

バイタルサインの統合的評価による急性毒性試験の判定基準策定と代替法に資する研究

・診断学と AI による致死性予測と人道的エンドポイントの設定・

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	安全性生物試験研究センター 毒性部 動物管理室長
研究協力者	山本栄一	国立医薬品食品衛生研究所	医療機器部 部長
研究協力者	鶴岡秀志	Siddarmark LLC	
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	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

研究要旨

本研究の目的は、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である。近年の情報技術の果実であるウェアラブルデバイスは、バイタルサインの取得を容易とし人の健康管理に利用されている。先行研究の成果により小動物でもその可能性が見出された (Taquahashi 2022)。本研究は【1】バイタルサイン測定器の更なる改良を進め、【2】*in vitro* 代替法にて外れ値を示す化合物を動物に投与しバイタルサインを取得、【3】化学物質の体内動態に資する情報としてタンパク結合率測定、【4】AI によるバイタルサインの統合的評価と致死性予測を目的とする。この結果、【5】人の中毒治療に利用可能な情報取得、【6】急性毒性試験 (ATS) の「人道的エンドポイント」として利用することで動物福祉を充足することが可能となり、また、【7】*in vivo* と *in vitro* のギャップを埋める情報が得られることから、代替法の開発に寄与できる。バイタルサインセンサーの開発においては、新素材であるカーボンナノチューブヤーン (CNT-Y) を表面電極として使用し、イソフルラン麻酔下でヘアレスラットから心電波形 (ECG) 及び脳波 (EEG) を測定し、脳及び心臓に作用する三環系抗うつ薬の一つであるアミトリプチリンの影響を捉えることに成功した。生体電位を測定する部位及び方法がこれまで報告されている ECG、EEG とは異なる特性を有するため、今後はその特性を明らかにすると共に適切な解析方法を検討する必要がある。しかしながら、ECG、EEG 共にアミトリプチリンによる変化を明確に捉えていることから、ベンチマークとなる化学物質のデータを蓄積することで、急性毒性評価の指標を定めることが可能と考えられた。タンパク結合率については、化学物質とタンパク質の結合モデルの構築を進めており、文献情報から 222 物質のデータを用いた化合物の吸着、分散の指標となるパラメータを計算しモデル式を検討した。今後、実測データと比較し有用なモデル作成を進める計画である。

A. 研究目的

本研究の目的は、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」による評価に置き換えることを計画している。

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。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。

近年の情報技術の果実であるウェアラブルデバイスは、バイタルサインの取得を容易とし人の健康管理に利用されている。先行研究の成果により小動物でもその可能性が見出された(Taquahashi et al., Fundam. Toxicol. Sci. 2022)。本研究は【1】バイタルサイン測定器の更なる改良を進め、【2】*in vitro* 代替法にて外れ値を示す化合物を動物に投与しバイタルサインを取得、【3】血漿タンパク結合率測定、【4】人工知能(AI)によるバイタルサインの統合的評価と致死性予測を目的とする。この結果、【5】人の中毒治療に利用可能な情報取得、【6】急性毒性試験の「人道的エンドポイント」として利用することで動物福祉を充足することが可能となり、【7】*in vivo* と *in vitro* のギャップを埋める情報が得られることから、代替法の開発に寄与できる。

被験物質は、ICCVAM(2006)の急性毒性試験代替法の開発で使用された 72 化合物の中で、*in vitro* 細胞毒性から LD₅₀ の予測において外れ値を示した 22 物質のうち入手可能な 17 化合物(ジゴキシン、ブスルファン、シクロヘキシミド、1-フェニル-2-チオ尿素、ジスルホトン、シアン化カリウム、硫酸タリウム、ベラパミル塩酸塩、カフェイン、パラオキシ安息香酸プロピル、フタル酸ジエチル、フタル酸ジブチル、5-アミノサリチル酸、フェノバルビタールナトリウム、ニコチン、ジゴキシン、L-アドレナリン)について検討を

