

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K00575

研究課題名(和文)ネオニコチノイド系農薬が鳥類胚の発育に及ぼす影響と作用機序の解明

研究課題名(英文)Effects of neonicotinoid pesticides on the development and growth of avian embryos

研究代表者

川嶋 貴治 (Kawashima, Takaharu)

国立研究開発法人国立環境研究所・生物・生態系環境研究センター・主任研究員

研究者番号：90360362

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：鳥類胚の発育に及ぼすネオニコチノイド系農薬の有害性を評価するために、ウズラ受精卵の胚培養技術を開発することで、放卵後からの任意の発生段階において、定量的に被験物質の曝露を可能とした。さらに、孵化に至るまでの全期間において、胚致死や発育状態について連続して観察することができた。イミダクロプリドの曝露試験を行った結果、高濃度区において、致死および発育遅延が顕在化し、生存率の低下が認められた。今後さらなる作用機序を解明するために、胚発生後期の生殖腺や副生殖器(ミュラー管、ウォルフ管)の形態、血中の性ステロイドホルモン濃度及び性分化関連遺伝子の発現量を有害性評価指標として利用できる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鳥類胚培養技術を開発することで、被験物質の胚への定量的かつ直接的な曝露を容易にしたことから、従来法に比べて精緻な解析が可能となった。鳥類は、哺乳類と同じ有羊膜類に属するため、発生・分化に関する生命原理の相同性と種差を比較しつつ、農薬の安全性に対して、より強固な科学的根拠を付与するものと予想される。今後、本研究成果を発展させ、迅速、簡便かつ低コストの試験法が実用化できれば、高次捕食動物に対する化学物質影響評価の国際標準化に向けた波及効果も期待される。また、鳥類発育卵を利用する点で、母体を傷つけない生殖発生毒性試験の動物実験代替法として新たな研究の道を拓く先駆となった意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：In order to assess the toxicity of neonicotinoid pesticides on avian embryonic development and growth, we have developed a technique for avian embryo culture using quail fertilized eggs, which enabled to expose them to the test substances quantitatively at any developmental stage after newly laid egg. Furthermore, we were able to observe embryonic lethality and developmental status continuously during the whole embryonic period until hatching. As a result of the exposure test of imidacloprid, lethality and growth retardation became apparent in the high concentration test group, and a decrease in survival rate was observed. Furthermore, the morphology of the gonads and paragenital gland (i.e. Mullerian duct and Wolffian duct), sex steroid hormone levels in the blood, and expression levels of genes related to sexual differentiation could be used as toxicological endpoints to elucidate the modes of action in the future.

研究分野：鳥類発生工学

キーワード：農薬 胚 ウズラ 鳥類

## 1. 研究開始当初の背景

1962年にレイチェル・カーソンが「沈黙の春」で警鐘した「そして、鳥は鳴かず」という悪夢は、半世紀以上を経た現在において、幸いにも現実のものとなっていない。それは、人類が残留性・難分解性の農薬を適正に管理・規制してきた結果とも言えるが、絶滅のおそれのある鳥類種は増加の一途を辿っている。Hallmannら(2014)は、オランダの農地に分布する食虫性鳥類個体群の減少と、ネオニコチノイド系農薬の一種であるイミダクロプリドの水中濃度とが相関しているとの新たな問題を提示した。その空間的な相関関係は、他の複数の土地利用変化を考慮して補正しても依然として認められ、ネオニコチノイド系農薬が生態系の高次捕食動物である鳥類まで影響を及ぼす可能性を初めて示唆した。

ネオニコチノイド系農薬は、蜂群崩壊症候群(Colony Collapse Disorder, CCD)としてハナバチ類をはじめとする花粉媒介性の無脊椎動物の減少との因果関係が指摘されているが、近年、ヒトを含む脊椎動物の神経発達や生殖機能への悪影響が懸念されている。鳥類では、クロチアニジンの酸化ストレスによる生殖能力の低下について、ウズラを用いた実験によって実証されるとともに(Tokumoto et al., 2013)、ニワトリ胚を用いた実験で、イミダクロプリドは、神経堤細胞の増殖とアポトーシスを阻害することで頭蓋形成異常を発生することが報告されている(Wang et al., 2016)。我々は、アセタミプリドの発達期曝露でマウスの性行動・攻撃行動亢進、注意欠陥を誘導することを明らかにした(Sano et al., 2016)。

