

令和 6 年度

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

バイタルサインの統合的評価による急性毒性試験の判定基準策定と代替法に資する研究
-診断学と AI による致死性予測と人道的エンドポイントの設定-(22KD1004)

分担研究報告書

分担研究課題 脳波解析による神経毒性予測

研究分担者 鈴木郁郎 東北工業大学工学部

研究要旨

本研究では、化合物を動物に投与した際に測定されたバイタルサインの総合的評価と致死性予測を可能とする解析手法の構築を目的として、二層カーボンナノチューブ(Double-Walled Carbon Nanotube: DWCNT)を基にした CNT ヤーン(Siddarmark LLC)を用いたラット脳波測定データから、化合物投与による脳波信号の変化を捉えるための解析手法を検討した。FFT(Fast Fourier Transform)による PSD(Power Spectral Density)を算出し、PSD のピーク値および、ピーク周波数を定量化することで被験物質投与による脳波信号の変化を評価した。また、脳波データに対してバースト解析を実施する独自の解析手法(特許第 7138995 号)を用いることで、脳波データから神経活動信号に関する複数の解析パラメータを算出し、被験物質に対する脳波信号の周波数依存的な変化を評価した。さらに、前年度の研究で課題となった麻酔下と覚醒下での影響についても検討した。本研究で検討した FFT の PSD による脳波解析および、脳波データのバースト解析を用いることで、CNT ヤーンによる脳波測定データにおける化合物投与時の脳波変化を捉えられることが確認された。また、麻酔下と覚醒下における脳波解析への影響も明らかにした。本解析手法は化合物を動物に投与した際のバイタルサインの総合的評価と致死性予測を可能とする解析手法の基盤としての活用期待できる。

A. 研究目的

本研究では、化合物を動物に投与した際に測定されたバイタルサインの総合的評価と致死性予測を可能とする解析手法の構築を目的とした。二層カーボンナノチューブ(Double-Walled Carbon Nanotube: DWCNT)を基にした CNT ヤーン(Siddarmark LLC)を用いたラット脳波測定データから、化合物投与による脳波信号の変化を捉えるための解析手法および、麻酔下と覚醒下における脳波解析への影響を検討した。

B. 研究方法

二層カーボンナノチューブを基にした CNT ヤーン(CNT-Y)を用いて計測された、雌性ヘアレスラット(HWY/Slc)の脳波測定データの解析を実施した。被験

物質としてアミトリプチリン塩酸塩および、ニコチンを使用し、ラットへの投与前後の脳波データを用いた。

脳波データは、被験物質投与前、投与後および麻酔下、覚醒下等の Section で分割し、FFT(Fast Fourier Transform)による PSD(Power Spectral Density: パワースペクトル密度)を各 Section で算出した。算出された PSD のピーク値および、ピーク周波数を定量化し、各 Section を比較することで被験物質投与および、麻酔の有無による脳波信号の変化を評価した。

また、脳波データに対してバースト解析を実施する独自の解析手法(特許第 7138995 号)を用いることで、脳波データから神経活動信号に関する複数の解析パラメータを算出した。これらの解析パラメータは複数の周波数帯域でそれぞれ算出可能なため、被験物質に対する脳波信号の周波数依存的な変化を評価することができ

る。

C. 研究結果

FFT の PSD による脳波解析

図 1 に Amitriptyline 5 mg/kg および、50 mg/kg 試験時の脳波波形に対する FFT の PSD を示す。Amitriptyline 5 mg/kg 試験は 2 検体で同様の試験を実施した。検体 1 について、投与前ではピーク値 0.118 V²/Hz、ピーク周波数 1 Hz、投与後ではピーク値 0.090 V²/Hz、ピーク周波数 1 Hz であった。検体 2 について、投与前ではピーク値 0.069 V²/Hz、ピーク周波数 3 Hz、投与後ではピーク値 0.079 V²/Hz、ピーク周波数 2 Hz であった。同様の試験ではあるが、投与前の時点で検体 1 と検体 2 の PSD には異なる特徴が観察され、検体の違いによる個体差が反映されることが判明した。各検体で被験物質投与による変化を評価した場合にも、検体 1 ではピーク値が減少するのに対して、検体 2 ではピーク値が増加し、共通の変化が得られなかったことから、覚醒下での脳波測定では動物の行動等による影響の考慮が必要であることが示唆される。Amitriptyline 50 mg/kg 試験では、投与前後でピーク値は変化しなかったが、ピーク周波数が 1 Hz から 2 Hz にシフトした。

