

平成 28-30 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)
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 第二室長 山崎 大樹

要旨

本研究では、スループット性が高い化学物質の *in vitro* リスク予測系の開発を目的として、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(MEA)システムにより、以下の内容を実施した。第一に、高い再現性を目指すための条件検討項目として、プレートのコーティング方法、播種細胞密度、AraC の添加の有無、培地交換の量及び化学物質の投与方法について検証を行い、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。各々の条件検討の結果から、最適条件を得ることができ、その条件において再現性の高い結果が得られた。次に、今回のプロトコル整備にあたり、米国環境保護庁の Timothy J Shafer 教授との共同研究体制を構築した。さらに、HESI NeuTox の MEA サブチームにおけるプレバリデーション試験に関する議論に参加して、条件設定に関する有益な情報を得ることができた。また、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 12 化合物のバリデーション試験を実施した。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、環境中化学物質の暴露の可能性が考えられている。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: Multi electrode array)システム法による評価系の構築を目指した。

1 年目は、MEA システムとラット神経細胞の組み合わせによる培養や化学物質の投与方法などの検討を行い、実験条件の最適化を行った。2 年目には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するとともに、最適化された実験条件を用いて

評価指標の探索を行った。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。3 年目には、最終化した実験条件および評価指標を用いて、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

細胞は群馬大学・白尾智明教授の研究室で胎生 18 日目のラット胎仔海馬より単離・凍結された凍結ラット胎仔海馬神経細胞およびラット大脳皮質神経細胞(Lonza)を用いた。

2. プレートコーティング

AxionBiosystems 社製 Maestro プレート(48 ウェルタイプ)の各ウェルに 100 μ l の 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))を添加し、インキ

ュベーター内に 1 時間静置した。その後、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。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. 細胞の解凍および播種

細胞バイアルを液体窒素保存容器から取り出し、速やかに 37°C の温浴に 3 分間浸した。その後、クリーンベンチ内で細胞懸濁液を 50 ml チューブに移し、バイアル内を播種用培地 (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 (海馬神経細胞: 6,000~50,000 細胞/ウェル、大脳皮質神経細胞: 120,000 細胞/ウェル) 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。2 時間後、500 µl の培地を添加し、2~3 日おきに培地交換を行った。化合物を 3~5 濃度ずつ添加し、その投与前後で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。

4. MEA システム

使用した 48 ウェルプレートの各ウェルには、4 x 4 の合計 16 個の電極がパターンニングされている。このプレートで細胞を培養した状態で MEA システムにセットすると、各電極における自発的なスパイク発生をアクティビティマップにて可視化することができる (図 1A)。MEA システムではスパイクの検出閾値をノイズレベルの 6~8 倍に設定することでノイズの検出を防いでおり、検出閾値を超えたスパイクはラスタープロットとして表される (図 1B)。神経細胞の成熟とともにスパイクの発生頻度は増加し、やがて神経細胞の突起同士がシナプスを形成することで神経ネットワークを構築する。神経ネットワークの構築により各神経細胞で独立に発生しているスパイクが同期し、最終的にはバーストやネットワークスパイクと呼ばれる連続的でウェル中の複数の電極で同期した電位変化が起こるようになる (図 1C)。

5. 解析

化合物の投与は、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とした。評価指標としては、平均発火頻度 (MFR: Mean firing rate、1 ウェルで 1 分間に発生したスパイク数を活性化電極数で割ったもの) と活性化電極数、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。また、HESI NeuTox の化合物については下記の 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 2 に示した。

6. 化合物

評価した化合物は以下の通りである。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)、ピ

ククリン(BIC)、ベラパミル(VER)。また、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。

C. 研究結果

1. 細胞の解凍

通常、ラット等げっ歯類の胎児から単離した神経細胞は、そのまま分散培養して各種実験に供する。しかしながら、状態の良い細胞を単離するには熟練した技術が必要であり、またそのための単離・培養設備を準備しなければならない。神経細胞を凍結することで同一ロットの細胞バイアルを大量に作成することができ、事前に当該ロットの状態をグルタミン酸に対する反応性などで確認することが可能なことから、再現性の高い結果が期待できる。一方で、細胞の凍結・融解は細胞に対してダメージを与えることが知られているため、凍結・融解による細胞の生存率への影響について、群馬大学・白尾教授の研究室にて作製されたラット海馬神経細胞を用いて検証した。表 2 にまとめたように生細胞数と死細胞数はほぼ半々であり、生存率としては平均 50%強であった。ロットや実験者(融解の際の)に依存した差はほとんどなかった。

2. コーティングに関する検討

Axion 社が提供している Maestro 用プロトコルでは、0.1% PEI によるプレートコーティングを推奨している。一方で、ラット海馬神経細胞のコーティングについては、群馬大学にて PLL (Poly-L lysine) コーティングが実施されている。そこで、PEI コーティングと PLL コーティングを 1 枚のプレートに施し、その他の条件を全く同一にして実験を行った。その結果、平均発火頻度、活性化電極ともに PLL コーティングよりも PEI コーティングにおいて、顕著な値の上昇が確認された。電極がパターンニングされていない通常プレートによる細胞観察では、培養開始 2 日後には細胞の凝集が PLL コーティングの方で観察されている一方で、PEI コーティングでは、細胞が接着していないことによる隙間が極端に少なかった。次に PEI コーティングがどの程度有効なのかを調べるため、PEI コーティング直後、約 3 週間後および約 4 週間後のプレートをを用いて実験を行った。その結果、コーティング 3 週間以降のプレートでは、活性化電極数はコーティング直後のものと大差ない変化を示すものの、平均発火頻度の時間依存的な上昇は AraC の有無にかかわらずコーティング直後に比べて低い値で推移することが明らかとなった(図 3)。活性化電極数については、コーティング期間の長さには影響されなかった。

以上より、Maestro による MEA システムにおいては、PEI コーティングの方が適しており、コーティングの効果は 3 週間保存することで低減することが示唆された。

3. 細胞播種密度の検討

MEA システムの性質上、電極部分に細胞が存在しなければスパイクの計測は不可能である。我々は再現性の高い結果を得るため、ラット海馬神経細胞について細胞播種密度の検討を行った。これまでに他の研究室ではラット大脳皮質神経細胞における検討が行われており、その際の細胞播種密度は 150,000 細胞/25 μ l である。今回の検討では、播種する細胞懸濁液量を全電極が覆うことのできる最小量 10 μ l とした。これまでの論文における細胞播種密度に関する情報と最小量 10 μ l を鑑みたくて細胞播種密度以外の条件を揃えて 6,000、12,500、25,000、50,000 細胞/10 μ l の 4 条件にて計測を行ったところ、12,500 細胞/10 μ l 以下では平均発火頻度および活性化電極数のいずれもほとんど増加しなかった。25,000 細胞/10 μ l の条件では、50,000 細胞/10 μ l の条件と比較して、平均発火頻度の増加が緩やかであり、また最高値も低かった(図 4A)。活性化電極数については、50,000 細胞/10 μ l では 16 電極全てが活性化する一方で、25,000 細胞/10 μ l では最高で 12~14 電極が活性化した(図 4B)。細胞数を増やすことで 16 電極全てを確実に覆うことが可能になるものと考察される。以上より、ラット海馬神経細胞の細胞播種密度は、50,000 細胞/10 μ l が妥当との結論に至った。

4. AraC の添加に関する検討

神経細胞単離の際、グリア細胞の混入は避けられない。また、血清存在下での培養によりグリア細胞は増殖するため、グリア細胞の割合によって化学物質に対する応答も異なる可能性が考えられる。

そこで、グリア細胞の増殖による神経ネットワーク形成への影響を検討するため、グリア細胞の増殖抑制剤である 0.5 μM AraC を培養開始 5 日目に添加し 7 日目に除去する群 (0.5 AraC) と AraC を添加しない群 (0 AraC) の 2 群についてラット海馬神経細胞を用いて比較した。その結果、0 AraC および 0.5 AraC のいずれにおいても培養開始 7 日後から急激な平均発火頻度の上昇が観察された (図 5A)。平均発火頻度の最高値は 0 AraC の方が高かった。これは、グリア細胞の増殖が抑制されなかったことにより、グリア細胞の影響により神経細胞間のネットワーク形成が亢進した可能性が考えられた。両群で活性化電極数の経時的変化に大きな差はなく (図 5B)、いずれの群においても培養開始 12~19 日目において平均発火頻度の値が安定していたことから、化学物質の急性投与実験を行うタイミングとしては、培養開始 16 日目が最適だと考えられる。

培地を全量交換ではなく半量あるいは 1/3 量で交換することで AraC の濃度を徐々に薄くしていく方法もある。しかし、Maestro プレートはウェル間で培地の蒸発量が異なっていることから、AraC の濃度を徐々に薄める方法では、同一の条件とはなり得ない。従って今回は培養 7 日目に AraC を培地の全量交換によって除去した。神経細胞の単離 (ロット) ごとにどの程度グリア細胞が混入しているかは不明であることから、AraC 非添加の場合にグリア細胞と神経細胞の割合がどの程度なのかは全く予想できない。AraC の添加によってグリア細胞の増殖がある程度抑制されれば、培養期間を通じてのグリア細胞が混入している割合はそれほど大きくばらつかないのではないかと考えられる。現段階では、定量的にどちらが最良か判断できないため、引き続き条件検討を続けることが必要である。

5. 培地交換量

本研究では、最大で 28 日間の培養を行うが、その間 3 日あるいは 4 日おきに培地交換を行う。その際、ウェル中のすべての培地を除

去して新たに培地を添加すると、細胞が乾燥してしまい結果に影響することが予想された。そこで、培地交換の量を半量あるいは全量の 2 条件について検討を行った。その結果、0 AraC の半量交換が全量交換に比べて顕著に高い平均発火頻度だったが、0.5 AraC では半量交換と全量交換に大きな差はなかった (図 6A)。活性化電極数にも半量交換と全量交換で大きな差はなかった (図 6B)。

3 日あるいは 4 日おきに培地交換を行うと、インキュベーター内の湿度が十分であっても各ウェルより培地が蒸発していく。しかもウェルごとに蒸発量が異なるため培地量を一定に保つことが困難だと考えられる。0.5 AraC の場合、半量交換と全量交換で大差なかったことから全量交換によって毎回ウェル中の培地を一定量に保つことが最適だと考えられる。

6. 急性投与の投与操作の検討

上述したように、化学物質の急性投与実験を行うタイミングとしては、培養開始 16 日目付近が最適だと考えられる。急性投与実験では、化学物質の投与前後でのパラメーターの比較を行うことから、化学物質による作用のみを抽出する必要があり、溶媒や投与操作によるパラメーター変動は避けたい。そこで、溶媒に最も多く用いられる培地と DMSO に関して、投与操作の検討を行った。DMSO の最終濃度を 0.1% に抑えたいため、500 μl の培地に対して 5% DMSO を 10 μl 投与した。

10 μl の培地および DMSO を 1 ショットで投与した場合、培地では平均発火頻度の大きな変化は観察されなかったものの、DMSO の投与により平均発火頻度の値が大きく変化し時にはまったくスパイクが観察されない時間帯もあった (図 7)。これは高濃度の DMSO が神経細胞に対して直接作用したためだと考えられる。次に高濃度の DMSO が細胞に直接作用することを避けるため、以下の 4 つの投与方法を検討した。① 10 μl の 5% DMSO を 1 ショットではなく、ゆっくりと時間をかけてウェル中に投与、② 96 ウェルプレートに配置した 10 μl の 5% DMSO に細胞を培養している実際のマエストロプレートのウェルから培地を 50 μl 抜いて混合し、元のウェルに戻す方法、③ ②における培地量を 100 μl にした方法、④ ②における培地量を 200 μl にした方法。①は 1 ショットで投

与した場合と同じように、平均発火頻度が大きく変動した(図 8A)。②では添加直後に平均発火頻度がゼロとなる時間帯も観察された(図 8B)。③④はウェルに投与する DMSO の濃度が大幅に薄くなっていることから、投与による影響はほぼ消失した(図 8C,D)。以上より 100 μ l 以上の培地と 5% DMSO を混合し、ウェルに投与することが最適だと考えられる。

7. 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

ラット海馬神経細胞において、1 年目はこれまでに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: Day5-7 に 0.5 μ M, 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 μ l 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 の経時的变化について、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 9A)。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 9B)。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 μ M まで投与しても MFR に変化がなかったが、3 μ M TBT、30 μ M 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 10A)。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 10B)。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。

8. 国際共同研究体制の構築

上記の条件検討を行うにあたり非常に有用

だったのが、米国環境保護庁 (EPA) の Timothy J Shafer 教授との共同研究体制である。EPA を訪問し、実際に作業を行っている実験補助の方を交えて直接話をする事で技術的な問題が解決できるとともに、プロトコルの最適化を加速することができた。特に、プレートのコーティングおよび細胞播種について、コーティング剤である Laminin を培地に混合しそこに細胞を懸濁させて播種することで、コーティング時間の短縮と電極上への確実な細胞播種を実現することができ、再現性が飛躍的に向上した。また、HESI (Health and Environmental Sciences Institute) の NeuTox サブチームにも参加し、プレバリデーションに関する議論を進めている。

9. HESI NeuTox MEA サブチームにおけるバリデーション試験

HESI NeuTox MEA サブチームでは、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した施設および使用する細胞を表 3 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 μ l 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 11A には、3 種類の培地における MFR の経時的变化を、図 11B には、AE の経時的变化を

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 11C)。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 12A-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。

