

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書

海馬ニューロンを用いた神経ネットワークによる評価法の開発

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所薬理部 主任研究官
山崎 大樹
研究協力者 群馬大学大学院医学研究科 教授
白尾 智明

要旨

本研究では、ラット海馬神経細胞および HESI NeuTox バリデーション試験のためのラット大脳皮質神経細胞を用いて、多点電極システムにおける化合物の急性投与に対する評価系の構築を行った。両細胞において、最適化したネットワーク活動評価条件にて複数の化合物を評価した。今後、より多くの化合物を評価し、これまでの結果と比較することで試験法としての有用性や予測性について検証を行う。

A. 研究目的

近年、子供の学習障害や自閉症などの発達障害が増加しているが、その原因の一つとして環境中の化学物質の関与が指摘されている。現在の化学物質に対する発達神経毒性を評価するガイドライン(OECD: TG426 および EPA: OPPTS870.6300)は、妊娠ラットを用いた複雑な試験系であり、試験期間が1年以上、動物数も 700 以上に及び経費も膨大であるため、これまでにわずかな化学物質しか評価できていない。そこで本研究では、スループット性および再現性の高いラット神経細胞を用いた多点電極(MEA: Micro-electrode array)システム法による評価系の構築を目指した。

これまでに選定した評価指標をもとに、ラット海馬神経細胞を用いてネットワーク活動を評価するための条件を最適化した。次いで複数の化学物質を評価し、スループット性および再現性が高いスクリーニング系となるようプロトコルを確定し

た。また、HESI NeuTox 多点電極サブチームにおけるバリデーション試験の実施を見据えて、ラット大脳皮質神経細胞を用いた測定条件の最適化および予備試験を実施した。

B. 研究方法

1. 細胞

細胞はラット大脳皮質神経細胞(Lonza、スイス、バーゼル)および群馬大学・白尾教授の研究室で作製されたラット胎児凍結海馬神経細胞を用いた。

2. プレートコーティング

多点電極システムとして Maestro (Axion Biosystems 社)を用いて、神経活動を計測した。細胞播種前日までに Maestro 用 48 ウェルプレートを 0.1% ポリエチレンイミン (PEI) (0.1% PEI in 0.1 M Boric acid buffer solution (pH 8.5) でコーティングした。0.1% PEI 溶液を各ウェルに 100 μ l ずつ添加後 CO₂ インキュベーター内に 1 時間静置した後、滅菌水で 3 回リン

スし、クリーンベンチ内で 1 時間乾燥させた。乾燥後、フタをしてアルミホイルで遮光し、4°C に保管した。過去の検討により、PEI コート後 1 週間以上経過すると、神経活動の抑制が観察されたことから、PEI コートしたプレートは 1 週間以内に使用した。

3. 細胞播種、培地交換および神経活動測定

液体窒素から取り出した凍結細胞は 37°C の温浴に 3 分間浸して解凍した。解凍した細胞懸濁液を 50 ml 遠沈管に入れ、そこへ播種用培地(海馬神経細胞: 10% FBS, 1.14 mM Pyruvic acid, 0.7% Glucose in Minimum Essential medium、大脳皮質神経細胞: 5% FBS, 2% B-27, 2 mM GlutaMax, 1% Penicillin-Streptomycin in Neurobasal medium-A)を細胞懸濁液と合わせて 10 ml になるまで少しずつ加えた。よく混合した後に細胞数を計測した。海馬神経細胞は 200 x g で、大脳皮質神経細胞は 370 x g で 5 分間遠心し、一定の細胞密度になるように 20 µg/ml ラミニンを含む播種用培地を添加し、10 µl/ウェルにて電極上に播種した。播種 2 時間後に、培養培地(海馬神経細胞: 0.25% GlutaMAX, 1% Penicillin-Streptomycin, 2% B27 in Neurobasal medium-A、大脳皮質神経細胞: 播種用培地と同じ組成)を添加した。必要に応じて 0.5 µM AraC を Day 5-7 で加えた。大脳皮質神経細胞について、Day 5 以降は播種用培地、血清除去培地(2% B-27, 2 mM GlutaMax, 1% Penicillin-Streptomycin in Neurobasal medium-A)、あるいは Brainphys neuronal medium (2% NeuroCult™ SM1 Neuronal Supplement)にて培養した。培養は 16-20 日目まで行い、定期的に培地交換および MEA による測定を行った。また、神経活動