行なう。また、先行研究で使用され背景データがあるアセフェート、ジヒドロキシビフェニル、DTBHQ、アミトリプチリン、テトロドトキシン(TTX)についても検討する計画である。

B. 研究方法

B-1 バイタルサインセンサーの開発

1. 使用動物:

雌性ヘアレスラット(HWY/Slc)8~12 週齢を用いた。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 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。

2. 被験物質:

被験物質として三環系抗うつ薬の一つであるアミトリプチリン塩酸塩(Amitriptyline HCl、富士フィルム和光純薬)を用いた。用量は OECD 化学物質試験に関するガイドライン TG423(毒性等級法)にて設定されている 5 mg/kg、50 mg/kg、300 mg/kg 及び 2,000 mg/kg の 4 段階を考慮して、本研究では 50mg/kg を用いた。

3. 生体電位測定電極

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(Siddarmark LLC)を用い、バイタルサイン測定のための電極として利用について検討した。CNT ヤーン(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)を用いて単結紮した状態で使用した。イソフルラン麻酔下でヘアレスラットの頭部から背部にかけて皮膚 5 箇所(縫合針を用いて CNT-Y を結紮し、心電波形(ECG)測定用電極として 3 箇所(左耳介基部、頸部、腰部)、脳波(EEG)測定用電極として 2 箇所(プレグマ、右耳介基部)から電位を測定した。動物は麻酔による体温低下を防止するためヒーターマット(KN-475-3-35、夏名製作

所)の上に載せて保温した。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。CNT-Y を通して取得した信号は、AD コンバーター (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。

電極を装着後、イソフルラン麻酔濃度を 1% とし、平常時の生体電位測定を行なうと共にアミトリプチリン塩酸塩を腹腔内投与し、心電波形及び脳波への影響を観察した。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モニターした。

B-2 タンパク結合率の予測モデル

毒性予測にトキシコキネティクス (TK) は有用であるが、一般化学物質では費用の面から TK の実施は難しい。本研究では、化合物のタンパク結合率の情報を得ることで、*in vivo* と *in vitro* のギャップを埋め TK に資する情報を得ることを目的として、タンパク結合率の予測及び測定を行なう計画である。医薬品に比較して、一般化学物質の血漿タンパク質結合率の情報は極めて少ない。そのため、まずは医薬品のタンパク結合率の情報を収集し、それを基に予測式を構築する手法を選択した。

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 (承認番号: 721、896)。

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

イソフルラン麻酔下 (1%) にて、CNT-Y を動物の皮膚に単結紮して生体電位測定を行なった結果、明確な心電図波形 (ECG) が得られた。ブレグマと右耳介基部から誘導した電位変化は、呼吸による筋電波形と考えられる大きな電位変化に加えて、ノイズとは明らかに異なる波形が得られた。

ECG では、一般的な ECG とは異なる波形であった。P 波に相当する電位変化が二相性を示し、Q 波に相当する波形は明確ではなく、R 波よりも S 波の振

幅が大きく記録された。アミトリプチリン塩酸塩を投与すると、15 分後には RS 波形の一時的な増高が見られ、20 分以降には RS 波増高不良を認めた一方、T 波の増高が認められた (図 1 B, C, D)。呼吸停止後にも EEG は観察されたが、約 50 分後には観察されなくなった (図 1A)。

ブレグマと右耳介基部から誘導した電位変化は、麻酔下で照明と音に反応して波形の変化が観察されたことから脳波 (EEG) を反映している可能性が示唆された。個体によっては、呼吸と同期した EEG 波形の変化、及び ECG の R 波と同期した波形が認められた。アミトリプチリン投与により EEG 波形の変化が認められ、パワースペクトル解析によっても変化が認められた (図 1E, F, G)。呼吸停止後には波形の変化は認められなかった。

C-2 タンパク結合率の予測モデル

医薬品のデータとしては、以下の文献 1 の情報を参照し 222 物質のデータを用いた。タンパク結合率のモデルは研究協力者の山本が報告済みの文献 2 の手法を基盤として吸着、分散の指標となる Abraham Solvation Parameter を計算し、モデル式を検討中であるが、十分な性能を有するモデル式は得られていない。

