

化学物質のヒト健康影響を評価するための *in vitro* 代替試験法の実用化に向けた比較・検証研究

研究分担者：鈴木郁郎 東北工業大学工学部 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、特徴量に基づく判定結果の解釈が難しいという問題があることから、より単純なバースト関連パラメータを用いた機械学習手法を構築することにより、これらの問題解決を検討してきた。パラメータ AI は入力パラメータの数値情報となるため、MEA データに限らず、その他の評価系による解析値をパラメータとして追加することが可能であり、MEA データによる神経機能情報に加えて、その他評価系による情報を含有した統合的な毒性評価が可能となる。本研究では、パラメータ AI による神経毒性評価方法の構築と精度検証のために、MEA 上に培養したヒト iPSC 細胞から取得した神経活動パラメータを使用して、農薬関連化合物および、陰性対照化合物の毒性予測を実施した。バースト関連パラメータのみを用いた毒性予測 AI モデルでは、16 化合物中 14 化合物を正しく毒性予測することができた。今回の検証では 9 つのバースト関連パラメータのみを使用した、パラメータ数を増やすことで予測精度が向上する可能性がある。

A. 研究目的

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、特徴量に基づく判定結果の解釈が難しいという問題があることから、より単純なバースト関連パラメータを用いた機械学習手法を構築することにより、これらの問題解決を検討してきた。パラメータ AI は入力パラメータの数値情報となるため、MEA データに限らず、その他の評価系による解析値をパラメータとして追加することが可能であり、MEA データによる神経機能情報に加えて、その他評価系による情報を含有した統合的な毒性評価が可能となる。本研究では、パラメータ AI による神経毒性評価方法の構築と精度検証のために、MEA 上に培養したヒト iPSC 細胞から取得した神経活動パラメータを使用して、農薬関連化合物および、陰性対照化合物の毒性予測を実施した。

B. 研究方法

Human iPSC-derived cortical neurons (Neucyte Inc., USA) を 24-well MEA 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 12 種類の農薬関連化合物と 4 つの陰性化合物を使用した。農薬関連化合物は、Cypermethrin, Deltamethrin, Permethrin, Dieldrin, Fenamidone, Fipronil, Lindane, Permethrin, Acetamidiprid, Aldicarb, Carbaryl, Clothianidin を使用した。陰性対照化合物として、Acetaminophen, Amoxicilline, Aspirin 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総発火数、②同期バースト数、③バースト間隔、④バースト持続時間、⑤バースト内発火数、⑥最大発火周波数、⑦最大発火周波数の変動

係数、⑧最大発火周波数点の間隔、⑨最大発火周波数点の間隔の変動係数を算出した。

陰性対照化合物と溶媒データを陰性データ、農薬関連化合物の高濃度を陽性データとして、毒性予測 AI モデルを作成し、学習データの ROC 曲線から毒性判定閾値を決定した。次に、未学習 well のデータに対して、作成した AI による毒性判定を実施し、精度検証を実施した。

C. 研究結果

作成した毒性予測 AI モデルによる学習データの ROC 曲線を図 1 に示す。ROC 曲線の AUC は 0.91 であり、学習した化合物の毒性判定を高い精度で実現していることが示された。学習データに対する判定精度が最も高くなる positive score = 0.585 を毒性判定閾値として決定した。

作成した毒性予測 AI モデルによる未学習 well に対する毒性判定結果を図 2、図 3 に示す。前述のとおり、positive score = 0.585 を毒性判定閾値として使用すると、すべての陰性対照化合物で低濃度から高濃度にかけて毒性は検出されず、正しく陰性判定することができた。農薬関連化合物については、Acetamidiprid, Aldicarb, Carbaryl, Cypermethrin, Deltamethrin, Dieldrin, Fenamidone, Lindane, Permethrin で濃度依存的に毒性判定された。Clothianidin, Fipronil は毒性判定されず、Tributyltin は低濃度から同期バーストが消失した為、毒性判定を実施できなかった。

毒性予測 AI モデルによる毒性判定結果表を図 4 に示す。前述の Clothianidin, Fipronil ではいずれの濃度においても毒性判定されなかったものの、その他の化合物では、同期バースト発火の消失も毒性とみなすことで濃度依存的に毒性判定されていることが示された。結果として、陰性対照化合物 4 種類および、農薬関連化合物 12 種類の合計 16 化合物中 14 化合物を正しく毒性予測することができた。