10. 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 13-24)。また、これらの結果を一見できるようヒートマップにまとめた(図 25)。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が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、フェントイン、4-アミノピリジン、アミキシシリンは 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、ラット神経細胞および MEA システムを用いて神経ネットワーク形成後の化学物質のリスク予測評価系の開発を目指し、1 年目にはプレートコーティング方法、播種細胞密度、AraC の添加、培地交換の量について検証を行った。その結果、最適だと考えられる条件が選択でき、より高い再現性が得られた。また、化学物質の投与方法についても溶媒である DMSO を用いて検証した。DMSO を 10 倍に薄めて投与する方法は測定パラメーターへ影響を与えないことが明らかとなった。

2 年目には、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ことが可能である。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。

3 年目には、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

海馬ニューロンを用いて神経ネットワーク形成過程およびネットワーク形成後の化学物質の毒性評価系の開発を行い、再現性が高く最適な評価系を構築した。また、対照物質の投

与方法についても適切な方法を見出した。次いで、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。最後に、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

F. 研究発表

1. 論文発表

- [1] Yamada S, Kubo Y, Yamazaki D, Sekino Y, Kanda Y. Chlorpyrifos inhibits neural induction via Mfn1-mediated mitochondrial dysfunction in human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep.* 7, 40925 (2017).
- [2] 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*, 7:290-295 (2017).
- [3] Yamada S, Yamazaki D, Kanda Y. Silver nanoparticles inhibit neural induction in human induced pluripotent stem cells. *Nanotoxicology*. 14, 1-11 (2018).
- [4] 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).
- [5] 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] Yasunari Kanda, Shigeru Yamada, Naoya Hirata, Daiju Yamazaki, and Yuko Sekino. Role of mitochondrial dynamics in neural toxicity assessment in human iPSC cells. 5th Annual Meeting of the American Society for Cellular and Computational

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。

Toxicology. US EPA Building Research Triangle Park, NC. 2016.9.29-30

- [2] 山田茂、山崎大樹、諫田泰成：ヒト iPSC 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、2017/7/8 (東京)
- [3] 山田茂、山崎大樹、諫田泰成：ヒト iPSC 細胞の神経分化に対するトリブチルスズの影響、第 44 回日本毒性学会、2017/7/11 (横浜)
- [4] 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、2017/7/12 (横浜)
- [5] 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, 2017/8/20-24 (シアトル、米国)
- [6] 山田茂、山崎大樹、諫田泰成：ヒト iPSC 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、2017/9/16 (東京)
- [7] Yamada S, Yamazaki D, Kanda Y: Development of human iPSC cell-based platform for developmental neurotoxicity testing, Safety Pharmacology Society 2017, 2017/9/24-28 (ベルリン、ドイツ)
- [8] Yamada S, Yamazaki D, Kanda Y : Novel role of mitochondrial fusion factor Mfn1 in neural differentiation of human iPSC cells, WCP, 2018/7/1-5 (京都、日本)

- [9] 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)
- [10] 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)
- [11] 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)
- [12] 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)
- [13] 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)
- [14] 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、2019/3/16 (大阪)

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

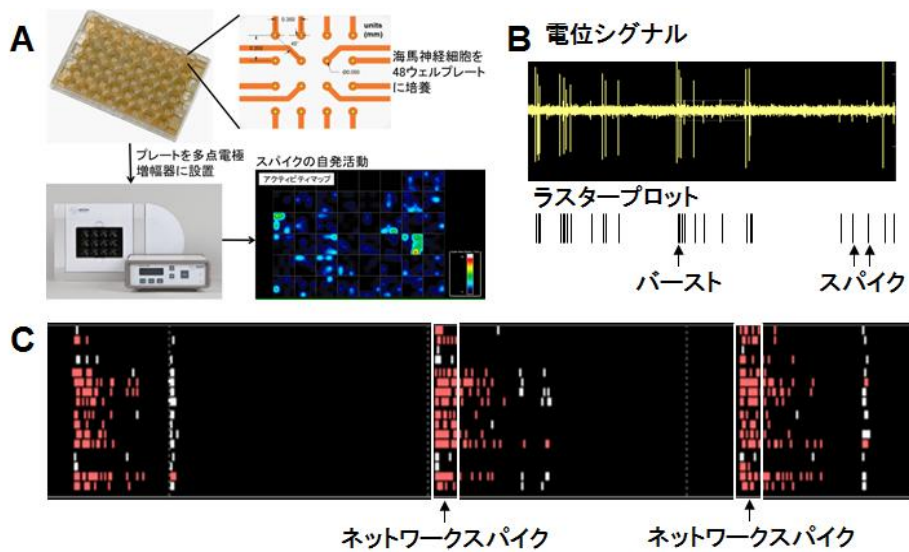


図 1. 神経細胞を用いた多点電極システムについて

A. 各ウェルに16個の電極が埋め込まれている48ウェルプレートに対して凍結ラット胎仔海馬神経細胞を1ウェルあたり50,000細胞を播種・培養し、Axion社製多点電極システムに設置し、神経活動を記録する。神経活動（スパイク）がアクティビティマップとして疑似カラー表示される。

B. 1電極ごとに電位シグナルが検出され、検出閾値よりも大きなシグナルはラスタープロットとして表示される。ラスタープロット1本1本はスパイクを表しており、スパイクがまとまって発生した場合にはバーストと呼ばれる。

C. 1ウェル（16電極）のラスタープロット。同期したスパイクをネットワークスパイクと呼ぶ。白のラスタープロットは単一のスパイク、赤のラスタープロットはバーストを表している。

1. Mean Firing Rate (単位時間あたりのスパイク数)

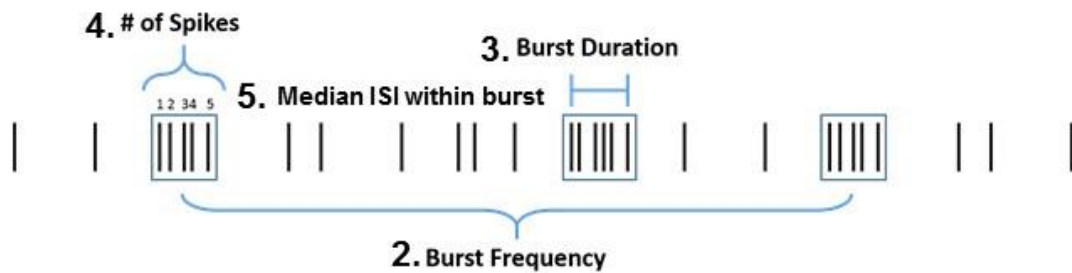


2. バースト頻度 (単位時間あたりのバースト頻度)

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

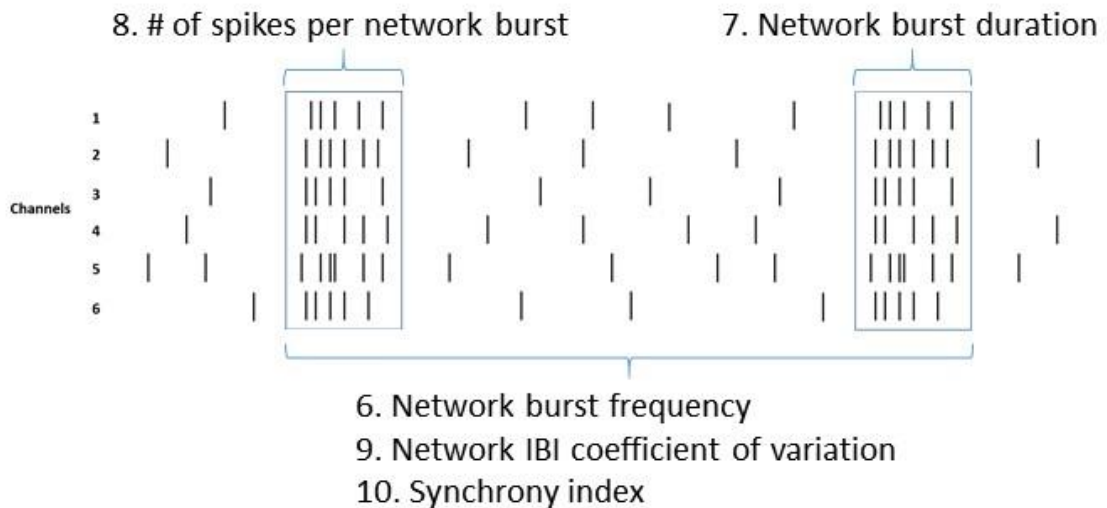


図 2. 各パラメーターについての説明

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。

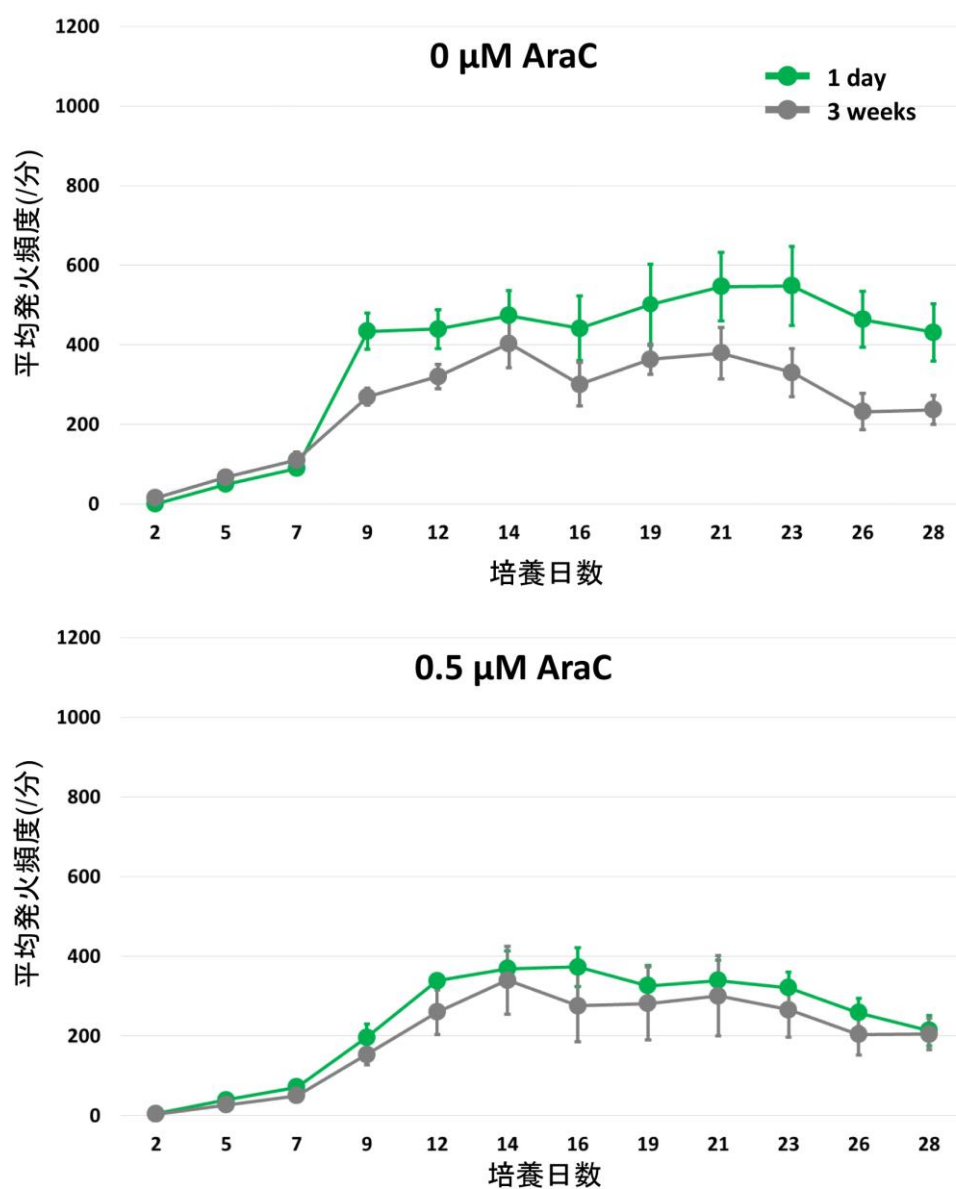


図 3. コーティング後の保存期間の検討

マエストロプレートに対して 0.1% PEI コーティングを行った後、1 日 (1 day) あるいは 3 週間 (3 weeks) 後に細胞を播種し、28 日後まで計測を行った。AraC を適用しない場合 (上段) には、3 weeks に比べて 1 day の方が平均発火頻度は高値であった。一方で、0.5 μM AraC の適用 (下段) では、1 day および 3 weeks に大きな差はなかったものの、コーティングから時間が経過すると、若干低い平均発火頻度で推移する傾向があった。

