

平成 29 年度厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）分担研究報告書

研究課題名

発生-発達期における低用量の化学物質暴露による成熟後の神経行動毒性の誘発メカニズム解明と、その毒性学的評価系構築に資する研究（H27-化学-一般-007）

分担研究課題名

「周産期における低用量ネオニコチノイド系農薬暴露による成熟後マウスの行動異常、およびエストロゲン受容体遺伝子改変マウスを用いた行動異常値設定の試み」

研究代表者

種村 健太郎（東北大学大学院農学研究科 動物生殖科学分野 教授）

【研究要旨】

本研究は、発生発達期における化学物質の低用量暴露が成熟後に誘発する情動認知行動異常について、定量性をもって捕捉し、毒性学的な意味づけを明確にできる評価系を作出し、もって行政施策へ反映することを目的とする。

平成29年度は、昨年度に引き続き、ネオニコチノイド系農薬であるアセタミプリドとイミダクロプリドを妊娠11.5日齢の妊娠雌マウスに低用量（0.01および0.1mg/kg/day）にて飲水投与を開始し、出産後の生後4週齢時の離乳時まで同投与を行い、生後12-13週齢時に成長した産仔雄マウスについて情動認知行動解析を行った。また併行して類似構造化合物としてニコチンを飲水投与（0.01、0.1mg/kg/day）し、得られた雄産仔マウスについて成熟期の情動認知行動解析を進めた。その結果、アセタミプリド0.1mg/kg/day飲水投与による顕著な不安関連行動異常の誘発と、イミダクロプリド0.1mg/kg/day飲水投与による顕著な不安関連行動異常並びに学習記憶異常の誘発が認められた。しかし併行して行ったニコチン投与群に比較すると、その程度がやや低いものと考えられた。一方、0.01mg/kg/dayアセタミプリド、イミダクロプリド、ニコチン投与群においては行動様式の逸脱レベルは低いものであった。

A. 研究目的

先行研究 (H20-化学一般-009)にて、周産期マウスへの神経作動性化学物質の投与が、従来の神経毒性試験法では同定困難な情動認知行動異常を誘発することを明らかにし、その異常に対応する神経科学的物証を捉えた。次の研究 (H23-化学一般-004)では、それらが毒性指標として定量評価できることを示した。本研究は、先行研究を踏まえて発生発達期における化学物質の低用量暴露が成熟後に誘発する情動認知行動異常について、定量的に捕捉し、毒性学的な意味づけを明確にできる評価系を作出し、もって行政施策へ反映することを目的とする。これにより情動認知行動異常の高精度なリスク評価が普遍性を持って実施可能となり、行政対応に必須のバリデーションに耐え、国際的に通用しうる体系的・総合的な評価手法としてのガイドライン作成と、OECD への提案を通じての国際貢献を目指す。

尚、中枢神経系の発生発達に重要な役割を果たす神経可塑性の分子背景が各種の脳内伝達物質の適切な機能に深く依存しているという知見と、その機能の外的なかく乱が人の集団の情動認知機能異常を引き起こすという疫学的調査報告が有り、低用量の化学物質が胎児や小児に及ぼす中枢影響の毒性学的評価が問題となっている。この様な、低用量暴露の結果として成熟後に情動認知行動異常が顕在化するという毒性を評価するための動物試験は、従来は主観的な心理学的記述に終始する事が多く、行政対応への適用が困難であった。この為、普遍的、客観的、定量的、かつ高精度な情動認知行動異常リスクの評価系の作成が必要である。

H28 年度には、①低用量化学物質の慢性暴露による次世代個体の神経行動毒性発現を検討する目的で、ネオニコチノイド系農薬であるアセタミプリドとイミダクロプリドについて、妊娠 11.5 日齢の妊娠雌マウスに低用量 (0.1mg/kg/day) にて飲水投与を開始し、出産後の生後 4 週齢時の離乳時まで同投与を行い、成長後の生後 12-13 週齢の産仔雄マウス行動異常について検討した。また、②情動認知行動異常値を設定する目的で、これまでに行ったドーモイ酸、イボテン酸、有機リン農薬であるアセフェート等の発生

発達期暴露により成熟期に誘発される行動解析結果と併せて、情動認知行動異常値を設定する検定項目として、オープンフィールド試験における総移動量と中央部滞在時間、条件付け学習記憶試験における短期記憶形成能と空間記憶能についての妥当性の検証を推し進めるために 2 種のエストロゲン受容体遺伝子改変マウス (北嶋、菅野との共同研究) を用意し、同様の情動認知行動解析を行った。

