

別添 1

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)

令和 2 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高橋祐次

令和 3(2021)年 3 月

# 研究報告書目次

## I. 総括報告書

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-

高橋 祐次 ..... 2

## II. 分担研究報告書

1. バイタルサインセンサーの開発及び研究統括

高橋 祐次 ..... 13

2. 急性毒性試験における遺伝子発現変動解析

北嶋 聡 ..... 19

3. 急性経口投与毒性による行動様式影響における非侵襲的な新規バイタルサインの探索

種村 健太郎 ..... 30

4. バイタルサインの統合的解析方法(ソフトウェア)の開発

相崎 健一 ..... 36

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表

## IV. 倫理審査等報告書の写し

**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)  
総括報告書**

研究代表者 高橋祐次 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター  
毒性部 動物管理室 室長

## 研究要旨

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」のみであり、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。本研究は、ヒトの安全性確保に主眼を置いた上で、Reduction と Refinement により動物福祉の課題を解決する新規急性経口投与毒性試験方法の開発を目的としている。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(LD<sub>50</sub>)」から「診断学」を基盤にした「概略の致死量」へ転換を図る。具体的には、1匹の動物から多項目に亘る毒性徴候を精緻に測定し、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(スコア化)することで、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。これにより、毒劇法の指定に関して、中毒事象を含むより現実想定される事故等に即した規制が可能となる。例えるならば、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匹の動物から取得する試験法の開発である。

本研究は、①バイタルサインセンサーの開発、②急性毒性試験における遺伝子発現変動解析、③急性毒性試験における行動解析、④バイタルサインの統合的解析方法(ソフトウェア)の開発の4つの分担研究課題を設定している。バイタルサインセンサーの開発では、CNT ヤーンを用いて心電の測定は可能となったが、脳波については現在のところ明確なデータが得られていない。ラット用に開発したパルスオキシメータでは、24時間以上連続して心拍数、SpO<sub>2</sub>、呼吸数の計測に成功した。神経毒性物質である Tetrodotoxin (TTX)の急性毒性発現時の海馬及び肝臓の遺伝子発現データを取得し、その臓器連関解析において、海馬及び肝臓ではストレス関連遺伝子の発現が高い一方、Na<sup>+</sup>チャネルなど TTX が直接関与することが示唆されるシグナルネットワーク関連遺伝子の発現変動は認められなかった。肝臓では糖新生に係るシグナルネットワークが見出された。マウス及びラットを用いて本研究の基盤となる行動(ハイスピードカメラを含む)、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。バイタルサインの統合的評価のためのソフトウェア開発においては、昨年度選定した Acute Toxicity Vital Signs Score(ATVSS、仮称)の定義に利用可能なアルゴリズムのうち、教師あり深層学習につい

て、判別性能の評価を行った結果、本研究の目標実現に有効な手法であることが分かった。現在は商業的に入手可能な血圧測定装置と、新規開発の CNT センサー及びパルスオキシメータを並行して使用し研究を遂行しているが、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。

## 研究分担者

北嶋 聡	国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 部長
相崎健一	国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 第一室 室長
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

## A. 研究目的

本研究の目的は、ヒトの安全性確保に主眼を置いた上で、Reduction と Refinement により動物福祉の課題を解決する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(LD<sub>50</sub>)」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 IC<sub>50</sub> 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。

本研究は二つの大きな柱からなる。第一の柱は、今までの情報や経験から選択した VS の諸項目の、急性毒性指標としての妥当性、再現性、信頼性、を確認する研究である。これには、①急性毒性発現における遺伝子発現変動解析、②急性毒性試験における行動解析の二つを分担研究課題として設定した。第二の柱は、選択した VS の諸項目を正確に、実験動物から測定するためのデバイスの改良である。これには、③新素材を用いたバイタルサインセンサーの開発、④バイタルサインの統合的解析方法(ソフトウェア)の開発を分担研究課題として設定した。

## B. 研究方法

### B-1 バイタルサインセンサーの開発

1. 心電・脳波電極としての CNT ヤーンの性能評価  
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 年度に引き続き、生体電位データである心電及び脳波を対象に開発を行った。CNT ヤーンは、CNT 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。

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 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。

## 2. ラット用反射型パルスオキシメータの開発:

現在、市販されている小型動物用パルスオキシメータは有線でデータ収集を行うため、麻酔下での測定、または、覚醒下であっても動物を拘束する必要があり長時間の測定は困難である。これを改善するため、覚醒下非拘束ラットにおいて 24 時間以上の計測を可能とするラット用のパルスオキシメータと、データをリアルタイムでグラフ化するソフトウェアの開発に着手した。

ヘモグロビンは酸化型と還元型で赤外光の吸光度はほとんど変わらないが、赤色光では酸化型ヘモグロビンの吸光度が低いことが知られている。パルスオキシメータは、動脈血を対象として赤色光と赤外光を組織に照射してその反射光または透過光を測定し、それぞれの吸光度の比率から血中酸素濃度 ( $SpO_2$ ) を求める装置である。動脈は心臓の拍動に伴って血管径が変動し、これを脈波として検出することにより  $SpO_2$  を求めることが可能となる。また、脈波は心拍を反映した情報であることから、パルスオキシメータは心拍数の測定も可能である。加えて、心臓拍出量は呼吸による影響を受ける(フランク・スターリングの心臓の法則)ため、脈波成分を高速フーリエ変換することで呼吸数の検出を試みた。

非拘束を実現するため、Bluetooth モジュールを実装して無線化した。体動による影響を受けにくくす

るため測定は胸部とし、最小のモジュール構成反射型のパルスオキシメータを作製した。赤外線 LED 搭載カメラを用いてラットの一般状態を 24 時間記録し、 $SpO_2$  の体動と脈波ノイズの相関を調べた。

なお、本装置は下記の研究協力者により開発を行った。

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

太田 裕貴 横浜国立大学大学院工学研究院  
システムの創生部門 准教授

## B-2 急性毒性試験における遺伝子発現変動解析

急性毒性発現時の海馬、肺、肝の遺伝子発現データを取得し、その臓器連関解析を実施した。具体的には、被験物質を単回経口投与後、得られたマウスの海馬を含む脳 4 部位、肺及び肝の mRNA サンプルにつき、当方が開発した Percellome 手法(遺伝子発現値の絶対化手法)を適用した網羅的遺伝子発現解析を行った。再現性、感度、用量相関性、全遺伝子発現の網羅性を考慮し Affymetrix 社 GeneChip、Mouse Genome 430 2.0 を使用した。4 用量、4 時点の遺伝子発現情報を既に開発済みの波面解析等を用いた教師無しクラスタリング解析を行い、多臓器連関及びインフォマティクス解析を行った

モデル物質として、フグ毒として知られるテトロドトキシン (Tetrodotoxin, TTX、純度 95.7 %、富士フイルム和光純薬(株))を選択した。

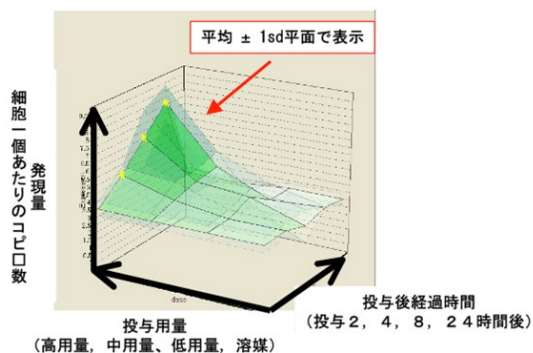
H31/R 元年度は、雄性マウスに単回経口投与した際の「海馬」における網羅的な遺伝子発現変動解析について検討した。R2 年度(今年度)は、海馬とは別に、「肝」における解析を検討し、多臓器連関解析を実施することにより、昨年度の解析により想定された二次的シグナル候補物質を探索した。

用量設定のため、TTX のマウス経口  $LD_{50}$  値が 334  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (RTECS 情報)であったことから、最高用量を 700  $\mu\text{g}/\text{kg}$  とし 3 段階の用量(700, 500, 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、及び溶媒対照)を設定し、予備試験を実施した。12 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを用い、金属製胃ゾンデ (KN-348、夏目製作所)を用いて各群 3 匹

に単回経口投与した。700 µg/kg 群では全例、500 µg/kg 群では 2 例に死亡が認められたが、300 µg/kg 投与群では死亡例はみられなかった。この結果から、24 時間無作用量であった 300µg/kg を最高用量をとり、公比 $\sqrt{10}$  で除して 300, 100, 30µg/kg の投与用量を設定した。

本実験では、投与後の時間 4 点(投与 2, 4, 8 及び 24 時間後)、投与用量 4 段階(300, 100, 30, 0 µg/kg (溶媒:0.1%酢酸を含む 0.5%MC, pH3.5)からなる計 16 群、各群 3 匹、合計 48 匹のマウスについて解析を行った。

各遺伝子の発現変動は、下記図のように用量依存性、経時変化、遺伝子発現量についての 3 次元グラフとして、縦軸(Z 軸)に絶対値化した(細胞 1 個あたりのコピー数) mRNA の発現量を取り、X, Y 軸にはそれぞれ、投与用量とサンプリング時間を取り、各条件の n=3 の平均値曲面で表示した。加えてこの平均曲面の上下に標準偏差(SD)平面(薄い色)で示した。すなわち、一つの化学物質につき、約 45,000 枚の平面が描かれる。



統計処理は、溶媒群と投与群の間の有意差の検定を Student の t 検定にて P 値が 0.05 未満の場合を有意と判定した。実験データは、平均値±標準偏差(SD)にて示した。

### B-3 急性毒性試験における行動解析

#### 1. マウス:

C57BL/6N 成熟雄マウスを使用して、既存の行動解析装置により急性経口毒性発現時の行動様式(移動量、移動様式、痙攣、流涎、瞬目)への影響を調べた。モデル化合物としてアセフェートを用い、投与量は AChE 活性阻害の特徴が現れると想定される

100mg/kg に設定した(アセフェートの経口投与におけるマウスの LD50 は 233mg/kg)。投与直後、投与 30 分後、投与 60 分後、投与 120 分後における微細な経時変化を捉えるために、ハイスピードカメラ(CHU30-BSNA-12, Shodensha, Inc.)を用いて撮影した。

#### 2. ラット:

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。モデル化合物として、TTX(100, 300, 500µg/kg)を投与した。

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 750™ 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。

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)による体表面温度の変化を調べた。

### B-4 バイタルサインの統合的解析方法(ソフトウェア)の開発

#### 1. 学習・評価用データ:

開発中のバイタルサイン(VS)取得デバイスはまだ充分量のデータを生成していないため、完成時に得られるデータと同質のものとして、ヒトの心電図データ(MIT-BIH Arrhythmia Database (mitdb) (<https://physionet.org/content/mitdb/1.0.0/>)より入手)を用いた。

## 2. 解析計算及びソフトウェア生成:

異常検出に利用し得る人工知能アルゴリズムのコーディングについては、関連ライブラリが充実している Python 言語( ver.3.6.9)を使用した。機械学習ライブラリとしては Chainer (ver.7.7.0)、GPU 処理ライブラリとして CUDA (ver.10.2.89)、mitdb からの心電図データのダウンロード・処理ライブラリとして WFDB (ver.3.1.1)、その他、Numpy (ver.1.19.4)、Matplotlib (ver.3.3.3)を使用した。Python スクリプト実行環境としては Jupyter Notebook (ver.6.1.5)を使用した。

## 3. 計算精度確認:

計算精度は必要に応じて Excel (USA Microsoft Corporation) や R 言語 (オープンソース R Development Core Team) で実施し、浮動小数点誤差以上の乖離がないことを確かめた。

(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)」、東北大学大学院農学研究科では、「国立大学法人 東北大学環境・安全委員会 動物実験専門委員会内規」に則って実施した。

## C. 研究結果

### C-1 バイタルサインセンサーの開発

#### 1. 心電・脳波電極としての CNT ヤーンの性能評価:

CNT センサーを動物の皮膚に単結紮して脳波の測定を試みたが、ノイズレベルが高く、現在のところ明確な脳波を取得に至っていない。

#### 2. ラット用反射型パルスオキシメータの開発:

反射型のパルスオキシメータの最小構成モジュールとして、赤色光 LED ランプ、赤外光 LED ランプ、フォトディテクター(PD)、オペアンプ、DC/DC コンバータ、マイクロコントロールユニットの構成とした。LED と PD の最適距離を決定すると共に、それらを

黒色の柔軟シリコン樹脂で囲うことで LED から PD への直接光の漏れ込みを軽減し、脈波の検出感度が上昇した。また、パルスオキシメータは 40×20×8mm 程度の大きさまで小型化した。ヒトに比べ心拍数の多いラット用にサンプリングレートを 25ms から 6.25ms に間隔を狭めることで、適切に脈波を捉えることに成功した(図 1)。

パルスオキシメータにより、心拍数、SpO<sub>2</sub>、呼吸数の計測と一般状態観察の撮像を並行して実施し解析を行った。その結果、制止状態では、安定的に測定が可能であることが明らかになった。呼吸数は目視で測定した呼吸数とほぼ一致することが明らかになった。しかしながら、高速フーリエ変換は倍数を判別できない特性から、60 回/分と 120 回/分の違いを判別できない場合がある。これに対しては、直前の呼吸数データを参照するプログラムを実装することで正確な呼吸数の計測が可能となった。

