

研究課題

ゼブラフィッシュ胚を用いた化学物質の発達神経毒性評価法と高感度バイオマーカーの開発

研究代表者 久保田 彰 (帯広畜産大学獣医学研究部門)

共同研究者 Chen Xing (帯広畜産大学大学院畜産学研究科)

川合 佑典 (帯広畜産大学獣医学研究部門)

野見山 桂 (愛媛大学沿岸環境科学研究センター)

田上 瑠美 (愛媛大学沿岸環境科学研究センター)

研究背景と目的

中枢神経系に対する毒性は、致死を含む重大影響に直結しうる。とりわけ、化学物質に対する感受性の高い胚発生期における曝露は次世代(胚・胎児)の神経発生に影響を及ぼすことがあるため、発達神経毒性は化学物質安全性評価において重要視されている。また、最近では、増加する子どもの発達障害と化学物質曝露の関係性を示唆する疫学知見も増えてきている。

一方、動物を用いた毒性試験に関する世界的な 3R (代替・削減・改善)の潮流や試験実施にかかる経費および時間といった観点から、化学物質の有害性評価において動物実験代替法の利用を促進する活動が拡大している。2019 年には、米国環境保護庁が、哺乳類を用いた動物実験の要請と研究費助成を 2025 年までに 3 割削減し、2035 年までに全廃する方針を発表した。したがって、代替法の開発が難しい発達神経毒性試験においても、昨今の動物福祉の関心の高まりに対応した新たな評価法を開発すべき時にきている。

こうした中で申請者は、動物福祉に配慮し多数の化学物質をハイスループットに評価できるゼブラフィッシュに注目した。ゼブラフィッシュは、ヒトとゲノム相同性が高いばかりでなく、脳や神経回路の保存性も高いことから神経生物学分野でも重用されている。さらに、曝露胚を用いた各種オミクス解析(トランスクリプトーム・メタボロームなど)により、化学物質の毒性発現機序の解析や高感度なバイオマーカーの開発を行うことも可能で

ある。

本研究の目的は、動物福祉に配慮した新たな発達神経毒性の統合的評価手法をゼブラフィッシュ胚で開発するとともに、神経毒性物質の曝露に応答する高感度なバイオマーカーを開発することである。

研究方法

本研究ではまず、帯広畜産大学・久保田の研究室で、神経毒性を有するネオニコチノイド系殺虫剤（NNs; アセタミプリド ACET、イミダクロプリド IMI、ニコチン NIC）について、ゼブラフィッシュ胚（RIKEN WT 系統）を用いた曝露試験を実施し、行動解析と遺伝子発現量解析に供試した。このため、受精後 5 日齢の稚魚を用いて、20 分間の短期曝露、ならびに発達期間を通じた曝露に相当する受精後 4 時間からの継続曝露（半止水式; 24 時間ごとに全量換水）を行い、行動解析を実施した。さらに、それぞれの曝露稚魚および 5 日齢で 55 分間の短期曝露を行った稚魚を用いて、神経マーカー遺伝子などの発現量をリアルタイム PCR 法により測定した。

次いで、久保田の研究室で新たに調製した同様の NNs 曝露胚の瞬間凍結試料を用いて、愛媛大学沿岸環境科学研究センター・野見山准教授および田上助教の研究室で、神経伝達物質に及ぼす影響を評価した。このため、一級アミンに特異的に反応する誘導体化試薬「Py-Tag」を用いて、チロシン代謝系の 5 物質（Dopamine、Norepinephrine、Tyramine、Octopamine、3-Methoxytyramine）およびトリプトファン代謝系の 3 物質（Serotonin、Tryptamine、5-Methoxytryptamine）の計 8 種を対象とした分析を行った。

研究成果

ACET および IMI をそれぞれ 10^{-4} M から 10^{-3} M（3 段階）で、NIC を 10^{-5} M から 10^{-4} M（3 段階）で短期曝露し行動解析を実施した（Fig. 1, Fig. 2）。その結果、稚魚の活動性を評価する連続明期試験（曝露後 20 分に開始）において、ACET は 10^{-3} M で、NIC は 10^{-5} M および 3×10^{-5} M で、10 分間の総移動距離を有意に増加させた。また、ストレス環境での行動への影響を評価する明暗切り替え試験（曝露後 55 分に開始）において、IMI は試験した

