

MEA を用いた *in vitro* 神経毒性試験系の開発

研究分担者：諫田 泰成 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部長
研究分担者：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。

ばらつきの少ない MEA データを得るための細胞ウェル選択基準を検討し、バースト電極数 5 以上というクライテリアを見出した。ヒト iPS 細胞由来脳オルガノイドについて、高密度電極 MEA により良好なネットワーク活動計測が行えること、計測に適したタイムウィンドウが存在することを見出した。さらに BBB と MEA の統合システム構築に向け、培地組成の検討により BBB・神経双方の機能を保った共培養の見込みを得た。

以上の結果から、ヒト iPS 細胞由来神経細胞及び脳オルガノイドを用いた MEA による神経毒性評価系、さらに BBB を統合した 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、MEA プレートに播種した細胞に関する品質評価法として、発火電極数に閾値を設けてウェル選択を検討した。またヒト iPS 細胞由来脳オルガノイドの作製、及びそれを用いた神経毒性評価系樹立のための MEA 計測手法の開発を行った。さらに血液脳関門 (BBB) を統合した MEA システムの開発へ向け、BBB

バリア機能と神経機能を共に保つことのできる培地の開発を進めた。

B. 研究方法①MEAによる急性神経毒性評価プロトコルの検証

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、播種についてもメーカープロトコルに従い行った。

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。播種後 4 週間、Neucyte 社供給の専用培地を週 2 回半量交換し、交換翌日に MEA により神経活動のベースライン計測を実施した。測定プレートを MAESTRO にセット後、10 分間静置した上、15 分間の MEA 計測を実施した。得られたデータから AxIS ソフトウェア (Axion 社) でスパイクを抽出後、Neural Metric tools ソフトウェア (Axion 社) 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。

また週一回（培地交換前）、細胞画像AI解析（加藤の分担研究を参照）のため、全ウェルの細胞画像撮影を実施した。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。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った。MEAデータへの影響を最小限とするため、画像撮影後に培地交換を行い、MEA測定はその1日後に実施した。

化学物質の投与は細胞播種後5週目に行った。4種の化学物質（Chlorpyrifos, Diazinon, Deltamethrin, Cypermethrin）について、蓄積的に5段階に分けて行い、最終濃度は4物質とも30 μ Mとした。各化学物質14ウェル分のMEAデータについて、「発火電極数8以上」「バースト電極数5以上」の二つの条件でデータの選別を行い、データのばらつきに関し、選別が無い場合との比較を行った。

Deltamethrin, Cypermethrinの全スパイク数データを用いて、BMDSソフトウェア（US EPA）により半量阻害ベンチマーク濃度(BMC₅₀)を算出し、先行研究の慢性曝露により得られた値との比較を行った。

②脳オルガノイドを用いたMEAによる神経毒性評価系の開発

ヒトiPS細胞RIKEN-1Aから、培養液キットStemDiff cerebral organoid kit（米国STEMCELL Technologies社）を用いて脳オルガノイドの樹立を行った。MEAによる脳オルガノイド神経ネットワーク活動の検出には、MaxOneシステム（スイスMaxwell社）を使用した。培養108日の脳オルガノイド（直径2-3mm）4個を、電極チップ1基あたり1個播種し、週に2回の培養液交換、週に1回のMEA計測を実施した。MEAデータからのネットワーク活動関連パラメータの算出はScopeソフトウェア（Maxwell社）により行った。

③BBBとMEAを統合したin vitro神経毒性試験系の開発

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、ドライシッパー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、一晚コーティングした。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、30回程度ピペッ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回ピペッティングして均一化し、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂にて静置培養した。

血管内皮細胞培地（米国Thermo Fisher Scientific社）をベースとした培養液で培養を行い、Endohm-6カップ型電極（米国World Precision Instruments社）を用いて経内皮電気抵抗値(TEER)によりバリア機能を解析した。TEER確認は国立医薬品食品衛生研究所、名古屋市立大学の2か所で実施した。培養液の比較検討においては、同時に播種したBBBを培養5日目に群分け（1群2-3ウェル）し、比較を行う培養液に交換後、経時的にTEER測定を行った。

（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ない。

C. 研究結果

①MEAによる急性神経毒性評価プロトコルの検証

化学物質影響のMEA解析に供する細胞培養ウェルの選択にあたり、ベースラインのMEAパラメータに閾値を設ける方法が従来用いられている。閾値として先行研究では「発火電極数8以上」「バースト電極数5以上」の二つが主に見られた。1群14ウェルからなる6群について両クライテリアを適用したところ、「発火電極数8以上」では使用可能なウェルが1など極めて少なくなる群が生じた。「バースト電極数5以上」では全ての群において少なくとも3ウェル分の使用可能データが得られた。「バースト電極数5以上」クライテリアで得られた陰性化合物(DMSO)データはウェル間のばらつきも少なかった（Fig.1）。

In silico神経毒性予測（分担研究、吉成の項）において予測性が低かった有機リン剤について、MEAによりヒトiPS細胞由来神経細胞への影響を解析した。Chlorpyrifos, DiazinonでMEAパラメータに変動が見られ、ヒトiPS細胞由来神経細胞を用いたMEAにより神経毒性を検出していることが示唆された。また、両

剤ともNetwork burst数の増加やBurst持続時間、BurstあたりSpike数の減少等に関して類似したパラメータ変化を示しており、共通のメカニズムによる影響が示唆された (Fig.2)。

OECD DNT-IVBでは慢性曝露によるNeural network forming assayが記載されているが、神経毒性の検出に慢性曝露が必要か、急性曝露でも可能かは結論が出ていない。ヒトiPS細胞由来神経細胞への毒性が報告されているDeltamethrin、Cypermethrinについて、急性曝露による神経活動への影響を解析したところ、先行研究にて同一の細胞を用いて行われた慢性曝露実験より低い半量阻害ベンチマーク濃度(BMC₅₀)が得られた (Fig.3)。急性曝露により、慢性曝露より高感度で神経毒性評価が行えることが示唆された。

②脳オルガノイドを用いたMEAによる神経毒性評価系の開発

MEAによる脳オルガノイドの神経活動解析は近年数多く報告されているが、化学物質影響の解析のための手法は確立されていない。ヒトiPS細胞より樹立された脳オルガノイドは直径2mm程度と大きく、Maestroシステムで用いられる電極 (1mm四方の範囲に16電極) では十分にカバーできなかったことから、26400電極により4mm x 3mmの範囲をカバーできる高密度電極MEAシステムであるMaxOneシステムを用いた。MaxOneシステムにより脳オルガノイドからネットワーク活動を示す明瞭なシグナルが得られ、化学物質曝露を行うための適切なタイムウィンドウが存在することが示唆された (Fig.4)。

③BBBとMEAを統合したin vitro神経毒性試験系の開発

BBBを用いた毒性評価系の樹立へ向けたプレバリデーションとして、国立医薬品食品衛生研究所と名古屋市立大学の2か所でBBBの培養とTEER測定を実施し、双方とも良好なバリア機能を有すると考えられる500Ωcm²以上のTEERが得られることを確認した (Fig.5)。

キネティクスを考慮した化学物質神経毒性の解析のためBBBを神経細胞と共培養する場合、BBBのバリア機能が良好に保たれる条件を見出すことが重要となる。培地成分の検討を行った結果、神経細胞の発火、BBBのバリア機能とともに保つことができる培地の候補を見出した (Fig.6)。

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) ガイダン

スが承認され、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)。ばらつきの少ないMEAデータを得るための細胞ウェル選択基準として、バースト電極数5以上というクライテリアを見出した。

