

令和2年度

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

バイタルサインの統合的評価をエンドポイントとした新規急性経口投与毒性試験方法の開発-統計学による半数致死量から診断学による概略の致死量への転換-(19KD1002)

分担研究報告書

分担研究課題 バイタルサインセンサーの開発及び研究統括

研究分担者:	高橋 祐次	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部 室長
研究協力者:	栗形麻樹子	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部 室長
研究協力者:	大久保佑亮	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部 主任研究官
研究協力者:	太田裕貴	横浜国立大学大学院工学研究院	システムの創生部門 准教授
研究協力者:	森田紘一	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
研究協力者:	辻 昌貴	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
研究協力者:	菅 康佑	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
研究協力者:	相田麻子	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部

研究要旨

本研究の目的は、ヒトの安全性確保に主眼を置いた上で **Reduction** と **Refinement** により動物福祉の課題を解決する新規急性経口投与毒性試験方法の開発である。現在、急性毒性において使用されているエンドポイントを「死亡」からより精緻な「複数のバイタルサイン」に置き換え、化学物質の毒性強度の指標を「統計学」を背景とした「半数致死量(LD₅₀)」から「診断学」を基盤にした「概略の致死量」へ転換を図る。本分担研究では、一般状態、心電、心拍、血圧、体温、呼吸、脳波などのバイタルサイン(VS)測定と、VS測定のためのセンサーの開発を行った。急性毒性を誘発するモデル化合物として **Tetrodotoxin** を用いた。並行して、新規素材であるカーボンナノチューブ(CNT)のヤーンを用い心電と脳波測定に取り組むとともに、ラット用のパルスオキシメータを独自開発した。TTXの急性毒性発現時には一過性の体温上昇と、心拍数と血圧の低下がみられた。CNTヤーンを用いて心電の測定は可能となったが、脳波については現在のところ明確なデータが得られていない。ラット用に開発したパルスオキシメータでは、24時間以上連続して心拍数、SpO₂、呼吸数の計測に成功した。現在は商業的に入手可能なVS測定装置と新規開発のCNTセンサーを並行して使用し実験を実施しているが、新規経口投与毒性試験の実用化のためには、これらの機器を統合して実験者の利便性を高め、かつ、廉価な装置として開発する必要がある。

A. 研究目的

本研究の目的は、ヒトの安全性確保に主眼を置いた上で **Reduction** と **Refinement** により動物福祉の課題を解決する新規急性経口投与毒性試験方法の開発である。現在、急性毒性において使用されているエンドポイントを「死亡」からより精緻な「複数のバイタルサイン」に置き換え、化学物質の毒性強度の指標を「統計学」を背景とした「半数致死量(LD₅₀)」から「診断学」を基盤にした「概略の致死量」へ転換を図る。

急性毒性試験は時代と共に簡便化され、使用する動物数が削減された。しかし、試験のエンドポイントは動物の「死亡」のままであり、死因、標的臓器等その内容は一切考慮されていない。そのため、ヒトの中毒治療に有用ではないとの批判がある。一方、動物福祉の観点から「死亡」をエンドポイントとすることに強い批判がある。そのため、代替法(**Replacement**)として、細胞毒性の **IC50** を指標として急性毒性を評価する方法が **ICCVAM** と **ECVAM** から提案されているが、難溶性物質、代謝活性化による毒性発現物質、心臓や神経系など臓器特異的な毒性評価を代替するに至っていない。

しかし、一般状態、心電、心拍、血圧、体温、呼吸、脳波などの「バイタルサイン」を指標とした更なる動物数の削減とヒトの安全性確保の向上を可能とする「新規急性経口投与毒性試験方法」が、近年の IT デバイスの小型化と新素材センサーの出現により開発可能となった。具体的には1匹の実験動物から多項目に亘るバイタルサインを取得することにより毒性徴候を精緻に解析・定量化し、計算科学によって化学物質の急性毒性の強度と毒性標的の合理的判定基準を作成し、ヒトが急性曝露された際の危険度をより正確に予測する事を可能とする。これにより、毒物及び劇物取締法の指定に関して、中毒事象を含むより現実に想定される事故等に即した規制が可能となる。言い換えると、ヒトの急性中毒患者が救急外来で受ける諸検査に該当する所見を1匹の実験動物から取得する試験法の開発である。これを実現するため、先行研究においてデータが豊富なモデル化合物を用いてラットにおける急性影響を調べた。並行して、