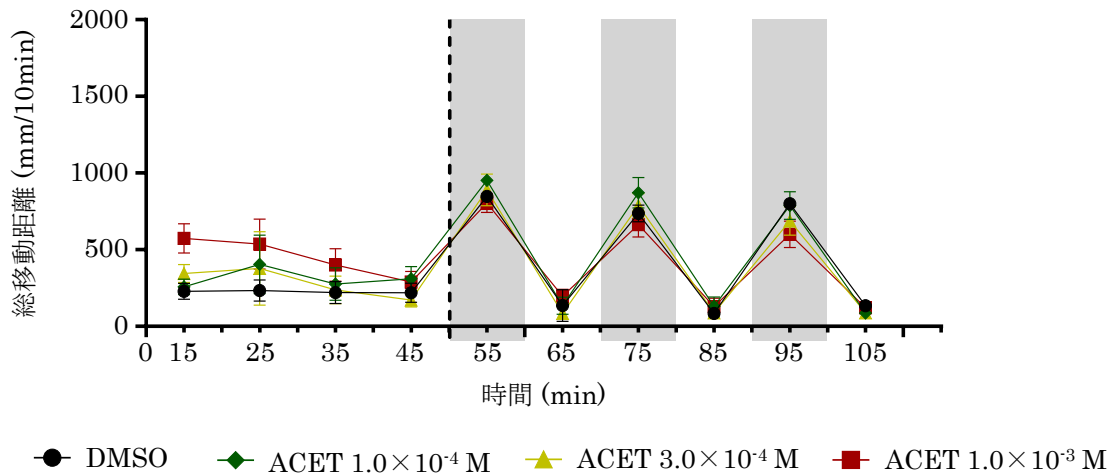


Fig. 1. ACET の短期曝露によるゼブラフィッシュ稚魚の行動量の経時変化 (平均±SEM、n=3)

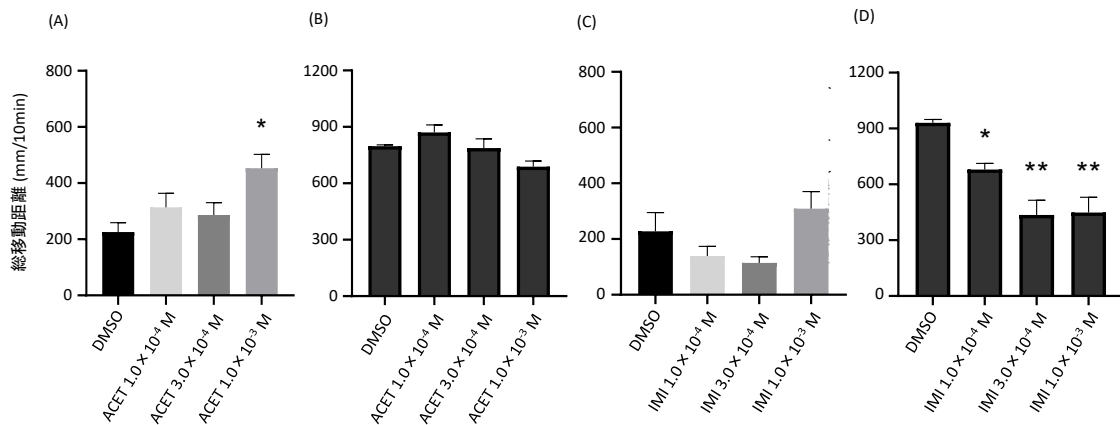


Fig. 2. ACET および IMI を短期曝露したゼブラフィッシュ稚魚の連続明期時の行動量 (A, C) と明暗切り替え試験時の暗期の行動量 (B, D) (平均±SEM、n=3、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$)

いずれの濃度でも暗期の 10 分間の総移動距離を有意に減少させた。さらに、ACET の短期曝露群では *c-fos* の発現量が 10^{-3} M で、NIC では試験したすべての濃度で発現量が有意に増加した一方、IMI では明瞭な変化はみられなかった (Fig. 3)。また、いずれの NNs 曝露胚においても、測定した 8 種の神経伝達物質の有意な濃度変化は認められなかった。

