



ネオニコチノイド系農薬 最新研究



Animal Molecular Morphology, Kobe University

誰の尿を調べても.....

Animal Molecular Morphology, Kobe University

国内3歳児(223名)の尿中に有機リン系, ピレスロイド系が100%, ネオニコチノイド系が79.8%検出

Osaka A, et al. Environ Res. 2016, 147:89-96よりデータ引用

農薬	検出率%	幾何平均 nmol/L	パーセンタイル nmol/L					最高値 nmol/L
			5 th	25 th	50 th	75 th	95 th	
ネオニコチノイド総量	79.8	4.9	*	0.8	4.0	15.4	63.8	308.2
有機リン代謝物ΣDMAP	100	167.3	35.4	97.2	155.5	276.1	824.0	2158.5
ピレスロイド代謝物3-PBA	100	5.8	1.7	3.0	5.0	9.0	29.8	

夏季 > 冬季

2012-2013年サンプル採取 * : 検出限界以下

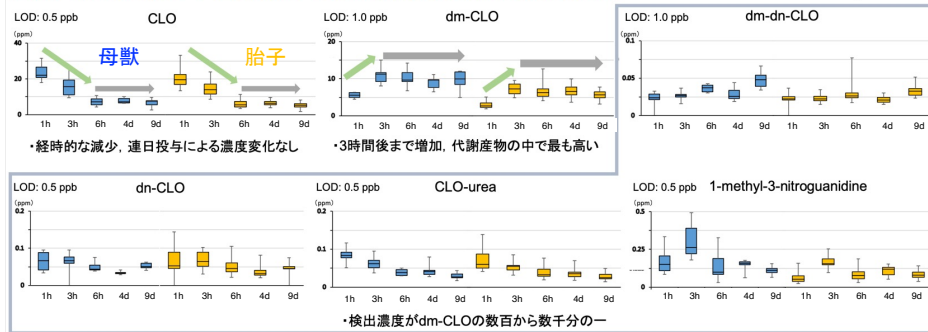
日本の小児は3大殺虫剤(農薬)に環境的に曝露されており, 日常曝露源は共通であることが示唆された

2019年の論文では, 日本人の子ども46人の尿から, **ネオニコチノイドが100%検出** (Ikenaka Y, et al. Environ Toxicol Chem, 2019). 最新の論文では, **日本人の赤ちゃん約1,000人のオムツの尿から高率にネオニコチノイドが検出** (Oya N, et al., Sci Total Environ, 2021). **日本の子どもは有機リン, ピレスロイド, ネオニコチノイド系農薬などに日常曝露**しており, 複数の農薬による低用量長期曝露が懸念.

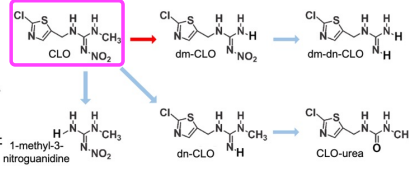
Animal Molecular Morphology, Kobe University



結果: 母獣(■)と胎子(■)において検出濃度および動態はほぼ同等 ※回収率は80%以上、血液5μlから検出

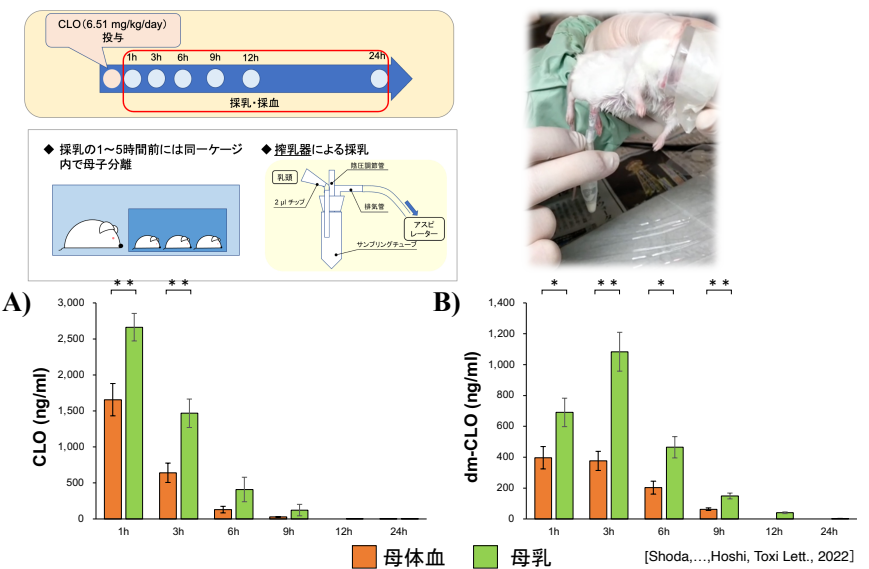


- 考察**
- ◆胎子においてCLOが検出された
→CLOの胎子移行が初めて定量的に確認された
 - ◆CLOの検出濃度および動態: 母獣=胎子
→CLOは胎盤関門を極めて迅速に通過する
 - ◆CLOの経時的な減少, dm-CLOの増加, 代謝産物の中でdm-CLOの濃度が最も高い
→CLOは体内に入った後、速やかにデスメチルCLOに代謝される
 - ◆dn-CLOが検出された
→哺乳類の受容体に対する親和性がより高い代謝産物が生成されることがわかった
 - ◆母獣と胎子で検出(曝露)濃度がほぼ同等
→より化学物質に対する感受性の高いとされる胎子への影響が懸念される



[Ohno, ...Hoshi, Toxi Lett., 2020]

クロチアジジン & その代謝物の母乳移行



Animal Molecular Morphology, Kobe University



農薬とは? →農作物を保護するもの

農作物は何故保護することが必要か

- ◆単純生態系—農耕地は人工的な空間なので自然の生態系のバランスは存在しない
- ◆品種改良—農作物は人間が食べることに適したように育種で選抜した植物なので天然防御物質が除去されている



Animal Molecular Morphology, Kobe University



すなわち、農薬は……

「作物」にとっては「薬」
でも

消費者(農業従事者)や環境にとっては「毒」でしかない!

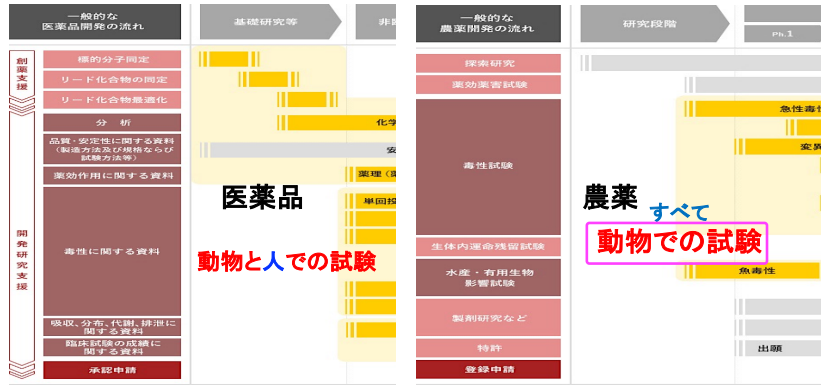


Animal Molecular Morphology, Kobe University



医薬品と農薬の違いは？

開発費用：200-300億円
開発期間：10年以上



医薬品

- 臨床試験(人に対する試験)がある
- 環境に対する試験はない!

農薬

- 臨床試験がない!(できない)

Animal Molecular Morphology, Kobe University

「医薬品」と「農薬」の相違点

とはいえ.....

「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!

ところが.....

「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」も、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「ヒトへの影響」が分かる化学物質であり、安全マージンは取られているとは言え、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」のヒトでの安全性は一度も確認されていない!

「医薬品」と「農薬」の決定的な違い!

Animal Molecular Morphology, Kobe University

「医薬品」だって100%安全ではない!

一方で、「医薬品」は動物実験(非臨床試験)および臨床試験が行われているにもかかわらず、副作用の見つかることは少なくありません。

それはなぜでしょう。

影響の受けやすさ



一つには、80億の人間一人ひとりの「感受性」は同じではないからです。

100%クローンであるはずの一卵性の子どもたちにおいてさえも感受性を含め様々な表現型が異なります。

その背景には我々の遺伝子発現に個体差があること。



それは遺伝子のみによって決まるのではなく、生後の環境要因によって変化することが分かってきました(エピゲノム変化)。

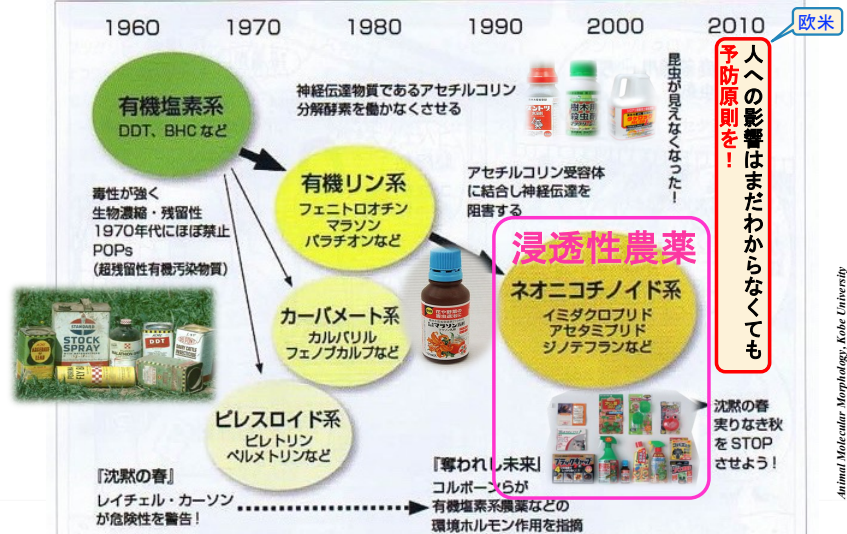
また、胎児期や乳幼児期は感受性が高いことも知られています。

シックハウス症候群(欧米ではシックビルディング症候群)が一例です。新築の建材やテーブルなど家具に用いる接着剤に含まれるホルムアルデヒドへの感受性において、一万人に一人くらいの割合で、感受性の高い方がいます。

Animal Molecular Morphology, Kobe University

農薬年譜

たかだか60~70年
人類の化学合成農薬との付き合いは



Animal Molecular Morphology, Kobe University

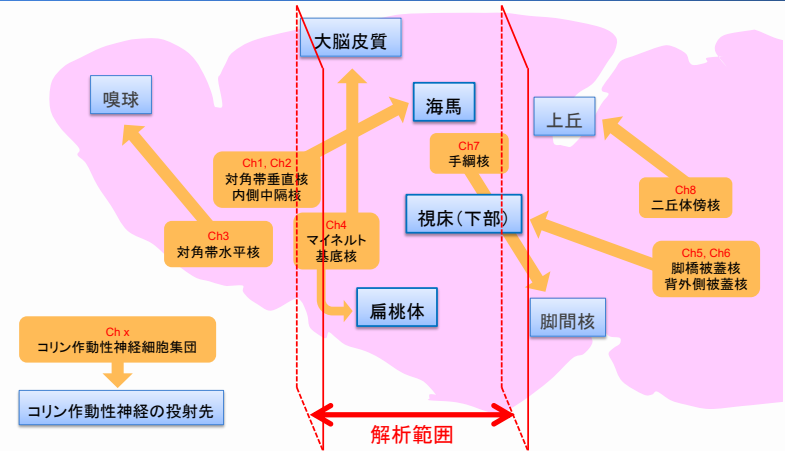
脳を標的にした農薬の危険性 一殺虫剤

主な殺虫剤の種類	浸透性	農薬の具体例(商品名)	神経の標的
有機塩素系	—	DDT BHC	ナトリウムチャネル GABA受容体
ピレスロイド系	—	ペルメトリン(アディオン乳剤)	ナトリウムチャネル
カルバメート系	—	カルバリル(デナボン)	アセチルコリン分解酵素
有機リン系	±	フェントロチオン(スミチオン) マラチオン(マラソン)	アセチルコリン分解酵素
ネオニコチノイド系	+	アセタミプリド(モスピラン) イミダクロプリド(アドマイヤー)	ニコチン性 アセチルコリン受容体
フェニルピラゾール系	+	フィプロニル(プリンス) エチプロール(キラップ)	GABA受容体

- ▶ 有機塩素系以外は国内で使用。
- ▶ EUでは毒性のためほぼ未使用の有機リン系が一番多い。
- ▶ 近年、浸透性農薬のネオニコチノイド、フェニルピラゾール系が急増。
- ▶ 浸透性農薬は、水に溶けやすく植物内に浸透し、残留すると洗っても落ちない

Animal Molecular Morphology, Kobe University

コリン作動性神経の分布 -ネオニコチノイドの標的部位は?-

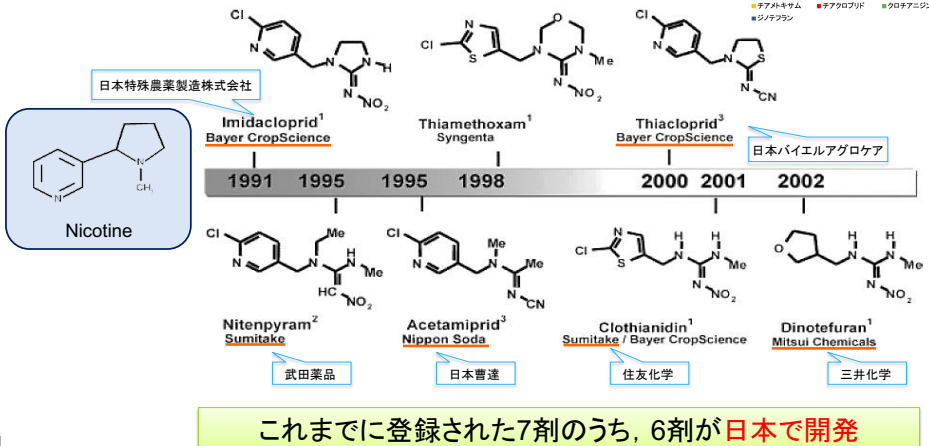
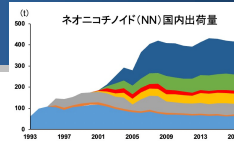


[Hirano et al., 2018]

Animal Molecular Morphology, Kobe University

ネオニコチノイドとは

◆ 1980年以降にニコチンの構造を元として開発



Animal Molecular Morphology, Kobe University

ネオニコチノイド系農薬とは?

