

平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

化学物質のヒト健康リスク評価における（定量的）構造活性相関および
カテゴリーアプローチの実用化に関する研究（H24-化学-指定-010）

**分担研究課題：カテゴリー化による神経系毒性評価に関する研究
- ネオニコチノイド系殺虫剤のアセチルコリンエステラーゼ活性阻害作用と構造 -**

研究分担者	帝京平成大学	薬学部	西村 哲治
研究協力者	帝京平成大学	薬学部	深山 俊
研究協力者	帝京平成大学	薬学部	山下 亜紀子

研究要旨

アセチルコリンによる神経伝達機構に影響を及ぼす化学物質に関する検討の一環として、昆虫に対して選択性の高いネオニコチノイド系殺虫剤の神経毒性に関する検討を実施した。

アセタミプリドとイミダクリプリド及びニテンピラムが類似の骨格構造を有し、チアクロプリド、チアメトキサム及びクロチアニジンが類似の骨格構造を有し、ジノテフランが他の2群と異なった構造をもつ。ヒトアセチルコリンエステラーゼ活性に対するネオニコチノイド系殺虫剤7物質の作用を検討した結果、アセタミプリドが、AChE に対して最も作用が強く、ダイアジノンオキソンと比較して、相対濃度として約 1,150 倍に相当する濃度（1,150 分の1の作用）で AChE の阻害を示した。アセタミプリド（1）に対して、ジノテフランが相対濃度として 0.08 であった他は、0.1~0.3 に相当し、毒性が低いこともあり、構造と明確な定量関係を明らかにすることができなかったが、-C-N-C-N- の構造を共通骨格構造として、側鎖として結合している構造が作用に関与していることが推測された。

当該物質は AChE の酵素に作用して、アセチルコリンの分解を抑制する作用も最大で 1/1,000 ~ 1/10,000 程度ではあるが、0.1~0.3 µg/mL の濃度から示した。個々の物質の評価では、問題とする作用濃度ではないが、類似の基本骨格をもち、側鎖の構造は変化に富み多岐にわたることから、それらの環境に共存する状況における複合暴露については注意を払う必要がある。今後、さらにカテゴリー化を進め、詳細な検討を行うことが重要な課題である。

A. 研究目的

末梢神経系と中枢神経系に大別される神経系は、部位によって特異的で複雑な機能を発現して生体の生理機能を維持しているが、細胞としては主としてニューロンとグリア細胞によって機能を分担しているといえる。ニューロンは、情報を集める、情報を処理する、処理された情報を他の細胞や部位に伝達する、対象とする細胞・組織

等の部位に情報を伝える（作用発現）などの働きを担っている。あるニューロンから素早く他の部位に情報を伝達するために電気的信号伝達機構と、ニューロン間の情報伝達のために化学的信号伝達機構により機能を発揮している。

化学的信号伝達機構は、多種多様な神経伝達物質を用いて情報の伝達を行っている。そのため、多様な情報信号の伝達処理が可能となり、機能の

多様化にも現れている。典型的な化学シナプスは、シナプス前部とシナプス後部との狭いシナプス間隙と呼ばれる領域から成る構造をしており、シナプス前部が情報を得て脱分極すると、シナプス小胞に蓄えられた神経伝達物質の遊離が促される。シナプス間隙に放出された神経伝達物質はシナプス後部に存在する神経伝達物質受容体に結合し、シナプス後部の膜のイオン透過性を変化させることにより、情報の伝達が達成される。これらの過程において、神経伝達物質の合成と蓄積、神経伝達物質の遊離の促進と阻害、神経伝達物質受容体との結合能に対するアンタゴニスト活性とアゴニスト活性、そして神経伝達物質の分解や再吸収などの段階に化学物質が作用することにより、情報伝達機能に影響が及ぶことが考えられる。

ボツリヌス毒素は、運動ニューロンの前終末に取り込まれることにより、アセチルコリンを蓄積している小胞がシナプス前膜との融合に必須なタンパク質を切断する。そのために、シナプス間隙へのアセチルコリンの遊離が阻害されて、神経筋接合部の伝達機能が阻害される。

