

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：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。我々はラスター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iPS細胞から取得した神経活動パラメータを使用して、ヒトへの健康影響が報告されている化学物質および、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、13化合物の毒性を予測することができた。

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。我々はラスター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iPS細胞から取得した神経活動パラメータを使用して、ヒトへの健康影響が報告されている化学物質および、陰性対照化合物の毒性予測を実施した。

B. 研究方法

ヒトiPSC由来ニューロンはiCell Glutaneurons（FUJIFILM Cellular Dynamics Inc.）を使用した。48-well MEAプレート上に神経細胞を培養し、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11種類のヒトへの健康影響が報告されている化学物質と2つの陰性化合物を使用した。試験化合物は、Bisphenol A, Chlorpyrifos, Fipronil, Fluoxetine, Haloperidol, Tebuconazole, Tributyltin, Deltame-

thrin, Rotenone, β -Cyfluthrin, Metaflumizoneを使用した。陰性対照化合物として、Acetaminophen, 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、⑩バースト間隔の変動係数、⑪バースト持続時間の変動係数、⑫バースト内発火数の変動係数、⑬バーストの規則性、⑭バースト持続時間の四分位範囲、⑮バースト持続時間の最大値を算出した。

陰性対照化合物を陰性データ、ヒトへの健康影響が報告されている化学物質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、陰性対照化合物に対する毒性スコアの標準偏差を基準とした毒性判定閾値を決定した。次に、未学習データおよび未学習化合物に対して、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

ヒトへの健康影響が報告されている化学物質および陰性対照化合物による神経活動パラメータの変化をヒートマップを作成することで確認した（図1）。11種類の試験化合物のうち10種類の化合物で濃度依存的に発火数および同期バースト数が減少する傾向が観察された。また化合物によって各々複数のパラメータで濃度依存的な変化が観察された。ただし、陰性対照化合物であるAcetaminophen, Aspirinにおいても複数のパラメータで変化が認められたため、試験化合物と陰性対

照化合物の変化の差異を見極められるAI作成が重要となる。

作成した毒性予測AIモデルが予測した未学習データおよび未学習化合物に対する毒性スコアを図2に示す。陰性対照化合物では、濃度に関わらず低い毒性スコアを維持した。試験化合物では、未学習データおよび未学習化合物いずれにおいても濃度依存的に毒性スコアが上昇する傾向が観察された。

毒性予測AIモデルによる毒性判定結果表を図3に示す。陰性対照化合物に対する毒性スコアの2SDを毒性判定閾値として使用すると、すべての未学習データで低濃度から高濃度にかけて毒性検出することができた。また、陰性対照化合物では低濃度から高濃度にかけて毒性が誤検出されず、正しく陰性判定することができた。さらに、未学習化合物に対しても低濃度から高濃度にかけて毒性検出することができた。

結果として、陰性対照化合物2種類および、ヒトへの健康影響が報告されている化学物質11種類の合計13化合物すべてで毒性を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、13化合物の毒性を予測することができた。以前の検証では9つのバースト関連パラメータのみを使用した。今回の検証では6つのパラメータを追加した計15パラメータを使用した。以前の検証では毒性を検出できない化合物があったが、今回の検証ではすべての化合物で毒性を予測できたことから、パラメータ数を増やすことで予測精度が向上することが示された。

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。またパラメータ数を増やすことで予測精度が向上する結果が得られたことから、今後複数の評価系データを学習することで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

