

令和4年度-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いる。本分担研究では、急性毒性に関連する神経毒性予測の高度化を目的とし、初年度となるR3年度にはヒトiPS細胞由来ニューロンを用いたMEA(多電極アレイ)計測による毒性リスク評価を実施した。痙攣陽性・陰性化合物を対象とした検証により、用量依存的なリスク推定が可能であり、従来の代替法で予測困難だった化合物に対しても評価可能であることが示された。R5～R6年度は、本研究班で独自に開発したCNTヤーンを表面電極として取得して、実際にラットを用いた動物実験により取得した脳波データを対象に、化合物投与による脳波変化の解析を行った。具体的には、FFTによるパワースペクトル密度(PSD)解析と、独自に開発したバースト解析(特許第7138995号)を組み合わせることで、周波数依存的な神経活動の変化を捉える手法を確立した。さらに、R6年度には、麻酔下および覚醒下での脳波解析への影響も検討し、実験条件による信号特性の違いを評価した。これらの成果は、バイタルサインの統合的解析と致死性予測のための基盤技術としての応用が期待される。

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ており、本分担研究では神経毒性予測に特化した研究を推進した。初年度となるR3年度にはヒトiPS細胞由来ニューロンを用いたMEA(多電極アレイ)計測による毒性リスク評価を実施し、2年目以降は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

本研究では、急性毒性における神経毒性予測を目的とし、ヒトiPS細胞由来ニューロンおよび動物から測定し

た脳波データを用いた解析手法を開発・検証した。R4年度は、ヒトiPS細胞から分化誘導したGlutamatergicおよびGABAergicニューロン、アストロサイトを共培養し、MEAプレートにて神経ネットワーク活動を計測した。痙攣陽性・陰性化合物や予測精度の低い化合物を用い、スパイク検出および独自の4-step法により同期バースト発火を評価し、13種のパラメータから毒性リスクを推定した。R5年度以降は、CNTヤーン電極を用いて雌性ヘアレスラットから脳波データを取得し、アミトリプチリン塩酸塩およびアトロピン、ニコチンを投与後の脳波変化を解析対象とした。脳波は被験物質投与前後でセクション分割し、FFTによるパワースペクトル密度(PSD)解析によりピーク値およびピーク周波数を定量化した。さらに、特許取得済みのバースト解析手法(特許第7138995号)を用いて、複数の周波数帯域ごとの神経活動パラメータを抽出し、薬剤に対する周波数依存的な脳波変化を評価した。R6年度には、麻酔下および覚醒

下の脳波データを比較し、意識状態の違いが解析結果に与える影響についても検討した。これらの一連の方法により、被験物質による神経毒性の影響を定量的かつ多角的に評価可能な解析体系を構築した。

倫理面への配慮

本研究で実施したヒト iPS 細胞由来ニューロンの利用は、市販のニューロンであり、平成 30 年 8 月、令和元年 6 月に東北工業大学研究倫理審査委員会で承認済である。

C. 研究結果

R4 年度は、ヒト iPS 細胞から分化させた Glutamatergic および GABAergic ニューロン、アストロサイトを混合した共培養系を MEA プレートに播種し、神経ネットワーク活動のスパイクパターンを解析した。その結果、Caffeine 投与により、同期バースト発火頻度が濃度依存的に上昇することが確認され、薬剤応答の解析において同期バースト関連パラメータが有用であることが示された。痙攣陽性化合物 (4-AP、Picrotoxin、Pilocarpine)、陰性化合物 (Acetaminophen、Amoxicillin)、および予測性の低かった Caffeine や Nicotine に対して、13 種類の神経活動パラメータを抽出し、多変量解析による毒性リスク推定を実施した。主成分分析により、DMSO 濃度に依存しない領域を定義し、そこから逸脱した度合いに応じて低・中・高リスクと評価する方法を確立した。痙攣陽性化合物は濃度依存的に高リスクと判定され、陰性化合物ではリスク上昇が見られなかったことから、定量的かつ再現性の高い毒性リスク推定が可能であることが明らかとなった。また、異なる細胞種としてヒト iPS 細胞由来ドーパミンニューロンを用いた系でも同様の解析を行い、Nicotine によるリスク上昇を検出する一方、Acetaminophen ではリスクが上昇しない結果となった。これにより、細胞種を変更しても手法の有効性が保たれることが確認された。

