

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)

令和元年度-令和 3 年度 総合・分担研究報告書

研究代表者 高橋祐次

令和 4(2022)年 3 月

研究報告書目次

I. 総合報告書

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 18

2. 急性毒性試験における遺伝子発現変動解析

北嶋 聡 24

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 31

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 37

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)
総合報告書**

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(LD₅₀)」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、Carbon-nanotube yarn(CNT-Y)を用い、従来法に比較して侵襲性の極めて低い手法にて心電波形及び脳波を取得することに成功した。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、SpO₂、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、その臓器関連解析において、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⁺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。急性毒性試験における行動解析では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。モデル化合物として、アセフェートと TTX を投与したマウスの行動様式と顔面表情について高速ビデオカメラ画像による経時的解析を行い、加えて超音波発声の測定を行った。その結果、活動量低下、痙攣、歩行異常、自発運動の消失、振戦を検

出、表情観察では眼瞼腫脹と瞬目不全、半眼、流涙を明確に捉えることに成功した。一方で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。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、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、畳み込みニューラルネットワーク(CNN: Convolutional Neural Networks)モデルとAutoEncoder(AE)モデルの予測評価を行なった。その結果、AEモデルの予測性能はCNNモデルを上回る結果が得られた。特にCNNモデルでの成績が悪かった異常拍動予測については、AEの圧勝であり、異常検知におけるAEモデルの優位性が明らかになった。現在は商業的に入手可能な血圧測定装置と、独自開発の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

近年の目覚ましいデジタル技術の進歩によって開発されたウェアラブルデバイスは、簡便なバイタルサインの取得を可能とし、ヒトの健康管理に利用されている。本研究では、これらの技術を急性毒性試験に導入し、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を目的とする。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。

J. W.Trevaan(1927)によって初めて導入されたLD₅₀値は、化学分析による評価に適さない強心配糖体、インスリン、ジフテリア毒素などの強力な作用を有する薬物の力価をバイオアッセイにより標準化するための手法であった。標準品との比較を必要とするも

のであり、その精度を保証するため、多数の動物からデータを取得して統計的処理によって信頼区間までを求めることに努力が払われた。その後、毒性発現の究極である「死亡」をエンドポイントとして、投与された動物の半数を致死させるLD₅₀は、化合物の毒性の強さを共通の指標で示すことができる利便性から、化合物のハザードに応じて取り扱い方法を区別する「分類と表示」に使用されている。

一方で、急性毒性試験は科学的、経済的、動物倫理的な理由により批判されてきた(Hunter 1979, Zbinden 1981)。そのため、多くの動物を用いた試験法TG401は2002年に廃止され、使用動物数を削減し、用量も4~5段に固定された改良法(TG420、TG423、TG425)が採択された。しかし、指標は「死亡」のままであり、動物福祉の観点から批判の対象となっている。そして、最大の欠陥は、死因、標的臓器等その内容は一切考慮されていないため、ヒトの中毒治療に有用ではないことである(Robinson 2009)。

急性毒性試験の*in vitro*代替は直接的には培養細胞の細胞死で代用できると考えられ、1980年代よりいくつかのトライアルはすでに行われてきている。Willi Halle(1998)はLD₅₀の文献値と3T3細胞を用いた細胞毒性実験のIC₅₀値を比較したデータベースを報告した。このデータベースから得られた回帰式を基盤とした代替法がICCVAM(2006)とECVAM(2013)から提案された。現在、これらを基盤としてOECD GD129、また、本邦においては薬生

薬審発 0422 第 1 号(令和 3 年)が発出されている。しかしながら、評価可能である物質が、 $LD_{50}>2,000\text{mg/kg}$ 以上である「普通物」の判定のみであり、毒物及び劇物に相当するもの、難溶性物質、代謝物及び心臓や神経系など臓器特異的な毒性評価はできない。

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「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」の可能性が見えてきた。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。例えば、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バイタルサインの諸項目の、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、選択したバイタルサインの諸項目を正確に、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)から作製された Carbon-nanotube yarn (CNT-Y, Siddarmark

LLC)を用い、バイタルサイン測定の重要な要素である心電波形と脳波の電極として利用について検討した。CNT-Y は非金属材料であるため、現在のところ半田付けによって従来の電子回路に接続することができない。そのため、CNT-Y を中空電極内に通し圧着して結合する方法を開発した。皮膚に接触する部分を除き、電氣的短絡を防ぐためにシリコーンゴムチューブ(外径:1.2mm、内径:0.6mm)で被覆した。

CNT-Y は動物の皮膚に縫合針(外科強角針 No.0 バネ穴、夏目製作所)を用い単結紮により皮膚に装着した。動物は、心臓の電気生理学的特性が異なるラット(ヘアレスラット、HWY/Slc)とモルモット(Slc:Hartley)を使用した。ヘアレスラットは、CNT-Y の装着が容易であり、また装着後も CNT-Y の観察が容易であることから選択した。イソフルラン麻酔下でヘアレスラットまたはモルモットの頭部から背部にかけて皮膚 5 箇所、CNT-Y を縫合針(外科強角針 No.0、No.00 バネ穴、夏目製作所)を用いて結紮し、心電図用に 3 箇所、脳波用に 2 箇所から電位を測定した。

R 元年から R2 年度は、電源ノイズ対策のため、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 にデータを取得した。

R3 年度には、電源ノイズ対策が可能となったことから CNT-Y 電極は、生体信号増幅ユニット(BAS-301、Biotex)および電源を含む DC-DC コンバーター(IF-2、Biotex)に順次接続した。生体信号増幅ユニットの特性は以下の通り。

- 入力インピーダンス： $>10\text{M}\Omega$
- 増幅率：2,000 倍
- 周波数特性：ECG 1~250 Hz、EEG 0.5~250Hz
- 入力変換ノイズ： $<10\ \mu\text{Vp-p}$
- 出力電圧： $>\pm 5\text{V}$

最終的に信号は、AD コンバータ(MP150; BIOPAC Systems)を介してデータ取得および解析ソフトウェア(AcqKnowledge; BIOPAC Systems)を使用して、PC に取り込んだ。サンプリング周波数は 2kHz とした。

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(SpO₂)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SpO₂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。

R3年度には、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、SpO₂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。

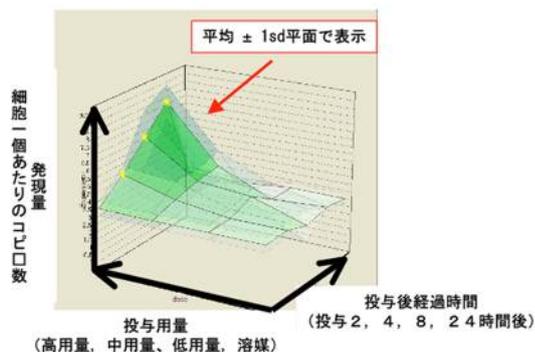
R元年度は、雄性マウスに単回経口投与した際の「海馬」における網羅的な遺伝子発現変動解析について検討した。R2年度は、海馬とは別に、「肝」における解析を検討し、多臓器連関解析を実施することにより、昨年度の解析により想定された二次的シグナル候補物質を探索した。

用量設定のため、TTXのマウス経口LD₅₀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、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を最高用量をとし、公比√10で除して300、100、30 µg/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、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。

R3 年度は、毒性発現機序に、肝臓における代謝活性化が大きく寄与していると考えられる 4,4'-Dihydroxybiphenyl について、C57BL/6J マウスを用いて遺伝子発現変動解析のための用量設定試験を実施した。0.5%メチルセルロース溶液(0.5%MC)に懸濁し、0、62.5、125、250 及び 500 mg/kg の用量にて実験を行なった。

B-3 急性毒性試験における行動解析

1. マウス:

R 元年度から R2 年度は、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。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を用いて撮影した。

R3 年度は、被毛が白い雌 ICR マウスを用いて、アセフェート(300 及び 500 mg/kg)、テロドトキシシン(300 µg/kg)、及び溶媒対照群としてメチルセルロー

スを投与し、急性経口投与後における行動様式(移動量、移動様式、痙攣)、並びに顔面表情(眼、呼吸)への影響について、ハイスピードカメラによる動画データの取得による解析を試みるとともに超音波測定装置による超音波発声(USVs: Ultrasonic vocalizations)の測定を行った。

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。また血圧やパルスオキシメータによ

る SpO₂、活動性(単位時間あたりの移動距離など)などのデータ処理を想定し、心電波形データと同様の処理が可能であることを検証した。

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)、arff 形式データの処理ライブラリとして arff2pandas(ver.1.0.1)、汎用データ処理ライブラリとして Pandas(ver.1.1.5)、numpy (ver.1.19.4 若しくは ver.1.19.5)、データ可視化ライブラリとして 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) 或いは Google Colaboratory 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:

