

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4-6年度総合報告書

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、キネティクスを反映させた予測性の高いMEA解析のため、ラット神経細胞、ヒトiPS細胞由来神経細胞およびヒトiPS細胞由来脳オルガノイドについて、培養・解析の標準的プロトコルの開発、またヒトiPS細胞由来血液脳関門（BBB）と神経細胞MEAを接続した生体模倣システム（MPS）の開発を行った。

研究班内の2施設でヒトiPS細胞由来BBBの培養を行い、経内皮電気抵抗値（TEER）によりバリア機能を確認し、高いバリア機能が得られる培養プロトコルを確認した。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、灌流下で安定したMEA実験が行えることを確認した。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た。さらにヒトiPS細胞由来脳オルガノイドについて、作製およびMEA計測手順の検討により、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確認した。欧米、アジアの動物実験代替法関連学会に参加し成果を報告した。また、OECDのDNTワークショップにて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。

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。本研究は、ヒトiPS細胞由来神経細胞を用いた新たなin vitro発達神経毒性評価法の開発を目的として実施した。

化学物質による発達神経毒性のin vitro評価系として、現在、OECDのin vitro testing battery（DNT-IVB）ガイダンスに多点電極アレイ（MEA）システムによる神経毒性評価法が記載されているが、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。本研究では、MEAによるin vitro神経毒性評価にキネティクスを解析可能な生体模倣システム（MPS）の開発を目標とした。

血液脳関門（BBB）とヒトiPS細胞由来神経細胞の共培養法を検討した。ヒトiPS細胞由来BBBのバリア機能について2施設でプレバリデーションを実施した。血液脳関門BBBを統合したMEAシステムの開発へ向け、BBBバリア機能と神経機能を共に保つことのできる培地の開発を進めた。既存データが豊富なラット初代培養大脳皮質神経細胞を利用するための培養プロトコルを検討した上で、灌流培養装置を接続したMEA装置による神経ネットワーク活動の計測を実施した。

ヒトiPS細胞由来神経細胞のプロトコル作成について、研究期間中に市販細胞の供給に問題が生じた例も踏まえ、複数のヒトiPS細胞由来神経細胞製品を用いて培養およびMEA計測手順の検討を行った。MEAシステム上の培養細胞の状態を非侵襲的に評価し管理することを目指し、細胞画像から神経ネットワーク活動を予測できる方法の開発に取り組んだ。さらにヒトiPS

細胞由来脳オルガノイドの作製、及びそれを用いた神経毒性評価系樹立のための MEA 計測手法の開発を進めた。

B. 研究方法

①ヒトiPS細胞由来BBBの培養

ヒトiPS細胞由来BBBは、分担研究者の松永らが樹立したものを、液体室素温度で国立医薬品食品衛生研究所に輸送し、液体室素中に保存した (Yamashita et al. Fluids Barriers CNS (2020) 17:36)。

24 ウェルプレートのウェルに、セルカルチャーインサート (Merck, PIHP01250) をセットし、Fibronectin 及び Cellmatrix Type IV (それぞれ 100 μ g/ml 及び 400 μ g/ml) により 4 $^{\circ}$ C、一晚コーティングした。コーティング溶液を除去した後、セルカルチャーインサートをセットしたウェル内に 600 μ l、セルカルチャーインサート内に 200 μ l の播種培地を注入し、37 $^{\circ}$ C で保温した。培地の組成は前掲の Yamashita らの文献に従った。

凍結 BBB 細胞を液体室素から取り出し、バイアル内に 37 $^{\circ}$ C に温めた播種培地 1ml を加え、10 回程度ピペッティングして解凍した。得られた細胞懸濁液を 8ml の播種培地に加え、100 x g、5 分、室温にて遠心した。細胞ペレットを 1ml の播種培地に懸濁してトリパンブルー染色の上で細胞数をカウントし、細胞の生存率が 80% 以上であることを確認した。細胞懸濁液の細胞密度を 2.7 x 10⁶ cells/ml に調整し、セルカルチャーインサートあたり 200 μ l (5.4 x 10⁵ cells) を添加した。各セルカルチャーインサート内の液を、400 μ l にセットしたピペッターで 1 回ピペッティングして均一化し、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ にて静置培養した。

血管内皮細胞培地 (米国 Thermo Fisher Scientific 社) をベースとした培養液で培養を行い、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) によりバリア機能を解析した。TEER 確認は国立医薬品食品衛生研究所、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。経内皮電気抵抗 (TEER) は、測定器 EVOM (World Precision Instruments) にカップ型電極 EndOhm 6G (World Precision Instruments) を接続し、電極カップ内にセルカルチャーインサートをセットして測定した。

