

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 6 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高橋祐次

令和 6(2025)年 3 月

研究報告書目次

I. 総括報告書

バイタルサインの統合的評価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 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 14

2. 急性毒性試験における遺伝子発現変動解析

北嶋 聡 22

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 27

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 35

5. 脳波解析による神経毒性予測

鈴木 郁郎 41

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)
総括報告書

研究代表者 高橋祐次

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

研究要旨

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 2022)。本研究は【1】VS 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 VS を取得、【3】タンパク結合率測定、【4】AI による VS 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、315MHzの帯域を用いた動物(ヘアレスラット)に装着可能なトランスミッターを開発し、覚醒下、非拘束状態にて心電図(ECG)及び脳波(EEG)の測定が可能となった。このトランスミッターを用いて、アミトリプチリン塩酸塩、アトロピン硫酸塩、ニコチン、カフェイン、ハロペリドールを投与した際の影響を測定した。化学物質のタンパク結合率測定では、*in vitro* 急性毒性試験代替法において予測性の低い 6 種類の検体について、平衡透析法によりラット血漿タンパク結合率を測定したが何れも極めて低い結合率であり測定困難な物質であることが明らかとなった。

急性毒性試験における遺伝子発現変動解析については、C57BL/6J マウスを用い、フグ毒として知られるテトロドトキシン(TTX)の毒性のエンドポイントとして欧州食品安全機関(EFSA)で利用されている apathy(無関心・無気力状態)の誘発メカニズムについて、海馬を対象に網羅的遺伝子発現解析を進めた。独自に開発した Percellome データベースを活用した解析により、TTX と類似した遺伝子発現変動を引き起こす物質としてデヒドロ酢酸ナトリウムやサリドマイドなどが特定された。さらに、軸索輸送に関与していることが知られハンチントン病(HD)の病因遺伝子であるハンチンチンタンパク質(HTT)が抽出されたことから、apathy に HTT シグナルネットワークの関与が示唆された。

急性毒性試験における行動解析について、聴覚性プレパルス驚愕反応抑制試験装置(プレパルス・インヒビション)を用いた解析を行った。雌 ICR マウスを使用し、アセフェート(300 mg/kg)、無水カフェイン(300 mg/kg)、ニコチン(50 mg/kg)、を選択し、急性経口毒性発現時のプレパルス・インヒビション(軽減率)の経時的影響を解析した。

VS の統合的解析方法(ソフトウェア)の開発においては、異常値の検出に有効性を確認した Matrix Profile アルゴリズム(MP)を組み込んだ GUI ベースのアプリケーションソフトウェアを作成した。アミトリプチリン塩酸塩とニコチンを投与した ECG データを対象として性能評価を行った結果、急性毒性試験におけるリアルタイム解析の実用化や、機械学習用の ECG 異常波の自動抽出手段としての利用などの可能性が示された。MP 解析と、先行研究で有用性を示した機械学習モデルと組み合わせれば、より効率的且つ網羅的な評価が可能になると考えられた。

EEG 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ニコチンを投与したラットの EEG について、

Fast Fourier Transform による PSD (Power Spectral Density) 解析と、独自に開発した解析手法である EEG バースト解析 (特許取得済) を用いて評価した。アミトリプチリン塩酸塩の PSD 解析では 5 mg/kg は個体差が大きく、投与前後でピーク値やピーク周波数の変化が異なった。50 mg/kg ではピーク値の変化は見られなかったが、ピーク周波数が 1 Hz から 2 Hz にシフトした。脳波バースト解析では、 β 波帯域以上で Oscillation rate および Burst rate が増加する傾向が見られたが、50 mg/kg では変化が軽微であった。ニコチンの PSD 解析では 1 mg/kg および 5 mg/kg において PSD のピーク値やピーク周波数に顕著な変化は観察されなかった。脳波バースト解析では、1 mg/kg では変化が軽微であるが、5 mg/kg では θ 、 α 波帯域を除き、Oscillation rate および Burst rate が増加した。また、イソフルラン麻酔による影響も同様に検討した結果、麻酔中止直後に PSD のピーク値が約 1.5 倍に増加し、その後約 3 分で元の状態に戻ることも、また、すべての周波数帯域で Oscillation rate は減少する一方で、 θ 、 α 、 β 波帯域で Burst rate が急激に増加することが明らかとなり、麻酔中止後の脳波データ解析では一定の待機時間が重要であることが示された。

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】VS 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 VS を取得、【3】血漿タンパク結合率測定、【4】AI による VS 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 LD₅₀ 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、N-フェニルチオ尿素、ジスルホトン、シアニ化カリウム、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、L-アドレナリン) から選択した。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) を用いた。

B. 研究方法

B-1 バイタルサインセンサーの開発

二層カーボンナノチューブ (Double-Walled Carbon Nanotube: DWCNT) から作成された Carbon-nanotube yarn (CNT-Y, Siddarmark LLC) を用い、心電波形 (ECG) 及び脳波 (EEG) を取得する検討を行った。CNT-Y は動物の皮膚に縫合針を用い単結紮により皮膚に装着した。動物は、ヘアレスラット (HWY/Slc) を使用した。イソフルラン麻酔下でヘアレスラットの皮膚 4 箇所縫合針を用いて CNT-Y を

結紮し電位を測定した。CNT-Y 電極は、独自に開発したトランスミッターに接続した。トランスミッターからの信号は、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。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。

EEG と ECG の測定は、イソフルラン麻酔から覚醒に至るまで継続して実施した。十分に覚醒したと判断できる状態 (約 30 分後) で、アミトリプチリン塩酸塩、アトロピン硫酸塩、ニコチン、カフェイン、ハロペリドール (何れも富士フイルム和光純薬) を腹腔内投与した。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。

B-2 タンパク結合率測定

毒性予測にトキシコキネティクス (TK) は有用であるが、一般化学物質では費用の面から TK の実施は難しい。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、タンパク結合率の予測及び測定を行った。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。*in vitro* 急性毒性試験において予測性が低かった化学物質のうち、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測定を試みた。化合物の濃度は 10 または 1000 nmol/L とし、平衡透析法にて行い、測定は LC-MS を用いた。

B-3 急性毒性試験における遺伝子発現変動解析

モデル物質として、フグ毒として知られるテトロドトキシン (TTX) を用いた。動物は C57BL/6J マウスを用いた。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 μ g/kg (溶媒: 0.1% 酢酸を含む 0.5% メチルセルロース液) の 4 点からなる計 16 群、各群 3 匹、合計 48 匹の海馬の mRNA を採取し、GeneChip MOE430v2 (affymetrix 社) を用い、約 45,000 プローブセット (ps) の遺伝子発現の絶対量を Percellome 法により得て網羅的解析をおこなった。

B-4 急性毒性試験における行動解析

急性毒性試験における行動解析について、聴覚性プレパルス驚愕反応抑制試験装置 (プレパルス・インヒビション) を用いた解析を行った。雌 ICR マウスを使用し、アセフェート (300 mg/kg)、無水カフェイン (300 mg/kg)、ニコチン (50mg/kg)、を選択し、急性経口毒性発現時のプレパルス・インヒビション (軽減率) の経時的影響 (2 時間後、及び 24 時間後) を解析した。

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

評価用 VS データとして、本研究班独自開発の CNT-Y 電極とトランスミッターにて覚醒下・非拘束状態における雌性ヘアレスラットから取得した ECG を対象として検討を行った。モデル化合物としてアミトリプチリン塩酸塩 (50mg/kg) 及びニコチン (1 mg/kg、5 mg/kg) を投与し、投与前後の ECG 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)、GUI ライブラリとして TKinter (ver.8.6.9) 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

CNT-Y を用いて計測された、雌性ヘアレスラット (HWY/Slc) の脳波測定データの解析を実施した。モデル化合物としてアミトリプチリン塩酸塩 (5、50 mg/kg) および、ニコチン (1、5 mg/kg) 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、検体投与前、投与後および麻酔下、覚醒下等の 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 を比較することで検体投与および、麻酔の有無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、化学物質に対する脳波信号の周波数依存的な変化を評価できる。

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から覚醒下にて、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 EEG と ECG が得られた。この条件において、各種化学物質を投与して EEG と ECG への影

響を調べた。代表例としてアミトリプチリン塩酸塩 (50mg/kg) 及びニコチン (1mg/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。

動物の体動によって特に EEG のベースラインが変動した。詳細な観察により、EEG のベースライン変動は、アンテナの揺れが原因であった。一方、ECG は体動によるベースラインが変動は見られないが、非常に大きな一過性のスパイク信号が観察された。時折、ECG の Q-R 振幅が小さくなることが観察されたが、比較的速やかに回復する場合もあるため、化学物質投与の影響ではないと考えられた。特に、興奮を引き起こすカフェインでは激しい動きによって安定したデータを取得することが困難であった。

C-2 タンパク結合率測定

何れの化合物においても非常に低い蛋白結合率であり、ジゴキシンでは 3~7%、カフェインでは 6% 程度、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、ニコチンでは濃度測定ができなかった (バッチ不成立)。

C-3 急性毒性試験における遺伝子発現変動解析

海馬において、比較的多くの遺伝子の発現変動が認められ (121ps の増加、減少はゼロ)、解析の結果、ストレス応答やサイトカインに係るシグナルネットワークが抽出された。具体的には、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、in silico プロモーター解析を、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、あるいはサイトカインである TNF が調節因子として抽出されてきた。また、フォールスコリンとイソブチルメチルキサンチンが抽出され、細胞内 cAMP レベルの増加が示唆された。興味深いことに、海馬での上流解析において、軸索輸送に関与していることが知られハンチントン病 (HD) の病因遺伝子であるが、正確な機能は未解明であるハンチンチンタンパク質 (HTT) が抽出された。

C-4 急性毒性試験における行動解析

まず、80db、85db、90db、95db、100db、105db、110dbにて驚愕反応量を調べたところ、コントロール群と比較して、投与 2 時間後のアセフェート投与群とニコチン投与群に驚愕反応量の抑制が確認された。一方で、無水カフェイン投与群に驚愕反応量の増強傾向が認められた。また、投与 24 時間後ではアセフェート投与群とニコチン投与群に驚愕反応量抑制の緩和が確認された。一方で、無水カフェイン投与群に驚愕反応量の抑制傾向が認められた。

80db、85db、90db のプレパルスに対して、120db のパルスを用いたプレパルス・インヒビション(軽減率)については、コントロール群と比較して、投与 2 時間後および投与 24 時間後にアセフェート投与群とニコチン投与群に増強傾向が認められたが、無水カフェイン投与群には顕著な差異は認められなかった。

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

急性毒性試験において、心電図などの測定データをリアルタイムに現場で処理し、判断材料とするためには、自動若しくは必要最低限の操作のみで実行可能な解析評価システムが必要である。昨年度までに有効性を確認した Matrix Profile アルゴリズム(MP)はライブラリとして提供されているため、実行にはデータに応じてスクリプトを書き換えるためのキーボード入力等のやや煩雑な操作が必要だった。

そこで今年度は MP を組み込んだグラフィカルユーザーインターフェイススペースのアプリケーションソフトウェア ECG_matrixprofile_analysis.py を開発した。試験開始前に各パラメータを設定しておけば、ECG データファイルをドラッグ&ドラッグだけ(ダイアログボックスでも選択可能)で MP 解析が実行され、解析図が表示される。設定可能なパラメータには、ECG データファイルの様式に関するもの、解析範囲に関するもの、MP 解析パラメータ、出力画像に関するもの、を用意した。また本アプリ

は Python 言語で記述されているため、基本的にマルチプラットフォーム対応となっている。また主な処理が MP 計算であるため、一般的な性能のコンピュータでも十分に動作可能であった。

ECG_matrixprofile_analysis.py の動作確認を兼ね、今年度新たに測定した ECG データ(投与前及びアミトリプチリン塩酸塩(50mg/kg)投与後、及びニコチン(1mg/kg, 5mg/kg)投与後)を用いて MP 解析を実施した。今年度のデータは覚醒下、非拘束状態で取得された ECG であるため、全体的に体動などによるノイズが含まれている。このため、MP 解析はノイズのない 5000 データポイント区間(2.5 秒間)を選んで実施した。

これらは事前のノイズ除去やベースライン調整・正規化を一切行わず、解析単位区間のサイズ(周期的に出現するパターンのサイズ)のみを指定して MP 解析を実行したものであり、もちろん機械学習と異なりラベル付加や事前学習も行っていない。また ECG_matrixprofile_analysis.py による MP 解析の操作性や処理速度を、昨年度と同じ汎用 PC (Windows10、第 7 世代 Intel Core m3、RAM8GB、SATA-SSD)にて評価したところ、昨年度、Jupyter lab 上で MP 解析スクリプトを実行した条件に比べて処理速度は同等のまま、操作性は明らかに向上しており、急性毒性試験実施中のリアルタイムの致死性予測に利用しうる性能を示した。

C-6 脳波解析による神経毒性予測

(1)FFT の PSD による脳波解析:

アミトリプチリン塩酸塩を 5 mg/kg 投与した実験成績 2 例を解析した。その結果、1 例目の動物では、投与前ではピーク値 0.118 V²/Hz、ピーク周波数 1 Hz、投与後ではピーク値 0.090 V²/Hz、ピーク周波数 1 Hz であった。2 例目の動物では、投与前ではピーク値 0.069 V²/Hz、ピーク周波数 3 Hz、投与後ではピーク値 0.079 V²/Hz、ピーク周波数 2 Hz であった。

同様の条件で実施された実験ではあるが、投与前の時点で動物 1 と動物 2 の PSD は異なる特徴が観察され、動物の個体差が反映されることが判明した。各動物で化学物質投与による変化を評価した場合にも、動物 1 ではピーク値が減少するのに対して、動物 2 ではピーク値が増加し、共通の変化が得られなかったことから、覚醒下での脳波測定では動物の行動等による影響の考慮が必要であることが示唆された。アミトリプチリン塩酸塩 50 mg/kg 試験では、投与前後でピーク値は変化しなかったが、ピーク周波数が 1 Hz から 2 Hz にシフトした。

ニコチン 1 mg/kg および 5 mg/kg を投与した脳波波形を解析した。その結果、1 mg/kg では投与前はピーク値 0.054 V2/Hz、ピーク周波数 2 Hz、投与後ではピーク値 0.047 V2/Hz、ピーク周波数 2 Hz であった。5 mg/kg では、投与前ではピーク値 0.053 V2/Hz、ピーク周波数 2 Hz、投与後ではピーク値 0.055 V2/Hz、ピーク周波数 2 Hz であった。ニコチンの投与では PSD のピーク値および、ピーク周波数に顕著な変化は観察されなかった。

イソフルラン麻酔下および、それに続く麻酔中止後の脳波波形について解析を行った。麻酔下ではピーク値 0.060 V2/Hz、ピーク周波数 2 Hz、麻酔中止後 0-1 min ではピーク値 0.089 V2/Hz、ピーク周波数 2 Hz、麻酔中止後 1-2 min ではピーク値 0.084 V2/Hz、ピーク周波数 2 Hz、麻酔中止後 2-3 min ではピーク値 0.056 V2/Hz、ピーク周波数 3 Hz であった。麻酔下と比較して麻酔中止直後に PSD のピーク値が約 1.5 倍に増加し、約 3 分後には麻酔下と同程度に戻ったことから、覚醒下の脳波測定では麻酔中止による影響の混入を避けるために、麻酔中止後から一定時間経過してからの測定が必要であることが示唆された。

(2) 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。

アミトリプチリン塩酸塩 5 mg/kg および 50 mg/kg 投与時のバースト解析の結果、個体差はあるが、アミトリプチリン塩酸塩投与により、とくに β 波帯域以上で Oscillation rate、Burst rate ともに増加する傾向が観察された。50 mg/kg では 5 mg/kg と比較して変化は軽微であった。

ニコチン 1 mg/kg および 5 mg/kg 投与時のバースト解析の結果、1 mg/kg では Oscillation rate、Burst rate ともに変化が軽微であったのに対して、5 mg/kg では θ 、 α 波帯域の Burst rate を除いて、Oscillation rate、Burst rate ともに増加する傾向が観察された。

麻酔下および、それに続く麻酔中止後の脳波波形に対するバースト解析の結果、麻酔中止後から時間経過と共にすべての周波数帯域で Oscillation rate が減少する傾向が観察された。一方で、Burst rate は θ 、 α 、 β 波帯域で急激に増加した。

D. 考察

今年度は、独自に開発したトランスミッターを用い、動物を覚醒下、非拘束状態で EEG と ECG を測定することが可能となった。

一般に安全性薬理試験等で使用されているテレメトリーシステムでは、動物の体内にトランスミッターを埋め込み、磁気カップリングを用いたデータ送信が用いられている。磁場は急速に減衰するため、送信機と受信機の距離が数 cm 以内である必要がある。腹部に埋め込んだトランスミッターの場合、受信機をケージの底に設定することでこの問題は解決されている。

