

環境ホルモン・ネオニコチノイド 研究の最前線と遅れる規制



ここまで分かったネオニコの毒性

神戸大学先端融合研究環・農学研究科

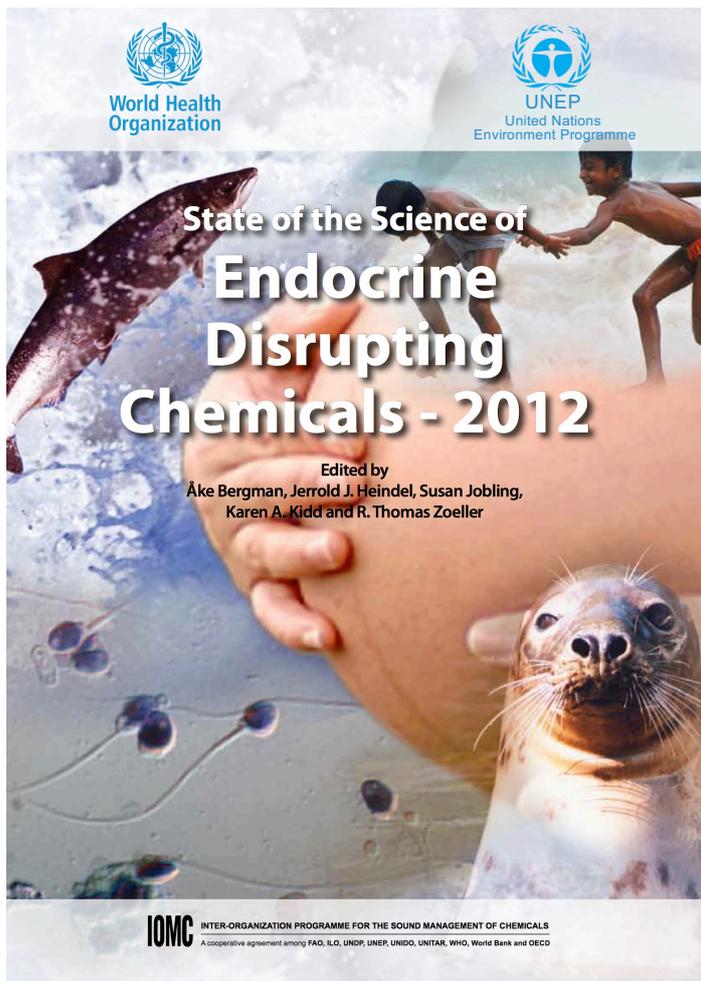
応用動物講座 動物分子形態学分野

教授 星 信彦 (nobhoshi@kobe-u.ac.jp)



Outline

- ・ 環境化学物質の安全性評価(毒性試験)とは？
- ・ 研究データの紹介(ネオニコチノイド系農薬を一例に)
 - ① 水田の生態系に及ぼす影響
 - ② 鳥類の生殖機能に及ぼす影響
 - ③ 哺乳類の脳神経系に及ぼす影響
 - ④ 胎子移行・性差・免疫系・加齢への影響
- ・ まとめ
ネオニコチノイド系農薬をとりまく現状について
環境化学物質の安全性評価に関する課題



Environmental Hormone Report from WHO / UNEP

(世界保健機関) (国連環境計画)

2013年7月

内分泌攪乱化学物質(EDCs)について、WHOとUNEPの共同研究の報告書が公表された。

人や野生生物の内分泌系(ホルモン系)の障害、疾病が急増している事から研究が始められたが、内分泌攪乱化学物質が疑われる800種の化学物質のうち、影響が知られているEDCsは今でも氷山の一角に過ぎない。

報告では、内分泌攪乱は10年前に理解されていたものよりはるかに広範であり、地球上全ての人も野生生物もEDCsに曝露されていること、EDCsの発生源の多くは知られていないことを上げ、問題の深刻さを警鐘している。

生殖系(男性器異常)、神経系(脳発達障害)、そしてある種のがんリスク増大(乳がん、前立腺がん等)への有害影響について、その関連性は明らかであると言及している。

また、一部のEDCsの使用禁止や制限により、野生生物の個体数の回復や健康問題の改善がみられたという報告もあり、健康と環境への影響のためにより多くの研究が喫緊の課題であるとしている。

Animal Molecular Morphology @ Kobe University

Profile



【研究テーマ】

環境要因 (環境化学物質やストレス等) が生体に与える影響評価
およびメカニズム解明に関する研究

毒性試験データの利用

動物実験

無毒性量（NOAEL：No-Observed Adverse Effect Level）の算出

…動物試験等で有害な影響が認められない最大の投与量



A試験 : 100 mg/kg/day
B試験 : 1 mg/kg/day
C試験 : 50 mg/kg/day
…

外挿

全ての毒性試験について算出し、
最低値を安全係数（×100）で除する

ヒトに対する安全性

許容一日摂取量（ADI：Acceptable Daily Intake）の決定

…ヒトが生涯毎日摂取してもこの量の摂取は耐容されると判断される量



ヒトのADI
= 0.01 mg/kg/day

- ・食品添加物の使用量
 - ・農薬の残留基準値
 - ・医薬品の投与量
- 等の設定に活用される

「医薬品」と「農薬」の相違点

「医薬品」も「農薬」もヒトが摂取することが前提で作られている！

「医薬品」はあらかじめ、長期にわたる臨床試験がある。

殺虫剤を含む「農薬」は、ヒトが摂取することを前提として散布・使用されるため各企業は莫大な予算を投じてその安全性評価を実施しています。

しかし、その安全性評価において、医薬品と決定的に異なる点は、「農薬」の場合、ヒトへの投与を含む臨床試験が無い事です。即ち、**農薬は出荷・使用されてから初めてヒトへの曝露が始まる化学物質**であり、安全マージンは取られているとはいえ、**医薬品に比べてヒトへの健康影響は不明な点が多い**。



「農薬」の毒性試験をヒトに行うことができない！

農薬と医薬品の重要な違い！

ネオニコチノイドとは

ほとんどが日本で開発された！

	イミダクロプリド★	ニテンピラム	アセタミプリド	チアメトキサム★	チアクロプリド	クロチアニジン★	ジノテフラン
農薬登録年度 in Japan	1992	1995	1995	2000	2001	2001	2002
製造元	Bayer (Germany)	武田薬品	日本曹達	Syngenta (Swiss)	Bayer (Germany)	住友化学	三井化学
水溶解度 [g/L]	0.48	840	2.95	4.1	0.185	0.327	40
土壌中半減期 [days]	40-97	-	1-8	25-100	1-27	148-1155	138
1日許容摂取量 (ADI) [mg/kg/day]	0.057	0.53	0.071	0.018	0.012	0.097	0.22
日本人尿中検出率	76.7%	11.8%	24.4% 100% (D-ACE)	92.0%	7.8%	96.5%	93.3%

