

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-(22KD1004)

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 毒性部 室長

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

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】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、315MHzの帯域を用いた動物(ヘアレスラット)に装着可能なトランスミッターを開発し、覚醒下、非拘束状態にて心電図(ECG)及び脳波(EEG)の測定が可能となった。このトランスミッターを用いて、アミトリプチリン塩酸塩、アトロピン硫酸塩、ニコチン、カフェイン、ハロペリドールを投与した際の影響を測定した。化学物質のタンパク結合率測定では、in vitro 急性毒性試験代替法において予測性の低い 6 種類の検体について、平衡透析法によりラット血漿タンパク結合率を測定したが何れも極めて低い結合率であり測定困難な物質であることが明らかとなった。

バイタルサインの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。現在は商業的に入手可能な測定装置と独自開発のセンサーとトランスミッターを混在させて使用しているが、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。本研究を推進することにより、ヒトの安全性確保、動物福祉の充足、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。

A. 研究目的

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】VS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 VS を取得、【3】血漿タンパク結合率測定、【4】AI による VS 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、N-フェニルチオ尿素、ジスルホトン、シアニ化カリウム、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、L-アドレナリン)に加えて、先行研究で使用され背景データがあるアセフェート、アミトリプチリン塩酸塩についても検討した。

本分担研究では、バイタルサイン測定に使用するセンサー並びにトランスミッターの開発を行った。

B. 研究方法

バイタルサインセンサーの開発

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た。CNT ヤーン(CNT-Y)は動物の皮膚に縫合針(外科強角針 No.00 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(雌性ヘアレスラット、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 750TM 個別換気式飼育装置 特型)を使用した。飼育条件は、温度; $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度; $55 \pm 5\%$ 、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。

麻酔装置(RC2+Anesthesia system, VetEquip, CA, US)を用い、イソフルラン麻酔下でヘアレスラットの皮膚 4 箇所(縫合針を用いて CNT-Y を結紮した。CNT-Y を装着する前には、ラットの頭部から背部の皮膚を 70%エタノールで清拭した後、皮膚の保護と絶縁を目的として皮膚被膜剤(3M™ キャビロン™ 非アルコール性皮膜)を塗布した。更にトランスミッターの本体を装着する背部には粘着性透明傷被覆剤(3M™ テガダーム™ トランスペアレント ドレッシング)を貼付した。心電図(ECG)測定用電極として 2 箇所(左耳介基部、背部)、脳波(EEG)測定用電極として 2 箇所(ブレグマ、右耳介基部)を用いた(図 1A)。

CNT-Y 電極は、独自に開発したトランスミッターに接続した。トランスミッターのサイズはラットの背中に装着できるサイズであり、315MHzの帯域を用い Pulse Position Modulation(PPM)方式で信号を送信する。トランスミッター内部にて低インピーダンス化を行い各信号の増幅率は、EEG は 2,000 倍、ECG では 1,000 倍とした。電源は CR2032 バッテリーを用い約 4 時間安定した動作が可能である(図 1B)。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 2 kHz とした。

EEG と ECG の測定は、イソフルラン麻酔から覚醒に至るまで継続して実施した。十分に覚醒したと判断できる状態(約 30 分後)で、アミトリプチリン塩酸塩、アトロピン硫酸塩、ニコチン、カフェイン、ハロペリドール(何れも富士フイルム和光純薬)を腹腔内投与した。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 タンパク結合率測定

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て解析を行っている。*in vitro*急性毒性試験において予測性が低かった化学物質のうち、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測定を試みた。化合物の濃度は 10 または 1000 nmol/L とし、平衡透析法にて行い、測定は LC-MS 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)」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から覚醒下にて、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 EEG と ECG が得られた。この条件において、各種化学物質を投与して EEG と ECG への影響を調べた。代表例としてアミトリプチリン塩酸塩(50mg/kg、図 2)及びニコチン(1mg/kg、図 3)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。

