

ラットの lipopolysaccharide 誘発  
脳発達障害に対する  $\alpha$ -glycosyl  
isoquercitrin の修飾効果に関する研究

2022 年

東京農工大学大学院農学府共同獣医学専攻

岡野 拓

## 目次

序論	3
第1章 新生児期 lipopolysaccharides 曝露による免疫活性化が及ぼす海馬神経新生及び神経行動への影響と $\alpha$ -glycosyl isoquercitrin 投与による保護作用	
緒言	7
材料及び方法	11
結果	25
考察	34
小括	44
第2章 母体 lipopolysaccharides 曝露による胎生期免疫活性化が及ぼす海馬神経新生及び神経行動への影響と $\alpha$ -glycosyl isoquercitrin 投与による保護作用	
緒言	47
材料及び方法	49
結果	62
考察	71
小括	78
第3章 胎生期ないしは新生児期免疫活性化がもたらす海馬歯状回のオリゴデンド	

ロサイト分化に対する影響の違いと  $\alpha$ -glycosyl isoquercitrin 投与による保護

作用

緒言	80
材料及び方法	83
結果	91
考察	97
小括	102
総合考察	103
結論	108
謝辞	111
引用文献	112
図表	130

## 序論

脳は胎生期からいくつかの重要な段階を経て発達する。特にニューロンの発達は、幹細胞の自己複製に始まり、神経前駆細胞の増殖、軸索の伸長やシナプス形成などの分化・成熟過程を経ることから、各段階を標的とする様々な外的刺激に対して影響を受ける可能性がある。外的刺激の一つに感染症があり、周産期の感染症は母体、胎児ないしは新生児の脳内の酸化ストレスの増加を伴う炎症反応を誘導する [Hagberg et al., 2012]。これは自閉症スペクトラム障害 (ASD) や統合失調症などの発達障害の重要な危険因子であり、抗酸化ストレス・抗炎症を目的とした抗酸化剤の摂取は、ASD 患者に症状の改善をもたらすという報告がなされている [Singh et al., 2014]。

海馬は認知記憶形成や学習に関わる主要な器官であり、発達障害の多くは海馬の機能障害が深く関わるコミュニケーション障害や学習・認知記憶障害を特徴とする。海馬歯状回では、生後も持続的に神経細胞を生み出す成体神経新生が営まれており、顆粒細胞層下帯における幹細胞の自己複製及び分化に始まり、神経前駆細胞の増殖、移動、分化成熟の過程を経て成熟ニューロンが新たに生み出される [Hodge et al., 2008; Sibbe and Kulik, 2017]。海馬歯状回の門部には各種の介在ニューロンが存在し、顆粒細胞の機能調節や、移動及び分化を制御しており、神経新生への影響に応じて分布変化を示したり、その分布変化自体が神経新生に影響を及ぼすことが知られている [Freund and Buzsáki, 1996; Masiulis et al., 2011]。また、同部にはオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) が存在し、OPC は分化・成熟を経て成熟オリゴデンドロサイ



トとなり、介在ニューロンの髄鞘形成を担っている。

胎生期と新生児期のラットにおいて、炎症誘導物質である lipopolysaccharides (LPS) 曝露による酸化ストレスを伴う免疫活性化は ASD 様行動を誘導することから、ASD モデルとして広く使用されている [Pang et al., 2016; Wu et al., 2021; Yan et al., 2022; Yeh et al., 2014]。LPS 曝露モデルは神経新生障害やオリゴデンドロサイト新生障害を起こすが [Wischhof et al, 2015; Xie et al, 2016], 免疫活性化の時期によりこれらの細胞系譜のどの分化段階が標的となるのか、更には、神経新生障害性とオリゴデンドロサイト新生障害性との間に関連があるのかどうかについては不明な点が多い。そこで、本研究では海馬歯状回に着目し、LPS 曝露による胎生期と新生児期の異なる時期の免疫活性化により神経新生の障害性および神経行動への影響に違いが生じるのかどうか、並びにオリゴデンドロサイトの分化障害についても標的性の違いを生じるのかどうか検討し、神経新生障害性や神経行動異常とオリゴデンドロサイト新生障害性との間の関連性について考察した。また、LPS による各障害のメカニズムに対してどのように炎症や酸化ストレス反応が関与するのかを明らかにする目的で、抗炎症作用が知られているルチン由来の抗酸化物質で、経口摂取によりバイオアベイラビリティを高めるために開発されたケルセチン製剤である  $\alpha$ -glycosyl isoquercitrin (AGIQ) を LPS 投与前から継続的に投与する実験を加えて、その修飾効果を検討した。

第 1 章では、新生児期免疫活性化実験として LPS を新生ラットに腹腔内投与し、LPS 投与前から AGIQ を母動物と児動物に継続混餌投与した。本研究では LPS による新生児期免疫活性化がその後の海馬神経新生に与える影響と、それに対する AGIQ の修飾効果を検討するため、

乳児期, 離乳時, 成体期に免疫組織化学的解析及び遺伝子発現解析を実施し, 乳児期と離乳時に酸化ストレスマーカーの定量解析を実施した。さらに ASD 様行動指標についての新生児期免疫活性化の影響とそれに対する AGIQ の修飾効果を検討するため, 社会性, 記憶形成, 学習に関わる神経行動テストバッテリーを乳児期, 春機発動期, 成体期に実施した。

第 2 章では, 胎生期免疫活性化実験として LPS を妊娠ラットに腹腔内投与し, LPS 投与前から AGIQ を母動物に, 続けて児動物に継続混餌投与した。本研究では LPS による胎生期免疫活性化が生後の海馬神経新生と神経行動に与える影響と, それに対する AGIQ の修飾効果を検討するため, 第 1 章と同様の解析を実施した。

第 3 章では, 第 1 章と第 2 章の実験で得られた海馬組織サンプルを用いて, LPS による新生児期と胎生期での免疫活性化が海馬歯状回門におけるオリゴデンドロサイト分化に対して示す影響の差異とそれに対する AGIQ の修飾効果を検討するため, 乳児期, 離乳時, 成体期に免疫組織化学的解析及び遺伝子発現解析を実施した。

## 第 1 章

新生児期 lipopolysaccharides 曝露による免疫活性化が及ぼす海馬神経新生及び神経  
行動への影響と  $\alpha$ -glycosyl isoquercitrin 投与による保護作用

## 緒言

周産期において未熟な脳はいくつかの重要な段階を経て発達する。妊娠期ないし新生児期に中枢神経系において免疫系が活性化すると正常な脳の発達に影響を及ぼし、神経学的及び精神的な健康に長期的な影響を及ぼす可能性が指摘されている [Hagberg et al., 2012]。自閉症スペクトラム障害 (ASD) は社会性及びコミュニケーション能力の障害、反復行動、または興味分野の制限を特徴とする症状を持つ神経発達障害である [Hyman et al., 2020]。ASD にはアスペルガー症候群や広汎性発達障害などいくつかのタイプがあり、複数の原因が存在すると考えられている [Sharma et al., 2018]。ASD の病因に関して、脳の発達過程における神経系の免疫反応の変化や炎症が寄与している可能性が指摘されている [Bjorklund et al., 2016]。

Lipopolysaccharides (LPS) はグラム陰性菌の細胞壁を構成する主要成分で、エンドトキシン的一种であり、Toll 様受容体 (TLR)-4 を介して自然免疫系を強力に活性化する。脳内では TLR-4 は主にミクログリア、アストロサイト、成熟神経細胞、神経前駆細胞に発現している。特に海馬には TLR-4 やサイトカイン受容体を発現する細胞が多く存在するため、海馬は神経炎症の影響を受けやすい [Domínguez-Rivas et al., 2022]。また、酸化ストレスと神経炎症は密接に関連しており、炎症反応を呈した神経組織内では酸化ストレスが増加し、神経細胞死を引き起こす可能性がある [Corona, 2020]。実験的な LPS 曝露モデルは神経炎症に関連した神経変性疾患研究の重要なモデルとして用いられており [Batista et al., 2019]、新生ラットへの LPS 曝露は社会行動や認知機能の異常をきたすことから ASD モデルとしても用いられている

[Pang et al., 2016]。

成体神経新生により新たに産生されたニューロンは既存の神経回路に統合し、神経回路を修正することができるため、環境の変化に対して適応的に機能する [Rusznák et al., 2016]。成体神経新生がみられる主要な脳部位として海馬歯状回の顆粒細胞層下帯 (SGZ) が知られている。SGZ では type-1 の神経幹細胞が自己複製を行い, type-2a, type-2b, type-3 増殖性神経前駆細胞が増殖し, type-3 神経前駆細胞は最終有糸分裂を終えて未熟顆粒細胞 (未熟ニューロン) へと分化・成熟し, その結果生じた成熟顆粒細胞 (成熟ニューロン) は既存の顆粒細胞層 (GCL) の神経細胞集団に統合される [Hodge et al., 2008; Sibbe and Kulik, 2017]。海馬歯状回の神経新生部位は  $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) 作動性, コリン作動性, ドーパミン作動性, グルタミン酸作動性の入力など様々な投射を受けている [Freund and Buzsáki, 1996; Masiulis et al., 2011]。歯状回門部の GABA 性介在ニューロンは顆粒細胞の分化と適切な顆粒細胞集団の維持を制御することが報告されている [Freund and Buzsáki, 1996; Masiulis et al., 2011; Sibbe and Kulik, 2017]。SGZ へのコリン作動性及びグルタミン酸作動性神経の入力は顆粒細胞系譜の適切な増殖と分化を維持するために重要である [Cameron et al., 1995; Freund and Buzsáki, 1996]。海馬での成体神経新生は LPS 誘発性神経炎症によって抑制され [Domínguez-Rivas et al., 2022], げっ歯類 ASD モデルを用いた先行研究において, 神経新生の障害, GABA 性 GABA 性回路の異常発達, シナプス可塑性の抑制など多くのメカニズムが ASD の病態に関与することが示唆されている [Fueta et al., 2018; Li et al., 2019; Rhee et al., 2019]。

Alpha-glycosyl isoquercitrin (AGIQ) は酵素処理イソクエルシトリンとしても知られ, ルチン

の酵素によるグルコシル化によって生成されるフラボノイド配糖体である。また、ルチンは柑橘類, 小豆, ソバなどの植物中に含まれる [Akiyama et al., 2000]。AGIQ はケルセチンよりも優れた水溶性と生物学的利用能を有し [Makino et al., 2013], 実験的に抗酸化作用 [Kangawa et al., 2017], 抗炎症作用 [Kangawa et al., 2017], 抗高血圧作用 [Gasparotto et al., 2011], 抗アレルギー作用 [Makino et al., 2013], 抗腫瘍作用 [Fujii et al., 2013] などの化学予防作用を発揮する。また, 体内に吸収された AGIQ は血液脳関門を通過して脳に分布することが報告されており [Valentová et al., 2014], 脳内で抗酸化作用を発揮することが期待される。近年, 所属研究室では, 正常ラットに胎生期から AGIQ を継続的に投与することで, 文脈的恐怖条件付け試験における恐怖記憶の消去学習が促進されることを報告した [Masubuchi et al., 2020; Okada et al., 2019]。さらに, 胎生期から生後離乳時にかけての甲状腺機能低下によって生じる神経新生障害が, 離乳後からの AGIQ の継続的な投与により改善し, それには抗酸化酵素の発現の回復と共に, GABA 性介在ニューロンの細胞群が関与する神経新生制御系の回復が関わっている可能性を報告している [Tanaka et al., 2019]。

したがって本章では, ラットの新生児期での LPS 投与による海馬神経新生障害の詳細な標的性と ASD 様行動への影響を明らかにするとともに, 神経炎症と脳内酸化ストレスがどのような機序で神経新生障害や神経行動異常に関与しているのかを明らかにすることを目的とした。そのために, AGIQ を用いた化学予防効果について検討した。LPS は生後 3 日目の児動物に投与した。AGIQ は妊娠後期及び授乳期から離乳時まで母動物に継続投与し, 離乳後の児動物には成体期まで継続投与した。児動物については, コミュニケーション能力, 記憶・学習能

力を指標とした行動実験と共に, 神経炎症, 酸化ストレス, 海馬神経新生の各エンドポイントに関する各指標を用いた免疫組織化学的解析並びに遺伝子発現解析, 酸化ストレスマーカーの定量解析を実施し, 新生児期 LPS 投与後の影響の時間依存性と AGIQ による化学予防効果を検討した。

## 材料及び方法

### 被験物質及び動物

フェノール抽出により精製した大腸菌 O55:B5 由来 LPS (EC No.297-473-0; 純度:97%)は, Sigma-Aldrich Co. LLC. (St. Louis, MO, USA) から購入した。AGIQ (純度:> 97%) は, 三栄源エフ・エフ・アイ株式会社 (大阪, 日本) から提供された。交尾確認済み雌 Slc:SD ラットを妊娠 1 日目で日本エスエルシー株式会社 (浜松, 日本) より購入した。妊娠ラットを入荷時から分娩後 21 日目まで温度  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 相対湿度  $55 \pm 15\%$ , 照明条件 12 時間の明暗サイクルで, ポリカーボネート製ケージに紙製床敷を入れ個別飼育した。AGIQ 投与開始までは妊娠ラットに粉末基礎飼料 (CRF-1; オリエンタル酵母工業株式会社, 東京, 日本) を自由に摂取させ, 実験を通じて水道水を自由に摂取させた。生後 21 日目の離乳以降, 児動物は 1 ケージあたり 3~4 匹で飼育し, AGIQ 添加または無添加の粉末基礎飼料と水道水を自由に摂取させた。

### 実験デザイン

#### 主実験

主実験では春機発動期及び成体期におけるオープンフィールド試験, 社会的相互作用試験, 文脈的恐怖条件付け試験を行い, 加えて乳児期, 離乳時及び成体期における脳の酸化ストレス, 神経炎症, 海馬の神経新生の変化について検討した (Fig. 1-1)。妊娠ラットを 1 群 15 匹の 4 群 (対照群, LPS 単独群, LPS + 0.25% AGIQ 群, LPS + 0.5% AGIQ 群) に無作為に割り当てた。AGIQ



投与群には 0.25% (w/w) または 0.5% (w/w) の割合で AGIQ を混合した粉末基礎飼料を母動物に対して妊娠 18 日目から投与を開始し, 分娩後 21 日目まで継続的に混餌投与した。さらに生後 21 日目 (離乳時) から生後 77 日目までの児動物にも同用量で混餌投与した。AGIQ の用量は, 所属研究室の先行研究において, 胎生期から成体期まで継続的に曝露することで, 恐怖条件付け試験の恐怖記憶の消去学習が促進されることを示した 0.5% (w/w) 混餌用量に基づき決定した [Masuuchi et al., 2020 Okada et al., 2019]。母動物は実験期間中, 3~5 日おきに体重, 摂餌量, 摂水量を測定した。神経新生は発情周期中のステロイドホルモンの循環レベルに影響されるため [Pawluski et al., 2009], 全ての解析に雄児動物を用いた。生後 2 日目に児動物を無作為に淘汰し, 各母動物に 5~8 匹の雄児動物を割り当てた。また, 母動物あたりの児動物数を合計 8 匹に揃えるため, 雄児動物が 8 匹に満たない場合は雌児動物を割り当てた。生後 3 日目に LPS を投与する群に対して LPS を 1 mg/kg 体重の割合で腹腔内投与し, 対照群に対しては生理食塩水を腹腔内投与した。LPS の投与量および方法については, ミクログリアの高度な活性化, 海馬の神経新生破綻, 神経行動学的なコミュニケーション機能障害及び認知機能障害の誘発を示した先行研究に基づき決定した [Pang et al., 2016]。雄児動物の体重については, 生後 21 日目までは 3~4 日ごとに測定し, 生後 21 日目以降から生後 77 日目までは週 1 回, 摂餌量, 摂水量と共に測定した。生後 6 日目に, 脳の免疫組織化学的解析のため, 各群 10 匹の雄児動物 (母動物 1 匹につき 1 匹) を CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 処置下で腹大動脈切断により放血安楽死させ, 頭蓋骨ごと脳を採取し, メタカーン溶液で 5 時間固定後, 100% エタノールで置換した。生後 21 日目に免疫組織化学的解析のため, 各群 10~12 匹の雄児動物 (母動物 1 匹につき 1 匹) について, CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>

処置下で 4% (w/v) paraformaldehyde (PFA)/0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を用いて経心灌流固定 (流速 10mL/min) 後, 頭蓋骨ごと脳を採取した。mRNA 発現解析のため, 各群 6~12 匹の雄児動物 (母動物 1 匹につき 1 匹) を CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 処置下で腹大動脈切断により放血安楽死させ, 脳を採取し, 重量測定後メタカーン溶液を用いて全脳固定法に従って固定した [Akane et al., 2013]。脳内酸化ストレスレベルの測定のため, 各群 7~13 匹の雄児動物 (母動物 1 匹につき 1 匹) について, CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 処置下で氷冷生理食塩水 [0.9% (w/v) 塩化ナトリウム] を用いて経心灌流 (流速 10 mL/min) 後, 脳を摘出した。氷上で海馬組織を摘出後, 直ちに液体窒素にて凍結し, 解析まで -80°C 下で保存した。春機発動期 (生後 38~45 日目) 及び成体期 (生後 70~77 日目) に各群 10 匹の雄児動物について行動試験を実施した。なお, 春機発動期と成体期の行動試験は異なる動物を用いて実施した。生後 77 日目に成体期の行動試験を実施していない各群 10 匹の雄児動物について, CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 処置下で 4% (w/v) PFA/0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を用いて経心灌流固定 (流速 35mL/min) 後, 頭蓋骨ごと脳を採取し, 神経新生及びグリア細胞に関する免疫組織化学的解析に供した。また, 成体期に行動試験を行った全ての動物について, 同様に灌流固定後, 脳を採取し, シナプス可塑性に関する免疫組織化学的解析に供した。mRNA 発現解析のため, 生後 21 日目と同様の方法で各群 6~10 匹の雄児動物を安楽死させ, 脳を採取した。

## サテライト実験

サテライト実験では LPS 投与後早期の脳内酸化ストレスや神経炎症反応, 乳児期の超音波発声試験について検討した (Fig. 1-1)。群構成並びに LPS と AGIQ の投与プロトコルは主実験

と同様であり、1群3匹の妊娠ラットを使用した。生後2日目に児動物を無作為に淘汰し、各母動物に4~6匹の雄児動物を割り当てた。また、雌児動物を充足し、母動物あたりの児動物数を合計10匹に揃えた。生後6日目に酸化ストレスレベル測定のため、各群7匹の雄動物をCO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>処置下で腹部大動脈切断により放血安楽死させ、脳を採取した。大脳半球組織を摘出後、直ちに液体窒素にて凍結し、解析まで-80℃下で保存した。酸化ストレス及び神経炎症反応に関するmRNA発現解析のため、各群7匹の雄児動物を同様に安楽死させ、摘出した脳を前述の全脳固定法でメタカーン溶液を用いて固定した。生後10日目に各群6~10匹の雌児動物について超音波発声試験を実施した。

主実験及びサテライト実験の全ての母動物と残余雌児動物は、それぞれ生後21日目にCO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>処置下で腹部大動脈切断により放血安楽死させた。

本研究における全ての動物実験は National Institutes of Health guide for the care and use of laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) に従い実施し、動物の苦痛を最小限にするための方策に努めた。実験方法は東京農工大学動物実験委員会の承認を得た (承認番号: 主実験 31-38, サテライト実験 31-64)。

## 行動試験

全ての行動試験は動物飼育室に隣接した行動実験室にて実施した。各行動試験において、各動物の試験前後に毎回70%エタノール溶液で解析器具を清拭した。各動物の試験終了後、

動物を速やかに飼育ケージに戻し動物飼育室に移動させた。実験は全て 08:00 から 19:00 の間に行い、各群における試験動物の選択順序は概日性ホルモンの変動などによる偏りが無いように選択した。

### 超音波発声試験

超音波発声試験は母子間コミュニケーションに関連するパラメータを評価するために生後 10 日目の雌児動物について実施した。試験はポリカーボネート製の観察ケージ (幅 172 mm × 奥行き 240 mm × 高さ 129 mm) を輝度 50 Lux, ホワイトノイズ 50 dB に維持した防音箱 (CL-4211; 小原医科産業株式会社, 東京, 日本) に設置した実験装置内で実施された。被験動物の超音波発声を収集するため、プリアンプ内蔵マイクロホン (4158 HN; 小原医科産業株式会社) を観察ケージ中央に、集音部の先端が被験動物の真上に来るように、また、被験動物が集音部の先端に触れないように設置した。被験動物を飼育ケージから観察ケージに移し、インタフェース (USV-1010AF; 小原医科産業株式会社) 及びレコーディングソフトウェア (URS-9100; 小原医科産業株式会社) を用いて 5~95 kHz の超音波発声を 1 匹あたり 5 分間記録した。児ラットが母ラットから分離され社会的に孤立した際に 40 kHz の超音波発声をすることから [Wöhr and Schwarting, 2008], 超音波解析ソフト (UWA-9100; 小原医科産業株式会社) を用いて 38~42 kHz の超音波発声を抽出し各パラメータ (発声数, 発声ごとの平均・最大継続時間) を算出した。

## オープンフィールド試験

生後 38 日目 (春機発動期) 及び生後 70 日目 (成体期) にオープンフィールド試験を行い, 自発運動及び不安様行動に関するパラメータを評価するとともに翌日の社会的相互作用試験で使用する同実験箱に馴化させた (Fig. 1-2)。実験箱は, 正方形の, 表面が黒色ポリビニルで加工されたステンレス製トレイと, トレイを囲む表面が黒色ポリビニルで加工されたステンレス製の壁 (幅 172 mm × 奥行き 240 mm × 高さ 129 mm, 小原医科産業株式会社) から構成され, 床面照度は中央で 20 Lux に維持された。動物は実験開始の 1~1.5 時間前に動物飼育室から行動実験室に移動し行動実験室に慣らした。被験動物は実験箱の隅に壁側に頭を向けて配置後, 10 分間自由に探索させた。動物の行動は行動実験室の天井に設置した CCD カメラ (WAT-902B; ワテック株式会社, 鶴岡, 日本) を用いて記録し, ビデオ画像解析装置 (TimeOFCR1 ソフトウェア; 小原医科産業株式会社) を用いて動物の総移動距離及びフィールドの中心領域及び周辺領域の滞在時間を記録した。ビデオ追跡解析では実験箱内のフィールドを 25 の正方形領域に等分し, 中央の 9 領域を中心領域と定義し, 中心領域または壁側に滞在した時間の割合を算出した。

## 社会的相互作用試験

生後 39 日目と生後 40 日目 (春機発動期) 及び生後 71 日目と生後 72 日目 (成体期) に社会的相互作用試験を行い, 新奇動物に対する認知能力, 社会性を評価した。試験はセッション 1 (生後 39 日目, 生後 71 日目) とセッション 2 (生後 40 日目, 生後 72 日目) に分けて実施した。床面

照度はアリーナ中央で 20 Lux に維持した。被験動物は実験開始の 1～1.5 時間前に動物飼育室から行動実験室に移動させ行動実験室に慣らした。セッション 1 では、オープンフィールド試験で用いたものと同じ実験箱の隅にメッシュケージ (幅 200 mm × 奥行き 150 mm × 高さ 300 mm, SI-MBR; 小原医科産業株式会社) を、新奇動物を入れない状態で設置した。被験動物をメッシュケージの正反対側の壁に頭を向けて配置後、5 分間自由に探索させた。動物の行動を行動実験室の天井に設置した CCD カメラ (WAT-902B; ワテック株式会社) を用いて記録し、自動ビデオ追跡システム (TimeSSI ソフトウェア; 小原医科産業株式会社) を用いて解析した。ビデオ追跡解析ではメッシュケージ周辺を「接触領域」「ケージ周囲内域」「ケージ周囲外域」に分割し、社会的相互作用パラメータ (メッシュケージ周辺の移動距離, 接触領域への接触回数, メッシュケージ周辺の滞在時間) を算出した。セッション 2 では、メッシュケージ内に新奇動物を配置し、被験動物を 3 分間自由に探索させ、セッション 1 と同様の解析を行った。新奇動物は被験動物とは異なるケージで飼育されている対照群の動物から平均的な体重の 4 匹を選び、順番に各試験に使用した。

### 文脈的恐怖条件付け試験

生後 41～45 日目 (春機発動期) 及び生後 73～77 日目 (成体期) に、恐怖条件付け試行, 恐怖記憶獲得試行, 恐怖記憶消去試行#1, #2, #3 の順に 24 時間間隔で 5 日間連続して文脈的恐怖条件付け試験を実施し、文脈的な記憶・学習能力を評価した (Fig. 1-2)。試験は、防音箱 (CL-4211; 小原医科産業株式会社) 内に設置したアクリル製の実験箱 (幅 300 mm × 奥行き 370 mm × 高さ

250 mm, CL-3001; 小原医科産業株式会社) 内で行った。実験箱内は 50 dB のホワイトノイズ, 50 Lux の輝度で維持した。動物は実験開始の 1~1.5 時間前に動物室から行動実験室に移動させて行動実験室に慣らした。恐怖条件付け試行では, 動物を飼育ケージから実験箱に移し, 非条件刺激として床面の 21 本の鉄棒からショックジェネレータ(SGA-2020; 小原医科産業株式会社) によるスクランブル電流を流した。実験開始から 88, 148, 238 秒後に 2 秒間のフットショック (強度 0.3 mA, 計 3 回) を与え, 最終フットショックから 60 秒後に動物を観察ケージから取り出し, 飼育ケージに戻した。したがって試行時間は 5 分間であった。恐怖記憶の獲得と消去試行では被験動物を恐怖条件付け試行と同様の文脈に戻してフットショック無しで 5 分間行動を観察した。成体期の恐怖条件付け試験では, 各被験動物を 3 回目の恐怖記憶消去試行が終了した 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について免疫組織化学的解析を行い, 行動刺激に対するシナプス可塑性の最大誘導 [Masubuchi et al., 2020] を調べた。動物の行動は防音箱の天井に設置した CCD カメラ (WAT-902B; ワテック株式会社) を用いて記録し, ビデオ追跡解析装置 (TimeFZ4 ソフトウェア; 小原医科産業株式会社) を用いて解析した。試行時間 5 分のうち, ラットが 2 秒以上フリージング行動をとっていた時間の割合をフリージング率とした。

### 脳内酸化ストレスマーカーの定量解析

脳内酸化ストレスは脂質過酸化とグルタチオンを指標とした。

Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit (Abcam plc, Cambridge, UK) を用いて脳組織中のチオバル

ピツール酸反応物質の蓄積量を測定し、マロンジアルデヒド (MDA) 含量を算出した。脳組織サンプル (各群 7 匹, 生後 6 日目の大脳半球組織と生後 21 日目の海馬組織) を, ジブチルヒドロキシトルエンを含む溶解緩衝液でホモジナイズした。このホモジネートをチオバルピツール酸と 95°C で 60 分間反応させた。その後 MDA-チオバルピツール酸付加体を n-ブタノールで抽出し, その濃度についてマイクロプレートリーダーを用いて 532 nm で算出した。さらに, 各ホモジネート中のタンパク質濃度を Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて測定し, MDA の濃度 (nmol/mg tissue protein) を定量化した。

脳組織中のグルタチオンジスルフィド (GSSG) 及び還元型グルタチオン (GSH) 濃度は, GSSG/GSH 定量キット (同仁堂研究所, 熊本, 日本) を用いて測定した。脳組織サンプル (各群 7 匹, 生後 6 日目の大脳半球組織と生後 21 日目の海馬組織) を 5% 5-スルホサリチル酸水溶液でホモジナイズした。希釈したホモジネートの上清における GSSG/GSH レベルを, 製造元のプロトコルに従ってマイクロプレートリーダーを用いて 405 nm で算出した。総グルタチオン (GSH + GSSG) 濃度及び GSSG 濃度 ( $\mu\text{mol/L}$ ) は総 GSH 及び GSSG の標準曲線を用いて算出した。この 2 つの濃度から GSH 濃度 ( $\mu\text{mol/L}$ ) を算出した。そして GSSG 濃度と GSH 濃度の比を求めた。

#### 免疫組織化学的解析及びアポトーシス細胞の検出

生後 6 日目に採取したメタカーン固定脳は翌日に頭蓋から摘出し, 100%エタノールにて一



晩固定した。生後 21 日目と生後 77 日目に採取した灌流固定脳は翌日に頭蓋から摘出し、4% PFA 緩衝液にて一晩固定した。その後、生後 6 日目に採取したメタカーン固定脳は海馬体を含むように視交叉の位置で 4 mm 厚の冠状断面スライスを作製し、生後 21 日目と生後 77 日目に採取した 4% PFA 緩衝液灌流固定脳は bregma の後方約 2.2 mm の位置で 3 mm 厚の冠状断面スライスを作製した。各スライスは 4°C で一晩同様の固定液 (エタノールないし PFA 緩衝液) で固定後、標準プロトコルに従ってパラフィン包埋した後、3 μm 厚の連続切片を作製した。

免疫組織化学的解析は、以下に示す一次抗体を用いて行った (Table 1-1)。顆粒細胞系譜のうち、SGZ に分布する type-1 神経幹細胞 (放射状グリア細胞) とアストロサイトの指標である glial fibrillary acidic protein (GFAP) [Shibutani, 2015], SGZ に分布する type-1 神経幹細胞と type-2a 神経前駆細胞の指標である SRY-box transcription factor 2 (SOX2) [Shibutani, 2015], SGZ に分布する type-2b 神経前駆細胞の指標である T-box brain protein 2 (TBR2) [Shibutani, 2015], SGZ 及び GCL に分布する type-2b, type-3 神経前駆細胞及び未熟顆粒細胞の指標である doublecortin (DCX), 主に SGZ と GCL の内側に分布する未熟顆粒細胞の指標である tubulin, beta 3 class III (TUBB3) [von, 2007], SGZ と GCL に分布する未熟及び成熟顆粒細胞の指標である neuronal nuclei (NeuN) [Shibutani, 2015]; GABA 性介在ニューロンの指標である calbindin-D-28K (CALB1), calbindin-D-29K (CALB2), glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67), parvalbumin (PVALB), reelin (RELN), somatostatin (SST) [Freund and Buzsáki, 1996; Gong et al., 2007]; グリア指標のうち、脳内ミクログリアの指標である ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) [Iosif et al., 2006], M1 および M2 ミクログリアに共通する指標である cluster of differentiation (CD) 68 [Jurga et al.,

2020], M2 ミクログリアの指標である CD163 [Jurga et al., 2020]; 細胞増殖活性の指標である proliferating cell nuclear antigen (PCNA); シナプス可塑性に関与する最初期遺伝子関連タンパク質である Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit (FOS), activity-regulated cytoskeleton-associated protein (ARC), cyclooxygenase-2 (COX2), リン酸化により活性化し *Arc* や *Fos* の転写誘導に機能し, シナプス可塑性に関与する phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 (p-ERK1/2) [Brami-Cherrier et al., 2009; Miyashita et al., 2008; Tzingounis and Nicoll, 2006]。免疫組織化学的染色には Avidin-Biotin Complex 法を用いた。内因性ペルオキシダーゼの不活化には, 0.3% (v/v) 過酸化水素水を含むメタノール溶液を用い室温にて 30 分処理した。Table 1-1 に示した条件で一次抗体の抗原賦活化を行い, 切片と一次抗体を 4°C で一晩反応させた。シグナル検出は Vectastain® Elite ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用い, 3,3'-diaminobenzidine/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で発色し, 対比染色にはヘマトキシリンを用いた。動物 1 匹につき 1 切片を各抗体の免疫組織化学的解析に供した。SGZ と GCL におけるアポトーシス細胞の検出のため, *In Situ* Apoptosis Detection Kit (タカラバイオ, 群馬, 日本) を用い, 製造元のプロトコルに従って Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay を実施した。動物 1 匹につき 1 切片を TUNEL assay に供した。

#### 免疫組織化学染色陽性細胞と TUNEL 陽性アポトーシスの定量解析

生後 6 日目の組織サンプルについて, 各グリア細胞 (Iba1 細胞, CD68 陽性細胞, CD163 陽性細胞, GFAP 陽性細胞) を両側でカウントし, 海馬体の全領域の面積で正規化した (Fig. 1-3)。

生後 21 日目と生後 77 日目の組織サンプルについて、海馬歯状回の SGZ に分布する顆粒細胞系譜の GFAP 陽性細胞, SOX2 陽性細胞, TBR2 陽性細胞, PCNA 陽性増殖細胞は両側でカウントし, SGZ の長さで正規化した (Fig. 1-3)。SGZ と GCL に分布する顆粒細胞系譜の DCX 陽性細胞, TUBB3 陽性細胞, NeuN 陽性細胞; GCL に分布するシナプス可塑性関連の ARC 陽性顆粒細胞, COX2 陽性顆粒細胞, FOS 陽性顆粒細胞, p-ERK1/2 陽性顆粒細胞は両側でカウントし, SGZ の長さで正規化した。TUNEL 陽性アポトーシス細胞は, SGZ と GCL においてそれぞれカウントし, SGZ の長さで正規化した。海馬歯状回門に分布する GABA 性介在ニューロンの細胞群 (CALB1 陽性細胞, CALB2 陽性細胞, GAD67 陽性細胞, PVALB 陽性細胞, RELN 陽性細胞, SST 陽性細胞) は両側でカウントし, 海馬歯状回門の面積で正規化した。その際, 海馬歯状回門における CA3 領域の大型錐体ニューロンはカウントから除外した。歯状回門に分布するグリア細胞群 (Iba1 陽性細胞, CD68 陽性細胞, CD163 陽性細胞, GFAP 陽性細胞) も同様にカウントし, 正規化した。NeuN 陽性細胞を除き, 各抗体の陽性細胞は BX51 顕微鏡 (オリンパス株式会社, 東京, 日本) 下で, 処理条件を盲検化しカウントした。NeuN 陽性細胞については DP26 Digital Camera System (オリンパス株式会社) を取り付けた BX51 顕微鏡で 100 倍の倍率のデジタル顕微鏡写真を撮影し, WinROOF 画像解析ソフト (version 5.7; 三谷商事株式会社, 福井, 日本) を用いて自動でカウントした。SGZ の長さ及び海馬体と歯状回門の面積は BX51 顕微鏡でデジタル顕微鏡写真を撮影し, cellSens (version 1.9 ; オリンパス株式会社) を用いて測定した。

## 遺伝子発現解析

生後 6 日目, 生後 21 日目, 生後 77 日目の海馬歯状回サンプルにおける転写産物レベルをリアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) を用いて解析した。生後 6 日目のメタカーン固定脳について, 視交叉の位置で 2 mm 厚の冠状断面スライスを作製し, 孔径 1 mm の生検パンチ (貝印株式会社, 岐阜, 日本) を用いて海馬歯状回組織を採取した。生後 21 日目及び生後 77 日目のメタカーン固定脳について, bregma の後方約 3.0 mm の位置で 2 mm 厚の冠状断面スライスを作製し, 生検パンチを用いて歯状回組織を採取した。各歯状回サンプルについて, RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて製造元のプロトコルにしたがって total RNA を抽出した。次いで, 1 µg の total RNA より SuperScript® III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) を用いて cDNA を合成した。リアルタイム RT-PCR の標的遺伝子と各遺伝子のプライマー配列を Table 1-2 に示した。Il6 を除く遺伝子のプライマー配列は, Primer Express™ Software (Version 3.0; Thermo Fisher Scientific) または Primer-BLAST (NCBI, <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既報で使用されたものを参考に設計した [Ghowsi et al., 2018]。リアルタイム RT-PCR は SYBR®Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) 及び Step One Plus™ Real-time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用いて製造元のプロトコルに従って実施した。各遺伝子の転写産物レベルは目的の遺伝子の  $C_T$  値及び内因性コントロールである hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*Hprt1*) ないしは glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) の  $C_T$  値を用いて  $\Delta\Delta C_T$  法により算出した [Livak and Schmittgen, 2001]。

## 統計解析

数値データは平均値±SD で示した。対照群と LPS 単独群間の有意差は以下のように評価した。等分散性については Levene の検定を適用した。等分散の場合は Student の *t*-test を用いて評価し、不等分散の場合は Aspin-Welch の *t*-test を用いて評価した。LPS 単独群と LPS + 0.25% AGIQ 群または LPS + 0.5% AGIQ 群との有意差は以下のように評価した。等分散性については Levene の検定を適用した。等分散の場合は Dunnett の検定を用いて評価し、不等分散の場合は Bonferroni 補正した Aspin Welch の *t*-test を用いて評価した。全ての解析は IBM SPSS Statistics ver. 25 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) を用いて行い、それぞれの有意水準は  $P < 0.05$  とした。

## 結果

### 児動物の実験期間中および解剖時パラメータの変化

生後 3 日目の LPS 曝露後, 20~30%の雄児動物が数日中に死亡した (Table 1-3)。LPS 単独群の体重は生後 6 日目から生後 40 日目まで対照群と比較して有意に減少したが, 摂餌量と摂水量には有意な差はみられなかった (Table 1-4)。LPS + 0.5% AGIQ 群の体重は生後 3 日目から生後 13 日目及び生後 23 日目から生後 77 日目にかけて LPS 単独群と比較して有意に減少した。摂餌量については, LPS + 0.25% AGIQ 群では生後 23 日目に, LPS + 0.5% AGIQ 群では生後 23 日目及び生後 34 日目に, LPS 単独群と比較して有意に減少した。LPS + 0.5% AGIQ 群の摂水量は生後 23 日目, 生後 34 日目, 生後 48 日目に LPS 単独群と比較して有意に減少した。生後 21 日目の剖検時の脳重量は LPS 単独群で対照群と比較して有意に減少した (Table 1-5)。

### 行動試験結果

#### 超音波発声試験

LPS 単独群では総発声回数, 1 回の発声あたりの最大継続時間, 1 回の発声あたりの平均継続時間は対照群と比較して有意に減少した。LPS + 0.5% AGIQ 群では総発声回数, 1 回の発声あたりの平均継続時間は, LPS + 0.25% AGIQ 群では 1 回の発声あたりの最大継続時間は LPS 単独群と比較して有意に増加した (Fig. 1-4, Table 1-6)。

## オープンフィールド試験

対照群と LPS 単独群間, LPS 単独群と各 AGIQ 投与群間のいずれにおいても, 春機発動期及び成体期に実施したオープンフィールド試験において運動量及び不安に関連するパラメータに有意な差はみられなかった (Table 1-7)。

## 社会的相互作用試験

春機発動期において, メッシュケージのみを使用したセッション 1 では LPS 単独群と対照群間, LPS 単独群と各 AGIQ 投与群のいずれにおいても各パラメータに有意な差はみられなかった (Table 1-8)。一方, メッシュケージに新奇の動物を入れたセッション 2 ではメッシュケージ周囲の移動距離が LPS 単独群で対照群と比較して有意に減少した。また, 同パラメータは LPS + 0.5% AGIQ 群では LPS 単独群と比較して有意に増加した (Fig. 1-4, Table 1-8)。

成体期において, 対照群と LPS 単独群間, LPS 単独群と LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても各パラメータに有意な差はみられなかった (Table 1-9)。

## 文脈的恐怖条件付け試験

春機発動期において, LPS 単独群では恐怖記憶消去試行の 1 回目のフリージング率が対照群と比較して有意に減少した (Fig. 1-4, Table 1-10)。その他の試行におけるフリージング率は, 対照群と LPS 単独群間, LPS 単独群と各 AGIQ 投与群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった。

成体期において、恐怖条件付け試行のフリージング率は対照群と LPS 単独群間、LPS 単独群と各 AGIQ 投与群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった (Fig. 1-4, Table. 1-10)。恐怖記憶獲得試行のフリージング率は、LPS 単独群において 1 回目の試行で対照群と比較して有意に減少し、LPS + 0.25% AGIQ 群において 1 回目と 2 回目の試行で LPS 単独群と比較して有意に増加した。

## 免疫組織化学的解析

### 海馬におけるグリア細胞数

生後 6 日目において、Iba1 陽性ミクログリア/マクロファージの数は LPS 単独群で対照群と比較して有意に増加し、各 AGIQ 投与群で LPS 単独群と比較して有意に減少した (Fig. 1-5, Table 1-11)。CD68 陽性ミクログリア/マクロファージの数は、LPS 単独群で対照群と比較して有意に増加したが、LPS 単独群と各 AGIQ 投与群間で有意な差はみられなかった。CD163 陽性ミクログリア/マクロファージの数は対照群と LPS 単独群間、LPS 単独群と各 AGIQ 投与群間で有意な差はみられなかった。GFAP 陽性アストロサイトの数は、LPS 単独群で対照群と比較して有意に増加し、各 AGIQ 投与群で LPS 単独群と比較して有意に減少した。

生後 21 日目において、Iba1 陽性ミクログリア/マクロファージの数は、LPS 単独群で対照群と比較して有意に増加し、LPS + 0.25% AGIQ 群で LPS 単独群と比較して有意に減少した (Fig. 1-5, Table 1-12)。CD68 陽性ミクログリア/マクロファージの数は、LPS 単独群で対照群と比較して有意に増加し、各 AGIQ 投与群で LPS 単独群と比較して有意に減少した。CD163 陽性ミ



クログリア/マクロファージの数は, LPS 単独群で対照群と比較して有意に増加したが, LPS 単独群と各 AGIQ 投与群間で有意な差はみられなかった。GFAP 陽性アストロサイトの数は, LPS 単独群で対照群と比較して有意に増加し, LPS + 0.5% AGIQ 群で LPS 単独群と比較して有意に減少した。

生後 77 日目において, Iba1 陽性ミクログリア/マクロファージ, CD68 陽性ミクログリア/マクロファージ, CD163 陽性ミクログリア/マクロファージと GFAP 陽性アストロサイトの数は, 対照群と LPS 単独群間, LPS 単独群と各 AGIQ 投与群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった (Fig. 1-5, Table 1-12)。

#### **SGZ 及び GCL における顆粒細胞系譜の細胞数**

生後 21 日目において, NeuN 陽性細胞の数は, LPS 単独群で対照群と比較して有意に減少し, LPS + 0.5% AGIQ 群で LPS 単独群と比較して有意に増加した (Fig. 1-6, Table 1-12)。GFAP 陽性細胞, SOX2 陽性細胞, TBR2 陽性細胞, DCX 陽性細胞, TUBB3 陽性細胞の数については対照群と LPS 単独群間, LPS 単独群と各 AGIQ 投与群間でいずれも有意な差はみられなかった。

生後 77 日目において, DCX 陽性細胞及び TUBB3 陽性細胞の数は, LPS 単独群で対照群と比較して有意に減少し, TUBB3 陽性細胞の数は, LPS + 0.5% AGIQ 群で LPS 単独群と比較して有意に増加した (Fig. 1-5, Table 1-13)。GFAP 陽性細胞, SOX2 陽性細胞, TBR2 陽性細胞, NeuN 陽性細胞の数については, 対照群と LPS 単独群間, LPS 単独群と各 AGIQ 投与群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった。

## SGZ 及び GCL における細胞増殖活性及びアポトーシス細胞数

生後 21 日目において、PCNA 陽性細胞の数は対照群と LPS 単独群間、LPS 単独群と各 AGIQ 投与群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった (Fig. 1-7, Table 1-12)。SGZ における TUNEL 陽性アポトーシス細胞の数は、LPS 単独群で対照群と比較して有意に増加したが、各 AGIQ 投与群では LPS 単独群と比較して有意な差はみられなかった。GCL における TUNEL 陽性細胞の数は、対照群と LPS 単独群間、LPS 単独群と各 AGIQ 投与群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった。

生後 77 日目において、PCNA 陽性細胞の数は、LPS 単独群で対照群と比較して有意に増加したが、各 AGIQ 投与群では LPS 単独群と比較して有意な差はみられなかった (Fig. 1-7, Table 1-13)。SGZ 及び GCL における TUNEL 陽性アポトーシス細胞の数は対照群と LPS 単独群間、LPS 単独群と各 AGIQ 投与群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった。

## 歯状回門における介在ニューロンの分布

生後 21 日目において、GAD67 陽性細胞と PVALB 陽性細胞の数は、LPS 単独群で対照群と比較して有意に減少したが、各 AGIQ 投与群では LPS 単独群と比較して有意な差はみられなかった (Fig. 1-8, Table 1-12)。CALB1 陽性細胞、CALB2 陽性細胞、RELN 陽性細胞、SST 陽性細胞の数は、対照群と LPS 単独群間、LPS 単独群と各 AGIQ 投与群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった。

生後 77 日目において、GAD67 陽性細胞の数は、LPS 単独群で対照群と比較して有意に増加したが、各 AGIQ 投与群では LPS 単独群と比較して有意な差はみられなかった (Fig. 1-8, Table 1-13)。CALB1 陽性細胞, CALB2 陽性細胞, PVALB 陽性細胞, RELN 陽性細胞, SST 陽性細胞の数は、対照群と LPS 単独群間, LPS 単独群と各 AGIQ 投与群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった。

### GCL におけるシナプス可塑性関連分子陽性細胞数

生後 21 日目において、FOS 陽性細胞と p-ERK1/2 陽性細胞の数は対照群と LPS 単独群間で有意な差はみられなかったが、LPS + 0.5% AGIQ 群では LPS 単独群と比較して有意に増加した (Fig. 1-9, Table 1-12)。ARC 陽性細胞と COX2 陽性細胞の数は対照群と LPS 単独群間, LPS 単独群と各 AGIQ 投与群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった。

生後 77 日目において、ARC 陽性細胞と FOS 陽性細胞の数は、LPS 単独群で対照群と比較して有意に増加したが、各 AGIQ 投与群では LPS 単独群と比較して有意な差はみられなかった (Fig. 1-9, Table 1-13)。COX2 陽性細胞と p-ERK1/2 陽性細胞の数は、対照群と LPS 単独群間, LPS 単独群と各 AGIQ 投与群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった。

### 海馬歯状回における遺伝子発現解析

#### 炎症及び酸化ストレス関連遺伝子

生後 6 日目において、ケミカルメディエーター及びその関連分子をコードする遺伝子のう

ち *Illa*, *Il1b*, *Il6*, *Nfkb1*, *Tgfb1* 及び *Tnf* の転写産物レベルが LPS 単独群で対照群と比較して有意に増加した (Table 1-14)。 *Illa* と *Il1b* の転写産物レベルは、各 AGIQ 投与群で LPS 単独群と比較して有意に減少した。酸化ストレス関連遺伝子のうち *Keap1* 及び *Nfe2l2* の転写産物レベルは、LPS 単独群で対照群と比較して有意に増加した。 *Nfe2l2* の転写産物レベルは、LPS + 0.5% AGIQ 群で LPS 単独群と比較して有意に減少した。

生後 21 日目と生後 77 日目において、ケミカルメディエーター及びその関連分子をコードする遺伝子のうち *Illa* の転写産物レベルは、LPS 単独群で対照群と比較して有意に増加したが、各 AGIQ 投与群と LPS 単独群間で有意な差はみられなかった (Table 1-14)。酸化ストレス関連遺伝子については、対照群と LPS 単独群間、LPS 単独群と各 AGIQ 投与群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった。

### 神経新生関連遺伝子

生後 21 日目において、顆粒細胞系譜マーカー遺伝子のうち NeuN としても知られる *Rbfox3* の転写産物レベルは、LPS 単独群で対照群と比較して有意に減少し、各 AGIQ 投与群で LPS 単独群と比較して有意に増加した (Table 1-15)。GABA 性介在ニューロンマーカー遺伝子のうち *Pvalb* の転写産物レベルは、LPS 単独群で対照群と比較して有意に減少し、 *Calb1* の転写産物レベルは LPS + 0.5% AGIQ 群で LPS 単独群と比較して有意に増加した。コリン作動性受容体遺伝子のうち *Chrna7* の転写産物レベルは、LPS + 0.5% AGIQ 群で LPS 単独群と比較して有意に増加した。ドーパミン作動性受容体遺伝子である *Drd2* の転写産物レベルは、LPS + 0.5% AGIQ

群で LPS 単独群と比較して有意に減少した。グルタミン酸受容体及びグルタミン酸輸送体をコードする遺伝子のうち *Gria2* の転写産物レベルは, LPS 単独群で対照群と比較して有意に減少した。シナプス可塑性関連遺伝子のうち *Ptgs2* の転写産物レベルは, LPS 単独群で対照群と比較して有意に減少し, 各 AGIQ 投与群で LPS 単独群と比較して有意に増加した。神経栄養因子関連遺伝子のうち *Bdnf* の転写産物レベルは, LPS + 0.5% AGIQ 群で LPS 単独群と比較して有意に増加した。

生後 77 日目において, 顆粒細胞系譜マーカー遺伝子のうち *Tubb3* の転写産物レベルは, LPS 単独群で対照群と比較して有意に減少し, 各 AGIQ 投与群で LPS 単独群と比較して有意に増加した (Table 1-16)。コリン作動性受容体遺伝子のうち *Chrna7* の転写産物レベルは, LPS + 0.25% AGIQ 群で LPS 単独群と比較して有意に減少した。グルタミン酸受容体遺伝子のうち *Grial*, *Gria2*, *Gria3* の転写産物レベルは, 各 AGIQ 投与群のいずれかまたは両方で LPS 単独群と比較して有意に減少した。シナプス可塑性関連遺伝子のうち *Arc* の転写産物レベルは, LPS 単独群で対照群と比較して有意に増加し, 各 AGIQ 投与群で LPS 単独群と比較して有意に減少した。神経栄養因子関連遺伝子のうち *Cntf* の転写産物レベルは, LPS 単独群で対照群と比較して有意に増加し, *Ntrk2* の転写産物レベルは LPS + 0.25% AGIQ 群で LPS 単独群と比較して有意に減少した。

**脳内酸化ストレスマーカーの定量解析** 生後 6 日目において, 大脳の MDA 濃度は, LPS 単独群で対照群と比較して有意に増加した (Fig. 1-10, Table 1-17)。

生後 21 日目において、海馬の MDA 濃度が LPS + 0.25% AGIQ 群で LPS 単独群と比較して有意に減少した。

GSSG/GSH 比は、生後 6 日目と生後 21 日目の両日とも、対照群と LPS 単独群間、LPS 単独群と各 AGIQ 投与群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった。

## 考察

本章では, LPS 単独群で生後 6 日目に Iba1 陽性ミクログリア/マクロファージと GFAP 陽性アストロサイトが増加し, 炎症性サイトカイン遺伝子 (*Il1a*, *Il1b*, *Il6*, *Tnf*) の転写産物レベルが増加した。また, CD68 陽性ミクログリア/マクロファージも LPS 単独群で増加した。CD163 陽性ミクログリア/マクロファージの数はこの時点ではどの群でも非常に少なく, 各群間で差はなかった。CD68 は M1 型炎症性及び M2 型抗炎症性ミクログリア/マクロファージの両方の活性化アイソフォームに発現し[Bolós et al., 2017], CD163 は M2 型抗炎症ミクログリア/マクロファージに発現している [Jurga et al., 2020]。Interleukin 6 (IL-6) と tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) は炎症反応を引き起こす M1 マーカーであるため [Tang and Le, 2016; Xiong et al., 2016], 得られた結果は新生児期の LPS 曝露直後では M1 型ミクログリア/マクロファージが活性化されて炎症反応が誘導されることを示唆している。本実験の LPS 単独群の生後 6 日目では, 強力な炎症抑制因子であるトランスフォーミング成長因子 (TGF)- $\beta$  [Dobolyi et al., 2012] をコードする *Tgfb1* の発現が増加した。これは LPS 投与後数日で抗炎症反応の誘導が開始されることを示唆している。また, アストロサイトは炎症による神経組織傷害に対して, 炎症抑制と組織修復に寄与することから [Colombo and Farina, 2016], GFAP 陽性アストロサイトの増加は神経炎症に起因する神経組織損傷に対する修復反応を反映している可能性が示唆された。本研究の AGIQ 投与群では, 生後 6 日目において LPS 単独群と比較して Iba1 陽性ミクログリア/マクロファージ及び GFAP 陽性アストロサイトの数が減少し, *Il1a*, *Il1b* 及び *Tnf* の転写産物レ

ベルが減少あるいは減少傾向を示したが、これらの結果は LPS 誘発急性神経炎症に対する AGIQ の抗炎症効果を示唆するものであった。

生後 21 日目において、LPS 単独群で Iba1 陽性細胞, CD68 陽性細胞, CD163 陽性細胞の数が増加し、*Tgfb1* の転写産物レベルに増加傾向がみられた。これらの結果は、生後 6 日目の M1 型から離乳時の M2 表現型へのミクログリア/マクロファージの表現型の移行による抗炎症反応の誘導を示唆するものと思われた。また、生後 6 日目から続く GFAP 陽性アストロサイトの持続的な増加も抗炎症反応を示唆するものと考えられた。一方、AGIQ 投与により、LPS 群と比較して CD68 陽性細胞数が減少し、CD163 陽性細胞数が増加した。加えて *Tgfb1* の転写産物レベルが両用量でさらに増加したことから、AGIQ は離乳時にみられた LPS に対する抗炎症反応を増強する可能性が示唆された。また、AGIQ 投与群において GFAP 陽性アストロサイトの数が LPS 単独群と比較して減少したことから、LPS の曝露早期における炎症反応に対する AGIQ の改善効果が示唆された。生後 77 日目には、LPS によるグリア細胞群の数の変化とケミカルメディエーター遺伝子の転写産物レベルの変化は、*Il1a* の持続的な増加を除き全て消失し、成体期に至るまでの間に神経炎症反応が自発的に消失することが示唆された。

LPS の脳内投与はラットの脳の主要な酸化ストレスマーカーである MDA レベル及び GSSG/GSH 比を増加させることが報告されている [Tyagi et al., 2010]。本実験では LPS 単独群で生後 6 日目の脳内 MDA 濃度が増加し、GSSG/GSH 比に増加傾向がみられたことから、LPS の投与後早期に脳内酸化ストレス障害が誘発されることが示唆された。AGIQ 投与により生後 6 日目の脳内 MDA 濃度と GSSG/GSH 比の増加傾向は回復し、LPS による脳内酸化ストレス



障害に対する AGIQ の保護作用が示唆された。また、LPS 単独投与群で *Keap1* 及び *Nfe2l2* の転写産物レベルが増加した。*Keap1* は Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1) をコードし、酸化還元反応のセンサーとして働く。*Nfe2l2* は nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) をコードし、酸化ストレスに反応し細胞保護に関連する遺伝子群を制御する転写因子である [Yamamoto et al., 2018]。KEAP1 は静止状態では NRF2 の活性を抑制しているが、様々なストレスにさらされると NRF2 は KEAP1 を介した抑制から解放されて活性化し [Yamamoto et al., 2018], 例えばマクロファージの極性を M2 表現型にシフトさせ抗炎症効果を発揮する [Feng et al., 2018]。したがって、新生児期 LPS 投与後早期の KEAP1-NRF2 システムの活性化は、酸化ストレスに対する細胞保護作用の誘導と、離乳時にみられたミクログリア/マクロファージの抗炎症表現型への移行との関与が示唆された。なお、LPS による脳内 MDA レベルの変化及び GSSG/GSH 比の変化は、離乳時には対照群レベルに回復していた。

海馬神経新生指標について、生後 21 日目の LPS 単独群において SGZ と GCL における未熟・成熟顆粒細胞に発現する NeuN [Sibbe and Kulik, 2017] 陽性細胞が減少し、海馬歯状回での NeuN をコードする *Rbfox3* の転写産物レベルが減少した。一方で未熟顆粒細胞に発現する TUBB3 [von, 2017] 陽性細胞の数は変化せず、未熟顆粒細胞のマーカー遺伝子である *Tubb3* 及び *Dpysl3* [Knoth et al., 2013] の転写産物レベルも変化しなかった。TUNEL 陽性アポトーシス細胞は SGZ で増加したが、GCL では変化がなかったことから、新生児期 LPS 投与は離乳時の SGZ の未熟顆粒細胞の分化を標的としてアポトーシスを誘導し、成熟顆粒細胞集団の減少をもたらしたものと考えられた。一方、生後 77 日目においては、LPS 単独群では DCX 陽性細胞

