

**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

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、Carbon-nanotube yarn(CNT-Y)を用い、従来法に比較して侵襲性の極めて低い手法にて心電波形及び脳波を取得することに成功した。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。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臓の遺伝子発現データを取得し、その臓器関連解析において、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。急性毒性試験における行動解析では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。モデル化合物として、アセフェートと TTX を投与したマウスの行動様式と顔面表情について高速ビデオカメラ画像による経時的解析を行い、加えて超音波発声の測定を行った。その結果、活動量低下、痙攣、歩行異常、自発運動の消失、振戦を検

出、表情観察では眼瞼腫脹と瞬目不全、半眼、流涙を明確に捉えることに成功した。一方で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。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、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、畳み込みニューラルネットワーク(CNN: Convolutional Neural Networks)モデルとAutoEncoder(AE)モデルの予測評価を行なった。その結果、AEモデルの予測性能はCNNモデルを上回る結果が得られた。特にCNNモデルでの成績が悪かった異常拍動予測については、AEの圧勝であり、異常検知におけるAEモデルの優位性が明らかになった。現在は商業的に入手可能な血圧測定装置と、独自開発の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

近年の目覚ましいデジタル技術の進歩によって開発されたウェアラブルデバイスは、簡便なバイタルサインの取得を可能とし、ヒトの健康管理に利用されている。本研究では、これらの技術を急性毒性試験に導入し、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を目的とする。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。

J. W.Trevaan(1927)によって初めて導入されたLD₅₀値は、化学分析による評価に適さない強心配糖体、インスリン、ジフテリア毒素などの強力な作用を有する薬物の力価をバイオアッセイにより標準化するための手法であった。標準品との比較を必要とするも

のであり、その精度を保証するため、多数の動物からデータを取得して統計的処理によって信頼区間までを求めることに努力が払われた。その後、毒性発現の究極である「死亡」をエンドポイントとして、投与された動物の半数を致死させるLD₅₀は、化合物の毒性の強さを共通の指標で示すことができる利便性から、化合物のハザードに応じて取り扱い方法を区別する「分類と表示」に使用されている。

一方で、急性毒性試験は科学的、経済的、動物倫理的な理由により批判されてきた(Hunter 1979, Zbinden 1981)。そのため、多くの動物を用いた試験法TG401は2002年に廃止され、使用動物数を削減し、用量も4~5段に固定された改良法(TG420、TG423、TG425)が採択された。しかし、指標は「死亡」のままであり、動物福祉の観点から批判の対象となっている。そして、最大の欠陥は、死因、標的臓器等その内容は一切考慮されていないため、ヒトの中毒治療に有用ではないことである(Robinson 2009)。

急性毒性試験の*in vitro*代替は直接的には培養細胞の細胞死で代用できると考えられ、1980年代よりいくつかのトライアルはすでに行われてきている。Willi Halle(1998)はLD₅₀の文献値と3T3細胞を用いた細胞毒性実験のIC₅₀値を比較したデータベースを報告した。このデータベースから得られた回帰式を基盤とした代替法がICCVAM(2006)とECVAM(2013)から提案された。現在、これらを基盤としてOECD GD129、また、本邦においては薬生

薬審発 0422 第 1 号(令和 3 年)が発出されている。しかしながら、評価可能である物質が、 $LD_{50} > 2,000 \text{mg/kg}$ 以上である「普通物」の判定のみであり、毒物及び劇物に相当するもの、難溶性物質、代謝物及び心臓や神経系など臓器特異的な毒性評価はできない。

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「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」の可能性が見えてきた。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。例えば、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バイタルサインの諸項目の、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、選択したバイタルサインの諸項目を正確に、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)から作製された Carbon-nanotube yarn (CNT-Y, Siddarmark

LLC)を用い、バイタルサイン測定の重要な要素である心電波形と脳波の電極として利用について検討した。CNT-Y は非金属材料であるため、現在のところ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する方法を開発した。皮膚に接触する部分を除き、電氣的短絡を防ぐためにシリコーンゴムチューブ(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。イソ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、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。

