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 4 年度-令和 6 年度 総合研究報告書

研究代表者 高橋祐次

令和 7(2025)年 5 月

目次

I. 総合研究報告

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

1. バイタルサインセンサーの開発及び研究統括

高橋 祐次 18

2. 急性毒性試験における遺伝子発現変動解析

北嶋 聡 24

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

種村 健太郎 31

4. バイタルサインの統合的解析方法(ソフトウェア)の開発

相崎 健一 37

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

VI. 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)
総合報告書

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

研究要旨

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。

令和4年度には、麻酔下ラットで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)を測定を実現し、三環系抗うつ薬であるアミトリプチリンの影響を捉えることに成功した。毒性発現に関わる遺伝子発現変動解析では、4,4'-Dihydroxybiphenyl(4,4'-D)で肝のタンパク質変性が亢進していること、2,5-Di-tert-butylhydroquinone では海馬の概日リズムの乱れが示唆された。行動解析では、アセフェート、ニコチン、無水カフェイン、テトロドトキシンによる活動量の変化を観察したが、超音波発声は確認されなかった。さらに、Matrix Profile(MP)アルゴリズムによる ECG 異常検出が有用であることが示された。神経毒性予測については、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの MEA 計測により ICCVAM の急性毒性試験代替法の開発において、予測性の低かった化合物を選定し、毒性リスク評価を実施した結果、毒性リスク評価法としての有効性が示された。

令和5年度には、CNT-Yを表面電極として用い、EEGとECGを非拘束、覚醒下の動物から測定するためのトランスミッターの開発を行った。薬物動態を考慮するための一助として血漿タンパク結合率の測定を、in vitro 急性毒性試験で外れ値を示す6物質を対象に評価した。遺伝子発現変動解析では、4,4'-Dのインフォマティクス解析により、4,4'-Dと類似した反応を惹起する化合物のリストを抽出した。行動解析では、ホームケージ活動量測定によりアセフェートやニコチンによる活動量変動を検出した。ソフトウェア開発ではMPアルゴリズムをCNT-Yを表面電極として測定したECGに適用し、実際に異常値の検出が可能であることを示した。神経毒性予測では、独自手法によるEEGバースト解析により、アミトリプチリンやアトロピンに特有の周波数変動を捉え、神経毒性評価におけるバイオマーカーの可能性が示された。

令和6年度では、ラットへの装着が可能な無拘束・覚醒下で使用できる315MHz帯のトランスミッターを持ち、アミトリプチリンやハロペリドールなど複数化合物投与時のECG・EEGを測定。タンパク結合率は平衡透析法により評価されたが結合率が低い、または測定が困難であった。遺伝子発現変動解析では、海馬を対象にフグ毒であるテトロドトキシン(TTX)の影響を解析した結果、TTXによる無気力状態(apathy)にハンチンチン

タンパク質 (HTT) のシグナルネットワークが関与している可能性が示唆された。行動解析ではプレパルスインヒビション (PPI) 試験を用い、アセフェート、カフェイン、ニコチンの投与による軽減率の経時的変動を観察した。統合解析のための、MP アルゴリズムを組み込んだアプリケーションソフトウェアを開発し異常値の自動抽出が可能となった。神経毒性予測では、EEG の解析を行い PSD (Power spectral density) およびバースト解析により化合物ごとの脳波周波数帯域への影響を詳細に評価したアミトリプチリン投与では高用量で周波数のシフトが観察され、バースト解析では β 波以上での活動増加が確認された。ニコチンでは高用量で $\theta \cdot \alpha$ 波を除いた帯域での変化が確認された。また、麻酔 (イソフルラン) による EEG への影響を明らかにし、解析前に麻酔からの回復時間が必要であることが明らかとなった。

以上より、本研究において開発した VS 取得技術と統合解析手法は、動物実験の負担軽減と人道的エンドポイント設定への応用可能性を有し、急性毒性試験の新たな評価指標としての展開が期待される。また、in vivo・in vitro 間のデータギャップを埋める情報として、代替法の整備・普及にも資するものである。

研究分担者

北嶋 聡	国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 部長
相崎健一	国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 第一室 室長
種村健太郎	東北大学大学院農学研究科 動物生殖科学分野 教授
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。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) から作製された 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 を表面電極として利用するため、実験動物には電極装着が容易なヘアレスラットを使用して、有線及び無線を用いて ECG と EEG の測定を行った。無線方法では、315 MHz 帯と PPM 方式による軽量小型のワイヤレストランスミッターを独自開発し、ラットの覚醒・非拘束状態下での同時測定を試みた。信号は増幅後、2kHz でサンプリングし、データは PC に取り込んで解析された。測定はイソフルラン

麻酔下から覚醒後にかけて継続し、アミトリプチリンやニコチンなど複数の化合物投与による影響を評価した。また、赤外線サーモグラフィにより体表温度もモニターした。

さらに、一般化学物質のタンパク結合率を予測するモデルを構築し、予測性の低かった 6 物質に対して平衡透析法と LC-MS を用いて結合率を測定した。

B-3 急性毒性試験における遺伝子発現変動解析

急性毒性発現時の海馬、肺及び肝の遺伝子発現データを取得し、その臓器関連解析を実施した。モデル物質として、4,4'-Dihydroxybiphenyl、2,5-Di-tert-butylhydroquinone、及びテトロドトキシン (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 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

急性経口毒性試験における非侵襲的なバイタルサイン (VS) としての行動解析手法の確立を目的に、ICR マウスを用いて化学物質投与後の行動様式、体表温度、超音波発声、顔面動きなどを評価した。令和 4 年度には、アセフェート、ニコチン、無水カフェイン、テトロドトキシンを投与し、ホームケージ活動量とオープンフィールド活動量を測定した。また、超音波発声と 20 Hz 音刺激に対する反応性も試みた。令和 5 年度は同様の化合物を用い、活動量測定期間を延長し、超音波反応性の再検討を実施した。令和 6 年度はプレパルス・インヒビション (PPI) 試験を導入し、化学物質投与後の感覚反応の抑制効果を 2 時間後および 24 時間後に測定した。PPI は弱刺激が先行すると驚愕反応が抑制される現象であり、神経毒性の指標となる。

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

急性毒性試験における動物の ECG データを対象に、時系列解析アルゴリズムである Matrix Profile (MP) を活用した異常検知手法の開発とその実装を試みた。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 MP 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

急性毒性における神経毒性予測を目的に、ヒト iPS 細胞由来ニューロンおよび動物脳波データを用いた解析手法の開発と検証を行った。令和 4 年度には、Glutamatergic および GABAergic ニューロン、アストロサイトを共培養したヒト iPS 細胞由来の神経ネットワークを MEA プレート上で計測し、痙攣陽性・陰性化合物や予測性の低い化合物を対象に、スパイク検出および独自の 4-step 法により同期バースト発火を評価。13 種の神経活動パラメータから毒性リスクを推定する手法を確立した。令和 5 年度以降は、CNT ヤーン電極を用いて雌性ヘアレスラットから脳波データを取得し、アミトリプチリン塩酸塩、アトロピン、ニコチンの投与前後でデータをセクション分割して解析した。FFT によるパワースペクトル密度 (PSD) 解析でピーク値と周波数を定量化し、さらに特許取得済みのバースト解析法を用いて各周波数帯域ごとの Oscillation および Burst rate を算出して、薬剤による周波数依存的な脳波変化を調べた。令和 6 年度

には麻酔下と覚醒下のデータを比較し、意識状態が脳波解析に与える影響を評価。これら一連の解析により、被験化合物による神経毒性影響を定量的かつ多面的に捉えることが可能な評価体系を構築した。

倫理面への配慮

本実験は動物愛護に関する法律、基準、指針を遵守し、国立医薬品食品衛生研究所は、国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の制定による「動物実験等の適正な実施に関する規程(平成 27 年 4 月版)」、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。また、本研究で実施したヒト iPS 細胞由来ニューロンの利用は、市販のニューロンであり、平成 30 年 8 月、令和元年 6 月に東北工業大学研究倫理審査委員会承認済である。