と TUBB3 陽性細胞の数が減少し, *Tubb3* の転写産物レベルが減少したが, type-2b 神経前駆細胞に発現する TBR2 [Sibbe and Kulik, 2017] 陽性細胞の数は変化せず, 大部分が成熟顆粒細胞からなる NeuN 陽性細胞の数は対照群レベルまで回復した。これらの結果から, 新生児期の LPS 投与により, 成体期の type-3 神経前駆細胞と未熟顆粒細胞の数が減少することが示唆された。また, 生後 77 日目には SGZ における PCNA 陽性細胞数の増加がみられ, 顆粒細胞系譜の神経新生障害に対する代償的な増殖反応が示唆された。文献的には, 発達期の LPS 投与による顆粒細胞系譜の細胞集団に対する傷害の標的性に関しては, LPS 処置のタイミングや解析方法の違いにより一貫しておらず, 報告によってまちまちである [Domínguez-Rivas et al., 2022]。この標的性の違いは, LPS 曝露後の神経新生に対する傷害性の反応と代償性の反応が並行して長期的に複雑に進行する動的な反応を反映し, 観察時期による影響の違いとなっているのかもしれない。本実験では LPS による炎症反応と酸化ストレス反応は生後 21 日目までに概ね終息した。文献的に発達期の LPS 曝露は, 神経発達を制御する分子機構を損傷することで, 後に続く長期的あるいは不可逆的な神経機能変化を引き起こすことが報告されている [Izvolaska et al., 2018]。したがって LPS の新生児期投与は, 生後早期に神経発達に関する制御系の過程を損ない, 離乳時以降の神経新生を進行性に障害する可能性が示唆された。

本実験では, LPS による生後 21 日目と生後 77 日目の両時点の神経新生障害が AGIQ 投与により回復した。本実験の結果と同様に, LPS 処置前から抗酸化物質である *N*-acetyl-L-cysteine や亜鉛塩を母体に投与すると, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 の産生が抑制され, 胎児脳における局所炎症の発生を防ぎ, 炎症による長期の影響を予防することが報告されている [Beloosesky et al.,

2009; Chua et al., 2012]。したがって、LPS 投与前に開始した AGIQ 投与が LPS による初期の神経炎症と酸化ストレス反応のほぼ全てを抗酸化、抗炎症作用により防御し、その後の神経新生や神経行動への影響を予防したものと考えられた。

本実験の AGIQ 投与により、生後 21 日目において最初期遺伝子タンパク質である FOS [Nahm and Noebels, 1998] に陽性を示す顆粒細胞及び最初期遺伝子の制御因子である p-ERK1/2 [Brami-Cherrier et al., 2009] に陽性を示す顆粒細胞の数が増加した。海馬のニューロンにおける最初期遺伝子の発現増加は、シナプス可塑性と記憶の定着プロセスにおいて重要な役割を果たす [Guzowski, 2002]。また、ERK1/2 は急性刺激に応答して急速にリン酸化することで活性化され、最初期遺伝子を誘導してシナプス可塑性の促進に関与する [Gao and Ji, 2009]。所属研究室の先行研究において、正常動物に胎生期から AGIQ を継続的に投与すると文脈的恐怖条件付け試験における恐怖記憶の消去学習が促進され、海馬歯状回と内側前頭皮質において、それぞれ FOS と p-ERK1/2 を介したシナプス可塑性が増強されることを報告している [Masubuchi et al., 2020; Okada et al., 2019]。したがって、本実験における AGIQ の継続投与は LPS による有害影響に対して神経保護作用を発揮し、シナプス可塑性の促進をもたらしたものと考えられた。実際、神経系におけるフラボノイドなどの天然由来抗酸化物質の生物学的作用は、古典的な抗酸化作用によるものだけではなく、細胞内シグナル伝達との相互作用により、脆弱なニューロンの保護、既存のニューロン機能の強化、ニューロンの再生刺激、神経新生の誘導を行う可能性があることが知られている [Spencer, 2010; Williams and Spencer, 2012]。

生後 77 日目の LPS 単独群、各 AGIQ 投与群のいずれにおいても、最初期遺伝子タンパク質

である ARC [Tzingounis and Nicoll, 2006]に陽性を示す顆粒細胞や FOS 陽性顆粒細胞の数が増加した。また, LPS 単独群では *Il1a* と *Il1b* の転写産物レベルの持続的な増加または増加傾向がみられ, AGIQ 投与群では生後 21 日目及び生後 77 日目のいずれにおいても LPS 単独群でみられた *Il1a* と *Il1b* の転写産物レベルの増加は回復しなかった。IL-1 $\alpha$  と IL-1 $\beta$  は感染症や傷害時に惹起される炎症反応における重要なサイトカイン分子である。一方で, IL-1 $\beta$  は海馬に高レベルで発現している IL-1 受容体に結合することによって, シナプス可塑性に局所的な効果を及ぼすことが示されている [Hoshino et al., 2017]。IL-1 $\beta$  は海馬のシナプス可塑性に対してシナプス特異的な効果を示し, 異なるタイプのシナプスで長期増強に対して様々な効果を発揮する [Hoshino et al., 2017]。IL-1 $\alpha$  についてはシナプスにおける機能的役割は十分に検討されていないが, ある研究ではマウスにおいて IL-1 $\alpha$  による長期記憶の消去学習が促進されることが報告されている [Takemiya et al., 2017]。したがって, 新生児期に LPS に曝露された動物は, IL-1 $\alpha$  と IL-1 $\beta$  の持続的な放出により成体期のシナプス可塑性の増強を示す可能性がある。本実験では生後 77 日目時点のシナプス可塑性関連タンパク質については最後の恐怖記憶消去試行から 90 分後の動物で調べたため, ARC 陽性顆粒細胞あるいは FOS 陽性顆粒細胞の増加は, 以前に報告があるように行動刺激に関連した反応であると考えられた [Masubuchi et al., 2020]。しかし, AGIQ 投与によってこれらの陽性顆粒細胞の数は変化しなかったことから, 新生児期の LPS 投与では成体期でのシナプス可塑性が自然回復することが示唆された。

本実験では, 生後 21 日目の LPS 単独群で歯状回門部の PVALB 陽性の GABA 性介在ニューロン及び GAD67 陽性 GABA 性介在ニューロンの数が減少し, 歯状回における *Pvalb* の転写産

物レベルが減少した。GABA 性介在ニューロンは神経新生を促進することが報告されており、歯状回における神経新生の促進に関わる GABA 性介在ニューロンの有力な候補としてバスケット細胞と軸索間細胞が考えられている [Tozuka et al., 2005]。歯状回のバスケット細胞と軸索間細胞の主要な集団は PVALB 陽性介在ニューロンであり、PVALB 陽性介在ニューロンのシグナル伝達の低下は神経新生を抑制する可能性がある [Freund and Buzsáki, 1996]。所属研究室では、マウスの母体へのマンガン曝露により、*Pvalb* プロモーター領域の過メチル化による、PVALB 陽性介在ニューロン集団の減少と関連した海馬の神経新生障害を報告した [Wang et al., 2013]。以上より、新生児期の LPS 投与は主に PVALB を標的とし、離乳時の神経新生を障害する可能性が示唆された。GAD67 は GABA 産生の 90%以上を担う律速酵素であり [Asada et al., 1997]、GABA 性 GABA 性介在ニューロンの細胞群はこの酵素を発現している [Roth and Draguhn, 2012]。本実験で観察された GAD67 陽性介在ニューロン数の減少は、新生児期の LPS 投与が GABA 性介在ニューロンを標的としていることを示唆するものであり、これは PVALB 陽性細胞数の減少の一因であると考えられた。

本実験では、高用量 AGIQ 投与により生後 21 日目の歯状回における *Bdnf* の転写産物レベルが LPS 単独群と比較して増加したが、対照群と LPS 単独群間で差はみられなかった。また、高用量の AGIQ 投与により LPS による PVALB 陽性介在ニューロンの減少が回復した。海馬歯状回において、脳由来神経栄養因子 (BDNF) は、成熟顆粒細胞で産生され [Danzer and McNamara, 2004]、PVALB 陽性介在ニューロンの成熟と活動電位の発火を刺激することが報告されている [Berghuis et al., 2004]。したがって、新生児期 LPS 投与により減数した成熟顆粒細

胞に対し, AGIQ が BDNF シグナルを代償的に増強し, それにより PVALB 陽性介在ニューロン数の減少が回復した可能性が考えられた。

本実験の生後 10 日目における超音波発声試験では, LPS 単独群で母子間コミュニケーション関連パラメータが減少したが, 先行研究の報告と同様に [Pang et al., 2016], 本実験においても神経炎症が誘導された後にコミュニケーション障害が誘発されることが示唆された。ASD は, 前述のように, 社会性の障害を特徴とし, 免疫調節障害と神経炎症は ASD の重要な構成要素である [Bjorklund et al., 2017]。げっ歯類の超音波発声は, 前脳から脳幹にわたる広い神経ネットワークが関与していることから [Boulanger and Mouly, 2021], 実験的な LPS 曝露による ASD 様コミュニケーション障害は, 広範な脳領域における急性神経炎症によって生じる可能性が示唆された。本研究では, AGIQ 投与により新生児期 LPS 曝露後早期の超音波発声の減少が消失し, 海馬の神経炎症も抑制されたことから, 抗酸化剤を介した急性炎症に対する神経保護効果は, 発達中の脳の広い領域にわたって効果を及ぼすことが示唆された。

春機発動期の社会的相互作用試験において, LPS 単独群で新奇動物に対する興味の低下と探索行動の減少がみられたが, オープンフィールド試験の結果を含めて運動量の低下はみられなかったことから, 新生児期 LPS 投与は春機発動期にも ASD 様のコミュニケーション障害を引き起こす可能性が示唆された。AGIQ の高用量投与により, LPS 投与でみられたパラメータの変化は回復ないしは回復傾向を示した。LPS 投与モデルを含む実験的 ASD モデルでは海馬の神経新生障害を起こすことが報告されており [Domínguez-Rivas et al., 2022], 本実験においても, LPS 投与により離乳時及び成体期の神経新生障害がみられ, 神経新生障害は AGIQ 投与

により改善された。社会性行動には、海馬に加え、線条体、大脳皮質、扁桃体などの脳領域が関与する [Blázquez et al., 2019]。したがって、AGIQ 投与による、LPS 誘発急性炎症反応に対する抗酸化・抗炎症作用と神経保護作用が発達中の脳領域全体に及ぶことが、ASD 様のコミュニケーション障害の予防に重要である可能性が示唆された。

春機発動期の文脈的恐怖条件付け試験において、LPS 単独群で恐怖記憶獲得試行のフリージング率が減少傾向を示し、恐怖記憶消去試行の初回のフリージング率が減少した。これは、新生児期の LPS 投与が春機発動期に恐怖記憶の学習過程を阻害することを示唆している。海馬歯状回は記憶の獲得過程に重要な役割を担っており、顆粒細胞の除去やサイレンシングは文脈的恐怖条件付けの記憶獲得過程を阻害することが報告されている [Huckleberry et al., 2018]。本研究では、LPS 単独群で離乳時における成熟顆粒細胞群の数が減少したことから、機能的に活性化している顆粒細胞数の減少と恐怖記憶獲得障害との因果関係が示唆された。

AGIQ の高用量投与は、成熟顆粒細胞数の回復に有効であったが、恐怖記憶獲得障害を明らかに改善することはできなかった。しかし、AGIQ 投与群における恐怖記憶消去段階でのフリージング率の傾きは、対照群でみられたものと同様であり、AGIQ により恐怖記憶消去学習能力の異常は示さないことが示唆された。恐怖記憶の獲得、定着、維持、消去には、海馬歯状回以外に内側前頭前野や扁桃体が関与していることから [Maren et al., 2013]、LPS による恐怖記憶の学習障害に対する AGIQ の作用機序には、これらの脳領域間での複雑な調節が関与している可能性が考えられた。

成体期の文脈的恐怖条件付け試験では、春機発動期と同様、LPS 単独群で恐怖記憶獲得試行

のフリージング率が減少し, 恐怖記憶消去試行の 1 回目のフリージング率が減少した。この消去試行での変化は, 恐怖記憶の獲得過程の抑制を反映している変化であると考えられた。

また, LPS 単独群では, 上述のように成体期の海馬歯状回の type-3 神経前駆細胞と未熟顆粒細胞を標的とする神経新生障害がみられており, 神経新生障害が恐怖記憶の獲得障害に関与していることが示唆された。AGIQ 投与は成体期の恐怖記憶獲得障害と海馬神経新生障害の両方を効果的に改善したが, これは, 抗炎症・抗酸化作用により AGIQ が LPS 投与後早期の神経炎症を抑制したことによるものであると考えられた。



## 小括

本章では、ラットの新生児期 LPS 投与による海馬神経新生障害の詳細な標的性と ASD 様行動への影響を検討するとともに、神経炎症と脳内酸化ストレスがどのように神経新生障害や神経行動異常に関与しているのかを AGIQ を用いて検討した。その結果、新生児期のラットへの LPS 投与は、投与後早期に脳内の酸化ストレスの増加を伴う急性の神経炎症反応を引き起こし、それが原因となり乳児期のコミュニケーション障害を誘発した。離乳時には神経炎症プロファイルは抗炎症性に移行したが、海馬では神経新生の後期分化段階を標的とした障害がみられ、春機発動期には、神経新生障害に関連すると考えられる社会性の障害と恐怖記憶学習障害を誘導した。成体期には神経炎症反応は消失したが、海馬の後期分化段階を標的とした神経新生障害と恐怖記憶学習障害は持続してみられた。妊娠母動物からその児動物に継続して AGIQ を投与すると、LPS 投与後早期の急性炎症と酸化ストレス反応が抑制された。また、その後の成体期まで及ぶ神経新生障害と神経行動障害のほとんどが AGIQ により改善された。

以上のように、新生児期の LPS 投与は、急性かつ一過性の炎症反応を引き起こし、持続的な海馬の神経新生障害と ASD 様行動を誘導する結果が示された。AGIQ の継続投与は、LPS による急性の神経炎症反応と脳内酸化ストレス障害を確実に抑制することで、神経行動や神経新生に及ぼす進行性的な変化を効果的に予防することができる可能性が示された。このことから、持続的な海馬神経新生障害と ASD 様行動の発現には、LPS 投与後早期に誘発される炎症

反応が重要な要因であると考えられた。

## 第2章

母体 lipopolysaccharides 曝露による胎生期免疫活性化が及ぼす海馬神経新生及び神経行動への影響と  $\alpha$ -glycosyl isoquercitrin 投与による保護作用

## 緒言

第1章では、LPS曝露によるラット新生児期免疫活性化モデルが、急性かつ一過性の神経炎症を引き起こし、文脈的恐怖記憶の学習障害を伴うASD様行動と海馬神経新生における顆粒細胞系譜の後期分化段階を標的とした神経新生障害を進行性に生じさせることを明らかにした。また、妊娠後期からAGIQを継続投与することで、LPS投与後早期の神経炎症や酸化ストレス反応が抑制され、その後のASD様行動変化や海馬神経新生障害を効果的に予防することを明らかにした。これらの結果は、発達期におけるLPSによる炎症や酸化ストレス反応が、その後の脳発達障害を起こす直接的な要因である可能性を示唆するものである。

妊娠中の感染性または非感染性の母体免疫活性化(MIA)は、ケミカルメディエーターを誘導することにより、胎児の中枢神経系の構造と機能に急性及び慢性の変化をもたらし、ASDや統合失調症の危険因子とされている[Estes and McAllister, 2016]。MIAは炎症性サイトカインによる細胞内シグナル伝達経路などを介した直接的な作用、あるいはミクログリアなどの機能を間接的に調節することにより、正常な神経発達のプログラミングを乱し、神経発達を制御する分子機構に障害を与え、長期的あるいは不可逆的な機能変化を引き起こすと考えられている[Smolders et al., 2018]。炎症及び酸化ストレス誘導物質であるLPSの妊娠ラットへの投与は、児動物にMIAに起因した神経行動障害を誘導することから、ASDや統合失調症のモデルとして用いられている[Wu et al., 2021; Yan et al., 2022; Yeh et al., 2014]。文脈的記憶に関する障害はASDや統合失調症患者に共通する症状として認識されているが[Banker et al.,

2021; Guo et al., 2019], LPS 誘発 MIA モデルにおける文脈的記憶形成への影響を検討した報告はない。また, 発達期のげっ歯類への LPS 曝露は海馬の成体神経新生を障害するが, ほとんどの研究は海馬歯状回の神経新生の活性や動態に焦点を当てるのみであり, 標的とする細胞群と障害の不可逆性の有無についての研究は殆どない [Cui et al., 2009; Domínguez-Rivas et al., 2022; Pang et al., 2016]。

したがって本章では, LPS 誘発 MIA モデルを用いて, MIA による海馬神経新生障害の標的性や MIA が文脈的記憶の形成に与える影響, さらには児動物における他の神経行動エンドポイントについて調査した。また, MIA による神経炎症と酸化ストレスが脳障害に主要な役割を果たすことを検証するために, MIA に対する AGIQ の修飾効果について検討した。LPS は妊娠中期の母ラットに投与し, AGIQ は LPS 投与前の妊娠初期から授乳期終了まで継続して母動物に投与した。また, LPS 誘発 MIA は脳の長期的あるいは不可逆的な機能変化を引き起こすため, 離乳時以降から成体期まで児動物にも継続投与した。社会性や学習能力, 脳内神経炎症と酸化ストレスの各指標, 海馬の神経新生にかかわる各指標, 新生顆粒細胞のシナプス可塑性に関して, 児動物の胎生期免疫活性化による影響と AGIQ 継続投与による化学予防効果に関して時間依存的に検討した。

## 材料及び方法

### 被験物質及び動物

フェノール抽出により精製した大腸菌 O11:B4 由来 LPS (EC No.297-473-0; 純度: 97%)は Sigma-Aldrich Co. LLC. (St. Louis, MO, USA) から購入した。AGIQ (純度: > 97%) は三栄源エフ・エフ・アイ株式会社 (大阪, 日本) から提供された。交尾確認済み雌 Slc:SD ラットを妊娠 1 日目で日本エスエルシー株式会社 (浜松, 日本) より購入した。妊娠ラットを入荷時から分娩後 21 日目まで温度  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 相対湿度  $55 \pm 15\%$ , 照明条件 12 時間の明暗サイクルで, ポリカーボネート製ケージに紙製床敷を入れ, 個別飼育した。AGIQ 投与開始までは妊娠ラットに粉末基礎飼料 (CRF-1; オリエンタル酵母工業株式会社, 東京, 日本) を自由に摂取させ, 実験を通じて水道水を自由に摂取させた。出生後 21 日目の離乳以降, 児動物は 1 ケージあたり 2 ~3 匹で飼育し, AGIQ 添加または無添加の粉末基礎飼料と水道水を自由に摂取させた。

### 実験デザイン

交配済み雌ラットを, 1 群 16~17 匹の 3 群 (対照群, LPS 単独群, LPS + AGIQ 群) に無作為に割り付けた (Fig. 2-1)。LPS 誘発 MIA モデルラットの先行研究 [Cui et al., 2009] に基づき, LPS を妊娠 15 日目及び妊娠 16 日目の母動物に  $100 \mu\text{g}/\text{kg}$  体重/回, 腹腔内投与する予備実験を実施した。結果, ほとんどの母動物で死産が確認された。したがって本実験では, LPS を妊娠 15 日目及び妊娠 16 日目の母動物に  $50 \mu\text{g}/\text{kg}$  体重/回, 腹腔内投与した。この投与量は, 春機発動期

の雄児動物に ASD 様行動が発現した先行研究 [Foley et al., 2015] に基づき設定した。AGIQ 投与群には AGIQ 0.5% (w/w) を混合した粉末基礎飼料を妊娠 10 日目から投与し, 分娩後 21 日まで継続的に混餌投与した。さらに生後 21 日目 (離乳後) から生後 77 日目までの児動物にも同用量で混餌投与した。AGIQ の用量は胚・胎児期から成体期までの連続曝露により新生児期 LPS 投与誘発性の神経行動障害及び海馬神経新生障害に対する化学予防効果を示した第 1 章の実験結果に基づき決定した。神経新生は発情周期中のステロイドホルモンの循環レベルに影響されるため [Pawluski et al., 2009], 本実験では全ての解析に雄児動物を用いた。生後 4 日目に児動物を無作為に淘汰し, 各母動物に 2~8 匹の雄児動物を割り当てた。また母動物あたりの児動物数を合計 8 匹に揃えるため, 雄児動物数が 8 匹に満たない場合は雌児動物を割り当てた。雄児動物について, 生後 21 日目までは 3~5 日ごとに体重を測定し, 生後 77 日目までは週 1 回, 体重, 摂餌量, 摂水量を測定した。生後 6 日目に各群 23~30 匹の雄児動物を CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 処置下で腹大動脈切断により放血安楽死させた。酸化ストレスレベル測定のため, 各群 7~9 匹の雄児動物 (母動物 1 匹につき 1 匹) から脳を採取した。大脳半球組織を摘出後, 直ちに液体窒素にて凍結し, 解析まで -80°C 下で保存した。免疫組織化学的解析のため, 各群 10~13 匹の雄児動物 (母動物 1 匹につき 1 匹) について, 頭蓋骨ごと脳を採取した。さらに脳をメタカーン溶液で 5 時間固定後, 100%エタノールで置換した。mRNA 発現解析のため, 各群 6~8 匹の雄児動物 (母動物 1 匹につき 1 匹) について脳を採取し, 重量測定後メタカーン液を用いて全脳固定法に従って固定した [Akane et al., 2013]。生後 21 日目に, 脳内酸化ストレスレベルの測定のため, 各群 7~9 匹の雄児動物 (母動物 1 匹につき 1 匹) について, CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 処置下で氷冷生

理食塩水 [0.9% (w/v) 塩化ナトリウム] を用いて経心灌流 (流速 10mL/min) 後, 脳を摘出した。

氷上で海馬組織を摘出し, 直ちに液体窒素にて凍結し, 解析まで-80°C 下で保存した。免疫組織化学的解析のため, 各群 10~12 匹の雄児動物 (母動物 1 匹につき 1 匹) について, CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 処置下で 4% (w/v) paraformaldehyde (PFA)/0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を用いて経心灌流固定 (流速 10mL/min) 後, 頭蓋骨ごと脳を採取した。mRNA 発現解析のため, 各群 6~9 匹の雄児動物 (母動物 1 匹につき 1 匹) を CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 処置下で腹大動脈切断により放血安楽死させ, 脳を採取し, 重量測定後メタカーン液を用いて全脳固定法に従って固定した。春機発動期 (生後 38~45 日目) 及び成体期 (生後 70~77 日目) に, 各群 10 匹の雄児動物について行動試験を実施した。なお, 春機発動期と成体期で異なる動物を用いて行動試験を行った。生後 77 日目に, 成体期の行動試験を実施していない各群 10~12 匹の雄児動物について CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 処置下で 4% (w/v) PFA/0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を用いて経心灌流固定 (流速 35mL/min) 後, 頭蓋骨ごと脳を採取し, 神経新生及びグリア細胞に関する免疫組織化学的解析に供した。また, 成体期に行動試験を行った全ての動物について, 同様に灌流固定後, 脳を採取し, シナプス可塑性に関する免疫組織化学的解析に供した。mRNA 発現解析のため, 生後 21 日目と同様の方法で各群 7~10 匹の雄児動物を安楽死させ脳を採取した。

本研究における全ての動物実験は National Institutes of Health guide for the care and use of laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) に従い実施し, 動物の苦痛を最小限にするための方策に努めた。実験方法は東京農工大学動物実験委員会の承認を得た (承認番号: 主実験 R02-61, 予備実験 31-76)。



## 行動試験

全ての行動試験は動物飼育室に隣接した行動実験室にて実施した。各行動試験において、各動物の試験前後に毎回 70%エタノール溶液で解析器具を清拭した。各動物の試験終了後、動物を速やかに飼育ケージに戻し動物飼育室に移動させた。実験は全て 08:00 から 19:00 の間に行い、各群における試験動物の選択順序は概日性ホルモンの変動などによる偏りがないように選択した。

## 超音波発声試験

超音波発声試験は母子間コミュニケーションに関連するパラメータを評価するために生後 10 日目の雄児動物について実施した。試験はポリカーボネート製の観察ケージ (幅 172 mm × 奥行き 240 mm × 高さ 129 mm) を輝度 50 Lux, ホワイトノイズ 50 dB に維持した防音箱 (CL-4211; 小原医科産業株式会社, 東京, 日本) に設置した実験装置内で実施された。被験動物の超音波発声を収集するため、プリアンプ内蔵マイクロホン (4158 HN; 小原医科産業株式会社) を観察ケージ中央に、集音部の先端が被験動物の真上に来るように、また、被験動物が集音部の先端に触れないように設置した。被験動物を飼育ケージから観察ケージに移し、インタフェース (USV-1010AF; 小原医科産業株式会社) 及びレコーディングソフトウェア (URS-9100; 小原医科産業株式会社) を用いて 5~95 kHz の超音波発声を 1 匹あたり 5 分間記録した。児ラットが母ラットから分離され社会的に孤立した際に 40 kHz の超音波発声をすることから [Wöhr

and Schwarting, 2008], 超音波解析ソフト (UWA-9100; 小原医科産業株式会社) を用いて 38~42 kHz の超音波発声を抽出し各パラメータ (発声数, 発声ごとの平均・最大継続時間) を算出した。

### オープンフィールド試験

生後 38 日目 (春機発動期) 及び生後 70 日目 (成体期) にオープンフィールド試験を行い, 自発運動及び不安様行動に関するパラメータを評価するとともに翌日の社会的相互作用試験で使用する同実験箱に馴化させた (Fig. 1-2)。実験箱は, 正方形の, 表面が黒色ポリビニルで加工されたステンレス製トレイと, トレイを囲む表面が黒色ポリビニルで加工されたステンレス製の壁 (幅 172 mm × 奥行き 240 mm × 高さ 129 mm, 小原医科産業株式会社) から構成され, 床面照度は中央で 20 Lux に維持された。動物は実験開始の 1~1.5 時間前に動物飼育室から行動実験室に移動し行動実験室に慣らした。被験動物は実験箱の隅に, 壁側に頭を向けて配置後, 10 分間自由に探索させた。動物の行動は行動実験室の天井に設置した CCD カメラ (WAT-902B; ワテック株式会社, 鶴岡, 日本) を用いて記録し, ビデオ画像解析装置 (TimeOFCR1 ソフトウェア; 小原医科産業株式会社) を用いて動物の総移動距離及びフィールドの中心領域及び周辺領域の滞在時間を記録した。ビデオ追跡解析では実験箱内のフィールドを 25 の正方形領域に等分し, 中央の 9 領域を中心領域と定義し, 中心領域または壁側に滞在した時間の割合を算出した。

## 社会的相互作用試験

生後 39 日目と生後 40 日目 (春機発動期) 及び生後 71 日目と生後 72 日目 (成体期) に社会的相互作用試験を行い, 新奇動物に対する認知能力, 社会性を評価した。試験はセッション 1 (生後 39 日目, 生後 71 日目) とセッション 2 (生後 40 日目, 生後 72 日目) に分けて実施した。床面照度はアリーナ中央で 20 Lux に維持した。被験動物は実験開始の 1~1.5 時間前に動物飼育室から行動実験室に移動させ行動実験室に慣らした。セッション 1 では, オープンフィールド試験で用いたものと同じ実験箱の隅にメッシュケージ (幅 200 mm × 奥行き 150 mm × 高さ 300 mm, SI-MBR; 小原医科産業株式会社) を, 新奇動物を入れない状態で設置した。被験動物をメッシュケージの正反対側の壁に頭を向けて配置後, 5 分間自由に探索させた。動物の行動を行動実験室の天井に設置した CCD カメラ (WAT-902B; ワテック株式会社) を用いて記録し, 自動ビデオ追跡システム (TimeSSI ソフトウェア; 小原医科産業株式会社) を用いて解析した。ビデオ追跡解析ではメッシュケージ周辺を「接触領域」「ケージ周囲内域」「ケージ周囲外域」に分割し, 社会的相互作用パラメータ (メッシュケージ周辺の移動距離, 接触領域への接触回数, メッシュケージ周辺の滞在時間) を算出した。セッション 2 では, メッシュケージ内に新奇動物を配置し, 被験動物を 3 分間自由に探索させ, セッション 1 と同様の解析を行った。新奇動物は被験動物とは異なるケージで飼育されている対照群の動物から平均的な体重の 4 匹を選び, 順番に各試験に使用した。

## 文脈的恐怖条件付け試験

生後 41～45 日目 (春機発動期) 及び生後 73～77 日目 (成体期) に, 恐怖条件付け試行, 恐怖記憶獲得試行, 恐怖記憶消去試行#1, #2, #3 の順に 24 時間間隔で 5 日間連続して文脈的恐怖条件付け試験を実施し, 文脈的な記憶・学習能力を評価した (Fig. 1-2)。試験は, 防音箱 (CL-4211; 小原医科産業株式会社) 内に設置したアクリル製の実験箱 (幅 300 mm × 奥行き 370 mm × 高さ 250 mm, CL-3001; 小原医科産業株式会社) 内で行った。実験箱内は 50 dB のホワイトノイズ, 50 Lux の輝度で維持した。動物は実験開始の 1～1.5 時間前に動物室から行動実験室に移動させて行動実験室に慣らした。恐怖条件付け試行では, 動物を飼育ケージから実験箱に移し, 非条件刺激として, 床面の 21 本の鉄棒からショックジェネレータ (SGA-2020; 小原医科産業株式会社) によるスクランブル電流を流した。実験開始から 88, 148, 238 秒後に 2 秒間のフットショック (強度 0.3 mA, 計 3 回) を与え, 最終フットショックから 60 秒後に動物を観察ケージから取り出し, 飼育ケージに戻した。したがって試行時間は 5 分間であった。恐怖記憶の獲得と消去試行では被験動物を恐怖条件付け試行と同様の文脈に戻してフットショック無しで 5 分間行動を観察した。成体期の恐怖条件付け試験では, 各被験動物を 3 回目の恐怖記憶消去試行が終了した 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について免疫組織化学的解析を行い, 行動刺激に対するシナプス可塑性の最大誘導 [Masubuchi et al., 2020] を調べた。動物の行動は防音箱の天井に設置した CCD カメラ (WAT-902B; ワテック株式会社) を用いて記録し, ビデオ追跡解析装置 (TimeFZ4 ソフトウェア; 小原医科産業株式会社) を用いて解析した。試行時間 5 分のうち, ラットが 2 秒以上フリージング行動をとっていた時間の割合をフリージング率とした。

## 脳内酸化ストレスマーカーの定量解析

脳内酸化ストレスは脂質過酸化とグルタチオンを指標とした。

Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit (Abcam plc, Cambridge, UK) を用いて脳組織中のチオバルビツール酸反応物質の蓄積量を測定し、マロンジアルデヒド (MDA) 含量を算出した。脳組織サンプル (各群 7 匹, 生後 6 日目の大脳半球組織と生後 21 日目の海馬組織) を, ジブチルヒドロキシトルエンを含む溶解緩衝液でホモジナイズした。このホモジネートをチオバルビツール酸と 95°C で 60 分間反応させた。その後 MDA-チオバルビツール酸付加体を n-ブタノールで抽出し, その濃度についてマイクロプレートリーダーを用いて 532 nm で算出した。さらに, 各ホモジネート中のタンパク質濃度を Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて測定し, MDA の濃度 (nmol/mg tissue protein) を定量化した。

脳組織中のグルタチオンジスルフィド (GSSG) 及び還元型グルタチオン (GSH) 濃度は, GSSG/GSH 定量キット (同仁堂研究所, 熊本, 日本) を用いて測定した。脳組織サンプル (各群 7 匹, 生後 6 日目の大脳半球組織と生後 21 日目の海馬組織) を 5% 5-スルホサリチル酸水溶液でホモジナイズした。希釈したホモジネートの上清における GSSG/GSH レベルを, 製造元のプロトコルに従ってマイクロプレートリーダーを用いて 405 nm で算出した。総グルタチオン (GSH + GSSG) 濃度及び GSSG 濃度 ( $\mu\text{mol/L}$ ) は総 GSH 及び GSSG の標準曲線を用いて算出した。この 2 つの濃度から GSH 濃度 ( $\mu\text{mol/L}$ ) を算出した。そして GSSG 濃度と GSH 濃度の

比を求めた。

## 免疫組織化学的解析及びアポトーシス細胞の検出

生後 6 日目に採取したメタカーン固定脳は翌日に頭蓋から摘出し, 100%エタノールにて一晩固定した。生後 21 日目と生後 77 日目に採取した灌流固定脳は翌日に頭蓋から摘出し, 4% PFA 緩衝液にて一晩固定した。その後, 生後 6 日目に採取したメタカーン固定脳は海馬体を含むように視交叉の位置で 4 mm 厚の冠状断面スライスを作製し, 生後 21 日目と生後 77 日目に採取した 4% PFA 緩衝液灌流固定脳は bregma の後方約 2.2 mm の位置で 3 mm 厚の冠状断面スライスを作製した。各スライスは 4°C で一晩同様の固定液 (エタノールないし PFA 緩衝液) で固定後, 標準プロトコルに従ってパラフィン包埋した後, 3 μm 厚の連続切片を作製した。

免疫組織化学的解析は以下に示す一次抗体を用いて行った (Table 2-1)。顆粒細胞系譜のうち, SGZ に分布する type-1 神経幹細胞 (放射状グリア細胞) とアストロサイトの指標である glial fibrillary acidic protein (GFAP) [Shibutani, 2015], SGZ に分布する type-1 神経幹細胞と type-2a 神経前駆細胞の指標である SRY-box transcription factor 2 (SOX2) [Shibutani, 2015], SGZ に分布する type-2b 神経前駆細胞の指標である T-box brain protein 2 (TBR2) [Shibutani, 2015], SGZ 及び GCL に分布する type-2b, type-3 神経前駆細胞及び未熟顆粒細胞の指標である doublecortin (DCX), 主に SGZ と GCL の内側に分布する未熟顆粒細胞の指標である tubulin, beta 3 class III (TUBB3) [von, 2007], SGZ と GCL に分布する未熟及び成熟顆粒細胞の指標である neuronal nuclei (NeuN) [Shibutani, 2015]; GABA 性介在ニューロンの指標である calbindin-D-28K (CALB1),

calbindin-D-29K (CALB2), glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67), parvalbumin (PVALB), reelin (RELN), somatostatin (SST) [Freund and Buzsáki, 1996; Gong et al., 2007]; グリア指標のうち, 脳内ミクログリアの指標である ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) [Iosif et al., 2006], M1 および M2 ミクログリアに共通する指標である cluster of differentiation (CD) 68 [Jurga et al., 2020], M2 ミクログリアの指標である CD163 [Jurga et al., 2020]; 細胞増殖活性の指標である proliferating cell nuclear antigen (PCNA); シナプス可塑性に関与する最初期遺伝子関連タンパク質である Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit (FOS), activity-regulated cytoskeleton-associated protein (ARC), cyclooxygenase-2 (COX2), リン酸化により活性化し *Arc* や *Fos* の転写誘導に機能し, シナプス可塑性に関与する phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 (p-ERK1/2) [Brami-Cherrier et al., 2009; Miyashita et al., 2008; Tzingounis and Nicoll, 2006]。免疫組織化学的染色には Avidin-Biotin Complex 法を用いた。内因性ペルオキシダーゼの不活化には, 0.3% (v/v) 過酸化水素水を含むメタノール溶液を用い室温にて 30 分処理した。Table 2-1 に示した条件で一次抗体の抗原賦活化を行い, 切片と一次抗体を 4°C で一晩反応させた。シグナル検出は Vectastain® Elite ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用い, 3,3'-diaminobenzidine/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で発色し, 対比染色にはヘマトキシリンを用いた。動物 1 匹につき 1 切片を各抗体の免疫組織化学的解析に供した。SGZ と GCL におけるアポトーシス細胞の検出のため, *In Situ* Apoptosis Detection Kit (タカラバイオ, 群馬, 日本) を用い, 製造元のプロトコルに従って Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay を実施した。動物 1 匹につき 1 切片を TUNEL assay に供した。

## 免疫組織化学染色陽性細胞と TUNEL 陽性アポトーシスの定量解析

生後 6 日目の組織サンプルについて、各グリア細胞 (Iba1 細胞, CD68 陽性細胞, CD163 陽性細胞, GFAP 陽性細胞) を両側でカウントし、海馬体の全領域の面積で正規化した (Fig. 1-3)。

生後 21 日目と生後 77 日目の組織サンプルについて、海馬歯状回の SGZ に分布する顆粒細胞系譜の GFAP 陽性細胞, SOX2 陽性細胞, TBR2 陽性細胞, PCNA 陽性増殖細胞は両側でカウントし、SGZ の長さで正規化した (Fig. 1-3)。SGZ と GCL に分布する顆粒細胞系譜の DCX 陽性細胞, TUBB3 陽性細胞, NeuN 陽性細胞; GCL に分布するシナプス可塑性関連の ARC 陽性顆粒細胞, COX2 陽性顆粒細胞, FOS 陽性顆粒細胞, p-ERK1/2 陽性顆粒細胞は両側でカウントし、SGZ の長さで正規化した。TUNEL 陽性アポトーシス細胞は、SGZ と GCL においてそれぞれカウントし、SGZ の長さで正規化した。海馬歯状回門に分布する GABA 性介在ニューロンの細胞群 (CALB1 陽性細胞, CALB2 陽性細胞, GAD67 陽性細胞, PVALB 陽性細胞, RELN 陽性細胞, SST 陽性細胞) は両側でカウントし、海馬歯状回門の面積で正規化した。その際、海馬歯状回門における CA3 領域の大型錐体ニューロンはカウントから除外した。歯状回門に分布するグリア細胞群 (Iba1 陽性細胞, CD68 陽性細胞, CD163 陽性細胞, GFAP 陽性細胞) も同様にカウントし、正規化した。NeuN 陽性細胞を除き、各抗体の陽性細胞は BX51 顕微鏡 (オリンパス株式会社, 東京, 日本) 下で、処理条件を盲検化しカウントした。NeuN 陽性細胞については DP26 Digital Camera System (オリンパス株式会社) を取り付けた BX51 顕微鏡で 100 倍の倍率のデジタル顕微鏡写真を撮影し、WinROOF 画像解析ソフト (version 5.7; 三谷商事株式会社, 福井, 日



本) を用いて自動でカウントした。SGZ の長さ及び海馬体と歯状回門の面積は BX51 顕微鏡でデジタル顕微鏡写真を撮影し, cellSens (version 1.9 ; オリンパス株式会社) を用いて測定した。

## 遺伝子発現解析

生後 6 日目, 生後 21 日目, 生後 77 日目の海馬歯状回サンプルにおける転写産物レベルをリアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) を用いて解析した。生後 6 日目のメタカーン固定脳について, 視交叉の位置で 2 mm 厚の冠状断面スライスを作製し, 孔径 1 mm の生検パンチ (貝印株式会社, 岐阜, 日本) を用いて海馬歯状回組織を採取した。生後 21 日目及び生後 77 日目のメタカーン固定脳について, bregma の後方約 3.0 mm の位置で 2 mm 厚の冠状断面スライスを作製し, 生検パンチを用いて歯状回組織を採取した。各歯状回サンプルについて, RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて製造元のプロトコルにしたがって total RNA を抽出した。次いで, 1 µg の total RNA より SuperScript® III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) を用いて cDNA を合成した。リアルタイム RT-PCR の標的遺伝子と各遺伝子のプライマー配列を Table 2-2 に示した。Il6 を除く遺伝子のプライマー配列は, Primer Express™ Software (Version 3.0; Thermo Fisher Scientific) または Primer-BLAST (NCBI, <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既報で使用されたものを参考に設計した [Ghowasi et al., 2018]。リアルタイム RT-PCR は SYBR®Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) 及び Step One Plus™ Real-time PCR

System (Thermo Fisher Scientific) を用いて製造元のプロトコルに従って実施した。各遺伝子の転写産物レベルは目的の遺伝子の  $C_T$  値及び内因性コントロールである hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*Hprt1*) ないしは glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) の  $C_T$  値を用いて  $\Delta\Delta C_T$  法により算出した [Livak and Schmittgen, 2001]。

### 統計解析

数値データは平均値±SD で示した。対照群と LPS 単独群間, LPS 単独群と LPS + AGIQ 群間の比較では Levene の検定により等分散性を評価した。等分散の場合は Student の *t*-test を, 不等分散の場合は Aspin-Welch の *t*-test を用いた。全ての解析は IBM SPSS Statistics ver. 25 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) を用いて行い, それぞれの有意水準は  $P < 0.05$  とした。

## 結果

### 母動物パラメータの変化

対照群, LPS 単独群及び LPS + AGIQ 群においてそれぞれ 1 匹ずつ不妊動物が確認されたためこれらの動物は解析から除外した。一般状態の観察では歩行や行動には異常は認められなかった。繁殖パラメータについて, 着床痕数, 産児数, 児動物の雌雄比は対照群と LPS 単独群間, LPS 単独群と LPS + AGIQ 群間で有意な差はみられなかった (Table 2-3)。妊娠期間中及び授乳期間中の母動物の体重と摂水量は, 対照群と LPS 単独群間, LPS 単独群と LPS + AGIQ 群間で有意な差はみられなかった (Table 2-4)。摂餌量について, LPS 単独群で妊娠 16 日目及び 17 日目 (1 回目 LPS 投与の 1 日後及び 2 日後) に対照群と比較して有意に減少したが, LPS 単独群と LPS + AGIQ 群間で有意な差はみられなかった。

### 児動物の実験期間中および解剖時パラメータの変化

実験期間中, 雄児動物の体重, 摂餌量, 摂水量は, 対照群と LPS 単独群間, LPS 単独群と LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった (Table 2-5)。

生後 6 日目, 生後 21 日目, 生後 77 日目の剖検時の体重, 脳重量は対照群と LPS 単独群間, LPS 単独群と LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった (Table 2-6)。

### 行動試験結果

## 超音波発声試験

総発声回数, 1回の発声あたりの最大継続時間, 1回の発声あたりの平均継続時間は, 対照群と LPS 単独群間, LPS 単独群と LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった (Table 2-7)。

## オープンフィールド試験

春機発動期において, 運動量及び不安に関連するパラメータに対照群と LPS 単独群間, LPS 単独群と LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった (Fig. 2-2, Table 2-8)。

成体期において, 総移動距離, 総移動時間, 平均移動速度, 1回あたりの移動距離, 1回あたり移動時間は, LPS 単独群で対照群と比較して有意に減少した。LPS + AGIQ 群では総移動距離, 総移動時間, 平均移動速度, 1回あたり移動時間が LPS 単独群と比較して有意に増加し, 1回あたりの移動距離は差がなかった。壁側ないしは中央部での滞在時間, 中央部での滞在率について, 対照群と LPS 単独群間, LPS 単独群と LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった。

## 社会的相互作用試験

春機発動期, 成体期において, セッション 1 とセッション 2 のいずれのパラメータに対照群と LPS 単独群間, LPS 単独群と LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった (Table 2-9)。

## 文脈的恐怖条件付け試験

春機発動期において、全試行のフリージング率と恐怖記憶獲得試行のフリージング率に対する恐怖記憶消去試行の相対フリージング率は対照群と LPS 単独群間、LPS 単独群と LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった (Fig. 2-2, Table 2-10)。

成体期において、恐怖記憶獲得試行のフリージング率は LPS 単独群で対照群と比較して有意に減少し、恐怖記憶消去試行 1 回目のフリージング率は有意に増加した。また、恐怖記憶獲得試行のフリージング率に対する全ての恐怖記憶消去試行の相対フリージング率は、LPS 単独群で対照群と比較して有意に増加した。LPS + AGIQ 群では恐怖記憶獲得試行のフリージング率が LPS 単独群と比較して有意に増加した。また、恐怖記憶獲得試行のフリージング率に対する全ての恐怖記憶消去試行の相対フリージング率は、LPS 単独群と比較して有意に減少した。

**脳内酸化ストレスマーカーの定量解析** 生後 6 日目の大脳及び生後 21 日目の海馬における MDA 量と GSSG/GSH 比は、対照群と LPS 単独群間、LPS 単独群と LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった (Table 2-11)。

## 免疫組織化学的解析

### 海馬におけるグリア細胞数

生後 6 日目において, Iba1 陽性ミクログリア/マクロファージ, CD68 陽性ミクログリア/マクロファージ, CD163 陽性ミクログリア/マクロファージ, GFAP 陽性アストロサイトの数は, 対照群と LPS 単独群間, LPS 単独群と LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった (Fig. 2-3, Table 2-12)。

生後 21 日目及び生後 77 日目において, Iba1 陽性ミクログリア/マクロファージと GFAP 陽性アストロサイトの数は, 対照群と LPS 単独群間, LPS 単独群と LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった。

#### **SGZ 及び GCL における顆粒細胞系譜の細胞数**

生後 21 日目において, TBR2 陽性細胞の数は LPS 単独群で対照群と比較して有意に減少し, LPS + AGIQ で LPS 単独群と比較して有意に増加した (Fig. 2-4, Table 2-13)。GFAP 陽性細胞, SOX2 陽性細胞, DCX 陽性細胞, TUBB3 陽性細胞, NeuN 陽性細胞の数については, 対照群と LPS 単独群間, LPS 単独群と LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった。

生後 77 日目において, GFAP 陽性細胞と SOX2 陽性細胞の数は, LPS 単独群で対照群と比較して有意に減少し, LPS + AGIQ 群で SOX2 陽性細胞の数が LPS 単独群と比較して有意に増加した (Fig. 2-4, Table 2-14)。TBR2 陽性細胞, DCX 陽性細胞, TUBB3 陽性細胞, NeuN 陽性細胞の数については, 対照群と LPS 単独群間, LPS 単独群と LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった。

## SGZ 及び GCL における細胞増殖活性及びアポトーシス細胞数

生後 21 日目において、PCNA 陽性細胞の数は LPS 単独群で対照群と比較して有意に減少した (Fig. 2-5, Table 2-13)。SGZ 及び GCL における TUNEL 陽性細胞の数は、対照群と LPS 単独群間、LPS 単独群と LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった。

生後 77 日目において、SGZ における PCNA 陽性細胞と TUNEL 陽性細胞の数は、対照群と LPS 単独群間、LPS 単独群と LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった (Fig. 2-5, Table 2-14)。GCL における TUNEL 陽性細胞は検出されなかった。

## 歯状回門における介在ニューロンの分布

生後 21 日目において、GAD67 陽性細胞の数は LPS 単独群で対照群と比較して有意に減少したが、LPS + AGIQ 群では LPS 単独群と比較して有意な差はみられなかった (Fig. 2-6, Table. 2-13)。CALB1 陽性細胞、CALB2 陽性細胞、PVALB 陽性細胞、RELN 陽性細胞、SST 陽性細胞の数は、対照群と LPS 単独群間、LPS 単独群と LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった。

生後 77 日目において、GAD67 陽性細胞の数は LPS 単独群で対照群と比較して有意に減少し、LPS + AGIQ 群で LPS 単独群と比較して有意に増加した (Fig. 2-6, Table. 2-14)。CALB1 陽性細胞、CALB2 陽性細胞、PVALB 陽性細胞、RELN 陽性細胞、SST 陽性細胞の数は、対照群と LPS 単独群間、LPS 単独群と LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった。

## GCLにおけるシナプス可塑性関連分子陽性細胞数

生後 21 日目において, FOS 陽性細胞の数は LPS 単独群で対照群と比較して有意に減少し, LPS + AGIQ 群で LPS 単独群と比較して有意に増加した (Fig. 2-7, Table. 2-13)。ARC 陽性細胞, COX2 陽性細胞, p-ERK1/2 細胞の数は, 対照群と LPS 単独群間, LPS 単独群と LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった。

生後 77 日目において, ARC 陽性細胞, FOS 陽性細胞, COX2 陽性細胞, p-ERK1/2 陽性細胞の数は, 対照群と LPS 単独群間, LPS 単独群と LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった (Table. 2-14)。

## 海馬歯状回における遺伝子発現解析

### 炎症及び酸化ストレス関連遺伝子

生後 6 日目において, ケミカルメディエーター及びその関連分子をコードする *Il1a*, *Il1b*, *Il6*, *Il18*, *Nfkb1*, *Tgfb1*, *Tnf* の転写産物レベルは, 対照群と LPS 単独群間, LPS 単独群と LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった (Table 2-15)。酸化ストレス関連遺伝子のうち *Gpx1* の転写産物レベルは, LPS 単独群で対照群と比較して有意に減少した。LPS + AGIQ 群において, *Mt1* の転写産物レベルは LPS 単独群と比較して有意に減少し, *Sod1* の転写産物レベルは LPS 単独群と比較して有意に増加した。*Cat* と *Keap1* の転写産物レベルは対照群と LPS 単独群間, LPS 単独群と LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった

生後 21 日において, *Sod1* の転写産物レベルは LPS 単独群で対照群と比較して有意に減少し



た (Table 2-15)。その他のケミカルメディエーターとその関連分子をコードする遺伝子並びに酸化ストレス関連遺伝子については、対照群と LPS 単独群間、LPS 単独群と各 AGIQ 投与群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった。

### 神経新生関連遺伝子

生後 21 日目において、顆粒細胞系譜マーカー遺伝子のうち *Nes* の転写産物レベルは LPS 単独群で対照群と比較して有意に増加し、*Eomes* の転写産物レベルは有意に減少した (Table 2-15)。*Sox2*, *Dcx*, *Dpysl3*, *Tubb3*, *Rbfox3* の転写産物レベルについては対照群と LPS 単独群間、LPS 単独群と各 AGIQ 投与群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった。細胞増殖マーカー遺伝子である *Pcna* の転写産物レベルは、LPS 単独群で対照群と比較して有意に減少した。細胞周期関連遺伝子のうち *Chek1* の転写産物レベルは、LPS 単独群で対照群と比較して有意に増加した。他の細胞周期関連遺伝子 (*Cdk1*, *Cdk2*) の転写産物レベルは、対照群と LPS 単独群間、LPS 単独群と各 AGIQ 投与群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった。GABA 性介在ニューロンマーカー遺伝子 (*Calb1*, *Calb2*, *Pvalb*, *Reln*)、コリン作動性受容体遺伝子 (*Chrm1*, *Chrna7*)、ドーパミン作動性受容体遺伝子 (*Drd2*)、グルタミン酸受容体及びグルタミン酸輸送体をコードする遺伝子 (*Grial*, *Gria2*, *Grin2a*) の転写産物レベルは、対照群と LPS 単独群間、LPS 単独群と各 AGIQ 投与群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった。GABA 性介在ニューロンマーカー遺伝子の *Sst* の転写産物レベルは対照群と LPS 単独群間で有意な差はみられなかったが、LPS + AGIQ 群で LPS 単独群と比較して有意に増加した。シナプス可塑性関連

遺伝子のうち *Fos* の転写産物レベルは、LPS 単独群で対照群と比較して有意に減少した。*Arc*, *Mapk1*, *Mapk3* の転写産物レベルは、対照群と LPS 単独群間、LPS 単独群と各 AGIQ 投与群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった。神経栄養因子関連遺伝子 (*Bdnf*, *Ntrk2*) の転写産物レベルは、対照群と LPS 単独群間、LPS 単独群と各 AGIQ 投与群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった。

生後 77 日目において、顆粒細胞系譜マーカー遺伝子のうち *Nes*, *Sox2*, *Dpysl3* の転写産物レベルは、LPS 単独群で対照群と比較して有意に減少した (Table 2-17)。*Eomes*, *Dcx*, *Tubb3*, *Rbfox3* の転写産物レベルは、対照群と LPS 単独群間、LPS 単独群と各 AGIQ 投与群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった。GABA 性介在ニューロンマーカー遺伝子のうち *Sst* の転写産物レベルは、LPS 単独群で対照群と比較して有意に減少した。*Calb1*, *Calb2*, *Pvalb*, *Reln* の転写産物レベルは、対照群と LPS 単独群間、LPS 単独群と各 AGIQ 投与群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった。コリン作動性受容体遺伝子 (*Chrm1*, *Chrna7*) とドーパミン作動性受容体遺伝子 (*Drd2*) の転写産物レベルは、対照群と LPS 単独群間、LPS 単独群と各 AGIQ 投与群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった。グルタミン酸受容体遺伝子のうち *Grin2a* 及び *Grin2b* の転写産物レベルは、LPS 単独群で対照群と比較して有意に減少したが、*Gria1* の転写産物レベルに差はみられなかった。シナプス可塑性関連遺伝子のうち *Fos*, *Mapk1*, *Mapk3* の転写産物レベルは、LPS 単独群で対照群と比較して有意に減少したが、*Arc* と *Ptgs2* の転写産物レベルに有意な差はみられなかった。神経栄養因子関連遺伝子のうち *Bdnf* と *Ntrk2* の転写産物レベルは、LPS 単独群で対照群と比較して有意に減少した。LPS + AGIQ

群において、顆粒細胞系譜マーカー遺伝子のうち *Nes* と *Sox2* の転写産物レベルが LPS 単独群と比較して有意に増加した。シナプス可塑性関連遺伝子のうち *Fos* の転写産物レベルが LPS 単独群と比較して有意に増加した。その他の遺伝子については LPS 単独群と比較して有意な差はみられなかった。

## 考察

本実験の妊娠中期 (50 µg/kg, 2回) の LPS 投与により, 生後 6 日目における海馬の炎症性グリアの細胞数 (Iba1, CD68, CD163 陽性ミクログリア/マクロファージ及び GFAP 陽性アストロサイト) 及び海馬歯状回の炎症/抗炎症サイトカイン遺伝子の転写産物レベルに変化はみられなかった。また, 生後 21 日目及び生後 77 日目のいずれにおいても, Iba1 陽性ミクログリア/マクロファージ及び GFAP 陽性アストロサイトの数に変化はみられなかった。一般に, LPS は血液・脳関門を通過せず, 母親由来の LPS は胚や胎児に移行しないこと, 並びに, 妊娠中の LPS 曝露は母体の免疫系を活性化させることで, 母体と胎児の両方で炎症/抗炎症サイトカインの合成を促進させることが知られている [Firmal et al., 2021]。また, 母体由来の IL-6 は胎児及び出生後の脳の発達に影響を及ぼす可能性が示唆されている [Mouihate, 2016]。文献上, 胎生期に免疫活性化を受けた発達期児動物における活性化ミクログリアの誘導に関しては矛盾したデータが報告されており, これは LPS の投与方法・計画や投与量の違いに起因していると考えられる。例えば, 高用量 LPS の反復投与 (500 µg/kg を妊娠 14 日目から妊娠 20 日目まで隔日で 4 回皮下投与) により, 児動物の海馬において, 生後 60 日目から生後 97 日目まで長期に渡ってミクログリアの活性化が誘導された [Graciarena et al., 2010]。一方, 低用量 LPS の単回投与 (100 µg/kg を妊娠 15 日目に腹腔内投与) では, 海馬の神経新生は抑制されたが, 生後 70 日目の児動物の海馬において, ミクログリアの数及び形態に変化はみられなかった [Mouihate, 2016]。これらの報告から, 児動物の神経炎症反応の程度及び発現時期は MIA の

強さに依存している可能性があり, 本実験で用いた LPS 投与による MIA は, 生後の児動物の長期的な神経炎症反応を誘導しないことが示された。本実験の AGIQ 投与は児動物における炎症パラメータに影響を示さなかった。第 1 章で明らかにしたように, LPS 投与前からの AGIQ 投与は LPS による神経炎症を効果的に改善したことから, 本実験における AGIQ の投与も, MIA の抑制に有効であったと考えられる。

