

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：54101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05930

研究課題名（和文）魚類脳神経系に対するネオニコチノイド系農薬環境変化体の影響評価

研究課題名（英文）Effects of neonicotinoid and its transformation products on the cranial nerve system of medaka (*Oryzias latipes*) embryos

研究代表者

甲斐 穂高 (KAI, HOTAKA)

鈴鹿工業高等専門学校・その他部局等・准教授

研究者番号：50518321

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：ネオニコチノイド系農薬環境変化体（NN-PTPWs）は、親化合物と比較して、昆虫等のニコチン性アセチルコリン受容体に強い結合親和性を示すことが明らかにされており、魚類等の水生生物に対しても受容体を介して脳神経系へ影響する可能性がある。本研究課題では、ヒメダカ(*Oryzias latipes*)をモデル生物としてNN-PTPWsの胚脳神経系への影響を明らかにした。その結果、NN-PTPWsは親化合物と比較して胚の脳神経系への影響がより強いことが示唆された。また、脳神経系の中でも、視神経は胚の脳神経系で最も影響を受けやすいと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ネオニコチノイド系農薬環境変化体（NN-PTPWs）が水生生物に及ぼす影響は不明な点が多い。本研究では、NN-PTPWsを対象として、メダカ脳神経系への影響について、異なる成長段階に対する毒性影響評価、免疫染色による脳神経系観察、発現変動遺伝子解析と毒性発現機序の予測を通して、個体・組織・細胞レベルにおいて包括的に解析した。そして、NN-PTPWsによる脳神経系への作用濃度・毒性影響とその発現機序の一部を明らかにでき、生態リスク評価のための科学的根拠が得られた。

研究成果の概要（英文）：Previous studies have suggested that neonicotinoid pesticide transformation products in water environments (NN-PTPWs) show high binding potency to nicotinic acetylcholine receptors in insects and other organisms compared to the parent compound. Furthermore, several NN-PTPWs may affect the cranial nerve system via intracellular receptors in aquatic organisms such as fish. In this study, we investigated the effects of NN-PTPWs on the embryonic cranial nerve system in medaka (*Oryzias latipes*). The fluorescent immunostaining analysis revealed that NN-PTPW had a severe effect on the embryonic nerve system than the parent compound, and that the optic nerve is one of the most affected cranial nerves. These results suggest that NN-PTPW has an adverse effect on the cranial nerve system of medaka embryos.

研究分野：バイオアッセイ

キーワード：ネオニコチノイド系農薬 環境変化体 脳神経系 免疫染色 メダカ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ネオニコチノイド系農薬 (NN) は、ミツバチなどの大量死など有害性を示すことから、欧州をはじめとする諸外国で、その使用や販売の規制が行われている。NN は農薬以外にも、動物用医薬品や建材などにも使用されるため、最終的に水系に排出されることで水生生物に影響を及ぼす可能性が懸念されている。NN は、自然環境中において代謝され、その構造が変化していくが、その代謝物(環境変化体: PTPWs)は代謝前の親化合物と同等以上の毒性があると報告されている。しかし、その詳細は明らかにされていない。加えて、一部のネオニコチノイド系農薬環境変化体は、親化合物と比較して、ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) に強い結合親和性を示すことが明らかにされており、水環境中のネオニコチノイド系農薬環境変化体が受容体を介して水生生物の脳神経系に影響を及ぼす可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究課題では、バイオアッセイ試験のモデル生物の一つであるヒメダカ (*Oryzias latipes*) を対象として、ネオニコチノイド系農薬環境変化体がヒメダカの脳神経系へ与える影響について、異なる成長段階に対する毒性試験、免疫染色による脳神経系観察、発現変動遺伝子解析から評価した。これらの結果から、ネオニコチノイド系農薬環境変化体が個体・組織・細胞レベルにおいて生体に与える影響を解析することを目的としている。