D. 考察

バースト関連パラメータのみを用いた毒性予測AIモデルでは、16化合物中14化合物を正しく毒性予測することができた。今回の検証では9つのバースト関連パラメータのみを使用した。パラメータ数を増やすことで予測精度が向上する可能性がある。パラメータAIは入力がパラメータの数値情報となるため、MEAデータに限らず、その他の評価系による解析値をパラメータとして追加することが可能であり、MEAデータによる神経機能情報に加えて、その他評価系による情報を含む統合的な毒性評価が可能となり、評価対象とできる化合物範囲が非常に広がることを推測できる。今後はMEAデータ以外の評価系パラメータを含む統合的な毒性評価AIの構築を目指す。また、他施設で取得したMEAデータを本研究で構築したパラメータAIに入力し、毒性予測結果の再現性を検証すると共に、複数施設で構築したデータベースを学習したパラメータAIを作成し、本研究のAIと毒性予測の精度を比較する。

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バースト関連パラメータを用いた毒性予測AIモデルの化合物毒性予測法としての有効性が示唆された。パラメータAIの特性上、複数の評価系データを学習することができるため、MEAデータ以外の評価系パラメータを含む統合的な毒性評価AIの構築に期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yuto Ishibashi, Nami Nagafuku, Yasunari Kanda, Ikuro Suzuki, Evaluation of neurotoxicity for pesticide-related compounds in human iPS cell-derived neurons using microelectrode array, *Toxicology in Vitro*, 93:105668

2. 著書

1. 鈴木郁郎 『動物実験代替法とNew approach Methodologiesの開発・利用動向』【第IV編 農薬業界】第4章 発達神経毒性評価 2023年 シーエムシー出版

2. 学会発表

1. I. Suzuki, Y. Ishibashi, N. Nagafuku, MEA assessment for neurotoxicity of pesticide-related compounds in human iPS cell-derived neurons, EuroTox 2023, 9/10-13, Slovenia
2. 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MEAデータを用いた殺虫剤の神経毒性評価, 第50回日本毒性学会学術年会
3. 石橋勇人, 永福菜美, 鈴木郁郎, MEAシステムによる痙攣化合物および殺虫剤の神経毒性評価と作用機序推定, 第6回医薬品毒性機序研究会