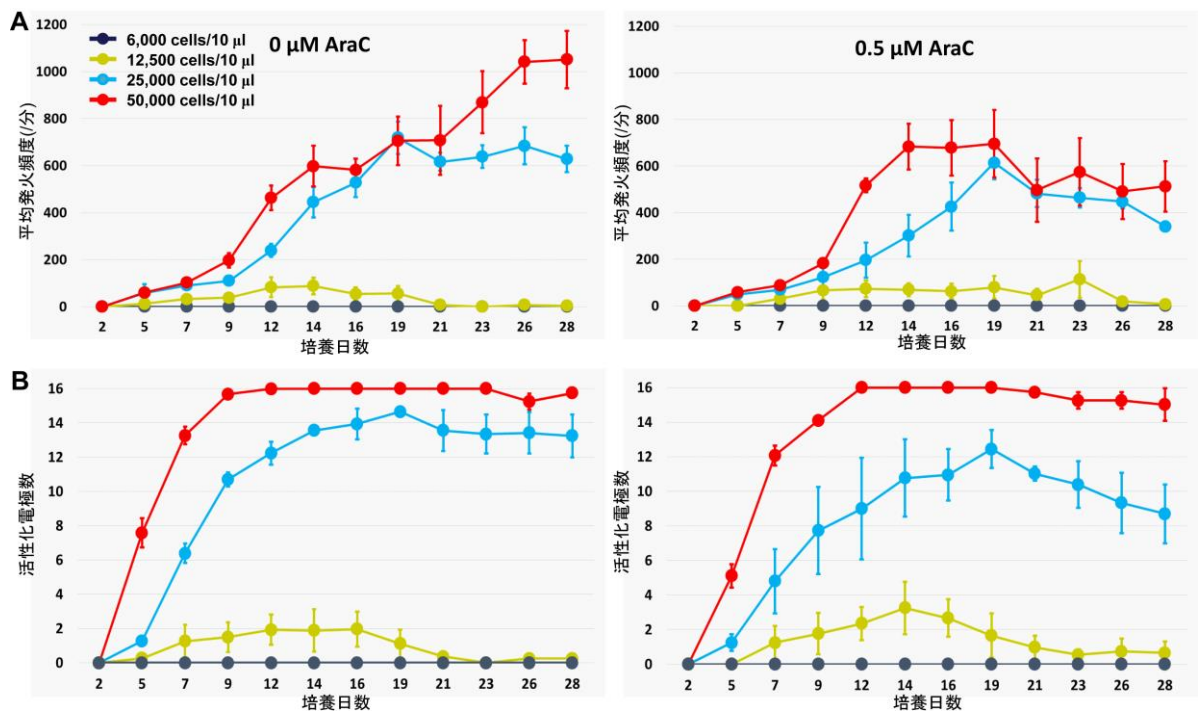


図 4. 播種細胞密度の検討

播種細胞密度について 6,000、12,500、25,000、50,000 細胞/10 μl で検討を行った。0 μM AraC (左) および 0.5 μM AraC (右) を適用した際の平均発火頻度 (A) および活性化電極数 (B) について 28 日まで計測した。6,000 細胞/10 μl および 12,500 細胞/10 μl では、培養期間が 9 日を過ぎたところで平均発火頻度が上昇せず、28 日目まで低値であった。活性化電極数も 12,500 細胞/10 μl や 25,000 細胞/10 μl ではほとんどの電極が活性化しなかった。25,000 細胞/10 μl では、50,000 細胞/10 μl に比べてわずかに遅れて平均発火頻度が上昇したものの、すべての電極が活性化しなかったことから全電極を覆うことができないものと考えられる。

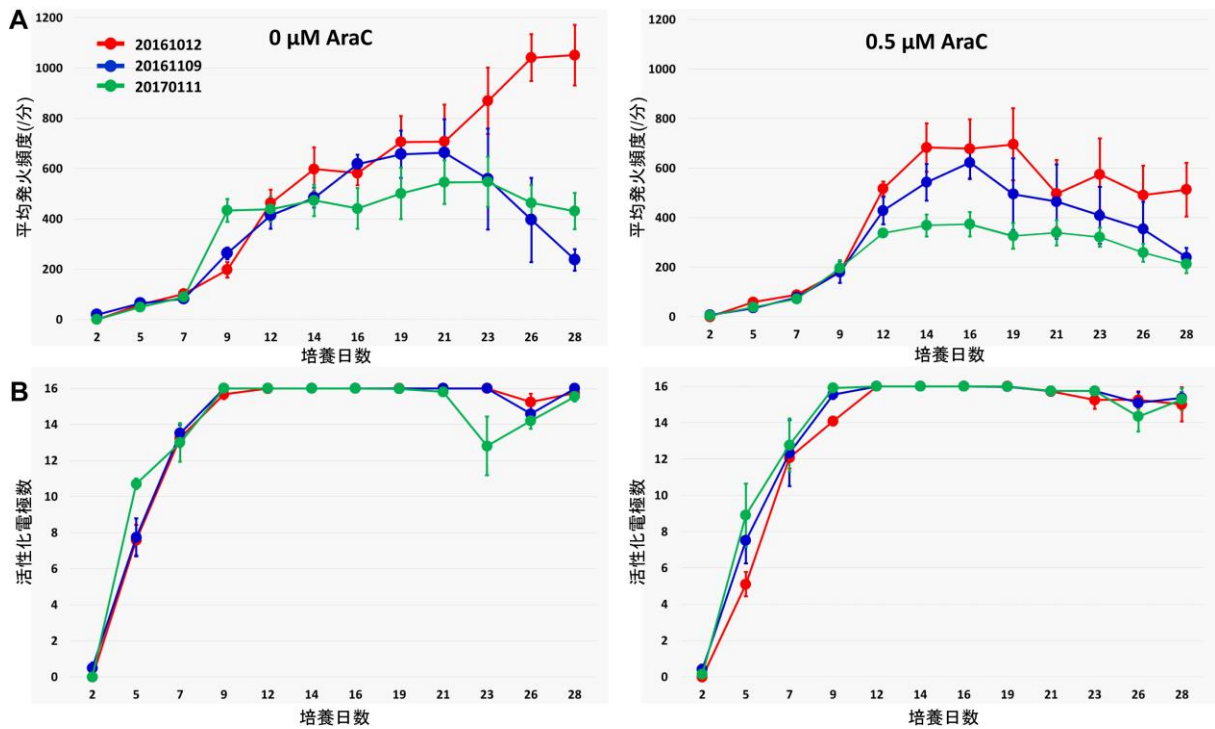


図 5. AraC 濃度の検討

Day 5 から Day 7 の 3 日間に培地に AraC を加えるかどうかの検討を行った。0 μM AraC (左) および 0.5 μM AraC (右) を適用した際の平均発火頻度 (A) および活性化電極数 (B) について 28 日まで計測した。それぞれ同一ロット、同一条件にて 3 回行った結果を示した。AraC の添加、非添加のいずれにおいても平均発火頻度は Day 7 あるいは Day 9 から上昇し、一部を除いて Day 21 あたりから下降を始めた。活性化電極数については、いずれも Day 12 では最大値まで到達し、Day 19 まではそれを維持した。

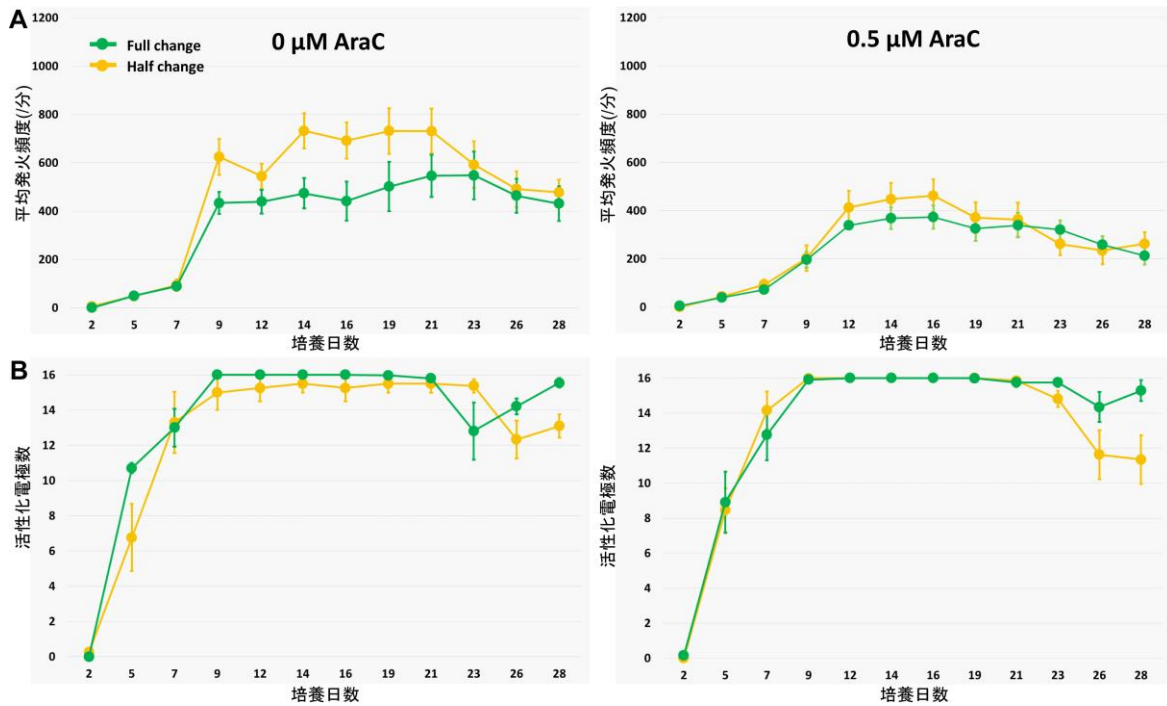


図 6. 培地交換量の検討

3 日あるいは 4 日おきに実施している培地交換に関して、交換する培地の量を全量（緑）あるいは半量（黄色）か検討を行った。0 μM AraC（左）および 0.5 μM AraC（右）を適用した際の平均発火頻度（A）および活性化電極数（B）について 28 日まで計測した。平均発火頻度については、0 μM AraC の半量交換を除いて他の 3 条件はほぼ同じような値で変化した。活性化電極数についても 0 μM AraC の半量交換のみ最大値に到達しなかった。半量交換の条件では、培養期間後半の Day 23 あたりから活性化電極数の下降が目立った。

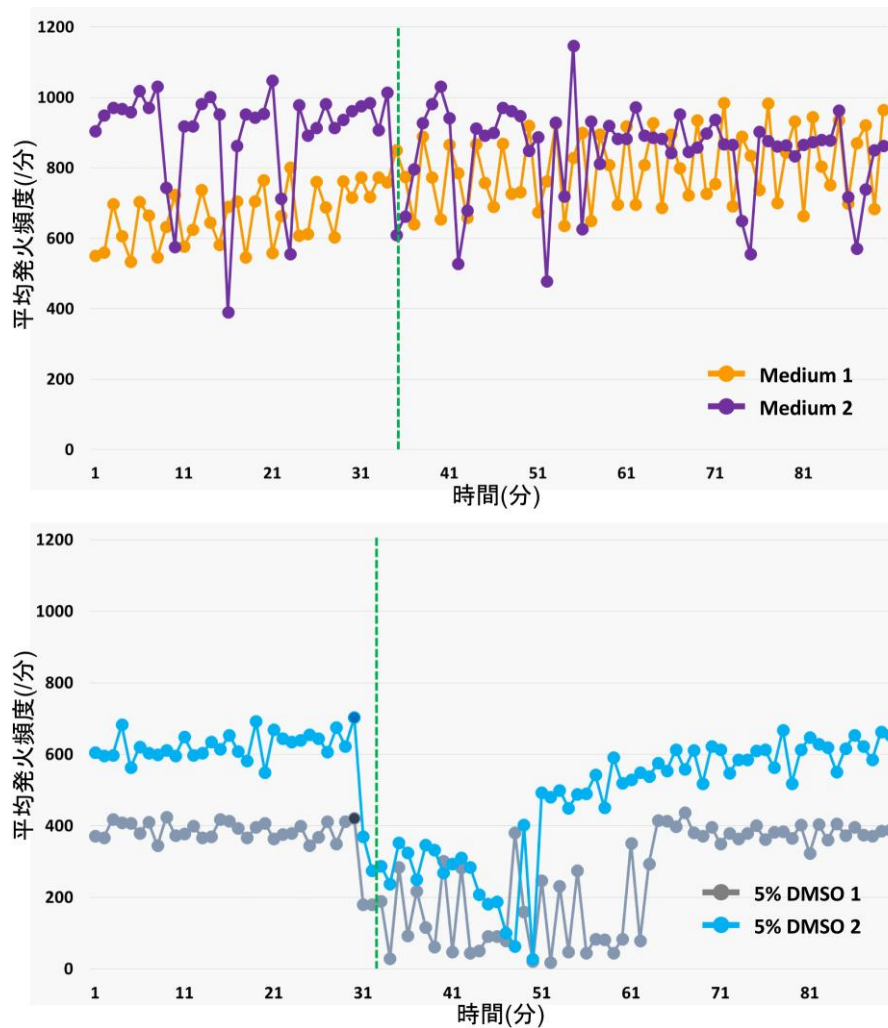


図7. 投与方法に関する検討1

化学物質の投与方法に関する検討。およそ30分間の測定後に10 μ lのmedium(上段)および5% DMSO(下段)を1ショットでウェル中に投与し、その後60分間平均発火頻度を記録した。1分間ごとの総平均発火頻度をプロットした。緑色の点線がそれぞれ投与したタイミングである。Mediumを投与した細胞は培養26日目、DMSOを投与した細胞は培養16日目である。Mediumの投与では、平均発火頻度に大きな乱れは観察されなかったが、5% DMSOの投与によって急激な平均発火頻度の下降が観察され、その後30分間元の値に戻らなかった。

