

令和 6 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-(22KD1004)**

**分担研究報告書**

**分担研究課題 急性毒性試験における行動解析**

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、聴覚性プレパルス驚愕反応抑制試験装置（プレパルス・インヒビション）を用いた解析を行った。雌 ICR マウスを使用し、アセフェート (300 mg/kg)、無水カフェイン (300 mg/kg)、ニコチン (50 mg/kg)、を選択し、急性経口毒性発現時のプレパルス・インヒビション（軽減率）の経時的影響を解析した。その結果、80db、85db、90db のプレパルスに対して、120db のパルスを用いたプレパルス・インヒビション（軽減率）については、コントロール群と比較して、投与 2 時間後および投与 24 時間後にアセフェート投与群とニコチン投与群に増強傾向が認められたが、無水カフェイン投与群には顕著な差異は認められなかった。

## 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。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診断学を基盤にしたスコア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与え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、急性毒性試験における行動解析について、聴覚性プレパルス驚愕反応抑制試験装置(プレパルス・インヒビション)を用いた解析を行った。雌 ICR マウスを使用し、アセフェート(300 mg/kg)、無水カフェイン(300 mg/kg)、ニコチン(50mg/kg)、を選択し、急性経口毒性発現時のプレパルス・インヒビション(軽減率)の経時的影響(2 時間後、及び 24 時間後)を解析している。なお、突然に強い感覚刺激(この場合は、聴覚性刺激)を動物に与えることで生じる驚愕反応が、その強い刺激の直前(60-120 msec)に比較的弱い刺激を先行させることで、抑制される現象をいう。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

まず、80db、85db、90db、95db、100db、105db、110dにて驚愕反応量を調べたところ、コントロール群と比較して、投与 2 時間後のアセフェート投与群とニコチン投与群に驚愕反応量の抑制が確認された。一方で、無水カフェイン投与群に驚愕反応量の増強傾向が認められた。また、投与 24 時間後ではアセフェート投与群とニコチン投与群に驚愕反応量抑制の緩和が確認された。一方で、無水カフェイン投与群に驚愕反応量の抑制傾向が認められた(図1~4)。

80db、85db、90db のプレパルスに対して、120db のパルスを用いたプレパルス・インヒビション(軽減率)については、コントロール群と比較して、投与 2 時間後および投与 24 時間後にアセフェート投与群とニコチン投与群に増強傾向が認められたが、無水カフェイン投与群には顕著な差異は認められなかった(図

5)。

## D. 考察

聴覚性プレパルス驚愕反応抑制試験装置(プレパルス・インヒビション)を用いた解析による急性毒性のエンドポイントの評価に関しては、化学物質による差異が顕著であるため、他の行動試験との組み合わせによる補正が必要と判断できた。

## 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

Harima R, Sasaki T, Kaneko T, Aso F, Takashima H, Toyama T, Hara K, Tanemura K, Saito Y. Ccdc152 is not necessary for male fertility, but contributes to maintaining sperm morphology. *J Reprod Dev.* 2024 Dec 13;70(6):396-404.

Yanai R, Mitani TT, Susaki EA, Minamihisamatsu T, Shimojo M, Saito Y, Mizuma H, Nitta N, Kaneda D, Hashizume Y, Matsumoto G, Tanemura K, Zhang MR, Higuchi M, Ueda HR, Sahara N. A novel tauopathy model mimicking molecular and spatial aspects of human tau pathology. *Brain Commun.* 2024 Sep 19;6(5):fcae326.

Sasaki T, Islam J, Hara K, Nochi T, Tanemura K. Male mice are susceptible to brain dysfunction induced by early-life acephate exposure. *Front Neurosci.* 2024 Jul 10;18:1404009.

Kaku K, Sasaki T, Hara K, Tanemura K. A single dose of clothianidin exposure induces varying sex-specific behavioral changes in adulthood depending on the developmental stage of its administration. *J Toxicol Sci.* 2024;49(7):301-311.

## 2. 学会発表

種村 健太郎: 発達期トスフロキサシン投与による成長影響と成熟後の神経行動様式、第 51 回日本毒性学会学術年会(2024.7.3-5)

Ryua Harima, Kenshiro Hara, Kentaro Tanemura: Cytoplasmic dynein 2 is required to the regulation of intra-flagellar transport system in sperm flagellum formation. SSR (Society for the Study of Reproduction) Annual Meeting 2024, Dublin, Ireland (the Convention Centre Dublin) (2024.7.15-19)

張磨 琉亜、原 健士朗、種村 健太郎: マウス Tctex1d2 は体細胞系列の繊毛形成にはない、精子鞭毛形成に特有の機能をもつ、第 117 回日本繁殖生物学会大会(2024.9.22-9.25)