C. 研究結果

C-1 バイタルサインセンサーの開発

令和 4 年度の解析では、CNT-Y を用い、麻酔下有線測定により、明瞭な ECG が得られ、アミトリプチリン投与後には RS 波の一時的増高や T 波の増高など、薬剤に応じた電位変化が確認された。EEG についても同様に測定を行い、環境刺激に反応する波形や心拍・呼吸との同期が見られ、脳波としての可能性が示唆された。令和 5 年度には、非拘束下での測定を可能とする送受信装置の開発を進め、ラットに装着可能な軽量トランスミッターと仕様を定めたレシーバーを独自に開発した。令和 6 年度には、トランスミッターシステムにより化学物質(アミトリプチリン、ニコチン等)の投与時の変化を計測した。測定中に EEG、ECG のノイズとベースライン変動が観察されたが、これはアンテナの揺れに起因しており、皮膚と電極の接触変化ではないことが確認された。そのため、カフェインのように興奮性の薬物では安定した測定が困難であった。得られたデータはソフトウェア開発や脳波解析に活用された。

一方、タンパク結合率の測定では全体的に結合率が極めて低い、または一部物質では濃度測定ができなかった。

C-3 急性毒性試験における遺伝子発現変動解析

4,4'-Dihydroxybiphenyl を投与した肝を解析した結果、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。

TTX を投与した海馬では、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。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(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

令和 4 年度は、ホームケージおよびオープンフィールド活動量測定装置を用いて急性毒性物質(アセフェート、ニコチン、無水カフェイン、テロドトキシシン)投与後の行動変化を解析した。ニコチンとアセフェートでは投与後活動量の低下が、テロドトキシシンでは一時的な亢進後に急激な低下が確認された。無水カフェインは 12 時間後まで活動量が亢進した。オープンフィールドではすべての群で活動量が低下し、テロドトキシシンとアセフェート群で顕著だった。ニコチン群では中央滞在時間が増加し、不安関連行動の変化が示唆された。超音波発声は全群で確認されなかった。令和 5 年度はホームケージ活動量を長時間測定し、アセフェート投与群では急速な活動量の低下と体重減少が確認された。無水カフェイン群では暗期の活動量亢進と正常な昼夜リズムの回復が観察された。令和 6 年度のプレパルス・インヒビション試験では、アセフェートおよびニコチン投与群に驚愕反応量の抑制と軽減率の増強が見られ、カフェイン群に

は顕著な差はなかった。これらの結果から、行動指標をバイタルサインとして活用する可能性が示唆された。

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

急性毒性試験における動物の ECG データを対象に、MP アルゴリズムを用いた異常検知手法の開発と実装を目的とし、3 年間にわたって実施した。令和 4 年度には MP の基本性能を検証し、完全自動の Pan-Matrix Profile には限界があるものの、周期的パターンサイズを適切に設定することで、高速かつ有効な異常検知が可能であることが示された。また、心電図に限らず機械音データなどへの応用可能性も確認された。令和 5 年度にはラットから CNT-Y を電極として用いて取得した ECG データに MP を適用し、事前の学習や前処理を行うことなく局所的な心拍異常や心停止に近い状態を検出できた。さらに、比較的性能の低い PC でも 50,000 点規模のデータを 5 秒以内で処理でき、リアルタイム解析の現実性が示された。R6 年度には、GUI ベースのアプリケーション「ECG_matrixprofile_analysis.py」を開発し、直感的な操作によって MP 解析を自動化・可視化できるシステムを構築した。このアプリケーションでは、ドラッグ & ドロップでデータ投入が可能で、パラメータ指定のみで解析が実行される。アミトリプチリンやニコチン投与後の覚醒・非拘束下データにおいても、前処理なしで高い精度の解析が可能であり、現場での即時対応性と実用性が大きく向上した。

C-6 脳波解析による神経毒性予測

本研究では、in vitro および in vivo における神経毒性予測手法の確立を目的に、多面的な解析を行った。令和 4 年度には、ヒト iPS 細胞由来の Glutamatergic・GABAergic ニューロンとアストロサイトを共培養した MEA 系を用い、Caffeine 投与による同

期バースト発火の濃度依存的増加を確認し、同期バースト関連パラメータが薬剤応答の有効な指標であることを示した。13 種の神経活動パラメータを抽出し、多変量解析と主成分分析によりリスク評価を行った結果、痙攣陽性化合物は濃度依存的に高リスクと分類され、陰性化合物では変化がなかった。さらに、ドーパミンニューロンを用いた系でも Nicotine によるリスク増加が確認され、細胞種に依存しない手法の汎用性が示された。同年度には CNT ヤーンを表面電極としたラット脳波測定も実施し、Amitriptyline や Atropine 投与による周波数帯域ごとの神経活動変化を FFT による PSD 解析と独自のバースト解析で定量化した。令和 5 年度には、非拘束・覚醒下での脳波データを取得し、個体差の影響や麻酔中止直後の一過性変動への配慮が必要であることを明らかにした。Amitriptyline では β 波帯域以上での Oscillation および Burst rate の上昇、Nicotine では複数帯域での変動が観察され、化合物ごとの特異な神経応答を的確に捉えた。

これらの結果から、MEA と脳波解析の組み合わせは、薬剤による神経毒性の濃度依存的・周波数依存的変化を精密に評価できる有力な方法であり、急性毒性試験への応用に高い有用性を持つことが確認された。

D. 考察

バイタルサイン測定においては、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で使用されるテレメトリーシステムでは、体内に埋め込んだトランスミッターから磁気カップリングでデータを送信するが、距離が数 cm 以内に制限される。本研究では、急性毒性試験向けに侵襲性の低い装置を目指し、CNT-Y を表面電極として用い、トランスミッターをラット背部に装着し無線通信を採用した。体動によるアンテナの揺れが EEG や ECG のノイズの原因となった。通常のラットの動きでは問題

は少なかったが、カフェイン投与による激しい動きでは安定したデータ取得が困難であった。一方、CNT-Y と皮膚の接触による信号変動は少なく、CNT-Y は金属電極と異なり分極せず、表面電極として他にも有用な特性を持つ可能性が示唆された。アンテナを工夫することでノイズの低減が期待される。

急性毒性試験における遺伝子発現解析では、重篤な肝障害を誘発する 4,4'-Dihydroxybiphenyl では、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との関連が示唆された。TTX 投与によりマウス海馬でストレス応答、炎症、cAMP 上昇が示唆されたが、神経伝達関連分子の変動は少なかった。Percellome データベースを用いた解析により、TTX と類似の変動を示す化学物質としてデヒドロ酢酸ナトリウム、サリドマイド、クロルピリホスが特定され、いずれも HTT の関与が示唆された。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、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。TTX による apathy には HTT シグナルがその誘発に関与する可能性が示された。

行動解析において、ホームケージ活動量測定では、測定時間の延長が必要であることが示された。無水カフェイン投与群における活動量の顕著な亢進から投与用量の再検討が求められた。また、死亡に至るまでの行動異常を捉えることができたことから、今後は赤外線サーモグラフィとの併用が有効と考えられる。約 20 Hz の音による刺激では超音波発声は確認されず、これが外界音には反応しない行動であることが示された。プレパルス・インヒビション試験では化学物質による明確な差異が認められ、他の行動試験との併用による補正が必要とされた。

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、急性毒性試験における ECG データのリアルタイム解析を目的に、MP アルゴリズムの有用性を検討した。MP は学習不要で周期性のある時系列データに適しており、前処理なしに局所的な心拍異常や心停止の予兆を検出可能であった。従来の機械学習手法に比べて初期導入が容易で、汎用 PC

でも短時間で実行可能なため、試験中の即時解析に有効と考えられる。さらに、GUI ベースの解析ソフトを開発し、非専門家でも簡単に操作できるようにした。MP による異常検出は将来的に機械学習モデルの訓練データとしても活用でき、両手法の連携によるバイタルサイン評価体制の構築が期待される。

神経毒性予測では、in vitro および in vivo の脳機能指標を活用した神経毒性予測法を検討した。初年度の MEA 計測では、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの自発電気活動を用い、多変量解析により細胞種を問わず予測可能な評価体系の有効性が示された。2 年目以降はラット脳波を FFT と独自のバースト解析で評価し、薬剤投与による周波数帯域別の神経活動変化を定量化。麻酔の有無による影響も解析し、状態依存性の重要性が示唆された。最終年度には個体差や行動状態を含めた解析により、覚醒下でも脳波変化を正確に捉えられることが示され、バイタルサインや一般状態観察との併用による評価精度の向上が期待された。これにより、in vitro と in vivo を統合した神経毒性評価体系の構築に向けた重要な知見が得られた。

E. 結論

本研究では、新素材 CNT-Y を用いた表面電極と独自開発のトランスミッターにより、覚醒下かつ非拘束状態のヘアレスラットから ECG および EEG の測定を可能とし、複数のモデル化合物投与による生理変化の検出に成功した。ECG データについては、MP アルゴリズムを用いたリアルタイム異常検知プログラムを構築し、致死性予測への応用可能性が示唆された。EEG は個体差の検討が必要ながらも、FFT による PSD 解析およびバースト解析により薬物特異的な変化を捉えることができた。さらに、TTX による apathy 誘発には、ハンチントン病関連の HTT シグナルネットワークが関与する可能性が示されたが、詳細なメカニズムは未解明である。今後は、脳波などを用いた apathy の客観的指標化とヒトへの外挿性評価が求められる。

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]

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]

Hidenobu 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 iPSC 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
- Hoyo 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, Hoyo 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, Hoyo 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.
- 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.