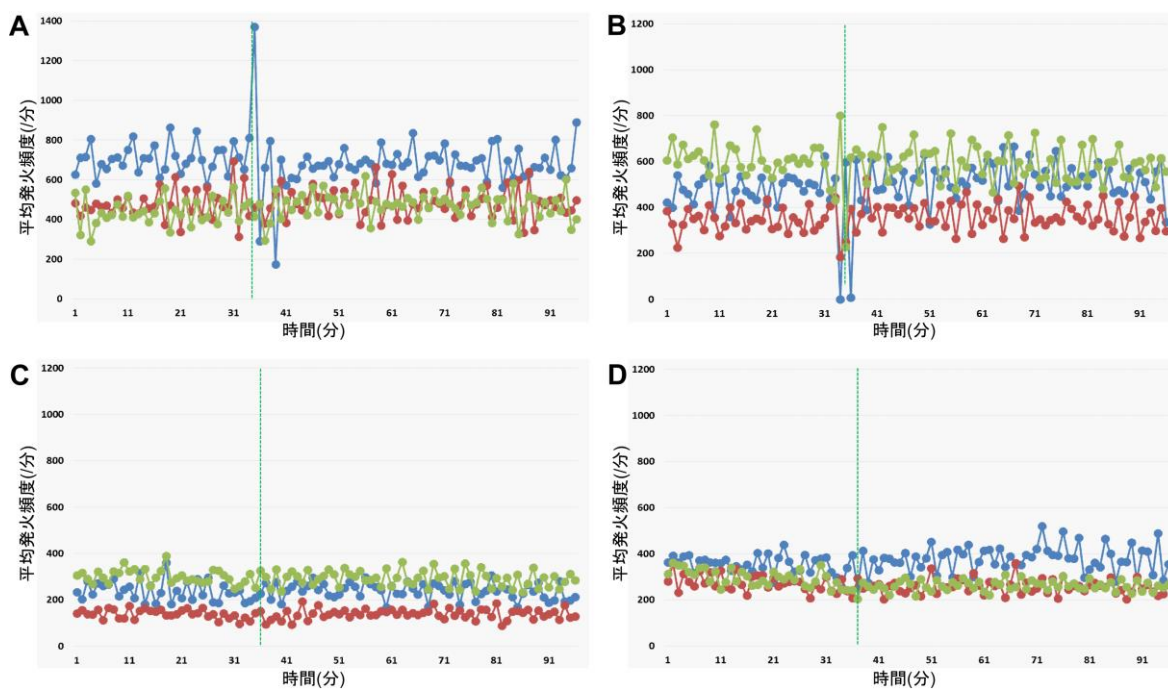


図 8. 投与方法に関する検討 2

化学物質の投与方法に関する検討。およそ 30 分間の測定後に 5% DMSO をウェルにゆっくりと添加 (A)、96 ウェルプレートに分注した 10 μ l の 5% DMSO に記録するウェルから 50 μ l の培地を抜いて混合しその混合液を記録するウェルに添加 (B)、96 ウェルプレートに分注した 10 μ l の 5% DMSO に記録するウェルから 100 μ l の培地を抜いて混合しその混合液を記録するウェルに添加 (C) および 96 ウェルプレートに分注した 10 μ l の 5% DMSO に記録するウェルから 200 μ l の培地を抜いて混合しその混合液を記録するウェルに添加 (D) した。添加の後 60 分間平均発火頻度を記録した。1 分間ごとの総平均発火頻度をプロットした。緑色の点線がそれぞれ投与したタイミングである。100 μ l 以上の培地に 5% DMSO を混合した場合に添加による影響が観察されなくなった。

