

生体情報の統合的評価を基盤とした急性毒性試験の基準策定と代替法開発に資する研究
-人の健康影響評価の精緻化と動物福祉を充足する試験法開発-
(25KD1003)

分担研究報告書

分担研究課題 脳波解析による急性毒性予測

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。先行研究において、検体を投与したラットの脳波パワースペクトル密度、及び独自に開発した手法であるバースト解析をもちいることでモデル化合物投与による変化を検出可能であることが示されたが、個体差がある。また、脳波に混入するアーチファクトの取り扱いについても課題となっていた。本研究では先行研究において検出された信号の変化が脳波由来の信号であることを確認するために、各モデル化合物の影響がラット急性脳スライスの MEA 計測においても再現されるかを検証した。その結果、先行研究で脳波解析を実施したアトロピン、アミトリプチリン塩酸塩、ニコチンについて、急性脳スライスの MEA 計測においても同様の解析手法で変化が捉えられたことから、先行研究で CNT-Y を用いて計測されたデータが確かに脳由来であることが示されるとともに、構築した解析手法の有効性が示された。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に期待できる。

A. 研究目的

先行研究において、CNT-Y を用いて計測されたラット脳波測定データについて、パワースペクトル密度(Power Spectral Density: PSD)、及び独自に開発した手法であるバースト解析により、化合物投与による脳波信号の変化を捉えることができた。本研究ではラット急性脳スライスの Microelectrode array (MEA) 計測においても同様の解析手法で化合物投与による変化が認められるかを検証し、先行研究において検出された信号の変化が脳波由来の信号であることを検証した。

B. 研究方法

ラット急性脳スライスを MEA 上に設置し、人工脳脊髄液(ACSF: Artificial Cerebrospinal Fluid)を灌流させて計測を実施した。計測は化合物添加前、および、

化合物を 4-5 段階の濃度で上昇させた ACSF を灌流させ、それぞれ 10 分間を記録した。解析は、計測した 10 分間について FFT(Fast Fourier Transform)による PSD を各濃度で算出し、PSD のピーク値および、ピーク周波数を定量化することで化合物投与による変化を評価した。さらに、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)を脳スライス計測データに適用することで、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。

C. 研究結果

先行研究において、CNT-Y を用いて計測されたラット脳波測定データに変化が認められたアトロピン、アミトリプチリン塩酸塩、ニコチンについて、ラット急性脳スライスの MEA 計測においても同様の解析手法で投与によ

る変化が認められるか検証を行った。

(1) FFT の PSD による脳スライス信号解析:

いずれの条件においても、PSD のピーク周波数は 1 Hz であり、化合物の種類や濃度に依存したピーク周波数の変化は観察されなかった(図 1-3)。

アトロピンについて、0.01, 0.1, 1 μ M では変化が観察されなかったが、10, 100 μ M で有意なピーク値の上昇が認められた。アミトリプチリン塩酸塩について、0.1 μ M では変化が観察されなかったが、1 μ M でピーク値が約 2 倍に上昇する特異的な応答が認められた。ニコチンについて、0.01 μ M では変化が観察されなかったが、0.1 μ M で有意なピーク値の上昇が認められ、1, 10, 100 μ M においても同様のピーク値の上昇が認められた(図 4)。

(2) 脳スライス信号のバースト解析

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を脳スライス計測データに適用することで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。脳スライスから取得した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) に分割し、各周波数帯域でバースト解析を実施した。

アトロピンについて、各周波数帯域で 0.01 μ M 投与後に Oscillation rate, Burst rate ともに上昇する傾向が観察され、以降の 0.1, 1, 10, 100 μ M においても上昇が持続した(図 5)。アミトリプチリン塩酸塩について、各周波数帯域で 0.1 μ M 投与後に Oscillation rate, Burst rate ともに上昇する傾向が観察されたが、0.1 μ M の変化をピークにして以降の 1, 10, 100 μ M では上昇が減衰する傾向が観察された(図 6)。ニコチンについて、 θ , α , β 波帯域で 1 μ M 投与後に Oscillation rate, Burst rate ともに上昇する傾向が観察された。 θ 波帯域では 3, 10, 30, 100 μ M においても上昇が持続したが、 α , β 波帯域では 1 μ M 投与後のみの上昇に留まった(図 7)。