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)

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

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

Horibata K, Takasawa H, Hojo M, Taquahashi Y, Shigano M, Yokota S, Kobayashi N, Sugiyama KI, Honma M, Hamada S. In vivo genotoxicity assessment of a multiwalled carbon nanotube in a mouse ex vivo culture. *Genes Environ.* 2022 Oct 19;44(1):24.

鶴岡秀志、高橋祐次、カーボンナノチューブのヘルスケア応用、2022, *Nanofiber* 13(1,2) 19-24

Tsunematsu T, Arakaki R, Sato M, Saito M, Otsuka K, Furukawa Y, Taquahashi Y, Kanno J, Ishimaru N., Exposure to Multiwall Carbon Nanotubes Promotes Fibrous Proliferation by Production of Matrix Metalloproteinase-12 via NF- κ B Activation in Chronic Peritonitis., *Am J Pathol.* 2022 Aug 10:S0002-9440(22)00240-1.

高橋祐次、齊藤洋克、栗形麻樹子、北嶋聡、加圧式定量噴霧式吸入器 (pMDI) 製剤のげっ歯類を対象とした鼻部ばく露装置の開発, *Jpn. J. Clin.Toxicol.* 2022 35(3) 255-259

Takahiro Sasaki, Hirokatsu Saito, Yusuke Furukawa, Takashi Tominaga, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Kentaro Tanemura: 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.

Satoshi Yokota, Hidenobu Miyaso, Toshinori Hirai, Kousuke Suga, Tomohiko Wakayama, Yuhji Taquahashi and Satoshi Kitajima, 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.

相崎健一、小野竜一、菅野純、北嶋聡: Percellome

プロジェクト〜トランスクリプトミクスとエピジェネティクスによる毒性分子機序の探求〜、日本薬理学雑誌, 2022; 157: 200-206. doi.org/10.1254/fpj.21122

Kanno H, Kurata S, Hiradate Y, Hara K, Yoshida H, Tanemura K. High concentration of dopamine treatment may induce acceleration of human sperm motility. *Reprod Med Biol.* 2022 Oct 1;21(1):e12482. doi: 10.1002/rmb2.12482. PMID: 36310655; PMCID: PMC9601866.

Kurata S, Umezu K, Takamori H, Hiradate Y, Hara K, Tanemura K. Exogenous gamma-aminobutyric acid addition enhances porcine sperm acrosome reaction. *Anim Sci J.* 2022 Jan;93(1):e13744. doi: 10.1111/asj.13744. PMID: 35699686; PMCID: PMC9286608.

Kawabe Y, Numabe T, Tanemura K, Hara K. Characteristics of alpha smooth muscle actin-positive peritubular cells in prepubertal bovine testes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2022 Jun 18;609:48-53. doi: 10.1016/j.bbrc.2022.03.149. Epub 2022 Apr 7. PMID: 35413539.

Hiradate Y, Harima R, Yanai R, Hara K, Nagasawa K, Osada M, Kobayashi T, Matsuyama M, Kanno SI, Yasui A, Tanemura K. Loss of *Axdnd1* causes sterility due to impaired spermatid differentiation in mice. *Reprod Med Biol.* 2022 Mar 30;21(1):e12452. doi: 10.1002/rmb2.12452. PMID: 35386379; PMCID: PMC8968163.

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、分折と中毒」,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

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 Tanemra: : 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 iPSC-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 オン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

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)

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)

Taquahashi Y, Yokota S, Tsuji M, Morita K, Suga K,
Hojyo M, Hirose A, Kanno J, Preliminary report on a
two-year, 4-week-interval intermittent whole body
inhalation study of the multi-walled carbon nanotube
(MWNT-7) in male mice, SOT 2023 Abstract
Number/Poster Board number: 4715/ P621
(2023.3.22)

Taquahashi Y, Tsuruoka S, Okubo Y Tanemura K,
Aisaki K, Kitajima S, Modernization of acute toxicity

testing with integrated assessment of multiple vital
signs as endpoints, 第 96 回日本薬理学会学術年会
シンポジウム (2022.12.2)

高橋祐次、DPI 製品化の課題: 粉体の吸入剤研究
開発における有効性・薬物動態・安全性の評価を
推進する非臨床評価手法の開発、第 13 回 粉末
吸入剤研究会シンポジウム(2022.11.24)

Taquahashi Y, Non-clinical Safety Issue in Pediatric
Drug Development: What issues are to be considered
from now on? 第 49 回日本毒性学会学術年会 シ
ンポジウム(2022.7.2)

高橋 祐次、動物を用いない新たなリスク評価アプ
ローチ法の開発: In vivo 毒性試験の経験に基づく
NGRA による安全性評価手法に関する考察、日本
動物実験代替法学会 第 35 回大会 (2022.11.20)

Taquahashi Y, Yokota S, Hirose A, Kanno J
Streamline of chronic inhalation exposure study
protocol for nanomaterial, 第 49 回日本毒性学会学
術年会 シンポジウム(2022.6.30)

Taquahashi Y, Tsuruoka S, Aisaki K, Okubo Y
Kitajima S, An approach to prediction of mortality in
acute toxicity studies by integrated assessment of
vital signs, 第 49 回日本毒性学会学術年会 シ
ンポジウム(2022.6.30)

北嶋 聡: 創薬研究における薬理-病理連携の必
要性: 毒性学の立場から 一食品トキシコゲノミクス
と薬理学一、第 96 回日本薬理学会年会、
(2022.12.2)、横浜

相崎 健一、小野 竜一、菅野 純、北嶋 聡:
Percellome プロジェクト ~トランスクリプトミクスとエ
ピジェネティクス、インフォ マティクスによる毒性分
子機序の探求~、第 96 回日本薬理学会年会、
(2022.12.2)、横浜

小野 竜一、田埜 慶子、安田 智、佐藤 陽治、内
田 恵理子、平林 容子、北嶋 聡 ゲノム編集技術
を利用した際の、オンターゲット部位における非意

図配列の挿入と、その検出方法の確立 日本食品衛生学会第118回学術講演会 2022.11.11 長崎(口頭発表)

J. Kanno, K.-I. Aisaki, R. Ono, S. Kitajima: Histone Modification, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeatedly Exposure to a Chemical. The XVITH International Congress of Toxicology (ICT2022), (2022.9.19), Maastricht, The Netherlands Oral.

五十嵐智女、藤井咲子、釣本真理子、高橋祐次、北嶋 聡、栗形麻樹子:ビスフェノール類似体 4,4'-(1,3-dimethylbutylidene)diphenol の卵巣摘出マウスにおける皮下および経口投与による子宮肥大試験 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.7.2)

菅野 純、相崎健一、小野竜一、北嶋 聡: Percellome project からみた毒性 AI の展望 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.7.2)

五十嵐智女、松村万里、小川いづみ、矢川千織、早川孝彦、越智美代子、齊藤 洋克、栗形麻樹子、北嶋 聡:「新規の食品」の安全性を確保するための諸外国の制度比較 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.7.1)

齊藤洋克、種村健太郎、菅野 純、北嶋 聡:アセフェート単回経口投与による雄マウスの情動認知行動解析 -化学物質曝露影響から考える神経発達障害-第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.7.1)

大久保佑亮、菅野聖世、北嶋 聡、平林容子、福田淳二:ヒト iPS 細胞を用いたシグナル伝達かく乱作用のダイナミクスに基づく高精度かつ網羅的ヒト発生毒性試験法の開発、第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.7.1)

菅野 純、相崎健一、小野竜一、北嶋 聡:新型反復曝露トランスクリプトミクスから見た発癌エピジェネティクスの考察 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30)

小野竜一、山本雄介、成瀬美衣、田邊思帆里、吉

岡祐亮、相崎健一、広瀬明彦、落谷孝広、平林容子、北嶋 聡:cfDNA による毒性評価 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.7.2)

