

厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）  
総合研究報告書（分担1）

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】

測定環境の影響を排除し再現性と定量性を確保するために独自開発した防音密閉式の情動認知行動解析機器群と測定プロトコルを用いて、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、生後2週齢（以下、幼若期）、或いは、生後11週齢（以下、11週令以降を成熟期と定義）のマウスに投与し、生後12-13週齢時（平成27年度）或いは生後24-25週齢時（平成28年度）の成熟期に、情動認知行動解析を行った。その結果、幼若期投与による異常の誘発が生後12-13週齢時に確認され、さらに生後24-25週齢時には、むしろ異常の程度が増すことが示された（平成28-29年度）。特に、学習記憶異常と不安関連行動異常が顕著に増悪し、その程度は、統合失調症や認知症といった神経疾患モデルマウスが示す異常の範囲と程度を超えるものであった。また、胎生期から幼若期にかけての経母体暴露のモデルとして、妊娠/泌乳期雌マウスに、ADI（一日許容摂取量）を想定した低用量のアセタミプリドとイミダクロプリドを飲水投与し、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結果、不安関連行動異常を伴う学習記憶異常を検出した（平成29年度）。特有の異常を恒常的に示す「標準マウス」として用いるエストロゲン受容体 $\alpha$ 遺伝子改変マウスとして、ER $\alpha$ KIマウスおよびER $\beta$ KIマウスの示す行動異常や、低用量のニコチンを用いた行動解析結果、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、オープンフィールド試験、明暗往來試験、条件付け学習記憶試験における各検定項目の「情動認知行動異常」の程度を検討することが可能となった。

## 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

① 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、幼若期投与として生後 2 週齢を、成熟期投与として生後 11 週齢を設定し、雄マウスに対してゾンデを用いて、急性参照用量 (ARfD) を参照とし、アセタミプリド (10mg/kg) またはイミダクロプリド (8mg/kg) を単回強制経口投与した (溶媒はコーンオイルを使用) (A)。

さらに、妊娠 11.5 日齢の妊娠雌マウスに一日摂取許用量 (ADI) を参照とした低用量 (0.1mg/kg/day) にてアセタミプリドとイミダクロプリドを、また、類似化合物としてニコチンを用いて同用量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 (B)。

いずれの実験についても成長後の生後 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。

② 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、①同様の情動認知行動解析を行い、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の仮設定を試みた。尚、本研究で用いたエストロジェン受容体遺伝子改変マウスは、相同組み替えによってエストロジェン受容体 $\alpha$ 遺伝子座の3'-UTRをウシ成長ホルモン遺伝子の3'-UTRに置き換えたマウス(ER $\alpha$ KIマウス)と、さらにエストロジェン受容体 $\alpha$ 遺伝子のORFをエストロジェン受容体 $\beta$ 遺伝子座のORFに置き換えたマウス(ER $\beta$ KIマウス)である。

(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

① ④バッテリー式の情動認知行動解析の結果、高架式十字迷路試験において、アセタミプリドの幼若期投与による不安関連行動の逸脱が認められるとともに条件付け学習記憶試験において、アセタミプリドおよびイミダクロプリドの幼若期投与による学習記憶異常の誘発が認められた。さらに、神経新生マーカーを用いた免疫組織化学から、アセタミプリドおよびイミダクロプリドの幼若期投与群の海馬において神経新生能低下が示された。また、大脳、および海馬について網羅的遺伝子発現解析と、その解析結果に基づくパスウェイ解析から、幼若期アセタミプリド投与群に髄鞘機能低下、軸索機能異常、神経保護作用低下が生じていることが示唆された

⑤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、ニコチンによる影響結果に比較すると、その程度はやや低いものであった。

② 生後12-13週齢時のER $\alpha$ KIマウスについて行動解析を行った結果、条件付け学習記憶試験における場所-連想記憶度および音-連想記憶度の低下、プレパルス驚愕反応抑制度の減少が認められた( $p<0.05$ )。また、生後12-13週齢時のER $\beta$ KIマウスについて行動解析を行った結果、オープンフィールド試験による中央部滞在時間の減少、明暗往来における明所滞在時間および明暗往来数の減少、高架式十字迷路試験における総移動量の減少、条件付け学習記憶試験における場所-連想記憶度および音-連想記憶度の低下、プレパルス驚愕反応抑制度の減少が認められた( $p<0.05$ )。

