

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

AI支援型MPSを用いたヒトiPS由来神経細胞による神経毒性試験法の開発

(課題番号：22KD1002)

令和4年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 安彦 行人

令和5（2023）年 5月

目 次

I. 総括研究報告		
A I支援型MPSを用いたヒトiPS由来神経細胞による神経毒性試験法の開発		
安彦 行人	-----	1
II. 分担研究報告		
1. MEAとBBBを統合したin vitro試験系の開発	-----	5
諫田 泰成		
2. MEAとBBBを統合したMPSデバイスの開発	-----	14
松永 民秀		
3. 細胞形態評価AIアルゴリズムの開発	-----	17
加藤 竜司		
4. MEAによるin vitro神経毒性評価	-----	21
鈴木 郁郎		
5. In vivo毒性評価	-----	25
渋谷 淳		
6. 化学構造によるグルーピング及びリードアクロスによる神経毒性のin silico予測	-----	35
吉成 浩一		
7. 試験法の行政利用に向けた国際動向調査	-----	45
小島 肇		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	50

AI支援型MPSを用いたヒトiPS由来神経細胞による神経毒性試験法の開発

研究代表者：安彦 行人 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 室長

研究要旨

化学物質の神経毒性はげっ歯類を用いた *in vivo* 試験により評価されているが、ヒトに対する予測性や外挿性に課題がある。動物試験に関する 3Rs の観点からも、ヒト細胞を用いた *in vitro* 試験、カテゴリーアプローチ等を用いた *in silico* 予測の活用が期待される。OECD の *in vitro* testing battery (DNT-IVB) ガイダンスにヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた多点電極アレイ (MEA) システムによる評価法が記載されているが、実験の再現性やキネティクスの反映が課題である。また DNT-IVB の段階的なアプローチにおいて Tier0 に computational approach が記載されているが、具体的な *in silico* 手法の検証が必要不可欠である。ヒトに対する予測性向上には、化学構造と *in vitro* 神経毒性を統合的に評価する必要がある。

今年度は、キネティクスを反映できる *in vitro* 神経毒性評価に生体模倣システム (MPS) を活用することを目指し、まず血液脳関門 (BBB) とヒト iPS 細胞由来神経細胞の共培養系の研究を進めた。また、MEA データと細胞画像データの同時取得を行い、非侵襲に神経ネットワーク活動を予測できる AI システム開発に取り組んだ。さらに、神経毒性の *in silico* 予測に有用な化学構造情報の検討を進めた。これらのデータと照合するために、毒性データが不足する物質について *in vivo* 試験を実施した。

以上のように、統合的に発達神経毒性を評価可能なシステム開発を進めている。今後、OECD 発達神経毒性ガイダンスや国内外の関連団体との連携のもと、新規試験法として国際発信を目指す。

研究分担者：諫田 泰成

国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 部長

研究分担者：松永 民秀

名古屋市立大学医薬学総合研究院 (薬学) 教授

研究分担者：鈴木 郁郎

東北工業大学 大学院工学研究科 電気工学専攻・教授

研究分担者：加藤 竜司

名古屋大学大学院 創薬科学研究科 准教授

研究分担者：渋谷 淳

国立大学法人東京農工大学 大学院・農学研究院・教授

研究分担者：吉成 浩一

静岡県立大学 薬学部 教授

研究分担者：小島 肇

国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 特別研究員

A. 研究目的

現在、化学物質の発達神経毒性は主にげっ歯類を用いた行動試験により評価されているが、ヒトへの外挿性や予測性に課題がある。動物試験における 3Rs の観点からも、ヒト生体環境に近い *in vitro* 評価系や、コンピューターを活用した *in silico* 予測手法の開発が望まれる。

OECD の発達神経毒性 *in vitro* testing battery (DNT-IVB) ガイダンスにヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた多点電極アレイ (MEA) システムによる評価法が記載されているが、実験の再現性やキネティクスの反映が課題である。また DNT-IVB の段階的アプローチにおいて Tier 0 に computational approach が記載されているが、具体的な *in silico* 手法の検証が必要不可欠である。ヒトに対する予測性向上には、化学構造に基づく *in silico* 予測と *in vitro* 神経毒性を統合的に評価する必要がある。

本研究は、ヒト iPS 細胞由来の細胞を用いた精度の高い *in vitro* 評価法の開発、及び *in vitro* と *in silico* 手法の統合による *in vivo* 発達神経毒性予測の精度向上を目的とする。

この目的のため本年度は、*in vitro* 評価系の開発として、MEA システムへの血液脳関門 (BBB) の統合、

細胞画像のAI解析によるin vitro系の品質評価法の開発を進めた。またin silico手法の開発としてMEAデータの機械学習による解析手法の開発、構造記述子による化学物質のグルーピング及びリードアクロスによる神経毒性予測手法の開発を行った。in vivo発達神経毒性の予測性向上のため、発達神経毒性情報の不足する物質のin vivo毒性評価、及びin silico予測とin vitro評価の比較に基づくin vivo毒性情報の収集を実施した。

さらに、研究成果を国際ガイダンスとして確立することを目指し、試験法の行政利用に向けた国際動向調査を進めた。

B. 研究方法

① ヒトiPS細胞由来神経細胞及びBBBを用いたin vitro発達神経毒性評価法の開発

ヒトiPS細胞由来神経細胞のネットワーク活動をMEAにより再現性良く測定するための、培養の品質管理手法を検討した。具体的には、米国Neucyte社の市販細胞培養キット、米国Axion社のMEAシステムを使用し、ヒトiPS細胞由来神経細胞を培養して神経ネットワーク活動を測定した。培養期間中にヒトiPS細胞由来神経細胞の写真撮影を行い、得られた画像を深層学習モデルU-netによる学習に供して、コンフルエント状態の細胞画像から特徴量を抽出するアルゴリズムを開発した。

また分担研究者の松永らが樹立したヒトiPS細胞由来BBBの分与を受け、国衛研にて培養及び経内皮電気抵抗 (TEER) 測定による機能確認を行った。

ヒトiPS細胞由来神経細胞のネットワーク活動の化学物質に対する反応をMEAにより測定し、得られたデータを用いた機械学習による毒性予測を行った。化学物質として5つの痙攣陽性化合物と3つの陰性化合物を使用し、MEAにより得られる神経ネットワーク活動のパラメータのうち、スパイク数、バースト数に関するパラメータを用いて機械学習モデルを構築した。

② 化学構造の類似性に基づくin silico発達神経毒性予測

化学構造式から発達神経毒性を予測する手法として、発達神経毒性に関する総説 (Mundy et al., Neurotoxicol Teratol, 52:25-35, 2015) に記載された361の化学物質を、351の構造記述子によりクラスタリングした。同じ化学物質と構造記述子のセットを用いて化学物質相互の構造類似度を計算し、リードアクロスによる毒性予測手法を開発した。類似度の計算に用いる構造記述子の選択や、構造類似度を判定する閾値、比較する物質数、陽性判定基準の設定を検討した。

③ in vitroとin silico手法の統合によるin vivo発達神経毒性の予測性の向上

発達神経毒性のメカニズムが明らかでない化学物質としてフッ化ナトリウム、過塩素酸アンモニウム、イミダクロプリドに着目してラット発達期ばく露を行い、児動物脳の海馬歯状回における神経新生について組織及び遺伝子発現を解析した。

またin vitroとin silico手法の統合的アプローチとして、構造情報による分類(in silico)とMEAシステムによるin vitroデータから発達神経毒性が陽性と推測した物質について、既報のin vivoデータの検索を行った。

④ 試験法の行政利用に向けた国際動向調査

JacVAM資料編纂委員会の協力のもとOECD in vitro DNTガイダンスに対する意見募集に対応 (意見集約と提出) を行った。

(倫理面の配慮)

本研究で用いたヒトiPS細胞由来神経細胞は、細胞バンクに集積された匿名化ドナー由来細胞から作製されており、個人情報の取扱いは生じていない。また動物実験については、実験を実施した国立大学法人東京農工大学の動物実験等に関する規定ならびに動物実験指針に従った。投与方法は飲水投与を主体として動物の苦痛を最小限に留め、動物はすべてCO₂/O₂深麻酔下での灌流固定ならびに放血により屠殺し動物に与える苦痛を最小限に留めた。

C. 研究結果

① ヒトiPS細胞由来神経細胞及びBBBを用いたin vitro発達神経毒性評価法の開発

ヒトiPS細胞由来BBBの輸送安定性やバリア機能に関するプレバリデーションを行い、良好なバリア機能を得られる培養のプロトコルを確立した。これにより今後、BBBのキネティクスを反映したin vitro評価系の樹立に繋がると期待される。

MEAプレート上で培養された細胞の画像から、AIによる細胞培養の品質評価を行うための特徴量の抽出手法を開発した。これによりin vitro評価系の再現性向上に資することが期待される。

またMEAデータの機械学習により構築したモデルは、未知の (学習に用いられていない) 陽性物質データから陽性判定を下すことができた。

② 化学構造の類似性に基づくin silico発達神経毒性予測

構造記述子により化学構造や物性の類似した物質をグループ化できるクラスタリング手法を開発した。その結果、発達神経毒性陽性の物質や類似した構造を

持つ物質が集積したクラスターが得られ、開発したクラスターリング手法が適切であることが示唆された。リードアクロスにおいて、比較する物質数や類似度に適切な閾値を設けることで、神経毒性予測性を向上させられることが示唆された。

③ in vitroとin silico手法の統合によるin vivo発達神経毒性の予測性の向上

発達神経毒性のメカニズムが明らかでない化学物質としてフッ化ナトリウム、過塩素酸アンモニウム、イミダクロプリドに着目し、in vivo発達神経毒性評価を実施した結果、海馬歯状回において神経幹細胞の増殖抑制や神経炎症が生じていることを見出した。

また発達神経毒性に関する総説(Mundy et al., Neurotoxicol Teratol, 52:25-35, 2015)に発達神経毒性陽性の記載がなかった物質のうち、化学構造によるin silico予測とMEAデータから発達神経毒性陽性の可能性が示唆されたフィプロニルについて文献検索を実施し、海外評価機関における発達神経毒性陽性の試験報告を見出した。このことから、in silico及びin vitroの統合的アプローチにより、in vivo発達神経毒性の予測精度が向上することが示唆された。

④ 試験法の行政利用に向けた国際動向調査

OECDにて策定中のin vitro DNTガイドランスの意見募集に対し、神経細胞分化や神経突起伸長といったエンドポイントの生物学的な意味づけ、またin vivoでの行動異常との対応づけについてのコメントを提出した。また国内外の学会に出席し関連情報の収集、意見交換を実施した。

D. 考察

同一のiPS神経を用いたMEA評価で化学物質の投与前の神経ネットワーク活動にばらつきが認められることから、標準化のネックとなっている(ALTEX, 37:121-135, 2020)。そこでAI画像解析による細胞状態のモニタリングに着手し、今年度は機械学習に供するZ-stack画像をMEAデータと紐づけてデータを取得した。今後、MEAのスパイクやバーストと関連するような特徴量の抽出を進める。

また、使用するヒトiPS細胞由来神経細胞の株間差も重要な課題である。本研究においては国際バリデーションが進められているNeucyteを利用したが、株間差、ラットとヒトの種差はExcitatory neuronとInhibitory neuronの比率(E/Iバランス)の違いだけでは説明できていないことから、株間差を克服できる評価指標の選定が必要と考えられる。まずはNeucyteのデータの活用を進めているが、今後、AIを活用するためには株ごとにMEAデータセットを取得する必

要がある。また、今回は限られた化学物質を用いて機械学習の検討を進めたが、さらに化学物質を増やしてモデルの妥当性などを検証する必要があると考えられる。

OECDのDNT-IVBガイドランスでも指摘されているように、化学物質の中枢神経作用を評価するうえでBBBの影響は重要であり、3Rsの観点からヒト細胞を用いた試験系の樹立が望まれる。ラットBBBは市販されているが、ヒトiPS由来BBBはまだ6版(富士フィルムCDI, Emulate)の販売に留まっており、本研究では独自のヒトiPS由来BBBを利用した。本研究で用いたBBBも市販のBBBも、同じプロトコルをベースに分化誘導している(Lippmann et al. Nat. Biotechnol. 2012;30:783-791.)。その結果、2施設(名市大と国立衛研)で同様のTEER値が得られ、プレバリデーションに成功したと考える。今後、MEAシステムとBBBの統合へ向け、BBB共存によりMEAデータが受ける影響、また化学物質がBBBのバリア機能に与える影響を検証する。一般に、神経機能の異常にはBBBの破たんやミクログリアによる炎症なども関与すると考えられることから、脳血管ユニットを構成する他のメンバーであるペリサイト、アストロサイト、ミクログリアといった細胞をセルカルチャーインサート上で培養する系を構築し、神経毒性を総合的に評価できる系の確立を目指す。

化学物質の構造情報の活用によって、in vivo発達神経毒性の予測性の向上が期待されることから、OECDにおける発達神経毒性評価の段階的アプローチでも、Tier 0としてin silico手法の活用が議論されている。しかし具体的なアプローチの検討は未だなされていないことから、本研究では分子記述子を用いたクラスターリング及びリードアクロス手法を開発した。類似性評価及び毒性判定に関する条件検討を行い、予測精度を向上する条件を見出したが、用いたデータセットの発達神経毒性情報の不確実性を改善する必要があることが示唆された。引き続き、in vivoのデータを収集しながら、検討する必要がある。

イミダクロプリドは発達神経毒性の陽性対照化合物であるが、DNT-IVBでは毒性を検出できていない。今回、イミダクロプリドの作用点として海馬歯状回の神経新生、神経炎症が示されたことから、ヒト神経幹細胞の増殖やミクログリアなどを用いて毒性を検討することにより、DNT-IVBに貢献することが期待される。

化学構造によるin silico予測とMEAデータから発達神経毒性陽性の可能性が示唆された物質について文献検索を実施したところ、海外評価機関における発達神経毒性陽性の試験報告を見出した。in silico及び

in vitroの統合的アプローチにより、in vivo発達神経毒性の予測精度が向上することが示唆された。

以上のように、研究班全体で連携して神経毒性評価法の開発を進めており、順調に進展している。

E. 結論

本研究において、MEAを用いた神経ネットワーク解析法のAIによる予測モデルを構築した。これにより、in vitro神経毒性評価の予測性向上が期待される。今後、BBBとMEAを連結した生体模倣システムの開発を進め、キネティクスを反映した新たなin vitro試験法を構築する。さらに、化学構造に基づくin silico予測とin vitroデータを統合的に活用することにより、in vivo発達神経毒性の予測性が向上することが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

研究班全体として、以下の通り積極的に研究発表を行った。

1. 論文発表

7件

2. 学会発表

国内学会 18 件、国際学会 3 件

H. 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

MEA と BBB を統合した *in vitro* 試験系の開発

分担研究者：諫田 泰成 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部長

研究要旨

化学物質の神経毒性はげっ歯類を用いた *in vivo* 試験により評価されているが、ヒトへの外挿性や 3Rs の観点から、ヒト細胞を用いた *in vitro* 試験の活用が期待される。OECD の *in vitro* testing battery (DNT-IVB) ガイダンスにヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた多点電極アレイ (MEA) システムによる神経毒性評価法が記載されているが、実験の再現性やキネティクスの反映が課題である。そこで本分担研究では、MEA による *in vitro* 神経毒性評価にキネティクスを反映させた解析が可能な生体模倣システム (MPS) の開発を目指す。

まず GABA 受容体拮抗薬であるピクロトキシンを用いて、抑制性神経細胞の細胞機能を調べたところ、用量依存的に神経活動の指標となるスパイクやバーストの亢進が認められた。また発達神経毒性の陽性対照物質ビスフェノール A を用いたところ、用量依存的にスパイクやバーストの亢進が認められた。しかし、一定期間培養してもスパイクが十分に解析できないウェルがありウェル間差が認められたことから、細胞画像から神経ネットワーク活動を予測できる方法の開発に取り組んだ。

次に、血液脳関門 (BBB) とヒト iPS 細胞由来神経細胞の共培養法を検討した。MPS のプロトタイプとして、MEA 測定プレートにヒト iPS 細胞由来 BBB を播種したインサートを載せる方法の開発を行った。MEA の測定プレートに適したインサートを用いてヒト iPS 細胞由来 BBB を培養し、経内皮電気抵抗値 (TEER) によりバリア機能が保たれていることを確認した。

さらにヒト iPS 細胞由来 BBB については、微小流路デバイスを用いた長期培養の検討もを行い、二週間以上に渡り良好なバリア機能を有する条件を見出した。

以上の結果から、MEA と BBB を用いた MPS の開発の基盤を構築した。今後、さらに発達神経毒性の評価法の開発を行う予定である。

A. 研究目的

現在、化学物質の発達神経毒性は主にげっ歯類を用いた行動試験により評価されているが、ヒトへの外挿性や予測性に課題がある。動物試験における 3Rs の観点からも、ヒト生体環境に近い細胞や組織を活用した *in vitro* 評価系の開発が望まれる。本研究は、ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた新たな *in vitro* 発達神経毒性評価法の開発を目的とする。

化学物質による発達神経毒性の *in vitro* 評価系として、現在、OECD の *in vitro* testing battery (DNT-IVB) ガイダンスにヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた多点電極アレイ (MEA) システムによる神経毒性評価法が記載されているが、施設間・実験間の再現性や、キネティクスの反映、細胞の株間差等が課題である。

本研究では、MEA による *in vitro* 神経毒性評価にキネティクスを解析可能な生体模倣システム (MPS) の開発を目指す。

本年度は、ヒト iPS 由来神経細胞のネットワーク活動を MEA システムにより記録して、GABA 受容体拮抗薬であるピクロトキシン、発達神経毒性の陽性対照物質ビスフェノール A を評価し、細胞間差などを検討した。また、MEA システム上の培養細胞の状態を非侵襲的に評価し管理することを目指し、細胞画像から神経ネットワーク活動を予測できる方法の開発に取り組んだ。

次に、血液脳関門 (BBB) とヒト iPS 細胞由来神経細胞の共培養法を検討した。ヒト iPS 細胞由来 BBB は 2 施設でプレバリデーションを実施した。微小流路デバイスを用いた MPS における BBB の長期培養についても検討を行った。

B. 研究方法

①ヒト iPS 細胞由来神経細胞の培養

ヒト iPS 細胞由来神経細胞として、OECD の *in vitro* 神経毒性評価系の国際的なバリデーションに用いられている市販細胞培養キット（米国 Neucyte 社、

SynFire® MEA kit) を用いた。本キットはヒトiPS細胞から分化誘導された Glutamatergic neuron、GABAergic neuronおよびAstrocyteからなり、メーカープロトコルに従い14:6:7の数比で混合培養した。細胞の解凍、播種、培地交換についてもメーカープロトコルに従い行った。Neucyte社細胞はMEAシステムMAESTRO (米国Axion社) の測定プレート上で培養した。

また株間差の検討のため、米国Xcell社のヒトiPS細胞由来神経細胞XCL-1も使用した。Xcell社細胞はMEAシステムPresto (アルファメッドサイエンティフィック) の測定プレート上で培養した。

②MEAデータの取得と解析

Neucyte社細胞のMEAデータはMAESTROを使用して取得した。神経活動データの取得は15分間実施し、AxISソフトウェアでスパイクを抽出後、Neural Metric toolsソフトウェアを使用してネットワークバースト等、各種ネットワーク活動パラメータを取得した。Xcell社細胞のMEAデータ取得にはPrestoシステムを使用した。

化学物質の投与は、スパイク及びネットワークバーストの上昇が止まり、神経細胞ネットワークが成熟したと考えられる時期に達した後に実施した。Neucyte社細胞については細胞播種後28日目以降、Xcell社細胞は60日目以降に投与した。投与は蓄積的に5段階に分けて行い、最終濃度はピクロトキシン、ビスフェノールAとも100 μ Mとした。

③神経細胞画像の取得

細胞画像の取得にはBioRevo BZ9000オールインワン顕微鏡 (Keyence) を使用し、ソフトウェアBZ-IIにより画像の撮影および合成を行った。細胞画像の撮影は週に1回実施した。MEAデータと紐づけた細胞画像の撮影にあたっては、MEAデータに影響を与えないよう、画像撮影はMEA測定後に実施した。

④ヒトiPS細胞由来BBBの培養

ヒトiPS細胞由来BBBは、分担研究者の松永らが樹立したものを、液体窒素温度で国立医薬品食品衛生研究所に輸送し、液体窒素中に保存した (Yamashita et al. *Fluids Barriers CNS* (2020) 17:36)。

24ウェルプレートのウェルに、セルカルチャーインサート (Merck, PIHP01250) をセットし、Fibronectin及びCellmatrix Type IV (それぞれ100 μ g/ml及び400 μ g/ml) により4 $^{\circ}$ C、一晩コーティングした。コーティング溶液を除去した後、セルカルチャーインサートをセットしたウェル内に600 μ l、セ

ルカルチャーインサート内に200 μ lの播種培地を注入し、37 $^{\circ}$ Cで保温した。培地の組成は前掲のYamashitaらの文献に従った。

凍結BBB細胞を液体窒素から取り出し、バイアル内に37 $^{\circ}$ Cに温めた播種培地1mlを加え、10回程度ピペティングして解凍した。得られた細胞懸濁液を8mlの播種培地に加え、100 x g、5分、室温にて遠心した。細胞ペレットを1mlの播種培地に懸濁してトリパンブルー染色の上で細胞数をカウントし、細胞の生存率が80%以上であることを確認した。細胞懸濁液の細胞密度を2.7 x 10⁶cells/mlに調整し、セルカルチャーインサートあたり200 μ l (5.4 x 10⁵cells) を添加した。各セルカルチャーインサート内の液を、400 μ lにセットしたピペッターで1回ピペティングして均一化し、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂にて静置培養した。

経内皮電気抵抗 (TEER) は、測定器EVOM (World Precision Instruments)にカップ型電極EndOhm 6G (World Precision Instruments)を接続し、電極カップ内にセルカルチャーインサートをセットして測定した。

⑤微小流路デバイスを用いたBBBの培養

米国Emulate社の微小流路デバイスChip-S1を使用した。Top channelに④に示した方法で解凍したヒトiPS細胞由来BBB細胞2.5 x 10⁵cellsを播種して、メーカープロトコルに従い灌流下で培養を行った。BBBのバリア機能の確認は、蛍光物質Lucifer yellow (LY, Invitrogen) の透過率測定により行った。BBBを通過し蛍光測定により定量が可能な対照物質として、4-methyl-umbelliferone (4MU, SIGMA) を使用した。LY (300 μ M)あるいは4MU (100 μ M)をTop channelのinlet側に添加し、細胞播種面を通過してBottom channel outletに回収されたLY及び4MUを、ARVO X (Perkin Elmer)により定量した。

(倫理面の配慮)

本研究で用いたヒトiPS細胞由来神経細胞は、細胞バンクに集積された匿名化ドナー由来細胞から作製されており、個人情報の取扱いは生じない。

C. 研究結果

MEA測定プレート上で培養したヒトiPS細胞由来神経細胞について、経時的に神経活動の測定を行った。その結果、総スパイク数、ネットワークバースト数ともウェル間差が観察され、神経活動が十分に上昇しないウェルが生じていた。

神経活動を細胞画像から予測する技術の開発を目指し、細胞画像の機械学習に適切な撮影条件を検討し

た。その結果、1視野で3 x 3のタイリング撮影を行い、それぞれZ軸方向に3.5 μ m間隔で積層的に撮影してベストフォーカス合成を行うこととした(図1)。この方法で経時的に細胞画像を取得し、機械学習による画像特徴量の抽出に供した(分担研究・加藤の項目を参照)。

ヒトiPS神経細胞のネットワーク活動をMEAにより記録し、株間差を検討した。抑制性神経細胞の評価のためにピクロトキシン、神経毒性が既知の化合物としてビスフェノールAを用いたところ、今回使用したNeucyte社細胞においても、Xcell社細胞で得られたものと類似した傾向の用量反応が観察された(図2, 3)。

BBBとヒトiPS細胞由来神経細胞の共培養系の開発のために、名市大と衛研でプレバリデーションを行い、両施設で同程度のTEER値(良好なバリア機能の目安となる1000 Ω /cm²を超える値)が得られることを明らかにした(図4)。

また微小流路デバイスを用いて培養したBBBは、少なくとも培養19日で高いバリア機能を保つことを明らかにした。一方、培養インサートによる培養では13日程度でLucifer yellowに対するバリア機能は失われた(図5)。

D. 考察

化学物質の発達神経毒性評価に関して、2023年4月にOECDのin vitro testing battery (DNT-IVB) ガイドラインがWNTで承認されて、国際的な議論が進められている。その中でMEAによる神経ネットワーク活動の評価法が記載されているが、同一のiPS神経を用いたMEA評価で化学物質の投与前の神経ネットワーク活動にばらつきが認められることから、標準化のネックとなっている(ALTEX, 37:121-135, 2020)。そこでAI画像解析による細胞状態のモニタリングに着手し、今年度は機械学習に供するZ-stack画像をMEAデータと紐づけて取得した。今後、機械学習を用いてMEAプレート上における神経ネットワーク形成と関連する画像特徴量の抽出等の研究を進める。

DNT-IVBガイドラインでも指摘されているように、化学物質の中樞神経作用を評価するうえでBBBの影響は重要であり、3Rsの観点からヒト細胞を用いた試験系の樹立が望まれる。ラットBBBは市販されているが、ヒトiPS由来BBBはまだ8版(富士フィルムCDI、Emulateなど)の販売に留まっており、本研究では独自のヒトiPS由来BBBを利用した。本研究で用いたBBBも市販のBBBも、同じプロトコルをベースに分化誘導している(Lippmann et al, Nat. Biotechnol. 2012; 30: 783-791)。プロトコルや輸送などを検証した結果、2施設で同様のTEER値が得られ、プレバ

リデーションに成功したと考えられる。今後、MEAとBBBを連結したMPSを開発し、キネティクスを考慮した評価方法に取り組む。

一般に、神経機能の異常にはBBBの破たんやミクログリアによる炎症なども関与すると考えられる。本研究ではBBBに脳血管内皮細胞のみを使用した、脳血管ユニットを構成する他のメンバーであるペリサイト、アストロサイト、ミクログリアなどの細胞を含むBBBを構築し、その予測性を検証する必要がある。また、微小流路を用いた灌流培養においてBBBのバリア機能が静置培養に比べ安定して維持されたことから、MEAとの統合に適した微小流路デバイスについても開発を進める予定である。

ヒトiPS細胞由来神経細胞の株間差も重要な課題である。本研究においてはNeucyte社、Xcell社の2種のヒトiPS細胞由来神経細胞を用いて、ピクロトキシン及びビスフェノールAの影響を解析した。2つの細胞株に対して、両化学物質は類似した用量反応関係を示したが、ピクロトキシンについてはスパイク数の増加が、NeucyteよりもXcellで顕著であった。これはピクロトキシンにより阻害を受ける抑制性ニューロンの比率が、NeucyteにおいてXcellよりも低いことによる可能性があるため、興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの比率(E/Iバランス)を調べる必要がある。またラットとヒトの種差の要因はE/Iバランス以外にも様々な原因が報告されていることから(ALTEX, 37:121-135, 2020)、株間差を克服できるMEA評価指標の選定が必要と考えられる。まずはNeucyteのデータの活用を進めているが、今後、AIを活用するためには株ごとにMEAデータセットを取得する必要がある。

E. 結論

本研究において、ヒトiPS細胞由来神経細胞とヒトiPS細胞由来BBBを使用し、細胞画像やMEAデータ、培養条件の最適化など基盤となる技術を構築した。今後、キネティクスを考慮したin vitro神経毒性評価系の構築を目指す。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 諫田泰成、安彦行人：化学物質のインビトロ発達神経毒性評価—甲状腺ホルモンの影響評価の取り組み、第49回日本毒性学会学術年会、北海道、2022年7月2日、口頭、国内。

2. Shigeru Yamada, Yukuto Yasuhiko, Yasunari Kanda : Tributyltin inhibits neural induction via mitochondrial dysfunction in human iPS cells、第 8 回国際メタロミクス学会、石川、2022 年 7 月 12 日、ポスター、国内。
3. 安彦行人、山田茂、諫田泰成 : 多点電極アレイシステム (MEA) を用いたヒト iPS 由来神経細胞によるピレスロイド発達神経毒性の評価、第 62 回日本先天異常学会学術集会、石川、2022 年 7 月 29 日、口頭、国内。
4. 諫田泰成、安彦行人 : インビトロ神経毒性評価法の現状と課題、日本動物実験代替法学会第 35 回大会、静岡、2022 年 11 月 19 日、口頭、国内。
5. Yukuto Yasuhiko, Shigeru Yamada, Yasunari Kanda : ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた多

点電極アレイシステムによるピレスロイド系農薬の神経毒性評価、第 96 回日本薬理学会年会、神奈川、2022 年 11 月 30 日、ポスター、国内。

6. 安彦行人、山田茂、花尻瑠理、諫田泰成 : ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた解離性麻醉剤の神経毒性評価、第 143 回日本薬学会年会、北海道、2023 年 3 月 27 日、ポスター、国内

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

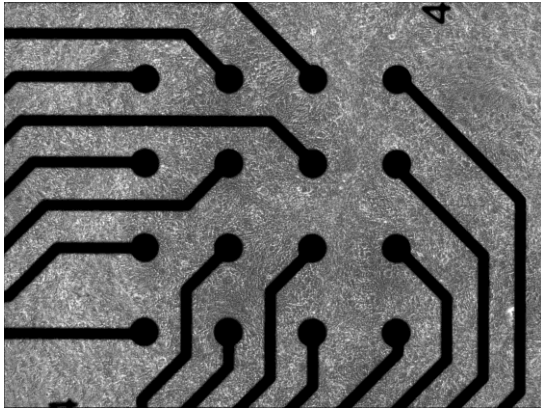


図1. MEA 測定プレート上で培養したヒト iPS 細胞由来神経細胞の画像

1 視野で 3 x 3 のタイリング撮影を行った。それぞれ Z 軸方向に 3.5 μ m 間隔で積層的に撮影し、BX-II ソフトウェアのベストフォーカス機能で合成した。

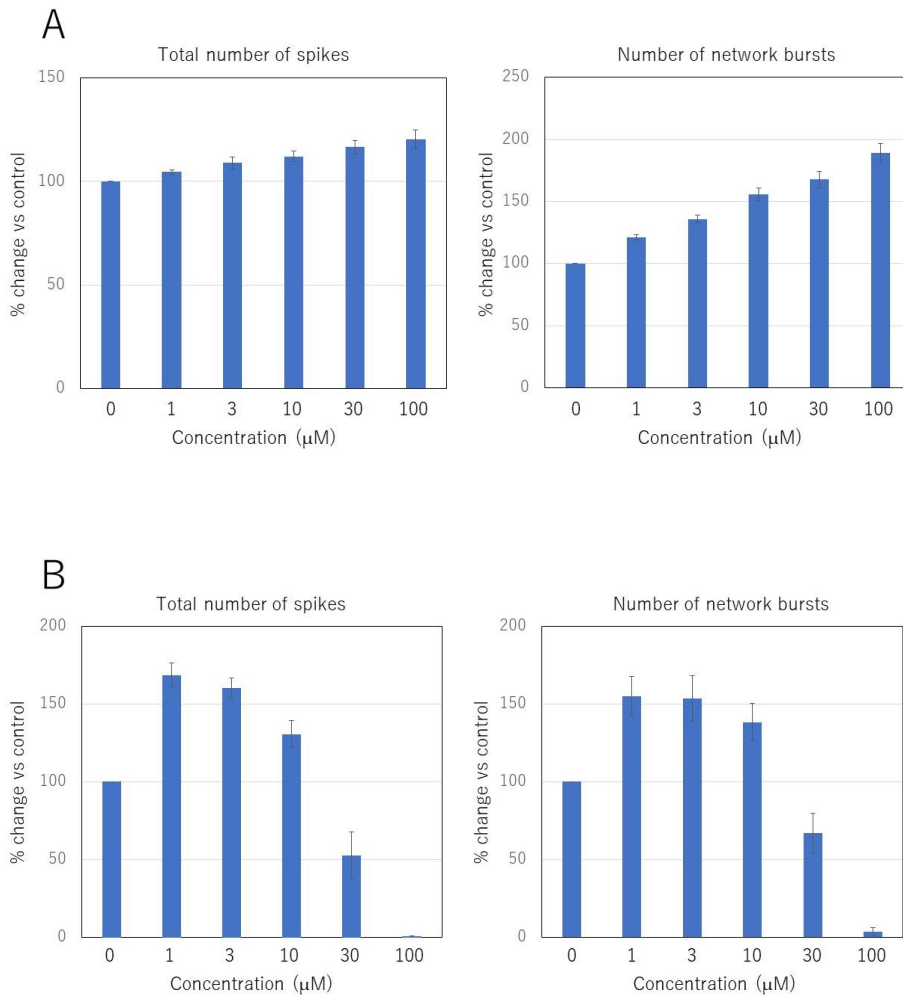


図 2. ヒト iPS 細胞由来神経細胞 (Neucyte) のネットワーク活動に対する化学物質の作用

Neucyte 社製ヒト iPS 細胞由来神経細胞に化学物質を投与し、MEA により神経ネットワーク活動を測定した。A. ピクロトキシン投与 (N=5、平均値±標準偏差)。B. ビスフェノール A 投与 (N=4、平均値±標準偏差)。左：総スパイク数、右：ネットワークバースト数。いずれも投与濃度 0 における値を 100%とした相対値で示した。

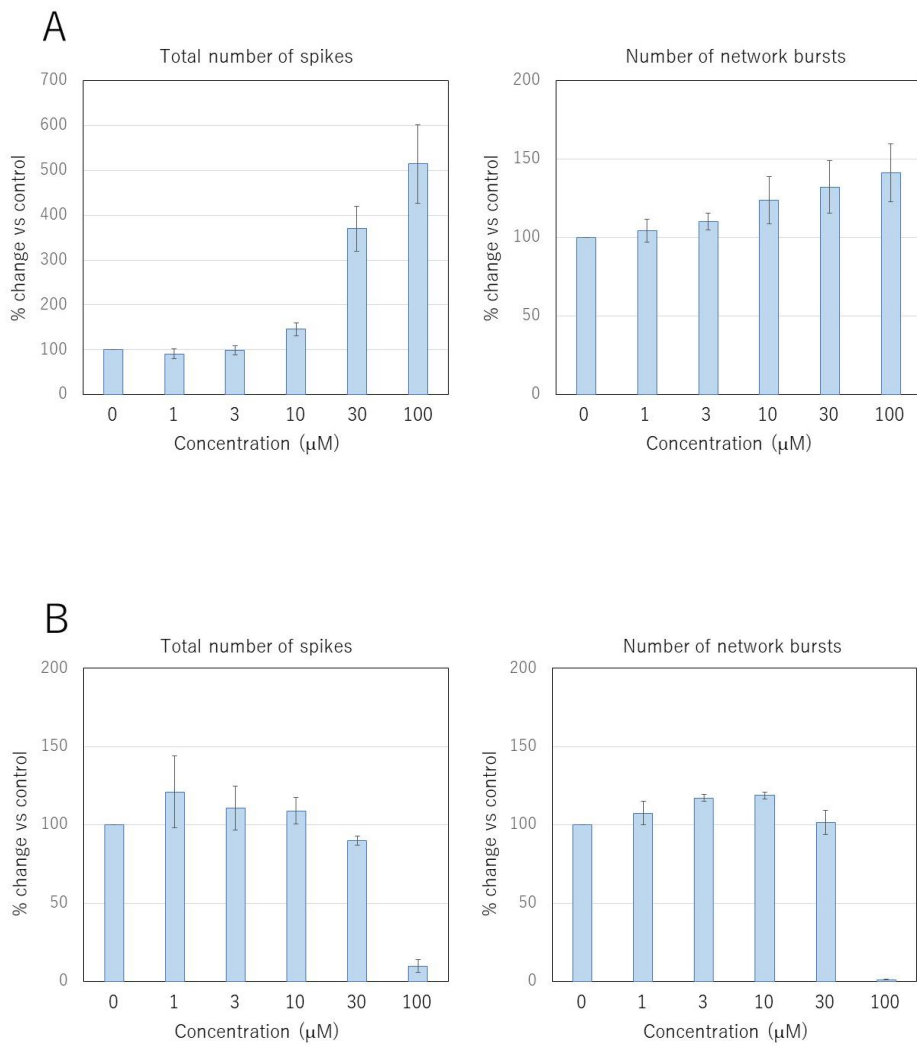


図3. ヒト iPS 細胞由来神経細胞 (Xcell) のネットワーク活動に対する化学物質の作用

Xcell 社製ヒト iPS 細胞由来神経細胞に化学物質を投与し、MEA により神経ネットワーク活動を測定した。A. ピクロトキシン投与 (N=8、平均値±標準偏差)。B. ビスフェノール A 投与 (N=4、平均値±標準偏差)。左：総スパイク数、右：ネットワークバースト数。いずれも投与濃度 0 における値を 100% とした相対値で示した。

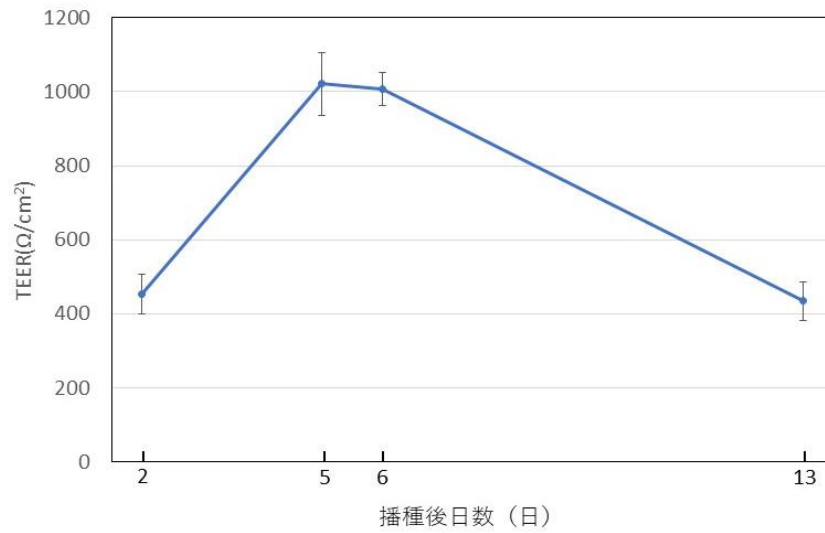


図4. 静置培養されたヒト iPS 細胞由来 BBB の TEER 値の経時変化
 セルカルチャーインサートに播種後 5 日、6 日目に 1000 Ω/cm² を超える良好な TEER 値が得られた。(N=4, 平均値±標準偏差)

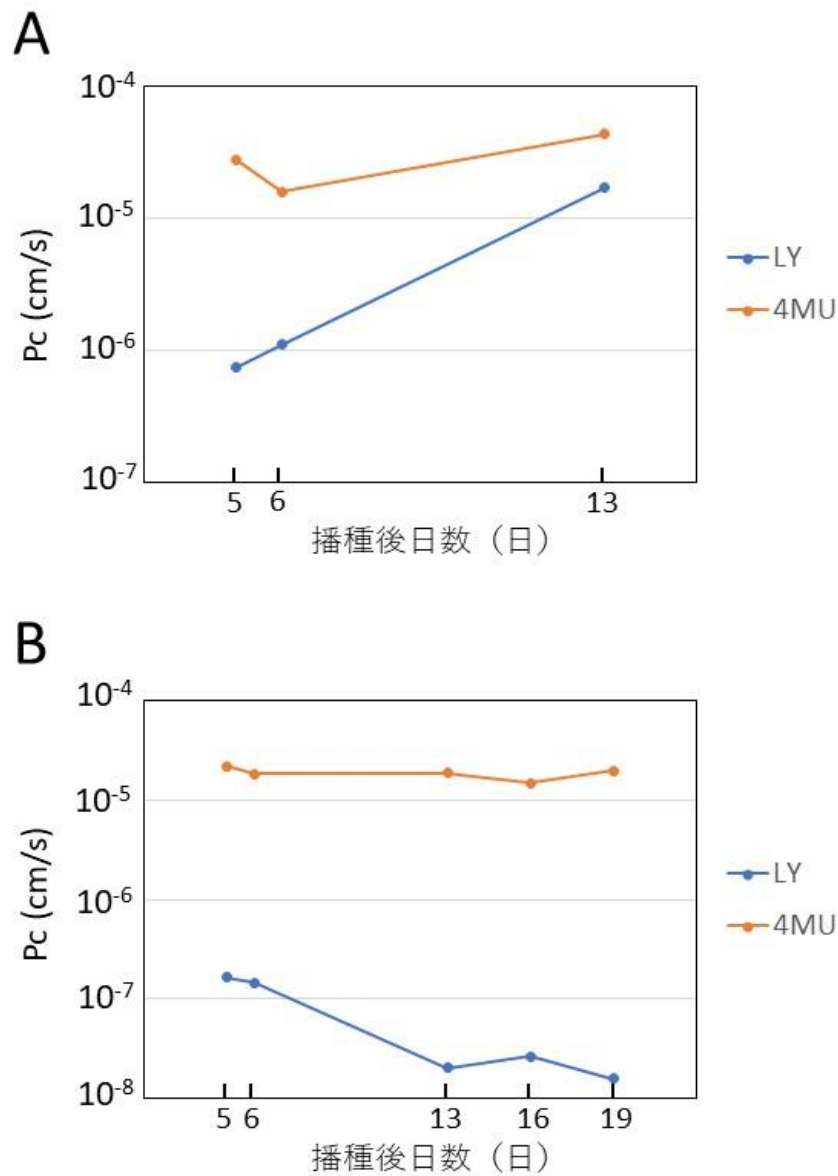


図5. 静置培養と灌流培養におけるヒト iPS 細胞由来 BBB の透過率の経時変化

透過率 P_c (Permeability coefficient) は細胞培養面を透過した蛍光物質の濃度より計算した。BBB を透過しない蛍光物質として Lucifer Yellow (LY)、BBB を透過する蛍光物質として 4-methylumbelliferone (4MU) を使用した。A. セルカルチャーインサートによる静置培養 (N=1)。播種後 13 日目には、LY の透過率が 4MU と同等まで上昇した (BBB のバリア機能が低下した)。B. 微小流路を用いた灌流培養 (N=2, 平均値)。播種後 19 日目まで BBB の高いバリア機能が保たれた。

MEA と BBB を統合した MPS デバイスの開発

研究分担者：松永民秀 名古屋市立大学医薬学総合研究院（薬学）教授

研究要旨

血液脳関門 (BBB) は脳毛細血管内皮細胞、脳ペリサイト、アストロサイトから構成されている。これまで、どのような化学物質が BBB を通過して神経毒性を示すのかを評価するための *in vitro* システムは皆無に等しかった。そこで本研究では、ヒト iPS 細胞由来神経細胞を播種した多電極アレイ (MEA) とヒト iPS 細胞由来 BBB 細胞を播種したセルカルチャーインサートを Microphysiological System (MPS) デバイ스에搭載し、メカニズムベースに予測性の高い化学物質の BBB 透過性と神経毒性の評価を開発することを目的としている。本研究の中で我々は、MPS に搭載する細胞株選択および培養条件の検討を担っており、特にヒト iPS 細胞由来 BBB 細胞を構築し MPS に搭載、多電極アレイ (MEA) と統合することを目標としている。