本研究では、急性毒性試験での使用を念頭に置

き、簡便で動物への侵襲性が低い装置を開発するため CNT-Y を表面電極として用い、トランスミッターは電極等を動物が嚙らないように背部に装着する必要がある。そのため、磁気カップリングでは十分に近い伝達距離をとれないため、トランスミッターは電磁波を用いる無線通信方法を選択した。315MHzの帯域では、伝達効率のよいアンテナ長が約 24cm 必要となる。EEG のベースライン変動、ECG のスパイクノイズは体動によってアンテナが揺れることが原因であった。通常、飼育ケージ内のラットは、激しく動き回ることがないため、ノイズが少ない状況のデータを選ぶことで解析が可能であった。しかしながら、カフェインのように興奮性の剤の場合にはこの限りではなく、激しい動きによって安定したデータを取得することが困難であった。

その一方で、覚醒下でのデータ取得で最も懸念された CNT-Y 電極と皮膚の接触部分が体動で動くことによる信号への影響は非常に少ないように見受けられた。体表面電極の問題点は当該研究分野において指摘されており、特に、皮膚のインピーダンスと広がり抵抗について 1970 年代から 80 年代にかけて議論がされているが、根本的な解決には至っていないようである。CNT-Y は現在汎用されている金属電極とは異なり分極しないことを特徴とするが、それ以外にも表面電極として有用な特性があるのかもしれない。

急性毒性試験における遺伝子発現変動解析では TTX の単回経口投与により、マウス海馬においてストレス応答や炎症、及び、細胞内 cAMP レベルの増加が示唆され、後者では海馬における記憶の長期増強や非選択的なニューロン活性化が起きている可能性が示唆された。しかし、チャンネル分子など、神経伝達に絡むシグナル分子の発現変動は目立たなかった。そこでさらに詳細な解析を行うために、Percellome データベース(150 化学物質)について、海馬において TTX の場合と類似した遺伝子発現変動を惹起する物質を探索したところ、デヒドロ酢酸ナトリウム、サリドマイド、クロルピリホスなどが挙がってきた。これらについてもそれぞれ上流解析をしたところ、興味深いことに、これらに共通して、ストレス応答やサ

イトカインに関わるものに加え HTT が抽出されてきた。

欧州食品安全機関(EFSA)は、海産二枚貝における TTX のリスク評価を実施し、雌性 Swiss マウスを用いた急性経口試験の結果に基づき、最も感度の高いエンドポイントとして「apathy(無気力状態)」が選択されている。HTT はハンチントン病の原因となるタンパク質であるが、ハンチントン病における apathy は時間とともに増加し、臨床転帰の悪化と関連しているとの報告があることから、TTX による apathy 誘発に、HTT シグナルネットワークが関与する可能性が示唆された。

バイタルサインの統合的解析方法(ソフトウェア)の開発では、昨年度と同様、MP 解析を適用して、アミトリプチリン塩酸塩及びニコチン投与による ECG 異常を補足することが出来た。これは機械学習と異なり、MP は原理的にラベル付けしたデータによる事前学習を必要としないことを実証しており、MP によって検出した異常波データを収集し、機械学習に利用できる可能性をも示している。今回、急性毒性試験中のリアルタイム解析を想定し、MP 解析を組み込んだアプリケーションソフトウェアである ECG_matrixprofile_analysis.py を in house 開発した。スクリプトを書き換えつつ実行していた昨年度までと異なり、試験実施中でも利用可能なほどに操作性は格段に向上したが、現状は ECG データファイルを、マウスを使ってドラッグ&ドロップすることが MP 解析の実行トリガーになっているが、ECG は経時的データであり、データポイント数の追加量は計測周期で予測できることから、将来的にはアプリケーションソフトウェアにタイマー機能を追加し、新たに追加記録された ECG データを定期的に自動解析する、等の機能強化を検討している。

脳波解析による神経毒性予測では、FFT の PSD による脳波解析について、各モデル化合物の影響を検討した。その結果、動物の個体差が FFT の PSD に反映されることが示唆された。また、アミトリプチリン塩酸塩に対する応答に共通の特徴が得られなかったことから、覚醒下における脳波測定では動物の行

動等による影響を考慮した評価が必要であることが示唆された。

今年度は、トランスミッターにより覚醒下、非拘束状態で EEG 測定が可能であることから、麻酔下および、覚醒下における脳波解析への影響を検討した。その結果、イソフルラン麻酔中止直後に FFT の PSD が増加すること、および、麻酔中止後に Oscillation rate が減少し、Burst rate が急激に増加することが判明した。麻酔時と覚醒時で PSD のピーク値および、バースト解析の結果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ことが示唆された。

上記のような課題が示唆された一方で、検体投与による脳波信号の変化については、アミトリプチリン塩酸塩では β 波帯域以上で Oscillation rate、Burst rate ともに増加すること、ニコチンでは Oscillation rate、Burst rate の増加が濃度依存的に観察されたことから、検体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。

本研究により、麻酔下ではなく覚醒時の脳波測定においても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ることが示された。覚醒下における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上記課題が解決されると共に、活動状態に依存した脳波信号の評価が可能となる。

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 を表面電極として独自開発のトランスミッターを通して、覚醒下、非拘束のヘアレスラットから ECG 及び EEG を測定が可能となった。脳及び心臓に作用する各種モデル化合物を投与し、その影響を捉えることに成功した。

本研究で得られたデータのうち ECG については MP アルゴリズムによるリアルタイム解析による異常検知プログラムを独自に開発した。EEG に関しては、データ取得の際の個体差について検討する必要があるものの、FFT の PSD 解析とバースト解析により、モデ

ル化合物の特徴を捉えることに成功した。以上のことから、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。

急性毒性試験における遺伝子発現変動解析については、apathy はハンチントン病で最もよくみられる神経行動学的症状の 1 つとする論文から、TTX による apathy 誘発に、HTT シグナルネットワークが関与する可能性が示唆されたが、apathy 誘発と HTT の具体的なシグナルネットワークは不明であり、HTT シグナルのさらなる機能解析が待たれる。また人への外挿性を考慮すると Apathy のような一般状態の変化と脳波などの測定により Apathy の把握の客観化をする必要があるものと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yuhji Taquahashi, Ken-ich Aisaki, Koichi Morita, Kousuke Suga, Satoshi Kitajima: Application of the matrix profile algorithm for detecting abnormalities in rat electrocardiograms. Fundam. Toxicol. Sci. 2024; 11(6): 289-296. [doi.org/10.2131/fts.11.289]

Makiko Kuwagata, Yuko Doi, Hirokatsu Saito, Mariko Tsurumoto, Toshime Igarashi, Takuya Nishimura, Yuhji Taquahashi, Yoko Hirabayashi, Satoshi Kitajima: A 90-day repeated oral dose toxicity study of p-cymene in rats. Fundam. Toxicol. Sci. 2024; 11(4): 169-181.[doi.org/10.2131/fts.11.169]

Kiyoshi Hashimoto, Hiroshi Arakawa, Rikako Imamura, Takuya Nishimura, Satoshi Kitajima, Takuya Sato, Kazuhide Makiyama, Takehiko Ogawa, Satoshi Yokota: A novel alternative method for long-term evaluation of male reproductive toxicity and its recovery using a pre-pubertal mouse testis organ culture system. J Appl. Toxicol. 2024; 44(5): 784-793. [doi.org/10.1002/jat.4584]

Hideobu Miyaso, Satoshi Yokota, Kousuke Suga, Yui Hashimoto, Céline Kouno, Kenta Nagahori, Masahiro Itoh, Satoshi Kitajima: Histological differences between the central and peripheral areas of the testes of busulfan-administered mice. *J Toxicol Sci.* 2024; 49(4): 139-149. [doi.org/10.2131/jts.49.139]

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]

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]

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]

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

Harima R, Sasaki T, Kaneko T, Aso F, Takashima H, Toyama T, Hara K, Tanemura K, Saito Y. Ccdc152 is not necessary for male fertility, but contributes to maintaining sperm morphology. *J Reprod Dev.* 2024 Dec 13;70(6):396-404.

Yanai R, Mitani TT, Susaki EA, Minamihisamatsu T, Shimojo M, Saito Y, Mizuma H, Nitta N, Kaneda D,

Hashizume Y, Matsumoto G, Tanemura K, Zhang MR, Higuchi M, Ueda HR, Sahara N. A novel tauopathy model mimicking molecular and spatial aspects of human tau pathology. *Brain Commun.* 2024 Sep 19;6(5):fcae326.

Sasaki T, Islam J, Hara K, Nochi T, Tanemura K. Male mice are susceptible to brain dysfunction induced by early-life acephate exposure. *Front Neurosci.* 2024 Jul 10;18: 1404009.

Kaku K, Sasaki T, Hara K, Tanemura K. A single dose of clothianidin exposure induces varying sex-specific behavioral changes in adulthood depending on the developmental stage of its administration. *J Toxicol Sci.* 2024;49(7):301-311.

Y. Ishibashi, N Nagafuku, S Kimura, X Han, I Suzuki, Development of an evaluation method for addictive compounds based on electrical activity of human iPS cell-derived dopaminergic neurons using microelectrode array, *Addiction Biology.* 29:e13443, 2024

X. Han, N. Matsuda, M. Yamanaka, I Suzuki, Development of a Novel Microphysiological System for Peripheral Neurotoxicity Prediction Using Human iPSC-Derived Neurons with Morphological Deep Learning, *Toxics*, 12(11), 809, 2024

2. 学会発表

Taquahashi Y, Aisaki K, Morita K, Kousuke Suga K, Tsuji M, Kitajima S, Application of Matrix Profile Algorithm for Detecting Abnormalities in Waveform Data with Repetitive Patterns to Electrocardiograms, 第 51 回日本毒性学会学術年会(2024.7.4)福岡

北嶋 聡, 高橋 祐次, 相崎 健一, 菅野 純: フグ毒テトロドトキシンを単回経口投与した際のマウス肝及び海馬 Percellome トキシコゲノミクス. 第 51 回日本毒性学会学術年会(2024.7.3)

五十嵐智女、安彦行人、小野竜一、高橋 雄、桑形麻樹子、北嶋 聡:ゲノム編集によるノックインマウス作製時に生じた、オンターゲット部位の多様な変異とその次世代伝達、第 71 回日本実験動物学会総会、京都、2024 年 5 月 29 日、ポスター

横田 理 , 宮宗秀伸 , 菅 康佑, 兼子 智, 若山友彦 , 北嶋 聡:Reactive blue 2 の雄性生殖毒性評価への適用、第 51 回日本毒性学会学術年会、福岡、2024 年 7 月 5 日、口頭

小野竜一、桑形麻樹子、成瀬美衣、渡邊章仁、鷹野正生、長谷川拓郎、高島宏昌、吉岡祐亮、落谷孝広、平林容子、北嶋 聡:バルプロ酸(VPA)の妊娠マウスへの反復投与により誘導される羊水由来の細胞外小胞 Small RNA、第 51 回日本毒性学会学術年会、福岡、2024 年 7 月 5 日、口頭

齊藤洋克 , 横田 理 , 北嶋 聡:セルトリ細胞におけるビメンチンの免疫組織化学的変化と精子形成不全との関連、第 51 回日本毒性学会学術年会、福岡、2024 年 7 月 3 日、ポスター

五十嵐智女、西村拓也、北嶋 聡:細胞培養食品の開発や規制に関する最近の国際動向、第 51 回日本毒性学会学術年会、2024 年 7 月 4 日、ポスター

堀 正敏、三原大輝、後藤もも、徳永弥月、茶園貴志、黒澤珠希、北嶋 聡:細胞培養食品バイオハザード研究 2:培養細胞の遺伝子発現における老齢個体の影響と 継代による生体内有害物質合成/分解系の遺伝子変動、第 51 回日本毒性学会学術年会、福岡、2024 年 7 月 4 日、ポスター

横田 理、前野 愛、北條 幹、辻 昌貴、森田 紘一、菅 康佑、相田麻子、広瀬 明彦、菅野 純、高橋 祐次、北嶋 聡:多層カーボンナノチューブのマウス単回吸入曝露による肺負荷量の経時的変化、第 51 回日本毒性学会学術年会、福岡、2024 年 7 月 4 日、ポスター

北嶋 聡:毒性学 revisited-生命科学のパラダイムシフトと毒性学の進展-, 基調講演 6L-1「拮抗剤、分

析と中毒」,第 46 回日本中毒学会総会・学術集会、(2024.7.24.)、神戸

五十嵐智女、西村拓也、北嶋 聡:細胞培養食品(いわゆる培養肉)の開発と安全性確保に関する最新動向一家畜・家禽以外の動物 種を含めて一、日本動物学会第 95 回長崎大会、長崎、2024 年 9 月 14 日、口頭

北嶋 聡: いわゆる培養肉の開発動向とその食品安全に関する諸外国の規制動向、日本食品化学学会 第 40 回食品化学シンポジウム、(2024.11.15)、川崎

北嶋 聡:網羅的分子毒性学からみたヒトと化学物質との共生, シンポジウム 3S02m「ヒトとヒト、異種生物、そして環境との「共生」を考える」、APPW2025(第 130 回日本解剖学会・第 102 回日本生理学会・第 98 回日本薬理学会 合同大会), 2025.3.19、千葉

Yuhji Taquahashi, Koichi Morita, Kousuke Suga, Masaki Tsuji, Makiko Kuwagata, Ken-ich Aisaki, Satoshi Kitajima, Development of a telemetry unit for measuring rat biopotential: easy to attach, less invasive by using carbon nanotube yarn as a surface electrode, SOT 2025 64th Annual Meeting in Orlando, Florida 2025.3.18,Poster

種村 健太郎: 発達期トスフロキサシン投与による成長影響と成熟後の神経行動様式、第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.7.3-5)

Ryua Harima, Kenshiro Hara, Kentaro Tanemura: : Cytoplasmic dynein 2 is required to the regulation of intra-flagellar transport system in sperm flagellum formation. SSR (Society for the Study of Reproduction) Annual Meeting 2024, Dublin, Ireland (the Convention Centre Dublin) (2024.7.15-19)

張磨 琉亜、原 健士朗、種村 健太郎:マウス Tctex1d2 は体細胞系列の繊毛形成にはない、精子鞭毛形成に特有の機能をもつ、第 117 回日本繁殖

生物学会大会 (2024.9.22-9.25)

Nami Nagafuku, Naoki Matsuda, Yuto Ishibashi, Ikuro Suzuki, “Enhanced Cardiotoxicity Assessment through Propagation Pattern Analysis Using HD-CMOS-MEA in hiPSC-Derived Cardiomyocytes”, 2024 SPS Annual Meeting, 22-25 September, 2024, San Diego, USA

Xiaobo Han, Naoki Matsuda, Kazuki Matsuda, Makoto Yamanaka, Ikuro Suzuki, “Predicting Peripheral Neurotoxicity on Soma or Axon through Morphological Deep Learning and Electrical Measurements Using an In Vitro Microphysiological System”, MPS World Summit 2024, June, 10-14, 2024, Seattle, USA

Ikuro Suzuki, Xiaobo Han, Kazuki Matsuda, Naoki Matsuda, Makoto Yamanaka, “In vitro analysis of drug-induced neuron degeneration by morphological deep learning on a novel microphysiological system”, FENS forum 2024, June, 25-29, 2024, Vienna, Austria

Xiaobo Han, Naoki Matsuda, Makoto Yamanaka, Ikuro Suzuki, “Development of an in vitro assessment platform for drug-induced neuron degeneration based on morphological deep learning using cultured neurons in a microphysiological system”, Neuroscience 2024, October, 5-9, 2024, Cicago, USA

Y. ISHIBASHI, X. HAN, N. NAGAFUKU, N. MATSUDA, I. SUZUKI, “Functional analysis of synaptic network and single neuron in human iPS cell-derived neurons using HD-CMOS-MEA”, Neuroscience 2024, October, 5-9, 2024, Cicago, USA

鈴木郁郎、ヒト iPS 由来神経細胞およびアストロサイトを用いた in vitro 痙攣毒性予測と作用機序予測、第51回日本毒性学会学術年会、2024年7月4日、福岡

Nami NAGAFUKU, Naoki MATSUDA, Kazuki

MATSUDA, Ikuro SUZUKI, “Cardiotoxicity evaluation method using HD-CMOS-MEA can predict drug action mechanism”, 第51回毒性学会学術年会, 2024年7月3-5日, 福岡

Xiaobo Han, Naoki Matsuda, Chinatsu Suzuki, Makoto Yamanaka, Ikuro Suzuki, “In vitro analysis of drug-induced neuron degeneration by morphological deep learning on a novel microphysiological system”, 第51回毒性学会学術年会, 2024年7月3-5日, 福岡

松田 直毅, 永福 菜美, 石橋 勇人, 鈴木 郁郎, “ヒト iPS 細胞由来ニューロンの MEA 計測における殺虫剤の神経毒性評価と作用機序予測”, 第51回毒性学会学術年会, 2024年7月3-5日, 福岡

