

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：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、MEA上に培養したヒトiPS細胞から取得したバースト関連パラメータを用いたone-class SVM (support-vector machine) モデル、および、NN (neural network) モデルを構築し、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。SVMモデルは、5種類の陽性化合物中3種類の化合物、および8種類の農薬中7種類の化合物のリスクを検出可能であり、すべての化合物の濃度依存的なリスク上昇を検出できたことから、毒性リスク予測手法としての可能性を秘めていると考えられる。偽陽性のリスクを考慮する必要があるが、予測モデルに学習させるパラメータを検討することで、予測精度の向上が期待できる結果が得られた。バースト関連パラメータを用いた毒性予測NNモデルではSVMモデルを上回る精度で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（SVMモデル、NNモデル）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

Human iPSC-derived cortical neurons (Neucyte Inc.) あるいは、iCell Glutaneurons (FUJIFILM Cellular Dynamics Inc.) を24-well MEAプレートおよび48-well MEAプレート上に培養し、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。

SVMモデルの検討として、薬剤は5つの痙攣陽性化合物と4つの陰性化合物および8つの農薬を使用した。痙攣陽性化合物として、4-AP, Kainic Acid, Pilocarpine, Picrotoxin, PTZ, 陰性化合物として、Acetaminophen, Amoxicilline, Aspirin, 農薬として、Cypermethrin, Deltamethrin, Dieldrin, Fenamidone, Lindane, Permethrin, Acetamiprid, Aldicarbを使用した。NNモデルの1回目の検討として、薬剤は12種類の農薬関連化合物と4つの陰性化合物を使用した。農薬関連化合物は、Cypermethrin, Deltamethrin, Permethrin, Dieldrin, Fenamidone, Fipronil, Lindane, Permethrin, Acetamiprid, Aldicarb, Carbaryl, Clothianidinを使用した。陰性対照化合物として、Acetaminophen, Amoxicilline, Aspirinを使用した。NNモデルの2回目の検討として、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, Deltamethrin, 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。SVMモデルには、バースト内発火数、バースト内の最大発火周波数、最大発火周波数の変動係数、最大発火周波数間隔の変動係数を使用した。1回目のNNモデルには、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を使用し、2回目のNNモデルには、①～⑯の全てのパラメータを使用した。

それぞれのパラメータAIは、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・農薬・痙攣陽性化合物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、未学習wellのデータに対して、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

1. SVMモデルの検討

作製したSVMモデルの痙攣陽性化合物と痙攣陰性化合物の予測結果を図1に示す。リスクスコアは、陰性化合物データの外れ値($p \leq 0.05$)からの距離を示し、正のスコアは外れ値(毒性リスク)であること示している。作製したSVMは、陰性化合物を91%の精度で陰性と判定し、5つの陽性化合物のうち3化合物を毒性と判定した。また、毒性判定できなかったPilocarpineとPTZも用量依存的にリスクスコアの上昇がみられた。

次に、SVMモデルの農薬の予測結果を図2に示す。未学習のDMSOをすべて陰性と判定した。8種類の農薬の内、7種類を毒性と判定した。また、毒性判定できなかったAldicarbも用量依存的にリスクスコアの上昇がみられた。

2. NNモデルの検討 (1回目)

作成した毒性予測AIモデルによる学習データのROC曲線を図3に示す。ROC曲線のAUCは0.91であり、学習した化合物の毒性判定を高い精度で実現していることが示された。学習データに対する判定精度が最も高くなるpositive score = 0.585を毒性判定閾値として決定した。作成した毒性予測AIモデルによる未学習wellに対する毒性判定結果を図4、図5に示す。前述のとおり、positive score = 0.585を毒性判定閾値として使用すると、すべての陰性対照化合物で低濃度から高濃度にかけて毒性は検出されず、正しく陰性判定することができた。農薬関連化合物については、Acetamiprid, Aldicarb, Carbaryl, Cypermethrin, Deltamethrin, Dieldrin, Fenamidone, Lindane, Permethrinで濃度依存的に毒性判定された。Clothianidin, Fipronilは毒性判定されず、Tributyltinは低濃度から同期バーストが消失した為、毒性判定を実施できなかった。