A. 研究目的

MPS 上での iPS 細胞由来 BBB 細胞の培養条件の検討および iPS 細胞由来 BBB 細胞を搭載した MPS と MEA の統合に向けた開発を目的とする。本年度においては予備検討として、スタンディングタイプのセルカルチャーインサート上においても、高い経内皮的電気抵抗 (TEER) 値を維持した培養が可能かどうかを調べることを目的とした。

B. 研究方法

iPS細胞由来脳毛細血管内皮細胞をスタンディングタイプのセルカルチャーインサートに播種し、チョップスティック型の測定器を用いて経内皮的電気抵抗 (TEER) 値を測定した。また、ルシファーイエローを用いた透過性試験により、傍細胞経路輸送についても確認した。

C. 研究結果

既存のセルカルチャーインサートと同様に、スタンディングタイプのセルカルチャーインサートにおいても、TEER値を測定できることを確認した。また、得られたTEER値は、既存のセルカルチャーインサートよりもやや低い値ではあったものの、 $1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ を超える値を示したことから、タイトジャンクション機能を十分に備えていることが示された。また、ルシファーイエローを用いた透過性試験においても、 $2.2 \times 10^{-5} \text{ cm/sec}$ の値を示し、TEER値同様、高いタイトジャンクション機能を有していることが確認できた。

D. 考察

これまで用いられてきたセルカルチャーインサートとは異なり、MEAとの統合においては、スタンディング

タイプのセルカルチャーインサートしか用いることができないが、プレート上に立つスタンディングタイプのセルカルチャーインサートにおいても高いタイトジャンクション機能を有することが確認できた。

E. 結論

MEAと統合することが可能なスタンディングタイプのセルカルチャーインサートにおいても、高いタイトジャンクション機能を有するiPS細胞由来脳毛細血管内皮細胞を培養することが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

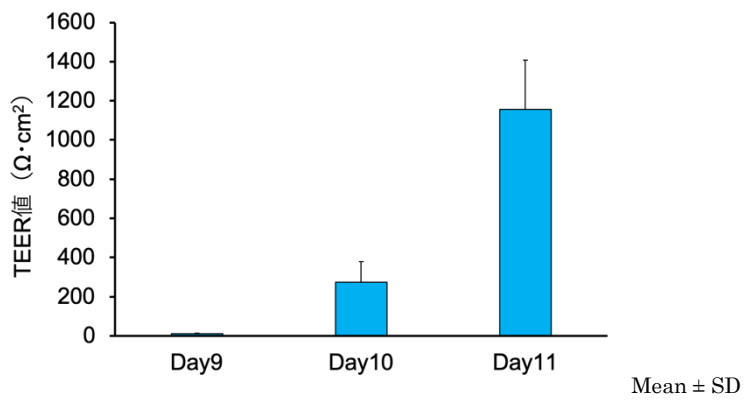
竹内規晃、山下美紗季、坡下真大、岩尾岳洋、常喜祥子、広瀬賢一、山中誠、小柳博、畠山健治、松永民秀。ヒトiPS細胞由来脳毛細血管内皮細胞を用いたBBB-on-a-chipの開発。日本薬学会 第143年会, 2023年3月26日。

G. 知的所有権の取得状況

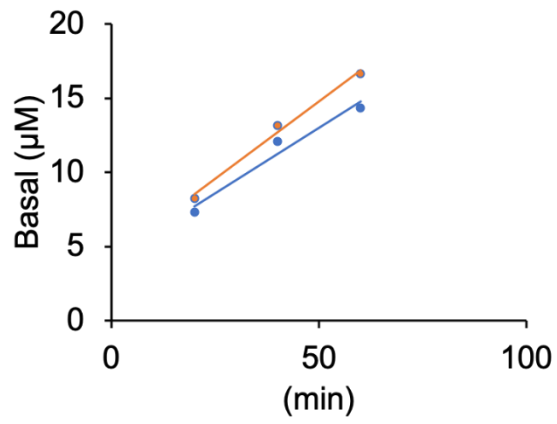
1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし



スタンディングインサート上に播種したヒト iPS 細胞
由来脳毛細血管内皮細胞の経内皮的電気抵抗値



$$P_{app} = 2.9 \times 10^{-5} \text{ cm/sec}$$

ヒト iPS 細胞由来脳毛細血管内皮細胞におけるルシファーイエローによる透過性試験

細胞形態評価 AI アルゴリズムの開発

研究分担者：加藤竜司 名古屋大学大学院創薬科学研究科 准教授

研究要旨

本研究の目標は「**神経細胞の形態解析に着目した AI モデルの開発**」であり、名古屋大学・加藤の有する技術を応用することで、国衛研・安彦らの取得した神経細胞の定量数値化技術および細胞品質管理のための AI モデル化技術の開発を行うものである。より具体的には、(1) 細胞形態背景データの取得及び MPS 品質管理への AI 活用、(2) 神経毒性物質による神経細胞形態変化の捕捉及び指標抽出、を実施する。令和 4 年度は特に開発項目 (1) において、MPS 品質管理・再現性確保への活用を主眼に、AI による細胞画像解析のための基礎データ集積を進め、試作 MPS 上での神経細胞培養画像と MEA データの集積データセットを用いたコンフレント状態にある細胞状態の特微量化アルゴリズムの開発と、画像に紐づけられた MEA データの情報をを用いた細胞品質の安定した培養環境の画像評価における技術基盤（培養条件、焦点条件、画像枚数等）の構築を行う。本年度は蓄積された画像データと MEA データにおける多次元特微量の安定性分析を行うと共に、画像データからのテクスチャ情報抽出・学習アルゴリズムを構築した。

A. 研究目的

本研究では、神経毒性（特に急性毒性）の安定かつ定量的な *in vitro* 評価モデルとしてのヒト iPS 細胞由来神経細胞 MPS 評価を安定化・効率化するため、評価材料である神経細胞の品質評価技術として次の 2 つの技術開発を目指し、従来の神経毒性試験や発達神経毒性試験を代替して国際的な化学物質管理の取り組みに貢献する試験法確立に貢献する。

開発項目 (1) ではヒト iPS 細胞由来神経細胞の品質判定画像 AI 解析技術を目指し、研究分担者・加藤がこれまで様々な細胞の非破壊的画像品質判定を実現してきた非破壊的画像細胞品質判定技術『細胞形態情報解析』を応用し、MPS 薬剤評価を安定に実現するための神経細胞品質を判定する画像 AI 解析技術を開発する。

開発項目 (2) では、神経毒性物質への神経細胞応答表現型の定量化を実現する画像 AI 解析技術を目指し、MPS 中で薬剤に応答する神経細胞の形態応答変化の特微量解析から、MEA 解析を補完する深い生物学的理解のための情報として細胞毒性及び細胞機能障害と連動する表現型特微量の抽出技術開発と、特微量の分析・特定を行う。

本年度は特に、開発項目 (1) において MPS 品質管理・再現性確保への活用を主眼に、AI による細胞画像解析のための基礎データ集積を進め、試作 MPS 上での神経細胞培養画像と MEA データの集積データセットを用いて、コンフレント状態にある細胞状態の特微量化アルゴリズムの開発と、画像に紐づけられた MEA データの情報をを用いた細胞品質の安定した培養環境の画像評価における技術基盤（培養条件、焦点条件、画像枚数等）の構築を目指す。

B. 研究方法

本年度は、研究代表者・安彦と連携し、MPS 上での画像撮影条件・画像蓄積共有方法の構築を第一に進めた。次に、MPS プレート上において培養された SynFire の顕微鏡画像データおよび MEA データの提供を受け、得られたデータの分析および画像データからの特微量抽出技術の開発を行った。技術開発としては、MPS 上から得られる画像データのフォーカス得点化アルゴリズム、画像データからの特徴抽出・モデル化技術としての U-net モデルの構築を行った。

（倫理面の配慮）

本研究では、市販細胞を用いた培養データの解析を行うだけであるため、倫理面で配慮が必要な事項は無い。

C. 研究結果

(a) MPS プレート上で培養された神経細胞画像の焦点得点化アルゴリズムを開発し、結果、画像特微量（テクスチャ情報）の最も安定化する撮影条件の探索と、最適化が可能となった（図1）。

(b) MPS プレート上で培養された神経細胞からの MEA データの蓄積（図2）と、得られる MEA データの分析を行い、実験間での安定性の高い計測特微量の絞り込みを行った。現在まだデータ蓄積を繰り返しているため、特微量データの完全な絞り込みには至っていないが、多次元 MEA データの教師なし学習解析により、ほとんど同じ意味しか有しない特微量の絞り込みや、計測安定性の低い特微量候補をリスト化した。

(c) 深層学習モデル U-net を用いたコンフレント画像からの細胞セグメントモデルの開発を行い、コンフレン

ト画像の特徴量抽出アルゴリズムの一つとして、U-netモデルを用いた密集細胞セグメンテーションアルゴリズムの開発を行った。具体的にはU-netモデルの実装・稼働状態を構築し、単純な画像データそのものとMEA特徴量データとのデータセット学習モデル構築も行える体制が整った。実際の密集画像には現状はマニュアルで細胞輪郭教師値を与え、できるだけ少ない教師データ画像でコンプレント画像中の細胞セグメンテーションがどこまで行えるかを検証した。この検証結果、初期に取得していた数枚の画像では細胞領域の認識ができたが、残念ながら実験日が違う場合や、違う画像になった場合、ロバストな細胞抽出が難しいことがわかった。この課題については引き続きロバスト性向上のための検証の必要がある。この一つの解決法としては、GANなどの他のモデルを用いて細胞領域の区分を行うのではなく、状態としての認識を行うことや、新規テキスト特徴量を導入することで「不均質領域」「均質領域」を見分けることができないかトライする予定である。

D. 考察

本年、研究代表者・安彦との連携によって、AI開発のためのデータ蓄積基盤体制の確立と、撮影条件の絞り込み、神経細胞画像からの独自特徴量抽出のためのアルゴリズムとAIモデルの基礎技術開発を実施した。

実験の進捗とデータ蓄積の結果、そもそもMPS上で培養された3種類の細胞は形態的にも局所的ヘテロ性が高いことが示唆された。即ち、細胞播種手技や条件によって、各ウェル内の細胞局在性や密集の偏りが制御しきれない可能性があり、それが計測MEAデータ不安定化につながっているリスクがある。このため、今後は細胞播種の均質性をどこまで安定化できるかを、画像解析およびロボット分注機などを用いた最適播種混合条件を見出す検証を行う必要があると考えられた。

また、MEAデータの蓄積・分析からは、同じプロトコルで培養された神経細胞であっても、異なるウェル間・異なる実験日間で、大きくMEA計測データの安定性が変わることがわかった。即ち、想像以上にSynFireの細胞状態および計測環境にはまだ「未知のバラツキリスク」が大量に存在する可能性が高かった。

現状では、世界的にもまだMEA多次元特徴量の中で何が安定計測データかは特定されていないため、今後は複数のデータ（特に薬剤応答時に神経細胞の画像とMEAデータ）の蓄積を進め、MEAデータの計測安定性およびSN比の観点と、ここに関連する培養中の細胞画像特徴量のバラツキの観点から、どのウェル（どの状態の神経細胞）が安定なMEA計測に紐づくかを定量的な予測モデルへと実装することを目指したい。

今年度はまだAIモデル構築にはデータ蓄積量が少なかったため、品質判定モデル確定には至ることができなかった。またU-netなどのセグメンテーションアルゴリズムの導入を行ったが、データ内のバラツキが大きく安定なロバスト処理の構築には至らなかった。今後はデータ蓄積を重ね、より良い画像・MEAデータを分析によって特定し、高品質データを用いた細胞品質判定モデルの構築を行う。特に学習データ数が少な

くても異常値検出が可能となるAnomaly Detection Model (MT法)を応用することで、異常計測に繋がる細胞状態を初期判定する技術開発を目指す。

E. 結論

本研究を通じて、現状の神経細胞を用いたMPS薬剤評価系における「計測不安定化リスク」の項目出しと、リスク低減に向けた基盤画像解析アルゴリズムの開発に成功したと言える。基盤技術が構築できた今後としては、解析用データの蓄積・分析・改善のPDCAサイクルを回すことで、画像解析ならではの効率的なリスク低減培養条件の決定と、AI開発のための効果的データ蓄積が行えると考えている。

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

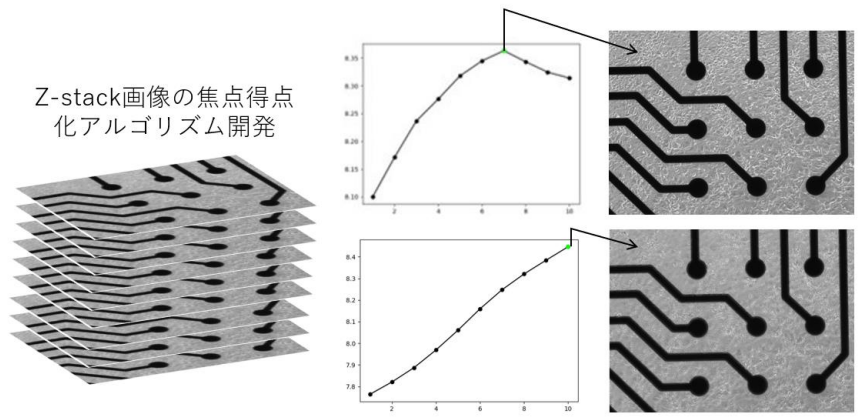


図1：神経細胞撮影条件最適化アルゴリズムの開発

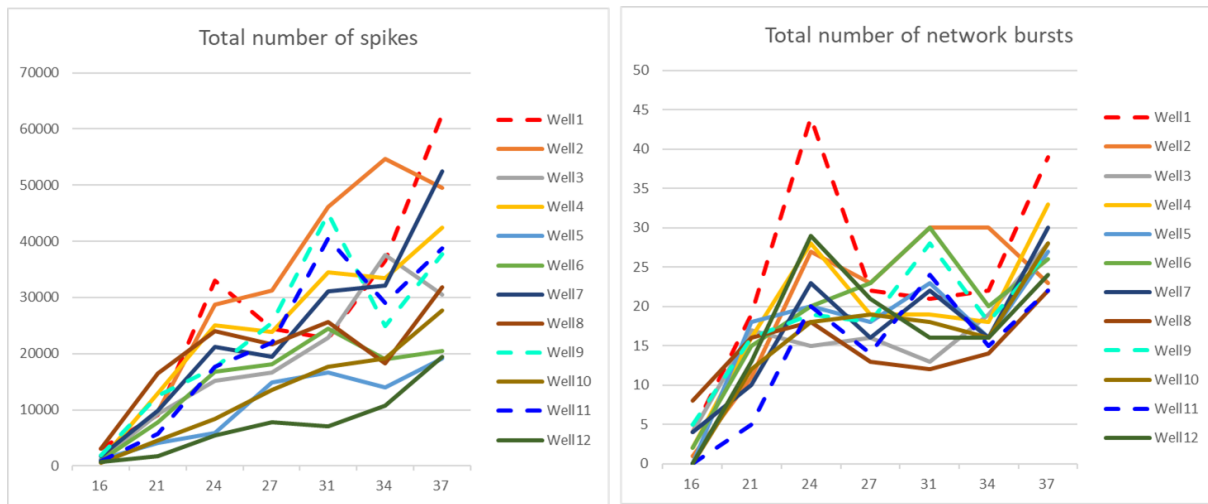


図2： MEA多次元特徴量の蓄積と分析

MEAによるin vitro神経毒性評価

研究分担者：鈴木郁郎 東北工業大学大学院工学研究科電気工学専攻 教授

研究要旨

ヒト誘導多能性幹細胞（iPSC）由来ニューロンを使用したin vitro微小電極アレイ（MEA）評価は、毒性評価の方法として有望である。我々はラスタプロット画像の特徴量を学習したAIを用いた毒性リスク検出法を開発してきたが、特徴量をもとにした判定結果の生物学的な解釈が難しいという側面がある。神経活動の状態を反映した標準的なパラメータは、神経活動変化の意味づけを可能とする。ここでは、MEA計測で標準的に用いられているバースト関連のパラメータ値を用いた機械学習手法による、化合物の毒性評価法を検討した。具体的には、MEA上に培養したヒトiPS細胞から化合物の用量依存的なデータを取得し、データから算出したバースト関連パラメータを用いたone-class SVMを作製した。作製したSVMモデルは、5種類の陽性化合物中3種類の化合物、および農薬関連の8種類の化合物中、7種類の化合物のリスクを検出した。すべての化合物の濃度依存的なリスク上昇を検出できたことから、毒性リスク予測手法として有効である可能性が示唆された。しかしながら、学習や毒性判定に使用するパラメータの種類を厳密に検討する必要がある。陽性化合物の毒性用量を再現性高く判定できる方法まで改良を重ねる必要がある。パラメータを用いた機械学習モデルについても複数検討することで最適なモデルを選択することも予測精度の向上に必要である。サンプル間のバラつきは実験プロトコルの確立で抑えられる側面はあるが、それ以上に細胞ロットに依存する為、バラつきに対しても頑健性を有する解析法を考慮する必要がある。

A. 研究目的

in vitro微小電極アレイ（MEA）評価は、OECDの神経毒性ガイドランスに掲載され、神経機能を指標とした化合物の毒性試験法として国内外で着目されている。ヒト誘導多能性幹細胞（iPSC）由来ニューロンの使用は、ヒトへの外挿性の観点および動物実験廃止の流れから需要が高い。我々は、ヒトiPS細胞由来ニューロンのMEA計測で得られるラスタプロット（発火タイミングの時系列データ）画像の特徴量を学習したAIによる化合物の毒性リスク検出法を開発してきた。しかしながら、ラスタプロット画像から抽出された特徴量に基づいた毒性判定結果は、生物学的な解釈が難しいという側面がある。神経活動の状態を反映したパラメータは、神経活動変化の意味づけを可能とする。従って、本研究では、MEA計測で標準的に用いられているバースト関連のパラメータ値を用いた機械学習手法による、化合物の毒性リスク評価法を検討した。

B. 研究方法

Human iPSC-derived cortical neurons (Neucyte Inc., USA) を24-wellMEAプレート上に培養し、培養4-5週目に自発活動および薬剤累積投与後の細胞外電位を取得した。薬剤は5種類の痙攣陽性化合物と4種類の陰性化合物および8種類の農薬関連化合物を使用した。痙攣陽性化合物として、4-AP, Kainic Acid, Pilocarpine, Picrotoxin, PTZ, 陰性化合物として、Acetaminophen, Amoxicilline, Aspirin, 農薬として、Cypermethrin, Deltamethrin, Dieldrin, Fenamidone, Lindane, Permethrin, Acetamidrid, Aldicarbを使用した。すべての薬剤の溶媒にはDMSOを使用した。

取得した細胞外電位からスパイクを検出し、スパイク時系列データのバースト解析を行った。バースト関連パラメータとして、①バースト内発火数、②バースト内の最大発火周波数、③最大発火周波数の変動係数、

④最大発火周波数間隔の変動係数を算出した。

陰性化合物と溶媒データの上記バースト関連パラメータを使用して、one-class SVM毒性予測モデルを作製し、未学習の陰性化合物と痙攣陽性化合物のデータを用いて予測精度検証を実施した。次に、作製した毒性予測モデルを使用して、農薬関連化合物データの毒性予測精度検証を実施した。

C. 研究結果

作製したSVMモデルの痙攣陽性化合物と陰性化合物の予測結果を図1に示す。リスクスコアは、陰性化合物データの外れ値($p \leq 0.05$)からの距離を示し、正のスコアは外れ値(毒性リスク)であること示している。作製したSVMは、陰性化合物を91%の精度で陰性と判定し、5種類の陽性化合物のうち3化合物を毒性と判定した。また、毒性判定できなかったPilocarpineとPTZも用量依存的にリスクスコアの上昇がみられた(図1)。

次に、SVMモデルの農薬関連化合物の毒性リスク予測結果を図2に示す。未学習のDMSOをすべて陰性と判定した。8種類の農薬関連化合物の内、7種類を毒性と判定した。また、毒性判定できなかったAldicarbも用量依存的にリスクスコアの上昇がみられた(図2)。

D. 考察

Pilocarpineが毒性判定されない結果となったが、動物で痙攣が認められる際の脳室内濃度は今回試験し最高用量 $30 \mu\text{M}$ より10倍高い為、AIの判定結果は正しいと考えられる。毒性が検出されなかったPTZに関しては、用量依存的な変化は検出されている為、化合物による神経活動の変化は捉えているが、PTZで顕著に変化するパラメータを考察し、AIモデルに組み込むことで改善されると考えられる。毒性判定される用量

がin vivoへの外挿性を有していることが重要となるが、Picrotoxin、4-AP、Kinic acidは概ねvivoを反映する用量で毒性が判定されていた。

陰性化合物においては、AmoxicillineとAspirinの一部濃度は陽性と判定された。今回使用したパラメータは陰性化合物においても変化が認められるパラメータであることを示唆している。偽陽性のリスクを排除するためには、パラメータ数の増加とともに適切なパラメータを選定する必要がある。

