

II. 分担研究報告書

バイタルサインの統合的評価をエンドポイントとした新規急性経口投与毒性試験方法の開発-統計学による半数致死量から診断学による概略の致死量への転換-(19KD1002)

分担研究報告書

分担研究課題 バイタルサインセンサーの開発及び研究統括

研究分担者:	高橋 祐次	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部 室長
研究協力者:	栗形麻樹子	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部 室長
研究協力者:	大久保佑亮	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部 主任研究官
研究協力者:	森田紘一	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
研究協力者:	辻昌貴	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
研究協力者:	相田麻子	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部

研究要旨

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「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。

本分担研究では、一般状態、心電、心拍、血圧、体温、呼吸、脳波などのバイタルサイン(VS)測定と、VS 測定のためのセンサーの開発を行った。初年度となる H31/R1 年度は、現在、市販品として入手可能な測定器のセットアップを行い体温、血圧を測定した。急性毒性を誘発するモデル化合物として、先行研究においてデータが豊富である有機リン系農薬 Acephate (50, 300 mg/kg)と、中枢神経と心臓への作用が知られている Amitriptyline hydrochloride (5, 50 mg/kg)を用いた。並行して、新規素材であるカーボンナノチューブ(CNT)のヤーンを用い、心電測定に取り組んだ。センサーの実装に向けたセンサーの加工及び装着方法を検討し心電波形の取得に成功した。現在は商業的に入手可能な VS 測定装置と新規開発の CNT センサーを並行して使用し実験を実施しているが、新規経口投与毒性試験の実用化のためには、これらの機器を統合して実験者の利便性を高め、かつ、廉価な装置として開発する必要がある。

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「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。

急性毒性試験は時代と共に簡便化され、使用する動物数が削減された。しかし、試験のエンドポイントは動物の「死亡」のままであり、死因、標的臓器等その内容は一切考慮されていない。そのため、ヒトの中毒治療に有用ではないとの批判がある。一方、動物福祉の観点から「死亡」をエンドポイントとすることに強い批判がある。そのため、代替法(Replacement)として、細胞毒性のIC50を指標として急性毒性を評価する方法がICCVAMとECVAMから提案されているが、難溶性物質、代謝活性化による毒性発現物質、心臓や神経系など臓器特異的な毒性評価を代替するに至っていない。

しかし、一般状態、心電、心拍、血圧、体温、呼吸、脳波などの「バイタルサイン」を指標とした更なる動物数の削減とヒトの安全性確保の向上を可能とする「新規急性経口投与毒性試験方法」が、近年のITデバイスの小型化と新素材センサーの出現により開発可能となった。具体的には1匹の実験動物から多項目に亘るバイタルサインを取得することにより毒性徴候を精緻に解析・定量化し、計算科学によって化学物質の急性毒性の強度と毒性標的の合理的判定基準を作成し、ヒトが急性曝露された際の危険度をより正確に予測する事を可能とする。これにより、毒物及び劇物取締法の指定に関して、中毒事象を含むより現実に想定される事故等に即した規制が可能となる。言い換えると、ヒトの急性中毒患者が救急外来で受ける諸検査に該当する所見を1匹の実験動物から取得する試験法の開発である。これを実現するため、先行研究においてデータが豊富なモデル化合物を用いてラットにおける急性影響を調べた。並行して、新規素材であるカーボンナノチューブ(CNT)のヤー

ンを用い、心電測定に取り組んだ。

B. 研究方法

B-1 ラットを用いた化学物質の急性影響評価

1. 使用動物:

CrI:CD(SD)雌性ラット 8~12 週齢を用いて、既存の血圧測定装置を用いた被験物質投与による血圧への影響を調べた。並行して赤外線サーモグラフィによる体表面温度測定を実施した。

ラットの飼育ケージは、ポリカーボネイト製のケージを使用した。紙製の床敷を使用し、1ケージ当り1~2匹のラットを収容した。ケージラックはケミカルセーフティ対応のケージ個別換気式飼育装置(RAIR HD SUPER MOUSE 750TM 個別換気式飼育装置特型)を使用した。飼育条件は、温度;25±1℃、湿度;55±5%、換気回数;約 20 回/h、照明時間;8 時~20 時点灯(照明明暗サイクル 12 時間)とし、固型飼料 CRF-1(オリエンタル酵母工業株式会社)を自由摂取させ、飲水は市水をフィルター濾過し給水瓶により自由摂取させた。