次いで、ACET、IMI を 10^{-6} M から 10^{-4} M (3 段階) で、NIC を 10^{-9} M か

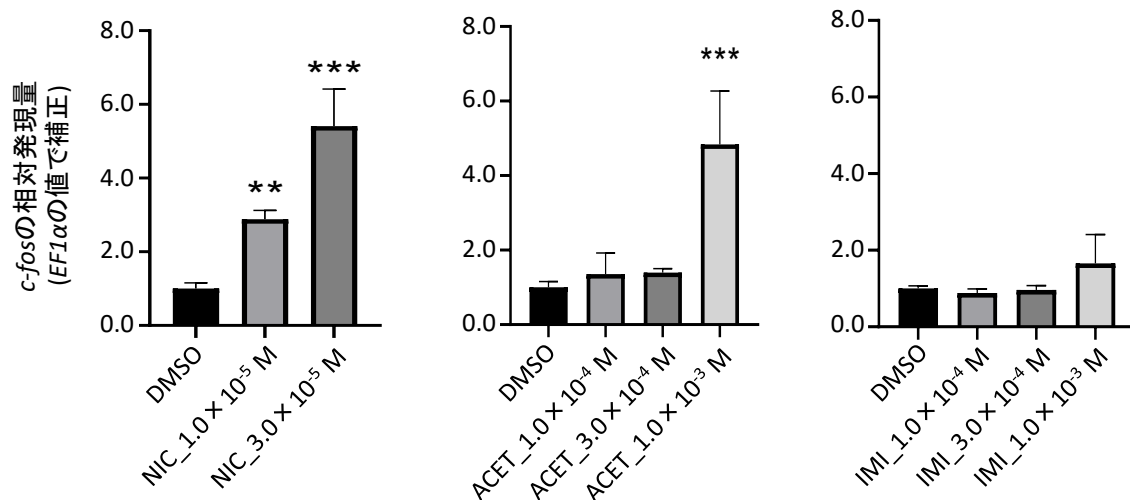


Fig. 3. NIC、ACET、IMI を短期曝露したゼブラフィッシュ稚魚の *c-fos* 発現量 (平均±SEM、n=4、** $p < 0.01$)

ら 10^{-5} M (3 段階) で継続曝露したところ、ACET は 10^{-6} M および 10^{-5} M で、IMI は 10^{-6} M で明暗切り替え試験における暗期の 10 分間の総移動距離を有意に減少させ、NIC は 10^{-7} M において暗期の 10 分間の総移動距離に減少傾向がみられた。さらに、ACET および IMI の継続曝露群において *c-fos* の発現量は濃度依存的に減少した。神経伝達物質については、NIC 曝露胚で神経伝達物質の前駆体・代謝物である Tyramine、3-Methoxytyramine、Tryptamine、5-Methoxytryptamine の有意な低下がみられた。IMI 曝露胚では Tyramine、3-Methoxytyramine、5-Methoxytryptamine に加え、神経伝達物質である Dopamine、Norepinephrine、Serotonin レベルの有意な低下がみられた。一方、ACET 曝露胚ではすべての物質で低濃度曝露群における有意な低下または低下傾向がみられた。

以上の結果から、ACET および NIC は稚魚の一般的な活動性に、IMI はストレス環境での活動性に影響を及ぼし、神経細胞の過活動化による多動または不安様行動を引き起こすと考えられた。さらに、行動解析および *c-fos* 発現量解析の結果から、同一の NNs に対しても短期曝露および長期曝露で神経行動学的な応答性が異なること、ならびに短期曝露で ACET は NIC と同様の反応を示し IMI はそれらと異なる反応を示したことから、NNs の

中でも物質により神経系への影響は異なると考えられた。また、本研究により NNs の継続曝露がゼブラフィッシュ胚の神経伝達物質濃度を低下させることが明らかとなった。その機序の解明にはさらなる研究が必要であるものの、実環境では慢性曝露が想定されるため、本研究で測定した神経伝達物質は、行動解析パラメータや神経マーカー遺伝子発現量と同様に、発達神経毒性の有用なバイオマーカーとなる可能性が考えられた。

今後の課題

本研究により、発達期の NIC および NNs 曝露はゼブラフィッシュ胚の神経伝達物質濃度を変動させることが明らかとなったものの、その機序には不明な点も残った。本研究では 24 時間ごとに全量換水を行う半止水式曝露を実施したが、NIC や NNs は速やかに代謝されるため、24 時間内で曝露水中および胚・稚魚中の濃度は経時的に低下しているものと予想される。継続的にあるいは高濃度で NIC や NNs に曝露すると、Dopamine、Norepinephrine、Serotonin など神経伝達物質の調節を NIC や NNs に依存し自己分泌能が低下すると予想されるため、NIC や NNs 濃度の低下時に神経伝達物質濃度の低下が生じる可能性も考えられる。こうした可能性を検証するためには、胚・稚魚中 NIC および NNs の濃度推移を明らかにする必要があると考えられる。さらに、作用機序の異なる神経毒性物質として GABA 受容体の拮抗阻害作用を示すフェニルピラゾール系殺虫剤を被験物質に用いて、発達神経毒性やバイオマーカープロファイルの NIC および NNs との共通性・相違点を明らかにすることも、バイオマーカーの汎用性の観点から重要と考えられる。