

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

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

研究要旨

急性毒性試験は時代と共に簡便化され、使用する動物数が削減された。しかし、試験のエンドポイントは動物の「死亡」のみであり、死因、標的臓器等その内容は一切考慮されていない。そのため、ヒトの中毒治療に有用ではないとの批判がある。一方、動物福祉の観点から「死亡」をエンドポイントとすることに強い批判がある。本研究は、ヒトの安全性確保に主眼を置いた上で、Reduction と Refinement により動物福祉の課題を解決する新規急性経口投与毒性試験方法の開発を目的としている。現在、急性毒性において使用されているエンドポイントを「死亡」からより精緻な「複数のバイタルサイン」に置き換え、化学物質の毒性強度の指標を「統計学」を背景とした「半数致死量(LD₅₀)」から「診断学」を基盤にした「概略の致死量」へ転換を図る。具体的には、1匹の動物から多項目に亘る毒性徴候を精緻に測定し、計算科学によって化学物質の急性毒性の強度と毒性標的の合理的判定基準を作成(スコア化)することで、ヒトが急性曝露された際の危険度をより正確に予測する。これにより、毒劇法の指定に関して、中毒事象を含むより現実想定される事故等に即した規制が可能となる。例えるならば、ヒトの急性中毒患者が救急外来で受ける諸検査に該当する所見を1匹の動物から取得する試験法の開発である。

本研究は、①バイタルサインセンサーの開発、②急性毒性試験における遺伝子発現変動解析、③急性毒性試験における行動解析、④バイタルサインの統合的解析方法(ソフトウェア)の開発の4つの分担研究課題を設定している。バイタルサインセンサーの開発では、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。神経毒性物質である Tetrodotoxin (TTX)の急性毒性発現時の海馬及び肝の遺伝子発現データを取得し、その臓器連関解析において、海馬及び肝臓ではストレス関連遺伝子の発現が高い一方、Na⁺チャネルなど TTX が直接関与することが示唆されるシグナルネットワーク関連遺伝子の発現変動は認められなかった。肝臓では糖新生に係るシグナルネットワークが見出された。マウス及びラットを用いて本研究の基盤となる行動(ハイスピードカメラを含む)、体温、心拍、血圧等の VS 測定装置のセットアップを行い、先行研究において、データが豊富であるモデル化学物質を使用して基礎データの取得に成功した。バイタルサインの統合的評価のためのソフトウェア開発においては、昨年度選定した Acute Toxicity Vital Signs Score(ATVSS、仮称)の定義に利用可能なアルゴリズムのうち、教師あり深層学習につい

て、判別性能の評価を行った結果、本研究の目標実現に有効な手法であることが分かった。現在は商業的に入手可能な血圧測定装置と、新規開発の CNT センサー及びパルスオキシメータを並行して使用し研究を遂行しているが、新規経口投与毒性試験の実用化のためには、これらの機器を統合して実験者の利便性を高め、かつ、廉価な装置として開発する必要がある。

研究分担者

北嶋 聡	国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 部長
相崎健一	国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 第一室 室長
種村健太郎	東北大学大学院農学研究科 動物生殖科学分野 教授

A. 研究目的

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。

本研究は二つの大きな柱からなる。第一の柱は、今までの情報や経験から選択した VS の諸項目の、急性毒性指標としての妥当性、再現性、信頼性、を確認する研究である。これには、①急性毒性発現における遺伝子発現変動解析、②急性毒性試験における行動解析の二つを分担研究課題として設定した。第二の柱は、選択した VS の諸項目を正確に、実験動物から測定するためのデバイスの改良である。これには、③新素材を用いたバイタルサインセンサーの開発、④バイタルサインの統合的解析方法(ソフトウェア)の開発を分担研究課題として設定した。

B. 研究方法

B-1 バイタルサインセンサーの開発

1. 心電・脳波電極としての CNT ヤーンの性能評価
二層カーボンナノチューブ(Double-Walled Carbon Nanotube:DWCNT)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。

H31/R1 年度に引き続き、生体電位データである心電及び脳波を対象に開発を行った。CNT ヤーンは、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。CNT センサーからのデータは 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。

