

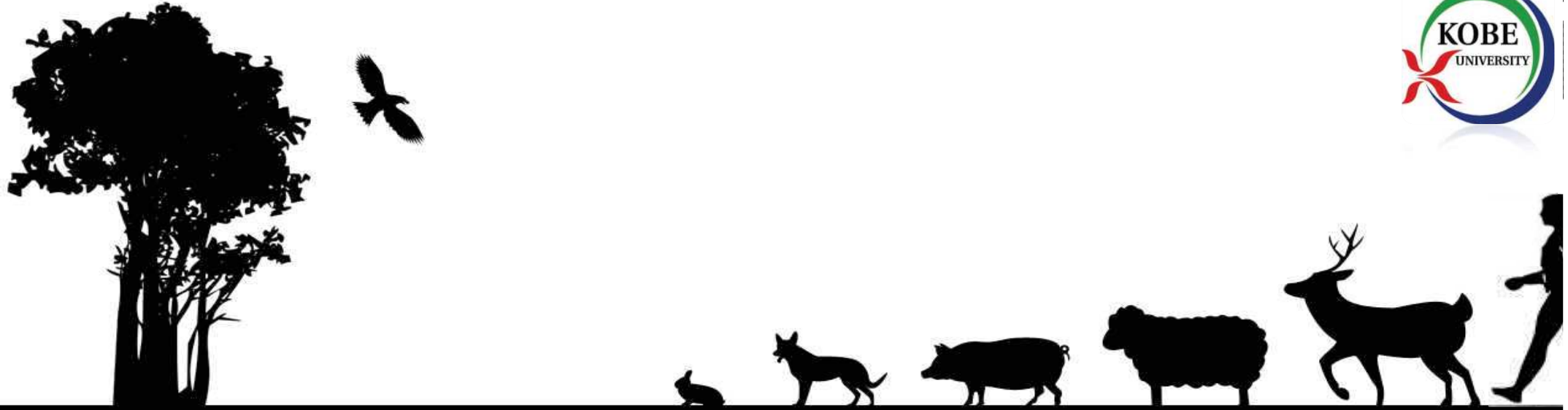


ネオニコチノイド系農薬シグナル毒性と 子供の発達

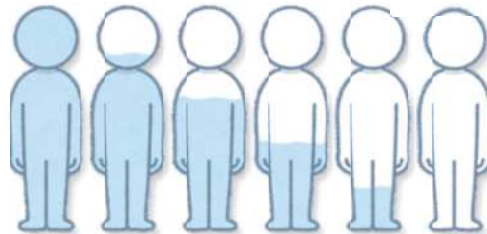


星 信彦

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)



『感受性』は同じではない！



環境要因に対する影響評価の難しさ

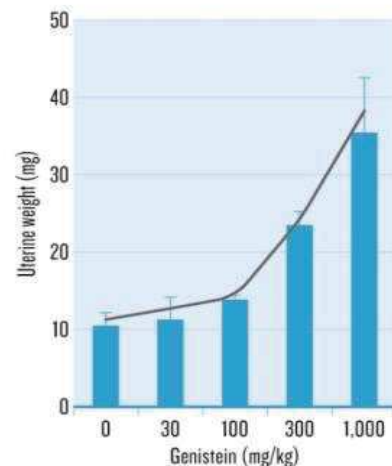
1. 非線形性

CURIOUS CURVES

Researchers have found that many endocrine-disrupting chemicals do not generate the standard monotonic dose-response curves seen for other types of compound.

MONOTONIC CURVE

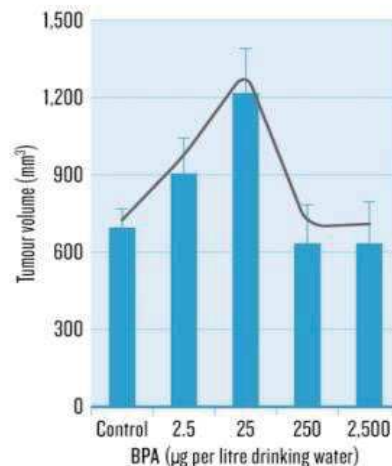
In some cases, dose and response increase together. The plant oestrogen genistein, for instance, causes the mouse uterus to increase in weight.



SOURCE: Ohto, R. et al. *J. Toxicol. Sci.* **37**, 879–889 (2012)

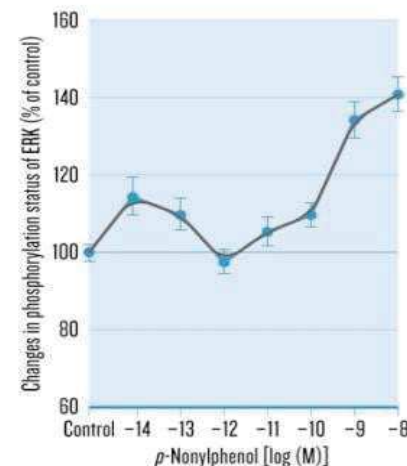
NON-MONOTONIC CURVES

Mice exposed to moderate doses of bisphenol A develop the largest tumours. Moderate and high doses are thought to induce tumour-cell proliferation, but high doses also trigger cell death.



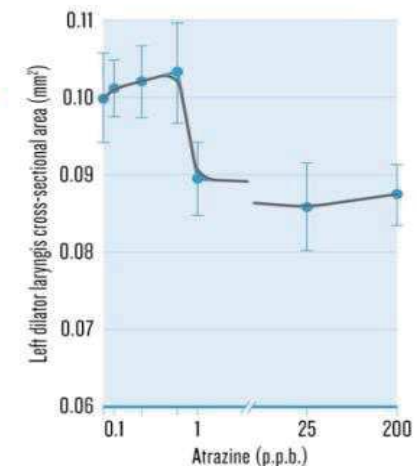
SOURCE: Jenkins, S. et al. *Environ. Health Perspect.* **119**, 1604–1609 (2011)

The oestrogen mimic *p*-nonylphenol stimulates the ERK cell-signalling pathway at low and high doses. Interactions with hormone receptors and other membrane proteins explain the complex shape of the curve.



SOURCE: Bulayeva, N. N. & Watson, C. S. *Environ. Health Perspect.* **112**, 1481–1487 (2004)

Above a certain dose, the herbicide atrazine causes the larynx muscle to shrink in male frogs. But the effect does not increase at higher doses.



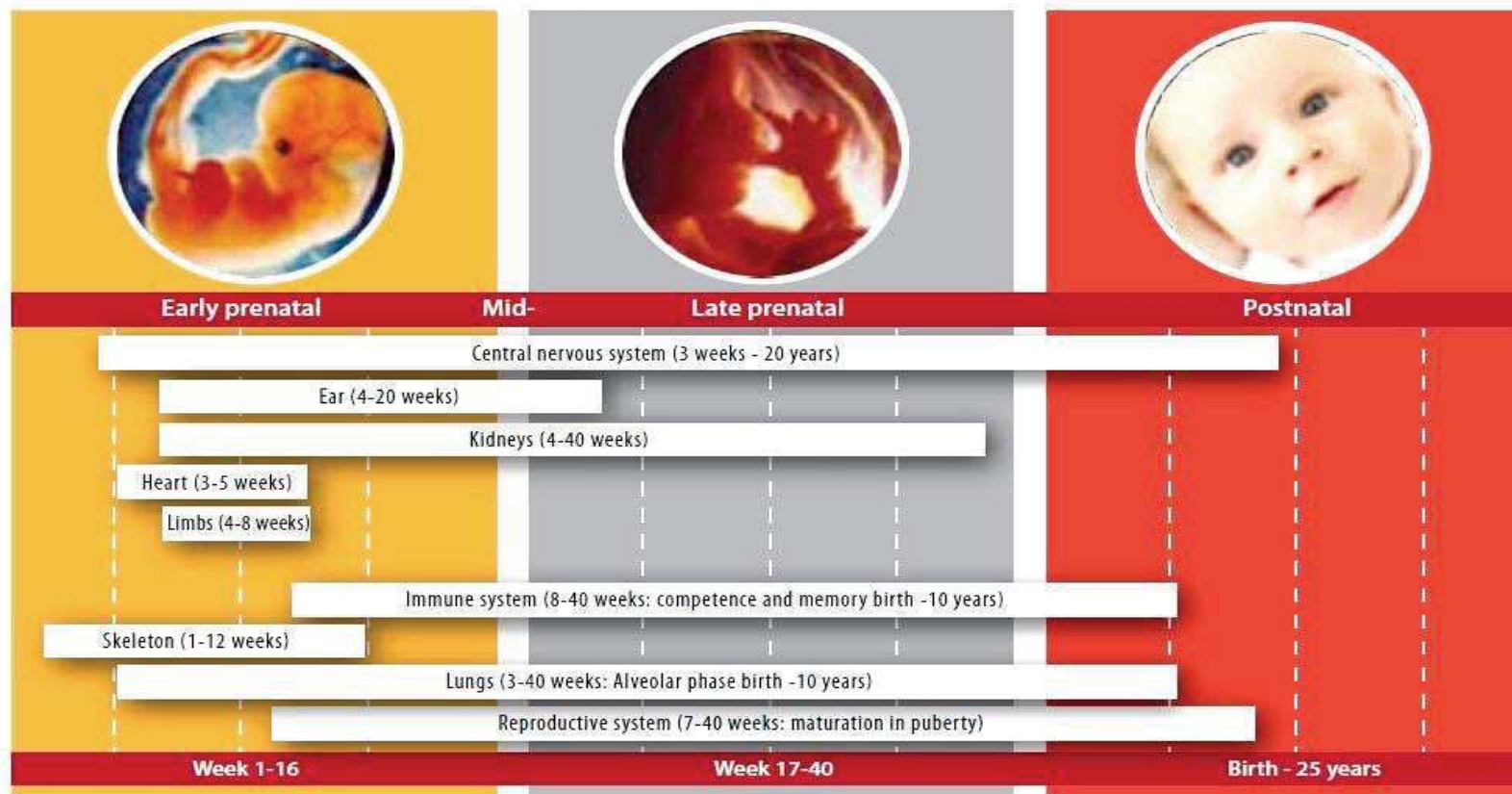
SOURCE: Hayes, T. A. et al. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 5476–5480 (2002).

