

博士学位論文

機械学習を用いた *in vitro* 神経回路活動の解析法の開発

2021年 3月
東北工業大学
大学院工学研究科
電子工学専攻

松田 直毅

目次

第1章 緒言.....	4
1-1 研究の背景と目的.....	4
1-2 本論文の構成.....	8
第2章 4step methods を用いたバースト検出法の開発.....	9
2-1 序論.....	9
2-2 方法.....	10
2-2-1 ヒト iPS 細胞由来皮質ニューロンの培養.....	10
2-2-2 細胞外記録.....	10
2-2-3 薬理試験.....	10
2-2-4 免疫化学蛍光染色.....	11
2-2-5 データ解析.....	11
2-3 結果.....	12
2-3-1 hiPSC 由来皮質ニューロンの自発活動と従来閾値法を用いた同期バースト 発火 (SBF) 検出.....	12
2-3-2 4-step method を用いた SBF 検出.....	12
2-3-3 従来法と 4-step method の SBF 検出結果の比較.....	13
2-3-4 従来法と 4-step method の薬剤応答比較.....	14
2-3-5 4-step method バースト検出を学習したバースト検出 AI の作製.....	14
2-3-6 4-step method と AI の SBF 検出結果の比較.....	15
2-4 考察.....	16
2-5 結論.....	18
第3章 AI を用いた神経活動の毒性・薬剤名予測法の開発.....	25
3-1 序論.....	25
3-2 方法.....	26
3-2-1 ヒト iPS 細胞由来皮質ニューロンの培養.....	26
3-2-2 細胞外記録.....	26

3-2-3 薬理試験	26
3-2-4 バースト解析	27
3-2-5 統計解析	27
3-3 結果	28
3-3-1 ヒト iPS 細胞由来神経ネットワークの薬剤応答	28
3-3-2 ラスタープロット画像を用いた AI の作製とポジネガ分離の評価	29
3-3-3 AI による用量依存的な痙攣毒性の判定	30
3-3-4 AI による未学習薬剤の痙攣毒性判定	30
3-3-5 AI による薬剤名予測	30
3-4 考察	32
3-5 結論	35
第 4 章 生体脳波における痙攣前兆検出法の開発	42
4-1 序論	42
4-2 方法	43
4-2-1 脳波電極の植込み標本作製方法	43
4-2-2 動物の選別及び群分け	43
4-2-3 脳波計測	43
4-2-4 波形解析	44
4-2-5 統計解析	44
4-3 結果	45
4-3-1 ラット皮質脳波のスペクトル強度ヒストグラム画像の作製	45
4-3-2 スペクトル強度ヒストグラム画像の作製法の開発	45
4-3-3 痙攣予測 AI の作製	46
4-3-4 痙攣予測 AI の検証	47
4-3-5 AI による痙攣前兆状態予測	48
4-3-6 痙攣リスクの検出に関与する特徴量	49
4-4 考察	49

目次

4-5 結論.....	52
5 結言	64
参考文献.....	67
謝辞	72
業績リスト.....	73

第 1 章 緒言

1-1 研究の背景と目的

創薬開発において、1 薬剤が上市されるまでに平均 2000 億円の費用と 10 年以上の歳月を要する(Paul et al. 2010)。従って、開発後期の臨床試験で毒性が判明し、候補化合物が脱落した場合、開発コストと時間の損失は膨大であり、創薬開発の大幅な遅れを生じる。臨床試験の副作用検出により脱落した候補化合物において、副作用が検出された臓器別の割合は脳が最も高いと報告されている(Cook et al. 2014)。脱落した候補化合物の 34%が中枢神経系における毒性検出であり、他の臓器に比べ、圧倒的に高い。その原因は、非臨床試験の段階で中枢神経系に働く副作用を検出できる評価法が十分でないこと、および実験動物とヒトにおける「種差の壁」の問題が挙げられる。

神経系への副作用は、前臨床試験の動物実験で検出される場合も非常に多い。中枢神経系疾患に対する新規治療薬の創出を、主たる研究開発目標として掲げている製薬企業は数多く、脳内移行性の高い医薬品候補化合物が、非臨床動物モデルにおいて高い確率で毒性を誘発することは、中枢神経系領域の創薬研究に従事する製薬企業の研究員の間では周知の事実である。非臨床動物試験まで進んでから創薬プロジェクトが断念されることも、創薬コストと時間の損失が大きい。すなわち、動物試験に移行する前の前臨床試験の段階で、ヒトへの神経毒性を予測できる精度の高い *in vitro* 試験法が求められている。

中枢神経系の副作用の内、高い頻度で検出され、重篤な副作用は痙攣毒性である(Authier et al. 2016)。臨床試験で痙攣毒性が検出された場合、即開発中止となるとともに、非臨床動物モデルで痙攣徴候が観察されてしまった場合においても、有効薬効濃度まで投薬できない臨床試験計画への妥協を余儀なくされる。従って、リード化合物が選定され、*in vivo* 動物試験に移行する前に、痙攣毒性リスクやその作用機序が予測できる評価系が求められている。動物実験に移行する前に、化合物の順位付けや化合物への修飾等が可能となれば、効率的な創薬開発につながる。

痙攣毒性リスクの評価は神経ネットワークの電気活動を指標とした評価が最も有効である。中枢神経系で見られる痙攣現象は脳内の電気活動の異常として現れる為である。現在、痙攣毒性の検出において、*in vitro* で最も一般的に使用される方法は、電気活動を指標としたラット海馬の脳スライスアッセイである(Authier et al. 2016)。脳スライスアッセイは生体脳の構造を有し、機能的なネットワークを形成しているため、*in vitro* のゴールドスタンダードとされている(Grainger et al. 2018)。しかしながら、作製されたスライスは急速に劣化するため一般に脳スライスアッセイはサンプル作製と実験を同日に行う必要があり、スループット性が低い(Buskila et al. 2020)。また、げっ歯類サンプルである為、人間の受容体やその他の薬物標的が欠如しており「種差の壁」の問題は解決されない。

ヒトへの外挿性を担保できる方法として期待されているのがヒト iPS 細胞由来神経細胞の利用である。そのヒト iPS 細胞由来神経ネットワークの電気活動をハイスループットに計測する方法として、近年、平面微小電極アレイ (MEA) 計測法が着目されている。MEA は、直径数〜数 10 μm サイズの微小電極が基板上に配置された構造を持ち、MEA 上に培養された神経ネットワークの電気活動を細胞外で電位計測するシステムである。時間分解能が高いこと、非侵襲計測故に長期間の電気活動記録が可能であること、多点計測故に神経ネットワークの解析が可能であるなどの特徴を有する。MEA の歴史は古く、培養細胞からの記録は、Thomas らによって 1972 年に初めて報告され(Thomas Jr et al. 1972)、培養ニューロンからの記録は、1979 年と 1980 年にそれぞれ Pine と Gross らによって報告された(Gross 1979; Pine 1980)。その後、海馬スライスを使用した記録が報告され(Jao et al. 2014)、培養皮質ニューロンの電気刺激による増強(Jimbo et al. 1999; Wagenaar et al. 2005)などの基礎研究が進んだ。MEA 計測法が近年盛んに使用されるようになったのは、ヒト iPS 細胞の発見など、幹細胞科学の発展により、*in vitro* 機能計測の需要が高くなったことが大きい。近年では、MEA を開発する企業が増え、1 プレートに 24 ウェルや 48 ウェル等のマルチウェル化が進み、ハイスループット性も上がってきたことから、化合物評価に広く使用されるようになってきた。

2014 年に小田原らがヒト iPS 細胞由来ニューロンの電気活動を MEA で計測して以来(Odawara et al. 2014)、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの機能評価や化合物に対する応答に関する報告がされている。本研究室や他のグループらの研究から、グリア細胞であるアストロサイトとの共培養により、神経ネットワークの活動を増大させ、機能的な成熟化の指標の一つであるシナプス伝達による同期バースト発火が早期に認められることなどが示されてきた(Ishii et al. 2017; Odawara et al. 2016; Odawara et al. 2014)。早期成熟化には、播種時の細胞密度が重要であり、ヒト iPS 細胞由来中枢ニューロンにおいては、 3.0×10^5 cells/cm² 以上が望ましいことも明らかとなっている。また、BrainPhysMedium (Bardy et al. 2015)などの生理学的環境を再現した培地の開発などにより、電気生理学的な応答が見られるまでの時間が短縮されてきた。これらのヒト iPS 細胞由来ニューロンの培養条件に関する基礎研究の成果により、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの機能計測の条件が次第に明らかになってきた。ヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いた医薬品の痙攣毒性評価法としての取り組みが近年盛んに行われるようになってきた要因の一つである。代表的な痙攣陽性化合物に対して、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの電気活動が変化することが年々報告されてきている(Amin et al. 2016; Bradley and Strock 2019; Kreir et al. 2018; Odawara et al. 2018; Ojima and Miyamoto 2018; Tukker et al. 2018; Yokoi et al. 2019)。このような状況下で、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの MEA 計測法による医薬品の痙攣毒性検出法への期待が高まり、日本では、ヒト iPS 細胞応用安全性コンソーシアム (CSAHi) にヒト iPS 細胞由来ニューロンの MEA 計測で痙攣毒性予測を行う神経チームが立ち上がり(Shirakawa and

Suzuki 2020)、海外では国際的産官学シンクタンク団体の The Health and Environmental Sciences Institute (HESI) NeuTox committee に MEA-sub team が立ち上がった(Roberts et al. 2021)。現在、多くの製薬企業、細胞ベンダー、機器メーカー、アカデミア、政府機関等が参画している。

上述のように、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの MEA 計測法による医薬品の痙攣毒性予測法の構築に向けた取り組みが国内外で動いており、痙攣陽性化合物に対する電気活動の解析結果について議論できる状態となってきた。しかしながら、データの取得は可能となったものの、毒性予測の為の解析法が未確立であり、国内外で課題となっている。

げっ歯類の中枢初代培養ニューロンもヒト iPS 細胞由来ニューロンと同様であるが、2次元培養した中枢神経ネットワークの電気活動の特徴として、神経ネットワークがある時刻にシナプス結合を介して同期的に活動する「同期バースト発火」が観察される。この同期バースト発火に基づいた解析パラメータが、神経活動変化を検出する主要なパラメータとなっている。しかしながら、同期バースト発火の正確な検出法や施設間で統一した検出法は確立していない。従って、同期バースト発火の検出法に依存して、その後の解析パラメータ値が異なっている状況にある。加えて、同期バースト発火検出後に解析パラメータが算出されるが、毒性検出に有効なパラメータも定まっておらず、化合物評価に適する解析パラメータの選択は研究者毎の判断に委ねられている状態である。それ故に、痙攣毒性を評価する解析法の構築が国内外で求められており、解析法の構築が、波形データから医薬品の痙攣毒性予測法を構築する上でのボトルネックとなっている。

そこで本研究では、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの *in vitro* MEA データから精度の高い医薬品の痙攣毒性予測を実現する解析法の開発を目的とした。具体的には、近年急速に技術発展している機械学習の手法を取り入れた、神経回路活動の解析法の開発である。まず、はじめに、同期バーストを正確に検出できる方法の開発と開発した方法により算出した同期バースト発火を教師データとした同期バースト検出 AI の開発を行った。本開発の意義は、熟練者が判断する同期バースト個数と長さを正確に検出できる同期バースト検出法を開発し、AI 検出法へと発展させることで、研究者や施設に依存しない統一的な同期バースト検出を可能とすることである。本開発により、精度および信頼性の高い、同期バースト関連パラメータを用いた毒性検出法開発が発展することが見込まれ、施設間検証が可能となる。次に、本研究目的の主題である医薬品の痙攣毒性予測法の開発として、多電極で取得した神経活動の時系列データの「ラスタプロット画像」を用いた AI 予測法の開発を行った。*in vitro* 中枢神経回路の電気活動における解析パラメータは、主に同期バースト発火に関する解析パラメータである。数学的に解析パラメータを算出したとしても 100 個程度であり、どの解析パラメータが毒性検出に有効であるかの判断が難しい状況にある。ラスタプロット画像には同期バースト発火の情報が入っている。AI を用いることで同期バースト発火を検出する必要もなく、同期バースト発火の特徴が抜き出せると考えた。また同期バースト発火のみならず、同期バー

スト以外の発火パターンの特徴も同時に抜き出すことが可能となる。例えば、AI は画像から 4096 次元の特徴量を算出して、画像の差異を判別することができる (Krizhevsky et al. 2012)。数学的パラメータの個数よりも圧倒的に多い特徴量数を同時に処理する特徴を持つ。以上のような理由から、ラスタープロット画像の機械学習法を用いた痙攣毒性予測法の開発を行うこととした。ラスタープロット画像は、神経活動の研究で広い範囲で使用されている。本開発技術は、*in vitro* MEA データを用いた医薬品の痙攣毒性予測法のみならず、様々な毒性評価、医薬品の薬効評価に使用できるとともに、Ca²⁺ や膜電位感受性色素などを用いた光イメージング法で得られたラスタープロットデータや *in vivo* 動物で得られる神経活動全般にも展開できる基本技術となる。

In vitro の試験法の一般的な課題は、*in vivo* への外挿性である。近年、*in vitro to in vivo extrapolation (IVIVE)* という言葉が、世界的に使用されるようになり、益々その重要性が指摘されている。最後に、開発した *in vitro* MEA データによる痙攣毒性法を *in vivo* への外挿性を持つ予測法へと発展させる為の取り組みを行った。具体的には、ラスタープロット AI に教師データとして教える医薬品の痙攣毒性用量を *in vivo* の脳室内濃度より決定する方法である。痙攣毒性予測法において、偽陰性を可能な限り低減させる必要がある為、痙攣発作の出る以前の前兆状態が認められる用量を毒性用量として決定することが望まれる。すなわち、痙攣前兆が認められた際の脳内に実際に暴露されている医薬品の用量を脳室内濃度測定により同定し、その用量の *in vitro* MEA データを痙攣毒性としてラベルし、AI に学習させることで、*in vivo* への外挿性を担保する *in vitro* 痙攣毒性予測法へと発展させることが狙いである。しかしながら、痙攣前兆を捉えることは、動物の一般状態観察から判定することは難しい。そこで、本研究では、脳波データから痙攣前兆状態を検出する方法を開発することとした。具体的には、脳波データから周波数成分画像を作製し、機械学習を用いて、痙攣前兆を予測する方法である。脳波データから痙攣前兆状態を検出する方法は、前述のように、痙攣前兆時の脳室内濃度を毒性用量として決定し、*in vitro* MEA データの教師データとして使用することを目的としているが、脳波データから痙攣前兆状態を捉える本解析法は、脳波データ単体から痙攣毒性予測を行う方法としても有効な解析法である。これまで前臨床試験で見逃していた痙攣毒性を感度高く検出できる新規解析法の開発でもある。

1-2 本論文の構成

第1章では本研究の背景と目的、本論文の構成について記載した。

第2章では、培養中枢神経ネットワークの化合物評価パラメータとして最も重要な同期バースト発火を正確に検出する新しい手法 (4-step method) の開発について記載し、統一的な同期バースト発火検出法の創出の為に、開発した 4-step method で検出した同期バースト発火を教師データとした同期バースト発火検出 AI の開発および結果について論じた。

第3章では、*in vitro* MEA データから医薬品の痙攣毒性および作用機序予測を行う為のラスタープロット画像を用いた AI の開発について、アルゴリズムおよび痙攣毒性リスクと、作用機序予測につながる薬剤名予測の結果について論じた。

第4章では、*in vitro* の MEA データから *in vivo* の痙攣毒性リスクを予想できる、精度の高い予測法にする為の取り組みについて記載した。具体的には、*in vivo* で痙攣の前兆が見られる用量と同じ用量の *in vitro* の MEA データを痙攣毒性として学習させる為に、*in vivo* 脳波から痙攣前兆を検出できる AI のアルゴリズムと結果、および今後の展望について論じた。

第5章では、各章のまとめと、総括として、開発した各技術の関連性を含めた本研究のまとめについて記載した。

第 2 章 4step methods を用いたバースト検出法の開発

2-1 序論

中枢神経において、シナプス伝達によってある時刻にネットワークが同期的に活動する同期バースト発火が見られる。自発活動および感覚器からの入力信号において観察される現象であり、発達期の神経回路形成や成体の高次機能表現まで多岐にわたる (Johnson et al. 2011; Lubenov and Siapas 2008; Namiki et al. 2013; Spitzer 2006; Sweatt 2016)。この同期バースト発火は生体脳(*in vivo*)のみならず、脳スライス (extra vivo) や培養神経ネットワーク(*in vitro*)においても観察される。*In vitro* MEA データから得られる中枢培養神経ネットワークにおいて、同期バースト発火の出現が機能的成熟化の指標の一つである。同期バースト発火が観察される培養時期において、主要な興奮性シナプス伝達を担う、AMPA 型グルタミン酸受容体や NMDA 型グルタミン酸受容体を介した同期バーストの発生が確かめられている。同期バースト発火の減少は化合物投与によって変化する為、化合物応答の重要な指標となっている (Bader et al. 2017; Fukushima et al. 2016; Hammond et al. 2013; Odawara et al. 2016; Takasuna et al. 2017)。同期バースト発火 (Synchronized burst firing : SBF) の解析パラメータには、同期バースト発火数 (Number of Bursts : NB) ,同期バースト発火の持続時間 (Duration)、同期バースト内発火数 (Spikes in a Burst : SiB)、同期バースト発火間隔 (Inter Burst Interval: IBI) など 30 種類以上ある。このパラメータを指標とした薬効評価には、同期バースト発火の正確な検出が不可欠であるが、正確な検出法は確立されていない。多くの解析法では、複数の電極で取得された発火数のヒストグラムに閾値を設定する手法で検出されている (Bakkum et al. 2014; Charlesworth et al. 2015; Chen et al. 2009; Cocatre-Zilgien and Delcomyn 1992; Gourévitch and Eggermont 2007; Hennig et al. 2011; Kaneoke and Vitek 1996; Ko et al. 2012; Legendy and Salcman 1985; Pimashkin et al. 2011; Tokdar et al. 2010)。しかし、この方法では、正確に同期バースト発火を検出することができず、例えば同期バーストの数を正確に検出できたとしても、Duration や SiB を正確に検出することは困難である。また、別の同期バースト検出法には発火間隔 (inter spike interval : ISI) と SiB、およびアクティブ電極の数に基づく方法がある。しかし、この手法も Duration の正確な検出や連続的に発生した同期バースト発火を区別して NB を正確に検出することは難しく、また小規模な同期バースト発火を検出できる方法ではない。

本章では同期バースト発火を熟練の研究者が望む同期バーストの個数と長さを正確に検出できる新規同期バースト検出法を開発した。この方法は 4 つのステップで実行され、4 つの閾値を順次設定することで、正確な同期バースト検出を可能とする。さらに、研究者に依存しない、均一な同期バースト検出法へと発展させる為、4-step method で正確に検出した同期バースト領域を AI に学習させ同期バースト検出 AI を開発した。

2-2 方法

2-2-1 ヒト iPSC 細胞由来皮質ニューロンの培養

Human induced PSC-derived cortical neurons (XCL-1, XCell Science) を 3.0×10^5 cells/cm² の密度で Polyethyleneimine (Sigma) と Laminin-511 (Nippi) をコーティングした 64-channel MEA chips (MED-P515A; Alpha Med Scientific) に $\phi 3.4$ mm のガラスリングを使用して播種を行った。播種の 1 時間後に Neural Maturation basal medium (NM-001-BM100, XCell Science Inc. USA) に neuron maturation supplement A (NM-001-SA100, XCell Science) と 100U/ml の penicillin/streptomycin (168–23191, Wako) を加えた培地をリング外に添加した。その後、慎重にリングを取り除いた。培養 8 日目以降は、培地を SM 1 neuronal supplement を加えた BrainPhys Neuronal medium (STEMCELL technologies, USA) に置換して培養した。培養 14 日目に Human iPSC-derived mature astrocytes (XCL-1 mature astrocytes, AR-001-1V, XCell Science) を 3.0×10^4 cells / well の密度で播種した。培地交換は 4 日おきに半量交換を行った。

Human iPSC derived neurons (ax 0019, Axol Bioscience) を 5.0×10^6 cells/cm² の密度で ready set (ax0052, Axol Bioscience) と sure bond (ax0041, Axol Bioscience) をコーティングした 24-well MEA plates (Comfort; Alpha Med Scientific) に $\phi 3.4$ mm のガラスリングを使用して播種を行った。培養 21 日目以降は、培地を SM 1 neuronal supplement を加えた BrainPhys Neuronal medium (STEMCELL technologies) に置換して培養した。培養 14 日目に Human iPSC-derived mature astrocytes (XCL-1 mature astrocytes, AR-001-1V, XCell Science) を 3.0×10^4 cells / well の密度で播種した。培地交換は 4 日おきに半量交換を行った。

2-2-2 細胞外記録

自発活動の細胞外電位計測を、37 °C、CO₂ 5% の環境下で 24-well MEA system (Presto; Alpha Med Scientific) と 64-channel MEA system (MED64-Basic; Alpha Med Scientific) を用いて 20kHz のサンプリングレートと 100Hz のハイパスフィルタで行った。

2-2-3 薬理試験

薬剤応答が従来の SBF 法と 4 ステップ SBF 法で異なるかどうかを判断するために、痙攣誘発薬として Potassium channel blocker である 4-aminopyridine (4-AP, 0, 0.3, 1, 3, 10, 30 μ M ; 275875-1G, Sigma–Aldrich) を投与した。従来の方法では、2 つの閾値をそれぞれ 120 および 50 Hz (Vehicle, 0.1, 1, および 3 μ M 4-AP)、60 および 20

Hz (10 μ M 4-AP)、35 および 10Hz (30 μ M 4-AP) に設定してバースト検出を行った (Kapucu et al. 2012)。自発的発火を各濃度で 10 分間記録した。

2-2-4 免疫化学蛍光染色

培養したサンプルを氷上で 4°C の 4% paraformaldehyde で 10 分間固定し、その後 20°C のメタノールで 10 分間固定した。固定した細胞を 0.2% Triton X-100 で 5 分間インキュベートした後に、preblock buffer (0.05% Triton-X and 5% goat serum) で 1 時間インキュベートした。神経を可視化するために一次抗体 rabbit anti- β -tubulin III, 1:1000 (T2200, Sigma-Aldrich) で 24 時間インキュベートし、その後、二次抗体 anti-rabbit 488 Alexa Fluor (A21206, Thermo Fisher Scientific, 1:1000 in preblock buffer) で 1 時間インキュベートした。細胞核を染色するために、Hoechst 33258 (H341, DOJINDO) 1 mg/ml で 1 時間インキュベートした。染色したサンプルを preblock buffer で 2 回洗浄し、paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) で 2 回洗浄した。蛍光染色画像は共焦点顕微鏡 (TCS SP8, Leica) で取得した。画像処理には ImageJ software (NIH) を使用した。

2-2-5 データ解析

電気生理学的活動を Presto と Mobius (Alpha Med Scientific) を使用して解析した。信号の $\pm 5.3\sigma$ の閾値を用いて細胞外電位からスパイクを検出した。ここで σ はベースラインノイズの標準偏差である。同期バーストの検出には Fig. 2-2 に示す 4-step method を使用した。同期バーストの Duration と同期バースト内発火数は MATLAB を用いて算出した。従来の同期バースト検出法として、スパイクのヒストグラムを用いた two-threshold SBF detection method を使用した。ヒストグラムは bin size 50 ms and smoothing of 3 bin で作製した。上限と下限の閾値にはそれぞれ 800, 600 spikes/s を使用した。データは平均値 \pm 標準誤差で表し、有意差検定は Student's t-test で行った。

2-3 結果

2-3-1 hiPSC 由来皮質ニューロンの自発活動と従来閾値法を用いた同期バースト発火 (SBF) 検出

64-channel MEA チップ上に hiPSC 由来皮質ニューロンを培養し、自発活動を計測した。hiPSC 細胞由来皮質ニューロンは培養 2 週から 3 週で自発活動が数電極で観察され、培養 5 週目以降から同期バースト発火が観察された。Fig. 2-1 (A) に培養 200DIV 以上培養した皮質ニューロンの蛍光免疫染色画像 (a) と、赤枠で示すような少ない発火数で構成される弱い同期バーストと構成する発火数が多い強い同期バーストを含む 115DIV における典型的な自発活動電位波形 (b) を示す。Fig. 2-1 (B) は各電極で検出された自発活動をプロットしたラスタプロット (下段) と電極全体の発火数のヒストグラム (上段) 上に従来の 2 つの閾値法で検出した同期バースト領域 (橙色) を示した図である。この方法は発火数のヒストグラムの平滑線と、上限閾値および下限閾値との交点をそれぞれ同期バーストの開始と終了とする方法である。橙色の矢印で示す範囲の同期バーストを検出するために、閾値を上限閾値 : 800 spikes/sec、下限閾値 : 550 spikes/sec に設定した。従来法で橙色の矢印で示す範囲で同期バーストを検出した結果、黒矢印で示すように、同期バーストではない領域の検出や 2 つの同期バーストを 1 つの同期バーストとして検出するなどの誤検出が含まれた。

2-3-2 4-step method を用いた SBF 検出

従来の発火数のヒストグラムの閾値法では弱い同期バーストと強い同期バーストを正確に検出することはできなかった。そこで、発火数だけでなく、発火間隔を含む 4 つの閾値で同期バーストを検出する 4-step method を開発した。開発した検出方法は Fig.2-2 に示すように 4 つのステップで構成される。ステップ 1 : 発火間隔 (Inter Spike Interval : ISI) を算出し、ISI が閾値 X ms 以下の場合、その発火を同一の同期バーストを構成する発火として定義した。Fig.2-2 (A) では $X = 4$ ms で検出された同期バーストの開始 (赤線および赤矢印) と終了 (青線および青矢印) をプロットしたラスタプロット (上段) とヒストグラム (下段) の例を示す。ラスタプロットの赤点は同期バーストを構成する発火であることを示す。ステップ 1 では 26671 個の同期バーストを検出された。ステップ 2 : 同期バーストを構成する発火数を算出し、発火数が X spikes/SBF 未満の同期バーストを非同期バーストと定義した。Fig.2-2 (B) は $X=20$ spikes/SBF で定義された同期バーストをプロットしたヒストグラムと同期バーストを構成する発火 (赤点) と非同期バースト発火と定義された発火 (緑点) をプロットしたラスタプロットを示している。ステップ 2 で検出される同期バーストは 4337 個に削減された。ステップ 3 : 同期バースト間隔 (Inter Burst Interval : IBI) を算出し、IBI