### C-2 急性毒性試験における遺伝子発現変動解析

H31/R1 年度は、モデル物質として、フグ毒として知られるテトロドトキシン(TTX)を、12 週齢の雄性マウスに単回経口投与した際の(4 用量、4 時点、各群 3 匹、計 48 匹)、脳の内、背景データが多く揃っている海馬における網羅的遺伝子発現変動解析をおこなった結果、ストレス関連遺伝子(Sgk1 遺伝子など)の発現増加が目立ち、他方、Na<sup>+</sup>チャネルなど TTX が直接関与することが示唆されるシグナルネットワーク関連遺伝子の発現変動は認められなかった。

具体的には、解析ソフト RSort を利用し、遺伝子の発現変動が有意(t 検定での時点毎に溶媒対照との間で P 値<0.05)で、発現変動の最高値のコピー数が 2 以上という条件で遺伝子を粗抽出した。その結果、発現が増加する遺伝子 286 プローブセット(ps)が粗抽出され、このうち目視による確認により生物学的な変化が示唆されたものとして 121 ps が抽出された。また発現が減少する遺伝子としては 508 ps が粗抽出され、目視による確認により生物学的な変化が示唆されたものは抽出されなかった。

R2 年度は TTX を、12 週齢の雄性マウスに単回経口投与した際の(4 用量、4 時点、各群 3 匹、計 48

匹)、「肝」における網羅的遺伝子発現変動解析をおこなった結果、ストレス応答遺伝子(代表的なものとしては、Nfkbia、Sgk1、Mt1 や Gadd45g 遺伝子など)やサイトカイン関連遺伝子が見出された。なおストレス応答遺伝子は海馬の際でも認められた。また、肝機能への影響などについてさらに詳細な解析を進めたところ、糖新生に係るシグナルネットワークが見出された。すなわち「PGC-1→Foxo1→ HNF4→G6pc→Pck1」というシグナルネットワークである。したがって毒性予測として、TTX の単回経口投与により、血糖値が上昇するものと考えられ、今後、実証に向けた実験が有用と考える。この際、血糖値の測定にあたっては、中性脂肪と同様に、摂食の影響を受けるため、できるだけ絶食下にておこなう必要があると考える。具体的には、解析ソフト RSort を利用し、遺伝子の発現変動が有意(t 検定での時点毎に溶媒対照との間で P 値<0.05)で、発現変動の最高値のコピー数が 2 以上という条件で遺伝子を粗抽出した。その結果、発現が増加する遺伝子 1,893 プローブセット(ps)が粗抽出され、このうち目視による確認により生物学的な変化が示唆されたものとして 750 ps が抽出された。また発現が減少する遺伝子としては 352 ps が粗抽出され、目視による確認により生物学的な変化が示唆されたものとして 27 ps が抽出された。抽出されなかった。

### C-3 急性毒性試験における行動解析

#### 1. マウス:

アセフェートの投与 30 分後に活動性低下、瞬目反応の異常や半眼がみられ、投与 60 分後には流涙の症状が確認された。また、投与 120 分後には歩行時の振戦が確認され、流涙の増加および縮瞳がみられた。さらに、髭の動きから呼吸不整を起こしていることが考えられた。

#### 2. ラット:

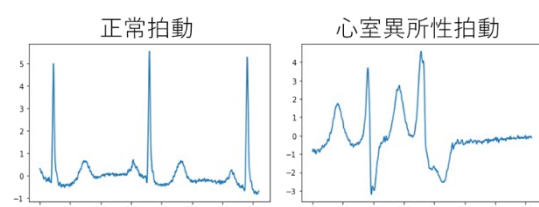
TTX を投与したラットを用い、体表面温度と血圧測定を行ったところ、TTX では体表面温度上昇に伴って血圧低下が認められた。

### C-4 バイタルサインの統合的解析方法(ソフトウェア)の開発

現在開発中のバイタルサイン(VS)取得デバイスが完成した際に生成されるデータは、主に一次元の波形データになると予想されるため、今年度はヒトの心電図データをサンプルとして用い、異常検出アルゴリズムの評価や、最終目標である「概略の致死量」を推定するための Acute Toxicity Vital Signs Score(仮称)の「定義」を行う方策を検討した。

一般的に新規開発デバイスによる計測値処理では、実データを得てからでないと測定値分布も推定するしかなく、数理的な手法では閾値など具体的な基準値を設定するのは困難である。このため、汎用性の高い異常検出アルゴリズムとして、人工知能、とりわけ近年、開発研究が飛躍的に進み、代表的な手法となっている深層学習(Deep Learning)に着目し、その判別性能等を検討した。

まず学習及び評価用データとして、MIT-BIH Arrhythmia Database (mitdb)に収録されていた 47 人の心電図データ、延べ 24 時間のシグナルデータを入手した。このデータベースでは予め各 R 波ピークに AAMI (Association for the Advancement of Medical Instrumentation) 推奨基準によるラベルが付与されており、これを元に個々のレコードに分割し、正常拍動若しくは心室異所性拍動にラベリングした。

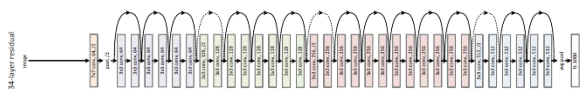


前処理として、ペースメーカー等によるノイズが混入したレコードや重複レコードを取り除き、約 9 万レコードのサンプルデータを得た。なお、これらの 9 割が正常拍動、残り 1 割が心室異所性拍動であった。

深層学習で用いるネットワーク構造としては、画像



認識タスクで著名な畳み込みニューラルネットワーク (CNN: Convolutional Neural Networks)ベースの ResNet34 (arXiv:1512.03385)を採用した。



ResNet34 の層構造概略 (arXiv:1512.03385)

ただし、画像認識時の二次元畳み込みではなく、入力データである心電図に合わせて一次元畳み込みに設定し、上記 9 万件の拍データのうち半数を用いて教師あり深層学習を実施した。

学習に用いなかった残り半数の心拍データに対して、学習済み CNN で評価を実行した結果、正答率 (accuracy) は 93.0%であった。内訳としては正常拍動レコードに対する予測スコアは適合率 (precision) 0.99/再現率 (recall) 0.93 であったが、心室異所性拍動レコードに対しては同 0.50/0.89 であった。

accuracy		0.930	
	precision	recall	f1 score
正常拍動	0.99	0.93	0.96
異常拍動	0.50	0.89	0.64

#### D. 考察

バイタルサインセンサーの開発では、H31/R 元年度に CNT ヤーンを用いて心電の測定に成功したが、R2 年度に実施した脳波については、現在のところ明確なデータが得られなかった。心電図は 1~5mV 程度であるが、脳波は 1~500μV であり、加えて動物では体動の制御が難しいため、これに伴う筋電 (~10mV) によって脳波信号の抽出ができていない可能性がある。今後は測定部位並びに解析方法の改良を試みる。今年度着手したパルスオキシメータでは、24 時間以上連続して心拍数、SpO<sub>2</sub>、呼吸数の計測に成功した。パルスオキシメータも体動によるノイズに

より正確な測定が困難となる場合もあった。これを回避するため、パルスオキシメータと皮膚との密着性を高める必要がある。また、正確な呼吸数の測定のために、高速フーリエ変換によって得られた呼吸数の急変 (倍数変化) をキャンセルするアルゴリズムを解析ソフトウェアに導入する必要がある。

遺伝子発現変動解析において、TTX のマウス海馬への直接作用は弱く、サイトカイン、糖質コルチコイドを介した影響が示唆された。多臓器関連の検討に向け、肝において発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析 (in silico) を、IPA における Upstream Analysis を用いて検討した結果、ストレス応答に絡むデキサメタゾンあるいはグルココルチコイド受容体 (NR3C1) やサイトカインである IL1B や TNF が調節因子として抽出されてきた。したがって、肝における細胞に対してストレス応答が誘発されていることが明らかとなった。この点、IL1B は、別の研究班での先行研究により、海馬に対して神経伝達抑制作用を有する可能性を示唆するデータを得ており、このことから、IL1B や TNF といった肝由来のサイトカインが海馬に働く二次的シグナル候補物質であることが示唆された。興味深いことに、欧州食品安全機関 (EFSA) が取りまとめた報告書では、既往知見であるヒトに対する最低致死用量が 2 mg であることに疑問が示され、そこで齧歯類を用いる急性毒性試験を用いるリスク評価がおこなわれた。その結果、「単回経口投与の際の無気力状態 (apathy) という一般状態変化を指標」とした急性参照用量 (ARfD) を 0.25 μg/kgBW と導出し、貝類を 400 グラム喫食した場合のヒトに対し有害な影響をもたらさない貝肉中の含有量を 44 μgTTX 等量/kg 貝肉と推定している。ARfD とは、ヒトがある物質を 24 時間以内に経口摂取した場合に、健康に悪影響を示さないと推定される一日当たりの摂取量である。したがって、げっ歯類において単回経口投与した TTX が無気力状態 (apathy) を誘発することから、中枢にはたらくことが明らかとなってきているが、TTX が血液脳関門を通過できないことから、この分子機序は不明である。われわれの検討結果からは、二次的シグナル候補物質としての IL1B や TNF といった肝由来のサイ

トカインが海馬に働いた結果、TTX のマウス経口投与により、無気力状態(apathy)が生じる可能性が考えられた。

急性毒性試験における行動解析では、アセフェートを投与した成熟雄マウスをハイスピードカメラ(CHU30-BSNA-12, Shodensha, Inc.)を用いて撮影した結果、肉眼では観察が困難である髭の動きから呼吸不整を起こしていることが考えられた。したがって、ハイスピードカメラは化学物質の毒性所見をより簡便に捉えることができると考えられる。今後、モデル化学物質の検討増やすとともに撮影条件の設定を進める予定である。

TTX を投与したラットでは体表面温度の上昇と血圧の低下が認められた。従来、これらの情報は実験者の感覚によって評価されているが、サーモグラフィと血圧計により定量的データが得られた。特に、サーモグラフィは体表面温度を非接触で簡便に測定することが可能であり、経時的に取得できるバイタルサインの評価には利便性が高い。本研究で使用している血圧測定装置はげっ歯類専用開発されたものであり、従来の装置では必須であった動物の加温が不要である。このため、動物にストレスを与えることがなく、かつ、サーモグラフィによる体温測定と同時に使用が可能である。一方、血圧測定は動物を一時的に拘束する必要があるため、経時的に取得することは難しい。

バイタルサインの統合的評価のためのソフトウェア開発において、今年度は代表的な畳み込みニューラルネットワーク(CNN)モデルを採用し、一般的な教師あり深層学習による次元の時系列データ(評価用サンプルとして心電図データを利用)の判別性能評価を実施した。総合的な正答率は 93%と期待より低いものであったが、これは異常波(心室異所性拍動)に対するスコアが低いためである。これは学習に用いたデータの極端な不均衡(心室異所性拍動レコードが全数の一割しかない)が原因と考えられる。対策としては、学習に用いるデータの選定において正常レコード数を削減して異常レコード数とのバランスをとる(アンダーサンプリング)といった単純な手法で対応可能である。さらに必要に応じて他の学習モデル、例えば異常検知に有効とされている自己符号化

器(autoencoder)や 深層距離学習(deep metric learning)などの導入と組み合わせを行うことで、性能向上が可能と考えられる。今回の検討は一種類のデータ、且つ正常/異常の単純分類であったが、機械学習技術は本来、多種類のデータ入力と複数クラスへの分類(出力)に対応する柔軟なものであり、本研究の目標である、計測したバイタルサイン(VS)の諸項目(=多種類データ)から「診断学」による分類(=複数クラス分類)に基づく統合評価の実現に必要な要件を充足する技術として、大変有望な手法と考えられる。なお機械学習技術を判別に利用する場合の最大の懸念は、特徴抽出工程をヒトが行わず機械が自動的に処理してしまうために、判断根拠がブラックボックス化することが想定される。ブラックボックスを内包する毒性試験法では、その判定結果への信頼度が低下するだけでなく、VS 変動に関与する毒性機序研究においても支障を来す。幸い、人工知能研究分野において機械学習の判断根拠を説明する技術が急速に開発されつつあり、将来的にはブラックボックス問題は解消される見込みである。来年度は、従来からの統計を含む数理的手法や機械学習技術を導入して、ATVSS 定義のために必要な、多項目・複数クラス分類の入力データに対応した異常検知モデルの構築を進め、完成予定のVS取得デバイスによる実データを得て、性能評価を試みる。

なお、本研究では実験動物で観察されたバイタルサインがヒトの所見と符合するか否かについて日本中毒学会の専門家の協力を得る予定であったが、当該専門家は救急医療に携わる医師であり COVID-19 への対応のため本年度は実現できなかった。

## E. 結論

バイタルサインセンサーの開発では、CNT ヤーンを用いて心電の測定は可能であるが、脳波については、現在のところ明確なデータが得られていない。ラット用に開発したパルスオキシメータでは、24 時間以上連続して心拍数、SpO<sub>2</sub>、呼吸数の計測に成功した。神経毒性物質である TTX の急性毒性発現時の海馬及び肝の遺伝子発現データを取得し、その臓器関連解析では、海馬及び肝ではストレス関連遺伝子

の発現が高い一方で、Na<sup>+</sup>チャネルなどTTXが直接関与することが示唆されるシグナルネットワーク関連遺伝子の発現変動は認められなかった。二次的シグナル候補物質を探索するために多臓器連関解析として肝の解析を実施した結果、二次的シグナル候補物質として、サイトカインであるIL1BやTNFが示唆された。興味深いことに、糖新生に係る多くの遺伝子の発現増加が認められ、毒性予測として、血糖値が上昇するものと考えられた。マウス及びラットを用いて本研究の基盤となる行動(ハイスピードカメラを含む)、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。バイタルサインの統合的評価のためのソフトウェア開発においては、昨年度選定したAcute Toxicity Vital Signs Score(ATVSS、仮称)の定義に利用可能なアルゴリズムのうち、教師あり深層学習について、判別性能の評価を行った結果、本研究の目標実現に有効な手法であることが分かった。現在は商業的に入手可能な血圧測定装置と新規開発のCNTセンサー並びにパルスオキシメータを並行して使用し研究を遂行しているが、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

Ono R, Yoshioka Y, Furukawa Y, Naruse M, Kuwagata M, Ochiya T, Kitajima S, Hirabayashi Y: Novel hepatotoxicity biomarkers of extracellular vesicle (EV)-associated miRNAs induced by CCl4. *Toxicol Rep.* 2020; 7: 685-692. [doi 10.1016/j.toxrep.2020.05.002].