本実験の生後 21 日目の海馬において, LPS 単独群で SGZ の TBR2 陽性細胞 (type-2b 神経前駆細胞) と PCNA 陽性増殖性細胞の数が減少したが, 他の顆粒細胞系譜マーカー陽性細胞の数に差はみられなかった。また, 海馬歯状回では TBR2 をコードする *Eomes* 及び *Pcna* の転写産物レベルが減少した。したがって, 胎生期免疫活性化は, 神経前駆細胞の増殖活性を抑制し, type-2b 神経前駆細胞の数を減少させることにより, 海馬顆粒細胞系譜における中期前駆細胞を標的とした神経新生障害が生じたものと考えられた。一方, 生後 77 日目において, LPS 単独群で SGZ の type 1 神経幹細胞 (放射状グリア細胞) マーカーである GFAP の陽性細胞, 及び type-1 神経幹細胞, type-2a, type-2b 神経前駆細胞のマーカーである SOX2 の陽性細胞数が減少した。海馬歯状回における遺伝子発現解析の結果, type-1 神経幹細胞と type-2a 神経前駆細胞に発現する *Nes* [Kronenberg et al., 2003] と *Sox2* の転写産物レベルが減少した。この時点では, 離乳時と比較して増殖活性は低いものの, SGZ の PCNA 陽性細胞数に低値傾向がみられた。TBR2 陽性細胞の数や *Eomes* の転写産物レベルに変化がみられないことから, 成体期には神経幹細胞の自己複製と増殖が抑制され, type-1 神経幹細胞と type-2a 神経前駆細胞の数が減少することにより, 顆粒細胞系譜の初期分化段階を標的とした神経新生障害が生じたものと考え

えられた。加えて海馬歯状回では、有糸分裂後の未熟顆粒細胞マーカーである *Dpysl3 (Tuc4)* の転写産物レベルが減少し、同じく未熟顆粒細胞マーカーである *Tubb3* の転写産物レベルも LPS 単独群で減少傾向を示した。一方、TUBB3 陽性細胞の数は差がみられなかったことから、生後 77 日目以降に未熟顆粒細胞の数が減少する可能性が示唆された。

生後 21 日目の海馬歯状回において、LPS 単独群で *Chek1* の転写産物レベルが増加した。

*Chek1* はセリン・スレオニンキナーゼである check point kinase 1 (CHK1) をコードし、CHK1 は遺伝毒性ストレス後の細胞周期チェックポイントを制御することで、損傷 DNA を有する細胞が有糸分裂へ移行することを防ぎ、DNA 修復を調整する [McNeely et al., 2013]。したがって胎生期免疫活性化は離乳時の神経前駆細胞の細胞周期停止を引き起こす可能性があり、これは細胞増殖の抑制を介した type-2b 神経前駆細胞の減少に関連している可能性が示唆された。

生後 21 日目と生後 77 日目の海馬歯状回門において、LPS 単独群で GAD67 陽性介在ニューロンの数が減少した。成体脳における主要な抑制性神経伝達物質である GABA は、神経前駆細胞の増殖、神経前駆細胞の移動と分化、新生ニューロンのシナプス統合など成体神経新生のさまざまな段階を制御する重要な役割を担っている [Ge et al., 2006]。このことより、LPS による GAD67 陽性介在ニューロンの数の減少と神経新生障害との関連が示唆された。GAD67 陽性介在ニューロン数について、AGIQ 投与群では生後 21 日目には LPS 群と比較して差はみられなかったものの、生後 77 日目では LPS による GAD67 陽性介在ニューロン数の減少が回復し、対照群レベル以上に増加した。このことは、AGIQ の成体期までの継続的な投与が、抗酸化

作用というよりは神経保護的に作用し, GAD67 を介した神経新生の増強作用を発揮することを示唆している。

生後 21 日目の歯状回門において, LPS 単独群で SST 陽性介在ニューロン数の減少傾向がみられた。一方, AGIQ 投与により歯状回における *Sst* の転写産物レベルが増加し, SST 陽性介在ニューロン数の回復傾向がみられた。SST 陽性介在ニューロンは GCL の顆粒細胞に投射し [Groisman et al., 2020], アポリポ蛋白 E のノックアウトあるいはノックインマウスでは歯状回における SST 陽性介在ニューロンの数と新しく発生した顆粒細胞の数に正の相関があることが報告されている [Li et al., 2009]。したがって, 本実験における LPS による SST 陽性介在ニューロン数の減少は神経新生の抑制に関連していると考えられ, AGIQ 投与により SST 陽性介在ニューロンの集団が維持された結果, LPS による神経新生の抑制から保護されたものと考えられた。生後 77 日目の歯状回において, LPS 単独群で *Sst* の転写産物レベルが減少し, *Bdnf* と *Ntrk2* も減少した。*Bdnf* は BDNF をコードし, その受容体遺伝子である *Ntrk2* はトロポミオシン受容体キナーゼ B (TrkB) をコードしている。海馬歯状回において BDNF は成熟顆粒細胞で合成され, TrkB 受容体の活性化を介して海馬介在ニューロンの成長に影響を与えて, SGZ の神経前駆細胞の分化と成熟を促進する [Waterhouse et al., 2012]。また, SST の発現は BDNF-TrkB シグナル経路を一部介することが知られている [Muruet-Goyena et al., 2020]。したがって, 生後 77 日目における LPS による神経新生障害と *Sst* の発現減少には BDNF-TrkB シグナルの減少が関与したものと考えられた。AGIQ 投与は LPS による海馬の神経新生障害

を改善したが、*Sst*, *Bdnf* 及び *Ntrk2* の転写産物レベルは LPS 単独群と比較して有意な差はみられず、これらの因子は神経新生障害の回復には寄与しない可能性が示唆された。

生後 21 日目の海馬歯状回において、LPS 単独群で FOS 陽性顆粒細胞の数が減少し、歯状回の *Fos* の転写産物レベルも減少した。FOS は海馬顆粒細胞のシナプス可塑性に関与する最初期遺伝子であることから [Guzowski, 2002], 胎生期免疫活性化は離乳時に海馬顆粒細胞のシナプス可塑性を抑制するものと考えられた。生後 77 日目の海馬歯状回において、LPS 単独群で *Fos*, ERK2 をコードする *Mapk1*, ERK1 をコードする *Mapk3* の転写産物レベルが減少したが、FOS 陽性顆粒細胞及び p-ERK1/2 陽性顆粒細胞の数に変化はなかった。これらの結果は顆粒細胞あたりの FOS, ERK1, ERK2 の発現レベルが低下していることを示唆している。ERK1/2 は急性刺激に応答して急速にリン酸化して活性化され、*Fos* の転写を促進する [Thiel and Rössler, 2018]。したがって、生後 77 日目における *Fos*, *Mapk3*, *Mapk1* の転写産物レベルの減少は、生後 21 日目から持続して顆粒細胞のシナプス可塑性が抑制されていることを示唆している。さらに、生後 77 日目の歯状回では LPS 単独群で *Grin2a* 及び *Grin2b* の転写産物レベルが減少していた。*Grin2a* は *N-methyl-D-aspartate* (NMDA) 受容体サブユニット 2A をコードし、*Grin2b* は NMDA 受容体サブユニット 2B をコードしている。NMDA 受容体は脳のシナプス機能に重要であり、NMDA 受容体を介したシナプス後  $Ca^{2+}$  の上昇は神経細胞の分化、シナプス形成、シナプス可塑性の長期的な持続、認知機能の向上に関与している [Lau et al., 2009]。したがって、成体期における歯状回でのシナプス可塑性関連遺伝子の発現低下は、NMDA 受容体遺伝子の発現低下と関連している可能性が示唆された。AGIQ 投与により生後



21 日目において LPS によって生じた FOS 陽性顆粒細胞数の減少は改善し、生後 77 日目においても歯状回の *Fos* の発現低下が回復し、*Mapk3* の発現及びシナプス可塑性に関連する最初期遺伝子である *Arc* の発現についても回復ないしは増加傾向がみられた。これらの結果は妊娠母ラットへの LPS 曝露前から AGIQ を継続投与することで、シナプス可塑性の抑制が成体期までに改善されることを示すものであった。

成体期のオープンフィールド試験において、LPS 単独群で総移動距離、総移動時間、平均移動速度、1 回の移動距離、1 回の移動時間が減少したが、中心領域での滞在時間や中心領域の滞在率は変化せず、この結果から胎生期免疫活性化は、成体期に不安様行動を伴わない運動抑制を誘導することが示唆された。うつ病は海馬を含むいくつかの脳領域に影響を与え、シナプス可塑性の変化がうつ病の発症・進展に重要な役割を果たすことが報告されている [Blugeot et al., 2011]。大うつ病モデルにみられる典型的な神経行動変化 [Ménard et al., 2016] に照らし合わせると十分とは言えないが、本実験でみられた運動抑制は胎生期免疫活性化が成体期にうつ様行動を示す可能性を示唆するものであり、運動抑制には神経新生障害とシナプス可塑性の抑制との関連が示唆された。また、AGIQ 投与により、LPS による神経行動パラメータの変化は改善ないし改善傾向を示したが、これは LPS による海馬神経新生障害とシナプス可塑性抑制からの回復を反映した結果であると考えられた。

成体期の文脈的恐怖条件付け試験において、LPS 単独群で恐怖記憶獲得試行のフリージング率が減少し、恐怖記憶消去試行の 1 回目のフリージング率が増加した。また、恐怖記憶の獲得試行で影響がみられたため、消去試行について、獲得試行のフリージング率で正規化した相

対フリージング率を算出したところ, LPS 群では全ての恐怖記憶消去試行で相対フリージング率が増加した。この結果は, 胎生期免疫活性化が成体期に恐怖記憶の獲得過程に障害を起こし, 以降の消去学習過程にも影響を与えたことを示している。海馬歯状回は記憶の獲得と消去に重要な役割を果たすが [Baldi and Bucherelli, 2015], 顆粒細胞の除去やサイレンシングは文脈的恐怖条件付けの記憶獲得過程を阻害することが報告されている [Huckleberry et al., 2018]。また, 海馬の NMDA 受容体及び BDNF/TrkB シグナルの調節を含むシナプス可塑性の調節は文脈的恐怖記憶の形成に必須である [Andero et al., 2012; Gao et al., 2010]。したがって本実験における胎生期免疫活性化による成体期の文脈的恐怖記憶獲得・消去過程の障害は, 海馬の神経新生障害や BDNF/TrkB シグナルの抑制, NMDA 受容体の減少を伴うシナプス可塑性の抑制との因果関係が示唆された。AGIQ 投与は, LPS による恐怖記憶獲得試行と消去試行にみられた変化を改善したが, これは LPS による海馬神経新生障害とシナプス可塑性抑制からの回復を反映した結果であると考えられた。

## 小括

本章では、LPS 誘発 MIA モデルを用いて、胎生期免疫活性化による海馬神経新生障害の標的性及び文脈記憶形成に与える影響と他の神経行動エンドポイントへの影響について調査した。また、脳障害に対する MIA による神経炎症と酸化ストレスの影響を、AGIQ を用いて検討した。

解析の結果、胎生期免疫活性化は成体期にかけて進行性に海馬神経新生障害と新生顆粒細胞におけるシナプス可塑性の抑制を誘導した。神経新生障害は神経新生過程の中期前駆細胞を標的としていた。神経新生障害とシナプス可塑性抑制の発現は、MIA により胎生期からの正常な神経発達が乱されたことに起因するものと考えられ、そのメカニズムとして GABA 性あるいはグルタミン酸作動性の神経伝達物質シグナルの抑制と BDNF/TrkB シグナルの抑制の関与が疑われた。また、胎生期免疫活性化は成体期に文脈的恐怖記憶の獲得と消去過程の障害と運動抑制を誘導することが明らかになった。神経行動障害は海馬歯状回の神経新生及び新生ニューロンのシナプス可塑性が抑制されたことが要因であると考えられた。

AGIQ 投与により LPS 誘発性の神経新生障害や神経行動への影響はほとんどが改善された。これは、AGIQ が抗酸化・抗炎症作用により MIA を抑制し、生後の脳発達障害に対する予防効果を発揮したためであると考えられた。また、LPS により持続的にみられた GAD67 陽性介在ニューロン数の減少について、AGIQ が成体期でのみ回復以上の増加を示したことから、AGIQ が抗炎症作用だけでなく、成体までの継続的な曝露により神経保護効果を発揮した可能性があることが示唆された。

### 第3章

胎生期ないしは新生児期免疫活性化がもたらす海馬歯状回のオリゴデンドロサイト分化に対する影響の違いと  $\alpha$ -glycosyl isoquercitrin による保護作用

## 緒言

オリゴデンドロサイト (OL) は、神経細胞の軸索に対して髄鞘形成を担う成熟した細胞である。胎生期に神経系の原基である神経管の腹側脳室帯からオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) が発生する。出生後、多数の OPC は脳の白質と灰白質領域に広く分布し、生涯を通じて自己増殖能力を保持する [Bergles and Richardson, 2015]。OPC は、自己複製する OPC 集団だけでなく、ニューロン、免疫担当細胞、脈管系とも複雑で広範なネットワークを形成しており、種々の病態、特に炎症や酸化ストレス障害の際に主要な標的となり得る [Akay et al., 2021]。OPC の脆弱性は ASD や統合失調症などの神経発達障害の有病率の上昇につながり、これらの発達障害は白質損傷を特徴とする [Galvez-Contreras et al., 2020; Kolomeets, 2017]。

第 1 章でも述べたように海馬の歯状回では生後も新しいニューロンが継続的に生成され、そこで生み出された新生ニューロンは既存の神経回路に統合され、学習と記憶、情動行動及び社会的行動を担う [Cope and Gould, 2019]。歯状回の神経新生ニッチは、神経新生の調節のために歯状回内部または外部からの種々の神経伝達物質の入力を受ける。例えば、歯状回の門部には顆粒細胞の分化と維持を適切に制御する GABA 性介在ニューロンが存在し [Song et al., 2012]、GABA 性介在ニューロンは有髄軸索線維を介してシグナル伝達を行う。したがって、海馬における OPC の分化障害及び髄鞘形成障害は神経新生に影響を与える可能性があり、海馬における脱髄と認知・記憶障害との関連が報告されている [Dutta et al., 2013]。

母体及び新生児の免疫活性化は神経系の正常な発達機構を変化させ、成体期まで長期にわたり影響を及ぼし、ASDや統合失調症などの神経発達障害を生じさせる [Bokobza et al., 2019; Han et al., 2021; Scott et al., 2021]。また、ラットに対する発達期での LPS 曝露は、脳内の免疫活性化に起因して髄鞘形成を障害し、OPC の成熟・分化抑制がこの髄鞘形成障害の一因であることが報告されている [Wischhof et al, 2015; Xie et al, 2016]。

第 1 章及び第 2 章では、LPS による新生児期免疫活性化と胎生期免疫活性化が、共通して文脈的恐怖記憶の獲得過程を障害することを明らかにし、一方、他の神経行動障害と海馬神経新生障害については異なる影響を与えることを明らかにした。すなわち、神経行動障害に関して、新生児期免疫活性化は、乳児期及び春機発動期においてコミュニケーション障害を誘導し、胎生期免疫活性化は成体期において不安様行動を伴わない運動抑制を誘導した。また、海馬神経新生障害に関しては、新生児期免疫活性化は顆粒細胞系譜の後期段階を主に標的とし、胎生期免疫活性化は顆粒細胞系譜の中間前駆細胞を主に標的としていずれも進行性の神経新生障害を誘導した。所属研究室では以前、脱髄誘導剤であるクプリゾンを用いてラットに発達期曝露すると、児動物の海馬神経新生が阻害されることを見出しており、これは、クプリゾンが神経新生ニッチの調節に関わる神経伝達物質入力を調節する有髄神経を標的とした結果生じたものと考察している [Abe et al., 2016]。これらの結果から、第 1 章と第 2 章における、新生児期と胎生期の免疫活性化による海馬神経新生障害や神経行動障害に対する異なる影響は、各時期の LPS 曝露が OPC/OL の分化や成熟、髄鞘形成に異なる影響を及ぼすことを反映している可能性がある。

したがって本章では, OPC/OL の分化と成熟に焦点を当てて, 第 1 章と第 2 章の実験サンプルを用いて, 発達期の異なる LPS 曝露のタイミングでの影響の違いを検討し, 神経新生障害性や行動異常とオリゴデンドロサイト新生障害性との間の関連性について考察した。また, LPS 曝露による神経炎症と酸化ストレスが, OPC/OL の分化と成熟障害に役割を果たすかどうかについても, 抗酸化物質である AGIQ による修飾効果をみることで検討した。

## 材料及び方法

本章における材料及び方法は第1章と第2章に準ずる。すなわち2つの動物実験, 新生児期免疫活性化実験 (実験 1) と胎生期免疫活性化実験 (実験 2) を実施した (Fig. 3-1)。

### 被験物質及び動物

フェノール抽出により精製した大腸菌 O55:B5 (実験 1), O11:B4 (実験 2) 由来の LPS (EC No.297-473-0; 純度: 97%) は Sigma-Aldrich Co. LLC. (St. Louis, MO, USA) から購入した。AGIQ (純度: > 97%) は三栄源エフ・エフ・アイ株式会社 (大阪, 日本) から提供された。交尾確認済み雌 Slc:SD ラットを妊娠 1 日目で日本エスエルシー株式会社 (浜松, 日本) より購入した。妊娠ラットを入荷時から分娩後 21 日目まで, 温度  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 相対湿度  $55 \pm 15\%$ , 照明条件 12 時間の明暗サイクルで, ポリカーボネート製ケージに紙製床敷を入れ, 個別飼育した。AGIQ 投与開始までは妊娠ラットに粉末基礎飼料 (CRF-1; オリエンタル酵母工業株式会社, 東京, 日本) を自由に摂取させ, 実験を通じて水道水を自由に摂取させた。

### 実験デザイン

#### 実験 1

第1章の実験デザインに準じる。

主実験では, 妊娠 10 日目の妊娠ラットを, 1 群 15 匹の 4 群 (対照群, LPS 単独群, LPS + 0.25%



AGIQ 群, LPS + 0.5% AGIQ 群) に無作為に割り当てた。なお, 本実験では, 対照群, LPS 単独群 (N-LPS 単独群), LPS + 0.5% AGIQ 群 (N-LPS + AGIQ 群) について各解析を実施した。N-LPS + AGIQ 群には AGIQ 0.5% (w/w) を混合した粉末状基礎飼料を妊娠 18 日目から投与し, 分娩後 21 日目まで継続的に母動物に混餌投与した。さらに生後 21 日目 (離乳後) から生後 77 日目までの児動物にも同用量で混餌投与した。AGIQ の用量は胎生期から成体まで 0.5% (w/w) の用量で継続的に曝露することで恐怖条件付け試験の恐怖記憶の消去学習が促進されることを示した所属研究室の先行研究に基づき決定した [Masuuchi et al., 2020; Okada et al., 2019]。生後 2 日目に児動物を無作為に淘汰し, 各母動物に 5~8 匹の雄児動物を割り当てた。また, 母動物あたりの児動物数を 8 匹に揃えるため, 雄児動物数が合計 8 匹に満たない場合は雌児動物を割り当てた。生後 3 日目に LPS 投与群には LPS を 1 mg/kg 体重で腹腔内投与し, 対照群には生理食塩水を腹腔内投与した。LPS の投与方法はミクログリアの高度な活性化, 海馬の神経新生破綻, 神経行動学的なコミュニケーション機能障害及び認知機能障害の誘発を示した先行研究に基づき決定した [Pang et al., 2016]。雄児動物の体重を生後 21 日目までは 3~4 日ごとに測定し, 生後 21 日目以降から生後 77 日目までは週 1 回, 体重, 摂餌量, 摂水量を測定した。生後 6 日目に免疫組織化学的解析のため, 各群 10 匹の雄児動物 (母動物 1 匹につき 1 匹) を CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 処置下で腹大動脈切断により放血安楽死させ, 頭蓋骨ごと脳を採取した。さらにメタカーン溶液で 5 時間固定後, 100% エタノールで置換した。生後 21 日目に免疫組織化学的解析のため, 各群 10~12 匹の雄児動物 (母動物 1 匹につき 1 匹) について, CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 処置下で 4% (w/v) paraformaldehyde (PFA)/0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を用いて経心灌流固定 (流速 10mL/min) 後,

頭蓋骨ごと脳を採取した。また, mRNA 発現解析のため各群 6~12 匹の雄児動物 (母動物 1 匹につき 1 匹) を CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 処置下で腹大動脈切断により放血安楽死させ, 脳を採取し, 重量測定後メタカーン液を用いて全脳固定法に従って固定した [Akane et al., 2013]。生後 77 日目に, 成体期の行動試験を実施していない各群 10 匹の雄児動物について, CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 処置下で 4% (w/v) PFA/0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を用いて経心灌流固定 (流速 35mL/min) 後, 頭蓋骨ごと脳を採取し, 免疫組織化学的解析に供した。mRNA 発現解析のため, 生後 21 日目と同様の方法で各群 6~10 匹の雄児動物を安楽死させ, 脳を採取した。

サテライト実験では, 群構成及び LPS と AGIQ の投与プロトコルは主実験と同様であり, 1 群 3 匹の妊娠ラットを使用した。生後 2 日目に児動物を無作為に淘汰し, 各母動物に 4~6 匹の雄児動物を割り当てた。また, 雌児動物を充足し, 母動物あたりの児動物数を合計 10 匹に揃えた。生後 6 日目に OL 新生に関する mRNA 発現解析のため, 各群 7 匹の雄動物を CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 処置下で腹部大動脈切断により放血安楽死させ, 摘出した脳を前述の全脳固定法でメタカーン溶液を用いて固定した。

主実験及びサテライト実験ともに全ての母動物と残余雌児動物は生後 21 日目に CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 処置下で腹部大動脈切断により放血安楽死させた。

## 実験 2

第 2 章の実験デザインに準じる。

主実験では交配済み雌ラットを, 1 群 16~17 匹の 3 群 (対照群, E-LPS 単独群, E-LPS + AGIQ

群)に無作為に割り付けた。LPS 誘発 MIA モデルラットの先行研究 [Cui et al., 2009] に基づき、LPS を妊娠 15 日目及び妊娠 16 日目の母動物に 100 µg/kg 体重/回、腹腔内投与する予備実験を実施した結果、ほとんどの母動物で死産が確認された。したがって、春機発動期の雄児動物に ASD 様行動が発現した先行研究 [Foley et al., 2015] に基づき、本実験では LPS を妊娠 15 日目及び妊娠 16 日目の母動物に 50 µg/kg 体重/回、腹腔内投与した。AGIQ 投与群には AGIQ 0.5% (w/w) を混合した粉末基礎飼料を妊娠 10 日目から投与し、分娩後 21 日まで継続的に母動物に混餌投与した。さらに生後 21 日目 (離乳時) から生後 77 日目までの児動物にも同用量で混餌投与した。AGIQ の用量は胚・胎児期から成体期までの連続曝露により新生児期 LPS 投与誘発性障害に対する化学予防効果を示した第 1 章の実験に基づき決定した。生後 4 日目に児動物を無作為に淘汰し、各母動物に 2~8 匹の雄児動物を割り当てた。また、母動物あたりの児動物数を 8 匹に揃えるため、雄児動物数が合計 8 匹に満たない場合は雌児動物を割り当てた。雄児動物について、生後 21 日目までは 3~5 日ごとに体重を測定し、生後 77 日目までは週 1 回、体重、摂餌量、摂水量を測定した。生後 6 日目に免疫組織化学的解析のため、各群 10~13 匹の雄児動物 (母動物 1 匹につき 1 匹) について、頭蓋骨ごと脳を採取した。さらにメタカーン溶液で 5 時間固定後、100% エタノールで置換した。mRNA 発現解析のため、各群 6~8 匹の雄児動物 (母動物 1 匹につき 1 匹) について脳を採取し、重量測定後メタカーン液を用いて全脳固定法に従って固定した。生後 21 日目に免疫組織化学的解析のため、各群 10~12 匹の雄児動物 (母動物 1 匹につき 1 匹) について、CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 処置下で 4% (w/v) paraformaldehyde (PFA)/0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を用いて経心灌流固定 (流速 10 mL/min) 後、頭蓋骨ごと脳を採取した。

mRNA 発現解析のため、各群 6~9 匹の雄児動物 (母動物 1 匹につき 1 匹) を CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 処置下で腹大動脈切断により放血安楽死させ、脳を採取し、重量測定後メタカーン液を用いて全脳固定法に従って固定した。生後 77 日目に、成体期の行動試験を実施していない各群 10~12 匹の雄児動物について CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 処置下で 4% (w/v) PFA/0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を用いて経心灌流固定 (流速 35 mL/min) 後、頭蓋骨ごと脳を採取し免疫組織化学的解析に供した。mRNA 発現解析のため、生後 21 日目と同様の方法で各群 7~10 匹の雄児動物を安楽死させ脳を採取した。

本研究における全ての動物実験は National Institutes of Health guide for the care and use of laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) に従い実施され、動物の苦痛を最小限にするためにあらゆる努力がなされた。実験方法は東京農工大学動物実験委員会の承認を得た。承認番号を以下に示す。実験 1 について、主実験 31-38, サテライト実験 31-64。実験 2 について、主実験 R02-61, 予備実験 31-76。

### 実験 1 と実験 2 における免疫組織化学的解析及びアポトーシス細胞の検出

生後 6 日目に採取したメタカーン固定脳は翌日に頭蓋から摘出し、100% エタノールで一晩固定した。生後 21 日目と生後 77 日目に採取した灌流固定脳は翌日に頭蓋から摘出し、4% PFA 緩衝液で一晩固定した。さらに、生後 6 日目に採取した脳は海馬体を含むように視交叉の位置で 4 mm 厚の冠状断面スライスを作製し、生後 21 日目と生後 77 日目に採取した脳は bregma の後方約 2.2 mm の位置で 3 mm 厚の冠状断面スライスを作製した。各スライスは 4°C で一晩

同様の固定液で固定後, 標準プロトコルに従ってパラフィン包埋し, 3  $\mu\text{m}$  厚の連続切片を作製した。

免疫組織化学的解析は以下に示す一次抗体を用いて行った (Table 3-1)。すなわち, OL 系譜の指標である NG2 chondroitin sulfate proteoglycan (NG2), oligodendrocyte lineage transcription factor 2 (OLIG2), 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) [Gravel et al. 1996; Sakry and Trotter 2016; Sock and Wegner 2021]; 細胞増殖活性の指標である proliferating cell nuclear antigen (PCNA); OPC の分化と成熟に役割を果たす KLOTHO [Chen et al. 2013]。免疫組織化学的染色には Avidin-Biotin Complex 法を用いた。内因性ペルオキシダーゼの不活化には 0.3% (v/v) 過酸化水素水を含むメタノール溶液を用い室温にて 30 分処理した。Table 3-1 に示した条件で一次抗体の抗原賦活化を行い, 切片と一次抗体を 4°C で一晚反応させた。シグナル検出は Vectastain<sup>®</sup> Elite ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用い, 3,3'-diaminobenzidine/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で発色し, 対比染色にはヘマトキシリンを用いた。動物 1 匹につき 1 切片を各抗体の免疫組織化学的解析に供した。

#### 免疫組織化学染色陽性細胞の定量解析

生後 6 日目の組織サンプルについて, 各抗体の陽性細胞を両側でカウントし, 海馬体の全領域の面積で正規化した (Fig. 1-2)。生後 21 日目と生後 77 日目の組織サンプルについて, 海馬歯状回門に分布する各抗体の陽性細胞は両側でカウントし, 海馬歯状回門の面積で正規化した (Fig. 1-2)。各抗体の陽性細胞のカウントは BX51 顕微鏡 (オリンパス株式会社, 東京, 日本) 下

で,処理条件を盲検化して実施した。海馬体と歯状回門の面積は BX51 顕微鏡でデジタル顕微鏡写真を撮影し cellSens (version 1.9 ; オリンパス株式会社) を用いて測定した。

## 遺伝子発現解析

生後 6 日目, 生後 21 日目, 生後 77 日目の海馬歯状回サンプルにおける転写産物レベルをリアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) を用いて解析した。生後 6 日目のメタカーン固定脳について, 視交叉の位置で 2 mm 厚の冠状断面スライスを作製し, 孔径 1 mm の生検パンチ (貝印株式会社, 岐阜, 日本) を用いて海馬歯状回組織を採取した。生後 21 日目及び生後 77 日目のメタカーン固定脳について, bregma の後方約 3.0 mm の位置で 2 mm 厚の冠状断面スライスを作製し, 生検パンチを用いて歯状回組織を採取した。各歯状回サンプルについて, RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて製造元のプロトコルにしたがって total RNA を抽出した。次いで, 1 µg の total RNA より SuperScript® III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) を用いて cDNA を合成した。リアルタイム RT-PCR の標的遺伝子と各遺伝子のプライマー配列を Table 3-2 に示した。全ての検索遺伝子のプライマー配列は Primer Express™ Software (Version 3.0; Thermo Fisher Scientific) または Primer-BLAST (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) を用いて設計した。リアルタイム RT-PCR は SYBR®Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) 及び Step One Plus™ Real-time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用いて製造元のプロトコルに従って実施した。各遺伝子の転写産物レベルは目的の遺伝子の  $C_T$  値及び内因性コントロールである hypoxanthine

phosphoribosyltransferase 1 (*Hprt1*) ないしは glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) の  $C_T$  値を用いて  $\Delta\Delta C_T$  法により算出した [Livak and Schmittgen, 2001]。

## 統計解析

数値データは平均値±SD で示した。実験 1 で得られたサンプルにおける対照群と N-LPS 単独群間, N-LPS 単独群と N-LPS + AGIQ 群間の比較, 実験 2 で得られたサンプルにおける対照群と E-LPS 単独群間, E-LPS 単独群と E-LPS + AGIQ 群間の比較では Levene の検定により等分散性を評価した。等分散の場合は Student の *t*-test を, 不等分散の場合は Aspin-Welch の *t*-test を用いた。全ての解析は IBM SPSS Statistics ver. 25 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) を用いて行い, それぞれの有意水準は  $P < 0.05$  とした。

## 結果

### 実験 1 における免疫組織化学的解析

#### 海馬体または海馬歯状回門における OL 系譜細胞数の変化

生後 6 日目において, OLIG2 陽性細胞の数は, N-LPS 単独群で対照群と比較して有意に減少し, N-LPS + AGIQ 群で E-LPS 単独群と比較して有意に増加した (Table 3-3)。NG2 陽性細胞の数は, 対照群と N-LPS 単独群間, N-LPS 単独群と N-LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった。CNPase 陽性細胞は, この時点では検出されなかった。

生後 21 日目において, NG2 陽性細胞と CNPase 陽性細胞の数は, N-LPS 単独群で対照群と比較して有意に減少した (Table 3-3)。OLIG2 陽性細胞と CNPase 陽性細胞の数は, 対照群と N-LPS 単独群間, N-LPS 単独群と N-LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった。

生後 77 日目において, CNPase 細胞は, N-LPS 単独群で対照群と比較して有意に増加した (Table 3-3)。NG2 陽性細胞と OLIG2 陽性細胞の数は, 対照群と N-LPS 単独群間, N-LPS 単独群と N-LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった。

#### 海馬体または海馬歯状回門における KLOTHO 陽性 OL 系譜細胞数とグリア細胞の細胞増殖活性の変化

生後 6 日目において, KLOTHO 陽性細胞は検出されなかった。PCNA 陽性増殖細胞の数は,



対照群と N-LPS 単独群間, N-LPS 単独群と N-LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった (Table 3-3)。

生後 21 日目において, KLOTHO 陽性細胞の数は, N-LPS 単独で対照群と比較して有意に減少し, N-LPS + AGIQ 群で N-LPS 単独群と比較して有意に増加した (Fig. 3-2, Table 3-3)。PCNA 陽性増殖細胞の数は, 対照群と N-LPS 単独群間, N-LPS 単独群と N-LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった。

生後 77 日目において, KLOTHO 陽性細胞の数は, N-LPS 単独群で対照群と比較して有意に増加した (Table 3-3)。PCNA 陽性増殖細胞数は, 対照群と N-LPS 単独群間, N-LPS 単独群と N-LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった。

## 実験 1 における遺伝子発現解析

### 海馬歯状回における OL 系譜関連遺伝子の発現変動

生後 6 日目において, *Cspg4* と *Pdgfra* の転写産物レベルは, 対照群と N-LPS 単独群間, N-LPS 単独群と N-LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった (Table 3-4)。

生後 21 日目において, *Kl* の転写産物レベルは, N-LPS 単独群で対照群と比較して有意に減少し, N-LPS + AGIQ 群で N-LPS 単独群と比較して有意に増加した (Table 3-4)。*Cspg4* と *Pdgfra* の転写産物レベルは, 対照群と N-LPS 単独群間, N-LPS 単独群と N-LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった。

生後 77 日目において, *Cspg4*, *Pdgfra*, *Kl* の転写産物レベルは対照群と N-LPS 単独群間, N-

LPS 単独群と N-LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった (Table 3-4)。

#### 海馬歯状回におけるシグナル伝達関連遺伝子の発現変動

生後 6 日目において、*Bmp4* の転写産物レベルは、N-LPS 単独群で対照群と比較して有意に増加した (Table 3-4)。*Hes5* の転写産物レベルは N-LPS 単独群で対照群と比較して有意に減少し、*Tcf4* の転写産物レベルは N-LPS + AGIQ 群で N-LPS 単独群と比較して有意に増加した。*Hdac1*, *Hdac2*, *Notch1*, *Shh*, *Yy1* の転写産物レベルは対照群と N-LPS 単独群間、N-LPS 単独群と N-LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった。

生後 21 日目において、*Bmp4*, *Tcf4*, *Yy1* の転写産物レベルは N-LPS 単独群で対照群と比較して有意に減少し、*Notch1* の転写産物レベルは N-LPS + AGIQ 群で N-LPS 単独群と比較して有意に減少した (Table 3-4)。*Hdac1*, *Hdac2*, *Hes5*, *Shh* の転写産物レベルは対照群と N-LPS 単独群間、N-LPS 単独群と N-LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった。

生後 77 日目において、*Bmp4*, *Hdac1*, *Hdac2*, *Hes5*, *Notch1*, *Shh*, *Tcf4*, *Yy1* の転写産物レベルは対照群と N-LPS 単独群間、N-LPS 単独群と N-LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった (Table 3-4)。

#### 海馬歯状回におけるミエリン形成関連遺伝子の発現変動

生後 21 日目と生後 77 日目において、*Cnp*, *Klk6*, *Mag*, *Mbp*, *Plp1*, *Rtn4*, *Ugt8* 及び *Cnp* の転写産物レベルは対照群と N-LPS 単独群間、N-LPS 単独群と N-LPS + AGIQ 群間のいずれにおいて

も有意な差はみられなかった (Table 3-4)。

## 実験 2 における免疫組織化学的解析

### 海馬体または海馬歯状回門における OL 系譜細胞数の変化

生後 6 日目において, NG2 陽性細胞の数は, E-LPS 単独群で対照群と比較して有意に減少し, E-LPS + AGIQ 群で E-LPS 単独群と比較して有意に増加した (Fig. 3-4, Table 3-5)。OLIG2 陽性細胞の数は, 対照群と E-LPS 単独群間, E-LPS 単独群と E-LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった。

生後 21 日目において, NG2 陽性細胞数は E-LPS 単独群で対照群と比較して有意に減少し, E-LPS + AGIQ 群で E-LPS 単独群と比較して有意に増加した (Fig. 3-4, Table 3-5)。OLIG2 陽性細胞の数は E-LPS 単独群で対照群と比較して有意に増加し, E-LPS + AGIQ 群で E-LPS 単独群と比較して有意に減少した。CNPase 陽性細胞の数は, 対照群と E-LPS 単独群間, E-LPS 単独群と E-LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった。

生後 77 日目において, NG2 陽性細胞, OLIG2 陽性細胞, CNPase 陽性細胞の数は, 対照群と E-LPS 単独群間, E-LPS 単独群と E-LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった。

### 海馬体または海馬歯状回門における KLOTHO 陽性 OL 系譜細胞数とグリア細胞の細胞増殖活性の変化

生後 6 日目において, KLOTHO 陽性細胞は検出されなかった。PCNA 陽性増殖細胞の数は対照群と E-LPS 単独群間, E-LPS 単独群と E-LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった (Fig. 3-5, Table3-5)。

生後 21 日目と生後 77 日目において, KLOTHO 陽性細胞と PCNA 陽性増殖細胞の数は対照群と N-LPS 単独群間, N-LPS 単独群と N-LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった (Table 3-5)。

## 実験 2 における遺伝子発現解析

### 海馬歯状回における OL 系譜関連遺伝子の変動

生後 6 日目において, *Cspg4* と *Pdgfra* の転写産物レベルは, E-LPS 単独群で対照群と比較して有意に減少し, *Cspg4* の転写産物レベルは, E-LPS + AGIQ 群で E-LPS 単独群と比較して有意に増加した (Table 3-6)。

生後 21 日目と生後 77 日目において, *Cspg4*, *Pdgfra*, *Kl* の転写産物レベルは, 対照群と E-LPS 単独群間, E-LPS 単独群と E-LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった (Table 3-6)。

### 海馬歯状回におけるシグナル伝達関連遺伝子の発現変動

生後 6 日目において, *Hes5* と *Tcf4* の転写産物レベルは, E-LPS 単独群で対照群と比較して有意に増加し, *Hes5* の転写産物レベルは, E-LPS + AGIQ 群で E-LPS 単独群と比較して有意に減

少した (Table 3-6)。 *Notch1* の転写産物レベルは、E-LPS + AGIQ 群で E-LPS 単独群と比較して有意に減少した。

生後 21 日目と生後 77 日目において、*Bmp4*, *Hdac1*, *Hdac2*, *Hes5*, *Notch1*, *Shh*, *Tcf4*, *Yy1* の転写産物レベルは、対照群と E-LPS 単独群間、E-LPS 単独群と E-LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった (Table 3-6)。

#### 海馬歯状回におけるミエリン形成関連遺伝子の発現変動

生後 21 日目と生後 77 日目において、*Cnp*, *Klk6*, *Mag*, *Mbp*, *Plp1*, *Rtn4*, *Ugt8* 及び *Cnp* の転写産物レベルは、対照群と E-LPS 単独群間、E-LPS 単独群と E-LPS + AGIQ 群間のいずれにおいても有意な差はみられなかった (Table 3-6)。

## 考察

### 新生児期 LPS 投与による変化

生後 6 日目の海馬歯状回門において, N-LPS 単独群で OLIG2 陽性細胞の数が減少した。OL の転写因子である OLIG2 は, 全ての OL 系譜, すなわち OPC, 前 OL, 未成熟 OL, 成熟 OL に発現する [Kuhn et al., 2019]。NG2 陽性 OPC の数に変化はみられなかったことから, 新生児期の LPS 投与後早期に, OPC の OL への分化が阻害された可能性が示唆された。第 1 章の実験では, 新生児期 LPS 曝露が, 生後 6 日目の海馬においてアストロサイトの増加を含む神経炎症を誘導し, アストロサイトの増加は生後 21 日目まで持続するが, 生後 77 日目には炎症反応が終息することを明らかにした。一般に, NG2 陽性 OPC は炎症時に反応性アストロサイトに分化することが知られており, *Bmp4* にコードされる OPC から分泌される骨形成タンパク質 4 (BMP4) が, OPC の OL への分化を抑制し, アストロサイトへの分化を促進することが知られている [Akay et al., 2021; Xu et al., 2020]。本実験において, N-LPS 単独群の生後 6 日目の海馬で *Bmp4* の転写産物レベルが増加し, 生後 21 日目の海馬で減少したことから, 新生児期 LPS 曝露による神経炎症により, 曝露後早期に BMP4 を介して OPC のアストロサイトへの分化が促進された可能性が示唆された。

生後 21 日目の海馬歯状回門において, N-LPS 単独群で NG2 陽性細胞の数が減少した。実験的な新生ラットへの LPS 曝露によりミクログリアによる IL-1 $\beta$  の分泌増加が生じ, それが脳室周囲白質における NG2 陽性 OPC を減少させると報告されている [Xie et al., 2016]。第 1 章の実

験において、新生児期の LPS 曝露により生後 6 日目の海馬で *I1b* の転写産物レベルが増加することを見出しており、LPS 投与後早期の IL-1 $\beta$  の増加を伴う神経炎症が生後 21 日目の NG2 陽性 OPC の減少を誘導した可能性が示唆された。

N-LPS 単独群の海馬歯状回門では CNPase 陽性細胞の数が減少した。成熟 OL に発現する CNPase は哺乳類の中樞神経系に最も多く存在するタンパク質の一つであり、髄鞘形成に重要である [Myllykoski et al., 2016]。この結果は、新生児期の免疫活性化が離乳時に未成熟 OL から成熟 OL への分化を抑制することを示唆している。生後 21 日目の歯状回門において N-LPS 単独群で KLOTHO 陽性細胞の数が減少し、歯状回の *Kl* 及び *Yy1* の転写産物レベルが減少した。抗老化タンパク質である KLOTHO は OPC と OL の成熟を促進することが知られており、KLOTHO ノックアウトマウスは OL の減少により、脳梁の髄鞘形成障害を示す [Chen et al., 2013]。 *Yy1* がコードする Yin Yang 1 (YY1) は OPC の分化を制御する重要な転写因子であり、YY1 の欠損は分裂後の OL の成熟を阻害し、髄鞘形成障害をもたらす [He et al., 2007]。したがって、KLOTHO 及び YY1 の発現減少により離乳時の未熟 OL から成熟 OL への分化が抑制されたと考えられた。一方、歯状回門における CNPase 陽性細胞と KLOTHO 陽性細胞の数は生後 77 日目に増加しており、成熟 OL への分化障害は KLOTHO の発現を介して自然性の回復を示すと考えられた。

### 胎生期免疫活性化による変化

生後 6 日目の海馬歯状回門において、NG2 陽性 OPC の数と OPC のマーカー分子である NG2

をコードする *Cspg4* と *Pdgfra* の転写産物レベルが減少した。一方, OLIG2 陽性細胞数に変化はみられず, CNPase 陽性細胞はこの時点では検出されなかった。CNPase は髄鞘形成を担う成熟 OL に発現することから [Myllykoski et al., 2016], 本研究の胎生期免疫活性化は生後 6 日目以前～未熟 OL が増加することが示唆された。OPC から OL への分化は生後に起こり [Barateiro and Fernandes, 2014], 本実験では生後 6 日目において E-LPS 単独群でグリア細胞の増殖活性が変化しなかったことを考慮すると, 胎生期免疫活性化は出生後の OPC 分化を促進する可能性が指摘できる。生後 21 日目には, NG2 陽性 OPC 数の減少は持続し, OLIG2 陽性細胞数が増加した。グリア細胞群の増殖活性と CNPase 陽性細胞数に変化がないことから, 離乳時においても OPC 分化の促進が継続し, 前及び未熟 OL の増加が誘導されたものと考えられた。生後 77 日目において OL 系譜の変化は全て消失し, 胎生期免疫活性化による OL への影響は一過性であることが示唆された。LPS による MIA は, 胎仔の正常な神経発達とそれを調節する機構を傷害し, 長期的あるいは不可逆的な変化を起こす [Izvolaskaia et al., 2018]。発達中のラット脳では PDGFR $\alpha$  を共発現する NG2 陽性 OPC は胎齢 15 日目以降に神経幹細胞から発生することから [Trotter et al., 2009], 本実験の胎生期 (胎齢 15 日目、胎齢 16 日目) の母体 LPS 曝露による MIA が OPC の正常な発達機構を変化させ, 生後の OL 分化に影響を及ぼした可能性が示唆された。OL 分化に関連するシグナル伝達について, 生後 6 日目の海馬歯状回において E-LPS 単独群で *Tcf4* の転写産物レベルが増加した。ヒト胎児中枢神経から培養した初代 OPC は transcription factor 4 (TCF4) を発現し, OPC から始まる OL 系譜の分化段階において TCF4 の発現が増加することが報告されている [Lürbke et al., 2012]。したがって, 本実験でみられた胎生



期免疫活性化による生後早期の OPC の OL への分化促進には TCF4 の発現増加が寄与する可能性が示唆された。

## 異なる LPS 曝露時期に起因したそれぞれの OPC/OL の分化・成熟障害に対する AGIQ 投与の影響

第 1 章では妊娠後期から AGIQ を継続投与することで、新生児期免疫活性化による酸化ストレスの増加と、炎症性グリアや炎症性サイトカインの誘導からなる免疫活性化を確実に抑制し、その後に現れる神経行動障害や海馬神経新生障害を予防できることを明らかにした。また、第 2 章では妊娠母ラットへの LPS 曝露前に AGIQ を投与することで、主に MIA による正常な神経発達機構の傷害を防ぐことにより、生後の神経行動障害や海馬神経新生障害が予防できることを明らかにした。これらの結果は、AGIQ が抗炎症及び抗酸化ストレス作用を発揮して、神経行動及び海馬神経新生の障害を予防していることを示唆している。本章では、新生児期免疫活性化実験と胎生期免疫活性化実験のいずれにおいても、各時期の免疫活性化による生後 6 日目及び生後 21 日目の歯状回門部における OPC/OL の分化・成熟の変化は AGIQ 投与により効果的に回復した。したがって、各時期の免疫活性化による OPC/OL の分化・成熟に与える影響は、LPS 曝露後早期の免疫活性化に起因するものであると考えられた。

## 異なる時期の LPS 曝露が OPC/OL に及ぼす影響の差異

新生児期免疫活性化は生後 6 日目に OPC のアストロサイトへの分化を促進し、前及び未熟

OLを減少させた。さらに離乳時には OPC と成熟 OL が減少し, OPC/OL の分化が障害されることが示唆された。一方,胎生期免疫活性化は生後 6 日目と離乳時の両方で OPC が減少し,離乳時には前及び未熟 OL が増加したことから,OPC の分化が促進されることが示唆された。この各 LPS 曝露時期による OPC/OL への影響の違いは,胎生期と新生児期の免疫活性化が標的とする OL 系譜が異なることを示唆している。上述のように OPC は胎生期に発生し,OL への分化は生後に開始する [Barateiro and Fernandes, 2014; Trotter et al., 2009]。また,本研究において,生後 6 日目時点では CNPase 陽性成熟 OL は検出されなかった。したがって,胎生期免疫活性化は神経幹細胞と OPC を標的とする可能性があり,新生児期免疫活性化は前・未熟 OL を標的する可能性があることから,胎生期免疫活性化よりも新生児期免疫活性化がより広範囲の OL 系譜とその調節機構に影響を与えられ,この違いが胎生期と新生児期での免疫活性化による海馬神経新生や神経行動障害のパターンの違いに反映されている可能性が示唆された。しかし,OL 系譜への影響は成体期までに全て自然性に回復を示す一方,神経行動障害や海馬神経新生障害は成体まで進行することが,新生児期と胎生期免疫活性化ウィンドウに共通する特徴であった。

## 小括

本章では、異なる発達時期における LPS 曝露がラット海馬の OPC/OL 分化に及ぼす影響を調査し、その影響メカニズムについて、炎症や酸化ストレスの関与を、AGIQ を用いて検討した。解析の結果、新生児期の免疫活性化は生後 6 日目に神経炎症を誘導し、神経炎症に応答した OPC からアストロサイトへの分化促進を反映したものと考えられる、OPC から OL への分化障害を誘導した。加えて、離乳時には生後 6 日目時点でみられた *Ili1b* の増加に起因するものと考えられる OPC 数の減少と、OL の分化促進因子である KLOTHO と YY1 の発現抑制に起因すると考えられる成熟 OL 数の減少が観察された。一方、胎生期の免疫活性化は、生後 6 日目に OPC 分化の活性化因子である *Tcf4* の転写促進を伴って OPC 数が減少し、これは離乳時まで継続した。生後 6 日目には OLIG2 陽性細胞数に変化はなく、離乳時には OLIG2 陽性細胞の数が増加し、成熟 OL の数に変化はみられなかったことから、胎生期の免疫活性化は OPC の分化を促進し、生後早期に OPC 数の減少と前及び未熟 OL の増加を誘導する可能性が示唆された。本章の結果は、胎生期免疫活性化よりも新生児期免疫活性化がより広範囲の OL 系譜の細胞とその分化調節機構に影響を与える可能性を示唆するものであった。両 LPS 曝露ウインドウとも、成体期までに OL 系譜細胞への影響は自然回復した。また、AGIQ 投与は新生児期ないしは胎生期免疫活性化による OPC/OL 分化への影響をほぼ回復させたことから、LPS によって誘発される神経炎症が、発生過程における OPC/OL 分化を障害する主要な要因である可能性が示唆された。

## 総合考察

本研究では海馬歯状回に着目し, 炎症誘導物質である LPS 曝露による新生児期と胎生期の異なる時期の免疫活性化による, 神経新生障害に対する詳細な顆粒細胞系譜への標的性と神経行動への影響並びに OL 分化障害に対する詳細な OPC/OL 系譜への標的性を検討した。また, 抗酸化・抗炎症物質である AGIQ を LPS 投与前から継続的に投与することで, 各障害のメカニズムに対しどのように炎症や酸化ストレス反応が関与するか, その修飾効果を検討した。

第 1 章では, 新生児期の LPS 投与が, 海馬神経新生に関して, 離乳時の未熟顆粒細胞のアポトーシス増加に起因する成熟顆粒細胞の減少と, 成体期の type-3 神経前駆細胞と未熟顆粒細胞の減少からなる, 海馬顆粒細胞系譜の後期分化段階 [Hodge et al., 2008; Sibbe and Kulik, 2017] を標的とした進行性の神経新生障害を誘導することを見出した。海馬歯状回の神経細胞は GABA 性, コリン作動性, ドーパミン作動性, グルタミン酸作動性の入力など様々な投射を受けており, これらの入力により神経新生が調節されている [Freund and Buzsáki, 1996; Masiulis et al., 2011]。離乳時の海馬歯状回門において GAD67 ないしは PVALB 陽性介在ニューロンの減少がみられことから, 神経新生障害には主に PVALB による GABA 性入力の抑制が関与した可能性が示唆された。第 3 章では, 新生児期 LPS 投与が, 離乳時に歯状回門の成熟 OL を減少させることを明らかにした。齧歯類とヒトの海馬における髄鞘形成は GABA 性介在ニューロンの軸索でみられ, 有髄 GABA 性介在ニューロンはほとんどが PVALB 陽性介在ニューロンであることが報告されている [Micheva et al., 2016; Stedehouder et al., 2017]。したがって, 離乳時の

歯状回門における成熟 OL の減少が PVALB 陽性 GABA 性介在ニューロンの髄鞘形成を抑制し、神経新生障害の一因となった可能性が示唆された。

第 2 章では、胎生期免疫活性化により離乳時の増殖活性抑制に起因する type-2b 神経前駆細胞の減少がみられ、成体期の神経幹細胞の自己複製と増殖抑制に起因する type-1 神経幹細胞と type-2a 神経前駆細胞の減少がみられた。加えて、成体期以降の未熟顆粒細胞の減少を示唆する *Dpys13* の転写産物レベルの減少もみられた。これらの結果から、胎生期免疫活性化は発達期の海馬顆粒細胞系譜の主に初期段階を標的とした進行性の神経新生障害を誘導することが明らかになった。神経新生障害の原因として、神経前駆細胞の細胞周期停止及び GAD67 ないしは SST 陽性 GABA 性介在ニューロンの減少、BDNF-TrkB シグナルの減少の関与が示唆された。第 3 章では、胎生期免疫活性化が、離乳時に歯状回門の OPC を減少させることを明らかにした。OPC は GABA 性介在ニューロンからのシナプス入力を直接感知し、OPC の活性化は介在ニューロンの GAD67 合成を介して GABA 放出を促進する [Zhang et al., 2021]。したがって、離乳時の OPC の減少が GAD67 陽性 GABA 性介在ニューロンの減少に寄与し、神経新生障害の一因となった可能性が示唆された。本研究の結果から、胎生期免疫活性化が新生児期免疫活性化と比較してより広範囲の顆粒細胞系譜を標的として海馬神経新生障害を誘導する可能性が示唆されたが、これには MIA が胎生期から始まる正常な神経発達とそれを制御する分子機構に影響を与えて、生後に長期的あるいは不可逆的な機能変化を生じさせること [Smolders et al., 2018] が影響しているのかもしれない。

神経行動指標について、第 1 章の新生児期 LPS 投与では春機発動期と成体期に、第 2 章の胎

生期免疫活性化では成体期に、文脈的恐怖記憶の学習障害が誘導された。また、上述の神経新生障害に加え、海馬におけるシナプス可塑性の抑制が胎生期免疫活性化では離乳時と成体期にそれぞれみられた。海馬は記憶の獲得と消去に重要な役割を果たす器官であり、シナプス可塑性の調節が文脈的恐怖記憶の形成に必須であることを考慮すると [Andero et al., 2012; Baldi and Bucherelli, 2015; Gao et al., 2010], 海馬の神経新生障害とシナプス可塑性の抑制が学習障害の発現に大きく寄与した可能性が示唆された。文脈的恐怖記憶学習以外の神経行動への影響として、本研究の新生児期免疫活性化は乳児期ないしは春機発動期のコミュニケーション障害を誘導し、胎生期免疫活性化は成体期の運動抑制を誘導した。これまでの LPS 曝露モデルを用いた研究において、LPS 処置のタイミングや解析方法の違いにより神経行動障害のプロファイルは一貫していない [Domínguez-Rivas et al., 2022]。また、社会性や自発運動の調節には海馬の他、線条体、大脳皮質、扁桃体などの脳領域が複雑に関与することが知られている [Blázquez et al., 2019; Blugeot et al., 2011]。本研究において新生児期ないし胎生期免疫活性化によって生じる神経新生障害とシナプス可塑性の抑制が、それぞれコミュニケーション障害や運動抑制に関与した可能性はあるものの、詳細なメカニズムについては海馬以外の脳部位についての炎症指標やシナプス可塑性指標を含めたさらなる調査が必要であると考えられた。

OL 系譜への影響について、新生児期の LPS 投与が生後早期に、OPC の OL への分化障害と成熟 OL の減少を誘導させることを見出した。一方、胎生期の免疫活性化は OPC の分化を促進し、生後早期に OPC の減少と前期及び未熟 OL の増加を誘導した可能性が示唆された。これらの結果は、胎生期免疫活性化よりも新生児期免疫活性化がより広範囲の OL 系譜の細胞と

その分化調節機構に影響を与える可能性を示唆するものであった。一方、上述のように海馬顆粒細胞系譜への影響は、胎生期免疫活性化が新生児期免疫活性化と比較して、より広範囲の顆粒細胞系譜を標的として海馬神経新生障害を誘導する可能性が示唆された。2つの異なるLPS曝露ウインドウで神経新生とOL新生への標的性やその範囲が異なる結果となったのは、それぞれのLPS曝露時期で受ける神経細胞とOLの発生時期や分化過程の違いが複雑に影響を及ぼしている可能性がある [Barateiro and Fernandes, 2014; Domínguez-Rivas et al., 2022; Oswald, 2020; Trotter et al., 2009]。また、各免疫活性化によるOL系譜への影響は成体期までに全て自然性に回復した。これにはKLOTHOの発現増加が寄与している可能性が示唆された。発達期の免疫活性化は、海馬においてはOL系譜への影響よりも神経細胞の新生に強い影響を及ぼす可能性が示唆された。

