

バイタルサインの統合的評価による急性毒性試験の判定基準策定と代替法に資する研究  
-診断学とAIによる致死性予測と人道的エンドポイントの設定-

分担研究報告書

分担研究課題 急性毒性における行動解析

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としての利用について検討する。今年度は、急性毒性試験における非侵襲的な新規バイタルサインの候補として、ホームケージ活動量測定装置およびオープンフィールド活動量測定装置を用いて行動様式を解析した。また、超音波測定装置による超音波発声解析の測定を試みた。生後8週齢の成熟雌ICRマウスを使用し、有機リン農薬成分であるアセフェート(300 mg/kg)、ニコチン(50 mg/kg)、無水カフェイン(300 mg/kg)、テトロドトキシン(500 µg/kg)を用いた。その結果、ホームケージ活動量測定装置による解析からは、コントロール群と比較して、ニコチン投与群において投与10分後以降に活動量の低下が認められた。またアセフェート投与群においては投与20分後以降に活動量の低下が認められた。一方でテトロドトキシン投与群においては投与10分後に活動量の亢進が認められたが、投与30分後以降に急激な活動量の低下が認められた。また、無水カフェイン投与群については投与12時間後も活動量の亢進が認められた。オープンフィールド活動量測定装置による解析からはコントロール群と比較して、いずれの投与群においても投与10分後以降に活動量の低下が認められた。最も活動量の低下が著しく認められたのはテトロドトキシン投与群であり、投与30分後以降はほとんど動かなかった。またアセフェート投与群においては投与60分後以降にはほとんど動かなかった。一方でニコチン投与群と無水カフェイン投与群は活動量の低下を示すものの完全に活動を停止する事はなかった。なお、超音波測定装置による超音波発声解析では約20 Hzの音を聞かせることによる音に対する反応性も含めて、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。

## 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。本分担研究では、実験動物の行動様式に現れる影響を非侵襲的なバイタルサイン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、急性経口毒性発現時にマウスが呈する投与後の行動様式(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や、顔面の動きを計測し、非侵襲的なバイタルサインとしての利用について検討する。

今年度は生後8週齢の成熟雌ICRマウスを使用し、有機リン農薬成分であるアセフェート(300 mg/kg、N=4)、ニコチン(50 mg/kg、N=4)、無水カフェイン(300 mg/kg、N=4)、テロドトキシン(500 µg/kg、N=4)を用いた。急性毒性試験における非侵襲的な新規バイタルサインの候補としては、①ホームケージ活動量測定装置(W:25 cm×D:15 cm×H:13 cm、22 hour 施行、14時から翌日の12時まで測定した。また14時から19時までを明期、19時から翌日の7時までを暗期、7時から12時までを再び明期とした。なお、自由飲水自由摂餌とした)による解析と②オープンフィールド活動量測定装置(W:50 cm×D:50 cm×H:50 cm、120 min 施行)による解析を選択した。また、③超音波測定装置による超音波発声の測定を試みた。またその際に約20 Hzの音を聞かせることによって音に対する反応性も検討した。なお、いずれの実験も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(N=4)を行った。

## C. 研究結果

ホームケージ活動量測定装置による解析

ニコチン投与群において投与直後(1分後以内)に死亡した個体を確認した。この1例は解析から除外した。残りのマウスは少なくとも24時間生存していた。

コントロール群と比較して、ニコチン投与群におい

て投与10分後以降に活動量の低下が認められた。またアセフェート投与群において投与20分後以降に活動量の低下が認められた。一方でテロドトキシン投与群においては投与10分後に活動量の亢進が認められたが、投与30分後以降に急激な活動量の低下が認められた。また無水カフェイン投与群については投与12時間後も活動量の亢進が認められ、特に暗期(本来のマウスの活動時間帯)の活動量の亢進は顕著であった。ホームケージ活動量測定装置による解析結果を図1に示す。

オープンフィールド活動量測定装置による解析

コントロール群と比較して、いずれの投与群においても投与10分後以降に活動量の低下が認められた。最も活動量の低下が著しく認められたのはテロドトキシン投与群であり、投与30分後以降はほとんど動かなかった。またアセフェート投与群においては投与60分後以降にはほとんど動かなかった。一方でニコチン投与群と無水カフェイン投与群は活動量の低下を示すものの完全に活動を停止する事はなかった。また、オープンフィールド活動量測定装置における不安関連行動に認められる中央滞在時間に関して、ニコチン投与群においては著しい上昇が認められた。オープンフィールド活動量測定装置による結果を図2及び図3に示す。なお、全ての群において24時間の生存を確認できた。