2. ラット用反射型パルスオキシメータの開発:

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

ヘモグロビンは酸化型と還元型で赤外光の吸光度はほとんど変わらないが、赤色光では酸化型ヘモグロビンの吸光度が低いことが知られている。パルスオキシメータは、動脈血を対象として赤色光と赤外光を組織に照射してその反射光または透過光を測定し、それぞれの吸光度の比率から血中酸素濃度 (SpO_2) 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 SpO_2 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、 SpO_2 の体動と脈波ノイズの相関を調べた。

なお、本装置は下記の研究協力者により開発を行った。

大久保佑亮 国立医薬品食品衛生研究所
毒性部 主任研究官

太田 裕貴 横浜国立大学大学院工学研究院
システムの創生部門 准教授

B-2 急性毒性試験における遺伝子発現変動解析

急性毒性発現時の海馬、肺、肝の遺伝子発現データを取得し、その臓器連関解析を実施した。具体的には、被験物質を単回経口投与後、得られたマウスの海馬を含む脳 4 部位、肺及び肝の mRNA サンプルにつき、当方が開発した Percellome 手法(遺伝子発現値の絶対化手法)を適用した網羅的遺伝子発現解析を行った。再現性、感度、用量相関性、全遺伝子発現の網羅性を考慮し Affymetrix 社 GeneChip、Mouse Genome 430 2.0 を使用した。4 用量、4 時点の遺伝子発現情報を既に開発済みの波面解析等を用いた教師無しクラスタリング解析を行い、多臓器連関及びインフォマティクス解析を行った

モデル物質として、フグ毒として知られるテトロドトキシン (Tetrodotoxin, TTX、純度 95.7 %、富士フイルム和光純薬(株))を選択した。

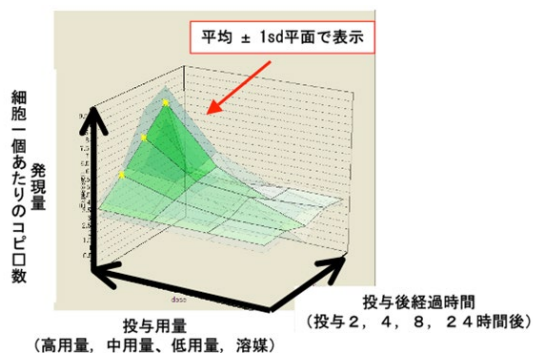
H31/R 元年度は、雄性マウスに単回経口投与した際の「海馬」における網羅的な遺伝子発現変動解析について検討した。R2 年度(今年度)は、海馬とは別に、「肝」における解析を検討し、多臓器連関解析を実施することにより、昨年度の解析により想定された二次的シグナル候補物質を探索した。

用量設定のため、TTX のマウス経口 LD_{50} 値が 334 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (RTECS 情報)であったことから、最高用量を 700 $\mu\text{g}/\text{kg}$ とし 3 段階の用量(700, 500, 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、及び溶媒対照)を設定し、予備試験を実施した。12 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを用い、金属製胃ゾンデ (KN-348、夏目製作所)を用いて各群 3 匹

に単回経口投与した。700 µg/kg 群では全例、500 µg/kg 群では 2 例に死亡が認められたが、300 µg/kg 投与群では死亡例はみられなかった。この結果から、24 時間無作用量であった 300µg/kg を最高用量をとり、公比 $\sqrt{10}$ で除して 300, 100, 30µg/kg の投与用量を設定した。

本実験では、投与後の時間 4 点(投与 2, 4, 8 及び 24 時間後)、投与用量 4 段階(300, 100, 30, 0 µg/kg (溶媒:0.1%酢酸を含む 0.5%MC, pH3.5)からなる計 16 群、各群 3 匹、合計 48 匹のマウスについて解析を行った。

各遺伝子の発現変動は、下記図のように用量依存性、経時変化、遺伝子発現量についての 3 次元グラフとして、縦軸(Z 軸)に絶対値化した(細胞 1 個あたりのコピー数) mRNA の発現量を取り、X, Y 軸にはそれぞれ、投与用量とサンプリング時間を取り、各条件の n=3 の平均値曲面で表示した。加えてこの平均曲面の上下に標準偏差(SD)平面(薄い色)で示した。すなわち、一つの化学物質につき、約 45,000 枚の平面が描かれる。