Nock R, Polouliakh N, Nielsen F, Oka K, R Connell C, Heimhofer C, Shibani K, Ghosh S, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J, Akama T, Kitano H: A Geometric Clustering Tool (AGCT) to robustly unravel the inner cluster

structures of time-series gene expressions. *PLoS One* 2020; 15(7): e0233755.

[doi 10.1371/journal.pone.0233755]

Saito H, Hara K, Kitajima S, Tanemura K: Effect of Vitamin E deficiency on spermatogenesis in mice and its similarity to aging. *Reproductive Toxicology* 2020; 98: 225-232.

[doi: 10.1016/j.reprotox.2020.10.003].

登田美桜、北嶋 聡、シリーズ：日本毒性学会との連携 マリンバイオトキシシン；フグ毒のリスク評価について、*中毒研究(Jpn. J. Clin. Toxicol.)* 2021; 34: 58-62.[ISSN: 0914-3777]

Yamamoto E, Taquahashi Y, Kuwagata M, Saito H, Matsushita K, Toyoda T, Sato F, Kitajima S, Ogawa K, Izutsu K, Saito Y, Hirabayashi Y, Iimura Y, Goda Y, Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat lungs after inhalation of 1- $\mu$ m ciclesonide aerosol by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging, *Int. J. Pharm.* Epub 2021 Jan 21

Umezumi K, Kurata S, Takamori H, Numabe T, Hiradate Y, Hara K, Tanemura K. Characteristics and Possible Role of Bovine Sperm Head-to-Head Agglutination. *Cells.* 2020 Aug 9;9(8):1865. doi: 10.3390/cells9081865. PMID: 32784858; PMCID:PMC7463926.

Hiradate Y, Hara K, Tanemura K. Effect of neurotensin on cultured mouse preimplantation embryos. *J Reprod Dev.* 2020 Oct 13;66(5):421-425. doi:10.1262/jrd.2020-002. Epub 2020 Jun 2. PMID: 32493860; PMCID: PMC7593629.

Umezumi K, Hara K, Hiradate Y, Numabe T, Tanemura K. Stromal cell-derived factor 1 regulates in vitro sperm migration towards the cumulus-oocyte complex in cattle. *PLoS*

One. 2020 Apr 30;15(4):e0232536.  
doi:10.1371/journal.pone.0232536. PMID:  
32353075; PMCID: PMC7192438.

## 2. 学会発表

北嶋 聡、種村 健太郎、菅野 純、室内揮発性有機  
化学物質の極低濃度下における吸入曝露の際  
のマウス中枢神経系への影響、第 47 回日本毒  
性学会学術年会 (2020.6.30.) オンライン

高橋 祐次、種村 健太郎、相崎 健一、北嶋 聡、  
急性毒性試験の近代化によるテトロドキシンの  
中枢影響評価、第 47 回日本毒性学会学術年会  
(2020.6.29.) オンライン

種村 健太郎、佐々木 貴熙、齊藤 洋克、高橋 祐  
次、北嶋 聡、菅野 純、発達期マウスへのドー  
モイ酸投与による成熟後の神経行動毒性発現～  
海産毒による異常誘発モデルとしての検討 2 ～、  
第 47 回日本毒性学会学術年会 (2020.6.29.)  
オンライン

齊藤 洋克、原 健士朗、冨永 貴志、中島 欽一、  
北嶋 聡、菅野 純、種村 健太郎、低用量ベルメ  
トリンの早期慢性ばく露による成熟後の雄マウス  
行動影響、第 47 回日本毒性学会学術年会  
(2020.6.29.) オンライン

種村 健太郎、齊藤 洋克、古川 佑介、相崎 健一、  
北嶋 聡、菅野 純、低用量/低濃度化学物質の  
発生-発達期ばく露による情動認知行動毒性～  
情動認知行動毒性評価系の国際標準化に向け  
た対応～、第 47 回日本毒性学会学術年会  
(2020.6.30.) オンライン

菅野 純、北嶋 聡、相崎 健一、小野 竜一、  
Percellome Project における精度管理とその  
解析への影響、第 47 回日本毒性学会学術年会  
(2020.6.30.) オンライン

小野 竜一、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、化学物  
質の反復投与によるゲノムワイドなヒストン修飾の  
変化、第 47 回日本毒性学会学術年会  
(2020.6.30.) オンライン

大久保 佑亮、嘉本 海大、高橋 祐次、北嶋 聡、太  
田 裕貴、覚醒下非拘束ラットから血中酸素飽和

度・心拍数・呼吸数を計測可能なウェアラブルパ  
ルスオキシメータの開発、第 47 回日本毒性学会  
学術年会 (2020.6.30.) オンライン

相崎 健一、長谷 武志、北嶋 聡、小野 竜一、北野  
宏明、菅野 純、Current and future  
application of PERCELLOME database as a  
part of big data to toxicological research、第  
47 回日本毒性学会学術年会 (2020.7.1.) オン  
ライン

Toshime Igarashi、Yukuto Yasuhiko、Ryuichi  
Ono、Erika Tachihara、Yu Takahashi、  
Makiko Kuwagata、Satoshi Kitajima、  
CRISPR/Cas9 システムを用いたマウス受精卵  
のゲノム編集におけるオンターゲットの多様な非  
意図的変異、第 47 回日本毒性学会学術年会  
(2020.6.29.) オンライン

原唯香、平舘裕希、原健士朗、北嶋聡、菅野純、種  
村 健太郎、エストロゲン受容体  $\alpha$  非翻訳領域  
遺伝子改変マウスの学習記憶不全と遺伝子発現  
プロファイル解析、第 113 回日本繁殖生物学会  
大会 (2020.9.25.)、オンライン

嘉本海大、稲森剛、磯田豊、高橋祐次、北嶋聡、大  
久保佑亮、太田裕貴、毒性試験ための小動物用  
ウェアラブルパルスオキシメータの開発、第 11 回  
マイクロ・ナノ工学シンポジウム (2020.10.28) オン  
ライン

Taquahashi Y、Yokota S、Morita K、Tsuji M、  
Kuwagata M、Hojyo M、Hirose A、Kanno J、  
Interim report of four-week interval  
intermittent inhalation study on multi-  
walled carbon nanotube in mice, 9th Nano  
Conference (2020.11.12, Virtual Meeting)

五十嵐智女、安彦行人、小野竜一、高橋雄、栗形麻  
樹子、北嶋 聡、CRISPR/Cas9 のゲノム編集に  
よるノックインマウス作製時に認められたオンター  
ゲットの多様な非意図的変異、日本食品衛生学  
会創立 60 周年記念第 116 回学術講演会  
(2020.11.24.)、オンライン

北嶋 聡、食品トキシコゲノミクスと毒性予測、第 18 回  
食品安全フォーラム (2020.11.27.)

高橋 祐次、森田 紘一、辻 昌貴、菅 康佑、相崎 健一、大久保 佑亮、種村 健太郎、北嶋 聡、急性毒性試験の近代化による毒性機序研究、第 3 回医薬品毒性機序研究会 (2021.1.15) オンライン

M. Hojo, Y. Yamamoto, Y. Sakamoto, A. Ohnuki, A. Maeno, T. Moriyasu, Y. Taquahashi, J. Kanno, A. Hirose, and D. Nakae. Declines in Serum Levels of Apolipoproteins during the Development of Peritoneal Mesothelioma by Multiwalled Carbon Nanotube in Rats, SOT 2021 (2021.3.17), Poster, virtual

Y. Taquahashi, S. Yokota, M. Hojyo, K. Morita, M. Tsuji, K. Suga, M. Kuwagata, A. Hirose, and J. Kanno, Interim Report of the 4-Week Interval Intermittent Whole Body Inhalation Study on

Multiwalled Carbon Nanotube in Mice, SOT 2021 (2021.3.17), Poster, virtual

## 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

令和2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:	太田裕貴	横浜国立大学大学院工学研究院	システムの創生部門 准教授
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:	菅 康佑	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、ヒトの安全性確保に主眼を置いた上で **Reduction** と **Refinement** により動物福祉の課題を解決する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(LD<sub>50</sub>)」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。急性毒性を誘発するモデル化合物として **Tetrodotoxin** 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と脳波測定に取り組むとともに、ラット用のパルスオキシメータを独自開発した。TTXの急性毒性発現時には一過性の体温上昇と、心拍数と血圧の低下がみられた。CNTヤーンを用いて心電の測定は可能となったが、脳波については現在のところ明確なデータが得られていない。ラット用に開発したパルスオキシメータでは、24時間以上連続して心拍数、SpO<sub>2</sub>、呼吸数の計測に成功した。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、ヒトの安全性確保に主眼を置いた上で **Reduction** と **Refinement** により動物福祉の課題を解決する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(LD<sub>50</sub>)」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)のヤーンを用いて心電測定に取り組み、また独自にラット用パルスオキシメータの開発を行った。

## 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 **Tetrodotoxin**(富士フイルム和光)を用いた。0.1%酢酸を 0.5%MC 溶液を溶媒として用いた。投与用量は、100、300 及び 500 µg/kg とした。

#### 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 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。CNT 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。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。

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。

### 2. ラット用パルスオキシメータの開発:

現在、市販されている小型動物用パルスオキシメータは有線でデータ収集を行うため、麻酔下での測定、または、覚醒下であっても動物を拘束する必要があり長時間の測定は困難である。これを改善するため、覚醒下非拘束ラットにおいて 24 時間以上の計測を可能とするラット用のパルスオキシメータと、データをリアルタイムでグラフ化するソフトウェアの開発に着手した。

ヘモグロビンは酸化型と還元型で赤外光の吸光度はほとんど変わらないが、赤色光では酸化型ヘモグロビンの吸光度が低いことが知られている。パルスオキシメータは、動脈血を対象として赤色光と赤外光を組織に照射してその反射光または透過光を測定し、それぞれの吸光度の比率から血中酸素濃度 (SpO<sub>2</sub>) を求める装置である。動脈は心臓の拍動に伴って血管径が変動し、これを脈波として検出することにより SpO<sub>2</sub> を求めることが可能となる。また、脈波は心拍を反映した情報であることから、パルスオキシメータは

心拍数の測定も可能である。加えて、心臓拍出量は呼吸による影響を受ける (フランク・スターリングの心臓の法則) ため、脈波成分を高速フーリエ変換することで呼吸数の検出を試みた。

非拘束を実現するため、Bluetooth モジュールを実装して無線化した。体動による影響を受けにくくするため測定は胸部とし、最小のモジュール構成反射型のパルスオキシメータを作製した。赤外線 LED 搭載カメラを用いてラットの一般状態を 24 時間記録し、SpO<sub>2</sub> の体動と脈波ノイズの相関を調べた。

(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

TTX 投与群においては、100 µg/kg において体温上昇 (38°C) がみられ僅かに血圧の低下が認められた。300 µg/kg では体温上昇 (38°C) と、血圧及び心拍数低下がみられた。500 µg/kg においては急激な体温上昇 (39°C) と顕著な心拍数低下と血圧低下がみられた (図 1)。

### C-2 バイタルサインセンサーの開発

心電・脳波電極としての CNT ヤーンの性能評価では、CNT センサーを動物の皮膚に単結紮して心電・脳波の測定を試みた。心電については麻酔下でデータ取得に成功したが、脳波についてはノイズレベルが高く、現在のところ明確な脳波を取得に至っていない。

反射型のパルスオキシメータの最小構成モジュールとして、赤色光 LED ランプ、赤外線 LED ランプ、フォトディテクター (PD)、オペアンプ、DC/DC コンバータ、マイクロコントロールユニットの構成とした。LED と PD の最適距離を決定すると共に、それらを黒色の柔軟シリコン樹脂で囲うことで LED から PD



への直接光の漏れ込みを軽減し、脈波の検出感度が上昇した。また、パルスオキシメータは  $40 \times 20 \times 8\text{mm}$  程度の大きさまで小型化した。ヒトに比べ心拍数の多いラット用にサンプリングレートを  $25\text{ms}$  から  $6.25\text{ms}$  に間隔を狭めることで、適切に脈波を捉えることに成功した(図 2)。

パルスオキシメータにより、心拍数、SpO<sub>2</sub>、呼吸数の計測と一般状態観察の撮像を並行して実施し解析を行った。その結果、制止状態では、安定的に測定が可能であることが明らかになった。呼吸数は目視で測定した呼吸数とほぼ一致することが明らかになった。しかし、高速フーリエ変換は倍数を判別できない特性から、60 回/分と 120 回/分の違いを判別できない場合があることが明らかとなった。

#### 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。

新素材である CNT 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る。そのため、皮膚結紮による方法を試みた。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。

脳波については、現在のところ明確なデータが得られなかった。心電図は  $1 \sim 5\text{mV}$  程度であるが、脳波は  $1 \sim 500\mu\text{V}$  であり、加えて動物では体動の制御が難しいため、これに伴う筋電( $\sim 10\text{mV}$ )によって脳波信号の抽出ができていない可能性がある。しかしながら、CNT センサーは皮膚結紮によって取り付け