バースト関連パラメータを用いたone-class SVMで、陽性化合物のリスクスコアは濃度依存的に増加し、農薬の毒性リスクも検出できたことから、毒性リスク予測手法としての有効であることが示唆された。学習や毒性判定に使用するパラメータの種類を厳密に検討する必要があり、陽性化合物の毒性用量を再現性高く判定できる方法まで改良を重ねる必要がある。パラメータを用いた機械学習モデルについても複数検討することで最適なモデルを選択することも予測精度の向上に必要である。サンプル間のバラつきは実験プロトコルの確立で抑えられる側面はあるが、それ以上に細胞ロットに依存する為、バラつきに対しても頑健性を有する解析法を考慮する必要がある。

E. 結論

本研究により、ヒトiPS細胞由来神経ネットワークのMEA計測における化合物の毒性予測法として、国内外で標準的に使用されているバースト関連パラメータを用いたSVMモデルが有効であることが示唆された。予測精度の向上と再現性のある解析法への検討は必要であるが、標準的なパラメータを用いた方法である為、汎用性および予測結果の生物学的な考察が可能なモデルである。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 鈴木郁郎, ヒトiPS神経のMEA計測による化合物毒性リスク予測, 情報計算化学生物学会 (CBI学会) 2022年大会
2. 鈴木郁郎, In vitro神経活動に基づいた化学物質の神経毒性評価, シンポジウム「発達神経毒性の現状と今後の課題」第35回日本動物実験代替法学会
3. 石橋勇人, 永福菜美, 鈴木郁郎 ヒトiPS細胞由来ニューロンの電気活動を指標とした化合物の毒性リスク評価法の検討, 第13回スクリーニング学研究会
4. Yuto Ishibashi, Nami Nagafuku, Ikuro Suzuki, Toxicity risk assessment method for compounds using human iPS cell-derived neurons, Neuroscience 2022

3. 総説

1. 鈴木郁郎, 「ヒトiPS神経の電気活動に基づいた化合物の毒性及び作用機序予測」 谷本学校 毒性質問箱 第24号, 2022, 20-31

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

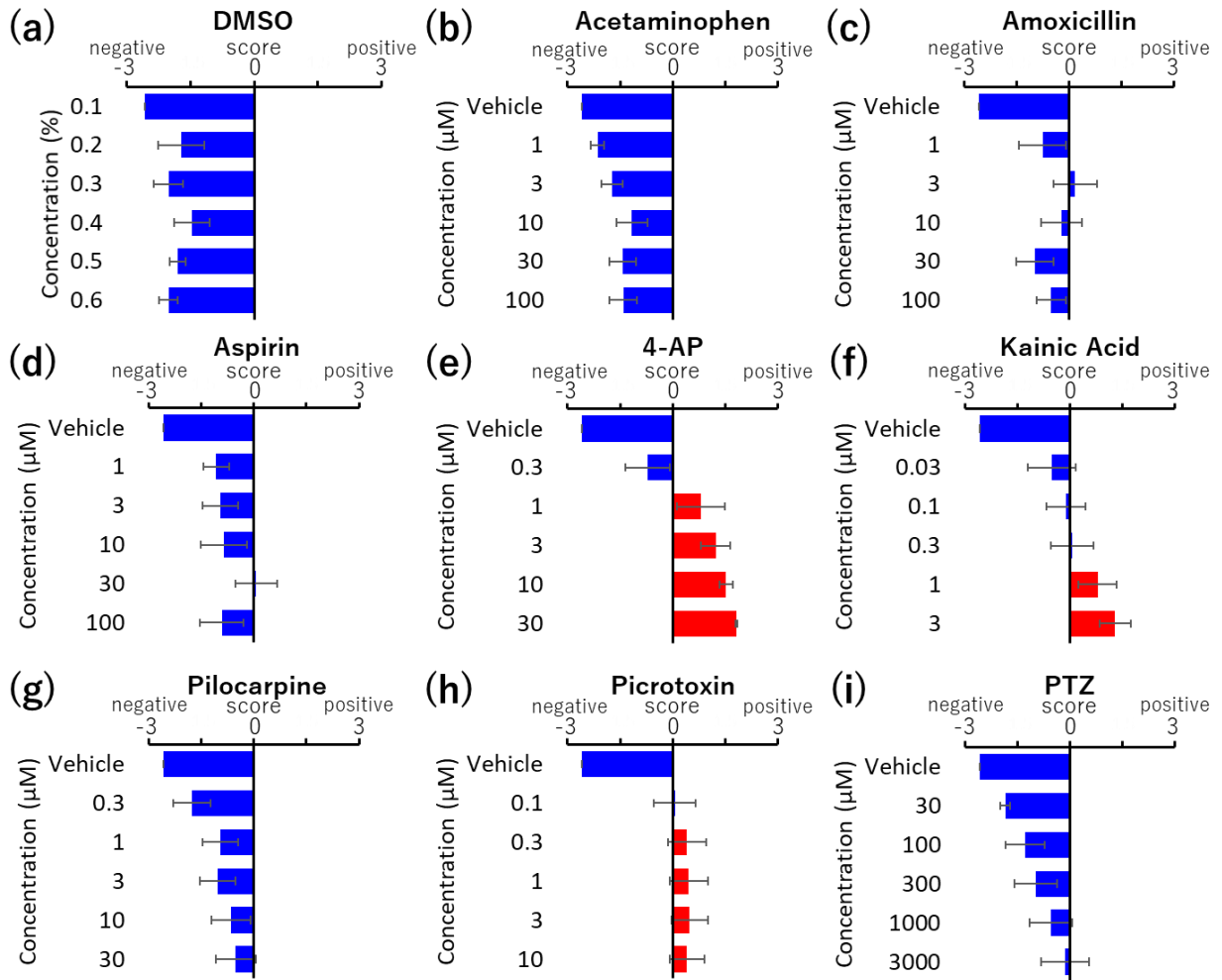


図 1. パースト関連パラメータ SVM による陽性化合物の毒性リスク予測
 (a) DMSO, (b) Acetaminophen, (c) Amoxicillin, (d) Aspirin, (e) 4-AP, (f) Kainic Acid, (g) Pilocarpine,
 (h) Picrotoxin, (i) PTZ. 青色：陰性判定された濃度、赤色：毒性判定された濃度

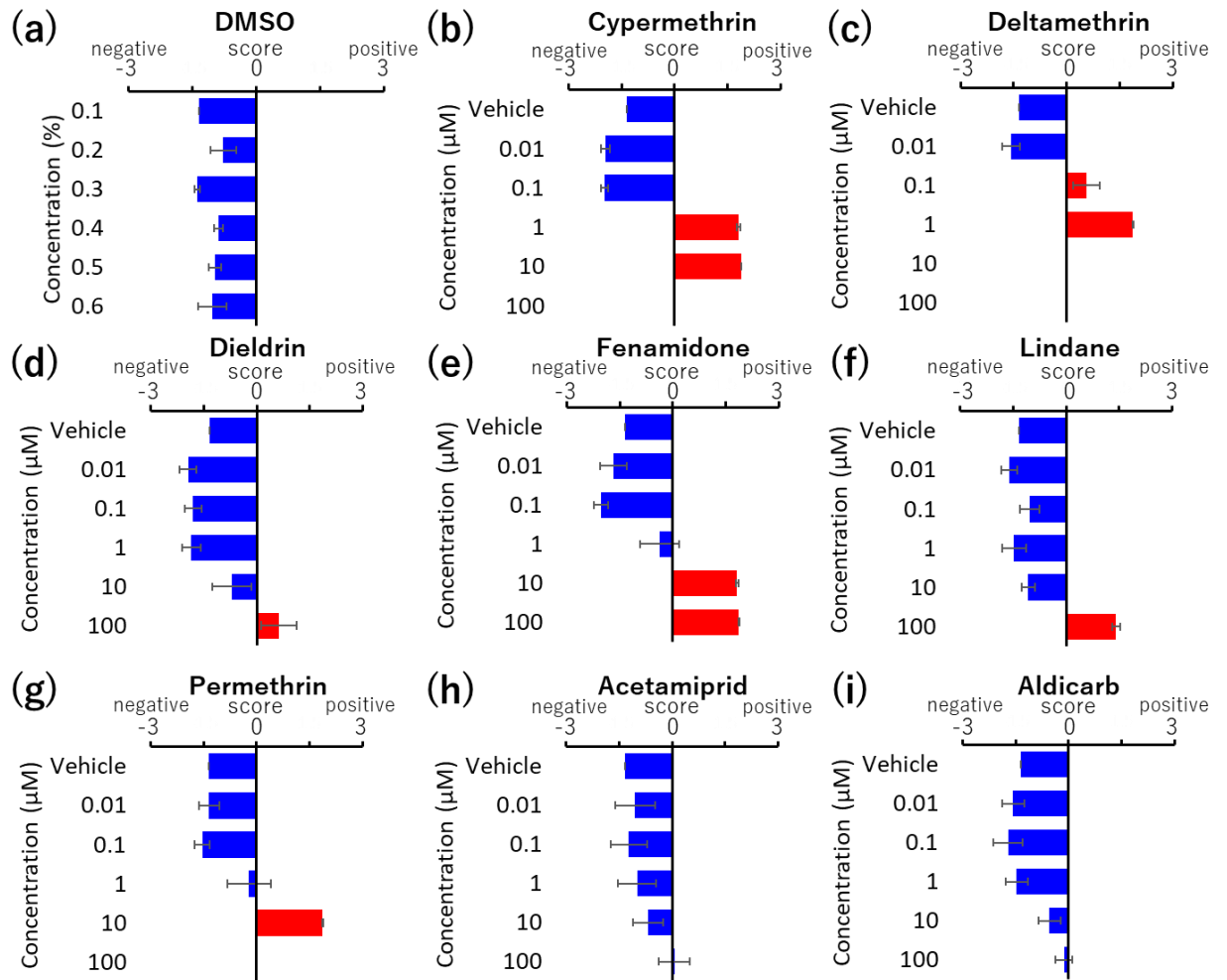


図 2. バースト関連パラメータ SVM による農薬の毒性リスク予測

(a) DMSO, (b) Cypermethrin, (c) Deltamethrin, (d) Dieldrin, (e) Fenamidone, (f) Lindane, (g) Permethrin, (h) Acetamiprid, (i) Aldicarb. 青色：陰性判定された濃度、赤色：毒性判定された濃度

In vivo 毒性評価

研究分担者：渋谷 淳 国立大学法人東京農工大学大学院・農学研究院 教授

研究要旨

本分担研究では、化学物質のインビトロ神経毒性評価法の開発を目的とし、OECDと共有している化学物質のリストをもとに動物実験による神経毒性評価を行う。対象物質はヒトに対する重要脳発達障害物質であるフッ化ナトリウム (NaF)と過塩素酸アンモニウム (AP)及びヒトでの発達神経毒性が懸念されているネオニコチノイド系農薬の1つであるイミダクロプリド(IMI)として、ラットを用いて妊娠6日目から分娩後21日目まで発達期曝露を行い、児動物の海馬歯状回における神経新生に対する影響を不可逆性も含めて検討する。文献データを参考に、NaFは0, 30, 100 ppm、APは0, 300, 1000 ppmの濃度で飲水投与し、IMIは0, 83, 250, 750 ppmの濃度で混餌投与した。児動物を出生後21日と77日目に解剖し、免疫組織学的検索、遺伝子発現解析のため脳を採材した。現在までの解析で、NaFでは離乳時において神経幹細胞及び分化前期の神経前駆細胞の増加と顆粒細胞のシナプス可塑性の増加が確認できた。AP曝露により離乳時において、神経幹細胞の自己複製の抑制が確認できた。IMI曝露で離乳時において分化後期の神経前駆細胞の増殖抑制を認めた。IMIでは神経炎症の誘導も確認された。今後、障害が検出された場合、関連する神経新生関連因子（コリン作動性・グルタミン酸作動性入力、神経成長因子制御系、細胞増殖制御系、アポトーシス制御系など）に関して、遺伝子発現解析を行いメカニズムの同定を行う。

A. 研究目的

化学物質のインビトロ神経毒性評価法の開発を目的として、OECDと共有している化学物質のリストをもとに動物実験による神経毒性評価を行う。分担研究者は、動物実験で発達期の神経毒性評価を行う。

神経発達には神経幹細胞の自己複製に始まり、神経前駆細胞の増殖・分化、移動、成熟の各段階から構成され、神経細胞系譜が標的となる発達神経毒性ではこれらの過程のいずれかが障害を受ける。神経新生はそれら全ての発達過程を含むため、生後に始まる海馬の神経新生は様々な発達神経毒性物質の発達期曝露に対して感受性を示す可能性が高い。また、成体でのニューロンの生存や維持に関わる分子機序には、神経発達における神経突起やシナプスの形成、髄鞘形成の機序と共通する部分が多い。そのため、成熟神経に対する毒性物質は発達神経毒性を示す可能性がある。

令和4年度はヒトに対する重要脳発達障害物質であるフッ化ナトリウム(NaF)と過塩素酸アンモニウム(AP)及びヒトでの発達神経毒性が懸念されているネオニコチノイド系農薬の1つであるイミダクロプリド(IMI)についてラットを用いて発達期曝露を行い、海馬歯状回の神経新生に対する影響を不可逆性も含めて検討する。

B. 研究方法

動物への曝露実験として、OECDの発達神経毒性試験ガイドライン426に準じ、妊娠SDラット（妊娠1日で入手、日本エスエルシー）に対して、一群あたり12匹ずつとして、妊娠6日目から分娩後21日目までの期間、NaFは0, 30, 100 ppm、APは0, 300, 1000 ppmの濃度で飲水投与し、IMIは0, 83, 250, 750 ppmの濃度で混餌投与した。NaFとIMIの最高用量は、過去の文献報告をもとに、母動物への軽度な毒性とともに妊娠の維持と児動物への重篤な毒性が出ない濃度に設定

した。APの最高用量は文献データを参考に母動物と児動物に甲状腺機能低下を誘発することが知られている用量とした。本実験では、出生後4日目に間引きを行い、各母動物に8匹を確保するよう児動物数を調整した。投与期間中、一般状態は1日1回観察し、体重、摂餌量および摂水量を週に2回の頻度で測定した。出生後21日目（離乳時; PND 21）に児動物の半数を解剖に供した。各群10匹以上の雄児動物をCO₂/O₂麻酔下で4%PFA/0.1Mリン酸バッファーにより灌流固定を行い、免疫組織学的検討に供した。各群6匹以上の雄児動物をCO₂/O₂麻酔下で放血し、脳をメタカーン液にて固定し、遺伝子発現解析に供した。IMIの実験では各群6匹以上の雄児動物について脳内酸化ストレス(MDA)及びAChE活性値の測定のため、生理食塩水にて灌流固定を行い、海馬を採材した。

残り半数の児動物はPND 77まで被験物質を含まない飲料水により飼育し、一般状態を1日1回観察し、体重を週に1回の割合で測定した。PND 77に各群10匹以上の雄児動物をCO₂/O₂麻酔下で4%PFA/0.1Mリン酸バッファーにより灌流固定を行い、免疫組織学的検討に供した。各群6匹以上の雄児動物をCO₂/O₂麻酔下で放血し、脳をメタカーン液にて固定し、遺伝子発現解析に供した。

PFA灌流固定脳については大脳のbregmaの後方約-3.5 mmの1カ所で冠状断面を作製して、その前後の対称面（2切面）が薄切面となるようにパラフィン包埋し、3 μm厚の連続切片を作製した。切片は顆粒細胞系譜の分化段階の指標 [GFAP, BLBP, TBR2, DCX, TUBB3, NeuN]、介在ニューロンの指標 [RELN, PVALB]、細胞増殖活性の指標 (PCNA)、アポトーシスの指標 (TUNEL)、神経可塑性の指標 (ARC, FOS, COX2) および神経炎症 (Iba1, CD68, CD163) に対する抗体を用いて、DAB発色にてABC法による免疫染色を行った。海馬歯状回のSGZにおいて単位長さ当たりの陽性細胞数または海馬歯状回門における単位面積当たりの陽性細胞数を算出した。

メタカーン固定脳は、大脳のbregmaの後方約-2.2

mmの2 mm厚スライスより生検パンチを用いて海馬歯状回部分を採取した。今後、そこからtotal RNAを抽出し、cDNAを合成、RT-PCRにより遺伝子発現解析を実施する。

(倫理面の配慮)

投与方法は飲水投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべてCO₂/O₂深麻酔下での灌流固定ならびに放血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物飼育、管理にあつては、国立大学法人 東京農工大学の動物実験等に関する規定ならびに動物実験指針に従った。

C. 研究結果

NaF曝露では、繁殖パラメーター(表1)、母動物と児動物の体重、摂餌量、飲水量の推移(図1)に変動が認められなかった。PND 21およびPND 77の解剖時における体重、脳重量に関しては、PND 77の低用量群で脳重量の増加を認めた以外は変動を認めなかった(表2)。PND 21の海馬MDA及びGSHレベルは変動しなかった(表3)。海馬歯状回の免疫組織学的解析により、PND 21に、100 ppm群において顆粒細胞系譜のGFAP陽性細胞及びSOX2陽性細胞が増加し、DCX陽性細胞が減少傾向を示した(表4)。シナプス可塑性関連ではARC陽性顆粒細胞が増加した。

AP曝露により、繁殖パラメーター(表5)、母動物の体重、摂餌、飲水量、児動物の体重、摂餌、飲水量の推移(図2)、剖検時の母動物と児動物における体重と脳重量(表6, 7)に明らかな変動は認められなかった。PND 21の海馬MDA及びGSHレベルも変動しなかった(表8)。PND 21において、甲状腺の肉眼的腫大の有無を確認した結果、AP曝露の両群で母動物における軽度腫大と児動物における中度腫大が認められ、母動物、児動物共に、病理組織学的に濾胞上皮の肥大とコロイドの減少を認めた(表9: 児動物)。PND 21において、AP曝露の両群で児動物の血清T3, T4レベルが減少し、高用量群で統計学的に有意であった(表10)。実施中の免疫組織化学的解析では、PND 21において、顆粒細胞系譜のうち、顆粒細胞層下帯で、AP曝露によりGFAP陽性細胞数とPCNA陽性細胞が減少ないし減少傾向を示した(図3)。また、SOX2陽性細胞及びTBR2陽性細胞も用量依存的な減少傾向を示した。介在ニューロンでは、高用量でPVALB陽性細胞およびRELN陽性細胞数が減少傾向を示した。シナプス可塑性関連では、ARC陽性顆粒細胞の用量依存的な減数傾向を認めた。

IMI曝露により母動物の体重に変動は認めなかったものの、750 ppmで妊娠期間中の摂餌量の減少、250 ppm以上で妊娠、授乳期間で摂水量の低値が認められた(図4)。雄児動物では摂餌量、摂水量の変動を認めなかったが、750 ppmでPND 9からPND 21の体重が低値を示した。PND 21とPND 77の剖検時の脳重量は変動しなかった。海馬のAchE活性は離乳時の750 ppm群で有意に低値を示したが、MDAレベルは成熟後の750 ppm群で有意に高値を示した(図5)。海馬神経新生に関しては、PND 21の解析で、免疫組織化学的に750 ppm群でDCX⁺細胞数とPCNA⁺細胞数、歯状回門部におけるRELN⁺細胞数の減少を認めた(図6)。また、グリア細胞に関しては全てのIMI群でCD68⁺陽性細胞が増加したが、CD163⁺細胞数は変動しなかった。顆粒細胞のシナプス可塑性に変動はなかった。

D. 考察

NaFの発達期曝露により、生後21日目の海馬神経新生においてtype-1神経幹細胞及びtype-2a神経前駆細胞の増加と顆粒細胞のシナプス可塑性の増加がみられた。これはtype-3神経前駆細胞の減少を示唆するDCX陽性細胞の減少傾向に対する代償性の神経新生及び新生ニューロンのシナプス可塑性の増強を示唆した。

APの発達期曝露により、既に報告してある抗甲状腺剤投与による変化と同様に、曝露終了時での顆粒細胞系譜の増殖抑制に伴うtype-1神経幹細胞からtype-2b神経前駆細胞数の減少、ARC依存性のシナプス可塑性の低下及びPVALB⁺介在ニューロンの減数を認めた。一方で、一致しない変化としてRELN⁺介在ニューロン数が減少し、幹細胞の静止・維持の抑制への関与が示唆された。

IMIの発達期曝露により、750 ppmでは顆粒細胞系譜マーカーの免疫反応細胞集団のうちDCX陽性細胞、顆粒細胞層下帯でのPCNA陽性増殖細胞、介在ニューロンのうちのRELN陽性細胞数が減少し、RELNシグナル抑制による後期神経前駆細胞の増殖抑制と新生顆粒細胞のシナプス可塑性の低下が示唆された。歯状回門部では、IMIはM1型ミクログリアが増加し、神経炎症と酸化ストレス反応の誘導が示唆された。さらに、750 ppmのIMIは、海馬のアセチルコリンエステラーゼのレベルを低下させた。これらの結果は、IMIの発達期曝露により、神経炎症と酸化ストレスの誘導を伴う海馬のニコチン作動性シグナル伝達と神経新生障害を誘導することが示唆された。

今後、障害が検出された場合、関連する神経新生関連因子(コリン作動性・グルタミン酸作動性入力、神経成長因子制御系、細胞増殖制御系、アポトーシス制御系など)に関して、遺伝子発現解析を行い原因分子の特定を行う。

E. 結論

NaF, AP, IMIのラットを用いた発達期曝露を行い、海馬の神経新生影響を検討し、現在、離乳時での解析を実施している。今後は、休薬後の成体期での解析を進め、変動に応じたメカニズム解析を進める。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Ojiro, R., Okano, H., Takahashi, Y., Takashima, K., Tang, Q., Ozawa, S., Zou, X., Woo, G.H., Shibutani, M.: Comparison of the effect of glyphosate and glyphosate-based herbicide on hippocampal neurogenesis after developmental exposure in rats. *Toxicology* 483: 153369, 2023.
- Maeda, N., Shimizu, S., Takahashi, Y., Kubota, R., Uomoto, S., Takesue, K., Takashima, K., Okano, H., Ojiro, R., Ozawa, S., Tang, Q., Jin, M., Ikarashi, Y., Yoshida, T., Shibutani, M.: Oral exposure to lead acetate for 28 days reduces the number of neural progenitor cells but increases the number and synaptic plasticity of newborn granule cells in adult hippocampal neurogenesis of young-adult rats. *Neurotox. Res.* 40(6), 2203–2220, 2022.
- Takahashi, Y., Okano, H., Takashima, K., Ojiro, R., Tang, Q., Ozawa, S., Ogawa, B., Woo, G.H., Yoshida, T., Shibutani, M.: Oral exposure to high-dose ethanol for 28 days in rats reduces neural stem cells and

immediate nascent neural progenitor cells as well as FOS-expressing newborn granule cells in adult hippocampal neurogenesis. Toxicol. Lett. 360: 20–32, 2022.

