

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 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: 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: 齊藤洋克 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

研究協力者: 森田紘一 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

研究協力者: 辻昌貴 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

研究協力者: 森山紀子 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

研究要旨

本分担研究では、急性毒性発現時の海馬、肺、肝の遺伝子発現データを取得し、その臓器連関解析を実施した。具体的には、被験物質を単回経口投与後、得られたマウスの海馬を含む脳 4 部位、肺及び肝の mRNA サンプルにつき、当方が開発した Percellome 手法(遺伝子発現値の絶対化手法)を適用した網羅的遺伝子発現解析を行う。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ー解析を行い、多臓器連関及びインフォマティクス解析により、死因の究明につながる情報を得ることを目的としている。R3 年度は、4,4'-Dihydroxybiphenyl (CAS No: 92-88-6)をモデル化合物として選択し、用量設定実験(0、62.5、125、250、500 mg/kg)を実施した。その結果、125 mg/kg 以上で腎が硬く、表面が粗造を呈した、250 mg/kg 以上で体重抑制、500mg/kg で腎重量増加がみられた。この結果を基に、最高用量を 70 mg/kg とし、以下、20、7、0 mg/kg(溶媒:0.5%MC)の用量で本実験を実施しサンプリングまでを実施した。現在、網羅的遺伝子発現解析を実施している。

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。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(VS)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。

本分担研究では、第一の柱の①急性毒性発現における遺伝子発現変動解析を扱う。

B. 研究方法

計画通りに、H31/R 元年度(初年度)は、モデル物質として、フグ毒として知られているテトロドトキシン

(Tetrodotoxin, TTX)を選択し、雄性マウスに単回経口投与した際の、「海馬」における網羅的な遺伝子発現変動解析について検討した。また 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することとした。

以下に実験方法の概要を示す。遺伝子発現変動解析は、独自の遺伝子発現値の絶対化手法である Percellome 法(Kanno J. et al., BMC Genomics 7 64 2006)を用いた。

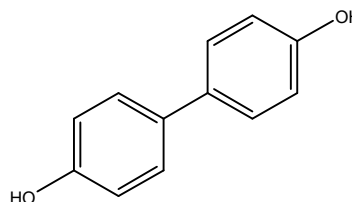
B-1 用量設定実験

雄性マウス(成熟期[12 週齢])を対象とし、被験物質を、金属製胃ゾンデ(KN-348、夏目製作所)を用いて強制経口投与し、体重推移、剖検所見、臓器重量を指標に用量設定試験を実施した。用量設定実験では 0.5%メチルセルロース溶液を溶媒として、0、62.5、125、250、500 mg/kg の用量を投与した。

B-2 被検物質

4,4'-Dihydroxybiphenyl (CAS No: 92-88-6)
(富士フイルム和光)

純度:99.0 %[Capillary GC]

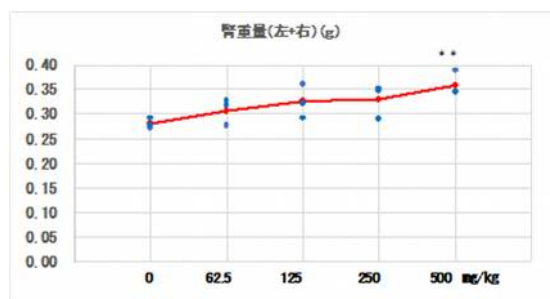
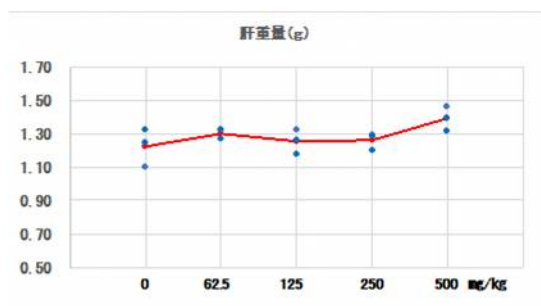
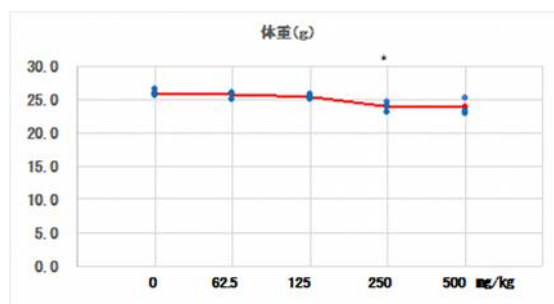


C. 研究結果及び考察

C-1 用量設定実験:

250 mg/kg 以上から体重増加抑制、500 mg/kg では腎臓重量増加と肝重量増加が見られた。剖検所見では、125 mg/kg 以上で腎が硬く、表面が粗造を呈した。この結果を基に、最高用量を 70 mg/kg とし、以下、20、7、0 mg/kg (溶媒:0.5%MC) の用量で本実験を実施しサンプリングまでを実施した。現在、網羅的遺伝子発現解析を実施している。本剤は、ラット急性経口投与試験において 2000 mg/kg で黄疸がみられ、二日目に 1/3 例が死亡した。また、子宮肥大試験において、経口投与は陰性であるが、

皮下投与では陽性であり、本剤の毒性発現には肝での代謝が大きく関与していると考えられる。



D. 結論

毒性発現機序に肝代謝が大きく関わっていると考えられる 4,4'-Dihydroxybiphenyl について、単回経口投与した際の、海馬や肝などの組織における網羅的遺伝子発現変動解析のため、用量設定実験と本実験を実施し、肝、腎及び海馬のサンプリングした。現在、網羅的遺伝子発現変動解析を行なっている。

E. 健康危機情報

なし

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

Makiko Kuwagata, Takuro Hasegawa, Hiromasa Takashima, Makiko Shimizu, Satoshi Kitajima, Hiroshi Yamazaki: Pharmacokinetics of primary metabolites 5-hydroxythalidomide and 5'-hydroxythalidomide formed after oral administration of thalidomide in the rabbit, a thalidomide-sensitive species. *J Toxicol Sci.* 2021; 46: 553-560. [doi.org/10.2131/jts.46.553]

Toshime Igarashi, Yukuto Yasuhiko, Ryuichi Ono, Erika Tachihara, Miki Uchiyama, Atsuya Takagi, Yu Takahashi, Makiko Kuwagata, Satoshi Kitajima: Diverse unintended on-target mutations induced by zygote genome-editing using CRISPR/Cas9 system. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2021; 8: 161-167. [doi.org/10.2131/fts.8.161]

2. 学会発表

Taquahashi Y, Yamamoto E, makiko 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)

夏目 やよい、相崎 健一、北嶋 聡、Samik GHOSH、北野 宏明、水口 賢司、菅野 純、PPAR α リガンドの比較毒性オミクス、第 48 回 日本毒性学会学術年会 (2021.7.7)

菅野 純、相崎 健一、小野 竜一、北嶋 聡、毒性 Omics と AI による慢性毒性予測、第 48 回 日本毒性学会学術年会 (2021.7.7)

相崎 健一、小野 竜一、菅野 純、北嶋 聡、トランスクリプトミクスから見た発癌物質の特性、第 48 回 日本毒性学会学術年会 (2021.7.8)

菅野 純、高木 篤也、相崎 健一、北嶋 聡、異物発癌に関わるトランスクリプトミクス特性、第 48 回 日本毒性学会学術年会 (2021.7.8)

菅野 純、北嶋 聡、相崎 健一、齊藤 洋克、種村 健太郎、肺の遺伝子発現応答と毒性機序予測解析、第 48 回 日本毒性学会学術年会 (2021.7.9)

J. Kanno, K.I.Aisaki, R.Ono, S.Kitajima, Analysis of murine liver mRNA expression, DNA methylation, and histone after repeated exposure to chemicals, EUROTOX2021(2021.9.29)

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