

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 主成分分析を用いた医薬品の痙攣毒性検出法の開発.....	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 スパイク検出およびネットワークバースト解析	11
2-2-5 周期性解析.....	11
2-2-6 主成分分析.....	12
2-3 結果.....	13
2-3-1 ヒト iPS 細胞由来神経ネットワークにおける自発活動計測および薬理応答	13
2-3-2 周期性解析法の構築.....	13
2-3-3 作用機序の異なる化合物における解析パラメータの変化	13
2-3-4 痙攣毒性の検出に有効なパラメータセットの導出.....	13
2-3-5 痙攣毒性の検出に有効なパラメータセットを用いた主成分分析.....	14
2-4 考察.....	15
2-5 結論.....	18
第3章 医薬品の痙攣リスク評価法の開発と IVIVE の検証	29
3-1 序論.....	29
3-2 方法.....	30
3-2-1 ヒト iPS 細胞由来皮質ニューロンの培養	30
3-2-2 細胞外記録.....	30

3-2-3 薬理試験	30
3-2-4 スパイク検出およびネットワークバースト解析	31
3-2-5 主成分分析.....	31
3-2-6 痙攣リスク評価.....	31
3-3 結果.....	32
3-3-1 ヒト iPS 細胞由来神経ネットワークにおける自発活動計測および薬理応答	32
3-3-2 作用機序の異なる化合物における解析パラメータの変化	32
3-3-3 DMSO の影響を除去する主成分分析における化合物評価.....	32
3-3-4 化合物の痙攣リスク評価	32
3-3-5 IVIVE の検証	33
3-4 考察.....	34
3-5 結論.....	37
第 4 章 農薬関連化合物の毒性リスク評価.....	50
4-1 序論.....	50
4-2 方法.....	51
4-2-2 細胞外記録.....	51
4-2-3 薬理試験	51
4-2-4 スパイク検出およびネットワークバースト解析	51
4-2-5 主成分分析.....	52
4-2-6 毒性リスク評価.....	52
4-3 結果.....	53
4-3-1 農薬関連化合物の暴露による解析パラメータの変化	53
4-3-2 農薬関連化合物の毒性リスク評価	53
4-3-3 農薬関連化合物の作用機序推定	54
4-4 考察.....	55
4-5 結論.....	57

第 5 章 抗菌薬関連脳症のタイプ分類.....	64
5-1 序論.....	64
5-2 方法.....	65
5-2-1 ヒト iPS 細胞由来皮質ニューロンの培養	65
5-2-2 細胞外記録.....	65
5-2-3 薬理試験	65
5-2-4 スパイク検出およびネットワークバースト解析	66
5-3 結果.....	67
5-3-1 ヒト iPS 細胞由来神経ネットワークにおける自発活動計測および薬理応答	67
5-3-2 作用機序の異なる化合物における解析パラメータの変化	67
5-3-3 ヒト iPS 細胞由来ニューロンにおける抗菌薬のタイプ分類	68
5-4 考察.....	69
5-5 結論.....	71
結言	76
参考文献	79
謝辞	89
業績リスト.....	90

第 1 章 緒言

1-1 研究の背景と目的

医薬品開発では安全性の高い医薬品候補化合物を効率よく選別することが重要である。安全性評価では動物実験により生体内での毒性や副作用が評価されている。中でも中枢神経毒性は、新薬開発の遅れや中止の主要な原因のひとつである。Watkins らにより、神経系の有害事象はフェーズ I からフェーズ III での新薬開発の中止の主な原因であり、79 の薬剤候補の約 22% の開発中止は神経毒性によるものと報告されている (Watkins et al., 2011)。また、アストラゼネカの Cook らによる報告では、非臨床において毒性が判明する臓器の割合は中枢神経系が 7% と低かったが、臨床試験において毒性が判明する臓器の割合は中枢神経系が 34% で最も高くなっており、その主な要因の 1 つは痙攣毒性である (Cook et al., 2014)。これらは動物実験と臨床試験における、動物とヒトとの種差が原因のひとつであると考えられる。痙攣発作の評価のために実施された海馬スライスの実験では、ラット、ミニブタ、イヌ、霊長類で痙攣薬に対する感度に種差があることが報告されている (Accardi et al., 2018)。種差の観点から動物実験に代替するヒト由来神経ネットワークを用いた *in vitro* 神経機能を指標とした化合物評価法の構築が求められている。

神経細胞の機能評価にはパッチクランプ法 (Bosca et al., 2014; Franz et al., 2017) やカルシウムイメージング (Balez et al., 2016; Pacico et al., 2014)、MEA を用いた細胞外記録法が用いられている。In vitro 神経機能を計測可能な評価系の中でも MEA は神経ネットワークの電気生理学的活動を非侵襲、長時間分解能、多点同時計測でき、化合物投与による神経ネットワークの活動変化を精度高く、ハイスループットに評価可能である為、動物実験に代替する *in vitro* 神経機能を指標とした化合物評価法として期待されている (Amin et al., 2016; Black et al., 2017; Bradley et al., 2018; Bradley et al., 2019; Fan et al., 2019; Frega et al., 2017; Grainger et al., 2018; Hyvärinen et al., 2019; Ishibashi et al., 2021; Ishii et al., 2017; Kayama et al., 2018; Kreir et al., 2018; Matsuda et al., 2018; Obien et al., 2015; Odawara et al., 2016a, b; Odawara et al., 2018; Odawara et al., 2014; Ojima et al., 2018; Plumbly et al., 2019; Seidel et al., 2017; Shirakawa et al., 2020; Toivanen et al., 2017; Tukker et al., 2020a; Tukker et al., 2018, 2020b; Yokoi et al., 2019)。ローデントの神経細胞を用いて MEA 計測を行った研究では、MEA が痙攣発作を起こす化合物を特定するために有用な評価系である可能性が報告されている (Bradley et al., 2018; Bradley et al., 2019; Fan et al., 2019; Kreir et al., 2018)。ヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いた MEA 計測においても自発活動や、痙攣薬への応答などの神経ネットワークの評価が報告されている (Amin et al., 2016; Black et al., 2017; Frega et al., 2017; Grainger et al., 2018; Hyvärinen et al., 2019; Ishii et al., 2017; Kayama et al., 2018; Obien et al., 2015; Ojima et al., 2018;

Plumbly, et al., 2019; Seidel, et al., 2017; Toivanen, et al., 2017; Tukker, et al., 2020a; Tukker, et al., 2018, 2020b)。我々はMEAを用いたヒトiPS細胞由来ニューロンの電気活動記録を世界で初めて報告しており(Odawara, et al., 2014)、これまで痙攣薬を用いたヒトiPS細胞由来神経ネットワークの薬理応答や、MEAで計測された電気活動の解析手法を構築し、化合物評価法なども報告してきた(Ishibashi, et al., 2021; Matsuda, et al., 2018; Odawara, et al., 2016a, b; Odawara, et al., 2018; Shirakawa, et al., 2020; Yokoi, et al., 2019)。さらに、MEAを用いた研究は近年さかんに行われており、脳オルガノイドの活動計測の報告や(Durens et al., 2020; Fair et al., 2020; Ghatak et al., 2021; Pelkonen et al., 2021; Tasnim et al., 2022; Yao et al., 2020; Yokoi et al., 2021)、高密度電極であるCMOS-MEAによる高解像度計測法が登場し、MEAへの期待度は非常に高い(Duru et al., 2022; Obien et al., 2019; Ogi et al., 2019; Ronchi et al., 2019; Sharf et al., 2022; Yuan et al., 2020)。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。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。

MEAシステムで計測された神経活動は主に神経ネットワークの同期的な活動である同期バースト発火が評価指標とされ、同期バースト発火の頻度や期間の長さなど、様々な解析パラメータが構築されてきた(Kosnik et al., 2020; Plumbly et al., 2019; Robinette et al., 2011; Tukker et al., 2020a; Valdivia et al., 2014)。しかし、中枢神経毒性を有することが既知であるが、既存の解析パラメータではその毒性を検出できない化合物(代表例:Pilocarpine)が存在する問題がある。どの解析パラメータを評価に用いるかは研究者によって異なっており、毒性評価・作用機序予測に有効とされる統一的な解析パラメータは未だ確立されていないことから、現状では単一の解析パラメータを使用するだけでは作用機序の異なる化合物の毒性を検出することが困難である。そこで、主成分分析やクラスター分析などの多変量解析を神経ネットワークの電気活動データに適用することが着目されている(Gong et al., 2016; Hyvärinen et al., 2019; Mack et

al., 2014; Mendis et al., 2019; Passaro et al., 2021; Tukker et al., 2020b)。Tukker ら、Tim ら、は神経ネットワークの電気活動データを多変量解析することで、化合物を分離できる可能性を報告している(Mack, et al., 2014; Tukker, et al., 2020b)。これまで報告されている神経活動の多変量解析では、用意した解析パラメータをすべて使用する場合、または、寄与の大きい解析パラメータを選択して使用する場合のただ 1 通りの解析パラメータセットのみで検討されている。化合物の毒性を検出するのに最適な解析パラメータの組み合わせが不明であること、寄与の大きい解析パラメータが毒性検出に最適であるかが不明であることが新たな課題となっている。本研究では、ヒト iPS 細胞由来神経ネットワークの MEA 計測における痙攣毒性の検出を可能とする解析手法の構築を目的に、まず、中枢神経毒性を有することが既知である化合物だが、既存の解析パラメータではその毒性を検出できない化合物が存在する問題を解決するために、神経ネットワーク活動の周期性に着目した新規解析パラメータの構築を試みた。また、化合物の毒性を検出するのに最適な解析パラメータの組み合わせが不明である問題を解決するために、任意の条件を達成する最適な解析パラメータの組み合わせを選定して実施する多変量解析法の構築を試みた。検証用に用意した既知の痙攣陽性化合物と陰性化合物について、構築した多変量解析法を用いることで、痙攣陽性化合物の毒性検出を試みた。

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。MEA と神経細胞を用いた化合物評価では、生体における毒性濃度を特定できないことが重要な課題である。MEA によって検出された神経細胞の活動変化が生体における毒性発現を反映しているかは不明である。より生体での毒性発現濃度を反映させるためには、MEA 計測における神経ネットワークへの暴露濃度と *in vivo* における脳室内濃度の相関を明らかにし、IVIVE の観点を検証する必要がある。また、これまで MEA と神経細胞を用いた様々な化合物評価が研究されてきたが、MEA 計測における化合物の評価方法は個別の解析パラメータに頼っている。どの解析パラメータに変化が認められたら毒性なのか、どの程度の数値から毒性なのか具体的に定められていないことが課題である。また、神経細胞の MEA 計測では細胞の種類により溶媒の影響を受ける場合があり(McConnell et al. 2012; Strickland et al. 2018)、化合物を正確に評価するには溶媒の影響を取り除くような解析手法が必要である。本研究では、医薬品開発における安全性評価で動物実験の代替法になり得るような *in vitro* 神経機能の評価系構築を目的とした。MEA 計測によって得られた神経活動データから溶媒の影響を除外可能なパラメータセットを導出し、主成分分析において、溶媒の標準偏差を指標とした痙攣リスクの基準を設定することで、MEA 計測における化合物の評価基準および溶媒の影響に対する課題解決を試みた。また、ヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いた MEA 計測による化合物の痙攣リスク評価と、動物実験によるラットで振戦および痙攣発作が観察されたときの CSF 内濃度の調査を実施し、MEA 計測で痙攣リスクが

検出された濃度と CSF 内濃度を比較することで IVIVE の観点を検証した。

本研究で開発した化合物評価法は、主に医薬品の痙攣リスクをターゲットとして開発を進めてきた。最後に、本研究で開発した化合物評価法の医薬品以外への応用性と痙攣リスク以外の有害事象への応用性を検証する取り組みを実施した。

具体的には、まず医薬品以外のターゲットとして、OECD と共有している評価対象物質から農薬関連化合物を選定し、毒性リスク評価を実施した。毒性リスク評価を行う解析法の検証として痙攣陽性化合物 5 種類を用いて毒性リスク推定の妥当性を検証し、新たに被験物質として農薬関連化合物のデータを取得し、毒性リスク推定を実施することで医薬品以外の化合物の評価法としての有効性を検証した。OECD へのアプローチは本研究で開発した化合物評価法の国際標準化に向けた取り組みとしても重要である。

次に痙攣リスク以外の有害事象として、抗菌薬関連脳症 (Antibiotic Associated Encephalopathy: AAE) をターゲットとした。AAE は抗菌薬投与によって引き起こされる中枢神経障害である。ICU においてせん妄や脳症が見られる症例は 80% に及ぶことが知られており (Inouye et al., 2014)、薬剤が原因と考えられる割合は 12~39% 程度である (Alagiakrishnan & Wiens, 2004)。AAE は、敗血症性脳症などの原疾患との鑑別、他の原因による脳症との鑑別が困難な場合が多いだけでなく、重篤な経過を辿る場合があるため、その特徴を同定し、原因の解明と予防につなげることが重要である。また、抗菌薬の開発においても、開発品の AAE リスクや引き起こされる AAE の症状を把握することは重要な課題である。各抗生物質の臨床的特徴や脳波変化、画像所見をまとめたシステマティックレビューの結果から、AAE は 3 つのタイプに分類されている (Bhattacharyya et al., 2016)。タイプ 1 は、ミオクローヌス発作、てんかん波が生じ、頭部 MRI は正常であるが、脳波異常が認められることが知られている。該当する抗生物質はペニシリン、セファロスポリン系抗菌薬である。タイプ 2 にはキノロン系、マクロライド系、S/T 合剤であり、投与開始後数日以内に幻覚や妄想等の精神症状を発症することが特徴である。タイプ 3 は 5-ニトロイミダゾール誘導体であるメトロニダゾールであり、小脳失調が主体である。本研究では、ヒト iPS 細胞由来神経ネットワークの MEA 計測により取得した電気活動から、既知の抗菌薬について臨床に基づく抗菌薬の AAE タイプを評価可能とすることで、抗菌薬開発における AAE 評価の課題解決を目的とする検証を実施した。抗菌薬投与時の電気生理学的特徴を抽出し、神経ネットワークの同期的活動を指標とした主成分分析を行うことによって、各抗菌薬を臨床で報告されている AAE に基づいた 3 つのタイプに分類することを試みた。

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、中枢神経毒性を有することが既知である化合物だが、既存の解析パラメータではその毒性を検出できない化合物が存在する問題を解決するための、神経ネットワーク活動の周期性に着目した新規解析パラメータの構築について記載し、化合物の毒性を検出するための、任意の条件を達成する最適な解析パラメータの組み合わせを選定して実施する多変量解析法の構築および結果について論じた。

第 3 章では、ヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いた MEA 計測による化合物の痙攣リスク評価と、動物実験によるラットで振戦および痙攣発作が観察されたときの CSF 内濃度の調査を実施し、MEA 計測で痙攣リスクが検出された濃度と CSF 内濃度を比較することで IVIVE の観点を論じた。

第 4 章では、開発した化合物評価法の医薬品以外への応用性を農薬関連化合物をターゲットとして検証した結果、および今後の展望について論じた。

第 5 章では、開発した化合物評価法の痙攣以外の有害事象への応用性を抗菌薬関連脳症をターゲットとして検証した結果、および今後の展望について論じた。

第 6 章では、各章のまとめと、総括として、開発した化合物評価法の有用性、応用性を含めた本研究のまとめについて記載した。

第 2 章 主成分分析を用いた医薬品の痙攣毒性検出法の開発

2-1 序論

MEA システムで計測された神経活動は主に神経ネットワークの同期的な活動である同期バースト発火が評価指標とされ、同期バースト発火の頻度や期間の長さなど、様々な解析パラメータが構築されてきた。しかし、中枢神経毒性を有することが既知であるが、既存の解析パラメータではその毒性を検出できない化合物（代表例：Pilocarpine）が存在する問題がある。どの解析パラメータを評価に用いるかは研究者によって異なっており、毒性評価・作用機序予測に有効とされる統一的な解析パラメータは未だ確立されていないことから、現状では単一の解析パラメータを使用するだけでは作用機序の異なる化合物の毒性を検出することが困難である。そこで、主成分分析やクラスター分析などの多変量解析を神経ネットワークの電気活動データに適用することが着目されている。Tukker ら、Tim ら、は神経ネットワークの電気活動データを多変量解析することで、化合物を分離できる可能性を報告している。これまで報告されている神経活動の多変量解析では、用意した解析パラメータをすべて使用する場合、または、寄与の大きい解析パラメータを選択して使用する場合のただ 1 通りの解析パラメータセットのみで検討されている。化合物の毒性を検出するのに最適な解析パラメータの組み合わせが不明であること、寄与の大きい解析パラメータが毒性検出に最適であるかが不明であることが新たな課題となっている。

本研究では、ヒト iPS 細胞由来神経ネットワークの MEA 計測における痙攣毒性の検出を可能とする解析手法の構築を目的に、まず、中枢神経毒性を有することが既知である化合物だが、既存の解析パラメータではその毒性を検出できない化合物が存在する問題を解決するために、神経ネットワーク活動の周期性に着目した新規解析パラメータの構築を試みた。また、化合物の毒性を検出するのに最適な解析パラメータの組み合わせが不明である問題を解決するために、任意の条件を達成する最適な解析パラメータの組み合わせを選定して実施する多変量解析法の構築を試みた。検証用に用意した既知の痙攣陽性化合物と陰性化合物について、構築した多変量解析法を用いることで、痙攣陽性化合物の毒性検出を試みた。

2-2 方法

2-2-1 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 プレート (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 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。

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)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

培養 8 週のヒト iPS 細胞由来ニューロンにカイニン酸型グルタミン酸受容体のアゴニストである Kainic acid (0.1, 1, 10 μ M)、NMDA 型グルタミン酸受容体のアゴニストである NMDA acid (0.1, 1, 10 μ M)、選択的セロトニン再取り込み阻害作用を有する Paroxetine (0.3, 3, 30 μ M)、GABA_A受容体のアンタゴニストである PTZ (10, 100, 1000 μ M)、同じく GABA_A受容体のアンタゴニストである Picrotoxin (0.1, 1, 10 μ M)、ムスカリン受容体のアゴニストである Pilocarpine (0.3, 3, 30 μ M)、ホスホジエステラーゼのアンタゴニストである Theophylline (0.3, 3, 30 μ M)、ニコチン受容体のアゴニストである Varenicline (0.3, 3, 30 μ M)、セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害作用を有する Venlafaxine (0.3, 3, 30 μ M)、オピオイド受容体のアゴニストであり、セロトニン・ノルアドレナリンの再取り込み阻害作用も有する Tramadol (0.3, 3, 30 μ M)、医薬品開発中に動物で痙攣発作を引き起こしドロップアウトした化合物 X (1, 10, 100 μ M)、痙攣陰性化合物として Acetaminophen (1, 10, 100 μ M)、Ethylenediamine (10, 100, 1000 μ M)、Felbinac (1, 10, 100 μ M)、溶媒である DMSO をそれぞれ累積

投与し、投与前後 10 分間の自発活動を記録した。

2-2-4 スパイク検出およびネットワークバースト解析

計測データから Mobius software を用いてスパイク検出行った。各電極の活動休止期のベースラインノイズの標準偏差 $\pm 530\%$ の閾値を上回るものをスパイクとして検出した。検出したスパイクデータから、4-step method を用いて network burst (NB) の検出を行った。本研究では、10 分間のスパイク数の総和 (Total spikes)、10 分間の NB の数 (No. of NBs)、NB の終了時間から次の NB の開始までの時間 (Inter Burst Interval : IBI)、NB の期間 (Duration of NB)、NB 期間に検出されたスパイク数 (Spikes in a NB)、NB 内の発火頻度のピーク値 (Max Frequency : MF)、MF が検出された時間から次の MF が検出されるまでの時間 (Inter MF Interval : IMFI)、MF の変動係数 (CV of MF)、IMFI の変動係数 (CV of IMFI) の 9 つの解析パラメータに、本研究で新規に構築した NB の周期性を指標とした Periodicity を加えた 10 個の解析パラメータで化合物投与時の神経ネットワークの応答を評価した。MF は、10 分の計測時間で検出された各 NB から bin size = 100 msec ごとのスパイク数を算出し、その中の最大発火数を平均した値である。単位時間当たりの spike 数であるため、frequency とした。例えば、10 分間に 10 個の NB が検出されたとき、10 個の NB それぞれについて、最大発火数を算出する。この 10 個の値を平均したものを MF とした。薬理試験データの正規化は、各 well の vehicle 投与時のデータを 100% として行った。解析パラメータの内、Total Spikes、No. of NBs、Inter Burst Interval、Duration of NB、Spikes in a NB は 4-step method ソフトウェアで算出され、MF、CV of MF、IMFI、CV of IMFI、Periodicity は MATLAB で算出された。

2-2-5 周期性解析

臨床で痙攣毒性を有することが既知である化合物であっても、既存の解析パラメータではその応答を検出することが困難なことがある。Fig. 2Aa は痙攣化合物投与時の神経ネットワークにおける発火時系列データを示すラスタプロットと発火数のヒストグラム (spikes/100msec) である。発火数のヒストグラムをみると、山のような形になっている部分がある。このときのラスタプロットをみると、複数の電極で同期的に発火していることが分かる。これは、NB というシナプス伝達を介して神経ネットワーク全体が同期的に活動する現象で、神経ネットワークの成熟や痙攣誘発応答などの薬効評価の重要な指標である。この痙攣陽性化合物の用量依存的な応答を既存の解析パラメータである No. of NBs で評価すると Fig. 2C に示すように全く変化を示さず、痙攣毒性の検出が不可能である。そこで、既存の解析パラメータでは毒性の検出が困難であった化合物においても、用量依存的な応答を検出するために、NB の周期性に着目した新規解

析パラメータを構築した。bin size = 100 msec ごとのスパイク数を算出し、その時系列データを Fast Fourier Transform(FFT)することで各周波数のパワースペクトルを算出した(Fig. 2Ab)。算出されたパワースペクトルのピーク値の 10%を閾値として、閾値を上回った周波数帯域幅に対する全周波数帯域幅の割合を算出することで Periodicity とした(Fig. 2B)。

$$Periodicity = \frac{All\ frequency\ band}{Dominant\ frequency\ band}$$

2-2-6 主成分分析

痙攣陽性化合物である Kainic acid、NMDA acid、Paroxetine、PTZ、Picrotoxin、Pilocarpine、Theophylline、Varenicline、Venlafaxine、溶媒である DMSO、検証用化合物として Tramadol、Acetaminophen、Ethylenediamine、Felbinac、化合物 X について、バースト解析および周期性解析によって得られる 10 個の解析パラメータを行ベクトルの要素にもつすべての well のデータを並べた行列を用意した。968 個のパラメータセットにより指定された解析パラメータの列を取り出して構成される 968 個の新たな行列について、それぞれ MATLAB の関数 `pca` を用いて主成分分析した。主成分分析により得られる、第一主成分スコアおよび第二主成分スコアに化合物間で差があるかをパラメータセットごとに MANOVA で検証し、溶媒である DMSO が各痙攣陽性化合物とそれぞれ有意差が認められたパラメータセットを痙攣毒性の検出に有効なパラメータセットとした。導出したパラメータセットによる痙攣毒性検出の検証のために、Tramadol、Acetaminophen、Ethylenediamine、Felbinac、化合物 X について、導出したパラメータセットを用いた主成分分析を実施し、MANOVA で検証した。

2-3 結果

2-3-1 ヒト iPS 細胞由来神経ネットワークにおける自発活動計測および薬理応答

ヒト iPS 細胞由来神経ネットワークにおける既知の痙攣薬剤への応答を調べるために、MEA 上にヒト iPS 細胞由来ニューロンを培養し (Fig. 1A,B)、自発活動を計測した結果、SN 比高く活動を検出することができた (Fig. 1C)。Fig. 1D は NMDA 投与時の自発活動計測のラスタプロットとヒストグラムである。ほぼすべてのチャンネルでスパイクが検出されると共に、同期バースト発火の様子が用量依存的に変化していることが観察された (Fig. 1D)。Fig. 1E にバースト解析における 9 個の解析パラメータを示す。ネットワークバースト解析における 9 個の解析パラメータの説明を Table 1 に示す。

2-3-2 周期性解析法の構築

既知の痙攣陽性化合物である Pilocarpine は No. of NBs では濃度依存的な変化を検出することができない。しかし、ラスタプロットとヒストグラムを観察すると、ネットワークバーストの周期性が濃度依存的に上昇していることが分かった (Fig. 2A-a,b)。そこで、ネットワークバーストの周期性を定量解析する手法を構築した (Fig. 2B)。構築した解析方法を用いて Pilocarpine 投与時のネットワークバーストの周期性を Periodicity として定量化した結果、濃度依存的な周期性の変化が検出され、最大で 10 μ M 投与時に 950%まで上昇した (Fig. 2C)。

2-3-3 作用機序の異なる化合物における解析パラメータの変化

痙攣毒性の検出に有効な解析パラメータを同定するために、10 個の解析パラメータを用いて DMSO 投与時を 100%として薬剤投与時と比較したヒートマップを作成した (one way ANOVA, and Dunnett test, Fig. 3)。痙攣陽性化合物はいずれかの解析パラメータで顕著な変化が認められたが、そのパラメータに統一性は見られなかった。検証のために用意した陰性化合物である Acetaminophen においては全てのパラメータで顕著な変化は認められなかった。

