

称号及び氏名	博士（獣医学）	於勢 佳子
学位授与の日付	平成31年2月20日	
論文名	両生類における農薬の生態影響評価に関する研究： アフリカツメガエルに対するピリプロキシフェンの影響	
論文審査委員	主査	中村 洋一
	副査	竹内 正吉
	副査	山手 丈至
	副査	森山 光章

論文要旨

1. 序章

農薬とは、食糧の確保や安定供給を目的に、農作物の生産上問題になる病虫害および雑草などの防除や、農作物の生理機能を増進あるいは抑制するものをいい、農作物の収穫量の増大や農作業の大幅な効率化をもたらしてきた。しかしながら生態系を構成する環境生物への農薬の影響を的確に評価することは重要な課題であり、なかでも水圏生態系への影響評価が重要視されている。近年、農薬暴露により両生類が減少しているとの報告がなされ、欧米では農薬の両生類に対する生態影響評価が求められている。

内分泌系を乱す作用をもつ化学物質は内分泌攪乱物質(ED 物質)として環境生物の減少の要因であるとの仮説が提唱された。米国環境保護局は世界に先駆けて内分泌攪乱物質スクリーニング計画による体系的な ED 物質の評価・規制を実施し、欧州では ED 物質の判定の基準となるガイダンスが発行されたが、日本では具体的な規制は未だ確立されていない。世界的にも ED 物質の評価や規制の基準は統一されておらず、各国規制当局が特定の化学物質の評価において異なる判断を下している。甲状腺ホルモンは脊椎動物の生存に必須のホルモンで、その化学構造は完全に保存されており、合成および分泌様式も同様に動物種に拠らず、視床下部-下垂体-甲状腺軸(HPT 軸)により調節されている。甲状腺ホルモ

ン系への影響を評価するための試験として、両生類変態試験 (amphibian metamorphosis assay, AMA)が欧米でガイドライン化された。

ピリプロキシフェン (pyriproxyfen: 4-phenoxyphenyl(*R,S*)-2-(2-pyridyloxy)propylether)は住友化学で開発された幼若ホルモン様活性を有する昆虫成長制御剤で、ED作用に懸念があるとして EDSP による評価化合物群のひとつに挙げられ、AMA が実施された。その結果、ピリプロキシフェン暴露により変態の遅れが認められたものの、明らかに摂餌量の低下がみられ、かつ、甲状腺の病理組織学的検査で何ら影響が認められなかったことから、ピリプロキシフェン暴露による HPT 軸への影響はなく、摂餌抑制による間接的影響であると考えられた。

本研究では、農薬、特にピリプロキシフェン暴露による両生類への影響を評価すべく、アフリカツメガエルを用いた AMA での病理組織学的観察法を確立するとともに、生物濃縮性とその代謝を検討した。さらに遺伝子発現解析により摂餌抑制の間接的影響の評価について詳しく検討した。

2. 両生類変態試験における病理組織検査方法の確立

本研究所内での AMA の確立と効率的な実施を目的として、アフリカツメガエル幼生を用いて、抗甲状腺作用物質の 6-プロピル 2-チオウラシル(PTU)および甲状腺ホルモン(T4)暴露区、ならびに、化合物暴露をしない通常給餌量の対照区と制限給餌区を設けた試験を実施した。ホルマリン固定後の全長、鼻-排泄口長および後肢長を用いた評価がガイドラインに適合したものであることが示され、試験実施の効率化を図ることができた。

甲状腺の病理組織学的変化については、PTU 曝露区で濾胞細胞の肥大と過形成、T4 曝露区では濾胞の小型化が見られた。制限給餌区では変態の遅れと甲状腺の萎縮が認められたものの、濾胞細胞組織像には何らの変化は認められず、HPT 軸への化合物暴露による影響とは区別されることが示された。AMA により HPT 軸への影響を検討する際は、起こりうる二次的影響について慎重に評価することが重要であることが示唆された。

3. アフリカツメガエルにおけるピリプロキシフェンの生物濃縮と代謝

農薬の安全性評価における暴露と毒性の関連を知るうえでは、環境中での挙動を明確にすることに加えて、暴露生物における吸収、分布、代謝、排泄 (absorption, distribution, metabolism, excretion, ADME)や生物濃縮に関する知見が重要である。哺乳類および魚類では ADME や生物濃縮に関する知見も多いが、両生類については、魚類と同様に農薬の疎水性が濃縮性を左右する重要な因子となりえるにも関わらず、その ADME および濃縮性に関する情報は極めて少ない。そこで、アフリカツメガエル幼生を用いたピリプロキシフェンの代謝および生物濃縮について検討した。