②MEAによる急性神経毒性評価プロトコルの検証

ヒトiPS細胞由来神経細胞として、OECD の in vitro 神経毒性評価系の国際的なバリデーションに用いられ

ている市販細胞培養キット (米国 Neucyte 社、SynFire® MEA kit) を用いた。本キットはヒトiPS細胞から分化誘導された Glutamatergic neuron、GABAergic neuron および Astrocyte からなり、メーカープロトコルに従い 14:6:7 の数比で混合培養した。細胞の解凍、播種についてもメーカープロトコルに従った。

細胞は MEA システム MAESTRO (米国 Axion 社) の測定プレート上で培養した。播種後 4 週間、Neucyte 社供給の専用培地を週 2 回半量交換し、交換翌日に MEA により神経活動のベースライン計測を実施した。測定プレートを MAESTRO にセット後、10 分間静置した上、15 分間の MEA 計測を実施した。得られたデータから AxIS ソフトウェア (Axion 社) でスパイクを抽出後、Neural Metric tools ソフトウェア (Axion 社) を使用してネットワークバースト等、各種ネットワーク活動パラメータを取得した。

また週一回 (培地交換前)、細胞画像 AI 解析 (加藤の分担研究を参照) のため、全ウェルの細胞画像撮影を実施した。BioRevo BZ9000 オールインワン顕微鏡 (Keyence) を使用し、ソフトウェア BZ-II により画像の撮影および合成を行った。1 視野で 3 x 3 のタイリング撮影を行い、それぞれ Z 軸方向に 3.5 μ m 間隔で積層的に撮影してベストフォーカス合成を行った。MEA データへの影響を最小限とするため、画像撮影後に培地交換を行い、MEA 測定はその 1 日後に実施した。

化学物質の投与は細胞播種後 5 週目に行った。4 種の化学物質 (Chlorpyrifos, Diazinon, Deltamethrin, Cypermethrin) について、蓄積的に 5 段階に分けて行い、最終濃度は 4 物質とも 30 μ M とした。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。

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。

③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 $^{\circ}$ C 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 3.4x10⁴ 個の割合で生細胞

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 3x104 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)。

④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、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。

⑤MEA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細胞由来グルタミン酸作動性神経細胞iCell glutaneuron (米国iCell社) を 37 $^{\circ}$ C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 7.3x10⁴ 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 (iCell社) を 37 $^{\circ}$ C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 5x10⁵ 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 1.2x10⁴ 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。

⑥MEAのためのヒトiPS細胞由来脳オルガノイドの作製・計測方法の開発

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システムを使用した。脳オルガノイド (直径 2-4mm) 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、週に 2 回のOrganoid maturation medium (Stemcell社) 培養液交換、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。

⑦試験法の行政利用に向けた国際動向調査

欧米、アジア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の拡張一世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、個人情報の取扱いには生じない。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BBBの培養

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 Ω cm² 以上のTEERが得られることを確認した (Fig.1)。

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

のバリア機能をともに保つことができる培地の候補を見出した (Fig.2)。

②MEAによる急性神経毒性評価プロトコルの検証

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 ウェルからなる 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 (Fig.3)。

In silico神経毒性予測 (分担研究、吉成の項) において予測性が低かった有機リン剤について、MEAによりヒト iPS 細胞由来神経細胞への影響を解析した。Chlorpyrifos、Diazinon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。また、両剤とも Network burst 数の増加や Burst 持続時間、Burstあたり Spike 数の減少等に関して類似したパラメータ変化を示しており、共通のメカニズムによる影響が示唆された (Fig.4)。

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 (Fig.5)。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。

③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.6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.7)。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)。

④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. 8B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.8C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.8C下)。

⑤MEAのためのヒトiPS細胞由来神経細胞培養手順の開発

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 (Fig.9A)。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.9B)。

⑥MEAのためのヒトiPS細胞由来脳オルガノイドの作製・計測方法の開発

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 (令和 5 年度: オルガノイド作製開始後 260 日以降、令和 6 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。令和 5 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、令和 6 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.10）。

