

令和 5 年 10 月 27 日現在

機関番号：13904

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12621

研究課題名（和文）胎生期農薬曝露による発達神経変性を定量評価する技術の検討

研究課題名（英文）Quantitative analysis of developmental neurotoxicity due to embryonic exposure of pesticides

研究代表者

吉田 祥子（Yoshida, Sachiko）

豊橋技術科学大学・工学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：40222393

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：農薬は発達神経毒性源を予想されるが、細胞試験で容易に感知される神経毒性は見られない。これら比較的安全な物質の曝露では、細胞自身に生じた小さい変性が、動物個体の中で回路の発達とともに大きな障害となる可能性があり、発達過程で示す微弱な変化を集約する技術が必要である。本研究では、除草剤グリホサート、および殺虫剤アセタミプリド、およびクロルピリホスを、胎生期に急性または慢性投与し、出生子の神経発達および行動、腸内細菌叢の変化、脳内の免疫系細胞の反応性の変化を継続的・多面的に観察した。微量・慢性投与であっても神経回路に影響が見られ、機械学習によるパラメータ化から、農薬の細胞への影響を定量評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子供の発達障害は、現代社会が共通して抱える問題であり、環境内因子の影響はその大きな素因の一つで、発達神経毒性を有する化学物質は有機金属、医薬品、農薬など多種にわたっている。一方、近年の農薬は、急性毒性の低い、変異原性の少ない製品が開発されている。農薬など比較的安全な物質の曝露では、細胞自身に生じた小さい変性が、動物個体の中で回路の発達とともに歪んだ回路を形成して大きな障害となる「関係性の障害」が生じる可能性がある。関係性の障害は軽微で検出されにくい可能性があり、これを感知するためには、環境中に推定されるレベルの農薬を胎生期に曝露した動物が、発達過程で示す微弱な変化を集約する技術が必要である。

研究成果の概要（英文）：Pesticides are expected to be a source of developmental neurotoxicity, but it is hard to detect their neurotoxicity in vitro models. With exposure to these relatively safe substances, small degenerative changes in the cells themselves may become significant disturbances as the circuit develops in individual animals, and techniques are needed to consolidate the subtle exhibited modifications during development. In this study, the herbicide glyphosate and the insecticides acetamiprid and chlorpyrifos were administered acutely or chronically during the embryonic period, and the neurodevelopment and behavior of the birth pups, changes in the gut flora, and changes in the reactivity of immune system cells in the brain were observed in a continuous and multidimensional manner. Effects on neural circuits were observed even after a minute, and chronic administration, and the impact of pesticides on cells were quantitatively evaluated from parameterization by machine learning.

研究分野：神経科学 医用工学

キーワード：発達神経毒性 機械学習 超音波顕微鏡 腸内細菌叢 小脳 ミクログリア 動物実験

# 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

子供の発達障害は、現代社会が共通して抱える問題であり、その原因も様々の仮説が提示されてきた。環境内因子の影響はその大きな素因の一つで、発達神経毒性(DNT)を有する化学物質は有機金属、医薬品、農薬など多種にわたっている。これらの化学物質の作用メカニズムは、炎症誘発(リポポリサッカリド:LPS など)、HDAC 阻害(トリコスタチン:TSA、バルプロ酸:VPA など)、ミトコンドリア毒性(有機金属など)と多岐にわたるが、iPS 細胞などヒト in vitro 系研究を用いた解明が進んでいる。その一方、農薬の神経毒性については特異な意見対立が見られる。近年の農薬の開発にあたり、企業は安全性に細心の注意を払い、急性毒性の低い、変異原性の少ない製品開発に注力している。これらの新世代農薬には細胞試験で容易に感知される神経毒性は見られない。しかしながら、グリホサート(除草剤ラウンドアップの主成分)やネオニコチノイド系殺虫剤には、安全性に対する疑念が絶えない。多くの報告は産業衛生の観点からの、成人や大人動物の神経系への影響で、妊娠中の曝露や幼若期曝露の影響の報告は少ないが、培養細胞を用いた神経障害の報告もなされている。

