

# ネオニコチノイド系農薬による 母性行動への継世代影響

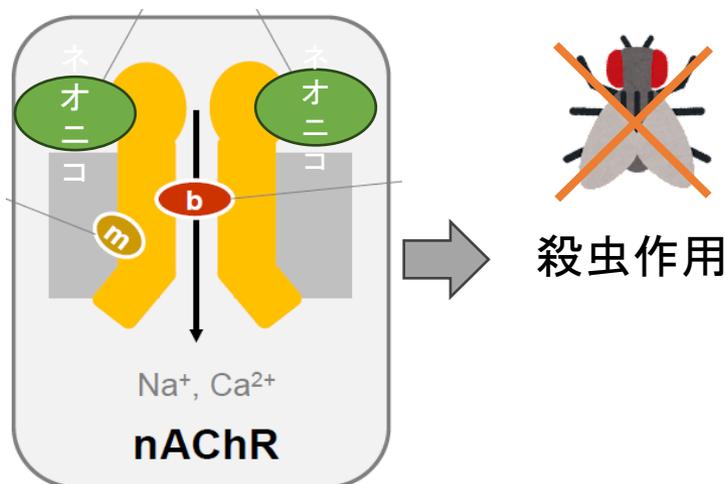
神戸大学大学院 農学研究科

動物分子形態学分野

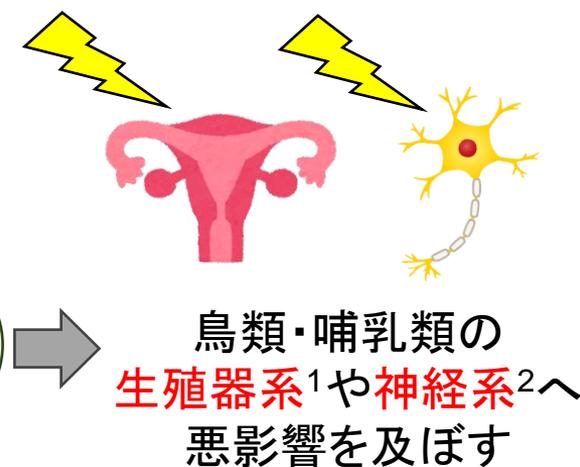
星 信彦

# 緒言

## ■ ネオニコチノイド系農薬(ネオニコ)



[IRAC資料: 殺虫剤作用機序より引用]



[1)Hirano *et al.*, 2015; Hoshi *et al.*, 2014; Kitauchi *et al.*, 2021; Tokumoto *et al.*, 2014; Yanai *et al.*, 2017]

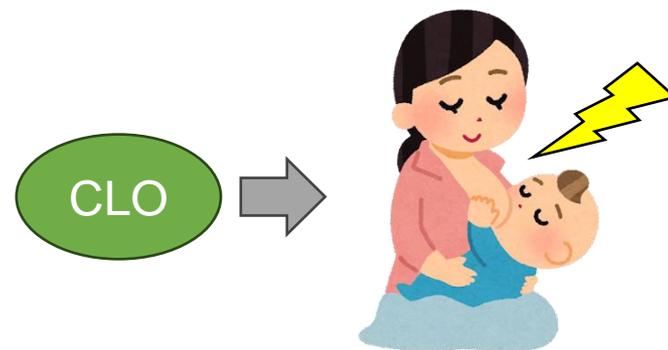
[2)Hirai *et al.*, 2022; Hirano *et al.*, 2015, 2018, 2021; Hoshi, 2021; Kubo&Hirano *et al.*, 2022; Maeda *et al.*, 2021; Nishi *et al.*, 2022; Takada *et al.*, 2018, 2020; Yoneda *et al.*, 2018]

## ■ クロチアニジン(CLO)の母子間移行



CLOとその代謝物が  
胎盤を介して迅速に移行する

[Ohno *et al.*, 2020]



CLOが母体内で代謝・濃縮されて  
速やかに母乳中に移行する

[Shoda *et al.*, 2023a]

# 緒言

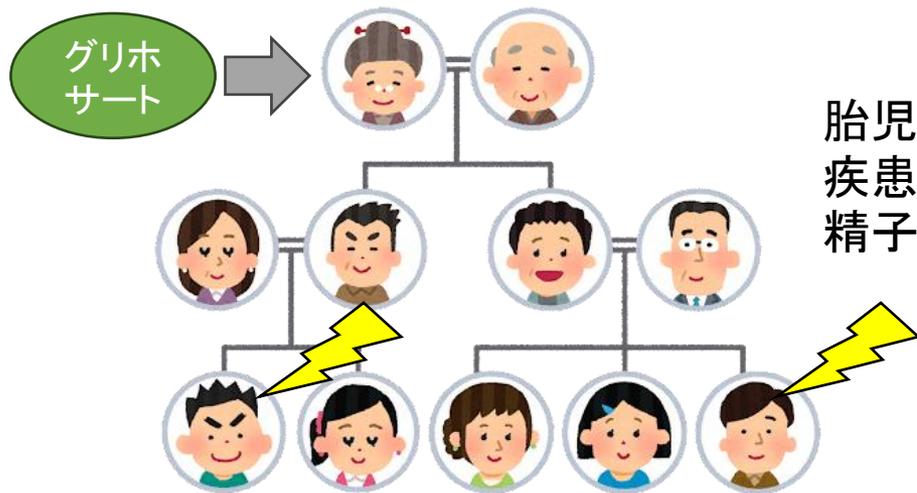
## 多世代・継世代影響を考慮したネオニコのリスク評価が急務



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, ネオニコが検出された

[Ichikawa *et al.*, 2019; Ikenaka *et al.*, 2019; Oya *et al.*, 2021]

## 環境化学物質による**エピゲノム毒性**



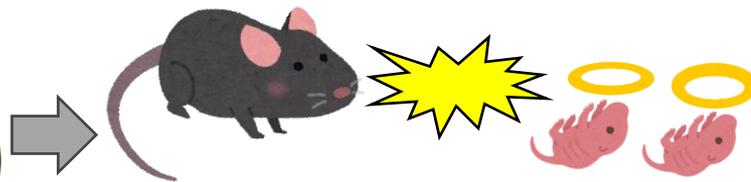
胎児期グリホサート曝露によるF2・F3世代での  
疾患 (前立腺・腎臓・卵巣の病気や肥満, 出産異常など) の増加・  
精子のエピゲノム変異

[Kubsad *et al.*, 2019]

# 緒言

## 先行研究

胎子・授乳期  
でのネオニコ  
曝露

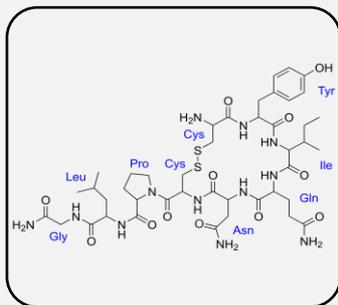


オキシトシン &  
親の不十分な養育  
が関係？

継代的な食殺・育子放棄の増加など、**母性行動が悪化した**

[Kitauchi *et al.*, 2021; Shoda *et al.*, 2023b]

正常な母性行動には「オキシトシン」と「親の十分な養育」が重要である



### オキシトシン

- 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ノックアウトマウスにおける養育行動の低下

[Yamamoto *et al.*, 2019]



### 親の不十分な養育

- 親による不十分な養育を受けた産子は、将来の養育行動を怠る

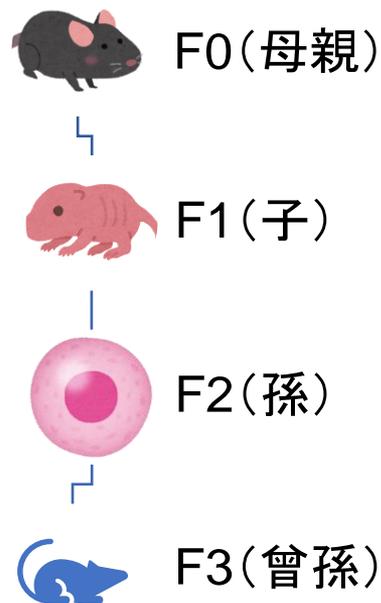
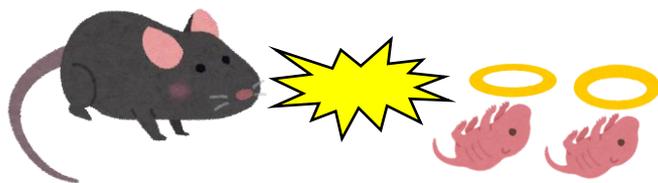
[Catanese *et al.*, 2017]

# 緒言

## ■ 本研究の目的

ネオニコ曝露によってオキシトシンや母性行動が損なわれることを明確に示した報告はない

- ➔
1. ネオニコが母性行動に関連するホルモン分泌機構にどのような影響を及ぼすのか明らかにする
  2. 母性行動とそのホルモン分泌機構の変化が継世代的に引き継がれるのか検証する



# 材料と方法

(※)GD(Gestational day): 妊娠日数  
PD(Postnatal day): 分娩後日数

## 供試動物

C57BL/6N 母獣(F0)およびF1, F2, F3マウス 各群6匹

- ・CLO-0群 CLO 0 mg/kg 体重/日
- ・CLO-65群 CLO 65 mg/kg 体重/日 (CLO 雌無毒性量 65 mg/kg/day 参考)

## 投与方法

MediGel Sucralose<sup>R</sup>(給水ゲル)に、上記CLO濃度にCLOを溶解させたDESOを注入、攪拌した。  
⇒これを、F0母獣にGD(※)1.5から離乳日まで自由摂取させた。

[Medigel Sucralose]



## 実験スケジュール



F3母獣のみ、産子のリトリーブング試験直後に採材した。

# 材料と方法

(※)GD(Gestational day): 妊娠日数  
PD(Postnatal day): 分娩後日数

## 交配

同群の産子を交配し, F2, F3, F4を作製する.