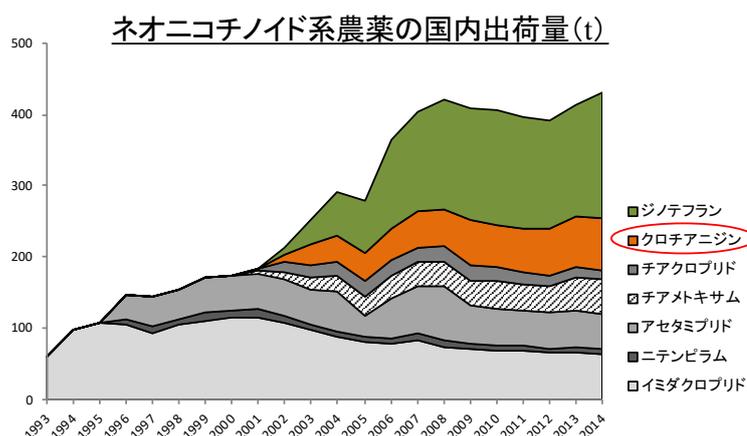
日本特殊農薬製造株式会社

日本バイエルアグロケア

Harada et al., 2016

ネオニコチノイドとは

- ◆ 1990年代にニコチンの構造を元として開発
- ◆ 昆虫のニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChRs) を標的とし
アゴニスト作用を示す
- ◆ 害虫への「選択毒性」、植物への「浸透性」、環境中の「残効性」



緒言

ATTENTION DEFICIT/HYPERACTIVITY DISORDER AND URINARY METABOLITES OF ORGANOPHOSPHATE PESTICIDES IN U.S. CHILDREN 8-15 YEARS

[Bouchard *et al.*, 2010]

Association of pyrethroid pesticide exposure with attention-deficit/hyperactivity disorder in a nationally representative sample of U.S. children

[Wagner-Schuman *et al.*, 2012]

Pesticide Exposure in Children

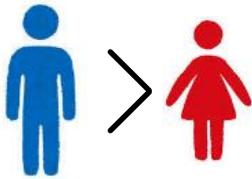
James R. Roberts, MD, MPH, Catherine J. Karr, MD, PhD, and COUNCIL ON ENVIRONMENTAL HEALTH

[米国小児科学会, 2012]

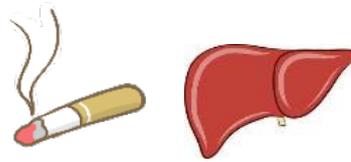
発達障害増加の原因として、農薬など環境化学物質汚染の危険性

[黒田洋一郎 木村-黒田純子, 2014 「発達障害の原因と発症メカニズム」]

農薬と発達障害の因果関係を示唆



発達障害の発症率の差
[Kenneth *et al.*, 1999; Kern *et al.*, 2017]

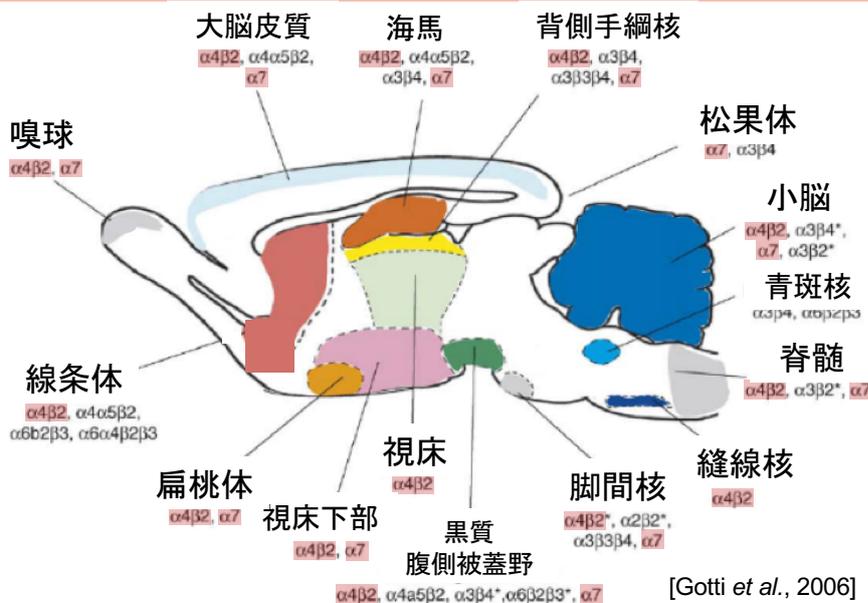


化学物質の感受性, 代謝に性差
[Esterlis *et al.*, 2013; Schwartz *et al.*, 2004]

「性差医療」への注目

「性差」の詳細な研究が求められる

緒言



哺乳類の脳には nAChR が 広範囲に存在

[Gotti *et al.*, 2006]

ラット神経細胞に感受性



[Kimura-Kuroda *et al.*, 2012]

哺乳類の行動に対する影響



[Hirano *et al.*, 2018; Takada *et al.*, 2018; Yoneda *et al.*, 2018]

生態系への影響は？

ミツバチ



大量死・失踪
飛行障害

V. Girolami *et al.* (2009)

アカトンボ



羽化率低下

神宮宇 他 (2009)

ミミズ



排泄の割合
が減少

Alexander *et al.* (2007)

オサムシ



歩行障害

Kunkel *et al.* (2011)

ネオニコチノイド系農薬が
生態系を攪乱する可能性を示唆

水田生態系への影響は？

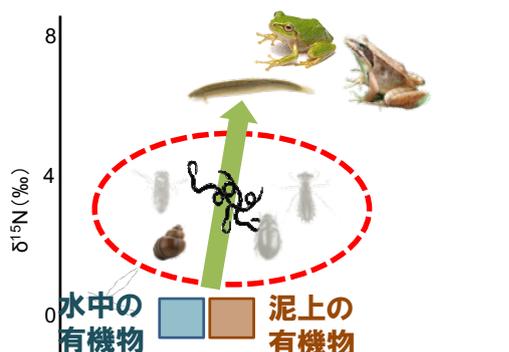
Point 1

- スタークル使用水田では、**食物連鎖長が短縮化**する
➡ **高次消費者の餌項目が変化したのでは？**



Point 2

- 水生昆虫類の**種数が減少**する
- ダントツ使用水田では、**水生コウチュウ目の種の豊富さの減少**がみられた
- 生物の**数**に対する影響には、**種間差**がみられた
➡ **感受性の違いが存在するのでは？**





© 2009 Ohno Hiroyuki

ネオニコチノイドの鳥類への影響

「知らずに食べていませんか？ネオニコチノイド」(水野 玲子 著), 36-37, 2014, 高文研出版, 東京

コラム

鳥の繁殖にクロチアニジンが影響する

星 信彦 (神戸大学大学院教授)

近年、マウスなどの実験小動物では、ネオニコチノイドが活性酸素の増加や、抗酸化物質を減少させることにより酸化ストレスを増加させ、精巣・卵巣など様々な器官に影響を及ぼすことが報告されています。この酸化ストレスは、ヒトにおいても不妊の原因となることが報告されています。鳥類では調べられていないため、ニホンウズラにネオニコチノイドを投与し、繁殖能力への影響を評価しました。

ニホンウズラの繁殖能力に影響

《実験の内容》

生後7週間の雌雄のニホンウズラに、クロチアニジンを含むダントツ (商品名) を6週間口から投与 (0, 0.01, 0.1, 1, 10 mg/kg) して、精巣または卵巣、肝臓および脾臓を採取して重量を測定した後、組織学的解析をしました。また、産卵率、受精率、孵化率および胚発生を調べました。