が閾値 X ms 以下の場合、2 つの同期バーストを結合し、2 つのバースト間の発火を 1 つの同期バーストとして定義した。Fig.2-2 (C) では $X = 4$ ms で検出された同期バーストの開始 (赤線および赤矢印) と終了 (青線および青矢印) をプロットしたラスタープロット (上段) とヒストグラム (下段) の例を示す。ステップ 3 で検出される同期バーストは 1090 個に削減された。ステップ 4: 同期バーストを構成する発火数を算出し、発火数が X spikes/SBF 未満の同期バーストを非同期バーストと定義した。Fig.2-2 (D) は $X=3000$ spikes/SBF で定義された同期バーストをプロットしたヒストグラムと同期バーストを構成する発火 (赤点) と非同期バースト発火と定義された発火 (緑点) をプロットしたラスタープロットを示している。ステップ 4 で最終的に 4 つの同期バーストが検出された。従来の閾値法 (Fig. 2-1B(a)) では誤検出が発生した部分を、4step method (Fig. 2-2 D) は目的とする同期バーストを正確に検出できることが分かった。4step method は同期バーストの持続時間を正確に検出し、連続した同期バーストの識別と誤検出の防止を可能にした。

2-3-3 従来法と 4-step method の SBF 検出結果の比較

従来法と 4-step method を用いて検出した強い同期バーストと弱い同期バーストの解析結果の比較を Fig. 2-3 に示す。Fig. 2-3 A (a) は強い同期バーストのヒストグラムとラスタープロットである。ヒストグラムの赤い領域は 4-step method で検出された領域を示し、赤点と青点はそれぞれ従来法で検出したバースト開始点と終了点を示している。強い同期バーストにおける同期バースト時と非同期バースト時のヒストグラムの最大ピーク発火数の平均値はそれぞれ 6029.5 ± 47.2 Hz と 48.8 ± 0.6 Hz であり、同期バースト時は非同期バースト時の 123.5 倍の発火周波数であった。Fig. 2-3 A(b) に従来法と 4-step method で検出した同期バースト数と同期バーストの持続時間および、同期バースト内発火数を示す。検出された同期バースト数は従来法と 4-step method とともに 10 分間に 21 回で一致した。同期バーストの持続時間は従来法: 8.33 ± 0.09 秒、4-step method: 8.06 ± 0.10 秒で同期バースト内発火数は従来法: $12,215 \pm 69$ spikes/SBF、4-step method: $12,166 \pm 70$ spikes/SBF であった。弱い同期バーストの場合 (Fig. 2-3 B) は、同期バースト時と非同期バースト時のヒストグラムの最大ピーク発火数の平均値はそれぞれ 1086.3 ± 36.0 Hz と 212.4 ± 4.8 Hz であり、同期バースト時は非同期バースト時の 5.11 倍の発火周波数を示した。従来法を用いたバースト検出は 4-step method で検出した同期バーストの持続時間と同じ持続時間でバーストを検出できる閾値を用いて行った。その結果、Fig. 2-3 B (a) の黒矢印示す部分で誤検出が発生した。Fig. 2-3 B(b) に従来法と 4-step method で検出した同期バースト数と同期バーストの持続時間および、同期バースト内発火数を示す。検出された同期バースト数は従来法: 82 回、4-step method: 38 回であった。同期バーストの持続時間は従来法: 5.06 ± 0.53 秒、4-step method: 9.02 ± 0.39 秒で同期バースト内発火数は従来法: 2388 ± 279 spikes/SBF、4-step

method : 4634 ± 234 spikes/SBF であった。弱い SBF 検出の結果は、従来の方法と 4 ステップの方法で大幅に異なった。

2-3-4 従来法と 4-step method の薬剤応答比較

同期バースト検出法の違いが同期バーストを指標とした薬剤応答の解釈に与える影響を調べるため、24-well MEA plates 上に 15 週間培養したヒト iPS 細胞由来大皮質ニューロンにてんかん様発火を誘発する 4-AP を投与した際の自発活動を計測し、同期バースト検出を従来法と 4-step method を用いて解析した。Fig. 2-4 A に Vehicle、4-AP 1 μ M、30 μ M を投与した際の 16 電極のラスタプロットとヒストグラムを示す。同期バースト数は 4-AP 投与により用量依存的に増加した。同期バーストの持続時間は 4-AP 1 μ M で増加し、30 μ M で減少した。Fig. 2-4 B は従来法および 4-step method で検出した典型的な同期バーストを示している。従来法と 4-step method で検出された同期バーストの個数はほぼ同じであったが、同期バーストの持続時間は大幅に異なった (Fig. 2-4 B b-c)。4-AP 0.3、1、3 μ M の同期バーストの持続時間は 4-step method が従来法よりも 1.4 倍長く検出され、10、30 μ M では 2.3 倍、2.5 倍長く検出された (Fig. 2-4 C b)。同期バースト内発火数も同様に Vehicle 以外の用量で従来法と 4-step method の間で異なる結果となった (Fig. 2-4 C c)。同期バーストの持続時間および発火数の用量依存的な変化は 2 つの方法で同じ傾向を示したが、持続時間が最も増加する 4-AP の用量は従来法 (3 μ M) と 4-step method (1 μ M) で異なった。

2-3-5 4-step method バースト検出を学習したバースト検出 AI の作製

開発した 4-step method によるバースト検出には依然として問題がある。4-step method は、ラスタプロットで視覚的に認識できる同期バーストを正確に検出できるが、同期バーストの発生の判断は研究者の判断に依存するため、均一な同期バースト検出法ではない。研究者の間で同期バーストの明確な定義を決定することは、4-step method の使用を標準化するために不可欠である。しかし、細胞種や培養状況の違いによって、明確な定義が難しいのが現状である。そこで、4-step method によって正確に検出した同期バースト領域とラスタプロット画像を AI に学習させ、均一な同期バースト検出を可能とするバースト検出モデルを開発した。Fig2-5 にモデルの概念図を示す。研究者が目視で同期バーストを検出する工程はラスタプロット画像の特徴からバースト領域を検出する物体検出の課題といえる。そこで、今回のアルゴリズムでは Faster R-CNN モデルを採用した。サンプルによってバーストの頻度が異なるため、AI に学習させるラスタプロット画像の正規化を Fig2-6 に示す方法で行った。具体的には発火数のヒストグラムを作製し、ヒストグラムに高速 FFT を行い、同期バーストの発火周波数からバースト周期を算出した。ラスタプロット画像をバースト周期の 2 倍

の時間窓で分割することで、ラスタープロット画像に占める同期バースト領域の割合を正規化した。モデルの学習および検証には、同期バースト頻度の異なるサンプルが混在した、1536枚のラスタープロット画像を使用した。データセットの内75%を学習に使用し、残りの25%を学習時の検証に使用した。

2-3-6 4-step method と AI の SBF 検出結果の比較

作製したモデルが形状や強さが異なる同期バーストを正確に検出できるかを調べるため、培養状況や投与した痙攣陽性化合物が異なる178サンプルのデータを用いて4-step method で検出した同期バーストとAIが検出した同期バーストを比較した (Fig. 2-7)。Fig. 2-7 (A) は4-step method およびバースト検出モデルが検出した典型的な同期バーストを示している。バースト検出モデルは4-step method と同様に誤検出なくバーストを検出できている。Fig. 2-7 B に従来法と4-step method で検出した同期バースト数と同期バーストの持続時間を示す。モデルの検出結果はバースト数：99.7%、Duration：91.9%の精度で4-step method の結果と一致した。培養状況や投与した薬剤が異なるデータであっても4-step method と同様にバースト検出可能であった。

2-4 考察

In vitro MEA データで得られる同期バースト発火の数と持続時間を正確に取得できる新しい同期バースト検出法を開発した。4つの閾値を使用することで、熟練の研究者が判断する同期バーストを正確に検出することができた (Fig. 2-2)。4-step method は同期バーストの発火数を2回評価し、同期バースト間隔の閾値で同期バーストを結合する点に新規性がある。この4-step method は、研究者が意図した同期バーストの持続時間を決定することが可能で、連続した同期バーストの分離や弱い同期バーストの検出を可能とし、従来の方法に比べて誤検出を回避できる利点がある (Fig. 2-2D, Fig. 2-3)。強い同期バーストを誘発する ACSF では、同期バースト数、持続時間、および含まれる発火数に関して、従来のヒストグラムの閾値法と4-step method の間に有意差は観察されなかった (Fig. 2-3)。これらの結果は、hiPSC 由来ニューロンの活動が強い同期バーストだけで構成される場合は、従来の方法を使用して同期バーストを正確に評価できることを示している。対照的に、培地で培養された hiPSC 由来ニューロンの活動には弱い同期バーストと非同期バースト活動が混在する。培地中の神経活動の4-step method と従来の方法間で検出された同期バースト数、持続時間、および含まれる発火数に有意差が観察された (Fig. 2-3B)。4-step method では、同期バーストと自発的な活動を正確に区別することができた。従来閾値法を用いて、研究者が判断する同期バーストの発火の持続時間を指標として閾値を設定した場合の結果を Fig. 2-3B に示した。この設定値では、同期バーストの数は4-step method で示された数の2倍以上となった。閾値を高く設定すると、同期バーストの数は4-step method と同等に検出できるが、同期バースト発火の持続時間や同期バースト内発火数は、4-step method で示される数よりも大幅に少なくなり、正確な同期バースト発火の検出はできなかった。MEA を用いて中枢神経系に影響を与える薬物の有効性を評価する指標は、同期バースト発火に関するパラメータに基づいている。そのため、4-AP 30 μ M を投与時の様な、同期バースト内発火数が少ない高頻度の同期バーストが含まれる場合、従来の閾値法では同期バーストを正確に検出できない (Fig. 2-4A, B-c)。4-AP の薬剤応答の結果から、発火取得電極数が少ない場合 (16 電極/well) も同様に従来法では正確に同期バースト発火が検出できない可能性が示唆される。Figure 2-4 C(b)が示すように、従来法と4-step method では、同期バーストの持続時間の最大値を示す用量が異なっていた。すなわち、使用する同期バースト検出方法によって、薬剤応答で重要な指標となる Half maximal effective concentration (EC50)や Half-maximal inhibitory concentration (IC50)などの薬理学的パラメータが異なる可能性が示唆される。異なる同期バースト検出方法を使用して同じ化合物の応答を施設間で比較した場合、生物学的応答の比較を行うことは難しく、誤った結論を導く可能性がある。そのため、MEA データから化合物応答を検出する方法として、本研究で開発した4-step method を国内外の研究者に広く使用して頂くことが、精度の高い薬効評価系を構築する上で最適であると考えられる。毒性評価法は、施設間

で共通するプロトコルを使用して実施する歴史的背景があり、ガイドライン化された場合は統一的な解析法で算出された結果に基づいて議論される。

4-step method を普及させるための問題点は、熟練した研究者の判断に依存している点である。同期バーストの発生と持続時間は研究者の判断に依存するため、均一な同期バースト検出法ではない。そこで、4-step method によって正確に検出した同期バースト領域を教師データとして、ラスタープロット画像を用いた同期バースト検出 AI を開発した。物体検出モデルに学習させる画像に同期バーストの発火周期を用いて正規化したラスタープロット画像を用いた点に本 AI 解析法の新規性がある。この同期バースト検出モデルで検出した同期バーストの個数は 100%の精度で検出し、同期バースト発火の持続時間は 92%の精度で検出した。AI が検出した同期バーストの長さを研究者が判断してもどちらが正しいのか判断が付かなかった為、AI が検出した長さの方が正しい可能性がある。バースト検出 AI は 4-step method に比べ、研究者の目視による閾値設定を必要とせず、高速に処理できることから、大幅な時間短縮も実現する。本同期バースト検出 AI を国内外で検出された MEA データに適用することで、*in vitro* MEA データを用いた基礎研究および応用研究の発展が加速されるものと考えられる。

2-5 結論

本章では熟練の研究者が意図する同期バーストの個数と持続時間を正確に検出可能な 4-step method を開発した。 *In vitro* MEA データから同期バースト検出が行われ、約 50 年になるが、最も正確に検出できる方法であると考えられる。本検出法は、研究者の判断に依存するが、施設内で特定の解析担当者が常に 4-step method を用いて検出すれば、正確な同期バースト発火の検出に基づいたデータベースが構築され、化合物評価の精度が向上するものと期待される。誰が解析しても同じ結果となる均一的な同期バースト検出法とする為に、ラスタープロット画像を用いた同期バースト検出 AI を開発した。本開発は、4-step method による正確な同期バースト発火の検出を実現したことによる成果である。AI 解析法により、国内外全施設の同期バースト発火を統一的な方法で検出することが可能となり、新しい解析プラットフォームとしての展開が期待される。また、本研究で開発した同期バースト発火検出法は、*in vitro* MEA データのみならず、脳スライスや *in vivo* 脳のデータにも適用可能であり、Ca²⁺指示薬や膜電位感受性色素を用いた光イメージング法で取得されたデータにも適用可能である。神経科学領域において、幅広い汎用性を有し、様々な分野の基礎研究および応用研究へと展開できるものである。

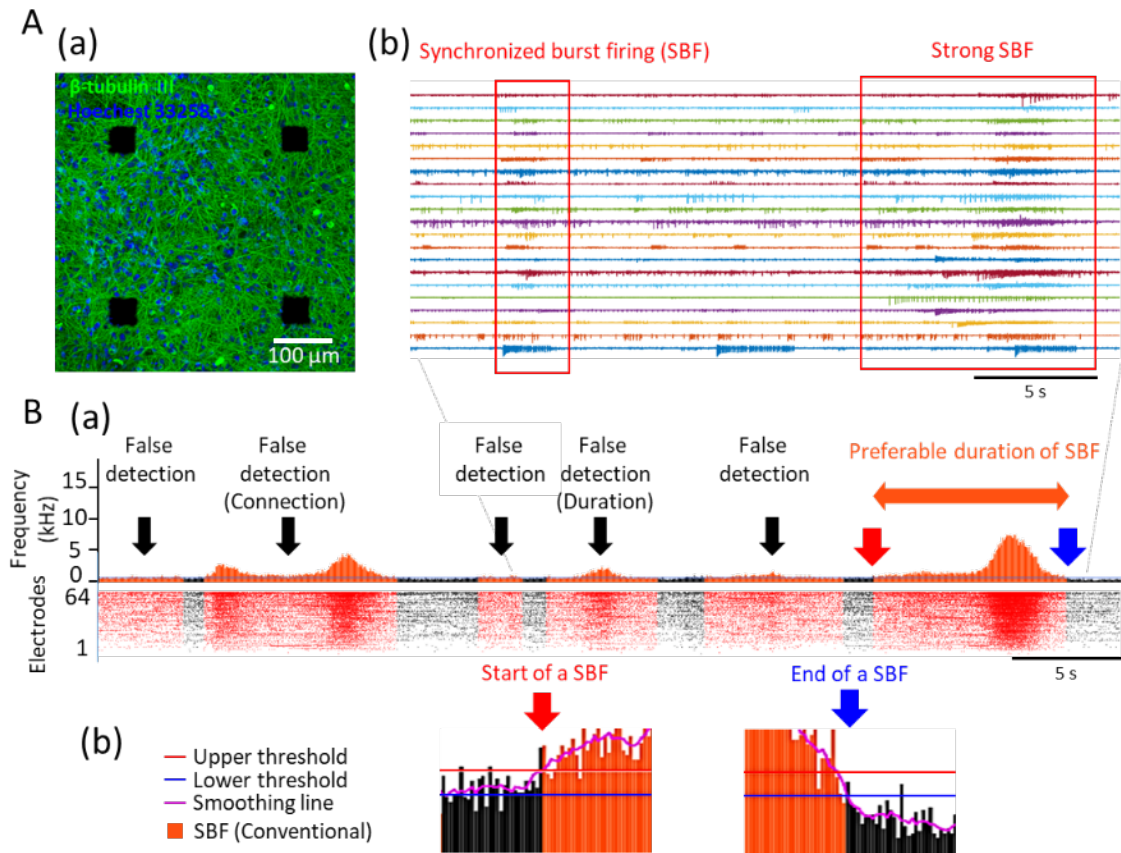


Figure 2-1. Synchronized burst firings (SBFs) in cultured hiPSC-derived cortical neurons on a multi-electrode array (MEA) chip and SBF detection using the conventional threshold method. (A-a) Immunostained image of cultured hiPSC-derived cortical neurons on an MEA chip for 6 weeks in vitro. The images show the neurons using β -tubulin III (green) and nuclei using Hoechst 33258 (blue) immunostaining. (A-b) Raw data from extracellular recordings of spontaneous firings, including SBFs, at the 21 electrodes picked up from 64 electrodes. Red squares indicate an SBF and a strong SBF with a long duration. (B-a) Raster plots and the array-wide spike detection rate (AWSDR; bin size, 50 ms) of spontaneous firings at 64 electrodes for 1 min at 115 days in vitro. Gray dotted line shows the same time with the raw data from Fig. 1Aeb. The SBFs detected by the conventional two-threshold method are red in raster plots and orange in AWSDRs. The upper and lower thresholds were set to detect the duration of SBFs described by the orange arrow. Black arrows indicate false detection of SBFs. (B-b) Magnified image of the start and end of SBFs in red and blue arrows in Fig. 1Bea. The start and end of an SBF were determined by the intersection of the threshold and smoothing line (bin size, 3).

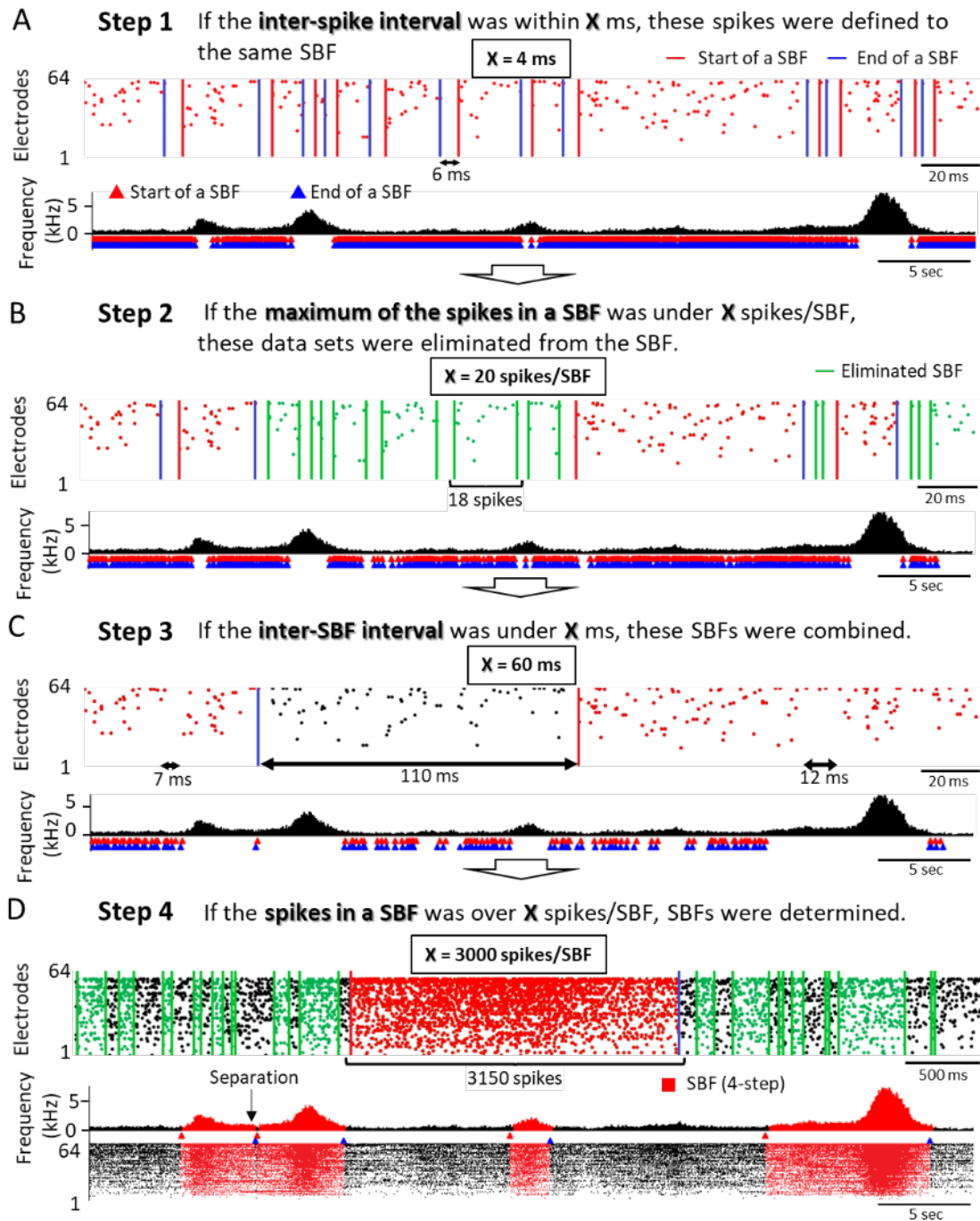


Figure 2-2. 4-step SBF detection method. (A) The step 1 parameter and a sample magnified raster plot and AWSDR for 300 ms. Red and blue lines show the start and end of an SBF at $X = 4$ ms. Red dots indicate the spikes in an SBF. Red and blue triangles show the start and end of an SBF in AWSDR for 1 min. (B) The step 2 parameter and a sample raster plot and AWSDR in the same time scale as step 1. Green lines show the eliminated SBFs at 20 spikes/SBF. (C) The step 3 parameter and the raster plot and AWSDR combining SBFs at $X = 60$ ms. Time scale is the same as in steps 1 and 2. (D) The step 3 parameter and the raster plot for 1 min and the AWSDR for which the SBF was determined. The final 4 SBFs are indicated by red in the raster plot and orange in the AWSDR.

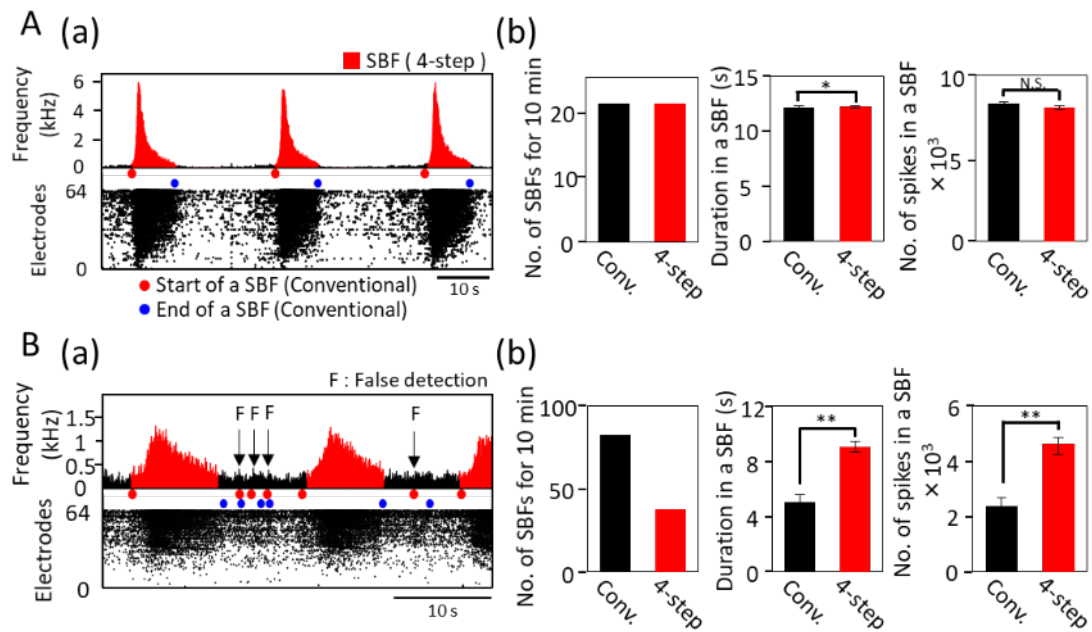


Figure 2-3. Difference in SBF detection between the conventional and 4-step methods. (A) SBF detection in the case of a firing pattern with strong SBFs. Spontaneous firings were recorded under ACSF conditions in cultured Xcell hiPSC neurons at 8 weeks in vitro. (a) The AWSDR and raster plots with strong SBFs. The red histogram shows the SBF detected by the 4-step method. Red and blue circles show the start and end, respectively, of an SBF using the conventional method. (b) The number of SBFs/10 min, duration, and number of spikes in an SBF analyzed by the conventional and 4-step methods. (B) SBF detection in the case of a firing pattern with a low ratio of SBFs. Spontaneous firings were recorded under medium conditions at 8 weeks in vitro. (a) The AWSDRs, raster plots showing a firing pattern typical for a low ratio of SBFs, and the SBFs detected by the conventional and 4-step methods. F indicates a false detection by the conventional method. (b) Analyzed SBFs by both methods. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

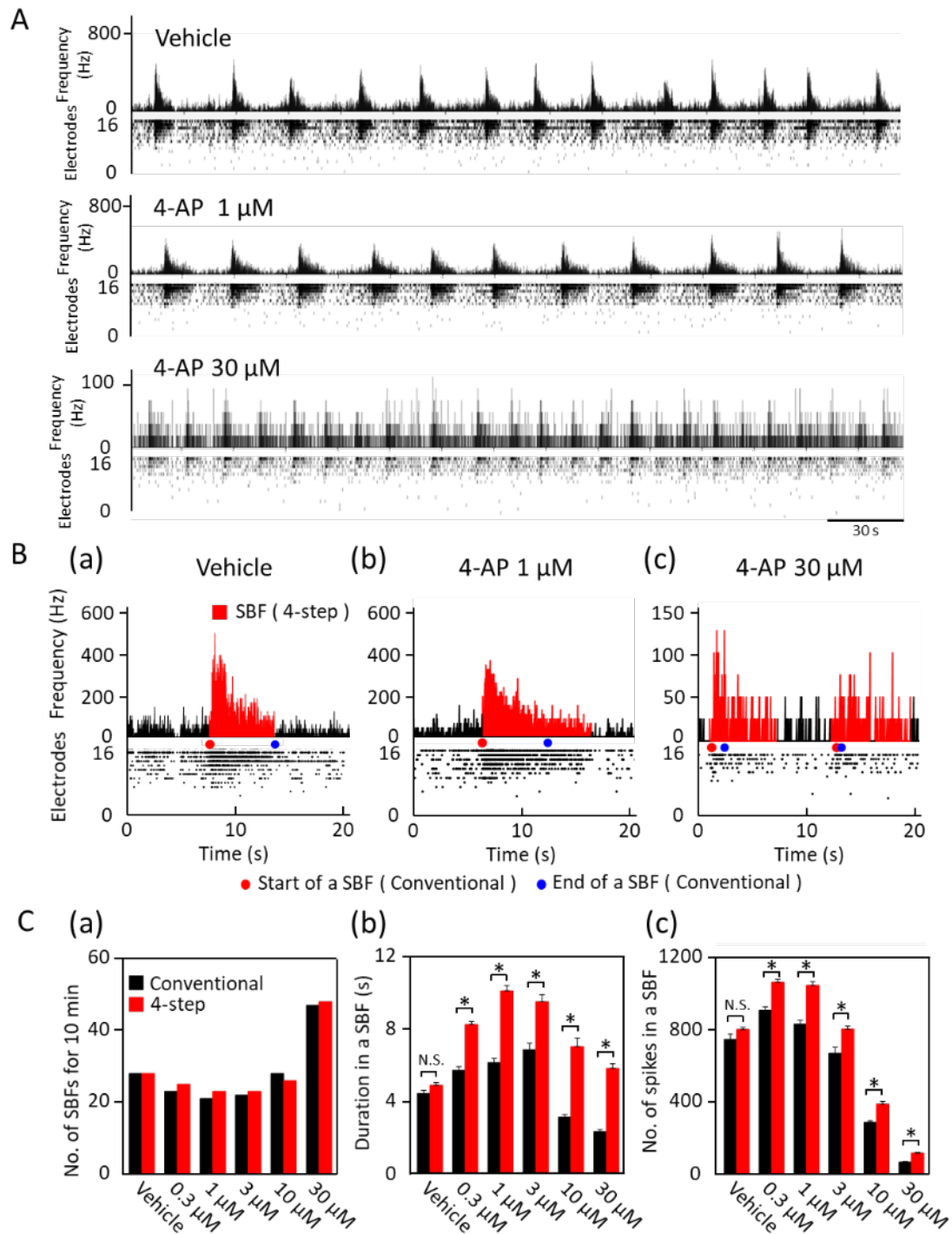


Figure 2-4. Comparison of SBF analyses of epileptiform activities induced by 4-AP using conventional and the 4-step SBF detection methods. (A) Raster plots and AWSDR at 16 electrodes for 5 min without and with 4-AP administration (1 and 30 mM). (B) Typical SBF detection using conventional and 4-step methods without and with 4-AP administration (1 and 30 mM). The red histogram shows the SBF detected by the 4-step method. Red and blue circles show the start and end, respectively, of an SBF using the conventional method. The lower graph shows the raster plots at 16 electrodes for 20 s. (C) Comparison of SBF analysis between conventional and 4-step method. (a) Number of SBFs/10 min. (b) Duration of an SBF. (c) Number of spikes in a SBF. Black bar, conventional detection method; red bar, 4-step detection method (* $p < 0.01$).

