

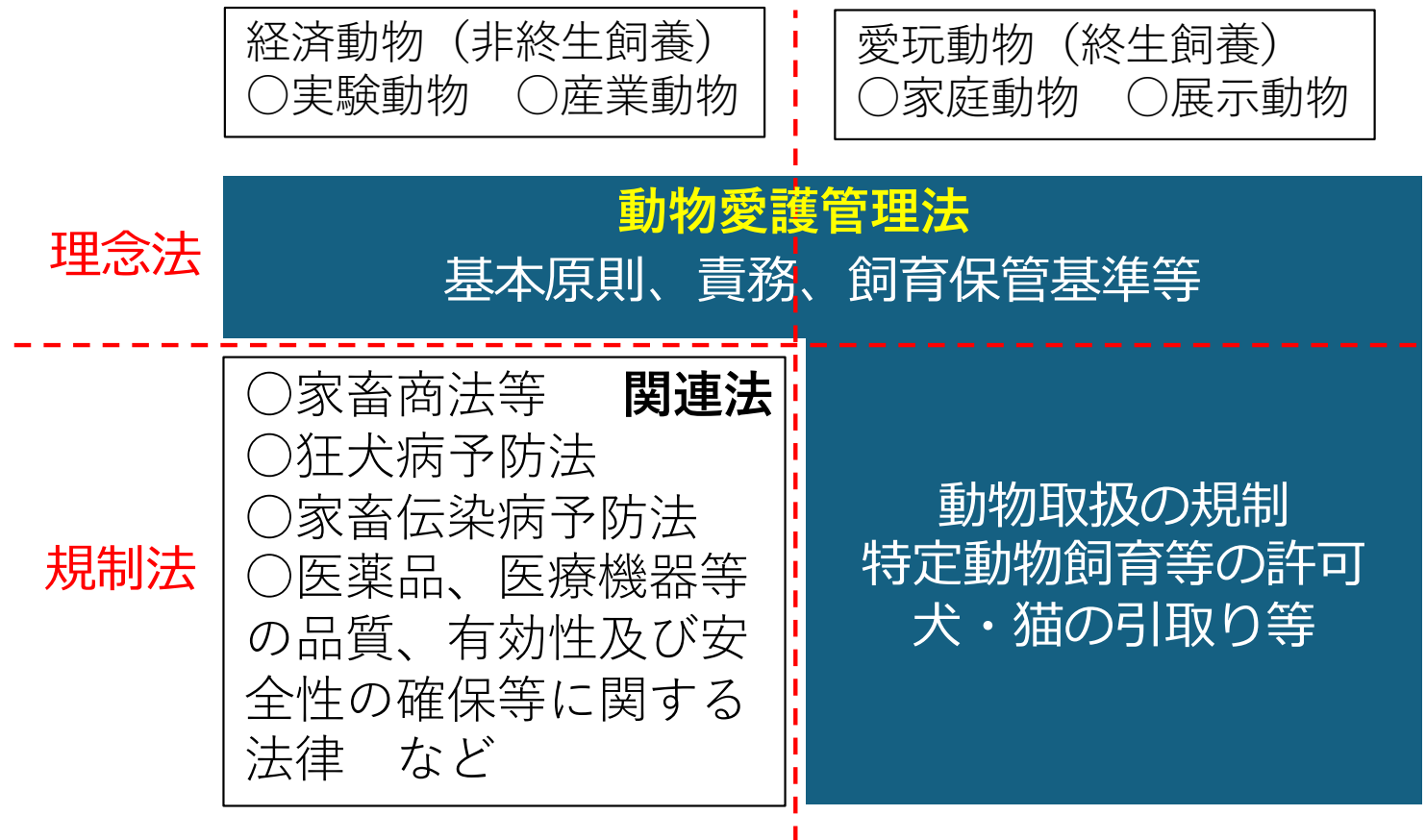
症状診断を活用した魚類急性毒性試験へ の転換と代替法活用に向けた研究

環境リスク・健康領域
環境リスク科学研究推進室
山岸隆博

動物の愛護及び管理に関する法律（動物愛護管理法）について

（基本原則）

第二条 動物が命あるものであることにかんがみ、何人も、動物をみだりに殺し、傷つけ、又は苦しめることのないようにするのみでなく、人と動物の共生に配慮しつつ、その習性を考慮して適正に取り扱うようにしなければならない。



- 実験動物については理念法の範疇であり、飼育基準などはあるが義務ではない。
- ただし、虐待や遺棄は実験動物であっても罰則の対象となる。

実験動物/動物実験の法体系：国際的動向とわが国の状況

日本

国際実験動物学会議（ICLAS: International Council for Laboratory Animal Science）
国際医科学団体協議会（CIOMS: Council for International Organization of Medical Science）

CIMOS-ICLAS国際原則

3R原則

苦痛の軽減 使用数削減 代替法利用

実験動物（飼養）

動物実験（利用）

動物愛護管理法（環境省）

- 実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（環境省）

動物愛護管理法（環境省）

動物実験基本指針（文科・厚労・農水省）

- 動物実験ガイドライン（学術会議）

指導

各機関が実験動物・動物実験に関する規定を作成し管理

- 日本の実験動物・動物実験に関する法体系は、法的枠組みを踏まえた研究機関による自主的規制である。

自主規制（枠組み規制）

実験動物/動物実験の法体系：国際的動向とわが国の状況

例：イギリス

国際実験動物学会議 (ICLAS: International Council for Laboratory Animal Science)
国際医科学団体協議会 (CIOMS: Council for International Organization of Medical Science)

↓
CIMOS-ICLAS国際原則

3R原則

苦痛の軽減 使用数削減 代替法利用

↓
EU Directive

DIRECTIVE 2010/63/EU on the protection of Animals used for Scientific Purposes

↓
実験動物 (飼養) + 動物実験 (利用)

Animals [Science Procedures] Act
(動物(実験処置)法：内務省)

- Code of Practice (実務規範)

法規制

実験施設：内務大臣による認定

実験実施者：免許制

+ 内務省による査察

実験計画：内務省長官の承認

実験動物/動物実験の法体系：国際的動向とわが国の状況

例：アメリカ

国際実験動物学会議 (ICLAS: International Council for Laboratory Animal Science)
国際医科学団体協議会 (CIOMS: Council for International Organization of Medical Science)

CIMOS-ICLAS国際原則

3R原則

苦痛の軽減 使用数削減 代替法利用

実験動物 (飼養)

動物実験 (利用)

Animal Welfare Act
(動物福祉法：農務省)

Health Research Extension ACT
(健康科学推進法：保健福祉省)

- PHS Policy (保健福祉省)
- ILARガイド (実験動物研究協会)

農務省 (USDA) による査察

* 科学者で構成される非営利団体
(AAALAC International) の施設
認証も容認

法規制

attending veterinarian (選任獣医師)
AAALACの認証取得または機関
長による評価

自主規制

例：欧州諸国

20.10.2010

EN

Official Journal of the European Union

L 276/33

DIRECTIVES

DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL

of 22 September 2010

on the protection of animals used for scientific purposes

(Text with EEA relevance)

- (8) In addition to vertebrate animals including cyclostomes, cephalopods should also be included in the scope of this Directive as there is scientific evidence of their ability to experience pain, suffering, distress and lasting harm.

cyclostomes: 円口類；ヤツメウナギ、ヌタウナギ

cephalopods: 頭足類；タコ、イカ

- EU指令は、脊椎動物に加えて、円口類や頭足類を動物福祉の対象としている。

動物福祉の対象生物：国際的動向とわが国の状況

例：アメリカ

法律	動物福祉法（飼養）	健康科学推進法（動物実験）
下部法令	動物福祉法施行規則	PHS方針
所管	農務省動物検疫局（APHIS）	保健福祉省公衆衛生局（PHS） NIH動物福祉局（OLAW）
対象範囲	温血動物	脊椎動物
適用範囲	繁殖業者、販売業者、展示業者、 研究施設	健康科学推進法のもとにNIHや国立の 研究機関から研究費を得る機関
監査	少なくとも年1回の事前通告なしの 査察	施設訪問もありうる

- アメリカは、実験動物の飼養とその利用（動物実験）で対象動物の範囲が異なる。
- 動物実験では、その対象に魚類も含まれる。

動物福祉の対象生物：国際的動向とわが国の状況

日本：

法律	動物愛護管理法（飼養）	動物愛護管理法（動物実験）
下部法令	実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準	動物実験基本指針（文科・厚労・農水省）
所管	環境省自然環境局総務課	環境省自然環境局総務課
対象範囲	哺乳類、鳥類、爬虫類	哺乳類、鳥類、爬虫類
適用範囲	繁殖業者、販売業者、展示業者、研究施設	動物実験を実施する研究機関
監査	なし	なし

- 日本では、実験動物、動物実験のいずれにおいても、動物福祉の対象に魚類は含まれない。
- ただし、除外要項に、両生類や魚類についてもこの基準の趣旨に沿って実験等を実施することが望ましい、とある。
- 国内法で魚類は動物福祉の対象外であるので、魚類に3R原則を適用しなくてもよいというのは国際的には通用しない。

動物福祉推進費の目的

◆ 動物福祉の対象は：魚類を含む脊椎動物全般へと拡大している。

➤ 特に致死をエンドポイントとする魚類急性毒性試験法（96h）の動物福祉に配慮した試験法への転換が求められている。

3Rの原則に基づき、症状診断による安楽死導入と代替試験の活用に向けた研究の2つの方向から研究を進めている。

方向性1 Refinement：試験法の洗練

◆ 瀕死（Moribund）症状をエンドポイントとして採用することで安楽死を適用
→試験魚の苦痛削減

課題

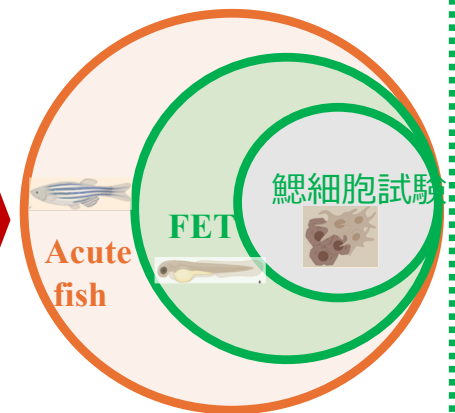
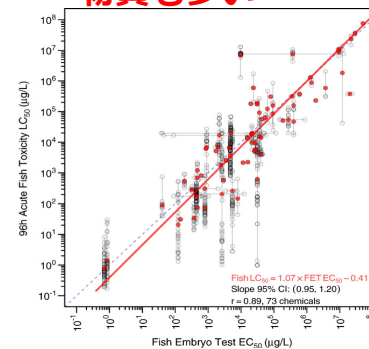
- ① 科学的知見に基づく**明確な瀕死基準設定。**
- ② 症状診断における**客観性と再現性。**