[Dan Fagin, *Nature News Feature*, 2012]

用量反応曲線が直線的な反応を示すとは限らない

環境要因に対する影響評価の難しさ

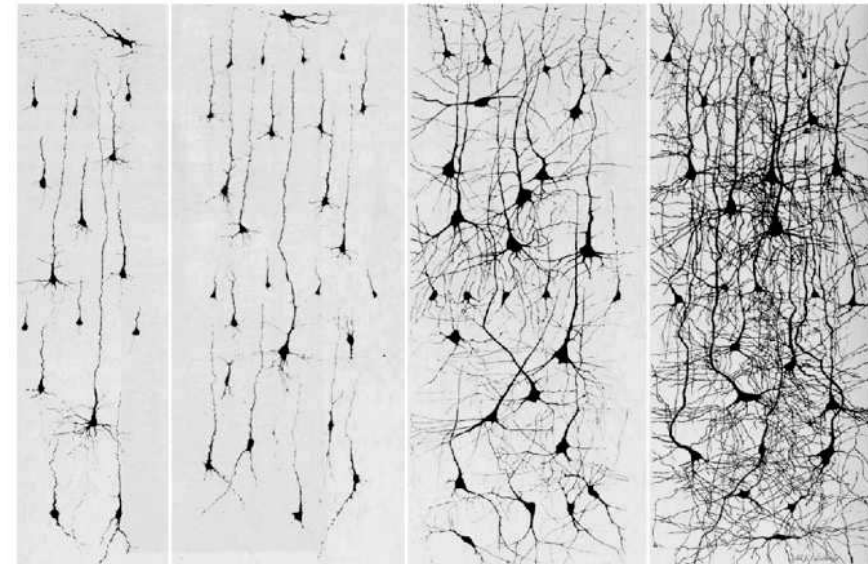
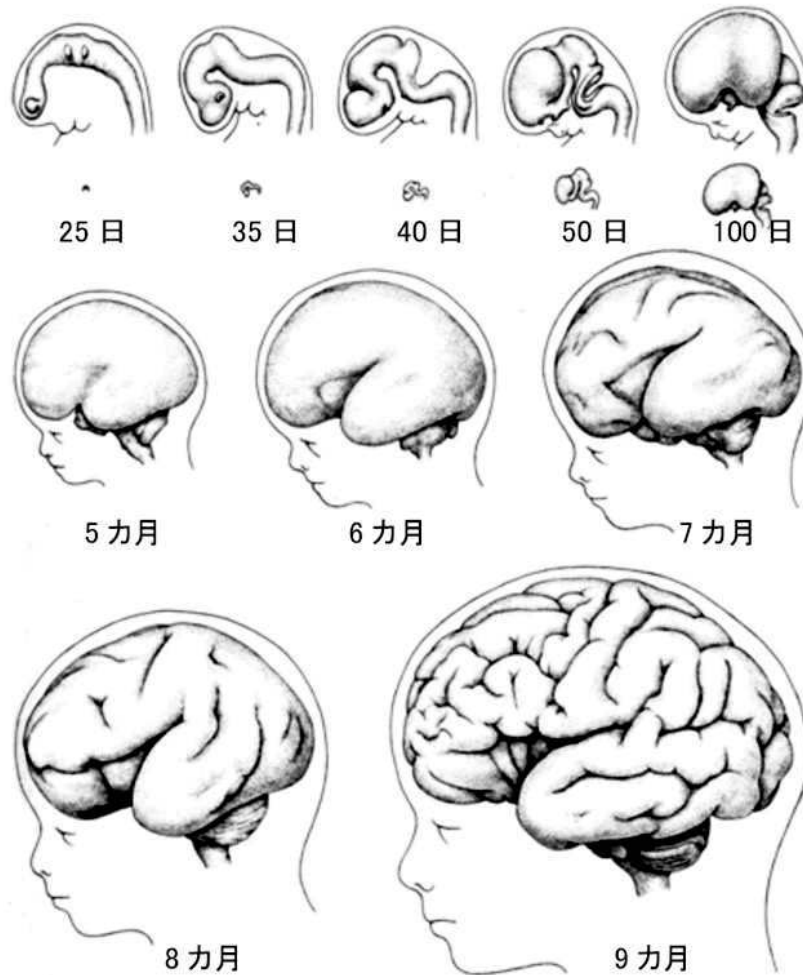
2. 時期特異性



State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals 2012 Summary for Decision-Makers
【WHO & UNEP】

「影響を受けやすい時期 (Critical point)」が存在する

胎児・子どもの脳の発達



出生直後 1 か月目 6 か月目 2 年目

B. 生後の大脳皮質の神経回路の発達

Courchesne, Neuron. 2007;56

A. 胎児の脳の発達 Cowan, Sci Am. 1979;241

脳の発達は、**胎児期も重要**だが、**出生後の発達**は脳の高次機能を担う神経回路網が出来る重要な時期.

環境要因に対する影響評価の難しさ

★ 3. 感受性(動物種差)

(Ex). TCDDの半数致死量 (LD50: $\mu\text{g}/\text{kg}$)

(ハムスターとモルモットで10,000倍違う!)



モルモット

~0.1



ラット

10



マウス

100



ハムスター

1000~

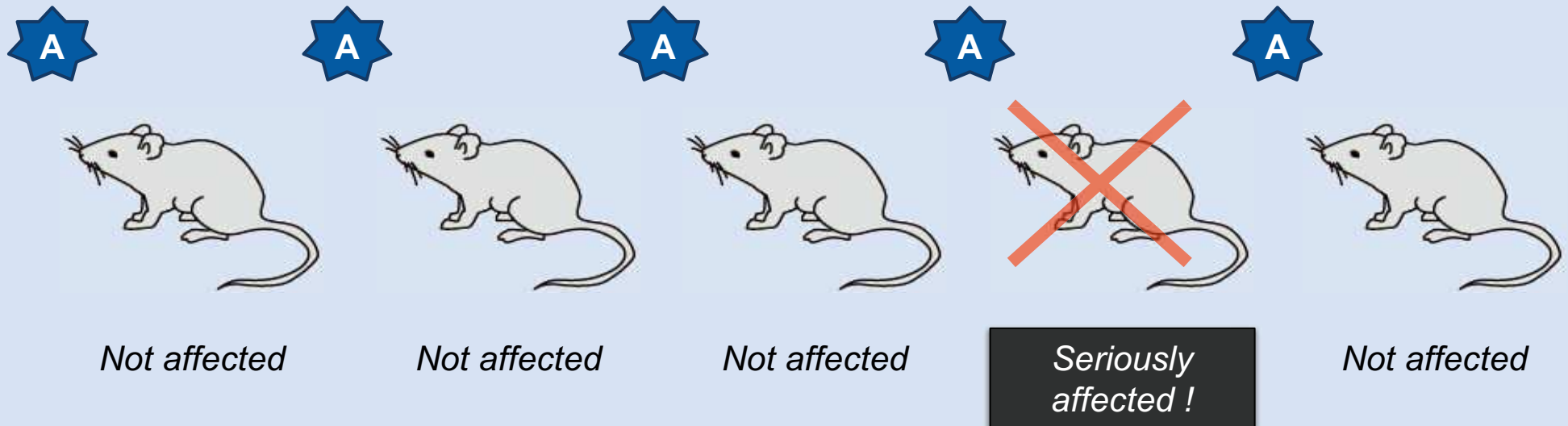


影響の受けやすさ(感受性)は動物種毎に大きく異なる

環境要因に対する影響評価の難しさ

★ 3. 感受性(個体差)

