

令和6年度

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

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)

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 室長

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(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 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】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、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。

急性毒性試験における遺伝子発現変動解析については、C57BL/6J マウスを用い、フグ毒として知られるテトロドトキシン(TTX)の毒性のエンドポイントとして欧州食品安全機関(EFSA)で利用されている apathy(無関心・無気力状態)の誘発メカニズムについて、海馬を対象に網羅的遺伝子発現解析を進めた。独自に開発した Percellome データベースを活用した解析により、TTX と類似した遺伝子発現変動を引き起こす物質としてデヒドロ酢酸ナトリウムやサリドマイドなどが特定された。さらに、軸索輸送に関与していることが知られハンチントン病(HD)の病因遺伝子であるハンチンチンタンパク質(HTT)が抽出されたことから、apathy に HTT シグナルネットワークの関与が示唆された。

急性毒性試験における行動解析について、聴覚性プレパルス驚愕反応抑制試験装置(プレパルス・インヒビション)を用いた解析を行った。雌 ICR マウスを使用し、アセフェート(300 mg/kg)、無水カフェイン(300 mg/kg)、ニコチン(50 mg/kg)、を選択し、急性経口毒性発現時のプレパルス・インヒビション(軽減率)の経時的影響を解析した。

VSの統合的解析方法(ソフトウェア)の開発においては、異常値の検出に有効性を確認した Matrix Profile アルゴリズム(MP)を組み込んだ GUI ベースのアプリケーションソフトウェアを作成した。アミトリプチリン塩酸塩とニコチンを投与した ECG データを対象として性能評価を行った結果、急性毒性試験におけるリアルタイム解析の実用化や、機械学習用の ECG 異常波の自動抽出手段としての利用などの可能性が示された。MP 解析と、先行研究で有用性を示した機械学習モデルと組み合わせれば、より効率的かつ網羅的な評価が可能になると考えられた。

EEG 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ニコチンを投与したラットの EEG について、

Fast Fourier Transform による PSD (Power Spectral Density) 解析と、独自に開発した解析手法である EEG バースト解析 (特許取得済) を用いて評価した。アミトリプチリン塩酸塩の PSD 解析では 5 mg/kg は個体差が大きく、投与前後でピーク値やピーク周波数の変化が異なった。50 mg/kg ではピーク値の変化は見られなかったが、ピーク周波数が 1 Hz から 2 Hz にシフトした。脳波バースト解析では、 β 波帯域以上で Oscillation rate および Burst rate が増加する傾向が見られたが、50 mg/kg では変化が軽微であった。ニコチンの PSD 解析では 1 mg/kg および 5 mg/kg において PSD のピーク値やピーク周波数に顕著な変化は観察されなかった。脳波バースト解析では、1 mg/kg では変化が軽微であるが、5 mg/kg では θ 、 α 波帯域を除き、Oscillation rate および Burst rate が増加した。また、イソフルラン麻酔による影響も同様に検討した結果、麻酔中止直後に PSD のピーク値が約 1.5 倍に増加し、その後約 3 分で元の状態に戻ることも、また、すべての周波数帯域で Oscillation rate は減少する一方で、 θ 、 α 、 β 波帯域で Burst rate が急激に増加することが明らかとなり、麻酔中止後の脳波データ解析では一定の待機時間が重要であることが示された。

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】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) から選択した。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) を用いた。

B. 研究方法

B-1 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) から作成された Carbon nanotube yarn (CNT-Y, Siddarmark LLC) を用い、心電波形 (ECG) 及び脳波 (EEG) を取得する検討を行った。CNT-Y は動物の皮膚に縫合針を用い単結紮により皮膚に装着した。動物は、ヘアレスラット (HWY/Slc) を使用した。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

結紮し電位を測定した。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。トランスミッターからの信号は、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。最終的に信号は、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。

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 (何れも富士フィルム和光純薬) 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った。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。*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。

B-3 急性毒性試験における遺伝子発現変動解析

モデル物質として、フグ毒として知られるテトロドトキシン (TTX) を用いた。動物は C57BL/6J マウスを用いた。金属製胃ゾンデ (KN-348、夏目製作所) を用

