

令和 3 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（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）、顔面の動き、等を計測し、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、生後 8 週齢の雌 ICR マウスに対して、モデル化合物としてアセフェート(300/500 mg/kg)、テトロドトキシン (300 µg/kg) を選択し、急性経口投与後における行動様式（移動量、移動様式、痙攣）や顔面表情(眼、呼吸)への影響について動画データの取得による解析を試みるとともに、超音波測定装置による超音波発声(USVs: Ultrasonic vocalizations)の測定を行った。尚、コントロール群には同量のメチルセルロースの経口投与を行った。その結果、コントロール群ではいずれのマウスにおいても投与後 0、30、60、90 分後において探索行動を行い、その活動量に違いは見られなかったが、アセフェート 300 mg/kg 投与群では、投与直後にはコントロール群との差異はなかったが、投与 30 分後では、初期探索は行うものの、活動量が低下した。また、わずかに振戦も確認された。投与 60 分後では活動量の著しい低下が見られ、腹臥位の状態の個体も見られた。振戦も強く現れていた。投与 90 分後ではほとんど動かず、後肢伸展が見られた個体もあった。また、痙攣が観察された。アセフェート 500 mg/kg 投与群では、投与直後ではコントロール群との差異はなかった。一方でいずれの群においても超音波発声は確認に至らなかった。以上から、従来の目視観察による記述式の一般状態観察に基づいた毒性発現を VS 計測データ取得のスコア化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(LD<sub>50</sub>)」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超音波発声(USVs: ultrasonic vocalizations)、ハイスピードカメラ等により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、生後8週齢の雌ICRマウスに対して、モデル化合物としてアセフェート(300/500 mg/kg)、テトロドトキシン(300 $\mu$ g/kg)を選択し、急性経口投与後における行動様式(移動量、移動様式、痙攣)や顔面表情(眼、呼吸)への影響についてカラービデオカメラによる動画データの取得による解析を試みるとともに超音波測定装置による超音波発声(USVs: Ultrasonic vocalizations)の測定を行った。尚、コントロール群には同量のメチルセルロースの経口投与を行った。

## C. 研究結果

### <行動様式>

コントロール群では、メチルセルロース投与後0、30、60、90分後のいずれにおいても探索行動や立位姿勢が見られ、活動量についても差異は見られなかった。

アセフェート300 mg/kg投与群では、投与直後にはコントロール群との差異はなかった。投与30分後には初期探索は行わないものの、活動量が低下した。また、

わずかに振戦も確認された。投与60分後には活動量の著しい低下が見られ、腹臥位の状態の個体も見られた。振戦も強く現れていた。投与90分後には、ほとんど動かず、後肢伸展が見られた個体もあった。また、痙攣が観察された。

アセフェート500 mg/kg投与群には、投与直後にはコントロール群との差異はなかった。投与30分後には活動量の低下が見られ振戦が観察された。投与60分には、著しい活動量の低下が観察され痙攣が確認された。投与90分後には、ほとんど動かず、全身性の強い痙攣が見られた。

テトロドトキシン投与群では、投与直後から30分後の間には活動量の低下が見られ、振戦や痙攣が観察された。また1個体は投与6分後に死亡した。投与60分から90分後にはわずかに痙攣が見られたものの、ほぼ回復状態を示した。

### <表情>

コントロール群では、いずれのマウスにおいても投与0、30、60、90分後のいずれにおいても表情の変化はなかった。

アセフェート300 mg/kg投与群では、投与直後にはコントロール群と同様の表情が見られた。投与30分後には眼瞼脱色が見られた。投与60分後には眼瞼腫脹が観察された。また、浅速呼吸と頻呼吸も観察された。投与90分後には眼瞼下垂によって瞬目不全になった個体が観察された。また、チェーン・ストーク型呼吸も観察された(図1)。

アセフェート500 mg/kg投与群では、投与直後はコントロール群と同様の表情が見られた。投与30分後には眼瞼脱色と眼瞼腫脹が見られた。また、浅速呼吸や頻呼吸が見られた。投与60分後には呼吸不全が更に強く現れ、流涙が見られた個体も存在した。投与90分後には眼瞼下垂、瞬目不全、流涙が観察され、チェーン・ストーク型呼吸も見られた(図2)。