3. 研究の方法

本研究課題では、ネオニコチノイド系農薬の中から、親化合物としてイミダクロプリド (Imidacloprid: IMI)、これの環境変化体デスニトロイミダクリプリド (Desnitro-imidacloprid hydrochloride: DNI) と 2-クロロ-5-ピリジンカルバルデヒド (2-Chloro-5-pyridinecarbaldehyde: CPC) および最終代謝物 (6-Chloropyridine-3-carboxylic acid: 6-CNA) を評価対象物質として選択し、以下の実験等を行なった。

1) 異なる成長段階に対する毒性影響評価

胚や仔魚 (孵化後 24 時間以内) に対するネオニコチノイド系農薬環境変化体の毒性影響を評価するために、OECD テストガイドライン TG203/236 等に準拠した曝露試験を実施した。具体的には、受精後約 6 時間の胚を胚培養液に浸し、25°C、明暗周期 16h: 8h の条件で 24 時間ごとに胚培養液を交換しながら所定の期間における曝露を行った。なお、曝露試験においては、孵化率、死亡率、発生 の 速 さ、心拍数計測、催奇形の有無等を確認した。

2) 免疫染色手法による脳神経系の観察

上記 1) で実施した曝露実験に供した胚または仔魚に対して、脳の神経分化や神経軸索走行に対するネオニコチノイド環境変化体の影響を明らかにするため、脳神経系を抗アセチル化チューブリン抗体と蛍光標識抗体を用いて免疫染色処理し、蛍光実体顕微鏡を用いて観察した。

3) 発現変動遺伝子解析と毒性発現機序の予測

上記 1) で実施した曝露実験に供した胚は、RNAlater で固定後、total RNA を抽出した。Total RNA はアジレント社製バイオアナライザーを用いて品質確認を行い (RIN: >9)、RNA の精製、cDNA 合成、アダプター付加により mRNA ライブラリーを調製した。次世代シーケンサーによる RNA シーケンス (RNA-Seq) はイルミナ社製 NovaSeq 6000 プラットフォームを用いて行った。

得られたシーケンシング配列データは、Ensembl (<http://asia.ensembl.org/index.html>) を用いてメダカのゲノム情報を取得し、マッピング後に発現変動遺伝子 (DEG) を抽出した (対照群と比較して 2 倍以上・-2 倍以下および $p < 0.05$)。また、DEG については、DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>) ならびに STRING (<https://string-db.org>) を用いて、GO、パスウェイおよびネットワーク解析を行った。

4. 研究成果

1) 異なる成長段階に対する毒性影響評価

本実験で得られた結果のうち、環境変化体に曝露したメダカ胚の発生過程の異常に関する結果について、以下のとおり報告する。図 1 に IMI の環境変化体の一つである CPC: 10 mg/L に曝露した胚の実体顕微鏡写真を示した。曝露群と対照区を比較すると曝露 5 日目から胚の発生が不十分であることが確認された。具体的には、図 1 に示したように血栓が形成された個体、左右非対称な個体、眼球が溶けたような個体がみられた。また、対照区では曝露 6 日目 (7 日目胚) 頃から血流がはっきり見えていたが、CPC 10 mg/L を曝露した胚は血流が少なく見えた。

図 2 は、IMI の環境変化体の一つである 6-CNA に曝露した胚の実体顕微鏡写真を示した。曝露 7 日目までは対照区と比較して、胚の発生速さや外観に異常は見られなかった。しかし、曝露 8 日目になると 6-CNA: 160mg/L の胚は曝露個体全て (15 個体) が図 2 の一番右のように死亡した。

6-CNA : 80mg/L の胚は、曝露 8 日目で全 15 個体のうち 2 個体、曝露 9 日目にはさらに 8 個体の死亡が確認された。

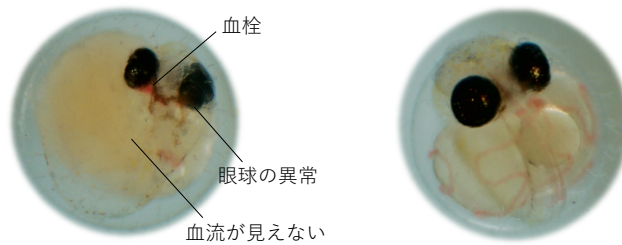


図 1 CPC 10 mg/L に 6 日間曝露したメダカ胚の実体顕微鏡観察結果 (写真右は、対照区)