この系により、Chlorpyrifos、DiazinonによるMEAパラメータ変動が見られ、ヒトiPS細胞由来神経細胞に対する神経毒性を検出していることが示唆された。有機リン系農薬はin silico毒性予測 (吉成の項) における予測精度が低かったが、in silico及びin vitroの統合的アプローチにより、予測精度が向上することが示唆された

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Synfire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、株ごとにMEAデータセットを取得する必要がある。

脳オルガノイドを用いた神経毒性評価を目指し、高密度MEAシステムによるネットワーク活動検出を行い明瞭なシグナルを得ることができたが、得られたシグナルは経時的な変動が大きかった。化学物質曝露のために適切なタイムウィンドウが存在することが示唆され、今後の検討により、脳オルガノイドを用いたMEAシステムによる神経毒性評価プロトコルの確立が期待される。

OECDのDNT-IVBガイダ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は販売が開始されたばかりであり (富士フィルムCDIなど)、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.)。神経細胞とBBBの共培養においては、両者がともに機能を保つことが重要であり、本研究では良好な共培養を可能とする培養液の候補を見出した。これによりMEAとBBBを統合したシステムの完成に大きく前進したと考える。今後、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ペリサイト、アストロサイト、ミクログリア等の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。

E. 結論

本研究において、ヒトiPS細胞由来神経細胞及び脳オルガノイド、さらにヒトiPS細胞由来BBBを使用し、標準的なMEAデータ取得プロトコルの開発、培地の最適化など基盤となる技術を構築した。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。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. **Kanda Y, Yasuhiko Y**: Predictive toxicology using human iPS cells. 12th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences WC12, Aug. 27-31, 2023. Niagara Falls, Canada.
2. **Kanda Y**: Recent progress of alternatives to animal testing from regulatory science in Japan. 12th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences WC12, Aug. 27-31, 2023. Niagara Falls, Canada.
3. **Yasuhiko Y, Yoshinari K, Kanda Y**: Prediction of developmental neurotoxicity using a read across approach. 12th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences WC12, Aug. 27-31, 2023. Niagara Falls, Canada.
4. **安彦 行人**, 村上 真菜, **諫田 泰成**: 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フルオキセチンの神経毒性評価. 第 97 回日本薬理学会年会, 2023 年 12 月 14 日, 兵庫
5. **安彦 行人**, **諫田 泰成**: ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いたマンガン化合物の神経毒性評価. 日本毒性学会・生体金属部会メタルバイオサイエンス研究会 2023, 2023 年 10 月 6 日, 岐阜
6. **諫田泰成**: ヒト iPS 細胞を用いた発達神経毒性ガイドランスと今後の展望. 第 63 回日本先天異常学会学術集会シンポジウム, 2023 年 7 月 28 日, 茨城
7. **諫田泰成**: 化学物質の発達神経毒性評価と甲状腺影響評価の取り組み. 日本動物実験代替法学会第 36 回大会シンポジウム, 2023 年 11 月 29 日, 千

