

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による急性毒性試験の判定基準策定と  
代替法に資する研究-診断学と AI による致死性予測と  
人道的エンドポイントの設定-  
(22KD1004)

令和 5 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高橋祐次

令和 6(2024)年 5 月

## 研究報告書目次

I.	<b>総括報告書</b>		
	バイタルサインの統合的評価による急性毒性試験の判定基準策定と代替法に資する研究-診断学とAIによる致死性予測と人道的エンドポイントの設定-		
	高橋 祐次	.....	1
II.	<b>分担研究報告書</b>		
1.	バイタルサインセンサーの開発及び研究統括	.....	11
	高橋 祐次		
2.	急性毒性試験における遺伝子発現変動解析		
	北嶋 聡	.....	17
3.	急性毒性における行動解析		
	種村 健太郎	.....	24
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	.....	29
5.	脳波解析による神経毒性予測		
	鈴木 郁郎	.....	33
III.	<b>研究成果の刊行に関する一覧表</b>		
IV.	<b>倫理審査等報告書の写し</b>		

バイタルサインの統合的評価による急性毒性試験の判定基準策定と代替法に資する研究  
-診断学と AI による致死性予測と人道的エンドポイントの設定-

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 動物管理室長

研究要旨

本研究の目的は、Reduction と Refinement によりヒトの安全性確保に主眼を置いた新規急性経口投与毒性試験方法の開発である。近年の情報技術の果実であるウェアラブルデバイスは、バイタルサインの取得を容易とし人の健康管理に利用されている。先行研究の成果により小動物でもその可能性が見出された(Taquahashi 2022)。本研究は【1】バイタルサイン測定器の更なる改良を進め、【2】*in vitro* 急性毒性試験代替法にて外れ値を示す化合物を動物に投与しバイタルサインを取得、【3】タンパク結合率測定と予測、【4】AI によるバイタルサインの統合的評価と致死性予測を目的とする。この結果、【5】人の中毒治療に利用可能な情報取得、【6】急性毒性試験の「人道的エンドポイント」として利用することで動物福祉を充足することが可能となり、また、【7】*in vivo*と *in vitro*のギャップを埋める情報が得られることから、代替法の開発に寄与できる。

バイタルサインセンサーの開発においては、新素材であるカーボンナノチューブヤーン(CNT-Y)を表面電極として使用し、イソフルラン麻酔下でヘアレスラットから心電波形(ECG)及び脳波(EEG)を測定が可能となっているが、CNT-Yは半田付ができないため、ラットに装着するプリント基板(15mm角)との接続方法を検討した結果、微小ナット及びネジにCNT-Yを巻き付けて接続する方法を考案した。化学物質とタンパク質の結合モデルの構築では、予測性を向上させるため *in vitro* 急性毒性試験代替法において予測性の低い6種類の検体(ジゴキシン、カフェイン、フタル酸ジエチル、フタル酸ジブチル、5-アミノサリチル酸、ニコチン)についてラット血漿タンパク結合率を測定した。急性毒性試験における遺伝子発現変動解析については、4,4'-Dihydroxybiphenyl(4,4'-D)の肝プロファイルデータについてインフォマティクス解析を進め、独自に開発した解析プログラム Percellome Explorer により、4,4'-Dと類似した反応を惹起する227の化学物質のリストを抽出した。各化学物質において共通して発現した遺伝子群からはタンパク質変性の亢進が示唆された。急性毒性試験における行動解析については、ICRマウスを使用し非侵襲的な新規バイタルサインの候補として、ホームケージ活動量測定装置による行動様式の解析と超音波測定装置による超音波発声解析の測定を試みた。その結果、アセフェート(300 mg/kg)では投与10分後にかけて活動量の上昇が認められたが、その後急激に活動量が低下しその状態が継続した。また、ニコチン(50mg/kg)投与群において、投与10分後にかけて活動量の上昇が認められたが、その後30分後にかけて活動量の低下が認められた。無水カフェイン(300 mg/kg)投与群については投与12時間後まで活動量の亢進が認められたが、投与500分後以降は、ほぼ正常な昼夜リズムが認められた。なお、超音波測定装置による超音波発声解析を行ったが、いずれの群においても超音波発声は確認に至らず、また約20 Hzの音に対する反応も見られなかった。バイタルサインの統合的解析方法(ソフトウェア)の開発においては、時系列データ、特にECGのような繰り返しパターンのある波形データの解析に有用なMatrix Profile(MP)アルゴリズムを適用して、アミトリプチリン塩酸塩を投与したラットのEEGの解析を行った。その結果、MP解析は、緩やかな変化には反応しなかったが、局所的な心拍異常や、ほぼ心停止状態の心電図異常について検知し

た。また、処理速度も十分高速であり、急性毒性試験実施中のリアルタイムの致死性予測システムに実装できる可能性が高いと考えられた。脳波解析による神経毒性予測では、アミトリプチリン塩酸塩及びアトロピン硫酸塩を投与したラットの EEG について、FFT (Fast Fourier Transform) による PSD (Power Spectral Density: パワースペクトル密度) 解析と、独自に開発した解析手法である脳波バースト解析 (特許取得済) を用いて評価した。その結果、PSD 解析では、アミトリプチリン塩酸塩投与により PSD のピーク値が減弱する傾向を捉えることができた。脳波バースト解析では、アミトリプチリン塩酸塩では、低周波数帯域では Oscillation rate が増加し、高周波数帯域では Oscillation rate が減少する特徴が観察され、アトロピン硫酸塩では Oscillation rate の増加が観察され、低周波数帯域では Burst rate が減少し、高周波数帯域では Burst rate が顕著に増加する特徴が用量依存的に捕らえることができた。以上のことから、データ取得の方法については改善する必要があるものの得られたデータを用いてバイタルサインの統合的評価による致死性予測が評価法としての可能が示された。

## 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
鈴木郁郎	東北工業大学大学院 工学研究科電子工学専攻 教授

## 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。近年の情報技術の果実であるウェアラブルデバイスは、バイタルサイン (VS) の取得を容易とし人の健康管理に利用されている。先行研究の成果により小動物でもその可能性が見出された (Taquahashi et al., Fundam. Toxicol. Sci. 2022)。本研究は【1】バイタルサイン測定装置の更なる改良を進め、【2】*in vitro* 急性毒性試験代替法にて外れ値を示す化合物を動物に投与しバイタルサインを取得、【3】化学物質の体内動態に資する情報として血漿タンパク結合率測定と予測、【4】AI によるバイタルサインの統合的評価と致死性予測を目的とする。この結果、【5】人の中毒治療に利用可能な情報取得、【6】急性毒性試験 (ATS) の「人道的エンドポイント」として利用することで動物福祉を充足することが可能となり、【7】*in vivo* と *in vitro* のギャップを埋める情報が得られることから、代替法の

開発に寄与できる。

被験物質は、ICCVAM (2006) の急性毒性試験代替法の開発で使用された 72 化合物の中で、*in vitro* 細胞毒性から LD<sub>50</sub> の予測において外れ値を示した 22 物質のうち入手可能な 17 化合物 (ジゴキシン、ブスルファン、シクロヘキシミド、1-フェニル-2-チオ尿素、ジスルホトン、シアン化カリウム、硫酸タリウム、ベラパミル塩酸塩、カフェイン、パラオキシ安息香酸プロピル、フタル酸ジエチル、フタル酸ジブチル、5-アミノサリチル酸、フェノバルビタールナトリウム、ニコチン、ジゴキシン、L-アドレナリン) について検討を行なう。また、先行研究で使用され背景データがあるアセフェート、ジヒドロキシビフェニル、DTBHQ、アミトリプチリン、テトロドトキシン (TTX) についても検討する計画である。

## B. 研究方法

### B-1 バイタルサインセンサーの開発 (高橋)

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 (Siddarmark LLC) を使い、バイタルサイン測定のための電極として利用について検討した。CNT ヤーン (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) を用いて単結紮した状態で使用した。動物は、ラット (ヘアレスラット、HWY/SIc) を使用した。ラットの飼育は、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 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。

イソフルラン麻酔下でヘアレスラットの頭部から背部にかけて皮膚 5箇所(縫合針を用いて CNT-Y を結紮し、心電波形(ECG)測定用電極として 3箇所(左耳介基部、頸部、腰部)、脳波(EEG)測定用電極として 2箇所(プレグマ、右耳介基部)から電位を測定した。動物は麻酔による対応低下を防止するため、麻酔措置に付属のヒータで加温した状態で作業を行った(AD-5000 Digita; Anesthesia System, EZ systems)。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。CNT-Yを通して取得した信号は、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。

電極を装着後、イソフルラン麻酔濃度を 1%とし、平常時の生体電位測定を行なうと共に、三環系抗うつ薬の一つであるアミトリプチリン塩酸塩(富士フィルム和光純薬)及びアトロピン硫酸塩(富士フィルム和光純薬)を腹腔内投与し、心電波形及び脳波への影響を観察した。アミトリプチリンは神経終末におけるノルアドレナリン及びセロトニンの再取り込みを阻害することで心臓及び脳神経に作用する。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モニターした。

## **B-2 タンパク結合率測定(高橋、研究協力者:山本)**

毒性予測にトキシコキネティクス(TK)の情報は極めて有用であるが、一般化学物質では費用の面から TK の実施は難しく情報は限定的である。本研究では、化合物のタンパク結合率の情報を得ることで、*in vivo*と *in vitro*のギャップを埋め TKに資する情報を得ることを目的としてタンパク結合率の測定並びに予測を行なう。医薬品に比較して、一般化学物質の血漿タンパク質結合率の情報は極めて少ないため、予測性を向上させるため *in vitro* 急性毒性試験代替法において予測性の低い 6種類の検体(ジゴキシン、カフェイン、フタル酸ジエチル、フタル酸ジブチル、5-アミノサリチル酸、ニコチン)についてラット血漿タン

パク結合率を測定した。測定方法は、平衡透析法とし、各被験物質の濃度は 1000 nM 及び 10 nM の 2ポイント、LC-MS/MSにより濃度測定を行った。

## **B-3 急性毒性試験における遺伝子発現変動解析(北嶋)**

急性毒性発現時の海馬、肺及び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する。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、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)による網羅的遺伝子発現解析を行なった。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について既に関済済みの波面解析等を用いた教師無しクラスター解析を行なった。モデル物質として、4,4'-Dihydroxybiphenyl (CAS No: 92-88-6,富士フィルム和光純薬)を用いた。R4 年度に 5%MC を溶媒として 0、7、20 及び 70 mg/kg の用量でマウスに投与し、mRNA サンプルについて、肝を解析した結果、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、折りたたみ不全タンパク質反応、酸化ストレス応答転写因子、糖質コルチコイド受容体シグナルが抽出されてきた。R5 年度は、さらにインフォマティクス解析を進めた。

## **B-4 急性毒性試験における行動解析(種村)**

急性毒性試験における行動解析については成熟雌 ICR マウスを使用し、急性経口毒性発現時に動物が呈する行動様式(移動量、移動様式、痙攣、流涎、瞬目)への影響、赤外線サーモグラフィによる体表温度の変化、超音波測定装置による超音波発声(USVs: ultrasonic vocalizations)、顔面の動き、等を計測し、非侵襲的なバイタルサイン(VS)としての利用について検討した。モデル化合物として、アセフェート(300 mg/kg)、ニコチン(50 mg/kg)及び無水カフェイン(300 mg/kg)を用いた。

## **B-5 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)**

VS の統合的評価による急性毒性試験の判断基準として用いる VS データとして想定される測定項目としては、血圧やパルスオキシメーターによる SpO2、

心電図などの、時系列データが想定される。本年度は、評価用 VS データとして、B-1 の手法にてイソフルラン麻酔下、平常状態及びアミトリプチリン塩酸塩 50mg/kg の投与前後のヘアレスラット(HWY/Slc)の心電図データを用いた。異常検知に利用し得る人工知能等の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.3.9.1)を使用した。汎用データ処理ライブラリとして Numpy (ver.1.19.5)、Pandas(ver.1.2.1)、データ可視化ライブラリとして Matplotlib (ver.3.3.4)を使用した。また Matrix Profile アルゴリズムの実装ライブラリとして matrixprofile (ver.1.1.10)を導入した。Python スクリプト実行環境としては Jupyter Lab(ver. 4.0.9)を使用した。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。

#### **B-6 脳波解析による神経毒性予測(鈴木)**

脳波データとして、B-1 にて取得したイソフルラン麻酔下のラットにアミトリプチリン塩酸塩及びアトロピン硫酸塩を投与したデータを用いた。脳波データは、被験物質投与前、投与後等の Section で分割し、FFT(Fast Fourier Transform)による PSD(Power Spectral Density : パワースペクトル密度)を各 Section で算出した。算出された PSD のピーク値および、ピーク周波数を定量化し、各 Section を比較することで被験物質投与による脳波信号の変化を評価した。各セクションは以下の通り;①アミトリプチリン塩酸塩 A:投与前の 4 分、B~H 投与後 4 分毎に分割されたセクション、②アトロピン硫酸塩 A:投与前の約 8 分、B:投与後 16 分、C:イソフルラン麻酔 Off。また、脳波データに対してバースト解析を実施する独自の解析手法(特許第 7138995 号)を用いることで、脳波データから神経活動信号に関する複数の解析パラメータを算出した。これらの解析パラメータは複数の周波数帯域でそれぞれ算出可能なため、被験物質に対する脳波信号の周波数依存的な変化を評価することができる。

#### **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**

イソフルラン麻酔下(1%)にて、CNT-Y を動物の皮膚に単結紮して生体電位測定を行なった結果、明確な心電図波形(ECG)が得られた。この条件において、アミトリプチリン塩酸塩(50mg/kg)及びアトロピン硫酸塩(5及び50mg/kg)を腹腔内投与して EEG と ECG を測定し、得られたデータを解析ソフトウェア開発(分担研究者 相崎)と脳波解析(分担研究者 鈴木)に供した。また、CNT-Y を用いて非拘束にて EEG と ECG を測定するためのトランスミッター及びレシーバーを開発中である。CNT-Y は半田付ができないため、ラットの頭部に乗せるサイズのプリント基板(15 mm×15 mm×0.8 mm)と CNT-Y との接続方法を検討した結果、微小のナットとネジを基板側に装着し、CNT-Y をネジに巻き付ける方法を採用することにした。

#### **C-2 タンパク結合率測定**

測定したいずれの化合物においても、蛋白結合率は 10%を超えることはなく非常に低かった。ニコチンの測定はできなかった。プラスチックの可塑剤として使用されているフタル酸ジエチル及びフタル酸ジブチルはプラスチック製品由来の夾雑成分がブランクから検出されることから、MS 測定の濃度域ではバックグラウンドが非常に高く、測定が困難であった。加えて、血漿中のエステラーゼによって分解された可能性も考えられた。

#### **C-3 急性毒性試験における遺伝子発現変動解析**

4,4'-D と類似した反応を示すデータを、独自に開発した PercellomeExplorer プログラムにより Percellome データベース全体と網羅的に比較解析した。382 通りの試験データベース中、227 の肝プロファイルデータについて、4,4'-D と類似した反応を惹起する化学物質のリストが生成された。類似反応を惹

起する化学物質として、高順位のものとしてはインデゴや硫酸アンモニウムアルミニウムなどが抽出されてきたが概して類似度は低かったが、各化学物質と共通して発現する遺伝子群からは、特にタンパク質の変性が亢進が示唆されていた。この解析結果は、昨年度実施した 4,4'-D 単独の解析結果を支持するものである。