統計処理は、溶媒群と投与群の間の有意差の検定を Student の t 検定にて P 値が 0.05 未満の場合を有意と判定した。実験データは、平均値±標準偏差(SD)にて示した。

B-3 急性毒性試験における行動解析

1. マウス:

C57BL/6N 成熟雄マウスを使用して、既存の行動解析装置により急性経口毒性発現時の行動様式(移動量、移動様式、痙攣、流涎、瞬目)への影響を調べた。モデル化合物としてアセフェートを用い、投与量は AChE 活性阻害の特徴が現れると想定される

100mg/kg に設定した(アセフェートの経口投与におけるマウスの LD50 は 233mg/kg)。投与直後、投与 30 分後、投与 60 分後、投与 120 分後における微細な経時変化を捉えるために、ハイスピードカメラ(CHU30-BSNA-12, Shodensha, Inc.)を用いて撮影した。

2. ラット:

CrI:CD(SD)雌性ラット 8~12 週齢を用いて、既存の血圧測定装置を用いた被験物質投与による血圧への影響を調べた。並行して赤外線サーモグラフィによる体表面温度測定を実施した。モデル化合物として、TTX(100, 300, 500µg/kg)を投与した。

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

血圧計は無加温型非観血式血圧計(MK-2000ST、室町機械株式会社)を用い、ラット尾動脈にて心拍数、最高血圧、最低血圧及び平均血圧を測定した。並行して赤外線サーモグラフィ(サーモフレックス F50B-STD、協和テクノロジーズ)による体表面温度の変化を調べた。

B-4 バイタルサインの統合的解析方法(ソフトウェア)の開発

1. 学習・評価用データ:

開発中のバイタルサイン(VS)取得デバイスはまだ充分量のデータを生成していないため、完成時に得られるデータと同質のものとして、ヒトの心電図データ(MIT-BIH Arrhythmia Database (mitdb) (<https://physionet.org/content/mitdb/1.0.0/>)より入手)を用いた。

2. 解析計算及びソフトウェア生成:

異常検出に利用し得る人工知能アルゴリズムのコーディングについては、関連ライブラリが充実している Python 言語(ver.3.6.9)を使用した。機械学習ライブラリとしては Chainer (ver.7.7.0)、GPU 処理ライブラリとして CUDA (ver.10.2.89)、mitdb からの心電図データのダウンロード・処理ライブラリとして WFDB (ver.3.1.1)、その他、Numpy (ver.1.19.4)、Matplotlib (ver.3.3.3)を使用した。Python スクリプト実行環境としては Jupyter Notebook (ver.6.1.5)を使用した。

3. 計算精度確認:

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

(倫理面への配慮)

本実験は動物愛護に関する法律、基準、指針を遵守し、国立医薬品食品衛生研究所は、国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の制定による「動物実験等の適正な実施に関する規程(平成 27 年 4 月版)」、東北大学大学院農学研究科では、「国立大学法人 東北大学環境・安全委員会 動物実験専門委員会内規」に則って実施した。

C. 研究結果

C-1 バイタルサインセンサーの開発

1. 心電・脳波電極としての CNT ヤーンの性能評価:

CNT センサーを動物の皮膚に単結紮して脳波の測定を試みたが、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。

2. ラット用反射型パルスオキシメータの開発:

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

黒色の柔軟シリコン樹脂で囲うことで LED から PD への直接光の漏れ込みを軽減し、脈波の検出感度が上昇した。また、パルスオキシメータは 40×20×8mm 程度の大きさまで小型化した。ヒトに比べ心拍数の多いラット用にサンプリングレートを 25ms から 6.25ms に間隔を狭めることで、適切に脈波を捉えることに成功した(図 1)。