方向性2 Replacement：代替法の活用

◆ FET試験やニジマス鰓細胞試験の活用

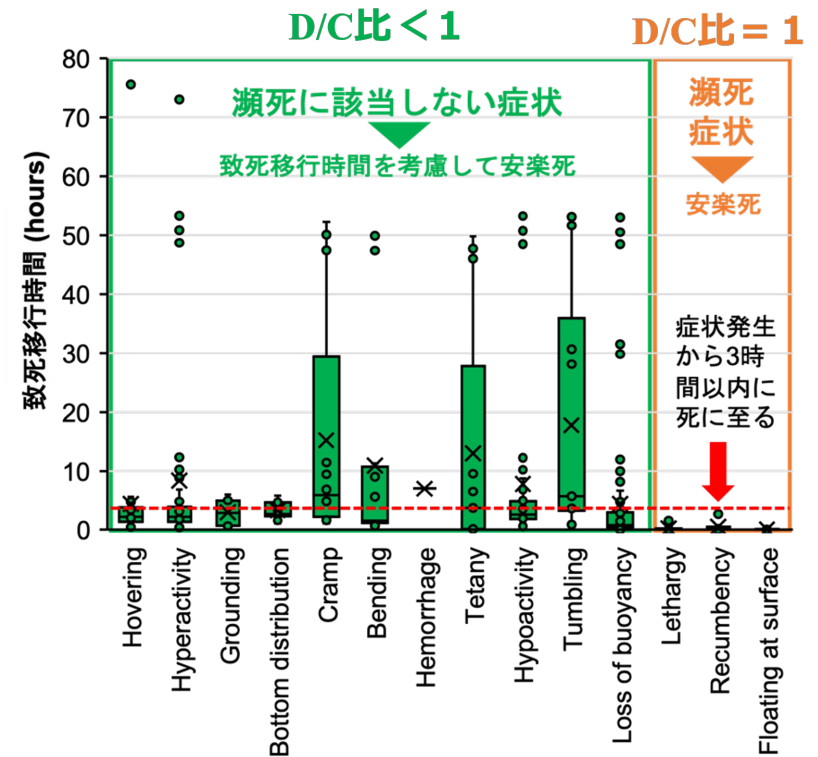
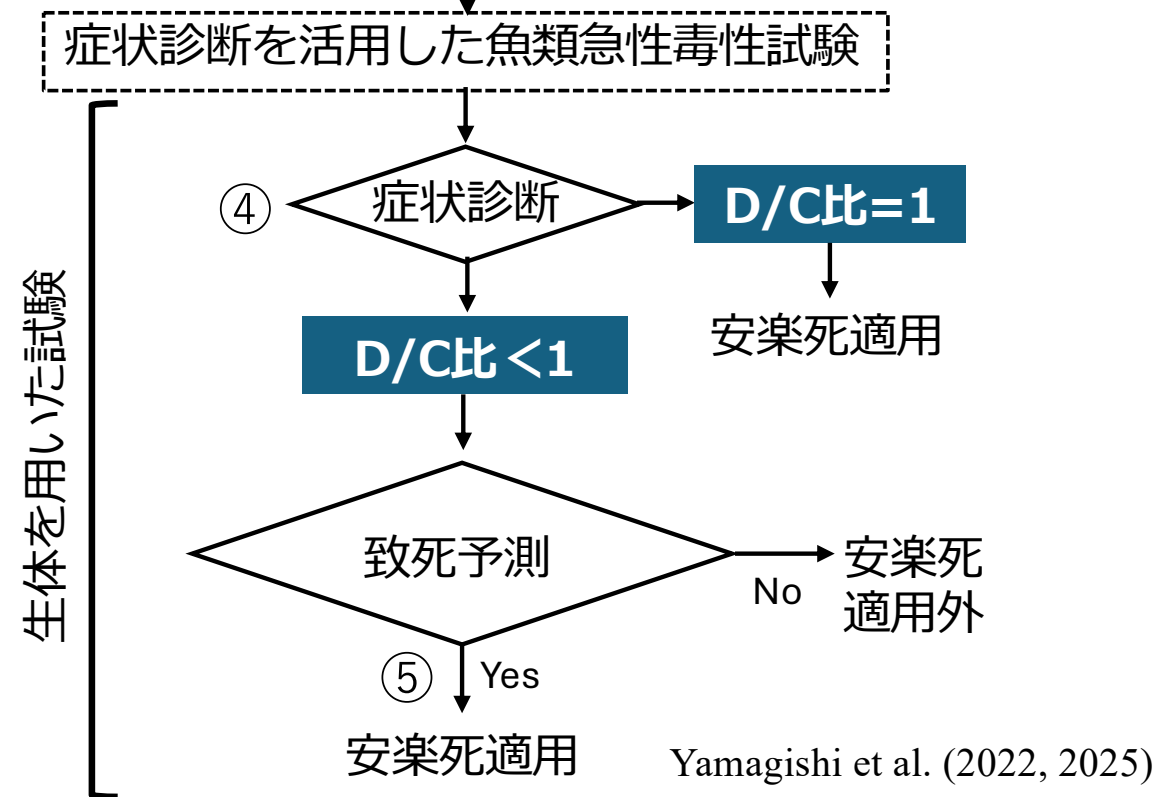
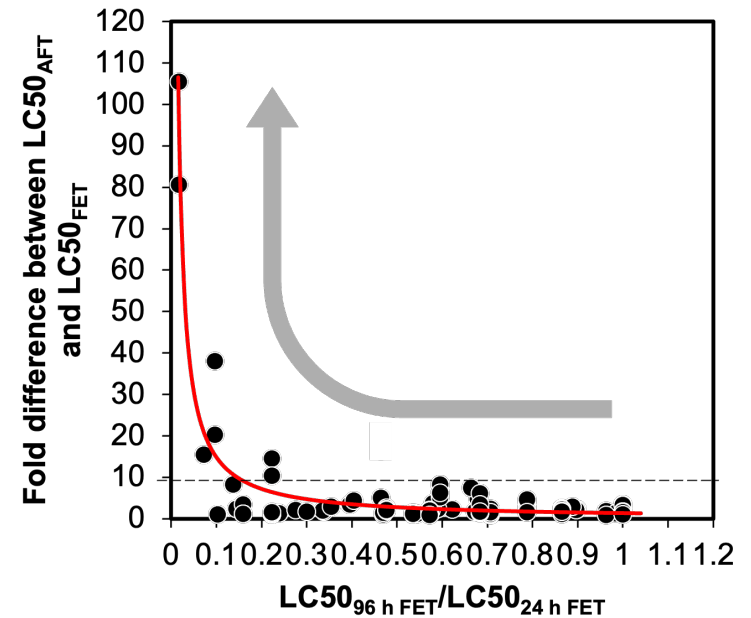
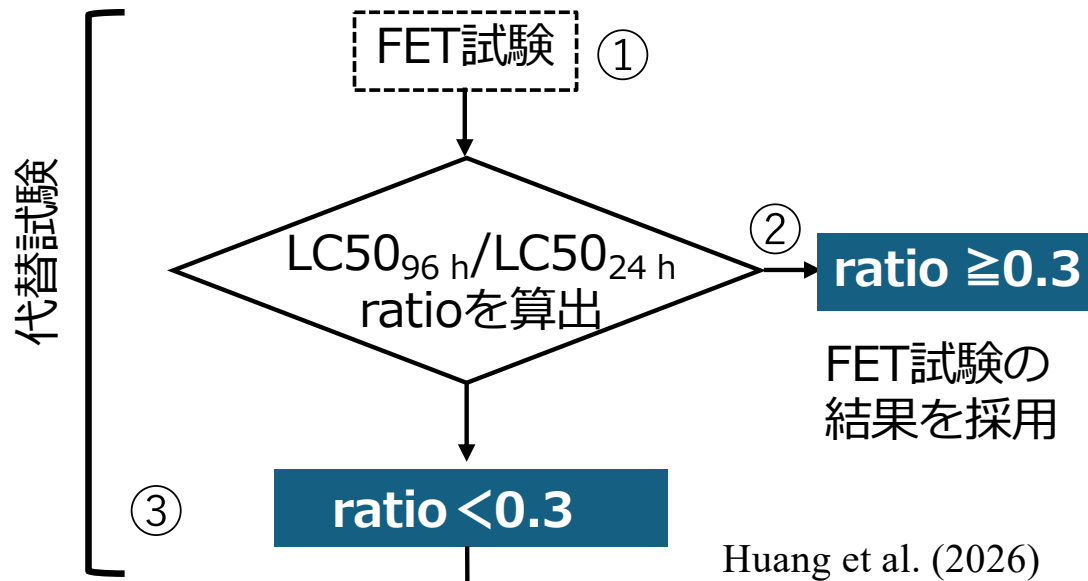
課題

