

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年度総括研究成果報告書

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

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。2023 年に発表された OECD の発達神経毒性（DNT）*in vitro* testing battery（DNT-IVB）ガイダンスには 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（運動）の反映、ヒトの予測性が課題である。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* 手法は検証されていない。従って、ヒトにおける化学物質のハザードやリスク評価には、化学物質の構造情報とヒト細胞により DNT を統合的に評価する必要がある。

本研究では、まずキネティクスを考慮した MEA システムの構築に向けて、血液脳関門（BBB）と神経細胞をマイクロ流路により連結した生体模倣システムを新たに構築し、灌流下で MEA 計測が可能であることを明らかにした。MEA のエンドポイントに関して、MEA パラメータを用いた AI モデルにより神経毒性予測を行えること、また独自のパラメータを追加することにより毒性予測の精度が向上することを見出した。実験の再現性を確保するために、神経細胞の画像から特徴量の抽出手法を確立し、MEA パラメータと相関する特徴量の探索を進めている。より生理的なモデルとしてヒト iPS 細胞由来脳オルガノイドについて、高密度電極 MEA により長期に安定したネットワーク活動計測が行えることを明らかにした。

次に、化学構造に関しては、分子記述子によるリードアクロスにおいて、構造的に類似する物質の毒性スコアを構造的類似度で重みづけして合計する手法、また *in silico* 生物活性予測値の活用で高い予測性が得られることが示唆された。さらに、IVIVE の観点から、毒性メカニズムが不明なイミダクロプリドについてラット DNT 試験を実施し、神経炎症と酸化ストレス、またストレスに対する感受性の上昇により、多動的行動と進行性の神経新生抑制を引き起こすことが示唆された。

これらの成果は米国、韓国の動物実験代替法学会、OECD の DNT ワークショップなど関連学会・会議で発表するとともに、OECD・DNT 専門家会議などで DNT-IVB ガイダンスに向けて意見交換を実施した。

以上のように、本研究において班全体で連携しながら統合的に DNT を評価可能なシステム開発を進めた。今後、OECD 専門家会議や国内外の関連団体との連携のもと、新規試験法の検証を行い、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)ガイダンスに培養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、ヒトの予測性や実験の再現性、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、血液脳関門 (BBB) を統合したMEAシステムの開発、細胞画像のAI解析によるin vitro系の品質評価法、MEAデータのAIモデルによる解析手法、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、これまで使用してきたものとは異なるデータセットを用いた検証を実施した。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ダ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

①BBBとMEAを統合したin vitro神経毒性試験系の開発

2層灌流デバイスとMEAをマイクロ流路にて連結したMEA連結型MPSの開発を行った。具体的には、MEA (スイスMaxwell社製MaxOne) の電極チップにシリコン製のカバーを被せ、上部を厚めの蓋で押さえつけ

ることで灌流できる装置を作製した。

この装置の評価のため、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」と記載) を利用するための培養プロトコルを検討した。ラット神経細胞は米国LONZA社の市販凍結品 (R-Cx-500, CryoCells, Rat Brain Cortex) を使用し、MEA装置MaxOneおよびMaestro (米国Axion社) での経時的なMEA計測を実施した。

②MEAのためのヒトiPS細胞由来神経細胞培養手順の開発

ヒトiPS細胞由来神経細胞を用いたMEA計測のプロトコル作成を進めた。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購入が不可能となったため、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計測手順の検討を行った。

③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、3.5μm間隔のZ-stack撮影とした。本年度は画像予測AIモデルロバスト化のための各種処理の最適化およびノイズデータ影響の検証と最適化を行った。コンフルエントな細胞画像からの特徴量抽出のために、変分オートエンコーダ (VAE) モデルについての開発環境整備と実装を行い、最適なモデル化環境とハイパーパラメータの最適化を進めた。

