

平成 31 年/令和元年度  
厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

**バイタルサインの統合的評価をエンドポイントとした新規急性経口投与毒性試験方法の開発  
-統計学による半数致死量から診断学による概略の致死量への転換-(19KD1002)**

**分担研究報告書**

**分担研究課題 急性経口投与毒性による行動様式影響における非侵襲的な  
新規バイタルサインの探索**

研究分担者

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 教授）

**研究要旨**

本分担研究では、急性経口毒性発現時に動物が呈する行動様式影響を非侵襲的なバイタルサイン(VS)として利用するため、投与後動物の行動様式(移動量、移動様式、痙攣、流涎、瞬目)への影響、赤外線サーモグラフィによる体表温度の変化、超音波測定装置による超音波発声(USVs: ultrasonic vocalizations)を計測し、非侵襲的なバイタルサイン(VS)としての利用について検討する。今年度は、モデル化合物としてテトロドトキシン(300 $\mu$ g/kg)、アセフェート(50 および 300mg/kg)用いた成熟雄マウスへの投与実験を行った結果、テトロドトキシン投与群に体表温度の低下を伴う活動量低下と痙攣が、またアセフェート投与群においても体表温度の低下を伴う活動量低下と痙攣、が観察され、特にアセフェート 300mg/kg 投与群では、重度の振戦と瞬目不全が観察された。尚、いずれの投与群にも超音波発声の確認には至らなかった。従来が目視観察による記述式の一般状態観察による毒性発現を VS 計測データ取得によりスコア化することによって標準化する為の基礎データを取得することに成功した。

## A. 研究目的

本研究の目的は、ReductionとRefinementによりヒトの安全性確保に主眼を置いた新規急性経口投与毒性試験方法の開発である。現在、急性毒性において使用されているエンドポイントを「死亡」からより精緻な「複数のバイタルサイン」に置き換え、化学物質の毒性強度の指標を「統計学」を背景とした「半数致死量(LD50)」から「診断学」を基盤にした「概略の致死量」へ転換を図ることにあり、本分担研究では、特に実験動物の行動様式に顕れる影響を非侵襲的なバイタルサイン(VS)として利用するための計測手法の開発とそのスコア化による急性毒性指標の設定を目的とする。

## B. 研究方法

本分担研究では雄マウスを用いて、急性経口毒性発現時にマウスが呈する行動様式影響として投与後の行動様式(移動量、移動様式、痙攣、流涎、瞬目)への影響、赤外線サーモグラフィによる体表温度の変化、超音波測定装置による聴音波発声(USVs: ultrasonic vocalizations)を計測し、非侵襲的なバイタルサイン(VS)としての利用について検討する。今年度は、赤外線サーモグラフィによる体表温度と、超音波測定装置による聴音波発声の測定条件の設定を行うとともに、テトロドトキシン(300µg/kg)、アセフェート(50 および 300mg/kg)を用いた検討を行った。尚、アセフェートについてはOECD化学物質試験に関するガイドライン TG423(毒性等級法)にて設定されている5 mg/kg、50 mg/kg、300 mg/kg及び2,000 mg/kgの4段階から選択した。

## C. 研究結果

赤外線サーモグラフィによる体表温度の変化として、テトロドトキシン投与群に体表温度の低下を伴う活動量低下と痙攣が、またアセフェート投与群においても体表温度の低下を伴う活動量低下と痙攣が観察され、特にアセフェート300 mg/kg投与群では、重度の振戦と瞬目不全が観察された(図1)。尚、いずれの投与群にも超音波発声の確認には至らなかった。また、

超音波測定装置による聴音波発声(USVs: ultrasonic vocalizations)の測定については、測定条件設定を目的に性行動時の聴音波発声に成功したが、上記の投与条件下において、超音波発声の確認には至らなかった。

## D. 考察

赤外線サーモグラフィによる体表温度については、非常に有効なVSと考えられた。一方、超音波測定装置による聴音波発声については、測定条件を再検討すると共に、可聴域をも含めた解析が必要と考えられた。また、投与後の行動様式(移動量、移動様式、痙攣、流涎、瞬目等)影響は、上記の体表温度影響と高い相関があると考えられた為、動画データ取得による解析によって急性毒性指標の設定に向けた高度化が必要である。

## E. 結論

従来の目視観察による記述式の一般状態観察による毒性発現をVS計測データ取得によりスコア化することによって標準化する為の基礎データを取得することに成功した。今後、重度の振戦や瞬目不全についてもスコア化に向けた対応が必要であると考えられた。また超音波発声を含めた発声については雌雄差を含めた条件設定を進める必要があると考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Yamashita S, Kogasaka Y, Hiradate Y, Tanemura K, Sendai Y. Suppression of mosaic mutation by co-delivery of CRISPR associated protein 9 and three-primerepair exonuclease 2 into porcine zygotes via electroporation. J Reprod Dev. 2019 Nov 24. doi: 10.1262/jrd.2019-088. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 31761839.

○ Saito H, Hara K, Tominaga T, Nakashima K, Tanemura K. Early-life exposure to low levels of permethrin exerts impairments in learning and memory with the effects on neuronal and

glial population in adult male mice. *J Appl Toxicol.* 2019 Dec;39(12):1651-1662. doi: 10.1002/jat.3882. Epub 2019 Aug 15. PubMed PMID: 31415104

Goto M, Saito H, Hiradate Y, Hara K, Tanemura K. Differences in resistance against osmotic challenge among C57BL/6, DBA/2 and their hybrid mice metaphase II (MII) stage oocytes. *Zygote.* 2019 Aug;27(4):250-254. doi: 10.1017/S0967199418000370. Epub 2019 Aug 9. PubMed PMID: 31397238.