相関が見られない物質も多い



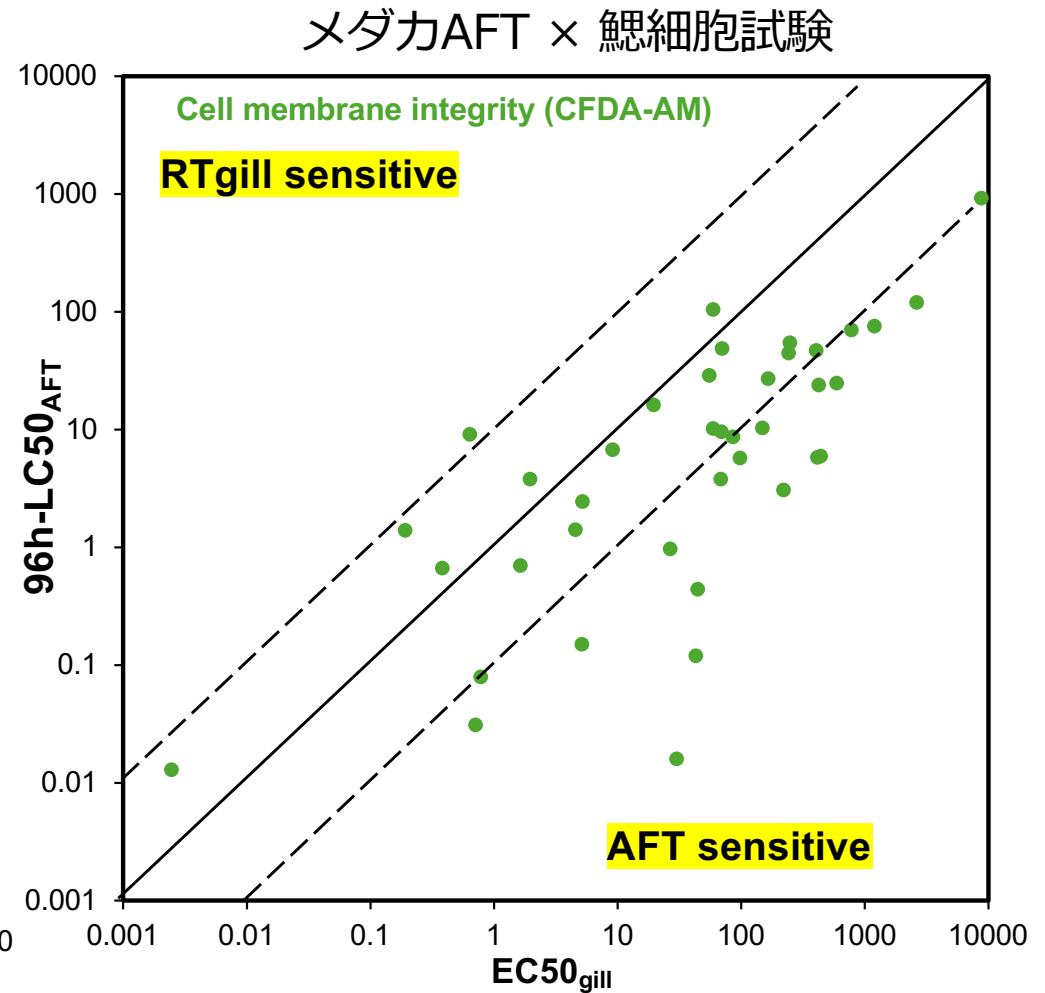
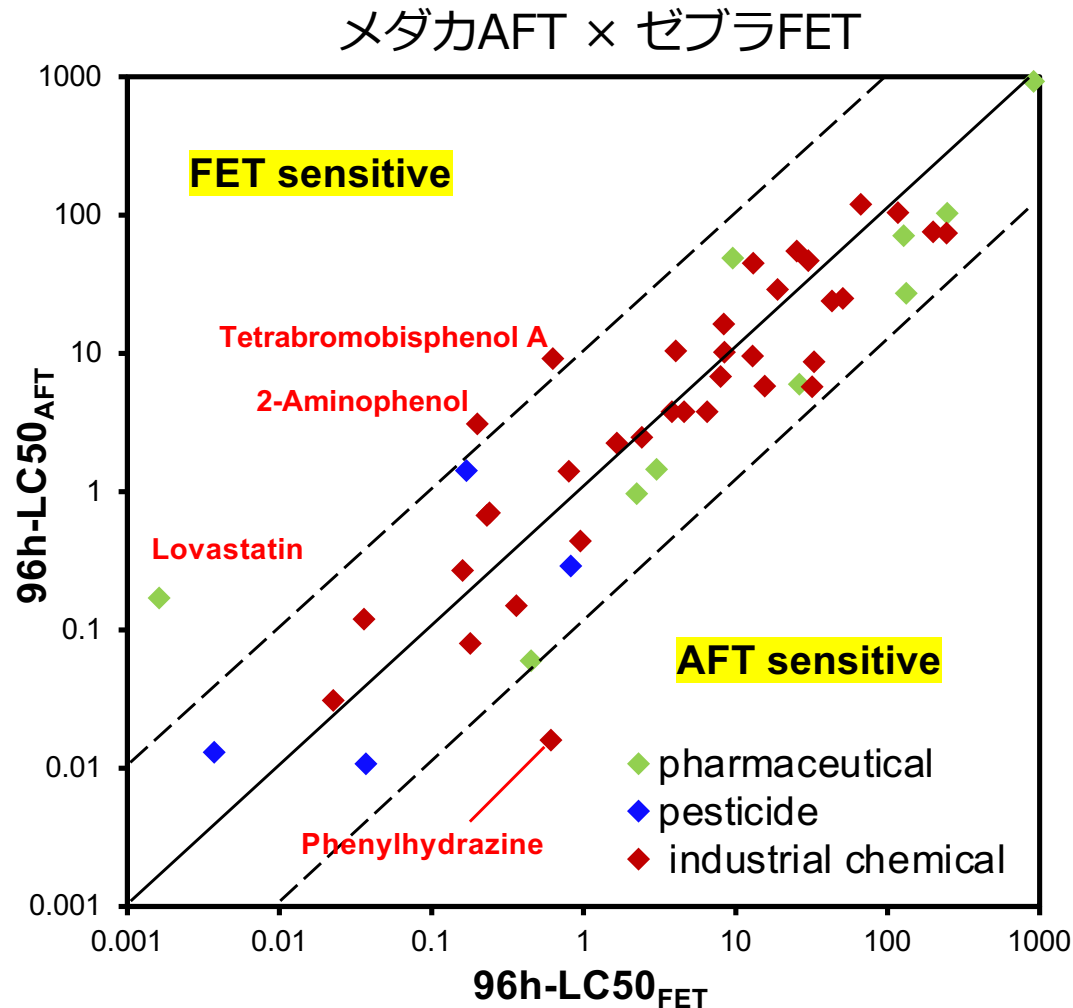
代替試験としての活用には適用範囲の検証が必要。

FET試験を中心とした魚類急性毒性試験の新たなフレームワーク案



背景：代替試験の適用範囲

AFT試験のLC50と代替試験のLC50の比較

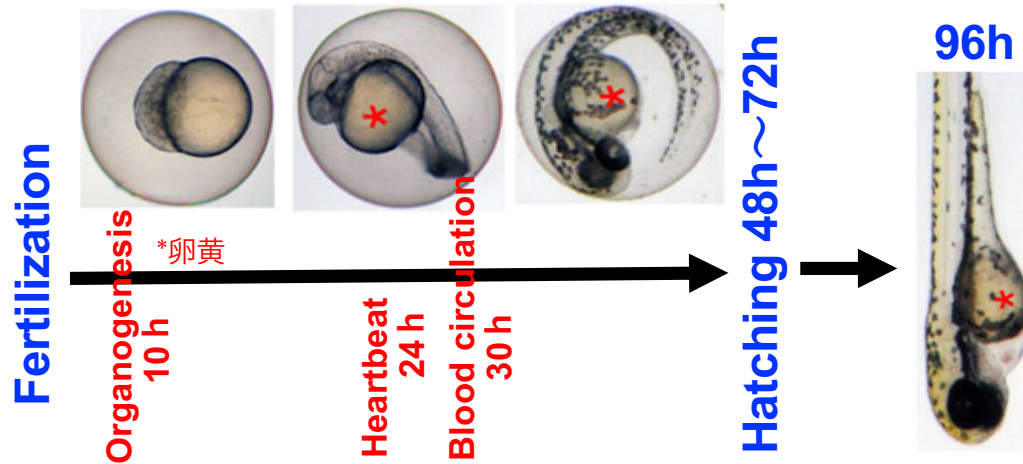


- FET試験とAFT試験のLC50値は概ね10倍以内の範囲で近似するが、例外も多数存在する。
- 鰓細胞試験の適用範囲はFET試験に比較すると狭い。
- 代替法については適用範囲や活用法の検討が必要である。

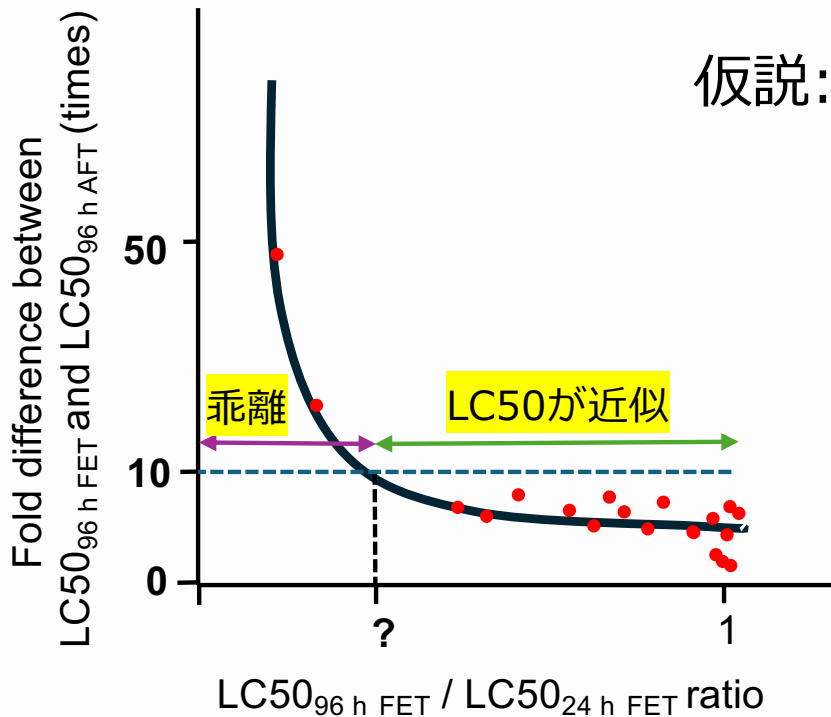
研究 I : FET試験の適用範囲

LC50_{96 h FET} / LC50_{24 h FET} ratioを指標とした魚類急性毒性値の予測手法

◆ FET試験のばく露ステージ



- ◆ LC50_{24 h FET} = Cytotoxicity
- ◆ LC50_{96 h FET} = Cytotoxicity + a
- ◆ LC50_{96 h FET} / LC50_{24 h FET} = 細胞毒性の寄与率



仮説:

