

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-

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 動物管理室長

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* 急性毒性試験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】タンパク結合率測定と予測、【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中である。急性毒性試験における遺伝子発現変動解析については、12 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを用い、4,4'-Dihydroxybiphenyl 及び 2,5-Di-tert-butylhydroquinone の用量設定試験並びに主試験を実施し、肝、腎、肺及び海馬をサンプリングした。独自の遺伝子発現値の絶対化手法である Percellome 法による網羅的遺伝子発現解析により、4,4'-Dihydroxybiphenyl では肝においてはタンパク質の変性が亢進していることが示唆され、2,5-Di-tert-butylhydroquinone では海馬において概日リズムの乱れが示唆された。急性毒性試験における行動解析については、ICR マウスを使用し、ホームケージ活動量測定装置およびオープンフィールド活動量測定装置を用い、アセフェート・ニコチン・無水カフェイン・テトロドトキシンを投与したマウスの行動様式を解析した。また、超音波測定装置による超音波発声解析の測定を試みたが超音波発声の確認には至らなかった。ソフトウェア開発においては、時系列データ、特に心電図のような繰り返しパターンのある波形データの解析に有用な Matrix Profile アルゴリズムの性能評価や要件検討を実施した。その結果、評価方法の最適化の進んでいない段階での異常検知において有用であり、また先行研究で評価した機械学習モデルとの組み合わせによる相乗効果が予想されることから、本研究班の目標実現に有効な手法であることが確認された。ヒト iPS 細胞由来ニューロンの MEA 計測により ICCVAM の急性毒性試験代替法の開発において、予測性の低かった化合物を選定し、毒性リスク評価を実施した結果、毒性リスク評価法としての有効性が示された。

## 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
鈴木郁郎	東北工業大学大学院 工学研究科電子工学専攻 教授

## 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。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装置の更なる改良を進め、【2】*in vitro* 急性毒性試験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血漿タンパク結合率測定と予測、【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、【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 LD<sub>50</sub> 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(高橋)

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。動物は、ラット(ヘアレスラット、HWY/Slc)を使用した。ラットの飼育は、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。

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(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(図 1)。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)の上に乗せて保温した。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、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)を腹腔内投与し、心電波形及び脳波への影響を観察した。

アミトリプチリンは神経終末におけるノルアドレナリン及びセロトニンの再取り込みを阻害することで心臓及び脳神経に作用する。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 タンパク結合率測定(高橋、研究協力者:山本)**

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。実際のデータ測定は今後、実施する計画である。

### **B-3 急性毒性試験における遺伝子発現変動解析(北嶋)**

急性毒性発現時の海馬、肺及び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する。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、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) による網羅的遺伝子発現解析を行なった。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について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なった。

モデル物質として、4,4'-Dihydroxybiphenyl (CAS No: 92-88-6、富士フイルム和光純薬)及び2,5-Di-tert-butylhydroquinone (CAS No: 88-58-4、DTBHQ、富士フイルム和光純薬)を選択した。

### **B-4 急性毒性試験における行動解析(種村)**

急性毒性試験における行動解析については成熟雌 ICR マウスを使用し、モデル化合物としてアセフェート(300 mg/kg)、ニコチン(50 mg/kg)、無水カフェイン(300 mg/kg)、TTX(500 µg/kg)を選択し、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)とへの経時的影響を検討

した。また、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(CHU30-BSNA-12、Shodensha, Inc.)を用いて撮影した。並行して、超音波測定装置による聴音波発声(USVs: ultrasonic vocalizations)の測定を検討した。