図 2 に Nicotine 1 mg/kg および、5 mg/kg 試験時の脳波波形に対する FFT の PSD を示す。1 mg/kg について、投与前ではピーク値 0.054 V²/Hz、ピーク周波数 2 Hz、投与後ではピーク値 0.047 V²/Hz、ピーク周波数 2 Hz であった。5 mg/kg について、投与前ではピーク値 0.053 V²/Hz、ピーク周波数 2 Hz、投与後ではピーク値 0.055 V²/Hz、ピーク周波数 2 Hz であった。Nicotine の投与では PSD のピーク値および、ピーク周波数に顕著な変化は観察されなかった。

図 3 に麻酔下および、それに続く麻酔中止後の脳波波形に対する FFT の PSD を示す。麻酔下ではピーク値 0.060 V²/Hz、ピーク周波数 2 Hz、麻酔中止後 0-1 min ではピーク値 0.089 V²/Hz、ピーク周波数 2 Hz、麻酔中止後 1-2 min ではピーク値 0.084 V²/Hz、ピーク周波数 2 Hz、麻酔中止後 2-3 min ではピーク値 0.056 V²/Hz、ピーク周波数 3 Hz であった。麻酔下と比較して麻酔中止直後に PSD のピーク値が約 1.5 倍に増加し、約 3 分後には麻酔下と同程度に戻ったことから、覚醒下の脳波測定では麻酔中止による影響の混入を避けるために、麻酔中止後から一定時間経過してからの測定が必要であることが示唆される。

脳波データのバースト解析

脳波データに対するバースト解析手法(特許第 7138995 号)を用いて、神経信号であるオシレーションおよび、高頻度神経活動であるバーストを検出し、それぞれの頻度(Oscillation rate、Burst rate)を算出した。脳波信号はバンドパスフィルタにより、 θ 波帯域(5-8 Hz)、 α 波帯域(8-14 Hz)、 β 波帯域(15-25 Hz)、 γ 波帯域(30-50 Hz)、high- γ 波帯域(70-150 Hz)および、150-200 Hz に分割し、各周波数帯域でバースト解析を実施した。

Amitriptyline 5 mg/kg および、50 mg/kg 試験時のバースト解析の結果を図 4 に示す。検体による個体差はあるが、Amitriptyline 投与により、とくに β 波帯域以上で Oscillation rate、Burst rate ともに増加する傾向が観察された。50 mg/kg では 5 mg/kg と比較して変化は軽微であった。

Nicotine 1 mg/kg および、5 mg/kg 試験時のバースト解析の結果を図 5 に示す。1 mg/kg では Oscillation rate、Burst rate ともに変化が軽微であったのに対して、5 mg/kg では θ 、 α 波帯域の Burst rate を除いて、Oscillation rate、Burst rate ともに増加する傾向が観察された。

麻酔下および、それに続く麻酔中止後の脳波波形に対するバースト解析の結果を図 6 に示す。麻酔中止後から時間経過と共にすべての周波数帯域で Oscillation rate が減少する傾向が観察された。一方で、Burst rate は θ 、 α 、 β 波帯域で急激に増加した。

D. 考察

FFT の PSD による脳波解析について、同じ実験における検体の違いによる影響を検討した結果、異なる検体の個体差が FFT の PSD に反映されることが示唆された。また、Amitriptyline に対する応答の観点でも共通の特徴が得られなかったことから、覚醒下における脳波測定では動物の行動等による影響を考慮した評価が必要であることが示唆された。

麻酔下および、覚醒下における脳波解析への影響を検討した結果、麻酔中止直後に FFT の PSD が増加すること、および、麻酔中止後に Oscillation rate が減少し、Burst rate が急激に増加することが判明した。麻酔時と覚醒時で PSD のピーク値および、バースト解析の結果に差異があったことから、動物の状態を考慮した評価が必要であることが示唆された。

上記のような課題が示唆された一方で、各検体にお

ける被験物質投与による脳波信号の変化については、Amitriptyline によって β 波帯域以上で Oscillation rate、Burst rate とともに増加すること、Nicotine による Oscillation rate、Burst rate の増加が濃度依存的に観察されたことから、化合物投与による脳波信号の変化を捉えることが可能であった。

