

アセフェート経口投与による マウスの情動認知行動影響

種村健太郎

東北大学大学院農学研究科

動物生殖科学分野

背景

効果の高い化学物質によって健康被害が生じる、
という問題がある。

被害を未然に防ぐ為に、化学物質の安全性を評価することが、
国家レベル、国際レベルで随時行われている。

その為に、実験動物を用いた「毒性試験」が行われている。

脳と神経に対する毒性を調べる試験

★現在、国際的に推奨されている試験

○急性の末梢神経系への影響（麻痺、痙攣）を検出しやすい。

×遅発性の中枢神経系（情動行動・認知行動）への影響を検出しにくい。

胎児期～小児期に化学物質に曝露された後に、遅発性に情動行動・認知行動の異常が誘発される、という毒性を検出する研究している。

発生-発達期

化学物質曝露→神経シグナル異常→脳の微細構造の異常



微細構造の異常が固定される（不可逆的になる）



成熟期

行動異常等の脳の機能障害が顕在化する

この様な「遅発性中枢神経毒性」は、
国際的に推奨されている試験ではカバーできない

動物モデル：マウス（C57/BL6）

（遺伝子改変マウスの情報を利用できる。）

遅発性中枢神経毒性の検出システム

- 1) 神経作動性の化学物質を胎生期～幼若期に曝露するプロトコール
- 2) 高精度かつスループット性の高い成熟期の行動解析プロトコール
- 3) 神経科学的物証（病理形態学、分子生物学）の収集プロトコール

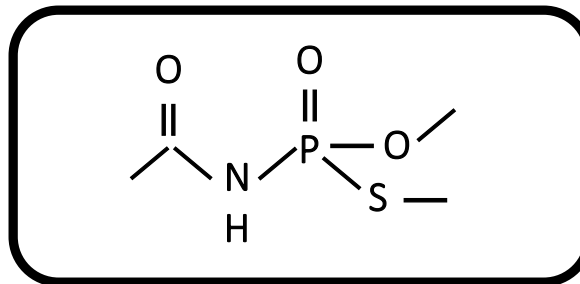
分子メカニズムの解明

- 4) 網羅的遺伝子発現変動解析

アセフェート経口投与による マウスの情動認知行動影響

アセフェート

ACEPHATE



C₄H₁₀NO₃PS

O,S-ジメチル-N-アセチルホスホロアミドチオエート
(CAS No. 30560-19-1)

用途：農薬・殺虫剤 (ADI：0.0024mg/kg/day)

作用機序：コリンエステラーゼ阻害

急性毒性：縮瞳、筋痙直、発汗、嘔吐、目眩・・・

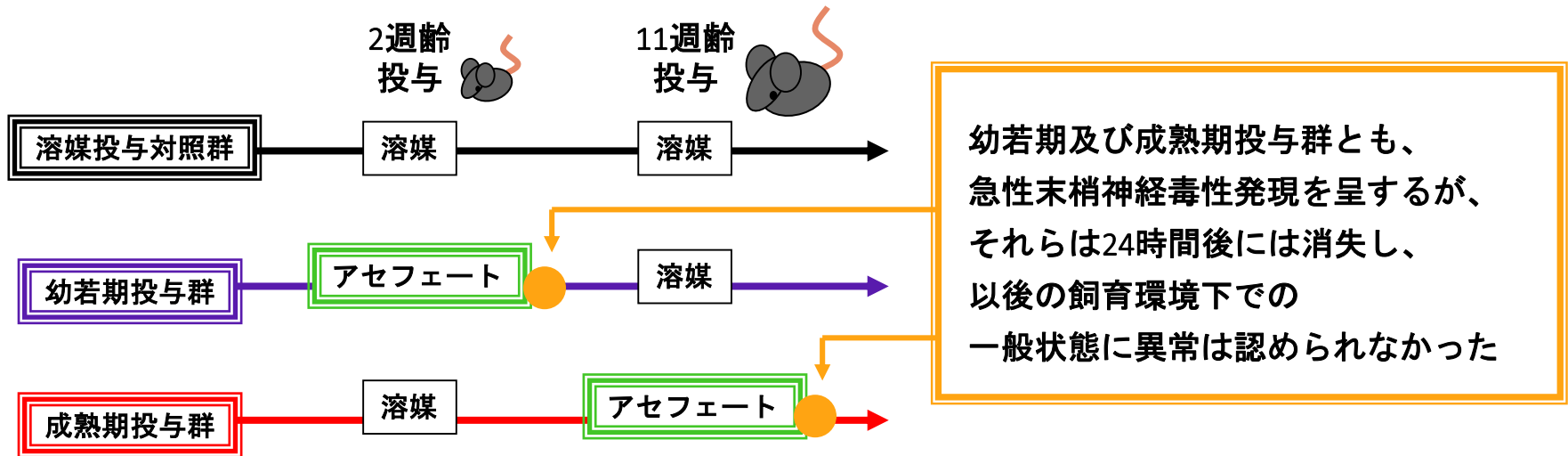
LD50：700mg/kg (ラット、経口投与)

LD50：233mg/kg (マウス、経口投与)

LD50：681mg/kg (イヌ、経口投与)

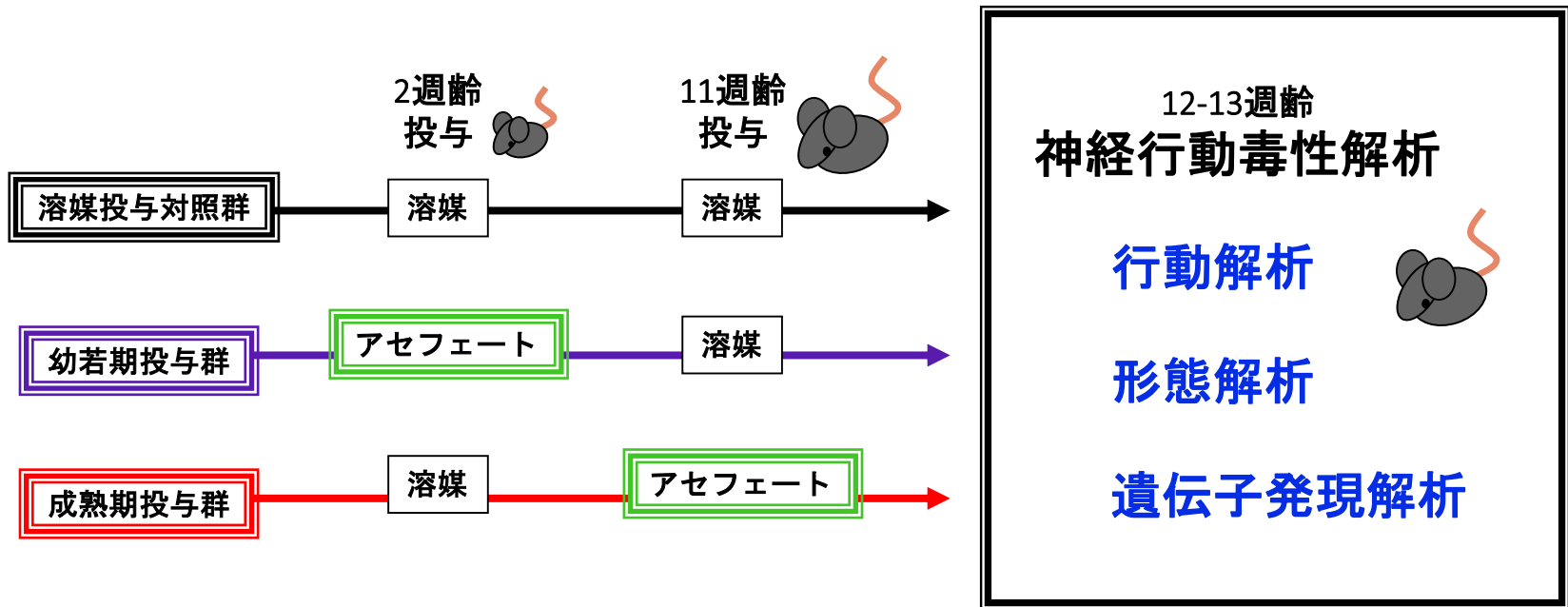
LD50：800mg/kg (ニワトリ、経口投与)