2-3-4 痙攣毒性の検出に有効なパラメータセットの導出

複数の解析パラメータを考慮するために、10 個の解析パラメータから 3 個以上を組み合わせてできる 968 組のパラメータセットをそれぞれ主成分分析した。得られた第一主成分スコアおよび第二主成分スコアに痙攣陽性化合物と DMSO の間で差異があるかを MANOVA 検定で検証を行い、すべての痙攣陽性化合物と DMSO に有意差が認められたパラメータセットを痙攣毒性の検出に有効なパラメータセットとして導出した結

果、22 組のパラメータセットが導出された (Table 2)。22 個のパラメータセットについて、解析パラメータの採用率は TS および CV of IMFI が 100.0%で最も高く、次に Periodicity が 86.4%で高く、MF および IMFI も 50%以上のパラメータセットで採用されていた (Fig. 4)。

2-3-5 痙攣毒性の検出に有効なパラメータセットを用いた主成分分析

痙攣毒性の検出に有効なパラメータセットで採用率の高かった、TS、MF、IMFI、CV of IMFI、Periodicity で構成されるパラメータセットを用いた主成分分析の結果を Fig. 5 に示す。DMSO と各痙攣陽性化合物の低濃度、中濃度、高濃度それぞれの第一主成分スコア、第二主成分スコアを比較した結果、Kainic acid の低濃度を除く、すべての痙攣陽性化合物の各濃度において DMSO と有意差が認められた (one way MANOVA, Table 3)。検証用の痙攣陽性化合物である Tramadol、化合物 X の各濃度においても DMSO と有意差が認められた。一方、検証用の陰性化合物である Acetaminophen、Ethylenediamine、Felbinac は全ての濃度で DMSO と有意差は認められなかった。次に各化合物における第一主成分、第二主成分の累積寄与率を調べた。Kainic acid は 88.0%、NMDA acid は 89.2%、Paroxetine は 77.3%、PTZ は 81.1%、Picrotoxin は 70.8%、Pilocarpine は 82.5%、Theophylline は 84.5%、Varenicline は 83.4%、Venlafaxine は 87.2%、Acetaminophen は 80.6%、Ethylenediamine は 83.8%、Felbinac は 76.0%、Tramadol は 84.6%、化合物 X は 80.5% (Fig. 5) で 14 化合物の平均は約 82.1%であった。

2-4 考察

本研究では、まず MEA システムで計測された神経ネットワークの電気活動における新規解析パラメータとして NB の周期性を指標とした Periodicity を構築した。臨床で痙攣毒性を有することが既知である化合物の Pilocarpine(Marchi et al., 2007)は、既存の解析パラメータではその応答を検出することが困難であったが(Bradley, et al., 2018)、新規解析パラメータとして Periodicity を構築することによって用量依存的な応答を評価することが可能となった。これは、既存の解析パラメータは 1 回の NB に着目した解析パラメータがほとんどであるのに対して(Kosnik, et al., 2020; Plumbly, et al., 2019; Robinette, et al., 2011; Tukker, et al., 2020a; Valdivia, et al., 2014)、Periodicity は 10 分間の経時的な応答を指標とすることで、これまで着目されていなかった神経ネットワークにおける長期的な周期性に着目したことで可能となったと考えられる。

10 パラメータによる解析結果から、痙攣陽性化合物について 1 つの解析パラメータに着目した場合、作用機序の違いにより数値が上昇する痙攣陽性化合物もあれば、数値が減少する痙攣陽性化合物もあり、1 つの解析パラメータに着目しただけでは痙攣毒性の統一的な評価は不可能であることが示された。これは、国内外で行われている MEA システムを用いた中枢神経系の評価系構築へ向けた活動において、未だに毒性予測や作用機序予測を可能とする解析手法が確立されていない要因の 1 つであると考えられる。単一の解析パラメータを使用するだけでは統一的な評価が困難であることから、主成分分析やクラスター分析などの多変量解析を神経ネットワークの電気活動データに適用したこれまでの報告では、用意した解析パラメータをすべて使用する場合、または、寄与の大きい解析パラメータを選択して使用する場合のただ 1 通りの解析パラメータセットのみで検討されている(Gong, et al., 2016; Hyvärinen, et al., 2019; Mack, et al., 2014; Mendis, et al., 2019; Passaro, et al., 2021; Tukker, et al., 2020b)。化合物の毒性を検出するのに最適な解析パラメータの組み合わせが不明であること、寄与の大きい解析パラメータが毒性検出に最適であるかが不明であることが、新たな課題となっている。本研究で構築した多変量解析法は用意した解析パラメータをすべて使用するのではなく、10 個の解析パラメータから構成される 968 通りのパラメータセットすべてについて主成分分析し、任意の条件を達成するパラメータセットを探索する解析手法となっている。構築した多変量解析法を用いて 9 種類の痙攣陽性化合物において、用量依存的な応答を検出可能とする統一的なパラメータセットを導出した結果、Total Spikes、MF、IMFI、CV of IMFI、Periodicity で構成されるパラメータセットが導出された。検証のために用意した痙攣陽性化合物である Tramadol、化合物 X においても用量依存的な応答が検出され、検証のために用意した陰性化合物である Acetaminophen、Ethylenediamine、Felbinac においては用量依存的な応答が検出されず、痙攣陽性化合物のみで用量依存的な応答を検出することに成功した。用意した 10 個の解析パラメータすべてを用いた主成分分析では痙攣陽性化合物の用量依存応答の検出は実現しなか

ったことから、本研究で構築した任意の条件を達成する解析パラメータセットを探索する解析手法の有効性が示された。

10 個の解析パラメータの中から 3 個以上の組み合わせで構成される 968 通りのパラメータセットをそれぞれ主成分分析することで、痙攣毒性の検出に有効なパラメータセットを導出した。導出したパラメータセットで採用されている解析パラメータを確認すると CV of IMFI、Periodicity の採用率が高かった。これらは何れも規則性を指標とした解析パラメータであることから、痙攣毒性を予測するパラメータとしてネットワークバーストの規則性が重要であることが示唆された。

10 パラメータのヒートマップと主成分負荷量を参照することで、各化合物の毒性検出に寄与している解析パラメータを確認することができる。Kainic acid、NMDA acid、Tramadol、Venlafaxine は TS、CV of IMFI を減少させ、Periodicity を上昇させるような特徴を有する。Theophylline、Varenicline は MF、Periodicity を上昇させ、CV of IMFI を減少させるような特徴を有する。Picrotoxin、Pilocarpine は TS、CV of IMFI を減少させ、MF、Periodicity を上昇させるような特徴を有する。Paroxetine は TS、CV of IMFI を減少させ、MF を上昇させるような特徴を有する。PTZ は TS、MF、IMFI を減少させ、Periodicity を上昇させるような特徴を有する。多くの痙攣陽性化合物について、CV of IMFI を減少させ、Periodicity を上昇させるような特徴を有することから、痙攣陽性化合物はヒト iPS 細胞由来ニューロンの MEA 計測において、ネットワークバーストの規則性を上昇させることが示唆された。

主成分分析では累積寄与率が 80%程度になる主成分まで考慮するのが一般的である。本研究では第一主成分、第二主成分のみを用いて分析を行ったが、その累積寄与率は平均 82.1%であった。第一主成分、第二主成分のみで高い累積寄与率が得られたことは、本研究で導出した解析パラメータセットが痙攣毒性の検出に重要であったことを示す結果となった。

本研究で毒性として検出した神経活動に有意な影響を及ぼす PTZ、Picrotoxin の最低濃度はそれぞれ 10 μ M、0.1 μ M であった。MEA を用いた先行研究では、ヒト iPS 由来神経で PTZ が 30 μ M、Picrotoxin が 0.1 μ M で神経活動に有意な影響を及ぼす最低濃度として検出されており(Tukker, et al., 2020b)、本研究と同程度の濃度帯で有意な影響が検出されている。一方で、ラット皮質神経では、PTZ が 100 μ M、Picrotoxin が 0.3 μ M で検出されており、いずれもヒト iPS 由来神経と比較して高い濃度になっている(Tukker, et al., 2020b)。本研究と先行研究において、ヒト iPS 由来神経に影響を及ぼす化合物の濃度帯が一致しており、ラット皮質神経に影響を及ぼす濃度帯との差異が検出されていることから、ヒト iPS 由来神経を用いた in vitro 神経活動の評価系はヒトとローデントの種差を反映し、非臨床試験で課題となっている種差の問題を解決する手法であることが示唆された。

本研究では、痙攣毒性のポテンシャルを有する化合物を検出することであり、可能な

限り低濃度で検出が可能となるようなパラメータセットを導出した。したがって、一部の化合物は *in vivo* で痙攣を発現する CSF 濃度よりも低い濃度で試験している場合がある。ラットの痙攣発現時の Paroxetine の CSF 濃度は $0.39\ \mu\text{M}$ であり、今回 MEA で痙攣毒性を検出した $0.3\ \mu\text{M}$ と一致している。痙攣が生体で発現する濃度を特定したい場合は、パラメータセットを導出するための任意の条件設定が重要となる。MEA 計測における神経ネットワークへの暴露濃度と *in vivo* における CSF 濃度の相関を明らかにする必要があり、痙攣発作時における、化合物の CSF 濃度の調査が必要不可欠である。

2-5 結論

本章では化合物の毒性評価系の構築に向けて、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの MEA 計測を用いた痙攣毒性を検出可能な解析パラメータの構築と多変量解析法の構築を行った。新規解析パラメータとして神経ネットワークにおける長期的な周期性を指標とした **Periodicity** を構築することで、既存の解析パラメータでは応答を検出することが困難であった痙攣陽性化合物の応答も検出することが可能となった。任意の条件を達成するパラメータセットを探索する多変量解析法を構築することで、**Total Spikes**、**MF**、**IMFI**、**CV of IMFI**、**Periodicity** で構成されるパラメータセットが作用機序の異なる痙攣陽性化合物の痙攣毒性を統一的に検出可能であることを見出し、痙攣陽性化合物はヒト iPS 細胞由来ニューロンの MEA 計測において、ネットワークバーストの規則性を上昇させることが示唆された。本研究により、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの MEA 計測で、化合物の痙攣毒性を検出可能であることは示された。本研究で設定した化合物の濃度は *in vivo* の CSF 濃度の考慮が不十分であるため、MEA における神経ネットワークへの暴露濃度と *in vivo* における脳室内濃度の相関を明らかにすることで、実用性の高い *in vitro* の毒性評価系が実現されるだろう。IVIVE へのアプローチは第 3 章で述べる。

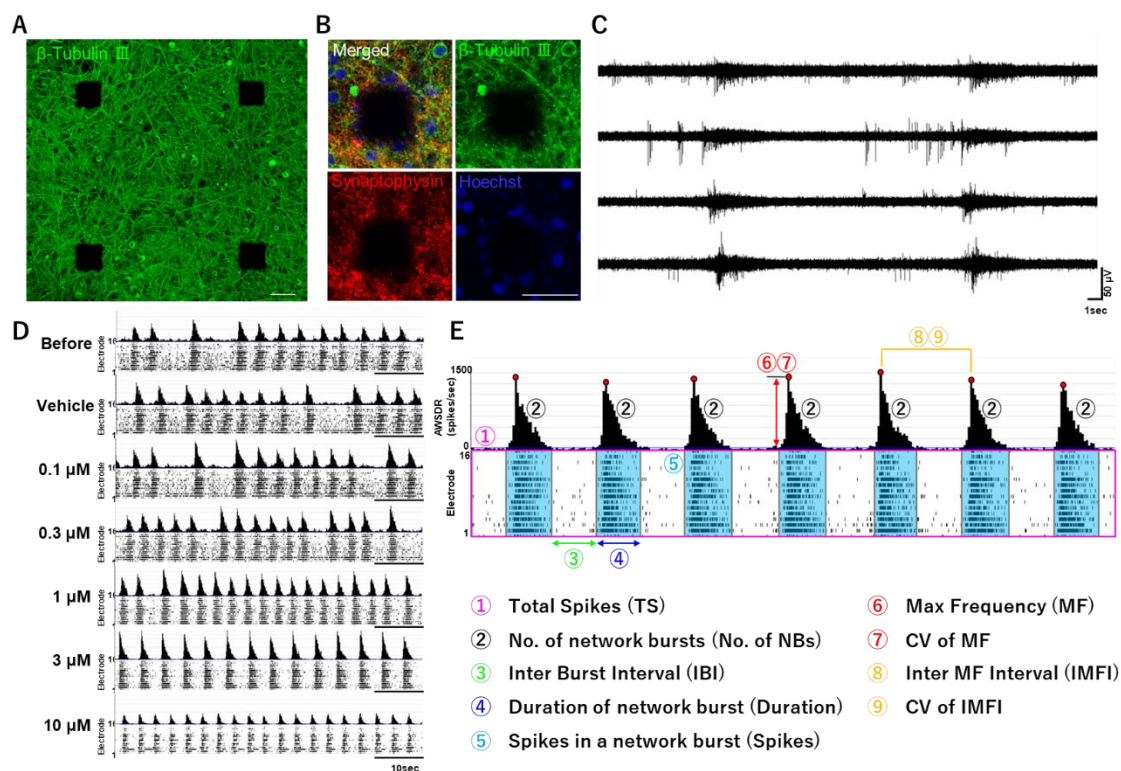


Figure 1 Spontaneous firing in human iPS cell-derived cortical neurons and analytical parameters. (A) Immunofluorescent image of neurons cultured on microelectrode array (MEA) at 35 days in vitro (35DIV), (B) Immunofluorescent images of neurons by β -Tubulin III (green), synapses by Synaptophysin (red), cell nucleus by Hoechst (blue), and merged images at 35 days in vitro (35DIV), (C) Typical action potential waveform at the spontaneous activity measurement at 8 weeks in vitro (8WIV), (D) Raster plots and histograms of detected spikes in administration of NMDA acid, (E) Explanation of analytical parameters.

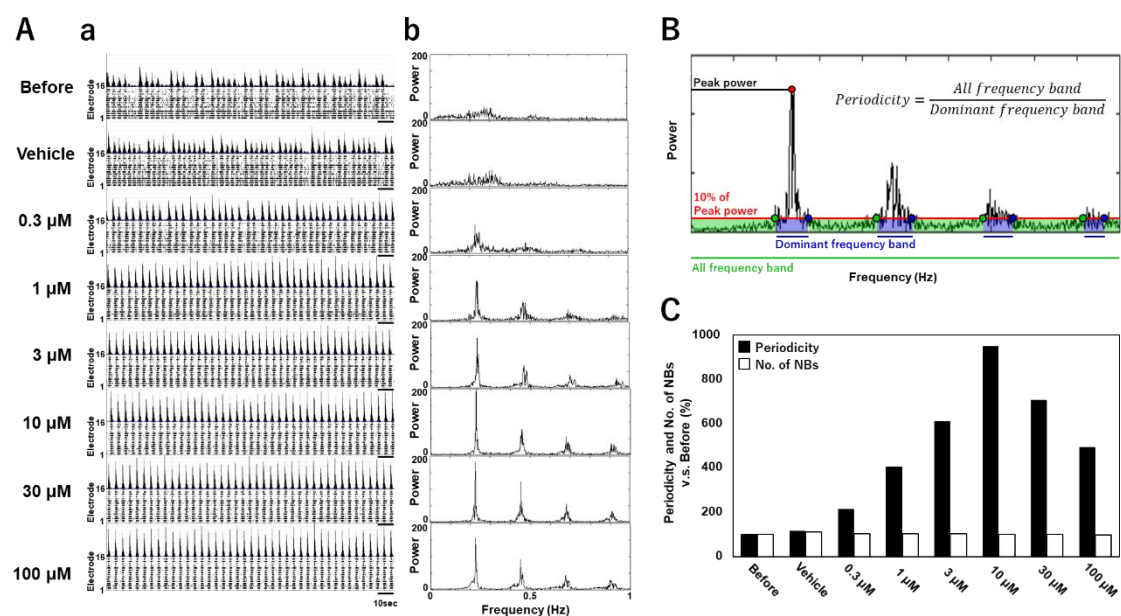


Figure 2 Periodic analysis of network bursts (NBs). (A) Periodicity of NB in administration of pilocarpine, (a) Raster plots and histograms of detected spikes in administration of pilocarpine, (b) Power spectrum of histograms, (B) Calculation method of periodicity, (C) No. of NBs and periodicity in administration of pilocarpine.

第2章 主成分分析を用いた医薬品の痙攣毒性検出法の開発

Kainic acid	Concentration (μM)	0.1	1	10	NMDA acid	Concentration (μM)	0.1	1	10	Paroxetine	Concentration (μM)	0.3	3	30
	Total Spikes	*		**		Total Spikes			**		Total Spikes	*	**	**
	No. of NBs					No. of NBs			**		No. of NBs			
	IBI					IBI					IBI			
	Duration					Duration			**		Duration			
	Spikes in a NB					Spikes in a NB			**		Spikes in a NB			
	Max Frequency			*		Max Frequency		**	**		Max Frequency			*
	CV of Max Frequency					CV of Max Frequency			**		CV of Max Frequency			
	IMFI					IMFI					IMFI		*	
	CV of IMFI			**		CV of IMFI		**	**		CV of IMFI	**	**	**
PTZ	Concentration (μM)	10	100	1000	Picrotoxin	Concentration (μM)	0.1	1	10	Pilocarpine	Concentration (μM)	0.3	3	30
	Total Spikes	**	**	**		Total Spikes	*	*	*		Total Spikes			**
	No. of NBs	**	**	**		No. of NBs	*	*	*		No. of NBs		*	*
	IBI	**	**	*		IBI	**	*	*		IBI		*	**
	Duration			**		Duration		*	**		Duration			
	Spikes in a NB	**	**	**		Spikes in a NB					Spikes in a NB			
	Max Frequency	*	*			Max Frequency		*			Max Frequency		*	*
	CV of Max Frequency	**	**	*		CV of Max Frequency	*	*			CV of Max Frequency		*	*
	IMFI					IMFI					IMFI		*	*
	CV of IMFI					CV of IMFI		*	*		CV of IMFI	**	**	**
Theophylline	Concentration (μM)	0.3	3	30	Varenicline	Concentration (μM)	0.3	3	30	Venlafaxine	Concentration (μM)	0.3	3	30
	Total Spikes	**	**	*		Total Spikes			*		Total Spikes			*
	No. of NBs		*	*		No. of NBs	*	*	*		No. of NBs	*	*	*
	IBI		*	*		IBI	*	*	*		IBI	*	*	*
	Duration					Duration					Duration			*
	Spikes in a NB					Spikes in a NB		*	*		Spikes in a NB			*
	Max Frequency		*	*		Max Frequency		*	*		Max Frequency		*	*
	CV of Max Frequency	*	*	*		CV of Max Frequency	*	*	*		CV of Max Frequency	*	*	*
	IMFI	*	*	*		IMFI		*	*		IMFI		*	*
	CV of IMFI	*	*	*		CV of IMFI	*	*	*		CV of IMFI	*	*	*
Acetaminophen	Concentration (μM)	1	10	100	Ethylenediamine	Concentration (μM)	10	100	1000	Felbinac	Concentration (μM)	1	10	100
	Total Spikes					Total Spikes					Total Spikes			
	No. of NBs					No. of NBs		*	*		No. of NBs		*	*
	IBI					IBI		*	*		IBI		*	*
	Duration					Duration		*	*		Duration		*	*
	Spikes in a NB					Spikes in a NB		*	*		Spikes in a NB		*	*
	Max Frequency					Max Frequency		*	*		Max Frequency		*	*
	CV of Max Frequency					CV of Max Frequency		*	*		CV of Max Frequency		*	*
	IMFI					IMFI		*	*		IMFI		*	*
	CV of IMFI					CV of IMFI		*	*		CV of IMFI	*	*	*
Tramadol	Concentration (μM)	0.3	3	30	Compound X	Concentration (μM)	1	10	100	 0% 100% 200% vs. DMSO				
	Total Spikes	*		**		Total Spikes		*	*					
	No. of NBs	*	*	*		No. of NBs	*	*	*					
	IBI	*	*	*		IBI	*	*	*					
	Duration					Duration	*							
	Spikes in a NB	*	*	*		Spikes in a NB		*	*					
	Max Frequency		*	*		Max Frequency		*	*					
	CV of Max Frequency	*	*	*		CV of Max Frequency		*	*					
	IMFI		*	*		IMFI	*	*	*					
	CV of IMFI	*	*	*		CV of IMFI	*	*	*					

Figure 3 Heatmap of the analytical parameters of seizurogenic drugs and verification compounds. Kainic acid (n = 3), NMDA acid (n = 4), paroxetine (n = 4), PTZ (n = 5), picrotoxin (n = 4), pilocarpine (n = 4), theophylline (n = 4), varenicline (n = 3), venlafaxine (n = 3), acetaminophen (n = 4), ethylenediamine (n = 3), felbinac (n = 4), tramadol (n = 4), compound X (n = 7). One-way ANOVA followed by Dunnett's test, *p < 0.05, **p < 0.01 vs. DMSO (n = 6).

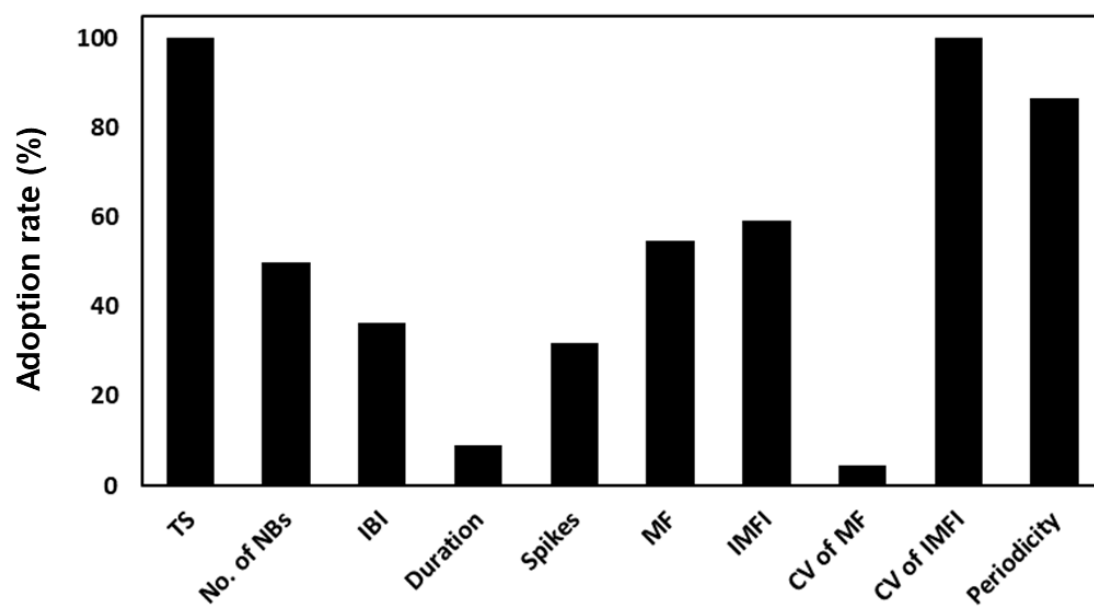


Figure 4 Adoption rate of analytical parameters in effective parameter sets for detecting seizure liability. n = 22 parameter sets.



Figure 5 Scatter plots of principal component analysis (PCA) using effective parameter set for detecting seizure liability. DMSO (blue), low concentration (yellow), middle concentration (orange), high concentration (red). In seizurogenic drugs, DMSO and after administration are clearly separated. In tramadol, a seizurogenic drug used for verification, DMSO and after administration are clearly separated. In acetaminophen, a negative compound used for verification, DMSO and after administration are not separated. (A) Kainic acid (n = 3), (B) NMDA acid (n = 4), (C) Paroxetine (n = 4), (D) PTZ (n = 5), (E) Picrotoxin (n = 4), (F) Pilocarpine (n = 4), (G) Theophylline (n = 4), (H) Varenicline (n = 3), (I) Venlafaxine (n = 3), (J) Acetaminophen (n = 4), (K) Ethylenediamine (n = 3), (L) Felbinac (n = 4), (M) Tramadol (n = 4), (N) Compound X (n = 7).

Table 1 Description of analytical parameters. 9 analytical parameters calculated by burst analysis.

Analytical parameter	Description
Total spikes (TS)	The total number of spikes detected on all channels in 10 minutes.
No. of network bursts (No. of NBs)	The number of NBs in 10 minutes.
Inter burst interval (IBI)	Average time from the end point of NB to the start point of the next NB.
Duration of network burst (Duration)	Average duration of NBs.
Spikes in a network burst (Spikes)	Average the number of spikes contained in an NB.
Max frequency (MF)	Average peak value of the histogram during an NB.
CV of MF	Coefficient of variance of MF.
Inter MF interval (IMFI)	Average time from the peak of NB to the peak of the next NB.
CV of IMFI	Coefficient of variance of IMFI.

Table 2 Identified effective parameter sets for detecting seizure liability. Check marks indicate the adopted parameters. Red: parameter set identified as most effective for detecting seizure liability.

