

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21510075

研究課題名（和文） 脳発達への環境化学物質の影響を調べるための培養シナプス形成系と遺伝子発現解析

研究課題名（英文） Effects of environmental chemicals on synapse formation and gene expression using primary brain culture.

研究代表者

黒田 純子（木村 純子）(KURODA JUNKO (KIMURA JUNKO))

財団法人東京都医学総合研究所 脳発達・神経再生研究分野 研究員

研究者番号：20142151

研究成果の概要（和文）：本研究では、環境化学物質の中で、哺乳類への影響が十分調べられていない新規農薬ネオニコチノイドに焦点を当て、脳発達の要であるシナプス形成期に及ぼす影響を調べた。発達期のラット小脳神経細胞培養を用いて、ネオニコチノイド2種の影響を調べたところ、ニコチン同様に1 μ M とごく低用量から興奮性反応を起こすことが明らかとなった。ニコチンは子どもの脳発達に悪影響を及ぼすことが確認されており、ネオニコチノイドによる子どもの脳発達への影響が懸念される。

研究成果の概要（英文）：The neonicotinoids belong to a new, widely used class of pesticide. With similar chemical structures to nicotine, neonicotinoids also share agonist activity at nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). Although their toxicities against insects are well established, their precise effects on mammalian nAChRs remain to be elucidated. Because of the importance of nAChRs for mammalian brain function, especially brain development, detailed investigation of the neonicotinoids is needed to protect the health of human children. Our study shows that neonicotinoids and nicotine exert similar excitatory effects on mammalian nAChRs of cultured cerebellar neurons from neonatal rats at concentrations greater than 1 μ M. Using this *in vitro* model system, it is proposed that the neonicotinoids adversely influences human health, especially the brain of children.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1700,000	510,000	2210,000
2010年度	1000,000	300,000	1300,000
2011年度	900,000	270,000	1170,000
年度			
年度			
総計	3600,000	1080,000	4,680,000

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：環境学、放射線・化学物質影響科学

キーワード：環境化学物質、脳発達、神経毒性、シナプス形成、培養神経細胞、農薬ネオニコチノイド

1. 研究開始当初の背景

PCB、ダイオキシン、農薬などの環境化学物質は、ヒトを含む自然界で広く検出されており、それらが感受性の高い胎児や子どもの発育・健康に影響を与える可能性が懸念されている。その上、新農薬など新規化学物質の種類も増加している。農薬の毒性試験は、脳高次機能発達への影響、エピジェネティックな変異や多種類の農薬の複合的影響、内分泌機能の攪乱など新しい知見の項目は入っておらず、安全性が十分とはいえない。農薬は昆虫の神経系を標的とした物質が多いが、基本的な神経伝達物質はヒトと同じであり、ヒトの脳神経系に及ぼす影響が懸念される。子供の行動異常や発達障害が増加している社会的背景から、農薬など環境化学物質暴露のリスクを検討、評価し対策を講じる必要が生じている。一方、環境化学物質の脳発達への影響を調べる研究はいまだ不十分である。個体レベルの動物実験では莫大な時間とコストがかかるため、効率の良い細胞レベルでのリスク評価が必要とされている。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト脳発達への影響が十分調べられていない新規農薬ネオニコチノイドに着目した。農薬の毒性は病虫害や雑草に特異的ではなく、ヒトや生態系に予想外の影響をもたらした歴史がある。有機塩素系農薬は深刻な環境汚染を起こし、次に開発された有機リン系農薬もヒトへの毒性が問題になり、最近では注意欠陥多動性障害など子どもの発達障害との因果関係を示す研究報告が複数出てきている。1990年代以降、ヒトにより安全とされているネオニコチノイド系農薬の使用量が急増している。ネオニコチノイドは、昆虫では神経伝達物質アセチルコリン(ACh)の受容体であるニコチン性 ACh 受容体 (nAChR) に強いアゴニスト作用をもつニコチン類似物質であるが、ニコチンで報告されているヒトの健康への影響、特に子どもへの影響がどれだけあるかは十分調べられていない。ヒトの nAChR は、末梢神経や自律神経系だけでなく脳の高次機能、免疫系に至るまで多様な機能を持ち、特に子どもの脳の発達において重要な働きをしていることが明らかとなっている。そこで我々は、発達期のラット小脳培養系を用いて、ネオニコチノイド系農薬がシナプス形成期に及ぼす影響について調べた。新生仔ラット小脳培養系は、神経細胞の成熟やシナプス形成などを再現できる脳発達の良いモデル系であり、その影響は感度の高いリスク評価となりうる。