いて強制経口投与し、投与後の時間 4 点 (投与 2, 4, 8 及び 24 時間後)、投与用量各 300、100、30、0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (溶媒: 0.1% 酢酸を含む 0.5% メチルセルロース液) の 4 点からなる計 16 群、各群 3 匹、合計 48 匹の海馬の mRNA を採取し、GeneChip MOE430v2 (affymetrix 社) を用い、約 45,000 プローブセット (ps) の遺伝子発現の絶対量を Percellome 法により得て網羅的解析をおこなった。

B-4 急性毒性試験における行動解析

急性毒性試験における行動解析について、聴覚性プレパルス驚愕反応抑制試験装置 (プレパルス・インヒビション) を用いた解析を行った。雌 ICR マウスを使用し、アセフェート (300 mg/kg)、無水カフェイン (300 mg/kg)、ニコチン (50mg/kg)、を選択し、急性経口毒性発現時のプレパルス・インヒビション (軽減率) の経時的影響 (2 時間後、及び 24 時間後) を解析した。

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

評価用 VS データとして、本研究班独自開発の CNT-Y 電極とトランスミッターにて覚醒下・非拘束状態における雌性ヘアレスラットから取得した ECG を対象として検討を行った。モデル化合物としてアミトリプチリン塩酸塩 (50mg/kg) 及びニコチン (1 mg/kg、5 mg/kg) を投与し、投与前後の ECG 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)、GUI ライブラリとして TKinter (ver.8.6.9) 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

CNT-Y を用いて計測された、雌性ヘアレスラット (HWY/Slc) の脳波測定データの解析を実施した。モデル化合物としてアミトリプチリン塩酸塩 (5、50 mg/kg) および、ニコチン (1、5 mg/kg) を使用し、ラットへの投与前後の脳波データを用いた。

脳波データは、検体投与前、投与後および麻酔下、覚醒下等の 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 を比較することで検体投与および、麻酔の有無による脳波信号の変化を評価した。

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、化学物質に対する脳波信号の周波数依存的な変化を評価できる。

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) 及びニコチン (1mg/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。

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った。一方、ECG は体動によるベースラインが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。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た。特に、興奮を引き起こすカフェインでは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。

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)。

C-3 急性毒性試験における遺伝子発現変動解析

海馬において、比較的多くの遺伝子の発現変動が認められ (121ps の増加、減少はゼロ)、解析の結果、ストレス応答やサイトカインに係るシグナルネットワークが抽出された。具体的には、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、in silico プロモーター解析を、IPA における Upstream Analysis を用いて検討した結果、ストレス応答に絡むデキサメタゾン、あるいはサイトカインである TNF が調節因子として抽出されてきた。また、フォルスコリンとイソブチルメチルキサンチンが抽出され、細胞内 cAMP レベルの増加が示唆された。興味深いことに、海馬での上流解析において、軸索輸送に関与していることが知られハンチントン病 (HD) の病因遺伝子であるが、正確な機能は未解明であるハンチンチンタンパク質 (HTT) が抽出された。

C-4 急性毒性試験における行動解析

まず、80db、85db、90db、95db、100db、105db、110dにて驚愕反応量を調べたところ、コントロール群と比較して、投与 2 時間後のアセフェート投与群とニコチン投与群に驚愕反応量の抑制が確認された。一方で、無水カフェイン投与群に驚愕反応量の増強傾向が認められた。また、投与 24 時間後ではアセフェート投与群とニコチン投与群に驚愕反応量抑制の緩和が確認された。一方で、無水カフェイン投与群に驚愕反応量の抑制傾向が認められた。

80db、85db、90db のプレパルスに対して、120db のパルスを用いたプレパルス・インヒビション(軽減率)については、コントロール群と比較して、投与 2 時間後および投与 24 時間後にアセフェート投与群とニコチン投与群に増強傾向が認められたが、無水カフェイン投与群には顕著な差異は認められなかった。