Order	Adapted Parameter									
	TS	No. of NBs	IBI	Duration	Spikes	MF	IMFI	CV of MF	CV of IMFI	Periodicity
1	✓					✓	✓		✓	✓
2	✓	✓							✓	✓
3	✓		✓	✓					✓	
4	✓		✓						✓	✓
5	✓			✓					✓	✓
6	✓					✓	✓		✓	
7	✓						✓		✓	✓
8	✓	✓	✓						✓	✓
9	✓	✓			✓				✓	✓
10	✓	✓				✓			✓	✓
11	✓		✓				✓		✓	✓
12	✓				✓	✓	✓		✓	
13	✓				✓		✓		✓	✓
14	✓	✓	✓			✓			✓	✓
15	✓	✓			✓	✓			✓	✓
16	✓	✓			✓		✓		✓	✓
17	✓	✓				✓	✓		✓	✓
18	✓		✓			✓	✓		✓	✓
19	✓				✓	✓	✓		✓	✓
20	✓	✓	✓			✓	✓		✓	✓
21	✓	✓			✓	✓	✓		✓	✓
22	✓	✓	✓			✓	✓	✓	✓	✓

Table 3 Statistical analysis for PCA using effective parameter set for detecting seizure liability. Kainic acid (n = 3), NMDA acid (n = 4), paroxetine (n = 4), PTZ (n = 5), picrotoxin (n = 4), pilocarpine (n = 4), theophylline (n = 4), varenicline (n = 3), venlafaxine (n = 3), tramadol (n = 4), acetaminophen (n = 4), ethylenediamine (n = 3), felbinac (n = 4), compound X (n = 7). One-way MANOVA, *p < 0.050, **p < 0.010.

Drugs	Concentration (μ M)		
	p value		
	0.1	1	10
Kainic acid	** p < 0.010	* p = 0.011	** p < 0.010
	0.1	1	10
NMDA acid	p = 0.115	** p < 0.010	** p < 0.010
	0.3	3	30
Paroxetine	* p = 0.014	** p < 0.010	** p < 0.010
	10	100	1000
PTZ	** p < 0.010	** p < 0.010	** p < 0.010
	0.1	1	10
Picrotoxin	** p < 0.010	** p < 0.010	** p < 0.010
	0.3	3	30
Pilocarpine	** p < 0.010	** p < 0.010	** p < 0.010
	0.3	3	30
Theophylline	** p < 0.010	** p < 0.010	** p < 0.010
	0.3	3	30
Varenicline	* p = 0.011	** p < 0.010	** p < 0.010
	0.3	3	30
Venlafaxine	* p = 0.020	** p < 0.010	** p < 0.010
	0.3	3	30
Tramadol	** p < 0.010	** p < 0.010	** p < 0.010
	1	10	100
Acetaminophen	p = 0.882	p = 0.286	p = 0.094
	10	100	1000
Ethylenediamine	p = 0.315	p = 0.720	p = 0.752
	1	10	100
Felbinac	p = 0.230	p = 0.177	p = 0.267
	1	10	100
Compound X	p = 0.306	* p = 0.024	** p < 0.010

Table 4 Principal component loadings for PCA using effective parameter set for detecting seizure liability. Kainic acid (n = 3), NMDA acid (n = 4), paroxetine (n = 4), PTZ (n = 5), picrotoxin (n = 4), pilocarpine (n = 4), theophylline (n = 4), varenicline (n = 3), venlafaxine (n = 3), tramadol (n = 4), acetaminophen (n = 4), ethylenediamine (n = 3), felbinac (n = 4), compound X (n = 7).

Drugs	Principal component loadings									
	PC1					PC2				
	TS	MF	IMFI	CV of IMFI	Periodicity	TS	MF	IMFI	CV of IMFI	Periodicity
Kainic acid	-0.54	-0.46	0.05	-0.49	0.51	-0.10	0.35	0.92	0.04	0.16
NMDA acid	-0.50	-0.44	-0.45	-0.37	0.47	0.07	0.55	0.27	-0.75	0.26
Paroxetine	-0.54	0.58	0.38	-0.47	0.01	0.40	0.22	0.51	0.22	0.69
PTZ	-0.41	-0.49	-0.45	-0.42	0.47	0.82	-0.01	-0.02	-0.18	0.54
Picrotoxin	-0.16	0.51	0.47	-0.54	0.45	0.80	0.30	0.33	0.41	0.10
Pilocarpine	-0.26	0.51	0.46	-0.53	0.43	0.80	0.42	-0.01	0.27	0.34
Theophylline	-0.42	0.39	0.50	-0.47	0.46	0.64	0.65	0.18	0.32	0.17
Varenicline	-0.39	0.42	0.52	-0.51	0.38	0.56	-0.22	-0.05	-0.06	0.80
Venlafaxine	-0.36	0.06	0.47	-0.60	0.53	0.59	0.73	0.29	0.10	0.17
Tramadol	-0.47	0.20	0.46	-0.56	0.46	-0.42	-0.76	-0.39	0.03	0.31
Acetaminophen	0.45	0.48	-0.48	0.20	0.55	0.15	-0.45	-0.18	0.84	-0.19
Ethylenediamine	0.51	0.39	-0.40	-0.46	0.47	0.20	0.59	0.62	0.42	0.23
Felbinac	-0.34	0.21	0.60	0.59	0.35	0.66	0.74	0.02	0.01	0.13
Compound X	0.54	0.54	-0.42	-0.42	-0.25	-0.10	-0.26	-0.49	-0.40	0.72

第3章 医薬品の痙攣リスク評価法の開発と IVIVE の検証

3-1 序論

第2章では、ヒト iPS 細胞由来神経ネットワークの MEA 計測における痙攣毒性の検出を可能とする解析手法、つまり *in vitro* における化合物評価について述べた。考察でも論じたように、生体での毒性発現濃度を予測するためには、MEA 計測における神経ネットワークへの暴露濃度と *in vivo* における CSF 濃度の相関を明らかにする必要がある。本章では、本研究の主題である *in vitro* MEA データによる医薬品の痙攣毒性予測と、生体における痙攣発現時の CSF 濃度を比較することによる IVIVE の観点における検証の結果を述べる。

これまで MEA と神経細胞を用いた様々な化合物評価が研究されてきたが、MEA 計測における化合物の評価方法は個別の解析パラメータに頼っている。どの解析パラメータに変化が認められたら毒性なのか、どの程度の数値から毒性なのかが具体的に定められていないことが課題である。また、神経細胞の MEA 計測では細胞の種類により溶媒の影響を受ける場合があり、化合物を正確に評価するには溶媒の影響を取り除くような解析手法が必要である。

MEA と神経細胞を用いた化合物評価では、生体における毒性濃度を特定できないことが重要な課題である。MEA によって検出された神経細胞の活動変化が生体における毒性発現を反映しているかは不明である。より生体での毒性発現濃度を反映させるためには、MEA 計測における神経ネットワークへの暴露濃度と *in vivo* における脳室内濃度の相関を明らかにし、IVIVE の観点を検証する必要がある。

本研究では、医薬品開発における安全性評価で動物実験の代替法になり得るような *in vitro* 神経機能の評価系構築を目的とした。MEA 計測によって得られた神経活動データから溶媒の影響を除外可能なパラメータセットを導出し、主成分分析において、溶媒の標準偏差を指標とした痙攣リスクの基準を設定することで、MEA 計測における化合物の評価基準および溶媒の影響に対する課題解決を試みた。また、ヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いた MEA 計測による化合物の痙攣リスク評価と、動物実験によるラットで振戦および痙攣発作が観察されたときの CSF 内濃度の調査を実施し、MEA 計測で痙攣リスクが検出された濃度と CSF 内濃度を比較することで IVIVE の観点を検証した。

3-2 方法

3-2-1 ヒト iPS 細胞由来皮質ニューロンの培養

Glutamatergic neurons、GABAergic neurons、Astrocyte (SynFire Co-Culture Kit, Neucyte Inc.) を 7 : 3 : 3.5 の比率で混合し、 8.0×10^5 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。播種時には Seeding Medium を使用し、培養 1~6 日目は Short-Term Medium を使用し、培養 7 日目以降は Long-Term Medium (SynFire Complete Media Kit, Neucyte Inc.)を使用した。培地交換は 3 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 5 週のヒト iPS 細胞由来ニューロンにカリウムチャネルブロッカーの 4-aminopyridine (4-AP, 0.3, 1, 3, 10, 30 μ M)、アデノシン受容体のアンタゴニストである Aminophylline (100, 300, 1000, 3000 μ M)、ノルエピネフリン-ドーパミン取り込み阻害およびニコチン性アセチルコリン受容体アンタゴニストの Bupropion (3, 10 μ M)、セロトニン取り込み阻害剤である Paroxetine (0.1, 0.3, 1, 3 μ M)、GABA_A受容体のアンタゴニストである PTZ (30, 100, 300, 1000, 3000 μ M)および Picrotoxin (0.1, 0.3, 1, 3, 10 μ M)、ムスカリン性アセチルコリン受容体アゴニストの Pilocarpine (3, 10, 30, 100, 300, 1000 μ M)、グリシン受容体のアンタゴニストである Strychnine (0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 μ M)、ノルエピネフリン-セロトニン再取り込み阻害剤の Tramadol (3, 10, 30, 100, 300 μ M) および Venlafaxine (3, 10, 30 μ M)、痙攣陰性化合物として Acetaminophen (1, 3, 10, 30, 100, 300 μ M)、Amoxicillin (1, 3, 10, 30, 100, 300 μ M)、Aspirin (1, 3, 10, 30, 100, 300 μ M)、溶媒である DMSO (0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 %) をそれぞれ累積投与し、投与前後 15 分間の自発活動を記録した。

3-2-4 スパイク検出およびネットワークバースト解析

計測データから Mobius software を用いてスパイク検出行った。各電極の活動休止期のベースラインノイズの標準偏差 $\pm 530\%$ の閾値を上回るものをスパイクとして検出した。検出したスパイクデータから、4-step method を用いて network burst (NB) の検出を行った。本研究では、15 分間のスパイク数の総和 (Total spikes)、15 分間の NB の数 (No. of NBs)、IBI、Duration of NB、Spikes in an NB、MF、IMFI、CV of IBI、CV of Duration、CV of Spikes、CV of MF、CV of IMFI、Periodicity、Duration の四分位範囲 (Duration IQR) を算出した。薬理試験データの正規化は、各 well の vehicle 投与時のデータを 100% として行った。

3-2-5 主成分分析

溶媒である DMSO について、ネットワークバースト解析によって得られる 14 個の解析パラメータを行ベクトルの要素にもつすべての well のデータを並べた行列を用意した。16369 個のパラメータセットにより指定された解析パラメータの列を取り出して構成される 16369 個の新たな行列について、それぞれ MATLAB の関数 pca を用いて主成分分析した。主成分分析により得られる、第一主成分スコアおよび第二主成分スコアに化合物間で差があるかをパラメータセットごとに MANOVA で検証し、溶媒である DMSO に各濃度間で有意差が認められないパラメータセットを導出した。導出したパラメータセットと主成分負荷量を使用して、4-AP、Aminophylline、Bupropion、Paroxetine、PTZ、Picrotoxin、Pilocarpine、Strychnine、Tramadol、Venlafaxine、Acetaminophen、Amoxicillin、Aspirin の主成分分析を実施した。

3-2-6 痙攣リスク評価

主成分分析により算出された各化合物の主成分スコアを DMSO の標準偏差 (SD) 範囲と比較することで、化合物の痙攣リスクを定量的に評価した。具体的には、DMSO の SD 範囲内は低リスク、SD 範囲外の場合は中リスク、2SD 範囲外は高リスクと定義した。ここで「リスク」とは化合物の痙攣誘発の可能性を意味する。

3-3 結果

3-3-1 ヒト iPS 細胞由来神経ネットワークにおける自発活動計測および薬理応答

ヒト iPS 細胞由来神経ネットワークにおける既知の痙攣薬剤への応答を調べるために、MEA 上にヒト iPS 細胞由来ニューロンを培養し (Fig. 1A)、自発活動を計測した結果、SN 比高く活動を検出することができた (Fig. 1B)。Fig. 1C は 4-AP 投与時の自発活動計測のラスタプロットとヒストグラムである。ほぼすべてのチャンネルでスパイクが検出されると共に、同期バースト発火の様子が用量依存的に変化していることが観察され (Fig. 1C)、Total spikes と No. of NBs に濃度依存的に有意差が認められた (Fig. 1D)。

3-3-2 作用機序の異なる化合物における解析パラメータの変化

痙攣毒性の検出に有効な解析パラメータを同定するために、14 個の解析パラメータを用いて DMSO 投与時を 100%として薬剤投与時と比較したヒートマップを作成した (one way ANOVA, and Dunnett test, Fig. 2)。Table 1 に解析パラメータの説明図を示す。痙攣陽性化合物はいずれかの解析パラメータで顕著な変化が認められたが、そのパラメータに統一性は見られなかった。痙攣陰性化合物および DMSO においても有意な変化が認められたため、DMSO 添加による影響を除去するためのパラメータを導出する必要があることが示唆された。

3-3-3 DMSO の影響を除去する主成分分析における化合物評価

DMSO の影響を除去するためのパラメータセットを決定するために、one-way MANOVA で DMSO の各濃度における第一主成分と第二主成分を比較した (Table 2)。DMSO の各濃度で有意差が認められないパラメータセットが DMSO の影響を除去するために有効なパラメータセットとして探索した結果、TS、CV of IMFI、Duration IQR のパラメータセットが導出された。導出されたパラメータセットと主成分負荷量 (Table 3)を使用して、4-AP、Aminophylline、Bupropion、Paroxetine、PTZ、Picrotoxin、Pilocarpine、Strychnine、Tramadol、Venlafaxine、Acetaminophen、Amoxicillin、Aspirin の主成分分析を実施した。Fig. 3 に DMSO の影響を除去するために有効なパラメータセットで実施した主成分分析の結果を示す。各化合物を DMSO の SD 範囲と比較することで、化合物の痙攣リスクを定量的に評価した。具体的には、DMSO の SD 範囲内は低リスク、SD 範囲外の場合は中リスク、2SD 範囲外は高リスクと定義した。

3-3-4 化合物の痙攣リスク評価

Fig. 4 に各化合物の痙攣リスク評価のための主成分分析結果を示す。痙攣陽性化合物

は濃度依存的に DMSO の SD 範囲から逸脱する様子が観察されたが、痙攣陰性化合物は DMSO の SD 範囲にとどまる様子が観察された。Fig. 5 は SD 範囲内を低リスク (青)、SD 範囲外を中リスク (ピンク)、2SD 範囲外を高リスク (赤)として基準を設定し、化合物の痙攣リスク評価を実施した結果を示している。4-AP のリスクは 1 μM で検出され、リスクは濃度依存的に増加した。アミノフィリンのリスクは 1000 μM で検出された。ブプロピオンのリスクは 3 μM で検出され、リスクは濃度依存的に増加した。パロキセチンのリスクは 0.3 μM で検出され、リスクは濃度依存的に増加した。PTZ のリスクは 1000 μM で検出され、リスクは濃度依存的に増加した。ピクロトキシンのリスクは 0.1 μM で検出された。ピロカルピンのリスクは、10～100 μM および 1000 μM で検出された。ストリキニーネのリスクは 3 μM で検出された。トラマドールのリスクは 30 μM で検出され、リスクは濃度依存的に増加した。ベンラファキシンのリスクは 3 μM で検出され、リスクは濃度依存的に増加した。陰性化合物では濃度が増加しても、リスクの増加は検出されなかった。

3-3-5 IVIVE の検証

ラットを用いた動物実験から得られた振戦および痙攣時の CSF 濃度と、MEA で痙攣リスクが検出された濃度を比較することで、IVIVE の観点で検証を実施した。Table 4 は各化合物の振戦時の CSF 濃度、痙攣時の CSF 濃度および MEA で痙攣リスクが検出された濃度を示している。ほとんどの化合物について、CSF 濃度と MEA で痙攣リスクが検出された濃度の間に顕著な差は認められなかった。ピロカルピンは、MEA で 2 つの濃度帯で痙攣リスクが検出された。最初の 10 μM は CSF 濃度の約 26.6 倍低く、2 番目の 1000 μM は CSF 濃度に近い結果となった。MEA でストリキニーネの痙攣リスクが検出された濃度は、CSF 濃度よりも 15～30 倍高い結果となった。Fig. 6 に MEA における痙攣リスク検出濃度と CSF 濃度の相関図を示す。4-AP、アミノフィリン、パロキセチン、PTZ、トラマドールは振戦時の CSF 濃度と同レベルの濃度で痙攣リスクを検出することができた。ブプロピオン、ピクロトキシン、ピロカルピン、ベンラファキシンは振戦時の CSF 濃度より低い濃度で痙攣リスクを検出することができた。痙攣時の CSF 濃度と比較するとストリキニーネ以外の化合物は CSF 濃度よりも低い濃度で痙攣リスクを検出することができた。

3-4 考察

これまで MEA と神経細胞を用いた様々な化合物評価が研究されてきたが(Bradley et al. 2018; Bradley and Strock 2019; Gerber et al. 2021; Kosnik et al. 2020; Nicolas et al. 2014; Strickland et al. 2018; Tukker et al. 2020a; Tukker et al. 2018; Valdivia et al. 2014)、より生体での毒性発現濃度を反映させるためには、MEA 計測における神経ネットワークへの暴露濃度と *in vivo* における脳室内濃度の相関を明らかにする必要があった(Tukker and Westerink 2021)。本研究では MEA における化合物の痙攣毒性を対象にして、従来の評価方法と比較してパラメータ値だけに頼らず、統計解析に基づく、より具体的な毒性判定基準を設けた。また、MEA 計測で使用した化合物について、動物実験によりラットで振戦および痙攣発作が観察されたときの CSF 内濃度を調査し、MEA 計測で痙攣毒性が検出された濃度と CSF 内濃度を比較することで、その相関を明らかにした。

本研究で使用したヒト iPS 細胞由来ニューロンでは、溶媒の添加による影響が確認された(Fig. 2)。神経細胞の MEA 計測では細胞の種類により溶媒の影響を受ける場合がある(McConnell et al. 2012; Strickland et al. 2018)。化合物の痙攣リスクを正確に評価するには溶媒の影響を取り除く必要がある為、溶媒の影響が最も反映されない解析パラメータの組み合わせを 14 パラメータのすべての組み合わせ 16369 通りから導出した (Table 3)。導出した解析パラメータを使用した主成分分析において、溶媒で濃度依存的に顕著な変化が認められなかったことから(Table 2)、これらのパラメータを使用した主成分分析では溶媒の影響を受けずに化合物の評価が実施可能であることが示された。

従来の MEA 計測における化合物の評価方法は解析パラメータ値に頼っており、どの解析パラメータに変化が認められたら毒性なのか、どの程度の数値から毒性なのかが具体的に定められていなかった(Bradley et al. 2018; Bradley and Strock 2019; Gerber et al. 2021; Tukker et al. 2020a; Tukker et al. 2018)。本研究では、溶媒の影響を除外した主成分分析において、溶媒の標準偏差を指標とした痙攣リスクの基準範囲を設定し、化合物の評価を実施した。ネガコンである Acetaminophen, Amoxicillin, Aspirin (Breier et al. 2008)は濃度が上昇しても溶媒の標準偏差内に留まり続け (Fig. 4)、痙攣リスクが検出されることがなかったことから (Fig. 5)、偽陽性の可能性が排除された評価方法であることが示唆された。また、様々な作用機序を有する痙攣陽性化合物について、いずれの化合物も濃度依存的に溶媒の標準偏差から逸脱し (Fig. 4)、痙攣リスクが上昇する結果が得られたことから (Fig. 5)、偽陰性の可能性が排除された評価方法であることも示唆された。さらに、これらの痙攣陽性化合物で痙攣リスクが検出された濃度と *in vivo* の CSF 内濃度を比較すると、4-AP, Aminophylline, Paroxetine, PTZ, Tramadol は振戦時の CSF 濃度と同レベルで痙攣リスクを検出し、Bupropion, Picrotoxin, Pilocarpine, Venlafaxine は振戦時の CSF 濃度よりも低い濃度で痙攣リス

クを検出した (Table 4)。痙攣発作時の CSF 濃度と比較すると Strychnine 以外の化合物は CSF 濃度と同レベル以下で痙攣リスクを予測することができていたことから (Fig. 6)、in vivo において表現型が発現する濃度と in vitro において表現型が発現する濃度が概ね一致することが示唆された。

MEA 計測において、Pilocarpine は 10-100 μM と 1000 μM の 2 段階で痙攣リスクが検出された (Fig. 5)。これまで報告された MEA 計測における Pilocarpine の濃度は 0.3-100 μM 程度であり、低濃度と高濃度で反応が異なる場合がある (Tukker et al. 2020a; Tukker et al. 2020b)。本研究で調査した痙攣時の CSF 濃度は 656 μM であり、濃度レベルが一致していることから、MEA における Pilocarpine 1000 μM の表現型が in vivo における表現型と相関していると考えられる。一方で、in vivo では症状が認められない 10-100 μM について、MEA 計測で痙攣リスクが検出されたことは、in vivo では捉えることができない潜在的な痙攣リスクを MEA 計測によって捉えられる可能性を示唆している。

MEA 計測において、Strychnine は 3 μM で痙攣リスクが検出された (Fig. 5)。痙攣時の CSF 濃度は 0.21 μM であり、比較的高い濃度での痙攣リスク検出となった。MEA 計測における Strychnine 添加時のラスタプロット・ヒストグラムを確認すると、3 μM 添加で同期バースト発火の頻度が上昇しているが、5-10min で元の同期バースト発火頻度に戻っていた (Fig. 7)。これは、Strychnine 添加によるニューロンの活動変化が添加直後の数分間のみで現れることを示唆している。0.03-1 μM の低濃度では 3 μM と比較して、さらに短期間の活動変化であることが考えられるため、計測時間内に活動変化が認められず、痙攣リスクが検出されなかったことが示唆される。Tukker らの報告では、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの MEA 計測において、0.3 μM で Strychnine による顕著な変化が認められているが、特定のパラメータのみであり (Tukker et al. 2020b)、本研究と同様である。また、0.3-3 μM では顕著な変化が認められるパラメータが変動しており、低濃度帯での反応が不安定であることから、本研究と同様に Strychnine による短期間の活動変化を捉えられていない可能性がある。本研究で実施した化合物以外にも MEA 計測において、添加から特定の時間経過でのみ活動変化が現れる化合物が存在する可能性は十分に考えられる。今後、MEA 計測による化合物評価の研究において、化合物添加タイミングと計測時間を検証する研究が必要となるだろう。

本研究では、ヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いた MEA 計測による化合物の痙攣リスク評価を実施し、その結果をラットの CSF 濃度と比較することで IVIVE の観点を検証した (Fig. 6)。ヒトとラットの種差の観点から、本来であればヒトにおける CSF 濃度と比較するのが好ましいが、ヒトにおける痙攣化合物の CSF 濃度情報を得るのは困難である。興味深いことに、ヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いた MEA 計測により痙攣リスクが検出された化合物の濃度レベルと、ラットで痙攣発作が発現した化合物の CSF 濃度は概ね一致していた。痙攣リスクが検出された濃度レベルが一致しなかった

化合物については、ヒトとラットの種差が反映されている可能性があり、本研究で実施した MEA 計測による化合物の痙攣リスク評価法は種差が反映される可能性がある。IVIVE の観点および種差の観点をより詳細に検証するには、ラット CSF 濃度、ラット初代培養ニューロンを用いた MEA 計測、およびヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いた MEA 計測の 3 つの実験をつなぎ合わせる研究が必須である。

医薬品開発における安全性評価は重要な工程であり、種差の観点から動物実験に代替するヒト由来神経ネットワークを用いた *in vitro* 神経機能を指標とした毒性試験法の構築が求められている。In vitro 神経機能を計測可能な評価系の中でも MEA を用いた研究が近年さかんに行われており、MEA への期待度は高い。本研究で実施したヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いた MEA 計測による化合物評価は、ラットで振戦・痙攣発作が発現した際の CSF 濃度と比較した結果、IVIVE の観点からも有効な評価系であることが示唆された。中枢神経毒性以外に目を向けると、MEA 計測によるヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた心毒性評価が実施されている。心毒性評価では MEA 上に培養したヒト iPS 細胞由来心筋から心電図様波形を測定することで QT 延長を検出できる。MEA 計測で実施した化合物の心毒性リスク評価において 84.2%の正確性が得られたことや、ヒトの致死性不整脈リスクを有する化合物を *in vitro* で正確に予測し、ヒト臨床と *in vitro* 評価系の相関性が実証されたことが報告されている。これらの報告をもとに 2022 年から ICH のガイドラインに、新たに MEA 計測を用いたヒト iPS 細胞由来心筋およびヒト心筋による QT 延長評価が Q&A として追加された。本研究で実施したヒト iPS 細胞由来ニューロンの MEA 計測を用いた化合物評価法は、*in vivo* と *in vitro* 評価系の相関が認められるリスク評価が可能であったことから、医薬品開発の実応用へ向けた動物実験の代替法になり得る評価系として有用である。

3-5 結論

本章では、医薬品開発における安全性評価で動物実験の代替法になり得るような *in vitro* 神経機能の評価系構築を目的とした。MEA 計測によって得られた神経活動データから溶媒の影響を除外可能なパラメータセットを導出し、主成分分析において、溶媒の標準偏差を指標とした痙攣リスクの基準を設定することで、MEA 計測における化合物の評価基準および溶媒の影響に対する課題を解決した。また、ヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いた MEA 計測による化合物の痙攣リスク評価と、動物実験によるラットで振戦および痙攣発作が観察されたときの CSF 内濃度の調査を実施し、MEA 計測で痙攣リスクが検出された濃度と CSF 内濃度を比較することで IVIVE の観点を検証することで、*in vitro* の毒性評価で *in vivo* と相関のある痙攣リスク評価が可能であることが示唆された。*In vitro* MEA assessment における精度の高い、化合物の痙攣リスク評価法として今後の展開が期待できる。

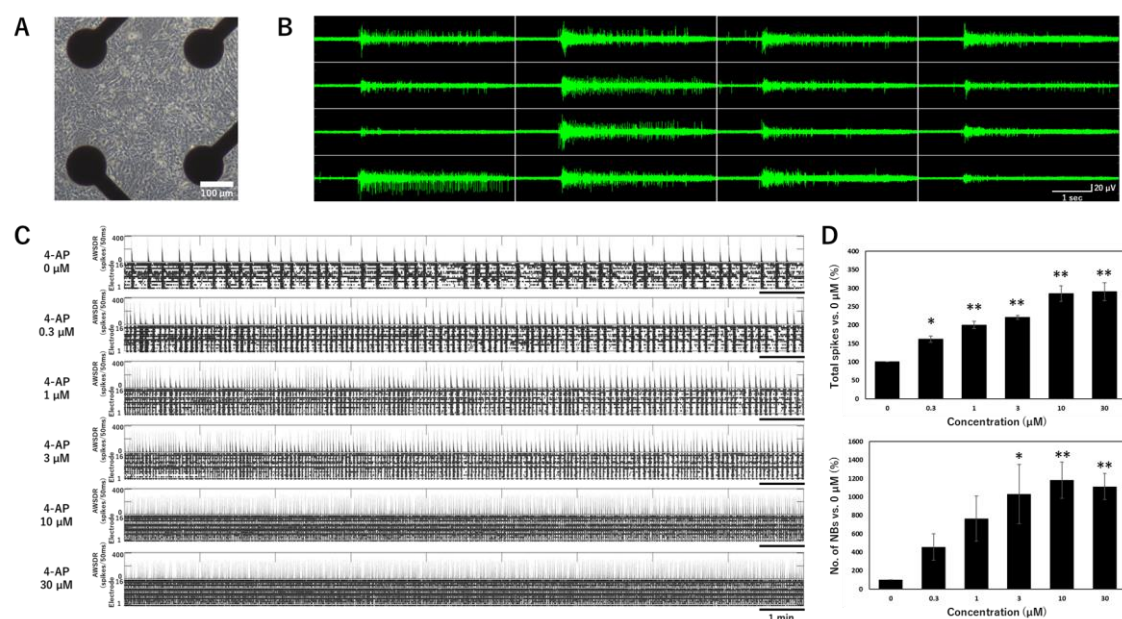


Figure 1 Spontaneous firing in human iPS cell-derived neurons. (A)Phase contrast of neurons cultured on a microelectrode array (MEA) at 5 weeks in vitro (5WIV). (B) Typical action potential waveform of the spontaneous activity measurement at 5 WIV. (C) Raster plot of spikes and array-wide spike detection rate (AWSDR) for 15 min cumulative administration of 4-aminopyridine (4-AP). (D) Total spikes and No. of network bursts (NBs) in cumulative administration of 4-AP (n = 6, one-way ANOVA and Dunnett's test, *p < 0.05, **p < 0.01 vs. 0 μM).