テトロドトキシン投与群では、表現型が現れる時間に個体差はあったものの、投与直後から60分後にかけて眼瞼脱色とわずかな眼瞼腫脹が見られた。また、呼吸不全も観察された(図3)。それ以降は開眼し、呼吸もほとんど回復していた。

### <超音波発声>

いずれの群においても超音波発声は確認に至らなかった。

## D. 考察

カメラによる顔面の動きの取得は有効な VS と考えられた。今後、さらに撮影条件を整備する必要があると考えられた。また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。これまで実験動物として体毛色が黒い B6 マウスを使用してきたが、白い ICR マウスに切り替えることによってより正確に画像を得ることができたと考えている。一方で、雌マウスを使用したものの、いずれの群においても超音波発声は確認に至らなかった。これは、音声コミュニケーションとして、社会行動に含まれると考えられた。

## E. 結論

従来の「目視観察に基づく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ってスコア化可能なデータ」として取得することに成功した。これは標準化に向けた基礎データとして利用可能と考えられる。また、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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Sakai K, Hiradate Y, Hara K, Tanemura K. Potential of sperm small non-coding RNAs as biomarkers of testicular toxicity in a doxorubicin-induced mouse model. *Biochem Biophys Rep.* 2021 Oct 22;28:101160. doi: 10.1016/j.bbrep.2021.101160. PMID: 34729424; PMCID: PMC8545667.

Kawahara T, Kanouchi M, Naniwa Y, Koyago M, Numabe T, Mizutani K, Tanemura K, Hara K. Persistence of undifferentiated spermatogonia in aged Japanese Black cattle. *Anim Sci J.* 2021 Dec;92(1):e13572. doi: 10.1111/asj.13572. PMID: 34254411; PMCID: PMC8365669.

Umezumi K, Kurata S, Hara K, Tanemura K. Caffeine induces sperm detachment from sperm head-to-head agglutination in bull. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021 Jul 12;562:105-111. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.05.060. Epub 2021 May 26. PMID: 34049203.

Ogasawara S, Ezaki M, Ishida R, Sueyoshi K, Saito S,

Hiradate Y, Kudo T, Obara M, Kojima S, Uozumi N, Tanemura K, Hayakawa T. Rice amino acid transporter-like 6 (OsATL6) is involved in amino acid homeostasis by modulating the vacuolar storage of glutamine in roots. *Plant J.* 2021 Sep;107(6):1616-1630. doi: 10.1111/tpj.15403. Epub 2021 Jul 21. PMID: 34216173.

Sasaki T, Saito H, Hiradate Y, Hara K, Tanemura K. Behavioural effects in mice orally exposed to domoic acid or ibotenic acid are influenced by developmental stages and sex differences. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021 Jun 18;558:175-182. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.04.080. Epub 2021 Apr 28. PMID: 33932777.

Ideta-Otsuka M, Miyai M, Yamamoto N, Tsuchimoto A, Tamura H, Tanemura K, Shibutani M, Igarashi K. Development of a new in vitro assay system for evaluating the effects of chemicals on DNA methylation. *J Toxicol Sci.* 2021;46(2):83-90. doi: 10.2131/jts.46.83. PMID: 33536392.

Makino Y, Hiradate Y, Umezumi K, Hara K, Tanemura K. Expression and Possible Role of Nicotinic Acetylcholine Receptor  $\epsilon$  Subunit (AChRe) in Mouse Sperm. *Biology (Basel).* 2021 Jan 11;10(1):46. doi: 10.3390/biology10010046. PMID: 33440720; PMCID: PMC7826850.

### 2. 学会発表

菅野 純、北嶋 聡、相崎 健一、齊藤 洋克、種村 健太郎、肺の遺伝子発現応答と毒性機序予測解析、第 48 回 日本毒性学会学術年会(2021.7.9)

齊藤洋克、北嶋 聡、菅野 純、種村健太郎、低用量化学物質の発生-発達期ばく露による成熟後の神経行動毒性の検出と評価ー発生-発達期マウスへのネオニコチノイド系農薬ばく露影響解析を中心にー、第 48 回 日本毒性学会学術年会(2021.7.9)

富永貴志、種村 健太郎、富永洋子、膜電位感受性色素 (VSD) による全神経回路活動計測の開発:海馬スライス標本へのビスフェノール A 関連物質の急性投与、第 48 回 日本毒性学会学術年会(2021.7.9)