B. 研究方法

ネオニコチノイド系農薬であるアセタミプリドとイミダクロプリド、類似構造化合物としてニコチンについて、妊娠 11.5 日齢の妊娠雌マウスにネオニコチノイド農薬類の一日摂取許容量 (ADI) を参照とした低用量 (0.01 および 0.1mg/kg/day) にて飲水投与を開始し、出産後の生後 4 週齢時の離乳時まで同投与を行い、成長後の生後 12-13 週齢の産仔雄マウス行動様式について、オープンフィールド試験 (検定項目として、総移動量、中央部滞在率、総移動回数)、明暗往来試験 (検定項目として、明所滞在時間、明暗往来数、暗所滞在時間)、高架式十字迷路試験 (検定項目として、総移動量、オープンアーム滞在時間、総アーム選択数)、条件付け学習記憶試験 (検定項目として、学習度、場所連想記憶度、音連想記憶度)、プレパルス驚愕反応抑制試験 (検定項目として、120dB に対する 90、95、100dB のプレパルスによる驚愕反応抑制抑制度) からなるバッテリー式の行動解析を行うことで検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験に際しては、東北大学の規定にのっとり、あらかじめ実験計画について承認を受け、かつ 3R の原則を遵守しつつ実施した。

C. 研究結果

ネオニコチノイド系農薬であるアセタミプリドとイミダクロプリドについて、妊娠 11.5 日齢の妊娠雌マウスに低用量 (0.1mg/kg/day) にて飲水投与を開始し、出産後の生後 4 週齢時の離乳時まで同投与を

行い、成長後の生後 12-13 週齢の産仔雄マウスについて行動解析を行った結果、アセタミプリドの発生-発達期飲水投与によって、オープンフィールド試験による総移動量の増加、明暗往来における明所滞在時間および明暗往来数の増加、高架式十字迷路試験における総移動量、オープンアーム滞在時間および総アーム選択数の増加が誘認められた ($p < 0.05$)。また、イミダクロプリドの発生-発達期飲水投与によって、オープンフィールド試験による中央部滞在時間の減少、高架式十字迷路試験における総移動量、オープンアーム滞在時間および総アーム選択数の増加、条件付け学習記憶試験における学習度、場所-連想記憶度の低下が認められた ($p < 0.05$)。しかしながら併行して行ったニコチン投与群に比較すると、その程度がやや低いものと考えられた。一方、0.01mg/kg/day アセタミプリド、イミダクロプリド、ニコチン投与群においては行動様式の逸脱レベルは低いものであった。

D. 考察

発生-発達期における慢性暴露モデルとして、妊娠 11.5 日齢の妊娠雌マウスに低用量 (0.1mg/kg/day) にて飲水投与を開始し、出産後の生後 4 週齢時の離乳時まで同投与を行ったが、胎仔マウスに対しては経胎盤投与、産仔マウスに対して経乳投与されたと考えられる (特に、産仔マウスは、体が小さく給水口まで到達することがないため、化学物質は母マウスを介しての投与となる)。アセタミプリドによって重篤な多動が、またイミダクロプリドによって多動を伴う学習記憶異常が誘発されたと考えられる。今回の用量設定においては、一日摂取許容量 (ADI) を元に、安全係数を 10 として、さらに母マウスの体重の約 1/10 を産仔マウスへ移行すると仮定し、いずれも 0.1mg/kg/day としたが、同用量のニコチン暴露影響結果に比較するとやや程度は低いが、重篤な行動異常を誘発すると考えられた。しかしながら、0.01mg/kg/day アセタミプリド、イミダクロプリド、ニコチン投与群においては行動様式の逸脱レベルは低いものであった。

E. 結論

ネオニコチノイド系農薬の発生-発達期における化学物質の慢性暴露による成熟後の神経行動異常と、対応する神経科学的物証について捕捉することに成功した。また、エストロゲン受容体遺伝子改変マウスの利用によって情動認知行動「毒性基準値」の設定に向けた取り組みが大きく進んだ。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

なし

2) 雑誌

1: Sakai K, Ideta-Otsuka M, Saito H, Hiradate Y, Hara K, Igarashi K, Tanemura K. Effects of doxorubicin on sperm DNA methylation in mouse models of testicular toxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018 Apr 6;498(3):674-679.

2: Ohtani N, Suda K, Tsuji E, Tanemura K, Yokota H, Inoue H, Iwano H. Late pregnancy is vulnerable period for exposure to BPA. *J Vet Med Sci.* 2018 Mar 30;80(3):536-543.

3: Saito H, Hara K, Tanemura K. Prenatal and postnatal exposure to low levels of permethrin exerts reproductive effects in male mice. *Reprod Toxicol.* 2017 Dec;74:108-115.

4: Sugimura S, Kobayashi N, Okae H, Yamanouchi T, Matsuda H, Kojima T, Yajima A, Hashiyada Y, Kaneda M, Sato K, Imai K, Tanemura K, Arima T, Gilchrist RB. Transcriptomic signature of the follicular somatic compartment surrounding an oocyte with high

developmental competence. Sci Rep.
2017 Jul 28;7(1):6815.