石橋 勇人, 韓 笑波, 永福 菜美, 松田 直毅, 鈴木 智夏, 鈴木 郁郎, “CMOS-MEA を用いた Field Potential Imaging によるヒト iPS 細胞由来神経ネットワークと単一ニューロンの機能解析”, 第51回毒性学会学術年会, 2024年7月3-5日, 福岡

倉敷 秀明, 韓 笑波, 石橋 勇人, 鈴木 郁郎, “中枢神経系における薬物毒性評価のための神経細胞と星状膠細胞の信号分離”, 第51回毒性学会学術年会, 2024年7月3-5日, 福岡

横井れみ, 永福菜美, 松田直毅, 石橋勇人, 鈴木郁郎, “平面微小電極アレイを用いたドラベ症候群脳オルガノイドにおける禁忌薬の評価”, 第51回毒性学会学術年会, 2024年7月3-5日, 福岡

鈴木郁郎、化合物評価における IVIVE への取り組み、LIFE2024、2024年9月13日、東京

中村奈緒子、帆足和希、秋山翔太、安田英莉、松田直毅、鈴木郁郎、高木基樹、岸田晶夫、木村剛、脱細胞化組織の組織学的評価への AI の応用、日本バイオマテリアル学会シンポジウム、2024年10月28-29日、仙台

帆足和希、松田直毅、鈴木郁郎、高木基樹、岸田晶夫、木村剛、中村奈緒子、脱細胞化組織模倣画

像の導入による ECM 構造特徴マップの拡張、日本バイオマテリアル学会シンポジウム、2024 年 10 月 28-29 日、仙台

鈴木郁郎、超精密神経活動計測と AI 解析による創薬応用、学振 R031 ハイブリッド量子ナノ技術委員会 第 18 回研究会、2024 年 11 月 1 日、東京

永福 菜美、松田 直毅、石橋 勇人、鈴木 郁郎、“HD-CMOS MEA 計測による心毒性検出と作用機序予測法の構築”、第 15 回スクリーニング学研究会、2024 年 11 月 21 日、東京

石橋 勇人、永福 菜美、久田 素、鈴木 郁郎、“培養神経細胞の Ca オシレーション解析による発達神経毒性評価法の検討”、第 15 回スクリーニング学研究会、2024 年 11 月 21 日、東京

Xiaobo Han, Naoki Matsuda, Makoto Yamanaka, Ikuro Suzuki, “A novel microphysiological system for assessment of drug-induced neuropathy using human iPSC-derived neurons with morphological deep learning”, 第 15 回スクリーニング学研究会、2024 年 11 月 21 日、東京

鈴木郁郎、in vitro MEA 試験による化合物の神経作用評価、第 41 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム、2024 年 11 月 25 日、仙台

鈴木郁郎、ヒト由来神経細胞を用いた NAMs や MPS の利活用と国際動向、第 47 回日本分子生物学会年会、2024 年 11 月 28 日、福岡

鈴木郁郎、in vitro 神経モデルを用いた化合物評価、日本動物実験代替法学会 第 37 回大会、2024 年 11 月 30 日、宇都宮

3. その他

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

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-(22KD1004)

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: 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

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】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、315MHzの帯域を用いた動物(ヘアレスラット)に装着可能なトランスミッターを開発し、覚醒下、非拘束状態にて心電図(ECG)及び脳波(EEG)の測定が可能となった。このトランスミッターを用いて、アミトリプチリン塩酸塩、アトロピン硫酸塩、ニコチン、カフェイン、ハロペリドールを投与した際の影響を測定した。化学物質のタンパク結合率測定では、in vitro 急性毒性試験代替法において予測性の低い 6 種類の検体について、平衡透析法によりラット血漿タンパク結合率を測定したが何れも極めて低い結合率であり測定困難な物質であることが明らかとなった。

バイタルサインの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。現在は商業的に入手可能な測定装置と独自開発のセンサーとトランスミッターを混在させて使用しているが、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。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。

A. 研究目的

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】VS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 VS を取得、【3】血漿タンパク結合率測定、【4】AI による VS 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 LD50 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、N-フェニルチオ尿素、ジスルホトン、シアニ化カリウム、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、L-アドレナリン)に加えて、先行研究で使用され背景データがあるアセフェート、アミトリプチリン塩酸塩についても検討した。

本分担研究では、バイタルサイン測定に使用するセンサー並びにトランスミッターの開発を行った。

B. 研究方法

バイタルサインセンサーの開発

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(Siddarmark LLC)を用い、バイタルサイン測定のための電極とした。CNT ヤーン(CNT-Y)は動物の皮膚に縫合針(外科強角針 No.00 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(雌性ヘアレスラット、HWY/Slc)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 750TM 個別換気式飼育装置 特型)を使用した。飼育条件は、温度; $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度; $55 \pm 5\%$ 、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。

麻酔装置(RC2+Anesthesia system, VetEquip, CA, US)を用い、イソフルラン麻酔下でヘアレスラットの皮膚 4 箇所(縫合針を用いて CNT-Y を結紮した。CNT-Y を装着する前には、ラットの頭部から背部の皮膚を 70%エタノールで清拭した後、皮膚の保護と絶縁を目的として皮膚被膜剤(3M™ キャビロン™ 非アルコール性皮膜)を塗布した。更にトランスミッターの本体を装着する背部には粘着性透明傷被覆剤(3M™ テガダーム™ トランスペアレント ドレッシング)を貼付した。心電図(ECG)測定用電極として 2 箇所(左耳介基部、背部)、脳波(EEG)測定用電極として 2 箇所(ブレグマ、右耳介基部)を用いた(図 1A)。

CNT-Y 電極は、独自に開発したトランスミッターに接続した。トランスミッターのサイズはラットの背中に装着できるサイズであり、315MHzの帯域を用い Pulse Position Modulation(PPM)方式で信号を送信する。トランスミッター内部にて低インピーダンス化を行い各信号の増幅率は、EEG は 2,000 倍、ECG では 1,000 倍とした。電源は CR2032 バッテリーを用い約 4 時間安定した動作が可能である(図 1B)。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 2 kHz とした。

EEG と ECG の測定は、イソフルラン麻酔から覚醒に至るまで継続して実施した。十分に覚醒したと判断できる状態(約 30 分後)で、アミトリプチリン塩酸塩、アトロピン硫酸塩、ニコチン、カフェイン、ハロペリドール(何れも富士フイルム和光純薬)を腹腔内投与した。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。

B-2 タンパク結合率測定

毒性予測にトキシコキネティクス(TK)は有用であるが、一般化学物質では費用の面から TK の実施は難しい。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、タンパク結合率の予測及び測定を行なう計画である。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。そのため、まずは医薬品のタンパク結合率の情報を収集し、それを基に予測式を構築する手法を選択して解析を行っている。*in vitro*急性毒性試験において予測性が低かった化学物質のうち、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測定を試みた。化合物の濃度は 10 または 1000 nmol/L とし、平衡透析法にて行い、測定は LC-MS を用いた。

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 バイタルサインセンサーの開発

イソフルラン麻酔下から覚醒下にて、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 EEG と ECG が得られた。この条件において、各種化学物質を投与して EEG と ECG への影響を調べた。代表例としてアミトリプチリン塩酸塩(50mg/kg、図 2)及びニコチン(1mg/kg、図 3)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。

動物の体動によって特に EEG のベースラインが変動した。詳細な観察により、EEG のベースライン変動

は、アンテナの揺れが原因であり、電極である CNT-Y と接触している皮膚の接触面の変化に起因したものではないことが明らかとなった。一方、ECG は体動によるベースラインの変動は見られないが、非常に大きな一過性のスパイク信号が観察された(C-5 項、図 6 参照)。また、時折、ECG の Q-R 振幅が小さくなることが観察されたが、比較的速やかに回復する場合もあるため、化学物質投与の影響ではないと考えられる。興奮を引き起こすカフェインで激しい動きによって安定したデータを取得することが困難であった。

現在、より小型のトランスミッターを開発中である(図 4)。新型のトランスミッターでは、アンテナを不要にして通信を行う仕様となっているため、体動によるノイズの混入を抑制できることが期待される。

C-2 タンパク結合率測定

何れの化合物においても非常に低い蛋白結合率であり、ジゴキシンでは 3~7%、カフェインでは 6%程度、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、ニコチンでは濃度測定ができなかった(バッチ不成立)。

D. 考察

今年度は、独自に開発したトランスミッターを用い、動物を覚醒下、非拘束状態で EEG と ECG を測定することが可能となった。

一般に安全性薬理試験等で使用されているテレメトリーシステムでは、動物の体内にトランスミッターを埋め込み、磁気カップリングを用いたデータ送信が用いられている。磁場は急速に減衰するため、送信機と受信機の距離が数 cm 以内である必要がある。腹部に埋め込んだトランスミッターの場合、受信機をケージの底に設定することでこの問題は解決されている。

本研究では、急性毒性試験での使用を念頭に置き、簡便で動物への侵襲性が低い装置を開発するため CNT-Y を表面電極として用い、トランスミッターは電極等を動物が嚙らないように背部に装着する必要がある。そのため、磁気カップリングでは十分に近い伝達距離をとれないため、トランスミッターは電磁波を

用いる無線通信方法を選択した。315MHzの帯域では、伝達効率のよいアンテナ長が約 24cm 必要となる。EEG のベースライン変動、ECG のスパイクノイズは体動によってアンテナが揺れることが原因であった。通常、飼育ケージ内のラットは、激しく動き回ることがないため、ノイズが少ない状況のデータを選ぶことで解析が可能であった。しかしながら、カフェインのように興奮性の剤の場合にはこの限りではなく、激しい動きによって安定したデータを取得することが困難であった。そのため、現在は通信方式を Modified Pulse Position Modulation 方式とし、Low power Bluetooth に加えて、電力消費量を低減する独自の方法を組み込んだ新型トランスミッターを開発中である。現行型と同等 (CR2032) のバッテリーで連続 30 時間程度の稼働を目標にしている。

その一方で、覚醒下でのデータ取得で最も懸念された CNT-Y 電極と皮膚の接触部分が体動で動くことによる信号への影響は非常に少ないように見受けられた。体表面電極の問題点は当該研究分野において指摘されており、特に、皮膚のインピーダンスと広がり抵抗について 1970 年代から 80 年代にかけて議論がされているが、根本的な解決には至っていないようである。CNT-Y は現在汎用されている金属電極とは異なり分極しないことを特徴とするが、それ以外にも表面電極として有用な特性があるのかもしれない。

EEG に関して、現在、動物を対象とした実験では脳内に電極を刺入して測定していることが一般的であるため、表面電極で測定している本研究と直接比較することはできないが、CNT-Y 表面電極により麻酔下と覚醒下での違い、化合物投与後の変化が明確に捉えられている。特に、ニコチンを投与した際の波形変化は顕著であり、信号の振幅も大きい。EEG は大脳皮質の錐体細胞の電位変化であるとされているが、それ以外にも筋電、心電図、脈波、呼吸、眼球運動によるアーチファクトが混入することが知られている。本研究では、動物の一般状態観察も並行して行っており、ニコチンで見られた EEG 波形観察時では、動物の激しい動きは観察されていない。そのため、本研究の実験条件においてこれらのアーチファクトが

影響しているか否かは不明であり、更なる観察・解析が必要である。その一方で、EEG に混入するアーチファクトは動物の状態を伝える情報とも捉えられる。急性毒性試験では、これらの情報もうまく活用することで、動物の状態把握の深化につながることを期待される。

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 を表面電極として独自開発のトランスミッターを通して、覚醒下、非拘束のヘアレスラットから ECG 及び EEG を測定が可能となった。脳及び心臓に作用する各種モデル化合物を投与し、その影響を捉えることに成功した。現在は商業的に入手可能な測定装置と独自開発のセンサーとトランスミッターを混在させて使用しているが、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るため、費用と時間を要するため、一般化学物質の分類と表示に利用される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

Yuhji Taquahashi, Ken-ich Aisaki, Koichi Morita, Kousuke Suga, Satoshi Kitajima: Application of the matrix profile algorithm for detecting abnormalities in rat electrocardiograms. Fundam. Toxicol. Sci. 2024; 11(6): 289-296. [doi.org/10.2131/fts.11.289]

Makiko Kuwagata, Yuko Doi, Hirokatsu Saito,

Mariko Tsurumoto, Toshime Igarashi, Takuya Nishimura, Yuhji Taquahashi, Yoko Hirabayashi, Satoshi Kitajima: A 90-day repeated oral dose toxicity study of p-cymene in rats. Fundam. Toxicol. Sci. 2024; 11(4): 169-181.[doi.org/10.2131/fts.11.169]

2. 学会発表

Taquahashi Y, Aisaki K, Morita K, Kousuke Suga K, Tsuji M, Kitajima S, Application of Matrix Profile Algorithm for Detecting Abnormalities in Waveform Data with Repetitive Patterns to Electrocardiograms, 第 51 回日本毒性学会学術年会(2024.7.4)福岡

北嶋 聡, 高橋 祐次, 相崎 健一, 菅野 純: フグ毒テトロドトキシンを単回経口投与した際のマウス肝及び海馬 Percellome トキシコゲノミクス. 第 51 回日本毒性学会学術年会(2024.7.3)

Yuhji Taquahashi, Koichi Morita, Kousuke Suga, Masaki Tsuji, Makiko Kuwagata, Ken-ich Aisaki, Satoshi Kitajima, Development of a telemetry unit for measuring rat biopotential: easy to attach, less invasive by using carbon nanotube yarn as a surface electrode, SOT 2025 64th Annual Meeting in Orlando, Florida 2025.3.18,Poster

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

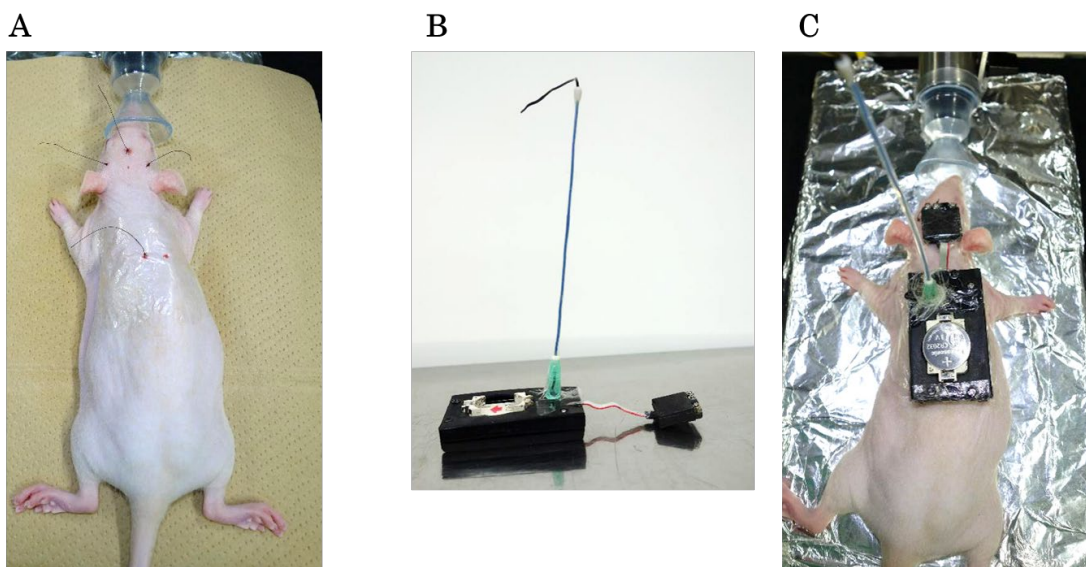
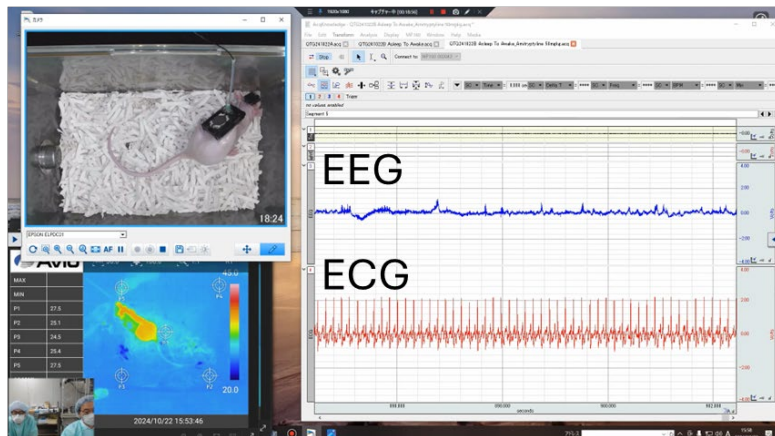


図 1: 表面電極 CNT-Y の装着とトランスミッター

A: 心電図 (ECG) 測定用電極として 2 箇所 (左耳介基部、背部)、脳波 (EEG) 測定用電極として 2 箇所 (ブレグマ、右耳介基部) に CNT-Y を結紮した。B: 独自に開発したトランスミッター。アンテナ (約 24cm) と電源部分と頭部用のパートを分割して作製し導線にて接続している。C: 動物にトランスミッターを装着した動物の様子。