《実験の結果》

オスの体重増加率は、投与群でわずかに減少しました。肝臓重量は10 mg/kgの投与群で有意に高値を示し、脾臓重量は10 mg/kgの投与群でわずかに増加しました。また、精巣では精上皮中の空胞数および



DNAが断片化した生殖細胞数が有意に増加しました。また、抗酸化酵素 (GPx4 および Mn-SOD) の減少を引き起こすことが分かりました。

近年、精子は細胞膜が酸化されやすい不飽和脂肪酸でできている点や、酸化ストレスから細胞を守る抗酸化酵素が十分

に備わっていないために酸化ストレスの影響を受けやすく、タンパク質酸化またはDNA損傷を受けると、運動能および受精能の低下、受精後の胚の発育不良を引き起こすことが確かめられています。

メスは産卵率が有

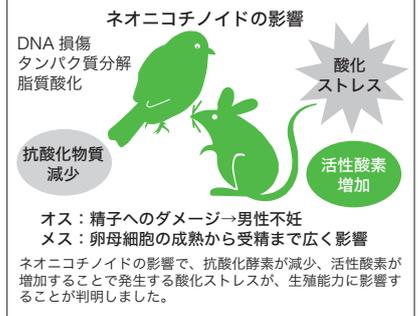
意に低下し、胚重量は濃度が濃いほどわずかに減少しました。また、卵の成熟に必要なホルモン (プロゲステロン) を産生する顆粒膜細胞の損傷が増加しました。雌雄どちらも肝臓の肝細胞内における空胞数および大きさは、濃度が濃いほど増加しました。

この結果、クロチアニジンは鳥類の繁殖能力に影響を及ぼすことが初めて示され、クロチアニジンに感受性の高い個体の繁殖能力に重大な作用を及ぼす可能性が示されました。

トキなど稀少鳥類を守るために

昨年 (2012)、新潟県佐渡市において36年ぶりにトキの雛が野生下で誕生しました。佐渡市は近年、生物多様性の保全に力を入れ、トキ野生復帰のための環境再生ビジョンを掲げています。目標として2015年までにトキ60羽が佐渡に定着することとしており、水稲へのネオニコチノイド系農薬の使用を大幅に削減した結果、2012年は8羽の、そして2013年では既に11羽のトキのヒナが誕生しています。

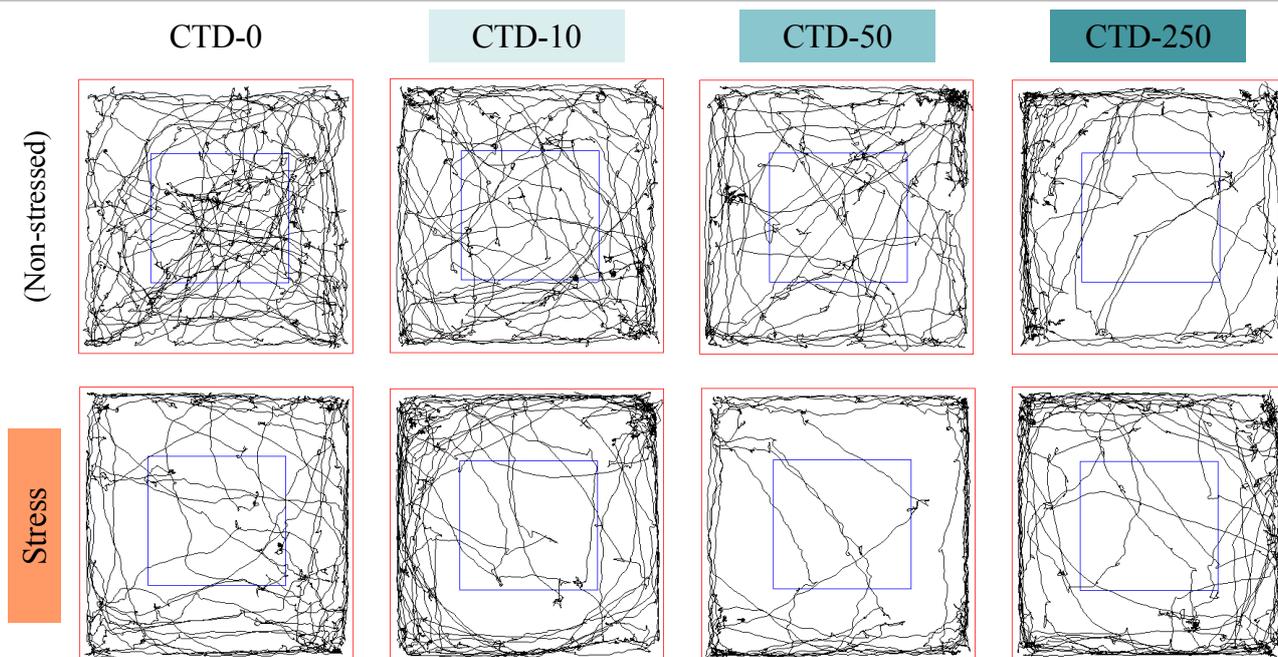
※我々の研究は佐渡市『平成23年度および24年度生物多様性学術研究等奨励補助金』に採用され、その成果を報告しました。



哺乳類に対する影響は？

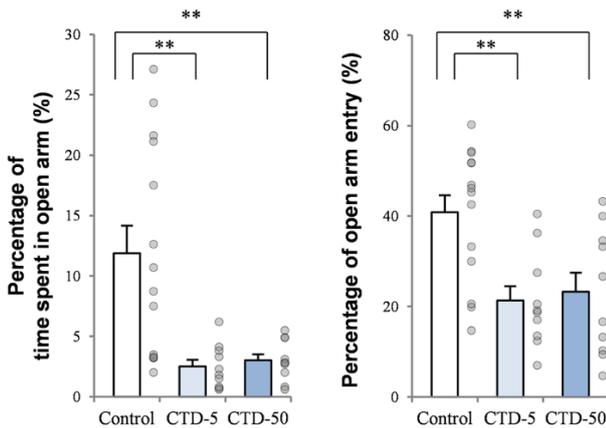
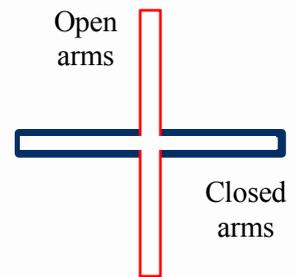
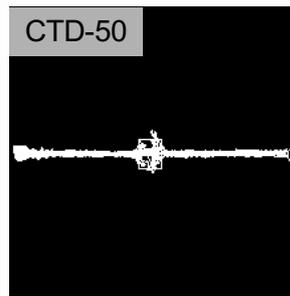
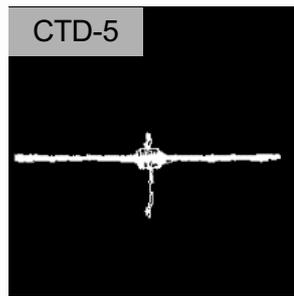
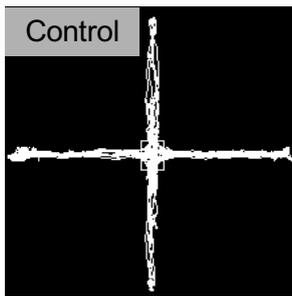


行動軌跡図 (Open field test)