ネオニコチノイド系農薬(NN)

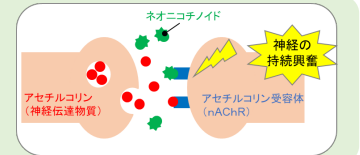
ニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)競合的モジュレーター
(NNとnAChRの親和性: 哺乳類 << 昆虫)
[Tomizawa & Casida, 2003]

- ①「浸透性」→ 洗ってもダメ
- ②「残効性」→ 植物体・土壌
- ③「選択毒性」→ 昆虫に作用

食物中残留基準値の緩和 (厚生労働省, 2015, 2016, 2017)

日常的なNNへの曝露 (Hirano et al., 2016)

尿中にNN検出 (Ikenaka et al., 2019)



無毒性量以下のNNによる高等脊椎動物への毒性

不安 ↑

鳥類・哺乳類への生殖毒性 [Tokumoto et al., 2013; Hoshi et al., 2014; Yanai et al., 2017; Kitauchi et al., 2021]

マウス・ラットの胸腺・腸管免疫系への影響 [Onaru et al., 2020; Murata et al., 2023]

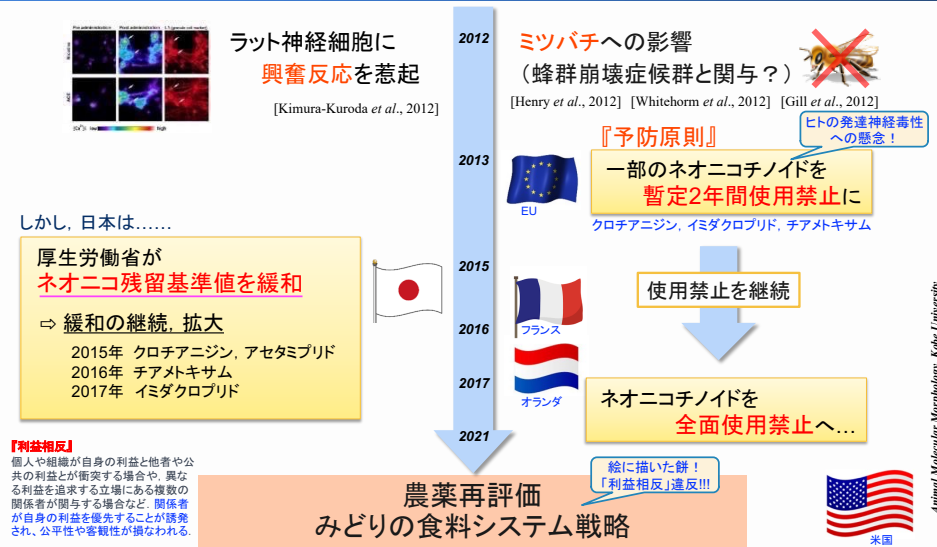
マウスへの神経行動学的影響 [Hoshi et al., 2014; Hirano et al., 2015, 2018, 2021; Takada et al., 2018, 2020; Yoneda et al., 2018; Hoshi 2021; Maeda et al., 2021; Hirai et al., 2022; Nishi et al., 2022]

NNの母子間移行

- ▶ 成人・子供・新生児の尿からNNを検出 [Ichikawa et al., 2019; Ikenaka et al., 2019; Oya et al., 2021; Ueyama et al., 2015]
- ▶ NN・代謝産物の胎盤を介した胎子への迅速な移行 [Ohno et al., 2020]
- ▶ NNが母体内で代謝・濃縮され迅速に母乳中へ移行 [Shoda et al., 2023]

Animal Molecular Morphology, Kobe University

ネオニコチノイドに関する研究と国際動向(～現在)



日本にはどんな問題があるの？

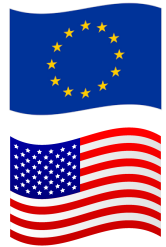
世界はすでに脱ネオニコ農薬に

1999年のフランスの規制に始まり、EU諸国、アメリカ・ブラジル・台湾・韓国でも使用禁止の動きが始まっています。日本では世界の動きに逆行して農業残留基準の緩和が進んでいます。

- EU委員会 2018年 3種のネオニコ農薬のハチへの毒性を確認し、永続的に屋外使用禁止を決定 (3種以外のネオニコは安全とされたのではなく、農業として未登録、もしくは1日の摂取許容量が日本より厳しく設定されたり、環境ホルモン作用の懸念物質とされ、今後規制される可能性があります。)
- フランス 2016年 ネオニコ農薬、フィプロニルの全面禁止 2018年9月発効
- オランダ 2014年 ネオニコ農薬、フィプロニルの全面禁止法案を可決
- ブラジル 2015年 綿花にネオニコ農薬3成分、フィプロニルの使用禁止
- カナダ 2014年 一部の州でネオニコ農薬の使用規制に向けた取り組み開始
- 台湾 2016年 茶葉へのネオニコ農薬、フィプロニルの使用禁止
- 韓国 2014年 ネオニコ3成分の新規、変更登録禁止
- 中国 2009年 フィプロニルの使用規制、輸出は許可

*フィプロニル...ネオニコ系でない新しい系統の殺虫剤。ミツバチの大量死の原因として警戒されている。

アメリカ, カナダ, ブラジル, 韓国, 台湾でも使用禁止・規制



Animal Molecular Morphology, Kobe University

日本にはどんな問題があるの？

そもそも、日本の規制は欧米に比較して緩い!!!

→ **更に緩和された日本の残留基準**

農作物には、摂取しても安全なように農薬の残留基準が厚生省によって定められている。しかし、日本のネオニコチノイドの残留基準値は**欧米に比べてほとんどが格段に高値**となっている!

ネオニコチノイド成分の**クロチアニジン**の残留基準値は、**カブの葉で2,000倍**の40 ppm。
ホウレンソウは**13倍**の40 ppmとなり、**1.5株食べた**だけで子どもが急性中毒になる可能性がある値となった。



Animal Molecular Morphology, Kobe University

ネオニコチノイドの農薬残留基準値は欧米に比べて緩い

アセタミプリドの農薬残留基準 (ppm) 2021年3月現在

食品	アセタミプリドの農薬残留基準 (ppm)			食品	アセタミプリドの農薬残留基準 (ppm)		
	日本	USA	EU		日本	USA	EU
イチゴ	3	0.6	0.05*	茶葉	30	**	0.05*
リンゴ	2	1.0	0.4	トマト	2	0.2	0.5
ナシ	2	1.0	0.4	キュウリ	2	0.5	0.3
ブドウ	5	0.35	0.5	キャベツ	3	1.2	0.4
スイカ	0.3	0.5	0.2	ブロッコリー	2	1.2	0.4
メロン	0.5	0.5	0.2	ピーマン	1	0.2	0.3

*: 検出限界以下, **: 輸入茶のみ暫定値2010年2月

- ペットボトルのお茶で2.5 ppm検出した例があり、**子どもが800 mL飲むと一日摂取許容量(0.071 mg/kg体重/日)を超える。**
- 2018年の論文では、日本産とスリランカ産の茶葉と国産ペットボトル入り茶飲料を調べたところ、**日本産茶葉(39検体)とペットボトル飲料(9検体)には全てネオニコチノイドが検出されたが、スリランカ産(30検体)は非検出。**濃度は低いが慢性複合影響が懸念される。
- 2015年、農薬残留基準のさらなる緩和
アセタミプリド 春菊, レタス 5→10ppm クロチアニジン ホウレンソウ3→40ppm

Animal Molecular Morphology, Kobe University

身近にあるネオニコ農薬

農地や森林だけでなく住宅にも、シロアリやゴキブリ駆除、ペットのノミとり、ガーデニングにネオニコ農薬が使われています。



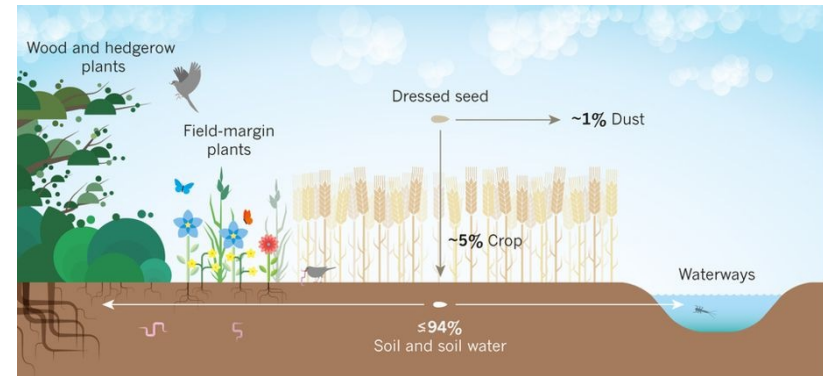
「農薬」は環境中へ拡散

対象化学物質354種中、124種が農薬(実に%)

とんでもない『ザル法』!

農地はPRTR (化学物質排出移動量届出制度 since 1999) の対象外!!!

⇒ 田畑に播かれた化学物質は無制限に公共用水域に排出される



種子中NNの94%は土壌・地下水を介して植物や河川に移行

[Sur and Stork, 2003; Goulson, 2014]

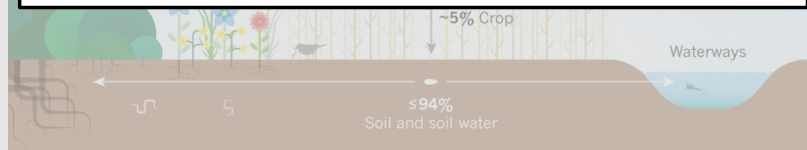
「農薬」は環境中へ拡散



※: 全国12箇所の浄水場での水道原水と水道水を対象に162種の農薬濃度を分析した結果、水道水から21種の農薬が頻繁に検出された(含イミダクロプリド、ジノテフラン、クロチアニジン、フィプロニル)

[National trends in pesticides in drinking water and water sources in Japan.]
Kamata M, Matsui Y, Asami M. *Sci Total Environ*, 744: 2020

水溶性⇒水に溶け、土壌や地下水へ移行
 残効性⇒土壌中で長期間蓄積
 農薬は環境中に拡散し、**水道水にも混入**※



種子中NNの94%は土壌・地下水を介して植物や河川に移行

[Sur and Stork, 2003; Goulson, 2014]

農薬の毒性試験の話

農薬の毒性評価.....

GLP施設の管理運営の適正調査/公的機関における適正システムの構築が必須

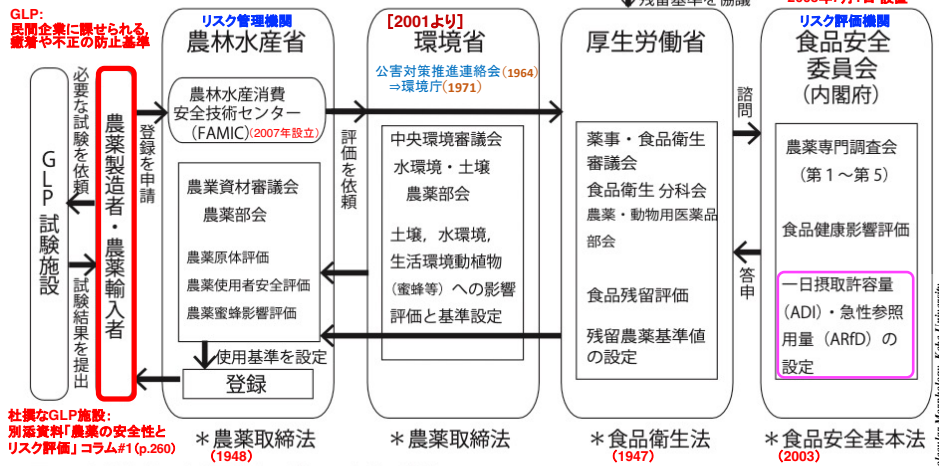


図1-農薬登録・農薬再評価に関わる省庁の関係
新規登録と再評価の申請に際しては、必要とされる試験結果とともに公表文献の資料が提出される。*：関連する法律。出典：FAMIC および食品安全委員会の資料をもとに筆者が作成。

OECD (経済協力開発機構) とガイドライン



OECD は、経済成長、開発、貿易拡大をミッションとし、国際的協調の観点から安全性試験の規格化をはかり、製品の安全性を保証することを目的とする組織で、加盟国は38カ国(2022年1月現在)である。

OECDが作成するガイドラインは、**国際比較を可能にするため、限定的かつ古い一般的な方法を用いて、あらかじめ定められた試験項目に則して調べることを目的としている**。具体的には、**肉眼的・組織学的病理学を基本としたデータを俯瞰するもので、当然ながら実験動物の生体反応すべてをみているものではない**。たとえば、行動試験やゲノム・エピゲノム毒性試験データはほとんど含まれていないのだから、今日問題となっている発達神経毒性や自己免疫疾患などへの影響は見落とされることもある。それゆえ、それらを補填するためのデータを多くの研究者が報告しているものの、**農薬メーカーの意に反する学術論文は農薬評価に採用されないシステムとなっている**。

ところで、この健康影響に関する毒性試験ガイドラインまでもが、**世界保健機関(WHO)ではなく、OECDによって作成されていること**に、皆さんは違和感をお持ちにはならないだろうか。

観察するだけの古いOECD毒性試験

Animal Molecular Morphology, Kobe University

農薬工業会とは...

国内の主要な農業製造業者を中心として組織された**任意団体**。現在(2021年11月10日)、正会員(農業製造業者)34社、賛助会員(輸出入業者など)43社で構成され、農薬の取扱高は業界全体の約90%を占めている。

一部上場企業を会員にしている団体なのに「任意団体」としては、任意団体だと登記の必要がないから、誰が組織を動かしているのかわかりません。ただ、10数年前に明らかにしたことがあって、**会長や副会長は農薬メーカーの社長でした。そして、理事は全員、農水省からの「天下り」だった**そうす。農薬メーカーと農水省がつるんでいる構図が垣間見られます。(奥野修司氏)

➤ 『**真実を明らかにしようとするのではなく、「安全な農薬」「農薬は安全」をアピールするための組織**』

➤ 『**「農薬の安全性を喧伝する」ことが仕事であって、「農薬の危険性を見つける」ことではない**』

なぜ、危険性を示す学術論文を自ら検証しようしないのか？

既存の決められた試験法(OECDガイドライン)のみで!

農薬の安全基準の決め方には問題がある

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

動物実験
動物試験等では有害な影響が認められない最大投与量

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

外挿
農薬原体の全ての毒性試験について算出し、**最低値を安全係数(×100)で割る**
安全係数(個体差10 × 種差10)

★一日摂取許容量(ADI: Acceptable Daily Intake)の決定

ヒトに対する安全性
ヒトが生涯にわたり毎日摂取し続けても有害作用を示さない一日あたりの量

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
等の設定に活用される

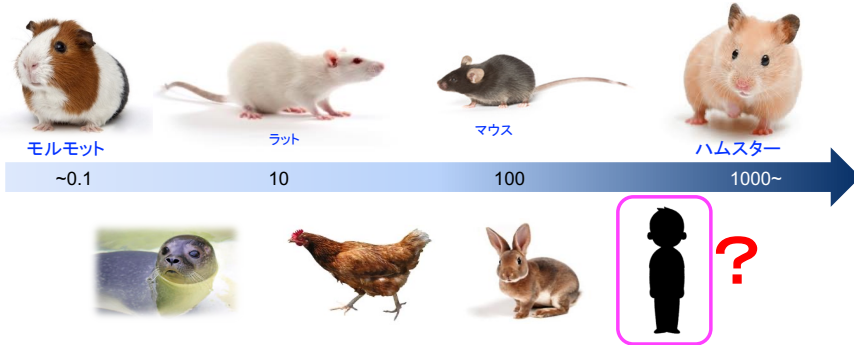
➤ 医薬品と違い、農薬は人間の臨床試験は行えないので、後からヒトへの毒性が判明することがある。
➤ 農薬は、**原体と製品とでは毒性が異なる(製品>原体)** [Mesnaga et al., 2014, 2022; Nagy et al., 2020] (補助剤の毒性は考慮されていない) (最大1,000倍) **グリホサート(原体名)とラウンドアップ(商品名)

環境要因に対する影響評価の難しさ

★ 3. 感受性(動物種差)

(Ex). TCDDの半数致死量 (LD50: $\mu\text{g}/\text{kg}$)

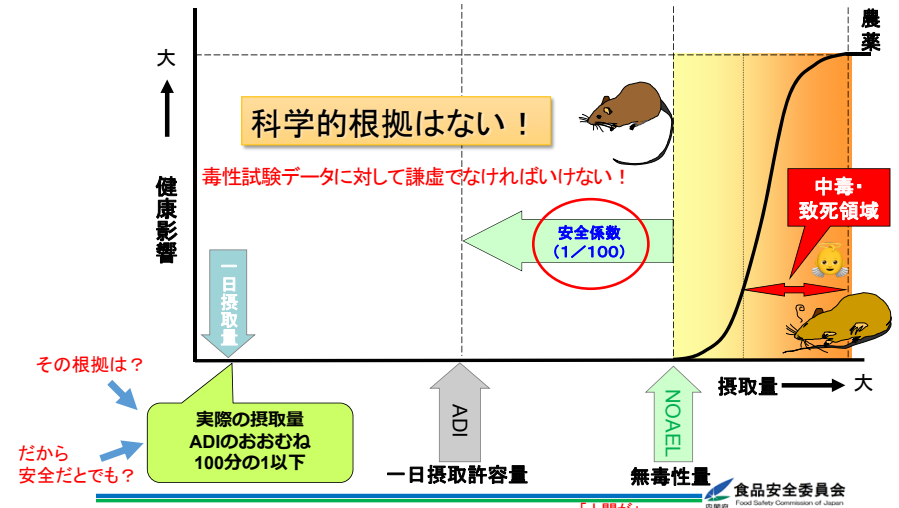
(ハムスターとモルモットで10,000倍違う!)



影響の受けやすさ(感受性)は動物種毎に大きく異なる

Animal Molecular Morphology, Kobe University

食品中の農薬に関する各数値の関係



その根拠は? だから安全だとも? 「人間が」
そもそも、人生80年、化学農薬が世に出てきて70余年 どうやって一生摂取しても安全な量を決められる?