ることができるため、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低いため、極めて有用な方法であると考えられる。今後は測定部位並びに解析方法の改良を試みる。

今年度着手したパルスオキシメータでは、24 時間以上連続して心拍数、SpO<sub>2</sub>、呼吸数の計測に成功した。パルスオキシメータも体動によるノイズにより正確な測定が困難となる場合もあった。これを回避するため、パルスオキシメータと皮膚との密着性を高める必要がある。また、正確な呼吸数の測定のために、高速フーリエ変換によって得られた呼吸数の急変(倍数変化)をキャンセルするアルゴリズムを解析ソフトウェアに導入する必要がある。

#### E. 結論

バイタルサインセンサーの開発では、CNT ヤーンを用いて心電の測定は可能であるが、脳波については、現在のところ明確なデータが得られていない。ラット用に開発したパルスオキシメータでは、24 時間以上連続して心拍数、SpO<sub>2</sub>、呼吸数の計測に成功した。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

Yamamoto E, [Taquahashi Y](#), Kuwagata M, Saito H, Matsushita K, Toyoda T, Sato F, Kitajima S, Ogawa K, Izutsu K, Saito Y, Hirabayashi Y, Iimura Y, Goda Y, Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat lungs after inhalation of  $1\text{-}\mu\text{m}$  ciclesonide aerosol by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging, Int. J. Pharm. Epub 2021 Jan 21

## 2. 学会発表

高橋 祐次、種村 健太郎、相崎 健一、北嶋 聡、急性毒性試験の近代化によるテトロドトキシンの中枢影響評価、第 47 回日本毒性学会学術年会 (2020.6.29.) オンライン

大久保 佑亮、嘉本 海大、高橋 祐次、北嶋 聡、太田 裕貴、覚醒下非拘束ラットから血中酸素飽和度・心拍数・呼吸数を計測可能なウェアラブルパルスオキシメータの開発、第 47 回日本毒性学会学術年会 (2020.6.30.) オンライン

嘉本海大、稲森剛、磯田豊、高橋祐次、北嶋聡、大久保佑亮、太田裕貴、毒性試験ための小動物用ウェアラブルパルスオキシメータの開発、第 11 回マイクロ・ナノ工学シンポジウム (2020.10.28) オンライン

Taquahashi Y, Yokota S, Morita K, Tsuji M, Kuwagata M, Hojyo M, Hirose A, Kanno J, Interim report of four-week interval intermittent inhalation study on multi-walled carbon nanotube in mice, 9th Nano Conference (2020.11.12, Virtual Meeting)

高橋 祐次、森田 紘一、辻 昌貴、菅 康佑、相崎 健一、大久保 佑亮、種村 健太郎、北嶋 聡、急性毒性試験の近代化による毒性機序研究、第 3 回医薬品毒性機序研究会 (2021.1.15) オンラ

イン

Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Ohnuki A., Maeno A., Moriyasu T., Taquahashi Y, Kanno J., Hirose A., and Nakae D., Declines in Serum Levels of Apolipoproteins during the Development of Peritoneal Mesothelioma by Multiwalled Carbon Nanotube in Rats, SOT 2021 (2021.3.17), Poster, virtual

Taquahashi Y, Yokota S., Hojyo M., Morita K., Tsuji M., Suga K., Kuwagata M., Hirose A., and Kanno J., Interim Report of the 4-Week Interval Intermittent Whole Body Inhalation Study on Multiwalled Carbon Nanotube in Mice, SOT 2021 (2021.3.17), Poster, virtual

## 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

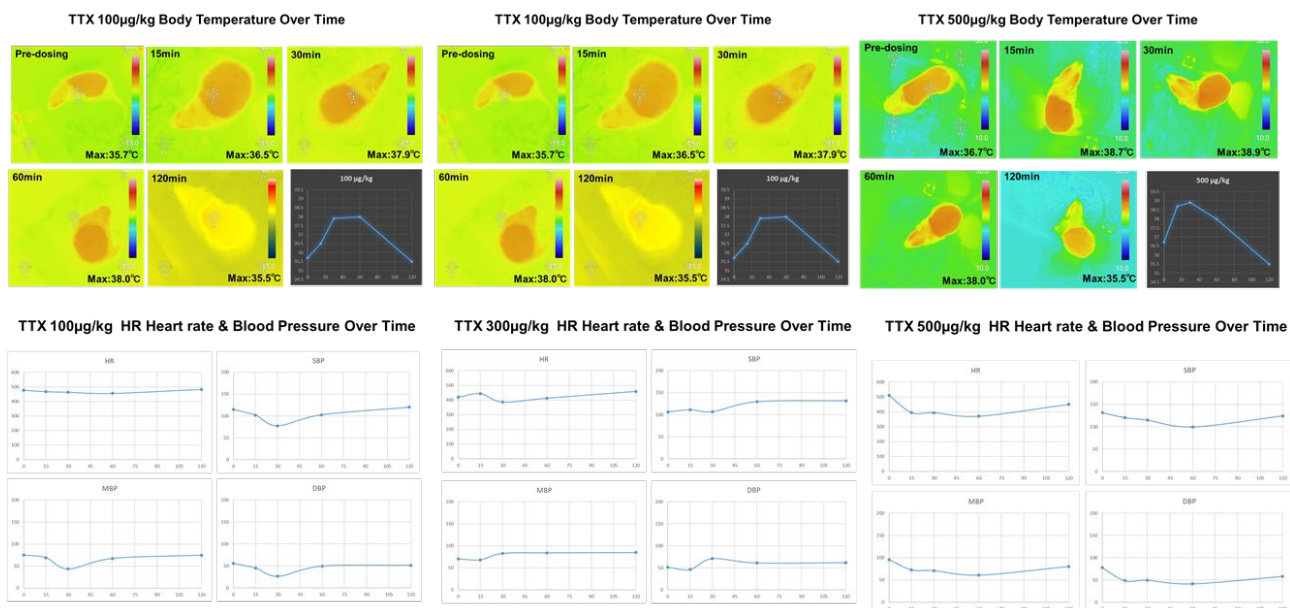


図 1 ラットを用いた化学物質の急性影響評価 (TTX)

TTX 投与群においては、100 µg/kg において体温上昇 (38°C) がみられ僅かに血圧の低下が認められた。300 µg/kg では体温上昇 (38°C) と、血圧及び心拍数低下がみられた。500 µg/kg においては急激な体温上昇 (39°C) と顕著な心拍数低下と血圧低下がみられた。

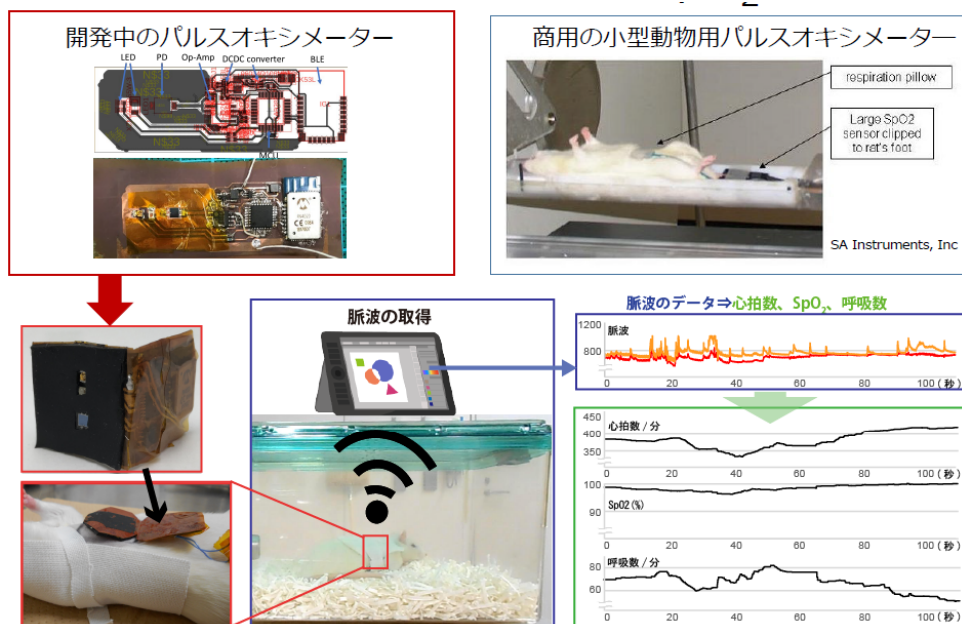


図 2 バイタルサインセンサーの開発

反射型のパルスオキシメータの最小構成モジュールとして、赤色光 LED ランプ、赤外光 LED ランプ、フォトディテクター (PD)、オペアンプ、DC/DC コンバータ、マイクロコントロールユニットで構成可能であった。LED と PD の最適距離を決定すると共に、それらを黒色の柔軟シリコン樹脂で囲うことで LED から PD への直接の漏れ込みを軽減し、脈波の検出感度が上昇した。また、パルスオキシメータは 40×20×8mm 程度の大きさまで小型化した。ヒトに比べ心拍数の多いラット用にサンプリングレートを 25ms から 6.25ms に間隔を狭めることで、適切に脈波を捉えることに成功した。

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 急性毒性試験における遺伝子発現変動解析

研究分担者:	北嶋 聡	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部 部長
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:	齊藤洋克	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
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:	森山紀子	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部

## 研究要旨

本分担研究では、急性毒性発現時の海馬、肺、肝の遺伝子発現データを取得し、その臓器連関解析を実施した。具体的には、被験物質を単回経口投与後、得られたマウスの海馬を含む脳 4 部位、肺及び肝の mRNA サンプルにつき、当方が開発した Percellome 手法(遺伝子発現値の絶対化手法)を適用した網羅的遺伝子発現解析を行った。再現性、感度、用量相関性、全遺伝子発現の網羅性を考慮し Affymetrix 社 GeneChip、Mouse Genome 430 2.0 を使用した。4 用量、4 時点の遺伝子発現情報を既に開発済みの波面解析等を用いた教師無しクラスタリング解析を行い、多臓器連関及びインフォマティクス解析の開発を進める計画である。

H31/R 元年度は、被験物質としてモデル物質として、フグ毒として知られるテトロドトキシン(tetrodotoxin, TTX)を選択し、雄性マウスに単回経口投与した際の「海馬」における網羅的な遺伝子発現変動解析について検討した。金属製胃ゾンデを用いて強制経口投与し、投与後の時間 4 点(投与 2, 4, 8 及び 24 時間後)、投与用量各 300, 100, 30, 0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ (溶媒:0.1%酢酸を含む 0.5%MC, pH3.5)の 4 点からなる計 16 群、各群 3 匹、合計 48 匹のマウスについて解析を行った。なお用量設定に際しては、TTX のマウス経口 LD50 値が 334  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (RTECS 情報)であったことから、最高用量を 700  $\mu\text{g}/\text{kg}$  とし 3 段階の用量(700, 500, 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、及び溶媒対照)を設定し、予備試験を実施した。12 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを用い、各群 3 匹に単回経口投与した。その結果、700  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群では全例、500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群では 2 例に死亡が認められたが、300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  投与群では死亡例はみられなかった。この結果から、24 時間無作用量であった 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$  を最高用量をとし、公比  $\sqrt{10}$  で除して 300, 100, 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$  の投与用量を設定した。

脳のなかで、背景データが多く揃っている「海馬」における網羅的遺伝子発現変動解析をおこなった結果、ストレス関連遺伝子(Sgk1 遺伝子など)の発現増加が目立ち、他方、Na<sup>+</sup>チャンネルなど TTX が直接関与すること

が示唆されるシグナルネットワーク関連遺伝子の発現変動は認められなかった。この事は、海馬に対して TTX が直接作用するわけではなく、ストレス応答に絡むサイトカインや糖質コルチコイドなどのような二次的シグナルが海馬に働き、その結果、TTX の急性参照用量設定のための報告にあるように、**apathy**(無関心)といった中枢影響が誘発されている事が示唆された。

そこで R2 年度は、上述した二次的シグナル候補物質を探索するために、海馬とは別に、「肝」における解析を検討し、多臓器連関解析を実施することとした。現時点での解析の結果、発現変動する遺伝子群の上流には、ストレス応答に絡むデキサメタゾンあるいはグルココルチコイド受容体(NR3C1)やサイトカインである **IL1B** や **TNF** が調節因子として抽出されてきた。グルココルチコイド、**TNF** が存在するのは、海馬での解析と同様であったが、興味深いことに、糖新生に係る多くの遺伝子の発現増加が認められ、毒性予測として、血糖値が上昇するものと考えられた。また二次的シグナル候補物質として、サイトカインである **IL1B** や **TNF** が示唆された。引き続き、多臓器連関につき解析中である。

## A. 研究目的

本研究の目的は、ヒトの安全性確保に主眼を置いた上で、Reduction と Refinement により動物福祉の課題を解決する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。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(VS)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。本研究は二つの大きな柱からなる。第一の柱は、「今までの情報や経験から選択した VS の諸項目の、急性毒性指標としての妥当性、再現性、信頼性、を確認する研究」である。これには、①急性毒性発現における遺伝子発現変動解析、②急性毒性試験における行動解析の二つを分担研究課題として設定した。第二の柱は、「選択した VS の諸項目を正確に、実験動物から測定するためのデバイスの改良」である。これには、③新素材を用いたバイタルサインセンサーの開発、④バイタルサインの統合的解析方法(ソフトウェア)の開発を分担研究課題として設定した。