## 定量解析

LC/ESI-MS/MSによる血漿中オキシトシンおよび副腎皮質ホルモンの測定

## 統計解析

Welchの $t$ 検定, Mann-Whitneyの $U$ 検定, Repeated two-way ANOVA (Tukey-Kramer, Tukey)

## 実験スケジュール

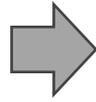


F3母獣のみ, 産子のリトリービング試験直後に採材した.

# 材料と方法

## ■ 巣作り行動試験

1. 試験前日19時  
コットン3.0 gをケージの  
左手前側に入れる.

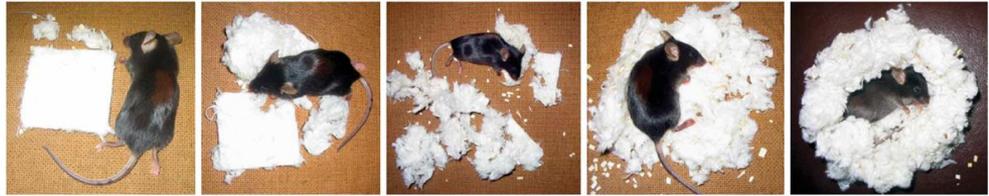


2. 試験当日9時  
ケージを撮影し, コットン重量を測定して,  
下記をスコアづけした.
  - Nest Quality : 0~5
  - Usage of nesting material : 0~2
  - Degree of nestlet shredding : 0~2

# 材料と方法

## ■ 巣作り行動試験

1. 試験前日19時  
コットン3.0 gをケージの  
左手前側に入れる。



[Deacon *et al.*, 2006]

### • Nest Quality: 0~5

#### Nest Quality

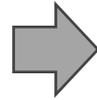
No nest	Full but flat nest occupying at least $\frac{1}{4}$ of the cage	Half flat and half raised (walls are half of the mouse's body height when the mouse is curled up on its side)	Fully raised nest (greater than the mouse's body height when the mouse is curled up on its side)	Half raised and half covered (walls are higher than mouse's body height when the mouse is curled up on its side)	Fully covered
Score: 0	1	2	3	4	5

[Moazzam *et al.*, 2021]

# 材料と方法

## ■ 巣作り行動試験

1. 試験前日19時  
コットン3.0 gをケージの  
左手前側に入れる.



2. 試験当日9時  
ケージを撮影し, コットン重量を測定して,  
下記をスコアづけした.
  - Nest Quality: 0~5
  - Usage of nesting material: 0~2
  - Degree of nestlet shredding: 0~2

例)



0



1

**9点満点で評価**

# 材料と方法

## 産子のリトリービング試験

母獣が産子をリトリービングする様子を撮影し、下記を記録した.

- ・リトリービング潜伏秒数
- ・6分間で母獣がリトリービングした産子の合計匹数(0~4匹)
- ・それぞれの産子をリトリービングするまでの秒数

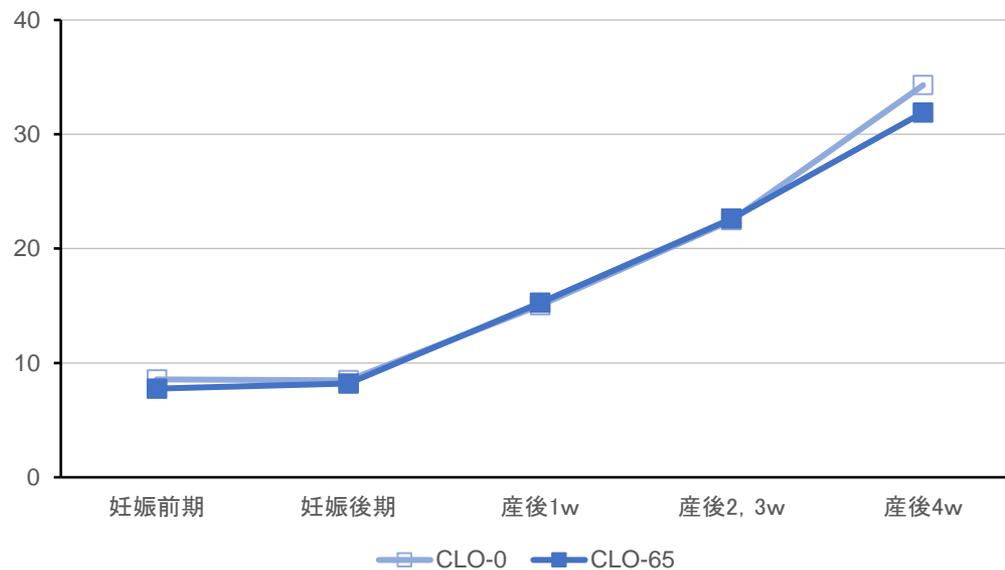
例)

(暗期での撮影のため画像が不鮮明)



①→②→③→④の順にリトリービングしている

(g) F0母獣 1日あたりの給水ゲル平均摂取量



[CLO-0:n=10, CLO-65:n=6]

## ■ F0母獣

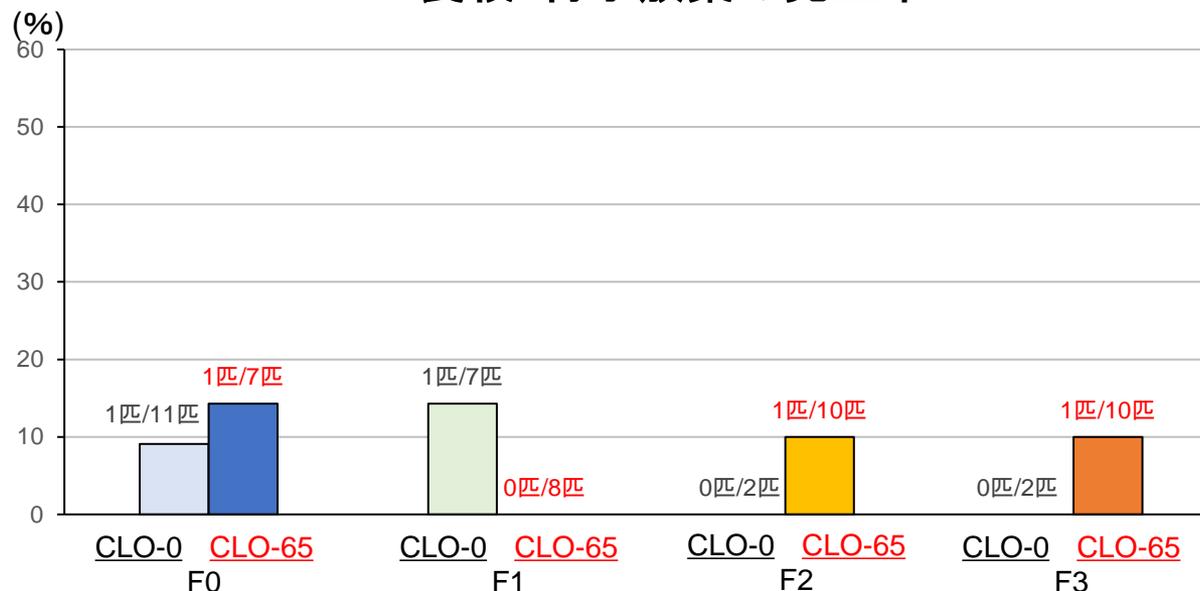
Two-way ANOVAの結果, 両群間において有意な差はみられなかった.