葉

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

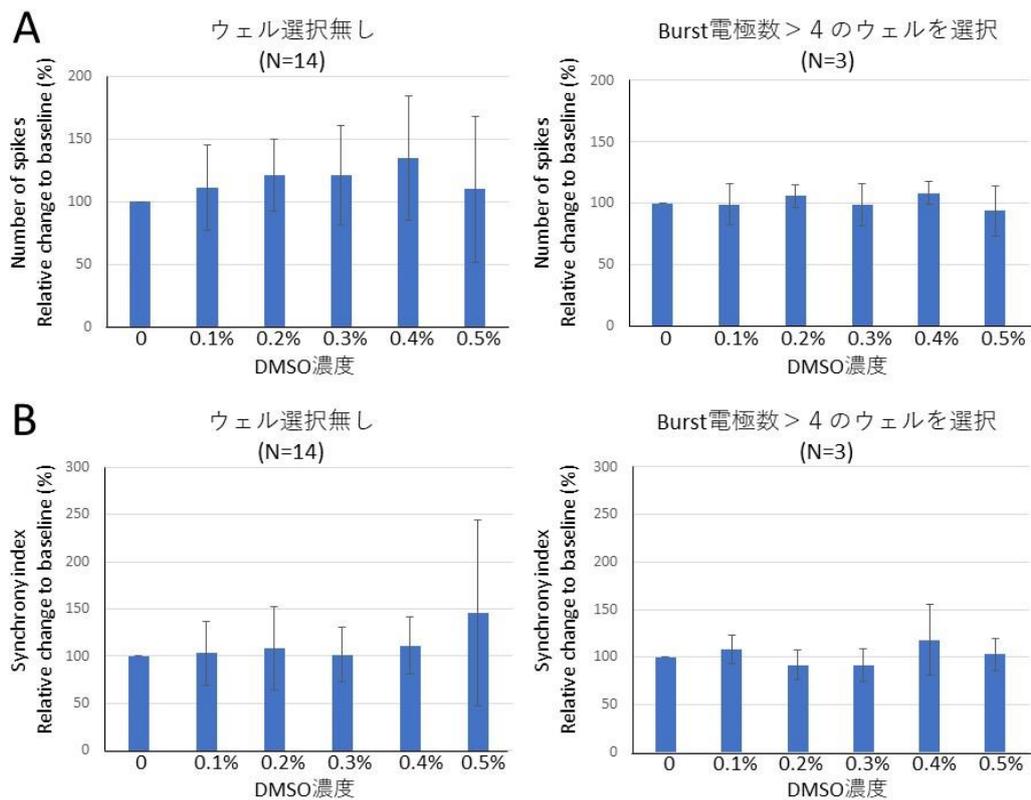


Fig.1 バースト電極(Bursting electrode)数によるウエル選択が MEA データのばらつきに与える効果。

Synfire iPS neuron に溶媒(DMSO)を 0.1%から 0.5%まで累積投与し、各濃度における Number of Spikes (A)、Synchrony index (B)を MEA により計測した。横軸は培地中 DMSO の濃度を示す。縦軸は DMSO 不添加(0%)を 100%とした全スパイク数の相対値を示す。データは平均値±標準偏差を示す。

