

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22933

研究課題名(和文)イオン性環境汚染物質がもたらす神経伝達物質への影響の理解と評価法の開発

研究課題名(英文)Developing evaluation methods for the effects of ionic environmental pollutants on neurotransmitters

研究代表者

野見山 桂(Nomiyama, Kei)

愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・准教授

研究者番号：30512686

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、モノアミンの脳における分布と濃度を明らかにするため、質量イメージング(MSI)とLC-MS/MS法による網羅的かつ高感度・高精度な分析法を開発を試みた。

イミダクロプリドを曝露したマウスの脳を対象にMSIで局在解析を行った結果、線条体に分布するドーパミンを検出し、イミダクロプリド曝露に伴いその強度の減少傾向が認められた。DPP誘導体化試薬をLC/MSに適用し高感度なモノアミン定量法を確立した。脳の各部位のモノアミン濃度を測定した結果、線条体のドーパミン濃度に変化は認められなかったが、嗅球における3-MT、ドーパミンの減少、線条体におけるセロトニン、ヒスタミンの減少などが検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳神経作用への作用機序の解明にはこれら脳内関連物質を含めた包括的な分析が必要であるが、高マトリクスな脳試料を対象とした分析は容易ではなく、神経伝達物質の包括的分析法は達成されていない。

本研究で新たに開発したDPP誘導体化によるMSIおよびLC/MS定量法により、NNが脳の各部位においてモノアミン濃度を変化させ、さらに低濃度によっても変化させることをグラフィカルに初めて明らかにすることが出来た。本研究成果は、曝露実験で得られた結果と併せて化学物質の脳移行による異常行動を予測する技術にも応用できると考えており、当該研究分野の発展に繋がる斬新かつチャレンジ性のあるアイデアの創生が期待される。

研究成果の概要(英文)：Monoamine neurotransmitters (MAs), including dopamine (DA) and serotonin (5-HT), regulate brain functions such as behavior, memory, and learning. Neonicotinoids are pesticides that are being used more frequently. Neonicotinoid exposure has been observed to produce neurological symptoms, such as altered spontaneous movements and anxiety-like behaviors, which are suspected to be caused by altered MA levels. In this study, we developed a sensitive and accurate analytical method using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) to clarify the effects of neonicotinoid administration on MAs in the brain. We orally administered the neonicotinoid imidacloprid to mice. The LC-MS/MS quantification of MAs in various brain regions by DPP derivatization, which was newly developed in this study, showed a decrease in some MA levels in the olfactory bulb and the striatum. Thus, in this study, we developed a new method for the sensitive detection of MAs by LC/MS using DPP derivatization.

研究分野：環境分析化学・環境毒性学

キーワード：イオン性環境汚染物質 脳移行 質量イメージング 神経伝達物質 ネオニコチノイド

## 1. 研究開始当初の背景

近年、ネオニコチノイド系殺虫剤 (NN) による哺乳類への毒性が報告されている。中でも神経毒性に関する報告は多岐にわたり、不安様行動の増加や自発運動量の変化が認められている<sup>5,6</sup>。NNによる神経毒性の詳細な機序は未だ不明であるが、このような行動の変化には脳内のモノアミンの関与が疑われている。しかしながら、NNによるモノアミンへの影響を調べた研究は未だ少なく、十分な知見は得られていない。また、NN脳のどの部位に作用し、どの神経伝達物質へ影響を与えるかについては明らかになっていない。

そこで新規検出手法として注目したのが質量分析イメージング (MSI) 法および液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS/MS) 法である。MSI は、組織切片上で質量分析を行うことで、多様な分子種の局在を可視化することができる。また、一度の測定で多数の物質を網羅的かつ定性的に解析できるため、既知の物質だけでなく未知の物質の変化も検出することが可能である。LC-MS/MS は高速液体クロマトグラフィーと質量分析を組み合わせた手法で、測定物質を高感度かつ定量的に測定することができる。

MSI では、モノアミン誘導体化試薬である Tetrafluoroborate salts of 2,4-diphenyl-pyranium (DPP) を用いることでイオン化効率が上昇し、高感度なモノアミン検出が可能となる。DPP はピリリウム基を持ち、モノアミンのアミノ基と反応する。LC-MS/MS での適用例は存在しないが、本試薬を用いることで LC-MS/MS におけるモノアミンの高感度分析を確立できる可能性がある。この2種類の質量分析法を併用することで、従来では検出することが出来なかったモノアミンの異常を含めた神経攪乱の検出が可能になると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、脳におけるモノアミンの局在と各部位における濃度を明らかにするため、MSI および LC-MS/MS による網羅的かつ高感度・高精度な分析法を開発し、NN 投与が脳におけるモノアミンの産生に与える影響を明らかにすることを試みた。

