

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

本研究は、急性経口毒性試験において Reduction と Refinement を推進し、ヒトの安全性確保に資する新規試験法の開発を目的とした。ウェアラブルデバイスの発展により、小動物におけるバイタルサインの非侵襲的測定が現実となりつつあり、本研究ではカーボンナノチューブヤーン(CNT-Y)電極とトランスミッターを組み合わせた測定機器を開発した。これにより、ラットにおいて心電図(ECG)と脳波(EEG)の同時取得が、覚醒・非拘束状態で可能となった。三環系抗うつ薬(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、ハロペリドールなどの神経・心臓作用を有する薬物を投与した際、ECG および EEG に明確な変化が捉えられた。これらのデータは、急性毒性評価のベンチマーク指標として蓄積可能であることが示唆された。また、*in vitro* 急性毒性代替法で予測性が低い化合物(ジゴキシン等 6 物質)について、ラット血漿中タンパク結合率を平衡透析法にて測定した結果、結合率が低い、または測定困難であることが判明した。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

本研究では、動物実験における急性毒性評価の高精度化と動物福祉の向上を目的として、バイタルサインセンサーの開発に取り組んだ。使用動物としては、被毛がなく電極装着が容易な雌性ヘアレスラット(HWY/Slc 系統)を選定し、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 ±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。

センサー開発においては、二層カーボンナノチューブ(Double-Walled Carbon Nanotube: DWCNT)から作製されて CNT ヤーン(CNT-Y)を表面電極として用いた。具体的にはラット皮膚へ縫合針により CNT-Y を単結紮して固定することで、生体電位測定を可能とした。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 の装着部位は、心電図(ECG)用として左耳介基部・頸部・腰部、脳波(EEG)用としてブレグマおよび右耳介基部とした。

加えて、本研究では、従来の有線測定から一歩進め、315 MHz 帯域と Pulse Position Modulation (PPM) 方式を採用したワイヤレストランスミッターを独自に開発し、動物が覚醒下、非拘束状態でも ECG および EEG を同時に取得できる環境を実現した。このトランスミッターは、ラットの背部に装着可能な軽量かつ小型設計であり、内部では EEG 信号を 2,000 倍、ECG 信号を 1,000 倍に増幅した後、CR2032 電池により最大約 4 時間の動作が可能となっている。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。

生体電位測定はイソフルラン麻酔下から覚醒後まで継続的に実施し、投与化合物(アミトリプチリン、アトロピン、ニコチン、カフェイン、ハロペリドール)によるバイタルサインへの影響を測定した。

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。

一方、タンパク結合率については、医薬品データをもとに予測モデルを構築し、一般化学物質に対して適用する手法を採用した。特に in vitro 急性毒性試験で予測性の低かった 6 物質(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、濃度を 10 または 1000nM に設定し、LC-MS を用いた平衡透析法により結合率を測定した。

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

令和4年度の解析では、CNT-Yにより明確なECGが得られ、アミトリプチリン投与によるRS波の一時的増高やT波増高など、薬剤影響に応じた電位変化が観察された。EEGでは、照明や音への反応性を持つ波形や呼吸・R波との同期が示され、脳波である可能性が示唆された。

令和5年度は、EEG・ECGデータの解析に加え、非拘束状態で測定を目的とした送受信装置の開発に取り組み、6gの軽量トランスミッターおよび周波数・帯域・感度を規定したレシーバーを設計した。ハードウェアの試作においては、CNT-Yとの接続に専用ナットとネジを用いる工夫がなされた。

令和6年度には、独自に開発したシステムを用いてアミトリプチリンやニコチン等を投与し、その生理影響を計測した。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。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た。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。

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。

一方、タンパク結合率の測定においては、化合物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%程度であった。一方、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。

D. 考察

本研究では、動物実験における急性毒性試験に応用可能な非侵襲的生体電位測定システムの開発とその応用性について検討した。心電図(ECG)波形は一般的な第二誘導とは異なるが、明確な反応が

得られ、急性毒性評価に利用可能であることが示唆された。

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]

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.

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

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- κ 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

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

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)

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)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許

(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

(3)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