3. 研究の方法

(1) 小脳神経細胞培養：生後 1 日のラット (SD) 新生仔を用いて、小脳神経細胞培養を作成した。動物の扱いは、東京都医学総合研究所動物実験倫理要綱に基づいて行い、個体数を減らし苦痛を極力軽減した。小脳神経細胞は、poly-L-lysine, ラミニンコートしたカバーガラス底シャーレに撒いて、無血清培地 (Kimura-Kuroda et al. Dev Brain Res 2002, 137:55-65) を用い、炭酸ガス培養機でシナプス形成が盛んな 14-16 日まで培養した。

(2) 試薬：神経細胞への影響を調べる物質としては、ニコチン (純度 99%以上 Sigma), ネオニコチノイド系農薬 2 種、イミダクロプリド (純度 98%以上関東化学)、アセタミプリド (純度 98%以上和光純薬) を用いた。ニコチン性受容体への作用の特異性を調べるため、ニコチン性受容体のアンタゴニスト 3 種、メカミラミン、 α ブングロトキシン、デヒドロ β エリスロイディンを用いた。

(3) ニコチン性受容体の発現：用いた小脳神経細胞にニコチン性受容体が発現していることは、逆転写 PCR 法を用いて mRNA を調べた。

(4) 免疫染色：小脳培養細胞の同定には、一次抗体に神経細胞特異的な TuJ1 抗体、培養小脳顆粒細胞に特異的な L1 抗体、プルキンエ細胞特異的な Calbindin D28K 抗体、アストロサイト特異的な GFAP 抗体を用い、蛍光色素でラベルした二次抗体で染色して調べた。

(5) 細胞内カルシウムの経時的計測：ラット培養小脳神経細胞に、カルシウム指示薬 Fluo4 を取り込ませ、ネオニコチノイド系農薬アセタミプリド、イミダクロプリドを添加し、細胞内カルシウムの動態を共焦点レーザー顕微鏡で経時的に測定した。細胞内カルシウムの動態は神経細胞の電気生理的活動の指標であり、興奮性細胞内カルシウムの流入はシナプス形成や記憶過程の重要な第 1 段階である。ニコチン性受容体は極めて脱感作を起こしやすいので、ニコチンやネオニコチノイドを投与する際は、標的の細胞から約 100 μ m から圧吐出法を用いて投与し、培養神経細胞を灌流しながら行った。

(6) アンタゴニストによる阻害実験：ニコチンやネオニコチノイドによる神経細胞の興奮性作用の特異性を調べるために、カルシウム動態を調べる前にニコチン性受容体のアンタゴニスト 3 種を投与してから、ニコチンやネオニコチノイドを作用させた。さらに培養細胞を灌流で洗ってから再度ニコチンやネオニコチノイドへの反応を調べた。

(7) 統計処理：得られたデータはスチュー

デントTテスト、もしくはANOVA法を用いて解析し、有意差はボンフェローニダンテストにより検定した。

4. 研究成果

(1) 主な研究結果: 2種のネオニコチノイド、イミダクロプリド、アセタミプリドはニコチン同様に1-100 μ Mで小脳顆粒神経細胞(特異抗体で細胞を確認)に興奮性カルシウムの流入を起こした(図1)。ニコチンとアセタミプリドは比較的シャープな反応パターンを示したが、イミダクロプリドは反応の終息が比較的遅く、緩やかなパターンを示した(図2)。