が安定して得られる培養 16-20 日後に、化合物を急性で添加し、その投与前後での神経活動の変化を解析した。

4. 解析

1 電極における 1 分間あたりのスパイク発生頻度(MFR: Mean firing rate)、活性化電極(AE: Active electrodes、1 分間に 5 回以上スパイクが発生した電極と定義する)、バースト頻度(Burst frequency、1 電極における 1 分間あたりのバースト発生頻度)や同期性(Synchrony index)等についても解析した。

C. 研究結果

1. ラット胎児凍結海馬神経細胞を用いた MEA による化学物質の毒性評価

ラット胎児凍結海馬神経細胞において、これまで選定した評価指標のもと、ネットワーク活動評価の条件を以下のように定めた。1) プレートコーティング: 0.1% PEI、2) 細胞播種密度: 生細胞数 50,000 細胞/ウェル、3) AraC 濃度および投与期間: Day 5-7 に 0.5 µM、4) 培地交換: 3-4 日ごとに全量交換、5) 化学物質の投与: Day 16~に 200 µl の培養液と混合後に細胞に添加。まず、各ウェルの MFR および AE の経時的変化について、観察を行った。その結果、いずれのパラメーターもウェル毎のバラツキが小さく、MFR は Day 14 をピークとして、Day 16 では少し減少傾向であった(図 1A)。一方、Day 9 の時点でほとんどすべての電極が活性化状態となり、Day 16 までそれは維持された(図 1B)。そこで、Day 17 において、陰性対照物質であるアセチルサリチル酸(ASA)を含む複数の化学物質(有機スズ化合物で船底塗料などに用いられているトリブチルスズ: TBT、有機リン系殺虫剤クロルピリホ

ス: CPF、抗てんかん薬として用いられているバルプロ酸: VPA)を急性で4濃度ずつ投与し、MFR への影響を調べた。その結果、陰性対照物質であるASAは300 μMまで投与してもMFRに変化がなかったが、3 μM TBT、30 μM CPF、3 mM VPAにて有意にMFRが減少することを明らかにした(図 2A)。その他、GABA_A受容体アンタゴニストであるビククリン(BIC)およびCa²⁺チャネル拮抗薬であるベラパミル(VER)についても実施したので、結果を掲載した(図 2B)。今後、発達神経毒性評価系として感受性や反応性等において、過去に本研究班で行った他の試験系と比較することで試験法としての有用性や予測性を検証する。

2. HESI NeuTox MEA サブチームにおけるバリデーション試験

我々は、痙攣誘発毒性評価を化合物のメカニズムに基づいて議論を行う HESI NeuTox MEA サブチームに昨年度より参加している。ここでは、電話会議および対面会議にてバリデーション試験に関する議論を行いながら、痙攣誘発毒性評価法の開発および国際協調を推進している。バリデーション試験に参加する施設および使用する細胞を表1にまとめた。

我々は、NeuTox のバリデーション試験に参加するにあたり予備試験を実施することとした。予備試験の実施にあたり、バリデーション試験に用いるラット大脳皮質神経細胞にて、測定条件の最適化を行った。バリデーションに参加する他の施設の実験条件等と比較・検討した。その結果、以下の条件にて測定を行うこととなった。1) プレートコーティング: 0.1%PEI、2) 細胞播種密度: 総細胞数 120,000 細胞/ウェル、3) AraC: 投与しない、4) 培地交換: 3-4 日ごとに全量交換、5) 化学物質の投与:

