

令和2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聴音波発声（USVs: ultrasonic vocalizations）、顔面の動き、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、ハイスピードカメラによる顔面の動きを計測した。モデル化合物としてアセフェート（100 および 500mg/kg）用い、成熟雄マウスへの投与実験を行った。その結果、特にアセフェート 500mg/kg 投与群では、重度の振戦と瞬目異常が観察された。すなわち、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、より詳細な計測データ取得にすることに成功した。また、昨年度から実験動物として雄マウスを使用してきたが、急性経口毒性発現時に動物が呈する行動様式についての雌雄差を検討する目的で、オープンフィールド試験と大脳皮質の遺伝子発現解析を行った。

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)、ハイスピードカメラによる顔面の動き、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、ハイスピードカメラによる顔面の動きを計測した。モデル化合物としてアセフェート(100 および 500mg/kg)用い、成熟雄マウスへの投与実験を行った。また、昨年度から実験動物として雄マウスを使用してきたが、雌雄差を検討する目的で、オープンフィールド試験と大脳皮質の遺伝子発現解析を行った。

C. 研究結果

アセフェート(100 mg/kg)投与群において、投与5分後には異常所見は認められなかったが、投与30分後には活動量が低下し、投与60分後には流涎が顕著であった。投与120分後には、自発運動はみられるものの、歩行失調の様子がみられた。また、呼吸不整を起こしていると考えられた(図1)。一方で、アセフェート(500 mg/kg)投与群においては、投与5分後には異常所見は認められなかったが、投与30分後には活動性低下、半眼、流涎がみられたほか、

歩行時にはAChE阻害に特有の振戦が現れた。さらに、投与60分後には呼吸が浅く速いため、呼吸促拍や呼吸亢進の症状と考えられる異常や、筋肉麻痺のためか起立困難、歩行失調がみられた。そして投与120分後には、流涎で口まわりが濡れる様子が観察された。一方、姿勢制御不能で反応性運動(ヒトが触った刺激で動くなど)が認められなかった(図2)。

また、昨年度から実験動物として雄マウスを使用してきたが、雌雄差を検討する目的で、オープンフィールド試験(図3)と大脳皮質の遺伝子発現解析を行った。

D. 考察

ハイスピードカメラによる顔面の動きの取得は、非常に有効なVSと考えられた。今後、撮影条件を整備する必要があると考えられた。さらに赤外線サーモグラフィによる体表温度を組み合わせる必要があると考えられた。また、昨年度から実験動物として雄マウスを使用してきたが、雌雄差を検討する目的で、オープンフィールド試験を行ったところ、雌マウスに関しても、総移動距離、中央部対在時間、移動速度、移動回数、について極端なばらつきは認められなかった。超音波測定装置による聴音波発声については、雌マウスの方がデータを取得しやすいことがあるため、次年度は雌マウスでの反応を取得予定である。

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

Saito H, Hara K, Kitajima S, Tanemura K. Effect

of Vitamin E deficiency on spermatogenesis in mice and its similarity to aging. *Reprod Toxicol.* 2020 Oct 9;S0890-6238(20)30225-2. doi: 10.1016/j.reprotox. 2020.10.003. Epub ahead of print. PMID: 33045311..

Umezu K, Kurata S, Takamori H, Numabe T, Hiradate Y, Hara K, Tanemura K. Characteristics and Possible Role of Bovine Sperm Head-to-Head Agglutination. *Cells.* 2020 Aug 9;9(8):1865. doi: 10.3390/cells9081865. PMID: 32784858; PMCID: PMC7463926.

Hiradate Y, Hara K, Tanemura K. Effect of neurotensin on cultured mouse preimplantation embryos. *J Reprod Dev.* 2020 Oct 13;66(5):421-425. doi: 10.1262/jrd.2020-002. Epub 2020 Jun 2. PMID: 32493860; PMCID: PMC7593629.

