

「MEA 計測」に関する研究
分担研究者 東北工業大学・特任助教 小田原あおい

研究要旨

ヒトiPS細胞由来ニューロンを用いて、OECD と共有している化学物質のリストから15化合物を選定し、MEA計測法によってリスク評価を行った。3パラメータを用いた主成分解析法によって、化合物リスクの低、中、高を分離した。神経毒性が報告されているDeltamethrin、Methamidophos、Tebucomazoleは、高リスクを示し、リスク用量も先行研究と一致していた。これらの結果から、ヒトiPS細胞由来ニューロンを用いたMEA計測法、および構築した解析法はリスク評価法として妥当であることが示唆された。また、我々の解析結果から、これまで神経毒性が報告されていないAcibenzolar-S-methyl、Flubendiamide、Tembotrioneがリスク判定されたことから、新たな神経毒性の存在が示唆された。また、Mepiquat Chlorideは、in vivoでの毒性報告はあるが、ラット大脳皮質初代培養細胞のMEA計測において毒性検出されなかったとの報告がある。しかしながら、我々のヒトiPS細胞由来ニューロンの解析結果からは、10 μ Mで中リスク、100 μ Mで高リスクとなった。この結果は、ヒトiPS細胞由来ニューロンとRodentの違いを示している可能性、および我々の解析法の有効性を示しているものと考えられる。本年度、明らかになった課題を来年度以降検討し、信頼性の高いインビトロ神経毒性評価法を構築して行く。

A. 研究目的

本研究では、OECD と共有している化学物質のリストを基に、ヒトiPS細胞由来ニューロンの電気活動を指標とした化学物質のin vitro毒性評価法の構築を目的としている。本年度は、OECDと共有している化学物質のリストから入手可能な15種類を選択し、ヒトiPS細胞由来中枢ニューロンを用いた平面微小電極アレイ（MEA）計測によるインビトロ毒性検出法について検討した。

B. 研究方法

ヒト iPS 細胞から分化させた中枢の Glutamatergic neuron (Glutamatergic induced neurons, 1001-7.5 ; NeuCyte Inc.)と GABAergic neuron (GABAergic induced neurons, 1002-3.5 ; NeuCyte Inc.)とヒト初代培養アストロサイト (Astroglia, 1003-1; NeuCyte Inc.)を7 : 3 : 3.5 の割合で混合し、8.0 \times 10⁵ cells/cm² の密度で 0.1% の Polyethyleneimine (Sigma Aldrich)と 20 μ g/mL の Laminin-511 (Nippi)でコーティングした 48well MEA plate (M768-tMEA-48B ; Axion BioSystems) に播種した。播種時の培地は、Seeding Supplement (2001S-20 ; NeuCyte Inc.)を加えた Seeding Basal Media (2001-20 ; NeuCyte Inc.)を 50 μ L/well 使用した。また、培養 1 日目に Short-Term Supplement (2002S-40 ; NeuCyte Inc.)を加えた Short-Term Basal Media (2002-40 ; NeuCyte Inc.)を 250 μ L/well 追加した。1 日毎に Short-Term Basal Media を半量交換し、培養 7 日目に Long-Term Supplements (2003S-120 ; NeuCyte Inc.)を加えた Long-Term Basal Media (2003-120 ; NeuCyte Inc.)に半量交換した。その後、培養 5 週目まで Long-Term Basal Media

を 1 週間に 2 回半量交換し、培養 5 週目に B27 Plus Supplement (A3582801 ; Gibco)と 100 U/mL penicillin/streptomycin (68-23191, Wako)を加えた Neurobasal Plus Medium (A3582901 ; Gibco)に全量交換した。薬理試験は培養 7 週目に、