FET試験で細胞毒性の寄与が高い場合は魚類急性毒性値と近似する。

$$\text{LC50}_{96 \text{ h FET}} / \text{LC50}_{24 \text{ h FET}} \approx 1$$

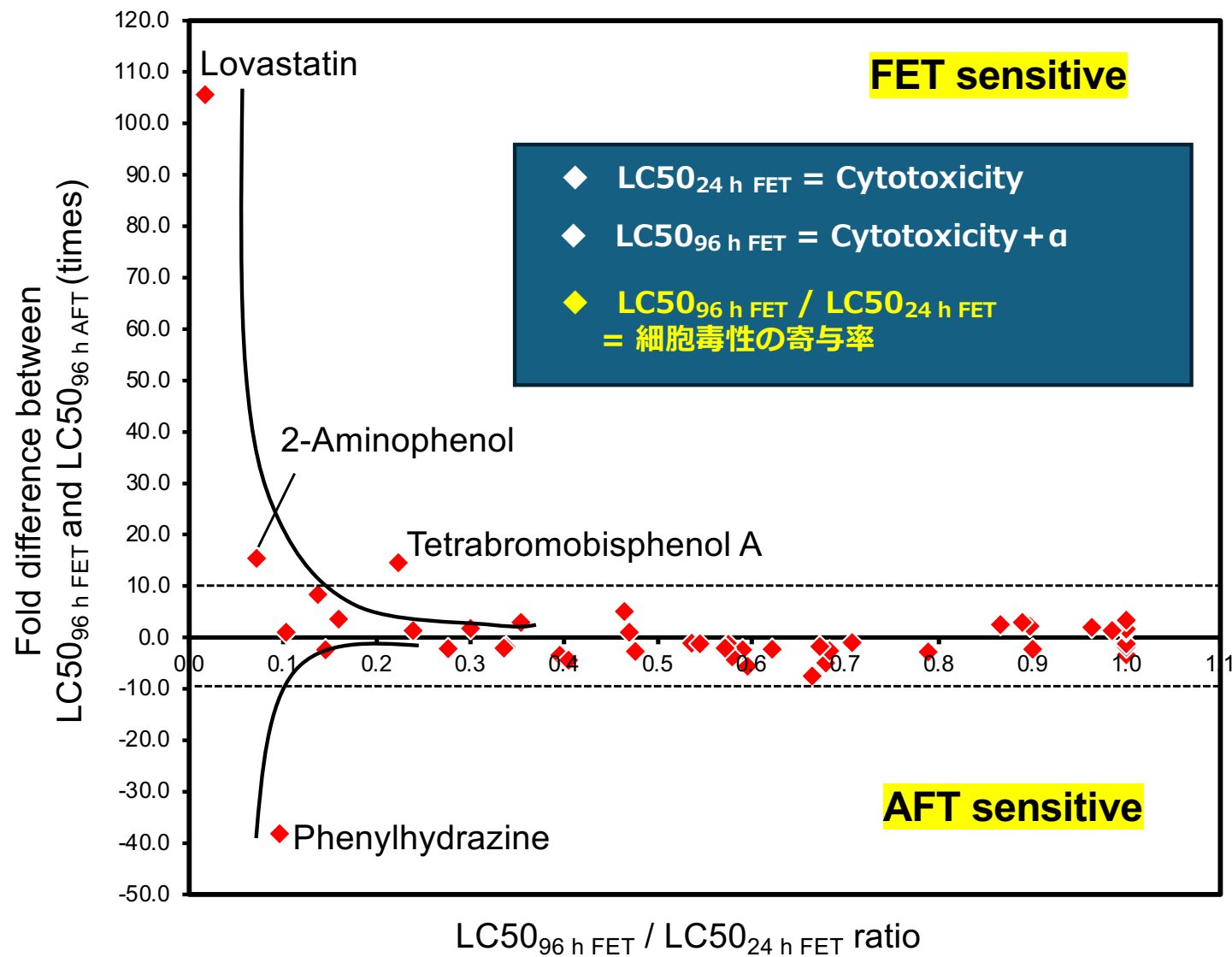
LC50_{96 h AFT} と LC50_{96 h FET} は近似する

$$\text{LC50}_{96 \text{ h FET}} / \text{LC50}_{24 \text{ h FET}} < 1$$

LC50_{96 h AFT} と LC50_{96 h FET} は乖離する

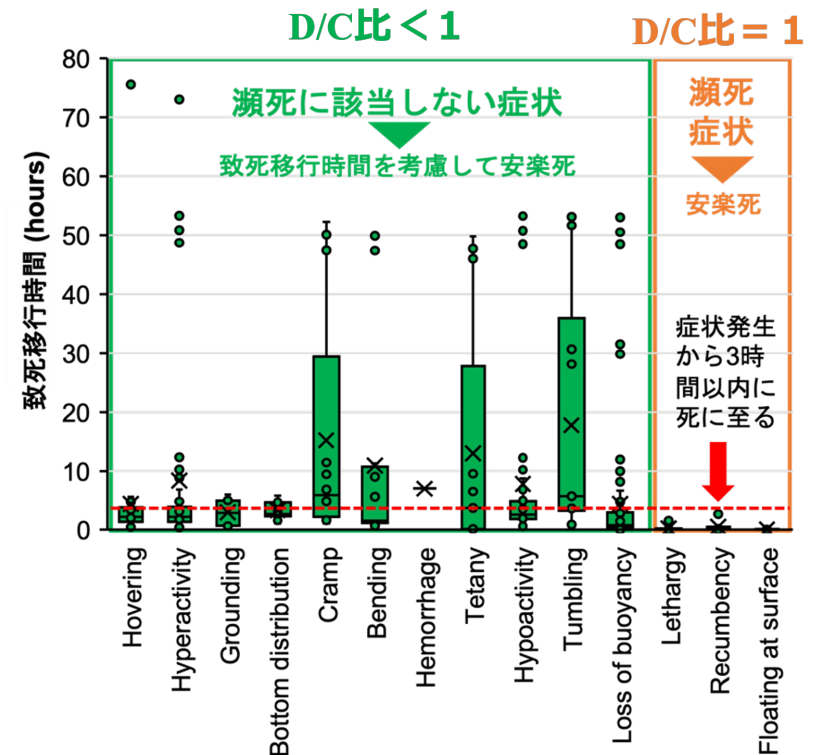
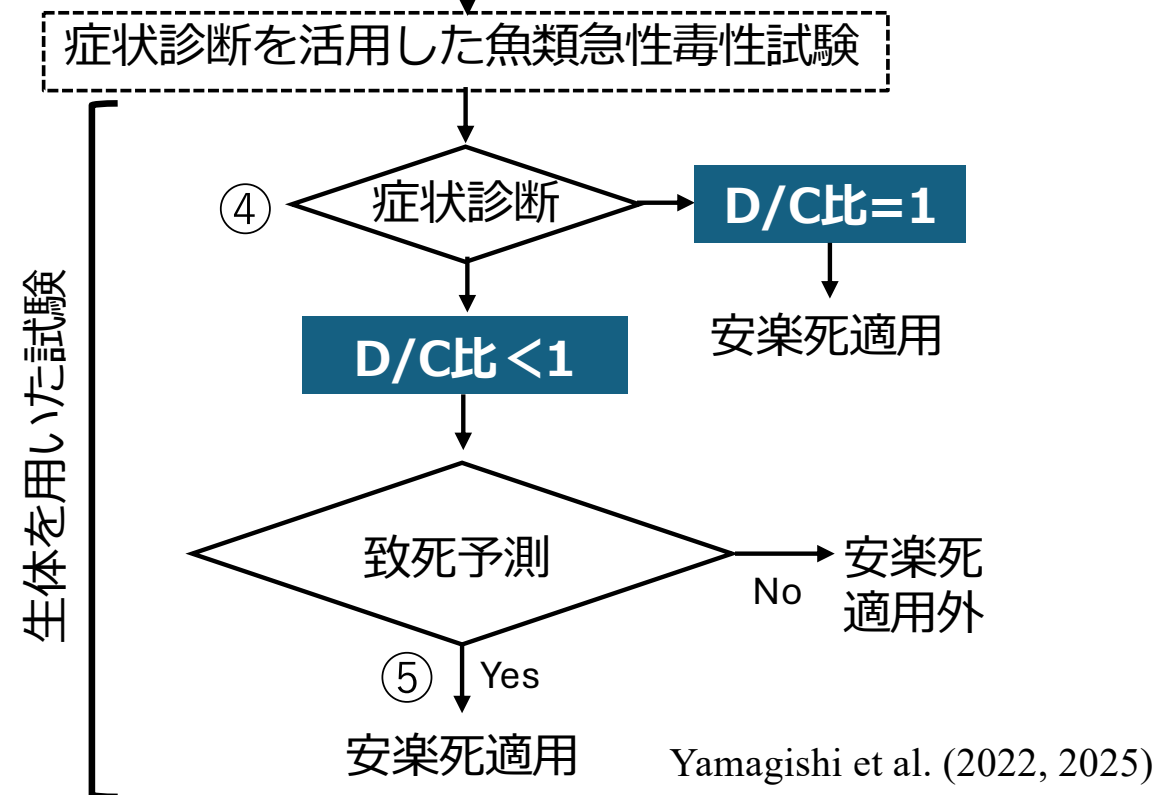
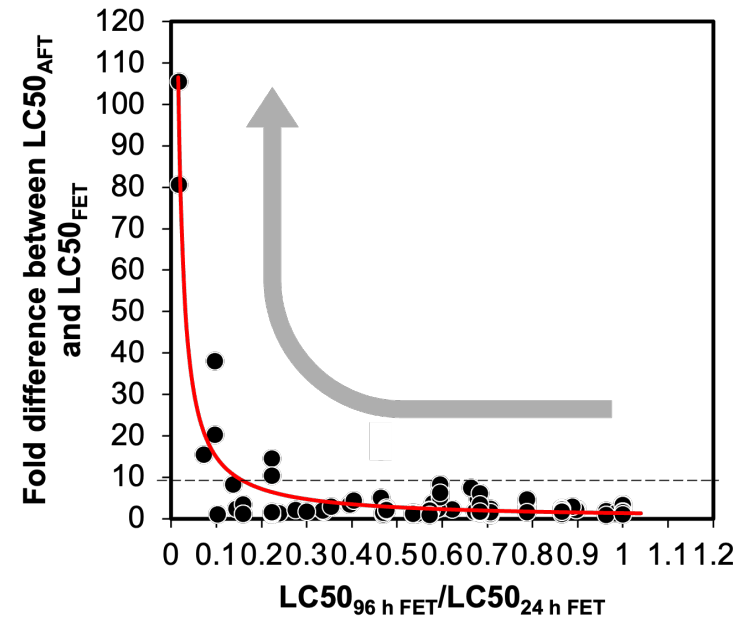
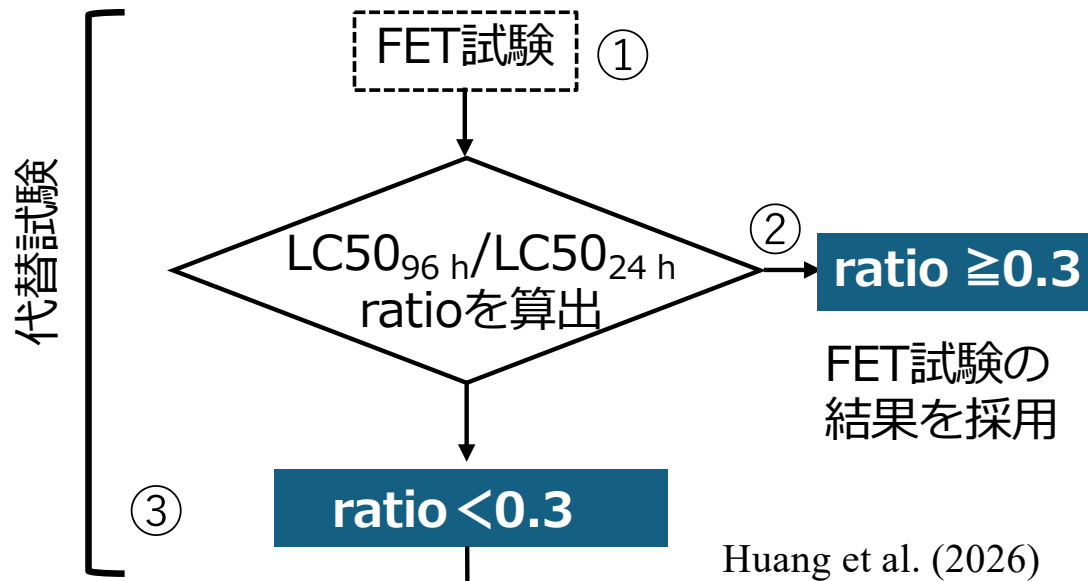
研究 I : FET試験の適用範囲

LC50_{96 h FET} / LC50_{24 h FET} ratioを指標とした魚類急性毒性値の予測手法



- ◆ LC50_{96 h FET} / LC50_{24 h FET} ratioは、FET試験における適用範囲決定のための指標となる。
- ◆ LC50_{96 h FET} / LC50_{24 h FET} ratioのlimiting pointは精値化が必要。