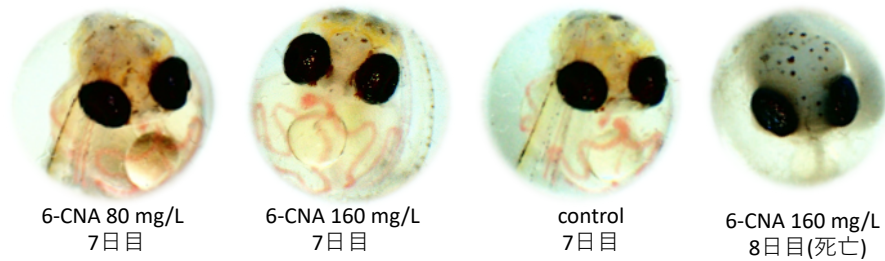


図 2 6-CNA に曝露したメダカ胚の実体顕微鏡観察結果

2) 免疫染色手法による脳神経系の観察

IMI に曝露したメダカ胚の脳神経系観察結果を図 3 に示した。IMI 曝露群において、対照区では、視神経、顔面神経、舌咽神経、迷走神経、後側線神経が確認された。320 mg/L 曝露胚では、A のメダカ胚では後側線神経のみが、B のメダカ胚では視神経、三叉神経、後側線神経のみが確認された。160 mg/L 曝露胚では、視神経、三叉神経、顔面神経、後側線神経が確認された。対照区と曝露群を比較すると、いずれの個体も、目や耳の周りの神経の蛍光強度が弱くなっており、神経自体が細いことが分かった。また、この結果は、高濃度曝露群の方が顕著であった。なお、後側線神経において、異常は見られなかった。

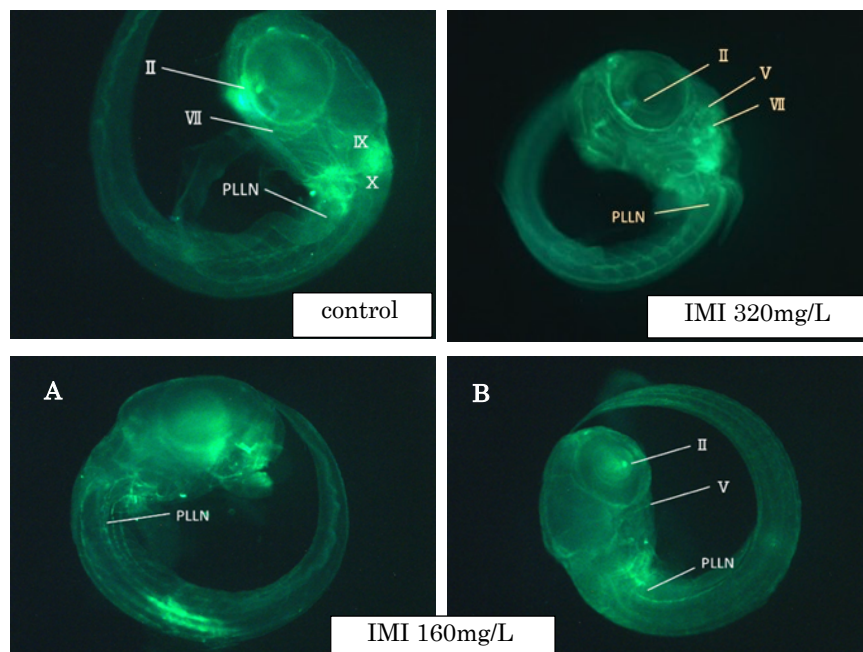


図 3 免疫染色した IMI 曝露胚の脳神経系観察結果
(IMI=160 mg/L の A と B は別個体)