D. 考察

先行研究で実施した FFT の PSD による脳波解析およびバースト解析について、各モデル化合物の影響がラット急性脳スライスの MEA 計測においても再現されるかを検証した。その結果、先行研究で脳波解析を実施したアトロピン、アミトリプチリン塩酸塩、ニコチンについて、急性脳スライスの MEA 計測においても同様の解析

手法で変化が捉えられたことから、先行研究で CNT-Y を用いて計測されたデータが確かに脳由来であることが示されるとともに、構築した解析手法の有効性が示された。

E. 結論

脳波に混入するアーチファクトの取り扱いについては依然検討中であるが、バンドパスフィルタを用いた信号分離により概ね脳波信号との切り分けが可能であり、解析への影響は最小限であることを確認済みである。

先行研究の脳波データおよび本研究の脳スライス MEA 計測データの双方で、FFT の PSD 解析とバースト解析によりモデル化合物の特徴を捉えることに成功した。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に期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Matsuda N, Nagafuku N, Matsuda K, Ishibashi Y, Taniguchi T, Matsushita Y, Miyamoto N, Yoshinaga T, Suzuki I. Advanced cardiotoxicity profiling using field potential imaging with UHD-CMOS-MEA in human iPSC-derived cardiomyocytes. *Toxicol Sci.* 2025 Dec 1;208(2):384-400. doi: 10.1093/toxsci/kfaf134.

Hasegawa A, Matsuda N, Suzuki I. Development of a microelectrode array system for simultaneous measurement of field potential and glutamate release in brain slices. *Biosens Bioelectron.* 2025 Nov 1;287:117696. doi: 10.1016/j.bios.2025.117696.

Yokoi R, Matsuda N, Ishibashi Y, Suzuki I. Advanced neural activity mapping in brain organoids via field potential imaging with ultra-high-density CMOS microelectrode arrays. *Front Neurosci.* 2025 Aug 13;19:1634582. doi: 10.3389/fnins.2025.1634582.

Seki Y, Mikamoto M, Ojima A, Mihara I, Iwamoto M, Odawara A, Goto Y, Taniguchi T, Shiotani M, Yoshinaga T, Asakura S, Ishibashi Y, Matsuda N,

Suzuki I, Miyamoto N. In vitro seizure risk assessment using a microelectrode array and comparison with an in vivo rat study. *Toxicol Sci.* 2025 Jul 1;206(1):202-217. doi: 10.1093/toxsci/kfaf056.

2. 学会発表

N. Matsuda, N. Nagafuku, H. Kurashiki B. Noda, I. Suzuki, High-Precision Neurotoxicity and Neuropharmacology Assessment in CNS Models Using Field Potential Imaging, SOT 2026, March 22-25, San Diego, USA

Ikuro Suzuki, Xiaobo Han, Naoki Matsuda, Remi Yokoi, Hideaki, Kurashiki, Makoto Yamanaka, Using a Novel Microphysiological System on MEA to Evaluate Neuron Electrical Characteristics and Synaptic Signal Conduction for in vitro Neurological Disorder Model, AD/PD 2026, March 17-21, Copenhagen, DNK

Ikuro Suzuki, Xiaobo Han, Naoki Matsuda, Chinatsu Suzuki, Makoto Yamanaka, Kenishi Hirose, Bumpei Noda, Developing compartmentalized co-culturing neural models in a novel MPS-MEA system for in vitro drug assessment, SLAS2026, February 7-11, Boston, USA

Yuto Ishibashi, Nami Nagafuku, Bumpei, Noda, Ikuro Suzuki, Prediction of toxicity risk and adverse effects using MEA measurement of human iPSC-derived neurons, SLAS2026, February 7-11, Boston, USA

X. HAN, N. MATSUDA, M. YAMANAKA, B. NODA, I. SUZUKI, A microphysiological system on ultra-high-density CMOS-MEA for in vitro functional evaluation with compartmentalized co-culturing neural models, *Neuroscience* 2025, November 15-19, San Diego, USA

N. MATSUDA, B. NODA, I. SUZUKI, High-resolution mapping of beta rhythm induction in

acute brain slices using field potential imaging with ultra-high-density CMOS-MEA, *Neuroscience* 2025, November 15-19, San Diego, USA