FET試験を中心とした魚類急性毒性試験の新たなフレームワーク案



研究 II：重篤度の数値化と瀕死の定義

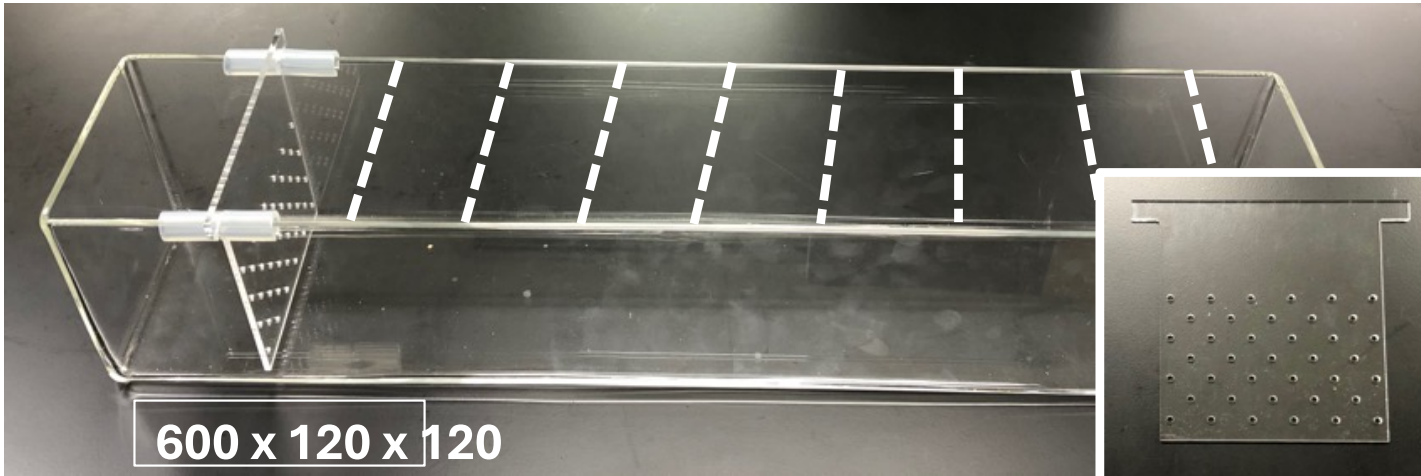
■ Death/Clinical sign比（D/C比）を用いた症状重篤度の数値化法 Yamagishi et al. 2022

Death/Clinical sign 比 = 症状が死に移行する割合

$$\text{Death/Clinical sign ratio}_{96\text{h}} = \frac{\text{imminent death } (x)}{\text{clinical sign } (y)}$$



D/C比 = 1 : 100%の割合で致死に移行
D/C比 = 0.5 : 50%の割合で致死に移行
D/C比 = 0 : 致死に移行しない



- オールガラス水槽（溶接） 容量：8.46 L
- 仕切り板（アクリル製）



個別飼育法を用いたメダカ急性毒性試験を選定した13物質について実施し、観察された症状が死に移行する割合（Death / Clinical signs比）の算出及び死に移行するまでの時間を計測した。

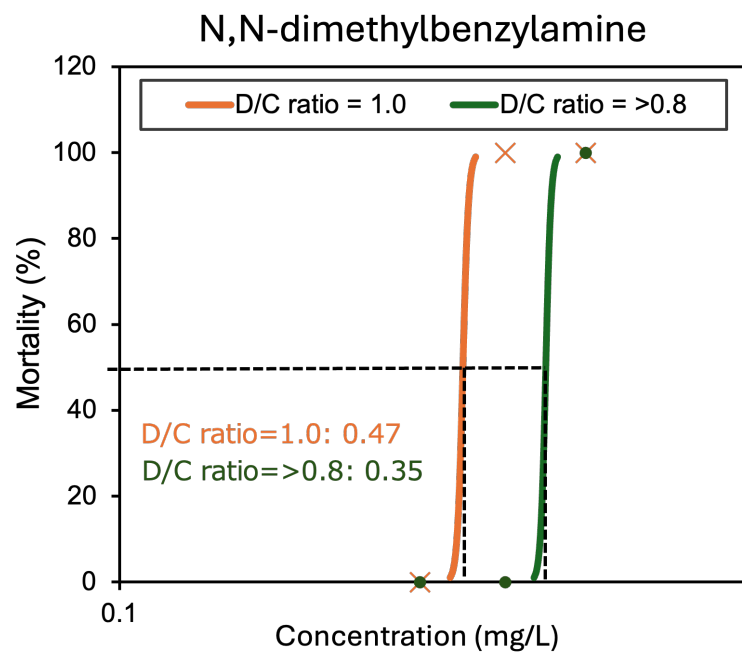
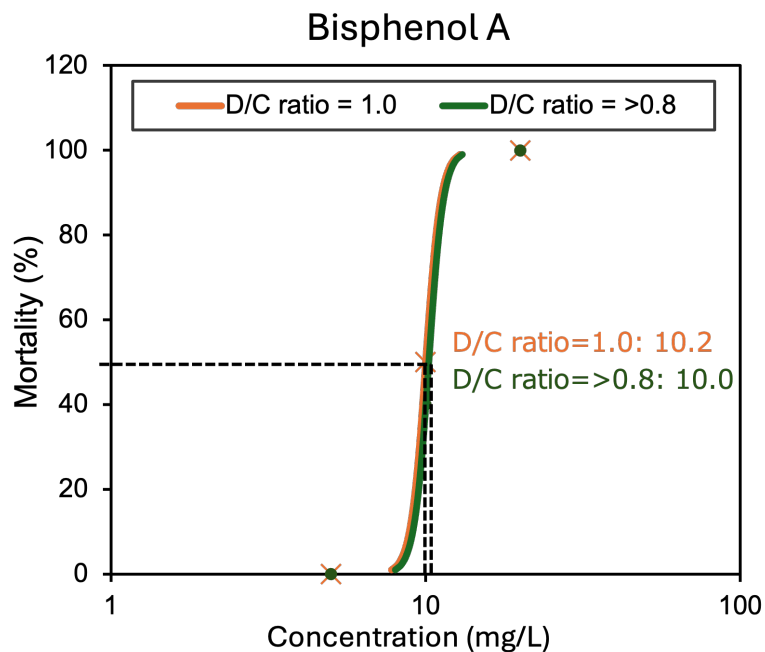
研究 II：重篤度の数値化と瀕死の定義

症状分類	症状名	D/C 比 Min-Max	D/C 比 Ave.	重篤度分類	
遊泳不能 (瀕死)	横臥	1.00-1.00	1.00	重篤	<ul style="list-style-type: none"> ➤ LC50値への影響は小さい ➤ 安楽死を適用できる個体は少ない
	水面不動	1.00-1.00	1.00	重篤	
	嗜眠	1.00-1.00	1.00	重篤	
異常遊泳	浮力異常	0.30-1.00	0.88	中度	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 安楽死を適用できる個体は多い ➤ LC50値への影響は大きい ➤ 瀕死の定義を0.8以上とした場合、LC50値は最大で2倍程度低くなる。
	過活発	0.30-1.00	0.82	中度	
	活動量の低下	0.30-1.00	0.80	中度	
	らせん・回転	0.33-1.00	0.88	中度	
	停止遊泳	0.00-1.00	0.53	中軽度	
	けいれん	0.30-1.00	0.85	中度	
	着底	0.00-1.00	0.67	中軽度	
外見異常	出血	0.00-0.25	0.13	軽度	
	曲がり	0.30-1.00	0.72	中度	
	硬直	0.30-1.00	0.80	中度	

重篤：D/C 比= 1、中度：0.7 ≤ D/C 比 < 1、中軽度：0.5 ≤ D/C 比 < 0.7、軽度：D/C 比 < 0.5

研究 II：魚類（メダカ）における瀕死基準の設定

◆ D/C比 ≥ 0.8 を瀕死とした場合について



安楽死を適用できる個体数は増えるが、LC50値の乖離が生じる。

LC50値の乖離は生じるが、乖離は2倍程度？

エンドポイントごとのLC50値のまとめ

エンドポイント	致死		D/C比 = 1.0		D/C比 ≥ 0.8	
	LC50	LC10	LC50	LC10	LC50	LC10
3,4-ジクロロアニリン	10.5	9.27	10.5	9.27	<5.0	<5.0
ロバスタチン	2.71	2.38	2.44	2.18	1.13	0.96
キノクラミン	1.72	1.62	1.72	1.62	<1.0	<1.0
2-ナフトール	3.54	3.37	3.54	3.37	1.76	1.69
4-クロロフェノール	8.84	8.43	8.84	8.43	8.84	8.43
ビスフェノールA	10.2	8.77	10.2	8.77	10.0	8.70

研究 II：死亡時期予測に基づく安楽死導入法の検討

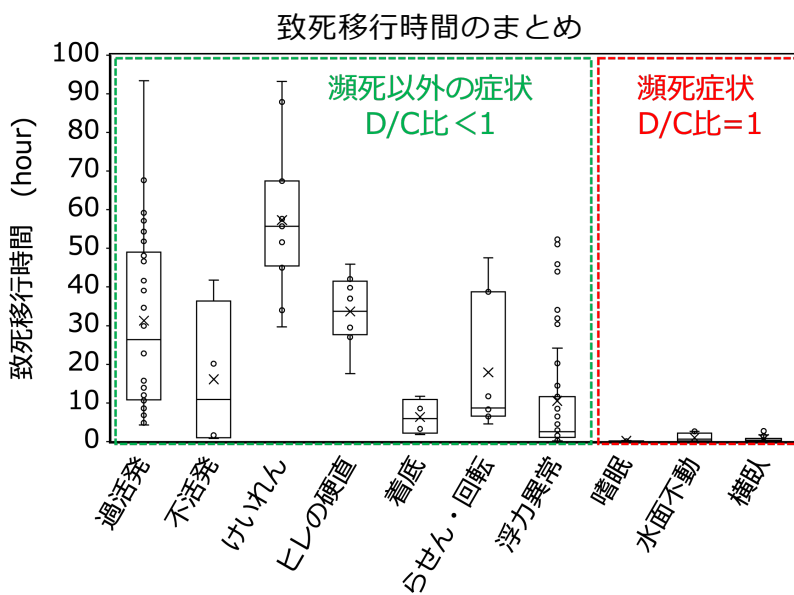
致死移行時間を活用した安楽死適用法の検討



- ◆ 選定した10物質について魚類急性毒性試験を実施した。
- ◆ 観察される12症状の最長致死移行時間を動画解析により決定した。

致死移行時間のまとめ

症状分類	症状名	D/C 比	最長致死移行時間 (h)	安楽死適用可能期間 (h) *
遊泳不能	横臥	1.00*	3.00	0~93.0
	水面不動	1.00*	2.63	0~93.4
	嗜眠	1.00*	1.58	0~94.4
異常遊泳	浮力異常	0.88*	53.0	0~43
	過活発	0.82*	93.4	0~2.6
	不活発	0.80*	53.2	0~42.8
	らせん・回転	0.88*	53.1	0~42.9
	けいれん	0.85*	93.2	0~2.8
	着底	0.67*	11.7	0~84.3
外見異常	出血	0.13*	7.00	0~89
	曲がり	0.72*	50.0	0~46
	硬直	0.80*	49.8	0~46.2



* 安楽死適用可能期間 = 96h - 最長致死移行時間

研究 II：死亡時期予測に基づく安楽死導入法の検討

致死移行時間を活用した安楽死適用法の開発

致死予測に基づく安楽死数のまとめ

	症状			安楽死		乖離度**
	無	有	死亡	対象	Total (%)*	
Bisphenol A	15	14	1	13	92.9	1
o-nitroanisole	10	17	3	6	35.3	1
N,N-dimethylbenzylamine	12	18	0	18	100	1
2,4,6-trimethylphenol	20	10	0	10	100	1
2-phenylindole	10	20	0	10	50	1