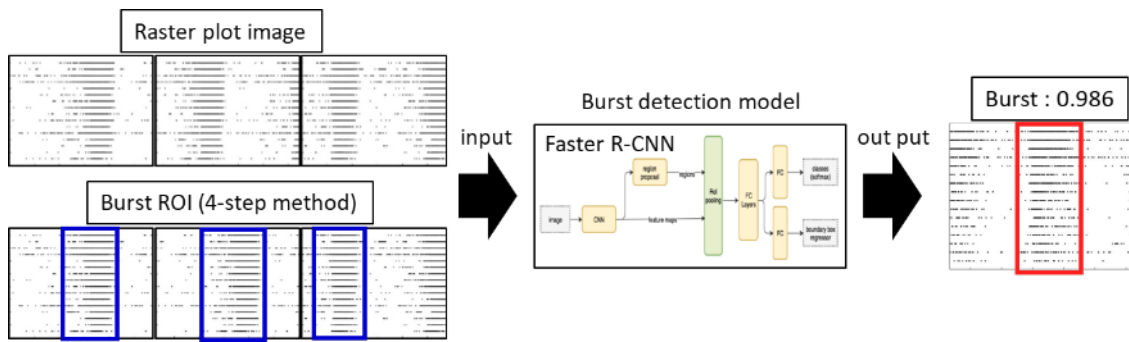


Fig. 2-5. Schematic of the burst detection algorithm

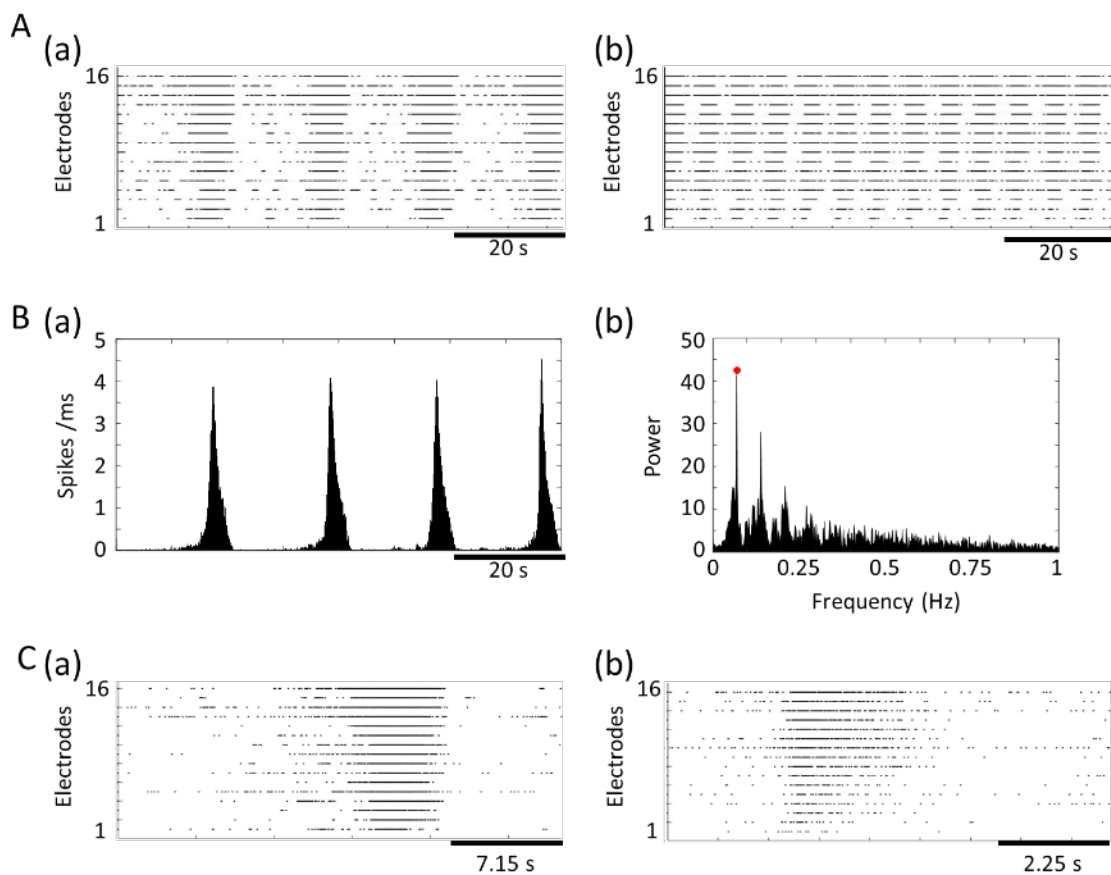


Figure 2-6. Raster plot image normalization using burst firing period. (A) Raster plots at 16 electrodes for 100 sec. (a) low burst frequency data. (b) high burst frequency data. (B) (a) AWSDR at low burst frequency data. (b) Fast Fourier transform spectrum of (a). red dot indicate maximum power. (C) Raster plot after normalization using burst firing period. (a) low burst frequency data. (b) high burst frequency data.

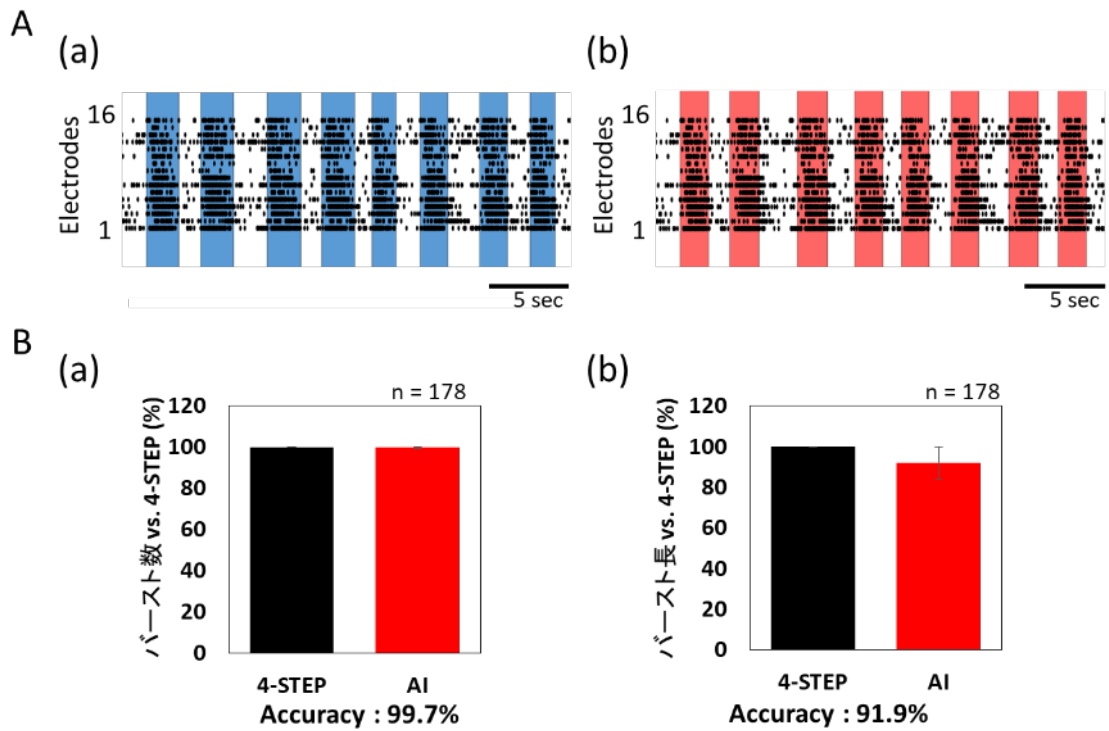


Figure 2-7. Difference in SBF detection between the 4-step method and burst detection model. (A) Raster plots at 16 electrodes for 30 sec and Typical SBF detection using (a) 4-step methods and (b) burst detection model. The blue area shows the SBF detected. The red area shows the SBF detected by burst detection model. (B) Comparison of SBF analysis between the 4-step method and burst detection model. (a) Number of SBFs/10 min. (b) Duration of an SBF. Black bar, 4-step detection method; red bar, burst detection model.

第3章 AIを用いた神経活動の毒性・薬剤名予測法の開発

3-1 序論

第2章では、*in vitro* MEA データの主要な解析パラメータとなる同期バースト発火を検出する方法について述べた。本章では、本研究の主題である *in vitro* MEA データから、医薬品の痙攣毒性および作用機序を予測する新規解析法について述べる。*In vitro* MEA データにおける医薬品の痙攣毒性検出法は、リード化合物が選定された時点での使用が最も期待されている。痙攣毒性リスクが高い候補化合物を排除することは勿論のこと、開発を進めるリード化合物の順位付けに期待されている。また、作用機序が予測できれば、毒性のみならず作用機序に基づいた順位付けや、作用機序に基づき、化合物の修飾を変化させることで、薬効を保ちながら、毒性を減少させる化合物開発が可能となる。

近年、ヒト iPS 細胞由来ニューロンおよび Rodent の神経細胞を用いて痙攣陽性化合物の応答を検出した論文が報告されている (Bradley et al. 2018; Fan et al. 2019; Kreir et al. 2018)。しかしながら、痙攣毒性を検出する為の解析法および解析パラメータは全く確立していない。特に、作用機序の異なる痙攣陽性化合物は変化が検出される解析パラメータが異なることが報告されている (Bradley et al. 2018; Kreir et al. 2018; Tukker et al. 2020)。すなわち、毒性検出には、一般的なたんかん様活動 (SLE) である同期バーストの数や発火数などの単純な解析パラメータだけでは不十分で、複数の解析パラメータを用いた多変量解析や新規解析パラメータの開発が必要な状況にある。2章で論じたように、同期バースト発火の検出法が定まっていないこともあり、痙攣毒性検出の為の解析法が未確立である点が、国内外で共通の課題となっており、議論の対象となっている。

MEA データから得られる同期バースト発火に関する各種パラメータ、および同期バースト発火以外のパラメータは、神経ネットワーク活動の時系列データをラスタープロット化して算出する方法が一般的である。すなわち、ラスタープロット画像に神経ネットワーク活動の時系列の特徴が入っていると言えることから、数学的に解析パラメータを算出するのではなく、ラスタープロット画像そのものを機械学習することに毒性検出法が有効であると考えた。研究者が抽出している解析パラメータ数よりも遥かに多い情報を同時に判定することができる。機械学習による痙攣の検出は *in vivo* 皮質脳波の発作終了の検出 (Shoeb et al. 2011) や Rat 急性スライスの LFP 波形画像と画像認識技術を用いた SLE の識別 (Gao et al. 2017) が報告されているが、ラスタープロットを用いた機械学習は報告されていない。本章では、ヒト iPS 細胞由来皮質ニューロンを用いて、13 種類の痙攣陽性化合物と 2 種類の陰性化合物の MEA データを取得し、ラスタープロット画像の機械学習により、痙攣毒性リスクを予測する AI および作用機序予測と同様の意味合いを持つ薬剤名予測 AI を開発した。

3-2 方法

3-2-1 ヒト iPS 細胞由来皮質ニューロンの培養

Human induced PSC-derived cortical neurons (XCL-1, XCell Science) を 3.0×10^5 cells/cm² の密度で Polyethyleneimine (Sigma) と Laminin-511 (Nippi) をコーティングした 24-well MEA plates (Comfort; Alpha Med Scientific) に $\phi 3.4$ mm のガラスリングを使用して播種を行った。播種の1時間後に Neural Maturation basal medium (NM-001-BM100, XCell Science) に neuron maturation supplement A (NM-001-SA100, XCell Science) と 100U/ml の penicillin/streptomycin (168-23191, Wako) を加えた培地をリング外に添加した。その後、慎重にリングを取り除いた。培養8日目以降は、培地を SM 1 neuronal supplement を加えた BrainPhys Neuronal medium (STEMCELL technologies) に置換して培養した。培養14日目に Human iPSC-derived mature astrocytes (XCL-1 mature astrocytes, AR-001-1V, XCell Science) を 3.0×10^4 cells / well の密度で播種した。培地交換は4日おきに半量交換を行った。

3-2-2 細胞外記録

24-well MEA system (Presto; Alpha Med Scientific) を用いて 37 °C 、CO₂ 5% の環境下で自発活動を記録した。20kHz のサンプリングレートで 100Hz のハイパスフィルタを用いて細胞外電位を記録した。

3-2-3 薬理試験

培養14週以降のヒト iPS 細胞由来皮質ニューロンに痙攣を誘発するために13種類の痙攣陽性化合物と2種類の陰性化合物を累積投与した。痙攣陽性化合物には Potassium channel blocker である 4-aminopyridine (4-AP, 1, 10, 30, 60 μ M ; 275875-1G, Sigma-Aldrich) と GABAA receptor antagonist である Picrotoxin (0.1, 0.3, 1, 3, 10 μ M ; P1675-1G, Sigma-Aldrich), 1,5-pentamethylene-tetrazole (PTZ, 1,10,100,1000 μ M; P0046, Tokyo Chemical Industry Co), Sodium channel blocker である Carbamazepine (1,3,10,30,100 μ M; C4024-1G, Sigma-Aldrich), Muscarinic ACh receptor agonist である Pilocarpine (0.3, 1, 3, 10, 30, 100 μ M ; P6503-5G, Sigma-Aldrich) , オピオイド鎮痛薬およびノルエピネフリンおよびセロトニン再取り込み阻害薬である Tramadol (0.3, 1, 3, 10, 30, 100 μ M ; 42965-1G, Sigma-Aldrich) , セロトニン取り込み阻害薬である Paroxetine (0.3,1,3,10,30 μ M; PHR1804, Sigma-Aldrich) , ノルエピネフリンおよびセロトニン再取り込み阻害剤である Venlafaxine (0.3,1,3,10,30 μ M ; PHR1736-1G), ノルエピネフリンおよびセロトニン再取り込み阻害剤およびドーパミン受容体の阻害剤である Amoxapine (1,3,10,30,100 μ M ; A129-

100MG、Sigma-Aldrich), adenosine receptor antagonists である Theophylline (1,3,10,30,100 μM ; T1633-50G、Sigma-Aldrich), Kainic acid (0.1,0.3,1,3,10 μM ; K0250-10MG、Sigma-Aldrich), N-Methyl-D-aspartic acid (NMDA,0.1,0.3,1,3,10 μM ; M3262-25MG、Sigma-Aldrich), α 4 β 2 ニコチン性アセチルコリン受容体作動薬である Varenicline (0.3,1,3,10,30 μM ; PZ0004-5MG、Sigma-Aldrich) を使用した。陰性化合物として、解熱鎮痛剤である Acetaminophen (1,3,10,30,100 μM ; A7085-100G、Sigma-Aldrich), 薬剤の溶媒である DMSO (0.1%,0.2%,0.3%,0.4%,0.5%,0.6%; D2650-5X10ML、Sigma-Aldrich) を使用した。最終濃度の薬剤は 0.1%の DMSO 濃度となるように調整した。化合物の累積投与の前に vehicle control として、DMSO 0.1%をすべての well に投与し自発活動を各濃度で 10 分間記録した ($n \geq 3$)。

3-2-4 バースト解析

電気生理学的活動を Presto (Alpha Med Scientific)と MATLAB を使用して解析した。信号の $\pm 5.3\sigma$ の閾値を用いて細胞外電位からスパイクを検出した。ここで σ はベースラインノイズの標準偏差である。同期バースト発火は 4-step method を用いて検出した。

3-2-5 統計解析

バースト解析により算出されたパラメータから痙攣発作を決定するために、one-way ANOVA followed by Dunnett's test を用いて各濃度と vehicle 間の有意差を算出した。パラメータに有意差が見られた濃度を痙攣毒性用量として決定した。

3-3 結果

3-3-1 ヒト iPS 細胞由来神経ネットワークの薬剤応答

MEA 上に播種したヒト iPS 細胞由来神経ネットワークは、培養 12 週目でも凝集することなく培養され、培養 6 週目以降に同期バースト発火が観察された。Fig. 3-1 A (a) に培養 81DIV の位相差画像、Fig. 3-1 A (b) に典型的な同期バースト波形を示す。成熟したと考えられる培養 14 週目以降に痙攣陽性化合物 13 種類と陰性化合物 3 種類の用量依存的なデータを取得した。得られた波形に閾値を引き、スパイク検出し、ラスタプロットを作製した。Fig. 3-1 (c) に単一電極の波形とスパイク検出のための閾値（上部）と検出されたスパイクのラスタプロット（下部）を示す。Fig. 3-1 B は作用機序の異なる 4-AP、Carbamazepine、NMDA、PTZ、Acetaminophen、DMSO の用量依存的なラスタプロット画像を示す。陰性化合物である Acetaminophen と DMSO は顕著な変化はなく、陽性化合物は作用機序ごとに異なる変化を示した (Fig. 3-1B)。Fig. 3-1 (C) はラスタプロットから算出された 5 つの解析パラメータ Total spikes (TS)、No. of network burst (NoB)、Inter Burst Interval (IBI)、Duration of Burst (DoB)、Spikes in a network burst (SiB) の模式図である。Fig. 3-2 は Vehicle を 100% とした時の各パラメータの薬剤応答を示す。数値データはサプリメント 1 に記載した。4AP、PTZ はそれぞれ NoB が最大 $321.0 \pm 15.4\%$ ($30 \mu\text{M}$)、 $147.3 \pm 2.7\%$ ($10 \mu\text{M}$) の増加が認められ、IBI、DoB、SiB の減少が 4-AP は $1 \mu\text{M}$ から、PTZ は $1 \mu\text{M}$ から認められた。PTX は DoB の減少が $0.3 \mu\text{M}$ から認められた。Carbamazepine は $30 \mu\text{M}$ から TS、NoB が減少し、 $100 \mu\text{M}$ で、DoB の減少と IBI の増加が認められた。Pilocarpine は $10 \mu\text{M}$ から IBI が増加、 $30 \mu\text{M}$ から DoB が減少、 $100 \mu\text{M}$ で TS が減少した。Kainic acid は $0.3 \mu\text{M}$ で TS が減少し、 $1 \mu\text{M}$ から NoB が消失した。NMDA は $1 \mu\text{M}$ で TS が上昇し、 $10 \mu\text{M}$ で TS、DoB、SiB が減少し、NoB が増加した。Tramadol は $3 \mu\text{M}$ から NoB が減少し、SiB が増加、 $30 \mu\text{M}$ から TS、DoB、SiB が減少し、 $100 \mu\text{M}$ で IBI が増加した。Theophylline は $10 \mu\text{M}$ から IBI が増加、 $30 \mu\text{M}$ から SiB が増加し、NoB が減少した。Paroxetine は $0.3 \mu\text{M}$ から Duration が減少し、 $1 \mu\text{M}$ から TS が減少した。Varenicline は、 $30 \mu\text{M}$ で IBI が増加し、Duration が減少した。Venlafaxine は $10 \mu\text{M}$ から Duration が減少、 $30 \mu\text{M}$ で TS、SiB が減少した。Acetaminophen は $3 \mu\text{M}$ から Duration の減少が認められた。DMSO はパラメータの変化は認められなかった。Amoxapine はパラメータの変化は認められなかった (Fig. 3-2)。以上の結果より、痙攣陽性化合物で変化するパラメータは共通ではなく、作用機序毎に異なっていることがわかった。一方、陰性化合物である Acetaminophen においても Duration のパラメータで有意差が検出された。Duration のパラメータは特定の陽性化合物においても変化していた。従って、作用機序の異なる痙攣陽性化合物と陰性化合物を分離することができる共通する単一パラメータを同定することは困難であることが分かった。

3-3-2 ラスタープロット画像を用いたAIの作製とポジネガ分離の評価

作用機序の異なる痙攣陽性化合物と陰性化合物の応答を分離するために、ラスタープロット画像を学習したAIを作製した。検出した Spike の時系列データからラスタープロット画像を作製し、薬剤投与前の Inter Maximum Frequency Interval (IMFI) の4倍の時間窓で分割した画像を作製した。Well によってバースト頻度が異なるため分割されたラスタープロット画像は well によって枚数が異なる。次に、分割したラスタープロット画像を物体認識モデルである Alexnet に入力し、21層目の FullyConnected layer から出力される 4096次元のパラメータを画像の特徴量として抽出した。最後に、各ウェルの Vehicle 投与時の特徴量の平均値で、各薬剤の特徴量を正規化することで、初期状態の違いによる Well 間差の是正を図った。痙攣陽性化合物と痙攣陰性化合物の2分類を予測する毒性予測モデルは 4096ニューロンの入力層と 9シグモイドニューロンの Hidden 層と 2つの分類子を持つ出力層で構成されたパターン認識ニューラルネットワークを使用した (Fig. 3-3A)。モデルの学習および検証には、作用機序とバースト頻度の応答が異なる4つの痙攣陽性化合物 (4-AP(30,60 μ M, n=3well)、Carbamazepine(100 μ M, n=3well)、NMDA (3,10 μ M, n=3well)、PTZ(1000 μ M, n=3well))、と痙攣陰性化合物として Acetaminophen の全濃度(n=3well)と DMSO の全濃度(n=3well)のデータセットを使用した。データセットの内 75%を学習に使用し、残りの 25%を学習時の検証(Validation)に使用した。学習後に未学習 well のラスタープロット画像を使用して精度を評価した。学習データには、4-AP 220枚、Carbamazepine 411枚、NMDA 882枚、PTZ 99枚、Acetaminophen と DMSO および Vehicle は 6742枚使用し、検証データには 4-AP 74枚、Carbamazepine 127枚、NMDA 294枚、PTZ 27枚、Acetaminophen と DMSO および Vehicle は 2242枚使用した。学習データと検証データの痙攣陽性と痙攣陰性の2つ分類についてのコンフュージョンマトリクスを作製した (Fig. 3-3B)。次に全学習データと全検証データそれぞれの ROC (Receiver Operating Characteristic) 曲線と AUC (Area Under the Curve) を算出し最適動作点を決定した (Fig. 3-3C)。最適動作点におけるモデルの予測結果から、Accuracy、Positive predictive value、Sensitivity、Specificity、F-measure を算出した (Table 1)。ラスタープロット画像の特徴量を学習したモデルの、学習データにおける AUC は 0.9998、未学習データの AUC は 0.9967 を示し学習データにおける最適動作点は 0.158 であった。最適動作点での薬剤毎の学習データにおける分離精度は、4-AP は 100%、Carbamazepine 97.8%、NMDA 99.6%、PTZ 96.0%であり、未学習データにおける分離精度は、4-AP は 100%、Carbamazepine 91.5%、NMDA 100%、PTZ 94.4%であった。すべての薬剤において 90%以上の予測精度を示した。作製したラスタープロット画像を学習したポジネガ分離 AI は作用機序の異なる痙攣陽性化合物と陰性化合物の応答を正確に分離した。

3-3-3 AIによる用量依存的な痙攣毒性の判定

医薬品の痙攣リスクに基づいた開発化合物の優先順位をつけることができれば、効率的な創薬開発が実現する。優先順位をつけるためには、用量依存性を明らかにすることが必須である。ここでは、作製したAIを用いて、陽性・陰性判定の用量依存性を調べた。AIが予測した各用量データの毒性確率をFig. 3-4に示した。各wellの時系列データについて、痙攣陽性と痙攣陰性に分類された画像の枚数の割合を算出し、wellの平均確率を用量毎に毒性リスクとして算出した。未学習サンプルにおいて、50%以上の確率で痙攣リスクと判定した用量は、それぞれ、4-AP：1 μ M(62.2%)、10 μ M(94.6%)、30 μ M(100%)、60 μ M(100%)、Carbamazepine：30 μ M(76.9%)、100 μ M(85.0%)、NMDA：1 μ M(63.3%)、3 μ M(100%)、10 μ M(100%)、PTZ：1 μ M(51.9%)、10 μ M(81.5%)、100 μ M(88.9%)、1000 μ M(88.9%)であった (Fig. 3-4(a),(b),(d),(e))。学習させた濃度よりも低濃度で痙攣リスクを示し、用量依存性が検出された。陰性化合物であるAcetaminophenは用量によらず97.9%以上の確率で陰性と判定され、DMSOも用量によらず99.1%以上の確率で陰性と判定された (Fig. 3-4(c),(f))。作製した痙攣リスク予測AIは痙攣陽性化合物を用量依存的に毒性と判定し、陰性化合物を用量によらず陰性と判定した。

3-3-4 AIによる未学習薬剤の痙攣毒性判定

作製したAIが、学習したことがない薬剤の毒性を検出できることが重要である。そこで、作製したAIに未学習痙攣陽性化合物(9薬剤)のデータを毒性判定させた。Fig. 3-5に未学習薬剤の各濃度の判定結果を示す。50%以上の確率で痙攣リスクと判定した用量はそれぞれ、Kainic acid：1 μ M(81.8%)、3 μ M(100%)、10 μ M(100%)、Paroxetine：3 μ M(73.7%)、10 μ M(100%)、30 μ M(100%)、Picrotoxin：0.1 μ M(91.4%)、0.3 μ M(93.7%)、1 μ M(91.8%)、3 μ M(97.8%)、10 μ M(91.5%)、Varenicline：10 μ M(52.6%)、30 μ M(77.1%)、Pilocarpine：1 μ M(62.3%)、3 μ M(75.8%)、10 μ M(86.8%)、30 μ M(89.4%)、100 μ M(97.0%)、Tramadol：3 μ M(61.9%)、10 μ M(88.6%)、30 μ M(98.9%)、100 μ M(100%)、Venlafaxine：10 μ M(90.5%)、30 μ M(100%)、100 μ M(100%)であった。未学習薬剤においても7化合物は、用量依存的に痙攣リスク有と判定した (Fig. 3-5(a)-(d),(f)-(h))。一方、AmoxapineとTheophyllineはすべての濃度で陰性と判定された (Fig. 3-5(e),(i))。未学習薬剤においても、痙攣毒性を用量依存的に検出できることがわかった。

