

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、心電波形、心拍、血圧、体温、呼吸、脳波などのバイタルサイン(VS)を測定するためセンサーの開発を行った。新規素材である二層カーボンナノチューブ(Double-Walled Carbon Nanotube: DWCNT)を基にしたカーボンナノチューブヤーン(Carbon-nanotube yarn, CNT-Y)を用い心電波形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。ヘアレスラット及びモルモットの左側耳介、頸部中央並びに背部から電位を誘導することで明らかな心電波形を得ることができた。Bregma と右側耳介基部から誘導した電位はヘアレスラットでは 6Hz 以下、モルモットでは 2Hz 以下のパワースペクトルを有する電位が誘導された。CNT-Y の抵抗は 1.204Ω/m、CNT-Y から取得した心電波形データの SN 比は約 40dB であった。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が、体動によるノイズが発生するため、これを除去する方法の開発が必要である。本研究では、現在は商業的に入手可能な VS 測定装置と、独自に開発したセンサーを並行して使用し実験を進めているが、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、心電波形、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

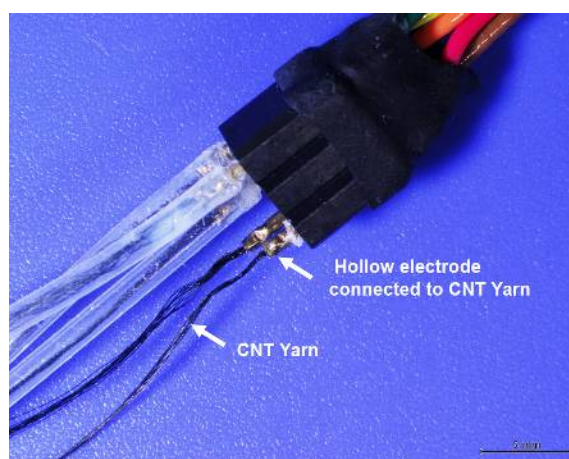
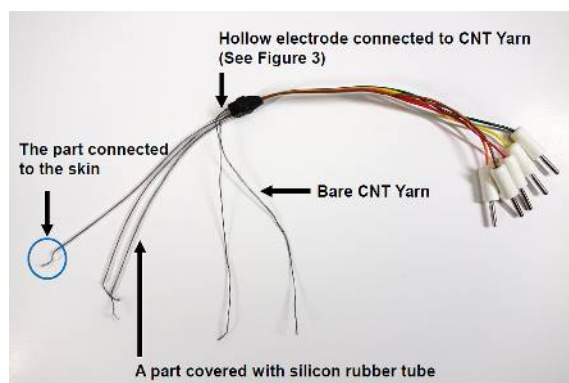
して、新規素材である Carbon-nanotube yarn を用いて心電測定に取り組み、また独自にラット用パルスオキシメータの開発を行った。

B. 研究方法

バイタルサインセンサーの開発

1. 心電波形・脳波の測定:

二層カーボンナノチューブ (Double-Walled Carbon Nanotube: DWCNT) から作成された Carbon-nanotube yarn (CNT-Y, Siddarmark LLC) を用い、心電波形 (ECG) 及び脳波 (EEG) を取得する検討を行った。CNT-Y は非金属材料であるため、半田付けによって従来の電子回路に接続することができない。そのため、CNT-Y を中空電極内に通し圧着して結合した。皮膚に接触する部分を除き、電気的短絡を防ぐためにシリコンゴムチューブ (外径: 1.2mm、内径: 0.6mm) で被覆した。



CNT-Y は動物の皮膚に縫合針 (外科強角針 No.0 バネ穴、夏目製作所) を用い単結紮により皮膚に装着した。動物は、心臓の電気生理学的特性が異なるラット (ヘアレスラット、HWY/Slc) とモルモット (Slc:Hartley) を使用した。ヘアレスラットは、CNT-Y

の装着が容易であり、また装着後も CNT-Y の観察が容易であることから選択した。インフルラン麻酔下でヘアレスラットまたはモルモットの頭部から背部にかけて皮膚 5 箇所 に CNT-Y を縫合針(外科強角針 No.0、No.00 バネ穴、夏目製作所)を用いて結紮し、心電図用に 3 箇所、脳波用に 2 箇所から電位を測定した。CNT-Y 電極は、生体信号増幅ユニット(BAS-301、Biotex)および電源を含む DC-DC コンバーター(IF-2、Biotex)に順次接続した。生体信号増幅ユニットの特性は以下の通り。

- 入力インピーダンス： $>10\text{M}\Omega$
- 増幅率：2,000 倍
- 周波数特性：ECG 1~250 Hz
EEG 0.5~250Hz
- 入力変換ノイズ： $<10\ \mu\text{Vp-p}$
- 出力電圧： $>\pm 5\text{V}$

最終的に信号は、AD コンバータ(MP150; BIOPAC Systems)を介してデータ取得および解析ソフトウェア(AcqKnowledge; BIOPAC Systems)を使用して、PC に取り込んだ。サンプリング周波数は 2kHz とした。

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(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。

倫理面への配慮

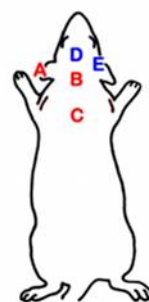
本実験は動物愛護に関する法律、基準、指針を遵守し、国立医薬品食品衛生研究所は、国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の制定による「動物実験等の適正な実施に関する規程(平成 27 年 4 月版)」に則って実施した。