本分担研究では、第一の柱の①急性毒性発現における遺伝子発現変動解析を扱う。

## B. 研究方法

計画通りに、H31/R 元年度(初年度)は、モデル物質として、フグ毒として知られるテトロドトキシン

(tetrodotoxin, TTX)を選択し、雄性マウスに単回経口投与した際の、「海馬」における網羅的な遺伝子発現変動解析について検討した。また R2 年度(今年度)は、海馬とは別に、「肝」における解析を検討し、多臓器連関解析を実施することにより、昨年度の解析により想定された二次的シグナル候補物質を探索することとした。

以下に実験方法の概要を示す。遺伝子発現変動解析は、独自の遺伝子発現値の絶対化手法である Percellome 法(Kanno J et al, BMC Genomics 7 64 2006)を用いた。

### B-1 トキシコゲノミクス

雄性マウス(成熟期[12 週齢])を対象とし、被験物質を、金属製胃ゾンデ(KN-348、夏目製作所)を用いて強制経口投与し、投与後の時間 4 点(投与 2, 4, 8 及び 24 時間後)、投与用量各 300, 100, 30, 0 µg/kg(溶媒:0.1%酢酸を含む 0.5%MC, pH3.5)の 4 点からなる計 16 群、各群 3 匹、合計 48 匹のマウス各臓器について解析を行った。採取臓器は、海馬を含む脳 4 部位(海馬、皮質、脳幹、小脳)、肺及び肝とする。マウス各組織を採取後すみやかに RNA later (Ambion 社)の入った RNA 用サンプルチューブ(キアゲン社)に採取し、4°Cで一晩浸漬し、RNase を不活化した。

得られたマウスの海馬を含む脳 4 部位、肺及び肝の mRNA サンプルにつき、当方が開発した Percellome 手法(遺伝子発現値の絶対化手法)を適用した網羅的遺伝子発現解析を行った。再現性、感度、用量相関性、全遺伝子発現の網羅性を考慮し Affymetrix 社 GeneChip、Mouse Genome 430 2.0 を使用する。4 用量、4 時点の遺伝子発現情報を既に開発済みの波面解析等を用いた教師無しクラスタリング解析を行い、多臓器連関及びインフォマテイクス解析を行った。

### B-2 被検物質

H31/R 元年度(初年度)は、モデル物質として、フグ毒として知られるテトロドトキシン(tetrodotoxin, TTX) (生化学用); 分子量 319.27, CAS No. 4368-28-9、富士フイルム和光純薬(株))を使用した。TTX の化学構造式を図1に示す(別添)。

カタログ番号:206-11071  
ロット番号 :LKG5746  
純度 :95.7 %[HPLC]

### B-3 用量設定実験

TTX のマウス経口 LD<sub>50</sub> 値が 334 µg/kg (RTECS 情報)であったことから、最高用量を 700 µg/kg とし 3 段階の用量(700, 500, 300 µg/kg、及び溶媒対照)を設定し、予備試験を実施した。12 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを用い、各群 3 匹に単回経口投与した。その結果、700 µg/kg 群では全例、500 µg/kg 群では 2 例に死亡が認められたが、300 µg/kg 投与群では死亡例はみられなかった。この結果から、24 時間無作用量であった 300 µg/kg を最高用量をとし、公比√10 で除して 300, 100, 30µg/kg の投与用量を設定した

### B-4 統計処理

溶媒群と投与群の間の有意差の検定を Student の t 検定によりおこない P 値が 0.05 未満の場合を有意と判定した。実験データは、平均値±標準偏差(SD)にて示した。

### B-5 各遺伝子の発現変動の表示方法

実験結果における各遺伝子の発現変動を、下記図 2(別添)のように、各遺伝子につき濃度依存性、経時変化、遺伝子発現量についての 3 次元グラフとして示す。具体的には、縦軸(Z 軸)に絶対値化した(細胞 1 個あたりのコピー数)mRNA の発現量をと、X、Y 軸にはそれぞれ、投与用量とサンプリング時間をとり、各条件の n=3 の平均値曲面で表示する。加えてこの平均曲面の上下に標準偏差(SD)平面(薄い色)を示す。

(倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護の配慮を十分行い、下記、所属の研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。「国立医薬品食品衛生研究所・動物実験等の適正な実施に関する規程(平成 27 年 4 月版)」。

## C. 研究結果及び考察

### C-1 TTX をマウスに単回強制経口投与した際の海馬における網羅的遺伝子発現変動解析:

解析ソフト RSort を利用し、遺伝子の発現変動が有意(t 検定での時点毎に溶媒対照との間で P 値< 0.05)で、発現変動の最高値のコピー数が 2 以上という条件で遺伝子を粗抽出した。その結果、発現が増加する遺伝子 286 プローブセット(ps) が粗抽出され、このうち目視による確認により生物学的な変化が示唆されたものとして 121 ps が抽出された。また発現が減少する遺伝子としては 508 ps が粗抽出され、目視による確認により生物学的な変化が示唆されたものは抽出されなかった。

増加分 121 ps について検討した結果、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークとして、ストレス応答遺伝子が見出せた。

次いで、発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析 (in silico) を、IPA における Upstream Analysis を用いて検討した結果、ストレス応答に絡むデキサメタゾンあるいは TNF が調節因子として抽出されてきた。したがって、海馬における細胞に対してストレス応答が誘発されていることが明らかとなった。神経機能への影響などについてさらに詳細な解析を進めている。

他方、興味深いことに Na<sup>+</sup>チャネルなど TTX が直接関与することが示唆されるシグナルネットワーク関連遺伝子の発現変動は認められないことが明らかとなった。この事は、TTX が血液脳関門を通過できないことを示しているものと考えられる。

近年、二枚貝から TTX が検出され、EU において貝類の TTX のリスク評価が行われ、TTX のリスクは国際的に注目されるようになってきている。欧州食品安全機関 (EFSA) が取りまとめた報告書では、既往知見であるヒトに対する最低致死用量が 2 mg であることに疑問が示された。その一方で、マウス腹腔内投与毒性における半数致死量 (LD<sub>50</sub>) を 9~12.5 µg/kg、経口投与における LD<sub>50</sub> を 232~532 µg/kg と推定し、また「単回経口投与の際の無気力状態 (apathy) という一般状態変化を指標」とした急性参照用量 (ARfD) を 0.25 µg/kgBW と導出し、貝類を 400 グラム喫食した場合のヒトに対し有害な影響をもたらさない貝肉中の含有量を 44 µgTTX 等量/kg 貝肉と推定

している。ARfD とは、ヒトが、ある物質を 24 時間以内に経口摂取した場合に、健康に悪影響を示さないと推定される一日当たりの摂取量である。

したがって、げっ歯類において単回経口投与した TTX が無気力状態 (apathy) を誘発することから、中枢にはたらくことが明らかとなってきたが、TTX が血液脳関門を通過できないことから、この分子機序は不明である。

我々の海馬における網羅的遺伝子発現変動解析の結果からは、海馬に対して TTX が直接作用するわけではなく、ストレス応答に絡むサイトカインや糖質コルチコイドなどのような二次的シグナルが海馬に働き、その結果、TTX の急性参照用量設定のための報告にあるように、apathy (無関心) といった中枢影響が誘発されている事が示唆された。そこで今後、二次的シグナル候補物質を探索するために、海馬とは別に、肝における解析を検討し、多臓器連関解析を実施することとした。

#### C-2: TTX をマウスに単回強制経口投与した際の「肝」における網羅的遺伝子発現変動解析:

解析ソフト RSort を利用し、遺伝子の発現変動が有意 (t 検定での時点毎に溶媒対照との間で P 値 < 0.05) で、発現変動の最高値のコピー数が 2 以上という条件で遺伝子を粗抽出した。その結果、発現が増加する遺伝子 1,893 プロブセット(ps) が粗抽出され、このうち目視による確認により生物学的な変化が示唆されたものとして 750 ps が抽出された。また発現が減少する遺伝子としては 352 ps が粗抽出され、目視による確認により生物学的な変化が示唆されたものは抽出されたものとして 27ps が抽出された。

増加分 750ps について検討した結果、有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークとして、ストレス応答遺伝子やサイトカイン関連遺伝子が見出せた。ストレス応答遺伝子は海馬の際でも認められた。

この内、顕著な発現変動が認められた、Nfkbia (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells inhibitor, alpha)、Sgk1 (serum/glucocorticoid regulated kinase 1)、Mt1 (metallothionein 1) 及び、Gadd45g (growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma) の 4 種の遺伝子の発現変動を図 3 (別添) に示す。

次いで、発現増加が認められる遺伝子の発現調

節因子の探索の為に、プロモーター解析 (in silico) を、IPA における Upstream Analysis を用いて検討した結果、ストレス応答に絡むデキサメタゾンあるいはグルココルチコイド受容体(NR3C1)やサイトカインである IL1B や TNF が調節因子として抽出されてきた。抽出された上位 20 位のを図 4 (別添) として示す (< E-9)。したがって、肝における細胞に対してストレス応答が誘発されていることが明らかとなった。

この点、IL1B は、別の研究班での先行研究により、海馬に対して神経伝達抑制作用を有する可能性を示唆するデータを得ており、このことから、IL1B や TNF といった肝由来のサイトカインが海馬に働く二次的シグナル候補物質であることが示唆された。

肝機能への影響などについてさらに詳細な解析を進めたところ、糖新生に係るシグナルネットワークが見出された。すなわち「PGC-1→Foxo1→HNF4→G6pc→Pck1」というシグナルネットワークである。これに係る遺伝子発現変動を図 5 (別添) として示す。したがって毒性予測として、TTX の単回経口投与により、血糖値が上昇するものと考えられ、今後、実測する予定である。

加えて今後、当毒性部が有する遺伝子発現データベース(100 種類以上の化学物質の単回投与データが含まれている)との参照解析を行い、より詳細な遺伝子発現変動解析をおこない、解析精度を上げる予定である。

#### D. 結論

H31/R 元年度は、被験物質としてモデル物質として、フグ毒として知られる TTX を選択し、雄性マウスに単回経口投与した際の「海馬」における網羅的な遺伝子発現変動解析について検討した。この理由は、脳の内、背景データが多く揃っている部位が海馬であるためである。解析の結果、ストレス関連遺伝子 (Sgk1 遺伝子など) の発現増加が目立ち、他方、Na<sup>+</sup>チャネルなど TTX が直接関与することが示唆されるシグナルネットワーク関連遺伝子の発現変動は認められなかった。この事は、海馬に対して TTX が直接作用するわけではなく、ストレス応答に絡むサイトカインや糖質コルチコイドなどのような二次的シグナルが海馬に働き、その結果、TTX の急性参照用量設定のための報告にあるように、apathy (無関心) と



いった中枢影響が誘発されている事が示唆された。

そこで R2 年度は、この二次的シグナル候補物質を探索するために、海馬とは別に、「肝」における解析を検討し、また多臓器連関解析を実施することとした。解析の結果、発現変動する遺伝子群の上流には、ストレス応答に絡むデキサメタゾンあるいはグルココルチコイド受容体(NR3C1)やサイトカインである IL1B や TNF が調節因子として抽出されてきた。

興味深いことに、ストレス応答関連遺伝子やサイトカイン遺伝子に加えて、糖新生に係る多くの遺伝子の発現増加が認められた。したがって毒性予測として、TTX の単回経口投与により、血糖値が上昇するものと考えられ、今後、実測する予定である。

なお別添に表 1 として、遺伝子の発現変動が有意 (t 検定での P 値<0.05)で、発現変動の最高値の発現コピー数が 200 以上という条件下で自動抽出した全遺伝子のリストを示す。抽出された遺伝子数は 25 ps であった。

R3 年度も引き続き、急性毒性誘発モデル物質を単回経口投与した際の、海馬や肝などの組織における網羅的遺伝子発現変動解析を実施する。

## E. 健康危機情報

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Ryuichi Ono, Yusuke Yoshioka, Yusuke Furukawa, Mie Naruse, Makiko Kuwagata, Takahiro Ochiya, Satoshi Kitajima, Yoko Hirabayashi: Novel hepatotoxicity biomarkers of extracellular vesicle (EV)-associated miRNAs induced by CCl4. *Toxicol Rep.* 2020; 7: 685-692. [doi 10.1016/j.toxrep.2020.05.002].

Richard Nock, Natalia Polouliakh, Frank Nielsen, Keigo Oka, Carlin R Connell, Cedric Heimhofer, Kazuhiro Shibani, Samik Ghosh, Ken-Ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Taketo Akama, Hiroaki Kitano: A Geometric Clustering Tool (AGCT) to robustly unravel the inner cluster structures of time-series gene expressions. *PLoS One* 2020; 15(7):

e0233755.

[doi 10.1371/journal.pone.0233755]

Hirokatsu Saito, Kenshiro Hara, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura: Effect of Vitamin E deficiency on spermatogenesis in mice and its similarity to aging. *Reproductive Toxicology* 2020; 98: 225-232. [doi: 10.1016/j.reprotox.2020.10.003].

