

神経回路形成期の時期特異的ネオニコチノイド曝露影響 と発達神経毒性の継世代評価



星 信彦

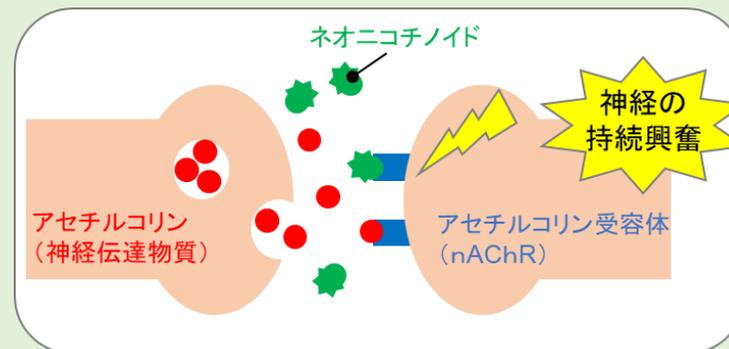
神戸大学 大学院農学研究科
応用動物講座 動物分子形態学分野
(nobhoshi@kobe-u.ac.jp)

ネオニコチノイド系農薬(NN)

ニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)
競合的モジュレーター

(NNとnAChRの親和性: **哺乳類** ≪ **昆虫**)

[Tomizawa & Casida, 2003]



無毒性量以下のNNによる高等脊椎動物への毒性

鳥類・哺乳類への
生殖毒性

[Tokumoto *et al.*, 2013; Hoshi *et al.*, 2014;
Yanai *et al.*, 2017; Kitauchi *et al.*, 2021]

ラットの胸腺・腸内
細菌叢への影響

[Onaru *et al.*, 2020]

マウスへの
神経行動学的影響

[Hoshi *et al.*, 2014; Hirano *et al.*, 2015, 2018, 2021; Takada
et al., 2018, 2020; Yoneda *et al.*, 2018, Hoshi 2021; Maeda
et al., 2021; Hirai *et al.*, 2022; Nishi *et al.*, 2022]

NNの母子間移行

- 成人・子供・新生児の尿からNNを検出
- NN・代謝産物の胎盤を介した胎子への迅速な移行
- NNが母体内で代謝・濃縮され迅速に母乳中へ移行

[Ichikawa *et al.*, 2019; Ikenaka *et al.*, 2019;
Oya *et al.*, 2021; Ueyama *et al.*, 2015]

[Ohno *et al.*, 2020]

[Shoda *et al.*, 2023a]

NNの次世代影響

胎子・新生子期のCLO曝露

E1.5 出生 PND21(離乳) 10wk

CLO

神経発達への**障害**

幼年・成年期で異なる**行動異常** [Maeda et al., 2021]