⇒CLO-65群におけるCLO曝露に問題はなかったことを確認した

# 結果

出生

## 食殺・育子放棄の発生率



[F0) CLO-0:n=11, CLO-65:n=7  
F1) CLO-0:n=7, CLO-65:n=8  
F2) CLO-0:n=2, CLO-65:n=10  
F3) CLO-0:n=1, CLO-65:n=10]

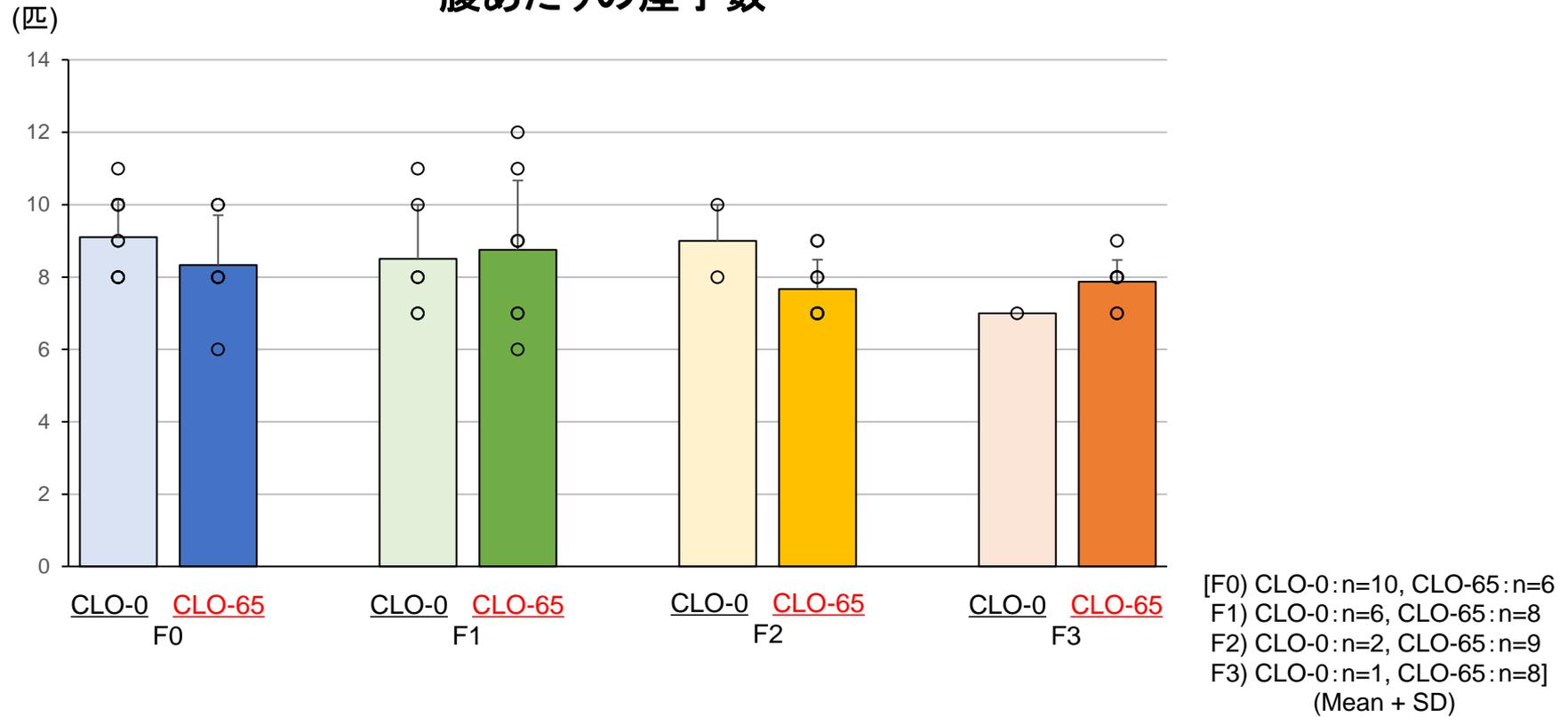
### F0母獣

両群ともに、食殺が1例ずつ認められた。

### F1母獣

CLO-0群において、食殺が1例認められた。

## 一腹あたりの産子数



■ ■ F0, F1母獣

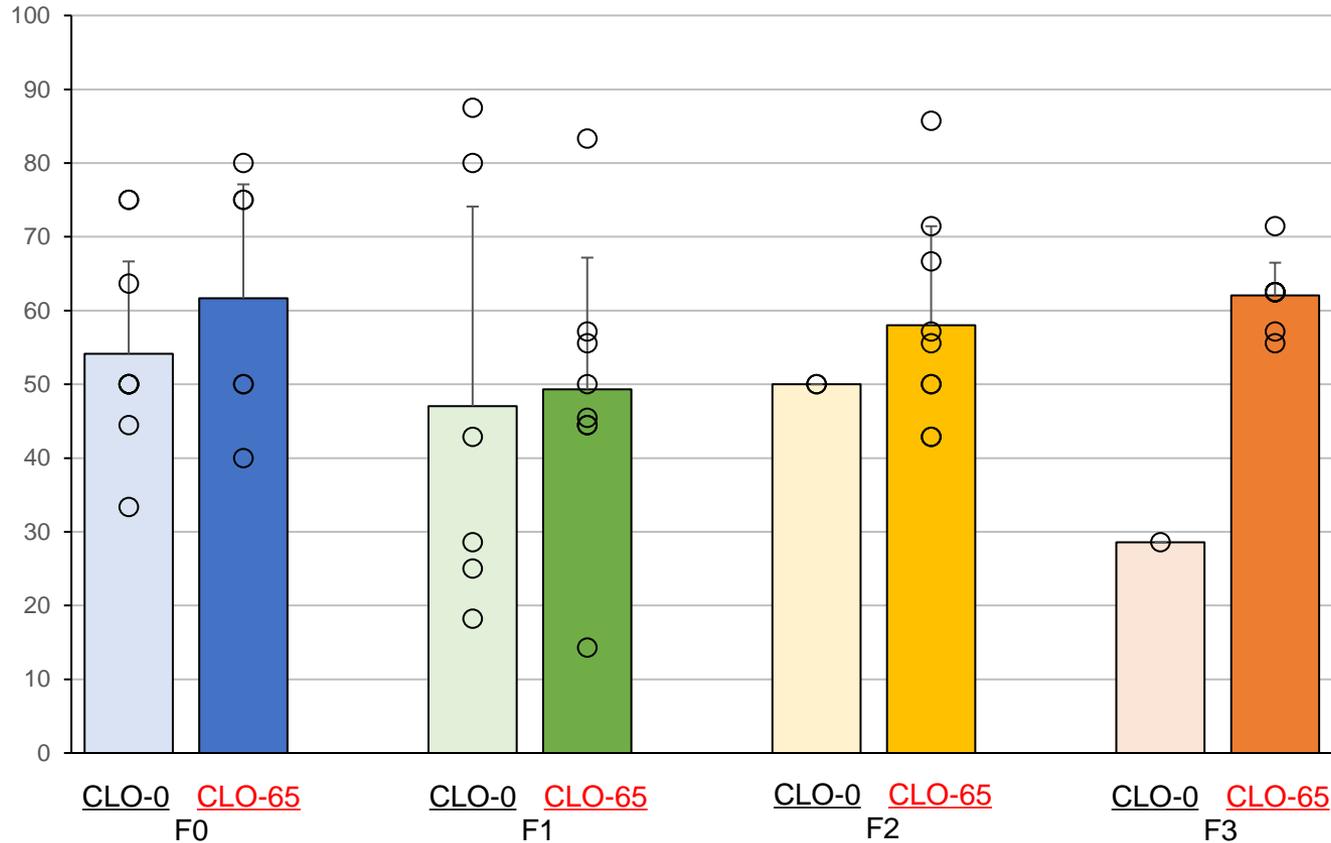
一腹あたりの産子数に有意な差はみられなかった。

# 結果

出生

## オス産子数割合

(%)



[F0] CLO-0: n=10, CLO-65: n=6  
[F1] CLO-0: n=6, CLO-65: n=8  
[F2] CLO-0: n=2, CLO-65: n=9  
[F3] CLO-0: n=1, CLO-65: n=8]  
(Mean + SD)