Kanamori M, Oikawa K, Tanemura K, Hara K. Mammalian germ cell migration during development, growth, and homeostasis. *Reprod Med Biol.* 2019 Jun 9;18(3):247-255. doi: 10.1002/rmb2.12283. eCollection 2019 Jul. Review. PubMed PMID: 31312103; PubMed Central PMCID: PMC6613016.

Kurata S, Hiradate Y, Umezu K, Hara K, Tanemura K. Capacitation of mouse sperm is modulated by gamma-aminobutyric acid (GABA) concentration. *J Reprod Dev.* 2019 Aug 9;65(4):327-334. doi: 10.1262/jrd.2019-008. Epub 2019 Jun 10. PubMed PMID: 31178551; PubMed Central PMCID: PMC6708848.

Umezu K, Yajima R, Hiradate Y, Yanai R, Numabe T, Hara K, Oikawa T, Tanemura K. Improvement in blastocyst quality by neurotensin signaling via its receptors in bovine spermatozoa during in vitro fertilization. *J Reprod Dev.* 2019 Apr 12;65(2):147-153. doi: 10.1262/jrd.2018-147. Epub 2019 Jan 19. PubMed PMID: 30662011; PubMed Central PMCID: PMC6473113.

## 2. 学会発表

倉田笙平、小塩健介、高森広典、梅津康平、平舘裕希、原健士朗、種村健太郎「ブタ精子機能に対する GABA 影響解析」日本畜産学会第 127 回大会 (2020.3.25-28)、京都府

酒井和哉、原健士朗、種村健太郎「精巢毒性モデルマウスにおける精子エピゲノム影響評価」第 42 回日本分子生物学会年会 (2019.12.3-6)、博多市

影山恵理、沼邊孝、種村健太郎、原健士朗「ウシ精巢の対外培養における PDMS 製カバーの有用性」第126回日本畜産学会大会 (2019.9.17-20)、盛岡市

牧野優誠、平舘裕希、矢内凜、齊藤洋克、原健士朗、種村健太郎「ニコチン型アセチルコリン受容体シグナルを利用したマウス精子機能の調節」第112回日本繁殖生物学会大会 (2019.9.2-5) 札幌市

倉田笙平、平舘裕希、梅津康平、原健士朗、種村健太郎「 $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) を利用した精子機能制御法の開発に資する研究」第112回日本繁殖生物学会大会 (2019.9.2-5) 札幌市

矢内凜、平舘裕希、原健士朗、藤井渉、佐原成彦、種村健太郎「タウ欠損マウスを用いた精子におけるタウ類似タンパクの発現様式」第112回日本繁殖生物学会大会 (2019.9.2-5) 札幌市

梅津康平、平舘裕希、原健士朗、種村健太郎「ウシ精子を卵母細胞に導く走化性因子の特定」第112回日本繁殖生物学会大会 (2019.9.2-5) 札幌市

○ Hirokatsu Saito, Kenshiro Hara, Takashi Tominaga, Kinichi Nakashima, Kentaro Tanemura 「Early-life exposure to low levels of permethrin exerts impairments in learning and memory associated with glial cell disturbance in adult male mice」the 15th IUTOX International Congress of Toxicology (ICTXV) (2019.7.15-18) ホ

ノルル

○ 種村健太郎「非侵襲的な早期精巣毒性バイオマーカーとしての精子エピゲノム影響評価」第38回日本アンドロロジー学会学術大会(2019.6.21-22)大阪府

○ 種村健太郎、北嶋聡、菅野純「低用量科学物質の周産期ばく露による情動認知行動動毒性～子どもの毒性額にむけた評価系開発の現在～」第46回日本毒性学会学術年会(2019.6.26-28)徳島市

○ 種村健太郎、北嶋聡、菅野純「発生期マウスへ

の神経シグナル異常による成熟後の神経行動毒性発現～海産毒による異常誘発モデルとしての検討～」第46回日本毒性学会学術年会(2019.6.26-28)徳島市

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

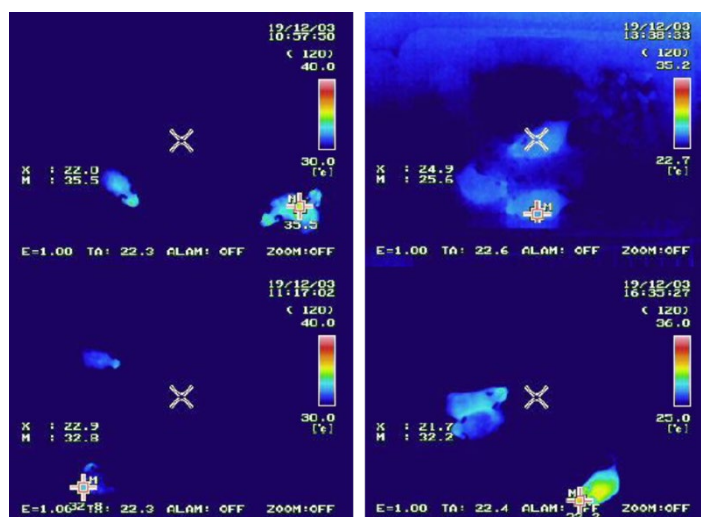


図1 急性毒性試験における行動解析(マウス Acephate 300 mg/kg 投与群)

体表温度の低下を伴う活動量低下と痙攣が観察され、特に Acephate 300 mg/kg 投与群では、重度の振戦と瞬目不全が観察された。