パルスオキシメータにより、心拍数、SpO₂、呼吸数の計測と一般状態観察の撮像を並行して実施し解析を行った。その結果、制止状態では、安定的に測定が可能であることが明らかになった。呼吸数は目視で測定した呼吸数とほぼ一致することが明らかになった。しかしながら、高速フーリエ変換は倍数を判別できない特性から、60 回/分と 120 回/分の違いを判別できない場合がある。これに対しては、直前の呼吸数データを参照するプログラムを実装することで正確な呼吸数の計測が可能となった。

C-2 急性毒性試験における遺伝子発現変動解析

H31/R1 年度は、モデル物質として、フグ毒として知られるテトロドトキシン(TTX)を、12 週齢の雄性マウスに単回経口投与した際の(4 用量、4 時点、各群 3 匹、計 48 匹)、脳の内、背景データが多く揃っている海馬における網羅的遺伝子発現変動解析をおこなった結果、ストレス関連遺伝子(Sgk1 遺伝子など)の発現増加が目立ち、他方、Na⁺チャネルなど TTX が直接関与することが示唆されるシグナルネットワーク関連遺伝子の発現変動は認められなかった。

具体的には、解析ソフト RSort を利用し、遺伝子の発現変動が有意(t 検定での時点毎に溶媒対照との間で P 値<0.05)で、発現変動の最高値のコピー数が 2 以上という条件で遺伝子を粗抽出した。その結果、発現が増加する遺伝子 286 プローブセット(ps)が粗抽出され、このうち目視による確認により生物学的な変化が示唆されたものとして 121 ps が抽出された。また発現が減少する遺伝子としては 508 ps が粗抽出され、目視による確認により生物学的な変化が示唆されたものは抽出されなかった。

R2 年度は TTX を、12 週齢の雄性マウスに単回経口投与した際の(4 用量、4 時点、各群 3 匹、計 48

匹)、「肝」における網羅的遺伝子発現変動解析をおこなった結果、ストレス応答遺伝子(代表的なものとしては、Nfkb1a、Sgk1、Mt1 や Gadd45g 遺伝子など)やサイトカイン関連遺伝子が見出された。なおストレス応答遺伝子は海馬の際でも認められた。また、肝機能への影響などについてさらに詳細な解析を進めたところ、糖新生に係るシグナルネットワークが見出された。すなわち「PGC-1→Foxo1→ HNF4→G6pc→Pck1」というシグナルネットワークである。したがって毒性予測として、TTX の単回経口投与により、血糖値が上昇するものと考えられ、今後、実証に向けた実験が有用と考える。この際、血糖値の測定にあたっては、中性脂肪と同様に、摂食の影響を受けるため、できるだけ絶食下にておこなう必要があると考える。具体的には、解析ソフト RSort を利用し、遺伝子の発現変動が有意(t 検定での時点毎に溶媒対照との間で P 値<0.05)で、発現変動の最高値のコピー数が 2 以上という条件で遺伝子を粗抽出した。その結果、発現が増加する遺伝子 1,893 プローブセット(ps)が粗抽出され、このうち目視による確認により生物学的な変化が示唆されたものとして 750 ps が抽出された。また発現が減少する遺伝子としては 352 ps が粗抽出され、目視による確認により生物学的な変化が示唆されたものとして 27 ps が抽出された。抽出されなかった。

C-3 急性毒性試験における行動解析

1. マウス:

アセフェートの投与 30 分後に活動性低下、瞬目反応の異常や半眼がみられ、投与 60 分後には流涙の症状が確認された。また、投与 120 分後には歩行時の振戦が確認され、流涙の増加および縮瞳がみられた。さらに、髭の動きから呼吸不整を起こしていることが考えられた。

2. ラット:

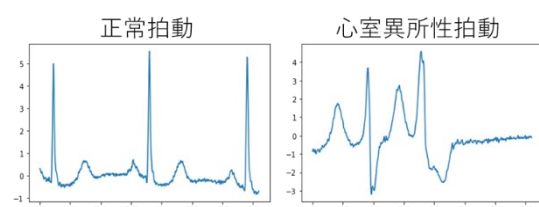
TTX を投与したラットを用い、体表面温度と血圧測定を行ったところ、TTX では体表面温度上昇に伴って血圧低下が認められた。