3-3-5 AIによる薬剤名予測

異なる作用機序をもつ痙攣陽性化合物を応答の違いから分類することができれば、未知薬剤の痙攣リスクの作用機序を予測することができる。そこで、作用機序の異なる痙攣陽性化合物および陰性化合物を分類するためにラスタープロット画像と薬剤名をAI

に学習させた。

痙攣陽性化合物と痙攣陰性化合物の薬剤名予測モデルには4096個のニューロンをもつ入力層と120個のシグモイドニューロンをもつ隠れ層と14つの分類子を持つ出力層で構成されたパターン認識ニューラルネットワークを使用した。モデルの学習には4-AP(30,60 μ M)、Amoxapine(100 μ M)、Carbamazepine(30,100 μ M)、Kainic acid(1,3,10 μ M)、NMDA(3,10 μ M)、PTZ(1000 μ M)、Paroxetine(3,10,30 μ M)、Picrotoxin(1,3,10 μ M)、Pilocarpine(10,30,100 μ M)、Theophylline(100 μ M)、Tramadol(30,100 μ M)、Varenicline(30 μ M)、Venlafaxine(10,30,100 μ M)と痙攣陰性化合物としてAcetaminophenの全濃度とDMSOの全濃度のデータセットを使用した。使用した、全データセットは56のwellで構成された。学習のさせ方は、56wellの中から1つのwellを除き、55wellの薬剤名を学習させた。55wellのデータセットの内75%を学習に使用し、残りの25%を学習時の検証(Validation)に使用した。除いた1つのwellを最終的なモデルの精度検証に使用した。作製したAIは、除いた1つのwellに対して5回作製した。すなわち、 $56 \times 5 = 280$ 個のAIを作製した。1つのWellのデータ(AIの学習に使用しなかった1wellのデータ)を、作製した5つのモデルを用いて薬剤名判定を行い、その平均値を算出した。Table3-2に薬剤の濃度毎の予測確率を示す。陰性化合物であるDMSO、Acetaminophenの全濃度と各薬剤のVehicleは全て陰性と判定され、平均陰性確率は $99.9 \pm 0.3\%$ であった。4-AP (1 μ M)、Amoxapine (3 μ M)、NMDA (1 μ M)、Picrotoxin (0.1 μ M)、Pilocarpine (1 μ M)、PTZ (10 μ M)、Theophylline (3 μ M)、Varenicline (10 μ M)、Venlafaxine (3 μ M)、Tramadol (10 μ M)は学習した濃度よりも低濃度で薬剤名を正しく判定された。Carbamazepine(30 μ M)、Kainic acid(1 μ M)、Paroxetine(3 μ M)は学習した濃度で薬剤名を正しく判定された。薬剤名を正しく判定されなかった濃度は全て陰性化合物と判定され、異なる薬剤名に判定されることはなかった。学習した濃度における全薬剤の平均予測精度は $99.9 \pm 0.1\%$ であった。作製した薬剤名予測AIは13種類の化合物の応答と陰性化合物の応答を正確に識別した。

3-4 考察

痙攣陽性化合物を用いた *in vitro* 試験の先行研究の結果と本研究で取得したデータにおける従来の解析パラメータを用いた結果、AIによる痙攣毒性リスク判定の結果、AIによる薬剤名予測の結果を比較する。上記、4つのデータをまとめた表を Table3-3 に示す(Bradley et al. 2018; Bragin et al. 1999; Erken et al. 2014; Fujimoto et al. 2015; Gao et al. 2017; Liu et al. 2006; Ma et al. 2013; Santos Junior et al. 2002; Tukker et al. 2018)。従来法である同期バースト関連解析パラメータにおいて有意差が見られた用量、AIによってリスク判定された用量、AIによって薬剤名が予測された用量を記載した。本研究で取得した MEA データにおいて、従来法で算出した解析パラメータでリスク判定した結果と AI が予測した結果を比較すると、Theophylline と Acetaminophen 以外は、ほぼ同様の濃度で痙攣リスクを判定した。この結果は、本研究で開発したラスタープロット画像 AI は、従来法で得られるパラメータの特徴を少なくとも捉えていると言える。従来のパラメータ解析では薬剤毎に変化するパラメータが違うので、どのパラメータに着目して毒性を検出すれば良いのか不明であった。一つでも変化するパラメータを用いて毒性と判定すれば、アセトアミノフェンの結果のように、陰性化合物をリスク判定（擬陽性判定）してしまう。しかしながら、本研究で開発した AI は、陰性化合物である Acetaminophen を全ての用量で痙攣リスクなしと判定した。本 AI 予測法は、痙攣リスクの特徴を捉えることによって、偽陽性を生まない方法であると言える。Theophylline の脳スライスでの応答は本実験より高濃度である 300 μ M で痙攣リスクが報告されていることから、AI が痙攣リスクと判定しなかった結果は妥当である。従来の解析法による結果は、3 μ M で痙攣リスクを判定しており、擬陽性の可能性が高い。本結果からも痙攣リスク予測 AI は、従来の MEA 解析法に比べ、正確かつ偽陽性を軽減できる方法でもあると考えられる。また、AI は毒性リスクを確率で算出する為、用量依存性や化合物における痙攣リスクの順位付けを行うことができる。例えば、セロトニンの再取り込み阻害作用を持つ痙攣陽性化合物 Venlafaxine、Tramadol、Paroxetine の用量 3 μ M における毒性リスクは Paroxetine (73.7%), Tramadol (61.9%), Venlafaxine (43.3%) の順に順位付けすることができる。痙攣リスクが知られているこれら 3 化合物の臨床における推奨初期用量は、Paroxetine : 20 mg, Tramadol : 25 mg, Venlafaxine : 37.5 mg であり、推奨初期用量からリスクを順位づけすると Paroxetine、Tramadol、Venlafaxine の順となる。この結果は、AI によるリスクの順位付けと推奨用量の順列が一致していることを示している。また、3 化合物の成人男性における活性代謝物を含む体内の薬物総吸収量 (the total amount of drug absorbed by the body) すなわち area under the blood concentration-time curve は、Paroxetine : 81.31 ng*h/ml, Tramadol : 970 ng*h/ml, Venlafaxine : 1522 ng*h/ml であり、薬物総吸収量においてもリスクの順位付けと同様の順列であった。すなわち、AI による痙攣リスクの順位付けは、臨床データを反映する結果となっており、ヒトへの予測が可能である可能性を示唆している。

薬剤名予測 AI において、薬剤名を予測した用量は、毒性リスクを判定した用量とほぼ同様であった。これは、痙攣陽性化合物としてリスクを生じる用量にて、作用機序が異なる薬剤別の応答が顕著に現れることを示している。また、毒性判定されなかった Amoxapine と Theophylline も薬剤名の予測には成功している。これは、必ずしも毒性用量でのみ作用機序が予測されるわけではなく、毒性リスクがなくても AI は薬剤の特性を検出できることを示している。これらの結果により、同じ痙攣陽性化合物であっても、AI は薬剤別、すなわち作用機序別の特徴を検出できることがわかった。薬剤名予測 AI は、未知化合物がどの既知化合物に近いのか、すなわち、どの作用機序を有しているかを予測することができると期待される。

開発した AI の特徴の一つは、ラスタープロット画像の作成法にある。同期バースト間隔(IMFD)の4倍の時間窓で分割した画像を作成した点であり、利点は2つある。1つ目は、単一のバースト発火や計測時間全体の平均値ではなく時系列の特徴を捉えることができる点である。Pilocarpine においては、AI はパラメータ解析よりも低濃度で毒性と判定した。ラスタープロットを見ると、Pilocarpine はバーストの周期が揃う傾向にあった。AI は、同期バースト発火の規則性を読み取った為、従来解析法に比べ、低用量で毒性リスクと判定したと考えられる。2つ目は、バースト発火頻度のサンプル間差に依存しない点である。Fig. 3-1B に示すように、サンプルによって、初期状態 (Vehicle) の発火頻度が異なる場合においても毒性予測や作用機序予測に成功している。バースト発火の個数で画像を作成する方法は、well 間差やロット間差などにロバストな方法であると言える。より多くの薬剤データを学習させて行く際にも利点となる。

本研究で開発した痙攣リスク予測 AI は、陰性化合物と陽性化合物の区別、用量依存性、痙攣リスクの順位付けを可能とした。リード化合物が選定された時点での痙攣リスクに基づいた開発化合物の順位付けなどに使用できると考えられ、実用化が期待される。また、痙攣リスク予測 AI により、これまで施設ごとにそれぞれの基準 (パラメータ) で毒性評価を行っている現状から、統一された指標での毒性評価ができるようになることが期待される。検証する必要があるが、バースト間隔を使用した今回の方法はサンプルの初期状態の影響を受けないため、異なる施設や異なるベンダーの細胞であっても予測できる可能性がある。従来解析法では、上記のような間差がある場合、統一したパラメータでの解析比較は困難であったが、本痙攣毒性リスク AI は間差に影響しない可能性があり、*in vitro* 痙攣毒性予測法の構築を一気に進めることができる方法として期待される。また、薬剤名予測 AI は同じ作用機序を持つ陽性化合物であっても、区別可能であったことから、説明可能性を有する xAI を用いて AI が区別している根拠を同定することができれば、より詳細な作用機序の発見や神経科学的知見の発見が期待できる。

In vitro の毒性評価系の重要な課題は *in vitro to in vivo* extrapolation (IVIVE) である。今回判定した毒性濃度が *in vivo* をどれだけ反映しているかは今後検討する必要がある。IVIVE へアプローチする手法として、動物実験における痙攣時の脳室内濃度との

比較は有効な手法であると考えられる。すなわち、痙攣が発生した脳室内用量と同じ用量の *in vitro* のデータを陽性化合物の教師データとして使用方法である。この方法を用いれば、痙攣時の脳室内濃度を基準とした痙攣リスク AI が作製でき、*in vivo* の毒性を反映したリスク予測が可能となると考えられる。また、今回 AI の毒性判定に使用した閾値（1枚の画像を AI が毒性リスク判定した確率の閾値）は 50%以上としたが、AI の毒性判定の閾値設定を *in vivo* の脳室内濃度に合わせて変更することで既知化合物における *in vivo* のデータに合わせられる可能性もある。いずれにせよ、動物実験のデータ取得を進め、*in vitro* 予測結果との比較を行う必要がある。IVIVE への取り組みは第4章で述べる。

3-5 結論

本章では、神経ネットワーク活動のラスタープロット画像の Deep learning を用いて、痙攣リスク予測 AI および薬剤名予測 AI を開発した。痙攣リスク予測 AI は学習薬剤において 90%以上の予測精度で痙攣陽性化合物と陰性化合物の応答を正確に分離し、未学習薬剤の痙攣リスクも用量依存的に判定した。また、薬剤名予測 AI は 13 種類の化合物の応答と陰性化合物の応答を識別し、全薬剤の平均予測精度は $99.9\pm 0.1\%$ であった。本 AI 予測法は、痙攣リスクの用量依存性、痙攣リスク確率に基づく痙攣リスクの順位付け、化合物の作用機序を識別する能力を有していることがわかった。*In vitro* MEA assessment における精度の高い強力な新規痙攣リスク予測法として今後の使用が期待できる。

また、本研究で開発したラスタープロット画像を用いた AI は、他に報告例が無く、新規性を有しているとともに、汎用性が非常に高い技術である。ラスタープロットは *in vitro* MEA データのみならず、*in vivo* の電気活動記録や Ca^{2+} 指示薬や膜電位感受性色素などの光イメージング計測によって得られる神経活動全般で使用されていることから、神経系を対象とした基礎研究および応用研究全般に適用できる方法である。本研究開発の意義は非常に高いものである。

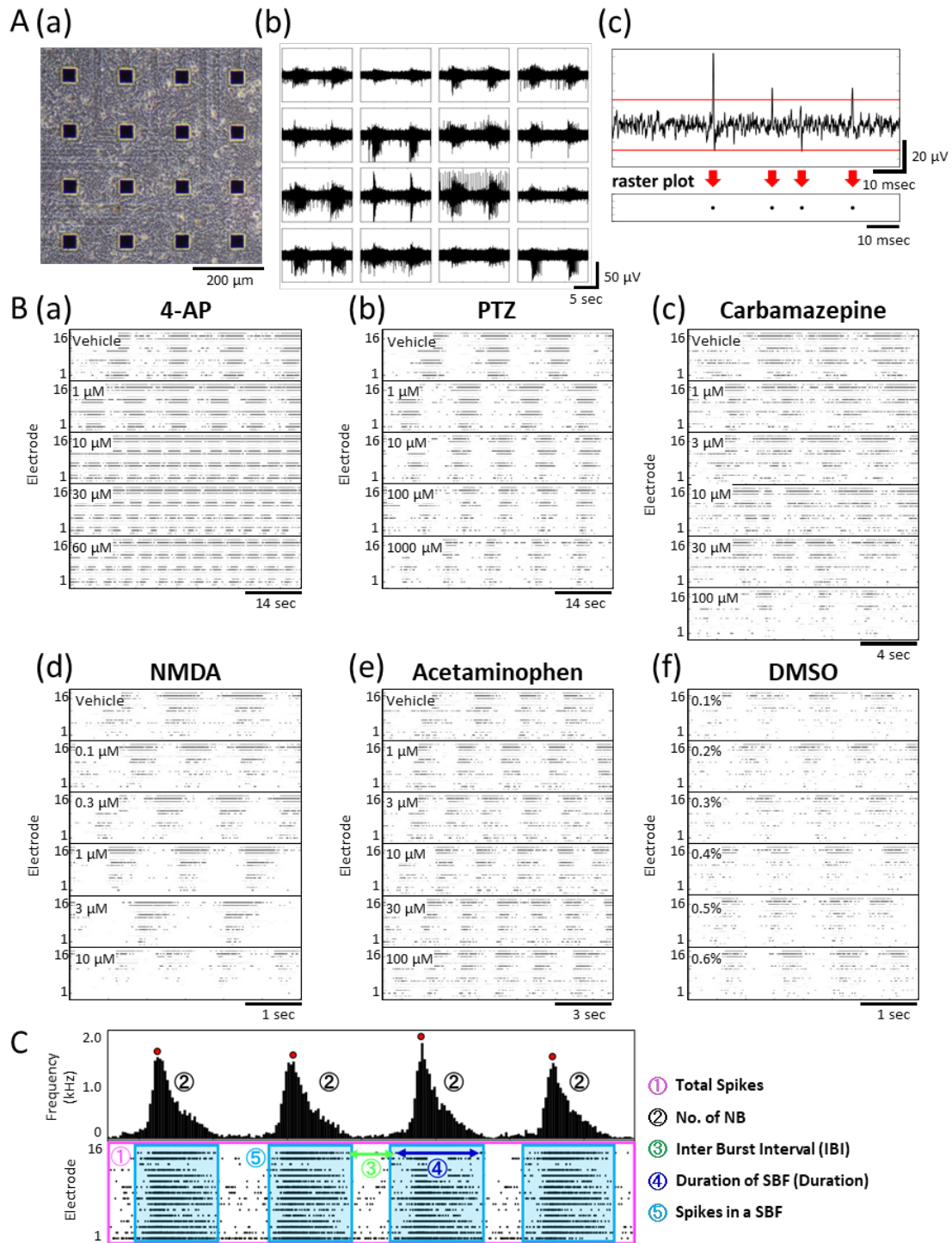


Figure 3-1. MEA data from a cultured human iPSC-derived neural network. (A)(a) Phase-contrast image of neurons on an MEA chip at 81 days in vitro (DIV). (b) Typical action potential waveform in a spontaneous recording. (c) Upper graph shows the action potential waveform acquired with a single electrode and the voltage threshold for spike detection (red line). Raster plots of detected spikes (black circles) are shown under the graph. (B) Dose-dependent raster plot images of typical mechanisms of action (a) 4-AP, (b) carbamazepine, (c) NMDA, (d) PTZ, (e) acetaminophen, (f) DMSO. (C) Schematic diagram of analysis parameters.

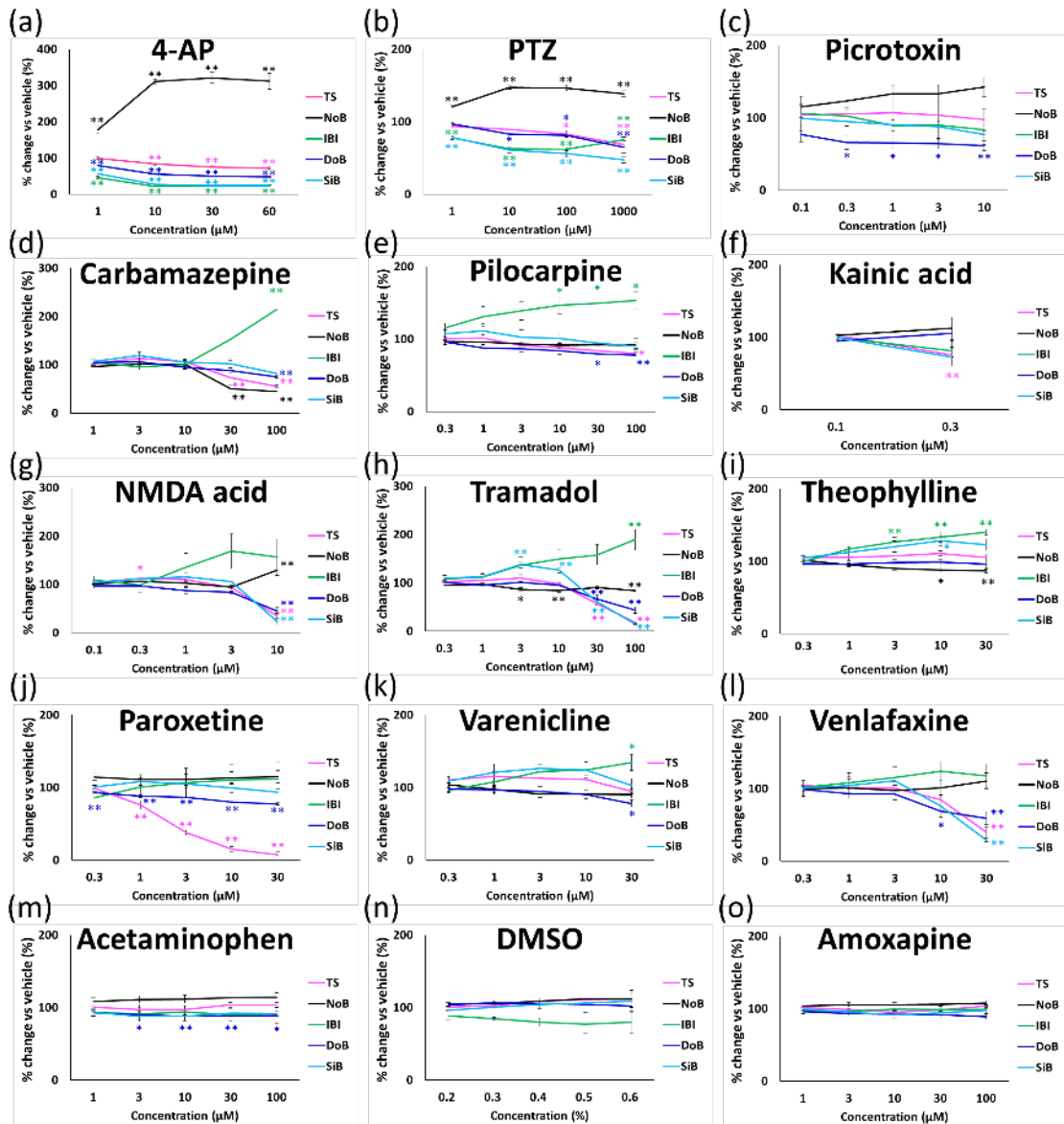


Figure 3-2. Dose-dependent changes of 15 compounds in five parameters: TS (pink), NoB (black), IBI (green), DoB (blue), SiB (cyan). Parameters were depicted as the average % change of control (vehicle control set to 100%) \pm SEM from $n = 3-4$ wells. Data were analyzed using one-way ANOVA followed by post hoc Dunnett's test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. vehicle).

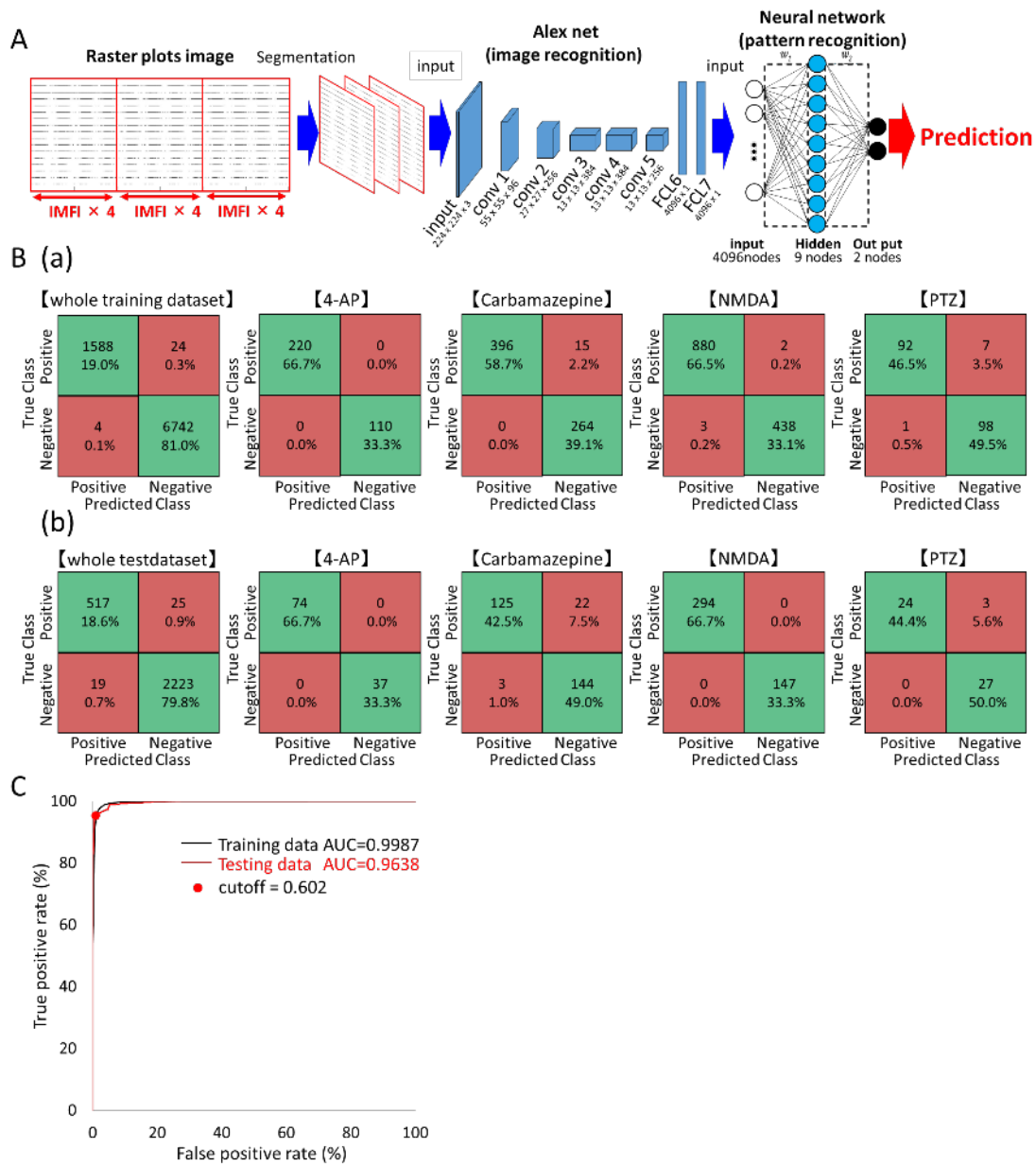


Figure 3-3. Creation of seizure risk prediction (AI) using raster plot images and evaluation of the prediction model. (A) Data flow and architecture of seizure risk prediction model. w_1 is the weight between the input layer and the hidden layer, w_2 is the weight between the hidden layer and the output layer. (B) Confusion matrix of (a) training dataset and (b) test dataset. (C) Receiver operating characteristic (ROC) curve (black line: training data; red line: testing data; red dot: optimum operating point).

Table 2-1. Predictive model performance evaluation using the optimum operating point.

Original/ Predict	Training					Test				
	Acc	PPV	Sen	Spec	F-measure	Acc	PPV	Sen	Spec	F-measure
whole dataset	99.7	99.7	98.5	99.9	99.1	98.4	96.5	95.4	99.2	95.9
4-AP	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Carbamazepine	97.8	100	96.4	100	98.1	91.5	97.7	85.0	98.0	90.9
NMDA	99.6	99.7	99.8	99.3	99.7	100	100	100	100	100
PTZ	96.0	98.9	92.9	99.0	95.8	94.4	100	88.9	100	94.1

* Acc = accuracy , PPV = positive predictive value , Sen = sensitivity , Spec = specificity

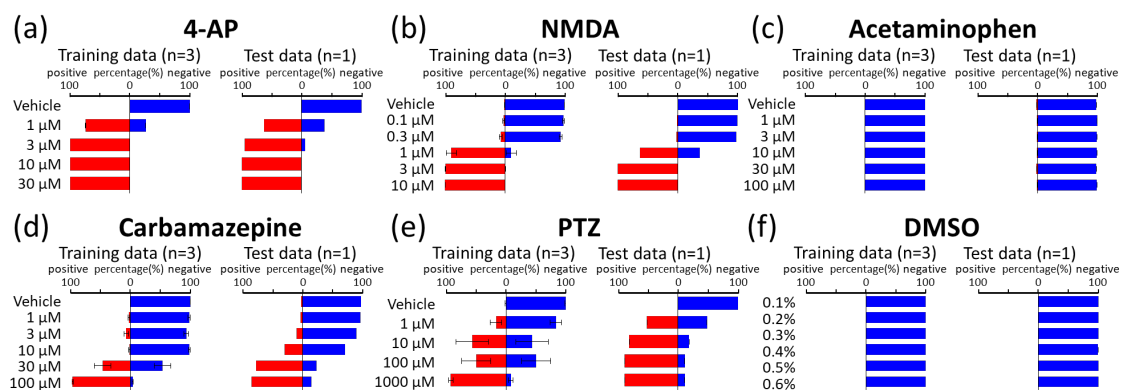


Figure 3-4. Dose-dependent prediction of seizure risk in learning drugs by AI. AI predicted the negative probabilities (blue bar) and seizure risk (red bar) at each concentration of training data (left) and test data (right). (a) 4-AP, (b) NMDA, (c) acetaminophen, (d) carbamazepine, (e) PTZ, (f) DMSO.

