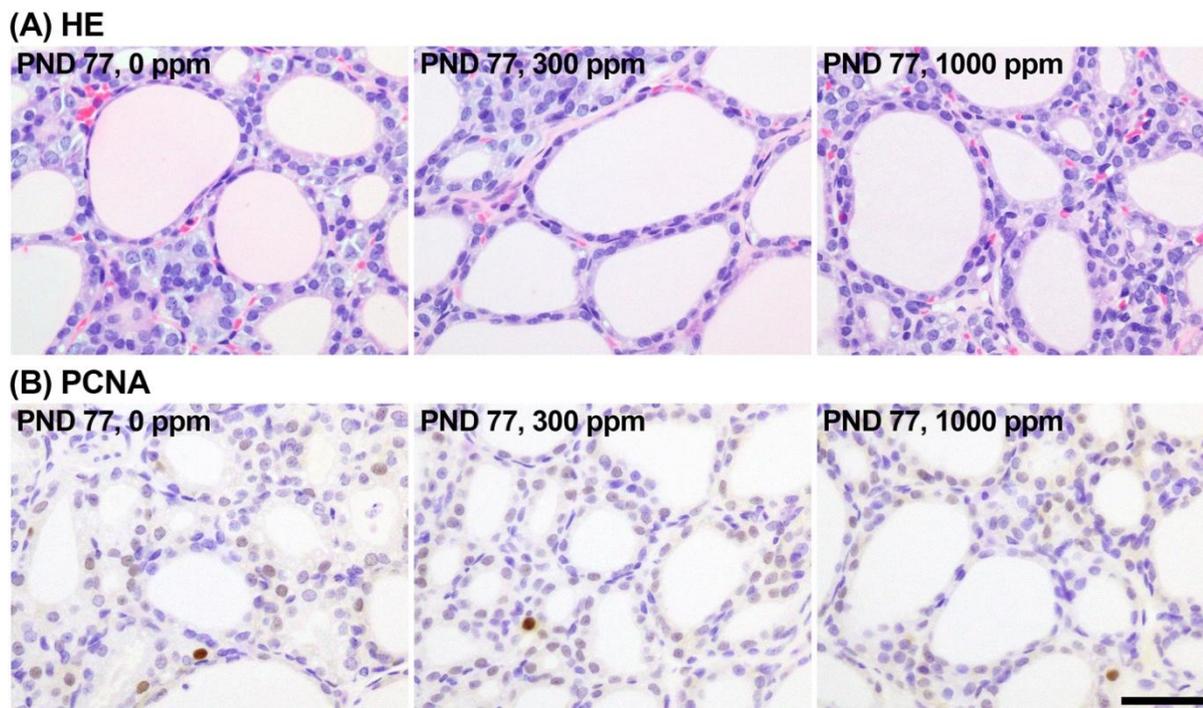
Supplementary Table 11**Serum thyroid hormone changes in female offspring on PND 21 in the AP study**

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

Abbreviations: AP, ammonium perchlorate; PND, postnatal day; T₃, triiodothyronine; T₄, thyroxine.

^aMean ± S.D.

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



Supplementary Fig. 9

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

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

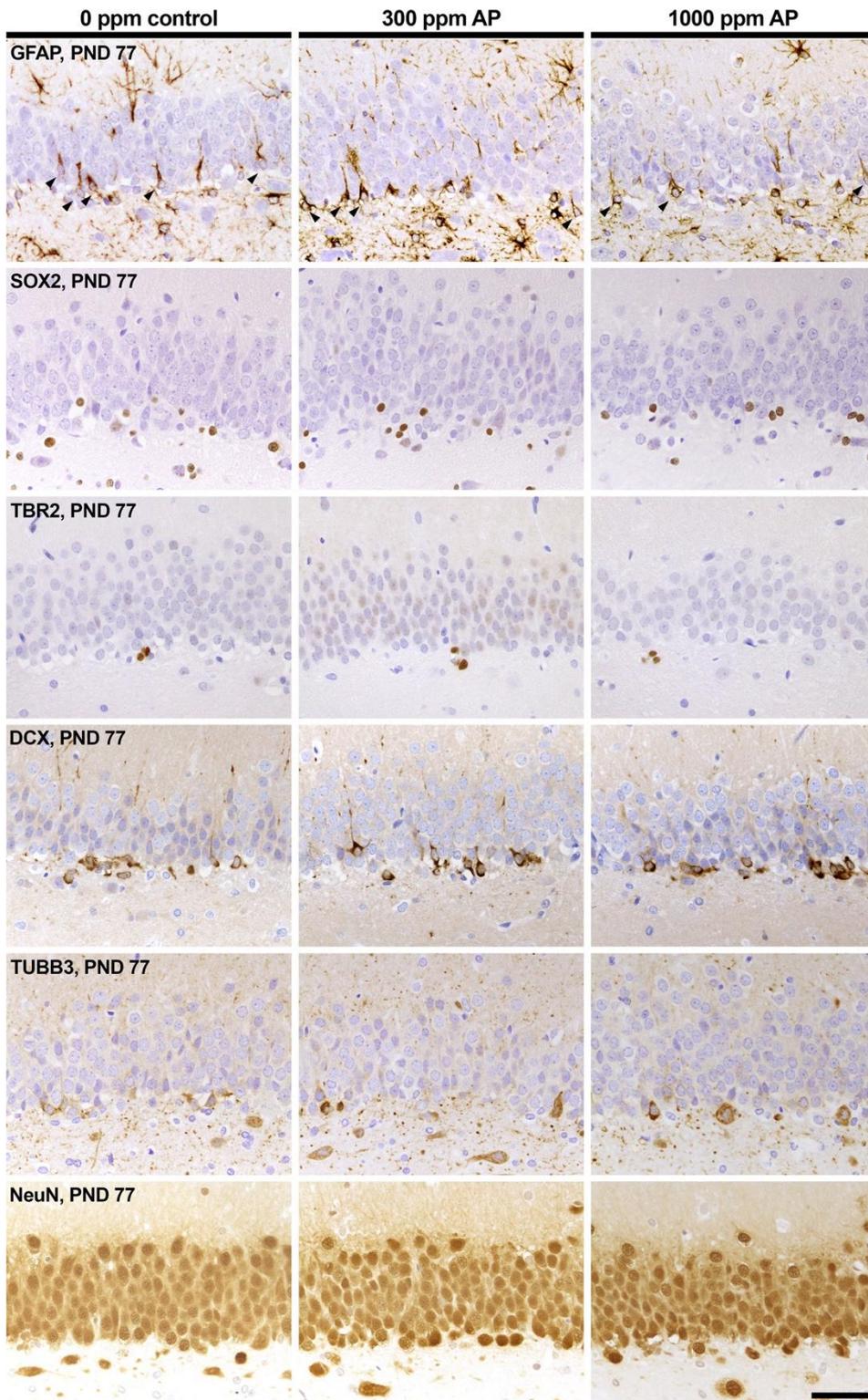
	AP in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	300	1000
Granule cell lineage subpopulations (No./mm SGZ length)			
GFAP	4.97±1.77 ^a	3.92±1.10	3.31±0.86*
SOX2	18.62±5.61	15.39±7.09	14.16±2.61
TBR2	9.17±4.46	8.52±3.65	8.43±5.12
DCX	174.71±29.13	163.58±39.96	158.83±34.10
TUBB3	122.07±27.85	124.95±19.51	122.46±19.34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

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

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

^a Mean ± SD.