⑦試験法の行政利用に向けた国際動向調査

欧米、アジア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。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計測には利点が多いと考えられる。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。本研究の第 2 年度までに、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。第 3 年度にて、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. **諫田泰成, 安彦行人**: 化学物質のインビトロ発達神経毒性評価—甲状腺ホルモンの影響評価の取り組み, 第49回日本毒性学会学術年会, 北海道, 2022年7月2日, 口頭, 国内。
2. Shigeru Yamada, **Yukuto Yasuhiko, Yasunari Kanda**: Tributyltin inhibits neural induction via mitochondrial dysfunction in human iPS cells, 第8回国際メタロミクス学会, 石川, 2022年7月12日, ポスター, 国内。
3. **安彦行人**, 山田茂, **諫田泰成**: 多点電極アレイシステム (MEA) を用いたヒト iPS 由来神経細胞によるピレスロイド発達神経毒性の評価, 第62回日本先天異常学会学術集会, 石川, 2022年7月29日, 口頭, 国内。
4. **諫田泰成, 安彦行人**: インビトロ神経毒性評価法の現状と課題, 日本動物実験代替法学会第35回大会, 静岡, 2022年11月19日, 口頭, 国内。
5. **Yukuto Yasuhiko**, Shigeru Yamada, **Yasunari Kanda**: 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ピレスロイド系農薬の神経毒性評価, 第96回日本薬理学会年会, 神奈川, 2022年11月30日, ポスター, 国内。
6. **安彦行人**, 山田茂, 花尻瑠理, **諫田泰成**: ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた解離性麻酔剤の神経毒性評価, 第143回日本薬学会年会, 北海道, 2023年3月27日, ポスター, 国内。
7. **諫田泰成**: ヒト iPS 細胞を用いた発達神経毒性ガイ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。
8. **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.
9. **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.
10. **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.
11. **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。
12. **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。
13. **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シ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。
14. **Kanda Y, Yasuhiko Y, Yoshinari K, Suzuki I**. Japanese perspectives. DNT5 workshop., April 7, 2024. Konstanz, Germany.
15. **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. 14-16, 2024. Busan, Korea.
16. **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. 27-31, 2023. North Carolina, USA.
17. **Kanda Y**. Evaluation of neurotoxicity for pesticide-related compounds in human iPS 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.
18. **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

19. **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
20. **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.
21. **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.
22. **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.
23. **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
24. **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
25. **諫田泰成**: ヒト iPS 細胞を用いた発達神経毒性ガイドランスと今後の展望. 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
26. **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
27. **Kanda Y, Yasuhiko Y, Yoshinari K, Suzuki I**. Japanese perspectives. DNT5 workshop, April 7, 2024. Konstanz, Germany.
28. **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.
29. **Kanda Y**: Regulatory science using New Approach and Methodologies. Aug 25, 2024. TSSCR. Taipei, Taiwan.
30. 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.
31. 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.
32. **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.
33. **Kanda Y**. Evaluation of neurotoxicity for pesticide-related compounds in human iPS 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.
34. **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
35. **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
36. **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
37. **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
38. 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

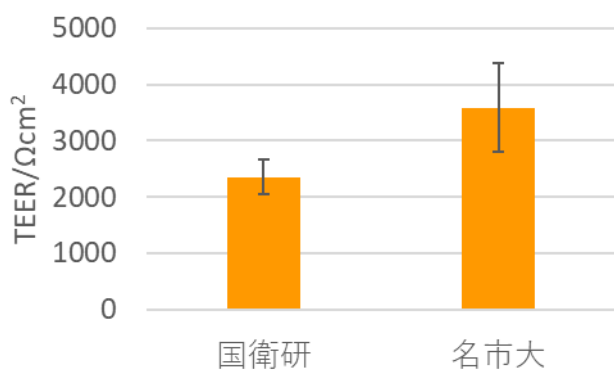


Fig.1 ヒト iPS 細胞由来 BBB のバリア機能に関する施設間プレバリデーション。
ヒト iPS 細胞由来 BBB をセルカルチャーインサートに播種し、播種後 3 日目にバリア機能 (TEER) の計測を行った。データは平均値 ± 標準偏差を示す。N=6 (国衛研)、3 (名市大)。