最も電位波形の取得が容易であり、かつ、将来的には無線によるデータ取得をおこなうため、動物の背面での電極の取り付け位置を検討した結果、ヘアレ

スラット及びモルモットの左側耳介、頸部中央並びに背部から電位を誘導し明らかな心電波形を得ることができた。脳波を解析した結果、ヘアレスラットでは 6Hz 以下、モルモットでは 2Hz 以下の周波数を有する電位波形であった。

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。

パルスオキシメータにより、心拍数、SpO₂、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。

無線モジュールを組み込むことで、非拘束下でデータ取得は可能となった。一方、体動の影響によるノイズが発生することが判明した。

C-2 急性毒性試験における遺伝子発現変動解析

R 元年度は 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)、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⁺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。

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、Nfkb1、Sgk1、Mt1 や Gadd45g 遺伝子など)やサイトカイン関連遺伝子が見出せた。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。

R3 年度に実施した、4,4'-Dihydroxybiphenyl の用量設定実験では、125 mg/kg 以上で腎が硬化し、

表面が粗造を呈した。250 mg/kg 以上で体重抑制、500 mg/kg で腎重量増加が認められた。本実験では、最高用量を 70 mg/kg とし、以下、20、7、0 mg/kg (溶媒:0.5%MC)として実施し、肝臓及び海馬のサンプリングを実施した。

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。一方で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。

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 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(ATVS、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。

R2年度は、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。

R3年度は異常検知によく使われる AutoEncoder について検討した。心電波形データの学習には正常拍動のみ500件の心拍データを用いた。学習に用いなかった心電波形データに対して、学習済み AE で判別予測を実行した結果、正答率は 0.972 であった。

D. 考察

バイタルサインセンサーの開発では、R元年度にCNT-Yを用いて心電の測定に成功したが、脳波の取得は困難であった。その理由として、実験環境に混入してくる電源ノイズの処理が困難であったことがあげられる。R3年度には、様々な電源ノイズ対策を実施するとともに、増幅器の改造も実施した。その結果、筋電波形またはノイズとは明らかに異なる波形が

得られた。本研究の脳波は、表面電極により信号を取得しており、これまで報告されている脳波波形とは異なる特性を有する可能性があるため、本研究に適切な解析方法を検討すると共に、その特性を明らかにする必要がある。CNT-Yは皮膚結紮によって取り付け、電位測定を行なっているため、一般的に使用されている手法よりも簡便で侵襲性が低い。そのため、術後の回復期間を設ける必要はなく、急性毒性試験に対して極めて有用な方法であると考えられる。また、導電性ペーストが不要であること、長時間の使用においても分極しないことも利点である。なお、非拘束下での測定には無線通信装置が必要となるが、半導体等の部品の調達が非常に困難な状況でありまだ実現できていない。パルスオキシメータでは、24時間以上連続して心拍数、SpO₂、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、そこでげっ歯類を用いる急性毒性試験にて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 $\mu\text{g}/\text{kgBW}$ 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 apathy を誘発することから、中枢に作用することが明らかとなってきた。しかしながら、TTX が血液脳関門を通過できないため、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、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性マウスをハイスピードカメラ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。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、動物の表情から苦痛の程度を評価する Grimace Scale が開発されており、行動評価のデータとして加えることでより精緻な評価が可能となる。

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として利便性が高い。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、CNN モデルと AE モデルの予測評価を行なった。その結果、AE モデルの予測性能は CNN モデルを上回る成績であった。特に CNN モデルでの成績が悪かった異常拍動予測については、AE の圧勝であり、異常検知における AE モデルの優位性が明らかになった。これは正常データのみで学習可能である AE の特性によるものであり、本研究の目的において極めて有効な手法であることが確認された。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 (ATVSS, 仮称) を「定義」するためには、一次元データのみならず、二次元データ (画像、動画など) を含む、複数のバイタルサインデータ群を統合評価する必要があると考えられる。この統合評価については、各バイタルサインデータで学習した AE などのニューラルネットワークモデルを複数個、融合させるアンサンブル学習 (Ensemble learning) が汎用性が高く、尚且つ高性能と予想されており、設計を進めている。今後引き続き整備を進める新規急性経口投与毒性試験では測定機器や試験施設を限定しない、柔軟で実用的なものであるべきで、そのためにはデータサイエンスの専門家でなくともデータ測定、学習、予測といった高度な解析処理が可能な解析計算システムを設計、構築するのが肝要と考えられる。

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。

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-Y を用いて心電波形及び脳波の測定が可能となった。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、SpO₂、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、その臓器連関解析では、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⁺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。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、体温、心拍、血圧等の VS 測定装置を用い、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、Acute Toxicity Vital Signs Score の定義に利用可能なアルゴリズムを検討したところ、AE モデルの予測性能は CNN モデルを上回る成績が得られ、本研究の目標実現に有効な手法であることが分かった。

急性毒性試験は全ての毒性試験の起点となる重要な試験である。急性毒性試験のエンドポイントには多くの議論がありながら、改善が行なわれてこなかった(小野宏 1990)。死亡に至る時には重要な毒性徴候が現れるが、刻々と変化する毒性徴候を記録し化学物質のハザードを判定することは熟練者でも相当に困難であるため、判定が容易な死亡がエンドポイントとして採用されてきた。一方、バイタルサインの一部を自動測定する手法は、医薬品開発の安全性薬理試験で使用されるテレメトリー法が確立されている

が、送信機を埋植する外科処置と術後の回復期間期間が必要であり、また、専用ケージおよび受信機を備えた実験室が必要であるため、費用の面から、また医薬品に比較してはるかに数が多い一般化学物質への急性毒性試験への導入は難しい。本研究を推進することにより、簡便かつ安価にバイタルサインの測定が可能となるため、ヒトの安全性確保、動物福祉を充足し、試験費用の低減と期間の短縮による効率化が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

Taquahashi Y, Tsuruoka S, Morita K, Tsuji M, Suga K, Aisaki K and Kitajima S, A novel high-purity carbon-nanotube yarn electrode used to obtain biopotential measurements in small animals: flexible, wearable, less invasive, and gel-free operation, *Fundam Toxicol, Sci.* 2022, 9(1),17-21
doi.org/10.2131/fts.9.17

Taquahashi Y, Saito H, Kuwagata M, Kitajima S, Development of an inhalation exposure system of a pressurized metered-dose inhaler (pMDI) formulation for small experimental animals, *Fundam Toxicol, Sci.* 2021,8(6),169-175,
doi:10.2131/fts.8.169

Hoyo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Maeno A, Ohnuki A, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Nakae D. Histological sequence of the development of rat mesothelioma by MWCNT, with the involvement of apolipoproteins, *Cancer Sci.* 2021 Jun;112(6):2185-2198. doi: 10.1111/cas.14873. Epub 2021 May 2.

Makiko Kuwagata, Takuro Hasegawa, Hiromasa Takashima, Makiko Shimizu, Satoshi Kitajima, Hiroshi Yamazaki: Pharmacokinetics of primary metabolites 5-hydroxythalidomide and 5'-hydroxythalidomide formed after oral administration

of thalidomide in the rabbit, a thalidomide-sensitive species. *J Toxicol Sci.* 2021; 46: 553-560. [doi.org/10.2131/jts.46.553]

Toshime Igarashi, Yukuto Yasuhiko, Ryuichi Ono, Erika Tachihara, Miki Uchiyama, Atsuya Takagi, Yu Takahashi, Makiko Kuwagata, Satoshi Kitajima: Diverse unintended on-target mutations induced by zygote genome-editing using CRISPR/Cas9 system. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2021; 8: 161-167. [doi.org/10.2131/fts.8.161]

Sakai K, Hiradate Y, Hara K, Tanemura K. Potential of sperm small non-coding RNAs as biomarkers of testicular toxicity in a doxorubicin-induced mouse model. *Biochem Biophys Rep.* 2021 Oct 22;28:101160. doi: 10.1016/j.bbrep.2021.101160. PMID: 34729424; PMCID: PMC8545667.

Kawahara T, Kanouchi M, Naniwa Y, Koyago M, Numabe T, Mizutani K, Tanemura K, Hara K. Persistence of undifferentiated spermatogonia in aged Japanese Black cattle. *Anim Sci J.* 2021 Dec;92(1):e13572. doi: 10.1111/asj.13572. PMID: 34254411; PMCID: PMC8365669.

Umezumi K, Kurata S, Hara K, Tanemura K. Caffeine induces sperm detachment from sperm head-to-head agglutination in bull. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021 Jul 12;562:105-111. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.05.060. Epub 2021 May 26. PMID: 34049203.