発達障害の素因には、要素性の障害、つまり細胞自体、遺伝子自体の不具合が大きな原因になることが多いが、農薬など比較的安全な物質の曝露では、細胞自身に生じた小さい変性が、動物個体の中で回路の発達とともに歪んだ回路を形成して大きな障害となる「関係性の障害」が生じる可能性がある。関係性の障害は要素性の障害に比べ軽微で検出されにくい可能性があり、これの発達神経変性を感知するためには、環境中に推定されるレベルの農薬を胎生期に曝露した動物が、発達過程で示す微弱な変化を集約する技術が必要である。

## 2. 研究の目的

本研究では、いまだ意見の対立する農薬類の曝露による発達神経変性について、小脳を主たる観察対象として、定量的な評価技術を提示することを目的とする。神経細胞は発達と回路形成に伴って複雑に形を変化させる。農薬などの環境内物質曝露によって、炎症性細胞によるシナプス形成の抑制や入力信号の過不足などが生じると、神経死に至る前に形態的な変化が発生すると予想される。本研究では比較的観察が容易で発達障害の病変部位でもある小脳を用いて曝露動物の神経細胞の変化を継時的に観察し、小さい変化を抽出し定量化を試みる。数値化・定量化が容易でない神経細胞の形態変化を、機械学習によって振り分け、パラメータ化を試みる。さらに、生きた細胞の変化を無侵襲で観察できる超音波顕微鏡技術、ヒトへの応用を念頭にした腸内細菌叢の解析技術、炎症性サイトカインの発現変化、行動の変化の相関をとり、農薬類の曝露がもたらす神経変性を検討する。現代社会で環境中の化学物質をゼロとすることは困難だが、影響を確認し、安心して次世代に受け渡すことは我々の世代の重要な責務である。農薬の安全性は現在評価が二分されており、安全評価の一助となる技術の提供につなげる。

## 3. 研究の方法

本研究では、主として除草剤グリホサート(GLY)、およびネオニコチノイド系殺虫剤のアセタミプリド(ACET)、有機リン系殺虫剤のクロルピリホス(CPF)を、胎生期に急性投与または慢性投与し、出生仔の神経発達および行動、腸内細菌叢の変化、脳内の免疫系細胞の反応性の変化を継時的・多面的に観察する。得られたデータのパラメータ化を行って、AI を利用した機械学習により、農薬の影響の定量評価法を検討する。

## 4. 研究成果

動物を用いた多面的な神経発達状況の観察として、グリホサート(GLY)、アセタミプリド(ACET)、クロルピリホス(CPF)、リポポリサッカリド(LPS)の胎児期への急性投与または慢性投与を行い、その結果を観察した。高濃度の GLY 投与では、神経死の進行および神経発達の抑制が見られたが、低濃度慢性 GLY 投与では、むしろプログラム神経死の抑制が見られた。CPF、ACET 投与でもプログラム神経死の抑制と神経樹状突起発達の抑制が観察された。LPS では、生後 1 週では神経死の抑制、生後 2 週では神経死の進行という二相性の変化が観察された。神経死の増加とミクログリアの増加は必ずしも一致せず、ミクログリアの増加と強く相関を示したのは樹状突起発達の抑制だった。これらの結果は、炎症性サイトカインの上昇と部分的にしか一致せず、むしろエピジェネティックな変化が発達に伴って進行すること、異なる物質による発達神経毒性が、一定のルールに従った変異を示す可能性を示唆した。機械学習を利用した特徴抽出の試行では、MATLAB の machine learning toolbox を用いた画像認識システムを構築した。従来の共焦点顕微鏡を用いた神経細胞観察では、細胞死や樹状突起長などの小さな構造変化を定量化することは困難であったが、これまでの発達神経毒性物質の投与で得た神経細胞の抗体染色画像 約 4000 枚を読み込み、神経細胞の自動識別が可能となった。これ

は神経細胞(プルキンエ細胞)の形態的な特徴に基づいた抽出であるため、神経毒性物質によって本来ない場所に分布している細胞や形が大きく変化している細胞に対しても有効な抽出結果が得られた。さらに発達神経毒性物質投与によって活性化されたミクログリアを単離し音響観察することができた。

