

博士論文

神経作動性化学物質の胎生期曝露による成熟後の中枢影響に
おける雌雄差の検討

東北大学大学院農学研究科
応用生命科学専攻 博士課程後期
平成 24 年 4 月博士課程後期進学

平賀 孔

指導教員 種村 健太郎 教授

目次

第 1 章	緒論	1
第 2 章	ブタ卵母細胞の体外成熟培養におけるアセタミプリドの影響	
	緒言	8
	材料および方法	10
	結果	16
	考察	19
	付図	22
第 3 章	成熟マウスへの神経作動性化学物質曝露による行動影響解析系の構築	
	緒言	29
	材料および方法	32
	結果	37
	考察	40
	付図	44
第 4 章	胎生期マウスのセロトニン受容体過剰刺激による遅発中枢影響解析	
	緒言	54
	材料および方法	56
	結果	60

考察	63
付図	66
第 5 章 総括	74
参考文献	83
謝辞	93

第 1 章 緒論

受容体を介して作用する化学物質が哺乳類の生殖系と中枢系に及ぼす影響

環境中に存在し、動物個体に有害な作用を示す化学物質は多数存在するが、その代表的なものとして環境ホルモン（内分泌かく乱物質）が挙げられる。内分泌かく乱物質は内分泌かく乱作用、すなわちホルモン作用やホルモン阻害作用があり、生殖への影響が知られている。代表的な化学物質として、極めて強いエストロゲン作用を示す Diethylstilbestrol (DES) や Dichloro-diphenyl-trichloroethane (DDT)、Polychlorinated biphenyl (PCB)、Bisphenol A などがあり、DES は妊婦が服用した場合、生まれた女児が膣ガンを患う割合を増加させることが広く知られており、動物実験でも新生仔期の曝露により子宮重量の減少や多卵性卵胞の増加などが確認されている (Newbold et al, 2004; Kim et al., 2009)。これらの影響は受容体を介して生じるため、生殖器以外でも受容体があれば同様に作用する可能性がある。脊椎動物の生殖系は中枢神経系と内分泌系が協調して作る視床下部－下垂体－性腺軸（HPG 軸）によって調整を受けていると考えられており、生殖系と中枢神経系に共通した受容体が存在することが明らかになっている (Navarro et al., 2011; Jin et al., 2014)。そのため、内分泌かく乱作用を持つ化合物は中枢神経系にも影響を及ぼす恐れがある。PCB は胎生期曝露によって生殖器重量や生殖細胞機能に影響を与えることが知られているが、近年、PCB に曝露したマウスにおいて、酸

化ストレスを介してドーパミンニューロンが変性し、活動過多になることや、胎生期に PCB に曝露されたマウスが成熟後に空間学習能の低下を示すことが報告されており、内分泌かく乱作用を持つ化学物質の曝露は中枢、特に学習記憶などの脳高次機能を含む行動へも影響することが明らかとなっている (Pocar et al., 2012; Lee et al., 2012; Sugawara et al., 2006)。一方で、殺虫剤などの農薬は、神経系への作用を目的としているが、それらの化学物質は生殖系へも影響を及ぼしていることが報告されている。すなわち、ピレスロイド系農薬のペルメトリンは、軸索のシグナル伝達阻害によりナトリウムチャネル開口時間延長を介して殺虫効果を示すが、ペルメトリン曝露を受けた雄マウスはテストステロンレベルと精子数の低下を引き起こすことが報告されている (Zhang et al., 2007)。これらのことから、環境中に存在し、受容体を介して作用する化学物質は哺乳類へ生殖影響と中枢影響をおよぼす恐れがある。実際に殺虫剤に曝露される可能性のある畜産現場においては、家畜の生殖系や中枢神経系への影響は優良家畜の増産や効率的な畜産経営へ悪影響を及ぼすことが懸念されるため、少なくともこれら 2 つの影響を包括して検討することが必要であると考えられる。

ネオニコチノイド系農薬が哺乳類家畜の生殖細胞に及ぼす影響

近年、飼料作物に多用されているネオニコチノイド系農薬（以下、ネオニコチノイド）がラットのニコチン性アセチルコリン受容体（nAChR）に対して、ニコチンと同程度に受容体を刺激することが報告され、哺乳類への影響が懸念されている（Kimura et al., 2012）。ニコチンの家畜への曝露に関しては、ブタおよびウシ卵母細胞の体外成熟過程への影響が知られており、卵丘細胞の膨化や成熟率への影響が報告されている（Vrsanska et al., 2003; Liu et al., 2008）。さらにネオニコチノイドの生殖器影響に関しても報告があり、2011年に Kapoor らがラットの卵巢における過酸化脂質の増加を報告している。しかし、ネオニコチノイドの生殖細胞系列への影響に関する報告は少なく、家畜の卵母細胞に対する影響は報告されていない。特にブタは過酸化脂質の元となる脂質を卵母細胞の細胞質内に脂肪滴という形で多量に内包しているため、影響を受けやすいと考えられるが、ブタ卵母細胞の脂肪滴については、その役割を含めて不明な点が多い。そこでブタ卵母細胞における脂肪滴の役割を検討し、その上でネオニコチノイドのブタ卵母細胞への影響について検討する必要がある。

家畜への応用を考慮した行動影響解析系の構築

ニコチンおよび nAChR は学習記憶などの認知行動と密接に関連していることが知られており（Herman et al., 2010）、哺乳類の nAChR

をニコチンと同程度刺激するネオニコチノイドも、認知行動などの脳高次機能に影響を及ぼす可能性がある。ネオニコチノイド系農薬曝露による行動影響解析としては、チアメトキサムをラットに曝露し、その際の行動影響を試験した報告が存在するが、雄のみを用い、雌個体での影響は報告されていない (Rodrigues et al., 2010)。この報告に限らず、行動解析を用いた報告の多くは、雌ではデータのバラツキが大きくなるため、基本的に雄のみの報告が大部分を占めている。しかし、畜産分野への応用を考慮した場合、家畜はその種ごとに性別によってそれぞれ重要な役割をもつため、雌個体の影響も検出可能な解析系が必要である。そこで、脳高次機能を評価できる行動試験の内、検出精度の高い試験を組み合わせた行動テストバッテリーを構築し、実際に行動影響とその雌雄差を検出可能か成熟期のマウスにネオニコチノイドを投与して検討した。

胎生期受容体シグナルかく乱による成熟後の影響の解析

成熟期と比較して、胎生期は化学物質に対する耐性や感受性、脳における受容体の発現パターンが異なると考えられ、曝露影響が成熟期と同一とは限らない。そのため、成熟期とは別に胎生期曝露影響の解析とそのメカニズムを検討することは重要である。胎生期に内分泌かく乱物質に曝露された個体のうち出生に至った産仔は成熟後に行動影響を示すことが報告されており (Sugawara et al., 2006)、ネオニコチ

ノイドのように受容体に作用する化学物質においても、胎生期曝露による成熟後の行動影響が疑われる。しかし、農薬は標的受容体以外への作用や受容体に対してアゴニスト・アンタゴニスト両方の作用を示す可能性があり、詳細な解明は難しい。近年、マウスは胎生初期において、胎仔の脳発達に胎盤からのセロトニンを利用していることが報告され、この時期の胎仔脳は外来性のセロトニンに感受性が高いことが考えられた。脳内におけるセロトニン受容体は 1950 年代から研究されており、マウス胎仔期における受容体発現パターンについても詳細な報告が存在する (Gaddum & Picarelli., 1957; Bonnin et al., 2006)。このことから、胎生期における受容体を介したシグナルかく乱の詳細な解析にモデル化学物質としてセロトニン受容体のアゴニストが最も適切であると考えた。

以上のように本研究では、ブタ卵母細胞体外成熟培養系を用いて細胞質中に存在する脂肪滴の局在に着目し、その役割を検討するとともに、ネオニコチノイド系農薬の 1 つであるアセタミプリドのブタ卵母細胞への影響について評価した。また、雌雄差を検出可能な行動解析系を構築し、成熟期マウスへのアセタミプリド投与による行動影響について解析した。さらに、構築した解析系を用いて化学物質の胎生期曝露による成熟後の中枢影響についてモデル化学物質としてセロトニン受容体のアゴニストを用いて検討した。

第 2 章

ブタ卵母細胞の体外成熟培養におけるアセタミプリドの影響

緒言

家畜の飼料となる作物によく使用されている農薬の 1 つとしてネオニコチノイド系農薬がある。ネオニコチノイドは植物体への浸透移行性と残効性が高く、有機リン系殺虫剤とは作用機序が異なることから、有機リン系に抵抗性をもつ病害虫にも有効であり、稲、トウモロコシ、大豆などに対して世界中で広く使用されている。ネオニコチノイド系農薬は、昆虫神経のシナプス後膜のニコチン性アセチルコリン受容体（nAChR）に選択的に結合し、神経の興奮とシナプス伝達の遮断を引き起こすことで殺虫活性を示す。また、昆虫の nAChRs に選択的結合親和性をもち、高い毒性を示すが、ヒトを含む哺乳類に対する毒性は低く、安全とされている。

しかし近年、ネオニコチノイド系農薬がラットのニコチン性アセチルコリン受容体に対して、ニコチンと同程度に受容体を刺激することが報告され、哺乳類への影響が懸念されている（Kimura et al., 2012）。ニコチンの家畜への曝露に関しては、ウシおよびブタ卵母細胞における卵丘細胞の膨化や成熟率への影響が報告されている（Vrsanska et al., 2003; Liu et al., 2008）。さらにネオニコチノイド系農薬の生殖器影響については、2011 年に Kapoor らがラットの卵巣における形態影響と過酸化脂質の増加を報告している（Kapoor et al., 2011）。過酸化脂質はコレステロールや中性脂肪といった脂質

が、活性酸素によって酸化されたもので、特に中性脂肪由来の過酸化脂質は細胞内でスーパーオキシドアニオンを発生させ、それが核内のDNAを損傷させる作用を持つため、がん発生原因のひとつであると考えられている (Winczura et al., 2012)。ブタの卵母細胞ではこの中性脂肪の一つであるトリグリセリドが他の動物種と比較して多量に含まれることが知られており、脂肪滴という形で細胞質中に内包している (Sturmey RG et al., 2009)。過酸化脂質の元となるトリグリセリドが脂肪滴として多量に含まれることから、ネオニコチノイド系農薬はブタ卵母細胞にも影響をおよぼすことが考えられた。しかし、ネオニコチノイド系農薬の生殖細胞系列への影響に関する報告は少なく、家畜の卵母細胞に対する影響は報告されていない。また、ブタ卵母細胞の成熟や発生過程におけるトリグリセリドおよび脂肪滴の役割については報告が少なく、不明な点が残されている。

そこで、本章では、ブタ卵細胞質内の脂肪滴の局在に着目し、その役割を検討するとともに、ネオニコチノイド系農薬がブタ卵母細胞におよぼす影響を解析することとした。

材料および方法

卵丘細胞・卵母細胞複合体の採取

食肉センターから採取したブタ卵巢を 30～35℃の 0.925% 生理食塩水入り水筒に入れて研究室に搬送し、同生理食塩水で洗浄した。洗浄後、卵巢はウォーターバス (TAITEK) 中で 38℃に保温しながら、卵胞内容物の吸引採取を行なった。吸引採取は 18 ゲージの注射針(Terumo)を装着した 10ml シリンジ (Terumo) により、直径 3～6mm の卵胞を選択し行なった。卵胞内容物を吸引後、15ml の遠沈管 (Becton Dickinson) に集め、浮遊物が沈殿するまでウォーターバス内で静置した。分離後、遠沈管底部の下層部分を直径 100mm の滅菌済ディッシュ (広陵化学) に移し、実体顕微鏡下で卵丘細胞・卵子複合体 (Cumulus-Oocyte Complexes : COCs) を選別後、0.1% Polyvinyl alcohol (PVA) を含むリン酸緩衝生理食塩水(phosphate bufferd saline: PBS)(以下 PBS-PVA)入りの 60mm (Nunc) の滅菌済ディッシュ中に移した。インキュベーター (Tabai) 外の全ての卵子および胚の体外操作は 38.5℃の温度条件に設定したウォームプレート (Kitazato) 上で行なった。残渣を持ち込まないように COCs を Tissue Culture Medium(TCM)-199 培地入りの 35mm 滅菌ディッシュ (Sumitomo Bakelite) 中に移してプールした。なお、培地への移動の際に、卵子が球形で卵細胞質が均

一に黒く、透明帯周辺に卵丘細胞が 2~3 層以上付着している COCs を選択した。

体外成熟培養 (*in vitro* maturation: IVM)

採卵後、培養液にプールした COCs を再度、残渣を持ち込まないように 25 個ずつ 250 μ l の TCM-199 培地の小滴に移し、培養に供した。0.1g/ml ピルビン酸ナトリウム (SIGMA), 100 IU/ml ペニシリン G カリウム, 0.1mg/ml 硫酸ストレプトマイシン (MEIJI), 10ml/mg BSA (SIGMA), 10 IU/ml FSH を添加した TCM - 199 (GIBCO) を使用した。選別した COCs を無作為に等分し、各培地で 3 回洗浄後、流動パラフィン (NACALAI TEQUE) で覆った各培地の小滴 (250 μ l) 中に 25 個ずつ移し、5% CO₂, 95% 空気, 38.5°C の条件下で成熟培養を 44 時間行なった。

体外成熟卵母細胞の成熟判定

成熟の判定は、オルセイン染色で行った。体外成熟培養 44 時間後、COCs は 0.1% ヒアルロニダーゼ (SIGMA) 添加 PBS に 30 秒間曝露した。曝露後、卵丘細胞はピペッティングにより除去した (裸化处理)。裸化した卵母細胞を PB1 培地 (Quinn et al., 1982) で 3 回洗浄し、スライドガラス (MATSUNAMI) にのせ、カバーガラ

スで覆い、酢酸（和光純薬）とエタノール（Wako）、（1：3）の混合液中に 1～3 日保持し、固定した。固定後、酢酸オルセインで 2 時間染色後に脱色し、検鏡した。第二減数分裂中期（metaphase II: MII）の核相を呈しているものを成熟卵母細胞と判定した。

脂肪滴分布様式のクラス分け

体外成熟後、全ての卵母細胞の卵丘細胞を裸化し、実体顕微鏡下（Olympus, SZ-40）で第一極体を放出している卵母細胞を選別した。成熟卵を実体顕微鏡下で観察し、脂肪滴が細胞質全体に均一に分布し黒く見えるものを class I、脂肪滴が細胞質中心もしくは片側に偏在しているものを class II と分類し、それぞれの割合を計測した。

脂肪滴と染色体の評価

卵母細胞の染色はいくつかの修正を加えた X-W Fu らの方法を用いた（X-W Fu et al., 2011）。裸化した卵母細胞を 0.1% polyvinyl alcohol を含む PBS(PBS-PVA)で溶解させた 4% paraformaldehyde で 90 分間室温にて固定した。固定した卵母細胞は PBS-PVA で 5 分間、3 回洗浄した。次に PBS-PVA に溶解させた 10 µg/mL Nile red solution (Invitrogen)で、一晩室温で処理した。Nile red stock solution (1 mg/mL)は dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma)に溶解させ

て用意し、暗所に室温で保存した。最終濃度は stock solution を生理食塩水で希釈することで得た。Nile red solution で反応後、卵子を PBS-PVA で洗浄し、5 μ g/mL Hoechst 33342 (Sigma)を含む PBS-PVA で、20 分間室温にて染色を行った。PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄した後、卵母細胞をスライドにマウントし、共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss LSM700)で観察した。本実験は、3 回以上の繰り返しを行った。

体外受精と体外培養

体外成熟後、全ての卵母細胞の卵丘細胞を除去し、実体顕微鏡下で第一極体を放出した卵母細胞を選別し、体外受精 (IVF) に供した。IVF の方法は Kikuchi (2002)らの方法に従った。成熟した卵母細胞を 2mM caffeine と 5mg/mL BSA を含む Pig-FM 培地 (Suzuki et al., 2002)で、凍結融解されたブタ精巣上体精子とともに 38.5°C、5% CO₂ 下で 3 時間体外受精した (Kikuchi et al., 1998)。体外受精後、卵母細胞に付着している精子を剥がし、体外培養 (IVC) 培地、すなわち 4mg/mL BSA、50mM β -mercaptoethanol、0.17mM sodium pyruvate、2.73mM sodium lactate (IVC-PyrLac)を含む NCSU-37 培地に移した。IVC は 38.5°C、5% CO₂ の条件下で行った。

