

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。今年度は、新たに複数のネオニコチノイド系殺虫剤と主要な代謝物に加えて、フェニルピラゾール系殺虫剤を対象として研究を実施した。

研究方法

今年度はまず、帯広畜産大学・久保田の研究室で、ジノテフラン (DIN)、クロチアニジン (CLO)、ならびに昨年度の結果を踏まえアセタミプリドおよびイミダクロプリドの主要な代謝物であるデスメチルアセタミプリド (DMAP) およびオレフィン体イミダクロプリド (IMI-olefin) 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、行動解析に供試した。得られた結果を踏まえ、DMAP 曝露胚については神経活性マーカー遺伝子 *c-fos* の発現量解析も実施した。また、代表的なフェニルピラゾール系殺虫剤であるフィプロニル (FIP) について、*c-fos* 発現量解析を実施した。このため、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) 行い、受精後 5 日齢の稚魚を用いて行動解析を実施した。さらに、同様の曝露試験を実施し回収した稚魚を用いて、*c-fos* 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 DMAP、FIP の各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准教授の研究室で、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

DIN、CLO、DMAP、IMI-olefin（それぞれ 1.0×10^{-6} 、 1.0×10^{-5} 、 1.0×10^{-4} M）を対象に発達期間を通じた曝露試験を行い、行動解析を実施した。その結果、稚魚の活動性を評価する連続明期試験および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において、DIN、CLO、IMI-olefin の曝露胚では有意な変化は認められなかった。一方、DMAP の 1.0×10^{-6} M 曝露群において、明暗切り替え試験の明期 10 分間における総移動距離は有意に減少し、暗期 10 分間の総移動距離も減少傾向を示した（Fig. 1）。行動への影響が示唆された DMAP 曝露胚で *c-fos* の発現量を解析したところ、 10^{-6} M では有意な変化はみられなかったものの、濃度依存的に発現量が減少する傾向が認められた。また、DMAP 曝露胚（ 1.0×10^{-4} 、 3.0×10^{-4} 、 1.0×10^{-3} M）において、測定したすべての神経伝達物質・前駆体・代謝物の濃度は低下傾向を示し、そのうち Tyramine と 5-Methoxytryptamine は有意な低下を示した。

次いで、FIP の神経系に対する影響を評価した。現時点までに得られたデータについて報告する。上記ならびに昨年度までのネオニコチノイド系殺虫剤の結果より、曝露胚中の *c-fos* 発現量および神経伝達物質濃度が発達神経毒性のバイオマーカーとして有用と考えられたことから、FIP についてはそれらパラメーターの測定から実施した。受精後 5 日における曝露胚中の *c-fos* 発現量を測定したところ（Fig. 2）、55 分間の曝露では濃度依存的な発現量の増加が認められた。一方、受精後 4 時間からの長時間曝露では、試験した最低濃度である $0.3 \mu\text{M}$ で有意な発現増加がみられたものの、高濃度では発現量はむしろ低下する傾向がみられた。また、FIP の短時間曝露胚では低濃度側（ 0.3 、 1 、 $3 \mu\text{M}$ ）で Dopamine、Serotonin、3-Methoxytyramine、5-Methoxytryptamine、Tyramine の有意な上昇あるいは上昇傾向がみられた。これに対し、FIP の長時間曝露胚では同等の濃度レベル（ $3 \mu\text{M}$ ）において Dopamine、Serotonin、5-Methoxytryptamine の有意な低下または低下傾向がみられた。また、長時間曝露胚において Tyramine、Octopamine、Tryptamine、Norepinephrine の濃度は有意に上昇した。