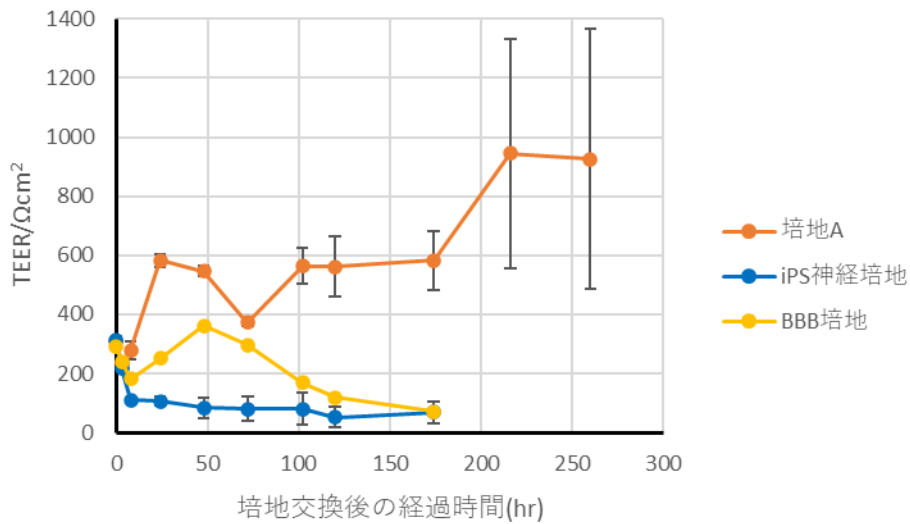


Fig.2 ヒト iPS 細胞由来神経細胞と BBB の共培養のための培地の探索。

ヒト iPS 細胞由来 BBB をセルカルチャーインサートに播種し、播種後 5 日目に検討する各培地への培地交換を行った後、バリア機能(TEER)を経時的に計測した。横軸は培地交換後の経過時間。データは平均値±標準偏差を示す。N=3 (培地 A、iPS 培地)、2 (BBB 培地)。BBB 培地の TEER は平均値のみ示した。

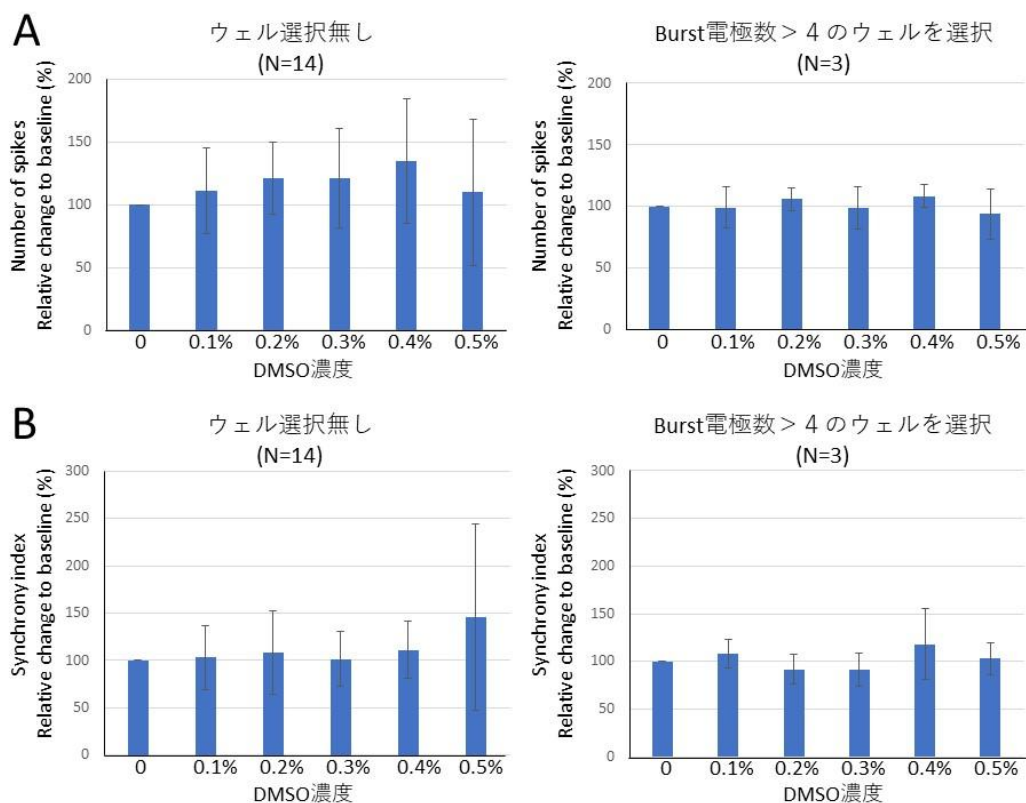


Fig.3 バースト電極(Bursting electrode)数によるウェル選択が MEA データのばらつきに与える効果。

Synfire iPS neuron に溶媒(DMSO)を 0.1%から 0.5%まで累積投与し、各濃度における Number of Spikes (A)、Synchrony index (B)を MEA により計測した。横軸は培地中 DMSO の濃度を示す。縦軸は DMSO 不添加(0%)を 100%とした全スパイク数の相対値を示す。データは平均値±標準偏差を示す。