#### **C-4 急性毒性試験における行動解析**

アセフェート(300 mg/kg)投与群において、投与 10 分後にかけて活動量の上昇が認められたが、その後 30 分後にかけて 急激な活動量の低下が認められ、投与 60 分後以降から 500 分後まではほぼ活動量は認められなかった。また、ニコチン(50 mg/kg)投与群において、投与 10 分後にかけて活動量の上昇が認められたが、その後 30 分後にかけて 活動量の低下が認められたが、コントロール群と比較して、それらは低いものであった。無水カフェイン(300 mg/kg)投与群については投与 12 時間後まで活動量の亢進が認められたが、投与 500 分後以降は、ほぼ正常な昼夜リズムが認められた。なお、超音波測定装置による超音波発声解析を投与開始 4 時間後と 20 時間後に行ったが、約 20 Hz の音に対する反応性も含めて、いずれの群においても超音波発声は確認に至らなかった。

#### **C-5 バイタルサインの統合的解析方法(ソフトウェア)の開発**

麻酔下・平常状態での心電図データと、脳及び心臓に作用する三環系抗うつ薬の一つであるアミトリプチリン塩酸塩の投与後、経時的に測定した心電図データについて、特に心電図のような繰り返しパターンのある波形データの解析に有用な Matrix Profile (MP) アルゴリズムの性能評価や要件検討を実施した。具体的には、ラベル付加や正規化などの前処理を適用していない、25 秒間(サンプリング周波数 2kHz)なのでデータ点数 50,000)若しくは 2.5 秒間(同、データ点数 5,000)に切り分けた心電図データについて、昨年度の最適条件検討を元に、事前のベースライン調整や正規化を行わず、唯一、部分データのサイズ(周期的に出現するパターンのサイズ)のみを指定して MP 解析を実行した。

アミトリプチリン塩酸塩は徐々に心電図の基本波形の変化や心拍数の低下を引き起こし、最終的には T 波の増高が顕著になる。MP 解析は、全体的な波

形異常は検出していないが、局所的な心拍異常については検知することができた。この解析に使用した PC は Windows10、第 7 世代 Intel Core m3、RAM8GB、SATA-SSD という 2024 年現在においては旧型の PC 環境であるが、MP 解析の処理時間を計測したところ、データ点数 50,000 の処理に約 5 秒、データ点数 5,000 の処理に約 1 秒を要した。これは使用した PC 性能を考慮すると、十分高速であり、急性毒性試験実施中のリアルタイムの致死性予測に寄与する可能性が高い。

#### **C-6 脳波解析による神経毒性予測(鈴木)**

FFT による PSD を算出した結果、投与前の EEG ではピーク値 0.088 V<sup>2</sup>/Hz、ピーク周波数 2 Hz であった。アミトリプチリン塩酸塩投与では、ピーク周波数は 2 Hz であったが PSD のピーク値が時間経過と共に減弱する傾向が観察された。一方、アトロピン硫酸塩投与においては、ピーク周波数は 2 Hz であり、PSD のピーク値についても影響が見られなかった。

脳波データに対するバースト解析手法を用いて、神経信号であるスパイクおよび、高頻度神経活動であるバーストを検出し、それぞれの頻度(Oscillation rate, Burst rate)を算出した。脳波信号はバンドパスフィルタにより、 $\theta$  波帯域(5-8 Hz)、 $\alpha$  波帯域(8-14 Hz)、 $\beta$  波帯域(15-25 Hz)、 $\gamma$  波帯域(30-50 Hz)、high- $\gamma$  波帯域(70-150 Hz)および、150-200 Hz に分割し、各周波数帯域でバースト解析を実施した。

アミトリプチリン塩酸塩 50mg/kg 投与では、 $\theta$ 、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  波帯域で、投与後の Section C で Oscillation rate が増加し、Section D で減少した。High- $\gamma$ 、150-200 Hz では、投与後 Section B から Oscillation rate が減少した。High- $\gamma$  波帯域で Burst rate が投与後 Section C にかけて上昇した。150-200 Hz では投与後 Section B から Burst rate が減少した。

アトロピン硫酸塩 5mg/kg 投与では、 $\theta$ 、 $\alpha$ 、 $\gamma$ 、high- $\gamma$  波帯域で、投与後に Oscillation rate が増加した。また、 $\theta$ 、 $\alpha$ 、 $\beta$  波帯域で、Atropine 投与後に Burst rate が顕著に減少したのに対して、 $\gamma$ 、high- $\gamma$ 、150-200 Hz では Burst rate が上昇した。

アトロピン硫酸塩 50mg/kg 投与では、すべての周波数帯域で、投与後に Oscillation rate が顕著に増加した。 $\gamma$ 、high- $\gamma$ 、150-200 Hz では Burst rate が顕著に上昇した。

## D. 考察

本研究では、CNT-Y を表面電極として用いて EEG 及び ECG を測定している。電極は体内に埋め込む方法に比較して、簡便で動物への侵襲性が極めて低いため、急性毒性試験のバイタルサイン測定においては極めて有用性が高いと考えられる。その一方で、本研究で得られる ECG は一般的な波形とは異なる。本研究は最終的に動物を拘束しない状態で測定可能な装置として開発するため、動物の口が届かない背部に電極を装着している。そのため、心臓に伝わる電気信号を、腹部と水平な面にプロットする一般的な双極誘導心電図 (I, II, III) とは異なる波形であると考えられる。

また、本研究の EEG は、表面電極により信号を取得している。現在、論文で報告されている EEG は脳内に刺入した金属電極により信号を取得しており、脳神経の活動電位が発生する場所の近傍の情報である。本研究で得られた EEG は、脳神経の活動電位が大脳皮質、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 EEG とは異なる特性を有するため、その特性を明らかにすると共に適切な解析方法を検討する必要がある。

血漿中のタンパク結合率測定においては、何れも極めて低い値であった。血漿タンパク結合率が低い場合、血液中でより多くの非結合型が存在するため化学物質の生体影響強く表れる可能性がある。その一方で、腎臓や肝臓で迅速に代謝されるため半減期が短くなる。In vitro 急性毒性試験は、細胞毒性を評価するため、digoxin、caffeine、nicotine のように生体内で特定の受容体等に結合して生体影響を発現する物質は評価できないが、加えて血漿タンパク結合率が低いこともそのひとつの要因かもしれない。

急性毒性発現における遺伝子発現変動解析では肝毒性により死亡する 4,4'-Dihydroxybiphenyl の毒性発現メカニズムを明らかにした。4,4'-Dihydroxybiphenyl はラットの急性毒性試験において黄疸を呈し、投与後 2~3 日に死亡する。このような遅発性の急性毒性を引き起こす化学物質に共通して細胞のタンパク質変性が亢進することが毒性発現機序であることが示唆された。

本研究で CNT-Y をセンサーとして使用して測定した ECG ではアミトリプチリン塩酸塩による変化を明確に捉えており、MP アルゴリズムを用いた解析により

異常検知が可能であった。MP 解析は、基本波形の緩やかな変化には反応しなかったが、これは期外収縮のような局所的な不整脈を検出する設定であったためである。また、徐々に変化している状況であっても、孤立性のペース異常といった局所異常を検知できることから、MP アルゴリズムの事前学習を必要としない利点が示された。さらに、EEG もパワースペクトル密度解析及び脳波バースト解析により、その変化を用量依存的に捉えることに成功している。現在は、麻酔下でのデータであるが、覚醒時の脳波データであれば、脳波測定時の一般状態観察および、その他のバイタルサインを指標にして脳波データをラベリングすることで、活動状態に依存した脳波信号の特徴を捉えることができると考えられる。今後、ベンチマークとなる化学物質のデータの蓄積により、急性毒性評価の指標を定めることが可能と考えられる。

## E. 結論

バイタルサインセンサーの開発においては、新素材である CNT-Y を表面電極として使用し、イソフルラン麻酔下でヘアレスラットから ECG 及び EEG を測定し、脳及び心臓に作用する三環系抗うつ薬の一つであるアミトリプチリン塩酸塩及びアトロピン硫酸塩の影響を捉えることに成功した。生体電位を測定する部位及び方法がこれまで報告されている ECG、EEG とは異なる特性を有するため、今後はその特性を明らかにする必要がある。一方、本研究で得られたデータを異常検知解析に供したところ ECG、EEG 共に被検物質投与による影響を明確に検出できた。以上のことから、データ取得の方法については改善する必要があるものの、得られたデータを用いてバイタルサインの統合的評価による致死性予測が評価法としての可能を示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Hojo M, Maeno A, Sakamoto Y, Yamamoto, Taquahashi Y, Hirose A, Suzuki J, Inomata A, Nakae D., Time-Course of Transcriptomic Change in the Lungs of F344 Rats Repeatedly Exposed to a Multiwalled Carbon Nanotube in a 2-Year Test., *Nanomaterials* (Basel). 2023 Jul



19;13(14):2105.

Shimizu M, Hojo M, Ikushima K, Yamamoto Y, Maeno A, Sakamoto Y, Ishimaru N, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Suzuki J, Inomata A, Nakae D., Continuous infiltration of small peritoneal macrophages in the mouse peritoneum through CCR2-dependent and -independent routes during fibrosis and mesothelioma development induced by a multiwalled carbon nanotube, MWNT-7., *J Toxicol Sci.* 2023;48(12):617-639.

Miyauchi A, Akashi T, Yokota S, Taquahashi Y, Hirose A, Hojo M, Yoshida H, Kurokawa M, Watanabe W., Effects of inhalation of multi-walled carbon nanotube (MWCNT) on respiratory syncytial virus (RSV) infection in mice. *J Toxicol Sci.* 2023;48(7):411-420. doi: 10.2131/jts.48.411.

Yokota S, Miyaso H, Hirai T, Suga K, Wakayama T, Taquahashi Y, Kitajima S., Development of a non-invasive method for testicular toxicity evaluation using a novel compact magnetic resonance imaging system., *J Toxicol Sci.* 2023;48(2):57-64. doi: 10.2131/jts.48.57.

Kuwagata M, Tsuboi M, Igarashi T, Tsurumoto M, Nishimura T, Taquahashi Y, Satoshi Kitajima: A 90-day repeated oral dose toxicity study of 2-Butylbenzo[d]isothiazol-3(2H)-one in rats *Fundam. Toxicol. Sci.* 2023; 10: 69-82.

Kuwagata M, Tsuboi M, Igarashi T, Tsurumoto M, Nishimura T, Taquahashi Y, Satoshi Kitajima: A 90-day dose toxicity study of 2-(2H-benzotriazol-2-yl)-6-dodecyl-4-methylphenol in rats *Fundam. Toxicol. Sci.* 2023; 10: 59-68.

Takahashi Y, Wakabayashi R, Kitajima S, Uchiyama H: Epichordal vertebral column

formation in *Xenopus laevis*. *J Morphol*, 2023; jmor.21664

Yokota S, Wakayama T, Miyaso H, Suga K, Fujinoki M, Kaneko S, Kitajima S: Reactive Blue 2 Labels Protamine in Late-Haploid Spermatids and Spermatozoa and Can Be Used for Toxicity Evaluation. *Andrologia*, 2023; 2023:7364862

Pu J, Kofuji S, Okamoto-Uchida Y, Danzaki K, Ruoxing Yu, Suzuki A, Kitajima S, Nishina H: Lethal Phenotype-Based Database Screening Identifies Ceramide as a Negative Regulator of Primitive Streak Formation. *Stem Cells*, 2023; 41(12):1142-1156  
doi.org/10.1093/stmcls/sxad071

Saito H, Yokota S, Kitajima S: Immunohistochemical analysis of the vimentin filaments in Sertoli cells is a powerful tool for the prediction of spermatogenic dysfunction. *Acta Histochem.* 2023; 125(5): 152046.

Hase T, Ghosh S, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J, Kitano H, Yachie A: DTox: A Deep neural network-based in visio lens for large scale Toxicogenomics data *J Toxicol Sci.* 2024;49(3):105-115. doi: 10.2131/jts.49.105.

Sasaki T, Hara K, Tanemura K. Early-life exposure to acephate inhibits sexual development and induces testicular and ovarian toxicity in mice. *Reprod Toxicol.* 2023 Oct;121:108472. doi: 10.1016/j.reprotox.2023.108472. Epub 2023 Sep 16.

Saito H, Furukawa Y, Sasaki T, Kitajima S, Kanno J, Tanemura K. Behavioral effects of adult male mice induced by low-level acetamiprid, imidacloprid, and nicotine exposure in early-life. *Front Neurosci.* 2023 Aug 16;17:1239808.doi:10.3389/fnins.2023.1239808.

Sasaki T, Saito H, Furukawa Y, Tominaga T, Kitajima S, Kanno J, Tanemura K. Exposure to bisphenol A or its phenolic analogs during early

life induces different types of anxiety-like behaviors after maturity in male mice. *J Toxicol Sci.* 2023;48(4):211-219. doi: 10.2131/jts.48.211.

Saito H, Tanemura K, Furukawa Y, Sasaki T, Kanno J, Kitajima S. Behavioral effects induced by the oral administration of acetamiprid in male mice during the postnatal lactation period or adulthood. *J Toxicol Sci.* 2023;48(4):203-210. doi: 10.2131/jts.48.203.

Sakai K, Hara K, Tanemura K. Testicular histone hyperacetylation in mice by valproic acid administration affects the next generation by changes in sperm DNA methylation. *PLoS One.* 2023 Mar 9;18(3):e0282898. doi: 10.1371/journal.pone.0282898.

Hasegawa A, Sasaki T, Islam J, Tominaga T, Nochi T, Hara K, Tanemura K. Effects of early-life tosufloxacin tosylate hydrate administration on growth rate, neurobehavior, and gut microbiota at adulthood in male mice. *J Toxicol Sci.* 2023;48(3):149-159. doi: 10.2131/jts.48.149.

五十嵐智女、西村拓也、北嶋聡：細胞培養食品に係る開発や諸外国の衛生規制に関する最近の動向，月刊「食品衛生研究」，2023；通巻885号（73巻12号），公益社団法人日本食品衛生協会（東京）

齊藤洋克、北嶋聡：化学物質を発生-発達期に曝露した際の情動認知行動影響検出，化学物質と環境：化学物質と環境との調和をめざす情報誌，184，3-6，2024

Ono R, Kuwagata M, Naruse M, Watanabe A, Takano M, Hasegawa T, Takashima H, Yoshioka Y, Ochiya T, Hirabayashi Y, Kitajima S: Extracellular vesicle small RNAs secreted from mouse amniotic fluid induced by repeated oral administration of VPA to pregnant mice. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2024; 11(1): 37-56, doi.org/10.2131/fts.11.37

菅野純、相崎健一、北嶋聡：遺伝子発現を指標とした毒性評価・予測，単行本「化学物質の複合影響

と健康リスク評価」，2024；第2章 複合曝露による毒性の評価手法 第1節，医歯薬出版（東京）[ISBN: 978-4-263-73220-5]

西村拓也、西村次平、伊藤かな子、高橋祐次、医薬品開発における非臨床安全性評価の変遷、*日本獣医師学雑誌*第61号、2024.2.20

## 2. 学会発表

高橋祐次、微粒子毒性の in vivo 吸入毒性試験法と課題－吸入毒性試験ガイドラインの変遷と吸入ばく露実験装置の開発について－日本薬学会第144年会シンポジウム(2024.3.30)

Sato K, Taquahashi Y, Suzuki I. Possible improvement of the increase in non-clinical evaluation predictability by in vivo imaging and MPS-The cases of the CNS seizure risk assessment and drug delivery to the alveoli. 日本薬学会第144年会シンポジウム(2024.3.30)

Taquahashi Y, Morita K, Suga K, Tsuji M, Okubo Y, Aisaki K, Kitajima S, New approach for assessment of acute oral toxicity by multiple parameters of vital signs: development of a less invasive method for measuring biopotential in small laboratory animal using carbon-nanotube yarn as surface electrodes, The 63rd Society of Toxicology Annual Meeting (2024.3.11)

Taquahashi Y, Morita K, Suga K, Tsuji M, Okubo Y, Aisaki K, Kitajima S, Improved acute toxicity study incorporating vital signs: a less invasive method for measuring biopotential in laboratory animal using CNT yarn, 10th International Congress of Asian Society of Toxicology (2023. 6.18)

高橋祐次、森田紘一、辻昌貴、菅康佑、相崎健一、北嶋聡、平林容子、先端素材カーボンナノチューブヤーンを使用した実験用小動物における低侵襲な生体電位測定法の開発，第70回 日本実験動物学会総会(2023.5.24)

北嶋 聡:生命科学のパラダイムシフトと毒性学の進展、第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.19)

菅野純,相崎健一,小野竜一、北嶋 聡、新型反復曝露実験による PFOA の毒性発現分析-Clofibrate の網羅的エピジェネティック情報を参照して、第 50 回日本毒性学会学術年会、(2023.6.19)

Toshime Igarashi, Mari Matsumura, Izumi Ogawa Chiori Yakawa, Takahiko Hayakawa, Miyoko Ochi, Hirokatsu Saito, Takuya Nishimura, Makiko Kuwagata, Satoshi Kitajima, Recent trends in regulatory systems in other countries regarding the safety assurance of new food products including so-called cultured meat 10th International Congress of Asian Society of Toxicology, Taiwan on 17 – 20 July 2023.