C-4 バイタルサインの統合的解析方法(ソフトウェア)の開発

現在開発中のバイタルサイン(VS)取得デバイスが完成した際に生成されるデータは、主に一次元の波形データになると予想されるため、今年度はヒトの心電図データをサンプルとして用い、異常検出アルゴリズムの評価や、最終目標である「概略の致死量」を推定するための Acute Toxicity Vital Signs Score(仮称)の「定義」を行う方策を検討した。

一般的に新規開発デバイスによる計測値処理では、実データを得てからでないと測定値分布も推定するしかなく、数理的な手法では閾値など具体的な基準値を設定するのは困難である。このため、汎用性の高い異常検出アルゴリズムとして、人工知能、とりわけ近年、開発研究が飛躍的に進み、代表的な手法となっている深層学習(Deep Learning)に着目し、その判別性能等を検討した。

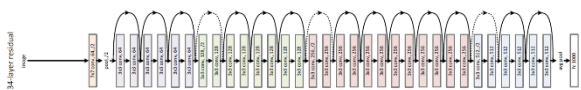
まず学習及び評価用データとして、MIT-BIH Arrhythmia Database (mitdb)に収録されていた 47 人の心電図データ、延べ 24 時間のシグナルデータを入手した。このデータベースでは予め各 R 波ピークに AAMI (Association for the Advancement of Medical Instrumentation) 推奨基準によるラベルが付与されており、これを元に個々のレコードに分割し、正常拍動若しくは心室異所性拍動にラベリングした。



前処理として、ペースメーカー等によるノイズが混入したレコードや重複レコードを取り除き、約 9 万レコードのサンプルデータを得た。なお、これらの 9 割が正常拍動、残り 1 割が心室異所性拍動であった。

深層学習で用いるネットワーク構造としては、画像

認識タスクで著名な畳み込みニューラルネットワーク (CNN: Convolutional Neural Networks)ベースの ResNet34 (arXiv:1512.03385)を採用した。



ResNet34 の層構造概略 (arXiv:1512.03385)

ただし、画像認識時の二次元畳み込みではなく、入力データである心電図に合わせて一次元畳み込みに設定し、上記 9 万件の拍データのうち半数を用いて教師あり深層学習を実施した。

学習に用いなかった残り半数の心拍データに対して、学習済み CNN で評価を実行した結果、正答率 (accuracy) は 93.0%であった。内訳としては正常拍動レコードに対する予測スコアは適合率 (precision) 0.99/再現率 (recall) 0.93 であったが、心室異所性拍動レコードに対しては同 0.50/0.89 であった。

accuracy		0.930	
	precision	recall	f1 score
正常拍動	0.99	0.93	0.96
異常拍動	0.50	0.89	0.64

D. 考察

バイタルサインセンサーの開発では、H31/R 元年度に CNT ヤーンを用いて心電の測定に成功したが、R2 年度に実施した脳波については、現在のところ明確なデータが得られなかった。心電図は 1~5mV 程度であるが、脳波は 1~500μV 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 (~10mV) によって脳波信号の抽出ができていない可能性がある。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。

遺伝子発現変動解析において、TTX のマウス海馬への直接作用は弱く、サイトカイン、糖質コルチコイドを介した影響が示唆された。多臓器関連の検討に向け、肝において発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析 (in silico) を、IPA における Upstream Analysis を用いて検討した結果、ストレス応答に絡むデキサメタゾンあるいはグルココルチコイド受容体 (NR3C1) やサイトカインである IL1B や TNF が調節因子として抽出されてきた。したがって、肝における細胞に対してストレス応答が誘発されていることが明らかとなった。この点、IL1B は、別の研究班での先行研究により、海馬に対して神経伝達抑制作用を有する可能性を示唆するデータを得ており、このことから、IL1B や TNF といった肝由来のサイトカインが海馬に働く二次的シグナル候補物質であることが示唆された。興味深いことに、欧州食品安全機関 (EFSA) が取りまとめた報告書では、既往知見であるヒトに対する最低致死用量が 2 mg であることに疑問が示され、そこで齧歯類を用いる急性毒性試験を用いるリスク評価がおこなわれた。その結果、「単回経口投与の際の無気力状態 (apathy) という一般状態変化を指標」とした急性参照用量 (ARfD) を 0.25 μg/kgBW と導出し、貝類を 400 グラム喫食した場合のヒトに対し有害な影響をもたらさない貝肉中の含有量を 44 μgTTX 等量/kg 貝肉と推定している。ARfD とは、ヒトがある物質を 24 時間以内に経口摂取した場合に、健康に悪影響を示さないと推定される一日当たりの摂取量である。したがって、げっ歯類において単回経口投与した TTX が無気力状態 (apathy) を誘発することから、中枢にはたらくことが明らかとなってきているが、TTX が血液脳関門を通過できないことから、この分子機序は不明である。われわれの検討結果からは、二次的シグナル候補物質としての IL1B や TNF といった肝由来のサイ