Ogasawara S, Ezaki M, Ishida R, Sueyoshi K, Saito S, Hiradate Y, Kudo T, Obara M, Kojima S, Uozumi N, Tanemura K, Hayakawa T. Rice amino acid transporter-like 6 (OsATL6) is involved in amino acid homeostasis by modulating the vacuolar storage of glutamine in roots. *Plant J.* 2021 Sep;107(6):1616-1630. doi: 10.1111/tbj.15403. Epub 2021 Jul 21. PMID: 34216173.

Sasaki T, Saito H, Hiradate Y, Hara K, Tanemura K.

Behavioural effects in mice orally exposed to domoic acid or ibotenic acid are influenced by developmental stages and sex differences. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021 Jun 18;558:175-182. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.04.080. Epub 2021 Apr 28. PMID: 33932777.

Ideta-Otsuka M, Miyai M, Yamamoto N, Tsuchimoto A, Tamura H, Tanemura K, Shibutani M, Igarashi K. Development of a new in vitro assay system for evaluating the effects of chemicals on DNA methylation. *J Toxicol Sci.* 2021;46(2):83-90. doi: 10.2131/jts.46.83. PMID: 33536392.

Makino Y, Hiradate Y, Umezumi K, Hara K, Tanemura K. Expression and Possible Role of Nicotinic Acetylcholine Receptor ϵ Subunit (AChRe) in Mouse Sperm. *Biology (Basel).* 2021 Jan 11;10(1):46. doi: 10.3390/biology10010046. PMID: 33440720; PMCID: PMC7826850.

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 CC14. *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- μ m ciclesonide aerosol by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging, *Int. J. Pharm.*

Epub 2021 Jan 21

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.

Ono R, Yasuhiko Y, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J, Yoko H.: Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing. *Commun Biol* 2, Article number: 57, 2019.

Kobayashi K, Kuze J, Abe S, Takehara S, Minegishi

G, Igarashi K, Kitajima S, Kanno J, Yamamoto T, Oshimura M, Kazuki Y.: CYP3A4 Induction in the Liver and Intestine of Pregnane X Receptor/CYP3A-Humanized Mice: Approaches by Mass Spectrometry Imaging and Portal Blood Analysis. *Mol Pharmacol*, 96(5): 600-608, 2019

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.

Yamashita S, Kogasaka Y, Hiradate Y, Tanemura K, Sendai Y. Suppression of mosaic mutation by co-delivery of CRISPR associated protein 9 and three-primerepair exonuclease 2 into porcine zygotes via electroporation. *J Reprod Dev.* 2019 Nov 24.

Saito H, Hara K, Tominaga T, Nakashima K, Tanemura K. Early-life exposure to low levels of permethrin exerts impairments in learning and memory with the effects on neuronal and glial population in adult male mice. *J Appl Toxicol.* 2019 Dec;39(12):1651-1662.

Goto M, Saito H, Hiradate Y, Hara K, Tanemura K. Differences in resistance against osmotic challenge among C57BL/6, DBA/2 and their hybrid mice metaphase II (MII) stage oocytes. *Zygote.* 2019 Aug;27(4):250-254.

Kanamori M, Oikawa K, Tanemura K, Hara K. Mammalian germ cell migration during development, growth, and homeostasis. *Reprod Med Biol.* 2019 Jun 9;18(3):247-255.

Kurata S, Hiradate Y, Umezu K, Hara K, Tanemura K. Capacitation of mouse sperm is modulated by gamma-aminobutyric acid (GABA) concentration. *J Reprod Dev.* 2019 Aug 9;65(4):327-334.

Umezu K, Yajima R, Hiradate Y, Yanai R, Numabe T, Hara K, Oikawa T, Tanemura K. Improvement in blastocyst quality by neurotensin signaling via its receptors in bovine spermatozoa during in vitro fertilization. *J Reprod Dev.* 2019 Apr 12;65(2):147-153.

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

種村健太郎「非侵襲的な早期精巣毒性バイオマーカーとしての精子エピゲノム影響評価」第38回日本アンドロロジー学会学術大会(2019.6.21-22)大阪府

種村健太郎、北嶋聡、菅野純「低用量科学物質の周産期ばく露による情動認知行動毒性～子どもの毒性額にむけた評価系開発の現在～」第46回日本毒性学会学術年会(2019.6.26-28)徳島市

種村健太郎、北嶋聡、菅野純「発生期マウスへの神経シグナル異常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～」第46回日本毒性学会学術年会(2019.6.26-28)徳島市

登田 美桜、北嶋聡、フグ毒として知られるテトロドトキシンのリスク評価に関する国際的動向ーマウスユニットと急性参照用量ー、第46回日本毒性学会学術年会(2019.6.26.)

種村 健太郎、北嶋聡、菅野 純、発生期マウスへの神経シグナル異常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～、第46回日本毒性学会学術年会(2019.6.26.)

小野 竜一、相崎 健一、北嶋聡、菅野 純、Percellome プロジェクトから見えてきたエピジェネティクス影響、第46回日本毒性学会学術年会(2019.6.26.)

菅野 純、北嶋聡、相崎 健一、小野 竜一、Percellome トキシコゲノミクスのエピジェネティクス基盤 —「新型」反復曝露試験の解析—、第46回日本毒性学会学術年会(2019.6.28.)

夏目 やよい、相崎 健一、北嶋聡、Samik GOSH, 北野 宏明、水口 賢司、菅野 純、Garuda プラットフォームによる多角的毒性予測、第46回日本毒性学会学術年会(2019.6.28.)

種村 健太郎、北嶋聡、菅野 純、低用量化学物質の周産期ばく露による情動認知行動毒性～子どもの毒性学に向けた評価系開発の現在～、第46回日本毒性学会学術年会(2019.6.28.)

Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, Jun Kanno, Cross Talks among PPAR α , SREBP, and ER Signaling Pathways in the Side Effect of Valproic Acid, IUTOX 15th International Congress of Toxicology (ICT 2019) (2019.7.16.)

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

Ryuichi Ono, Yusuke Yoshioka, Yusuke Furukawa, Takahiro Ochiya, Satoshi Kitajima, Yoko Hirabayashi, Evaluation of Exosomes as Toxic Biomarkers、IUTOX 15th International Congress of Toxicology (ICT 2019)] (2019.7.17.)

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura、The Concept of “Signal Toxicity” for the Mechanistic Analysis of So-Called Low Dose Effect and Delayed Effect after Perinatal Exposure.、IUTOX 15th International Congress of Toxicology (ICT 2019)] (2019.7.17.)

Hirokatsu Saito, Kenshiro Hara, Takashi Tominaga, Kinichi Nakashima, Kentaro Tanemura「Early-life exposure to low levels of permethrin exerts impairments in learning and memory associated with glial cell disturbance in adult male mice」the 15th IUTOX International Congress of Toxicology (ICTXV) (2019.7.15-18) Honolulu

牧野優誠、平館裕希、矢内凜、齊藤洋克、原健士朗、種村健太郎「ニコチン型アセチルコリン受容体シグナルを利用したマウス精子機能の調節」第112回日本繁殖生物学会大会 (2019.9.2-5) 札幌市

倉田笙平、平館裕希、梅津康平、原健士朗、種村健太郎「 γ -アミノ酪酸(GABA)を利用した精子機能制御法の開発に資する研究」第112回日本繁殖生物学会大会 (2019.9.2-5) 札幌市

矢内凜、平館裕希、原健士朗、藤井渉、佐原成彦、種村健太郎「タウ欠損マウスを用いた精子におけるタウ類似タンパクの発現様式」第112回日本繁殖生物学会大会 (2019.9.2-5) 札幌市

梅津康平、平館裕希、原健士朗、種村健太郎「ウシ精子を卵母細胞に導く走化性因子の特定」第112回日本繁殖生物学会大会 (2019.9.2-5) 札幌市

北嶋 聡、シックハウス(室内空気汚染)対策に関する研究-シックハウス症候群レベルの室内揮発性有機化合物の吸入暴露の際の海馬 Percellome トキシコゲノミクスによる中枢影響予測-、環境科学会 2019 年会(2019.9.13.)

影山恵理、沼邊孝、種村健太郎、原健士朗「ウシ精巢の対外培養における PDMS 製カバーの有用性」第126回日本畜産学会大会 (2019.9.17-20) 盛岡市

北嶋 聡、近藤一成、ゲノム編集技術応用食品の現状と課題、日本食品化学学会 第35回食品化学シンポジウム(2019.11.8.)