新生児期の免疫活性化において、LPS投与前からのAGIQの継続投与は離乳時にBDNFシグナルとシナプス可塑性の亢進に関わる神経保護作用を発揮するとともに、LPSによる急性炎症を確実に抑制することで神経新生やOL新生障害及び行動障害を予防・改善した。胎生期免疫活性化において、AGIQは胎生期の免疫活性化を防ぐことで生後のLPSによる障害を予防すると共に、成体期にはGAD67を介した神経保護作用を発揮したものと考えられた。これらの結果から、LPS曝露後早期の免疫活性化がその後起こる脳発達障害の主因であることが強く示唆された。所属研究室では、正常な脳機能及び脳発達障害におけるAGIQの神経保護作用と恐怖記憶学習の促進効果を見出しているが [Masubuchi et al., 2020; Okada et al., 2019; Tanaka et al., 2019], 本研究でLPSによる免疫活性化脳発達障害モデルに対する、抗炎症作用に

よる AGIQ の有効性を示したことは, AGIQ の摂取が ASD などのヒトの発達障害に対して有効である可能性を示唆するものであり, さらなる研究が望まれる。



## 結論

胎生期ないしは新生児期の免疫活性化はその後の ASD や統合失調症といった脳発達障害を生じさせる。本研究では、海馬歯状回に着目し、炎症誘導物質である LPS を新生児期と胎生期の異なる曝露時期に投与した際の、神経新生障害と OL 新生障害における各分化段階への標的性と神経行動への影響を検討した。また、抗酸化・抗炎症物質である AGIQ を LPS 投与前から継続的に投与することで、各障害のメカニズムに対しどのように炎症や酸化ストレス反応が関与するか、その修飾効果を検討した。

新生児期のラットへの LPS 曝露により、海馬における曝露後早期の急性かつ一過性の神経炎症と酸化ストレス反応が検出された。乳児期には炎症反応に起因するものと考えられる母子間コミュニケーション障害が誘発された。離乳時には、海馬顆粒細胞系譜の未熟顆粒細胞のアポトーシス増加に起因する成熟顆粒細胞の減少と海馬歯状回門の GAD67 及び PVALB 陽性 GABA 性介在ニューロンの減少が検出され、主に PVALB による GABA 性入力への抑制が関与する神経新生障害が生じることが明らかとなった。歯状回門の OL 系譜への影響については、生後早期の OPC の OL への分化障害と成熟 OL の減少が検出された。OPC の分化障害は OPC のアストロサイトへの分化が促進されたことが原因と考えられ、成熟 OL の減少は PVALB 陽性 GABA 性介在ニューロンの髄鞘形成を阻害した可能性があり、神経新生障害への関与が示唆された。成体期には海馬顆粒細胞系譜の type-3 神経前駆細胞と未熟顆粒細胞の減少が検出された。新生児期 LPS 投与は発達期における顆粒細胞系譜の後期分化段階を標的と

し神経新生障害を生じさせる可能性が示唆された。一方, OL 系譜への影響は成体期では検出されず, KLOTHO の発現増加を介して自然性の回復を示した。春機発動期にコミュニケーション障害を, 春機発動期と成体期に文脈的恐怖記憶の学習障害を示した。これは乳児期にみられたコミュニケーション障害を含め, 新生児期の免疫活性化による ASD 様の行動障害の誘導を示唆する結果であり, 海馬の神経新生障害が一因である可能性が示唆された。

胎生期免疫活性化により, 生後の神経炎症と酸化ストレス反応は検出されなかった。離乳時には顆粒細胞系譜の増殖活性抑制に起因する type-2b の中期神経前駆細胞の減少が検出された。これには神経前駆細胞の細胞周期停止及び GAD67 ないしは SST 陽性 GABA 性介在ニューロンの減少の関与が示唆された。歯状回門の OL 系譜への影響については, 生後の OPC 分化の促進を示唆する, 生後 6 日目と離乳時の OPC の減少と離乳時の前及び未熟 OL の増加が検出された。離乳時の OPC の減少は GAD67 陽性 GABA 性介在ニューロンの減少に寄与し, 神経前駆細胞の減少の一因となった可能性が示唆された。成体期には神経幹細胞の自己複製と増殖抑制に起因する type-1 神経幹細胞と type-2a 神経前駆細胞の減少が検出され, BDNF-TrkB シグナルの減少が要因であると考えられた。また, 生後 77 日目の成体期以降の未熟顆粒細胞の減少を示唆する *Dpysl3* の転写産物レベルの減少も検出された。胎生期免疫活性化は発達期における顆粒細胞系譜の主に初期段階を標的とし, 神経新生障害を生じさせる可能性が示唆された。OL 系譜への影響は成体期では検出されず自然性の回復を示した。離乳時と成体期には顆粒細胞のシナプス可塑性の抑制が検出された。成体期には運動抑制と文脈的恐怖記憶の学習障害を示し, 海馬神経新生障害とシナプス可塑性の抑制が一因と考えられた。

各 LPS 曝露による神経新生障害と OPC/OL 新生障害に対する標的性が明らかとなったが、これらの標的性の違いは各 LPS 曝露ウインドウにおける神経細胞及び OPC/OL の発生・分化過程の違いを反映している可能性が示唆された。神経行動障害の発現には神経新生障害とシナプス可塑性の抑制が寄与したと考えられるが、より詳細な行動障害発現メカニズムについては海馬以外の脳領域についても検討する必要がある。

LPS 投与前からの AGIQ の継続投与は各 LPS 曝露による障害をほぼ回復させ、発達期の LPS 曝露により生じる神経新生障害、シナプス可塑性の抑制、OL 新生障害及び神経行動障害は曝露後早期の免疫活性化が主因である可能性が強く示唆された。AGIQ 継続投与による、抗酸化・抗炎症作用に加え、BDNF シグナルや GAD67 を介した神経保護作用による LPS 誘発脳発達障害に対する予防・改善効果が明らかになった。本研究の結果は、免疫活性化が一因となる ASD などの脳発達障害に対する AGIQ の有効性を示唆する結果であり、今後のさらなる研究が期待される。

## 謝辞

本稿を終えるにあたり, 本研究の遂行に際して終始御指導, 御鞭撻を賜りました東京農工大学大学院農学研究院動物生命科学部門 渋谷 淳 教授, 東京農工大学大学院農学研究院動物生命科学部門 吉田 敏則 准教授に深謝いたします。

本稿作成に際し, 懇篤な御指導, 御助言を賜りました, 東京農工大学大学院農学研究院動物生命科学部門 佐々木 一昭 准教授, 東京農工大学大学院農学研究院動物生命科学部門 永岡 謙太郎 教授, 岩手大学農学部共同獣医学科 古市 達哉 教授, 岩手大学農学部共同獣医学科 佐藤 洋 教授に謹んで深謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり, 研究費並びに研究材料を御提供いただくと共に, 有益な御助言を賜りました, 三栄源エフ・エフ・アイ株式会社 安全性科学部 千葉 修一 博士, 三栄源エフ・エフ・アイ株式会社 安全性科学部 小柳 美穂子 博士, Maronpot Consulting LLC Robert R. Maronpot 博士に心より感謝の意を表します。

研究に際し, 実験にご協力下さりました同教室諸氏の皆様に心から感謝いたします。

## 引用文献

1. Abe H, Saito F, Tanaka T, Mizukami S, Hasegawa-Baba Y, Imatanaka N, Akahori Y, Yoshida T, Shibutani M. (2016). Developmental cuprizone exposure impairs oligodendrocyte lineages differentially in cortical and white matter tissues and suppresses glutamatergic neurogenesis signals and synaptic plasticity in the hippocampal dentate gyrus of rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* **290**:10-20.
2. Akane H, Saito F, Yamanaka H, Shiraki A, Imatanaka N, Akahori Y, Morita R, Mitsumori K and Shibutani M. (2013). Methacarn as a whole brain fixative for gene and protein expression analyses of specific brain regions in rats. *J Toxicol Sci.* **38**(3):431-43.
3. Akay LA, Effenberger AH and Tsai LH. (2021). Cell of all trades: oligodendrocyte precursor cells in synaptic, vascular, and immune function. *Genes Dev.* **35**(3-4):180-198.
4. Akiyama T, Washino T, Yamada T, Koda T and Maitani T. (2000). Constituents of enzymatically modified isoquercitrin and enzymatically modified rutin (extract). *J. Food Hyg. Soc. J.* **41**: 54-60.
5. Andero R and Ressler KJ. Fear extinction and BDNF: translating animal models of PTSD to the clinic. *Genes Brain Behav.* **11**(5):503-12.
6. Asada H, Kawamura Y, Maruyama K, Kume H, Ding RG, Kanbara N, Kuzume H, Sanbo M, Yagi T and Obata K. (1997). Cleft palate and decreased brain gamma-aminobutyric acid in mice

- lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94**(12):6496-9.
7. Baldi E and Bucherelli C. (2015). Brain sites involved in fear memory reconsolidation and extinction of rodents. *Neurosci Biobehav Rev*. **53**:160-90.
  8. Banker SM, Gu X, Schiller D and Foss-Feig JH. (2021). Hippocampal contributions to social and cognitive deficits in autism spectrum disorder. *Trends Neurosci*. **44**(10):793-807.
  9. Barateiro A, and Fernandes A. (2014). Temporal oligodendrocyte lineage progression: in vitro models of proliferation, differentiation and myelination. *Biochimica et biophysica acta*, **1843**(9), 1917–1929.
  10. Batista CRA, Gomes GF, Candelario-Jalil E, Fiebich BL and de Oliveira ACP. (2019) Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation as a Bridge to Understand Neurodegeneration. *Int J Mol Sci*. **20**(9):2293
  11. Beloosesky R, Weiner Z, Khativ N, Maravi N, Mandel R, Boles J, Ross MG and Itskovitz-Eldor J. (2009). Prophylactic maternal n-acetylcysteine before lipopolysaccharide suppresses fetal inflammatory cytokine responses. *Am J Obstet Gynecol*. **200**(6):665.e1-5
  12. Berghuis P, Dobszay MB, Sousa KM, Schulte G, Mager PP, Härtig W, Görös TJ, Zilberter Y, Ernfors P and Harkany T. (2004). Brain-derived neurotrophic factor controls functional differentiation and microcircuit formation of selectively isolated fast-spiking GABAergic interneurons. *Eur J Neurosci*. **20**(5):1290-306.

13. Bergles DE and Richardson WD. (2015). Oligodendrocyte Development and Plasticity. Cold Spring Harb Perspect Biol. **8**(2):a020453.
14. Bjorklund G, Saad K, Chirumbolo S, Kern JK, Geier DA, Geier MR and Urbina MA. (2016). Immune dysfunction and neuroinflammation in autism spectrum disorder. Acta Neurobiol Exp (Wars). **76**(4):257-268
15. Blázquez G, Castañé A, Saavedra A, Masana M, Alberch J and Pérez-Navarro E. (2019). Social Memory and Social Patterns Alterations in the Absence of STriatal-Enriched Protein Tyrosine Phosphatase. Front Behav Neurosci. **12**:317.
16. Blugeot A, Rivat C, Bouvier E, Molet J, Mouchard A, Zeau B, Bernard C, Benoliel JJ and Becker C. (2011). Vulnerability to depression: from brain neuroplasticity to identification of biomarkers. J Neurosci. **31**(36):12889-99.
17. Bokobza C, Van Steenwinckel J, Mani S, Mezger V, Fleiss B and Gressens P. (2019). Neuroinflammation in preterm babies and autism spectrum disorders. Pediatr Res. **85**(2):155-165.
18. Bolós M, Perea JR and Avila J. (2017). Alzheimer's disease as an inflammatory disease. Biomol Concepts. **8**(1):37-43.
19. Boulanger-Bertolus J and Mouly AM. (2021). Ultrasonic Vocalizations Emission across Development in Rats: Coordination with Respiration and Impact on Brain Neural Dynamics. Brain Sci. **11**(5):616.

20. Brami-Cherrier K, Roze E, Girault JA, Betuing S and Caboche J. (2009). Role of the ERK/MSK1 signalling pathway in chromatin remodelling and brain responses to drugs of abuse. *J Neurochem.* **108**(6):1323-35.
21. Cameron, H. A., McEwen, B. S., and Gould, E. (1995). Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **15**(6), 4687–4692.
22. Chen CD, Sloane JA, Li H, Aytan N, Giannaris EL, Zeldich E, Hinman JD, Dedeoglu A, Rosene DL, Bansal R, Luebke JI, Kuro-o M, and Abraham CR. (2013). The antiaging protein Klotho enhances oligodendrocyte maturation and myelination of the CNS. *J Neurosci.* **33**(5):1927-39.
23. Chua JS, Cowley CJ, Manavis J, Rofe AM and Coyle P. (2012). Prenatal exposure to lipopolysaccharide results in neurodevelopmental damage that is ameliorated by zinc in mice. *Brain Behav Immun.* **26**(2):326-36.
24. Colombo E and Farina C. (2016). Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. *Trends Immunol.* **37**(9):608-620.
25. Cope EC and Gould E. (2019). Adult Neurogenesis, Glia, and the Extracellular Matrix. *Cell Stem Cell.* **24**(5):690-705.
26. Corona JC. (2020). Role of Oxidative Stress and Neuroinflammation in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Antioxidants (Basel).* **9**(11):1039.



27. Cui K, Ashdown H, Luheshi GN and Boksa P. (2009). Effects of prenatal immune activation on hippocampal neurogenesis in the rat. *Schizophr Res.* **113**(2-3):288-97.
28. Danzer SC and McNamara JO. (2004). Localization of brain-derived neurotrophic factor to distinct terminals of mossy fiber axons implies regulation of both excitation and feedforward inhibition of CA3 pyramidal cells. *J Neurosci.* **24**(50):11346-55.
29. Dobolyi A, Vincze C, Pál G and Lovas G. (2012). The neuroprotective functions of transforming growth factor beta proteins. *Int J Mol Sci.* **13**(7):8219-8258.
30. Domínguez-Rivas E, Ávila-Muñoz E, Schwarzacher SW and Zepeda A. (2022) Adult hippocampal neurogenesis in the context of lipopolysaccharide-induced neuroinflammation: A molecular, cellular and behavioral review. *Brain Behav Immun.* **97**:286-302.
31. Dutta R, Chomyk AM, Chang A, Ribaldo MV, Deckard SA, Doud MK, Edberg DD, Bai B, Li M, Baranzini SE, Fox RJ, Staugaitis SM, Macklin WB and Trapp BD. (2013). Hippocampal demyelination and memory dysfunction are associated with increased levels of the neuronal microRNA miR-124 and reduced AMPA receptors. *Ann Neurol.* **73**(5):637-45.
32. Estes ML and McAllister AK. (2016). Maternal immune activation: implications for neuropsychiatric disorders. *Science.* **353**(6301):772-777.
33. Feng R, Morine Y, Ikemoto T, Imura S, Iwahashi S, Saito Y and Shimada M. (2018). Nrf2 activation drive macrophages polarization and cancer cell epithelial-mesenchymal transition during interaction. *Cell Commun Signal.* **16**(1):54.

34. Firmal P, Shah VK and Chattopadhyay S. (2020). Insight Into TLR4-Mediated Immunomodulation in Normal Pregnancy and Related Disorders. *Front Immunol.* **11**:807.
35. Foley KA, MacFabe DF, Kavaliers M and Ossenkopp KP. (2015). Sexually dimorphic effects of prenatal exposure to lipopolysaccharide, and prenatal and postnatal exposure to propionic acid, on acoustic startle response and prepulse inhibition in adolescent rats: relevance to autism spectrum disorders. *Behav Brain Res.* **278**:244-56.
36. Freund TF and Buzsáki G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus.* **6**(4):347-470
37. Fueta Y, Sekino Y, Yoshida S, Kanda Y and Ueno S. (2018). Prenatal exposure to valproic acid alters the development of excitability in the postnatal rat hippocampus. *Neurotoxicology.* **65**:1-8
38. Fujii Y, Kimura M, Ishii Y, Yamamoto R, Morita R, Hayashi SM, Suzuki K and Shibutani M. (2013). Effect of enzymatically modified isoquercitrin on preneoplastic liver cell lesions induced by thioacetamide promotion in a two-stage hepatocarcinogenesis model using rats. *Toxicology.* **305**:30-40.
39. Galvez-Contreras AY, Zarate-Lopez D, Torres-Chavez AL and Gonzalez-Perez O. (2020). Role of Oligodendrocytes and Myelin in the Pathophysiology of Autism Spectrum Disorder. *Brain Sci.* **10**(12):951.
40. Gao C, Gill MB, Tronson NC, Guedea AL, Guzmán YF, Huh KH, Corcoran KA, Swanson GT and Radulovic J. (2010). Hippocampal NMDA receptor subunits differentially regulate fear memory formation and neuronal signal propagation. *Hippocampus.* **20**(9):1072-82.

41. Gao YJ and Ji RR. (2009). c-Fos and pERK, which is a better marker for neuronal activation and central sensitization after noxious stimulation and tissue injury? *Open Pain J.* **2**:11-17.
42. Gasparotto Junior A, Gasparotto FM, Lourenço EL, Crestani S, Stefanello ME, Salvador MJ, da Silva-Santos JE, Marques MC and Kassuya CA. (2011). Antihypertensive effects of isoquercitrin and extracts from *Tropaeolum majus* L.: evidence for the inhibition of angiotensin converting enzyme. *J Ethnopharmacol.* **134**(2):363-72.
43. Ge S, Pradhan DA, Ming GL and Song H. (2007). GABA sets the tempo for activity-dependent adult neurogenesis. *Trends Neurosci.* **30**(1):1-8.
44. Ghowsi M, Khazali H and Sisakhtnezhad S. (2018). Evaluation of TNF- $\alpha$  and IL-6 mRNAs expressions in visceral and subcutaneous adipose tissues of polycystic ovarian rats and effects of resveratrol. *Iran J Basic Med Sci.* **21**(2):165-174.
45. Gong C, Wang TW, Huang HS and Parent JM. (2007). Reelin regulates neuronal progenitor migration in intact and epileptic hippocampus. *J Neurosci.* **27**(8):1803-11.
46. Graciarena M, Depino AM and Pitossi FJ. (2010). Prenatal inflammation impairs adult neurogenesis and memory related behavior through persistent hippocampal TGF $\beta$ 1 downregulation. *Brain Behav Immun.* **24**(8):1301-9.
47. Gravel M, Peterson J, Yong VW, Kottis V, Trapp B and Braun PE. (1996). Overexpression of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in transgenic mice alters oligodendrocyte development and produces aberrant myelination. *Mol Cell Neurosci.* **7**(6):453-466.

48. Groisman AI, Yang SM and Schinder AF. (2020). Differential Coupling of Adult-Born Granule Cells to Parvalbumin and Somatostatin Interneurons. *Cell Rep.* **30**(1):202-214.e4.
49. Guo JY, Ragland JD and Carter CS. (2019). Memory and cognition in schizophrenia. *Mol Psychiatry.* **24**(5):633-642.
50. Guzowski JF. (2002). Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. *Hippocampus.* **12**(1):86-104.
51. Hagberg H, Gressens P and Mallard C. (2012). Inflammation during fetal and neonatal life: implications for neurologic and neuropsychiatric disease in children and adults. *Ann Neurol.* **71**(4): 444-457.
52. Han VX, Patel S, Jones HF, Dale RC. (2021). Maternal immune activation and neuroinflammation in human neurodevelopmental disorders. *Nat Rev Neurol.* **17**(9):564-579
53. He Y, Dupree J, Wang J, Sandoval J, Li J, Liu H, Shi Y, Nave KA and Casaccia-Bonnel P. (2007). The transcription factor Yin Yang 1 is essential for oligodendrocyte progenitor differentiation. *Neuron.* **55**(2):217-30.
54. Hodge RD, Kowalczyk TD, Wolf SA, Encinas JM, Rippey C, Enikolopov G, Kempermann G and Hevner RF. (2008). Intermediate progenitors in adult hippocampal neurogenesis: Tbr2 expression and coordinate regulation of neuronal output. *J Neurosci.* **28**(14):3707-17.

55. Hoshino K, Hasegawa K, Kamiya H and Morimoto Y. (2017). Synapse-specific effects of IL-1 $\beta$  on long-term potentiation in the mouse hippocampus. *Biomed Res.* **38**(3):183-188.
56. Huckleberry KA, Shue F, Copeland T, Chitwood RA, Yin W and Drew MR. (2018). Dorsal and ventral hippocampal adult-born neurons contribute to context fear memory. *Neuropsychopharmacology.* **43**(12):2487-2496.
57. Hyman SL, Levy SE and Myers SM. (2020). Identification, Evaluation, and Management of Children With Autism Spectrum Disorder. *Pediatrics.* **145**(1):e20193447.
58. Iosif RE, Ekdahl CT, Ahlenius H, Pronk CJ, Bonde S, Kokaia Z, Jacobsen SE and Lindvall O. (2006). Tumor necrosis factor receptor 1 is a negative regulator of progenitor proliferation in adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci.* **26**(38):9703-12.
59. Izvol'skaia M, Sharova V and Zakharova L. (2018). Prenatal Programming of Neuroendocrine System Development by Lipopolysaccharide: Long-Term Effects. *Int J Mol Sci.* **19**(11):3695.
60. Jurga AM, Paleczna M and Kuter KZ. (2020). Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Front Cell Neurosci.* **14**:198.
61. Kangawa Y, Yoshida T, Abe H, Seto Y, Miyashita T, Nakamura M, Kihara T, Hayashi SM and Shibutani M. (2017). Anti-inflammatory effects of the selective phosphodiesterase 3 inhibitor, cilostazol, and antioxidants, enzymatically-modified isoquercitrin and  $\alpha$ -lipoic acid, reduce dextran sulphate sodium-induced colorectal mucosal injury in mice. *Exp Toxicol Pathol.* **69**(4):179-186

62. Knoth R, Singec I, Ditter M, Pantazis G, Capetian P, Meyer RP, Horvat V, Volk B and Kempermann G. (2010). Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years. *PLoS One*. **5**(1):e8809.
63. Kolomeets NS. (2017). Narusheniia differentsirovki oligodendrotsitov v mozge pri shizofrenii: sviaz' s osnovnymi gipotezami zabolevaniia [Disturbance of oligodendrocyte differentiation in schizophrenia in relation to main hypothesis of the disease]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*. **117**(8):108-117.
64. Kronenberg G, Reuter K, Steiner B, Brandt MD, Jessberger S, Yamaguchi M and Kempermann G. (2003). Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J Comp Neurol*. **467**(4):455-63.
65. Kuhn S, Gritti L, Crooks D and Dombrowski Y. (2019). Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond. *Cells*. **8**(11):1424.
66. Lau CG, Takeuchi K, Rodenas-Ruano A, Takayasu Y, Murphy J, Bennett MV and Zukin RS. (2009). Regulation of NMDA receptor Ca<sup>2+</sup> signalling and synaptic plasticity. *Biochem Soc Trans*. **37**(Pt 6):1369-74.
67. Li G, Bien-Ly N, Andrews-Zwilling Y, Xu Q, Bernardo A, Ring K, Halabisky B, Deng C, Mahley RW and Huang Y. (2009). GABAergic interneuron dysfunction impairs hippocampal neurogenesis in adult apolipoprotein E4 knockin mice. *Cell Stem Cell*. **5**(6):634-45.

68. Li Z, Jagadapillai R, Gozal E and Barnes G. (2019). Deletion of Semaphorin 3F in Interneurons Is Associated with Decreased GABAergic Neurons, Autism-like Behavior, and Increased Oxidative Stress Cascades. *Mol Neurobiol.* **56**(8):5520-5538.
69. Livak KJ and Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, **25**:402-408
70. Loayza M, Lin S, Carter K, Ojeda N, Fan LW, Ramarao S, Bhatt A and Pang Y. (2022). Maternal immune activation alters fetal and neonatal microglia phenotype and disrupts neurogenesis in mice. *Pediatr Res.* 10.1038/s41390-022-02239-w. Advance online publication.
71. Lürbke A, Hagemeyer K, Cui QL, Metz I, Brück W, Antel J and Kuhlmann T. (2013). Limited TCF7L2 expression in MS lesions. *PLoS One.* **8**(8):e72822.
72. Makino T, Kanemaru M, Okuyama S, Shimizu R, Tanaka H, Mizukami H. (2013). Anti-allergic effects of enzymatically modified isoquercitrin ( $\alpha$ -oligoglucosyl quercetin 3-O-glucoside), quercetin 3-O-glucoside,  $\alpha$ -oligoglucosyl rutin, and quercetin, when administered orally to mice. *J Nat Med.* **67**(4):881-6
73. Maren S, Phan KL and Liberzon I. (2013). The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nat Rev Neurosci.* **14**(6):417-28.
74. Masiulis I, Yun S and Eisch AJ. (2011). The interesting interplay between interneurons and adult hippocampal neurogenesis. *Mol Neurobiol.* **44**(3):287-302.

75. Masubuchi Y, Nakahara J, Kikuchi S, Okano H, Takahashi Y, Takashima K, Koyanagi M, Maronpot RR, Yoshida T, Hayashi SM and Shibutani M. (2020). Continuous exposure to  $\alpha$ -glycosyl isoquercitrin from developmental stages to adulthood is necessary for facilitating fear extinction learning in rats. *J Toxicol Pathol.* **33**(4):247-263.
76. McNeely S, Beckmann R and Bence Lin AK. (2014). CHEK again: revisiting the development of CHK1 inhibitors for cancer therapy. *Pharmacol Ther.* **142**(1):1-10.
77. Ménard C, Hodes GE and Russo SJ. (2016). Pathogenesis of depression: Insights from human and rodent studies. *Neuroscience.* **321**:138-162.
78. Micheva KD, Wolman D, Mensh BD, Pax E, Buchanan J, Smith SJ and Bock DD. (2016). A large fraction of neocortical myelin ensheathes axons of local inhibitory neurons. *Elife.* **5**:e15784.
79. Miyashita T, Kubik S, Lewandowski G and Guzowski JF. (2008). Networks of neurons, networks of genes: an integrated view of memory consolidation. *Neurobiol Learn Mem.* **89**(3):269-84.
80. Mouihate A. (2016). Prenatal Activation of Toll-Like Receptor-4 Dampens Adult Hippocampal Neurogenesis in An IL-6 Dependent Manner. *Front Cell Neurosci.* **10**:173.
81. Murueta-Goyena A, Ortuzar N, Lafuente JV and Bengoetxea H. (2020). Enriched Environment Reverts Somatostatin Interneuron Loss in MK-801 Model of Schizophrenia. *Mol Neurobiol.* **57**(1):125-134.



82. Myllykoski M, Seidel L, Muruganandam G, Raasakka A, Torda AE and Kursula P. (2016).  
Structural and functional evolution of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase. *Brain Res.*  
**1641**(Pt A):64-78.
83. Nahm WK and Noebels JL. (1998). Nonobligate role of early or sustained expression of  
immediate-early gene proteins c-fos, c-jun, and Zif/268 in hippocampal mossy fiber sprouting. *J*  
*Neurosci.* **18**(22):9245-55.
84. Okada R, Masubuchi Y, Tanaka T, Nakajima K, Masuda S, Nakamura K, Maronpot RR, Yoshida  
T, Koyanagi M, Hayashi SM and Shibutani M. (2019). Continuous exposure to  $\alpha$ -glycosyl  
isoquercitrin from developmental stage facilitates fear extinction learning in rats. *J. Funct. Foods,*  
**55**:312-324,
85. Oschwald A, Petry P, Kierdorf K and Erny D. (2020). CNS Macrophages and Infant Infections.  
*Front Immunol.* **11**:2123.
86. Pang Y, Dai X, Roller A, Carter K, Paul I, Bhatt AJ, Lin RC and Fan LW. (2016). Early Postnatal  
Lipopolysaccharide Exposure Leads to Enhanced Neurogenesis and Impaired Communicative  
Functions in Rats. *PLoS One.* **11**(10):e0164403.
87. Pawluski JL, Brummelte S, Barha CK, Crozier TM and Galea LA. (2009). Effects of steroid  
hormones on neurogenesis in the hippocampus of the adult female rodent during the estrous  
cycle, pregnancy, lactation and aging. *Front Neuroendocrinol.* **30**(3):343-57.

88. Rhee J, Park K, Kim KC, Shin CY and Chung C. (2018) Impaired Hippocampal Synaptic Plasticity and Enhanced Excitatory Transmission in a Novel Animal Model of Autism Spectrum Disorders with Telomerase Reverse Transcriptase Overexpression. *Mol Cells*. **41**(5):486-494.
89. Roth FC and Draguhn A. (2012). GABA metabolism and transport: effects on synaptic efficacy. *Neural Plast*. 805830.
90. Rusznák Z, Henskens W, Schofield E, Kim WS and Fu Y. (2016). Adult Neurogenesis and Gliogenesis: Possible Mechanisms for Neurorestoration. *Exp Neurobiol*. **25**(3):103-12.
91. Sakry D and Trotter J. (2016). The role of the NG2 proteoglycan in OPC and CNS network function. *Brain Res*. **1638**(Pt B):161-166.
92. Scott KJ, Tashakori-Sabzevar F and Bilkey DK. (2021). Maternal immune activation alters the sequential structure of ultrasonic communications in male rats. *Brain Behav Immun Health*. **16**:100304.
93. Sharma SR, Gonda X and Tarazi FI. (2018). Autism Spectrum Disorder: Classification, diagnosis and therapy. *Pharmacol Ther*. **190**:91-104.
94. Shibutani M. (2015). Hippocampal Neurogenesis as a Critical Target of Neurotoxicants Contained in Foods. **3**(1):1-15
95. Sibbe M and Kulik A. (2017). GABAergic Regulation of Adult Hippocampal Neurogenesis. *Mol Neurobiol*. **54**(7):5497-5510.

96. Singh K, Connors SL, Macklin EA, Smith KD, Fahey JW, Talalay P and Zimmerman AW. (2014). Sulforaphane treatment of autism spectrum disorder (ASD). *Proc Natl Acad Sci U S A.* **111**(43):15550-5.
97. Smolders S, Notter T, Smolders SMT, Rigo JM and Brône B. (2018). Controversies and prospects about microglia in maternal immune activation models for neurodevelopmental disorders. *Brain Behav Immun.* **73**:51-65.
98. Sock E and Wegner M. (2021). Using the lineage determinants *Olig2* and *Sox10* to explore transcriptional regulation of oligodendrocyte development. *Dev Neurobiol.* **81**(7):892-901.
99. Song J, Zhong C, Bonaguidi MA, Sun GJ, Hsu D, Gu Y, Meletis K, Huang ZJ, Ge S, Enikolopov G, Deisseroth K, Luscher B, Christian KM, Ming GL and Song H. (2012). Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision. *Nature.* **489**(7414):150-4.
100. Spencer JP. (2010). Beyond antioxidants: the cellular and molecular interactions of flavonoids and how these underpin their actions on the brain. *Proc Nutr Soc.* **69**(2):244-60.
101. Stedehouder J, Couey JJ, Brizee D, Hosseini B, Slotman JA, Dirven CMF, Shpak G, Houtsmuller AB and Kushner SA. (2017). Fast-spiking Parvalbumin Interneurons are Frequently Myelinated in the Cerebral Cortex of Mice and Humans. *Cereb Cortex.* **27**(10):5001-5013.
102. Takemiya T, Fumizawa K, Yamagata K, Iwakura Y and Kawakami M. (2017). Brain Interleukin-1 Facilitates Learning of a Water Maze Spatial Memory Task in Young Mice. *Front Behav Neurosci.* **11**:202.

103. Tanaka T, Masubuchi Y, Okada R, Nakajima K, Nakamura K, Masuda S, Nakahara J, Maronpot RR, Yoshida T, Koyanagi M, Hayashi SM and Shibutani M. (2019). Ameliorating effect of postweaning exposure to antioxidant on disruption of hippocampal neurogenesis induced by developmental hypothyroidism in rats. *J Toxicol Sci.* **44**(5):357-372.
104. Tang Y and Le W. (2016). Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol.* **53**(2):1181-1194.
105. Thiel G and Rössler OG. (2018). Resveratrol stimulates c-Fos gene transcription via activation of ERK1/2 involving multiple genetic elements. *Gene.* **658**:70-75.
106. Tozuka Y, Fukuda S, Namba T, Seki T and Hisatsune T. (2005). GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron.* **47**(6):803-15.
107. Trotter J, Karram K and Nishiyama A. (2010). NG2 cells: Properties, progeny and origin. *Brain Res Rev.* **63**(1-2):72-82.
108. Tyagi E, Agrawal R, Nath C and Shukla R. (2010). Cholinergic protection via alpha7 nicotinic acetylcholine receptors and PI3K-Akt pathway in LPS-induced neuroinflammation. *Neurochem Int.* **56**(1):135-42.
109. Tzingounis AV and Nicoll RA. (2006). Arc/Arg3.1: linking gene expression to synaptic plasticity and memory. *Neuron.* **52**(3):403-7.
110. Valentová K, Vrba J, Bancířová M, Ulrichová J and Křen V. (2014). Isoquercitrin: pharmacology, toxicology, and metabolism. *Food Chem Toxicol.* **68**:267-82.

111. von Bohlen Und Halbach O. (2007). Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res.* **329**(3):409-20.
112. Wang L, Shiraki A, Itahashi M, Akane H, Abe H, Mitsumori K and Shibutani M. (2013). Aberration in epigenetic gene regulation in hippocampal neurogenesis by developmental exposure to manganese chloride in mice. *Toxicol Sci.* **136**(1):154-65.
113. Waterhouse EG, An JJ, Orefice LL, Baydyuk M, Liao GY, Zheng K, Lu B and Xu B. (2012). BDNF promotes differentiation and maturation of adult-born neurons through GABAergic transmission. *J Neurosci.* **32**(41):14318-30.
114. Williams RJ and Spencer JP. (2012). Flavonoids, cognition, and dementia: actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med.* **52**(1):35-45.
115. Wischhof L, Irrsack E, Osorio C and Koch M. (2015). Prenatal LPS-exposure--a neurodevelopmental rat model of schizophrenia--differentially affects cognitive functions, myelination and parvalbumin expression in male and female offspring. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* **57**:17-30.
116. Wöhr M and Schwarting RK. (2008). Maternal care, isolation-induced infant ultrasonic calling, and their relations to adult anxiety-related behavior in the rat. *Behav Neurosci.* **122**(2):310-30.
117. Wu Y, He T, Fu Y and Chen J. (2021). Corynoline protects lipopolysaccharide-induced mastitis through regulating AKT/GSK3 $\beta$ /Nrf2 signaling pathway. *Environ Toxicol.* **36**(12):2493-2499.

118. Xie D, Shen F, He S, Chen M, Han Q, Fang M, Zeng H, Chen C and Deng Y. (2016). IL-1 $\beta$  induces hypomyelination in the periventricular white matter through inhibition of oligodendrocyte progenitor cell maturation via FYN/MEK/ERK signaling pathway in septic neonatal rats. *Glia*. **64**(4):583-602.
119. Xiong XY, Liu L and Yang QW. (2016). Functions and mechanisms of microglia/macrophages in neuroinflammation and neurogenesis after stroke. *Prog Neurobiol*. **142**:23-44.
120. Xu S, Lu J, Shao A, Zhang JH and Zhang J. (2020). Glial Cells: Role of the Immune Response in Ischemic Stroke. *Front Immunol*. **11**:294.
121. Yamamoto M, Kensler TW and Motohashi H. (2018). The KEAP1-NRF2 System: a Thiol-Based Sensor-Effector Apparatus for Maintaining Redox Homeostasis. *Physiol Rev*. **98**(3):1169-1203.
122. Yan T, Zhang X, Mao Q, Wu B, He B, Jia Y and Shang L. (2022). *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* alleviated LPS-induced cognitive impairments via PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Environ Toxicol*. **37**(3):489-503.
123. Yeh CH, Yang ML, Lee CY, Yang CP, Li YC, Chen CJ and Kuan YH. (2014). Wogonin attenuates endotoxin-induced prostaglandin E2 and nitric oxide production via Src-ERK1/2-NF $\kappa$ B pathway in BV-2 microglial cells. *Environ Toxicol*. **29**(10):1162-70.
124. Zhang X, Liu Y, Hong X, Li X, Meshul CK, Moore C, Yang Y, Han Y, Li WG, Qi X, Lou H, Duan S, Xu TL and Tong X. (2021). NG2 glia-derived GABA release tunes inhibitory synapses and contributes to stress-induced anxiety. *Nat Commun*. **12**(1):5740.

図表

Table 1-1.

Primary antibodies used for immunohistochemistry

Antigen	Abbreviate d name	Host species	Clonality	Clone name	Dilution	Antigen retrieval	Manufacturer (City, State, Country)
Activity-regulated cytoskeleton-associated protein	ARC	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:2000	Microwavin g <sup>a</sup>	Synaptic Systems GmbH (Goettingen, Germany)
Calbindin-D-28K	CALB1	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	CB-955	1:500	Microwavin g <sup>a</sup>	Sigma-Aldrich Corp. (Saint Louis, MO, USA)
Calbindin-D-29K	CALB2	Rabbit	Monoclonal IgG	EP1798	1:600	Microwavin g <sup>a</sup>	Abcam plc (Cambridge, UK)
Cluster of differentiation 68	CD68	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	ED1	1:500	Autoclaving b	BMA Biomedicals (Augst, Switzerland)
Cluster of differentiation 163	CD163	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	ED2	1:500	Protein digesting <sup>c</sup>	Bio-rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
Cyclooxygenase-2	COX2	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	33/Cox-2	1:200	Microwavin g <sup>a</sup>	BD Biosciences, Inc. (San Jose, CA, USA)
Doublecortin	DCX	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:1000	Autoclaving b	Abcam plc
Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	FOS	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	2H2	1:1000	Microwavin g <sup>d</sup>	Abcam plc
Glutamic acid decarboxylase 67	GAD67	Mouse	Monoclonal IgG <sub>2a</sub>	1G10.2	1:200	Autoclaving b	Sigma-Aldrich Corp.
Glial fibrillary acidic protein	GFAP	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	GA5	1:200	None	MilliporeSigma (Burlington, MA, USA)
Ionized calcium-binding adaptor molecule 1	Iba1	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:300	None	Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation (Osaka, Japan)
Neuronal nuclei	NeuN	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	A60	1:100	None	MilliporeSigma
Parvalbumin	PVALB	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	PARV-19	1:1000	Microwavin g <sup>a</sup>	MilliporeSigma
phosphorylated Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (p44/p42 MAP kinase)	p-ERK1/2	Rabbit	Monoclonal IgG	137F5	1:100	Microwavin g <sup>a</sup>	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA)
Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	Mouse	Monoclonal IgG <sub>2a</sub>	PC10	1:200	None	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
Reelin	RELN	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	Kappa G10	1:1000	None	Novus Biologicals (Littleton, CO, USA)
SRY-box transcription factor 2	SOX2	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	9-9-3	1:4000	None	Abcam plc
Somatostatin	SST	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:200	Microwavin g <sup>a</sup>	Abcam plc
T-box brain protein 2	TBR2	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:500	Autoclaving b	Abcam plc
Tubulin, beta 3 class III	TUBB3	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	TU-20	1:500	Autoclaving b	Abcam plc

Abbreviation: n.a, not applicable.

<sup>a</sup> 90°C for 10 min in 10 mM citrate buffer (pH 6.0).

<sup>b</sup> 121°C for 10 min in 10 mM citrate buffer (pH 6.0).

<sup>c</sup> Proteinase K treatment (40 µg/mL) at room temperature for 15 min.

<sup>d</sup> 90°C for 10 min in Target Retrieval Solution (pH 9.0; Agilent Technologies).

**Table 1-2**

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

Gene	Accession no.	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')
<i>Apex1</i>	NM_024148.1	GAATGTGGAT GGGCTTCGA	AAGATGTCTG GTGCTTCTTC CTTT
<i>Arc</i>	NM_019361.1	AGTGTCTGAA AGGCAATGAA AAGTAG	CCTTCGGCCA TCTCTGATTC
<i>Bak1</i>	NM_053812.1	CTGCTAACCC TGAGATGGAC AAC	ACCCACCTGA CCCAAGACAC T
<i>Bax</i>	NM_017059.2	AGGACGCATC CACCAAGAAG	CCAGTTCATC GCCAATTCG
<i>Bcl2</i>	NM_016993.1	GGATGCCTTT GTGGAACATAT ATGG	CAGAGACAGC CAGGAGAAAT CAA
<i>Bdnf</i>	NM_001270630	CACTTTTGAG CACGTGATCG A	TCCGCGTCTT TATGGTTTTT
<i>Brip1</i>	XM_008768158.1	GGGACACGAA CACACAAGCA	GACCCCTGAG TAAGTGTGTT TACG
<i>Calb1</i>	NM_031984.2	AGGCTGGATT GGACCTATCA C	GTTGCTGGCA TCGAAAGAGC
<i>Calb2</i>	NM_053988	AGCTCCAGGA GTACACCCAA AC	CCCAATTTGC CGTCTCCAT
<i>Casp1</i>	NM_012762.2	CCTGCCCAGA GCACAAGACT	CCTGGAGACC ATGAGACATG AA
<i>Casp3</i>	NM_012922.2	ACAAGCTGGA ATTCATGCAC AT	CAAATTCCGT GGCCACCTT
<i>Casp6</i>	NM_001271984.1	GCACGGTAGT TCCCTGGAGT T	GCGCTGAGAG ACCTTCCTGT T
<i>Casp8</i>	NM_022277.1	TGGCTGGAAA ACCCAAAATC	GGCACCGCTT TCTGGAAGT
<i>Casp9</i>	NM_031632.1	CATGGTGGAG GTGAAGAACG A	TGCGCCATCT CCATCAAAG
<i>Casp12</i>	NM_130422.1	TCCTCCGACA GCACATTCCT	CACCCACAG ATTCCTTCCA
<i>Cat</i>	NM_012520.2	ATTGCCGTCC GATTCTCC	CCAGTTACCA TCTTCAGTGT AG
<i>Cend1</i>	NM_171992	GCGTTCGGAA CCAGATTCAC	CAAAATAAAA CTGACCCTCC AATAGC
<i>Cend2</i>	NM_022267	CCTGCCAGGA GCAAATCG	GCTCTTGACG GAACTGCTGA A
<i>Cdk1</i>	NM_019296.1	CGCGTCCCAC GTCAAGA	CCAGCATTTT CGAGAGCAAG T
<i>Cdk2</i>	NM_199501.1	TTGGCCAGGA GTTACTTCTA TGC	TCCTGCCGAG CCCACTT
<i>Chek1</i>	NM_080400.1	TGGCAAAGGA CTGCTTGTTG	AGTTGAACTT CTCCATAGGC G
<i>Chrna7</i>	NM_012832	CGTTTCGCTGG TTCCTTTT	GGACCAGGAC CCAAACCTCA
<i>Chrb2</i>	NM_009602.4	TGTGGACGGT GTACGCTTCA	CCTCACACTC TGGTCATCAT CTTT
<i>Chrm1</i>	NM_080773.1	CCATCCTCTT CTGGCAATAC CT	GGGAGAGGAA CTGGATGTAG CA
<i>Chrm2</i>	NM_031016.1	CCCAGTTAAG CGGACCACAA	CCCAGAGGAT GAAGGAAAGG A
<i>Cntf</i>	NM_013166	GAGGAGTTAA TGGTGCTTCT GGAA	TGGCAGGCAT CCCATCA
<i>Dcx</i>	NM_053379.3	GGATTGTGTA CGCTGTTTCT TCTG	TCAGGTCAGC CAGCAATGC
<i>Dpysl3</i>	NM_012934.1	CATGTGGTAC CTGAACCTGA GTCTA	GCCCACTCAC GCCACTTTT
<i>Drd2</i>	NM_012547.1	CTTTGCAGAC CACCACCAAC T	TGTGGCCACC AGAAGATCAG
<i>Eomes</i>	XM_017596193.1	GCCGGACTAC CATGGACATC	TTTCTCCTTG GCAAGCTGAT C
<i>Ercc1</i>	NM_001106228.1	TGGCGTTGTA TCGCTCTAT T	GTCCTTTCCC GATCCCTGA A
<i>Fos</i>	NM_022197	CAACGAGCCC TCCTCTGACT	TGCCTTCTCT GACTGCTCAC A
<i>Gapdh</i>	NM_017008	GGCCGAGGGC CACTA	TGTTGAAGTC ACAGGAGACA ACCT
<i>Gpx1</i>	NM_030826.4	GCTGCTCATT GAGAATGTCG	GAATCTCTTC ATTCTTGCCA TT
<i>Gpx2</i>	NM_183403.2	GTGTGATGTC AATGGGCAGA AT	AGGGCAGCTT GTCTTTCAGG TA
<i>Gpx4</i>	NM_001039849.3	TGCATCCCGC GATGATT	TCCTTGGCTG CGAATTCG
<i>Gria1</i>	NM_031608	GTGAGCGTCG TCCTCTTCCT	TCTTCGCTGT GCCATTTCGTA
<i>Gria2</i>	NM_001083811.1	CATCACACCT AGCTTCCCAA CA	CTTTGAGGTC AGGTCGCATC T
<i>Gria3</i>	NM_032990	GAAACATAAA GGACGTCCAG GAA	TTCTGCCTT CTGTCCATTT CT
<i>Grin2a</i>	NM_012573	GGCTGTCAGC ACTGAATCCA	GGTTTAGAGA ATCCTGGCGT AGAG
<i>Grin2b</i>	NM_012574	TCGTCAAGAC ACAAGATTAA AACCA	GGAGGATAAA GGAACGGAAG AAA
<i>Grin2d</i>	NM_022797	TCGTGCTCAC ACCCAAGGA	GGTCACTGCC ACAAAGGATG T
<i>Hmox1</i>	NM_012580.2	GCTCTATCGT GCTCGCATGA	TCTTCTGTCA CCCTGTGCTT GA
<i>Hprt1</i>	NM_012583	GCCGACCGGT TCTGTTCAT	TCATAACCTG TTCATCATC ACTAATC
<i>Il4</i>	NM_201270.1	CAGACCGCTG ACACCTCTAC A	AACAAGGAAC ACCACGGAGA
<i>Il6</i>	NM_012589.2	GACTTCCAGC CAGTTGCCTT CTTG	TGGTCTGTTG TGGGTGGTAT CCTC
<i>Il18</i>	NM_019165.1	ACACAGGCGG GTTTCTTTT	CAACCGCAGT AATACGGAGC ATA
<i>Il1a</i>	NM_017019.1	GAGGCCATAG CCCATGATTT AG	TGGAAGCTGT GAGGTGCTGA T
<i>Il1b</i>	NM_031512	TGACAGACCC CAAAAGATTA AGG	CTCATCTGGA CAGCCCAAGT C
<i>Jun</i>	NM_021835.3	GCCCTCAACG CCTCGTT	GCCAGGTTCA AGGTCAATGC T
<i>Keap1</i>	NM_057152	CAGAACAAGC CATGCCTTCT T	TCTGGTCTTC CACAAGGTCC TT
<i>Mapk1</i>	NM_053842.2	AAAATAAGGT GCCGTGGAAC AG	ATCCAGTAAA TCCAGAGCTT TGGA
<i>Mapk3</i>	NM_017347.3	GCCCTCCAAT CTGCTTATCA AC	GCAAGGCCAA AATCACAGAT C
<i>Mt1</i>	NM_138826.4	GCTGTGCCTG AAGTGACGAA	TCTGAGTTGG TCCGGAAATT ATTT
<i>Mt2a</i>	NM_001137564.1	GCGTCTCAC AATGGTGTA AATAA	GAACCGTCA GGGTTGTACA A
<i>Nes</i>	NM_001308239.1	TTGGCTTTCT GGACCCCAAG	CAGGAAGGCT GTCACAGGAG



<i>Nfkb1</i>	NM_001276711.1	CACTAAATCC AACACAGGCA TCAC	GGCACAATCT CTAGGCTCGT TT
<i>Nfe2l2</i>	NM_031789.2	TGCCCTGGGA AGTGTCAAA	GGCTGACTG TATCCCAGA AGA
<i>Nqo1</i>	NM_017000.3	TCTGCGTGGG CCAATACA	GATCCGCCCC CAACTTCT
<i>Ntrk1</i>	NM_021589.1	GCCGCCCTCT TCCTTTCT	ATTTGCTCCT CTGTCCACAT TTG
<i>Ntrk2</i>	NM_001163168.2	GGCTTATGCT TGCTGGTCTT G	TCCTAGTGGT GCTGCATTG C
<i>Ogg1</i>	NM_030870.1	GACCCCACTG AGTGCCTTTT C	CGTTCCACCA TGCCAGTAAT G
<i>Pcna</i>	NM_022381.3	CTCACGTCTC CTTAGTGCAG CTT	CGATCGCAGC GGTATGTGT
<i>Ptgs2</i>	NM_011198	CTCAGCCAGG CAGCAAATC	ACATTCACCA CGGTTTTGAC
<i>Pvalb</i>	NM_022499	TCGCCACAAA AAGTTCTTCC A	TCTTCACATC ATCCGCACTC TT
<i>Rbfox3</i>	NM_001134498.2	TCTCTTGTCC GTTTGCTTCC A	CCTCCATAAA TCTCAGCACC ATAA
<i>Reln</i>	NM_080394	GCCAGCTTTC GACTACCCTA TTAAC	CGTAGTGGCA CAGAAGCTAT CG
<i>Slc17a7</i>	NM_053859.2	TTGTGGTAC TCCACCCTA A	CGAAGATGAC ACAGCCATAG TGA
<i>Sod1</i>	NM_017050.1	CATTCCATCA TTGGCCGTAC TA	TTTCCACCTT TGCCCAAGTC
<i>Sod2</i>	NM_017051.2	CTCCCTGACC TGCCTTACGA	CTGCATGATC TGC GCGTTA
<i>Sox2</i>	NM_001109181	GCGGCAACCA GAAGAACAG	CCCCTCGCC ATGCT
<i>Sst</i>	NM_012659.1	ACCCCGGGAA CGCAAA	CCACACCATG AAGGCATTCA
<i>Tgfb1</i>	NM_021578	ATCGACATGG AGCTGGTGAA A	CGAGCCTTAG TTTGGACAGG AT
<i>Tnf</i>	NM_012675.3	GCCCGAGGCA ACACATCT	CCAGTTCCAC ATCTCGGATC A
<i>Tp53</i>	NM_030989	CCCTTCACTG CCTTTTTTTA CCT	GCCAGGAACC AGTTTGATA G
<i>Tubb3</i>	NM_139254.2	AACGTCAAGG TAGCGGTGTG T	CGTGCTGTTG CCGATGAAG
<i>Txn1</i>	NM_053800.3	GTGGATGACT GCCAGGATGT T	GGAAGGTCGG CATGCATT

Abbreviations: *Apex1*, apurinic/aprimidinic endodeoxyribonuclease 1; *Arc*, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; *Bak1*, BCL2-antagonist/killer 1; *Bax*, BCL2 associated X, apoptosis regulator; *Bcl2*, BCL2, apoptosis regulator; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Brip1*, BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1; *Calb1*, calbindin 1 (also known as calbindin-D-28K); *Calb2*, calbindin 2 (also known as calbindin-D-29K and calretinin); *Casp1*, caspase 1; *Casp3*, caspase 3; *Casp6*, caspase 6; *Casp8*, caspase 8; *Casp9*, caspase 9; *Casp12*, caspase 12; *Cat*, catalase; *Cend1*, cyclin D1; *Cend2*, cyclin D2; *Cdk1*, cyclin-dependent kinase 1; *Cdk2*, cyclin-dependent kinase 2; *Chek1*, checkpoint kinase 1; *Chrna7*, cholinergic receptor nicotinic alpha 7 subunit; *Chrb2*, cholinergic receptor nicotinic beta 2 subunit; *Chrm1*, cholinergic receptor, muscarinic 1; *Chrm2*, cholinergic receptor, muscarinic 2; *Cntf*, ciliary neurotrophic factor; *Dcx*, doublecortin; *Dpysl3*, dihydropyrimidinase-like 3 (also known as TUC4: TOAD-64/Ulip/CRMP protein 4b); *Drd2*, dopamine receptor D2; *Eomes*, eomesodermin (also known as TBR2: T-box brain protein 2); *Ercc1*, ERCC excision repair 1, endonuclease non-catalytic subunit; *Fos*, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Gpx1*, glutathione peroxidase 1; *Gpx2*, glutathione peroxidase 2; *Gpx4*, glutathione peroxidase 4; *Gria1*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1; *Gria2*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2; *Gria3*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3; *Grin2a*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A; *Grin2b*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B; *Grin2d*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D; *Hmox1*, heme oxygenase 1; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Il4*, interleukin 4; *Il6*, interleukin 6; *Il18*, interleukin 18; *Il1a*, interleukin 1 alpha; *Il1b*, interleukin 1 beta; *Jun*, Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; *Keap1*, Kelch-like ECH-associated protein 1; *Mapk1*, mitogen activated protein kinase 1; *Mapk3*, mitogen activated protein kinase 3; *Mt1*, metallothionein 1; *Mt2a*, metallothionein 2A; *Nes*, nestin; *Nfkb1*, nuclear factor kappa B subunit 1; *Nfe2l2*, nuclear factor, erythroid 2-like 2 (also known as NRF2: nuclear factor erythroid 2-related factor 2); *Nqo1*, NAD(P)H quinone dehydrogenase 1; *Ntrk1*, neurotrophic receptor tyrosine kinase 1; *Ntrk2*, neurotrophic receptor tyrosine kinase 2 (also known as TrkB: tropomyosin receptor kinase B); *Ogg1*, 8-oxoguanine DNA glycosylase; *Pcna*, proliferating cell nuclear antigen; *Ptgs2*, prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (also known as COX2: cyclooxygenase-2); *Pvalb*, parvalbumin; *Rbfox3*, RNA binding fox-1 homolog 3 (also known as NeuN: neuronal nuclei); *Reln*, reelin; *Slc17a7*, solute carrier family 17 member 7; *Sod1*, superoxide dismutase 1; *Sod2*, superoxide dismutase 2; *Sox2*, SRY-box transcription factor 2; *Sst*, somatostatin; *Tgfb1*, transforming growth factor, beta 1; *Tnf*, tumor necrosis factor; *Tp53*, tumor protein p53; *Tubb3*, tubulin, beta 3 class III; *Txn1*, thioredoxin 1.

**Table 1-3**

**Survival rate of male pups after LPS treatment in the main study**

	Control <sup>a</sup>	LPS alone	LPS + 0.25% AGIQ	LPS + 0.5% AGIQ
No. of pups examined	86 <sup>a</sup>	87	89	84
Survival rate (%)	97.8±5.9	83.4±16.6**	82.9±21.7	71.8±27.3

Abbreviations: AGIQ, alpha-glycosyl isoquercitrin; LPS, lipopolysaccharides.

Data are expressed as the mean ± SD.

<sup>a</sup>Pups in controls were administrated saline intraperitoneally.

\*\* $P < 0.01$ , significantly different from the controls by Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test.