R4 年度は、in vivo モデルへの展開として、CNT ヤーンを表面電極として用い、雌性ヘアレスラットから得られた脳波データを用いて解析を行った。被験物質として Amitriptyline および Atropine を用い、投与前後の脳波データをセクションに分割し、FFT による PSD (Power Spectral Density) を算出した。Amitriptyline では時間経過に伴って PSD ピーク値が減少する傾向がみられ、Atropine では麻酔の有無がピーク値や周波数に影響を与えることが明らかとなった。加えて、特許取得済の独自バースト解析手法を適用し、

θ 波から high- γ 帯域まで各帯域の Oscillation rate および Burst rate を定量化した結果、薬剤投与により特定周波数帯における神経活動の変動が検出された。

R5 年度には、非拘束、覚醒下での脳波測定の結果を解析した。Amitriptyline 5 mg/kg および 50 mg/kg の投与試験では、被験動物個体ごとの PSD プロファイルに差がみられ、個体差が解析に与える影響の重要性が示唆された。Nicotine 投与では、1 mg/kg と 5 mg/kg いずれにおいても PSD に顕著な変化は認められなかった。一方、麻酔中止直後の脳波解析では PSD のピーク値が一時的に 1.5 倍程度に増加し、その後速やかに基準値に戻ることが確認され、麻酔からの覚醒時の影響を回避するための測定タイミングの工夫が必要であることが示された。

さらに、バースト解析の結果、Amitriptyline 投与では特に β 波帯域以上で Oscillation および Burst rate が上昇する傾向が見られ、Nicotine 5 mg/kg では複数の帯域で増加が確認された。麻酔中止後は、全帯域で Oscillation rate が減少する一方、低周波帯 (θ 、 α 、 β) で Burst rate が急激に増加するという一過性の変動が観察された。

これらの結果より、ヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いた MEA 解析、および CNT ヤーン電極による脳波解析を組み合わせた評価手法は、薬剤による神経毒性リスクの濃度依存的・周波数依存的変化を的確に捉えるものであり、急性毒性試験における神経毒性予測手法として高い有用性を示すものであった。

D. 考察

本研究では、in vitro および in vivo における脳機能指標を用いた化合物の神経毒性予測手法を検討した。初年度の MEA 計測では、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの自発電気活動を指標とした毒性リスク推定において、DMSO 濃度に依存しない領域の標準偏差 (SD) 範囲を基準とする多変量解析法が有効であることを示し、異なる細胞種においても予測性が維持されることを確認した。これは細胞種ごとの神経活動特性の違いを前提とした柔軟な評価体系の構築可能性を示唆している。

2 年目以降のラット脳波解析では、FFT による PSD および独自のバースト解析を用い、薬剤投与による周波数帯域ごとの神経活動変化を定量的に評価した。Amitriptyline や Atropine では、低～高周波帯における Oscillation rate と Burst rate に特徴的な変動が見られ、化合物の神経作用に応じた脳波応答が捉えられた。さらに、麻酔下と覚醒下での結果を比較したところ、

特に麻酔中止直後における PSD やバースト指標に一過性の変動が観察され、解析には状態依存性の考慮が不可欠であることが示唆された。

最終年度には、個体間差や行動状態の影響も含めて評価を行い、覚醒下でも脳波変化の定量解析が可能であること、さらにバイタルサインや一般状態観察と組み合わせることで、神経毒性評価の精度向上が期待できることが明らかとなった。これにより、*in vitro* と *in vivo* を統合した神経毒性評価体系の実現に向けた重要な知見が得られた。

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ことが期待される。

E. 結論

本研究では、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの MEA 計測による神経毒性リスク推定が、予測性の低い化合物にも有効であることを示した。また、CNT-Y を用いたラット脳波の FFT およびバースト解析により、化合物投与時の脳波変化を捉えることができ、致死性予測に資する解析基盤となる可能性が確認された。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 iPS 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