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

急性毒性試験において、心電図などの測定データをリアルタイムに現場で処理し、判断材料とするためには、自動若しくは必要最低限の操作のみで実行可能な解析評価システムが必要である。昨年度までに有効性を確認した Matrix Profile アルゴリズム(MP)はライブラリとして提供されているため、実行にはデータに応じてスクリプトを書き換えるためのキーボード入力等のやや煩雑な操作が必要だった。

そこで今年度は MP を組み込んだグラフィカルユーザーインターフェイススペースのアプリケーションソフトウェア ECG_matrixprofile_analysis.py を開発した。試験開始前に各パラメータを設定しておけば、ECG データファイルをドラッグ&ドラッグだけ(ダイアログボックスでも選択可能)で MP 解析が実行され、解析図が表示される。設定可能なパラメータには、ECG データファイルの様式に関するもの、解析範囲に関するもの、MP 解析パラメータ、出力画像に関するもの、を用意した。また本アプリ

は Python 言語で記述されているため、基本的にマルチプラットフォーム対応となっている。また主な処理が MP 計算であるため、一般的な性能のコンピュータでも十分に動作可能であった。

ECG_matrixprofile_analysis.py の動作確認を兼ね、今年度新たに測定した ECG データ(投与前及びアミトリプチリン塩酸塩(50mg/kg)投与後、及びニコチン(1mg/kg, 5mg/kg)投与後)を用いて MP 解析を実施した。今年度のデータは覚醒下、非拘束状態で取得された ECG であるため、全体的に体動などによるノイズが含まれている。このため、MP 解析はノイズのない 5000 データポイント区間(2.5 秒間)を選んで実施した。

これらは事前のノイズ除去やベースライン調整・正規化を一切行わず、解析単位区間のサイズ(周期的に出現するパターンのサイズ)のみを指定して MP 解析を実行したものであり、もちろん機械学習と異なりラベル付加や事前学習も行っていない。また ECG_matrixprofile_analysis.py による MP 解析の操作性や処理速度を、昨年度と同じ汎用 PC (Windows10、第 7 世代 Intel Core m3、RAM8GB、SATA-SSD)にて評価したところ、昨年度、Jupyter lab 上で MP 解析スクリプトを実行した条件に比べて処理速度は同等のまま、操作性は明らかに向上しており、急性毒性試験実施中のリアルタイムの致死性予測に利用しうる性能を示した。

C-6 脳波解析による神経毒性予測

(1)FFT の PSD による脳波解析:

アミトリプチリン塩酸塩を 5 mg/kg 投与した実験成績 2 例を解析した。その結果、1 例目の動物では、投与前ではピーク値 0.118 V²/Hz、ピーク周波数 1 Hz、投与後ではピーク値 0.090 V²/Hz、ピーク周波数 1 Hz であった。2 例目の動物では、投与前ではピーク値 0.069 V²/Hz、ピーク周波数 3 Hz、投与後ではピーク値 0.079 V²/Hz、ピーク周波数 2 Hz であった。

同様の条件で実施された実験ではあるが、投与前の時点で動物 1 と動物 2 の PSD は異なる特徴が観察され、動物の個体差が反映されることが判明した。各動物で化学物質投与による変化を評価した場合にも、動物 1 ではピーク値が減少するのに対して、動物 2 ではピーク値が増加し、共通の変化が得られなかったことから、覚醒下での脳波測定では動物の行動等による影響の考慮が必要であることが示唆された。アミトリプチリン塩酸塩 50 mg/kg 試験では、投与前後でピーク値は変化しなかったが、ピーク周波数が 1 Hz から 2 Hz にシフトした。

ニコチン 1 mg/kg および 5 mg/kg を投与した脳波波形を解析した。その結果、1 mg/kg では投与前はピーク値 0.054 V2/Hz、ピーク周波数 2 Hz、投与後ではピーク値 0.047 V2/Hz、ピーク周波数 2 Hz であった。5 mg/kg では、投与前ではピーク値 0.053 V2/Hz、ピーク周波数 2 Hz、投与後ではピーク値 0.055 V2/Hz、ピーク周波数 2 Hz であった。ニコチンの投与では PSD のピーク値および、ピーク周波数に顕著な変化は観察されなかった。