- Tebuconazole (T2988 ; Tokyo Chemical Industry),
- Deltamethrin (D4775 ; Tokyo Chemical Industry),
- 3,5,6-Trichloro-2(1H)-pyridone (327-85421 ; Wako),
- 2-Mercapto-1-methylimidazole (M0868 ; Tokyo Chemical Industry),
- N-Carbobenzoxy-L-homoserine Lactone (C2699 ; Tokyo Chemical Industry),
- Omethoate (36181-100MG ; Sigma Aldrich),
- Methamidophos (33395-100MG ; Sigma Aldrich),
- Cymoxanil (34326-100MG ; Sigma Aldrich),
- Acibenzolar-S-methyl (SC-227215 ; Santa Cruz Biotechnology),
- Sodium chlorite (28-2350-5-500G-J ; Sigma Aldrich),
- Mepiquat Chloride (D4016 ; Tokyo Chemical Industry),
- Thiamethoxam (37924-100MG-R ; Sigma Aldrich),
- Tembotrione (32766-100MG ; Sigma Aldrich),
- Flubendiamide (32801-100MG ; Sigma Aldrich),
- Aldicarb (P001N ; AccuStandard Inc.)

を 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μ M の用量で累積投与を行った。試薬はすべて DMSO(D8418-100ML ; Sigma

Aldrich)で溶解し、Neurobasal Plus Mediumで希釈した。陰性対象として、DMSOを0.1%から0.6%まで累積投与した。神経ネットワーク活動の計測は、Maestro Pro (Axion BioSystems)を用いて37℃、CO₂ 5%存在下で行った。計測データは、AxIS Navigator (Axion BioSystems)を用いてデータの解析を行った。計測データからAxIS Navigatorを用いてスパイク検出行った。各電極の活動休止期のベースラインノイズの標準偏差 ± 530%の閾値を上回るものをスパイクとして検出した。検出したスパイクデータから、我々が開発した4-step method (Biochem Biophys Res Commun, 497, 612-618, 2018)を用いて同期バースト発火の検出を行った。解析パラメータは、図1に示すように、Total Spikes, No. of SBF, Inter Burst Interval, Duration of SBF, Spikes in a SBF, Max Frequency (MF), CV of MF, Inter MF Interval (IMFI), CV of IMFIの9つを用いた。

(倫理面の配慮)

本研究で実施するヒトiPS細胞由来ニューロンの利用は、市販のニューロンであり、平成30年8月、令和元年6月に本学研究倫理審査委員会承認済である。本研究では、遺伝子解析、遺伝子組み換え実験、動物実験等は行わない為、その他必要な手続きはない。

C. 研究結果

ヒトiPS細胞由来ニューロンの培養条件を検討したところ、グルタミン酸ニューロン、GABAニューロン、アストロサイトを7:3:3.5の割合で混合し、 8.0×10^5 cells/cm²の播種密度の培養条件が、well間差が比較的少なく、神経ネットワークの成熟化指標であるシナプス伝播を介した同期バースト発火が早期に検出されることがわかった。自発活動は培養2週目で観察され、同期バースト発火は培養3-4週目で観察された。発達神経毒性において、回路形成前から化合物をばく露し続けて評価する考え方とシナプス結合後にばく露して神経機能への影響を急性的に評価する考え方がある。

本実験で使用したヒトiPS細胞由来ニューロンにおいては、用量依存的に発火数と同期バースト発火数が増加する傾向が見られた。但し、DMSOにおいても増加傾向が見られた為、陽性化合物の判定には、発火数と同期バースト発火数は適していないと判断した。また、その他のパラメータにおいて、単一パラメータで毒性判定することは難しい為、多変量解析を用いることとした。DMSOの各濃度(0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6%)の間に有意差が1つも認められない主

成分マップを作成することで、DMSOの影響を除外する解析法を採用した。使用したパラメータは、同期バースト内の最大周波数(Max Frequency)、最大周波数の変動係数(CV of MF)、最大周波数時刻の間隔における変動係数(CV of IMFI)である。

我々は、シナプス結合による同期バースト発火が確認され、化合物評価に十分な自発活動が観察された培養50-55日目に化合物試験を行った。図2のAにヒトiPS細胞由来ニューロンの活動電位を細胞外で記録した典型的な波形を示す。異なる電極で同期した信号(同期バースト発火)と個々のニューロンの発火が混じった自発活動が観察されているのがわかる。Methamidophos 100 μM投与で、同期バースト発火頻度の上昇が見られた(図2A)。図2Bは、16電極/wellで10分間計測した際のラスタープロットと発火数のヒストグラムを示している。Methamidophosの用量依存的に、同期バースト発火が上昇する現象が認められた。同期バースト発火はシナプス伝達を介して行われる為、培養神経ネットワークにおける薬剤応答において、同期バーストに関する解析パラメータが有効である。我々は、総発火数(Total spikes)以外の8つのパラメータについて、同期バースト発火に関するパラメータを採用して解析を進めた。