R. YOKOI, N. MATSUDA, Y. ISHIBASHI, B. NODA, I. SUZUKI, Precision neural activity mapping in brain organoids through field potential imaging with ultra-high-density CMOS microelectrode array, *Neuroscience* 2025, November 15-19, San Diego, USA

Y Ishibashi, N Nagafuku, B Noda, I Suzuki, Development of an evaluation method for addictive compounds based on electrical activity of human iPSC cell-derived dopaminergic neurons using MEA, 2025 SPS Annual Meeting, October 13-15, Utrecht, NLD

Y Ishibashi, N Nagafuku, B Noda, I Suzuki, Prediction of toxicity risk and symptom-specific adverse effects using MEA measurements of human iPSC-derived neurons, 2025 SPS Annual Meeting, October 13-15, Utrecht, NLD

N Matsuda, N Nagafuku, B Noda, I Suzuki, High-Resolution In Vitro Electrophysiological Profiling of Drug-Induced Cardiotoxicity Using UHD-CMOS-MEA in Human iPSC-Derived Cardiomyocytes, 2025 SPS Annual Meeting, October 13-15, Utrecht, NLD

菊地 柊李、永福 菜美、松田 直毅、鈴木 郁郎、Development of a Cardiotoxicity Mechanism Prediction Method Based on AI Analysis of Field Potential Imaging Data from Human iPSC-Derived Cardiomyocytes、日本薬理学会第 99 回年会、2026.3.16-18

横井 れみ、松田 直毅、石橋 勇人、鈴木 郁郎、Neural Activity Mapping in Brain Organoids and Midbrain-Striatum Assembloids Using Ultra-High-Density CMOS-MEA、日本薬理学会第 99 回年会、2026.3.16-18

韓笑波、松田直毅、鈴木智夏、山中誠、野田文平、鈴木郁郎、Assessment of Electrical Signal Transduction through Neural Synapse Network Using a Novel Microphysiological System on MEA、日本薬理学会第 99 回年会、2026.3.16-18

永福菜美、松田直毅、石橋勇人、鈴木郁郎、Development of a highly sensitive method for predicting cardiotoxicity in human iPSC-derived cardiomyocytes using UHD-CMOS-MEA、日本薬理学会第 99 回年会、2026.3.16-18

Shuri Kikuchi, Nami Nagafuku, Naoki Matsuda, Ikuro Suzuki, Development of a Cardiotoxicity Mechanism Prediction, Method Based on AI Analysis of Field Potential Imaging Data from Human iPSC-Derived Cardiomyocytes, 第 17 回日本安全性薬理研究会学術年会、2026.2.26-27

Naoki Matsuda, Nami Nagafuku, Ikuro Suzuki, Detection of Chronic Cardiotoxicity Using UHD-CMOS-MEA in hiPSC-Derived Cardiomyocytes, 第 17 回日本安全性薬理研究会学術年会、2026.2.26-27

Hideaki Kurashiki, Naoki Matsuda, Xiaobo Han, Ikuro Suzuki, Multilevel Assessment of Neural Network Responses to Inhibitory Modulation Using an Ultra-High-Density CMOS-MEA, 第 17 回日本安全性薬理研究会学術年会、2026.2.26-27

Xiaobo Han, Naoki Matsuda, Chinatsu Suzuki, Makoto Yamanaka, Bumpei Noda, Ikuro Suzuki, A Novel Microphysiological System (MPS) -MEA Platform for in Vitro Functional Evaluation with Compartmentalized Cultured Neural Models, 第 17 回日本安全性薬理研究会学術年会、2026.2.26-27

松田直毅、永福菜美、石橋勇人、韓笑波、横井れみ、鈴木郁郎、高時空間分解能 CMOS-MEA を用いた単一細胞レベルの電気活動評価、第 1 回日本疾患幹細胞学会学術集会、2026.2.17

石橋勇人、永福菜美、鈴木郁郎、ヒト iPSC 由来ニュー

ロン MEA 計測による化合物の毒性評価、第 1 回日本疾患幹細胞学会学術集会、2026.2.17

松田直毅、永福菜美、石橋勇人、韓笑波、横井れみ、鈴木郁郎、高時空間分解能 CMOS-MEA による電気イメージングを用いた単一細胞レベルの化合物応答評価、第 16 回スクリーニング学研究会、2025.11.28