文献 1: Zhang et al., Compilation of 222 drugs' plasma protein binding data and guidance for study designs, Drug Discovery Today (2012)

文献 2: Yamamoto et al., Evaluation of Drug Sorption on Laboratory Materials with Abraham Solvation Parameters of Drugs and its Prevention, Pharmaceutical Research (2021)

D. 考察

先行研究では ECG の電極を、左耳介先端部を陽極、頸部をアース電極、両肩甲骨の間を負極として測定したが、今後の無線装置の開発において耳介部先端は電極とトランスミッターの接続が困難であることから、耳介基部に電極を移動させた。これにより、ECG のシグナルが小さくなるが、負極の位置を腰部に移動させることで十分なシグナルを得ることが可能となった。

心電波形においては、最初の陰性波を Q 波、最初の陽性波を R 波、その後の陰性波を S 波と定義されるが、本研究で得られた ECG は一般的な波形と

は異なる波形であった。本研究では、最終的に動物を拘束しない状態で測定可能な装置として開発するため、動物の口が届かない背部に電極を装着している。そのため、心臓に伝わる電気信号を、腹部と水平な面にプロットする一般的な双極誘導心電図(I、II、III)とは異なる波形であると考えられる。また、本研究の EEG は、表面電極により信号を取得している。現在、論文で報告されている EEG は脳内に刺入した金属電極により信号を取得しており、脳神経の活動電位が発生する場所の近傍の情報である。本研究で得られた EEG は、脳神経の活動電位が大脳皮質、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 EEG とは異なる特性を有するため、その特性を明らかにすると共に適切な解析方法を検討する必要がある。しかしながら、ECG、EEG 共にアミトリプチリンによる変化を明確に捉えていることから、ベンチマークとなる化学物質のデータの蓄積により、急性毒性評価の指標を定めることが可能と考えられる。

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救急医療の専門家である順天堂大学医学部附属練馬病院 救急・集中治療科 診療科長 杉田学先生にインタビューを行なった。杉田先生は、救急医療の現場におけるバイタルサインの中で、呼吸観察の重要性を強調された。以下にインタビューの概要を記載する。

近年、簡便な SpO₂ 測定器が普及したことにより、血液の酸素化と脈波を定量的に観察できるようになっているが、呼吸は血液の酸素化だけの役割ではなく、換気により血液の pH を 7.4 に維持する役割がある。深部の臓器が障害を受けている場合、血流の低下により酸素が供給されず、嫌気性代謝により乳酸が発生する。この乳酸による pH の低下を換気回数の増加により呼吸性アルカローシスにて代償することがある。そのため、呼吸数の増加は深部臓器への影響を示している可能性がある。呼吸による pH 調整ができない患者の場合、腎臓による調整が行なわれるが、呼吸性よりも時間がかかる。脳幹に障害が有る場合、呼吸による pH の調整ができなくなるため、死亡につながる。災害の際に避難している方が突然死することがあり、小さな肺塞栓が原因となっていることがある。その際も呼吸数の増加が生じているため、これをモニターすることで、急死を防げる。脈の波形は胸

腔内圧の影響をうける(陰圧:血管拡張、陽圧:血管収縮)。SpO₂ はその変動を捉えており、また、心電図からの情報から得ている呼吸数はこのインピーダンスの変化をみているため、精度が良くない。

本研究にて CNT-Y を用いた EEG には、呼吸に応じた波形も同時に捉えられている。一つのセンサーで複数の情報を得られることは利点であるが、毒性影響を詳細に解析するためには、複数の手法により呼吸数モニタリング手法の開発を行なうことも必要と考えられる。実際に、CNT-Y を用いた簡便なヒトの呼吸数測定機器はプロトタイプが完成している(研究協力者:鶴岡秀志)。今後、実験用小動物へ適用できるデザインを進める計画である。