毒性予測AIモデルによる毒性判定結果表を図6に示す。前述のClothianidin, Fipronilではいずれの濃度においても毒性判定されなかったものの、その他の化合物では、同期バースト発火の消失も毒性とみなすことで濃度依存的に毒性判定されていることが示された。結果として、陰性対照化合物4種類および、農薬関連化合物12種類の合計16化合物中14化合物を正しく毒性予測することができた。

2. NNモデルの検討 (2回目)

2回目の検討では、使用する細胞、パラメータの種類、化学物質の種類を拡充し、NNモデルの適応可能な範囲

を検討した。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7)。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8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9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を用いたone-class SVMでは、陽性化合物と陰性化合物のリスク評価は達成されたが、AmoxicillineとAspirinの一部濃度は陽性と判定された。さらに、Pilocarpine, PTZの毒性リスクは検出できなかった。しかし、陽性化合物のリスクスコアは濃度依存的に増加し、農薬の毒性リスクも検出できたことから、毒性リスク予測手法としての可能性を秘めていると考えられる。ただし、陰性化合物の一部は陽性と判定されたため、偽陽性のリスクを考慮する必要がある。今回の検証では4つのバースト関連パラメータのみを使用した。パラメータ数を増やすことで予測精度が向上する可能性があると考えられる。

バースト関連パラメータを用いた毒性予測NNモデルでは、16化合物中14化合物を正しく毒性予測することができた。この検証では9つのバースト関連パラメータのみを使用した。パラメータ数を増やすことで予測精度が向上する可能性がある。

続けて実施した2回目の毒性予測NNモデルでは、13化合物の毒性を予測することができた。1回目の検証では9つのバースト関連パラメータのみを使用した。2回目の検証では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は入力が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がる。今後MEAデータ以外の評価系パラメータを含有した統合的な毒性評価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有した統合的な毒性評価AIの構築に期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

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, Volume 93, 105668, 2023

2. 学会発表

1. 鈴木郁郎, ヒトiPS神経のMEA計測による化合物毒性リスク予測, 情報計算法学生物学会 (CBI学会) 2022年大会
2. 鈴木郁郎, In vitro神経活動に基づいた化学物質の神経毒性評価, シンポジウム「発達神経毒性の現状と今後の課題」第35回日本動物実験代替法学会
3. 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電気活動を指標とした化合物の毒性

リスク評価法の検討, 第13回スクリーニング学研究会

4. Yuto Ishibashi, Nami Nagafuku, Ikuro Suzuki, Toxicity risk assessment method for compounds using human iPS cell-derived neurons, Neuroscience 2022