A



B

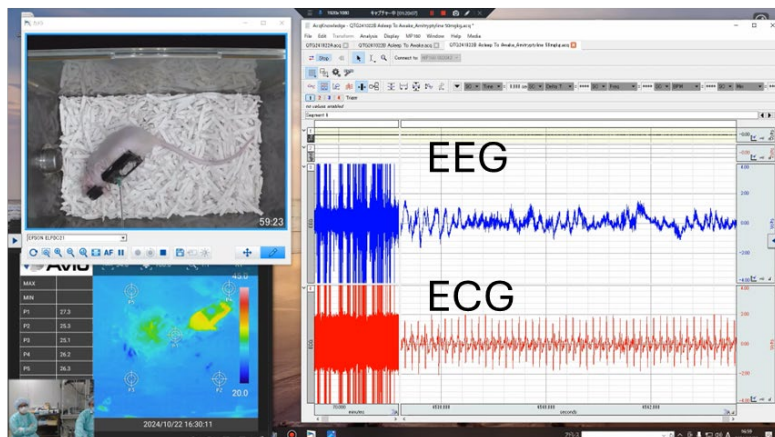


図 2: アミトリプチリン塩酸塩投与前後の EEG、ECG、サーモグラフィ

A: 覚醒下、非拘束状態の EEG (青線) と ECG (赤線) 波形。B: アミトリプチリン塩酸塩 50mg/kg 投与後の EEG と ECG 波形。EEG は振幅が大きくなり、ECG は脈拍数が増加した。動物の行動は可視光とサーモグラフィにて観察した。

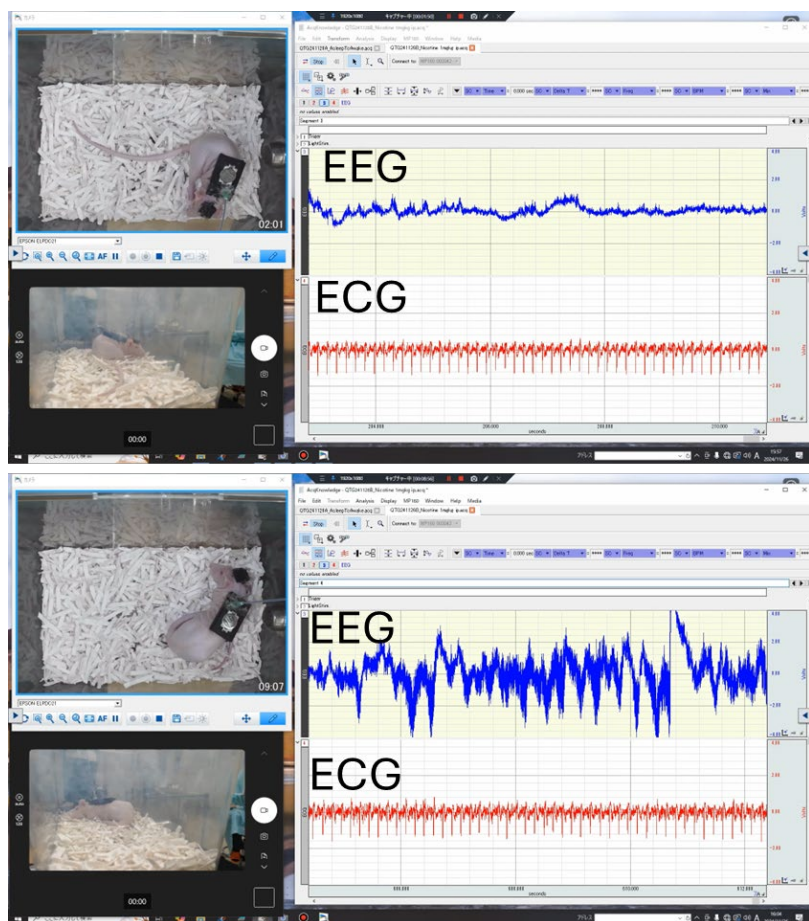


図 3: ニコチン投与前後の EEG、ECG、サーモグラフィ

A: 覚醒下、非拘束状態の EEG (青線) と ECG (赤線) 波形。B: ニコチン 1 mg/kg 投与後の EEG と ECG 波形。動物はうずくまって動きを停止しているが、EEG の振幅は極めて大きくなっている。ECG は脈拍数が増加した。

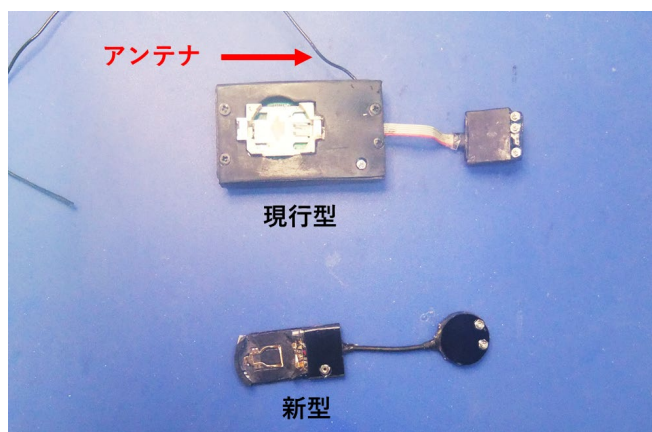


図 4: 独自開発のトランスミッター

上段が現行型のトランスミッターであり、約 24cm アンテナが必要である。下段は現在開発中のトランスミッターで、サイズが小さくなりアンテナも不要となる。現行型と同等 (CR2032) のバッテリーで連続 30 時間程度の

稼働が可能であることを確認した。

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-(22KD1004)
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: 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。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関済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により、死因の究明につながる情報を得ることを目的としている。R6 年度は、フグ毒として知られているテトロドトキシンを対象に、海馬の解析を行った。遺伝子発現変動解析の結果、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、in silico プロモーター解析を、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、あるいはサイトカインである TNF が調節因子として抽出されてきた。興味深いことに、海馬での上流解析において、軸索輸送に関与していることが知られハンチントン病の病因遺伝子であるが、正確な機能は未解明であるハンチンチンタンパク質(HTT)が抽出された。

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

モデル物質として、フグ毒として知られてい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。

24 時間無作用量を高用量とし、12 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを対象とし、モデル物質として、フグ毒として知られるテトロドトキシン(tetrodotoxin, TTX、生化学用；ロット番号：LKG5746；純度：95.7 % [HPLC]、富士フイルム和光純薬(株))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%メチルセルロース(MC)液(0.5w/v% メチルセルロース溶液 400cP、滅菌済)、富士フイルム和光純薬(株)), pH3.5)の 4 点からなる計 16 群、各群 3 匹、合計 48 匹の海馬の mRNA を採取し、GeneChip MOE430v2 (affymetrix 社)を用い、約 45,000 プローブセット(ps)の遺伝子発現の絶対量を Percellome 法(Kanno J et al, BMC Genomics 7 64 2006)により得て網羅的解析をおこなった。なお、TTX はアルカリ性の溶液中では不安定であり、酸性条件下で溶解し、投与溶液を準備することは必須操作である(常法では、0.1%酢酸で希釈)。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 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。

C. 研究結果

用量設定実験の結果、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、30µg/kg の投与用量を設定した。海馬において、比較的多くの遺伝子の発現変動が認められ(121ps の増加、減少はゼロ)、解析の結果、ストレス応答やサイトカインに係るシグナルネットワークが抽出された。具体的には、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、in silico プロモーター解析を、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、あるいはサイトカインである TNF が調節因子として抽出されてきた。また、フォールスコリンとイソブチルメチルキサンチンが抽出され、細胞内 cAMP レベルの増加が示唆された。興味深いことに、海馬での上流解析において、軸索輸送に関与していることが知られハンチントン病(HD)の病因遺伝子であるが、正確な機能は未解明であるハンチンチンタンパク質(HTT)が抽出されてきた。

D. 考察

急性毒性試験における遺伝子発現変動解析については、以下のような背景をもとに実施した。すなわち、フグ毒として知られる TTX とその類似物質が、ヨーロッパ海域の腹足類や二枚貝から検出されたため、欧州食品安全機関(EFSA)は、海産二枚貝における TTX のリスク評価を実施した。雌性 Swiss マウスを用いた急性経口試験の結果に基づき、最も感度の高いエンドポイントとして「apathy(無気力状態)」が選択され、その無影響量(NOEL)である 25 µg/kg 体重に基づいて、TTX およびその類縁物質の急性参照用量(ARfD)として 0.25 µg/kg 体重が導き出された(2017 年)。従ってマウスにおいては、TTX の経

口投与により、人での中毒症状としてあまり知られていない「apathy」という中枢影響が、最も感度良く誘発されることが示唆された。TTX 誘発 apathy の誘発分子メカニズムの探索を目的として、分子メカニズムに基づく毒性予測に向けて開発された Percellome トキシコゲノミクスを適用した。

TTX の単回経口投与により、マウス海馬においてストレス応答や炎症、及び、細胞内 cAMP レベルの増加が示唆され、後者では海馬における記憶の長期増強や非選択的なニューロン活性化が起きている可能性が示唆された。しかし、チャネル分子など、神経伝達に絡むシグナル分子の発現変動は目立たなかったことから、示唆されたこれらの影響では、apathy との関連は不明であった。そこでさらに詳細な解析を行うために、Percellome データベース(150 化学物質)について、海馬において TTX の場合と類似した遺伝子発現変動を惹起する物質を探索したところ、デヒドロ酢酸ナトリウム、サリドマイド、クロルピリホスなどが挙がってきた。これらについてもそれぞれ上流解析をしたところ、興味深いことに、これらに共通して、ストレス応答やサイトカインに関わるものに加え、やはり HTT が抽出されてきた。すなわち、これらの物質においても急性影響として apathy が誘発される可能性が示唆されたが、いずれも未報告であり、今後の検討を要する。この点、apathy は一般状態の変化であり、人への外挿性を考慮すると、本研究班でも扱っている脳波などの測定により Apathy の把握の客観化をする必要があるものとする(急性毒性の近代化の必要性)。

そこで、この HTT と apathy との関連について文献検索をしたところ、「ハンチントン病(HD)は常染色体優性の神経変性疾患であり、運動障害、認知症、精神症状を引き起こすが、apathy は一般的な症状であり、HD における apathy は時間とともに増加し、臨床転帰の悪化と関連し、これらの関連はうつ病とは独立していた」という論文(Michael H Connors et al, J Neuropsychiatry Clin Neurosci 35(1): 69-76,2023)を見出した。すなわち、TTX による apathy 誘発に、HTT シグナルネットワークが関与する可能性が強く示唆された。しかし、apathy 誘発に向けた HTT の具体的なシグナルネットワークは不明であり、

HTT シグナルのさらなる機能解析が待たれる(シグナルネットワーク基礎研究の必要性)。

D. 結論

急性毒性試験における遺伝子発現変動解析については、apathy はハンチントン病(HD)で最もよくみられる神経行動学的症状の 1 つとする論文から、TTX による apathy 誘発に、HTT シグナルネットワークが関与する可能性が示唆されたが、apathy 誘発に向けた HTT の具体的なシグナルネットワークは不明であり、HTT シグナルのさらなる機能解析が待たれる。また人への外挿性を考慮すると、apathy のような一般状態の変化を、脳波などの測定により Apathy の把握の客観化をする必要があ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

Yuhji Taquahashi, Ken-ich Aisaki, Koichi Morita, Kousuke Suga, Satoshi Kitajima: Application of the matrix profile algorithm for detecting abnormalities in rat electrocardiograms. Fundam. Toxicol. Sci. 2024; 11(6): 289-296.[doi.org/10.2131/fts.11.289]

Makiko Kuwagata, Yuko Doi, Hirokatsu Saito, Mariko Tsurumoto, Toshime Igarashi, Takuya Nishimura, Yuhji Taquahashi, Yoko Hirabayashi, Satoshi Kitajima: A 90-day repeated oral dose toxicity study of p-cymene in rats. Fundam. Toxicol. Sci. 2024; 11(4): 169-181. [doi.org/10.2131/fts.11.169]

Kiyoshi Hashimoto, Hiroshi Arakawa, Rikako Imamura, Takuya Nishimura, Satoshi Kitajima, Takuya Sato, Kazuhide Makiyama, Takehiko Ogawa, Satoshi Yokota: A novel alternative method for long-term evaluation of male reproductive toxicity and its recovery using a pre-pubertal mouse testis organ culture system.

J Appl. Toxicol. 2024; 44(5): 784-793. [doi.org/10.1002/jat.4584]

Hidehito Miyaso, Satoshi Yokota, Kousuke Suga, Yui Hashimoto, Céline Kouno, Kenta Nagahori, Masahiro Itoh, Satoshi Kitajima: Histological differences between the central and peripheral areas of the testes of busulfan-administered mice. J Toxicol Sci. 2024; 49(4): 139-149. [doi.org/10.2131/jts.49.139]

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]

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]

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]

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

2. 学会発表

五十嵐智女、安彦行人、小野竜一、高橋 雄、桑形麻樹子、北嶋 聡: ゲノム編集によるノックインマウス作製時に生じた、オンターゲット部位の多様な変異とその次世代伝達、第71回日本実験動物学会総会、

京都、2024年5月29日、ポスター

北嶋 聡, 高橋祐次, 相崎健一, 菅野 純: フグ毒テトロドトキシンを単回経口投与した際のマウス肝及び海馬 Percellome トキシコゲノミクス、第51回日本毒性学会学術年会、福岡、2024年7月3日、口頭

横田 理、宮宗秀伸、菅 康佑、兼子 智、若山友彦、北嶋 聡: Reactive blue 2 の雄性生殖毒性評価への適用、第51回日本毒性学会学術年会、福岡、2024年7月5日、口頭

小野竜一、桑形麻樹子、成瀬美衣、渡邊章仁、鷹野正生、長谷川拓郎、高島宏昌、吉岡祐亮、落谷孝広、平林容子、北嶋 聡: バルプロ酸(VPA)の妊娠マウスへの反復投与により誘導される羊水由来の細胞外小胞 Small RNA、第51回日本毒性学会学術年会、福岡、2024年7月5日、口頭

齊藤洋克、横田 理、北嶋 聡: セルトリ細胞におけるビメンチンの免疫組織化学的变化と精子形成不全との関連、第51回日本毒性学会学術年会、福岡、2024年7月3日、ポスター

五十嵐智女、西村拓也、北嶋 聡: 細胞培養食品の開発や規制に関する最近の国際動向、第51回日本毒性学会学術年会、2024年7月4日、ポスター

堀 正敏、三原大輝、後藤もも、徳永弥月、茶園貴志、黒澤珠希、北嶋 聡: 細胞培養食品バイオハザード研究 2: 培養細胞の遺伝子発現における老齢個体の影響と 継代による生体内有害物質合成/分解系の遺伝子変動、第51回日本毒性学会学術年会、福岡、2024年7月4日、ポスター

高橋祐次、相崎健一、森田紘一、菅 康佑、辻昌貴、北嶋 聡: 心電図の異常検出法としてのマトリクスプロファイルアルゴリズムの応用、第51回日本毒性学会学術年会、福岡、2024年7月4日、ポスター

横田 理、前野 愛、北條 幹、辻 昌貴、森田 紘一、菅 康佑、相田麻子、広瀬 明彦、菅野 純、高橋祐次、北嶋 聡: 多層カーボンナノチューブのマウス単回吸入曝露による肺負荷量の経時的変化、第51回日本毒性学会学術年会、福岡、2024年7月4日、

ポスター

北嶋 聡:毒性学 revisited-生命科学のパラダイムシフトと毒性学の進展-、基調講演 6L-1「拮抗剤、分析と中毒」、第 46 回日本中毒学会総会・学術集会、(2024.7.24.)、神戸

五十嵐智女、西村拓也、北嶋 聡:細胞培養食品(いわゆる培養肉)の開発と安全性確保に関する最新動向—家畜・家禽以外の動物 種を含めて—、日本動物学会第 95 回長崎大会、長崎、2024 年 9 月 14 日、口頭

北嶋 聡:いわゆる培養肉の開発動向とその食品安全に関する諸外国の規制動向、日本食品化学学会第 40 回食品化学シンポジウム、(2024.11.15)、川崎

北嶋 聡:網羅的分子毒性学からみたヒトと化学物質との共生、シンポジウム 3S02m「ヒトとヒト、異種生物、そして環境との「共生」を考える」、APPW2025(第 130 回日本解剖学会・第 102 回日本生理学会・第 98 回日本薬理学会 合同大会)、2025.3.19、千葉