### **B-5 バイタルサインの統合的解析方法(ソフトウェア)の開発(相崎)**

バイタルサインデータとして想定される測定項目としては、血圧やパルスオキシメーターによる SpO<sub>2</sub>、心電図などの、時系列データが想定されるため、評価用のバイタルサインデータとしては、主として心電図データを用いた。ただし最終的にはバイタルサインの種類や測定機器を限定することなく汎用性を持たせることを重視して、バイタルサイン以外の時系列データも追加評価用として取り入れた。異常検知に利用し得る人工知能等の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.3.9.1)を使用した。汎用データ処理ライブラリとして Numpy (ver.1.19.5)、Pandas(ver.1.2.1)、データ可視化ライブラリとして Matplotlib (ver.3.3.4)を使用した。また Matrix Profile アルゴリズムの実装ライブラリとして matrixprofile (ver.1.1.10)を導入した。Python スクリプト実行環境としては Visual Studio Code (ver.1.74.2)、Jupyter Extension for VSCode (ver. v2022.11.1003412109) あるいは Google Colaboratory を使用した。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。

### **B-6 脳波解析による神経毒性予測(鈴木)**

ヒト iPS 細胞から分化させた Glutamatergic neuron と GABAergic neuron とヒトアストロサイトを 7:3:3.5 の割合で混合し、 $8.0 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で Polyethyleneimine との Laminin-511 でコーティングした MEA plate に播種した。同様に、ドーパミンニューロンを  $7.3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で Polyethyleneimine でコーティングした MEA plate に播種し、培養1週間後、ヒトアストロサイトを  $1.2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で追加し、共培養とした。試験化合物は、痙攣陽性化合物として、4-AP、

Picrotoxin, Pilocarpine を用いた。痙攣陰性化合物として、Acetaminophen, Amoxicillin, DMSO を用いた。ICCVAM の急性毒性試験代替法の開発において、予測性の低い結果が得られた化合物として、Caffeine と Nicotine を用いた。

神経ネットワーク活動の計測は、Maestro (Axion BioSystems) を用いて 37 °C、CO<sub>2</sub> 5% 存在下で行った。計測データは、AxIS Navigator (Axion BioSystems) を用いて検出したスパイクデータから、独自に開発した 4-step method (Biochem Biophys Res Commun, 497, 612-618, 2018) を用いて同期バースト発火の検出を行った。解析パラメータは、Total Spikes, No. of SBF, Inter Burst Interval, Duration of SBF, Spikes in a SBF, Max Frequency (MF), CV of MF, Inter MF Interval (IMFI), CV of IMFI と Duration of SBF, Spikes in a SBF の CV 値、Duration の四分位範囲 (IQR) および、神経ネットワーク活動の規則性を指標とした Periodicity を合わせた 13 パラメータを用いた。

### 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。また、本研究で実施したヒト iPS 細胞由来ニューロンの利用は、市販のニューロンであり、平成 30 年 8 月、令和元年 6 月に東北工業大学研究倫理審査委員会承認済である。

## C. 研究結果

### C-1 バイタルサインセンサーの開発

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に加えて、ノイズとは明らかに異なる波形が得られた。

ECG 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。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。

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 S 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。呼吸停止後には波形の変化は認められなかった。

### C-2 タンパク結合率測定

一般化学物質に比較して、情報が豊富な医薬品のタンパク結合率データを用いて計算科学によるタンパク結合率の予測式の構築を行い、実際にタンパク結合率の測定を行なう計画とした文の情報を参照し 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、現在、モデル式を検討したが、十分な性能は得られていない。

### C-3 急性毒性試験における遺伝子発現変動解析

動物は何れも、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。遺伝子発現変動解析は、投与後の時間 4 点(投与 2、4、8 及び 24 時間後)、各群 3 匹、合計 48 匹のマウスについて解析を行った。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 検定での各時点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1以上という条件で遺伝子を粗抽出した。このソフトウェアは、各遺伝子(probe set: ps)につき、用量、経時変化及び遺伝子の発現コピー数を各軸とした 3 次元グラフにおいて、発現を表す平面につき凹凸を評価し、全ての ps を生物学的に有意と考えられる順に並び替えるものである。また、既知情報との照合によるシグナルネットワーク及び遺伝子発現の制御因子の探索は、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.) を用いて行った。