本研究により、麻酔下ではなく覚醒時の脳波測定においても化合物投与による脳波信号の変化を捉えることが可能であることが示された。覚醒下における脳波測定時の一般状態観察および、その他のバイタルサインを指標にして脳波データをラベリングすることで、上記課題が解決されると共に、活動状態に依存した脳波信号の評価が可能となる。

E. 結論

本研究で検討した FFT の PSD による脳波解析および、脳波データのバースト解析を用いることで、覚醒下における CNT-Y による脳波測定データから化合物投与時の脳波変化を捉えられることが確認された。本解析手法は化合物を動物に投与した際に測定されたバイタルサインの総合的評価と致死性予測を可能とする解析手法の基盤としての活用期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Y. Ishibashi, N Nagafuku, S Kimura, X Han, I Suzuki, Development of an evaluation method for addictive compounds based on electrical activity of human iPS cell-derived dopaminergic neurons using microelectrode array, *Addiction Biology*. 29:e13443, 2024

X. Han, N. Matsuda, M. Yamanaka, I Suzuki, Development of a Novel Microphysiological System for Peripheral Neurotoxicity Prediction Using Human iPSC-Derived Neurons with Morphological Deep Learning, *Toxics*, 12(11), 809, 2024

2. 学会発表

Nami Nagafuku, Naoki Matsuda, Yuto Ishibashi, Ikuro Suzuki, “Enhanced Cardiotoxicity Assessment through Propagation Pattern

Analysis Using HD-CMOS-MEA in hiPSC-Derived Cardiomyocytes”, 2024 SPS Annual Meeting, 22-25 September, 2024, San Diego, USA

Xiaobo Han, Naoki Matsuda, Kazuki Matsuda, Makoto Yamanaka, Ikuro Suzuki, “Predicting Peripheral Neurotoxicity on Soma or Axon through Morphological Deep Learning and Electrical Measurements Using an In Vitro Microphysiological System”, MPS World Summit 2024, June, 10-14, 2024, Seattle, USA

Ikuro Suzuki, Xiaobo Han, Kazuki Matsuda, Naoki Matsuda, Makoto Yamanaka, “In vitro analysis of drug-induced neuron degeneration by morphological deep learning on a novel microphysiological system”, FENS forum 2024, June, 25-29, 2024, Vienna, Austria

Xiaobo Han, Naoki Matsuda, Makoto Yamanaka, Ikuro Suzuki, “Development of an in vitro assessment platform for drug-induced neuron degeneration based on morphological deep learning using cultured neurons in a microphysiological system”, *Neuroscience* 2024, October, 5-9, 2024, Chicago, USA

Y. ISHIBASHI, X. HAN, N. NAGAFUKU, N. MATSUDA, I. SUZUKI, “Functional analysis of synaptic network and single neuron in human iPSC cell-derived neurons using HD-CMOS-MEA”, *Neuroscience* 2024, October, 5-9, 2024, Chicago, USA

鈴木郁郎、ヒト iPS 由来神経細胞およびアストロサイトを用いた in vitro 痙攣毒性予測と作用機序予測、第 51 回日本毒性学会学術年会、2024 年 7 月 4 日、福岡

Nami NAGAFUKU, Naoki MATSUDA, Kazuki MATSUDA, Ikuro SUZUKI, “Cardiotoxicity evaluation method using HD-CMOS-MEA can predict drug action mechanism”, 第 51 回毒性学会学術年会、2024 年 7 月 3-5 日、福岡

Xiaobo Han, Naoki Matsuda, Chinatsu Suzuki, Makoto Yamanaka, Ikuro Suzuki, “In vitro analysis of drug-induced neuron degeneration by morphological deep learning on a novel microphysiological system”, 第 51 回毒性学会学術年会, 2024 年 7 月 3-5 日, 福岡

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 51 回毒性学会学術年会, 2024 年 7 月 3-5 日, 福岡

石橋 勇人, 韓 笑波, 永福 菜美, 松田 直毅, 鈴木 智夏, 鈴木 郁郎, “CMOS-MEA を用いた Field Potential Imaging によるヒト iPS 細胞由来神経ネットワークと単一ニューロンの機能解析”, 第 51 回毒性学会学術年会, 2024 年 7 月 3-5 日, 福岡

倉敷 秀明, 韓 笑波, 石橋 勇人, 鈴木 郁郎, “中枢神経系における薬物毒性評価のための神経細胞と星状膠細胞の信号分離”, 第 51 回毒性学会学術年会, 2024 年 7 月 3-5 日, 福岡