イオンチャンネル型アセチルコリン受容体（ニコチン受容体）は、自律神経節細胞と骨格筋で構成されているサブユニットがそれぞれ異なり、ヘキサメトニウムは自律神経節細胞のニコチン受容体に、 α -ツボクラリン（クラレー）は神経筋接合部ニコチン受容体にそれぞれ作用することにより、伝達機能を阻害する。

神経伝達物質の再取り込みを阻害することにより、伝達物質がシナプス間隙にとどまる時間を延ばして効果を増強する物質がある。フルオキセチンはセレトニンの、コカインはドパミン等の再吸収を阻害する。

有機リン酸化合物は、アセチルコリンエステラーゼに結合し、シナプス間隙に放出されたアセチルコリンの分解を阻害することにより、骨格筋のシナプス後部の膜にアセチルコリンが長時間留まり、骨格筋は脱分極した状態が継続することになる。その結果、筋繊維は非興奮性の収縮ができなくなることで有害作用を発現する。アセチルコリンは、

ニコチン受容体に作用する、末梢神経系で速い興奮性伝達を担う伝達物質である。ニコチン受容体は、神経筋伝達がおきている骨格筋繊維に多く見られ、自立神経筋細胞にも存在している。

以上のように、化学物質が神経系における情報伝達の作用を及ぼす例が知られている。

本研究では、アセチルコリンによる神経伝達機構に影響を及ぼす化学物質に関する検討の一環として、昆虫に対して選択性の高いネオニコチノイド系殺虫剤の神経毒性に関する検討を実施した。

B. 研究方法

1. ネオニコチノイド系殺虫剤

ネオニコチノイド系殺虫剤であるアセタミプリド（純度98.0%）、イミダクロプリド（純度98.0%）、チアクロプリド（純度98.4%）、ニテンピラム（純度99.0%）、チアメトキサム（純度99.9%）、ジノテフラン（純度99.0%）は和光純薬工業株式会社、クロチアニジン（純度99.5%）はDr. Ehrenstorfer GmbH社から購入した。フィプロニル（純度97.0%）は関東化学（株）、フロニカミド（純度98.0%）は和光純薬工業（株）から購入した。

2. ヒトアセチルコリンエステラーゼ活性阻害を指標とした評価

アッセイ緩衝液（100 mmol/Lリン酸溶液（pH7.4））50 μ Lを96穴ウエルプレートに加え、ヒトアセチルコリンエステラーゼ（AChE）を含むアッセイ緩衝液溶液 50 μ L、アッセイ緩衝液に溶解した2 mmol/L 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNBと省略) 溶液 50 μ Lと2 mmol/L 1,1-Dimethyl-4-acetylthiomethylpiperidinium iodide (MATP⁺と省略) 溶液を順次加え均一にした。その混合溶液に、アッセイ緩衝液により公比2で希釈した被験物質溶液を50 μ L加え、37 °Cで、60分間保温した。反応後、マイクロプレートリーダー（コロナ電気株式会社製、型式：MTP-810Lab/880Lab）を用いて、450 nmの吸光度を測定した。

C. 結果および考察

1. ヒトアセチルコリンエステラーゼに対する活性阻害を指標とした評価

ヒトアセチルコリンエステラーゼ活性に対するネオニコチノイド系殺虫剤7物質の作用を検討した(図2)。

アセタミプリドは、60分間の反応後において1 mg/mL(最終作用濃度;以下同様)で93.8%、0.5 mg/mLで84.2%、0.25 mg/mLで71.6%、0.125 mg/mLで50.5%、0.0625 mg/mLで32.0%、0.03125 mg/mLで19.5%の割合で、AChEの活性を阻害した。一方、有機リン系殺虫剤の一つであるダイアジノンの活性体であるダイアジノンオキシソンの場合には、0.0007 mg/mLの濃度で90%以上の阻害が認められた。アセタミプリドの設定濃度である0.125 mg/mLの作用で示した阻害の割合(約50%)は、ダイアジノンオキシソンが示す阻害の作用濃度では約0.11 µg/mLに相当した。