## 3. 研究の方法

動物実験に関しては「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定」に基づいた計画の上で行った。(承認番号 18-0061) マウス (C57BL/6NCrSlc ; N = 24) を対照群、低用量群、高用量群の3群 (N = 8/群) に分けた。IMI 溶解 2.5% (v/v) DMSO コーン油を低用量群には 10 mg/kg 体重、高用量群には 50 mg/kg 体重となるように経口投与した。対照群には 2.5% (v/v) DMSO コーン油を 10 mL/kg 体重となるように経口投与した。なお、経口投与はイソフルランにより軽度の麻酔をかけた後に行った。本実験で使用した IMI の用量は、無毒性量 (NOAEL) である 10 mg/kg (低用量群) および、最小毒性量 (LOAEL) である 46 mg/kg 付近 (高用量群) に設定した。

### 3.1. 質量分析イメージング (MSI)

投与から1時間後にイソフルラン深麻酔下での頸椎脱臼により安楽殺を行い、解剖・採材を行った。採材した脳を液体窒素で急速冷凍した後、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。凍結した脳組織はクライオスタット (CM1900、Leica) を用いて  $8\ \mu\text{m}$  に薄切した。切片は、ITO コートガラス (コード No. 8237001、Bruker Daltonics) へ貼付し、シリカゲルと共に 50 mL チューブで、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

DPP をメタノールで 10 mg/mL に調整し、DPP 溶液とした。希釈溶媒としてメタノール 8.1 mL、蒸留水 (DW) 5.4 mL 及びトリエチルアミン (TEA) 9  $\mu\text{L}$  を混和した。誘導体化試薬は、得られた希

積溶媒と DPP 溶液が 69 : 6 の組成となるように混合した溶液とした (以下 DPP mix と呼ぶ)。調整した DPP mix をエアブラシ (プロコン BOY PS268-A、クレオス製) を用いて、スライドガラス 1 枚に対して約 200  $\mu$ L を均一になるよう噴霧した。誘導体化試薬噴霧後、室温 (約 25°C) で 24 時間静置し、組織上誘導体化反応を完了した。

組織上誘導体化反応完了後、ITO コートガラスを DW に 10 回ほど浸漬し、余剰な誘導体化試薬を洗浄した。ITO コートガラスの乾燥後、あらかじめ誘導体化させておいた STD mix (終濃度: 250 ppb) を ITO コートガラス及びコントロール組織上に滴下して陽性対照とした。その後、MALDI マトリックスを組織上に供給した。本実験では、MALDI マトリックスとして、CHCA を用いた。CHCA 溶液濃度は、10 mg/mL とし、溶媒として TA50 (ACN : 0.1% TFA 水溶液 = 50 : 50 の混合溶媒) を用いた。CHCA 溶液調整に際し、ポルテックスミキサーで攪拌後、超音波処理を 10 分間行い、上澄みを噴霧に用いた。CHCA 溶液の噴霧は誘導体化試薬と同様、エアブラシを用いて行い、150-200  $\mu$ L のマトリックス溶液を組織表面に均一に噴霧した。なお、コンタミネーションを防ぐため、誘導体化試薬噴霧とマトリックス溶液噴霧は別のエアブラシを準備して行った。

質量分析イメージングは、SolariX XR (Bruker Daltonics) にて測定を行った。モノアミン系神経伝達物質のうち、Dopamine、3-methoxytyramine、Serotonin、Histamine の 4 種類を測定対象とした。

### 3.2. DPP 誘導体化分析法の条件検討

脳はブレインマトリックス (ステンレススチール製、マウス (40-75 g) Coronal、CellPoint 社、商品コード 15831110、型式 69-2175-1、バイオリサーチセンター株式会社) を用いて、線条体を含む冠状断面 (Bregma 1.00 mm-0.00 mm) および海馬を含む冠状断面 (Bregma -3.00 mm - 4.00 mm) を切り出した。線条体は、目視で確認した上で、DISPOSABLE BIOPSY PUNCH ( $\phi$  2 mm、Lot No. 19L48、カイイングストリーズ株式会社) を用いてパンチアウトで採材した。海馬は上記断面からピンセットで分離して採材した。その他の部位 (大脳皮質、脳幹、小脳、嗅球) も分離し、採材した。各脳部位は重量を測定した後、1.5 mL チューブ (嗅球、線条体、海馬) および 2.0 mL チューブ (大脳皮質、脳幹、小脳) に入れ、液体窒素で急速冷凍した後、-80°C で保存した。心採血で得られた血液は氷上で保管した後、遠心 (4°C、4,000G、10 min) し、血漿を -80°C で保管した。採材した脳および血漿はモノアミン濃度の測定に用いた。