新規素材であるカーボンナノチューブ(CNT)のヤーンを用いて心電測定に取り組み、また独自にラット用パルスオキシメータの開発を行った。

B. 研究方法

B-1 ラットを用いた化学物質の急性影響評価

1. 使用動物:

CrI:CD(SD)雌性ラット 8~12 週齢を用いて、既存の血圧測定装置を用いた被験物質投与による血圧への影響を調べた。並行して赤外線サーモグラフィによる体表面温度測定を実施した。

ラットの飼育ケージは、ポリカーボネイト製のケージを使用した。紙製の床敷を使用し、1ケージ当り1~2匹のラットを収容した。ケージラックはケミカルセーフティ対応のケージ個別換気式飼育装置(**RAIR HD SUPER MOUSE 750TM** 個別換気式飼育装置特型)を使用した。飼育条件は、温度;25±1℃、湿度;55±5%、換気回数;約 20 回/h、照明時間;8 時~20 時点灯(照明明暗サイクル 12 時間)とし、固型飼料 **CRF-1**(オリエンタル酵母工業株式会社)を自由摂取させ、飲水は市水をフィルター濾過し給水瓶により自由摂取させた。

2. 被験物質:

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

3. バイタルサイン測定:

バイタルサインは実験動物用として入手可能な装置を用いて測定した。血圧計は無加温型非観血式血圧計(**MK-2000ST**、室町機械株式会社)を用い、ラット尾動脈にて心拍数、最高血圧、最低血圧及び平均血圧を測定した。並行して赤外線サーモグラフィ(サーモフレックス **F50B-STD**、協和テクノロジーズ)による体表温度の変化を調べた。

B-2 バイタルサインセンサーの開発

1. 心電用センサーの開発:

二層カーボンナノチューブ (Double-Walled Carbon Nanotube: DWCNT) を基にした CNT ヤーン (Sugikuro@yarn, sugi nano carbon technology 合同会社) を用い、バイタルサイン測定のための電極 (以下、CNT センサー) として利用について検討した。CNT ヤーンのまま動物の皮膚に縫合針 (外科強角針 No.0 バネ穴、夏目製作所) を用いて単結紮した状態で使用した。CNT センサーからのデータは①プレアンプ (特注品、バイオテックス) を介して A/D コンバータ (MP160、バイオパック) と有線接続、または、② A/D 変換・トランスミッター (BITalino (r)evolution) を用いて無線接続により PC にてデータを取得した。

CNT センサーの装着前にラットの背部を動物用バリカンで刈り皮膚を露出させた。表面電極はラットが覚醒した状態で装着した。CNT ヤーンを皮膚に単結紮して使用する際は、イソフルラン (ファイザー) 麻酔下で、耳介、頸部、背部及び腰部の 3 か所に一針単結紮を行い、プレアンプと接続した。

2. ラット用パルスオキシメータの開発:

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

ヘモグロビンは酸化型と還元型で赤外光の吸光度はほとんど変わらないが、赤色光では酸化型ヘモグロビンの吸光度が低いことが知られている。パルスオキシメータは、動脈血を対象として赤色光と赤外光を組織に照射してその反射光または透過光を測定し、それぞれの吸光度の比率から血中酸素濃度 (SpO₂) を求める装置である。動脈は心臓の拍動に伴って血管径が変動し、これを脈波として検出することにより SpO₂ を求めることが可能となる。また、脈波は心拍を反映した情報であることから、パルスオキシメータは