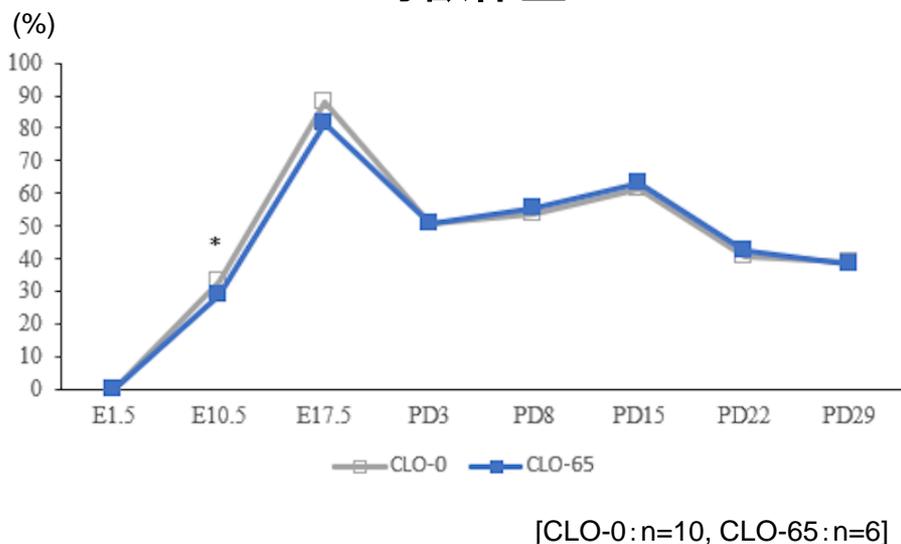
 F0, F1母獣

オス産子数割合に有意な差はみられなかった。

# 結果



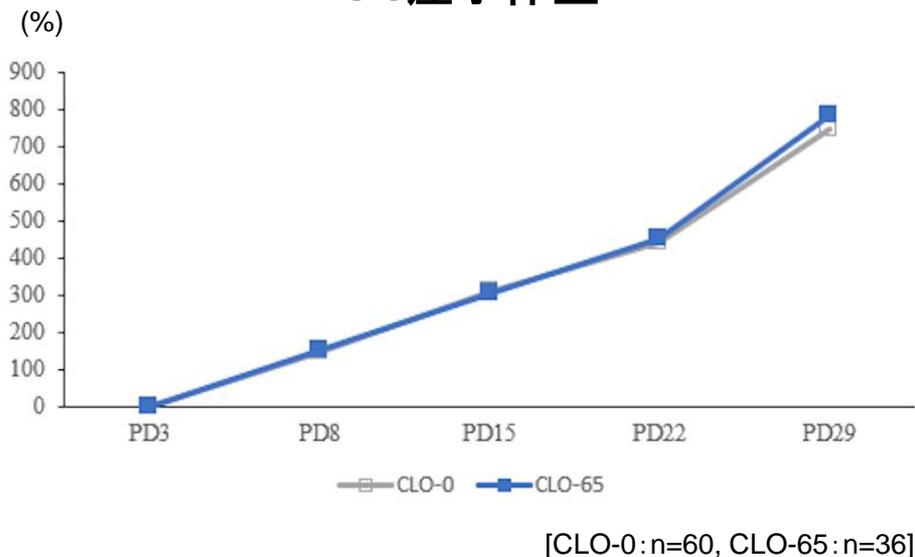
## F0母獣体重



### F0母獣

Two-way ANOVAの結果, E10.5のみにCLO投与の影響( $P < 0.05$ )がみられたが, 他に有意な差は認められなかった

## F1産子体重



### F1産子

Two-way ANOVAの結果, 有意な差は認められなかった

# 結果



## F1母獣体重

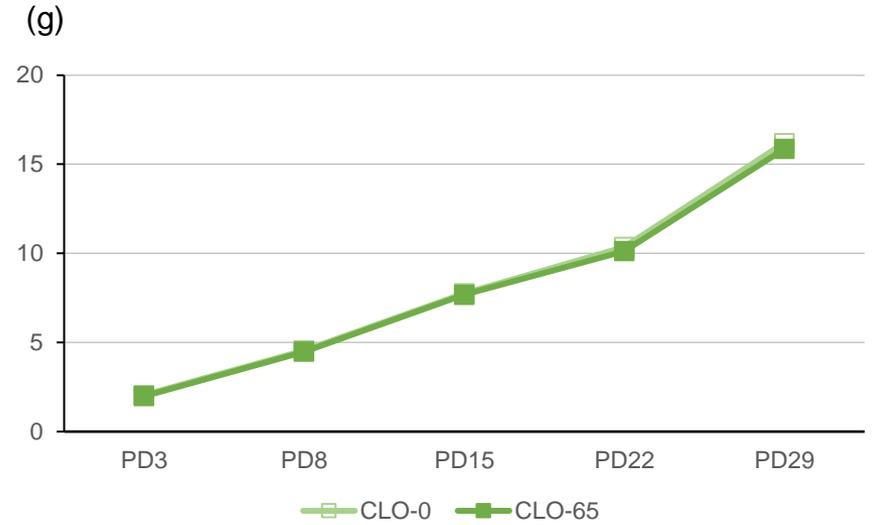


[CLO-0: n=6, CLO-65: n=8]

### F1母獣

Two-way ANOVAの結果, 有意な差はみられなかった.

## F2産子体重



[CLO-0: n=36, CLO-65: n=48]

### F2産子

Two-way ANOVAの結果, 有意な差はみられなかった.

# 結果

\*\* :  $P < 0.01$

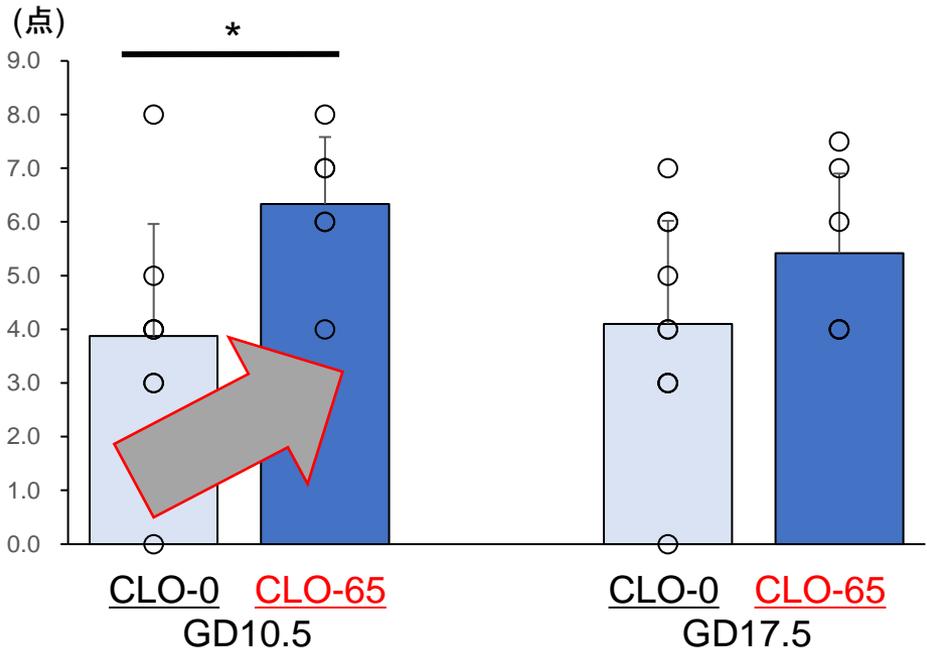
\* :  $P < 0.05$

GD10.5

GD17.5



## F0母獣 巣作り行動試験スコア



[CLO-0: n=8-10, CLO-65: n=6]  
(Mean + SD)

■ F0母獣

CLO-65群において、GD10.5での巣作り行動スコアが有意に高い。

# 結果

GD10.5

GD17.5

GD10.5 F0 CLO-0群



GD10.5 F0 CLO-65群



## F0母獣

CLO-65群において、GD10.5での巣作り行動試験スコアが**有意に高い**。

# 結果

GD10.5



GD17.5



## GD17.5 F0 CLO-0群



## GD17.5 F0 CLO-65群



### F0母獣

CLO-65群において、GD10.5での巣作り行動試験スコアが**有意に高い**.

# 結果

\*\* :  $P < 0.01$

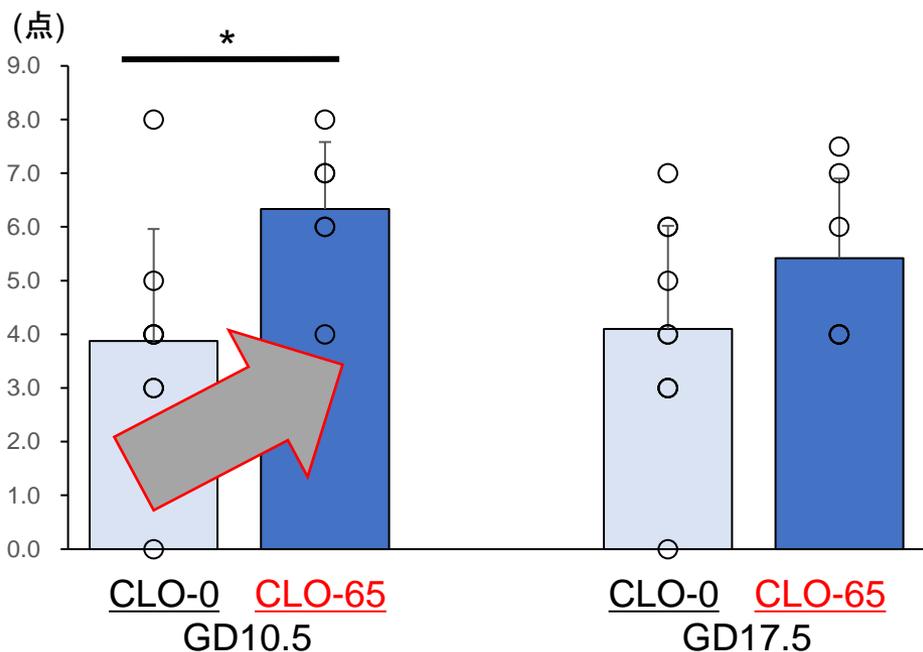
\* :  $P < 0.05$

GD10.5

GD17.5



## F0母獣 巣作り行動試験スコア

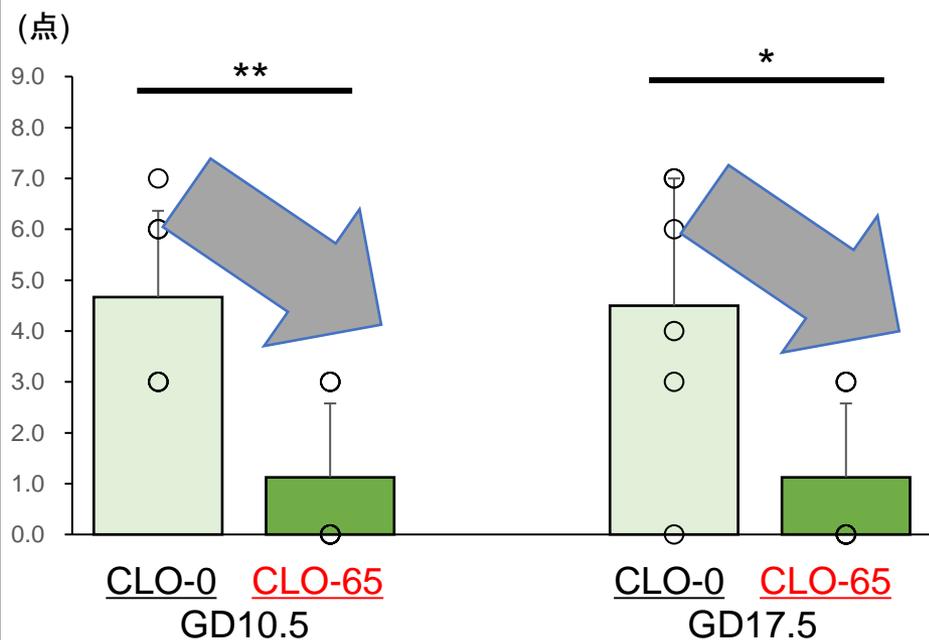


[CLO-0: n=8-10, CLO-65: n=6]  
(Mean + SD)