動物の体動によって特に EEG のベースラインが変動した。詳細な観察により、EEG のベースライン変動

は、アンテナの揺れが原因であり、電極である CNT-Y と接触している皮膚の接触面の変化に起因したものではないことが明らかとなった。一方、ECG は体動によるベースラインの変動は見られないが、非常に大きな一過性のスパイク信号が観察された(C-5 項、図 6 参照)。また、時折、ECG の Q-R 振幅が小さくなることが観察されたが、比較的速やかに回復する場合もあるため、化学物質投与の影響ではないと考えられる。興奮を引き起こすカフェインで激しい動きによって安定したデータを取得することが困難であった。

現在、より小型のトランスミッターを開発中である(図 4)。新型のトランスミッターでは、アンテナを不要にして通信を行う仕様となっているため、体動によるノイズの混入を抑制できることが期待される。

C-2 タンパク結合率測定

何れの化合物においても非常に低い蛋白結合率であり、ジゴキシンでは 3~7%、カフェインでは 6%程度、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、ニコチンでは濃度測定ができなかった(バッチ不成立)。

D. 考察

今年度は、独自に開発したトランスミッターを用い、動物を覚醒下、非拘束状態で EEG と ECG を測定することが可能となった。

一般に安全性薬理試験等で使用されているテレメトリーシステムでは、動物の体内にトランスミッターを埋め込み、磁気カップリングを用いたデータ送信が用いられている。磁場は急速に減衰するため、送信機と受信機の距離が数 cm 以内である必要がある。腹部に埋め込んだトランスミッターの場合、受信機をケージの底に設定することでこの問題は解決されている。

本研究では、急性毒性試験での使用を念頭に置き、簡便で動物への侵襲性が低い装置を開発するため CNT-Y を表面電極として用い、トランスミッターは電極等を動物が嚙らないように背部に装着する必要がある。そのため、磁気カップリングでは十分に近い伝達距離をとれないため、トランスミッターは電磁波を

用いる無線通信方法を選択した。315MHzの帯域では、伝達効率のよいアンテナ長が約 24cm 必要となる。EEG のベースライン変動、ECG のスパイクノイズは体動によってアンテナが揺れることが原因であった。通常、飼育ケージ内のラットは、激しく動き回ることがないため、ノイズが少ない状況のデータを選ぶことで解析が可能であった。しかしながら、カフェインのように興奮性の剤の場合にはこの限りではなく、激しい動きによって安定したデータを取得することが困難であった。そのため、現在は通信方式を Modified Pulse Position Modulation 方式とし、Low power Bluetooth に加えて、電力消費量を低減する独自の方法を組み込んだ新型トランスミッターを開発中である。現行型と同等 (CR2032) のバッテリーで連続 30 時間程度の稼働を目標にしている。

その一方で、覚醒下でのデータ取得で最も懸念された CNT-Y 電極と皮膚の接触部分が体動で動くことによる信号への影響は非常に少ないように見受けられた。体表面電極の問題点は当該研究分野において指摘されており、特に、皮膚のインピーダンスと広がり抵抗について 1970 年代から 80 年代にかけて議論がされているが、根本的な解決には至っていないようである。CNT-Y は現在汎用されている金属電極とは異なり分極しないことを特徴とするが、それ以外にも表面電極として有用な特性があるのかもしれない。

EEG に関して、現在、動物を対象とした実験では脳内に電極を刺入して測定していることが一般的であるため、表面電極で測定している本研究と直接比較することはできないが、CNT-Y 表面電極により麻酔下と覚醒下での違い、化合物投与後の変化が明確に捉えられている。特に、ニコチンを投与した際の波形変化は顕著であり、信号の振幅も大きい。EEG は大脳皮質の錐体細胞の電位変化であるとされているが、それ以外にも筋電、心電図、脈波、呼吸、眼球運動によるアーチファクトが混入することが知られている。本研究では、動物の一般状態観察も並行して行っており、ニコチンで見られた EEG 波形観察時では、動物の激しい動きは観察されていない。そのため、本研究の実験条件においてこれらのアーチファクトが