放射性標識した ^{14}C -ピリプロキシフェンを AMA の場合と同条件で暴露したところ、速やかに取り込まれた後、代謝、排泄され、生物濃縮係数も 400~600 の範囲であり、生物濃縮性が比較的低いことが示された。代謝経路については、グルクロン酸抱合に比べて硫酸抱合が優位であるなどの特徴はあるものの、両生類特有の代謝反応はなく、他の脊椎動物種と共通していることが明らかとなった。これらの結果から、生物濃縮性の評価につい

ては、魚類を用いた結果を両生類へ外挿することが可能であることが示唆された。

4. 両生類変態試験における遺伝子発現解析：化学物質暴露と給餌制限影響の比較

化学物質暴露による摂餌量の低下やそれに基づく低体重などは二次的影響として毒性的意義のない変化に分類されることから、安全性評価においては化学物質暴露による直接影響と二次的影響を区別することが特に重要である。オミックスによる分子レベルの遺伝子発現解析は、安全性評価における毒性メカニズムを理解するうえで非常に有用な手段となりうる。本章では、ピリプロキシフェンおよび PTU を暴露したアフリカツメガエル幼生の甲状腺における遺伝子発現プロファイルマイクロアレイ解析により、制限給餌の二次的影響による作用機構の違いを検討した。

給餌を 40%に減らした制限食対照区および摂餌量の減少が認められたピリプロキシフェン暴露区では、変態の遅れがみられたものの、甲状腺の病理組織学的変化は認められなかった。一方、PTU 暴露区では明らかな甲状腺の病理組織学的変化および発達の遅れが認められた。ピリプロキシフェン暴露および PTU 暴露で共通して変動した遺伝子のごくわずかであった。階層クラスタリング解析では大きく 2 つのクラスターに分類され、ひとつは PTU 暴露区のサンプル、他方はピリプロキシフェン暴露区、制限食および通常食対照区のサンプルであった。後者はさらに、ピリプロキシフェン暴露区および制限食対照区のサンプルと、通常食対照区のサンプルの 2 つのクラスターに分類された。即ち、ピリプロキシフェン暴露による両生類甲状腺への作用機構は制限食対照区とほぼ同様で、PTU 暴露によるものとは全く異なるものであると判断できる。これらの結果により、作用機作が異なるのかどうかの評価においてもトランスクリプトーム解析が有用であることが示唆された。

5. 総括

本研究では、農薬暴露による両生類への影響を評価すべく、アフリカツメガエルを用いた AMA により以下の結果を得た。

1. ガイドラインに適合した AMA を確立することができた。WBL, SVL および HLL の測定をホルマリン固定後に行うことにより、より効率的な実施が可能となった。
2. 制限給餌区では、変態の遅れが認められるものの甲状腺の組織学的変化は伴っておらず、T4 や PTU 曝露による HPT 軸への影響とは区別されることが示された。
3. アフリカツメガエル幼生におけるピリプロキシフェンの取込・代謝・排泄はいずれも速やかなことが示され、生物濃縮性もかなり低いことが明らかとなった。
4. その代謝経路については、グルクロン酸抱合に比べて硫酸抱合が優位であるという特徴はあるものの、両生類特有の代謝反応はなく他の脊椎動物種と共通しており、同じ水棲の魚類の結果を用いて両生類に対する生態影響評価が可能であることが示唆された。
5. トランスクリプトーム解析により、ピリプロキシフェン暴露区と制限給餌対照区はほぼ同等で、PTU 暴露区とは全く異なるクラスターに位置付けられることが明らかとなり、作用機作の評価におけるトランスクリプトーム解析の有用性が示された。

審査結果の要旨

農薬は農作物の収穫量の増大や農作業の効率化をもたらしてきたが、生態系への影響を考慮して使用されなければならない、そのための的確な生態影響評価は重要な課題である。欧米では水圏生態系への影響が重要視され、両生類に対する生態影響評価が求められるようになった。内分泌攪乱物質(ED 物質)は環境生物の減少の要因であるとの仮説が提唱され、欧米では体系的な ED 物質の評価・規制が始まり、ED 物質の判定基準となるガイダンスが発行されたが、日本では具体的な規制は未だ確立されていない。欧米では最近、ED 物質の典型例である甲状腺ホルモン系(HPT 軸)への影響を評価するための試験として、両生類変態試験(amphibian metamorphosis assay, AMA)がガイドライン化された。