Shimizu, S., Maeda, N., Takahashi, Y., Uomoto, S., Takesue, K., Ojiro, R., Tang, Q., Ozawa, S., Okano, H., Takashima, K., Woo, G.H., Yoshida, T., Shibutani, M.: Oral exposure to aluminum chloride for 28 days suppresses neural stem cell proliferation and increases mature granule cells in adult hippocampal neurogenesis of young-adult rats. J. Appl. Toxicol. 42(8):1337-1353, 2022.

2. 学会発表

尾城 椋太, 高橋 康徳, 山下 理紗子, 清水 沙織, 前田 夏乃, 岡野 拓, 高嶋 和巳, 唐 倩, 小澤 俊介, 吉田 敏則, 渋谷 淳: グリホサートの発達期曝露によるラットの海馬神経新生に対する影響. 第9回日本獣医病理学専門家協会(JCVP)学術集会, 札幌 (WEB 開催), 第9回日本獣医病理学専門家協会(JCVP)学術集会講演要旨集: P-39, p.56, 3月25日-4月3日, 2022

尾城 椋太, 岡野 拓, 高嶋 和巳, 高橋 康徳, 唐 倩, 小澤 俊介, 鄒 昕羽, 渋谷 淳: グリホサート原体及びグリホサート系除草剤の発達期曝露によるラットの脳発達への影響. 第5回医薬品毒性機序研究会, 東京, 第5回医薬品毒性機序研究会プログラム集: P-12, pp.50, 12月8-9日, 2022.

尾城 椋太, 岡野 拓, 高嶋 和巳, 高橋 康徳, Qian Tang, 小澤 俊介, Xinyu Zou, 渋谷 淳: グリホサート原体及びグリホサート系除草剤の発達期曝露はラットの脳発達に類似した影響を及ぼす. 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会, 東京 (ハイブリッド開催), 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会要旨集: P-03, pp. 64, 1月25-26日, 2023.

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

表 1. Maternal reproductive parameters in NaF study

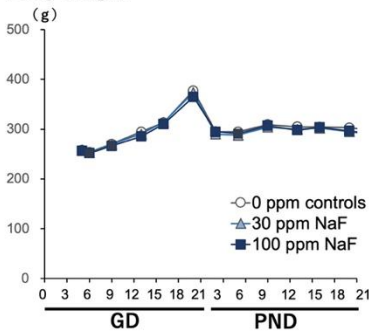
	NaF in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	30	100
No. of dams examined	12	12	11
No. of implantation sites	12.4 ± 1.8	12.2 ± 2.2	11.6 ± 4.0
No. of live offspring	11.6 ± 3.2	12.0 ± 2.3	10.4 ± 4.4
Male ratio (%)	53.4 ± 19.4	50.7 ± 12.2	62.8 ± 21.8

Abbreviation: NaF, sodium fluoride.

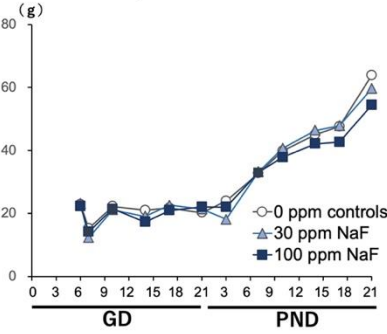
^a Mean ± S.D.

Dams

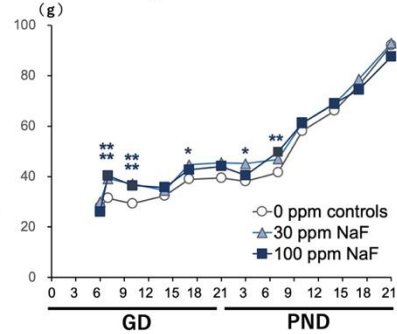
Body weight



Food consumption

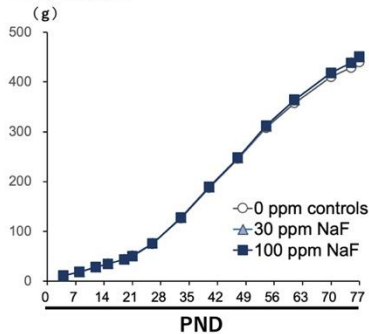


Water consumption

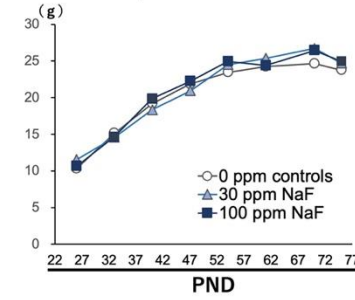


Male offspring

Body weight



Food consumption



Water consumption

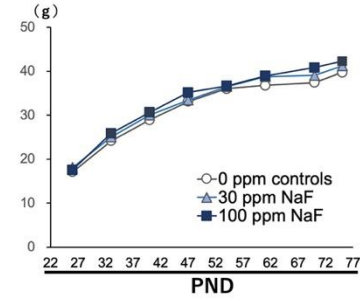


图 1. Body weight and food and water consumption of dams and male offspring in NaF study

表 2. Body and brain weight changes in male offspring at necropsies on PND 21 and PND 77 in NaF study

	NaF in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	30	100
PND 21			
No. of offspring examined	10	10	10
Body weight (g)	51.7 ± 4.0 ^a	50.4 ± 4.0	49.8 ± 4.3
Brain weight (g)	1.51 ± 0.06	1.47 ± 0.05	1.53 ± 0.05
PND 77			
No. of offspring examined	12	12	12
Body weight (g)	434.5 ± 37.1	442.5 ± 17.0	450.9 ± 32.2
Brain weight (g)	2.09 ± 0.05	2.16 ± 0.07*	2.12 ± 0.06

Abbreviations: NaF, sodium fluoride; PND, postnatal day.

^a Mean ± S.D.

**P* < 0.05, compared with the untreated controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's *t*-test with Bonferroni correction.

表 3. Changes in oxidative stress parameters of the hippocampal tissue in male offspring on PND 21 in NaF study

	NaF in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	30	100
No. of offspring examined	6	6	6
MDA concentration(nmol/mg protein)	0.68±0.10 ^a	0.76 ± 0.07	0.8 ± 0.10
GSH concentration (μmol/L)	17.9±0.9	18.7 ± 0.7	18.0 ± 1.2

Abbreviations: GSH, glutathione; MDA, malondialdehyde; NaF, sodium fluoride; PND, postnatal day.

^aMean ± S.D.

表 4. Number of immunoreactive or TUNEL⁺ cells in the SGZ/GCL or hilar region of the hippocampal dentate gyrus of male offspring on PND 21 in NaF study

	NaF in drinking water		
	0 ppm (Control)	30 ppm	100 ppm
No. of animals examined	10	10	10
PND 21			
Granule cell lineage subpopulations (No./mm SGZ length)			
GFAP	2.27 ± 0.51 ^a	2.77 ± 0.75	4.32±1.68**
SOX2	25.44 ± 5.58	27.73 ± 5.70	33.88±9.76*
TBR2	3.92 ± 2.08	4.55 ± 1.11	3.45±1.47
DCX	115.83 ± 20.68	102.75 ± 28.42	101.09±24.08
TUBB3	40.19 ± 9.77	37.54 ± 7.26	39.70±8.40
NeuN	480.76 ± 60.06	508.63 ± 48.69	512.11±51.54
Interneuron subpopulation (No./mm ² hilar region)			
PVALB	19.45 ± 7.70	23.39 ± 10.23	23.48±8.31
Cell proliferation and apoptosis (No./mm SGZ length)			
PCNA	5.12 ± 3.07	4.54 ± 2.01	4.90±2.13
TUNEL	0.69 ± 0.13	0.74 ± 0.32	0.80±0.19
Synaptic plasticity-related IEGs (No./mm SGZ length)			
COX2	25.27 ± 8.26	32.50 ± 7.43	29.24±12.23
FOS	3.50 ± 0.98	3.42 ± 1.24	3.79±1.23
ARC	1.43 ± 0.75	2.39 ± 1.41	3.68±1.05**
p-ERK1/2	1.29 ± 1.00	1.40 ± 1.33	2.26±1.38
Astrocytes and microglia (No./mm ² hilar region)			
Iba1	68.95 ± 14.97	62.6 ± 20.82	71.1±25.27
CD68	12.01 ± 7.57	9.78 ± 3.55	9.62±3.86
CD163	5.57 ± 3.11	6.85 ± 3.35	5.73±3.66
GFAP	384.18 ± 66.97	344.06 ± 47.21	396.71±92.1

Abbreviations: ARC, activity-regulated cytoskeleton-associated protein; CD68, cluster of differentiation 68; CD163, cluster of differentiation 163; COX2, cyclooxygenase-2; DCX, doublecortin; FOS, Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; GFAP, glial fibrillary acidic protein; Iba1, ionized calcium-binding adaptor molecule 1; IEGs, immediate-early genes; NaF, NaF, sodium fluoride; NeuN, neuronal nuclei; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; p-ERK1/2, phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2; PND, postnatal day; PVALB, parvalbumin; SGZ, subgranular zone; SOX2, SRY-box transcription factor 2; TBR2, T-box brain protein 2; TUBB3, tubulin, beta 3 class III (also known as Tuj-1); TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling.

^aMean ± SD.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the untreated controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

表 5. Maternal reproductive parameters in AP study

	AP in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	300	1000
No. of dams examined	10	9	11
No. of left implantation sites	5.5±2.3 ^a	5.0±1.0	6.2±1.6
No. of right implantation sites	7.0±1.3	8.1±1.2	6.5±1.4
No. of all implantation sites	12.5±2.0	13.1±1.4	12.7±2.4
No. of live offspring	12.0±2.6	12.0±2.8	11.0±3.3
Male ratio (%)	58.4±18.1	40.0±20.1	48.1±13.2

Abbreviation: AP, ammonium persulfate.

^aMean ± S.D.

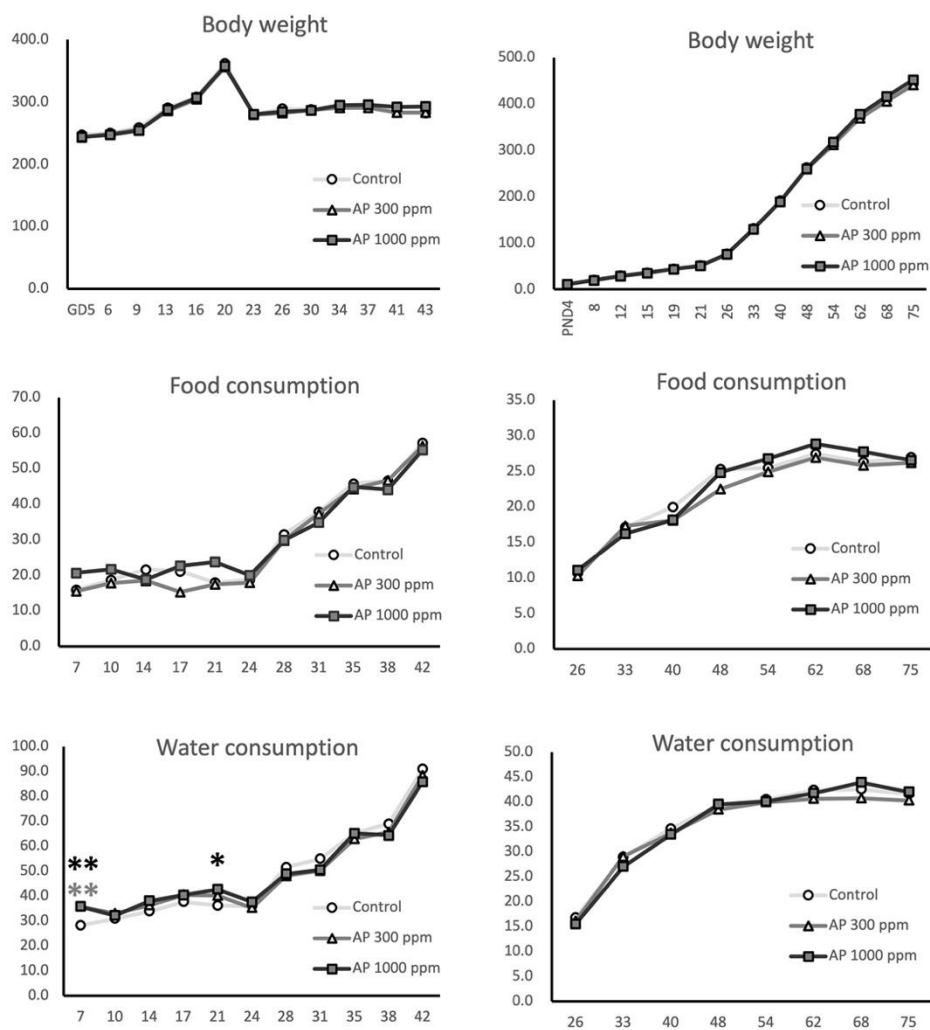


图2. Body weight and food and water consumption of dams and male offspring in AP study

表 6. Body and brain weights of dams on day 21 post-delivery in AP study

	AP in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	300	1000
No. of dams examined	10	9	11
Body weight (g)	282.6±20.8 ^a	283.4±12.3	292.7±16.8
Brain weight (g)	1.9±0.1	1.9±0.1	1.9±0.1

Abbreviation: AP, ammonium persulfate.

^a Mean ± S.D.

表 7. Body and brain weight changes in male offspring at necropsies on PND 21 and PND 77 in AP study

	AP in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	300	1000
PND 21			
No. of offspring examined	19	19	19
Body weight (g)	52.5±2.9 ^a	51.1±3.0	50.1±3.6
No. of offspring examined	8	8	8
Brain weight (g)	1.50±0.08	1.50±0.05	1.50±0.05
PND 77			
No. of offspring examined	19	19	19
Body weight (g)	451.8±30.6	450.4±21.2	459.7±29.3
No. of offspring examined	8	8	8
Brain weight (g)	2.1±0.13	2.1±0.03	2.2±0.21

Abbreviations: AP, ammonium persulfate; PND, postnatal day.

^a Mean ± S.D.

表 8. Changes in oxidative stress parameters in female offspring on PND 21 in AP study

	AP in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	300	1000
No. of offspring examined	6	6	6
MDA (nmol/mg protein)	2.96±0.38 ^a	2.84±0.21	2.88±0.49
GSH (μmol/L)	14.9±1.44	15.9±0.80	14.6±1.08

Abbreviations: AP, ammonium persulfate; GSH, glutathione; MDA, malondialdehyde; PND, postnatal day.

^aMean ± S.D.

表 9. Histopathological changes in the thyroid in female offspring on PND 21 in AP study

	AP in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	300	1000
No. of offspring examined	12	12	12
Decrease in follicular colloids (+/+/+++)	0 (0/0)	12** (6/6) ^{††}	12** (0/12) ^{††}
Follicular cell hypertrophy (+/+/+++)	0 (0/0)	12** (12/0) ^{††}	12** (6/6) ^{††}

Abbreviations: AP, ammonium persulfate; PND, postnatal day.

** $P < 0.01$, compared with the vehicle controls by Fisher's exact test.

^{††} $P < 0.01$, compared with the vehicle controls by Mann-Whitney's U -test.

表 10. Serum thyroid hormone changes in female offspring on PND 21 in AP study

	AP in drinking water (ppm)		
	0 (Control)	300	1000
No. of offspring examined	8	8	8
T3 (ng/ml)	1.52±0.18 ^a	1.50±0.19	1.37±0.14*
T4 (ng/ml)	49.2±8.28	45.2±7.38	32.6±5.75**

Abbreviations: AP, ammonium persulfate; PND, postnatal day.

^aMean ± S.D.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the vehicle controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

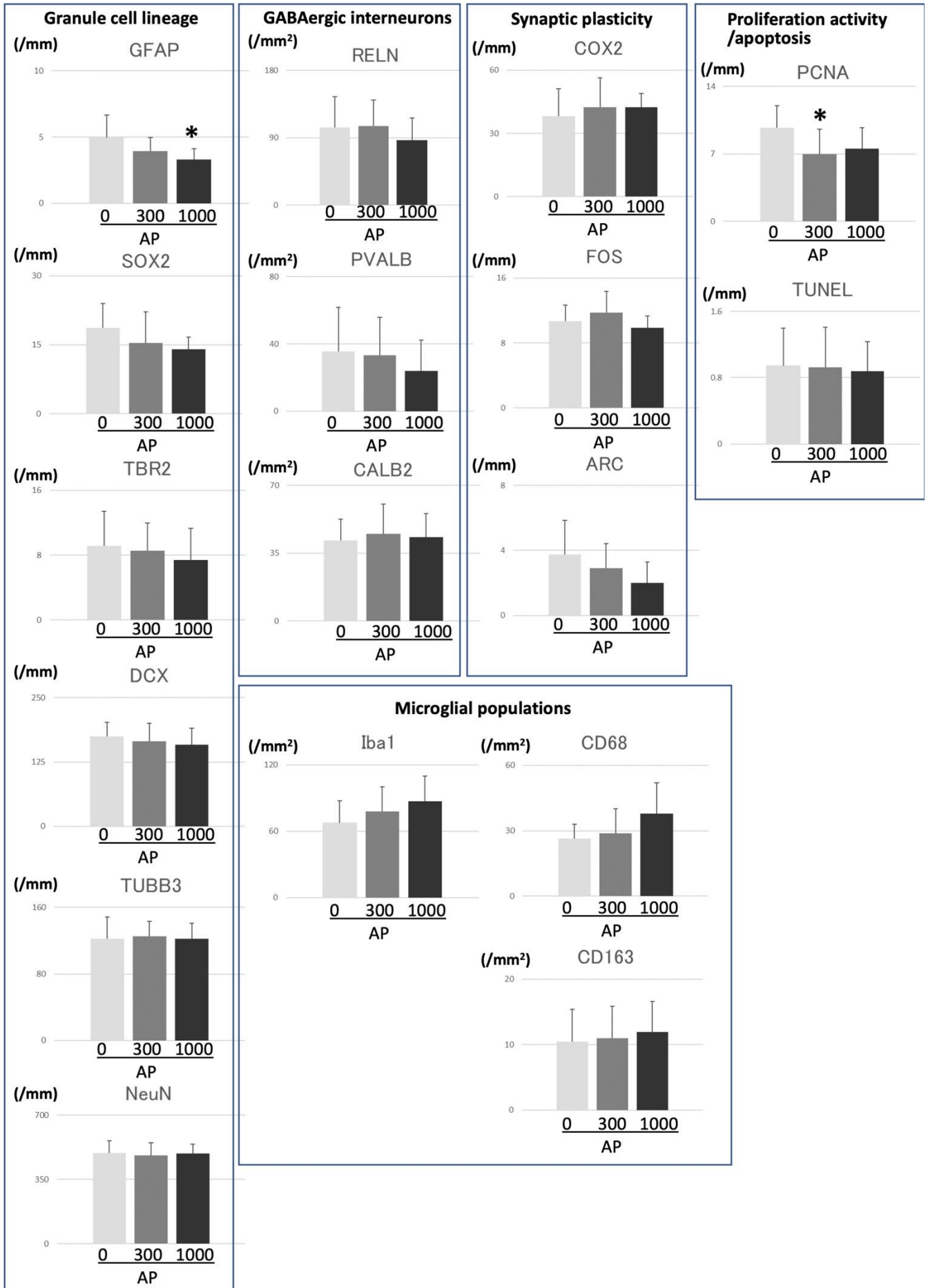
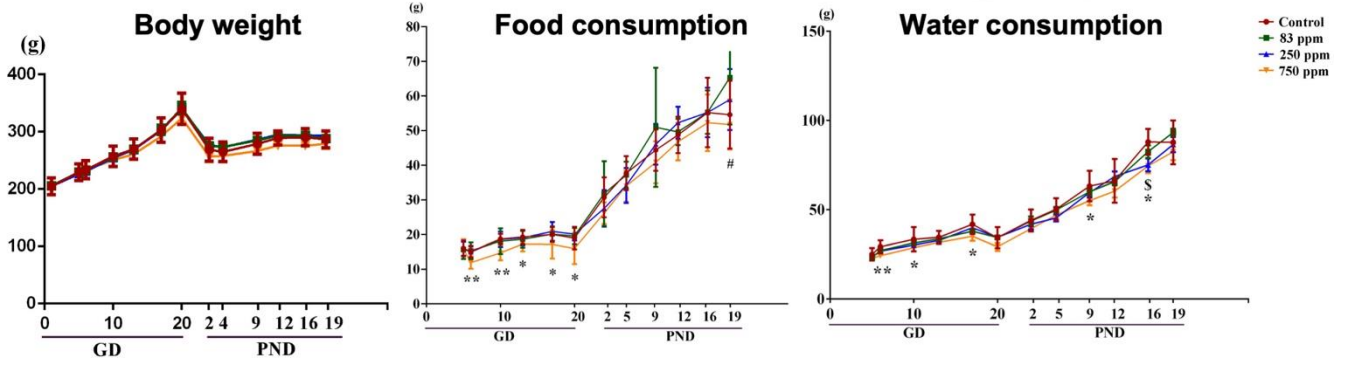