2. 被験物質:

被験物質として、Acephate(富士フィルム和光純薬(株))、Amitriptyline hydrochloride(富士フィルム和光純薬(株))を用いた。用量段階は、TTXを除き、OECD 化学物質試験に関するガイドライン TG423(毒性等級法)にて設定されている 5 mg/kg、50 mg/kg、300 mg/kg 及び 2,000 mg/kg の4段階から選択し、RTECS の情報を基に LD50 以下の用量を投与した。

3. バイタルサイン測定:

バイタルサインは実験動物用として入手可能な装置を用いて測定した。血圧計は無加温型非観血式血圧計(MK-2000ST、室町機械株式会社)を用い、ラット尾動脈にて心拍数、最高血圧、最低血圧及び平均血圧を測定した。並行して赤外線サーモグラフィ(サーモフレックス F50B-STD、協和テクノロジーズ)による体表温度の変化を調べた。

B-2 新素材を用いたバイタルサインセンサーの開発

1. 心電用センサーの開発:

二層カーボンナノチューブ (Double-Walled Carbon Nanotube: DWCNT) を基にした CNT ヤーン (Sugikuro® yarn, sugi nano carbon technology 合同会社) を用い、バイタルサイン測定のための電極 (以下、CNT センサー) として利用について検討した。H31/R1 年度は、生体電位の中で比較的データの取得が容易である心電を対象に開発を行った。CNT ヤーンは、①井上リボン工業株式会社 (越前市) にて織物技術による加工を行った皮膚に接触させる表面電極としての使用 (図 1A)、または②CNT ヤーンのまま動物の皮膚に縫合針 (外科強角針 No.0 バネ穴、夏目製作所) を用いて単結紮した状態で使用した。

並行して、表面電極を装着するためのラット用ジャケットの開発に取り組んだ。具体的には、8 及び 12 週齢の SD ラット (雌) から 3D スキャナーにより三次元データを取得し、3D プリンターにて硬質樹脂製のラット模型を作製した。この模型を基にシリコン樹脂製のラット模型を作製し、ジャケットを作製するひな形とした。ジャケットの加工は井上リボン工業にて行った (図 1)。

2. 動物を用いた CNT センサーの性能評価:

CNT センサーの装着前にラットの背部を動物用バリカンで刈り皮膚を露出させた。表面電極はラットが覚醒した状態で装着した。CNT ヤーンを皮膚に単結紮して使用する際は、イソフルラン (ファイザー) 麻酔下で、耳介、頸部、背部及び腰部の 3 か所に一針単結紮を行い、プレアンプと接続した。

CNT センサーからのデータは①プレアンプ (特注品、バイオテックス) を介して A/D コンバータ (MP160、バイオパック) と有線接続、または、② A/D 変換・トランスミッター (BITalino (r)evolution) を用いて無線接続により PC にてデータを取得した。

(倫理面への配慮)

本実験は動物愛護に関する法律、基準、指針を遵

守し、国立医薬品食品衛生研究所は、国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の制定による「動物実験等の適正な実施に関する規程 (平成 27 年 4 月版)」に則って実施した。

C. 研究結果

C-1 ラットを用いた化学物質の急性影響評価

Acephate 投与群においては、5 mg/kg において血圧低下、体温上昇がみられ、50 mg/kg では心拍数低下もみられた。300 mg/kg においては顕著な心拍数低下と血圧上昇がみられ伏臥位、呼吸異常がみられた。体表面温度は、僅かな低下がみられたが、尾部は顕著な温度上昇がみられた (図 2)。

Amitriptyline Hydrochloride では、5mg/kg 投与により一過性の軽度の心拍数低下、体表面温度は上昇した。50mg/kg 投与では一過性の心拍数増加がみられたが、血圧には影響はみられなかった。体表面温度は心拍の上昇にともなって一過性に上昇したが、投与後 1 時間では投与前に比較して低下した (図 3)。