山中誠、韓笑波、鈴木郁郎、異種細胞間神経接続を模倣する神経 MPS を搭載した MEA プラットフォームの開発、第 16 回スクリーニング学研究会、2025.11.28

石橋勇人、永福菜美、鈴木郁郎、ヒト iPSC 由来ニューロンの MEA データを用いた毒性・副作用リスク推定、第 16 回スクリーニング学研究会、2025.11.28

鈴木郁郎、ヒト iPS ニューロンとマルチスケール MEA プラットフォームを用いた化合物の神経安全性評価、日本動物実験代替法学会 第 38 回大会、2025.11.3

鈴木郁郎、in vitro 先端計測技術と解析技術を用いた神経・心臓における化合物安全性評価法、第 52 回日本毒性学会学術年会、2025.7.2-4

石橋勇人、永福菜美、鈴木郁郎、100 化合物に対するヒト iPSC 由来ニューロンの MEA データを用いた神経毒性予測と副作用リスク推定、第 52 回日本毒性学会学術年会、2025.7.2-4

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 細胞由来ニューロンの MEA 測定による神経毒性評価法の開発、第 52 回日本毒性学会学術年会、2025.7.2-4

倉敷秀明、韓笑波、松田直毅、鈴木郁郎、高密度 CMOS-MEA によるラット海馬培養系の神経毒性誘発機能障害の解析、第 52 回日本毒性学会学術年会、2025.7.2-4

韓笑波、松田直毅、鈴木智夏、山中誠、鈴木郁郎、MPS-MEA システムで培養したヒト iPSC 由来ニューロンを用いた末梢神経障害評価系の新規開発、第 52 回日本毒性学会学術年会、2025.7.2-4

永福菜美、松田直毅、石橋勇人、鈴木郁郎、UHD-CMOS-MEA 計測による高感度な毒性検出と作用機序予測法の開発、第 52 回日本毒性学会学術年会、

2025.7.2-4

横井れみ、松田直毅、石橋勇人、鈴木郁郎、UHD-CMOS-MEA を用いた脳オルガノイドおよび中脳-線条体アセンブロイドの機能解析、第 52 回日本毒性学会学術年会、2025.7.2-4