图3. 免疫组化数据在男性后代在PND 21在AP研究

Dams



Male offspring

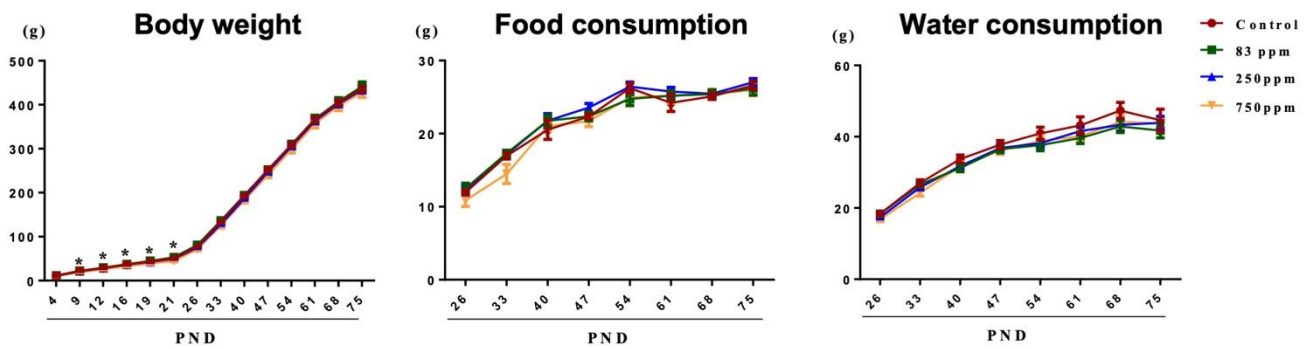
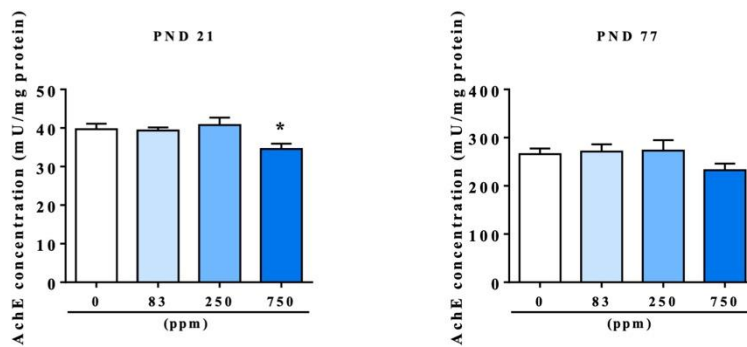


Figure 4. Body weight and food and water consumption of dams and male offspring in IMI study

AchE activity



MDA level

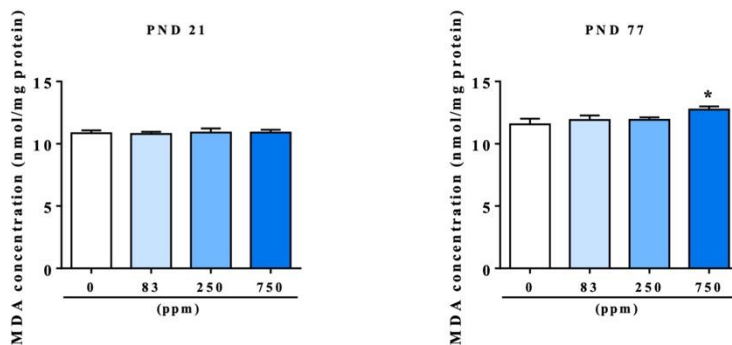
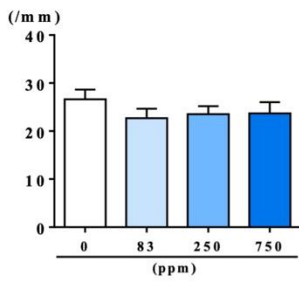
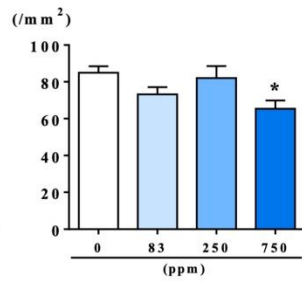


Figure 5. AchE activity and MDA level in male offspring in IMI study

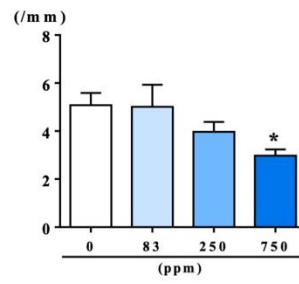
**Granule cell lineage
SOX2**



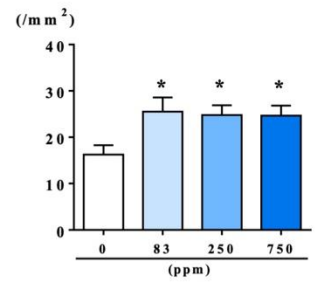
**GABAergic interneurons
RELN**



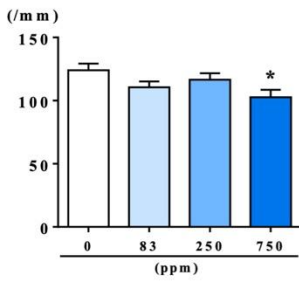
**Proliferation activity
PCNA**



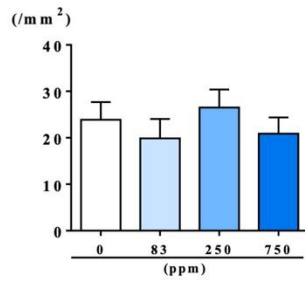
**Glial populations
CD68**



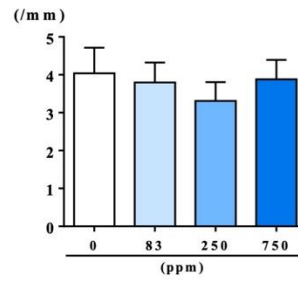
DCX



PVALB



**Synaptic plasticity
ARC**



CD163

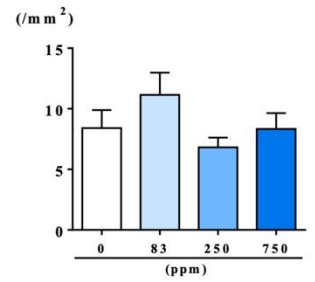


Figure 6. Immunohistochemistry data in male offspring on PND 21 in IMI study

化学構造によるグルーピング及びリードアクロスによる神経毒性の *in silico* 予測

研究分担者：吉成浩一 静岡県立大学 教授

研究要旨

化学物質の発達神経毒性（DNT）を動物実験で評価するには多大なコストと時間を要し、また、近年は動物福祉の観点から安全性試験の動物実験代替法の開発が求められている。DNTについても動物実験代替法の開発が期待されているが、公的に利用可能なデータベースがないことなどの理由から研究が遅れている。そこで本研究では、DNT評価におけるインシリコ手法の有用性を提案するために分子記述子を活用したリードアクロス手法の開発並びにクラスタリング解析を行った。文献情報を元に構築した361物質のデータセットを利用して、分子記述子を活用した物質間距離に基づいて毒性予測のための参照物質（ソース物質）を選択し、データセット内の全物質についてリードアクロスを実施したところ、概ね0.6~0.65程度の一致率が認められ、特にDNTと統計学的に関連が認められた分子記述子を選択して使用することで予測精度が向上することが確認された。これは、記述子の選択により陰性物質間の距離が近くなることに起因していると考えられた。また、構造の小さな陽性物質、構造の大きな陰性物質の予測が困難であることが示唆された。クラスタリング解析においては、DNT陽性物質または陰性物質を多く含むクラスターを得ることができ、クラスタリングに基づくDNT予測の精度は、クラスターを形成しなかった物質を除くと0.7程度とかなり高かった。これらのグルーピング手法は、DNT評価において、化学構造に基づく初期スクリーニングに活用できる可能性がある。一方で、予測精度が十分とは言えないこと、また用いたデータセットの不確実性が考えられること、などの課題が見出されたことから、次年度以降はこれらの改善、解消を目指す。

A. 研究目的

化学物質の神経毒性や発達神経毒性（DNT）を動物実験で評価するには多大なコストと時間を要する。また、近年動物福祉の観点から、実験動物を用いた安全性試験の代替法の開発が求められている。しかし、DNTに関しては、公的に利用可能な毒性試験データベースがないことなどの理由から研究が遅れている。そこで我々は、DNT評価におけるインシリコ手法の有用性を提案するために、既存情報からDNT予測のためのデータセットを構築し、DNTを示す物質のグルーピング解析やリードアクロス手法によるDNT評価手法の開発に向けた基礎検討を行ってきた。これまでに、化学構造情報を数値化した分子記述子を利用して化学物質の類似性を評価し、その結果に基づいたグルーピングやリードアクロスを行い、使用する分子記述子の種類、毒性予測に利用する類似物質の数などの検討を進めてきた。今年度は、これまでの成果の再現性の解析を行うとともに、予測結果の具体的な内容を解析し、今後の精度向上のための課題を明らかにすることを目的として研究を行った。

B. 研究方法

1. データセット

文献 (*Neurotoxicol Teratol*, 52: 25-35, 2015) から DNT を示す物質及び DNT 情報がない物質の情報を抽出し、前者を DNT 陽性物質 (164 物質)、後者を DNT 陰性物質 (197 物質) として使用した。データセットの DNT 陽性率は 0.454 である。被験物質の化学構造情報は PubChem から収集した。

2. 分子記述子

分子記述子は alvaDesc ソフトウェア (Alvascience, ver 2.0) で計算し、搭載されている 33 ブロックに分類された 5,666 記述子のうち、化学構造との関連を理

解しやすい 6 ブロック (Constitutional indices, Ring descriptors, Functional group counts, Atom-centred fragments, Molecular properties) に含まれ、被験物質で計算可能であった 376 記述子 (セット A: 6b all) を解析に利用した。

376 種の分子記述子から、次の方法でさらに選択した。セット B~D: セット A の分子記述子のうち、相関係数の閾値を、0.99、0.95 または 0.90 に設定し、相関する分子記述子ペアの片方を削除したセットを、それぞれセット B ($r < 0.99$, 311 種)、セット C ($r < 0.95$, 288 種)、セット D ($r < 0.90$, 261 種) とした。

セット E~G: 376 種の分子記述子について、DNT 陽性物質と陰性物質の間で Welch の t 検定を行い、得られた p 値が 0.2、0.1、0.05 であった分子記述子のセットを、それぞれセット E ($p < 0.2$, 173 種)、セット D ($p < 0.1$, 129 種)、セット G ($p < 0.05$, 81 種) とした。

3. リードアクロス

各分子記述子について、最大値が 1、最小値が 0 となるように標準化したのち、物質間のユークリッド距離を R を利用して計算した。物質間距離は理論上の最大距離 (使用した分子記述子数の平方根) で除して相対距離とした。

本解析では、データセット内の全物質を被験物質として解析に用いた。リードアクロスと予測精度の算出の概略は以下の通りである。361 物質それぞれについて、残りの 360 物質を距離が近い順に並べ、そこから最近傍の 1 物質、または 4、6、8、10、12、14、16 物質を選択し、それらを毒性予測に利用する「ソース物質」とした。ソース物質に占める DNT 陽性物質の割合がデータセットの陽性率 (0.454) よりも大きかった場合、被験物質を陽性と判定し、小さかった場合は陰性と判定した。これらの予測を全 361 物質で実施した。得られた 361 物質の結果を基に、感度 (陽性物質を正しく陽性と判定できた割合)、特異度 (陰性物質を正しく陰

性と判定できた割合)、一致率(全物質の正答率)、ならびに balanced accuracy (BA、感度と特異度の平均値)を算出した。

4. クラスタリング解析

JMP Pro 15 (SAS Institute) を使用し、Ward 法により実施した。

(倫理面の配慮) 本研究では動物実験データを利用した解析を行うため、倫理的配慮を必要とする情報は含まれない。

C. 研究結果

1. リードアクロスを利用した解析

分子記述子を利用したリードアクロスに関する当研究室のこれまでの研究結果から、DNTと統計学に関連する分子記述子を選択して使用することで予測精度が向上することが明らかになっている。これまでの研究では毒性予測に利用する物質(ソース物質)数を奇数個として検討してきたが、再現性解析の過程で、偶数個の選択時には判定結果が異なる事象が認められた。そこで、これまでの解析結果の再現性確認も兼ねて、偶数個のソース物質を利用した解析を行った。

(解析1) 研究方法欄に示したAからGの7つの分子記述子セットを利用して全物質間の相対距離をそれぞれ算出し、各物質について最も近い物質から1、4、6、8、10、12、14または16番目の物質までをソース物質とした。ソース物質のDNT情報から各物質の毒性判定を行う際の閾値は、データセットのDNT陽性率である0.454とした。例えば、近傍物質数が10の条件で陽性物質が5物質であった場合、陽性率は0.5であり、閾値である0.454を超えるため、被験物質を陽性と判定した。本解析では、データセット内の全361物質全てを被験物質として毒性判定を行い、それらの結果に基づいて感度、特異度、一致率およびBAを算出し、その結果をFig. 1に示した。分子記述子を使用せずにランダムに物質を選択した場合の感度と特異度は、データセットの陽性率である0.454と1から陽性率を引いた0.546程度となる。

全分子記述子 (Fig. 1A) を用いた場合、10~14物質をソース物質とした際に、感度と特異度の差が小さく、比較的精度の高い予測結果が得られた。相関係数に基づいて関連性の高い分子記述子を削減した場合は、BAに大きな変化は認められなかったが、削減数が増えると感度と特異度の差が大きくなり、BAが低下するケースも認められた (Fig. 1B~1D)。DNTとの関連性により分子記述子を選択した場合は (Fig. 1E~1G)、8または10物質をソース物質とした際に、0.65を超えるBAが得られ、これはセットAからEで得られた値よりも高かった。ソース物質数を増やすと、特異度は上昇したが、感度が著しく低下した。

以上の結果より、毒性学的に関連性の高い分子記述子を選択して使用することで、リードアクロスの精度が向上することが再現された。また、ソース物質数は10物質程度とすることで、感度と特異度のバランスがよい精度が得られることが示された。

(解析2) ソース物質数を固定した解析では、被験物質と近傍物質の距離を考慮しないため、データセット内に被験物質と類似性が高い物質が存在しない場合は、それほど類似性が高くない物質もソース物質に含まれてしまう。類似物質が存在しないそのような物質に関しては、リードアクロスにより毒性判定を行うことは不適切であるとも考えられる。そこで次に、一定距離内にソース物質が存在しない物質を解析対象外として予測精度を算出した。具体的には、上記解析と同様に近傍10物質をソース物質として選択し、最も遠い10番

目の物質が設定した閾値内に含まれる場合にのみリードアクロスによる評価を行い、閾値内に含まれない場合には解析対象外として精度の算出から除外した。本研究では理論上の最大距離を1として相対距離を算出していることから、物質間の距離は0~1の値をとる。詳細は割愛するが、物質間距離の分布を確認し、本解析での閾値を0.15~0.2の間で変化させて解析した。

全376分子記述子を利用した場合 (Fig. 2A)、閾値を設定することでBAは0.5程度上昇した。閾値を狭くすることで10種のソース物質が閾値内に含まれない解析対象外物質数は増えたが、特異度の上昇は認められたが、感度が低下し、BAや一致率に大きな変化は認められなかった。相関性に基づいて削除した分子記述子セットを用いた場合においても、全分子記述子を用いた場合とほぼ同様の精度の変化が認められた (Fig. 2B~2D)。一方、DNTと関連がある分子記述子セットを利用した場合には、「 $p < 0.2$ 」セットで閾値の設定により特異度が上昇し、その結果BAも0.2程度上昇したが、その他のセットでは顕著な上昇は認められなかった。

以上の結果から、閾値の設定の効果が認められる分子記述子セットは、解析1とは異なることが明らかになった。

(解析3) 機械学習等を利用した毒性予測においては、感度と特異度のバランスのよい予測モデルが良いとされ、本研究でもBAや、感度と特異度のバランスを指標として予測精度を判断してきた。しかし、DNTの毒性学的な重要性を考えると、偽陰性が少ない予測手法が求められる可能性がある。そこで次に、ソース物質数を10物質で固定し、判定基準をこれまでの解析で利用した「データセットの陽性率 (0.454) 以上で陽性」から、「10物質中 n 物質の陽性物質が存在すれば陽性」という基準に変更し、 n を1から10まで1ずつ変化させて予測精度を算出した。結果をFig. 3に示した。

解析1で最も良い精度が認められたセットG ($p < 0.05$) の分子記述子を用いた場合での結果を見ると、ソース物質10物質中1、2または3物質以上が存在した場合を陽性と判断する条件において、感度がそれぞれ0.98、0.96、0.90と高い値を示した。このときの特異度はそれぞれ0.06、0.20、0.32だった。

(解析4) 予測結果の詳細を確認すると共に、分子記述子セットG ($p < 0.05$) の選択による予測精度向上の理由を解析することを目的として、データセットのDNT陽性物質、陰性物質それぞれについて、セットAおよびGの分子記述子を用いた場合のソース物質10物質中の陽性物質数のヒストグラムを作成した (Fig. 4)。その結果、多少のゆがみはあるが、正規分布曲線に近い形状のヒストグラムが得られた。

DNT陽性物質について見ると、セットA (6b all) とセットG ($p < 0.05$) では、感度はともに0.63程度と変わらないことから、ヒストグラムのパターンにも大きな違いは認められなかった。ただし、陽性物質が7物質以上であった物質数は、セットGではセットAの37物質から42物質に増加していた。予測結果が一致しなかった物質については、いずれの記述子セットにおいても陽性物質数が3または4である物質が多かった。

DNT陰性物質について見ると、セットAに比べてセットGの分子記述子を用いた場合の特異度が0.60から0.69に大きく上昇したことと一致して、グラフが全体的に左側にシフトしていた。特に、ソース物質10物質中、陽性物質が1物質以下しか含まれない被験物質数は、15 (セットA) から40 (セットG) に大きく増加した。

予測が難しい物質の特徴を明らかにするために、セットG ($p < 0.05$) の分子記述子を用いた場合に、ソース

物質に陽性物質が0または1物質しか含まれなかった陽性物質（ヒストグラムにa, bで示した各3物質）ならびに陽性物質が8物質含まれた陰性物質（ヒストグラムにcで示した8物質）を抽出し、それらの化学構造を確認した（Fig. 4下）。陽性物質では比較的単純な構造を有する物質がほとんどであったのに対し、陰性物質では構造が複雑で分子量の大きな物質が多く含まれていた。

以上の結果より、本研究で用いた手法において、少なくともソース物質を10物質とした場合には、DNT陽性物質、陰性物質共に大きく予測が外れている物質はそれほど多くないことが明らかになった。さらに、DNTと関連した分子記述子を選択することで、陽性物質同士の距離を縮める効果はあまり認められないが、陰性物質と陽性物質の距離が離れ、陰性物質同士の距離が近くなると考えられた。また、化学構造が比較的小さい、または大きい物質の予測が困難であることが示された。

（解析5）解析4で示唆された「DNTと関連した分子記述子を選択することで陰性物質同士の距離が近くなる」という仮説を検証するために、データセット中の各物質について、各記述子セットを用いた場合のソース物質10物質中における毒性（DNT）が一致するソース物質との距離の平均値を算出した。そして、全DNT陽性物質および陰性物質について、平均距離の分布を比較するために箱ひげ図を作成した（Fig. 5）。

その結果、陽性物質同士の距離ならびに陰性物質同士の距離は、セットAの分子記述子を使用した場合に比べて、セットD~Gの分子記述子を使用した場合でともに減少したが、その程度は陰性物質間の距離でより大きく、解析4の結果を支持していた。

2. クラスタリングを利用した解析

研究方法欄に示したAからGの7つの分子記述子セットを使用して、Ward法による階層的クラスタリングを実施し、全物質を物質数の約十分の一である36クラスターに分類した。セットAの分子記述子を使用して得られたデンドログラムをFig. 6に示した。5物質以上が含まれていたクラスターに着目すると、クラスター12（4/5）、15（12/14）、24（6/7）、30（6/9）に陽性物質が多く集まっていた（カッコ内は陽性物質数/クラスター内物質数）。一方、クラスター6（7/26）、9（6/22）、29（20/61）、32（3/12）、34（10/34）には陰性物質が多く集められていた。

次に、各分子記述子セットを用いたクラスタリング結果について、2物質以上が含まれたクラスターを対象として、クラスターの陽性率がデータセットの陽性率より高い場合にそのクラスター内の物質を陽性と判定、低い場合にはそのクラスター内の物質を陰性と判定し、感度、特異度、一致率、BAを算出した（Fig. 6）。その結果、セットAの分子記述子を使用した場合の一致率とBAはともに0.67程度であり、セットB~Dの分子記述子を使用した場合にも大きな変化は認められなかった。一方、DNTとの関連で選択したセットE~Gの分子記述子を利用した場合には、一致率およびBAは0.7以上に上昇した。これらの結果から、クラスタリング解析においても、DNTと関連する分子記述子を利用することで、DNTの有無がより一致する物質をグループ化できると考えられた。