5. 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

6. 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

7. 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

8. 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

3. 総説

1. 鈴木郁郎, 「ヒトiPS神経の電気活動に基づいた化合物の毒性及び作用機序予測」 谷本学校 毒性質問箱 第24号, 2022, 20-31

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

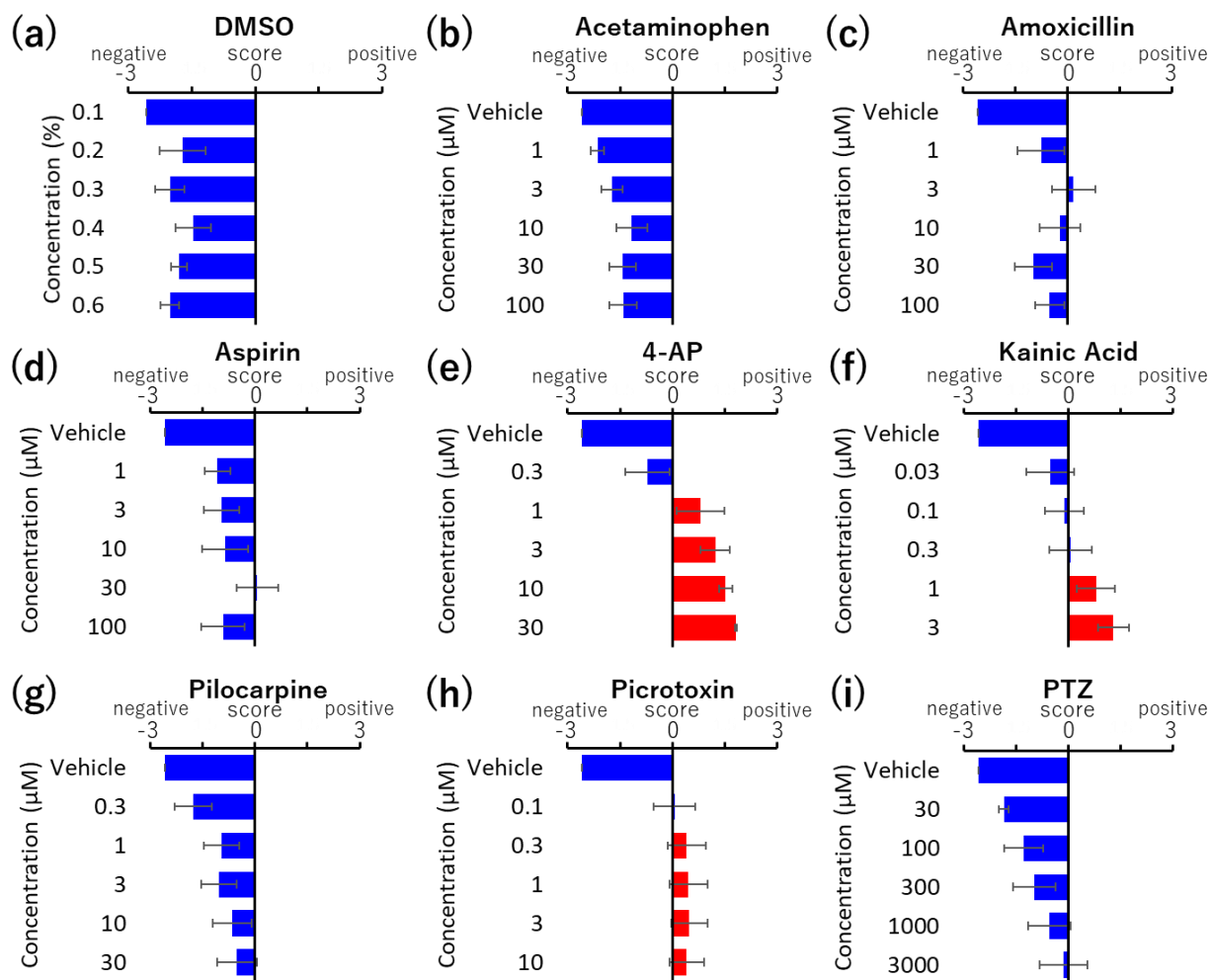


図 1. バースト関連パラメータ SVM による陽性化合物の毒性リスク予測
 (a) DMSO, (b) Acetaminophen, (c) Amoxicillin, (d) Aspirin, (e) 4-AP, (f) Kainic Acid, (g) Pilocarpine, (h) Picrotoxin, (i) PTZ. 青色：陰性判定された濃度、赤色：毒性判定された濃度