幼若期及び成熟期における アセフェート（7、20、70 mg/kg） 単回強制経口投与による中枢影響解析



幼若期及び成熟期投与群とも、急性末梢神経毒性発現を呈するが、それらは24時間後には消失し、以後の飼育環境下での一般状態に異常は認められなかった

幼若期及び成熟期における アセフェート (7、20、70 mg/kg) 単回強制経口投与による中枢影響解析

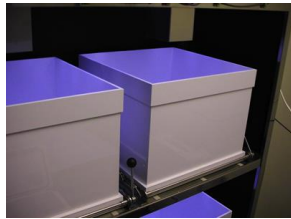


行動解析

遺伝子改変マウスの行動解析で実績があり、
比較的短時間で、判りやすい結果が得られる試験を選択した。

→化学物質による行動影響があるか？

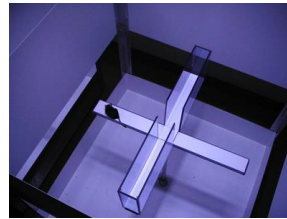
→毒性発現と呼べる行動異常か？



オープンフィールド
試験



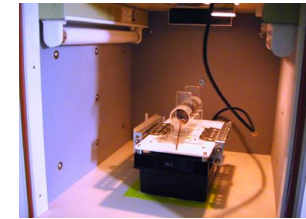
明暗
往来試験



高架式十字
迷路試験

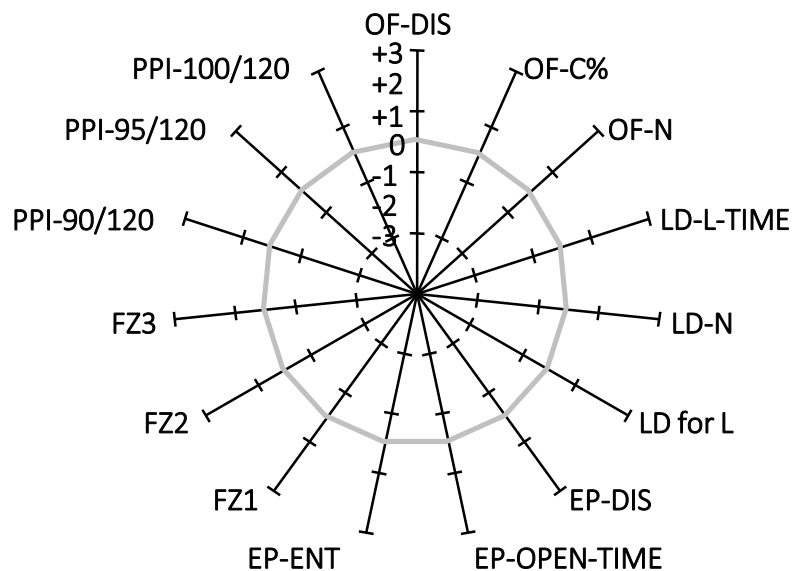


条件付け
学習記憶試験



プレパルス驚愕反応
抑制試験

単回強制経口投与による遅発性情動-認知行動解析を元に 行動様式の逸脱（*t*-検定）レベルを示す為のレーダー図



+/-3: $p < 0.01$
 +/-2: $p < 0.05$
 +/-1: $p < 0.1$
 0: $p > 0.1$

OF: オープンフィールド試験-10min

OF-DIS: 総移動量

OF-C%: 中央滞在率

OF-N: 移動回数

LD: 明暗往来試験-5min

LD-L-TIME: 明所滞在時間

LD-N: 明暗往来数

LD for L: 初移動までの時間

EP: 高架式十字迷路試験-10min

EP-DIS: 高所総移動量

EP-OPEN-TIME: 柵無しアーム部滞在時間

EP-ENT: number of entry in arms

FZ: 条件付け学習記憶試験-6min

FZ1: 学習度（短期記憶形成度）

FZ2: 空間-連想記憶

FZ3: 音-連想記憶

PPI: プレパルス驚愕反応抑制試験-30min

PPI-90/120: プレパルス 90db/120db

PPI-95/120: プレパルス 95db/120db

PPI-100/120: プレパルス 100db/120db

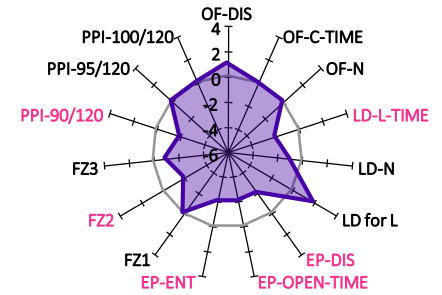
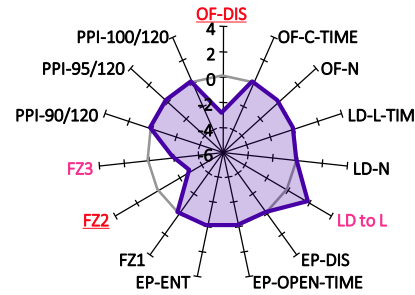
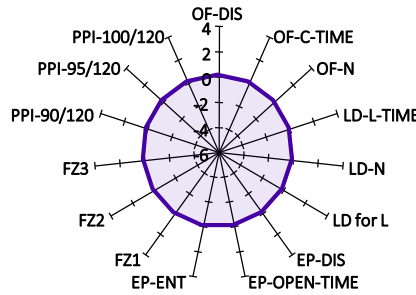
アセフェート (7、20、70 mg/kg) 単回強制経口投与による成熟期の行動逸脱レベル