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

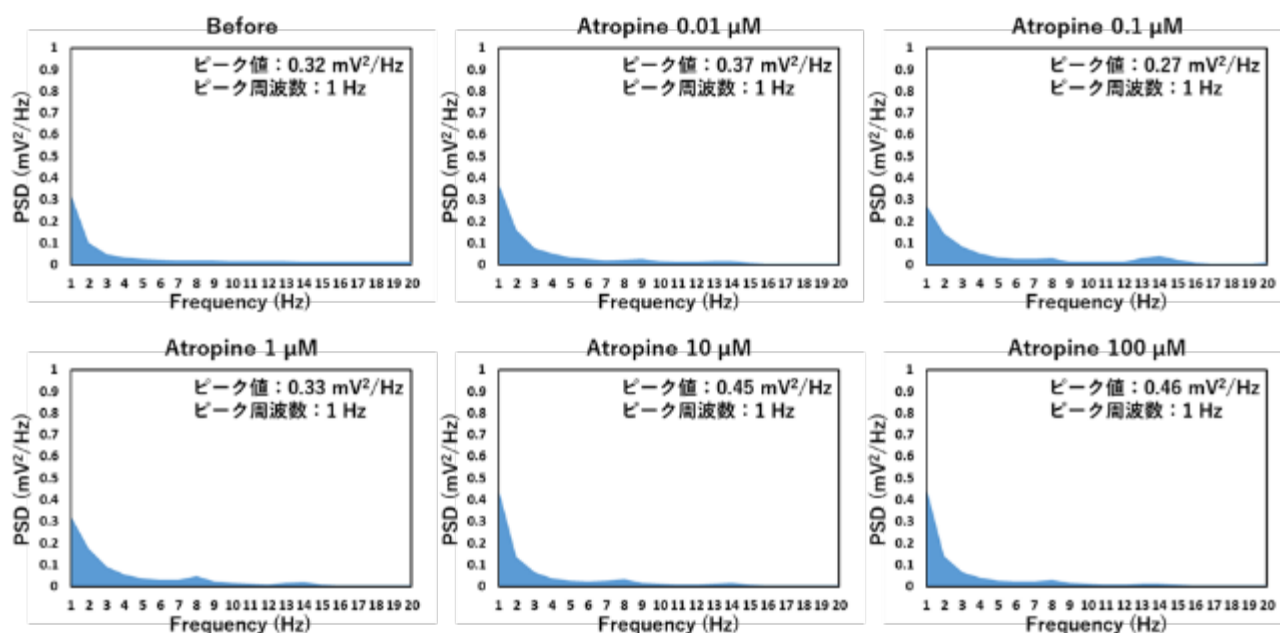


図 1: 脳スライスの MEA データにおける Atropine 試験時の FFT による PSD

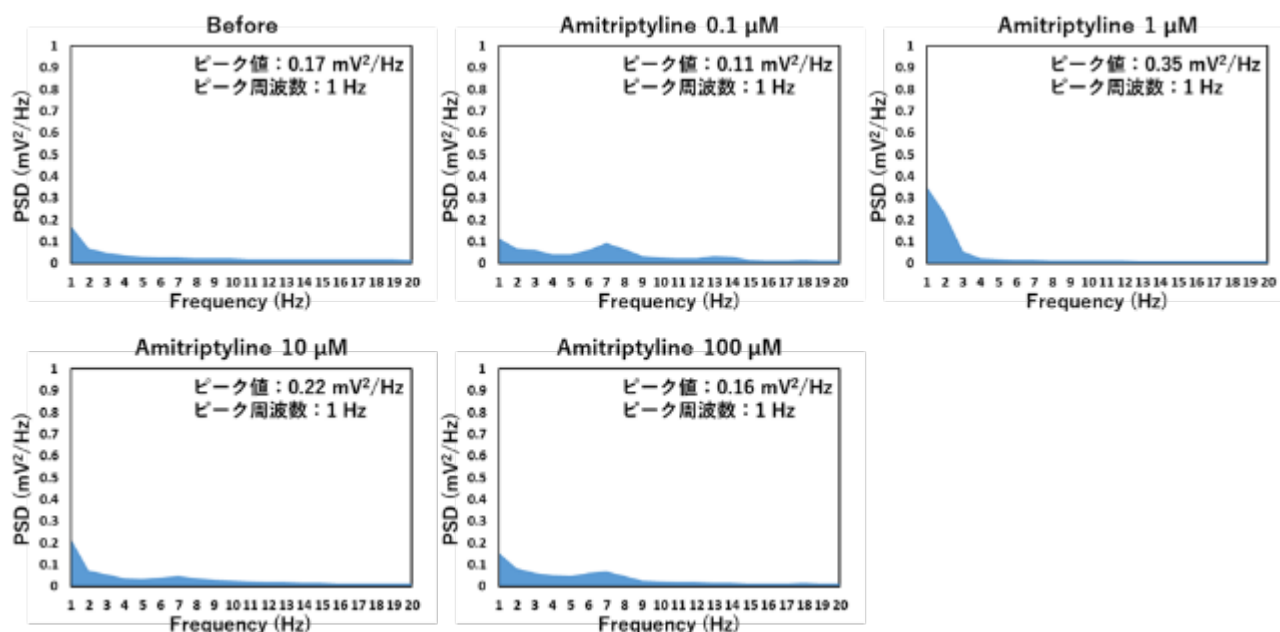


図 2: 脳スライスの MEA データにおける Amitriptyline 試験時の FFT による PSD