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



Supplementary Fig. 10

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

Supplementary Table 13**Number of immunoreactive or TUNEL⁺ cells in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on PND 77 in the AP study**

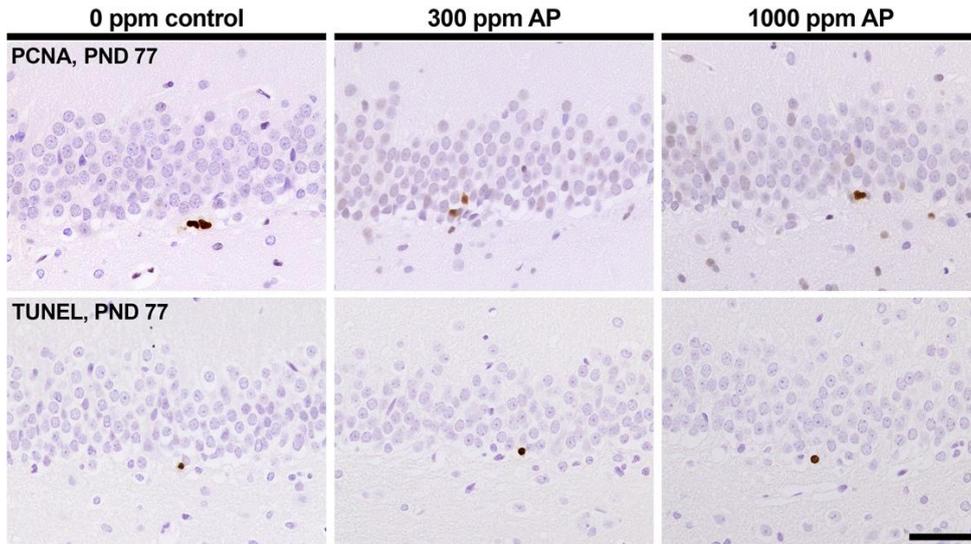
	No. of animals examined	AP in drinking water (ppm)		
		0 (Control)	300	1000
		10	10	10
Granule cell lineage subpopulations (No./mm SGZ length)				
GFAP		5.64±1.31 ^a	4.77 ± 1.37	3.44±1.30**
SOX2		14.18±2.09	12.75 ± 2.61	12.64±2.90
TBR2		3.59±1.66	2.96 ± 1.20	2.64±1.34
DCX		21.96±1.89	19.72 ± 3.13	20.96±5.41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

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

N = 10/group.

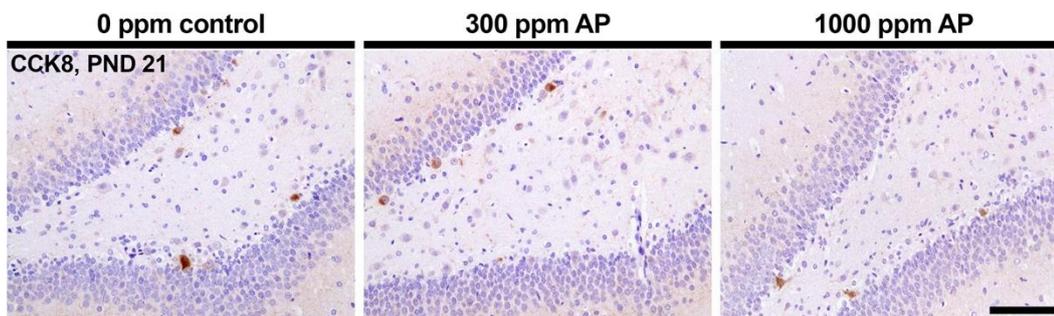
^a Mean ± SD.