D. 考察

1. リードアクロスを利用した解析

リードアクロスによる毒性評価においては、毒性試験結果がある物質をソース物質として選択して被験物

質の毒性を予測する。そのため、適切なソース物質の選択が高い予測精度を得るための鍵となる。解析1の結果から、分子記述子を利用したリードアクロスによるDNT評価においては、統計学的にDNTと関連する分子記述子を選択して使用することで、より高い予測精度が得られることが明らかになった。これは、使用する分子記述子計算ソフトウェアのバージョンならびにソース物質の選択方法が異なる当研究室の以前の解析結果と一致しており、得られた結果は妥当かつ普遍的であると考えられた。

一方で、このときのBAは高くても0.65程度であり、予測精度としては十分とは言えない。その理由として、本研究ではデータセットを固定し、その中の全物質を解析対象（被験物質）としていることから、必ずしもデータセット内に構造的に類似する物質が存在しないために予測が外れる物質が存在する可能性が考えられた。そこで解析2では、ソース物質の選択に条件（距離の閾値）を設定して解析した。その結果、全分子記述子を用いた場合や相関係数で選択した記述子セットを用いた場合には、閾値の設定による予測精度の向上が認められた。しかし、解析1で良い精度を示したDNTと関連する分子記述子セットを使用した場合にはそのような効果は認められなかった。これは、事前に適切な分子記述子を選択していない場合には、閾値を設定することで不適切なソース物質が選択される被験物質が解析から除外され、結果的に予測精度の向上が認められたが、DNTと関連する分子記述子を使用した場合には、その選択に伴いソース物質の選択が比較的適切に行われたため、閾値の設定による解析に不適切な被験物質の除外効果が認められなかったのではないかと考えられた。本研究では、近傍第10位の物質に対して閾値を設定して解析対象・対象外を決定したが、この仮説をさらに検証するために、閾値の判定を行う近傍物質を変化させて同様の解析を行う予定である。

インシリコ手法による評価は、コンピュータ上での評価が可能であり、スループットに優れていることから、体系的なDNT評価における初期スクリーニングに有用と考えられる。そのような評価では高い感度が必要であると推察されることから、上記解析で決定した条件（分子記述子セット、ソース物質数）において、ソース物質に基づく判定条件を変化させて、感度を高めた際の全体の予測精度を確認したところ、10物質中3物質が陽性の場合に陽性と判定する条件において、感度が0.90と高い判定精度が得られた。一方、この条件における特異度は0.32、一致率は0.59であり、初期スクリーニングに利用した場合、陰性物質の約7割を偽陽性としてしまうと考えられた。

最後に、予測結果の詳細を確認するために、DNT陽性物質と陰性物質について、それぞれにおけるソース物質中の陽性物質数をヒストグラムとして可視化したところ、一致率が20%未満などの予測がひどく外れている物質数が多いわけではないこと、またDNT関連記述子の選択は、陰性物質同士の距離の短縮に寄与していることが明らかになった。さらに、構造が小さい陽性物質、大きい陰性物質の予測が難しいことが示された。おそらく、データセット内に類似物質が少なく、ソース物質の選択時に適切な参照物質が存在しなかったことが原因と考えられる。今後は予測精度が非常に低かった物質について、どのような物質がソース物質として選択されているのかなど、個別のリードアクロス結果を確認し、得られた情報を元に、予測精度の向上に向けた取り組みを進めていく予定である。また、本研究で用いているデータセットは、2015年の論文を元に構築

していることから、その後の情報更新の確認作業や、論文における陽性、陰性判定根拠の詳細などについて確認し、データセットの信頼性向上も図る予定である。

2. クラスタリングを利用した解析

典型的なグループ化手法である階層的クラスタリングによりデータセット内の物質をグループ化し、化学構造とDNT情報との関連性を解析した。その結果、陽性物質が多いグループや陰性物質が多いグループをいくつか作成することができた。また、クラスタリングに使用する分子記述子の種類の影響を確認するために、種々の方法で選択した分子記述子セットを使用してクラスタリングを実施し、クラスター精度の判定を行ったところ、DNTと関連する分子記述子を使用した場合にクラスタリングの精度が向上すると考えられる結果が得られた。今後、各クラスターに含まれる物質の詳細を確認し、化学構造との関連性を確認するとともに、リードアクロス解析のところで記載したように、データセットの信頼性確認を行う必要があると考えている。

一方、階層的クラスタリングを実施したところ、1物質や2物質程度しか含まれないクラスターも多く認められた。これは、これらクラスターに含まれる物質に類似する物質がデータセットに含まれていないことを意味しており、今後リードアクロスにおいて予測が適切に行われなかった物質との一致性を確認する予定である。そのような物質は、現データセットを用いる限り、化学構造からのDNT予測が難しい物質と考えられ、さらなるデータ拡充に向けた参考情報として活用したい。

E. 結論

化学構造情報を利用したリードアクロス手法の確立に向けて基礎検討を行った結果、分子記述子を利用した類似性評価、すなわちリードアクロスにおけるソース物質の選択においては、DNTと関連する分子記述子を選択して使用することで、予測精度が向上することが

示唆された。また、階層的クラスタリングを利用した化学物質のグループ化においても、DNTと関連した分子記述子の使用がよりよいグループ化を可能にする可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 大村奈央、志津怜太、保坂卓臣、菅野裕一朗、吉成浩一：発達神経毒性を予測するためのリードアクロス手法の検討、日本動物実験代替法学会第35回大会、2022年11月18日～20日、静岡市
- 2) 吉成浩一：化学構造情報を用いたリードアクロスによる発達神経毒性の評価、日本動物実験代替法学会第35回大会、2022年11月18日～20日、静岡市
- 3) 大村奈央、志津怜太、保坂卓臣、菅野裕一朗、吉成浩一：リードアクロスによる発達神経毒性評価手法の開発：分子記述子を用いた類似物質選択の有効性、第49回日本毒性学会学術年会、2022年6月29日～7月2日、札幌市
- 4) 吉成浩一：化学構造情報を利用したリードアクロスによる化学物質の毒性予測、第49回日本毒性学会学術年会、2022年6月29日～7月2日、札幌市

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

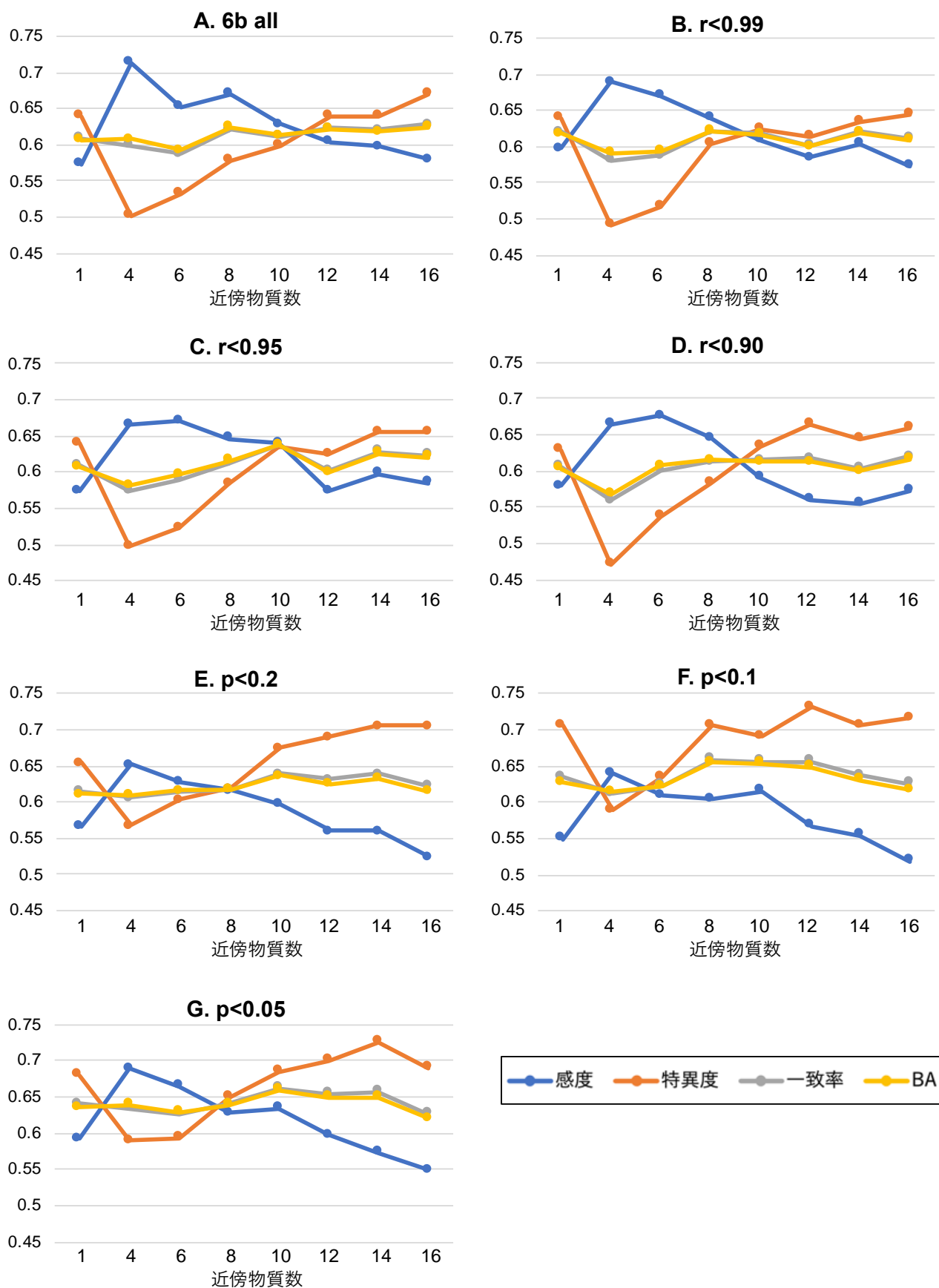


Fig. 1. 分子記述子を利用したリードアクロスにおける分子記述子セットとソース物質数の検討
 各分子記述子セットを利用して物質間距離を計算し、全物質について横軸で示した近傍物質数をソース物質としてリードアクロスを実施した。分子記述子セットごとの予測精度を示した。



Fig. 2. 分子記述子を利用したリードアクロスにおけるソース物質の物質間距離の閾値の検討
 10個のソース物質を利用したリードアクロスを実施する際に、10番目のソース物質が示した閾値内に含まれない場合には解析対象外として、予測精度を算出した。カッコ内の緑の数字は解析対象物質数を示す。

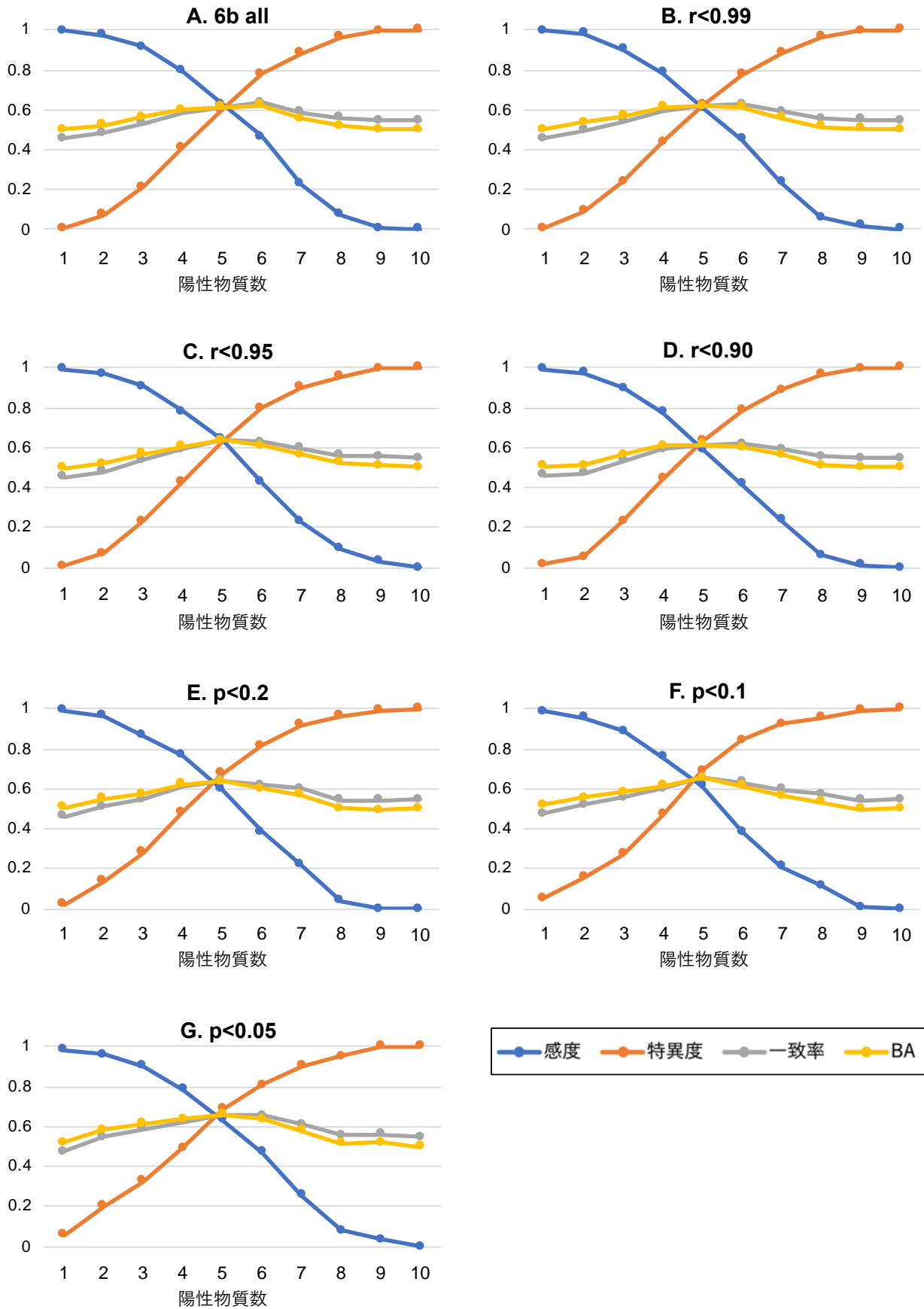


Fig. 3. 10個のソース物質を利用したリードアクロスの性能評価

10個のソース物質を利用したリードアクロスを実施する際に、陽性判定の際に必要な物質数を変化させて予測精度を算出した。

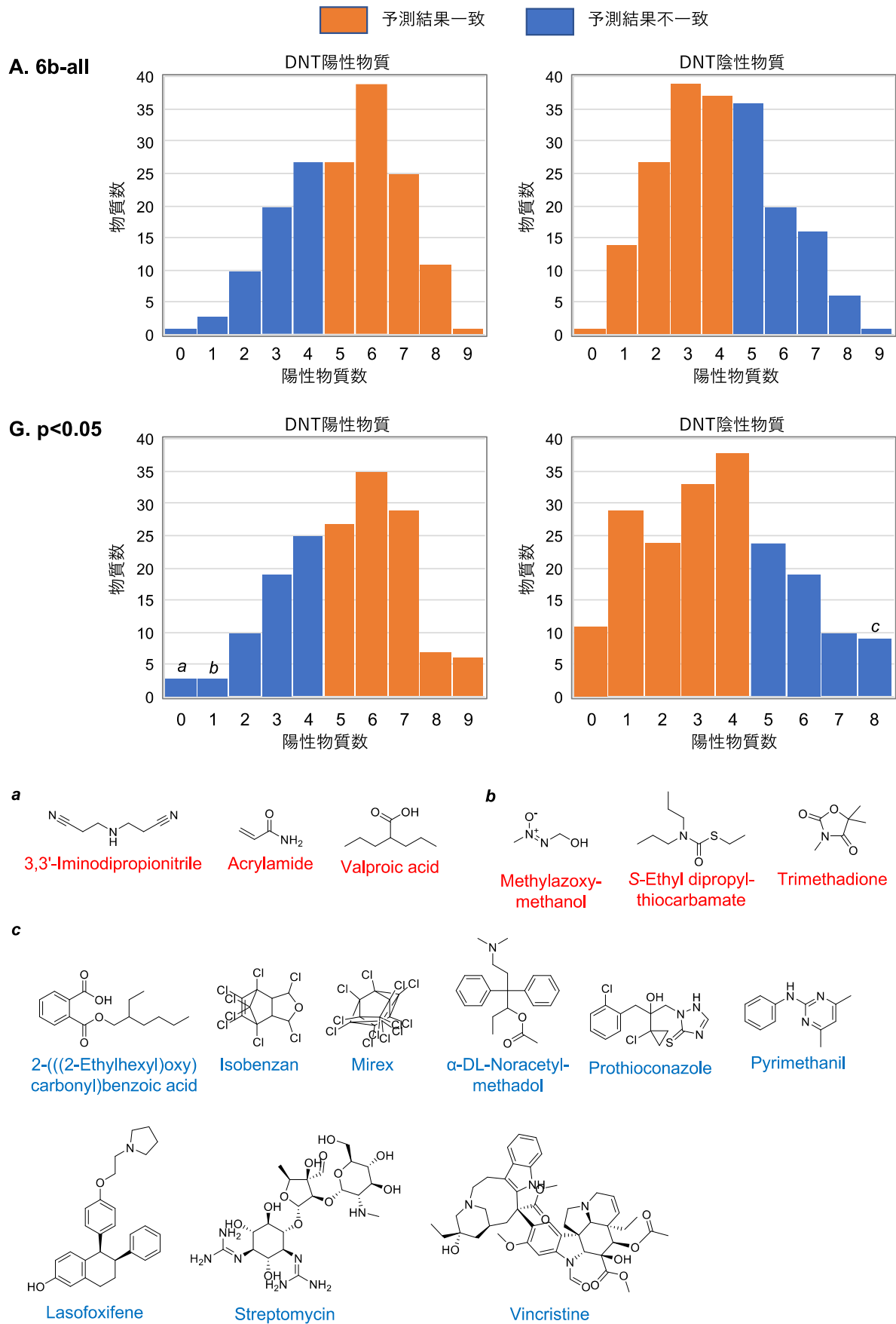
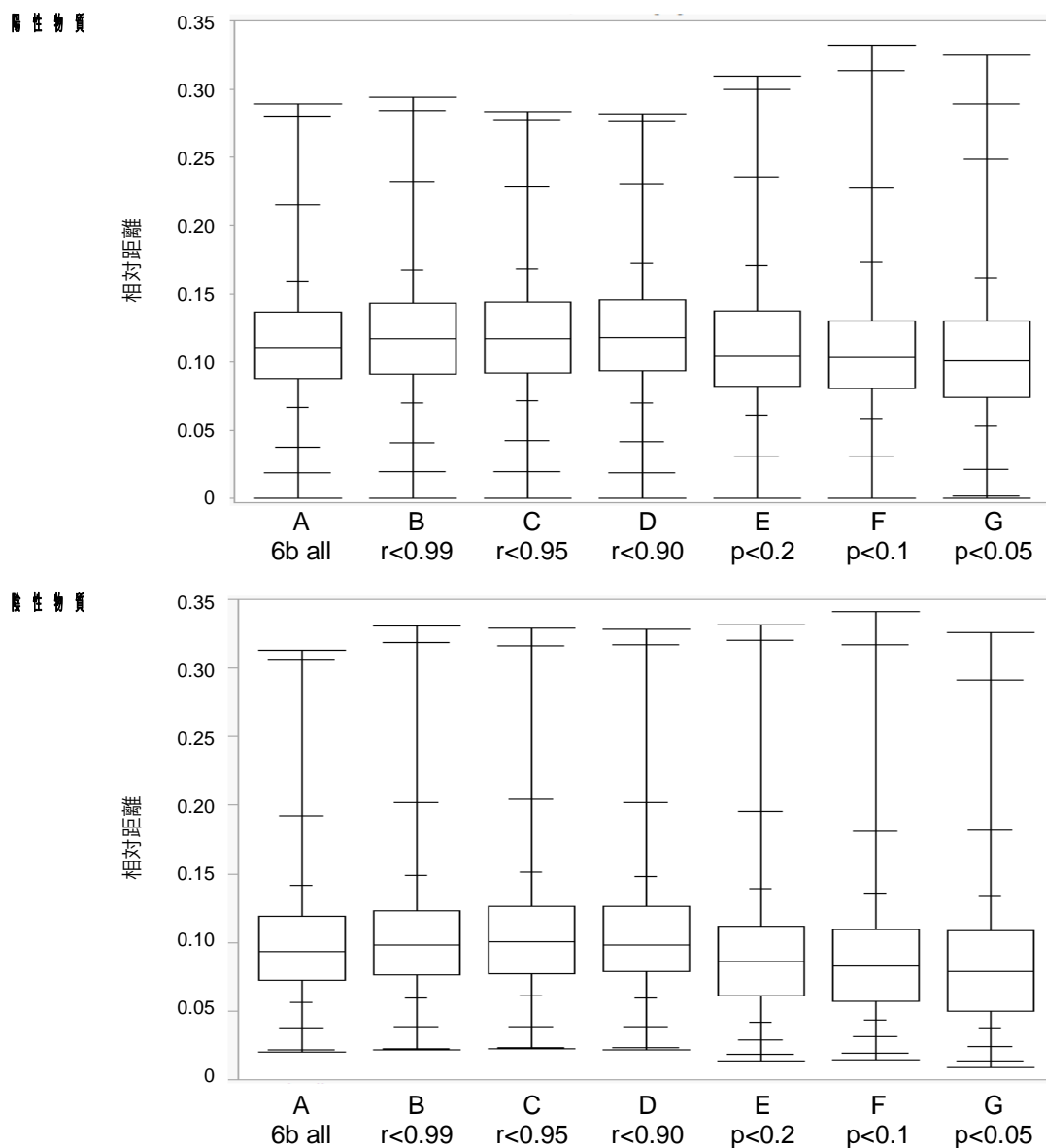