皮膚結紮による方法は、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。次年度はこの手法による脳波測定に取り組む計画である。この手法により脳波が取得できれば、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極めて低い。

E. 結論

バイタルサインセンサーの開発においては、新素材である CNT-Y を表面電極として使用し、イソフルラン麻酔下でヘアレスラットから ECG 及び EEG を測定し、脳及び心臓に作用する三環系抗うつ薬の一つであるアミトリプチリンの影響を捉えることに成功した。生体電位を測定する部位及び方法がこれまで報告されている ECG、EEG とは異なる特性を有するため、今後はその特性を明らかにすると共に適切な解析方法を検討する必要がある。しかしながら、ECG、EEG 共にアミトリプチリンによる変化を明確に捉えており、ベンチマークとなる化学物質のデータを蓄積することで、急性毒性評価の指標を定めることが可能と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Horibata K, Takasawa H, Hojo M, Taquahashi Y, Shigano M, Yokota S, Kobayashi N, Sugiyama KI, Honma M, Hamada S. In vivo genotoxicity assessment of a multiwalled

carbon nanotube in a mouse ex vivo culture. *Genes Environ.* 2022 Oct 19;44(1):24.

鶴岡秀志、高橋祐次、カーボンナノチューブのヘル
スケア応用、2022, *Nanofiber* 13(1,2) 19-24

Tsunematsu T, Arakaki R, Sato M, Saito M, Otsuka K, Furukawa Y, Taquahashi Y, Kanno J, Ishimaru N., Exposure to Multiwall Carbon Nanotubes Promotes Fibrous Proliferation by Production of Matrix Metalloproteinase-12 via NF- κ B Activation in Chronic Peritonitis., *Am J Pathol.* 2022 Aug 10:S0002-9440(22)00240-1.

高橋祐次、齊藤洋克、栗形麻樹子、北嶋聡、加圧式
定量噴霧式吸入器(pMDI)製剤のげっ歯類を対
象とした鼻部ばく露装置の開発、*Jpn. J. Clin.Toxicol.* 2022 35(3) 255-259

2. 学会発表

Taquahashi Y, Yokota S, Tsuji M, Morita K, Suga K, Hojyo M, Hirose A, Kanno J, Preliminary report on a two-year, 4-week-interval intermittent whole body inhalation study of the multi-walled carbon nanotube (MWNT-7) in male mice, SOT 2023 Abstract Number/Poster Board number: 4715/ P621 (2023.3.22)

Taquahashi Y, Tsuruoka S, Okubo Y Tanemura K, Aisaki K, Kitajima S, Modernization of acute toxicity testing with integrated assessment of multiple vital signs as endpoints, 第 96 回日本薬理学会学術年会シンポジウム (2022.12.2)

高橋祐次、DPI 製品化の課題:粉体の吸入剤研究
開発における有効性・薬物動態・安全性の評価
を推進する非臨床評価手法の開発、第 13 回
粉末吸入剤研究会シンポジウム(2022.11.24)

Taquahashi Y, Non-clinical Safety Issue in Pediatric Drug Development: What issues are to be considered from now on? 第 49 回日本毒性学会学術年会 シンポジウム(2022.7.2)

高橋 祐次、動物を用いない新たなリスク評価アプ
ローチ法の開発:In vivo 毒性試験の経験に基づく
NGRA による安全性評価手法に関する考察、日
本動物実験代替法学会 第 35 回大会
(2022.11.20)

Taquahashi Y, Yokota S, Hirose A, Kanno J Streamline of chronic inhalation exposure study protocol for nanomaterial, 第 49 回日本毒性学会学術年会 シンポジウム(2022.6.30)

Taquahashi Y, Tsuruoka S, Aisaki K, Okubo Y Kitajima S, An approach to prediction of mortality in acute toxicity studies by integrated assessment of vital signs, 第 49 回日本毒性学会学術年会 シンポジウム (2022.6.30)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