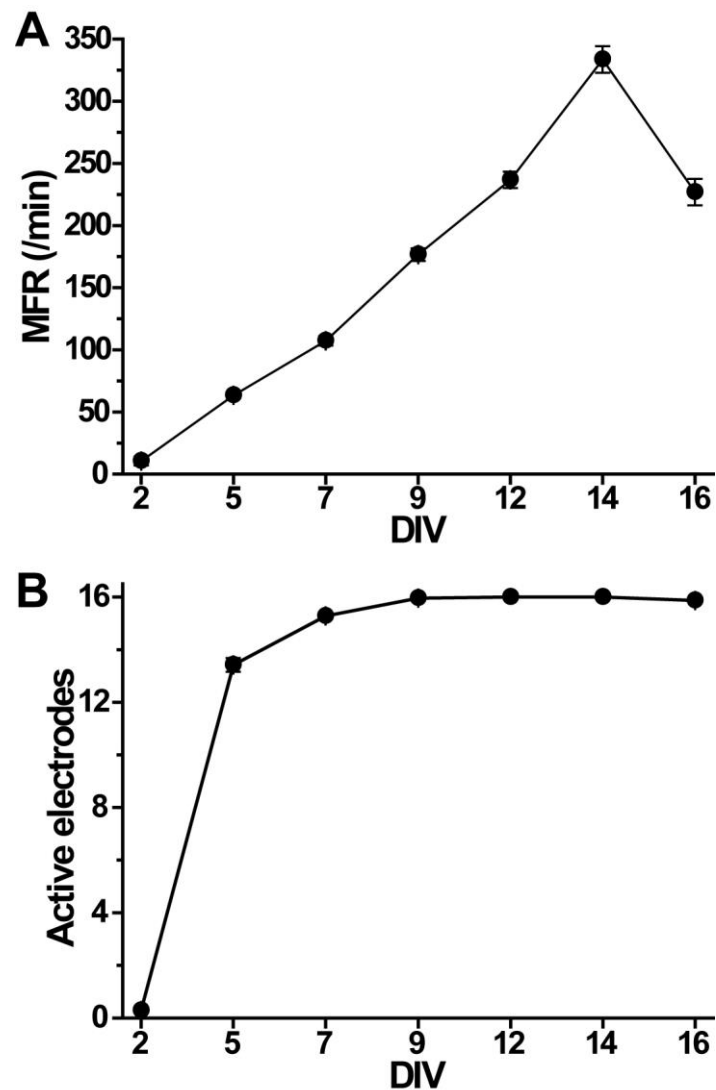


図9. ラット海馬神経細胞における神経活動の経時的変化

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。

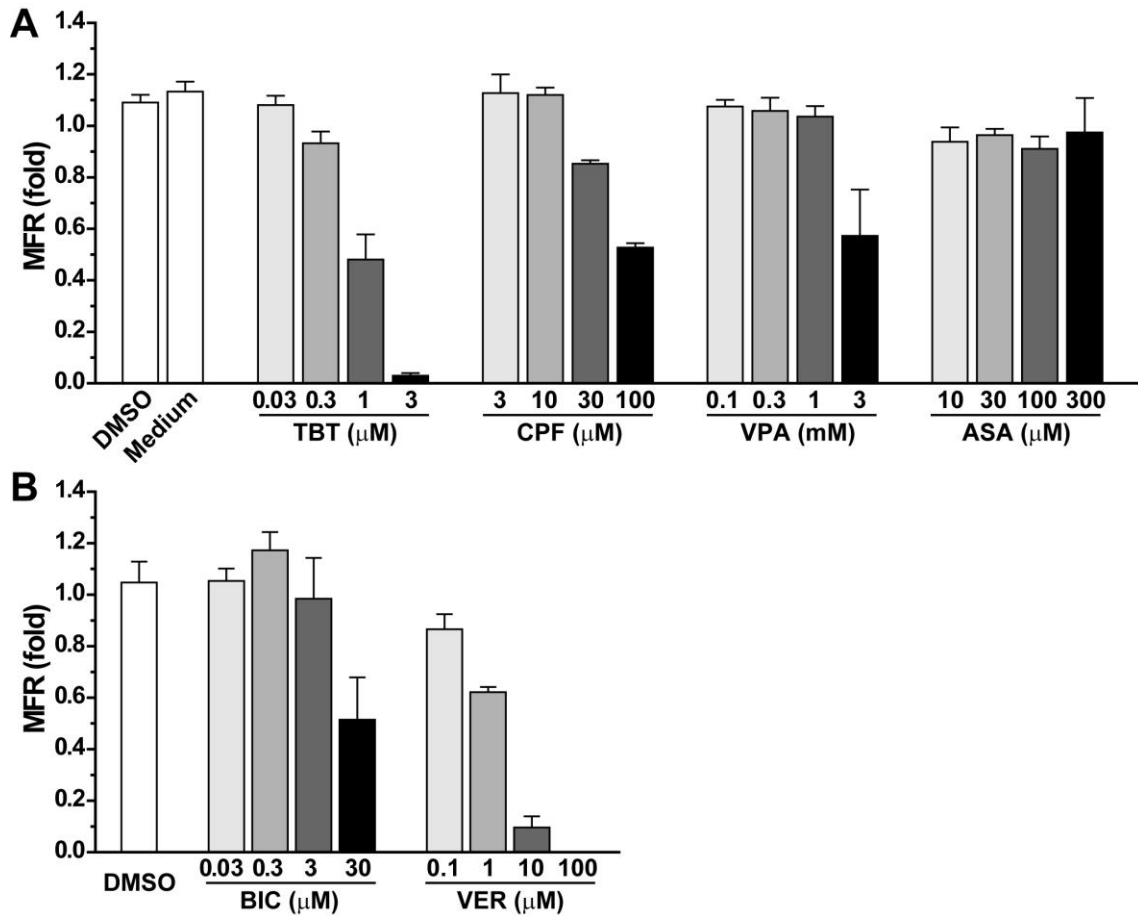


図 10. ラット海馬神経細胞における化学物質の急性投与に対する反応

(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。

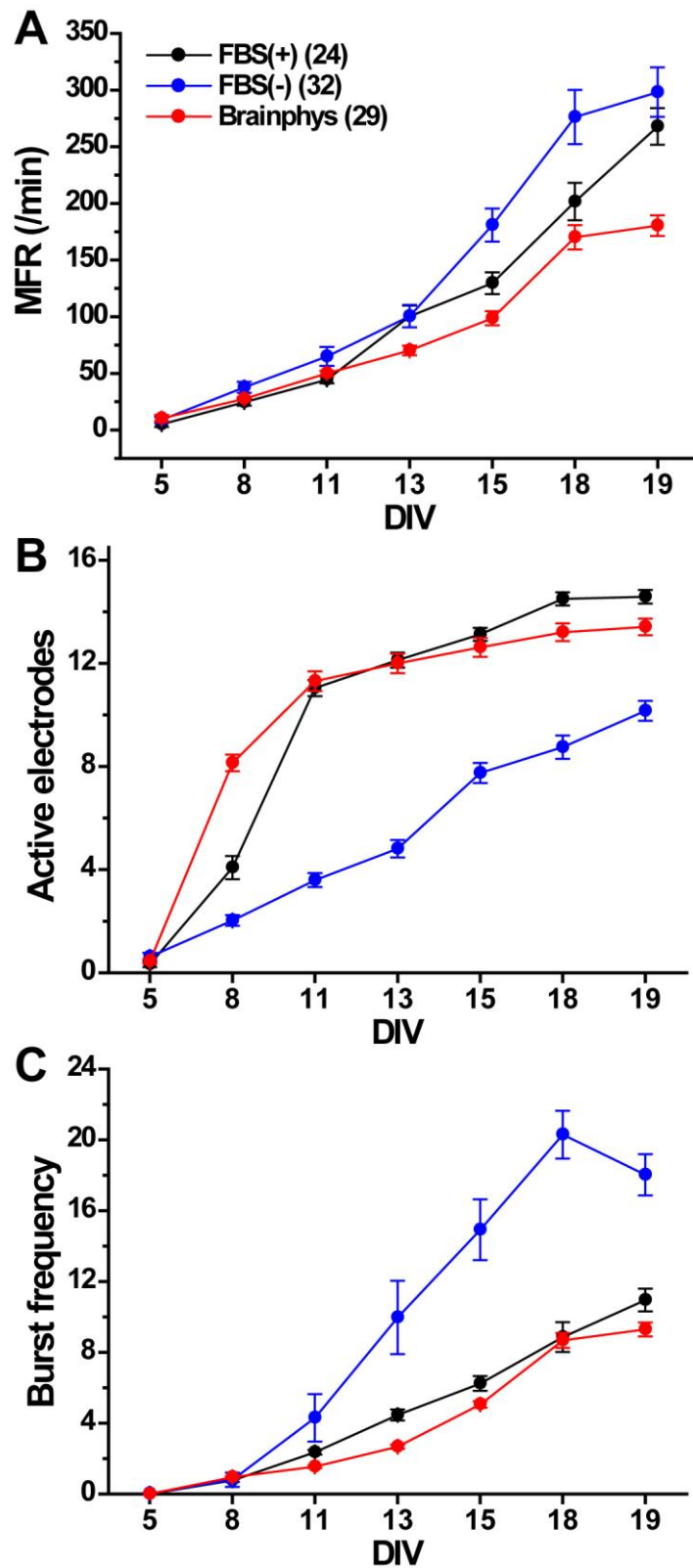


図 11. ラット大脳皮質神経細胞の神経活動に対する培地の検討

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 まで経時的変化を示した。括弧内は例数を示す。

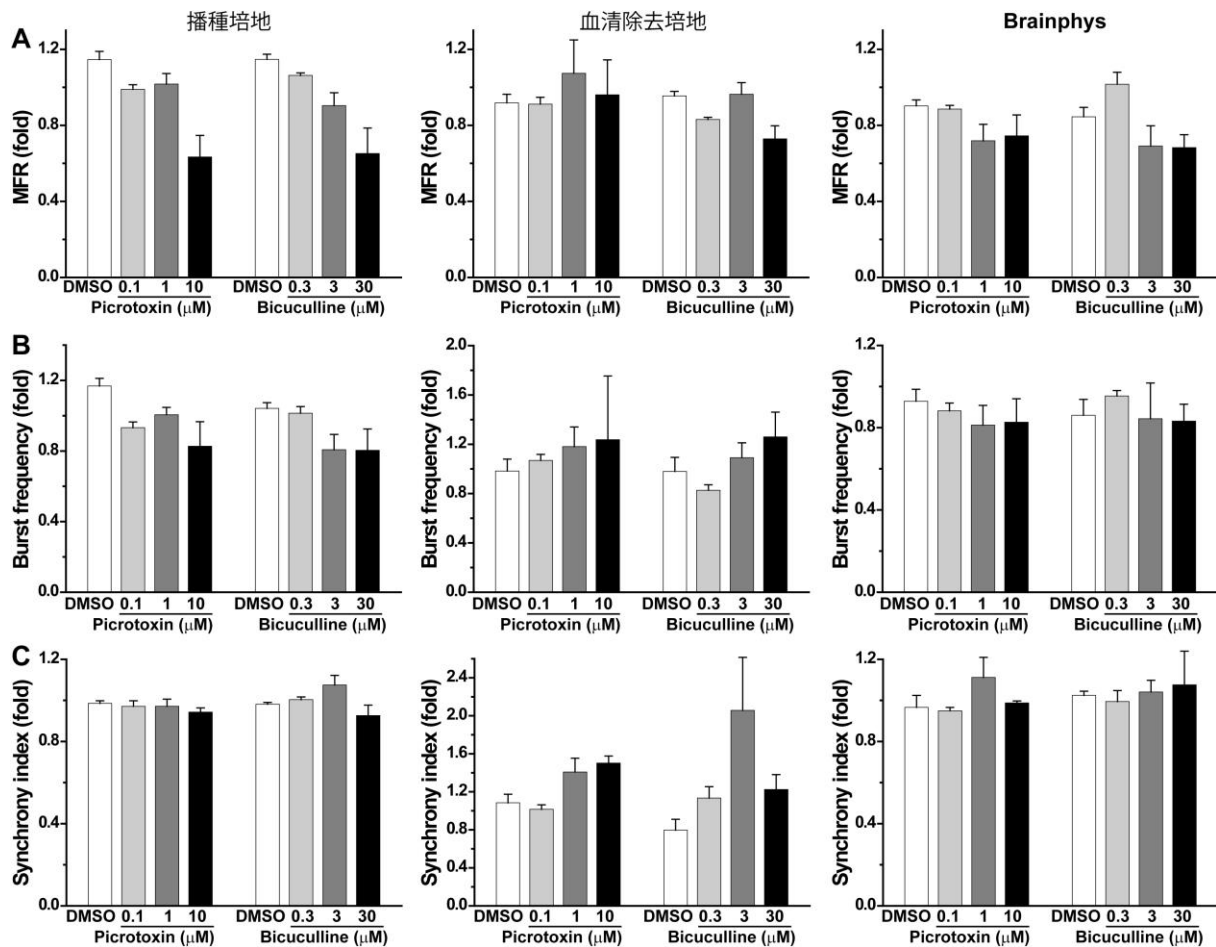


図 12. ラット大脳皮質神経細胞の GABA_A 受容体アンタゴニストによる反応性に対する培地の検討

GABA_A 受容体アンタゴニストであるピクロトキシ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。

1. ペンチレンテトラゾール

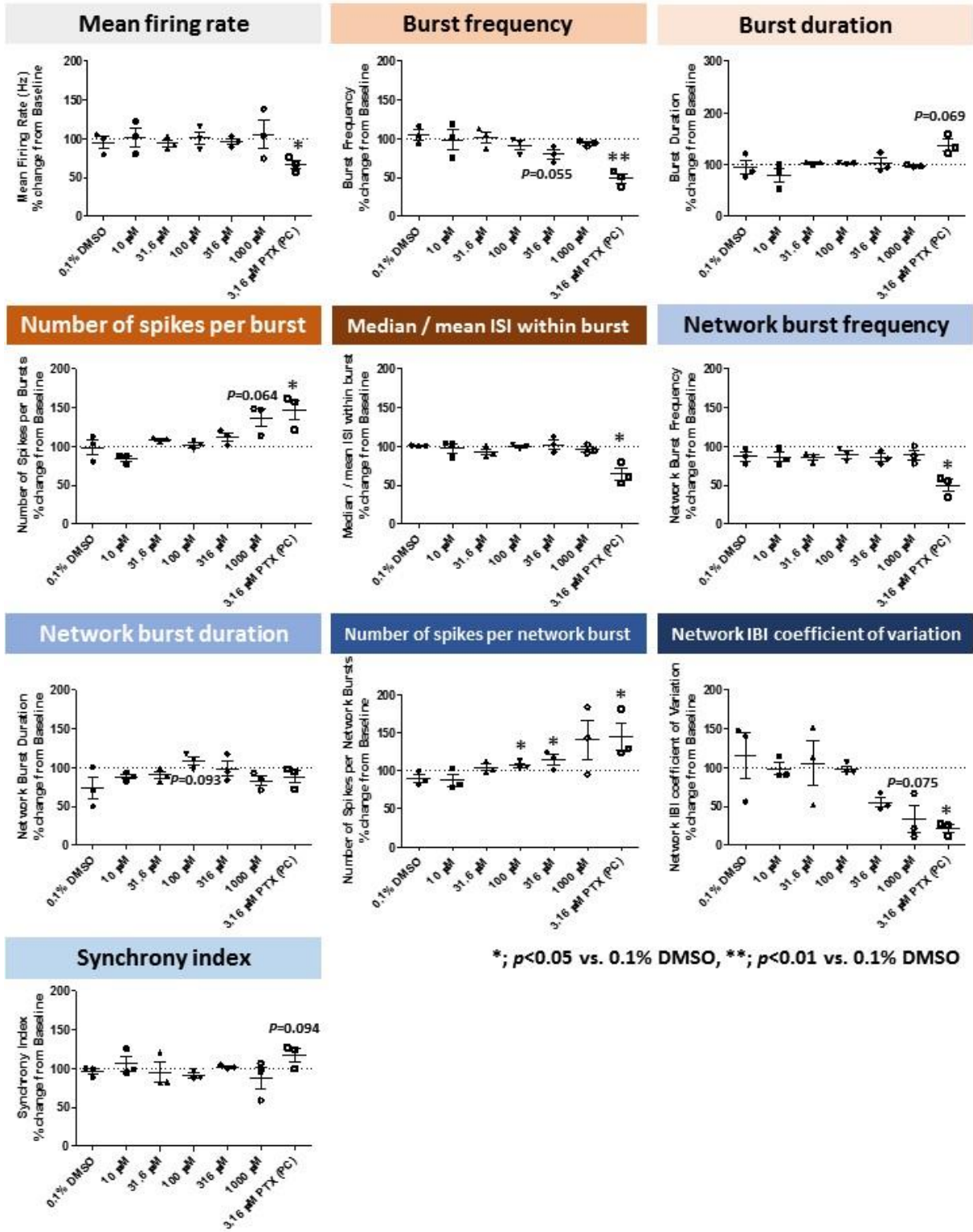


図 13. ペンチレンテトラゾール

溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクトキシシン (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. ピクロトキシン

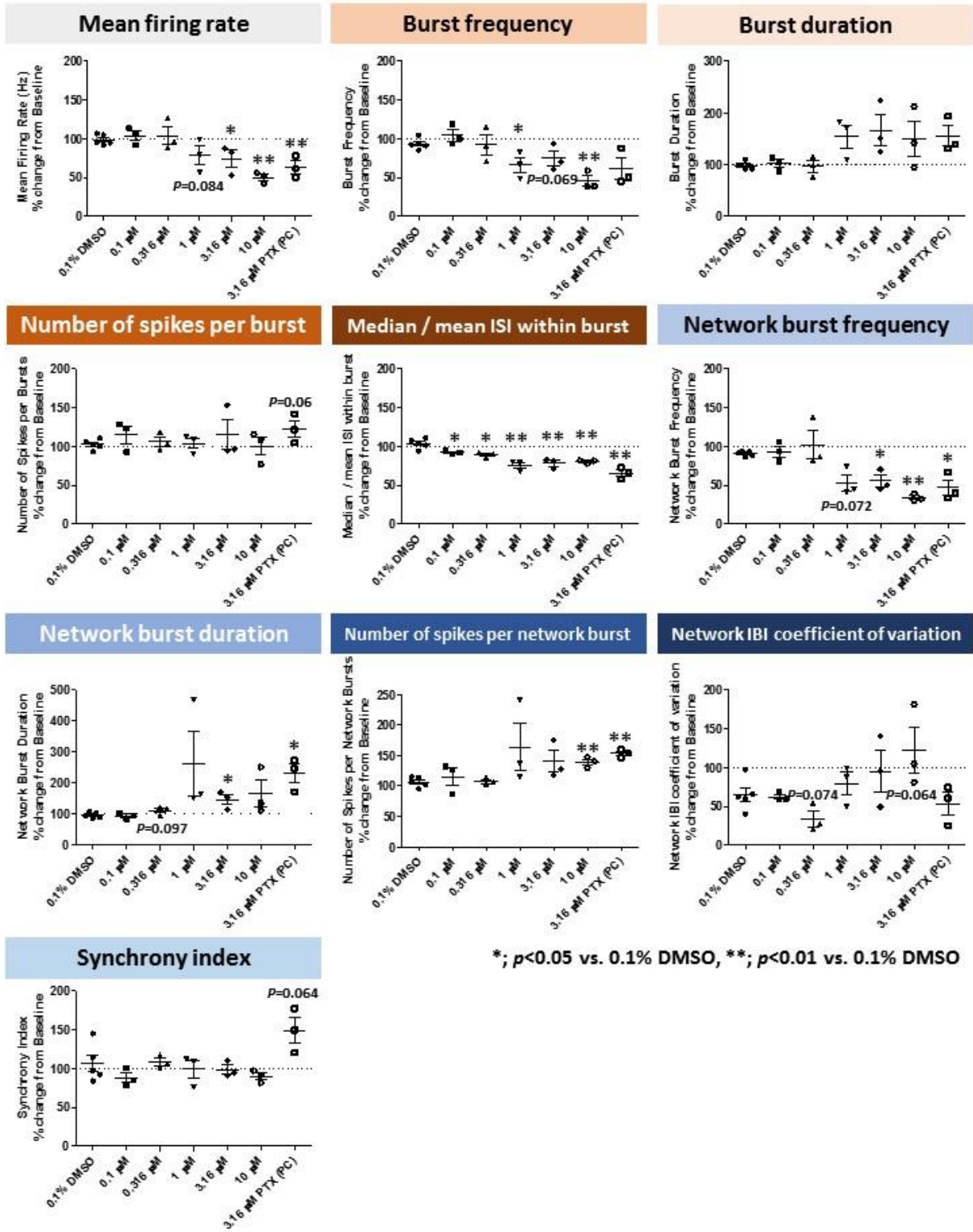


図 14. ピクロトキシン

溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクロトキシン (PTX)、0.1-10 μM ピクロト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