およそ Day 20 に 200 μl の培養液と混合後に細胞に添加。海馬神経細胞における培養条件を用いて、測定条件の最適化を開始した当初、ピクロトキシン投与によりMFRおよびBurst frequency がピクロトキシンの濃度依存的に減少した。この反応はピクロトキシンの作用機序からは考えにくいものであったため、3種類(播種用培地、血清除去培地、および Brainphys neuronal medium)の培地条件にてピクロトキシンの反応性について検討を行うこととした。図 3A には、3種類の培地におけるMFRの経時的変化を、図 3B には、AEの経時的変化を示した。MFRは3種類の培地でそれほど大きな違いはなかったが、活性化電極は Brainphys を用いた際には、Day 8 において半分以上が活性化し、その後緩やかに増加していった。また、播種用培地を用いた場合にも、Day 11 の時点で 3/4 の電極が活性化した。一方で、血清除去培地を用いた場合には、活性化電極の数は Day 19 まで緩やかに増加していった。逆に Burst frequency は血清除去培地を用いると他の2種類の培地よりも大きな値を示した(図 3C)。Day 20 において、GABA_A受容体アンタゴニストであるピクロトキシンおよびビククリンを急性投与した際の、MFR、Burst frequency および同期性(Synchrony index)についてそれぞれ図 4A-Cにまとめた。ピクロトキシンおよびビククリンの作用機序は、神経活動に対して抑制的に寄与している GABA_A受容体を阻害し、興奮性を上昇させるとともにスパイクの同期性を上昇させる。これに類似した反応を示したのが血清除去培地であった。今後、再現性を確認するとともにバリデーション試験のデータ提出に向けて合計12化合物のデータ取得を行う。

D. 考察

本研究では、ラット海馬および大脳皮質神経細胞を用いて、MEA における化合物の急性投与に対する評価系の構築を行った。両細胞において、条件が最適化されたため複数の化合物を評価系した。ラット海馬神経細胞においては、過去に本研究班で実施済の他の評価系の結果との比較を行うことで試験法の有用性や予測性を検証する。一方で大脳皮質神経細胞においては、GABA_A 受容体アンタゴニストであるピクロトキシンおよびビククリンを投与し、期待される結果が得られたことから、今後 12 化合物に対して評価を行い、有用性や予測性の検証を詳細に実施する。取得したデータについては、HESI NeuTox のバリデーション試験用データとして提出予定である。

E. 結論

2 種類のラット神経細胞を用いて、MEA によるスループット性および再現性の高い評価系の構築を行った。今後、試験法としての妥当性の検証を行う。

F. 研究発表

1. 論文発表

- [1] Yamazaki D., Kanda Y., Sekino Y. “Field potential recording method using multi-electrode array system-Cellular responses in human iPSC-derived cardiomyocytes and rodent brain-derived neurons.” BUNSEKI (2017) 7:290-295

2. 学会発表

- [1] 山田茂、山崎大樹、諫田泰成：ヒト iPS 細胞の神経分化に対するクロル

ピリホス曝露の影響、第 136 回日本薬理学会関東部会、2017 東京

- [2] 山崎大樹、後藤和愛、小金澤紀子、花村健次、白尾智明、関野祐子、諫田泰成：海馬ニューロンを用いた神経活動ネットワークによる評価法の開発、第 44 回日本毒性学会、2017 横浜
- [3] 山田茂、山崎大樹、諫田泰成：ヒト iPS 細胞の神経分化に対するトリプチルスズの影響、第 44 回日本毒性学会、2017 横浜
- [4] Yamazaki D., Goto K., Koganezawa N., Hanamura K., Shirao T., Sekino Y., Kanda Y. : Development the assay of spontaneous activity in rat hippocampal neural networks, 10th world congress, Alternative and animal use in the life science, 2017, Seattle
- [5] 山田茂、山崎大樹、諫田泰成：ヒト iPS 細胞の神経分化能を指標にした発達神経毒性評価系の開発、第 3 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、2017 東京
- [6] Yamada S., Yamazaki D., Kanda Y. : Development of human iPS cell-based platform for developmental neurotoxicity testing, SPS, 2017, Berlin

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表 1 HESI NeuTox バリデーション試験への参加施設の使用機器と細胞