7 mg/kg

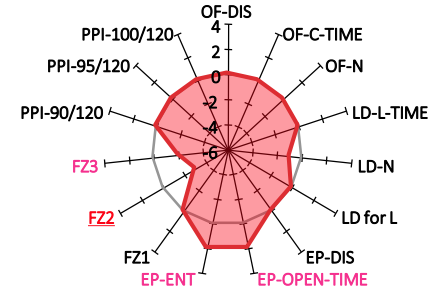
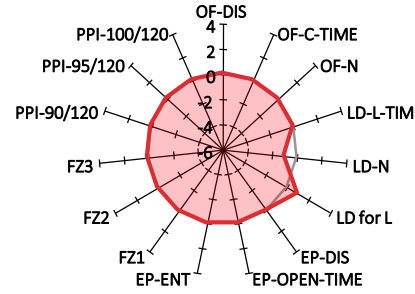
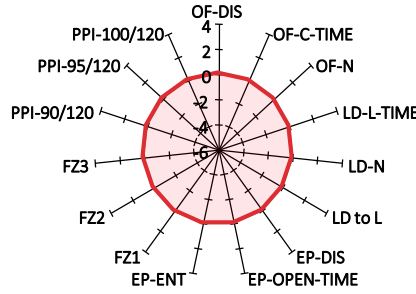
20 mg/kg

70 mg/kg

幼若期投与群



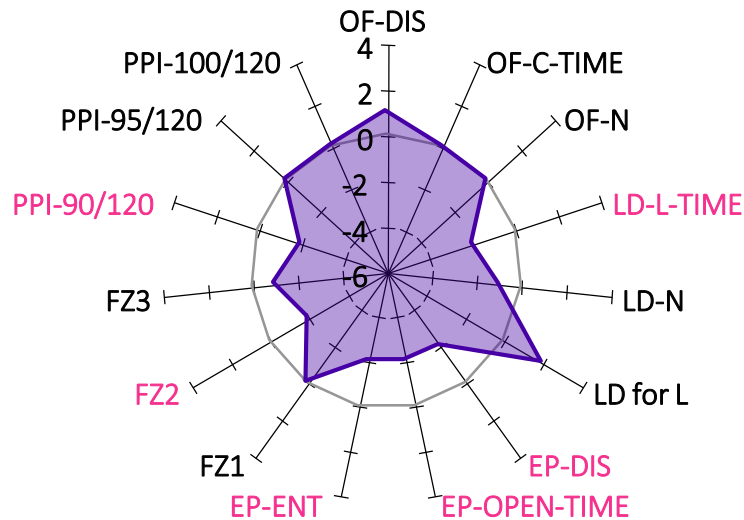
成熟期投与群



+/-3: $p < 0.01$
 +/-2: $p < 0.05$
 +/-1: $p < 0.1$
 0: $p > 0.1$

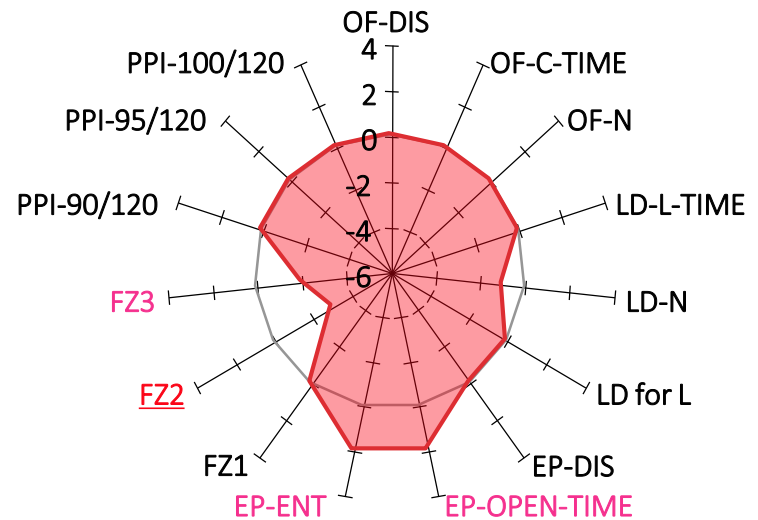
アセフェート (70 mg/kg) 単回強制経口投与による成熟期の行動逸脱レベル

幼若期投与群



不安関連行動逸脱に
起因する行動異常か？

成熟期投与群



認知機能不全に
起因する行動異常か？

+/-3: $p < 0.01$
 +/-2: $p < 0.05$
 +/-1: $p < 0.1$
 0: $p > 0.1$

形態解析

HE染色を施した脳組織標本を用いた病理観察



神経細胞死、神経細胞変性（例えば神経原線維変化）、
神経細胞脱落、大脳皮質層構造の破綻...等の異常は認められない。

所謂、神経病理学的所見が得られない。



行動異常はあるが毒性学的に問題とされるものではない？

**国際的に推奨されている試験では、
「問題なし」とされる恐れがある？**

遺伝子発現解析



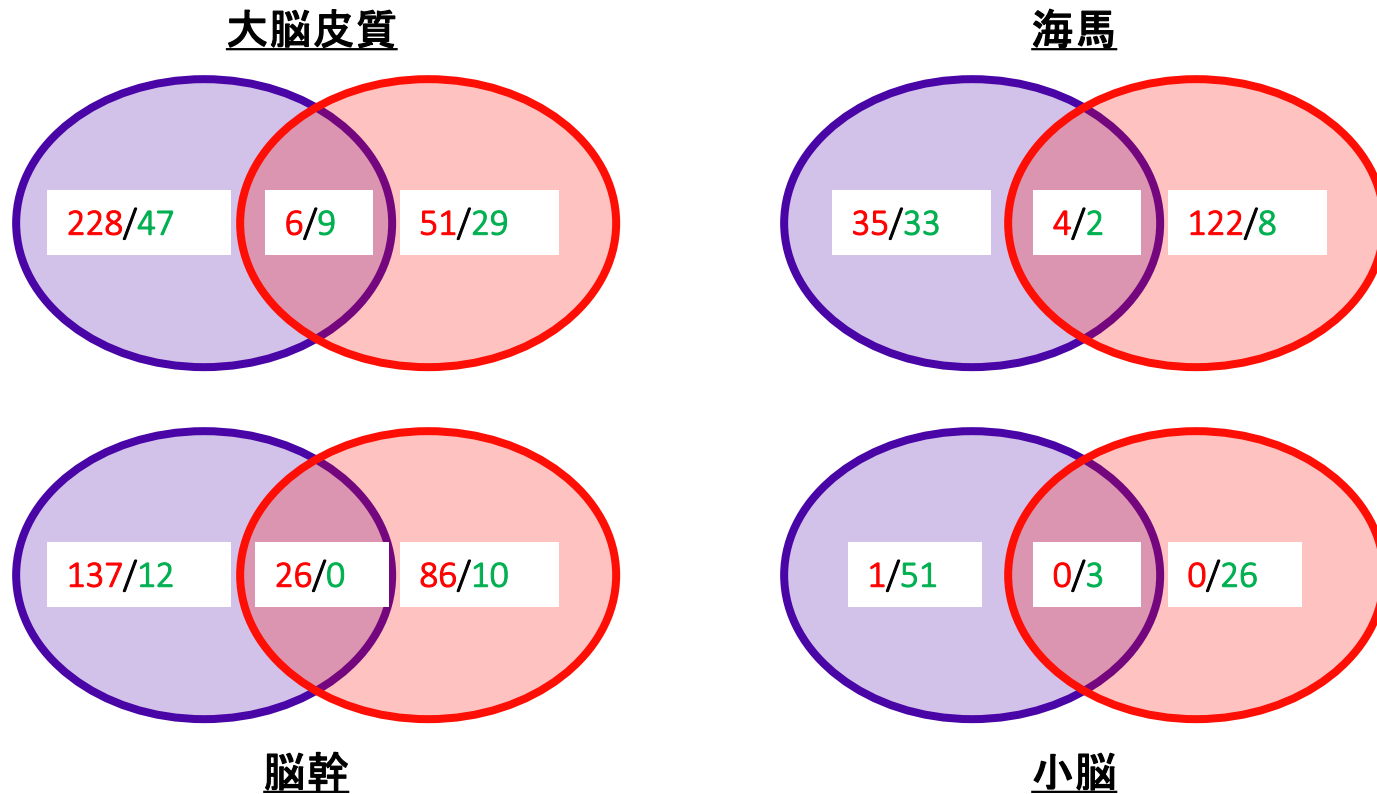
Percellome 法：サンプルのDNA濃度を精密に計測し、
添加した外部標準mRNA（スパイクRNA）の測定値を基準として、
サンプルの測定値を細胞1個当たりのmRNA発現コピー数に
換算することでmRNA発現絶対量を得ることができる。