イミダクロプリドは、60分間の反応後において1 mg/mLで45.7%、0.5 mg/mLで56.0%、0.25 mg/mLで30.1%、0.125 mg/mLで17.6%の割合で、AChEの活性を阻害した。設定濃度である0.5 mg/mLの作用で示した阻害の割合(約56%)は、ダイアジノンオキシソンが示す阻害の作用濃度では約0.13 µg/mLに相当した。

ニテンピラムは、60分間の反応後において1 mg/mLで37.1%、0.5 mg/mLで35.2%、0.25 mg/mLで31.2%、0.125 mg/mLで17.8%の割合で、AChEの活性を阻害した。設定濃度である0.25 mg/mLの作用で示した阻害の割合(約30%)は、ダイアジノンオキシソンが示す阻害の作用濃度では0.049 µg/mL/mLに相当した。

チアクロプリドは、60分間の反応後において1 mg/mLで67.4%、0.5 mg/mLで55.2%、0.25 mg/mLで22.6%、0.125 mg/mLで13.2%の割合で、AChEの活性を阻害した。設定濃度である0.5 mg/mLの作用で示した阻害の割合(約55%)は、ダイアジノンオキシソンが示す阻害の作用濃度では0.13 µg/mLに相当した。

チアメトキサムは、60分間の反応後において1 mg/mLで43.7%、0.5 mg/mLで36.3%、0.25

mg/mLで29.1%、0.125 mg/mLで21.1%、0.0625 mg/mLで21.8%、0.03125 mg/mLで15.4%の割合で、AChEの活性を阻害した。設定最高濃度である1 mg/mLの作用で示した阻害の割合(約44%)は、ダイアジノンオキシソンが示す阻害の作用濃度では0.088 µg/mLに相当した。

クロチアニジンは、60分間の反応後において1 mg/mLで37.1%、0.5 mg/mLで35.2%、0.25 mg/mLで30.2%、0.125 mg/mLで17.8%の割合で、AChEの活性を阻害した。設定濃度である0.25 mg/mLの作用で示した阻害の割合(約30%)は、ダイアジノンオキシソンが示す阻害の作用濃度では0.057 µg/mLに相当した。

ジノテフランは、60分間の反応後において1 mg/mLで39.5%、0.5 mg/mLで26.3%、0.25 mg/mLで20.7%、0.125 mg/mLで17.6%の割合で、AChEの活性を阻害した。設定濃度である0.25 mg/mLの作用で示した阻害の割合(約40%)は、ダイアジノンオキシソンが示す阻害の作用濃度では0.073 µg/mLに相当した。

ネオニコチノイド系殺虫剤は、イミダクリプリドが開発されて、-C-N-C-N-の構造を共通に有する類似の作用性を持つ殺虫剤として、開発されて登録されている(図1)。アセタミプリドとイミダクリプリド及びニテンピラムが類似の骨格構造を有し、チアクロプリド、チアメトキサム及びクロチアニジンが類似の骨格構造を有し、ジノテフランが他の2群と異なった構造をもつ。アセタミプリドが最も作用が強く、ダイアジノンオキシソンに比較して、相対濃度として約1,150倍に相当する濃度(1,150分の1の作用)でAChEの阻害を示した。アセタミプリド(1)に対して、ジノテフランが相対濃度として0.08であった他は0.1~0.3に相当し、毒性が低いこともあり、構造と明確な定量関係を明らかにすることができなかったが、-C-N-C-N-の構造を共通骨格構造として(図3)側鎖として結合している構造が作用に関与していることが推測された。