ピリプロキシフェン(pyriproxyfen, PYR)は幼若ホルモン様活性を有する昆虫成長制御剤で、ED 作用の懸念があるとして AMA が実施された。その結果、PYR 暴露により変態の遅れが認められたものの、明らかな摂餌量の低下がみられたこと等から、PYR 暴露による HPT 軸への直接影響ではなく、摂餌抑制による間接的影響であると考えられたが、その作用機構の詳細は明らかになっていない。本研究では、農薬、特に PYR 暴露による両生類への影響を詳しく検討すべく、アフリカツメガエルを用いた AMA での病理組織学的観察法を確立するとともに、その代謝と生物濃縮性について検討した。さらに遺伝子発現解析により毒性メカニズムについて検討した。

AMA における病理組織検査方法の確立

AMA の確立と効率的な実施を目的として、アフリカツメガエル幼生を用いて、抗甲状腺作用物質のプロピルチオウラシル(PTU)および甲状腺ホルモン(T4)暴露区、ならびに通常量給餌の対照区と給餌を 40%に減らした制限給餌区の試験を実施した。全長、鼻-排泄口長および後肢長の評価については、10%中性緩衝ホルマリン液による固定後に行うことにより効率化を図ることができた。甲状腺の病理組織学的変化については、PTU 曝露区で濾胞細胞の肥大と過形成、T4 曝露区では濾胞の小型化が見られた。制限給餌区では変態の遅れと甲状腺の萎縮がみられたが、濾胞細胞組織像に変化は認められず、HPT 軸への化合物暴露による影響とは区別されることが示された。AMA により HPT 軸への影響を検討する際は、起こりうる二次的影響について慎重に評価することが重要であることが示された。

アフリカツメガエルにおける PYR の生物濃縮と代謝

農薬の安全性評価における暴露と毒性の関連を知るうえでは、環境中での挙動に加えて、暴露生物における吸収・分布・代謝・排泄や生物濃縮に関する知見が重要である。哺乳類および魚類では代謝や生物濃縮に関する知見も多いが、両生類についての情報は極めて少ない。そこでアフリカツメガエル幼生を用いた PYR の代謝および生物濃縮について検討した。放射性 ^{14}C -PYR を AMA と同じ条件で暴露したところ、取り込まれた後、速やかに代謝・排泄され、生物濃縮係数は 400~600 と比較的低いことが示された。代謝経路については、グルクロン酸抱合に比べて硫酸抱合が優位であるという特徴はあるものの、両生類特有の

代謝反応は認められず、他の脊椎動物種と共通していることが明らかとなった。生物濃縮性の評価については、魚類を用いた結果を両生類へ外挿することが可能であることが示された。

AMA における遺伝子発現解析：化学物質暴露と給餌制限影響の比較

安全性評価においては、化学物質暴露による直接影響と摂餌量の低下やそれに基づく低体重などの二次的影響を区別することが重要である。オミックスによる分子レベルの遺伝子発現解析は、安全性評価における毒性メカニズムを理解するうえで有用な手段となりうる。そこで PYR および PTU を暴露したカエル幼生の甲状腺における遺伝子発現プロファイルマイクロアレイ解析により、制限給餌の二次的影響による作用機構との違いを検討した。PYR 暴露区および PTU 暴露区で共通して変動した遺伝子はごくわずかであった。階層クラスタリング解析では大きく 2 つのクラスターに分類され、ひとつは PTU 暴露区のサンプル、他方は PYR 暴露区+制限給餌区+対照区のサンプル群であった。後者はさらに、PYR 暴露区+制限給餌区のサンプル群と、対照区のサンプルの 2 つのクラスターに分類された。即ち、PYR 暴露による両生類甲状腺への作用機構は制限給餌と同等とみなすことができ、PTU 暴露によるものとは全く異なるものであると判断できた。トランスクリプトーム解析が作用機作の評価においても有用であることが示された。

以上の本研究の成果は、両生類を用いるという新たな生態環境評価法を確立しただけではなく、農薬毒性メカニズムのオミックスによる解明の端緒となるものであり、今後の新規農薬開発にも大きく貢献し、ひいては環境動物をめぐる獣医学の発展に寄与するものと考えられる。本論文の審査ならびに学力確認の結果とあわせて、博士(獣医学)の学位を授与することを適当と認める。