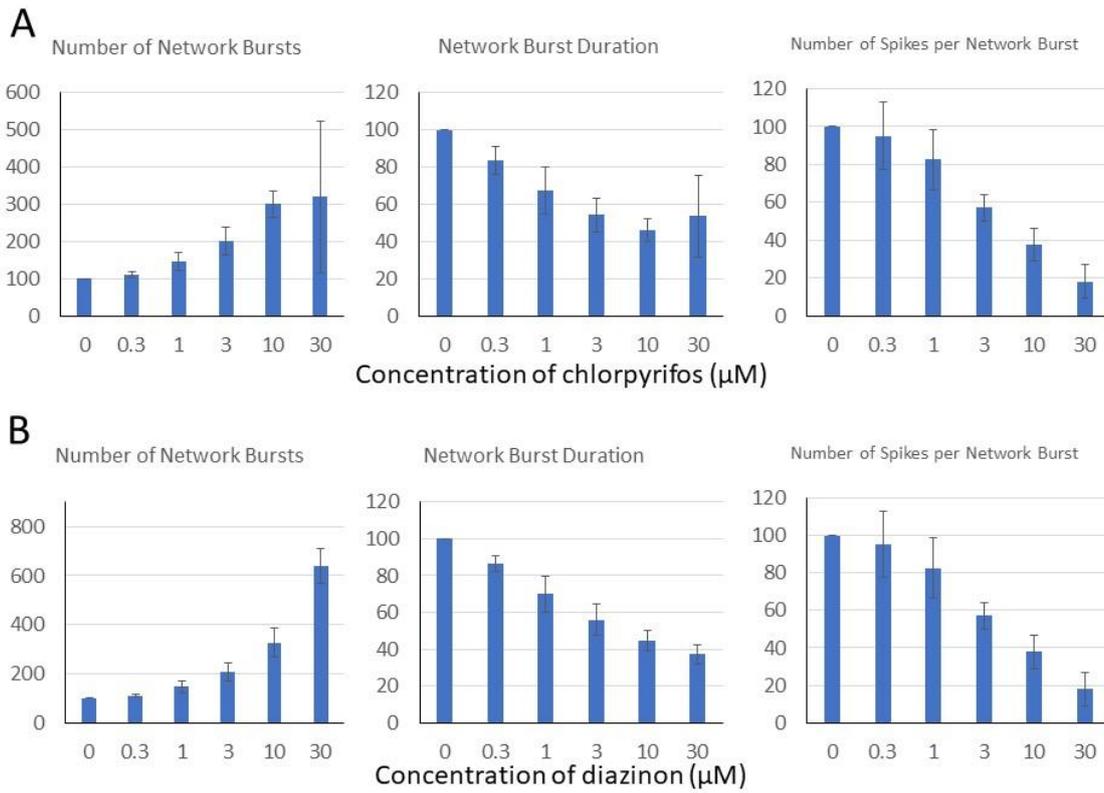


Fig.2 有機リン系農薬2剤によるヒト iPS 細胞由来神経細胞 MEA パラメータ変化。

Synfyre iPS neuron に Chlorpyrifos (A)、Diazinon (B)を累積投与し、MEA によりネットワーク関連パラメータを取得した。横軸は各剤の培地中濃度を示す。縦軸は溶媒添加(0μM)を 100%とした各パラメータの相対値を示す。データは平均値±標準偏差を示す。N=7 (Chlorpyrifos)、5 (Diazinon)。

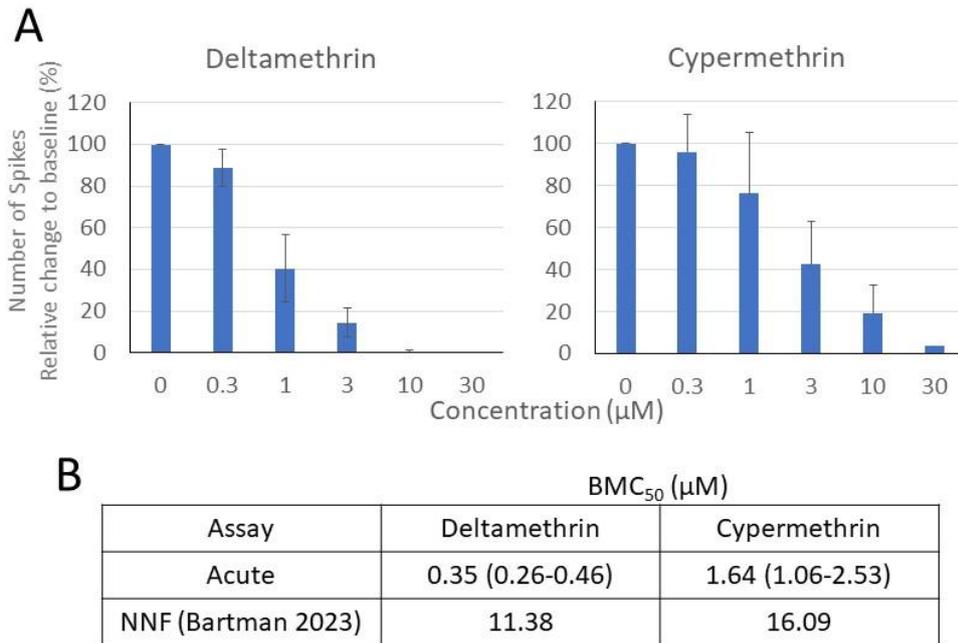


Fig.3 ピレスロイド系農薬 2 剤の急性(Acute)曝露による神経毒性評価。

A. Deltamethrin、Cypermethrin を 5 段階で累積投与し、各濃度での全スパイク数(Number of Spikes)を MEA により計測した。横軸は培地中の Deltamethrin、Cypermethrin の濃度を示す。縦軸は DMSO 不添加(0%)を 100%とした全スパイク数の相対値を示す。データは平均値±標準偏差を示す。N=7 (Deltamethrin)、10 (Cypermethrin)。