Animal Molecular Morphology, Kobe University

毒性試験の種類とその内容

急性毒性試験	中長期的な毒性試験	体内動態試験
急性経口毒性 (ラット、マウス) 被験物質を1回だけ投与して一般的な毒性を調べる	経口毒性 (21日間:ラット)	動物体内運命試験 植物体内運命試験
急性経皮毒性 (ラット、ウサギ)	亜急性吸入毒性 (90日間:ラット)	一般薬理試験 生体機能への影響
急性吸入毒性 (ラット)	亜急性神経毒性 (90日間:ラット)	環境中での影響 土壌中運命試験 水中運命試験
皮膚刺激性 (ウサギ、モルモット)	遅発性神経毒性 (28日間:ニワトリ)	残留試験 農作物への残留性 土壌への残留性 後作物への残留性
眼刺激性 (ウサギ、モルモット)	亜急性毒性 (90日間:ラット、マウス、イヌ)	
皮膚感作性 (モルモット)	慢性毒性 (1年間:ラット、マウス、イヌ)	
急性神経毒性 (ラット)	発がん性 (1.5-2年間:マウス、ラット)	
急性遅発性神経毒性 (ニワトリ)	繁殖毒性 (ラット) 生まれてくる子に影響がないか調べる	
	発生毒性 (催奇形性) (ラット、ウサギ) 奇形の子が生まれてこないか調べる	
	遺伝毒性 (変異原性) 遺伝子を傷害するかどうか調べる	
	その他	

既存の決められた試験法 (OECDガイドライン) によって行われる
↓
観ているだけの試験法

発達神経毒性は「その他」で良いのか?

Animal Molecular Morphology, Kobe University



リスク(毒性)評価の脆弱性

Animal Molecular Morphology, Kobe University

(遠山千春先生スライド@2016日本毒学会より)

農薬抄録に記載の一例 (FAMIC ウェブサイト): クロチアニジン (2010.4.23改訂版)

Ⅷ. 毒性	-----	1 1 0
1. 原体を用いた試験成績	-----	1 1 8
(1) 急性毒性	-----	1 1 8
(2) 眼及び皮膚に対する刺激性	-----	1 2 9
(3) 皮膚感作性	-----	1 3 1
(4) 亜急性毒性	-----	1 3 3
(5) 慢性毒性及び発がん性	-----	1 5 4
(6) 繁殖性に及ぼす影響及び催奇形性	-----	2 1 8
(7) 変異原性	-----	2 4 1
(8) 生体の機能に及ぼす影響	-----	2 5 7
(9) 補足試験	-----	2 6 1 - 1
2. 原体混在物及び代謝物を用いた試験成績	-----	2 6 2
3. 製剤を用いた試験成績	-----	2 8 9
Ⅸ. 動植物及び土壌等における代謝分解	-----	3 4 1

発達神経毒性の記載なし

(遠山千春先生スライド@2016日本毒性学会より)

Animal Molecular Morphology, Kobe University

毒性試験データの公正さの担保

食品安全委員会・リスク評価書における文献情報の事例:
農薬(クロチアニジン)のリスク評価書から

<参照>…引用ページを明示すべきでは?

- 1 農薬抄録クロチアニジン(殺虫剤)(2004年9月14日改訂):住化武田農薬株式会社, 2004年, 一部公表
- 2 クロチアニジンのラットにおける吸収, 分布及び排泄性試験:武田薬品工業株式会社, 2000年, **未公表**
- 3 クロチアニジンのラットにおける代謝試験:武田薬品工業株式会社, 2000年, **未公表**
- 4 クロチアニジンの安全性評価資料の追加提出について:住化武田農薬株式会社, 2001年, **未公表**
- 5 クロチアニジンのイネにおける代謝分解性試験:武田薬品工業株式会社, 2000年, **未公表**
中略
- 19 クロチアニジンの作物残留試験成績:日本食品分析センター, 2004年, **未公表**
- 20 クロチアニジンの作物残留試験成績:武田薬品工業株式会社, 2004年, **未公表**
- 21 クロチアニジンの乳汁への移行分析試験:武田薬品工業株式会社, 2002年, **未公表**
- 22 クロチアニジンにおける薬理試験(GLP対応):(株)三菱化学安全科学研究所, 2000年, **未公表**
- 23 クロチアニジンのラットを用いた急性経口毒性試験(GLP対応):Covance Laboratories(英国), 1997年, **未公表**
- 24 クロチアニジンのマウスを用いた急性経口毒性試験(GLP対応):Covance Laboratories(英国), 1997年, **未公表**

(遠山千春先生スライド@2016日本毒性学会より)

Animal Molecular Morphology, Kobe University

- 27 TZNGのラットを用いた急性経口毒性試験(GLP対応):Covance Laboratories(英国), 1999年, **未公表**
- 28 TZMUのラットを用いた急性経口毒性試験(GLP対応):Covance Laboratories(英国), 1999年, **未公表**
- 29 TMGのラットを用いた急性経口毒性試験(GLP対応):Covance Laboratories(英国), 1999年, **未公表**
- 30 MGのラットを用いた急性経口毒性試験(GLP対応):Covance Laboratories(英国), 1999年, **未公表**
- 31 MAIのラットを用いた急性経口毒性試験(GLP対応):Covance Laboratories(英国), 1999年, **未公表**
- 32 クロチアニジンのラットを用いた急性神経毒性試験(GLP対応):Bayer Corporation(米国), 2000年, **未公表**
- 33 クロチアニジンのラットを用いた急性神経毒性試験(追加GLP対応):Bayer Co.(米国), 2000年, **未公表**
- 34 クロチアニジンのウサギを用いた眼一次刺激性試験(GLP対応):Covance Lab.(英国), 1997年, **未公表**
- 35 クロチアニジンのウサギを用いた皮膚一次刺激性試験(GLP対応):Covance Lab.(英国), 1997年, **未公表**
- 36 クロチアニジンのモルモットにおける皮膚感作性試験(GLP対応):Covance Lab.(英国), 1997年, **未公表**
- 37 クロチアニジンのラットを用いた3ヶ月混餌投与亜急性毒性試験(GLP対応):Bayer Co.(米国), 2000年, **未公表**
- 38 クロチアニジンの安全性評価資料の追加提出について:住化武田農薬株式会社, 2001年, **未公表**
- 39 クロチアニジンのイヌを用いた3ヶ月混餌投与亜急性毒性試験(GLP対応):Covance Lab.(英国), 2000年, **未公表**
- 40 クロチアニジンのラットを用いた90日間反復経口投与神経毒性試験(GLP対応):Bayer Cor.(米国)2000年, **未公表**
- 41 クロチアニジンのイヌを用いた12ヶ月間混餌投与による慢性毒性試験(GLP対応):Covance Lab.(米国), 2000年, **未公表**
- 42 クロチアニジンのラットを用いた24ヶ月間混餌投与による慢性毒性・発がん性試験(GLP対応):Covance Lab., Madison(米国), 2000年, **未公表**

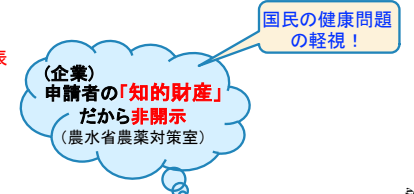
(遠山千春先生スライド@2016日本毒性学会より)

- 43 クロチアニジンのマウスを用いた18ヶ月間混餌投与による発がん性試験(GLP対応):Covance Laboratories, Madison(米国), 2000年, **未公表**
- 44 クロチアニジンのラットを用いた2世代繁殖試験(GLP対応):Bayer Corporation(米国), 2000年, **未公表**
- 45 クロチアニジンのラットにおける催奇形性試験(GLP対応):Argus Research Lab.(米国), 1998年, **未公表**
- 46 クロチアニジンのウサギにおける催奇形性試験(GLP対応):Argus Research Lab.(米国), 1998年, **未公表**
中略

- 72 Ames試験(GLP対応):Safeparm, 2000年, **未公表**
- 73 TAI535株のAmes試験(GLP対応), BayerAG, 1991年, **未公表**
- 74 V79/HPRT試験(GLP対応), RCC, 1991年, **未公表**
- 75 V79/TK試験(GLP対応), RCC, 1991年, **未公表**
- 76 染色体異常試験(GLP対応), RCC, 2003年, **未公表**
- 77 小核試験(GLP対応), RCC, 2003年, **未公表**
- 78 UDS試験(GLP対応), RCC, 2003年, **未公表**

79 発達神経毒性試験(GLP対応), Argus, 2000年, **未公表**

- 80 免疫毒性試験(GLP対応), CR-DDS, 2004年, **未公表**
- 81 発達免疫毒性試験(GLP対応), Charles River, 2008年, **未公表**
- 82 代謝物(ATMG-Pyr);ラット急性経口(GLP対応), CovanceUK, 2000年, **未公表**
- 83 代謝物(ATMG-Pyr);Ames試験(GLP対応), CovanceUK, 2000年, **未公表**
- 84 代謝物(ATG-Ac);ラット急性経口(GLP対応), CovanceUK, 2000年, **未公表**
- 85 代謝物(ATG-Ac);Ames試験(GLP対応), CovanceUK, 2000年, **未公表**
- 86 ラット動物代謝試験(GLP対応), BayerAG, 2000年



(遠山千春先生スライド@2016日本毒性学会より)

Animal Molecular Morphology, Kobe University

ネズミでの実験の話

Animal Molecular Morphology, Kobe University



我々の実験結果は何を意味するのか？

研究データの紹介(ネオニコチノイド系農薬を一例に)

- ① OECD ガイドライン試験では“見落とされる”毒性
- ② 毒性が低いはずのネオニコチノイドによる神経細胞の攪乱
- ③ 母子間移行・性差・免疫系・加齢・次世代への影響

Up-to-date

Animal Molecular Morphology, Kobe University

2021年11月6日(土) 17:30~18:50 OA

TBS
報道特集
JAPAN NEWS NETWORK

「魚が激減」その原因は…
報道特集

最も使われている殺虫剤
ネオニコ系農薬 人への影響は

Animal Molecular Morphology, Kobe University

A news broadcast thumbnail for TBS '報道特集'. It features an aerial view of a crop field with a drone spraying pesticides. A circular inset shows a man's face. A photo of three people (two women and one man) is also visible. The text highlights the impact of neonicotinoid pesticides on humans.

無料YouTubeサイト <https://www.youtube.com/watch?v=0J1T-MO3t5U>

無料YouTubeサイト
<https://www.youtube.com/watch?v=0J1T-MO3t5U> からご覧になれます

神戸市

ネオニコ系農薬 人への影響は
報道特集

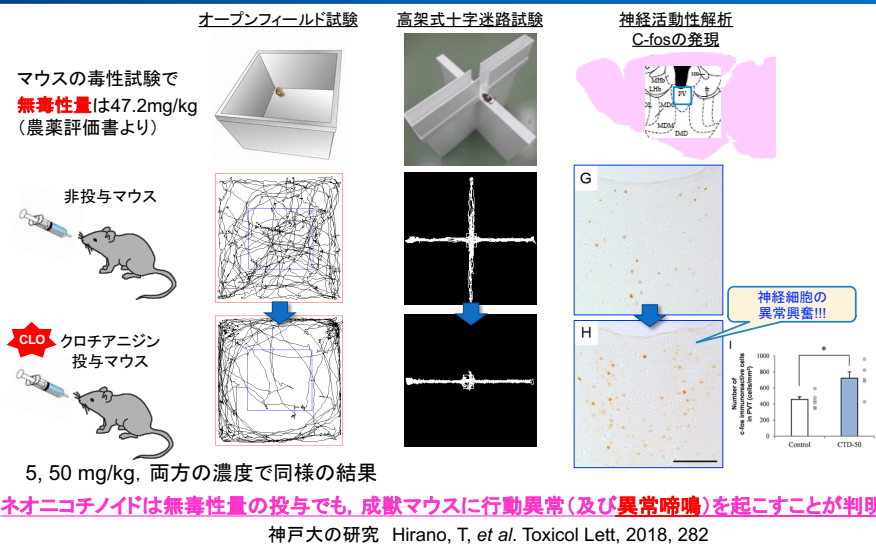
ネオニコはヒトにも影響が…?

Animal Molecular Morphology, Kobe University

A video thumbnail showing a woman walking up a large stone staircase in front of a building. The text asks about the impact of neonicotinoids on humans.

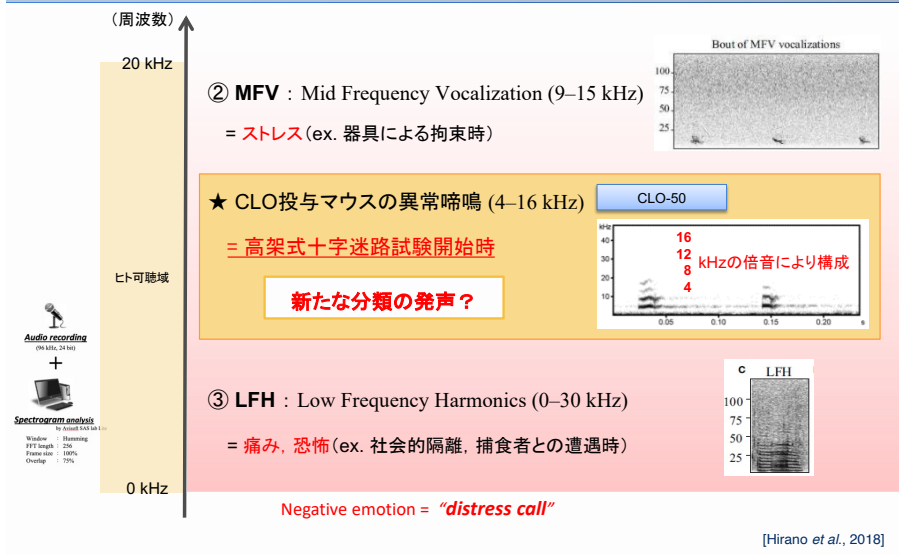
Animal Molecular Morphology, Kobe University

無毒性量のクロチアジンを単回投与した成獣マウスは不安行動を示し、脳の一部が過活動化していた



マウス(超音波)発声の分類

[Grimsley et al., 2016]

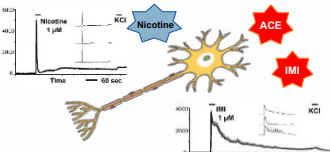


ヒトを含む哺乳類に対する影響は?

Nicotine-Like Effects of the Neonicotinoid Insecticides Acetamiprid and Imidacloprid on Cerebellar Neurons from Neonatal Rats

Junko Kimura-Kuroda*, Yukari Komuta, Yoichiro Kuroda, Masaharu Hayashi, Hitoshi Kawano
Department of Brain Development and Neural Regeneration, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Setagaya-city, Tokyo, Japan

PLoS ONE February 2012 | Volume 7 | Issue 2 | e32432



ラット小脳由来神経細胞においてアセタミプリド(ACE), イミダクロプリド(IMI)は哺乳類型nAChRsを介して

Nicotineと同様の興奮性反応を引き起こす

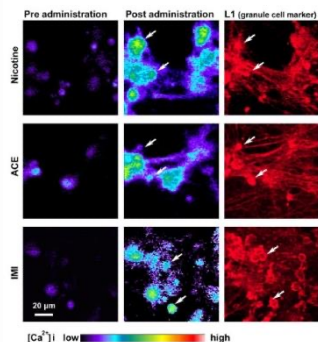
[Kimura-Kuroda et al., 2012]

ネオニコチノイドは哺乳類にも作用する

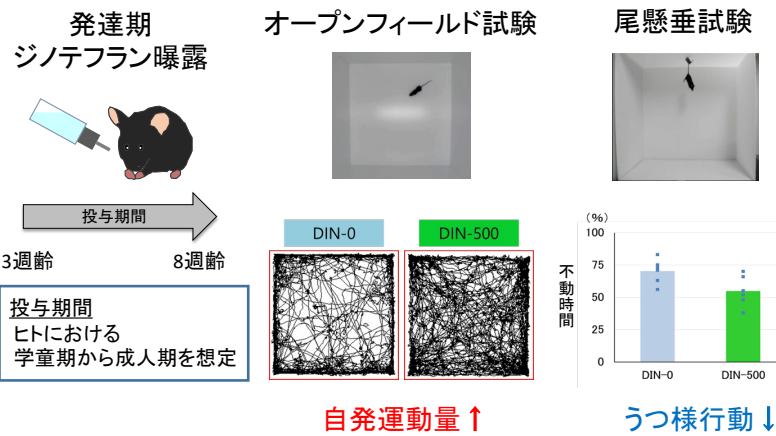
高次脳機能への影響?

