

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(VS)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、アセフェート(300 mg/kg)、ニコチン(50mg/kg)、無水カフェイン(300 mg/kg)を選択し、ホームケージ活動量測定装置により急性経口毒性発現時の行動様式の経時的影響(68 時間:4080 分)を解析した。また、超音波測定装置による超音波発声(USVs: ultrasonic vocalizations)の録音データ取得条件の最適化を目指した。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、アセフェート(300 mg/kg)投与群において、投与 10 分後にかけて活動量の上昇が認められたが、その後 30 分後にかけて急激な活動量の低下が認められ、投与 60 分後以降から 500 分後まではほぼ活動量は認められなかった。また、ニコチン(50 mg/kg)投与群において、投与 10 分後にかけて活動量の上昇が認められたが、その後 30 分後にかけて活動量の低下が認められたが、コントロール群と比較して、それらは低いものであった。無水カフェイン(300 mg/kg)投与群については投与 12 時間後まで活動量の亢進が認められたが、投与 500 分後以降は、ほぼ正常な昼夜リズムが認められた。なお、超音波測定装置による超音波発声解析を投与開始 4 時間後と 20 時間後に行ったが、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。すなわち、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(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、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(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、①N=4、②N=4)、ニコチン(50 mg/kg、①N=4、②N=4)、無水カフェイン(300 mg/kg、①N=4、②N=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:25cm×D:15cm×H:13cm、68 hour 施行、14時から翌々日の10時まで測定した。また7時から19時までを明期、19時から翌日の7時までを暗期とし、自由飲水自由摂餌とした)による解析と、②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

①ホームケージ活動量測定装置による解析

コントロール群では馴化行動につづいて飲水行動や摂食行動が認められ、また、ほぼ正常な昼夜リズム

が認められた。計測終了後のマウス体重は認められなかった。

アセフェート(300 mg/kg)投与群において、投与10分後にかけて活動量の上昇が認められたが、その後30分後にかけて急激な活動量の低下が認められ、投与60分後以降から500分後まではほぼ活動量は認められなかった。投与600分後以降は一部のマウスに活動量が認められたが、飲水行動や摂食行動は認められなかった。投与850分後以降、4080分後まで、ほぼ全てのマウスに活動量は認められなかったものの、生存が確認できた。なお、計測終了後のマウス体重は約10%減少していた。

ニコチン(50mg/kg)投与群において、投与10分後にかけて活動量の上昇が認められたが、その後30分後にかけて活動量の低下が認められたが、コントロール群と比較して、それらは低いものであった。投与1500分後以降は4匹中の3匹のマウスにおいて活動量は認められず、計測終了後に死亡が確認されたが、1匹のマウスにおいては飲水行動や摂食行動が認められ、ほぼ正常な昼夜リズムが認められた。計測終了後のマウス体重に変動は認められなかった。

また無水カフェイン(300 mg/kg)投与群については投与12時間後まで活動量の亢進が認められ、コントロール群と比較して馴化行動が遅れていたが、やがて特に暗期(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が、投与500分後以降は、ほぼ正常な昼夜リズムが認められ、また、計測終了後のマウス体重は認められなかった。

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。

②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、全ての群において投与開始4時間後と20時間後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、死に至るまで行動異常を捉えることができた。今後、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。超音波発声は性行動や保育行動のコミュニケーション時に行われるが、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「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。

F. 研究発表

1. 論文発表

Sasaki T, Hara K, Tanemura K. Early-life exposure to acephate inhibits sexual development and induces testicular and ovarian toxicity in mice. *Reprod Toxicol*. 2023 Oct;121:108472. doi: 10.1016/j.reprotox.2023.108472. Epub 2023 Sep 16.

Saito H, Furukawa Y, Sasaki T, Kitajima S, Kanno J, Tanemura K. Behavioral effects of adult male mice induced by low-level acetamiprid, imidacloprid, and nicotine exposure in early-life. *Front Neurosci*. 2023 Aug 16;17:1239808. doi:10.3389/fnins.2023.1239808.

Sasaki T, Saito H, Furukawa Y, Tominaga T, Kitajima S, Kanno J, Tanemura K. 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: 10.2131/jts.48.211.