横井れみ, 永福菜美, 松田直毅, 石橋勇人, 鈴木郁郎, “平面微小電極アレイを用いたドラベ症候群脳オルガノイドにおける禁忌薬の評価”, 第 51 回毒性学会学術年会, 2024 年 7 月 3-5 日, 福岡

鈴木郁郎, 化合物評価における IVIVE への取り組み 鈴、LIFE2024、2024 年 9 月 13 日、東京

中村奈緒子, 帆足和希, 秋山翔太, 安田英莉, 松田直毅, 鈴木郁郎, 高木基樹, 岸田晶夫, 木村剛, 脱細胞化組織の組織学的評価への AI の応用、日本バイオマテリアル学会シンポジウム、2024 年 10 月 28-29 日、仙台

帆足和希, 松田直毅, 鈴木郁郎, 高木基樹, 岸田晶夫, 木村剛, 中村奈緒子, 脱細胞化組織模倣画像の導入による ECM 構造特徴マップの拡張、日本バイオマテリアル学会シンポジウム、2024 年 10 月 28-29 日、仙台

鈴木郁郎, 超精密神経活動計測と AI 解析による創薬応用、学振 R031 ハイブリッド量子ナノ技術委員会 第 18 回研究会、2024 年 11 月 1 日、東京

永福 菜美, 松田 直毅, 石橋 勇人, 鈴木 郁郎, “HD-CMOS MEA 計測による心毒性検出と作用機序予測法の構築”, 第 15 回スクリーニング学研究会, 2024 年 11 月 21 日, 東京

石橋 勇人, 永福 菜美, 久田 素, 鈴木 郁郎, “培養神経細胞の Ca オシレーション解析による発達神経毒性評価法の検討”, 第 15 回スクリーニング学研究会, 2024 年 11 月 21 日, 東京

Xiaobo Han, Naoki Matsuda, Makoto Yamanaka, Ikuro Suzuki, “A novel microphysiological system for assessment of drug-induced neuropathy using human iPSC-derived neurons with morphological deep learning”, 第 15 回スクリーニング学研究会, 2024 年 11 月 21 日, 東京

鈴木郁郎, in vitro MEA 試験による化合物の神経作用評価、第 41 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム、2024 年 11 月 25 日、仙台