精神疾患や発達障害との関与?

[European Food Safety Authority]



発達期ジノテフラン(DIN)曝露が行動に及ぼす影響



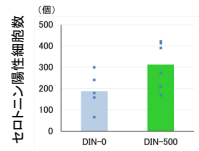
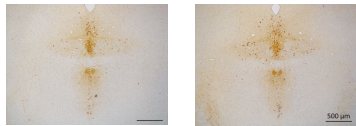
発達期曝露により、多動様症状を引き起こす可能性?

[Yoneda, ..., Hoshi et al., 2018]

発達期ジノテフラン曝露が脳に及ぼす影響

セロトニン

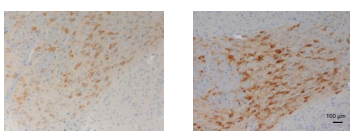
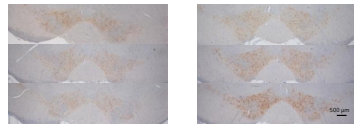
DIN-0 DIN-500



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

DIN-0 DIN-500



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

[Yoneda, ..., Hoshi et al., 2018]

無毒性量のネオニコチノイド摂取による行動影響の性差

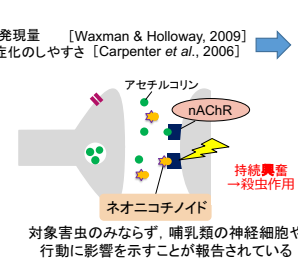
背景と目的

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



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



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

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
行動試験後に腫瘍マスを採取し♀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

Animal Molecular Morphology, Kobe University

まとめ: クロリアニジン (CLO) 急性投与にみられた不安様行動・物体認識記憶の性差

OF: 中心区画滞在時間 (s), 総移動距離 (cm), 軌跡図, 不安 (↑), 自発運動量 (↑)
NOR: 新奇対象物の探索割合 (%), 物体認識記憶 (↓)
EPM: オープンアーム滞在時間の割合 (%), 総移動距離 (cm), EPM後の視床室傍核におけるc-fos陽性細胞 (個), 不安 (↑), 探索量増加 (↑)

まとめ
OF: CLO-50群において有意に減少
EPM: CLO-50群において有意に減少
NOR: CLO投与群において有意に減少
EPM: CLO投与群において増加

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

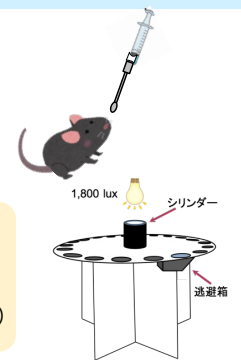
先行研究 (Hirano et al., 2018) において、EPM中に♂CLO-50群が啼鳴を示したが、本研究ではすべての行動試験において、♂♀CLO-50群の異常啼鳴が認められた。
異常啼鳴 ♀はすべて発情期
性ホルモン量がnAChRを介するシグナル伝達に関与し、CLOの感受性を変化させる可能性

「学習と記憶」の性差 2

◆ バーンズ迷路試験 (Barnes Maze: BM)

供試動物 9週齢 C57BL/6Nマウス ♂♀ 各群6匹
投与物質 純度95%の精製CLO
溶媒: 0.5%カルボキシメチルセルロース

CLO-0 (対照群): 溶媒のみ
CLO-50 : CLO 50 mg/kg体重
(CD-1マウス無毒性量 ♂: 47.2 mg/kg ♀: 65.1 mg/kg)



組織解析

視床室傍核、海馬歯状回におけるc-fos陽性細胞の免疫組織化学的検出
エストロゲン受容体 (α, β) の免疫組織化学的検出
肝臓脾臓のHE染色 (一般性状の観察)

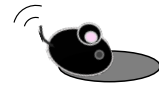
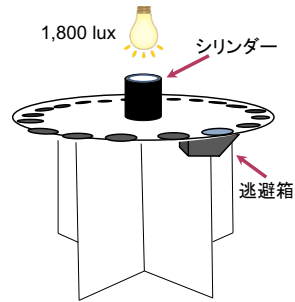
統計解析

二元配置分散分析 Tukey法 (♂, ♀の各水準における多重比較)
一元配置分散分析 Dunnettの多重比較検定

材料と方法

行動試験2種類(各試験において個別のマウスを使用)

バーンズ迷路試験(Barnes Maze: BM)



暗くて狭い場所を好む性質を利用

訓練によって逃避箱の位置を記憶し、最短距離でたどり着くようになる

投与1時間後, 1回目の訓練を開始

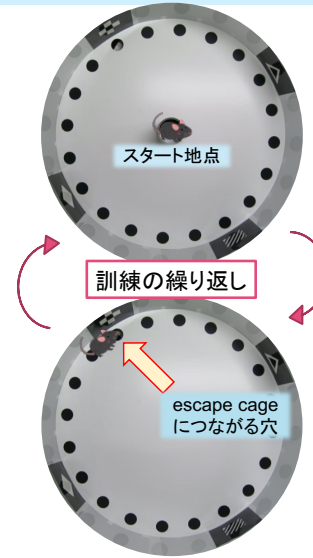
5分間隔で**1日4回, 5日間**繰り返す

空間学習記憶

逃避箱に入るまでの移動距離および時間を評価

Animal Molecular Morphology, Kobe University

材料と方法



参考 Barnes maze testing strategies with small and large rodent models [Rosenfeld and Ferguson, 2014]

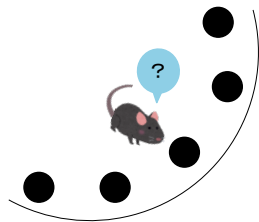
1. 実験室に移動させ, 1時間馴化させる
2. CLO投与1時間後, 1回目の訓練を開始
 ☆escape cageに入れば訓練を終了
 ☆3分を超過
 マウスを誘導し, 2分間滞在させる
3. ホームケージ内に戻し,
 5分間隔で**1日4回, 5日間**繰り返す

ストレス因子(絶食・強制水泳など)を必要とせず, **空間認識記憶**を評価

Animal Molecular Morphology, Kobe University

材料と方法

☆5日目の最後の試行においてProbe testを実施



Probe Test

学習の後にescape cageを取り外した状態でマウスを探索させescape cageがあった場所に留まる時間を測定する

3分間撮影して解析

☆解析について



覗き込む様子

♂対照群以外の群ではなかなかescape cage内に入らない個体があった

→ escape cageに { たどりつくまで(最初に覗き込むまで)
完全に入るまで

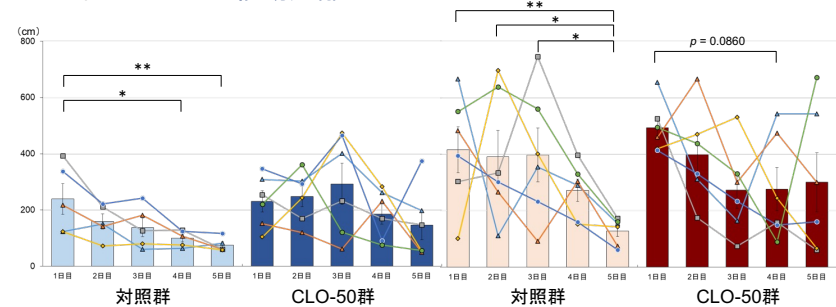
の2パターンで時間および移動距離を解析

Animal Molecular Morphology, Kobe University

結果(BM 5日間の学習曲線)

逃避箱に入るまでの移動距離

(棒グラフ: 平均値, 折れ線グラフ: 個体ごとの値)



♂
 対照群: 1日目と比較して
 4, 5日目に有意な**減少**
 CLO-50群: 5日間の訓練で有意差なし

♀
 対照群: 5日目に有意に**減少**
 CLO-50群: 4日目に**減少傾向**,
 5日目に再度ばらつき

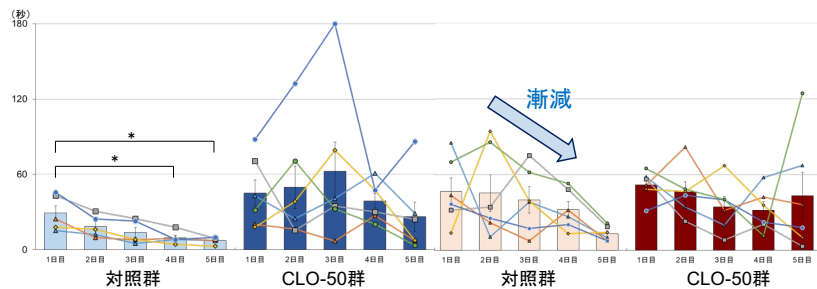
(Mean ± SE, *: p<0.05, **: p<0.01)

Animal Molecular Morphology, Kobe University

結果(BM 5日間の学習曲線)

逃避箱に入るまでの時間

(棒グラフ: 平均値, 折れ線グラフ: 個体ごとの値)



♂
 対照群 : 1日目と比較して
 4, 5日目に有意な減少
 CLO-50群 : 5日間の訓練で有意差なし

♀
 対照群 : 漸減, 5日目に低値
 CLO-50群 : 4日目までは収束

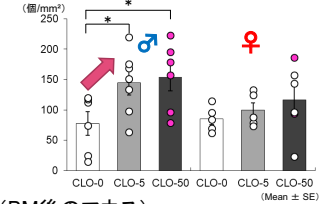
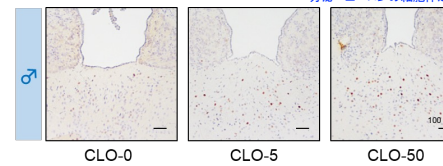
(Mean ± SE, *: p<0.05)

Animal Molecular Morphology, Kobe University

結果(c-fos陽性細胞数)

視床室傍核(NOR後のマウス)

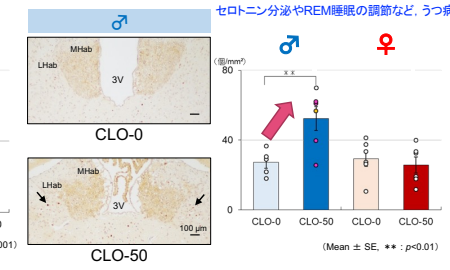
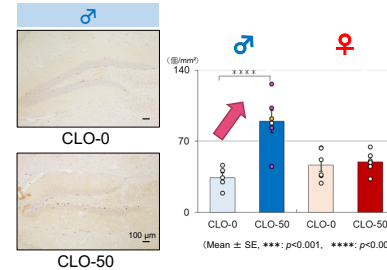
バゾプレシンあるいはオキシトシンを含む神経分泌ニューロンや、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモンを分泌する神経分泌ニューロンの細胞体がある



海馬歯状回(BM後のマウス) 短期記憶

手綱核(BM後のマウス)

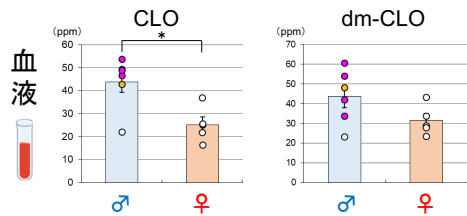
セロトニン分泌やREM睡眠の調節など、うつ病に関与



●: BM最終試行異常啼鳴個体 ○: BM最終試行のみ異常啼鳴

Animal Molecular Morphology, Kobe University

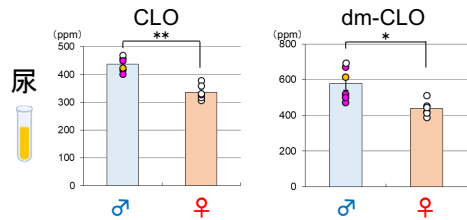
結果(血液・尿中CLO分析)



dm-CLO: CLOの主要代謝物

血中・尿中CLO
 およびdm-CLO

♂ > ♀



♂異常啼鳴個体は
 鳴かなかった♂よりも
 血液からの検出量 多
 尿への排出量 少

●: BM最終試行異常啼鳴個体 ○: BM最終試行のみ異常啼鳴

Animal Molecular Morphology, Kobe University

考察

拘束されるなどの強いストレス下を除き、ヒト可聴域の啼鳴を示すことはほとんどない [Sanchez, 2003]

本研究結果 **♂**CLO-50群において異常啼鳴
♀はほぼ鳴かず、鳴いた個体はすべて発情期



CLO
 代謝速度 **♂ < ♀**

♂異常啼鳴個体

CLO } 血中の残留 多
 dm-CLO } 尿への排出 少

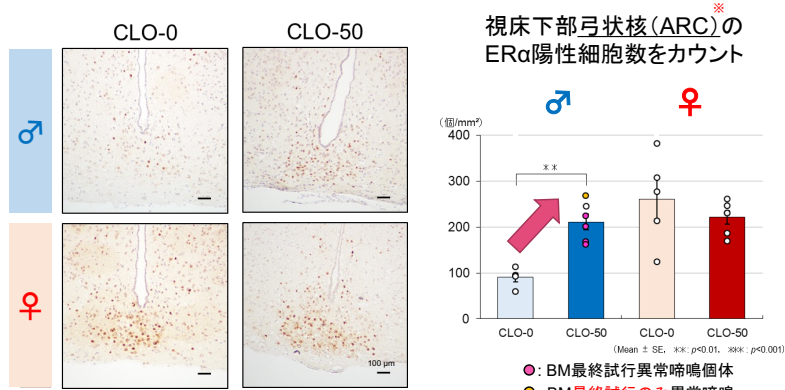
性ホルモン量によって
 ニコチン感受性
 nAChR発現量 が変化

[Centeno et al., 2006; Rhodes et al., 2004]

➡ CLO原体だけでなく代謝物が異常啼鳴に関与
♀では、性周期によってCLO感受性が変化

Animal Molecular Morphology, Kobe University

結果(視床下部 ERα陽性細胞数)



♂: CLO-50群において有意に増加
♀: 投与による差はみられなかった

* エネルギー調節や生殖・自律神経・神経内分泌機能に関与

Animal Molecular Morphology, Kobe University

考察

BMIにおける逃避箱に入るまでの移動距離

	2日目	3日目	4日目	5日目
♂ 对照群	→	→	↓	↓
♂ CLO-50群	→	→	→	→
♀ 对照群	→	→	→	↓
♀ CLO-50群	→	→	↓	→

BM	♂	♀
	CLO-50	CLO-50
c-fos陽性細胞数 (海馬歯状回)	↑	→
c-fos陽性細胞数 (手綱核)	↑	→

♂: 0.05 < p < 0.1 ♂↓: p < 0.05 →: 変化なし

無毒性量の低用量CLO曝露によって、♂の空間学習記憶に顕著に影響

NNの先行研究(♂ラットに90日間投与) [Kara et al., 2015; Ozdemir et al., 2014]

イミダクロプリドおよびCLO → 空間学習記憶 低下

♀は用いられていない

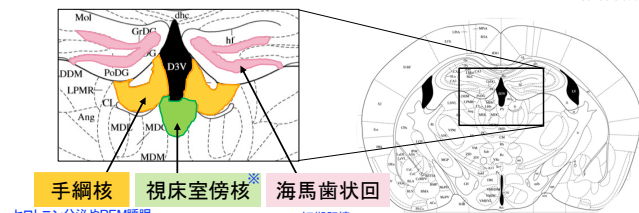


空間学習記憶に対するCLO影響に性差のあることが初めて示された

Animal Molecular Morphology, Kobe University

考察

不安や学習、ストレス反応に関与する脳領域 [Anacker & Hen, 2017; Hsu et al., 2014; Sanders et al., 2010]



セロトニン分泌やREM睡眠の調節など、うつ病に関与

短期記憶

♂のみにおいてc-fos陽性細胞数が有意に増加, ♀よりも♂が脆弱

ニコチンやnAChRアゴニスト投与によりc-fos陽性細胞が増加

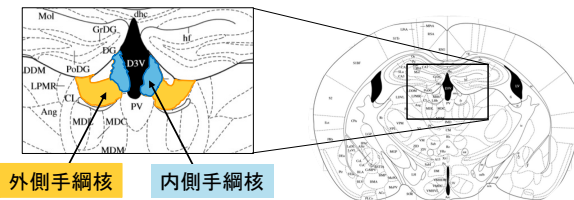
[Sun & Ye, 1997; Jacobsen et al., 2012; Mathieu-Kia et al., 1998]