5: Umezu K, Hiradate Y, Numabe T, Hara
K, Tanemura K. Effects on glycocalyx
structures of frozen-thawed bovine
sperm induced by flow cytometry and
artificial
capacitation. J Reprod Dev. 2017 Oct
18;63(5):473-480.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

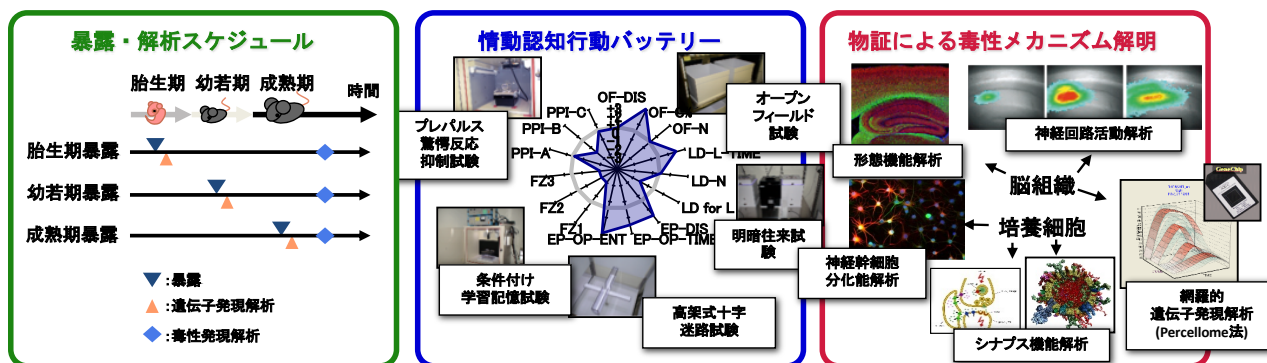
発生-発達期における低用量の化学物質暴露による 成熟後の神経行動毒性の誘発メカニズム解明と、 その毒性学的評価系構築に資する研究 (H27-化学-一般-007)

東北大学大学院
農学研究科動物生殖科学分野 教授
種村 健太郎

先行研究(1)による成果

H20-化学-一般-009

化学物質の情動・認知行動に対する影響の毒性学的評価法に関する研究
-特に遅発性影響の評価系のメカニズム解明による確立-
(研究代表者 北嶋 聡)



周産期マウスへの神経作動性化学物質の投与によって、

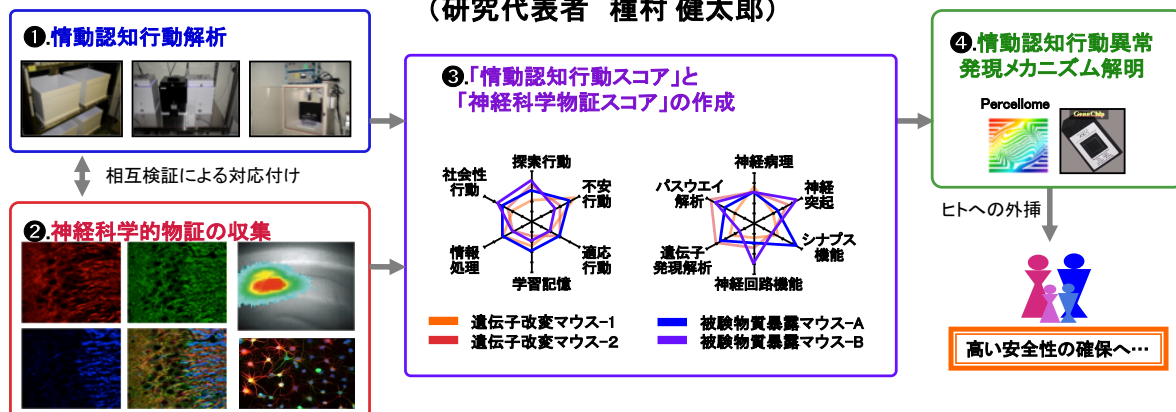
- ①従来の神経毒性試験法では同定困難な中枢神経毒性を情動認知行動異常として検出可能であり、
- ②その異常に対応する神経科学的物証を検出可能であること、を示した。

1. 細胞死や細胞変性を惹起しないレベルの暴露で遅発性異常が誘発される
2. 遅発性の情動-認知行動異常には計測可能な脳の異常を伴う
3. 胎生期・幼若期暴露後の遅発性異常は、成熟期暴露後のそれと原則的に異なる。
4. 胎生期・幼若期暴露後の遅発性異常の方が重篤なことが多い。

先行研究(2)による成果

H23-化学-一般-004

神経系発生-発達期の化学物質暴露による遅発中枢影響解析に基づく
統合的な情動認知行動毒性評価系確立に資する研究
(研究代表者 種村 健太郎)