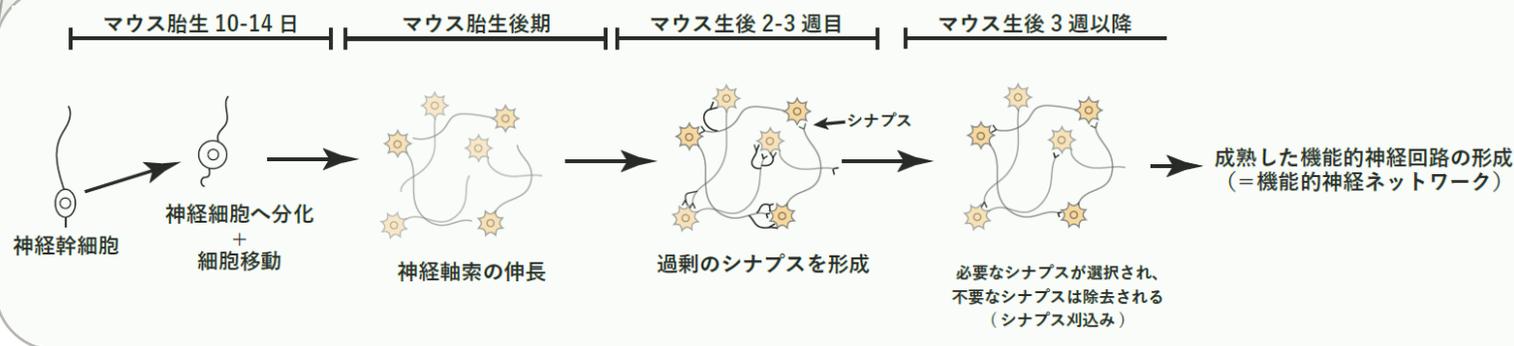
幼年期
PND21
不安様行動



成年期
10wk
多動



脳の神経回路形成期



神経新生, 神経細胞移動, 神経突起・軸索の伸長, シナプスの形成・刈込みなどが行われる **脳機能形成において最も重要な時期**



各発達段階のCLO曝露による神経行動学的な影響は明らかではない

環境因子の継世代影響

※エピゲノム: ゲノムに加えられた修飾で、後天的に変化を受ける

細胞エピゲノム[※]の変化により、複数の世代に有害な表現型が伝達される可能性

[Xin et al., 2015]

無毒性量のCLO

F1, F2, F3世代の雌産子の
雌性生殖器に影響を及ぼす

[Kitauchi et al., 2021] [北内, 2021]

除草剤グリホサート

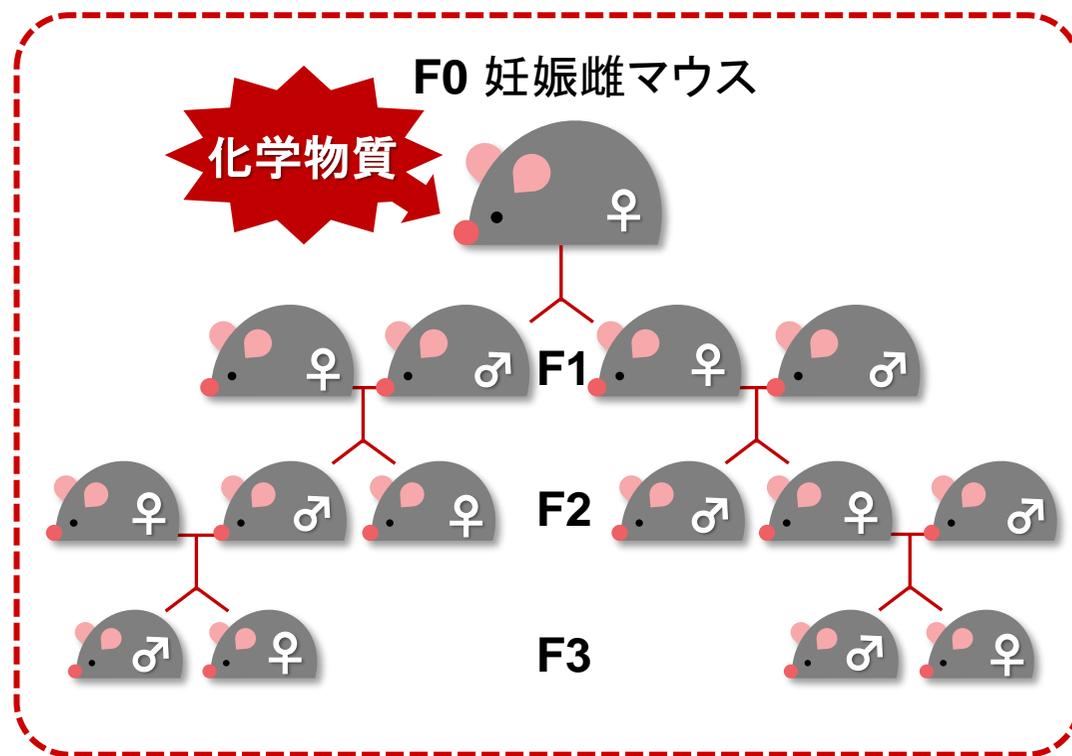
F2, F3世代の疾患に関与,
精子DNAメチル化領域の変化

[Kubsad et al., 2019]

妊娠中のニコチン曝露

F1, F2世代の行動異常,
DNAの低メチル化

[Buck et al., 2019]