実験動物は基本的に99.99%遺伝的背景は均一



遺伝的に均一な集団においても
個体毎に影響の受けやすさ(感受性)が異なる場合がある



エピゲノムの差? 生体間地位から生じるストレス状態の差?

環境要因に対する影響評価の難しさ

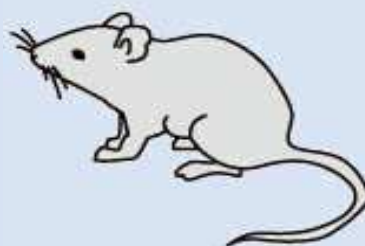
★ 4. 複合影響(複数化学物質)

A



Not affected

B



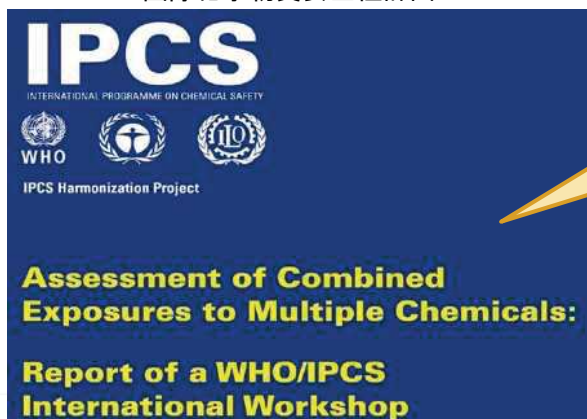
Not affected

A + B



Seriously affected !

International Program on Chemical Safety
国際化学物質安全性計画



低濃度(単独では影響なし)の環境化学物質も
複合曝露により毒性を発現する例が存在

複合的影響評価の必要性

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

★企画の背景・目的

ネオニコチノイド系農薬(NN)

- ①浸透性
- ②残効性
- ③選択毒性

- ・ニコチンに類似した構造
- ・昆虫のアセチルコリン受容体(nAChR)に結合

神経の持続興奮, 殺虫効果

NNとnAChRの親和性
哺乳類<<昆虫
[Tomizawa & Casida, 2003]

食物中残留基準値の緩和
[厚生労働省, 2015, 2016, 2017]

日常的なNNへの曝露
[Harada et al., 2016]

尿中にNN検出
[Ikenaka et al., 2019; Ueyama et al., 2015]

NNは哺乳類のnAChRを介して, 神経興奮を引き起こす
[Kimura-Kuroda et al., 2012]

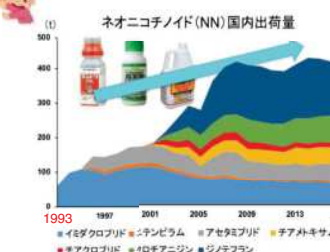
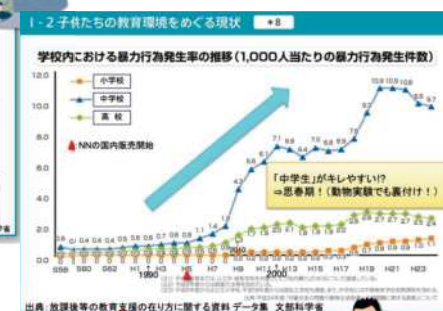
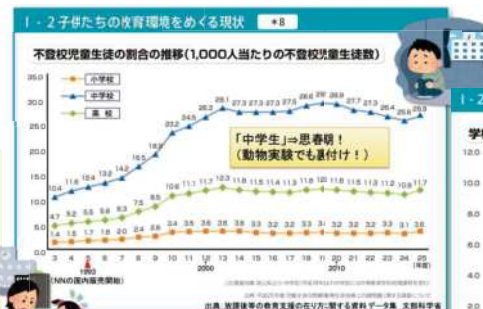
NNは哺乳類の行動・恒常性の維持に影響を及ぼす

クロチアニジン(CLO)の曝露 → マウスの不安様行動増加・異常啼鳴・加齢影響
[Hirano, ...[Hoshi, 2015, 2018, 2019, 2021](#); [Maeda, ...\[Hoshi, 2020\]\(#\)](#); [Hoshi, 2021](#)]

ジノテフランの胎子期～発達期曝露 → マウスへの抗うつ作用・自発運動量の増加
[[Takada, ...\[Hoshi, 2018, 2020\]\(#\)](#); [Yoneda, ...\[Hoshi, 2018\]\(#\)](#)]

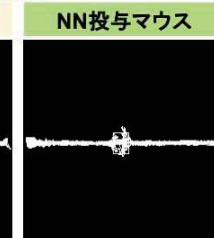
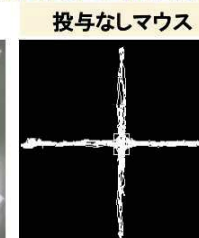
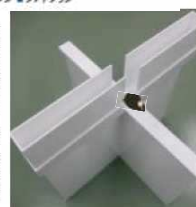
CLO経口投与 → 腸内細菌叢・胸腺の異常&農薬原体&代謝産物の胎子移行
[[Onaru, ...\[Hoshi, 2020\]\(#\)](#); [Ohno, ...\[Hoshi, 2020\]\(#\)](#); [Hoshi, 2021](#)]

哺乳類への詳細なリスク評価が急務!!!



哺乳類の情動変容

高架式十字迷路



不安↑

神経回路形成期の時期特異的ネオニコチン曝露影響と発達神経毒性の継世代評価

★企画の概要

➤ DOHaDと継世代影響

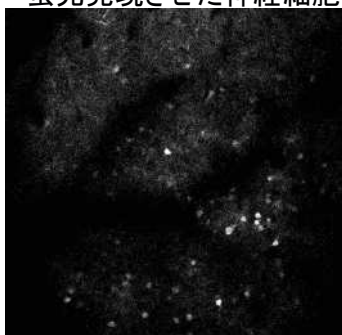
(成人病胎児期発症起源説)

- ◆ **農薬毒性試験の無毒性量(NOAEL)濃度以下**で、認知情動変容を誘発するネオニコチノイドを妊娠マウス(F₀)に曝露し、そのF₁, F₂, F₃世代(4世代)に、オープンフィールド試験(OF), 高架式十字迷路試験(EPM), 高架式プラットホーム試験(EOP), 明暗往来試験, バーンズ迷路試験(BM), 新規物体認識記憶試験(NOR)等の認知情動行動テスト, あるいはストレス・アレルギー負荷を実施する(**フィジウム解析**).

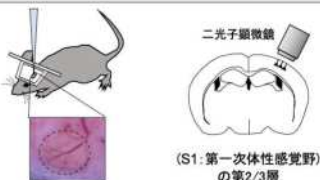
◆ メタボローム・トランスオミクス解析

- ◆ 光遺伝学(オプトジェネティクス)を用いて細胞活動, シグナル伝達, 遺伝子・分子発現, を操作. 機能発現に伴う構造変化・活動を再現し, 遺伝子発現プロファイリングから, 異常行動誘発メカニズムの解明を推し進めるとともに, それらの項目ごとに定量化手法を確定し, 対応する神経科学的な異常の基準値として設定する.