胚発生の評価

胚盤胞期への発生能を調べるために、体外受精後の卵母細胞を IVC に供試した。IVC は Kikuchi (2002)らの方法に従った。IVC 開始後 2 日目まで IVC-PyrLac で培養し、その後 sodium pyruvate と sodium lactate を 5.55mM のグルコースで置換した NCSU-37 培地に培地交換し、5 日間(合計 7 日間)培養した。IVC 後、ヘキスト染色により、細胞数を計数することで発生能を評価した。

胚を 4% Paraformaldehyde (PFA)で 30 分間処理後、Washing buffer で 3 回洗浄した。Washing buffer は PBS に 0.1% PVA を添加して作製した。Hoechst33258 を Washing buffer で 1.0 μ g/ml に希釈し、30 分間反応させた。その後、胚は Washing buffer で 3 回洗浄し、UV 照射下で蛍光シグナルを観察することで、胚盤胞形成率と胚盤胞期における細胞数を計測することで胚発生を評価した。

体外成熟培地へのアセタミプリド添加の影響

ネオニコチノイド系農薬のアセタミプリド (Wako) を室温で DMSO ($\leq 0.1\%$)を用いて最終濃度がそれぞれ 10, 30, 100ppm になるように調整し、成熟培地に添加後、卵母細胞は 44 時間培養した。培養後、本章の材料と方法における「体外成熟卵母細胞の成熟判定」と同様の方法で成熟への影響を評価した。

統計解析

実験の結果は、Stat View 5.0 (SAS Institute)を用いて統計分析した。試験は各々3回以上繰り返し、一元配置分散分析 (ANOVA)を行った。平均値を Fisher の最小有意差検定法により比較し、 $P < 0.05$ を有意とみなした。

結果

ブタ未成熟卵母細胞における脂肪滴の分布

卵巣から採取したブタ未成熟卵母細胞を裸化し、実体顕微鏡を用いて観察したところ、細胞質に黒色の顆粒が多数確認され、それにより細胞質全体が黒色に観察された (Fig.1A,B)。卵丘細胞を除去した裸化卵子を脂肪染色試薬であるナイルレッドで染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、実体顕微鏡下で観察された細胞質中の黒色顆粒が全て赤く染色された (Fig.1C)。この結果から、黒色顆粒が全て脂肪滴であり、未成熟の卵母細胞内に万遍なく分布していることが明らかになった。

体外成熟培養後の成熟卵母細胞における脂肪滴の分布

ブタ未成熟卵母細胞を体外成熟培養後に裸化し、成熟卵母細胞の細胞質中における脂肪滴の分布様式を観察した。その結果、脂肪滴の分布様式が卵母細胞によって異なっており、大きく 2 つのクラス

(class I , class II) に分類できることが明らかとなった (Fig.2)。

class I は細胞質全体に脂肪滴が均一に分布しており、実体顕微鏡下では細胞質が均一に黒く見えるものとし、class II は脂肪滴が細胞質中心もしくは片側に偏在しているものとした。次に、IVM 後の成熟卵母細胞を脂肪滴分布様式毎に分類し、各クラスの割合を計測、比較

した。その結果、class I (27.3%) と class II (72.7%) の間で有意な差が認められ、IVM 後の卵母細胞の脂肪滴分様式において、各クラスの割合が異なることが判明した (Fig.3)。

体外成熟後の脂肪滴分布様式と胚発生能の関連

IVM 後の成熟卵母細胞の脂肪滴分布様式と胚発生能との関連を調べるため、class I と class II の分布様式を示した IVM 卵をそれぞれ IVF、IVC に供試し、卵割率、胚盤胞形成率、胚盤胞細胞数を計測した。結果、卵割率において class 間 (class I : class II = 86.7 ± 3.8 : 83.1 ± 3.5) に有意な差は認められなかった。一方、胚盤胞形成率においては、class II において class I と比較して有意に高い値が認められた (class I : class II = 3.3% : 16.4%)。胚盤胞細胞数について有意差は認められなかった (Table.1)。

体外成熟培地へのアセタミプリド添加による成熟率への影響

ブタ卵母細胞体外成熟におけるネオニコチノイド系農薬の影響を検討するため、体外成熟培地にアセタミプリドを添加し、成熟率を比較した。卵母細胞の核成熟率は、control ($78.46 \pm 3.85\%$) に対して、10ppm 添加群 ($73.58 \pm 4.84\%$) で有意な差は見られなかった。しかし、30ppm 添加群では、control と比較して、核成熟率の有意な低下 ($p < 0.05$) が観察された ($66.76 \pm 4.12\%$)、また 100ppm 添加群におい

でも、control と比較して、核成熟率の有意な低下($p<0.01$)が観察された($53.85 \pm 2.32\%$) (Fig.4)。

考察

本章ではブタ卵母細胞における脂肪滴の役割を検討するため、体外成熟培養前後の脂肪滴の分布様式の変化に着目し、成熟卵母細胞を脂肪滴の分布様式でクラス分けし、各クラスの発生能を解析した。また、ネオニコチノイド系農薬のブタ卵母細胞への影響を検討するため、体外成熟培地へアセタミプリドを添加し、成熟率への影響を解析した。

ブタ卵巢から採取した COCs をヒアルロニダーゼにより裸化後、未成熟卵母細胞を実体顕微鏡下で観察すると、細胞質に黒色の顆粒が多数みられ、それにより細胞質全体が黒色に観察された (Fig.1B)。これをトリグリセリドの染色試薬であるナイルレッドで染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、黒色顆粒が全て赤く染色され、細胞質内に存在する黒色顆粒が全てトリグリセリドを含む脂肪滴であり、ブタ未成熟卵母細胞の細胞質中に脂肪滴が万遍なく分布していることが明らかとなった (Fig.1C)。この脂肪滴の分布を体外成熟培養後の成熟卵母細胞で観察したところ、一部の成熟卵母細胞では分布が変化し、脂肪滴が細胞質の中央および片側に偏在した (Fig.2)。IVM後に脂肪滴分布様式が変化しなかった卵母細胞と変化した卵母細胞をそれぞれ class I、class II とし、成熟卵母細胞における各クラスの割合を計測したところ、class I (27.3%) と class II (72.7%) の間で有

意な差が認められ、IVM 後の卵母細胞の脂肪滴分様式において、各クラスの割合が異なることが判明した (Fig.3)。ブタ卵母細胞細胞質中の脂肪滴は R.G.Sturmey と H.J. Leese (2003) により IVM 後、減少することが報告されており、脂肪滴分布様式の違いは、IVM 中に消費される脂質の量が卵母細胞によって異なることによって生じると考えられた。

そこで次に、各クラスにおける発生能を比較するため、IVF および IVC を行い、その後の胚盤胞発生率および胚盤胞細胞数を測定した。その結果、class II が class I と比べ、体外受精後の発生率が有意に高いことが明らかとなった (Table.1)。これらの結果から、脂肪滴の局在と発生率に密接な関係があることが示唆された。脂肪滴の分布は体外成熟過程においてミトコンドリアの移動に付随して変化することが報告されている (R G Sturmey et al., 2006)。本章の結果と合わせて、ブタ卵母細胞細胞質内の脂肪滴はブタ未成熟卵母細胞の成熟または胚発生にとって重要なエネルギー源となっている可能性が考えられた。

脂肪滴の主成分であるトリグリセリドは酸化されることで過酸化脂質となることが知られている (Gutteridge., 1994; Takahashi et al., 2003)。ネオニコチノイド系農薬はラットへの経口投与で卵巣における過酸化脂質の割合を増加させることから、ブタ卵母細胞へのネオニ

コチノイドの曝露は脂質を介して卵母細胞の成熟に影響を与えるが考えられた。そこでブタ卵母細胞体外成熟へのネオニコチノイドの影響を検討するため、体外成熟培地にネオニコチノイド系農薬のアセタミプリドを 10ppm, 30ppm, 100ppm の濃度で添加し、培養後の成熟率を測定した。その結果、10ppm 添加群では有意な差は見られなかったが、30ppm、100ppm 添加群では濃度依存的に成熟率が低下した (Fig.4)。ブタ卵母細胞中における過酸化脂質の割合が増加すると、核成熟率が低下することが報告されている (Yazaki et al., 2013)。さらに、ブタ卵母細胞体外成熟において、抗酸化物質を培地に添加することにより核成熟率の有意な増加が報告されていることから、酸化ストレスのブタ卵母細胞体外成熟への影響は大きいと考えられる (Wu et al., 2011)。以上のことから、アセタミプリドがブタ卵母細胞に直接曝露されたことにより、酸化ストレス影響を受け、卵母細胞中のトリグリセリドが過酸化脂質へと酸化され、成熟率の低下が引き起こされたことが示唆された。

第 2 章 付図

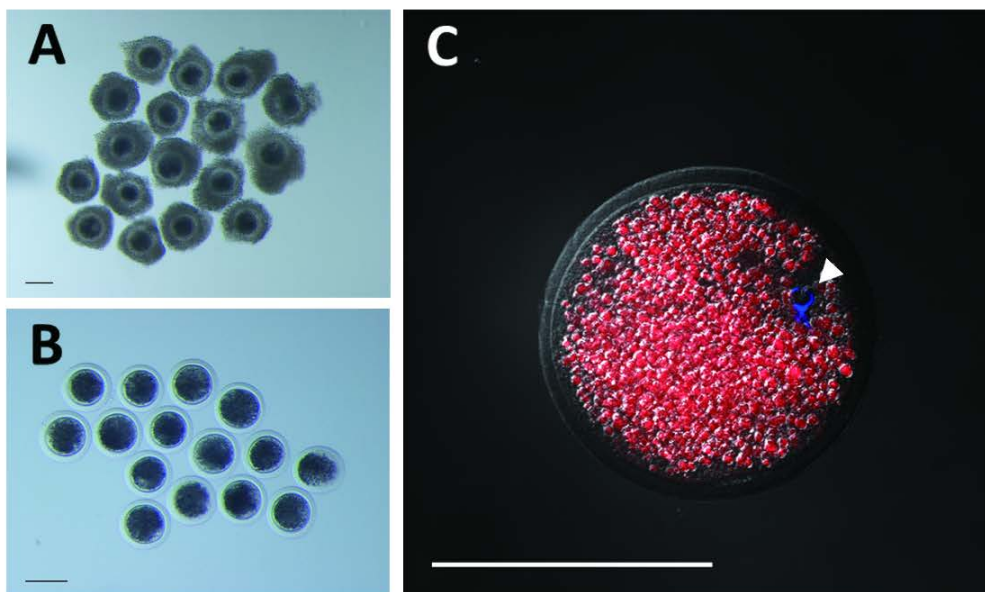


Figure 1. ブタ未成熟卵母細胞における脂肪滴の分布.
 A: 体外成熟培養(IVM)のために選別したCOCs、B: 裸化後の卵母細胞、
 C: 脂肪滴の免疫染色. 細胞内脂質とDNAはそれぞれナイルレッド(赤)と
 ヘキスト33342(青; 矢頭)によって染色した. Scale bar = 100 μ m.


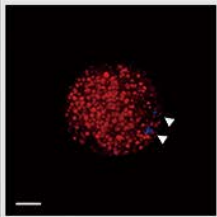
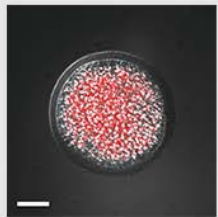
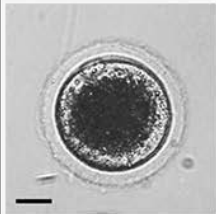
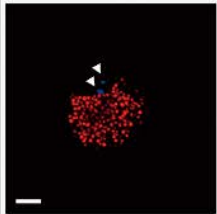
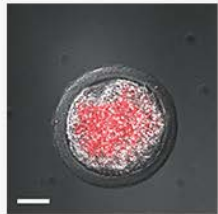
Class	Light microscopy	UV illumination (405 nm for Hoechst, 555 nm for Nile red)		Definition
I				Lipid droplets localized uniformly in the whole cytoplasm
II				Lipid droplets located centrally in the cytoplasm

Figure 2. IVM後のブタ卵における脂肪滴分布様式のクラス分け.
細胞内脂質とDNAはそれぞれナイルレッド(赤)とヘキシスト(青; 矢頭)によって染色された. Scale bar = 30 μ m.

No. of oocytes	Class I	Class II
104	27.3 ± 2.6	72.7 ± 2.6

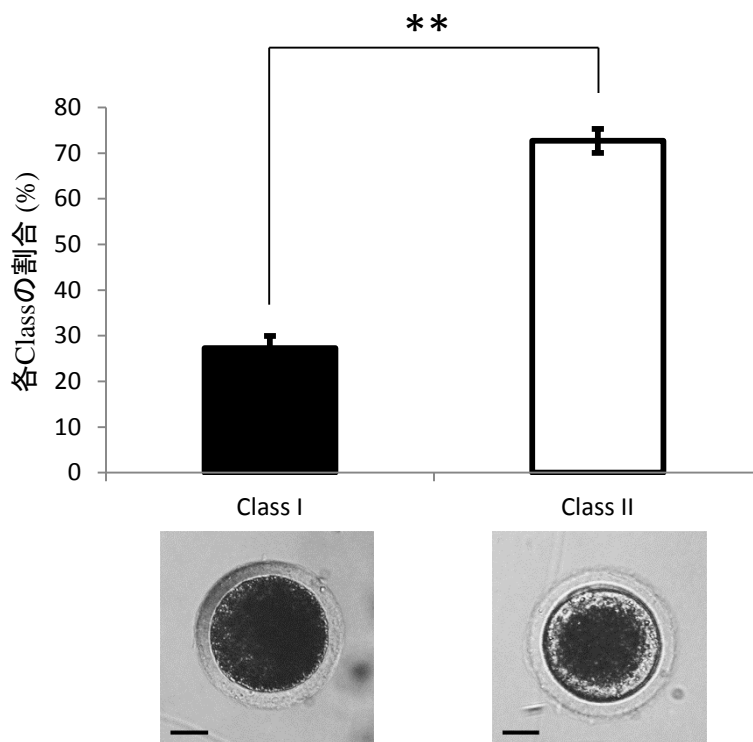


Figure 3. IVMがブタ卵母細胞の脂肪滴分布におよぼす影響. それぞれの棒グラフは脂肪滴分布様式クラス分け表 (Fig. 2) に定義するclass I、class IIを表す。IVM44時間後、各クラスの脂肪滴の割合を算出した。値は平均値±標準偏差, **P<0.01. Scale bar = 30 μm.

Table 1. 異なる脂肪滴分布様式の成熟卵における発生能

Lipid droplet distribution	No. of oocytes	Cleavage at Day 2 (%)	Blastocyst at Day 7 (%)	Cell number/blastocyst
class I	77	64 (85.3 \pm 3.4)	3 (3.3 \pm 2.1) ^b	48.7 \pm 14.3
class II	138	110 (80.6 \pm 3.8)	23 (16.4 \pm 3.6) ^a	50.6 \pm 4.9

Dayは受精後の日数を示す. %: Mean \pm SD. 異符号間に有意差有り (P<0.05).