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

非拘束を実現するため、Bluetooth モジュールを実装して無線化した。体動による影響を受けにくくするため測定は胸部とし、最小のモジュール構成反射型のパルスオキシメータを作製した。赤外線 LED 搭載カメラを用いてラットの一般状態を 24 時間記録し、SpO₂ の体動と脈波ノイズの相関を調べた。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

C-1 ラットを用いた化学物質の急性影響評価

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

C-2 バイタルサインセンサーの開発

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

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

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

パルスオキシメータにより、心拍数、SpO₂、呼吸数の計測と一般状態観察の撮像を並行して実施し解析を行った。その結果、制止状態では、安定的に測定が可能であることが明らかになった。呼吸数は目視で測定した呼吸数とほぼ一致することが明らかになった。しかし、高速フーリエ変換は倍数を判別できない特性から、60 回/分と 120 回/分の違いを判別できない場合があることが明らかとなった。

D. 考察

現在入手可能なバイタルサイン測定装置を用いて、心拍・血圧・体温測定を行った。心拍・血圧測定は安定した結果が得られたが、測定に際しては動物を保定してセンサーを取り付けることが必要であり、経時的な測定が困難である。サーモグラフィによる体温測定は非常に簡便かつ鋭敏に変化を捉えることができることから、本研究の目的としては極めて有用であると考えられる。

新素材である CNT を用いたバイタルサインセンサーの開発では、皮膚結紮と無線 A/D コンバータの組み合わせで心電波形の取得が可能であった。表面電極でのノイズは、体動によりセンサーの接触性が低下することが原因である。そのため、皮膚結紮による方法を試みた。表面電極に比較して作業が多くなるが、ラットの個体識別に使用される耳パンチと同程度の作業量であるため、動物実験へ組み込むことへの難易度は低いと考えられる。

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

ることができるため、現在、一般的に使用されている方法である動物の頭蓋骨を穿孔して金属電極を埋め込む手法よりも簡便で侵襲性が低いため、極めて有用な方法であると考えられる。今後は測定部位並びに解析方法の改良を試みる。

今年度着手したパルスオキシメータでは、24 時間以上連続して心拍数、SpO₂、呼吸数の計測に成功した。パルスオキシメータも体動によるノイズにより正確な測定が困難となる場合もあった。これを回避するため、パルスオキシメータと皮膚との密着性を高める必要がある。また、正確な呼吸数の測定のために、高速フーリエ変換によって得られた呼吸数の急変(倍数変化)をキャンセルするアルゴリズムを解析ソフトウェアに導入する必要がある。

E. 結論

バイタルサインセンサーの開発では、CNT ヤーンを用いて心電の測定は可能であるが、脳波については、現在のところ明確なデータが得られていない。ラット用に開発したパルスオキシメータでは、24 時間以上連続して心拍数、SpO₂、呼吸数の計測に成功した。現在は商業的に入手可能なバイタルサイン測定装置と新規開発の CNT センサーを並行して使用し実験を実施しているが、新規経口投与毒性試験の実用化のためには、これらの機器を統合して実験者の利便性を高め、かつ、廉価な装置として開発する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 学会発表