佐々木 貴熙、長谷川 彩乃、酒井 和哉、平舘 裕希、原 健士朗、Jahidul ISLAM、野地 智法、種村 健太郎、アセフェートの発生ー発達期慢性ばく露による成熟後のマウス行動影響と腸内細菌叢の解析 第 48 回 日本毒性学会学術年会(2021.7.9)

**G. 知的所有権の取得状況**

**1. 特許取得**

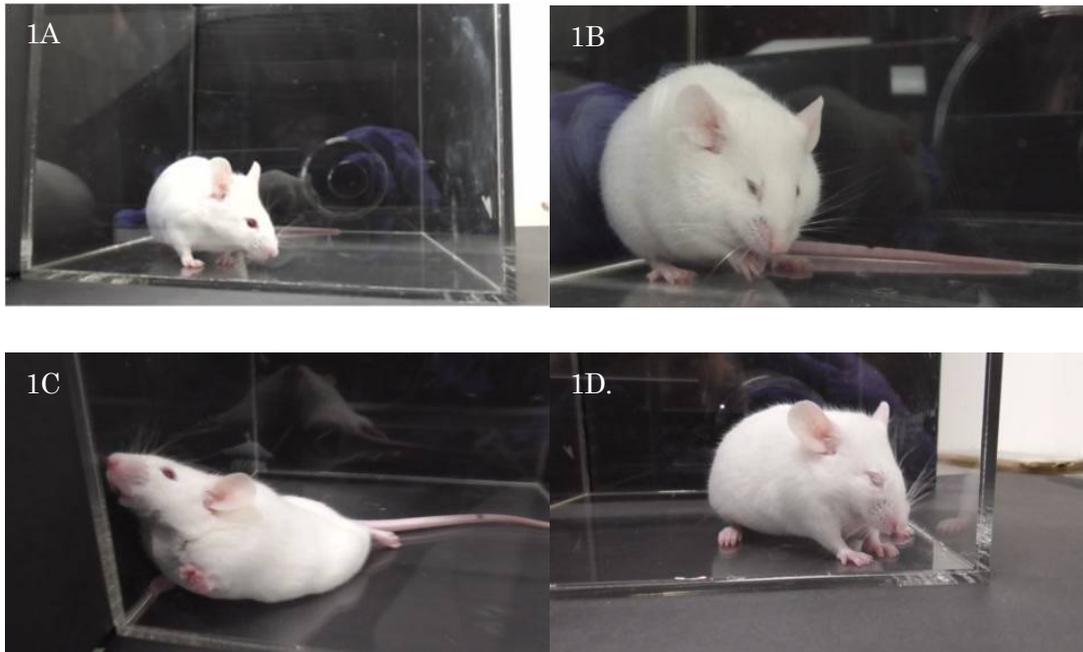
なし

**2. 実用新案登録**

なし

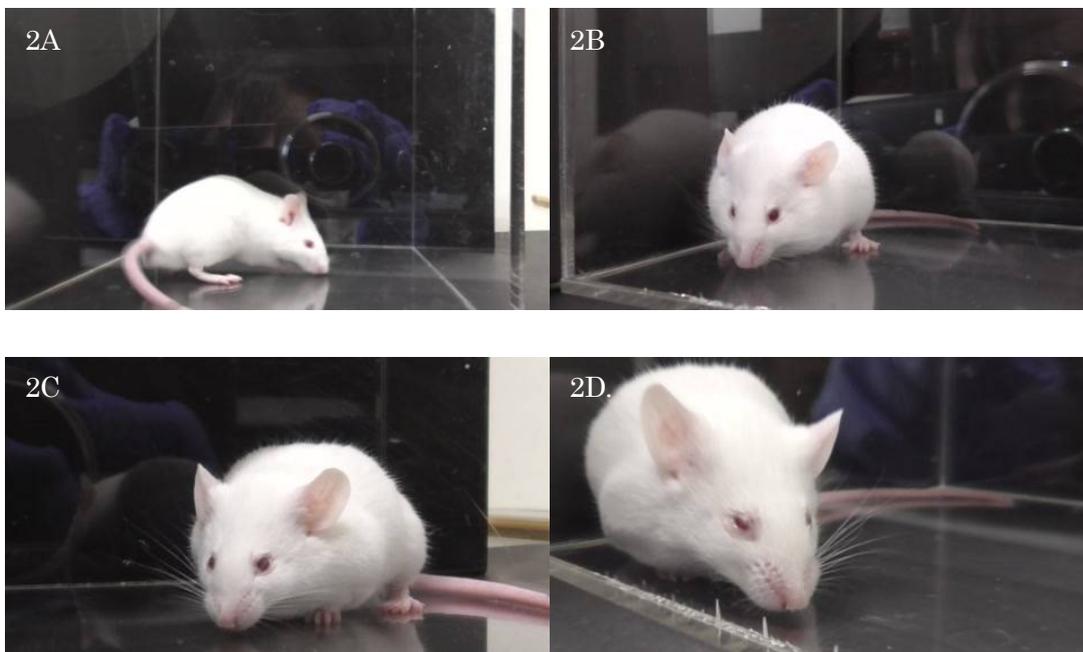
**3. その他**

なし



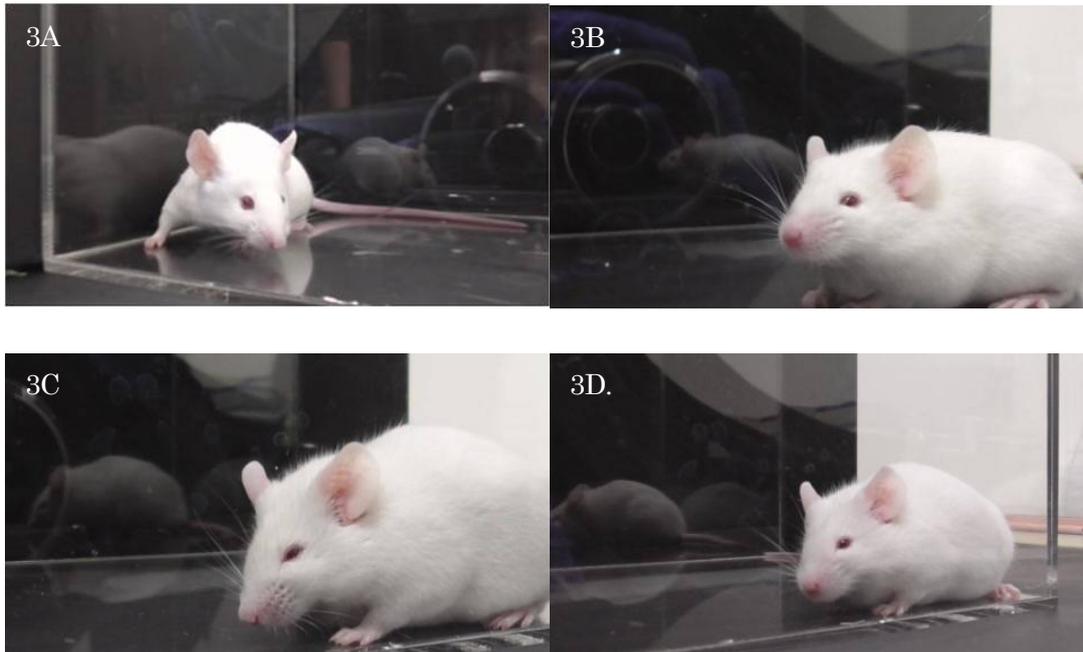
**図1 急性毒性試験における行動解析(アセフェート 300 mg/kg 投与群)**

投与直後にはコントロール群と同様の表情が見られた (1A)。投与 30 分後では眼瞼脱色が見られた (1B)。投与 60 分後では眼瞼腫脹が観察された (1C)。投与 90 分後では眼瞼下垂によって瞬目不全になった個体が観察された (1D)。



**図2 急性毒性試験における行動解析(アセフェート 500 mg/kg 投与群)**

投与直後にはコントロール群と同様の表情が見られた (2A)。投与 30 分後では眼瞼脱色傾向が見られた (1B)。投与 60 分後では眼瞼腫脹が観察された (2C)。投与 90 分後では眼瞼下垂によって瞬目不全になった個体が観察された (2D)。



**図3 急性毒性試験における行動解析(テトロドトキシン 300 mg/kg 投与群)**

投与直後から60分後にかけて眼瞼脱色とわずかな眼瞼腫脹が見られた(3A-D)。また、呼吸不全も観察された。それ以降は開眼し、呼吸もほとんど回復していた。