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, Volume 93, 105668, 2023

2. 学会発表

1. 松田直毅、永福菜美、石橋勇人、鈴木郁郎、機械学習を用いたヒトiPSニューロンのMEA計測におけ

る神経毒性評価法、第15回スクリーニング学研究会

2. 松田直毅、永福菜美、石橋勇人、鈴木郁郎、ヒトiPS細胞由来ニューロンのMEA計測における殺虫剤の神経毒性評価と作用機序予測、第50回日本毒学会学術年会

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

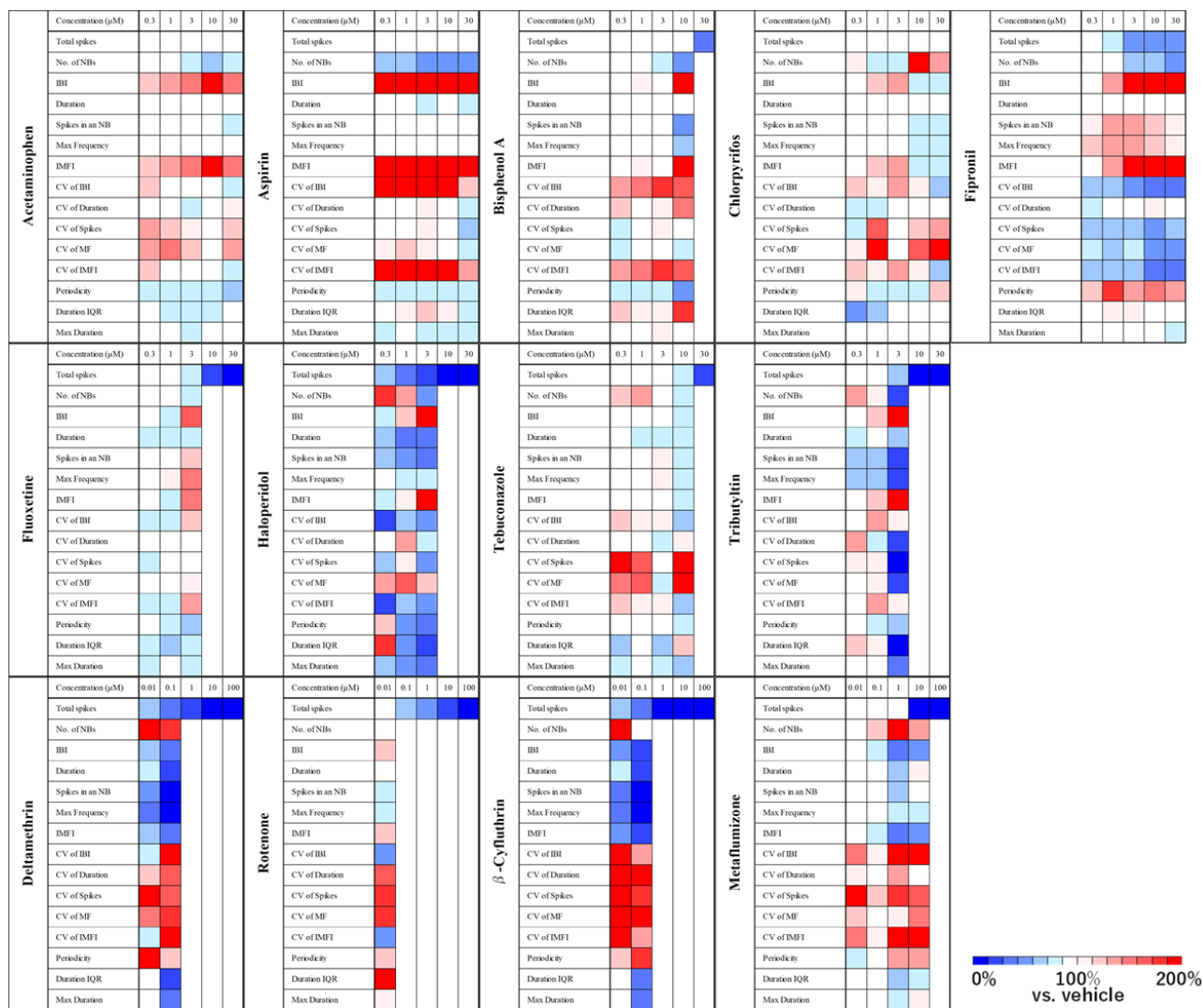
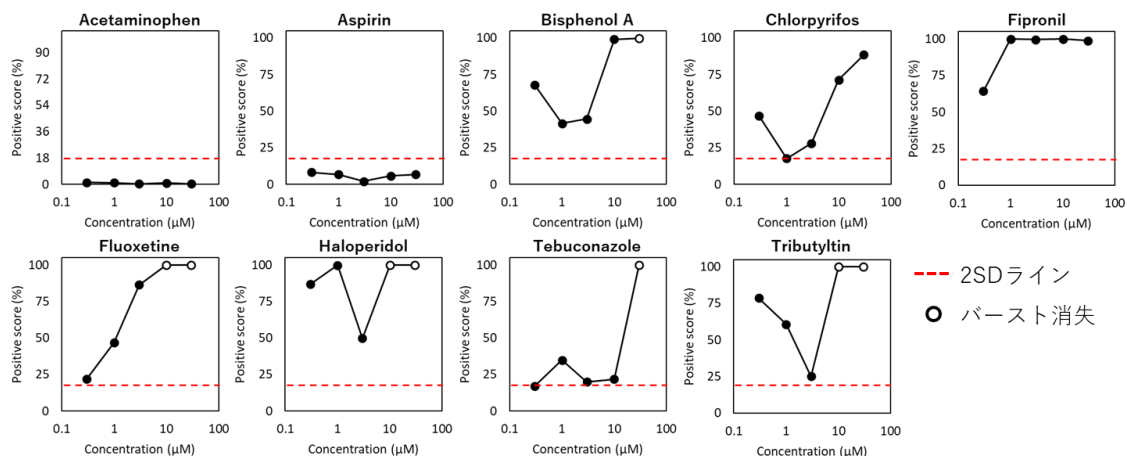


図1. 化学物質および陰性対照化合物による神経活動パラメータのヒートマップ

未学習データ



未学習化合物

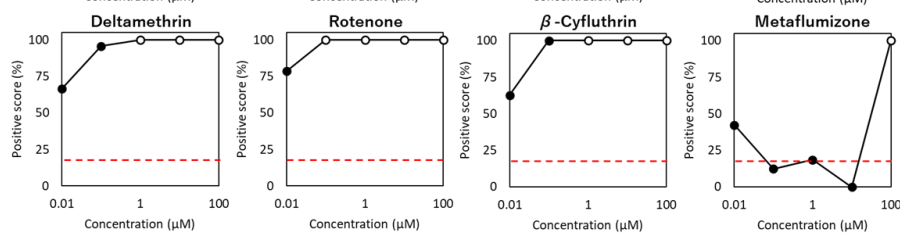


図2. 毒性予測AIモデルによる未学習データおよび未学習化合物に対する毒性スコア

	Concentration (μM)				
	0.3	1	3	10	30
Acetaminophen	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk
Aspirin	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk
Bisphenol A	High risk	High risk	High risk	High risk	—
Chlorpyrifos	High risk	Medium risk	High risk	High risk	High risk
Fipronil	High risk	High risk	High risk	High risk	High risk
Fluoxetine	High risk	High risk	High risk	—	—
Haloperidol	High risk	High risk	High risk	—	—
Tebuconazole	Medium risk	High risk	High risk	High risk	—
Tributyltin	High risk	High risk	High risk	—	—
Deltamethrin	High risk	High risk	—	—	—
Rotenone	High risk	—	—	—	—
β -Cyfluthrin	High risk	High risk	—	—	—
Metaflumizone	High risk	Medium risk	High risk	Low risk	—

■ Low risk ■ Medium risk ■ High risk
■ disappearance of NB

図 3. 毒性予測AIモデルによる毒性判定結果