D. 結論

ネオニコチノイド系殺虫剤は、天然物であるニ

コチンと同様、神経のシナプス後膜に局在するアセチルコリン受容体に結合し、神経興奮を遮断することにより毒性作用を発現されるとされている。

ネオニコチノイド系殺虫剤7物質の間で、アセタミプリドが、AChE に対して最も作用が強く、ダイアジノンオキソンに比較して、相対濃度として約 1,150 倍に相当する濃度 (1,150 分の一の作用) で AChE の阻害を示した。アセタミプリド (1) に対して、ジノテフランが相対濃度として 0.08 であった他は、0.1~0.3 に相当し、毒性が低いこともあり、構造と明確な定量関係を明らかにすることができなかったが、-C-N-C-N- の構造を共通骨格構造として、側鎖として結合している構造が作用に関与していることが推測された。

一方、本研究で明らかとなったように、当該物質は AChE の酵素に作用して、アセチルコリンの分解を抑制する作用も最大で 1/1,000 ~ 1/10,000 程度ではあるが、0.1~0.3 µg/mL の濃度から示した。個々の物質の評価では、問題とする作用濃度ではないが、類似の基本骨格をもち、側鎖の構造は変化に富み多岐にわたることから、それらの環境に共存する状況における複合暴露については注意を払う必要がある。今後、さらにカテゴリー化を進め、詳細な検討を行うことが重要な課題であ

る。

E . 参考文献

- 1) 神経科学, Nolet, J (白尾智明監訳) 東京化学同人 (2011).

F . 健康危機情報

なし。

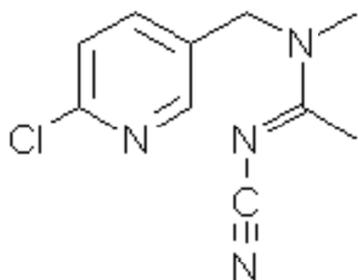
G . 成果発表

- 1 . 論文発表
なし。
- 2 . 学会発表
なし。

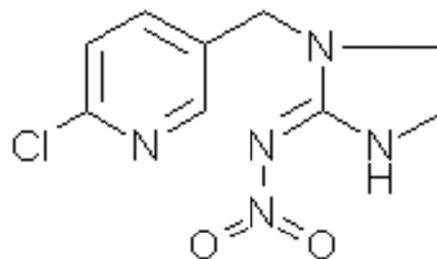
H . 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

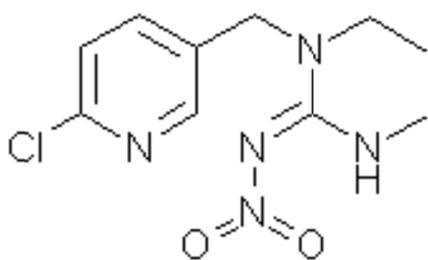
- 1 . 特許取得
該当なし。
- 2 . 実用新案登録
該当なし。
- 3 . その他
該当なし。