周産期マウスへの神経作動性化学物質の投与によって誘発される①情動認知行動異常や、②それに対応する神経科学的物証が、毒性指標として定量評価できるものであることを示した。

1. 行動異常と対応した神経突起異常像が認められる。
2. 行動異常と対応した神経幹細胞動態異常が認められる。
3. 遺伝子発現解析から、異常行動の分子メカニズムの一端を捉えることができる。
4. 神経回路機能解析から、行動異常の責任部位を絞り込むことができる。
5. いずれも異常の数値化が可能である。

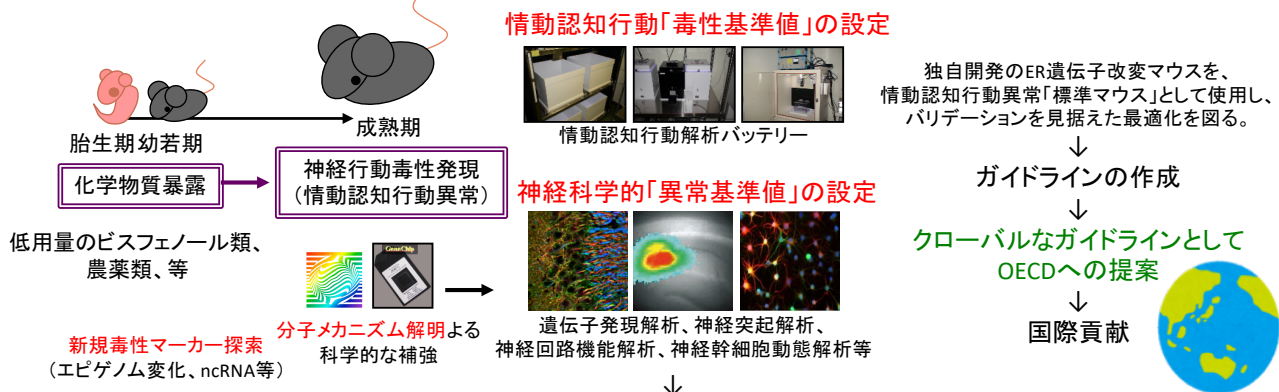
厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

発生-発達期における低用量の化学物質暴露による成熟後の神経行動毒性の誘発メカニズム解明と、その毒性学的評価系構築に資する研究 (H27-化学-一般-007)

研究代表者 東北大学大学院・農学研究科・動物生殖科学分野 種村 健太郎

先行研究1(H20-化学-一般-009)から
周産期マウスへの神経作動性化学物質の投与が、成熟期の情動認知行動異常を誘発することを明らかにし、その異常に対応する神経科学的物証を捉えた。
先行研究2(H23-化学-一般-004)から
上記の情動認知行動異常や神経科学的物証が毒性指標として定量評価できるものであることを示した。

【目的】周産期における化学物質の低用量暴露が成熟後に誘発する情動認知行動異常について、定量性をもって捕捉し、毒性学的な意味づけを明確にできるリスク評価系を作出する。



本研究により情動認知行動異常の高精度なリスク評価が普遍性を持って実施可能となり、行政対応に必須のバリデーションに耐えるガイドラインの作成に向けた大きな前進と、国際的に通用しうる体系的・総合的な評価手法として、OECDへの提案を通じての国際貢献も期待できる。

正常な脳の発生-発達は
適切な神経シグナルによるものである。

NX (neuroactive xenobiotics)

Proper Neural Signals
↓
Normal Brain Development
↓
Healthy Brain Function

正常な脳の発生-発達は
適切な神経シグナルによるものである。

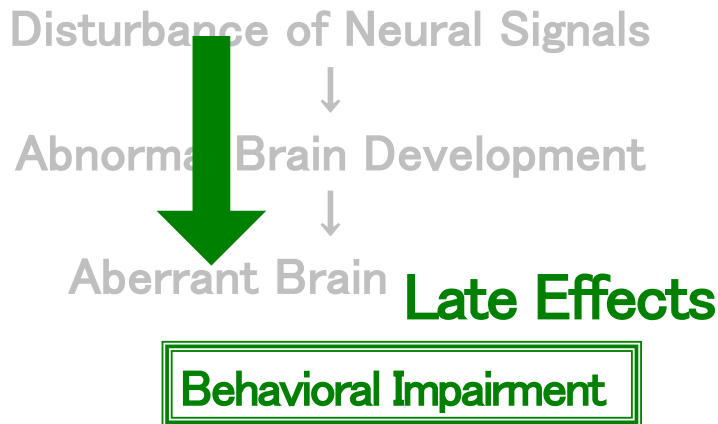
NX (neuroactive xenobiotics)

Disturbance of Neural Signals
↓
Abnormal Brain Development
↓
Aberrant Brain Function

