

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）
令和6年度研究成果報告書

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
分担課題：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。2023 年に発表された OECD の発達神経毒性（DNT）in vitro testing battery（DNT-IVB）ガイダンスは 17 種類の in vitro 試験法がリストされている。その一つにラット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、ヒトの予測性が課題である。

本分担研究では、開発した新規 MEA 試験系の評価およびヒト iPS 細胞由来神経細胞との比較のため、ラット初代培養大脳皮質神経細胞の培養系を検討し、安定した MEA 実験を行うために、プロトコルを検証した。ヒト iPS 細胞由来神経細胞の解凍や播種について、良好な培養を得るためのプロトコルの検討を進め、改良すべき点を見出した。次に、ラット神経細胞を搭載した MEA 装置を灌流培養装置と接続し、灌流下でのネットワーク活動計測に成功し、MPS のプロトタイプを構築した。さらに、国際動向を踏まえて、ヒト iPS 細胞由来脳オルガノイドのフィージビリティを検討した。基材の選択や培養期間等、作製プロトコルの検討により、高密度電極 MEA を用いて安定したネットワーク活動計測が行えることを見出した。

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できたと考えられる。

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。

現在、発達神経毒性の in vitro 評価系として OECD の in vitro testing battery（DNT-IVB）ガイダンスが進められており、アッセイの中で多点電極アレイ（MEA）システムによる神経毒性評価法が記載されている。しかし、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。そこで本研究では、MEA による in vitro 神経毒性評価においてキネティクスを考慮することが可能な生体模倣システム（MPS）の開発を目標として検討を進めた。

これまで開発を進めてきた MEA と BBB を灌流培養装置で接続したシステムを構築するため、本年度は既存データが豊富なラット初代培養大脳皮質神経細胞（以下、ラット神経細胞）を利用して、培養プロトコ

ルやアッセイ系を検討した。

まず、DNT-IVB のラット神経細胞を用いて、国際的にデータが蓄積されている慢性曝露 MEA データと比較するため、プロトコルを検証した。

次に、ヒト iPS 細胞由来神経細胞に関しては、前年度まで使用した NeuCyte 社のヒト iPS 細胞由来神経細胞の安定供給に問題が生じて購入できなくなったため、OECD DNT 専門家会議で報告するとともに、本年度は別メーカー（富士フイルム CDI 社）のヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いて培養および MEA 計測プロトコルの検討を行った。

さらに、ヒト iPS 細胞由来脳オルガノイドの作製と MEA 計測による品質評価を実施した。

B. 研究方法

①灌流装置におけるラット神経細胞のMEA計測

ラット皮質由来の神経細胞は米国 LONZA 社の市販凍結品（R-Cx-500, CryoCells, Rat Brain Cortex）を使用した。凍結細胞バイアルを 37℃ 温浴中で 2.5 分加温して解凍し、トリパンブルー染色により生細胞をカウ

ントし、播種した。

MEAシステムはMaestro（米国Axion社）および高密度電極のMaxOne（スイスMaxwell社）を使用した。Maestroでの計測のため、48 ウェルMEAプレート（Axion社）に1 ウェル当たり 3.4×10^4 個の割合で生細胞を播種し、週に2回の培地交換、3回のMEA計測を実施した。プレートを装置にセットして10分間静置後、15分間の計測を行った。計測データをAxISソフトウェア（Axion社）で処理してスパイク数、バースト数等のパラメータを算出した。またMEA計測実施後、BioRevo オールインワン顕微鏡（Keyence社）により細胞のZ-stack画像を取得し、AI画像解析に供した（加藤の項を参照のこと）。

MaxOneシステムでは、上記と同じラット神経細胞を高密度微小電極アレイチップに 3×10^4 個の割合で播種した。週に2回の培地交換、3回のMEA計測を実施した。電極チップを装置にセットし5分間静置後、5分間のActivity scan、5分間の計測を行った。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。培養19-20日目に灌流培養装置との接続実験を実施した（松永の項を参照のこと）。