## **G. 知的所有権の取得状況**

### 1. 特許取得

なし

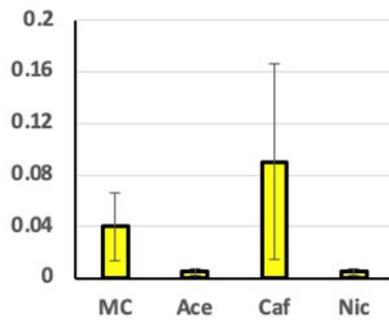
### 2. 実用新案登録

なし

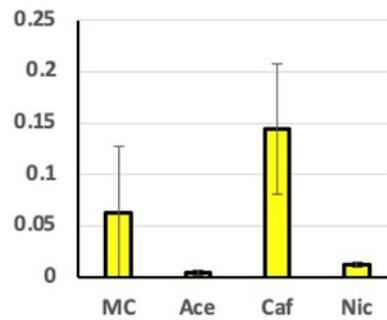
### 3. その他

なし

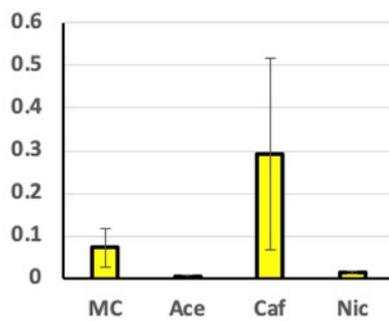
80dBパルスでの反  
応量：2h後



90dBパルスでの反  
応量：2h後



85dBパルスでの反  
応量：2h後



95dBパルスでの反  
応量：2h後

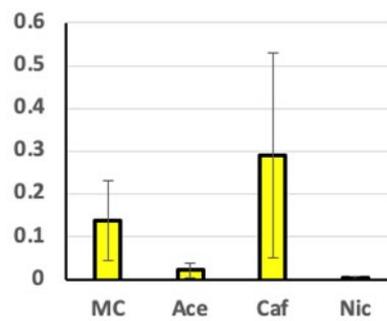
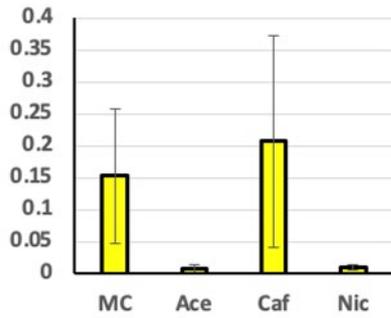


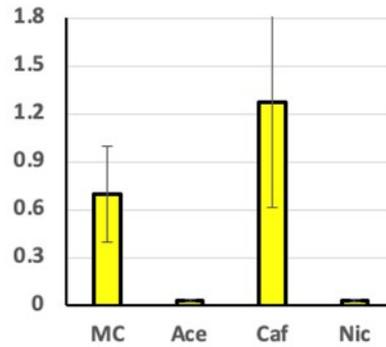
図1

投与2時間後の80db、85db、90db、95dbの驚愕反応量。MC: コントロール群、Ace: アセフェート (300 mg/kg)、Caf: 無水カフェイン (300 mg/kg)、Nic: ニコチン (50mg/kg)。