4,4'-Dihydroxybiphenyl は、0.5%MC を溶媒と

して主試験を0、7、20及び70 mg/kgの用量で実施した。肝についての解析の結果、発現が増加する遺伝子1,425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788 psが抽出された。また発現が減少する遺伝子としては859 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26 psが抽出された。次いで、増加分788 psについて検討した結果、IPAによる検索で、有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークとして、折りたたみ不全タンパク質(unfolded protein)反応、酸化ストレス応答転写因子 Nrf2 (NFE2L2; Nuclear factor erythroid 2-related factor 2)や糖質コルチコイド(Glucocorticoid)受容体シグナルが抽出されてきた。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、小胞体ストレス応答の下流に位置するATF4あるいはXBP1が抽出されてきたことから、肝においてはタンパク質の変性が亢進していることが示唆された。また、Nrf2が抽出されてきたことから、酸化的ストレスが更新していることが示唆された。加えて、TNF、IL4、IL1B、IL6、IL3及びTGFB1が抽出してきたことから、サイトカインシグナルが活性化され炎症が誘発されることが示唆された。

2,5-Di-tert-butylhydroquinone (DTBHQ)はコーンオイルを溶媒として、0、100、300、1000 mg/kgを投与した用量設定試験の結果、300 mg/kg以上において体重増加抑制及び肝重量の増加、100 mg/kg以上において腎重量の増加が認められたことから、主試験を0、10、30、100 mg/kgの用量で実施した。

海馬についての解析の結果、発現が増加する遺伝子1,256 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87 psが抽出された。また発現が減少する遺伝子としては337 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1 psが抽出された。次いで、増加分87 psについて検討した結果、IPAによる検索で、有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークとして、概日リズムが見出された。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、やはり

概日リズム関連遺伝子であるPER2、PER1、CLOCKやCRY1、CRY2などが抽出されてきた。したがって、被験物質の投与により、少なくとも海馬領域における概日リズムの変調が示唆された。この概日リズムの乱れを誘発する因子は現時点では不明であり、また有害事象との直接的な関連は不明であるが潜在的に、生理現象(睡眠、摂食、細胞の分裂・再生、ホルモン分泌など)における体内リズムの変調によるなんらかの異常が誘発される可能性が示唆された。

肝についての解析の結果、発現が増加する遺伝子802 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63 psが抽出された。また発現が減少する遺伝子としては296 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5 psが抽出された。次いで、増加分63 psについて検討した結果、IPAによる検索で、有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークとして、酸化ストレス応答転写因子 Nrf2 (NFE2L2; Nuclear factor erythroid 2-related factor 2)シグナルが見出された。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、insulin、IGF1、LEPR(レプチン受容体)は抽出されてきた。インスリンは、グリコーゲン合成酵素(glycogen synthase)を活性化させ、グリコーゲン合成を促進させるため、グリコーゲンが貯蔵させる作用を有する可能性が示唆された。また、TNFとIL1Bが抽出してきたことから、サイトカインシグナルが活性化され炎症が誘発されることが示唆された。

#### C-4 急性毒性試験における行動解析

アセフェート投与群は、投与直後にはコントロール群との差異はなかった。投与30分後には活動量の低下が見られ振戦が観察された。投与60分には、著しい活動量の低下が観察され痙攣が確認された。投与90分後には、ほとんど動かず、全身性の強い痙攣が見られた。また、テトロドトキシン投与群では、投与直後から30分後の間には活動量の低下が見られ、振戦や痙攣が観察され、投与60分後から90分後にはわずかに痙攣が見られたものの、ほぼ回復状態を示した。

アセフェート投与群では、投与直後はコントロール群と同様の表情が見られた。投与30分後には眼瞼

脱色と眼瞼腫脹が見られた。また、浅速呼吸や頻呼吸が見られた。投与 60 分後には呼吸不全が更に強く現れ、流涙が見られた個体も存在した。投与 90 分後には眼瞼下垂、瞬目不全、流涙が観察された。また、テトロドトキシン投与群では、表現型が現れる時間に個体差はあったものの、投与直後から60分後にかけて眼瞼脱色とわずかな眼瞼腫脹が見られた。また、呼吸不全も観察された。