②ラット神経細胞を用いた慢性曝露MEA計測

48 ウェルMEAプレート（Axion社）にラット神経細胞（LONZA社）を①と同様に播種した。DNT-IVB収載の慢性曝露プロトコル（Fig.3A）に従い、DMSO（溶媒対照）と化学物質の曝露、MEA計測を実施した。化学物質としては、DNT陽性対照物質としてハロペリドール（0-30 μ M）、陰性対照物質としてアセトアミノフェン（0-300 μ M）を使用した。化学物質はDMSOに最終濃度の1,000倍濃度で溶解し、培地に1/1000量を混合した（最終DMSO濃度0.1%）。各化学物質の最大用量は、ヒトにおけるCmaxをもとに安全係数を30として算出した。播種日をDIV（Days In Vitro）=0とし、播種日から化学物質を含む培地で培養を行った。DIV5, 9, 12, 14にMEA計測を実施し、MEA計測後、化学物質を含む培地にて培地交換（全量）を行った。

③MEAのためのヒトiPS細胞由来神経細胞培養プロトコルの検証

ヒトiPS細胞由来グルタミン酸作動性神経細胞iCell glutaneuron（富士フィルムCDI社）を37℃温浴中で正確に2分間加温して解凍し、トリパンブルー染色により生細胞を計数した。48ウェルMEAプレート（Axion社）に1ウェル当たり 7.3×10^4 個の割合で生細胞を播種し、週に2回の培地交換を行った。iCell GlutaNeuronの解凍と同日に、ヒトiPS細胞由来アストログリア細胞

iCell Astrocyte v2.0（富士フィルムCDI社）を37℃温浴中で正確に2分間加温して解凍し、10cm細胞培養ディッシュに1枚当たり 5×10^5 個の割合で播種して7日間培養した。培養7日目にiCell Astrocyteを回収し、iCell GlutaNeuronを培養しているウェルに1ウェル当たり 1.2×10^4 個の割合で重層した。以後、週に2回の培地交換およびMEA計測を実施した。MEA計測はAxionシステムを使用し、ラット神経細胞と同様に行った。

④ヒトiPS細胞由来脳オルガノイドの作製プロトコルの検証とMEAによる品質評価

ヒトiPS細胞RIKEN-1A（理研バイオリソースセンター）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高密度MEAシステムMaxOneを使用した。培養113日の脳オルガノイド（直径2-4mm）11個を、ラミニンコートした電極チップ1基あたり1-2個播種し、週2回のOrganoid maturation medium（STEMCELL Technologies社）培養液の交換と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。

（倫理面の配慮）

本研究で用いたヒトiPS細胞由来神経細胞やアストロサイトは、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

①灌流装置におけるラット神経細胞のMEA計測

MEAシステムMaestroにより計測されたラット神経細胞の全スパイク数、ネットワークバースト数の経時変化をFig.1に示す。全スパイク数、ネットワークバースト数とも培養開始後1週間で増加が始まり、培養開始後2週間でプラトーに達するプロファイルが得られた。DNT-IVBガイダンスに記載のプロトコルでは、ラットから単離した神経細胞を凍結せずにそのまま用いているが、本研究では検証試験の観点から市販の凍結ラット神経細胞を使用したところ、ネットワーク活動が見られるまでの期間に両細胞間で特に差は見られなかった。

MaxOneシステムにラット神経細胞を播種し、神経活動の指標として、多電極アレイ上でスパイクを検出した電極（Active電極）の割合を経時的に計測した（Fig.2）。Active電極の割合(%)は、培養開始後1週間で増加し、培養後3週間目までにプラトーに達してい

ると思われた。ラット神経細胞を搭載したMaxOne電極を灌流培養装置と接続してMEA計測を行った結果、培養液流動に伴うと考えられるノイズが見られたものの、ネットワーク活動の計測に成功した（松永の項を参照のこと）。

②ラット神経細胞を用いた慢性曝露MEA計測

DMSO (0.1%)の曝露は、MEAデータに影響を及ぼさなかった。全スパイク数に対するDMSO曝露の結果をFig. 3Bに示す。DIV7-14のハロペリドール曝露は3 μ M以上の濃度でスパイクを消失させた（Fig.3C上）。これに対し、アセトアミノフェン慢性曝露はいずれの濃度でも全スパイク数に影響を与えなかった（Fig.3C下）。

③MEAのためのヒトiPS細胞由来神経細胞の培養プロトコルの開発

iCell GlutaNeuronとAstrocyteの重層培養により、培養開始後 4～5 週間でネットワークバーストが認められたが、多くのウェルで強い凝集が観察された（Fig.4A）。細胞解凍の際、iCell GlutaNeuronを、顕微鏡下ですべて単一細胞として観察できるまでピペettingして分散させるようにしたところ、凝集はほぼ見られなくなった（Fig.4B）。