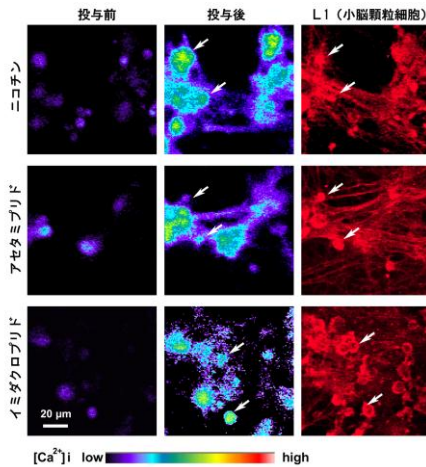


図1 ニコチン、ネオニコチノイドによる神経細胞の興奮性カルシウム流入

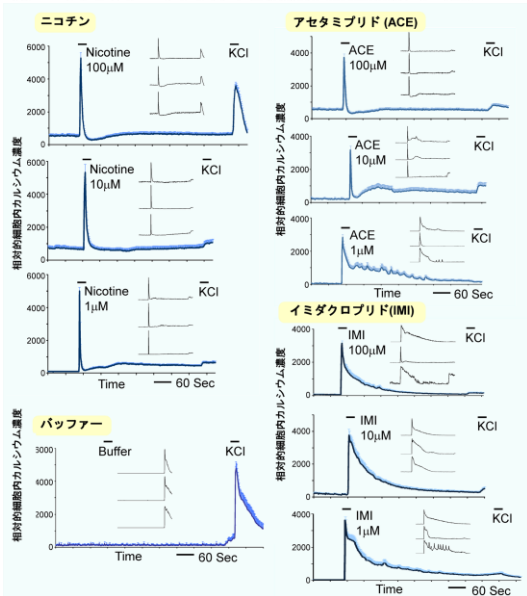


図2. ニコチン、ネオニコチノイドによる神経細胞の興奮性カルシウム濃度の上昇

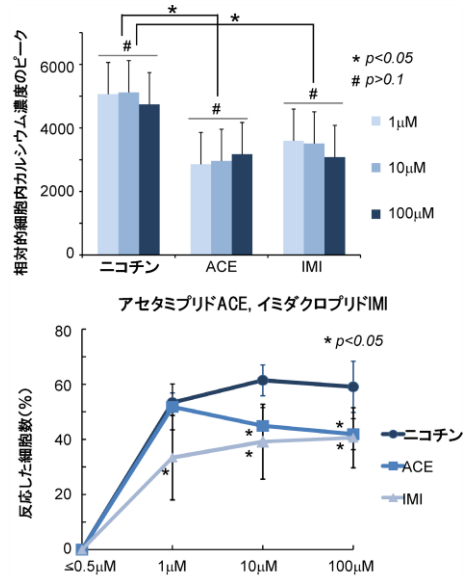


図3. ネオニコチノイドは神経細胞にニコチン類似の興奮性カルシウム流入を起こす

興奮性反応のピークや反応した神経細胞数はニコチンがより高かったが、結合実験からの推定以上に、哺乳類へ強いニコチン類似作用を示した(図3)。小脳顆粒細胞におけるnAChR α 3, α 4, α 7の発現はPCRで確認しており(図4)、ネオニコチノイドによる興奮性反応は特異的アンタゴニストで阻害されることから、これらの反応はnAChRを介していることを確認した(図5,6)。