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)

酒井和哉、原健士朗、種村健太郎「精巢毒性モデルマウスにおける精子エピゲノム影響評価」第42回日本分子生物学会年会 (2019.12.3-6)、博多市

倉田笙平、小塩健介、高森広典、梅津康平、平館裕希、原健士朗、種村健太郎「ブタ精子機能に対する GABA 影響解析」日本畜産学会第 127 回大会 (2020.3.25-28)、京都府

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ロロ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

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

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

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

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

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 α 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

高橋 祐次:粉体の吸入剤研究開発を推進する非臨床安全性評価手法の開発、ラウンドテーブルセッション、日本薬剤学会第 36 年会、招待講演 (2021.5.14)

山本 栄一、高橋 祐次:吸入剤に係る薬物動態の新規イメージング技術、第 48 回日本毒性学会学術年会、シンポジウム (2021.7.9)

夏目 やよい、相崎 健一、北嶋 聡、Samik GHOSH、北野 宏明、水口 賢司、菅野 純、PPAR α リガンドの比較毒性オミクス、第 48 回 日本毒性学会学術年会 (2021.7.7)

菅野 純、相崎 健一、小野 竜一、北嶋 聡、毒性 Omics と AI による慢性毒性予測、第 48 回 日本毒性学会学術年会 (2021.7.7)

相崎 健一、小野 竜一、菅野 純、北嶋 聡、トランスクリプトミクスから見た発癌物質の特性、第 48 回 日本毒性学会学術年会 (2021.7.8)

菅野 純、高木 篤也、相崎 健一、北嶋 聡、異物発癌に関わるトランスクリプトミクス特性、第 48 回 日本毒性学会学術年会 (2021.7.8)

菅野 純、北嶋 聡、相崎 健一、齊藤 洋克、種村 健太郎、肺の遺伝子発現応答と毒性機序予測解析、第 48 回 日本毒性学会学術年会 (2021.7.9)

J. Kanno, K.I.Aisaki, R.Ono, S.Kitajima, Analysis of murine liver mRNA expression, DNA methylation, and histone after repeated exposure to chemicals, EUROTOX2021(2021.9.29)

Taquahashi Y, Yamamoto E, makiko Kuwagata M, Saito H and Kitajima S, Development of an inhalation exposure system of a pressurized metered-dose inhaler formulation for small experimental animal and visualizing the spatial localization of an inhalant in rat lungs by mass spectrometry imaging, The 37th Annual Meeting of KSOT/KEMS, Invited (2021.11.2)

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

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(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。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 Carbon-nanotube yarn(CNT-Y)を用い心電と脳波測定に取り組みとともに、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。ヘアレスラット及びモルモットの左側耳介、頸部中央並びに背部から電位を誘導することで明らかな心電波形を得ることができた。Bregma と右側耳介基部から誘導した電位はパワースペクトルとしてヘアレスラットでは 6Hz 以下、モルモットでは 2Hz 以下の周波数を有する電位が誘導された。CNT-Y の抵抗は 1.204Ω/m、CNT-Y から取得した心電波形データの SN 比は約 40dB であった。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、SpO₂、呼吸数の計測に成功したが、体動によるノイズが発生するため、これを除去する方法の開発が必要である。本研究では、現在は商業的に入手可能な VS 測定装置と、独自に開発したセンサーを並行して使用し実験を進めているが、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 (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 **Carbon-nanotube yarn (CNT-Y)** 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 °C、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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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-Yは動物の皮膚に縫合針(外科強角針No.0 バネ穴、夏目製作所)を用い単結紮により皮膚に装着した。動物は、心臓の電気生理学的特性が異なるラット(ヘアレスラット、HWY/Slc)とモルモット(Slc:Hartley)を使用した。生体電位測定は、イソフルラン吸入麻酔下で実施した。

実験室のノイズ対策が不十分であったR 元年から2 年度は、CNT センサーからのデータは、プリアンプ(特注品、バイオテックス)を介して、無線によるA/D 変換・トランスミッター(BITalino (r)evolution)を用いてPC にデータを取得した。R3 年度は、測定装置を含む電源にUPS を接続、またプリアンプも改造してノイズ対策を行なった。CNT-Y 電極から、生体信号増幅ユニット(BAS-301、Biotex)および電源を含むDC-DC コンバーター(IF-2、Biotex)に順次接続した。生体信号増幅ユニットの特性は以下の通り;入力インピーダンス:>10M Ω 。増幅率:2,000 倍;周波数特性:ECG 1~250 Hz、EEG 0.5~250Hz。入力変換ノイズ:<10 μ Vp-p; 出力電圧:> \pm 5V。最終的に信号は、AD コンバータ(MP150; BIOPAC Systems)を介してデータ取得および解析ソフトウェア(AcqKnowledge; BIOPAC Systems)を使用して、PC に取り込んだ。サンプリング周波数は2kHzとした。

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を

実施した。

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(SpO₂)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SpO₂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、SpO₂ 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 μ g/kg において体温上昇(38 $^{\circ}$ C)がみられ僅かに血圧の低下が認められた。300 μ g/kg では体温上昇(38 $^{\circ}$ C)と、血圧及び心拍数低下がみられた。500 μ g/kg においては急激な体温上昇(39 $^{\circ}$ 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

1. 心電波形・脳波の測定:

電極の取り付け位置を検討した結果、ヘアレスラット及びモルモットの左側耳介、頸部中央並びに背部から電位を誘導し明らかな心電波形を得ることができた。Bregma と右側耳介基部から誘導した脳波をパワースペクトル解析した結果、ヘアレスラットでは 6Hz 以下、モルモットでは 2Hz 以下の周波数を有する電位波形であった(イソフルラン麻酔下)。CNT-Y の抵抗は 1.204Ω/m(RM3542-01、日置電機)、CNT-Y から取得した心電波形データの SN 比は約 40dB であった。

2. ラット用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。パルスオキシメータにより、心拍数、SpO₂、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。

CNT-Y は誘導用のインピーダンスとしては十分低い値と考えられた。心電図については十分な電位変化を捉えることに成功した。将来的に無線通信でのデータ取得を目指していることから背側で心電が取得できる位置を探索し、結果的に第 II 誘導を変形した電極配置での測定が可能となった。一方、脳波測定を目的とした電位誘導からは、筋電波形またはノイズとは明らかに異なる波形が得られた。本研究の脳波は、表面電極により信号を取得している。信号は大脳皮質、頭蓋骨、皮膚など、インピーダンスの異なる組織を介して記録されており、これまで報告されている脳波波形とは異なる特性を有する可能性があるため、本研究に適切な解析方法を検討すると共に、その特性を明らかにする必要がある。本研究では、CNT-Y を皮膚結紮によって取り付け測定を行なっているため、現在、一般的に使用されてい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。そのため、術後の回復期間を設ける必要はなく、急性毒性試験に対して極めて有用な方法であると考えられる。また、導電性ペーストが不要であること、金属ではないため長時間の使用においても分極しないことも利点である。なお、非拘束下での測定には無線通信装置が必要となる。CNT-Y に最適化した装置の構想はあるが、半導体等、部品の調達が非常に困難な状況でありまだ実現できていない。

独自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、SpO₂、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

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。バイタルサインセンサーの開発では、CNT-Yを用いて心電波形及び脳波の測定が可能となった。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、SpO₂、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独自開発の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。バイタルサインの一部を自動測定する手法は、医薬品開発の安全性薬理試験で使用されるテレメトリー法が確立されているが、送信機を埋植する手術と術後の回復期間期間、専用ケージおよび受信機を備えた実験室が必要であり急性毒性への導入は難しい。本研究を推進することにより、ヒトの安全性確保、動物福祉の充足、試験費用の低減と期間の短縮による効率化が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

Taquahashi Y, Tsuruoka S, Morita K, Tsuji M, Suga K, Aisaki K and Kitajima S, A novel high-purity carbon-nanotube yarn electrode used to obtain biopotential measurements in small animals: flexible, wearable, less invasive, and gel-free operation, *Fundam Toxicol, Sci.* 2022, 9(1),17-21
doi.org/10.2131/fts.9.17

Taquahashi Y, Saito H, Kuwagata M, Kitajima S, Development of an inhalation exposure system of a pressurized metered-dose inhaler (pMDI) formulation for small experimental animals, *Fundam Toxicol, Sci.* 2021,8(6),169-175
doi.:10.2131/fts.8.169

Hoyo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Maeno A, Ohnuki A, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T,

Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Nakae D. Histological sequence of the development of rat mesothelioma by MWCNT, with the involvement of apolipoproteins, *Cancer Sci.* 2021 Jun;112(6):2185-2198. doi: 10.1111/cas.14873. Epub 2021 May 2.