鈴木郁郎, ヒト由来神経細胞を用いた NAMs や MPS の利活用と国際動向、第 47 回日本分子生物学会年会、2024 年 11 月 28 日、福岡

鈴木郁郎, in vitro 神経モデルを用いた化合物評価、日本動物実験代替法学会 第 37 回大会、2024 年 11 月 30 日、宇都宮

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

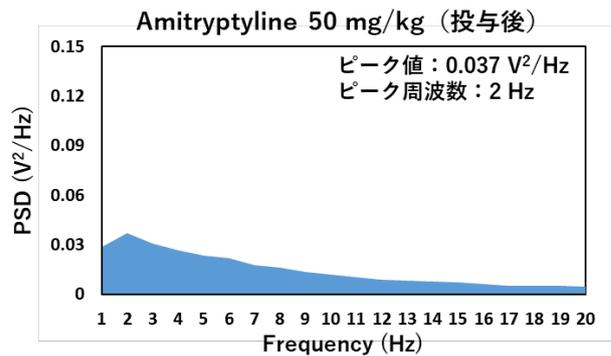
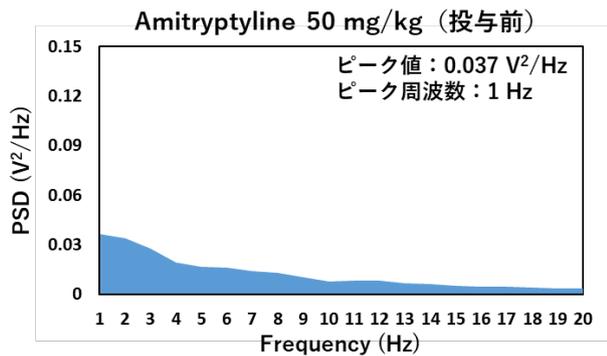
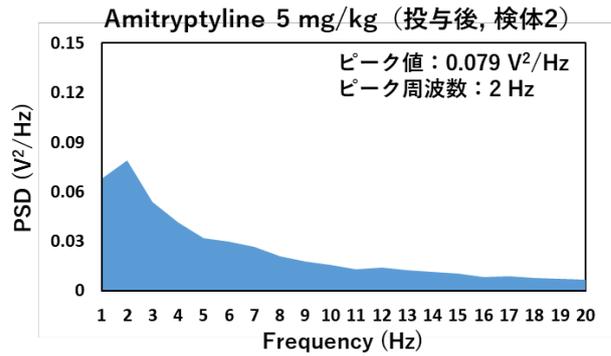
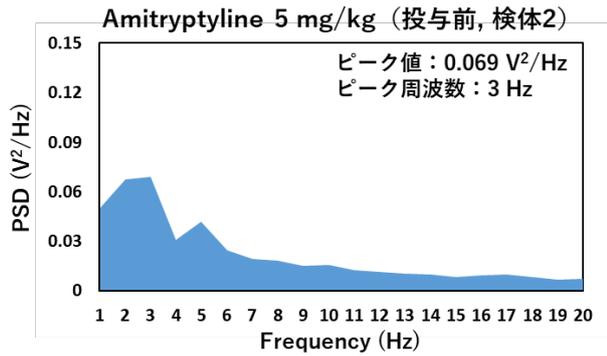
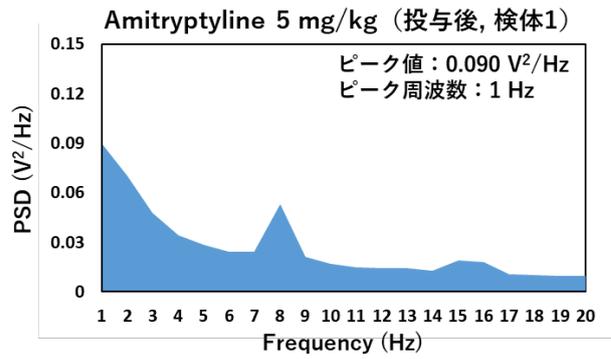
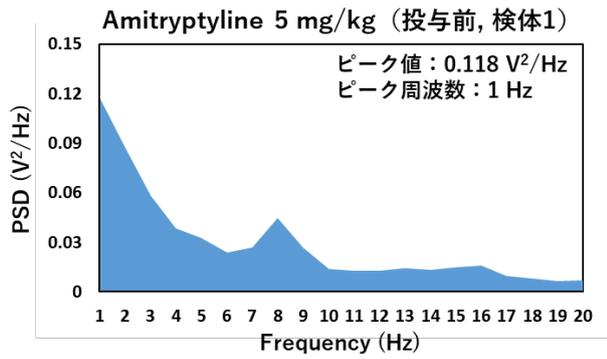


図1 Amitriptyline 試験時のFFTによるPSD

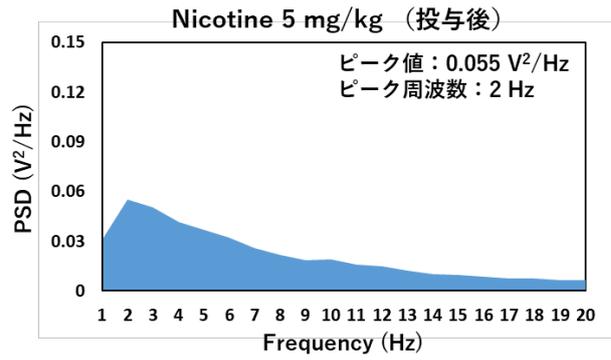
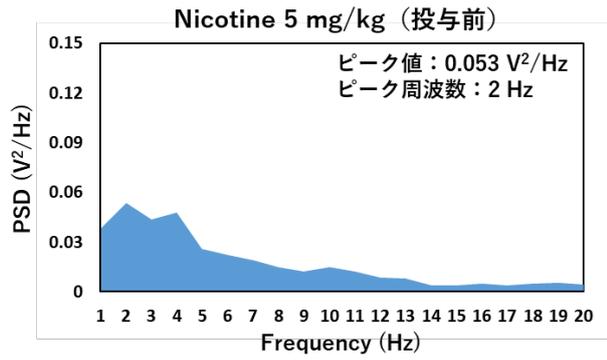
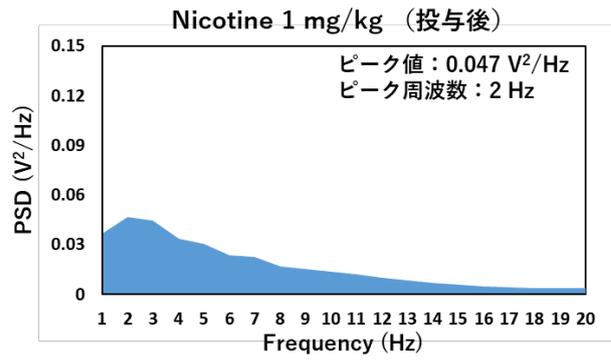
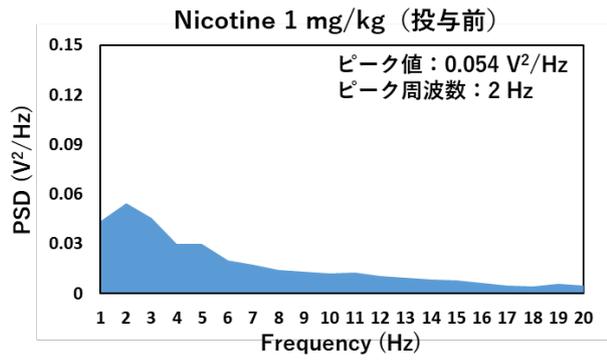