内部標準物質として IS mix (1 ppm in 0.1%ギ酸含有 70% MeOH ; MeOH で適宜希釈) を 200 ppb, 20  $\mu$ L (線条体) 10 ppb, 20  $\mu$ L (海馬) 100 ppb, 20  $\mu$ L (嗅球、大脳皮質、脳幹、小脳) 加えた。氷冷した 0.05%ギ酸アセトニトリルを 200  $\mu$ L (線条体、海馬) 100  $\mu$ L (嗅球) 300  $\mu$ L (大脳皮質、脳幹) 400  $\mu$ L (小脳) 加え、1.5 mL チューブにはジルコニアビーズ (2.0 mm、Lot No. 0894-T40、東レ株式会社) を 2 粒、2.0 mL チューブにはジルコニアビーズ (5.0 mm、ZZ50-0001、株式会社バイオメディカルサイエンス) を 1 粒入れて、Tissue Lyser (Cat. 85200、Retsch、QIAGEN) でホモジェナイズ (1 min、30/s) した。その後、各チューブを遠心 (10,000G、10 min、25 ) した。上清 10  $\mu$ L と DPP mix 10  $\mu$ L を 8 連チューブに加え、サーマルサイ클ーを用いて 60 、4 時間誘導体化反応させた。誘導体化反応終了後、各チューブに DW を 80  $\mu$ L ずつ加えて希釈し、対象物質を LC-MS/MS で測定した。いずれのモノアミンも内部標準法で定量した。

## 4. 研究成果

#### 4.1. 質量分析イメージング (MSI)

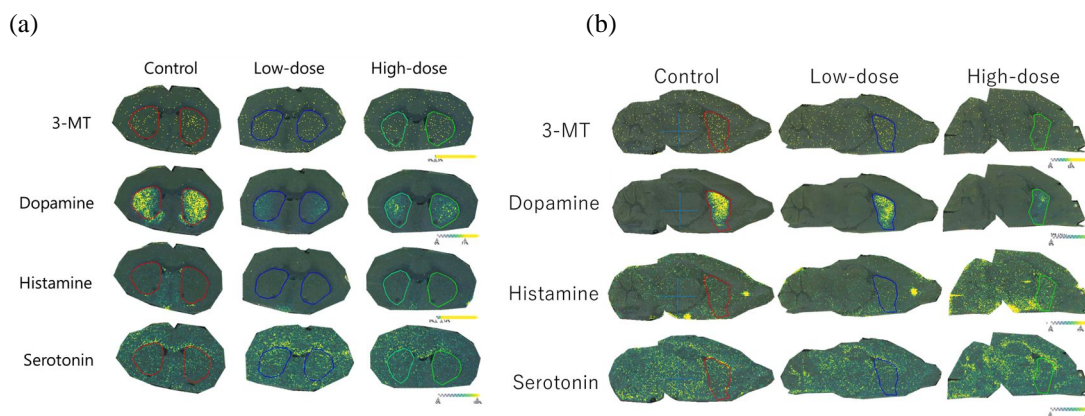
マウスの冠状断切片と矢状断切片を用いて MSI を行い、対照群と曝露群で比較した (Fig. 1)。Dopamine ( $m/z$  368.16) は、線条体に局在しており、対照群に比べて曝露群でその強度が減少していた (Fig. 3)。Serotonin ( $m/z$  391.18) は、強度が弱いものの脳全体に分布していた。3-MT ( $m/z$  382.18) および Histamine ( $m/z$  326.16) は検出感が悪く、ほとんど検出されなかった。

#### 4.2. DPP 誘導体化分析法の条件検討

各物質ともに、反応時間依存性に濃度 (面積値) が上昇していた。ヒスタミンを除いた 3 物質では反応開始から 6 時間で濃度が最高となったが、4 時間との間に有意な差は認められなかったため、反応時間は 4 時間に設定した。反応温度では、温度依存的に濃度が上昇し、いずれの物質でも 60°C において反応効率が最大となった。そのため、反応温度は 60°C に設定した。