化学物質による遅発中枢影響について
分子レベルで見落としなく解析することができる。

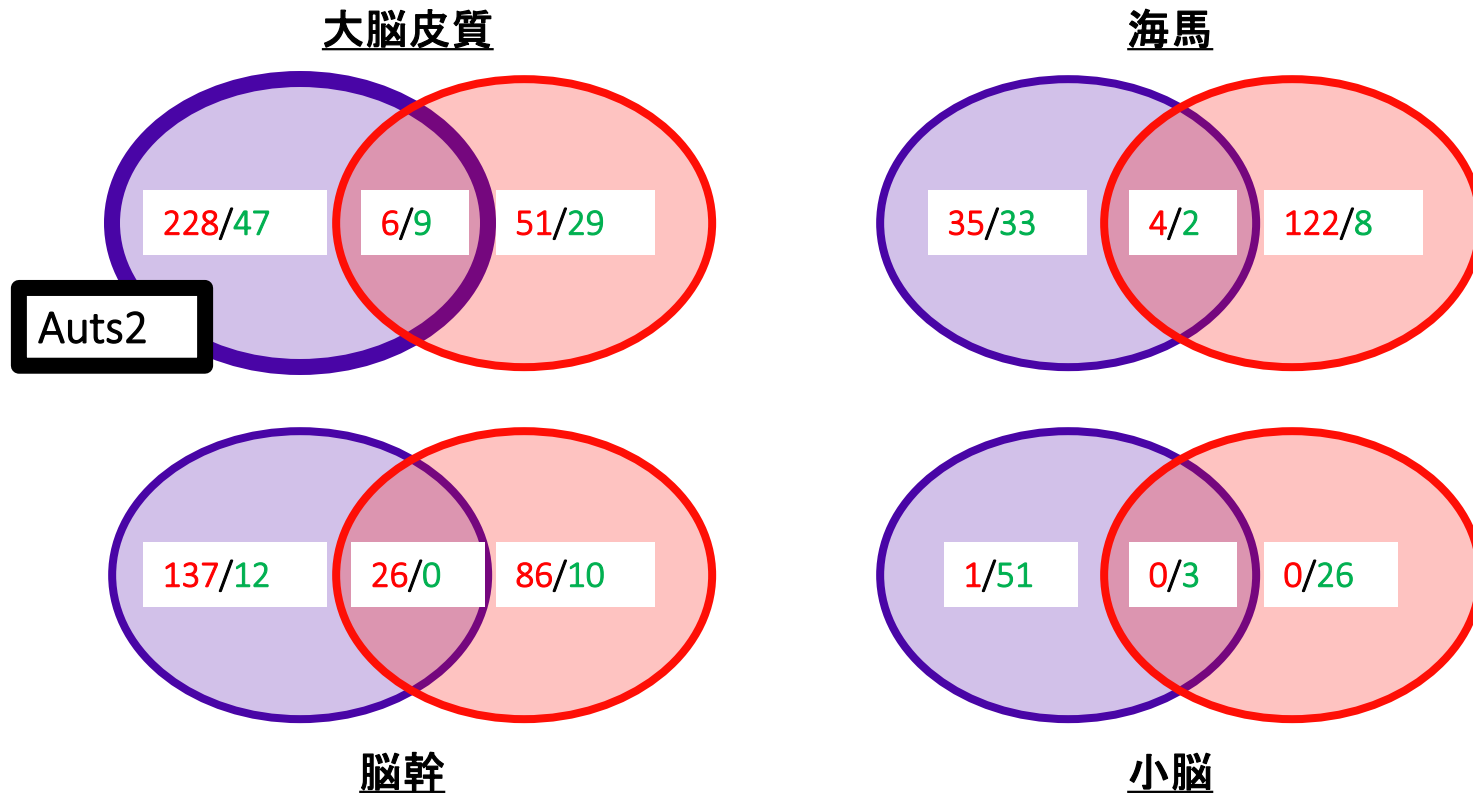
アセフェート(70mg/kg)投与により、行動解析後の脳における遺伝子プロファイルは、**幼若投与群**と**成熟期投与群**で異なる。