このように、ネオニコチノイド系農薬を含有した穀物や昆虫を摂取した鳥類の異変は、哺乳類などの高次捕食動物、さらにはヒトの発達神経に悪影響を及ぼす可能性があるために無視することはできない。2013年に欧州で、予防原則として数種のネオニコチノイド系農薬について暫定的使用規制に踏み切ったものの、国内外においてネオニコチノイド系農薬の有害性に対する科学的知見の集積が強く求められていた。

本研究開始時点において、我々は、鳥類胚を培養する手法の開発に着手するとともに(Kawashima et al., 2005)、この胚培養技術と行動試験を組み合わせた発達神経毒性の試験バッテリーを提唱していた(Kawashima et al., 2016)。そのため、鳥類に対するネオニコチノイド系農薬の影響について、特に、胚発育期に焦点をあてて調べる着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、鳥類(ウズラ)受精卵を用いて、胚発育に及ぼすネオニコチノイド系農薬の有害性を評価し、その作用機序を明らかにすることである。受精から孵化までの様々な発生段階において、ネオニコチノイド系農薬を定量的に曝露し、致死、発育不全および形態形成異常等のエンドポイントから、催奇形性の有無や低濃度でも奇形を誘導する「絶対過敏期」の特定を目指す。また、ニコチンとの有害性の比較を行い、脊椎動物では影響が低いとされているネオニコチノイド系農薬の生殖発生毒性の強度について明らかにする。鳥類は、哺乳類と同じ有羊膜類に属することから、発生・分化に関する根本原理を比較しつつ、生態系の高次捕食動物全般に対する化学物質のハザードについて演繹することを目指す。

### (1) ネオニコチノイド系農薬は、鳥類の胚発育に影響を及ぼすのか？

受精から孵化までの様々な発生段階において、ネオニコチノイド系農薬を定量的に曝露し、致死、発育不全および形態形成異常等の障害の発生について明らかにするとともに、ニコチンとの有害性の比較を行い、生殖発生毒性の強度について調べる。その基盤として、形態形成異常の分類・類型化とともに、性ステロイドホルモンレベル等のバイオマーカーを検索する。

### (2) ネオニコチノイド系農薬は、形態形成に関する遺伝子の発現を変化させるのか？

様々なネオニコチノイド系農薬による催奇形性の有無や低濃度でも奇形を誘導する「絶対過敏期」の特定するため、定量PCR法等による分子生物学的な手法を用いて、その背景データとなる形態形成遺伝子の発現変動を調べる。

## 3. 研究の方法

### (1) ネオニコチノイド系農薬の鳥類胚への曝露方法の検討

鳥類代理卵殻培養法(Perry, 1988)を用いて、投与時期、投与期間、投与部位等を検討した。特に、溶媒を滴下し(0~400 µl)、培養9日目の胚を観察し、死亡率や発生異常の有無を調べた。

### (2) ネオニコチノイド系農薬の鳥類の胚発育に及ぼす影響の解析

鳥類胚培養技術を用いて、孵卵 3 日目までの胚形成期に、アセタミプリド、イミダクロプリド、クロチアニジン等のネオニコチノイド系農薬あるいはニコチンを定量的に曝露し、孵化に至るまでの期間に致死、発育不全および形態形成異常等をエンドポイントして有害性の評価を行った。ネオニコチノイド系農薬の曝露量や時期と形態形成異常との関連を調べることで、低濃度でも奇形を誘導する「絶対過敏期」を探索した。