PLLN=後側線神経 II =視神経 V =三叉神経 VII=顔面神経 IX=舌咽神経 X =迷走神経

DNI に曝露したメダカ胚の脳神経系観察結果を図 4 に示した。DNI 曝露群において、320 mg/L 曝露では、視神経、後側線神経が確認できた。160 mg/L 曝露胚では、三叉神経、顔面神経、舌咽神経、迷走神経、後側線神経が確認できた。320 mg/L 曝露胚では、対照区と比較して神経が全体的に細くなっており、また、耳の周りの神経の蛍光強度が著しく弱く、神経の発達が不十分であることが示唆された。160 mg/L 曝露胚では、耳の周りの神経や後側線神経は確認できたが、視神経の蛍光強度が弱かった。

6-CNA に曝露したメダカ胚の脳神経系観察結果を図 5 に示した。6-CNA 曝露群において、160 mg/L 曝露胚では、主要な脳神経の同定ができず、全体的に神経が細く、発達が不十分であった。80 mg/L を曝露胚では、視神経、三叉神経、顔面神経、舌咽神経、迷走神経、後側線神経が確認された。しかし、目や耳の周りの神経は対照区と比較して細かった。

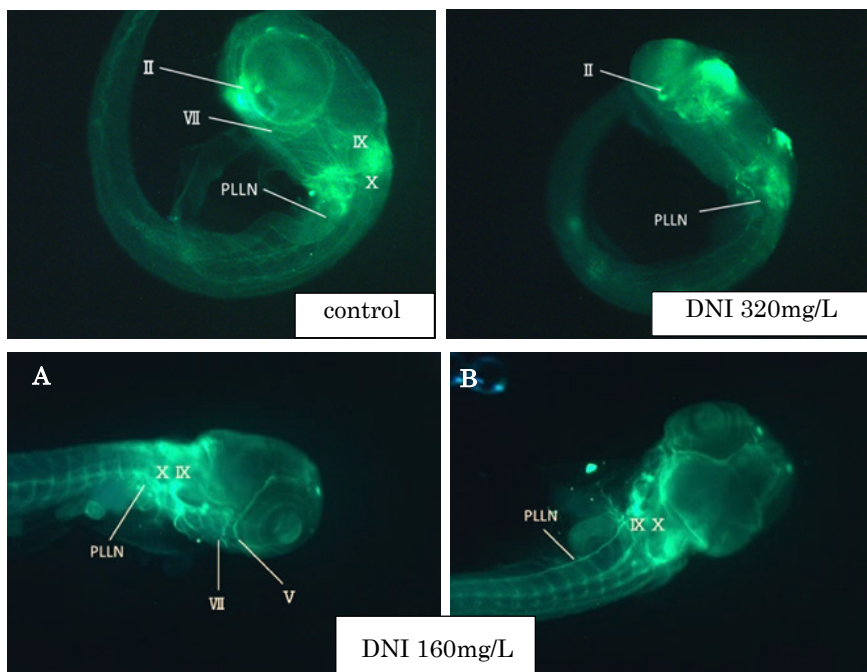


図 4 免疫染色した DNI 曝露胚の脳神経系観察結果
(DNI=160 mg/L の A と B は同個体)