Makiko Kuwagata, Hiromasa Takashima, Ryo Haneda, Kanako Tanaka, Takuro Hasegawa, Hi-roshi Yamazaki, Satoshi Kitajima: Possible ter-atogenic effects mediated by seminal plasma ex-posed to thalidomide in rabbits. EUROTOX2023. Ljubljana, Slovenija (2023.9.10-13)

桑形麻樹子、高島宏昌、長谷川拓郎、田中加奈子、羽田亮、山崎浩史、北嶋 聡:ウサギへのサリドマイド経口投与による精漿を介する発生毒性発現リスクの解明. 第 63 回日本先天異常学会学術集会 (2023.7.28-30)

北嶋 聡:トキシコゲノミクスからみた付加体科学、第 1 回付加体科学部会研究会 (2023.9.26)

北嶋 聡:分子メカニズムに依拠した、迅速、高精度、省動物に適った毒性予測法の開発～食品トキシコゲノミクスを例に～、第 9 回 浜松毒性試験フォーラム 基調講演(2023.10.27)

北嶋 聡:職域における環境因子による健康影響～化学物質によるヒト健康への影響評価に関する試験・研究～、第 38 回日本健康科学学会学術大会 (2023.12.2)

佐々木 貴熙、長谷川 彩乃、Islam Jahidul、原 健士朗、野地 智法、種村 健太郎:有機リン系殺虫剤の発達気暴露が脳・腸へ及ぼす影響、第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.19-6.21)

加来 建之、佐々木 貴熙、原 健士朗、種村 健太郎:クロチアニジンの幼若期/思春期/成熟期暴露が及ぼす遅発行動影響とその雌雄差、第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.19-6.21)

張磨 琉亜、原 健士朗、種村 健太郎:Axdnd1 遺伝子欠損により生じる精子形成不全 ～非閉息性無精子症モデルマウスとしての有用性の検討～、第 41 回日本受精着床学会総会・学術講演会 (2023.7.27-7.28)

佐々木 貴熙、齊藤 洋克、古川 佑介、富永 貴志、北嶋 聡、菅野 純、種村 健太郎:Exposure to bisphenol A or its phenolic analogs during early life induces different types of anxiety-like behaviors after maturity in male mice、第 46 回日本神経科学大会 (2023.8.1-8.4)

川邊 悠介、中川 俊徳、山田 紗也、種村 健太郎、嶋 雄一、吉田 松生、原 健士朗:精巣成長に沿ったマウス精子幹細胞でのラミニン発現の拡大とその役割、第 116 回日本繁殖生物学会大会 (2023.9.24-9.27)

張磨 琉亜、金子 尚志、原 健士朗、斎藤 芳郎、種村 健太郎:セレノプロテイン P 翻訳抑制因子:ccdc152 による精子形成への影響解析、第 116 回日本繁殖生物学会大会 (2023.9.24-9.27)

夏目 やよい、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純:PPAR alpha リガンドが惹起する遺伝子発現プロファイルの比較解析. 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.19)

山田 隆志、大畑 秀雄、古濱 彩子、杉山 圭一、本間 正充、瀬川 勝智、斎藤 嘉朗、相崎 健一、北嶋 聡、広瀬 明彦、増村 健一:行政における化学物質リスク評価を支援するAIを用いた安全性予測

プラットフォームの開発. 第 50 回日本毒性学会学術  
年会(2023.6.21)

## **G. 知的財産権の出願・登録状況**

### **1. 特許出願**

高橋祐次、岩本正春、鶴岡秀志、久本 豊、生体信  
号のリアルタイム精密測定方法、2023 年 12 月 18 日  
出願

### **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による急性毒性試験の判定基準策定と代替法に資する研究

・診断学と AI による致死性予測と人道的エンドポイントの設定・

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	安全性生物試験研究センター 毒性部 動物管理室長
研究協力者	山本栄一	国立医薬品食品衛生研究所	医療機器部 部長
研究協力者	鶴岡秀志	Siddarmark LLC	
研究協力者	栗形麻樹子	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部 室長
研究協力者	大久保佑亮	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部 主任研究官
研究協力者	森田紘一	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
研究協力者	辻 昌貴	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
研究協力者	菅 康佑	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部

研究要旨

本研究の目的は、Reduction と Refinement によりヒトの安全性確保に主眼を置いた新規急性経口投与毒性試験方法の開発である。近年の情報技術の果実であるウェアラブルデバイスは、バイタルサインの取得を容易とし人の健康管理に利用されている。先行研究の成果により小動物でもその可能性が見出された (Taquahashi 2022)。本研究は【1】バイタルサイン測定器の更なる改良を進め、【2】*in vitro* 代替法にて外れ値を示す化合物を動物に投与しバイタルサインを取得、【3】化学物質の体内動態に資する情報としてタンパク結合率測定、【4】AI によるバイタルサインの統合的評価と致死性予測を目的とする。この結果、【5】人の中毒治療に利用可能な情報取得、【6】急性毒性試験 (ATS) の「人道的エンドポイント」として利用することで動物福祉を充足することが可能となり、また、【7】*in vivo* と *in vitro* のギャップを埋める情報が得られることから、代替法の開発に寄与できる。バイタルサインセンサーの開発においては、新素材であるカーボンナノチューブヤーン (CNT-Y) を表面電極として使用し、イソフルラン麻酔下でヘアレスラットから心電波形 (ECG) 及び脳波 (EEG) を測定し、脳及び心臓に作用するアミトリプチリン塩酸塩及びアトロピン硫酸塩の影響を捉えることに成功した。生体電位を測定する部位及び方法がこれまで報告されている ECG、EEG とは異なる特性を有するため、その特性を明らかにすると共に適切な解析方法を検討する必要がある。しかしながら、ECG、EEG 共にアミトリプチリン塩酸塩とアトロピン硫酸塩の影響を明確に捉えていることから、ベンチマークとなる化学物質のデータを蓄積することで、急性毒性評価の指標を定めることが可能と考えられた。血漿中タンパク結合率については、*in vitro* 急性毒性試験代替法において予測性の低い 6 種類の検体 (ジゴキシン、カフェイン、フタル酸ジエチル、フタル酸ジブチル、5-アミノサリチル酸、ニコチン) についてラット血漿タンパク結合率を測定した。何れもタンパク結合率は非常に低い値であった。

## 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」による評価に置き換えることを計画している。

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。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。

近年の情報技術の果実であるウェアラブルデバイスは、バイタルサインの取得を容易とし人の健康管理に利用されている。先行研究の成果により小動物でもその可能性が見出された (Taquahashi et al., Fundam. Toxicol. Sci. 2022)。本研究は【1】バイタルサイン測定器の更なる改良を進め、【2】*in vitro* 代替法にて外れ値を示す化合物を動物に投与しバイタルサインを取得、【3】血漿タンパク結合率測定、【4】人工知能 (AI) によるバイタルサインの統合的評価と致死性予測を目的とする。この結果、【5】人の中毒治療に利用可能な情報取得、【6】急性毒性試験の「人道的エンドポイント」として利用することで動物福祉を充足することが可能となり、【7】*in vivo* と *in vitro* のギャップを埋める情報が得られることから、代替法の開発に寄与できる。

被験物質は、ICCVAM (2006) の急性毒性試験代替法の開発で使用された 72 化合物の中で、*in vitro* 細胞毒性から LD<sub>50</sub> の予測において外れ値を示した 22 物質のうち入手可能な 17 化合物 (ジゴキシン、ブスルファン、シクロヘキシミド、1-フェニル-2-チオ尿素、ジスルホトン、シアン化カリウム、硫酸タリウム、ベラパミル塩酸塩、カフェイン、パラオキシ安息香酸プロピル、フタル酸ジエチル、フタル酸ジブチル、5-アミノサリチル酸、フェノバルビタールナトリウム、ニコチン、ジゴキシン、L-アドレナリン) について検討を

行なう。また、先行研究で使用され背景データがあるアセフェート、ジヒドロキシビフェニル、DTBHQ、アミトリプチリン、テトロドトキシン (TTX) についても検討する計画である。

## B. 研究方法

### B-1 バイタルサインセンサーの開発

#### 1. 使用動物:

雌性ヘアレスラット (HWY/Slc) 8~12 週齢を用いた。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 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。

#### 2. 被験物質:

被験物質として三環系抗うつ薬の一つであるアミトリプチリン塩酸塩及びアトロピン硫酸塩 (何れも富士フィルム和光純薬から入手) を用いた。用量は 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 段階を考慮して、本研究では 5 及び 50mg/kg を用いた。

#### 3. 生体電位測定電極

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 (Siddarmark LLC) を用い、バイタルサイン測定のための電極として利用について検討した。CNT ヤーン (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) を用いて単結紮した状態で使用した。イソフルラン麻酔下でヘアレスラットの頭部から背部にかけて皮膚 5 箇所 (左耳介基部、頸部、腰部) に縫合針を用いて CNT-Y を結紮し、心電波形 (ECG) 測定用電極として 3 箇所 (左耳介基部、頸部、腰部)、脳波 (EEG) 測定用電極として 2 箇所 (プレグマ、右耳介基部) から電位を測定した。動物は麻酔による対応低下を防止するため、麻酔措置に付属のヒータで加温した状

態で作業を行った (AD-5000 Digita; Anesthesia System, EZ systems)。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。CNT-Y を通して取得した信号は、AD コンバーター (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。

電極を装着後、イソフルラン麻酔濃度を 1% とし、平常時の生体電位測定を行なうと共にアミトリプチリン塩酸塩を腹腔内投与し、心電波形及び脳波への影響を観察した。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モニターした。

また、動物を非拘束にて EEG と ECG を測定するため、トランスミッター及びレシーバーについて検討を行った。

## B-2 タンパク結合率の測定

毒性予測にトキシコキネティクス (TK) の情報は極めて有用であるが、一般化学物質では費用の面から TK の実施は難しく情報は限定的である。本研究では、化合物のタンパク結合率の情報を得ることで、*in vivo* と *in vitro* のギャップを埋め TK に資する情報を得ることを目的としてタンパク結合率の測定並びに予測を行なう。医薬品に比較して、一般化学物質の血漿タンパク質結合率の情報は極めて少ないため、予測性を向上させるため *in vitro* 急性毒性試験代替法において予測性の低い 6 種類の検体 (ジゴキシン、カフェイン、フタル酸ジエチル、フタル酸ジブチル、5-アミノサリチル酸、ニコチン) についてラット血漿タンパク結合率を測定した。測定方法は、平衡透析法とし、各被験物質の濃度は 1000 nM 及び 10 nM の 2 ポイント、LC-MS/MS により濃度測定を行った。

## 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 (承認番号: 721、896)。

## 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

イソフルラン麻酔下 (1%) にて、CNT-Y を動物の皮膚に単結紮して生体電位測定を行なった結果、明確な心電図波形 (ECG) が得られた。ブレグマと右耳介基部から誘導した電位変化は、呼吸による筋電波形と考えられる大きな電位変化に加えて、ノイズとは明らかに異なる波形が得られた。本研究で得られた EEG の解析は研究分担者の鈴木郁郎研究分担者、ECG は相崎健一研究分担者によって解析された。

現在、CNT-Y を用いて非拘束にて EEG と ECG を測定するためのトランスミッター及びレシーバーを下記の仕様で開発することとした。CNT-Y は半田付ができないため、ラットの頭部に乗せるサイズのプリント基板 (15 mm × 15 mm × 0.8 mm) と CNT-Y との接続には極小のナットとネジを用いて、ネジに CNT-Y を巻き付ける方法を採用した。現時点でのモックアップを図 1 に示した。

トランスミッター	
基盤: ポリイミド樹脂	15mm × 15mm × 0.8mm
送信チャンネル数	2 チャンネル
送信パラメータ	EEG、ECG
送信周波数	76~109MH
(送信器にて固定)	
電源	CR2032
送信帯域	EEG(1~30Hz) ECG(32~300Hz)
送信感度	EEG(50 μ V/V) ECG(0.5mV/V)
	(レシーバー感度含む)
変調方式	FM-FM
総重量	6g (電池含)
レシーバー	
受信チャンネル数	2 チャンネル
受信パラメータ	EEG、ECG
受信周波数	76~109MHz
	(手動にてチューニング)
電源	AC100V(50/60Hz)
出力端子	BNC 出力
受信帯域	EEG(1~32Hz) ECG(32~300Hz)
受信感度	EEG(50 μ V/V)

ECG(0.5mV/V)  
(トランスミッター感度含む)

## C-2 タンパク結合率の予測モデル

ジゴキシンは 7.7%、カフェインは 5.7%、5-アミノサリチル酸は MS の感度不足により算出が難しかったが、1000nM において 3.9%の値が得られた。ニコチンは測定できなかった。プラスチックの可塑剤として使用されているフタル酸ジエチル及びフタル酸ジブチルはプラスチック製品由来の夾雑成分がブランクから検出されることから、MS 測定の濃度域ではバックグラウンドが非常に高く、測定が困難であった。加えて、血漿中のエステラーゼによって分解された可能性も考えられた。

## D. 考察

先行研究では ECG の電極を、左耳介先端部を陽極、頸部をアース電極、両肩甲骨の間を負極として測定したが、今後の無線装置の開発において耳介部先端は電極とトランスミッターの接続が困難であることから、耳介基部に電極を移動させた。これにより、ECG のシグナルが小さくなるが、負極の位置を腰部に移動させることで十分なシグナルを得ることが可能となった。皮膚結紮による方法は、表面電極に比較して作業が多くなるが、ラットの個体識別に使用される耳パンチと同程度の作業量であるため、動物実験へ組み込むことへの難易度は低いと考えられる。次年度はこの手法による脳波測定に取り組む計画である。この手法により脳波が取得できれば、現在、一般的に使用されている方法である動物の頭蓋骨を穿孔して金属電極を埋め込む手法よりも簡便で侵襲性が極めて低い。

## E. 結論

バイタルサインセンサーの開発においては、新素材である CNT-Y を表面電極として使用し、インフルラン麻酔下でヘアレスラットから ECG 及び EEG を測定し、脳及び心臓に作用するアミトリプチリン塩酸塩及びアトロピン硫酸塩の影響を捉えることに成功した。生体電位を測定する部位及び方法がこれまで報告されている ECG、EEG とは異なる特性を有するため、今後はその特性を明らかにすると共に適切な解析方

法を検討する必要がある。しかしながら、ECG、EEG 共にアミトリプチリンによる変化を明確に捉えており、ベンチマークとなる化学物質のデータを蓄積することで、急性毒性評価の指標を定めることが可能と考えられた。今後、非拘束下にてデータを取得するため、トランスミッターとレシーバーの開発を行い、実データの取得する計画である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Hojo M, Maeno A, Sakamoto Y, Yamamoto, Taquahashi Y, Hirose A, Suzuki J, Inomata A, Nakae D., Time-Course of Transcriptomic Change in the Lungs of F344 Rats Repeatedly Exposed to a Multiwalled Carbon Nanotube in a 2-Year Test., *Nanomaterials (Basel)*. 2023 Jul 19;13(14):2105.