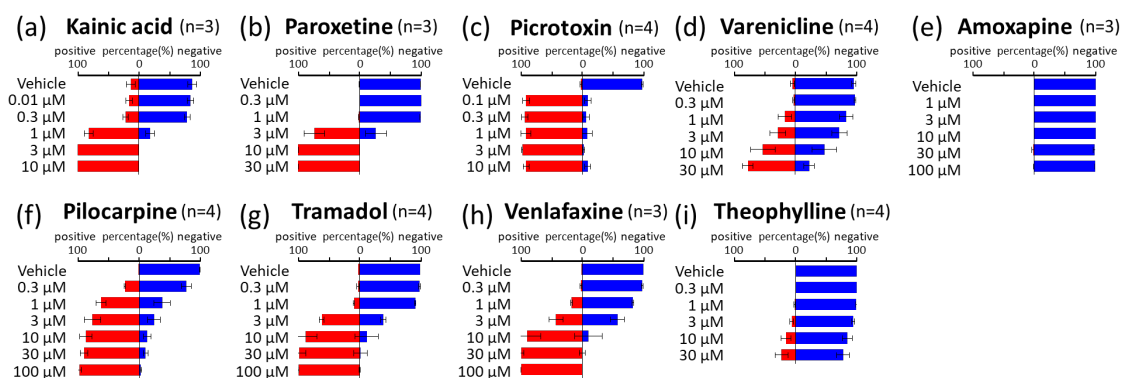


Figure 3-5. Dose-dependent prediction of seizure risk in non-training drugs by AI. AI predicted the negative probabilities (blue bar) and seizure risk (red bar) at each concentration. (a) Kainic acid, (b) paroxetine, (c) picrotoxin, (d) varenicline, (e) amoxapine, (f) pilocarpine, (g) tramadol, (h) venlafaxine, (i) theophylline.

第3章 AIを用いた神経活動の毒性・薬剤名予測法の開発

Table 3-2. Probability of drug name in each concentration data predicted by AI. The underlining shows the concentration data used for learning the drug name (red), and the negative control (blue).

Drugs	Prediction	Concentration (μM)					
		(%)					
4-AP	negative control	<u>99.7</u>	28.3	0	0	0	
	4-AP	0	70.5	100	<u>100</u>	<u>100</u>	
Amoxapine	negative control	<u>100</u>	61.8	18.8	28.7	14.0	0.3
	Amoxapine	0	38.2	81.2	71.3	85.9	<u>99.7</u>
Carbamazepine	negative control	<u>99.4</u>	95.1	89.3	70.6	1.4	0.1
	Carbamazepine	0.6	4.9	10.6	29.1	<u>98.6</u>	<u>99.9</u>
Kainic acid	negative control	<u>99.5</u>	94.7	97.4	0.1	0	0
	Kainic acid	0.5	4.5	1.7	<u>99.9</u>	<u>100</u>	<u>100</u>
NMDA	negative control	<u>100</u>	98.8	94.0	13.5	0.1	0
	NMDA	0	0.5	1.3	70.2	<u>99.9</u>	<u>100</u>
PTZ	negative control	<u>100</u>	82.8	29.2	19.4	0	
	PTZ	0	12.2	58.4	77.5	<u>100</u>	
Paroxetine	negative control	<u>100</u>	100	89.9	0	0	0
	Paroxetine	0	0	7.5	<u>100</u>	<u>100</u>	<u>100</u>
Picrotoxin	negative control	<u>100</u>	1.1	0.1	0	0	0
	Picrotoxin	0	95.1	99.9	<u>100</u>	<u>100</u>	<u>100</u>
Pilocarpine	negative control	<u>100</u>	75.6	16.9	2.1	0	0
	Pilocarpine	0	21.1	82.4	97.6	<u>100</u>	<u>100</u>
Theophylline	negative control	<u>99.7</u>	91.0	66.5	26.3	12.3	1.2
	Theophylline	0.3	9.0	33.1	73.3	87.3	<u>98.8</u>
Tramadol	negative control	<u>100</u>	99.1	91.8	35.4	7.7	0
	Tramadol	0	0	2.8	9.6	50.7	<u>100</u>
Varenicline	negative control	<u>100</u>	99.8	88.7	53.6	18.1	0.3
	Varenicline	0	0.0	10.4	44.0	80.6	<u>99.7</u>
Venlafaxine	negative control	<u>99.9</u>	97.3	68.5	32.6	0.1	0
	Venlafaxine	0.1	2.2	19.8	60.5	<u>99.8</u>	<u>100</u>
Acetaminophen	negative control	<u>100</u>	100	100	100	100	100
	others	0	0	0	0	0	0
DMSO	negative control	<u>100</u>	<u>100</u>	<u>99.9</u>	<u>99.8</u>	<u>100</u>	<u>100</u>
	others	0	0	0.1	0.2	0	0

negative control : DMSO 0.1%,0.2%,0.3%,0.4%,0.5%,0.6%, Acetaminophen 1,3,10,30,100 μM and Vehicle (DMSO 0.1%)

第 3 章 AI を用いた神経活動の毒性・薬剤名予測法の開発

Table 3-3. Comparison with pre-clinical seizure assay benchmark using 15 compounds.

Compound	Concentration Range Tested	Seizurogenic Response Minimum Effective Concentration				
		Rodent	iPS	iPS (this work)	iPS (this work)	iPS (this work)
		*conventional burst analysis	*conventional burst analysis	*conventional burst analysis	*AI	Drug name AI
4-AP	1-60 μ M	3 μ M	1 μ M	<1 μ M	<1 μ M	<1 μ M
Amoxapine	1-100 μ M	0.03 μ M	0.03 μ M	N/A	N/A	3 μ M
Carbamazepine	1-100 μ M	0.75 μ g/0.2 μ L (in vivo)	-	30 μ M	30 μ M	30 μ M
Kainic acid	0.1-10 μ M	0.4 μ M	-	0.3 μ M	1 μ M	1 μ M
NMDA	0.1-10 μ M	5 μ M	-	0.3 μ M	1 μ M	1 μ M
Paroxetine	0.3-30 μ M	5 mg/kg (in vivo)	-	0.3 μ M	3 μ M	3 μ M
Picrotoxin	0.1-10 μ M	<0.2 μ M	0.1 μ M	0.3 μ M	<0.1 μ M	<0.1 μ M
Pilocarpine	0.3-100 μ M	0.3 μ M	0.3 μ M	10 μ M	1 μ M	1 μ M
PTZ	1-1000 μ M	100 μ M	30 μ M	<1 μ M	<1 μ M	10 μ M
Theophylline	0.3-30 μ M	300 μ M (in slice)	-	3 μ M	N/A	3 μ M
Tramadol	0.3-100 μ M	43 mg/kg (in vivo)	-	3 μ M	10 μ M	10 μ M
Varenicline	0.3-30 μ M	0.25 mg/kg (in vivo)	-	30 μ M	10 μ M	10 μ M
Venlafaxine	0.3-100 μ M	25 mg/kg (in vivo)	-	10 μ M	10 μ M	3 μ M
DMSO	0.1-0.6 %	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Acetaminophen	1-100 μ M	N/A	N/A	3 μ M	N/A	N/A
				* Risk judge, - no report, N/A : No Risk		

第4章 生体脳波における痙攣前兆検出法の開発

4-1 序論

in vitro における予測法の一般的な課題は *in vivo* への外挿性が担保されるかどうかにある。第3章で開発した医薬品の *in vitro* 痙攣毒性予測法が *in vivo* への外挿性を担保できる予測法となれば、精度の高い毒性予測法として確立される。痙攣毒性予測においては、偽陰性を排除した予測法が望まれる。ここでは、*in vivo* 動物において、痙攣時ではなく、痙攣が検出する前、すなわち前兆状態における脳室内濃度を毒性リスク用量として決定し、決定した用量における *in vitro* MEA データを毒性として AI に学習させる戦略をとることとした。学習した AI は、*in vivo* で痙攣前兆状態を誘発する用量の特徴を判定できる可能性がある。

ここで問題となるのは、動物試験における前兆状態の判定である。痙攣を誘発した際の判断は可能である。しかしながら、痙攣前兆状態を一般状態観察や脳波から判別する方法は確立していない。一般状態観察においては、熟練の研究者による振戦状態の判断は可能であるが、動物の個体差があり、痙攣前兆状態が、痙攣前駆症状として動物の行動に必ずしも現れるとは限らない。Electroencephalogram (EEG) から痙攣前兆状態を検出する方法は信頼性が高い。しかしながら、EEG における痙攣の前駆的な特徴として、スパイク shape wave form といった波形パターン (Fisher2014, Authier 2019, Delaunois 2020) が報告されているが、ラットの “behavioral arrest (行動停止状態)” における棘徐波放電現象においても発生してしまうため (Fisher2014)、EEG からの痙攣前兆状態の検出法は未確立の状況である。

そこで本研究では、痙攣が誘発されることがわかっている痙攣陽性化合物を用いて、痙攣が誘発される用量と、発作が誘発されないより低用量のデータを取得し、低用量のデータにおいて痙攣発作状態を学習した AI が痙攣毒性リスクを検出した時間帯を前兆状態であると仮に定義し、その場合の脳室内濃度を毒性用量と決定する。すなわち、痙攣前兆状態を脳波から捉えることができれば、一般状態観察では難しかった痙攣を引き起こす用量より低用量を毒性リスクとして検出できると考えた。痙攣前兆の特徴を捉えることができれば、代表的な痙攣陽性化合物以外の化合物において、脳波データから前兆状態を判別することができる。前兆状態を捉えた化合物における *in vitro* MEA データを取得し、その用量のデータを AI に学習させれば毒性化合物数が増え、より精度の高い痙攣毒性予測法となる。

更に、本技術開発により、痙攣前兆状態を捉えることができれば、脳波データのみで痙攣毒性予測を行う方法としても有効である。

脳波データから前兆状態を検出できる方法はこれまで確立していない。ここでは、脳波データの周波数特性画像を用いた機械学習によって、脳波データから痙攣前兆を予測できる解析法の開発を行った。

4-2 方法

4-2-1 脳波電極の植込み標本作製方法

検疫期間終了後、健康状態に異常が認められない動物について Pellegrino らの脳図譜を参考に脳波電極慢性植込み手術を施した。ケタミン（ケタラール筋注用 500 mg，第一三共プロファーマ）＋キシラジン（セラクター 2%注射液，バイエル製薬株式会社）混合麻酔薬（80 mg+10 mg/5 ml/kg）を腹腔内投与し、麻酔下で脳定位固定装置（サミットメディカル㈱）にラットを保定した。術部をクロルヘキシジングルコン酸塩液剤（5%ヒビテン液，大日本住友製薬）で消毒した。メスを用いて頭皮を切開し、頭蓋骨を露出した。皮質前頭葉（Bregma より前 2.0 mm、横 1.5 mm に皮質前頭葉用にドリルを用いて頭蓋に穴を開けた。また、嗅脳付近にも基準電極用の穴を開けた。皮質前頭葉に、先端の直径が約 1 mm の単極銀球電極（自社製）を脳硬膜上に設置した。基準電極は真鍮ネジを用いてビス止めした。さらに、筋電図測定用として先端を約 1 mm 露出したリード線を頸部に極間約 1 cm で双極に植込み、他端は皮下を通して頭部に露出した。これらの電極及びリード線は、コネクタースocket とハンダ付けを行い、歯科用樹脂（ハイボンドガラスアイオノマーCX 及びアドファ，松風）等で頭蓋に固定した。術部の皮膚を縫合糸で縫合し、ポビドンヨード（イソジンゲル 10%、Meiji Seika ファルマ）を塗布と共にメロキシカム鎮痛薬（1 mg/1 ml/kg、メタカム 0.5%注射液，ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社）を皮下投与した。

4-2-2 動物の選別及び群分け

手術後 3-5 日目に健康状態に異常が認められない SD ラットを防音シールドルーム（照明時間 07:00～19:00）に設置した測定ケージ〔400 mm W×280 mm D×350 mm H〕に収容した。ラットのコネクタースocket とリード線を連結し、30 分以上測定環境に慣らした後、無麻酔及び無拘束下で脳波及び筋電図の波形チェックを約 10 分間行った。測定はポリグラフシステム（RMT-1000、日本光電工業㈱）に入力した脳波及び筋電図の電気信号を LabChart pro ソフトウェア（サンプルレート 500/S、ADInstruments）を介して行った。

波形に異常のないことを確認したラットは手術後 5-7 日目に電子天秤を用い体重を測定した。体重の降順に 25 匹を選択し、体重の降順に投与を行う様に振り分けた。被験物質又は媒体の投与の順序は表計算ソフト Excel（Microsoft Corporation）の乱数機能を用いて層別無作為化割付法で決め、群分けで除外し、安定した脳波が得られるラットは予備動物とした。

4-2-3 脳波計測

電子天秤を用いてラットの体重を測定後、防音シールドルーム（照明時間 07:00～19:00）に設置した測定ケージ（給餌、絶水下）に収容した。ラットのコネクタースocketとリード線を連結し、無麻酔及び無拘束下で投与前の測定を 15 分程度行った後、被験物質又は媒体を投与し、投与後 3 時間まで連続的に脳波の測定を行った。皮質前頭葉は基準電極との間で単極誘導とした。被験物質には生理食塩水に溶解した 4-AP (Sigma-Aldrich Co. LLC) : 3,6 mg/kg, i.p. (Maxime 2013)、Strychnine(和光純薬工業株式会社) : 1,3 mg/kg, s.c. (SADEK 2017)、Pilocarpine (和光純薬工業株式会社) : 150,400 mg/kg, i.p. (Turski 1983)、Tramadol (和光純薬工業株式会社) : 150 mg/kg, i.p. (Lagard et al. 2016; Valian et al. 2021)、Aspirin (和光純薬工業株式会社) : 3000 mg/kg, p.o.および、溶媒である saline : 5 ml/kg, i.p.を使用した。測定はポリグラフィシステムに入力した脳波及び筋電図の電気信号を LabChart pro ソフトウェアを介して行った。測定後の得られたデータは MATLAB ソフトウェアを用いて変換した。なお、試験途中でソケットの脱落、健康状態の悪化などが生じた場合はデータから除外し、予備動物を用いて実験の最終日に投与、測定した。

4-2-4 波形解析

250Hz を超える周波数成分を、MatLab の Signal Processing Toolbox を使用して、0.1～250 Hz のバンドパス FIR フィルターによって除去した。wavelet 解析は、Continuous Wavelet Transform (CWT) を使用した。マザーウェーブレットに Complex Morlet 関数を選択した。波形解析には MatLab の Wavelet Toolbox および、Signal processing Toolbox を使用した。

4-2-5 統計解析

統計解析には Statistics and MachineLearningToolbox™と R を使用した。特徴量の有意差検定、および投与化合物間の特徴量の違いを検定するために、one-way ANOVA および Bonferroni multiple test を使用した。痙攣毒性の有無を評価するために、取得した AI 予測発作リスクスコアの 60 秒間の移動合計値を、one-way ANOVA および Dunnett's test によって検定した。すべての分析で、p 値が 0.05 未満 ($p < 0.05$) の場合、統計的に有意差があるとした。

4-3 結果

4-3-1 ラット皮質脳波のスペクトル強度ヒストグラム画像の作製

成体雄 SD ラットに 3 つの痙攣化合物 (4-AP : 6 mg/kg、Strychnine: 3 mg/kg、Pilocarpine: 400 mg/kg) と陰性対照として溶媒のみ (Vehicle) を投与し、投与後最大 3 時間の脳波測定および一般状態観察を行った。痙攣化合物の上記用量は、全て動物において、痙攣を誘発した。一般状態観察によって、痙攣状態の時刻を定義した。はじめに、脳波の痙攣時における周波数特性を調べる為に、wavelet 解析を用いて 4–250Hz 帯のスカログラムを算出した。スカログラム画像は、投与前 15 分間の周波数強度の中央値 (MN) の 6 倍をカラースケールの最大値として作製した。Figure 4-1A に、痙攣発作時の典型的な生波形と周波数特性を表すスカログラム画像を示す。4-AP 投与では、発作直後 5 秒間で 4-50Hz 帯の強度の激しい増強と、50-250Hz 帯の強度の増強が見られ、その後 20 秒間 50Hz-250Hz 帯の強度の増強が見られた(Fig. 4-1 Aa)。Strychnine 投与では、発作直後 2 秒間、4-30 Hz 帯の強度の増強が見られ、その後 10 秒間、80-120Hz 帯の強度が増強し、その後 7 秒間、30-60Hz 帯の強度の増強が見られた(Fig. 4-1 Ab)。Pilocarpine 投与では、発作直後 30 秒間 4-50Hz 帯の強度の増強と、発作から 10 秒以降の 50-100Hz 帯の強度の増強が見られた(Fig. 4-1 Ac)。周波数解析の結果、薬剤に共通して、痙攣時に 30Hz 以下の帯域で周波数強度の増加が見られたが、化合物によって異なる周波数変化の時間的特性が観察された。

Figure 4-1B に、一般状態観察によって痙攣が認められなかった用量(4-AP : 3 mg/kg、Strychnine: 1 mg/kg、Pilocarpine: 150 mg/kg) の典型的な生波形とスカログラム画像を示す。全ての薬剤において、間代性痙攣や強直性痙攣は認められなかった。4-AP 投与では、10-100Hz 帯の強度の増強(Fig. 4-1 Ba)が見られるが、Vehicle においても増強は認められる (Figure 4-1C)。したがって、生波形やスカログラムから、Vehicle と低用量の痙攣陽性化合物との差異を判断することは難しかった。また、低用量の脳波データから前兆状態の時刻を同定することも困難であった。

4-3-2 スペクトル強度ヒストグラム画像の作製法の開発

痙攣状態と痙攣前駆状態の脳波の変化を詳細に解析するため、周波数強度分布のヒストグラム画像を作成した。その結果、痙攣前兆の脳波は痙攣時と Vehicle 時の中間を示す画像特性が認められた。そのため、痙攣前兆状態を予測する手法として、痙攣時の脳波特性を AI に学習させる方法を採用することにした。痙攣状態の脳波は、痙攣陽性化合物の種類に依存して周波数強度の時間変化が異なる為 (Fig. 4-1)、周波数強度の短期的な時間情報を排除した周波数強度分布のヒストグラム画像を作成した(Fig. 4-2A)。具体的にはスカログラムを 60 秒の時間窓で分割し(Fig. 4-2Aa)、60 秒間の各周波数帯の強度のヒストグラムを算出し、確率密度の最大値で正規化した(Fig. 4-2Ab)。算出した

各周波数帯のヒストグラムから、縦軸に周波数、横軸に強度、カラースケールが確率密度を表す周波数強度分布のヒストグラム画像を作製した。投与後 61 分間の検体の脳波データから、60 秒窓を 1 秒ずつスライドさせたヒストグラム画像を 1 検体につき 3600 枚作成した。

Figure 4-2B,C,D に、Figure 4-1A,B,C と同じデータの周波数強度分布のヒストグラム画像を示す。各薬剤 (4-AP: 6 mg/kg、Strychnine: 3 mg/kg、Pilocarpine: 400 mg/kg) の痙攣時のヒストグラム画像を比較すると (Fig. 4-2B)、薬剤に依存せず、30Hz-150Hz 帯の強度分布が高強度にシフトする様子が認められた。Vehicle のヒストグラム画像は、低周波帯域に強い分布を示した (Fig. 4-2D)。一般状態観察によって痙攣が認められなかった低用量 (4-AP: 3 mg/kg、Strychnine: 1 mg/kg、Pilocarpine: 150 mg/kg) のヒストグラム画像 (Fig. 4-2C) は、痙攣時と Vehicle 時の中間を示す画像特性が認められた。まとめると、周波数強度分布のヒストグラム画像により、作用機序が異なる痙攣陽性化合物であっても、痙攣特性を捉えられる可能性が示唆された。

4-3-3 痙攣予測 AI の作製

作製した周波数強度のヒストグラム画像を用いて、痙攣状態を判別する AI の開発を行った。モデルの学習には、溶媒のみ (Vehicle n=3) を投与した検体と、痙攣発作が見られた用量の痙攣陽性化合物 4-AP (6 mg/kg, n=5)、Strychnine (3 mg/kg, n=4)、Pilocarpine (400 mg/kg, n=3) の投与前、および一般状態観察から定義された痙攣状態時刻のデータセットを使用した。Vehicle および各薬剤の投与前と各薬剤の痙攣状態のヒストグラム画像をそれぞれ作製し、物体認識モデルである Alexnet に入力し、21 層目の fully Connected layer から出力される 4096 次元のパラメータを画像の特徴量として抽出した。最後に、検体毎に投与前のヒストグラム画像の平均特徴量で、投与後の特徴量を正規化することで、初期状態の違いによる検体差の違いを排除した。投与前と痙攣発作時の 2 分類を予測する状態予測モデルは 4096 ニューロンの入力層と 6 つのシグモイドニューロンの Hidden 層と 2 つの分類子を持つ出力層で構成されたパターン認識ニューラルネットワークを使用した (Fig. 4-3A)。学習データの 2 状態分類についてコンフュージョンマトリクス (Fig. 4-3Ba) および ROC (Receiver Operating Characteristic) 曲線 (Fig. 4-3Bb) を作製し、モデルの評価指標として Accuracy と ROC の AUC (Area Under the Curve) を算出した。モデルの学習データにおける予測精度は投与前: 100%、痙攣: 100% を示し、AUC は 1.0 であった。ヒストグラム画像を学習した状態予測 AI は作用機序の異なる痙攣陽性化合物であっても、痙攣状態と通常時を正確に判別した。

一般状態観察で痙攣発作が見られなくとも、脳波には変化が現れている可能性が考えられる。そこで、一般状態観察から定義される痙攣発作が現れるまでに痙攣兆候を予測できるかも含めて、投与直後から痙攣状態に至るまでの全時間の脳波を AI に予測させた。

各化合物の投与後の予測結果(赤線)と一般状態観察で検出された痙攣発作の時間帯(青線)を比較した結果を Fig. 4-4 に示す。痙攣陽性化合物3薬剤共に、一般状態観察で痙攣状態と判断される以前に AI は、痙攣毒性を予測した。4-AP、Pilocarpine においては、全てのサンプルで、痙攣状態が早い段階で検出された (Fig. 4-4 a, c)。特に Pilocarpine は4-AP に比べて、投与直後に痙攣状態として検出された。一方、Strychnine は、4-AP および Pilocarpine に比べて、一般状態観察で同定された痙攣状態の直前に痙攣毒性が予測されている (Fig. 4-4 b)。一方、Vehicle のデータは、時間に依存せず、痙攣毒性リスクは判定されなかった (Fig. 4 d)。すなわち、開発した痙攣毒性検出 AI は、痙攣状態と投与前の状態を判別でき、痙攣が起きる前の状態においても痙攣兆候を捉えることができる AI であることが示唆された。次に、AI が予測した痙攣スコアの 60 秒間の移動合計値を算出し、合計値が 1 未満を痙攣リスク無、合計値が 1 以上、20 未満をリスク低、合計値が 20 以上、40 未満をリスク中、合計値が 40 以上をリスク高と定義した。AI による痙攣リスク予測が変動した時間帯のヒストグラム画像を比較した (Fig. 4-5)。上段に AI の痙攣リスク予測(赤線)と一般状態観察で検出された痙攣発作の時間帯(青線)の比較、中段にスカログラム画像、下段に AI が判定した痙攣リスク変動前後のヒストグラム画像を示している。Fig 4-5(a)に示す 4-AP 投与時の(i)痙攣リスク無 (score=0.00)、(ii)痙攣リスク中 (score=32.4)、(iii)痙攣リスク強 (score=60.0) のヒストグラムを比較すると、痙攣スコアの上昇に伴って、60-100Hz 帯の分布が高強度にシフトしていた。しかし、(ii)痙攣リスク中、(iii)痙攣リスク高と (iv) 痙攣リスク低 (score=14.3) を比較すると、30-50Hz 帯が低強度に分布している場合に痙攣リスクが低いと判定した。Fig 4-5(b)に示す Strychnine 投与時の(i)痙攣リスク無 (score=0.00)、(ii)痙攣リスク高 (score=60.0) を比較すると、リスク判定されたヒストグラムは 50-100Hz 帯の分布が高強度にシフトした。Fig 4-5(c)に示す Pilocarpine 投与時の(i)痙攣リスク無 (score=0.00)、(ii)発作前の痙攣リスク高 (score=59.9)、(iii)発作直後の痙攣リスク高 (score=60.0) を比較すると、4-AP や Strychnine とは異なり、痙攣スコアの上昇に伴って、10-50Hz 帯の分布が低強度にシフトしている。Fig 4-5(d)に示す Vehicle 投与時の(i)通常状態、(ii)二足直立、歩行状態、(iii)半目で転寝、(iv)毛繕い時において、運動時には 50-250Hz 帯、睡眠時には 4-50Hz 帯が増強したが、AI は痙攣リスク無と判定した。開発した痙攣リスク検出 AI は強度分布全体の形状でリスクを判定していると考えられる。

4-3-4 痙攣予測 AI の検証

開発した痙攣リスク検出 AI が未学習薬剤の痙攣リスクを検出できるかを検証するために、痙攣陽性化合物である Tramadol 150mg/kg、痙攣陰性化合物である Aspirin 3000mg/kg を投与したデータを AI に予測させた。Figure 4-6A に Aspirin 投与後 1 時間のデータ(14400 ヒストグラム/ n=4)と Tramadol 投与による痙攣発作時のデータ

(1127 ヒストグラム/ n=4)を判定させた結果のコンフージョンマトリクスと ROC 曲線を示す。AI は未学習化合物でも 100%の精度で発作状態を識別した。Figure 4-6B は Aspirin と Tramadol の投与後の AI の痙攣リスク予測(赤線)と一般状態観察で検出された痙攣発作の時間帯 (青線) の比較を示している。AI は Tramadol 150mg/kg を投与したすべての検体で、一般状態観察で痙攣状態と判断される前に痙攣毒性を予測した (Fig. 4-6Bb)。一方、Aspirin 3000mg/kg を投与した検体では一時的なスコアの上昇のみが見られ、そのうち1検体ではスコアの上昇は見られなかった。

AI が予測した痙攣スコアの 60 秒間の移動合計値が 1 を超えた時間帯を算出し、Vehicle に対する各化合物の有意差検定を行った。各化合物の合計値が 1 を超えた平均時間は、Vehicle = 0.0 ± 0.0 s (n=5), Aspirin = 147.5 ± 119.4 s (n=4), 4-AP = 3336.8 ± 105.3 s (n=5), Strychnine = 3402.3 ± 88.6 s (n=4), Pilocarpine = 3568.0 ± 8.2 s (n=3), Tramadol = 3503.8 ± 147.7 s (n=4)であった。Vehicle と Aspirin の間に有意差はなく ($p = 0.129$)、Vehicle とすべての痙攣陽性化合物との間に有意差が認められた：4-AP ($p < 0.001$), strychnine ($p < 0.001$), pilocarpine ($p < 0.001$), tramadol ($p < 0.001$)。開発した AI は、未学習の薬剤でも痙攣リスクを判断できることがわかった。