♂では、CLOがこれらの脳領域のnAChRに作用し行動異常を引き起こした可能性

* パゾプレシンあるいはオキソトシンを含む神経分泌ニューロンや、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモンを分泌する神経分泌ニューロンの細胞体がある

Animal Molecular Morphology, Kobe University

考察



本研究 ♂CLO-50群, 外側手綱核に強いc-fos陽性像

外側手綱核はセロトニン分泌調節やREM睡眠の維持など、うつ病に関与 [Aizawa et al., 2013]



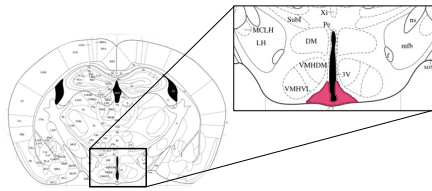
うつ病発症率 ♂ < ♀ 2倍 [Weissman & Klerman, 1977]

うつ病患者自殺率 ♂ > ♀ 5.6倍 [Blair-West et al., 1999]

重症化の性差に、CLOの外側手綱核への影響が関与

Animal Molecular Morphology, Kobe University

考察



視床下部弓状核 (ARC)
 エネルギー調節や
 神経内分泌機能に関与
 ARCのERα ♂ < ♀

[Koch & Ehret, 1989; Leal et al., 1998]

本研究 CLO曝露によって、♂でのみERα陽性細胞数が有意に増加

エストロゲンはコリン作動性ニューロンの活性を調節する
 ERαはストレス反応や学習記憶に関与 [Shughrae et al., 2000; Wang et al., 2018]

CLOによる異常興奮を制御するため、♂CLO-50群の
 ERα発現が増加？ 他の脳領域における検証が必要

結論

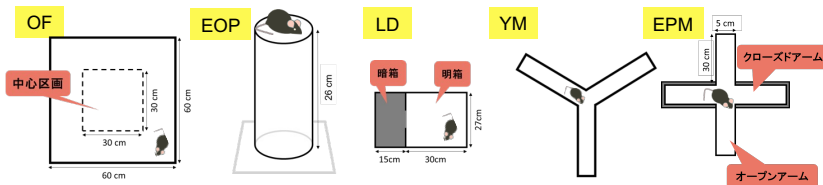


行動および神経回路に及ぼす影響に性差
 その一端に性ホルモンや代謝が関与

[Kubo S & Hirano T, Hoshi N et al., Toxicol Appl Pharmacol, 2022]

CLO (NOAEL 以下) が老年動物に及ぼす情動認知変容

- 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)

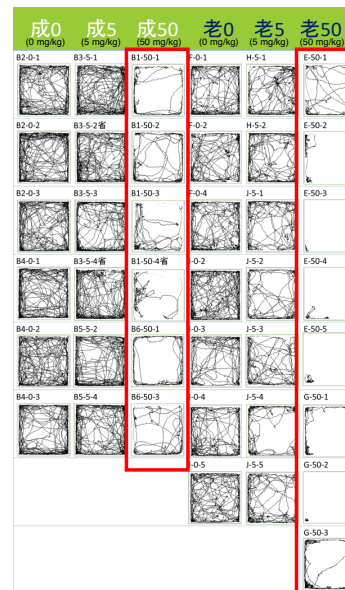


経口投与+馴化1時間 行動試験 10分間 約2週間後 次の行動試験を実施

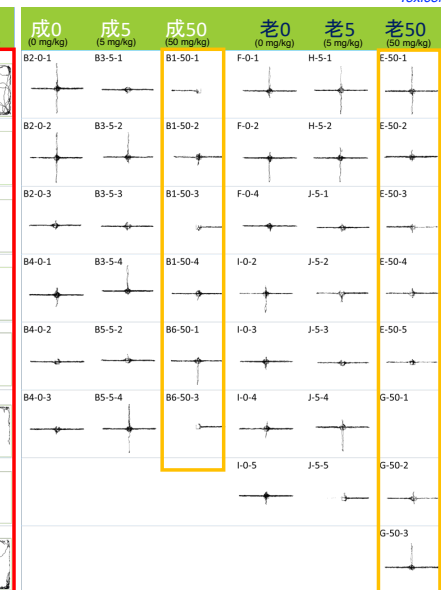
※統計 二元配置分散分析, Tukey(成年, 老年の各水準における多重比較)

Animal Molecular Morphology, Kobe University

行動試験2 OF軌跡図



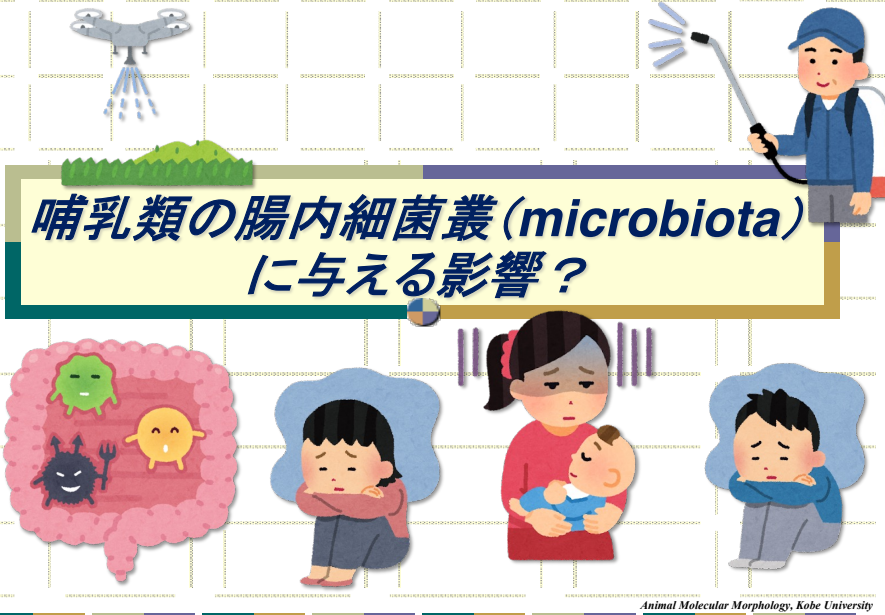
行動試験2 EPM 軌跡図



[Hirano T & Miyata U, Hoshi N et al., Toxicol Lett, 2022]

Animal Molecular Morphology, Kobe University

Animal Molecular Morphology, Kobe University



アレルギーの鍵は“腸”にあり



★「腸」は免疫力を司る(全身の免疫本部) ⇒ 母乳によってスタート
(抗菌活性因子, 免疫性因子, ビフィズ菌増殖因子)

- 免疫細胞: 全身に2兆個 ⇒ その7割を腸に配備
- 腸内細菌(100兆個, 1,000種類) & 免疫細胞(絨毛内部) 最初に接触する母親の細菌叢(腸内, 産後, 皮膚)の影響を大きく受ける
- 免疫細胞の訓練所: M細胞が外来異物を取り込み, 「味方」と「敵」を免疫細胞に教える! その訓練を終えた免疫細胞は腸から全身へ戦士となって出て行く

代表的な腸内細菌
 ・ビフィズ菌(Actinobacteria): 整腸・うつ
 ・バクテロイデス菌: 肥満および過敏性腸症候群
 ・クロストリジウム(100種)

★「腸」の異常→免疫の暴走(アレルギー, 自己免疫疾患)

免疫細胞を異常興奮させる物質を放出
 特定の腸内細菌の減少

- ・クロストリジウム & ラクトバチルス(乳酸菌)[Firmicutes]
- ・多発性硬化症: 原因は脳 ← 免疫細胞が脳を攻撃(自閉症との関係)
- ・腸の異常(クロストリジウム, バクテロイデス)

(制御性T細胞)

★Tregは「腸」で産生される & クロストリジウム菌が鍵(メッセージ物質を放出)

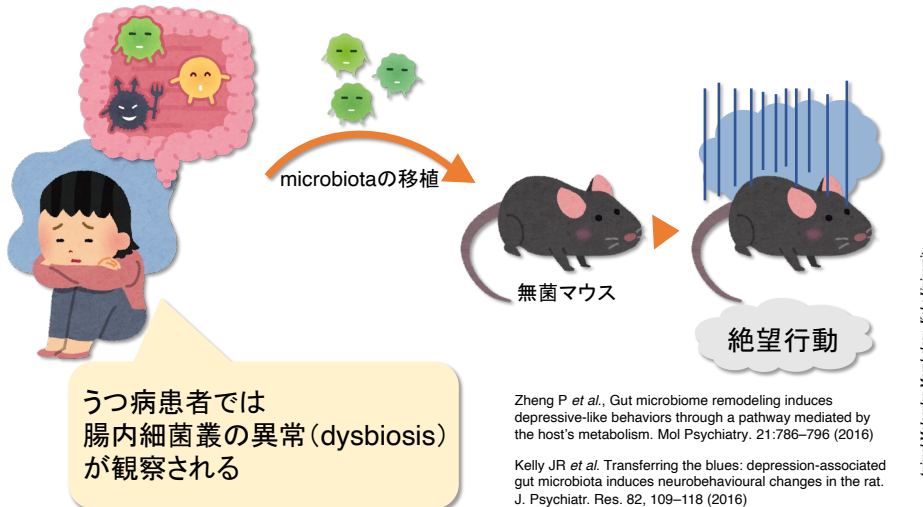
- ←坂口志文教授(阪大免疫学フロンティアセンター):「全く違う役割」の免疫細胞(制御性T細胞, Treg)の発見
- 暴走を止める(免疫の抑制役) ← クロストリジウム菌のうちの17種類を混合しマウスに与えるとTregが増える
- アレルギー性疾患にならない!

★修行僧(總持寺@神奈川) ⇒ 食物繊維中心の食事 ⇒ アレルギーが減少
(腸叢の餌になる)



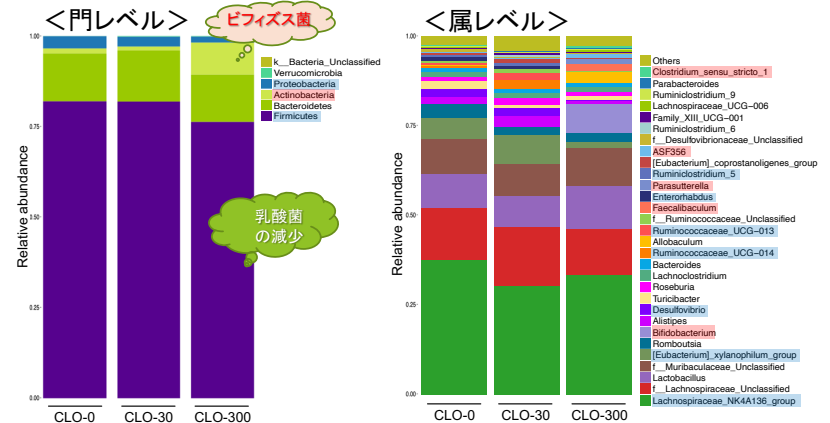
Animal Molecular Morphology, Kobe University

腸内細菌叢の変化はストレスによる絶望行動の発症と関連する



結果 腸内細菌叢解析

OTU(97%以上一致する配列を一つの菌種とした分類単位)相対存在量

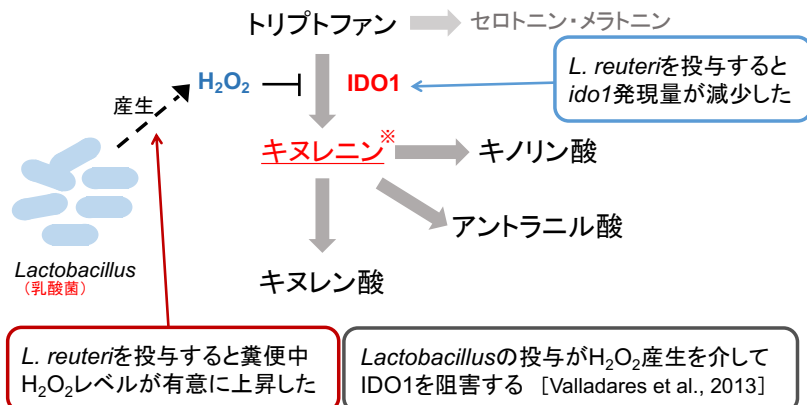


CLO-300群において、門および属レベルともに腸内細菌叢の変動が認められた

[Onaru *et al.*, 2020; Murata *et al.*, 2023]

Animal Molecular Morphology, Kobe University

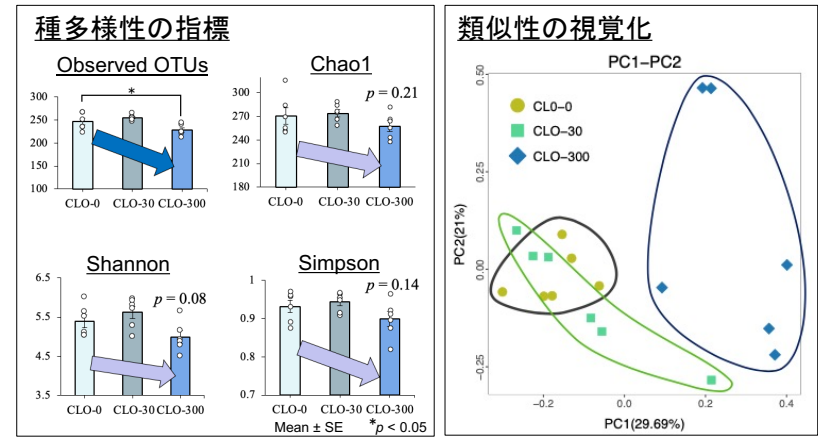
乳酸菌の減少がdysbiosisを起こす



※ 血液脳関門を通過後、神経伝達物質のバランスを崩して神経炎症を促進し、中枢神経において抑うつ状態を引き起こす

Animal Molecular Morphology, Kobe University

結果 腸内細菌叢解析

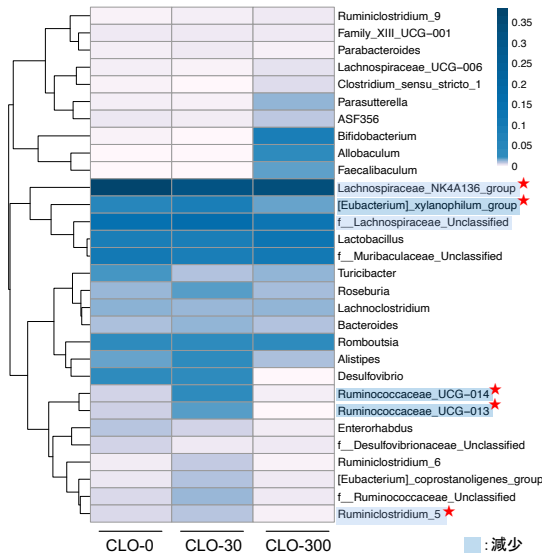


CLO-300群において種多様性 低下

CLO-300群はCLO-0および30群と異なるクラスターを形成

Animal Molecular Morphology, Kobe University

結果と考察 OTU相対存在量

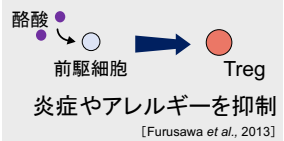


CLOにより属レベルで変動した細菌

「上皮性炎症反応」「短鎖脂肪酸の産生」

とくに、CLO-300群では酪酸産生菌(属)*が減少

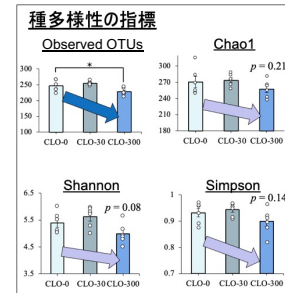
炎症性腸疾患患者の特徴 [Manichanh et al., 2006; Sokol et al., 2009]