イソフルラン麻酔下および、それに続く麻酔中止後の脳波波形について解析を行った。麻酔下ではピーク値 0.060 V2/Hz、ピーク周波数 2 Hz、麻酔中止後 0-1 min ではピーク値 0.089 V2/Hz、ピーク周波数 2 Hz、麻酔中止後 1-2 min ではピーク値 0.084 V2/Hz、ピーク周波数 2 Hz、麻酔中止後 2-3 min ではピーク値 0.056 V2/Hz、ピーク周波数 3 Hz であった。麻酔下と比較して麻酔中止直後に PSD のピーク値が約 1.5 倍に増加し、約 3 分後には麻酔下と同程度に戻ったことから、覚醒下の脳波測定では麻酔中止による影響の混入を避けるために、麻酔中止後から一定時間経過してからの測定が必要であることが示唆された。

(2) 脳波データのバースト解析:

脳波データに対するバースト解析手法(特許第 7138995 号)を用いて、神経信号であるオシレーショ

ンおよび、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 5 mg/kg および 50 mg/kg 投与時のバースト解析の結果、個体差はあるが、アミトリプチリン塩酸塩投与により、とくに β 波帯域以上で Oscillation rate、Burst rate ともに増加する傾向が観察された。50 mg/kg では 5 mg/kg と比較して変化は軽微であった。

ニコチン 1 mg/kg および 5 mg/kg 投与時のバースト解析の結果、1 mg/kg では Oscillation rate、Burst rate ともに変化が軽微であったのに対して、5 mg/kg では θ 、 α 波帯域の Burst rate を除いて、Oscillation rate、Burst rate ともに増加する傾向が観察された。

麻酔下および、それに続く麻酔中止後の脳波波形に対するバースト解析の結果、麻酔中止後から時間経過と共にすべての周波数帯域で Oscillation rate が減少する傾向が観察された。一方で、Burst rate は θ 、 α 、 β 波帯域で急激に増加した。

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。

急性毒性試験における遺伝子発現変動解析では TTX の単回経口投与により、マウス海馬においてストレス応答や炎症、及び、細胞内 cAMP レベルの増加が示唆され、後者では海馬における記憶の長期増強や非選択的なニューロン活性化が起きている可能性が示唆された。しかし、チャンネル分子など、神経伝達に絡むシグナル分子の発現変動は目立たなかった。そこでさらに詳細な解析を行うために、Percellome データベース(150 化学物質)について、海馬において TTX の場合と類似した遺伝子発現変動を惹起する物質を探索したところ、デヒドロ酢酸ナトリウム、サリドマイド、クロルピリホスなどが挙がってきた。これらについてもそれぞれ上流解析をしたところ、興味深いことに、これらに共通して、ストレス応答やサ

イトカインに関わるものに加え HTT が抽出されてきた。

欧州食品安全機関(EFSA)は、海産二枚貝における TTX のリスク評価を実施し、雌性 Swiss マウスを用いた急性経口試験の結果に基づき、最も感度の高いエンドポイントとして「apathy(無気力状態)」が選択されている。HTT はハンチントン病の原因となるタンパク質であるが、ハンチントン病における apathy は時間とともに増加し、臨床転帰の悪化と関連しているとの報告があることから、TTX による apathy 誘発に、HTT シグナルネットワークが関与する可能性が示唆された。