4-3-5 AI による痙攣前兆状態予測

痙攣が誘発されなかった低用量の痙攣陽性化合物を投与した検体 4-AP (3 mg/kg, n=5)、Strychnine (1 mg/kg, n=4)、Pilocarpine (150 mg/kg, n=4)と溶媒のみ (Vehicle n=2) を投与した検体の脳波データを、痙攣状態を学習させた AI に痙攣リスク予測させた (Fig.4-7)。AI は痙攣陽性化合物の投与直後を投与前と予測し、その後、痙攣陽性化合物全 3 化合物において、痙攣リスクの時間帯を予測した (Fig. 4-7(a)-(c))。Strychnine の 1 検体のみ、痙攣リスクは僅かであった。投与後に痙攣兆候が観察される順番は、痙攣時と同様に pilocarpine が最も早い傾向にあった。AI が一度も見たことがない Vehicle のサンプルは、全時間を通して、痙攣リスクは検出されなかった。本結果から、開発したヒストグラム画像 AI は、痙攣が観察されない脳波においても痙攣リスクを検出できることがわかった。

次に、AI による痙攣リスク予測が変動した時間帯のヒストグラム画像を比較した (Fig. 4-8)。痙攣発作が見られなかった用量において、4-AP 投与時の (i) 痙攣リスク無 (score=0.00)、(ii) 痙攣リスク中 (score=30.6)、(iii) 痙攣リスク無 (score=0.08)、(iv) 痙攣リスク高 (score=54.8) を比較すると、高用量と同様に痙攣リスク判定時のヒストグラムは 60-100Hz 帯の分布が高強度にシフトしていた (Fig 4-8(a))。Fig 4-8(b) の Strychnine 投与時の(i)痙攣リスク無(score=0.00)、(ii)痙攣リスク高(score=55.1)、(iii)痙攣リスク無 (score=0.00)、(iv)痙攣リスク中 (score=37.9) および、Fig 4-8(c)の Pilocarpine 投与時の(i)痙攣リスク無 (score=0.00)、(ii)痙攣リスク中 (score=35.8)、(iii)痙攣リスク高 (score=59.0) では高用量と共通するヒストグラムの変化は見られな

かった。痙攣発作が見られなかった用量においても AI が予測した痙攣スコアの 60 秒間の移動合計値が 1 を超えた時間帯を算出し、Vehicle に対する各化合物の有意差検定を行った。各化合物の合計値が 1 を超えた平均時間は、それぞれ 4-AP = 2769.2 ± 246.6 s ($n = 5$), strychnine = 1295.3 ± 766.8 s ($n = 4$), pilocarpine = 3554.4 ± 18.5 s ($n = 4$)であり、Vehicle とすべての痙攣陽性化合物との間に有意差が認められた：4-AP ($p < 0.001$), strychnine ($p < 0.001$), pilocarpine ($p < 0.001$)。まとめると、痙攣時のヒストグラム画像を学習した AI は、一般状態観察では痙攣が認められなかった低用量の痙攣陽性化合物の脳波から痙攣リスクを予測することに成功した。AI は人の目では明確に特徴を捉えることができないヒストグラムの特徴に基づいて、痙攣リスクを検出していると考えられる。

4-3-6 痙攣リスクの検出に関与する特徴量

AI はヒストグラム画像の 4096 次元の正規化された特徴量に基づいて痙攣リスクを予測している。各化合物の 4096 次元の中央値のプロットを Figure 4-9A に示す。Feature quantities = 1 は薬剤投与前の平均特徴量を表している。4096 次元の特徴量から痙攣リスクを決定する特徴量を同定するために、Vehicle (18000 ヒストグラム / $n = 5$), Aspirin (14400 ヒストグラム / $n = 4$) と、痙攣発作時の 4-AP (23381 ヒストグラム / $n = 5$), strychnine (5015 ヒストグラム / $n = 4$), pilocarpine (11232 ヒストグラム / $n = 3$), Tramadol (1127 ヒストグラム / $n = 4$) の特徴量の各次元について有意差検定を行った。初めに、陰性化合物の Vehicle と Aspirin の間に有意差が無い特徴量を抽出した。次に抽出した特徴量から、各痙攣陽性化合物(4-AP, Strychnine, Pilocarpine, Tramadol) と Vehicle, Aspirin の両方の間に有意差を示す特徴量を抽出した。痙攣陽性化合物ごとに抽出した特徴量を Figure 4-9B の 64×64 次元のマップに示す。有意差が見られた特徴量の次元数は、4-AP : 232 次元、Strychnine : 130 次元、Pilocarpine : 224 次元、Tramadol : 184 次元であった。このうち、78 次元の特徴量が 4 つの痙攣陽性化合物で共通していた。この 78 次元の特徴量は AI が痙攣リスクを予測する根拠となる特徴であると考えられる。また、各痙攣薬についてのみ有意差が認められた特徴量の次元数は、4-AP : 32 次元、Strychnine : 5 次元、Pilocarpine : 19 次元、Tramadol : 7 次元であった。これらの特徴量は、各痙攣陽性化合物特有の反応を示していると考えられる。Figure 4-9C は単一の痙攣陽性化合物(63 次元)、二つの痙攣陽性化合物(67 次元)、三つの痙攣陽性化合物(87 次元)、すべての痙攣陽性化合物 (78 次元) で有意差が認められた特徴量を示している。

4-4 考察

In vivo 脳波から、痙攣リスクを検出するための周波数強度分布ヒストグラム画像 AI

を開発した。wavelet 解析で算出した周波数強度の時系列データを時間窓に分割し、時間窓内の周波数強度の分布を画像する方法は、新しい画像化法である。作用機序が異なる痙攣陽性化合物における痙攣時のスカログラム強度分布の特徴は時間的に異なるが (Fig. 4-1)、時間情報を排除することで、機序の異なる痙攣であっても共通する強度分布の変化を捉えることが可能となった (Fig. 4-2)。痙攣時の周波数強度分布ヒストグラム画像を学習した AI は、投与前の正常な脳波と痙攣状態を 100%の精度で判別するとともに、一般状態観察で痙攣が確認されるよりも早期に痙攣リスクを検出した (Fig. 4-4)。痙攣状態に見られる脳波の特徴が、痙攣発作前の脳波データに内在していることを示している。

同様に、一般状態観察で痙攣が見られなかった低用量の脳波においても、AI は、痙攣リスクを予測したことから (Fig. 4-6)、痙攣様の特徴が低用量暴露時の脳波に内在していたことを示している。脳波データのみで痙攣前兆状態を検出した報告はなく、薬物誘発性発作における振戦などの前兆行動と EEG 形態を調査した報告のみである。前兆行動の表れない、てんかん発作の自動検出には AI の進歩が期待されていると報告されている (Authier 2019, Delaunois 2020)。本 AI 解析法は、検体毎に投与前の特徴量で、投与後の特徴量を正規化することで、初期状態の差に影響を受けないロバストな解析法であり、一般状態観察において、痙攣が認められない化合物であっても、脳波データから痙攣リスクを検出できるこれまでに無い方法であると考えられる。

痙攣リスクと判定した画像とリスクなしと判定した画像を Fig. 4 と Fig. 4-7 に示したが、人間の目で違いがはっきりとわからない画像も AI は識別しており、従来では脳波から痙攣前兆状態を検出できる AI の開発に成功したと言える。

AI が痙攣リスク検出に使用している特徴量を特定した。その結果、4つの痙攣陽性化合物による痙攣発作時には 78次元の特徴量が共通して変化することがわかった。この特徴量からヒストグラムの変化を復元することができれば、痙攣発作に結び付く神経活動の変化を特定することが可能となる。さらに、各痙攣陽性化合物の固有の変化を示す特徴量も特定した。この特徴量は、薬の作用機序の違いを反映している可能性がある。この結果は未知の化合物によって変化したヒストグラムの特徴量から、作用機序を予測できる可能性を示唆している。

痙攣が誘発されない低用量の実験から計測された脳室内濃度は、4-AP (3 mg/kg) : 2.12 μM 、Strychnine (1 mg/kg) : 0.1 μM 、Pilocarpine (200 mg/kg) : 266 μM であった。4-AP は 2 μM であり、*in vitro* MEA データと比較すると、1 μM で 62.2%、10 μM で 94.6%の痙攣リスクを予測していることから妥当な用量だと考察できる。しかしながら、脳波による AI は、全ての検体で長期にわたり痙攣リスクを予測していたことから、より低濃度のデータを取得し、痙攣リスク用量を同定する必要がある。ピロカルピンも同様であり、脳室内用量は 266 μM であった。*in vitro* のデータは 100 μM までしか取得しておらず、97%の確率で毒性を示している。脳波データの AI 検出結果も投与後

直後に痙攣を予測していたことから、より低用量のデータを取得する必要がある。**Strychnine** の MEA データは本論文では取得していないが、別実験のデータを参照した場合、 $3\mu\text{M}$ 以上を毒性と学習させた AI は Vehicle で 1.0%、 $0.3\mu\text{M}$ で 35.3%、 $1\mu\text{M}$ で 100.0% の毒性を予測しており、 $0.3\mu\text{M}$ から用量依存的に毒性を予測できていた。より低用量のデータを取得し、 $0.3\mu\text{M}$ を毒性と学習させることで、より予測精度の高い AI になることが期待される。

いずれにせよ、*in vivo* 脳波実験において、より低用量のデータを取得し、痙攣兆候が見られる用量を決定して行く必要がある。今後、用量が決定されれば、その用量の *in vitro* MEA データを毒性リスクとして AI に学習させることで、*in vivo* への外挿性を担保できる、より精度の高い *in vitro* 痙攣毒性予測へと発展できることが期待される。一方、今回の結果から、*in vivo* で痙攣が出ない用量でも痙攣兆候が見られたことから、一般状態観察による痙攣毒性評価は、偽陰性が高い確率で発生する可能性があることがわかった。

また、本開発手法は、脳波データ全般に使用することができる為、教師として教えるデータを変化させれば、神経疾患の基礎研究や痙攣毒性のみならず、頭痛などの様々な毒性評価手法としての展開が期待される。更には、ヒト *in vivo* 脳波に応用すれば、痙攣兆候を捉えることで、痙攣発作を回避する薬剤の投与や手術中のモニタリングなどへの応用も期待される。本研究の開発技術は汎用性が高いものである。

4-5 結論

本章では、脳波データの周波数特性画像を用いた機械学習によって、脳波データから痙攣前兆を予測できる解析法の開発を行った。周波数強度分布ヒストグラム画像を学習したAIは、痙攣リスクの特徴を捉えることによって、一般状態観察で痙攣前兆が確認されるよりも早期に痙攣リスクを検出可能であった。痙攣前兆時の脳室内濃度における *in vitro* MEA データを取得し、その用量をAIに学習させればより精度の高い *in vitro* 痙攣毒性予測法となることが期待される。

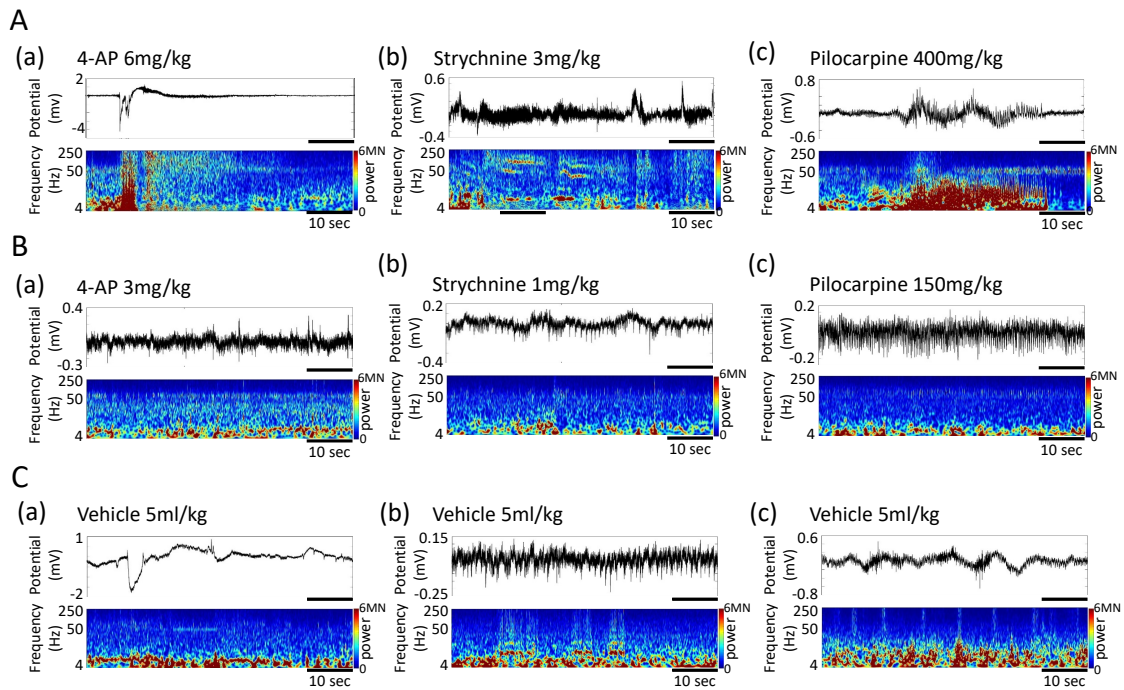


Figure 4-1. Typical raw waveforms and scalograms (A) Raw waveforms and scalograms determined to be seizure by general observation, (a) 4-AP 6 mg/kg, (b) Strychnine 3 mg/kg, (c) Pilocarpine 400 mg/kg, (B)After the administration of the convulsants at doses inducing no seizures (a) 4-AP 3 mg/kg, (b) Strychnine 1 mg/kg, (c) Pilocarpine 150 mg/kg, (C) After vehicle 5 ml/kg administration

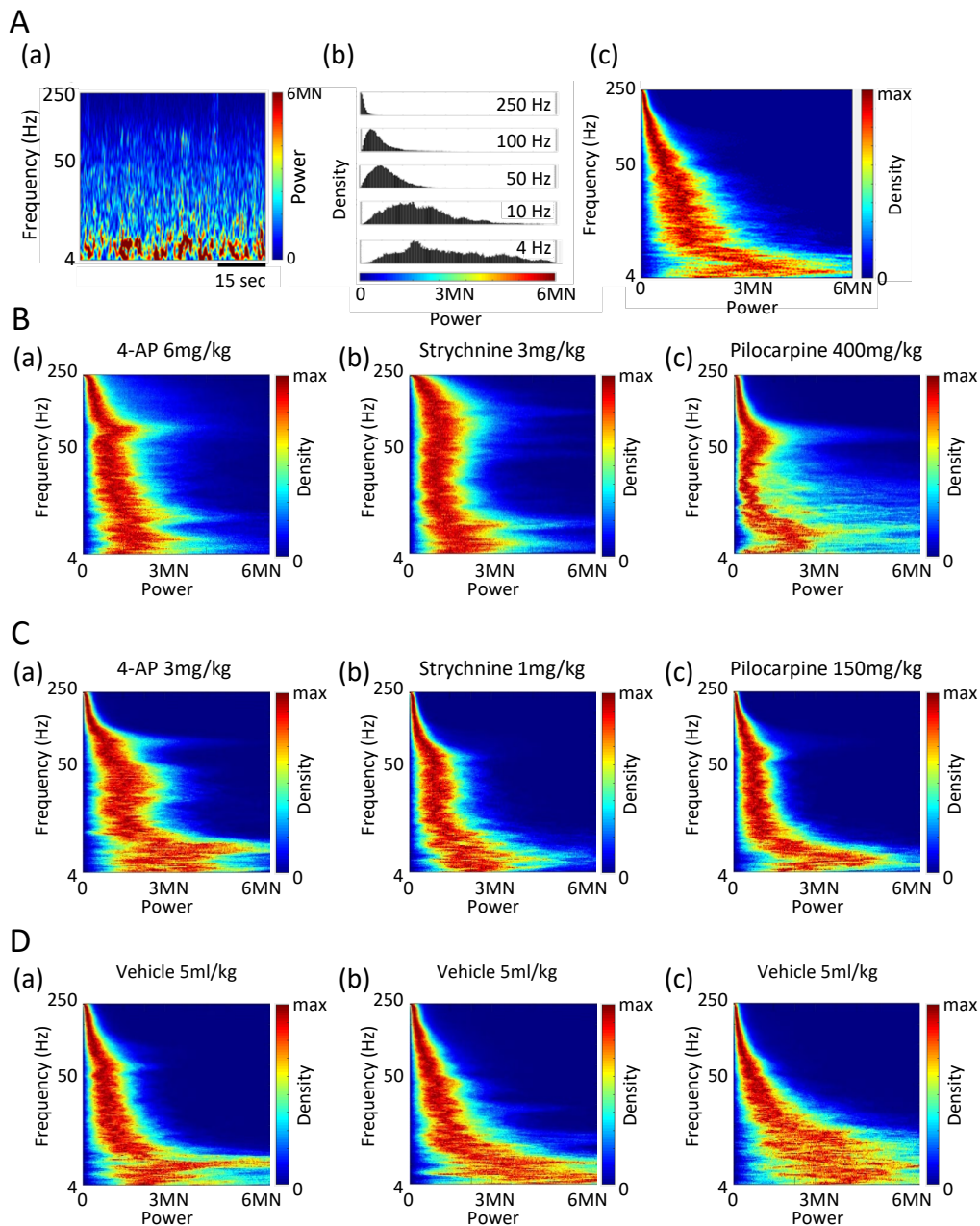


Figure 4-2. Histograms of frequency–intensity distribution (A) (a) A scalogram in 60-second window, (b) Intensity histogram of each frequency band in 60-second window, (c) Histograms of frequency–intensity distribution in 60-second window. (B) Histograms of frequency–intensity distribution during a seizure, (a) 4-AP 6 mg/kg, (b) Strychnine 3 mg/kg, (c) Pilocarpine 400 mg/kg, (C) Histograms of frequency–intensity distribution at doses inducing no seizures, (a) 4-AP 3 mg/kg, (b) Strychnine 1 mg/kg, (c) Pilocarpine 150 mg/kg, (D) Histograms of frequency–intensity distribution after vehicle 5 ml/kg administration. MN indicates the median intensity of signals over 15 minutes before administration.

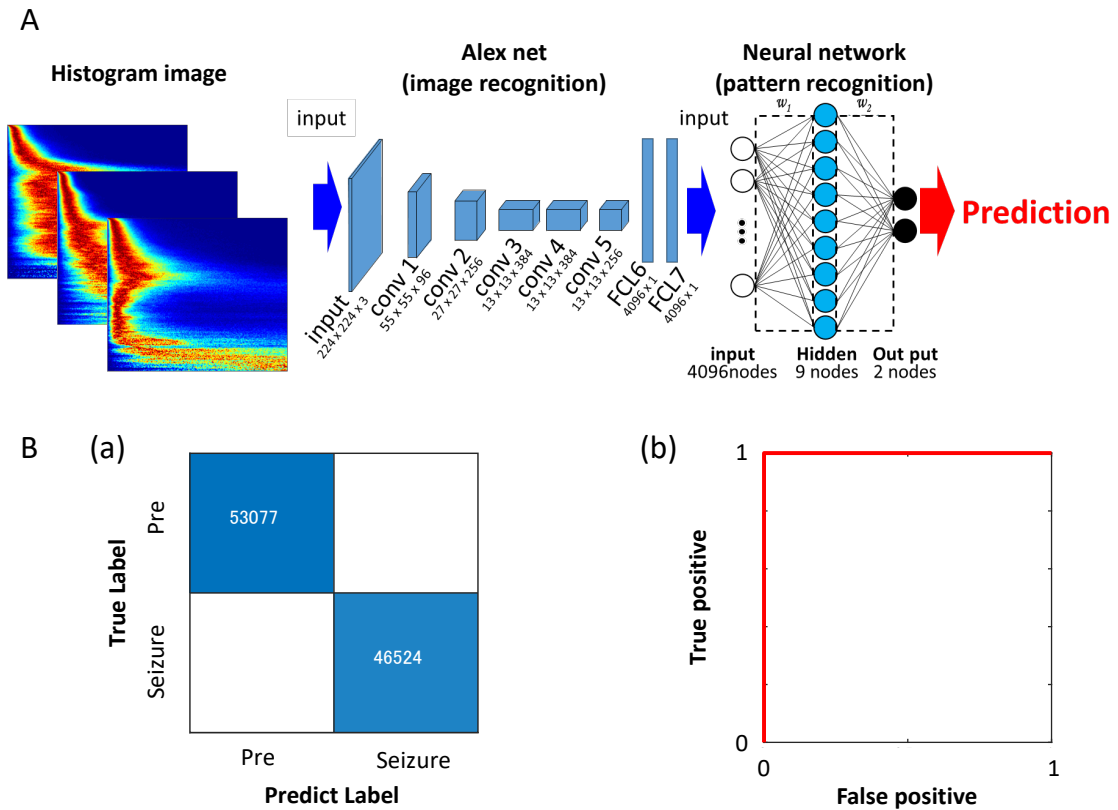


Figure 4-3 Creation of an AI-based seizure prediction system. (A) Data flow and architecture of seizure risk prediction system. w_1 is the weight between the input layer and the hidden layer, w_2 is the weight between the hidden layer and the output layer. (B) (a) Confusion matrix of training dataset. (b) Receiver operating characteristic (ROC) curve.

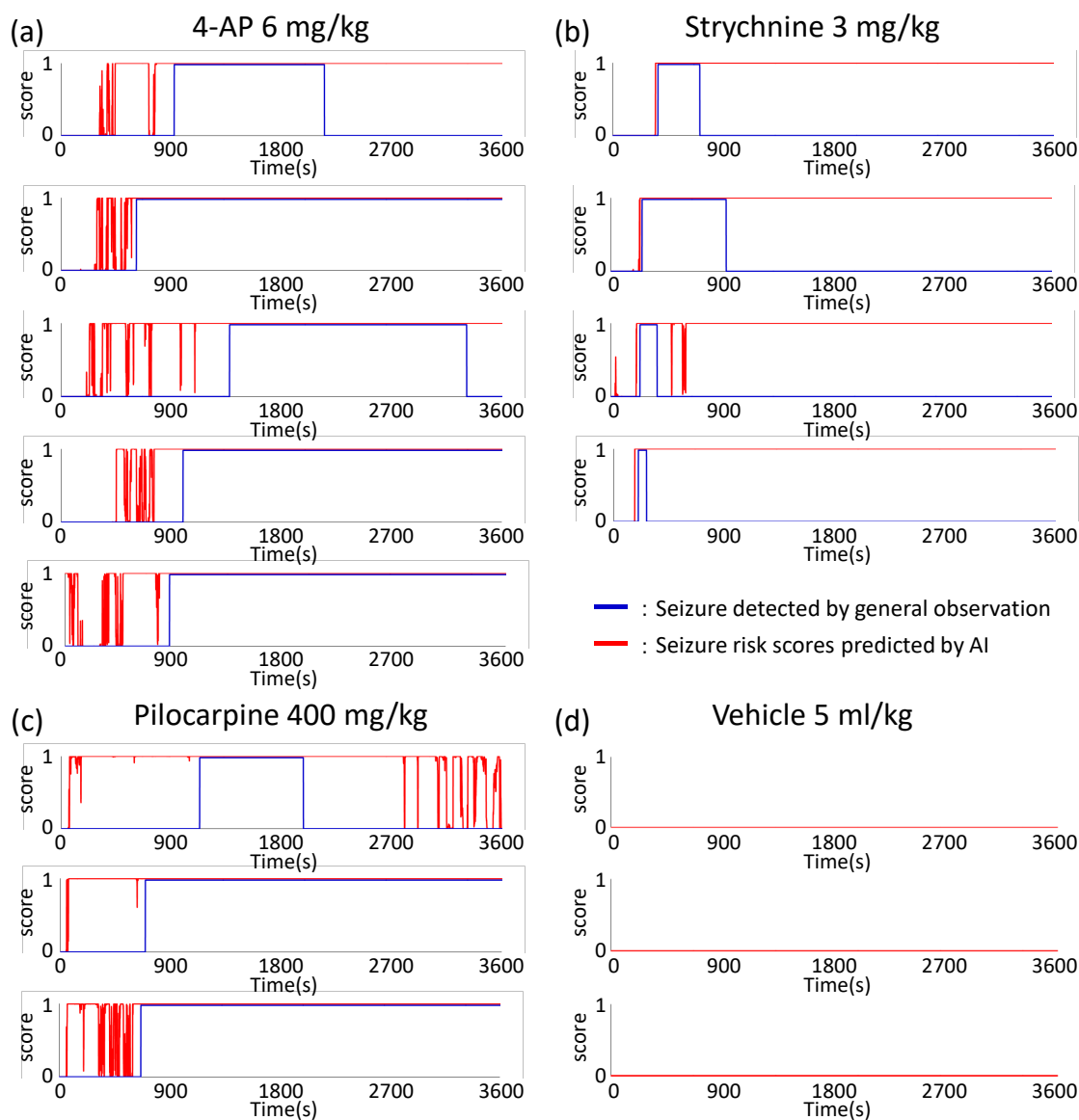
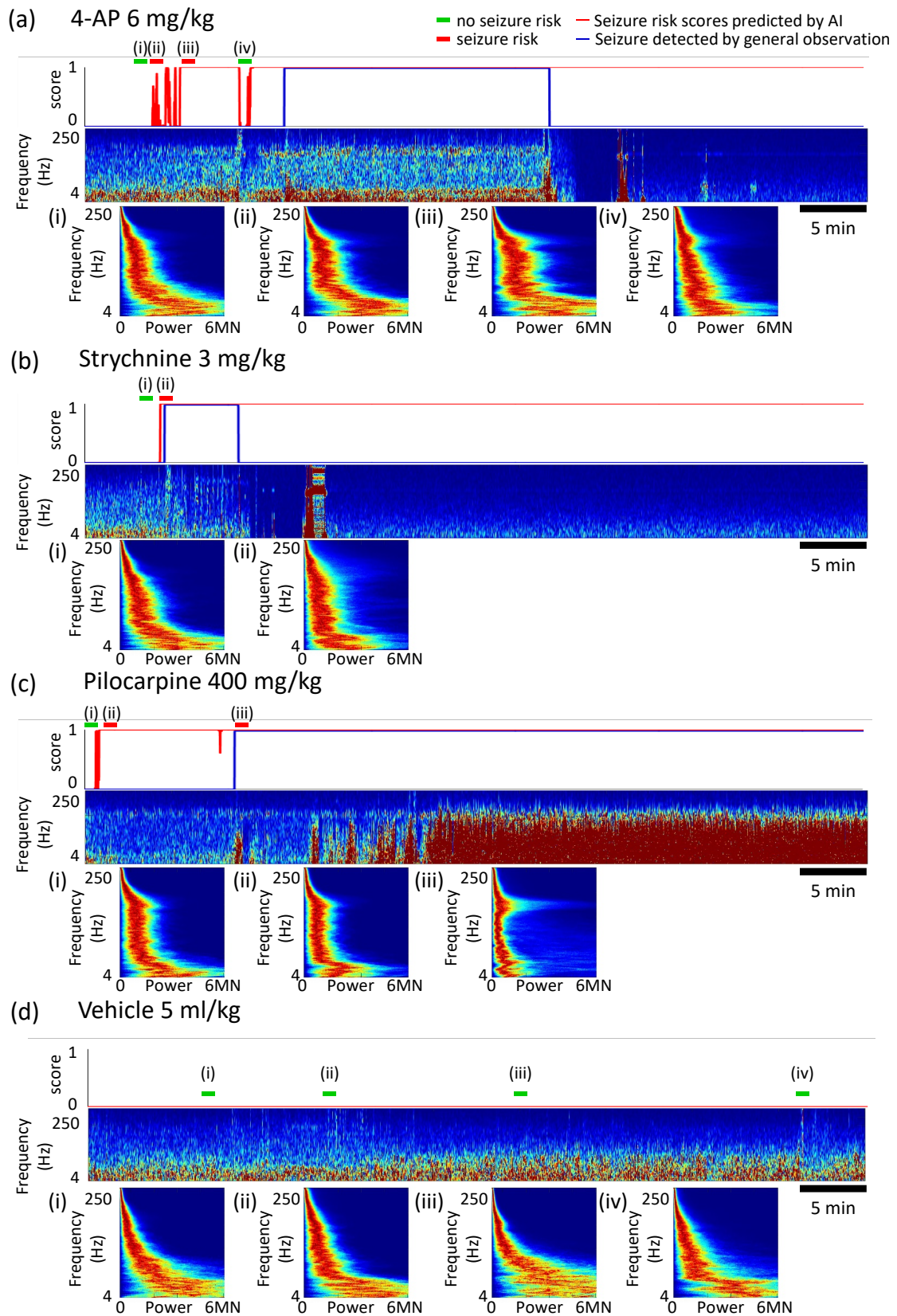


Figure 4-4 Prediction of seizure risk in seizure-inducing dose of convulsants. Seizure risk scores predicted by AI system (red line) and seizures detected by general observation (blue line). (a) 4-AP: 6mg/kg, (b) Strychnine: 3mg/kg, (c) Pilocarpine: 400mg/kg, (d) Vehicle: 5ml/kg.