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

**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)**

分担研究報告書

分担研究課題 急性毒性試験における行動解析

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、聴覚性プレパルス驚愕反応抑制試験装置（プレパルス・インヒビション）を用いた解析を行った。雌 ICR マウスを使用し、アセフェート (300 mg/kg)、無水カフェイン (300 mg/kg)、ニコチン (50 mg/kg)、を選択し、急性経口毒性発現時のプレパルス・インヒビション（軽減率）の経時的影響を解析した。その結果、80db、85db、90db のプレパルスに対して、120db のパルスを用いたプレパルス・インヒビション（軽減率）については、コントロール群と比較して、投与 2 時間後および投与 24 時間後にアセフェート投与群とニコチン投与群に増強傾向が認められたが、無水カフェイン投与群には顕著な差異は認められなかった。

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。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診断学を基盤にしたスコア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与える影響を非侵襲的なバイタルサイン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、急性毒性試験における行動解析について、聴覚性プレパルス驚愕反応抑制試験装置(プレパルス・インヒビション)を用いた解析を行った。雌 ICR マウスを使用し、アセフェート(300 mg/kg)、無水カフェイン(300 mg/kg)、ニコチン(50mg/kg)、を選択し、急性経口毒性発現時のプレパルス・インヒビション(軽減率)の経時的影響(2 時間後、及び 24 時間後)を解析している。なお、突然に強い感覚刺激(この場合は、聴覚性刺激)を動物に与えることで生じる驚愕反応が、その強い刺激の直前(60-120 msec)に比較的弱い刺激を先行させることで、抑制される現象をいう。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

まず、80db、85db、90db、95db、100db、105db、110dbにて驚愕反応量を調べたところ、コントロール群と比較して、投与 2 時間後のアセフェート投与群とニコチン投与群に驚愕反応量の抑制が確認された。一方で、無水カフェイン投与群に驚愕反応量の増強傾向が認められた。また、投与 24 時間後ではアセフェート投与群とニコチン投与群に驚愕反応量抑制の緩和が確認された。一方で、無水カフェイン投与群に驚愕反応量の抑制傾向が認められた(図1~4)。

80db、85db、90db のプレパルスに対して、120db のパルスを用いたプレパルス・インヒビション(軽減率)については、コントロール群と比較して、投与 2 時間後および投与 24 時間後にアセフェート投与群とニコチン投与群に増強傾向が認められたが、無水カフェイン投与群には顕著な差異は認められなかった(図

5)。

D. 考察

聴覚性プレパルス驚愕反応抑制試験装置(プレパルス・インヒビション)を用いた解析による急性毒性のエンドポイントの評価に関しては、化学物質による差異が顕著であるため、他の行動試験との組み合わせによる補正が必要と判断できた。

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

Harima R, Sasaki T, Kaneko T, Aso F, Takashima H, Toyama T, Hara K, Tanemura K, Saito Y. Ccdc152 is not necessary for male fertility, but contributes to maintaining sperm morphology. J Reprod Dev. 2024 Dec 13;70(6):396-404.

Yanai R, Mitani TT, Susaki EA, Minamihisamatsu T, Shimojo M, Saito Y, Mizuma H, Nitta N, Kaneda D, Hashizume Y, Matsumoto G, Tanemura K, Zhang MR, Higuchi M, Ueda HR, Sahara N. A novel tauopathy model mimicking molecular and spatial aspects of human tau pathology. Brain Commun. 2024 Sep 19;6(5):fcae326.

Sasaki T, Islam J, Hara K, Nochi T, Tanemura K. Male mice are susceptible to brain dysfunction induced by early-life acephate exposure. Front Neurosci. 2024 Jul 10;18:1404009.

Kaku K, Sasaki T, Hara K, Tanemura K. A single dose of clothianidin exposure induces varying sex-specific behavioral changes in adulthood depending on the developmental stage of its administration. J Toxicol Sci. 2024;49(7):301-311.

2. 学会発表

種村 健太郎: 発達期トスフロキサシン投与による成長影響と成熟後の神経行動様式、第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.7.3-5)

Ryua Harima, Kenshiro Hara, Kentaro Tanemura: Cytoplasmic dynein 2 is required to the regulation of intra-flagellar transport system in sperm flagellum formation. SSR (Society for the Study of Reproduction) Annual Meeting 2024, Dublin, Ireland (the Convention Centre Dublin) (2024.7.15-19)

張磨 琉亜、原 健士朗、種村 健太郎: マウス Tctex1d2 は体細胞系列の繊毛形成にはない、精子鞭毛形成に特有の機能をもつ、第 117 回日本繁殖生物学会大会 (2024.9.22-9.25)

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

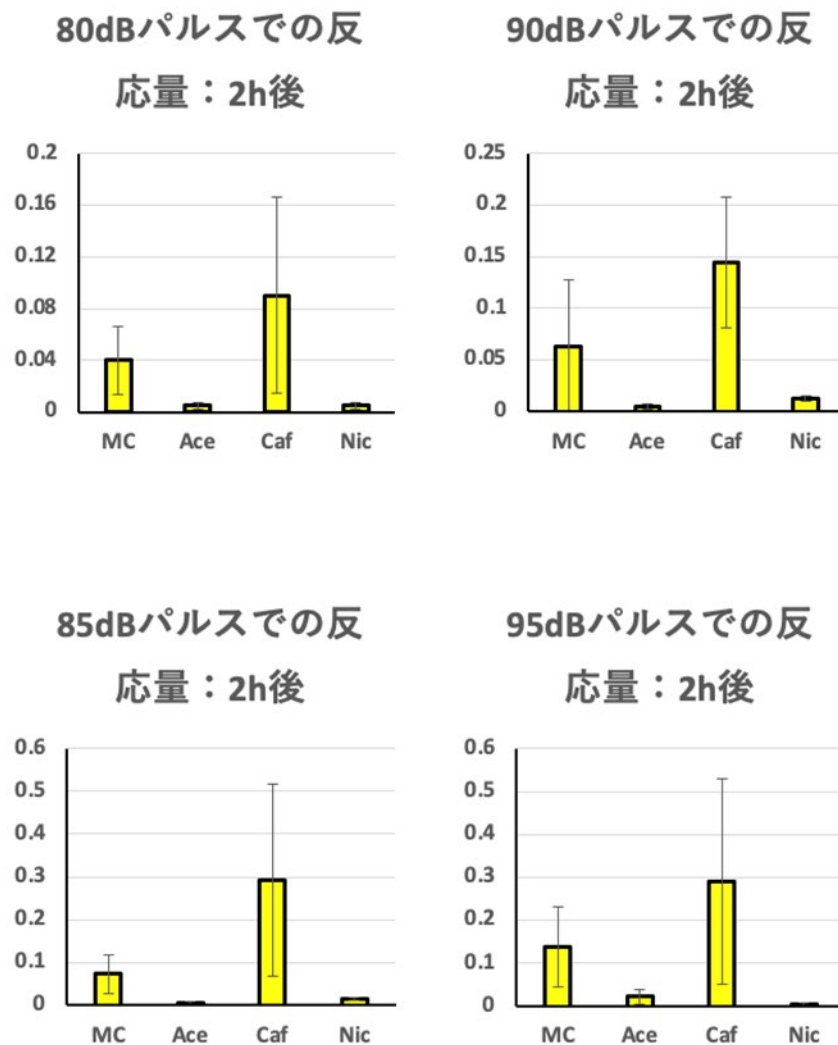
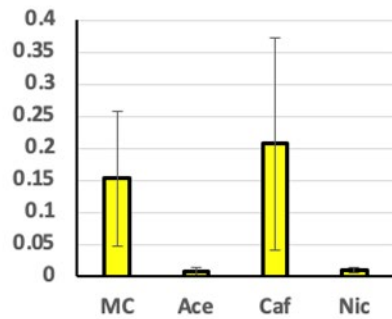


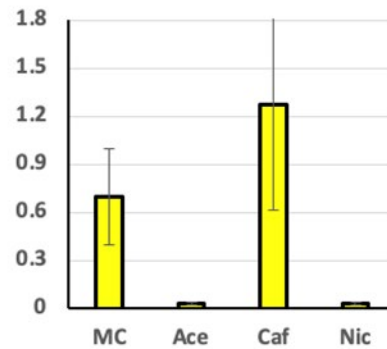
図 1

投与 2 時間後の 80db、85db、90db、95db の驚愕反応量。MC: コントロール群、Ace: アセフェート (300 mg/kg)、Caf: 無水カフェイン (300 mg/kg)、Nic: ニコチン (50mg/kg)。

100dBパルスでの
反応量：2h後



110dBパルスでの
反応量：2h後



105dBパルスでの
反応量：2h後

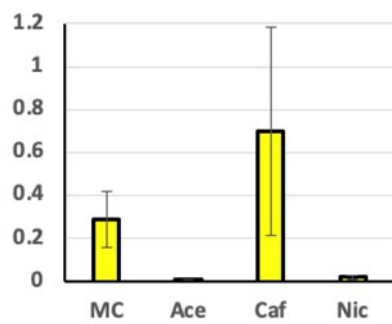


図2

投与 2 時間後の 100db、105db、110d の驚愕反応量。MC: コントロール群、Ace: アセフェート (300 mg/kg)、Caf: 無水カフェイン (300 mg/kg)、Nic: ニコチン (50mg/kg)。

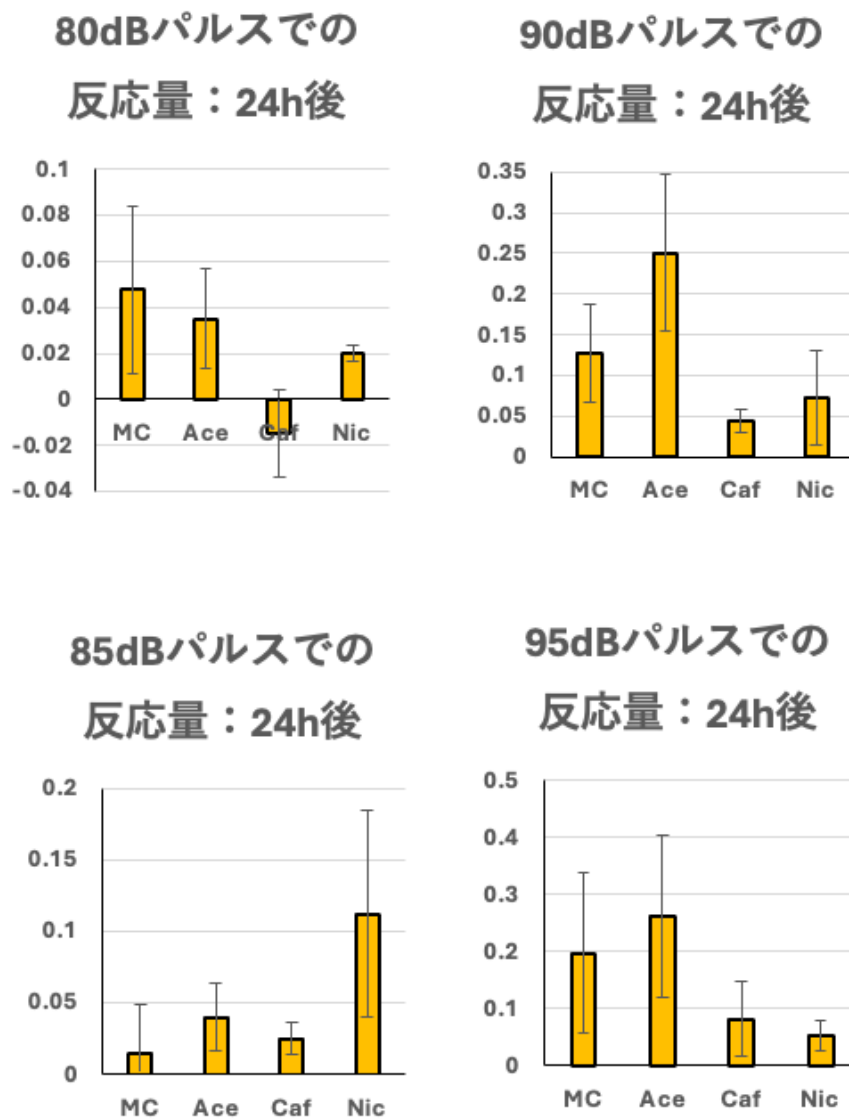


図3

投与 24 時間後の 80db、85db、90db、95db の驚愕反応量。MC: コントロール群、Ace: アセフェート(300 mg/kg)、Caf: 無水カフェイン(300 mg/kg)、Nic: ニコチン(50mg/kg)。

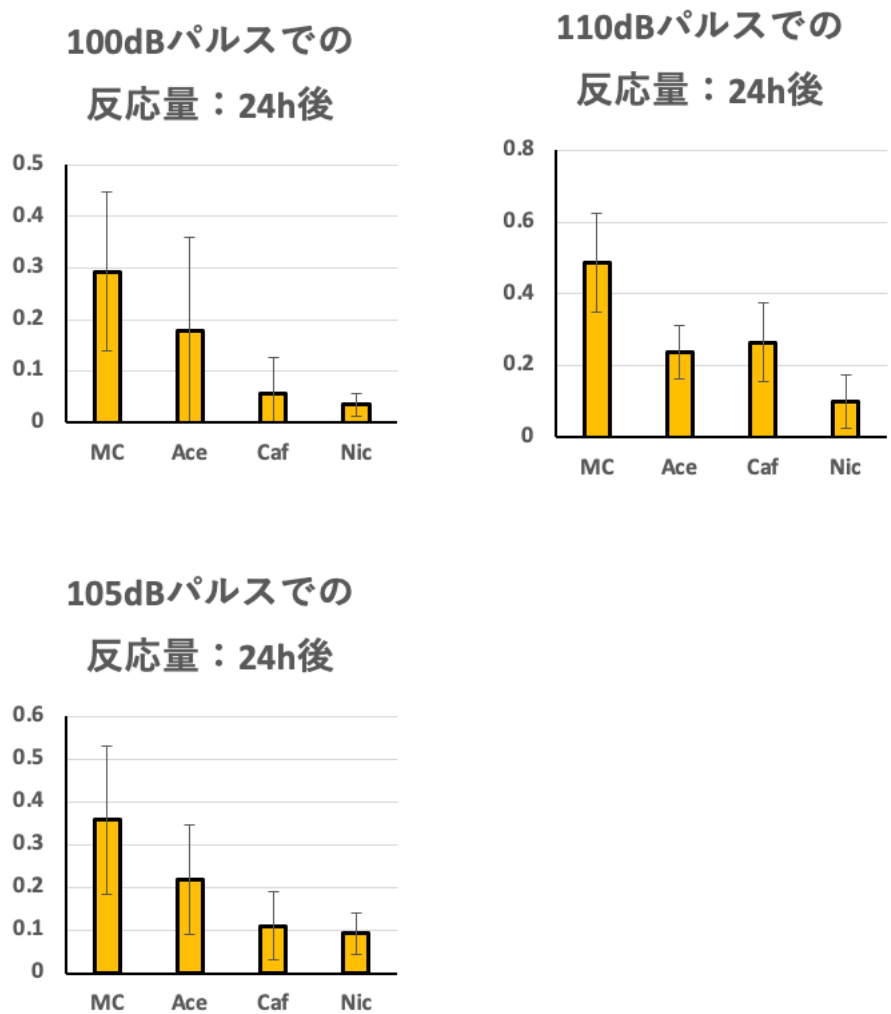


図 4

投与 24 時間後の 100db、105db、110d の驚愕反応量。MC: コントロール群、Ace: アセフェート(300 mg/kg)、Caf: 無水カフェイン(300 mg/kg)、Nic: ニコチン(50mg/kg)。