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- μ m ciclesonide aerosol by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging, *Int. J. Pharm.*

Epub 2021 Jan 21

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)

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

高橋 祐次:粉体の吸入剤研究開発を推進する非臨床安全性評価手法の開発、ラウンドテーブルセッション、日本薬剤学会第 36 年会、招待講演 (2021.5.14)

山本 栄一、高橋 祐次:吸入剤に係る薬物動態の新規イメージング技術、第 48 回日本毒性学会学術年会、シンポジウム (2021.7.9)

Taquahashi Y, Yamamoto E, Kuwagata M, Saito H and Kitajima S, Development of an inhalation exposure system of a pressurized metered-dose inhaler formulation for small experimental animal and visualizing the spatial localization of an inhalant in rat lungs by mass spectrometry imaging, The 37th Annual Meeting of KSOT/KEMS, invited (2021.11.2)

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

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た。

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 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 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 $\sqrt{10}$ で除して300、100、30 µg/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⁺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。

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。R3 年度は、4,4'-Dihydroxybiphenyl (CAS No: 92-88-6) をモデル化合物として選択し、用量設定実験 (0、62.5、125、250、500 mg/kg) を実施した。その結果、125 mg/kg 以上で腎が硬く、表面が粗造を呈した、250 mg/kg 以上で体重抑制、500mg/kg で腎重量増加がみられた。この結果を基に、最高用量を 70 mg/kg とし、以下、20、7、0 mg/kg (溶媒:0.5%MC) の用量で本実験を実施しサンプリングまでを実施した。現在、網羅的遺伝子発現解析を実施している。

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℃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 Percellome 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、次いで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 元年度は、モデル物質として、フグ毒としてしられるテトロドトキシン(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。

B-3 用量設定実験

TTX のマウス経口 LD₅₀ 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、00 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 を最高用量とし、公比 $\sqrt{10}$ で除して 300、100、30 µg/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 検定をおこない 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、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した。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。この平均曲面の上下に標準偏差をしめした。

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的配慮を十分行い、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、目視による確認にて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。

他方、興味深いことに Na⁺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(LD₅₀)を 9~12.5 µg/kg、経口投与における LD₅₀を 232~532 µg/kg と推定し、また「単回経口投与の際の 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 400g 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 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。

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 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、多臓器関連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は抽出されものとして 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遺伝子は、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 種であった。

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

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。

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。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る。

R3 年度は、毒性発現に肝臓での代謝が大きいと考えられる 4,4'-Dihydroxybiphenyl (CAS No: 92-88-6) をモデル化合物として選択し、用量設定実験 (0、62.5、125、250、500 mg/kg) を実施した。その結果、125 mg/kg 以上で腎が硬く、表面が粗造を呈した、250 mg/kg 以上で体重抑制、500mg/kg で腎重量増加がみられた。この結果を基に、最高用量を 70 mg/kg とし、以下、20、7、0 mg/kg (溶媒:0.5%MC) の用量で本実験を実施しサンプリングまでを実施した。現在、網羅的遺伝子発現解析を実施している。

D. 結論

H31/R 元年度は、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⁺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 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た。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Taquahashi Y, Tsuruoka S, Morita K, Tsuji M, Suga K, Aisaki K and Kitajima S, A novel high-purity carbon-nanotube yarn electrode used to obtain biopotential measurements in small animals: flexible, wearable, less invasive, and gel-free operation, *Fundam Toxicol, Sci.* 2022, 9(1),17-21
doi.org/10.2131/fts.9.17

Taquahashi Y, Saito H, Kuwagata M, Kitajima S, Development of an inhalation exposure system of a pressurized metered-dose inhaler (pMDI) formulation for small experimental animals, *Fundam Toxicol, Sci.* 2021,8(6),169-175, doi.:10.2131/fts.8.169

Makiko Kuwagata, Takuro Hasegawa, Hiromasa Takashima, Makiko Shimizu, Satoshi Kitajima, Hiroshi Yamazaki: Pharmacokinetics of primary metabolites 5-hydroxythalidomide and 5'-hydroxythalidomide formed after oral administration of thalidomide in the rabbit, a thalidomide-sensitive species. *J Toxicol Sci.* 2021; 46: 553-560. [doi.org/10.2131/jts.46.553]

Toshime Igarashi, Yukuto Yasuhiko, Ryuichi Ono, Erika Tachihara, Miki Uchiyama, Atsuya Takagi, Yu Takahashi, Makiko Kuwagata, Satoshi Kitajima: Diverse unintended on-target mutations induced by zygote genome-editing using CRISPR/Cas9 system. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2021; 8: 161-167. [doi.org/10.2131/fts.8.161]

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 CC14. *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 Shibana, 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]

Kobayashi K, Kuze J, Abe S, Takehara S, Minegishi G, Igarashi K, Kitajima S, Kanno J, Yamamoto T, Oshimura M, Kazuki Y.: CYP3A4 Induction in the Liver and Intestine of Pregnane X Receptor/CYP3A-Humanized Mice: Approaches by Mass Spectrometry Imaging and Portal Blood Analysis. *Mol Pharmacol*, 96(5): 600-608, 2019.

Ono R, Yasuhiko Y, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J, Yoko H.: Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing. *Commun Biol* 2, Article number: 57, 2019.

北嶋 聡、エディトリアル: ドーピングの中毒学・毒性学—序文—、*中毒研究(Jpn. J. Clin. Toxicol.)* 32: 373-374.2019.

2. 学会発表

登田 美桜、北嶋 聡、フグ毒として知られるテトロドトキシシンのリスク評価に関する国際的動向—マウスユニットと急性参照用量—、第46回日本毒性学会学術年会(2019.6.26.)徳島

種村 健太郎、北嶋 聡、菅野 純、発生期マウスへの神経シグナル異常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—、第46回日本毒性学会学術年会(2019.6.26.)徳島

小野 竜一、相崎 健一、北嶋聡、菅野 純、Percellome プロジェクトから見えてきたエピジェネテ

イクス影響、第 46 回日本毒性学会学術年会 (2019.6.26.) 徳島

菅野 純, 北嶋 聡, 相崎 健一, 小野 竜一、**Percellome** トキシコゲノミクスのエピジェネティクス基盤 —「新型」反復曝露試験の解析—、第 46 回日本毒性学会学術年会 (2019.6.28.) 徳島

夏目 やよい, 相崎 健一, 北嶋 聡, Samik GOSH, 北野 宏明, 水口 賢司, 菅野 純, Garuda プラットフォームによる多角的毒性予測、第 46 回日本毒性学会学術年会 (2019.6.28.) 徳島

種村 健太郎, 北嶋 聡, 菅野 純、低用量化学物質の周産期ばく露による情動認知行動毒性～子どもの毒性学に向けた評価系開発の現在～、第 46 回日本毒性学会学術年会 (2019.6.28.) 徳島

Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, Jun Kanno, Cross Talks among PPAR α , SREBP, and ER Signaling Pathways in the Side Effect of Valproic Acid, IUTOX 15th International Congress of Toxicology (ICT 2019) (2019.7.16.) ハワイ

Ryuichi Ono, Yusuke Yoshioka, Yusuke Furukawa, Takahiro Ochiya, Satoshi Kitajima, Yoko Hirabayashi, Evaluation of Exosomes as Toxic Biomarkers, IUTOX 15th International Congress of Toxicology (ICT 2019) (2019.7.17.) ハワイ

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura, The Concept of “Signal Toxicity” for the Mechanistic Analysis of So-Called Low Dose Effect and Delayed Effect after Perinatal Exposure., IUTOX 15th International Congress of Toxicology (ICT 2019) (2019.7.17.) ハワイ

北嶋 聡、シックハウス(室内空気汚染)対策に関する研究-シックハウス症候群レベルの室内揮発性有機化合物の吸入曝露の際の海馬 **Percellome** トキシコゲノミクスによる中枢影響予測-、環境科学会 2019 年会(2019.9.13.)名古屋

北嶋 聡、近藤一成、ゲノム編集技術応用食品の現状と課題、日本食品化学学会 第35回食品化学シンポジウム(2019.11.8.) 東京

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

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

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

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

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

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

原唯香、平舘裕希、原健士朗、北嶋聡、菅野純、種村健太郎、エストロジェン受容体 α 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)対策に関する研究一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一、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

夏目 やよい、相崎 健一、北嶋 聡、Samik GHOSH、北野 宏明、水口 賢司、菅野 純、PPAR α リガンドの比較毒性オミクス、第 48 回 日本毒性学会学術年会(2021.7.7)

菅野 純、相崎 健一、小野 竜一、北嶋 聡、毒性 Omics と AI による慢性毒性予測、第 48 回 日本毒性学会学術年会(2021.7.7)

相崎 健一、小野 竜一、菅野 純、北嶋 聡、トランスクリプトミクスから見た発癌物質の特性、第 48 回 日本毒性学会学術年会 (2021.7.8)

菅野 純、高木 篤也、相崎 健一、北嶋 聡、異物発癌に関わるトランスクリプトミクス特性、第 48 回 日本毒性学会学術年会 (2021.7.8)

菅野 純、北嶋 聡、相崎 健一、齊藤 洋克、種村健太郎、肺の遺伝子発現応答と毒性機序予測解析、第 48 回 日本毒性学会学術年会 (2021.7.9)

J. Kanno, K.I.Aisaki, R.Ono, S.Kitajima, Analysis of murine liver mRNA expression, DNA methylation, and histone after repeated exposure to chemicals, EUROTOX2021(2021.9.29)