Behavioral Impairment

正常な脳の発生-発達は
Early Exposure 神経シグナルによるものである。

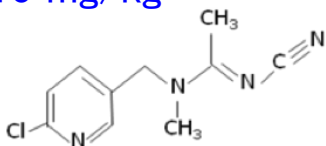
NX (neuroactive xenobiotics)



ネオニコチノイド系農薬による 中枢神経影響解析および生殖機能影響解析

	作用点	主な農薬
アセチルコリン	コリンエステラーゼ阻害	有機リン系・カーバメート系
	アセチルコリン受容体活性化	ネオニコチノイド系
	アセチルコリン受容体阻害	ネライストキシシン系
GABA	GABA受容体拮抗	有機塩素系・フェニルピラゾール系
	GABA受容体作用	マクロライド系
セロトニン	セロトニン受容体作用	ピメトロジン
神経軸索シグナル伝達阻害	ナトリウムチャネル開口時間延長	ピレスロイド系

10 mg/kg



物質名: アセタミプリド 英名: Acetamiprid(ACT)

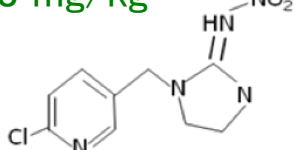
CAS No.: 135410-207 分子式・分子量:

$C_{10}H_{11}ClN_4=222.68$

純度: 98% メーカー: 和光純薬株式会社

カタログNo.: 099-03771

8 mg/kg



物質名: イミダクロプリド 英名: Imidacloprid(IM)

CAS No.: 117-81-7 分子式・分子量:

$C_9H_{10}ClN_5O_2=255.7$

純度: 98% メーカー: 和光純薬株式会社

カタログNo.: 010-24541

溶媒はコーンオイル、ゾンデを用いた単回強制経口投与、
尚、急性参照用量(ARfD)も元に安全係数を100として用量設定を行った。

慢性飲水暴露用量の算出と調整

用量設定根拠: 1日摂取許容量(ADI)から算出した(農薬評価書, 食品安全委員会, 2007年)

ADI: イミダクロプリド 0.057mg/kg/day, アセタミプリド 0.071mg/kg/day

暴露用量0.1mg/kg/dayまたは0.01mg/kg/dayの
算出と調整方法

各単位における溶液中濃度の換算		1日暴露量
mg/ml	ppm	mg/kg/day
0.001000	1.000000	0.100000
0.000100	0.100000	0.010000

※動物体積=10mlに対し1日飲水量1mlとした。

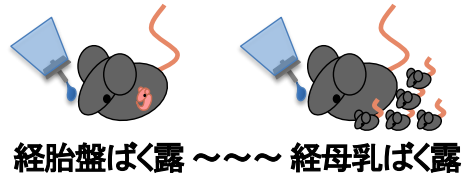
※Bioavailability及び体内動態は考慮しないものとした。

★飲水暴露溶液の調整

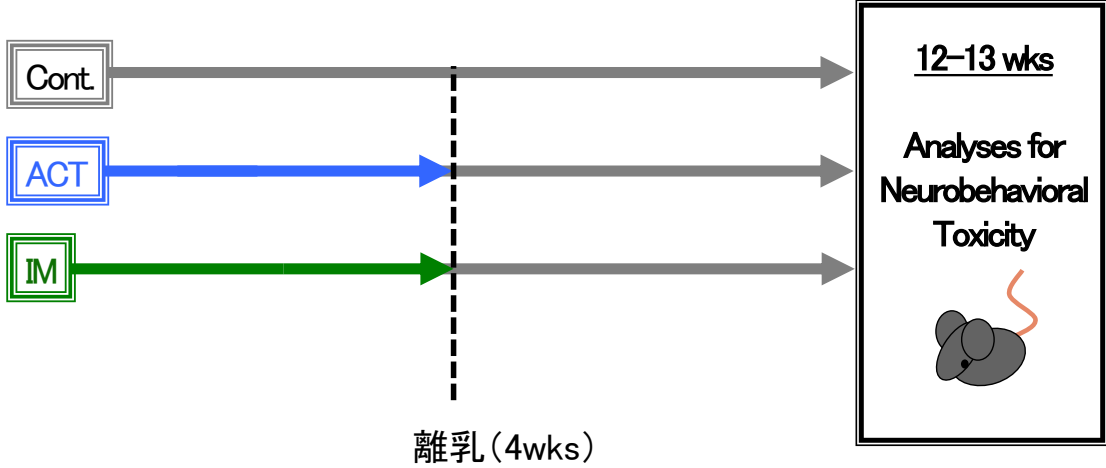
目的濃度1000倍のStock solution(検体を注射用水に溶解)1mlを
飲水(水道水)で1000mlにメスアップした。

