

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）総括研究報告書

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。

本研究では、MEA パラメータを用いた主成分分析および AI モデルにより、神経毒性判定の閾値設定を行えること、また主成分分析により神経毒性の作用機序ごとのグループ分けが可能であることを見出した。神経細胞画像からの特徴量抽出手法を確立し、AI モデル構築へ向け MEA パラメータと相関する特徴量の探索を進めている。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。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。分子記述子によるリードアクロスにおいて、比較する類似物質数等に適切な閾値を設けることで、予測性を向上できることが示唆された。一方で化学物質群ごとに予測性に差が見られ、神経毒性に関する既知見の量が影響することが示唆されたことから、陽性知見に重みづけをした予測手法の開発を開始した。In silico 予測性が低かった有機リン剤について MEA による検証を行い、神経毒性の検出が可能であることを示唆する結果を得た。発達神経毒性メカニズムが明らかでないフッ化ナトリウム、過塩素酸アンモニウムについてラット発達神経毒性試験を実施し、各々異なるメカニズムにより海馬神経新生が阻害されることを確認した。OECD の *in vitro* DNT ガイダ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、*in vivo* での行動異常との対応づけについてコメントを提出した。また国際動物実験代替法学会など関連学会に出席し、成果発表とともに関連情報の収集、意見交換を実施した。

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、オルガノイド等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)ガイドランスにヒト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細胞由来神経細胞および脳オルガノイドを用いた精度の高いin vitro毒性評価法の開発、及びin vitroとin silico手法の統合によるin vivo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データのAIモデルによる解析手法、細胞画像のAI解析およびMEAデータによるin vitro系の品質評価法、ヒトiPS細胞由来脳オルガノイドを用いた神経毒性評価系樹立のためのMEA計測手法、血液脳関門 (BBB) を統合したMEAシステムの開発を進めた。

またin silico手法として分子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進めるとともに、陽性知見に基づいて重みづけを行ったin silico毒性予測手法の開発に着手した。In silicoおよびin vitro手法によるin vivo発達神経毒性の予測性向上のため、発達神経毒性情報が不足する物質のin vivo毒性評価を進めた。

さらに、研究成果を国際ガイドランスとして確立することを目指し、研究成果を国際学会にて発表するとともに、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脳オルガノイドを用いたin vitro発達神経毒性評価法の開発

①MEAデータ解析AIモデルの開発

ヒトiPS細胞由来神経細胞Synfire (米国Neucyte社) を4週間培養し、4種の陰性化合物 (DMSO, Acetaminophen, Aspirin, Amoxicillin) 及び12種の農薬等 (Acetamiprid, Aldicarb, Carbaryl, Clothianidin, Cypermethrin, Deltamethrin, Dieltrin, Fenamidone,

Fipronil, Lindane, Permethrin, Tributyltin) にばく露した (各物質6ウェル以上)。ばく露は6段階の累積投与により行い、投与後15分間のMEAデータをMEAシステムMaestro (米国Axion社) により記録した。MEAデータはAxISソフトウェア (米国Axion社) により解析し、スパイク数、バースト数等の神経活動関連MEAパラメータを算出した。得られたMEAパラメータを用いて、主成分分析により、神経毒性評価の閾値を設定した。また9種のMEAパラメータ (全スパイク数、バースト間隔、バースト持続時間等) を用いてパターン認識モデルによるAIモデルを構築した。AIモデルにより、投与した12種の農薬について、主成分分析による結果と比較した。

②細胞品質評価のための画像解析AIモデルの開発

ヒトiPS細胞由来神経細胞Synfireを4週間培養し、培養期間内に週2回のMEA計測 (Maestroシステム) と画像撮影を行った。画像撮影はBioRevoオールインワン顕微鏡 (キーエンス) を用い、3.5 μ m間隔のZ-stack撮影とした。模様関連特徴量、変動パターン関連特徴量等26個の形態特徴量を細胞画像から自動的に計算するプログラムを開発した。このプログラムを用いてMEAデータと紐づいた画像データ計17セットを解析し、26の特徴量の中からMEAデータと相関の強い特徴量の探索を行った。

③細胞品質評価のためのMEAクライテリア作成

ヒトiPS細胞由来神経細胞Synfireを4週間培養し、5種の化学物質 (DMSO, Chlorpyrifos, Diazinon, Deltamethrin, Cypermethrin) を累積投与して6段階の濃度でMEA計測 (Maestroシステム) を行った。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。

