

生体情報の統合的評価を基盤とした急性毒性試験の基準策定と代替法開発に資する研究
-人の健康影響評価の精緻化と動物福祉を充足する試験法開発-
(25KD1003)

分担研究報告書

分担研究課題 生体情報取得システム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 動物管理室長

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

本研究の目的は、急性毒性試験において「ヒトの中毒事例に有益な情報」を取得することを目指し、生体情報の統合的評価が可能なシステムの構築をおこなう。これを基盤とした「死亡に替わる客観的なエンドポイント」を設定することにより、3Rs を充足する試験法を開発することである。急性毒性は毒性発現の究極である「死亡」をエンドポイントとしており、供試動物群の 50%を死亡させる半数致死量(LD50)は、毒性強度を共通の指標で示せる利便性から、国内では毒物・劇物の指定、国際的には GHS として化学物質の「分類と表示」に利用されている。急性毒性は化学物質の管理において重要な役割を果たす一方で、動物福祉の観点からの批判があり、また、ヒト中毒事例に有益な情報が乏しいことが指摘されている。先行研究では、ラットを対象として生体情報を取得する装置の開発を進めており、これまでに、サーモグラフィーによる体温、USB カメラによる動き、そして、先行研究において先端素材であるカーボンナノチューブヤーン(Neura 株式会社、CNT-Y)を用いた簡易、かつ侵襲性が低い脳波、心電図測定装置の開発を進めてきた(Taquahashi et al., 2022)。しかしながら統合的な評価のためには、これらのデータを同一の時間軸上で取得する必要がある。本分担研究では、ラットを対象として急性毒性試験に特化した生体情報取得システムの開発の一環として、多モーダル生理情報の統合取得と実験者支援を目的とした独自のアプリケーションソフトウェア ToxQb v0.9を開発した。現時点では、赤外・可視・USB カメラ 2 台・EEG/ECG について、時間軸を揃えた同時記録が可能となっている。今後、ToxQb から取得したデータをオフライン解析に供して死亡予測方法を検討し、その成果を ToxQb に統合してオンライン死亡予測システムを開発する計画である。本研究を推進することにより、ヒトの安全性確保と動物福祉を充足する試験法の構築が期待される。

A. 研究目的

本研究の目的は、急性毒性試験において「ヒトの中毒事例に有益な情報」を取得することを目指し、生体情報の統合的評価が可能なシステムの構築をおこなう。これを基盤とした「死亡に替わる客観的なエンドポイント」を設定することにより、3Rs を充足する試験法を開発することである。

急性毒性は毒性発現の究極である「死亡」をエンドポイントとしており、供試動物群の 50%を死亡させる半数致死量(LD50)は、毒性強度を共通の指標で示せる利便性から、国内では毒物・劇物の指定、国際的には GHS として化学物質の「分類と表示」に利用されている。急性毒性は化学物質の管理において重要な役割を果たす一方で、動物福祉の観点からの批判があり、また、ヒト中毒事例に有益な情報が乏しいことが指摘されている。

先行研究では、ラットを対象として生体情報を取得する装置の開発を進めており、これまでに、サーモグラフィによる体温、USB カメラによる動き、そして、先行研究において先端素材であるカーボンナノチューブヤーン(Neura 株式会社、CNT-Y)を用いた簡易、かつ侵襲性が低い脳波、心電図測定装置の開発を進めてきた(Taquahashi et al., 2022)。しかしながら統合的な評価のためには、これらのデータを同一の時間軸上で取得する必要がある。本分担研究では、ラットを対象として急性毒性試験に特化した生体情報取得システムの開発の一環として、多モーダル生理情報の統合取得と実験者支援を目的とした独自のアプリケーションソフトウェアの開発を行った。

B. 研究方法

【使用動物】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±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。

【生体電位測定】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 3 箇所(縫合針を用いて CNT-Y を結紮した。心電図(ECG)測定用電極として左耳介基部と背部、脳波(EEG)測定用電極としてブレグマと右耳介基部を用いた。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。トランスミッターのサイズはラットの頭部から背部に装着できるサイズであり、315MHz の帯域を用い Pulse Position Modulation(PPM)方式で信号を送信した。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、デスクトップ PC に取り込んだ。サンプリング周波数は 2 kHz とした。

