

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)を測定が可能となっているが、CNT-Yは半田付ができないため、ラットに装着するプリント基板(15mm角)との接続方法を検討した結果、微小ナット及びネジにCNT-Yを巻き付けて接続する方法を考案した。化学物質とタンパク質の結合モデルの構築では、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。急性毒性試験における遺伝子発現変動解析については、4,4'-Dihydroxybiphenyl(4,4'-D)の肝プロファイルデータについてインフォマティクス解析を進め、独自に開発した解析プログラム Percellome Explorer により、4,4'-Dと類似した反応を惹起する227の化学物質のリストを抽出した。各化学物質において共通して発現した遺伝子群からはタンパク質変性の亢進が示唆された。急性毒性試験における行動解析については、ICRマウスを使用し非侵襲的な新規バイタルサインの候補として、ホームケージ活動量測定装置による行動様式の解析と超音波測定装置による超音波発声解析の測定を試みた。その結果、アセフェート(300 mg/kg)では投与10分後にかけて活動量の上昇が認められたが、その後急激に活動量が低下しその状態が継続した。また、ニコチン(50mg/kg)投与群において、投与10分後にかけて活動量の上昇が認められたが、その後30分後にかけて活動量の低下が認められた。無水カフェイン(300 mg/kg)投与群については投与12時間後まで活動量の亢進が認められたが、投与500分後以降は、ほぼ正常な昼夜リズムが認められた。なお、超音波測定装置による超音波発声解析を行ったが、いずれの群においても超音波発声は確認に至らず、また約20 Hzの音に対する反応も見られなかった。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、時系列データ、特にECG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)アルゴリズムを適用して、アミトリプチリン塩酸塩を投与したラットのEEGの解析を行った。その結果、MP解析は、緩やかな変化には反応しなかったが、局所的な心拍異常や、ほぼ心停止状態の心電図異常について検知し

た。また、処理速度も十分高速であり、急性毒性試験実施中のリアルタイムの致死性予測システムに実装できる可能性が高いと考えられた。脳波解析による神経毒性予測では、アミトリプチリン塩酸塩及びアトロピン硫酸塩を投与したラットの EEG について、FFT (Fast Fourier Transform) による PSD (Power Spectral Density: パワースペクトル密度) 解析と、独自に開発した解析手法である脳波バースト解析 (特許取得済) を用いて評価した。その結果、PSD 解析では、アミトリプチリン塩酸塩投与により PSD のピーク値が減弱する傾向を捉えることができた。脳波バースト解析では、アミトリプチリン塩酸塩では、低周波数帯域では Oscillation rate が増加し、高周波数帯域では Oscillation rate が減少する特徴が観察され、アトロピン硫酸塩では Oscillation rate の増加が観察され、低周波数帯域では Burst rate が減少し、高周波数帯域では Burst rate が顕著に増加する特徴が用量依存的に捕らえることができた。以上のことから、データ取得の方法については改善する必要があるものの得られたデータを用いてバイタルサインの統合的評価による致死性予測が評価法としての可能が示された。

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 (VS) 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 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 (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) を使い、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(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(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(富士フィルム和光純薬)及びアトロピン硫酸塩(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)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。

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関済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なった。モデル物質として、4,4'-Dihydroxybiphenyl (CAS No: 92-88-6、富士フィルム和光純薬)を用いた。R4 年度に 5%MC を溶媒として 0、7、20 及び 70 mg/kg の用量でマウスに投与し、mRNA サンプルについて、肝を解析した結果、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反応、酸化ストレス応答転写因子、糖質コルチコイド受容体シグナルが抽出されてきた。R5 年度は、さらにインフォマティクス解析を進めた。

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、急性経口毒性発現時に動物が呈する行動様式(移動量、移動様式、痙攣、流涎、瞬目)への影響、赤外線サーモグラフィによる体表温度の変化、超音波測定装置による超音波発声(USVs: ultrasonic vocalizations)、顔面の動き、等を計測し、非侵襲的なバイタルサイン(VS)としての利用について検討した。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)及び無水カフェイン(300 mg/kg)を用いた。

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)

VS の統合的評価による急性毒性試験の判断基準として用いる VS 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 SpO₂、

心電図などの、時系列データが想定される。本年度は、評価用 VS データとして、B-1 の手法にてイソフルラン麻酔下、平常状態及びアミトリプチリン塩酸塩 50mg/kg の投与前後のヘアレスラット(HWY/Slc)の心電図データを用いた。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 Jupyter Lab(ver. 4.0.9)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)