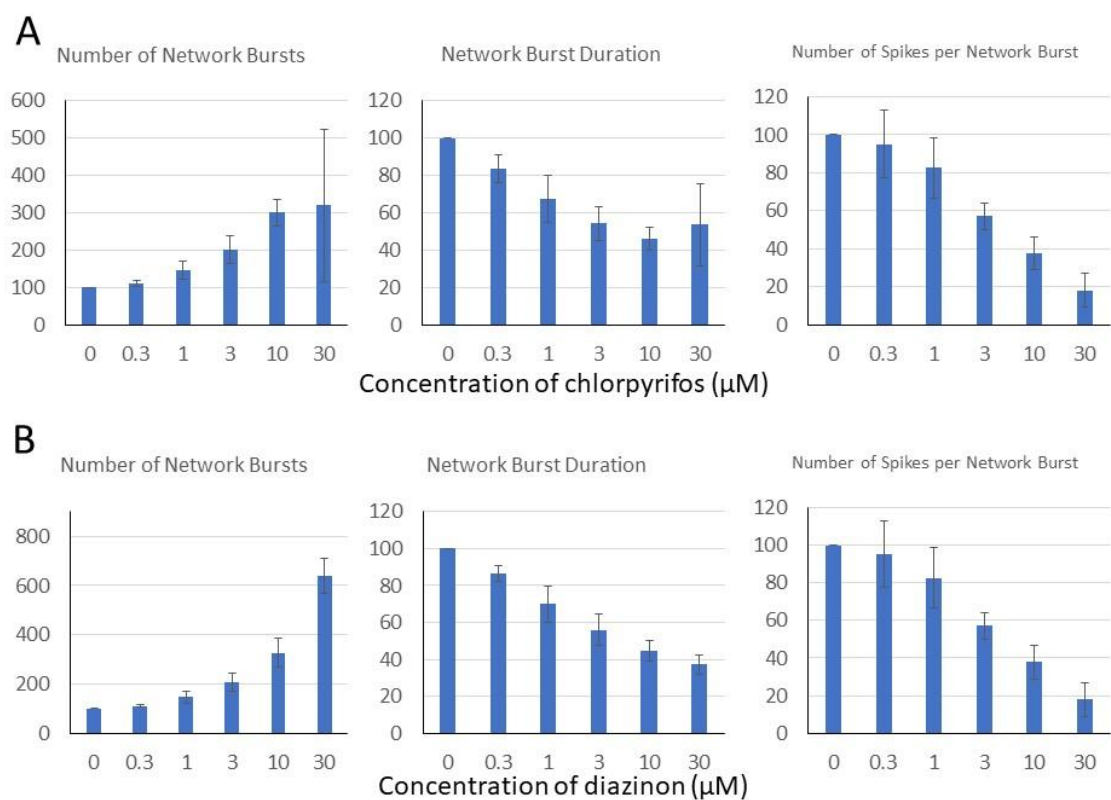


Fig.4 有機リン系農薬2剤によるヒト iPS 細胞由来神経細胞 MEA パラメータ変化。

Synfyre iPS neuron に Chlorpyrifos (A)、Diazinon (B)を累積投与し、MEA によりネットワーク関連パラメータを取得した。横軸は各剤の培地中濃度を示す。縦軸は溶媒添加(0 μM)を 100%とした各パラメータの相対値を示す。データは平均値 $\pm$ 標準偏差を示す。N=7 (Chlorpyrifos)、5 (Diazinon)。