第 4 章 生体脳波における痙攣前兆検出法の開発

Figure 4-5 Comparison of seizure risk scores and histograms in seizure-inducing dose of convulsants and vehicle. AI-predicted seizure risk score (upper), scalogram (middle), typical histograms (lower). (a) 4-AP: 6mg/kg, (b) Strychnine: 3mg/kg, (c) Pilocarpine: 400mg/kg, (d) Vehicle: 5ml/kg. MN indicates the median intensity of signals over 15 minutes before administration.

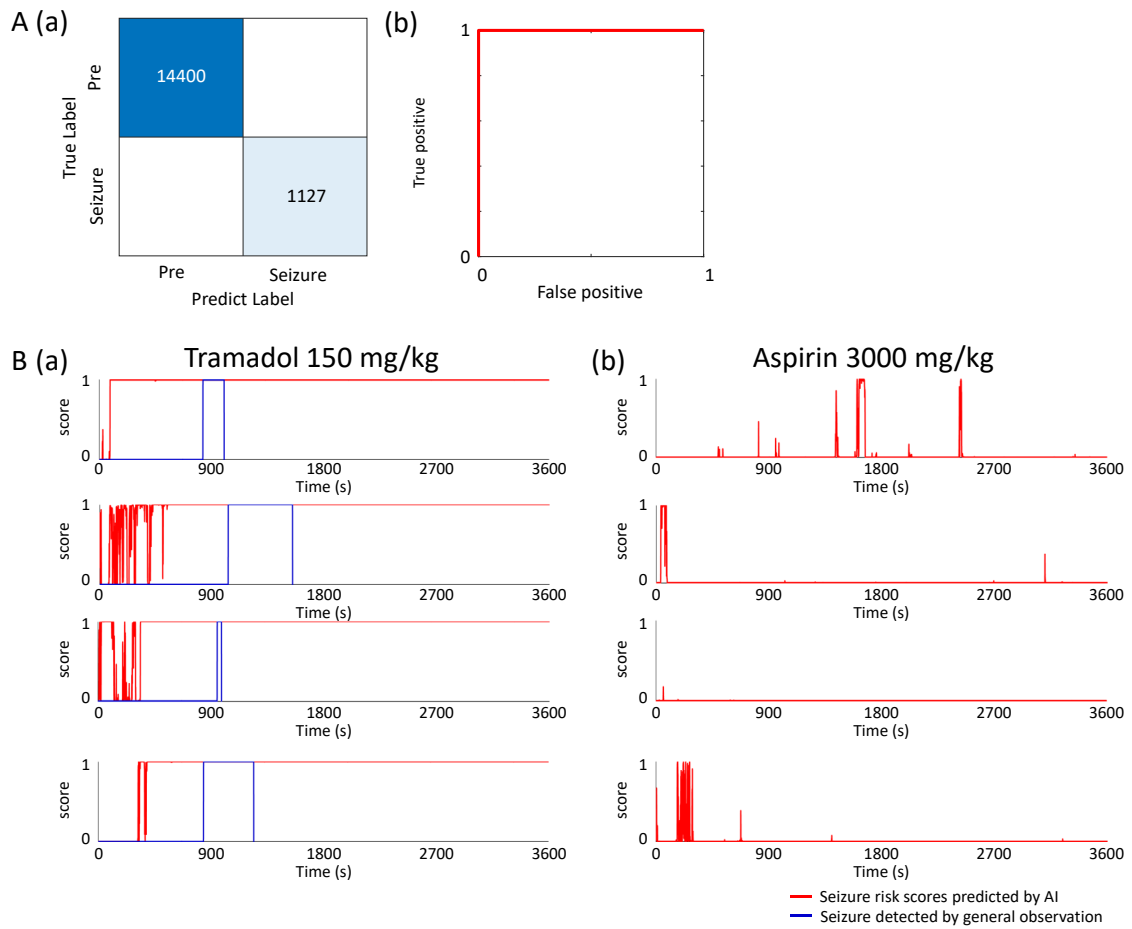


Figure 4-6 Prediction of seizure risk in unlearning compounds. (A) (a) Confusion matrix of test dataset. (b) Receiver operating characteristic (ROC) curve. (B) Seizure risk scores predicted by AI system (red line) and seizures detected by general observation (blue line). (a) Tramadol: 150 mg/kg, (b) Aspirin: 3000 mg/kg.

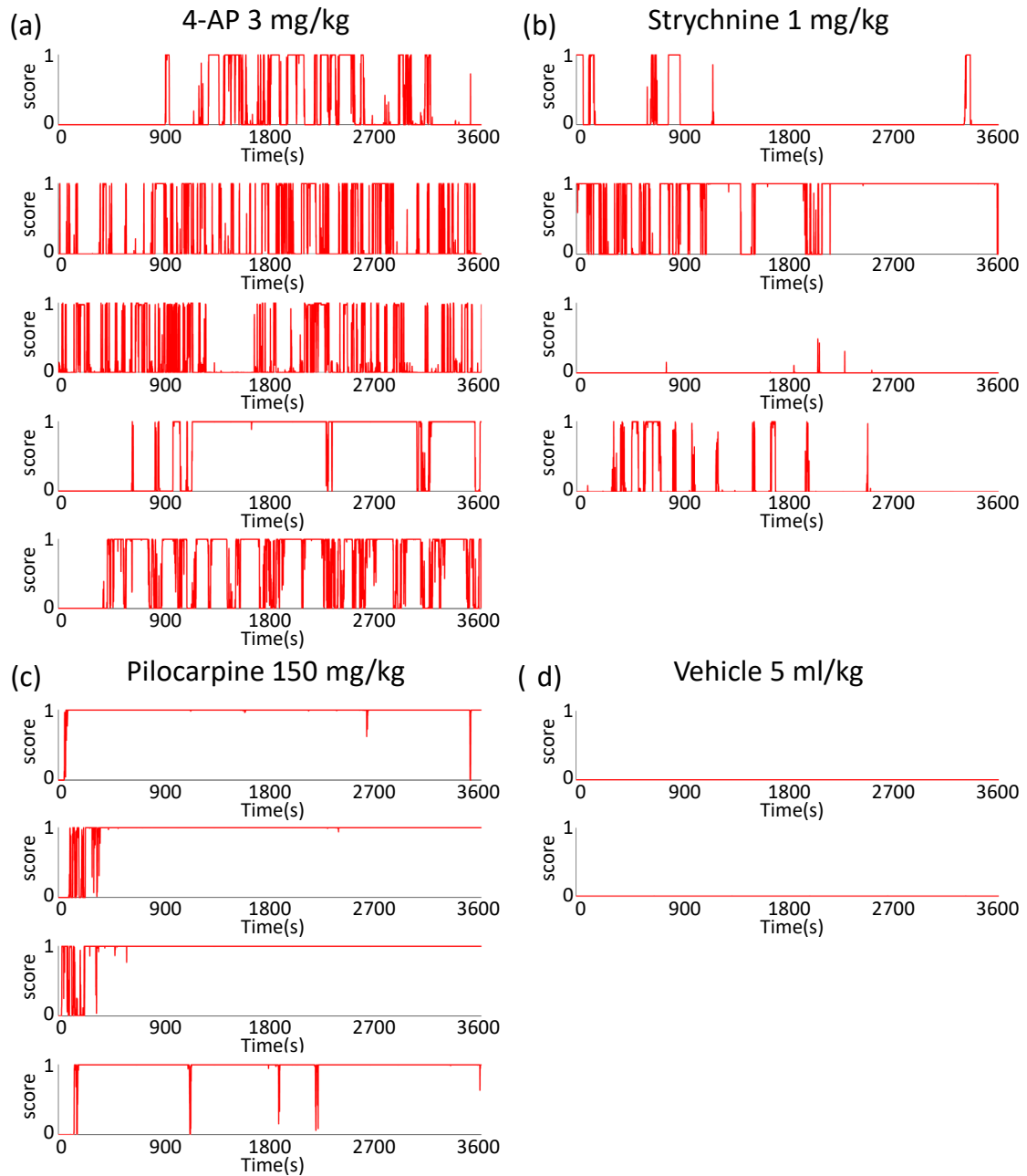


Figure 4-7 Prediction of seizure risk in subseizure dose of convulsants and vehicle. Red lines show seizure risk scores predicted by AI. (a) 4-AP: 3mg/kg, (b) Strychnine: 1mg/kg, (c) Pilocarpine: 150mg/kg, (d) Vehicle: 5ml/kg.

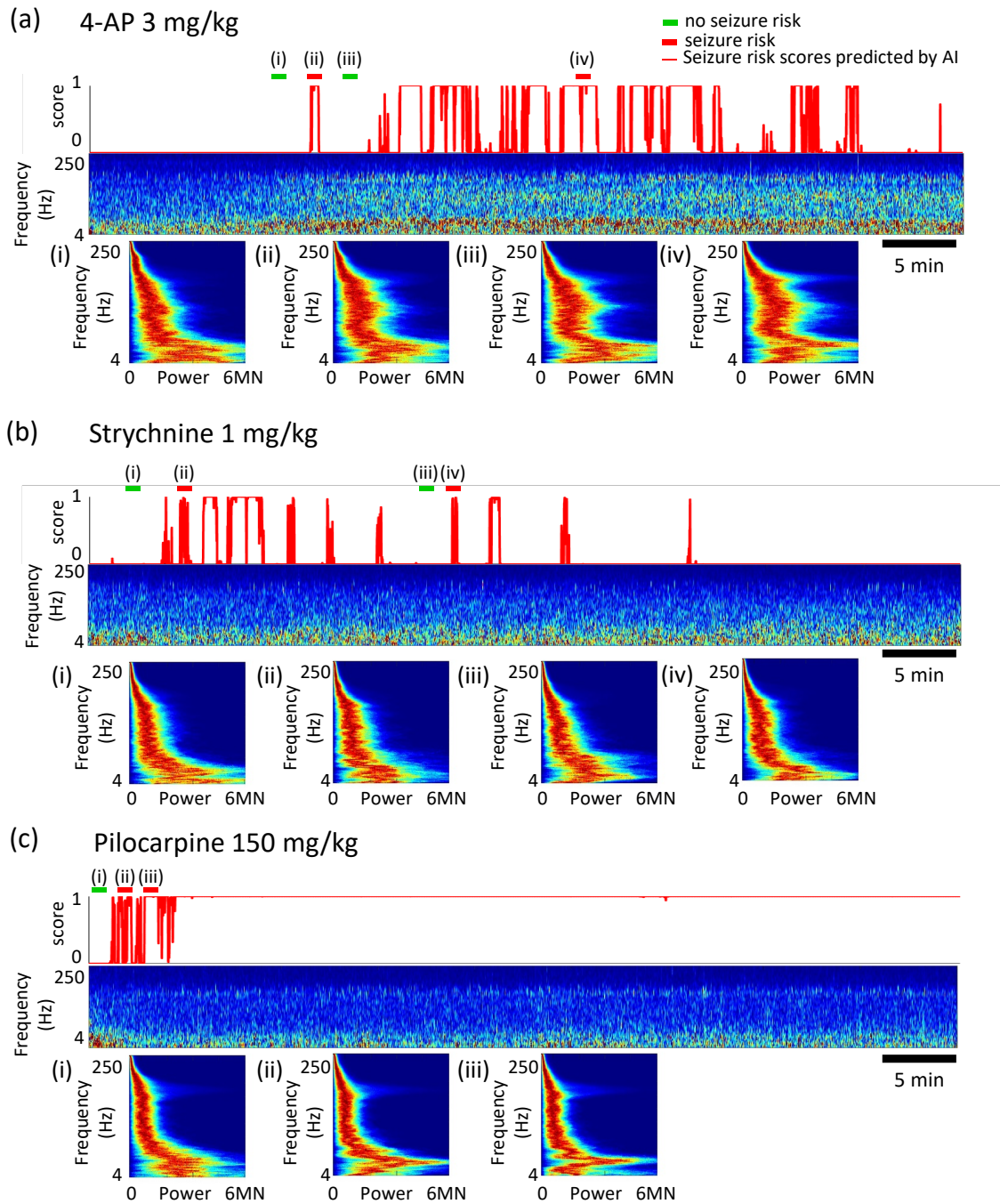


Figure 4-8 Comparison of seizure risk scores and histograms in subseizure dose of convulsants. AI-predicted seizure scores (upper), scalogram (middle), typical histograms (lower). (a) 4-AP: 3mg/kg, (b) Strychnine: 1mg/kg, (c) Pilocarpine: 150mg/kg .MN indicates the median intensity of signals over 15 minutes before administration.

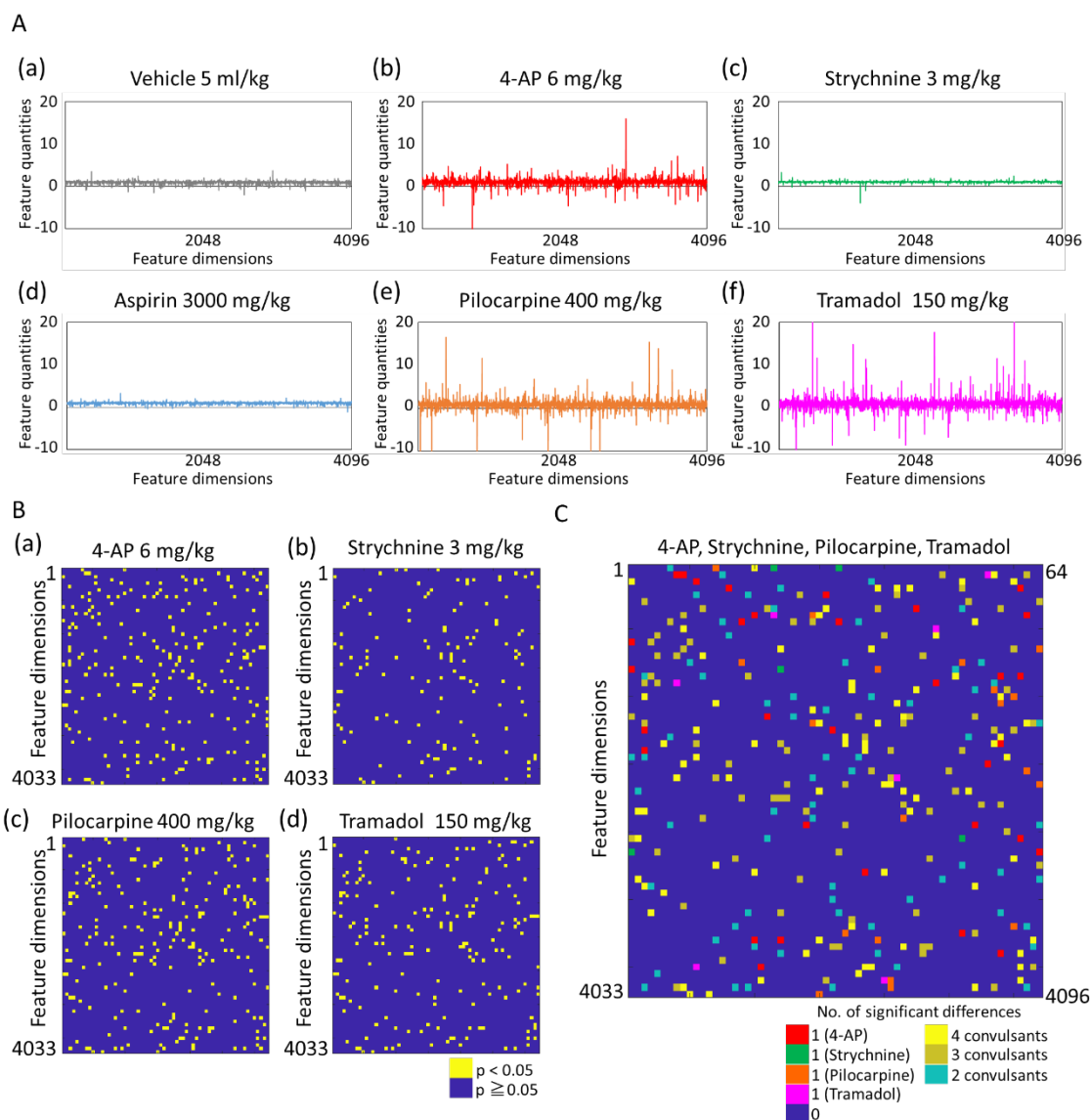


Figure 4-9 Feature quantities involved in determining seizure-risk. (A) Median plot of 4096-dimensional features for each drug normalized prior to drug administration. The median values were calculated from vehicle 18000 histograms ($n = 5$), aspirin 14400 histograms ($n = 4$), 4-AP 23381 histograms ($n = 5$) during seizure, strychnine 5015 histograms ($n = 4$) during seizure, pilocarpine 11232 histograms ($n = 3$) during seizure, Tramadol 1127 histograms ($n = 4$) during seizure, respectively. (a) Vehicle 5ml/kg, (b) 4-AP 6mg/kg, (c) Strychnine 3 mg/kg, (d) Aspirin 3000 mg/kg, (e) Pilocarpine 400 mg/kg, (f) Tramadol 150 mg/kg. (B) Feature quantities map showing significant differences between each convulsants and both vehicle and aspirin. Yellow indicates the feature quantities with significant difference. Statistical analysis performed using one-way ANOVA (Bonferroni's test), $p < 0.05$. (a) 4-AP

6mg/kg, (b) Strychnine 3 mg/kg, (c) Pilocarpine 400 mg/kg, (c) Tramadol 150 mg/kg, (B) A heat map that merges the feature quantities of four convulsants. The feature quantities showing significant differences only in each convulsant are shown by red (4-AP), green (strychnine), orange (pilocarpine), and magenta (tramadol). The feature quantities common to the four, three, and two convulsants are indicated by yellow, gold, and right green, respectively. The 78 features shown in yellow are the feature quantities common to the all convulsants.

5 結言

本研究では、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの *in vitro* MEA データから精度の高い医薬品の痙攣毒性予測を実現することを目的に、機械学習を用いた神経回路活動の解析法を3つ開発した。

第1章では、創薬開発後期中枢神経系の副作用検出により開発コストと時間が大幅に損失している現状があり、前臨床試験で精度の高い医薬品の神経毒性検出法が求められていることを述べた。中でも重篤な毒性である痙攣毒性検出の需要が高く、前臨床試験での *in vitro* 痙攣毒性評価法の取り組みが国内外で行われており、その課題について言及した。ヒト iPS 細胞由来ニューロンの MEA 計測は、ヒトへの外挿性を担保できる可能性があることから、痙攣毒性評価法として期待されている。しかしながら、痙攣毒性リスクを検出する為の解析法が未確立であることがボトルネックとなっている。そこで、本研究は、*in vitro* MEA データから医薬品の痙攣毒性リスクを高い精度で予測できる解析法の構築を目指し、機械学習を用いた神経回路活動の解析法の開発を目的とした。第1章では開発する3つの研究項目の意義について述べた。

第2章では、培養中枢神経ネットワークの化合物評価パラメータとして最も重要な「同期バースト発火」を正確に検出する新しい手法 (4-step method) の開発について述べた(Matsuda et al. 2018)。神経ネットワークがある時刻にシナプス結合を介して同期的に活動する「同期バースト発火」に関するパラメータは、中枢神経系の機能評価の代表的なパラメータであり、同期バースト発火関連のパラメータを用いて化合物の応答が議論されている。しかしながら、正確に同期バースト発火を検出できる方法は無く、また、同期バースト発火検出法は各施設で統一されていない状況である。

開発した同期バースト発火検出法は発火間隔と同期バースト内発火数の閾値を4つのステップで使用することで、同期バーストの個数および持続時間を正確に検出し、連続した同期バーストの識別と誤検出の防止を可能にした。*In vitro* MEA データから同期バースト検出が行われ、約50年になるが、最も正確に検出できる方法であると考えられる。次に、施設間で統一した同期バースト発火の検出を実現する為に、開発した4-step method で検出した同期バースト発火を教師データとした同期バースト発火検出 AI を開発した。物体検出モデルに学習させる画像に同期バーストの発火周期を用いて正規化したラスタプロット画像を用いることで、4-step method と同様な同期バースト発火の検出を可能とした。本成果は、4-step method の開発によって、正確な同期バースト発火の検出を実現したことによって達成された成果である。同期バースト発火検出 AI は研究者の目視による閾値設定を必要しない為、国内外全施設の同期バースト発火を統一した基準で検出することが可能となり、新しい解析プラットフォームとしての展開が期待される。同期バースト発火関連パラメータは痙攣毒性予測の主要なパラメータである為、本研究で開発した同期バースト発火検出法は、国内外に

における神経機能を指標とした評価系の構築を加速させる成果であると考えられる。また、本研究で開発した同期バースト発火検出法は、*in vitro* MEA データのみならず、脳スライスや *in vivo* 脳の電気活動データにも適用可能であり、Ca²⁺指示薬や膜電位感受性色素を用いた光イメージング法で取得されたデータにも適用可能である。神経科学領域において、幅広い汎用性を有し、様々な分野の基礎研究および応用研究へと展開できるものである。

第3章では、ヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いた *in vitro* MEA データから医薬品の痙攣毒性リスクや作用機序の予測を可能とする、神経ネットワーク活動のラスタープロット画像を用いた痙攣リスク予測 AI および薬剤名予測 AI を開発した。ラスタープロットは同期バーストの情報を含んでおり、これまで研究者が算出してきた解析パラメータよりも遥かに多い 4096 次元の特徴量に基づき毒性や作用機序を予測する方法である。痙攣リスク予測 AI は学習薬剤において 90%以上の予測精度で痙攣陽性化合物と陰性化合物の応答を正確に分離し、未学習薬剤の痙攣リスクも用量依存的に判定した。また、薬剤名予測 AI は 13 種類の化合物の応答と陰性化合物の応答を識別し、全薬剤の薬剤名を平均 99.9±0.1%の精度で予測した。本 AI 予測法は、痙攣リスクの用量依存性、痙攣リスク確率に基づく痙攣リスクの順位付け、化合物の作用機序を識別する能力を有しており、精度の高い新規痙攣リスク予測法としての有効性が示唆された。*in vitro* MEA データを用いた医薬品の痙攣毒性予測法を大きく前進させる成果であり、今後の実応用が期待できる。また、本研究で開発したラスタープロットを用いた機械学習法は、神経活動全般に適用できる方法であることから、痙攣毒性予測のみならず、様々な毒性検出や薬効、および神経機能の基礎研究としても使用でき、汎用性が非常に高い方法である。

また、本研究で開発したラスタープロットを用いた機械学習法は、他に報告例が無く、新規性を有しているとともに、汎用性が非常に高い技術である。ラスタープロットは *in vitro* MEA データのみならず、*in vivo* の電気活動記録や Ca²⁺指示薬や膜電位感受性色素などの光イメージング計測によって得られる神経活動解析全般で使用されている。神経系の電気活動を対象とした基礎研究および応用研究全般に適用できる方法であることから、本研究開発の意義は非常に高いものである。

第4章では、*in vitro* の毒性予測法をより精度の高い予測法とする為に、*in vivo* への外挿性を担保できる方法への取り組みについて述べた。精度の高い予測法とするためには、偽陰性を排除する必要がある。そこで、*in vivo* で痙攣兆候が見られる場合の脳室内濃度を毒性用量として決定し、その用量での *in vitro* MEA データを毒性とラベルして AI に学習させる戦略をとった。その為に、*in vivo* で痙攣前兆を検出する方法として脳波に着目し、痙攣前兆状態を判別する為の、脳波特性を学習した周波数画像 AI を開発した。はじめに、痙攣の周波数特性を可視化する周波数強度分布ヒストグラム画像作製法を開発し、機序の異なる痙攣前兆であっても共通する強度分布の変化を捉えること

を可能とした。次に、周波数強度分布ヒストグラム画像を学習させた AI は、痙攣リスクの特徴を捉えることによって、投与前の正常な脳波と痙攣状態を 100%の精度で判別し、一般状態観察では難しかった痙攣前兆状態の検出も可能とした。脳波から痙攣前兆状態を判別することが可能となった為、前兆状態が観察された脳室内濃度を同定することができる。脳室内濃度の *in vitro* MEA データを取得し、AI に毒性であると学習させることで、*in vivo* への外挿性も担保できる、精度の高い *in vitro* 痙攣毒性評価法が構築できると期待される。

また、脳波から痙攣前兆状態を捉えることができる本技術は、動物実験の脳波データのみで痙攣毒性予測を行う方法としても有効であり、実用化が期待される。また、脳波データ全般に使用できる解析法であることから、医薬品の痙攣毒性予測のみならず、これまで評価が難しかった頭痛などの他の副作用検出にも有効であると考えられる。また、教師として学習させるデータを変更することで、脳機能の基礎研究および様々な応用研究にも適用できる技術であり、汎用性が非常に高い技術である。

本研究は、*in vitro* MEA データを用いた医薬品の痙攣毒性予測法を構築する為に、機械学習を用いた神経回路活動の 3 つの解析技術を開発した。本研究開発により、前臨床試験における医薬品の痙攣毒性検出の精度が高くなると期待できる。本研究で開発した「機械学習を用いた神経回路活動の解析技術」は、データ駆動型神経科学を発展させる技術開発であるとも言える。

参考文献

- Amin H, Maccione A, Marinaro F, Zordan S, Nieuws T, Berdondini L. 2016. Electrical responses and spontaneous activity of human ips-derived neuronal networks characterized for 3-month culture with 4096-electrode arrays. *Frontiers in neuroscience*. 10:121.
- Authier S, Arezzo J, Delatte MS, Kallman M-J, Markgraf C, Paquette D, Pugsley MK, Ratcliffe S, Redfern WS, Stevens J. 2016. Safety pharmacology investigations on the nervous system: An industry survey. *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 81:37-46.
- Bader BM, Steder A, Klein AB, Frølund B, Schroeder OH, Jensen AA. 2017. Functional characterization of gabaa receptor-mediated modulation of cortical neuron network activity in microelectrode array recordings. *PloS one*. 12(10):e0186147.
- Bakkum DJ, Radivojevic M, Frey U, Franke F, Hierlemann A, Takahashi H. 2014. Parameters for burst detection. *Frontiers in computational neuroscience*. 7:193.
- Bardy C, van den Hurk M, Eames T, Marchand C, Hernandez RV, Kellogg M, Gorris M, Galet B, Palomares V, Brown J et al. 2015. Neuronal medium that supports basic synaptic functions and activity of human neurons in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 112(20):E2725-E2734.
- Bradley JA, Luithardt HH, Metea MR, Strock CJ. 2018. In vitro screening for seizure liability using microelectrode array technology. *Toxicological Sciences*. 163(1):240-253.
- Bradley JA, Strock CJ. 2019. Screening for neurotoxicity with microelectrode array. *Current Protocols in Toxicology*. 79(1):e67.
- Bragin A, Engel Jr J, Wilson CL, Vizenin E, Mathern GW. 1999. Electrophysiologic analysis of a chronic seizure model after unilateral hippocampal ka injection. *Epilepsia*. 40(9):1210-1221.
- Buskila Y, Bellot-Saez A, Kékesi O, Cameron M, Morley J. 2020. Extending the life span of acute neuronal tissue for imaging and electrophysiological studies. *Basic neurobiology techniques*. Springer. p. 235-259.
- Charlesworth P, Cotterill E, Morton A, Grant SG, Eglen SJ. 2015. Quantitative differences in developmental profiles of spontaneous activity in cortical and hippocampal cultures. *Neural development*. 10(1):1.
- Chen L, Deng Y, Luo W, Wang Z, Zeng S. 2009. Detection of bursts in neuronal spike trains by the mean inter-spike interval method. *Progress in Natural Science*. 19(2):229-235.
- Cocatre-Zilgien J, Delcomyn F. 1992. Identification of bursts in spike trains. *Journal of neuroscience methods*. 41(1):19-30.
- Cook D, Brown D, Alexander R, March R, Morgan P, Satterthwaite G, Pangalos MN. 2014.