発現が**増加/減少** (copy数>1t-test: p<0.01, ratio>1.2) した遺伝子(プローブセット: PS)数



アセフェート(70mg/kg)投与により、行動解析後の脳における遺伝子プロファイルは、**幼若投与群**と**成熟期投与群**で異なる。

発現が**増加/減少** (copy数>1t-test: p<0.01, ratio>1.2) した遺伝子(プローブセット: PS)数

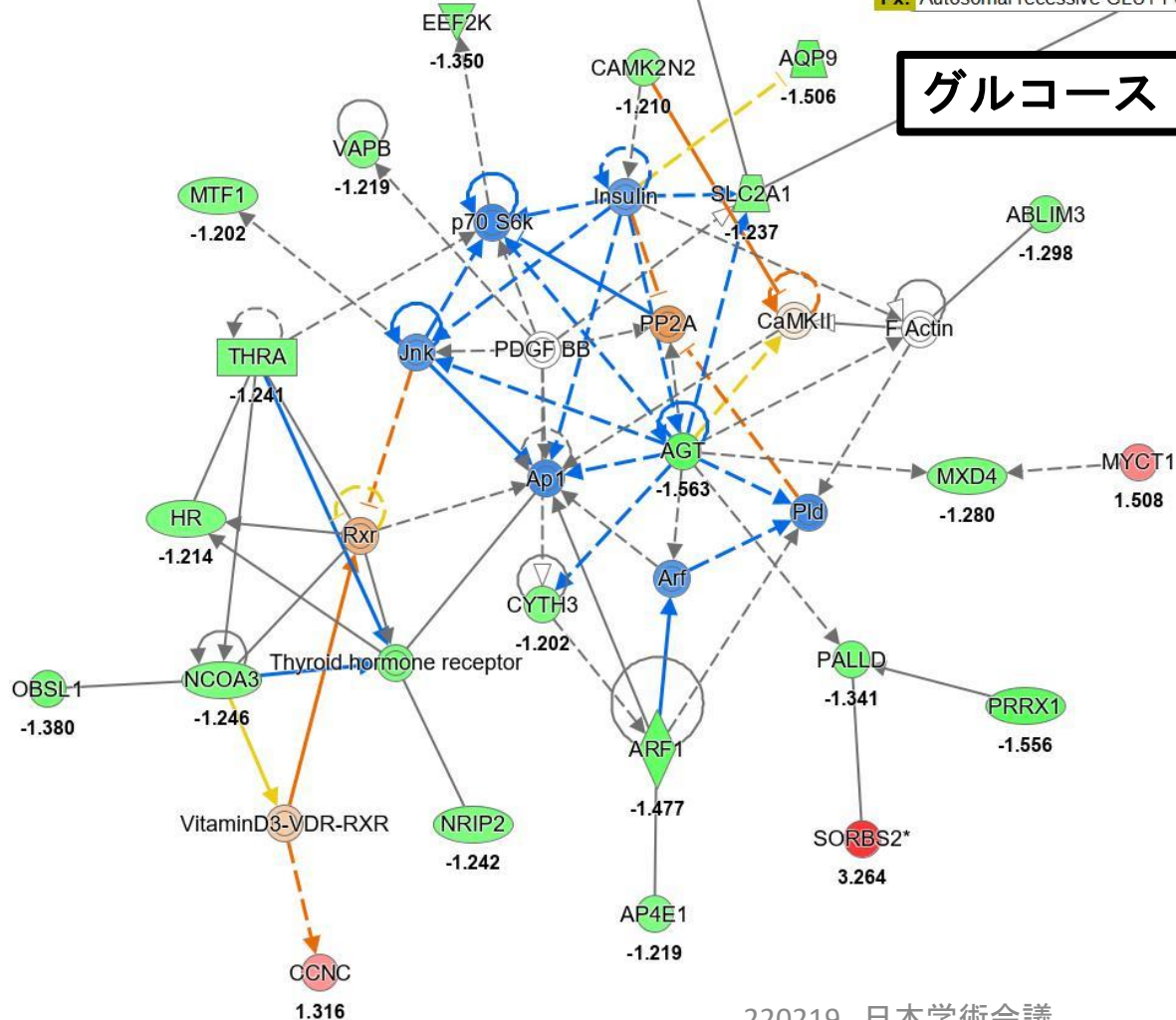


幼若投与群と成熟期投与群の**大脳**、**海馬**、**脳幹**、**小脳**、
 Percellome法により抽出された（copy数>1t-test: p<0.01, ratio>1.2）遺伝子の
 既知パスウェイへの関与についてIngenuity Pathway Analysisにて解析した。