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



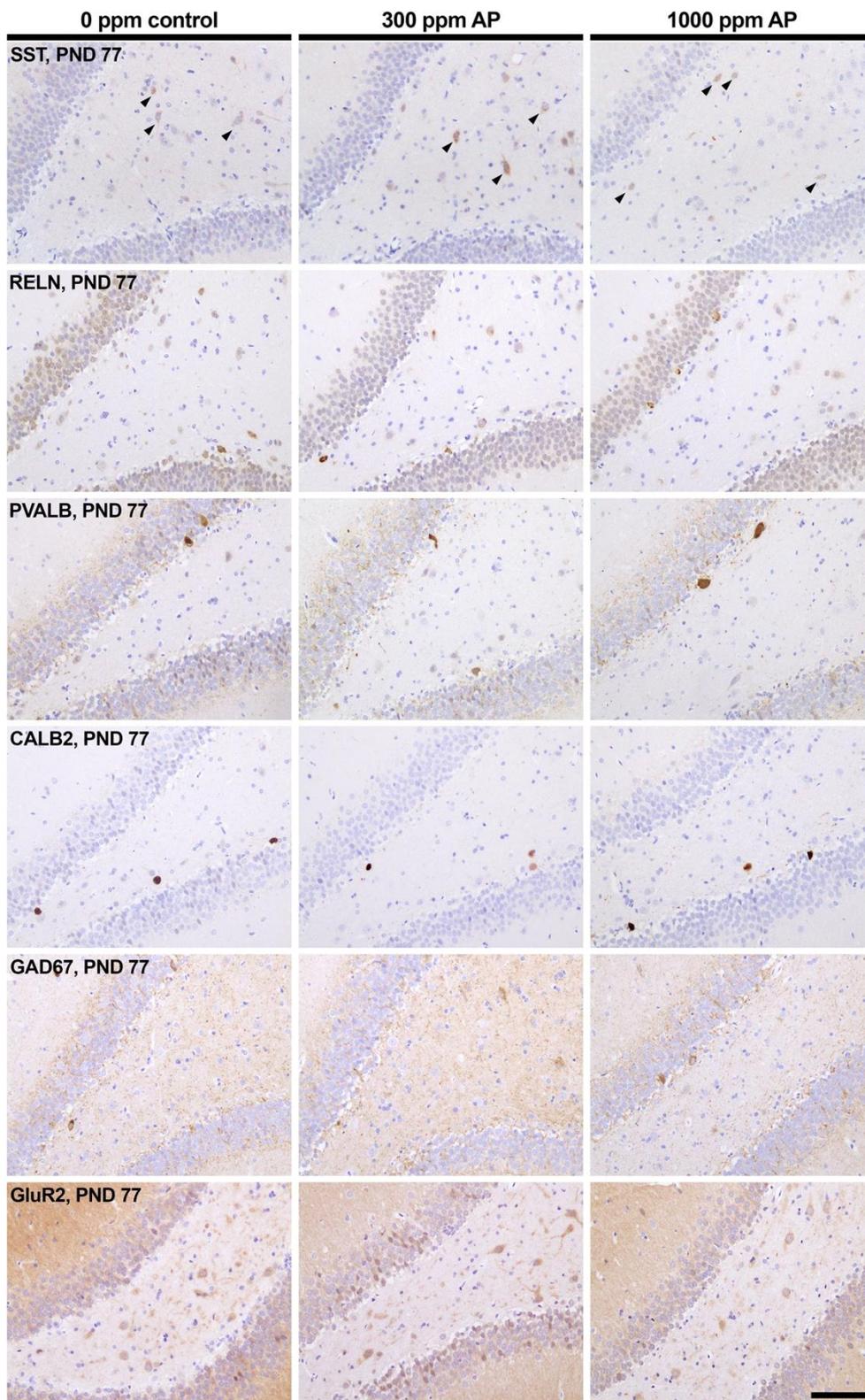
Supplementary Fig. 11

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



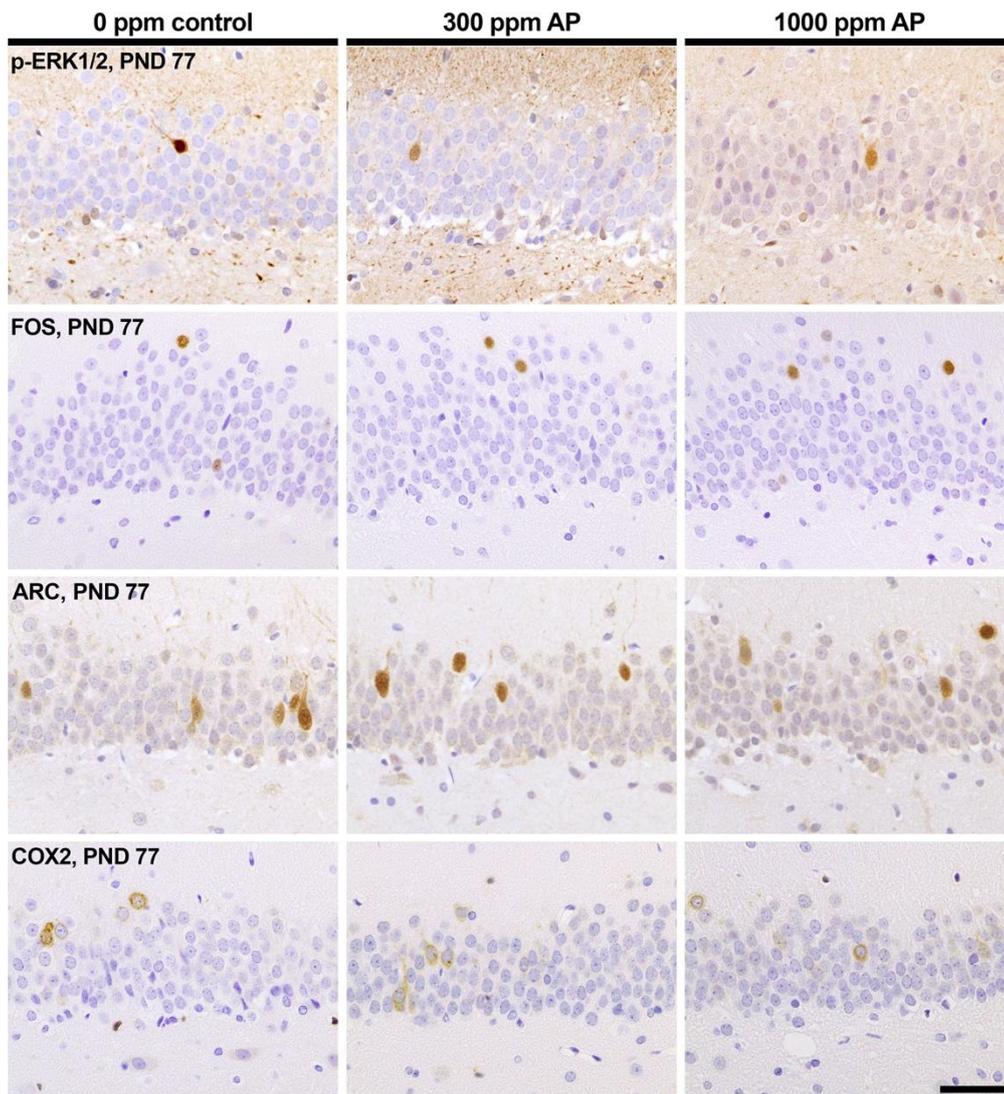
Supplementary Fig. 12

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



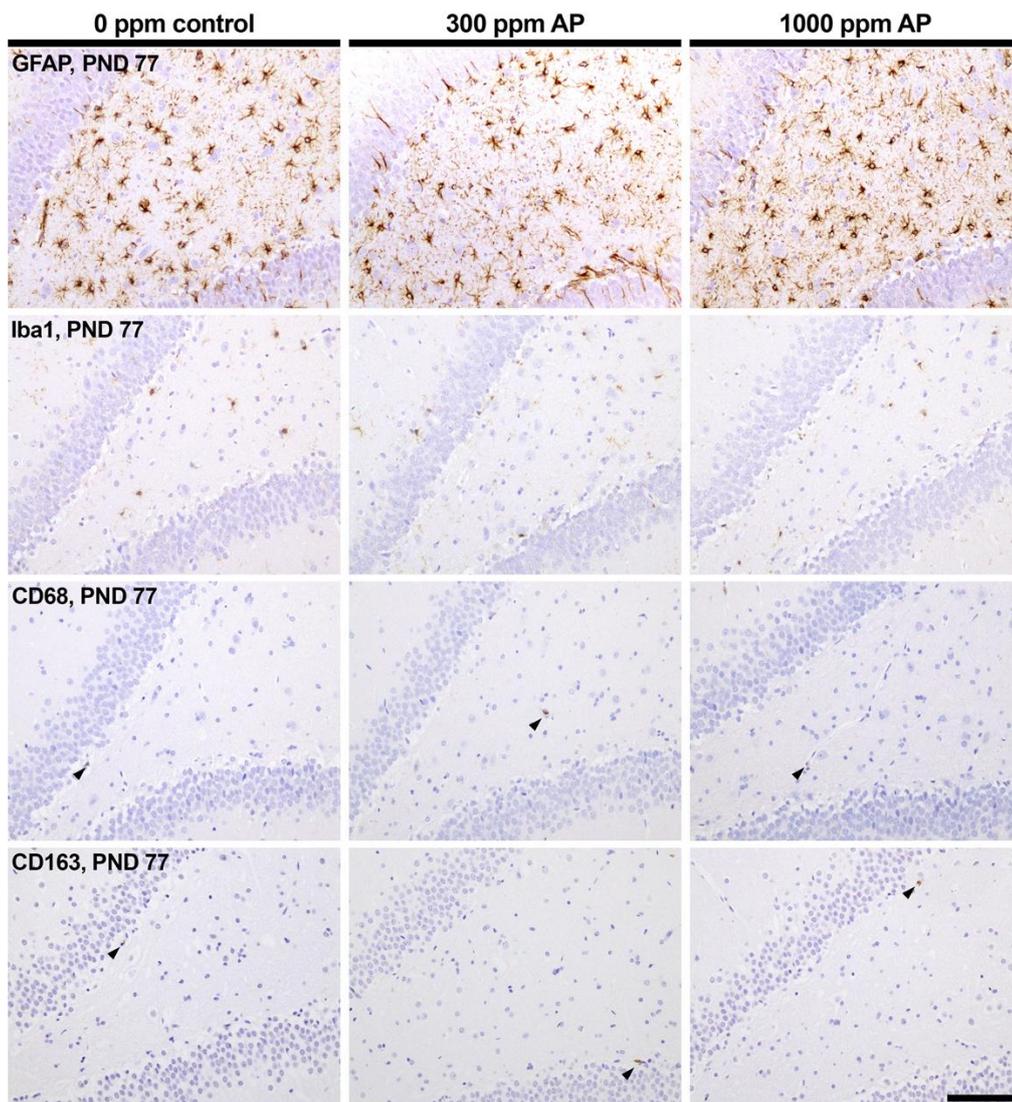
Supplementary Fig. 13

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



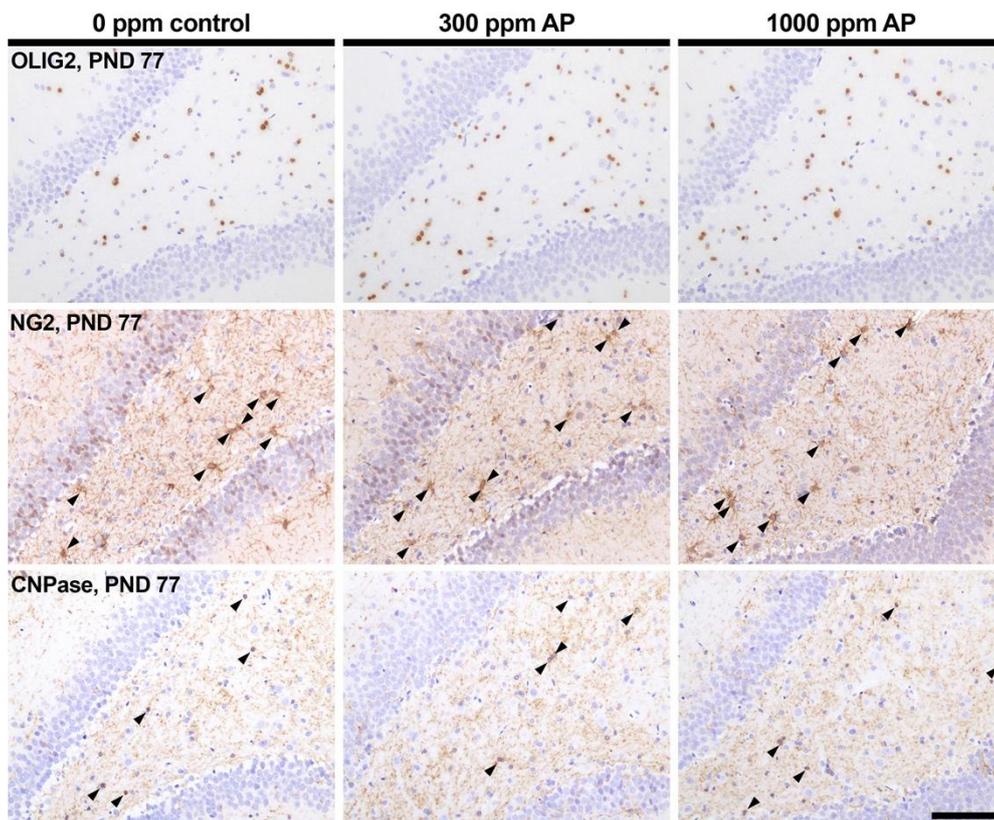
Supplementary Fig. 14

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



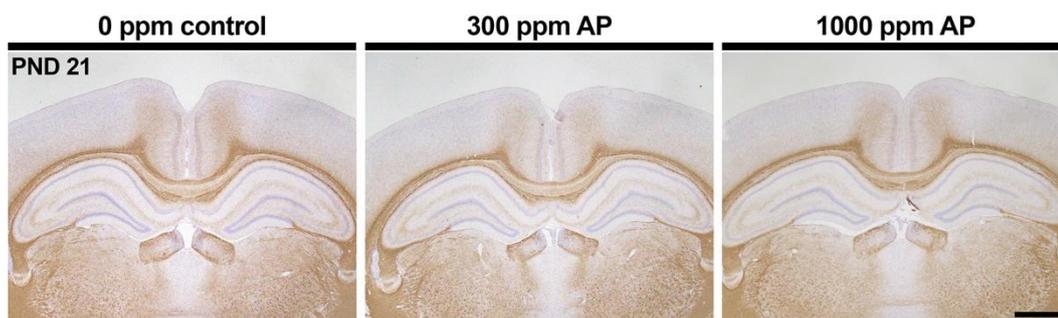
Supplementary Fig. 15

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



Supplementary Fig. 16

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



Supplementary Fig. 17

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

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

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

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

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

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

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

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

^aMean ± S.D.