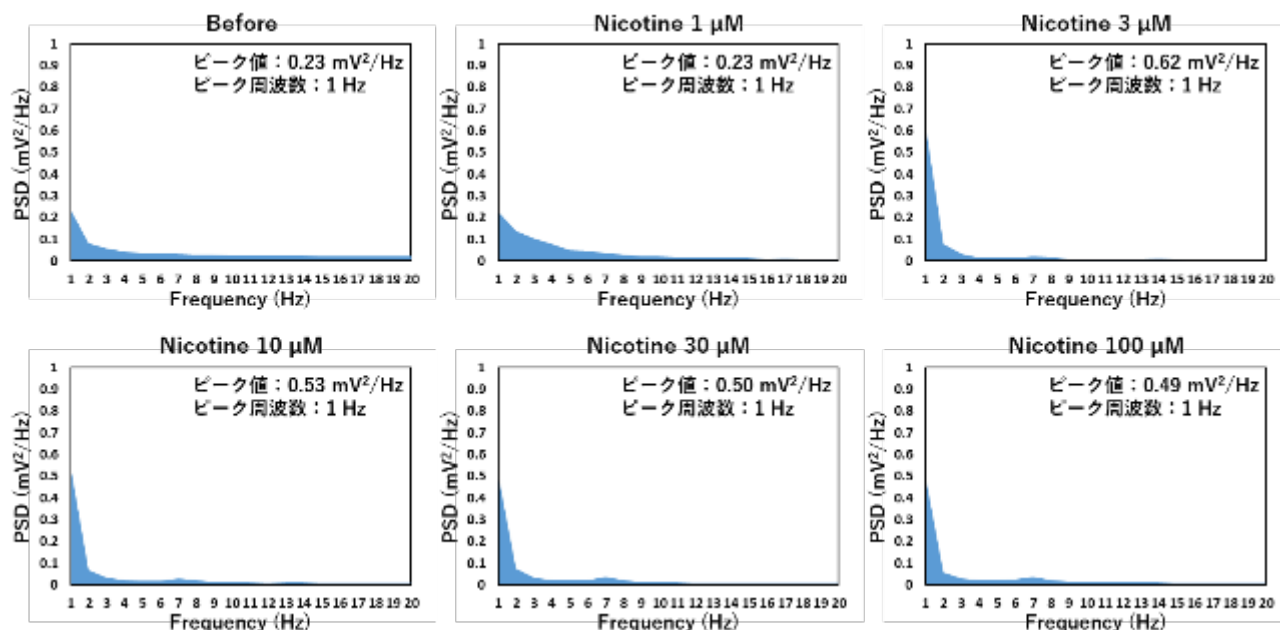


図 3: 脳スライスの MEA データにおけるニコチン試験時の FFT による PSD

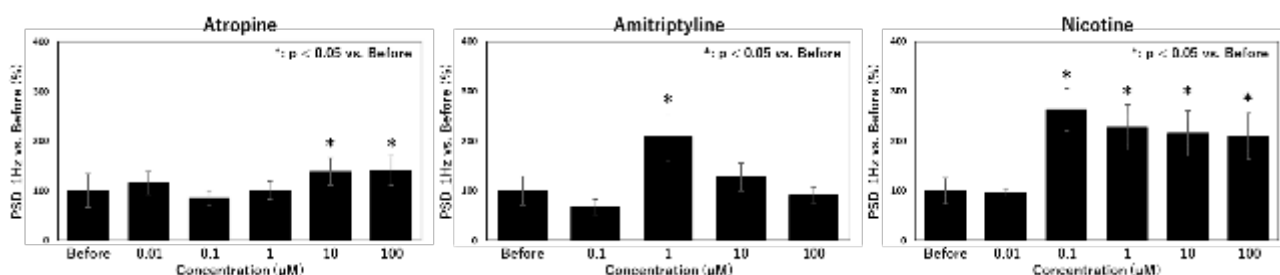


図 4: 脳スライスの MEA データにおけるピーク周波数(1Hz)の PSD

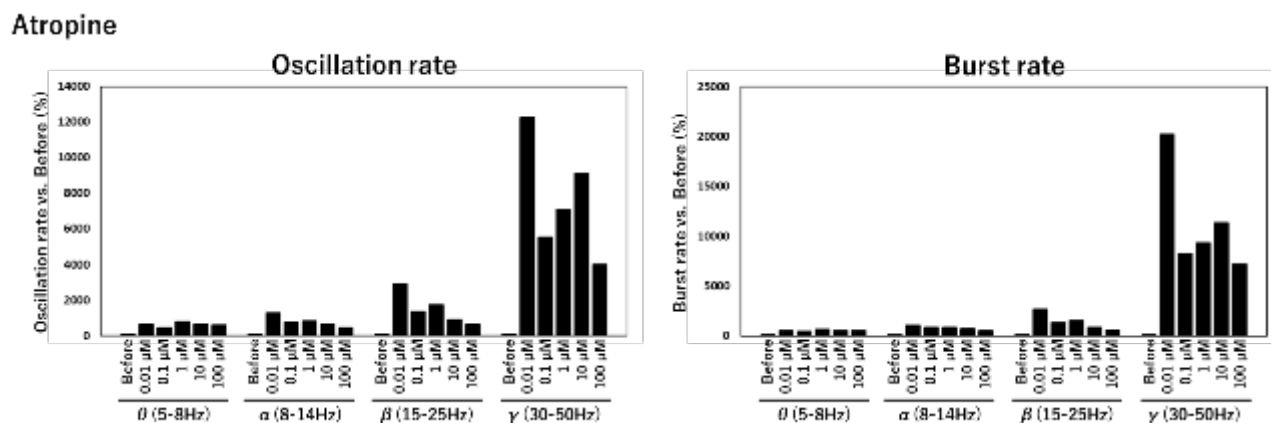


図 5: 脳スライスの MEA データにおける Atropine 試験時の Oscillation rate および Burst rate