バイタルサインの統合的解析方法(ソフトウェア)の開発では、昨年度と同様、MP 解析を適用して、アミトリプチリン塩酸塩及びニコチン投与による ECG 異常を補足することが出来た。これは機械学習と異なり、MP は原理的にラベル付けたデータによる事前学習を必要としないことを実証しており、MP によって検出した異常波データを収集し、機械学習に利用できる可能性をも示している。今回、急性毒性試験中のリアルタイム解析を想定し、MP 解析を組み込んだアプリケーションソフトウェアである ECG_matrixprofile_analysis.py を in house 開発した。スクリプトを書き換えつつ実行していた昨年度までと異なり、試験実施中でも利用可能なほどに操作性は格段に向上したが、現状は ECG データファイルを、マウスを使ってドラッグ&ドロップすることが MP 解析の実行トリガーになっているが、ECG は経時的データであり、データポイント数の追加量は計測周期で予測できることから、将来的にはアプリケーションソフトウェアにタイマー機能を追加し、新たに追加記録された ECG データを定期的に自動解析する、等の機能強化を検討している。

脳波解析による神経毒性予測では、FFT の PSD による脳波解析について、各モデル化合物の影響を検討した。その結果、動物の個体差が FFT の PSD に反映されることが示唆された。また、アミトリプチリン塩酸塩に対する応答に共通の特徴が得られなかったことから、覚醒下における脳波測定では動物の行

動等による影響を考慮した評価が必要であることが示唆された。

今年度は、トランスミッターにより覚醒下、非拘束状態で EEG 測定が可能であることから、麻酔下および、覚醒下における脳波解析への影響を検討した。その結果、イソフルラン麻酔中止直後に FFT の PSD が増加すること、および、麻酔中止後に Oscillation rate が減少し、Burst rate が急激に増加することが判明した。麻酔時と覚醒時で PSD のピーク値および、バースト解析の結果に差異があったことから、動物の状態を考慮した評価が必要であることが示唆された。

上記のような課題が示唆された一方で、検体投与による脳波信号の変化については、アミトリプチリン塩酸塩では β 波帯域以上で Oscillation rate、Burst rate ともに増加すること、ニコチンでは Oscillation rate、Burst rate の増加が濃度依存的に観察されたことから、検体投与による脳波信号の変化を捉えることが可能であった。

本研究により、麻酔下ではなく覚醒時の脳波測定においても化合物投与による脳波信号の変化を捉えることが可能であることが示された。覚醒下における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上記課題が解決されると共に、活動状態に依存した脳波信号の評価が可能となる。

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。

本研究で得られたデータのうち ECG については MP アルゴリズムによるリアルタイム解析による異常検知プログラムを独自に開発した。EEG に関しては、データ取得の際の個体差について検討する必要があるものの、FFT の PSD 解析とバースト解析により、モデ

ル化合物の特徴を捉えることに成功した。以上のことから、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。

急性毒性試験における遺伝子発現変動解析については、apathy はハンチントン病で最もよくみられる神経行動学的症状の 1 つとする論文から、TTX による apathy 誘発に、HTT シグナルネットワークが関与する可能性が示唆されたが、apathy 誘発と HTT の具体的なシグナルネットワークは不明であり、HTT シグナルのさらなる機能解析が待たれる。また人への外挿性を考慮すると Apathy のような一般状態の変化と脳波などの測定により Apathy の把握の客観化をする必要があるものと考えられた。

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]

Kiyoshi Hashimoto, Hiroshi Arakawa, Rikako Imamura, Takuya Nishimura, Satoshi Kitajima, Takuya Sato, Kazuhide Makiyama, Takehiko Ogawa, Satoshi Yokota: A novel alternative method for long-term evaluation of male reproductive toxicity and its recovery using a pre-pubertal mouse testis organ culture system. *J Appl. Toxicol.* 2024; 44(5): 784-793. [doi.org/10.1002/jat.4584]

Hidenobu Miyaso, Satoshi Yokota, Kousuke Suga, Yui Hashimoto, Céline Kouno, Kenta Nagahori, Masahiro Itoh, Satoshi Kitajima: Histological differences between the central and peripheral areas of the testes of busulfan-administered mice. *J Toxicol Sci.* 2024; 49(4): 139-149. [doi.org/10.2131/jts.49.139]

Ryuichi Ono, Makiko Kuwagata, Mie Naruse, Akihito Watanabe, Masao Takano, Takuro Hasegawa, Hiromasa Takashima, Yusuke Yoshioka, Takahiro Ochiya, Yoko Hirabayashi, Satoshi Kitajima: 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]