### **C-5 バイタルサインの統合的解析方法(ソフトウェア)の開発**

今年度は、時系列データ、特に心電図のような繰り返しパターンのある波形データの解析に有用な Matrix Profile (MP) アルゴリズムの性能評価や要件検討を実施した。

MPは基本的に、部分データ(A)と、時系列データ全体をAと同じ長さに分解した部分時系列データBの類似性を計算するものであり、異常検知だけでなく、繰り返しパターンの検出についても有用で、数理的なアルゴリズムであるため、事前学習や特別な処理を必要としない。またアルゴリズムの実装において優れたライブラリが提供されており、最小限のパラメータのみで実行可能である。波形データのベースラインの調整など、事前の正規化処理も不要であり、汎用性が高い。

性能評価としては、具体的には、ラベル付加や正規化などの前処理を適用していない、30 分間(測定頻度 650,000 回)連続測定した心電図データにおいて MP 解析を実行した。

まず、MP にパラメータを一切与えず解析 (matrixprofile.analyze) を実行した場合、基本的な評価単位となる部分データのサイズ(幅)を一定の範囲で変化させて自動解析する ("Pan-Matrix Profile" と呼称) が自動実行されるが、データ点数が数千程度の小規模データを解析した場合を除き、実用的な時間内に計算が終わらず、また解析結果も十分な異常検知性能を示さなかった。

次に、時系列データ(波形)の目視確認を元に、部分データのサイズ(幅=周期的に出現するパターンのサイズ)を適切に指定したところ、その他のパラメータを一切指定せずとも自動的に解析が実行され、実用的な時間内に十分な異常検知性能を示した。

ただし、部分データに比べ、長大な時系列データを解析した場合は相応の実行時間が掛かること、ま

た時系列データ内に極端な変動があった場合、異常の自動検知に大きな影響を与えてしまうこと、が確認された。

また、心電図データと同様に周期性のある時系列データとして、一定の動作を繰り返す機械音を数値化したものを MP 解析したところ、心電図での解析結果と同様の結果を得た。これは同アルゴリズムが様々な種類の時系列データに対応可能であることを示唆している。

一方、規則性に乏しいランダムな時系列データや、不整脈時の心電図など異常パルスが有意に頻出しているようなデータを MP 解析すると、偶然の波形を繰り返しパターンと誤認したり、正常心電パルスを異常と検出したが、MP により自動出力された解析図を確認すれば容易にそれと認識できた。

### **C-6 脳波解析による神経毒性予測(鈴木)**

興奮性化合物、痙攣陰性化合物および Caffeine に対するデータを取得し、13 個の解析パラメータを導出した。本実験で使用したヒト iPS 細胞由来ニューロンにおいては、単一パラメータで毒性判定することは難しい為、多変量解析を用いた。DMSO の各濃度の間に有意差が 1 つも認められない主成分マップを作成することで、DMSO の影響を除外する解析法を採用した。

使用したパラメータは、同期バースト発火数、同期バースト発火の持続時間 (Duration)、同期バースト発火内のスパイク数、同期バースト発火内の最大周波数 (Max Frequency)、同期バースト発火内のスパイク数の変動係数、最大周波数時刻の間隔における変動係数 (CV of IMF1)、神経ネットワーク活動の規則性を指標とした Periodicity である。既知の痙攣陽性化合物は濃度依存的に毒性リスクの上昇を示した。一方、痙攣陰性化合物は濃度が上昇しても毒性リスクが上昇することはなかったことから、毒性リスク評価法としての有効性が示された。ICCVAM の急性毒性試験代替法の開発において、予測性の低かった Caffeine においても、痙攣陽性化合物と同様に濃度依存的な毒性リスクの上昇が検出されたことから、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの MEA 計測法による神経毒性リスク推定は、ICCVAM の急性毒性試験代替法の開発において、予測性の低い化合物に対しても有効な評価法であることが示された。