佐々木 貴熙、原 健士朗、種村 健太郎:発生-発達期のアセフェート曝露による性成熟への影響評価、第24回環境ホルモン学会研究発表会(環境化学物質3学会合同大会) (2022.6.14-16)

佐々木 貴熙、原 健士朗、種村 健太郎:アセフェートの発生-発達期慢性曝露が雌雄の生殖能成熟に及ぼす遅発性影響評価、第49回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30-7.2)

長谷川 彩乃、佐々木 貴熙、原 健士朗、Jahidul ISLAM、野地 智法、種村 健太郎:発達期ニューキノロン系抗菌薬(TFLX)投与による成熟後の行動影響と腸内細菌叢解析、第49回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30-7.2)

張磨 琉亜、平舘 裕希、原 健士朗、種村 健太郎:精子完成におけるダイニン関連因子(Axdnd1)の機能解明、第115回日本繁殖生物学会大会 (2022.9.11-7-9.14)

Takahiro Sasaki, Kenshiro Hara, Kentaro Tanemura, The effects of early life exposure to acephate on sexual maturation in male and female. The XVITH International Congress of Toxicology, (2022.9.18-7-9.21)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

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

該当なし

3. その他

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

本研究は、急性経口毒性試験において **Reduction** と **Refinement** を推進し、ヒトの安全性確保に資する新規試験法の開発を目的とした。ウェアラブルデバイスの発展により、小動物におけるバイタルサインの非侵襲的測定が現実となりつつあり、本研究ではカーボンナノチューブヤーン(CNT-Y)電極とトランスミッターを組み合わせた測定機器を開発した。これにより、ラットにおいて心電図(ECG)と脳波(EEG)の同時取得が、覚醒・非拘束状態で可能となった。三環系抗うつ薬(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、ハロペリドールなどの神経・心臓作用を有する薬物を投与した際、ECG および EEG に明確な変化が捉えられた。これらのデータは、急性毒性評価のベンチマーク指標として蓄積可能であることが示唆された。また、**in vitro** 急性毒性代替法で予測性が低い化合物(ジゴキシン等 6 物質)について、ラット血漿中タンパク結合率を平衡透析法にて測定した結果、結合率が低い、または測定困難であることが判明した。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

本研究では、動物実験における急性毒性評価の高精度化と動物福祉の向上を目的として、バイタルサインセンサーの開発に取り組んだ。使用動物としては、被毛がなく電極装着が容易な雌性ヘアレスラット(HWY/Slc 系統)を選定し、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 ± 1°C、湿度;55 ± 5%、換気回数;約 20 回/h、照明時間;8 時~20 時点灯(照明明暗サイクル 12 時間)とし、固型飼料 CRF-1(オリエンタル酵母工業株式会社)を自由摂取させ、飲水は市水をフィルター濾過し給水瓶により自由摂取させた。

センサー開発においては、二層カーボンナノチューブ(Double-Walled Carbon Nanotube: DWCNT)から作製されて CNT ヤーン(CNT-Y)を表面電極として用いた。具体的にはラット皮膚へ縫合針により CNT-Y を単結紮して固定することで、生体電位測定を可能とした。麻酔装置(RC2+Anesthesia system, VetEquip, CA, US)を用い、イソフルラン麻酔下でへ

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 の装着部位は、心電図(ECG)用として左耳介基部・頸部・腰部、脳波(EEG)用としてブレグマおよび右耳介基部とした。

加えて、本研究では、従来の有線測定から一歩進め、315 MHz 帯域と Pulse Position Modulation (PPM) 方式を採用したワイヤレストランスミッターを独自に開発し、動物が覚醒下、非拘束状態でも ECG および EEG を同時に取得できる環境を実現した。このトランスミッターは、ラットの背部に装着可能な軽量かつ小型設計であり、内部では EEG 信号を 2,000 倍、ECG 信号を 1,000 倍に増幅した後、CR2032 電池により最大約 4 時間の動作が可能となっている。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。

生体電位測定はイソフルラン麻酔下から覚醒後まで継続的に実施し、投与化合物(アミトリプチリン、アトロピン、ニコチン、カフェイン、ハロペリドール)によるバイタルサインへの影響を測定した。

並行して赤外線サーモグラフィ(サーモフレックス F50B-STD、協和テクノロジーズ)による体表温度の変化をモニターした。

一方、タンパク結合率については、医薬品データをもとに予測モデルを構築し、一般化学物質に対して適用する手法を採用した。特に in vitro 急性毒性試験で予測性の低かった 6 物質(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、濃度を 10 または 1000nM に設定し、LC-MS を用いた平衡透析法により結合率を測定した。

倫理面への配慮

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

C. 研究結果

令和4年度の解析では、CNT-Yにより明確なECGが得られ、アミトリプチリン投与によるRS波の一時的増高やT波増高など、薬剤影響に応じた電位変化が観察された。EEGでは、照明や音への反応性を持つ波形や呼吸・R波との同期が示され、脳波である可能性が示唆された。

令和5年度は、EEG・ECGデータの解析に加え、非拘束状態で測定を目的とした送受信装置の開発に取り組み、6gの軽量トランスミッターおよび周波数・帯域・感度を規定したレシーバーを設計した。ハードウェアの試作においては、CNT-Yとの接続に専用ナットとネジを用いる工夫がなされた。

令和6年度には、独自に開発したシステムを用いてアミトリプチリンやニコチン等を投与し、その生理影響を計測した。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。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た。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。

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。

一方、タンパク結合率の測定においては、化合物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%程度であった。一方、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。

D. 考察

本研究では、動物実験における急性毒性試験に応用可能な非侵襲的生体電位測定システムの開発とその応用性について検討した。心電図(ECG)波形は一般的な第二誘導とは異なるが、明確な反応が

得られ、急性毒性評価に利用可能であることが示唆された。

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]

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.

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

Horibata K, Takasawa H, Hojo M, Taquahashi Y, Shigano M, Yokota S, Kobayashi N, Sugiyama KI, Honma M, Hamada S. In vivo genotoxicity assessment of a multiwalled carbon nanotube in a mouse ex vivo culture. *Genes Environ.* 2022 Oct 19;44(1):24.

鶴岡秀志、高橋祐次、カーボンナノチューブのヘルスケア応用、2022, *Nanofiber* 13(1,2) 19-24

Tsunematsu T, Arakaki R, Sato M, Saito M, Otsuka K, Furukawa Y, Taquahashi Y, Kanno J, Ishimaru N., Exposure to Multiwall Carbon Nanotubes Promotes Fibrous Proliferation by Production of Matrix Metalloproteinase-12 via NF- κ B Activation in Chronic Peritonitis., *Am J Pathol.* 2022 Aug 10;S0002-9440(22)00240-1.

高橋祐次、齊藤洋克、栗形麻樹子、北嶋聡、加圧式定量噴霧式吸入器 (pMDI) 製剤のげっ歯類を対象とした鼻部ばく露装置の開発, *Jpn. J. Clin.Toxicol.* 2022 35(3) 255-259

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

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)

Taquahashi Y, Yokota S, Tsuji M, Morita K, Suga K, Hojyo M, Hirose A, Kanno J, Preliminary report on a two-year, 4-week-interval intermittent whole body inhalation study of the multi-walled carbon nanotube (MWNT-7) in male mice, SOT 2023 Abstract Number/Poster Board number: 4715/ P621 (2023.3.22)

Taquahashi Y, Tsuruoka S, Okubo Y Tanemura K, Aisaki K, Kitajima S, Modernization of acute toxicity testing with integrated assessment of multiple vital signs as endpoints, 第 96 回日本薬理学会学術年会シンポジウム (2022.12.2)

高橋祐次、DPI 製品化の課題：粉体の吸入剤研究開発における有効性・薬物動態・安全性の評価を推進する非臨床評価手法の開発、第 13 回 粉末吸入剤研究会シンポジウム(2022.11.24)

Taquahashi Y, Non-clinical Safety Issue in Pediatric Drug Development: What issues are to be considered from now on? 第 49 回日本毒性学会学術年会 シンポジウム(2022.7.2)

高橋 祐次、動物を用いない新たなリスク評価アプローチ法の開発：In vivo 毒性試験の経験に基づく NGRA による安全性評価手法に関する考察、日本動物実験代替法学会 第 35 回大会 (2022.11.20)

Taquahashi Y, Yokota S, Hirose A, Kanno J Streamline of chronic inhalation exposure study protocol for nanomaterial, 第 49 回日本毒性学会学術年会 シンポジウム(2022.6.30)