### F0母獣

CLO-65群において, GD10.5での巣作り行動試験スコアが**有意に高い**

## F1母獣 巣作り行動試験スコア



[CLO-0: n=6, CLO-65: n=8]  
(Mean + SD)

### F1母獣

CLO-65群において, GD10.5, GD17.5ともに巣作り行動試験スコアが**有意に低い**

# 結果

GD10.5

GD17.5

GD10.5 F1 CLO-0群

巣作り行動を  
全く示さない

GD10.5 F1 CLO-65群



■ F1母獣

CLO-65群において、GD10.5、GD17.5とも  
に巣作り行動試験スコアが有意に低い

# 結果

GD10.5

GD17.5

GD17.5 F1 CLO-65群



巣作り行動を  
全く示さない

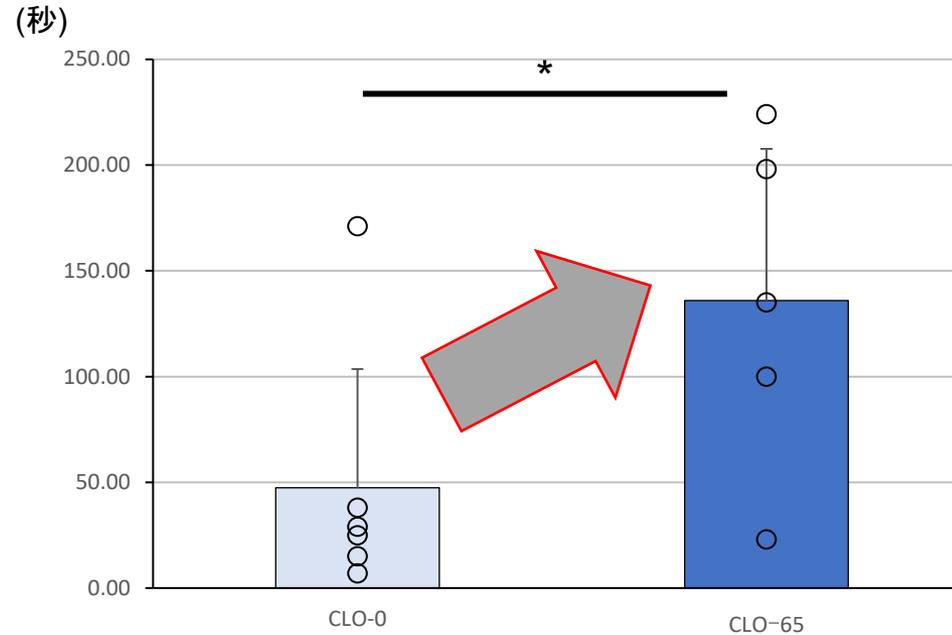
GD17.5 F1 CLO-0群



■ F1母獣

CLO-65群において、GD10.5、GD17.5とも  
に巣作り行動試験スコアが有意に低い

## F0母獣 リトリービング潜伏秒数

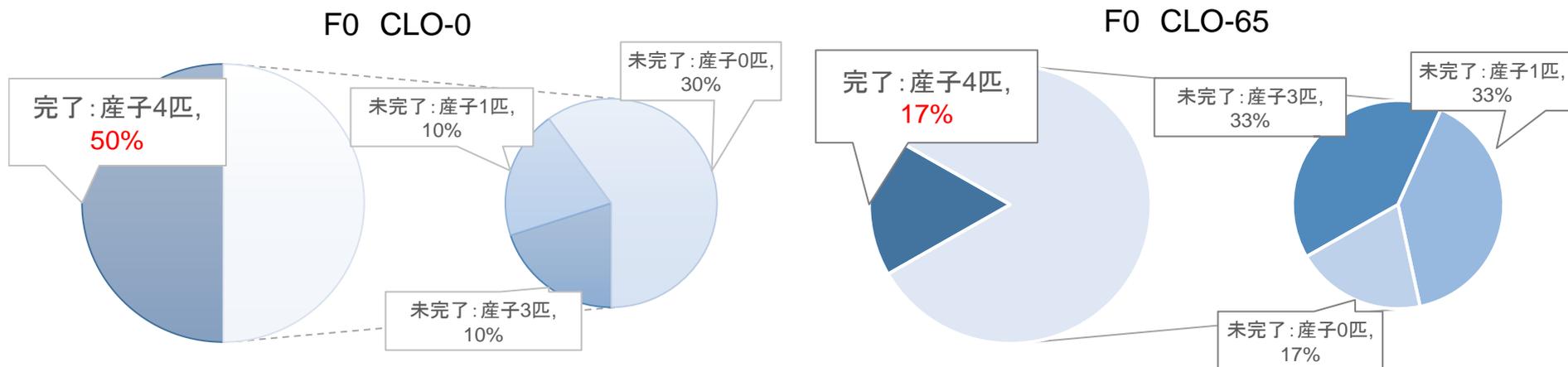


[CLO-0:n=6, CLO-65:n=5]

### ■ F0母獣

CLO-65群において、リトリービング潜伏秒数が**有意に長い**

## F0母獣 6分間で母獣がリトリービングした産子の合計匹数の割合



### F0母獣

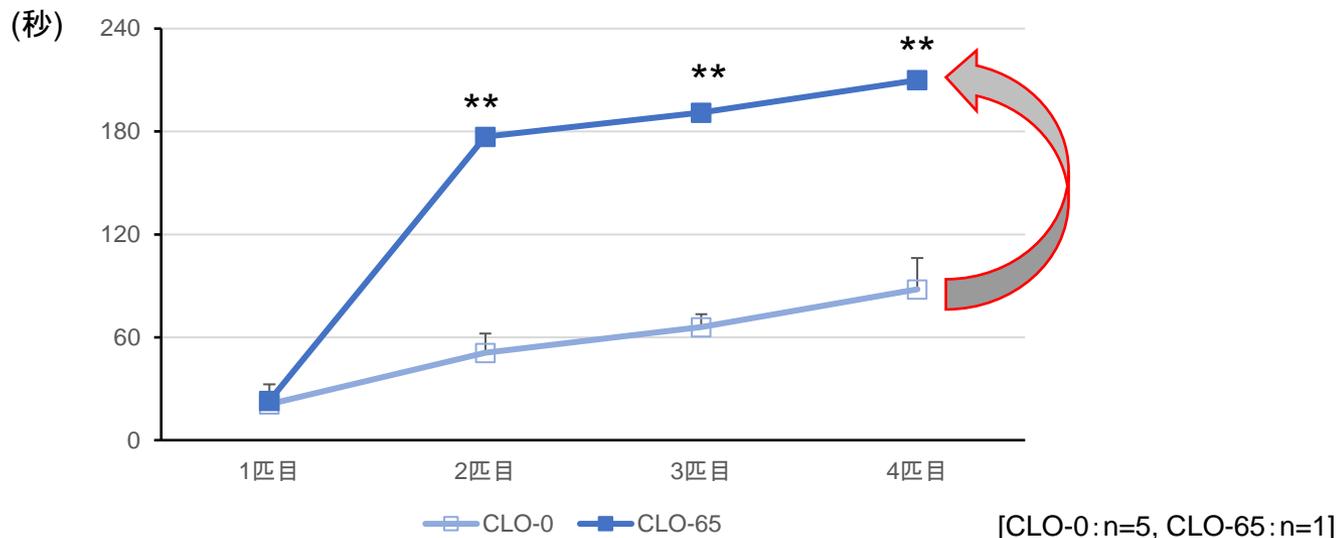
[CLO-0: n=10, CLO-65: n=6]

6分間で4匹すべての産子をリトリービングした母獣は,

CLO-0群: 5例 (50%)

CLO-65群: 1例 (17%)