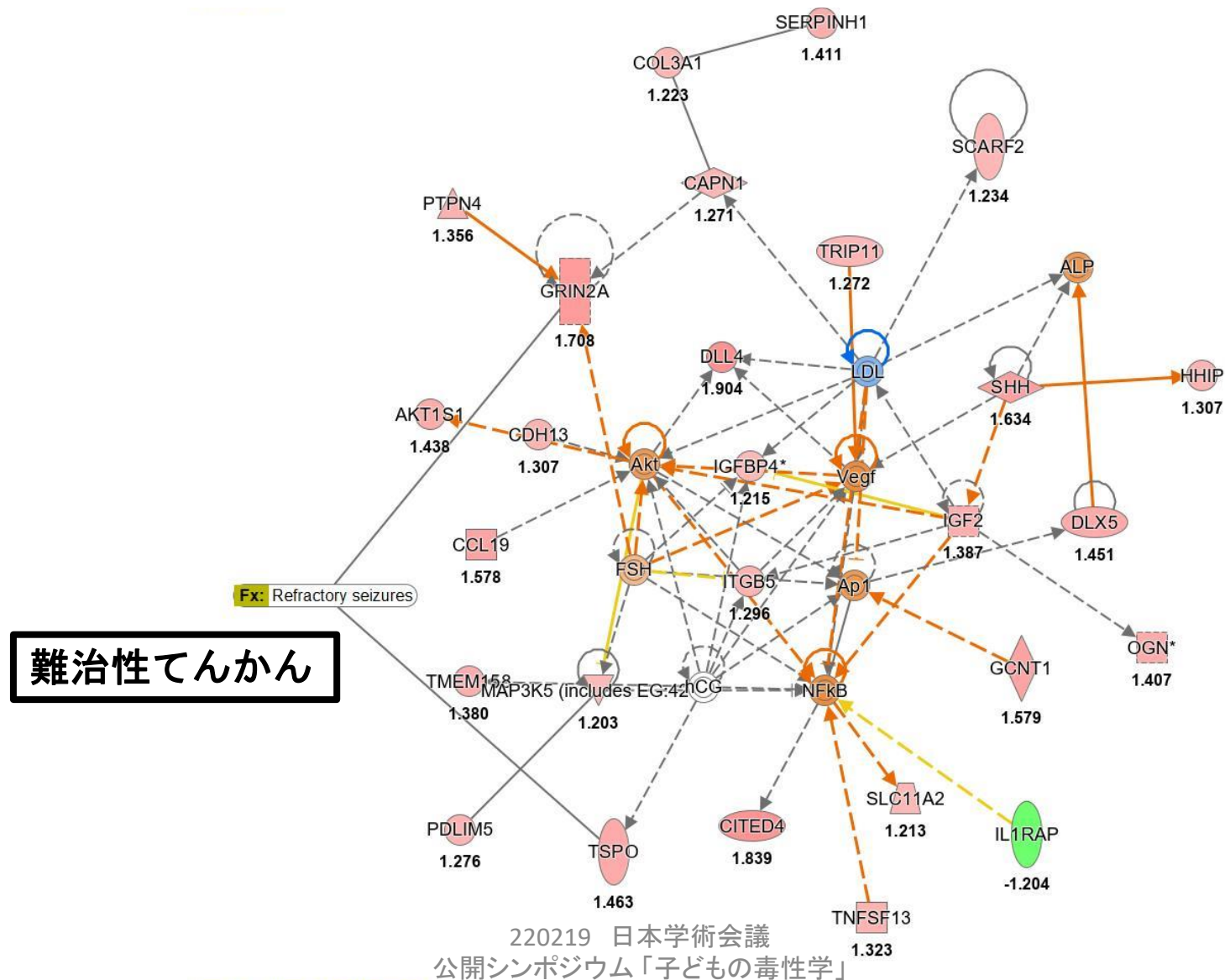
Fx: Glut1 deficiency syndrome type 2

Fx: Autosomal recessive GLUT1 deficiency syndrome type 1

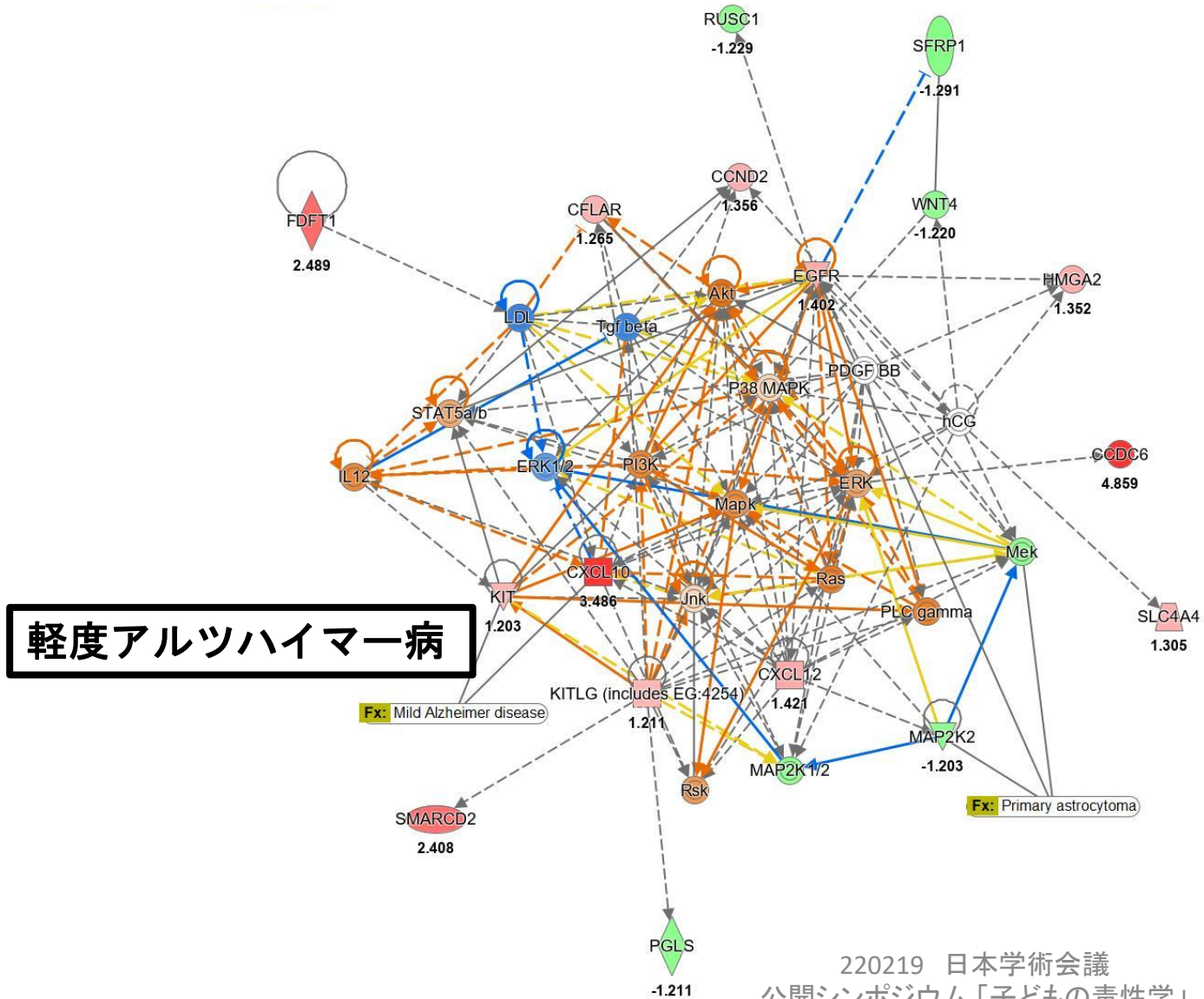
グルコーストランスポーター1欠損症



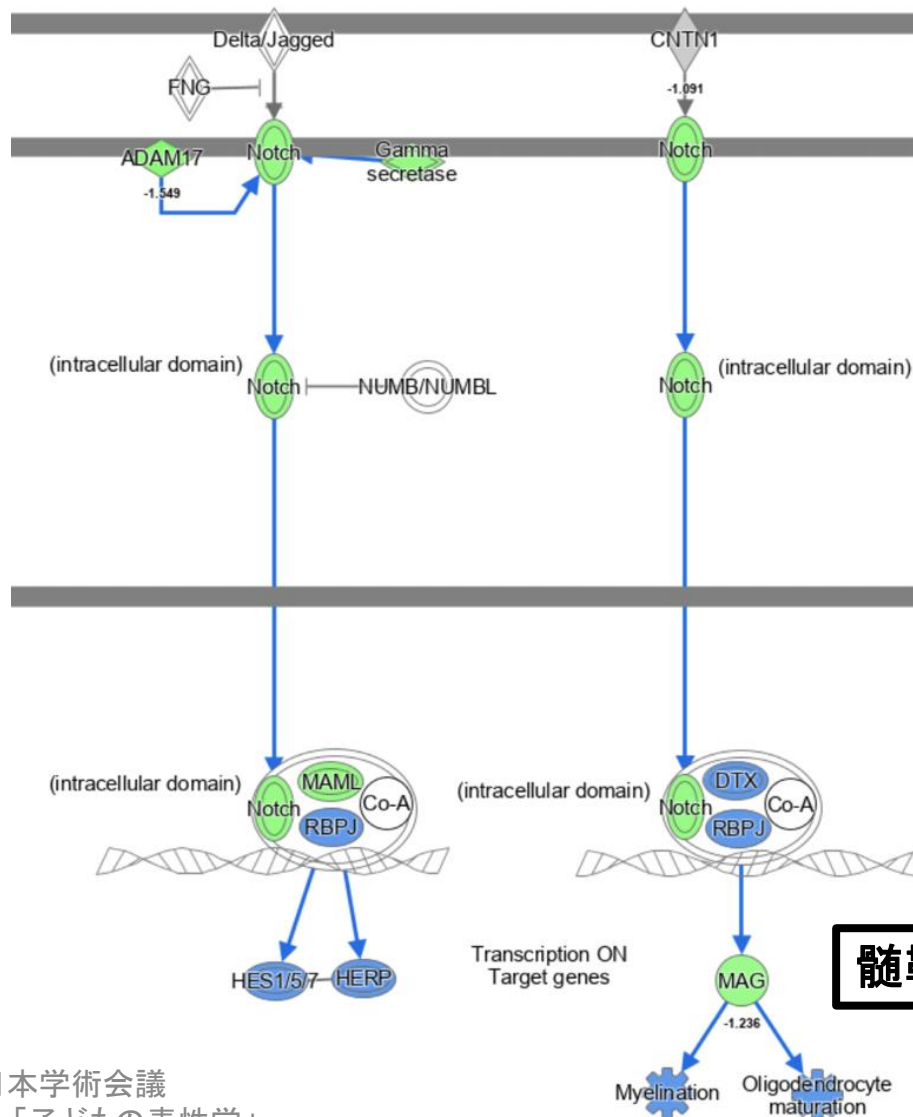
幼若投与群と成熟期投与群の脳、海馬、脳幹、小脳、Percellome法により抽出された（copy数>1t-test: p<0.01, ratio>1.2）遺伝子の既知パスウェイへの関与についてIngenuity Pathway Analysisにて解析した。