図2 Nicotine 試験時のFFTによるPSD

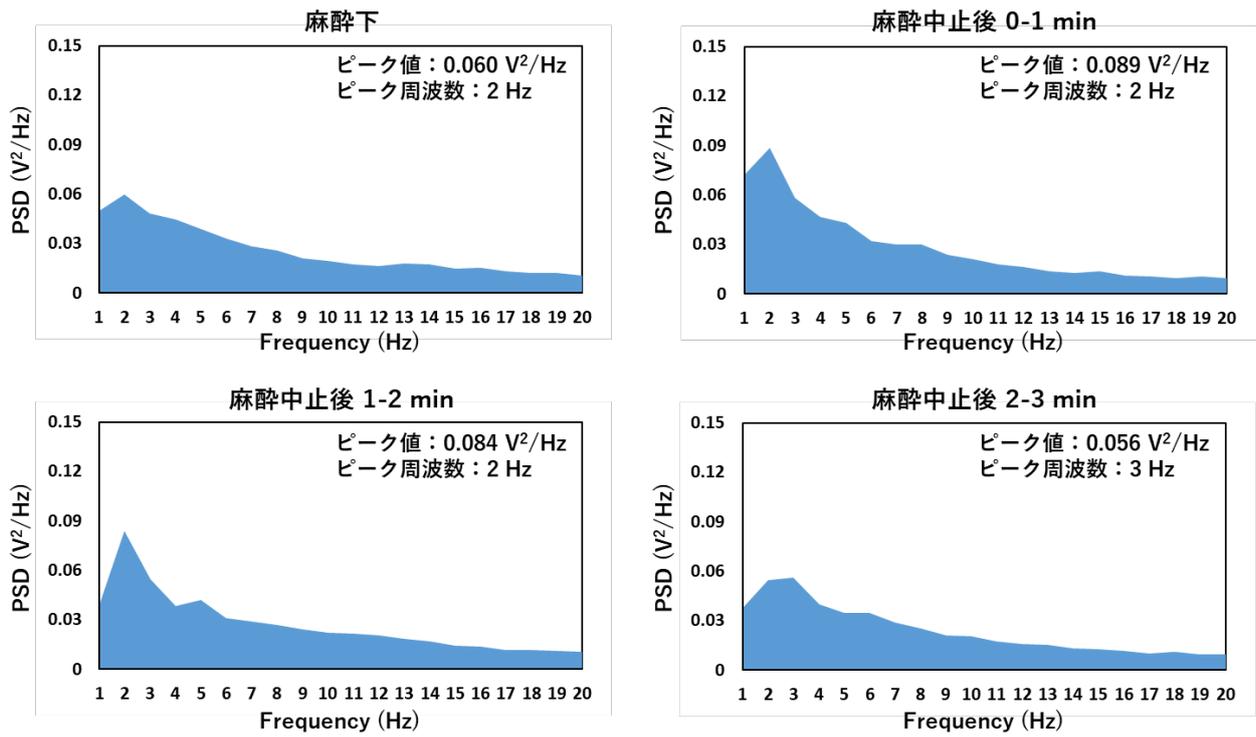
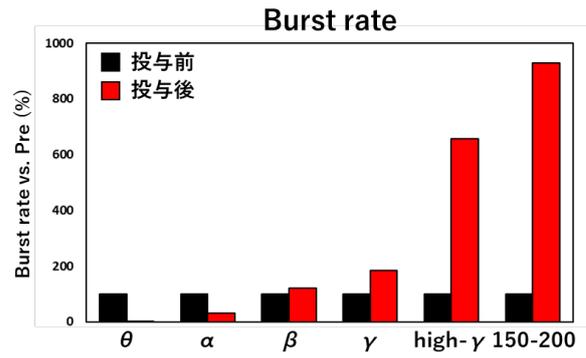
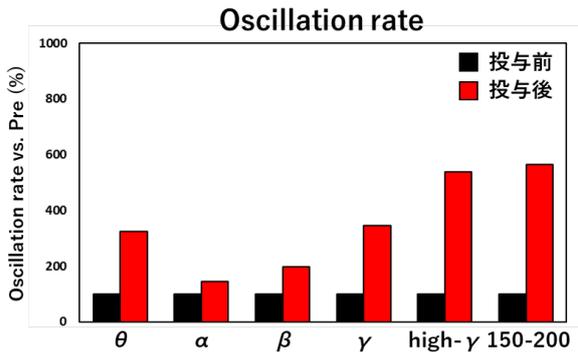
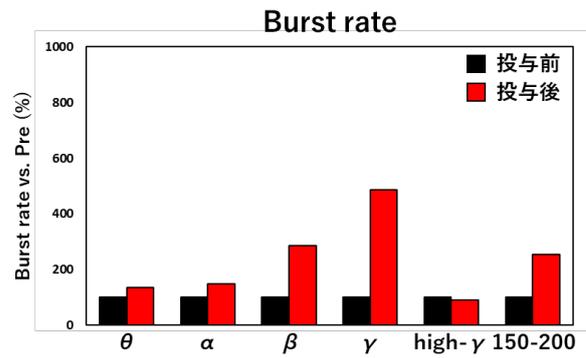
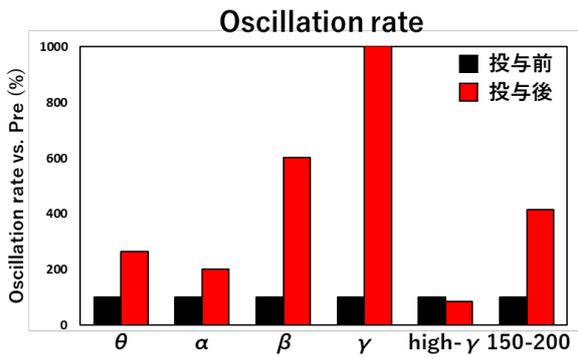


