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した。

令和4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。

令和5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(50 mg/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。

令和 6 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顕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(VS)としての利用について検討した。

令和 4 年度生後 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)、テトロドトキシン(500 μ g/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:25cm × D:15cm × H:13cm、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:50cm × D:50cm × H:50cm、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。

令和 5 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。

令和 6 年度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

令和 4 年度

①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。

②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。

③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。

令和5年度

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。

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。

令和6年度

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。

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・インビジョン(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。

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。

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。

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された。

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.

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 tosylate 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.

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 tosylate 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

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 回日本繁殖生物学学会大会(2024.9.22-9.25)

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ニ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)

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