#### 4.3. 脳の各部位におけるモノアミン濃度の測定

今回確立した分析手法を用いて、脳の各部位におけるモノアミン濃度の測定を行った。測定部位は嗅球、線条体、海馬、大脳皮質、小脳、脳幹とし、対照群と曝露群で比較した (Table 1)。3-MT は小脳において、高用量群で有意に上昇した ( $p = 0.0159$ ) が、嗅球では高用量群で有意に減少した ( $p = 0.0011$ )。Dopamine は、小脳において、高用量群で有意に減少し ( $p = 0.0007$ )、嗅球では用量依存性に有意な減少がみられた (低用量群:  $p = 0.0061$ 、高用量群:  $p = 0.0004$ )。また、有意な差は認められなかったが、線条体において用量依存性に減少傾向を認めた。Histamine は、線条体において低用量群、高用量群ともに有意に低下した ( $p < 0.0001$ )。また、小脳 (高用量群)、嗅球 (低用量群、高用量群) においても有意な低下が認められた (小脳:  $p = 0.013$ 、嗅球:  $p = 0.0271$  (低用量群)  $p = 0.037$  (高用量群))。Serotonin は線条体において、対照群が  $438.0 \pm 44.8$  ng/g であるのに対して低用量群では  $193.3 \pm 33.7$  ng/g、高用量群では  $320.2 \pm 14.8$  ng/g となり、有意な減少が認められた (低用量群:  $p < 0.0001$ 、高用量群:  $p = 0.0391$ )。その他の部位では、いずれのモノアミンも有意差は見られなかった。



**Fig. 1.** MSI visualizations of derivatives of monoamines with DPP.

Coronal (a) and sagittal (b) brain sections of IMI exposed mice were analyzed by MSI.

Dopamine was localized in striatum and reduced in IMI exposed group. The areas encircled by red, blue or green line indicate striatum.

**Table 1.** The concentration of monoamines in brain tissues.

	Control	Low-dose	High-dose
<b>3-MT (ng/g)</b>			
Striatum	747.3 ± 88.0	807.4 ± 137.1	595.6 ± 39.9
Hippocampus	6.1 ± 1.2	5.0 ± 0.6	4.9 ± 1.0
Cortex	66.7 ± 15.6	69.0 ± 15.8	56.5 ± 5.2†
Cerebellum	3.1 ± 0.2	3.7 ± 0.1	4.4 ± 0.45*
Brain stem	13.0 ± 0.9	11.9 ± 0.6	13.9 ± 1.2
Olfactory bulb	72.4 ± 5.1	62.4 ± 3.3	51.8 ± 1.4***†
<b>Dopamine (ng/g)</b>			
Striatum	9747.0 ± 1580.2	9364.5 ± 1458.3	8283.8 ± 515.5†
Hippocampus	67.9 ± 8.7	46.3 ± 8.8	43.0 ± 9.6
Cortex	418.0 ± 103.4	457.7 ± 116.7	294.3 ± 34.7†
Cerebellum	20.2 ± 1.6	16.7 ± 0.7	13.7 ± 0.7***†
Brain stem	123.0 ± 7.3	106.6 ± 7.3	116.9 ± 8.0
Olfactory bulb	407.8 ± 20.0	331.9 ± 16.7**	304.8 ± 10.1***
<b>Histamine (ng/g)</b>			
Striatum	452.8 ± 28.3	133.7 ± 28.5***	198.1 ± 12.2***
Hippocampus	53.3 ± 6.8	48.3 ± 4.8	39.6 ± 5.3
Cortex	64.1 ± 4.9	57.9 ± 4.1	55.9 ± 4.5
Cerebellum	60.9 ± 4.0	54.7 ± 3.2	44.9 ± 4.0*
Brain stem	65.3 ± 10.4	63.5 ± 4.76	60.8 ± 5.64
Olfactory bulb	155.9 ± 16.2	112.9 ± 8.6*	115.3 ± 7.6*
<b>Serotonin (ng/g)</b>			
Striatum	438.0 ± 44.8	193.3 ± 33.7***	320.2 ± 14.8*†
Hippocampus	704.0 ± 78.3	800.0 ± 51.7	651.3 ± 55.8
Cortex	546.6 ± 40.0	565.6 ± 41.9	481.3 ± 24.8
Cerebellum	370.1 ± 36.8	404.4 ± 30.5	260.8 ± 24.5
Brain stem	1348.0 ± 56.8	1407.9 ± 49.9	1288.4 ± 69.4
Olfactory bulb	666.8 ± 26.8	662.2 ± 43.3	616.9 ± 38.1

Values represent the mean ± SE of 8 animals in each group.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , Dunnett's test