図3 麻醉下および麻醉中止後のFFTによるPSD

Amitriptyline 5 mg/kg (検体1)



Amitriptyline 5 mg/kg (検体2)



Amitriptyline 50 mg/kg

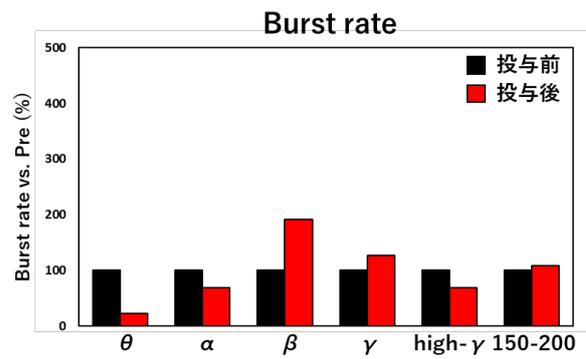
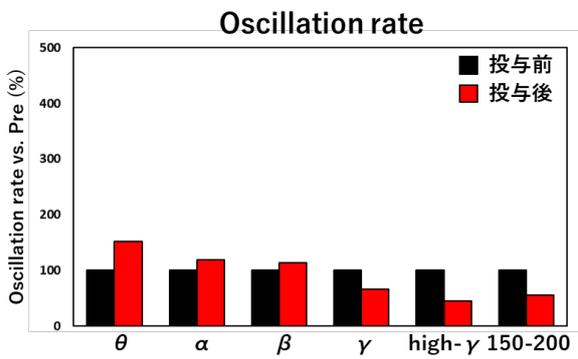
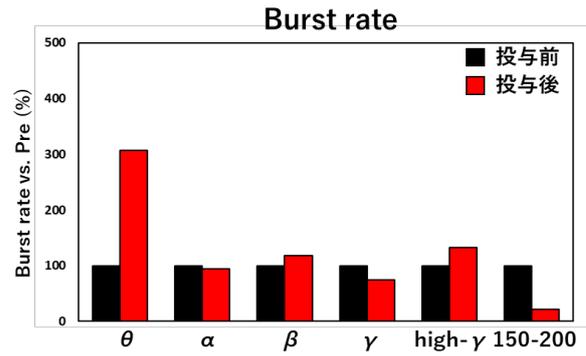
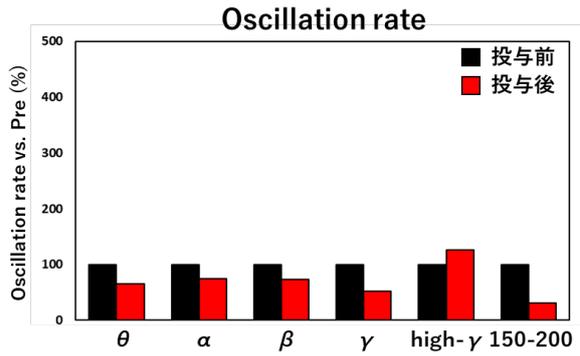