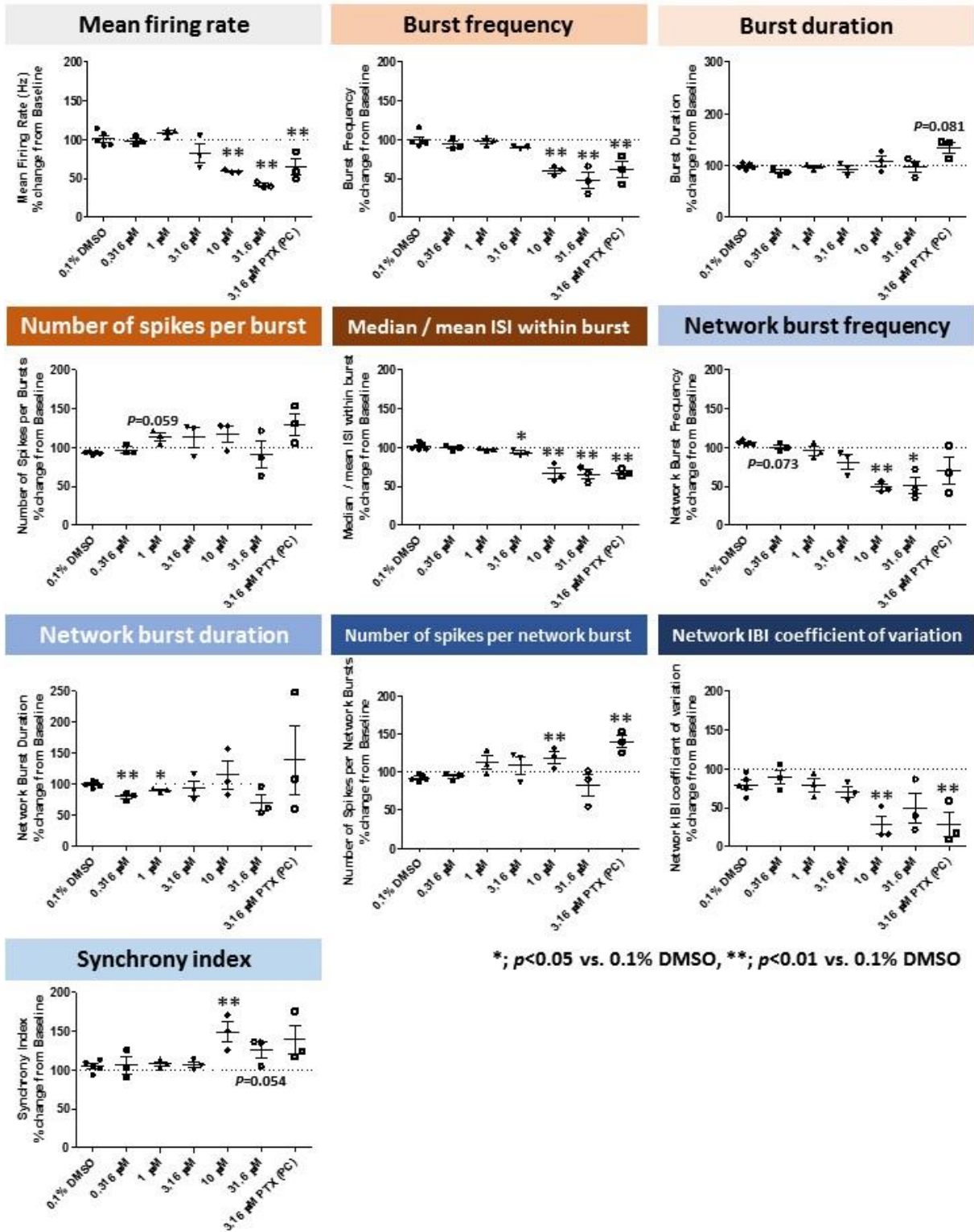
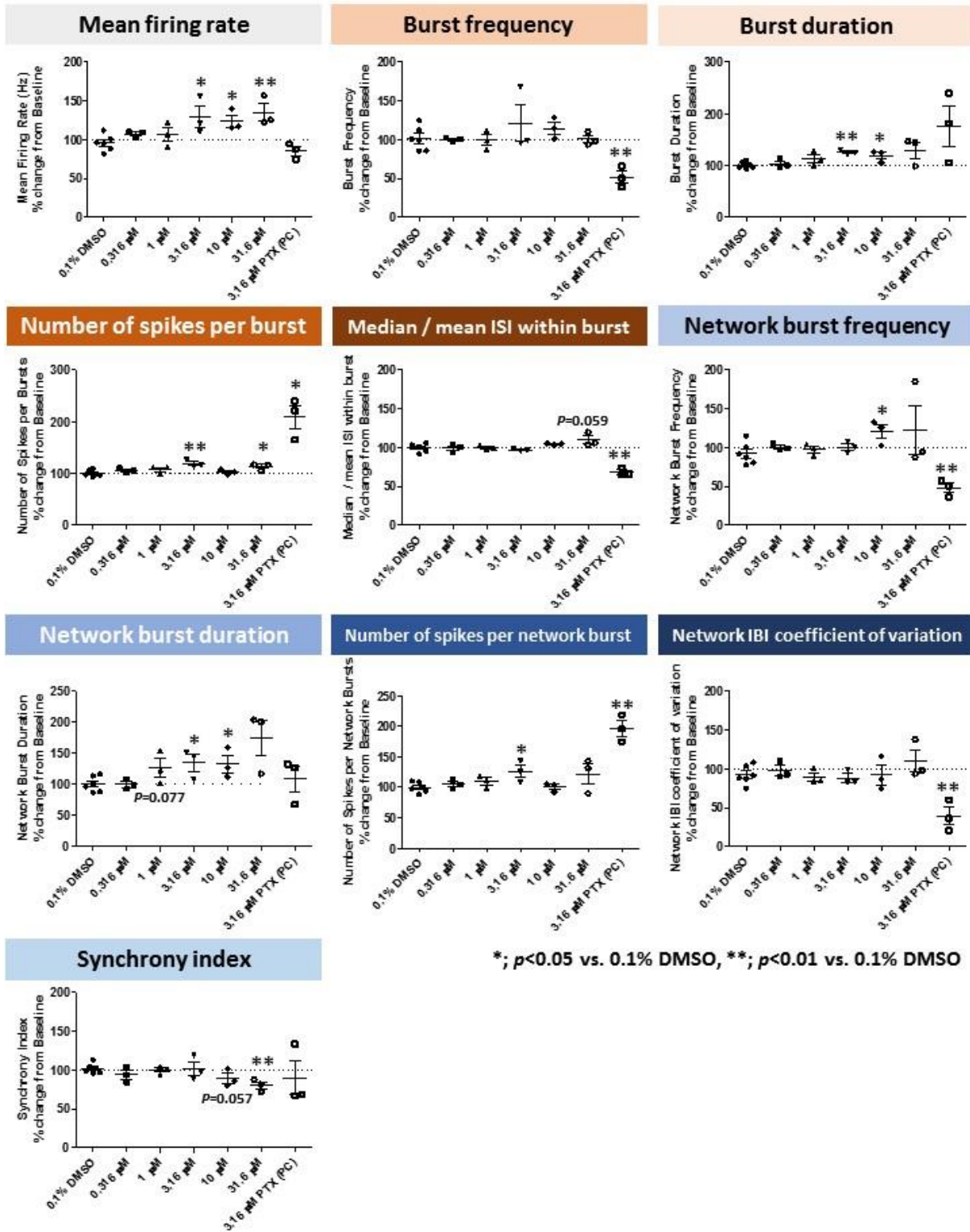


図 15. ストリキニーネ

溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクロトキシン (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±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



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

図 16. 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

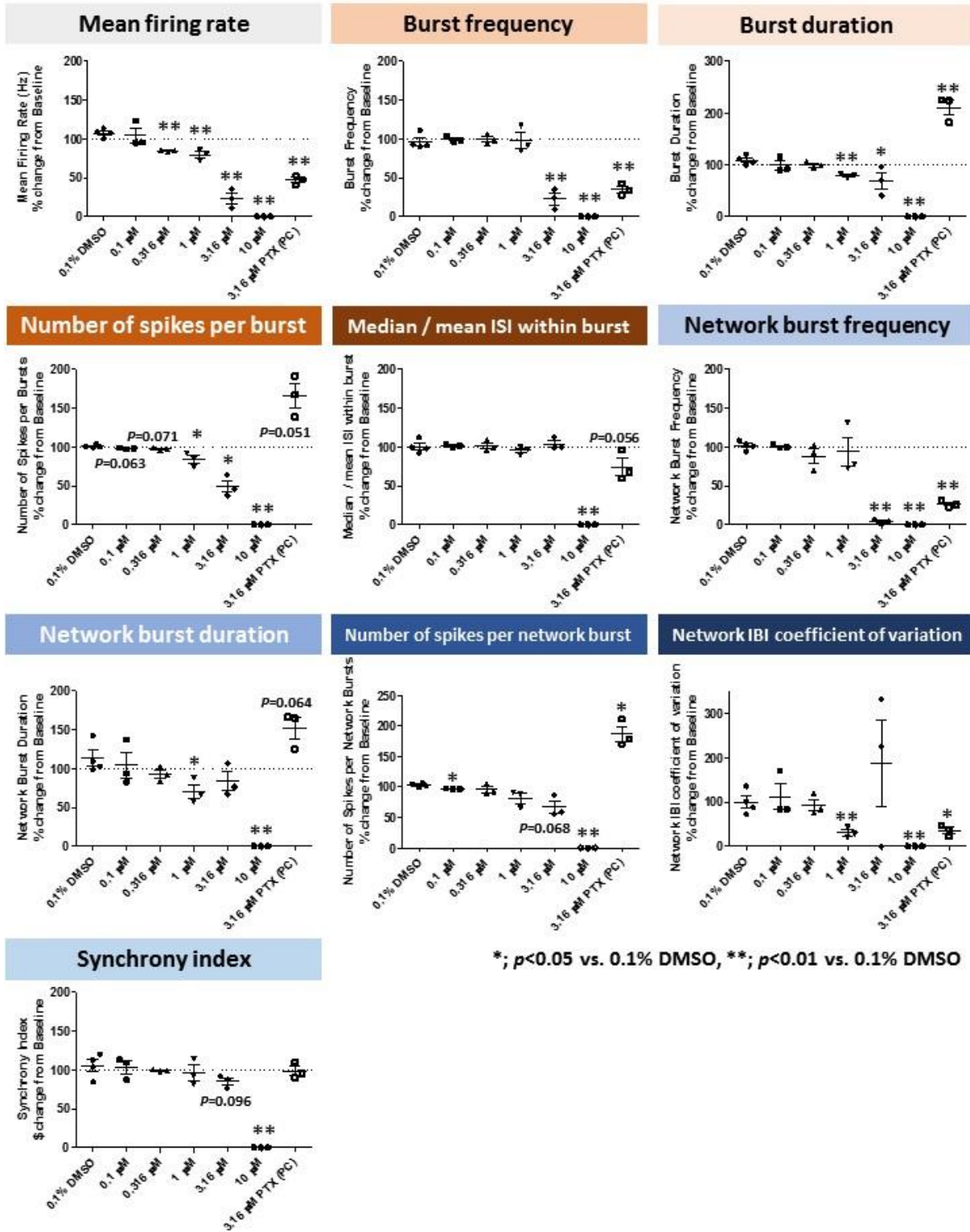


図 17. クロルプロマジン

溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクロトキシン (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 \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。

6. アモキサピン

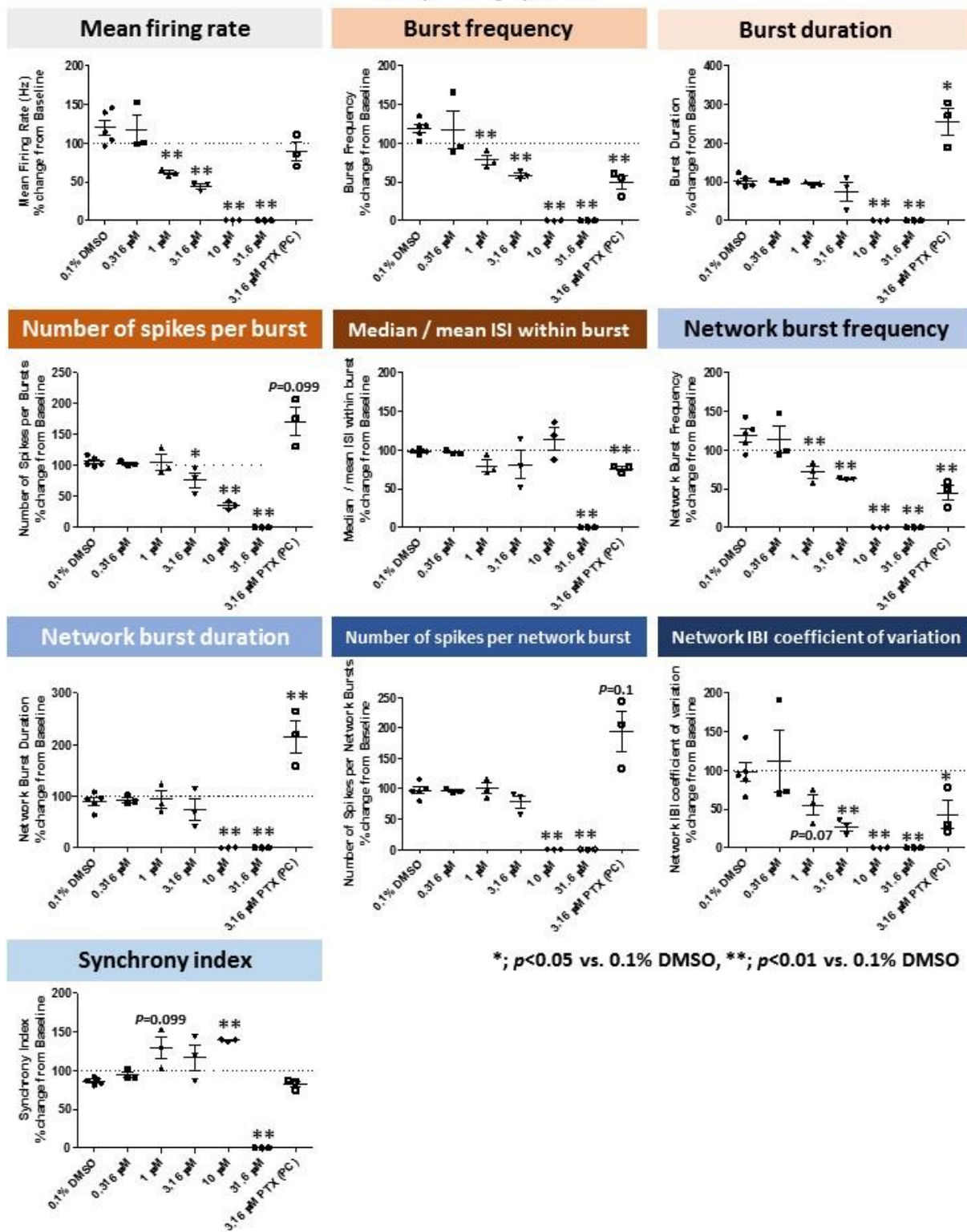


図 18. アモキサピン

溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクロトキシン (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