各発達段階のCLO曝露による神経行動学的な影響は明らかではない

実験①の目的

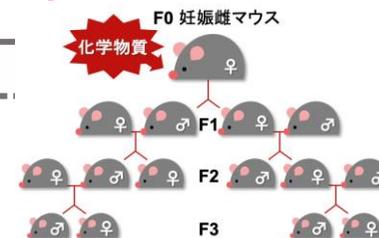
神経回路形成期(胎子・新生子期)を4つの期間に分け、
CLO曝露が脳の発達へ最も影響する発達段階を検証

実験②の目的

妊娠・授乳期のF0世代に無毒性量のCLOを曝露し、
F1, F2, F3世代の神経行動学的な継世代影響を検証

実験③の目的

妊娠・授乳期のF0世代に無毒性量のCLOを曝露し、
F1, F2, F3世代の胸腺・腸管免疫系への継世代影響を検証



実験① 結果と考察

評価	装置	項目	幼年期				成年期			
			CLO-1	CLO-2	CLO-3	CLO-4	CLO-1	CLO-2	CLO-3	CLO-4
自発運動量	OF	総移動距離	→	→	→	→	→	→	→	→
	OF	移動速度	→	→	→	→	→	→	→	→
	EPM	総移動距離	→	→	→	→	→	→	↑	→
	EPM	アーム総進入回数	→	→	→	→	→	→	↑	→
不安様行動	OF	中心区画滞在時間	→	→	→	→	↑	↑	→	→
	EPM	オープンアーム滞在時間	→	→	→	↗	→	→	→	→
	EPM	オープンアーム進入割合	→	→	→	→	↘	↘	→	→

4つの発達期

- **CLO-1**(胎齢 9~12 日): 成年期 不安様行動の**増加・抑制傾向**
- **CLO-2**(胎齢 15~18 日): 成年期 不安様行動の**増加・抑制傾向**
- **CLO-3**(生後 1~4 日): 成年期 自発運動量の**増加**
- **CLO-4**(生後 11~14 日): 幼年期 不安様行動の**増加傾向**

- ↑ 有意に増加
 - ↗ 増加傾向
 - ↘ 抑制傾向
 - 変化なし
- ※対照群との比較

➡ 脳の神経回路形成期の**発達段階別の行動影響**が明らかとなった

実験① 結果と考察

生後1～4日 (CLO-3) のCLO曝露

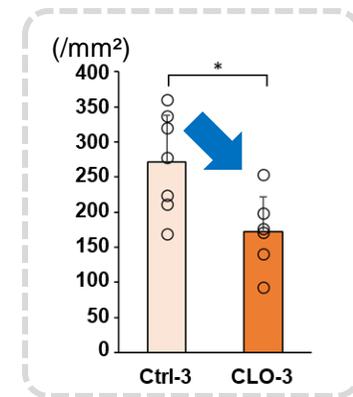
	曝露期間	幼年期	成年期	DCX陽性細胞数(成年期)
先行研究 [Maeda et al., 2021]	E1.5～PND21	不安様行動	多動	減少
本研究	E9～12 (CLO-1)	—	不安への影響	—
	E15～18 (CLO-2)	—	不安への影響	—
	PND1～4 (CLO-3)	—	多動	減少
	PND11～14 (CLO-4)	不安様行動	—	—

E=胎齢 PND=生後日齢

免疫組織化学的解析

成年期: DCX陽性細胞数(未熟神経細胞)の減少

⇒ 生後1～4日のCLO曝露による神経発達への影響が成年期の海馬においても継続



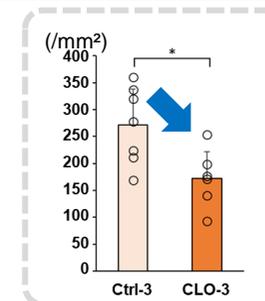
➡ 胎子・新生子期(全期間)のCLO曝露と同様の結果が、生後1～4日のCLO曝露(CLO-3)でも明らかとなった

