



# Molecular morphological study of the environmental factors and neurobehavioral change

Takada, Tadashi

---

(Degree)

博士（農学）

(Date of Degree)

2020-03-25

(Date of Publication)

2021-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7793号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007793>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



## 博士論文内容の要旨

氏 名 \_\_\_\_\_ 高田 匡 \_\_\_\_\_

専攻・講座 \_\_\_\_\_ 資源生命科学専攻・応用動物学講座 \_\_\_\_\_

論文題目 (外国語の場合は、その和訳を併記すること。)

Molecular morphological study of the environmental factors and neurobehavioral change

(環境因子と神経行動変化に関する分子形態学的研究)

指導教員 \_\_\_\_\_ 星 信彦 \_\_\_\_\_

現代社会において、我々は環境化学物質を含む様々なストレス因子(社会的・物理的・化学的ストレス)に曝されており、とくに近年、WHO、米国科学アカデミー、米国小児科学会等、農業と発達障害との因果関係を示唆する報告が集積されつつある。しかしながら、発症メカニズムとしては、個々の持つ素因に様々なストレスが複合し、閾値を越えた際に症状が顕在化することや、これらの環境要因は組合せにより互いの影響を相相乗的に強め合う例や不顕性化する例が報告されている。2011年にはWHOが複合曝露評価に対するFrameworkを公表する等、複合的な曝露現状を反映した影響評価の必要性が指摘されている。

1980年代に開発された新規農業ネオニコチノイド(NN)は、昆虫のニコチン性アセチルコリン受容体(nAChRs)に対して選択的アゴニスト作用を示し、持続的神経興奮を惹起させる。その利便性から、2000年代以降、急速に使用量が増加したが、世界各地で発生した蜂群崩壊症候群の原因物質として指摘され、つい最近では、ウナギやワカサギ激減の要因としてNature誌やScience誌に掲載され、注目を集めた。NNは哺乳類神経細胞のnAChRsに対しても結合能を有し、異常興奮反応を引き起こす[Kimura-Kuroda *et al.*, 2012]とともに、NNの空中散布による「うつ」症状を伴う患者症例が報告された[Taira, 2014]ことを端緒に、NNと注意欠如/多動症(AD/HD)、うつ病、学習障害との因果関係が問題視され、ヒトを含めた脊椎動物に対する不測の影響が懸念されている。このような状況の中で、EUは2013年に予防原則に基づき3種のNNを暫定使用禁止とした一方で、我が国においてはもともと欧米に比べて規制の緩かった食品中の農業残留基準値をさらに緩和するという相反した対応がみられ、NNに対する影響評価は国際レベルで急務となっている。これまでに所属研究室では、NNの一種クロチアニジン(CTD)による鳥類および哺乳類の生殖機能障害および神経発達障害に関する報告[Tokumoto *et al.*, 2013; Hoshi *et al.*, 2014; Hirano *et al.*, 2015, 2018, 2019; Yanai *et al.*, 2017]を行ってきた。そこで本論文では、CTDよりも新しい種類のNNであり、NNのうち国内出荷量が最大であるジノテフラン(DIN)について、哺乳動物への影響を検証する為に、我々が日常的に曝露されている環境化学物質および環境ストレス等の環境要因が生体の神経行動機能に与える影響を多角的に解析し、そのメカニズムを考察した。

第I章では、通常飼育条件下のマウスに対するDINの影響を検証した。ヒトをはじめ動物は、食品(あるいは餌)中に含まれる農業を日常的に摂取している。「食品を」「日常的に」という点に注目して、「離乳直後の」マウス(C57BL/6N)に「慢性的に」ジノテフランを投与している。DINの最大無作用量550mg/kg/dayを参照し、投与濃度が0, 100, 500, 2,500mg/kg/dayとなるように投与群(DIN-0, DIN-100, DIN-500, DIN-2500)を設定し、自由飲

(氏名： 高田 匡 NO. 2 )

水による投与を行った。神経行動変化の観察には、抗うつ薬の判定指標としてしばしば利用される、尾懸垂試験 (TST) および強制水泳試験 (FST) を行った後、脳を摘出し背側縫線核におけるセロトニン (5-HT) の発現を免疫組織学的に解析した。その結果、TST において DIN による不動時間の有意な短縮が認められ、5-HT 陽性細胞数では増加傾向が認められた。これらの結果から、農業評価書に表示されている無作用量以下の短期間投与であっても、通常飼育条件下で幼若期からのマウスが神経行動変化を示すことならびにその作用機序の一端を初めて示すことができた。これらの研究成果の一部について、The Journal of Veterinary Medical Science 誌において既に公表している [Takada, *et al.*, 2018].