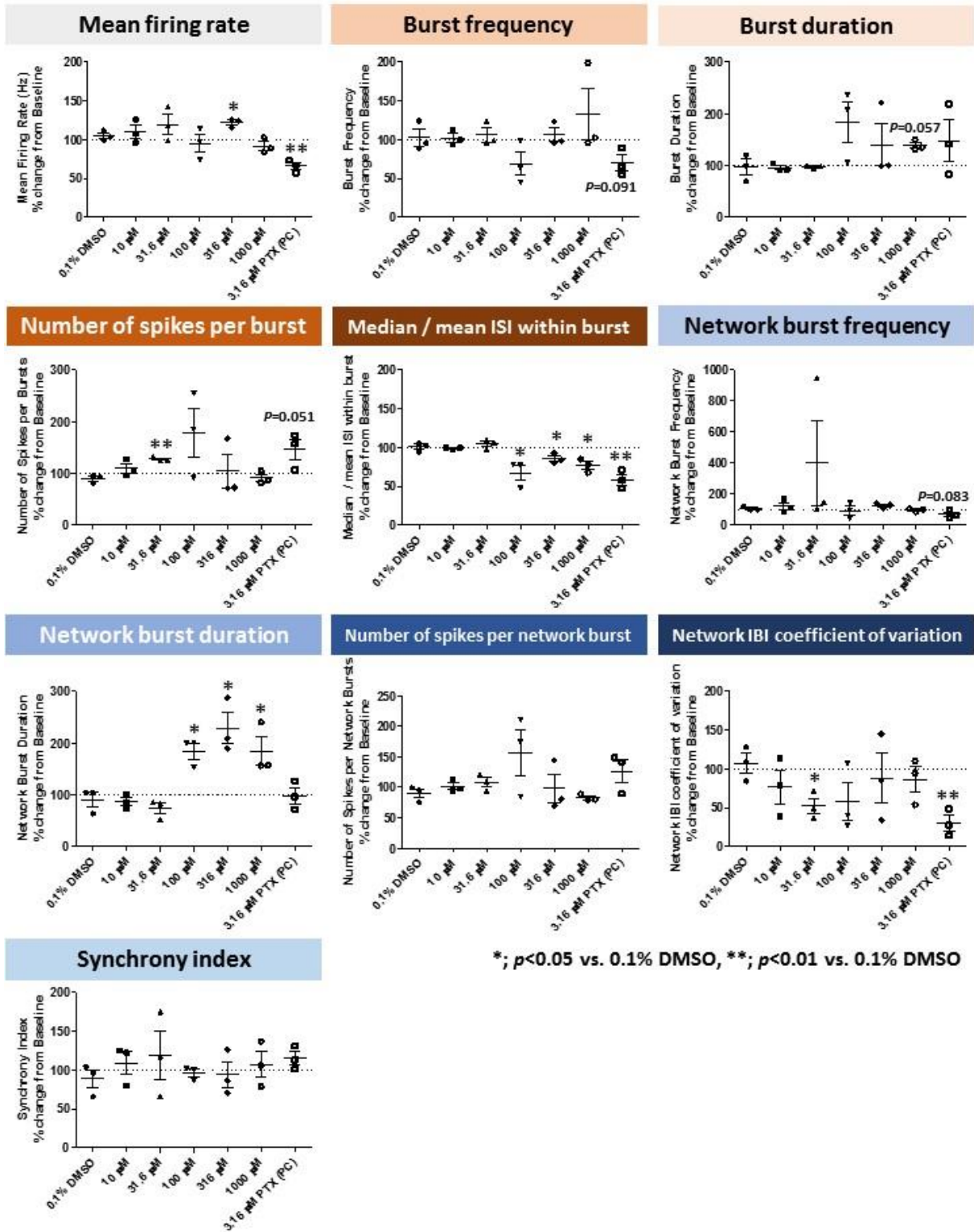


図 19. エノキサシン

溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクトロキシン (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±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

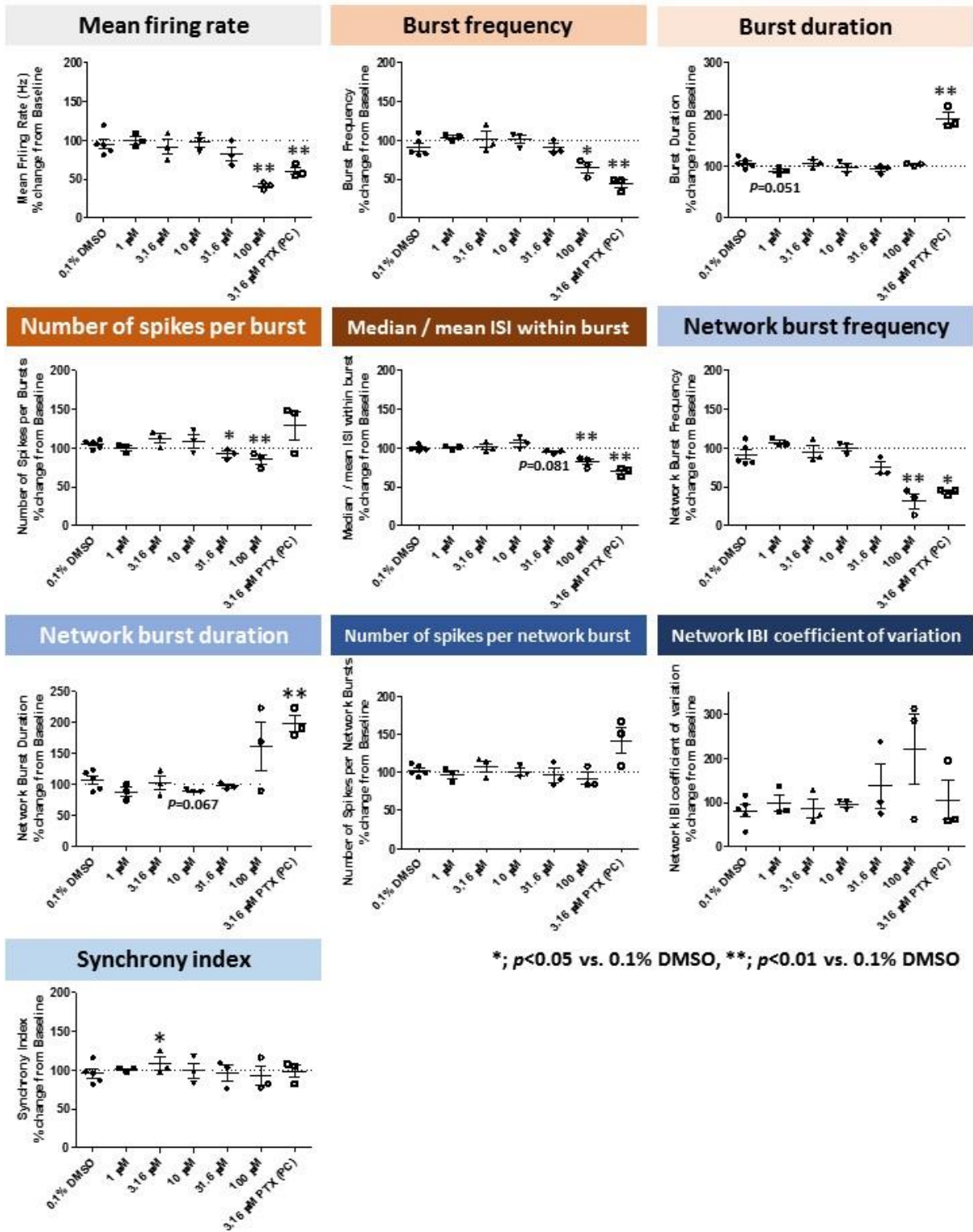


図 20. フェニトイン

溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクトロキシン (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 ± 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

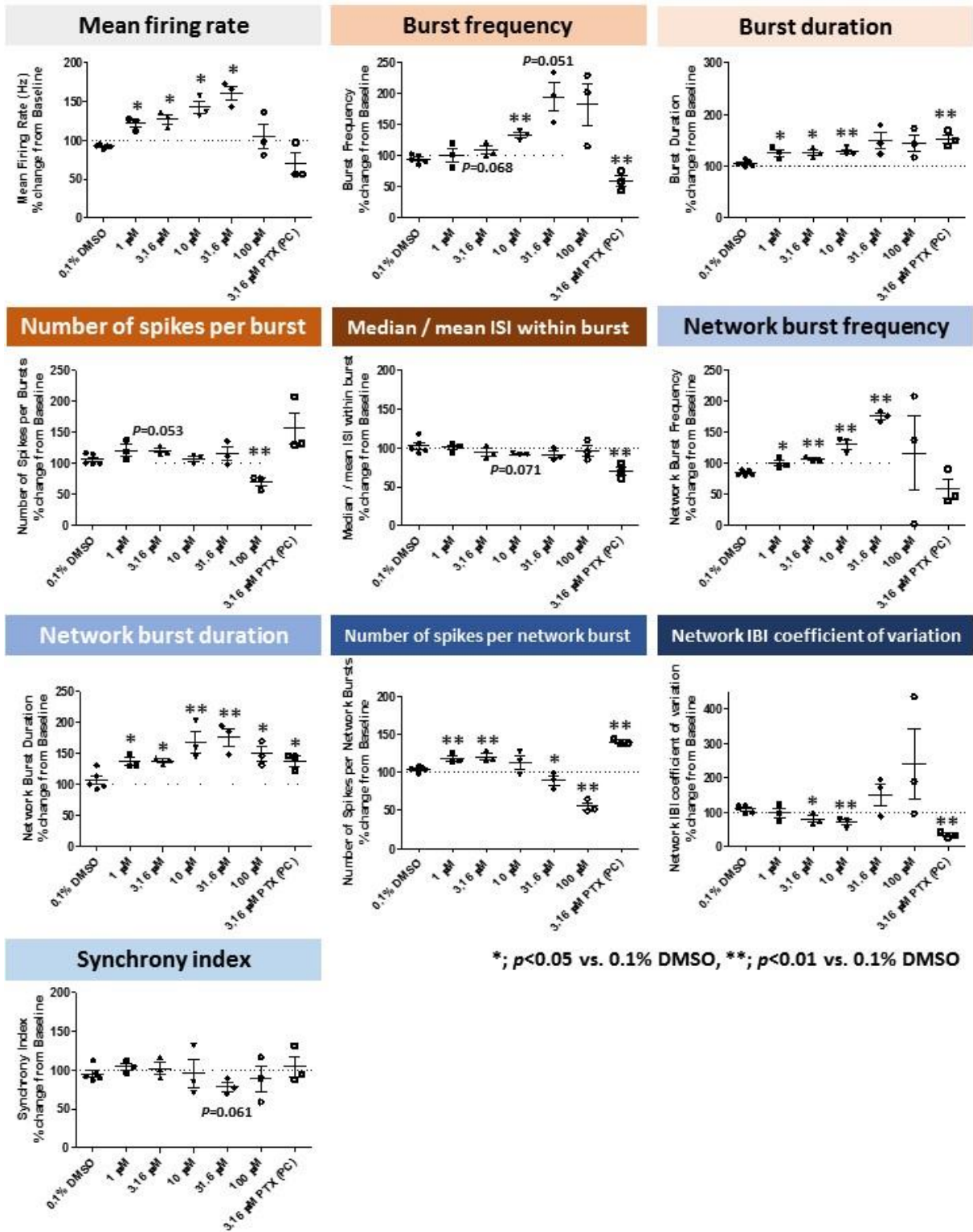
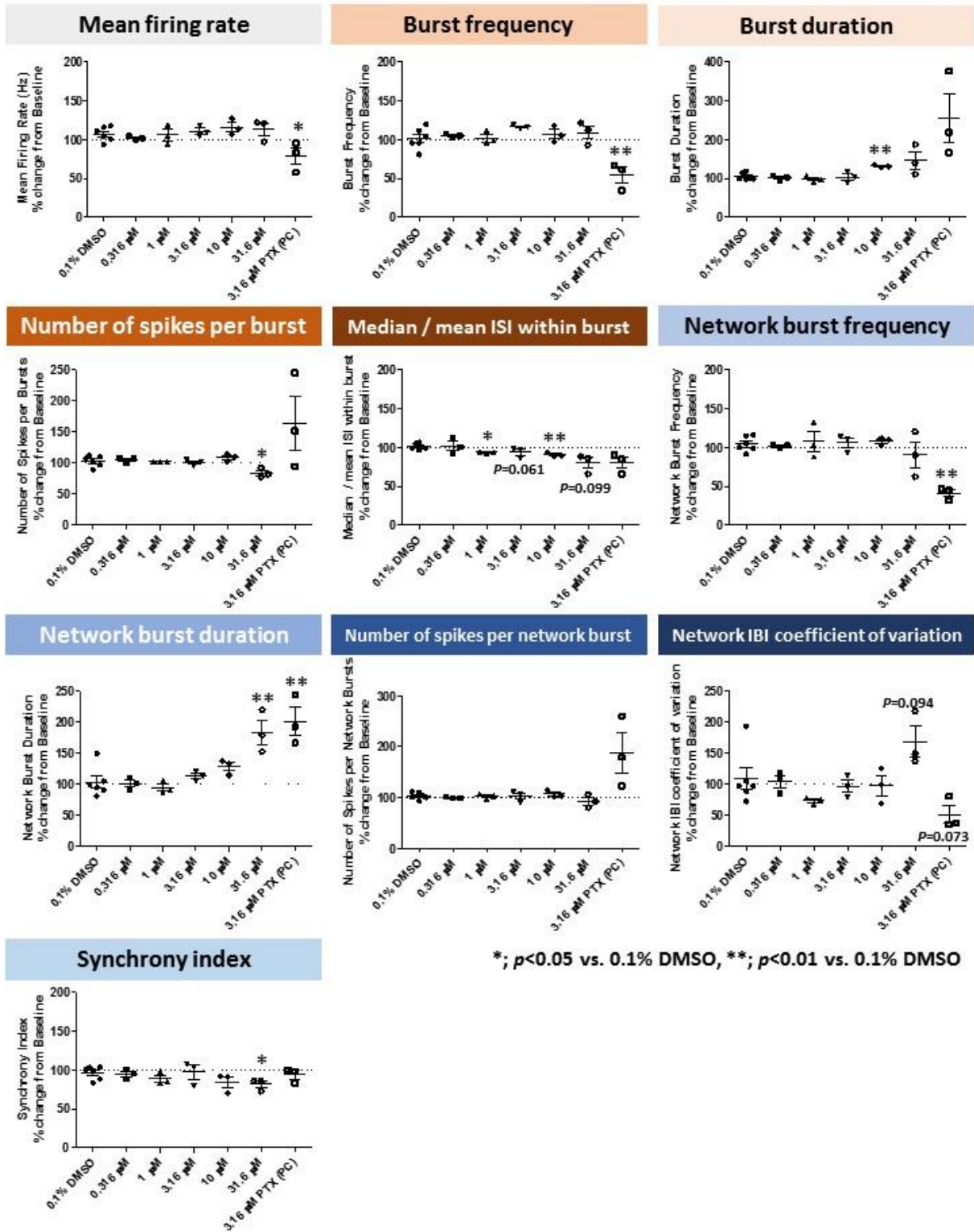