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

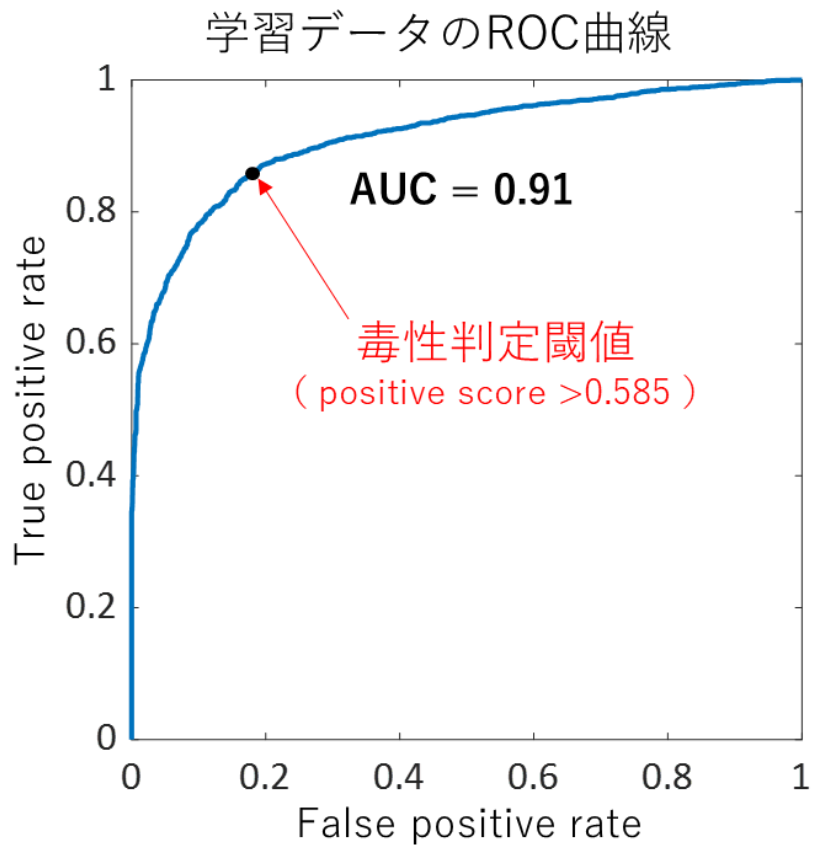
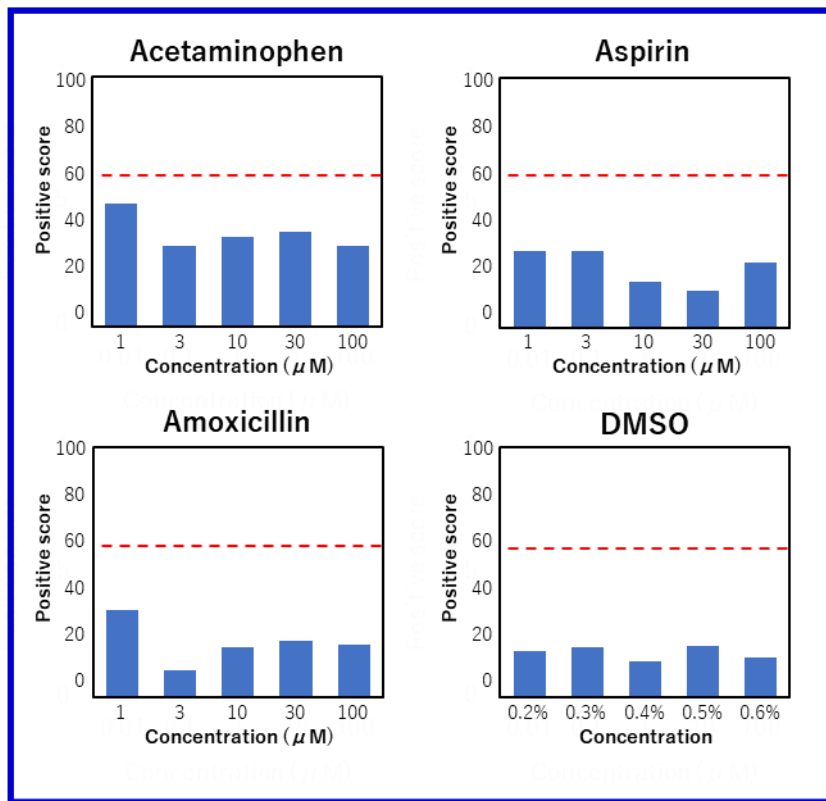


図 1. 毒性予測 AI モデルによる学習データの ROC 曲線
学習データに対する判定精度が最も高くなる $\text{positive score} = 0.585$ を毒性判定閾値として決定した。

陰性対照化合物



--- : 毒性ライン

図 2. 毒性予測 AI モデルによる陰性対照化合物に対する毒性判定結果
Positive score = 0.585 を毒性判定閾値として使用した。すべての陰性対照化合物で低濃度から高濃度にかけて毒性は検出されず、正しく陰性判定された。