④MEAデータ解析AIモデルの開発

iCell Glutaneuronsを48-wellMEAプレート上で培養し、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。試験化合物は、ヒトへの影響が報告されているものとしてBisphenol A, Chlorpyrifos, Fipronil, Fluoxetine, Haloperidol, Tebuconazole, Tributyltin, Deltamethrin, Rotenone, β -Cyfluthrin, Metaflumizoneの11種、陰性対照化合物としてAcetaminophen, Aspirinの2種を使用した。得られたMEAデータを解析し、Maestro標準の11パラメータに、独自に算出した最大発火周波数関連4パラメータを加えた15の神経活動関連パラメータを算出した。得られたMEAパラメータを用いて、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。

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、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113日の脳オルガノイド（直径2-4mm）11個を、電極チップ1基あたり1-2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。

（２）化学構造の類似性に基づくin silico発達神経毒性予測

食品安全委員会が構築している農薬評価書のラット反復投与毒性試験（90日間、2年間）の結果を約1000のエンドポイント（EP）として整理した独自のデータベース（DB）から、90日間試験の結果がある350の農薬を利用した。評価対象のエンドポイントとして、CE01（脳コリンエステラーゼ（ChE）活性低下、赤血球ChE活性低下、血中ChE活性低下、の3つをまとめたChE関連所見）、NV01（神経毒性と関連すると考えられる外観・行動の33所見をまとめたもの）の2グループを設定した。

分子記述子はalvaDescソフトウェア（Alvascience、ver 2.0.12）を利用して計算し、全物質で計算可能であり一定値ではない記述子のうち、相関係数が0.99未満の1889記述子を利用した。得られた分子記述子を、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。物質間距離は理論上の最大距離（使用した分子記述子数の平方根）で除して相対距離に変換し、物質間の類似性の指標とした。各物質の近傍17物質について、毒性所見の陽性、陰性スコアを相対距離で重みづけして合計し、毒性判定スコアを算出した。

リードアクロスは、350農薬から1物質を予測対象物質（ターゲット物質）として選択し、残りの物質を類似物質（ソース物質）の候補物質とする解析を全350農薬について実施した。毒性判定では、毒性スコアがDB全体の陽性率を上回った場合を陽性予測とし、最終的に350物質全体の感度、特異度、balanced accuracy（BA）を予測精度の指標として算出した。

（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

ネオニコチノイド系農薬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。イミダクロプリドは0, 83, 250, 750 ppmの濃度で混餌投与した。児動物を出生後21日と77日目に解剖し、脳をサンプリングして免

疫組織学的検索、遺伝子発現解析を実施した。またTG426に従い行動試験（各群N=10）を行った。

（４）試験法の行政利用に向けた国際動向調査

米国、韓国等の動物実験代替法関連学会に参加し、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。またOECDの拡張一代生殖発生毒性試験ガイドライン(TG443)の改訂に参画した。

（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ていない。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

①BBBとMEAを統合したin vitro神経毒性試験系の開発

MaxOneシステムにおいてラット神経細胞は、培養2週間で安定したネットワーク活動を示した。BBBを培養する灌流装置とラット神経細胞を播種したMEA装置をマイクロ流路により連結し、培養液の灌流下でMEA計測が可能であることを明らかにした。MEAデータに培養液の灌流に伴うと考えられるノイズが観察されたが、培養液を灌流するチューブの改良により、ノイズを軽減することができた。

②MEAのためのヒトiPS細胞由来神経細胞培養手順の開発

ヒトiPS細胞由来神経細胞の培養により、培養開始後4～5週間でネットワークバーストが観察されたものの、多くのウェルで強い凝集が観察された。培養手順を検討し、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ッティングにより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。これらの情報をSOPとしてまとめる予定である。

③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、MEAデータと細胞画像特徴量の相関をAIによ

り解析する手法の検討を進めた。その結果、MEAデータでは電極間で想像以上に大きな変動 ($CV>0.4$) が生じ、経時的に増大することが確認された。ガウス分布による最尤推定、階層ベイズモデルによる逸脱スパイク数データの定量化により、ノイズデータをin silicoで削減することによって、より安定なMEA解析が可能になることが示唆された。一方、撮影データの増加にしたがって、画像中の輝度ノイズや細胞形態の変化が大きく、特定の画像処理アルゴリズムだけでは安定した数値化ができない問題にも直面した。このため、深層学習技術の一つである変分オートエンコーダ (VAE) を用いて画像全体に共通する特徴量を潜在特徴量としてのモデル化する技術の開発を行った。この結果、これまでの解析アルゴリズムでは、細胞種やデータが変更された際に大きく解析パイプラインを変更する必要があった処理の一部が、安定して共通化できることが見出された。