図3は、15化合物+DMSO投与における、9つの解析パラメータの結果である。各パラメータにおいて、Vehicleを100%とし、上昇した場合は赤、減少した場合は青で表したヒートマップである。Deltamethrin 1 μM以上、Flubendiamide 100 μM、Tebuconazole 100 μMで同期バースト発火が消失した。

図4は、作成した主成分マップに各化合物の用量データをプロットしたものである。第一主成分と第二主成分の寄与率はそれぞれ51%と29%であり、合わせて80%であった為、情報量としては十分である。主成分マップに、DMSOの標準偏差(SD)の範囲と2×SDの範囲を描き、SDの範囲内であれば低リスク、2×SDの範囲であれば中リスク、2×SDの範囲外であれば高リスクとして評価を行った。各化合物の用量依存別のリスク評価結果を図5にまとめた。

同期バースト発火の消失を含め、高リスクを示した化合物が7化合物選出され、用量も選出された。高リスクを示す用量は化合物毎に異なっていた。一方、Cymoxanil、N-Carbobenzyloxy-L-homoserine Lactoneは、100 μMまでの濃度域で低リスクであった。リスク判定化合物において、低、中、高リスクの順番が逆転することはなかったことから、化合物の応答は、用量依存的に検出されていることが示唆された。

D. 考察

Na⁺チャネルに作用するDeltamethrinは、培養マウス大脳皮質ニューロンにおいて、発火数が減少することが報告されている (NeuroToxicology 29, 203–212, 2008)。報告では、0.1 μM以上の濃度で発火数や同期バースト発火数が減少しており、ヒトiPS細胞由来ニューロンを用いた本実験結果と一致した。0.1μMで高リスクであると判定した結果も妥当であると考えられる。TebuconazoleはCa²⁺流入の阻害作用を持つことが株化細胞であるPC12を用いた実験から明らかにされている。5 μMばく露時からCa²⁺流入が減少し、100 μMでほぼ見られなくなる (Toxicological sciences 134(2), 374–381 2013)。我々の結果においても、100 μMで同期バースト発火が消失した。Tebuconazoleにおいても、結果が一致した。Mepiquat Chlorideは、in vivoでの毒性報告があるが (EFSA Scientific Report (2008) 146, 1-73)、ラット大脳皮質初代培養細胞においては、毒性が検出されなかったとの報告がある (NeuroToxicology 48 (2015) 152–165)。インビトロでの毒性検出に成功していない。我々のヒトiPS細胞由来ニューロンを用いたデータとその解析結果からは、10μMで中リスク、100 μMで高リスクとなった。この結果は、ヒトiPS細胞由来ニューロンとRodentの違いを示している可能性、および我々の解析法の有効性を示しているものと考えられる。

変化が見られなかった N-Carbobenzoxy-L-homoserine Lactoneは、AChE阻害剤Carbarylの代謝物である。Carbarylの神経毒性は報告されているが、代謝物である N-Carbobenzoxy-L-homoserine Lactoneでの毒性報告はない。毒性が出ない可能性が考えられる。陽性対照化合物であるCarbaryl自体の毒性評価は来年度行う予定である。Cymoxanilも100 μMでリスク検出されなかった化合物であるが、現在までのところ神経毒性を示唆する文献は出ていない。毒性が出ない可能性が高いと考えている。神経毒性が報告されている薬剤、報告が無い薬剤において、一致した結果が得られていることから、主成分解析法によるリスク判定は妥当性があると考えられる。妥当性があると考え、Acibenzolar-S-methyl、Flubendiamide、Tembotrioneは、神経毒性があると考えられる。これまで、神経毒性の報告が無い為、新規神経毒性の発見である可能性を有している。