Taquahashi Y, Tsuruoka S, Aisaki K, Okubo Y Kitajima S, An approach to prediction of mortality in acute toxicity studies by integrated assessment of vital signs, 第 49 回日本毒性学会学術年会 シンポジウム(2022.6.30)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許

(1) 特許第 7111296 号(特開 2019-190915)：試験物質供給装置及び吸入曝露試験装置、柴田眞利、菅野純、生田達也、鶴田祐吾、高橋祐次

(2) 特許第 7112685 号(特開 2019-190914)：吸入曝露試験用カートリッジ、試験物質供給装置及び吸入曝露試験装置、柴田眞利、菅野純、生田達也、鶴田祐吾、高橋祐次

(3) 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-(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

本分担研究は、急性毒性発現時における海馬・肺・肝の遺伝子発現変動を取得し、多臓器間の連関解析により毒性発現機構の解明と人への外挿可能性向上を目的とした。マウスに各種化学物質を単回経口投与し、脳4部位(海馬を含む)、肺、肝の mRNA を対象に Percellome 法による網羅的遺伝子発現解析を実施した。Affymetrix 社 GeneChip を用い、4用量・4時点での取得データに対し、波面解析等を用いた教師なしクラスタリングにより解析を行った。令和4年度は 4,4'-Dihydroxybiphenyl および DTBHQ を対象に、肝におけるタンパク質変性、酸化ストレス、サイトカイン応答の活性化が示唆され、また海馬においては概日リズムに関与する遺伝子(PER1、PER2、CLOCK、CRY1/2 等)の変動が確認された。令和5年度は、Percellome Explorer を用いて試験データベース(382通り)と網羅的比較を行い、227の肝プロファイル中から 4,4'-D と類似反応を示す物質(インディゴ、硫酸アンモニウムアルミニウムなど)を抽出、肝におけるタンパク質変性の進行を示唆する遺伝子群が共通して確認され、前年度の知見が補強された。令和6年度はテトロドトキシンを用い、海馬における遺伝子発現変動から、デキサメタゾンや TNF などのストレス応答・炎症関連因子が抽出された。さらに、軸索輸送に関与しハンチントン病の病因遺伝子として知られる HTT が抽出され、海馬の機能変化との関連が示唆された。以上により、毒性に伴う神経系や肝での特徴的な分子応答が整理され、今後の急性毒性評価におけるバイオマーカー探索やヒト毒性予測への貢献が期待される。

A. 研究目的

本研究の目的は、Reduction と Refinement によりヒトの安全性確保に主眼を置いた新規急性経口投与毒性試験方法の開発である。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

本研究では、急性毒性発現時における海馬、肺、肝の遺伝子発現データを収集し、臓器連関の解析を

通じて毒性発現機構を明らかにすることを目的とした。令和4~6年度にかけて、12週齢雄性 C57BL/6J マウスに各種被験物質(4,4'-Dihydroxybiphenyl、DTBHQ、テトロドトキシン)を単回経口投与し、投与後2、4、8、24時間で海馬を含む脳4部位、肺、肝を採取、mRNA を Percellome 法により絶対定量化し、Affymetrix 社 GeneChip を用いた網羅的遺伝子発現解析を実施した。用量・時間依存性を含む発現変動データは、独自に開発した波面解析や Rsort ソフトウェアを用いた教師なしクラスタリングにより評価し、生物学的に有意と考えられる遺伝子を抽出し

た。さらに、Ingenuity Pathways Analysis (IPA, Ingenuity Systems Inc.)によりシグナルネットワークや制御因子を探索した。令和 5 年度には、解析結果を世界有数規模の *in vivo* トキシコゲノミクスデータベースである Percellome データベースと比較するため、独自開発の Percellome Explorer を用いて類似反応を示す化学物質群の抽出を行った。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るため、大規模比較解析を容易に実行可能な Percellome Explorer 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。

海馬を対象とした TTX 試験では、酢酸を含む酸性のメチルセルロース液を溶媒とし、GeneChip MOE430v2 を用いて約 45,000 プローブの解析を行った。投与溶液は pH3.5 で調製し、安定性を確保した。RNA は RNAlater 中で保存し、RNase の不活化を行った。得られたデータは、投与用量、時間、発現コピー数を軸とした 3 次元プロットとして視覚化され、遺伝子ごとの経時的かつ用量依存的変動を精密に評価した。

C. 研究結果及び考察

本研究では、急性毒性発現時の海馬・肺・肝の遺伝子発現変動を網羅的に解析し、毒性発現機構の解明を試みた。令和 4 年度には、4,4'-Dihydroxybiphenyl を 0~500 mg/kg で用量設定試験後、0、7、20、70 mg/kg で主試験を実施。肝で発現が増加した 1,425 ps 中 788 ps、減少した 859 ps 中 26 ps が生物学的変化と関連した。これらは、折りたたみ不全タンパク質反応、酸化ストレス応答 (Nrf2)、糖質コルチコイド受容体シグナルなどに関与しており、ATF4 や XBP1 が調節因子として抽出された。DTBHQ では海馬で 1,256 ps の発現増加中 87 ps、337 ps の減少中 1 ps が生物学的意義を持ち、概日リズム関連遺伝子 (PER1/2, CLOCK, CRY1/2) が変動。肝では 802 ps 中 63 ps の増加、296 ps 中 5 ps の減少が確認され、Nrf2 やサイトカ

イン因子 (TNF, IL1B 等) が関与。令和 5 年度は、4,4'-D による発現変動に注目し、Percellome Explorer で肝プロファイル 227 例と比較した結果、インディゴや硫酸アンモニウムアルミニウムなどが類似反応を示したが、共通遺伝子群の機能的意義は限定的で、主に ATF4/XBP1 を介したタンパク質変性が共通していた。これにより、前年度の知見が裏付けられた。加えて、4,4'-D はラットにおいて黄疸や死亡例が報告されており、本研究で示された小胞体ストレスの関与は、遅発性毒性の分子機構の一端を示唆する。令和 6 年度は TTX をモデルとし、300、100、30 μ g/kg を設定。海馬で 121 ps の発現増加が観察され、Upstream Analysis によりデキサメタゾン、TNF、cAMP 関連因子 (フォルスコリン、IBMX) を介したストレス応答が浮上。さらに、神経変性疾患関連の HTT が抽出され、軸索輸送異常との関連が示唆された。これらの結果から、化学物質による毒性は、臓器特異的な遺伝子応答に反映されるだけでなく、系統的なストレス応答や概日リズム異常、細胞内恒常性の破綻とも深く関連しており、本研究で得られた知見は、今後の毒性予測および新規毒性マーカーの探索に資する重要な基盤情報となることが示唆された。

* * 用量設定実験の結果、24 時間無作用量であった 300 μ g/kg を最高用量をとし、公比 $\sqrt{10}$ で除して 300、100、30 μ g/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. 結論

本研究では、急性毒性試験における網羅的遺伝子発現解析を通じて、各化学物質の毒性プロファイルと関連する分子機構を明らかにした。令和4年度には、DTBHQ投与による海馬の概日リズム変調が神経毒性に関与する可能性を示唆した。5年度には、4,4'-Dに対するインフォマティクス解析を進めたが、新たな毒性分類は得られず、タンパク質変性の亢進が一貫して観察された。このことは、肝における遅発性毒性の可能性を示し、急性毒性にも時間経過を考慮した評価が重要であることを示す。6年度には、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、詳細な経路は未解明であり、今後の解析が求められる。また、apathyのような行動変容の客観的評価には、脳波などによる指標化が有用と考えられた。

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]

Hidenobu 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

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]

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]

Takahiro Sasaki, Hirokatsu Saito, Yusuke Furukawa, Takashi Tominaga, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Kentaro Tanemura: 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
https://doi.org/10.2131/jts.48.211

Satoshi Yokota, Hidenobu Miyaso, Toshinori Hirai, Kousuke Suga, Tomohiko Wakayama, Yuhji Taquahashi and Satoshi Kitajima, Development of a non-invasive method for testicular toxicity evaluation using a novel compact magnetic resonance imaging system. *J Toxicol Sci.* 2023 48(2) 48-57
https://doi.org/10.2131/jts.48.57.