Amitriptyline

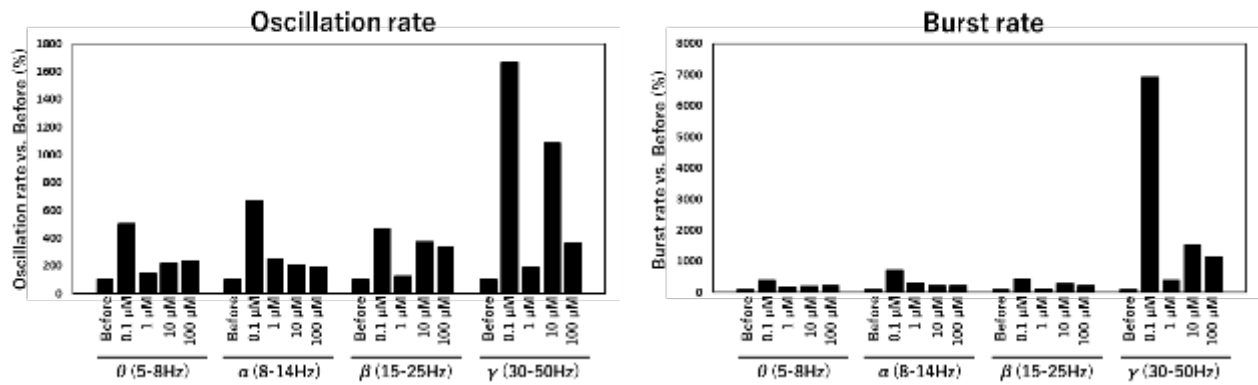


図 6: 脳スライスの MEA データにおける Amitriptyline 試験時の Oscillation rate および Burst rate

Nicotine

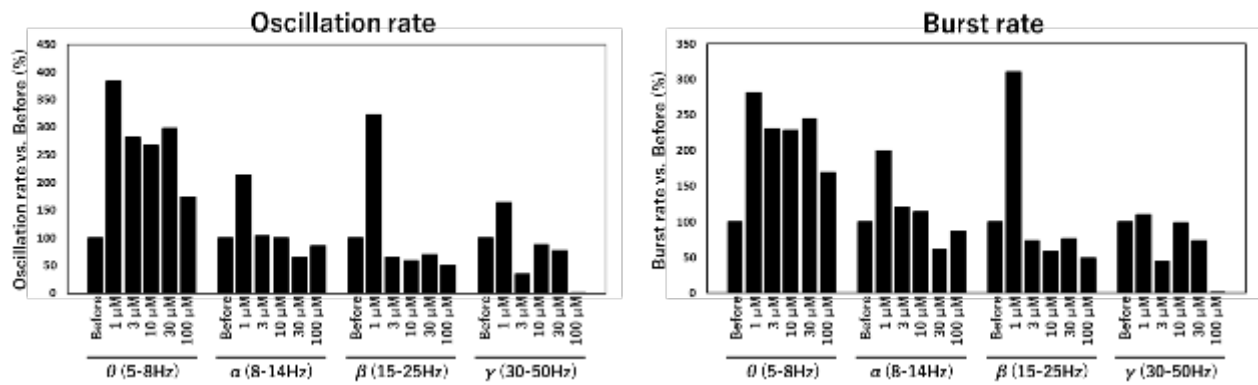


図 7: 脳スライスの MEA データにおける Nicotine 試験時の Oscillation rate および Burst rate