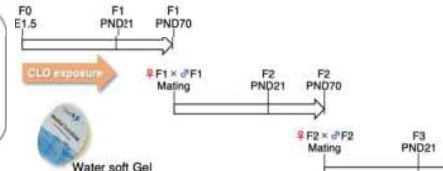
蛍光発現させた神経細胞



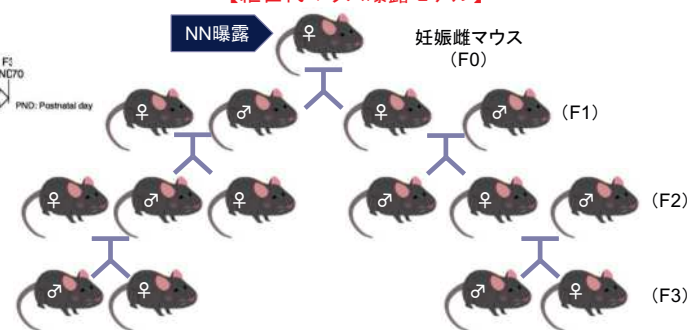
アデノ随伴ウイルスベクター
AAV1-hSyn-GCaMP6f
(GCaMP6f: 蛍光Ca²⁺インディケータ)



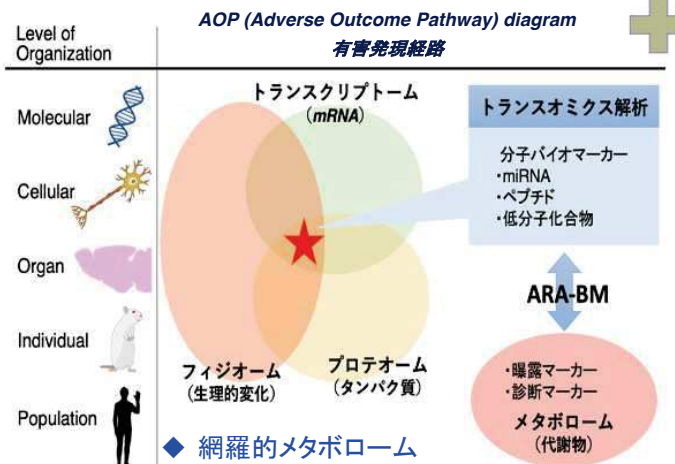
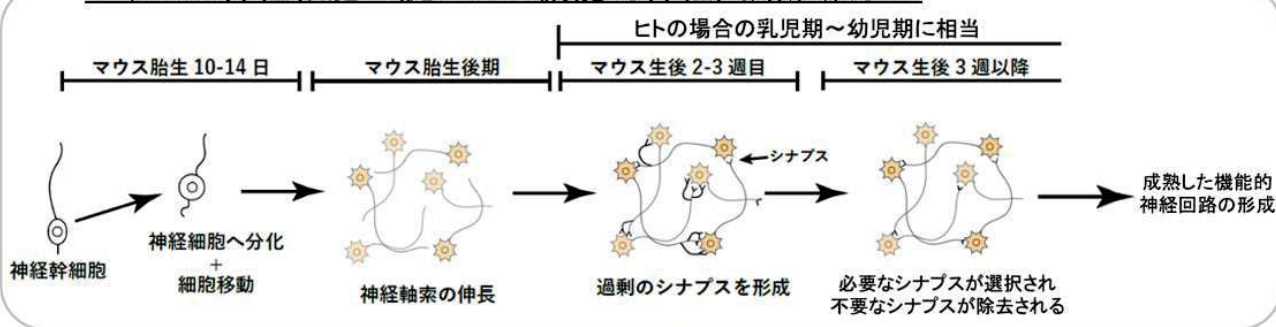
[Nishi, ..., Hoshi, et al., 2012]



【継世代マウス曝露モデル】



マウスの神経細胞の誕生から機能的神経回路形成まで

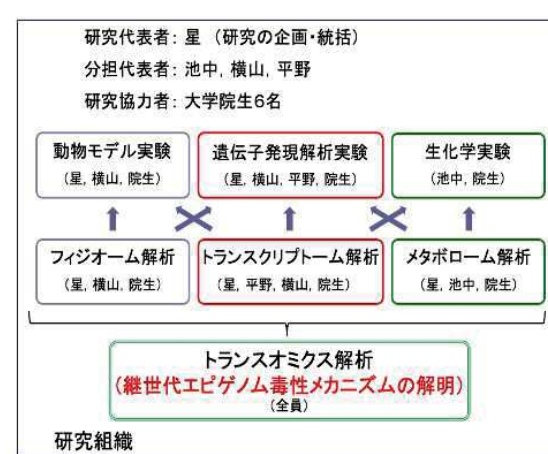


◆ 網羅的メタボローム

> 変動する代謝物の洗出

◆ 超高感度定量的ターゲットメタボローム

> 極低濃度代謝物の定量的ターゲット分析



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

★企画に求められる成果

ヒトやマウスにおいてNNの母子間移行



妊婦・新生児の尿および母乳からNNを検出
[López-García et al., 2017; Ichikawa et al., 2019; Chen et al., 2020]

母獣から胎子へNNおよび代謝産物が迅速に移行
[Ohno et al., 2020]

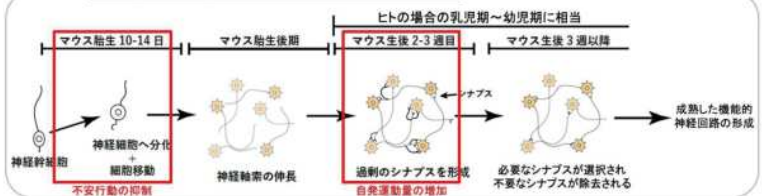
NNの次世代影響が懸念



胎児・授乳期の環境は将来の健康や病気へのリスクに強く影響することが明らかに(DOHaD仮説)
[Ishido et al., 2004; Alkam et al., 2017; Sha et al., 2021]

胎児・授乳期のNN曝露のリスク評価が求められる

マウスの神経回路形成と時期特異的曝露影響



幼年期(3週齢)

パスウェイ解析

カルシウムシグナリングの低下
nAChR α4
Ca²⁺チャネル
アデニル酸シクラーゼ
↓
Chrna4
Cacna1b-1g
Adcy1

nAChR α4 (Chrna4遺伝子)

カルシウムシグナリングを活性化 [Fucile et al., 2004]

Cacna遺伝子

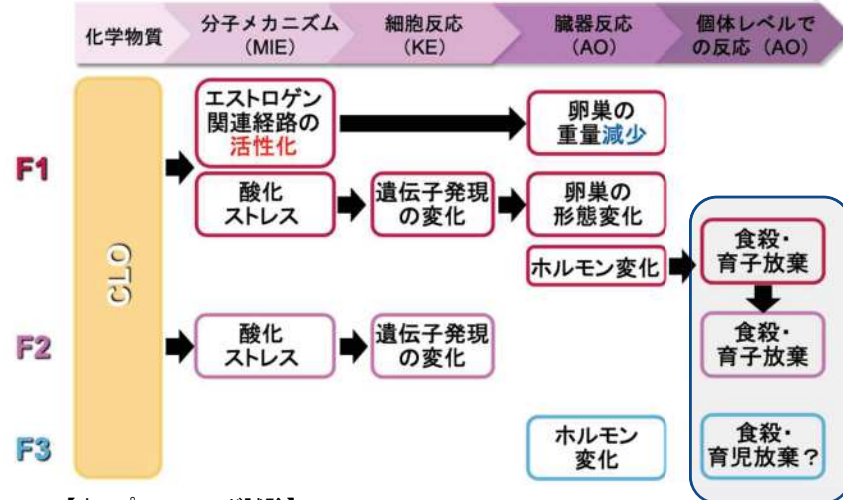
不安が主症状の精神疾患患者において低発現
(うつ病・統合失調症等) [Green et al., 2011; Sen et al., 2008]

ラット小脳培養細胞へのNN曝露

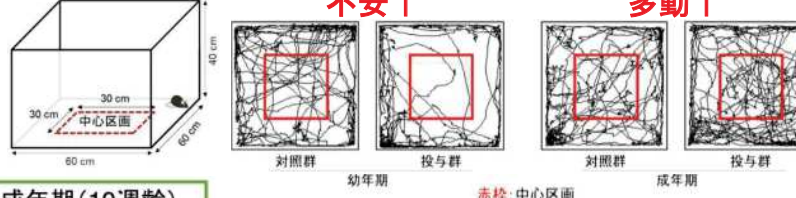
カルシウムシグナリング低下 / 樹状突起形成減少 [Kimura-Kuroda et al., 2016]