④急性および慢性曝露in vitro神経毒性評価の感度比較

③のMEA計測で得られた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。

⑤脳オルガノイドを用いたMEAによる神経毒性評価

ヒトiPS細胞RIKEN-1Aから、分化誘導キット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（スイスMaxwell社）により行った。

⑥BBBとMEAを統合したin vitro神経毒性試験系の開発

ヒトiPS細胞から、先行研究（Lippmann et al. Nat. Biotechnol. 2012;30:783-791）をベースとした方法で脳毛細血管内皮細胞様細胞(BMELC)を樹立した。得られたBMELCは凍結保存し以後の実験に使用した。BMELCをスタンディングタイプセルカルチャーインサート（米国メルク社）に播種し、血管内皮細胞培地（米国Therm Fisher Scientific社）をベースとした培養液で5日間培養を行いBBBモデルとした。BBBのバリア機能は、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)を測定することで確認した。TEER確認は国立医薬品食品衛生研究所及びBMELCを樹立した名古屋市立大学の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。

②化学構造の類似性に基づくin silico発達神経毒性予測

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の化学物質の構造から、AlvaDesc ver2.0ソフトウェア（イタリアAlvaDesc社）を使用して、Constitutional indices, Ringdescriptors, Functional group counts, Atom centred fragments, Molecular propertiesの各ブロックに属する376の分子記述子を計算した。得られた分子記述子を、361物質の中での最大値が1、最小値が0となるように標準化し、物質相互間のユークリッド距離をRソフトウェアにより算出した。クラスタリングは、Ward法により相互距離の近い物質を順次結合して行った。またリードアクロスは以下のように実施した。ある物質（ターゲット物質）について、距離の近い順に物質を並べ、距離の近い物質のうち発達神経毒性陽性物質が占める割合を算出した。得られた割合が、361物質全体における発達神経毒性陽性物質の割合(0.45)よりも大きい場合、ターゲット物質を発達神経毒性陽性と判定した。

③in 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

化学構造に基づくクラスタリング及びリードアクロスによるin silico神経毒性予測の予測性が低かった物

質群の例として、有機リン化合物について、MEAにおける神経細胞ネットワーク活動に対する影響の検証を行った。

発達神経毒性メカニズムが明らかでないフッ化ナトリウム、過塩素酸アンモニウム、イミダクロプリドについて、OECD発達神経毒性試験ガイドライン(TG426)に従いラット発達期ばく露を行った。生後21日、77日に脳サンプルを採取し、海馬における神経新生を免疫組織化学染色及びリアルタイムPCRにより解析した。今年度はフッ化ナトリウム、過塩素酸アンモニウムについて解析を実施した。

④試験法の行政利用に向けた国際動向調査

国際動物実験代替法学会WC12（カナダ）に参加し、ここまでの成果を発表して海外規制機関の関係者とのディスカッションを行う等、国内外の関連学会に参加し情報収集を行った。

（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。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オルガノイドを用いたin vitro発達神経毒性評価法の開発

①MEAデータ解析AIモデルの開発

MEAを用いた神経毒性評価の研究は数多く行われているが、用いるパラメータ等の具体的手法や毒性判定のクライテリアは明確になっていない。MEAパラメータを用いた主成分分析により、神経毒性判定の閾値設定を行うことができた。さらに、12種の農薬について主成分分析を行った結果、MEAパラメータの変動パターンを各農薬の神経作用機序ごとにグループ分けできることを見出した。また、MEAデータ9パラメータの機械学習により構築したAIモデルにより、12種類の農薬について主成分分析で得られるのと同様の神経毒性判定の閾値が得られた。

②細胞品質評価のための画像解析AIモデルの開発

化学物質神経毒性試験にMEAを活用するにあたり、培養した細胞の品質を担保する客観的な指標が必要である。非侵襲的かつ簡便に細胞品質をモニタリングす

るため、AIを用いた画像解析の活用を試みた。MEAプレート上で培養された細胞の画像から、7種類の画像特徴量を抽出し、MEAパラメータ（全スパイク数）との相関性を解析したところ、模様関連特徴量であるmean-homogeneity、変動パターン関連特徴量であるSD-bias frequencyが、異なる実験間やプレート間でも共通してMEAパラメータとの相関を示した。

③細胞品質評価のためのMEAクライテリア作成

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、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。