Taquahashi Y, Yamamoto E, makiko Kuwagata M, Saito H and Kitajima S, Development of an inhalation exposure system of a pressurized metered-dose inhaler formulation for small experimental animal and visualizing the spatial localization of an inhalant in rat lungs by mass spectrometry imaging, The 37th Annual Meeting of KSOT/KEMS, Invited (2021.11.2)

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

令和元年度-令和3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(移動量、移動様式、痙攣、流涎、瞬目)への影響、赤外線サーモグラフィによる体表温度の変化、超音波測定装置による超音波発声(USVs: ultrasonic vocalizations)、顔面の動き、等を計測し、非侵襲的なバイタルサイン(VS)としての利用について検討する。

R1年度は、赤外線サーモグラフィによる体表温度と、超音波測定装置による超音波発声の測定条件の設定を行うとともに、一部のモデル化合物としてテトロドトキシン(300 µg/kg)、アセフェート(50および300 mg/kg)を用いた成熟雄性マウスへの投与実験を行った。その際、超音波発声が特に動物間のコミュニケーションに用いられていることが知られていることから、3-4匹ずつの投与群として検討した。テトロドトキシン投与群に体表温度の低下を伴う活動量低下と痙攣がまたアセフェート投与群においても体表温度の低下を伴う活動量低下と痙攣が観察され、特にアセフェート300 mg/kg投与群では、重度の振戦と瞬目不全が観察された。尚、いずれの投与群にも超音波発声の確認には至らなかった。

R2年度は、ハイスピードカメラにより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500 mg/kg)を用い、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500 mg/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の詳細な計測データ取得に成功した。また、昨年度から実験動物として雄性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を行った。

R3年度は、生後8週齢の雌ICRマウスに対して、モデル化合物としてアセフェート(300/500 mg/kg)、テトロドトキシン(300 µg/kg)を選択し、急性経口投与後における行動様式(移動量、移動様式、痙攣)や顔面表情(眼、呼吸)への影響について動画データの取得による解析を試みる。尚、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を行った。その結果、コントロール群ではいずれのマウスにおいても投与後0、30、60、90分後において探索行動を行い、その活動量に違いは見られなかったが、アセフェート300 mg/kg投与群では、投与直後にはコントロール群との差異はなかったが、投与30分後では、初期探索は行うものの、活動量が低下した。また、わずかに振戦も確認された。投与60分後では活動量の著しい低下が見られ、腹臥位の状

態の個体も見られた。振戦も強く現れていた。投与 90 分後ではほとんど動かず、後肢伸展が見られた個体もあった。また、痙攣が観察された。アセフェート 500 mg/kg 投与群では、投与直後ではコントロール群との差異はなかった。一方で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。以上の成績から、従来の目視観察による記述式の一般状態観察に基づいた毒性発現を VS 計測データ取得のスコア化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。

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。すなわち、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超音波発声 (USVs: ultrasonic vocalizations)、ハイスピードカメラ等により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。

R1 年度は、赤外線サーモグラフィによる体表温度と、超音波測定装置による超音波発声の測定条件の設定を行うとともに、テロドトキシシ (300 µg/kg)、アセフェート (50 および 300 mg/kg) を用いた検討を行った。尚、アセフェートについては 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 段階から選択した。

R2 年度は、ハイスピードカメラにより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 500 mg/kg) を用い、成熟雄マウスへの投与と実験を行った。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。

R3 年度は、生後 8 週齢の雌 ICR マウスに対して、モデル化合物としてアセフェート (300/500 mg/kg)、テロドトキシシ (300 µg/kg) を選択し、急性経口投与後における行動様式 (移動量、移動様式、痙攣) や顔面表情 (眼、呼吸) への影響についてカラービデオカメラを用いた動画データの解析を試みるとともに超音波測定装置による超音波発声 (USVs: Ultrasonic vocalizations) の測定を行った。尚、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を行った。

C. 研究結果

<<R1 年度>>

赤外線サーモグラフィによる体表温度の変化として、テロドトキシシ投与群において体表温度の低下を伴う活動量低下と痙攣が、またアセフェート投与群においても体表温度の低下を伴う活動量低下と痙攣が観察され、特にアセフェート 300 mg/kg 投与群では、重度の振戦と瞬目不全が観察された。尚、いずれの投与群においても超音波発声の確認には至らなかった。また、超音波測定装置による超音波発声 (USVs: ultrasonic vocalizations) の測定については、測定条件設定を目的に性行動時の超音波発声に成功したが、上記の投与条件下において、超音波発声の確認には至らなかった。

<<R2 年度>>

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。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、呼吸促迫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。

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。

<<R3 年度>>

<行動様式>

コントロール群では、メチルセルロース投与後 0、30、60、90 分後のいずれにおいても探索行動や立位姿勢が見られ、活動量についても差異は見られなかった。

アセフェート 300 mg/kg 投与群では、投与直後にはコントロール群との差異はなかった。投与 30 分後には初期探索は行うものの、活動量が低下した。また、わずかに振戦も確認された。投与 60 分後には活動量の著しい低下が見られ、腹臥位の状態の個体も見られた。振戦も強く現れていた。投与 90 分後には、ほとんど動かず、後肢伸展が見られた個体もあった。また、痙攣が観察された。

アセフェート 500 mg/kg 投与群には、投与直後にはコントロール群との差異はなかった。投与 30 分後には活動量の低下が見られ振戦が観察された。投与 60 分には、著しい活動量の低下がみられ、痙攣が観察された。投与 90 分後には、ほとんど動かず、全身性の強い痙攣が見られた。

テトロドトキシン投与群では、投与直後から 30 分後の間には活動量の低下が見られ、振戦や痙攣が観察された。また 1 個体は投与 6 分後に死亡した。投与 60 分から 90 分後にはわずかに痙攣が見られたものの、ほぼ回復状態を示した。

<表情>

コントロール群では、全てのマウスにおいて投与 0、30、60、90 分後のいずれの時間においても表情の

変化はなかった。

アセフェート 300 mg/kg 投与群では、投与直後にはコントロール群と同様の表情が見られた。投与 30 分後には眼瞼脱色が見られた。投与 60 分後には眼瞼腫脹が観察された。また、浅速呼吸と頻呼吸も観察された。投与 90 分後には眼瞼下垂によって瞬目不全になった個体が観察された。また、チェーン・ストーク型呼吸も観察された。

アセフェート 500 mg/kg 投与群では、投与直後はコントロール群と同様の表情が見られた。投与 30 分後には眼瞼脱色と眼瞼腫脹が見られた。また、浅速呼吸や頻呼吸が見られた。投与 60 分後には呼吸不全が更に強く現れ、流涙が見られた個体も存在した。投与 90 分後には眼瞼下垂、瞬目不全、流涙が観察され、チェーン・ストーク型呼吸も見られた(図 2)。

テトロドトキシン投与群では、表現型が現れる時間に個体差はあったものの、投与直後から 60 分後にかけて眼瞼脱色とわずかな眼瞼腫脹が見られた。また、呼吸不全も観察された。それ以降は開眼し、呼吸もほとんど回復していた。

<超音波発声>

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。

D. 考察

赤外線サーモグラフィによる体表温度については、非常に有効な VS と考えられた。また、カメラによる顔面の動きの取得は有効な VS であるが、今後、さらに撮影条件を整備する必要があると考えられた。これまで実験動物として体毛色が黒い B6 マウスを使用してきたが、白い ICR マウスに切り替えることによってより正確に画像を得ることができたと考えている。一方で、雌マウスを使用したものの、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。これは、音声コミュニケーションとして、社会行動に含まれると考えられた。

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

Yamashita S, Kogasaka Y, Hiradate Y, Tanemura K, Sendai Y. Suppression of mosaic mutation by co-delivery of CRISPR associated protein 9 and three-primerepair exonuclease 2 into porcine zygotes via electroporation. *J Reprod Dev.* 2019 Nov 24. doi: 10.1262/jrd.2019-088. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 31761839.

○ Saito H, Hara K, Tominaga T, Nakashima K, Tanemura K. Early-life exposure to low levels of permethrin exerts impairments in learning and memory with the effects on neuronal and glial population in adult male mice. *J Appl Toxicol.* 2019 Dec;39(12):1651-1662. doi: 10.1002/jat.3882. Epub 2019 Aug 15. PubMed PMID: 31415104

Goto M, Saito H, Hiradate Y, Hara K, Tanemura K. Differences in resistance against osmotic challenge among C57BL/6, DBA/2 and their hybrid mice metaphase II (MII) stage oocytes. *Zygote.* 2019 Aug;27(4):250-254. doi: 10.1017/S0967199418000370. Epub 2019 Aug 9. PubMed PMID: 31397238.