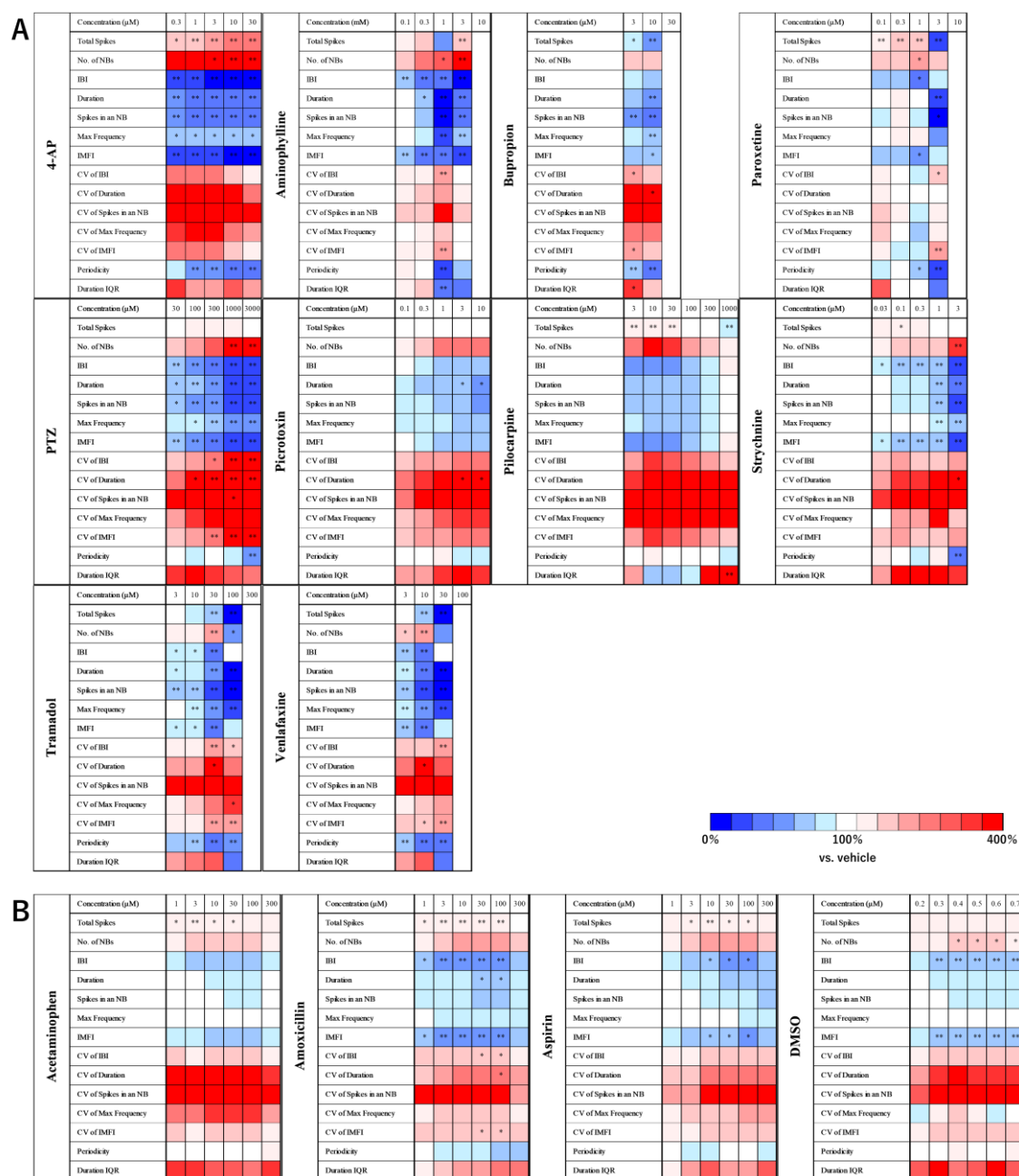


Figure 2 Heatmap of the analytical parameters of seizurogenic drugs and negative compounds. (A) Seizurogenic drugs, 4-AP (n = 6), aminophylline (n = 6), bupropion (n = 6), paroxetine (n = 6), PTZ (n = 7), picrotoxin (n = 8), pilocarpine (n = 6), strychnine (n = 6), tramadol (n = 6), venlafaxine (n = 6), (B) Negative compounds, acetaminophen (n = 6), amoxicillin (n = 6), aspirin (n = 6), DMSO (n = 6). One-way ANOVA followed by Dunnett's test, *p < 0.05, **p < 0.01 vs. vehicle.

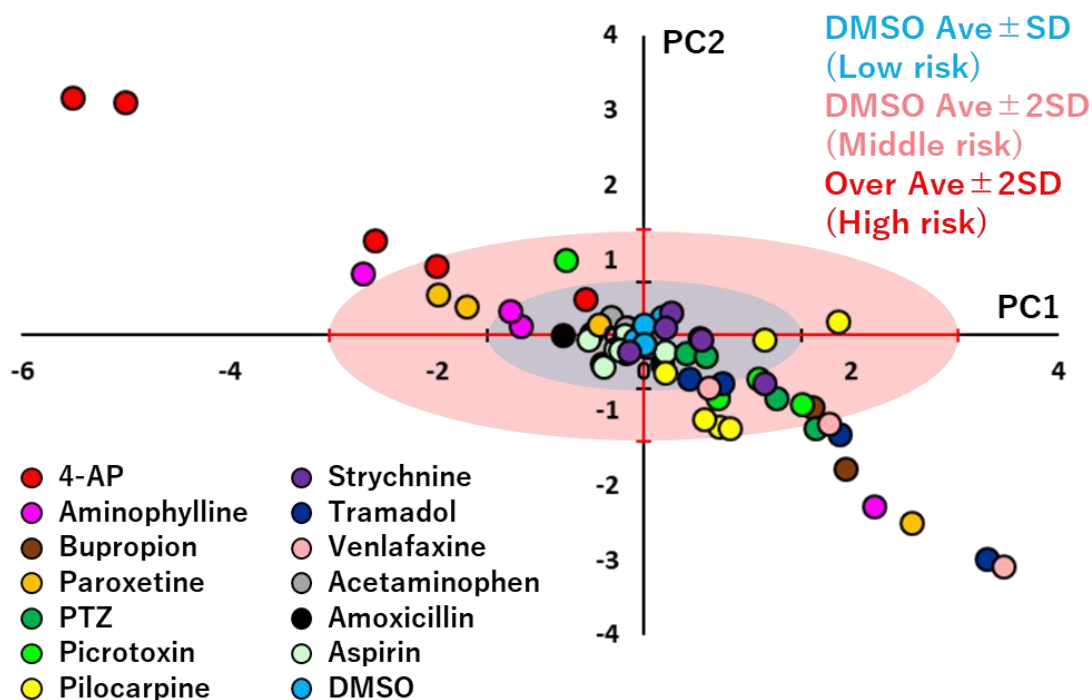


Figure 3 Scatter plots of principal component analysis (PCA) using effective parameter set for remove the effects of DMSO. By comparing each testing compounds with the standard deviation (SD) of DMSO, we predicted seizure liability in quantitatively scale. Low risk for lower than SD range (blue), medium risk for 2xSD (red), and high risk for over 2xSD. Centroid plots of PC1 and PC2 each concentrations of compounds. 4-AP (n = 6), aminophylline (n = 6), bupropion (n = 6), paroxetine (n = 6), PTZ (n = 7), picROTOXIN (n = 8), pilocarpine (n = 6), strychnine (n = 6), tramadol (n = 6), venlafaxine (n = 6), acetaminophen (n = 6), amoxicillin (n = 6), aspirin (n = 6), DMSO (n = 6).

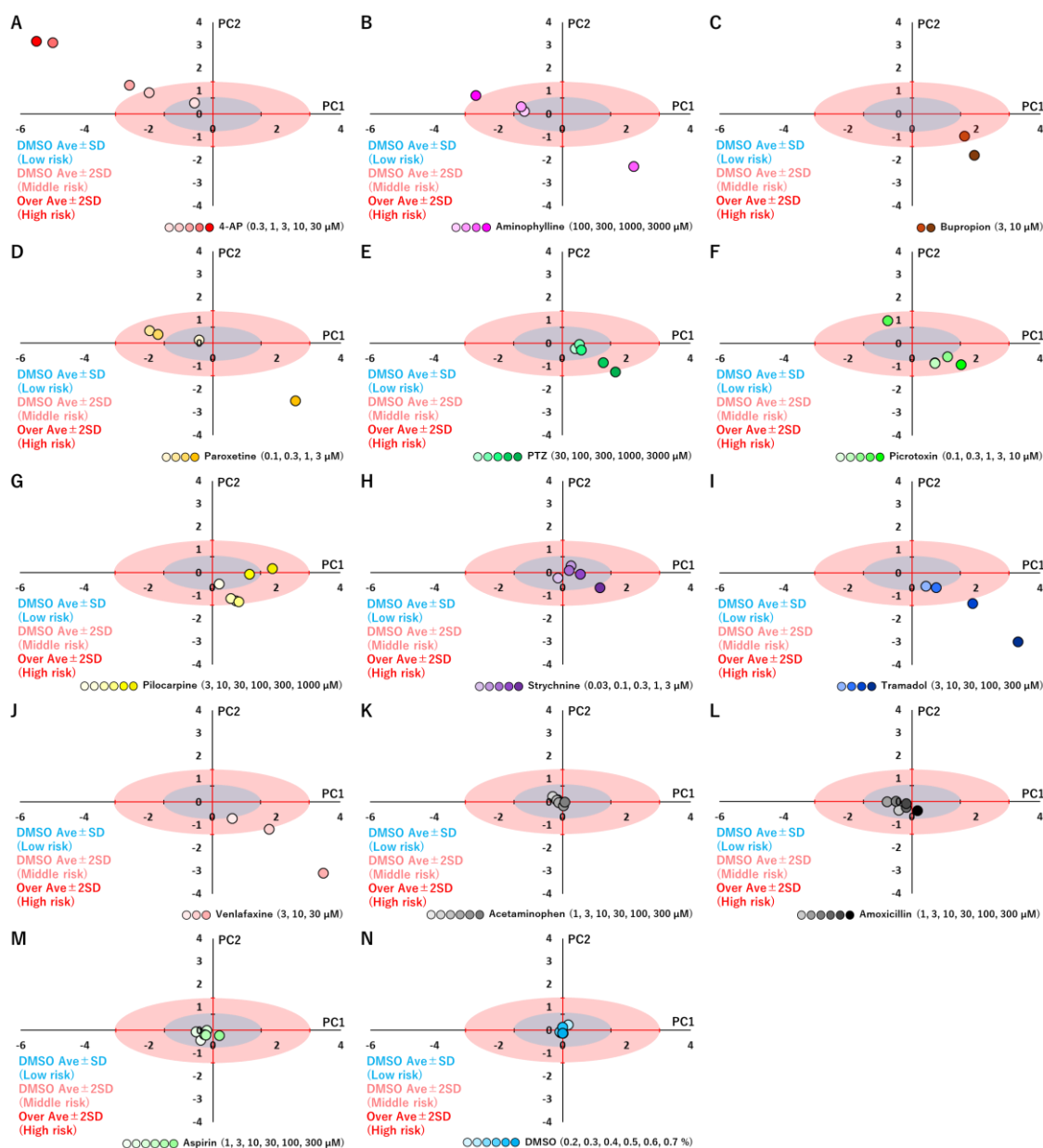


Figure 4 Scatter plots of PCA for seizure liability risk assessment with the SD of DMSO.

Low risk for lower than SD range (blue), medium risk for 2xSD (red), and high risk for over 2xSD.

Centroid plots of PC1 and PC2 each concentrations of compounds. (A) 4-AP (0.3, 1, 3, 10, 30 μ M, $n = 6$), (B) aminophylline (100, 300, 1000, 3000 μ M, $n = 6$), (C) bupropion (3, 10 μ M, $n = 6$), (D) paroxetine (0.1, 0.3, 1, 3 μ M, $n = 6$), (E) PTZ (30, 100, 300, 1000, 3000 μ M, $n = 7$), (F) picrotoxin (0.1, 0.3, 1, 3, 10 μ M, $n = 8$), (G) pilocarpine (3, 10, 30, 100, 300, 1000 μ M, $n = 6$), (H) strychnine (0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 μ M, $n = 6$), (I) tramadol (3, 10, 30, 100, 300 μ M, $n = 6$), (J)

venlafaxine (3, 10, 30 μ M, n = 6), (K) acetaminophen (1, 3, 10, 30, 100, 300 μ M, n = 6), (L) amoxicillin (1, 3, 10, 30, 100, 300 μ M, n = 6), (M) aspirin (1, 3, 10, 30, 100, 300 μ M, n = 6), (N) DMSO (0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7%, n = 6).

	Concentration					
	I	II	III	IV	V	VI
4-AP	Low risk	Middle risk	High risk	High risk	High risk	disappear of NB
Aminophylline	Low risk	Low risk	High risk	High risk	disappear of NB	disappear of NB
Bupropion	Middle risk	High risk	disappear of NB	disappear of NB	disappear of NB	disappear of NB
Paroxetine	Low risk	Middle risk	Middle risk	High risk	disappear of NB	disappear of NB
PTZ	Low risk	Low risk	Low risk	Middle risk	High risk	disappear of NB
Picrotoxin	Middle risk	Middle risk	Middle risk	Middle risk	Middle risk	disappear of NB
Pilocarpine	Low risk	Middle risk	Middle risk	Middle risk	Low risk	Middle risk
Strychnine	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Middle risk	disappear of NB
Tramadol	Low risk	Low risk	Middle risk	High risk	disappear of NB	disappear of NB
Venlafaxine	Middle risk	High risk	High risk	disappear of NB	disappear of NB	disappear of NB
Acetaminophen	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk
Amoxicillin	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk
Aspirin	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk
DMSO	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk

■ Low risk ■ Middle risk ■ High risk
■ disappear of NB not tested

Figure 5 Seizure liability risk assessment with the SD of DMSO. Results of seizure liability risk assessment by PCA. Low risk (blue), middle risk (pink), high risk (red). 4-AP (I: 0.3 μ M, II: 1 μ M, III: 3 μ M, IV: 10 μ M, V: 30 μ M), aminophylline (I: 100 μ M, II: 300 μ M, III: 1000 μ M, IV: 3000 μ M), bupropion (I: 3 μ M, II: 10 μ M, III: 30 μ M), paroxetine (I: 0.1 μ M, II: 0.3 μ M, III: 1 μ M, IV: 3 μ M, V: 10 μ M), PTZ (I: 30 μ M, II: 100 μ M, III: 300 μ M, IV: 1000 μ M, V: 3000 μ M), picrotoxin (I: 0.1 μ M, II: 0.3 μ M, III: 1 μ M, IV: 3 μ M, V: 10 μ M), pilocarpine (I: 3 μ M, II: 10 μ M, III: 30 μ M, IV: 100 μ M, V: 300 μ M, VI: 1000 μ M), strychnine (I: 0.03 μ M, II: 0.1 μ M, III: 0.3 μ M, IV: 1 μ M, V: 3 μ M), tramadol (I: 3 μ M, II: 10 μ M, III: 30 μ M, IV: 100 μ M, V: 300 μ M), venlafaxine (I: 3 μ M, II: 10 μ M, III: 30 μ M, IV: 100 μ M), acetaminophen (I: 1 μ M, II: 3 μ M, III: 10 μ M, IV: 30 μ M, V: 100 μ M, VI: 300 μ M), amoxicillin (I: 1 μ M, II: 3 μ M, III: 10 μ M, IV: 30 μ M, V: 100 μ M, VI: 300 μ M), aspirin (I: 1 μ M, II: 3 μ M, III: 10 μ M, IV: 30 μ M, V: 100 μ M, VI: 300 μ M), DMSO (I: 0.2%, II: 0.3%, III: 0.4%, IV: 0.5%, V: 0.6%, VI: 0.7%).

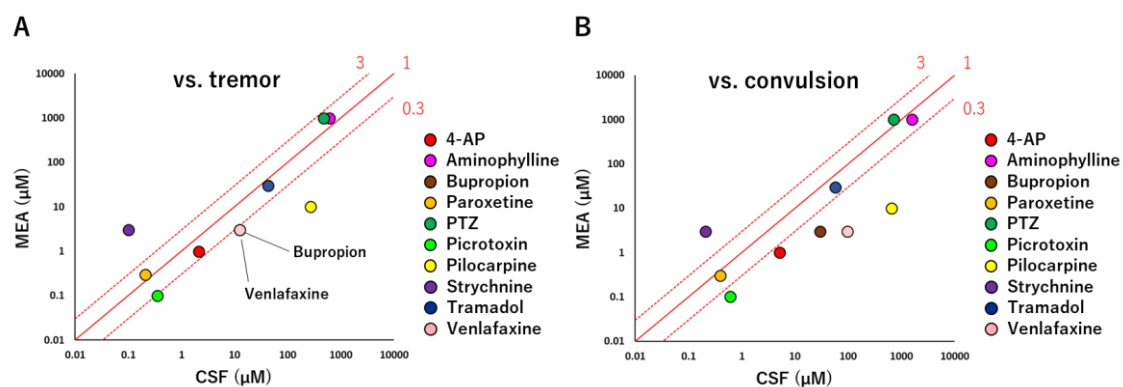


Figure 6 Verification of extrapolation from in vitro to in vivo. Correlation between seizure liability risk-detected concentrations in MEA experiments and CSF concentrations. The red line indicates the concentration ratio. At 0.3–3, MEA and CSF are at same level concentration. (A) Correlation between seizure liability risk-detected concentrations in MEA experiments and rat CSF concentrations during tremor. (B) Correlation between seizure liability risk-detected concentrations in MEA experiments and rat CSF concentrations during convulsion.

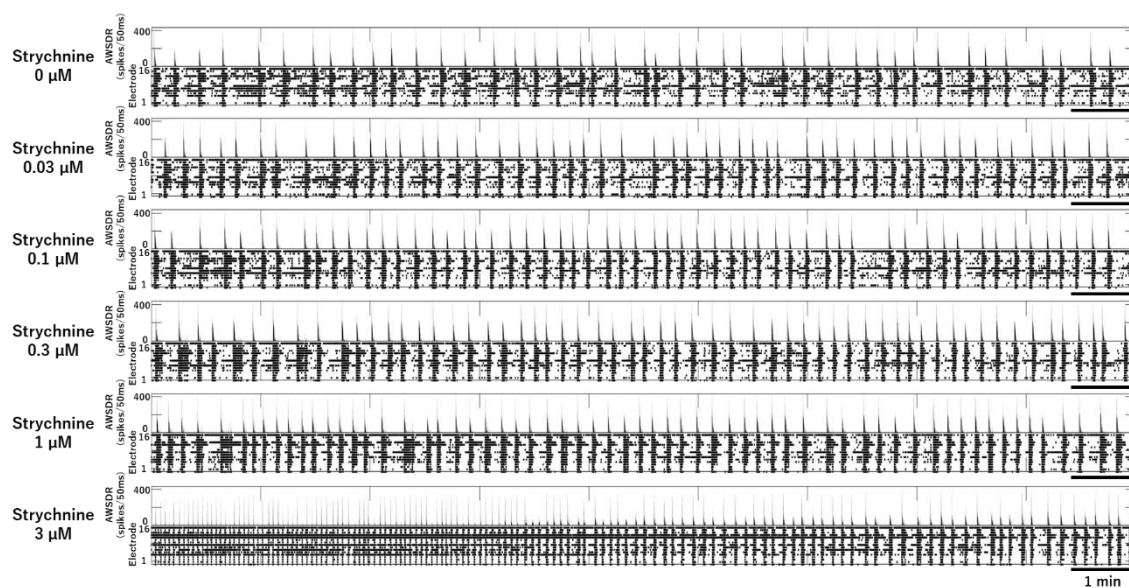


Figure 7 Strychnine responses in human iPS cell-derived neurons. Raster plot of spikes and array-wide spike detection rate (AWSDR) for 15 min cumulative administration of strychnine.

Table 1 Description of analytical parameters.

14 analytical parameters calculated by burst analysis.

Analytical parameter	Description
Total spikes (TS)	The total number of spikes detected on all channels in 15 minutes.
No. of network bursts (No. of NBs)	The number of network bursts in 15 minutes.
Inter burst interval (IBI)	Average time from the end point of network burst to the start point of the next network burst.
Duration of network burst (Duration)	Average duration of network burst.
Spikes in a network burst (Spikes)	Average the number of spikes contained in a network burst.
Max frequency (MF)	Average peak value of the histogram during a network burst.
Inter MF interval (IMFI)	Average time from the peak of network burst to the peak of the next network burst.
CV of IBI	Coefficient of variance of IBI.
CV of Duration	Coefficient of variance of Duration.
CV of Spikes	Coefficient of variance of Spikes.
CV of MF	Coefficient of variance of MF.
CV of IMFI	Coefficient of variance of IMFI.
Periodicity	The periodicity of the neural network activity in measurement time of all.
Duration IQR	Interquartile range of network burst duration.