Shimizu M, Hojo M, Ikushima K, Yamamoto Y, Maeno A, Sakamoto Y, Ishimaru N, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Suzuki J, Inomata A, Nakae D., Continuous infiltration of small peritoneal macrophages in the mouse peritoneum through CCR2-dependent and -independent routes during fibrosis and mesothelioma development induced by a multiwalled carbon nanotube, MWNT-7., *J Toxicol Sci*. 2023;48(12):617-639.

Miyauchi A, Akashi T, Yokota S, Taquahashi Y, Hirose A, Hojo M, Yoshida H, Kurokawa M, Watanabe W., Effects of inhalation of multiwalled carbon nanotube (MWCNT) on respiratory syncytial virus (RSV) infection in mice. *J Toxicol Sci*. 2023;48(7):411-420. doi: 10.2131/jts.48.411.

Yokota S, Miyaso H, Hirai T, Suga K, Wakayama T, Taquahashi Y, Kitajima S., Development of a non-invasive method for testicular toxicity evaluation using a novel compact magnetic resonance imaging system., *J*



Toxicol Sci. 2023;48(2):57-64. doi: 10.2131/jts.48.57.

Kuwagata M, Tsuboi M, Igarashi T, Tsurumoto M, Nishimura T, Taquahashi Y, Satoshi Kitajima: A 90-day repeated oral dose toxicity study of 2-Butylbenzo[d]isothiazol-3(2H)-one in rats Fundam. Toxicol. Sci. 2023; 10: 69-82.

Kuwagata M, Tsuboi M, Igarashi T, Tsurumoto M, Nishimura T, Taquahashi Y, Satoshi Kitajima: A 90-day dose toxicity study of 2-(2H-benzotriazol-2-yl)-6-dodecyl-4-methylphenol in rats Fundam. Toxicol. Sci. 2023; 10: 59-68.

西村拓也、西村次平、伊藤かな子、高橋祐次、医薬品開発における非臨床安全性評価の変遷、日本獣医師学雑誌第 61 号、2024.2.20

## 2. 学会発表

高橋祐次、微粒子毒性の in vivo 吸入毒性試験法と課題ー吸入毒性試験ガイドラインの変遷と吸入ばく露実験装置の開発についてー日本薬学会第 144 年会シンポジウム (2024.3.30)

Sato K, Taquahashi Y, Suzuki I. Possible improvement of the increase in non-clinical evaluation predictability by in vivo imaging and MPS-The cases of the CNS seizure risk assessment and drug delivery to the alveoli. 日本薬学会第 144 年会シンポジウム(2024.3.30)

Taquahashi Y, Morita K, Suga K, Tsuji M, Okubo Y, Aisaki K, Kitajima S, New approach for assessment of acute oral toxicity by multiple parameters of vital signs: development of a less invasive method for measuring biopotential in small laboratory animal using carbon-nanotube yarn as surface electrodes, The 63rd Society of Toxicology Annual Meeting (2024.3.11)

Taquahashi Y, Morita K, Suga K, Tsuji M, Okubo Y, Aisaki K, Kitajima S, Improved acute toxicity study incorporating vital signs; a less invasive method for measuring biopotential in laboratory animal using CNT yarn, 10th International Congress of Asian Society of Toxicology (2023. 6.18)

高橋祐次、森田紘一、辻昌貴、菅康佑、相崎健一、北嶋聡、平林容子、先端素材カーボンナノチューブヤーンを使用した実験用小動物における低侵襲な生体電位測定法の開発, 第 70 回 日本実験動物学会総会 (2023.5.24)

## **G. 知的財産権の出願・登録状況**

### 特許出願

高橋祐次、岩本正春、鶴岡秀志、久本 豊、生体信号のリアルタイム精密測定方法、2023 年 12 月 18 日出願

### 3. その他

なし

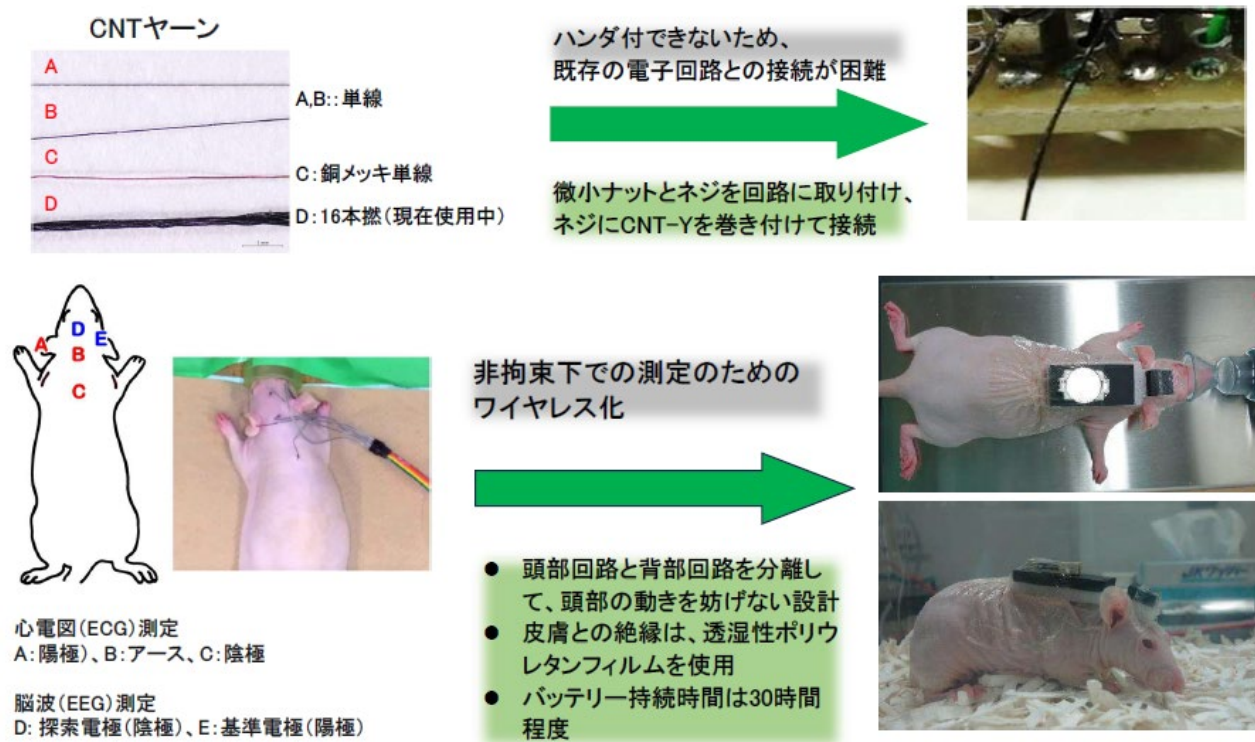


図 1 CNT-Y と既存の電子回路との接続方法

CNT-Y は柔軟で導電性に優れた素材であるが、既存の電子回路との接続にハンダ付を使用できないため、極小のナットとネジを用いて接続する。動物の背中に乗せることが可能なサイズとトランスミッターを開発している。

令和5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による急性毒性試験の判定基準策定と代替法に資する研究  
-診断学とAIによる致死性予測と人道的エンドポイントの設定-

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	安全性生物試験研究センター 毒性部 部長
研究協力者	相崎健一	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。R4年度は、モデル物質として 4,4'-Dihydroxybiphenyl (4,4'-D) を選択し、0.5%MC を溶媒として 0、7、20 及び 70 mg/kg の用量で実施した。肝についての解析の結果、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、折りたたみ不全タンパク質反応、酸化ストレス応答転写因子、糖質コルチコイド受容体シグナルが抽出されてきた。発現増加が認められる遺伝子のプロモーター解析した結果、小胞体ストレス応答の下流に位置する ATF4 あるいは XBP1 が抽出されてきたことから、肝においてはタンパク質の変性が亢進していることが示唆された。また、Nrf2 が抽出されてきたことから、酸化的ストレスが更新していることが示唆された。加えて、TNF, IL4, IL1B, IL6, IL3 及び TGFβ1 が抽出してきたことから、サイトカインシグナルが活性化され炎症が誘発されることが示唆された。R5年度は、さらにインフォマティクス解析を進め、具体的には Percellome データベース全体と網羅的に比較解析を行う、独自に開発した Percellome Explorer プログラムにより、382 通りの試験データベース中、227 の肝プロファイルデータについて、4,4'-D と類似した反応を惹起する化学物質のリストを生成した。その結果、類似反応を惹起する化学物質として、高順位のものとしてはインディゴや硫酸アンモニウムアルミニウムなどが抽出されてきたが、概して類似度は低く、また各化学物質と共通して発現していた遺伝子群からは、特に

タンパク質の変性が亢進が示唆されるという、昨年度の解析結果の内容を裏付ける解析結果となった。

## 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。本分担研究では、脳、肝、腎において、急性毒性発現時にどのような現象が生じているかを遺伝子発現変動解析により、バイタルサインの妥当性を考察し人への外挿を図る。

## B. 研究方法

急性毒性発現時の海馬、肺及び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する。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、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)による網羅的遺伝子発現解析を行なった。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について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なった。

モデル物質として、4,4'-Dihydroxybiphenyl (CAS No: 92-88-6, 富士フィルム和光純薬)及び2,5-Di-tert-butylhydroquinoneを選択した。

動物は、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。遺伝子発現変動解析は、投与後の時間4点(投与2、4、8及び24時間後)、各群3匹、合計48匹のマウスについて解析を行った。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。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検定での各時点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1以上という条件で遺伝子を粗抽出

した。このソフトウェアは、各遺伝子(probe set: ps)につき、用量、経時変化及び遺伝子の発現コピー数を各軸とした3次元グラフにおいて、発現を表す平面につき凹凸を評価し、全てのpsを生物学的に有意と考えられる順に並び替えるものである。また、既知情報との照合によるシグナルネットワーク及び遺伝子発現の制御因子の探索は、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.)を用いて行った。

インフォマティクス解析(ビッグデータによる毒性分子機序解析)には独自に開発した専用ソフトウェアPercellomeExplorerを使用した。Percellomeデータベースは*in vivo*系のトキシコゲノミクスデータベースとしては世界有数の規模となっており、現在では延べ遺伝子数にして8億5千万件が登録されている。この比較作業で扱うデータ量は膨大であり、人手では到底無理と考えられる。そこで、大規模比較解析を容易に実行できるように、PercellomeExplorerを使用し、各化学物質の曝露で変動する遺伝子リスト間で多対多の類似計算を行い、Percellomeデータベースの全レコードを検索して類似反応を示す化学物質を抽出した。

なお実験結果における各遺伝子の発現変動を、下記図1(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

R4 年度は、モデル物質として 4,4'-Dihydroxybiphenyl (4,4'-D) を選択し、0.5%MC を溶媒として 0、62.5、125、250、500 mg/kg を投与した用量設定試験の結果、125 mg/kg 以上で腎が硬くなり、表面が粗造を呈し、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ことから、主試験を 0、7、20 及び 70 mg/kg の用量で実施した。

肝についての解析の結果、発現が増加する遺伝子 1,425 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 788 ps が抽出された。また発現が減少する遺伝子としては 859 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 26 ps が抽出された。次いで、増加分 788 ps について検討した結果、IPA による検索で、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、折りたたみ不全タンパク質(unfolded protein)反応、酸化ストレス応答転写因子 Nrf2 (NFE2L2; Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) や糖質コルチコイド (Glucocorticoid) 受容体シグナルが抽出されてきた。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、小胞体ストレス応答の下流に位置する ATF4 あるいは XBP1 が抽出されてきたことから、肝においてはタンパク質の変性が亢進していることが示唆された。また、Nrf2 が抽出されてきたことから、酸化ストレスが更新していることが示唆された。加えて、TNF, IL4, IL1B, IL6, IL3 及び TGFβ1 が抽出してきたことから、サイトカインシグナルが活性化され炎症が誘発されることが示唆された。

R5 年度は、さらにインフォマティクス解析を進め、具体的には Percellome データベース全体と網羅的に比較解析を行う、独自に開発した Percellome Explorer プログラムにより、382 通りの試験データベース中、227 の肝プロファイルデータについて、類似した反応を惹起する化学物質のリストを生成した(表1)。その結果、4,4'-D の類似反応を惹起する化学物質として、高順位のものとしてはインディゴや硫酸アンモニウムアルミニウムなどが抽出されてきたが、類似度は低いものばかりであった。続いて、各化学物質に共通して発現していた遺伝子群につ

いて、IPA における Upstream Analysis を用いて検討した結果、4,4'-D とインディゴ、あるいは 4,4'-D と硫酸アンモニウムアルミニウム、双方の場合ともに、共通して変動した遺伝子群は、特に小胞体ストレス応答の下流に位置する ATF4 あるいは XBP1 が抽出されてきたことから、肝においてはタンパク質の変性が亢進していることが示唆され、この解析結果は、昨年度の解析結果の内容を裏付ける解析結果となった。この内、4,4'-D とインディゴの場合に、共通して変動した遺伝子について、Upstream Analysis を用いて解析した結果を図2に示す。

したがって、各化学物質と共通して発現していた遺伝子群からは、新たな毒性学的な意味付けを見いだすことは出来ず、特にタンパク質の変性が亢進が示唆されるという、昨年度の解析結果の内容を裏付ける解析結果となった。

4,4'-D は、ラットにおける単回経口投与では 2,000 mg/kg の用量で黄疸が、そして投与二日後に、3 匹中 1 例に死亡が認められている(内部データ)。本遺伝子発現解析においては、4,4'-D の単回経口投与により、肝において、折りたたみ不全タンパク質(unfolded protein)反応の障害が誘発され、タンパク質の変性が亢進していることが示唆されたことから、この機序が、4,4'-D による遅発性の毒性が認められた分子機序である事が示唆された。

## D. 結論

急性毒性試験における遺伝子発現変動解析において、昨年度検討した 4,4'-D を単回投与した場合について、今年度はさらにインフォマティクス解析を進めた。その結果、類似反応を惹起する化学物質は抽出されてきたが、概して類似度は低く、ここから新たな毒性プロファイルを見出すことはできなかった。また各化学物質と共通して発現していた遺伝子群からは、特に、タンパク質の変性の亢進が示唆されるという、昨年度の解析結果の内容を裏付ける解析結果となった。このタンパク質の変性の亢進という解析結果からは、遅発性に肝毒性が誘発される事が強く示唆され、このことは、急性毒性を考慮する際、必ずしも速やかではなく遅発性に症状が認められる分子機序があり得る可能性を示唆しており、今後、この観点からの観測も本研究に有用となるものとする。