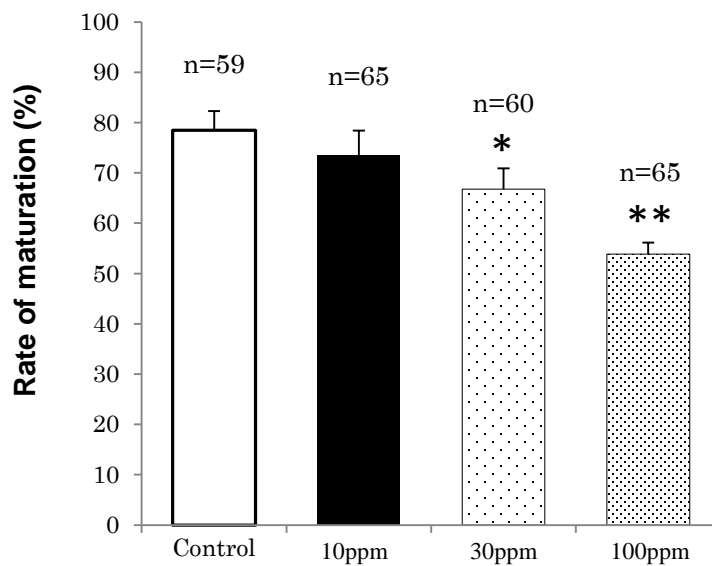


Figure 4. 体外成熟培地へのアセタミプリド添加による(10, 30, 100ppm) 核成熟率への影響. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

第 3 章

成熟マウスへの神経作動性化学物質曝露による行動影響解析系の構築

緒言

第 2 章の結果から、ネオニコチノイド系農薬アセタミプリドがブタ卵母細胞の核成熟に影響を与えることが明らかになった。これにより、中枢神経系を標的とした化学物質であっても、哺乳類家畜の生殖細胞に影響をおよぼす恐れがあることが示唆された。2012 年、Kimura らはネオニコチノイド系のイミダクロプリドとアセタミプリドがラットのニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR) に対し、ニコチンと同程度の影響を与えることを報告しており、ネオニコチノイド系農薬は生殖系だけでなく、哺乳類家畜の中枢神経系へも影響を及ぼすことが疑われる。しかし、特に中枢への影響は *in vitro* の報告が多く、*in vivo* での影響は不明な点が残されている。生体での中枢影響の指標の 1 つとして、個体の行動が挙げられ、個体の行動に及ぼす影響の評価系として、行動試験が知られている。しかし、哺乳類家畜における脳高次機能を含めた行動影響解析の報告は少なく、安定した解析系があるとは言えない。そのため、本研究では、行動影響の評価法として多数の報告がある齧歯類を用いた行動解析を選択した。

農薬の行動を含めた哺乳類神経系への影響は、日本では食品安全委員会、アメリカでは United States Environmental Protection Agency (EPA) が試験し、その結果を農薬評価書および Pesticide Fact Sheet にそれぞれまとめている。しかし、行動影響に関しては、投与

から短い期間内での増体重量や自発歩行といった急性影響を解析しており、遅発性の影響や情動や記憶学習などの脳高次機能を評価するための試験を含んでいない。ネオニコチノイド系農薬曝露による行動影響解析としては、チアメトキサムを 1 週間 10 週齢のラットに曝露し、その際の行動影響を試験した報告が存在するが、1 週間以内の解析であり、雄のみを用い、雌での影響は検討されていない

(Rodrigues et al., 2010)。この報告に限らず、行動試験では雌の場合は性周期の影響でデータのバラツキが大きくなると考えられているため、基本的に雄のみを用いた報告が大部分を占める。しかし、畜産分野への応用を考慮した場合、家畜はその種毎に性別によってそれぞれ重要な役割を持つため、雄個体だけでなく、雌個体を含めた両性で影響を検討することが重要であると考えられる。

そこで、本章では脳高次機能影響およびその雌雄差をも検出する解析系の構築を目指した。個体の行動に及ぼす影響の評価系として、行動テストバッテリーが知られている。これは複数の行動試験を組み合わせたものであり、得られた結果を総合的に判断することで個体の行動特性を評価する。行動試験には様々な方法があり、それぞれ評価できることが異なるが、本研究ではその中でも自発運動量・情動行動・学習記憶能に評価項目を絞り、オープンフィールド試験、明暗往来試験、条件付け学習記憶試験の 3 つの試験を選択し、これらを組み合わせたバッテリー試験を構築した。各行動試験の概要を Fig.5 に示す。

本章では、構築した解析系を用いて、神経伝達物質受容体を刺激するアセタミプリドの単回曝露が、マウスの行動に影響を及ぼすか、またその影響に雌雄差が存在するのかを検討した。

材料と方法

供試動物

雌雄の C57BL/6N マウス (SLC, Shizuoka, Japan) を 4 週齢で離乳し、1 ケージに 3~4 匹で飼育した。餌と水は絶えないように供給し、マウスが自由に摂取できるようにした。

投与化学物質

アセタミプリド (Wako) (50 mg/kg) を室温で 0.5 w/v% のメチルセルロース溶液に溶解させた。マウスが 8 週齢時に、投与群 (Experimental group: E) はアセタミプリド溶液をコントロール群 (Control group: C) は同量の溶媒を経口ゾンデ (Fuchigami, Kyoto, Japan) を用いて強制経口投与 (10 μ l/g 体重) した。投与後、急性影響を検討するため、投与直後、投与 1 時間後、投与 24 時間後にマウスの状態を観察した。

投与および解析スケジュール

アセタミプリドの体重への影響を検討するため、マウスの体重を投与直前 (8 週齢) と行動解析終了後 (12 週齢) に測定した。マウスは投与後 10 週齢まで飼育室で飼養管理し、10 週齢時に飼育室から行動解析室へケージを移動し、1 週間行動解析室に順化させ、11 週齢から

行動解析を開始した。本研究ではオープンフィールド試験、明暗往来試験、恐怖条件付け学習記憶試験から構成される行動テストバッテリーを用いて解析を行った。各行動試験の方法は過去の報告を参照した (Sakatani et al., 2009)。それぞれのテストにおいて各群 10 匹を供試し、全ての試験を同じマウスを用いて行った。

行動解析

オープンフィールド試験

オープンフィールド試験は装置を防音箱(78 × 63 × 65 cm (H))の中に設置して行った。装置は白いプラスチック製のものを用い(50 × 50 × 40 (H) cm)、LED ライトによって照度を調節した (フィールド中央の照度 : 25 Lux)。マウスの行動はオープンフィールド中央の真上に設置された CCD カメラによって測定した。測定中、防音箱の換気扇は換気とバックグラウンド・ノイズ (35 dB) の発生源のために起動した。オープンフィールド試験において、マウスは 1 匹ずつ実験者から見て装置の右手前側の隅に置き、10 分間自由に移動させた。Distance traveled (総移動距離 : cm), duration traveled (総移動時間 : sec), movement number of times (移動回数) と duration of stay at the center area of the field (中央滞在時間 : 36% of the field)を指標として測定した。データは 30 秒毎

に収集され、Image J OF2 (O'Hara, Tokyo, Japan)を用いて分析された。

明暗往来試験

明暗往来試験は装置をオープンフィールド試験と同様の防音箱の中に設置して行った。明暗往来試験装置は明室と暗室の隣り合う2種類の箱から構成され、明室は白いプラスチック製のものを用い(20 × 20 × 20 (H) cm)、LED ライトによって照度を調節し (250 Lux)、明室の中央真上に CCD カメラを設置した。暗室は黒いプラスチック製のものを用い(20 × 20 × 20 (H) cm)、赤外線カメラを暗室中央の真上に設置した。明室と暗室を隔てる中央の壁には各部屋に移動が出来るようにトンネルが設けられ (3 × 5 cm)、実験者が自由に開閉できるようにスライドドアを設置した。明暗往来試験において、マウスは1匹ずつ暗室に入れられ、試験開始から60秒後にトンネルのドアを実験者の操作により開放した。そこから5分間、マウスに明室と暗室を自由に行き来させた。Total distance traveled (総移動距離), % distance traveled in the light box (明室移動距離), % duration staying in the light box (明室滞在時間), number of transitions between light and dark boxes (転室回数), and the first latency to enter the dark box (暗室待機時

間) が指標として測定された。データは 1 分間毎に収集され、
Image J LD2 (O'Hara, Tokyo, Japan)を用いて分析された。

恐怖条件付け学習記憶試験

恐怖条件付け学習記憶試験は **conditioning trial** (条件付け)、**context test trial** (空間連想試験)および **cued test trial** (音連想試験)の 3 つのパートから構成される。恐怖条件付け学習記憶試験は装置をオープンフィールド試験および明暗往来試験と同様の防音箱の中に設置して行った。条件付けに用いる装置は、透明なプラスチック製の箱で底にステンレススチール製のグリッドを設置した (17 × 10 × 10 (H) cm)。CCD カメラは装置の真上に設置し、ビデオモニターとコンピューターに接続した。グリッド床はショックジェネレーターと配線された。ホワイトノイズ (65dB) は音刺激 (CS) として防音箱内に設置された拡声器から供給された。条件付けは、30 秒間の探索時間とそれに続く音刺激・電気刺激から成る 30 秒間の曝露時間を 6 回繰り返す構成とした。電気刺激 (foot-shock: 0.8 mA, 2 秒間) は音刺激 (30 秒間) の終わりの 2 秒間に与えられた。Context test (空間連想試験)は条件付けの 48 時間後に、条件付けに用いたものと同様の装置で 6 分間、ホワイトノイズ (CS) 無しで行われた。一方で、cued test (音連想試験) は、条件付けに用いたものとは、明るさ (約 1 Lux) と色 (白色) と床の

構造（グリッド無し）が異なる装置にマウスを入れ、実施した。

Cued test は context test の 48 時間後に実施し、3 分間の探索時間（no CS）とそれに続く 3 分間の音刺激（CS）曝露時間（foot shock 無し）によって構成した。フリージング率（呼吸と鼓動を除く静止）は恐怖記憶の指標として測定した。データの収集および分析は Image J FZ2 (O'Hara, Tokyo, Japan)を用いて行った。

統計処理

得られたデータについて 2 群間での比較は Student's t-test を用いて行い、統計学的有意差を得た。データは値±標準誤差で表し、 $P<0.05$ を有意差とみなした。

結果

急性影響と体重への影響

アセタミプリド投与直後、投与 1 時間後、投与 24 時間後にケージ内のマウスの行動を観察した。投与直後において、投与群では自発運動量の低下が観察されたが、コントロール群ではみられなかった。しかし、投与 1 時間後以降は特に急性症状はみられなかった。また、投与前（8 週齢）と行動解析終了時（12 週齢）に体重測定を行い、体重への影響を評価した。結果、コントロールと投与群の間に有意な差は見られなかった（Fig.6）。

オープンフィールド試験

オープンフィールド試験の結果、移動距離、移動時間、移動回数などの項目においてコントロール群と投与群で有意な差はみられなかった（Fig.7）。

明暗往来試験

アセタミプリド曝露マウスは、性別に関わらず、明暗往来試験でいくつかの行動変化を示した（Fig.8）。明暗往来試験において、雌のアセタミプリド曝露マウスは、明室移動距離、明室滞在時間および転室回数がコントロールと比較して有意に低かった（Fig.8A-C）。また、

暗室待機時間が有意に高かった (Fig.8D)。一方、雄マウスでは投与群で明室滞在時間のみ有意な減少がみられた (Fig.8B)。この結果は、投与群マウスでの不安性の増加を示唆している。特に複数の項目で不安関連行動の逸脱がみられることから、雄と比較して雌の投与群で強い不安性の増加がみられた。

条件付け学習記憶試験

本実験では 360 秒中に 6 回の音刺激と電気ショックを組み合わせた条件付け (conditioning) を行った (Fig.9)。conditioning では、雌雄で Freezing rate に差があり、雌に比べて雄では Freezing rate が低い傾向があった。しかし、続く context 試験、cued 試験ではコントロール群の雌雄に Freezing rate の大きな差はみられなかった。また、雌個体ではコントロールと投与群の間に有意な差は見られなかった (Fig.9B)。対して、雄個体では、3 度目の音刺激(bin15~18)の際にコントロール群で見られた Freezing rate の上昇が投与群では見られず、有意な差が認められた (Fig.9A)。context 試験において、雄投与群は試験開始から終了までコントロール群と比較して有意に低い Freezing rate を示した (Fig.10)。しかし、雌投与群では有意な差はみられなかった。cued 試験では音刺激前は雌雄とも投与群とコントロール群との間に有意な差はみられなかったが、音刺激後の Freezing rate に関しては、雄の投与群がコントロール群と比較して

有意に低い値を示した (Fig.11)。一方で雌個体では音刺激後も投与群とコントロール群との間で有意な差は認められなかった。

考察

本研究では、我々は性成熟後マウスへの中毒事故レベル (Taira., 2012) のアセタミプリド単回曝露が情動行動および学習記憶能に遅発性の影響を及ぼす可能性があることを明らかにした。今回マウスに投与し、中枢影響が確認されたアセタミプリドの濃度 (50mg/kg) は、日本とアメリカの政府が発行しているアセタミプリドの農薬評価書および Pesticide Fact Sheet において 90 日間亜急性影響試験では無毒性量とされている用量である (農薬評価書., 2008; EPA., 2002)。実際に、アセタミプリド投与直後は活動量の低下が見られたが、投与 1 時間後には活動量はコントロール群と同等となり、振戦、うずくまり、痙攣といった急性影響は見られなかった。また、成熟マウスへのアセタミプリド曝露は増体重量へ影響をおよぼさなかった (Fig.6)。しかしながら、投与 3 週間後の行動試験において、情動行動や認知行動に逸脱がみられた (Table.2)。これらの結果から、成熟期のアセタミプリド曝露は、増体重量や活動量に影響が見られない用量であっても、脳高次機能に影響を及ぼす恐れがあることが明らかとなった。また、アセタミプリドが哺乳類神経細胞の nAChR に対しニコチン様作用を示すことが報告されていることから (Kimura et al., 2012)、nAChR を介したアセチルコリン神経伝達のかく乱が、神経機能に影響を与えたことが示唆された。脳のコリン作動性ニューロンは前脳基底部、中

脳橋被蓋、線条体、手綱核などを起始核とし、脳内に広範に存在することが知られており、大脳基底核のコリン作動性ニューロンは大脳皮質や海馬に神経線維を送り、脳高次機能に重要な役割を担っているとされている (Descarries et al., 1997)。海馬において $\alpha 7$ nAChR は興奮性グルタミン酸神経の神経終末に、 $\alpha 4 \beta 2$ nAChR はアセチルコリン神経の神経終末に存在することが知られており (Gray et al., 1996; Wonnacott et al., 1997)、終脳特に海馬や大脳皮質が行動影響の責任部位である可能性が考えられた。さらに、本研究の結果は、アセタミプリド曝露によ

行動試験における雌雄差は空間学習能力などについて論文で長い間議論されている (Berger et al., 1995; Voyer et al., 1995)。本実験でもいくつかの項目で雌雄差がみられた (Fig.8D, 9AB)。しかし本研究では、性別による行動様式の違いではなく、アセタミプリド投与による行動影響が雌雄で異なるかどうかに着目した。行動影響が認められた試験は雌雄で大きく異なり、雄個体へのアセタミプリド曝露では、恐怖条件付け学習記憶試験において影響が見られた。Conditioning では Freezing rate の変化から、最終的に提示した条件の学習は成立しているものの、短期記憶の遅れが認められた (Fig.9)。また、その後の Context 試験および Cued 試験において Freezing rate の有意な低下が見られたことから、記憶の想起が障害されていることが示唆された (Fig.10, 11)。対して雌個体の投与群では、恐怖条件付け学習記憶

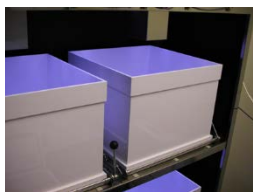
試験には影響がみられず、明暗往来試験の結果から、強い不安亢進が示唆された (Fig.8)。この結果は、性別によってアセタミプリド曝露の影響を受ける脳部位が異なる可能性を示している。アセタミプリドの標的である nAChR は脳に広範囲に存在し、脳全体における発現部位の性差は報告されていないが、ニコチン投与による nAChR の上昇は雌の方がより低用量時でも起こることが報告されている (Donny et al., 2000)。また、ニコチン投与後のバソプレシン分泌上昇は雄の方が大きく、アデノコルチコトロピックホルモン (ACTH)、コルチコステロン分泌の上昇は雌の方が大きいことが報告されており、ニコチン投与影響の雌雄差には nAChR の機能的な性差が関わっている可能性がある (Rhodes et al., 2001)。このように nAChR に関して機能的性差に関する報告がなされており、ニコチンと同様に nAChR を標的とするアセタミプリド曝露影響にも、雌雄差が存在する可能性がある。また、成体の雌ラットを用いた研究で、基底核コリン作動性ニューロンはエストロゲンに対して感受性をもつことが知られており、コリン作動性ニューロンにはエストロゲン受容体が存在することが報告されている (Mufson et al., 1999)。アセチルコリン受容体の一つであるムスカリン性アセチルコリン受容体遺伝子欠損マウスは雄では学習障害を示すのに対し、雌では野生型と違いがないことが知られており、これはエストロゲンによる脳機能回復作用によるものと報告されている (Kitamura et al., 2009)。このように脳高次機能やそれに関

与するコリン作動性ニューロンはエストロジェンの影響を受けており、本研究の性差もエストロジェンによってもたらされている可能性が考えられる。

本研究において、我々が構築した評価系を用いることによって、マウスにおけるアセタミプリドの遅発中枢影響が性別によって大きく異なることを初めて検出することが出来た。また、脳全体の nAChR 分布に大きな差がなくとも、脳部位によるホルモン量や nAChR の機能的な差、感受性の違いによって影響が異なる可能性が示唆された。

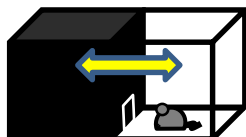
第 3 章 付図

1. オープンフィールド試験



通常マウスは広い新奇環境下に曝された場合、立ち上がり行動や歩行を繰り返して“探索行動”を行う。50×50×40のプラスチック製の箱の上部からビデオカメラを用いてマウスの探索行動を測定する。OFは自発運動量や活動量、一般行動を測定する場合に汎用される。