④急性および慢性曝露in vitro神経毒性評価の感度比較

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。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。

⑤脳オルガノイドを用いたMEAによる神経毒性評価

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数mm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。

⑥BBB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500 Ωcm²以上のTEERが得られることを確認した。

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。これによりヒトiPS細胞由来神経細胞とBBBの共培養系によるin vitro評価系の検討を行っている。

(2) 化学構造の類似性に基づくin silico発達神経毒性予測

発達神経毒性に関しては、国際的に合意されたin silico手法の開発が遅れている。そこで既存の発達神経毒性情報と分子構造の関連を解析するため、分子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、構造的な類似度から毒性を予測するリードアクロス手法を開発した。

本年度はリードアクロスについて、予測性が良好となる条件の検討を行った。毒性予測を行う物質（ターゲット物質）に対し、比較する物質（ソース物質）の数を1-16の間で変化させたところ、10個のソース物質を用いた場合に予測性が最も良好となった。またソース物質の選択に用いる記述子の選択基準を検討し、陰性物質に比べ陽性物質と関連が強い(P<0.05)記述子を選択することで予測性が向上することを見出した。一方、一部の物質においては、陽性であるにもかかわらず隣接物質に陰性物質が多く陰性と判定される（偽陰性）、陰性であるが隣接物質に陽性が多く陽性と判定される（偽陽性）例が見られた。予測性の低い化学物質に共通する構造上の特徴について検討し、偽陰性となる物質は低分子量で構造が単純である傾向、偽陽性となる物質は高分子量で構造が複雑である傾向を見出した。

また発達神経毒性陽性である有機リン剤がリードアクロスにおいて陰性と判定される例が見られた。この誤判定の原因は、発達神経毒性知見のベースとした総説 (Mundy et al., Neurotoxicol Teratol, 52:25-35, 2015)において、多くの有機リン剤について発達神経毒性知見が記載されていないことと考えられた。

(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

In silico神経毒性予測において予測性が低かった有機リン剤について、MEAによるin vitroデータとの照合

を行った。クロルピリホス、ダイアジノンなどで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。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。

*In silico*手法との統合に有用な*in vitro*実験を見出す方法として、毒性メカニズムが不明な化学物質の*in vivo*実験によるメカニズム情報の集積が考えられる。発達神経毒性のメカニズムが明らかでない化学物質であるフッ化ナトリウム、過塩素酸アンモニウムについて発達神経毒性評価を実施した。その結果、両物質ともに海馬歯状回における神経新生を阻害することが示された。またそのメカニズムを解析した結果、フッ化ナトリウムは神経前駆細胞の数を減少させ、過塩素酸アンモニウムは甲状腺機能低下を介して神経新生、オリゴデンドロサイト新生を阻害しており、こうした作用を検出する*in vitro*評価系の重要性が示唆された。

(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、*in vivo*での行動異常との対応づけについてコメントを提出した。安彦、諫田、鈴木、吉成、小島が国際動物実験代替法学会WC12 (カナダ)に参加し、MEAデータからのAIモデルによる神経毒性予測や化学構造に基づく*in silico*毒性予測と*in vitro*評価の統合等の成果を報告した。また日本における動物実験代替法に関する取り組みについての講演も行い、海外規制機関の関係者とのディスカッションと情報収集を行った。

D. 考察

OECDのDNT-IVBガイドランスにヒトiPS細胞由来神経細胞を用いたMEAシステムによる評価法が記載されているが、*in vivo*神経毒性の予測性については課題が残されている。分担研究者の鈴木は機械学習を用いた解析により、神経毒性発現機序に対応して、MEAパラメータのパターンを分類できることを報告した。未知の化合物のMEAを測定することにより、その化合物の神経毒性メカニズムが類推可能になることが期待される。さらに本研究でMEAデータ9パラメータから構築したAIモデルは、12種類の農薬について多変量解析で得られるのと同様の毒性閾値を与えた。AI解析においては扱うことのできるパラメータ数が多く、多種の*in vitro*実験データを取り込むことで、精度の高い毒性予測を行えるシステムの開発が期待される。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。

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、細胞画像から自動的に画像特徴量を抽出するプログラムを作成して、MEAデータと相関の高い画像特徴量を見出した。さらに、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以上というクリテリアを見出しており、今後こうしたパラメータについても相関の高い画像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、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。

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発見した。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。