④ヒトiPS細胞由来脳オルガノイドの作製と品質評価

近年、より生理的なモデルとして脳オルガノイドに着目されているが、化学物質影響の解析のための手法やエンドポイントは確立されていない。再現性の良いオルガノイドのMEA評価法を目指し、本研究ではオルガノイドの作製プロトコルの改良を行った。具体的には、神経誘導時に細胞を包埋するマトリゲルを、ES細胞用（米国Corning社、カタログ番号 354277）からオルガノイド作製用に最適化されたマトリゲル基底膜マトリックス フェノールレッドフリー オルガノイド形成用（Corning社、カタログ番号 356255）に変更した。またMEA計測をより早い時点（昨年度：オルガノイド作製開始後 260 日以降、今年度：同 113 日以降）に変更した。

ヒトiPS細胞より作製した脳オルガノイドは直径2mm以上と大きく、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、26,400 電極により 4mm x 3mm の範囲をカバーできる高密度MEAシステムMaxOneを用いた。各 1-2 個の脳オルガノイドを播種した 8 基のMaxOne電極チップのうち、2 個で播種後 1 週間目からネットワークバーストが検出された。前年度までの研究では、測定ごとにネットワークバーストの検出に大きな変動が生じていたが、本年度は 1 個のオルガノ

イド（直径約 2mm）について、培養 3 週間にわたりほぼ安定したネットワークバーストを観察できた（Fig.5）。

D. 考察

本年度はBBBを搭載する灌流培養装置とラット神経を搭載した高密度MEAシステムMaxOneを接続したアッセイ系の構築を目指して培養プロトコルやアッセイ系のフィージビリティを検討し、神経ネットワーク活動をMEAにより計測ができることを明らかにした（詳細は松永の項を参照）。

DNT-IVBガイダンスでも指摘されているように、化学物質の中樞神経作用を評価するうえでBBBの影響は重要である。前年度までに、ヒトiPS細胞由来BBBの複数施設におけるプレバリデーションを実施し、バリア機能を安定して発揮できることを確認した。今後、作製したMPSにより、統合的な神経毒性リスク評価法につながることを期待される。Maxwell社のシステムは、灌流培養装置との接続など拡張性が高く、キネティクスを考慮したMEA計測には利点が大きいと考えられる。一方、神経ネットワーク活動を記録するパラメータはMaxOneとMaestroなどでシステムごとに独自のものが用いられており、異なるシステムで得られたMEAデータを比較するためには、パラメータの対応付けなど機種間差を検討する必要がある。

これまでEPAでは、ラット神経細胞を用いたMEAにより、多くの化学物質について急性・慢性影響のデータが蓄積（<https://comptox.epa.gov/dashboard/>）されており、現在、OECDやEFSAなどでは適切な対照化合物の選定と技術移転を進めている。これらの手法の予測性を明らかにするためには、MEAなどin vitroのデータをin vivoに外挿するIVIVE (in vitro-in vivo extrapolation)が重要である。ヒト、ラットそれぞれの体内濃度と毒性影響が明確な対照物質を用いて、ヒト細胞とラット神経細胞でMEAパラメータの選定と曝露マージンなどを比較する必要がある。本研究では、陽性対照物質としてハロペリドール、陰性対照物質としてアセトアミノフェンを使用し、ラット神経慢性曝露評価系の検証を行った。ハロペリドールは3 μ M以上の濃度でスパイクを完全に消失させることが観察され、EPAのデータ（10 μ Mでスパイクを 100%抑制）と一致する結果が得られた。今後、更に化学物質を増やして、ラット神経細胞を用いた慢性曝露系の再現性などを検証する必要があると考えられる。

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、同一のヒトiPS細胞由来神経細胞を用いた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）。現在、EFSAの予算をもとに、欧米ではCROに技術移転を検討している。

ヒトiPS細胞由来神経細胞に関しては、培養手順の標準化に関する検討を進め、解凍した細胞を単一細胞まで分散させることが、凝集防止に重要であることを見出した。これは細胞供給元のプロトコルには記載のない工程であり、実験データの再現性に重要であると考えられる。また、これまで使用してきた市販ヒトiPS細胞由来神経細胞の供給が停止する事態が生じたこと等も踏まえ、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。細胞の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が、今のところ、MEAのパラメータからは選定できていない。今後、トランスクリプトーム解析などを実施し、MEAデータと細胞の品質との相関をさらに検討する必要がある。

