

令和4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)

バイタルサインの統合的評価による急性毒性試験の判定基準策定と代替法に資する研究
-診断学とAIによる致死性予測と人道的エンドポイントの設定-

分担研究報告書

分担研究課題 脳波解析による神経毒性予測

研究分担者 鈴木 郁郎 東北工業大学・大学院工学研究科・電子工学専攻 教授

研究要旨

本研究では、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの MEA 計測において、陰性対照である DMSO の SD 範囲を基準とした毒性リスク評価を実施した。ICCVAM の急性毒性試験代替法の開発において、予測性の低かった化合物を選定し、毒性リスク評価を実施した結果、用量依存的なリスク判定ができた。毒性リスク評価では解析法の検証として痙攣陽性化合物 3 種類と痙攣陰性化合物 3 種類を用いて毒性リスク推定の妥当性を検証した。その結果、痙攣陽性化合物はこれまで報告されている用量で毒性リスクが推定され、痙攣陰性化合物では毒性リスクが検出されなかったことから、毒性リスク評価法としての有効性が示された。本研究成果により、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの MEA 計測法による神経毒性リスク推定は、ICCVAM の急性毒性試験代替法の開発において、予測性の低い化合物に対しても有効な評価法であると言える。

A 研究目的

本研究では、ICCVAM の急性毒性試験代替法の開発において、予測性の低かった化合物を選定し、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 毒性評価法の有効性の検証を目的とした。ヒト iPS 細胞由来ニューロンの微小電極アレイ(MEA)計測で得られたデータから、陰性対照である DMSO の SD 範囲を基準とした毒性リスク評価を実施した。

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, NeuCyte Inc.) と GABAergic neuron (GABAergic induced neurons, NeuCyte Inc.)とヒトアストロサイト(Astroglia, NeuCyte Inc.)を 7:3:3.5 の割合で混合し、 8.0×10^5 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 MEA plate (Axion BioSystems)に播種した。

FUFIFILM Cellular Dynamics 社のヒト iPS 細胞由来ドーパミンニューロン(iCell dopaminergic neurons)を 7.3

×104 cells/cm² の密度で 0.1%の Polyethyleneimine (Sigma Aldrich)と 20 µg/mL の Laminin-511 (Nippi) でコーティングした MEA plate (Axion BioSystems) に播種した。培養 1 週間後、ヒト iPS 細胞由来アストロサイト (iCell astrocytes) を 1.2×104 cells/cm² の密度で追加し、共培養とした。

試験化合物は、痙攣陽性化合物として、4-AP:0.3, 1, 3, 10, 30 µM、Picrotoxin:0.1, 0.3, 1, 3, 10 µM、Pilocarpine:0.3, 1, 3, 10, 30 µM を用いた。痙攣陰性化合物として、Acetaminophen:1, 3, 10, 30, 100 µM、Amoxicillin:1, 3, 10, 30, 100 µM、DMSO:0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6%を用いた。また、ICCVAM の急性毒性試験代替法の開発において、予測性の低い化合物として、Caffeine:10, 30, 100, 300, 1000 µM、Nicotine:1, 3, 10, 30, 100 µM を用いた。試薬はすべて DMSO (D8418-100ML; Sigma Aldrich) で溶解した。

神経ネットワーク活動の計測は、Maestro (Axion BioSystems) を用いて 37 °C、CO₂ 5%存在下で行った。計測データは、AxIS Navigator (Axion BioSystems) 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 と Duration of SBF, Spikes in a SBF の CV 値、Duration の四分位範囲 (IQR) および、神経ネットワーク活動の規則性を指標とした Periodicity を合わせた 13 パラメータを用いた。

(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で承認済である。

C. 研究結果

ヒト iPS 細胞由来ニューロンの MEA 計測

図 2 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スパイクデータのラスタプロット

と発火数のヒストグラムを示す。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。Caffeine 投与で、濃度依存的に同期バースト発火頻度の上昇が見られた(図 2)。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。