**Table 1-4****Body weight and food and water consumption of male pups in the main study**

	Control	LPS alone	LPS + 0.25% AGIQ	LPS + 0.5% AGIQ
No. of pups examined	35–86	31–87	32–89	26–84
<b>Body weight (g)</b>				
PND 3	9.8 ± 1.1	9.9 ± 1.1	10.0 ± 1.0	9.2 ± 1.0 <sup>††</sup>
PND 6	15.7 ± 1.6	12.2 ± 1.7 <sup>**</sup>	12.4 ± 1.7	11.0 ± 1.6 <sup>††</sup>
PND 9	21.8 ± 2.4	17.8 ± 2.3 <sup>**</sup>	18.0 ± 2.6	15.6 ± 2.9 <sup>††</sup>
PND 13	32.3 ± 3.1	28.2 ± 3.9 <sup>**</sup>	28.4 ± 4.2	25.6 ± 4.6 <sup>††</sup>
PND 17	44.3 ± 4.5	40.5 ± 5.0 <sup>**</sup>	41.1 ± 4.4	37.9 ± 6.3
PND 21	56.1 ± 4.4	50.0 ± 6.6 <sup>**</sup>	50.8 ± 5.3	47.4 ± 7.9
PND 23	63.8 ± 5.7	58.2 ± 6.6 <sup>**</sup>	58.5 ± 7.3	52.1 ± 9.6 <sup>††</sup>
PND 26	86.2 ± 7.9	80.3 ± 7.0 <sup>**</sup>	79.1 ± 8.1	69.7 ± 11.3 <sup>††</sup>
PND 33	129.7 ± 12.1	124.2 ± 10.0 <sup>*</sup>	119.1 ± 13.5	105.5 ± 16.3 <sup>††</sup>
PND 40	183.2 ± 17.1	175.6 ± 13.4 <sup>*</sup>	171.5 ± 19.1	157.7 ± 20.9 <sup>††</sup>
PND 47	241.8 ± 23.3	235.4 ± 17.8	229.9 ± 24.2	211.5 ± 26.8 <sup>††</sup>
PND 54	292.2 ± 26.0	281.8 ± 18.9	273.2 ± 24.0	255.1 ± 26.4 <sup>††</sup>
PND 61	346.0 ± 28.2	340.3 ± 22.3	332.1 ± 27.5	312.5 ± 29.3 <sup>††</sup>
PND 68	386.4 ± 28.6	375.2 ± 24.9	363.4 ± 29.3	346.8 ± 29.7 <sup>††</sup>
PND 75	421.7 ± 30.4	411.4 ± 26.9	405.0 ± 33.2	386.1 ± 32.9 <sup>††</sup>
PND 77	429.8 ± 31.0	418.8 ± 28.1	411.8 ± 34.3	393.6 ± 33.4 <sup>††</sup>
<b>Food consumption (g/day)</b>				
PND 23	11.0 ± 4.6	13.1 ± 4.2	9.4 ± 2.2 <sup>††</sup>	7.9 ± 2.2 <sup>††</sup>
PND 27	12.1 ± 2.0	11.4 ± 2.9	9.7 ± 4.0	10.0 ± 1.7
PND 34	18.1 ± 1.4	17.8 ± 1.0	16.9 ± 2.2	15.6 ± 1.1 <sup>†</sup>
PND 41	20.0 ± 2.0	21.0 ± 1.9	19.8 ± 2.6	19.0 ± 1.7
PND 48	22.7 ± 3.4	23.0 ± 1.4	22.1 ± 1.8	21.8 ± 2.0
PND 55	25.7 ± 3.7	25.2 ± 1.3	23.6 ± 1.0	23.3 ± 3.7
PND 62	26.8 ± 2.7	28.3 ± 1.7	27.6 ± 1.5	26.6 ± 2.6
PND 69	29.3 ± 2.6	28.7 ± 2.6	28.3 ± 2.0	28.0 ± 2.4
PND 76	30.2 ± 1.8	29.2 ± 2.7	29.0 ± 2.0	28.7 ± 1.9
<b>Water consumption (g/day)</b>				
PND 23	13.5 ± 1.3	12.5 ± 2.2	12.5 ± 0.9	11.0 ± 1.7 <sup>†</sup>
PND 27	16.2 ± 2.5	17.5 ± 0.9	15.9 ± 3.5	15.3 ± 1.4
PND 34	26.9 ± 2.3	26.7 ± 2.2	25.9 ± 2.8	23.5 ± 1.8 <sup>††</sup>
PND 41	30.1 ± 3.0	31.2 ± 3.9	30.7 ± 3.9	28.3 ± 2.7
PND 48	36.0 ± 4.6	35.3 ± 1.6	34.7 ± 1.7	32.5 ± 2.8 <sup>†</sup>
PND 55	44.4 ± 4.2	43.7 ± 3.0	45.0 ± 2.9	42.4 ± 2.9
PND 62	43.9 ± 1.9	42.3 ± 2.2	42.3 ± 1.7	42.2 ± 2.8
PND 69	44.1 ± 1.7	43.2 ± 1.8	43.1 ± 2.2	42.2 ± 2.1
PND 76	44.4 ± 2.4	43.1 ± 1.9	43.7 ± 2.2	41.7 ± 2.7

Abbreviations: AGIQ, alpha-glycosyl isoquercitrin; LPS, lipopolysaccharides; PND, postnatal day.

Data are expressed as the mean ± SD.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the controls by Student's  $t$ -test or Aspin-Welch's  $t$ -test.

<sup>†</sup> $P < 0.05$ , <sup>††</sup> $P < 0.01$ , significantly different from the LPS alone by Dunnett's test or Aspin-Welch's  $t$ -test with

Bonferroni correction.

**Table 1-5****Body and brain weights of male pups at necropsies in the main study**

	Control	LPS alone	LPS + 0.25% AGIQ	LPS + 0.5% AGIQ
PND 6				
No. of pups examined	10	10	10	10
Body weight (g)	15.1±1.6	11.4±2.1**	11.6±1.6	10.5±1.5
PND 21				
No. of pups examined	38	32	32	23
Body weight (g)	56.1±4.4	50.0±6.6**	50.8±5.3	47.4±7.9
No. of pups examined	25	21	21	13
Brain weight (g)	1.60±0.11	1.52±0.05**	1.53±0.05	1.46±0.10
PND 77				
No. of pups examined	35	31	32	26
Body weight (g)	429.8±31.0	418.8±28.1	411.8±34.3	393.6±33.4
No. of pups examined	10	7	8	6
Brain weight (g)	2.09±0.06	2.05±0.05	2.08±0.05	2.05±0.12

Abbreviations: AGIQ, alpha-glycosyl isoquercitrin; LPS, lipopolysaccharides; PND, postnatal day.

Data are expressed as the mean ± SD.

\*\* $P < 0.01$ , significantly different from the controls by Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test.

**Table 1-6****Changes in ultrasonic vocalization test of female pups at PND 10 in the satellite study**

	Control	LPS alone	LPS + 0.25% AGIQ	LPS + 0.5% AGIQ
No. of pups examined	6	10	10	10
Call count (counts)	161.3±66.9	72.4±56.2*	135.9±128.4	213.2±122.6†
Maximum duration (sec/call)	0.34±0.03	0.22±0.08**	0.35±0.13†	0.33±0.09
Average duration (sec/call)	0.10±0.02	0.09±0.01*	0.10±0.02	0.11±0.02†

Abbreviations: AGIQ, alpha-glycosyl isoquercitrin; LPS, lipopolysaccharides; PND, postnatal day.

Data are expressed as the mean ± SD.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the controls by Student's  $t$ -test or Aspin-Welch's  $t$ -test.

† $P < 0.05$ , significantly different from the LPS alone by Dunnett's test or Aspin-Welch's  $t$ -test with Bonferroni correction.

**Table 1-7****Changes in open field test of male pups in the main study**

	Control	LPS alone	LPS + 0.25% AGIQ	LPS + 0.5% AGIQ
Adolescent stage (PND 38)				
No. of pups examined	10	10	10	10
Total moving distance (cm)	4908.5±810.1	4655.6±1065.3	4546.3±1127.7	5079.5±1076.9
Total moving duration (sec)	248.2±25.3	238.9±50.9	241.7±59.8	254.4±45.8
Average moving speed (cm/sec)	8.2±1.3	7.8±1.8	7.6±1.9	8.5±1.8
Wall side time (sec)	512.1±25.0	521.3±19.6	508.6±40.3	512.6±32.8
Center region time (sec)	87.9±25.0	78.8±19.6	91.5±40.3	87.4±32.8
Center region rate (%)	14.7±4.2	13.1±3.3	15.2±6.7	14.6±5.5
Adult stage (PND 70)				
No. of pups examined	10	10	10	10
Total moving distance (cm)	4494.0±915.5	4221.5±1603.4	4405.4±936.5	4202.9±1197.5
Total moving duration (sec)	247.0±46.1	225.0±83.9	245.7±52.4	236.9±50.6
Average moving speed (cm/sec)	7.5±1.5	7.0±2.7	7.3±1.6	7.0±2.0
Wall side time (sec)	517.7±31.1	515.3±44.8	520.8±30.7	519.3±57.1
Center region time (sec)	82.3±31.1	84.7±44.8	79.3±30.7	80.7±57.1
Center region rate (%)	13.7±5.2	14.1±7.5	13.2±5.1	13.5±9.5

Abbreviations: AGIQ, alpha-glycosyl isoquercitrin; LPS, lipopolysaccharides; PND, postnatal day.

Data are expressed as the mean ± SD.

**Table 1-8****Changes in social interaction test of male pups at the adolescent stage in the main study**

	Control	LPS alone	LPS + 0.25% AGIQ	LPS + 0.5% AGIQ
Adolescent stage (PND 39–40)				
	No. of pups examined			
	10	10	10	10
Session 1 (Empty mesh cage)				
Total moving distance (cm)	3516.0±412.6	3128.9±1151.4	3252.1±917.8	3234.5±340.0
Average moving speed (cm/sec)	23.1±1.9	22.9±4.1	22.5±3.2	22.6±0.9
Immobile time (sec)	148.1±8.7	166.9±24.0	158.8±25.7	156.9±10.6
Moving distance around mesh cage (cm)	1399.1±212.8	1400.3±556.9	1241.0±184.4	1347.3±286.4
Staying duration around mesh cage (sec)	170.2±25.1	180.3±18.2	166.4±42.2	164.1±29.9
No. of entry around mesh cage	16.2±2.4	12.0±6.4	14.3±5.5	15.1±2.2
Total contact count to mesh cage	76.8±13.8	67.4±25.6	66.9±17.8	67.7±13.8
Total mesh cage contact duration (sec)	109.7±18.6	116.4±21.8	107.5±28.7	111.7±27.2
Average mesh cage contact duration (sec)	1.5±0.3	1.9±0.6	1.7±0.6	1.7±0.3
Session 2 (Novel animal in mesh cage)				
Total moving distance (cm)	1840.9±411.4	1511.3±360.2	1794.3±339.9	1853.1±392.2
Average moving speed (cm/sec)	23.5±2.7	21.8±2.8	22.8±2.5	24.3±2.6
Immobile time (sec)	102.4±10.3	111.1±11.1	101.9±8.5	104.3±10.8
Moving distance around mesh cage (cm)	1212.7±180.2	908.5±164.3**	982.4±192.5	1180.4±209.1††
Staying duration around mesh cage (sec)	149.5±16.8	142.1±16.4	134.5±18.8	150.0±10.7
No. of entry around mesh cage	6.6±2.6	5.8±2.3	7.6±2.5	7.7±2.7
Total contact count to mesh cage	49.1±4.5	39.4±9.1	43.1±9.5	49.7±12.8
Total mesh cage contact duration (sec)	119.6±14.2	117.4±21.2	107.2±16.2	121.3±11.9
Average mesh cage contact duration (sec)	2.5±0.5	3.2±1.4	2.6±0.7	2.6±0.8

Abbreviations: AGIQ, alpha-glycosyl isoquercitrin; LPS, lipopolysaccharides; PND, postnatal day.

Data are expressed as the mean ± SD.

\*\* $P < 0.01$ , significantly different from the controls by Student's  $t$ -test or Aspin-Welch's  $t$ -test.

†† $P < 0.01$ , significantly different from the LPS alone by Dunnett's test or Aspin-Welch's  $t$ -test with Bonferroni correction.

**Table 1-9****Changes in social interaction test of male pups at the adult stage in the main study**

	Control	LPS alone	LPS + 0.25% AGIQ	LPS + 0.5% AGIQ
Adult stage (PND71–72)				
No. of pups examined	10	10	10	10
Session 1 (Empty mesh cage)				
Total moving distance (cm)	2693.0±1166.7	3348.3±647.5	3204.4±468.8	2750.9±852.3
Average moving speed (cm/sec)	20.1±3.4	21.8±1.8	21.3±1.6	20.1±2.3
Immobile time (sec)	172.4±45.1	147.7±18.4	149.9±13.5	165.6±32.7
Moving distance around mesh cage (cm)	1230.0±481.3	1356.2±336.7	1474.1±136.9	1260.5±442.8
Staying duration around mesh cage (sec)	164.1±73.3	159.6±43.0	183.5±20.5	160.0±51.2
No. of entry around mesh cage	9.3±5.7	11.4±3.8	12.3±3.3	9.5±3.8
Total contact count to mesh cage	70.7±33.2	70.2±18.9	84.6±10.2	66.6±26.5
Total mesh cage contact duration (sec)	100.5±46.7	95.1±22.5	112.3±22.4	95.7±33.7
Average mesh cage contact duration (sec)	1.3±0.7	1.4±0.2	1.3±0.2	1.5±0.3
Session 2 (Novel animal in mesh cage)				
Total moving distance (cm)	1799.7±387.8	1867.1±336.2	1749.7±410.5	1703.5±479.9
Average moving speed (cm/sec)	21.0±1.7	22.0±1.6	21.2±2.0	20.3±2.6
Immobile time (sec)	94.9±12.8	95.5±10.4	98.2±12.3	97.5±13.8
Moving distance around mesh cage (cm)	1075.3±198.6	1178.3±230.3	1092.5±108.1	1079.8±303.3
Staying duration around mesh cage (sec)	141.3±11.7	143.1±10.6	146.5±14.5	136.8±14.2
No. of entry around mesh cage	6.6±2.2	5.7±1.4	5.7±2.3	5.3±2.2
Total contact count to mesh cage	51.9±12.0	55.1±13.4	59.5±15.6	51.5±14.7
Total mesh cage contact duration (sec)	104.4±12.3	102.1±12.6	103.0±11.5	100.1±11.3
Average mesh cage contact duration (sec)	2.1±0.7	2.0±0.5	1.9±0.7	2.1±0.7

Abbreviations: AGIQ, alpha-glycosyl isoquercitrin; LPS, lipopolysaccharides; PND, postnatal day.

Data are expressed as the mean ± SD.



**Table 1-10****Changes in contextual fear conditioning test of male pups in the main study**

	Control	LPS alone	LPS + 0.25% AGIQ	LPS + 0.5% AGIQ
Adolescent stage (PND 41-45)				
No. of pups examined	10	10	10	10
Freezing rate (%)				
Fear conditioning	19.5±8.6	22.0±14.3	27.9±9.1	21.8±10.8
Fear acquisition	76.2±13.9	62.8±16.2	67.0±19.6	67.9±22.4
Fear extinction #1	51.7±22.9	28.9±15.3*	43.9±29.9	40.9±23.6
Fear extinction #2	38.3±17.7	27.4±12.5	30.5±26.0	34.7±28.3
Fear extinction #3	23.2±17.0	14.5±11.5	23.6±24.5	20.3±23.8
Adult stage (PND 73-77)				
No. of pups examined	10	10	10	10
Freezing rate (%)				
Fear conditioning	34.5±9.9	26.6±11.5	25.9±9.7	29.1±16.6
Fear acquisition	76.6±16.5	57.5±16.7*	77.6±21.8	76.5±21.0
Fear extinction #1	50.0±19.0	31.1±18.7*	63.1±26.2†	43.6±30.8
Fear extinction #2	33.3±28.8	17.0±11.1	42.9±26.0†	37.0±29.2
Fear extinction #3	21.7±24.1	24.4±17.4	21.8±19.2	16.7±20.1

Abbreviations: AGIQ, alpha-glycosyl isoquercitrin; LPS, lipopolysaccharides; PND, postnatal day.

Data are expressed as the mean ± SD.

\* $P < 0.05$ , significantly different from the controls by Student's  $t$ -test or Aspin-Welch's  $t$ -test.

† $P < 0.05$ , significantly different from the LPS alone by Dunnett's test or Aspin-Welch's  $t$ -test with Bonferroni correction.

**Table 1-11****Number of immunoreactive cells in the hippocampal formation of male pups on PND 6 in the main study**

	Control	LPS alone	LPS + 0.25% AGIQ	LPS + 0.5% AGIQ
No. of pups examined	10	10	10	10
Microglia/macrophages or astrocytes (No./mm <sup>2</sup> whole hippocampal area)				
Iba1	47.56±18.57	95.33±17.92**	70.26±9.71††	72.83±13.37††
CD68	11.48±5.20	51.22±15.49**	46.00±9.08	46.29±17.63
CD163	1.10±0.40	1.36±0.50	0.95±0.49	2.00±0.92
GFAP	8.01±5.42	37.69±16.62**	20.62±9.70†	19.83±9.76††

Abbreviations: AGIQ, alpha-glycosyl isoquercitrin; CD68, cluster of differentiation 68; CD163, cluster of differentiation 163; GFAP, glial fibrillary acidic protein; Iba1, ionized calcium-binding adaptor molecule 1; LPS, lipopolysaccharides; PND, postnatal day.

Data are expressed as the mean ± SD.

\*\* $P < 0.01$ , significantly different from the controls by Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test.

† $P < 0.05$ , †† $P < 0.01$ , significantly different from the LPS alone by Dunnett's test or Aspin-Welch's *t*-test with Bonferroni correction.

**Table 1-12****Number of immunoreactive cells in the SGZ/GCL or hilar region in the hippocampal dentate gyrus of male pups on PND 21 in the main study**

	Control	LPS alone	LPS + 0.25% AGIQ	LPS + 0.5% AGIQ
No. of pups examined	10	10	10	10
Granule cell lineage subpopulations (No./mm SGZ length)				
GFAP	1.08±0.48	1.36±0.52	1.19±0.89	1.46±0.48
SOX2	23.29±9.38	23.35±8.07	21.23±6.37	23.69±7.22
TBR2	6.43±2.35	7.40±1.69	5.66±2.20	6.05±2.91
DCX	50.47±15.85	58.18±17.02	62.99±19.83	63.75±20.33
TUBB3	62.20±11.53	62.29±11.19	67.57±12.89	63.61±12.87
NeuN	400.06±47.16	321.56±22.62**	345.55±41.13	377.47±35.08††
Cell proliferation and apoptosis (No./mm SGZ length)				
PCNA	4.34±0.74	4.80±1.09	4.40±1.50	4.92±1.54
TUNEL (in the SGZ)	0.99±0.25	1.59±0.58 **	1.48±0.88	1.39±0.64
TUNEL (in the GCL)	0.13±0.16	0.11±0.15	0.22±0.30	0.15±0.15
Interneuron subpopulations (No./mm <sup>2</sup> hilar region)				
CALB1	11.75±5.05	12.27±4.66	10.32±5.60	11.24±5.01
CALB2	29.19±5.67	29.38±7.64	28.79±6.51	32.49±8.64
GAD67	93.01±17.86	64.50±24.44*	79.30±25.36	80.83±17.16
PVALB	28.25±13.66	15.17±9.35*	9.96±6.22	22.67±11.24
RELN	70.05±12.39	74.49±18.81	58.71±16.26	88.27±24.05
SST	80.63±20.18	70.41±28.45	79.34±16.91	77.48±14.51
Granule cells expressing synaptic plasticity-related proteins (No./mm SGZ length)				
ARC	7.09±2.51	5.70±1.28	6.89±2.24	6.81±1.32
COX2	33.04±10.09	36.12±6.96	31.56±5.00	39.73±11.95
FOS	2.47±2.08	2.01±1.38	4.00±2.30	4.28±2.63†
p-ERK1/2	0.73±0.71	1.01±0.69	0.82±0.51	1.98±1.09†
Microglia/macrophages or astrocytes (No./mm <sup>2</sup> hilar region)				
Iba1	100.55±9.99	115.55±8.72**	100.70±10.99†	106.41±17.32
CD68	45.10±9.49	72.34±20.35**	52.73±15.03†	50.27±15.53†
CD163	15.30±7.00	31.09±12.05**	28.23±12.68	60.85±51.43
GFAP	117.04±43.70	166.62±39.20*	139.63±38.29	132.61±12.15†

Abbreviations: AGIQ, alpha-glycosyl isoquercitrin; ARC, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; CALB1, calbindin-D-28K; CALB2, calbindin-D-29K; 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; LPS, lipopolysaccharides; NeuN, neuronal nuclei; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; p-ERK1/2, phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 (phosphorylated 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-mediated dUTP-biotin nick end-labeling.

Data are expressed as the mean ± SD.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the controls by Student's  $t$ -test or Aspin-Welch's  $t$ -test.

† $P < 0.05$ , †† $P < 0.01$ , significantly different from the LPS alone by Dunnett's test or Aspin-Welch's  $t$ -test with Bonferroni correction.

**Table 1-13****Number of immunoreactive cells in the SGZ/GCL or hilar region in the hippocampal dentate gyrus of male pups on PND 77 in the main study**

	Control	LPS alone	LPS + 0.25% AGIQ	LPS + 0.5% AGIQ
No. of pups examined	10	10	10	10
Granule cell lineage subpopulations (No./mm SGZ length)				
GFAP	1.51±0.65	1.39±0.58	1.80±0.51	1.61±0.69
SOX2	7.51±1.80	8.08±2.88	8.31±1.70	8.82±1.91
TBR2	3.69±1.29	3.90±1.94	3.50±2.13	3.47±2.08
DCX	12.50±3.79	9.20±2.98*	8.58±3.42	10.34±4.47
TUBB3	8.61±2.06	6.32±1.32**	8.20±2.65	9.44±2.15††
NeuN	565.89±36.36	566.19±55.28	559.25±29.34	555.15±29.84
Cell proliferation and apoptosis (No./mm SGZ length)				
PCNA	2.53±1.30	4.68±1.42**	4.76±2.02	3.58±0.96
TUNEL (in the SGZ and GCL)	0.24±0.21	0.12±0.20	0.22±0.19	0.16±0.21
Interneuron subpopulations (No./mm <sup>2</sup> hilar region)				
CALB1	6.20±3.19	5.92±2.99	7.76±3.26	7.90±4.37
CALB2	18.13±7.87	18.51±4.06	20.22±7.33	16.75±7.08
GAD67	36.92±12.04	47.73±9.77*	47.87±9.07	45.47±10.52
PVALB	7.20±4.66	6.94±5.53	11.61±9.21	6.51±5.14
RELN	85.51±14.59	79.43±15.49	91.63±16.28	87.80±9.55
SST	21.79±12.34	16.90±9.23	20.61±3.78	19.93±11.40
Granule cells expressing synaptic plasticity-related proteins (No./mm SGZ length)				
ARC	7.12±1.51	9.04±1.60*	9.46±1.79	9.05±2.70
COX2	22.72±7.80	22.49±3.56	28.65±6.90	25.80±7.33
FOS	8.36±2.26	11.50±2.58**	10.98±2.28	11.36±3.33
p-ERK1/2	1.38±0.72	1.59±1.69	2.47±2.04	1.56±1.00
Microglia/macrophages or astrocytes (No./mm <sup>2</sup> hilar region)				
Iba1	101.07±19.79	112.32±20.98	100.80±19.94	100.43±17.96
CD68	33.39±12.76	38.30±18.15	34.99±17.70	39.71±11.03
CD163	17.39±6.60	15.62±6.29	16.19±6.12	29.13±25.66
GFAP	280.44±58.41	304.75±52.52	270.40±36.55	333.93±40.19

Abbreviations: AGIQ, alpha-glycosyl isoquercitrin; ARC, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; CALB1, calbindin-D-28K; CALB2, calbindin-D-29K; 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; LPS, lipopolysaccharides; NeuN, neuronal nuclei; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; p-ERK1/2, phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 (phosphorylated 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-mediated dUTP-biotin nick end-labeling.

Data are expressed as the mean ± SD.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the controls by Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test.

†† $P < 0.01$ , significantly different from the LPS alone by Dunnett's test or Aspin-Welch's *t*-test with Bonferroni correction.

**Table 1-14**  
**Transcript-level expression changes of inflammation and oxidative stress-related genes in the hippocampal formation or dentate gyrus in male pups**

	Control		LPS alone		LPS + 0.25% AGIQ		LPS + 0.5% AGIQ	
	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
Relative transcript level normalized to								
<b>PND 6</b>								
<b>Chemical mediators and related markers</b>								
<i>Il1a</i>	1.32 ± 1.04	1.17 ± 0.73	13.43 ± 3.99**	10.29 ± 1.65**	5.06 ± 1.67††	4.21 ± 1.52††	7.03 ± 2.18††	6.11 ± 2.48††
<i>Il1b</i>	1.46 ± 1.47	1.34 ± 1.21	40.30 ± 19.04**	33.86 ± 12.96**	11.64 ± 5.95††	10.34 ± 4.41††	14.05 ± 8.24††	14.12 ± 9.69††
<i>Il4</i>	1.02 ± 0.21	1.02 ± 0.24	1.36 ± 0.36	1.23 ± 0.31	1.21 ± 0.38	1.03 ± 0.25	1.12 ± 0.13	0.97 ± 0.21
<i>Il6</i>	1.25 ± 0.96	1.22 ± 0.74	3.33 ± 1.66*	2.56 ± 1.35	2.30 ± 1.56	1.87 ± 1.27	2.51 ± 1.57	2.43 ± 1.85
<i>Nfkb1</i>	1.11 ± 0.51	1.07 ± 0.34	2.28 ± 0.87*	1.73 ± 0.37	1.57 ± 0.25	1.30 ± 0.21	1.55 ± 0.32	1.32 ± 0.39
<i>Tgfb1</i>	1.09 ± 0.42	1.13 ± 0.54	1.92 ± 0.62**	1.48 ± 0.35	1.81 ± 0.76	1.54 ± 0.67	1.70 ± 0.30	1.45 ± 0.39
<i>Tnf</i>	1.05 ± 0.35	1.06 ± 0.40	2.46 ± 1.15*	1.86 ± 0.61*	1.56 ± 0.48	1.28 ± 0.36	1.48 ± 0.37	1.28 ± 0.47
<b>Oxidative stress-related markers</b>								
<i>Cat</i>	1.17 ± 0.68	1.26 ± 0.93	1.58 ± 1.01	1.29 ± 0.93	1.33 ± 0.49	1.10 ± 0.44	1.10 ± 0.69	0.95 ± 0.61
<i>Gpx1</i>	1.09 ± 0.53	1.06 ± 0.37	2.98 ± 3.01	2.49 ± 2.59	2.01 ± 0.99	1.71 ± 0.89	1.59 ± 1.38	1.30 ± 1.01
<i>Hmox1</i>	1.11 ± 0.45	1.12 ± 0.43	1.22 ± 0.09	1.03 ± 0.15	1.60 ± 0.36	1.31 ± 0.23	1.39 ± 0.19	1.20 ± 0.38
<i>Keap1</i>	1.15 ± 0.52	1.15 ± 0.45	2.04 ± 0.74*	1.56 ± 0.36	1.46 ± 0.29	1.20 ± 0.17	1.50 ± 0.27	1.29 ± 0.42
<i>Nfe2l2</i>	1.13 ± 0.52	1.13 ± 0.46	2.68 ± 1.25*	2.03 ± 0.67*	1.65 ± 0.42	1.36 ± 0.37	1.56 ± 0.36†	1.37 ± 0.59
<i>Mt1</i>	1.06 ± 0.37	1.06 ± 0.33	2.00 ± 1.08	1.50 ± 0.52	1.93 ± 0.59	1.57 ± 0.38	1.84 ± 0.46	1.63 ± 0.75
<i>Sod1</i>	1.02 ± 0.23	1.02 ± 0.21	1.33 ± 0.32	1.09 ± 0.38	1.10 ± 0.16	0.92 ± 0.19	1.03 ± 0.24	0.87 ± 0.27
<b>PND 21</b>								
<b>Chemical mediators and related markers</b>								
<i>Il1a</i>	1.19 ± 0.69	1.21 ± 0.69	2.67 ± 0.77**	2.61 ± 1.05*	1.74 ± 0.45	1.79 ± 0.55	2.53 ± 1.82	2.19 ± 1.26
<i>Il1b</i>	1.12 ± 0.51	1.13 ± 0.58	2.31 ± 1.24	2.20 ± 1.25	2.08 ± 1.33	2.08 ± 1.18	2.38 ± 2.35	1.97 ± 1.61
<i>Il4</i>	1.01 ± 0.19	1.02 ± 0.23	1.03 ± 0.16	0.96 ± 0.16	1.04 ± 0.23	1.11 ± 0.31	0.95 ± 0.12	1.01 ± 0.17
<i>Il6</i>	1.01 ± 0.18	1.01 ± 0.14	1.04 ± 0.40	1.01 ± 0.46	0.91 ± 0.17	0.94 ± 0.26	1.00 ± 0.21	0.95 ± 0.40
<i>Nfkb1</i>	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.09	1.02 ± 0.22	0.99 ± 0.30	0.92 ± 0.10	0.96 ± 0.25	1.18 ± 0.51	1.08 ± 0.48
<i>Tgfb1</i>	1.37 ± 1.10	1.30 ± 0.97	1.38 ± 0.67	1.38 ± 0.82	1.71 ± 1.14	1.64 ± 0.93	1.74 ± 1.40	1.57 ± 1.06
<i>Tnf</i>	1.05 ± 0.40	1.03 ± 0.29	1.25 ± 0.43	1.24 ± 0.63	1.26 ± 0.50	1.34 ± 0.67	1.44 ± 0.48	1.36 ± 0.68
<b>Oxidative stress-related genes</b>								
<i>Cat</i>	1.00 ± 0.09	1.01 ± 0.14	1.11 ± 0.37	1.08 ± 0.43	1.05 ± 0.18	1.10 ± 0.32	1.08 ± 0.38	1.03 ± 0.58
<i>Gpx1</i>	1.02 ± 0.24	1.01 ± 0.17	1.02 ± 0.21	0.97 ± 0.23	1.05 ± 0.22	1.06 ± 0.12	1.07 ± 0.17	1.01 ± 0.37
<i>Gpx2</i>	1.02 ± 0.21	1.01 ± 0.14	1.32 ± 0.68	1.28 ± 0.68	1.17 ± 0.49	1.24 ± 0.60	1.27 ± 0.60	1.21 ± 0.83
<i>Gpx4</i>	1.03 ± 0.29	1.02 ± 0.24	1.04 ± 0.19	0.99 ± 0.12	0.89 ± 0.18	0.90 ± 0.09	0.96 ± 0.20	0.90 ± 0.35
<i>Hmox1</i>	1.01 ± 0.20	1.01 ± 0.16	1.03 ± 0.18	0.99 ± 0.23	0.83 ± 0.11	0.86 ± 0.17	1.03 ± 0.33	0.97 ± 0.50
<i>Keap1</i>	1.01 ± 0.11	1.01 ± 0.12	1.00 ± 0.10	0.95 ± 0.13	1.07 ± 0.40	1.12 ± 0.53	0.93 ± 0.12	0.86 ± 0.17
<i>Mt1</i>	1.01 ± 0.13	1.00 ± 0.04	1.12 ± 0.34	1.10 ± 0.45	0.96 ± 0.18	0.99 ± 0.23	0.93 ± 0.26	0.85 ± 0.26
<i>Mt2a</i>	1.07 ± 0.37	1.05 ± 0.31	0.84 ± 0.21	0.82 ± 0.29	0.76 ± 0.19	0.76 ± 0.15	0.81 ± 0.46	0.80 ± 0.65
<i>Nqo1</i>	1.02 ± 0.23	1.01 ± 0.16	1.06 ± 0.14	1.00 ± 0.12	0.88 ± 0.17	0.89 ± 0.13	1.03 ± 0.23	0.98 ± 0.41
<i>Nfe2l2</i>	1.03 ± 0.27	1.01 ± 0.20	1.06 ± 0.23	1.02 ± 0.25	0.95 ± 0.09	0.97 ± 0.11	1.09 ± 0.23	1.01 ± 0.34
<i>Sod1</i>	1.02 ± 0.23	1.01 ± 0.18	1.07 ± 0.32	1.01 ± 0.20	0.87 ± 0.17	0.88 ± 0.14	0.98 ± 0.18	0.91 ± 0.29
<i>Sod2</i>	1.02 ± 0.22	1.01 ± 0.17	1.03 ± 0.14	0.98 ± 0.11	1.04 ± 0.10	1.07 ± 0.13	1.23 ± 0.35	1.18 ± 0.58
<i>Txn1</i>	1.03 ± 0.26	1.02 ± 0.21	1.10 ± 0.23	1.04 ± 0.15	1.00 ± 0.19	1.01 ± 0.16	1.05 ± 0.20	0.98 ± 0.33
<b>PND 77</b>								
<b>Chemical mediators and related markers</b>								
<i>Il1a</i>	1.19 ± 0.55	1.25 ± 0.66	2.47 ± 0.76**	2.32 ± 0.42**	2.03 ± 0.69	2.32 ± 1.02	2.02 ± 0.65	2.16 ± 1.08
<i>Il1b</i>	1.06 ± 0.44	1.12 ± 0.63	1.45 ± 0.37	1.38 ± 0.32	2.29 ± 1.49	2.47 ± 1.65	1.66 ± 0.90	1.94 ± 1.40
<i>Il4</i>	1.02 ± 0.22	1.04 ± 0.32	1.12 ± 0.39	1.04 ± 0.27	1.25 ± 0.39	1.26 ± 0.36	1.01 ± 0.24	1.02 ± 0.31
<i>Il6</i>	1.25 ± 0.32	1.27 ± 0.38	1.14 ± 0.19	1.13 ± 0.36	1.09 ± 0.44	1.29 ± 0.78	1.04 ± 0.54	1.05 ± 0.44
<i>Tgfb1</i>	1.02 ± 0.20	1.05 ± 0.34	1.34 ± 0.51	1.25 ± 0.27	1.12 ± 0.30	1.24 ± 0.37	1.18 ± 0.24	1.23 ± 0.46
<i>Tnf</i>	1.03 ± 0.26	1.05 ± 0.35	1.41 ± 0.57	1.30 ± 0.25	1.23 ± 0.14	1.37 ± 0.28	1.62 ± 0.86	1.58 ± 0.68

Abbreviations: AGIQ, alpha-glycosyl isoquercitrin; *Cat*, catalase; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Gpx1*, glutathione peroxidase 1; *Gpx2*, glutathione peroxidase 2; *Gpx4*, glutathione peroxidase 4; *Hmox1*, heme oxygenase 1; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Il1a*, interleukin 1 alpha; *Il1b*, interleukin 1 beta; *Il4*, interleukin 4; *Il6*, interleukin 6; *Keap1*, Kelch-like ECH-associated protein 1; LPS, lipopolysaccharides; *Mt1*, metallothionein 1; *Mt2a*, metallothionein 2A; *Nfe2l2*, nuclear factor, erythroid 2-like 2; *Nfkb1*, nuclear factor kappa B subunit 1; *Nqo1*, NAD(P)H quinone dehydrogenase 1; *Sod1*, superoxide dismutase 1; *Sod2*, superoxide dismutase 2; *Tgfb1*, transforming growth factor, beta 1; *Tnf*, tumor necrosis factor; *Txn1*, thioredoxin 1.

Data are expressed as the mean ± SD. N = 6/group.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the controls by Student's *t*-test or Aspin–Welch's *t*-test.

† $P < 0.05$ , †† $P < 0.01$ , significantly different from the LPS alone by Dunnett's test or Aspin–Welch's *t*-test with Bonferroni correction.

Table 1-15

**Transcript-level expression changes of neurogenesis-related genes in the hippocampal dentate gyrus in male pups on PND 21 in the main study**

	Control		LPS alone		LPS + 0.25% AGIQ		LPS + 0.5% AGIQ	
	Relative transcript level normalized to							
	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
<b>Granule cell lineage markers</b>								
<i>Nestin</i>	1.02 ± 0.21	1.04 ± 0.34	1.23 ± 0.30	1.15 ± 0.35	1.11 ± 0.33	1.03 ± 0.37	0.98 ± 0.11	1.02 ± 0.19
<i>Sox2</i>	1.05 ± 0.42	1.04 ± 0.34	0.95 ± 0.28	0.89 ± 0.20	0.91 ± 0.37	0.90 ± 0.29	0.90 ± 0.15	0.82 ± 0.11
<i>Eomes</i>	1.02 ± 0.21	1.02 ± 0.22	1.26 ± 0.50	1.23 ± 0.57	1.24 ± 0.52	1.30 ± 0.62	1.44 ± 0.18	1.32 ± 0.28
<i>Dcx</i>	1.01 ± 0.18	1.03 ± 0.28	1.16 ± 0.28	1.13 ± 0.36	0.94 ± 0.21	0.98 ± 0.31	1.31 ± 0.21	1.21 ± 0.32
<i>Dpysl3</i>	1.01 ± 0.14	1.02 ± 0.20	1.02 ± 0.15	0.98 ± 0.14	1.02 ± 0.12	1.06 ± 0.25	1.25 ± 0.22	1.17 ± 0.38
<i>Tubb3</i>	1.01 ± 0.19	1.01 ± 0.18	0.83 ± 0.11	0.80 ± 0.17	0.95 ± 0.11	0.98 ± 0.24	0.99 ± 0.20	0.94 ± 0.38
<i>Rbfox3</i>	1.01 ± 0.12	1.00 ± 0.11	0.70 ± 0.16**	0.65 ± 0.15**	1.01 ± 0.12††	0.93 ± 0.18†	0.94 ± 0.12†	0.97 ± 0.13††
<b>Cell proliferation marker</b>								
<i>Pcna</i>	1.03 ± 0.26	1.03 ± 0.24	0.99 ± 0.13	0.94 ± 0.12	0.94 ± 0.21	0.94 ± 0.14	0.93 ± 0.09	0.85 ± 0.17
<b>Cell cycle-related genes</b>								
<i>Ccnd1</i>	1.01 ± 0.15	1.00 ± 0.09	1.04 ± 0.15	1.00 ± 0.23	0.97 ± 0.15	1.01 ± 0.28	1.00 ± 0.16	0.93 ± 0.31
<i>Ccnd2</i>	1.02 ± 0.19	1.02 ± 0.24	1.29 ± 0.24	1.24 ± 0.26	1.13 ± 0.18	1.18 ± 0.35	1.26 ± 0.23	1.16 ± 0.27
<i>Cdk1</i>	1.04 ± 0.37	1.04 ± 0.32	1.32 ± 0.20	1.28 ± 0.32	1.13 ± 0.67	1.15 ± 0.67	0.76 ± 0.12	0.70 ± 0.19
<i>Cdk2</i>	1.01 ± 0.12	1.01 ± 0.15	1.07 ± 0.17	1.04 ± 0.31	0.98 ± 0.05	1.01 ± 0.17	0.93 ± 0.19	0.88 ± 0.34
<i>Chek1</i>	1.06 ± 0.36	1.06 ± 0.39	1.35 ± 0.83	1.37 ± 1.07	0.91 ± 0.45	0.96 ± 0.52	0.79 ± 0.23	0.72 ± 0.23
<i>Tp53</i>	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.16	1.06 ± 0.36	1.06 ± 0.54	0.91 ± 0.15	0.96 ± 0.29	1.04 ± 0.18	0.97 ± 0.31
<b>Apoptosis-related genes</b>								
<i>Bak1</i>	1.01 ± 0.18	1.01 ± 0.18	0.96 ± 0.23	0.94 ± 0.33	0.89 ± 0.13	0.93 ± 0.23	0.99 ± 0.27	0.93 ± 0.44
<i>Bax</i>	1.01 ± 0.19	1.01 ± 0.17	1.02 ± 0.13	0.97 ± 0.12	0.89 ± 0.13	0.91 ± 0.17	0.96 ± 0.14	0.89 ± 0.27
<i>Bcl2</i>	1.02 ± 0.18	1.01 ± 0.18	0.98 ± 0.30	0.97 ± 0.39	0.87 ± 0.20	0.92 ± 0.31	0.98 ± 0.21	0.92 ± 0.36
<i>Casp1</i>	1.01 ± 0.18	1.01 ± 0.18	0.94 ± 0.17	0.91 ± 0.29	0.94 ± 0.12	0.97 ± 0.18	1.02 ± 0.20	0.95 ± 0.35
<i>Casp3</i>	1.11 ± 0.52	1.15 ± 0.62	2.82 ± 2.02	2.87 ± 2.43	1.75 ± 0.75	1.78 ± 0.80	0.98 ± 0.41	0.94 ± 0.47
<i>Casp6</i>	1.04 ± 0.36	1.07 ± 0.46	1.66 ± 0.83	1.69 ± 1.20	1.51 ± 0.43	1.57 ± 0.61	1.26 ± 0.37	1.18 ± 0.48
<i>Casp8</i>	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.07	1.05 ± 0.28	1.04 ± 0.47	0.97 ± 0.26	1.01 ± 0.34	1.10 ± 0.25	1.00 ± 0.26
<i>Casp9</i>	1.02 ± 0.19	1.02 ± 0.19	0.85 ± 0.10	0.82 ± 0.16	0.78 ± 0.06	0.80 ± 0.17	0.87 ± 0.24	0.81 ± 0.32
<i>Casp12</i>	1.05 ± 0.39	1.03 ± 0.30	1.13 ± 0.38	1.10 ± 0.47	1.05 ± 0.38	1.11 ± 0.48	1.25 ± 0.33	1.15 ± 0.37
<b>GABAergic interneuron markers</b>								
<i>Calb1</i>	1.01 ± 0.19	1.03 ± 0.26	0.86 ± 0.20	0.81 ± 0.14	0.88 ± 0.34	0.91 ± 0.40	1.35 ± 0.35†	1.24 ± 0.37
<i>Calb2</i>	1.13 ± 0.65	1.14 ± 0.67	1.06 ± 0.71	0.96 ± 0.58	0.85 ± 0.16	0.89 ± 0.27	0.95 ± 0.40	0.89 ± 0.41
<i>Pvalb</i>	1.05 ± 0.36	1.04 ± 0.30	0.69 ± 0.19	0.66 ± 0.17*	0.69 ± 0.11	0.70 ± 0.08	0.85 ± 0.27	0.81 ± 0.38
<i>Reln</i>	1.01 ± 0.13	1.02 ± 0.23	0.92 ± 0.24	0.89 ± 0.28	0.75 ± 0.15	0.78 ± 0.22	1.03 ± 0.30	0.97 ± 0.46
<i>Sst</i>	1.06 ± 0.40	1.05 ± 0.35	0.99 ± 0.17	0.95 ± 0.24	0.83 ± 0.07	0.86 ± 0.18	1.00 ± 0.32	0.95 ± 0.47
<b>Cholinergic receptors</b>								
<i>Chrm1</i>	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.19	0.89 ± 0.09	0.83 ± 0.13	0.88 ± 0.11	0.81 ± 0.17	0.92 ± 0.08	0.98 ± 0.05
<i>Chrm2</i>	1.02 ± 0.20	1.03 ± 0.25	1.12 ± 0.28	1.03 ± 0.17	1.31 ± 0.26	1.21 ± 0.34	0.91 ± 0.27	0.95 ± 0.20
<i>Chrna7</i>	1.02 ± 0.21	1.01 ± 0.15	1.01 ± 0.14	0.94 ± 0.10	1.12 ± 0.11	1.02 ± 0.11	1.11 ± 0.20	1.18 ± 0.16††
<i>Chrn2</i>	1.00 ± 0.09	1.01 ± 0.19	1.00 ± 0.09	0.93 ± 0.13	1.10 ± 0.09	1.01 ± 0.19	0.95 ± 0.13	1.01 ± 0.06
<b>Dopaminergic receptor</b>								
<i>Drd2</i>	1.03 ± 0.28	1.04 ± 0.34	1.18 ± 0.20	1.10 ± 0.18	1.61 ± 0.94	1.43 ± 0.73	0.69 ± 0.10††	0.73 ± 0.08*
<b>Glutamatergic receptors and glutamate transporters</b>								
<i>Gria1</i>	1.00 ± 0.08	1.01 ± 0.14	0.92 ± 0.19	0.90 ± 0.30	0.74 ± 0.19	0.77 ± 0.28	1.10 ± 0.40	1.05 ± 0.57
<i>Gria2</i>	1.00 ± 0.10	1.01 ± 0.17	0.83 ± 0.13*	0.79 ± 0.18	0.71 ± 0.18	0.74 ± 0.23	1.05 ± 0.21	0.98 ± 0.34
<i>Gria3</i>	1.01 ± 0.16	1.02 ± 0.18	0.85 ± 0.14	0.83 ± 0.25	0.71 ± 0.16	0.73 ± 0.22	0.99 ± 0.31	0.94 ± 0.44
<i>Grin2a</i>	1.03 ± 0.26	1.03 ± 0.28	0.82 ± 0.24	0.81 ± 0.36	0.78 ± 0.15	0.80 ± 0.22	0.96 ± 0.31	0.92 ± 0.49
<i>Grin2b</i>	1.01 ± 0.18	1.02 ± 0.21	0.80 ± 0.16	0.78 ± 0.25	0.73 ± 0.14	0.76 ± 0.23	1.04 ± 0.36	0.99 ± 0.54
<i>Grin2d</i>	1.02 ± 0.21	1.01 ± 0.18	0.93 ± 0.14	0.86 ± 0.10	1.10 ± 0.25	1.00 ± 0.18	1.00 ± 0.34	1.04 ± 0.26
<i>Slc17a7</i>	1.02 ± 0.20	1.03 ± 0.25	0.97 ± 0.26	0.93 ± 0.28	1.00 ± 0.23	1.04 ± 0.35	1.14 ± 0.23	1.07 ± 0.42
<b>Synaptic plasticity-related genes</b>								
<i>Arc</i>	1.03 ± 0.27	1.03 ± 0.27	0.97 ± 0.31	0.91 ± 0.29	0.88 ± 0.16	0.81 ± 0.18	0.72 ± 0.29	0.77 ± 0.32
<i>Fos</i>	1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.14	0.93 ± 0.11	0.87 ± 0.10	1.02 ± 0.11	0.94 ± 0.17	0.82 ± 0.16	0.87 ± 0.14
<i>Jun</i>	1.03 ± 0.29	1.04 ± 0.33	0.82 ± 0.17	0.76 ± 0.19	1.02 ± 0.28	0.95 ± 0.34	1.02 ± 0.22	1.08 ± 0.21
<i>Mapk1</i>	1.03 ± 0.29	1.04 ± 0.32	0.76 ± 0.15	0.72 ± 0.21	0.97 ± 0.22	0.91 ± 0.32	1.00 ± 0.36	1.08 ± 0.45
<i>Mapk3</i>	1.35 ± 1.01	1.35 ± 0.90	0.72 ± 0.44	0.68 ± 0.41	1.12 ± 0.80	1.09 ± 0.92	1.41 ± 1.03	1.58 ± 1.27
<i>Ptgs2</i>	1.04 ± 0.29	1.03 ± 0.29	0.77 ± 0.10	0.71 ± 0.08*	1.16 ± 0.28††	1.07 ± 0.33†	1.12 ± 0.13†	1.19 ± 0.18††
<b>Neurotrophic factor-related genes</b>								
<i>Bdnf</i>	1.01 ± 0.11	1.02 ± 0.21	0.93 ± 0.29	0.92 ± 0.41	0.93 ± 0.13	0.97 ± 0.24	1.52 ± 0.58††	1.46 ± 0.84*
<i>Cntf</i>	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.17	0.99 ± 0.31	0.95 ± 0.28	1.08 ± 0.13	1.11 ± 0.21	1.80 ± 0.48	1.70 ± 0.69
<i>Ntrk1</i>	1.11 ± 0.50	1.10 ± 0.49	1.05 ± 0.36	1.02 ± 0.39	1.64 ± 0.62	1.70 ± 0.75	1.37 ± 0.32	1.27 ± 0.38
<i>Ntrk2</i>	1.01 ± 0.15	1.01 ± 0.14	0.91 ± 0.17	0.88 ± 0.23	0.81 ± 0.09	0.84 ± 0.19	0.90 ± 0.23	0.85 ± 0.36
<b>DNA repair-related genes</b>								
<i>Apex1</i>	1.04 ± 0.36	1.03 ± 0.28	0.95 ± 0.05	0.91 ± 0.18	0.87 ± 0.10	0.89 ± 0.14	0.93 ± 0.09	0.86 ± 0.21
<i>Brip1</i>	1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.19	0.93 ± 0.35	0.91 ± 0.43	0.90 ± 0.25	0.94 ± 0.33	0.96 ± 0.24	0.87 ± 0.20
<i>Erccl</i>	1.01 ± 0.18	1.02 ± 0.20	0.95 ± 0.13	0.92 ± 0.22	0.78 ± 0.11	0.81 ± 0.21	0.95 ± 0.16	0.90 ± 0.34
<i>Ogg1</i>	1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.17	0.99 ± 0.08	0.95 ± 0.21	0.93 ± 0.11	0.97 ± 0.24	1.03 ± 0.20	0.96 ± 0.30

Abbreviations: AGIQ, alpha-glycosyl isoquercitrin; *Apex1*, apurinic/aprimidinic endodeoxyribonuclease I; *Arc*, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; *Bak1*, BCL2-antagonist/killer 1; *Bax*, BCL2 associated X,

apoptosis regulator; *Bcl2*, BCL2, apoptosis regulator; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Brip1*, BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1; *Calb1*, calbindin 1 (also known as calbindin-D-28K); *Calb2*, calbindin 2 (also known as calbindin-D-29K and calretinin); *Casp1*, caspase 1; *Casp3*, caspase 3; *Casp6*, caspase 6; *Casp8*, caspase 8; *Casp9*, caspase 9; *Casp12*, caspase 12; *Ccnd1*, cyclin D1; *Ccnd2*, cyclin D2; *Cdk1*, cyclin-dependent kinase 1; *Cdk2*, cyclin-dependent kinase 2; *Chek1*, checkpoint kinase 1; *Chrm1*, cholinergic receptor, muscarinic 1; *Chrm2*, cholinergic receptor, muscarinic 2; *Chrna7*, cholinergic receptor nicotinic alpha 7 subunit; *Chrnb2*, cholinergic receptor nicotinic beta 2 subunit; *Cntf*, ciliary neurotrophic factor; *Dcx*, doublecortin; *Dpysl3*, dihydropyrimidinase-like 3; *Drd2*, dopamine receptor D2; *Eomes*, eomesodermin; *Ercc1*, ERCC excision repair 1, endonuclease non-catalytic subunit; *Fos*, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *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; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Jun*, Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; LPS, lipopolysaccharides; *Mapk1*, mitogen activated protein kinase 1; *Mapk3*, mitogen activated protein kinase 3; *Nes*, nestin; *Ntrk1*, neurotrophic receptor tyrosine kinase 1; *Ntrk2*, neurotrophic receptor tyrosine kinase 2; *Ogg1*, 8-oxoguanine DNA glycosylase; *Pcna*, proliferating cell nuclear antigen; *Ptgs2*, prostaglandin-endoperoxide synthase 2; *Pvalb*, parvalbumin; *Rbfox3*, RNA binding fox-1 homolog 3 (also known as NeuN); *Reln*, reelin; *Slc17a7*, solute carrier family 17 member 7; *Sox2*, SRY-box transcription factor 2; *Sst*, somatostatin; *Tp53*, tumor protein p53; *Tubb3*, tubulin, beta 3 class III.

Data are expressed as the mean  $\pm$  SD. N = 6/group.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the controls by Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test.

<sup>†</sup> $P < 0.05$ , <sup>††</sup> $P < 0.01$ , significantly different from the LPS alone by Dunnett's test or Aspin-Welch's *t*-test with Bonferroni correction.

**Table 1-16**

**Transcript-level expression changes of neurogenesis-related genes in the hippocampal dentate gyrus in male pups on PND 77 in the main study**

	Control		LPS alone		LPS + 0.25% AGIQ		LPS + 0.5% AGIQ	
	Relative transcript level normalized to							
	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
<b>Granule cell lineage markers</b>								
<i>Nestin</i>	1.01 ± 0.18	0.91 ± 0.23	1.20 ± 0.17	1.05 ± 0.27	1.23 ± 0.27	1.22 ± 0.33	1.21 ± 0.23	1.14 ± 0.47
<i>Sox2</i>	1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.15	1.11 ± 0.25	1.09 ± 0.36	1.03 ± 0.22	1.14 ± 0.31	0.96 ± 0.22	0.99 ± 0.29
<i>Eomes</i>	1.01 ± 0.15	1.01 ± 0.13	1.10 ± 0.32	1.03 ± 0.09	0.91 ± 0.15	1.02 ± 0.28	1.01 ± 0.32	1.00 ± 0.29
<i>Dcx</i>	1.01 ± 0.15	1.03 ± 0.30	0.95 ± 0.14	1.05 ± 0.30	0.95 ± 0.19	1.04 ± 0.19	1.00 ± 0.19	1.03 ± 0.33
<i>Tubb3</i>	1.01 ± 0.13	1.01 ± 0.19	0.66 ± 0.24*	0.65 ± 0.30*	0.95 ± 0.15†	1.05 ± 0.19	1.12 ± 0.21††	1.17 ± 0.43†
<i>Dpysl3</i>	1.00 ± 0.10	1.03 ± 0.26	1.13 ± 0.42	1.06 ± 0.22	0.94 ± 0.18	1.04 ± 0.19	1.00 ± 0.27	1.06 ± 0.25
<i>Rbfox3</i>	1.01 ± 0.14	1.03 ± 0.26	1.18 ± 0.37	1.11 ± 0.22	0.90 ± 0.20	0.98 ± 0.17	0.90 ± 0.13	0.91 ± 0.19
<b>GABAergic interneuron markers</b>								
<i>Calb1</i>	1.01 ± 0.19	1.03 ± 0.25	1.28 ± 0.34	1.23 ± 0.38	1.17 ± 0.23	1.29 ± 0.32	1.00 ± 0.19	1.02 ± 0.27
<i>Calb2</i>	1.00 ± 0.08	1.01 ± 0.16	1.14 ± 0.21	1.10 ± 0.30	0.94 ± 0.21	1.05 ± 0.30	1.05 ± 0.22	1.13 ± 0.23
<i>Pvalb</i>	1.02 ± 0.23	1.02 ± 0.20	1.23 ± 0.21	1.11 ± 0.29	0.99 ± 0.19	0.91 ± 0.29	1.11 ± 0.34	0.95 ± 0.42
<i>Reln</i>	1.01 ± 0.12	1.01 ± 0.13	1.00 ± 0.17	0.96 ± 0.18	1.07 ± 0.14	1.20 ± 0.29	0.98 ± 0.07	1.03 ± 0.29
<i>Sst</i>	1.02 ± 0.22	1.03 ± 0.25	1.08 ± 0.30	1.03 ± 0.29	1.11 ± 0.11	1.22 ± 0.22	0.87 ± 0.17	0.91 ± 0.29
<b>Cholinergic receptors</b>								
<i>Chrm1</i>	1.01 ± 0.15	1.02 ± 0.20	1.22 ± 0.28	1.17 ± 0.22	0.93 ± 0.19	1.01 ± 0.17	0.92 ± 0.18	0.93 ± 0.16
<i>Chrm2</i>	1.04 ± 0.31	1.04 ± 0.32	0.97 ± 0.43	0.90 ± 0.26	0.96 ± 0.23	1.04 ± 0.21	1.36 ± 0.57	1.47 ± 0.92
<i>Chrna7</i>	1.03 ± 0.28	1.07 ± 0.40	1.21 ± 0.37	1.13 ± 0.17	0.82 ± 0.15†	0.90 ± 0.16	0.95 ± 0.10	1.05 ± 0.28
<i>Chrnb2</i>	1.01 ± 0.18	1.03 ± 0.26	1.09 ± 0.43	1.02 ± 0.23	1.00 ± 0.19	1.09 ± 0.19	1.12 ± 0.17	1.17 ± 0.39
<b>Dopaminergic receptors</b>								
<i>Drd2</i>	1.07 ± 0.47	1.06 ± 0.40	1.17 ± 0.29	1.11 ± 0.19	1.35 ± 0.59	1.45 ± 0.41	1.24 ± 0.56	1.34 ± 0.86
<b>Glutamatergic receptors</b>								
<i>Gria1</i>	1.02 ± 0.21	1.04 ± 0.28	1.30 ± 0.38	1.23 ± 0.21	0.90 ± 0.21†	0.97 ± 0.18	0.96 ± 0.15	0.97 ± 0.19
<i>Gria2</i>	1.03 ± 0.24	1.06 ± 0.35	1.30 ± 0.43	1.23 ± 0.24	0.83 ± 0.22†	0.90 ± 0.20	0.87 ± 0.13†	0.91 ± 0.29
<i>Gria3</i>	1.02 ± 0.21	1.03 ± 0.25	1.27 ± 0.42	1.20 ± 0.25	0.87 ± 0.18†	0.95 ± 0.17	0.86 ± 0.16†	0.90 ± 0.30
<i>Grin2a</i>	1.02 ± 0.20	1.03 ± 0.24	1.27 ± 0.33	1.21 ± 0.25	0.97 ± 0.24	1.05 ± 0.17	1.00 ± 0.28	0.97 ± 0.06
<i>Grin2b</i>	1.02 ± 0.21	1.04 ± 0.29	1.40 ± 0.50	1.31 ± 0.24	1.02 ± 0.24	1.11 ± 0.23	1.02 ± 0.23	1.02 ± 0.21
<b>Synaptic plasticity-related genes</b>								
<i>Arc</i>	1.05 ± 0.31	1.04 ± 0.31	1.55 ± 0.34*	1.49 ± 0.37*	0.96 ± 0.23††	1.05 ± 0.25†	0.98 ± 0.24††	0.97 ± 0.16††
<i>Fos</i>	1.01 ± 0.15	1.02 ± 0.23	1.12 ± 0.21	1.08 ± 0.24	1.04 ± 0.19	1.13 ± 0.18	1.16 ± 0.33	1.21 ± 0.53
<i>Mapk1</i>	1.04 ± 0.28	1.06 ± 0.36	1.20 ± 0.39	1.13 ± 0.21	0.95 ± 0.10	1.06 ± 0.26	1.03 ± 0.14	1.05 ± 0.17
<i>Mapk3</i>	1.02 ± 0.21	1.05 ± 0.35	1.35 ± 0.42	1.26 ± 0.16	0.96 ± 0.15	1.08 ± 0.30	0.98 ± 0.17	1.00 ± 0.27
<b>Neurotrophic factor-related genes</b>								
<i>Bdnf</i>	1.01 ± 0.14	1.03 ± 0.16	1.02 ± 0.23	0.97 ± 0.12	0.87 ± 0.16	0.95 ± 0.13	0.83 ± 0.17	0.85 ± 0.25
<i>Cntf</i>	1.00 ± 0.11	1.02 ± 0.19	1.15 ± 0.13*	1.12 ± 0.29	1.16 ± 0.16	1.27 ± 0.19	1.17 ± 0.20	1.13 ± 0.32
<i>Ntrk1</i>	1.09 ± 0.08	1.06 ± 0.10	1.11 ± 0.20	1.09 ± 0.14	0.92 ± 0.20	1.00 ± 0.11	0.88 ± 0.31	1.06 ± 0.31
<i>Ntrk2</i>	1.01 ± 0.17	1.03 ± 0.18	1.19 ± 0.32	1.14 ± 0.31	0.78 ± 0.20†	0.86 ± 0.20	1.01 ± 0.26	1.05 ± 0.33

Abbreviations: AGIQ, alpha-glycosyl isoquercitrin; *Arc*, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Calb1*, calbindin 1 (also known as calbindin-D-28K); *Calb2*, calbindin 2 (also known as calbindin-D-29K and calretinin); *Chrm1*, cholinergic receptor, muscarinic 1; *Chrm2*, cholinergic receptor, muscarinic 2; *Chrna7*, cholinergic receptor nicotinic alpha 7 subunit; *Chrnb2*, cholinergic receptor nicotinic beta 2 subunit; *Cntf*, ciliary neurotrophic factor; *Dcx*, doublecortin; *Dpysl3*, dihydropyrimidinase-like 3; *Drd2*, dopamine receptor D2; *Eomes*, eomesodermin; *Fos*, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *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; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; LPS, lipopolysaccharides; *Mapk1*, mitogen activated protein kinase 1; *Mapk3*, mitogen activated protein kinase 3; *Nes*, nestin; *Ntrk1*, neurotrophic receptor tyrosine kinase 1; *Ntrk2*, neurotrophic receptor tyrosine kinase 2; *Pvalb*, parvalbumin; *Rbfox3*, RNA binding fox-1 homolog 3 (also known as NeuN); *Reln*, reelin; *Sox2*, SRY-box transcription factor 2; *Sst*, somatostatin; *Tubb3*, tubulin, beta 3 class III.