【体表面の温測定】組み込み用赤外線サーモグラフィカメラ(C50B-I、日本アビオニクス社)を用いて、体表温度の変化を取得した。

【行動観察】サーモグラフィカメラに附属する可視画像用のカメラに加えて、USB カメラ(C922n Pro、ロジクール)を 2 台用いて、動物の行動観察情報を取得した。

【生体データ統合のためのソフトウェア】

体温、行動、EEG、ECG を同一時間軸で取得・評価するため、生体情報統合取得ソフトウェア ToxQb (Toxicology Cube, v0.9)を開発した。ToxQb は Windows 環境で動作する C# 製アプリケーションとし、赤外線サーモグラフィカメラ(C50、日本アビオニクス)、同筐体の可視光カメラ、および EEG/ECG 計測系(BIOPAC SYSTEMS)を単一 GUI 上から制御できるよう設計した。C50 とは付属 SDK を介して接続し、体表温を反映するサーモグラフィ動画(7 fps)と可視動画(30 fps)を mp4 形式で同時録画できるようにした。録画開始には実験メタ情報入力を必須とし、ファイル名は Study ID、Animal ID、タイムスタンプを組み合わせた共通命名規則とし、試行単位でのデータ管理

と後段解析を容易にした。また、観察中に発生したイベント任意の時間に記録できるように設定した。

EEG と ECG は A/D コンバータ MP160 (Sample Rate : 2 kHz、BIOPAC SYSTEMS) を介して AcqKnowledge にて取得し、Network Data Transfer (NDT) 機能を用いて ToxQb ストリーミングし ToxQb 上で EEG/ECG データの統合を行う設計とした。

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

ToxQb v0.9 の開発により、C50 によるサーモグラフィ動画と可視動画の同時録画に加え、EEG・ECG の 2 チャンネルを単一のアプリケーション上でリアルタイム表示・記録することが可能となった(図 1)。AcqKnowledge/MP160 からの NDT 接続は安定しており、プログラム側からの計測開始/停止制御も問題なく動作した。

C50 録画と EEG/ECG 計測を同時に行った際のシステム負荷は、CPU 使用率約 20%、内蔵 GPU 使用率約 20%、メモリ使用量約 8 GB と中程度であり、SSD 書き込み速度に起因するフレーム落ちやデータ欠損は認められなかった(Vostro3681, Corei5-10400 @ 2.90GHz, 64.0 GB)。NDT のリンク速度は 10 Mbps であったが、実効データレートは約 200 Kbps と低く、2 kHz・2 チャンネルの double データとして理論値と整合する値であった。録画と NDT 記録の連動により、同一試行内で赤外動画/可視動画と EEG/ECG CSV を共通のファイル名で保存でき、TimeSec を基準とした時間軸により、動画上の行動変化と波形変化を同じ時間枠の中で評価可能であると考えられる。

D. 考察

ToxQb は、動物を入れるキューブ(箱)をイメージした多元計測プラットフォームとして開発した。箱の中

に動物を入れるだけで、非侵襲的に生体情報の取得が可能となれば利便性が高い。さらに重要な点は、全てのデータの時間軸を揃えて記録することである。これまでも、それぞれのデータに特化したソフトウェアを用いることで、データの記録は可能となっている。しかしながら、データ取得後にすべてのデータの時間軸を揃えることは極めて困難である。統合的評価により急性毒性試験での死亡予測を行うため、多モーダルデータの時間軸を揃えた記録が必須である。今年度開発した ToxQb v0.9 はこの概念実証版としての位置付けである。現在は、(1) マルチカメラ同時表示と同時録画、(2) EEG・ECG 計測・記録機能、(3) 計測開始・停止、用量投与等のイベント入力機能(実験メタデータを入力しないと録画されない)を実現している。今後は、実際にモデル化合物を動物に投与して ToxQb でデータを取得し、オフライン解析により死亡予測方法を検討する計画である。その成果を ToxQb に統合することによりオンラインでのリアルタイム死亡予測が可能となる。ToxQb は化学物質の人健康影響評価の精緻化と動物福祉を充足する試験法のプラットフォームへと発展することが期待される。