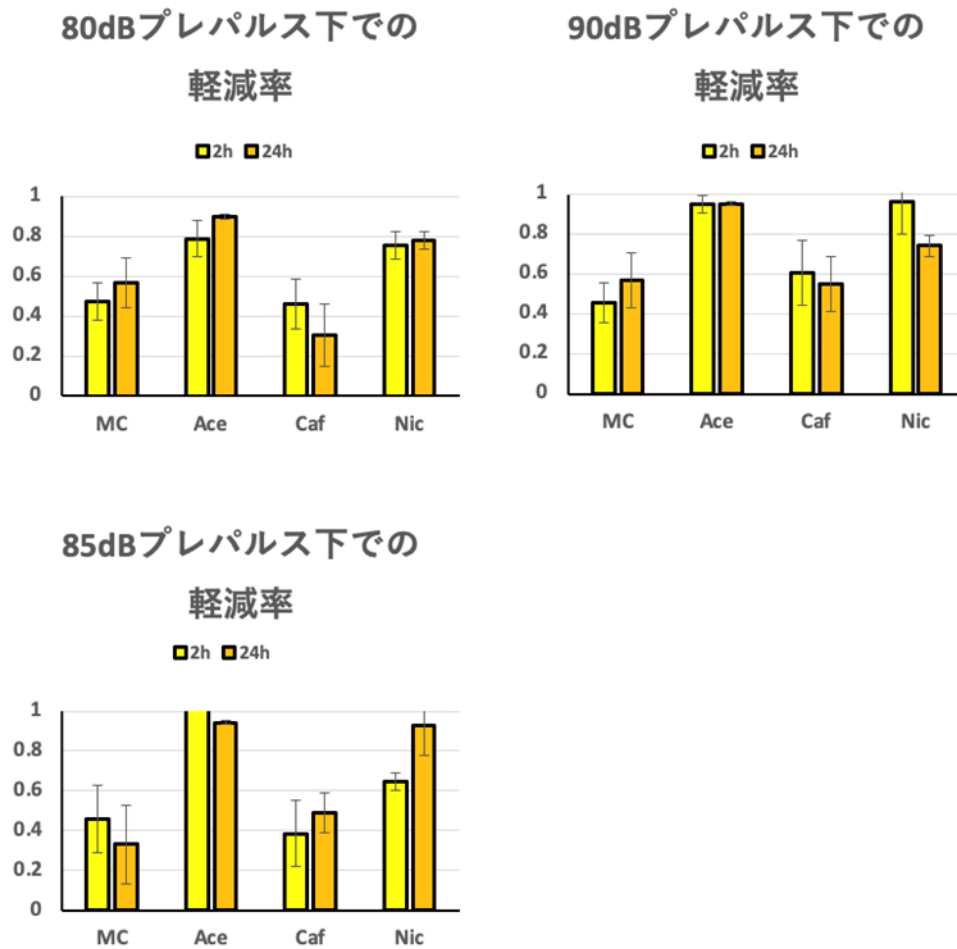


図 5

投与 2 時間後および 24 時間後の 80db、85db、90db のプレパルスに対して、120db のパルスを用いたプレパルス・インヒビション(軽減率)。MC: コントロール群、Ace: アセフェート(300 mg/kg)、Caf: 無水カフェイン(300 mg/kg)、Nic: ニコチン(50mg/kg)。

令和 6 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-(22KD1004)**

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。昨年度までに、(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。今年度は MP を組み込んだアプリケーションソフトウェアを作成し、動作確認を進めた。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:高橋祐次研究代表者)による心電図データを用い、急性毒性試験における利用の可能性やそのための最適化を検討した。

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。

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、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、覚醒下・非拘束状態において、投与前及び Amitriptyline (50mg/kg) 及び Nicotine (1mg/kg, 5mg/kg) 投与後のヘアレスラット(HWY/Slc)の心電図(ECG)データを用いた。

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、関連ライブラリーが充実している Python 言語(ver.3.9.1)を使用した。データ処理ライブラリーとして Numpy (ver.1.19.5)、Pandas(ver.1.2.1)、データ可視化ライブラリーとして Matplotlib (ver.3.3.4)、GUI ライブラリーとして TKinter (ver.8.6.9)を使用した。また Matrix Profile アルゴリズムの実装ライブラリーとして 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:

計算精度確認は必要に応じて 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

急性毒性試験において、心電図などの測定データをリアルタイムに現場で処理し、判断材料とするためには、自動若しくは必要最低限の操作のみで実行可能な解析評価システムが必要である。

昨年度までに有効性を確認した Matrix Profile アルゴリズム(MP)はライブラリーとして提供されているため、実行にはデータに応じてスクリプトを書き換えるためのキーボード入力等のやや煩雑な操作が必要だった。そこで今年度は MP を組み込んだグラフィカルユーザーインターフェイス(GUI)ベースのアプリケーションソフトウェア(アプリ) ECG_matrixprofile_analysis.pyを開発した(図1)。試験開始前に各パラメータを設定しておけば、ECG データファイルをドラッグ&ドラッグだけ(ダイアログボックスでも選択可能)で MP 解析が実行され、解析図が表示される。設定可能なパラメータには、ECG データファイルの様式に関係するもの、解析範囲に関するもの、MP 解析パラメータ、出力画像に関するもの、を用意した。

また本アプリは Python 言語で記述されているため、

基本的にマルチプラットフォーム対応となっている。また主な処理が MP 計算であるため、一般的な性能のコンピュータでも十分に動作可能であった。

ECG_matrixprofile_analysis.py の動作確認を兼ね、今年度新たに測定した ECG データ(投与前及び Amitriptyline (50mg/kg) 投与後、及び Nicotine(1mg/kg, 5mg/kg) 投与後)を用いて MP 解析を実施した。

今年度は覚醒下、非拘束状態での心電図測定であったため、全体的に体動などによるノイズが乗っていた(図2)。このため、MP 解析はノイズのない 5000 データポイント区間(2.5 秒間)を選んで実施した。Amitriptyline(50mg/kg)の ECG データ解析図を図3、Nicotine(1mg/kg, 5mg/kg)については図4に記載した。

これらは事前のノイズ除去やベースライン調整・正規化を一切行わず、解析単位区間のサイズ(周期的に出現するパターンのサイズ)のみを指定して MP 解析を実行したものであり、もちろん機械学習と異なりラベル付加や事前学習も行っていない。

また ECG_matrixprofile_analysis.py による MP 解析の操作性や処理速度を、昨年度と同じ汎用 PC (Windows10、第7世代 Intel Core m3、RAM8GB、SATA-SSD)にて評価したところ、昨年度(Jupyter lab 上で MP 解析スクリプトを実行)に比べて処理速度は同等のまま、操作性は明らかに向上しており、急性毒性試験実施中のリアルタイムの致死性予測に利用しうる性能を示した。

D. 考察

昨年度と同様、MP 解析により、Amitriptyline 及び Nicotine 投与による心電図異常を補足することが出来た。

これは機械学習と異なり、MP は原理的にラベル付けしたデータによる事前学習を必要としないことを実証しており、MP によって検出した異常波データを収集し、機械学習に利用できる可能性をも示している。

今回、急性毒性試験中のリアルタイム解析を想定し、MP を組み込んだアプリケーションソフトウェアを

in house 開発した。スクリプトを書き換えつつ実行していた昨年度までと異なり、試験実施中でも利用可能なほどに操作性は格段に向上したが、現状は ECG データファイルを、マウスを使ってドラッグ&ドロップすることが MP 解析の実行トリガーになっているが、ECG は経時的データであり、データポイント数の追加量は計測周期で予測できることから、将来的にはアプリケーションソフトウェアにタイマー機能を追加し、新たに追加記録された ECG データを定期的に自動解析する、等の機能強化を検討している。

E. 結論

昨年度までに有効性を確認した Matrix Profile アルゴリズム(MP)を組み込んだ GUI ベースのアプリケーションソフトウェアを作成した。本研究班独自開発のセンサーによって測定した心電図データを利用した性能評価においても、急性毒性試験におけるリアルタイム解析の実用化や、機械学習用の ECG 異常波の自動抽出手段としての利用などの可能性を示した。MP 解析と、先行研究で有用性を示した機械学習モデルと組み合わせれば、より効率的且つ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

Yuhji Taquahashi, Ken-ich Aisaki, Koichi Morita, Kousuke Suga, Satoshi Kitajima: Application of the matrix profile algorithm for detecting abnormalities in rat electrocardiograms. Fundam. Toxicol. Sci. 2024; 11(6): 289-296. [doi.org/10.2131/fts.11.289]

2. 学会発表

北嶋 聡, 高橋 祐次, 相崎 健一, 菅野 純: フグ毒テトロドトキシンを単回経口投与した際のマウス肝及び海馬 Percellome トキシコゲノミクス. 第 51 回日本毒性学会学術年会(2024.7.3)

Samik GHOSH, 長谷 武志, Vikraman

KARUNANIDHI, 谷内江 綾子, Sucheendra K PALANIAPPAN, 相崎 健一, 北嶋 聡, 菅野 純: ToxEye: トキシコゲノミクス・データのための Invisio モデル. 第 51 回日本毒性学会学術年会(2024.7.4)

高橋 祐次, 相崎 健一, 森田 紘一, 菅 康佑, 辻 昌貴, 北嶋 聡: 心電図の異常検出法としてのマトリックスプロファイルアルゴリズムの応用. 第 51 回日本毒性学会学術年会(2024.7.4)

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

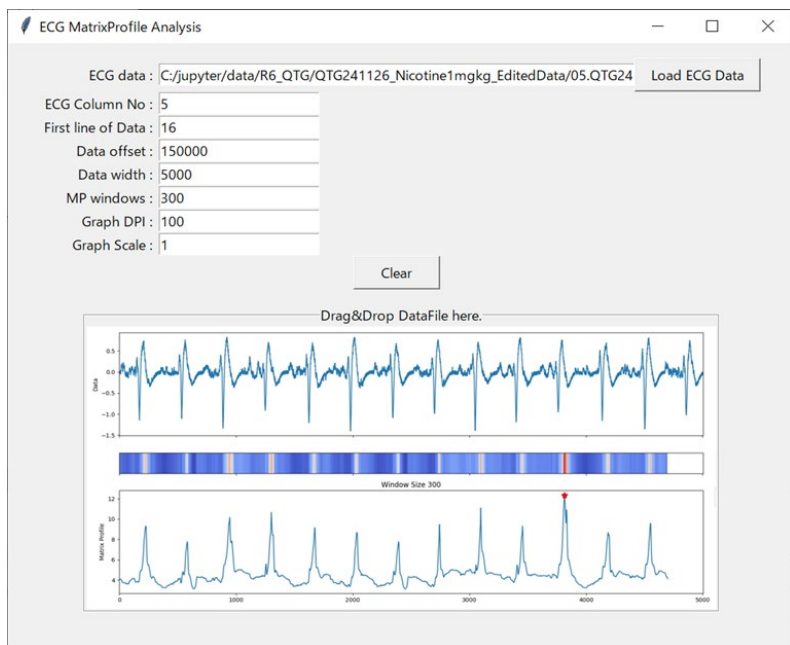


図 1 ECG_matrixprofile_analysis.py

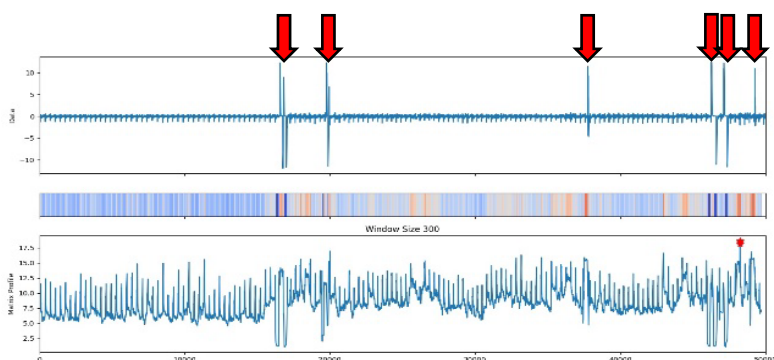


図2 ノイズの 1 例。ニコチン 1mg/kg 投与前 6m10s の ECG MP 解析図(上段が心電図、中段が異常スコアを示すヒートカラー、下段が異常スコアを折れ線で示す)。赤矢印が体動等によるノイズ。

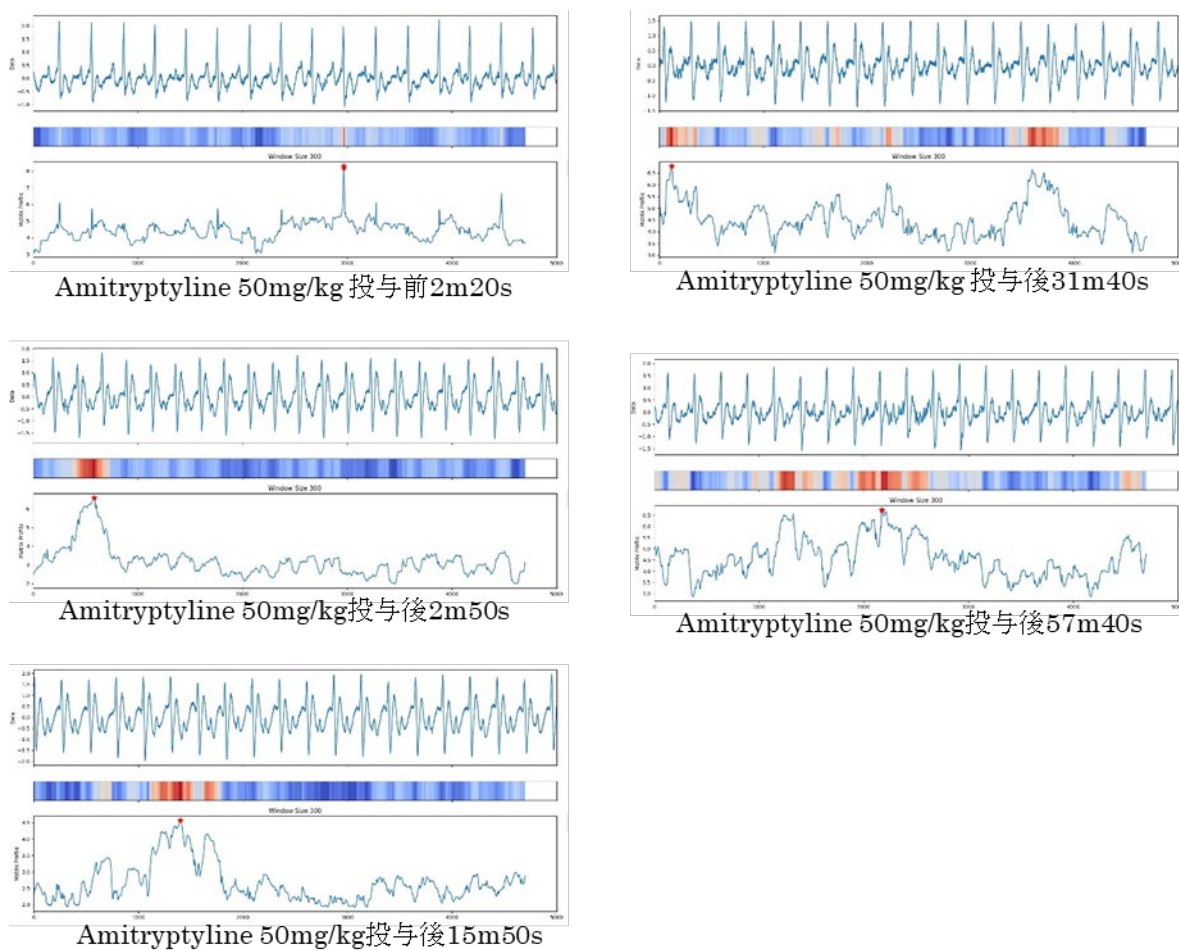


図 3. Amitriptyline 50mg/Kg 投与後の ECG 解析結果

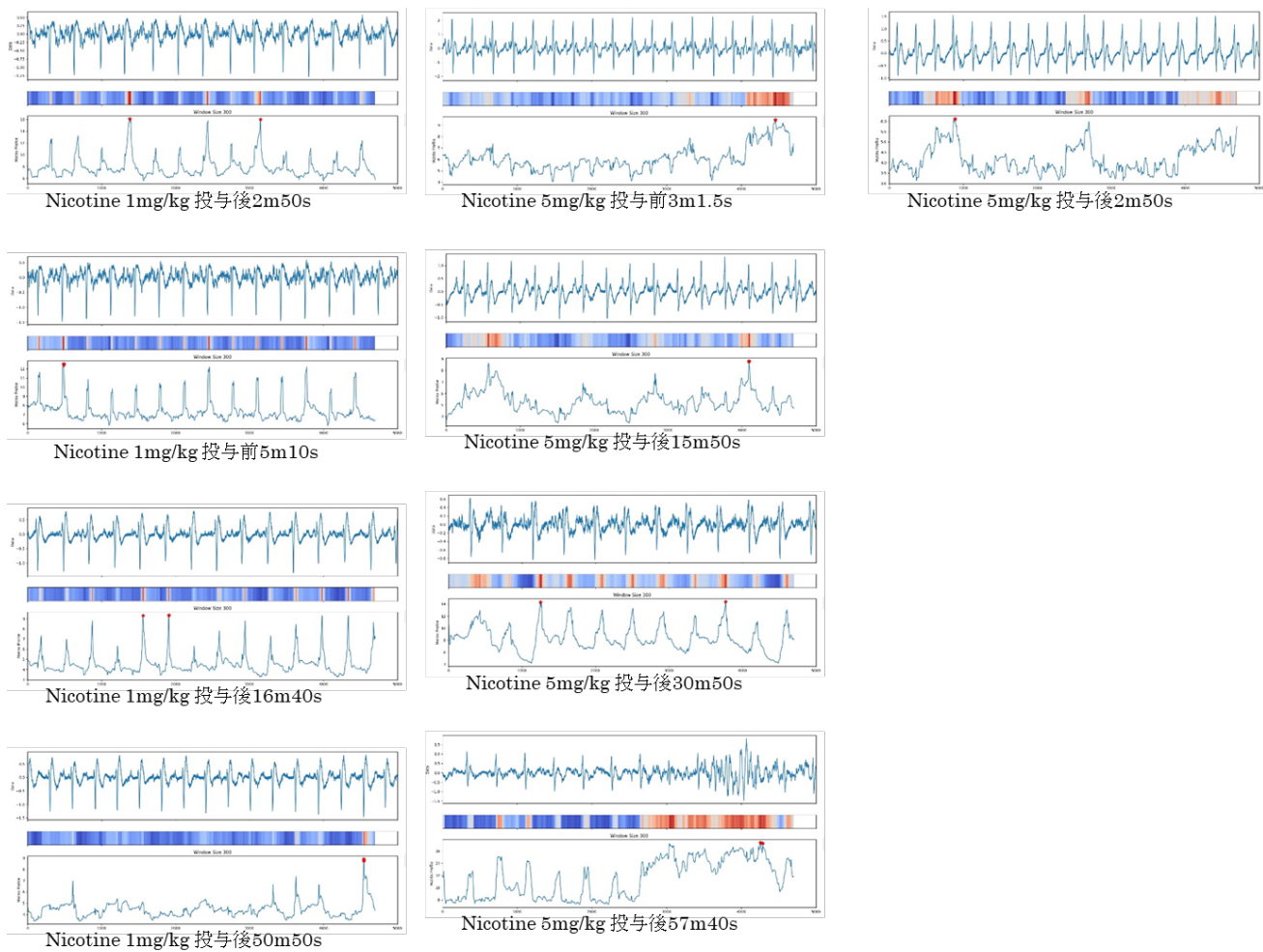


図 4. Nicotine 1 及び 5mg/Kg 投与後の ECG 解析結果

令和 6 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-(22KD1004)