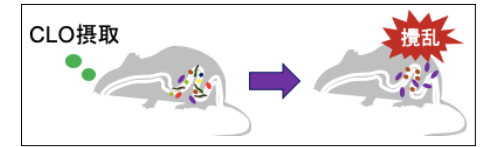
免疫系の恒常性の攪乱

Animal Molecular Morphology, Kobe University

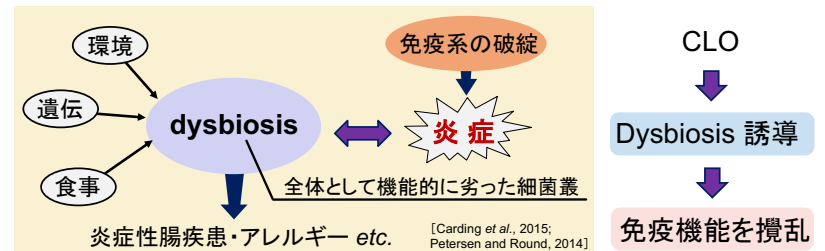
結果と考察 種多様性



CLO-300群において腸内細菌叢の種多様性が低下

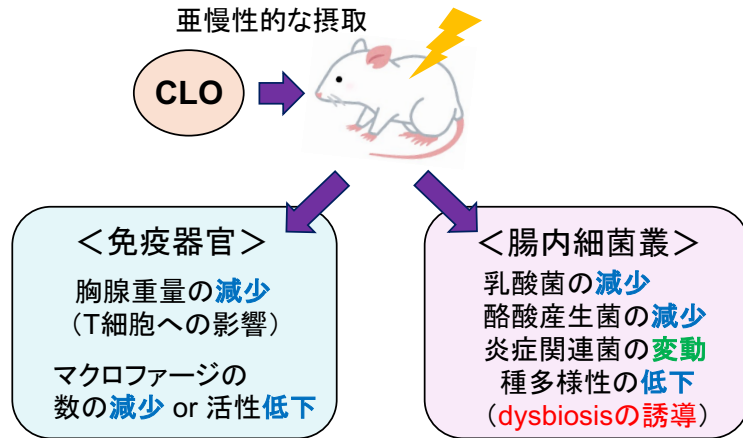


細菌叢構成の単純化 = dysbiosis



Animal Molecular Morphology, Kobe University

結論

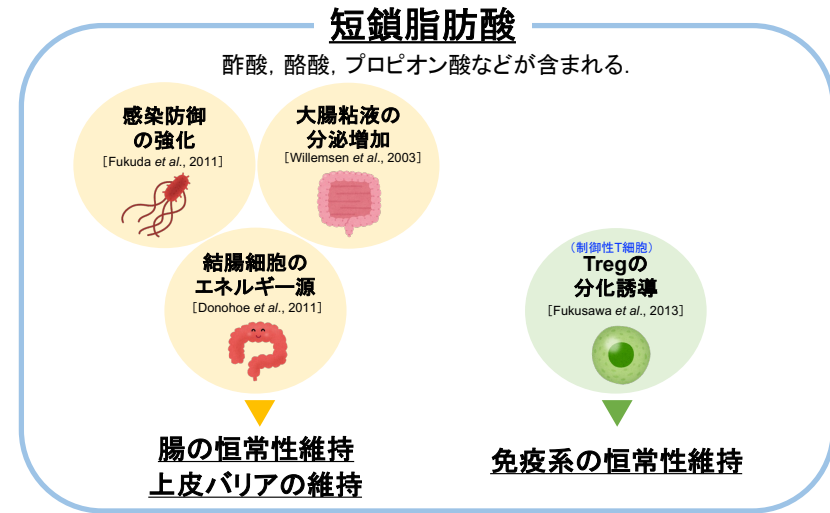


日常的なCLOへの曝露は免疫機能を攪乱する

[Onaru, ..., Hoshi *et al.*, 2020]

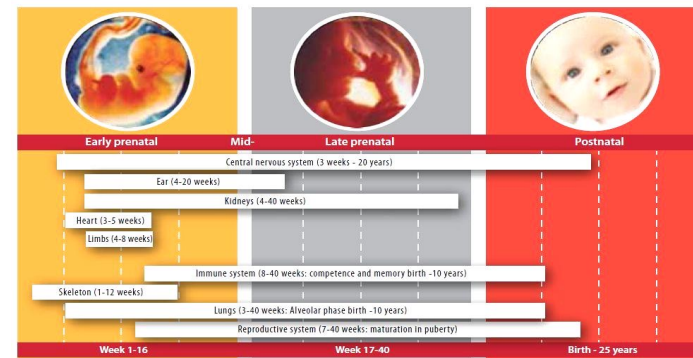
Animal Molecular Morphology, Kobe University

短鎖脂肪酸産生菌が減少する！



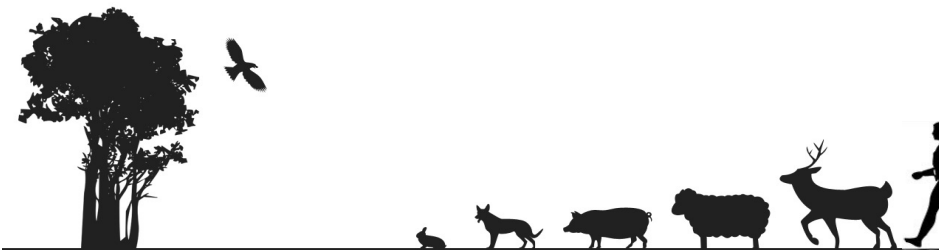
環境要因に対する影響評価の難しさ

2. 時期特異性



State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals 2012 Summary for Decision-Makers [WHO & UNEP]

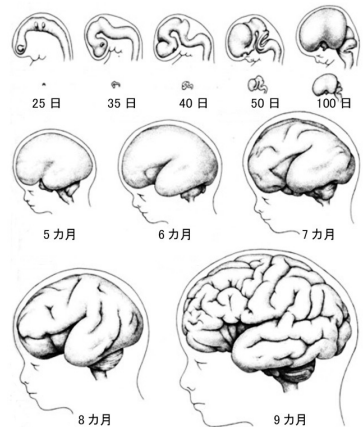
「影響を受けやすい時期 (Critical point)」が存在する



ネオニコチノイド系農薬のシグナル毒性と子どもの発達

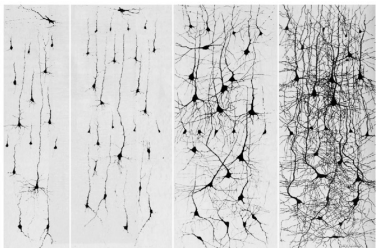


胎児・子どもの脳の発達



ネオニコチノイドが結合する所

胎児脳では、胎齢の早い時期からnAChRが高発現!



B. 生後の大脳皮質の神経回路の発達

[Courchesne, Neuron, 2007]

A. 胎児の脳の発達 [Cowan, Sci Am, 1979]

脳の発達は、胎児期も重要だが、出生後の発達は脳の高次機能を担う神経回路網が出来る重要な時期。

継世代影響から捉えるネオニコチノイド系農薬のシグナル毒性と神経前駆細胞・グリアの局所活動

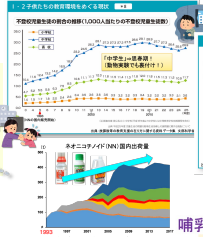
ネオニコチノイド系農薬(NN)

- ①浸透性
- ②残効性
- ③選択毒性

- ・ニコテンに類似した構造
- ・昆虫のアセチルコリン受容体(nAChR)に結合

神経の持続興奮, 殺虫効果

NNとnAChRの親和性
哺乳類<昆虫
[Tomizawa & Casida, 2003]



哺乳類の情動変動

食物中残留基準値の緩和

日常的NNへの曝露

尿中にNN検出

NNは哺乳類のnAChRを介して、神経興奮を引き起こす

NNは哺乳類の行動・恒常性の維持に影響を及ぼす

クロチアジン(CLO)の曝露 → マウスの不安様行動増加・異常啼鳴・加齢影響

ジノテフランの胎子期～発達期曝露 → マウスへの抗うつ作用・自発運動量の増加

CLO経口投与 → 腸内細菌叢・胸腺の異常&農薬原体・代謝産物の胎子移行

哺乳類への詳細なリスク評価が急務!!!

継世代影響から捉えるネオニコチノイド系農薬のシグナル毒性と神経前駆細胞・グリアの局所活動

AOP(有害発現経路)

化学物質 → 分子メカニズム(MIE) → 細胞反応(CE) → 組織反応(OAR) → 健康レベルでの反応(AO)

【オープンフィールド試験】

- 不安 ↑
- 多動 ↑

【焦点となる社会的課題】

母親(F0世代)が妊娠中に化学物質の曝露を受け、その化学物質が胎盤を透過する場合には胎子(F1)に速やかに到達し、胎子も曝露を受ける(次世代影響)。胎子の体内の生殖細胞に到達し、その生殖細胞から子孫(F2)が生じ、F2もまた母体からの影響を受ける可能性がある(多世代影響)。更に、化学物質に直接曝露されることがないにもかかわらずF3以降の世代にも影響が出る場合が報告され始めている(超世代影響)。それらの多世代・超世代影響のメカニズムなどについては未だ明らかでない。また、新たな視点から毒性評価を行う必要がある。

一我々はこれまでにネオニコチノイドをはじめとする浸透性農薬(クロチアジン、ジノテフラン、フイプロニル)のNOAEL量での動物実験を行い、①発達神経毒性・②免疫毒性・③性差・④年齢差影響を明らかにしてきた。すなわち、NOAELが真の意味で「無毒性量ではない」という点が最大の社会課題。

現状の毒性試験の問題点をより明確にする！
より簡便な新規バイオマーカーを提案する!

幼年期(3週齢)

パスウェイ解析
カルシウムシグナリングの低下
nAChR α4 (Chrm4) ↓
Ca²⁺チャネル ↓
アダニル酸シグナラー ↓
Ady1 ↓

nAChR α4 (Chrm4)遺伝子
カルシウムシグナリングを活性化 [Fuhrle et al., 2004]
Ca²⁺チャネル遺伝子
不安が症状の精神疾患患者において低発現 [Zhang et al., 2010; Shen et al., 2008]

ラット小脳培養細胞へのNN曝露
カルシウムシグナリング低下 ↓ / 樹状突起形成減少 ↓ [Kimura-Kuroda et al., 2012]

胎子・授乳期のCLO曝露がnAChRの発現低下をしてカルシウムシグナリングを阻害し、不安様行動を惹起させた可能性

成年期(10週齢)

免疫関連化学的解析
c-fos ↑ / DCX-NeuN ↓
胎子・授乳期CLO曝露の影響が成年期の海馬において継続

神経元的遺伝子発現解析
神経およびオリゴデンドロサイトの分化促進
ミトコンドリア関連因子 ↑
Mag ↑, Bdnf ↑

注意欠如・多動性障害(A/HD)

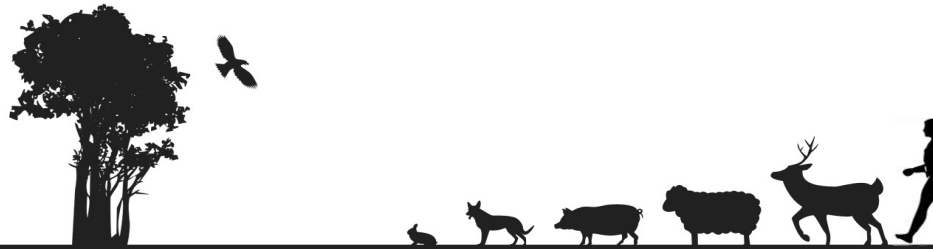
BDNFの血漿レベル増加 ↑
Bdnfの多型が高頻度で検出 [Friszel et al., 2009; Cho et al., 2010]

BDNF分解に働くホルモンの発現低下 ↓
Bdnf分解 [Bhatnagar et al., 2010]

胎子・授乳期のCLO曝露による、オリゴデンドロサイトおよびBDNF発現の促進により、多動が惹起した可能性

継世代影響

Animal Molecular Morphology, Kobe University



神経回路形成期の時期特異的ネオニコチノイド曝露影響と発達神経毒性の継世代評価

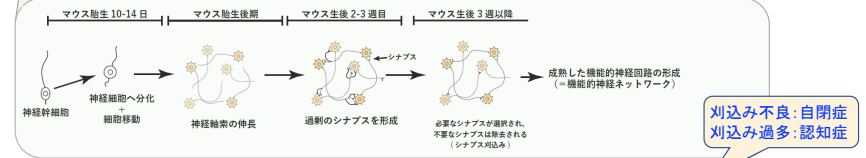


背景と目的

NNの次世代影響



脳の神経回路形成期



神経新生, 神経細胞移動, 神経突起・軸索の伸長, シナプスの形成・刈込みなどが行われる **脳機能形成において最も重要な時期**

➡ 各発達段階のCLO曝露による神経行動学的な影響は明らかではない

背景と目的

環境因子の継世代影響

*エピゲノム: ゲノムに加えられた修飾で、後天的に変化を受ける

細胞エピゲノム*の変化により、**複数の世代に有害な表現型が伝達される可能性**

[Xin et al., 2015]

無毒性量のCLO

F1, F2, F3世代の雌産子の雌性生殖器に影響を及ぼす

[Kitauchi et al., 2021] [北内, 2021]

除草剤グリホサート

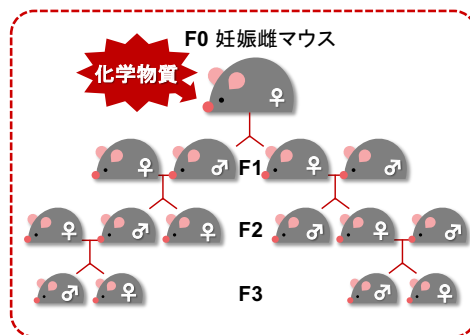
F2, F3世代の疾患に関与, 精子DNAメチル化領域の変化

[Kubsad et al., 2019]

妊娠中のニコチン曝露

F1, F2世代の行動異常,

DNAの低メチル化 [Buck et al., 2019]



➡ 各発達段階のCLO曝露による神経行動学的な影響は明らかではない

背景と目的

実験①の目的

神経回路形成期(胎子・新生子期)を4つの期間に分け、**CLO曝露が脳の発達へ最も影響する発達段階を検証**

実験②の目的

妊娠・授乳期のF0世代に無毒性量のCLOを曝露し、**F1, F2, F3世代の神経行動学的な継世代影響を検証**

実験③の目的

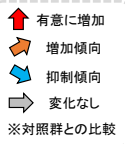
妊娠・授乳期のF0世代に無毒性量のCLOを曝露し、**F1, F2, F3世代の胸腺・腸管免疫系への継世代影響を検証**

実験① 結果と考察

評価	装置	項目	幼年期				成年期			
			CLO-1	CLO-2	CLO-3	CLO-4	CLO-1	CLO-2	CLO-3	CLO-4
自発運動量	OF	総移動距離	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒
	OF	移動速度	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒
	EPM	総移動距離	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	↑	⇒
	EPM	アーム総進入回数	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	↑	⇒
不安様行動	OF	中心区画滞在時間	⇒	⇒	⇒	⇒	↑	↑	⇒	⇒
	EPM	オープンアーム滞在時間	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒
	EPM	オープンアーム進入割合	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒

4週間の発達期

- CLO-1** (胎齢 9~12 日): 成年期 不安様行動の**増加・抑制傾向**
- CLO-2** (胎齢 15~18 日): 成年期 不安様行動の**増加・抑制傾向**
- CLO-3** (生後 1~4 日): 成年期 自発運動量の**増加**
- CLO-4** (生後 11~14 日): 幼年期 不安様行動の**増加傾向**



➡ 脳の神経回路形成期の**発達段階別の行動影響**が明らかとなった

実験① 結果と考察

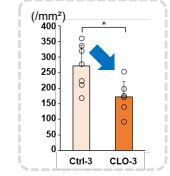
生後1~4日 (CLO-3) のCLO曝露

	曝露期間	幼年期	成年期	DCX陽性細胞数(成年期)
先行研究 [Maeda et al., 2021]	E1.5~PND21	不安様行動	多動	減少
本研究	E9~12 (CLO-1)	—	不安への影響	—
	E15~18 (CLO-2)	—	不安への影響	—
	PND1~4 (CLO-3)	—	多動	減少
	PND11~14 (CLO-4)	不安様行動	—	—