施設	機器	細胞
Cyprotex	Axion Maestro	Glutaneurons
Janssen (JNJ)	Axion Maestro	Rat cortical neurons, hiPSC neurons (CNS4U)
Ncardia	Axion Maestro	iPS neurons + astro,
GlaxoSmithKline	Axion Maestro	Rat cortical neurons
NIHS	Axion Maestro	Rat cortical neurons
BMS	Axion Maestro	CDI GTN + Astrocyte
Axion	Axion Maestro	Rat cortical neurons
Tohoku Inst. of Tech	AlphaMed Presto	Rat Hippocampal Neurons, hiPSC Neurons
Eisai	Axion Maestro, AlphaMed Presto	Rat Hippocampal Neurons
NeuCyte	Axion Maestro APEX	SynFire Neural Cells
EPA	Axion Maestro	
BMS	Axion Maestro	CDI iPSC GlutaNeurons

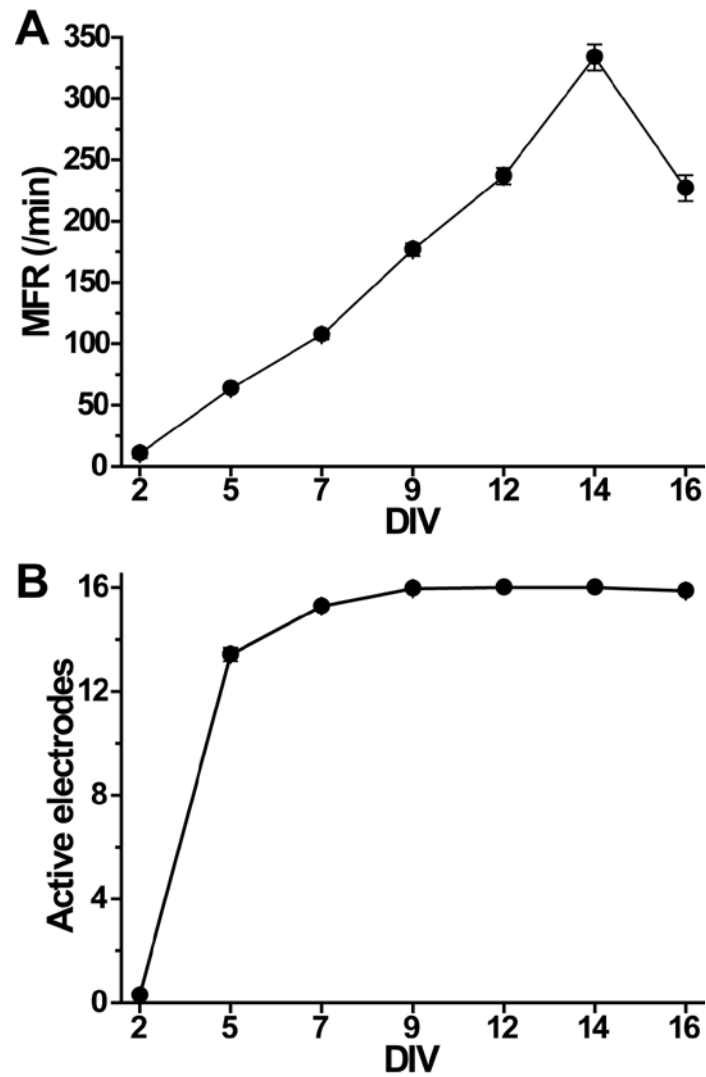


図1 ラット海馬神経細胞における神経活動の経時的変化

1) プレートコーティング: 0.1% PEI, 2) 細胞播種密度: 生細胞数 50,000 細胞/ウェル, 3) AraC 濃度および投与期間: Day5-7 に 0.5 μ M, 4) 培地交換: 3-4 日ごとに全量交換の条件にてラット海馬神経細胞を培養した際の、MFR (A) および Active electrodes (B) の経時的変化を示した。MFR が Day 16 にて落ち込んでおることから、このタイミングで化学物質を急性投与した。いずれも 48 サンプルの平均値および平均誤差 (SEM) を示した。