† $p < 0.025$ , Bartlett test

本研究では次に MSI 及び LC-MS/MS を用いて IMI 曝露マウス脳モノアミンの測定を行った。MSI においては、線条体における DA 強度が IMI 用量依存性に低下している傾向が認められた。その他の 3 種類のモノアミンはほとんど検出されなかった。MSI におけるこれらのモノアミンのさらなる高感度な検出法の開発が今後の課題である。本研究で確立した分析手法における LOD (MDL) は 3-MT で 2.08 ppt、DA で 24.9 ppt、ヒスタミンで 9.8 ppt、セロトニンで 1.5 ppt であり、従来手法に比べて非常に高い検出感度を達成した。化学物質による神経毒性を明らかにする上で、本研究により確立した MSI による網羅的解析と LC/MS による高感度な定量が有効であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nomiyama Kei, Tsujisawa Yusuke, Ashida Emiko, Yachimori Syuji, Eguchi Akifumi, Iwata Hisato, Tanabe Shinsuke	4. 巻 54
2. 論文標題 Mother to Fetus Transfer of Hydroxylated Polychlorinated Biphenyl Congeners (OH-PCBs) in the Japanese Macaque ( <i>Macaca fuscata</i> ): Extrapolation of Exposure Scenarios to Humans	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Environmental Science & Technology	6. 最初と最後の頁 11386 ~ 11395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.est.0c01805	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Suzuki Tomohiro, Hirai Anri, Khidkhan Kraisiri, Nimako Collins, Ichise Takahiro, Takeda Kazuki, Mizukawa Hazuki, Nakayama Shouta M.M., Nomiyama Kei, Hoshi Nobuhiko, Maeda Mizuki, Hirano Tetsushi, Sasaoka Kazuyoshi, Sasaki Noboru, Takiguchi Mitsuyoshi, Ishizuka Mayumi, Ikenaka Yoshinori	4. 巻 175
2. 論文標題 The effects of fipronil on emotional and cognitive behaviors in mammals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pesticide Biochemistry and Physiology	6. 最初と最後の頁 104847 ~ 104847
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pestbp.2021.104847	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Nomiyama K, Eguchi A, Takaguchi K, Yoo J, Mizukawa H, Oshihoi T, Tanabe S, Iwata H	4. 巻 377
2. 論文標題 Targeted metabolome analysis of the dog brain exposed to PCBs suggests inhibition of oxidative phosphorylation by hydroxylated PCBs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Toxicology and Applied Pharmacology	6. 最初と最後の頁 114620
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.taap.2019.114620	査読の有無 有
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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小椋 響子、田上 瑠美、池中 良徳、寺岡 宏樹、久保田 彰、国末 達也、野見山 桂
2. 発表標題 Py-Tag誘導体化法を用いた脳神経伝達物質とその関連物質の高感度分析法の開発とその応用
3. 学会等名 第29回環境化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tanoue, R., Nakayama, K., Kondo M., Nomiya, K., Kunisue, T., Tanabe, S
2. 発表標題 Toxicokinetic parameters causing the discrepancy between the measured and predicted bioconcentration factors of pharmaceuticals and personal care products in fish
3. 学会等名 Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) Europe 29th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池中良徳・一瀬貴大・ニマコ・コリンズ・市川 剛・野見山 桂・長谷川 浩・中山翔太・星 信彦・平 久美子・石塚 真由美
2. 発表標題 ネオニコチノイドの母子間移行の実態と移行メカニズムの解明
3. 学会等名 第28回環境化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野純華・高口倅暉・田上瑠美・国末達也・岩田久人・田辺信介・野見山 桂
2. 発表標題 ポリ塩化ビフェニル(PCBs)曝露がイヌ脳中甲状腺ホルモン恒常性へ及ぼす影響- 脳中甲状腺ホルモンの分析法開発 -
3. 学会等名 第46回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野島由衣・田上瑠美・国末達也・田辺信介・岩田久人・野見山 桂
2. 発表標題 液体クロマトグラフタンデム質量分析計(LC-MS/MS)を用いた脳中神経伝達物質と代謝物の分析法開発
3. 学会等名 第46回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野島由衣・和田博美・田辺信介・野見山 桂
2. 発表標題 母親を介した発達期BDE-209曝露による脳神経系およびラット超音波発声への影響評価
3. 学会等名 第22回環境ホルモン学会研究発表会
4. 発表年 2019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	水川 葉月 (Mizukawa Hazuki)  (60612661)	愛媛大学・農学研究科・准教授  (16301)	
研究分担者	池中 良徳 (Ikenaka Yoshinori)  (40543509)	北海道大学・獣医学研究院・教授  (10101)	

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