## E. 健康危機情報

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Jing Pu, Satoshi Kofuji, Yoshimi Okamoto-Uchida, Keiko Danzaki, Ruoxing Yu, Akira Suzuki, Satoshi Kitajima, Hiroshi Nishina: Lethal Phenotype-Based Database Screening Identifies Ceramide as a Negative Regulator of Primitive Streak Formation. *Stem Cells*, 2023; 41(12):1142-1156 doi.org/10.1093/stmcls/sxad071]

Takeshi Hase, Samik Ghosh, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Hiroaki Kitano, Ayako Yachie: DTox: A deep neural network-based in visio lens for large scale toxicogenomics data. *J Toxicol Sci.* 2024; 49(3): 105-115. doi.org/10.2131/jts.49.105]

Hirokatsu Saito, Yusuke Furukawa, Takahiro Sasaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Kentaro Tanemura: Behavioral effects of adult male mice induced by low-level acetamiprid, imidacloprid, and nicotine exposure in early-life. *Front. Neurosci.* 2023; 17:1239808. doi.org/10.3389/fnins.2023.1239808]

Hirokatsu Saito\*, Kentaro Tanemura\*, Yusuke Furukawa, Takahiro Sasaki, Jun Kanno, Satoshi Kitajima (\*co-first author): Behavioral effects induced by the oral administration of acetamiprid in male mice during the postnatal lactation period or adulthood. *J Toxicol Sci.* 2023; 48(4): 203-210. doi.org/10.2131/jts.48.203]

Makiko Kuwagata, Masaru Tsuboi, Toshime Igarashi, Mariko Tsurumoto, Takuya Nishimura, Yuhji Taquahashi, Satoshi Kitajima: A 90-day repeated oral dose toxicity study of 2-Butylbenzo[d]isothiazol-3(2H)-one in rats *Fundam. Toxicol. Sci.* 2023; 10: 69-82. doi.org/10.2131/fts.10.69]

Takahiro Sasaki\*, Hirokatsu Saito\*, Yusuke Furukawa, Takashi Tominaga, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Kentaro Tanemura (\*co-first author): Exposure to bisphenol A or its phenolic analogs during early life induces different types of anxiety-like behaviors after maturity in male mice. *J Toxicol Sci.* 2023; 48(4): 211-219. doi.org/10.2131/jts.48.211]

五十嵐智女、西村拓也、北嶋聡: 細胞培養食品に係る開発や諸外国の衛生規制に関する最近の動向、月刊「食品衛生研究」、2023; 通巻 885 号(73 巻 12 号), 公益社団法人日本食品衛生協会(東京)

齊藤洋克、北嶋 聡: 化学物質を発生・発達期に曝露した際の情動認知行動影響検出, 化学物質と環境: 化学物質と環境との調和をめざす情報誌, 184, 3-6, 2024

Ryuichi Ono, Makiko Kuwagata, Mie Naruse, Akihito Watanabe, Masao Takano, Takuro Hasegawa, Hiromasa Takashima, Yusuke Yoshioka, Takahiro Ochiya, Yoko Hirabayashi, Satoshi Kitajima: Extracellular vesicle small RNAs secreted from mouse amniotic fluid induced by repeated oral administration of VPA to pregnant mice. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2024; 11(1): 37-56. doi.org/10.2131/fts.11.37]

菅野純、相崎健一、北嶋 聡: 遺伝子発現を指標とした毒性評価・予測, 単行本「化学物質の複合影響と健康リスク評価」, 2024; 第 2 章 複合曝露による毒性の評価手法 第 1 節, 医歯薬出版(東京)[ISBN: 978-4-263-73220-5]

### 2. 学会発表

北嶋 聡: 生命科学のパラダイムシフトと毒性学の進展、第 50 回日本毒性学会学術年会、横浜、2023 年 6 月 19 日

菅野 純 ,相崎 健一 ,小野 竜一 ,北嶋 聡、新型反復ばく露実験による PFOA の毒性発現分析 Clofibrate の網羅的エピジェネティック情報を参照して、

第 50 回日本毒性学会学術年会、横浜、2023 年 6 月 19 日

Toshime Igarashi, Mari Matsumura, Izumi Ogawa Chiori Yakawa, Takahiko Hayakawa, Miyoko Ochi, Hirokatsu Saito, Takuya Nishimura, Makiko Kuwagata, Satoshi Kitajima, Recent trends in regulatory systems in other countries regarding the safety assurance of new food products including so-called cultured meat 10th International Congress of Asian Society of Toxicology, Taiwan on 17 – 20 July 2023.

桑形麻樹子、高島宏昌、長谷川拓郎、田中加奈子、羽田亮、山崎浩史、北嶋 聡:ウサギへのサリドマイド経口投与による精漿を介する発生毒性発現リスクの解明. 第 63 回日本先天異常学会学術集会(2023.7.28-30)

Makiko Kuwagata, Hiromasa Takashima, Ryo Haneda, Kanako Tanaka, Takuro Hasegawa, Hiroshi Yamazaki, Satoshi Kitajima: Possible teratogenic effects mediated by seminal plasma exposed to thalidomide in rabbits. EUROTOX2023. (2023.9.10-13)

北嶋 聡:トキシコゲノミクスからみた付加体科学、第 1 回付加体科学部会研究会 2023、岡山、2023 年 9 月 26 日

北嶋 聡:分子メカニズムに依拠した、迅速、高精度、省動物に適った毒性予測法の開発～食品トキシコゲノミクスを例に～、第 9 回 浜松毒性試験フォーラム 基調講演、浜松、2023 年 10 月 27 日

北嶋 聡:職域における環境因子による健康影響～化学物質によるヒト健康への影響評価に関する試験・研究～、第 38 回日本健康科学学会学術大会、東京、2023 年 12 月 2 日

## 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

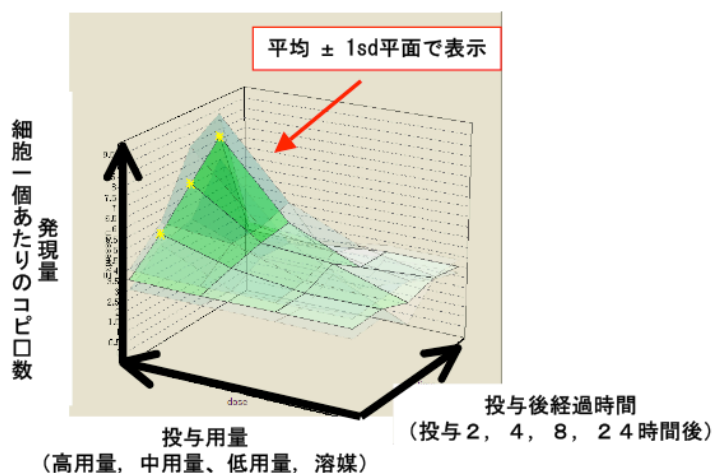


図1 遺伝子発現変動を示す図

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。

化学物質名	類似度
Indigo	0.805
Aluminum ammonium sulfate	0.785
Bisphenol A (corn oil)	0.635
Tetrodotoxin	0.607
DMSO	0.586
4-EthylNitrobenzene	0.585
Sodium Dehydroacetate	0.581
Dexamethasone	0.579
2-Aminomethylpyridine	0.573
Verbenone	0.571

表1 4,4'-D と類似した反応を惹起する化学物質のリスト

独自に開発した PercellomeExplorer プログラムにより、Percellome データベース全体と網羅的に比較解析を行った。382 通りの試験データベース中、227 の肝プロファイルデータについて、類似した反応を惹起する化学物質のリストを生成した(単回経口投与の場合を対象とした)。いずれも類似度は低かった。



	Upstream Regulator	Molecule Type	p-value of overlap	Target Molecules in Dataset
1	TP53	transcription regulator	4.25E-16	Abca8a,ACER2,AKAP13,BHLH
2	CTNNB1	transcription regulator	1.21E-12	AKAP13,AKT2,ALCAM,BHLHE
3	ERN1	kinase	2.39E-12	CAD,CEBPB,CPT1A,DLAT,DN
4	tunicamycin	chemical - endogenous non-mammalian	3.16E-12	CAD,CEBPB,CPT1A,DNAJB11
5	XBP1	transcription regulator	7.76E-11	COPE,COPG1,DNAJB11,EDEM
6	lipopolysaccharide	chemical drug	1.38E-10	AKAP13,AKT2,ALCAM,CCAR1
7	beta-estradiol	chemical - endogenous mammalian	1.58E-10	ACER2,ALCAM,B4GALT1,BHL
8	EIF2AK3	kinase	3.85E-09	CEBPB,CPOX,DNM1L,EDEM1,
9	SRSF1	other	2.35E-08	EIF4G1,EIF4G2,NARS1,Qars1
10	USF1	transcription regulator	5.77E-08	CAD,CEACAM1,CEBPA,CPT1/
11	trovafloxacin	chemical drug	6.86E-08	BHLHE40,CEBPA,EGFR,GNP
12	tretinoin	chemical drug	8.39E-08	B3GALT1,BHLHE40,CA8,CAD,
12	clofibrate	chemical drug	9.97E-08	CEACAM1,CPT1A,ECH1,EGFF
12	ATF4	transcription regulator	0.000000187	CEBPB,CPOX,CPT1A,IGFBP1
15	metribolone	chemical reagent	0.000000188	B4GALT1,CPOX,DBI,DLAT,EC

図 2 4'-D とインディゴの場合に、共通して変動した遺伝子についてのプロモーター解析 (in silico) IPA における Upstream Analysis を用いて検討した結果、小胞体ストレス関連遺伝子である XBP1 などが調節因子として抽出されてきた。小胞体ストレス関連と考えられる因子については、カラムの水色を変えた。

バイタルサインの統合的評価による急性毒性試験の判定基準策定と代替法に資する研究  
-診断学と AI による致死性予測と人道的エンドポイントの設定-

分担研究報告書

分担研究課題 急性毒性おける行動解析

研究分担者 種村健太郎 東北大学大学院農学研究科 動物生殖科学分野 教授

研究要旨

本分担研究では、急性経口毒性発現時に動物が呈する行動様式(移動量、移動様式、痙攣、流涎、瞬目)への影響、赤外線サーモグラフィによる体表温度の変化、超音波測定装置による超音波発声(USVs: ultrasonic vocalizations)、顔面の動き、等を計測し、非侵襲的なバイタルサイン(VS)としての利用について検討する。今年度は、急性毒性試験における非侵襲的な新規バイタルサインの候補として、ホームケージ活動量測定装置を用いて行動様式を解析した。また、超音波測定装置による超音波発声解析の測定を試みた。生後 8 週齢の成熟雌 ICR マウスを使用し、アセフェート(300 mg/kg)、ニコチン(50mg/kg)、無水カフェイン(300 mg/kg)を選択し、ホームケージ活動量測定装置により急性経口毒性発現時の行動様式の経時的影響(68 時間:4080 分)を解析した。また、超音波測定装置による超音波発声(USVs: ultrasonic vocalizations)の録音データ取得条件の最適化を目指した。その結果、ホームケージ活動量測定装置による解析からは、アセフェート(300 mg/kg)投与群において、投与 10 分後にかけて活動量の上昇が認められたが、その後 30 分後にかけて急激な活動量の低下が認められ、投与 60 分後以降から 500 分後まではほぼ活動量は認められなかった。また、ニコチン(50 mg/kg)投与群において、投与 10 分後にかけて活動量の上昇が認められたが、その後 30 分後にかけて活動量の低下が認められたが、コントロール群と比較して、それらは低いものであった。無水カフェイン(300 mg/kg)投与群については投与 12 時間後まで活動量の亢進が認められたが、投与 500 分後以降は、ほぼ正常な昼夜リズムが認められた。なお、超音波測定装置による超音波発声解析を投与開始 4 時間後と 20 時間後に行ったが、約 20 Hz の音を聞かせることによる音に対する反応性も含めて、いずれの群においても超音波発声は確認に至らなかった。

## 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、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る。本分担研究では、実験動物の行動様式に現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、急性経口毒性発現時にマウスが呈する投与後の行動様式(移動量、移動様式、痙攣、流涎、瞬目)への影響、赤外線サーモグラフィによる体表温度の変化、超音波測定装置による超音波発声や、顔面の動きを計測し、非侵襲的なバイタルサイン(VS)としての利用について検討する。

今年度は生後8週齢の成熟雌ICRマウスを使用し、有機リン農薬成分であるアセフェート(300 mg/kg、①N=4、②N=4)、ニコチン(50 mg/kg、①N=4、②N=4)、無水カフェイン(300 mg/kg、①N=4、②N=4)を用いた。急性毒性試験における非侵襲的な新規バイタルサインの候補としては、①ホームケージ活動量測定装置(W:25cm×D:15cm×H:13cm、68 hour 施行、14時から翌々日の10時まで測定した。また7時から19時までを明期、19時から翌日の7時までを暗期とし、自由飲水自由摂餌とした)による解析と、②超音波測定装置による超音波発声の測定を試みた。またその際に約20 Hzの音を聞かせることによって音に対する反応性も検討した。なお、いずれの実験もコントロール群には同量のメチルセルロースの経口投与(N=4)を行った。

## C. 研究結果

### ①ホームケージ活動量測定装置による解析

コントロール群では馴化行動につづいて飲水行動や摂食行動が認められ、また、ほぼ正常な昼夜リズム

が認められた。計測終了後のマウス体重は認められなかった。

アセフェート(300 mg/kg)投与群において、投与10分後にかけて活動量の上昇が認められたが、その後30分後にかけて急激な活動量の低下が認められ、投与60分後以降から500分後まではほぼ活動量は認められなかった。投与600分後以降は一部のマウスに活動量が認められたが、飲水行動や摂食行動は認められなかった。投与850分後以降、4080分後まで、ほぼ全てのマウスに活動量は認められなかったものの、生存が確認できた。なお、計測終了後のマウス体重は約10%減少していた。

ニコチン(50mg/kg)投与群において、投与10分後にかけて活動量の上昇が認められたが、その後30分後にかけて活動量の低下が認められたが、コントロール群と比較して、それらは低いものであった。投与1500分後以降は4匹中の3匹のマウスにおいて活動量は認められず、計測終了後に死亡が確認されたが、1匹のマウスにおいては飲水行動や摂食行動が認められ、ほぼ正常な昼夜リズムが認められた。計測終了後のマウス体重に変動は認められなかった。

また無水カフェイン(300 mg/kg)投与群については投与12時間後まで活動量の亢進が認められ、コントロール群と比較して馴化行動が遅れていたが、やがて特に暗期(本来のマウスの活動時間帯)の活動量の亢進は顕著であったが、投与500分後以降は、ほぼ正常な昼夜リズムが認められ、また、計測終了後のマウス体重は認められなかった。

ホームケージ活動量測定装置による解析結果を図1に示す。

### ②超音波測定装置による超音波発声解析

約20 Hzの音を聞かせることによる音に対する反応性も含めて、いずれの群においても超音波発声は確認に至らなかった。なお、全ての群において投与開始4時間後と20時間後の生存を確認できた。

## D. 考察

ホームケージ活動量測定装置による解析について、死に至るまで行動異常を捉えることができた。今後、赤外線サーモグラフィとの併用が効果的であると考えられた。

約20 Hzの音を聞かせることによる反応性も含めて、いずれの群においても超音波発声は確認に至ら

なかった。超音波発声は性行動や保育行動のコミュニケーション時に行われるが、外界音に応答するわけではないことが明らかとなった。

## E. 結論

既存の行動解析装置をアレンジすることで従来の「目視観察に基づく記述式の一般状態観察による毒性発現」を「VS 計測データ取得によってスコア化可能なデータ」として取得することに成功した。これは標準化に向けた基礎データとして利用可能と考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Sasaki T, Hara K, Tanemura K. Early-life exposure to acephate inhibits sexual development and induces testicular and ovarian toxicity in mice. *Reprod Toxicol*. 2023 Oct;121:108472. doi: 10.1016/j.reprotox.2023.108472. Epub 2023 Sep 16.