- ✓ ストレス及びCTD曝露群では、壁際を好み中心区画を避ける(不安)傾向がみられる

CTD急性投与にみられた不安様行動



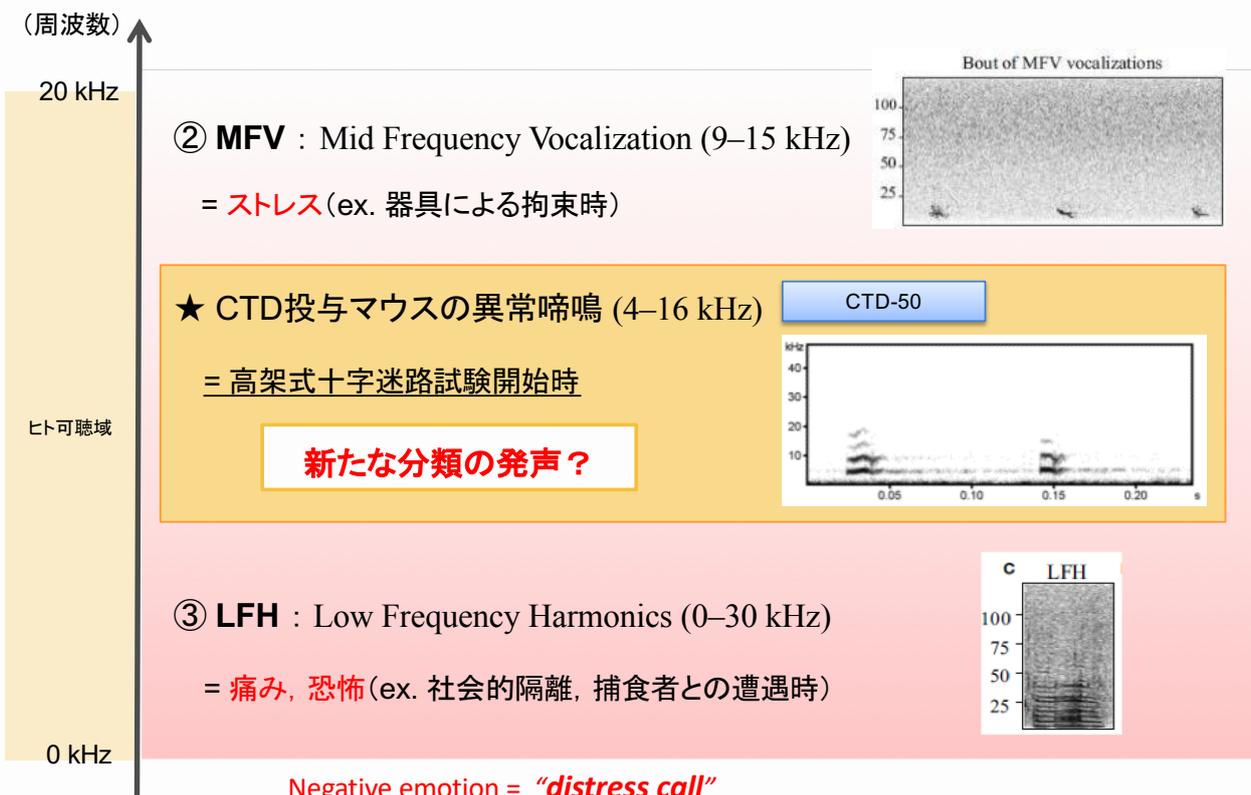
CTD投与群においては
オープンアームへの侵入が減少



CTDは単回投与直後に
強い不安様行動を引き起こす

マウス(超音波)発声の分類

[Grimsley *et al.*, 2016]





クロチアニジン曝露下においては

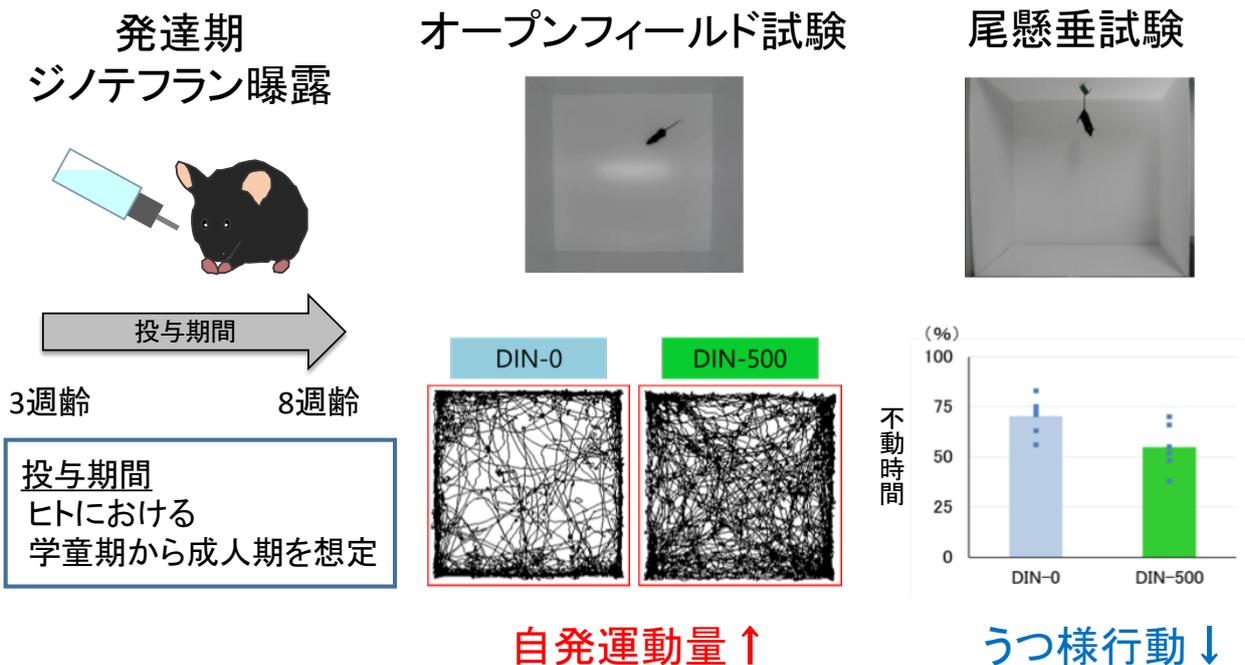
✓ 高架式十字迷路試験時に
異常啼鳴、不安様行動等を発現

海馬歯状回、視床室傍核の
興奮性が増加

✓ ストレスホルモン値の過剰な上昇？

ネオニコチノイドは
ストレス脆弱状態を発現させる？

発達期ジノテフラン曝露が行動に及ぼす影響



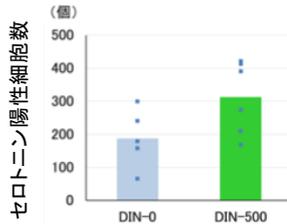
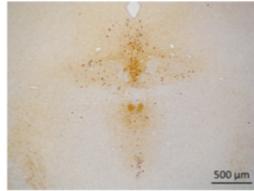
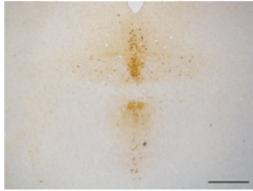
発達期曝露により、多動様症状を引き起こす可能性？