## 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。

急性毒性試験における遺伝子発現変動解析においては、肝での解析では、それぞれの化学物質をマウスに単回経口投与した際の毒性プロファイルが明らかとなったが、特に注目すべきは、DTBHQ を投与した際の海馬における概日リズムの乱れを示唆する所見であり、このことは神経毒性を示唆する一般状態の変化には、概日リズムの乱れが寄与する可能性を示唆しており、今後、この観点からの観測も本研究に有用となるものと考えられる。

バイタルサインの統合的解析方法 (ソフトウェア) の開発においては、先行研究では、汎用性の高い異常検知アルゴリズムとして人工知能 (AI)、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

る機械学習に着目し、代表的な、畳み込みニューラルネットワーク (CNN: Convolutional Neural Networks) モデルや自己符号化器 (AE: AutoEncoder) について、急性毒性試験においてバイタルサイン評価に用いる際の実用性と問題点を検討した結果、専門家による安全性評価に資する情報を提供し得ることを示した。一方で AI、特に CNN モデルにおいては事前の学習工程が出力データの精度に大きく影響することが確認され、学習のために十分な量の異常データのサンプリングが難しいバイタルサインの性質上、初期運用に際して困難が伴うことが予想された。

これらに比して、今年度取り上げた Matrix Profile (MP) は機械学習の類ではなく、基本的には数理的な手法といえるため、学習済みの機械学習モデルのように、検出された特徴波形 (パターン) の分類を行う事は困難だが、原理的に事前の学習工程を必要としないため、汎用性、即応性に優れており、解析速度も急性毒性試験実施中のリアルタイム処理が可能なほどに高速であることが確認された。

この特性は、本研究班の目指す、急性毒性試験中の動物の死亡の回避 (致死性予測) の実現において大変有効である。そのため、全ての測定を終えてから全測定範囲を一括解析するのではなく、急性毒性試験進行中に、現時点から遡って、高速処理が可能な範囲 (データ量) の時系列データを対象にした MP 解析を連続実行することで、異常の発生をほぼリアルタイムに検知可能になると思われる。

不整脈心電図などの異常が多発しているデータを入力した際には誤識別をする可能性があるが、むしろ人道的見地からそのような状態に至る前に急性毒性試験を終了すべきであり、適切な運用を行えば実用に際しての技術的問題にはならないと予想される。

今回の研究結果は、MP と機械学習のいずれが優れているか、というのではなく、組み合わせによる相乗効果を示唆するものと考えられる。実用化イメージとしては、急性毒性試験実施中は MP による自動且つ高感度の致死性予測をその場でリアルタイムに行い、試験実施後の詳細解析や評価においては機械学習による特徴分類によって、専門家による判断の補助を行うなど、適切な使い分け・組み合わせが有効と考えられる。

また MP は、上記の性能に加え、①実行に際して設定が必要なパラメータがほとんどなく、唯一必要と

思われる 部分データの幅についても、設定に際して専門的な知識を前提としないため、データサイエンスの専門家でなくとも運用が容易であること、さらには②測定された時系列データをそのまま入力しても異常検知を実施できるため、バイタルサイン統合解析ソフトウェアの機械学習モジュールを測定機器や試験施設に最適化するために必要な学習用データを抽出・生成する際にも活用可能であること、の 2 点からも導入するに値するものと評価された。

ヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いた MEA 計測において、DMSO の SD 範囲を基準とした毒性リスク推定法は、化合物の毒性リスク評価法として有効であることが示唆された。推定された痙攣陽性化合物の毒性用量が妥当であったことから、被験物質の毒性用量も妥当であると考えられる。細胞種によって DMSO に有意差が認められない主成分(パラメータセット)が異なった。これは細胞種によって自発活動特性が異なることを意味する。ICCVAM の急性毒性試験代替法の開発において、予測性の低い複数の化合物に対して有効であるとともに、異なる細胞種を用いた場合にも有効な評価法であることが示された。これらのことから、本研究で実施した MEA を用いたヒト iPS 細胞由来ニューロンの電気活動を指標とした化学物質の *in vitro* 毒性評価法の応用性が非常に高いことが示唆された。