さらに近年、より生理的なモデルとして脳オルガノイドに着目され、MEAによる脳オルガノイドの神経活動解析が数多く報告されている（Sun Y et al. Cell Stem Cell. 2025）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。前年までの研究では、大脳オルガノイドからネットワーク活動を示すMEAデータを得ることに成功したが、測定ごとにデータの変動が大きく、試験のためのタイムウィンドウを見出すことが課題であった。本年度のオルガノイド作製・計測では、オルガノイド作製のための包埋材（マトリゲル）や培養期間を調整することで、3週間にわたり安定したネットワークバーストが見られるオルガノイドを得ることに成功した。オルガノイドの安定したMEA計測には、マトリゲルなどの材料の選択や培養期間の最適化、オルガノイドのサイズなどが重要という知見を得ることができた。

E. 結論

本研究において、新たにMEA試験系を灌流装置につなぐことに成功し、BBBと神経の臓器連関モデルの基盤となる技術を構築できた。また、ラット神経細胞やヒトiPS細胞由来神経細胞、ヒトiPS細胞由来大脳オルガノイドの作製についても安定した結果が得られたことから、今後、標準プロトコルの確立に役立つと考えられる。以上の成果をもとに、DNT-IVBの改訂の議論を進めることにより、ガイダンスに貢献したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. **Kanda Y, Yasuhiko Y, Yoshinari K, Suzuki I.** Japanese perspectives. DNT5 workshop, April 7, 2024. Konstanz, Germany.
2. **諫田泰成**：ヒト細胞を活用した代替法の国際動向 第10回細胞凝集研究会, 2024年7月12日, 佐賀
3. **Yasuhiko Y**: Neurotoxicity assessment of pesticides using human iPSC-derived neurons with multi-electrode array system. 21st Korean Society for Alternative to Animal Experiment Annual Meeting, Jul 15, 2024. Busan, Korea.
4. **Kanda Y**: Regulatory science using New Approach and Methodologies. Aug 25, 2024. TSSCR. Taipei, Taiwan.
5. S. Yoshida, T. K. S. Tiong, Y. Nomura, **Y. Kanda**: Glyphosate exposure in utero induced social behavior alteration and neuronal cell death, which could be rescued with postnatal butyrate administration. EuroTox2024, Denmark, 2024/9/9, poster.
6. T. Nakanishi, K. Ishida, K. Tatsumi, D. Matsumaru, H. Nagase, **Y. Kanda**, K. Takuma. Utilizing neuronal differentiation reporter mice for in vivo detection of developmental neurotoxicity. EuroTox2024, Denmark, 2024/9/9, poster.
7. **Yasuhiko Y, Kanda Y**: Neurotoxicity assessment of pesticides by acute administration to human iPSC-derived neurons using multi-electrode array systems. 13th American Society for Cellular and Computational Toxicology Annual Meeting, Oct 29, 2024. North Carolina, USA.
8. **Kanda Y**. Evaluation of neurotoxicity for pesticide-related compounds in human iPSC cell-derived neurons using MEA: Japanese experience. OECD Workshop on critical innovations in pesticides safety testing and chemical risk assessment for DNT, Oct 30, 2024. Paris, France.
9. **諫田泰成**：ヒト細胞を活用した代替法の国際動向 第10回細胞凝集研究会, 2024年7月12日, 佐賀
10. **安彦 行人, 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農薬の神経毒性評価. 第61回全国衛生科学技術協議会年会, 2024年11月22日, 大阪
11. **諫田 泰成**：NAMsによる食品安全性評価の現状と今後の展望, 日本動物実験代替法学会 第37回大会, 2024年12月1日, 栃木

12. 諫田 泰成: ヒト細胞を用いた医薬品評価法の開発と標準化. 第8回ニューロン研究会, 2025年1月24日, 東京
13. 貫野 頌悟, 諫田 泰成, 吉田 祥子: Effects of in utero exposure to organophosphate pesticide and dimethyl sulfoxide on cerebellar development, 日本薬学会, 2025年3月30日, 福岡