発達期ジノテフラン曝露が脳に及ぼす影響

セロトニン

DIN-0

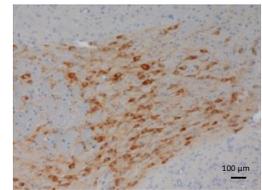
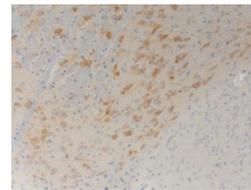
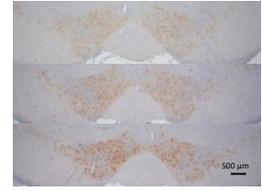
DIN-500



ドーパミン

DIN-0

DIN-500



セロトニンが過剰に分泌されると、
→興奮や混乱など精神的に不安定な状態に

ドーパミン合成が促進すると、
→多動や精神疾患を発症する原因に

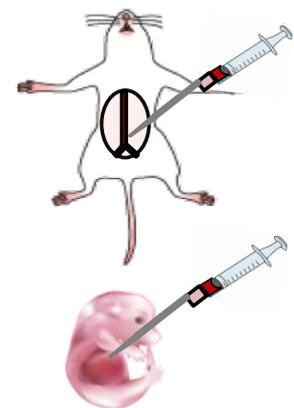
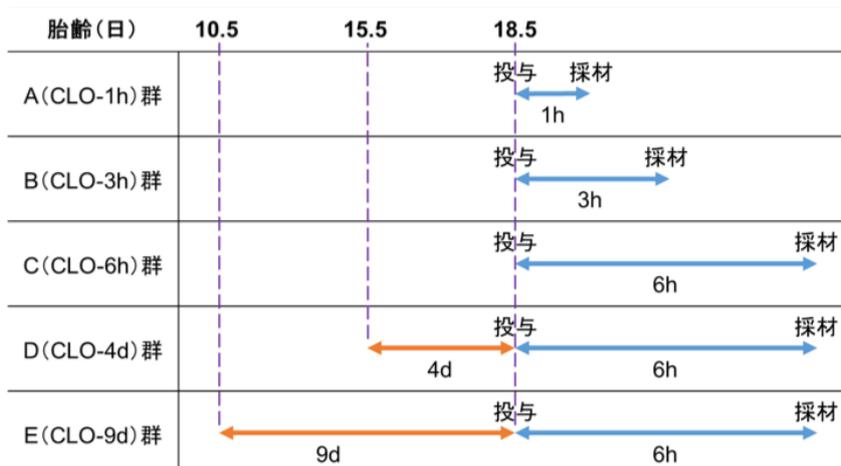
発達期曝露により、神経伝達物質のバランスを変化させる可能性も

浸透性農薬およびその代謝産物の胎子移行に関する研究

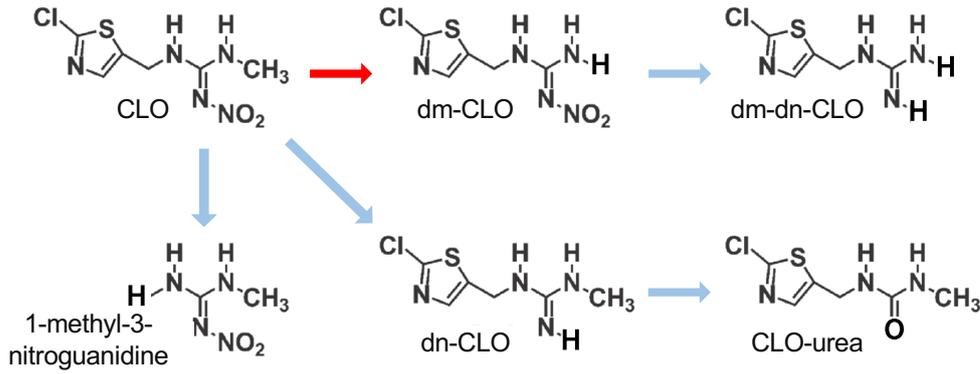
材料と方法

ICR妊娠マウスに対して、CLO (65 mg/kg/day) を投与した。母獣への投与は単回投与群と単回複数日投与群とに分けた。前者は、妊娠18.5日に投与し、その1, 3, 6時間後にそれぞれ母獣(後大静脈)および胎子(心臓)から採血を行った。後者は、妊娠10.5日と15.5日から一日一回投与を行い、同様にそれぞれ最終投与(妊娠18.5日)の6時間後に母子から採血を行った。

血液サンプルに内部標準物質としてCLO重水素化合物を加えたのち、蛋白質を除去し超音波処理した。その後、固相抽出を行いリン脂質を除去して溶出・乾固した。コチニン重水素化合物をシリンジスパイクとして加え再懸濁し、遠心分離して得られた上清をLC-MS/MS (LC6495B) を用いて定量解析した。



浸透性農薬およびその代謝産物の胎子移行に関する研究



考察

- ◆胎子においてCLOが検出された
→CLOの胎子移行が初めて定量的に確認された
- ◆CLOの検出濃度および動態：母獣≒胎子
→CLOは胎盤関門を極めて迅速に通過する
- ◆CLOの経時的な減少, dm-CLOの増加, 代謝産物の中でdm-CLOの濃度が最も高い
→CLOは体内に入った後, 速やかにデスメチルCLOに代謝される
- ◆dn-CLOが検出された
→哺乳類の受容体に対する親和性がより高い代謝産物が生成されることがわかった
- ◆母獣と胎子で検出(曝露)濃度がほぼ同等
→より化学物質に対する感受性の高いとされる胎子への影響が懸念される

無毒性量のネオニコチノイド系農薬曝露による行動影響の性差

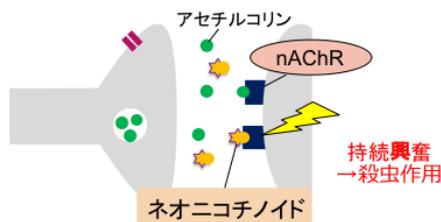
背景と目的

農薬と発達障害の因果関係を示唆する報告が集積されつつある



発達障害の発症率
化学物質の感受性
に性差がある

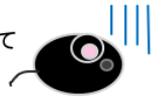
「性差」に関する詳細な研究が必要



対象害虫のみならず, 哺乳類の神経細胞や行動に影響を示すことが報告されている

当研究室の先行研究

CLOが♂B6Nマウスにおいて不安様行動を惹起
[Hirano et al., Toxicol Lett, 2018]



性周期によるばらつきが懸念され ♀は使用せず

CLOの単回経口投与によって生じる影響の性差を検証

材料と方法

供試動物: 9週齢 C57BL/6Nマウス ♂♀

投与物質: 精製CLO(純度95%)

投与方法: 単回経口投与(イソフルランによる軽麻酔下)

投与濃度 (各投与群♂♀6匹ずつ)

CLO-0	溶媒(0.5%カルボキシメチルセルロース)
CLO-5	5 mg/kg
CLO-50	50 mg/kg

無毒性量 ♂: 47.2 mg/kg ♀: 65.1 mg/kg

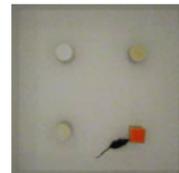
投与1時間後に行動試験を行い, その2時間後に脳を採材



オープンフィールド試験 (OF)