## D. 考察

ネオニコチノイド系農薬の発達期における化学物質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、暴露による影響を効率良く、また高精度に、かつ定量的に捕捉することに成功していると考えられた。

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、一日摂取許用量 (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、重篤な行動異常を誘発すると考えられた。特に、発生-発達期におけるアセタミプリド慢性暴露マウスの行動様式は、多動障害モデルマウスとして報告される行動様式を包括するものであり、また、発生-発達期におけるイミダクロプリド慢性暴露マウスの行動様式は、多動を伴う学習障害モデルとしての有用性も考えられた。

しかしながら、ニコチンによる影響結果に比較すると、その程度はやや低いものであったことから、今後、その毒性の程度に応じた対応策の検討が必要であると考えられた。

さらに、ER $\alpha$ KI マウスの行動様式は認知症 (アルツハイマー型認知症というよりも前頭側頭型認知症) モデルマウスの行動様式に非常に近く、また ER $\beta$ KI マウスの行動様式は、陰性の統合失調症モデルマウスの行動様式としての特徴を多く兼ね備えていた。いずれも、本研究班で設定する行動毒性基準値を定める上で、非常に有益なものであると考えられた。

#### E. 結論

低用量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。特に胎生期から幼若期を通じての低用量暴露系は多くの化学物質について応用が可能であると考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### 1) 書籍

なし

###### 2) 雑誌

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 Mar30;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 anooocyte 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.

- 6: Ohtani N, Iwano H, Suda K, Tsuji E, Tanemura K, Inoue H, Yokota H. Adverse effects of maternal exposure to bisphenol F on the anxiety- and depression-like behavior of offspring. *J Vet Med Sci.* 2017 Feb 28;79(2):432-439.
- 7: Kobayashi N, Okae H, Hiura H, Chiba H, Shirakata Y, Hara K, Tanemura K, Arima T. Genome-Scale Assessment of Age-Related DNA Methylation Changes in Mouse Spermatozoa. *PLoS One.* 2016 Nov 23;11(11):e0167127.
- 8: Furukawa Y, Tanemura K, Igarashi K, Ideta-Otsuka M, Aisaki K, Kitajima S, Kitagawa M, Kanno J. Learning and Memory Deficits in Male Adult Mice Treated with a Benzodiazepine Sleep-Inducing Drug during the Juvenile Period. *Front Neurosci.* 2016 Jul 20;10:339.
- 9: Inoue H, Ogonuki N, Hirose M, Hatanaka Y, Matoba S, Chuma S, Kobayashi K, Wakana S, Noguchi J, Inoue K, Tanemura K, Ogura A. Mouse D1Pas1, a DEAD-box RNA helicase, is required for the completion of first meiotic prophase in male germ cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Sep 16;478(2):592-8.
- 10: Umezu K, Hiradate Y, Oikawa T, Ishiguro H, Numabe T, Hara K, Tanemura K. Exogenous neurotensin modulates sperm function in Japanese Black cattle. *J Reprod Dev.* 2016 Aug 25;62(4):409-14.
- 11: Juliandi B, Tanemura K, Igarashi K, Tominaga T, Furukawa Y, Otsuka M, Moriyama N, Ikegami D, Abematsu M, Sanosaka T, Tsujimura K, Narita M, Kanno J, Nakashima K. Reduced Adult Hippocampal Neurogenesis and Cognitive Impairments following Prenatal Treatment of the Antiepileptic Drug Valproic Acid. *Stem Cell Reports.* 2015 Dec 8;5(6):996-1009.
- 12: Yabusaki R, Iwano H, Tsushima S, Koike N, Ohtani N, Tanemura K, Inoue H, Yokota H. Weak activity of UDP-glucuronosyltransferase toward Bisphenol analogs in mouse perinatal development. *J Vet Med Sci.* 2015 Nov;77(11):1479-84.
- 13: Otaka K, Hiradate Y, Kobayashi N, Shirakata Y, Tanemura K. Distribution of the sex chromosome during mouse spermatogenesis in testis tissue sections. *J Reprod Dev.* 2015;61(5):375-81.
- 14: Nakano K, Nishio M, Kobayashi N, Hiradate Y, Hoshino Y, Sato E, Tanemura K. Comparison of the effects of BPA and BPAF on oocyte spindle assembly and polar body release in mice. *Zygote.* 2016 Apr;24(2):172-80.
2. 学会発表 (抜粋)
- Late effects on CNS with behavioral disturbance induced by early exposure of environmental chemicals.  
Kentaro Tanemura  
Neuro 2016, 神奈川、2016年7月20-22日
- Neurobehavioral toxicity at adult period Induced by pesticide exposure at juvenile period  
Kentaro Tanemura and JUN Kanno  
ICT XIV, メキシコ、メリダ、2016年10月2-6日
- Norio Kobayashi, Hiroaki Okae, Hitoshi Hiura, Hatsune Chiba, Yoshiki Shirakata, Kenshiro Hara, Kentaro Tanemura, Takahiro Arima