胎児・授乳期のCLO曝露がnAChRの発現低下を介してカルシウムシグナリングを阻害し、不安様行動を惹起させた可能性

AOP (有害発現経路)



【オープンフィールド試験】



成年期(10週齢)

免疫組織化学的解析

c-fos: 増加傾向

DCX・NeuN: 減少

胎児・授乳期CLO曝露の影響が成年期の海馬において継続

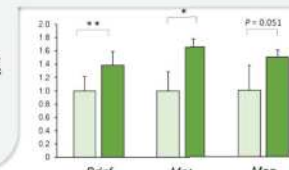
網羅的遺伝子発現解析

神経およびオリゴデントロサイトの分化促進

ミエリン関連因子

脳由来栄養因子

Mag
Mog
Bdnf



注意欠如・多動性障害(ADHD)

BDNFの血漿レベル増加

[Shim et al., 2008]

Bdnfの多型が高頻度に検出

[Friedel et al., 2005; Cho et al., 2010]

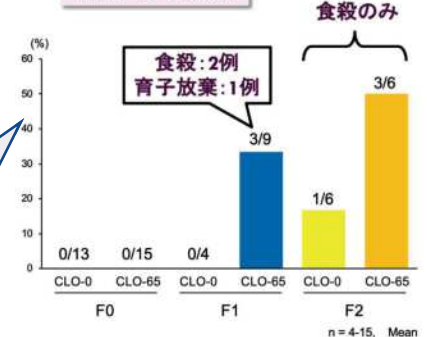
BDNF分解に働くホルモンの発現低下

[Budziszewska et al., 2010]

胎児・授乳期のCLO曝露による、オリゴデントロサイトおよびBDNF発現の促進により、多動が惹起した可能性

継世代影響

食殺・育子放棄

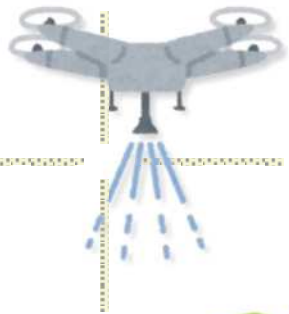


【焦点となる社会的課題】

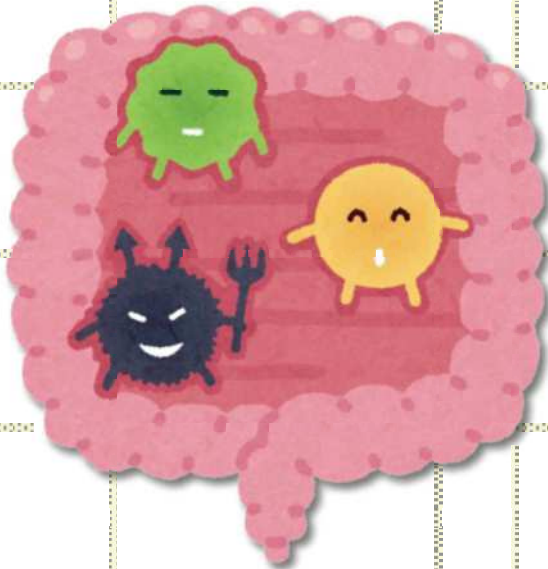
母親(F0世代)が妊娠中に化学物質の曝露を受け、その化学物質が胎盤を通過する場合には胎子(F1)に速やかに到達し、胎子も曝露を受ける(次世代影響)。胎子の体内の生殖細胞、すなわち孫世代(F2)をつくる生殖細胞にも到達し、そのF2世代に何らかの影響があらわれる可能性がある(多世代影響)。更に、化学物質に直接曝露されることがないにもかかわらずF3以降の世代にも影響が出る例が報告され始めている(継世代影響)。それらの多世代・継世代影響のメカニズムはどのようなものであろうか。神経回路形成期を4期に分けてその影響を検証を行い、発達神経毒性の新たな視点から毒性評価を行う必要がある。

→我々はこれまでにネオニコチノイドをはじめとする浸透性農薬(クロチアニジン、ジノテフラン、アセタミプリド、フイプロニル)のNOAEL量での動物実験を行い、①発達神経毒性、②免疫毒性、③性差、④年齢差影響を明らかにしてきた。すなわち、NOAELが真の意味で「無毒性量ではない」という点が最大の社会課題。

現状の毒性試験の問題点をより明確にする！より簡便な新規バイオマーカーを提案する！



哺乳類の腸内細菌叢 (microbiota) に与える影響？



アレルギーの鍵は“腸”にあり



★「腸」は免疫力を司る(全身の免疫本部) →母乳によってスタート
(抗菌活性因子, 免疫性因子, ビフィズス菌増殖因子)

- 免疫細胞: 全身に2兆個 → その7割を腸に配備
- 腸内細菌 (100兆個, 1,000種類) & 免疫細胞(絨毛内部) 最初に接触する母親の細菌叢 (腸内, 腔内, 皮膚)の影響を大きく受ける
- 免疫細胞の訓練所: **M細胞**が外来異物を取り込み, 「味方」と「敵」を免疫細胞に教える! その訓練を終えた免疫細胞は腸から全身へ戦士となって出て行く

代表的な腸内細菌

- ・ビフィズス菌: 整腸
- ・バクテロイデス菌: 脂肪吸収, 肥満防止
- ・クロストリジウム(100種)

★「腸」の異常 → 免疫の暴走(アレルギー, 自己免疫疾患)

免疫細胞を異常興奮させる物質を放出
特定の腸内細菌の減少

- ・**クロストリジウム** & **ラクトバチルス**(乳酸菌)
- ・多発性硬化症: 原因は脳 ← 免疫細胞が脳を攻撃 (自閉症との関係)
- ・腸の異常(クロストリジウム, バクテロイデス)

一般成人の腸内細菌構成の例

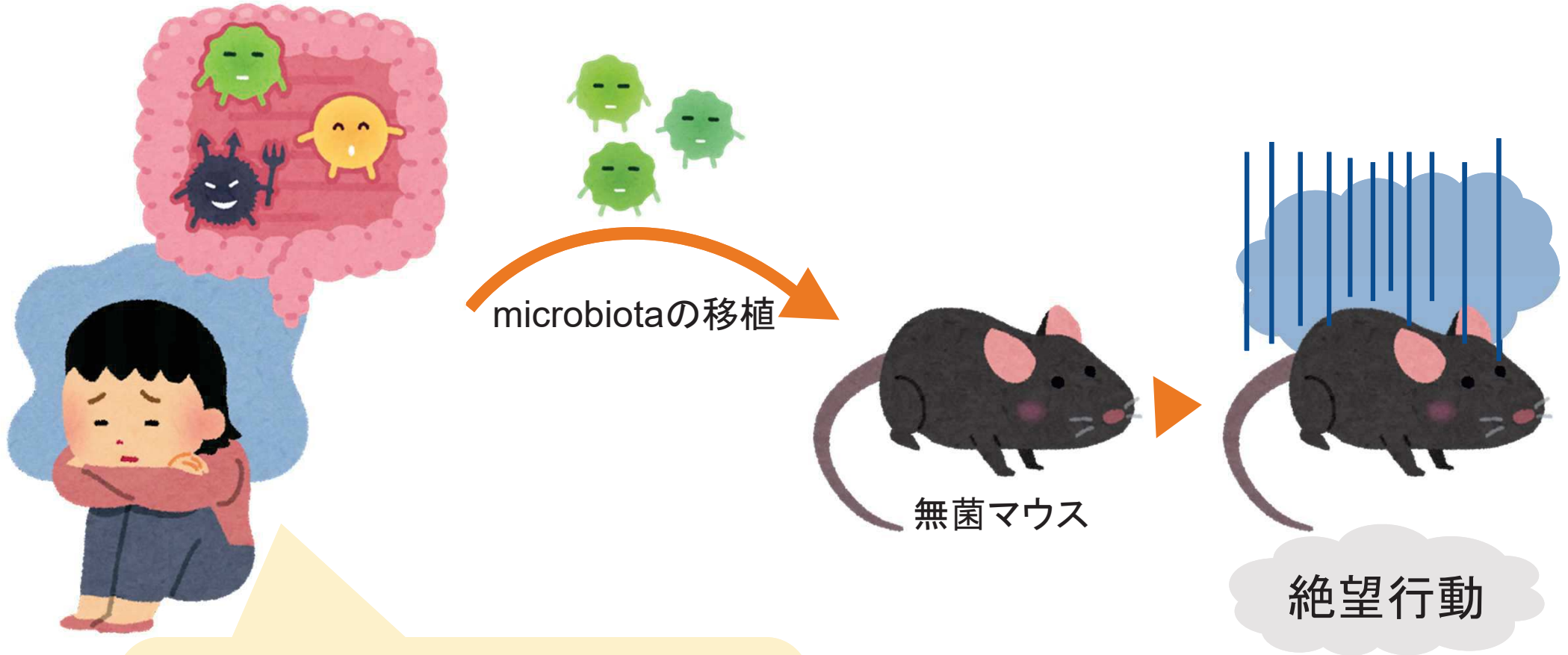
バクテロイデス	50%
ビフィズス菌	15%
嫌気性球菌	15%
ユウバクテリウム	10%
クロストリジウム	10%