トカインが海馬に働いた結果、TTX のマウス経口投与により、無気力状態(apathy)が生じる可能性が考えられた。

急性毒性試験における行動解析では、アセフェートを投与した成熟雄マウスをハイスピードカメラ(CHU30-BSNA-12, Shodensha, Inc.)を用いて撮影した結果、肉眼では観察が困難である髭の動きから呼吸不整を起こしていることが考えられた。したがって、ハイスピードカメラは化学物質の毒性所見をより簡便に捉えることができると考えられる。今後、モデル化学物質の検討増やすとともに撮影条件の設定を進める予定である。

TTX を投与したラットでは体表面温度の上昇と血圧の低下が認められた。従来、これらの情報は実験者の感覚によって評価されているが、サーモグラフィと血圧計により定量的データが得られた。特に、サーモグラフィは体表面温度を非接触で簡便に測定することが可能であり、経時的に取得できるバイタルサインの評価には利便性が高い。本研究で使用している血圧測定装置はげっ歯類専用開発されたものであり、従来の装置では必須であった動物の加温が不要である。このため、動物にストレスを与えることがなく、かつ、サーモグラフィによる体温測定と同時に使用が可能である。一方、血圧測定は動物を一時的に拘束する必要があるため、経時的に取得することは難しい。

バイタルサインの統合的評価のためのソフトウェア開発において、今年度は代表的な畳み込みニューラルネットワーク(CNN)モデルを採用し、一般的な教師あり深層学習による次元の時系列データ(評価用サンプルとして心電図データを利用)の判別性能評価を実施した。総合的な正答率は 93%と期待より低いものであったが、これは異常波(心室異所性拍動)に対するスコアが低いためである。これは学習に用いたデータの極端な不均衡(心室異所性拍動レコードが全数の一割しかない)が原因と考えられる。対策としては、学習に用いるデータの選定において正常レコード数を削減して異常レコード数とのバランスをとる(アンダーサンプリング)といった単純な手法で対応可能である。さらに必要に応じて他の学習モデル、例えば異常検知に有効とされている自己符号化

器(autoencoder)や 深層距離学習(deep metric learning)などの導入と組み合わせを行うことで、性能向上が可能と考えられる。今回の検討は一種類のデータ、且つ正常/異常の単純分類であったが、機械学習技術は本来、多種類のデータ入力と複数クラスへの分類(出力)に対応する柔軟なものであり、本研究の目標である、計測したバイタルサイン(VS)の諸項目(=多種類データ)から「診断学」による分類(=複数クラス分類)に基づく統合評価の実現に必要な要件を充足する技術として、大変有望な手法と考えられる。なお機械学習技術を判別に利用する場合の最大の懸念は、特徴抽出工程をヒトが行わず機械が自動的に処理してしまうために、判断根拠がブラックボックス化することが想定される。ブラックボックスを内包する毒性試験法では、その判定結果への信頼度が低下するだけでなく、VS 変動に関与する毒性機序研究においても支障を来す。幸い、人工知能研究分野において機械学習の判断根拠を説明する技術が急速に開発されつつあり、将来的にはブラックボックス問題は解消される見込みである。来年度は、従来からの統計を含む数理的手法や機械学習技術を導入して、ATVSS 定義のために必要な、多項目・複数クラス分類の入力データに対応した異常検知モデルの構築を進め、完成予定のVS取得デバイスによる実データを得て、性能評価を試みる。