しかしながら、実験から解析に至る一連の過程において検討すべき課題は多い。以降、今後の課題と展望を記載する。今年度は、Neucyte社のヒトiPS細胞由来ニューロンを用いて、化合物の評価を行ったが、用いるサンプルについては議論が必要である。今回のサンプルにおいては、DMSOで発火数や同期バースト発火数が増大する傾向が見られた。DMSOでの変化は望ましくない。他のヒトiPS細胞由来ニューロンでの応答、Rodentの初代培養ニューロンにおける応答を比較する必要がある。また、動物実験廃止の流れの中、ヒトiPS細胞由来ニューロンの使用が今後期待されるが、RodentとヒトiPS細胞由来ニューロンの反応性の違いも明らかにする必要がある。

用量設定問題についても考慮する必要がある。大抵の化合物において、高用量になれば何らかの神経作用を示す。今回、100 μMで変化が検出されなかった薬剤について、更なる高用量試験を行うと共に、現実的なばく露量を考慮して、毒性濃度を決定する必要がある。

毒性濃度の決定については、in vivoデータとの相関で決定することが望ましい。in vivoでの毒性症状を基に、毒性濃度を決定することができれば、in vitroの神経活動がどの程度変化すれば、リスクと捉えて良いかが決定する為である。変化を検出する解析手法およびパラメータが決定できれば、未知化合物であっても毒性およびリスク判定が可能となる。

in vivoのデータに頼らず、in vitroのみで毒性評価系を構築する手法として、陰性対照化合物のデータとの乖離で評価する手法がある。今回も採用した手法であるが、DMSOデータのみであった為、陰性対照化合物を増やす必要がある。来年度は、陰性対照化合物を増やし、毒性検出法を構築する計画である。

また、陽性対照化合物の応答特性と化合物の構造との相関を得ることができれば、実験を必要としない毒性評価が可能となる。今回、我々は9個の解析パラメータのみを用いたが、80パラメータ程度を算出し、化合物の構造と神経活動の相関を調べる研究も有効であると考えている。

E. 結論

ヒトiPS細胞由来ニューロンを用いて、OECD と共有している化学物質のリストから15化合物を選定し、MEA計測法によってリスク評価を行った。3パラメータを用いた主成分解析法によって、化合物リスクの低、中、高を分離した。神経毒性が報告されているDeltamethrin、Methamidophos、Tebuconazoleは、高いリスクを示し、リスク用量も先行研究と一致していた。これらの結果から、ヒトiPS細胞由来ニューロンを用いたMEA計測法および、構築した解析法は、リスク評価法として妥当であることが示唆された。我々の解析結果から、これまで神経毒性が報告されていないAcibenzolar-S-methyl、Flubendiamide、Tembotrioneにおいて、神経毒性がある可能性が示唆された。新規神経毒性の発見につながることを期待している。また、Mepiquat Chlorideは、in vivoでの毒性報告があるが、ラット大脳皮質初代培養細胞においては毒性が検出されなかったとの報告がある。しかしながら、我々のヒトiPS細胞由来ニューロンと解析法を用いた結果からは、10μMで中リスク、100 μMで高リスクとなった。この結果は、ヒトiPS細胞由来ニューロンとRodentの違いを示している可能性、および我々の解析法の有効性を示しているものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