C. 研究結果

C-1 バイタルサインセンサーの開発

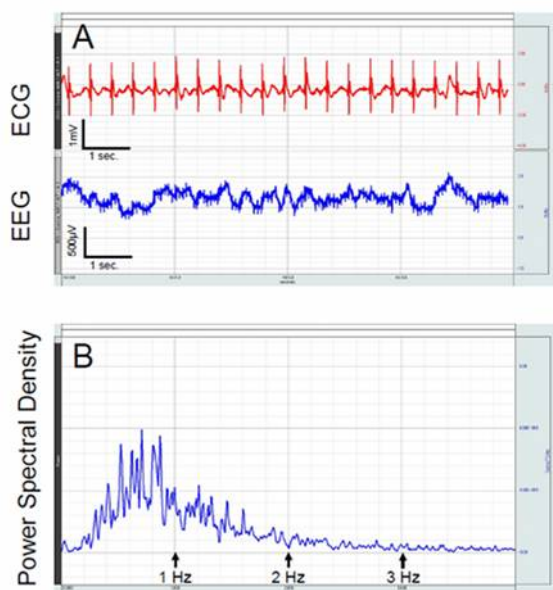
1. CNT-Y を用いた心電波形・脳波の測定:

電極の取り付け位置を検討した結果、ヘアレスラット及びモルモットの左側耳介、頸部中央並びに背部から電位を誘導し明らかな心電波形を得ることができた。Bregma と右側耳介基部から誘導した脳波をパワースペクトル解析した結果、ヘアレスラットでは 6Hz 以下、モルモットでは 2Hz 以下の周波数を有する電位波形であった。CNT-Y の抵抗は $1.204\Omega/\text{m}$ (RM3542-01、日置電機)、CNT-Y から取得した心電波形データの SN 比は約 40dB であった。



Electrode configuration for ECG recording
A: Left apex auricular as positive electrode
B: Cervical as electrode for body-earth
C: Interscapular as negative electrode

Electrode configuration for EEG recording
D: Bregma as electrode for exploring/negative
E: Base of right auricular as electrode for reference/positive



2. ラット用反射型パルスオキシメータの開発:

非拘束下での連続的データ取得は可能となったが、体動の影響によりノイズが発生する場合があるため、体動ノイズを除去する方策について検討を行っている。

D. 考察

CNT-Y は誘導用のインピーダンスとしては十分低い値と考えられた。心電図については十分な電位変化を捉えることに成功した。将来的に無線通信でのデータ取得を目指していることから背側で心電が取得できる位置を探索し、結果的に第 II 誘導を変形した電極配置での測定が可能となった。一方、脳波測定を目的とした電位誘導からは、筋電波形またはノイズとは明らかに異なる波形が得られた。本研究の脳波は、表面電極により信号を取得している。信号は大脳皮質、頭蓋骨、皮膚など、インピーダンスの異なる組織を介して記録されており、これまで報告されている脳波波形とは異なる特性を有する可能性があるため、本研究に適切な解析方法を検討すると共に、その特性を明らかにする必要がある。本研究では、CNT-Y を皮膚結紮によって取り付け測定を行なっているため、現在、一般的に使用されてい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。そのため、術後の回復期間を設け

る必要はなく、急性毒性試験に対して極めて有用な方法であると考えられる。また、導電性ペーストが不要であること、金属ではないため長時間の使用においても分極しないことも利点である。なお、非拘束下での測定には無線通信装置が必要となる。CNT-Y に最適化した装置の構想はあるが、半導体等、部品の調達が非常に困難な状況でありまだ実現できていない。また、バイタルサインとしての呼吸測定を非拘束下で実現するミリ波レーダを用いた装置の開発を進めている。

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が、体動の影響を装置の装着方法で除去することは困難であるため、体動が検出された際にデータを記録しないようにする仕組みが必要と考えられる。

E. 結論

バイタルサインセンサーの開発では、CNT-Y を用いて心電波形及び脳波の測定が可能となった。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独自開発の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。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り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

Taquahashi Y, Tsuruoka S, Morita K, Tsuji M, Suga K, Aisaki K and Kitajima S, A novel high-purity carbon-nanotube yarn electrode used to obtain

biopotential measurements in small animals: flexible, wearable, less invasive, and gel-free operation, *Fundam Toxicol, Sci.* 2022, 9(1),17-21
doi.org/10.2131/fts.9.17

Taquahashi Y, Saito H, Kuwagata M, Kitajima S, Development of an inhalation exposure system of a pressurized metered-dose inhaler (pMDI) formulation for small experimental animals, *Fundam Toxicol, Sci.* 2021,8(6),169-175
doi.:10.2131/fts.8.169

Hoyo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Maeno A, Ohnuki A, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Nakae D. Histological sequence of the development of rat mesothelioma by MWCNT, with the involvement of apolipoproteins, *Cancer Sci.* 2021 Jun;112(6):2185-2198. doi: 10.1111/cas.14873. Epub 2021 May 2.

2. 学会発表

高橋 祐次:粉体の吸入剤研究開発を推進する非臨床安全性評価手法の開発、ラウンドテーブルセッション、日本薬剤学会第 36 年会、招待講演

(2021.5.14)

山本 栄一、高橋 祐次:吸入剤に係る薬物動態の新規イメージング技術、第 48 回日本毒性学会学術年会、シンポジウム(2021.7.9)

Taquahashi Y, Yamamoto E, Kuwagata M, Saito H and Kitajima S, Development of an inhalation exposure system of a pressurized metered-dose inhaler formulation for small experimental animal and visualizing the spatial localization of an inhalant in rat lungs by mass spectrometry imaging, The 37th Annual Meeting of KSOT/KEMS, invited (2021.11.2)

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