★**Tレグ**は「腸」で産生される & **クロストリジウム菌**が鍵(メッセージ物質を放出)

- ←坂口志文教授(阪大免疫学フロンティアセンター):「全く違う役割」の免疫細胞(**制御性T細胞, Treg**)の発見
- 暴走を止める(免疫の抑制役) ← クロストリジウム菌のうちの**17種類を混合**しマウスに与えると**Tregが増える**
- アレルギー性疾患にならない!

★修行僧(總持寺@神奈川) → 食物繊維中心の食事 → アレルギーが減少
(酪酸菌の餌になる)

Microbiotaの変化はストレスによる絶望行動 の発症と関連する



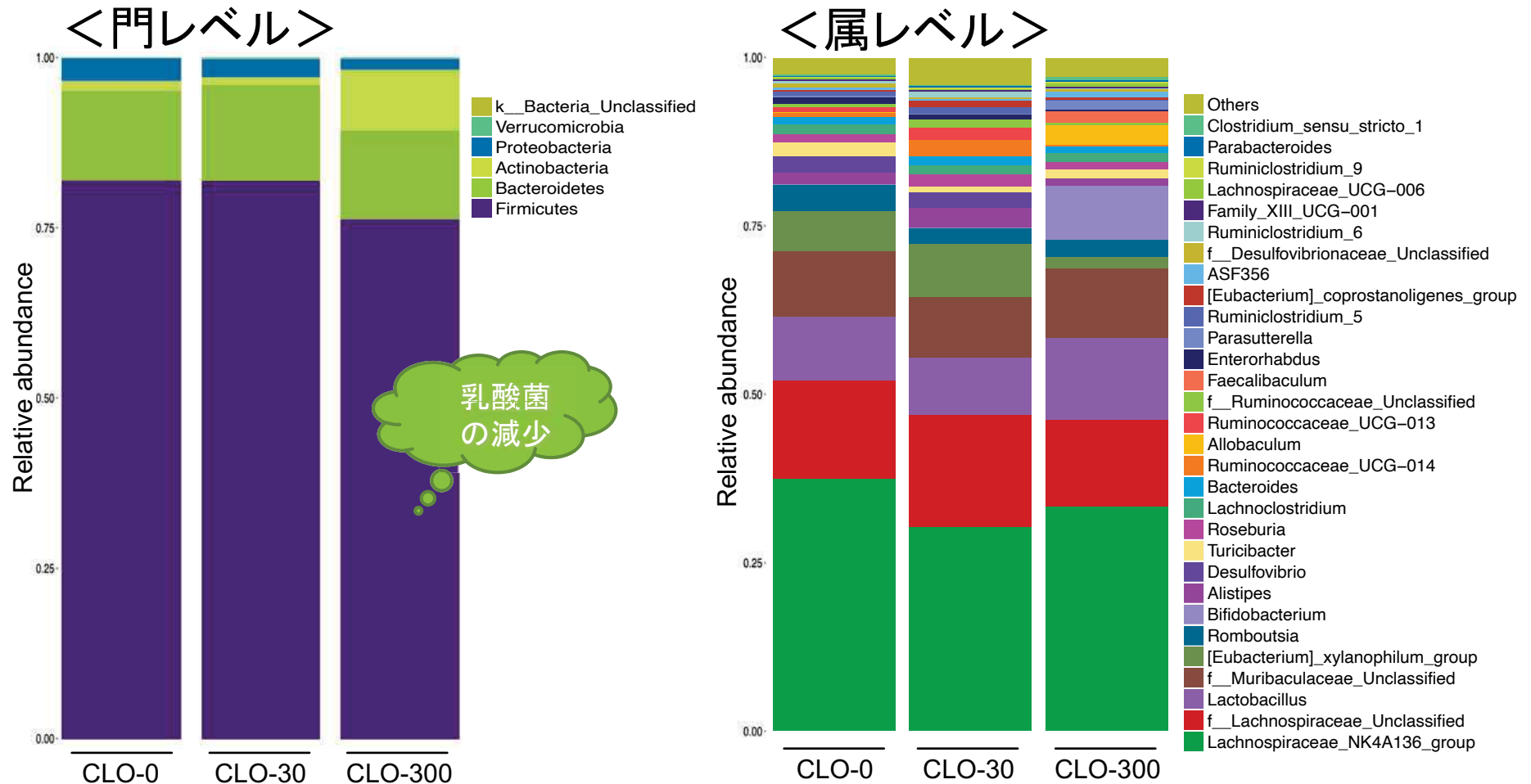
うつ病患者では
microbiotaの異常 (dysbiosis)
が観察される

Zheng P *et al.*, Gut microbiome remodeling induces depressive-like behaviors through a pathway mediated by the host's metabolism. *Mol Psychiatry*. 21:786–796 (2016)

Kelly JR *et al.* Transferring the blues: depression-associated gut microbiota induces neurobehavioural changes in the rat. *J. Psychiatr. Res.* 82, 109–118 (2016)