2. 明暗往来試験

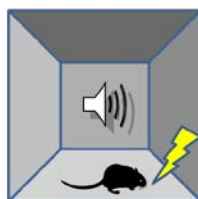


明るい部屋と暗い部屋の2部屋で構成される装置にマウスを入れ、各部屋におけるマウスの探索行動や滞在時間を測定する。マウスは暗い空間を好み明るい空間を嫌う習性のため、明室での探索行動や滞在時間は不安や恐怖などの情動機能を評価する際の指標となる。

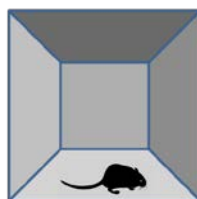
3. 条件付け学習記憶試験



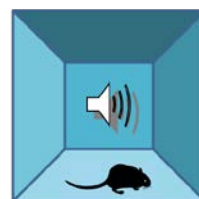
条件付け



空間連想記憶



音連想記憶



音と床からの電気ショックを組み合わせた条件付け後、刺激を与えた装置に戻すなどの条件刺激を与え、すくみ行動 (Freezing) を指標としてマウスが記憶しているかを評価する。本研究では条件付けを行った翌日に刺激を与えた装置に戻すことで空間と電気刺激を関連付けて記憶しているかを試験し、その翌日に刺激をあたえたものとは別の装置に入れ、音の条件刺激を与えることで音と電気刺激を関連付けて記憶しているかを試験した。

Figure 5. 行動テストバッテリーを構成する各行動試験の概要

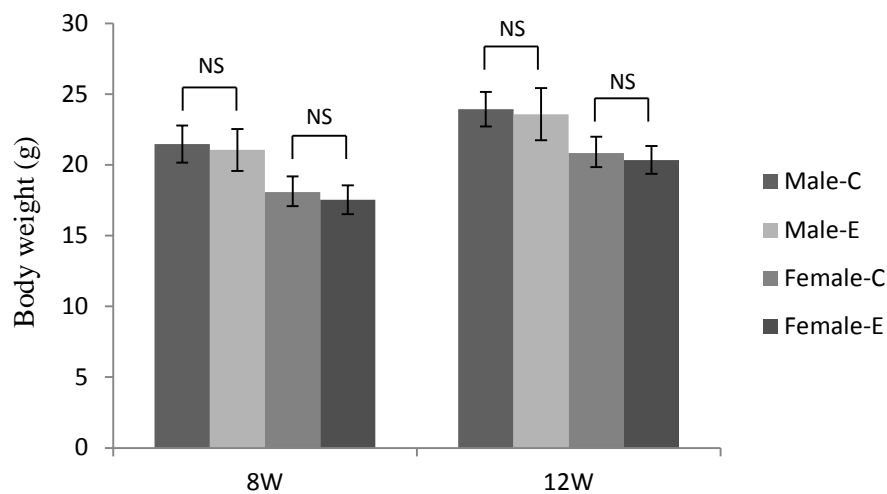
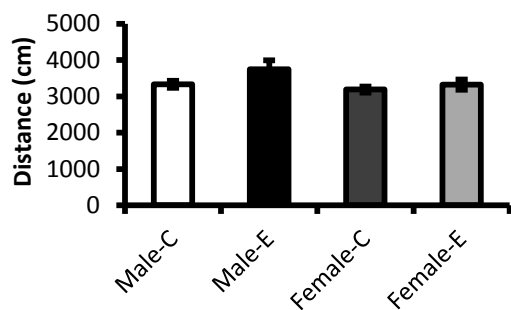
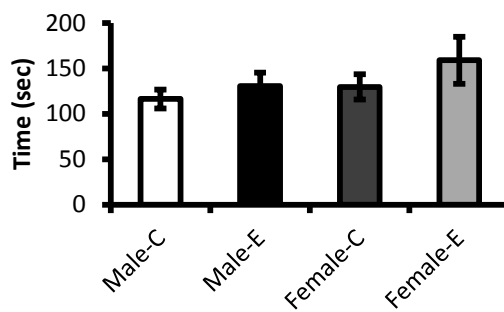


Figure 6. アセタミプリド曝露による体重への影響

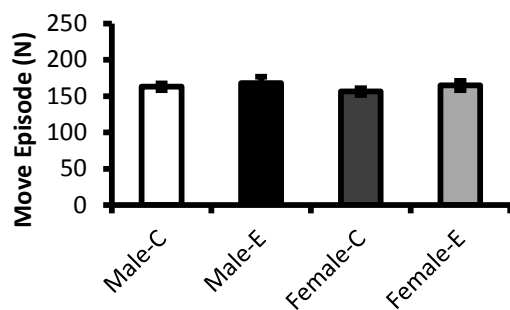
凡例 C: コントロール群、E: アセタミプリド投与群。*: $P > 0.05$, **: $P > 0.01$,
mean \pm S.D. (n = 10)

A

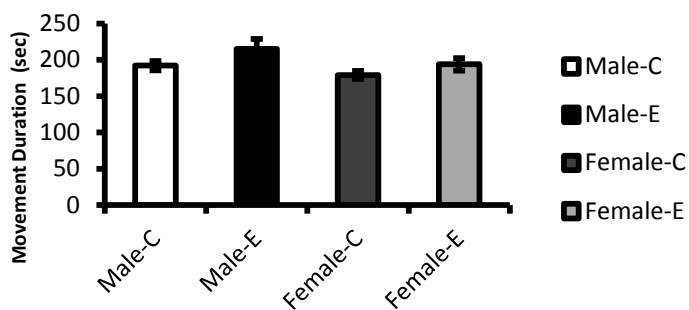
Total distance

B

Center time

C

Move episode N

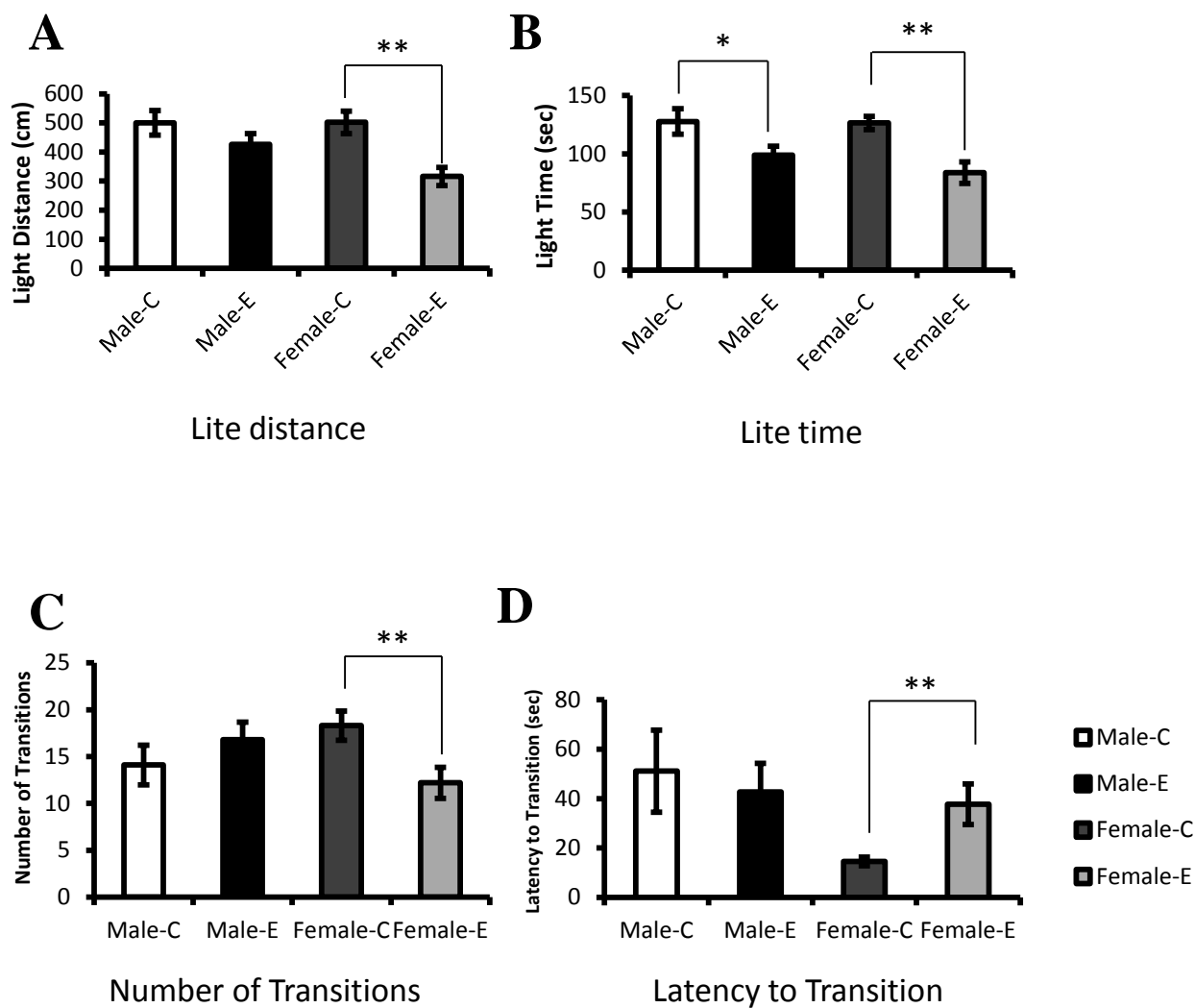
D

Total Movement Duration

* : $P > 0.05$, ** : $P > 0.01$, mean \pm S.E. (n = 10)

Figure 7. オープンフィールド試験の結果

A: 総移動距離、B: 中央滞在時間、C: 移動回数、D: 総移動時間

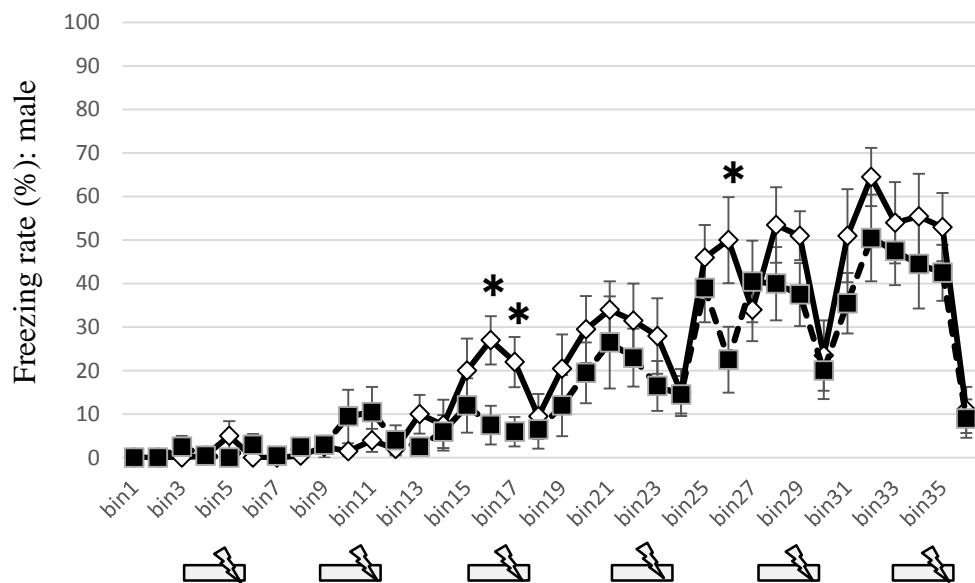


* : $P > 0.05$, ** : $P > 0.01$, mean \pm S.E. (n = 10)

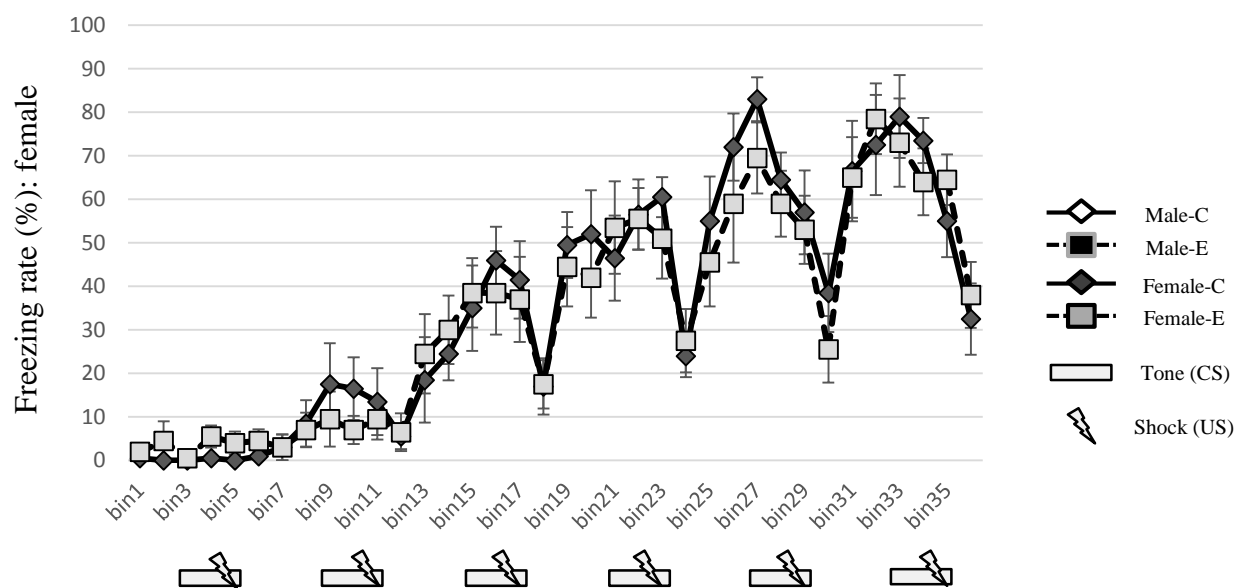
Figure 8. 明暗往来試験の結果

A: 明室移動距離、B: 明室滞在時間、C: 転室回数、D: 暗室待機時間(明室へ初めて入るまでにかかった時間)

A



B

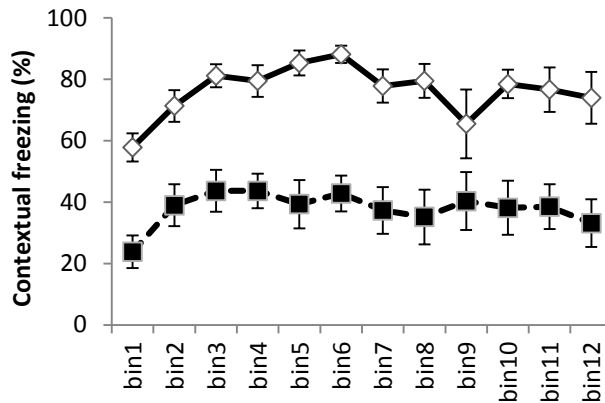


* : $P > 0.05$, ** : $P > 0.01$, mean \pm S.E. (n = 10)

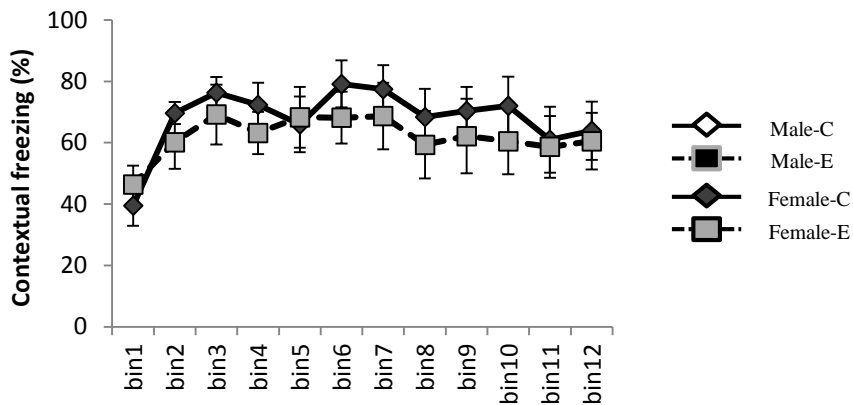
Figure 9. 条件付け学習記憶試験における条件付け時のフリージング率

A: 雄のコントロール群と投与群のフリージング率の経時的変化、B: 雌のコントロールと投与群のフリージング率の経時的変化。bin = 10秒。

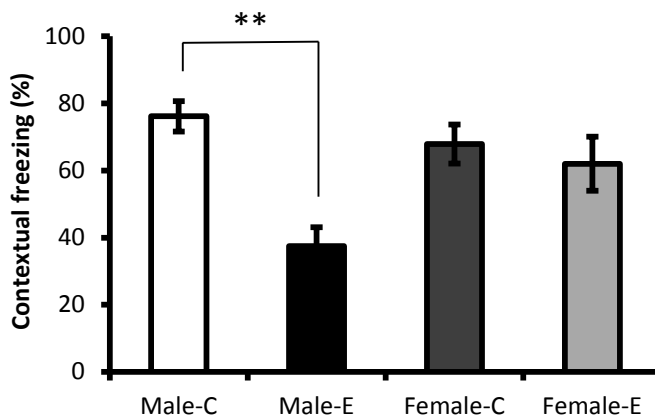
A



B



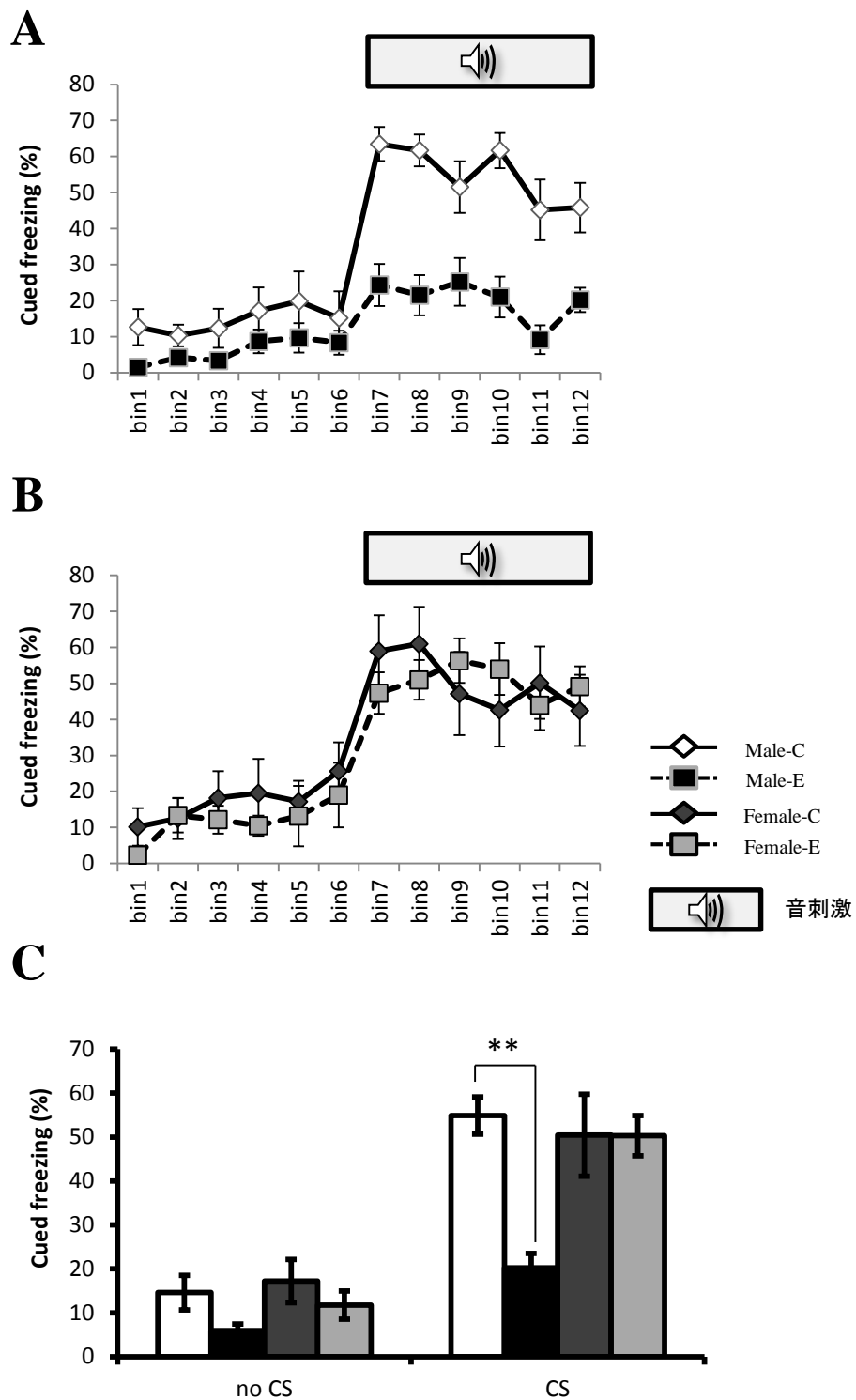
C



* : $P > 0.05$, ** : $P > 0.01$, mean \pm S.E. (n = 10)

Figure 10. 条件付け学習記憶試験における空間連想試験時のフリージング率

A: 雄のコントロール群と投与群のフリージング率の経時的変化、B: 雌のコントロールと投与群のフリージング率の経時的変化。C: 空間連想試験における総Freezing rateの比較。
bin = 30秒。



* : $P > 0.05$, ** : $P > 0.01$, mean \pm S.E. (n = 10)

Figure 11. 条件付け学習記憶試験における音連想試験時のフリージング率

A: 雄のコントロール群と投与群のフリージング率の経時的変化、B: 雌のコントロールと投与群のフリージング率の経時的変化。C: 音連想試験におけるFreezing rateの比較。
no CS: 探索時間 (bin1 - 6)、CS: 音刺激曝露時間 (bin6 - 12)。bin = 30秒。

Table 2. 行動解析結果の概要

	Male	Female
Behavioral task/Indices	8W	8W
Body weight	ns	ns
Open field test		
Distance traveled	ns	ns
Time center	ns	ns
Move episode N	ns	ns
Movement duration	ns	ns
Light-dark box test		
Dark distance	ns	ns
Light distance	ns	↓↓
Time light	↓	↓↓
No. of transition	ns	↓
First latency to enter dark	ns	↑
Classical fear conditioning		
conditioning	ns	ns
context test	↓↓	ns
cued test	↓↓	ns

↑ : $P > 0.05$, ↑↑ : $P > 0.01$

第 4 章

胎生期マウスのセロトニン受容体過剰刺激による遅発中枢影響解析

緒言

第3章の結果から、脳高次機能を含む行動影響やその雌雄差の検出に必要な解析系を構築することができた。この解析系を用いた実験により、哺乳類への神経作動性作用が疑われているアセタミプリドは単回曝露でも成熟マウスの認知行動・情動行動に影響を与えることが明らかとなった。また、曝露直後ではなく、3週間が経過した時点で行動影響が検出されたことから、化学物質による受容体を介したシグナルかく乱は、脳に長期的、または遅発性の影響を及ぼすことが考えられる。胎生期に内分泌かく乱物質に曝露された個体のうち出生に至った産仔は成熟後に行動影響を示すことが報告されており (Sugawara et al., 2006)、アセタミプリドのように受容体に作用する化学物質においても、胎生期曝露による成熟後の行動影響が疑われる。成熟期と比較して、胎生期は化学物質に対する耐性や感受性、脳における受容体の発現パターンが異なると考えられ、曝露影響が成熟期と同一とは限らない。そのため、成熟期とは別に胎生期曝露影響の解析とそのメカニズムを検討することは重要であると考えた。しかし、農薬は標的受容体以外への作用や受容体に対してアゴニスト・アンタゴニスト両方の作用を示す可能性があり、詳細な解明は難しい。

近年、Bonnin ら (Nature, 2011) によって、胎生期の初期において、胎盤で合成されたセロトニン (5-hydroxytryptamine : 5-HT)

が胎仔の前脳へと供給され、初期（胎生 10.5～14.5 日齢）の脳発生の調節に直接的な役割を果たしていることが報告された。この報告から、胎生 10.5 日齢から 14.5 日齢の胎仔脳は外来性のセロトニン刺激に対して感受性が高いことが推察される。このため、成熟期の個体と比較してより低用量の化学物質であっても、脳が大きな影響を受ける可能性がある。また、胎生期は脳が発生・発達する時期であることから、そのタイミングでの 5-HT 刺激による脳への影響は固定され、個体の成熟後も行動に影響をおよぼす可能性が考えられた。脳内におけるセロトニン受容体は 1950 年代から研究されており、マウス胎仔期における受容体発現パターンについても詳細な報告が存在する (Gaddum & Picarelli., 1957; Bonnin et al., 2006)。以上ことから、胎生期における受容体を介したシグナルかく乱の詳細な解析にモデル化学物質としてセロトニン受容体のアゴニストが最も適切であると考えた。

そこで本章では、母体を介した胎生期の 5-HT 受容体刺激が、個体の成熟後も影響を及ぼすかを形態的に解析するとともに、成熟後の行動影響について構築した解析系を用いて検討した。

材料と方法

供試動物

供試動物については第 3 章の方法に準じておこなった。

組織切片の作成

マウスから脳を摘出し、メタカン（メタノール：クロロホルム：酢酸＝6:3:1）で固定後、100%エタノールとキシレンで処理した。その後パラフィン包埋によりブロックを作成し、ミクロトーム処理によって 10 μ m の厚さで薄切し、スライドガラス上に貼り付け組織切片を作成した。

1. 固定 メタカン 24 時間（4℃）

2. 脱水 100%エタノール 一晩×2（4℃）

3. 透過 キシレン I 1 時間

 キシレン II 1 時間

 キシレン III 2 時間

4. 包埋 ソフトパラフィン 1 時間

 パラフィン I 2 時間

 パラフィン II 2 時間

 パラフィン III 2 時間

免疫組織化学

作成した組織切片をキシレンによる脱パラフィン処理後、エタノールで脱水処理を行い、Histo VT One (NACALAI TESQUE)に 90℃、30 分浸すことで抗原の賦活化処理を行った。蒸留水で洗浄後、Blocking One (NACALAI TESQUE)で 4℃、1 時間ブロッキング処理を行った。

1. 脱パラフィン キシレン I 20 分
 キシレン II 20 分
 キシレン III 20 分
2. 親水化 100%エタノール 10 分
 100%エタノール 10 分
 95%エタノール 10 分
 90%エタノール 10 分
 80%エタノール 10 分
 70%エタノール 10 分
3. 洗浄 蒸留水 3 分×3
4. 抗原賦活化 Histo VT One 40 分 (90℃)
5. 冷却 10 分 (室温)
6. 洗浄 流水 20 分
 蒸留水 数秒×2
7. ブロッキング Blocking One 60 分 (4℃)

ブロッッキング処理後、1次抗体（rat 抗 Ctip2 抗体；mouse 抗 BrdU 抗体または mouse 抗 MAP1A 抗体）を Blocking One と PBS の混合液（Blocking One：PBS = 1:4）で希釈し(1:500)、1晩 4℃でインキュベートした。PBS で洗浄後、2次抗体処理（Alexa Fluor 488 goat anti-rat; Alexa Fluor 568 goat anti-mouse, 1000 倍希釈）を 4℃で 3 時間行い、核は Hoechst 33342 (5000 倍希釈, Molecular Probes, USA)で共染色した。抗体処理を施した切片は共焦点レーザー顕微鏡(Zeiss LSM700)で観察し、撮影を行った。

免疫組織化学による新生児大脳皮質形態解析

5-HT 作動薬である Dexfenfluramine (Dfen) (NACALAI TESQUE) を室温で生理食塩水（Otsuka, Tokyo, Japan）に溶解させた (7.7mg/kg)。妊娠 11.5 日目のマウス（C57BL/6）に腹腔内注射により投与した（10 ul/g 体重）（対照群は同量の溶媒を投与）。また Dfen 投与群と対照群の両方に、チミジンのアナログであり、細胞周期の S 期において新たに合成された DNA に取り込まれるため、増殖した細胞の指標となる 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) (NACALAI TESQUE)を生理食塩水で希釈し（50mg/kg）、腹腔内投与した。出産日である Post natal day 0 (P0)時に新生仔から脳を摘出し、組織切片を作成後、免疫組織化学により評価した。

胎生期 Dfen 曝露マウスにおける成熟後の行動解析

生理食塩水に溶解させた Dfen(7.7mg/kg)を妊娠 11.5 日目のマウスに腹腔内注射により投与した (10 μ l/g 体重) (対照群は同量の溶媒を投与)。出産後、4 週齢で離乳し、1 ケージに 3~4 匹で飼育した。11 週齢時に飼育室から、行動解析室へケージを移動し、1 週間行動解析室に順化させ、12 週齢時から行動解析を行った。行動解析終了後、生後 13 週齢の時点で解剖し、脳組織切片を作成後、免疫組織化学により形態影響を評価した。

行動解析

行動解析は第 3 章の方法に準じて行った。

統計処理

得られたデータについて 2 群間での比較は Student' s t-test を用いて行い、統計学的有意差を得た。データは値 \pm 標準誤差で表し、 $P<0.05$ を有意差とみなした。

結果

免疫組織化学による新生児大脳皮質形態解析

胎仔期の Dfen 曝露が脳に及ぼす形態的な影響を検討するため、妊娠 11.5 日齢時に Dfen とともに BrdU（増殖した細胞のマーカー）を同時投与し、出産直後（P0）時に新生児を解剖、脳切片を作成した。切片における海馬の大きさを指標とし、脳における位置がほぼ同一な矢状断面の切片を用い、層構造マーカーである Ctip2 と BrdU の抗体およびヘキストを使用して免疫組織化学を行った。大脳皮質における BrdU 陽性細胞数を測定したところ、コントロール群と比較して雄の曝露群で BrdU 陽性細胞が減少している傾向がみられた。また、その局在はコントロール群と比較して大脳皮質の深層に集中していた（Fig.12）。また、大脳皮質の厚さを比較したところ、コントロール群と曝露群において有意な差はみられなかった。しかし、脳梁から Ctip2 陽性細胞層までの長さで大脳皮質の厚さの比を比較したところ、雄の曝露群でコントロールと比較して有意に数値が低下していた（Fig.13）。一方で雌のコントロール群と曝露群の間に有意な差は見られなかった。

胎生期 Dfen 曝露マウスにおける成熟後の中枢解析

新生児期の脳で影響がみられたことから、次に成熟後の脳において影響が確認されるかを検討するため、妊娠 11.5 日齢時に Dfen を投与し、生まれた仔を 13 週齢まで飼養管理した後、脳を摘出し、脳切片を作成した。大脳皮質の形態解析を行うため、樹状突起のマーカーである MAP1A と Ctip2 の抗体を用いて免疫組織化学を行った。

MAP1A の局在および蛍光強度について、雌雄共にコントロール群と胎生期曝露群で大きな差はみられなかった (Fig.14)。一方で、大脳皮質における Ctip2 陽性細胞の局在が雄のコントロール群と胎生期曝露群で異なっており、雄の胎生期曝露群において本来定着する層より深層に位置していた (Fig.14)。大脳皮質の厚さを比較したところ、コントロールと曝露群の間に有意な差はみられなかった。次に、大脳皮質直下に存在する脳梁から、Ctip2 陽性細胞層上端までの長さを測定し、大脳皮質の厚さとの比をとって比較したところ、雄の曝露群においてコントロール群と比較して有意に数値が低下していた。

行動解析

成熟後の行動影響を検討するため、妊娠 11.5 日齢時に Dfen を投与し、生まれた仔を 12 週齢まで飼養管理した後、行動解析を行った。オープンフィールド試験では有意な差はみられなかったが、明暗往来試験で雄でのみ、明室滞在時間、転室回数、暗室待機時間においてコ

ントロール群と曝露群で有意な差がみられた (Fig.16)。条件付け学習記憶試験では空間連想記憶および音連想記憶どちらの項目においても有意な差はみられなかった (Fig.17, 18)。行動テストバッテリーの結果から、雌では大きな変化は見られなかったが、雄の曝露群で不安関連行動の逸脱がみられた (Table.3)。

考察

ヒトにおいて、脳内の 5-HT 濃度を上昇させる選択的セロトニン再取り込み阻害剤が、うつ病や不安障害に有効であることが報告されており、5-HT は受容体を介して不安関連行動に密接な関わりがあると考えられている (Schatzberg AF., 2000)。また、マウスの不安行動の制御に大脳皮質の 5-HT_{2A} 受容体が関与していることが報告されており (Weisstaub et al., 2006)、胎生期の 5-HT 受容体の過剰刺激は不安を含む情動に関与する脳部位に影響を及ぼす可能性が考えられた。そこで、不安関連行動との関与が報告されている大脳皮質に着目し、胎生期 Dfen 曝露による脳の形態影響を検討した。

大脳皮質は大脳の表面に広がる 6 層の構造からなる神経細胞の薄い層で、知覚、随意運動、思考、情動、記憶などの脳の高次機能を司っている。大脳皮質の層構造は神経細胞どうしの規則正しい整列によって形成されているため、神経細胞への影響は層構造の乱れとなって表れる。そこで胎生期 Dfen 曝露による大脳皮質層構造への影響を検討するため、胎生 11.5 日齢時に Dfen と同時に層構造のマーカーである BrdU を投与後、出産直後の P0 時に脳を摘出し、脳切片を作成した。この切片を用いて BrdU 抗体と層構造マーカーの一つである Ctip2 の抗体を用いて免疫組織化学を行い解析した。その結果、BrdU 陽性細胞の減少および局在変化が認められた (Fig.12)。また、第 5 層のマーカーである Ctip2 の局在が雄の胎生期曝露群でコントロ

ール群と比較して、より深層に位置していた (Fig.13)。これらのことから、胎生期 Dfen 曝露は、新生児の脳皮質構造に影響を与えることが示唆された。また、層構造の変化と BrdU 陽性細胞の減少が見られることに対し、細胞数の大きな変化は確認されないことから、形態影響の要因として、脳皮質層構造形成時における神経細胞の増殖や移動の異常が考えられた。

次に、成熟後の脳皮質への形態影響を検討するために、Dfen 投与後、13 週齢まで成長したマウスの脳から切片を作成し、樹状突起マーカーの MAP1A と層構造マーカーの一つである Ctip2 について免疫組織化学を行い解析した。成熟期マウスの脳皮質において、樹状突起の形態および MAP1A の蛍光強度などに大きな差はみられなかった (Fig.14)。また、脳皮質の厚さにも有意な差は見られなかった。しかし、新生仔脳と同様に、第 5 層のマーカーである Ctip2 の局在が雄の胎生期曝露群で本来定着する層よりも深層に位置していた (Fig.15)。新生仔期で確認された形態影響が成熟後の脳においてもみられたことから、胎生期での影響が固定され、修復されずに成熟期に至った可能性が考えられた。

脳皮質は不安関連行動との関与が報告されており (Weisstaub et al., 2006; Mark J., 2003)、胎生期 Dfen 曝露マウスは成熟後も脳皮質で形態影響が認められたことから、行動への影響も疑われた。そこで、本研究 3 章で構築した解析系を用いて、胎生期 Dfen 曝露マウス

の成熟後の行動影響を検討した。行動解析の結果、胎生期における単回の Dfen 曝露が、雄個体の成熟後の不安関連行動に影響をおよぼすことが明らかになった (Table.3)。また、雌の胎生期曝露群では成熟後の有意な行動影響がみられなかったことから、胎生期 Dfen 曝露の成熟後の行動影響には雌雄差が存在することが示唆された。これまでの結果から、雄の胎生期曝露群でみられた行動変化に大脳皮質が関与している可能性が考えられた。また、その要因として、胎生期における神経細胞の増殖/移動不全が示唆された。

本章の結果から、胎生期で受けた影響により生じた変異が成熟期まで固定され、行動変化として表出したことが示唆された。

第 4 章 付図

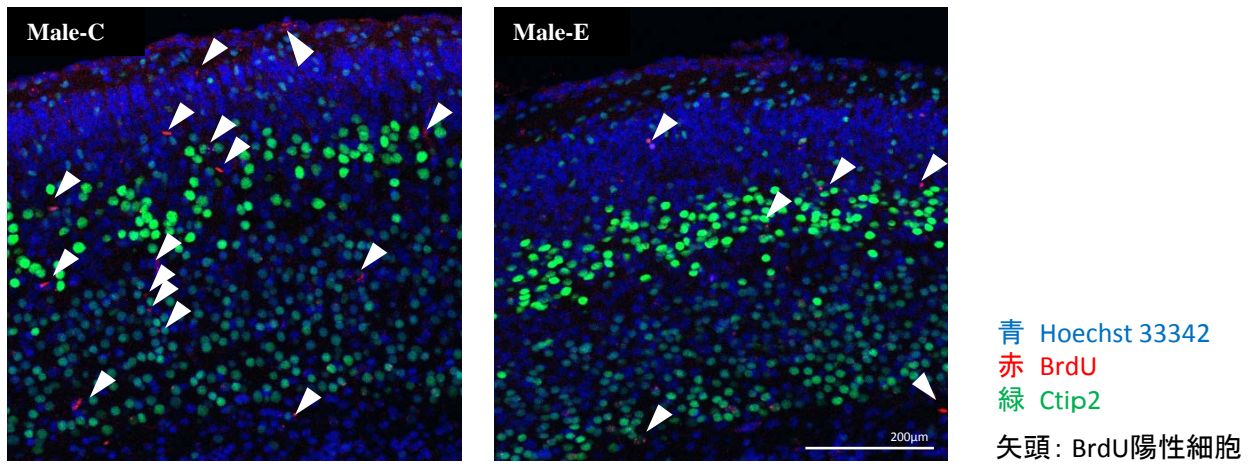


Figure 12. 新生仔大脳皮質におけるBrdU陽性細胞の局在

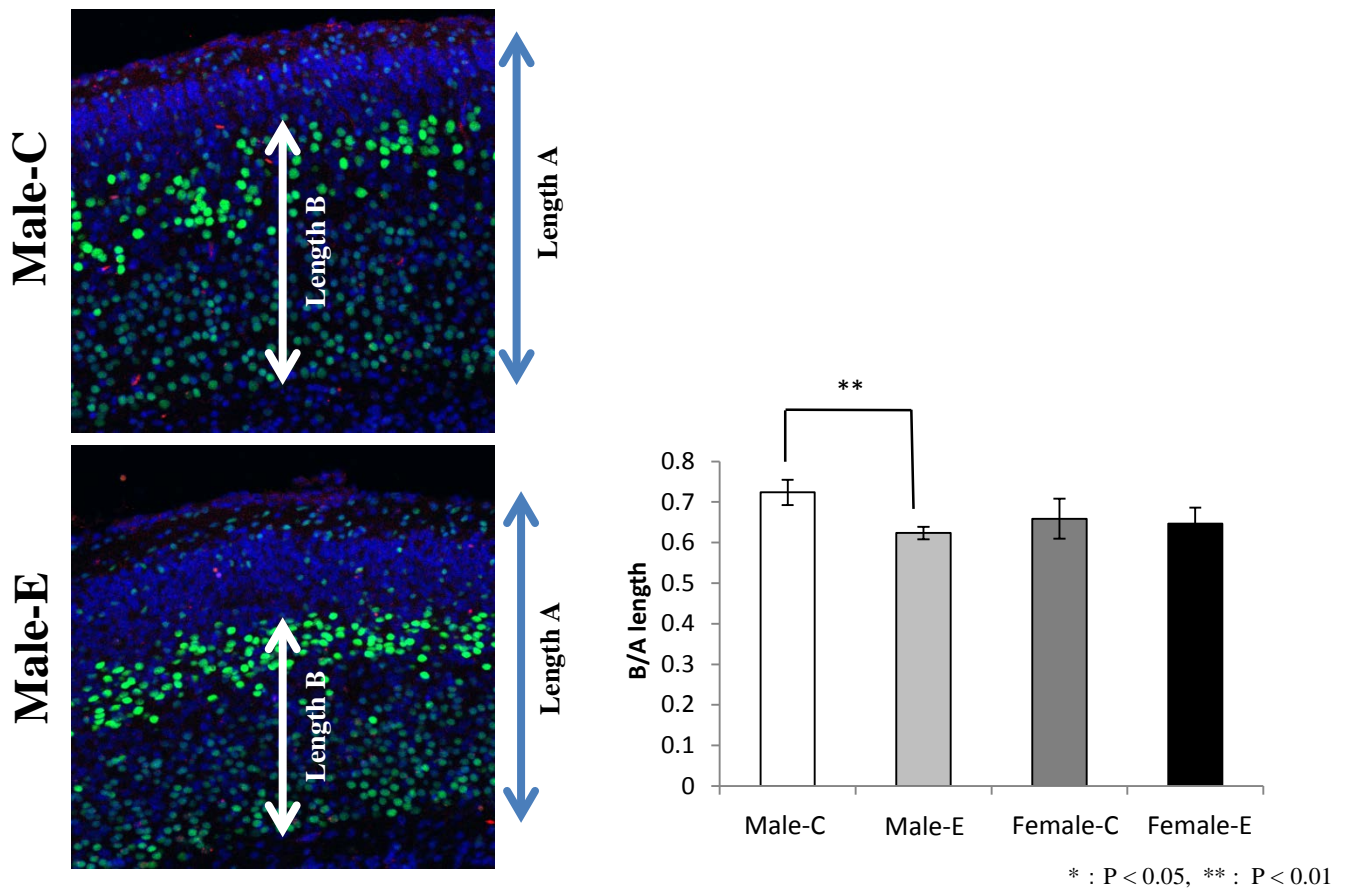


Figure 13. 新生仔大脳皮質におけるCtip2陽性細胞の局在

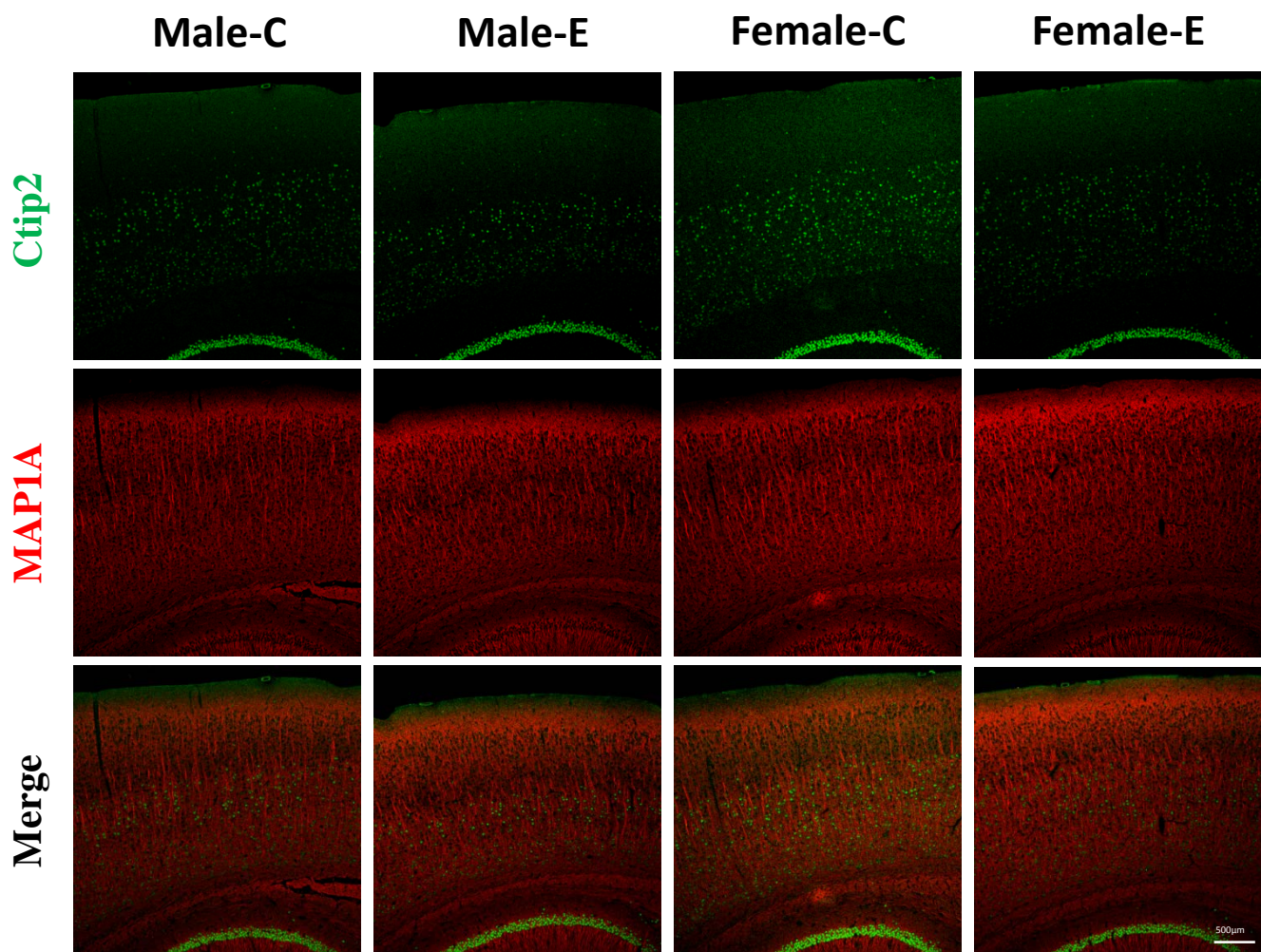
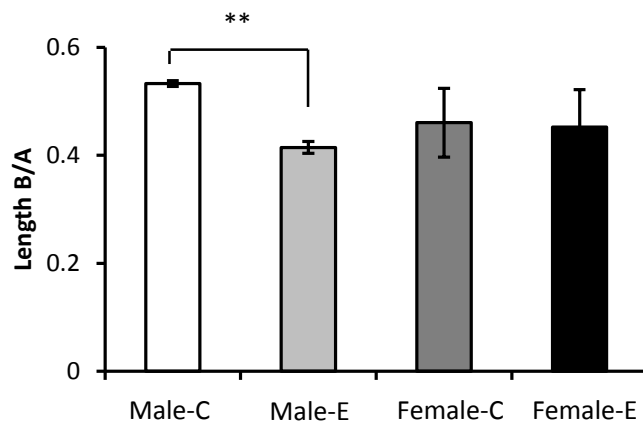
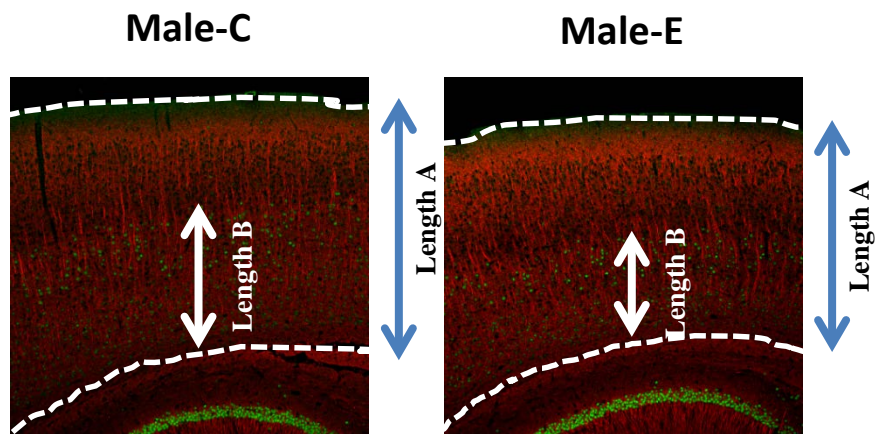