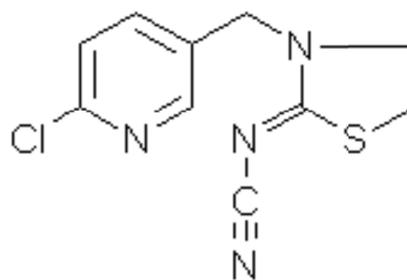
アセタミプリド



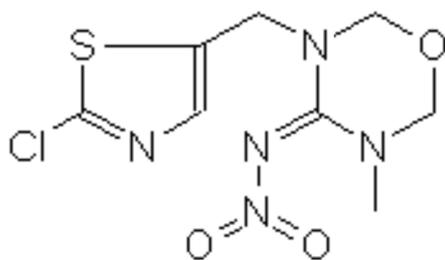
イミダクロプリド



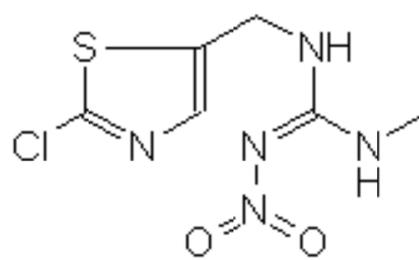
ニテンピラム



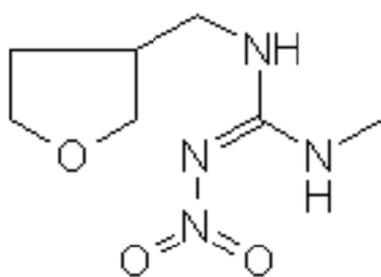
チアクロプリド



チアメトキサム



クロチアニジン

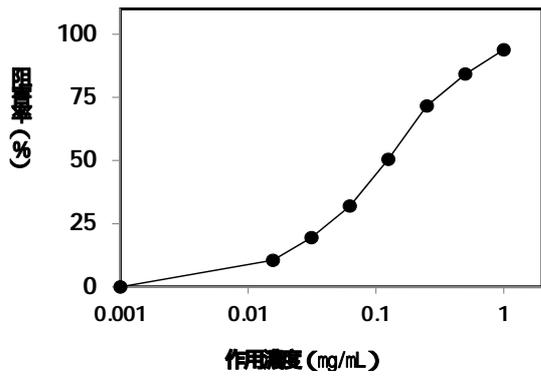


ジノテフラン

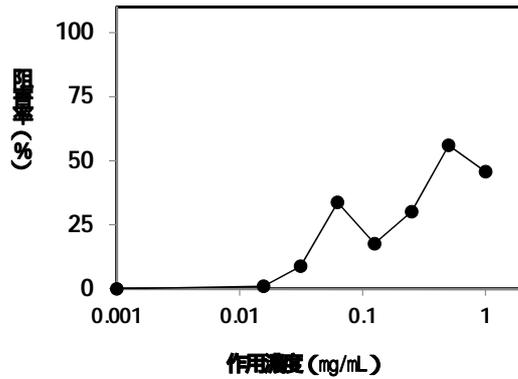
図1 ネオニコチノイド系殺虫剤の構造

「ネオニコチノイド系農薬・殺虫剤」便覧 (<http://no-neonico.jp/pdf/binran.pdf>) より転載

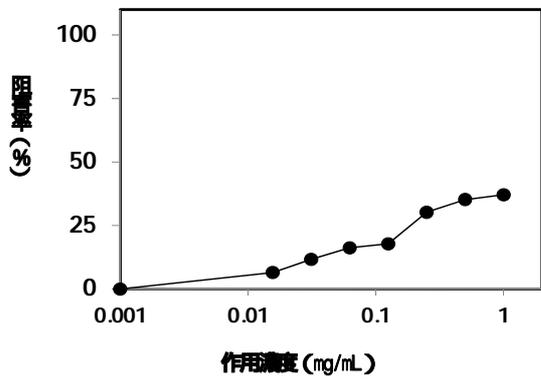
アセタミプリド



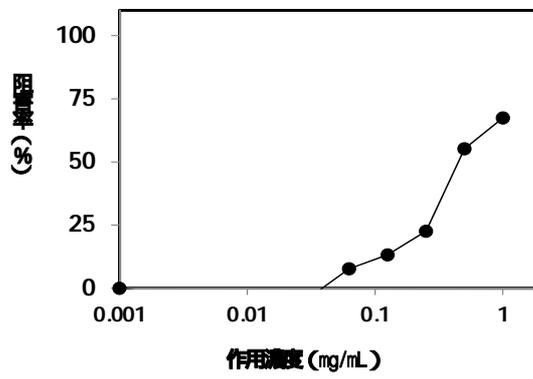
イミダクロプリド



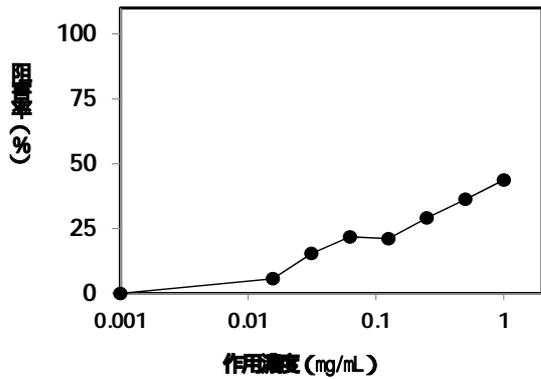
ニテンピラム