*症状のある個体のうち安楽死を適用できた個体の割合

**現行法によるLC50値からの乖離度

D/C比 (≥0.8) に基づく安楽死数のまとめ

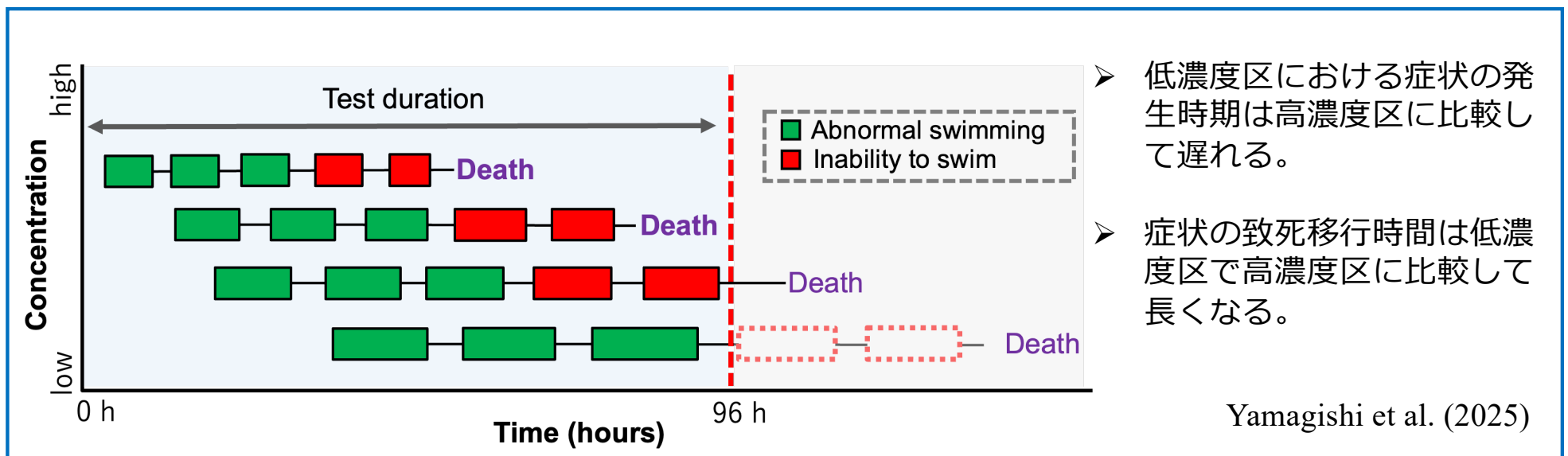
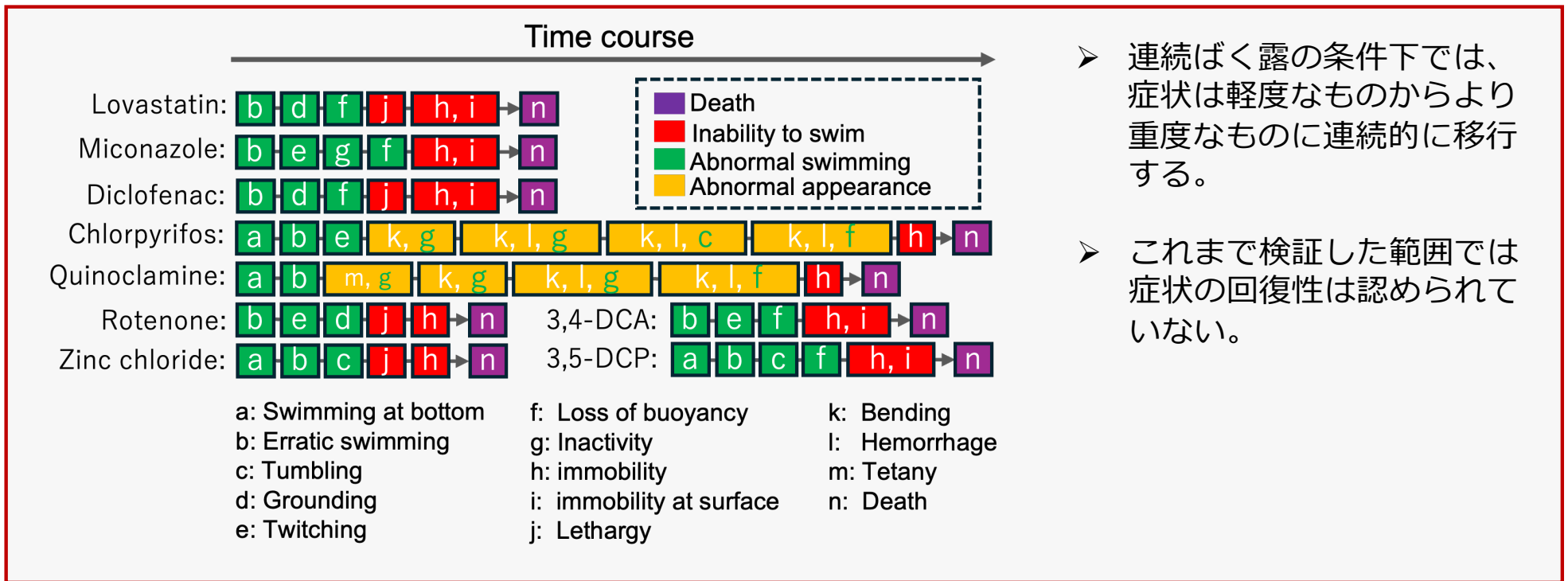
	症状			安楽死		乖離度**
	無	有	死亡	対象	Total (%)*	
Bisphenol A	15	14	1	5	7.14	1
o-nitroanisole	10	17	3	16	94.1	2.0倍
N,N-dimethylbenzylamine	12	18	0	18	100	1
2,4,6-trimethylphenol	20	10	0	10	100	1
2-phenylindole	10	20	0	20	100	1.8倍

*症状のある個体のうち安楽死を適用できた個体の割合

**現行法によるLC50値からの乖離度

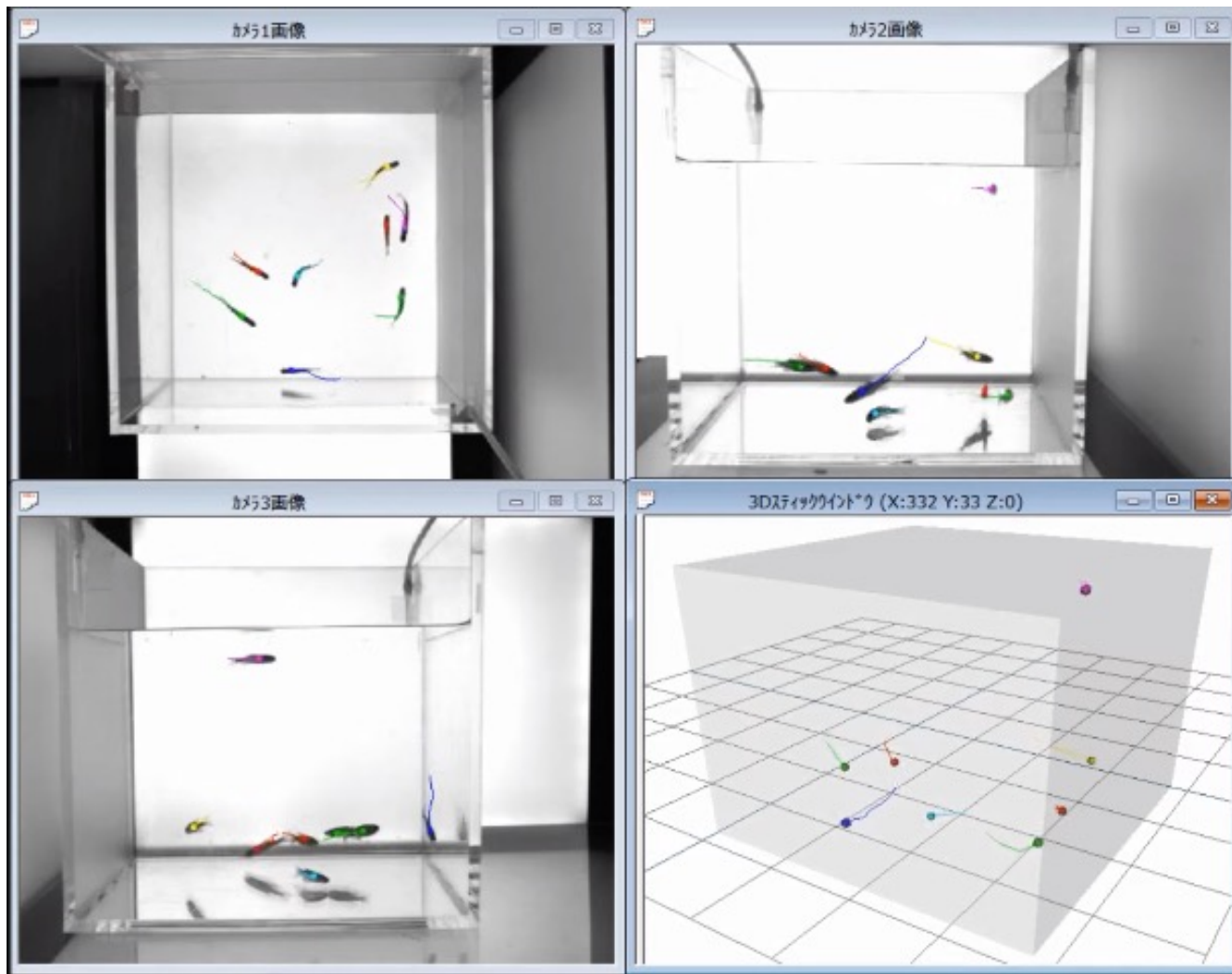
研究 II : 死亡時期予測に基づく安楽死導入法の検討

致死移行移行時間を活用した安楽死適用法の開発



客観的な症状診断手法の開発

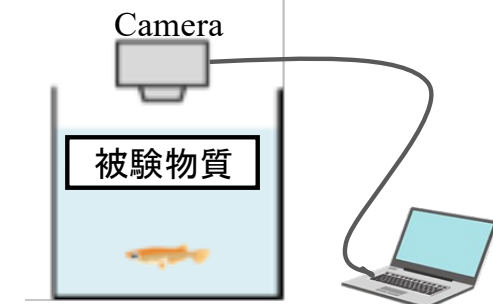
- ◆ 症状の定義を明確にし、動画などを共有することで診断の統一性を図る。
- ◆ 機械学習（教師あり学習）を利用した客観的な症状診断法の開発。



● 研究実施内容。

- ✓ 定義された症状について、移動速度と遊泳方向の観点から数値化。
- ✓ 機械的に症状を診断するための予測精度の高いモデルを構築。
- ✓ ケーススタディーによる、適用可能性の検証。

機械的に症状を診断する
手法の提案。



客観的な症状診断手法の開発

症状の分類と定義の明確化

メダカ症状分類表（案）一部抜粋

TG203症状分類			メダカ症状分類			
症状分類	症状名	症状の定義	症状小名	症状の定義	重篤度	映像コード
平行喪失	バランス喪失	バランスを失う。上下・水平感覚を失う、頭部を上又は下に向けた体勢				
	浮力喪失	着底・横転するか表面に浮上。	着底・横転	例：横臥 ● 水槽の底面で横倒しになる。鰓蓋の動きは見られるが、ヒレの動きは見られない。	重篤	01_0201
遊泳及び行動異常	不活発・嗜眠	自発運動の低下、刺激への反応が鈍った状態、嗜眠状態。	自発運動および刺激反応性の低下	例1：活動量の低下 ● ヒレの動きが鈍く遊泳速度が遅い。 ● 刺激に対する反応性が鈍い。	異常	02_0101
				例2：低層遊泳 ● 水槽底面で遊泳する。	異常	02_0102
				例3：泳力低下 ● ヒレの動きは見られるが、泳力が低下しており、浮上しようとするが浮上できない。着底してもなんらかの刺激で浮上する。 ● 底面で異常遊泳を呈しているもの、あるいはヒレの動きは見られるが横倒しになり遊泳を停止しているもの。	重篤	02_0103
			嗜眠	● 水槽の底面で横倒しになり、鰓蓋およびヒレの動きは見られない。水槽を叩くなどの刺激で動き出すが、再び動きが止まり、沈降する。	重篤	02_0104