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

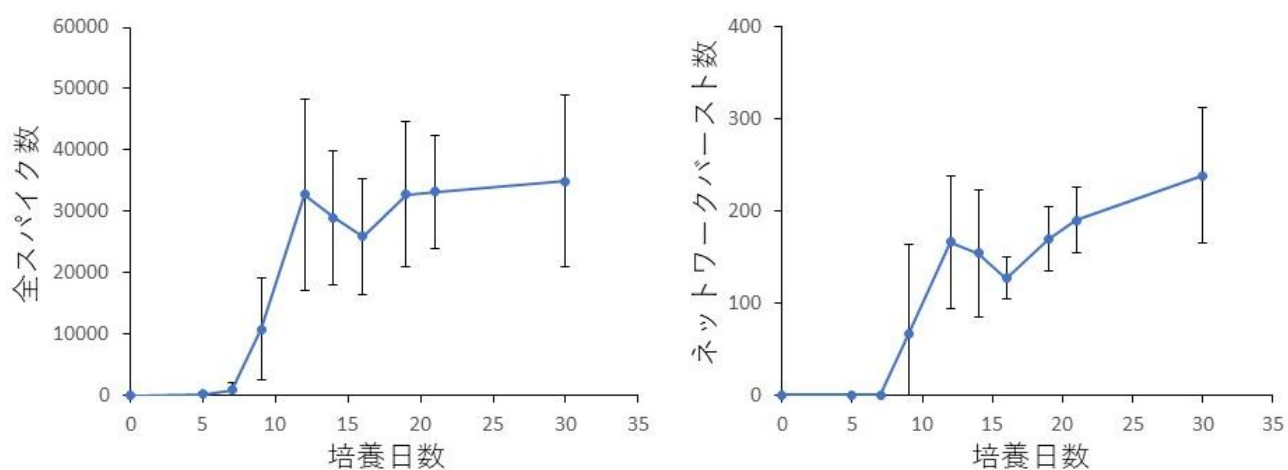


Fig.1 MEA システムによるラット神経細胞のネットワーク活動の経時変化

48well MEA プレートに凍結ラット神経細胞を解凍して播種後、経時的に全スパイク数 (左) およびネットワークバースト数 (右) を計測した。いずれも $N=4$ 、平均値 $\pm$ 標準偏差を示す。

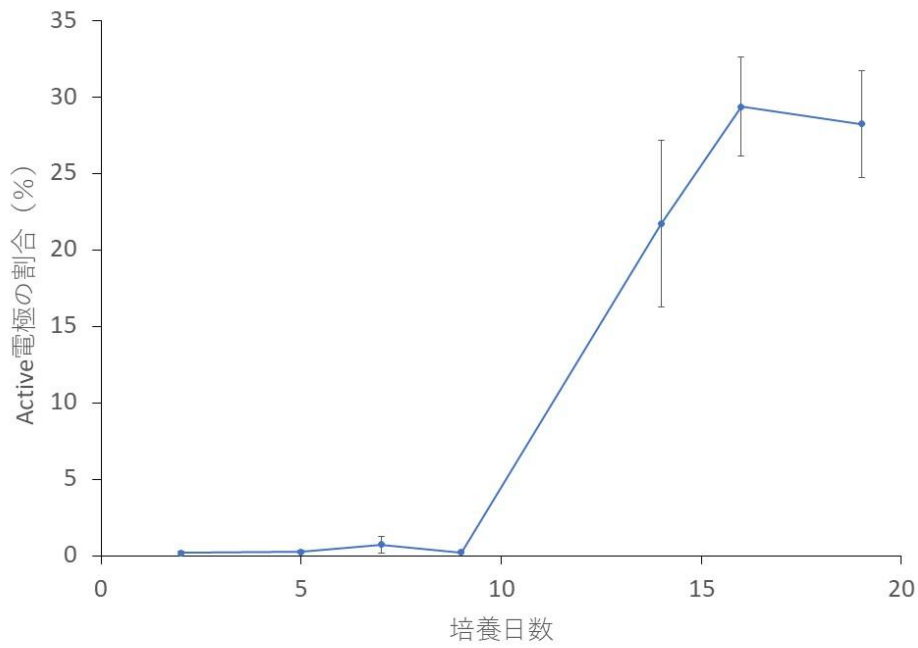


Fig.2 高密度 MEA システムによるラット神経細胞活動の経時変化

高密度 MEA システム MaxOne の電極チップに凍結ラット神経細胞を解凍して播種後、経時的に Active 電極の割合 (%) を計測した。N=4、平均値±標準偏差。