④MEAデータ解析AIモデルの開発

MEAを用いた神経毒性評価はDNT-IVBにも記載されているが、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。独自に最大発火周波数を計算し、最大発火周波数と関連する新規パラメータ4つを算出して、Maestro標準の11パラメータと合わせてAIモデルによる予測精度を検証した。未学習データおよび未学習化合物に対する毒性スコア予測を行ったところ、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。

⑤脳オルガノイドを用いたMEAによる神経毒性評価

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。本年度はオルガノイドの作製プロトコルを改良し、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。その結果、3週間にわたり安定したネットワークバーストを得ることに成功した。

(2) 化学構造の類似性に基づくin silico発達神経毒性予測

まず、gEPと統計学的に関連のある記述子を選択した場合、予測精度が向上するか否かを解析した (図1)。

CE01又はNV01の陽性及び陰性で物質を2群に分け、

Wilcoxonの順位和検定を用いて比較し、 $p < 0.05$ となった記述子 (CE01: 801種、NV01: 170種; 以下「 $p < 0.05$ 記述子」)、 p 値が小さい順に並べた際の上位350記述子 (以下「n350記述子」) を用いた。また、対照として、相関係数が0.99以上の記述子を削除した1889記述子 (以下「 $r < 0.05$ 記述子」) を用いた。なお、1889記述子は量gEPで共通であるが、n350記述子は両gEPで異なる種類の記述子から構成される。

その結果、CE01ではBAが0.75程度の高い精度が得られたのに対して、NV01では、BAは0.56程度で分子記述子のみのでは高い精度の予測は困難であった。また、両gEPにおいて、記述子の選択による感度、特異度及びBAの大きな変化は認められなかった。以上のことから、毒性と関連する記述子の選択は予測精度の向上に繋がらないことが示唆された。

次に、分子記述子に加えて生物学的な情報を追加することで予測精度が向上するか否かを解析した。ただし、対象農薬について実験結果を利用することは困難であることから、本解析では、約8000種を超える生物活性を予測可能なPASSソフトウェアの予測値 (生物活性予測値) を利用した。

CE01においては、分子記述子のみを用いた場合 (レーン1) に比べて程度はわずかであったが、生物活性予測値を利用することで感度、特異度及びBAのいずれも向上し、n350セットを用いた場合に最も高い感度が、 $p < 0.05$ を用いた場合に最も高い特異度が得られた。NV01においては、n350セットを用いた場合において、分子記述子のみを用いた場合に比べて感度の大きな向上 ($0.47 \rightarrow 0.56$) が認められ、BAも0.56から0.63に向上した。以上の結果から、PASSによる生物活性予測値を変数に追加することで予測精度が向上すること、さらにその際には対象とするgEPとの関連性が高い変数を絞り込んで利用することが精度向上に寄与することが示唆された。

(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。毒性メカニズムが明らかでない化学物質として、今年度はネオニコチノイド系農薬イミダクロプリドについて発達神経毒性評価を実施した。その結果、離乳期 (PND 21) の海馬において神経前駆細胞の数が減少し、成体期 (PND 77) において神経幹細胞数が減少した。離乳期には歯状回門におけるアストロサイトとM1型ミクログリアの数が増加し、神経炎症と酸化ストレス関連遺伝子が発現上昇した。成体期においては、酸化ストレスの指標であるmalondialdehydeレベルとM1

型ミクログリア数が増加し、神経炎症と酸化ストレス関連遺伝子の発現が低下した。これらの結果から、イミダクロプリドは海馬において神経炎症と酸化ストレス、またストレスに対する感受性を上昇させ、成体期における多動的行動と進行性の神経新生抑制を引き起こすことが示唆された。このような毒性メカニズムを検出する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

米国、韓国の動物実験代替法関連学会に参加し、MEAデータ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、OECDのDNTワークショップにおいて日本におけるDNT-IVB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。OECDやEFSAは、DNT-IVBの初期文書を検証試験に基づいて改訂する予定であり、IVBのTierに新たな技術を導入することに積極的である。