これらの結果は、発達神経毒性は単なる炎症性サイトカインによる神経死をもたらすものではなく、低濃度・発達初期ではアストロサイトの分化が誘導されて、過剰な神経保護による発達障害が誘導され、一方高濃度・発達中期では樹状突起発達の抑制と神経死の誘導されることが示唆された。一例として、CPFの投与はミクログリア増加と樹状突起発達抑制をもたらすが、神経死には至らず、むしろ過剰な神経保護作用を示した。ミクログリアは近年BDNFの主たる生成源であるとされ、BDNFによる樹状突起発達抑制が報告されているが、本研究でも共同研究者の諫田により、CPF投与によるBDNF発現増大を観察している。

次に、グリホサート(GLY) または アセタミプリド(ACET)を胎児期に急性投与または慢性投与した小脳構造の組織化学的な観察、生化学的な変化の観察、小脳から採取した脳の免疫細胞であるミクログリアの音響特性の変化の観察と、化学物質投与動物の行動変化と菌叢解析、動物の盲腸内の短鎖脂肪酸の産生量変化を比較検討した。高濃度GLYの投与で遅発的に進行する神経死の機序として、グルタミン酸トランスポーターGLASTの発現が抑制されることを確認し、これを生化学的な観察で確認した。この機序にYY1の関与が示唆された。低濃度慢性GLY投与は、腸内細菌叢の変化が緩やかで、短鎖脂肪酸はプロピオン酸が有意に変化など炎症抑制的な機序が強く示唆された。ACET投与動物では、神経死の抑制、樹状突起発達の抑制と同時に、プルキンエ細胞の配列が強く乱れることが確認された。これはニコチンの投与でも観察され、ニコチン性受容体の活性化によるものと示唆された。ACET投与動物から採取されたミクログリアは、培養開始時からramified形状をとり、音響観察から三次元的なブリッジ構造をとることが観察された。ACET投与により脳の免疫細胞の状態が変化していることを強く示唆した。機械学習を利用した特徴抽出技術を利用し、免疫組織化学観察で得た神経細胞およびアストログリアをMATLABのmachine learning toolboxを用いた画像認識システムで解析し、細胞を自動識別した上で、形状に変化がある神経細胞の自動抽出、アストロサイトの密度の自動抽出を行った。GLY投与動物では発達初期に過剰な運動能力を示すが、この時小脳ではアストロサイトの分化とグルタミン酸トランスポーターの発現が抑制されており、過剰なグルタミン酸環境にあることが示唆された。これが、この後の神経死を誘導すると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Tiong TKS, Sasaki R, Prastika EB, Kawaguchi Y, Kobayashi K, Hozumi N, Yoshida S.	4. 巻 -
2. 論文標題 1.Evaluation of elastic change during mitotic phase of murine breast cancer cells using scanning acoustic microscope.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Jpn. J. Appl. Phys.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.35848/1347-4065/ac54f7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Prastika EB, Shintani T, Kawashima T, Murakami Y, Hozumi N, Tiong TKS, Yoshida S, Nagaoka R, Kobayashi K.	4. 巻 119
2. 論文標題 2.Time and frequency domain deconvolution for cross-sectional cultured cell observation using an acoustic impedance microscope	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ultrasonics	6. 最初と最後の頁 106601
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ultras.2021.106601	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nagaoka R, Hasegawa H, Tamura K, Yoshida S, Hozumi N, Kobayashi K.	4. 巻 118
2. 論文標題 3.Suppression of reflected signals from substrate as clutters for cell measurements using acoustic impedance microscopy.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ultrasonics	6. 最初と最後の頁 106580
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ultras.2021.106580	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kumagai H, Kobayashi K, Yoshida S, Yokoyama K, Hirota N, Yamagata T.	4. 巻 3
2. 論文標題 4.Use of Ultrasound Microscopy for Ex Vivo Analysis of Acoustic Impedance in Mouse Liver with Steatohepatitis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acoustics	6. 最初と最後の頁 3-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/acoustics3010002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Prastika EB, Imori A, Kawashima T, Murakami Y, Hozumi N, Yoshida S, Nagaoka R, Kobayashi K.	4. 巻 60
2. 論文標題 5.Three-dimensional acoustic impedance mapping of human skin by improved time-frequency domain analysis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Jpn. J. Appl. Phys.	6. 最初と最後の頁 SDDE22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.35848/1347-4065/abf512	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kumagai H, Kobayashi K, Yoshida S, Yokoyama K, Hirota N, Yamagata T.	4. 巻 3(1)
2. 論文標題 Use of Ultrasound Microscopy for Ex Vivo Analysis of Acoustic Impedance in Mouse Liver with Steatohepatitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acoustics	6. 最初と最後の頁 3-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/acoustics3010002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 PRASTIKA EB, Imori A, Kawashima T, Murakami Y, HOZUMI N, Yoshida S, Nagaoka R, Kobayashi K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Three-dimensional acoustic impedance mapping of human skin by improved time-frequency domain analysis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Jpn. J. Appl. Phys.	6. 最初と最後の頁 -