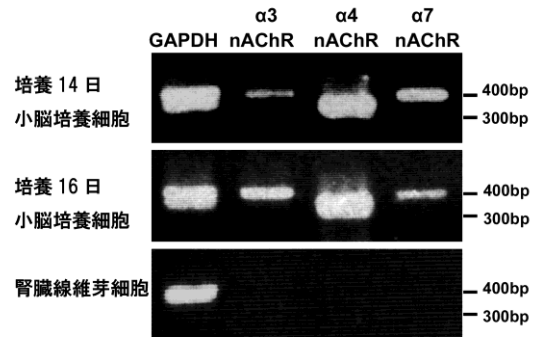


図4 小脳培養におけるニコチン性受容体の発現

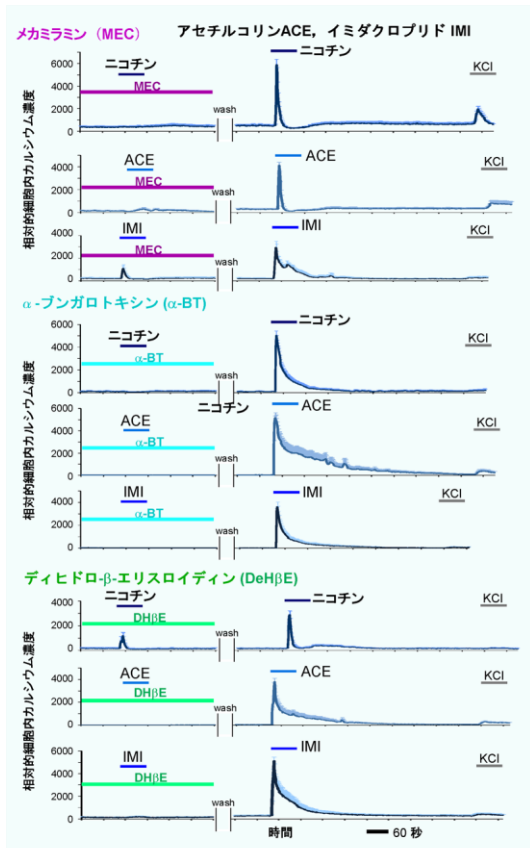


図5. ニコチン性受容体アンタゴニストはネオニコチノイドによる神経細胞の興奮性カルシウム濃度の上昇を抑制する

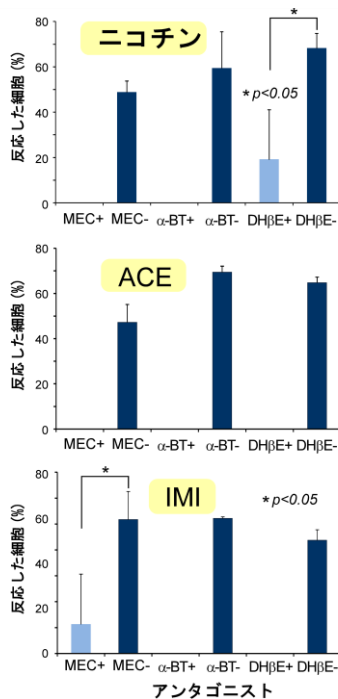


図6. ニコチン性受容体アンタゴニストによるネオニコチノイドの興奮性反応の抑制

以上の結果より、ネオニコチノイド系農薬イミダクロプリド、アセタミプリドは、哺乳類 nAChR に対し、これまで報告されている結合試験の結果から予想される反応性に比べ、

極めてニコチン類似の反応性を示すことが明らかとなった。

(2) 研究結果の考察：ヒト nAChR を強制発現させた細胞で、ネオニコチノイドがアセチルコリンへの反応性を増強するなど攪乱作用が報告されている (Li et al. J Neurosci Res. 2011, 89:1295)。さらにヒトなどの生体内で nAChR には内因性モジュレーター (LynX, SLURP など) が見つかり、これらのタンパクによって構造変化を起こしリガンドへの反応性に変化を起こすことが分かってきた (三澤日出巳、医学のあゆみ.2011,237:1053)。これらのことから、単純な結合実験でネオニコチノイドがヒトや哺乳類 nAChR には反応性が低くとも、生体内ではより高い反応性を示す可能性が考えられる。

またネオニコチノイドは、生体内で産生された代謝物の中には、原体より毒性を持つ場合があることも既に明らかにされている。マウスの実験では脳内にも入りやすく、アセタミプリドでは蓄積性も報告されている。ヒト由来の腸管細胞では、細胞内に取り込みやすいという報告もある。

一方でネオニコチノイドと類似性をもつニコチンは、子どもの発達に悪影響を及ぼすことが明らかになってきており、低体重出生、早産、乳児突然死症候群、注意欠陥多動性障害のリスクを上げることが知られている。脳の発達過程で、胎児期、小児期には nAChR が多量に発現して、神経回路形成を担っており、ニコチンやネオニコチノイドが脳発達に悪影響を及ぼす可能性がある。今後詳細な検討が必要である。

(3) 成果の位置づけ：これまで、ネオニコチノイド系農薬が哺乳類 nAChR に影響を及ぼす研究はあったが、ニコチンと比較した研究はなかった。本研究は、ヒトへの影響が確認されているニコチンとの対比から検討したことに一つの意義がある。また生体内に近いシナプス形成が in vitro で再現できる発達期の小脳神経細胞を実験系として用いたので、その影響を子どもの脳発達に類推することができることにも意義がある。個体内で同様なことが起こるか、確認は必要だが、細胞レベルでの情報は重要である。これらのことから、本研究は、ネオニコチノイドが脳発達過程において、ニコチン様の神経毒性をもつ可能性を明らかにしたものであり、その社会的意義は大きい。