## 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。救急医療の現場においてはバイタルサインの中で、呼吸観察の重要であることから、本研究においてもその解析を進める。

急性毒性発現における遺伝子発現変動解析では肝毒性により死亡する 4,4'-Dihydroxybiphenyl と神

経症状を呈する 2,5-Di-tert-butylhydroquinone 毒性発現メカニズムの一端を明らかにした。

ホームケージ活動量測定およびオープンフィールド活動量測定は急性毒性試験においても有効な手段であることが確認されたが、超音波発声については測定条件を含めて再検討が必要である。

ソフトウェア開発においては、今年度検討した Matrix Profile アルゴリズムは、最適化の進んでいない段階での異常検知において有用であり、また先行研究で評価した機械学習モデルとの組み合わせによる相乗効果が予想されることから、本研究班の目標実現に有効な手法であることが確認された。今後も、バイタルサインの統合的解析に有効と思われる手法や追加項目を検討すると共に、従来からの統計指標等の手法や機械学習技術を組み合わせ、本研究班で開発したバイタルサイン取得デバイス等による多項目の入力データに対応する評価システムの設計・構築を進める。

ヒト iPS 細胞由来ニューロンの MEA 計測法による神経毒性リスク推定は、ICCVAM の急性毒性試験代替法の開発において、予測性の低い化合物に対しても有効な評価法であることが示された。

## 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- $\kappa$ 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

Takahiro Sasaki, Hirokatsu Saito, Yusuke Furukawa, Takashi Tominaga, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Kentaro Tanemura: Exposure to bisphenol A or its phenolic analogs during early life induces different types of anxiety-like behaviors after maturity in male mice. J. Toxicol. Sci. 2023; in press.

Satoshi Yokota, Hidenobu Miyaso, Toshinori Hirai, Kousuke Suga, Tomohiko Wakayama, Yuhji Taquahashi and Satoshi Kitajima, Development of a non-invasive method for testicular toxicity evaluation using a novel compact magnetic resonance imaging system. J Toxicol Sci. 2022; 48 *in press*.

相崎健一、小野竜一、菅野純、北嶋聡:Percellome プロジェクト～トランスクリプトミクスとエピジェネティクスによる毒性分子機序の探求～、日本薬理学雑誌, 2022; 157: 200-206. doi.org/10.1254/fpj.21122

Kanno H, Kurata S, Hiradate Y, Hara K, Yoshida H, Tanemura K. High concentration of dopamine treatment may induce acceleration of human sperm motility. *Reprod Med Biol.* 2022 Oct 1;21(1):e12482. doi: 10.1002/rmb2.12482. PMID: 36310655; PMID: PMC9601866.

Kurata S, Umezu K, Takamori H, Hiradate Y, Hara K, Tanemura K. Exogenous gamma-aminobutyric acid addition enhances porcine sperm acrosome reaction. *Anim Sci J.* 2022 Jan;93(1):e13744. doi: 10.1111/asj.13744. PMID: 35699686; PMID: PMC9286608.

Kawabe Y, Numabe T, Tanemura K, Hara K. Characteristics of alpha smooth muscle actin-positive peritubular cells in prepubertal bovine testes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2022 Jun 18;609:48-53. doi:

10.1016/j.bbrc.2022.03.149. Epub 2022 Apr 7. PMID: 35413539.

Hiradate Y, Harima R, Yanai R, Hara K, Nagasawa K, Osada M, Kobayashi T, Matsuyama M, Kanno SI, Yasui A, Tanemura K. Loss of *Axdnd1* causes sterility due to impaired spermatid differentiation in mice. *Reprod Med Biol.* 2022 Mar 30;21(1):e12452. doi: 10.1002/rmb2.12452. PMID: 35386379; PMID: PMC8968163.