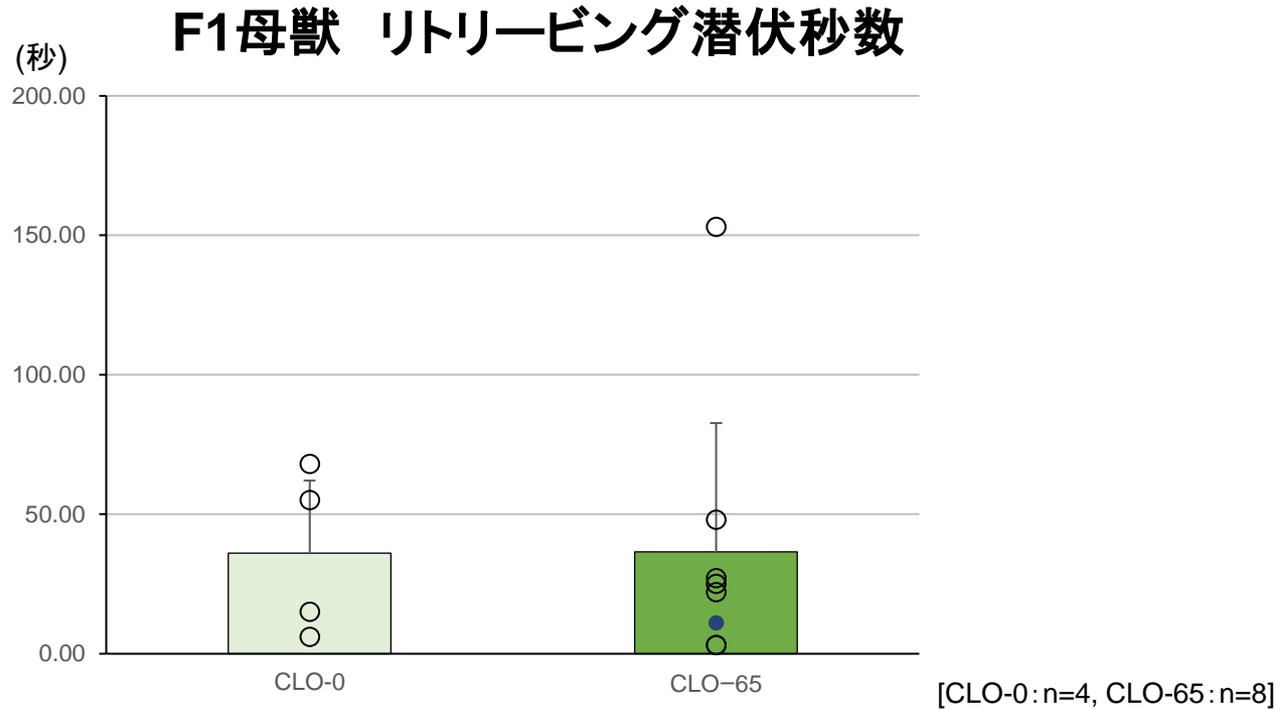
## F0母獣 それぞれの産子をリトリーピングするまでの秒数



### ■ F0母獣

Two-way ANOVAの結果, CLO投与と時間経過の交互作用 ( $P < 0.001$ ), CLO投与の影響 ( $P = 0.0046$ ) がみられた.

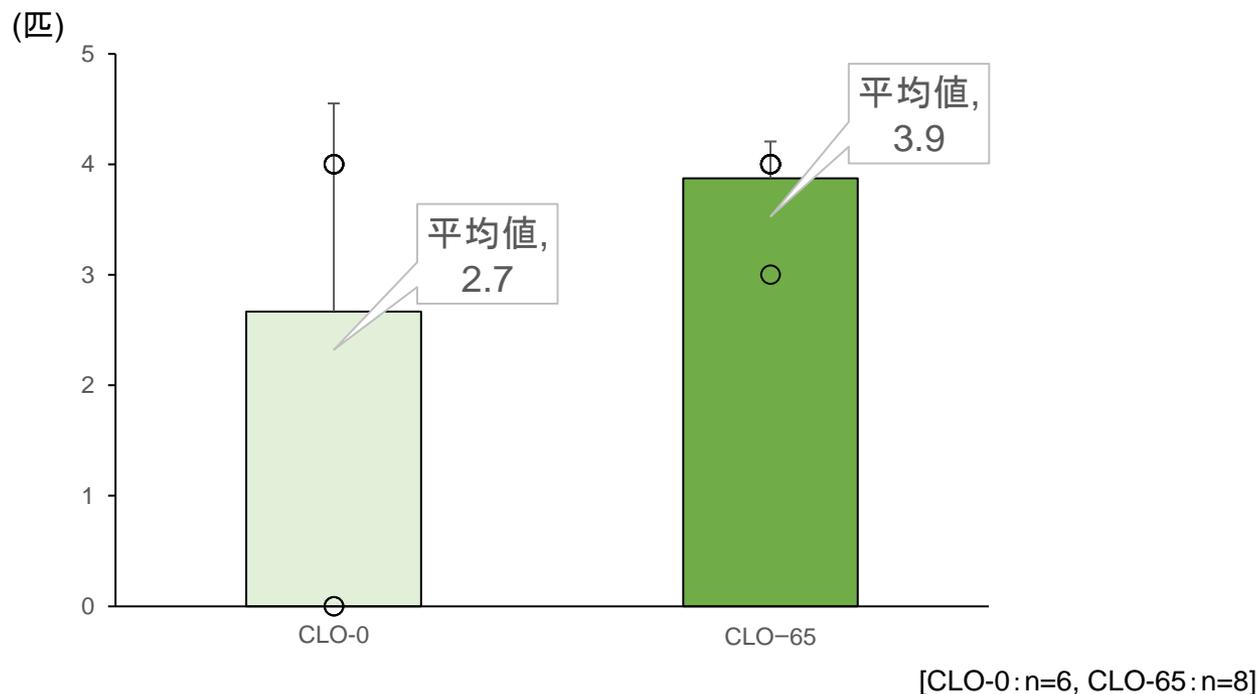
多重比較検定の結果, 2, 3および4匹目で有意な差が認められ, CLO-65群において, 2匹目以降の産子をリトリーピングするまでの秒数が**有意に長かった**.



## ■ F1母獣

リトリービング潜伏秒数に有意な差はみられなかった。

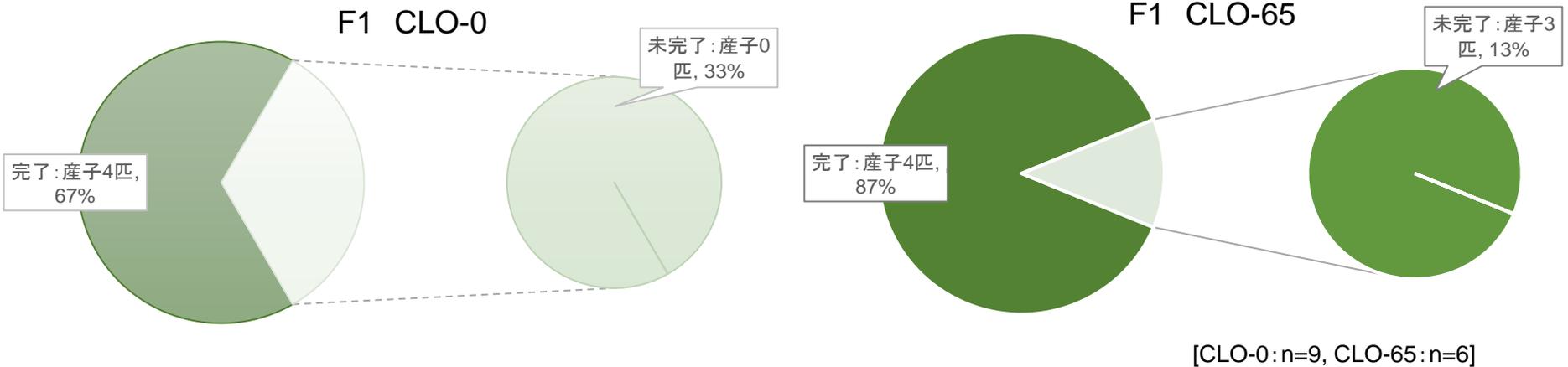
## F1母獣 6分間で母獣がリトリービングした産子の合計匹数



### ■ F1母獣

6分間で母獣がリトリービングした産子の合計匹数に有意な差はみられなかった。

## F1母獣 6分間で母獣がリトリーブした産子の合計匹数の割合



### ■ F1母獣

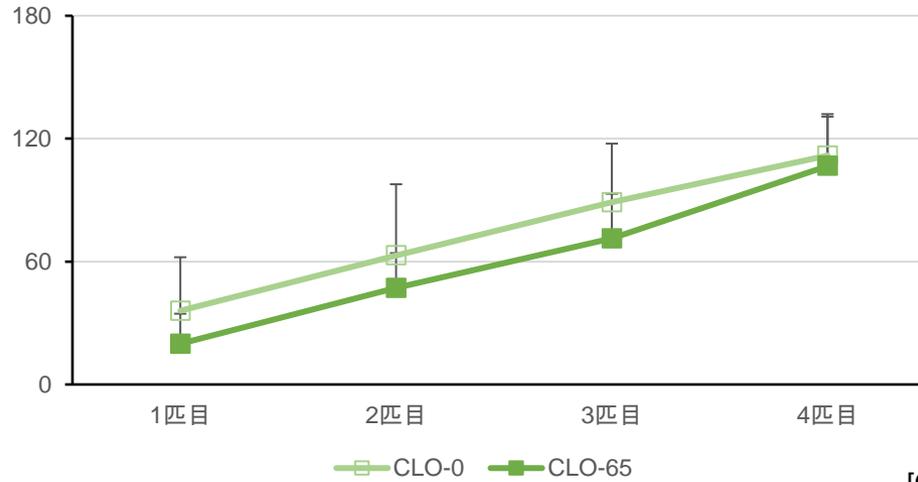
6分間で4匹すべての産子をリトリーブした母獣は,

CLO-0群:4例(67%)