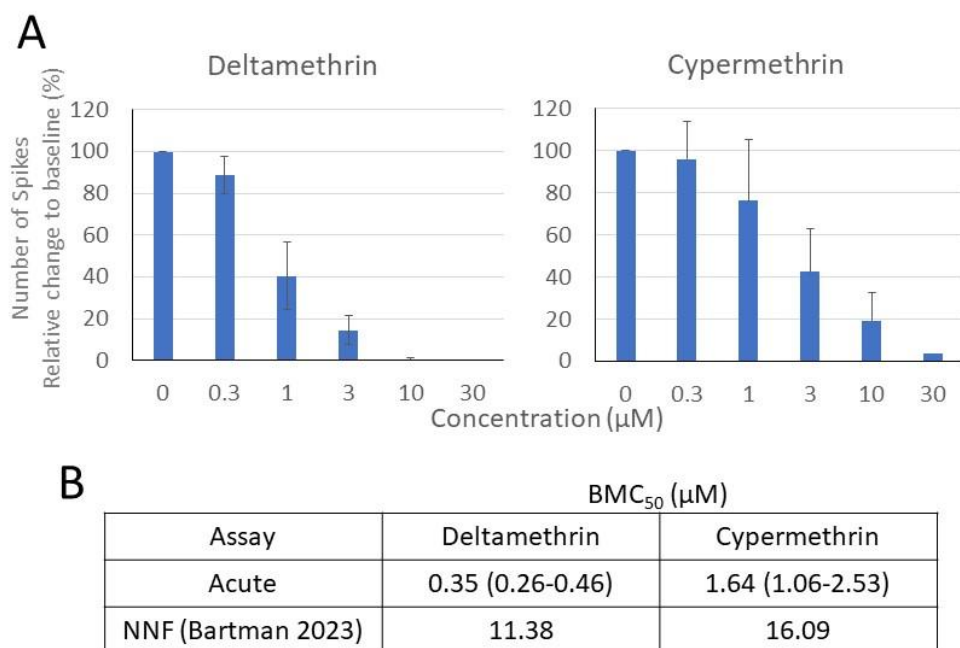


Fig.5 ピレスロイド系農薬 2 剤の急性(Acute)曝露による神経毒性評価。

A. Deltamethrin、Cypermethrin を 5 段階で累積投与し、各濃度での全スパイク数(Number of Spikes)を MEA により計測した。横軸は培地中の Deltamethrin、Cypermethrin の濃度を示す。縦軸は DMSO 不添加(0%)を 100%とした全スパイク数の相対値を示す。データは平均値±標準偏差を示す。N=7 (Deltamethrin)、10 (Cypermethrin)。

B. BMDS 3.3.2 ソフトウェア (米国 EPA) により半量阻害ベンチマーク濃度(BMC₅₀)を算出した (Acute の欄)。カッコ内は 95%信頼区間を示す。「NNF(Bartman 2023)」は同種のヒト iPS 細胞由来神経細胞を使用した慢性投与実験 Neural Network Forming (NNF)アッセイにより算出された BMC₅₀を示す。

