

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アミトリプチリン塩酸塩及びアトロピン硫酸塩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、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塩酸塩とアトロピン硫酸塩の影響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。血漿中タンパク結合率については、*in vitro* 急性毒性試験代替法において予測性の低い 6 種類の検体 (ジゴキシン、カフェイン、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、ニコチン) についてラット血漿タンパク結合率を測定した。何れもタンパク結合率は非常に低い値であった。

## 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 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

#### 1. 使用動物:

雌性ヘアレスラット (HWY/SIc) 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及びアトロピン硫酸塩 (何れも富士フィルム和光純薬から入手) 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 5 及び 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 (左耳介基部、頸部、腰部) に縫合針を用いて 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。動物は麻酔による対応低下を防止するため、麻酔措置に付属のヒータで加温した状

態で作業を行った (AD-5000 Digita; Anesthesia System, EZ systems)。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。

また、動物を非拘束にて EEG と ECG を測定するため、トランスミッター及びレシーバーについて検討を行った。

## B-2 タンパク結合率の測定

毒性予測にトキシコキネティクス (TK) の情報は極めて有用であるが、一般化学物質では費用の面から TK の実施は難しく情報は限定的である。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測定並びに予測を行なう。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ため、予測性を向上させるため *in vitro* 急性毒性試験代替法において予測性の低い 6 種類の検体 (ジゴキシン、カフェイン、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、ニコチン) についてラット血漿タンパク結合率を測定した。測定方法は、平衡透析法とし、各被験物質の濃度は 1000 nM 及び 10 nM の 2 ポイント、LC-MS/MS により濃度測定を行った。

## 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。本研究で得られた EEG の解析は研究分担者の鈴木郁郎研究分担者、ECG は相崎健一研究分担者によって解析された。

現在、CNT-Y を用いて非拘束にて EEG と ECG を測定するためのトランスミッター及びレシーバーを下記の仕様で開発することとした。CNT-Y は半田付ができないため、ラットの頭部に乗せるサイズのプリント基板 (15 mm × 15 mm × 0.8 mm) と CNT-Y との接続には極小のナットとネジを用いて、ネジに CNT-Y を巻き付ける方法を採用した。現時点でのモックアップを図 1 に示した。

トランスミッター	
基盤: ポリイミド樹脂	15mm × 15mm × 0.8mm
送信チャンネル数	2 チャンネル
送信パラメータ	EEG、ECG
送信周波数	76~109MH
(送信器にて固定)	
電源	CR2032
送信帯域	EEG(1~30Hz) ECG(32~300Hz)
送信感度	EEG(50 μ V/V) ECG(0.5mV/V)
	(レシーバー感度含む)
変調方式	FM-FM
総重量	6g (電池含)
レシーバー	
受信チャンネル数	2 チャンネル
受信パラメータ	EEG、ECG
受信周波数	76~109MHz
	(手動にてチューニング)
電源	AC100V(50/60Hz)
出力端子	BNC 出力
受信帯域	EEG(1~32Hz) ECG(32~300Hz)
受信感度	EEG(50 μ V/V)

ECG(0.5mV/V)  
(トランスミッター感度含む)

## C-2 タンパク結合率の予測モデル

ジゴキシンは 7.7%、カフェインは 5.7%、5-アミノサリチル酸は MS の感度不足により算出が難しかったが、1000nM において 3.9%の値が得られた。ニコチンは測定できなかった。プラスチックの可塑剤として使用されているフタル酸ジエチル及びフタル酸ジブチルはプラスチック製品由来の夾雑成分がブランクから検出されることから、MS 測定の濃度域ではバックグラウンドが非常に高く、測定が困難であった。加えて、血漿中のエステラーゼによって分解された可能性も考えられた。

## 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。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、イン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アミトリプチリン塩酸塩及びアトロピン硫酸塩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。今後、非拘束下にてデータを取得するため、トランスミッターとレシーバーの開発を行い、実データの取得する計画である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Hojo M, Maeno A, Sakamoto Y, Yamamoto, Taquahashi Y, Hirose A, Suzuki J, Inomata A, Nakae D., Time-Course of Transcriptomic Change in the Lungs of F344 Rats Repeatedly Exposed to a Multiwalled Carbon Nanotube in a 2-Year Test., *Nanomaterials (Basel)*. 2023 Jul 19;13(14):2105.

Shimizu M, Hojo M, Ikushima K, Yamamoto Y, Maeno A, Sakamoto Y, Ishimaru N, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Suzuki J, Inomata A, Nakae D., Continuous infiltration of small peritoneal macrophages in the mouse peritoneum through CCR2-dependent and -independent routes during fibrosis and mesothelioma development induced by a multiwalled carbon nanotube, MWNT-7., *J Toxicol Sci*. 2023;48(12):617-639.

Miyauchi A, Akashi T, Yokota S, Taquahashi Y, Hirose A, Hojo M, Yoshida H, Kurokawa M, Watanabe W., Effects of inhalation of multiwalled carbon nanotube (MWCNT) on respiratory syncytial virus (RSV) infection in mice. *J Toxicol Sci*. 2023;48(7):411-420. doi: 10.2131/jts.48.411.

Yokota S, Miyaso H, Hirai T, Suga K, Wakayama T, Taquahashi Y, Kitajima S., Development of a non-invasive method for testicular toxicity evaluation using a novel compact magnetic resonance imaging system., *J*

Toxicol Sci. 2023;48(2):57-64. doi: 10.2131/jts.48.57.

Kuwagata M, Tsuboi M, Igarashi T, Tsurumoto M, Nishimura T, Taquahashi Y, Satoshi Kitajima: A 90-day repeated oral dose toxicity study of 2-Butylbenzo[d]isothiazol-3(2H)-one in rats Fundam. Toxicol. Sci. 2023; 10: 69-82.

Kuwagata M, Tsuboi M, Igarashi T, Tsurumoto M, Nishimura T, Taquahashi Y, Satoshi Kitajima: A 90-day dose toxicity study of 2-(2H-benzotriazol-2-yl)-6-dodecyl-4-methylphenol in rats Fundam. Toxicol. Sci. 2023; 10: 59-68.

西村拓也、西村次平、伊藤かな子、高橋祐次、医薬品開発における非臨床安全性評価の変遷、日本獣医師学雑誌第 61 号、2024.2.20

## 2. 学会発表

高橋祐次、微粒子毒性の in vivo 吸入毒性試験法と課題ー吸入毒性試験ガイドラインの変遷と吸入ばく露実験装置の開発についてー日本薬学会第 144 年会シンポジウム (2024.3.30)

Sato K, Taquahashi Y, Suzuki I. Possible improvement of the increase in non-clinical evaluation predictability by in vivo imaging and MPS-The cases of the CNS seizure risk assessment and drug delivery to the alveoli. 日本薬学会第 144 年会シンポジウム(2024.3.30)

Taquahashi Y, Morita K, Suga K, Tsuji M, Okubo Y, Aisaki K, Kitajima S, New approach for assessment of acute oral toxicity by multiple parameters of vital signs: development of a less invasive method for measuring biopotential in small laboratory animal using carbon-nanotube yarn as surface electrodes, The 63rd Society of Toxicology Annual Meeting (2024.3.11)

Taquahashi Y, Morita K, Suga K, Tsuji M, Okubo Y, Aisaki K, Kitajima S, Improved acute toxicity study incorporating vital signs; a less invasive method for measuring biopotential in laboratory animal using CNT yarn, 10th International Congress of Asian Society of Toxicology (2023. 6.18)

高橋祐次、森田紘一、辻昌貴、菅康佑、相崎健一、北嶋聡、平林容子、先端素材カーボンナノチューブヤーンを使用した実験用小動物における低侵襲な生体電位測定法の開発, 第 70 回 日本実験動物学会総会 (2023.5.24)

## **G. 知的財産権の出願・登録状況**

### 特許出願

高橋祐次、岩本正春、鶴岡秀志、久本 豊、生体信号のリアルタイム精密測定方法、2023 年 12 月 18 日出願

### 3. その他

なし

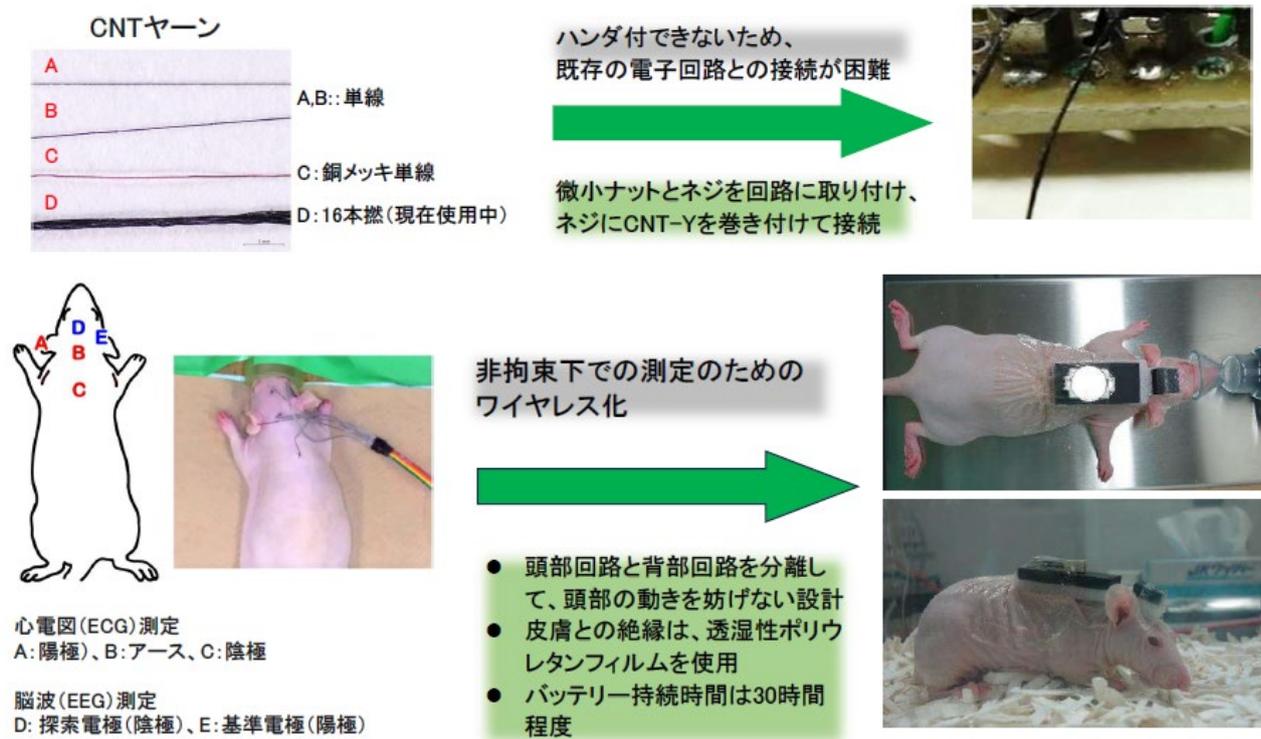


図 1 CNT-Y と既存の電子回路との接続方法

CNT-Y は柔軟で導電性に優れた素材であるが、既存の電子回路との接続にハンダ付を使用できないため、極小のナットとネジを用いて接続する。動物の背中に乗せることが可能なサイズとトランスミッターを開発している。