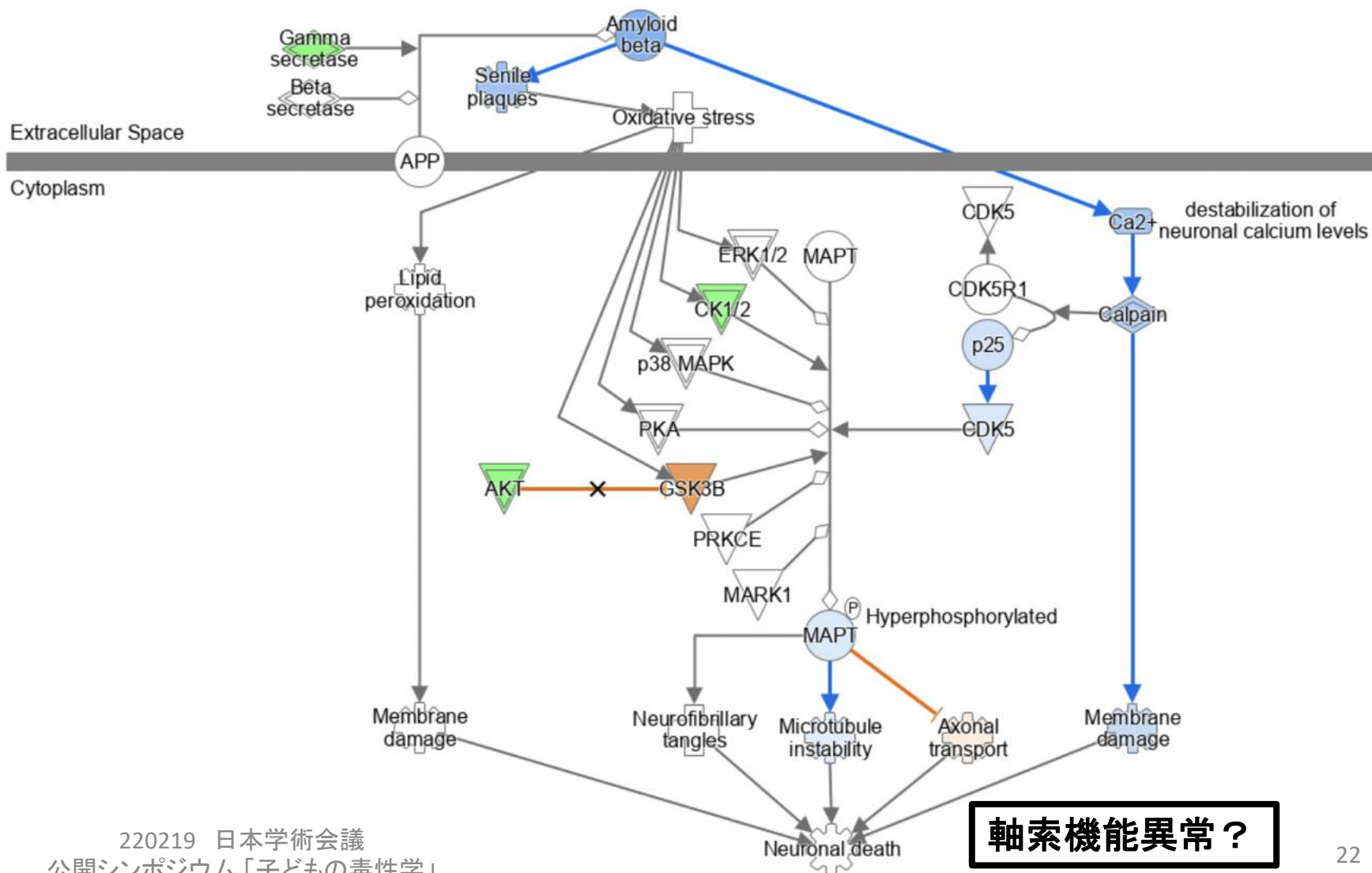
幼若投与群と**成熟期投与群**の**大脳**、**海馬**、**脳幹**、**小脳**、
 Percellome法により抽出された（copy数>1t-test: p<0.01, ratio>1.2）遺伝子の
 既知パスウェイへの関与についてIngenuity Pathway Analysisにて解析した。



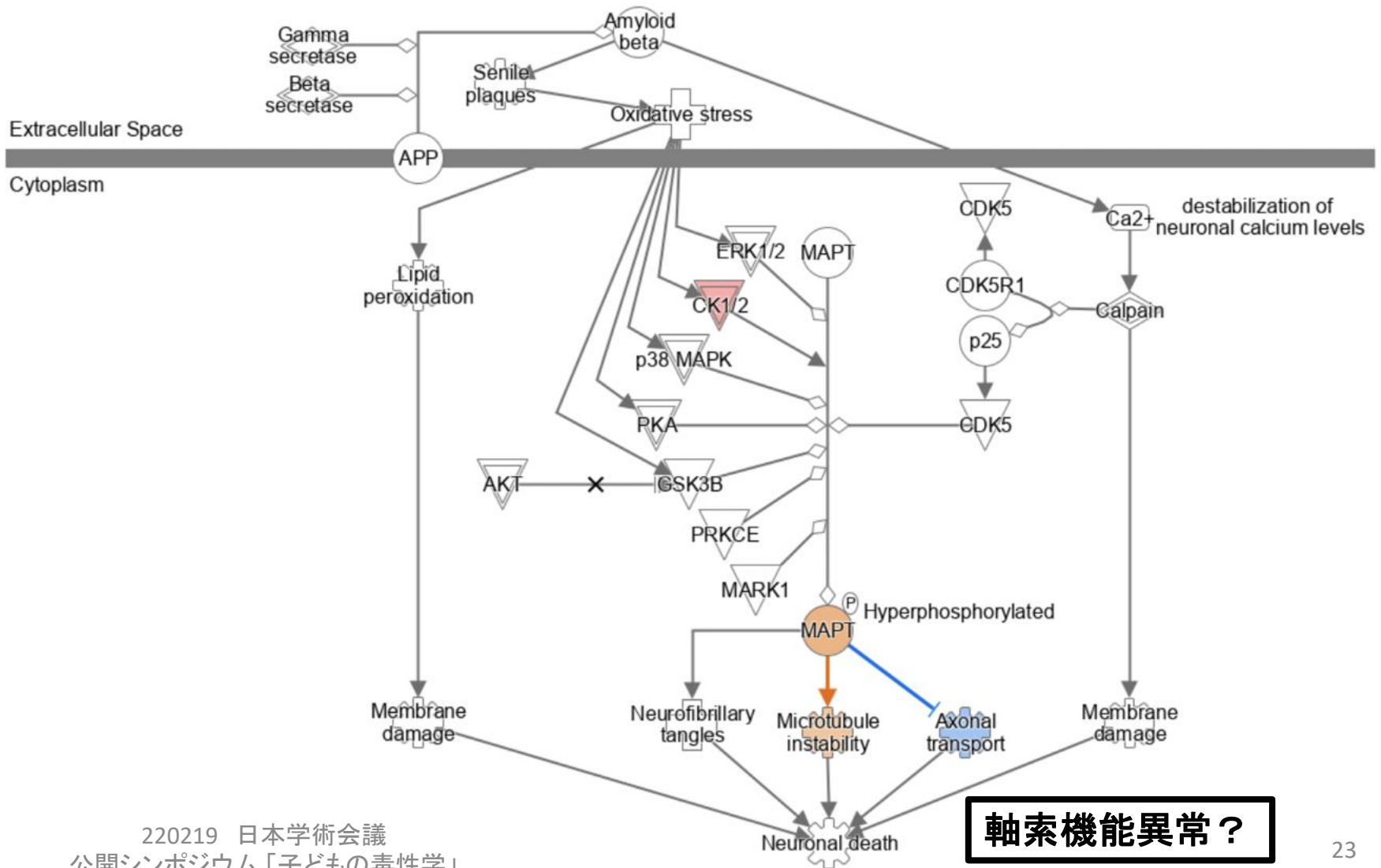
幼若投与群と成熟期投与群の**大脳**、**海馬**、**脳幹**、**小脳**について、Percellome法により抽出された（copy数>1t-test: p<0.01, ratio>1.2）遺伝子の既知パスウェイへの関与についてIngenuity Pathway Analysisにて解析した。