Table 2 Statistical analysis for PCA using effective parameter set for remove the effects of DMSO. DMSO had not significant differences between each concentration. DMSO 0.2% (n = 6), 0.3% (n = 6), 0.4% (n = 6), 0.5% (n = 6), 0.6% (n = 6), DMSO 0.7% (n = 6). One-way MANOVA, *p < 0.05, **p < 0.01.

	vs. DMSO 0.2%	vs. DMSO 0.3%	vs. DMSO 0.4%	vs. DMSO 0.5%	vs. DMSO 0.6%	vs. DMSO 0.7%
	p value	p value	p value	p value	p value	p value
DMSO 0.2%	—	p = 0.51	p = 0.99	p = 0.98	p = 0.86	p = 0.99
DMSO 0.3%	p = 0.51	—	p = 0.73	p = 0.73	p = 0.97	p = 0.73
DMSO 0.4%	p = 0.99	p = 0.73	—	p = 0.99	p = 0.88	p = 0.99
DMSO 0.5%	p = 0.98	p = 0.73	p = 0.99	—	p = 0.91	p = 0.99
DMSO 0.6%	p = 0.86	p = 0.97	p = 0.88	p = 0.91	—	p = 0.89
DMSO 0.7%	p = 0.99	p = 0.73	p = 0.99	p = 0.99	p = 0.89	—

Table 3 Principal component loadings.

TS, CV of IMFI, and Duration IQR were effective parameter set for remove the effects of DMSO.

	<i>Principal component loadings</i>		
	TS	CV of IMFI	Duration IQR
PC1	-0.60	0.60	0.53
PC2	0.38	-0.37	0.85

Table 4 Comparison of in vivo rat cerebrospinal fluid concentrations and in vitro seizure liability risk-detected concentrations.

Drugs	Tremor		Convulsion		MEA
	CSF	(μ M)	CSF	(μ M)	(μ M)
4-AP		2.12		5.13	1
Aminophylline		605.02		1570.83	1000
Bupropion		12.41		29.84	3
Paroxetine		0.21		0.39	0.3
PTZ		468.26		705.65	1000
Picrotoxin		0.35		0.61	0.1
Pilocarpine		266		656	10 , 1000
Strychnine		0.10		0.21	3
Tramadol		42.14		56.95	30
Venlafaxine		12.58		95.46	3

第 4 章 農薬関連化合物の毒性リスク評価

4-1 序論

本研究で開発した化合物評価法の医薬品以外への応用性の検証を実施した。

疫学的研究などにより、胎生期における化合物曝露は成人における神経系の機能変化との関連が示唆されている (Grandjean and Landrigan, 2014; Smirnova et al, 2014; Bennett et al, 2016)。現在、DNT のハザードは、OECD (OECD, 2007) または米国 EPA (USEPA, 1998) の *in vivo* 試験ガイドラインに従った動物試験に基づいて評価されている。しかし、これらのガイドラインを用いて評価された化合物は、約 180 種類に過ぎない (K.M. Crofton, W.R. Mundy; External scientific report on the interpretation of data from the developmental neurotoxicity *in vitro* testing assays for use in integrated approaches for testing and assessment. EFSA, 2021)。この要因としては、膨大な時間とコストを要すること、げっ歯類からヒトへの外挿が必要であること、毒性メカニズムに関する情報が限られていることなどがあげられる (Tsuji and Crofton, 2012)。従って、DNT をはじめとする神経毒性における化学物質の *in vivo* 評価には限界があると考えられる。この問題を解決するために、NAM を利用した *in vitro* 試験法を開発する戦略が期待されている (Sachana et al. 2019)。神経毒性評価の *In vitro* 試験法の開発は、神経系の複雑な性質と多様な機能のため、あらゆる化学物質によって引き起こされる神経毒性のメカニズムを捉えることは困難であり、現状では *in vivo* における神経毒性評価を代替する *in vitro* 試験法は確立されていない (Bal-Price et al. 2010; Coecke et al. 2006; Zuang et al. 2015)。最近、化学物質試験における OECD ガイドラインとして発達神経毒性の *in vitro* 試験に関するガイダンスが議論されており、複数の *in vitro* 試験を組み合わせる *in vitro* testing battery の考え方が導入されている。

本研究では、化学物質の神経毒性評価における動物実験を代替する *in vitro* 試験法の 1 つとして、MEA 計測によるヒト iPS ニューロンを用いた神経毒性評価法の構築を目的とした。MEA 計測により得られる電気生理学的パラメータを主成分分析し、溶媒添加による神経活性の標準偏差を基準とすることで、化合物添加による過剰な神経活性への影響を定義した。既知の痙攣化合物を MEA における神経毒性の陽性対照として、ヒトへの神経毒性の検証が不十分である農薬関連化合物のヒトへの神経毒性を検証することで、農薬関連化合物でヒトへの神経毒性が認められることを示した。また、農薬の作用機序をもっとも反映するパラメータを使用した主成分分析により、アセチルコリンエステラーゼ阻害、GABAA 受容体阻害、Na チャネル opener である農薬のそれぞれ異なる特徴的な応答が検出され、作用機序推定が可能であることを示した。本研究で実施した MEA 計測によるヒト iPS ニューロンにおける神経毒性評価法はヒト神経に対する農薬の毒性を評価する方法として有効であり、動物実験を代替する化学物質の *in vitro* 神経毒性試験法の 1 つとして期待される。

4-2 方法

4-2-1 ヒト iPS 細胞由来皮質ニューロンの培養

Glutamatergic neurons、GABAergic neurons、Astrocyte (SynFire Co-Culture Kit, Neucyte Inc.) を 7 : 3 : 3.5 の比率で混合し、 8.0×10^5 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 ϕ 3.4mm 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。播種時には Seeding Medium を使用し、培養 1~6 日目は Short-Term Medium を使用し、培養 7 日目以降は Long-Term Medium (SynFire Complete Media Kit, Neucyte Inc.) を使用した。培地交換は 3 日おきに半量交換を行った。

4-2-2 細胞外記録

24-well MEA system (Maestro; Axion Inc.) 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。

4-2-3 薬理試験

培養 5 週のヒト iPS 細胞由来ニューロンにカリウムチャネルブロッカーの 4-AP (0.3, 1, 3, 10, 30 μ M)、GABAA 受容体のアンタゴニストである PTZ (30, 100, 300, 1000, 3000 μ M) および Picrotoxin (0.1, 0.3, 1, 3, 10 μ M)、ムスカリン性アセチルコリン受容体アゴニストの Pilocarpine (0.3, 1, 3, 10, 30 μ M)、グルタミン酸受容体アゴニストの Kainic acid (0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 μ M)、痙攣陰性化合物として Acetaminophen (1, 3, 10, 30, 100 μ M)、農薬関連化合物は Acetamiprid, Clothianidin, Aldicarb, Carbaryl, Fipronil, Deildrin, Lindane, Cypermethrin, Deltamethrin, Permethrin, Fenamidone, Tributyltin をそれぞれ 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μ M、溶媒である DMSO (0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 %) をそれぞれ累積投与し、投与前後 15 分間の自発活動を記録した。

4-2-4 スパイク検出およびネットワークバースト解析

計測データから Mobius software を用いてスパイク検出行った。各電極の活動休止期のベースラインノイズの標準偏差 \pm 530% の閾値を上回るものをスパイクとして検出した。検出したスパイクデータから、4-step method を用いて network burst (NB) の

検出を行った。本研究では、15 分間のスパイク数の総和 (Total spikes)、15 分間の NB の数 (No. of NBs)、IBI、Duration of NB、Spikes in an NB、MF、IMFI、CV of MF、CV of IMFI を算出した。薬理試験データの正規化は、各 well の vehicle 投与時のデータを 100% として行った。

4-2-5 主成分分析

溶媒である DMSO について、ネットワークバースト解析によって得られる 9 個の解析パラメータを行ベクトルの要素にもつすべての well のデータを並べた行列を用意した。1013 個のパラメータセットにより指定された解析パラメータの列を取り出して構成される 1013 個の新たな行列について、それぞれ MATLAB の関数 `pca` を用いて主成分分析した。主成分分析により得られる、第一主成分スコアおよび第二主成分スコアに化合物間で差があるかをパラメータセットごとに MANOVA で検証し、溶媒である DMSO に各濃度間で有意差が認められないパラメータセットを導出した。

4-2-6 毒性リスク評価

主成分分析により算出された各化合物の主成分スコアを DMSO の標準偏差 (SD) 範囲と比較することで、化合物の痙攣リスクを定量的に評価した。具体的には、DMSO の SD 範囲内は低リスク、SD 範囲外の場合は中リスク、2SD 範囲外は高リスクと定義した。ここで「リスク」とは化合物の痙攣誘発の可能性を意味する。

4-3 結果

4-3-1 農薬関連化合物の暴露による解析パラメータの変化

毒性の検出に有効な解析パラメータを同定するために、9 個の解析パラメータを用いて DMSO 投与時を 100%として薬剤投与時と比較したヒートマップを作成した (one way ANOVA, and Dunnett test, Fig. 1)。痙攣陽性化合物はいずれかの解析パラメータで顕著な変化が認められ、とくに Total spikes、No. of NBs が大きく増加した。痙攣陰性化合物および DMSO においても変化が認められたため、DMSO 添加による影響を除去するためのパラメータを導出する必要があることが示唆された。農薬関連化合物は、痙攣陽性化合物と比較して軽微ではあるが、濃度依存的な反応が各パラメータにおいて観察された。また、同じ作用機序を有する Acetamiprid と Clothianidin、Aldicarb と Carbaryl、Fipronil と Dieldrin と Lindane、および Cypermethrin と Deltamethrin と Permethrin は、それぞれ同様の反応性が認められた。

4-3-2 農薬関連化合物の毒性リスク評価

DMSO の影響を除去するためのパラメータセットを決定するために、one-way MANOVA で DMSO の各濃度における第一主成分と第二主成分を比較した。DMSO の各濃度で有意差が認められないパラメータセットが DMSO の影響を除去するために有効なパラメータセットとして探索した結果、Spikes in an NB, MF, CV of MF, CV of IMFI のパラメータセットが導出された。導出されたパラメータセットと主成分負荷量を使用して主成分分析を実施した。

Fig. 2 に各化合物の毒性リスク評価のための主成分分析結果を示す。痙攣陽性化合物は濃度依存的に DMSO の SD 範囲から逸脱する様子が観察されたが、痙攣陰性化合物は DMSO の SD 範囲にとどまる様子が観察された。また、農薬関連化合物は痙攣陽性化合物と比較して変化は小さいが、いずれの農薬関連化合物も濃度依存的に DMSO の SD 範囲から逸脱する様子が観察された。Fig. 3 は SD 範囲内を低リスク (青)、SD 範囲外を中リスク (ピンク)、2SD 範囲外を高リスク (赤)として基準を設定し、化合物の毒性リスク評価を実施した結果を示している。4-AP のリスクは $0.3 \mu\text{M}$ で検出され、リスクは濃度依存的に増加した。Kainic acid のリスクは $0.03 \mu\text{M}$ で検出され、リスクは濃度依存的に増加した。PTZ のリスクは $300 \mu\text{M}$ で検出され、リスクは濃度依存的に増加した。Picrotoxin のリスクは $0.1 \mu\text{M}$ で検出された。Pilocarpine のリスクは $0.3 \mu\text{M}$ で検出され、リスクは濃度依存的に増加した。陰性化合物では濃度が増加しても、リスクの増加は検出されなかった。農薬関連化合物は Acetamiprid が $100 \mu\text{M}$, Clothianidin が $100 \mu\text{M}$, Aldicarb が $0.1 \mu\text{M}$, Carbaryl が $1 \mu\text{M}$, Fipronil が $10 \mu\text{M}$, Dieldrin が $10 \mu\text{M}$, Lindane が $0.01 \mu\text{M}$, Cypermethrin が $1 \mu\text{M}$, Deltamethrin が $0.1 \mu\text{M}$, Permethrin が $1 \mu\text{M}$, Fenamidone が $1 \mu\text{M}$, Tributyltin が $1 \mu\text{M}$ で毒性リスクが

検出された。

4-3-3 農薬関連化合物の作用機序推定

農薬関連化合物の作用機序分類に有効なパラメータセットを決定するために、one-way MANOVA で農薬関連化合物における第一主成分と第二主成分を比較した。同じ作用機序を有する農薬関連化合物間に有意差が認められないパラメータセットが作用機序を分類するために有効なパラメータセットとして探索した結果、Spikes in an NB, MF のパラメータセットが導出された。導出されたパラメータセットと主成分負荷量を使用して主成分分析を実施した (Fig. 4)。コリン系化合物である Acetamiprid, Clothianidin, Carbaryl は変化が小さく、原点近傍で少し左下に遷移した。GABA_A 受容体阻害である Fipronil, Deildrin は左下に大きく遷移した。Na チャネル opener である Cypermethrin, Deltamethrin は左上に大きく遷移した。

次に、作用機序推定が可能であるかを検証するために、パラメータセットの導出には使用していない農薬関連化合物として Aldicarb, Lindane, Permethrin の主成分分析を実施し、先述の農薬関連化合物と比較することで作用機序を推定した。Aldicarb はコリン系化合物として、Acetamiprid, Clothianidin, Carbaryl と同様の変化を示し、作用機序推定が可能であった。Lindane は GABA_A 受容体阻害として、Fipronil, Deildrin と同様の変化を示し、作用機序推定が可能であった。Permethrin は Na チャネル opener として、Cypermethrin, Permethrin と同様の変化を示し、作用機序推定が可能であった。

4-4 考察

本章では、第 3 章で開発した化合物評価法の医薬品以外への応用性を検証するために、農薬関連化合物をターゲットとして毒性リスク評価を実施した。

本研究では、農薬のヒトへの神経毒性を検討するために、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの MEA 計測により、農薬の神経活動への影響を評価した。MEA データから算出された電気生理学的パラメータの主成分分析することで神経活動への影響を評価し、既知の痙攣陽性化合物による神経活動への影響と比較することで、いくつかの農薬による神経活動への影響は痙攣陽性化合物と同等であることが示された。また、農薬の作用機序をもっとも反映するパラメータを使用した主成分分析により、農薬の作用機序推定を検討した。アセチルコリンエステラーゼ阻害、GABAA 受容体阻害、Na チャネル opener である農薬のそれぞれ異なる特徴的な応答が検出され、農薬の作用機序推定が可能であることが示された。

MEA 計測による化合物評価では、細胞の種類によって溶媒添加の影響を受けることがある。この研究においてもヒト iPS 細胞由来ニューロンに対する DMSO の添加による神経活動の変化が観察された (Fig. 1)。したがって、化合物による神経活動への影響を正確に評価するためには、溶媒添加による影響を取り除く必要がある。この問題を解決するために 9 個の解析パラメータから溶媒の影響を排除した評価が可能な解析パラメータの組み合わせを探索した (Table 3)。これらのパラメータを使用した主成分分析では DMSO による有意な濃度依存性の変化は観察されず、溶媒の影響を受けずに化合物の評価が可能となった。

Acetamiprid、Clothianidin はネオニコチノイドに属する農薬であり、ニコチン性アセチルコリン受容体のアゴニストである (Brown et al. 2016; Tan et al. 2007)。ネオニコチノイドは殺虫剤として広く使用されており (Jeschke et al. 2011; Casida and Durkin 2013)、哺乳類の受容体に対しては親和性が低くなるように設計されている (Tomizawa et al. 2000; Casida 2018)。規制研究においても、ラットによるネオニコチノイドへの耐性が示されているが、いくつかの研究では哺乳類に対するネオニコチノイドの影響が示されており (Abou-Donia et al. 2008; Gibbons et al. 2015; Burke et al. 2018; Berheim et al. 2019; Thompson et al. 2020)、ヒトのニューロンに対する影響が十分に評価されていないと言える。ヒトドーパミンニューロンを用いた Ca イメージングとパッチクランプの研究では 100 μ M の Acetamiprid と Clothianidin による影響が報告されている (Loser et al. 2021)。本研究では Acetamiprid、Clothianidin とともに 100 μ M で過剰な神経活性が検出された。先行研究と一致する濃度で過剰な神経活性が検出されたことから、本研究で実施した MEA における神経毒性評価でネオニコチノイドのヒト神経への毒性評価が可能であり、ネオニコチノイドがヒト神経に対して毒性を有することが示された。

Aldicarb、Carbaryl はカーバメートに属する農薬であり、コリンエステラーゼ阻害剤である。Carbaryl による生体の組織レベルにおけるコリンエステラーゼ活性の情報は不足しており (Herr et al. 2010)、ヒトに対する影響が十分に評価されていないと言える。ラット皮質神経の MEA 計測の研究では $1\text{ }\mu\text{M}$ から $10\text{ }\mu\text{M}$ の Carbaryl により発火頻度が減少し、カーバメートによる神経活動への影響が報告されている (Mack et al. 2014)。本研究では $1\text{ }\mu\text{M}$ 以上の Carbaryl で過剰な神経活性への影響が検出され、 $100\text{ }\mu\text{M}$ で発火とネットワークバーストが消失した。先行研究と一致する反応が検出されたことから、本研究で実施した MEA における神経毒性評価でカーバメートに属するコリンエステラーゼ阻害剤のヒト神経への毒性評価が可能であり、殺虫剤として使用されるコリンエステラーゼ阻害剤がヒト神経に対して毒性を有することが示された。

Dieldrin、Lindane は有機塩素系に属する農薬であり、GABAA 受容体のアンタゴニストである。Fipronil はフェニルピラゾールに属する農薬であり、おなじく GABAA 受容体のアンタゴニストである。ラットの *in vivo* 実験の研究では Lindane による GABAA 受容体の阻害により、ニューロンの発火率が増加することで発作を引き起こすことが報告されている (Vucević et al. 2008)。皮質神経の MEA 計測の研究では Lindane がネットワーク活動を変化させることが報告されている (Mack et al. 2014; Wallace et al. 2015)。また、PBPK モデルを使用した Lindane の発作誘発濃度の研究では、ヒトとラットの発作誘発濃度が類似していることが報告されており、さらに、*in vitro* MEA の結果がヒトにおける *in vivo* 用量反応を反映していることを示している (Croom et al. 2015)。本研究においても、同じ濃度レベルの Lindane による過剰な神経活性への影響が検出されたことから、本研究で実施した MEA における神経毒性評価で殺虫剤として使用される GABAA 受容体アンタゴニストのヒト神経への毒性評価が可能であることが示された。

Cypermethrin、Deltamethrin、Permethrin はピレスロイドに属する農薬であり、Na チャネル opener である。ピレスロイドはピレトリンの構造に基づいて設計された合成殺虫剤であり、化学構造と中毒症状の違いにより 2 つのタイプに分類され、Cypermethrin、Deltamethrin は Type-2、Permethrin は Type-1 に分類される (Soderlund et al. 2002)。ラット皮質神経の MEA 計測の研究では、Cypermethrin、Deltamethrin、Permethrin を含む 6 つのピレスロイドに対する応答を詳細に解析し、低濃度で発火頻度、バースト頻度を上昇させ、高濃度で減少させる特徴を共通して有することを報告している。さらに、この特徴は Type-1 ピレスロイドと比較して、Type-2 ピレスロイドの方がより強力であることも明らかにしている (Baskar and Murthy 2018)。本研究のピレスロイドに対するヒト iPS ニューロンの応答においても、低濃度で発火頻度、バースト頻度を上昇させ、高濃度で減少させる特徴が認められ、さらに、Type-1 ピレスロイドと Type-2 ピレスロイドの関係性も一致していた。先行研究と一致する神経活性が検出されたことから、本研究で実施した MEA における神経毒性評価で

ピレスロイドのヒト神経への毒性評価が可能であり、ピレスロイドがヒト神経に対して毒性を有することが示された。

主成分分析により農薬の作用機序推定を実施した結果では、アセチルコリンエステラーゼ阻害、GABAA 受容体阻害、Na チャネル opener である農薬のそれぞれ異なる特徴的な応答が検出され、農薬の作用機序推定が可能であることが示された。主成分負荷量から、GABAA 受容体阻害作用を有する化合物では **Spikes in an NB** の変化よりも **MF** の変化量が大きく、Na チャネル opener では **MF** の変化よりも **Spikes in an NB** の変化量が大きいという特徴を見出すことができ、これらのパラメータ値のバランスに化合物の作用機序が反映されていることが示唆された。一方で、アセチルコリン受容体アゴニストとアセチルコリンエステラーゼ阻害剤で同様の反応性を示したことは興味深い。アセチルコリンエステラーゼが阻害されることでアセチルコリンの量が増え、アセチルコリン受容体アゴニストと同様のふるまいが観察されたと考えられる。

この研究にはいくつかの制限がある。**MEA** による薬理試験では累積投与を行ったが、神経伝達物質受容体またはイオンチャネルの脱感作が懸念される化合物については、累積投与を避ける必要がある。本研究においても、化合物に対する応答にいくらかの影響があるかもしれないが、化合物による過剰な神経活性に対する影響を検出するには許容できるレベルだった。累積投与はスループットを改善し、コストを削減するという利点がある。ただし、評価する化合物の特徴を考慮したうえで実施する必要がある。また、この研究では限られた数の化合物のみを評価した。今後の研究では、より多くの種類の化合物を調査する必要がある。

ヒト iPS 細胞由来ニューロンの **MEA** 計測により、農薬の神経活動への影響を評価した結果、既知の痙攣陽性化合物による神経活動への影響と比較することで、いくつかの農薬による神経活動への影響は痙攣陽性化合物と同等であることが示された。また、農薬の作用機序をもっとも反映するパラメータを使用した主成分分析により、農薬の作用機序推定を検討した結果、アセチルコリンエステラーゼ阻害、GABAA 受容体阻害、Na チャネル opener である農薬のそれぞれ異なる特徴的な応答が検出され、農薬の作用機序推定が可能であることが示された。本研究で実施した **MEA** 計測によるヒト iPS ニューロンにおける神経毒性評価法はヒト神経に対する農薬の毒性を評価する方法として有効であり、動物実験を代替する化学物質の **in vitro** 神経毒性試験法の 1 つとして期待される。

4-5 結論

本章では、開発した化合物評価法の医薬品以外の化合物への有効性の検証を目的として、農薬関連化合物をターゲットとした評価を実施した。ヒト iPS 細胞由来神経細胞に農薬関連化合物を投与することで、各農薬関連化合物の作用機序に応じた異なる神経活動の変化が検出された。また、ヒト iPS 細胞由来神経ネットワークにおける電気生理学的応答を指標とした主成分分析による農薬関連化合物の毒性リスク評価を実施した結果、いずれの農薬関連化合物においても濃度依存的な毒性リスクの上昇が観察された。さらに、農薬関連化合物の作用機序分類に有効なパラメータセットを導出することで、農薬関連化合物の作用機序を推定することに成功した。本研究で用いた神経ネットワークの電気生理学的応答と多変量解析法を組み合わせることで、これまで実施してきた医薬品の毒性リスク評価だけではなく、農薬関連化合物の評価系として応用可能であると考えられ、本研究で開発した化合物評価法のさらなる評価対象の拡大に期待できる。

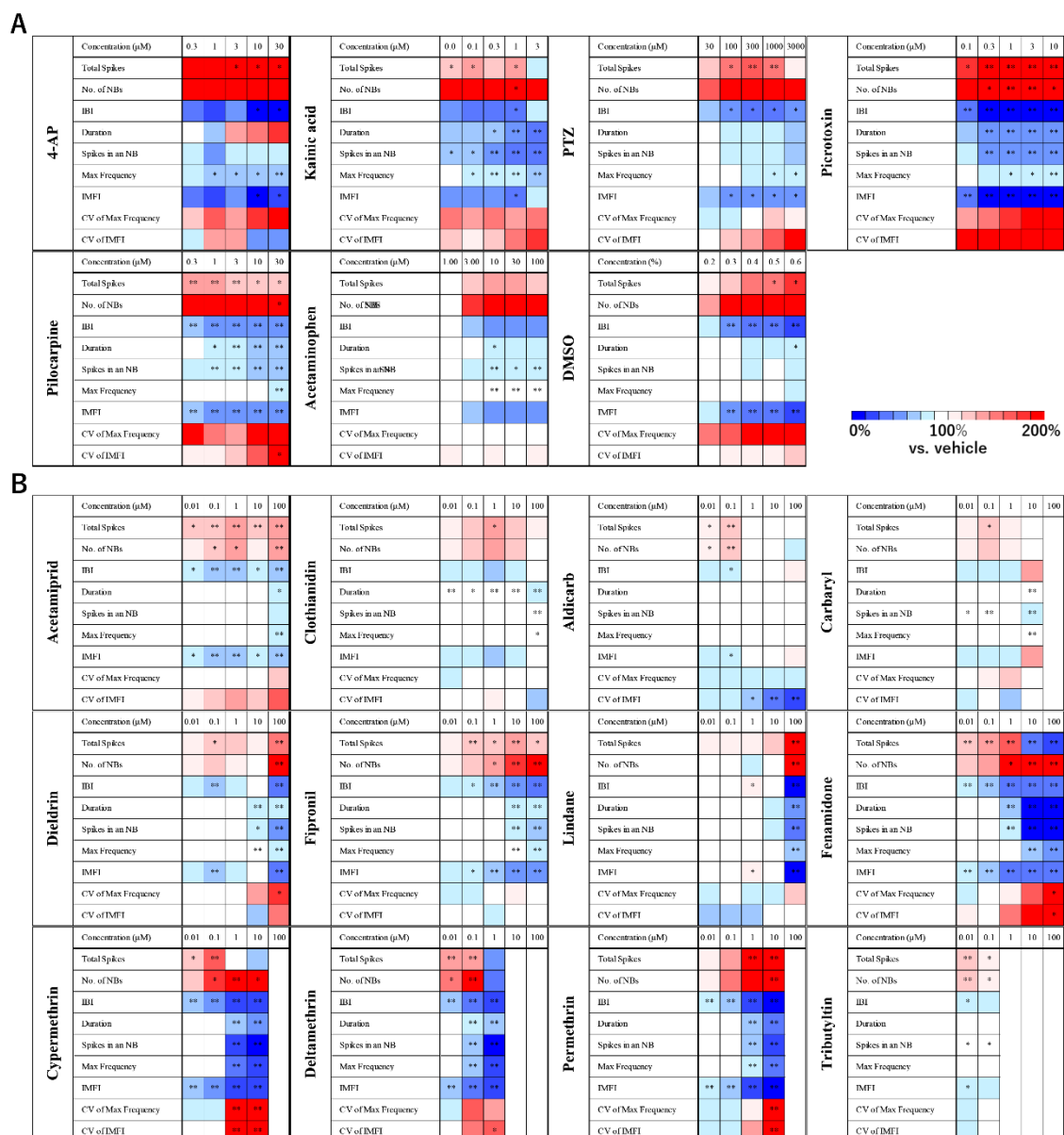


Figure 1 Heatmap of the analytical parameters of seizurogenic drugs and pesticides. (A) Seizurogenic drugs and negative compounds, 4-AP (n = 6), kainic acid (n = 6), PTZ (n = 6), picrotoxin (n = 6), pilocarpine (n = 7), acetaminophen (n = 8), DMSO (n = 6), (B) pesticides, acetamiprid (n = 6), clothianidin (n = 6), aldicarb (n = 6), carbaryl (n = 6), dieldrin (n = 6), fipronil (n = 6), lindane (n = 6), fenamidone (n = 6), cypermethrin (n = 6), deltamethrin (n = 6), permethrin (n = 6), tributyltin (n = 6). One-way ANOVA followed by Dunnett's test, *p < 0.05, **p < 0.01 vs. vehicle.