生後1~4日 (CLO-3) のCLO曝露

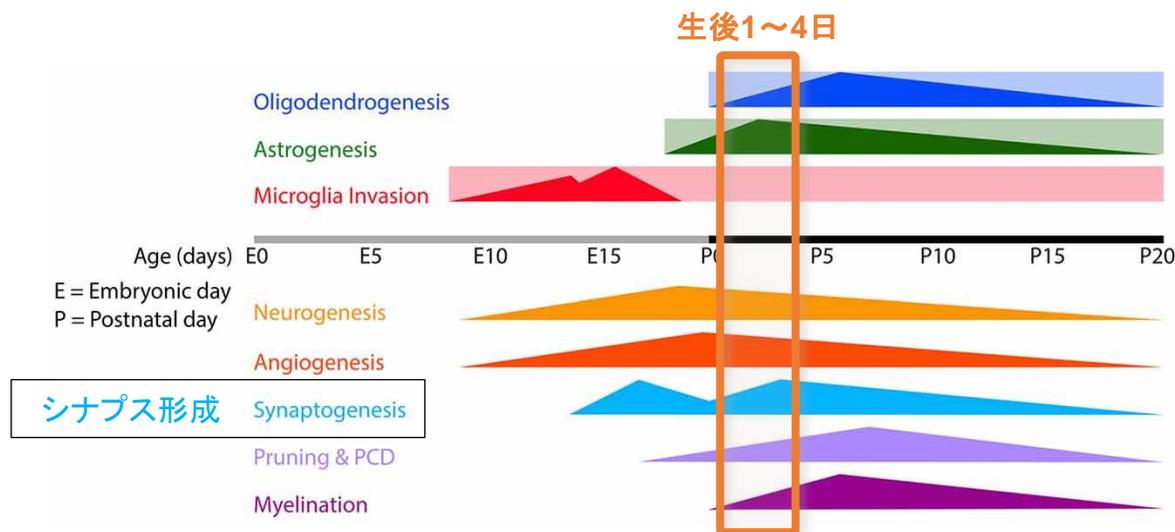
□ 網羅的遺伝子発現解析

幼年期
成年期 } : 海馬の神経突起・軸索の伸長・分枝が**促進**

- ・ “Neuritogenesis (神経突起形成)” や,
“Outgrowth of neurites (神経突起の伸長)” など
- ・ *Fgfr1* (線維芽細胞増殖因子受容体1) ↑



適正な時期
の神経発達
を阻害



マウスの脳における神経回路形成過程 [Reemst et al., 2016より]

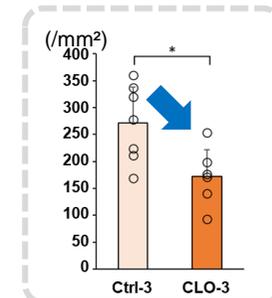
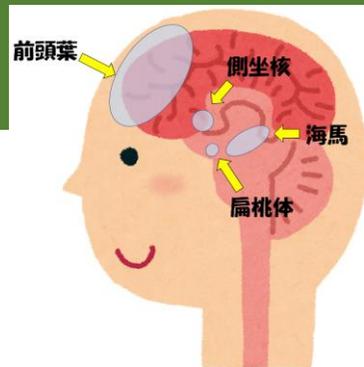
実験① 結果と考察