Takeshi Hase, Samik Ghosh, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Hiroaki Kitano, Ayako Yachie: DTox: A deep neural network-based in visio lens for large scale toxicogenomics data. *J Toxicol Sci.* 2024; 49(3): 105-115. [doi.org/10.2131/jts.49.105]

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]

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

Harima R, Sasaki T, Kaneko T, Aso F, Takashima H, Toyama T, Hara K, Tanemura K, Saito Y. Ccdc152 is not necessary for male fertility, but contributes to maintaining sperm morphology. *J Reprod Dev.* 2024 Dec 13;70(6):396-404.

Yanai R, Mitani TT, Susaki EA, Minamihisamatsu T, Shimojo M, Saito Y, Mizuma H, Nitta N, Kaneda D,

Hashizume Y, Matsumoto G, Tanemura K, Zhang MR, Higuchi M, Ueda HR, Sahara N. A novel tauopathy model mimicking molecular and spatial aspects of human tau pathology. *Brain Commun.* 2024 Sep 19;6(5):fcae326.

Sasaki T, Islam J, Hara K, Nochi T, Tanemura K. Male mice are susceptible to brain dysfunction induced by early-life acephate exposure. *Front Neurosci.* 2024 Jul 10;18: 1404009.

Kaku K, Sasaki T, Hara K, Tanemura K. A single dose of clothianidin exposure induces varying sex-specific behavioral changes in adulthood depending on the developmental stage of its administration. *J Toxicol Sci.* 2024;49(7):301-311.

Y. Ishibashi, N Nagafuku, S Kimura, X Han, I Suzuki, Development of an evaluation method for addictive compounds based on electrical activity of human iPSC cell-derived dopaminergic neurons using microelectrode array, *Addiction Biology.* 29:e13443, 2024

X. Han, N. Matsuda, M. Yamanaka, I Suzuki, Development of a Novel Microphysiological System for Peripheral Neurotoxicity Prediction Using Human iPSC-Derived Neurons with Morphological Deep Learning, *Toxics*, 12(11), 809, 2024

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)

五十嵐智女、安彦行人、小野竜一、高橋 雄、桑形麻樹子、北嶋 聡:ゲノム編集によるノックインマウス作製時に生じた、オンターゲット部位の多様な変異とその次世代伝達、第 71 回日本実験動物学会総会、京都、2024 年 5 月 29 日、ポスター

横田 理 , 宮宗秀伸 , 菅 康佑, 兼子 智, 若山友彦 , 北嶋 聡:Reactive blue 2 の雄性生殖毒性評価への適用、第 51 回日本毒性学会学術年会、福岡、2024 年 7 月 5 日、口頭

小野竜一、桑形麻樹子、成瀬美衣、渡邊章仁、鷹野正生、長谷川拓郎、高島宏昌、吉岡祐亮、落谷孝広、平林容子、北嶋 聡:バルプロ酸(VPA)の妊娠マウスへの反復投与により誘導される羊水由来の細胞外小胞 Small RNA、第 51 回日本毒性学会学術年会、福岡、2024 年 7 月 5 日、口頭

齊藤洋克 , 横田 理 , 北嶋 聡:セルトリ細胞におけるビメンチンの免疫組織化学的变化と精子形成不全との関連、第 51 回日本毒性学会学術年会、福岡、2024 年 7 月 3 日、ポスター

五十嵐智女、西村拓也、北嶋 聡:細胞培養食品の開発や規制に関する最近の国際動向、第 51 回日本毒性学会学術年会、2024 年 7 月 4 日、ポスター

堀 正敏、三原大輝、後藤もも、徳永弥月、茶園貴志、黒澤珠希、北嶋 聡:細胞培養食品バイオハザード研究 2:培養細胞の遺伝子発現における老齢個体の影響と 継代による生体内有害物質合成/分解系の遺伝子変動、第 51 回日本毒性学会学術年会、福岡、2024 年 7 月 4 日、ポスター