第 4 章 農薬関連化合物の毒性リスク評価

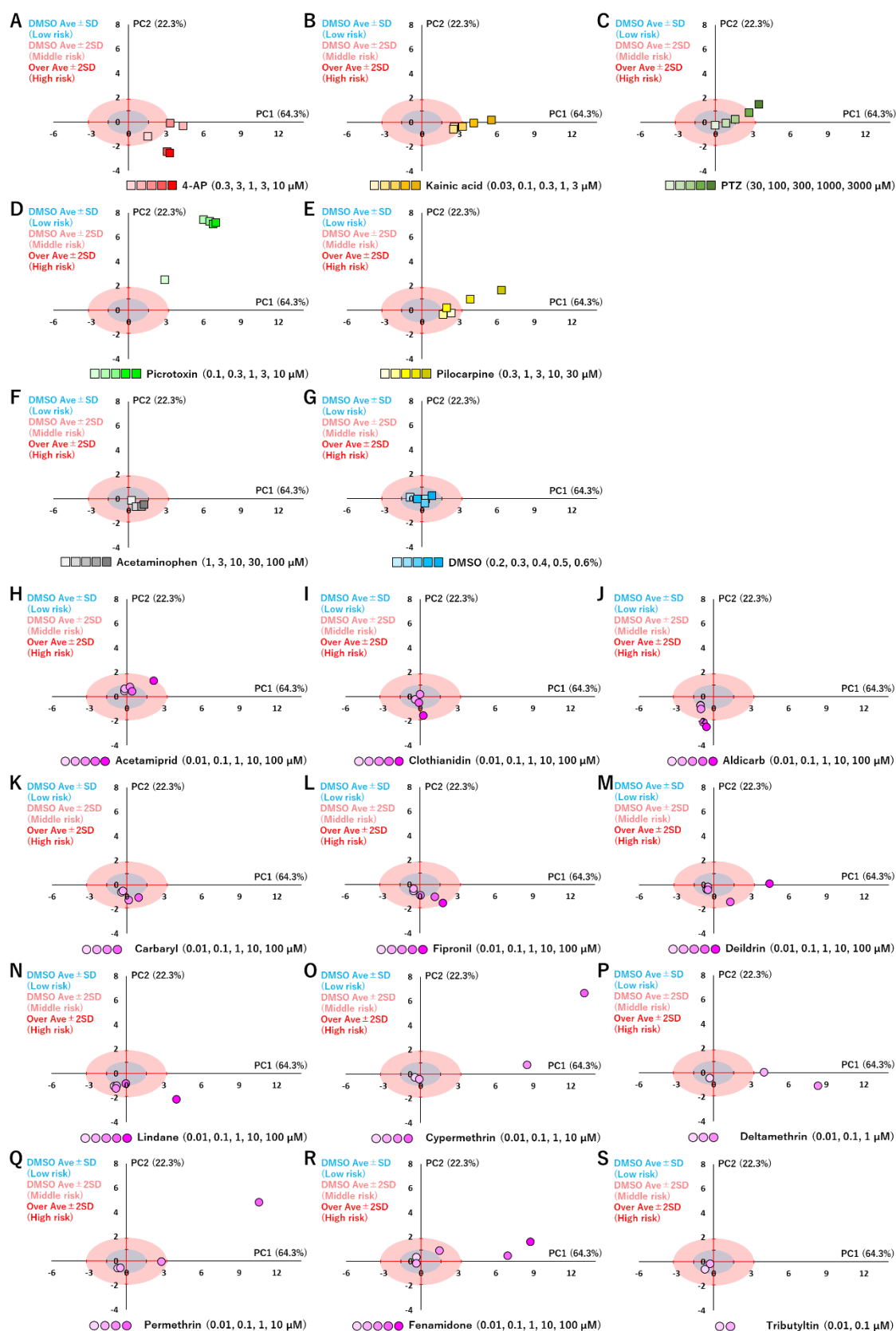


Figure 2 Scatter plots of PCA for toxicity risk assessment with the SD of DMSO.

Low risk for lower than SD range (blue), medium risk for 2xSD (red), and high risk for over 2xSD. Centroid plots of PC1 and PC2 each concentrations of compounds. (A) 4-AP, (B) kainic acid, (C) PTZ, (D) picrotoxin, (E) pilocarpine, (F) acetaminophen, (G) DMSO, (H) acetamiprid, (I) clothianidin, (J) aldicarb, (K) carbaryl, (L) fipronil, (M) deildrin, (N) lindane, (O) cypermethrin, (P) deltamethrin, (Q) permethrin, (R) fenamidone, (S) tributyltin.

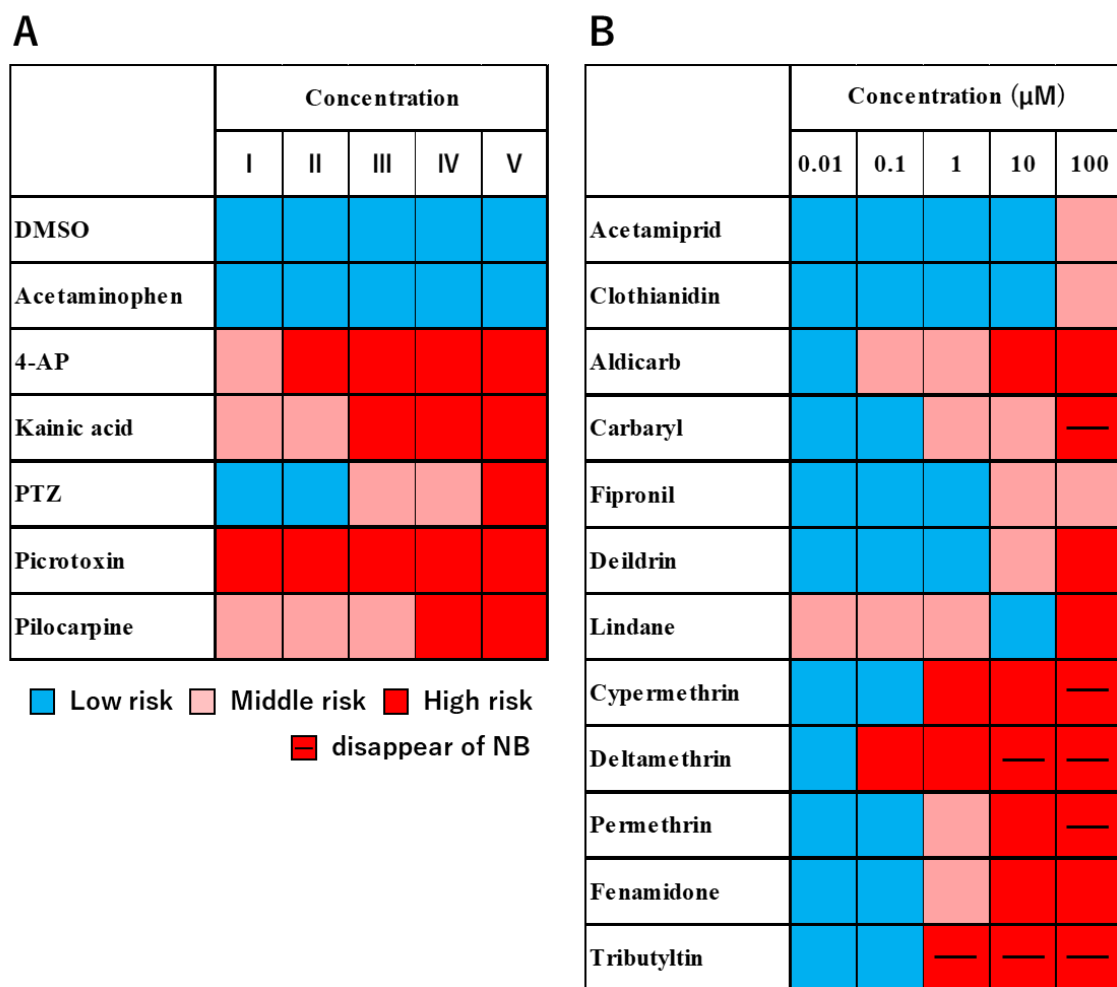


Figure 3 Toxicity risk assessment with the SD of DMSO. Results of toxicity risk assessment by PCA. Low risk (blue), middle risk (pink), high risk (red). DMSO (0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 %), acetoaminophen (I: 1 μM, II: 3 μM, III: 10 μM, IV: 30 μM, V: 100 μM), 4-AP (I: 0.3 μM, II: 1 μM, III: 3 μM, IV: 10 μM, V: 30 μM), kainic acid (I: 0.03 μM, II: 0.1 μM, III: 0.3 μM, IV: 1 μM, V: 3 μM), PTZ (I: 30 μM, II: 100 μM, III: 300 μM, IV: 1000 μM, V: 3000 μM), picrotoxin (I: 0.1 μM, II: 0.3 μM, III: 1 μM, IV: 3 μM, V: 10 μM), pilocarpine (I: 0.3 μM, II: 1 μM, III: 3 μM, IV: 10 μM, V: 30 μM).

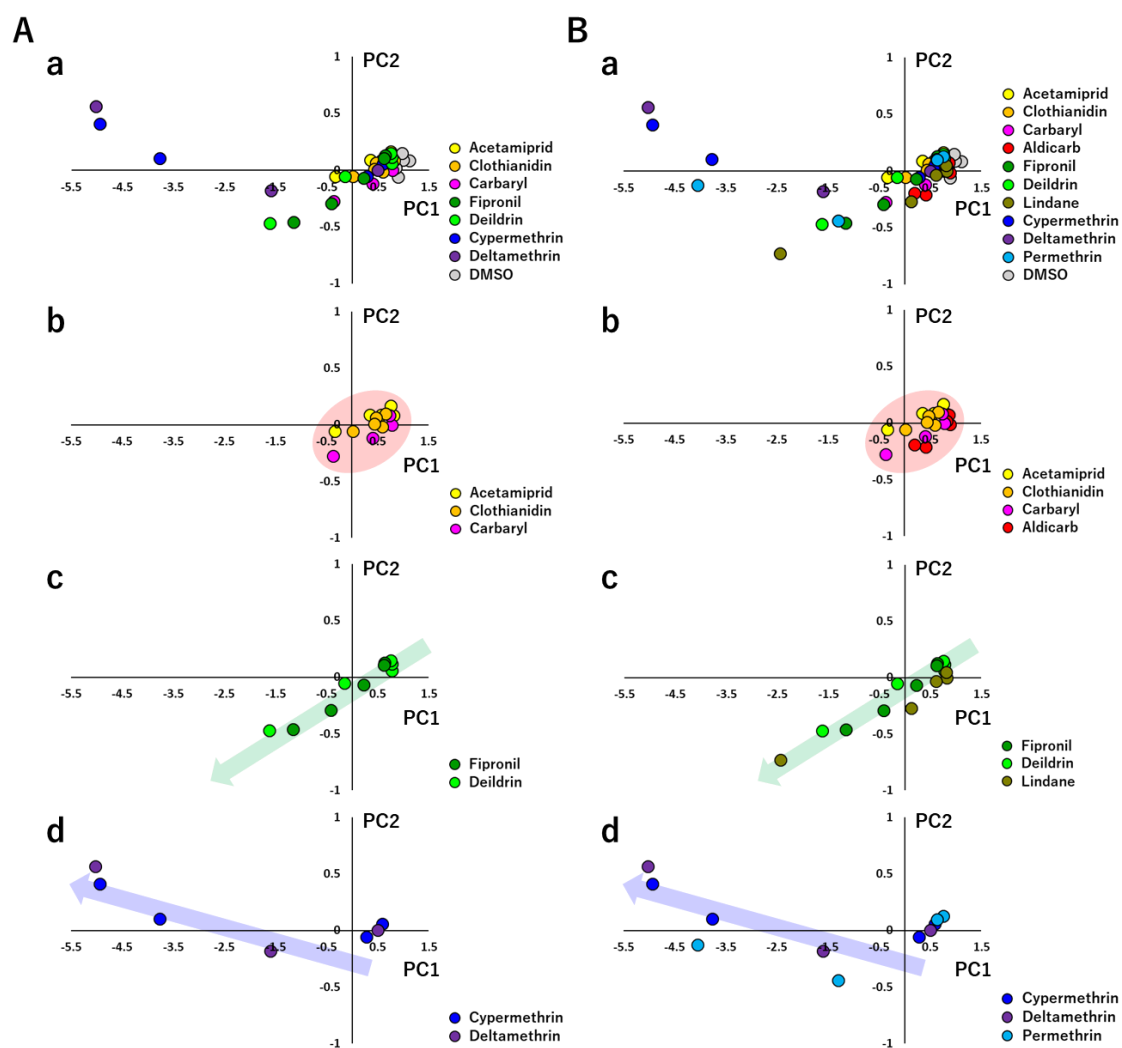


Figure 4 Scatter plots of PCA for predicting mechanism of action.

(A) original data. (A-a) all compounds. (A-b) choline compounds. (A-c) GABA_A receptor antagonists. (A-d) Na channel openers. (B) varification data. (B-a) all compounds. (B-b) choline compounds. (B-c) GABA_A receptor antagonists. (B-d) Na channel openers.

第 5 章 抗菌薬関連脳症のタイプ分類

5-1 序論

抗菌薬関連脳症 (Antibiotic Associated Encephalopathy ; AAE)は抗菌薬投与によって引き起こされる中枢神経障害である。ICU においてせん妄や脳症が見られる症例は 80%に及ぶことが知られており(Inouye et al., 2014)、薬剤が原因と考えられる割合は 12~39%程度である(Alagiakrishnan & Wiens, 2004)。AAE は、敗血症性脳症などの原疾患との鑑別、他の原因による脳症との鑑別が困難な場合が多いだけでなく、重篤な経過を辿る場合があるため、その特徴を同定し、原因の解明と予防につなげることが重要である。また、抗菌薬の開発においても、開発品の AAE リスクや引き起こされる AAE の症状を把握することは重要な課題である。

各抗生物質の臨床的特徴や脳波変化、画像所見をまとめたシステマティックレビューの結果から、AAE は 3 つのタイプに分類されている(Bhattacharyya et al., 2016)。タイプ 1 は、ミオクローヌス発作、てんかん波が生じ、頭部 MRI は正常であるが、脳波異常が認められることが知られている。該当する抗生物質はペニシリン、セファロスポリン系抗菌薬である。タイプ 2 にはキノロン系、マクロライド系、S/T 合剤であり、投与開始後数日以内に幻覚や妄想等の精神症状を発症することが特徴である。タイプ 3 は 5-ニトロイミダゾール誘導体であるメトロニダゾールであり、小脳失調が主体である。

先行研究においてセフェピム脳症の患者ではトライハイネックとよばれる脳波が示されたことから(Tamune et al., 2019)、各抗菌薬において特徴的な電気活動が疾患形成に関与している可能性が考えられる。これまで抗菌薬による脳症の解析手法として脳波解析が行われてきたが、各抗菌薬が神経機能に与える影響については不明瞭なままである。

本章では、ヒト iPS 細胞由来神経ネットワークの MEA 計測により取得した電気活動から、既知の抗菌薬について臨床に基づく抗菌薬の AAE タイプを評価可能とすることで、抗菌薬開発における AAE 評価の課題解決を目的とした。抗菌薬投与時の電気生理学的特徴を抽出し、神経ネットワークの同期的活動を指標とした主成分分析を行うことによって、各抗菌薬を臨床で報告されている AAE に基づいた 3 つのタイプに分類することを試みた。

5-2 方法

5-2-1 ヒト iPS 細胞由来皮質ニューロンの培養

ヒト iPS 細胞から分化させた Glutamatergic neuron と GABAergic neuron と Astrocyte(SynFire Co-Culture Kit, Neucyte Inc.)を 7 : 3 : 3.5 の割合で混合したものを、ポリエチレンイミン (Sigma) およびラミニン-511 (Nippi) でコートした MEA プレート(MEA; M768-tMEA-48B, AXION Biosystems)を用いて、1 ウェルあたり 16 チャンネル、 8.0×10^5 cells/cm² で培養した。培地は SynFire Complete Media Kit (2010-20; Neucyte, Inc.)を使用し、播種時に Seeding Medium、培養 1 日目～6 日目に Short-Term Medium、培養 7 日目以降に Long-Term Medium を用いて培養した。

5-2-2 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)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。

5-2-3 薬理試験

薬理試験は培養から培養 5 週目に行った。MEA 上に構築した神経ネットワークに対する抗菌薬投与の影響を評価するために、Type 1 に分類される Cefepime(C242750, Toronto Research Chemicals Inc, ; n=5)、Cefoxitin(1098107, United States Pharmacopeial Convention, Inc, ; n=6)、Ampicillin(016-23301, FUJIFILM Wako ; n=6)、Type 2 に分類される Norfloxacin(142-06391, FUJIFILM Wako ; n=5)、Ofloxacin(157-02981, FUJIFILM Wako ; n=6)、Nalidixic acid(147-09641, FUJIFILM Wako ; n=7)、Clarithromycin(032-17871, FUJIFILM Wako ; n=6)、ST mixture[Sulfamethoxazole(S0361, TCD: Trimethoprim(T2286, TCI ; n=5)の重量比が 5 : 1 となるように混合して使用, n=4)、Trimethoprim(n=5)、Penicillin G Procaine(1502552 United States Pharmacopeial Convention, Inc, ; n=5)、Type 3 に分類される Metronidazole(132-18061, FUJIFILM Wako ; n=8)、Secnidazole(S1810, LKT Labs, Inc, ; n=6)、Tinidazole(T3454, LKT Labs, Inc, ; n=6)を 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M, 100 μ M, 300 μ M, 1 mM でそれぞれ累積投与した。各薬剤は Dimethyl Sulfoxide (DMSO; D2660-100ML; Sigma-Aldrich)に溶解し、培養液で希釈した。各ウェルの薬剤投与前の自発活動、vehicle(0.1% DMSO)投与後の自発活動、各薬剤の自発活動をそれぞれ 10 分間記録した。

5-2-4 スパイク検出およびネットワークバースト解析

計測データから Mobius software を用いてスパイク検出行った。各電極の活動休止期のベースラインノイズの標準偏差 $\pm 530\%$ の閾値を上回るものをスパイクとして検出した。検出したスパイクデータから、4-step method を用いて network burst (NB) の検出を行った。本研究では、10 分間のスパイク数の総和 (Total spikes)、10 分間の NB の数 (No. of NBs)、NB の終了時間から次の NB の開始までの時間 (Inter Burst Interval : IBI)、NB の期間 (Duration of NB)、NB 期間に検出されたスパイク数 (Spikes in a NB)、NB 内の発火頻度のピーク値 (Max Frequency : MF)、MF が検出された時間から次の MF が検出されるまでの時間 (Inter MF Interval : IMFI)、MF の変動係数 (CV of MF)、IMFI の変動係数 (CV of IMFI) の 9 つの解析パラメータに、本研究で新規に構築した NB の周期性を指標とした Periodicity を加えた 10 個の解析パラメータで化合物投与時の神経ネットワークの応答を評価した。MF は、10 分の計測時間で検出された各 NB から bin size = 100 msec ごとのスパイク数を算出し、その中の最大発火数を平均した値である。単位時間当たりの spike 数であるため、frequency とした。例えば、10 分間に 10 個の NB が検出されたとき、10 個の NB それぞれについて、最大発火数を算出する。この 10 個の値を平均したものを MF とした。薬理試験データの正規化は、各 well の vehicle 投与時のデータを 100% として行った。解析パラメータの内、Total Spikes、No. of NBs、Inter Burst Interval、Duration of NB、Spikes in a NB は 4-step method ソフトウェアで算出され、MF、CV of MF、IMFI、CV of IMFI、Periodicity は MATLAB で算出された。

5-3 結果

5-3-1 ヒト iPS 細胞由来神経ネットワークにおける自発活動計測および薬理応答

各抗菌薬が神経ネットワークに対して与える影響を評価する為に、MEA 上にヒト iPS 細胞由来ニューロンを培養し(Fig. 1A), 自発活動の計測を行った結果、SN 比高く電気活動を検出することができた(Fig. 1B)。Fig. 1C は抗菌薬投与時の電気生理学的応答を示している。薬剤投与前、投与後においてシナプス伝達を介した同期バースト発火が観察された。痙攣発作が特徴である Type1 AAE に分類される薬剤 (Cefoxitin、Ampicillin) の投与により、神経ネットワークの同期活動頻度が用量依存的に増加することが示唆された。また、精神病症状が特徴である Type2 AAE に分類される薬剤 (Norfloxacin、Clarithromycin) の投与では、低用量から中用量において同期活動頻度の増加が見られるが、Norfloxacin では 1 mM において、Clarithromycin では 100 μ M において同期活動頻度および発火頻度が減少しており、高用量では神経ネットワークに対して異なる作用を示すことが示唆された。小脳症状が特徴である Type3 AAE に分類される薬剤 (Metronidazole) の投与により、低用量から中用量まで同期活動頻度が増加し、高用量 (1mM) では減少した。以上の結果から Type1 AAE に分類される薬剤と Type2, Type3 AAE に分類される薬剤では薬剤濃度の変化に伴って神経ネットワークに対して異なる影響を与えることが示唆された。

5-3-2 作用機序の異なる化合物における解析パラメータの変化

上記の実験で得られた AAE の各 Type の電氣的応答をより詳細に解析するために、各抗菌薬の特徴を検出するのに有効な解析パラメータの同定を行った。9 個の解析パラメータを用いて DMSO 投与時を 100%として薬剤投与時と比較したヒートマップを作成した (one way ANOVA, and Dunnett test)。Total Spikes は 10 分間にすべてのチャンネルで検出されたスパイク数の合計である。No. of SBF は 10 分間に発生した同期バースト発火の数である。Inter Burst Interval は同期バースト発火の終点から次の同期バースト発火の始点までの時間、Duration of SBF は同期バースト発火の持続時間、Spikes in a SBF は 1 個の同期バースト発火に含まれるスパイクの数、Max Frequency(MF)は同期バースト発火中のヒストグラムのピーク値、CV of MF は MF の CV 値。Inter MF Interval(IMFI)は同期バースト発火のピークから次の同期バースト発火のピークまでの時間、CV of IMFI は IMFI の CV 値である。

Fig. 2A は Type1 AAE に分類される薬剤(Cefepime, Cefoxitin, Ampicillin)、Fig. 2B は Type2 AAE に分類される薬剤 (Ofloxacin, Norfloxacin, Nalidixic acid, Clarithromycin, STmixture, Trimethoprim, Penicillin G Procaine)、Fig. 2C は Type3 AAE に分類される薬剤 (Metronidazole, Secnidazole, Tinidazole)のヒートマップを示している。Type1 AAE に分類される薬剤では他の Type と比較して CV of Max

Frequency が上昇する傾向があった。Type1 AAE, Type3 AAE は Duration, Spikes in a SBF, Max Frequency に変化が見られないが Type2 AAE では大きく変化した。また、すべてのタイプで Total Spikes, No. of SBF の上昇が見られるが、Type2 AAE は高用量で No. of SBF が減少することが示された。以上の結果から、それぞれの Type に属する抗菌薬が各解析パラメータに対して異なる影響を与えることが示唆された。また、9 個の解析パラメータを用いることによって各 Type の電気活動を検出し、特徴ごとに分類することが可能であることが示唆された。