重篤度：Death / Clinical signs比（症状が死に移行する割合）をもとに設定

映像コード：それぞれの症例を収録した動画のコード



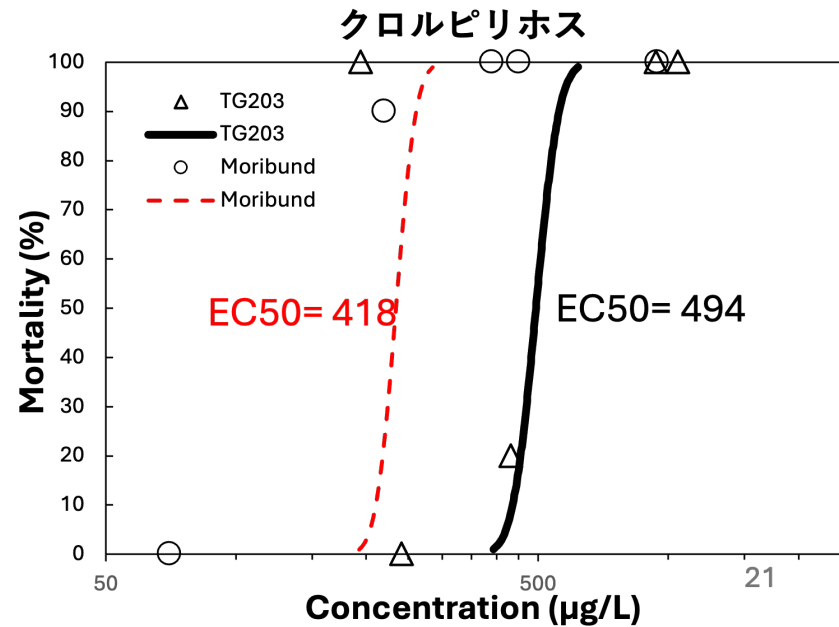
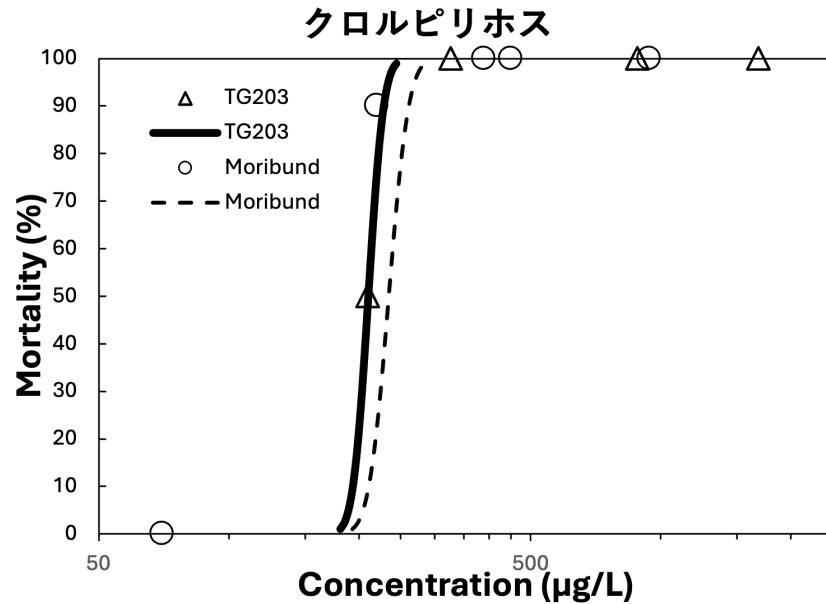
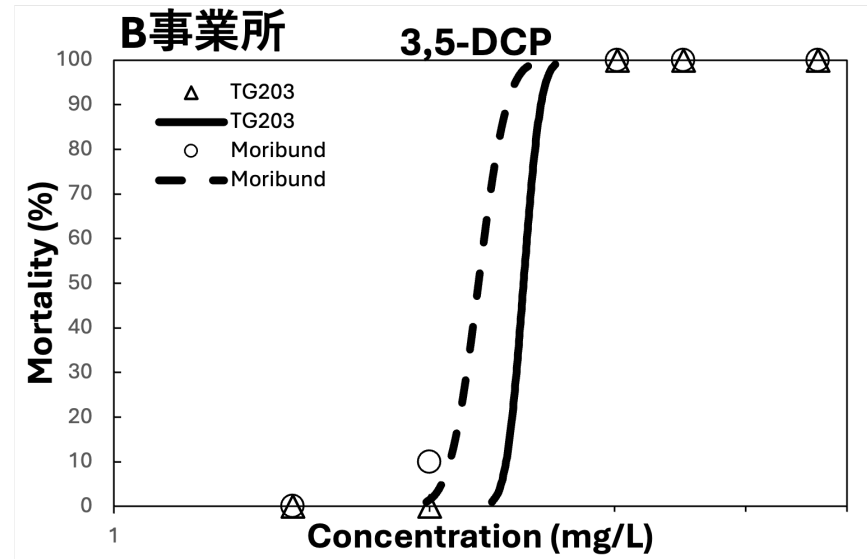
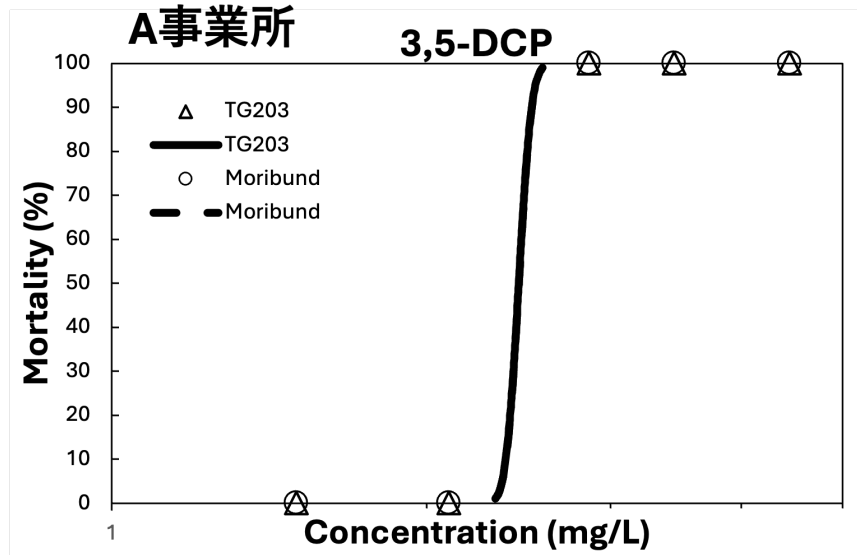
遊泳異常：浮力異常

遊泳不能：横臥



客観的な症状診断手法の開発

ケーススタディー

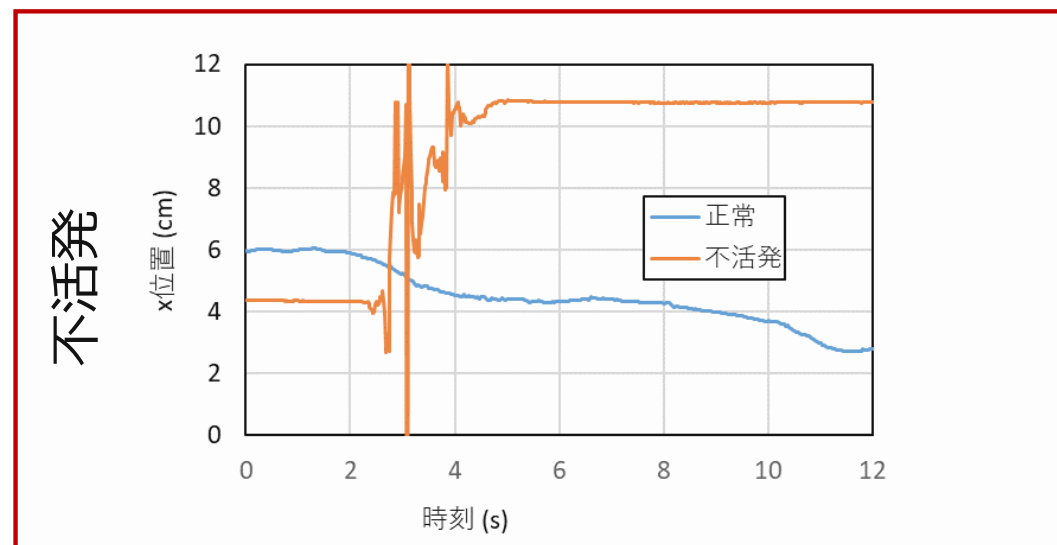
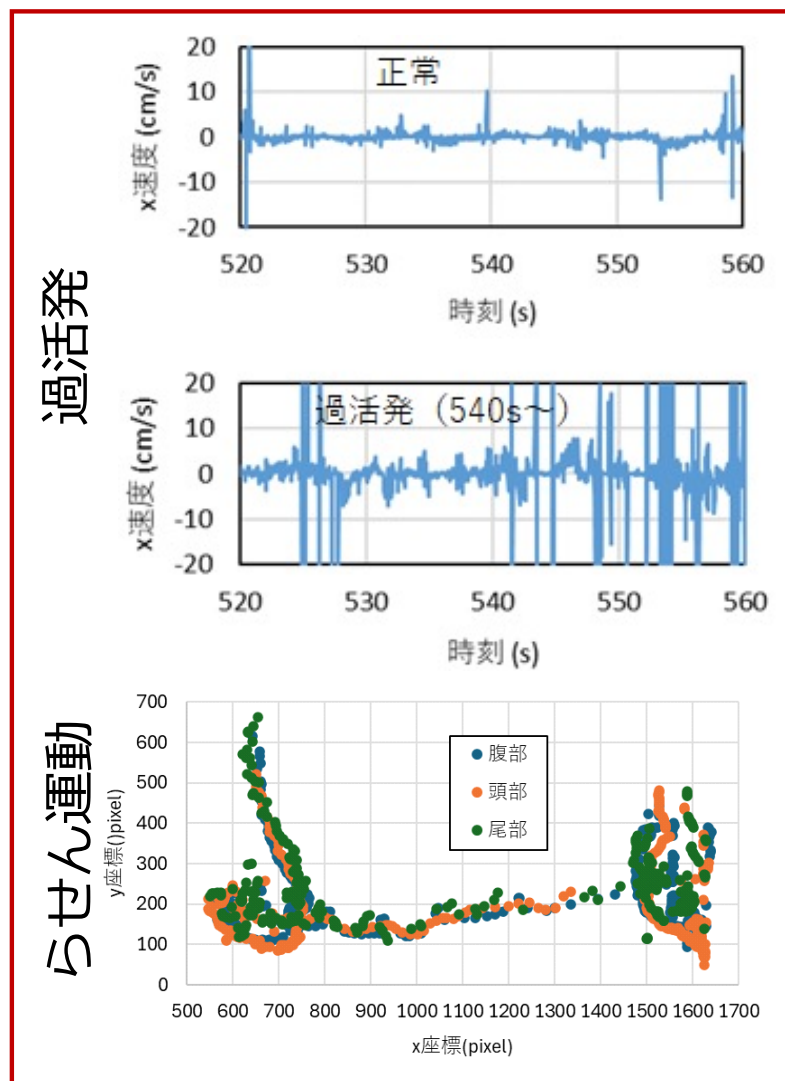