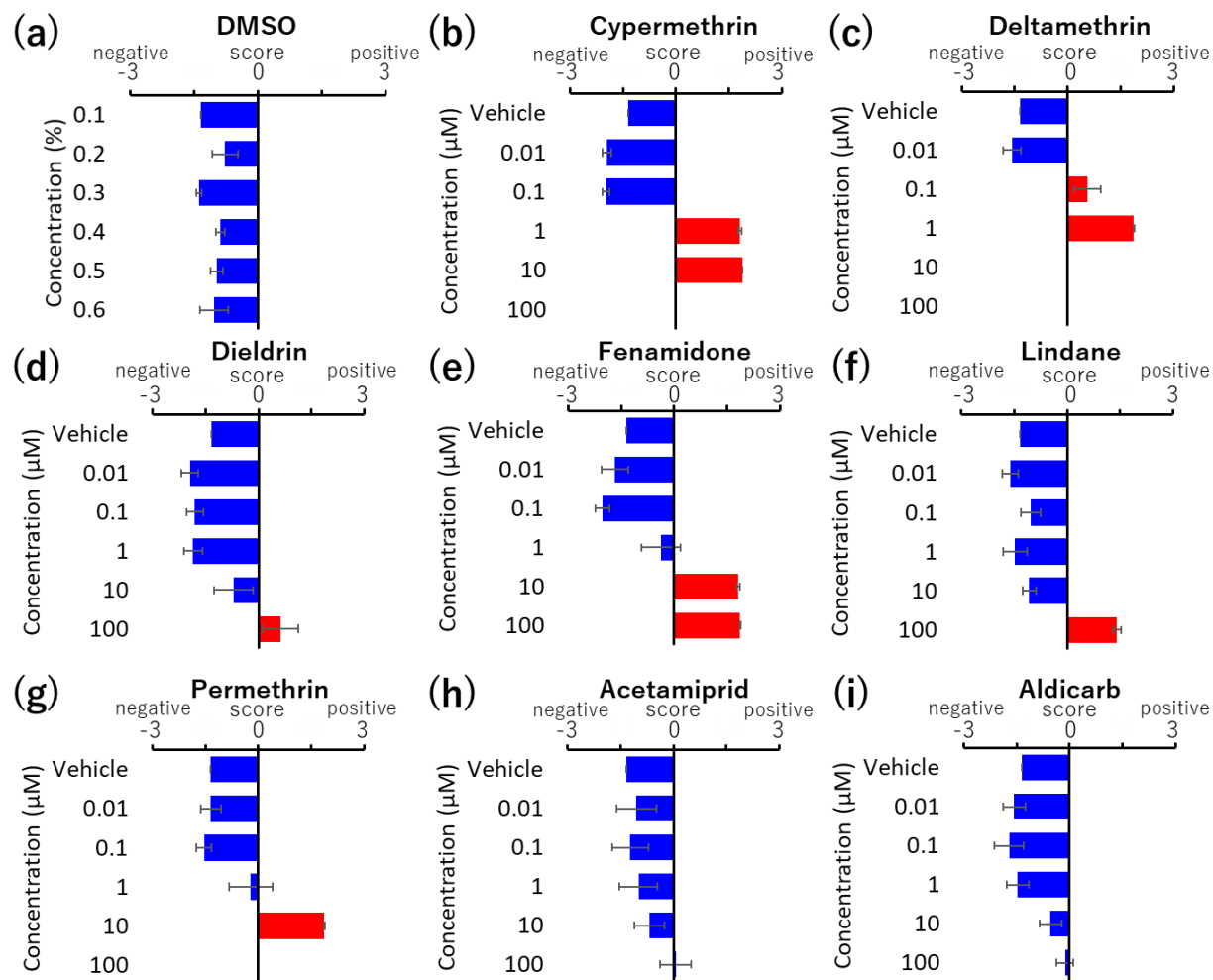


図 2. バースト関連パラメータ SVM による農薬の毒性リスク予測

(a) DMSO, (b) Cypermethrin, (c) Deltamethrin, (d) Dieldrin, (e) Fenamidone, (f) Lindane, (g) Permethrin, (h) Acetamiprid, (i) Aldicarb. 青色：陰性判定された濃度、赤色：毒性判定された濃度