登田美桜、北嶋 聡、シリーズ: 日本毒性学会との連携 マリンバイオトキシン; フグ毒のリスク評価について、*中毒研究(Jpn. J. Clin. Toxicol.)* 2021; 34: 58-62. [ISSN: 0914-3777]

### 2. 学会発表

北嶋 聡、種村 健太郎、菅野 純、室内揮発性有機化学物質の極低濃度下における吸入曝露の際のマウス中枢神経系への影響、第 47 回日本毒性学会学術年会 (2020.6.30.) オンライン

高橋 祐次、種村 健太郎、相崎 健一、北嶋 聡、急性毒性試験の近代化によるテトロドキシンの中枢影響評価、第 47 回日本毒性学会学術年会 (2020.6.29.) オンライン

種村 健太郎、佐々木 貴熙、齊藤 洋克、高橋 祐次、北嶋 聡、菅野 純、発達期マウスへのドーモイ酸投与による成熟後の神経行動毒性発現～海産毒による異常誘発モデルとしての検討 2 ～、第 47 回日本毒性学会学術年会(2020.6.29.) オンライン

齊藤 洋克、原 健士朗、富永 貴志、中島 欽一、北嶋 聡、菅野 純、種村 健太郎、低用量ペルメトリンの早期慢性ばく露による成熟後の雄マウス行動影響、第 47 回日本毒性学会学術年会 (2020.6.29.) オンライン

種村 健太郎、齊藤 洋克、古川 佑介、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、低用量/低濃度化学物質の発生-発達期ばく露による情動認知行動毒性～情動認知行動毒性評価系の国際標準化に向けた対応～、第 47 回日本毒性学会学術年会 (2020.6.30.) オンライン

菅野 純、北嶋 聡、相崎 健一、小野 竜一、Percellome Project における精度管理とその解析への影響、第 47 回日本毒性学会学術年会 (2020.6.30.) オンライン

小野 竜一、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、化学物質の反復投与によるゲノムワイドなヒストン修飾の変化、第 47 回日本毒性学会学術年会 (2020.6.30.) オンライン

大久保 佑亮、嘉本 海大、高橋 祐次、北嶋 聡、太田 裕貴、覚醒下非拘束ラットから血中酸素飽和

度・心拍数・呼吸数を計測可能なウェアラブルパルスオキシメータの開発、第 47 回日本毒性学会学術年会(2020.6.30.) オンライン

相崎 健一、長谷 武志、北嶋 聡、小野 竜一、北野 宏明、菅野 純、Current and future application of PERCELLOME database as a part of big data to toxicological research、第 47 回日本毒性学会学術年会 (2020.7.1.) オンライン

Toshime Igarashi, Yukuto Yasuhiko, Ryuichi Ono, Erika Tachihara, Yu Takahashi, Makiko Kuwagata, Satoshi Kitajima、CRISPR/Cas9 システムを用いたマウス受精卵のゲノム編集におけるオンターゲットの多様な非意図的変異、第 47 回日本毒性学会学術年会 (2020.6.29.) オンライン

原唯香、平舘裕希、原健士朗、北嶋聡、菅野純、種村健太郎、エストロゲン受容体  $\alpha$  非翻訳領域遺伝子改変マウスの学習記憶不全と遺伝子発現プロファイル解析、第 113 回日本繁殖生物学会大会(2020.9.25.)、オンライン

五十嵐智女、安彦行人、小野竜一、高橋雄、栗形麻樹子、北嶋聡、CRISPR/Cas9 のゲノム編集によるノックインマウス作製時に認められたオンターゲットの多様な非意図的変異、日本食品衛生学会創立 60 周年記念第 116 回学術講演会 (2020.11.24.)、オンライン

北嶋 聡、食品トキシコゲノミクスと毒性予測、第 18 回食品安全フォーラム (2020.11.27.)

北嶋 聡、シックハウス(室内空気汚染)対策に関する研究—極低濃度吸入曝露の際のマウス海馬 Percellome トキシコゲノミクスによる中枢影響予測—、令和 2 年度化学物質の安全管理に関するシンポジウム (2021.2.4.) オンライン

Ono R, Yasuhiko Y, Aisaki KI, Kitajima S, Kanno J, Hirabayashi Y: Horizontal gene transfer mediated by exosomes: a possible new risk for genome editing、Keystone Symposia Conference: Engineering the Genome(2020.2.10) on-line

Kanno J, Aisaki KI, Ono R, Kitajima S : Comprehensive Histone, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeated Exposure to Chemicals: Percellome Project Update、59th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2020.3.15) on-line

Ono R, Yoshioka Y, Furukawa Y, Ochiya T, Kitajima S, Hirabayashi Y: Evaluation of extracellular vesicles ( EVs ) as toxic biomarkers in mouse、59th Annual Meeting of Society of Toxicology (2020.3.15) on-line

## G. 知的財産所有権の出願・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

別添

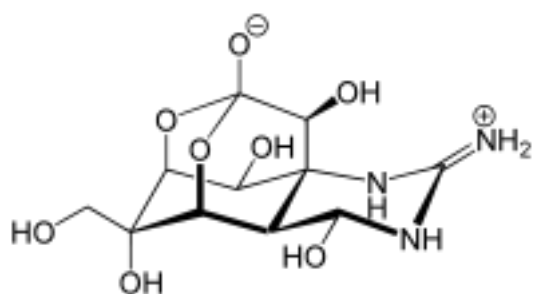


図 1 TTX の化学構造式

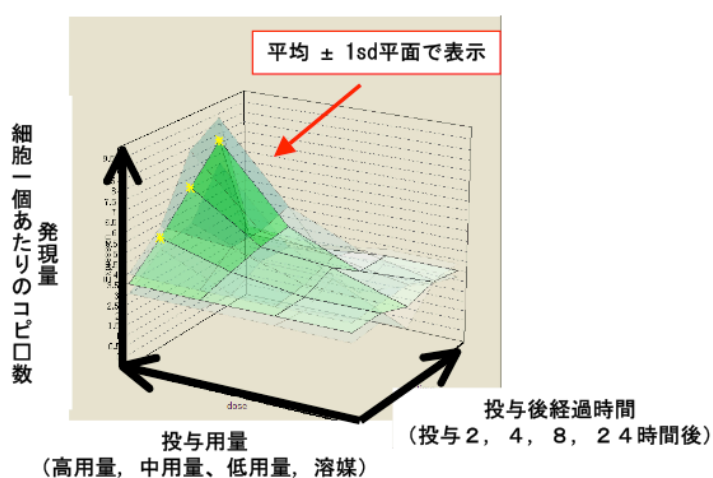


図 2 遺伝子発現変動を示す図

各遺伝子につき、濃度依存性、経時変化、遺伝子発現量についての 3 次元の曲面グラフとして示し、各条件の 3 サンプルの平均値を示す曲面と、その上下に標準偏差(SD)平面(薄い色)をあわせて示した。一つの化学物質につき、約 45,000 枚の平面が描かれる。

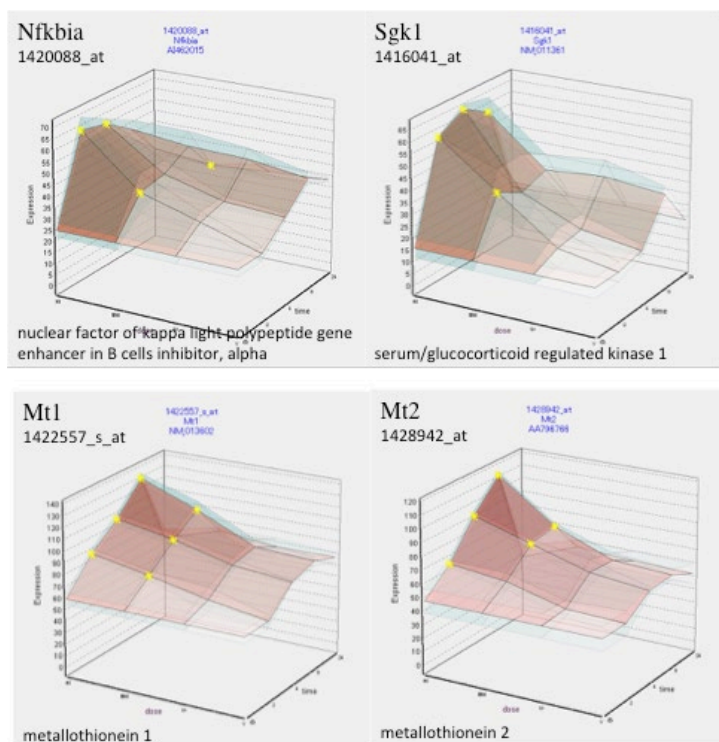


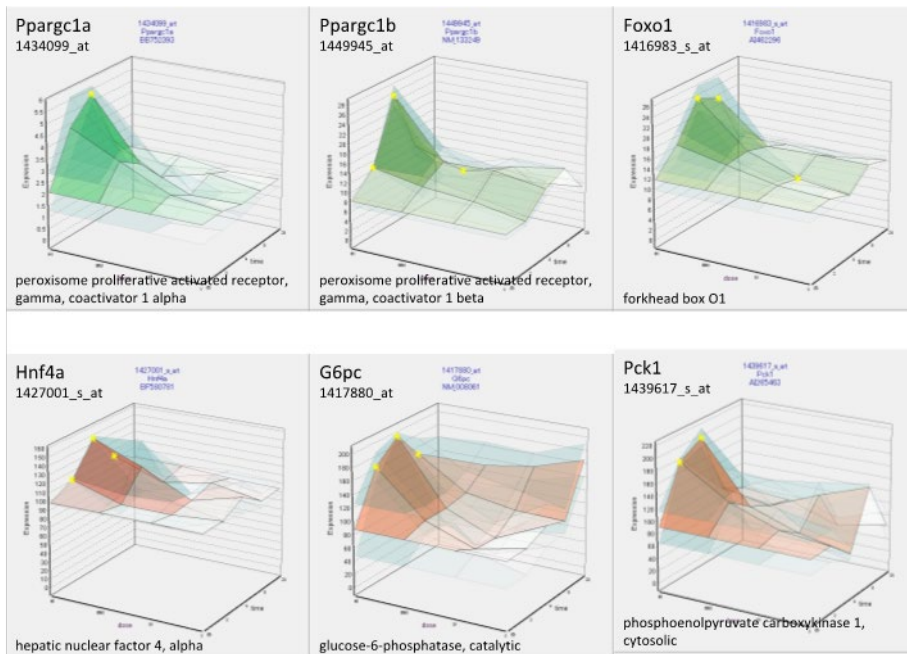
図3 TTX 単回経口投与時のマウス肝におけるストレス応答関連遺伝子 *Nfkbia*、*Sgk1*、*Mt1* 及び *Gadd45g* 遺伝子の発現変動

TTX 単回投与時にマウス海馬で発現増加が認められたストレス応答関連遺伝子の一部について発現変動の状態を示す(\*は、同時点の溶媒対象群に対して、 $p < 0.05$  で有意な変動であることを示す)。

Upstream Regulator	Molecule Type	p-value of over Target Molecules in Dataset
1 NR3C1	ligand-dependent nuclear receptor	1.41E-14
2 HNF4A	transcription regulator	1.83E-12
3 IL1B	cytokine	2.34E-12
4 dexamethasone	chemical drug	3.67E-12
5 Gcg	other	4.98E-12
6 lipopolysaccharide	chemical drug	5.23E-11
7 RORA	ligand-dependent nuclear receptor	5.66E-11
8 methylprednisolone	chemical drug	7.55E-11
9 palmitic acid	chemical - endogenous mammalian	7.58E-11
10 beta-estradiol	chemical - endogenous mammalian	1.48E-10
11 RORC	ligand-dependent nuclear receptor	2.66E-10
12 ACOX1	enzyme	3.23E-10
13 ZMPSTE24	peptidase	4.67E-10
14 PRKAG3	other	5.97E-10
15 forskolin	chemical toxicant	8.36E-10
16 TP53	transcription regulator	8.65E-10
17 TNF	cytokine	9.86E-10
18 FOXO3	transcription regulator	1.16E-09
19 cycloheximide	chemical reagent	3.35E-09
20 pirinixic acid	chemical toxicant	3.77E-09

図4 プロモーター解析 (in silico) を、IPA における Upstream Analysis を用いて検討した結果

ストレス応答に絡むデキサメタゾンあるいは TNF が調節因子として抽出されてきた。抽出された上位 20 位のもの示す。NR3C1 は、グルココルチコイド受容体の別名である。



**図5 TTX 単回経口投与時のマウス肝における糖新生関連遺伝子 Ppargc1a、Foxo1、Hnf4a、G6pc 及び Pck1 遺伝子の発現変動**

TTX 単回投与時にマウス海馬で発現増加が認められた糖新生関連遺伝子について発現変動の状態を示す (\*は、同時点の溶媒対象群に対して、 $p < 0.05$  で有意な変動であることを示す。)

**表1**

解析ソフト RSort を利用し、TTX 単回経口投与時のマウス海馬において遺伝子の発現変動が有意(t 検定での P 値<0.05)で、発現変動の最高値の発現コピー数が 200 以上という条件下で自動抽出した発現変動遺伝子のリスト [抽出された遺伝子数 25 ps] (抽出条件: Expand-H\_G2\_AP\_lmt\_Std-Av.RSSETA)

	AffyID	Gene Name	Yp1	Max	P1t-test
1	1418918_at	Igfbp1	02hr	318.1235667	0.003899734
2	1448185_at	Herpud1	02hr	214.0015	0.006725889
3	1450332_s_at	Fmo5	04hr	225.1868667	0.006593222
4	1422557_s_at	Mt1	04hr	307.9568667	8.72E-05
5	1424744_at	Sds	04hr	228.2198	1.12E-05
6	1426516_a_at	Lpin1	04hr	200.4312	1.61E-06
7	1428942_at	Mt2	04hr	300.4293	1.36E-05
8	1424853_s_at	Cyp4a10 /// C	08hr	246.6151667	0.029148386
9	1438657_x_at	Gm13363 ///	08hr	204.1972333	0.008159991
10	1450970_at	Got1	08hr	200.9056667	0.002013223
11	1435137_s_at	1200015M12Ri	08hr	201.3215333	0.021730182
12	1455770_at	Tdo2	08hr	249.9540333	0.002306547
13	1449337_at	Tdo2	08hr	212.0763333	0.003851623
14	1455892_x_at	---	08hr	230.5795	0.001144295
15	1431213_a_at	Gm3579	08hr	234.6139333	0.000630987
16	1455869_at	---	08hr	218.3590333	0.001007548
17	1424126_at	Alas1	08hr	250.9812333	0.023476841
18	1428909_at	A130040M12Ri	08hr	264.3732	0.024018119
19	1422230_s_at	Cyp2a4 /// Cy	08hr	241.2177	0.013657129
20	1417610_at	Apoa5	08hr	292.0906333	0.016281626
21	1423147_at	Mat1a	08hr	245.8919	0.039107447
22	1453238_s_at	A130040M12Ri	08hr	227.5710333	0.022209107
23	1418706_at	Slc38a3	08hr	237.4986	0.015401815
24	1454925_x_at	Mdh1	24hr	252.9401333	0.020635606
25	1435371_x_at	Ces1d	24hr	200.4195	0.009338377