生後1~4日 (CLO-3) のCLO曝露

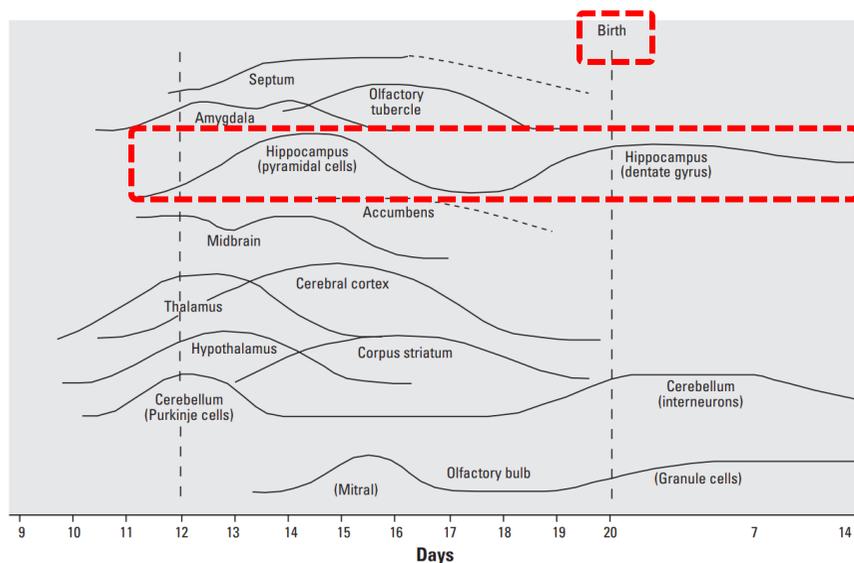
□ 網羅的遺伝子発現解析

幼年期 } : 海馬の神経突起・軸索の伸長・分枝が促進
成年期 }

- ・ “Neuritogenesis (神経突起形成)” や,
“Outgrowth of neurites (神経突起の伸長)” など
- ・ *Fgfr1* (線維芽細胞増殖因子受容体1)



適正な時期
の神経発達
を阻害



発達中のマウス脳における神経細胞の発生時期 [Rodier et al., 1977より]

海馬

神経新生・発達 は 生後も 継続



CLOは母体内で代謝・濃縮
され迅速に母乳中へ移行

[Shoda et al., 2023a]

海馬の神経発達に悪影響

実験① 結果と考察

生後1~4日 (CLO-3) のCLO曝露



海馬

情動行動を制御する重要な役割を担う

ヒト人工多能性幹細胞 (hiPSC) 由来脳オルガノイド
 出生前ニコチン曝露による早期の神経細胞分化, 神経突起の伸長
 [Wang et al., 2018]

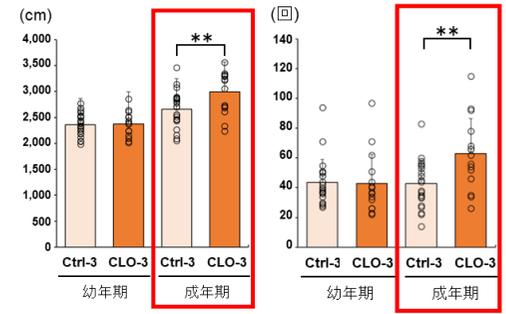
母性ニコチン曝露を受けたマウス産子
 認知・行動異常および分子層と海馬CA1の神経突起長の増加
 [Zhou et al., 2021]



本研究

生後1~4日のCLO曝露(CLO-3)

脳の神経突起や軸索の伸長・分枝に影響し, 成年期の行動異常に繋がる可能性



脳の神経回路形成期(胎子・新生子期)を4つの期間に分け、
無毒性量のCLO曝露による影響を発達段階別に評価

	曝露期間	幼年期	成年期	DCX陽性細胞数(成年期)
先行研究 [Maeda et al., 2021]	E1.5~PND21	不安様行動	多動	減少
本研究	E9~12	—	不安への影響	—
	E15~18	—	不安への影響	—
	PND1~4	—	多動	減少
	PND11~14	不安様行動	—	—

胎齢 9~12, 15~18日

成年期の不安レベルに影響

生後 1~4日

成年期の自発運動量増加

幼若神経細胞の減少

神経突起や軸索の伸長・分枝促進

脳の神経回路形成期(胎子・新生子期)における、
発達段階特異的な神経行動学的影響を初めて明らかにした

生後1~4日: CLO曝露による脳の発達への影響が最も大きい

[Shoda et al., 2023b (doi: 10.1292/jyms.22-0570)]

実験② 結果と考察

妊娠・授乳期のF0世代に無毒性量のCLOを曝露し、F1, F2, F3世代の神経行動学的な継世代影響を検証

評価	装置	項目	成年期		
			F1	F2	F3
自発運動量	OF	総移動距離	→	→	→
	OF	移動速度	→	→	→
	EPM	総移動距離	→	→	→
	EPM	アーム総進入回数	↓	↓	→
不安様行動	OF	中心区画滞在時間	→	→	→
	EPM	オープンアーム滞在時間	→	→	→
	EPM	オープンアーム進入割合	↑	→	→