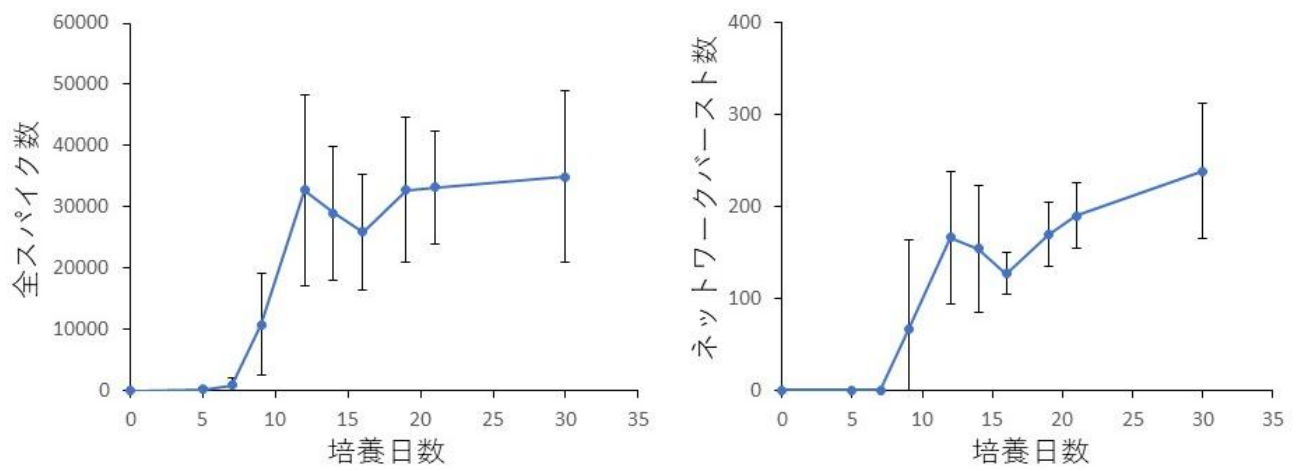


Fig.6 Maestro MEA システムによるラット神経細胞のネットワーク活動の経時変化

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±標準偏差を示す。

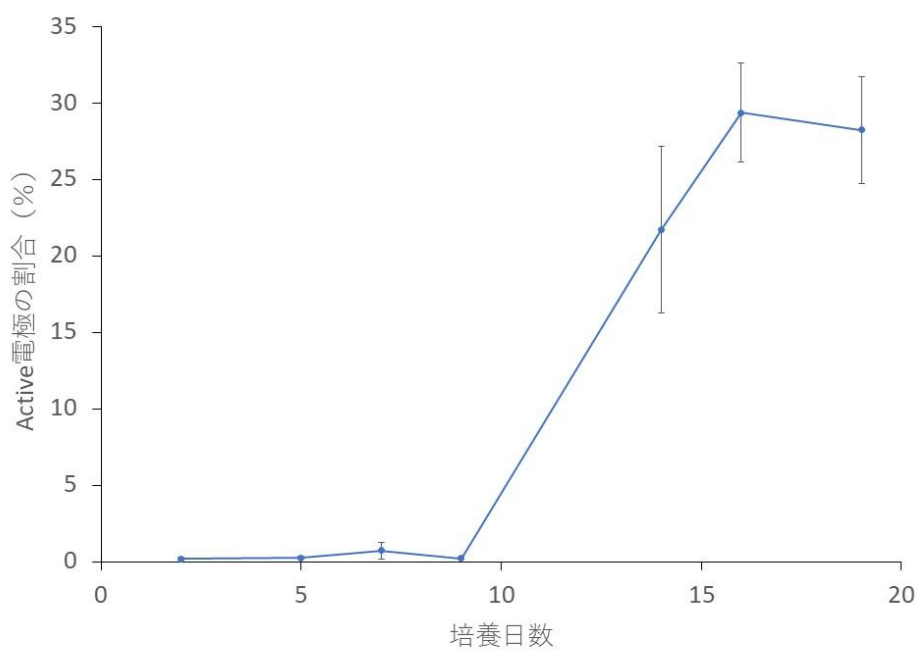


Fig.7 MaxOne MEA システムによるラット神経細胞のネットワーク活動の経時変化

多点電極 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±標準偏差を示す。

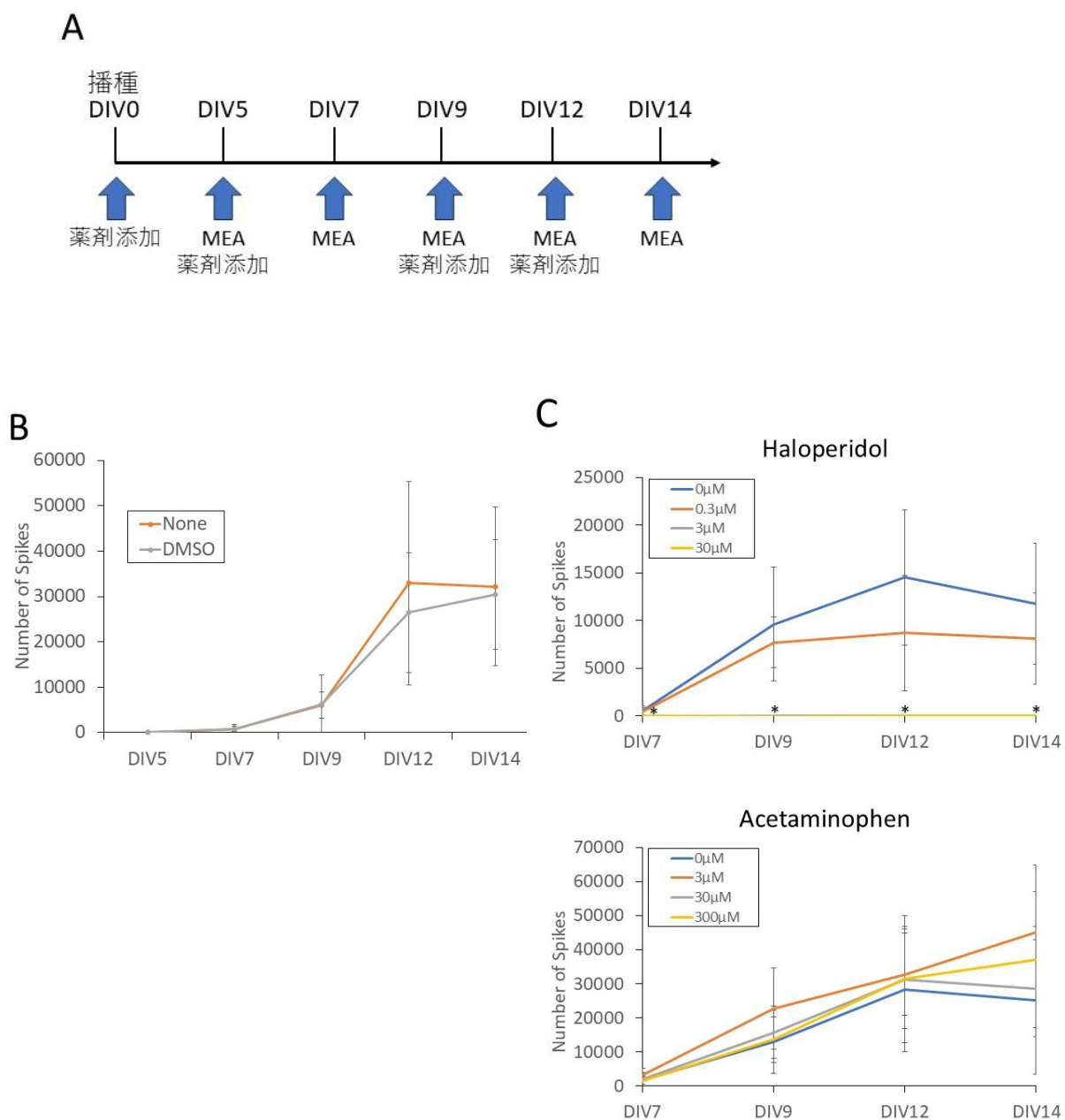


Fig.8 薬剤慢性曝露によるラット神経細胞活動の変化