図4 Amitriptyline 試験時のOscillation rateおよびBurst rate

Nicotine 1 mg/kg



Nicotine 5 mg/kg

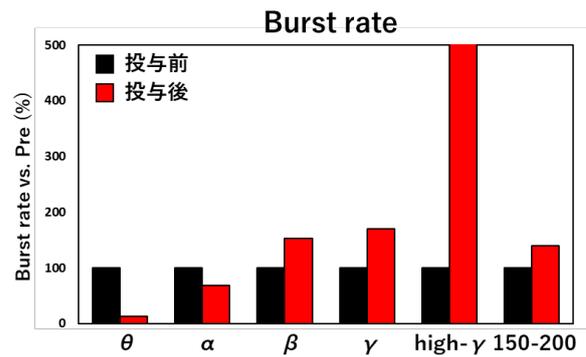
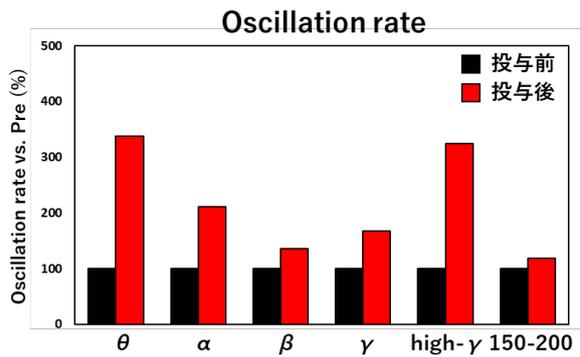


図14 Nicotine 試験時のOscillation rateおよびBurst rate

Asleep to Awake

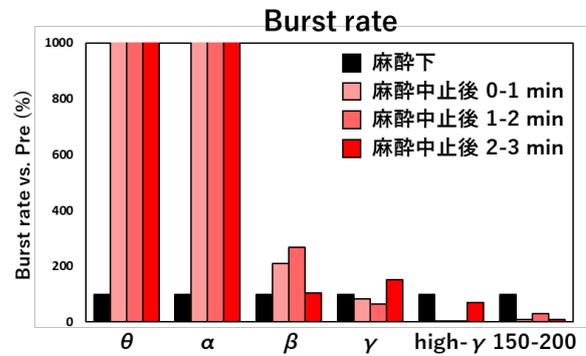
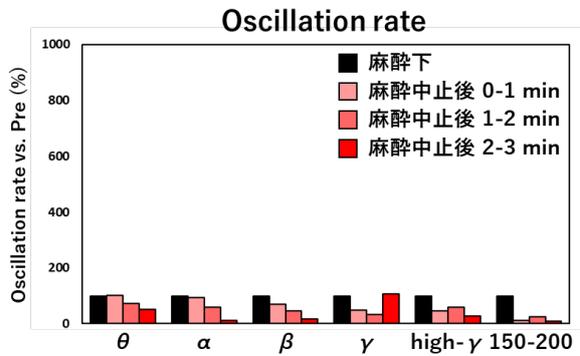


図15 麻醉下および麻醉中止後のOscillation rateおよびBurst rate