Data are expressed as the mean ± SD. N = 6/group.

\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, significantly different from the controls by Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test.

†*P* < 0.05, ††*P* < 0.01, significantly different from the LPS alone by Dunnett's test or Aspin-Welch's *t*-test with Bonferroni correction.



**Table 1-17****Measurement of oxidative stress parameters in the brain of male pups**

	Control	LPS alone	LPS + 0.25% AGIQ	LPS + 0.5% AGIQ
PND 6				
Cerebrum				
No. of pups examined	7	7	7	7
MDA (nmol/mg tissue protein)	1.20±0.37	2.36±1.18*	1.65±0.86	1.88±1.02
GSSG/GSH ratio	0.043±0.018	0.090±0.054	0.068±0.069	0.051±0.013
PND 21				
Hippocampus				
No. of pups examined	7	7	7	7
MDA (nmol/mg tissue protein)	6.42±3.05	5.80±3.21	3.05±0.37†	4.08±1.49
GSSG/GSH ratio	0.022±0.005	0.026±0.009	0.025±0.005	0.028±0.009

Abbreviations: AGIQ, alpha-glycosyl isoquercitrin; GSH, reduced glutathione; GSSG, glutathione disulfide;

LPS, lipopolysaccharides; MDA, malondialdehyde; PND, postnatal day.

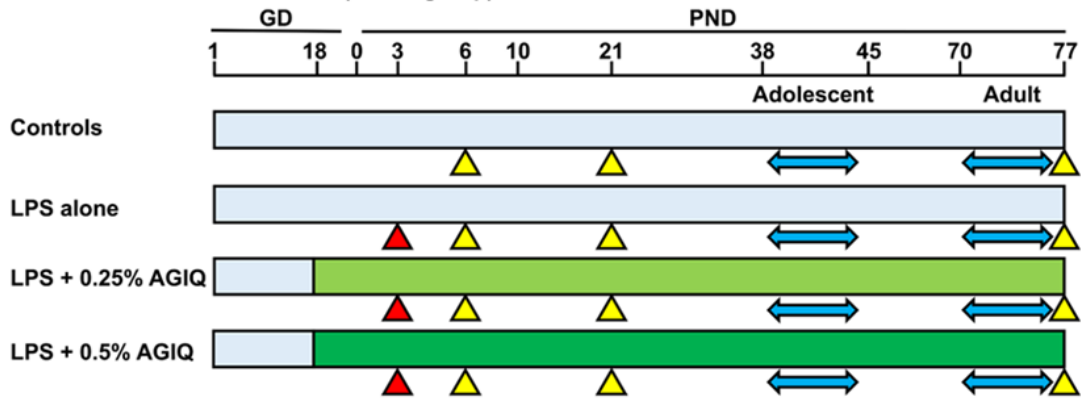
Data are expressed as the mean ± SD.

\* $P < 0.05$ , significantly different from the controls by Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test.

† $P < 0.05$ , significantly different from the LPS alone by Dunnett's test or Aspin-Welch's *t*-test with Bonferroni correction.

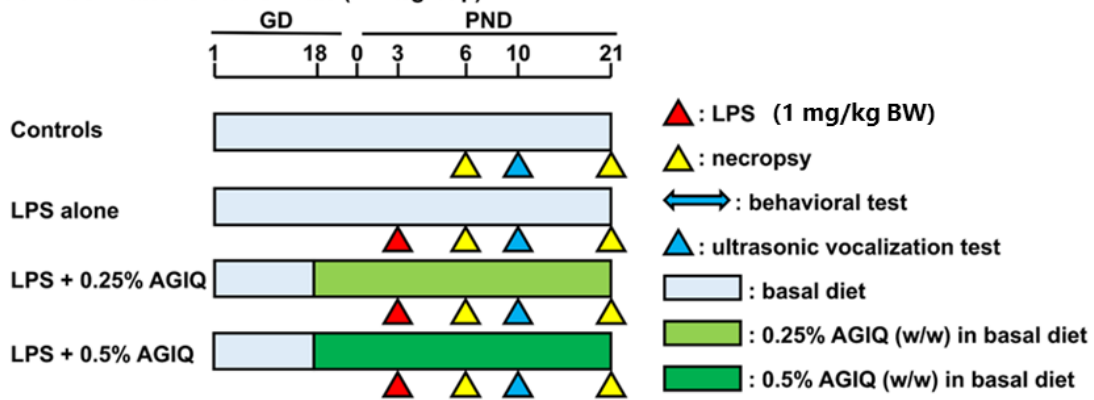
### Main Study

Animals: Mated female SD rats (N = 15/group)



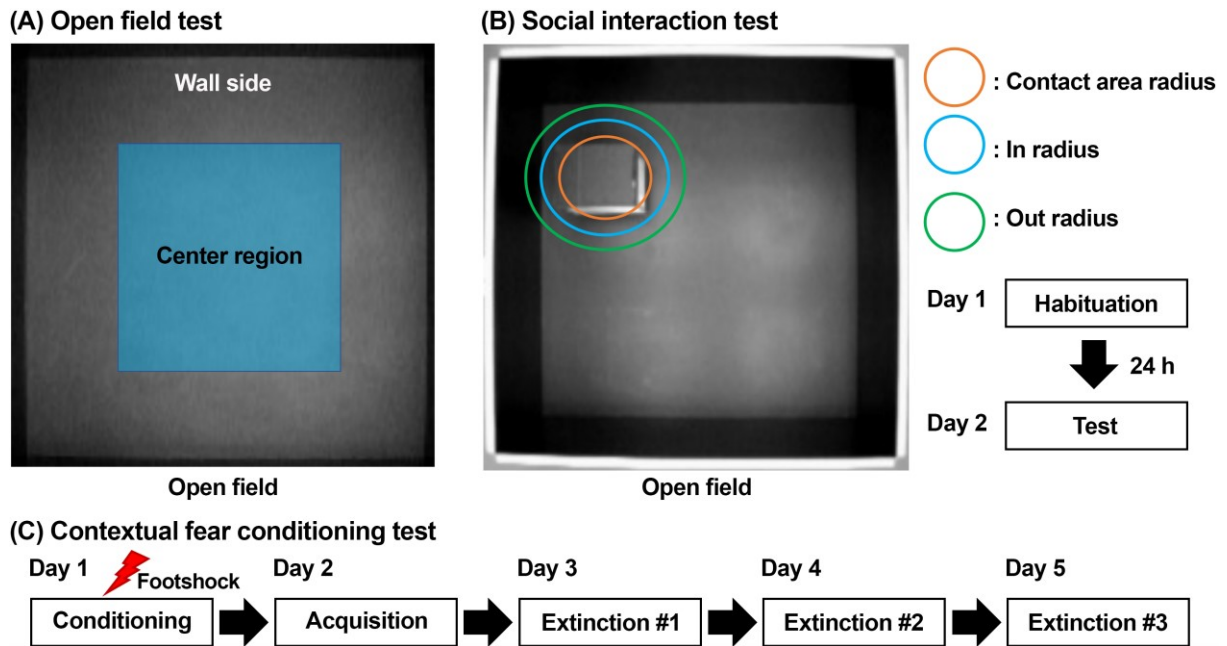
### Satellite Study

Animals: Mated female SD rats (N = 3/group)



**Fig. 1-1.**

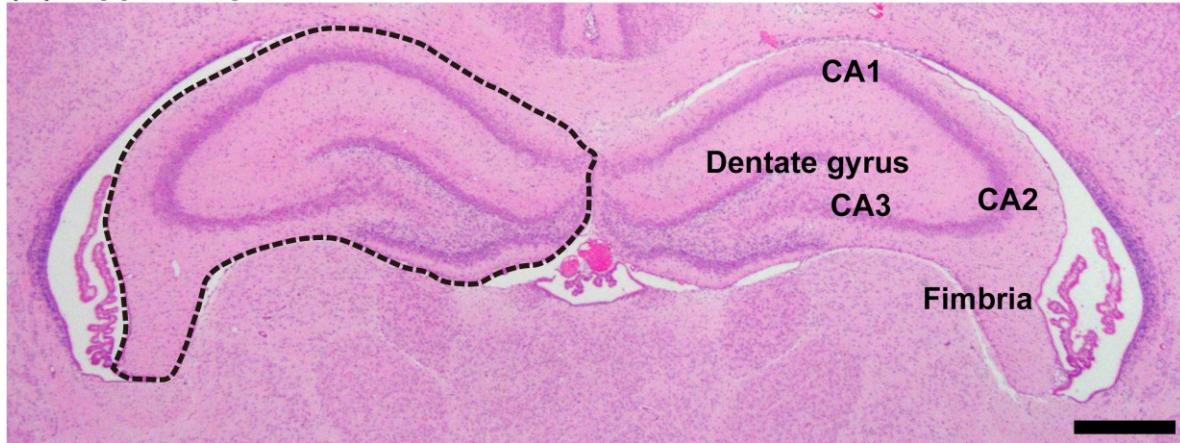
Experimental design of developmental exposure study of lipopolysaccharides (LPS) and alpha-glycosyl isoquercitrin (AGIQ) using mated female SD rats. Animal experiments consist of main study and satellite study.



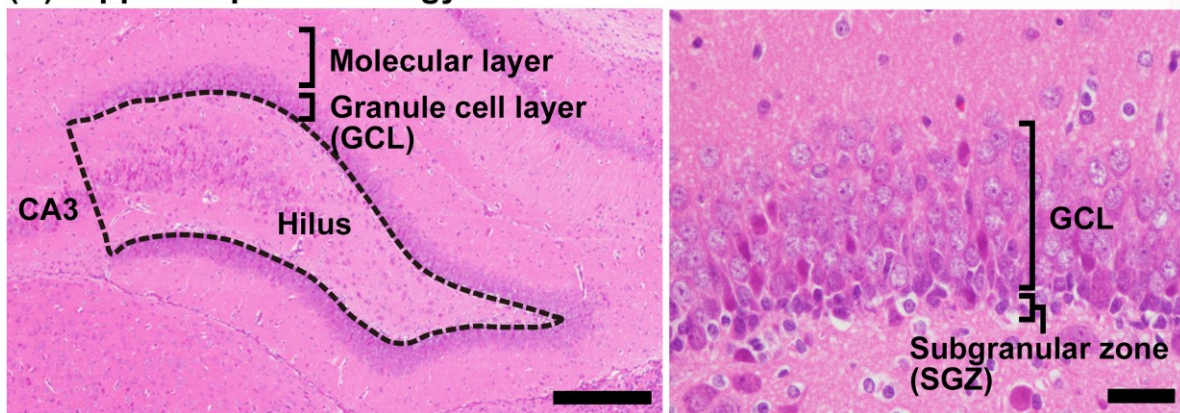
**Fig. 1-2.**

Experimental procedures of behavioral tests conducted during adolescent and adult stages. (A) Open field test was performed on postnatal day (PND) 38 (adolescent stage) and PND 70 (adult stage). (B) Social interaction test was performed consecutively on PND 39 and PND 40 (adolescent stage) and on PND 71 and PND 72 (adult stage) using the same arena used in the open field test. After the habituation on day 1, social interaction was evaluated on day 2. (C) Contextual fear conditioning test was performed during the period from PND 41 to PND 45 (adolescent stage) and from PND 73 to PND 77 (adult stage). Five trials in the order of “fear conditioning”, “fear acquisition” and “fear extinction #1, #2, and #3” were performed with 24 h interval during 5 consecutive days.

### (A) Hippocampal formation at PND 6



### (B) Hippocampal dentate gyrus at PND 77

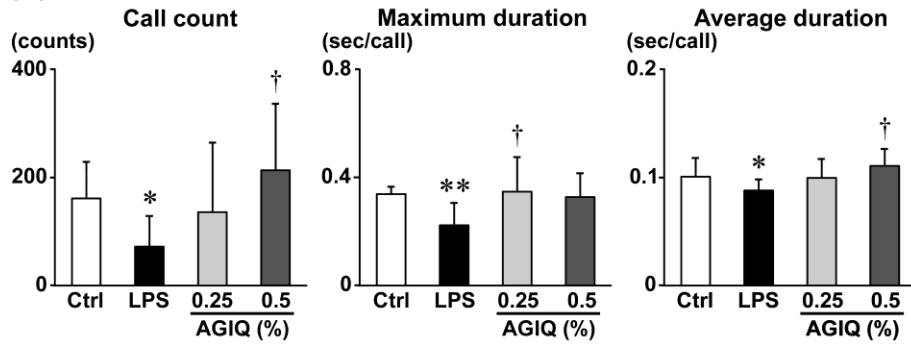


**Fig. 1-3.**

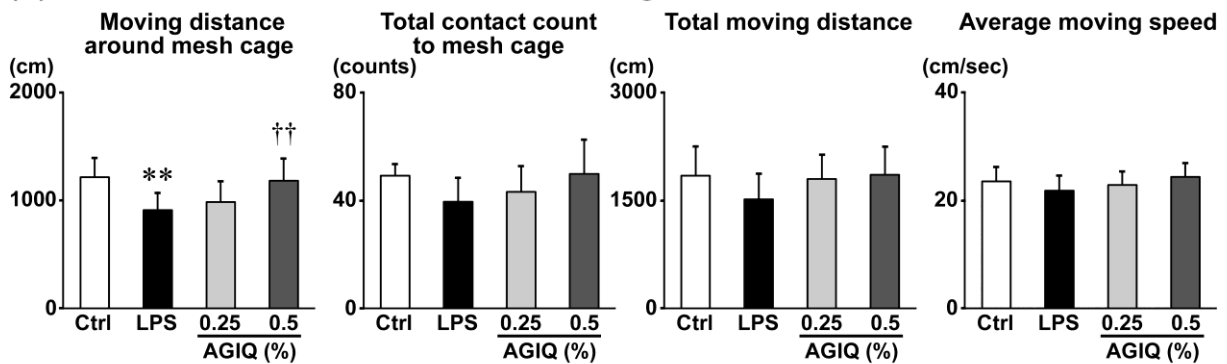
Overview of the hippocampus of a male rat on postnatal day (PND) 6 and PND 77 stained with hematoxylin and eosin. (A) Hippocampal formation on PND 6. The numbers of cells in the whole area of the hippocampal formation (as enclosed by the dotted line) displaying immunoreactivity for ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1), cluster of differentiation (CD) 68, CD163, and glial fibrillary acidic protein (GFAP) were counted at this time point. Bar = 500  $\mu$ m. (B) Hippocampal dentate gyrus on PND 77. (Left panel) Lower magnification of the dentate gyrus. On PND 21 and PND 77, the numbers of cells in the hilus of the dentate gyrus (as enclosed by the dotted line) displaying immunoreactivity for calbindin-D-28K (CALB1), calbindin-D-29K (CALB2), glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67), parvalbumin (PVALB), reelin (RELN), somatostatin (SST), Iba1, CD68, CD163, and GFAP were counted and normalized for the unit area. Only small-sized cells with positive immunoreactivity for these antigens were counted. Cornu Ammonis (CA) 3 neurons were excluded from counting. Bar = 200  $\mu$ m. (Right panel) Higher magnification of the granule cell layer (GCL) and subgranular zone (SGZ). The distribution of immunoreactive cells for GFAP, SRY-box transcription factor 2 (SOX2), T-box brain protein 2 (TBR2), doublecortin (DCX), tubulin, beta 3 class III (TUBB3), neuronal nuclei (NeuN), proliferating cell nuclear antigen (PCNA), activity-regulated cytoskeleton-associated protein (ARC), cyclooxygenase-2 (COX2), Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit (FOS), and phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 (p-ERK1/2), as well as apoptotic cells positive for terminal

deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL), were measured in the SGZ and/or GCL. Bar = 20  $\mu$ m.

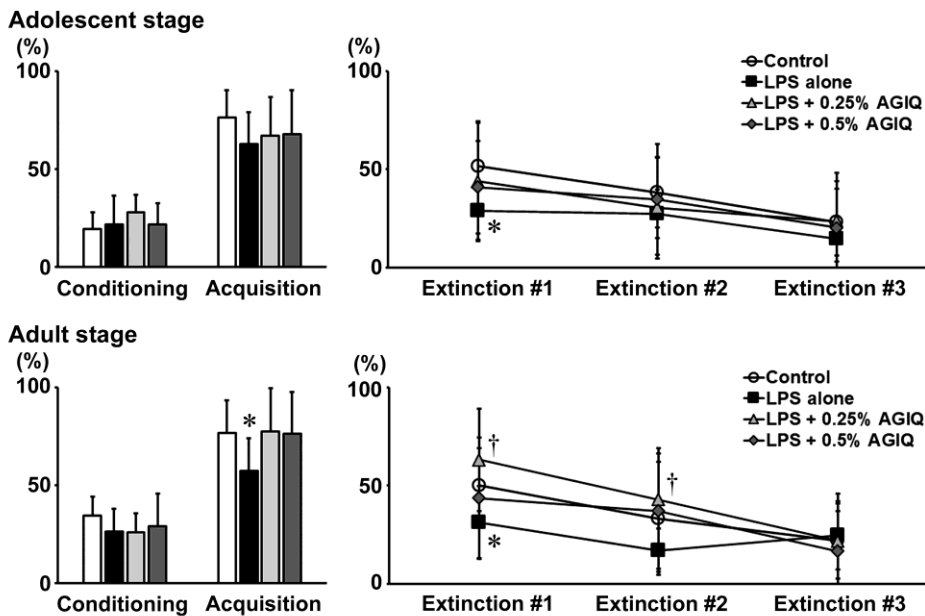
**(A) Ultrasonic vocalization test**



**(B) Social interaction test at the adolescent stage**



**(C) Contextual fear conditioning test**

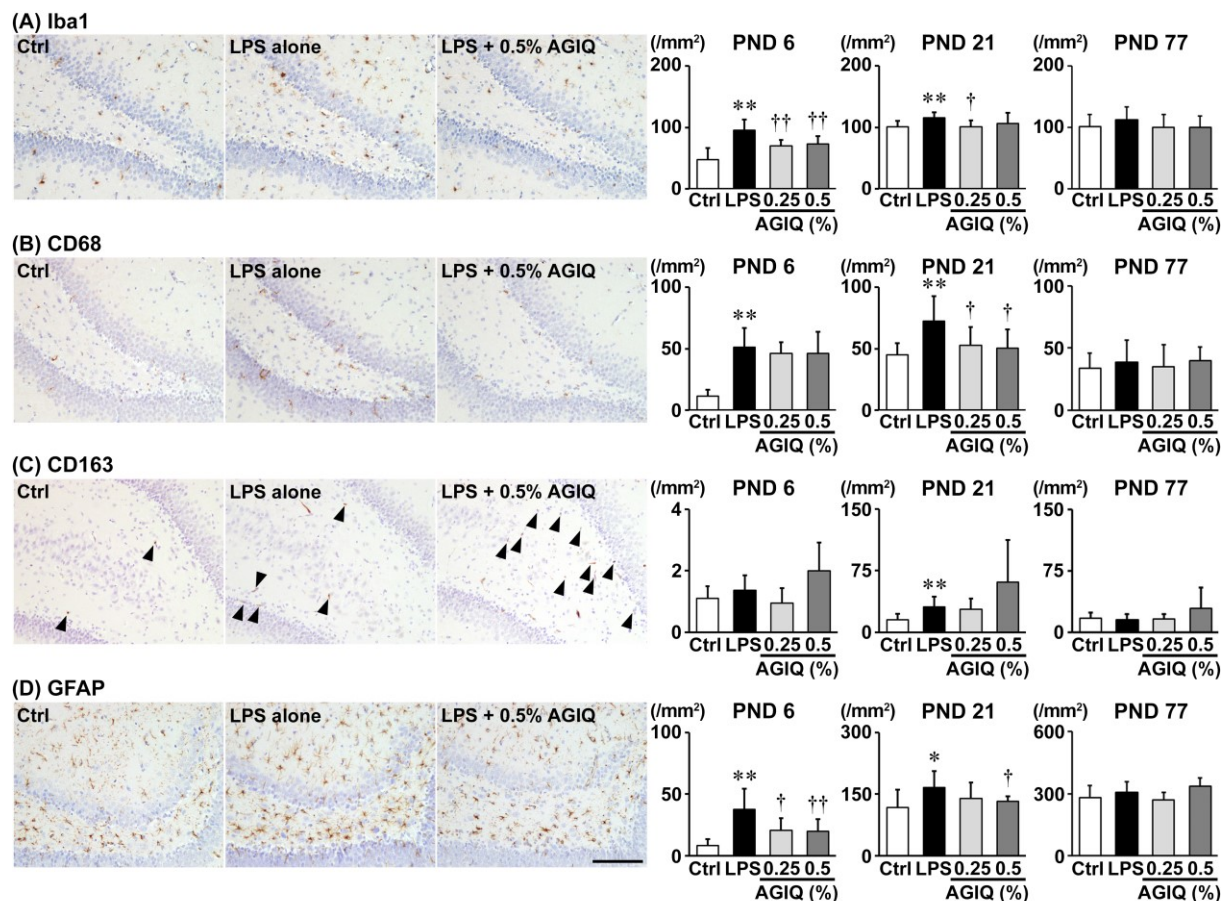


**Fig. 1-4.**

The results of behavioral tests. (A) Ultrasonic vocalization test in female pups at postnatal day (PND) 10. N = 6 (controls) or 10 (other groups). (B) Social interaction test in male pups during the adolescent stage (session 2; PND 39–40). N = 10/group. (C) Contextual fear conditioning test in male pups during the adolescent stage (PND 41–45) and adult stage (PND 73–77). N = 10/group. Values are expressed as the mean +SD or mean ± SD. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the controls by Student's  $t$ -test or Aspin–Welch's  $t$ -test. † $P < 0.05$ ,

<sup>††</sup> $P < 0.01$ , significantly different from the LPS alone by Dunnett's test or Aspin–Welch's  $t$ -test with Bonferroni correction.



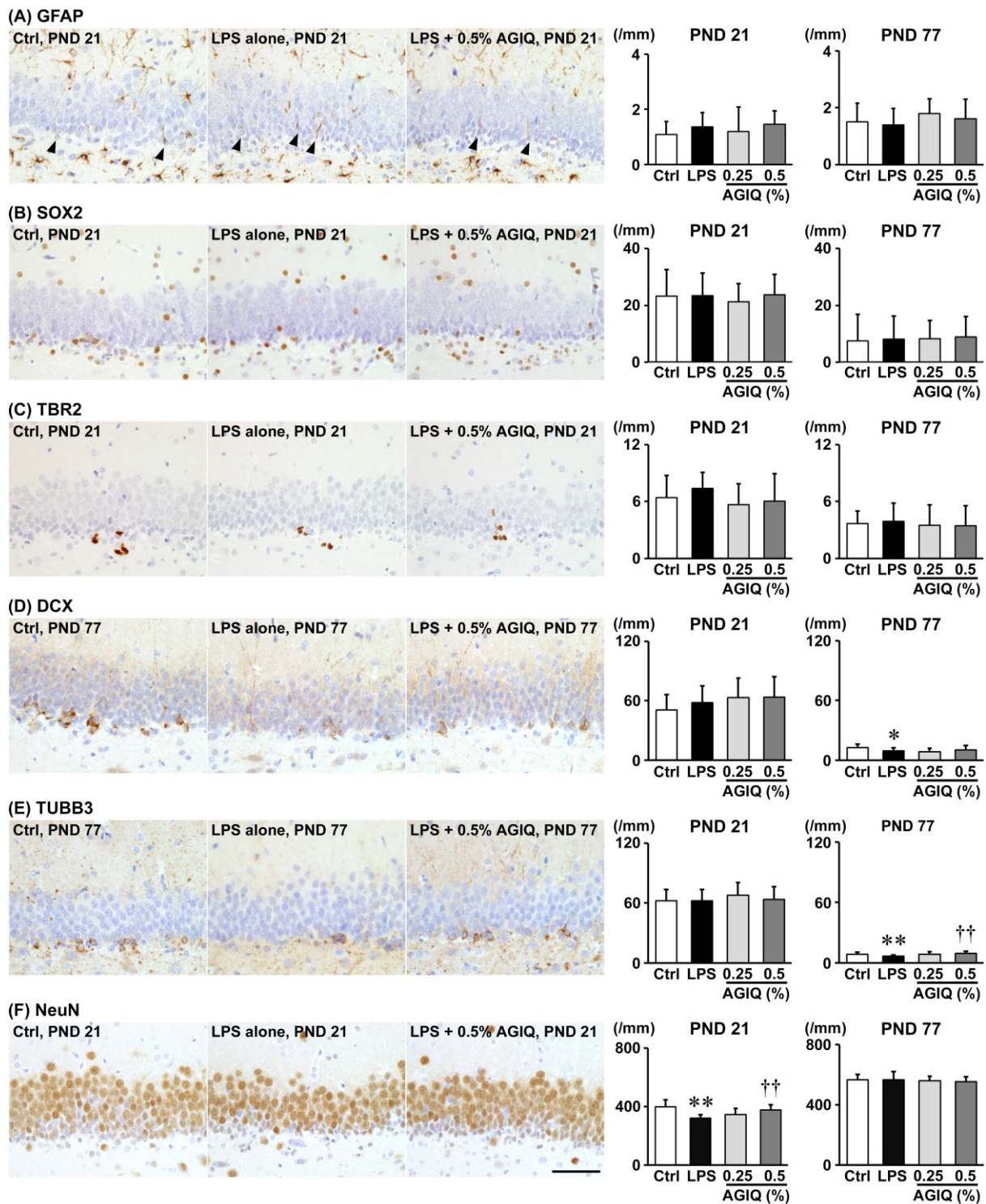


**Fig. 1-5.**

Distribution of immunoreactive cells for glial cell marker proteins, i.e., (A) ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1), (B) cluster of differentiation (CD) 68, (C) CD163, and (D) glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the hippocampal formation at postnatal day (PND) 6 and hilar region of the dentate gyrus at PND 21 and PND 77 of male pups. Representative images from the controls (left), LPS alone (middle), and LPS + 0.5% AGIQ (right) on PND 21. Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification  $\times 200$ ; bar = 100  $\mu\text{m}$ .

Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the hippocampal formation at PND 6 and hilar region at PND 21 and PND 77.  $N = 10/\text{group}$ . Values are expressed as the mean  $\pm$  SD.  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ , significantly different from the controls by Student's *t*-test or Aspin–Welch's *t*-test.  $\dagger P < 0.05$ ,  $\dagger\dagger P < 0.01$ , significantly different from the LPS alone by Dunnett's test or Aspin–Welch's *t*-test with Bonferroni correction.

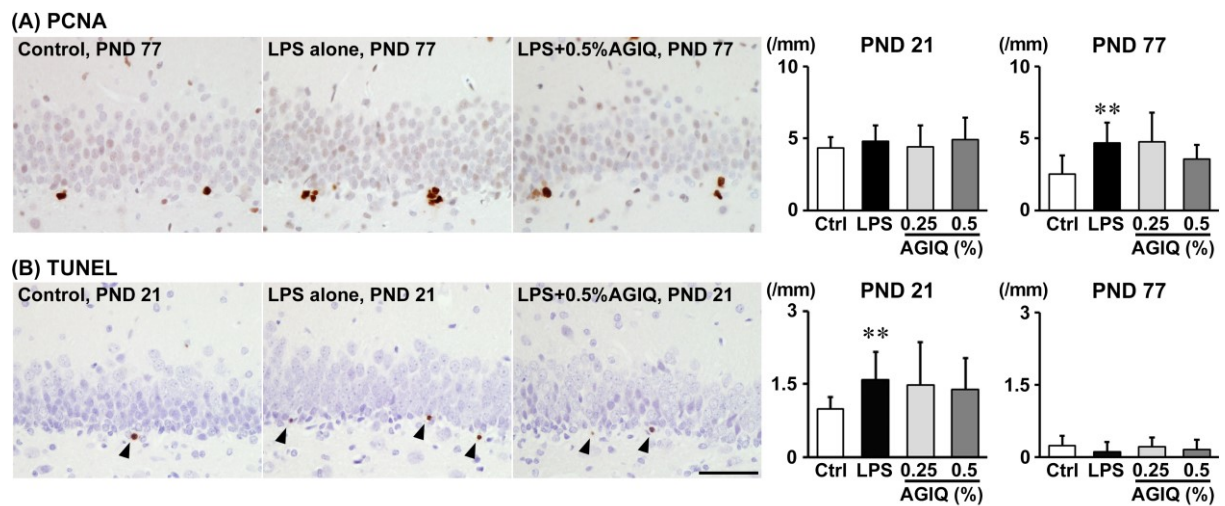




**Fig. 1-6.**

Distribution of immunoreactive cells for granule cell lineage marker proteins, i.e., (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) of male pups at postnatal day (PND) 21 and PND 77. Representative images from the controls (left), LPS alone (middle), and LPS + 0.5% AGIQ (right) at PND 21 (GFAP, SOX2, TBR2 and NeuN) or PND 77 (DCX and TUBB3). Arrowheads indicate immunoreactive cells.

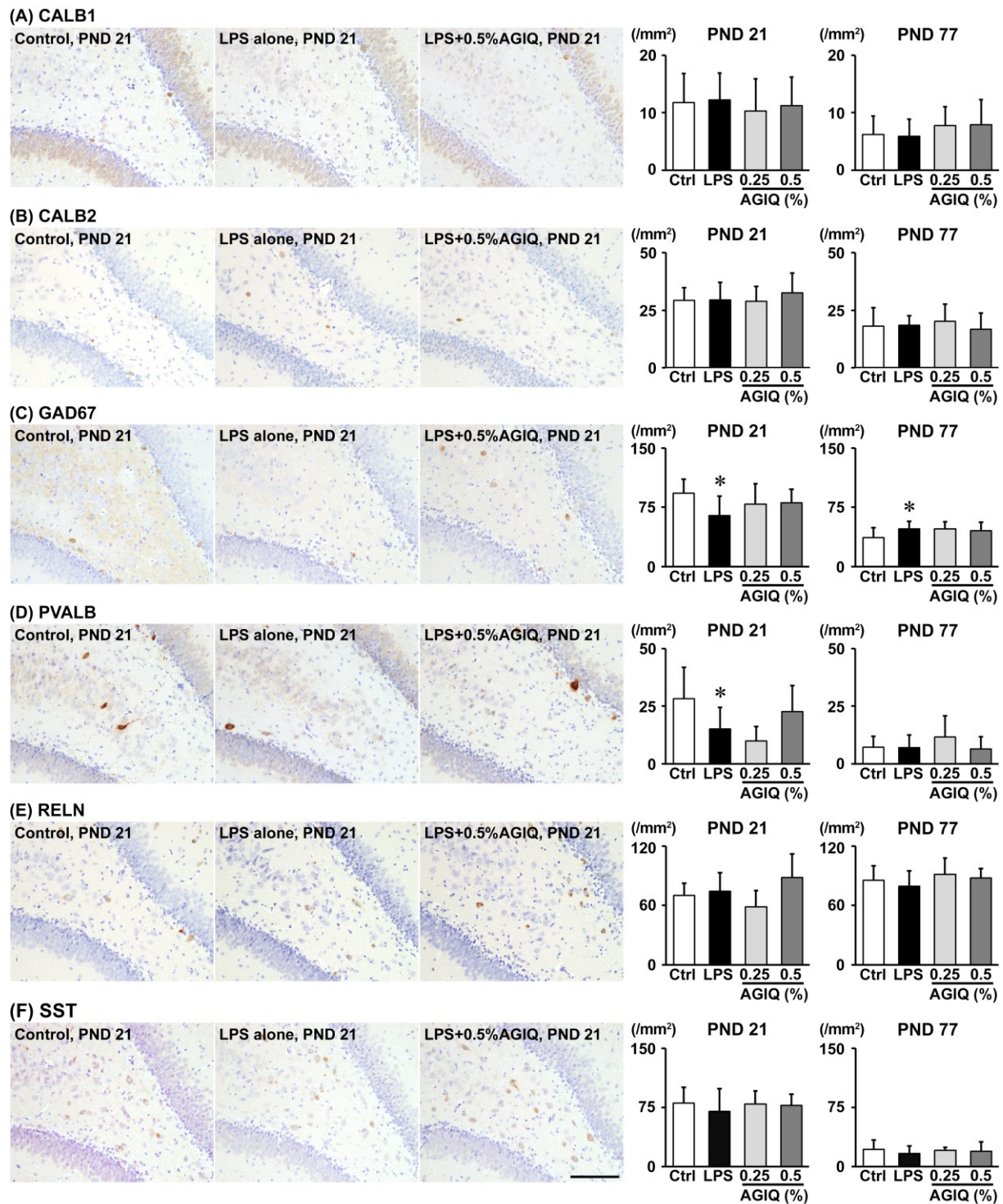
Magnification  $\times 400$ ; bar = 50  $\mu\text{m}$ . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the SGZ and/or GCL. N = 10/group. Values are expressed as the mean  $\pm$ SD. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the controls by Student's  $t$ -test or Aspin–Welch's  $t$ -test. †† $P < 0.01$ , significantly different from the LPS alone by Dunnett's test or Aspin–Welch's  $t$ -test with Bonferroni correction.



**Fig. 1-7.**

Distribution of (A) proliferating cell nuclear antigen (PCNA)<sup>+</sup> proliferating cells and (B) terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)<sup>+</sup> apoptotic cells in the subgranular zone (SGZ) of male pups at postnatal day (PND) 21 and PND 77. Representative images from the controls (left), LPS alone (middle) and LPS + 0.5% AGIQ (right) at PND 21 (TUNEL) or PND 77 (PCNA). Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification  $\times 400$ ; bar = 50  $\mu\text{m}$ . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the SGZ. N = 10/group. Values are expressed as the mean  $\pm$  SD. \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the controls by Student's  $t$ -test or Aspin–Welch's  $t$ -test.

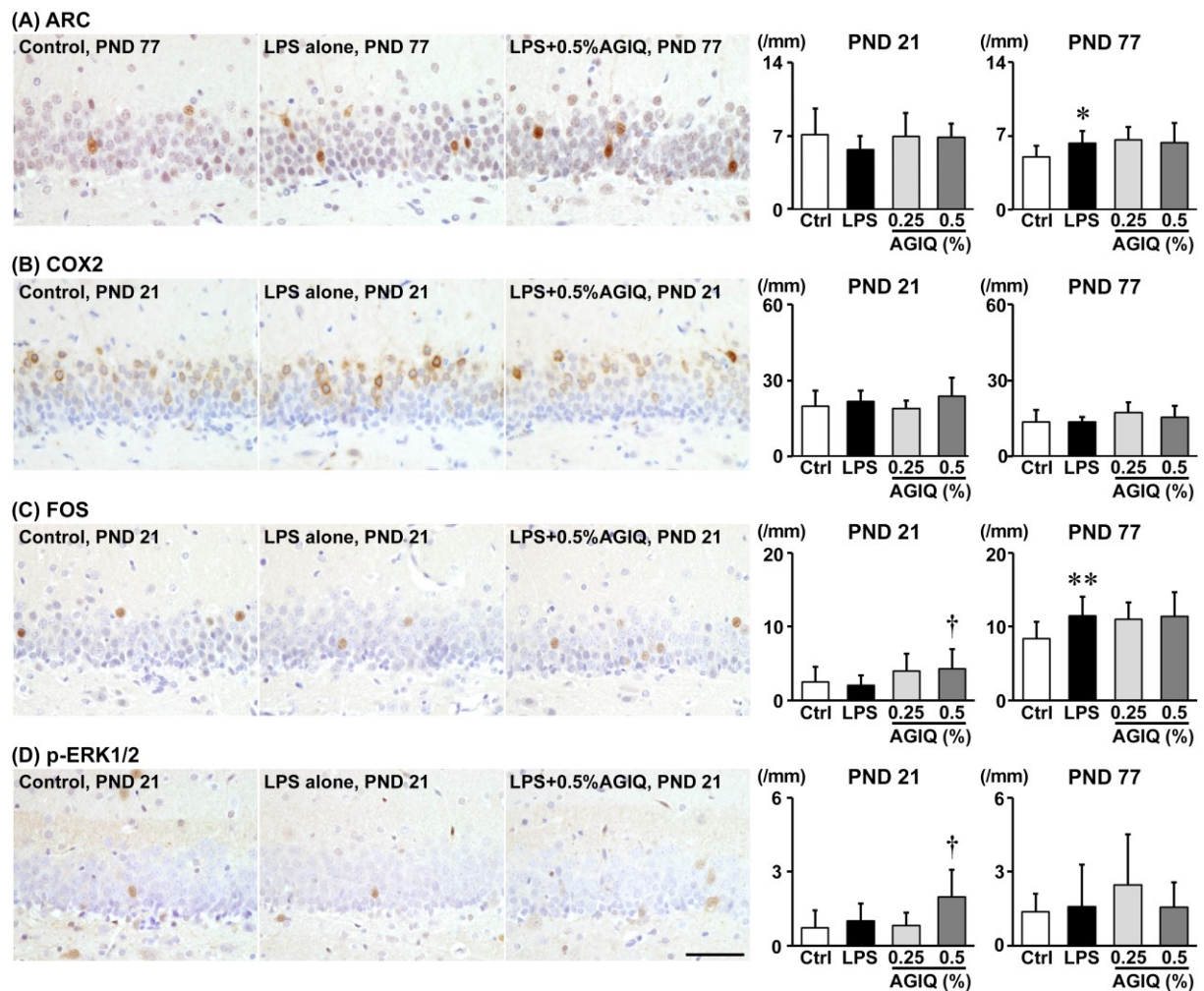




**Fig. 1-8.**

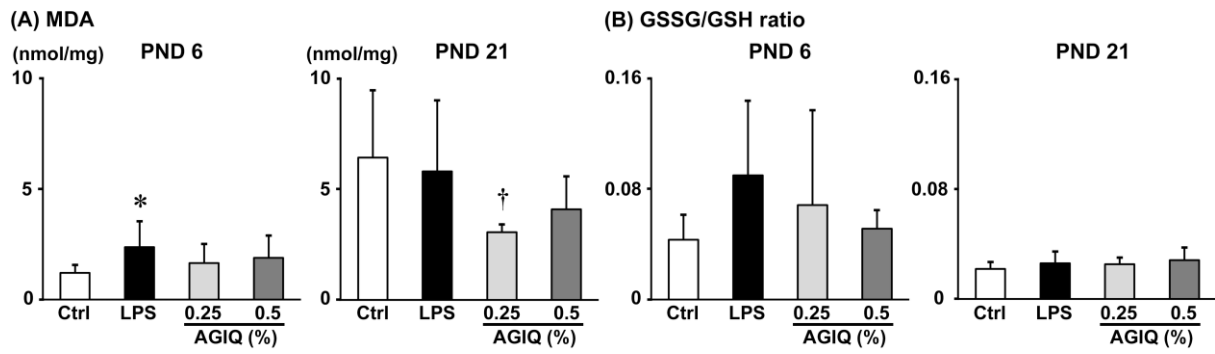
Distribution of interneurons immunoreactive for (A) calbindin-D-28K (CALB1), (B) calbindin-D-29K (CALB2), (C) glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67), (D) parvalbumin (PVALB), (E) reelin (RELN), and (F) somatostatin (SST) in the hilar region of the dentate gyrus of male pups at postnatal day (PND) 21 and PND 77. Representative images from the controls (left), LPS alone (middle), and LPS + 0.5% AGIQ (right) at PND 21. Magnification  $\times 200$ ; bar = 100  $\mu\text{m}$ . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the hilar region. N =

10/group. Values are expressed as the mean +SD. \* $P < 0.05$ , significantly different from the controls by Student's  $t$ -test or Aspin–Welch's  $t$ -test.



**Fig. 1-9.**

Distribution of granule cells immunoreactive for synaptic plasticity-related proteins, i.e., (A) activity-regulated cytoskeleton-associated protein (ARC), (B) cyclooxygenase-2 (COX2), (C) Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit (FOS), and (D) phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 (p-ERK1/2) in the granule cell layer (GCL) of male pups at postnatal day (PND) 21 and PND 77. PND 77 animals were those examined at 90 min after the 3rd trial of fear extinction test. Representative images from the controls (left), LPS alone (middle), and LPS + 0.5% AGIQ (right) at PND 21 (COX2, FOS, and p-ERK1/2) or PND 77 (ARC). Magnification  $\times 400$ ; bar = 50  $\mu\text{m}$ . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the GCL.  $N = 10/\text{group}$ . Values are expressed as the mean  $\pm$ SD. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the controls by Student's  $t$ -test or Aspin–Welch's  $t$ -test. † $P < 0.05$ , significantly different from the LPS alone by Dunnett's test or Aspin–Welch's  $t$ -test with Bonferroni correction.



**Fig. 1-10.**

The results of the oxidative stress measurement in the brain of male pups at postnatal day (PND) 6 and PND 21. N = 7/group. Values are expressed as the mean +SD. \* $P < 0.05$ , significantly different from the controls by Student's  $t$ -test or Aspin-Welch's  $t$ -test. † $P < 0.05$ , significantly different from the LPS alone by Dunnett's test or Aspin-Welch's  $t$ -test with Bonferroni correction.

**Table 2-1****Primary antibodies and experimental conditions used in immunohistochemistry**

Antigen	Abbreviated name	Host species	Clonality	Clone name	Dilution	Antigen retrieval	Manufacturer (City, State, Country)
Activity-regulated cytoskeleton-associated protein	ARC	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:2000	Microwaving <sup>a</sup>	Synaptic Systems GmbH (Göttingen, Germany)
Calbindin-D-28K	CALB1	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	CB-955	1:500	Microwaving <sup>a</sup>	Sigma-Aldrich Co. LLC (Saint Louis, MO, USA)
Calbindin-D-29K	CALB2	Rabbit	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	EP1798	1:600	Microwaving <sup>a</sup>	Abcam plc (Cambridge, UK)
Cluster of differentiation 68	CD68	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	ED1	1:500	Autoclaving <sup>b</sup>	BMA Biomedicals (Augst, Switzerland)
Cluster of differentiation 163	CD163	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	ED2	1:500	Protein digesting <sup>c</sup>	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
Cyclooxygenase-2	COX2	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	33/Cox-2	1:200	Microwaving <sup>a</sup>	BD Biosciences, Inc. (San Jose, CA, USA)
Doublecortin	DCX	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:1000	Autoclaving <sup>b</sup>	Abcam plc
Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	FOS	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	2H2	1:1000	Microwaving <sup>d</sup>	Abcam plc
Glutamic acid decarboxylase-67	GAD67	Mouse	Monoclonal IgG <sub>2a</sub>	1G10.2	1:200	Autoclaving <sup>b</sup>	MilliporeSigma (Burlington, MA, USA)
Glial fibrillary acidic protein	GFAP	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	GA5	1:200	Autoclaving <sup>b</sup>	MilliporeSigma
Ionized calcium-binding adaptor molecule 1	Iba1	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:300	Autoclaving <sup>b</sup>	Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation (Osaka, Japan)
Neuronal nuclei	NeuN	Rabbit	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	EPR12763	1:500	Autoclaving <sup>b</sup>	Abcam plc
Parvalbumin	PVALB	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	PARV-19	1:1000	Microwaving <sup>a</sup>	MilliporeSigma
phosphorylated Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (phosphorylated p44/p42 MAP kinase)	p-ERK1/2	Rabbit	Monoclonal IgG	137F5	1:100	Microwaving <sup>a</sup>	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA)
Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	Mouse	Monoclonal IgG <sub>2a</sub>	PC10	1:200	Microwaving <sup>a</sup>	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
Reelin	RELN	Rabbit	Monoclonal IgG	JA63-13	1:1000	Autoclaving <sup>b</sup>	Novus Biologicals (Littleton, CO, USA)
SRY-box transcription factor 2	SOX2	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	9-9-3	1:4000	None	Abcam plc
Somatostatin	SST	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:200	Microwaving <sup>a</sup>	Abcam plc
T box brain protein 2	TBR2	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:500	Autoclaving <sup>b</sup>	Abcam plc
Tubulin, beta 3 class III	TUBB3	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	TU-20	1:500	Autoclaving <sup>b</sup>	Abcam plc

Abbreviation: n.a, not applicable.

<sup>a</sup> 90°C for 10 min in 10 mM citrate buffer (pH 6.0).

<sup>b</sup> 121°C for 10 min in 10 mM citrate buffer (pH 6.0).

<sup>c</sup> Proteinase K treatment (40 µg/mL) at room temperature for 15 min.

<sup>d</sup> 90°C for 10 min in Target Retrieval Solution (pH 9.0; Agilent Technologies).



Table 2-2

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

Gene	Accession no.	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')
<i>Arc</i>	NM_019361.1	AGTGTCTGAA AGGCAATGAA AAGTAG	CCTTCGGCCA TCTCTGATTC
<i>Bdnf</i>	NM_001270630	CACTTTTGGAG CACGTGATCG A	TCCGCGTCCT TATGGTTTTTC
<i>Calb1</i>	NM_031984.2	AGGCTGGATT GGAGCTATCA C	GTTGCTGGCA TCGAAAGAGC
<i>Calb2</i>	NM_053988	AGCTCCAGGA GTACACCCAA AC	CCCAATTTGC CGTCTCCAT
<i>Cat</i>	NM_012520.2	ATTGCCGTCC GATTCTCC	CCAGTTACCA TCTTCAGTGT AG
<i>Cdk1</i>	NM_019296.1	CGCGTCCCAC GTCAAGA	CCAGCATTTC CGAGAGCAAG T
<i>Cdk2</i>	NM_199501.1	TTGGCCAGGA GTTACTTCTA TGC	TCCTGCCGAG CCCACTT
<i>Chek1</i>	NM_080400.1	TGGCAAAGGA CTGTTGTTG	AGTTGAACTT CTCATAGGC G
<i>Chrna7</i>	NM_012832	CGTTCGCTGG TTCCCTTTT	GGACCAGGAC CCAAACCTTCA
<i>Chrm1</i>	NM_080773.1	CCATCCTCTT CTGGCAATAC CT	GGGAGAGGAA CTGGATGTAG CA
<i>Dcx</i>	NM_053379.3	GGATTGTGTA CGCTGTTTCT TCTG	TCAGGTCAGC CAGCAATGC
<i>Dpysl3</i>	NM_012934.1	CATGTGGTAC CTGAACCTGA GTCTA	GCCCACTCAC GCCACTTTT
<i>Drd2</i>	NM_012547.1	CTTTGCAGAC CACCACCAAC T	TGTGGCCACC AGAAGATCAG
<i>Eomes</i>	XM_017596193.1	GCCGGACTAC CATGGACATC	TTTCTCCTTG GCAAGCTGAT C
<i>Fos</i>	NM_022197	CAACGAGCCC TCCTCTGACT	TGCCTTCTCT GACTGCTCAC A
<i>Gapdh</i>	NM_017008	GGCCGAGGGC CCACTA	TGTTGAAGTC ACAGGAGACA ACCT
<i>Gpx1</i>	NM_030826.4	GCTGCTCATT GAGAATGTCG	GAATCTCTTC ATTCTTGCCA TT
<i>Gria1</i>	NM_031608	GTGAGCGTCG TCCTCTTCCT	TCTTCGCTGT GCCATTCGTA
<i>Gria2</i>	NM_001083811.1	CATCACACCT AGCTTCCCAA CA	CTTTGAGGTC AGGTCGCATC T
<i>Grin2a</i>	NM_012573	GGCTGTCAGC ACTGAATCCA	GGTTTAGAGA ATCCTGGCGT AGAG
<i>Grin2b</i>	NM_012574	TCGTCAAGAC ACAAGATTAA AACCA	GGAGGATAAA GGAACGGAAG AAA
<i>Hprt1</i>	NM_012583	GCCGACCGGT TCTGTCAT	TCATAACCTG GTTCATCATC ACTAATC
<i>Il1a</i>	NM_017019.1	GAGGCCATAG CCCATGATTT AG	TGGAAGCTGT GAGGTGCTGA T
<i>Il1b</i>	NM_031512	TGACAGACCC CAAAAGATTA AGG	CTCATCTGGA CAGCCCAAGT C
<i>Il6</i>	NM_012589.2	GACTTCCAGC CAGTTGCCTT CTTG	TGGTCTGTTG TGGGTGGTAT CCTC
<i>Il18</i>	NM_019165.1	ACACAGGCGG GTTTCTTTTG	CAACCGCAGT AATACGGAGC ATA
<i>Keap1</i>	NM_057152	CAGAACAAGC CATGCCTTT T	TCTGGTCTTC CACAAGGTCC TT
<i>Mapk1</i>	NM_053842.2	AAAATAAGGT GCCGTGGAAC AG	ATCCAGTAAA TCCAGAGCTT TGGA
<i>Mapk3</i>	NM_017347.3	GCCCTCCAAT CTGCTTATCAA C	GCAAGGCCAA AATCACAGAT C
<i>Mtl</i>	NM_138826.4	GCTGTGCCTG AAGTGACGAA	TCTGAGTTGG TCCGAAAATT ATTT
<i>Nes</i>	NM_001308239.1	TTGGCTTTCT GGACCCCAA G	CAGGAAGGCT GTCACAGGAG
<i>Nfkb1</i>	NM_001276711.1	CACTAAATCC AACACAGGCA TCAC	GGACAATCT CTAGGCTCGT TT
<i>Nirk2</i>	NM_001163168.2	GGCTTATGCT TGCTGGTCTT G	TCCTAGTGGT GCTGCATTTG C
<i>Pcna</i>	NM_022381.3	CTCACGTCTC CTTAGTGCAG CTT	CGATCGCAGC GGTATGTGT
<i>Ptgs2</i>	NM_011198	CTCAGCCAGG CAGCAAATC	ACATTCCCCA CGGTTTTGAC
<i>Pvalb</i>	NM_022499	TCGCCACAAA AAGTTCTTCC A	TCTTCACATC ATCCGCACTC TT
<i>Rbfox3</i>	NM_001134498.2	TCTCTTGTCG GTTTGCTTCC A	CCTCCATAAA TCTCAGCACC ATAA
<i>Reln</i>	NM_080394	GCCAGCTTTC GACTACCCTA TTAAC	CGTAGTGGCA CAGAAGCTAT CG
<i>Sod1</i>	NM_017050.1	CATTCCATCA TTGGCCGTAC TA	TTTCCACCTT TGCCCAAGTC
<i>Sox2</i>	NM_001109181	GCGGCAACCA GAAGAACAG	CCCGCTCGCC ATGCT
<i>Sst</i>	NM_012659.1	ACCCCGGGAA CGCAA	CCACACCATG AAGGCATTCA
<i>Tgfb1</i>	NM_021578	ATCGACATGG AGCTGGTGAA A	CGAGCCTTAG TTTGGACAGG AT
<i>Tnf</i>	NM_012675.3	GCCCGAGGCA ACACATCT	CCAGTTCCAC ATCTCGGATC A
<i>Tubb3</i>	NM_139254.2	AACGTCAAGG TAGCGGTGTG T	CGTGCTGTTG CCGATGAAG

Abbreviations: *Arc*, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Calb1*, calbindin 1 (also known as calbindin-D-28K); *Calb2*, calbindin 2 (also known as calbindin-D-29K and calretinin); *Cat*, catalase; *Cdk1*, cyclin-dependent kinase 1; *Cdk2*, cyclin-dependent kinase 2; *Chek1*, checkpoint kinase 1; *Chrna7*, cholinergic receptor nicotinic alpha 7 subunit; *Chrm1*, cholinergic receptor, muscarinic 1; *Dcx*, doublecortin; *Dpysl3*, dihydropyrimidinase-like 3; *Drd2*, dopamine receptor D2; *Eomes*, eomesodermin; *Fos*, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; *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; *Grin2a*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A; *Grin2b*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Il1a*, interleukin 1 alpha; *Il1b*, interleukin 1 beta; *Il6*, interleukin 6; *Il18*, interleukin 18; *Keap1*, Kelch-like

ECH-associated protein 1; *Mapk1*, mitogen activated protein kinase 1; *Mapk3*, mitogen activated protein kinase 3; *Mt1*, metallothionein 1; *Nes*, nestin; *Nfkb1*, nuclear factor kappa B subunit 1; *Ntrk2*, neurotrophic receptor tyrosine kinase 2; *Pcna*, proliferating cell nuclear antigen; *Ptgs2*, prostaglandin-endoperoxide synthase 2; *Pvalb*, parvalbumin; *Rbfox3*, RNA binding fox-1 homolog 3; *Reln*, reelin; *Sod1*, superoxide dismutase 1; *Sox2*, SRY-box transcription factor 2; *Sst*, somatostatin; *Tgfb1*, transforming growth factor, beta 1; *Tnf*, tumor necrosis factor; *Tubb3*, tubulin, beta 3 class III.