R 元年から R2 年度は、電源ノイズ対策のため、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 にデータを取得した。

R3 年度には、電源ノイズ対策が可能となったことから 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 0.5~250 Hz
- 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(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。

R3年度には、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。

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。

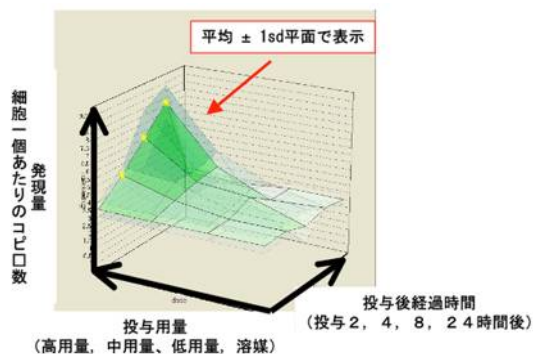
R元年度は、雄性マウスに単回経口投与した際の「海馬」における網羅的な遺伝子発現変動解析について検討した。R2年度は、海馬とは別に、「肝」における解析を検討し、多臓器連関解析を実施することにより、昨年度の解析により想定された二次的シグナル候補物質を探索した。

用量設定のため、TTXのマウス経口LD₅₀値が334 µg/kg (RTECS情報)であったことから、最高用量を700 µg/kgとし3段階の用量(700, 500, 300 µg/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を最高用量をとし、公比√10で除して300、100、30 µg/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。

R3 年度は、毒性発現機序に、肝臓における代謝活性化が大きく寄与していると考えられる 4,4'-Dihydroxybiphenyl について、C57BL/6J マウスを用いて遺伝子発現変動解析のための用量設定試験を実施した。0.5%メチルセルロース溶液(0.5%MC)に懸濁し、0、62.5、125、250 及び 500 mg/kg の用量にて実験を行なった。

B-3 急性毒性試験における行動解析

1. マウス:

R 元年度から R2 年度は、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。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を用いて撮影した。

R3 年度は、被毛が白い雌 ICR マウスを用いて、アセフェート(300 及び 500 mg/kg)、テロドトキシン(300 µg/kg)、及び溶媒対照群としてメチルセルロー

スを投与し、急性経口投与後における行動様式(移動量、移動様式、痙攣)、並びに顔面表情(眼、呼吸)への影響について、ハイスピードカメラによる動画データの取得による解析を試みるとともに超音波測定装置による超音波発声(USVs: Ultrasonic vocalizations)の測定を行った。

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。また血圧やパルスオキシメータによ

る SpO₂、活動性(単位時間あたりの移動距離など)などのデータ処理を想定し、心電波形データと同様の処理が可能であることを検証した。

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)、arff 形式データの処理ライブラリとして arff2pandas(ver.1.0.1)、汎用データ処理ライブラリとして Pandas(ver.1.1.5)、numpy (ver.1.19.4 若しくは ver.1.19.5)、データ可視化ライブラリとして 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) 或いは Google Colaboratory 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:

最も電位波形の取得が容易であり、かつ、将来的には無線によるデータ取得をおこなうため、動物の背面での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。脳波を解析した結果、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。

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。

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。

無線モジュールを組み込むことで、非拘束下でデータ取得は可能となった。一方、体動の影響によるノイズが発生することが判明した。

C-2 急性毒性試験における遺伝子発現変動解析

R 元年度は 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)、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⁺チャンネルなど 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、Nfkb1、Sgk1、Mt1 や Gadd45g 遺伝子など)やサイトカイン関連遺伝子が見出せた。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。

R3 年度に実施した、4,4'-Dihydroxybiphenyl の用量設定実験では、125 mg/kg 以上で腎が硬化し、

表面が粗造を呈した。250 mg/kg 以上で体重抑制、500 mg/kg で腎重量増加が認められた。本実験では、最高用量を 70 mg/kg とし、以下、20、7、0 mg/kg (溶媒:0.5%MC)として実施し、肝臓及び海馬のサンプリングを実施した。