B. BMDS 3.3.2 ソフトウェア (米国 EPA) により半量阻害ベンチマーク濃度(BMC₅₀)を算出した (Acute の欄)。カッコ内は 95%信頼区間を示す。「NNF(Bartman 2023)」は同種のヒト iPS 細胞由来神経細胞を使用した慢性投与実験 Neural Network Forming (NNF)アッセイにより算出された BMC₅₀を示す。

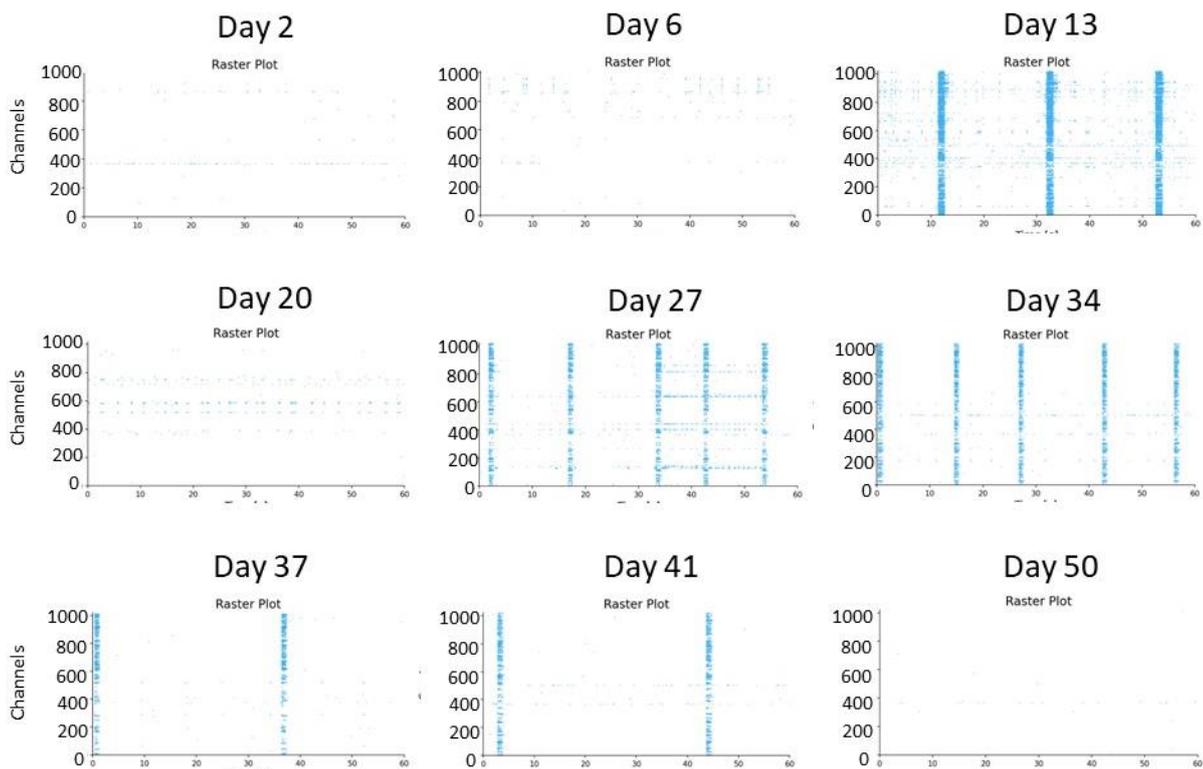


Fig.4 高密度電極 MEA によるヒト iPS 細胞由来脳オルガノイドの神経ネットワーク活動の計測。StemDiff kit を用いて作製したヒト iPS 細胞由来脳オルガノイド (培養 108 日目、直径約 2mm) の細胞外電位を高密度電極 MEA 装置 Maxwell で計測した。各プロット上部の日数(Day○)はオルガノイド設置後の経過日数。青い点がスパイクを示す。縦軸は選択された 1024 電極、横軸は計測時間(全て 60 秒間)。