高架式十字迷路試験 (EPM)



新奇物体認識試験 (NOR)

不安様行動
自発運動量
物体認識記憶
を測定

★試験ごとに個別のマウスを使用

行動試験後に膣スミアを採取し ♀の性周期を判定

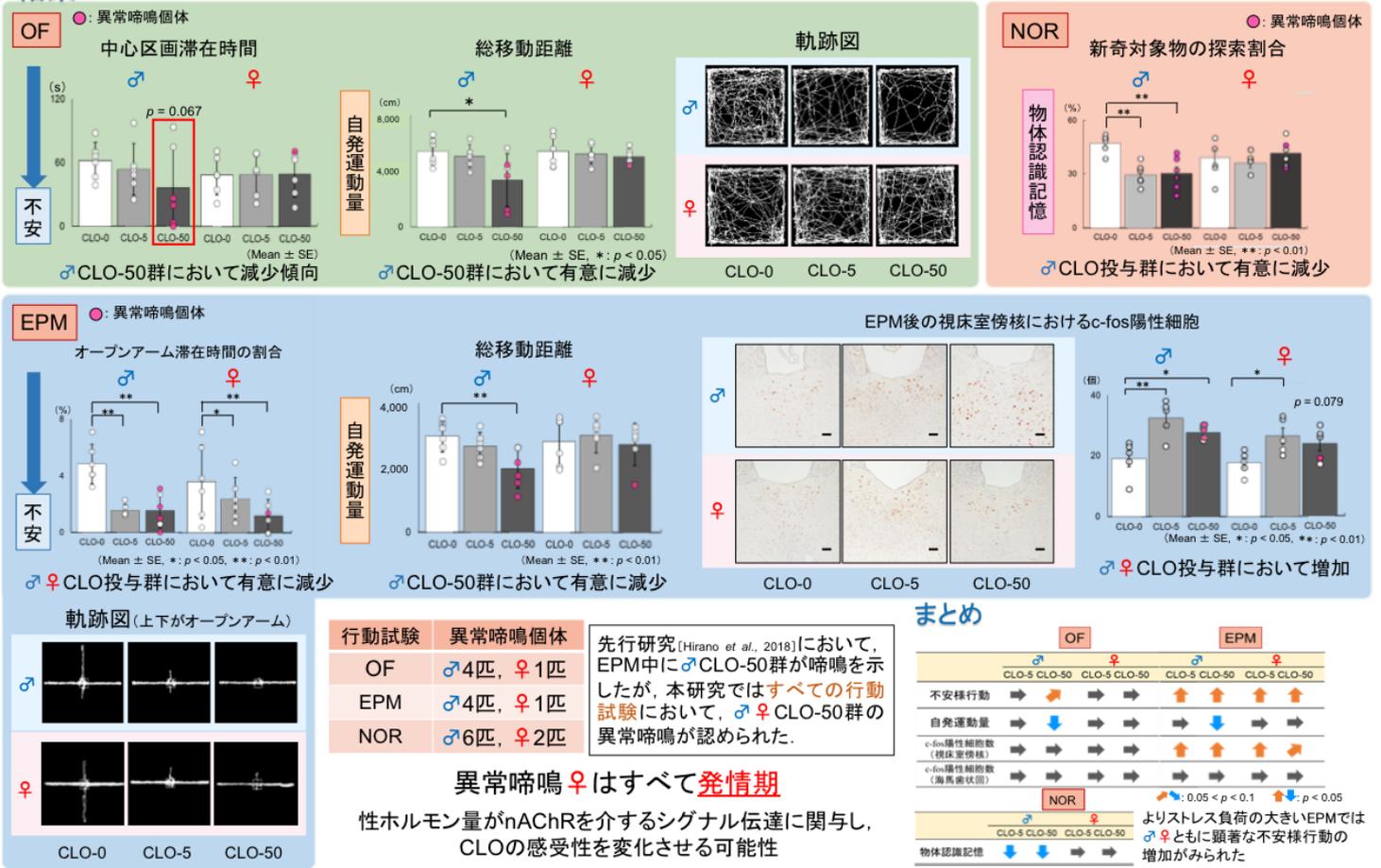


試験中におけるマウスのヒト可聴域(<20 kHz)の異常啼鳴^{*}を録音
試験開始から1分ごとの啼鳴回数をカウント

[*: Hirano et al., 2018]

視床室傍核, 海馬歯状回のc-fos陽性細胞数をカウント

結果



無毒性量のネオニコチノイド系農薬曝露による行動影響の性差

行動試験	異常啼鳴個体
OF	♂4匹, ♀1匹
EPM	♂4匹, ♀1匹
NOR	♂6匹, ♀2匹

先行研究 [Hirano et al., 2018] において、EPM中に♂CLO-50群が啼鳴を示したが、本研究では**すべての行動試験**において、♂♀CLO-50群の異常啼鳴が認められた。

異常啼鳴 ♀ はすべて **発情期**

性ホルモン量がnAChRを介するシグナル伝達に関与し、CLOの感受性を変化させる可能性

無毒性量のネオニコチノイド系農薬曝露による行動影響の性差

	OF				EPM			
	♂		♀		♂		♀	
	CLO-5	CLO-50	CLO-5	CLO-50	CLO-5	CLO-50	CLO-5	CLO-50
不安様行動	→	↗	→	→	↑	↑	↑	↑
自発運動量	→	↓	→	→	→	↓	→	→
c-fos陽性細胞数 (視床室傍核)	→	→	→	→	↑	↑	↑	↗
c-fos陽性細胞数 (海馬歯状回)	→	→	→	→	→	→	→	→

	NOR			
	♂		♀	
	CLO-5	CLO-50	CLO-5	CLO-50
物体認識記憶	↓	↓	→	→

↗↘: 0.05 < p < 0.1 ↑↓: p < 0.05

よりストレス負荷の大きいEPMでは♂♀ともに顕著な不安様行動の増加がみられた

材料と方法

6週齢

28日間 経口投与(経口ゾンデ)

10週齢

クロチアニジン (CLO) 純度95%



SDラット 雄(各群 6匹)

投与濃度

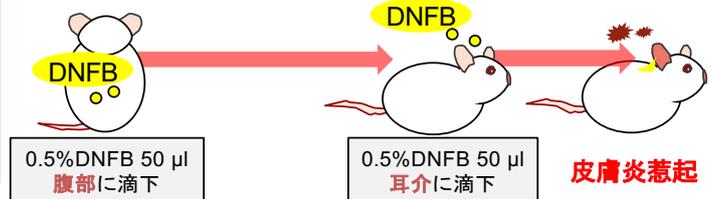
CLO-0	溶媒(0.5% CMC)
CLO-30	30 mg/kg/day
CLO-300	300 mg/kg/day
無毒性量	27.9 mg/kg/day

22日目
感作

28日目
再刺激

29日目
惹起&採材

2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB)
ハプテンとして使用
アセトン:ゴマ油 = 4:1 混合液に溶解