Saito H, Tanemura K, Furukawa Y, Sasaki T, Kanno J, Kitajima S. 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:

10.2131/jts.48.203.

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.

2. 学会発表

原 健士朗、野地 智法、種村 健太郎: 有機リン系殺虫剤の発達気暴露が脳・腸へ及ぼす影響、第 50 回日本毒性学会学術年会(2023.6.19-6.21)

加来 建之、佐々木 貴熙、原 健士朗、種村 健太郎: クロチアニジンの幼若期/思春期/成熟期暴露が及ぼす遅発行動影響とその雌雄差、第 50 回日本毒性学会学術年会(2023.6.19-6.21)

張磨 琉亜、原 健士朗、種村 健太郎: Axdnd1 遺伝子欠損により生じる精子形成不全 ~非閉息性無精子症モデルマウスとしての有用性の検討~、第 41 回日本受精着床学会総会・学術講演会(2023.7.27-7.28)

佐々木 貴熙、齊藤 洋克、古川 佑介、富永 貴志、北嶋 聡、菅野 純、種村 健太郎: Exposure to bisphenol A or its phenolic analogs during early life induces different types of anxiety-like behaviors after maturity in male mice、第 46 回日本神経科学大会(2023.8.1-8.4)

川邊 悠介、中川 俊徳、山田 紗也、種村 健太郎、嶋 雄一、吉田 松生、原 健士朗: 精巣成長に沿ったマウス精子幹細胞でのラミン発現の拡大とその役割、第 116 回日本繁殖生物学会大会(2023.9.24-9.27)

張磨 琉亜、金子 尚志、原 健士朗、斎藤 芳郎、

種村 健太郎:セレノプロテイン P 翻訳抑制因子:
ccdc152 による精子形成への影響解析、第 116 回
日本繁殖生物学会大会(2023.9.24-9.27)

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

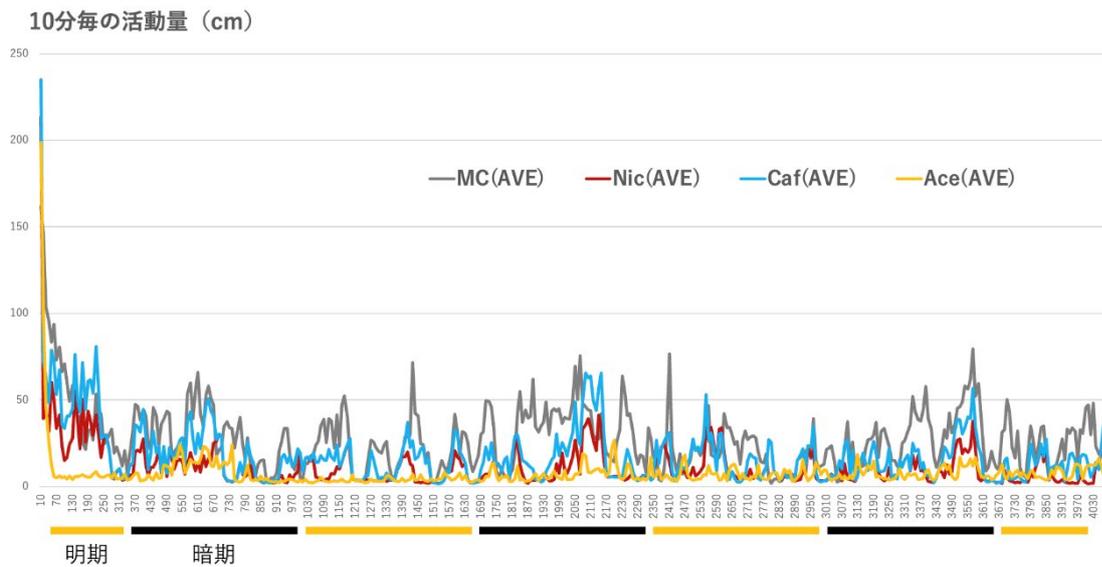


図1 ホームページ活動量測定装置による活動量の経時解析

ホームページ活動量測定装置による活動量の経時解析。10分毎の各投与群の活動量の平均を cm で示した。
 MC:メチルセルロース水溶液、Nic:ニコチン(50mg/kg)、Caf:無水カフェイン(300 mg/kg)、Ace:アセフェート(300 mg/kg)