横田 理、前野 愛、北條 幹、辻 昌貴、森田 紘一、菅 康佑、相田麻子、広瀬 明彦、菅野 純、高橋 祐次、北嶋 聡:多層カーボンナノチューブのマウス単回吸入曝露による肺負荷量の経時的変化、第 51 回日本毒性学会学術年会、福岡、2024 年 7 月 4 日、ポスター

北嶋 聡:毒性学 revisited-生命科学のパラダイムシフトと毒性学の進展-, 基調講演 6L-1「拮抗剤、分

析と中毒」,第 46 回日本中毒学会総会・学術集会、(2024.7.24.)、神戸

五十嵐智女、西村拓也、北嶋 聡:細胞培養食品(いわゆる培養肉)の開発と安全性確保に関する最新動向一家畜・家禽以外の動物 種を含めて、日本動物学会第 95 回長崎大会、長崎、2024 年 9 月 14 日、口頭

北嶋 聡: いわゆる培養肉の開発動向とその食品安全に関する諸外国の規制動向、日本食品化学学会 第 40 回食品化学シンポジウム、(2024.11.15)、川崎

北嶋 聡:網羅的分子毒性学からみたヒトと化学物質との共生、シンポジウム 3S02m「ヒトとヒト、異種生物、そして環境との「共生」を考える」、APPW2025(第 130 回日本解剖学会・第 102 回日本生理学会・第 98 回日本薬理学会 合同大会)、2025.3.19、千葉

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

種村 健太郎: 発達期トスフロキサシン投与による成長影響と成熟後の神経行動様式、第 51 回日本毒性学会学術年会(2024.7.3-5)

Ryua Harima, Kenshiro Hara, Kentaro Tanemra: : Cytoplasmic dynein 2 is required to the regulation of intra-flagellar transport system in sperm flagellum formation. SSR (Society for the Study of Reproduction) Annual Meeting 2024, Dublin, Ireland (the Convention Centre Dublin) (2024.7.15-19)

張磨 琉亜、原 健士朗、種村 健太郎: マウス Tctex1d2 は体細胞系列の繊毛形成にはない、精子鞭毛形成に特有の機能をもつ、第 117 回日本繁殖

生物学会大会(2024.9.22-9.25)

Nami Nagafuku, Naoki Matsuda, Yuto Ishibashi, Ikuro Suzuki, “Enhanced Cardiotoxicity Assessment through Propagation Pattern Analysis Using HD-CMOS-MEA in hiPSC-Derived Cardiomyocytes”, 2024 SPS Annual Meeting, 22-25 September, 2024, San Diego, USA

Xiaobo Han, Naoki Matsuda, Kazuki Matsuda, Makoto Yamanaka, Ikuro Suzuki, “Predicting Peripheral Neurotoxicity on Soma or Axon through Morphological Deep Learning and Electrical Measurements Using an In Vitro Microphysiological System”, MPS World Summit 2024, June, 10-14, 2024, Seattle, USA

Ikuro Suzuki, Xiaobo Han, Kazuki Matsuda, Naoki Matsuda, Makoto Yamanaka, “In vitro analysis of drug-induced neuron degeneration by morphological deep learning on a novel microphysiological system”, FENS forum 2024, June, 25-29, 2024, Vienna, Austria

Xiaobo Han, Naoki Matsuda, Makoto Yamanaka, Ikuro Suzuki, “Development of an in vitro assessment platform for drug-induced neuron degeneration based on morphological deep learning using cultured neurons in a microphysiological system”, Neuroscience 2024, October, 5-9, 2024, Cicago, USA

Y. ISHIBASHI, X. HAN, N. NAGAFUKU, N. MATSUDA, I. SUZUKI, “Functional analysis of synaptic network and single neuron in human iPSC cell-derived neurons using HD-CMOS-MEA”, Neuroscience 2024, October, 5-9, 2024, Cicago, USA

鈴木郁郎、ヒト iPSC 由来神経細胞およびアストロサイトを用いた in vitro 痙攣毒性予測と作用機序予測、第51回日本毒性学会学術年会、2024年7月4日、福岡