Kanamori M, Oikawa K, Tanemura K, Hara K. Mammalian germ cell migration during development, growth, and homeostasis. *Reprod Med Biol.* 2019 Jun 9;18(3):247-255. doi: 10.1002/rmb2.12283. eCollection 2019 Jul. Review. PubMed PMID: 31312103; PubMed Central PMCID: PMC6613016.

Kurata S, Hiradate Y, Umezu K, Hara K, Tanemura K. Capacitation of mouse sperm is modulated by gamma-aminobutyric acid (GABA) concentration. *J Reprod Dev.* 2019 Aug 9;65(4):327-334. doi: 10.1262/jrd.2019-008. Epub 2019 Jun 10. PubMed PMID: 31178551; PubMed Central PMCID: PMC6708848.

Umezu K, Yajima R, Hiradate Y, Yanai R, Numabe T, Hara K, Oikawa T, Tanemura K. Improvement in blastocyst quality by neurotensin signaling via its

receptors in bovine spermatozoa during in vitro fertilization. *J Reprod Dev.* 2019 Apr 12;65(2):147-153. doi: 10.1262/jrd.2018-147. Epub 2019 Jan 19. PubMed PMID: 30662011; PubMed Central PMCID: PMC6473113.

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.

Sakai K, Hiradate Y, Hara K, Tanemura K. Potential of sperm small non-coding RNAs as biomarkers of testicular toxicity in a doxorubicin-induced mouse model. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021 Oct 22;28:101160. doi: 10.1016/j.bbrep.2021.101160. PMID: 34729424; PMCID: PMC8545667.

Kawahara T, Kanouchi M, Naniwa Y, Koyago M, Numabe T, Mizutani K, Tanemura K, Hara K. Persistence of undifferentiated spermatogonia in aged Japanese Black cattle. *Anim Sci J.* 2021 Dec;92(1):e13572. doi: 10.1111/asj.13572. PMID: 34254411; PMCID: PMC8365669.

Umezu K, Kurata S, Hara K, Tanemura K. Caffeine induces sperm detachment from sperm head-to-head agglutination in bull. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021 Jul 12;562:105-111. doi:

10.1016/j.bbrc.2021.05.060. Epub 2021 May 26. PMID: 34049203.

Ogasawara S, Ezaki M, Ishida R, Sueyoshi K, Saito S, Hiradate Y, Kudo T, Obara M, Kojima S, Uozumi N, Tanemura K, Hayakawa T. Rice amino acid transporter-like 6 (OsATL6) is involved in amino acid homeostasis by modulating the vacuolar storage of glutamine in roots. *Plant J.* 2021 Sep;107(6):1616-1630. doi: 10.1111/tpj.15403. Epub 2021 Jul 21. PMID: 34216173.

Sasaki T, Saito H, Hiradate Y, Hara K, Tanemura K. Behavioural effects in mice orally exposed to domoic acid or ibotenic acid are influenced by developmental stages and sex differences. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021 Jun 18;558:175-182. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.04.080. Epub 2021 Apr 28. PMID: 33932777.

Ideta-Otsuka M, Miyai M, Yamamoto N, Tsuchimoto A, Tamura H, Tanemura K, Shibutani M, Igarashi K. Development of a new in vitro assay system for evaluating the effects of chemicals on DNA methylation. *J Toxicol Sci.* 2021;46(2):83-90. doi: 10.2131/jts.46.83. PMID: 33536392.

Makino Y, Hiradate Y, Umezu K, Hara K, Tanemura K. Expression and Possible Role of Nicotinic Acetylcholine Receptor ϵ Subunit (AChRe) in Mouse Sperm. *Biology (Basel).* 2021 Jan 11;10(1):46. doi: 10.3390/biology10010046. PMID: 33440720; PMCID: PMC7826850.

2. 学会発表

倉田笙平、小塩健介、高森広典、梅津康平、平館裕希、原健士朗、種村健太郎「ブタ精子機能に対する GABA 影響解析」日本畜産学会第 127 回大会(2020.3.25-28)、京都府

酒井和哉、原健士朗、種村健太郎「精巢毒性モデルマウスにおける精子エピゲノム影響評価」第 42 回日本分子生物学会年会(2019.12.3-6)、博多市

影山恵理、沼邊孝、種村健太郎、原健士朗「ウシ精巢の対外培養における PDMS 製カバーの有用性」第 126 回日本畜産学会大会(2019.9.17-20)、盛岡市

牧野優誠、平館裕希、矢内凜、齊藤洋克、原健士朗、種村健太郎「ニコチン型アセチルコリン受容体シグ

ナルを利用したマウス精子機能の調節」第 112 回日本繁殖生物学会大会(2019.9.2-5)札幌市

倉田笙平、平館裕希、梅津康平、原健士朗、種村健太郎「 γ -アミノ酪酸(GABA)を利用した精子機能制御法の開発に資する研究」第 112 回日本繁殖生物学会大会(2019.9.2-5)札幌市

矢内凜、平館裕希、原健士朗、藤井渉、佐原成彦、種村健太郎「タウ欠損マウスを用いた精子におけるタウ類似タンパクの発現様式」第 112 回日本繁殖生物学会大会(2019.9.2-5)札幌市

梅津康平、平館裕希、原健士朗、種村健太郎「ウシ精子を卵母細胞に導く走化性因子の特定」第 112 回日本繁殖生物学会大会(2019.9.2-5)札幌市

Hirokatsu Saito, Kenshiro Hara, Takashi Tominaga, Kinichi Nakashima, Kentaro Tanemura 「Early-life exposure to low levels of permethrin exerts impairments in learning and memory associated with glial cell disturbance in adult male mice」the 15th IUTOX International Congress of Toxicology (ICTXV) (2019.7.15-18)ホノルル

種村健太郎「非侵襲的な早期精巣毒性バイオマーカーとしての精子エピゲノム影響評価」第 38 回日本アンドロロジー学会学術大会(2019.6.21-22)大阪府

種村健太郎、北嶋聡、菅野純「低用量科学物質の周産期ばく露による情動認知行動毒性～子どもの毒性額にむけた評価系開発の現在～」第 46 回日本毒性学会学術年会(2019.6.26-28)徳島市

種村健太郎、北嶋聡、菅野純「発生期マウスへの神経シグナル異常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～」第 46 回日本毒性学会学術年会(2019.6.26-28)徳島市

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一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 α 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

菅野純、北嶋聡、相崎健一、齊藤洋克、種村健太郎、肺の遺伝子発現応答と毒性機序予測解析、第48回日本毒性学会学術年会(2021.7.9)

齊藤洋克、北嶋聡、菅野純、種村健太郎、低用量化学物質の発生-発達期ばく露による成熟後の神経行動毒性の検出と評価-発生-発達期マウスへのネオニコチノイド系農薬ばく露影響解析を中心に-、第48回日本毒性学会学術年会(2021.7.9)

富永貴志、種村健太郎、富永洋子、膜電位感受性色素(VSD)による全神経回路活動計測の開発:海

馬スライス標本へのビスフェノールA関連物質の急性投与、第48回日本毒性学会学術年会(2021.7.9)

佐々木貴熙、長谷川彩乃、酒井和哉、平舘裕希、原健士朗、Jahidul ISLAM、野地智法、種村健太郎、アセフェートの発生-発達期慢性ばく露による成熟後のマウス行動影響と腸内細菌叢の解析第48回日本毒性学会学術年会(2021.7.9)

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

**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 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)を学習用データとして用いた。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。R1 元年度は既存の情報から、パラメータに適した VS 項目の抽出や重み付け設定の参考になり得る情報の収集を実施した。また ATVSS の定義に利用可能なアルゴリズムを調査し、有望なアルゴリズムとして、代表的な畳み込みニューラルネットワーク(Convolutional Neural Networks, CNN)モデルである ResNet34 (arXiv:1512.03385)と異常検知によく使われる AutoEncoder(AE)を選択した。R2 年度に CNN モデルを用いて予測性能評価を行なった結果、総合的な正答率は 93%と期待より低いものであった。R3 年度は、AE モデルを用いて予測性能評価を行なった結果、正答率は 97%と CNN モデルの性能を上回った。本分担研究では、心電図などの一次元の単一データを用いて各種ニューラルネットワークモデルの性能を検討してきたが、最終目標である「概略の致死量」を推定するための ATVSS を「定義」するためには、一次元データのみならず、二次元データ(画像、動画など)を含む、複数のバイタルサインデータ群を統合評価する必要があると考えられる。この統合評価については、研究計画立案当初に想定していた数理的な評価式よりも、各バイタルサインデータで学習した AE などのニューラルネットワークモデルを複数個、融合させるアンサンブル学習(Ensemble learning)のほうが汎用性が高く、尚且つ高性能と予想される。今後引き続き整備を進める新規急性経口投与毒性試験プロトコルは、ATVSS を計算するために必要なバイタルサインの種類や測定精度を指定するだけで、測定機器や試験施設を限定しない、柔軟で実用的なものであるべきで、そのためにはデータサイエンスの専門家でなくともデータ測定、学習、予測といった高度な解析処理が可能な解析計算システムを設計、構築するのが肝要と考えられる。