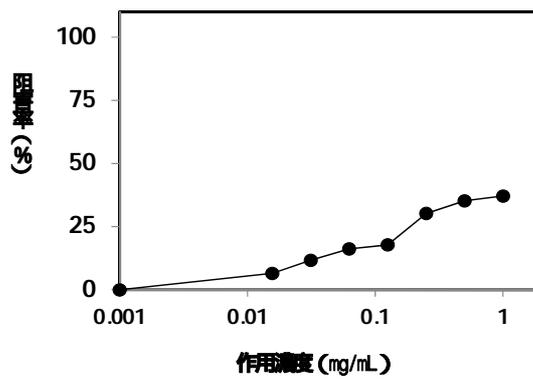
チアクロプリド



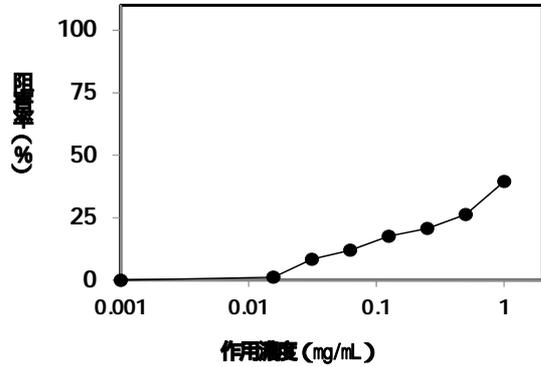
チアメトキサム



クロチアニジン



ジノテフラン



ダイアジノンオキソン

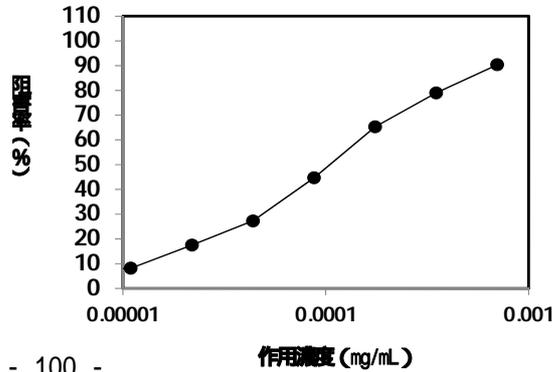


図2 ネオニコチノイド系殺虫剤とダイアジノンオキシソンのAChE 活性に対する阻害作用

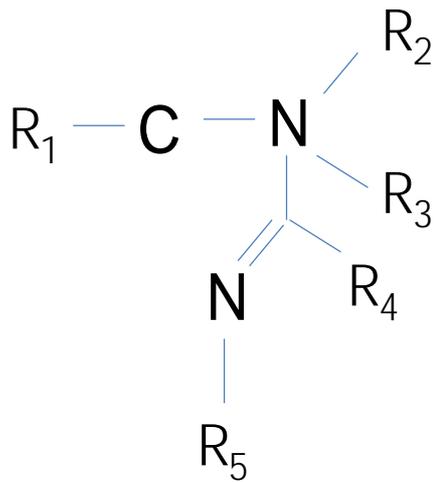


図3 ネオニコチノイド系殺虫剤の基本骨格

表1 ネオニコチノイド系殺虫剤のヒトAChE活性の阻害				
物質名	最小毒性発現濃度(μg/mL)	評価濃度(mg/mL)	阻害割合相当のダイアジノンオキシソン濃度(μg/mL)	相対毒性
アセタミプリド	15.6	0.125	0.11	8.8
イミダクロプリド	31.3	0.5	0.13	2.6
ニテンピラム	15.6	0.25	0.049	2
チアクロプリド	62.5	0.5	0.13	2.6
チアメトキサム	15.6	1	0.088	0.88
クロチアニジン	15.6	0.25	0.057	2.3
ジノテフラン	31.3	1	0.073	0.73