(1) 特許第 7111296 号(特開 2019-190915):試験
物質供給装置及び吸入曝露試験装置、柴田眞
利、菅野純、生田達也、鶴田祐吾、高橋祐次

(2) 特許第 7112685 号(特開 2019-190914):吸入
曝露試験用カートリッジ、試験物質供給装置及び
吸入曝露試験装置、柴田眞利、菅野純、生田達
也、鶴田祐吾、高橋祐次

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

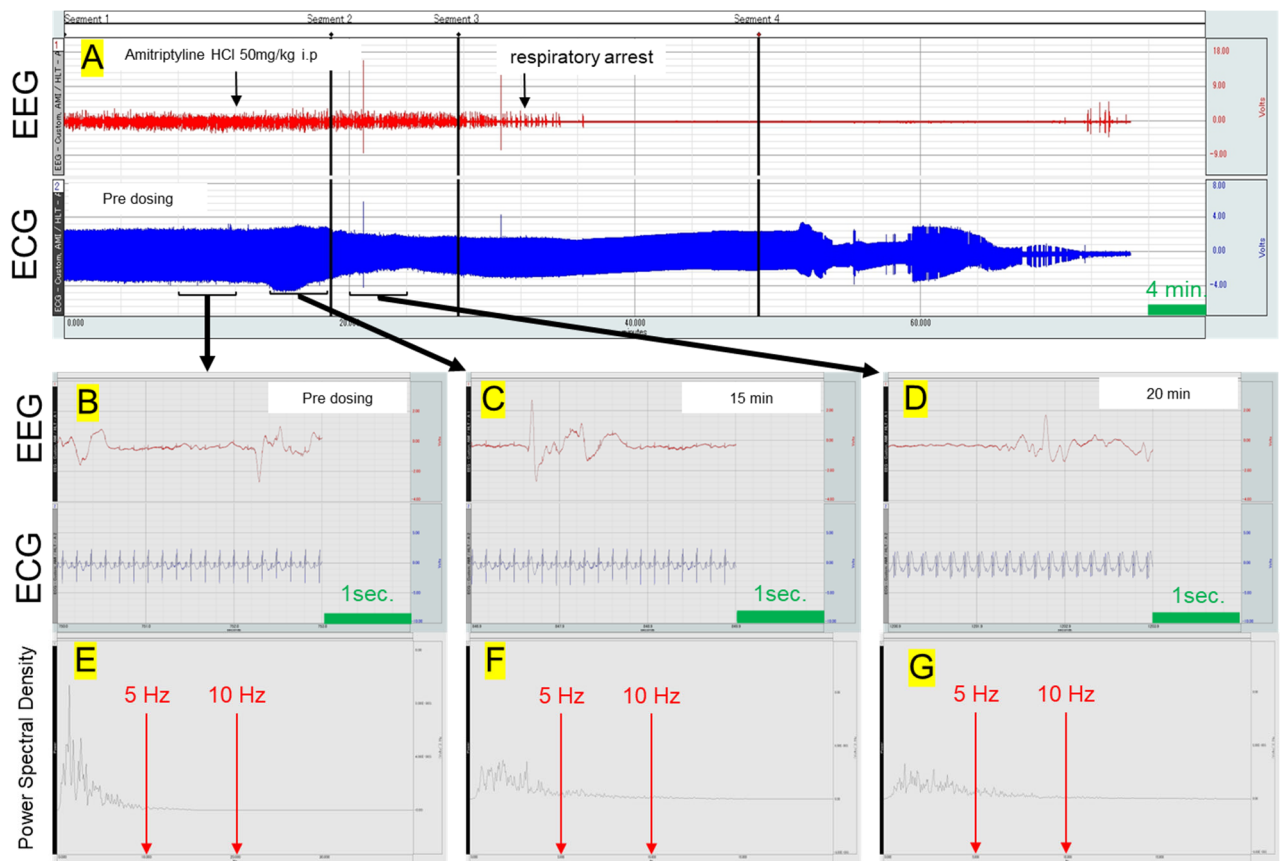


図1 アミトリプチリン塩酸塩投与によるEEGとECGの変化