Saito H, Furukawa Y, Sasaki T, Kitajima S, Kanno J, Tanemura K. Behavioral effects of adult male mice induced by low-level acetamiprid, imidacloprid, and nicotine exposure in early-life. *Front Neurosci*. 2023 Aug 16;17:1239808. doi:10.3389/fnins.2023.1239808.

Sasaki T, Saito H, Furukawa Y, Tominaga T, Kitajima S, Kanno J, Tanemura K. Exposure to bisphenol A or its phenolic analogs during early life induces different types of anxiety-like behaviors after maturity in male mice. *J Toxicol Sci*. 2023;48(4):211-219. doi: 10.2131/jts.48.211.

Saito H, Tanemura K, Furukawa Y, Sasaki T, Kanno J, Kitajima S. Behavioral effects induced by the oral administration of acetamiprid in male mice during the postnatal lactation period or adulthood. *J Toxicol Sci*. 2023;48(4):203-210. doi:

10.2131/jts.48.203.

Sakai K, Hara K, Tanemura K. Testicular histone hyperacetylation in mice by valproic acid administration affects the next generation by changes in sperm DNA methylation. *PLoS One*. 2023 Mar 9;18(3):e0282898. doi: 10.1371/journal.pone.0282898.

Hasegawa A, Sasaki T, Islam J, Tominaga T, Nochi T, Hara K, Tanemura K. Effects of early-life tosufloxacin tosilate hydrate administration on growth rate, neurobehavior, and gut microbiota at adulthood in male mice. *J Toxicol Sci*. 2023;48(3):149-159. doi: 10.2131/jts.48.149.

### 2. 学会発表

原 健士朗、野地 智法、種村 健太郎: 有機リン系殺虫剤の発達気暴露が脳・腸へ及ぼす影響、第 50 回日本毒性学会学術年会(2023.6.19-6.21)

加来 建之、佐々木 貴熙、原 健士朗、種村 健太郎: クロチアニジンの幼若期/思春期/成熟期暴露が及ぼす遅発行動影響とその雌雄差、第 50 回日本毒性学会学術年会(2023.6.19-6.21)

張磨 琉亜、原 健士朗、種村 健太郎: Axdnd1 遺伝子欠損により生じる精子形成不全 ~非閉息性無精子症モデルマウスとしての有用性の検討~、第 41 回日本受精着床学会総会・学術講演会(2023.7.27-7.28)

佐々木 貴熙、齊藤 洋克、古川 佑介、富永 貴志、北嶋 聡、菅野 純、種村 健太郎: Exposure to bisphenol A or its phenolic analogs during early life induces different types of anxiety-like behaviors after maturity in male mice、第 46 回日本神経科学大会(2023.8.1-8.4)

川邊 悠介、中川 俊徳、山田 紗也、種村 健太郎、嶋 雄一、吉田 松生、原 健士朗: 精巣成長に沿ったマウス精子幹細胞でのラミン発現の拡大とその役割、第 116 回日本繁殖生物学会大会(2023.9.24-9.27)

張磨 琉亜、金子 尚志、原 健士朗、斎藤 芳郎、

種村 健太郎:セレノプロテイン P 翻訳抑制因子:  
ccdc152 による精子形成への影響解析、第 116 回  
日本繁殖生物学会大会(2023.9.24-9.27)

## 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

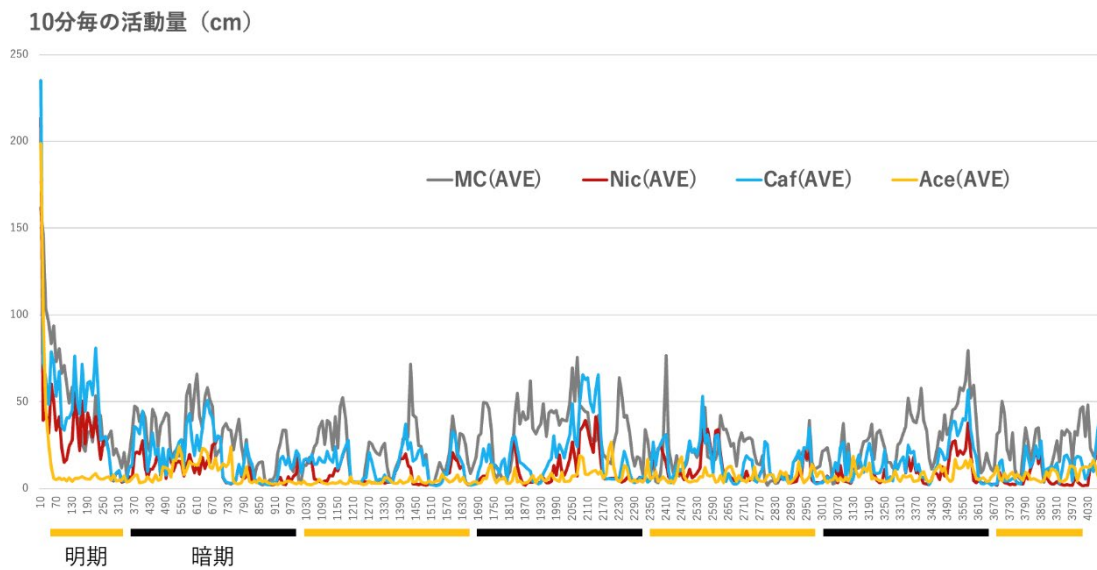


図1 ホームページ活動量測定装置による活動量の経時解析

ホームページ活動量測定装置による活動量の経時解析。10分毎の各投与群の活動量の平均を cm で示した。  
 MC:メチルセルロース水溶液、Nic:ニコチン(50mg/kg)、Caf:無水カフェイン(300 mg/kg)、Ace:アセフェート(300 mg/kg)

令和5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による急性毒性試験の判定基準策定と代替法に資する研究  
-診断学とAIによる致死性予測と人道的エンドポイントの設定-

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)の統合的評価による急性毒性試験の判定基準策定を主目的とした本研究班において、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」を推定するための統合的解析手法の開発と、これを実装したソフトウェアの開発を最終目標として研究を行った。昨年度は、(1)VS測定機器を限定することなく汎用性を持たせること、(2)学習プロセスを必要としないこと、の前提条件に適合し、時系列データ、特に心電図のような繰り返しパターンのある波形データの解析に有用な Matrix Profile アルゴリズム(MP)の有効性を確認したので、今年度はMPを、実際に本研究班独自開発のセンサー(新素材であるカーボンナノチューブヤーンを表面電極として使用。開発:高橋祐次)による心電図データに適用して、急性毒性試験の判断基準としての可能性を検討した。

A. 研究目的

バイタルサイン(VS)の統合的評価による急性毒性試験の判定基準策定を主目的とした本研究班において、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」を推定するための統合的解析手法の開発と、これを実装したソフトウェアの開発を最終目標とする。

れる測定項目としては、血圧やパルスオキシメーターによるSpO<sub>2</sub>、心電図などの、時系列データが想定される。本年度は、評価用VSデータとして、本研究班独自開発のセンサー(新素材であるカーボンナノチューブヤーンを表面電極として使用。開発は高橋祐次研究代表者)を用い、イソフルラン麻酔下、平常状態及びアミトリプチリン塩酸塩50mg/kgの投与前後のヘアレスラット(HWY/Slc)の心電図データを用いた。

B. 研究方法

B-1評価用データ

バイタルサイン(VS)の統合的評価による急性毒性試験の判断基準として用いるVSデータとして想定さ

B-2 解析計算及びソフトウェア生成

異常検知に利用し得る人工知能等の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.3.9.1)を使用した。汎用データ処理ライブラリとしてNumpy(ver.1.19.5)、

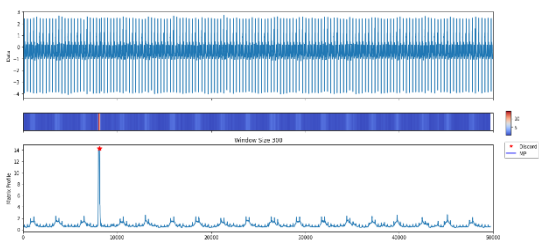
Pandas(ver.1.2.1)、データ可視化ライブラリとして Matplotlib (ver.3.3.4)を使用した。また Matrix Profile アルゴリズムの実装ライブラリとして matrixprofile (ver.1.1.10)を導入した。Python スクリプト実行環境としては Jupyter Lab(ver. 4.0.9)を使用した。

### B-3 計算精度検証

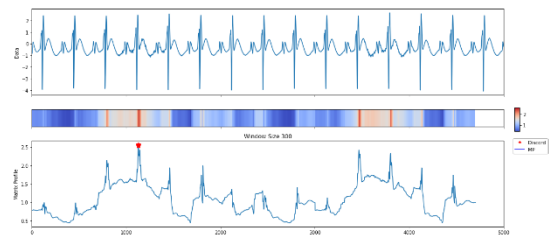
計算精度は必要に応じて Excel (USA Microsoft Corporation) や R 言語 (オープンソース R Development Core Team) で実施し、浮動小数点誤差以上の乖離がないことを確かめた。

### C. 研究結果

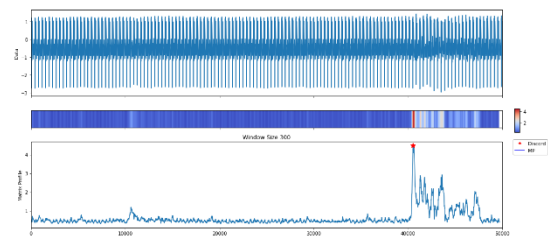
麻酔下・平常状態での心電図データと、脳及び心臓に作用する三環系抗うつ薬の一つであるアミトリプチリン塩酸塩の投与後、経時的に測定した心電図データについて、特に心電図のような繰り返しパターンのある波形データの解析に有用な Matrix Profile (MP) アルゴリズムの性能評価や要件検討を実施した。具体的には、ラベル付加や正規化などの前処理を適用していない、25 秒間 (サンプリング周波数 2kHz) なのでデータ点数 50,000) 若しくは 2.5 秒間 (同、データ点数 5,000) に切り分けた心電図データについて、昨年度の最適条件検討を元に、事前のベースライン調整や正規化を行わず、唯一、部分データのサイズ (周期的に出現するパターンのサイズ) のみを指定して MP 解析を実行した。



Matrix Profile 解析図。上段が心電図を示し、中段が異常スコアを示すヒートカラー、下段が異常スコアをピークにより示す。入力データは麻酔下、無投与、平常状態のヘアレスラットの心電図データ (50,000 点)。ペースの乱れを検出している。



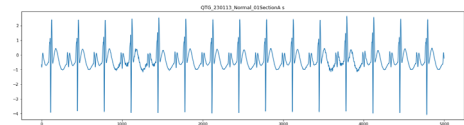
Matrix Profile 解析図。入力データは麻酔下、無投与、平常状態のヘアレスラットの心電図データ (5,000 点)。特に異常心拍がないため、正常範囲内のごく僅かなゆらぎを検出している。



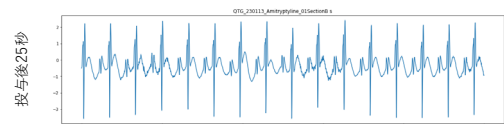
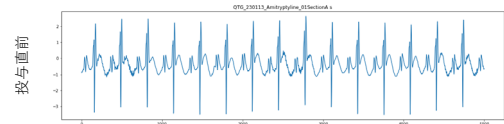
Matrix Profile 解析図。入力データは麻酔下、アミトリプチリン塩酸塩投与後 125 秒時点のヘアレスラットの心電図データ (05,000 点)。全体的な波形以上は検出していないが、局所的な異常心拍を検出している。

今回投与したアミトリプチリン塩酸塩は徐々に心電図の基本波形の変化や心拍数の低下を引き起こしていた (下図)。

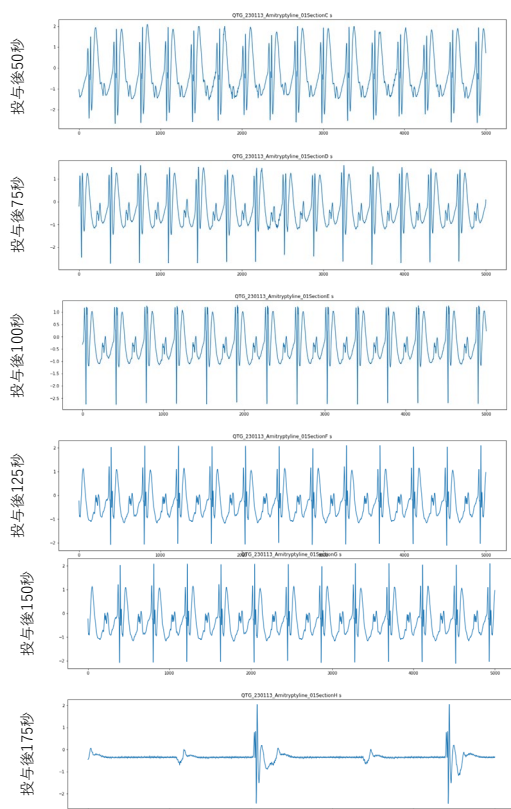
対照群



アミトリプチリン塩酸塩 投与群







MP 解析は、このような緩やかな変化には反応しなかったが、局所的な心拍異常や、ほぼ心停止状態の投与後 175 秒付近の心電図異常については、検知した。

また MP 解析の処理時間を計測した。2024 年 1 月時点では旧型となっている汎用 PC (Windows10、第 7 世代 Intel Core m3、RAM8GB、SATA-SSD) で MP 解析を実行したところ、データ点数 50,000 の処理に約 5 秒、データ点数 5,000 の処理に約 1 秒を要した。これは使用した PC 性能に比し、十分高速であり、急性毒性試験実施中のリアルタイムの致死性予測に寄与する可能性が高い。

#### D. 考察

本年度の結果から、MP 解析は、基本波形の緩やかな変化には反応しなかったが、これは期外収縮のような局所的な不整脈を検出する設定であったためであり、むしろ徐々に変化している状況であっても、孤立性のペース異常といった局所異常を検知したことで、事前学習を必要としない利点を示した。

MP 解析の評価範囲をより大きくすれば、基本波形の緩やかな変化についても検知可能と予想されるが、長時間のデータ=大容量のデータを、相当の時間を掛けて処理することとなり、MP 解析の高速性や即応性といった特徴を活かせないと考えられる。

このようなタイプの心電図異常については、対照群の波形との比較により容易に認識できるものであり、さらに心電図の正常及び異常パターンを学習済みの畳み込みニューラルネットワーク (CNN: Convolutional Neural Networks) モデルを利用すれば、自動的な特徴分類が可能であることは先行研究で確認済みであるから、本研究班の目標である、急性毒性試験における VS 評価の実用化に際しては、様々な異常に対応できるように、複数の異常検知手法の併用が不可欠と考えられた。

#### E. 結論

本研究班独自開発のセンサーによって測定された心電図データを用いた性能評価においても、Matrix Profile アルゴリズムの特性と有用性が確認され、先行研究で評価した機械学習モデルとの組み合わせによって、より網羅的な評価が可能になると考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Takeshi Hase, Samik Ghosh, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Hiroaki Kitano, Ayako Yachie: DTox: A Deep neural network-based in visio lens for large scale Toxicogenomics data J Toxicol Sci. 2024;49(3):105-115. doi: 10.2131/jts.49.105.