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 東北工業大学工学部

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、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。さらに、前年度の研究で課題となった麻酔下と覚醒下での影響についても検討した。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。また、麻酔下と覚醒下における脳波解析への影響も明らかにした。本解析手法は化合物を動物に投与した際の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。

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。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および、麻酔下と覚醒下における脳波解析への影響を検討した。

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)の脳波測定データの解析を実施した。被験

物質としてアミトリプチリン塩酸塩および、ニコチンを使用し、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、投与後および麻酔下、覚醒下等の 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および、麻酔の有無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 5 mg/kg および、50 mg/kg 試験時の脳波波形に対する FFT の PSD を示す。Amitriptyline 5 mg/kg 試験は 2 検体で同様の試験を実施した。検体 1 について、投与前ではピーク値 0.118 V²/Hz、ピーク周波数 1 Hz、投与後ではピーク値 0.090 V²/Hz、ピーク周波数 1 Hz であった。検体 2 について、投与前ではピーク値 0.069 V²/Hz、ピーク周波数 3 Hz、投与後ではピーク値 0.079 V²/Hz、ピーク周波数 2 Hz であった。同様の試験ではあるが、投与前の時点で検体 1 と検体 2 の PSD には異なる特徴が観察され、検体の違いによる個体差が反映されることが判明した。各検体で被験物質投与による変化を評価した場合にも、検体 1 ではピーク値が減少するのに対して、検体 2 ではピーク値が増加し、共通の変化が得られなかったことから、覚醒下での脳波測定では動物の行動等による影響の考慮が必要であることが示唆される。Amitriptyline 50 mg/kg 試験では、投与前後でピーク値は変化しなかったが、ピーク周波数が 1 Hz から 2 Hz にシフトした。

図 2 に Nicotine 1 mg/kg および、5 mg/kg 試験時の脳波波形に対する FFT の PSD を示す。1 mg/kg について、投与前ではピーク値 0.054 V²/Hz、ピーク周波数 2 Hz、投与後ではピーク値 0.047 V²/Hz、ピーク周波数 2 Hz であった。5 mg/kg について、投与前ではピーク値 0.053 V²/Hz、ピーク周波数 2 Hz、投与後ではピーク値 0.055 V²/Hz、ピーク周波数 2 Hz であった。Nicotine の投与では PSD のピーク値および、ピーク周波数に顕著な変化は観察されなかった。

図 3 に麻酔下および、それに続く麻酔中止後の脳波波形に対する FFT の PSD を示す。麻酔下ではピーク値 0.060 V²/Hz、ピーク周波数 2 Hz、麻酔中止後 0-1 min ではピーク値 0.089 V²/Hz、ピーク周波数 2 Hz、麻酔中止後 1-2 min ではピーク値 0.084 V²/Hz、ピーク周波数 2 Hz、麻酔中止後 2-3 min ではピーク値 0.056 V²/Hz、ピーク周波数 3 Hz であった。麻酔下と比較して麻酔中止直後に PSD のピーク値が約 1.5 倍に増加し、約 3 分後には麻酔下と同程度に戻ったことから、覚醒下の脳波測定では麻酔中止による影響の混入を避けるために、麻酔中止後から一定時間経過してから測定が必要であることが示唆される。

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 5 mg/kg および、50 mg/kg 試験時のバースト解析の結果を図 4 に示す。検体による個体差はあるが、Amitriptyline 投与により、とくに β 波帯域以上で Oscillation rate、Burst rate ともに増加する傾向が観察された。50 mg/kg では 5 mg/kg と比較して変化は軽微であった。

Nicotine 1 mg/kg および、5 mg/kg 試験時のバースト解析の結果を図 5 に示す。1 mg/kg では Oscillation rate、Burst rate ともに変化が軽微であったのに対して、5 mg/kg では θ 、 α 波帯域の Burst rate を除いて、Oscillation rate、Burst rate ともに増加する傾向が観察された。

麻酔下および、それに続く麻酔中止後の脳波波形に対するバースト解析の結果を図 6 に示す。麻酔中止後から時間経過と共にすべての周波数帯域で Oscillation rate が減少する傾向が観察された。一方で、Burst rate は θ 、 α 、 β 波帯域で急激に増加した。

D. 考察

FFT の PSD による脳波解析について、同じ実験における検体の違いによる影響を検討した結果、異なる検体の個体差が FFT の PSD に反映されることが示唆された。また、Amitriptyline に対する応答の観点でも共通の特徴が得られなかったことから、覚醒下における脳波測定では動物の行動等による影響を考慮した評価が必要であることが示唆された。

麻酔下および、覚醒下における脳波解析への影響を検討した結果、麻酔中止直後に FFT の PSD が増加すること、および、麻酔中止後に Oscillation rate が減少し、Burst rate が急激に増加することが判明した。麻酔時と覚醒時で PSD のピーク値および、バースト解析の結果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ことが示唆された。

上記のような課題が示唆された一方で、各検体にお

ける被験物質投与による脳波信号の変化については、Amitriptyline によって β 波帯域以上で Oscillation rate、Burst rate とともに増加すること、Nicotine による Oscillation rate、Burst rate の増加が濃度依存的に観察されたことから、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。

本研究により、麻酔下ではなく覚醒時の脳波測定においても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ることが示された。覚醒下における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、上記課題が解決されると共に、活動状態に依存した脳波信号の評価が可能となる。

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、覚醒下における CNT-Y による脳波測定データから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。

F. 研究発表

1. 論文発表

Y. Ishibashi, N Nagafuku, S Kimura, X Han, I Suzuki, Development of an evaluation method for addictive compounds based on electrical activity of human iPS cell-derived dopaminergic neurons using microelectrode array, *Addiction Biology*. 29:e13443, 2024

X. Han, N. Matsuda, M. Yamanaka, I Suzuki, Development of a Novel Microphysiological System for Peripheral Neurotoxicity Prediction Using Human iPSC-Derived Neurons with Morphological Deep Learning, *Toxics*, 12(11), 809, 2024

2. 学会発表

Nami Nagafuku, Naoki Matsuda, Yuto Ishibashi, Ikuro Suzuki, “Enhanced Cardiotoxicity Assessment through Propagation Pattern

Analysis Using HD-CMOS-MEA in hiPSC-Derived Cardiomyocytes”, 2024 SPS Annual Meeting, 22-25 September, 2024, San Diego, USA

Xiaobo Han, Naoki Matsuda, Kazuki Matsuda, Makoto Yamanaka, Ikuro Suzuki, “Predicting Peripheral Neurotoxicity on Soma or Axon through Morphological Deep Learning and Electrical Measurements Using an In Vitro Microphysiological System”, MPS World Summit 2024, June, 10-14, 2024, Seattle, USA

Ikuro Suzuki, Xiaobo Han, Kazuki Matsuda, Naoki Matsuda, Makoto Yamanaka, “In vitro analysis of drug-induced neuron degeneration by morphological deep learning on a novel microphysiological system”, FENS forum 2024, June, 25-29, 2024, Vienna, Austria

Xiaobo Han, Naoki Matsuda, Makoto Yamanaka, Ikuro Suzuki, “Development of an in vitro assessment platform for drug-induced neuron degeneration based on morphological deep learning using cultured neurons in a microphysiological system”, *Neuroscience* 2024, October, 5-9, 2024, Chicago, USA

Y. ISHIBASHI, X. HAN, N. NAGAFUKU, N. MATSUDA, I. SUZUKI, “Functional analysis of synaptic network and single neuron in human iPS cell-derived neurons using HD-CMOS-MEA”, *Neuroscience* 2024, October, 5-9, 2024, Chicago, USA

鈴木郁郎、ヒト iPS 由来神経細胞およびアストロサイトを用いた in vitro 痙攣毒性予測と作用機序予測、第 51 回日本毒性学会学術年会、2024 年 7 月 4 日、福岡

Nami NAGAFUKU, Naoki MATSUDA, Kazuki MATSUDA, Ikuro SUZUKI, “Cardiotoxicity evaluation method using HD-CMOS-MEA can predict drug action mechanism”, 第 51 回毒性学会学術年会、2024 年 7 月 3-5 日、福岡

Xiaobo Han, Naoki Matsuda, Chinatsu Suzuki, Makoto Yamanaka, Ikuro Suzuki, “In vitro analysis of drug-induced neuron degeneration by morphological deep learning on a novel microphysiological system”, 第 51 回毒性学会学術年会, 2024 年 7 月 3-5 日, 福岡

松田 直毅, 永福 菜美, 石橋 勇人, 鈴木 郁郎, “ヒト iPS 細胞由来ニューロンの MEA 計測における殺虫剤の神経毒性評価と作用機序予測”, 第 51 回毒性学会学術年会, 2024 年 7 月 3-5 日, 福岡

石橋 勇人, 韓 笑波, 永福 菜美, 松田 直毅, 鈴木 智夏, 鈴木 郁郎, “CMOS-MEA を用いた Field Potential Imaging によるヒト iPS 細胞由来神経ネットワークと単一ニューロンの機能解析”, 第 51 回毒性学会学術年会, 2024 年 7 月 3-5 日, 福岡

倉敷 秀明, 韓 笑波, 石橋 勇人, 鈴木 郁郎, “中枢神経系における薬物毒性評価のための神経細胞と星状膠細胞の信号分離”, 第 51 回毒性学会学術年会, 2024 年 7 月 3-5 日, 福岡

横井れみ, 永福菜美, 松田直毅, 石橋勇人, 鈴木郁郎, “平面微小電極アレイを用いたドラベ症候群脳オルガノイドにおける禁忌薬の評価”, 第 51 回毒性学会学術年会, 2024 年 7 月 3-5 日, 福岡

鈴木郁郎, 化合物評価における IVIVE への取り組み
鈴、LIFE2024、2024 年 9 月 13 日、東京

中村奈緒子、帆足和希、秋山翔太、安田英莉、松田直毅、鈴木郁郎、高木基樹、岸田晶夫、木村剛、脱細胞化組織の組織学的評価への AI の応用、日本バイオマテリアル学会シンポジウム、2024 年 10 月 28-29 日、仙台

帆足和希、松田直毅、鈴木郁郎、高木基樹、岸田晶夫、木村剛、中村奈緒子、脱細胞化組織模倣画像の導入による ECM 構造特徴マップの拡張、日本バイオマテリアル学会シンポジウム、2024 年 10 月 28-29 日、仙台

鈴木郁郎、超精密神経活動計測と AI 解析による創薬応用、学振 R031 ハイブリッド量子ナノ技術委員会 第 18 回研究会、2024 年 11 月 1 日、東京

永福 菜美, 松田 直毅, 石橋 勇人, 鈴木 郁郎, “HD-CMOS MEA 計測による心毒性検出と作用機序予測法の構築”, 第 15 回スクリーニング学研究会, 2024 年 11 月 21 日, 東京

石橋 勇人, 永福 菜美, 久田 素, 鈴木 郁郎, “培養神経細胞の Ca オシレーション解析による発達神経毒性評価法の検討”, 第 15 回スクリーニング学研究会, 2024 年 11 月 21 日, 東京

Xiaobo Han, Naoki Matsuda, Makoto Yamanaka, Ikuro Suzuki, “A novel microphysiological system for assessment of drug-induced neuropathy using human iPSC-derived neurons with morphological deep learning”, 第 15 回スクリーニング学研究会, 2024 年 11 月 21 日, 東京

鈴木郁郎、in vitro MEA 試験による化合物の神経作用評価、第 41 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム、2024 年 11 月 25 日、仙台