～発生-発達期 長期飲水投与～

Control (Cont.): 通常の給水
 Acetamidrid (ACT) :0.01、0.1mg/kg/day
 Imidacloprid (IM) : 0.01、0.1mg/kg/day

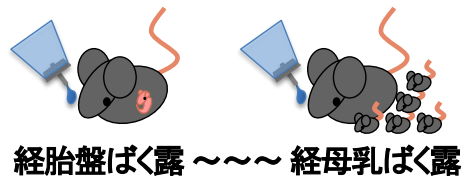


胎生11.5日から生後4週齢まで長期飲水投与

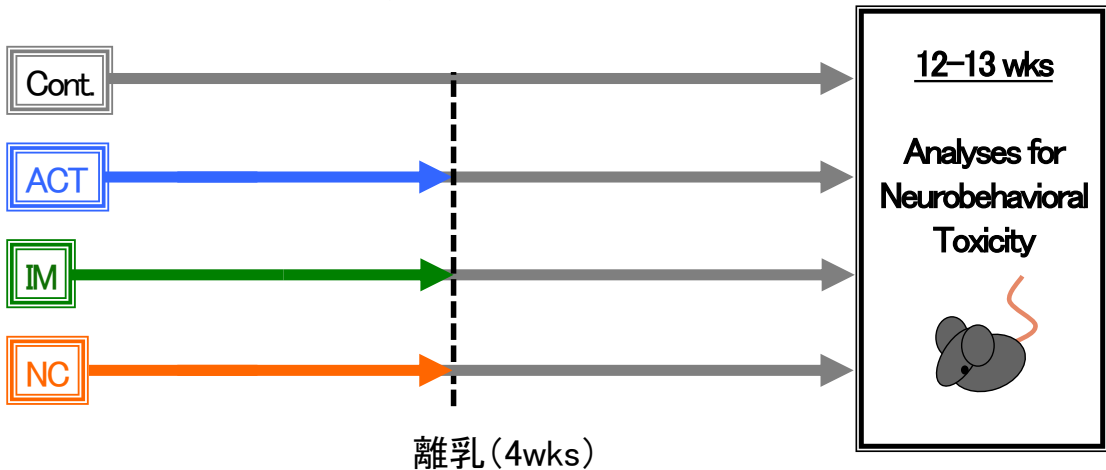


～発生-発達期 長期飲水投与～

Control (Cont.): 通常の給水
 Acetamidrid (ACT) :0.01、0.1mg/kg/day
 Imidacloprid (IM) : 0.01、0.1mg/kg/day
 Nicotine (NC) : 0.01、0.1mg/kg/day