E=胎齢 PND=生後日齢

免疫組織化学的解析

成年期: DCX陽性細胞数(未熟神経細胞)の**減少**
 ➡ 生後1~4日のCLO曝露による神経発達への影響が成年期の海馬においても継続



➡ 胎子・新生子期(全期間)のCLO曝露と同様の結果が、**生後1~4日のCLO曝露(CLO-3)**でも明らかとなった

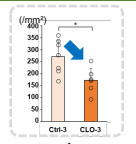
実験① 結果と考察

生後1~4日 (CLO-3) のCLO曝露

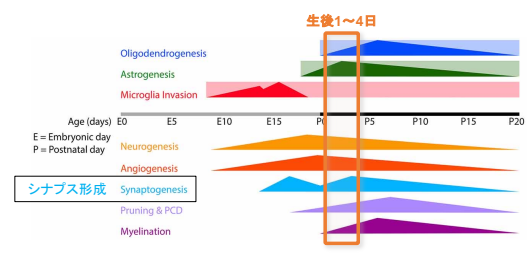
網羅的遺伝子発現解析

幼年期 } 海馬の神経突起・軸索の伸長・分枝が**促進**
 成年期 }

- "Neurogenesis (神経突起形成)" や, "Outgrowth of neurites (神経突起の伸長)" など ↑
- *Fgfr1* (線維芽細胞増殖因子受容体1) ↑



適正な時期の神経発達を**阻害**



マウスの脳における神経回路形成過程 [Reemst et al., 2016より]

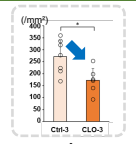
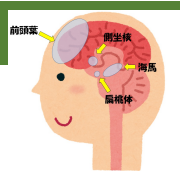
実験① 結果と考察

生後1~4日 (CLO-3) のCLO曝露

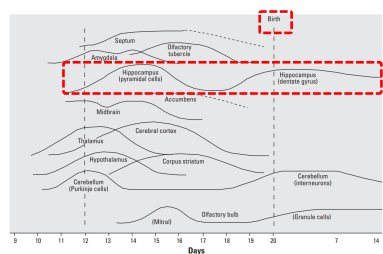
網羅的遺伝子発現解析

幼年期 } 海馬の神経突起・軸索の伸長・分枝が**促進**
 成年期 }

- "Neurogenesis (神経突起形成)" や, "Outgrowth of neurites (神経突起の伸長)" など ↑
- *Fgfr1* (線維芽細胞増殖因子受容体1) ↑



適正な時期の神経発達を**阻害**



発達中のマウス脳における神経細胞の発生時期 [Rodier et al., 1977より]

海馬
 神経新生・発達は生後も継続

➡ CLOは母体内で代謝・濃縮され迅速に**母乳中へ移行** [Shoda et al., 2023a]

➡ **海馬の神経発達に悪影響**

実験① 結果と考察

10

生後1~4日 (CLO-3)のCLO曝露

海馬 情動行動を制御する重要な役割を担う

ヒト人工多能性幹細胞 (hiPSC)
由来脳オルガノイド

出生前ニコチン曝露による早期の
神経細胞分化, 神経突起の伸長

[Wang et al., 2018]

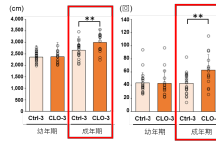
母性ニコチン曝露を受けた
マウス産子

認知・行動異常および分子層と
海馬CA1の神経突起長の増加

[Zhou et al., 2021]

本研究 生後1~4日のCLO曝露(CLO-3)

脳の神経突起や軸索の伸長・分枝に影響
し, 成年期の行動異常に繋がる可能性



Animal Molecular Morphology, Kobe University

結論(実験①)

11

脳の神経回路形成期(胎子・新生子期)を4つの期間に分け,
無毒性量のCLO曝露による影響を発達段階別に評価

	曝露期間	幼年期	成年期	DCX陽性細胞数(成年期)
先行研究 [Maeda et al., 2021]	E1.5~PND21	不安様行動	多動	減少
本研究	E9~12	—	不安への影響	—
	E15~18	—	不安への影響	—
	PND1~4	—	多動	減少
	PND11~14	不安様行動	—	—

胎齢 9~12, 15~18日

成年期の不安レベルに影響

生後 1~4日

成年期の自発運動量増加

幼若神経細胞の減少

神経突起や軸索の伸長・分枝促進

脳の神経回路形成期(胎子・新生子期)における,
発達段階特異的な神経行動学的影響を初めて明らかにした

生後1~4日: CLO曝露による脳の発達への影響が最も大きい

[Shoda et al., 2023b (doi: 10.1292/jvms.22-0570)]

Animal Molecular Morphology, Kobe University

実験② 結果と考察

12

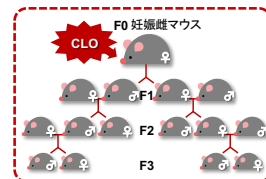
妊娠・授乳期のF0世代に無毒性量のCLOを曝露し,
F1, F2, F3世代の神経行動学的な継世代影響を検証

評価	装置	項目	成年期		
			F1	F2	F3
自発運動量	OF	総移動距離	⇒	⇒	⇒
	OF	移動速度	⇒	⇒	⇒
	EPM	総移動距離	⇒	⇒	⇒
	EPM	アーム総進入回数	⇩	⇩	⇩
不安様行動	OF	中心区画滞在時間	⇒	⇒	⇒
	EPM	オープンアーム滞在時間	⇒	⇒	⇒
	EPM	オープンアーム進入割合	⇩	⇩	⇩

F1 自発運動量の減少
不安様行動の増加
F2 自発運動量の減少傾向
不安様行動の増加傾向
F3 自発運動量の増加傾向

↑有意に増加 ↓有意に減少 ⇨変化なし
⇩増加傾向 ⇨減少傾向 ※対照群との比較

無毒性量のCLOによる影響は
F1・F2・F3へ世代を経ると減弱する



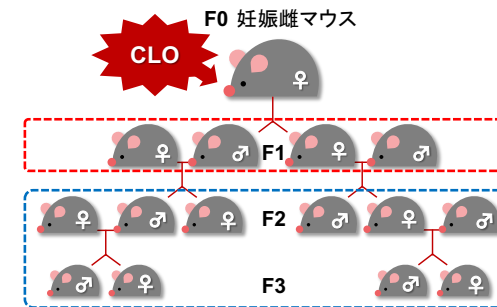
[Shoda et al., 2023c (in press)]

Animal Molecular Morphology, Kobe University

実験①&②の総括

13

神経回路形成期の時期特異的なクロチアニジン(CLO)曝露影響と
発達神経毒性の継世代評価



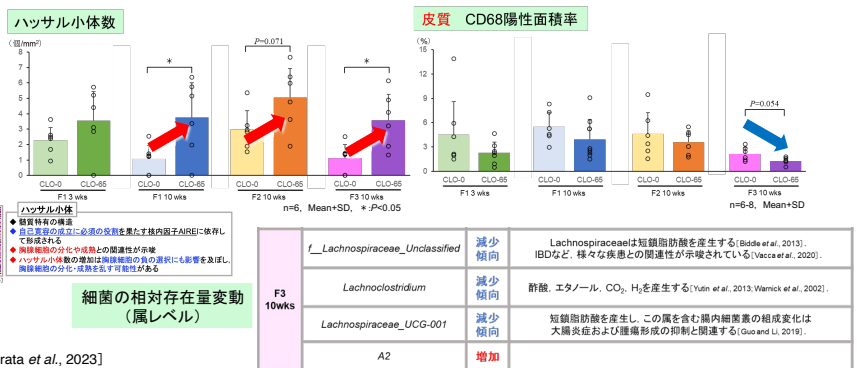
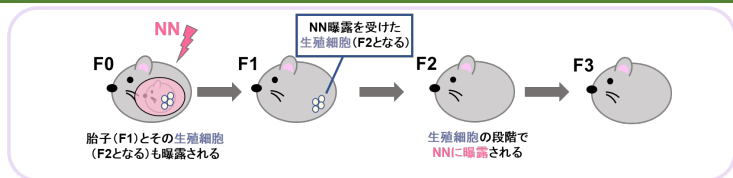
F1世代 脳神経回路形成の発達段階別の影響が明らかとなった

F2・F3世代 影響は波及するが, 世代を経ると減弱していく

[Shoda et al., 2023b, c]

Animal Molecular Morphology, Kobe University

実験③ まとめ



Animal Molecular Morphology, Kobe University

実験③ 結果と考察(腸内細菌叢解析)

無毒性量のCLOが腸内細菌叢に及ぼす影響は甚大ではないものの、細菌叢組成を継世代的に変動させる

α多様性に対する影響も顕著ではなかった

先行研究においても、無毒性量の投与群では細菌叢組成に大きな変化はみられなかった [Onaru et al., 2020]

Animal Molecular Morphology, Kobe University

実験③ 結果と考察(腸内細菌叢解析)

無毒性量のCLOが腸内細菌叢を攪乱した

複数の短鎖脂肪酸産生菌の相対存在量が変動した

先行研究と一致 [Onaru et al., 2020]

門レベルでの変動はみられなかった

α多様性に対する影響も顕著ではなかった

先行研究においても、無毒性量の投与群では細菌叢組成に大きな変化はみられなかった [Onaru et al., 2020]

Animal Molecular Morphology, Kobe University

結語

化学合成農薬が一般に使用されるようになっておよそ70年が過ぎました。人類は漸く農薬の本当の姿を理解できるようになってきたのではないのでしょうか。

一般に胎子および新生子は成体と比べて化学物質等への感受性が極めて高く、非可逆的に脳・生殖機能、さらには胸腺・腸管免疫系を障害する可能性が示唆されています。環境中微量化学物質の作用メカニズムの解明は、分子生物学的知見をもとに新しい時代に入ったといえますが、器官形成・発達時期である胎子・新生子期での曝露が、長期にわたって非可逆的にフィードバック機構の破綻を招来する作用機序については未だ不明な点が多くあります。

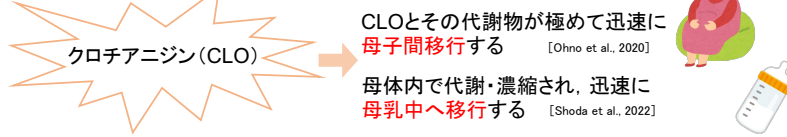
さらに近年、細胞世代を超えて継承され得る、塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現制御について研究する新たなパラダイムとして、エピゲノム毒性の領域が提唱され、環境中微量化学物質が生物に及ぼす環境エピゲノムの展開が期待されています。

「環境汚染と健康」の問題は未来(次世代)に先送りしてはならないし、「疑わしきは罰せず」ではすまされません。農薬との付き合い方を真剣に考えるときが来たかと思っています。

Animal Molecular Morphology, Kobe University

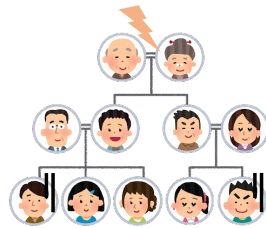
母性行動への影響

<NNの母子間移行>



日本人の成人、子供や新生児から有機リン系やピレスロイド系、NNが検出される [Ichikawa et al., 2019; Ikenaka, et al., 2019; Oya et al., 2021]

<環境化学物質によるエピジェネティクス変異>

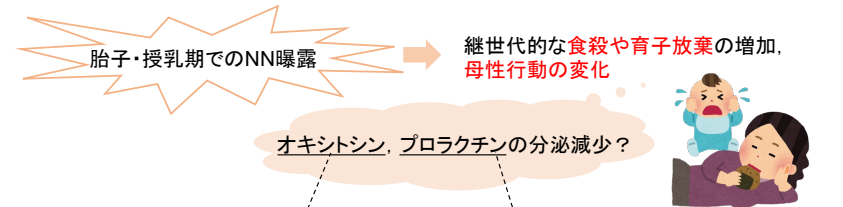


ラットへの除草剤グリホサートの胎児期曝露によるF2・F3世代における疾患の増加、精子DNAのメチル化領域の差異 [Kubsad et al., 2019]

Animal Molecular Morphology, Kobe University

母性行動への影響

<先行研究>



- ・タバコの煙によるラットのオキシトシン減少 [Napierala et al., 2017]
- ・オキシトシン受容体 (RAGE) ノックアウトマウスにおける養育行動の低下 [Yamamoto et al., 2019]

神経回路を活性化することで養育行動を生み出す [Sairenji et al., 2017]

正常な母性行動にはオキシトシンとプロラクチンの十分な分泌が重要

Animal Molecular Morphology, Kobe University

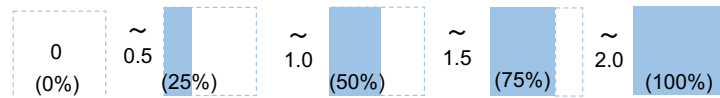
本実験(進捗状況 巣作り行動試験)

<巣作り行動試験の評価基準> 各項目のスコアを合計し、9点満点とした。

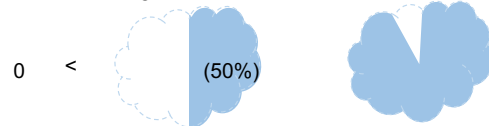
Nest Quality



Usage of nesting material



Degree of nestlet shredding



Animal Molecular Morphology, Kobe University

本実験(進捗状況 巣作り行動試験)

GD17.5 対照群2



<巣の天井>
天井があるがマウスが真上から見える (Nest Quality:4以下)



<巣の壁>
餌カゴ直下まで高さがあり、横からはマウスが見えない。マウスが横たわったときよりも高い。(Nest Quality: 3以上)

∴Nest Quality: 4

Animal Molecular Morphology, Kobe University

本実験(進捗状況 巣作り行動試験)

GD17.5 投与群3



<巣の天井>
なし(⇒Nest Quality:0~3)



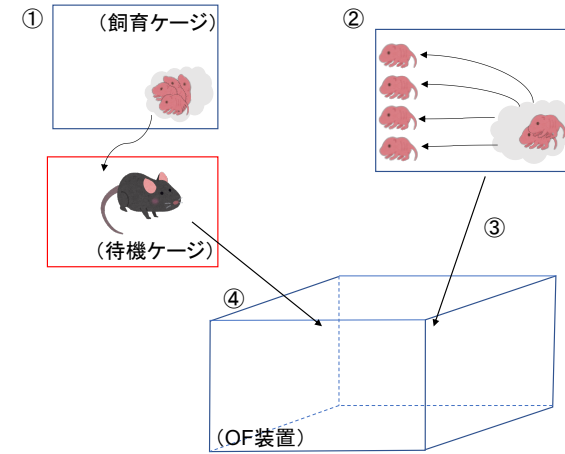
<巣の壁>
マウスが横たわったときの高さよりも高い.
(⇒Nest Quality:3)
しかし、四方から見てマウスが完全に覆われるほど
完全な壁ではない.
(⇒1点減点)

∴Nest Quality:2

Animal Molecular Morphology, Kobe University

本実験(進捗状況 産子のリトリービング試験)

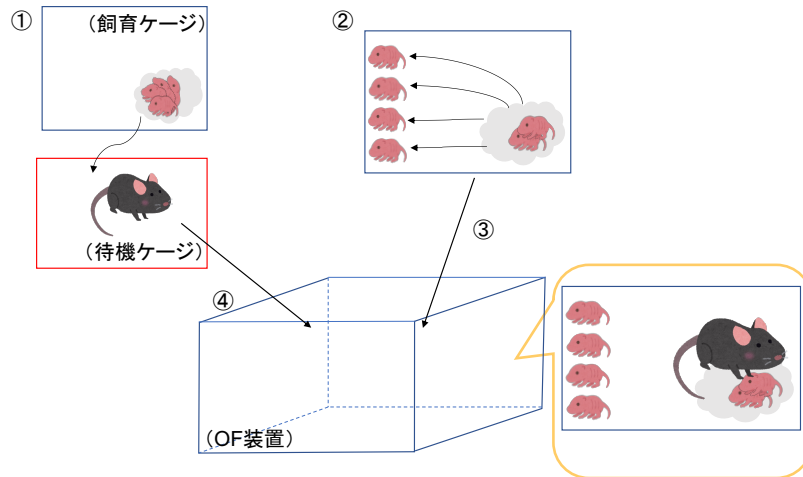
<産子のリトリービング試験の手順>



Animal Molecular Morphology, Kobe University

本実験(進捗状況 産子のリトリービング試験)

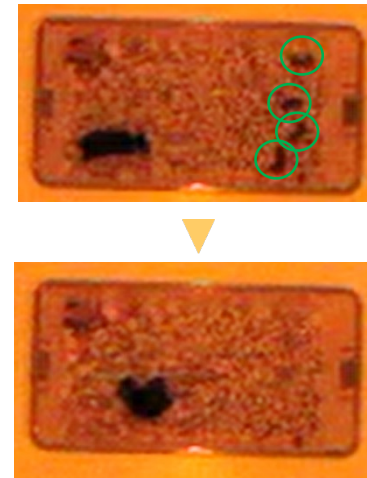
<産子のリトリービング試験の手順>



Animal Molecular Morphology, Kobe University

本実験(進捗状況 産子のリトリービング試験)