Nami NAGAFUKU, Naoki MATSUDA, Kazuki

MATSUDA, Ikuro SUZUKI, “Cardiotoxicity evaluation method using HD-CMOS-MEA can predict drug action mechanism”, 第51回毒性学会学術年会, 2024年7月3-5日, 福岡

Xiaobo Han, Naoki Matsuda, Chinatsu Suzuki, Makoto Yamanaka, Ikuro Suzuki, “In vitro analysis of drug-induced neuron degeneration by morphological deep learning on a novel microphysiological system”, 第51回毒性学会学術年会, 2024年7月3-5日, 福岡

松田直毅, 永福菜美, 石橋勇人, 鈴木郁郎, “ヒト iPSC 細胞由来ニューロンの MEA 計測における殺虫剤の神経毒性評価と作用機序予測”, 第51回毒性学会学術年会, 2024年7月3-5日, 福岡

石橋勇人, 韓笑波, 永福菜美, 松田直毅, 鈴木智夏, 鈴木郁郎, “CMOS-MEA を用いた Field Potential Imaging によるヒト iPSC 細胞由来神経ネットワークと単一ニューロンの機能解析”, 第51回毒性学会学術年会, 2024年7月3-5日, 福岡

倉敷秀明, 韓笑波, 石橋勇人, 鈴木郁郎, “中枢神経系における薬物毒性評価のための神経細胞と星状膠細胞の信号分離”, 第51回毒性学会学術年会, 2024年7月3-5日, 福岡

横井れみ, 永福菜美, 松田直毅, 石橋勇人, 鈴木郁郎, “平面微小電極アレイを用いたドラベ症候群脳オルガノイドにおける禁忌薬の評価”, 第51回毒性学会学術年会, 2024年7月3-5日, 福岡

鈴木郁郎、化合物評価における IVIVE への取り組み、LIFE2024、2024年9月13日、東京

中村奈緒子、帆足和希、秋山翔太、安田英莉、松田直毅、鈴木郁郎、高木基樹、岸田晶夫、木村剛、脱細胞化組織の組織学的評価への AI の応用、日本バイオマテリアル学会シンポジウム、2024年10月28-29日、仙台

帆足和希、松田直毅、鈴木郁郎、高木基樹、岸田晶夫、木村剛、中村奈緒子、脱細胞化組織模倣画

像の導入による ECM 構造特徴マップの拡張、日本バイオマテリアル学会シンポジウム、2024 年 10 月 28-29 日、仙台

鈴木郁郎、超精密神経活動計測と AI 解析による創薬応用、学振 R031 ハイブリッド量子ナノ技術委員会 第 18 回研究会、2024 年 11 月 1 日、東京

永福 菜美、松田 直毅、石橋 勇人、鈴木 郁郎、“HD-CMOS MEA 計測による心毒性検出と作用機序予測法の構築”、第 15 回スクリーニング学研究会、2024 年 11 月 21 日、東京

石橋 勇人、永福 菜美、久田 素、鈴木 郁郎、“培養神経細胞の Ca オシレーション解析による発達神経毒性評価法の検討”、第 15 回スクリーニング学研究会、2024 年 11 月 21 日、東京

Xiaobo Han, Naoki Matsuda, Makoto Yamanaka, Ikuro Suzuki, “A novel microphysiological system for assessment of drug-induced neuropathy using human iPSC-derived neurons with morphological deep learning”, 第 15 回スクリーニング学研究会、2024 年 11 月 21 日、東京

鈴木郁郎、in vitro MEA 試験による化合物の神経作用評価、第 41 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム、2024 年 11 月 25 日、仙台

鈴木郁郎、ヒト由来神経細胞を用いた NAMs や MPS の利活用と国際動向、第 47 回日本分子生物学会年会、2024 年 11 月 28 日、福岡

鈴木郁郎、in vitro 神経モデルを用いた化合物評価、日本動物実験代替法学会 第 37 回大会、2024 年 11 月 30 日、宇都宮

3. その他

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし