



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Establishment of a highly sensitive detection method for neurotransmission disturbances and elucidation of neurotoxicity mechanism, using neonicotinoids as model compounds [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	平井, 杏梨
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第16469号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95484
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Anri_Hirai_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨
Abstract of the dissertation

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：平 井 杏 梨
Name

学位論文題名
The title of the doctoral dissertation

Establishment of a highly sensitive detection method for
neurotransmission disturbances and elucidation of neurotoxicity
mechanism, using neonicotinoids as model compounds
(ネオニコチノイドをモデルとした、神経伝達攪乱の高感度検出法の
確立と神経毒性メカニズムの解明)

ヒトは、職業的に化学物質を扱わない場合でも、日用品や食品、環境などを通じて日常的に様々な化学物質に曝露されている。疫学研究によれば、こうした化学物質への曝露がパーキンソン病やアルツハイマー病といった精神疾患に関与する可能性が示唆されている。しかし、これらの知見はリスク管理への十分な活用には至っておらず、化学物質のリスク評価における重要なフレームワークである有害性発現経路（AOP）に関するデータの蓄積が求められている。また、ネオニコチノイド系農薬（NNs）を含む一部の化学物質は、病理組織学的な変化を伴わないような低濃度でも、神経情報伝達の攪乱によって情動認知行動に影響を及ぼす可能性があるが、現行の神経毒性試験法ではこうした影響を検出することは困難である。特にNNsは、世界中で広く使用されている農薬であるにもかかわらず、神経系への影響やその機序については十分に解明されていない。本研究では、NNsの一種であるアセタミプリド（ACE）とイミダクロプリド（IMI）に焦点を当て、AOPの複数のレベルにわたる知見を提供することで、これらのNNsが情動認知行動に影響を与えるメカニズムを解明するとともに、神経伝達攪乱の高感度検出を試みた。

まず、*Chapter 1*では、ACEがマウスの不安様行動に与える影響と、脳および血漿中のACE濃度を評価した。その結果、無毒性量（NOAEL）レベルのACEが高架式十字迷路試験（EPM）において不安様行動を誘発すること、さらに経口投与から1時間後にACEが海馬や線状体などの脳領域に移行することが示された。この結果は、ACEの神経毒性作用を解明するためのさらなる研究の必要性を強調している。

*Chapter 2*では、IMIおよびACEのモノアミン神経伝達物質（MAs）に対する影響を調べるとともに、この影響が不安様行動に関連するかどうかを明らかにした。まず*Chapter 2-1*において、LC/MS/MS分析によりMAsを高感度で検出するための誘導体

化条件を検討した。検討した条件でMAs分析を実施したところ、NOAELレベルのIMIが嗅球のドーパミンや線条体のセロトニンを減少させることが明らかとなり、低濃度のNNsでもMAsを変化させる可能性が示唆された。*Chapter 2-2*では、MAsの変化と不安様行動について相関解析を実施した。その結果、ACEが海馬のセロトニンと線条体のドーパミンレベルを増加させ、これは投与後30分の不安様行動と相関していることが示された。さらに、海馬などの前脳領域に投射するセロトニン作動性神経の大半が起始することが知られている背側縫線核（DRN）について、抗セロトニン染色を行ったところ、セロトニン産生の増加が観察された。これらの結果から、ACE誘発性の不安様行動にセロトニン作動性経路が関与している可能性が示唆された。

*Chapter 3*では、二光子顕微鏡を用いた生体内Ca²⁺イメージングを実施し、*Chapter 1*で行動に影響を及ぼさなかった濃度のACEが、覚醒下で体性感覚野の神経活動を変化させることを明らかにした。この結果は、二光子顕微鏡により、従来の毒性試験では検出できない神経毒性影響を検出できることを示している。

最後に*Chapter 4*では、活性化細胞を赤色蛍光タンパクtdTomatoで標識するように設計された遺伝子組換えマウスであるArc^{CreER};Ai14マウスを用いて、ACEの投与により神経活動が亢進した脳領域をスクリーニングした。その結果、主に不安や行動に関連する脳領域である体性感覚野、中隔核、扁桃核、下丘において、神経活動が増加する傾向が観察された。これらの脳領域はDRNからのセロトニン支配を受けることも知られており、ACEの神経毒性においてセロトニン系が重要な役割を果たす可能性が改めて示唆された。このアプローチを染色や質量分析イメージングなどの技術と組み合わせることで、毒性メカニズムのさらなる解明に大きく寄与できると考えられる。

以上の結果から、ACEによる神経毒性のメカニズムとして、DRNのセロトニン作動性神経が活性化され、これが海馬などのセロトニン経路を通じて不安様行動を誘発する、という仮説が提案された。本研究は、病理組織学的変化を伴わない神経情報伝達の攪乱を検出し、そのメカニズムを解明するためには、AOPの複数のレベルにわたる知見を統合することが重要であることを示している。今後、本研究で使用した二光子顕微鏡やArc^{CreER};Ai14マウスなど、毒性学分野でいまだ活用されていない技術も組み合わせながらAOPの複数のレベルにおける影響を調べることで、神経毒性のメカニズムを明らかにし、有用なバイオマーカーの発見などにつなげていく必要がある。本研究で得られた知見は、NNsによる神経毒性への理解を深めるとともに、高感度な神経毒性試験法の確立に貢献することが期待される。