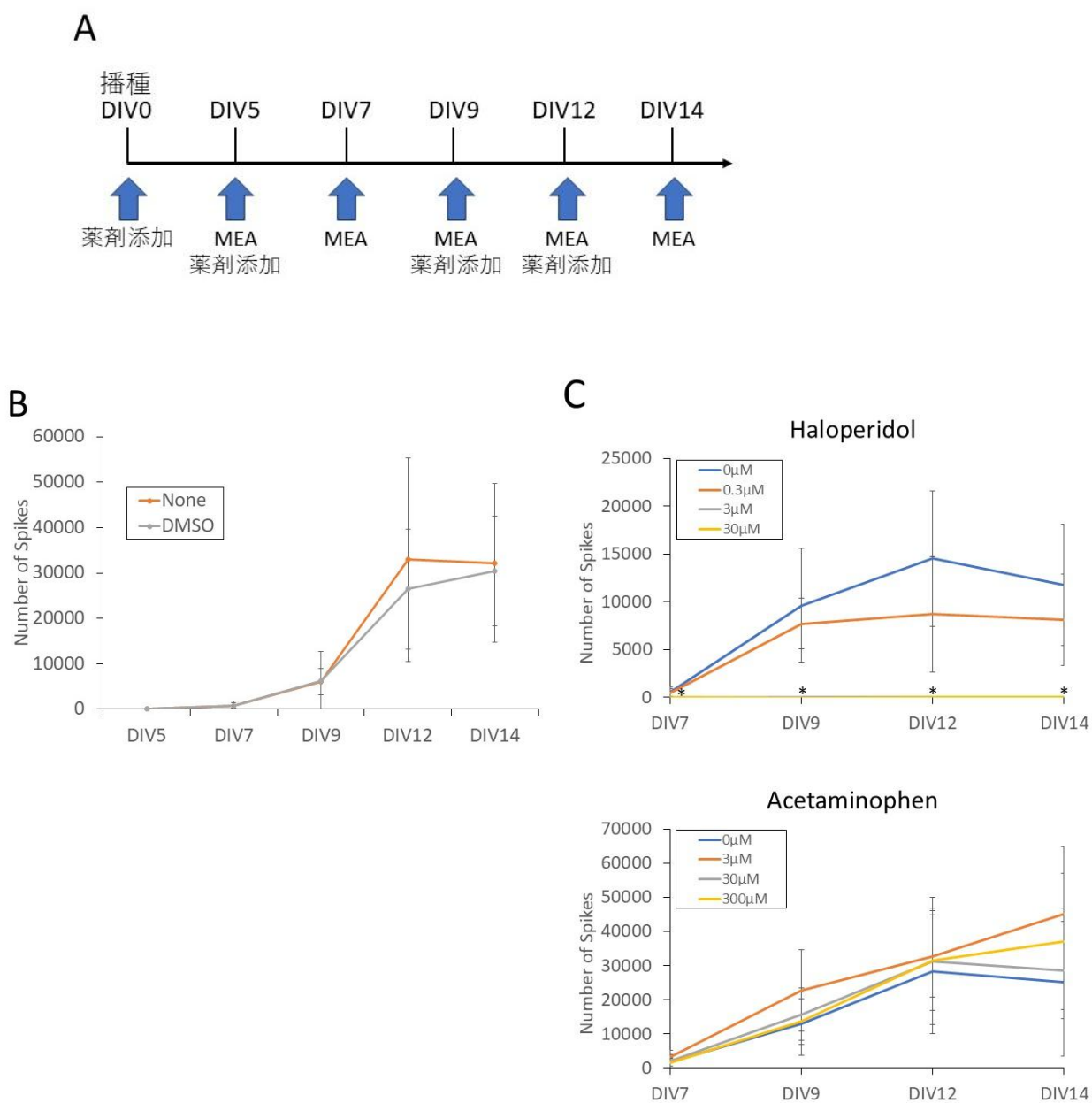


Fig.3 薬剤慢性曝露によるラット神経細胞活動の変化

48well MEA プレートに凍結ラット神経細胞を解凍して播種後、経時的に全スパイク数を計測した。
A. 実験手順 (DNT-IVB 収載の慢性曝露プロトコルに従った)。**B.** ベースラインに対する溶媒(DMSO)添加の影響。N=4、平均値±標準偏差。**C.** 全スパイク数に対するハロペリドール (上) およびアセトアミノフェン (下) 慢性曝露の経時的影響。ハロペリドール 3 μ M 以上の投与ではスパイクが消失した (*)。N=4、平均値±標準偏差。