100dBパルスでの  
反応量：2h後



110dBパルスでの  
反応量：2h後



105dBパルスでの  
反応量：2h後

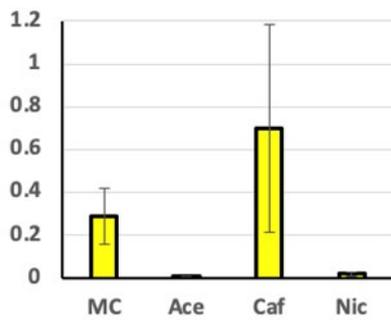
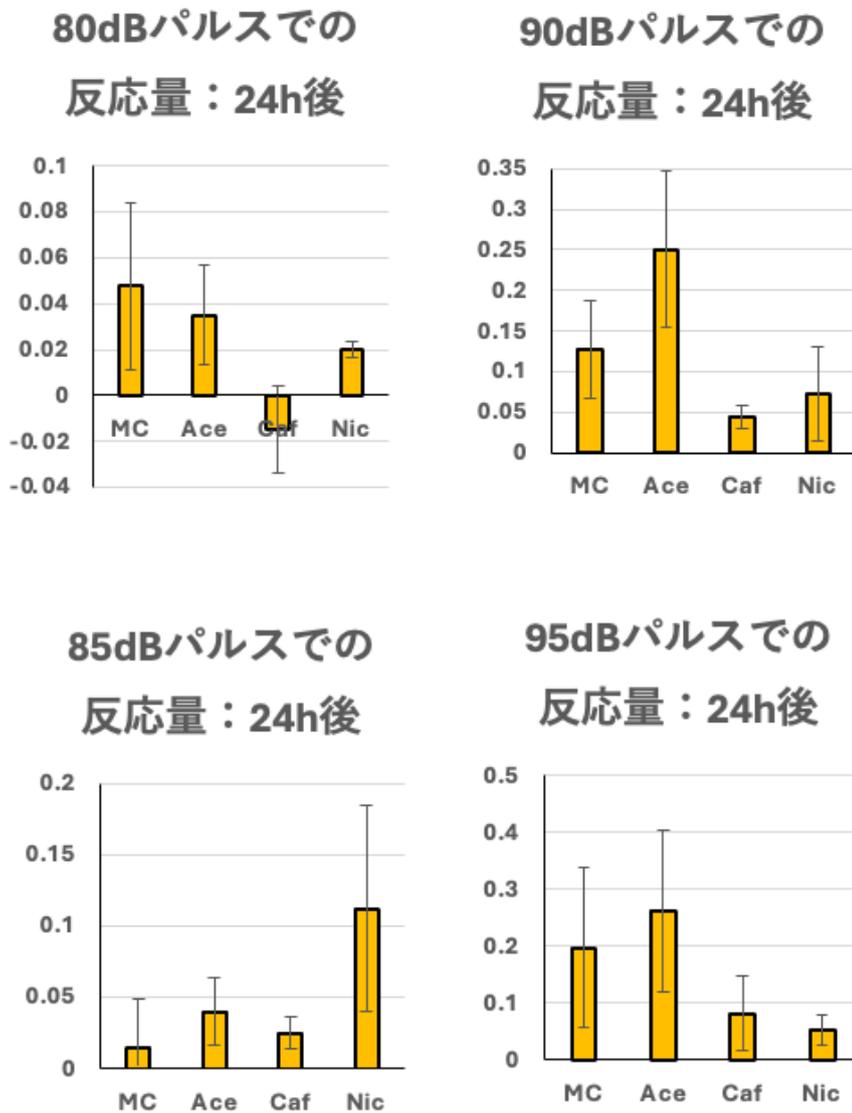


図2

投与 2 時間後の 100db、105db、110d の驚愕反応量。MC: コントロール群、Ace: アセフェート (300 mg/kg)、Caf: 無水カフェイン (300 mg/kg)、Nic: ニコチン (50mg/kg)。



**図3**

投与 24 時間後の 80db、85db、90db、95db の驚愕反応量。MC: コントロール群、Ace: アセフェート(300 mg/kg)、Caf: 無水カフェイン(300 mg/kg)、Nic: ニコチン(50mg/kg)。