相崎健一、小野竜一、菅野純、北嶋聡：Percellome プロジェクト～トランスクリプトミクスとエピジェネティクスによる毒性分子機序の探求～、日本薬理学雑誌, 2022; 157: 200-206. doi.org/10.1254/fpj.21122

高橋祐次、齊藤洋克、栗形麻樹子、北嶋 聡：加圧式定量噴霧式吸入器 (pMDI) 製剤のげっ歯類を対象とした鼻部ばく露装置の開発、中毒研究(Jpn J Clin Toxicol), 2022; 35: 255-59.[ISSN: 0 914-3777]

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、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

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, Hi-roshi Yamazaki, Satoshi Kitajima: Possible ter-atogenic 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

北嶋 聡:創薬研究における薬理-病理連携の必要性: 毒性学の立場から -食品トキシコゲノミクスと薬理学-、第 96 回日本薬理学会年会、(2022.12.2)、横浜

相崎健一、小野竜一、菅野 純、北嶋 聡: Percellome プロジェクト ～トランスクリプトミクスとエピジェネティクス、インフォ マティクスによる毒性分子機序の探求～、第 96 回日本薬理学会年会、(2022.12.2)、横浜

高橋祐次、鶴岡秀志、大久保佑介、種村健太郎、相崎健一北嶋 聡:バイタルサインの統合的評価をエンドポイントとした急性毒性試験の近代化、第 96 回日本薬理学会年会、(2022.12.2)、横浜

小野 竜一、田埜 慶子、安田 智、佐藤 陽治、内田 恵理子、平林 容子、北嶋 聡 ゲノム編集技術を利用した際の、オンターゲット部位における非意図

配列の挿入と、その検出方法の確立 日本食品衛生学会第118 回学術講演会 2022.11.11 長崎(口頭発表)

J. Kanno, K.-I. Aisaki, R. Ono, S. Kitajima: Histone Modification, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeatedly Exposure to a Chemical. The XVITH International Congress of Toxicology (ICT2022), (2022.9.19), Maastricht, The Netherlands Oral.

五十嵐智女、藤井咲子、釣本真理子、高橋祐次、北嶋 聡、桑形麻樹子:ビスフェノール類似体 4,4'-(1,3-dimethylbutylidene)diphenol の卵巣摘出マウスにおける皮下および経口投与による子宮肥大試験 第 49 回日本毒性学会学術年会(2022.7.2)

菅野 純、相崎健一、小野竜一、北嶋 聡: Percellome project からみた毒性 AI の展望 第 49 回日本毒性学会学術年会(2022.7.2)

五十嵐智女、松村万里、小川いづみ、矢川千織、早川孝彦、越智美代子、齊藤 洋克、桑形麻樹子、北嶋 聡:「新規の食品」の安全性を確保するための諸外国の制度比較 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.7.1)

齊藤洋克、種村健太郎、菅野 純、北嶋 聡:アセフェート単回経口投与による雄マウスの情動認知行動解析 -化学物質曝露影響から考える神経発達障害- 第 49 回日本毒性学会学術年会(2022.7.1)

大久保佑亮、菅野聖世、北嶋 聡、平林容子、福田淳二:ヒト iPS 細胞を用いたシグナル伝達かく乱作用のダイナミクスに基づく高精度かつ網羅的ヒト発生毒性試験法の開発、第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.7.1)

菅野 純、相崎健一、小野竜一、北嶋 聡:新型反復曝露トランスクリプトミクスから見た発癌エピジェネティクスの考察 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30)

高橋祐次、鶴岡秀志、大久保佑亮、相崎健一、北嶋 聡:バイタルサインの統合的評価による急性毒性

試験の致死性予測 第 49 回日本毒性学会学術年会(2022.6.30)

小野竜一、山本雄介、成瀬美衣、田邊思帆里、吉岡祐亮、相崎健一、広瀬明彦、落谷孝広、平林容子、北嶋 聡:cfDNA による毒性評価 第 49 回日本毒性学会学術年会(2022.7.2)

G. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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した。

令和4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およびオープンフィールド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、有機リン農薬成分であるアセフェート(300 mg/kg)、ニコチン(50 mg/kg)、無水カフェイン(300 mg/kg)、テトロドトキシシン(500 µg/kg)を用いた。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、コントロール群と比較して、ニコチン投与群において投与10分後以降に活動量の低下が認められた。またアセフェート投与群においては投与20分後以降に活動量の低下が認められた。一方でテトロドトキシシン投与群においては投与10分後に活動量の亢進が認められたが、投与30分後以降に急激な活動量の低下が認められた。また、無水カフェイン投与群については投与12時間後も活動量の亢進が認められた。オープンフィールド活動量測定装置による解析からはコントロール群と比較して、いずれの投与群においても投与10分後以降に活動量の低下が認められた。最も活動量の低下が著しく認められたのはテトロドトキシシン投与群であり、投与30分後以降はほとんど動かなかった。またアセフェート投与群においては投与60分後以降にはほとんど動かなかった。一方でニコチン投与群と無水カフェイン投与群は活動量の低下を示すものの完全に活動を停止する事はなかった。なお、超音波測定装置による超音波発声解析では約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。

令和5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(50 mg/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。

令和 6 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顕れ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した。

令和 4 年度生後 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、N=4)、ニコチン(50 mg/kg、N=4)、無水カフェイン(300 mg/kg、N=4)、テトロドトキシン(500 μ g/kg、N=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、22 hour 施行、14 時から翌日の 12 時まで測定した。また 14 時から 19 時までを明期、19 時から翌日の 7 時までを暗期、7 時から 12 時までを再び明期とした。なお、自由飲水自由摂餌とした)による解析と②オープンフィールド活動量測定装置(W:50cm × D:50cm × H:50cm、120 min 施行)による解析を選択した。また、③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。

令和 5 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。

令和 6 年度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

令和 4 年度

①ホームケージ活動量測定装置による解析

ニコチン投与群において投与直後(1分後以内)に死亡した個体を確認した。この1例は解析から除外した。残りのマウスは少なくとも24時間生存していた。

コントロール群と比較して、ニコチン投与群において投与10分後以降に活動量の低下が認められた。またアセフェート投与群において投与20分後以降に活動量の低下が認められた。一方でテロドトキシン投与群においては投与10分後に活動量の亢進が認められたが、投与30分後以降に急激な活動量の低下が認められた。また無水カフェイン投与群については投与12時間後も活動量の亢進が認められ、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。

②オープンフィールド活動量測定装置による解析

コントロール群と比較して、いずれの投与群においても投与10分後以降に活動量の低下が認められた。最も活動量の低下が著しく認められたのはテロドトキシン投与群であり、投与30分後以降はほとんど動かなかった。またアセフェート投与群においては投与60分後以降にはほとんど動かなかった。一方でニコチン投与群と無水カフェイン投与群は活動量の低下を示すものの完全に活動を停止する事はなかった。また、オープンフィールド活動量測定装置における不安関連行動に認められる中央滞在時間に関して、ニコチン投与群においては著しい上昇が認められた。オープンフィールド活動量測定装置による結果を図2及び図3に示す。なお、全ての群において24時間の生存を確認できた。

③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24時間の生存を確認できた。

令和5年度

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。

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。

令和6年度

まず、80db、85db、90db、95db、100db、105db、110d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・インビジョン(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。

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、測定時間を延長すべきであると考えられた。また、無水カフェイン投与群の投与用量について、投与 12 時間後も活動量の亢進が認められ、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ことから、無水カフェインの用量を再考すべきであると考えられた。

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。

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された。

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.

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.

Hirokatsu Saito, Kentaro Tanemura, Yusuke Furukawa, Takahiro Sasaki, Jun Kanno, Satoshi Kitajima: 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]

Takahiro Sasaki, Hirokatsu Saito, Yusuke Furukawa, Takashi Tominaga, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Kentaro Tanemura: 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]

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.]

Kanno H, Kurata S, Hiradate Y, Hara K,

Yoshida H, Tanemura K. High concentration of dopamine treatment may induce acceleration of human sperm motility. *Reprod Med Biol*. 2022 Oct 1;21(1):e12482. [doi: 10.1002/rmb2.12482.]

Kurata S, Umezu K, Takamori H, Hiradate Y, Hara K, Tanemura K. Exogenous gamma-aminobutyric acid addition enhances porcine sperm acrosome reaction. *Anim Sci J*. 2022 Jan;93(1):e13744. [doi: 10.1111/asj.13744.

Kawabe Y, Numabe T, Tanemura K, Hara K. Characteristics of alpha smooth muscle actin-positive peritubular cells in prepubertal bovine testes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2022 Jun 18;609:48-53. [doi: 10.1016/j.bbrc.2022.03.149.]

Hiradate Y, Harima R, Yanai R, Hara K, Nagasawa K, Osada M, Kobayashi T, Matsuyama M, Kanno SI, Yasui A, Tanemura K. Loss of *Axdnd1* causes sterility due to impaired spermatid differentiation in mice. *Reprod Med Biol*. 2022 Mar 30;21(1):e12452. [doi: 10.1002/rmb2.12452.]