Umezu K, Hara K, Hiradate Y, Numabe T, Tanemura K. Stromal cell-derived factor 1 regulates in vitro sperm migration towards the cumulus-oocyte complex in cattle. *PLoS One.* 2020 Apr 30;15(4):e0232536. doi: 10.1371/journal.pone.0232536. PMID: 32353075; PMCID: PMC7192438.

2. 学会発表

種村健太郎、佐々木貴熙、齊藤洋克、高橋祐次、北嶋聡、菅野純「発生期マウスへのドーモイ酸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2～」第47回日本毒性学会学術年会 (2020.6.29-7. 1)、オンライン
種村健太郎、齊藤洋克、古川佑介、相崎健一、北嶋聡、菅野純「低用量/低濃度化学物質の発生—発達期ばく露による情動認知行動毒性～情動認知行動毒性評価系の国際標準化に向けた対応～」第47回日本毒性学会学術年会 (2020.6.29-7. 1)、オンライン

齊藤洋克、原健士朗、富永貴志、中島欽一、北嶋聡、菅野純、種村健太郎、「低用量ペルメトリンの早期慢性ばく露による成熟後の雄マウス行動影響」

第47回日本毒性学会学術年会 (2020.6.29-7. 1)、オンライン

梅津康平、倉田笙平、平舘裕希、原健士朗、種村健太郎「ウシにおける凝集精子の特性と役割」第113回日本繁殖生物学会大会 (2020.9.23-25)、オンライン

原唯香、平舘裕希、原健士朗、北嶋聡、菅野純、種村健太郎「エストロゲン受容体 α 非翻訳領域遺伝子改変マウスの学習記憶不全と遺伝子発現プロファイル解析」第113回日本繁殖生物学会大会 (2020.9.23-25)、オンライン

張磨琉亜、平舘裕希、松山誠、藤井渉、原健士朗、種村健太郎「Axdnd1 遺伝子欠損マウスに精子形成不全」第113回日本繁殖生物学会大会 (2020.9.23-25)、オンライン

山下司朗、小賀坂祐平、平舘裕希、種村健太郎、千代豊「ブタ受精卵へのCRISPR/Cas9導入による遺伝子組換え胚作出とTrex2共導入によるモザイク胚低減」第113回日本繁殖生物学会大会 (2020.9.23-25)、オンライン

齊藤洋克、原健士朗、北嶋聡、種村健太郎、「ビタミンE欠乏給餌によるマウス雄性生殖器および精子への影響と加齢による退行変化との類似性」日本食品衛生学会創立60周年記念第116回学術講演会 (2020.11.24-12.8)、オンライン

種村健太郎、菅野純、低用量化学物質の周産期暴露による情動認知行動影響解と評価系の国際標準化に向けた展開、日本学術会議公開シンポジウム「食の安全と環境ホルモン」(2020.12.5) Web口演

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

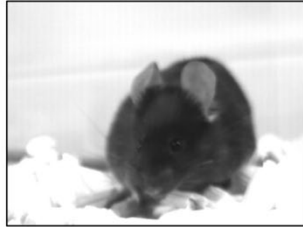
なし

3. その他

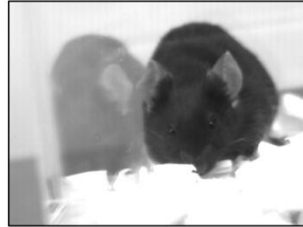
なし

ハイスピードカメラによる顔面の動き
(アセフェート投与 : 100 mg/kg)

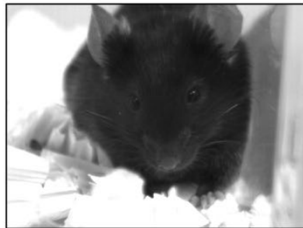
投与5分後



投与30分後



投与60分後



投与120分後

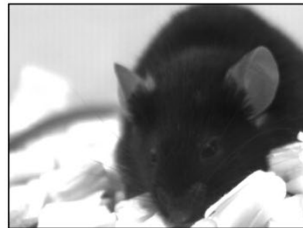
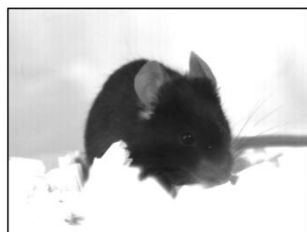