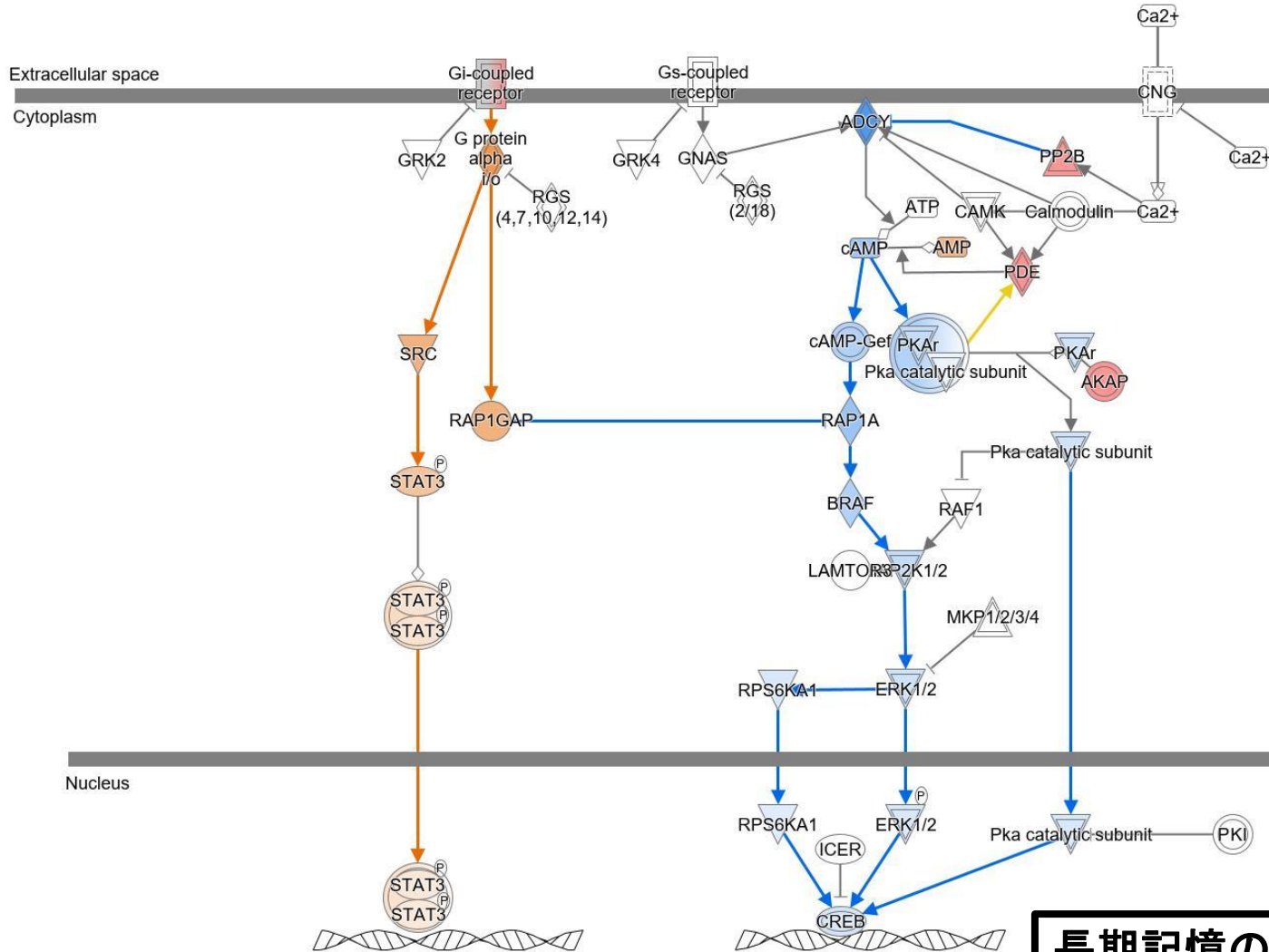
幼若投与群と成熟期投与群の**大脳**、**海馬**、**脳幹**、**小脳**について、Percellome法により抽出された（copy数>1t-test: p<0.01, ratio>1.2）遺伝子の既知パスウェイへの関与についてIngenuity Pathway Analysisにて解析した。



幼若投与群と**成熟期投与群**の**大脳、海馬、脳幹、小脳**について、Percellome法により抽出された（copy数>1t-test: p<0.01, ratio>1.2）遺伝子の既知パスウェイへの関与についてIngenuity Pathway Analysisにて解析した。



幼若投与群と**成熟期投与群**の**大脳、海馬、脳幹、小脳**について、Percellome法により抽出された（copy数>1t-test: p<0.01, ratio>1.2）遺伝子の既知パスウェイへの関与についてIngenuity Pathway Analysisにて解析した。



長期記憶の形成不全？

【結果1】

アセフェートの単回強制経口投与によって、
末梢神経影響が消失した後に行動異常が認められた。

幼若期投与群の行動異常は、
成熟期投与群の行動異常とは質的に異なる
「情動異常を伴う記憶異常」である。

【結果2】

アセフェートの単回強制経口投与時期によって、
遅発影響を分子レベルで捉えることに成功した。

「幼若期投与群では大脳影響が大きく」、
「成熟期投与群では海馬影響が大きい」、
ことから脳の部位ごとで異なる状態にある。

【結果3】

特に、幼若期投与群に、
自閉スペクトラム症に起きやすいことが知られている
「てんかん」関連遺伝子の発現かく乱が認められたことから、
妊娠中の女性を含めて乳幼児のいる場所での、
神経作動性化学物質の使用はより慎重であることが望ましい。

国立医薬品食品衛生研究所毒性部

菅野 純 先生
北嶋 聡 先生
相崎 健一 先生
齊藤 洋克 先生

星薬科大学

五十嵐 勝秀 先生
大塚 まき 先生

日本バイオアッセイセンター

古川 祐介 先生

徳島文理大学

冨永 貴志 先生
冨永 洋子 先生

九州大学

中島 欽一 先生

広島大学

今村 拓也 先生