超音波測定装置による超音波発声解析

約20 Hzの音を聞かせることによる音に対する反応性も含めて、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。なお、全ての群において24時間の生存を確認できた。

## D. 考察

ホームケージ活動量測定装置による解析について、測定時間を延長すべきであると考えられた。また、無水カフェイン投与群の投与用量について、投与12時間後も活動量の亢進が認められ、特に暗期(本来のマウスの活動時間帯)の活動量の亢進は顕著であったことから、無水カフェインの用量を再考すべきであると考えられた。

オープンフィールド活動量測定装置による解析については、測定時間内に死に至るマウスが認められなかったため、より高用量にすべきであると考えられた。同時に赤外線サーモグラフィとの併用が効果的

であると考えられた。

約 20 Hz の音を聞かせることによる反応性も含めて、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。すなわち、外界音に応答するわけではないことが明らかとなった。

## E. 結論

既存の行動解析装置をアレンジすることで従来の「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「バイタルサイン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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Hirokatsu Saito, Kentaro Tanemura, Yusuke Furukawa, Takahiro Sasaki, Jun Kanno, Satoshi Kitajima: Behavioral effects induced by the oral administration of acetamiprid in male mice during the postnatal lactation period or adulthood. *J Toxicol Sci.* 2023; 48(4): 203-210.[doi.org/10.2131/jts.48.203]

Takahiro Sasaki, Hirokatsu Saito, Yusuke Furukawa, Takashi Tominaga, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Kentaro Tanemura: Exposure to bisphenol A or its phenolic analogs during early life induces different types of anxiety-like behaviors after maturity in male mice. *J Toxicol Sci.* 2023; 48(4): 211-219.[doi.org/10.2131/jts.48.211]

Sakai K, Hara K, Tanemura K. Testicular histone hyperacetylation in mice by valproic acid administration affects the next generation by changes in sperm DNA methylation. *PLoS One.* 2023 Mar 9;18(3):e0282898.[doi:10.1371/journal.pone.0282898.]

Hasegawa A, Sasaki T, Islam J, Tominaga T, Nochi T, Hara K, Tanemura K. Effects of early-life tosufloxacin tosilate hydrate

administration on growth rate, neurobehavior, and gut microbiota at adulthood in male mice. *J Toxicol Sci.* 2023;48(3):149-159. [doi: 10.2131/jts.48.149.]

Kanno H, Kurata S, Hiradate Y, Hara K, Yoshida H, Tanemura K. High concentration of dopamine treatment may induce acceleration of human sperm motility. *Reprod Med Biol.* 2022 Oct 1;21(1):e12482. [doi: 10.1002/rmb2.12482.]

Kurata S, Umezu K, Takamori H, Hiradate Y, Hara K, Tanemura K. Exogenous gamma-aminobutyric acid addition enhances porcine sperm acrosome reaction. *Anim Sci J.* 2022 Jan;93(1):e13744. [doi: 10.1111/asj.13744.]

Kawabe Y, Numabe T, Tanemura K, Hara K. Characteristics of alpha smooth muscle actin-positive peritubular cells in prepubertal bovine testes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2022 Jun 18;609:48-53. [doi: 10.1016/j.bbrc.2022.03.149.]

Hiradate Y, Harima R, Yanai R, Hara K, Nagasawa K, Osada M, Kobayashi T, Matsuyama M, Kanno SI, Yasui A, Tanemura K. Loss of *Axdnd1* causes sterility due to impaired spermatid differentiation in mice. *Reprod Med Biol.* 2022 Mar 30;21(1):e12452. [doi: 10.1002/rmb2.12452.]