<IMI 曝露実験>

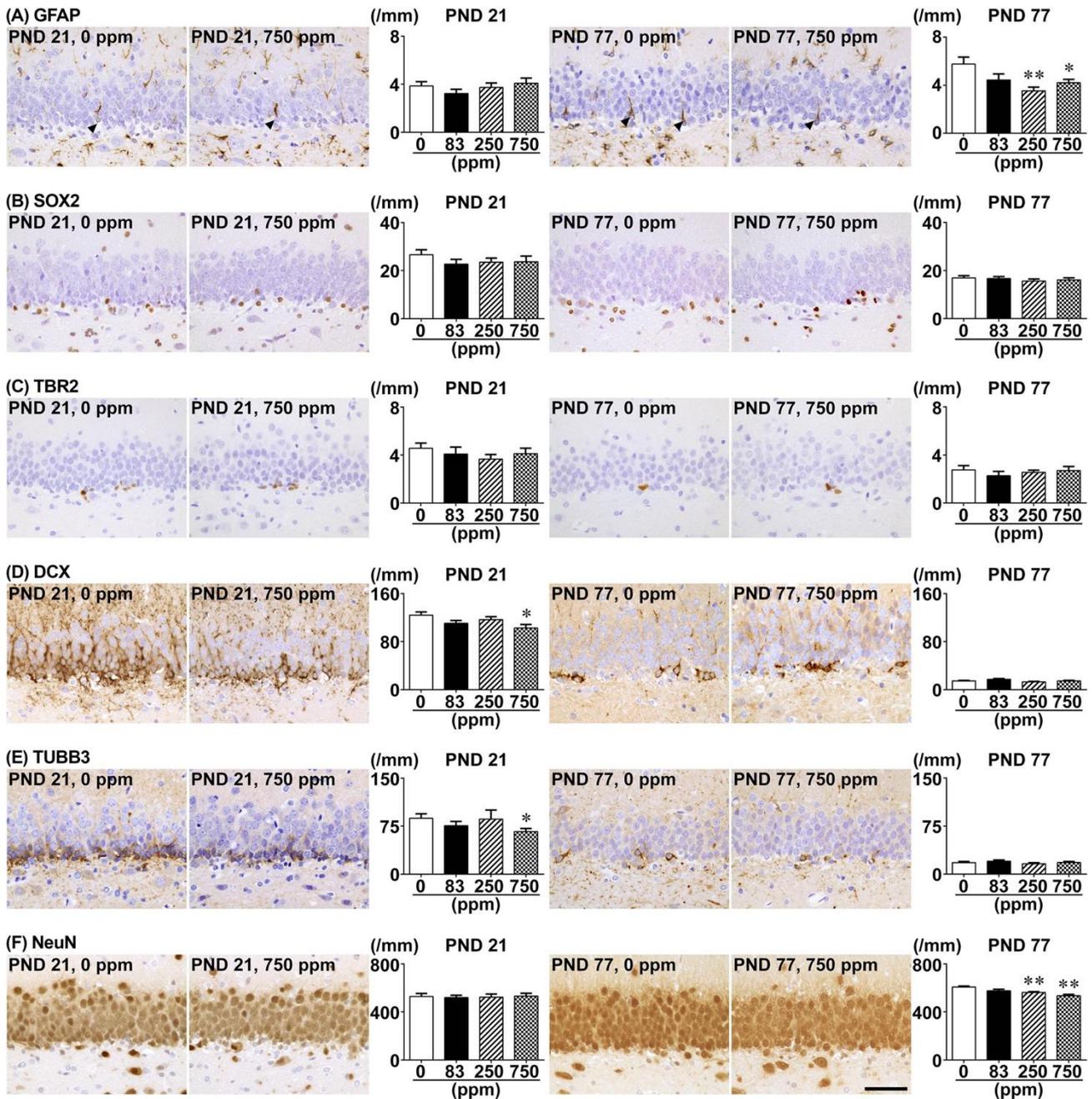


Fig. 16

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

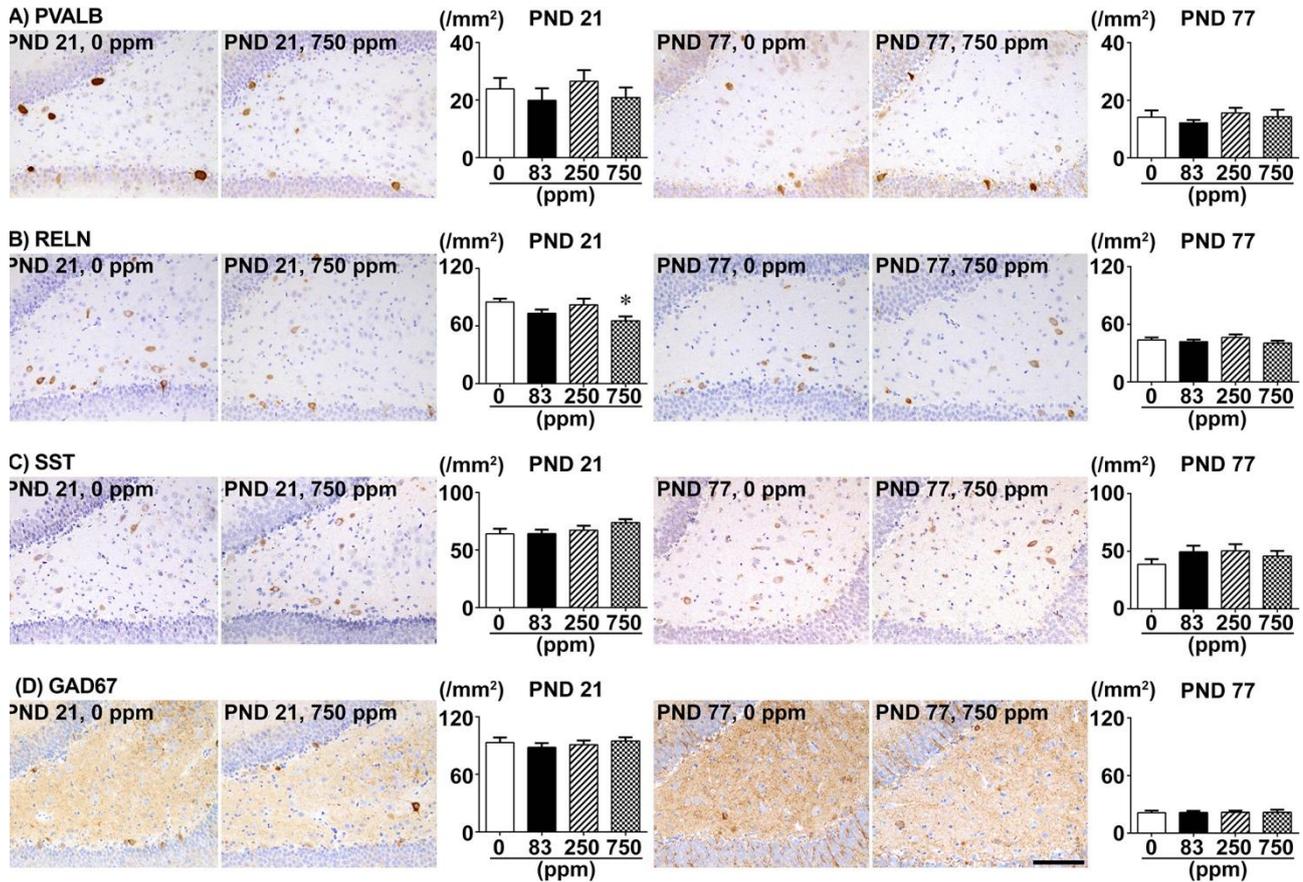


Fig. 17

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

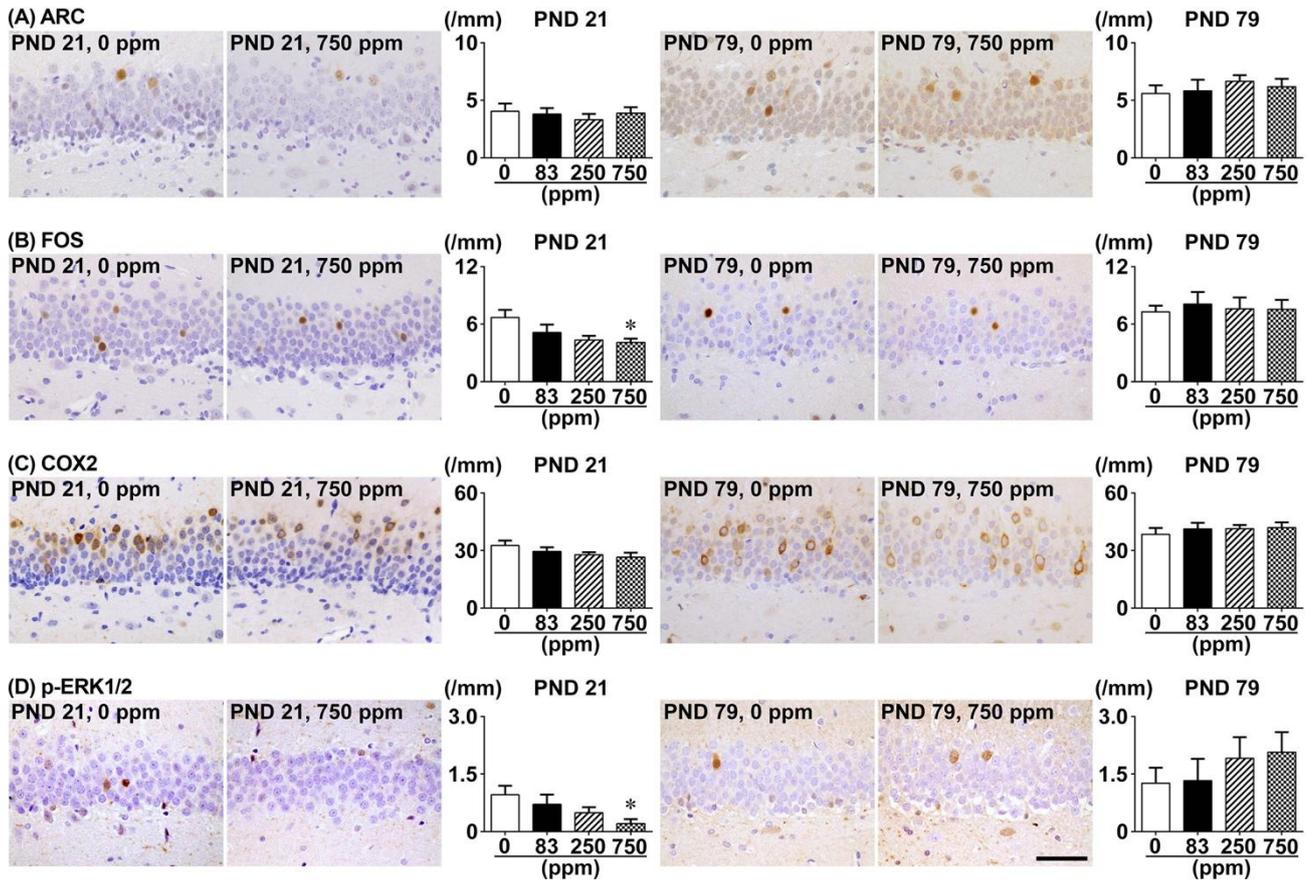


Fig. 18

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

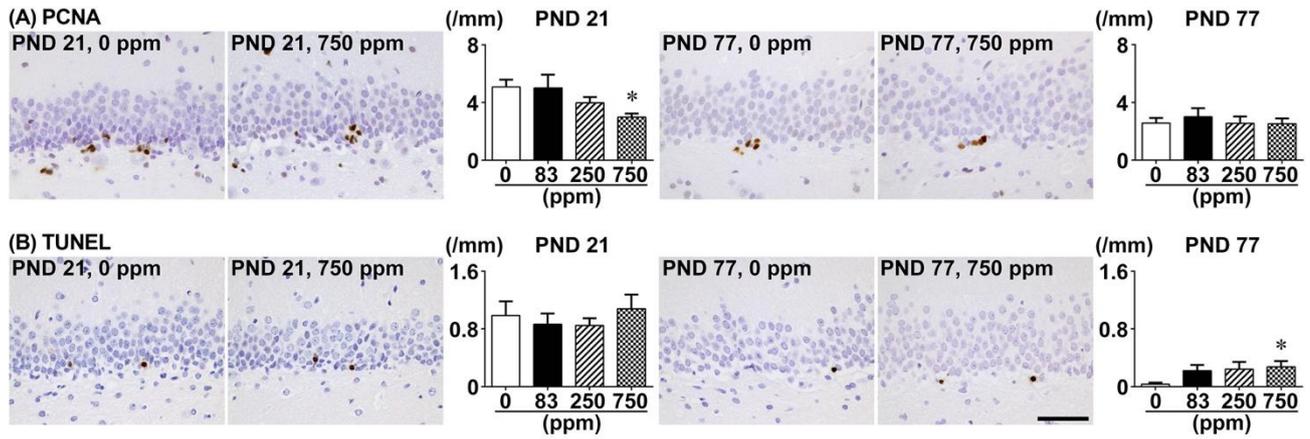


Fig. 19

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

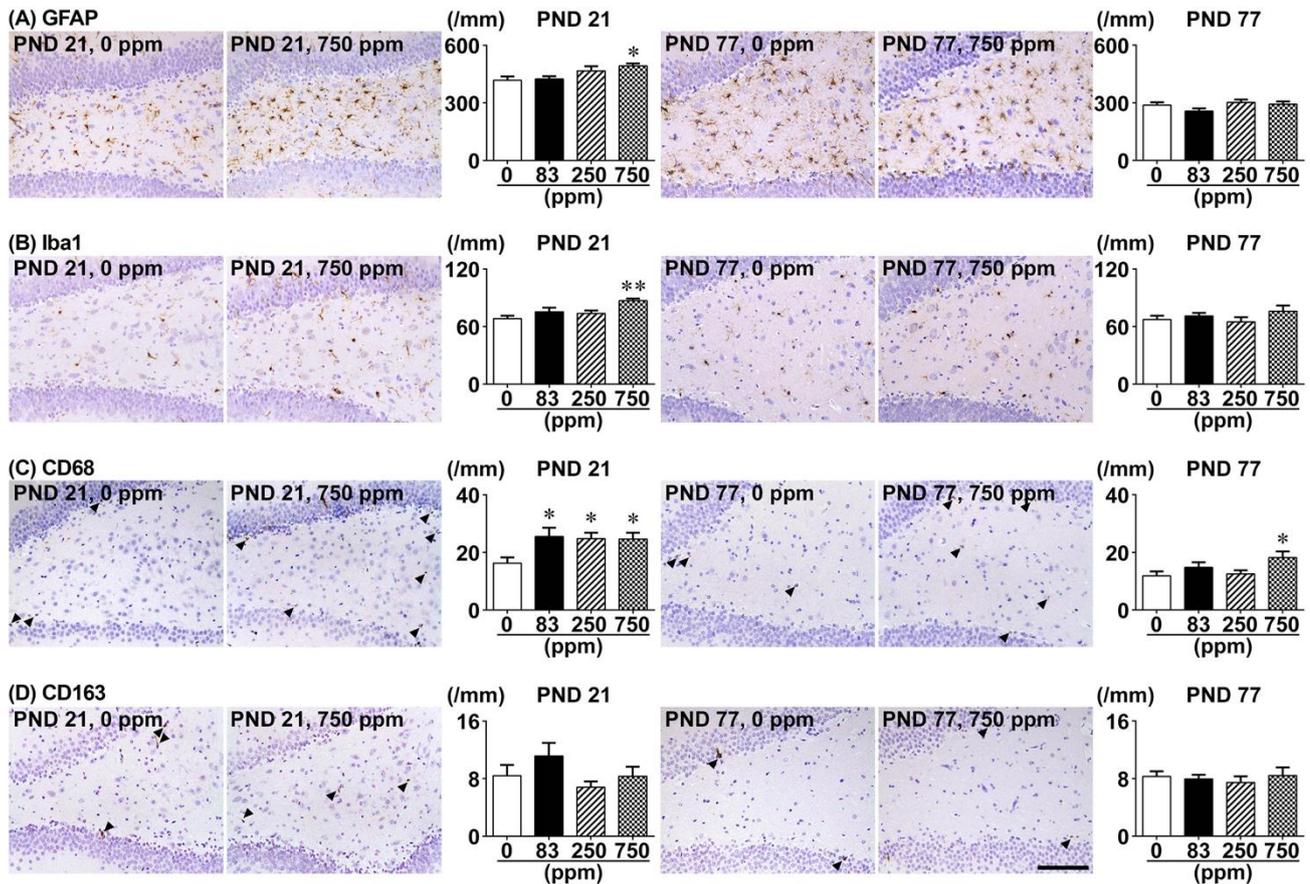


Fig. 20

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

Table 5**Transcript-level expression changes of neurogenesis-related genes in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on PND 21 in the IMI study**

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

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

Chrb2, cholinergic receptor nicotinic beta 2 subunit; *Dabl*, 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; *Grial*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1; *Gria2*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2; *Gria3*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3; *Grin2a*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A; *Grin2b*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B; *Grin2d*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D; *Hmox1*, heme