## 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)

北嶋 聡:創薬研究における薬理-病理連携の必要性: 毒性学の立場から -食品トキシコゲノミクスと薬理学-, 第 96 回日本薬理学会年会、(2022.12.2)、横浜

相崎健一、小野竜一、菅野 純、北嶋 聡: Percellome プロジェクト ~トランスクリプトミクスとエピジェネティクス、インフォ マティクスによる毒性分子機序の探求~, 第 96 回日本薬理学会年会、(2022.12.2)、横浜

小野 竜一、田埜 慶子、安田 智、佐藤 陽治、内田 恵理子、平林 容子、北嶋 聡 ゲノム編集技術を利用した際の、オンターゲット部位における非意図配列の挿入と、その検出方法の確立 日本食品衛生学会第118回学術講演会 2022.11.11 長崎(口頭発表)

J. Kanno, K.-I. Aisaki, R. Ono, S. Kitajima: Histone Modification, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeatedly Exposure to a Chemical. The XVITH International Congress of Toxicology (ICT2022), (2022.9.19), Maastricht, The Netherlands Oral.

五十嵐智女、藤井咲子、釣本真理子、高橋祐次、北嶋 聡、栗形麻樹子:ビスフェノール類似体 4,4'-(1,3-dimethylbutylidene)diphenol の卵巣摘出マウスにおける皮下および経口投与による子宮肥大試験 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.7.2)

菅野 純、相崎健一、小野竜一、北嶋 聡: Percellome project からみた毒性 AI の展望 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.7.2)

五十嵐智女、松村万里、小川いづみ、矢川千織、早

川孝彦、越智美代子、齊藤 洋克、栗形麻樹子、北嶋 聡:「新規の食品」の安全性を確保するための諸外国の制度比較 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.7.1)

齊藤洋克、種村健太郎、菅野 純、北嶋 聡:アセフェート単回経口投与による雄マウスの情動認知行動解析 -化学物質曝露影響から考える神経発達障害-第 49 回日本毒性学会学術年会(2022.7.1)

大久保佑亮、菅野聖世、北嶋 聡、平林容子、福田淳二:ヒト iPS 細胞を用いたシグナル伝達かく乱作用のダイナミクスに基づく高精度かつ網羅的ヒト発生毒性試験法の開発、第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.7.1)

菅野 純、相崎健一、小野竜一、北嶋 聡:新型反復曝露トランスクリプトミクスから見た発癌エピジェネティクスの考察 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30)

小野竜一、山本雄介、成瀬美衣、田邊思帆里、吉岡祐亮、相崎健一、広瀬明彦、落谷孝広、平林容子、北嶋 聡:cfDNA による毒性評価 第 49 回日本毒性学会学術年会(2022.7.2)

佐々木 貴熙、原 健士朗、種村 健太郎:発生-発達期のアセフェート曝露による性成熟への影響評価、第24回環境ホルモン学会研究発表会(環境化学物質3学会合同大会) (2022.6.14-16)

佐々木 貴熙、原 健士朗、種村 健太郎: アセフェートの発生-発達期慢性曝露が雌雄の生殖能成熟に及ぼす遅発性影響評価、第49回日本毒性学会学術年会(2022.6.30-7.2)

長谷川 彩乃、佐々木 貴熙、原 健士朗、Jahidul ISLAM、野地 智法、種村 健太郎:発達期ニューキノロン系抗菌薬(TFLX)投与による成熟後の行動影響と腸内細菌叢解析、第49回日本毒性学会学術年会(2022.6.30-7.2)

張磨 琉亜、平舘 裕希、原 健士朗、種村 健太郎:精子完成におけるダイニン関連因子(Axdnd1)の機能解明、第115回日本繁殖生物学会大会 (2022.9.11-7-9.14)

Takahiro Sasaki, Kenshiro Hara, Kentaro

Tanemura, The effects of early life exposure to acephate on sexual maturation in male and female. The XVIth International Congress of Toxicology, (2022.9.18-7-9.21)

## **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