第II章では、ストレス負荷条件下のマウスに対する DIN の影響を第I章同様、無作用量以下で検証した。生後 4~8 週齢の間、C57BL/6N 雄マウスに対し 6 種のストレスのうち 1 日 2 種ずつ組み合わせを変えて負荷した。「ストレス負荷マウス」および「非ストレス負荷マウス」に対し、DIN の投与濃度が 0, 500, 2,500 mg/kg/day となるように投与群 (DIN-0, DIN-500, DIN-2500) を設定し、自由飲水による DIN 投与を行った。8 週齢時に情動変容を調べるオープンフィールド試験 (OFT), ならびに TST および FST を行った後、脳を摘出し正中および背側縫線核における 5-HT およびその合成酵素であるトリプトファンヒドロキシラーゼ 2 (TPH2), ならびに黒質および腹側被蓋野におけるチロシンヒドロキシラーゼ (TH) の発現を免疫組織学的に解析した。さらに、それぞれのマウスの血液サンプル中の DIN およびコルチコステロンの濃度を測定した。非ストレス負荷マウスでは、DIN 投与によって OFT の総移動距離の変化は認められず、DIN-2500 における TST の不動時間の減少および DIN-500 における FST の不動時間の増加ならびに DIN-500, DIN-2500 における背側縫線核の 5-HT 発現の増大、DIN-2500 における背側縫線核の TPH2 発現の増大、DIN-500, DIN-2500 における黒質の TH 発現の増大が認められた。また、DIN-0 のストレス負荷単独曝露マウスでは DIN-0 の非ストレス負荷マウスと比較して、OFT の総移動距離の増加、TST における不動時間の減少、FST における不動時間の増加、ならびに背側縫線核の 5-HT および TPH2 発現の増大、黒質における TH 発現の増大が認められた。一方で、ストレス負荷と DIN の複合曝露マウスでは、単独曝露マウス同様に、ストレスマーカーであるコルチコステロン濃度が上昇したにもかかわらず、単独曝露群で認められた変化が打ち消された。以上の結果より、DIN は哺乳動物のストレス状態によって異なる影響を与える「神経毒性作用の多面性」ならびにストレスホルモン濃度を上昇させる「内分泌かく乱作用」を有することを初めて示した。これらの研究成果の一部について、The Journal of Veterinary Medical Science 誌において既に公表している [Takada, *et al.*, 2020].

(氏名： 高田 匡 NO. 3 )

以上のように、本研究は「無作用量」という従来の毒性試験から算出された値の安全性・信憑性に一石を投じたものであり、農業の安全性・リスク評価の上で、現在その評価基準項目から除外されている生体の神経行動学的変化を評価することの重要性を示すものである。加えて、神経作用を有する化学物質の重要な新規エンドポイントを示唆し、今後も生み出され続ける環境化学物質に対する新規リスク評価システムおよびバイオマーカーの開発ならびにヒトを含む動物の保全について重要な知見を与えるものとなる。

氏名	高田 匡		
論文 題目	Molecular morphological study of the environmental factors and neurobehavioral change (環境因子と神経行動変化に関する分子形態学的研究)		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	星 信彦
	副査	教授	上曾山 博
	副査	教授	吉川 潮
	副査		
			印

## 要 旨

## 概要

現代社会において、我々は環境化学物質を含む様々なストレス因子（社会的・物理的・化学的ストレス）に曝されており、とくに近年、WHO、米国科学アカデミー、米国小児科学会等、農薬と発達障害との因果関係を示唆する報告が集積されつつある。しかしながら、一卵性双生児が同一の疾患を発症しない例や、特定の高感受性集団においてのみ影響が顕在化する化学物質過敏症等の例が示すように、その発症メカニズムとして、個々の持つ素因に様々なストレスが複合し閾値を越えた際に症状が顕在化することや、これらの環境要因は組合せにより互いの影響を相加相乗的に強め合う例や不顕性化する例が報告されていることから、2011年にはWHOが複合曝露評価に対するFrameworkを公表する等、複合的な曝露現状を反映した影響評価の必要性が指摘されている。

1990年代に市販の開始された新規農薬ネオニコチノイド(NN)は、昆虫のニコチン性アセチルコリン受容体(nAChRs)に対して選択的アゴニスト作用を示し、持続的神経興奮を惹起させる。その利便性から、2000年代以降、急速に使用量が増加したが、世界各地で発生した蜂群崩壊症候群の原因物質として指摘され、つい最近では、日本においてウナギやワカサギが激減している要因としてもNature誌やScience誌に掲載され、注目を集めた。NNは哺乳類神経細胞のnAChRsに対しても結合能を有し、異常興奮反応を引き起こすとともに、NNの空中散布による「うつ」症状を伴う患者症例が報告されたことを端緒に、NNと注意欠如/多動症(AD/HD)、うつ病、学習障害との因果関係が問題視され、ヒトを含めた脊椎動物に対する不測の影響が懸念されている。このような状況の中で、EUは2013年に予防原則に基づき3種のNNを暫定使用禁止とした一方で、我が国においてはもともと欧米に比べて規制の緩かった食品中の農薬残留基準値をさらに緩和する相反した対応がみられ、NNに対する影響評価は国際レベルで急務となっている。これまでに所属研究室では、NNの一種クロチアニジン(CLO)による鳥類および哺乳類の生殖機能障害および神経発達障害に関する報告を行ってきた。そこで本論文では、CLOよりも新しい種類のNNであり、NNのうち国内出荷量が最大であるジノテフラン(DIN)について、哺乳動物への影響を検証するために、我々が日常的に曝露されている環境化学物質および環境ストレス等の環境要因が生体の神経行動機能に与える影響を多角的に解析し、そのメカニズムを考察している。