毒性リスク推定の実施

Neucyte 社のヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いて痙攣陽性化合物、痙攣陰性化合物および Caffeine に対するデータを取得し、13 個の解析パラメータを導出した。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、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、同期バースト発火数、同期バースト発火の持続時間(Duration)、同期バースト発火内のスパイク数、同期バースト発火内の最大周波数(Max Frequency)、同期バースト発火内のスパイク数の変動係数、最大周波数時刻の間隔における変動係数(CV of IMFI)、神経ネットワーク活動の規則性を指標とした Periodicity である。図 3 は、作成した主成分マップに各化合物のデータをプロットしたものである。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。各化合物の濃度依存別のリスク評価結果を図 4 にまとめた。既知の痙攣陽性化合物は濃度依存的に毒性リスクの上昇を示した。一方、痙攣陰性化合物は濃度が上昇しても毒性リスクが上昇することはなかったことから、毒性リスク評価法としての有効性が示された。ICCVAM の急性毒性試験代替法の開発において、予測性の低かった Caffeine においても、痙攣陽性化合物と同様に濃度依存的な毒性リスクの上昇が検出されたことから、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの MEA 計測法による神経毒性リスク推定は、ICCVAM の急性毒性試験代替法の開発において、予測性の低い化合物に対しても有効な評価法であることが示された。

異なる細胞種による毒性リスク推定の実施

様々な作用機序を有する化合物の毒性リスク推定を可能とするため、異なる細胞種を用いた毒性リスク推定を検討した。FUFIFILM Cellular Dynamics社のヒト iPS 細胞由来ドーパミンニューロンを用いて、痙攣陰性化合物と ICCVAM の急性毒性試験代替法の開発において、予測性の低かった Nicotine に対するデータを取得し、13 個の解析パラメータを導出した。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、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、同期バースト発火数、同期バースト発火の持続時間(Duration)、同期バースト発火の持続時間の変動係数、同期バースト発火内のスパイク数の変動係数、同期バースト発火内の最大周波数(Max Frequency)の変動係数、同期バースト発火の持続時間の四分位範囲である。図5は、作成した主成分マップに各化合物のデータをプロットしたものである。主成分マップに、DMSO の標準偏差(SD)の範囲と $2 \times SD$ の範囲を描き、SD の範囲内であれば低リスク、 $2 \times SD$ の範囲内であれば中リスク、 $2 \times SD$ の範囲外であれば高リスクとして評価を行った。各化合物の濃度依存別のリスク評価結果を図6にまとめた。痙攣陰性化合物である Acetaminophen では濃度が上昇しても毒性リスクが上昇することはない、Nicotine の濃度依存的な毒性リスク上昇のみを検出することに成功した。ICCVAM の急性毒性試験代替法の開発において、予測性の低い複数の化合物に対して有効であるとともに、異なる細胞種を用いた場合にも有効な評価法であることが示された。

D. 考察

DMSO の SD 範囲を基準とした毒性リスク推定法は、化合物の毒性リスク評価法として有効であることが示唆された。推定された痙攣陽性化合物の毒性用量が妥当であったことから、被験物質の毒性用量も妥当であると考えられる。細胞種によって DMSO に有意差が認められない主成分(パラメータセット)が異なった。これは細胞種によって自発活動特性が異なる

ことを意味する。ICCVAM の急性毒性試験代替法の開発において、予測性の低い複数の化合物に対して有効であるとともに、異なる細胞種を用いた場合にも有効な評価法であることが示された。これらのことから、本研究で実施した MEA を用いたヒト 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 毒性評価法の応用性が非常に高いことが示唆された。

E. 結論

本研究で実施したヒト iPS 細胞由来ニューロンの MEA 計測法による神経毒性リスク推定は、ICCVAM の急性毒性試験代替法の開発において、予測性の低い化合物に対しても有効な評価法であることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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