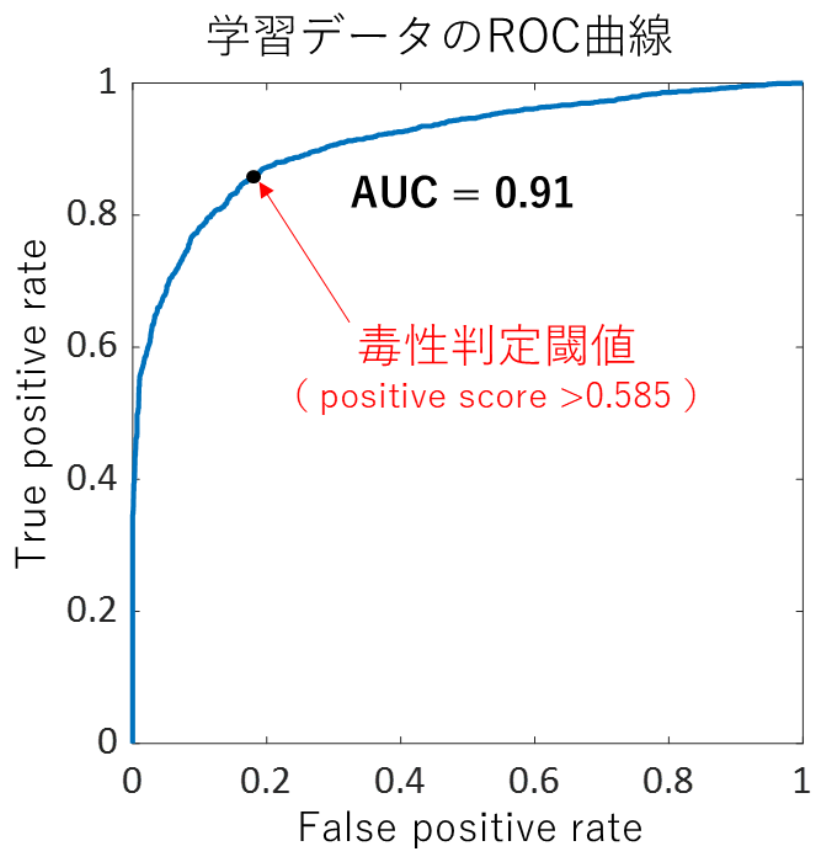
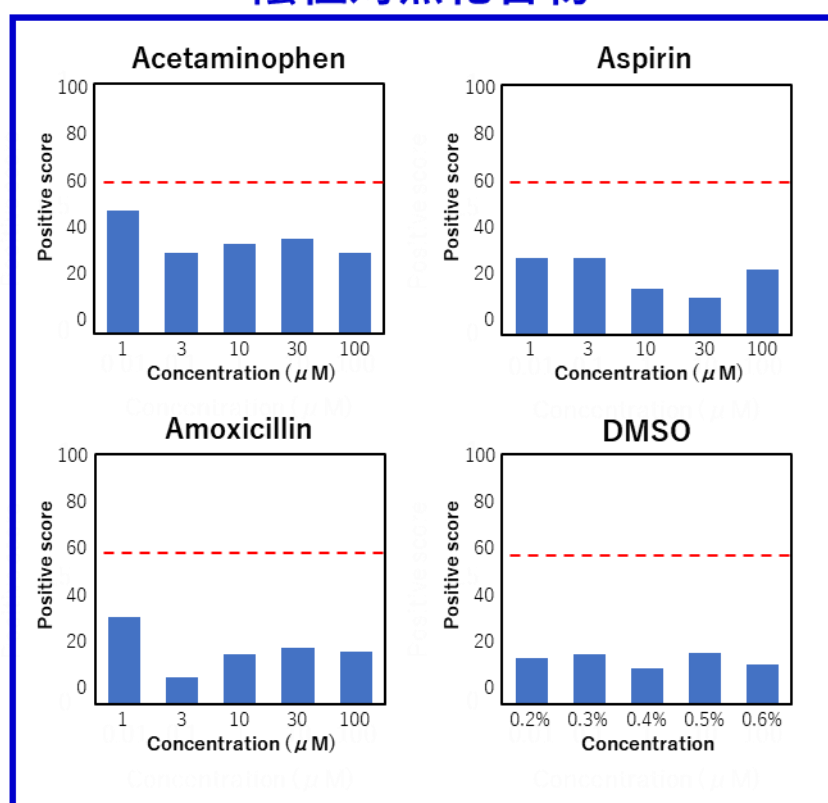


図 3. 毒性予測 AI モデルによる学習データの ROC 曲線
学習データに対する判定精度が最も高くなる positive score = 0.585 を毒性判定閾値として決定した。