#### (3) 形態形成異常の分類・類型化とバイオマーカーの探索

ウズラ受精卵を孵卵し、孵卵 9 日、12 日および 15 日 (E9、E12 および E15 : 孵卵開始日を E0 とする) における生殖腺 (卵巣、精巣) および副生殖器 (ミューラー管、ウォルフ管) の形態を観察した。加えて、E9、E12 および E15 のウズラ胚より血液、生殖腺および副生殖器を採取した。血液サンプルを用いて、エストラジオールとアンドロゲン (テストステロンおよびジヒドロテストステロン) の血中濃度を ELISA 法により測定した。

#### (4) 形態形成に関する遺伝子発現の変動

定量 PCR 法を用いて、形態形成に関する遺伝子の発現変動を調べた。採取した生殖腺と副生殖器から RNA を抽出し、cDNA 合成後、蛍光リアルタイム PCR 装置を用いた定量 PCR 法により、各種性分化関連遺伝子の発現量を計測し、遺伝子発現の変化を調べた。性分化関連遺伝子には、エストロゲン受容体 (ER $\alpha$ 、ER $\beta$ ) とアロマターゼ (P450<sub>arom</sub>) に加えて、アンドロゲンとエストロゲンの産生に関わる各種ステロイド合成酵素 (コレステロール側鎖切断酵素 (P450<sub>scc</sub>)、3 $\beta$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素 (3 $\beta$ -HSD)、17 $\beta$ -水酸化酵素 (P450<sub>17 $\beta$ lyase</sub>)、17 $\alpha$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素 (17 $\alpha$ -HSD))、アンドロゲン受容体 (AR)、抗ミューラー管ホルモン (AMH) および抗ミューラー管ホルモン受容体 (AMHR2) を想定した。

## 4. 研究成果

#### (1) ウズラ初期胚を用いた ex ovo アッセイ系の確立

鳥類代理卵殻培養法は、卵黄を針で傷つけなくて良いことや被験物質の投与量設定に自由度が増えるなどのメリットあり、新たな曝露方法として適用可能である。胚発生のいかなる時期、期間、部位にも被験物質の投与が可能となるだけでなく、経過観察が可能となった。

#### (2) ネオニコチノイド系農薬の鳥類の胚発育に及ぼす影響

ニコチンに対する鳥類胚の発育影響について調べた結果、胎児発育不全 (fetal growth restriction : FGR) の症状とよく似た発育遅延や体重減少が発生することを確認した。これは、鳥類発育卵を用いれば、母体からの移行量を無視して、胎児 (胚) への直接的な曝露影響を定量的に評価できることを意味する。

アセタミプリドとイミダクロプリドを初期胚へ曝露した結果、イミダクロプリド高濃度区において、致死および発育遅延が顕在化し、生存率の低下が認められた。さらに、対照区と比較して体重の低下とともに、頭部の奇形発生率の高い傾向が認められた。しかしながら、胚培養による影響も完全に否定できなかったため、今後、さらに詳細な検証が必要である。また、他のネオニコチノイド系農薬の有害性も含めて、その作用機序を検討するため、形態形成異常の分類・類型化と無操作胚におけるバイオマーカーを探索することが必要となった。

#### (3) バイオマーカーとしての生殖腺の形態と性ステロイドホルモン

胚発育期における致死や発育不全以外の有害性評価項目を検討するために、生殖腺および副生殖器の形態を調べた結果、鳥類ではこれらの形態に明らかな性差があることを確認した。E9 において、完全に性分化した生殖腺が観察され、雌胚では肥大した左側卵巣と萎縮した右側卵巣、雄胚では両側に精巣が確認された。雌雄胚ともにミューラー管とウォルフ管が存在したが、雄胚のミューラー管は雌胚のミューラー管と比べて細く、試料として採取することは困難であった。E12 になるとミューラー管とウォルフ管の形態に著しい性差が認められた。雌胚では、左側ミューラー管が、右側ミューラー管に比べて、長く肥大した。他方、雄胚ではミューラー管は退縮し、観察することができなくなった。ウォルフ管は雌雄胚において顕在であり、性差も認められなかった。E15 では、雌胚におけるミューラー管の非対称性がより顕著になった。左側ミューラー管は著しく発達したが、右側ミューラー管は著しく退縮した。E12 と同様、E15 でもウォルフ管は雌雄胚において顕在であり、性差は認められなかった。