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 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Prastika EB, Imori A, Kawashima T, Murakami Y, Hozumi N, Yoshida S, Nagaoka R, Kobayashi K.	4. 巻 59
2. 論文標題 Acoustic impedance interpretation of cross-sectional human skin by using time and frequency domain deconvolution	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Jpn. J. Appl. Phys.	6. 最初と最後の頁 SKKB06
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 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Lee CLM, Umemura K, Murakami M, Tiong TKS, Kobayashi K, Hozumi N, Yoshida S.
2. 発表標題 Directly assessing the reactivity of rat-derived microglia with scanning acoustic microscope.
3. 学会等名 USE2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Satake S, Shintani T, Nakada S, Tiong TKS, Prastika EB, Kobayashi K, Hozumi N, Yoshida
2. 発表標題 Evaluation of collagen release from cultured human fibroblasts via ultrasonic microscope.
3. 学会等名 USE2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshida S, Kanda Y, Kobayashi K, Hozumi N.
2. 発表標題 Novel assessment for the reactivity of rat-derived microglia with scanning acoustic microscope.
3. 学会等名 EMBL Microglia workshop (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshida S, Fukushima M, Kanda Y.
2. 発表標題 Prenatal exposure of valproate and HDAC inhibitors induce hyperplasia of cerebellar lobules and epigenetic change of granule cell precursors.
3. 学会等名 The 23rd Biennial Conference of the International Society for Developmental Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田祥子
2. 発表標題 Prenatal chemical exposure induce developmental neurotoxicity due to epigenetic alterations.
3. 学会等名 第64回神経化学会大会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshida S, Futagami K, Ohtsuka H, Lee CLM, Tiong TKS, Nomura Y, Kanda Y.
2. 発表標題 Development-progressive neurotoxicity regulated neuroinflammation with prenatal chemical exposure on the rat.
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshida S, Nomura Y, Kanda Y
2. 発表標題 Development-progressive neurotoxicity regulated neuroinflammation with prenatal chemical exposure on the rat.
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Satake S, Futagami K, Tiong TKS, Nomura Y, Kanda Y, Yoshida S
2. 発表標題 The developmental effect of chronic and low concentration of Glyphosate exposure in utero
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Inakawa T, Tiong TKS, Futagami K, Nomura Y, Kanda Y, Yoshida S
2. 発表標題 Examining the association between a model of butyrate recovery in glyphosate-treated rats and changes in flora in a single dose of butyrate.
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ohtsuka H, Veloo S, Tsunemoto K, Tiong TKS, Kanda Y, Yoshida S
2. 発表標題 Cytological mechanism of developmental neurotoxicity embryonic LPS exposure
3. 学会等名 2020神経化学学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ohmuro T, Miyamoto K, Tiong TKS, Kanda Y, Yoshida S
2. 発表標題 Behavioral alteration and microbiome transition of the prenatal glyphosate-treated rat.
3. 学会等名 2020神経化学学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Matsufusa R, Kanda Y, Yoshida S
2. 発表標題 Mechanism of developmental neurotoxicity of chlorpyrifos due to AChE inhibition
3. 学会等名 2020神経化学学会
4. 発表年 2020年



〔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
研究 分担者	穂積 直裕  (Hozumi Naohiro)  (30314090)	豊橋技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・研究員   (13904)	
研究 分担者	田村 和輝  (Tamura Kazuki)  (40822614)	浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・助教   (13802)	

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
---------	---------