**Table 2-3****Maternal reproductive parameters**

	Control	LPS alone	LPS + AGIQ
No. of dams examined	16	16	15
No. of left implantation sites	5.8±1.8	5.5±1.8	6.5±1.5
No. of right implantation sites	6.6±2.6	6.4±1.8	5.6±1.9
No. of all implantation sites	11.6±4.6	11.1±3.9	11.3±3.8
No. of live pups	10.4±4.5	10.5±3.6	10.4±4.8
Male ratio (%)	49.3±19.9	51.6±12.2	38.6±16.0

Abbreviations: AGIQ, alpha-glycosyl isoquercitrin; LPS, lipopolysaccharides.

Data are expressed as the mean ± SD.

**Table 2-4****Body weight and food consumption and water consumption of dams**

	Control	LPS alone	LPS + AGIQ
No. of dams examined	16	16	15
Body weight (g/day)			
GD 10	272.2 ± 22.8	271.0 ± 21.8	272.1 ± 20.5
GD 11	277.7 ± 23.1	276.1 ± 21.1	279.0 ± 21.3
GD 15	291.4 ± 25.3	290.4 ± 23.5	292.5 ± 23.1
GD 16	300.6 ± 25.1	294.9 ± 23.8	297.0 ± 25.3
GD 17	314.8 ± 33.8	308.6 ± 29.4	309.4 ± 34.9
GD 20	353.6 ± 44.3	348.5 ± 37.5	347.5 ± 38.2
PND 3	284.6 ± 22.7	283.5 ± 20.9	283.8 ± 23.7
PND 7	285.9 ± 23.1	284.2 ± 21.8	282.4 ± 23.2
PND 12	306.1 ± 22.6	305.5 ± 22.0	303.3 ± 21.2
PND 15	309.4 ± 22.6	303.4 ± 17.7	302.6 ± 20.3
PND 18	299.4 ± 21.1	286.9 ± 17.4	287.8 ± 18.7
PND 21	287.8 ± 18.4	283.7 ± 16.6	281.7 ± 18.8
Food consumption (g/day)			
GD 11	19.8 ± 2.8	19.5 ± 1.8	19.7 ± 3.1
GD 15	20.0 ± 2.6	19.8 ± 1.9	19.4 ± 1.7
GD 16	19.8 ± 2.1	15.7 ± 2.1**	15.2 ± 2.5
GD 17	19.1 ± 3.1	15.9 ± 1.9**	16.2 ± 2.1
GD 20	21.3 ± 2.5	22.2 ± 2.2	20.2 ± 3.1
PND 3	48.7 ± 15.0	51.0 ± 12.3	48.1 ± 12.4
PND 7	36.8 ± 7.9	35.6 ± 7.6	35.6 ± 7.4
PND 12	44.8 ± 10.3	45.5 ± 9.0	42.2 ± 9.8
PND 15	48.6 ± 9.8	48.2 ± 10.1	45.1 ± 12.4
PND 18	50.3 ± 10.1	49.1 ± 8.2	48.8 ± 8.7
Water consumption (g/day)			
GD 11	35.1 ± 6.5	34.4 ± 5.3	34.4 ± 5.8
GD 15	34.4 ± 6.7	35.4 ± 6.1	32.9 ± 4.6
GD 16	37.3 ± 7.0	32.1 ± 6.5	29.5 ± 5.5
GD 17	38.1 ± 8.3	36.4 ± 6.1	34.6 ± 4.4
GD 20	39.1 ± 8.1	38.7 ± 11.9	36.0 ± 8.7
PND 3	29.2 ± 8.4	30.0 ± 6.8	29.1 ± 7.4
PND 7	50.3 ± 11.2	51.2 ± 11.5	46.2 ± 11.4
PND 12	63.6 ± 14.8	65.4 ± 13.1	59.8 ± 14.4
PND 15	70.9 ± 16.8	65.0 ± 13.9	65.5 ± 17.3
PND 18	71.2 ± 18.1	68.1 ± 14.5	69.3 ± 18.2

Abbreviations: AGIQ, alpha-glycosyl isoquercitrin; LPS, lipopolysaccharides; GD, gestational day; PND, postnatal day.

Data are expressed as the mean ± SD.

\*\* $P < 0.01$ , significantly different from the controls by Student's  $t$ -test or Aspin-Welch's  $t$ -test.

**Table 2-5****Body weight and food consumption and water consumption of male pups**

	Control	LPS alone	LPS + AGIQ
No. of pups examined	30–127	32–122	27–106
Body weight (g/day)			
PND 6	15.9±1.8	15.9±1.5	15.5±1.3
PND 11	30.3±2.3	29.4±3.1	29.5±2.5
PND 14	41.7±2.9	40.4±3.7	41.0±2.9
PND 18	50.7±4.1	49.5±3.5	51.3±2.9
PND 21	58.9±4.9	56.0±3.4	57.0±4.3
PND 28	96.3±5.6	93.2±3.8	95.2±3.9
PND 35	151.1±6.1	145.4±5.5	149.5±5.6
PND 42	204.4±7.0	198.4±9.8	204.7±7.2
PND 49	258.9±11.7	256.4±10.4	261.2±12.5
PND 56	326.9±13.9	324.8±11.6	326.0±17.6
PND 63	365.9±14.3	368.5±13.8	372.7±18.6
PND 70	407.7±14.2	409.0±15.6	413.5±20.6
PND 77	439.4±12.5	438.5±19.1	442.5±21.0
Food consumption (g/day)			
PND 23	6.7±0.7	6.6±0.6	7.3±1.0
PND 28	11.2±0.6	11.2±0.6	11.5±1.9
PND 35	15.0±1.2	14.8±1.3	15.8±2.2
PND 42	22.2±5.4	19.1±1.0	19.6±2.5
PND 49	22.1±2.3	22.8±1.5	22.7±2.6
PND 56	25.9±2.9	25.9±1.7	25.3±3.7
PND 63	27.8±2.7	27.7±3.3	27.3±3.5
PND 70	27.5±3.6	27.7±2.6	28.0±2.6
PND 76	25.3±2.0	25.4±2.0	25.4±3.1
Water consumption (g/day)			
PND 23	11.7±0.8	11.6±1.1	12.0±1.1
PND 28	17.1±1.1	16.7±0.8	17.7±2.6
PND 35	23.8±1.6	23.3±1.5	25.2±3.6
PND 42	29.6±2.7	29.0±2.3	31.8±3.8
PND 49	33.8±2.2	34.5±3.9	35.5±3.5
PND 56	37.5±2.3	37.7±3.4	38.3±3.7
PND 63	36.9±2.6	38.4±3.4	40.6±5.1
PND 70	39.6±4.8	42.4±4.1	43.7±3.8
PND 76	33.8±2.9	36.1±2.8	35.7±2.5

Abbreviations: AGIQ, alpha-glycosyl isoquercitrin; LPS, lipopolysaccharides; PND, postnatal day.

Data are expressed as the mean ± SD.

**Table 2-6****Body and brain weights of male pups at necropsies**

	Control	LPS alone	LPS + AGIQ
PND 6			
No. of examined	30	27	23
Body weight (g)	15.8±1.6	15.2±0.9	14.8 ± 1.5
No. of pups examined	8	8	6
Brain weight (g)	0.65±0.06	0.64±0.06	0.64 ± 0.03
PND 21			
No. of pups examined	28	29	23
Body weight (g)	58.9±4.1	55.9±3.1	56.5 ± 3.8
No. of pups examined	25	21	13
Brain weight (g)	1.54±0.02	1.56±0.05	1.56 ± 0.03
PND 77			
No. of pups examined	30	32	27
Body weight (g)	439.4±12.5	438.5±19.1	442.5 ± 21.0
No. of pups examined	8	10	7
Brain weight (g)	2.11±0.05	2.16±0.10	2.13 ± 0.06

Abbreviations: AGIQ, alpha-glycosyl isoquercitrin; LPS, lipopolysaccharides; PND, postnatal day.

Data are expressed as the mean ± SD.

**Table 2-7**

**Changes in ultrasonic vocalization test of male pups at PND 10**

	Control	LPS alone	LPS + AGIQ
No. of pups examined	10	10	10
Call count (counts)	248.4±179.8	260.2±132.9	217.4±136.7
Maximum duration (sec/call)	0.40±0.20	0.41±0.11	0.35±0.13
Average duration (sec/call)	0.12±0.04	0.13±0.03	0.11±0.02

Abbreviations: AGIQ, alpha-glycosyl isoquercitrin; LPS, lipopolysaccharides; PND, postnatal day.

Data are expressed as the mean ± SD.

**Table 2-8****Changes in open field test of male pups**

	Control	LPS alone	LPS + AGIQ
Adolescent stage (PND 38)			
No. of pups examined	10	10	10
Total moving distance (m)	50.45 ± 7.83	52.43 ± 5.30	50.80 ± 1.08
Total moving duration (sec)	230.9 ± 64.5	260.6 ± 15.5	254.4 ± 45.8
Average speed (cm/sec)	7.9 ± 2.1	8.7 ± 0.9	8.5 ± 1.8
Average moving speed (cm/sec)	18.0 ± 1.3	18.0 ± 1.5	17.7 ± 2.1
Distance per movement (cm)	28.8 ± 4.3	28.8 ± 3.7	31.7 ± 6.3
Duration per movement (sec)	1.6 ± 0.2	1.6 ± 0.1	1.8 ± 0.2
Wall side time (sec)	519.1 ± 34.7	508.5 ± 28.4	512.6 ± 32.8
Center region time (sec)	81.0 ± 34.7	91.6 ± 28.4	87.4 ± 32.8
Center region rate (%)	13.5 ± 5.8	15.3 ± 4.7	14.6 ± 5.5
Adult stage (PND 70)			
No. of pups examined	10	10	10
Total moving distance (m)	50.01 ± 5.57	40.23 ± 7.62**	47.90 ± 6.31 <sup>†</sup>
Total moving duration (sec)	271.9 ± 27.7	229.9 ± 32.6**	271.9 ± 28.3 <sup>†</sup>
Average speed (cm/sec)	8.3 ± 0.9	6.8 ± 1.3**	8.0 ± 1.1 <sup>†</sup>
Average moving speed (cm/sec)	16.2 ± 1.3	14.7 ± 1.9	15.3 ± 1.2
Distance per movement (cm)	29.5 ± 3.3	23.9 ± 5.0**	27.5 ± 3.3
Duration per movement (sec)	1.8 ± 0.2	1.6 ± 0.2*	1.8 ± 0.1 <sup>†</sup>
Wall side time (sec)	511.5 ± 34.7	515.7 ± 19.3	518.1 ± 27.9
Center region time (sec)	88.6 ± 34.7	84.3 ± 19.3	81.9 ± 27.9
Center region rate (%)	14.8 ± 5.8	14.1 ± 3.2	13.6 ± 4.6

Abbreviations: AGIQ, alpha-glycosyl isoquercitrin; LPS, lipopolysaccharides; PND, postnatal day.

Data are expressed as the mean ± SD.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from controls by Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test.

<sup>†</sup> $P < 0.05$ , <sup>††</sup> $P < 0.01$  significantly different from LPS alone by Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test.



**Table 2-9****Changes in social interaction test of male pups**

	Control	LPS alone	LPS + AGIQ
Adolescent stage (PND 39–40)			
Empty mesh cage			
No. of pups examined	10	10	10
Total moving distance (cm)	3170.9±854.8	3109.8±908.2	3132.3±661.4
Average moving speed (cm/sec)	24.4±3.4	25.8±2.9	25.9±3.0
Immobile time (sec)	172.3±28.2	181.3±25.9	176.7±29.0
Moving distance around mesh cage (cm)	1123.2±399.7	1101.0±246.5	998.8±228.5
Staying duration around mesh cage (sec)	58.0±22.0	67.6±30.2	69.2±27.4
No. of entry around mesh cage	16.6±5.9	15.3±4.7	16.2±4.8
Total contact count to mesh cage	40.0±17.0	39.0±12.4	42.9±12.0
Total mesh cage contact duration (sec)	147.6±54.8	173.1±45.1	163.4±31.8
Average mesh cage contact duration (sec)	1.1±0.5	1.8±0.8	1.9±1.7
Novel animal in mesh cage			
Total moving distance (cm)	1631.4±319.3	1654.9±507.0	1548.7±494.8
Average moving speed (cm/sec)	25.6±2.6	26.4±4.3	25.0±3.6
Immobile time (sec)	116.1±13.3	118.0±10.8	118.9±15.3
Moving distance around mesh cage (cm)	857.4±124.2	884.2±139.1	833.6±245.4
Staying duration around mesh cage (sec)	66.7±18.6	75.2±12.8	70.4±22.3
No. of entry around mesh cage	7.3±2.2	7.2±3.6	6.8±3.8
Total contact count to mesh cage	37.6±9.6	41.3±14.2	37.2±13.2
Total mesh cage contact duration (sec)	133.8±18.8	140.9±15.5	138.9±18.8
Average mesh cage contact duration (sec)	1.9±0.3	2.0±0.7	2.4±2.2
Adult stage (PND 71–72)			
Empty mesh cage			
No. of pups examined	10	10	10
Total moving distance (cm)	3278.3±608.3	3138.6±606.6	3234.3±551.2
Average moving speed (cm/sec)	23.2±2.6	22.1±2.1	22.7±2.3
Immobile time (sec)	159.1±18.9	158.2±19.0	158.2±13.3
Moving distance around mesh cage (cm)	1476.7±332.8	1567.7±231.3	1605.4±245.7
Staying duration around mesh cage (sec)	85.0±29.0	96.8±16.5	96.0±15.1
No. of entry around mesh cage	12.5±3.5	11.3±3.3	12.0±3.1
Total contact count to mesh cage	82.3±25.7	95.5±22.0	93.5±20.9
Total mesh cage contact duration (sec)	182.2±37.5	191.2±23.8	192.8±25.5
Average mesh cage contact duration (sec)	1.0±0.2	1.0±0.2	1.1±0.2
Novel animal in mesh cage			
Total moving distance (cm)	1671.2±578.8	1682.9±404.4	1700.3±485.1
Average moving speed (cm/sec)	24.4±3.2	24.3±2.5	24.3±3.1
Immobile time (sec)	111.0±11.3	110.8±12.2	111.8±12.5
Moving distance around mesh cage (cm)	961.8±174.9	950.4±145.3	998.8±120.6
Staying duration around mesh cage (sec)	77.9±10.1	73.5±22.4	77.5±14.2
No. of entry around mesh cage	5.7±1.8	5.5±2.1	5.4±2.5
Total contact count to mesh cage	51.6±18.1	63.5±14.5	54.4±16.5
Total mesh cage contact duration (sec)	137.6±16.4	137.2±21.5	142.6±17.1
Average mesh cage contact duration (sec)	1.7±0.7	1.2±0.4	1.6±0.9

Abbreviations: AGIQ, alpha-glycosyl isoquercitrin; LPS, lipopolysaccharides; PND, postnatal day. Data are expressed as the mean ± SD.

**Table 2-10****Changes in contextual fear conditioning test of male pups**

	Control	LPS alone	LPS + AGIQ
Adolescent stage (PND 41–45)			
	No. of pups examined	10	10
Freezing rate		10	10
Fear conditioning (%)	21.5±10.7	18.1±10.1	24.3±12.4
Fear memory acquisition (%)	62.0±9.1	61.3±20.0	66.7±20.6
Fear memory extinction #1 (%)	36.3±20.2	36.0±24.2	38.7±28.3
Fear memory extinction #2 (%)	18.9±16.1	26.5±26.1	21.7±23.4
Fear memory extinction #3 (%)	10.7±7.7	16.5±20.6	16.7±15.5
Relative freezing rate			
Fear memory extinction #1 (/fear memory acquisition)	0.58±0.32	0.53±0.30	0.52±0.32
Fear memory extinction #2 (/fear memory acquisition)	0.31±0.26	0.38±0.36	0.28±0.28
Fear memory extinction #3 (/fear memory acquisition)	0.17±0.12	0.23±0.26	0.23±0.19
Adult stage (PND 73–77)			
	No. of pups examined	10	10
Freezing rate		10	10
Fear conditioning (%)	24.9±13.2	28.8±13.0	29.3±11.7
Fear memory acquisition (%)	76.6±13.6	57.6±19.2*	77.2±14.9 <sup>†</sup>
Fear memory extinction #1 (%)	45.2±22.2	65.0±20.6*	59.2±19.9
Fear memory extinction #2 (%)	28.4±18.1	47.8±19.7	36.4±18.1
Fear memory extinction #3 (%)	31.2±15.0	45.9±28.6	35.7±18.6
Relative freezing rate			
Fear memory extinction #1 (/fear memory acquisition)	0.57±0.23	1.20±0.32**	0.76±0.20 <sup>††</sup>
Fear memory extinction #2 (/fear memory acquisition)	0.36±0.21	0.88±0.35**	0.47±0.21 <sup>††</sup>
Fear memory extinction #3 (/fear memory acquisition)	0.40±0.16	0.78±0.37*	0.46±0.21 <sup>†</sup>

Abbreviations: AGIQ, alpha-glycosyl isoquercitrin; LPS, lipopolysaccharides; PND, postnatal day.

Data are expressed as the mean ± SD.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from controls by Student's  $t$ -test or Aspin-Welch's  $t$ -test.

<sup>†</sup> $P < 0.05$ , <sup>††</sup> $P < 0.01$ , significantly different from LPS alone by Student's  $t$ -test or Aspin-Welch's  $t$ -test.

**Table 2-11****Changes in oxidative stress parameters in the brain of male pups**

	Control	LPS alone	LPS + AGIQ
PND 6			
Cerebrum			
No. of pups examined	6	6	6
MDA (nmol/mg tissue protein)	1.37±0.59	1.92±0.48	1.67±0.42
GSSG/GSH ratio	0.078±0.019	0.095±0.017	0.082±0.018
PND 21			
Hippocampus			
No. of pups examined	6	6	6
MDA (nmol/mg tissue protein)	1.00±0.56	1.78±1.18	0.92±0.40
GSSG/GSH ratio	0.093±0.031	0.109±0.037	0.105±0.049

Abbreviations: AGIQ, alpha-glycosyl isoquercitrin; GSH, reduced glutathione; GSSG, glutathione disulfide; LPS, lipopolysaccharides; MDA, malondialdehyde; PND, postnatal day.

Data are expressed as the mean ± SD.

**Table 2-12****Number of immunoreactive cells for glial cell markers in the hippocampus of male pups**

		Control	LPS alone	LPS + AGIQ
PND 6				
	No. of pups examined	10	10	10
Microglia/macrophages (No./mm <sup>2</sup> whole hippocampal area)				
Iba1		117.86±20.46	121.64±19.38	127.97±13.77
CD68		6.12±4.35	8.41±2.32	7.89±4.90
CD163		1.89±0.74	2.48±1.40	2.50±0.82
Astrocytes (No./mm <sup>2</sup> whole hippocampal area)				
GFAP		68.49±19.92	73.73±18.23	74.35±20.82
PND 21				
	No. of pups examined	10	10	10
Microglia/macrophages (No./mm <sup>2</sup> hilar area)				
Iba1		138.72±22.13	139.71±21.94	142.03±20.34
Astrocytes (No./mm <sup>2</sup> hilar area)				
GFAP		330.05±73.29	339.25±53.59	341.58±51.58
PND 77				
	No. of pups examined	10	10	10
Microglia/macrophages (No./mm <sup>2</sup> hilar area)				
Iba1		106.14±20.72	100.47±11.33	100.28±14.86
Astrocytes (No./mm <sup>2</sup> hilar area)				
GFAP		184.99±70.13	208.13±52.02	200.18±73.57

Abbreviations: AGIQ, alpha-glycosyl isoquercitrin; CD68, cluster of differentiation 68; CD163, cluster of differentiation 163; GFAP, glial fibrillary acidic protein; Iba1, ionized calcium-binding adaptor molecule 1; LPS, lipopolysaccharides; PND, postnatal day.

Data are expressed as the mean ± SD.

**Table 2-13****Number of immunoreactive cells for neurogenesis-related markers in the SGZ/GCL or hilar area of the hippocampal dentate gyrus of male pups at PND 21**

	Control	LPS alone	LPS + AGIQ
No. of pups examined	10	10	10
Granule cell lineage subpopulations (No./mm SGZ length)			
GFAP	2.55±1.13	2.56±1.79	2.62±0.77
SOX2	19.63±6.02	21.12±2.01	18.94±4.86
TBR2	5.19±1.99	2.89±1.39**	6.27±2.29††
DCX	61.64±17.63	48.63±10.84	53.67±14.21
TUBB3	85.42±12.15	74.23±20.89	81.71±20.66
NeuN	468.28±38.90	433.82±35.65	467.86±54.99
Cell proliferation and apoptosis (No./mm SGZ length)			
PCNA	5.84±2.19	3.97±1.68*	5.32±1.59
TUNEL (in the SGZ)	0.92±0.47	1.35±0.45	1.13±0.73
TUNEL (in the GCL)	0.11±0.09	0.17±0.16	0.13±0.15
Interneuron subpopulations (No./mm <sup>2</sup> hilar area)			
CALB1	23.58±11.48	18.33±7.80	26.75±15.73
CALB2	15.67±9.77	14.90±11.20	15.97±12.55
GAD67	103.37±13.79	83.50±16.42**	89.11±16.88
PVALB	26.70±12.91	25.79±15.48	32.65±10.32
RELN	131.37±21.38	129.43±26.33	121.45±14.85
SST	59.11±31.67	35.40±25.34	57.55±28.77
Granule cells expressing synaptic plasticity-related proteins (No./mm SGZ length)			
ARC	8.26±3.04	7.88±2.31	8.34±3.40
COX2	103.07±20.53	96.76±20.10	100.46±15.07
FOS	15.47±4.01	11.29±1.37**	16.33±2.96††
p-ERK1/2	0.36±0.69	0.61±0.52	0.94±0.94

Abbreviations: AGIQ, alpha-glycosyl isoquercitrin; ARC, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; CALB1, calbindin-D-28K; CALB2, calbindin-D-29K; 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; LPS, lipopolysaccharides; NeuN, neuronal nuclei; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; p-ERK1/2, phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 (phosphorylated 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-mediated dUTP-biotin nick end-labeling.

Data are expressed as the mean ± SD.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from controls by Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test.

† $P < 0.05$ , †† $P < 0.01$ , significantly different from LPS alone by Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test.

**Table 2-14****Number of immunoreactive cells for neurogenesis-related markers in the SGZ/GCL or hilar area of the hippocampal dentate gyrus of male pups at PND 77**

	Control	LPS alone	LPS + AGIQ
Granule cell lineage subpopulations (No./mm SGZ length)			
GFAP	1.27±0.62	0.69±0.34*	1.07±0.75
SOX2	13.95±3.56	8.14±2.73**	11.90±4.62 <sup>†</sup>
TBR2	3.14±1.70	2.84±1.40	2.73±1.26
DCX	19.97±6.87	21.07±6.40	21.24±5.01
TUBB3	13.08±2.21	13.72±3.63	13.25±3.31
NeuN	529.84±50.70	535.57±27.26	515.49±61.73
Cell proliferation and apoptosis (No./mm SGZ length)			
PCNA	2.29±1.33	1.58±0.89	1.78±0.85
TUNEL (in the SGZ)	0.20±0.23	0.17±0.14	0.19±0.12
TUNEL (in the GCL)	N.D.	N.D.	N.D.
Interneuron subpopulations (No./mm <sup>2</sup> hilar area)			
CALB1	3.46±1.65	3.60±2.13	3.90±2.00
CALB2	6.59±5.51	6.48±5.20	8.96±6.17
GAD67	77.32±12.51	64.15±14.51*	82.62±11.28 <sup>††</sup>
PVALB	15.94±7.54	17.10±10.27	17.52±12.53
RELN	66.92±6.32	71.77±13.77	65.73±8.01
SST	34.75±6.98	34.19±7.99	38.75±7.76
Granule cells expressing synaptic plasticity-related proteins (No./mm SGZ length)			
ARC	6.14±2.21	6.52±1.66	5.76±1.66
COX2	71.86±14.71	68.81±11.49	71.83±12.40
FOS	12.64±2.52	12.70±2.81	12.53±2.62
p-ERK1/2	2.57±1.45	1.53±0.92	1.69±1.14

Abbreviations: AGIQ, alpha-glycosyl isoquercitrin; ARC, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; CALB1, calbindin-D-28K; CALB2, calbindin-D-29K; 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; LPS, lipopolysaccharides; N.D., not detected; NeuN, neuronal nuclei; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; p-ERK1/2, phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 (phosphorylated 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-mediated dUTP-biotin nick end-labeling.

Data are expressed as the mean ± SD.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from controls by Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test.

<sup>†</sup> $P < 0.05$ , <sup>††</sup> $P < 0.01$ , significantly different from LPS alone by Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test.

Table 2-15

**Transcript-level expression changes of inflammation and oxidative stress-related genes in the hippocampal formation or dentate gyrus of male pups**

	Control		LPS alone		LPS + AGIQ	
	Relative transcript level normalized to					
	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
<b>PND 6</b>						
<b>Chemical mediators and related makers</b>						
<i>Il1a</i>	1.05 ± 0.34	1.04 ± 0.33	1.21 ± 0.35	1.13 ± 0.34	1.07 ± 0.33	0.87 ± 0.25
<i>Il1b</i>	1.03 ± 0.29	1.02 ± 0.20	1.46 ± 0.43	1.37 ± 0.44	0.96 ± 0.33	0.99 ± 0.25
<i>Il6</i>	1.09 ± 0.42	1.11 ± 0.51	1.34 ± 0.62	1.22 ± 0.52	0.98 ± 0.51	0.82 ± 0.41
<i>Il18</i>	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.08	1.08 ± 0.27	1.00 ± 0.20	1.16 ± 0.12	0.96 ± 0.11
<i>Nfkb1</i>	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.10	1.01 ± 0.21	0.93 ± 0.13	1.05 ± 0.07	0.87 ± 0.14
<i>Tgfb1</i>	1.00 ± 0.06	1.01 ± 0.11	1.07 ± 0.14	0.99 ± 0.09	1.11 ± 0.10	0.92 ± 0.17
<i>Tnf</i>	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.15	1.06 ± 0.36	0.98 ± 0.21	1.05 ± 0.37	0.88 ± 0.29
<b>Oxidative stress-related genes</b>						
<i>Cat</i>	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.25	0.92 ± 0.19	1.09 ± 0.04	0.90 ± 0.10
<i>Gpx1</i>	1.03 ± 0.26	1.02 ± 0.24	0.81 ± 0.15	0.75 ± 0.10*	0.88 ± 0.09	0.73 ± 0.10
<i>Keap1</i>	1.01 ± 0.14	1.00 ± 0.11	1.05 ± 0.13	0.97 ± 0.03	1.09 ± 0.08	0.90 ± 0.13
<i>Mt1</i>	1.03 ± 0.25	1.02 ± 0.25	1.00 ± 0.31	0.91 ± 0.16	0.82 ± 0.13	0.68 ± 0.12 <sup>†</sup>
<i>Sod1</i>	1.02 ± 0.23	1.01 ± 0.14	0.95 ± 0.12	0.89 ± 0.16	1.17 ± 0.15 <sup>†</sup>	0.98 ± 0.22
<b>PND 21</b>						
<b>Chemical mediators and related makers</b>						
<i>Il1b</i>	1.02 ± 0.20	1.03 ± 0.26	1.18 ± 0.30	1.24 ± 0.38	1.19 ± 0.13	1.18 ± 0.11
<b>Oxidative stress-related genes</b>						
<i>Gpx1</i>	1.01 ± 0.13	1.01 ± 0.13	0.89 ± 0.15	0.93 ± 0.15	0.93 ± 0.27	0.92 ± 0.24
<i>Keap1</i>	1.01 ± 0.15	1.01 ± 0.12	0.93 ± 0.09	0.97 ± 0.12	0.94 ± 0.10	0.94 ± 0.13
<i>Mt1</i>	1.01 ± 0.14	1.00 ± 0.09	0.99 ± 0.17	1.03 ± 0.14	1.06 ± 0.26	1.06 ± 0.26
<i>Sod1</i>	1.00 ± 0.07	1.01 ± 0.12	0.84 ± 0.06**	0.88 ± 0.11	0.80 ± 0.09	0.80 ± 0.09

Abbreviations: AGIQ, alpha-glycosyl isoquercitrin; *Cat*, catalase; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Gpx1*, glutathione peroxidase 1; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Il1a*, interleukin 1 alpha; *Il1b*, interleukin 1 beta; *Il6*, interleukin 6; *Il18*, interleukin 18; *Keap1*, Kelch-like ECH-associated protein 1; LPS, lipopolysaccharides; *Mt1*, metallothionein 1; *Nfkb1*, nuclear factor kappa B subunit 1; *Sod1*, superoxide dismutase 1; *Tgfb1*, transforming growth factor, beta 1; *Tnf*, tumor necrosis factor.

Data are expressed as the mean ± SD. N = 6/group.

\* $P < 0.05$ , significantly different from controls by Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test.

<sup>†</sup> $P < 0.05$ , significantly different from LPS-alone by Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test.

Table 2-16

**Transcript-level expression changes of neurogenesis-related genes in the hippocampal dentate gyrus of male pups at PND 21**

	Control		LPS alone		LPS + AGIQ	
	Relative transcript level normalized to					
	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
<b>Granule cell lineage marker genes</b>						
<i>Nes</i>	1.00±0.08	1.00±0.11	1.42±0.23**	1.21±0.24	1.17±0.36	1.02±0.29
<i>Sox2</i>	1.01±0.12	1.00±0.10	1.14±0.22	0.97±0.20	1.24±0.38	1.08±0.30
<i>Eomes</i>	1.02±0.20	1.03±0.24	0.67±0.20*	0.57±0.20**	1.08±0.61	0.94±0.50
<i>Dcx</i>	1.01±0.19	1.00±0.20	0.92±0.20	0.88±0.24	0.94±0.24	0.85±0.21
<i>Dpysl3</i>	1.01±0.12	1.01±0.13	0.88±0.19	0.87±0.20	0.90±0.23	0.84±0.21
<i>Tubb3</i>	1.00±0.09	1.01±0.18	0.92±0.10	0.97±0.14	0.95±0.08	0.95±0.10
<i>Rbfox3</i>	1.01±0.13	1.01±0.16	0.99±0.13	0.97±0.12	0.94±0.13	0.87±0.11
<b>Cell proliferation marker gene</b>						
<i>Pcna</i>	1.00±0.07	1.00±0.10	0.81±0.09**	0.85±0.09*	0.92±0.08	0.92±0.16
<b>Cell cycle-related genes</b>						
<i>Cdk1</i>	1.00±0.10	1.01±0.18	0.95±0.23	0.99±0.20	0.99±0.31	0.99±0.33
<i>Cdk2</i>	1.02±0.23	1.02±0.21	0.91±0.23	0.95±0.24	1.02±0.14	1.01±0.16
<i>Chek1</i>	1.01±0.15	1.02±0.21	1.46±0.30**	1.53±0.34*	1.33±0.63	1.32±0.60
<b>GABAergic interneuron marker genes</b>						
<i>Calb1</i>	1.01±0.16	1.01±0.18	0.93±0.37	0.90±0.39	0.90±0.42	0.82±0.39
<i>Calb2</i>	1.02±0.19	1.02±0.20	1.03±0.19	0.98±0.16	0.98±0.15	0.89±0.12
<i>Pvalb</i>	1.01±0.17	1.01±0.16	1.05±0.26	1.00±0.25	1.17±0.30	1.07±0.27
<i>Reln</i>	1.02±0.24	1.01±0.16	1.09±0.07	1.00±0.25	1.01±0.13	1.07±0.27
<i>Sst</i>	1.03±0.25	1.03±0.25	1.01±0.21	0.96±0.19	1.33±0.17 <sup>†</sup>	1.22±0.14 <sup>†</sup>
<b>Cholinergic receptor genes</b>						
<i>Chrm1</i>	1.01±0.18	1.01±0.17	0.98±0.14	1.03±0.16	0.96±0.14	0.96±0.22
<i>Chrna7</i>	1.02±0.19	1.02±0.21	0.97±0.11	1.02±0.13	1.04±0.23	1.03±0.23
<b>Dopaminergic receptor gene</b>						
<i>Drd2</i>	1.01±0.13	1.02±0.21	0.95±0.33	0.99±0.37	0.92±0.11	0.91±0.07
<b>Glutamate receptor genes</b>						
<i>Gria1</i>	1.00±0.08	1.01±0.13	0.92±0.15	0.96±0.19	0.86±0.20	0.87±0.24
<i>Gria2</i>	1.04±0.10	1.03±0.18	1.05±0.10	1.10±0.14	1.05±0.18	1.05±0.19
<i>Grin2a</i>	1.02±0.19	1.02±0.21	1.11±0.16	1.17±0.23	1.00±0.24	1.00±0.29
<b>Synaptic plasticity-related genes</b>						
<i>Arc</i>	1.00±0.07	1.01±0.14	1.21±0.38	1.27±0.45	1.51±0.44	1.51±0.51
<i>Fos</i>	1.01±0.18	1.01±0.15	0.72±0.11**	0.75±0.10**	1.12±0.54	1.10±0.49
<i>Mapk1</i>	1.02±0.20	1.02±0.22	0.97±0.11	1.02±0.14	0.97±0.06	0.96±0.10
<i>Mapk3</i>	1.00±0.09	1.01±0.17	1.27±0.47	1.33±0.48	1.58±0.41	1.58±0.44
<b>Neurotrophic factor-related genes</b>						
<i>Bdnf</i>	1.00±0.07	1.01±0.12	0.89±0.12	0.85±0.15	0.91±0.19	0.83±0.16
<i>Ntrk2</i>	1.02±0.23	1.03±0.28	0.94±0.11	0.90±0.13	1.07±0.19	0.98±0.15

Abbreviations: AGIQ, alpha-glycosyl isoquercitrin; *Arc*, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Calb1*, calbindin 1 (also known as calbindin-D-28K); *Calb2*, calbindin 2 (also known as calbindin-D-29K and calretinin); *Cdk1*, cyclin-dependent kinase 1; *Cdk2*, cyclin-dependent kinase 2; *Chek1*, checkpoint kinase 1; *Chrm1*, cholinergic receptor, muscarinic 1; *Chrna7*, cholinergic receptor nicotinic alpha 7 subunit; *Dcx*, doublecortin; *Dpysl3*, dihydropyrimidinase-like 3; *Drd2*, dopamine receptor D2; *Eomes*, eomesodermin; *Fos*, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Gria1*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1; *Gria2*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2; *Grin2a*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; LPS, lipopolysaccharides; *Mapk1*, mitogen activated protein kinase 1; *Mapk3*, mitogen activated protein kinase 3; *Nes*, nestin; *Ntrk2*, neurotrophic receptor tyrosine kinase 2; *Pcna*, proliferating



cell nuclear antigen; *Pvalb*, parvalbumin; *Rbfox3*, RNA binding fox-1 homolog 3 (also known as NeuN); *Reln*, reelin; *Sox2*, SRY-box transcription factor 2; *Sst*, somatostatin; *Tubb3*, tubulin, beta 3 class III.

Data are expressed as the mean  $\pm$  SD. N = 6/group.

\* $P < 0.05$ , significantly different from controls by Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test.

† $P < 0.05$ , significantly different from LPS-alone by Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test.

**Table 2-17**

**Transcript-level expression changes of neurogenesis-related genes in the hippocampal dentate gyrus of male pups at PND 77**

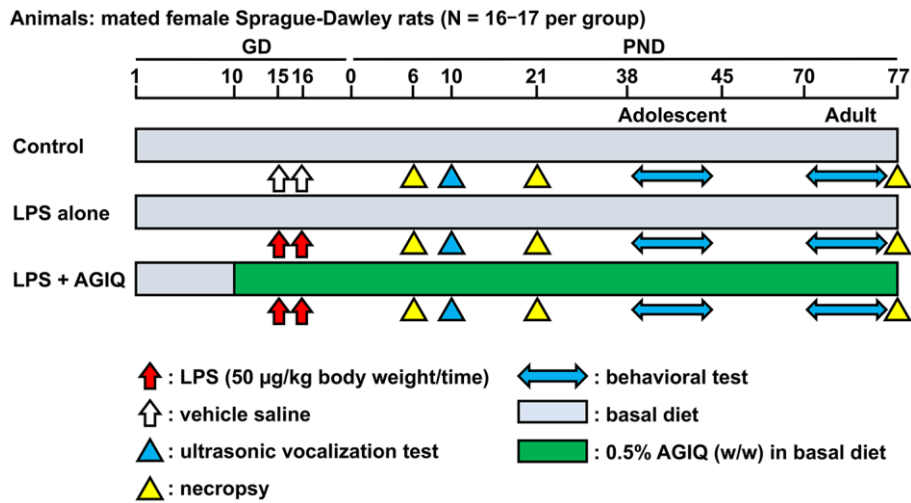
	Control		LPS alone		LPS + AGIQ	
	Relative transcript level normalized to					
	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
<b>Granule cell lineage marker genes</b>						
<i>Nes</i>	1.01 ± 0.13	1.00 ± 0.10	0.84 ± 0.09*	0.79 ± 0.15*	1.05 ± 0.18 <sup>†</sup>	1.01 ± 0.13 <sup>†</sup>
<i>Sox2</i>	1.01 ± 0.11	1.01 ± 0.11	0.60 ± 0.24**	0.59 ± 0.25**	0.95 ± 0.21 <sup>†</sup>	0.94 ± 0.21 <sup>†</sup>
<i>Eomes</i>	1.02 ± 0.19	1.02 ± 0.19	1.18 ± 0.20	1.15 ± 0.30	1.15 ± 0.13	1.14 ± 0.13
<i>Dcx</i>	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.10	0.91 ± 0.07	0.88 ± 0.15	0.86 ± 0.09	0.85 ± 0.11
<i>Dpysl3</i>	1.01 ± 0.18	1.02 ± 0.20	0.78 ± 0.13*	0.77 ± 0.09*	0.83 ± 0.16	0.83 ± 0.13
<i>Tubb3</i>	1.02 ± 0.22	1.02 ± 0.22	0.82 ± 0.18	0.78 ± 0.16	0.88 ± 0.09	0.87 ± 0.08
<i>Rbfox3</i>	1.01 ± 0.18	1.01 ± 0.18	0.92 ± 0.14	0.88 ± 0.11	0.90 ± 0.07	0.89 ± 0.08
<b>GABAergic interneuron marker genes</b>						
<i>Calb1</i>	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.07	0.95 ± 0.30	0.89 ± 0.22	0.91 ± 0.15	0.90 ± 0.14
<i>Calb2</i>	1.02 ± 0.21	1.02 ± 0.21	0.96 ± 0.10	0.97 ± 0.25	0.94 ± 0.15	0.93 ± 0.15
<i>Pvalb</i>	1.02 ± 0.24	1.02 ± 0.24	0.96 ± 0.15	0.95 ± 0.23	1.11 ± 0.31	1.09 ± 0.27
<i>Reln</i>	1.02 ± 0.20	1.02 ± 0.20	0.92 ± 0.13	0.90 ± 0.15	1.10 ± 0.19	1.08 ± 0.14
<i>Sst</i>	1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.16	0.78 ± 0.18*	0.75 ± 0.07**	0.82 ± 0.11	0.81 ± 0.09
<b>Cholinergic receptor genes</b>						
<i>Chrm1</i>	1.02 ± 0.24	1.02 ± 0.24	0.83 ± 0.22	0.78 ± 0.15	0.87 ± 0.28	0.85 ± 0.25
<i>Chrna7</i>	1.02 ± 0.23	1.02 ± 0.23	0.91 ± 0.22	0.87 ± 0.24	0.85 ± 0.23	0.83 ± 0.19
<b>Dopaminergic receptor gene</b>						
<i>Drd2</i>	1.01 ± 0.13	1.01 ± 0.13	0.82 ± 0.30	0.77 ± 0.24*	0.97 ± 0.31	0.93 ± 0.27
<b>Glutamate receptor genes</b>						
<i>Gria1</i>	1.02 ± 0.22	1.02 ± 0.22	0.85 ± 0.21	0.81 ± 0.17	0.90 ± 0.29	0.88 ± 0.26
<i>Grin2a</i>	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.09	0.82 ± 0.17*	0.78 ± 0.15*	0.88 ± 0.32	0.86 ± 0.31
<i>Grin2b</i>	1.02 ± 0.23	1.02 ± 0.23	0.83 ± 0.18	0.78 ± 0.11*	0.84 ± 0.23	0.82 ± 0.21
<b>Synaptic plasticity-related genes</b>						
<i>Arc</i>	1.07 ± 0.39	1.07 ± 0.39	1.01 ± 0.40	0.95 ± 0.29	1.26 ± 0.38	1.25 ± 0.39
<i>Fos</i>	1.02 ± 0.19	1.02 ± 0.19	0.80 ± 0.11*	0.76 ± 0.10*	1.01 ± 0.07 <sup>††</sup>	1.00 ± 0.05 <sup>††</sup>
<i>Mapk1</i>	1.02 ± 0.25	1.02 ± 0.25	0.76 ± 0.16	0.72 ± 0.14*	0.81 ± 0.13	0.79 ± 0.10
<i>Mapk3</i>	1.01 ± 0.15	1.01 ± 0.15	0.80 ± 0.22	0.75 ± 0.16*	1.00 ± 0.34	1.00 ± 0.38
<i>Ptgs2</i>	1.01 ± 0.15	1.01 ± 0.15	0.84 ± 0.25	0.79 ± 0.21	0.88 ± 0.18	0.87 ± 0.15
<b>Neurotrophic factor-related genes</b>						
<i>Bdnf</i>	1.01 ± 0.15	1.01 ± 0.15	0.81 ± 0.19	0.76 ± 0.11**	0.86 ± 0.15	0.86 ± 0.17
<i>Ntrk2</i>	1.02 ± 0.20	1.02 ± 0.20	0.82 ± 0.20	0.77 ± 0.09*	0.84 ± 0.14	0.83 ± 0.13

Abbreviations: AGIQ, alpha-glycosyl isoquercitrin; *Arc*, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Calb1*, calbindin 1 (also known as calbindin-D-28K); *Calb2*, calbindin 2 (also known as calbindin-D-29K and calretinin); *Chrm1*, cholinergic receptor, muscarinic 1; *Chrna7*, cholinergic receptor nicotinic alpha 7 subunit; *Dcx*, doublecortin; *Dpysl3*, dihydropyrimidinase-like 3; *Drd2*, dopamine receptor D2; *Eomes*, eomesodermin; *Fos*, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Gria1*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1; *Grin2a*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A; *Grin2b*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; LPS, lipopolysaccharides; *Mapk1*, mitogen activated protein kinase 1; *Mapk3*, mitogen activated protein kinase 3; *Nes*, nestin; *Ntrk2*, neurotrophic receptor tyrosine kinase 2; *Ptgs2*, prostaglandin-endoperoxide synthase 2; *Pvalb*, parvalbumin; *Rbfox3*, RNA binding fox-1 homolog 3 (also known as NeuN); *Reln*, reelin; *Sox2*, SRY-box transcription factor 2; *Sst*, somatostatin; *Tubb3*, tubulin, beta 3 class III.

Data are expressed as the mean ± SD. N = 6/group.

\**P* < 0.05, significantly different from controls by Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test.

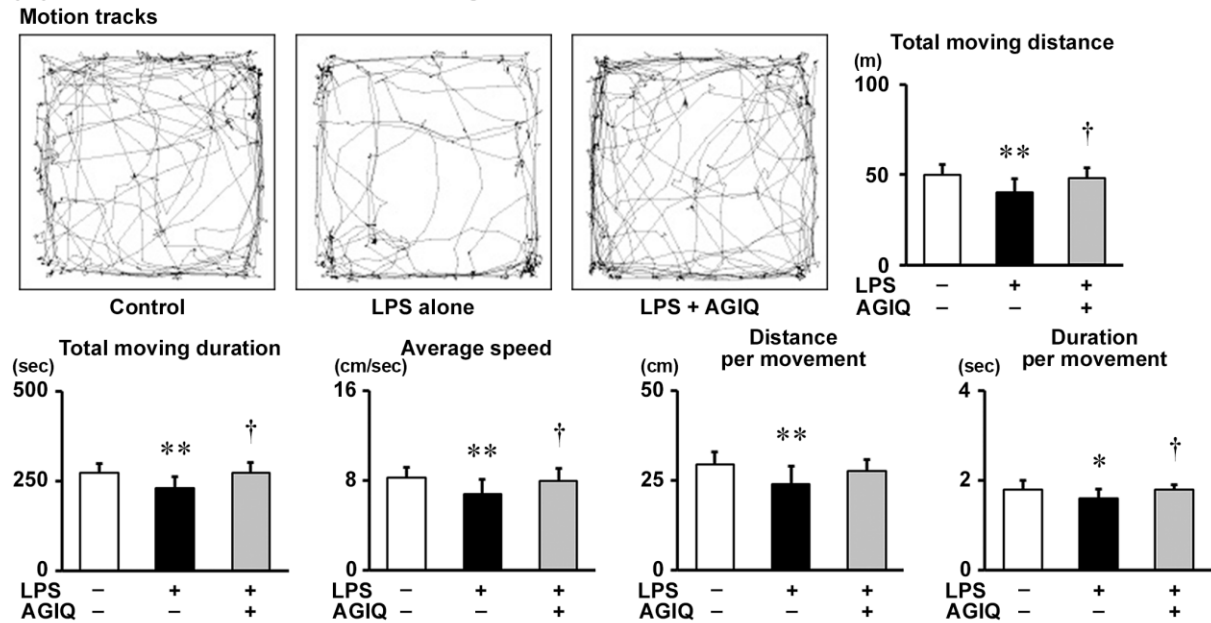
<sup>†</sup> $P < 0.05$ , significantly different from LPS-alone by Student's  $t$ -test or Aspin-Welch's  $t$ -test.



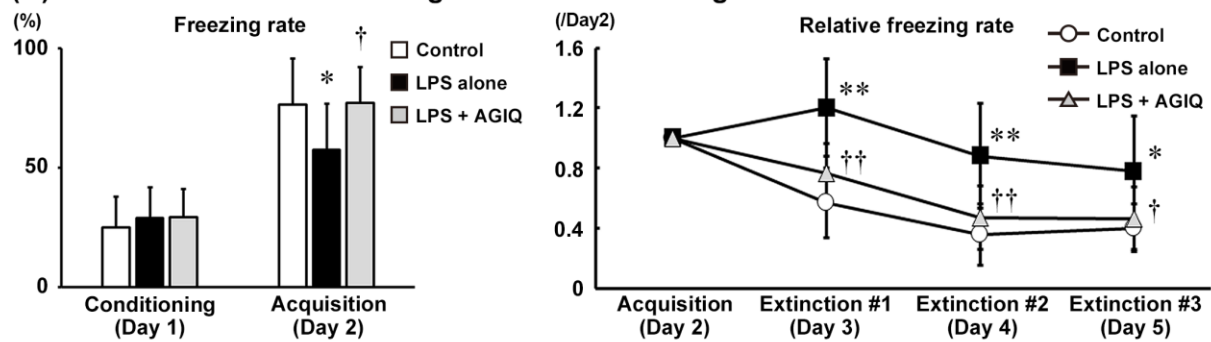
**Fig. 2-1.**

Experimental design on the study of mid-gestational treatment with lipopolysaccharides (LPS) and continuous treatment with alpha-glycosyl isoquercitrin (AGIQ) starting from embryo-fetal stage using mated female Sprague-Dawley rats.

### (A) Open field test at the adult stage

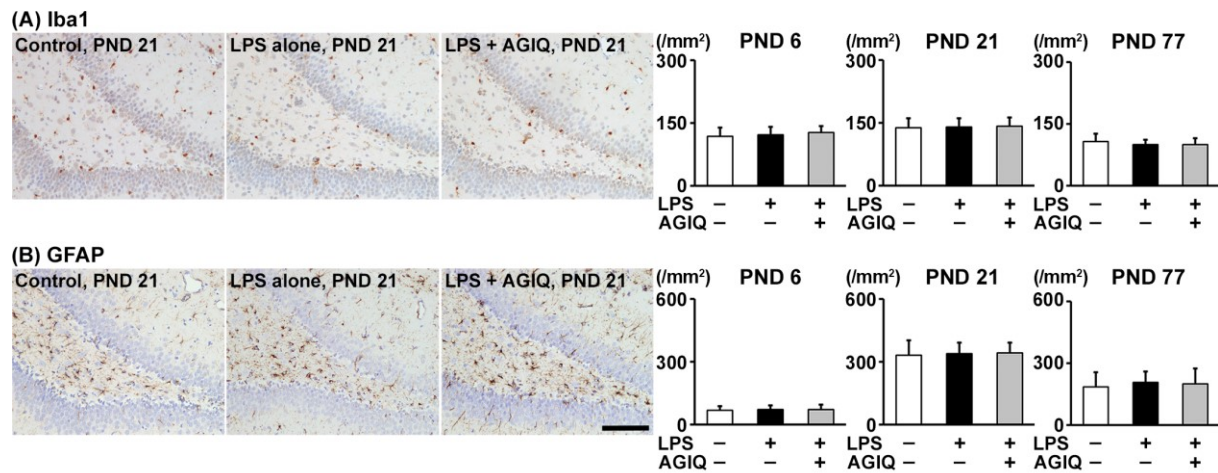


### (B) Contextual fear conditioning test at the adult stage



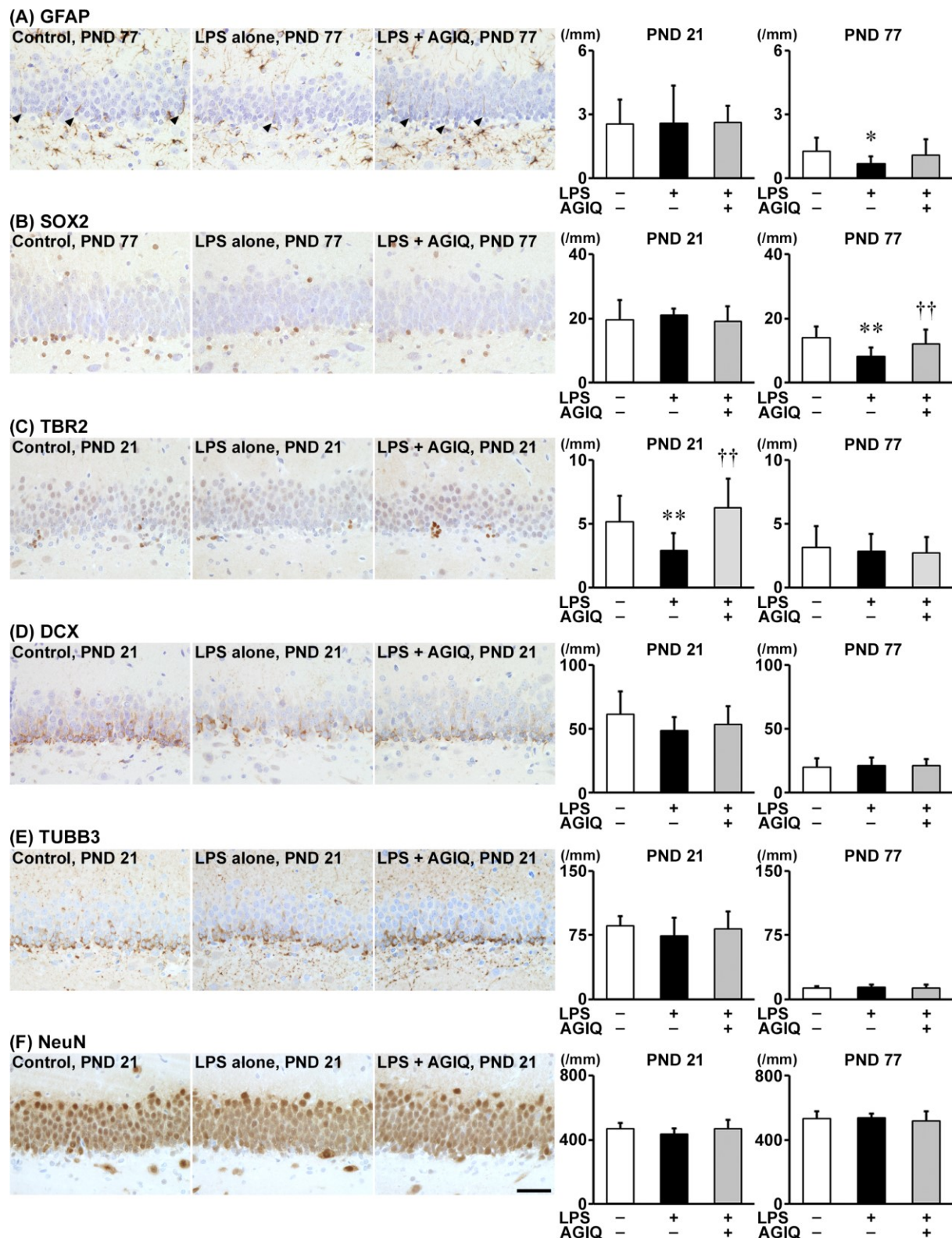
**Fig. 2-2.**

The results of behavioral tests. (A) Open field test in male offspring at postnatal day (PND) 70 at the adult stage. N = 10/group. (B) Contextual fear conditioning test in male offspring during the adult stage (PND 73–77). N = 10/group. Values are expressed as the mean + SD or mean ± SD. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the controls by Student's t-test or Aspin–Welch's t-test. † $P < 0.05$ , †† $P < 0.01$ , significantly different from the LPS alone by Student's t-test or Aspin–Welch's t-test.



**Fig. 2-3.**

Distribution of immunoreactive cells for glial cell marker proteins, that is, (A) ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1), (B) glial fibrillary acidic protein (GFAP), in the hippocampal formation at postnatal day (PND) 6 and hilar area of the dentate gyrus at PND 21 and PND 77 of male offspring. Representative images from the controls (left), LPS alone (middle) and LPS + AGIQ (right) at PND 21. Magnification  $\times 200$ ; bar = 100  $\mu\text{m}$ . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the hippocampal formation at PND 6 and in the hilar area at PND 21 and PND 77. N = 10/group. Values are expressed as the mean + SD.