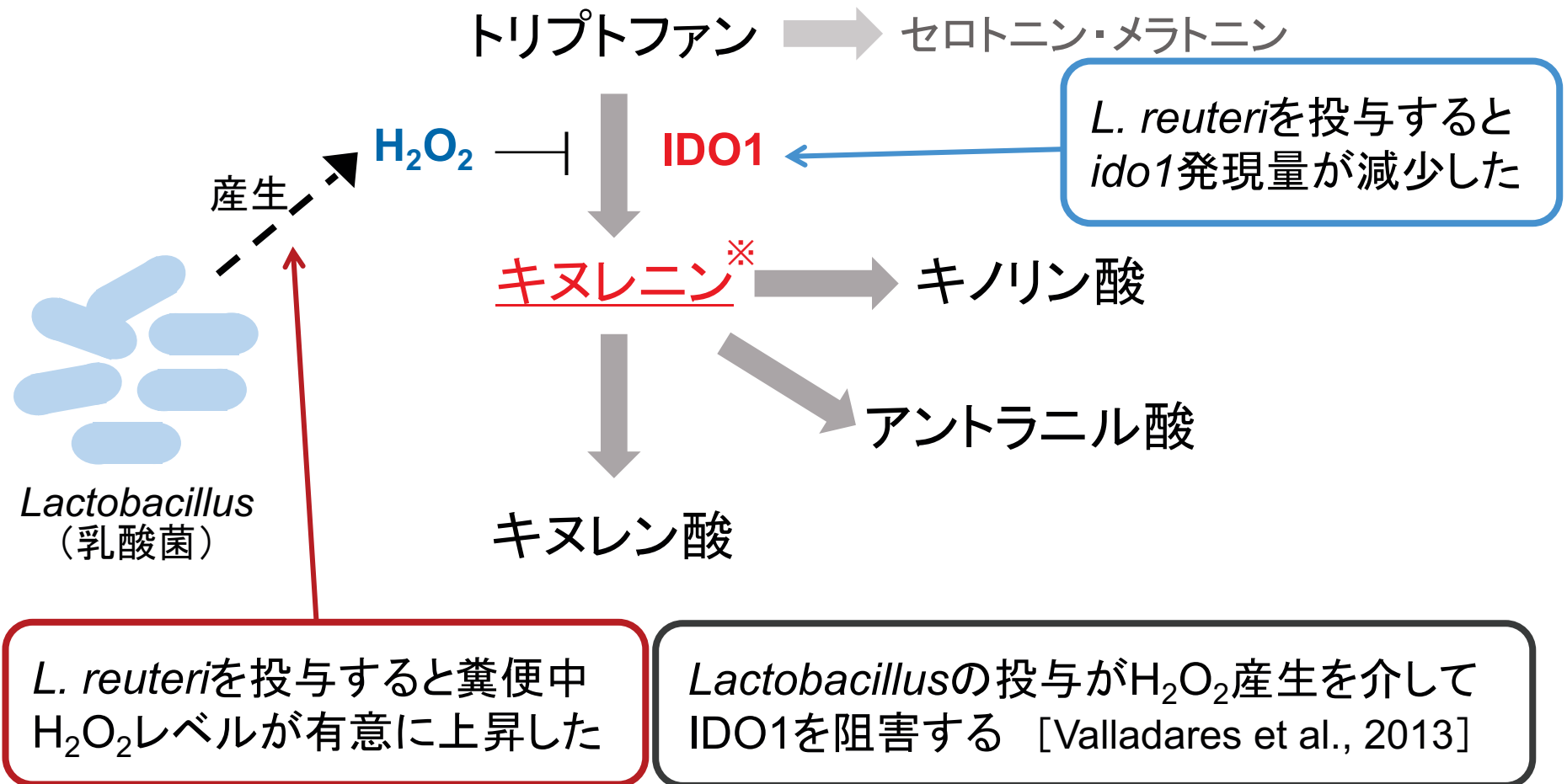
結果 腸内細菌叢解析

OTU (97%以上一致する配列を一つの菌種とした分類単位) 相対存在量



CLO-300群において、
門および属レベルともに腸内細菌叢の変動が認められた

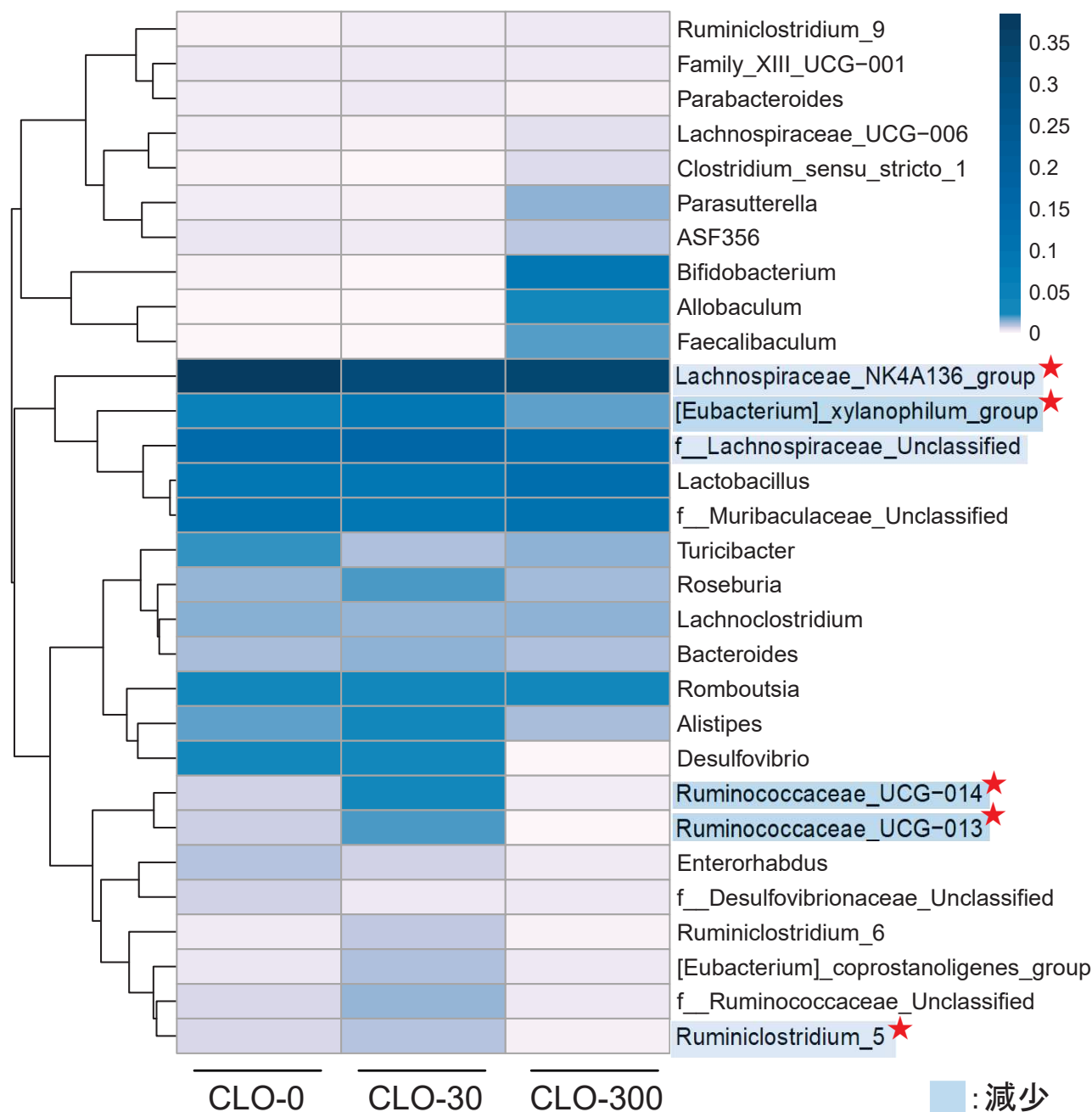
乳酸菌の減少がdysbiosisを起こす



※ 血液脳関門を通過後、神経伝達物質のバランスを崩して神経炎症を促進し、中枢神経において抑うつ状態を引き起こす

結果と考察

OTU相対存在量



CLOにより
属レベルで変動した細菌

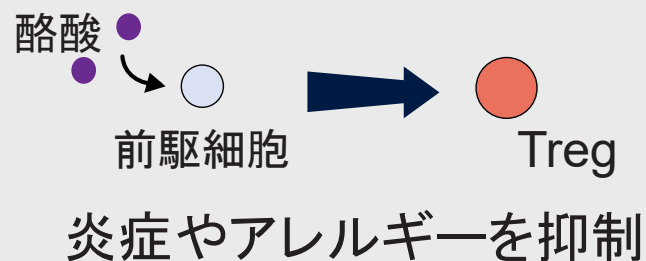


「上皮性炎症反応」
「短鎖脂肪酸の産生」

とくに, CLO-300群では
酪酸産生菌(属)★が減少

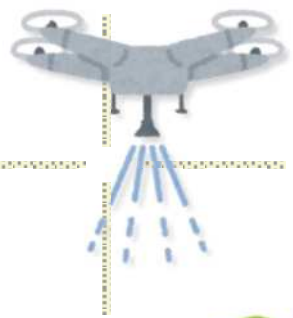
炎症性腸疾患患者の特徴

[Manichanh *et al.*, 2006; Sokol *et al.*, 2009]



[Furusawa *et al.*, 2013]

免疫系の恒常性の攪乱



農薬の母子間移行

ヒトやマウスにおいてNNの母子間移行



妊婦・新生児の
尿および母乳中から
NNを検出

[López-García *et al.*, 2017; Ichikawa
et al., 2019; Chen *et al.*, 2020]

母獣から胎子へ
NNおよび代謝産物が
迅速に移行

[Ohno *et al.*, 2020]



NNの次世代影響が懸念

胎児・授乳期



成人期



胎児・授乳期の環境は将来の健康や病気への
リスクに強く影響することが明らかに (DOHaD仮説)

[Ishido *et al.*, 2004; Alkash et al., 2017; Sha *et al.*, 2021]