5-3-3 ヒト iPS 細胞由来ニューロンにおける抗菌薬のタイプ分類

解析パラメータを用いた神経ネットワークにおける電気活動の特徴から、各抗菌薬を分類することが可能か検証する為に、前章に基づいた主成分分析を行った。9 個の解析パラメータのうち、No. of SBF, Spikes in a SBF を用いて主成分分析することで抗菌薬を分類するマップを作成した。Fig. 3A は 13 種類の抗菌薬(Cefepime, Cefoxitin, Ampicillin, Norfloxacin, Ofloxacin, Nalidixic acid, Clarithromycin, S/T 合剤, Trimethoprim, Penicillin G Procain, Metronidazole, Secnidazole, Tinidazole)を用いた主成分分析における、PC1, PC2 のプロットを示しており、セファロsporin系抗菌薬(Cefepime, Cefoxitin)やキノロン系抗菌薬(Norfloxacin, Ofloxacin, Nalidixic acid)、ニトロイミダゾール系(Metronidazole, Secnidazole, Tinidazole)の結果から、同種同効薬ほど各プロットが近接して分布していることが示唆された。また、Fig. 3B は 13 種類の抗菌薬を Type1、Type2、Type3 で分類した際の主成分分析における、PC1, PC2 のプロットを示している。各薬剤の AAE タイプを確認すると、Type1 AAE、Type2 AAE、Type3 AAE の薬剤がそれぞれ分離して分布していることを確認できた。従ってヒト iPS 細胞由来神経ネットワークにおける電気生理学的応答の特徴による抗菌薬の分類が、臨床における抗菌薬関連脳症の特徴による抗菌薬の分類と一致することが示された。

5-4 考察

本研究では、MEA上に培養したヒト iPS 細胞由来神経ネットワークにおける抗菌薬投与時の電気活動を指標にすることで、抗菌薬を臨床で報告されている AAE に基づいた 3 つのグループに分類することが可能かを検証した。ヒト iPS 細胞由来神経細胞に抗菌薬を投与することで、各抗菌薬の異なる神経活動の変化が検出された。また、ヒト iPS 細胞由来神経ネットワークにおける電気生理学的応答を指標とした解析パラメータを用いて主成分分析することで、抗菌薬を分類した結果、臨床における AAE の特徴による抗菌薬の分類と一致した。

今回 Type1 AAE の薬剤として使用した抗菌薬はセファロスポリン系の Cefepime、Cefoxitin 及びペニシリン系の Ampicillin である。これらの薬剤は構造中に β -ラクタム環を持つ β -ラクタム系抗菌薬であり、細菌の細胞壁の成分であるペプチドグリカンの伸長を停止することによって殺菌的に作用する。一方でこれらの薬剤は中枢神経において抑制的なシグナル伝達に関与する GABAA 受容体の作用を阻害することによって、痙攣発作を示すことが考えられる (Wallace, 1997)。これは β -ラクタム環をペニシリナーゼで加水分解すると、ペニシリンによる興奮性作用が消失すること (Gutnick & Prince, 1971) や、 β -ラクタム系抗菌薬による痙攣の治療に GABAA 受容体アゴニストであるベンゾジアゼピンが使用されることから示唆される。また、MEA と iPS 細胞由来ニューロンを用いて痙攣化合物の毒性を評価した先行研究では、GABA A 受容体のアンタゴニストであるペンチレンテトラゾールの投与によって用量依存的に同期バースト発火が増加することから (Odawara et al., 2018)、 β -ラクタム系抗菌薬でも同様の作用機序によって同期活動頻度が増加したと考えられる (Fig. 1C)。また、Fig. 3 の主成分分析の結果から、Cefepime、Cefoxitin、Ampicillin は Type1 AAE として分類できることが示されたが、セファロスポリン系の Cefepime、Cefoxitin とペニシリン系の Ampicillin が離れた位置にプロットされた。ペニシリン系は非競合的に、セファロスポリン系は競合的に GABA A 受容体を阻害することが知られており、受容体に対する親和性の違いを反映している可能性が考えられる (Sugimoto et al., 2001)。

Type2 AAE 2 に分類される薬剤はキノロン系、マクロライド系、ST 合剤である。これらの薬剤は薬理学的特性および構造的特徴において類似性に乏しいが、本研究における電気的応答に対する特性と主成分分析を用いた解析によって臨床的な分類である Type2 AAE と関連付けることが可能であった。キノロン系抗菌薬は、細菌に特有の DNA ジャイレースとトポイソメラーゼを阻害することによって作用する。キノロン系抗菌薬は GABA に類似した構造を持つため、GABA 受容体と相互作用することが可能であり、主に GABA A 受容体を阻害することによって痙攣誘発作用を示すことが知られている (Kushner et al., 2001; Neame et al., 2020)。また、GABAB 受容体作動薬であるバクロフェンがレボフロキサシンおよびシプロフロキサシンによる発作を抑制したことから、キノロン系抗菌薬は GABA A 受容体だけではなく、GABA B 受容体とも相

相互作用することが示唆されている(Akahane et al., 1993)。さらに、キノロン系抗菌薬はグルタミン酸受容体の内因性リガンドであるキヌレン酸と構造が類似しており、ラットの海馬スライスを使用した先行研究では NMDA 受容体の活性化によって濃度依存的にスパイクが増強することが示されている(Schmuck et al., 1998)。Fig. 1C ではノルフロキサシンの投与によって低用量から中用量における同期活動頻度の増加と、高用量で同期活動頻度および発火頻度の減少が見られた。また、Type2 AAE では、Type1 AAE, Type3 AAE と比較して高用量において Duration, Spikes in a SBF, Max Frequency が減少する傾向が示された (Fig. 3)。これらの結果はキノロン系抗菌薬が GABA A 受容体だけではなく、GABAB 受容体や NMDA 受容体に対しても複合的に作用することを反映していると考えられる。

キノロン系抗菌薬以外にも Type2 AAE に分類される薬剤にはマクロライド系抗菌薬、ST 合剤が含まれる。マクロライド系抗菌薬であるクラリスロマイシンは、細菌のリボソームに結合し、タンパク質合成を阻害することによって作用する。ST 合剤は葉酸合成阻害作用をもつスルファメトキサゾールと葉酸の活性化を阻害するトリメトプリムの配合剤である。マクロライド及び ST 合剤による AAE の発症メカニズムはまだ未解明な点が多いが、ラットの海馬スライスにおける CA3 錐体ニューロンの電気活動をパッチクランプによって測定した先行研究では、30 μ M から 300 μ M のクラリスロマイシン投与によって発火頻度が増加すること、及び GABA 作動性シグナルの減少がニューロンの電気活動の増加に関与していることが示唆されている(Bichler et al., 2017)。本研究では 3 μ M から 30 μ M において用量依存的に同期活動頻度の増加が認められたが、100 μ M 以上の高用量になると同期活動頻度は減少した (図 2)。これは、ラットとヒトの種差の違いや、MEA に構築した神経ネットワークに含まれるニューロンの存在比 (Glutamatergic neuron : GABAergic neuron = 7 : 3) が影響している可能性がある。また、キノロン系抗菌薬と類似した電気活動の特徴を持つことから、マクロライド及び ST 合剤も複数の作用点を持つ可能性があり、今後これらの薬剤が作用する受容体について詳細な研究が待たれるところである。

Type3 AAE に分類される薬剤にはメトロニダゾール、セクニダゾール、チニダゾールなどのニトロイミダゾール系抗菌薬がある。メトロニダゾールは病原微生物内で還元されニトロソ化合物 (R-NO) となり、細菌や原虫の DNA を切断することによって作用する。他の AAE と異なり、メトロニダゾール中毒では、MRI において小脳歯状核や脳梁膨大部に特徴的な異常を生じることが知られている。メトロニダゾールは、中間代謝物による GABA の変性や(Ramakrishna Rao & Mason, 1987)、RNA への直接結合によるタンパク質合成阻害、カテコールアミンとの反応によるラジカル生成、ミトコンドリア機能不全などが AAE 発作のリスクを高めることが知られている(Vilaça, 2018)。それぞれの毒性発症メカニズムがどのように AAE に寄与しているのかは不明であるが、本研究では、Type1, Type2 AAE とは異なる作用機序を持つ薬剤として分離が可能であ

り、AAE 評価における MEA と iPS 細胞を複合した *in vitro* 実験系の有用性が示された。

5-5 結論

本章では、開発した化合物評価法の痙攣以外の有害事象への有効性の検証を目的として、抗菌薬関連脳症をターゲットとした評価を実施した。ヒト iPS 細胞由来神経細胞に抗菌薬を投与することで、各抗菌薬の異なる神経活動の変化が検出された。また、ヒト iPS 細胞由来神経ネットワークにおける電気生理学的応答を指標とした主成分分析による抗菌薬のタイプ分類を実施した結果、臨床における AAE の特徴による抗菌薬の分類と一致する結果が得られた。本研究で用いた神経ネットワークの電気生理学的応答と多変量解析法を組み合わせることで、これまで実施してきた痙攣リスク評価だけではなく、AAE リスクの評価系として応用可能であると考えられる。さらに、臨床で見られる現象を反映する結果が *in vitro* 評価系で得られたことから、本研究で開発した化合物評価法のさらなる評価対象の拡大に期待できる。

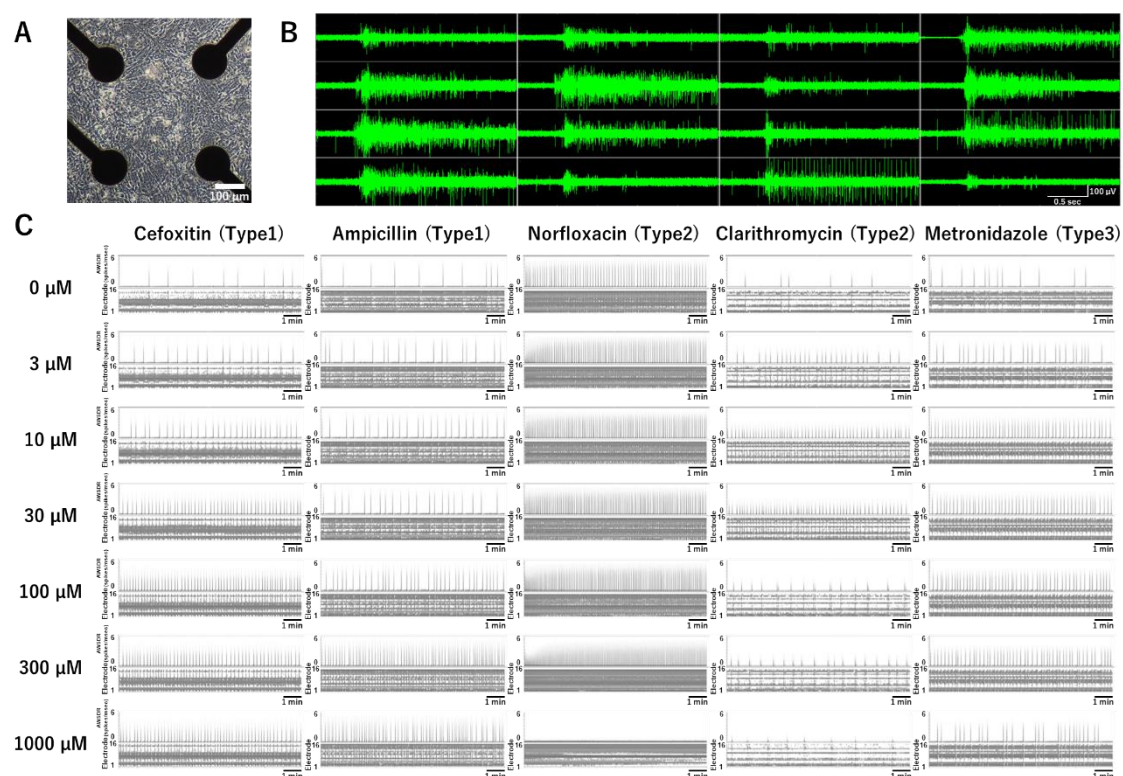


Figure 1 Electrophysiological response of human iPS cell-derived neurons to antibiotics treatment. (A) Phase contrast of neurons cultured on a microelectrode array (MEA) at eight weeks in vitro (WIV). (B) Typical action potential waveform of the spontaneous activity measurement at eight WIVs. (C) Raster plots of spikes and array-wide spike detection rate (AWSDR, spikes/second, bin size = 10 ms) for 10 min before drug administration, after vehicle administration, and cumulative administration of each antibiotic (cefoxitin (Type 1 AAE), ampicillin (Type 1 AAE), norfloxacin (Type 2 AAE), clarithromycin (Type 2 AAE), metronidazole (Type 3 AAE)).

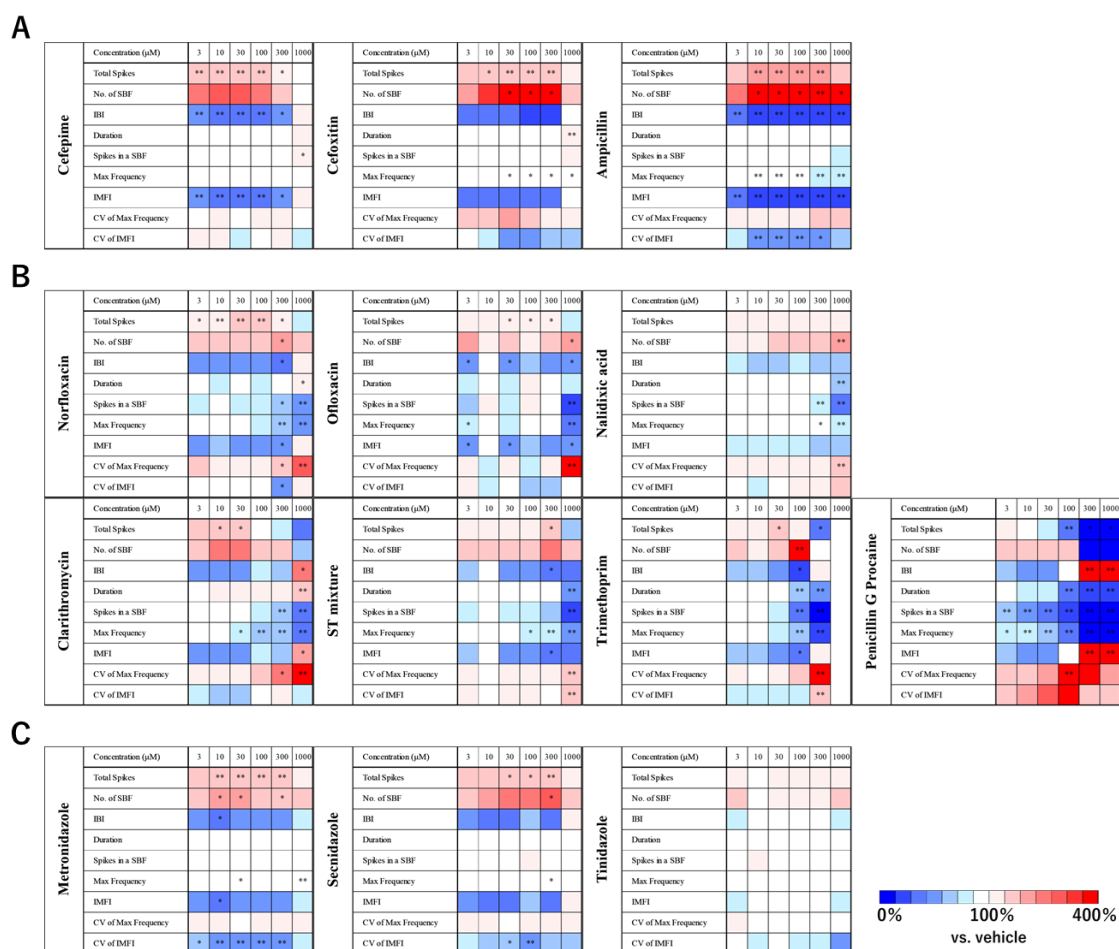


Figure 2 Dose dependence of each parameter of the antibiotics analysis. (A) Heat map of Type 1 AAE (cephalosporins and penicillins). (B) Heat map of Type 2 AAE (quinolone, macrolide, S/T mixture). (C) Heat map of Type 3 AAE (nitroimidazoles). Heat maps were created for cefepime (n = 5), cefoxitin (n = 6), ampicillin (n = 6), ofloxacin (n = 6), norfloxacin (n = 5), nalidixic acid (n = 7), clarithromycin (n = 6), ST mixture (n = 4), trimethoprim (n = 5), penicillin G procaine (n = 6), metronidazole (n = 8), secnidazole (n = 6), tinidazole (n = 6). Heat map with DMSO as 100% (one-way ANOVA and Dunnett's test, *p < 0.05, **p < 0.01 vs. DMSO).

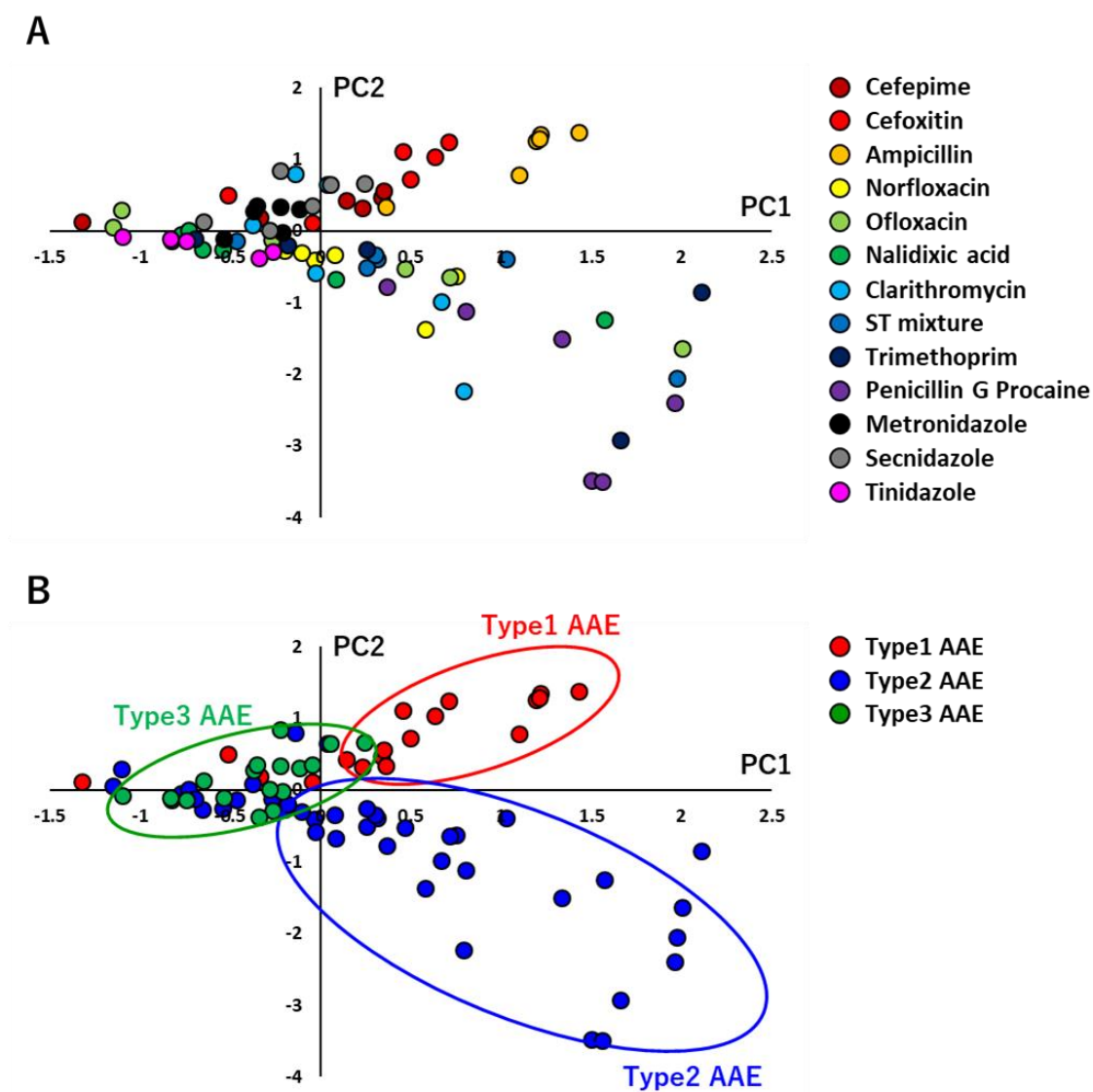


Figure 3 Classification of antibiotic agents in human iPS nerves using PCA. (A) Plots of PC1 and PC2 in the PCA using the effective parameter set for detecting AAE (No. of SBF, Spikes in an SBF). (B) Plots of PC1 and PC2 in a PCA classified each antibiotic as Type 1, Type 2, or Type 3.

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評価をはじめとする化合物評価を実現することを目的に、任意の条件を達成するパラメータセットを探索して実行する主成分分析法を構築し、化合物評価法として開発した。

第 1 章では、医薬品開発において安全性の高い医薬品候補化合物を効率よく選別することが重要であり、中でも中枢神経毒性は、新薬開発の遅れや中止の主要な原因のひとつであることから、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、動物由来細胞と比較して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、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課題となっている。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化合物評価法の開発を目的とした。

第 2 章では、既知の痙攣陽性化合物と開発中に痙攣が発現しドロップアウトした化合物を用いて、化合物の痙攣毒性検出法の構築と検証について述べた。MEA システムで計測された神経活動は主に神経ネットワークの同期的な活動である同期バースト発火が評価指標とされ、同期バースト発火の頻度や期間の長さなど、様々な解析パラメータが構築されてきた。しかし、中枢神経毒性を有することが既知であるが、既存の解析パラメータではその毒性を検出できない化合物（代表例：Pilocarpine）が存在する問題がある。どの解析パラメータを評価に用いるかは研究者によって異なっており、毒性評価・作用機序予測に有効とされる統一的な解析パラメータは未だ確立されていないことから、現状では単一の解析パラメータを使用するだけでは作用機序の異なる化合物の毒性を検出することが困難である。そこで、主成分分析やクラスター分析などの多変量解析を神経ネットワークの電気活動データに適用することが着目されている。これまで報告されている神経活動の多変量解析では、用意した解析パラメータをすべて使用する場合、または、寄与の大きい解析パラメータを選択して使用する場合のただ 1 通りの解析パラメータセットのみで検討されている。化合物の毒性を検出するのに最適な解析パラメータの組み合わせが不明であること、寄与の大きい解析パラメータが毒性検出に最適であるかが不明であることが新たな課題となっている。本研究では、ヒト iPS 細胞由来神経ネットワークの MEA 計測における痙攣毒性の検出を可能とする解析手法の構築を目的に、まず、中枢神経毒性を有することが既知である化合物だが、既存の解析パラメータではその毒性を検出できない化合物が存在する問題を解決するために、神経ネットワーク活動の周期性に着目した新規解析パラメータを構築した。また、化合物の毒性を検出するのに最適な解析パラメータの組み合わせが不明である問題を解決

するために、任意の条件を達成する最適な解析パラメータの組み合わせを選定して実施する多変量解析法を構築した。検証用に用意した既知の痙攣陽性化合物と陰性化合物について、構築した多変量解析法を用いることで、痙攣陽性化合物の毒性検出が可能であることを確認した。本研究で開発した解析法は分野を問わず、様々な解析値に応用可能であり、*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、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、生体での毒性発現濃度を予測するためには、MEA 計測における神経ネットワークへの暴露濃度と *in vivo* における CSF 濃度の相関を明らかにする必要があることから、IVIVE の観点での検証について述べた。これまで MEA と神経細胞を用いた様々な化合物評価が研究されてきたが、MEA 計測における化合物の評価方法は個別の解析パラメータに頼っている。どの解析パラメータに変化が認められたら毒性なのか、どの程度の数値から毒性なのかが具体的に定められていないことが課題である。また、神経細胞の MEA 計測では細胞の種類により溶媒の影響を受ける場合があり、化合物を正確に評価するには溶媒の影響を取り除くような解析手法が必要である。MEA と神経細胞を用いた化合物評価では、生体における毒性濃度を特定できないことが重要な課題である。MEA によって検出された神経細胞の活動変化が生体における毒性発現を反映しているかは不明である。より生体での毒性発現濃度を反映させるためには、MEA 計測における神経ネットワークへの暴露濃度と *in vivo* における脳室内濃度の相関を明らかにし、IVIVE の観点を検証する必要がある。本研究では、医薬品開発における安全性評価で動物実験の代替法になり得るような *in vitro* 神経機能の評価系構築を目的とした。MEA 計測によって得られた神経活動データから溶媒の影響を除外可能なパラメータセットを導出し、主成分分析において、溶媒の標準偏差を指標とした痙攣リスクの基準を設定することで、MEA 計測における化合物の評価基準および溶媒の影響に対する課題を解決した。また、ヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いた MEA 計測による化合物の痙攣リスク評価と、動物実験によるラットで振戦および痙攣発作が観察されたときの CSF 内濃度の調査を実施し、MEA 計測で痙攣リスクが検出された濃度と CSF 内濃度を比較することで IVIVE の観点を検証し、*in vitro* の毒性評価で *in vivo* と相関のある痙攣リスク評価が可能であることを示した。*In vitro* MEA assessment における精度の高い、生体での毒性発現濃度を予測する化合物の痙攣リスク評価法として今後の展開が期待できる。