oxygenase 1; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; IEG, immediate early gene; IMI, imidacloprid; *Il1a*, interleukin 1 alpha; *Il1b*, interleukin 1 beta; *Il4*, interleukin 4; *Il6*, interleukin 6; *Il10*, interleukin 10; *Keap1*, Kelch-like ECH-associated protein 1; *Mt1*, metallothionein 1; *Mt2a*, metallothionein 2A; *Nes*, nestin; *Nfkb1*, nuclear factor kappa B subunit 1; *Nos2*, nitric oxide synthase 2; *Nfe2l2*, NFE2 like bZIP transcription factor 2; *Pena*, 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.

^aMean \pm SEM.

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

Table 6
Transcript-level expression changes of neurogenesis-related genes in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on PND 77 in the IMI study

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

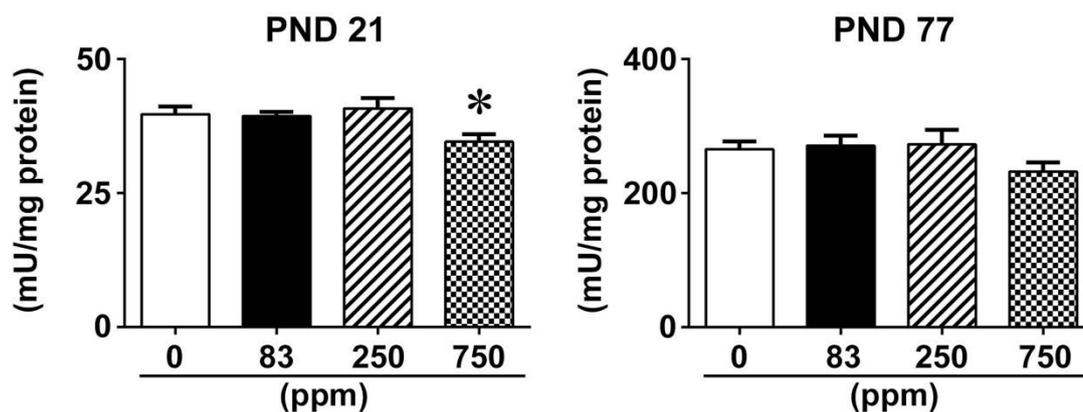
Abbreviations: *Aif1*, allograft inflammatory factor 1 (also known as Iba1: ionized calcium binding adapter protein 1); *Arc*, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; *Bax*, BCL2 associated X, apoptosis regulator; *Bcl2*, BCL2, apoptosis regulator; *Bcl2l1*, Bcl2-like 1; *Bdnf*, brain-derived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

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

^a Mean \pm SEM.