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。一方で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。

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 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(ATVS、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。

R2年度は、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。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。

R3年度は異常検知によく使われる AutoEncoder について検討した。心電波形データの学習には正常拍動のみ500件の心拍データを用いた。学習に用いなかった心電波形データに対して、学習済み AE で判別予測を実行した結果、正答率は 0.972 であった。

D. 考察

バイタルサインセンサーの開発では、R元年度にCNT-Yを用いて心電の測定に成功したが、脳波の取得は困難であった。その理由として、実験環境に混入してくる電源ノイズの処理が困難であったことがあげられる。R3年度には、様々な電源ノイズ対策を実施するとともに、増幅器の改造も実施した。その結果、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。CNT-Yは皮膚結紮によって取り付け、電位測定を行なっているため、一般的に使用されている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、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が、半導体等の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。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、そこでげっ歯類を用いる急性毒性試験にて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 $\mu\text{g}/\text{kgBW}$ 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 apathy を誘発することから、中枢に作用することが明らかとなってきた。しかしながら、TTX が血液脳関門を通過できないため、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、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性マウスをハイスピードカメラ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。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、動物の表情から苦痛の程度を評価する Grimace Scale が開発されており、行動評価のデータとして加えることでより精緻な評価が可能となる。

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として利便性が高い。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、CNN モデルと AE モデルの予測評価を行なった。その結果、AE モデルの予測性能は CNN モデルを上回る成績であった。特に CNN モデルでの成績が悪かった異常拍動予測については、AE の圧勝であり、異常検知における AE モデルの優位性が明らかになった。これは正常データのみで学習可能である AE の特性によるものであり、本研究の目的において極めて有効な手法であることが確認された。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 (ATVSS, 仮称) を「定義」するためには、一次元データのみならず、二次元データ (画像、動画など) を含む、複数のバイタルサインデータ群を統合評価する必要があると考えられる。この統合評価については、各バイタルサインデータで学習した AE などのニューラルネットワークモデルを複数個、融合させるアンサンブル学習 (Ensemble learning) が汎用性が高く、尚且つ高性能と予想されており、設計を進めている。今後引き続き整備を進める新規急性経口投与毒性試験では測定機器や試験施設を限定しない、柔軟で実用的なものであるべきで、そのためにはデータサイエンスの専門家でなくともデータ測定、学習、予測といった高度な解析処理が可能な解析計算システムを設計、構築するのが肝要と考えられる。

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。

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-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。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、その臓器連関解析では、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⁺チャンネルなど 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、体温、心拍、血圧等の VS 測定装置を用い、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、Acute Toxicity Vital Signs Score の定義に利用可能なアルゴリズムを検討したところ、AE モデルの予測性能は CNN モデルを上回る成績が得られ、本研究の目標実現に有効な手法であることが分かった。

急性毒性試験は全ての毒性試験の起点となる重要な試験である。急性毒性試験のエンドポイントには多くの議論がありながら、改善が行なわれてこなかった(小野宏 1990)。死亡に至る時には重要な毒性徴候が現れるが、刻々と変化する毒性徴候を記録し化学物質のハザードを判定することは熟練者でも相当に困難であるため、判定が容易な死亡がエンドポイントとして採用されてきた。一方、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、送信機を埋植する外科処置と術後の回復期間期間が必要であり、また、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、費用の面から、また医薬品に比較してはるかに数が多い一般化学物質への急性毒性試験への導入は難しい。本研究を推進することにより、簡便かつ安価にバイタルサインの測定が可能となるため、ヒトの安全性確保、動物福祉を充足し、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](https://doi.org/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.