##### 2. 学会発表

菅野 純、相崎 健一、小野 竜一、北嶋 聡: 新型反復曝露実験による PFOA の毒性発現分析 - Clofibrate の網羅的エピジェネティック情報を参照して - 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.19)

夏目 やよい、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純:

PPAR alpha リガンドが惹起する遺伝子発現プロファイルの比較解析. 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.19)

山田 隆志、大畑 秀雄、古濱 彩子、杉山 圭一、本間 正充、瀬川 勝智、斎藤 嘉朗、相崎 健一、北嶋 聡、広瀬 明彦、増村 健一:行政における化学物質リスク評価を支援する AI を用いた安全性予測プラットフォームの開発. 第 50 回日本毒性学会学術年会(2023.6.21)

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

令和5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による急性毒性試験の判定基準策定と代替法に資する研究  
-診断学とAIによる致死性予測と人道的エンドポイントの設定-

分担研究報告書

分担研究課題 脳波解析による神経毒性予測

研究分担者 鈴木 郁郎 東北工業大学・大学院工学研究科・電子工学専攻 教授

研究要旨

本研究では、化合物を動物に投与した際に測定されたバイタルサインの総合的評価と致死性予測を可能とする解析手法の構築を目的として、まずは、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(Siddarmark LLC)を用いたラット脳波測定データから、化合物投与による脳波信号の変化を捉えるための解析手法を検討した。FFT(Fast Fourier Transform)によるPSD(Power Spectral Density)を算出し、PSDのピーク値および、ピーク周波数を定量化することで被験物質投与による脳波信号の変化を評価した。また、脳波データに対してバースト解析を実施する独自の解析手法(特許第7138995号)を用いることで、脳波データから神経活動信号に関する複数の解析パラメータを算出し、被験物質に対する脳波信号の周波数依存的な変化を評価した。本研究で検討したFFTのPSDによる脳波解析および、脳波データのバースト解析を用いることで、CNTヤーンによる脳波測定データにおける化合物投与時の脳波変化を捉えられることが確認された。本解析手法は化合物を動物に投与した際に測定されたバイタルサインの総合的評価と致死性予測を可能とする解析手法の基盤としての活用期待できる。

A 研究目的

本研究では、化合物を動物に投与した際に測定されたバイタルサインの総合的評価と致死性予測を可能とする解析手法の構築を目的とした。まずは、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(Siddarmark LLC)を用いたラット脳波測定デ

ータから、化合物投与による脳波信号の変化を捉えるための解析手法を検討した。

B. 研究方法

二層カーボンナノチューブを基にしたCNTヤーン(CNT-Y)を用いて計測された、雌性ヘアレスラット(HWY/Slc)8~12週齢の脳波測定データの

解析を実施した。被験物質として三環系抗うつ薬の一つであるアミトリプチリン塩酸塩 (Amitriptyline HCl、富士フィルム和光純薬) および、ムスカリン性アセチルコリン受容体の阻害薬であるアトロピン硫酸塩 (ATROPINE SULFATE、田辺三菱製薬) を使用し、ラットへの投与前後の脳波データを用いた。

脳波データは、被験物質投与前、投与後等のSectionで分割し、FFT (Fast Fourier Transform) によるPSD (Power Spectral Density : パワースペクトル密度) を各Sectionで算出した。算出されたPSDのピーク値および、ピーク周波数を定量化し、各Sectionを比較することで被験物質投与による脳波信号の変化を評価した。

また、脳波データに対してバースト解析を実施する独自の解析手法(特許第7138995号)を用いることで、脳波データから神経活動信号に関する複数の解析パラメータを算出した。これらの解析パラメータは複数の周波数帯域でそれぞれ算出可能なため、被験物質に対する脳波信号の周波数依存的な変化を評価することができる。

## C. 研究結果

### FFTのPSDによる脳波解析

図1にAmitriptyline 50mg/kg試験時の脳波波形を示す。Amitriptyline投与前のSection Aおよび、Amitriptyline投与後のSection B、Section C、Section Dを解析対象とした。各SectionでFFTによるPSDを算出した結果、Section A (投与前) ではピーク値 0.088 V<sup>2</sup>/Hz、ピーク周波数 2 Hz、Section B (投与後0-8分) ではピーク値 0.091 V<sup>2</sup>/Hz、ピーク周波数 2 Hz、Section C (投与後8-16分) ではピーク値 0.075 V<sup>2</sup>/Hz、ピーク周波数 2 Hz、Section D (投与後16-24分) ではピーク値 0.072 V<sup>2</sup>/Hz、ピーク周波数 2 Hzであった(図2)。いずれのSectionにおいてもピーク周波数は2 Hzであったが、Amitriptyline投与によりPSDのピーク値が時間経過と共に減弱する傾向が観察された。

図3にAtropine 5mg/kg試験時の脳波波形を示す。Atropine投与前のSection A、Atropine投与後のSection Bおよび、麻酔をoffにしたSection Cを解析対象とした。各SectionでFFTによるPSDを算出し

た結果、Section A (投与前) ではピーク値 0.076 V<sup>2</sup>/Hz、ピーク周波数 2 Hz、Section B (投与後) ではピーク値 0.078 V<sup>2</sup>/Hz、ピーク周波数 2 Hz、Section C (麻酔off) ではピーク値 0.102 V<sup>2</sup>/Hz、ピーク周波数 2 Hzであった(図4)。いずれのSectionにおいてもピーク周波数は2 Hzであり、Atropine投与によるPSDのピーク値の変化はSection AとSection Bで観察されなかった。Section CではPSDのピーク値が増強した結果が得られたが麻酔を中止し覚醒したことによる影響と考えられる。

図5にAtropine 50mg/kg試験時の脳波波形を示す。Atropine投与前のSection A、Atropine投与後のSection Bおよび、麻酔をoffにしたSection Cを解析対象とした。各SectionでFFTによるPSDを算出した結果、Section A (投与前) ではピーク値 0.057 V<sup>2</sup>/Hz、ピーク周波数 2 Hz、Section B (投与後) ではピーク値 0.051 V<sup>2</sup>/Hz、ピーク周波数 2 Hz、Section C (麻酔off) ではピーク値 0.121 V<sup>2</sup>/Hz、ピーク周波数 1 Hzであった(図6)。Atropine投与によるPSDのピーク値および、ピーク周波数の変化はSection AとSection Bで観察されなかった。Section CではPSDのピーク値が増強し、ピーク周波数が1 Hzに変化した。麻酔を中止し覚醒したことによるラットの行動および、電極操作等のノイズの影響が含まれていると考えられる。

### 脳波データのバースト解析

脳波データに対するバースト解析手法(特許第7138995号)を用いて、神経信号であるオシレーションおよび、高頻度神経活動であるバーストを検出し、それぞれの頻度(Oscillation rate, Burst rate)を算出した。脳波信号はバンドパスフィルタにより、θ波帯域(5-8 Hz)、α波帯域(8-14 Hz)、β波帯域(15-25 Hz)、γ波帯域(30-50 Hz)、high-γ波帯域(70-150 Hz) および、150-200 Hzに分割し、各周波数帯域でバースト解析を実施した。

Amitriptyline 50mg/kg試験時のバースト解析の結果を図7に示す。θ、α、β、γ波帯域で、Amitriptyline投与後のSection CでOscillation rateが増加し、Section Dで減少した。High-γ、150-200 Hzでは、投与後Section BからOscillation rate

が減少した。High- $\gamma$ 波帯域でBurst rateが投与後Section Cにかけて上昇した。150-200Hzでは投与後Section BからBurst rateが減少した。

Atropine 5mg/kg試験時のバースト解析の結果を図8に示す。 $\theta$ 、 $\alpha$ 、 $\gamma$ 、high- $\gamma$ 波帯域で、Atropine投与後にOscillation rateが増加した。また、 $\theta$ 、 $\alpha$ 、 $\beta$ 波帯域で、Atropine投与後にBurst rateが顕著に減少したのに対して、 $\gamma$ 、high- $\gamma$ 、150-200 HzではBurst rateが上昇した。

Atropine 50mg/kg 試験時のバースト解析の結果を図9に示す。すべての周波数帯域で、Atropine投与後にOscillation rateが顕著に増加した。 $\gamma$ 、high- $\gamma$ 、150-200 HzではBurst rateが顕著に上昇した。

#### D. 考察

FFTのPSDによる脳波解析について、Amitriptylineおよび、Atropine投与によりPSDのピーク周波数は変化しないものの、Amitriptyline投与によりPSDのピーク値が減弱する傾向を捉えることができた。Atropineについても、投与後Sectionをより詳細に区分することで投与後の時間経過による脳波信号の変化を捉えられる可能性があると考えられる。また、麻酔時と覚醒時でPSDのピーク値に差異があったことから、動物の状態を考慮した評価が必要であると考えられる。

脳波データのバースト解析について、Amitriptyline投与により、低周波数帯域ではOscillation rateが増加し、高周波数帯域ではOscillation rateが減少する特徴が観察された。Atropine投与ではOscillation rateの増加が観察され、低周波数帯域ではBurst rateが減少し、高周波数帯域ではBurst rateが顕著に増加する特徴が観察された。この特徴は濃度依存的により顕著に変化した。Amitriptyline投与、Atropine投与いずれの場合も、周波数帯域に依存した特徴が観察され、化合物投与による脳波信号の変化を捉えることが可能であった。

麻酔下ではなく覚醒時の脳波データであれば、脳波測定時の一般状態観察および、その他のバイタルサインを指標にして脳波データをラベリングすることで、活動状態に依存した脳波信号の特徴を捉えることができると考えられる。

#### E. 結論

本研究で検討したFFTのPSDによる脳波解析および、脳波データのバースト解析を用いることで、CNT-Yによる脳波測定データにおける化合物投与時の脳波変化を捉えられることが確認された。本解析手法は化合物を動物に投与した際に測定されたバイタルサインの総合的評価と致死性予測を可能とする解析手法の基盤としての活用に期待できる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### 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

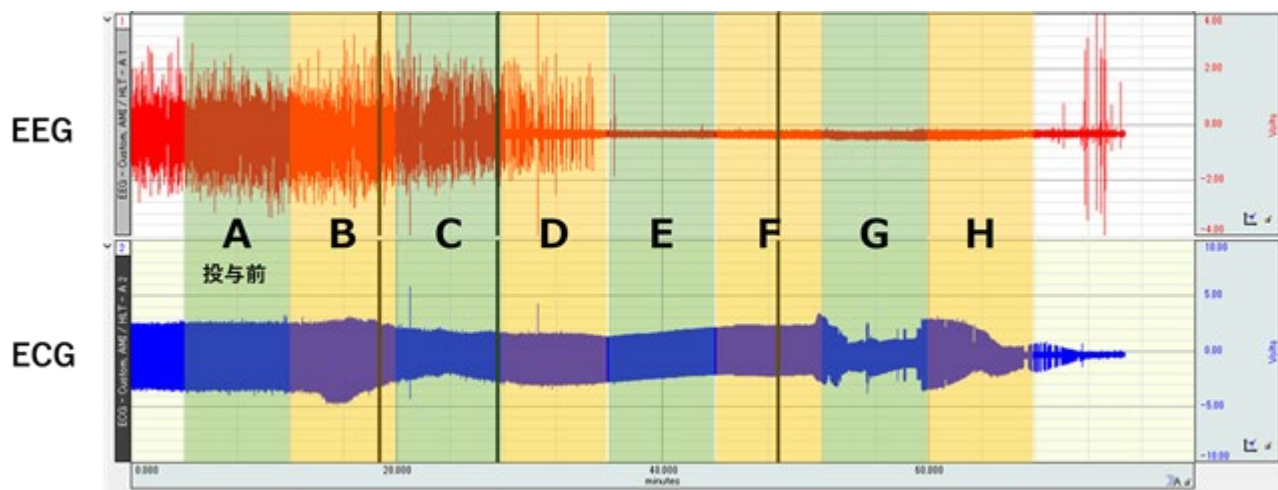


図1 Amitriptyline 50mg/kg 試験時の脳波波形(上段)、心電図(下段)