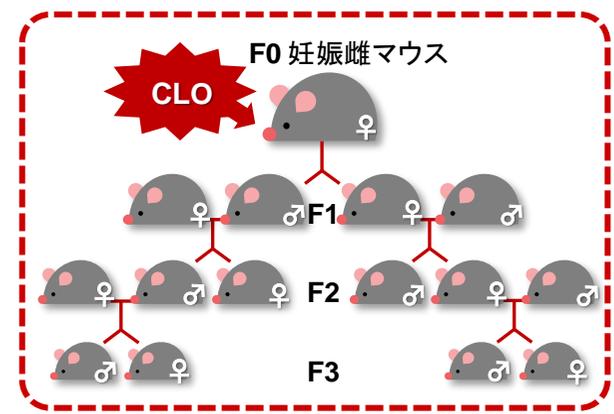
F1 自発運動量の**減少**
不安様行動の**増加**

F2 自発運動量の**減少傾向**
不安様行動の**増加傾向**

F3 自発運動量の**増加傾向**

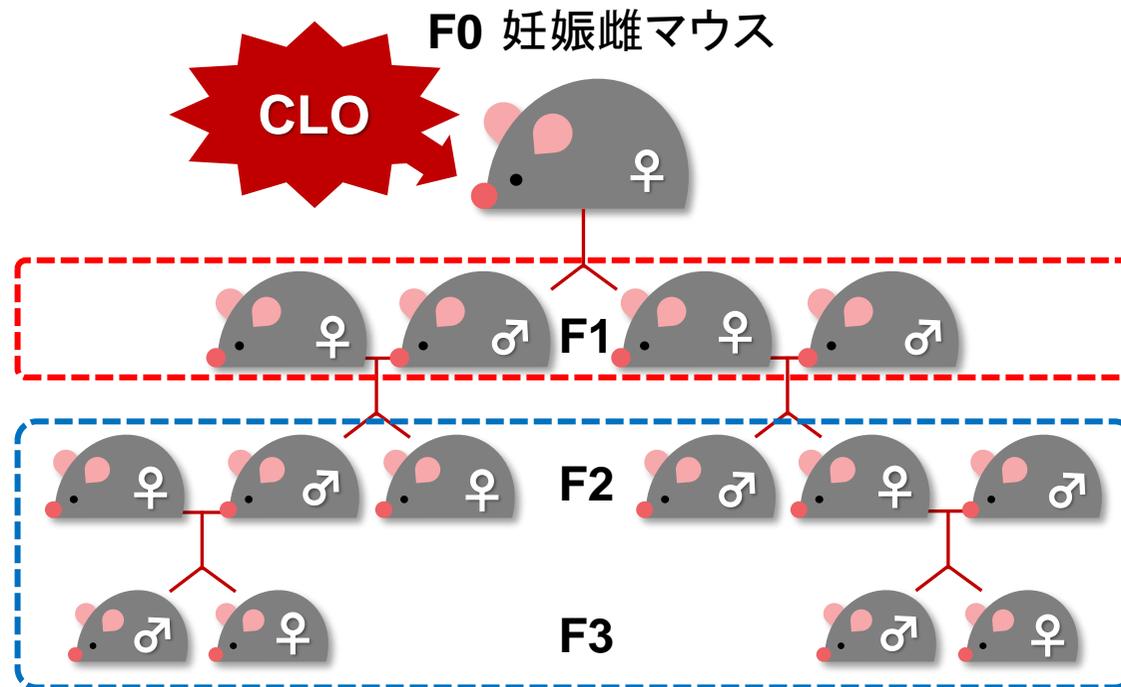
↑ 有意に増加 ↓ 有意に減少 → 変化なし
 → 増加傾向 ↓ 減少傾向 ※対照群との比較

➔ **無毒性量のCLOによる影響はF1・F2・F3へ世代を経ると減弱する**



[Shoda et al., 2023c (in press)]