Figure 14. 大脳皮質における免疫組織化学



* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$

Figure 15. 大脳皮質におけるCtip2陽性細胞の局在

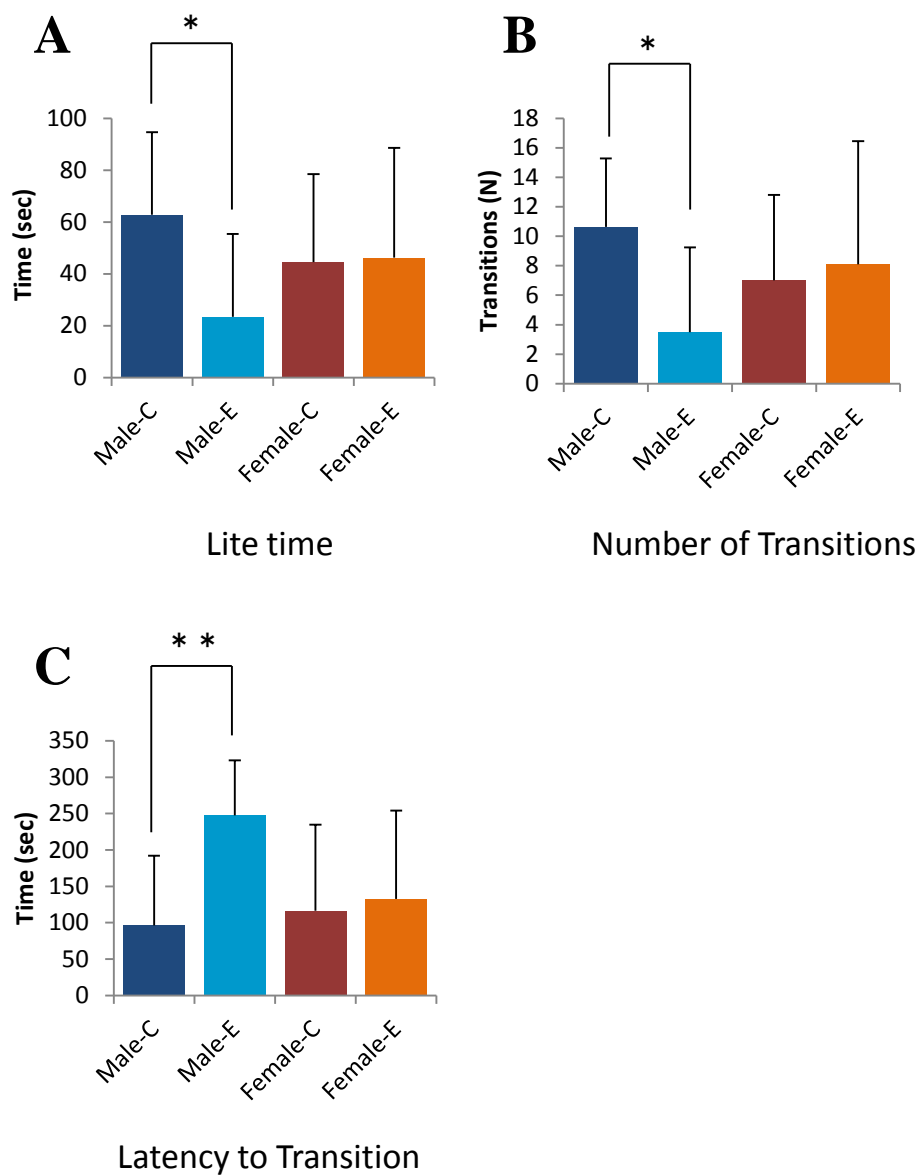


Figure 16. 明暗往来試験の結果

A: 明室滞在時間、B: 転室回数、C: 暗室待機時間。*: $P > 0.05$, **: $P > 0.01$, mean \pm S.D. (n = 8)

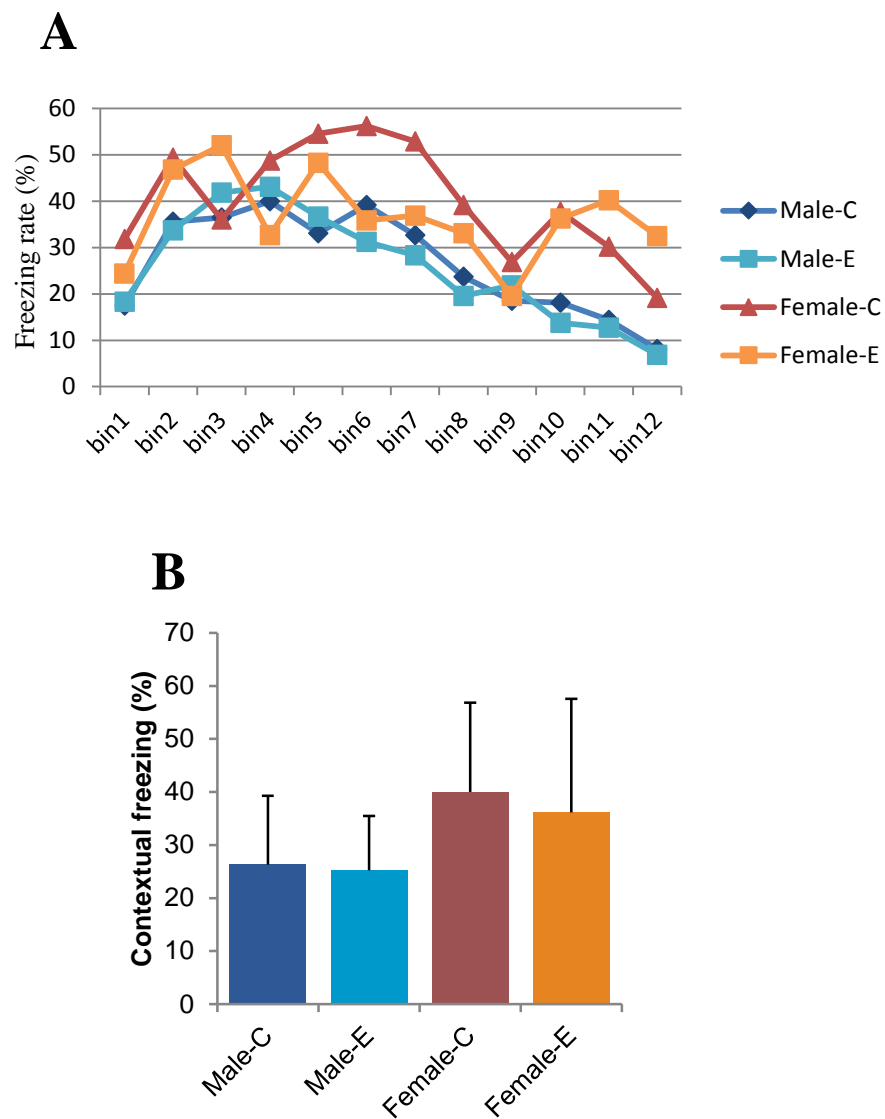


Figure 17. 条件付け学習記憶試験における空間連想時のフリージング率

A: コントロール群と投与群のフリージング率の経時的変化、B: 空間連想試験における総 Freezing rate の比較。bin = 30秒。

* : $P > 0.05$, ** : $P > 0.01$, mean \pm S.D. (n = 8)

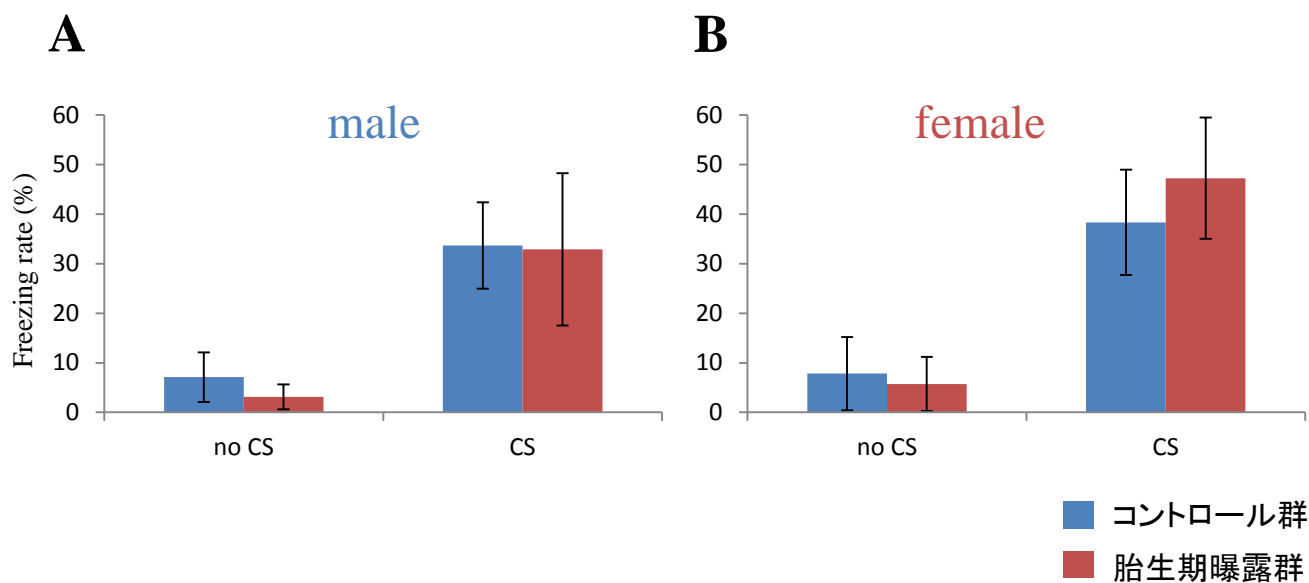


Figure 18. 条件付け学習記憶試験における音連想時のフリージング率

音連想試験における音刺激曝露前後のFreezing rateの比較。

A: 雄個体での結果、B: 雌個体での結果。no CS: 探索時間、CS: 音刺激曝露時間。

* : $P > 0.05$, ** : $P > 0.01$, mean \pm S.D. (n = 8)

Table 3. 行動解析結果の概要

Behavioral task/Indices	male	female
Body weight	ns	ns
Open field test		
distance traveled	ns	ns
time center	ns	ns
move episode N	ns	ns
Light-dark box test		
distance traveled	↓	ns
distance dark	ns	ns
distance light	↓	ns
time light	↓	ns
No. of transition	↓	ns
first latency to enter dark	↑↑	ns
Classical fear conditioning		
conditioning	ns	ns
context test	ns	ns
cued test	ns	ns

↑: $P < 0.05$, ↑↑: $P < 0.01$

第 5 章

総括

本研究では、ブタ卵母細胞体外成熟培養系を用いて細胞質中に存在する脂肪滴の局在に着目し、その役割を検討するとともに、ネオニコチノイド系農薬の1つであるアセタミプリドのブタ卵母細胞への影響について評価した。また、雌雄差を検出可能な行動解析系を構築し、成熟期マウスへのアセタミプリド投与による行動影響について解析した。さらに、構築した解析系を用いて化学物質の胎生期曝露による成熟後の中枢影響についてモデル化学物質としてセロトニン受容体のアゴニストを用いて検討した。得られた結果は以下のとおりである。

ブタ卵母細胞の体外成熟培養におけるアセタミプリドの影響

近年、ネオニコチノイド農薬の曝露によってラットの卵巣において、過酸化脂質の割合が有意に増加することが報告され、ブタの卵母細胞では過酸化脂質の元となるトリグリセリドが他の動物種と比較して多量に含まれることが知られていることから、ネオニコチノイド農薬はブタ卵母細胞にも影響を及ぼすことが考えられた。しかし、ブタ卵母細胞におけるトリグリセリドについては報告が少なく、その役割については不明な点が残されている。そのため本章では、ブタ卵細胞質内のトリグリセリドの分布に着目し、その役割を検討するとともに、ネオニコチノイド農薬がブタ卵母細胞におよぼす影響を解析した。ブタ未成熟卵母細胞を裸化し、ナイルレッドで染色したところ、実体顕微鏡下で観察された細胞質中の黒色顆粒が全て染色され、黒色

顆粒はトリグリセリドを含む脂肪滴であり、ブタ未成熟卵母細胞の細胞質には脂肪滴が万遍なく分布していることが明らかになった (Fig.1)。また、ブタ未成熟卵母細胞を体外成熟培養後に裸化し、細胞質中の脂肪滴の分布様式を観察したところ、脂肪滴の分布様式が卵母細胞によって異なっており、2つのクラス (class I, class II) に分類できることが明らかとなった (Fig.2)。体外成熟培養後の卵母細胞を脂肪滴分布様式毎に分類し、各クラスの割合を計測したところ、class I (27.3%) と class II (72.7%) の間で有意な差が認められ、体外成熟後の卵母細胞の脂肪滴分様式において、各クラスの割合が異なることが判明した (Fig.3)。次に脂肪滴分布様式と胚発生能との関連を調べるため、class I と class II の分布様式を示した体外成熟卵をそれぞれ体外受精に供試し、発生率を調べたところ、class II において class I と比較して有意に高い値が認められた (Table.1)。これまでの実験により、トリグリセリドがブタ卵母細胞の成熟・発生に重要であることが示唆された。そこで次にブタ卵母細胞体外成熟におけるネオニコチノイド系農薬の影響を検討するため、体外成熟培地にネオニコチノイド系農薬のアセタミプリドを添加し、成熟率を比較した。卵母細胞の核成熟率は、control に対して、10ppm 添加群で有意な差は見られなかった。しかし、30ppm 添加群では、control と比較して、核成熟率の有意な低下 ($p < 0.05$) が観察され、100ppm 添加群においても、核成熟率の有意な低下 ($p < 0.01$) が観察された (Fig.4)。本章の

結果より、アセタミプリドがブタ卵母細胞の成熟に影響を及ぼすことが明らかになった。

成熟マウスへの神経作動性化学物質曝露による行動影響解析系の構築

ネオニコチノイドは哺乳類の中樞神経系に作用を示すことから、行動への影響も疑われた。しかし、哺乳類家畜における脳高次機能を含めた行動影響解析の報告は少なく、安定した解析系があるとは言えない。そのため本研究では、行動影響の評価法として多数の報告がある齧歯類を用いた行動解析を選択した。一般に、行動解析を用いた報告の多くは、雌ではデータのバラツキが大きくなるため、基本的に雄のみの報告が大部分を占めている。しかし、畜産分野への応用を考慮した場合、家畜はその種ごとに性別によってそれぞれ重要な役割をもつため、雌個体の影響も検出可能な解析系が必要である。そこで、脳高次機能进行评估できる行動試験の内、検出精度の高い試験を組み合わせた行動テストバッテリーを構築し (Fig.5)、実際に行動影響とその雌雄差を検出可能な成熟期のマウスにネオニコチノイドを投与して検討した。オープンフィールド試験の結果、移動距離、移動時間、移動回数などの項目においてコントロール群と投与群で有意な差はみられなかった (Fig.7)。明暗往来試験の結果、明室での滞在時間はコントロールに比べ雌雄どちらの投与群でも有意に低下した (Fig.8B)。一方、他の項目すなわち明室移動距離、転室回数、暗室潜在時間などで

は、雌はコントロールと投与群の間に有意な差がみられたが、雄では見られなかった (Fig.8)。条件付け学習記憶試験の結果、空間連想試験および音連想試験の両方において雄では投与群でフリーズングが有意に低下したが、雌では有意な差はみられなかった (Fig.10, 11)。複数の行動試験の結果から、雄の投与群では学習記憶への影響が、雌の投与群では不安関連行動の逸脱がみられた (Table.2)。以上の結果から、本実験で構築したバッテリー試験によって化学物質曝露による遅発中枢影響の雌雄差を検出することができた。

胎生期セロトニン受容体過剰刺激による成熟後の中枢影響解析

成熟期と比較して、胎生期は化学物質に対する耐性や感受性、脳における受容体の発現パターンが異なると考えられ、曝露影響が成熟期と同一とは限らない。そのため、成熟期とは別に胎生期曝露影響の解析とそのメカニズムを検討することは重要である。胎生期に内分泌かく乱物質に曝露された個体のうち出生に至った産仔は成熟後に行動影響を示すことが報告されており、ネオニコチノイドのように受容体に作用する化学物質においても、胎生期曝露による成熟後の行動影響が疑われる。しかし、農薬は標的受容体以外への作用や受容体に対してアゴニスト・アンタゴニスト両方の作用を示す可能性があり、詳細な説明は難しい。近年、マウスは胎生初期において、胎仔の脳発達に胎盤からの 5-HT を利用していることが報告され、この時期の胎仔脳は

外来性の 5-HT に感受性が高いことが考えられた。脳内における 5-HT 受容体は 1950 年代から研究されており、マウス胎仔期における受容体発現パターンについても詳細な報告が存在する。このことから、モデル化学物質として 5-HT 受容体のアゴニストを選択し、胎生期 5-HT 受容体過剰刺激による影響を解析した。胎生期の 5-HT 刺激による脳への形態影響を検討するため、妊娠 11.5 日齢に 5-HT 受容体のアゴニストである Dfen (7.7 mg/kg) と、BrdU (増殖した細胞のマーカー) を腹腔内投与し、生後 0 日の新生仔から脳切片を作成し免疫組織化学により形態影響を検討した。結果、大脳皮質において BrdU 陽性細胞の減少および局在変化が認められ、大脳皮質の層構造マーカーの一つである Ctip2 陽性細胞の局在が雄のコントロール群と投与群で異なっていることが明らかになった。次に成熟後の形態影響を検討するため、胎生期に Dfen 投与後、13 週齢時に脳を摘出し、免疫組織化学を用いて形態解析を行った。結果、大脳皮質において Ctip2 陽性細胞が本来定着する層よりも深層に位置しており、新生仔脳と同様に雄でのみ有意な差がみられた。大脳皮質は不安関連行動との関与が報告されており、胎生期 Dfen 曝露マウスは成熟後も大脳皮質で形態影響が認められたことから、行動への影響も疑われた。成熟後の行動への影響を検討するため、胎生期に投与後、12 週齢時に第 3 章と同様のバッテリー試験を行った。結果、オープンフィールド試験では有意な差はみられなかったが、明暗往来試験で雄でのみ、明室滞