鈴木郁郎、ヒト由来神経細胞を用いた NAMs や MPS の利活用と国際動向、第 47 回日本分子生物学会年会、2024 年 11 月 28 日、福岡

鈴木郁郎、in vitro 神経モデルを用いた化合物評価、日本動物実験代替法学会 第 37 回大会、2024 年 11 月 30 日、宇都宮

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

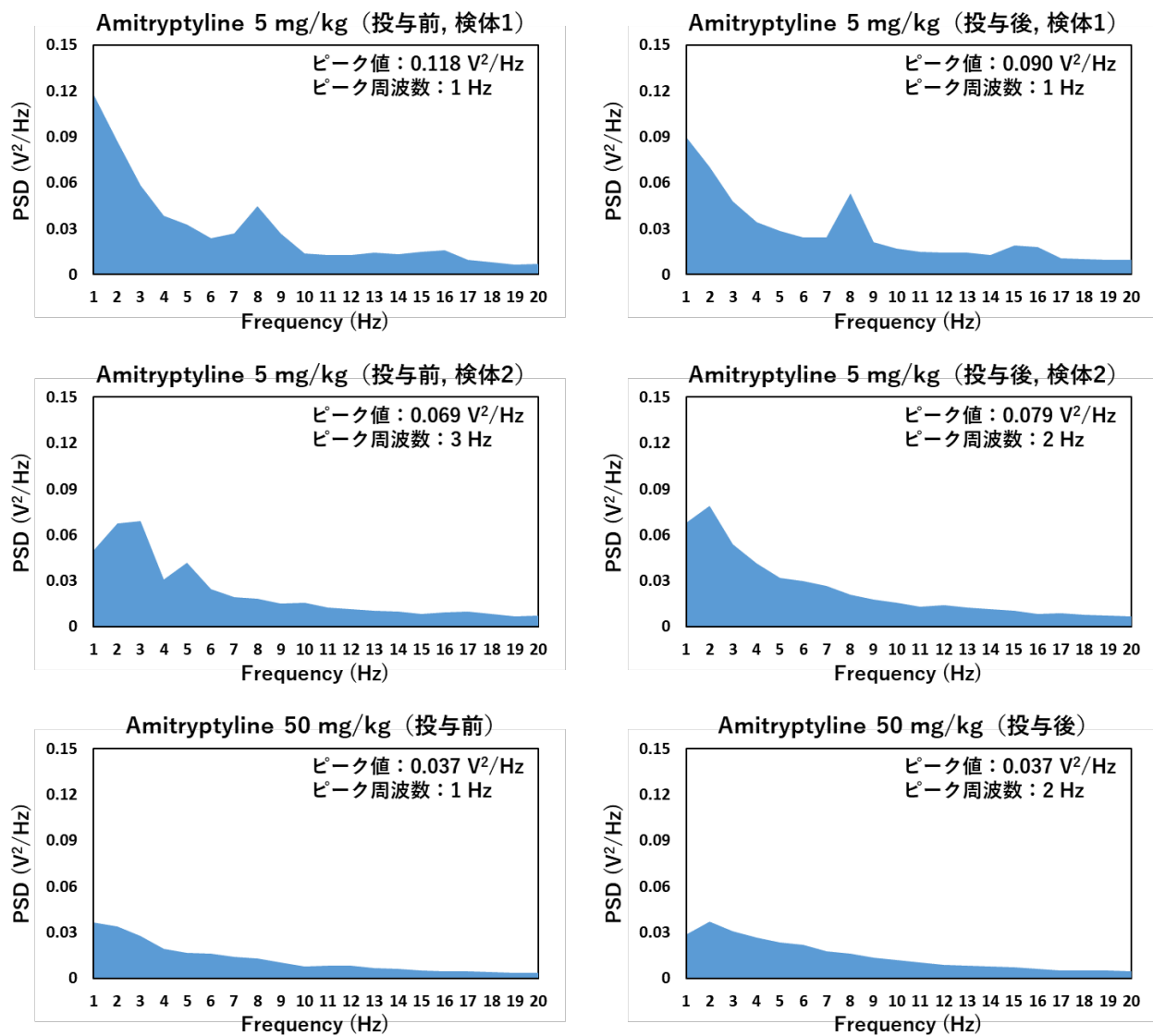


図1 Amitriptyline 試験時のFFTによるPSD

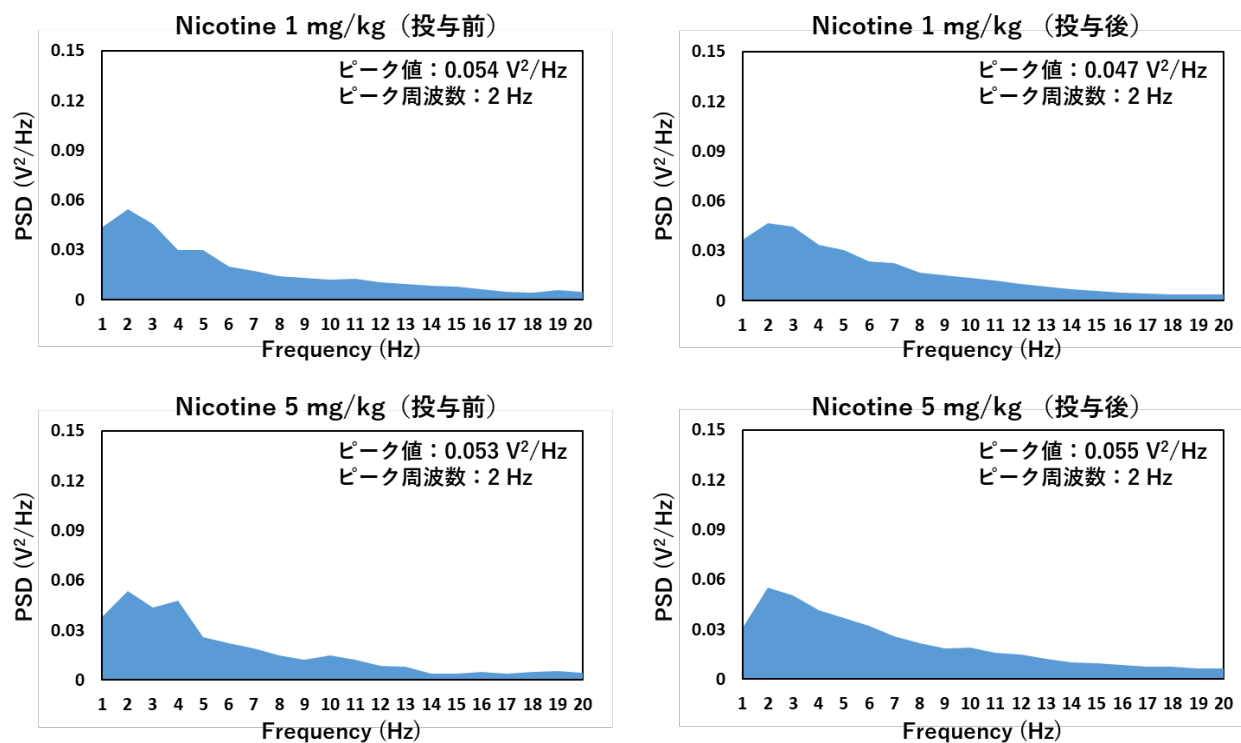


図2 Nicotine 試験時のFFTによるPSD

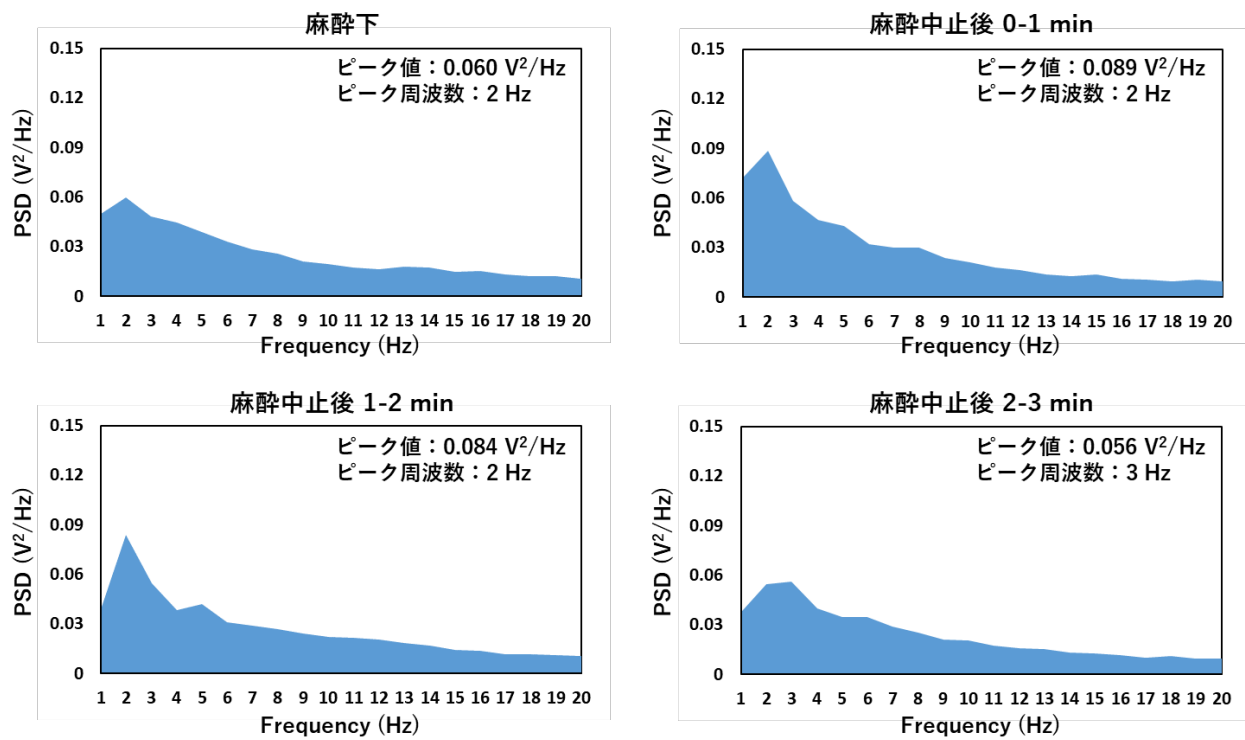
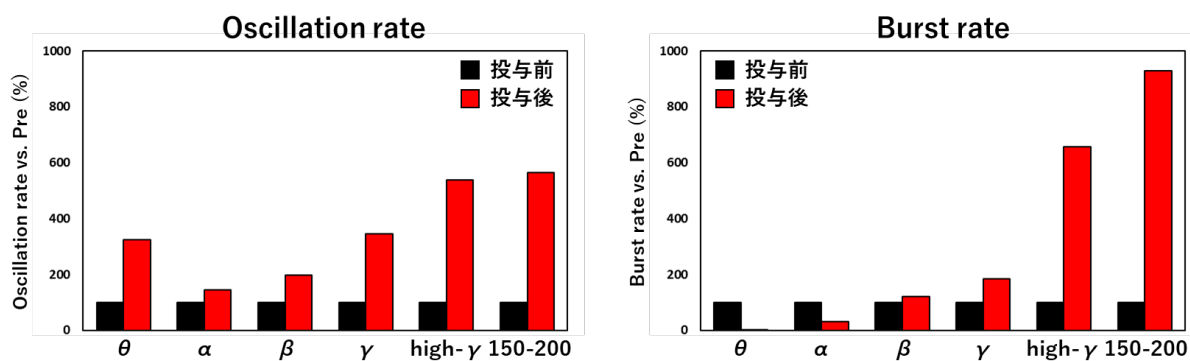
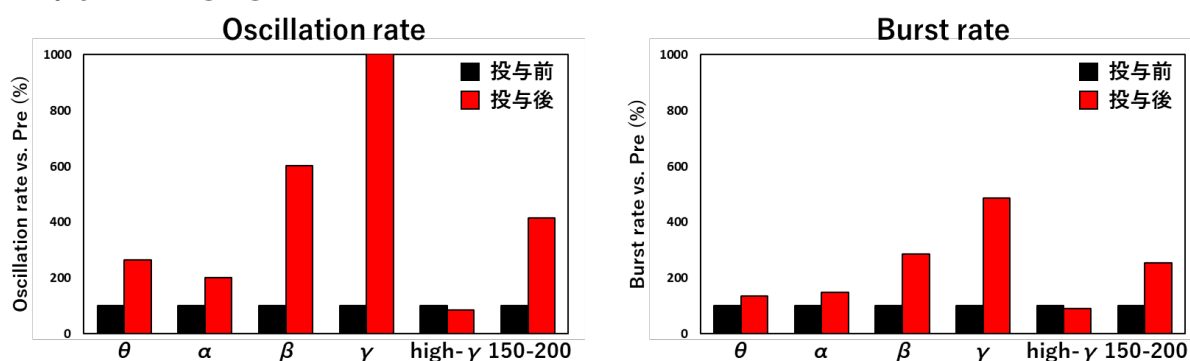


図3 麻酔下および麻酔中止後のFFTによるPSD

Amitriptyline 5 mg/kg (検体1)



Amitriptyline 5 mg/kg (検体2)



Amitriptyline 50 mg/kg

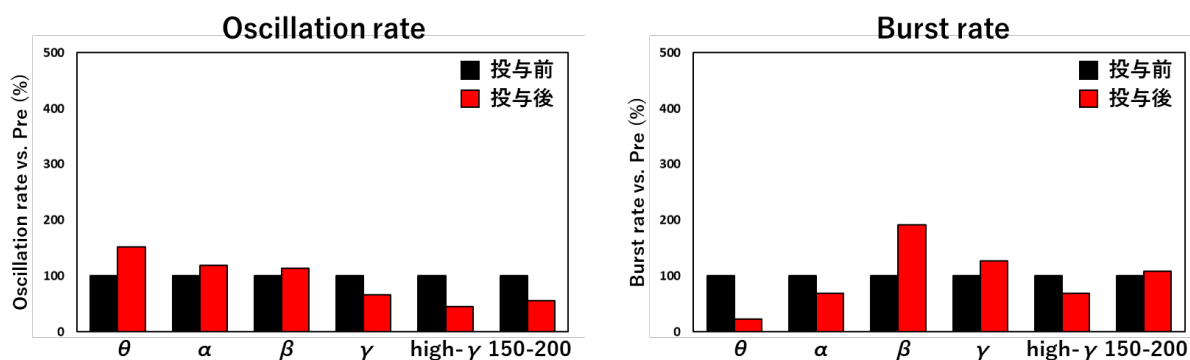
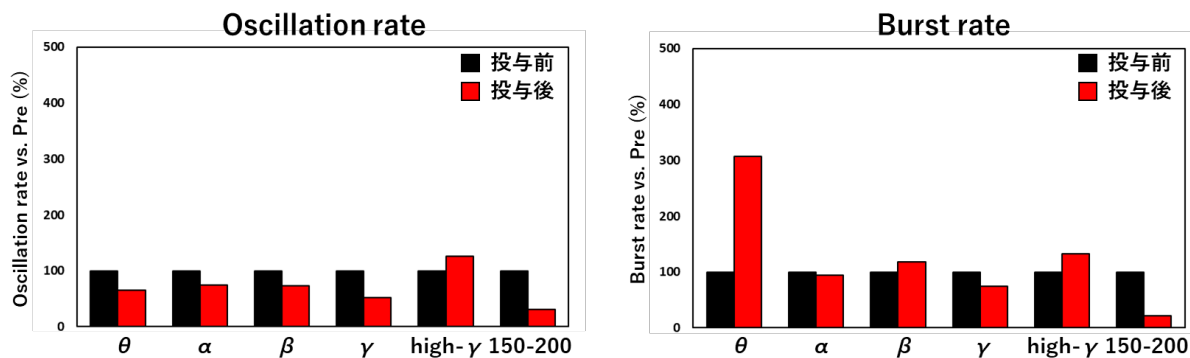


図4 Amitriptyline 試験時のOscillation rateおよびBurst rate

Nicotine 1 mg/kg



Nicotine 5 mg/kg

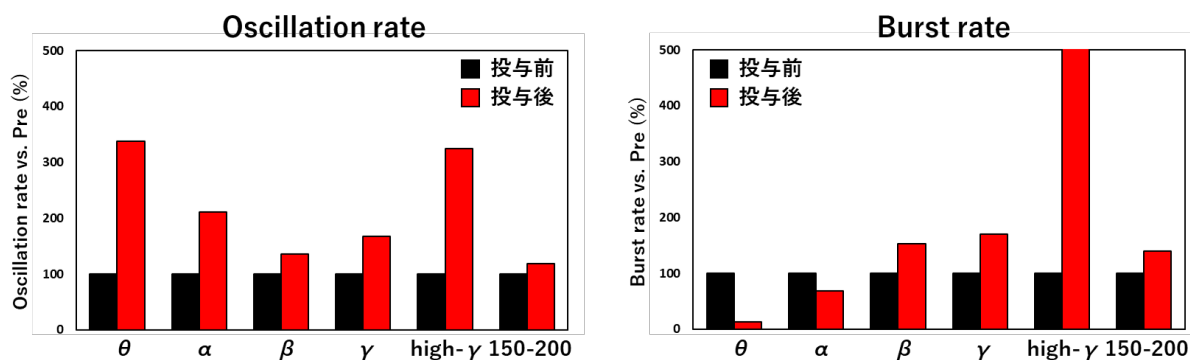


図14 Nicotine 試験時のOscillation rateおよびBurst rate

Asleep to Awake

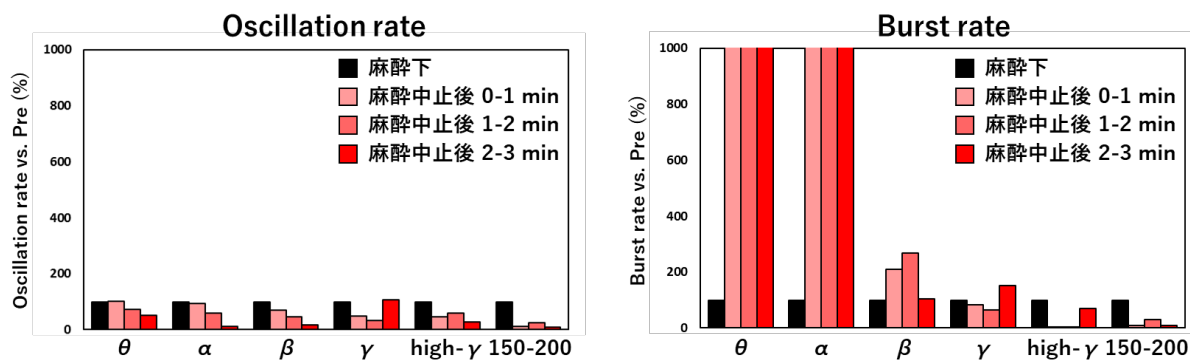


図15 麻酔下および麻酔中止後のOscillation rateおよびBurst rate

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
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	青木康展・ 青山博昭	化学物質の複 合影響と健康 リスク評価	医歯薬出 版	東京	2024	第2章・第 1節

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
Yuhji Taquahashi, Ken-ich Aisaki, Koichi Morita, Kousuke Suga, Satoshi Kitajima	Application of the matrix profile algorithm for detecting abnormalities in rat electrocardiograms	Fundam Toxicol, Sci	11(6)	289-296	2024
Makiko Ku wagata, Yuko Doi, Hirokatsu Saito, Mariko Tsurumoto, Toshime Igarashi, Takuya Nishimura, Yuhji Taquahashi, Yoko Hirabayashi, Satoshi Kitajima:	A 90-day repeated oral dose toxicity study of p- cymene in rats	Fundam Toxicol, Sci	11(4)	169-181	2024
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.	49(3):	105-115.	2024
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	41-58	2024

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6年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 バイタルサインの統合的評価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) 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)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☒	☐	☒	国立医薬品食品衛生研究所	☐
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：)	☐	☒	☐		☐

(※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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6年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 バイタルサインの統合的評価をエンドポイントとした新規急性経口投与毒性試験方法の開発-統計学による半数致死量から診断学による概略の致死量への転換-に関する研究
3. 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)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☒	☐	☒	国立医薬品食品衛生研究所	☐
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:)	☐	☒	☐		☐

(※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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6年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 バイタルサインの統合的評価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) 安全性生物試験研究センター毒性部 室長
(氏名・フリガナ) 相崎 健一・アイサキ ケンイチ
4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
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)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☒	☐	☒	国立医薬品食品衛生研究所	☐
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)	☒	☐	☒	国立医薬品食品衛生研究所	☐

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。
(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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6年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 バイタルサインの統合的評価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)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☒	☐	☒	東北大学	☐
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:)	☐	☒	☐		☐

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

その他 (特記事項)

- (※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。
- (※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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。

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【公印省略】

次の職員の令和6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 (22KD1004)
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)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☐	☒	☐		☐
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:)	☐	☒	☐		☐

(※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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。