なお、本研究では実験動物で観察されたバイタルサインがヒトの所見と符合するか否かについて日本中毒学会の専門家の協力を得る予定であったが、当該専門家は救急医療に携わる医師であり COVID-19 への対応のため本年度は実現できなかった。

E. 結論

バイタルサインセンサーの開発では、CNT 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。神経毒性物質である TTX の急性毒性発現時の海馬及び肝の遺伝子発現データを取得し、その臓器関連解析では、海馬及び肝ではストレス関連遺伝子

の発現が高い一方で、Na⁺チャネルなどTTXが直接関与することが示唆されるシグナルネットワーク関連遺伝子の発現変動は認められなかった。二次的シグナル候補物質を探索するために多臓器連関解析として肝の解析を実施した結果、二次的シグナル候補物質として、サイトカインであるIL1BやTNFが示唆された。興味深いことに、糖新生に係る多くの遺伝子の発現増加が認められ、毒性予測として、血糖値が上昇するものと考えられた。マウス及びラットを用いて本研究の基盤となる行動(ハイスピードカメラを含む)、体温、心拍、血圧等のVS測定装置のセットアップを行い、先行研究においてデータが豊富であるモデル化学物質を使用して基礎データの取得に成功した。バイタルサインの統合的評価のためのソフトウェア開発においては、昨年度選定したAcute Toxicity Vital Signs Score(ATVSS、仮称)の定義に利用可能なアルゴリズムのうち、教師あり深層学習について、判別性能の評価を行った結果、本研究の目標実現に有効な手法であることが分かった。現在は商業的に入手可能な血圧測定装置と新規開発のCNTセンサー並びにパルスオキシメータを並行して使用し研究を遂行しているが、新規経口投与毒性試験の実用化のためには、これらの機器を統合して実験者の利便性を高め、かつ、廉価な装置として開発する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ono R, Yoshioka Y, Furukawa Y, Naruse M, Kuwagata M, Ochiya T, Kitajima S, Hirabayashi Y: Novel hepatotoxicity biomarkers of extracellular vesicle (EV)-associated miRNAs induced by CCl₄. *Toxicol Rep.* 2020; 7: 685-692. [doi 10.1016/j.toxrep.2020.05.002].

Nock R, Polouliakh N, Nielsen F, Oka K, R Connell C, Heimhofer C, Shibana K, Ghosh S, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J, Akama T, Kitano H: A Geometric Clustering Tool (AGCT) to robustly unravel the inner cluster

structures of time-series gene expressions. *PLoS One* 2020; 15(7): e0233755.

[doi 10.1371/journal.pone.0233755]

Saito H, Hara K, Kitajima S, Tanemura K: Effect of Vitamin E deficiency on spermatogenesis in mice and its similarity to aging. *Reproductive Toxicology* 2020; 98: 225-232.

[doi: 10.1016/j.reprotox.2020.10.003].

登田美桜、北嶋 聡、シリーズ：日本毒性学会との連携 マリンバイオトキシシン；フグ毒のリスク評価について、*中毒研究(Jpn. J. Clin. Toxicol.)* 2021; 34: 58-62.[ISSN: 0914-3777]

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

Umezumi K, Kurata S, Takamori H, Numabe T, Hiradate Y, Hara K, Tanemura K. Characteristics and Possible Role of Bovine Sperm Head-to-Head Agglutination. *Cells.* 2020 Aug 9;9(8):1865. doi: 10.3390/cells9081865. PMID: 32784858; PMCID:PMC7463926.

Hiradate Y, Hara K, Tanemura K. Effect of neurotensin on cultured mouse preimplantation embryos. *J Reprod Dev.* 2020 Oct 13;66(5):421-425. doi:10.1262/jrd.2020-002. Epub 2020 Jun 2. PMID: 32493860; PMCID: PMC7593629.

Umezumi K, Hara K, Hiradate Y, Numabe T, Tanemura K. Stromal cell-derived factor 1 regulates in vitro sperm migration towards the cumulus-oocyte complex in cattle. *PLoS*

One. 2020 Apr 30;15(4):e0232536.
doi:10.1371/journal.pone.0232536. PMID:
32353075; PMCID: PMC7192438.