令和2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 急性経口投与毒性による行動様式影響における非侵襲的な  
新規バイタルサインの探索**

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、投与後動物の行動様式（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聴音波発声（USVs: ultrasonic vocalizations）、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、ハイスピードカメラによる顔面の動きを計測した。モデル化合物としてアセフェート（100 および 500mg/kg）用い、成熟雄マウスへの投与実験を行った。その結果、特にアセフェート 500mg/kg 投与群では、重度の振戦と瞬目異常が観察された。すなわち、従来の目視観察による記述式の一般状態観察による毒性発現を、より詳細な計測データ取得にすることに成功した。また、昨年度から実験動物として雄マウスを使用してきたが、急性経口毒性発現時に動物が呈する行動様式についての雌雄差を検討する目的で、オープンフィールド試験と大脳皮質の遺伝子発現解析を行った。

## 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「統計学」を背景とした「半数致死量(LD<sub>50</sub>)」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(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

本分担研究では雄マウスを用いて、急性経口毒性発現時にマウスが呈する行動様式影響として投与後の行動様式(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聴音波発声(USVs: ultrasonic vocalizations)、ハイスピードカメラによる顔面の動き、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、ハイスピードカメラによる顔面の動きを計測した。モデル化合物としてアセフェート(100 および 500mg/kg)用い、成熟雄マウスへの投与実験を行った。また、昨年度から実験動物として雄マウスを使用してきたが、雌雄差を検討する目的で、オープンフィールド試験と大脳皮質の遺伝子発現解析を行った。

## C. 研究結果

アセフェート(100 mg/kg)投与群において、投与5分後には異常所見は認められなかったが、投与30分後には活動量が低下し、投与60分後には流涎が顕著であった。投与120分後には、自発運動はみられるものの、歩行失調の様子がみられた。また、呼吸不整を起こしていると考えられた(図1)。一方で、アセフェート(500 mg/kg)投与群においては、投与5分後には異常所見は認められなかったが、投与30分後には活動性低下、半眼、流涎がみられたほか、

歩行時にはAChE阻害に特有の振戦が現れた。さらに、投与60分後には呼吸が浅く速いため、呼吸促拍や呼吸亢進の症状と考えられる異常や、筋肉麻痺のためか起立困難、歩行失調がみられた。そして投与120分後には、流涎で口まわりが濡れる様子が観察された。一方、姿勢制御不能で反応性運動(ヒトが触った刺激で動くなど)が認められなかった(図2)。

また、昨年度から実験動物として雄マウスを使用してきたが、雌雄差を検討する目的で、オープンフィールド試験(図3)と大脳皮質の遺伝子発現解析を行った。

## D. 考察

ハイスピードカメラによる顔面の動きの取得は、非常に有効なVSと考えられた。今後、撮影条件を整備する必要があると考えられた。さらに赤外線サーモグラフィによる体表温度を組み合わせる必要があると考えられた。また、昨年度から実験動物として雄マウスを使用してきたが、雌雄差を検討する目的で、オープンフィールド試験を行ったところ、雌マウスに関しても、総移動距離、中央部対在時間、移動速度、移動回数、について極端なばらつきは認められなかった。超音波測定装置による聴音波発声については、雌マウスの方がデータを取得しやすいことがあるため、次年度は雌マウスでの反応を取得予定である。

## E. 結論

従来の目視観察による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りスコア化することによって標準化する為の基礎データを取得することに成功した。今後、重度の振戦や瞬目不全についてもスコア化に向けた対応が必要であると考えられた。また超音波発声を含めた発声については雌雄差を含めた条件設定を進める必要があると考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Saito H, Hara K, Kitajima S, Tanemura K. Effect



of Vitamin E deficiency on spermatogenesis in mice and its similarity to aging. *Reprod Toxicol.* 2020 Oct 9;S0890-6238(20)30225-2. doi: 10.1016/j.reprotox. 2020.10.003. Epub ahead of print. PMID: 33045311..

Umezu K, Kurata S, Takamori H, Numabe T, Hiradate Y, Hara K, Tanemura K. Characteristics and Possible Role of Bovine Sperm Head-to-Head Agglutination. *Cells.* 2020 Aug 9;9(8):1865. doi: 10.3390/cells9081865. PMID: 32784858; PMCID: PMC7463926.

Hiradate Y, Hara K, Tanemura K. Effect of neurotensin on cultured mouse preimplantation embryos. *J Reprod Dev.* 2020 Oct 13;66(5):421-425. doi: 10.1262/jrd.2020-002. Epub 2020 Jun 2. PMID: 32493860; PMCID: PMC7593629.

Umezu K, Hara K, Hiradate Y, Numabe T, Tanemura K. Stromal cell-derived factor 1 regulates in vitro sperm migration towards the cumulus-oocyte complex in cattle. *PLoS One.* 2020 Apr 30;15(4):e0232536. doi: 10.1371/journal.pone.0232536. PMID: 32353075; PMCID: PMC7192438.

## 2. 学会発表

種村健太郎、佐々木貴熙、齊藤洋克、高橋祐次、北嶋聡、菅野純「発生期マウスへのドーモイ酸による成熟後の神経行動毒性発現～海産毒による異常誘発モデルとしての検討2～」第47回日本毒性学会学術年会（2020.6.29-7.1）、オンライン  
種村健太郎、齊藤洋克、古川佑介、相崎健一、北嶋聡、菅野純「低用量／低濃度化学物質の発生—発達期ばく露による情動認知行動毒性～情動認知行動毒性評価系の国際標準化に向けた対応～」第47回日本毒性学会学術年会（2020.6.29-7.1）、オンライン

齊藤洋克、原健士朗、富永貴志、中島欽一、北嶋聡、菅野純、種村健太郎、「低用量ペルメトリンの早期慢性ばく露による成熟後の雄マウス行動影響」

第47回日本毒性学会学術年会（2020.6.29-7.1）、オンライン

梅津康平、倉田笙平、平舘裕希、原健士朗、種村健太郎「ウシにおける凝集精子の特性と役割」第113回日本繁殖生物学会大会（2020.9.23-25）、オンライン

原唯香、平舘裕希、原健士朗、北嶋聡、菅野純、種村健太郎「エストロゲン受容体 $\alpha$ 非翻訳領域遺伝子改変マウスの学習記憶不全と遺伝子発現プロファイル解析」第113回日本繁殖生物学会大会（2020.9.23-25）、オンライン

張磨琉亜、平舘裕希、松山誠、藤井渉、原健士朗、種村健太郎「Axdnd1 遺伝子欠損マウスに精子形成不全」第113回日本繁殖生物学会大会（2020.9.23-25）、オンライン

山下司朗、小賀坂祐平、平舘裕希、種村健太郎、千代豊「ブタ受精卵へのCRISPR/Cas9導入による遺伝子組換え胚作出とTrex2共導入によるモザイク胚低減」第113回日本繁殖生物学会大会（2020.9.23-25）、オンライン

齊藤洋克、原健士朗、北嶋聡、種村健太郎、「ビタミンE欠乏給餌によるマウス雄性生殖器および精子への影響と加齢による退行変化との類似性」日本食品衛生学会創立60周年記念第116回学術講演会（2020.11.24-12.8）、オンライン

種村健太郎、菅野純、低用量化学物質の周産期暴露による情動認知行動影響解と評価系の国際標準化に向けた展開、日本学術会議公開シンポジウム「食の安全と環境ホルモン」（2020.12.5）Web口演

## 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

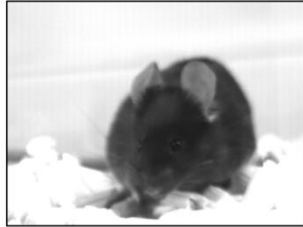
なし

### 3. その他

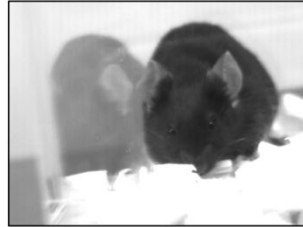
なし

ハイスピードカメラによる顔面の動き  
(アセフェート投与 : 100 mg/kg)

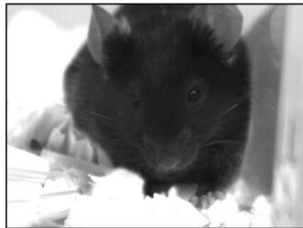
投与5分後



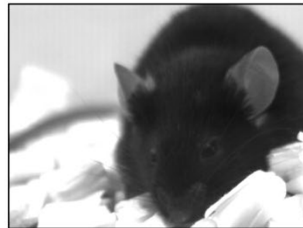
投与30分後



投与60分後



投与120分後

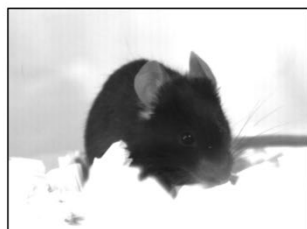


**図1 急性毒性試験における行動解析(マウス Acephate 100 mg/kg 投与群)**

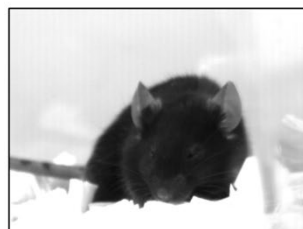
投与5分後には異常所見は認められなかったが、投与30分後には活動量が低下し、投与60分後には流涙が顕著であった。投与120分後には、自発運動はみられるものの、歩行失調の様子がみられた。

ハイスピードカメラによる顔面の動き  
(アセフェート投与 : 500 mg/kg)

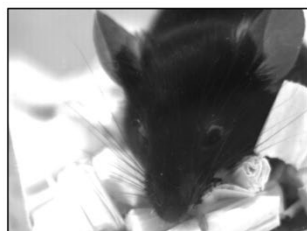
投与5分後



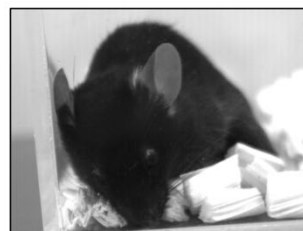
投与30分後



投与60分後



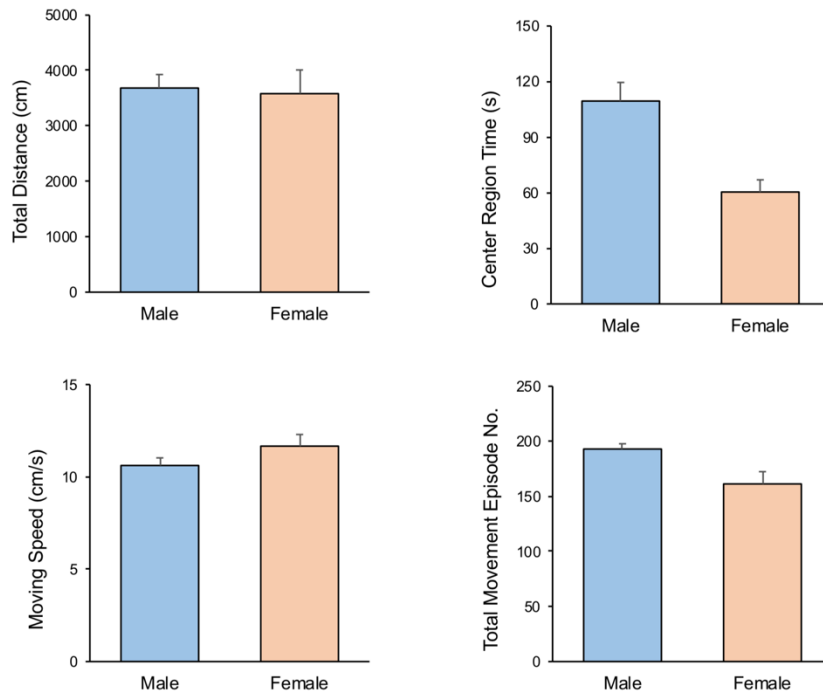
投与120分後



**図2 急性毒性試験における行動解析(マウス Acephate 500 mg/kg 投与群)**

投与 5 分後には異常所見は認められなかったが、投与 30 分後には活動性低下、半眼、流涙がみられたほか、歩行時にはAChE 阻害に特有の振戦が現れた。さらに、投与 60 分後には呼吸が浅く速いため、呼吸促拍や呼吸亢進の症状と考えられる異常や、筋肉麻痺のためか起立困難、歩行失調がみられた。そして投与 120 分後には、流涎で口まわりが濡れる様子が観察された。一方、姿勢制御不能で反応性運動が認められなかった。

### オープンフィールド試験（雌雄差）



**図3 オープンフィールド試験結果(雌雄差)**

雌マウスに関しても、総移動距離、中央部対在時間、移動速度、移動回数、について顕著なばらつきは認められなかった。

令和2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 バイタルサインの統合的解析方法(ソフトウェア)の開発**