Temporal alternations in DNA methylation patterns of spermatozoa in early young mice,  
The 17th AAAP Societies Animal Science Congress, Kyushu Sangyo University, 福岡、2016年8月20-25日

Norio Kobayashi, Hiroaki Okae, Hitoshi Hiura, Hatsune Chiba, Yoshiki Shirakata, Kenshiro Hara, Kentaro Tanemura, Takahiro Arima  
Age-related changes in DNA methylation patterns of spermatozoa in mice, BLUEPRINT/IHEC conference, Crowne Plaza Brussels, Brussels, Belgium, 2016年9月8-9日

小林記緒、岡江寛明、樋浦仁、千葉初音、白形芳樹、原健士朗、有馬隆博、種村健太郎

性成熟から繁殖期を通じたマウス精子DNAメチル化様式の変齢性変化、第109回日本繁殖生物学会相模原大会、麻布大学、神奈川県、2016年9月11-15日

小林記緒、岡江寛明、樋浦仁、千葉初音、白形芳樹、原健士朗、種村健太郎、有馬隆博

繁殖期におけるマウス精子 DNA メチル化様式の変齢性変化、第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、神奈川県、2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日

斉藤洋克、井上弘貴、小林記緒、白形芳樹、岡江寛明、樋浦仁、原健士朗、有馬隆博、種村健太郎

ビタミンE欠乏給餌によるマウス精巣影響と精子DNAメチローム変化  
第109回日本繁殖生物学会相模原大会、麻布大学、神奈川県、2016年9月11-15日

梅津康平、平舘裕希、原健士朗、種村健太郎

ニューロテンシンはウシ凍結精液の受精能獲得および先体反応を促進する  
第109回日本繁殖生物学会相模原大会、麻布大学、神奈川県、2016年9月11-15日

後藤萌 斉藤洋克 白形芳樹 原健士朗 種村健太郎

浸透圧変動に対するMII期卵母細胞の細胞膜状態についてのマウス系統間の差違  
第109回日本繁殖生物学会相模原大会、麻布大学、神奈川県、2016年9月11-15日

梅津康平、平舘裕希、原健士朗、種村健太郎

ウシ精子機能へのニューロテンシンの影響  
第159回日本獣医学会大会、日本大学、神奈川県、2016年9月6-8日

種村 健太郎、古川 佑介、北嶋 聡、菅野 純：

キシレン吸入暴露によるマウスへの中枢機能影響解析

第159回日本獣医学会大会、日本大学、神奈川県、2016年9月6-8日

種村 健太郎、古川 佑介、北嶋 聡、菅野 純：

キシレンの経気道吸入暴露によるマウス行動影響解析

第 43 回日本毒性学会学術年会 2016 年 6 月 30 日

#### 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