耳介・骨髄・胸腺・脾臓・リンパ節・回腸(パイエル板含む)・肝臓 を採取

全採取組織 → ヘマトキシリン・エオシン染色

耳介 → 免疫組織学的検索

抗TCRαβ抗体 抗CD4抗体
抗CD8抗体 抗CD11b抗体
抗CD68抗体 抗CD103抗体

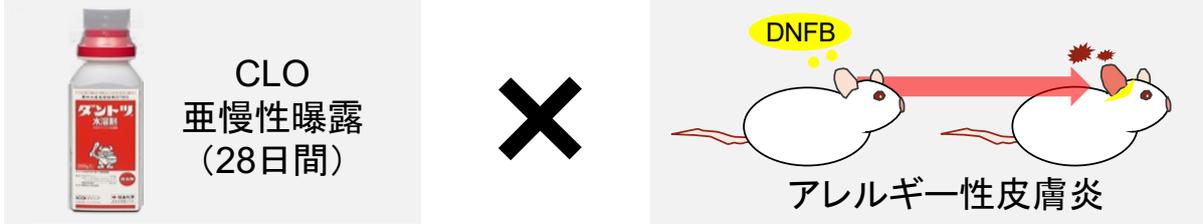
Helper T cell
Cytotoxic T cell
Macrophage
Granulocyte
Dendritic cell

※ 下線部の組織は重量を測定

評価方法 免疫担当細胞の

- 表皮・真皮・皮下組織への浸潤程度
- 陽性強度

考察と結論



		一次リンパ器官			二次リンパ器官			
		耳介	骨髄	胸腺	脾臓	頸部リンパ節	回腸パイエル板	肝臓
組織	HE							
	免染	-	-	-	-	-	-	+
重量				+	-			+
臨床		体重増加抑制 & 軟便 → 腸管？						

+: 影響あり -: 影響なし

本研究において、CLOの亜慢性曝露は局所免疫応答には影響しないが、胸腺・肝臓・腸管への影響が示唆された！

ネオニコチノイド系農薬が老年動物に及ぼす影響

オープンフィールド(OF)試験 ... 自発運動量/不安様行動

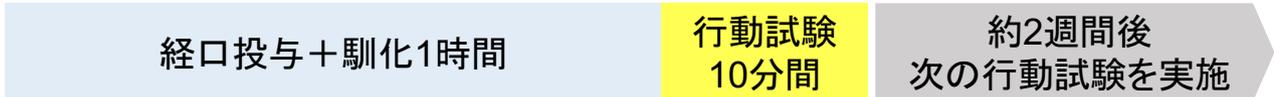
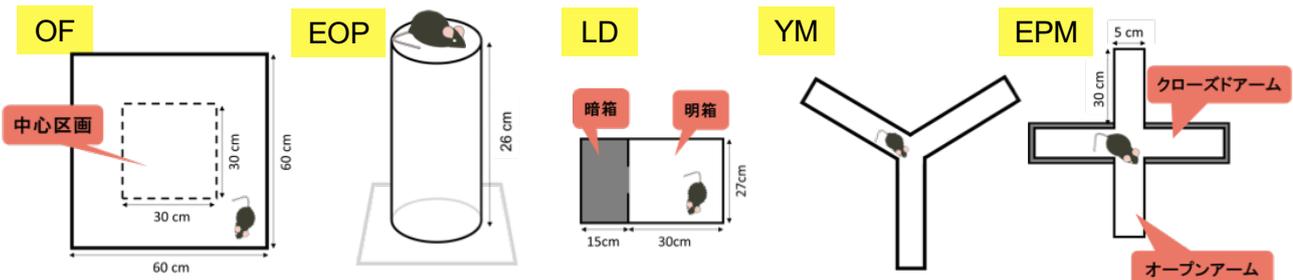
高架式プラットホーム(EOP)試験 ... ストレス抵抗性

明暗箱(LD)試験 ... 不安様行動/自発運動量

Y字迷路(YM)試験 ... 短期記憶/自発運動量

高架式十字迷路(EPM)試験 ... 不安様行動/自発運動量

供試動物: C57BL/6J ♂ (成年: 12-18週齢, 老年: 92-101週齢)
 投与物質: CLO (溶媒 0.5% カルボキシメチルセルロース)
 投与方法: 単回経口投与
 投与群: CLO-0 (溶媒), CLO-5 (5mg/kg), CLO-50 (50mg/kg)



※統計 二元配置分散分析, Tukey(成年, 老年の各水準における多重比較)

進捗状況 行動試験2 自発運動量

・CLO投与と加齢との間に交互作用が認められた※

※ただし、EPM総移動距離では交互作用無し



①CLO-5群の自発運動量低下が老年群のみで認められたもの
(成年群:CLO-50群でのみ減少, 老年群:濃度依存的な減少)

…OF総移動距離, EPM総進入回数

②老年群で有意なCLO影響が認められなかったもの

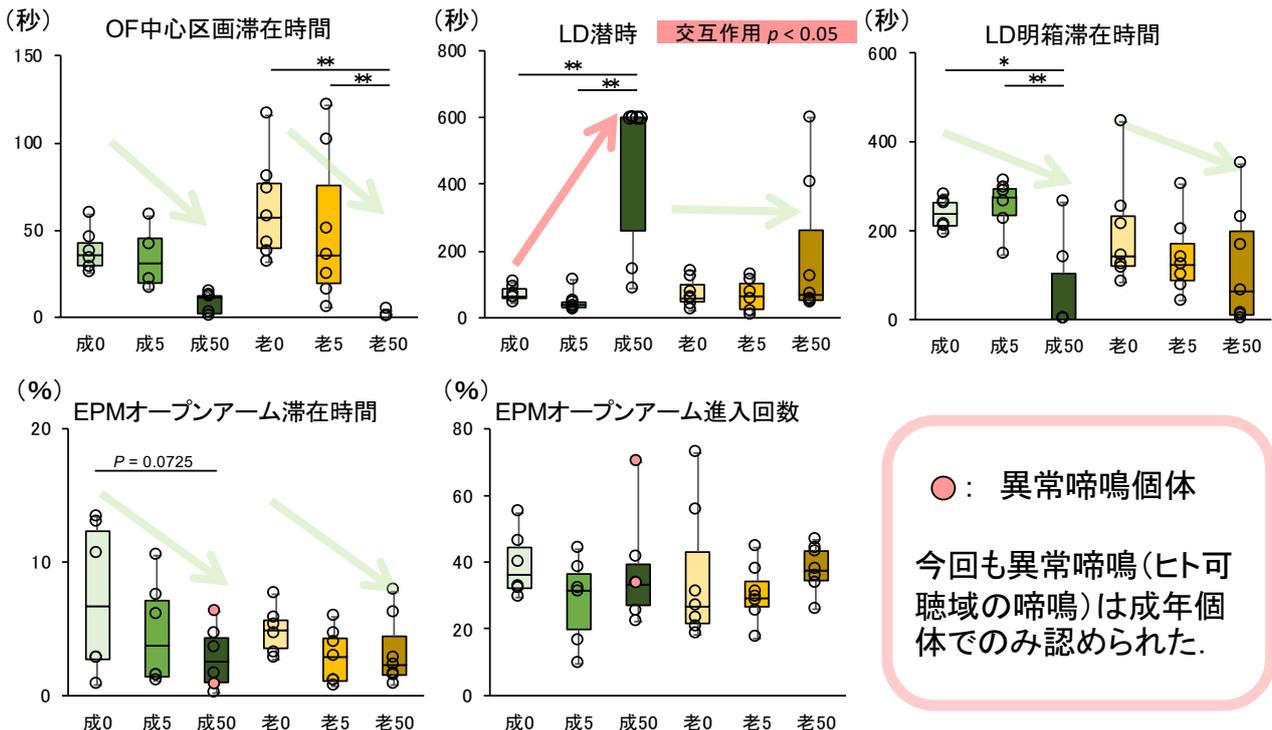
(成年群:CLO-50群でのみ減少, 老年群:有意な変化無し)