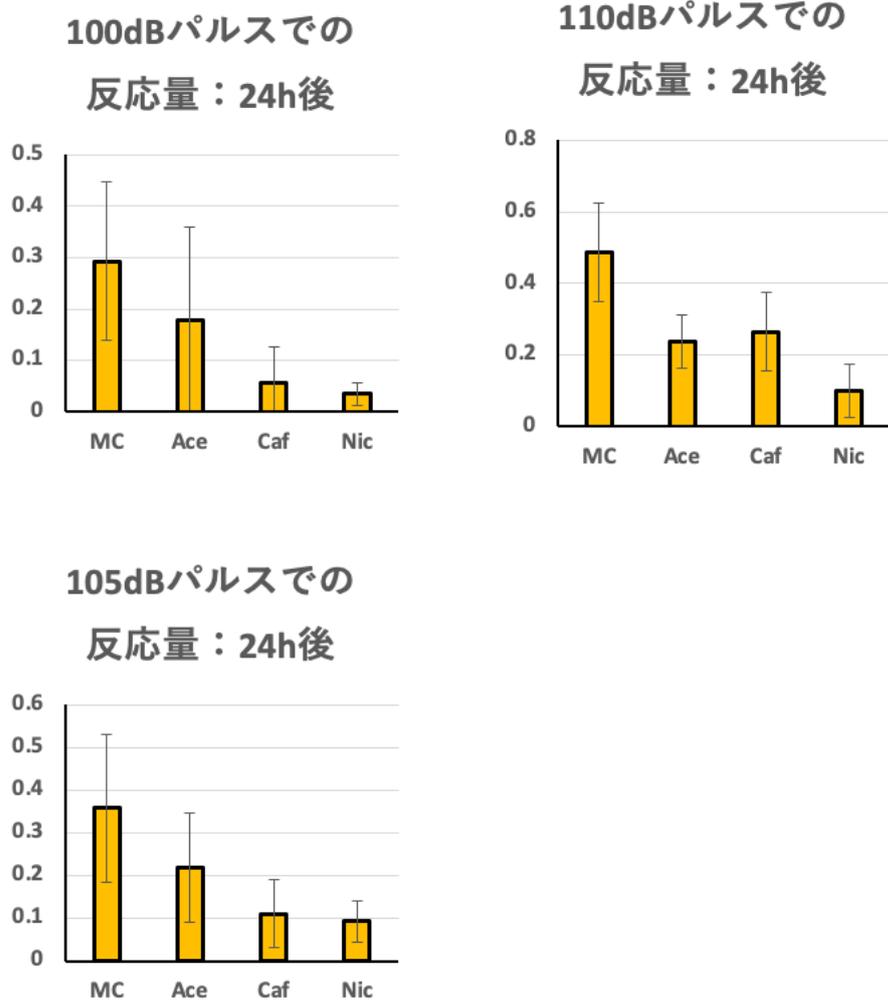
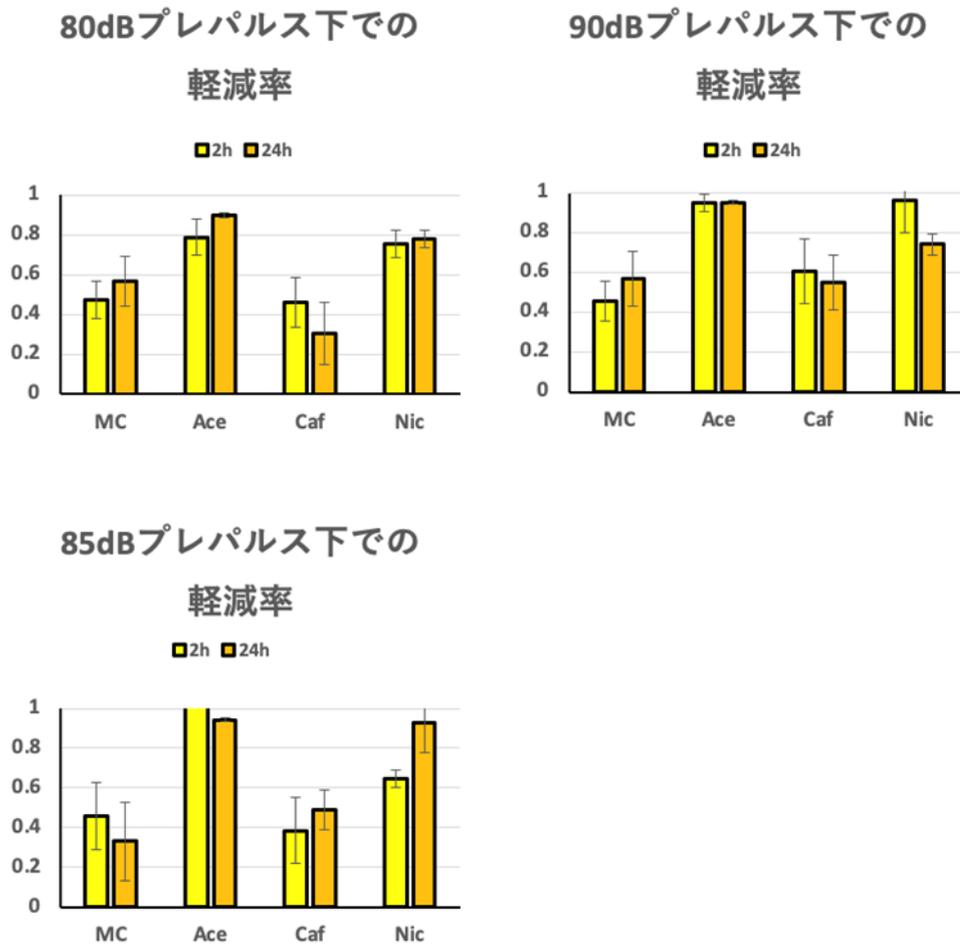


図 4

投与 24 時間後の 100db、105db、110d の驚愕反応量。MC: コントロール群、Ace: アセフェート(300 mg/kg)、Caf: 無水カフェイン(300 mg/kg)、Nic: ニコチン(50mg/kg)。



**図5**

投与2時間後および24時間後の80db、85db、90dbのプレパルスに対して、120dbのパルスを用いたプレパルス・インヒビション(軽減率)。MC: コントロール群、Ace: アセフェート(300 mg/kg)、Caf: 無水カフェイン(300 mg/kg)、Nic: ニコチン(50mg/kg)。