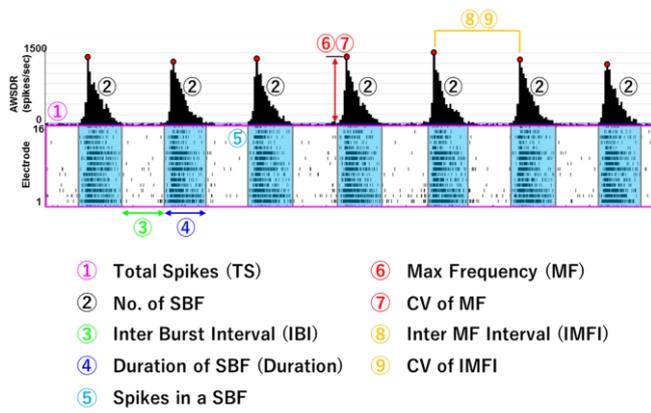


図1 MEAデータから算出する解析パラメータの模式図

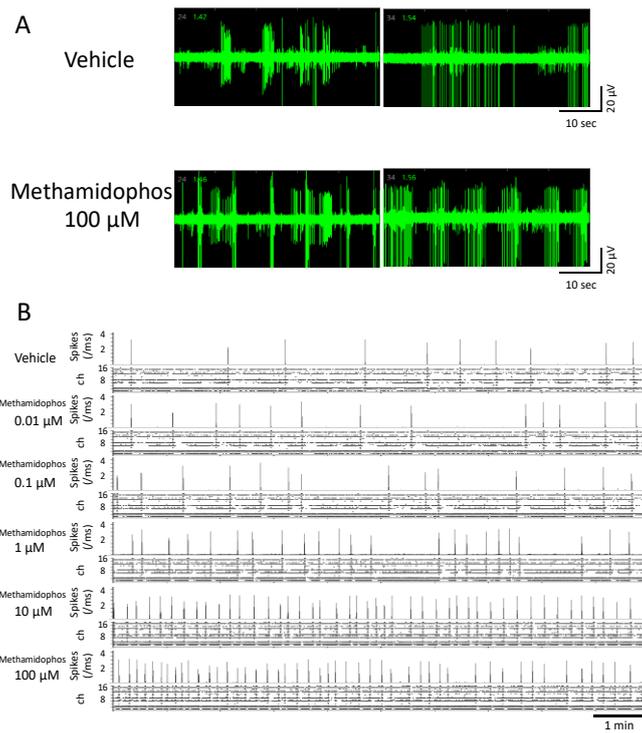


図 2 Methamidophos 投与によるヒト iPS 細胞由来神経ネットワークの活動変化

(A) Vehicle と Methamidophos 100 μ M投与における細胞外電位波形。(B) Methamidophos 0.01, 0.1, 1, 10,100 μ M投与における 16 電極/well の 10 分間のラスタープロットとヒストグラム (bin size=10 ms)。