OECDの拡張一世代生殖発生毒性試験ガイドライン(TG443)の改訂に参画し、発達神経毒性試験に関する改訂はほぼ無かったものの、内容の確認を行った。

D. 考察

OECDのDNT-IVBガイダンスにラット神経細胞を用いた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。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。また、ヒト細胞としてヒトiPS細胞由来神経細胞の利用も期待されている。そこで本研究では、BBBの培養を行う灌流培養装置と神経細胞のMEA装置を灌流培養装置により連結し、培養液灌流下でのMEA計測を行えることを明らかにした。これによりMEAとBBBを統合した新たな生体模倣システムの完成に大きく前進したと考えられる。今後、適切な化学物質を用いて本システムの有用性を検証する必要がある。

ヒトiPS細胞由来神経細胞の株間差も重要な課題である。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。本研究により、ヒトiPS細胞由来神経細胞の培養において、解凍した細胞を単一細胞まで分散させる操作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。今後、本研究で得られた知見をもとに標準的プロトコルの作成を目指す。

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)。本研究ではAI画像解析による細胞状態のモニタリング手法の開発を進めてきた。本年度は解析技術のロボスト化のため、ノイズデータの分析とクレンジング技術および、解析パイプラインロボスト化のための深層学習モデルの導入を行った。これらの開発の結果、MEAデータを安定化しながら、実験データごとにあまり解析パイプラインを変更せずに定量化につなぐことができる可能性が示唆された。

MEAデータを用いたAIモデルによる毒性予測について、以前の検証で用いた9つのパラメータに加え、今回は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スコアが低くなる化合物があったが、今回の検証ではすべての陽性化合物で高い毒性スコアを与えたことから、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有した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くなることが推測できる。

近年、より生理的なモデルとして脳オルガノイドの活用が期待されているが、化学物質影響の解析のための手法は確立されていない。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、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、オルガノイドの製造工程に重要な知見を得ることに成功した。今後、今回の作製手順やオルガノイドのデータをふまえ、標準的なプロトコルの検討を進める。

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、ソース物質数の設定が予測精度に与える影響を検討したが、評価する毒性エンドポイントにより予測精度には差が見られた。コリンエステラーゼ阻害などメカニズムの明らかな毒性に比べ、外観

や行動などメカニズムが多様と考えられるエンドポイントでは、構造情報からの予測精度が低くなることが示唆された。今後は、化学構造情報から生物活性を予測するソフトウェアを利用してDB内の物質について各種生物活性の予測値を算出し、それらを利用した類似性評価に基づくソース物質の選択により、リードアクロスの精度向上が可能かを検討する。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。

イミダクロプリドは発現メカニズムが不明な神経毒性物質であるが、本研究により海馬において神経炎症と酸化ストレス、またストレスに対する感受性を上昇させ、成体期における多動的行動と進行性の神経新生抑制を引き起こすことが示唆された。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が、実験系の選択方法については検討の途上である。神経毒性の作用点に関する知見の蓄積により、発達神経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。今後、これらの成果をもとに、OECD 発達神経毒性の専門家会議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。

E. 結論

本研究において、BBBとMEAを連結した生体模倣システムの開発を行った。これにより、キネティクスを反映した新たな*in vitro*試験法の構築が期待される。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。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

- Ojio, 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.
- Zou, X., Tang, Q., Ojio, R., Ozawa, S., Shobudani, M., Sakamaki, Y., Ebizuka, Y., Jin, M., Yoshida, T., **Shibutani, M.**: Increased spontaneous activity and progressive suppression of adult neurogenesis in the hippocampus of rat offspring after maternal

exposure to imidacloprid. *Chem. Biol. Interact.* 399:111145, 2024.