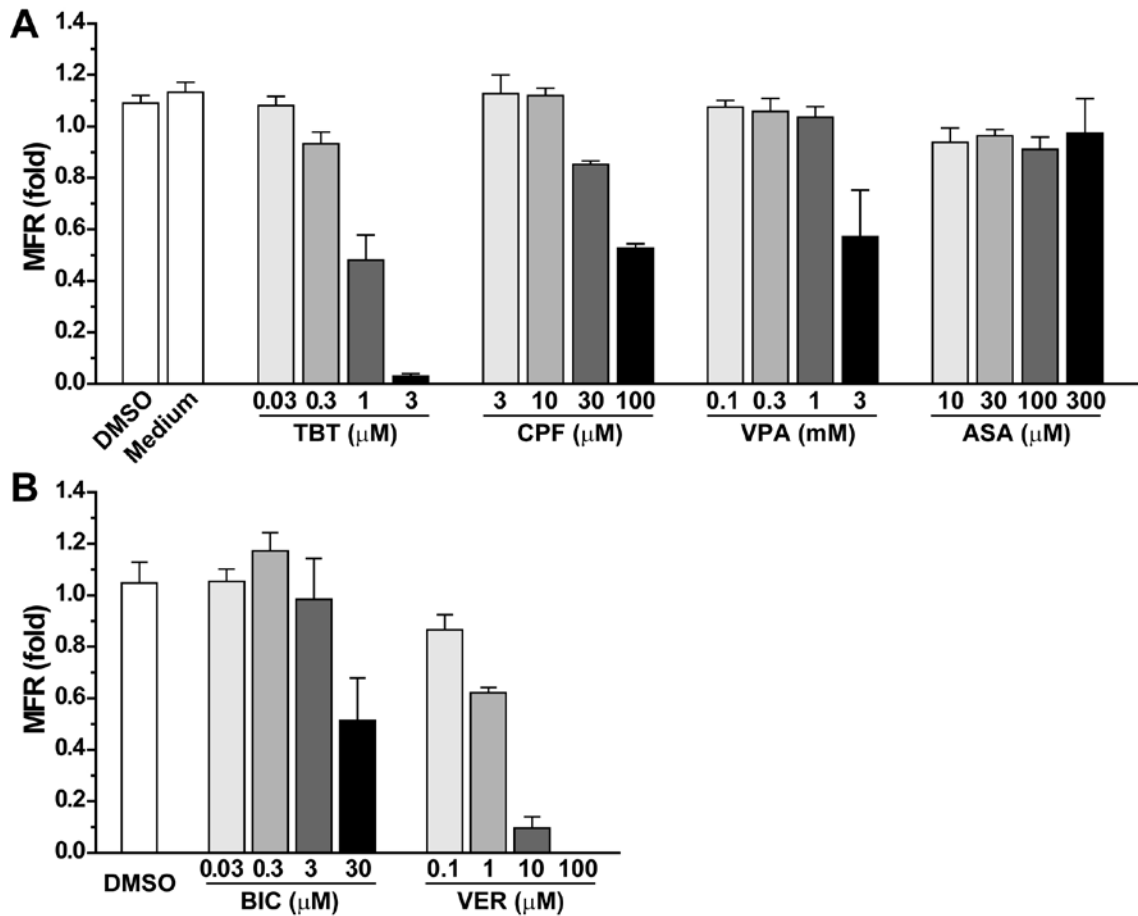


図2 ラット海馬神経細胞における化学物質の急性投与に対する反応

(A) 図1のDay 16のタイミングにて、トリブチルスズ (TBT)、クロルピリホス (CPF)、バルプロ酸 (VPA)、アセチルサリチル酸 (ASA) を4濃度ずつ急性投与した。各化学物質の投与前のMFRの値(5分間の平均値)を1.0として規格化し、投与60分後のMFRの値(5分間の平均値)を算出した。(B) 図1のDay 16のタイミングにて、ビククリン (BIC)、ベラパミル (VER) を4濃度ずつ急性投与した。各化学物質の投与前のMFRの値(5分間の平均値)を1.0として規格化し、投与60分後のMFRの値(5分間の平均値)を算出した。例数はすべて3以上である。