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

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

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

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

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

イン

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

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

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

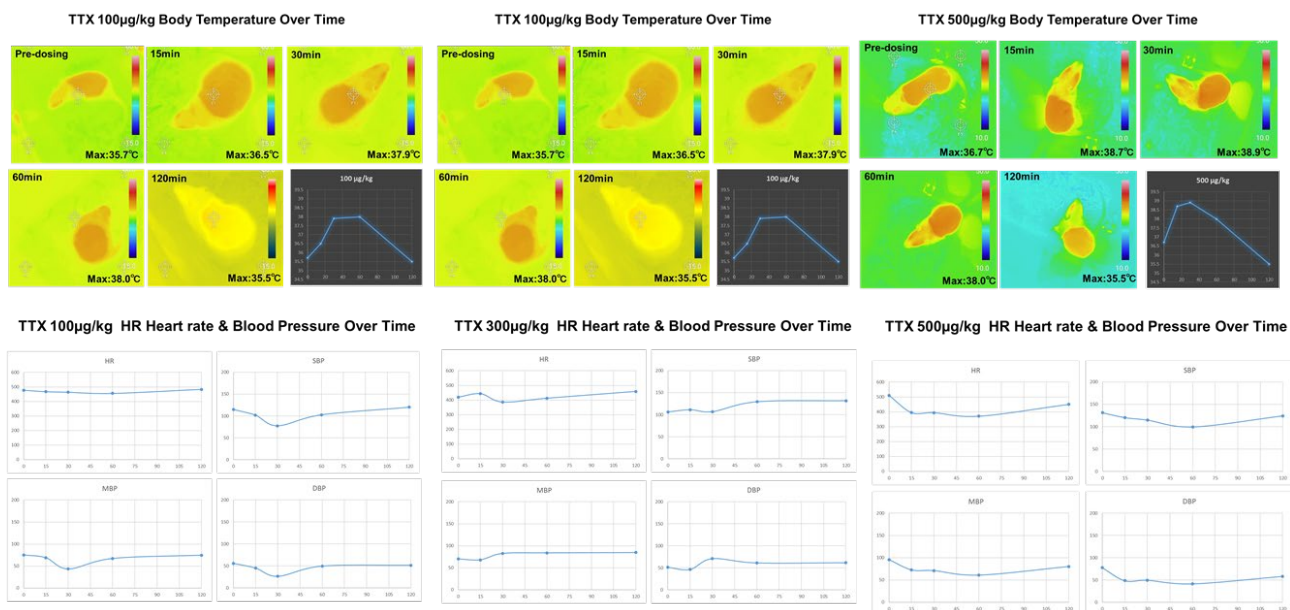


図 1 ラットを用いた化学物質の急性影響評価 (TTX)

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

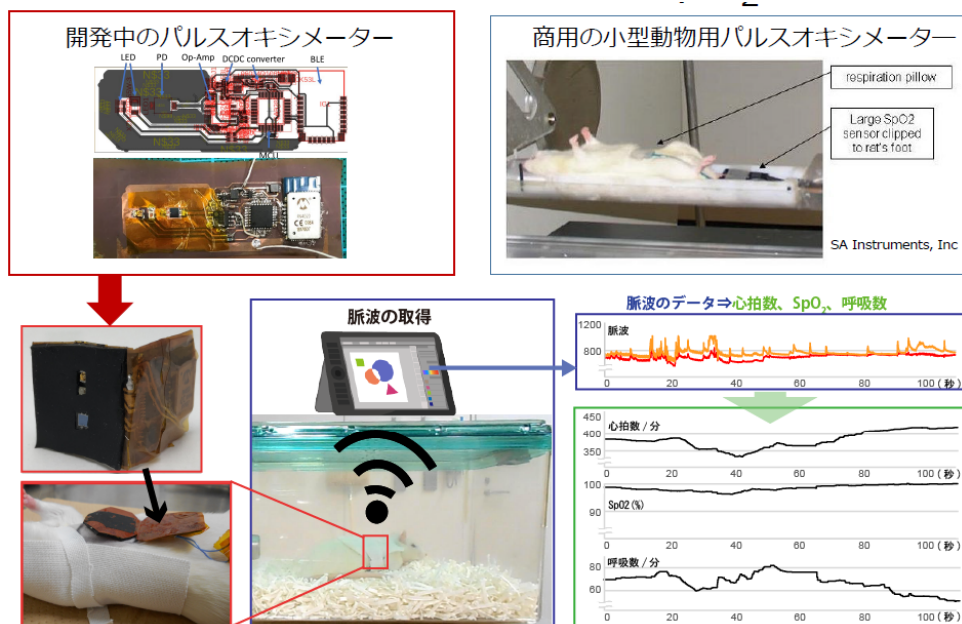


図 2 バイタルサインセンサーの開発

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