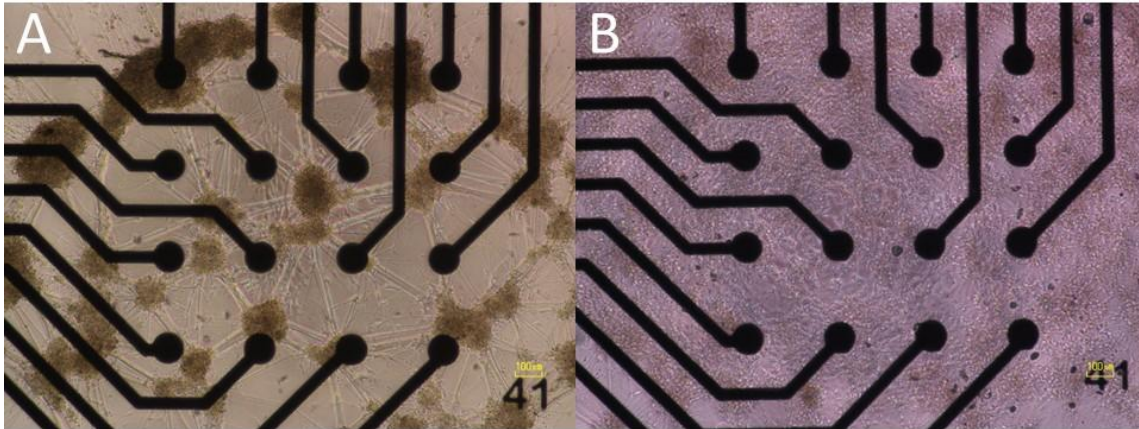


Fig.4 iCell GlutaNeuron、astrocyte 混合培養のプロトコル整備

A. iCell GlutaNeuron を解凍後、顕微鏡観察で細胞数個～10 個程度の塊が見える状態で播種したもの（培養 28 日目撮影）

B. iCell GlutaNeuron を解凍後、顕微鏡観察で完全に細胞が **single cell** になるまでピペッティングで分散させて播種したもの（培養 32 日目撮影）

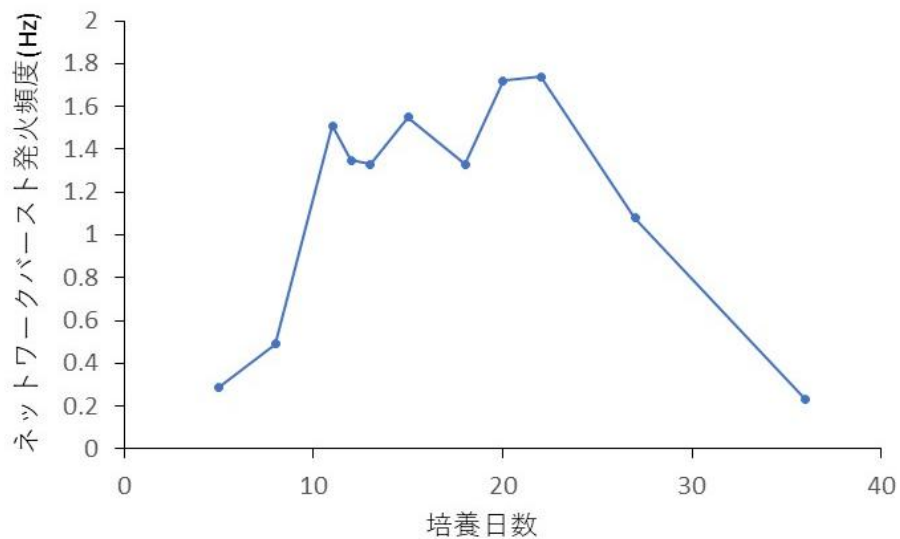


Fig.5 高密度MEAシステムによるヒトiPS細胞由来脳オルガノイドの神経ネットワーク活動の計測

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）のネットワークバーストを高密度 MEA システム MaxOne で計測した。8 個の電極チップ中、安定してネットワークバーストが計測された 1 個の結果を示す。