機械診断はあくまでもヒト診断のサポートとしての使用が目的。

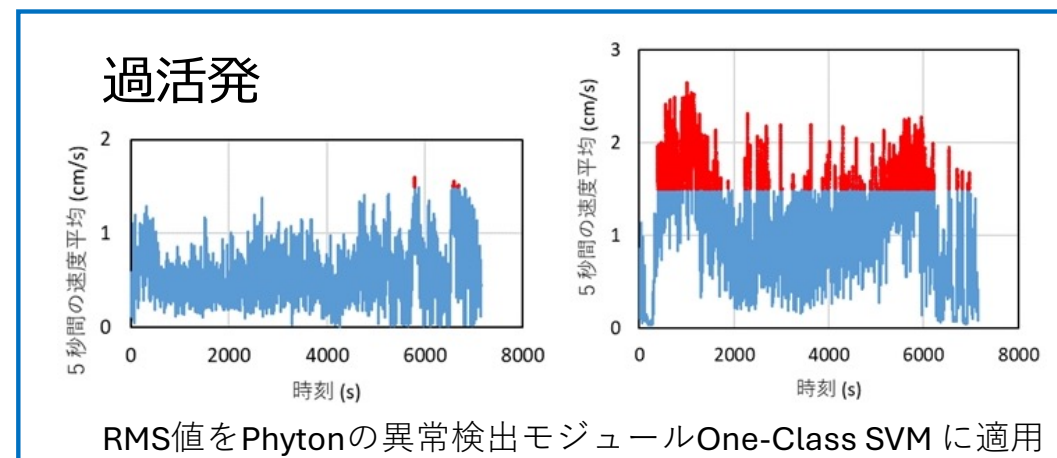
客観的な症状診断手法の開発

機械学習を利用した客観的な症状診断法の開発

- ◆ 症状の動画解析により複数症状の指標を抽出した。



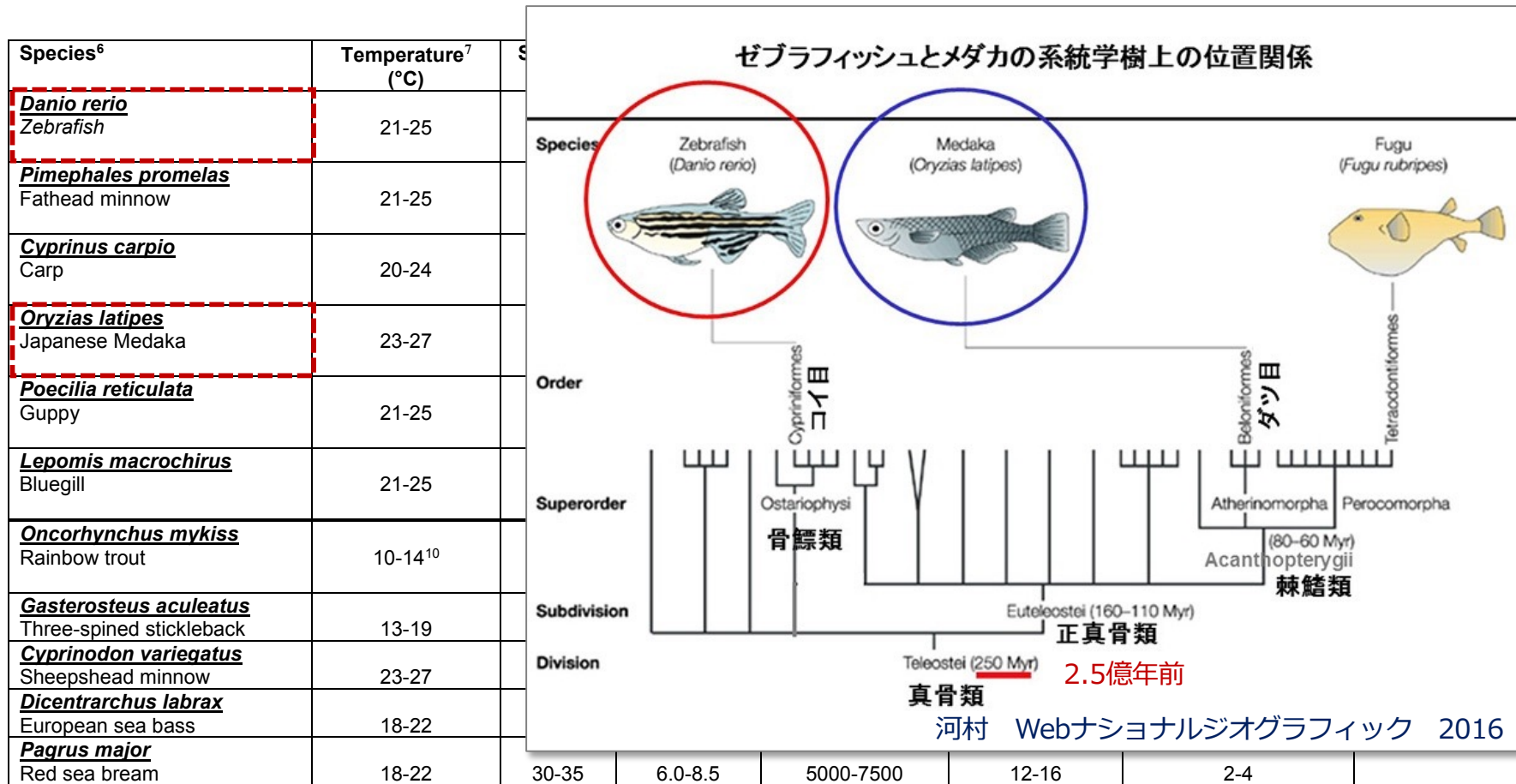
- ◆ 機械学習による異常診断。



50枚の静止画（無作為抽出）→訓練用データの作成→畳み込みニューラルネットワークの適用（反復学習10万回）→学習結果の適用（22万静止画 / 2時間）

メダカ以外の試験魚への展開

ゼブラフィッシュを対象とした安楽死適用法の開発



◆ 世界の試験魚の動向を考慮してゼブラフィッシュに展開。

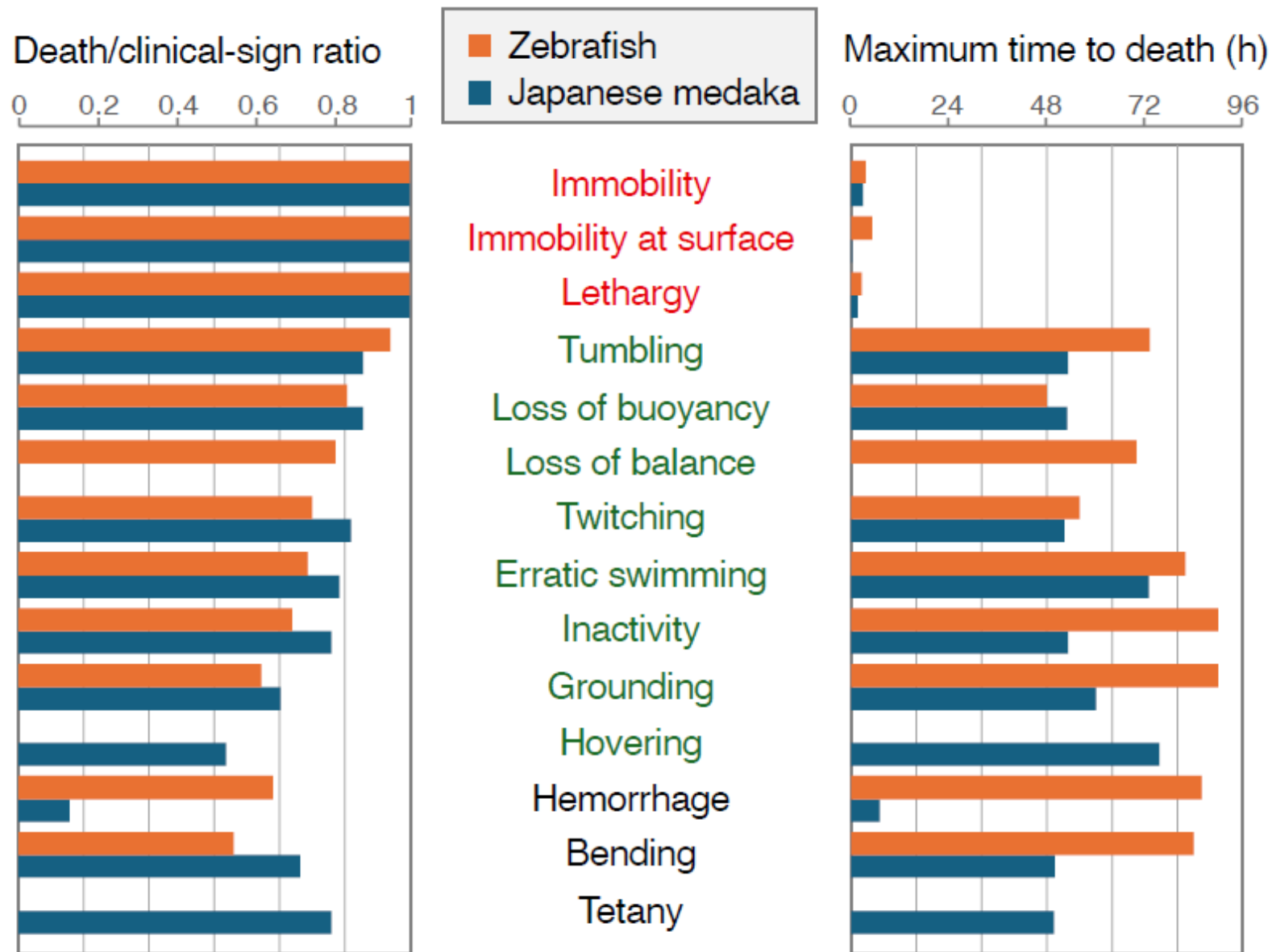
● 研究実施内容。

- ✓ 症状推移の検証（症状と死の関連づけ）。
- ✓ 症状のDeath / Clinical sign比を算出し、瀕死症状を提案する。
- ✓ ケーススタディーによる、安楽死導入の適用可能性の検証。

メダカ以外の試験魚への展開

ゼブラフィッシュを対象とした安楽死適用法の開発

Sui et al. (2026)



◆ メダカとゼブラフィッシュでは、D/C比、症状ごとの致死移行時間に大きな違いはみられなかった。

まとめ：FET試験を中心とした魚類急性毒性試験の新たなフレームワーク案