CLO-65群:7例(87%)

## F1母獣 それぞれの産子をリトリーピングするまでの秒数

(秒)



[CLO-0:n=4, CLO-65:n=7]

### ■ F1母獣

それぞれの産子をリトリーピングするまでの秒数に有意な差はみられなかった。

# 結果

PD28以降

\*\* :  $P < 0.01$

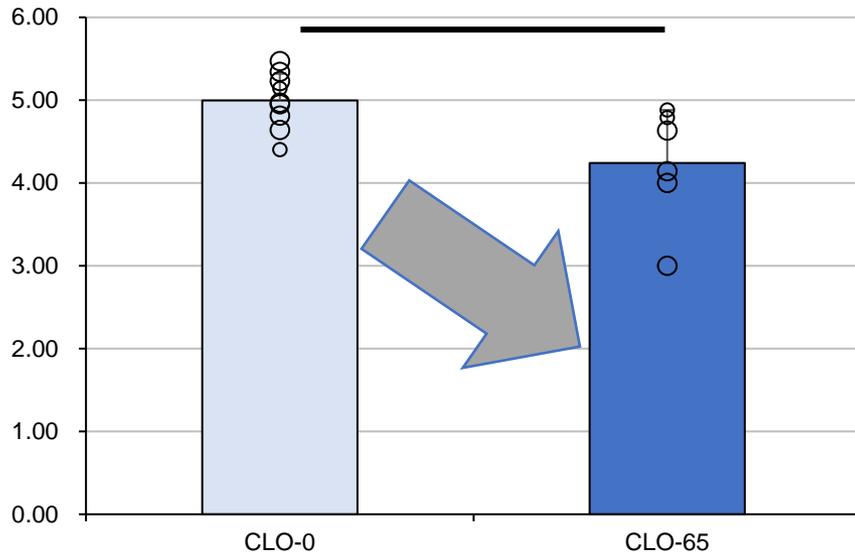
\* :  $P < 0.05$

Mean + SD

## F0母獣 副腎重量

(mg)

\*



[CLO-0: n=10, CLO-65: n=6]

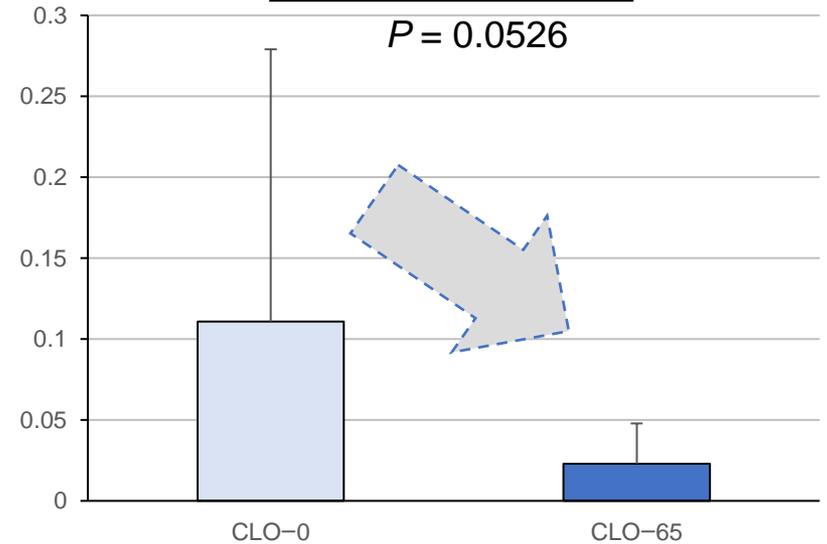
### ■ F0母獣

CLO-65群において、副腎重量が有意に減少した。

## F0母獣 血中オキシトシン濃度

(ng/mL)

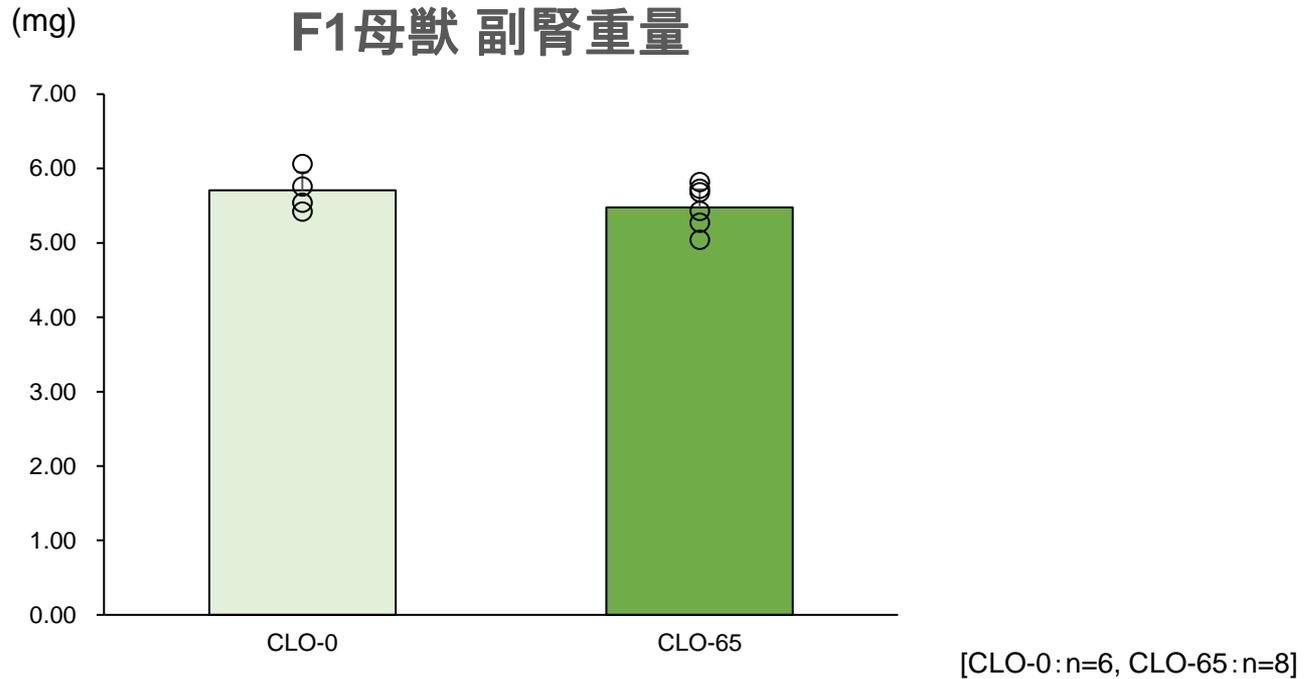
$P = 0.0526$



[CLO-0: n=10, CLO-65: n=6]

### ■ F0母獣

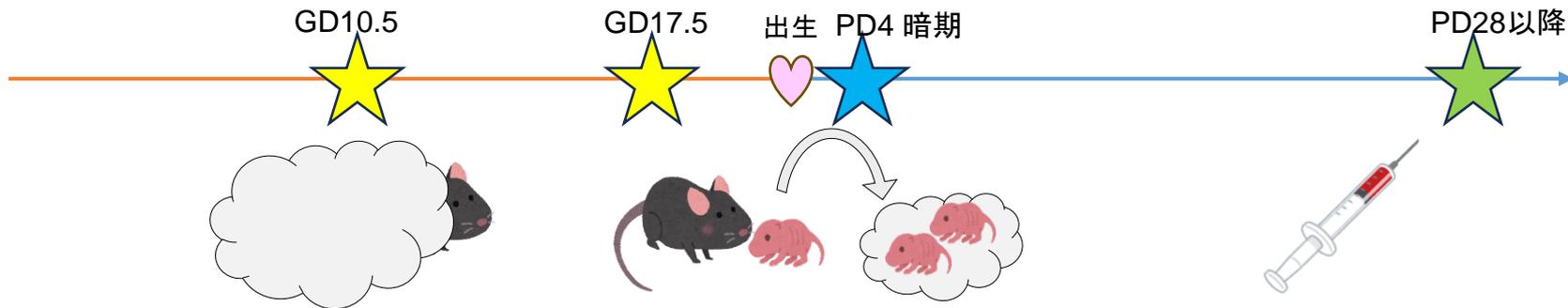
CLO-65群において、血中オキシトシン濃度が低値傾向を示した。



## ■ F1母獣

副腎重量に有意な差はみられなかった。

# まとめ



巣作り行動試験

産子のリトリービング試験

血中オキシトシン濃度

F0母獣			
F1母獣			—
F2母獣		(進行中)	
F3母獣		(進行中)	

# 考察

巣作り行動試験

産子のリトリービング試験

血中オキシトシン濃度

F0母獣



F1母獣

妊娠中のCLO曝露は、nAChRを介して、母獣を不安にさせ、それが妊娠前期における母獣に巣作り行動を邁進させた可能性もあるが、このことを示すにはさらなる研究が必要である



# 考察

	巣作り行動試験	産子のリトリービング試験	血中オキシトシン濃度
F0母獣			
F1母獣			—

授乳期に有機リン系殺虫剤の一種であるクロルピリホスに曝露されたCD-1マウスにおいて、母親になると巣作り行動の意欲が低下する [Venerosi et al., 2008]