(4) 今後の展望：本研究からネオニコチノイド系農薬のニコチン様神経毒性が明らかとなったが、その作用機序はまだ不明な点が多い。遺伝子レベル、個体レベルで何が起るのか調べる必要がある。またネオニコチノイド系農薬は7種あり、それぞれ作用が異なる可能性がある。また現在も多量に使われている有機リン系農薬は、アセチルコリン分解酵素阻害剤であり、ネオニコチノイド系農薬との複合影響も想定される。子どもの健康に関わる重要な課題であり、さらなる研究が必要と考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

① Kimura-Kuroda J., Komuta Y, Kuroda Y, Hayashi M, Kawano H. (2012) Nicotine-like effects of the neonicotinoid insecticides acetamiprid and imidacloprid on cerebellar neurons from neonatal rats. *PLoS One*. 7:e32432. 査読有

<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0032432>

② Ibhazehiebo K., Iwasaki T, Kimura-Kuroda J., Miyazaki W, Shimokawa N, Koibuchi N. (2011) Disruption of thyroid hormone receptor-mediated transcription and thyroid hormone-induced Purkinje cell dendrite arborization by polybrominated diphenyl ethers. *Environ Health Perspect.* 119:168-75. 査読有

③ 木村一黒田純子、黒田洋一郎、川野仁. (2010) 脳神経系をかく乱する農薬による新たな環境問題—ハチ大量死が私たちに伝えること—*ファルマシア* 46: 654-658. 査読無

④ 木村一黒田純子. (2010) 環境ホルモンなど環境化学物質のヒト脳への影響. *BMSA (バイオメディカルサイエンス研究会) 会誌* 22: 13-17. 査読無

⑤ 黒田洋一郎、木村一黒田純子. (2009) 子どもの脳の発達障害と行動異常. *イイホリ* 1: 33-41. 査読無

[学会発表] (計9件)

① 木村一黒田純子 農薬ネオニコチノイドのヒト・哺乳類への影響. 第20回日本臨床環境医学会学術集会シンポジウム招待講演 2011年12月13日千葉大学柏の葉キャンパス

② 木村一黒田純子等 ネオニコチノイド系農薬の哺乳類神経細胞へのニコチン様作用. 第14回環境ホルモン学会研究発表会 2011年12月2日 東京大学山上会館

③ Kimura-Kuroda J. et al. Nicotine-like Effects of the New Pesticide, Neonicotinoids on Rat Cerebellar Neurons. *Neuro2011* 2011年9月7日横浜パシフィコ

④ 木村一黒田純子等 新農薬ネオニコチノイドのラット脳神経細胞に対するニコチン

様作用について 第52回日本神経病理学会 2011年6月4日京都

⑤ 木村一黒田純子 脳神経系を攪乱する農薬と子どもの発達障害—ネオニコチノイド・有機リン系農薬の危険性—第24回環境ホルモン学会講演会招待講演 2011年2月7日東京大学山上会館

⑥ 木村一黒田純子等 浸透性農薬ネオニコチノイドは哺乳類神経細胞にニコチン類似の影響を及ぼす 第13回環境ホルモン学会研究発表会 2010年12月17日東京大学山上会館

⑦ Kimura-Kuroda J. et al. Nicotine-like Excitatory Effects of the New Pesticide, Neonicotinoids on Rat Cerebellar Neurons *Neuro2010* 2010年9月4日神戸コンベンションセンター

⑧ 木村一黒田純子等 殺虫剤ネオニコチノイドの哺乳類小脳神経細胞への影響 第12回環境ホルモン学会 2009年12月7日東京大学山上会館

⑨ 黒田洋一郎、木村一黒田純子 環境化学物質の子どもの脳への影響 日本安定同位体・生体ガス医学応用学会講演会招待講演 2009年10月30日 東京・東邦大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 純子 (木村 純子)

(KURODA JUNKO (KIMURA JUNKO))

財団法人東京都医学総合研究所・脳発達・神経再生研究分野・研究員

研究者番号：20142151

(2) 研究分担者

川野 仁 (KAWANO HITOSHI)

財団法人東京都医学総合研究所・脳発達・神経再生研究分野・副参事研究員

研究者番号：20161341

黒田 洋一郎 (KURODA YOICHIRO)

財団法人東京都医学総合研究所・脳発達・神経再生研究分野・副参事研究員

研究者番号：30073084

(H22→23 研究協力者)

(3) 研究協力者

小牟田縁 (KOMUTA YUKARI)

財団法人東京都医学総合研究所・脳発達・神経再生研究分野・研究員

研究者番号：60566850