図 21. リノピリジン

溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクトロキシン (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



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

図 22. 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 ピクロトキシン (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

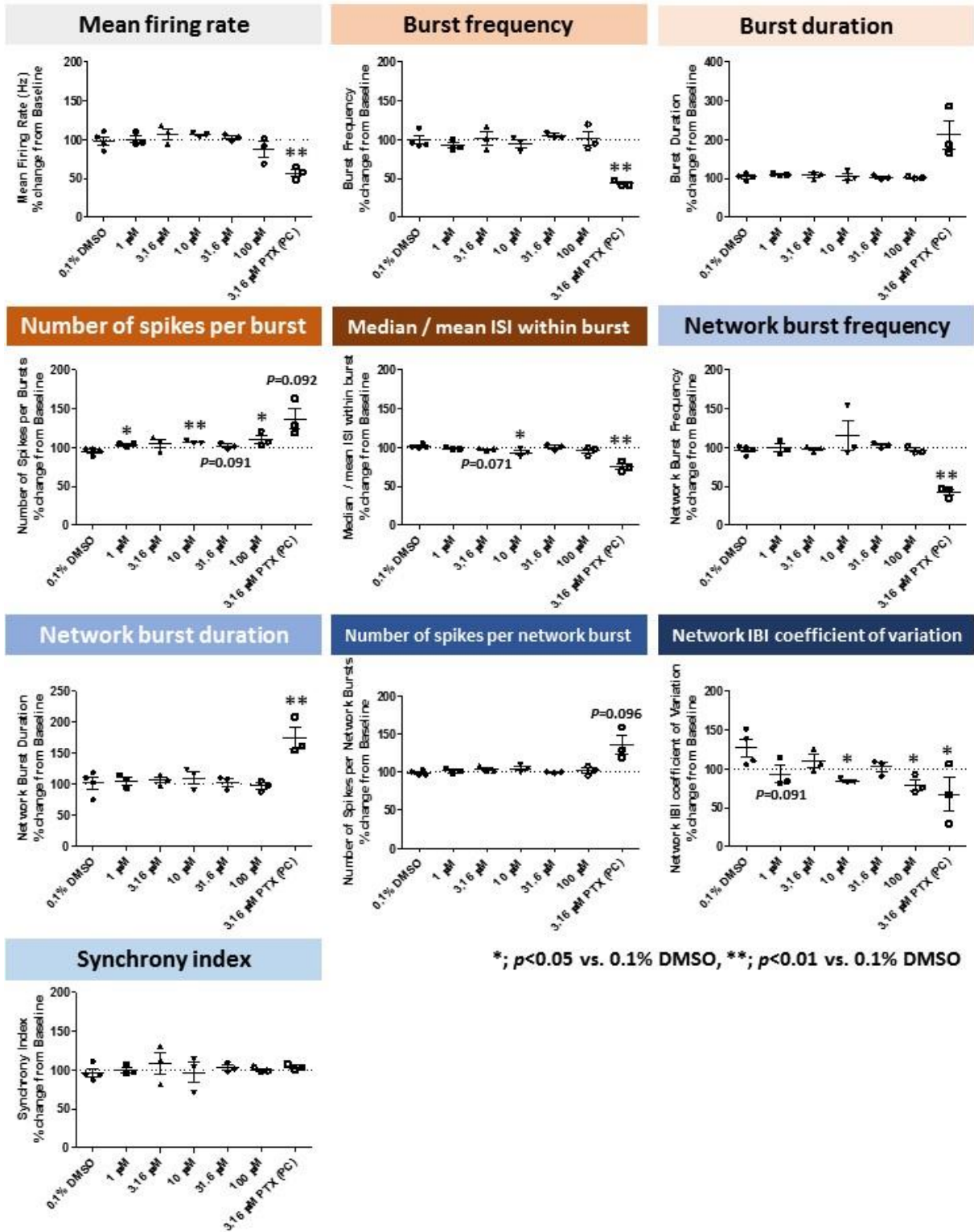


図 23. アモキシシリン

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土標準誤差を 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

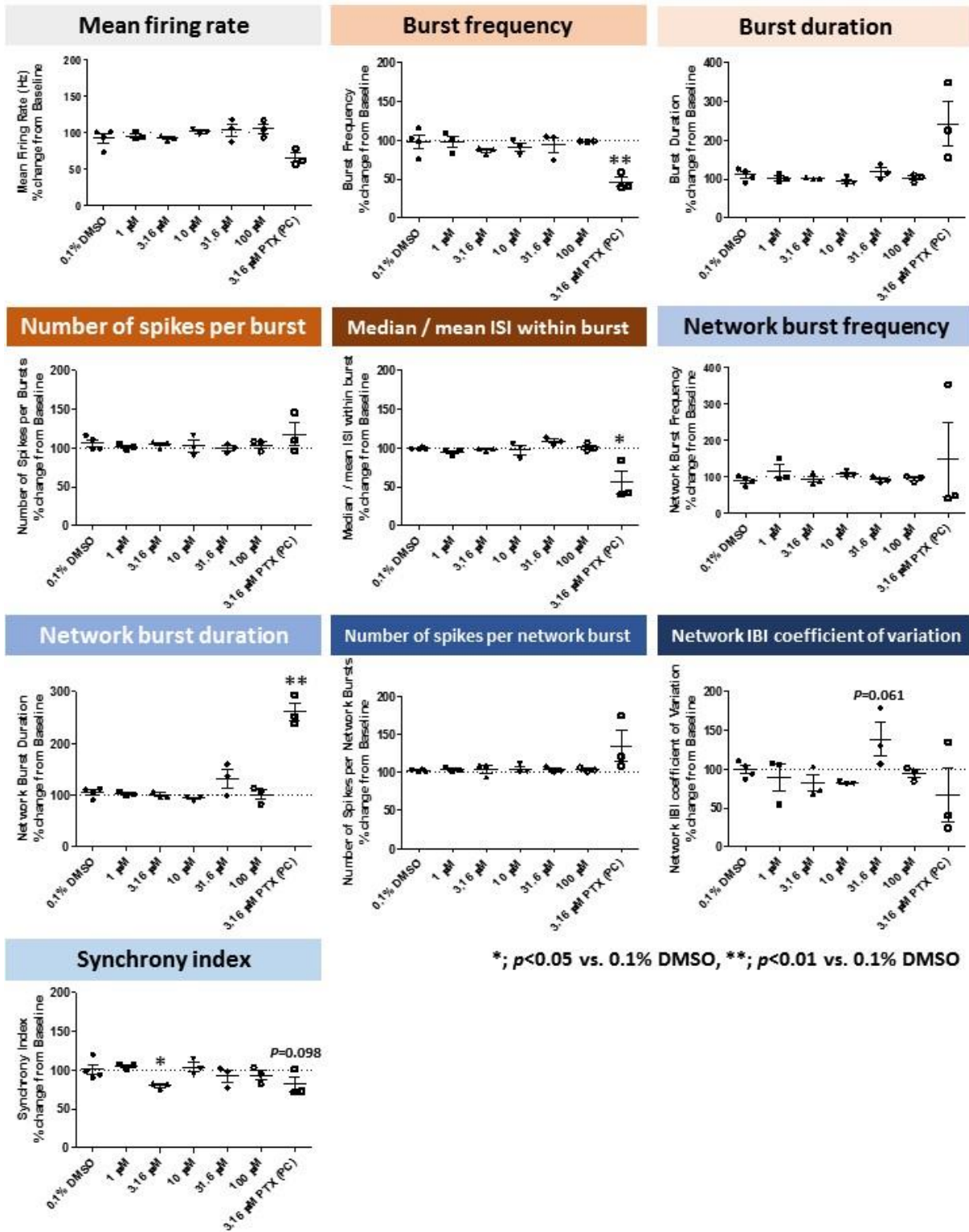


図 24. アセトアミノフェン

溶媒である 0.1% DMSO および陽性対照物質である 3.16 μM ピクトキシシン (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。

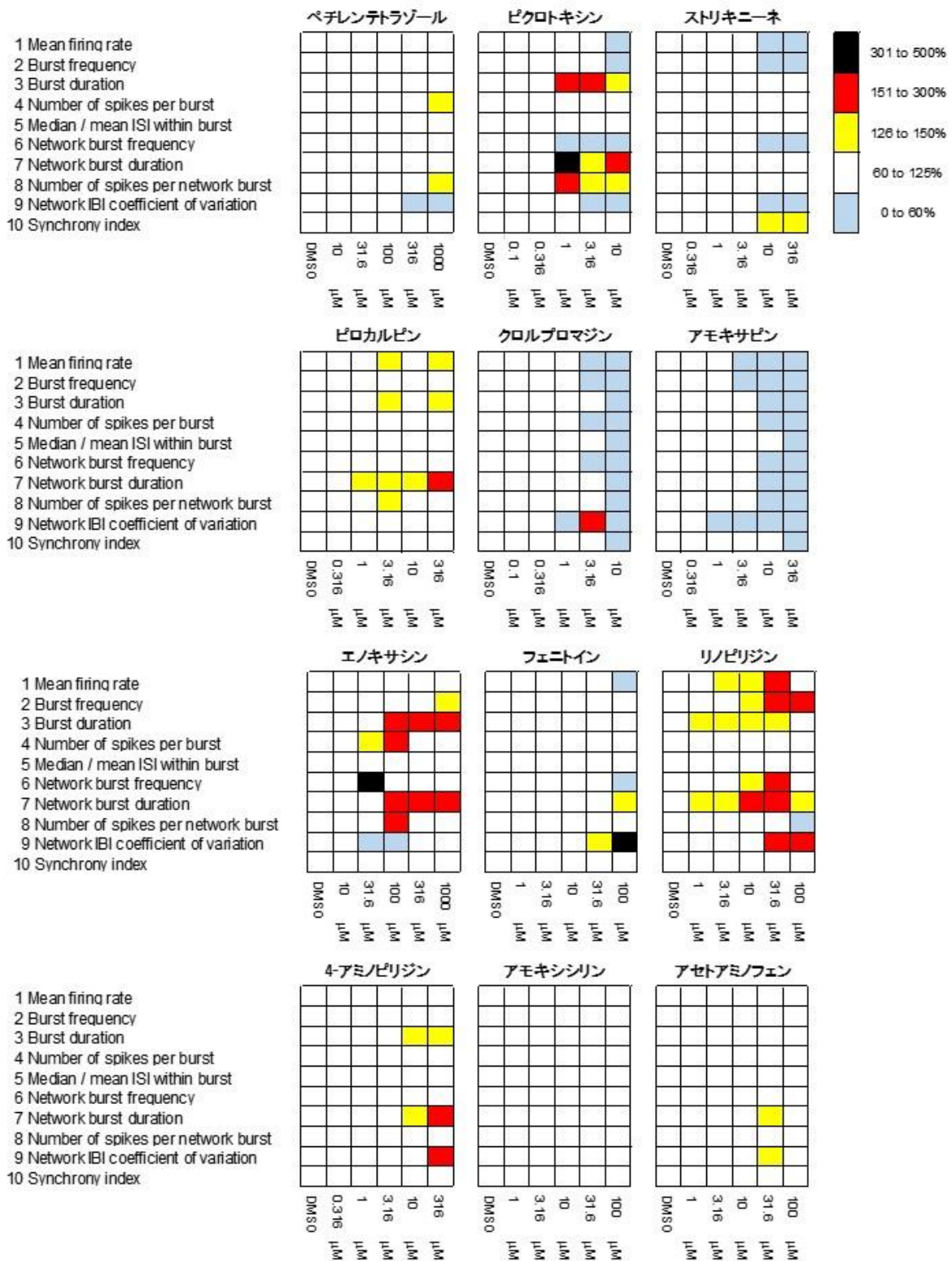


図 25. 12 化合物の結果のまとめ

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。

表 1 HESI NeuTox における化合物情報一覧

	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

表2 細胞融解時の生存率について

回数	生細胞数	死細胞数	生存率 (%)	総細胞数
1	0.86 x 10 ⁶	0.66 x 10 ⁶	56.6	1.52 x 10 ⁶
2	0.73 x 10 ⁶	0.85 x 10 ⁶	46.2	1.58 x 10 ⁶
3	0.9 x 10 ⁶	0.7 x 10 ⁶	56.3	1.60 x 10 ⁶
4	1.05 x 10 ⁶	0.9 x 10 ⁶	53.8	1.95 x 10 ⁶
5	2.2 x 10 ⁶	2.2 x 10 ⁶	50.0	4.4 x 10 ⁶
6	1.9 x 10 ⁶	2.1 x 10 ⁶	47.5	4.0 x 10 ⁶
7	0.78 x 10 ⁶	0.69 x 10 ⁶	53.1	1.47 x 10 ⁶
8	1.56 x 10 ⁶	0.78 x 10 ⁶	66.7	2.34 x 10 ⁶
9	0.53 x 10 ⁶	0.68 x 10 ⁶	43.4	1.21 x 10 ⁶
10	0.81 x 10 ⁶	0.54 x 10 ⁶	60.0	1.35 x 10 ⁶
11	1.8 x 10 ⁶	1.35 x 10 ⁶	57.1	3.15 x 10 ⁶
12	1.13 x 10 ⁶	0.95 x 10 ⁶	54.3	2.08 x 10 ⁶
13	0.81 x 10 ⁶	0.66 x 10 ⁶	55.1	1.47 x 10 ⁶
14	0.98 x 10 ⁶	0.68 x 10 ⁶	59.1	1.65 x 10 ⁶
15	0.80 x 10 ⁶	0.72 x 10 ⁶	52.3	1.52 x 10 ⁶
平均			54.1	

表3 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