第I章では、通常飼育条件下のマウスに対するDINの影響を検証した。ヒトをはじめ動物は、食品(あるいは餌)中に含まれる農薬を日常的に摂取している。「食品を」「日常的に」という点に注目して、「離乳直後の」マウス(C57BL/6N)に「慢性的に」ジノテフランを投与している。DINの最大無作用量550 mg/kg/dayを参照し、投与濃度が0, 100, 500, 2,500 mg/kg/dayとなるように投与群(DIN-0, DIN-100, DIN-500, DIN-2500)を設定し、自由飲水による投与を行った。神経行動変化の観察には、抗うつ薬

氏名	高田 匡
<p>の判定指標としてしばしば利用される、尾懸垂試験(TST)および強制水泳試験(FST)を行った後、脳を摘出し背側縫線核におけるセロトニン(5-HT)の発現を免疫組織学的に解析した。その結果、TSTにおいてDINによる不動時間の有意な短縮が認められ、5-HT陽性細胞数では増加傾向が認められた。これらの結果から、農薬評価書に表示されている無作用量以下の短期間投与であっても、通常飼育条件下で幼若期からのマウスが神経行動変化を示すことならびにその作用機序の一端を初めて示すことができた。</p> <p>第II章では、ストレス負荷条件下のマウスに対するDINの影響を第I章同様、無作用量以下で検証した。生後4~8週齢の間、C57BL/6N雄マウスに対し6種のストレス(①絶食[24時間]、拘束[1時間/日]、③床敷を濡らす[24時間]、④ケージ振盪[30分/日]、⑤ケージ傾斜[1時間/日]、⑥暗期の照明点灯)のうち1日2種ずつ組み合わせを変えて負荷した。「ストレス負荷マウス」および「非ストレス負荷マウス」に対し、DINの投与濃度が0, 500, 2,500 mg/kg/dayとなるように投与群(DIN-0, DIN-500, DIN-2500)を設定し、自由飲水によるDIN投与を行った。8週齢時に情動変容を調べるオープンフィールド試験(OFT)、ならびにTSTおよびFSTを行った後、脳を摘出し正中および背側縫線核における5-HTおよびその合成酵素であるトリプトファンヒドロキシラーゼ2(TPH2)、ならびに黒質および腹側被蓋野におけるチロシンヒドロキシラーゼ(興奮性シグナル伝達作用の指標)の発現を免疫組織学的に解析した。さらに、それぞれのマウスの血液サンプル中のDINおよびコルチコステロンの濃度を測定した。非ストレス負荷マウスでは、DIN投与によってOFTの総移動距離の変化は認められず、DIN-2500におけるTSTの不動時間の減少およびDIN-500におけるFSTの不動時間の増加が観察された。また、DIN-500, DIN-2500における背側縫線核の5-HT発現、DIN-2500における背側縫線核のTPH2発現およびDIN-500, DIN-2500における黒質のTH発現の増大が認められた。また、DIN-0のストレス負荷単独曝露マウスではDIN-0の非ストレス負荷マウスと比較して、OFTの総移動距離の増加、TSTにおける不動時間の減少、FSTにおける不動時間の増加、ならびに背側縫線核の5-HTおよびTPH2発現の増大、黒質におけるTH発現の増大が認められた。一方で、ストレス負荷とDINの複合曝露マウスでは、単独曝露マウスと同様に、ストレスマーカーであるコルチコステロン濃度が上昇したにもかかわらず、単独曝露群で認められた変化が打ち消された。以上の結果より、哺乳動物に対するDINの影響は、ストレス状態によって変化すること(DINの神経毒性作用の多面性)、ならびにDINはストレスホルモン濃度を上昇させる点で内分泌かく乱作用を有することを初めて示すことができた。</p> <p>以上のように、本研究は、従来認識されていなかった複数の環境要因間に存在する複合影響を、実際の生活様式に準ずる形で哺乳動物が神経行動変化を起こすことを初めて示したものであり、環境化学物質と環境影響という複合要因により生体のストレス反応性が上昇するという観点から複合影響メカニズムの一端を解明したものとして高く評価できる。さらに、「無作用量」という従来の毒性試験から算出された値の安全性・信憑性に一石を投じたものでもあり、農薬の安全性・リスク評価の上で、現在その評価基準項目から除外されている生体の神経行動学的変化を評価することの重要性を示すものである。加えて、神経作用を有する化学物質の重要な新規エンドポイントを示唆し、今後も生み出され続ける環境化学物質に対する新規リスク評価システムおよびバイオマーカーの開発、ならびにヒトを含む動物の保全について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、学位申請者の高田 匡氏は、博士(農学)の学位を得る資格があると認める。</p>	