### 2. 学会発表

高橋祐次、鶴岡秀志、大久保佑介、種村健太郎、相崎健一、北嶋 聡: バイタルサインの統合的評価をエンドポイントとした急性毒性試験の近代化、第96回日本薬理学会年会、(2022.12.2)、横浜

佐々木 貴熙、原 健士朗、種村 健太郎: 発生-発達期のアセフェート曝露による性成熟への影響評価、第24回環境ホルモン学会研究発表会(環境化学物質3学会合同大会)(2022.6.14-16)

佐々木 貴熙、原 健士朗、種村 健太郎: アセフェートの発生-発達期慢性曝露が雌雄の生殖能成

熟に及ぼす遅発性影響評価、第49回日本毒性学会学術年会(2022.6.30-7.2)

長谷川 彩乃、佐々木 貴熙、原 健士朗、Jahidul ISLAM、野地 智法、種村 健太郎:発達期ニューキノロン系抗菌薬(TFLX)投与による成熟後の行動影響と腸内細菌叢解析、第49回日本毒性学会学術年会(2022.6.30-7.2)

張磨 琉亜、平舘 裕希、原 健士朗、種村 健太郎:精子完成におけるダイニン関連因子(Axdnd1)の機能解明、第115回日本繁殖生物学会大会(2022.9.11-7-9.14)

Takahiro Sasaki, Kenshiro Hara, Kentaro Tanemura, The effects of early life exposure to acephate on sexual maturation in male and female. The XVIth International Congress of Toxicology, (2022.9.18-7-9.21)

## **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. ホームケージ活動量測定装置による解析

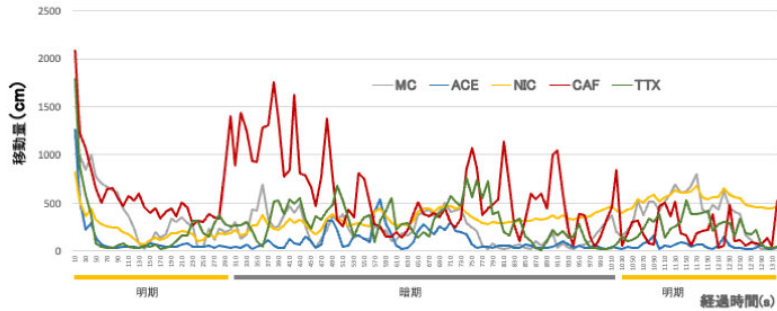


図1. ホームケージ活動量測定装置による移動量の経時変化(cm)  
 MC: メチルセルロース(N=4)、ACE: アセフェート(300 mg/kg、N=4)、NIC: ニコチン(50 mg/kg、N=4)、  
 CAF: 無水カフェイン(300 mg/kg、N=4)、TTX: テトロドトキシン(500 μg/kg、N=4)

図2. オープンフィールド活動量測定装置による解析(1)

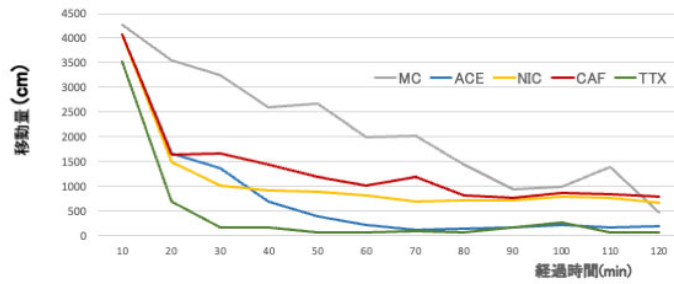


図2. オープンフィールド活動量測定装置による移動量の経時変化(cm)  
 MC: メチルセルロース(N=4)、ACE: アセフェート(300 mg/kg、N=4)、NIC: ニコチン(50 mg/kg、N=4)、  
 CAF: 無水カフェイン(300 mg/kg、N=4)、TTX: テトロドトキシン(500 μg/kg、N=4)

図3. オープンフィールド活動量測定装置による解析(3)

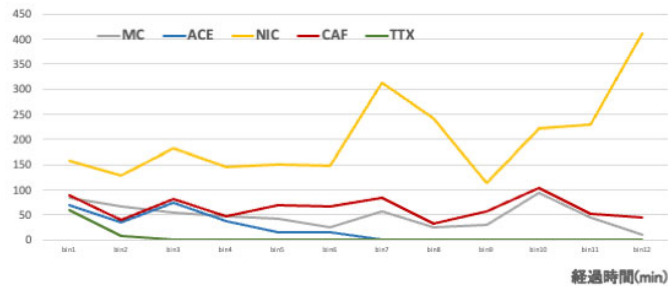


図3. オープンフィールド活動量測定装置による中央部滞在時間の経時変化(cm)  
 MC: メチルセルロース(N=4)、ACE: アセフェート(300 mg/kg、N=4)、NIC: ニコチン(50 mg/kg、N=4)、  
 CAF: 無水カフェイン(300 mg/kg、N=4)、TTX: テトロドトキシン(500 μg/kg、N=4)