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

(A) AChE activity



(B) MDA concentration

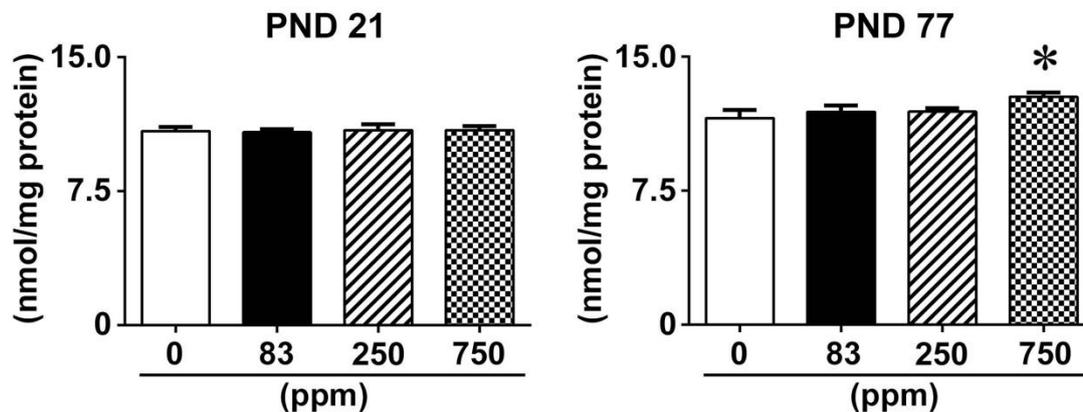


Fig. 21

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

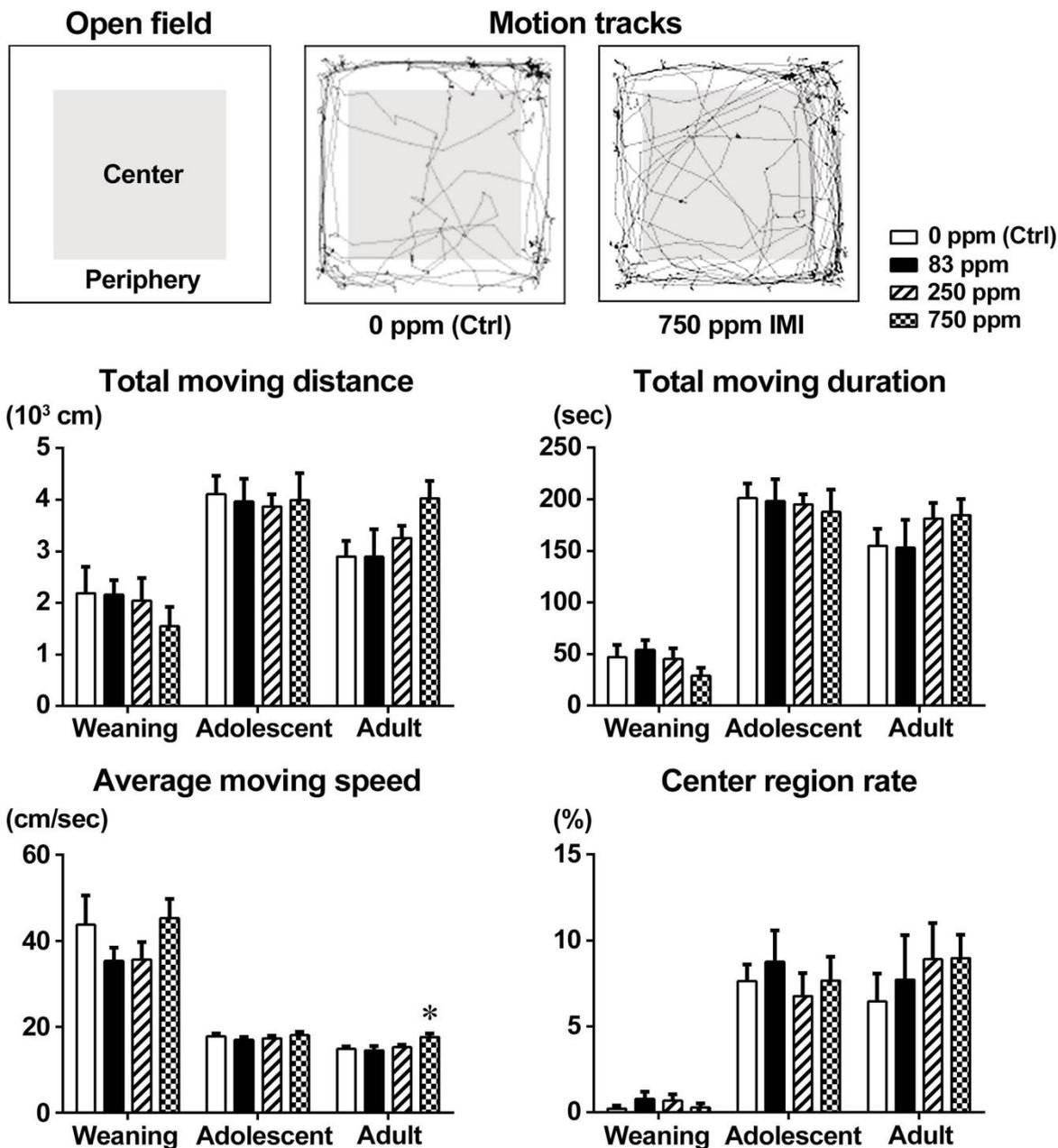
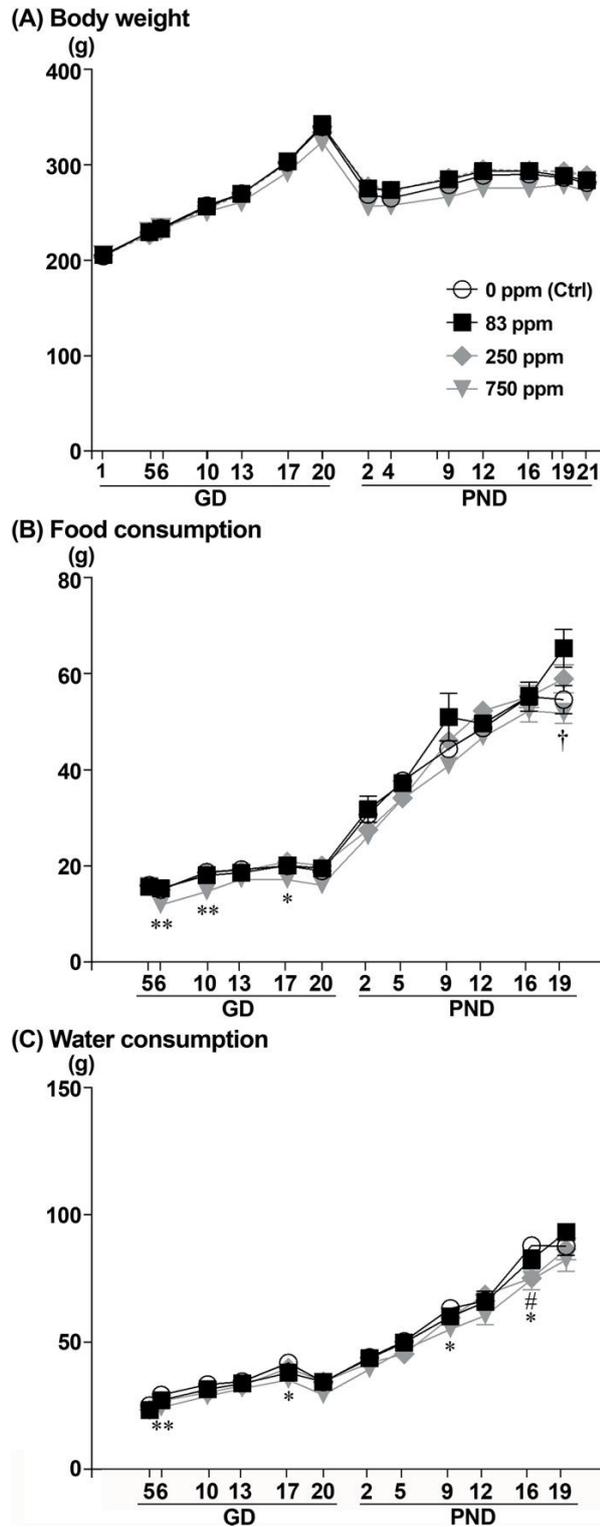


Fig. 22 Open field test in male offspring on postnatal day (PND) 18 (weaning stage), PND 38 (adolescent stage), and PND 62 (adult stage) after maternal exposure to imidacloprid (IMI) from gestational day 6 to PND 21. Upper panel shows representative examples of animal track in the 0-ppm controls and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



Bonferroni correction.