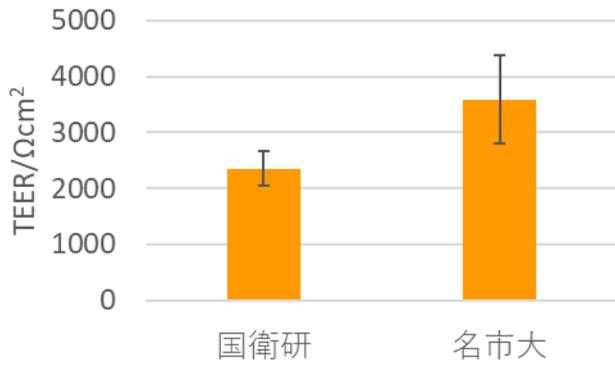


Fig.5 ヒト iPS 細胞由来 BBB のバリア機能に関する施設間プレバリデーション。
ヒト iPS 細胞由来 BBB をセルカルチャーインサートに播種し、播種後 3 日目にバリア機能 (TEER) の計測を行った。データは平均値 ± 標準偏差を示す。N=6 (国衛研)、3 (名市大)。

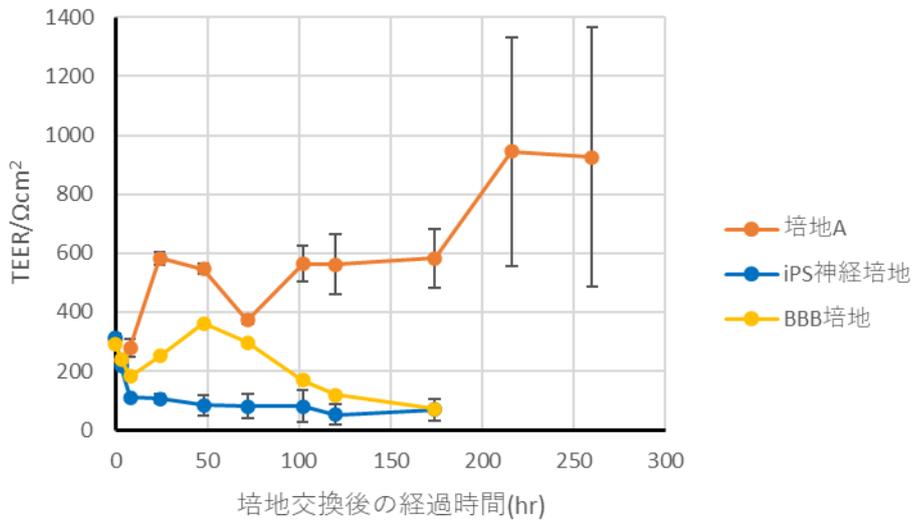


Fig.6 ヒト iPS 細胞由来神経細胞と BBB の共培養のための培地の探索。

ヒト iPS 細胞由来 BBB をセルカルチャーインサートに播種し、播種後 5 日目に検討する各培地への培地交換を行った後、バリア機能(TEER)を経時的に計測した。横軸は培地交換後の経過時間。データは平均値±標準偏差を示す。N=3 (培地 A、iPS 培地)、2 (BBB 培地)。BBB 培地の TEER は平均値のみ示した。