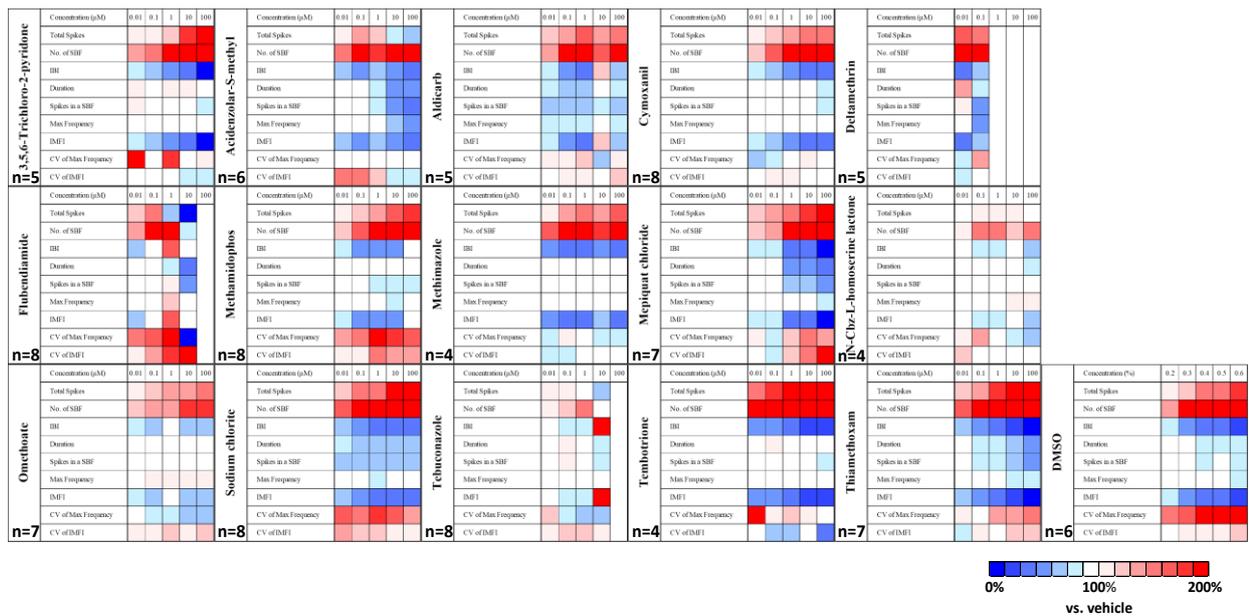


図3 15化合物+DMSOの用量依存的な9解析パラメータのヒートマップ

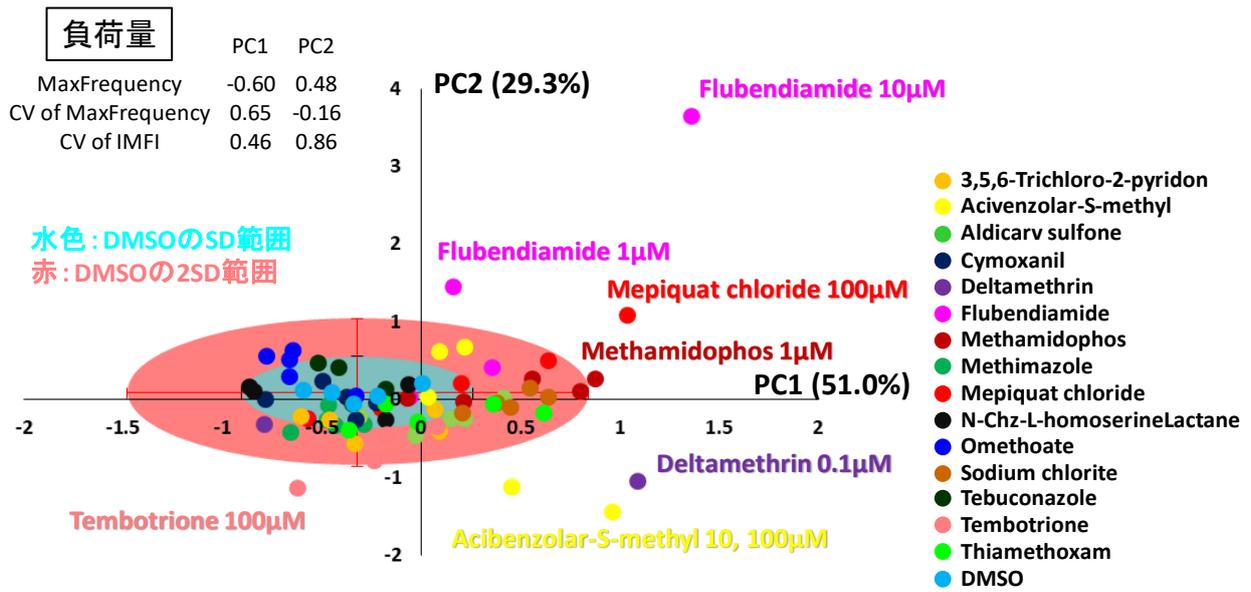


図4 3パラメータを用いた主成分マップと15化合物の用量プロット

Compound	Concentration (μM)				
	0.01	0.1	1	10	100
3,5,6-Trichloro-2-pyridone	低リスク	低リスク	中リスク	中リスク	中リスク
Acibenzolar-S-methyl	中リスク	中リスク	低リスク	高リスク	高リスク
Aldicarb sulfone	中リスク	中リスク	中リスク	低リスク	中リスク
Cymoxanil	低リスク	低リスク	低リスク	低リスク	低リスク
Deltamethrin	中リスク	高リスク	-	-	-
Flubendiamide	低リスク	中リスク	高リスク	高リスク	-
Methamidophos	低リスク	低リスク	中リスク	中リスク	高リスク
Methimazole	低リスク	低リスク	低リスク	低リスク	中リスク
Mepiquat chloride	低リスク	低リスク	低リスク	中リスク	高リスク
N-Cbz-L-homoserine Lactane	低リスク	低リスク	低リスク	低リスク	低リスク
Omethoate	低リスク	低リスク	中リスク	中リスク	中リスク
Sodium chlorite	中リスク	中リスク	中リスク	中リスク	中リスク
Tebuconazole	低リスク	低リスク	低リスク	低リスク	-
Tembotrione	中リスク	中リスク	中リスク	中リスク	高リスク
Thiamethoxam	低リスク	低リスク	中リスク	中リスク	中リスク

■ 低リスク
■ 中リスク
■ 高リスク
- バースト消失

図5 主成分分析による15化合物の毒性リスク評価