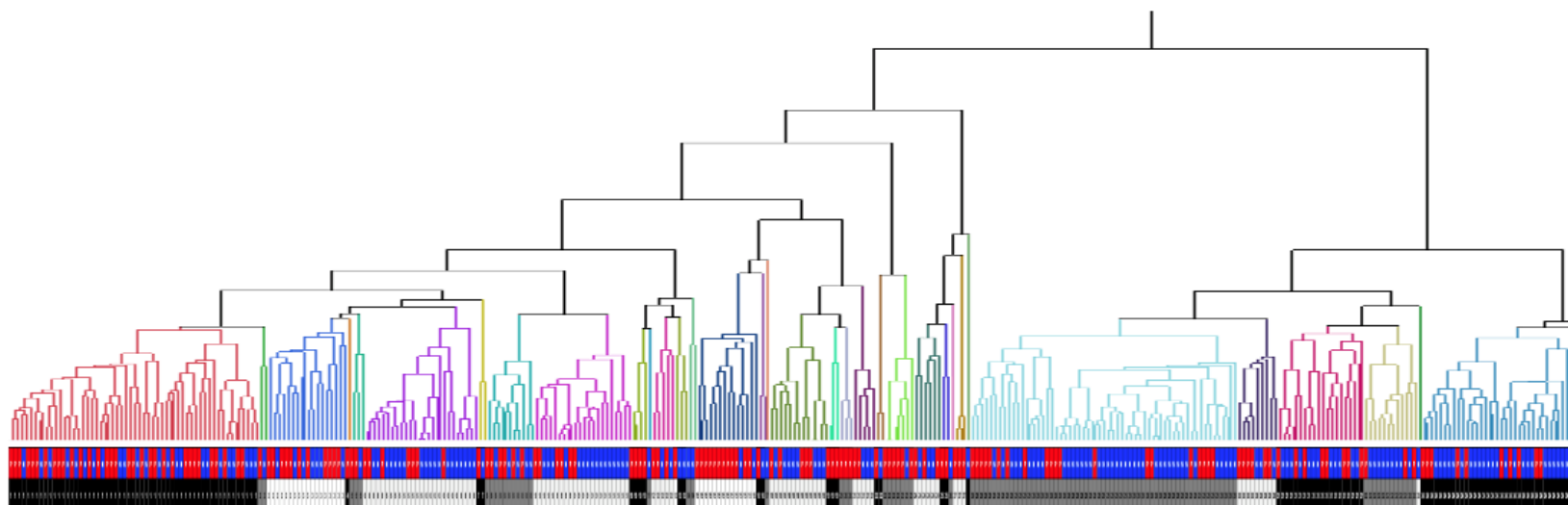
Fig. 4. 10個のソース物質を用いたリードアクロスによる予測結果の特徴解析

分子記述子セットAおよびGを用いたリードアクロスにおいて、各被験物質のソース物質10物質中の陽性物質数を、DNT陽性物質、陰性物質ごとにヒストグラムで示した。予測精度が著しく低かった3区分 (a, b, c) に含まれる化学物質の構造を下に示した。



		A. 6b all	B. r<0.99	C. r<0.95	D. r<0.90	E. p<0.2	F. p<0.1	G. p<0.05
陽性物質	平均	0.1135	0.1198	0.1203	0.1215	0.1117	0.1100	0.1064
	中央値	0.1108	0.1169	0.1174	0.1182	0.1043	0.1033	0.1007
陰性物質	平均	0.0984	0.1031	0.1050	0.1044	0.0907	0.0881	0.0846
	中央値	0.0933	0.0984	0.1005	0.0985	0.0857	0.0830	0.0787

Fig. 5. 10個のソース物質を用いたリードアクロスにおける被験物質とソース物質の物質間距離
 各分子記述子セットを用いたリードアクロスにおいて、DNT陽性物質、陰性物質ごとに、10個のソース物質のうち、それぞれ陽性物質、陰性物質のみの距離の平均を算出し、その分布を箱ひげ図で示した。表には平均値と中央値を示した。



クラスター	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
物質数	57	2	18	1	3	26	2	11	22	4	1	5	3	2	14	2	1	13	3	3	5	2	7	6	2	1	3	1	61	9	20	12	1	34	1	3
陽性物質数	33	1	11	1	2	7	1	6	6	4	0	4	0	0	12	1	0	5	3	3	2	1	6	3	2	0	3	0	20	6	8	3	0	10	0	0
陽性率	0.579	0.500	0.611	1.000	0.667	0.269	0.500	0.545	0.273	1.000	0.000	0.800	0.000	0.000	0.857	0.500	0.000	0.385	1.000	1.000	0.400	0.500	0.857	0.500	1.000	0.000	1.000	0.000	0.328	0.667	0.400	0.250	0.000	0.294	0.000	0.000

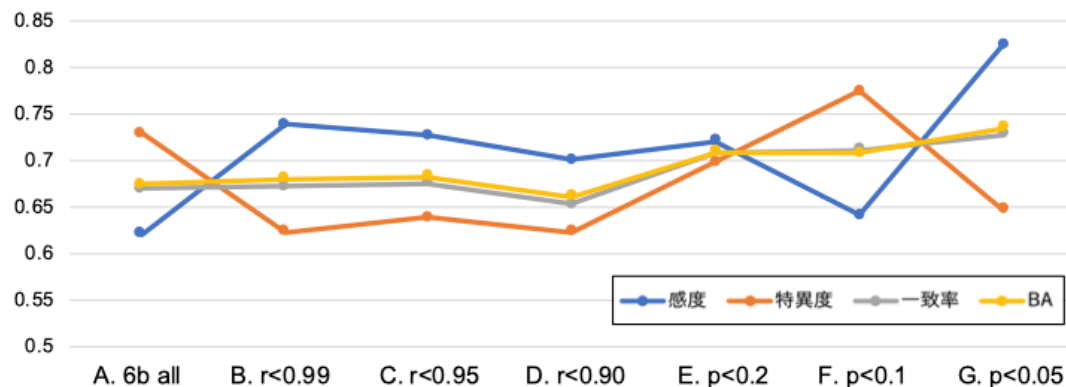


Fig. 6. 階層的クラスタリングによるデータセット内物質のグルーピング

(上) 各分子記述子セットを用いた階層的クラスタリング (Ward法) を実施し、セットAを使用した場合のデンドログラムを示した。デンドログラム下の図では、赤がDNT陽性物質、青が陰性物質を示し、クラスターを3段階のグレースケールで示した。各クラスターに含まれる物質数、陽性物質数を表で示した。

(下) 2物質以上が含まれたクラスターについて、データセットの陽性率を基準としてDNT陽性、陰性の判定を行い、その際の精度を示した。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
（課題番号：22KD1002） 分担研究報告

試験法の行政利用に向けた国際動向調査

研究分担者：小島 肇 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 特別研究員

研究要旨

本研究の目的は、ヒト人工多能性幹細胞 (iPS: Induced pluripotent stem cell) 細胞由来神経細胞を用いて、人工知能 (AI: Artificial Intelligence) による細胞形態評価と多点電極アレイ (MEA: MicroElectrode Arrays) による神経機能評価を組み込んだ人体模倣システム (MPS: Microphysiological system) を開発し、予測性が高い新たな神経毒性評価法を確立することである。メカニズムベースの神経毒性評価が可能となり、化審法・毒劇法の化学的基盤の確立に資するとともに、将来的には神経毒性試験のガイドライン化を目指している。本研究班の中で、試験法の行政利用の視点で、開発の現状に関する発表および情報交換、情報収集を行うとともに、本研究班における情報発信を担当した。

今年度、経済協力開発機構 (OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development) にて開発中の *in vitro* DNT (Developmental Neurotoxicity) ガイダンス文書の意見募集に対応し、本ガイダンスの公定化に寄与した。

A. 研究目的

本研究の目的は、ヒト人工多能性幹細胞 (iPS: Induced pluripotent stem cell) 細胞由来神経細胞を用いて、人工知能 (AI: Artificial Intelligence) による細胞形態評価と多点電極アレイ (MEA: MicroElectrode Arrays) による神経機能評価を組み込んだ人体模倣システム (MPS: Microphysiological system) を開発し、予測性が高い新たな神経毒性評価法を確立することである。メカニズムベースの神経毒性評価が可能となり、化審法・毒劇法の化学的基盤の確立に資するとともに、将来的には神経毒性試験のガイドライン化を目指している。本研究班の中で、試験法開発の現状に関する発表および情報交換、情報収集を行うとともに、本研究班における情報発信を担当した。

B. 研究方法

B-1. OECD 対応

経済協力開発機構 (OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development) にて開発中の *in vitro* DNT (Developmental Neurotoxicity) ガイダンス文書の2回目にあたる意見募集に対応した。本意見は、日本動物実験代替法評価センター (JaCVAM: Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) 資料編纂委員会の協力を得て取り纏め、OECD の日本のナショナルコーディネートに提出した。

B-2. 国内外の学会対応

情報収集のため、国内学会としては、日本毒性学会年会、日本動物実験代替法学会大会、日本薬理学会年会、日本薬学会年会

に参加した。国際学会としては、3rd Asian Congress for Alternatives to Animal Experimentsに参加した。

倫理面への配慮

実験を伴わないことから、倫理的問題は無いと考える。

C. 研究結果

C-1. OECD 対応

本ガイダンスの改善点・懸念点として、*in vitro* テストバッテリーにおいて観察された神経細胞の分化や神経突起の伸長への影響の生物学的な意味づけの限界、そして *in vivo* 試験において観察された行動異常との対応の限界について記載する必要性についてコメントを返した。

また、このガイダンスをもとに試験法ガイドラインが作られることを求めた。

C-2. 国内外の学会対応

C-2-1. 第49回日本毒性学会学術年会（令和4年7月）

神経毒性試験に関しては、以下のワークショップ及びシンポジウムに関連発表があった。

ワークショップ“創薬・開発安全性研究を牽引する *in vitro* 研究の現状”

- 1) 培養神経細胞及び Microelectrode array を利用した薬物誘発痙攣予測に関わる検討 ～ラット初代培養神経細胞 vs ラット *in vivo* モデル / 臨床 小田原 あおい（エーザイ株式会社）

シンポジウム“精度の高い発達神経毒性評価を目指した研究アプローチ”

- 1) これからの発達神経毒性評価のための自動行動解析アプローチ
ベナー 聖子（浜松医科大学 医学部精神医学講座）
- 2) 動物モデルを用いた環境化学物質の発

達神経毒性評価：自動行動解析の毒性試験への適用

前川 文彦（国立環境研究所環境リスク・健康領域）

- 3) 動物モデルを用いた環境化学物質の発達神経毒性評価：毒性エンドフェノタイプ

掛山 正心^{1,2}（1 早稲田大学人間科学学術院, 2 早稲田大学総合研究機構環境医科学研究所）

- 4) 神経系の発達過程に着目した神経発達毒性の *in vitro* アプローチ

伊藤 智彦（国立研究開発法人国立環境研究所）

C-2-2. 日本動物実験代替法学会第36回大会（令和4年11月）

本研究班の安彦行人代表研究所および諫田泰成研究分担者を座長とするシンポジウム“発達神経毒性の現状と今後の課題”が企画され、以下の発表があった。

- 1) *In vitro* 神経活動に基づいた化学物質の神経毒性評価

鈴木 郁郎（東北工業大学大学院 工学研究科）

- 2) 化学構造情報を用いたリードアクロスによる発達神経毒性の評価

吉成 浩一（静岡県立大学 薬学部）

- 3) ゼブラフィッシュを用いた発達神経毒性評価の現状と課題

西村 有平（三重大学大学院医学系研究科 統合薬理学）

- 4) インビトロ神経毒性評価法の現状と課題

諫田 泰成、安彦 行人（国立医薬品食品衛生研究所）

また、シンポジウム“ヒト iPS 細胞技術を活用した創薬応用研究の最前線”において、以下の関連演題が見受けられた。

- 1) 創薬応用を目指した iPS 細胞由来血液

脳関門モデルの開発

坂下 真大 (名古屋市立大学大学院 薬学研究科)

- 2) サルおよびヒトの多能性幹細胞を用いた脳オルガノイド研究
小坂田 文隆 (名古屋大学大学院 創薬科学研究科 細胞薬効解析学分野)

るヒト血液喚問 MPS の開発と創薬応用に向けた取り組み

降幡友己 (東京薬科大学)

- 2) ヒト iPS 細胞由来心筋・神経細胞を用いた安全性研究への応用と MPS 実装への期待
谷口智彦 (エーザイ)

C-2-3. 第 96 回日本薬理学会年会(令和 4 年 11-12 月)

シンポジウムやワークショップなどにおいて、関係する発表を見つけられなかった。

C-2.4. 3rd Asian Congress for Alternatives to Animal Experiments (令和 4 年 12 月)

神経毒性試験に関しては、以下のシンポジウムに関連発表が見受けられた。

S2: Novel *in vitro* test:

Development and application

- 1) Current status and future challenges of developmental neurotoxicity
Yasunari Kanda (NIHS)

S6: Zebrafish as an alternative model for toxicology

- 1) Disease modeling of rare neurological disorders in zebrafish
Cheol-Hee Kim (Chungnam National Univ., Korea)

S8: Organ-on-a-chip as an alternative model for drug screening

- 1) Brain-on-a-chip for neurotoxicity tests
Sungho Ko (CHA Univ., Korea)

C-2-5. 日本薬学会第 143 回年会 (令和 5 年 3 月)

一般シンポジウム S03 生体模システム/MPS 研究最前線: 産学で描く創薬実装に向けた道標において、以下発表がなされていた。

- 1) 産学共同研究 B4-Research Alliance によ

D. 考察

OECD からの意見募集 (*in vitro* DNT ガイダンス文書) に関しては、前回のコメント募集の際に主張した部分の反映や改善がなされている記述も多くあったが、現行の *in vivo* 試験との対応や、解決すべき課題についての言及で未だ不十分な記載が多かった。*in vivo* 試験と *in vitro* 試験で行われる評価手法と得られる結果のブリッジングについては、さらに議論を深める必要があることを繰り返し訴えていく必要があると感じた。

国内外の学会においては、本研究班に関するシンポジウムや発表が見受けられたが、いずれも研究段階のものばかりであり、標準化を目指せる段階の発表は少なかった。

E. 結論

OECD にて開発中の *in vitro* DNT ガイダンス文書の意見募集に対応し、本ガイダンスの公定化に寄与した。

F. 研究発表

F-1. 論文発表

1. Piersma AH, Baker NC, Daston GP, Flick B, Fujiwara M, Knudsen TB, Spielmann H, Suzuki N, Tsaioun K, Kojima H: Pluripotent stem cell assays: Modalities and applications for predictive developmental toxicity, *Current Research in Toxicology*, 2022;3, 100074.
2. Anklam E, Bahl MI, Ball R, Beger RD,

Cohen J, Fitzpatrick S, Kojima H, et al. Emerging technologies and their impact on regulatory science. *Exp Biol Med* (Maywood). 2022;247(1):1-75.

F-2. 学会発表

1. 小島肇: MPS の標準化のための国際戦略, 第 29 回 HAB 研究機構学術年会 (2022.5.19, 東京)
2. Kojima H: Approach to New Approach Methods developed by Japan in OECD WNT, ICCA-LRI Workshop 2022 (2022.6.20-21, 横浜)
3. 小島肇: 3Rs を取り巻く国際動向と課題, 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.7.2, 札幌)
4. 小島肇: 医薬品等の薬効及び安全性評価を支える in vitro 試験の未来, 日本組織培養学会第94回大会 (2022.7.8 豊中, 大阪)
5. 小島肇: 代替法に関する国内外の状況について代替法全般の最新動向, 日本動物実験代替法学会企画委員会主催講習会 (2022.8.25, Virtual)
6. 小島肇: OECD テストガイダンス作成の経験から見たツールガイダンス整備の課題, 日本学術会議公開シンポジウム (2022.11.19, 東京)
7. 小島肇: Computational Toxicology の利用の実際と将来展望, 第 96 回日本薬理学会年会 (2022.11.30, 横浜)

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ojiro, R., Okano, H., Takahashi, Y., Takashima, K., Tang, Q., Ozawa, S., Zou, X., Woo, G.H., Shibutani, M.	Comparison of the effect of glyphosate and glyphosate-based herbicide on hippocampal neurogenesis after developmental exposure in rats.	Toxicology	483	153369	2023
Maeda, N., Shimizu, S., Takahashi, Y., Kubota, R., Uomoto, S., Takesue, K., Takashima, K., Okano, H., Ojiro, R., Ozawa, S., Tang, Q., Jin, M., Ikarashi, Y., Yoshida, T., Shibutani, M.	Oral exposure to lead acetate for 28 days reduces the number of neural progenitor cells but increases the number and synaptic plasticity of newborn granule cells in adult hippocampal neurogenesis of young-adult rats.	Neurotox. Res.	40(6)	2203-2220	2022
Takahashi, Y., Okano, H., Takashima, K., Ojiro, R., Tang, Q., Ozawa, S., Ogawa, B., Woo, G.H., Yoshida, T., Shibutani, M.	Oral exposure to high-dose ethanol for 28 days in rats reduces neural stem cells and immediate nascent neural progenitor cells as well as FOS-expressing newborn granule cells in adult hippocampal neurogenesis.	Toxicol. Lett.	360	20-32	2022
Shimizu, S., Maeda, N., Takahashi, Y., Uomoto, S., Takesue, K., Ojiro, R., Tang, Q., Ozawa, S., Okano, H., Takashima, K., Woo, G.H., Yoshida, T., Shibutani, M.	Oral exposure to aluminum chloride for 28 days suppresses neural stem cell proliferation and increases mature granule cells in adult hippocampal neurogenesis of young-adult rats.	J. Appl. Toxicol.	42(8)	1337-1353	2022

Piersma AH, Baker NC, Daston GP, Flick B, Fujiwara M, Knudsen TB, Spielmann H, Suzuki N, Tsaoun K, <u>Kojima H</u> :	Pluripotent stem cell assays: Modalities and applications for predictive developmental toxicity	Current Research in Toxicology	3	100074	2022
Anklam E, Bahl MI, Ball R, Beger RD, Cohen J, Fitzpatrick S, Kojima H, et al.	Emerging technologies and their impact on regulatory science.	Exp Biol Med (Maywood)	247(1)	1-75	2022
鈴木郁郎	ヒトiPS神経の電気活動に基づいた化合物の毒性及び作用機序予測	谷本学校 毒性質問箱	第24号	20-31	2022

令和5年3月30日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸広

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 AI支援型MPSを用いたヒトiPS由来神経細胞による神経毒性試験法の開発(22KD1002)
3. 研究者名 (所属部署・職名) 薬理部第四室・室長
(氏名・フリガナ) 安彦 行人・ヤスヒコ ユクト

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和5年3月30日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸広

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 AI支援型MPSを用いたヒトiPS由来神経細胞による神経毒性試験法の開発(22KD1002)
- 研究者名 (所属部署・職名) 薬理部・部長
(氏名・フリガナ) 諫田 泰成・カンダ ヤスナリ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する口にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和5年 5月10日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 公立大学法人 名古屋市立大学

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 郡 健二郎

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 AI支援型MPSを用いたヒトiPS由来神経細胞による神経毒性試験法の開発(22KD1002)
- 研究者名 (所属部署・職名) 医薬学総合研究院(薬学)・教授
(氏名・フリガナ) 松永 民秀(マツナガ タミヒテ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査(※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針(※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他(特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する口にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立大学法人東海国立大学機構

所属研究機関長 職名 名古屋大学大学院創薬科学研究科長

氏名 廣明 秀一

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
- 研究課題名 AI支援型MPSを用いたヒトiPS由来神経細胞による神経毒性試験法の開発(22KD1002)
- 研究者名 (所属部署・職名) 名古屋大学大学院創薬科学研究科・准教授
(氏名・フリガナ) 加藤 竜司 (カトウ リュウジ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 東北工業大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 渡邊 浩文

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 AI支援型MPSを用いたヒトiPS由来神経細胞による神経毒性試験法の開発(22KD1002)
- 研究者名 (所属部署・職名) 大学院工学研究科 電子工学専攻・教授
(氏名・フリガナ) 鈴木 郁郎 スズキ イクロウ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査(※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針(※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他(特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する口にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立大学法人東京農工大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 千葉 一裕

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 AI支援型MPSを用いたヒトiPS由来神経細胞による神経毒性試験法の開発(22KD1002)
- 研究者名 (所属部署・職名) 農学研究院 動物生命科学部門 教授
(氏名・フリガナ) 渋谷 淳 (シブタニ マコト)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：東京農工大学動物実験等に関する規程)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	東京農工大学	<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 静岡県立大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 尾池 和夫

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 AI支援型MPSを用いたヒトiPS由来神経細胞による神経毒性試験法の開発(22KD1002)
- 研究者名 (所属部署・職名) 薬学部・教授
(氏名・フリガナ) 吉成 浩一・ヨシナリ コウイチ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査(※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針(※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他(特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸広

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 AI支援型MPSを用いたヒトiPS由来神経細胞による神経毒性試験法の開発 (22KD1002)
3. 研究者名 (所属部署・職名) 食品添加物部 特別研究員
(氏名・フリガナ) 小島 肇・コジマ ハジメ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する口にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。