対照群2

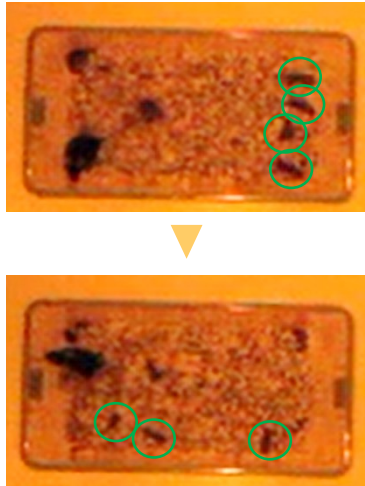


検索した母獣全例(n=6)において、6分以内にすべての産子のリトリービングを完了した

Animal Molecular Morphology, Kobe University

本実験(進捗状況 産子のリトリービング試験)

投与群6



検索した母獣全例(n=6)において、**6分以内に産子のリトリービングを完了できなかった**

Animal Molecular Morphology, Kobe University

アトピー性皮膚炎とネオニコチノイド系農薬

アトピー性皮膚炎(AD)

憎悪・寛解を繰り返す、掻痒のある湿疹を主変病とする疾患

アトピー素因

- ①家族歴・既往歴
- ②IgE抗体を産生しやすい



患者数が1990年から2017年の間に16万人増加

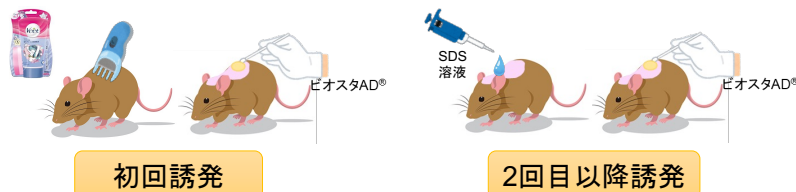
Animal Molecular Morphology, Kobe University

実験② 材料・方法

AD誘発

初回誘発: イソフルラン麻酔下、背部および耳介部をバリカンで毛刈りした後、除毛剤を適量塗布し除毛した。その後ピオスタ®AD 100 mg を背部に塗布した。2回目以降誘発: 4%SDS溶液150 µl をマウスの背部に塗布し、乾燥後にピオスタ®AD を100 mg 背部に塗布した。

これらの処理を、1週間に2回のペースで、計6回行った。



Animal Molecular Morphology, Kobe University

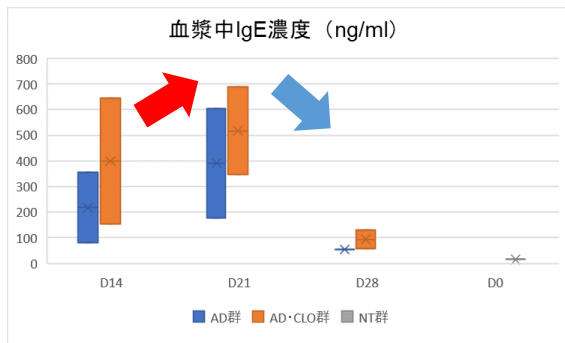
実験②結果 マクロ像 D21

群	IgE (ng/ml)	マクロ像	群	IgE (ng/ml)	マクロ像
AD21-1	177.5		CLO21-1	688.9	
AD21-2	603.6		CLO21-2	346.5	

D21においてもAD群およびAD・CLO群で、IgE値がより高い個体では出血、発赤において顕著な症状の悪化がみられた。また、**全体的にAD・CLO群でより症状の悪化が確認**できた。

Animal Molecular Morphology, Kobe University

実験②結果 IgE値



D14, 21, 28において、全体的にAD・CLO群がAD群よりも高かった。全体の傾向として、D14からD21にかけて増加し、D28では減少していた

Animal Molecular Morphology, Kobe University

ネオニコチノイドの哺乳類への影響—2

ネオニコ	処理と影響	文献
イミダクロプリド	マウスにごく低用量を高カロリー食と共に長期投与すると 肥満度を高め、インシュリン抵抗性を高率に起こした	Sun Q. <i>et al.</i> J Agric Food Chem, 2016
アセタミプリド・クロチアジジン・チアメトキサム	ラット・ニコチン性受容体α7を発現した細胞で、2種のネオニコが興奮作用を起こし、3種のネオニコがアセチルコリンの反応を攪乱	Cartereau A <i>et al.</i> Br J Pharmacol, 2017
クロチアジジン	母マウスに 無毒性量 を胎子・授乳期に投与すると、生まれた雄マウスの 生殖細胞が顕著に減少(次世代影響) 。	Yanai, S, Hoshi N <i>et al.</i> J Vet Med Sci, 2017
クロチアジジン	若い雄マウスに 無毒性量 を1回投与すると、 無毒性量以下でも不安行動(ヒト可聴域異常啼鳴)を示し、海馬など脳に異常が確認された	Hirano T, Hoshi N <i>et al.</i> Toxicol Lett, 2018 *
ジノテフラン商品名アルバリン	雄マウスの成長期(3-8週)に 無毒性量 を投与すると脳の黒質でドーパミン神経細胞の活性化、無毒性量以下でも 用量依存的に多動 が起こった	Yoneda N, Hoshi N <i>et al.</i> J Vet Med Sci, 2018 *
イミダクロプリド	ラット副腎髄質の培養系に、低用量で1-2日間投与すると、ニコチン性受容体を介してアドレナリンの分泌異常が起こった	Kawahata I, Yamakuni T. Toxicology, 2018
ジノテフラン商品名アルバリン	幼若マウスへの 無毒性量 垂慢性投与で 抗うつ作用 が認められた	Takada T, Hoshi N <i>et al.</i> J Vet Med Sci, 2018 *
クロチアジジン	ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞に対し、その 機能や形態に関わる遺伝子を減少 させ、神経分化の過程で神経突起の長さを増加させる	Hirano T, Hoshi N <i>et al.</i> Toxicol Appl Pharmacol, 2019 *
クロチアジジン	妊娠ラットに 無毒性量 を経口投与すると、投与後1時間で 胎子に移行 。胎仔血中のクロチアジジン濃度は母ラットとほぼ同じ。	Ohno, S, Hoshi N <i>et al.</i> Toxicol Lett, 2020 *
クロチアジジン	ラットに 無毒性量 を投与すると、胸腺が縮小(30%↓)、 腸内細菌叢のdysbiosis が起こり、炎症反応が増強した。	Onaru, K, Hoshi N <i>et al.</i> J Vet Med Sci, 2020 *

Animal Molecular Morphology, Kobe University

発達神経毒性、免疫毒性、生殖毒性の報告などがある。ネオニコが一定の濃度以上で毒性を発揮することは明白。低用量長期曝露でも発達神経毒性や生殖毒性が報告されてきている。

ネオニコチノイドの哺乳類への影響—1

ネオニコ	処理と影響	文献
イミダクロプリド	母胎經由曝露(337 mg/kg単回投与)仔ラットの脳組織、 異常行動	Abou-Donia MB <i>et al.</i> J Toxicol Environ Health A, 2008
チアメトキサム	成熟ラットに投与(50, 100 mg/kg 7回投与)ラットの脳内のAChE低下や不安行動	Rodrigues KJ, <i>et al.</i> Ecotoxicol Environ Saf, 2010
クロチアジジン	母マウスの給餌に0.002~0.018%(3~99 mg/kg)混合して発達期マウスに曝露 仔マウスに 異常行動	Tanaka T. Toxicol Ind Health, 2012
アセタミプリドイミダクロプリド	ラットの発達期神経細胞培養に投与すると1 μM以上で、ニコチン類似の興奮作用を起こした	Kimura-Kuroda J. <i>et al.</i> PLOS One, 2012
クロチアジジン	雄マウス(8週齢)に10, 50, 250 mg/kg投与時に、ストレスも与えると、 無毒性量以下でも不安行動や精子形成の異常	Hirano T, Hoshi N <i>et al.</i> J Vet Med Sci, 2015
アセタミプリドイミダクロプリド	胚卵母細胞の培養系に10~100 ppm, 44時間処理すると、成熟が阻害され染色体にも異常	Ishikawa S J Vet Med Sci, 2015
アセタミプリド	母マウスに1, 10 mg/kg経口投与(胎仔期6日~生後21日)し、雄仔マウスで不安様行動、攻撃行動、性行動における変化が観察された。 低用量群は無毒性量以下で、異常が起こることが確認された	Sano K, Toyama C <i>et al.</i> Front Neurosci, 2016
アセタミプリド(モスピラン)	雄マウス(8週齢)にNOAELの10,100倍量7日間投与 体重減少、脳内nAChRの発現変動やACEの脳内蓄積を確認	Terashima, H <i>et al.</i> Int J Environ Res Public Health, 2016
イミダクロプリド	雄ラットに1 mg/kg, 65日間経口投与。精子の形態異常、ステロイドホルモンの減少、DNAのダメージなどを確認	Mohamd, AA <i>et al.</i> Environ Pollutant, 2016
アセタミプリドイミダクロプリド	ラットの発達期神経細胞培養に低用量で長期投与すると、 自閉症関連遺伝子 など脳発達に重要な遺伝子発現に異常	Kimura-Kuroda J. <i>et al.</i> Int J Environ Res Public Health, 2016

ヒトとげっ歯類(マウス、ラット)のニコチン性アセチルコリン受容体は約90%の相同性があり、極めてよく似ているので、げっ歯類の結果はヒトでも起こりうる。

Animal Molecular Morphology, Kobe University

ネオニコチノイドの哺乳類への影響—3

ネオニコ	処理と影響	文献
ジノテフラン商品名アルバリン	ジノテフラン(無毒性量)と慢性軽度ストレスの複合曝露は、コルチコステロンの上昇にもかかわらず、いずれかの曝露単独で誘発される情動およびモノアミン作動性神経細胞活動の変化を打ち消す	Takada T, Hoshi N , <i>et al.</i> J Vet Med Sci, 2020
フィプロニル	成熟期のマウスに0.05および5 mg/kg(無毒性量)投与すると、ドーパミンの極端な減少に伴い、 運動量および不安行動が増加 する	Maeda M, Hoshi N , <i>et al.</i> J Vet Med Sci, 2021
クロチアジジン	無毒性量 (NOAEL)への 胎子・授乳期曝露 は、雄マウスの発達段階において 神経新生を阻害し、異なる行動異常を誘発 する	Maeda M, Hoshi N , <i>et al.</i> J Vet Med Sci, 2021
クロチアジジン	無毒性量 への 胎子・授乳期曝露 でも、次世代以降の雌マウスの エピゲノム毒性 により、 高率な育子放棄と食糧 が起こる	Kitachi S, Hoshi N , <i>et al.</i> J Vet Med Sci, 2021
クロチアジジン・ジノテフラン・フィプロニル、他	無毒性量 以下でも、 認知・情動行動や免疫系機能に悪影響 があり、現行の毒性試験には大きな欠陥のあることに警鐘を鳴らしている	Hoshi N. Risks and Regulation of New Technologies (Book), 2021
クロチアジジン	老齢マウスに無毒性量 を投与し、原体とその代謝物の濃度が成人群と比較して、 血液と脳で有意に高く、運動活性を低下 させる	Hirano T, Miyata N, Hoshi N , <i>et al.</i> Toxicol Lett, 2021 *
フィプロニル	マウス、犬、猫で、 情動・認知行動に影響 を与え、神経伝達物質(線条体ドーパミンおよび海馬セロトニン)のレベルを変化させる	Suzuki T, Ikenaka Y, Hoshi N , <i>et al.</i> Sci Report, 2022
クロチアジジン	二光子顕微鏡を用いた in vivo イメージングによる 無毒性量 での ニューロン過活動 を観察	Nishi M, Hoshi N , <i>et al.</i> J Vet Med Sci, 2022
アセタミプリド	二光子顕微鏡を用いたCa ²⁺ イメージングにより、投与マウスの 脳機能破壊を観察	Hirai A, Ikenaka Y, Hoshi N , <i>et al.</i> Sci Report, 2022
クロチアジジン	無毒性量 以下で、 認知記憶・情動行動 には明確な 性差 があり、雄マウスの神経行動学的な脆弱性が明らかになった	Kubo S, Hirano T, Hoshi N , <i>et al.</i> Toxicol Appl Pharmacol, 2022
クロチアジジン	母乳に速やかに移行し濃縮される。母乳中のCLO濃度は血中濃度より高いため、授乳中のCLOの影響が懸念される	Shoda A, Hoshi N , <i>et al.</i> Toxicol Lett, 2022
Review (総説論文)	メタアナリシス論文(2020までの神戸大学関連論文6篇が引用) 酸化ストレス、神経炎症 、そして最終的には 神経細胞死 を引き起こす。ネオニコチノイドによるnAChRの機能変化は、様々な研究で観察された影響のほとんどに関与している可能性がある	Rerreira CC & Faro LRF Int J Mol Sci, 2021

Animal Molecular Morphology, Kobe University

ネオニコチノイドの哺乳類への影響—4

ネオニコ	処理と影響	文献
クロチアジジン	妊娠・授乳期のF0世代に 無毒性量 のCLOを曝露し、F1、F2、F3世代の 胸腺・腸管免疫系への継世代影響 を検証、増悪することを明らかにした。	Murata M, Hoshi N, et al. J Vet Med Sci, 2023
クロラントラニプロール	成熟ラットに投与(50, 100 mg/kg 7回投与)ラットの脳内のAChE低下や不安行動	Kimura M, Hoshi N, et al. J Vet Med Sci, 2023
クロチアジジン	神経回路形成期(胎子・新生子期)を4つの期間に分け、 CLO曝露が脳の発達へ最も影響する発達段階を検証し、生後1~4日が最も影響があった	Shoda A, Hoshi N, et al. J Vet Med Sci, 2023a
クロチアジジン	妊娠・授乳期のF0世代に 無毒性量 のCLOを曝露し、F1、F2、F3世代の 神経行動学的な継世代影響 を検証し、曾孫世代まで影響が認められることを明らかにした。	Shoda A, Hoshi N, et al. J Vet Med Sci, 2023b

継世代影響の解明

Animal Molecular Morphology, Kobe University

でも、日本では……

学術論文は
農薬のリスク評価に
採用されない！

農薬問題における喫緊の課題

NOAEL, ADI の見直しが急務であることの背景

無毒性量 一日摂取許容量

➤ 現行毒性試験の問題点

- 1) 極めて**限定的な GLP準拠OECDガイドラインによる毒性試験**！
→ 杜撰なGLP施設の管理運営の適正調査／公的機関における追試システムの構築
- 2) **発達神経毒性試験の実施は任意項目 → 必須へ**
- 3) **農薬原体より毒性が強くなりうる代謝物や補助剤への未対応**
- 4) 毒性試験に関わる詳細を、リスク管理機関の**農水省が所掌**

欧米では独自の基準を作成！

➤ 最新の科学的知見の取り込みの不十分性

- 1) 「疫学調査」や「学術論文」は**軽視、または採用されない問題**
→ 学術論文の検証システムを！
現状は、公表文献の収集のみならず、文献の評価目的との適合性や文献の信頼性の確認までを、審査をされる側(農業企業)に委ねている
- 2) 疫学調査や事故事例の軽視

クロルピリホスの事例：別添資料「農薬の安全性とリスク評価」(p.267-269)

「利益相反」違反

国民の健康問題の軽視！

➤ 情報開示(透明性確保)の不十分性

- 1) 科学的知見情報の**非公開と知的財産保護という詭弁**
- 2) **情報非開示の農薬抄録 情報データがアナログ(検索できない)！**

Animal Molecular Morphology, Kobe University

本日のまとめ

- 「**脳に作用する農薬**」
- 「**感受性は同じではない！**」
- 「**動物実験データの過信！**」
- 「**農薬の安全性とリスク評価**」

- ① 杜撰なGLP準拠OECDガイドライン毒性試験の問題性
- ② 最新の科学的知見の取り込みの不十分性
- ③ 情報開示(透明性確保)の不十分性

について、再認識を！



Animal Molecular Morphology, Kobe University