# 考察

## 巣作り行動試験

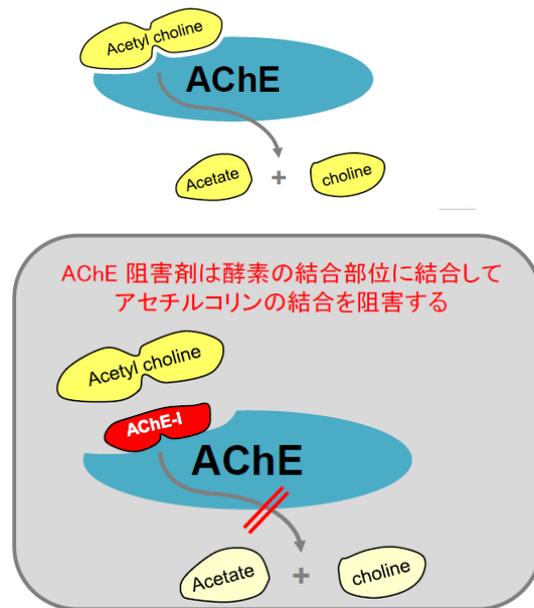
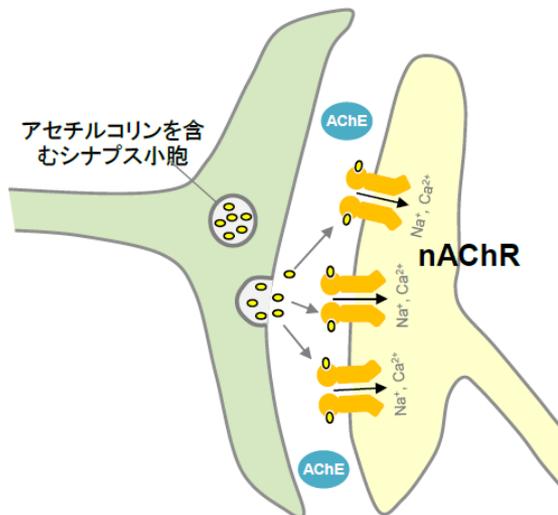
F0母獣



F1母獣



AChE阻害剤である有機リン系は, nAChRに対してネオニコと同じ作用を示す



[IRAC資料:殺虫剤作用機序より引用]

授乳期に有機リン系殺虫剤の一種であるクロルピリホスに曝露されたCD-1マウスにおいて, 母親になると巣作り行動の意欲が低下する [Venerosi et al., 2008]

⇒ 胎子・授乳期のCLO曝露はnAChRを介して巣作り行動を阻害する可能性

# 考察

巣作り行動試験

産子のリトリービング試験

血中オキシトシン濃度

F0母獣



F1母獣



—

母獣は産子の超音波発声 (USV) を手がかりにリトリービングする [Uematsu et al., 2007]

生後1~4日の子ラットにクロルピリホスを曝露させると、子ラットの発するUSVが阻害される [Berg et al., 2020]



⇒ CLO曝露によって、産子のUSV発声が阻害されたことで、母獣はリトリービングの手がかりを失い、リトリービングの開始が遅延した可能性

# 考察

	巣作り行動試験	産子のリトリビング試験	血中オキシトシン濃度
F0母獣			
F1母獣			—

分娩に伴う母性行動の発現・維持

分娩に伴う内分泌の変化

産子とのふれあい



⇒分娩時において正常に母性行動が発現され、維持されたことが考えられる

# 考察

巣作り行動試験

産子のリトリージング試験

血中オキシトシン濃度

F0母獣

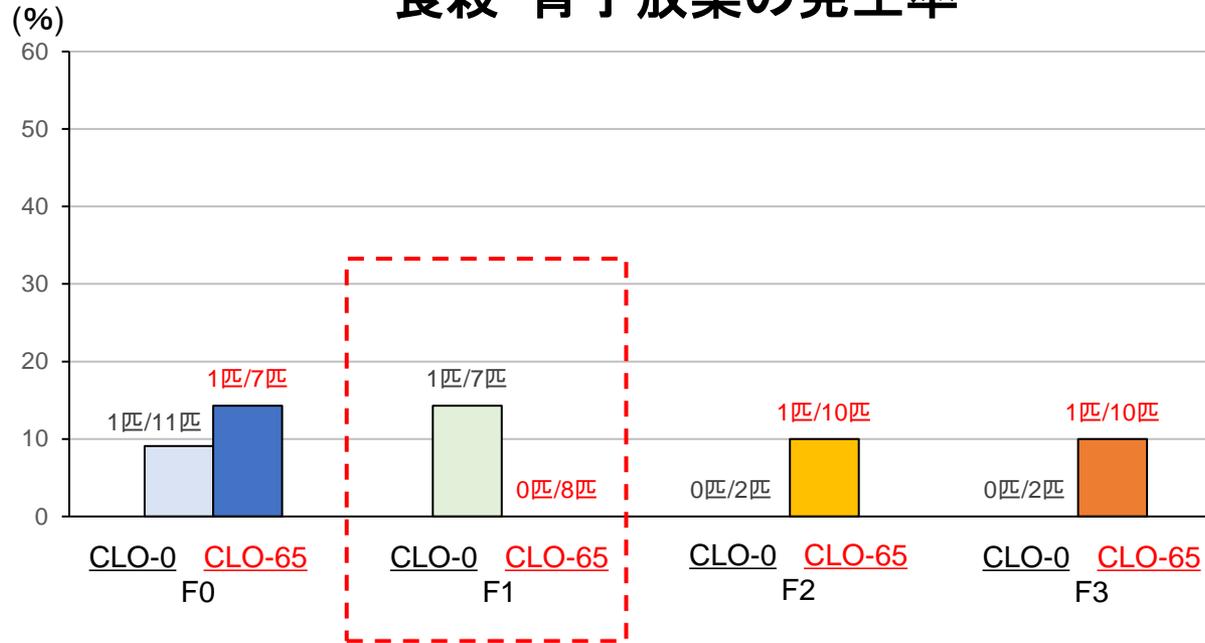
オキシトシンは養育行動の  
発現と維持に重要

母性行動を開始したオキシトシンレセプターKOマウスは、野生型マウスと同等の母性行動を示す [Rich *et al.*, 2014]

分娩や吸乳の刺激により母獣の脳内で放出されたオキシトシンが嗅球に到達して産子の匂いに選択的に反応する神経回路が形成され、養育行動を発現する [Kendrick *et al.*, 2004]

⇒ 離乳時では分娩直後と比較して、オキシトシンと母性行動との関係は小さい可能性

## 食殺・育子放棄の発生率



[F0] CLO-0:n=11, CLO-65:n=7  
 [F1] CLO-0:n=7, CLO-65:n=8  
 [F2] CLO-0:n=2, CLO-65:n=10  
 [F3] CLO-0:n=1, CLO-65:n=10]

### F1 CLO-0群の食殺マウスの母獣 (F0母獣)

- ・巣作り行動試験スコア: 0点
- ・産子のリトリビング試験: 0匹

母親からの養育行動の一つである毛繕い行動を受けた頻度によって  
 将来の母性行動の発現が大きく変わる

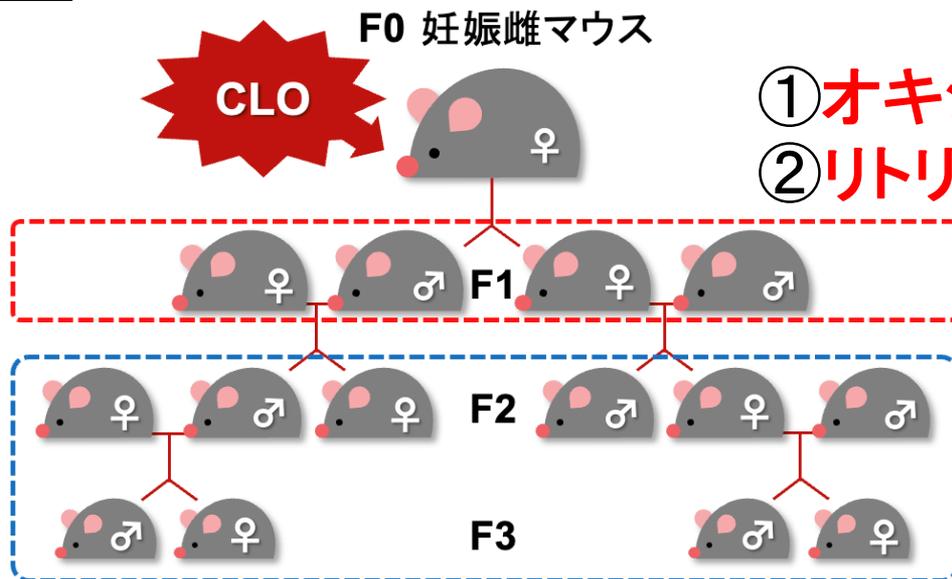
[Champagne *et al.*, 2001]

⇒ 不十分な母性行動が引き継がれ、食殺した可能性

# 結論

## F0世代

F0母獣への妊娠・授乳中のクロチアニジン曝露による母性行動への継世代影響は、



母性行動の低下

## F1世代

巣作り行動の明らかな低下

## F2・F3世代

影響は波及するが、世代を経ると減弱していく？

理由