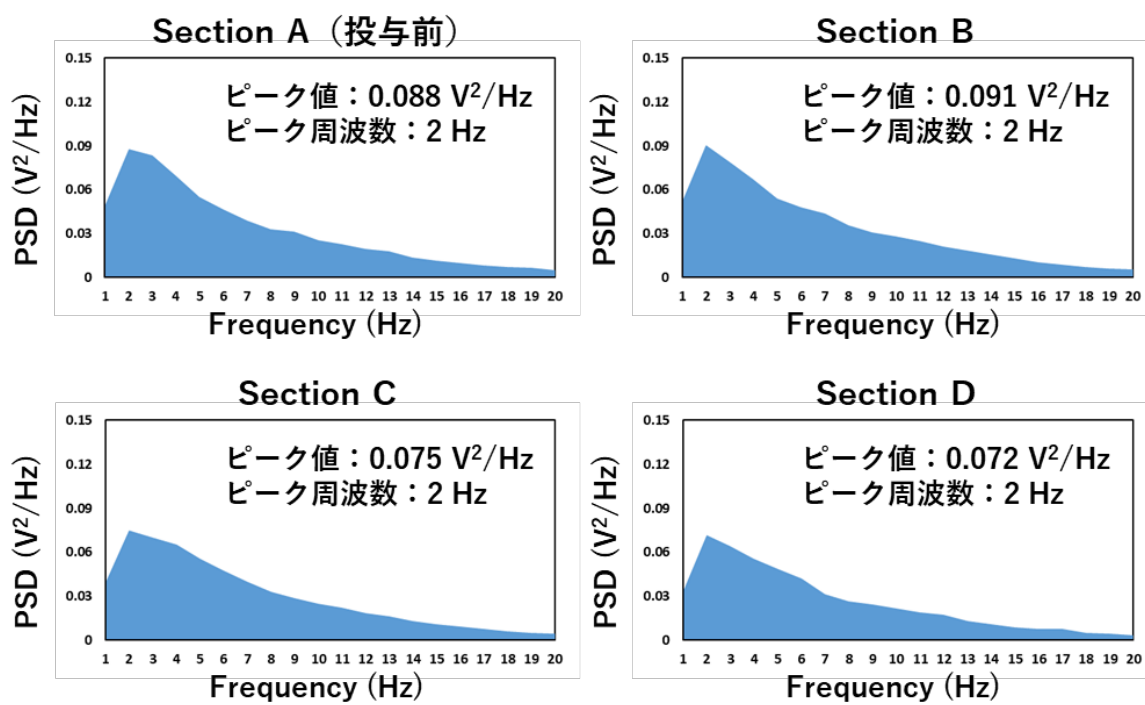


図2 Amitriptyline 50mg/kg試験時のFFTによるPSD

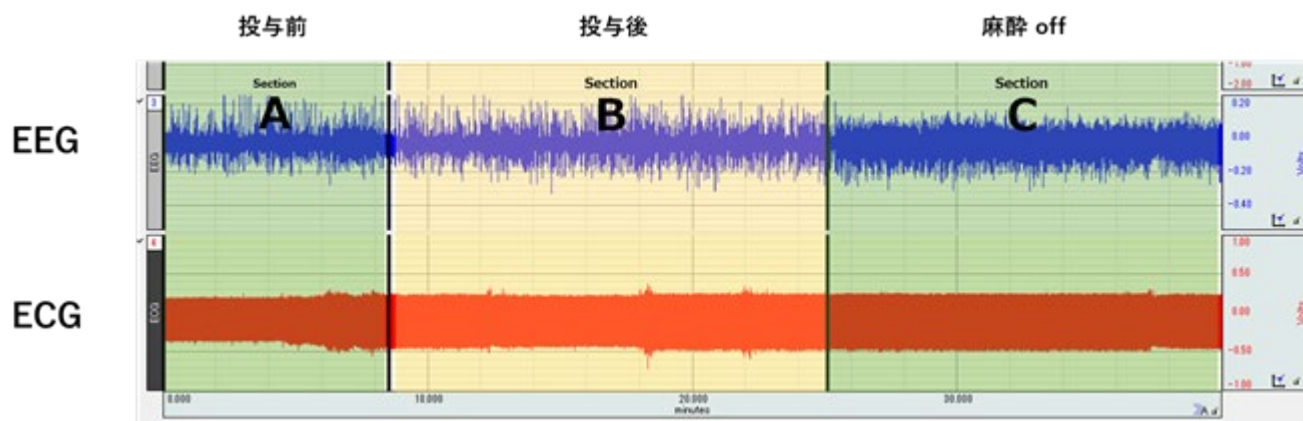


図3 Atropine 5mg/kg試験時の脳波波形（上段）、心電図（下段）

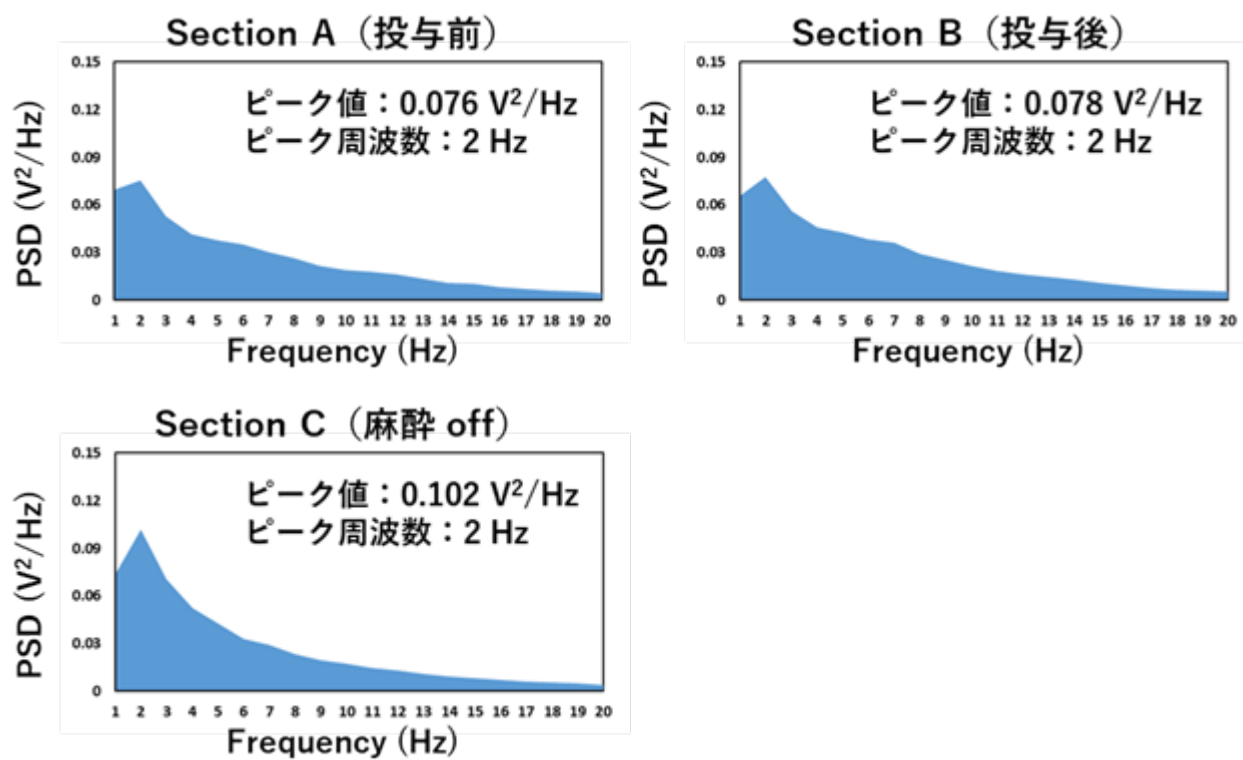


図4 Atropine 5mg/kg試験時のFFTによるPSD



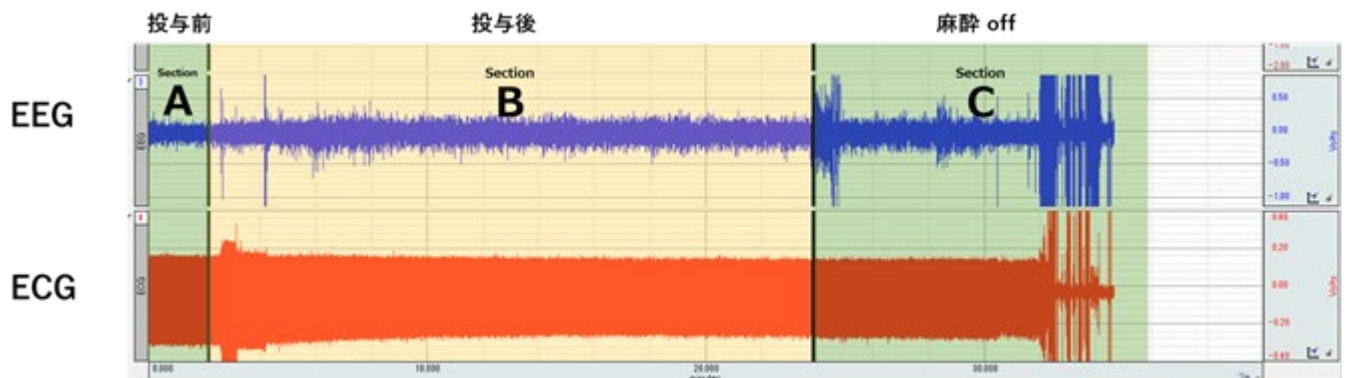


図5 Atropine 50mg/kg試験時の脳波波形（上段）、心電図（下段）

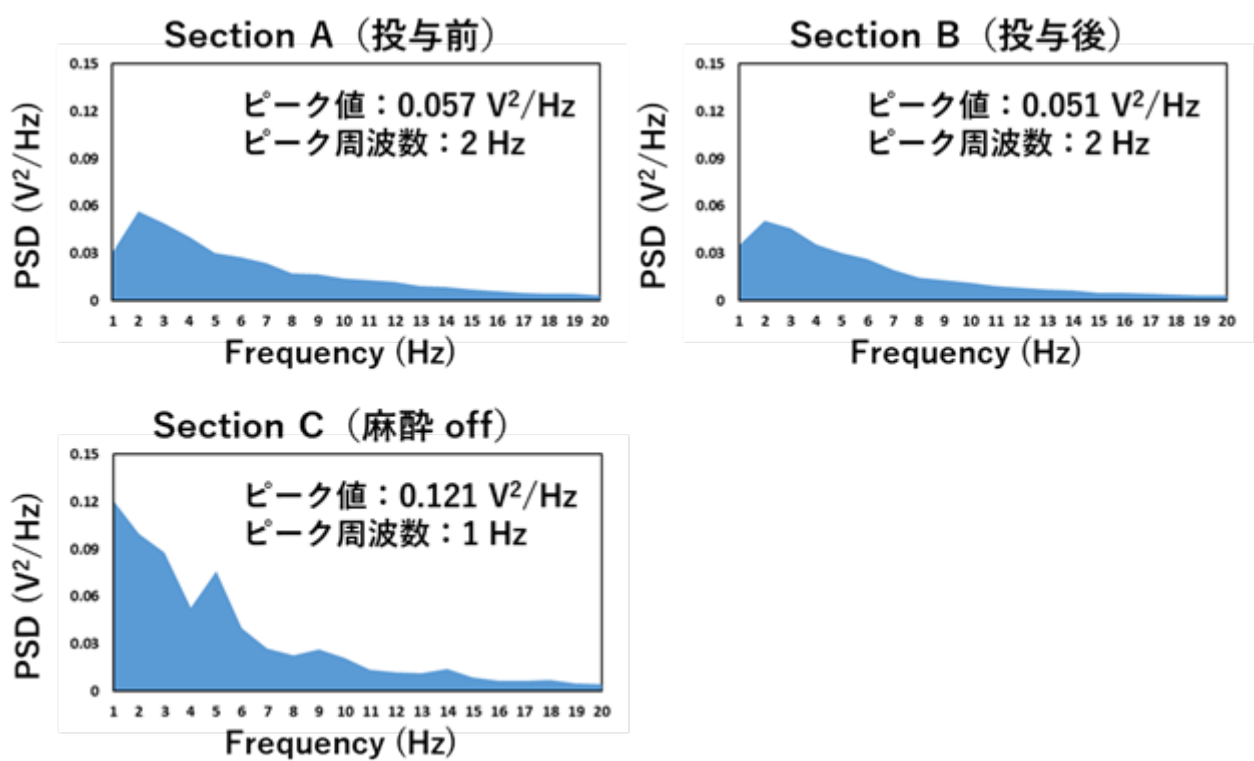


図6 Atropine 50mg/kg試験時のFFTによるPSD



Amitriptyline 50 mg/kg

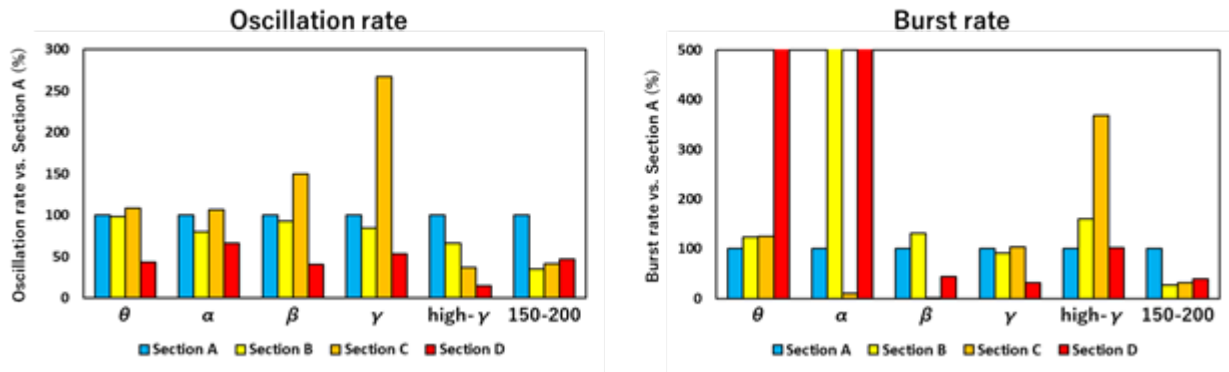


図7 Amitriptyline 50mg/kg試験時のOscillation rate (左図)、Burst rate (右図)

Atropine 5 mg/kg

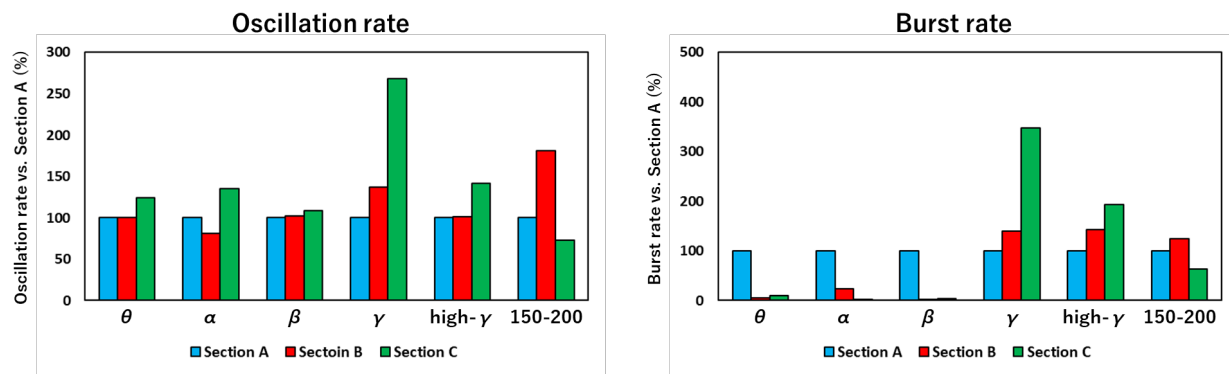


図8 Atropine 5mg/kg試験時のOscillation rate (左図)、Burst rate (右図)

Atropine 50 mg/kg

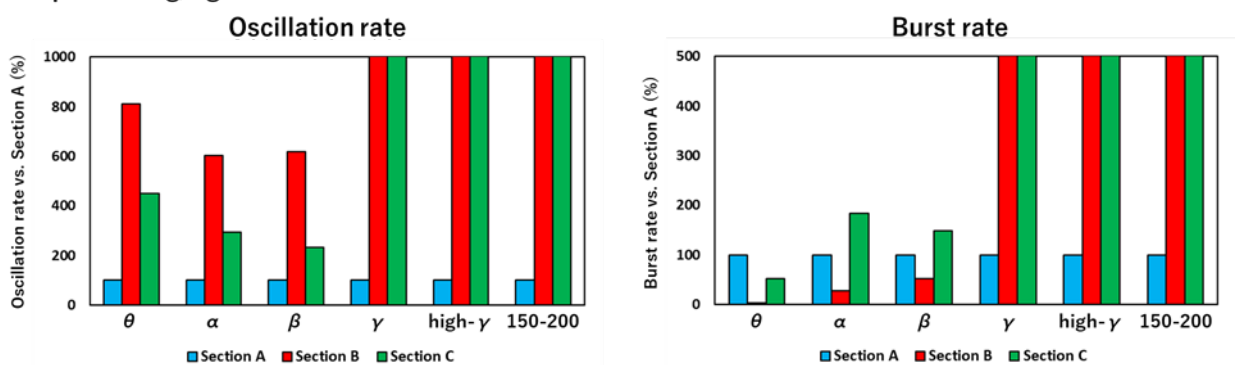


図9 Atropine 50mg/kg試験時のOscillation rate (左図)、Burst rate (右図)

#### IV. 倫理審査等報告書の写し

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 本間 正充

次の職員の令和5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による急性毒性試験の判定基準策定と代替法に資する研究・診断学とAIによる致死性予測と人道的エンドポイントの設定
- 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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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) 未審査の場合は、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 本間 正充

次の職員の令和5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による急性毒性試験の判定基準策定と代替法に資する研究-診断学とAIによる致死性予測と人道的エンドポイントの設定-
- 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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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) 未審査の場合は、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 東北大学

所属研究機関長 職名 総長

氏名 富永 悌二

次の職員の令和5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 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による急性毒性試験の判定基準策定と代替法に資する研究-診断学とAIによる致死性予測と人道的エンドポイントの設定-
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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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) 未審査の場合は、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。

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 本間 正充

次の職員の令和5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による急性毒性試験の判定基準策定と代替法に資する研究・診断学とAIによる致死性予測と人道的エンドポイントの設定
- 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 ・ 第一室長  
(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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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) 未審査の場合は、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。

令和6年5月28日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 東北工業大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 渡邊 浩文

次の職員の令和5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 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による急性毒性試験の判定基準策定と代替法に資する研究-  
診断学と AI による致死性予測と人道的エンドポイントの設定
3. 研究者名 (所属部署・職名) 大学院工学研究科 電子工学専攻・教授  
(氏名・フリガナ) 鈴木 郁郎 スズキ イクロウ

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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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 type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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。

### 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
該当なし					