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]

Sakai K, Hiradate Y, Hara K, Tanemura K. Potential of sperm small non-coding RNAs as biomarkers of testicular toxicity in a doxorubicin-induced mouse model. *Biochem Biophys Rep.* 2021 Oct 22;28:101160. doi: 10.1016/j.bbrep.2021.101160. PMID: 34729424; PMCID: PMC8545667.

Kawahara T, Kanouchi M, Naniwa Y, Koyago M, Numabe T, Mizutani K, Tanemura K, Hara K. Persistence of undifferentiated spermatogonia in aged Japanese Black cattle. *Anim Sci J.* 2021 Dec;92(1):e13572. doi: 10.1111/asj.13572. PMID: 34254411; PMCID: PMC8365669.

Umezu K, Kurata S, Hara K, Tanemura K. Caffeine induces sperm detachment from sperm head-to-head agglutination in bull. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021 Jul 12;562:105-111. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.05.060. Epub 2021 May 26. PMID: 34049203.

Ogasawara S, Ezaki M, Ishida R, Sueyoshi K, Saito S, Hiradate Y, Kudo T, Obara M, Kojima S, Uozumi N, Tanemura K, Hayakawa T. Rice amino acid transporter-like 6 (OsATL6) is involved in amino acid homeostasis by modulating the vacuolar storage of glutamine in roots. *Plant J.* 2021 Sep;107(6):1616-1630. doi: 10.1111/tbj.15403. Epub 2021 Jul 21. PMID: 34216173.

Sasaki T, Saito H, Hiradate Y, Hara K, Tanemura K.

Behavioural effects in mice orally exposed to domoic acid or ibotenic acid are influenced by developmental stages and sex differences. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021 Jun 18;558:175-182. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.04.080. Epub 2021 Apr 28. PMID: 33932777.

Ideta-Otsuka M, Miyai M, Yamamoto N, Tsuchimoto A, Tamura H, Tanemura K, Shibutani M, Igarashi K. Development of a new in vitro assay system for evaluating the effects of chemicals on DNA methylation. *J Toxicol Sci.* 2021;46(2):83-90. doi: 10.2131/jts.46.83. PMID: 33536392.

Makino Y, Hiradate Y, Umezu K, Hara K, Tanemura K. Expression and Possible Role of Nicotinic Acetylcholine Receptor ϵ Subunit (AChRe) in Mouse Sperm. *Biology (Basel).* 2021 Jan 11;10(1):46. doi: 10.3390/biology10010046. PMID: 33440720; PMCID: PMC7826850.

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 CC14. *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, Shibani 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

Umezu 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.

Umezu 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.

Ono R, Yasuhiko Y, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J, Yoko H.: Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing. *Commun Biol* 2, Article number: 57, 2019.

Kobayashi K, Kuze J, Abe S, Takehara S, Minegishi

G, Igarashi K, Kitajima S, Kanno J, Yamamoto T, Oshimura M, Kazuki Y.: CYP3A4 Induction in the Liver and Intestine of Pregnane X Receptor/CYP3A-Humanized Mice: Approaches by Mass Spectrometry Imaging and Portal Blood Analysis. *Mol Pharmacol*, 96(5): 600-608, 2019

Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigou M, Naiki-Ito A, Takase H, Abdou KA, Hirose A, Taquahashi Y, Kanno J, Abdelhamid M, Tsuda H, Takahashi S. Pulmonary and pleural toxicity of potassium octatitanate fibers, rutile titanium dioxide nanoparticles, and MWCNT-7 in male Fischer 344 rats. *Arch Toxicol.* 2019 Feb 13.

Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander WT, Numano T, Iigou M, Naiki-Ito A, Takase H, Hirose A, Taquahashi Y, Kanno J, Abdelhamid M, Abdou KA, Takahashi S, Alexander DB, Tsuda H. Carcinogenic effect of potassium octatitanate (POT) fibers in the lung and pleura of male Fischer 344 rats after intrapulmonary administration. *Part Fibre Toxicol.* 2019 Sep 2;16(1):34.