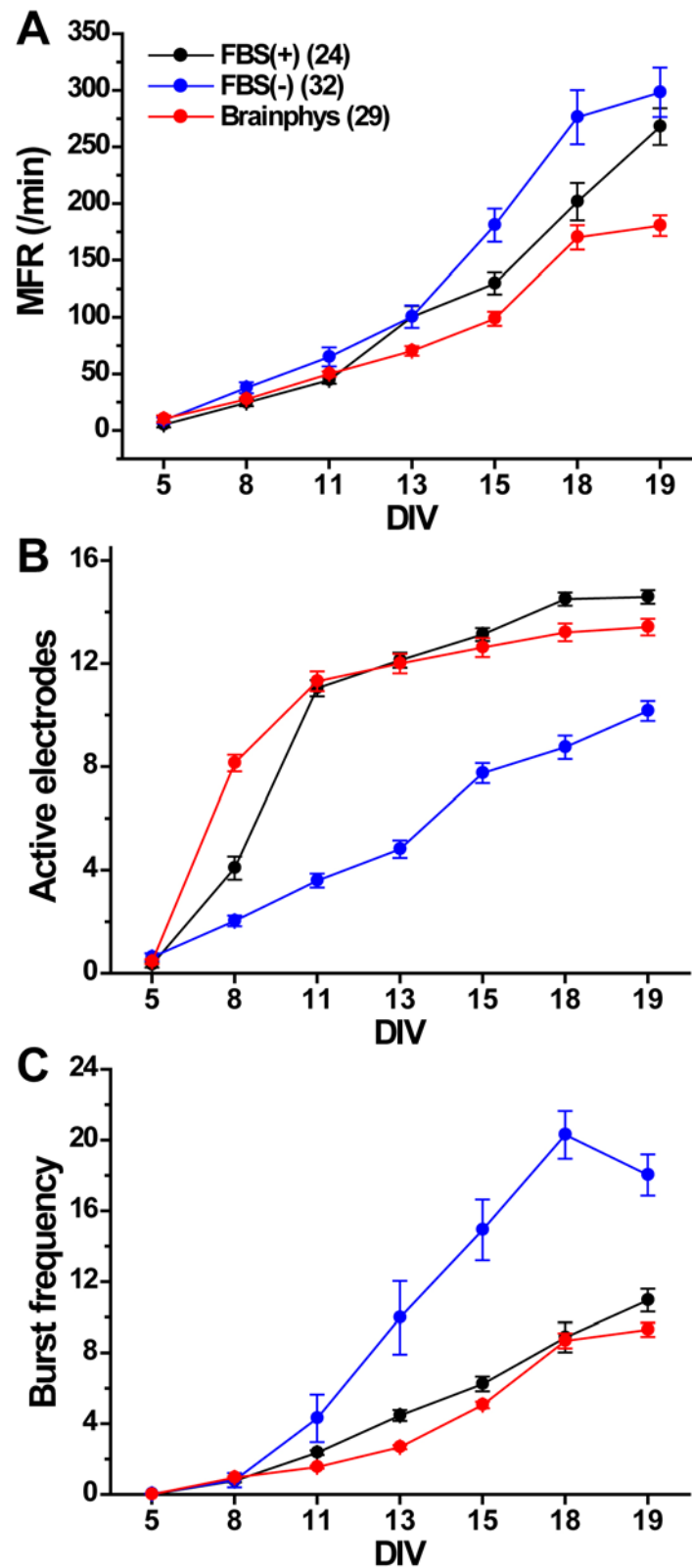


図3 ラット大脳皮質神経細胞の神経活動に対する培地の検討

ラット大脳皮質神経細胞の神経活動に対する播種用培地 (FBS+)、血清除去培地 (FBS-、Day 5 までは播種用培地で培養し、Day 5 から FBS- に置換) および Brainphys の 3 種類の培地の影響を検討した。MFR (A)、Active electrodes (B) および Burst frequency (C) のそれぞれのパラメーターを Day 5 から Day 19 まで経時的变化を示した。括弧内は例数を示す。

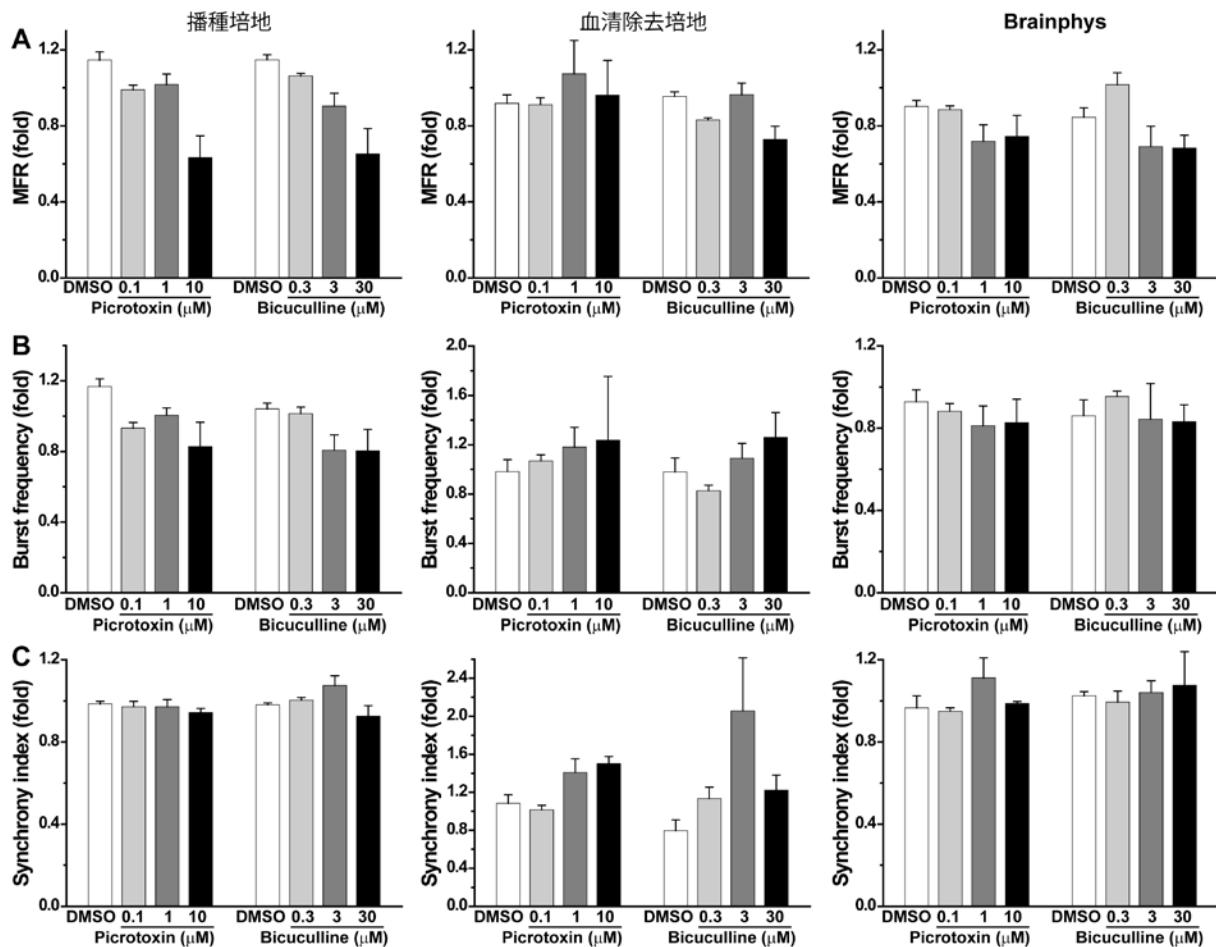


図4 ラット大脳皮質神経細胞のGABA_A受容体アンタゴニストによる反応性に対する培地の検討

GABA_A受容体アンタゴニストであるピクトロキシンおよびビククリンの急性投与に対する、MFR (A)、Burst frequency (B) および Synchrony index (C) の反応を検討した。左レーンが播種用培地、真ん中が血清除去培地、右レーンが Brainphys 培地である。Day 20 において、両化合物を急性投与し、各化学物質の投与前の各パラメーター値 (5 分間の平均値) を 1.0 として規格化し、投与 60 分後の各パラメーター値 (5 分間の平均値) を算出した。いずれも 3 例以上のデータを示す。