…LD箱間の移動回数

②では有意差は無かったものの、①と同様濃度依存的に減少しているようなグラフ

CLO-5群では老年群の方が感受性が高い？

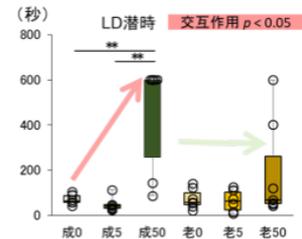
進捗状況 行動試験2 不安様行動



➡: 成年/老年で異なる変化が認められた部分 ** : $p < 0.01$ * : $p < 0.05$

進捗状況 行動試験2 不安様行動

- ・明箱に入るまでの潜時(LD)でのみ交互作用が認められ、CLO-50群での影響が老年群で小さかった。

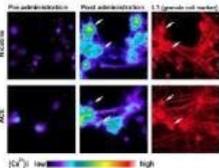


- ・交互作用は認められなかったものの、明箱滞在時間において、CLO-5群で老年群の方が強く影響が出ているようなグラフ。

CLO-5群では老年群の方が感受性が高く
CLO-50群では老年群の方が感受性が低い？※

※ただし、不安様行動について交互作用があったのは1項目(LD潜時)のみ

ネオニコチノイドに関する研究と国際動向(～現在)



ラット神経細胞に
興奮反応を惹起
[Kimura-Kuroda *et al.*, 2012]

2012

ミツバチへの影響
(蜂群崩壊症候群と関与?)



[Henry *et al.*, 2012] [Whitehorn *et al.*, 2012] [Gill *et al.*, 2012]

2013



一部のネオニコチノイドを
暫定2年間使用禁止に

2015



厚生労働省が
ネオニコ残留基準値を緩和

⇒ 緩和の継続、拡大
2015年 クロチアニジン
2016年 チアメキサム
2017年 イミダクロプリド

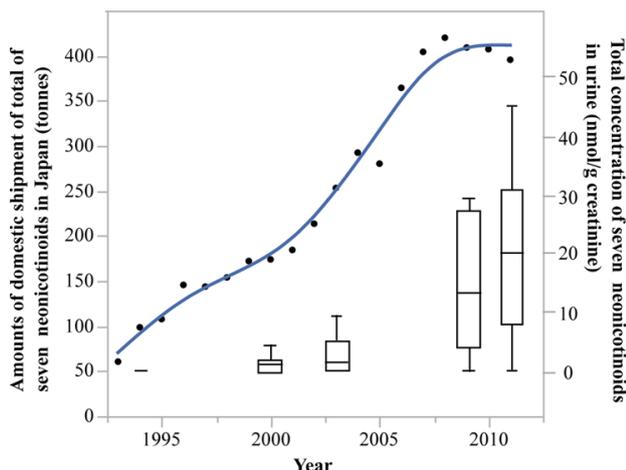
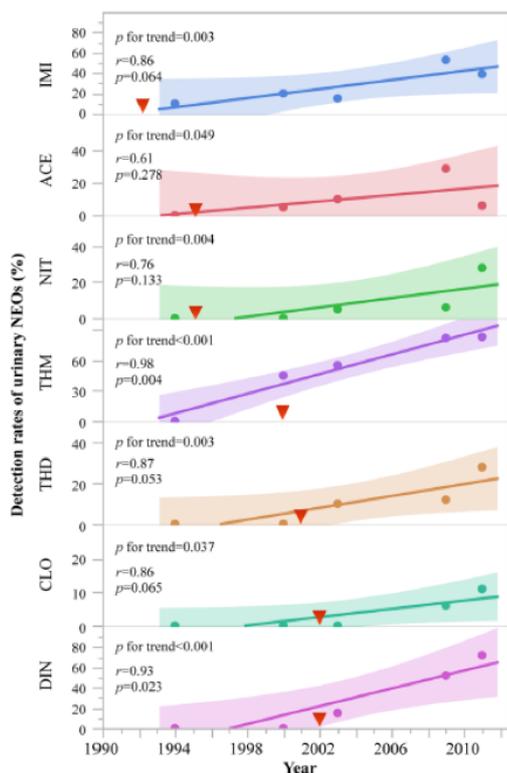
継続を決定

2017

ネオニコチノイドを
全面使用禁止へ...

早急なリスク評価および管理が求められる！

ヒトから検出されるネオニコチノイド



ネオニコチノイドの使用量増加に伴い、日本人尿からのネオニコチノイド検出率(左)、ネオニコチノイド合計検出量(上)は年々増加している

[Ueyama *et al.*, 2015]

131

ネオニコチノイドの「神話」と「現実」

『神話』

- 弱毒性 → 虫にはよく効くが、ヒトには安全
- 無色・無臭 → 環境保全型農薬である
- 有機燐よりヒトへの悪影響が少ない

『現実』は—

- 複合毒性が強い → ある種の殺菌剤と併用するとミツバチ毒性が最高1,000倍
- 代謝物の毒性が強い → 生体に入ってから毒性が強くなる
- ヒトにも神経毒性がある！
- ミツバチのみならず多くの昆虫、高等脊椎動物にも悪影響がある

Epilogue

- ◆ クロチアニジンは鳥類・哺乳類の性腺を標的として影響を及ぼすことが示唆された。
 - 生殖細胞のDNA断片化, 抗酸化酵素GPx4およびMn-SODの減少
- ◆ 哺乳類の脳神経系に対して, ネオニコチノイドはNOAEL以下の濃度でも曝露時期や期間によりさまざまな行動学的影響(不安様行動の亢進, 異常啼鳴, 自発運動量の増加等)を及ぼす
 - ストレスにより増強される
- ◆ ネオニコチノイドの標的となるnAChRsは脳全域に分布するが, 本研究からも海馬, 視床下部(室傍核), 黒質緻密部(中脳), 線条体(終脳), 縫線核(脳幹)等の広範な脳領域が標的となっている可能性
 - クロチアニジンとジノテフランでは, 脳への作用部位・機序が異なる可能性(両者は同じニトログアニジン系であるにもかかわらず)

今後の課題

NOAEL, ADI の見直しが急務であることに加え,

- 曝露感受性が高い胎児・こども, 化学物質に過敏に反応する人々, 高齢者などに配慮したリスク評価のあり方
- 発達神経毒性(DNT)試験が必須の検討項目に加える
 - 見逃し・見過ごしの可能性「見逃さない」・「見過ごさない」ための安全性・リスク評価の重要性
- OECDガイドラインや化審法で, 神経毒性の中で高次脳機能の試験を積極的に取り上げることが必要
- 網羅的検索ではなく, 仮説に依拠した探索的試験の導入が必要(不要な試験を省いては? 想定される毒性に焦点を当てた試験を行うことで経費削減にもつながる!)