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 回日本繁殖生物学学会大会(2024.9.22-9.25)

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)

高橋祐次、鶴岡秀志、大久保佑介、種村健太郎、相崎健一北嶋 聡:バイタルサインの統合的評価をエンドポイントとした急性毒性試験の近代化、第96回日本薬理学会年会、(2022.12.2)、横浜

佐々木 貴熙、原 健士朗、種村 健太郎:発生-発達期のアセフェート曝露による性成熟への影響評価、第24回環境ホルモン学会研究発表会(環境化学物質3学会合同大会)(2022.6.14-16)

佐々木 貴熙、原 健士朗、種村 健太郎:アセフェートの発生-発達期慢性曝露が雌雄の生殖能成熟に及ぼす遅発性影響評価、第49回日本毒性学会学術年会(2022.6.30-7.2)

長谷川 彩乃、佐々木 貴熙、原 健士朗、Jahidul ISLAM、野地 智法、種村 健太郎:発達期ニューキノロン系抗菌薬(TFLX)投与による成熟後の行動影響と腸内細菌叢解析、第49回日本毒性学会学術年会(2022.6.30-7.2)

張磨 琉亜、平舘 裕希、原 健士朗、種村 健太郎:精子完成におけるダイニン関連因子(Axdnd1)の機能解明、第115回日本繁殖生物学会大会(2022.9.11-7-9.14)

Takahiro Sasaki, Kenshiro Hara, Kentaro Tanemura, The effects of early life exposure to acephate on sexual maturation in male and female. The XVIth International Congress of Toxicology, (2022.9.18-7-9.21)

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

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」を基盤にした致死性予測の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。開発するソフトウェアは、(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を条件とした。R4 年度には、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)の検討を行ってその有効性を確認した。R5 年度には、実際に本研究班独自開発のセンサーで取得した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。R6 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た。このアプリケーションソフトウェアの動作確認、急性毒性試験における利用の可能性と、そのための最適化を検討した。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。

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した。

B. 研究方法

B-1 Matrix profile(MP)アルゴリズム

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。

MP アルゴリズムは基本的に、部分データ(A)と、時系列データ全体をAと同じ長さに分解した部分時系列データBの類似性を計算するものであり、異常検知だけでなく、繰り返しパターンの検出についても有用であり、教師なしで高い汎用性を有する。数理的なアルゴリズムであるため、事前学習や特別な処理を必要としない。またアルゴリズムの実装において優れたライブラリが提供されており、最小限のパラメータのみで実行可能である。波形データのベースラインの調整など、事前の正規化処理も不要であり、汎用性が高い。

R4 年度は、Web 上で公開されている長時間記録の心電図データを用いてラベル付加や正規化などの前処理を適用していない、30 分間(測定頻度 650,000 回)連続測定した心電図データを用いて、MP 解析を行い、異常値検知の性能評価を行った。R5 年度は、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)データを用いて、異常値の検出を試みた。

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。

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

本研究では、急性毒性試験における動物の心電図(ECG)データを対象に、時系列解析アルゴリズムである Matrix Profile(MP)を活用した異常検知手法の開発とその実装を目的として、3 年間にわたり検討を進めた。とりわけ、実用的かつリアルタイム性を有する評価システムの構築を念頭に置き、解析性能の検証からソフトウェア化までを段階的に実施した。

R4 年度には、MP アルゴリズムの特性と性能に関する基礎検討を行った。その結果、パラメータ未指定の完全自動解析(Pan-Matrix Profile)は、処理時間や精度の面で限界がある一方で、目視により周期性を踏まえて部分データのサイズを適切に設定することで、解析時間を抑えつつ有効な異常検知が可能であることが確認された。また、心電図と同様の周期的性質を有する機械音データへの適用においても良好な結果が得られたことから、MPの広範な時系列データへの応用可能性が示唆された。

R5 年度は、MP の有用性を実試験データにて検証すべく、本研究班がラットより取得した ECG データに MP 解析を適用した。対象としたのは、麻酔下における通常状態のデータと、アミトリプチリン投与後の心電図である。前年度に確立した手法に基づき、前処理や学習を行わず、周期的パターンのサイズのみを指定して MP を実行したところ、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は、異常波形を検出することができた。さらに、低スペックの汎用 PC (Windows10, Core m3, RAM8GB)上での解析では、50,000 点規模のデータが 5 秒以内に処理され、急性毒性試験中におけるリアルタイム評価の可能性を十分に示す結果となった。

R6 年度には、MP 解析の現場応用を目指し、より簡便かつ直感的に操作できる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「ECG_matrixprofile_analysis.py」を開発した。本アプリでは、事前に設定したパラメータをもとに、ECG データファイルをドラッグ&ドロップするだけで

MP 解析が実行され、解析結果が即時に可視化される。Python による開発により、マルチプラットフォームでの利用も可能であり、汎用 PC 環境下でも高い操作性と十分な処理速度を維持した。開発したアプリを用いて、覚醒下・非拘束状態における ECG データ（アミトリプチリンおよびニコチン投与後を含む）に対し MP 解析を行った結果、動物の体動によるノイズを含む状況下においても、ラベル付加やベースライン補正を必要とせず、所定のパターンサイズを指定するだけで解析が実行可能であった。また、処理速度は R5 年度と同等でありながら、ユーザー操作の簡略化により、実験現場での即時対応性が大きく向上した。

D. 考察

本研究では、急性毒性試験におけるバイタルサインの一つである心電図 (ECG) データのリアルタイム解析を目的に、Matrix Profile (MP) アルゴリズムの応用可能性を検討し、その実装と実用化に向けた取り組みを行った。従来、心拍異常などの検出には機械学習、特に畳み込みニューラルネットワーク (CNN) や自己符号化器 (AutoEncoder) といったモデルが活用されてきたが、これらの手法は十分な学習データを必要とし、特に異常例の収集が困難なバイタルサイン領域においては、初期運用の障壁が大きいという課題があった。また、学習済みモデルの適用にはデータセットや試験条件の違いによる再学習も必要となるなど、汎用的な運用には限界があった。

これに対し、MP は数理的アルゴリズムであり、教師なしかつ学習不要であるという特長を持ち、心電図のように周期性のある時系列データに対して、極めて少ないパラメータで異常検知を行える利点がある。実際に、実験動物から取得した心電図データを対象に MP 解析を行ったところ、投与薬剤に伴う局所的な心拍異常や心停止の予兆といった変化を、前処理や事前学習を必要とせず検出可能であることが確認された。また、MP 解析は処理時間が短く、汎用 PC でも実行可能であることから、急性毒性試験中のリアルタイム解析にも耐えうる性能を示した。

さらに、2024 年度には MP を搭載した GUI ベー

スのアプリケーションソフトウェアを in house 開発し、従来はスクリプトを記述して操作していた解析手順を大幅に簡略化した。これにより、専門知識を有さない実験担当者でも、試験中に即座に MP 解析を実施し、異常の兆候を検知することが現実的となった。また、MP で検出された異常波形は、今後、機械学習モデルの学習データとしても利用できる可能性があり、MP によるリアルタイム異常検知と、機械学習による波形分類を組み合わせることで、バイタルサインの総合的な評価体制を構築できると考えられる。

今後は、ECG データの逐次記録と自動解析を連動させるタイマー機能などの追加により、さらにリアルタイム性を高め、異常の兆候を試験進行中に即時把握するシステムへの発展が期待される。本研究で得られた知見は、単に MP の有効性を示すのみならず、機械学習との相補的活用による毒性評価の高度化に向けた基盤技術として、高い有用性を有するものである。

E. 結論

本研究では、Matrix Profile アルゴリズムが急性毒性試験における心電図異常のリアルタイム検出に有用であることを確認し 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]

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, 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

令和 4 年度-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いる。本分担研究では、急性毒性に関連する神経毒性予測の高度化を目的とし、初年度となる R3 年度にはヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いた MEA(多電極アレイ)計測による毒性リスク評価を実施した。痙攣陽性・陰性化合物を対象とした検証により、用量依存的なリスク推定が可能であり、従来の代替法で予測困難だった化合物に対しても評価可能であることが示された。R5~R6 年度は、本研究班で独自に開発した CNT ヤーンを表面電極として取得して、実際にラットを用いた動物実験により取得した脳波データを対象に、化合物投与による脳波変化の解析を行った。具体的には、FFT によるパワースペクトル密度(PSD)解析と、独自に開発したバースト解析(特許第 7138995 号)を組み合わせることで、周波数依存的な神経活動の変化を捉える手法を確立した。さらに、R6 年度には、麻酔下および覚醒下での脳波解析への影響も検討し、実験条件による信号特性の違いを評価した。これらの成果は、バイタルサインの統合的解析と致死性予測のための基盤技術としての応用が期待される。