E9 から E15 における血中エストラジオール濃度は、雌胚において雄胚よりも有意に高値を示したものの、血中アンドロゲン濃度には経時的な変化はみられず、性差も認められなかった。

#### (4) ウズラ胚における性分化関連遺伝子群の発現量変動

無操作ウズラ胚における背景データとして、コレステロールからテストステロンとエストラジオールの合成に関わる 5 つの酵素 (P450<sub>scc</sub>、P450<sub>17 $\beta$ lyase</sub>、3 $\beta$ -HSD、17 $\alpha$ -HSD、P450<sub>arom</sub>) の生

殖腺における発現量を測定した結果、E9 から E15 における左側卵巣における、これらの酵素の遺伝子発現量は、同期間における左側あるいは右側の精巣よりも有意に高かった。17 $\beta$ -HSD の遺伝子発現量は段階的に減少した。

生殖腺における性ステロイドホルモン受容体遺伝子の発現量を調べた結果、左側卵巣における ER $\alpha$ 、ER $\beta$  および AR の発現量は E9 から E15 にかけて増加する一方、精巣における発現量は変化しないことが分かった。左側卵巣における ER $\alpha$  と AR の発現量は E15 において E9 よりも有意に高かった。また、E15 の左側卵巣における ER $\beta$  の発現量は E15 の左側精巣よりも有意に高く、E15 の左側卵巣における AR の発現量は E15 の精巣よりも有意に高かった。

ミューラー管における性ステロイドホルモン受容体遺伝子の発現量を調べた結果、左側ミューラー管における ER $\alpha$ 、ER $\beta$  および AR の発現量は E9 から E15 にかけて増加する一方、右側ミューラー管の発現量は変化しないことが明らかになった。これにより、E15 には ER $\alpha$ 、ER $\beta$  および AR の発現量の明瞭な左右差が生じた。左側ミューラー管における ER $\alpha$  の発現量は E15 において E9 よりも有意に高く、左側ミューラー管における AR の発現量は E15 において E9 および E12 よりも有意に高かった。E15 における ER $\beta$  および AR の発現量は、左側ミューラー管において右側ミューラー管よりも有意に高くなった。他方、ウォルフ管における ER $\alpha$ 、ER $\beta$  および AR の発現量には性差は認められなかった。

生殖腺における AMH の発現量には明瞭な性差が認められて、精巣では左右差が認められた。E9 から E15 における右側精巣の AMH の発現量は、同期間の左側精巣および左側卵巣のそれよりも有意に高かった。雌胚のミューラー管には AMHR2 の発現が確認された。

#### <引用文献>

Hallmann et al. (2014) Declines in insectivorous birds are associated with high neonicotinoid concentrations. *Nature* 511: 341-343.

Tokumoto et al. (2013) Effects of exposure to clothianidin on the reproductive system of male quails. *J Vet Med Sci* 75: 755-760.

Wang et al. (2016) Imidacloprid exposure suppresses neural crest cells generation during early chick embryo development. *J Agri Food Chem* 64: 4705-4715.

Sano et al. (2016) In utero and lactational exposure to acetamiprid induces abnormalities in socio-sexual and anxiety-related behaviors of male mice. *Front Neurosci* 10 (228).

Kawashima et al. (2005) An avian embryo culture system for embryogenesis using an artificial vessel: Possible conservation benefits in the rescue and management of endangered avian species. *Zoo Biol* 24: 519-529.

Kawashima et al. (2016) Avian test battery for the evaluation of neuro- and reproductive toxicity. *Front Neurosci* 10 (296).

Perry MM (1988) A complete culture system for the chick embryo. *Nature* 331: 70-72.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 川嶋貴治	4. 巻 60
2. 論文標題 ウズラ フランス実験発生学を支えた日本産鳥類バイオリソース	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日仏生物学会誌	6. 最初と最後の頁 24-31
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------