研究分担者 相崎 健一

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部 第一室長

**研究要旨**

バイタルサイン(VS)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を目的とした本研究班において、最終的には、計測した VS の諸項目から「診断学」を基盤にした「概略の致死量」を推定するための Acute Toxicity Vital Signs Score(ATVSS 仮称)を定義し、これを実装したソフトウェアの開発を目的とし、研究を行った。開発中のバイタルサイン(VS)取得デバイスはまだ充分量のデータを生成していないため、完成時に得られるデータと同質のものとして、ヒトの心電図データ(MIT-BIH Arrhythmia Database (mitdb) (<https://physionet.org/content/mitdb/1.0.0/>)より入手)を用いた。汎用性の高い異常検出アルゴリズムとして、人工知能、とりわけ近年、開発研究が飛躍的に進み、代表的な手法となっている深層学習(Deep Learning)に着目し、その判別性能等を検討した。総合的な正答率は93%と期待より低いものであったが、これは異常波(心室異所性拍動)に対するスコアが低いためであり、学習に用いたデータの極端な不均衡(心室異所性拍動レコードが全数の一割しかない)が原因と考えられた。対策としては、学習に用いるデータの選定において正常レコード数を削減して異常レコード数とのバランスをとるといった単純な手法で対応可能であり、さらに必要に応じて他の学習モデル、例えば異常検知に有効とされている自己符号化器(autoencoder)や深層距離学習(deep metric learning)などの導入と組み合わせを行うことで、性能向上が可能と考えられる。来年度は、従来からの統計を含む数理的手法や機械学習技術を導入して、ATVSS 定義のために必要な、多項目・複数クラス分類の入力データに対応した異常検知モデルの構築を進め、完成予定の VS 取得デバイスによる実データを得て、性能評価を試みる計画である。

## A. 研究目的

バイタルサイン(VS)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に際して、計測した VS の諸項目から「診断学」を基盤にした「概略の致死量」を推定するための Acute Toxicity Vital Signs Score(仮称)を定義し、これを実装したソフトウェアの開発を目的とする。

## B. 研究方法

### B-1 学習・評価用データ

開発中のバイタルサイン(VS)取得デバイスはまだ充分量のデータを生成していないため、完成時に得られるデータと同質のものとして、ヒトの心電図データ(MIT-BIH Arrhythmia Database (mitdb) (<https://physionet.org/content/mitdb/1.0.0/>)より入手)を用いた。

### B-2 解析計算及びソフトウェア生成

異常検出に利用し得る人工知能アルゴリズムのコーディングについては、関連ライブラリが充実している Python 言語(ver.3.6.9)を使用した。機械学習ライブラリとしては Chainer (ver.7.7.0)、GPU 処理ライブラリとして CUDA (ver.10.2.89)、mitdb からの心電図データのダウンロード・処理ライブラリとして WFDB (ver.3.1.1)、その他、Numpy (ver.1.19.4)、Matplotlib (ver.3.3.3)を使用した。Python スクリプト実行環境としては Jupyter Notebook (ver.6.1.5)を使用した。

### B-3 計算精度検証:

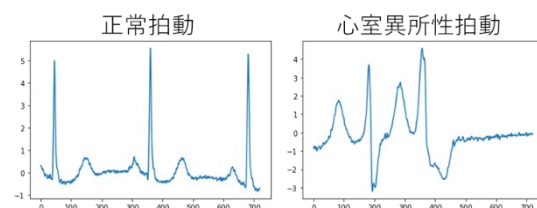
精度検証は必要に応じて Excel(USA Microsoft Corporation)や R 言語(オープンソース R Development Core Team)で実施し、浮動小数点誤差以上の乖離がないことを確認した。

## C. 研究結果

現在開発中のバイタルサイン(VS)取得デバイスが完成した際に生成されるデータは、主に一次元の波形データになると予想されるため、今年度はヒトの心電図データをサンプルとして用い、異常検出アルゴリズムの評価や、最終目標である「概略の致死量」を推定するための Acute Toxicity Vital Signs Score(仮称)の「定義」を行う方策を検討した。

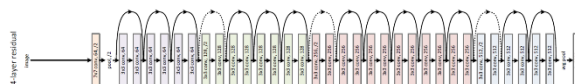
一般的に新規開発デバイスによる計測値処理では、実データを得てからでないと測定値分布も推定するしかなく、数理的な手法では閾値など具体的な基準値を設定するのは困難である。このため、汎用性の高い異常検出アルゴリズムとして、人工知能、とりわけ近年、開発研究が飛躍的に進み、代表的な手法となっている深層学習(Deep Learning)に着目し、その判別性能等を検討した。

まず学習及び評価用データとして、MIT-BIH Arrhythmia Database (mitdb)に収録されていた 47 人の心電図データ、延べ 24 時間のシグナルデータを入手した。このデータベースでは予め各 R 波ピークに AAMI (Association for the Advancement of Medical Instrumentation) 推奨基準によるラベルが付与されており、これを元に個々のレコードに分割し、正常拍動若しくは心室異所性拍動にラベリングした。



前処理として、ペースメーカー等によるノイズが混入したレコードや重複レコードを取り除き、約 9 万レコードのサンプルデータを得た。なお、これらの 9 割が正常拍動、残り 1 割が心室異所性拍動であった。

深層学習で用いるネットワーク構造としては、画像認識タスクで著名な畳み込みニューラルネットワーク(CNN: Convolutional Neural Networks)ベースの ResNet34 (arXiv:1512.03385)を採用した。



ただし、画像認識時の二次元畳み込みではなく、入力データである心電図に合わせて一次元畳み込みに設定し、上記 9 万件の拍データのうち半数を用いて教師あり深層学習を実施した。

学習に用いなかった残り半数の心拍データに対して、学習済み CNN で評価を実行した結果、正答率 (accuracy) は 93.0% であった。内訳としては正常拍動レコードに対する予測スコアは適合率 (precision) 0.99 / 再現率 (recall) 0.93 であったが、心室異所性拍動レコードに対しては同 0.50 / 0.89 であった。

accuracy		0.930	
	precision	recall	f1 score
正常拍動	0.99	0.93	0.96
異常拍動	0.50	0.89	0.64

#### D. 考察

バイタルサインの統合的評価のためのソフトウェア開発において、今年度は代表的な畳み込みニューラルネットワーク (CNN) モデルを採用し、一般的な教師あり深層学習による一次元の時系列データ (評価用サンプルとして心電図データを利用) の判別性能評価を実施した。総合的な正答率は 93% と期待より低いものであったが、これは異常波 (心室異所性拍動) に対するスコアが低いためである。これは学習に用いたデータの極端な不均衡 (心室異所性拍動レコードが全数の一割しかない) が原因と考えられる。対策としては、学習に用いるデータの選定において正常レコード数を削減して異常レコード数とのバランスをとる (アンダーサンプリング) といった単純な手法で対応可能である。さらに必要に応じて他の学習モデル、例えば異常検知に有効とされている自己符号化器 (autoencoder) や深層距離学習 (deep metric learning) などの導入と組み合わせを行うことで、性

能向上が可能と考えられる。今回の検討は一種類のデータ、且つ正常 / 異常の単純分類であったが、機械学習技術は本来、多種類のデータ入力と複数クラスへの分類 (出力) に対応する柔軟なものであり、本研究の目標である、計測したバイタルサイン (VS) の諸項目 (= 多種類データ) から「診断学」による分類 (= 複数クラス分類) に基づく統合評価の実現に必要な要件を充足する技術として、大変有望な手法と考えられる。なお機械学習技術を判別に利用する場合の最大の懸念は、特徴抽出工程をヒトが行わず機械が自動的に処理してしまうために、判断根拠がブラックボックス化することが想定される。ブラックボックスを内包する毒性試験法では、その判定結果への信頼度が低下するだけでなく、VS 変動に関与する毒性機序研究においても支障を来す。幸い、人工知能研究分野において機械学習の判断根拠を説明する技術が急速に開発されつつあり、将来的にはブラックボックス問題は解消される見込みである。来年度は、従来からの統計を含む数理的手法や機械学習技術を導入して、ATVSS 定義のために必要な、多項目・複数クラス分類の入力データに対応した異常検知モデルの構築を進め、完成予定の VS 取得デバイスによる実データを得て、性能評価を試みる。

#### E. 結論

バイタルサインの統合的評価のためのソフトウェア開発においては、昨年度選定した Acute Toxicity Vital Signs Score (ATVSS、仮称) の定義に利用可能なアルゴリズムのうち、教師あり深層学習について、判別性能の評価を行った結果、本研究の目標実現に有効な手法であることが判明した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nock R, Polouliakh N, Nielsen F, Oka K, R Connell C, Heimhofer C, Shibani K, Ghosh S, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J, Akama T, Kitano

H: A Geometric Clustering Tool (AGCT) to robustly unravel the inner cluster structures of time-series gene expressions. PLoS One 2020; 15(7): e0233755.

[doi 10.1371/journal.pone.0233755]

## 2. 学会発表

高橋 祐次、種村 健太郎、相崎 健一、北嶋 聡、急性毒性試験の近代化によるテトロドキシンの中枢影響評価、第 47 回日本毒性学会学術年会 (2020.6.29.) オンライン

種村 健太郎、齊藤 洋克、古川 佑介、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、低用量/低濃度化学物質の発生-発達期ばく露による情動認知行動毒性～情動認知行動毒性評価系の国際標準化に向けた対応～、第 47 回日本毒性学会学術年会 (2020.6.30.) オンライン

菅野 純、北嶋 聡、相崎 健一、小野 竜一、Percellome Project における精度管理とその解析への影響、第 47 回日本毒性学会学術年会 (2020.6.30.) オンライン

小野 竜一、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、化学物質の反復投与によるゲノムワイドなヒストン修飾の変化、第 47 回日本毒性学会学術年会 (2020.6.30.) オンライン

相崎 健一、長谷 武志、北嶋 聡、小野 竜一、北野 宏明、菅野 純、Current and future application of PERCELLOME database as a part of big data to toxicological research、第 47 回日本毒性学会学術年会(2020.7.1.) オンライン

高橋 祐次、森田 紘一、辻 昌貴、菅 康佑、相崎 健一、大久保 佑亮、種村 健太郎、北嶋 聡、急性毒性試験の近代化による毒性機序研究、第 3 回医薬品毒性機序研究会 (2021.1.15) オンライン

## 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



### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ono R, Yoshioka Y, Furukawa Y, Naruse M, Ku wagata M, Ochiya T, Kitajima S, Hirabayashi Y	Novel hepatotoxicity biomarkers of extracellular vesicle (EV)-associated miRNAs induced by CCl4.	Toxicol Rep	7	685-692	2020
Nock R, Polouliakh N, Nielsen F, Oka K, R Connell C, Heimhofer C, Shibanai K, Ghosh S, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J, Akama T, Kitano H	A Geometric Clustering Tool (AGCT) to robustly unravel the inner cluster structures of time-series gene expressions.	PLoS One	15(7)	e0233755	2020

## 別添 5

Saito H, Hara K, Kitajima S, Tanemura K	Effect of Vitamin E deficiency on spermatogenesis in mice and its similarity to aging	Reproductive Toxicology	98	225-232	2020
登田美桜、 北嶋 聡	シリーズ：日本毒性学会との連携 マリンバイオトキシン；フグ毒のリスク評価について	中毒研究 (Jpn. J. Clin. Toxicol.)	34	58-62	2021
Yamamoto E, Taquahashi Y, Ku wagata M, Saito H, Matsushita K, Toyoda T, Sato F, Kitajima S, Ogawa K, Izutsu K, Saito Y, Hirabayashi Y, Iimura Y, Goda Y,	Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat lungs after inhalation of 1- $\mu$ m ciclesonide aerosol by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging	Int. J. Pharm	Epub		2021
Umezu K, Kurata S, Takamori H, Numabe T, Hiradate Y, Hara K, Tanemura K	Characteristics and Possible Role of Bovine Sperm Head-to-Head Agglutination	Cells	9;9(8)	1865	2020
Hiradate Y, Hara K, Tanemura K.	Effect of neurotensin on cultured mouse preimplantation embryos	J Reprod Dev.	13;66(5)	421-425	2020
Umezu K, Hara K, Hiradate Y, Numabe T, Tanemura K	Stromal cell-derived factor 1 regulates in vitro sperm migration towards the cumulus-oocyte complex in cattle.	PLoS One	30;15(4)	e0232536	2020

令和3年3月29日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸広 印

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 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-
- 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター毒性部・動物管理室・室長  
(氏名・フリガナ) 高橋 祐次・タカハシ ユウジ

## 4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査(※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針(※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他(特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

## 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

## 6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所  
 所属研究機関長 職名 所長  
 氏名 合田 幸広 印

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 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-
- 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター毒性部・部長  
 (氏名・フリガナ) 北嶋 聡・キタジマ サトシ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する口にチェックを入れること。  
 ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸広 印

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 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-
- 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター毒性部 室長  
(氏名・フリガナ) 相崎 健一・アイサキ ケンイチ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：遺伝子組換え実験安全管理規則)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし、一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

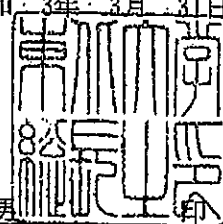
国立医薬品食品衛生研究所長 殿

令和 3年 3月 31日

機関名 東北大学

所属研究機関長 職名 総長

氏名 大野 英男



次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
2. 研究課題名 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）
3. 研究者名 （所属部局・職名） 東北大学大学院農学研究科・教授  
（氏名・フリガナ） 種村 健太郎・タネムラ ケンタロウ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（※3）	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	東北大学	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること （指針の名称： ）	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。

（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合はその理由： ）
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合は委託先機関： ）
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合はその理由： ）
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （有の場合はその内容：研究実施の際の留意点を示した ）

（留意事項） ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。