神経回路形成期の時期特異的クロチアニジン(CLO)曝露影響と発達神経毒性の継世代評価



F1世代

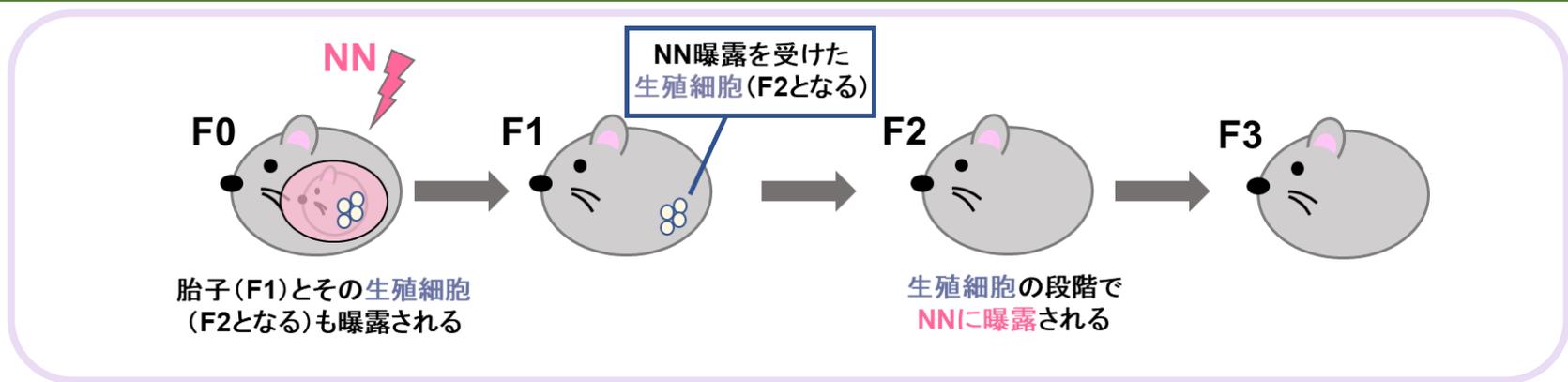
脳神経回路形成の**発達段階別の影響**が明らかとなった

F2・F3世代

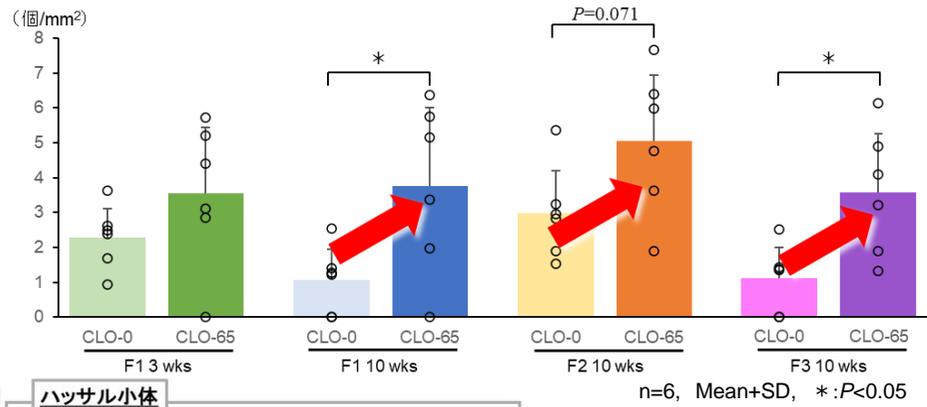
影響は波及するが、**世代を経ると減弱していく**

[Shoda et al., 2023b, c]

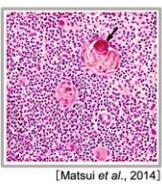
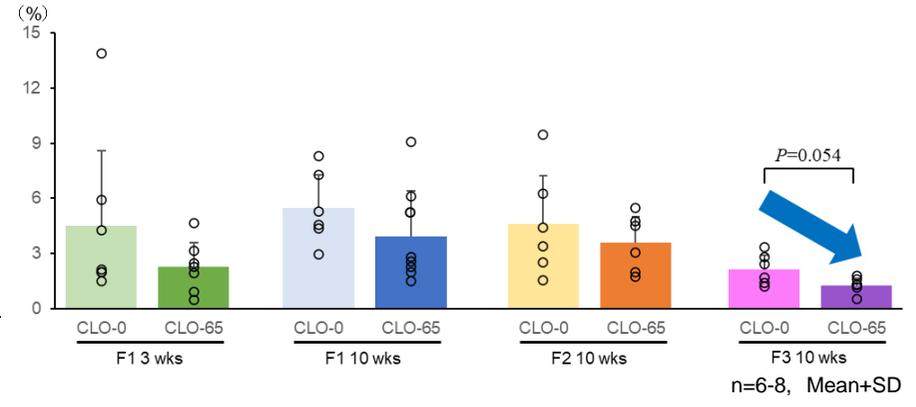
実験③ まとめ