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 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)、arff 形式データの処理ライブラリとして arff2pandas(ver.1.0.1)、汎用データ処理ライブラリとして Pandas(ver.1.1.5)、numpy(ver.1.19.4 若しくは ver.1.19.5)、データ可視化ライブラリとして 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) 或いは Google Colaboratory を使用した。

R2 年度は、代表的な畳み込みニューラルネットワーク(CNN: Convolutional Neural Networks)モデルである ResNet34(arXiv:1512.03385)を用いて検討を行なった。R3 年度は異常検知によく使われる AutoEncoder ニューラルネットワークモデルを用いて検討を行なった。

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 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。

R2 年度は、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。

R3 年度は、CNN の評価と同様に AE を用いて学習に用いなかった心電図データに対して、判別予測を実行した結果、正答率は 0.972 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0.99、再現率0.95 で、異常拍動レコードに対しては同 0.95/0.99 であった。

CNN model 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	

AE model accuracy		0.972		
	precision	recall	f1 score	
正常拍動	0.99	0.95	0.97	
異常拍動	0.95	0.99	0.97	

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、CNN または AE 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の判別性能評価を実施した。CNN モデルでは、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。

AE モデルは予測性能において CNN モデルの性能を上回った。原因が学習用の異常拍動データ数が少なく CNN モデルとしては十分な学習が出来なかったためとはいえ、特に CNN モデルでの成績が悪かった異常拍動予測については、AE の圧勝であり、異常検知における AE モデルの優位性が明らかになった。これは正常データのみで学習可能である、つまり学習過程で異常データを必要としないという AE の特性によるものであり、複雑な判別(クラス分け)を必要としない指標の予測処理においては極めて有効な手法であることが確認された。

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 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。

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 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、CNN モデルよりも AE モデルによる評価方法が、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

Taquahashi Y, Tsuruoka S, Morita K, Tsuji M, Suga K, Aisaki K and Kitajima S, A novel high-purity carbon-nanotube yarn electrode used to obtain biopotential measurements in small animals: flexible, wearable, less invasive, and gel-free operation, *Fundam Toxicol, Sci.* 2022, 9(1),17-21 doi.org/10.2131/fts.9.17

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]

Ono R, Yasuhiko Y, Aisaki KI, Kitajima SI, Kanno J, Hirabayashi Y Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing. *Commun Biol.* 2019, 2, 57.

2. 学会発表

小野 竜一、相崎 健一、北嶋聡、菅野 純、Percellome プロジェクトから見えてきたエピジェネティクス影響、第 46 回日本毒性学会学術年会 (2019.6.26.)

菅野 純、北嶋聡、相崎 健一、小野 竜一、Percellome トキシコゲノミクスのエピジェネティクス基盤 —「新型」反復曝露試験の解析—、第 46 回日本毒性学会学術年会 (2019.6.28.)

夏目 やよい、相崎 健一、北嶋聡、Samik GOSH, 北野 宏明、水口 賢司、菅野 純、Garuda プラットフォームによる多角的毒性予測、第 46 回日本毒性学会学術年会 (2019.6.28.)

Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, Jun Kanno, Cross Talks among PPARa,

SREBP, and ER Signaling Pathways in the Side Effect of Valproic Acid、IUTOX 15th International Congress of Toxicology (ICT 2019) (2019.7.16.)

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura, The Concept of “Signal Toxicity” for the Mechanistic Analysis of So-Called Low Dose Effect and Delayed Effect after Perinatal Exposure、IUTOX 15th International Congress of Toxicology (ICT 2019) (2019.7.17.)

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核影響評価、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

夏目 やよい、相崎 健一、北嶋 聡、Samik GHOSH、北野 宏明、水口 賢司、菅野 純、PPAR α リガンドの比較毒性オミクス、第 48 回 日本毒性学会学術年会(2021.7.7)

菅野 純、相崎 健一、小野 竜一、北嶋 聡、毒性 Omics と AI による慢性毒性予測、第 48 回 日本毒性学会学術年会(2021.7.7)

相崎 健一、小野 竜一、菅野 純、北嶋 聡、トランスクリプトミクスから見た発癌物質の特性、第 48 回 日本毒性学会学術年会(2021.7.8)

菅野 純、高木 篤也、相崎 健一、北嶋 聡、異物発癌に関わるトランスクリプトミクス特性、第 48 回 日本毒性学会学術年会(2021.7.8)

菅野 純、北嶋 聡、相崎 健一、齊藤 洋克、種村 健太郎、肺の遺伝子発現応答と毒性機序予測解析、第 48 回 日本毒性学会学術年会(2021.7.9)

J. Kanno, K.I.Aisaki, R.Ono, S.Kitajima, Analysis of murine liver mRNA expression, DNA methylation, and histone after repeated exposure to chemicals, EUROTOX2021(2021.9.29)

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
Taquahashi Y, Tsuruoka S, Morita K, Tsuji M, Suga K, Aisaki K and Kitajima S	A novel high-purity carbon-nanotube yarn electrode used to obtain biopotential measurements in small animals: flexible, wearable, less invasive, and gel-free operation	Fundam Toxicol, Sci	9(1)	17-21	2022
Kawahara T, Kanouchi M, Naniwa Y, Koyago M, Numabe T, Mizutani K, Tanemura K, Hara K.	Persistence of undifferentiated spermatogonia in aged Japanese Black cattle.	Anim Sci J.	92(1)	e13572	2021
Ogasawara S, Ezaki M, Ishida R, Sueyoshi K, Saito S, Hiradate Y, Kudo T, Obara M, Kojima S, Uozumi N, Tanemura K, Hayakawa T	Rice amino acid transporter-like 6 (OsATL6) is involved in amino acid homeostasis by modulating the vacuolar storage of glutamine in roots.	Plant J.	107(6)	1616-1630	2021

別添 4

Sakai K, Hiradate Y, Hara K, Tanemura K	Potential of sperm small non-coding RNAs as biomarkers of testicular toxicity in a doxorubicin-induced mouse model.	Biochem Biophys Rep.	22:28	101160.	2021
Umezu K, Kurata S, Hara K, Tanemura K	Caffeine induces sperm detachment from sperm head-to-head agglutination in bull.	Biochem Biophys Res Commun.	12:562	105-111	2021
Taquahashi Y, Saito H, Ku wagata M, Kitajima S	Development of an inhalation exposure system of a pressurized metered-dose inhaler (pMDI) formulation for small experimental animals	Fundam Toxicol, Sci.	8(6)	169-175	2021
Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Maeno A, Ohnuki A, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Taqahashi Y, Kanno J, Hirose A, Nakae D	Histological sequence of the development of rat mesothelioma by MWCNT, with the involvement of apolipoproteins	Cancer Sci.	112(6)	2185-2198	2021
Makiko Ku wagata, Takuro Hasegawa, Hiromasa Takashima, Makiko Shimizu, Satoshi Kitajima, Hiroshi Yamazaki	Pharmacokinetics of primary metabolites 5-hydroxythalidomide and 5'-hydroxythalidomide formed after oral administration of thalidomide in the rabbit, a thalidomide-sensitive species.	J Toxicol Sci.	46	553-560	2021

別添 4

Toshime Igarashi, Yukuto Yasuhiko, Ryuichi Ono, Erika Tachihara, Miki Uchiyama, Atsuya Takagi, Yu Takahashi, Makiko Kuwagata, Satoshi Kitajima	Diverse unintended on-target mutations induced by zygote genome-editing using CRISPR/Cas9 system.	Fundam. Toxicol. Sci.	8	161-167	2021
Sasaki T, Saito H, Hiradate Y, Hara K, Tanemura K	Behavioural effects in mice orally exposed to domoic acid or ibotenic acid are influenced by developmental stages and sex differences.	Biochem Biophys Res Commun.	18:558	175-182	2021
Ideta-Otsuka M, Miyai M, Yamamoto N, Tsuchimoto A, Tamura H, Tanemura K, Shibutani M, Igarashi K.	Development of a new in vitro assay system for evaluating the effects of chemicals on DNA methylation.	J Toxicol Sci.	46(2)	83-90	2021
Makino Y, Hiradate Y, Umezu K, Hara K, Tanemura K.	Expression and Possible Role of Nicotinic Acetylcholine Receptor ϵ Subunit (AChRe) in Mouse Sperm.	Biology (Basel).	11:10(1)	46	2021
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

別添 4

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, Imura Y, Goda Y,	Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat lungs after inhalation of 1- μ m ciclesonide aerosol by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging	Int. J. Pharm	Epub		2021
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 CCl ₄ .	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
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
Umez u 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

別添 4

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
---	--	----------	----------	----------	------