PLLN=後側線神経 II =視神経 V =三叉神経 VII=顔面神経 IX=舌咽神経 X =迷走神経

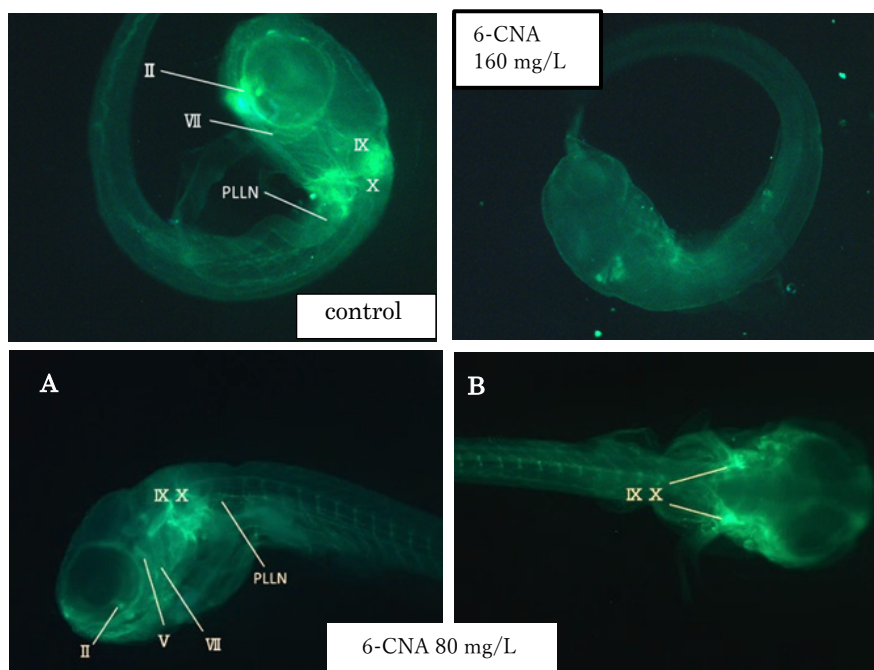


図 5 免疫染色した 6-CNA 曝露胚の脳神経系観察結果
(6-CNA:80 mg/L の A と B は同個体)

PLLN=後側線神経 II =視神経 V =三叉神経 VII=顔面神経 IX=舌咽神経 X =迷走神経

以上の結果から、IMI、DNI、6-CNA の全てにおいて、胚の脳神経系が細くなっている部分、または脳神経系が確認しづらい部分がみられ、これら脳神経系への影響は高濃度曝露区でより顕著であった。また、同一の曝露濃度で比較した場合、代謝が進んだ化合物に曝露した個体における脳神経系への影響が強くなり、環境変化体は親化合物と比較して胚の脳神経形成への影響がより強いことが示唆された。同一化合物の高濃度曝露区では、脳神経系の蛍光強度が全体的に弱く、神経が観察しにくい結果となっていた。一方で、同一化合物低濃度の曝露区では、胚の視神経の蛍光強度が弱く見られた。この結果より、視神経は他の神経部位と比較して、低濃度の曝露でも影響を受けやすいと考えられる。

3) 発現変動遺伝子解析と毒性発現機序の予測

ネオニコチノイド系農薬環境変化体を曝露したヒメダカ胚のトランスクリプトーム解析を行った。RNA-seq 解析の結果、ネオニコチノイド系曝露区における発現変動遺伝子 (DEGs) が明らかになった。また、DEGs を用いた解析から、様々な遺伝子オントロジー (GO) やパスウェイへの影響が示唆された。DEGs を用いたネットワーク解析 (DNI-320 のみ実施) から、脳神経系の発達等に重要な役割を果たすネットワークへの影響が示唆された。この結果は、上記 2) の脳神経系の染色の結果を支持すると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 甲斐穂高, 山下昂輝, 水谷明日香, 山口雅裕, 石橋康弘, 石橋弘志
2. 発表標題 ヒメダカ胚の脳神経系形成に対するネオニコチノイド系農薬環境変化体の影響
3. 学会等名 第29回環境化学討論会
4. 発表年 2021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	山口 雅裕 (Yamaguchi Masahiro) (00360660)	鈴鹿工業高等専門学校・その他部局等・教授 (54101)	
研究分担者	石橋 弘志 (Ishibashi Hiroshi) (90403857)	愛媛大学・農学研究科・准教授 (16301)	
研究分担者	石橋 康弘 (Ishibashi Yasuhiro) (00212928)	熊本県立大学・環境共生学部・教授 (27401)	

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