ハツサル小体数



皮質 CD68陽性面積率



ハツサル小体
 ◆ 髄質特有の構造
 ◆ 自己寛容の成立に必須の役割を果たす核内因子AIREに依存して形成される
 ◆ 胸腺細胞の分化や成熟との関連性が示唆
 ◆ ハツサル小体数の増加は胸腺細胞の負の選択にも影響を及ぼし、胸腺細胞の分化・成熟を乱す可能性がある

細菌の相対存在量変動 (属レベル)

F3 10wks	<i>f__Lachnospiraceae_Unclassified</i>	減少傾向	Lachnospiraceaeは短鎖脂肪酸を産生する [Biddle et al., 2013]. IBDなど、様々な疾患との関連性が示唆されている [Vacca et al., 2020].
	<i>Lachnoclostridium</i>	減少傾向	酢酸, エタノール, CO ₂ , H ₂ を産生する [Yutin et al., 2013; Warnick et al., 2002].
	<i>Lachnospiraceae_UCG-001</i>	減少傾向	短鎖脂肪酸を産生し、この属を含む腸内細菌叢の組成変化は大腸炎症および腫瘍形成の抑制と関連する [Guo and Li, 2019].
	A2	増加	

[Murata et al., 2023]

実験③ 結果と考察(腸内細菌叢解析)

☑ 無毒性量のCLOが腸内細菌叢を攪乱した

☑ 複数の短鎖脂肪酸産生菌の相対存在量の変動した

先行研究と一致 [Onaru et al., 2020]

☑ 門レベルでの変動はみられなかった

☑ α 多様性に対する影響も顕著ではなかった

先行研究においても、無毒性量の投与群では細菌叢組成に大きな変化はみられなかった [Onaru et al., 2020]

実験③ 結果と考察(腸内細菌叢解析)

☑ 無毒性量のCLOが腸内細菌叢を攪乱した

☑ 複数の短鎖脂肪酸産生菌の相対存在量の変動した

先行研究と一致 [Onaru et al., 2020]

☑ 門レベルでの変動はみられなかった

☑ α 多様性に対する影響も顕著ではなかった

先行研究においても、無毒性量の投与群では細菌叢組成に大きな変化はみられなかった [Onaru et al., 2020]

実験③ 結果と考察(腸内細菌叢解析)

☑ 無毒性量のCLOが腸内細菌叢を攪乱した

☑ 複数の短鎖脂肪酸産生菌の相対存在量の変動した

無毒性量のCLOが腸内細菌叢に及ぼす影響は甚大ではないものの、**細菌叢組成を継世代的に変動させる**

[Murata *et al.*, 2023 (doi: 10.1292/jvms.23-0038)]

☑ α 多様性に対する影響も顕著ではなかった

先行研究においても、無毒性量の投与群では細菌叢組成に大きな変化はみられなかった [Onaru *et al.*, 2020]

化学合成農薬が一般に使用されるようになっておよそ**70年が過ぎました**。人類は漸く農薬の本当の姿を理解できるようになってきたのではないのでしょうか。

一般に**胎子および新生子**は成体と比べて化学物質等への**感受性が極めて高く**、非可逆的に脳・生殖機能、さらには胸腺・腸管免疫系を障害する可能性が示唆されています。環境中微量化学物質の作用メカニズムの解明は、**分子生物学的知見をもとに新しい時代に入った**といえますが、器官形成・発達時期である胎子・新生子期での曝露が、長期にわたって非可逆的にフィードバック機構の破綻を招来する作用機序については未だ不明な点が多くあります。

さらに近年、細胞世代を超えて継承され得る、塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現制御について研究する新たなパラダイムとして、**エピゲノム毒性**の領域が提唱され、環境中微量化学物質が生物に及ぼす環境エピゲノムの展開が期待されています。

「環境汚染と健康」の問題は**未来(次世代)に先送りしてはならない**し、「疑わしきは罰せず」ではすまされません。農薬との付き合い方を真剣に考えるときが来たと思っています。