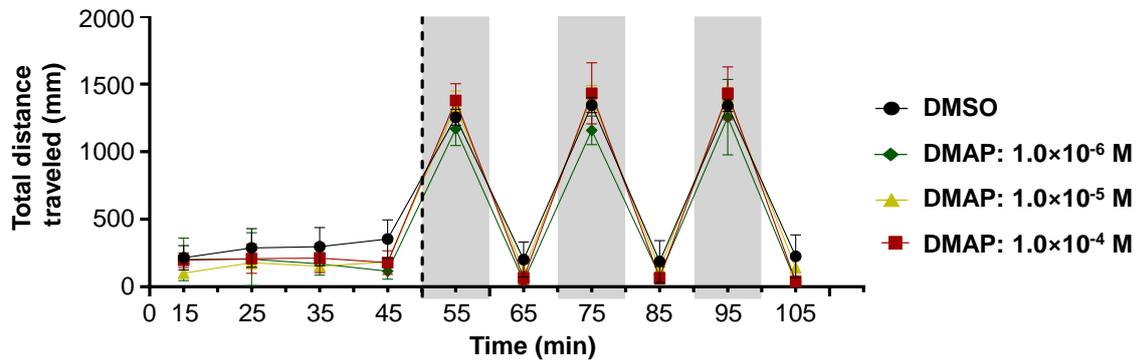


Fig. 2. DMAP の曝露によるゼブラフィッシュ稚魚の行動量の経時変化（平均±SEM、n=3）。連続明期試験、明暗切り替え試験の順で実施した。図中の白色部分のプロットは明期、灰色部分のプロットは暗期における 10 分間の総移動距離を示す。各曝露群につき、正常な浮袋の膨張が確認できた受精後 5 日齢の稚魚 12 匹を 48 穴プレートの各ウェルに 1 匹ずつ投入し、行動解析装置 Zantiks-MWP を用いてデータを取得した。これを 3 プレート用意してデータを取得し、平均±SEM で図示した。

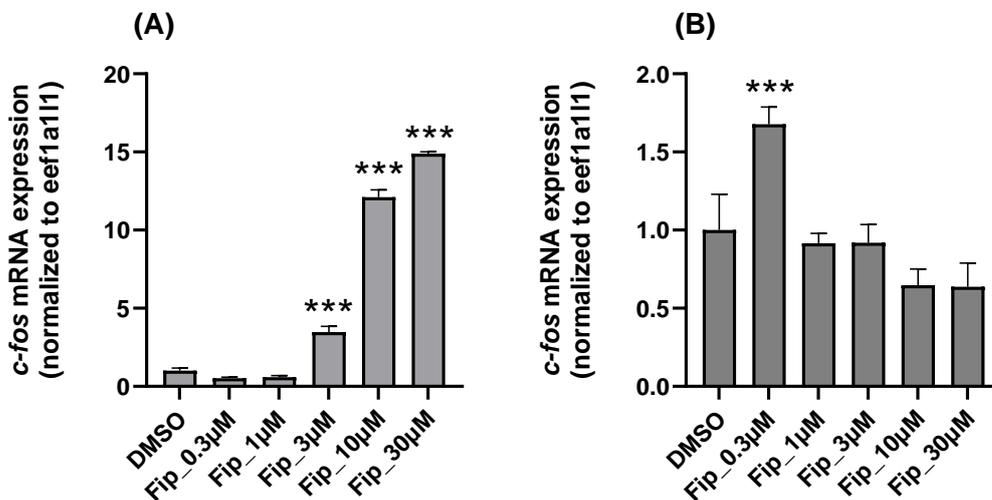


Fig. 1. FIP を短時間または発達期間を通して曝露したゼブラフィッシュ胚における *c-fos* 発現量（平均±SEM、n=4、*** $p < 0.001$ 、Dunnnett's test）。A：短時間曝露、B：発達期間を通じた長時間曝露。各曝露群につき、受精後 4 時間の胚 20 個をペトリ皿に入れて水性曝露し、受精後 5 日で回収した稚魚から総 RNA を抽出して *c-fos* 発現量解析用のサンプルとした。

以上の結果は、昨年度明らかにしたアセタミプリドやイミダクロプリドに加え、アセタミプリドの主要な代謝物である DMAP についても、親化合物ほどではないものの発達期ゼブラフィッシュの神経系に影響を及ぼすことを示している。さらに、GABA 受容体介在性の殺虫剤であるフィプロニルについても発達期ゼブラフィッシュに神経毒性を示す可能性が考えられた。フィプロニル曝露胚では短時間曝露で *c-fos* 発現量の顕著な増加がみられたものの、発達期間を通した長時間曝露では低濃度におけるわずかな増加のみであった。これに対し、一部の神経伝達物質の前駆体では長時間曝露群で顕著な上昇を示した。殺虫剤においては、事故などによる高濃度・短時間曝露だけでなく低濃度・長期間曝露も想定する必要があることから、本研究で明らかにしたような長時間曝露に応答するバイオマーカーの開発は有用と考えられる。

今後の課題

今後は、これまでに対象としたネオニコチノイド系殺虫剤とフェニルピラゾール系殺虫剤について、稚魚の行動、神経活性マーカーの発現、神経伝達物質の濃度のうち不足しているデータセットをすべて収集し、発達神経毒性の態様とバイオマーカーについて統合的な理解を試みる。また、今年度実施予定であったジアミド系殺虫剤（クロラントラニリプノール）についても取り組む予定である。得られた成果をまとめ、発達神経毒性試験の代替法としてゼブラフィッシュが活用可能であるか、またその際のメリットだけでなくデメリットや制限事項などについても考察する。得られた成果を学会等で発表するとともに、国際学術誌に英文として投稿する予定である。