- Sakamaki, Y., Shobudani, M., Ojio, R., Ozawa, S., Tang, Q., Zou, X., Ebizuka, Y., Karasawa, A., Woo, G.H., Yoshida, T., **Shibutani, M.**: Suppression of hippocampal neurogenesis and oligodendrocyte maturation similar to developmental hypothyroidism by maternal exposure of rats to ammonium perchlorate, a gunpowder raw material and known environmental contaminant. *Env. Toxicol.* 40(1), 30–53, 2025.
- Shobudani, M., Sakamaki, Y., Karasawa, A., Ojio, R., Zou, X., Tang, Q., Ozawa, S., Jin, M., Yoshida, T., **Shibutani, M.**: Metabolic shift as a compensatory response to impaired hippocampal neurogenesis after developmental exposure to sodium fluoride in rats. *Acta Histochem.* 126(8), 152204, 2024.
- Zou, X., Ebizuka, Y., Sakamaki, Y., Shobudani, M., Tang, Q., Kobayashi, M., Kigata, T., **Shibutani, M.**: Progressive motor dysfunction and loss of cerebellar Purkinje and granule cells in rat offspring after maternal exposure to imidacloprid. (submitted)
- Mathisen GH, Bearth A, Jones LB, Hoffmann S, Vist GE, Ames HM, Husøy T, Svendsen C, Tsaion K, Ashikaga T, Bloch D, Cavoiski A, Chiu WA, Davies HG, Giusti A, Hartung T, Hirabayashi Y, Hogberg HT, Joglekar R, **Kojima H**, Krishnan K, Kwon S, Osborne OJ, Roggen E, Rooney AA, Rousselle C, Sass JB, Sepai O, Simanainen U, Thayer KA, Tong W, Wikoff D, Wright F, Whaley P: Time for CHANGE: system-level interventions for bringing forward the date of effective use of NAMs in regulatory toxicology, *Arch Toxicol*, 2024 Jun 14. doi: 10.1007/s00204-024-03802-6.
- Kojima H**, History of the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) test guidelines for non-animal test methods in Japan. *Genes Environ.* 2025;47(1):3. doi: 10.1186/s41021-024-00323-7.

2. 学会発表

- Kanda Y, Yasuhiko Y, Yoshinari K, Suzuki I.** Japanese perspectives. DNT5 workshop, April 7, 2024. Konstanz, Germany.
- 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
- 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.
- 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, 2023. 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. 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
 10. 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
 11. 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
 12. 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
 13. Hiroyuki Sato, Kaho Nakai, Yuri Ikeda, Nagae Kazue, Tadahiro Hashita, Takahiro Iwao, Tamihide Matsunaga. Evaluation of receptor-mediated uptake and transcytosis using human iPSC cell-derived brain microvascular endothelial-like cells, 2024 International Society for the Study of Xenobiotics/The Japanese Society for the Study of Xenobiotics, Hawaii.
 14. 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
 15. 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 回日本毒性学会学術年会
 16. Xinyu Zou, Qian Tang, Ryota Ojio, Shunsuke Ozawa, Yuri Ebizuka, Toshinori Yoshida, Makoto Shibutani: Effects of maternal exposure to imidacloprid on cerebellar development and behaviors of rat offspring. 第 51 回日本毒性学会学術年会、福岡、7 月 3 日-5 日, 2024.
 17. Xinyu Zou, Shunsuke Ozawa, Yuri Ebizuka, Makoto Shibutani: Assessment of developmental neurotoxicity of imidacloprid on hippocampal neurogenesis and cerebellum in rat offspring. EUROTOX 2024. 58th Congress of the European Societies of Toxicology. Copenhagen, Denmark. 9 月 8- 11 日, 2024.
 18. 三ヶ島史人、真木一茂、小島肇、栗形麻樹子、大久保佑亮、星野裕紀子、片桐龍一、石黒司、渡部一人、角崎英志、下村和裕: 医薬品の生殖発生毒性試験及び生殖発生毒性評価代替法に係る状況調査、第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.7.5)
 19. 小島肇: 動物実験代替法から New Approach Methodologies (NAM) への変遷, 第 14 回レギュラトリーサイエンス学会 (2024.9.13, 東京)
 20. Hajime Kojima, International progress on the development and regulatory application of NAMs/Alternatives Symposium on Innovative Collaboration in Toxicology Alternative Methods in Shanghai (2024.11.2)
 21. 小島肇: JaCVAM の成果と今後の課題, 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.30, 栃木)
- 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