脳波データとして、B-1 にて取得したイソフルラン麻酔下のラットにアミトリプチリン塩酸塩及びアトロピン硫酸塩を投与したデータを用いた。脳波データは、被験物質投与前、投与後等の Section で分割し、FFT(Fast Fourier Transform)による PSD(Power Spectral Density : パワースペクトル密度)を各 Section で算出した。算出された PSD のピーク値および、ピーク周波数を定量化し、各 Section を比較することで被験物質投与による脳波信号の変化を評価した。各セクションは以下の通り;①アミトリプチリン塩酸塩 A:投与前の 4 分、B~H 投与後 4 分毎に分割されたセクション、②アトロピン硫酸塩 A:投与前の約 8 分、B:投与後 16 分、C:イソフルラン麻酔 Off。また、脳波データに対してバースト解析を実施する独自の解析手法(特許第 7138995 号)を用いることで、脳波データから神経活動信号に関する複数の解析パラメータを算出した。これらの解析パラメータは複数の周波数帯域でそれぞれ算出可能なため、被験物質に対する脳波信号の周波数依存的な変化を評価することができる。

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

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。この条件において、アミトリプチリン塩酸塩(50mg/kg)及びアトロピン硫酸塩(5 及び 50mg/kg)を腹腔内投与して EEG と ECG を測定し、得られたデータを解析ソフトウェア開発(分担研究者 相崎)と脳波解析(分担研究者 鈴木)に供した。また、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開発中である。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 との接続方法を検討した結果、微小のナットとネジを基板側に装着し、CNT-Y をネジに巻き付ける方法を採用することにした。

C-2 タンパク結合率測定

測定したいずれの化合物においても、蛋白結合率は 10%を超えることはなく非常に低かった。ニコチンの測定はできなかった。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。

C-3 急性毒性試験における遺伝子発現変動解析

4,4'-D と類似した反応を示すデータを、独自に開発した PercellomeExplorer プログラムにより Percellome データベース全体と網羅的に比較解析した。382 通りの試験データベース中、227 の肝プロファイルデータについて、4,4'-D と類似した反応を惹起する化学物質のリストが生成された。類似反応を惹

起する化学物質として、高順位のものとしてはインデゴや硫酸アンモニウムアルミニウムなどが抽出されてきたが概して類似度は低かったが、各化学物質と共通して発現する遺伝子群からは、特にタンパク質の変性が亢進が示唆されていた。この解析結果は、昨年度実施した 4,4'-D 単独の解析結果を支持するものである。

C-4 急性毒性試験における行動解析

アセフェート(300 mg/kg)投与群において、投与 10 分後にかけて活動量の上昇が認められたが、その後 30 分後にかけて 急激な活動量の低下が認められ、投与 60 分後以降から 500 分後まではほぼ活動量は認められなかった。また、ニコチン(50 mg/kg)投与群において、投与 10 分後にかけて活動量の上昇が認められたが、その後 30 分後にかけて 活動量の低下が認められたが、コントロール群と比較して、それらは低いものであった。無水カフェイン(300 mg/kg)投与群については投与 12 時間後まで活動量の亢進が認められたが、投与 500 分後以降は、ほぼ正常な昼夜リズムが認められた。なお、超音波測定装置による超音波発声解析を投与開始 4 時間後と 20 時間後に行ったが、約 20 Hz の音に対する反応性も含めて、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。

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

麻酔下・平常状態での心電図データと、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塩酸塩の投与後、経時的に測定した心電図データについて、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。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、25 秒間(サンプリング周波数 2kHz)なのでデータ点数 50,000)若しくは 2.5 秒間(同、データ点数 5,000)に切り分けた心電図データについて、昨年度の最適条件検討を元に、事前のベースライン調整や正規化を行わず、唯一、部分データのサイズ(周期的に出現するパターンのサイズ)のみを指定して MP 解析を実行した。

アミトリプチリン塩酸塩は徐々に心電図の基本波形の変化や心拍数の低下を引き起こし、最終的には T 波の増高が顕著になる。MP 解析は、全体的な波

形異常は検出していないが、局所的な心拍異常については検知することができた。この解析に使用した PC は Windows10、第 7 世代 Intel Core m3、RAM8GB、SATA-SSD という 2024 年現在においては旧型の PC 環境であるが、MP 解析の処理時間を計測したところ、データ点数 50,000 の処理に約 5 秒、データ点数 5,000 の処理に約 1 秒を要した。これは使用した PC 性能を考慮すると、十分高速であり、急性毒性試験実施中のリアルタイムの致死性予測に寄与する可能性が高い。