Supplementary Fig. 18

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

Supplementary Table 16

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

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

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

^a Mean ± SEM.

^b (%) decrease compared to 0-ppm controls.

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

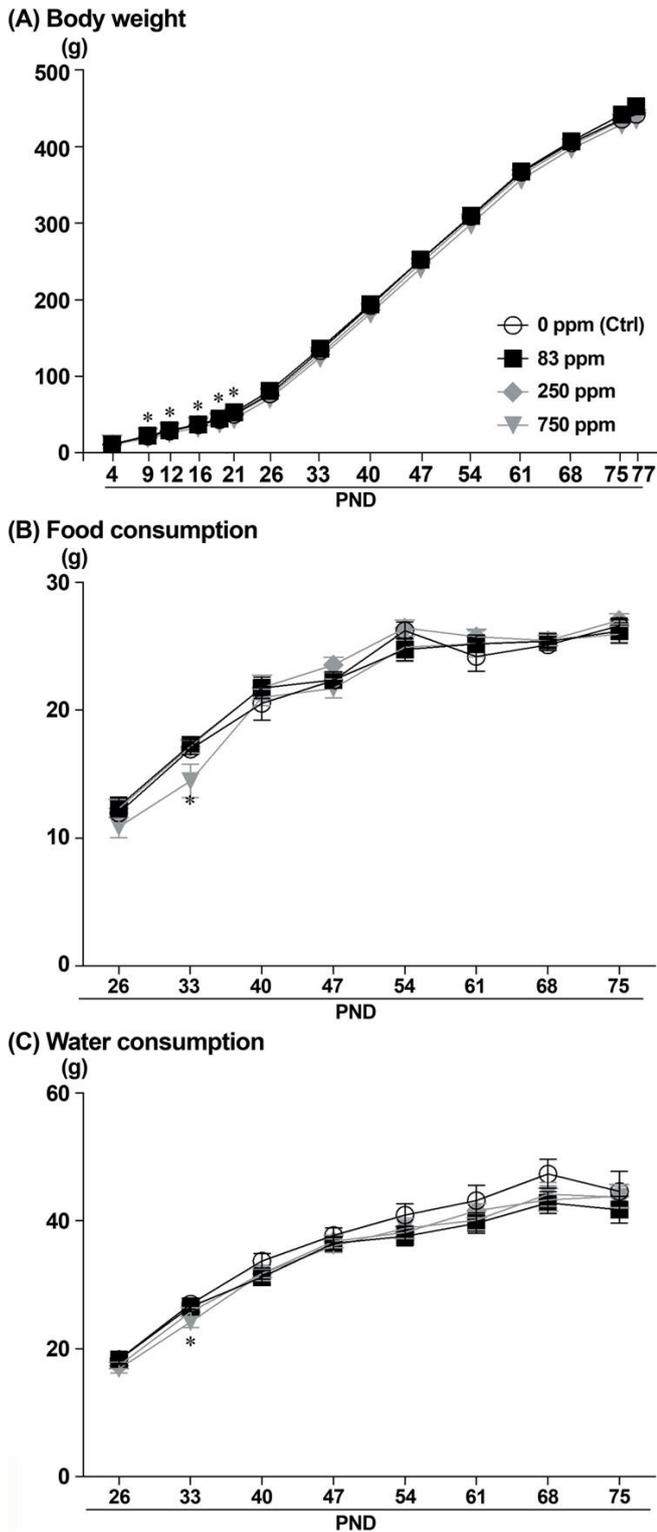
Supplementary Table 17**Maternal reproductive parameters in the IMI study**

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

Abbreviation: IMI, imidacloprid.

^a Mean ± SEM.

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



Supplementary Fig. 19

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

Supplementary Table 18

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

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

Abbreviation: IMI, imidacloprid; PND, postnatal day.

^a Mean ± SEM.

^b (%) decrease compared to 0-ppm controls.

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

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

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

Abbreviation: IMI, imidacloprid; PND, postnatal day.

^a Mean ± SEM.

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

Supplementary Table 20**Number of immunoreactive or TUNEL⁺ cells in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on PND 21 in the IMI study**

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

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

^a Mean ± SEM.

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

Supplementary Table 21**Number of immunoreactive or TUNEL⁺ cells in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on PND 77 or PND 79 in the IMI study^a**

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

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

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

^b Mean ± SEM.

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

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

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

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

^a Mean ± SEM.

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

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

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

Abbreviations: IMI, imidacloprid; PND, postnatal day.

^a Mean ± SEM.

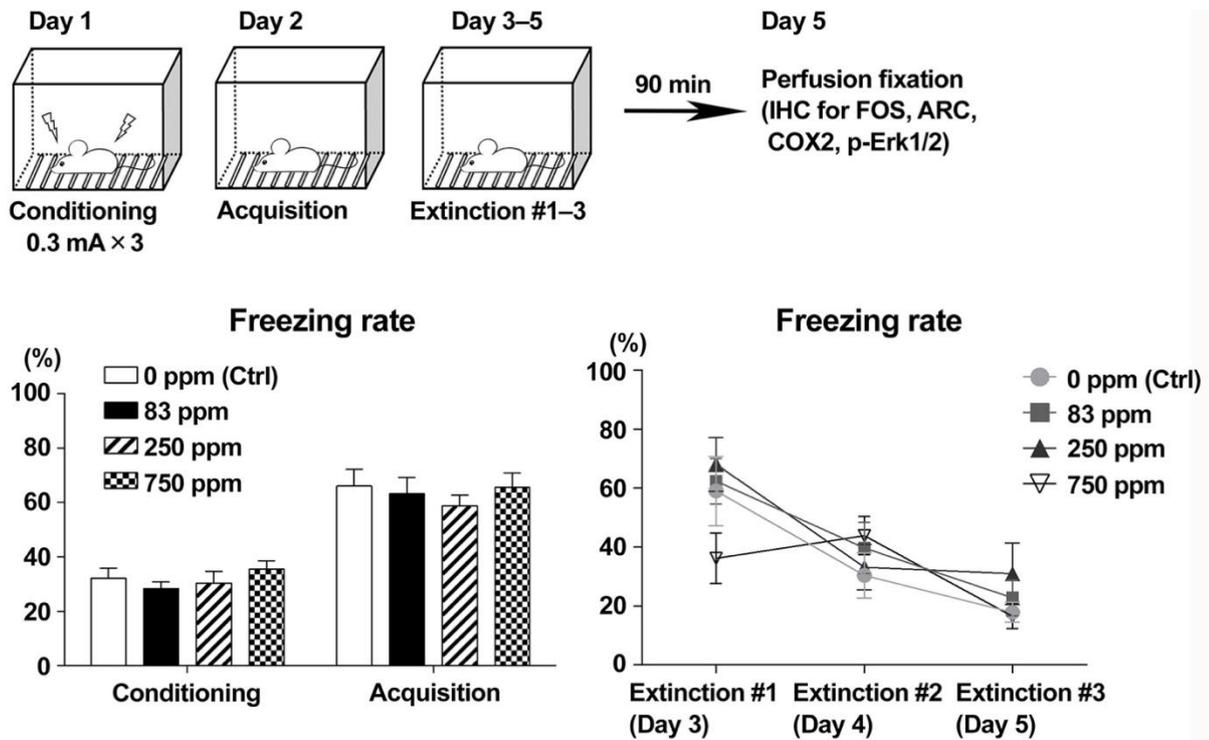
**P* < 0.05, compared with the untreated controls by Dunnett's test or Aspin–Welch's *t*-test with Bonferroni correction.

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

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

Abbreviations: IMI, imidacloprid; PND, postnatal day.

^aMean ± SEM.



Supplementary Fig. 20

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

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

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

Abbreviations: IMI, imidacloprid; PND, postnatal day.

^aMean ± SEM.