胎生11.5日から生後4週齢まで長期飲水投与

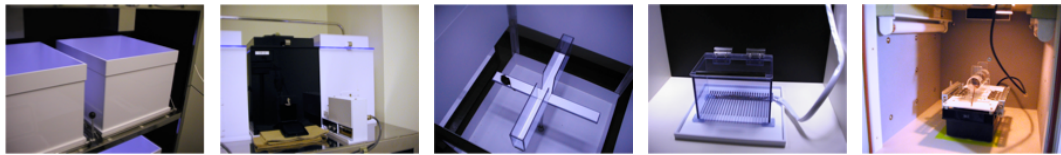


行動解析

遺伝子改変マウスの行動解析で実績があり、
比較的に短時間で、判りやすい結果が得られる試験を選択した。

→化学物質による行動影響があるか？

→毒性発現と呼べる行動異常か？



オープンフィールド
試験

明暗
往来試験

高架式十字
迷路試験

条件付け
学習記憶試験

プレパルス驚愕反応
抑制試験

第1週
水曜日



第1週
木曜日



第1週
金曜日

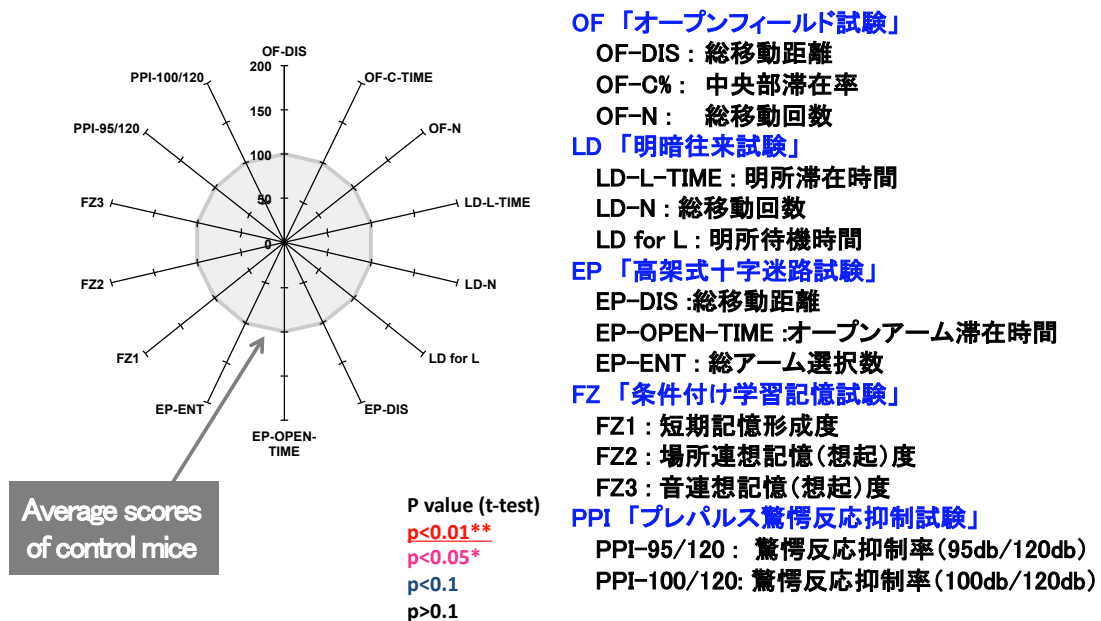


第2週
月～水曜日



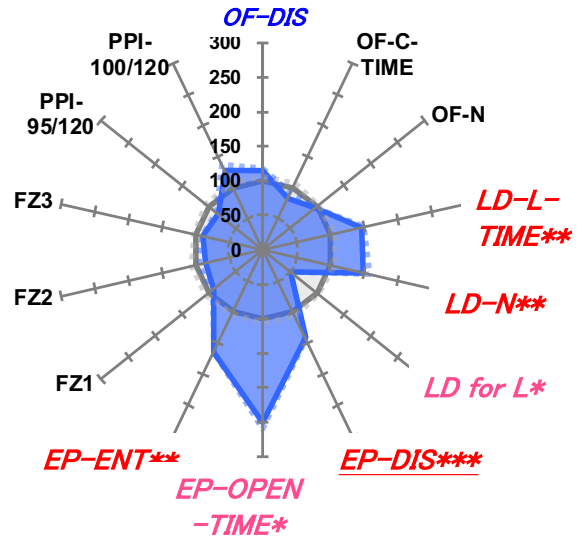
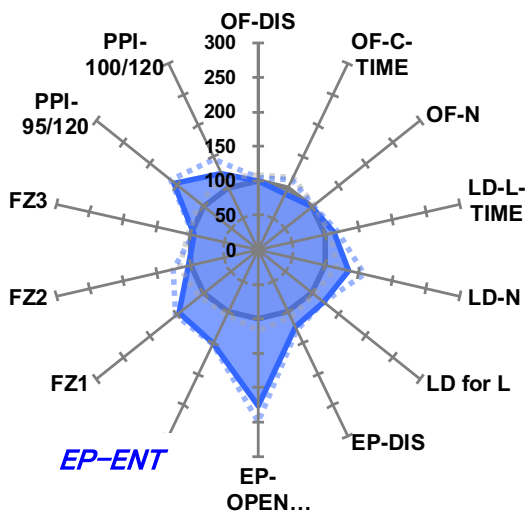
第2週
木曜日

Radar Chart Results of Behavioral Test Battery (Average scores of control mice = 100%)



Radar Chart Results of Behavioral Test Battery (Average scores of control mice = 100%)

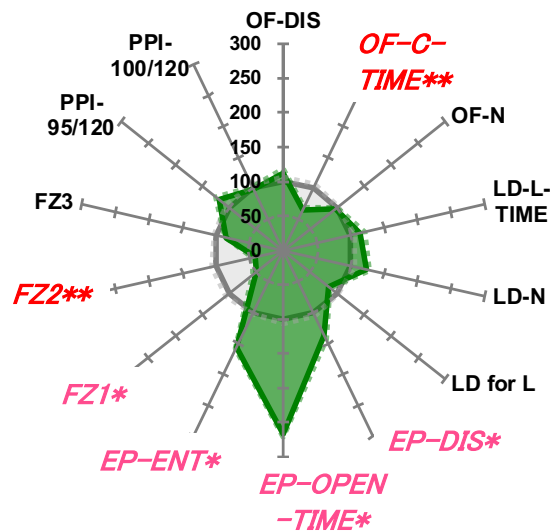
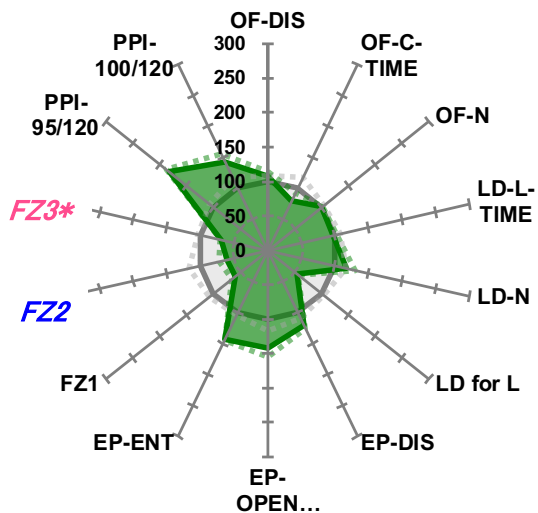
Acetamidiprid (ACT) :0.01、0.1mg/kg/day