陰性対照化合物



--- : 毒性ライン

図 4. 毒性予測 AI モデルによる陰性対照化合物に対する毒性判定結果

Positive score = 0.585 を毒性判定閾値として使用した。すべての陰性対照化合物で低濃度から高濃度にかけて毒性は検出されず、正しく陰性判定された。

農薬関連化合物

--- : 毒性ライン

※ : バースト消失

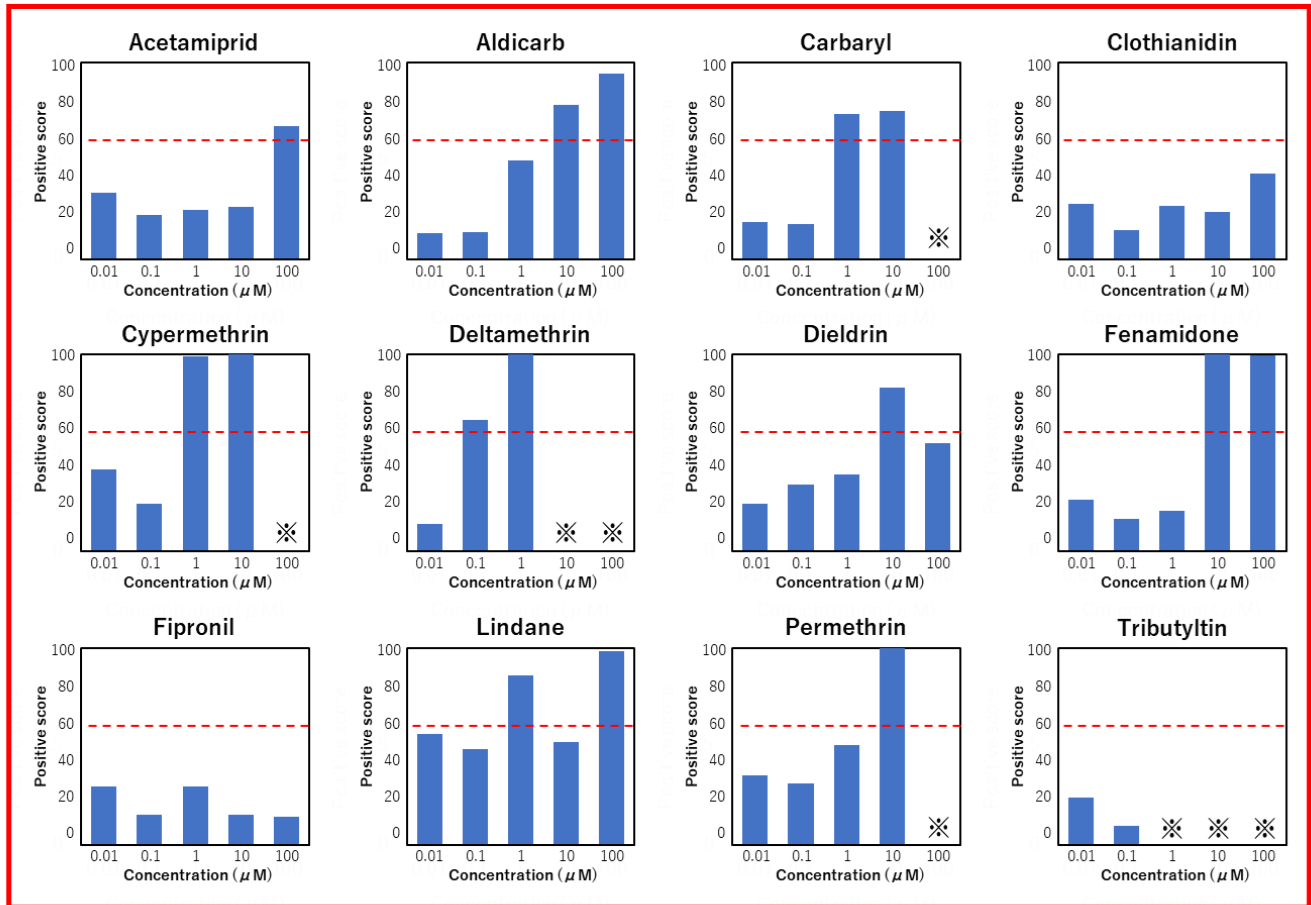


図 5. 毒性予測 AI モデルによる農薬関連化合物に対する毒性判定結果

Positive score = 0.585 を毒性判定閾値として使用した。Acetamiprid, Aldicarb, Carbaryl, Cypermethrin, Deltamethrin, Dieldrin, Fenamidone, Lindane, Permethrin で濃度依存的に毒性判定された。Clothianidin, Fipronil は毒性判定されず、Tributyltin は低濃度から同期バーストが消失した。