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ており、本分担研究では神経毒性予測に特化した研究を推進した。初年度となる R3 年度にはヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いた MEA(多電極アレイ)計測による毒性リスク評価を実施し、2 年目以降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

本研究では、急性毒性における神経毒性予測を目的とし、ヒト iPS 細胞由来ニューロンおよび動物から測定し

た脳波データを用いた解析手法を開発・検証した。R4 年度は、ヒト iPS 細胞から分化誘導した Glutamatergic および GABAergic ニューロン、アストロサイトを共培養し、MEA プレートにて神経ネットワーク活動を計測した。痙攣陽性・陰性化合物や予測精度の低い化合物を用い、スパイク検出および独自の 4-step 法により同期バースト発火を評価し、13 種のパラメータから毒性リスクを推定した。R5 年度以降は、CNT ヤーン電極を用いて雌性ヘアレスラットから脳波データを取得し、アミトリプチリン塩酸塩およびアトロピン、ニコチンを投与後の脳波変化を解析対象とした。脳波は被験物質投与前後でセクション分割し、FFT によるパワースペクトル密度(PSD)解析によりピーク値およびピーク周波数を定量化した。さらに、特許取得済みのバースト解析手法(特許第 7138995 号)を用いて、複数の周波数帯域ごとの神経活動パラメータを抽出し、薬剤に対する周波数依存的な脳波変化を評価した。R6 年度には、麻酔下および覚醒

下の脳波データを比較し、意識状態の違いが解析結果に与える影響についても検討した。これらの一連の方法により、被験物質による神経毒性の影響を定量的かつ多角的に評価可能な解析体系を構築した。

倫理面への配慮

本研究で実施したヒト iPS 細胞由来ニューロンの利用は、市販のニューロンであり、平成 30 年 8 月、令和元年 6 月に東北工業大学研究倫理審査委員会で承認済である。

C. 研究結果

R4 年度は、ヒト iPS 細胞から分化させた Glutamatergic および GABAergic ニューロン、アストロサイトを混合した共培養系を MEA プレートに播種し、神経ネットワーク活動のスパイクパターンを解析した。その結果、Caffeine 投与により、同期バースト発火頻度が濃度依存的に上昇することが確認され、薬剤応答の解析において同期バースト関連パラメータが有用であることが示された。痙攣陽性化合物 (4-AP、Picrotoxin、Pilocarpine)、陰性化合物 (Acetaminophen、Amoxicillin)、および予測性の低かった Caffeine や Nicotine に対して、13 種類の神経活動パラメータを抽出し、多変量解析による毒性リスク推定を実施した。主成分分析により、DMSO 濃度に依存しない領域を定義し、そこから逸脱した度合いに応じて低・中・高リスクと評価する方法を確立した。痙攣陽性化合物は濃度依存的に高リスクと判定され、陰性化合物ではリスク上昇が見られなかったことから、定量的かつ再現性の高い毒性リスク推定が可能であることが明らかとなった。また、異なる細胞種としてヒト iPS 細胞由来ドーパミンニューロンを用いた系でも同様の解析を行い、Nicotine によるリスク上昇を検出する一方、Acetaminophen ではリスクが上昇しない結果となった。これにより、細胞種を変更しても手法の有効性が保たれることが確認された。

R4 年度は、in vivo モデルへの展開として、CNT ヤーンを表面電極として用い、雌性ヘアレスラットから得られた脳波データを用いて解析を行った。被験物質として Amitriptyline および Atropine を用い、投与前後の脳波データをセクションに分割し、FFT による PSD (Power Spectral Density) を算出した。Amitriptyline では時間経過に伴って PSD ピーク値が減少する傾向がみられ、Atropine では麻酔の有無がピーク値や周波数に影響を与えることが明らかとなった。加えて、特許取得済の独自バースト解析手法を適用し、

θ 波から high- γ 帯域まで各帯域の Oscillation rate および Burst rate を定量化した結果、薬剤投与により特定周波数帯における神経活動の変動が検出された。

R5 年度には、非拘束、覚醒下での脳波測定の結果を解析した。Amitriptyline 5 mg/kg および 50 mg/kg の投与試験では、被験動物個体ごとの PSD プロファイルに差がみられ、個体差が解析に与える影響の重要性が示唆された。Nicotine 投与では、1 mg/kg と 5 mg/kg いずれにおいても PSD に顕著な変化は認められなかった。一方、麻酔中止直後の脳波解析では PSD のピーク値が一時的に 1.5 倍程度に増加し、その後速やかに基準値に戻ることが確認され、麻酔からの覚醒時の影響を回避するための測定タイミングの工夫が必要であることが示された。

さらに、バースト解析の結果、Amitriptyline 投与では特に β 波帯域以上で Oscillation および Burst rate が上昇する傾向が見られ、Nicotine 5 mg/kg では複数の帯域で増加が確認された。麻酔中止後は、全帯域で Oscillation rate が減少する一方、低周波帯 (θ 、 α 、 β) で Burst rate が急激に増加するという一過性の変動が観察された。

これらの結果より、ヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いた MEA 解析、および CNT ヤーン電極による脳波解析を組み合わせた評価手法は、薬剤による神経毒性リスクの濃度依存的・周波数依存的変化を的確に捉えるものであり、急性毒性試験における神経毒性予測手法として高い有用性を示すものであった。

D. 考察

本研究では、in vitro および in vivo における脳機能指標を用いた化合物の神経毒性予測手法を検討した。初年度の MEA 計測では、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの自発電気活動を指標とした毒性リスク推定において、DMSO 濃度に依存しない領域の標準偏差 (SD) 範囲を基準とする多変量解析法が有効であることを示し、異なる細胞種においても予測性が維持されることを確認した。これは細胞種ごとの神経活動特性の違いを前提とした柔軟な評価体系の構築可能性を示唆している。

2 年目以降のラット脳波解析では、FFT による PSD および独自のバースト解析を用い、薬剤投与による周波数帯域ごとの神経活動変化を定量的に評価した。Amitriptyline や Atropine では、低～高周波帯における Oscillation rate と Burst rate に特徴的な変動が見られ、化合物の神経作用に応じた脳波応答が捉えられた。さらに、麻酔下と覚醒下での結果を比較したところ、

特に麻酔中止直後における PSD やバースト指標に一過性の変動が観察され、解析には状態依存性の考慮が不可欠であることが示唆された。

最終年度には、個体間差や行動状態の影響も含めて評価を行い、覚醒下でも脳波変化の定量解析が可能であること、さらにバイタルサインや一般状態観察と組み合わせることで、神経毒性評価の精度向上が期待できることが明らかとなった。これにより、*in vitro* と *in vivo* を統合した神経毒性評価体系の実現に向けた重要な知見が得られた。

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ことが期待される。

E. 結論

本研究では、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの MEA 計測による神経毒性リスク推定が、予測性の低い化合物にも有効であることを示した。また、CNT-Y を用いたラット脳波の FFT およびバースト解析により、化合物投与時の脳波変化を捉えることができ、致死性予測に資する解析基盤となる可能性が確認された。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

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 iPSC 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

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-ichi 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

別添4

<p>Kuwagata M, Tsuboi M, Igarashi T, Tsurumoto M, Nishimura T, Taquahashi Y, Satoshi Kitajima</p>	<p>A 90-day repeated oral dose toxicity study of 2-Butylbenzo[d]isothiazol-3(2H)-one in rats</p>	<p>Fundam. Toxicol. Sci.</p>	<p>10(2)</p>	<p>69-82.</p>	<p>2023</p>
<p>Kuwagata M, Tsuboi M, Igarashi T, Tsurumoto M, Nishimura T, Taquahashi Y, Satoshi Kitajima</p>	<p>A 90-day dose toxicity study of 2-(2H-benzotriazol-2-yl)-6-dodecyl-4-methylphenol in rats</p>	<p>Fundam. Toxicol. Sci.</p>	<p>10(2)</p>	<p>59-68</p>	<p>2023</p>
<p>鶴岡秀志、高橋祐次</p>	<p>カーボンナノチューブのヘルスケア応用</p>	<p>Nanofiber</p>	<p>13(1,2)</p>	<p>19-24</p>	<p>2022</p>