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、予測性の低い物質群が存在することも判明した。今後、予測性の低い物質群に共通する構造上の特徴等について研究を進めるが、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も示唆される。引き続き、in vivoのデータについても収集を進めながら、検討する必要がある。

化学構造に基づくin silico神経毒性予測において予測性が低かった有機リン剤について、MEAによるin vitroデータとの照合を行ったところ、Chlorpyrifos、DiazinonなどMEAパラメータに変動が見られ、神経毒性を検出可能なことが示唆された。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。

フッ化ナトリウム、過塩素酸アンモニウムともに発現メカニズムが不明な発達神経毒性物質であるが、本研究によりフッ化ナトリウムは神経前駆細胞を減少させて神経新生を阻害し、過塩素酸アンモニウムは甲状腺機能低下を介して神経新生、オリゴデンドロサイト新生を阻害することが示された。DNT-IVBガイドラインには神経の分化、軸索伸長、ネットワーク形成等をカバーする17の実験系が記載されている。発達神経毒性の作用点に関する知見の蓄積により、毒性評価における実験系選択方法の確立等、DNT-IVBに貢献することが期待される。

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. 研究発表

1. 論文発表

原著論文

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. Ojiro, R., Ozawa, S., Zou, X., Tang, Q., Woo, G-H., Shibutani, M.: Similar toxicity potential of glyphosate and glyphosate-based herbicide on cerebellar development after maternal exposure in rats. *Environ. Toxicol.* 39(5):3040-3054, 2024.

著書

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 農業業界】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. **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ダンスと今後の展望. 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
8. 竹内規晃, 西川斗偉, 坂下真大, 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. 合同会社メドテックコンサルティング創業記念学術集会, 東京, 2023 年 7 月 3 日.
 9. **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
 10. 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
 11. 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
 12. 酒巻 友里, 菖蒲谷 桃香, 尾城 椋太, 鄒 昕羽, 唐 倩, 小澤 俊介, 吉田 敏則, **渋谷 淳**: 抗甲状腺作用が知られている過塩素酸アンモニウムの発達期曝露によるラット海馬歯状回の神経新生に対する影響. 第 50 回日本毒性学会学術年会, 第 50 回日本毒性学会学術年会プログラム・要旨集: S122, P1-077S, 6 月 19 日-21 日, 2023.
 13. Xinyu ZOU, Qian TANG, Ryota OJIRO, Shunsuke OZAWA, Momoka SHOBUDANI, Yuri SAKAMAKI, Toshinori YOSHIDA, **Makoto SHIBUTANI**: Sustained disruption of postnatal neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus after maternal exposure to imidacloprid in rats. 第 50 回日本毒性学会学術年会, 横浜, 第 50 回日本毒性学会学術年会プログラム・要旨集: S123, P1-080S, 6 月 19 日-21 日, 2023.
 14. 菖蒲谷 桃香, 酒巻 友里, 尾城 椋太, 鄒 昕羽, 唐 倩, 小澤 俊介, 吉田 敏則, **渋谷 淳**: 天然に豊富に存在する必須元素であるフッ化ナトリウムの発達期曝露によるラット海馬歯状回の神経新生に対する影響. 第 50 回日本毒性学会学術年会, 横浜, 第 50 回日本毒性学会学術年会プログラム・要旨集: S171, P2-200, 6 月 19 日-21 日, 2023.
 15. Ryota Ojira, Xinyu Zou, Qian Tang, Shunsuke Ozawa, **Makoto Shibutani**: Similar effects of glyphosate and glyphosate-based herbicide on brain development after developmental exposure to rats. The 10th International Congress of Asian Society of Toxicology. P146. Taipei, Taiwan. 7 月 17 日-20 日, 2023.
 16. 鄒 昕羽, 唐 倩, 尾城椋太, 小澤俊介, 菖蒲谷桃香, 酒巻友里, 海老塚由理, 吉田敏則, **渋谷 淳**: Effect of α -glycosyl isoquercitrin on maternal imidacloprid exposure-induced disruptive hippocampal neurogenesis in rats. 第 40 回日本毒性病理学会総会及び学術集会, 東京, 第 40 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 23-24 日, 2024
 17. 高村真弥, 大村奈央, 保坂卓臣, 志津怜太, 竹下潤一, **吉成浩一**: 分子記述子を用いたリードアクロスによる発達神経毒性予測手法の開発, フォーラム 2023 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2023 年 9 月 13 日, 広島市

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