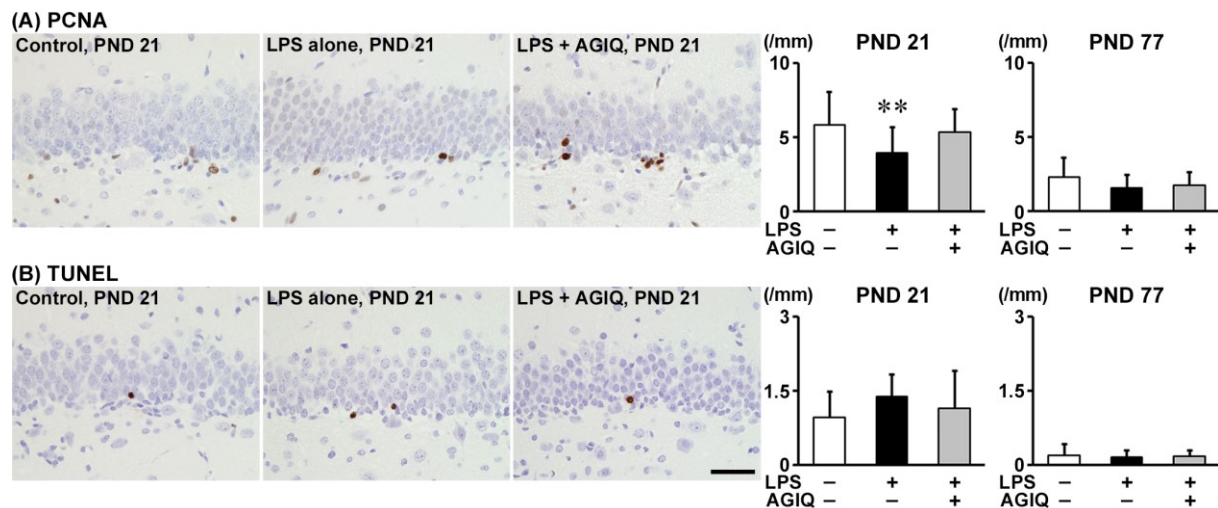


**Fig. 2-4.**

Distribution of immunoreactive cells for granule cell lineage marker proteins, that is, (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) of male offspring at postnatal day (PND) 21 and PND

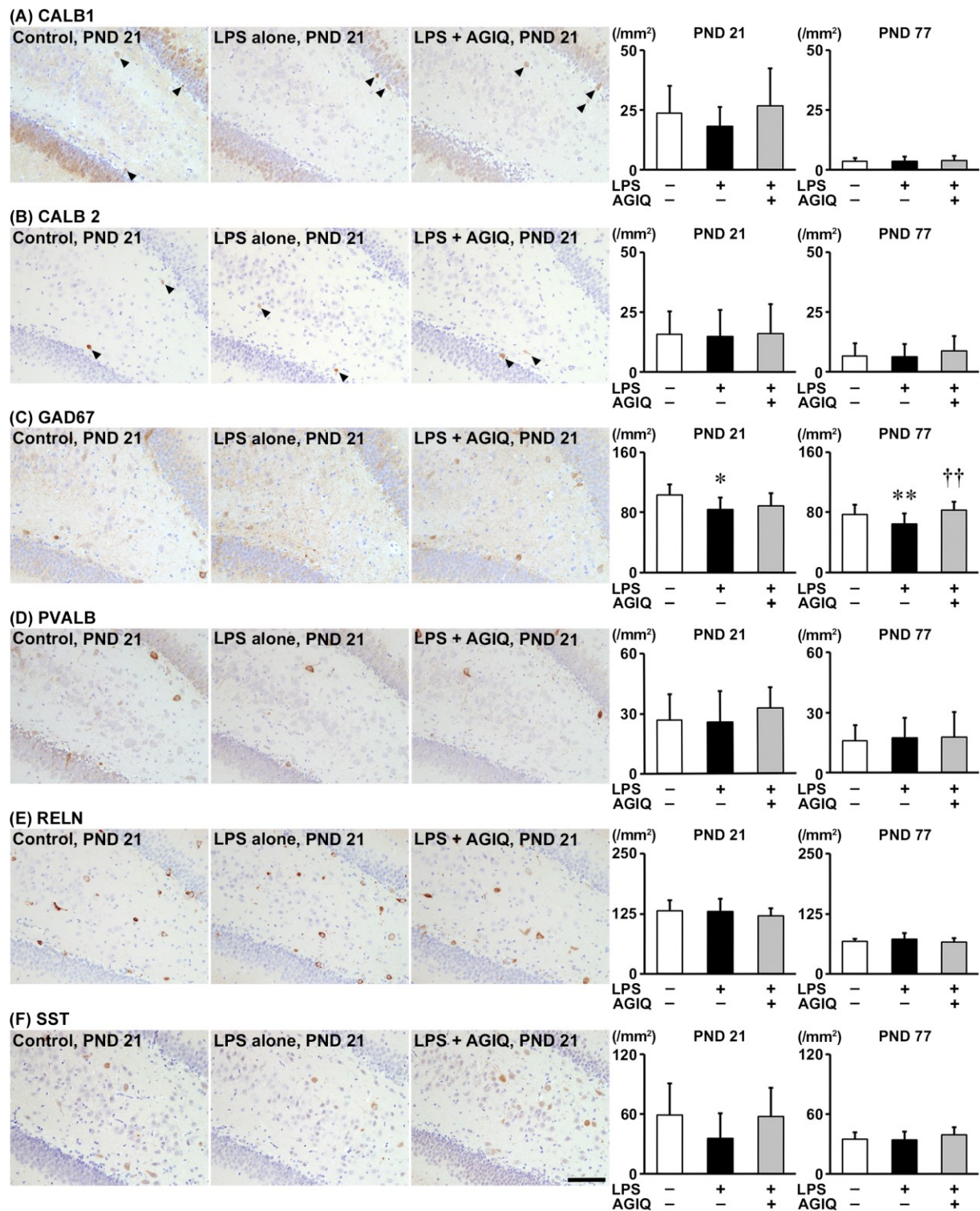
77. Representative images from the controls (left), LPS alone (middle) and LPS + AGIQ (right) at PND 21 (TBR2, DCX, TUBB3, and NeuN) or PND 77 (GFAP and SOX2). Arrowheads indicate immunoreactive cells. Magnification  $\times 400$ ; bar 50  $\mu\text{m}$ . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the SGZ and/or GCL. N = 10/group. Values are expressed as the mean + SD.  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ , significantly different from the controls by Student's *t*-test or Aspin–Welch's *t*-test.  $^{\dagger\dagger}P < 0.01$ , significantly different from the LPS alone by Student's *t*-test or Aspin–Welch's *t*-test.





**Fig. 2-5.**

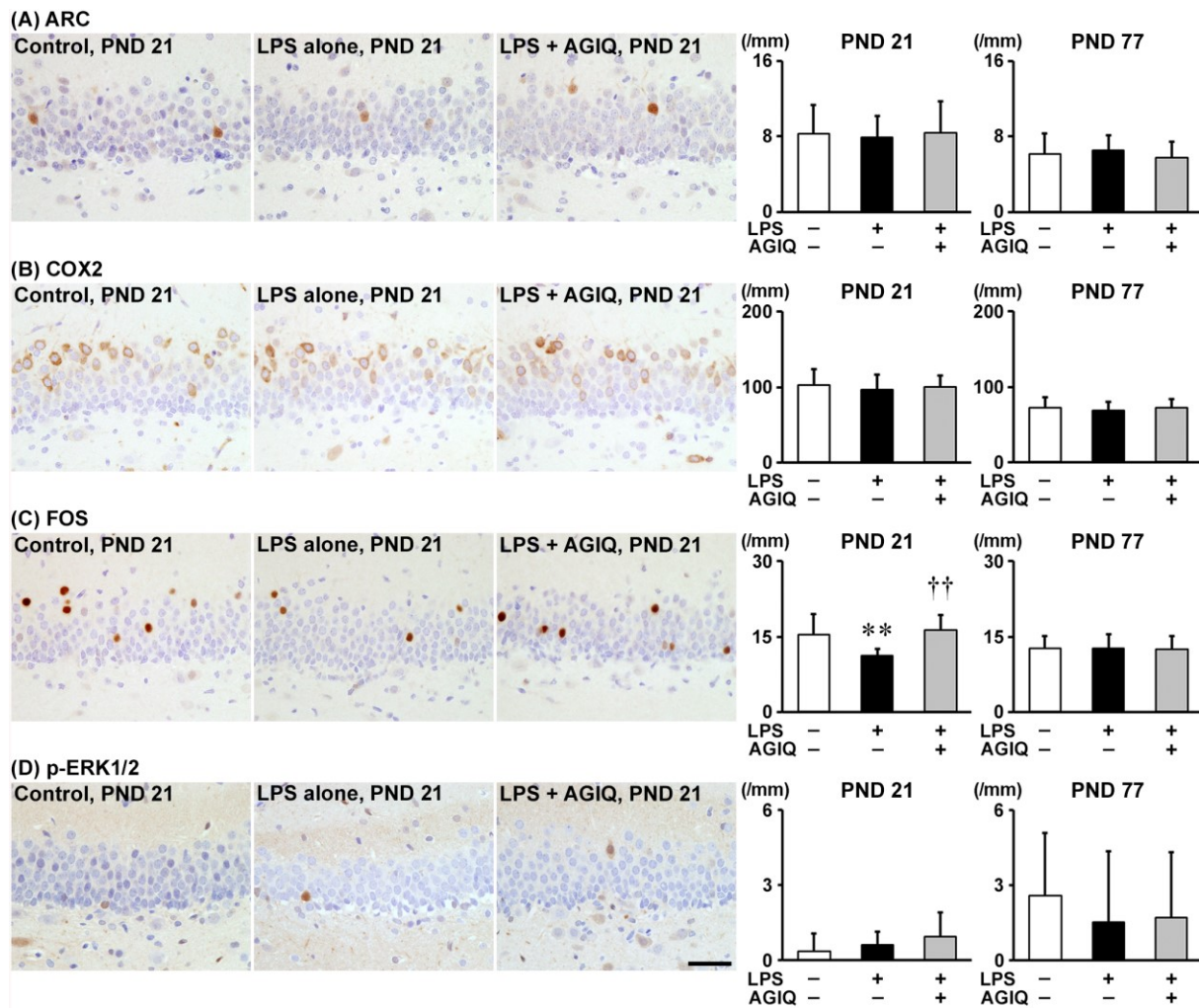
Distribution of (A) proliferating cell nuclear antigen (PCNA)<sup>+</sup> proliferating cells and (B) terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)<sup>+</sup> apoptotic cells in the subgranular zone (SGZ) of male offspring at postnatal day (PND) 21 and PND 77. Representative images from the controls (left), LPS alone (middle) and LPS + AGIQ (right) at PND 21. Magnification  $\times 400$ ; bar = 50  $\mu\text{m}$ . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the SGZ.  $N = 10/\text{group}$ . Values are expressed as the mean + SD.  $**P < 0.01$ , significantly different from the controls by Student's *t*-test or Aspin–Welch's *t*-test.



**Fig. 2-6.**

Distribution of interneurons immunoreactive for (A) calbindin-D-28K (CALB1), (B) calbindin-D-29K (CALB2), (C) glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67), (D) parvalbumin (PVALB), (E) reelin (RELN), and (F) somatostatin (SST) in the hilar area of the dentate gyrus of male offspring at postnatal day (PND) 21 and PND 77. Representative images from the vehicle controls (left), LPS alone (middle) and LPS + AGIQ (right) at PND 21. Magnification  $\times 200$ ; bar = 100  $\mu\text{m}$ . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the hilar area. N =

10/group. Values are expressed as the mean + SD. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , significantly different from the controls by Student's  $t$ -test or Aspin–Welch's  $t$ -test. †† $P < 0.01$ , significantly different from the LPS alone by Student's  $t$ -test or Aspin–Welch's  $t$ -test.



**Fig. 2-7.**

Distribution of granule cells immunoreactive for synaptic plasticity-related proteins, that is, (A) activity-regulated cytoskeleton-associated protein (ARC), (B) cyclooxygenase-2 (COX2), (C) Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit (FOS), and (D) phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 (p-ERK1/2) in the granule cell layer (GCL) of male offspring at postnatal day (PND) 21 and PND 77. Animals analyzed at PND 77 were those examined at 90 min after the 3rd trial of fear memory extinction test. Representative images from the controls (left), LPS alone (middle) and LPS + AGIQ (right) at PND 21. Magnification  $\times 400$ ; bar = 50  $\mu\text{m}$ . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the GCL.  $N = 10/\text{group}$ . Values are expressed as the mean + SD.  $**P < 0.01$ , significantly different from the controls by Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test.  $\dagger\dagger P < 0.01$ , significantly different from the LPS alone by Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test.

**Table 3-1****Antibodies used in this study**

Antigen	Abbreviated name	Host species	Clonality	Clone name	Dilution	Antigen retrieval	Manufacturer (City, State, Country)
2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase	CNPase	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	11-5B	1:300	Autoclaving <sup>a</sup>	MilliporeSigma (Burlington, MA, USA)
KLOTHO	n.a.	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:300	Microwaving <sup>b</sup>	Lifespan Biosciences (Seattle, WA, USA)
NG2 chondroitin sulfate proteoglycan	NG2	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:200	Autoclaving <sup>b</sup>	MilliporeSigma
Oligodendrocyte lineage transcription factor 2	OLIG2	rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:500	Autoclaving <sup>b</sup>	Lifespan Biosciences (Seattle, WA, USA)
Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	Mouse	Monoclonal IgG <sub>2a</sub>	PC10	1:200	Microwaving <sup>b</sup>	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)

Abbreviation: n.a, not applicable.

<sup>a</sup> 121°C for 10 min in 10 mM citrate buffer (pH 6.0).

<sup>b</sup> 90 °C for 10 min in 10 mM citrate buffer (pH 6.0).

**Table 3-2****Sequence of primers used for real-time reverse transcription-PCR**

Gene	Accession no.	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')
<i>Bmp4</i>	NM_012827	CCAAGCGTAGTCCCAAGCAT	CGACGGCAGTTCTTATTCTTCTTC
<i>Cnp</i>	NM_012809	ACCCACCCTC TTCCCCTTAA	GGTTCCTGAA TGGTGTCTTCCCT
<i>Cspg4</i>	NM_031022	CCCTGGCTCCACTACAACCTG	CTGCCTCCTGGACTACCTCTA
<i>Gapdh</i>	NM_017008	GGCCGAGGGC CCACTA	TGTTGAAGTC ACAGGAGACA ACCT
<i>Hdac1</i>	NM_001025409	CCTGGCTGTAGGCTGTGTAGTG	CGAACCACAGCAAAGCCATT
<i>Hdac2</i>	NM_053447	CACCACGCCAAGAAGTCAGA	CGAGGACAGCAAGCACAAATGT
<i>Hes5</i>	NM_024383	TCGGGACCCGCATCAACA	GGTGCCGCGCGAACT
<i>Hprt1</i>	NM_012583	GCCGACCGGT TCTGTCAT	TCATAACCTG GTTCATCATC ACTAATC
<i>Kl</i>	NM_031336	TGGCATTGATGACGATCCCC	CGTCCAACACGTAGGCTTTC
<i>Klk6</i>	NM_019175	CCCTGTGCTT GATTCTTGCT AA	GCCTCCATGT ACCACCTTAT CC
<i>Mag</i>	NM_017190	CCCCTGCCGT TTCGACTT	GTTGAAATAC CAGACGCCAT GTAC
<i>Mbp</i>	NM_001025293	CGCAGAGGAC CCAAGATGAA	ACGAGGTGTC ACAATGTTCT TGA
<i>Notch1</i>	NM_001105721	TGCTGTTCATCTCCGACTTCATC	TGGCAGCATCTGAACGAACGAGAGTA
<i>Pdgfra</i>	NM_012802	CGGCACAATCTTCTCATTCTCA	CTCATCGTCTGCCAGCTCTTAT
<i>Plp1</i>	NM_03099	TTTGTGGCTC CAACCTT	GGTGAAGGT CATTTGGA
<i>Rtn4</i>	XM_006251608	TGCAGTGTTGATGTGGGTGT	CTATCTGCACCTGATGCCGT
<i>Shh</i>	NM_017221	CCCAATTACAACCCCGACATC	CTTGCTTTGCACCTCTGAGTCAT
<i>Tcf4</i>	NM_053369	CACTCCTCGGCAGACATCAAC	GTTTGTGCCACTTCGATGGA
<i>Ugt8</i>	NM_019276	CACCTGTCAATCGGACTACCTA	AGCCGAACGGAGGTGATG
<i>Yy1</i>	NM_173290	GGCGACACCCTCTACATTGC	TCTCATGCAGTCCACGATCTC

Abbreviations: *Bmp4*, bone morphogenetic protein 4; *Cnp*, 2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase; *Cspg4*, chondroitin sulfate proteoglycan 4; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Hdac1*, histone deacetylase 1; *Hdac2*, histone deacetylase 2; *Hes5*, hes family bHLH transcription factor 5; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Kl*, klotho; *Klk6*, kallikrein related-peptidase 6; *Mag*, myelin-associated glycoprotein; *Mbp*, myelin basic protein; *Notch1*, notch receptor 1; *Pdgfra*, platelet derived growth factor receptor alpha; *Plp1*, proteolipid protein 1; *Rtn4*, reticulon 4; *Shh*, sonic hedgehog signaling molecule; *Tcf4*, transcription factor 4; *Ugt8*, UDP glycosyltransferase 8; *Yy1*, YY1 transcription factor.

**Table 3-3****Number of immunoreactive cells in male pups exposed to LPS at neonatal stage  
(Experiment 1)**

	Control	N-LPS alone	N-LPS + AGIQ
No. of pups examined	10	10	10
<b>PND 6</b>			
(No./mm <sup>2</sup> whole hippocampus)			
Oligodendrocyte lineage			
NG2	69.36 ± 14.07	76.02 ± 18.12	73.40 ± 22.28
OLIG2	363.23 ± 39.20	305.26 ± 42.47**	358.07 ± 54.29 <sup>†</sup>
CNPase	N.D.	N.D.	N.D.
Oligodendrocyte maturation factor			
KLOTHO	N.D.	N.D.	N.D.
Cell proliferation			
PCNA	98.21 ± 31.78	92.72 ± 37.01	101.47 ± 36.61
<b>PND 21</b>			
(No./mm <sup>2</sup> hilar region)			
Oligodendrocyte lineage			
NG2	159.48 ± 29.48	107.86 ± 39.12**	146.33 ± 56.57
OLIG2	446.61 ± 47.15	476.82 ± 43.72	494.35 ± 38.88
CNPase	94.36 ± 13.47	78.95 ± 13.42**	89.87 ± 10.78
Oligodendrocyte maturation factor			
KLOTHO	51.65 ± 14.51	30.55 ± 9.30**	46.66 ± 16.17 <sup>†</sup>
Cell proliferation			
PCNA	82.67 ± 22.29	89.76 ± 13.48	100.46 ± 31.22
<b>PND 77</b>			
(No./mm <sup>2</sup> hilar region)			
Oligodendrocyte lineage			
NG2	73.51 ± 12.47	82.14 ± 10.52	83.11 ± 19.85
OLIG2	463.94 ± 92.70	507.32 ± 43.64	541.90 ± 124.11
CNPase	29.24 ± 15.31	45.12 ± 14.66*	46.42 ± 17.75
Oligodendrocyte maturation factor			
KLOTHO	67.41 ± 35.48	102.66 ± 22.81*	106.67 ± 43.23
Cell proliferation			
PCNA	146.78 ± 50.86	152.52 ± 37.65	166.74 ± 36.78

Abbreviations: AGIQ, alpha-glycosyl isoquercitrin; CNPase, 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase; LPS, lipopolysaccharide; N.D., not detected; NG2, NG2 chondroitin sulfate proteoglycan; OLIG2, oligodendrocyte lineage transcription factor 2; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PND, postnatal day.

Data are expressed as the mean ± SD. N = 10/group.

\*\* $P < 0.01$ , significantly different from controls by Student's *t*-test.

<sup>†</sup> $P < 0.05$ , significantly different from N-LPS alone by Student's *t*-test.



Table 3-4

**Transcript-level expression changes in the hippocampal dentate gyrus in male offspring exposed to LPS at neonatal stage (Experiment 1)**

	Control		N-LPS		N-LPS + AGIQ	
	Relative transcript level normalized to					
	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
<b>PND 6</b>						
<b>Oligodendrocyte differentiation</b>						
<i>Cspg4</i>	1.02 ± 0.19	1.00 ± 0.08	1.05 ± 0.18	0.95 ± 0.17	1.06 ± 0.28	0.95 ± 0.42
<i>Pdgfra</i>	1.01 ± 0.14	1.02 ± 0.20	0.99 ± 0.21	0.90 ± 0.19	0.95 ± 0.22	0.85 ± 0.37
<b>Oligodendrocyte differentiation-related signal transduction</b>						
<b>Inhibiting</b>						
<i>Bmp4</i>	1.05 ± 0.34	1.02 ± 0.20	3.17 ± 2.21*	2.63 ± 1.72*	1.65 ± 0.52	1.35 ± 0.54
<i>Hes5</i>	1.01 ± 0.16	1.03 ± 0.26	0.92 ± 0.10*	0.83 ± 0.15	0.74 ± 0.16	0.65 ± 0.24
<i>Notch1</i>	1.07 ± 0.38	1.08 ± 0.18	1.25 ± 0.24	1.12 ± 0.11	1.55 ± 0.38	1.37 ± 0.49
<i>Tcf4</i>	1.01 ± 0.17	1.02 ± 0.19	0.91 ± 0.14	0.82 ± 0.12	1.11 ± 0.12 <sup>†</sup>	0.98 ± 0.30
<b>Promoting</b>						
<i>Hdac1</i>	1.01 ± 0.13	1.02 ± 0.20	1.06 ± 0.21	0.96 ± 0.21	1.07 ± 0.21	0.95 ± 0.35
<i>Hdac2</i>	1.01 ± 0.18	1.01 ± 0.16	1.04 ± 0.14	0.94 ± 0.09	1.07 ± 0.26	0.95 ± 0.36
<i>Shh</i>	1.02 ± 0.20	1.01 ± 0.19	1.15 ± 0.30	1.01 ± 0.37	1.04 ± 0.29	0.84 ± 0.19
<i>Yy1</i>	1.02 ± 0.24	1.01 ± 0.15	1.07 ± 0.27	0.91 ± 0.18	1.07 ± 0.31	0.90 ± 0.39
<b>PND 21</b>						
<b>Oligodendrocyte differentiation</b>						
<i>Cspg4</i>	1.00 ± 0.06	1.01 ± 0.17	1.02 ± 0.20	0.94 ± 0.19	0.82 ± 0.08	0.87 ± 0.11
<i>Pdgfra</i>	1.00 ± 0.05	1.01 ± 0.14	0.98 ± 0.12	0.91 ± 0.12	0.81 ± 0.13 <sup>†</sup>	0.86 ± 0.13
<i>Kl</i>	1.01 ± 0.13	1.01 ± 0.14	0.77 ± 0.15*	0.71 ± 0.12**	0.92 ± 0.18	0.96 ± 0.14 <sup>††</sup>
<b>Oligodendrocyte differentiation-related signal transduction</b>						
<b>Inhibiting</b>						
<i>Bmp4</i>	1.02 ± 0.24	1.01 ± 0.15	0.39 ± 0.24**	0.38 ± 0.25**	0.49 ± 0.09	0.52 ± 0.11
<i>Hes5</i>	1.03 ± 0.30	1.05 ± 0.35	0.89 ± 0.16	0.84 ± 0.23	0.76 ± 0.09	0.82 ± 0.13
<i>Notch1</i>	1.01 ± 0.15	1.02 ± 0.24	1.01 ± 0.20	0.94 ± 0.22	0.80 ± 0.07 <sup>†</sup>	0.86 ± 0.11
<i>Tcf4</i>	1.01 ± 0.18	1.01 ± 0.15	0.85 ± 0.04	0.80 ± 0.10*	0.84 ± 0.14	0.89 ± 0.16
<b>Promoting</b>						
<i>Hdac1</i>	1.00 ± 0.08	1.01 ± 0.19	1.01 ± 0.15	0.94 ± 0.17	1.00 ± 0.16	1.07 ± 0.28
<i>Hdac2</i>	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.11	0.99 ± 0.10	0.92 ± 0.12	0.88 ± 0.13	0.93 ± 0.11
<i>Shh</i>	1.02 ± 0.24	1.03 ± 0.28	1.16 ± 0.30	1.08 ± 0.26	0.84 ± 0.26	0.87 ± 0.22
<i>Yy1</i>	1.00 ± 0.09	1.01 ± 0.13	0.82 ± 0.20	0.77 ± 0.19*	0.66 ± 0.14	0.70 ± 0.16
<b>Myelination</b>						
<i>Cnp</i>	1.00 ± 0.07	1.01 ± 0.12	1.22 ± 0.27	1.13 ± 0.26	1.26 ± 0.10	1.20 ± 0.14
<i>Klk6</i>	1.01 ± 0.12	1.01 ± 0.19	1.46 ± 0.49	1.40 ± 0.51	1.37 ± 0.32	1.33 ± 0.24
<i>Mag</i>	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.08	1.16 ± 0.29	1.23 ± 0.30	1.21 ± 0.14	1.10 ± 0.21
<i>Mbp</i>	1.02 ± 0.25	1.05 ± 0.39	1.21 ± 0.28	1.13 ± 0.30	1.38 ± 0.20	1.23 ± 0.26
<i>Plp1</i>	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.09	1.28 ± 0.30	1.19 ± 0.32	1.10 ± 0.12	1.19 ± 0.19
<i>Rtn4</i>	1.00 ± 0.05	1.01 ± 0.14	0.98 ± 0.12	0.91 ± 0.12	0.87 ± 0.17	0.86 ± 0.13
<i>Ugt8</i>	1.00 ± 0.11	1.01 ± 0.15	1.30 ± 0.38	1.27 ± 0.32	1.28 ± 0.42	1.36 ± 0.35
<b>PND 77</b>						
<b>Oligodendrocyte differentiation</b>						
<i>Cspg4</i>	1.01 ± 0.14	1.02 ± 0.23	1.09 ± 0.11	1.06 ± 0.24	0.99 ± 0.12	1.03 ± 0.28
<i>Pdgfra</i>	1.00 ± 0.11	1.02 ± 0.24	0.98 ± 0.14	0.95 ± 0.22	0.95 ± 0.24	0.95 ± 0.36
<i>Kl</i>	1.02 ± 0.25	1.06 ± 0.41	1.71 ± 0.74	1.68 ± 0.69	1.31 ± 0.39	1.20 ± 0.33
<b>Oligodendrocyte differentiation-related signal transduction</b>						
<i>Bmp4</i>	1.00 ± 0.06	1.01 ± 0.18	1.03 ± 0.26	0.98 ± 0.18	1.05 ± 0.28	1.04 ± 0.18
<i>Hdac1</i>	1.02 ± 0.19	1.04 ± 0.30	1.32 ± 0.46	1.24 ± 0.21	1.13 ± 0.19	1.15 ± 0.28
<i>Hdac2</i>	1.01 ± 0.13	1.01 ± 0.18	1.20 ± 0.41	1.13 ± 0.23	0.87 ± 0.16	0.91 ± 0.31
<i>Hes5</i>	1.02 ± 0.12	1.02 ± 0.28	1.09 ± 0.16	1.06 ± 0.11	1.13 ± 0.15	1.11 ± 0.18
<i>Notch1</i>	1.00 ± 0.08	1.02 ± 0.22	1.22 ± 0.34	1.15 ± 0.20	1.12 ± 0.30	1.05 ± 0.26
<i>Shh</i>	1.01 ± 0.17	1.03 ± 0.23	0.95 ± 0.27	0.94 ± 0.38	1.08 ± 0.31	1.13 ± 0.33
<i>Tcf4</i>	1.01 ± 0.15	1.01 ± 0.13	1.01 ± 0.22	0.98 ± 0.28	0.94 ± 0.08	0.97 ± 0.24
<i>Yy1</i>	1.01 ± 0.15	1.03 ± 0.26	1.20 ± 0.26	1.16 ± 0.28	1.08 ± 0.16	1.13 ± 0.36
<b>Myelination</b>						
<i>Cnp</i>	1.00 ± 0.10	1.01 ± 0.16	1.05 ± 0.21	1.01 ± 0.25	0.98 ± 0.10	1.03 ± 0.28



<i>Klk6</i>	1.02 ± 0.23	1.03 ± 0.27	1.03 ± 0.35	0.98 ± 0.26	1.10 ± 0.17	1.14 ± 0.31
<i>Mag</i>	1.02 ± 0.24	1.05 ± 0.35	1.13 ± 0.28	1.07 ± 0.14	1.07 ± 0.19	1.07 ± 0.36
<i>Mbp</i>	1.03 ± 0.29	1.02 ± 0.22	1.07 ± 0.32	1.04 ± 0.37	1.12 ± 0.16	1.14 ± 0.30
<i>Plp1</i>	1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.19	1.09 ± 0.31	1.06 ± 0.37	1.09 ± 0.23	1.17 ± 0.48
<i>Rtn4</i>	1.00 ± 0.09	1.01 ± 0.13	1.33 ± 0.41	1.26 ± 0.25	0.96 ± 0.33	1.02 ± 0.29
<i>Ugt8</i>	1.02 ± 0.24	1.02 ± 0.23	1.13 ± 0.38	1.09 ± 0.36	1.02 ± 0.17	1.06 ± 0.35

Abbreviations: AGIQ,  $\alpha$ -glycosyl isoquercitrin; *Bmp4*, bone morphogenetic protein 4; *Cnp*, 2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase; *Cspg4*, chondroitin sulfate proteoglycan 4; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Hdac1*, histone deacetylase 1; *Hdac2*, histone deacetylase 2; *Hes5*, hes family bHLH transcription factor 5; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Kl*, klotho; *Klk6*, kallikrein related-peptidase 6; LPS, lipopolysaccharide; *Mag*, myelin-associated glycoprotein; *Mbp*, myelin basic protein; *Notch1*, notch receptor 1; *Pdgfra*, platelet derived growth factor receptor alpha; *Plp1*, proteolipid protein 1; *Rtn4*, reticulon 4; *Shh*, sonic hedgehog signaling molecule; *Tcf4*, transcription factor 4; *Ugt8*, UDP glycosyltransferase 8; *Yy1*, YY1 transcription factor.

Data are expressed as the mean  $\pm$  SD. N = 6/group.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from controls by Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test.

† $P < 0.05$ , †† $P < 0.01$ , significantly different from LPS groups by Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test.

**Table 3-5****Number of immunoreactive cells in male pups exposed to LPS at embryonic stage  
(Experiment 2)**

	Control	E-LPS alone	E-LPS + AGIQ
No. of pups examined	10	10	10
<b>PND 6</b>			
(No./mm <sup>2</sup> whole hippocampus)			
Oligodendrocyte lineage			
NG2	78.46 ± 22.17	50.35 ± 14.84**	85.28 ± 26.97††
OLIG2	424.07 ± 61.61	428.30 ± 45.67	454.28 ± 75.18
CNPase	N.D.	N.D.	N.D.
Oligodendrocyte maturation factor			
KLOTHO	N.D.	N.D.	N.D.
Cell proliferation			
PCNA	136.64 ± 84.82	120.97 ± 64.50	187.86 ± 155.77
<b>PND 21</b>			
(No./mm <sup>2</sup> hilar region)			
Oligodendrocyte lineage			
NG2	195.19 ± 42.54	112.23 ± 43.82**	160.20 ± 34.08†
OLIG2	433.75 ± 33.37	501.41 ± 42.67**	446.98 ± 56.67†
CNPase	87.16 ± 16.29	93.85 ± 13.97	95.55 ± 13.37
Oligodendrocyte maturation factor			
KLOTHO	11.76 ± 13.55	17.62 ± 12.71	27.93 ± 16.38
Cell proliferation			
PCNA	125.07 ± 40.23	128.23 ± 57.38	130.51 ± 48.21
<b>PND 77</b>			
(No./mm <sup>2</sup> hilar region)			
Oligodendrocyte lineage			
NG2	90.23 ± 14.47	87.61 ± 11.43	83.87 ± 8.23
OLIG2	416.36 ± 74.56	432.56 ± 62.30	394.98 ± 67.90
CNPase	33.11 ± 16.19	26.91 ± 6.68	32.66 ± 14.16
Oligodendrocyte maturation factor			
KLOTHO	68.44 ± 33.80	74.95 ± 24.51	73.69 ± 14.58
Cell proliferation			
PCNA	33.76 ± 13.34	33.36 ± 12.26	33.27 ± 12.34

Abbreviations: AGIQ, alpha-glycosyl isoquercitrin; CNPase, 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase; LPS, lipopolysaccharide; N.D., not detected; NG2, NG2 chondroitin sulfate proteoglycan; OLIG2, oligodendrocyte lineage transcription factor 2; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PND, postnatal day.

Data are expressed as the mean ± SD. N = 10/group.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from controls by Student's *t*-test.

† $P < 0.05$ , †† $P < 0.01$ , significantly different from E-LPS alone by Student's *t*-test.

Table 3-6

**Transcript-level expression changes in the hippocampal dentate gyrus in male offspring exposed to LPS at embryonic stage (Experiment 2)**

	Control		E-LPS alone		E-LPS + AGIQ	
	Relative transcript level normalized to					
	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>
<b>PND 6</b>						
<b>Oligodendrocyte differentiation</b>						
<i>Cspg4</i>	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.09	0.83 ± 0.10**	0.81 ± 0.17*	1.05 ± 0.13††	0.92 ± 0.21
<i>Pdgfra</i>	1.01 ± 0.15	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.14	0.92 ± 0.03*	0.97 ± 0.05	0.84 ± 0.15
<b>Oligodendrocyte differentiation-related signal transduction</b>						
<b>Inhibiting</b>						
<i>Bmp4</i>	1.01 ± 0.13	1.01 ± 0.18	0.99 ± 0.23	0.92 ± 0.21	0.99 ± 0.13	0.85 ± 0.08
<i>Hes5</i>	1.01 ± 0.12	1.00 ± 0.10	1.22 ± 0.14*	1.13 ± 0.07*	1.12 ± 0.15	0.96 ± 0.15†
<i>Notch1</i>	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.10	1.11 ± 0.24	1.02 ± 0.13	1.00 ± 0.11	0.86 ± 0.12†
<i>Tcf4</i>	1.02 ± 0.22	1.04 ± 0.30	2.19 ± 0.45**	2.02 ± 0.34**	1.44 ± 0.55†	1.23 ± 0.49††
<b>Promoting</b>						
<i>Hdac1</i>	1.01 ± 0.16	1.02 ± 0.22	1.12 ± 0.25	1.20 ± 0.12	1.27 ± 0.30	1.08 ± 0.24
<i>Hdac2</i>	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.18	1.15 ± 0.28	1.05 ± 0.14	1.09 ± 0.30	0.94 ± 0.22
<i>Shh</i>	1.01 ± 0.16	1.02 ± 0.21	1.02 ± 0.29	0.96 ± 0.33	1.08 ± 0.23	0.91 ± 0.13
<i>Yy1</i>	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.12	1.02 ± 0.11	0.95 ± 0.11	0.96 ± 0.10	0.83 ± 0.17
<b>PND 21</b>						
<b>Oligodendrocyte differentiation</b>						
<i>Cspg4</i>	1.01 ± 0.17	1.02 ± 0.25	0.93 ± 0.19	0.94 ± 0.10	0.98 ± 0.22	0.95 ± 0.23
<i>Pdgfra</i>	1.01 ± 0.17	1.02 ± 0.22	0.88 ± 0.21	0.88 ± 0.16	0.99 ± 0.27	0.96 ± 0.30
<i>Kl</i>	1.02 ± 0.18	1.02 ± 0.21	1.22 ± 0.30	1.29 ± 0.54	1.41 ± 0.30	1.54 ± 0.40
<b>Oligodendrocyte differentiation-related signal transduction</b>						
<b>Inhibiting</b>						
<i>Bmp4</i>	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.15	1.02 ± 0.12	1.04 ± 0.17	1.00 ± 0.16	0.97 ± 0.19
<i>Hes5</i>	1.01 ± 0.18	1.01 ± 0.12	0.89 ± 0.17	0.90 ± 0.16	0.93 ± 0.18	0.89 ± 0.16
<i>Notch1</i>	1.02 ± 0.20	1.02 ± 0.21	0.97 ± 0.22	1.02 ± 0.24	1.02 ± 0.15	1.02 ± 0.19
<i>Tcf4</i>	1.02 ± 0.20	1.03 ± 0.24	1.10 ± 0.36	1.09 ± 0.27	0.91 ± 0.12	0.88 ± 0.10
<b>Promoting</b>						
<i>Hdac1</i>	1.01 ± 0.15	1.00 ± 0.08	1.07 ± 0.22	1.07 ± 0.08	1.02 ± 0.20	0.97 ± 0.16
<i>Hdac2</i>	1.01 ± 0.13	1.00 ± 0.07	0.97 ± 0.19	0.97 ± 0.08	0.97 ± 0.18	0.93 ± 0.14
<i>Shh</i>	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.10	0.80 ± 0.26	0.83 ± 0.25	1.10 ± 0.26	1.09 ± 0.23
<i>Yy1</i>	1.00 ± 0.11	1.01 ± 0.12	0.89 ± 0.09	0.93 ± 0.10	0.97 ± 0.10	0.97 ± 0.18
<b>Myelination</b>						
<i>Cnp</i>	1.00 ± 0.10	1.01 ± 0.16	1.05 ± 0.21	1.01 ± 0.25	0.98 ± 0.10	1.03 ± 0.28
<i>Klk6</i>	1.01 ± 0.18	1.01 ± 0.14	1.23 ± 0.37	1.25 ± 0.37	1.17 ± 0.20	1.12 ± 0.19
<i>Mag</i>	1.01 ± 0.15	1.02 ± 0.22	1.01 ± 0.24	1.01 ± 0.16	0.98 ± 0.21	0.96 ± 0.24
<i>Mbp</i>	1.02 ± 0.22	1.03 ± 0.31	0.93 ± 0.31	0.97 ± 0.33	0.95 ± 0.27	0.95 ± 0.30
<i>Plp1</i>	1.02 ± 0.21	1.02 ± 0.22	1.07 ± 0.29	1.10 ± 0.35	1.11 ± 0.21	1.07 ± 0.23
<i>Rtn4</i>	1.00 ± 0.10	1.01 ± 0.13	0.98 ± 0.27	0.98 ± 0.20	0.93 ± 0.05	0.90 ± 0.06
<i>Ugt8</i>	1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.19	0.99 ± 0.28	0.99 ± 0.15	1.09 ± 0.21	1.05 ± 0.23
<b>PND 77</b>						
<b>Oligodendroglia differentiation</b>						
<i>Cspg4</i>	1.02 ± 0.22	1.00 ± 0.08	1.26 ± 0.19	1.14 ± 0.23	1.29 ± 0.20	1.19 ± 0.20
<i>Pdgfra</i>	1.03 ± 0.25	1.01 ± 0.12	1.18 ± 0.17	1.07 ± 0.20	1.26 ± 0.12	1.17 ± 0.16
<i>Kl</i>	1.02 ± 0.23	1.02 ± 0.22	1.19 ± 0.36	1.17 ± 0.36	1.23 ± 0.24	1.22 ± 0.23
<b>Oligodendrocyte differentiation-related signal transduction</b>						
<i>Bmp4</i>	1.02 ± 0.20	1.01 ± 0.18	1.22 ± 0.25	1.12 ± 0.31	1.04 ± 0.22	0.96 ± 0.24
<i>Hdac1</i>	1.03 ± 0.25	1.00 ± 0.08	1.21 ± 0.07	1.09 ± 0.08	1.15 ± 0.25	1.06 ± 0.18
<i>Hdac2</i>	1.02 ± 0.23	1.00 ± 0.08	1.14 ± 0.11	1.02 ± 0.08	1.07 ± 0.16	0.99 ± 0.11
<i>Hes5</i>	1.01 ± 0.18	1.02 ± 0.20	1.14 ± 0.14	1.22 ± 0.25	1.21 ± 0.12	1.04 ± 0.22
<i>Notch1</i>	1.02 ± 0.22	1.02 ± 0.22	1.19 ± 0.10	1.19 ± 0.10	1.32 ± 0.23	1.32 ± 0.23
<i>Shh</i>	1.01 ± 0.14	1.02 ± 0.21	1.13 ± 0.19	1.20 ± 0.20	1.18 ± 0.23	1.25 ± 0.25
<i>Tcf4</i>	1.01 ± 0.18	1.02 ± 0.25	1.13 ± 0.20	1.19 ± 0.21	1.11 ± 0.31	1.18 ± 0.33
<i>Yy1</i>	1.01 ± 0.12	1.01 ± 0.11	1.04 ± 0.07	1.02 ± 0.07	1.12 ± 0.15	1.10 ± 0.15
<b>Myelination</b>						
<i>Cnp</i>	1.01 ± 0.20	1.01 ± 0.19	1.00 ± 0.12	0.99 ± 0.12	1.05 ± 0.21	1.04 ± 0.21
<i>Klk6</i>	1.04 ± 0.32	1.02 ± 0.25	1.01 ± 0.23	0.91 ± 0.21	1.30 ± 0.31	1.20 ± 0.30
<i>Mag</i>	1.01 ± 0.17	1.01 ± 0.16	1.05 ± 0.17	1.04 ± 0.17	1.15 ± 0.19	1.14 ± 0.18

<i>Mbp</i>	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.13	1.06 ± 0.18	1.05 ± 0.17	1.08 ± 0.11	1.07 ± 0.11
<i>Plp1</i>	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.13	0.96 ± 0.18	0.95 ± 0.18	1.07 ± 0.16	1.06 ± 0.16
<i>Rtn4</i>	1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.11	1.12 ± 0.14	1.01 ± 0.11	1.19 ± 0.20	1.10 ± 0.15
<i>Ugt8</i>	1.01 ± 0.19	1.01 ± 0.18	1.04 ± 0.23	1.03 ± 0.23	1.10 ± 0.28	1.09 ± 0.27

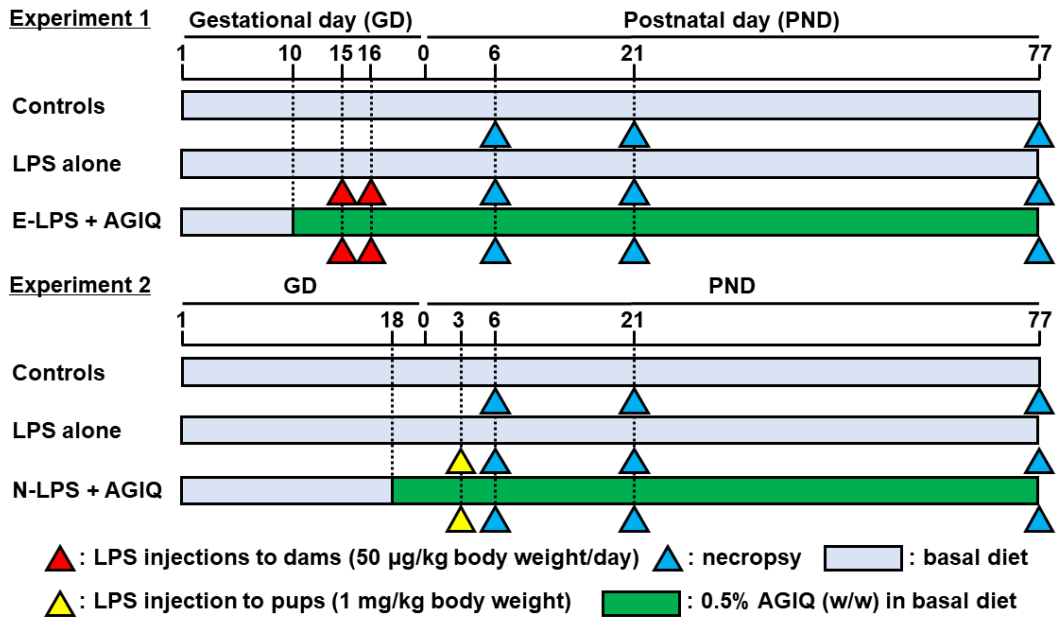
Abbreviations: AGIQ,  $\alpha$ -glycosyl isoquercitrin; *Bmp4*, bone morphogenetic protein 4; *Cnp*, 2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase; *Cspg4*, chondroitin sulfate proteoglycan 4; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Hdac1*, histone deacetylase 1; *Hdac2*, histone deacetylase 2; *Hes5*, hes family bHLH transcription factor 5; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Kl*, klotho; *Klk6*, kallikrein related-peptidase 6; LPS, lipopolysaccharide; *Mag*, myelin-associated glycoprotein; *Mbp*, myelin basic protein; *Notch1*, notch receptor 1; *Pdgfra*, platelet derived growth factor receptor alpha; *Plp1*, proteolipid protein 1; *Rtn4*, reticulon 4; *Shh*, sonic hedgehog signaling molecule; *Tef4*, transcription factor 4; *Ugt8*, UDP glycosyltransferase 8; *Yy1*, YY1 transcription factor.

Data are expressed as the mean  $\pm$  SD. N = 6/group.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from controls by Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test.

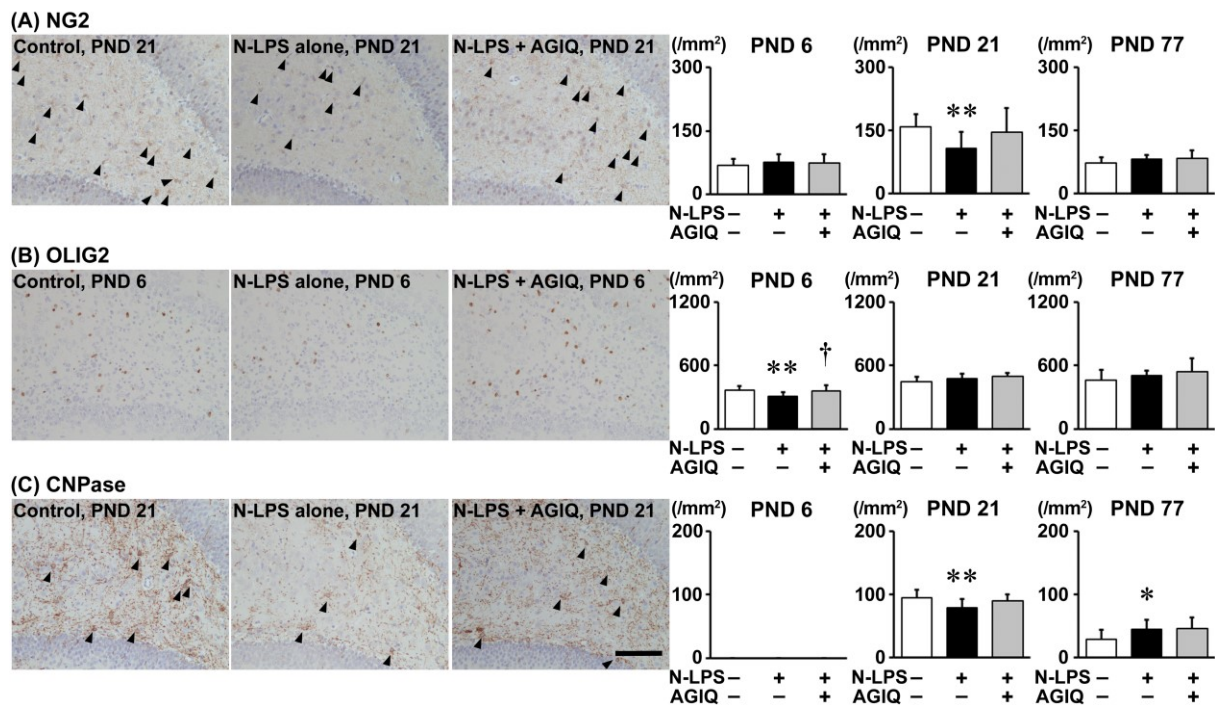
† $P < 0.05$ , †† $P < 0.01$ , significantly different from LPS groups by Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test.

Animals: mated female Sprague-Dawley rat



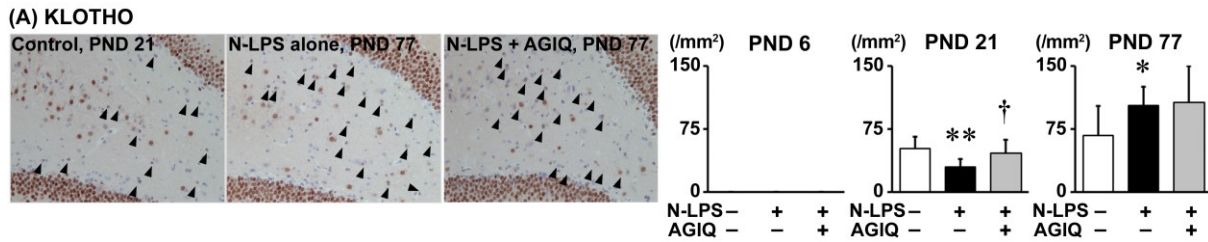
**Fig. 3-1.**

Experimental design on the study of mid-gestational treatment and neonatal treatment with lipopolysaccharides (LPS) and continuous treatment with alpha-glycosyl isoquercitrin (AGIQ) starting from gestational stage using mated female Sprague-Dawley rats.



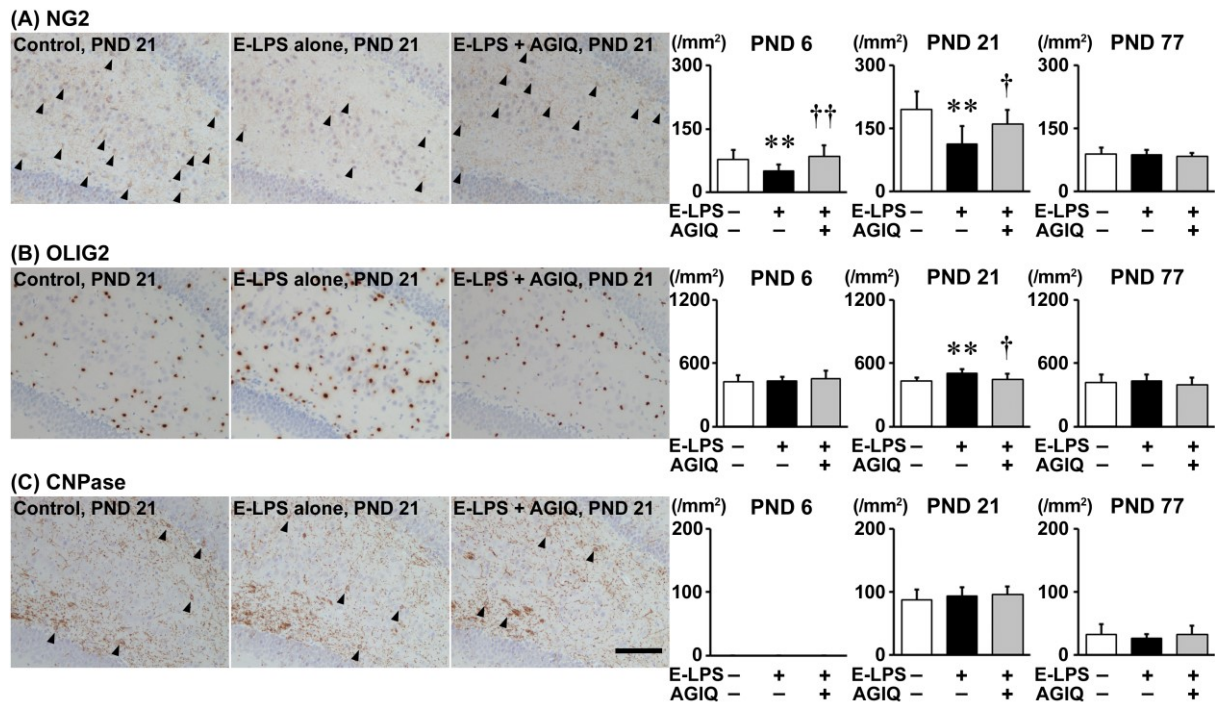
**Fig. 3-2.**

Distribution of immunoreactive cells for oligodendrocyte lineage cell marker proteins, i.e., (A) chondroitin sulfate proteoglycan (NG2), (B) oligodendrocyte lineage transcription factor 2 (OLIG2), (C) 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) in the hippocampal formation at postnatal day (PND) 6 and hilar region of the dentate gyrus at PND 21 and PND 77 of male offspring in the neonata; LPS exposed experiment. Representative images from the controls (left), N-LPS alone (middle) and N-LPS + AGIQ (right) on PND 21. Magnification  $\times 200$ ; bar = 100  $\mu\text{m}$ . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the hippocampal formation at PND 6 and in the hilar region at PND 21 and PND 77.  $N = 10/\text{group}$ . Values are expressed as the mean + SD. \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the controls by Student's  $t$ -test or Aspin-Welch's  $t$ -test. † $P < 0.05$ , †† $P < 0.01$ , significantly different from the N-LPS alone by Student's  $t$ -test or Aspin-Welch's  $t$ -test.



**Fig. 3-3.**

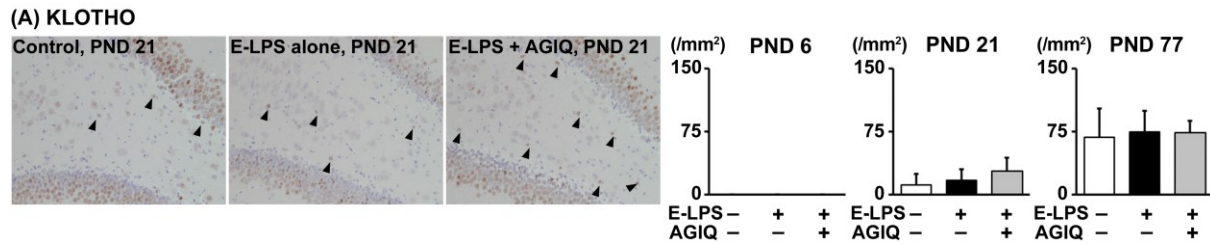
Distribution of immunoreactive cells for (A) KLOTHO in the hippocampal formation at postnatal day (PND) 6 and hilar region of the dentate gyrus at PND 21 and PND 77 of male offspring in the neonatal LPS exposed experiment. Representative images from the controls (left), N-LPS alone (middle) and N-LPS + AGIQ (right) on PND 21. Magnification  $\times 200$ ; bar = 100  $\mu\text{m}$ . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the hippocampal formation at PND 6 and in the hilar region at PND 21 and PND 77.  $N = 10/\text{group}$ . Values are expressed as the mean + SD.  $**P < 0.01$ , significantly different from the controls by Student's  $t$ -test or Aspin-Welch's  $t$ -test.  $^{\dagger}P < 0.05$ , significantly different from the N-LPS alone by Student's  $t$ -test or Aspin-Welch's  $t$ -test.



**Fig. 3-4.**

Distribution of immunoreactive cells for oligodendrocyte lineage cell marker proteins, i.e., (A) chondroitin sulfate proteoglycan (NG2), (B) oligodendrocyte lineage transcription factor 2 (OLIG2), (C) 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) in the hippocampal formation at postnatal day (PND) 6 and hilar region of the dentate gyrus at PND 21 and PND 77 of male offspring in the embryonic LPS exposed experiment. Representative images from the controls (left), E-LPS alone (middle) and E-LPS + AGIQ (right) on PND 21. Magnification  $\times 200$ ; bar = 100  $\mu\text{m}$ . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the hippocampal formation at PND 6 and in the hilar region at PND 21 and PND 77.  $N = 10/\text{group}$ . Values are expressed as the mean + SD.  $**P < 0.01$ , significantly different from the controls by Student's  $t$ -test or Aspin-Welch's  $t$ -test.  $†P < 0.05$ ,  $††P < 0.01$ , significantly different from the N-LPS alone by Student's  $t$ -test or Aspin-Welch's  $t$ -test.





**Fig. 3-5.**

Distribution of immunoreactive cells for (A) KLOTHO in the hippocampal formation at postnatal day (PND) 6 and hilar region of the dentate gyrus at PND 21 and PND 77 of male offspring in the neonatal LPS exposed experiment. Representative images from the controls (left), E-LPS alone (middle) and E-LPS + AGIQ (right) on PND 21. Magnification  $\times 200$ ; bar = 100  $\mu\text{m}$ . Graphs show the numbers of immunoreactive cells in the hippocampal formation at PND 6 and in the hilar region at PND 21 and PND 77. N = 10/group. Values are expressed as the mean + SD.