C-6 脳波解析による神経毒性予測(鈴木)

FFT による PSD を算出した結果、投与前の EEG ではピーク値 0.088 V²/Hz、ピーク周波数 2 Hz であった。アミトリプチリン塩酸塩投与では、ピーク周波数は 2 Hz であったが PSD のピーク値が時間経過と共に減弱する傾向が観察された。一方、アトロピン硫酸塩投与においては、ピーク周波数は 2 Hz であり、PSD のピーク値についても影響が見られなかった。

脳波データに対するバースト解析手法を用いて、神経信号であるスパイクおよび、高頻度神経活動であるバーストを検出し、それぞれの頻度(Oscillation rate、Burst rate)を算出した。脳波信号はバンドパスフィルタにより、 θ 波帯域(5-8 Hz)、 α 波帯域(8-14 Hz)、 β 波帯域(15-25 Hz)、 γ 波帯域(30-50 Hz)、high- γ 波帯域(70-150 Hz)および、150-200 Hz に分割し、各周波数帯域でバースト解析を実施した。

アミトリプチリン塩酸塩 50mg/kg 投与では、 θ 、 α 、 β 、 γ 波帯域で、投与後の Section C で Oscillation rate が増加し、Section D で減少した。High- γ 、150-200 Hz では、投与後 Section B から Oscillation rate が減少した。High- γ 波帯域で Burst rate が投与後 Section C にかけて上昇した。150-200 Hz では投与後 Section B から Burst rate が減少した。

アトロピン硫酸塩 5mg/kg 投与では、 θ 、 α 、 γ 、high- γ 波帯域で、投与後に Oscillation rate が増加した。また、 θ 、 α 、 β 波帯域で、Atropine 投与後に Burst rate が顕著に減少したのに対して、 γ 、high- γ 、150-200 Hz では Burst rate が上昇した。

アトロピン硫酸塩 50mg/kg 投与では、すべての周波数帯域で、投与後に Oscillation rate が顕著に増加した。 γ 、high- γ 、150-200 Hz では Burst rate が顕著に上昇した。

D. 考察

本研究では、CNT-Y を表面電極として用いて EEG 及び ECG を測定している。電極は体内に埋め込む方法に比較して、簡便で動物への侵襲性が極めて低いため、急性毒性試験のバイタルサイン測定においては極めて有用性が高いと考えられる。その一方で、本研究で得られる ECG は一般的な波形とは異なる。本研究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。

血漿中のタンパク結合率測定においては、何れも極めて低い値であった。血漿タンパク結合率が低い場合、血液中でより多くの非結合型が存在するため化学物質の生体影響強く表れる可能性がある。その一方で、腎臓や肝臓で迅速に代謝されるため半減期が短くなる。In vitro 急性毒性試験は、細胞毒性を評価するため、digoxin, caffeine, nicotine のように生体内で特定の受容体等に結合して生体影響を発現する物質は評価できないが、加えて血漿タンパク結合率が低いこともそのひとつの要因かもしれない。

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 の毒性発現メカニズムを明らかにした。4,4'-Dihydroxybiphenyl はラットの急性毒性試験において黄疸を呈し、投与後 2~3 日に死亡する。このような遅発性の急性毒性を引き起こす化学物質に共通して細胞のタンパク質変性が亢進することが毒性発現機序であることが示唆された。

本研究で CNT-Y をセンサーとして使用して測定した ECG ではアミトリプチリン塩酸塩による変化を明確に捉えており、MP アルゴリズムを用いた解析により

異常検知が可能であった。MP 解析は、基本波形の緩やかな変化には反応しなかったが、これは期外収縮のような局所的な不整脈を検出する設定であったためである。また、徐々に変化している状況であっても、孤立性のペース異常といった局所異常を検知できることから、MP アルゴリズムの事前学習を必要としない利点が示された。さらに、EEG もパワースペクトル密度解析及び脳波バースト解析により、その変化を用量依存的に捉えることに成功している。現在は、麻酔下でのデータであるが、覚醒時の脳波データであれば、脳波測定時の一般状態観察および、その他のバイタルサインを指標にして脳波データをラベリングすることで、活動状態に依存した脳波信号の特徴を捉えることができると考えられる。今後、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。

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必要がある。一方、本研究で得られたデータを異常検知解析に供したところ ECG、EEG 共に被検物質投与による影響を明確に検出できた。以上のことから、データ取得の方法については改善する必要があるものの、得られたデータを用いてバイタルサインの統合的評価による致死性予測が評価法としての可能が示された。

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 multi-walled 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.

Takahashi Y, Wakabayashi R, Kitajima S, Uchiyama H: Epichordal vertebral column

formation in *Xenopus laevis*. *J Morphol*, 2023; jmor.21664

Yokota S, Wakayama T, Miyaso H, Suga K, Fujinoki M, Kaneko S, Kitajima S: Reactive Blue 2 Labels Protamine in Late-Haploid Spermatids and Spermatozoa and Can Be Used for Toxicity Evaluation. *Andrologia*, 2023; 2023:7364862

Pu J, Kofuji S, Okamoto-Uchida Y, Danzaki K, Ruoxing Yu, Suzuki A, Kitajima S, Nishina H: Lethal Phenotype-Based Database Screening Identifies Ceramide as a Negative Regulator of Primitive Streak Formation. *Stem Cells*, 2023; 41(12):1142-1156
doi.org/10.1093/stmcls/sxad071

Saito H, Yokota S, Kitajima S: Immunohistochemical analysis of the vimentin filaments in Sertoli cells is a powerful tool for the prediction of spermatogenic dysfunction. *Acta Histochem.* 2023; 125(5): 152046.

Hase T, Ghosh S, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J, Kitano H, Yachie A: DTox: A Deep neural network-based in visio lens for large scale Toxicogenomics data *J Toxicol Sci.* 2024;49(3):105-115. doi: 10.2131/jts.49.105.

Sasaki T, Hara K, Tanemura K. Early-life exposure to acephate inhibits sexual development and induces testicular and ovarian toxicity in mice. *Reprod Toxicol.* 2023 Oct;121:108472. doi: 10.1016/j.reprotox.2023.108472. Epub 2023 Sep 16.

Saito H, Furukawa Y, Sasaki T, Kitajima S, Kanno J, Tanemura K. Behavioral effects of adult male mice induced by low-level acetamiprid, imidacloprid, and nicotine exposure in early-life. *Front Neurosci.* 2023 Aug 16;17:1239808.doi:10.3389/fnins.2023.1239808.

Sasaki T, Saito H, Furukawa Y, Tominaga T, Kitajima S, Kanno J, Tanemura K. 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;48(4):211-219. doi: 10.2131/jts.48.211.

Saito H, Tanemura K, Furukawa Y, Sasaki T, Kanno J, Kitajima S. Behavioral effects induced by the oral administration of acetamiprid in male mice during the postnatal lactation period or adulthood. *J Toxicol Sci.* 2023;48(4):203-210. doi: 10.2131/jts.48.203.

Sakai K, Hara K, Tanemura K. Testicular histone hyperacetylation in mice by valproic acid administration affects the next generation by changes in sperm DNA methylation. *PLoS One.* 2023 Mar 9;18(3):e0282898. doi: 10.1371/journal.pone.0282898.

Hasegawa A, Sasaki T, Islam J, Tominaga T, Nochi T, Hara K, Tanemura K. Effects of early-life tosufloxacin tosylate hydrate administration on growth rate, neurobehavior, and gut microbiota at adulthood in male mice. *J Toxicol Sci.* 2023;48(3):149-159. doi: 10.2131/jts.48.149.

五十嵐智女、西村拓也、北嶋聡：細胞培養食品に係る開発や諸外国の衛生規制に関する最近の動向，月刊「食品衛生研究」，2023；通巻885号（73巻12号），公益社団法人日本食品衛生協会（東京）

齊藤洋克、北嶋聡：化学物質を発生-発達期に曝露した際の情動認知行動影響検出，化学物質と環境：化学物質と環境との調和をめざす情報誌，184，3-6，2024

Ono R, Kuwagata M, Naruse M, Watanabe A, Takano M, Hasegawa T, Takashima H, Yoshioka Y, Ochiya T, Hirabayashi Y, Kitajima S: Extracellular vesicle small RNAs secreted from mouse amniotic fluid induced by repeated oral administration of VPA to pregnant mice. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2024; 11(1): 37-56, doi.org/10.2131/fts.11.37

菅野純、相崎健一、北嶋聡：遺伝子発現を指標とした毒性評価・予測，単行本「化学物質の複合影響

と健康リスク評価」，2024；第2章 複合曝露による毒性の評価手法 第1節，医歯薬出版（東京）[ISBN: 978-4-263-73220-5]

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－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－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）

北嶋 聡:生命科学のパラダイムシフトと毒性学の進展、第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.19)

菅野純,相崎健一,小野竜一、北嶋 聡、新型反復曝露実験による PFOA の毒性発現分析-Clofibrate の網羅的エピジェネティック情報を参照して、第 50 回日本毒性学会学術年会、(2023.6.19)

Toshime Igarashi, Mari Matsumura, Izumi Ogawa Chiori Yakawa, Takahiko Hayakawa, Miyoko Ochi, Hirokatsu Saito, Takuya Nishimura, Makiko Kuwagata, Satoshi Kitajima, Recent trends in regulatory systems in other countries regarding the safety assurance of new food products including so-called cultured meat 10th International Congress of Asian Society of Toxicology, Taiwan on 17 – 20 July 2023.

Makiko Kuwagata, Hiromasa Takashima, Ryo Haneda, Kanako Tanaka, Takuro Hasegawa, Hi-roshi Yamazaki, Satoshi Kitajima: Possible ter-atogenic effects mediated by seminal plasma ex-posed to thalidomide in rabbits. EUROTOX2023. Ljubljana, Slovenija (2023.9.10-13)

桑形麻樹子、高島宏昌、長谷川拓郎、田中加奈子、羽田亮、山崎浩史、北嶋 聡:ウサギへのサリドマイド経口投与による精漿を介する発生毒性発現リスクの解明. 第 63 回日本先天異常学会学術集会 (2023.7.28-30)

北嶋 聡:トキシコゲノミクスからみた付加体科学、第 1 回付加体科学部会研究会 (2023.9.26)

北嶋 聡:分子メカニズムに依拠した、迅速、高精度、省動物に適った毒性予測法の開発～食品トキシコゲノミクスを例に～、第 9 回 浜松毒性試験フォーラム 基調講演(2023.10.27)

北嶋 聡:職域における環境因子による健康影響～化学物質によるヒト健康への影響評価に関する試験・研究～、第 38 回日本健康科学学会学術大会 (2023.12.2)

佐々木 貴熙、長谷川 彩乃、Islam Jahidul、原 健士朗、野地 智法、種村 健太郎:有機リン系殺虫剤の発達気暴露が脳・腸へ及ぼす影響、第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.19-6.21)

加来 建之、佐々木 貴熙、原 健士朗、種村 健太郎:クロチアニジンの幼若期/思春期/成熟期暴露が及ぼす遅発行動影響とその雌雄差、第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.19-6.21)

張磨 琉亜、原 健士朗、種村 健太郎:Axdnd1 遺伝子欠損により生じる精子形成不全 ～非閉息性無精子症モデルマウスとしての有用性の検討～、第 41 回日本受精着床学会総会・学術講演会 (2023.7.27-7.28)

佐々木 貴熙、齊藤 洋克、古川 佑介、富永 貴志、北嶋 聡、菅野 純、種村 健太郎:Exposure to bisphenol A or its phenolic analogs during early life induces different types of anxiety-like behaviors after maturity in male mice、第 46 回日本神経科学大会 (2023.8.1-8.4)

川邊 悠介、中川 俊徳、山田 紗也、種村 健太郎、嶋 雄一、吉田 松生、原 健士朗:精巣成長に沿ったマウス精子幹細胞でのラミニン発現の拡大とその役割、第 116 回日本繁殖生物学会大会 (2023.9.24-9.27)

張磨 琉亜、金子 尚志、原 健士朗、斎藤 芳郎、種村 健太郎:セレノプロテイン P 翻訳抑制因子:ccdc152 による精子形成への影響解析、第 116 回日本繁殖生物学会大会 (2023.9.24-9.27)

夏目 やよい、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純:PPAR alpha リガンドが惹起する遺伝子発現プロファイルの比較解析. 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.19)

山田 隆志、大畑 秀雄、古濱 彩子、杉山 圭一、本間 正充、瀬川 勝智、斎藤 嘉朗、相崎 健一、北嶋 聡、広瀬 明彦、増村 健一:行政における化学物質リスク評価を支援する AI を用いた安全性予測

プラットフォームの開発. 第 50 回日本毒性学会学術
年会(2023.6.21)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 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

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし