

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 第二室長 山崎 大樹

要旨

本研究では、ラット大脳皮質神経細胞を用いて HESI NeuTox 多点電極サブチームで計画されたバリデーション試験を実施した。昨年度、培養・測定条件について最適化を行っており、最終化した条件にて HESI NeuTox 多点電極サブチームで定められた陰性対照化合物を含む 12 化合物について多点電極システムを用いた評価を行った。これら 12 化合物は大きくわけて 3 種類の異なる作用点を有するものが含まれており、作用点の違いによる応答性の違いを明らかにするため、10 種類の解析パラメーターについて、化合物・濃度ごとに化合物の投与前後の変化量を算出しヒートマップとしてまとめた。今後、ヒトやラットに関する既存の同一化合物データとの比較を行い、多点電極データの妥当性の検証やスループット性の高い化学物質リスク予測法の開発へと繋げることが期待される。

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発達期における化学物質の暴露の可能性が考えられる。発達神経毒性を評価する現在のガイドライン(OECD および EPA)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 以上にも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システム法による評価系の構築を目指した。今年度は、特に作用点の異なる化合物による多点電極パラメーターの応答性を把握するために、HESI NeuTox のバリデーション試験で定められた 12 種類の化合物に関して評価を行った。

B. 研究方法

1. 細胞

細胞はラット大脳皮質神経細胞(Lonza)を用いた。使用前は液体窒素内で保管し、播種の際には液体窒素から取り出し、37℃の温浴にて 3 分間インキュベートして溶解した。

2. 多点電極システム法による神経活動計測

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 ウェルプレートに 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℃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。細胞を解凍後、20 μ g/ml

ラミンを含む播種培地(10 μ l)にて 120,000 細胞/ウェルで電極上に播種した。播種 2 時間後に、5% ウシ血清含有の培養培地 (Neurobasal-A + B-27) を添加した。培養 5 日目からは 5% ウシ血清不含の培地で培養を行った。培養は 19 あるいは 20 日目まで行い、定期的(2~3 日おき)に培地交換および多点電極システムによる測定を行った。また、培養 19 あるいは 20 日後に、化合物を各 5 濃度ずつ添加し、その投与前後の神経活動データを取得した。投与前後の記録時間は 15 分間、化合物曝露時間は 1 時間とした。なお、活性化電極(1 分間に 5 スパイク以上観察された電極)が半数の 8 個以上存在するウェルに 1 ウェルあたり 1 濃度で化合物を添加した。

3. 化合物

HESI NeuTox 多点電極サブチームで定められた 12 化合物(ペンチレンテトラゾール、ピクロトキシン、ストリキニーネ、ピロカルピン、クロルプロマジン、アモキサピン、エノキサシン、フェニトイン、リノピリジン、4-アミノピリジン、アモキシシリン及びアセトアミノフェン)について評価を行った。各化合物の濃度および作用点については表 1 を参照のこと。

4. 解析

下記の 10 パラメーターについて解析を行った。1. 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)、2. バースト頻度(1 電極における 1 分間あたりのバースト発生頻度)、3. バーストの持続時間、4. バースト中に存在するスパイク数、5. バースト中のスパイク間隔の中央値、6. 同期バースト頻度(単位時間あたりのバースト頻度)、7. 同期バーストの持続時間、8. 同期バースト中に存在

するスパイク数、9. 同期バースト間隔のバラつき、10. シンクロ指標。各パラメーターの説明については、図 1 に図示した。

C. 研究結果

HESI NeuTox 多点電極サブチームにおけるバリデーション試験

HESI NeuTox 多点電極サブチームのバリデーション試験について、最適化された条件にて凍結ラット大脳皮質神経細胞を培養し、培養 19 あるいは 20 日後に上記 12 化合物を添加し、投与前後の 10 パラメーターの変化率を算出した(図 2 - 13)。また、これらの結果を一見できるようにヒートマップにまとめた(図 14)。GABA_A 受容体を阻害し、Cl⁻透過性を抑制させるペンチレンテトラゾールは、高濃度でも 10 パラメーターについては大きな変化がなかった一方で、同じ作用点を有するピクロトキシンは、バースト持続時間や同期バーストの持続時間、同期バースト中に存在するスパイク数といったパラメーターについて、増加が観察された。また、ドパミン D2 受容体を抑制し、K⁺チャネルを抑制させるクロルプロマジンは高濃度で各パラメーターの減少が観察された。しかし、同じ作用点を有するエノキサシンは変化率が増加するパラメーターが多かった。ピロカルピンとアモキサピンについては、最終的にカテコラミン濃度上昇作用を示すが、逆の反応性を示すパラメーターが多かった。一方で、フェニトイン、4-アミノピリジン、アモキシシリンは 10 パラメーターではほとんど変化がなかった。陰性対照化合物であるアセトアミノフェンについても 10 パラメーターで変化はほとんどなかった。

D. 考察

本研究では、多点電極システムおよびラット大脳皮質神経細胞を用いて、HESI NeuTox 多点電極サブチームのバリデーション試験で定められ多作用点の異なる 12 化合物について評価を行った。同一の作用点ながら異なる反応性を示したり、異なる作用点にもかかわらず同じような反応性を示したりするなど、一定の見解を得ることはできなかった。今後、より多くの化合物について評価を行っていく必要があると思われる。

E. 結論

今回、化合物の作用点から神経活動への影響について反応性を元に議論を行うべく 12 種類の化合物について評価を行った。しかしながら一定の見解を得ることができなかった。12 種類という限られた数では不十分であることが考えられるため、より多くの化合物について評価を行っていくことが求められる。さらに、得られた結果を in vivo あるいは ex vivo のヒトおよびラットから得られた既存の同一化合物データと比較を行い、多点電極データの妥当性の検証や、スループロット性の高い化学物質リスク予測法の開発につなげることが期待される (図 15)。

F. 研究発表

1. 論文発表

- [1] Yamada S, Yamazaki D, Kanda Y. Silver nanoparticles inhibit neural induction in human induced pluripotent stem cells. *Nanotoxicology*. 14, 1-11 (2018).
- [2] Yamada S, Kubo Y, Yamazaki D, Sekino Y,

Nomura Y, Yoshida S, Kanda Y. Tributyltin Inhibits Neural Induction of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Sci Rep*. 8, 12155 (2018).

- [3] Yamada S, Yamazaki D, Kanda Y. 5-Fluorouracil inhibits neural differentiation via Mfn1/2 reduction in human induced pluripotent stem cells. *J Toxicol Sci*. 43, 727-734 (2018).

2. 学会発表

- [1] YamadaS, Yamazaki D, Kanda Y : Novel role of mitochondrial fusion factor Mfn1 in neural differentiation of human iPS cells, WCP, 2018/7/1-5 (京都、日本)
- [2] 山田茂、山崎大樹、諫田泰成：ヒト iPS 細胞のミトコンドリア機能に基づく発達神経毒性の評価、第 4 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、2018/9/15 (東京)
- [3] Yamada S, Yamazaki D, Kanda Y. Assessment of neurotoxicity of silver nanoparticles using human iPS cell-based platform, Safety Pharmacology Society 2018, 2018/10/1-3 (ワシントン DC、米国)
- [4] Yamazaki D, Yamada S, Kanda Y. Developmental neurotoxicity evaluation using human iPS cells, China TATT-Asia CA 2018, 2018/10/10-12 (広州、中国)
- [5] Yamada S, Yamazaki D, Kanda Y: Silver nanoparticles inhibit neural induction via mitochondrial dysfunction in human induced pluripotent stem cells, Society for Neuroscience, 2018/11/2-8 (サンディエゴ、米国)

[6] 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銀ナノ粒子曝露の影響、メタルバイオサイエンス研究会、2018/11/17（仙台）

2019/3/16（大阪）

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

[7] 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、第 92 回日本薬理学会、

表 1 化合物情報一覧

	化合物名	作用機序		予想される興奮性の反応	薬効	化合物の位置付
1	ペンチレンテトラゾール	GABAA受容体 アンタゴニスト	Cl ⁻ の透過性抑制(抑制性神経) →脱分極	↑	—	Positive control (興奮性上昇)
2	ピクロトキシン	GABAA受容体 アンタゴニスト	Cl ⁻ の透過性抑制(抑制性神経) →脱分極	↑	—	Positive control (興奮性上昇)
3	ストリキニーネ	グリシン受容体 アンタゴニスト	Cl ⁻ の透過性抑制(抑制性神経) →脱分極	↑	—	被験物質
4	ピロカルピン	ムスカリンM3 受容体作動薬	細胞内Ca濃度上昇(興奮性神経) →神経伝達物質遊離上昇	↑	緑内障治療	被験物質
5	クロルプロマジン	D2(Giカップル) 受容体阻害	K ⁺ チャンネル抑制(抑制性神経) →脱分極	↑	抗精神病薬	被験物質
6	アモキサピン	MAO取り込み 阻害	シナプスにおける カテコールアミン濃度上昇	↑	抗うつ薬	被験物質
7	エノキサシン	D2(Giカップル) 受容体阻害	K ⁺ チャンネル抑制(抑制性神経) →脱分極	↑	抗精神病薬	被験物質
8	フェニトイン	電位依存性Na ⁺ チャンネル阻害	脱分極抑制	↓	抗てんかん薬	Positive control (興奮性下降)
9	リノピリジン	KCNQ2/3阻害薬	脱分極	↑	—	被験物質
10	4-アミノピリジン	非選択的 K ⁺ チャンネル阻害	脱分極	↑	—	被験物質
11	アモキシシリン	β ラクタマーゼ 不可逆的結合	—	↑	抗生物質	被験物質
12	アセトアミノフェン	Cox-2阻害	—	→	解熱鎮痛	Negative Control

1. Mean Firing Rate (単位時間あたりのスパイク数)

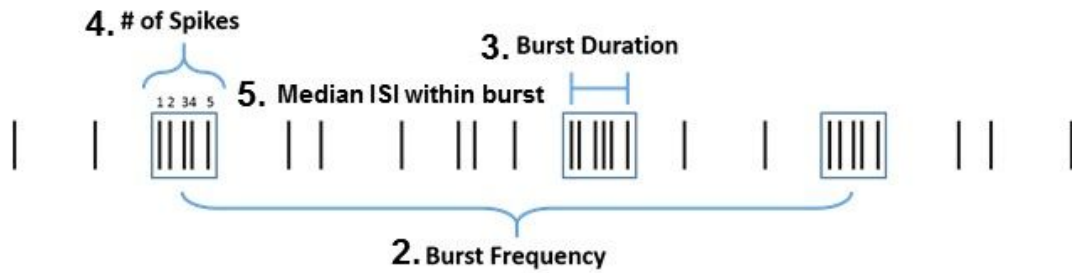


2. バースト頻度 (単位時間あたりのバースト頻度)

3. バーストの持続時間

4. バースト中に存在するスパイクの数

5. バースト中のスパイク間隔の中央値



6. 同期バースト頻度 (単位時間あたりのバースト頻度)

7. 同期バーストの持続時間

8. 同期バースト中に存在するスパイクの数

9. 同期バースト間隔のバラつき

10. シンクロ指標

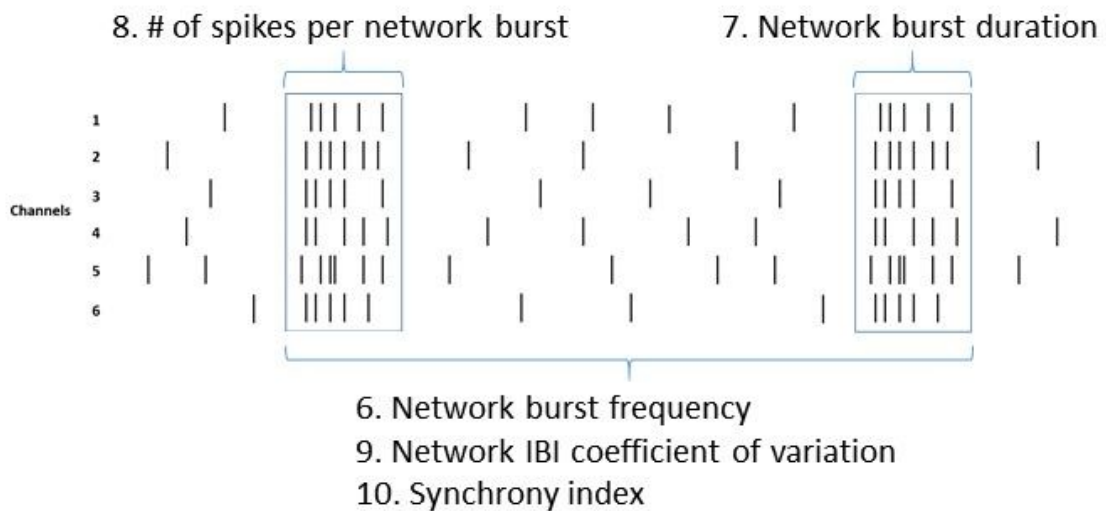
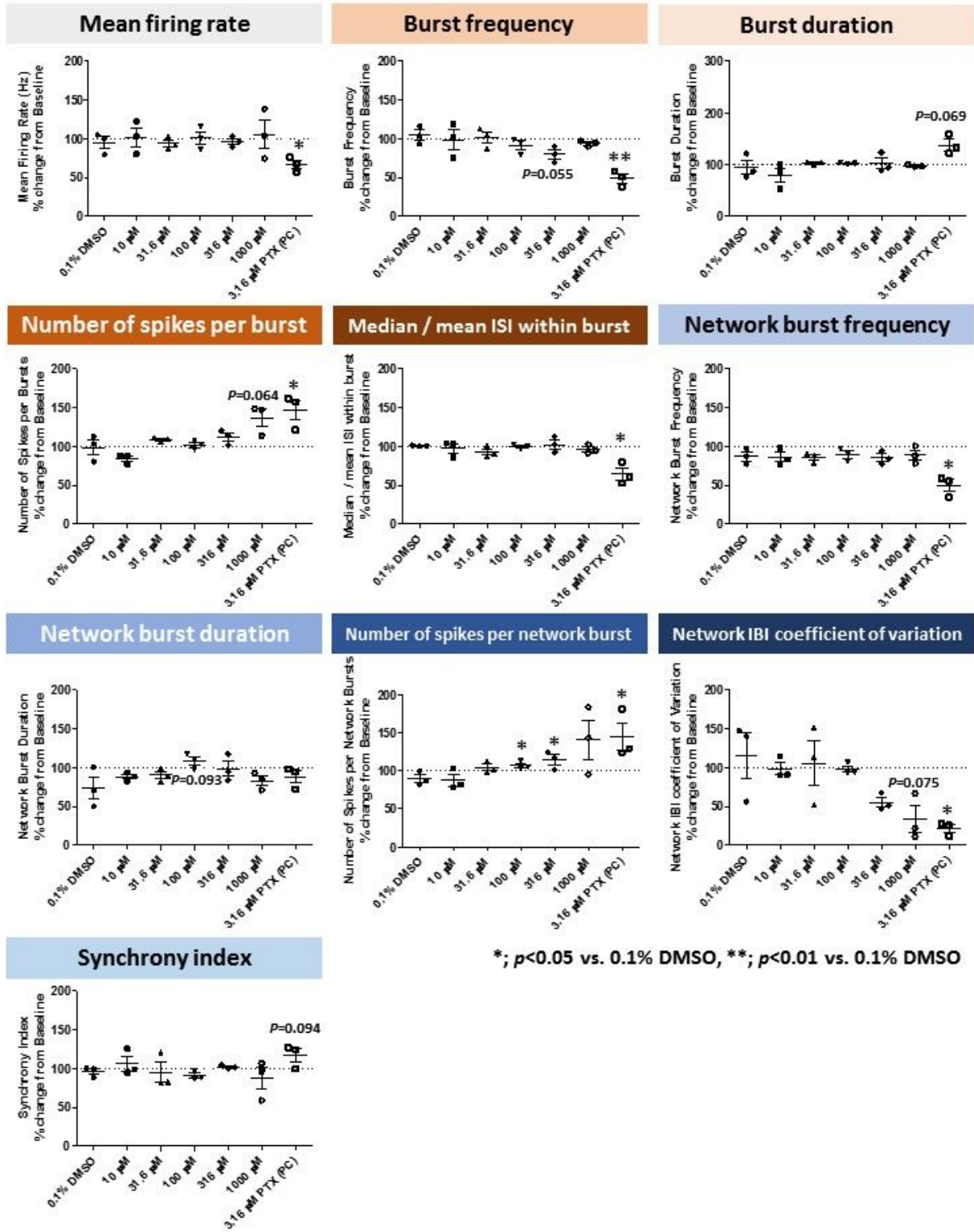


図1 各パラメーターについての説明

解析した10パラメーターについて、具体的なパラメーター内容を図示した。

1. ペンチレンテトラゾール



*; $p < 0.05$ vs. 0.1% DMSO, **; $p < 0.01$ vs. 0.1% DMSO

図2 ペンチレンテトラゾール

溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクروتキシン (PTX) 10-1000 μM ペンチレンテトラゾールの投与前の値を 100% に規格化し投与後の値を変化率として算出した。実験毎のプロットおよび平均値 ± 標準誤差を 10 パラメーターについてグラフにした。*; $p < 0.05$ vs. 0.1% DMSO, **; $p < 0.01$ vs. 0.1% DMSO。

2. ピクروتキシン

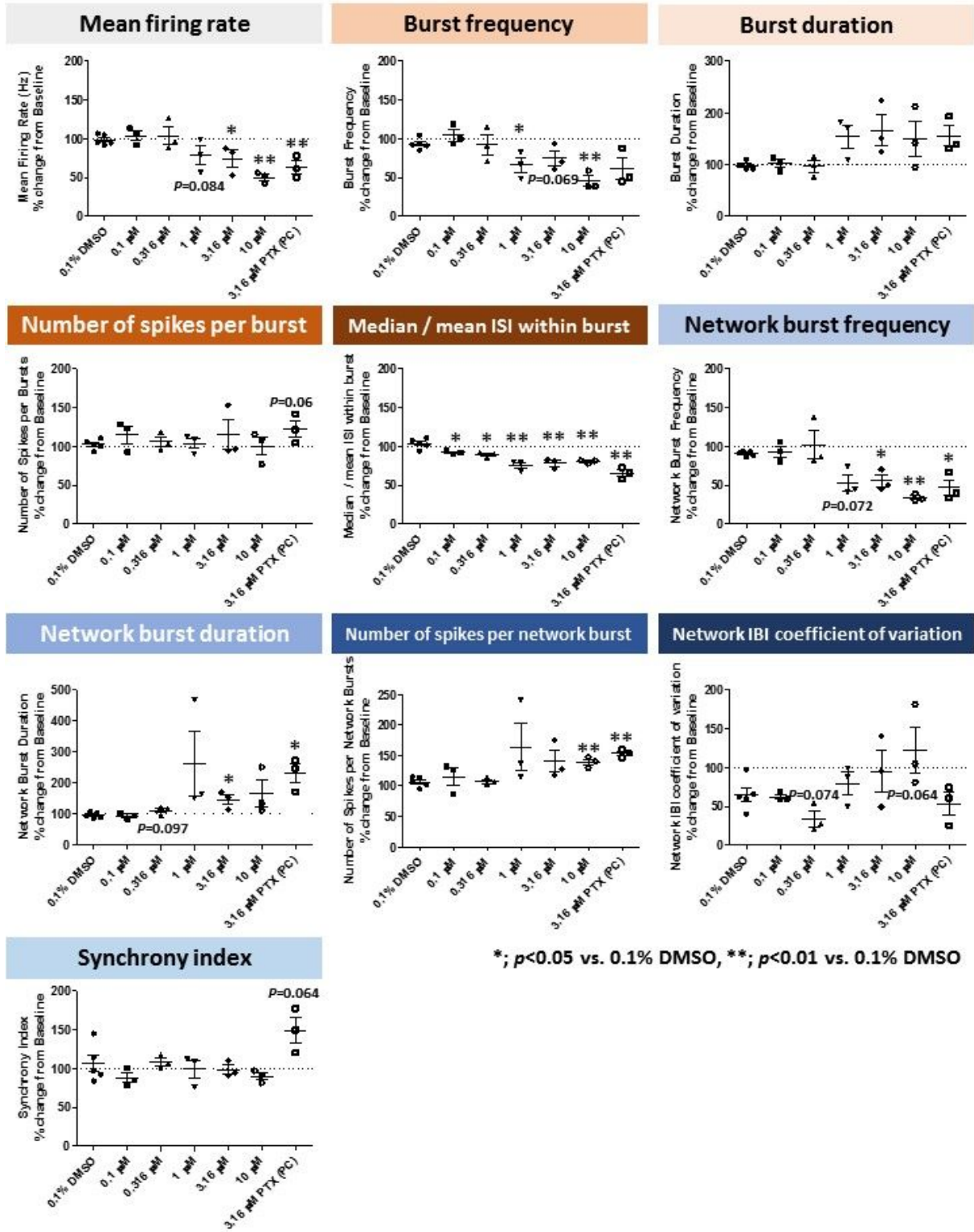


図3 ピクروتキシン

溶媒である0.1% DMSOおよび陽性対照物質である3.16 μM ピクروتキシン (PTX) 0.1-10 μM ピクروتキシンの投与前の値を100%に規格化し投与後の値を変化率として算出した。実験毎のプロットおよび平均値 \pm 標準誤差を10パラメーターについてグラフにした。*; $p < 0.05$ vs. 0.1% DMSO, **; $p < 0.01$ vs. 0.1% DMSO。

3. ストリキニーネ

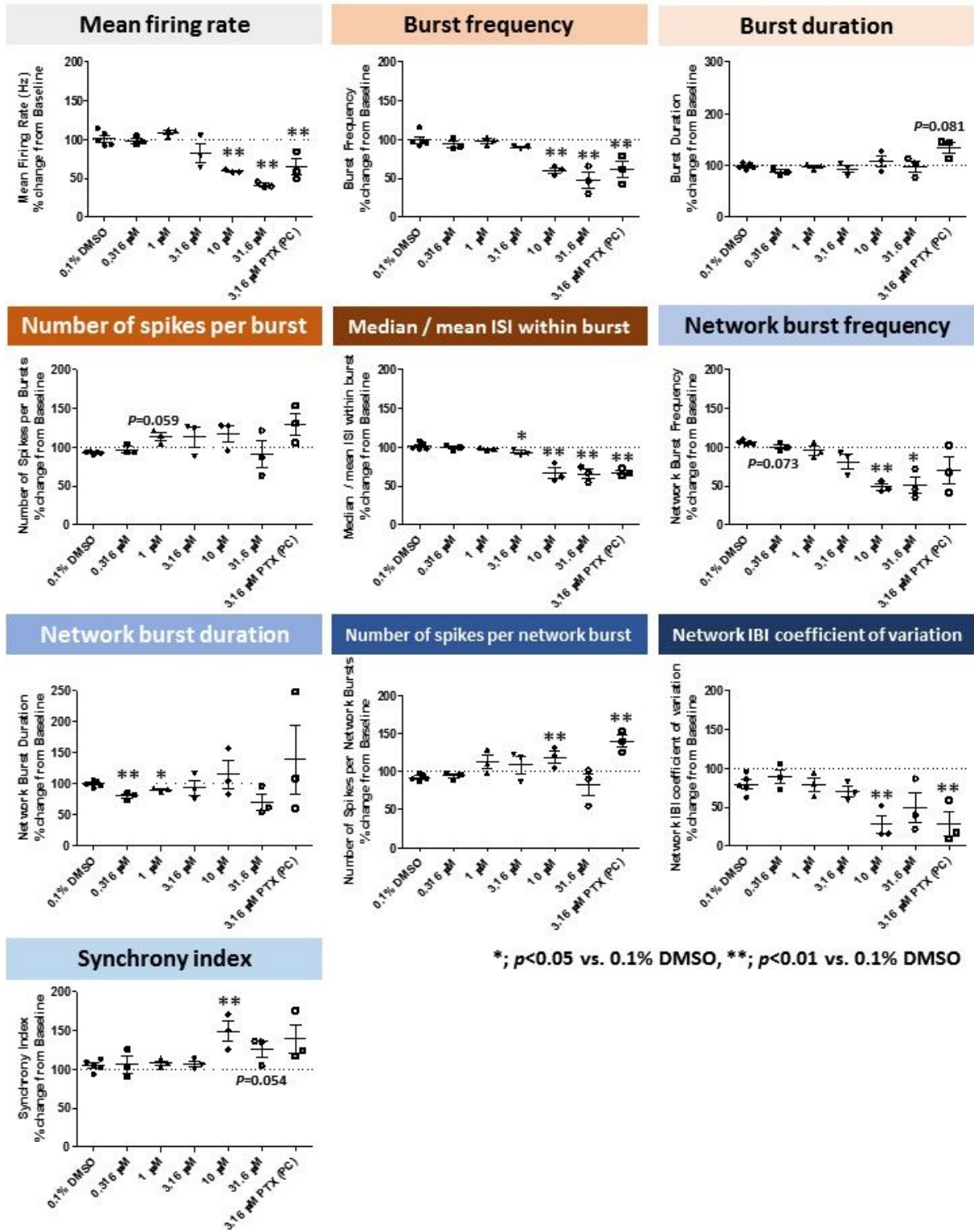


図4 ストリキニーネ

溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクトキシシン (PTX) 0.316-31.6 μM ストリキニーネの投与前の値を 100% に規格化し投与後の値を変化率として算出した。実験毎のプロットおよび平均値 \pm 標準誤差を 10 パラメーターについてグラフにした。*; $p < 0.05$ vs. 0.1% DMSO, **; $p < 0.01$ vs. 0.1% DMSO。

4. ピロカルピン

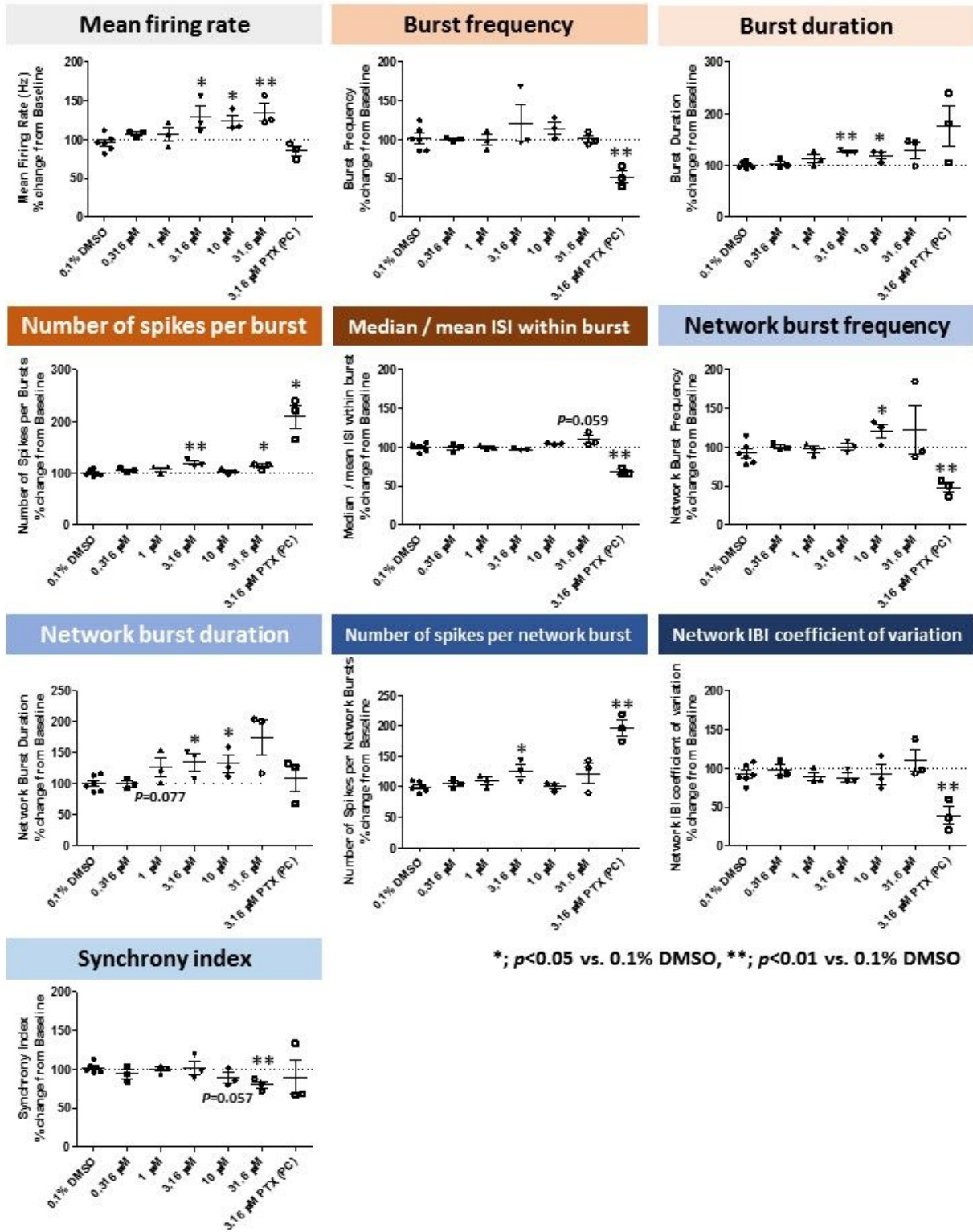
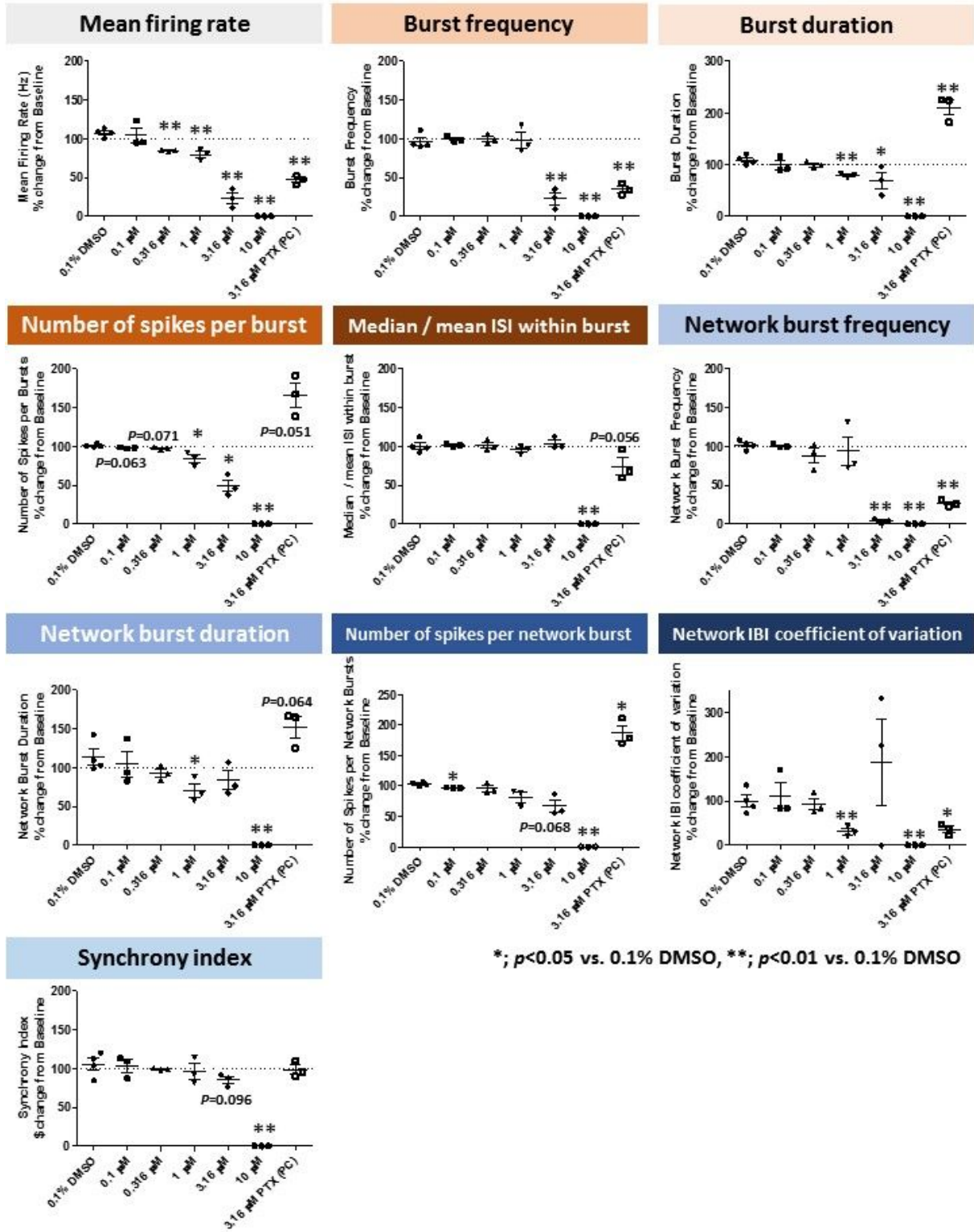


図5 ピロカルピン

溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクロトキシン (PTX) 0.316-31.6 μM ピロカルピンの投与前の値を 100% に規格化し投与後の値を変化率として算出した。実験毎のプロットおよび平均値 \pm 標準誤差を 10 パラメーターについてグラフにした。*; $p < 0.05$ vs. 0.1% DMSO, **; $p < 0.01$ vs. 0.1% DMSO。

5. クロルプロマジン

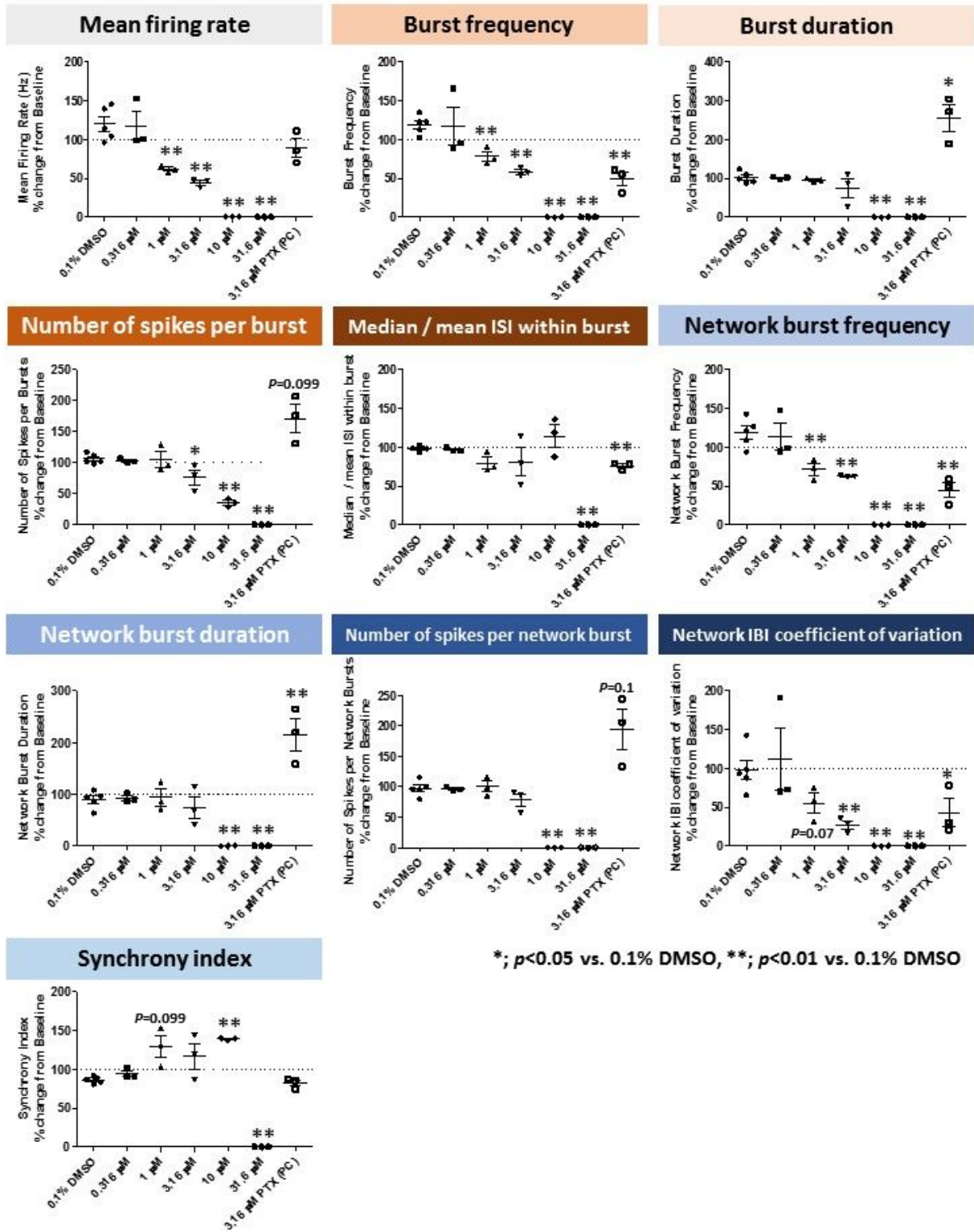


*; $p < 0.05$ vs. 0.1% DMSO, **; $p < 0.01$ vs. 0.1% DMSO

図6 クロルプロマジン

溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクروتキシン (PTX) 0.1-10 μM クロルプロマジンの投与前の値を 100% に規格化し投与後の値を変化率として算出した。実験毎のプロットおよび平均値 ± 標準誤差を 10 パラメーターについてグラフにした。*; $p < 0.05$ vs. 0.1% DMSO, **; $p < 0.01$ vs. 0.1% DMSO。

6. アモキサピン

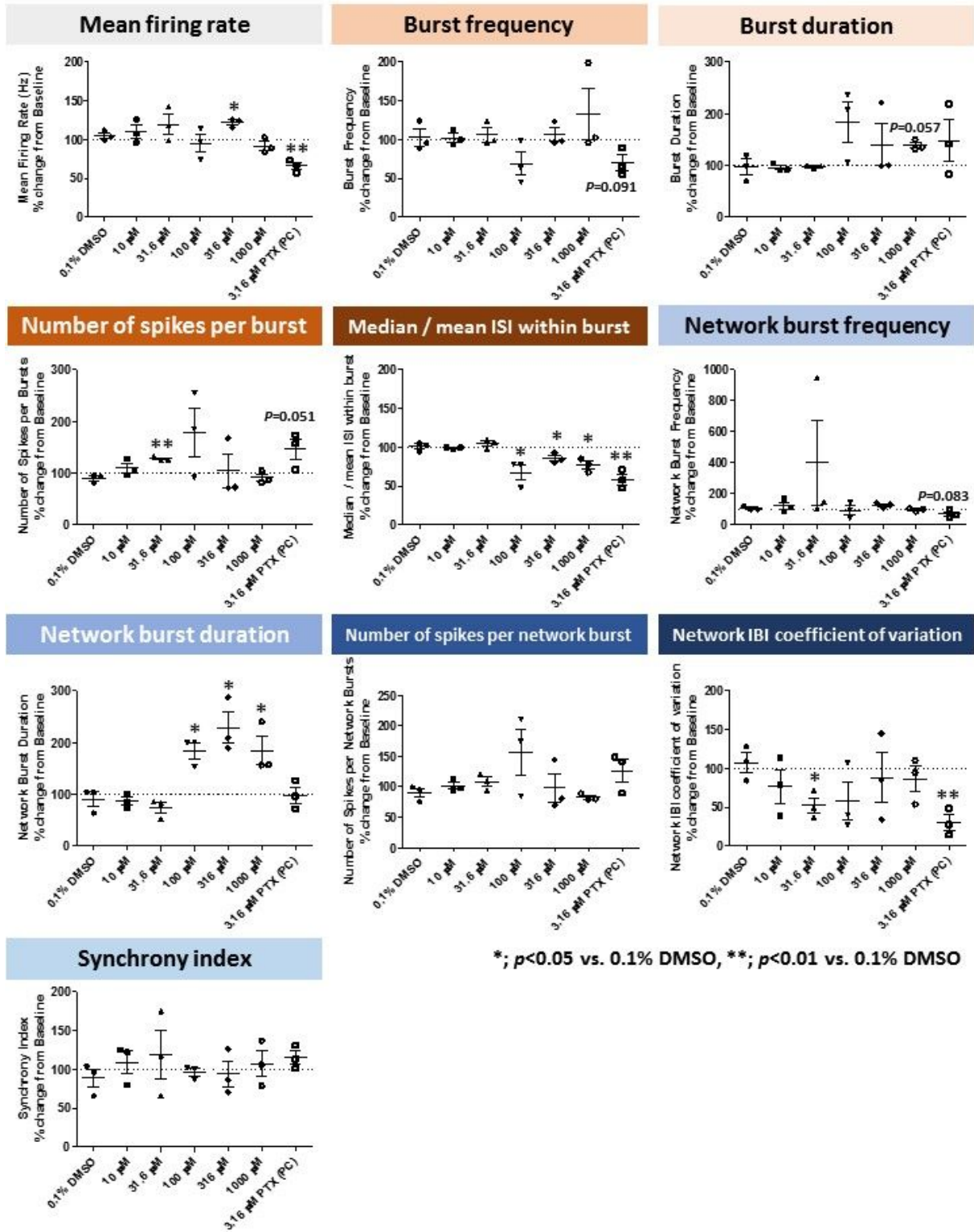


*; $p < 0.05$ vs. 0.1% DMSO, **; $p < 0.01$ vs. 0.1% DMSO

図7 アモキサピン

溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクروتキシン (PTX) 0.316-31.6 μM アモキサピンの投与前の値を 100% に規格化し投与後の値を変化率として算出した。実験毎のプロットおよび平均値 \pm 標準誤差を 10 パラメーターについてグラフにした。*; $p < 0.05$ vs. 0.1% DMSO, **; $p < 0.01$ vs. 0.1% DMSO。

7. エノキサシン

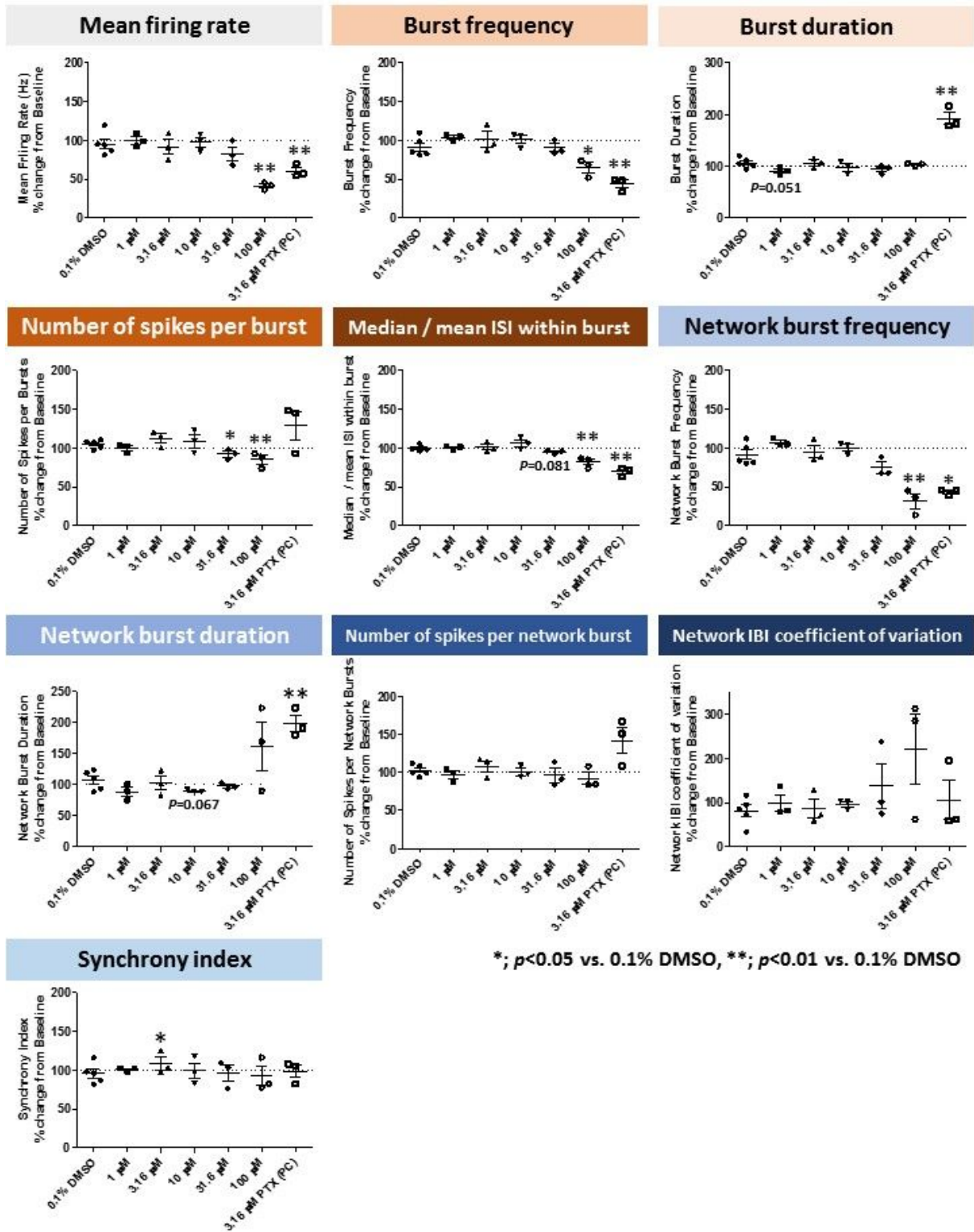


*; $p < 0.05$ vs. 0.1% DMSO, **; $p < 0.01$ vs. 0.1% DMSO

図8 エノキサシン

溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクロトキシン (PTX) 10-1000 μM エノキサシンの投与前の値を 100% に規格化し投与後の値を変化率として算出した。実験毎のプロットおよび平均値 \pm 標準誤差を 10 パラメーターについてグラフにした。*; $p < 0.05$ vs. 0.1% DMSO, **; $p < 0.01$ vs. 0.1% DMSO。

8. フェニトイン



*; $p < 0.05$ vs. 0.1% DMSO, **; $p < 0.01$ vs. 0.1% DMSO

図9 フェニトイン

溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクロトキシン (PTX) 1-100 μM フェニトインの投与前の値を 100% に規格化し投与後の値を変化率として算出した。実験毎のプロットおよび平均値 \pm 標準誤差を 10 パラメーターについてグラフにした。*; $p < 0.05$ vs. 0.1% DMSO, **; $p < 0.01$ vs. 0.1% DMSO。

9. リノピリジン

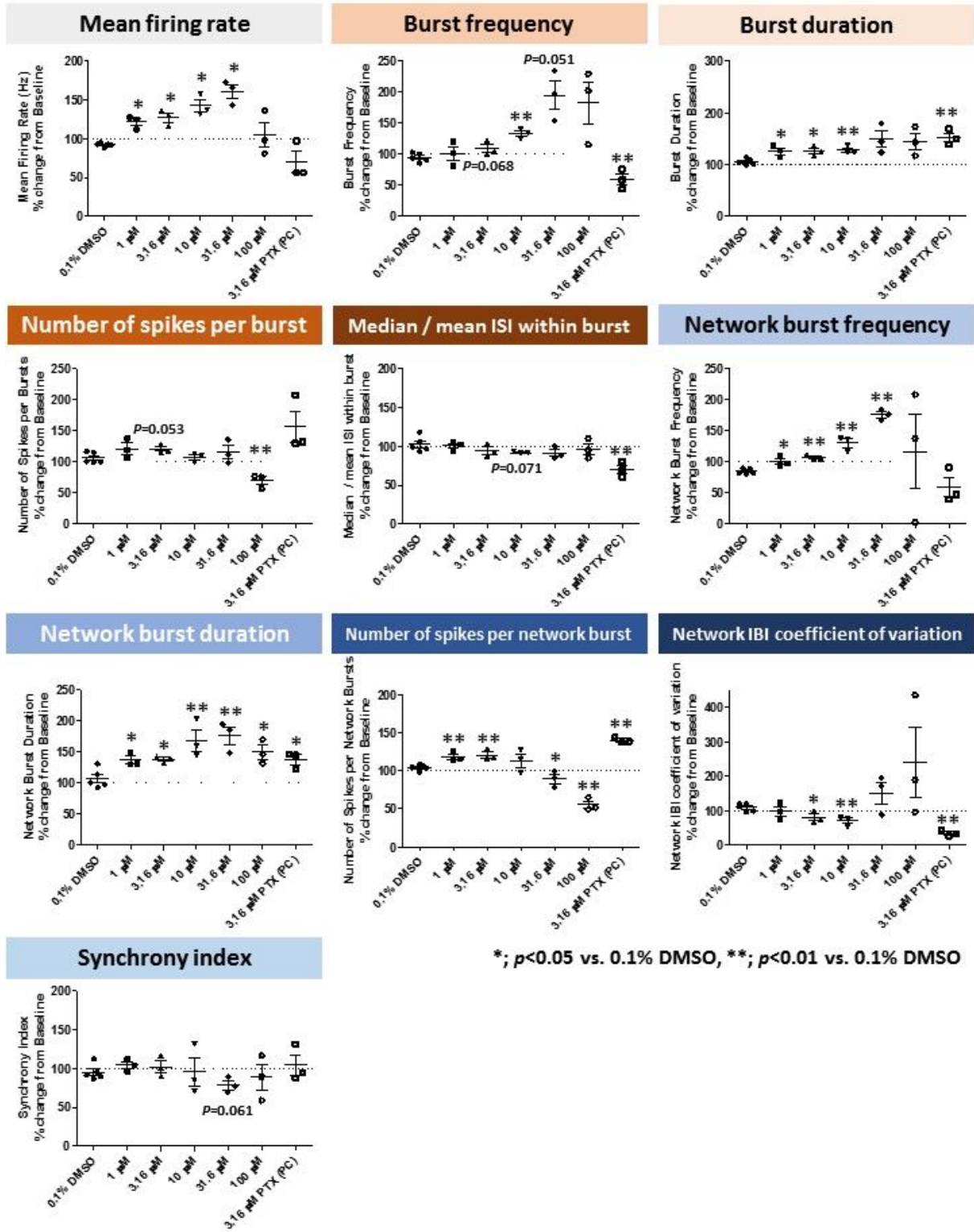


図 10 リノピリジン

溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクトキシシン (PTX) 1-100 μM リノピリジンの投与前の値を 100% に規格化し投与後の値を変化率として算出した。実験毎のプロットおよび平均値 \pm 標準誤差を 10 パラメーターについてグラフにした。*; $p < 0.05$ vs. 0.1% DMSO, **; $p < 0.01$ vs. 0.1% DMSO。

10. 4-アミノピリジン

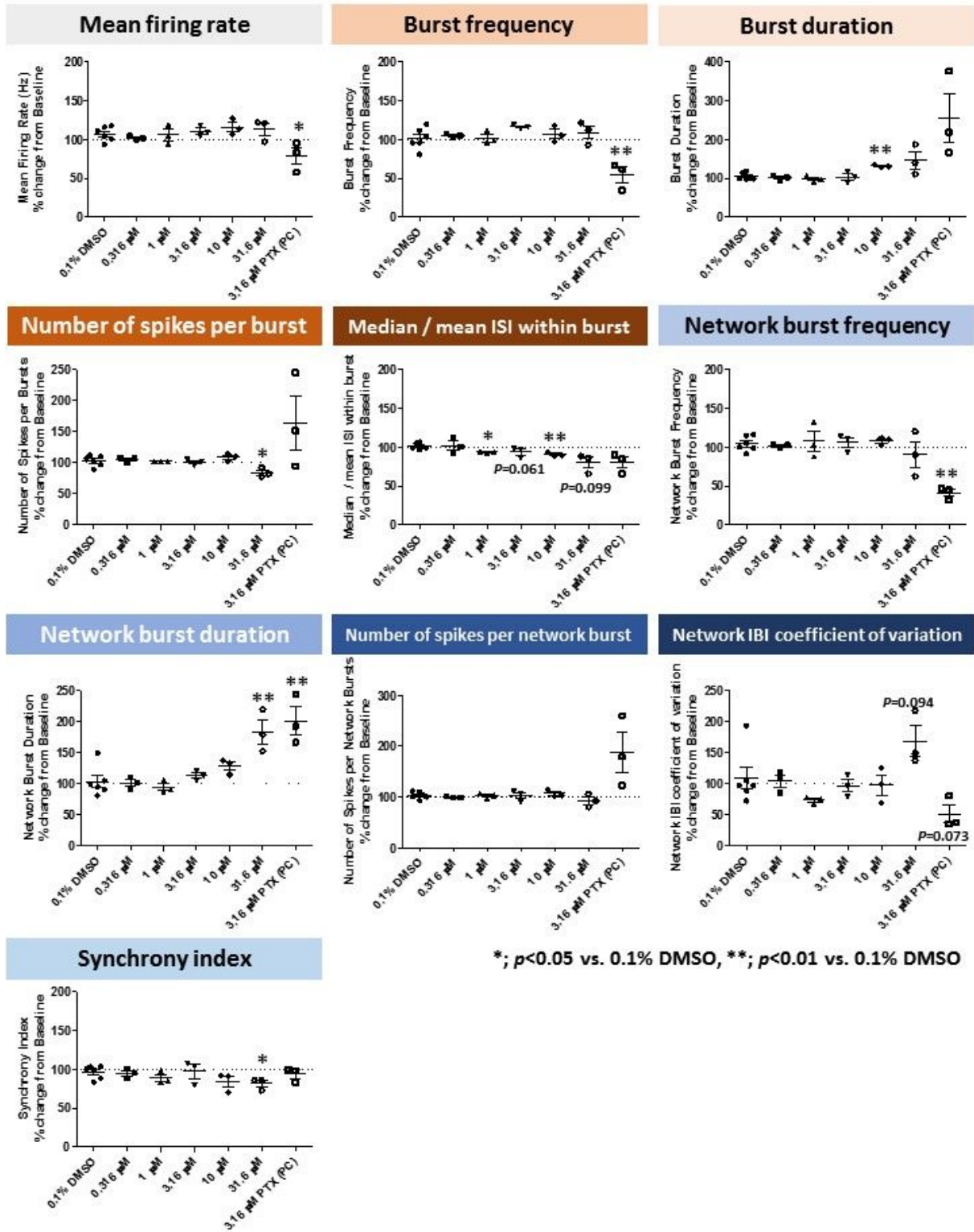


図 11 4-アミノピリジン

溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクروتキシン (PTX) 0.316-31.6 μM 4-アミノピリジンの投与前の値を 100% に規格化し投与後の値を変化率として算出した。実験毎のプロットおよび平均値 \pm 標準誤差を 10 パラメーターについてグラフにした。*; $p < 0.05$ vs. 0.1% DMSO, **; $p < 0.01$ vs. 0.1% DMSO。

11. アモキシシリン

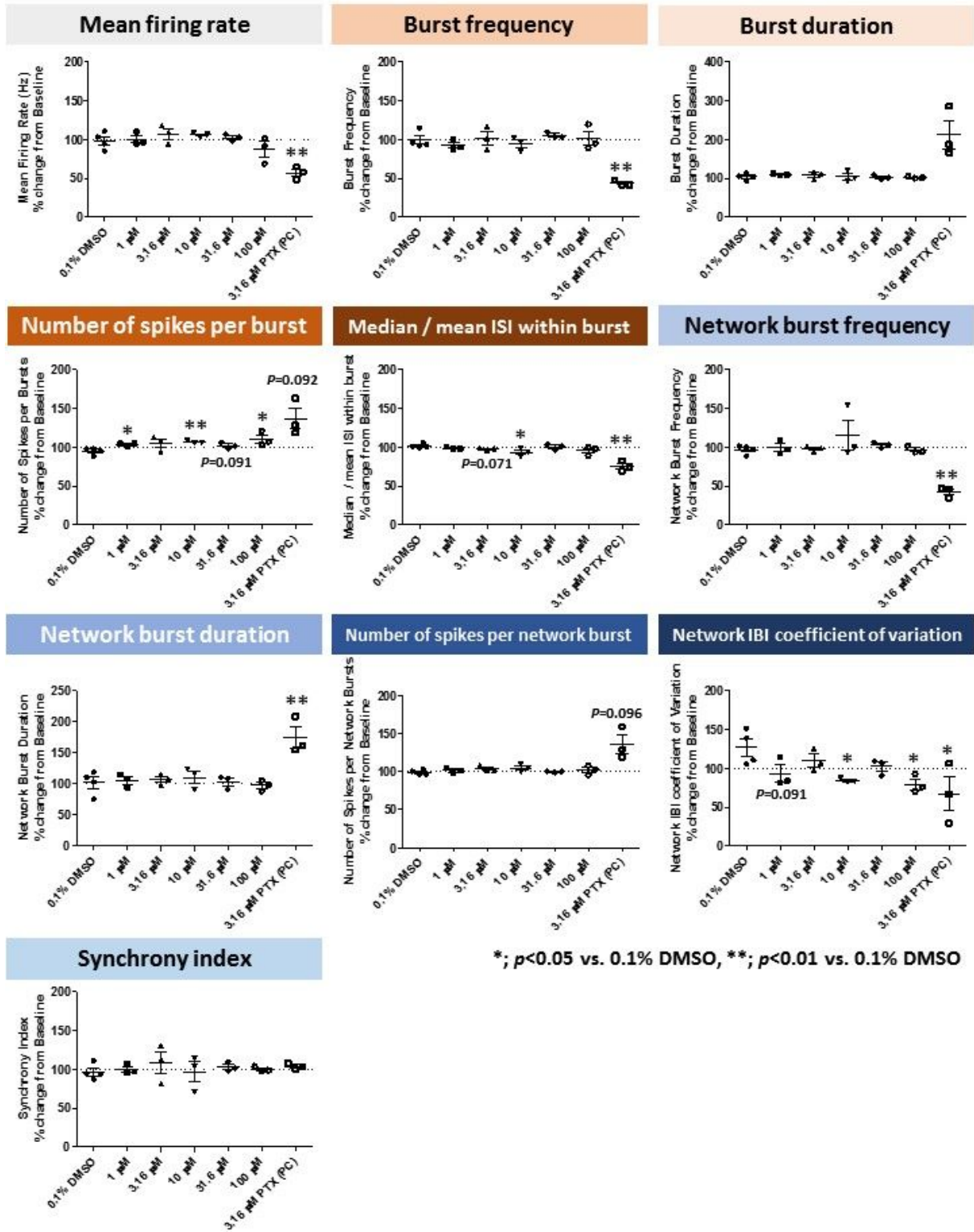


図 12 アモキシシリン

溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクトロキシン (PTX) 1-100 μM アモキシシリンの投与前の値を 100% に規格化し投与後の値を変化率として算出した。実験毎のプロットおよび平均値 ± 標準誤差を 10 パラメーターについてグラフにした。*; $p < 0.05$ vs. 0.1% DMSO, **; $p < 0.01$ vs. 0.1% DMSO。

12. アセトアミノフェン

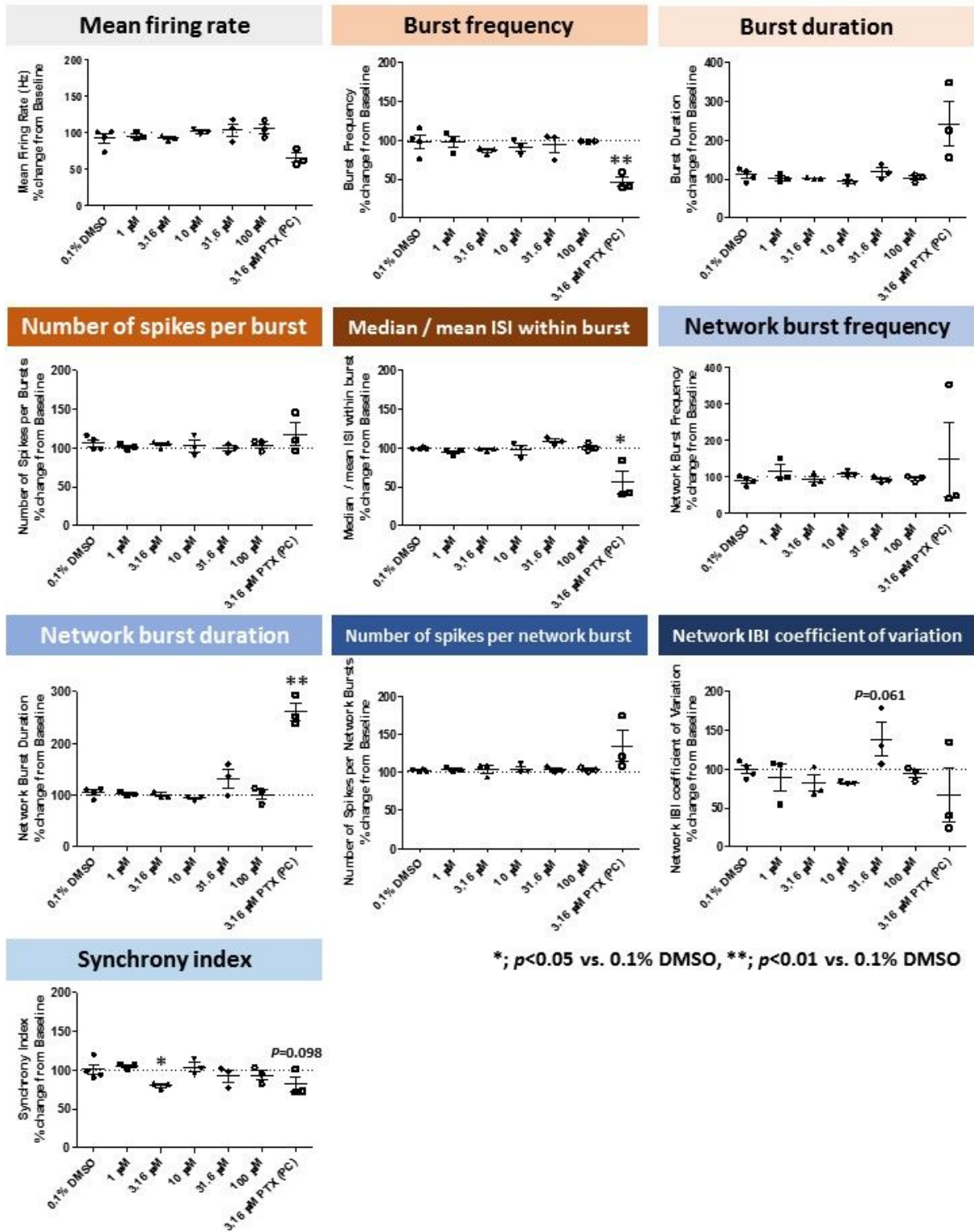
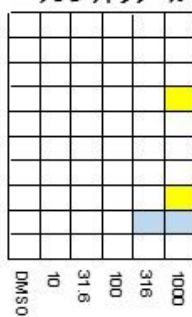


図 13 アセトアミノフェン

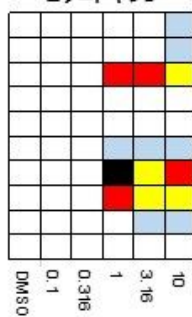
溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクロトキシン (PTX) 1-100 μM アセトアミノフェンの投与前の値を 100% に規格化し投与後の値を変化率として算出した。実験毎のプロットおよび平均値 \pm 標準誤差を 10 パラメーターについてグラフにした。*; $p < 0.05$ vs. 0.1% DMSO, **; $p < 0.01$ vs. 0.1% DMSO。

- 1 Mean firing rate
- 2 Burst frequency
- 3 Burst duration
- 4 Number of spikes per burst
- 5 Median / mean ISI within burst
- 6 Network burst frequency
- 7 Network burst duration
- 8 Number of spikes per network burst
- 9 Network IBI coefficient of variation
- 10 Synchrony index

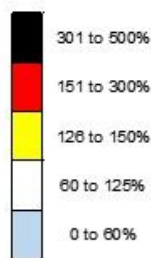
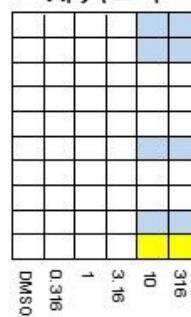
ペチレンテトラゾール



ピクロトキシン

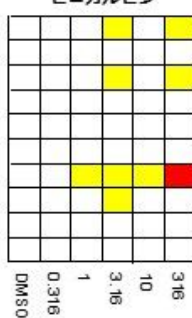


ストリキニーネ

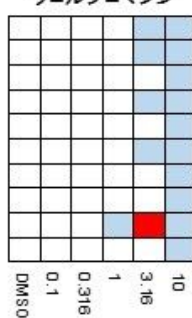


- 1 Mean firing rate
- 2 Burst frequency
- 3 Burst duration
- 4 Number of spikes per burst
- 5 Median / mean ISI within burst
- 6 Network burst frequency
- 7 Network burst duration
- 8 Number of spikes per network burst
- 9 Network IBI coefficient of variation
- 10 Synchrony index

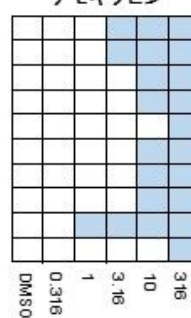
ピロカルピン



クロルプロマジン

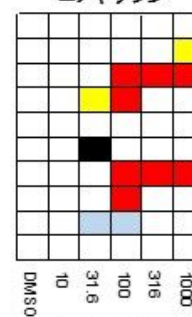


アモキサピン

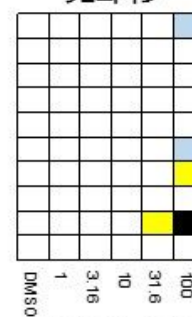


- 1 Mean firing rate
- 2 Burst frequency
- 3 Burst duration
- 4 Number of spikes per burst
- 5 Median / mean ISI within burst
- 6 Network burst frequency
- 7 Network burst duration
- 8 Number of spikes per network burst
- 9 Network IBI coefficient of variation
- 10 Synchrony index

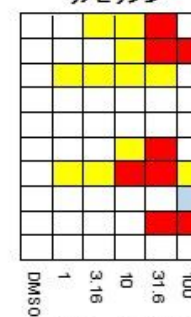
エノキサシン



フェニトイン

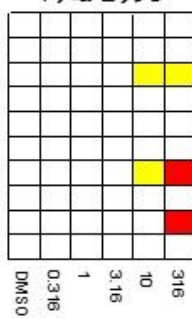


リノピリジン

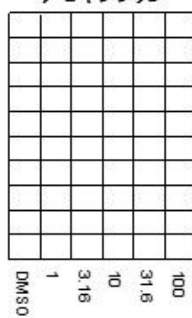


- 1 Mean firing rate
- 2 Burst frequency
- 3 Burst duration
- 4 Number of spikes per burst
- 5 Median / mean ISI within burst
- 6 Network burst frequency
- 7 Network burst duration
- 8 Number of spikes per network burst
- 9 Network IBI coefficient of variation
- 10 Synchrony index

4-アミノピリジン



アモキシシリン



アセトアミノフェン

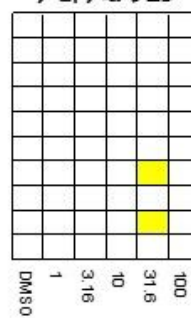


図 14 12 化合物の結果のまとめ

12 化合物について、投与後の変化率が 0-60% (薄水色)、60-125% (白)、126-150% (黄色)、151-300% (赤色)、301-500% (黒色) と設定し、ヒートマップにまとめた。

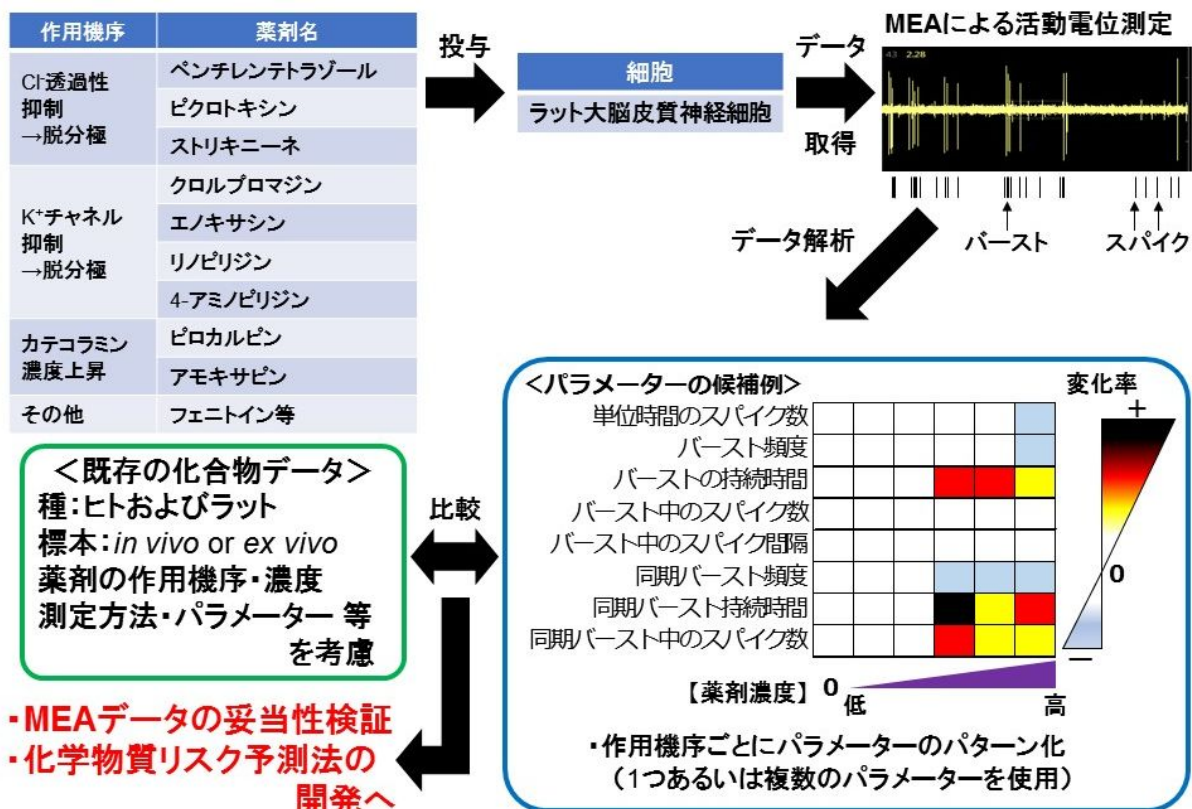


図 15 MEA による化学物質リスク予測法の開発戦略

今回得られたデータに加えてより多くの化合物データを取得し、ヒトやラットなどの *in vivo* あるいは *ex vivo* の既存データと比較することで、MEA データの妥当性を検証するとともに、化学物質リスク予測法への開発へとつながることが期待される。