- Lessons learned from the fate of astrazeneca's drug pipeline: A five-dimensional framework. *Nature reviews Drug discovery*. 13(6):419-431.
- Erken HA, Erken G, Şimşek H, Korkut O, Koç ER, Yavuz Ö, Genç O. 2014. Single dose varenicline may trigger epileptic activity. *Neurological Sciences*. 35(11):1807-1812.
- Fan J, Thalody G, Kwagh J, Burnett E, Shi H, Lewen G, Chen S-J, Levesque P. 2019. Assessing seizure liability using multi-electrode arrays (mea). *Toxicology in Vitro*. 55:93-100.
- Fujimoto Y, Funao T, Suehiro K, Takahashi R, Mori T, Nishikawa K. 2015. Brain serotonin content regulates the manifestation of tramadol-induced seizures in ratsdisparity between tramadol-induced seizure and serotonin syndrome. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists*. 122(1):178-189.
- Fukushima K, Miura Y, Sawada K, Yamazaki K, Ito M. 2016. Establishment of a human neuronal network assessment system by using a human neuron/astrocyte co-culture derived from fetal neural stem/progenitor cells. *Journal of biomolecular screening*. 21(1):54-64.
- Gao M, Igata H, Takeuchi A, Sato K, Ikegaya Y. 2017. Machine learning-based prediction of adverse drug effects: An example of seizure-inducing compounds. *Journal of pharmacological sciences*. 133(2):70-78.
- Gourévitch B, Eggermont JJ. 2007. A nonparametric approach for detection of bursts in spike trains. *Journal of neuroscience methods*. 160(2):349-358.
- Grainger AI, King MC, Nagel DA, Parri HR, Coleman MD, Hill EJ. 2018. In vitro models for seizure-liability testing using induced pluripotent stem cells. *Frontiers in Neuroscience*. 12(590).
- Gross GW. 1979. Simultaneous single unit recording in vitro with a photoetched laser deinsulated gold multimicroelectrode surface. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. (5):273-279.
- Hammond MW, Xydias D, Downes JH, Bucci G, Becerra V, Warwick K, Constanti A, Nasuto SJ, Whalley BJ. 2013. Endogenous cholinergic tone modulates spontaneous network level neuronal activity in primary cortical cultures grown on multi-electrode arrays. *BMC neuroscience*. 14(1):38.
- Hennig MH, Grady J, van Coppenhagen J, Sernagor E. 2011. Age-dependent homeostatic plasticity of gabaergic signaling in developing retinal networks. *Journal of Neuroscience*. 31(34):12159-12164.
- Ishii MN, Yamamoto K, Shoji M, Asami A, Kawamata Y. 2017. Human induced pluripotent stem cell (hipsc)-derived neurons respond to convulsant drugs when co-cultured with hipsc-derived astrocytes. *Toxicology*. 389:130-138.

- Jao PF, Franca EW, Fang S-P, Wheeler BC, Yoon Y-K. 2014. Immersion lithographic patterning of electrospun nanofibers for carbon nanofibrous microelectrode arrays. *Journal of Microelectromechanical Systems*. 24(3):703-715.
- Jimbo Y, Tateno T, Robinson H. 1999. Simultaneous induction of pathway-specific potentiation and depression in networks of cortical neurons. *Biophysical journal*. 76(2):670-678.
- Johnson SL, Eckrich T, Kuhn S, Zampini V, Franz C, Ranatunga KM, Roberts TP, Masetto S, Knipper M, Kros CJ. 2011. Position-dependent patterning of spontaneous action potentials in immature cochlear inner hair cells. *Nature neuroscience*. 14(6):711.
- Kaneoke Y, Vitek J. 1996. Burst and oscillation as disparate neuronal properties. *Journal of neuroscience methods*. 68(2):211-223.
- Kapucu FE, Tanskanen J, Mikkonen JE, Ylä-Outinen L, Narkilahti S, Hyttinen JA. 2012. Burst analysis tool for developing neuronal networks exhibiting highly varying action potential dynamics. *Frontiers in computational neuroscience*. 6:38.
- Ko D, Wilson C, Lobb C, Paladini C. 2012. Detection of bursts and pauses in spike trains. *Journal of neuroscience methods*. 211(1):145-158.
- Kreir M, Van Deuren B, Versweyveld S, De Bondt A, Van Den Wyngaert I, Van Der Linde H, Lu H, Teuns G, Gallacher D. 2018. Do in vitro assays in rat primary neurons predict drug-induced seizure liability in humans? *Toxicology and Applied Pharmacology*. 346:45-57.
- Krizhevsky A, Sutskever I, Hinton GE. 2012. Imagenet classification with deep convolutional neural networks. *Advances in neural information processing systems*. 25:1097-1105.
- Lagard C, Chevillard L, Malissin I, Risède P, Callebert J, Labat L, Launay J-M, Laplanche J-L, Mégarbane B. 2016. Mechanisms of tramadol-related neurotoxicity in the rat: Does diazepam/tramadol combination play a worsening role in overdose? *Toxicology and applied pharmacology*. 310:108-119.
- Legendy C, Salzman M. 1985. Bursts and recurrences of bursts in the spike trains of spontaneously active striate cortex neurons. *Journal of neurophysiology*. 53(4):926-939.
- Liu L, Zheng T, Morris MJ, Wallengren C, Clarke AL, Reid CA, Petrou S, O'Brien TJ. 2006. The mechanism of carbamazepine aggravation of absence seizures. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 319(2):790-798.
- Lubenov EV, Siapas AG. 2008. Decoupling through synchrony in neuronal circuits with propagation delays. *Neuron*. 58(1):118-131.
- Ma Z, Rudacille M, Prentice HM, Tao R. 2013. Characterization of electroencephalographic and biochemical responses at 5-HT promoting drug-induced onset of serotonin

- syndrome in rats. *Journal of neurochemistry*. 125(5):774-789.
- Matsuda N, Odawara A, Katoh H, Okuyama N, Yokoi R, Suzuki I. 2018. Detection of synchronized burst firing in cultured human induced pluripotent stem cell-derived neurons using a 4-step method. *Biochemical and biophysical research communications*. 497(2):612-618.
- Namiki S, Norimoto H, Kobayashi C, Nakatani K, Matsuki N, Ikegaya Y. 2013. Layer iii neurons control synchronized waves in the immature cerebral cortex. *Journal of Neuroscience*. 33(3):987-1001.
- Odawara A, Katoh H, Matsuda N, Suzuki I. 2016. Physiological maturation and drug responses of human induced pluripotent stem cell-derived cortical neuronal networks in long-term culture. *Scientific reports*. 6(1):1-14.
- Odawara A, Matsuda N, Ishibashi Y, Yokoi R, Suzuki I. 2018. Toxicological evaluation of convulsant and anticonvulsant drugs in human induced pluripotent stem cell-derived cortical neuronal networks using an mea system. *Scientific reports*. 8(1):1-11.
- Odawara A, Saitoh Y, Alhebshi A, Gotoh M, Suzuki I. 2014. Long-term electrophysiological activity and pharmacological response of a human induced pluripotent stem cell-derived neuron and astrocyte co-culture. *Biochemical and biophysical research communications*. 443(4):1176-1181.
- Ojima A, Miyamoto N. 2018. Method for mea data analysis of drug-treated rat primary neurons and human ipsc-derived neurons to evaluate the risk of drug-induced seizures. *Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*. 138(6):823-828.
- Paul SM, Mytelka DS, Dunwiddie CT, Persinger CC, Munos BH, Lindborg SR, Schacht AL. 2010. How to improve r&d productivity: The pharmaceutical industry's grand challenge. *Nature reviews Drug discovery*. 9(3):203-214.
- Pimashkin A, Kastalskiy I, Simonov A, Koryagina E, Mukhina I, Kazantsev V. 2011. Spiking signatures of spontaneous activity bursts in hippocampal cultures. *Frontiers in computational neuroscience*. 5:46.
- Pine J. 1980. Recording action potentials from cultured neurons with extracellular microcircuit electrodes. *Journal of neuroscience methods*. 2(1):19-31.
- Roberts R, Authier S, Mellon RD, Morton M, Suzuki I, Tjalkens RB, Valentin J-P, Pierson JB. 2021. Can we panelize seizure? *Toxicological Sciences*. 179(1):3-13.
- Santos Junior JG, Do Monte F, Russi M, Agustine P, LANZIOTTI VMNB. 2002. Proconvulsant effects of high doses of venlafaxine in pentylenetetrazole-convulsive rats. *Brazilian journal of medical and biological research*. 35(4):469-472.
- Shirakawa T, Suzuki I. 2020. Approach to neurotoxicity using human ipsc neurons:

- Consortium for safety assessment using human ips cells. *Current Pharmaceutical Biotechnology*.
- Shoeb A, Kharbouch A, Soegaard J, Schachter S, Guttag J. 2011. A machine-learning algorithm for detecting seizure termination in scalp eeg. *Epilepsy & Behavior*. 22:S36-S43.
- Spitzer NC. 2006. Electrical activity in early neuronal development. *Nature*. 444(7120):707-712.
- Sweatt JD. 2016. Neural plasticity and behavior—sixty years of conceptual advances. *Journal of neurochemistry*. 139:179-199.
- Takasuna K, Asakura K, Araki S, Ando H, Kazusa K, Kitaguchi T, Kunimatsu T, Suzuki S, Miyamoto N. 2017. Comprehensive in vitro cardiac safety assessment using human stem cell technology: Overview of csahi heart initiative. *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 83:42-54.
- Thomas Jr C, Springer P, Loeb G, Berwald-Netter Y, Okun L. 1972. A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells. *Experimental cell research*. 74(1):61-66.
- Tokdar S, Xi P, Kelly RC, Kass RE. 2010. Detection of bursts in extracellular spike trains using hidden semi-markov point process models. *Journal of computational neuroscience*. 29(1-2):203-212.
- Tukker AM, Wijnolts FM, de Groot A, Westerink RH. 2018. Human ipsc-derived neuronal models for in vitro neurotoxicity assessment. *Neurotoxicology*. 67:215-225.
- Tukker AM, Wijnolts FM, de Groot A, Westerink RH. 2020. Applicability of hipsc-derived neuronal cocultures and rodent primary cortical cultures for in vitro seizure liability assessment. *Toxicological Sciences*. 178(1):71-87.
- Valian N, Sorayya M, Asadi S, Sherafati F, Ershad A, Savaheli S, Ahmadiani A. 2021. Preconditioning by ultra-low dose of tramadol reduces the severity of tramadol-induced seizure: Contribution of glutamate receptors. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 133:111031.
- Wagenaar DA, Madhavan R, Pine J, Potter SM. 2005. Controlling bursting in cortical cultures with closed-loop multi-electrode stimulation. *Journal of Neuroscience*. 25(3):680-688.
- Yokoi R, Okabe M, Matsuda N, Odawara A, Karashima A, Suzuki I. 2019. Impact of sleep-wake-associated neuromodulators and repetitive low-frequency stimulation on human ipsc-derived neurons. *Frontiers in neuroscience*. 13:554.

謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり、多くのご支援とご指導、ご鞭撻をいただいた、東北工業大学 大学院工学研究科 電子工学専攻 鈴木郁郎 准教授には心より深く感謝申し上げます。時に応じて、厳しくご指導いただいたことや研究の世界の楽しさを教えていただいたこと、また励ましてくださったことを通して、私自身の至らなさを実感することができたことは今後の努力の糧になるものであります。

ヒト iPS 細胞由来ニューロンの培養および MEA データの取得、細胞培養法をご教授いただき、研究のディスカッションを通して多くを教えてくださいました株式会社エーザイ 小田原おあい（工学博士）先輩に感謝申し上げます。

第 2 章の 4-Step method の開発にあたりディスカッション頂き、解析プログラムの基礎を教えて頂いた加藤寛樹（2015 年度大学院修士課程修了）に感謝申し上げます。

第 4 章の実験データの取得、一般行動観察の結果をご提供頂き、*in vitro* の痙攣毒性予測に関するディスカッションもさせて頂き、実際の創薬現場での課題解決の為の貴重なディスカッションをさせて頂いた共同研究先であるアステラス製薬白川誉史様、木下健一様、岡村愛様に心から感謝申し上げます。

研究室で共に切磋琢磨し、解析や実験についてディスカッションした博士後期課程 1 年石橋勇人氏、横井れみ氏、博士前期課程 2 年野地修平氏に感謝申し上げます。

研究室の運営にご尽力頂いた研究員兼秘書の永福菜美様に感謝申し上げます。最後に、これまでの研究生活を心身ともに支えてくださった家族、友人に心より感謝致します。

業績リスト

学術論文

1. N. Matsuda, A. Odawara, K. Kinoshita, A. Okamura, T. Shirakawa, I. Suzuki, “Raster plots deep learning to predict the seizure liability of drugs and to identify drugs”, Revised
2. N. Matsuda, Y. Ishibashi, K. Kinoshita, T. Shirakawa, I. Suzuki, “Histograms of frequency–intensity distribution deep learning to predict the seizure liability of drugs in electrocorticography”, *Toxicological Sciences*, in press, DOI: 10.1093/toxsci/kfab061
3. Yokoi R, Okabe N, Matsuda N, Odawara A, Karashima A, Suzuki I*. “Impact of sleep-wake-associated neuromodulators and repetitive low-frequency stimulation on human iPSC-derived neurons”, *Frontiers in Neuroscience*, 2019, 13, 554, 1-15, DOI: 10.3389/fnins.2019.00554.
4. Odawara, A., Matsuda N., Ishibashi Y., Yokoi R., and Suzuki, I.* “Toxicological evaluation of convulsant and anticonvulsant drugs in human induced pluripotent stem cell-derived cortical neuronal networks using an MEA system” *Scientific Reports*, 8(1), 10416 (2018)
5. N. Matsuda, A. Odawara, I. Suzuki. “Detection of synchronized burst firing in cultured human induced pluripotent stem cell-derived neurons using a 4-step method” , *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018.02.117
6. Odawara, A., Katoh, H., Matsuda N., and Suzuki, I.* “Physiological maturation and drug responses of human induced pluripotent stem cell-derived cortical neuronal networks in long-term culture” *Scientific Reports*, 6, 26181 (2016)
7. Odawara, A., Katoh, H., Matsuda N., and Suzuki, I.* “Induction of long-term potentiation and depression phenomena in human induced pluripotent stem cell-derived cortical neurons.” *Biochem Biophys Res Commun.* (2016) 469(4):856-62.

特許

1. 鈴木郁郎、松田直毅、標的の特性の予測を行うための方法、コンピュータシステム、プログラム、特許第 6567153 号、PCT 出願済み
2. 鈴木郁郎、松田直毅、ヒストグラム画像を作成する方法、コンピュータシステム、プログラム、ならびに、ヒストグラム画像を用いて対象の状態を予測する方法、コンピュータシステム、特願 2020-136761 2020/8/13
3. 鈴木郁郎、松田直毅、中島駿、水野芳樹、細胞保持容器および計測システム、特願 2019-052714、 2019/3/20
4. 鈴木郁郎、松田直毅、中島駿、水野芳樹、計測システム、特願 2019-052715、 2019/3/20
5. 鈴木郁郎、松田直毅、中島駿、水野芳樹、細胞保持容器および計測システム、特願 2019-052716、 2019/3/20

学会発表

国際会議

1. Naoki Matsuda, Yuto Ishibashi, Remi Yokoi, Ikuro Suzuki, “AI analysis in MEA data of hiPSC-derived neurons is one of useful method for risk prediction of pesticides”, SAFETY PHARMACOLOGY SOCIETY VIRTUAL MEETING, e-Poster, September 14–17, 2020, Virtual.
2. Naoki Matsuda, Aoi Odawara, Yuto Ishibashi, Ikuro Suzuki, “In vitro drug efficacy evaluation in cultured human iPSC-derived neurons using MEA system” ISSCR International symposium 2019, Feb.20-22, Amsterdam, Netherlands
3. Naoki Matsuda, Aoi Odawara, Ikuro Suzuki, “Real-Time Measurement of Dopamine Release Using Carbon Nanotube MEA System”, Society of Toxicology 2019, Mar.10-14, Baltimore, USA
4. Naoki Matsuda, Aoi Odawara, Ai Okamura, Kenichi Kinoshita, Takafumi Shirakawa, Ikuro Suzuki. “Analysis of convulsant-induced firings in cultured human iPS cell-derived neurons using deep learning”, Neuroscience 2018, Nov.3-7, San Diego, USA
5. Naoki Matsuda, Aoi Odawara, Ai Okamura, Kenichi Kinoshita, Takafumi Shirakawa, Ikuro Suzuki. “Deep learning on MEA data obtained from human iPS cell-derived neurons for predicting seizure risk of new drugs”, SPS 2018 Annual meeting 2018, Sep.29-Oct.3, Washington, DC, USA
6. Naoki Matsuda, Aoi Odawara, Ikuro Suzuki. “Carbon Nanotube Microelectrode Array for Real-time Measurement of Dopamine Release in Human iPS Cell-derived neuron” MEA meeting 2018, Jul.4-6, Reutlingen, Germany
7. Naoki Matsuda, Aoi Odawara, H.Katoh, N.Okuyama, R.Yokoi, Ikuro Suzuki. “Detection of synchronized burst firing in cultured human induced pluripotent stem cell-derived neurons using a 4-step method” MEA meeting 2018, Jul.4-6, Reutlingen, Germany
8. Naoki Matsuda, Aoi Odawara, Yuto Ishibashi, Ikuro Suzuki. “Toxicological evaluation of convulsant and anticonvulsant drugs in human induced pluripotent stem cell derived cortical neuronal networks using an MEA system.”, ISSCR 2018, Jun.20-23, Melbourne, Australia

国内会議

1. 松田 直毅, 鈴木 郁郎, “in vitro 神経活動の Deep learning による痙攣毒性と作用機序予測”, 2020 年度ライフサポート学会細胞制御工学研究会, 口頭発表, 2020/9/24 オンライン開催.
2. 松田 直毅, 小田原 あおい, 木下 健一, 岡村 愛, 白川 誉史, 鈴木 郁郎, “AI による薬剤名予測 -ヒト iPS 神経の MEA データ解析-”, 第 27 回 HAB 研究機構学術年会, e-Poster, 2020/9/3~5, オンライン開催

3. 松田直毅, 鈴木郁郎, “AI 予測モデルを用いた *in vitro* ヒト iPS 細胞由来ニューロンの MEA 計測における毒性および作用機序予測,”第 71 回日本薬理学会北部会,口頭発表,2020/9/4 宮城
4. 松田直毅, 野地 修平, 石橋 勇人, 鈴木 郁郎, “MEA を用いたアストロサイトのオシレーション検出と薬剤応答評価”, 第 47 回日本毒性学会学術年, e-Poster ,2020/6/29~7/1 オンライン開催.
5. 松田直毅, 小田原あおい, 岡村愛, 木下健一, 白川誉史, 鈴木郁郎, Deep learning を用いた痙攣陽性化合物の作用機序予測—ヒト iPS 細胞由来ニューロンの MEA データ解析—, 第 11 回日本安全性薬理研究会学術年会, 2020/3/25-4/7, web, ポスター
6. 松田直毅, 小田原あおい, 鈴木郁郎, ヒト iPS 細胞由来ニューロンにおける痙攣毒性および作用機序予測を可能とする AI 解析, 細胞アッセイ研究会シンポジウム「細胞アッセイ技術の現状と将来」, 2020/1/20, 筑波
7. 松田直毅, 小田原あおい, 鈴木郁郎, 神経伝達物質放出と細胞外電位の同時計測を可能とするカーボンナノチューブ MEA システムの開発, 第 93 回日本薬理学会, 2020/3/16-18, 横浜 (紙上開催)
8. 松田直毅, 小田原あおい, 鈴木郁郎, ヒト iPS 細胞由来ニューロンにおける医薬品の痙攣リスクおよび MoA の AI 予測 第 32 回日本動物実験代替法学会, 2019/11/20-22, 筑波
9. 松田直毅, 小田原あおい, 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痙攣毒性および作用機序の AI 予測 第 10 回スクリーニング学研究会, 2019/11/20-22, 東京
10. 松田直毅, 小田原あおい, 鈴木郁郎, CNT 平面微小電極アレイを用いたヒト iPS 細胞由来ニューロンのドーパミン放出リアルタイム計測 日本バイオマテリアル学会東北ブロック講演会, 2019/10/2, 仙台
11. 松田直毅, 小田原あおい, 鈴木郁郎, ヒト iPS 細胞由来神経ネットワークを用いた痙攣毒性の AI 予測-HESI NeuTox Pilot study- 第 18 回日本再生医療学会総会, 2019/3/21-23, 神戸
12. 松田直毅, 小田原あおい, 鈴木郁郎, *In vitro* ヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いた AI による痙攣毒性予測 第 92 回日本薬理学会, 2019/3/14-16, 大阪
13. 松田直毅, 小田原あおい, 鈴木郁郎, AI を用いたヒト iPS 細胞由来ニューロンにおける HESI 化合物の痙攣毒性予測 第 10 回安全性薬理研究会学術年会, 2019/3/1-2, 東京
14. 松田直毅, 小田原あおい, 鈴木郁郎, “AI を用いたヒト iPS 細胞由来ニューロンにおける痙攣毒性予測法の検討”, 第 45 回日本毒性学会学術年会, 2018/7/18-20, 大阪
15. 松田直毅, 小田原あおい, 鈴木郁郎, “ヒト iPS 細胞由来ニューロンの薬効評価における人工知能 (AI) 解析法の検討”, 第 17 回日本再生医療学会総会, 2018.3
16. 松田直毅, 小田原あおい, 岡村 愛, 木下健一, 白川誉史, 鈴木郁郎, “薬剤性痙攣毒性および作用機序予測を目指したヒト iPS 細胞由来ニューロンにおける電気の AI 解析”, 日本安全性

薬理第 9 回学術年会, 2018.2

17. 松田直毅, 小田原あおい, 鈴木郁郎, "ドーパミン放出のリアルタイム計測を可能とするカーボンナノチューブ MEA の開発", 日本安全性薬理第 9 回学術年会, 2018.2
18. 松田直毅, 小田原あおい, 鈴木郁郎, "CNT-MEA を用いたヒト iPS 細胞由来ドーパミンニューロンのドーパミンセンシング法の開発", 平成 29 年 電気学会 電子・情報・システム部門大会, 2017.9
19. 松田直毅, 小田原あおい, 鈴木郁郎, "CNT 微小電極アレイを用いたヒト iPS 細胞由来ニューロンからのドーパミンリアルタイム計測法の開発", 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 35 回研究会, 2017.5
20. 松田直毅, 小田原あおい, 鈴木郁郎, "CNT 平面微小電極アレイを用いたヒト iPS 細胞由来ドーパミンニューロンのドーパミンセンシング", 第 56 回日本生体医工学会大会, 2017.5
21. 松田直毅, 小田原あおい, 鈴木郁郎, ヒト iPSC 由来ドーパミンニューロンから放出されるドーパミンのリアルタイムエレクトロセンシング技術の開発 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/7-9
22. 松田直毅, 小田原あおい, 鈴木郁郎, ヒト iPS 細胞由来ニューロン機能のエレクトロセンシング技術の開発, 第 26 回ライフサポート学会フロンティア講演会 2017.3
23. 松田直毅, 大川徳幸, 小田原あおい, 鈴木郁郎 “ヒト iPS 細胞由来ニューロンから放出される神経伝達物質の高感度リアルタイム計測法の開発”第 32 回ライフサポート学会大会, 2016/9/4-6, 宮城
24. 松田直毅, 大川徳幸, 小田原あおい, 鈴木郁郎 “CNT 平面微小電極アレイを用いたヒト由来ニューロンの高感度活動電位計測法の開発”平成 28 年度電気関係学会東北支部連合大会, 2016/8/30-31, 宮城
25. 松田直毅, 小田原あおい, 鈴木郁郎, 低インピーダンス平面微小電極アレイによるヒト iPS 細胞由来神経ネットワークの長期活動モニタリング 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 32 回研究会 2016.4.25-26
26. 松田直毅, 原田将, 小田原あおい, 鈴木郁郎. ヒト iPSC 由来ニューロンの高感度活動電位/神経伝達物質計測を可能とする CNT 平面微小電極アレイの開発 第 25 回ライフサポート学会フロンティア講演会,2016/3/8-9,東京
27. 松田直毅, 原田将, 小田原あおい, 鈴木郁郎. In vitro ヒト iPSC 由来ニューロンの活動電位及び神経伝達物質高感度計測を実現する平面微小電極アレイの開発 医用・生体工学研究会, 2016/3/22,東京
28. 松田直毅, 原田将, 小田原あおい, 鈴木郁郎. ヒト iPS 細胞由来ニューロンから放出されるドーパミンセンシング技術の開発 第 37 回日本バイオマテリアル学会大会,2015/11/9-10, 京都