図1 急性毒性試験における行動解析(マウス Acephate 100 mg/kg 投与群)

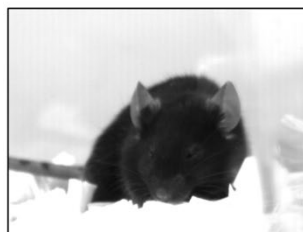
投与5分後には異常所見は認められなかったが、投与30分後には活動量が低下し、投与60分後には流涙が顕著であった。投与120分後には、自発運動はみられるものの、歩行失調の様子がみられた。

ハイスピードカメラによる顔面の動き
(アセフェート投与 : 500 mg/kg)

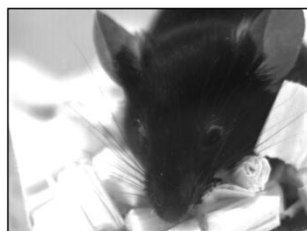
投与5分後



投与30分後



投与60分後



投与120分後

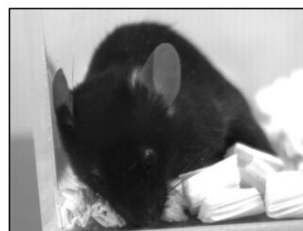


図2 急性毒性試験における行動解析(マウス Acephate 500 mg/kg 投与群)

投与 5 分後には異常所見は認められなかったが、投与 30 分後には活動性低下、半眼、流涙がみられたほか、歩行時にはAChE 阻害に特有の振戦が現れた。さらに、投与 60 分後には呼吸が浅く速いため、呼吸促拍や呼吸亢進の症状と考えられる異常や、筋肉麻痺のためか起立困難、歩行失調がみられた。そして投与 120 分後には、流涎で口まわりが濡れる様子が観察された。一方、姿勢制御不能で反応性運動が認められなかった。

オープンフィールド試験（雌雄差）

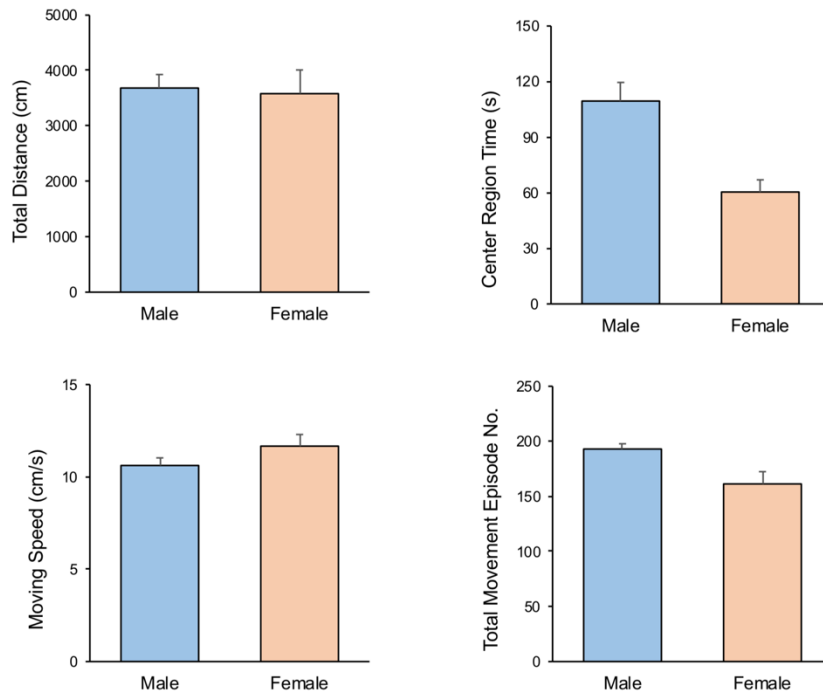


図3 オープンフィールド試験結果(雌雄差)

雌マウスに関しても、総移動距離、中央部対在時間、移動速度、移動回数、について顕著なばらつきは認められなかった。