胎児・授乳期のNN曝露のリスク評価が求められる

胎子期



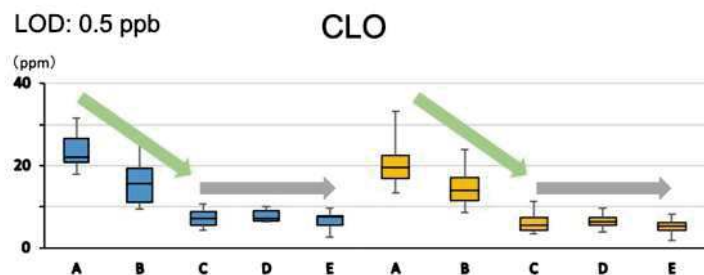
授乳期



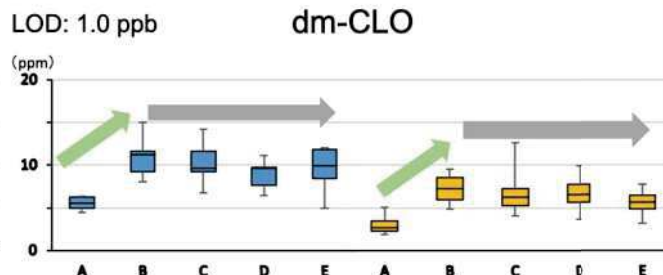
クロチアニジン&その代謝物の胎盤移行

結果：母獣(■)と胎子(■)において検出濃度および動態はほぼ同等

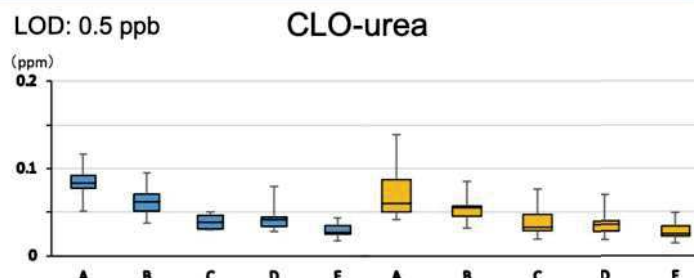
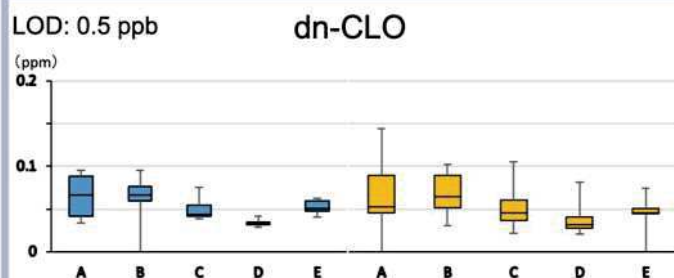
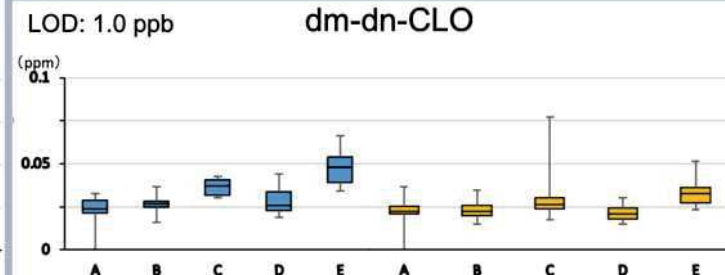
※回収率は80%以上、血液5 μlから検出



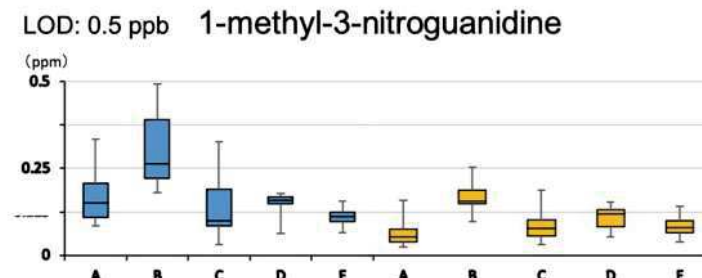
・経時的な減少, 連日投与による濃度変化なし



・3時間後まで増加, 代謝産物の中で最も高い

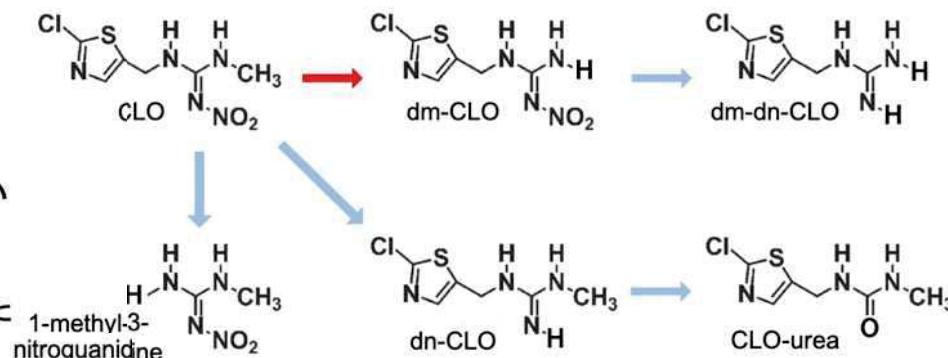


・検出濃度がdm-CLOの数百から数千分の一



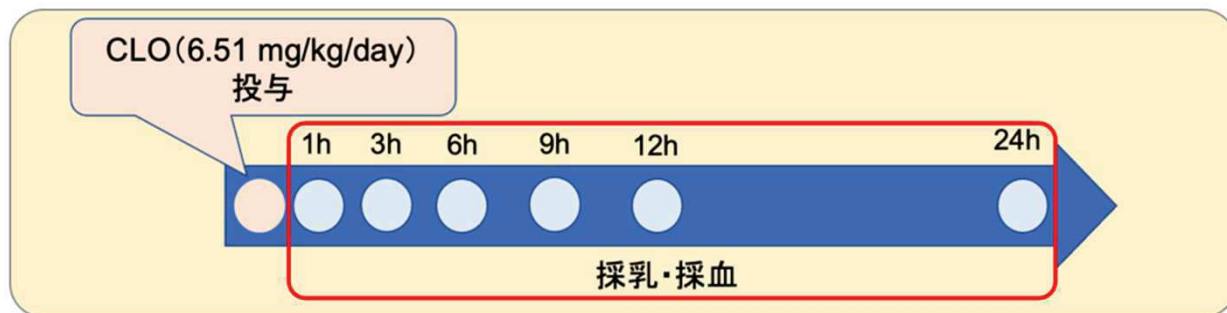
考察

- ◆胎子においてCLOが検出された
→CLOの胎子移行が初めて定量的に確認された
- ◆CLOの検出濃度および動態：母獣≒胎子
→CLOは胎盤関門を極めて迅速に通過する
- ◆CLOの経時的な減少, dm-CLOの増加, 代謝産物の中でdm-CLOの濃度が最も高い
→CLOは体内に入った後, 速やかにデスメチルCLOに代謝される
- ◆dn-CLOが検出された
→哺乳類の受容体に対する親和性がより高い代謝産物が生成されることがわかった
- ◆母獣と胎子で検出(曝露)濃度がほぼ同等
→より化学物質に対する感受性の高いとされる胎子への影響が懸念される

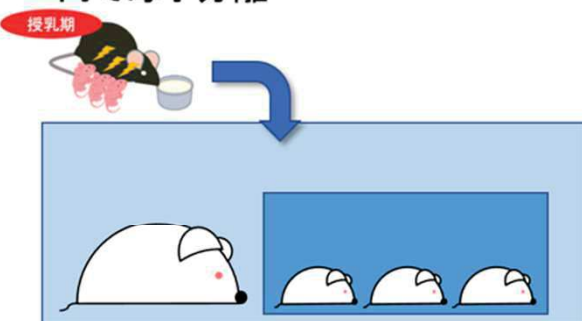


[Ohno, ..., Hoshi *et al.*, 2020]

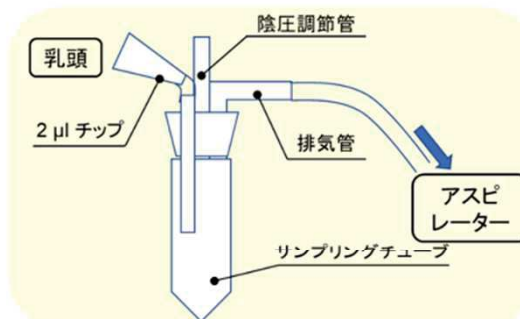
クロチアニジン&その代謝物の母乳移行



◆ 採乳の1~5時間前には同一ケージ内で母子分離



◆ 搾乳器による採乳



実際にCLOが母乳を介して乳子に摂取される影響を考慮すると、
乳子の1日の哺乳量を調べ、理論的摂取量を計算する必要がある