影響しているか否かは不明であり、更なる観察・解析が必要である。その一方で、EEG に混入するアーチファクトは動物の状態を伝える情報とも捉えられる。急性毒性試験では、これらの情報もうまく活用することで、動物の状態把握の深化につながることを期待される。

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 を表面電極として独自開発のトランスミッターを通して、覚醒下、非拘束のヘアレスラットから ECG 及び EEG を測定が可能となった。脳及び心臓に作用する各種モデル化合物を投与し、その影響を捉えることに成功した。現在は商業的に入手可能な測定装置と独自開発のセンサーとトランスミッターを混在させて使用しているが、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。

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、送信機を埋植する手術と術後の回復期間期間、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、費用と時間を要するため、一般化学物質の分類と表示に利用される急性毒性への導入は難しい。本研究を推進することにより、ヒトの安全性確保、動物福祉の充足、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

Yuhji Taquahashi, Ken-ich Aisaki, Koichi Morita, Kousuke Suga, Satoshi Kitajima: Application of the matrix profile algorithm for detecting abnormalities in rat electrocardiograms. Fundam. Toxicol. Sci. 2024; 11(6): 289-296. [doi.org/10.2131/fts.11.289]

Makiko Kuwagata, Yuko Doi, Hirokatsu Saito,

Mariko Tsurumoto, Toshime Igarashi, Takuya Nishimura, Yuhji Taquahashi, Yoko Hirabayashi, Satoshi Kitajima: A 90-day repeated oral dose toxicity study of p-cymene in rats. Fundam. Toxicol. Sci. 2024; 11(4): 169-181.[doi.org/10.2131/fts.11.169]

2. 学会発表

Taquahashi Y, Aisaki K, Morita K, Kousuke Suga K, Tsuji M, Kitajima S, Application of Matrix Profile Algorithm for Detecting Abnormalities in Waveform Data with Repetitive Patterns to Electrocardiograms, 第 51 回日本毒性学会学術年会(2024.7.4)福岡

北嶋 聡, 高橋 祐次, 相崎 健一, 菅野 純: フグ毒テトロドトキシンを単回経口投与した際のマウス肝及び海馬 Percellome トキシコゲノミクス. 第 51 回日本毒性学会学術年会(2024.7.3)

Yuhji Taquahashi, Koichi Morita, Kousuke Suga, Masaki Tsuji, Makiko Kuwagata, Ken-ich Aisaki, Satoshi Kitajima, Development of a telemetry unit for measuring rat biopotential: easy to attach, less invasive by using carbon nanotube yarn as a surface electrode, SOT 2025 64th Annual Meeting in Orlando, Florida 2025.3.18,Poster