Yamashita S, Kogasaka Y, Hiradate Y, Tanemura K, Sendai Y. Suppression of mosaic mutation by co-delivery of CRISPR associated protein 9 and three-primerepair exonuclease 2 into porcine zygotes via electroporation. *J Reprod Dev.* 2019 Nov 24.

Saito H, Hara K, Tominaga T, Nakashima K, Tanemura K. Early-life exposure to low levels of permethrin exerts impairments in learning and memory with the effects on neuronal and glial population in adult male mice. *J Appl Toxicol.* 2019 Dec;39(12):1651-1662.

Goto M, Saito H, Hiradate Y, Hara K, Tanemura K. Differences in resistance against osmotic challenge among C57BL/6, DBA/2 and their hybrid mice metaphase II (MII) stage oocytes. *Zygote.* 2019 Aug;27(4):250-254.

Kanamori M, Oikawa K, Tanemura K, Hara K. Mammalian germ cell migration during development, growth, and homeostasis. *Reprod Med Biol.* 2019 Jun 9;18(3):247-255.

Kurata S, Hiradate Y, Umezu K, Hara K, Tanemura K. Capacitation of mouse sperm is modulated by gamma-aminobutyric acid (GABA) concentration. *J Reprod Dev.* 2019 Aug 9;65(4):327-334.

Umezu K, Yajima R, Hiradate Y, Yanai R, Numabe T, Hara K, Oikawa T, Tanemura K. Improvement in blastocyst quality by neurotensin signaling via its receptors in bovine spermatozoa during in vitro fertilization. *J Reprod Dev.* 2019 Apr 12;65(2):147-153.

2. 学会発表

Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Yoko Hirabayashi, Akihiko Hirose and Jun Kanno, Development of Whole Body Inhalation System for Well-Dispersed Nanomaterials Toxicity Testing -Taquann Direct-Injection Whole Body Inhalation System-, Poster, 58th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2019.3.12., Baltimore

種村健太郎「非侵襲的な早期精巣毒性バイオマーカーとしての精子エピゲノム影響評価」第38回日本アンドロロジー学会学術大会(2019.6.21-22)大阪府

種村健太郎、北嶋聡、菅野純「低用量科学物質の周産期ばく露による情動認知行動動毒性～子どもの毒性額にむけた評価系開発の現在～」第46回日本毒性学会学術年会(2019.6.26-28)徳島市

種村健太郎、北嶋聡、菅野純「発生期マウスへの神経シグナル異常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～」第46回日本毒性学会学術年会(2019.6.26-28)徳島市

登田 美桜、北嶋聡、フグ毒として知られるテトロドトキシンのリスク評価に関する国際的動向ーマウスユニットと急性参照用量ー、第46回日本毒性学会学術年会(2019.6.26.)

種村 健太郎、北嶋聡、菅野 純、発生期マウスへの神経シグナル異常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～、第46回日本毒性学会学術年会(2019.6.26.)

小野 竜一、相崎 健一、北嶋聡、菅野 純、Percellome プロジェクトから見えてきたエピジェネティクス影響、第46回日本毒性学会学術年会(2019.6.26.)

菅野 純、北嶋聡、相崎 健一、小野 竜一、Percellome トキシコゲノミクスのエピジェネティクス基盤 —「新型」反復曝露試験の解析—、第46回日本毒性学会学術年会(2019.6.28.)

夏目 やよい、相崎 健一、北嶋聡、Samik GOSH, 北野 宏明、水口 賢司、菅野 純、Garuda プラットフォームによる多角的毒性予測、第46回日本毒性学会学術年会(2019.6.28.)

種村 健太郎、北嶋聡、菅野 純、低用量化学物質の周産期ばく露による情動認知行動動毒性～子どもの毒性学に向けた評価系開発の現在～、第46回日本毒性学会学術年会(2019.6.28.)

Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, Jun Kanno, Cross Talks among PPAR α , SREBP, and ER Signaling Pathways in the Side Effect of Valproic Acid, IUTOX 15th International Congress of Toxicology (ICT 2019) (2019.7.16.)

Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Akihiko Hirose and Jun Kanno, Improved aerosol generation method and newly designed whole body rodent inhalation apparatus for the testing of nanomaterials in human-relevant exposure scenario, 15th IUTOX International

Congress of Toxicology (ICTXV), Hawaii Convention Center, Honolulu, Hawaii, USA, July 16, 2019, Poster

Ryuichi Ono, Yusuke Yoshioka, Yusuke Furukawa, Takahiro Ochiya, Satoshi Kitajima, Yoko Hirabayashi, Evaluation of Exosomes as Toxic Biomarkers、IUTOX 15th International Congress of Toxicology (ICT 2019)] (2019.7.17.)

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura、The Concept of “Signal Toxicity” for the Mechanistic Analysis of So-Called Low Dose Effect and Delayed Effect after Perinatal Exposure.、IUTOX 15th International Congress of Toxicology (ICT 2019)] (2019.7.17.)

Hirokatsu Saito, Kenshiro Hara, Takashi Tominaga, Kinichi Nakashima, Kentaro Tanemura「Early-life exposure to low levels of permethrin exerts impairments in learning and memory associated with glial cell disturbance in adult male mice」the 15th IUTOX International Congress of Toxicology (ICTXV) (2019.7.15-18) Honolulu

牧野優誠、平館裕希、矢内凜、齊藤洋克、原健士朗、種村健太郎「ニコチン型アセチルコリン受容体シグナルを利用したマウス精子機能の調節」第112回日本繁殖生物学会大会 (2019.9.2-5) 札幌市

倉田笙平、平館裕希、梅津康平、原健士朗、種村健太郎「 γ -アミノ酪酸(GABA)を利用した精子機能制御法の開発に資する研究」第112回日本繁殖生物学会大会 (2019.9.2-5) 札幌市

矢内凜、平館裕希、原健士朗、藤井渉、佐原成彦、種村健太郎「タウ欠損マウスを用いた精子におけるタウ類似タンパクの発現様式」第112回日本繁殖生物学会大会 (2019.9.2-5) 札幌市

梅津康平、平館裕希、原健士朗、種村健太郎「ウシ精子を卵母細胞に導く走化性因子の特定」第112回日本繁殖生物学会大会 (2019.9.2-5) 札幌市

北嶋 聡、シックハウス(室内空気汚染)対策に関する研究-シックハウス症候群レベルの室内揮発性有機化合物の吸入暴露の際の海馬 Percellome トキシコゲノミクスによる中枢影響予測-、環境科学会 2019 年会(2019.9.13.)

影山恵理、沼邊孝、種村健太郎、原健士朗「ウシ精巢の対外培養における PDMS 製カバーの有用性」第126回日本畜産学会大会 (2019.9.17-20) 盛岡市

北嶋 聡、近藤一成、ゲノム編集技術応用食品の現状と課題、日本食品化学学会 第35回食品化学シンポジウム(2019.11.8.)

高橋祐次、新素材の毒性評価-工業的ナノマテリアルの高分散性小規模全身ばく露吸入装置の開発-、JST-CRDS 2019 年度 科学技術未来戦略 WS、2019.12.3 (東京)

酒井和哉、原健士朗、種村健太郎「精巢毒性モデルマウスにおける精子エピゲノム影響評価」第42回日本分子生物学会年会 (2019.12.3-6)、博多市

倉田笙平、小塩健介、高森広典、梅津康平、平館裕希、原健士朗、種村健太郎「ブタ精子機能に対する GABA 影響解析」日本畜産学会第 127 回大会 (2020.3.25-28)、京都府

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ロロ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

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、富永 貴志、中島 欽一、北嶋 聡、菅野 純、種村 健太郎、低用量ペ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

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

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

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

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

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)

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)

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)

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