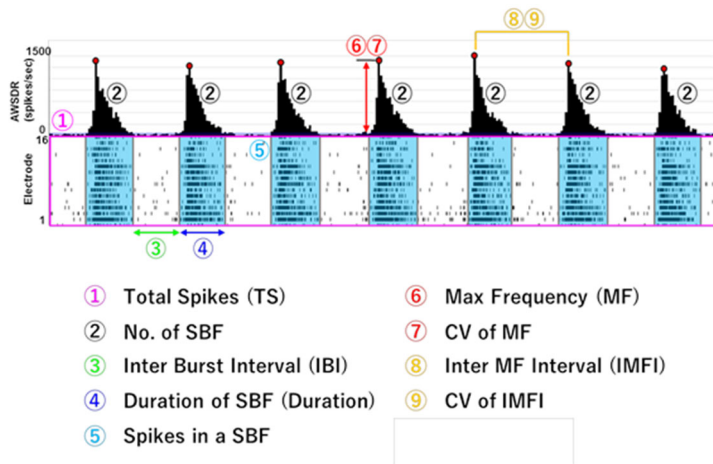


図1 解析パラメータの模式図

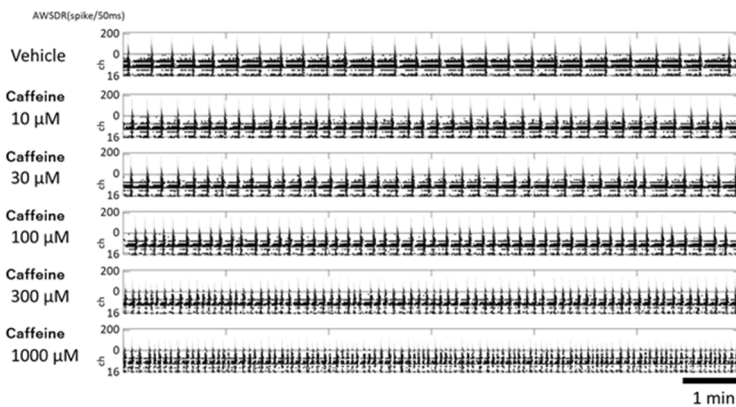


図2 Caffeine 投与による神経ネットワークの活動変化

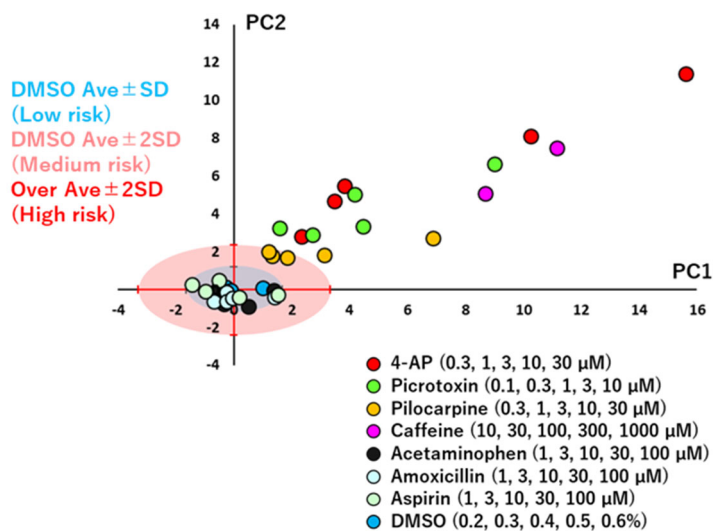


図3 7パラメータを用いた痙攣陽性化合物および痙攣陰性化合物の主成分プロット

	Concentration				
	1	2	3	4	5
4-AP	High risk	High risk	High risk	High risk	High risk
Picrotoxin	High risk	High risk	High risk	High risk	High risk
Pilocarpine	Medium risk	Medium risk	Medium risk	High risk	High risk
Caffeine	High risk	High risk	High risk	High risk	High risk
Acetaminophen	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk
Amoxicillin	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk
Aspirin	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk
DMSO	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk

■ Low risk
■ Medium risk
■ High risk

図4 主成分分析による化合物の毒性リスク評価

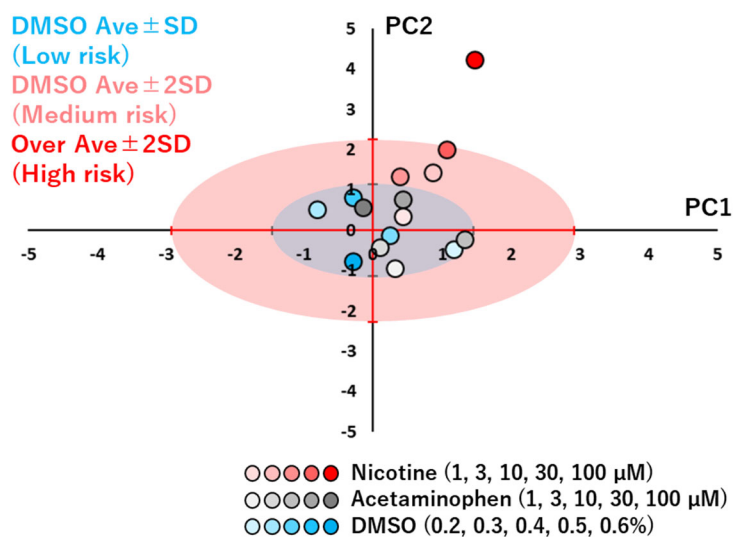


図5 6パラメータを用いた痙攣陰性化合物および Nicotine の主成分プロット

	Concentration				
	1	2	3	4	5
Nicotine	Low risk	Medium risk	Medium risk	Medium risk	High risk
Acetaminophen	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk
DMSO	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk

■ Low risk
■ Medium risk
■ High risk

図6 主成分分析による Nicotine の毒性リスク評価