2. 学会発表

北嶋 聡、種村 健太郎、菅野 純、室内揮発性有機
化学物質の極低濃度下における吸入曝露の際
のマウス中枢神経系への影響、第 47 回日本毒
性学会学術年会 (2020.6.30.) オンライン

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キシンの
中枢影響評価、第 47 回日本毒性学会学術年会
(2020.6.29.) オンライン

種村 健太郎、佐々木 貴熙、齊藤 洋克、高橋 祐
次、北嶋 聡、菅野 純、発達期マウスへのドー
モイ酸投与による成熟後の神経行動毒性発現～
海産毒による異常誘発モデルとしての検討 2 ～、
第 47 回日本毒性学会学術年会 (2020.6.29.)
オンライン

齊藤 洋克、原 健士朗、冨永 貴志、中島 欽一、
北嶋 聡、菅野 純、種村 健太郎、低用量ベルメ
トリンの早期慢性ばく露による成熟後の雄マウス
行動影響、第 47 回日本毒性学会学術年会
(2020.6.29.) オンライン

種村 健太郎、齊藤 洋克、古川 佑介、相崎 健一、
北嶋 聡、菅野 純、低用量/低濃度化学物質の
発生-発達期ばく露による情動認知行動毒性～
情動認知行動毒性評価系の国際標準化に向け
た対応～、第 47 回日本毒性学会学術年会
(2020.6.30.) オンライン

菅野 純、北嶋 聡、相崎 健一、小野 竜一、
Percellome Project における精度管理とその
解析への影響、第 47 回日本毒性学会学術年会
(2020.6.30.) オンライン

小野 竜一、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、化学物
質の反復投与によるゲノムワイドなヒストン修飾の
変化、第 47 回日本毒性学会学術年会
(2020.6.30.) オンライン

大久保 佑亮、嘉本 海大、高橋 祐次、北嶋 聡、太
田 裕貴、覚醒下非拘束ラットから血中酸素飽和

度・心拍数・呼吸数を計測可能なウェアラブルパ
ルスオキシメータの開発、第 47 回日本毒性学会
学術年会 (2020.6.30.) オンライン

相崎 健一、長谷 武志、北嶋 聡、小野 竜一、北野
宏明、菅野 純、Current and future
application of PERCELLOME database as a
part of big data to toxicological research、第
47 回日本毒性学会学術年会 (2020.7.1.) オン
ライン

Toshime Igarashi、Yukuto Yasuhiko、Ryuichi
Ono、Erika Tachihara、Yu Takahashi、
Makiko Kuwagata、Satoshi Kitajima、
CRISPR/Cas9 システムを用いたマウス受精卵
のゲノム編集におけるオンターゲットの多様な非
意図的変異、第 47 回日本毒性学会学術年会
(2020.6.29.) オンライン

原唯香、平舘裕希、原健士朗、北嶋聡、菅野純、種
村 健太郎、エストロゲン受容体 α 非翻訳領域
遺伝子改変マウスの学習記憶不全と遺伝子発現
プロファイル解析、第 113 回日本繁殖生物学会
大会 (2020.9.25.)、オンライン

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

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

五十嵐智女、安彦行人、小野竜一、高橋雄、栗形麻
樹子、北嶋 聡、CRISPR/Cas9 のゲノム編集に
よるノックインマウス作製時に認められたオンター
ゲットの多様な非意図的変異、日本食品衛生学
会創立 60 周年記念第 116 回学術講演会
(2020.11.24.)、オンライン

北嶋 聡、食品トキシコゲノミクスと毒性予測、第 18 回
食品安全フォーラム (2020.11.27.)

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

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

Y. Taquahashi, S. Yokota, M. Hojyo, K. Morita, M. Tsuji, K. Suga, M. Kuwagata, A. Hirose, and J. Kanno, Interim Report of the 4-Week Interval Intermittent Whole Body Inhalation Study on

Multiwalled Carbon Nanotube in Mice, SOT 2021 (2021.3.17), Poster, virtual

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