P value (t-test)
P<0.001***
 p<0.01**
 p<0.05*
 p<0.1
 p>0.1

Radar Chart Results of Behavioral Test Battery (Average scores of control mice = 100%)

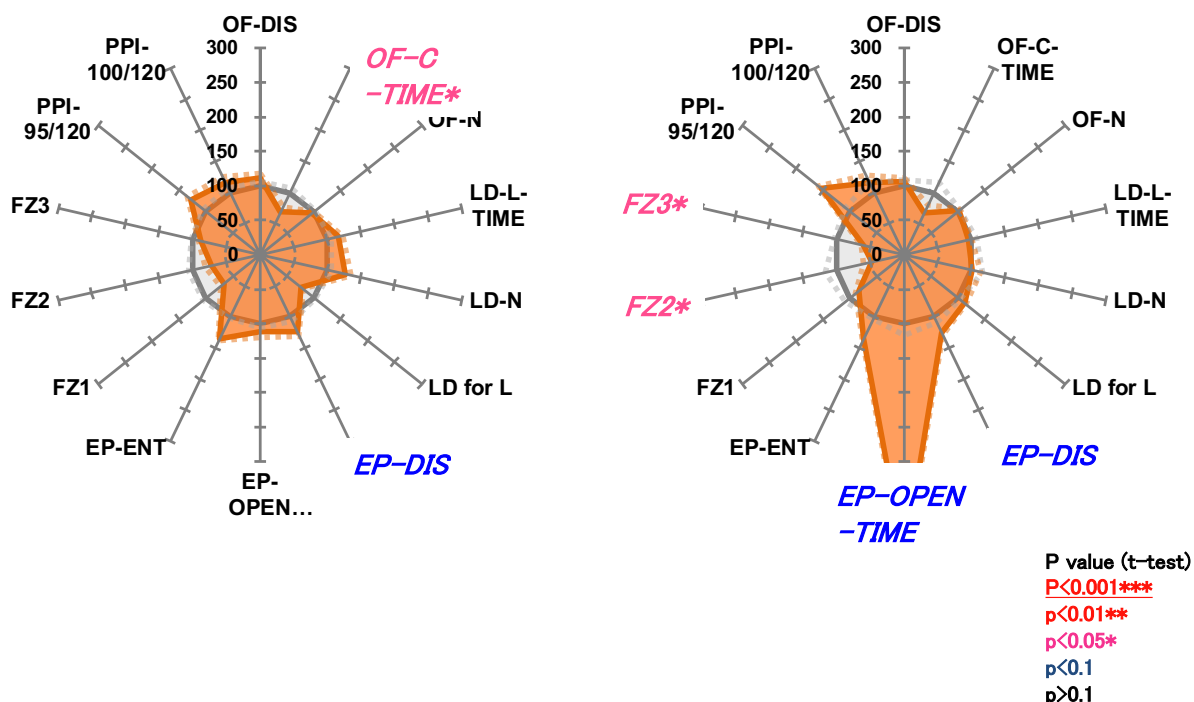
Imidacloprid (IM) : 0.01、0.1mg/kg/day



P value (t-test)
P<0.001***
 p<0.01**
 p<0.05*
 p<0.1
 p>0.1

Radar Chart Results of Behavioral Test Battery (Average scores of control mice = 100%)

Nicotine (NC) : 0.01、0.1mg/kg/day



期待される成果

本研究により従来の神経毒性試験法では検出が困難であった中枢神経毒性について、遅発的に顕在化する情動認知行動異常として検出することにより、高精度に普遍性を持ってリスク評価を実施することが可能となった。これにより、**行政対応に必須のバリデーションに耐えるガイドラインの作成**が期待できる。

本研究成果は、内外の情報を適切に考慮しつつ、国際的に通用しうる体系的・総合的な評価手法としての提案を目指しており、具体的にはOECDへの提案を通じての国際貢献も期待できる。

国際毒性学連盟ICT XIV 2016 (メリダ, メキシコ)シンポジウムにて成果の一部を発表した結果、特に農薬類暴露による神経行動毒性(行動異常)評価系の標準化への期待が高いことが確認されるとともに、2018年3月に、米国毒性学会SOT 2018(サンアントニオ、アメリカ)シンポジウムでも発表予定である。