在時間、転室回数、明室への初移動までに要する時間においてコントロール群と投与群で有意な差がみられた (Fig.16)。条件付け学習記憶試験では空間連想記憶および音連想記憶どちらの項目においても有意な差はみられなかった (Fig.17, 18)。バッテリー試験の結果から、雌では大きな変化は見られなかったが、雄の胎生期曝露群で不安関連行動の逸脱がみられた (Table.3)。これまでの結果から、雄の胎生期曝露群でみられた行動変化に大脳皮質が関与している可能性が考えられた。また、その要因として、胎生期における神経細胞の増殖/移動不全が示唆された。本章の結果から、胎生期で受けた影響により生じた変異が成熟期まで固定され、行動変化として表出したことが示唆された。

以上の結果から、本研究では以下のことを明らかにした。

本研究 2 章より、ブタ未成熟卵母細胞において脂肪滴が細胞質中に万遍なく分布していること、その分布が体外成熟後に変化することを明らかにした。また、脂肪滴の分布様式によって成熟卵を 2 つのクラスに分類でき、その分布様式によって体外受精後の発生率が異なることを示した。さらに、ネオニコチノイド系農薬アセタミプリドを曝露により、ブタの卵母細胞の成熟率が濃度依存的に低下することが明らかにした。成熟率低下の要因として、アセタミプリド曝露が脂質の酸

化を促し、細胞質内に酸化ストレス作用をもつ過酸化脂質を増加させたことが考えられた。以上のことから、ブタは他の動物種よりもネオニコチノイド系農薬による悪影響を受けやすいことが推察された。

本研究 3 章より、家畜への応用を考慮し、脳高次機能への影響とその雌雄差をも検出可能なマウスを用いた行動解析系を構築し、その解析系を用いて成熟期マウスのアセタミプリド曝露が行動影響を有すること、その影響に雌雄差が存在し、雄では学習記憶能の低下、雌では不安関連行動の逸脱がみられることを明らかにした。

本研究 4 章より、モデル化学物質として 5-HT アゴニストを使用して、胎生期曝露による成熟後の中枢影響解析を行った。この結果から、哺乳類の胎生期における 5-HT 受容体過剰刺激による影響は固定され、単回であっても成熟後の行動に影響し、そこに雌雄差が存在することが示唆された。

本研究により、ブタの卵母細胞にとって細胞質中の脂質が重要であり、それ故、他の哺乳類と比較してアセタミプリドの悪影響を受けやすいことが示唆された。また、アセタミプリドは受容体を介して作用することで、記憶や不安といった脳高次機能を含めた哺乳類の行動にも影響を及ぼすことが明らかとなった。さらに、5-HT アゴニストを

用いた実験により、哺乳類の胎生期における受容体を介した神経シグナル攪乱による影響は固定され、単回であっても成熟後の行動に影響をおよぼし得ることが明らかになった。農薬、特に殺虫剤にはアセタミプリド以外にも受容体を標的とするものが数多く存在し、大気・土壌・地下水から直接、あるいは飼料や飲料水を通して家畜に曝露される可能性がある。本研究の結果より、環境中の化学物質曝露は、家畜の繁殖機能および中枢機能への影響を介して生産性に悪影響を及ぼす恐れが考えられるため、飼養の最適化やそれに伴う効率的な畜産経営の為には、畜産現場におけるより詳細な化学物質のリスク管理が必要であると考えられる。また、その際に曝露時期による影響の違いや雌雄における影響の違いを考慮に入れることが重要である。

本研究が進み、胎生期曝露による成熟後の中枢影響の詳細なメカニズムが体系化されれば、農学領域において時期および受容体特異的な化学物質の投与により家畜の行動制御や気質の改良を通じて生産性の向上に貢献できる可能性が期待される。

引用文献

Newbold RR, Jefferson WN, Padilla-Banks E, Haseman J. Developmental exposure to diethylstilbestrol (DES) alters uterine response to estrogens in prepubescent mice: low versus high dose effects. *Reprod Toxicol*. 2004 May;18(3):399-406.

Kim H1, Nakajima T, Hayashi S, Chambon P, Watanabe H, Iguchi T, Sato T. Effects of diethylstilbestrol on programmed oocyte death and induction of polyovular follicles in neonatal mouse ovaries. *Biol Reprod*. 2009 Nov;81(5):1002-9. doi: 10.1095/biolreprod.108.070599. Epub 2009 Jun 24.

Navarro VM, Tena-Sempere M. Neuroendocrine control by kisspeptins: role in metabolic regulation of fertility. *Nat Rev Endocrinol*. 2011 Sep 13;8(1):40-53. doi: 10.1038/nrendo.2011.147.

Jin JM, Yang WX. Molecular regulation of hypothalamus-pituitary-gonads axis in males. *Gene*. 2014 Nov 1;551(1):15-25. doi: 10.1016/j.gene.2014.08.048. Epub 2014 Aug 26.

Pocar P, Fiandanese N, Secchi C, Berrini A, Fischer B, Schmidt JS, Schaedlich K, Rhind SM, Zhang Z, Borromeo V. Effects of polychlorinated biphenyls in CD-1 mice: reproductive toxicity and

intergenerational transmission. *Toxicol Sci.* 2012

Mar;126(1):213-26. doi: 10.1093/toxsci/kfr327. Epub 2011 Dec 7.

Lee DW¹, Notter SA, Thiruchelvam M, Dever DP, Fitzpatrick R, Kostyniak PJ, Cory-Slechta DA, Opanashuk LA. Subchronic polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) exposure produces oxidative damage and neuronal death of ventral midbrain dopaminergic systems. *Toxicol Sci.* 2012 Feb;125(2):496-508. doi: 10.1093/toxsci/kfr313. Epub 2011 Nov 17.

Sugawara N, Nakai K, Nakamura T, Ohba T, Suzuki K, Kameo S, Satoh C, Satoh H. Developmental and neurobehavioral effects of perinatal exposure to polychlorinated biphenyls in mice. *Arch Toxicol.* 2006 May;80(5):286-92. Epub 2005 Oct 22.

Zhang SY, Ito Y, Yamanoshita O, Yanagiba Y, Kobayashi M, Taya K, Li C, Okamura A, Miyata M, Ueyama J, Lee CH, Kamijima M, Nakajima T. Permethrin may disrupt testosterone biosynthesis via mitochondrial membrane damage of Leydig cells in adult male mouse. *Endocrinology.* 2007 Aug;148(8):3941-9. Epub 2007 Apr 26.

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.* e32432. doi: 10.1371

Vrsanská S, Nagyová E, Mlynarcíková A, Ficková M, Kolena J. Components of cigarette smoke inhibit expansion of oocyte-cumulus complexes from porcine follicles. *Physiol Res*. 2003;52(3):383-7.

Liu Y1, Li GP, Rickords LF, White KL, Sessions BR, Aston KI, Bunch TD. Effect of nicotine on in vitro maturation of bovine oocytes. *Anim Reprod Sci*. 2008 Jan 15;103(1-2):13-24. Epub 2006 Nov 26.

Kapoor U, Srivastava MK, Srivastava LP. Toxicological impact of technical imidacloprid on ovarian morphology, hormones and antioxidant enzymes in female rats. *Food Chem Toxicol*. 2011 Dec;49(12):3086-9. doi: 10.1016/j.fct.2011.09.009. Epub 2011 Sep 16.

Herman AI, Sofuoglu M. Cognitive effects of nicotine: genetic moderators. *Addict Biol*. 2010 Jul;15(3):250-65. doi: 10.1111/j.1369-1600.2010.00213.x. Epub 2010 Apr 29.

Rodrigues KJ, Santana MB, Do Nascimento JL, Picanço-Diniz DL, Maués LA, Santos SN, Ferreira VM, Alfonso M, Durán R, Faro LR. Behavioral and biochemical effects of neonicotinoid thiamethoxam on the cholinergic system in rats. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2010 Jan;73(1):101-7.

GADDUM JH, PICARELLI ZP. Two kinds of tryptamine receptor. *Br J Pharmacol Chemother*. 1957 Sep;12(3):323-8.

Bonnin A, Peng W, Hewlett W, Levitt P. Expression mapping of 5-HT₁ serotonin receptor subtypes during fetal and early postnatal mouse forebrain development. *Neuroscience*. 2006 Aug 25;141(2):781-94. Epub 2006 Jul 7.

Winczura A, Zdżalik D, Tudek B. Damage of DNA and proteins by major lipid peroxidation products in genome stability. *Free Radic Res*. 2012 Apr;46(4):442-59. doi: 10.3109/10715762.2012.658516. Epub 2012 Feb 22. Review.

Sturmey RG, Reis A, Leese HJ, McEvoy TG. Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. *Reprod Domest Anim*. 2009 Sep;44 Suppl 3:50-8. doi: 10.1111/j.1439-0531.2009.01402.x. Review.

Quinn P, Barros C, Whittingham DG. Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 1982 Sep;66(1):161-8.

Xiang-Wei Fu, Guo-Quan Wu, Jun-Jie Li, Yun-Peng Hou, Guang-Bin Zhou, Lun-Suo, Yan-Ping Wang, Shi-En Zhu. Positive

effects of Forskolin (stimulator of lipolysis) treatment on cryosurvival of in vitro matured porcine oocytes. *Theriogenology* 2011; 75: 268-275.

Kikuchi K, Onishi A, Kashiwazaki N, Iwamoto M, Noguchi J, Kaneko H, Akita T, Nagai T. Successful piglet production after transfer of blastocysts produced by a modified in vitro system. *Biol Reprod* 2002; 66: 1033–1041.

Suzuki K, Asano A, Eriksson B, Niwa K, Nagai T, Rodriguez-Martinez H. Capacitation status and in vitro fertility of boar spermatozoa: effects of seminal plasma, cumulus-oocyte-complexes-conditioned medium and hyaluronan. *Int J Androl.* 2002 Apr;25(2):84-93.

Kikuchi K, Nagai T, Kashiwazaki N, Ikeda H, Noguchi J, Shimada A, Soloy E, Kaneko H. Cryopreservation and ensuing in vitro fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4 degrees C. *Theriogenology.* 1998 Sep;50(4):615-23.

Sturmey RG, Leese HJ. Energy metabolism in pig oocytes and early embryos. *Reproduction.* 2003 Aug;126(2):197-204.

Sturmey RG, O'Toole PJ, Leese HJ. Fluorescence resonance energy transfer analysis of mitochondrial:lipid association in the porcine oocyte. *Reproduction*. 2006 Dec;132(6):829-37.

Gutteridge JM. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Interact*. 1994 Jun;91(2-3):133-40.

Takahashi T, Takahashi E, Igarashi H, Tezuka N, Kurachi H. Impact of oxidative stress in aged mouse oocytes on calcium oscillations at fertilization. *Mol Reprod Dev*. 2003 Oct;66(2):143-52.

Yazaki T, Hiradate Y, Hoshino Y, Tanemura K, Sato E. L-carnitine improves hydrogen peroxide-induced impairment of nuclear maturation in porcine oocytes. *Anim Sci J*. 2013 May;84(5):395-402. doi: 10.1111/asj.12016. Epub 2012 Dec 17.

Wu GQ, Jia BY, Li JJ, Fu XW, Zhou GB, Hou YP, Zhu SE. L-carnitine enhances oocyte maturation and development of parthenogenetic embryos in pigs. *Theriogenology*. 2011 Sep 15;76(5):785-93. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.04.011. Epub 2011 Jun 25.

Sakatani S, Yamada K, Homma C, Munesue S, Yamamoto Y, Yamamoto H, Hirase H. Deletion of RAGE causes hyperactivity and

increased sensitivity to auditory stimuli in mice. PLoS One. 2009 Dec 15;4(12):e8309. doi: 10.1371/journal.pone.0008309.

Taira K. Health effects of neonicotinoid insecticides. Jpn J Clin Ecol. 2012; 21(1): 24-34.

Food Safety Commission of Japan (食品安全委員会). 農薬評価書 アセタミプリド. 2008 Aug.

<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2008/12/dl/s1209-9h.pdf>

* 最新版：農薬評価書 アセタミプリド (第3版).

<https://www.fsc.go.jp/fsciis/attachedFile/download?retrievalId=kya20140702188&fileId=201>.

United States Environmental Protection Agency. Pesticide Fact Sheet, Acetamiprid. 2002 Mar 15.

https://www.google.co.jp/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CCQQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.epa.gov%2Fpesticides%2Fchem_search%2Freg_actions%2Fregistration%2Ffs_PC-099050_15-Mar-02.pdf&ei=nffFVM67DIPWmAWRzYH4AQ&usg=AFQjCNFNgnWzKpHFsTkBEIjh2cGVBwd4w&sig=2=21DBgGZIqw1LB_GsqyqXKQ&bvm=bv.84349003,d.dGY.

Descarries L, Gisiger V, Steriade M. Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. Prog Neurobiol. 1997 Dec;53(5):603-25.

Gray R, Rajan AS, Radcliffe KA, Yakehiro M, Dani JA. Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. *Nature*. 1996 Oct 24;383(6602):713-6.

Wonnacott S. Presynaptic nicotinic Ach receptors. *Trends Neurosci* 1997; 20: 92-98.

Berger-Sweeney J, Arnold A, Gabeau D, Mills J. Sex differences in learning and memory in mice: effects of sequence of testing and cholinergic blockade. *Behav Neurosci* 1995;109:859–73.

Voyer D, Voyer S, Bryden MP. Magnitude of sex differences in spatial abilities: a meta-analysis and consideration of critical variables. *Psychol Bull* 1995;117:250–70.

Donny EC, Caggiula AR, Rowell PP, Gharib MA, Maldovan V, Booth S, Mielke MM, Hoffman A, McCallum S. Nicotine self-administration in rats: estrous cycle effects, sex differences and nicotinic receptor binding. *Psychopharmacology (Berl)*. 2000 Sep; 151(4):392-405.

Rhodes ME, O'Toole SM, Czambel RK, Rubin RT. Male-female differences in rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to nicotine stimulation. *Brain Res Bull*. 2001 Apr;54(6):681-8.

Mufson EJ, Cai WJ, Jaffar S, Chen E, Stebbins G, Sendera T, Kordower JH. Estrogen receptor immunoreactivity within subregions of the rat forebrain: neuronal distribution and association with perikarya containing choline acetyltransferase. *Brain Res.* 1999 Dec 4; 849(1-2):253-74.

Kitamura N, Araya R, Kudoh M, Kishida H, Kimura T, Murayama M, Takashima A, Sakamaki Y, Hashikawa T, Ito S, Ohtsuki S, Terasaki T, Wess J, Yamada M. Beneficial effects of estrogen in a mouse model of cerebrovascular insufficiency. *PLoS One.* 2009;4(4):e5159.

Bonnin A, Goeden N, Chen K, Wilson ML, King J, Shih JC, Blakely RD, Deneris ES, Levitt P. A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain. *Nature.* 2011 Apr 21;472(7343):347-50. doi: 10.1038/nature09972.

Schatzberg AF. New indications for antidepressants. *J Clin Psychiatry.* 2000;61 Suppl 11:9-17.

Weisstaub NV, Zhou M, Lira A, Lambe E, González-Maeso J, Hornung JP, Sibille E, Underwood M, Itohara S, Dauer WT, Ansorge MS, Morelli E, Mann JJ, Toth M, Aghajanian G, Sealton SC, Hen R, Gingrich JA. Cortical 5-HT_{2A} receptor signaling modulates

anxiety-like behaviors in mice. *Science*. 2006 Jul
28;313(5786):536-40.

Mark J. Psychopharmacology plus psychotherapy for depression
treatment. *Psychiatr Serv*. 2003 Jul;54(7):1042; author reply
1042-3.

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究を通じて終始懇切な御指導を頂いた東北大学大学院農学研究科応用生命科学専攻動物生殖科学分野教授、種村健太郎博士に心より御礼申し上げます。

また本研究の遂行にあたり、ご指導および御助言を頂いた当分野前教授、佐藤英明博士に深く感謝致します。

また、本論文をまとめるにあたり、有益な御助言を賜りました東北大学農学研究科 機能形態学分野 麻生久教授ならびに動物栄養生化学分野 豊水正昭教授に深く感謝致します。

当分野においてご指導を頂きました当分野助教、星野由美博士、平舘裕希博士に厚く御礼申し上げます。

実験材料であるブタ卵巣の採取にあたりご協力頂いた仙台中央食肉卸売市場株式会社に深く感謝いたします。

博士前期課程修了まで無事に迎えることができたのは、公私にわたって支えてくださった本講座の先輩ならびに後輩諸氏の御助力の賜物であり、心より御礼申し上げます。