

令和元年度—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。

R1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超音波発声の測定条件の設定を行うとともに、一部のモデル化合物としてテトロドトキシン(300 µg/kg)、アセフェート(50および300 mg/kg)を用いた成熟雄性マウスへの投与実験を行った。その際、超音波発声が特に動物間のコミュニケーションに用いられていることが知られていることから、3-4匹ずつの投与群として検討した。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。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。

R2年度は、ハイスピードカメラにより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500 mg/kg)を用い、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500 mg/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の詳細な計測データ取得に成功した。また、昨年度から実験動物として雄性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を行った。

R3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。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。以上の成績から、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。すなわち、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。

R1 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超音波発声の測定条件の設定を行うとともに、テロドトキシシ (300 µg/kg)、アセフェート (50 および 300 mg/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。

R2 年度は、ハイスピードカメラにより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 500 mg/kg) を用い、成熟雄マウスへの投与と実験を行った。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。

R3 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)、テロドトキシシ (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) への影響についてカラービデオカメラを用いた動画データの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

<<R1 年度>>

赤外線サーモグラフィによる体表温度の変化として、テロドトキシシ投与群において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。尚、いずれの投与群において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超音波発声 (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超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。

<<R2 年度>>

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。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、呼吸促迫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。

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。

<<R3 年度>>

<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みられ、痙攣が観察された。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、全てのマウスにおいて投与 0、30、60、90 分後のいずれの時間においても表情の

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。

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。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

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。また、カメラによる顔面の動きの取得は有効な VS であるが、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。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.

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.

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 Res Commun.* 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.

Umezu 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, Umezu K, Hara K, Tanemura K. Expression and Possible Role of Nicotinic Acetylcholine Receptor ϵ 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

倉田笙平、小塩健介、高森広典、梅津康平、平館裕希、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「精巣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「ウシ精巣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、平館裕希、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、平館裕希、梅津康平、原健士朗、種村健太郎「 γ -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、平館裕希、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、平館裕希、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

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一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

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-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-、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-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