農薬関連化合物

--- : 毒性ライン

※ : バースト消失

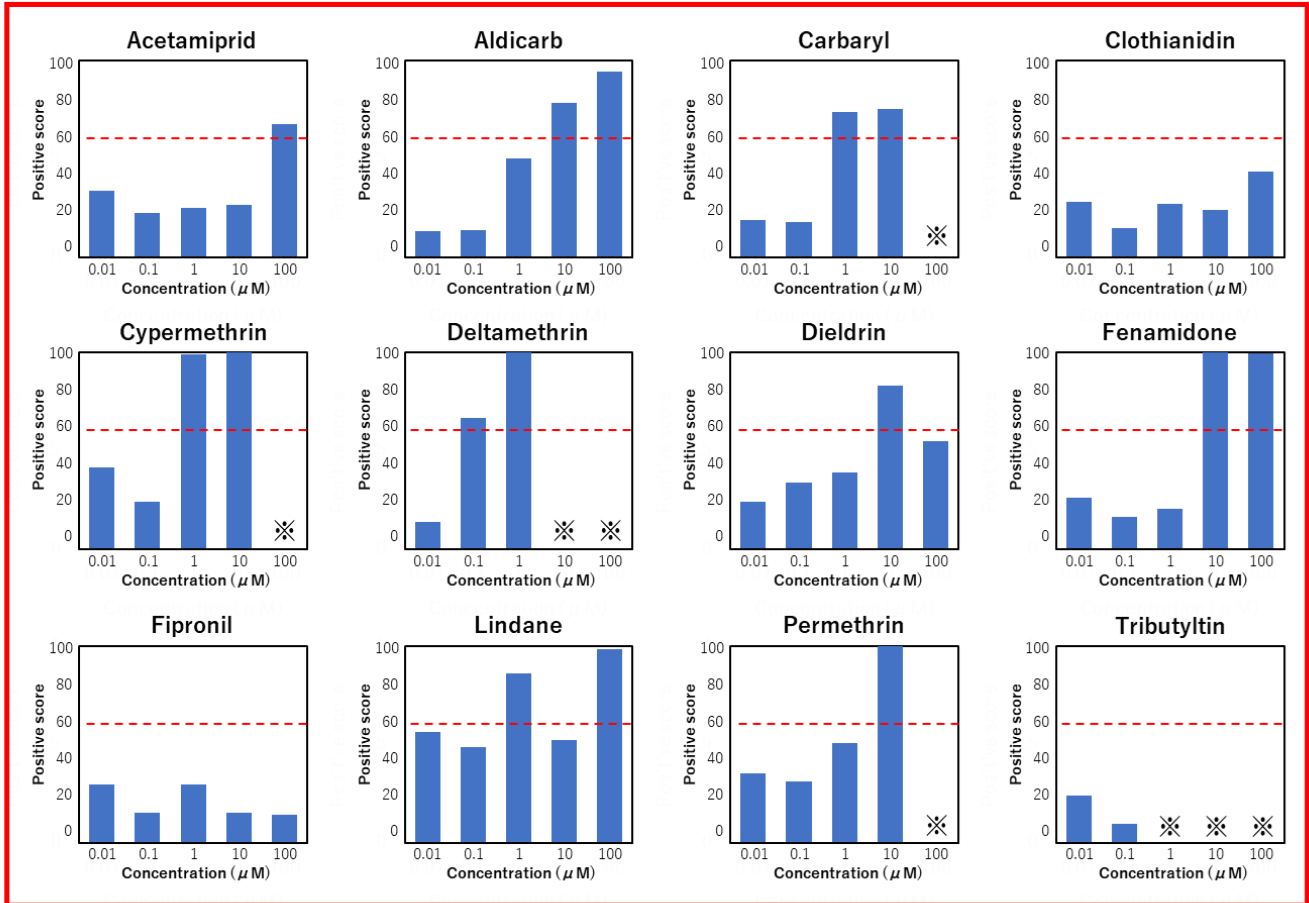


図 3. 毒性予測 AI モデルによる農薬関連化合物に対する毒性判定結果

Positive score = 0.585 を毒性判定閾値として使用した。Acetamidrid, Aldicarb, Carbaryl, Cypermethrin, Deltamethrin, Dieldrin, Fenamidone, Lindane, Permethrin で濃度依存的に毒性判定された。Clothianidin, Fipronil は毒性判定されず、Tributyltin は低濃度から同期バーストが消失した。

	Concentration (μM)				
	0	0.1	1	10	100
Acetamiprid	■	■	■	■	■
Clothianidin	■	■	■	■	■
Aldicarb	■	■	■	■	■
Carbaryl	■	■	■	■	—
Fipronil	■	■	■	■	■
Deildrin	■	■	■	■	■
Lindane	■	■	■	■	■
Cypermethrin	■	■	■	■	—
Deltamethrin	■	■	■	—	—
Permethrin	■	■	■	■	—
Tributyltin	■	■	—	—	—
Fenamidone	■	■	■	■	■

■ 毒性なし ■ 毒性あり
■ 同期バースト消失

図 4. 毒性予測 AI モデルによる毒性判定結果

陰性対照化合物 4 種類および、農薬関連化合物 12 種類の合計 16 化合物中 14 化合物が正しく毒性予測された。