E. 結論

急性毒性試験における非侵襲・多モーダル計測プラットフォームとして ToxQb v0.9 を開発した。現時点では、赤外・可視・USB カメラ 2 台・EEG/ECG について、時間軸を揃えた同時記録が可能となっている。今後、ToxQb から取得したデータをオフライン解析に供して死亡予測方法を検討し、その成果を ToxQb に統合してオンライン死亡予測システムを開発する計画である。本研究を推進することにより、ヒトの安全性確保と動物福祉を充足する試験法の構築が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ahmed OHM, Saleh DM, Alexander WT, Takase H, Taquahashi Y, Hojo M, Maeno A, Fukamachi K, Gi M, Hirose A, Tsuruoka S, Takahashi S, Tsuda H, Naiki-Ito A.: Comparative

Carcinogenicity of Double-Walled Carbon Nanotubes of Different Lengths Administered by Intratracheal Installation into Rat Lungs Nanomaterials (Basel). 2025 Sep 11;15(18):1402. doi: 202510.3390/nano15181402

高橋祐次: CNT の医療への応用-非臨床試験における生体電位測定-, Nanofiber, 16 (1,2,3,4), p41-45, 2025

高橋祐次: 動物実験代替法と動物実験-毒性学の視点から-, LABIO21, 95, 5-8, 2025

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

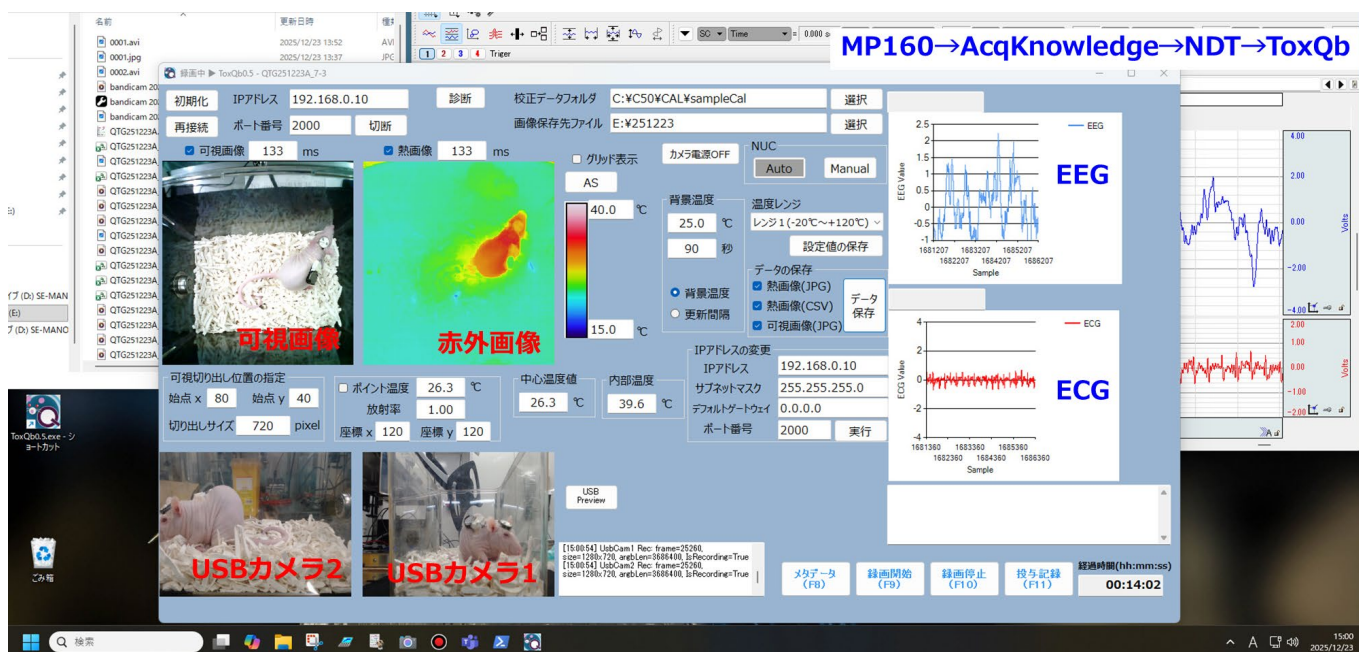


図 1: ToxQb v0.9

急性毒性試験における非侵襲・多モーダル計測プラットフォームとして ToxQb を開発した。ver0.9 にて赤外・可視・USB カメラ 2 台・EEG/ECG の同時表示と同時録画が可能となっている。