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

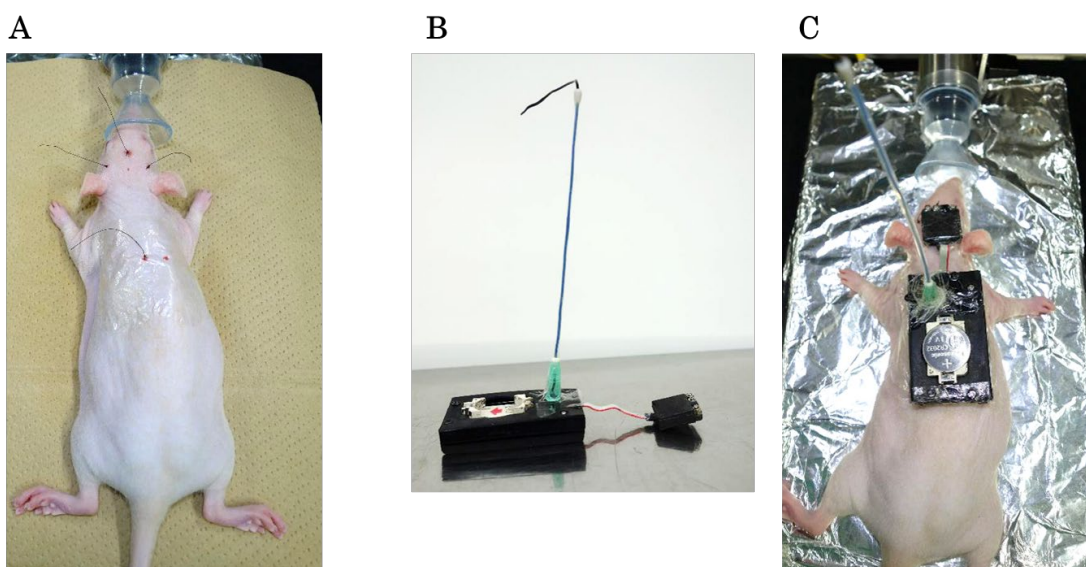
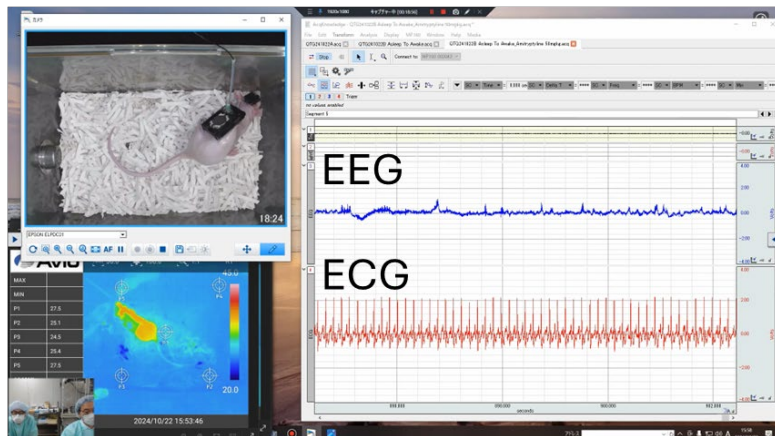


図 1: 表面電極 CNT-Y の装着とトランスミッター

A: 心電図 (ECG) 測定用電極として 2 箇所 (左耳介基部、背部)、脳波 (EEG) 測定用電極として 2 箇所 (ブレグマ、右耳介基部) に CNT-Y を結紮した。B: 独自に開発したトランスミッター。アンテナ (約 24cm) と電源部分と頭部用のパートを分割して作製し導線にて接続している。C: 動物にトランスミッターを装着した動物の様子。

A



B

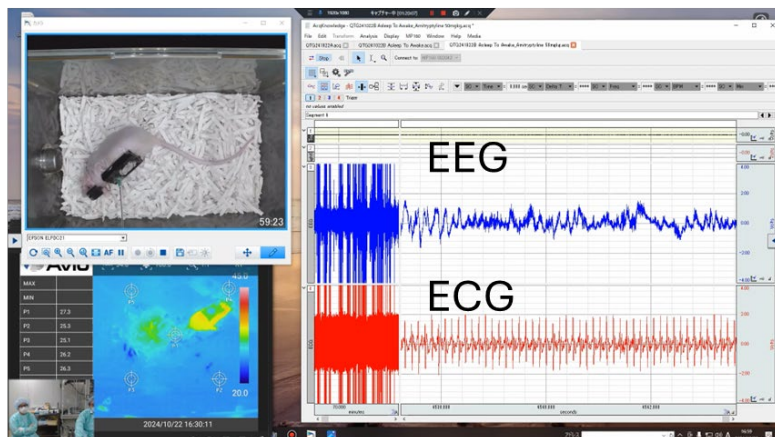


図 2: アミトリプチリン塩酸塩投与前後の EEG、ECG、サーモグラフィ

A: 覚醒下、非拘束状態の EEG (青線) と ECG (赤線) 波形。B: アミトリプチリン塩酸塩 50mg/kg 投与後の EEG と ECG 波形。EEG は振幅が大きくなり、ECG は脈拍数が増加した。動物の行動は可視光とサーモグラフィにて観察した。

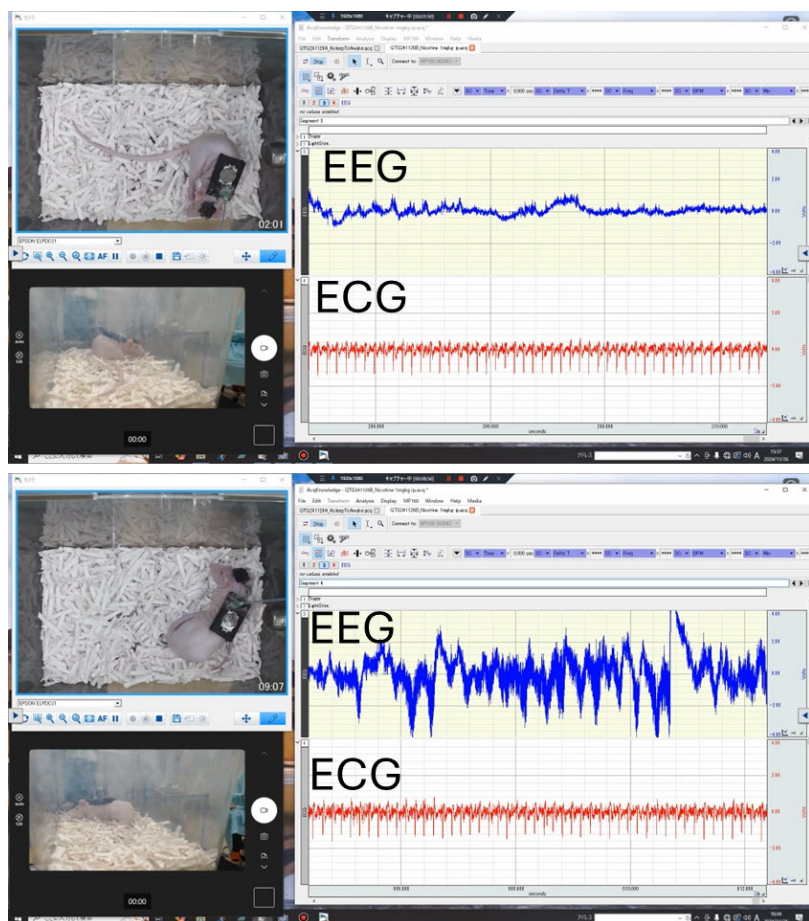


図 3: ニコチン投与前後の EEG、ECG、サーモグラフィ

A: 覚醒下、非拘束状態の EEG (青線) と ECG (赤線) 波形。B: ニコチン 1 mg/kg 投与後の EEG と ECG 波形。動物はうずくまって動きを停止しているが、EEG の振幅は極めて大きくなっている。ECG は脈拍数が増加した。

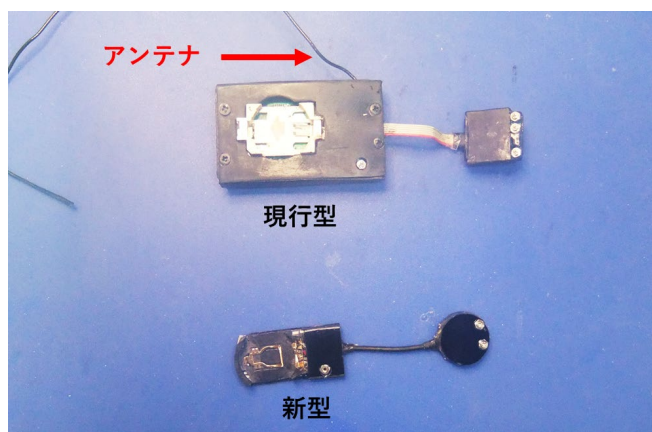


図 4: 独自開発のトランスミッター

上段が現行型のトランスミッターであり、約 24cm アンテナが必要である。下段は現在開発中のトランスミッターで、サイズが小さくなりアンテナも不要となる。現行型と同等 (CR2032) のバッテリーで連続 30 時間程度の

稼働が可能であることを確認した。