C-2 新素材を用いたバイタルサインセンサーの開発

無線によるデータ転送方法を用い、CNT センサーを動物の皮膚に単結紮した状態で、心電波形の取得に成功した (図 4)。一方、表面電極 CNT センサーは体動によるノイズレベルが高く、明確な心電波形を取得することができなかった。

有線による方法では表面電極 CNT センサー、皮膚に単結紮した CNT センサーもノイズレベルが非常に高く、データを取得することが出来なかった。得られたデータの解析により 50Hz 及びその倍数成分が高いレベルで混在していたことから、商用電源からのノイズであることが判明した。

D. 考察

現在入手可能なバイタルサイン測定装置を用いて、心拍・血圧・体温測定を行った。心拍・血圧測定は安定した結果が得られたが、測定に際しては動物を保定してセンサーを取り付けることが必要であり、経時

的な測定が困難である。サーモグラフィによる体温測定は非常に簡便かつ鋭敏に変化を捉えることができることから、本研究の目的としては極めて有用であると考えられる。

新素材を用いたバイタルサインセンサーの開発では、皮膚結紮と無線 A/D コンバータの組み合わせで心電波形の取得が可能であった。表面電極でのノイズは、体動によりセンサーの接触性が低下することが原因であり、表面電極と皮膚との接触性を高める形状の検討、並びにジャケットの改良が必要となる。実際にヒトにおいて、体動が生じないようにすることで心電波形の取得が可能となっている。特筆すべきは、CNT センサーは導電性ペーストが不要であることである。これは、動物実験に使用するセンサーとして非常に優れた特性である。

皮膚結紮による方法は、表面電極に比較して作業が多くなるが、ラットの個体識別に使用される耳パンチと同程度の作業量であるため、動物実験へ組み込むことへの難易度は低いと考えられる。次年度はこの手法による脳波測定に取り組む計画である。この手法により脳波が取得できれば、現在、一般的に使用されている方法である動物の頭蓋骨を穿孔して金属電極を埋め込む手法よりも簡便で侵襲性が極めて低い。

E. 結論

初年度となる H31/R1 年度は、①ラットを用いて本研究の基盤となる行動、体温、心拍、血圧等の VS 測定装置のセットアップを行い、先行研究においてデータが豊富であるモデル化学物質を使用して基礎データの取得に成功した。②新規素材であるカーボンナノチューブ (CNT) センサーの実装に向けたセンサーの加工及び装着方法を検討し心電波形の取得に成功した。現在は商業的に入手可能なバイタルサイン測定装置と新規開発の CNT センサーを並行して使用し実験を実施しているが、新規経口投与毒性試験の実用化のためには、これらの機器を統合して実験者の利便性を高め、かつ、廉価な装置として開発する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigou M, Naiki-Ito A, Takase H, Abdou KA, Hirose A, Taquahashi Y, Kanno J, Abdelhamid M, Tsuda H, Takahashi S. Pulmonary and pleural toxicity of potassium octatitanate fibers, rutile titanium dioxide nanoparticles, and MWCNT-7 in male Fischer 344 rats. Arch Toxicol. 2019 Feb 13.

Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander WT, Numano T, Iigou M, Naiki-Ito A, Takase H, Hirose A, Taquahashi Y, Kanno J, Abdelhamid M, Abdou KA, Takahashi S, Alexander DB, Tsuda H. Carcinogenic effect of potassium octatitanate (POT) fibers in the lung and pleura of male Fischer 344 rats after intrapulmonary administration. Part Fibre Toxicol. 2019 Sep 2;16(1):34.

2. 学会発表

Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Yoko Hirabayashi, Akihiko Hirose and Jun Kanno, Development of Whole Body Inhalation System for Well-Dispersed Nanomaterials Toxicity Testing -Taquann Direct-Injection Whole Body Inhalation System-, Poster, 58th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2019.3.12., Baltimore

Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Akihiko Hirose and Jun Kanno, Improved aerosol generation method and newly designed whole body rodent inhalation apparatus for the testing of nanomaterials in human-relevant exposure scenario, 15th IUTOX International Congress of Toxicology (ICTXV), Hawaii Convention Center,

Honolulu, Hawaii, USA, July 16, 2019,

Poster

高橋祐次、新素材の毒性評価-工業的ナノマテリアル
の高分散性小規模全身ばく露吸入装置の開発、
JST-CRDS 2019 年度 科学技術未来戦略 WS、
2019.12.3 (東京)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

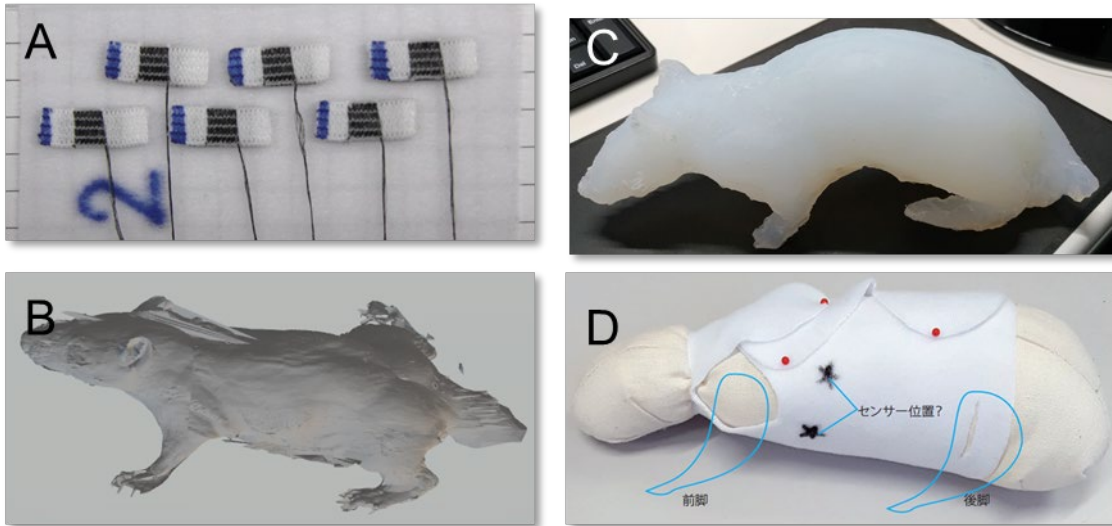


図 1 新素材を用いたバイタルサインセンサーの開発

A: 織物技術による CNT センサーの作製、B: ラット 3D スキャナーデータ、C: 3D プリンターの型を基に作成したシリコン樹脂製のラット模型、D: センサー装着ジャケットの作製

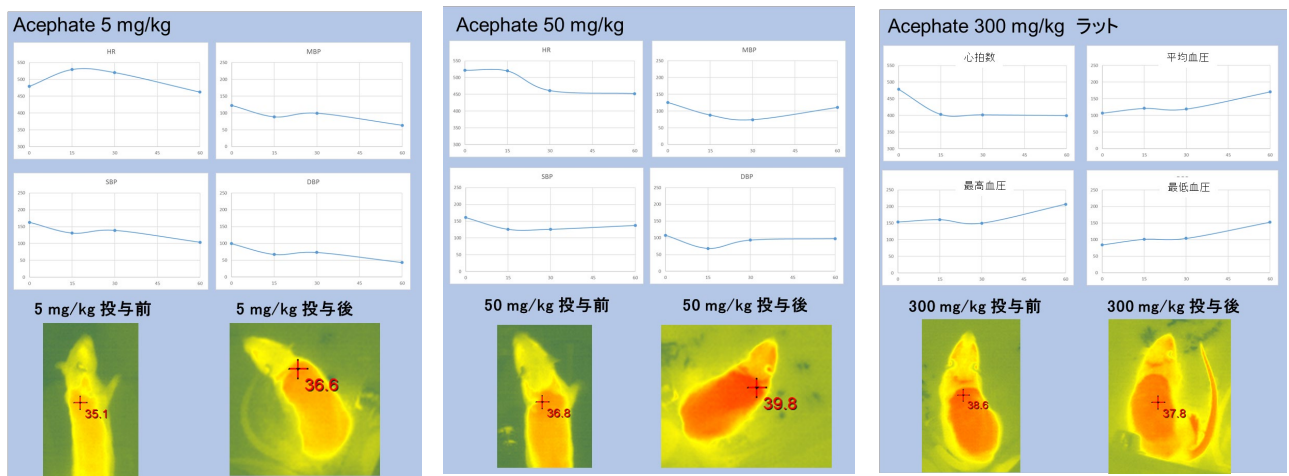


図 2 ラットを用いた化学物質の急性影響評価 (Acephate)

顕著な心拍数低下と血圧上昇がみられ伏臥位、呼吸異常がみられた。体表面温度は、僅かな低下がみられたが、尾部は顕著な温度上昇がみられた。

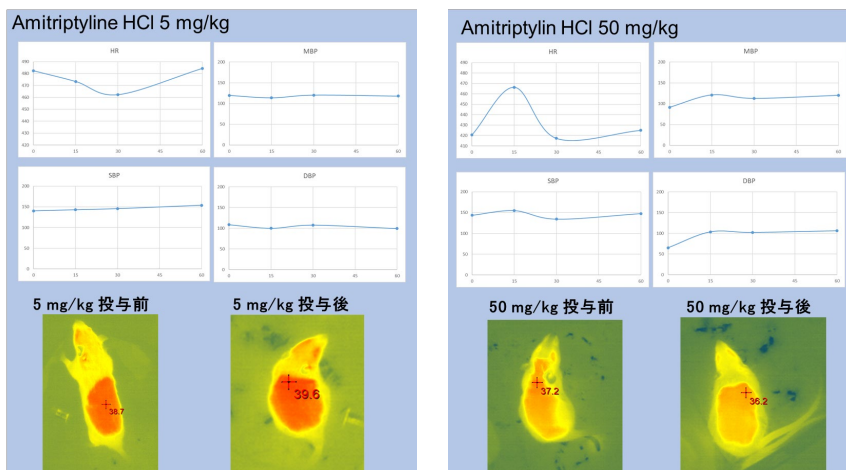


図 3 ラットを用いた化学物質の急性影響評価 (Amitriptyline HCl)

5mg/kg 投与により一過性の軽度の心拍数低下、体表面温度は上昇した。50mg/kg 投与では一過性の心拍数増加がみられたが、血圧には影響はみられなかった。体表面温度は心拍の上昇にともなって一過性に上昇したが、投与後 1 時間では投与前に比較して低下した。

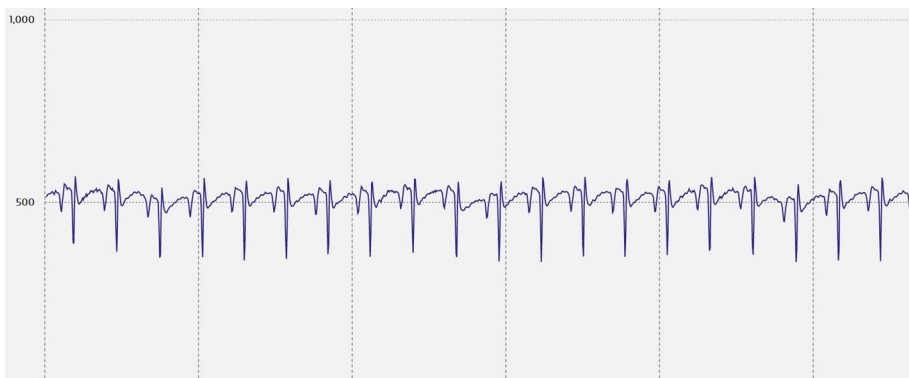


図 4 新素材を用いたバイタルサインセンサーの開発

無線による方法を用い、CNT センサーを動物の皮膚に単結紮した状態で、心電波形の取得に成功した。SD ラット 雌 10 週齢 イソフルラン麻酔下で測定、電極: CNT ヤーン、電極: 耳介 青、頸部 赤、腰部: 緑、A/D 変換・トランスミッター: BITalino (r)evolution。