	Concentration (μM)				
	0	0.1	1	10	100
Acetamiprid					
Clothianidin					
Aldicarb					
Carbaryl					—
Fipronil					
Deildrim					
Lindane					
Cypermethrin					—
Deltamethrin				—	—
Permethrin					—
Tributyltin			—	—	—
Fenamidone					

■ 毒性なし ■ 毒性あり
■ 同期バースト消失

図 6. 毒性予測 AI モデルによる毒性判定結果

陰性対照化合物 4 種類および、農薬関連化合物 12 種類の合計 16 化合物中 14 化合物が正しく毒性予測された。

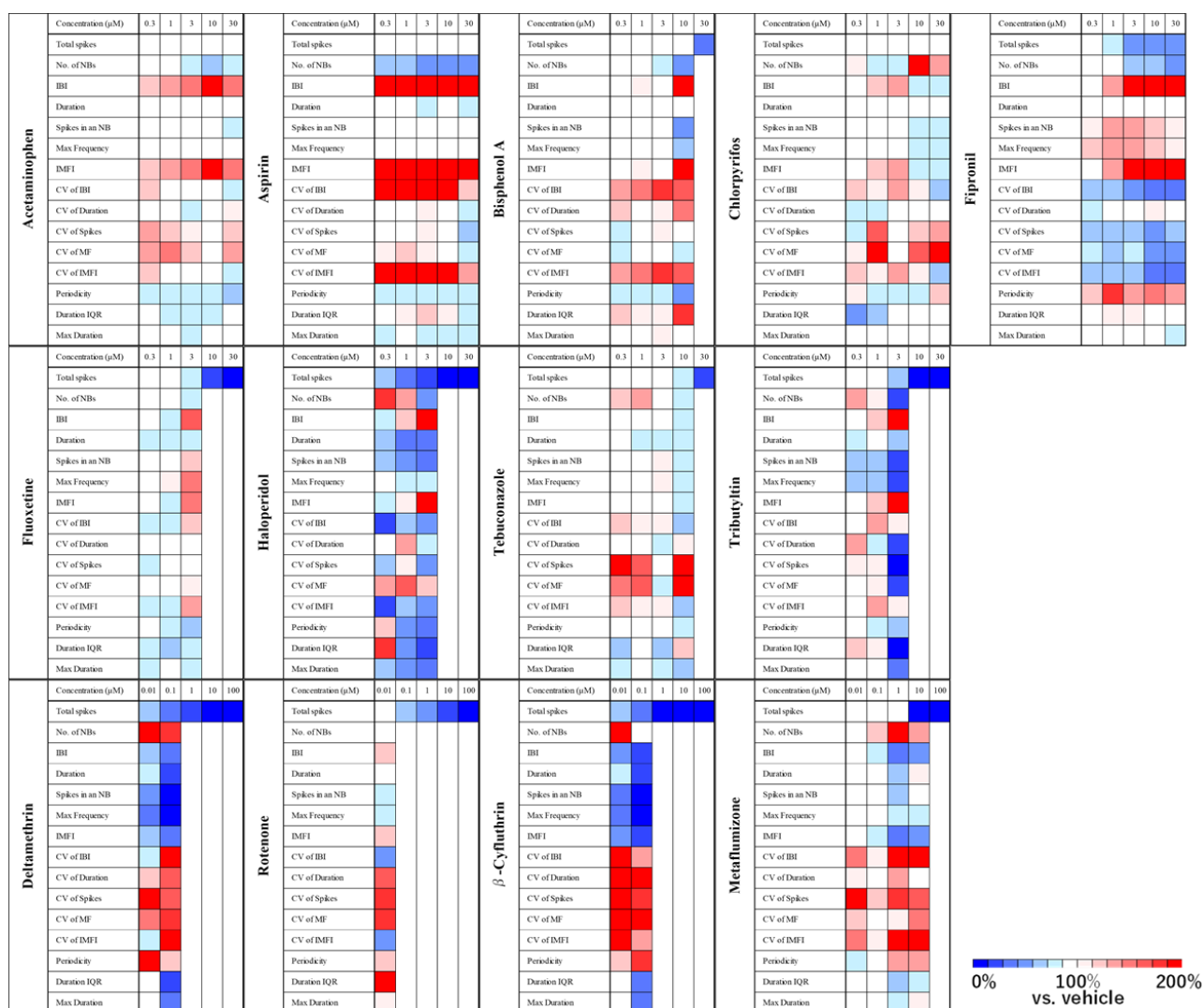


図7. 化学物質および陰性対照化合物による神経活動パラメータのヒートマップ

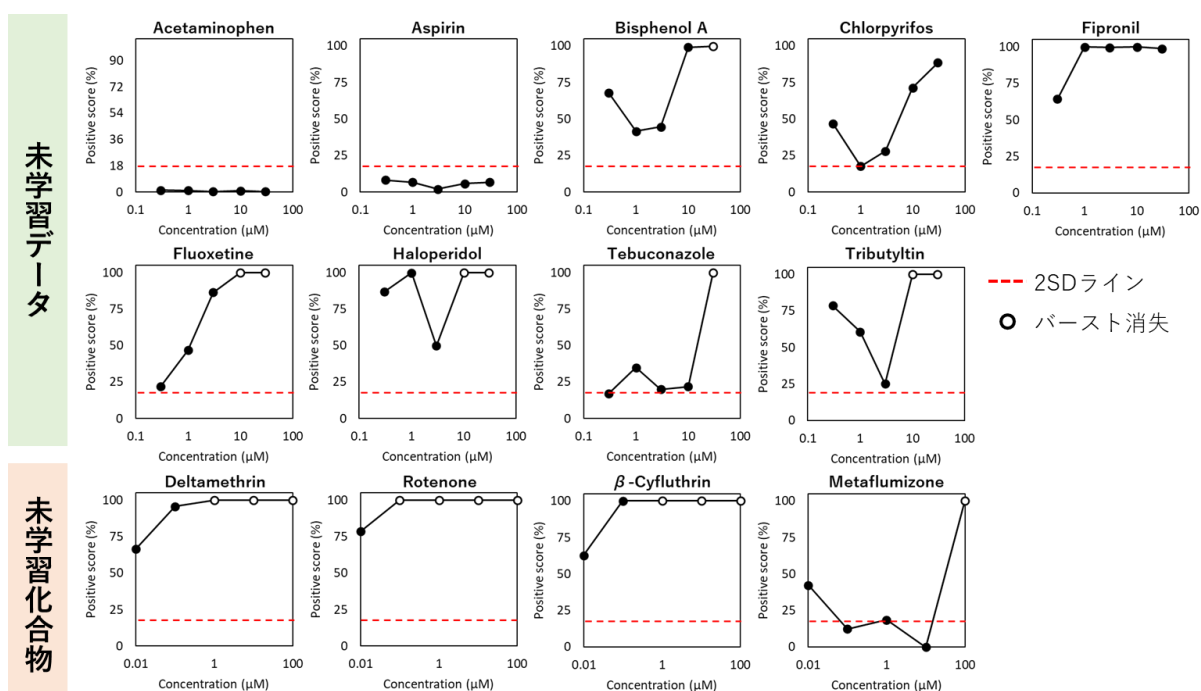


図8. 毒性予測AIモデルによる未学習データおよび未学習化合物に対する毒性スコア

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

Low risk
 Medium risk
 High risk
 disappearance of NB

図9. 毒性予測AIモデルによる毒性判定結果