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 3μM 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。

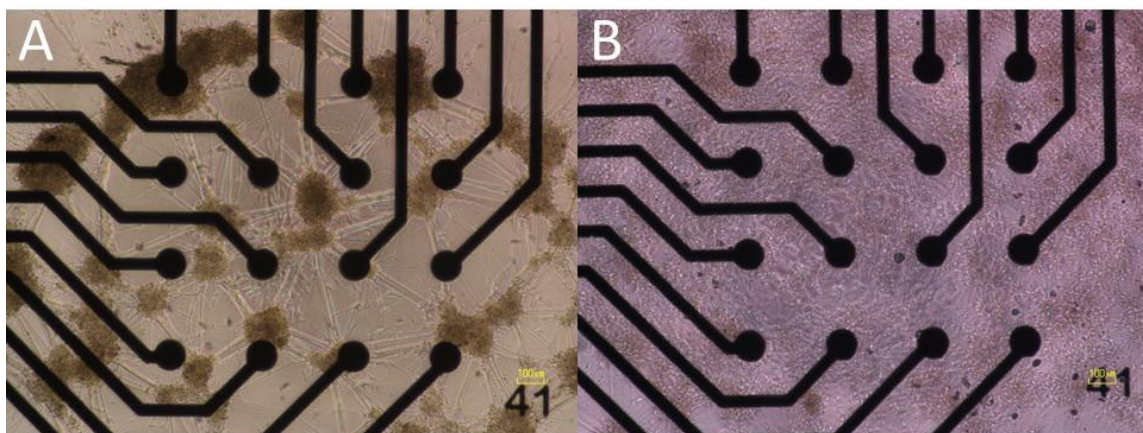


Fig.9 iCell glutaneuron、astrocyte 混合培養のプロトコル整備

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

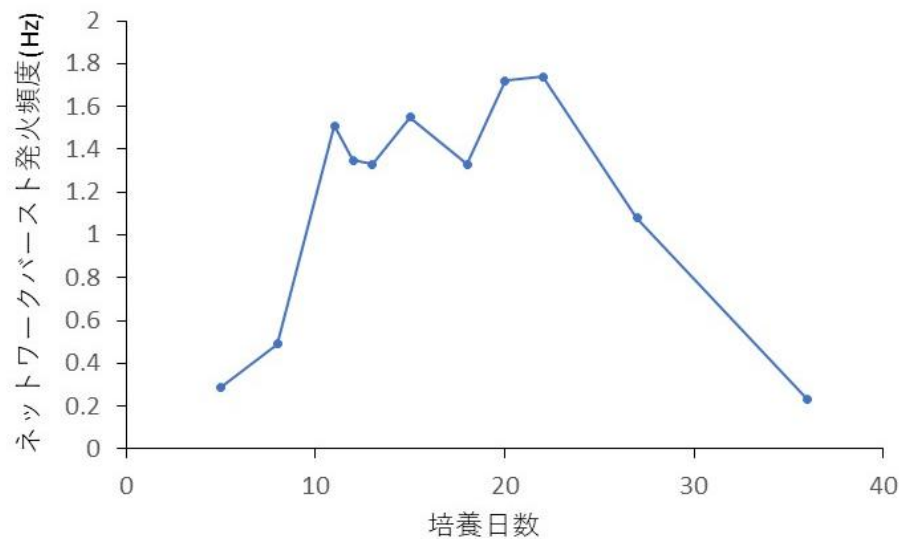


Fig.10 MaxOne によるヒト iPS 細胞由来脳オルガノイドの神経ネットワーク活動の計測

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 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。