第4章では、開発した化合物評価法の医薬品以外への応用性を農薬関連化合物をターゲットとして検証した結果について述べた。開発した化合物評価法を適用することで、農薬関連化合物の濃度依存的な毒性リスクを検出することが可能であり、さらにその作用機序推定が可能である結果が得られた。本成果は、これまで医薬品をターゲットとして開発してきた化合物評価法が医薬品以外の化合物にも有効であることを示す成果であり、評価対象と

なる化合物の範囲拡大に期待できる。

第 5 章では、開発した化合物評価法の痙攣以外の有害事象への応用性を抗菌薬関連脳症をターゲットとして検証した結果について述べた。ヒト iPS 細胞由来神経細胞に抗菌薬を投与することで、各抗菌薬の異なる神経活動の変化が検出された。また、ヒト iPS 細胞由来神経ネットワークにおける電気生理学的応答を指標とした主成分分析による抗菌薬のタイプ分類を実施した結果、臨床における AAE の特徴による抗菌薬の分類と一致する結果が得られた。本研究で用いた神経ネットワークの電気生理学的応答と多変量解析法を組み合わせることで、これまで実施してきた痙攣リスク評価だけではなく、AAE リスクの評価系として応用可能であると考えられる。さらに、臨床で見られる現象を反映する結果が *in vitro* 評価系で得られたことから、本研究で開発した化合物評価法のさらなる評価対象の拡大に期待できる。

本研究は、*in vitro* MEA データを用いた精度の高い医薬品の痙攣毒性評価をはじめとする化合物評価を実現することを目的に、任意の条件を達成するパラメータセットを探索して実行する主成分分析法を構築し、化合物評価法として開発した。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。また、医薬品以外の化合物、および痙攣以外の有害事象の評価への有効性も示されたことから、本研究で開発した化合物評価法は、あらゆる分野の化合物評価を発展させる技術開発であるとも言える。

参考文献

- Accardi, M. V., Huang, H., and Authier, S. (2018). Seizure liability assessments using the hippocampal tissue slice: Comparison of non-clinical species. *Journal of pharmacological and toxicological methods* 93, 59-68.
- Amin, H., Maccione, A., Marinaro, F., Zordan, S., Nieuw, T., and 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.
- Balez, R., Steiner, N., Engel, M., Muñoz, S. S., Lum, J. S., Wu, Y., Wang, D., Vallotton, P., Sachdev, P., and O'Connor, M. (2016). Neuroprotective effects of apigenin against inflammation, neuronal excitability and apoptosis in an induced pluripotent stem cell model of Alzheimer's disease. *Scientific reports* 6(1), 1-16.
- Black, B. J., Atmaramani, R., and Pancrazio, J. J. (2017). Spontaneous and evoked activity from murine ventral horn cultures on microelectrode arrays. *Frontiers in cellular neuroscience* 11, 304.
- Bosca, A., Martina, M., and Py, C. (2014). Planar Patch Clamp for Neuronal Networks—Considerations and Future Perspectives. In *Patch-Clamp Methods and Protocols*, pp. 93-113. Springer.
- Bradley, J. A., Luithardt, H. H., Metea, M. R., and Strock, C. J. (2018). In vitro screening for seizure liability using microelectrode array technology. *Toxicological Sciences* 163(1), 240-253.
- Bradley, J. A., and Strock, C. J. (2019). Screening for neurotoxicity with microelectrode array. *Current protocols in toxicology* 79(1), e67.
- Cook, D., Brown, D., Alexander, R., March, R., Morgan, P., Satterthwaite, G., and Pangalos, M. N. (2014). Lessons learned from the fate of AstraZeneca's drug pipeline: a five-dimensional framework. *Nature reviews Drug discovery* 13(6), 419-431.
- Fan, J., Thalody, G., Kwagh, J., Burnett, E., Shi, H., Lewen, G., Chen, S.-J., and Levesque, P. (2019). Assessing seizure liability using multi-electrode arrays (MEA). *Toxicology in Vitro* 55, 93-100.
- Franz, D., Olsen, H. L., Klink, O., and Gimsa, J. (2017). Automated and manual patch clamp data of human induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic neurons. *Scientific data* 4(1), 1-11.
- Frega, M., Van Gestel, S. H., Linda, K., Van Der Raadt, J., Keller, J., Van Rhijn, J.-R., Schubert, D., Albers, C. A., and Kasri, N. N. (2017). Rapid neuronal differentiation of induced pluripotent stem cells for measuring network activity on micro-electrode arrays.

- JoVE (Journal of Visualized Experiments)(119), e54900.
- Gong, W., Senčar, J., Bakkum, D. J., Jäckel, D., Obien, M. E. J., Radivojevic, M., and Hierlemann, A. R. (2016). Multiple single-unit long-term tracking on organotypic hippocampal slices using high-density microelectrode arrays. *Frontiers in neuroscience* 10, 537.
- Grainger, A. I., King, M. C., Nagel, D. A., Parri, H. R., Coleman, M. D., and Hill, E. J. (2018). In vitro models for seizure-liability testing using induced pluripotent stem cells. *Frontiers in neuroscience* 12, 590.
- Hyvärinen, T., Hyysalo, A., Kapucu, F. E., Aarnos, L., Vinogradov, A., Eglen, S. J., Ylä-Outinen, L., and Narkilahti, S. (2019). Functional characterization of human pluripotent stem cell-derived cortical networks differentiated on laminin-521 substrate: comparison to rat cortical cultures. *Scientific reports* 9(1), 1-15.
- Ishii, M. N., Yamamoto, K., Shoji, M., Asami, A., and 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.
- Kayama, T., Suzuki, I., Odawara, A., Sasaki, T., and Ikegaya, Y. (2018). Temporally coordinated spiking activity of human induced pluripotent stem cell-derived neurons co-cultured with astrocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 495(1), 1028-1033.
- Kosnik, M. B., Strickland, J. D., Marvel, S. W., Wallis, D. J., Wallace, K., Richard, A. M., Reif, D. M., and Shafer, T. J. (2020). Concentration–response evaluation of ToxCast compounds for multivariate activity patterns of neural network function. *Archives of toxicology* 94(2), 469-484.
- Kreir, M., Van Deuren, B., Versweyveld, S., De Bondt, A., Van den Wyngaert, I., Van der Linde, H., Lu, H., Teuns, G., and 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.
- Mack, C. M., Lin, B. J., Turner, J. D., Johnstone, A. F., Burgoon, L. D., and Shafer, T. J. (2014). Burst and principal components analyses of MEA data for 16 chemicals describe at least three effects classes. *Neurotoxicology* 40, 75-85.
- Marchi, N., Oby, E., Batra, A., Uva, L., De Curtis, M., Hernandez, N., Van Boxel -Dezaire, A., Najm, I., and Janigro, D. (2007). In vivo and in vitro effects of pilocarpine: relevance to ictogenesis. *Epilepsia* 48(10), 1934-1946.
- Matsuda, N., Odawara, A., Katoh, H., Okuyama, N., Yokoi, R., and 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.
- Mendis, G., Berecki, G., Morrisroe, E., Pachernegg, S., Li, M., Varney, M., Osborne, P., Reid, C., Halgamuge, S., and Petrou, S. (2019). Discovering the pharmacodynamics of conolidine and cannabidiol using a cultured neuronal network based workflow. *Scientific reports* 9(1), 1-12.
- Obien, M. E. J., Deligkaris, K., Bullmann, T., Bakkum, D. J., and Frey, U. (2015). Revealing neuronal function through microelectrode array recordings. *Frontiers in neuroscience* 8, 423.
- Odawara, A., Katoh, H., Matsuda, N., and Suzuki, I. (2016a). Induction of long-term potentiation and depression phenomena in human induced pluripotent stem cell-derived cortical neurons. *Biochemical and biophysical research communications* 469(4), 856-862.
- Odawara, A., Katoh, H., Matsuda, N., and Suzuki, I. (2016b). 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., and 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., and 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., and 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.
- Pacico, N., and Mingorance-Le Meur, A. (2014). New in vitro phenotypic assay for epilepsy: fluorescent measurement of synchronized neuronal calcium oscillations. *PLoS One* 9(1), e84755.
- Passaro, A. P., Aydin, O., Saif, M. T. A., and Stice, S. L. (2021). Development of an objective index, neural activity score (NAS), reveals neural network ontogeny and treatment effects on microelectrode arrays. *Scientific reports* 11(1), 1-12.
- Plumbly, W., Brandon, N., Deeb, T. Z., Hall, J., and Harwood, A. J. (2019). L-type voltage-gated calcium channel regulation of in vitro human cortical neuronal networks. *Scientific reports* 9(1), 1-12.
- Robinette, B. L., Harrill, J. A., Mundy, W. R., and Shafer, T. J. (2011). In vitro assessment

- of developmental neurotoxicity: use of microelectrode arrays to measure functional changes in neuronal network ontogeny¹. *Frontiers in neuroengineering* 4, 1.
- Seidel, D., Jahnke, H.-G., Englich, B., Girard, M., and Robitzki, A. A. (2017). In vitro field potential monitoring on a multi-microelectrode array for the electrophysiological long-term screening of neural stem cell maturation. *Analyst* 142(11), 1929-1937.
- Shirakawa, T., and Suzuki, I. (2020). Approach to Neurotoxicity using Human iPSC Neurons: Consortium for Safety Assessment using Human iPS Cells. *Current pharmaceutical biotechnology* 21(9), 780-786.
- Suzuki, I., and Ishibashi, Y. (2019). Japan Patent, P6558786, B1.
- Toivanen, M., Pelkonen, A., Mäkinen, M., Ylä-Outinen, L., Sukki, L., Kallio, P., Ristola, M., and Narkilahti, S. (2017). Optimised PDMS tunnel devices on MEAs increase the probability of detecting electrical activity from human stem cell-derived neuronal networks. *Frontiers in neuroscience* 11, 606.
- Tukker, A. M., Van Kleef, R. G., Wijnolts, F. M., De Groot, A., and Westerink, R. H. (2020a). Towards animal-free neurotoxicity screening: Applicability of hiPSC-derived neuronal models for in vitro seizure liability assessment. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation* 37(1), 121-135.
- Tukker, A. M., Wijnolts, F. M., de Groot, A., and Westerink, R. H. (2018). Human iPSC-derived neuronal models for in vitro neurotoxicity assessment. *Neurotoxicology* 67, 215-225.
- Tukker, A. M., Wijnolts, F. M., de Groot, A., and Westerink, R. H. (2020b). Applicability of hiPSC-Derived Neuronal Cocultures and Rodent Primary Cortical Cultures for In Vitro Seizure Liability Assessment. *Toxicological Sciences* 178(1), 71-87.
- Valdivia, P., Martin, M., LeFew, W. R., Ross, J., Houck, K. A., and Shafer, T. J. (2014). Multi-well microelectrode array recordings detect neuroactivity of ToxCast compounds. *Neurotoxicology* 44, 204-217.
- Watkins, P. (2011). Drug safety sciences and the bottleneck in drug development. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 89(6), 788-790.
- Yokoi, R., Okabe, M., Matsuda, N., Odawara, A., Karashima, A., and Suzuki, I. (2019). Impact of sleep-wake-associated neuromodulators and repetitive low-frequency stimulation on human iPSC-derived neurons. *Frontiers in neuroscience* 13, 554.
- human ipsc-derived neurons. *Frontiers in neuroscience*. 13:554.
- Accardi MV, Huang H, Authier S. 2018. Seizure liability assessments using the hippocampal tissue slice: Comparison of non-clinical species. *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 93:59-68.
- 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.
- Balez R, Steiner N, Engel M, Muñoz SS, Lum JS, Wu Y, Wang D, Vallotton P, Sachdev P, O'Connor M. 2016. Neuroprotective effects of apigenin against inflammation, neuronal excitability and apoptosis in an induced pluripotent stem cell model of alzheimer's disease. *Scientific reports*. 6(1):1-16.
- Black BJ, Atmaramani R, Pancrazio JJ. 2017. Spontaneous and evoked activity from murine ventral horn cultures on microelectrode arrays. *Frontiers in cellular neuroscience*. 11:304.
- Bosca A, Martina M, Py C. 2014. Planar patch clamp for neuronal networks—considerations and future perspectives. *Patch-clamp methods and protocols*. Springer. p. 93-113.
- 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.
- Breier JM, Radio NM, Mundy WR, Shafer TJ. 2008. Development of a high-throughput screening assay for chemical effects on proliferation and viability of immortalized human neural progenitor cells. *Toxicological Sciences*. 105(1):119-133.
- 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.
- Croom EL, Shafer TJ, Evans MV, Mundy WR, Eklund CR, Johnstone AF, Mack CM, Pegram RA. 2015. Improving in vitro to in vivo extrapolation by incorporating toxicokinetic measurements: A case study of lindane-induced neurotoxicity. *Toxicology and applied pharmacology*. 283(1):9-19.
- 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.
- Franz D, Olsen HL, Klink O, Gimsa J. 2017. Automated and manual patch clamp data of human induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic neurons. *Scientific data*. 4(1):1-11.
- Frega M, Van Gestel SH, Linda K, Van Der Raadt J, Keller J, Van Rhijn J-R, Schubert D, Albers CA, Kasri NN. 2017. Rapid neuronal differentiation of induced pluripotent stem cells for measuring network activity on micro-electrode arrays. *JoVE (Journal of*

- Visualized Experiments). (119):e54900.
- Gerber LS, van Melis LV, van Kleef RG, de Groot A, Westerink RH. 2021. Culture of rat primary cortical cells for microelectrode array (mea) recordings to screen for acute and developmental neurotoxicity. *Current Protocols*. 1(6):e158.
- 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.
- Hyvärinen T, Hyysalo A, Kapucu FE, Aarnos L, Vinogradov A, Eglen SJ, Ylä-Outinen L, Narkilahti S. 2019. Functional characterization of human pluripotent stem cell-derived cortical networks differentiated on laminin-521 substrate: Comparison to rat cortical cultures. *Scientific reports*. 9(1):1-15.
- Irwin S. 1968. Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia*. 13(3):222-257.
- Ishibashi Y, Odawara A, Kinoshita K, Okamura A, Shirakawa T, Suzuki I. 2021. Principal component analysis to distinguish seizure liability of drugs in human ips cell-derived neurons. *Toxicological Sciences*. 184(2):265-275.
- 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.
- Kayama T, Suzuki I, Odawara A, Sasaki T, Ikegaya Y. 2018. Temporally coordinated spiking activity of human induced pluripotent stem cell-derived neurons co-cultured with astrocytes. *Biochemical and biophysical research communications*. 495(1):1028-1033.
- Kosnik MB, Strickland JD, Marvel SW, Wallis DJ, Wallace K, Richard AM, Reif DM, Shafer TJ. 2020. Concentration–response evaluation of toxcast compounds for multivariate activity patterns of neural network function. *Archives of toxicology*. 94(2):469-484.
- 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.
- Kuroda T, Matsuda N, Ishibashi Y, Suzuki I. 2023. Detection of astrocytic slow oscillatory activity and response to seizurogenic compounds using planar microelectrode array. *Frontiers in Neuroscience*. 16:2266.
- 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.
- McConnell ER, McClain MA, Ross J, LeFew WR, Shafer TJ. 2012. Evaluation of multi-well microelectrode arrays for neurotoxicity screening using a chemical training set. *Neurotoxicology*. 33(5):1048-1057.
- Nicolas J, Hendriksen PJ, van Kleef RG, de Groot A, Bovee TF, Rietjens IM, Westerink RH. 2014. Detection of marine neurotoxins in food safety testing using a multielectrode array. *Molecular nutrition & food research*. 58(12):2369-2378.
- Obien MEJ, Deligkaris K, Bullmann T, Bakkum DJ, Frey U. 2015. Revealing neuronal function through microelectrode array recordings. *Frontiers in neuroscience*. 8:423.
- Odawara A, Katoh H, Matsuda N, Suzuki I. 2016a. Induction of long-term potentiation and depression phenomena in human induced pluripotent stem cell-derived cortical neurons. *Biochemical and biophysical research communications*. 469(4):856-862.
- Odawara A, Katoh H, Matsuda N, Suzuki I. 2016b. 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.
- Pacico N, Mingorance-Le Meur A. 2014. New in vitro phenotypic assay for epilepsy: Fluorescent measurement of synchronized neuronal calcium oscillations. *PLoS One*. 9(1):e84755.
- Plumbly W, Brandon N, Deeb TZ, Hall J, Harwood AJ. 2019. L-type voltage-gated calcium channel regulation of in vitro human cortical neuronal networks. *Scientific reports*. 9(1):1-12.
- Seidel D, Jahnke H-G, Englich B, Girard M, Robitzki AA. 2017. In vitro field potential monitoring on a multi-microelectrode array for the electrophysiological long-term screening of neural stem cell maturation. *Analyst*. 142(11):1929-1937.

- Shirakawa T, Suzuki I. 2020. Approach to neurotoxicity using human ipsc neurons: Consortium for safety assessment using human ips cells. *Current pharmaceutical biotechnology*. 21(9):780-786.
- Strickland JD, Martin MT, Richard AM, Houck KA, Shafer TJ. 2018. Screening the toxcast phase ii libraries for alterations in network function using cortical neurons grown on multi-well microelectrode array (mwmea) plates. *Archives of toxicology*. 92(1):487-500.
- Toivanen M, Pelkonen A, Mäkinen M, Ylä-Outinen L, Sukki L, Kallio P, Ristola M, Narkilahti S. 2017. Optimised pdms tunnel devices on meas increase the probability of detecting electrical activity from human stem cell-derived neuronal networks. *Frontiers in neuroscience*. 11:606.
- Tukker AM, Van Kleef RG, Wijnolts FM, De Groot A, Westerink RH. 2020a. Towards animal-free neurotoxicity screening: Applicability of hipsc-derived neuronal models for in vitro seizure liability assessment. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*. 37(1):121-135.
- Tukker AM, Westerink RH. 2021. Novel test strategies for in vitro seizure liability assessment. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 17(8):923-936.
- 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. 2020b. Applicability of hipsc-derived neuronal cocultures and rodent primary cortical cultures for in vitro seizure liability assessment. *Toxicological Sciences*. 178(1):71-87.
- Valdivia P, Martin M, LeFew WR, Ross J, Houck KA, Shafer TJ. 2014. Multi-well microelectrode array recordings detect neuroactivity of toxcast compounds. *Neurotoxicology*. 44:204-217.
- Watkins P. 2011. Drug safety sciences and the bottleneck in drug development. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 89(6):788-790.
- 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.
- Inouye, S. K., Westendorp, R. G. J., & Saczynski, J. S. (2014). Delirium in elderly people. In *The Lancet* (Vol. 383, Issue 9920, pp. 911–922). Elsevier B.V.
- Alagiakrishnan, K., & Wiens, C. A. (2004). An approach to drug induced delirium in the elderly. In *Postgraduate Medical Journal* (Vol. 80, Issue 945, pp. 388–393).
- Bhattacharyya, S., Darby, R. R., Raibagkar, P., Gonzalez Castro, L. N., & Berkowitz, A. L. (2016). Antibiotic-associated encephalopathy. *Neurology*, 86(10), 963–971.
- REULING, J. R., & CRAMER, C. (1947). INTRATHECAL PENICILLIN. *Journal of the*

- American Medical Association, 134(1), 16–18.
- Beck, M. R. C. P. E., & Jane Somerville, M. R. C. P. (1968). Penicillin encephalopathy N. CONWAY. In *Postgrad. med. J* (Vol. 44).
- Sugimoto, M., Fukami, S., Kayakiri, H., Yamazaki, S., Matsuoka, N., Uchida, I., & Mashimo, T. (2001). The b-lactam antibiotics, penicillin-G and cefoselis have different mechanisms and sites of action at GABA A receptors. In *British Journal of Pharmacology* (Vol. 135).
- De Sarro, A., Ammendola, D., Zappala, M., Grasso, S., & De Sarro, G. B. (1995). Relationship between Structure and Convulsant Properties of Some-Lactam Antibiotics following Intracerebroventricular Microinjection in Rats. In *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* (Vol. 39, Issue 1).
- Alkharfy, K. M., Kellum, J. A., Frye, R. F., & Matzke, G. R. (2000). Effect of Ceftazidime on Systemic Cytokine Concentrations in Rats (Vol. 44, Issue 11).
- Sutter, R., Rüegg, S., & Tschudin-Sutter, S. (2015). Seizures as adverse events of antibiotic drugs: A systematic review. *Neurology*, 85(15), 1332–1341.
- Bhattacharyya, S., Darby, R. R., Raibagkar, P., Gonzalez Castro, L. N., & Berkowitz, A. L. (2016). Antibiotic-associated encephalopathy. *Neurology*, 86(10), 963–971.
- Thomas, R. J., & Reagan, D. R. (1996). Association of a Tourette-like syndrome with ofloxacin. *The Annals of Pharmacotherapy*, 30(2), 138–141.
- Schmuck, G., Schürmann, A., & Schlüter, G. (1998). Determination of the excitatory potencies of fluoroquinolones in the central nervous system by an in vitro model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(7), 1831–1836.
- Bandettini di Poggio, M., Anfosso, S., Audenino, D., & Primavera, A. (2011). Clarithromycin-induced neurotoxicity in adults. *Journal of Clinical Neuroscience*, 18(3), 313–318.
- Ramakrishna Rao, D. N., & Mason, R. P. (1987). Generation of nitro radical anions of some 5-nitrofurane, 2- and 5-nitroimidazoles by norepinephrine, dopamine, and serotonin. A possible mechanism for neurotoxicity caused by nitroheterocyclic drugs. *Journal of Biological Chemistry*, 262(24), 11731–11736.
- Alston, T. A., & Abeles, R. H. (1987). Enzymatic conversion of the antibiotic metronidazole to an analog of thiamine. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 257(2), 357–362.
- Kim, E., Na, D. G., Kim, E. Y., Kim, J. H., Son, K. R., & Chang, K. H. (2007). MR imaging of metronidazole-induced encephalopathy: Lesion distribution and diffusion-weighted imaging findings. *American Journal of Neuroradiology*, 28(9), 1652–1658.
- Tamune, H., Hamamoto, Y., Aso, N., & Yamamoto, N. (2019). Cefepime-induced

- encephalopathy: Neural mass modeling of triphasic wave-like generalized periodic discharges with a high negative component (Tri-HNC). *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 73(1), 34–42.
- Wallace, K. L. (1997). Antibiotic-induced convulsions. *Critical Care Clinics*, 13(4), 741–762.
- Gutnick, M. J., & Prince, D. A. (1971). Penicillinase and the convulsant action of penicillin. *Neurology*, 21(7), 759–764.
- Kushner, J. M., Peckman, H. J., & Snyder, C. R. (2001). Seizures associated with fluoroquinolones. *The Annals of Pharmacotherapy*, 35(10), 1194–1198.
- Neame, M., King, C., Riordan, A., Iyer, A., Kneen, R., Sinha, I., & Hawcutt, D. B. (2020). Seizures and quinolone antibiotics in children: a systematic review of adverse events. *European Journal of Hospital Pharmacy*, 27(2), 60 LP – 64.
- Akahane, K., Kato, M., & Takayama, S. (1993). Involvement of inhibitory and excitatory neurotransmitters in levofloxacin- and ciprofloxacin-induced convulsions in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(9), 1764–1770.
- Bichler, E. K., Elder, C. C., & García, P. S. (2017). Clarithromycin increases neuronal excitability in CA3 pyramidal neurons through a reduction in GABAergic signaling. *Journal of Neurophysiology*, 117(1), 93–103.
- Vilaça, C. (2018). Seizures Related to Antibiotic Use: Update. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 4(2), 3845–3849.

謝辞

ラット CSF 濃度データの取得、*in vitro* の痙攣毒性予測に関するディスカッション、実際の創薬現場での課題解決の為に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。

業績リスト

学術論文

1. Yuto Ishibashi, Nami Nagafuku, Kenichi Kinoshita, Ai Okamura, Takafumi Shirakawa, Ikuro Suzuki, Verification of the seizure liability of compounds based on their in vitro functional activity in cultured rat cortical neurons and co-cultured human iPSC-derived neurons with astrocytes and in vivo cerebrospinal fluid concentration for in vitro to in vivo extrapolation, Toxicological Sciences, in revision
2. Taeko Kuroda, Naoki Matsuda, Yuto Ishibashi, Ikuro Suzuki, Detection of astrocytic slow oscillatory activity and response to seizurogenic compounds using planar microelectrode array, Frontiers in Neuroscience, 16, 1050150, 2023
3. Xiaobo Han, Naoki Matsuda, Yuto Ishibashi, Aoi Odawara, Sayuri Takahashi, Norie Tooi, Koshi Kinoshita, Ikuro Suzuki, A functional neuron maturation device provides convenient application on microelectrode array for neural network measurement, Biomaterials Research, 26, 84, 2022
4. Yuto Ishibashi, Shingo Kimura, Ikuro Suzuki, Responses to antibiotics in human iPSC-derived neurons based on the clinical antibiotic-associated encephalopathy classification, The Journal of Toxicological Sciences, 47, 10, 429-437, 2022
5. Aoi Odawara, Mikako Shibata, Yuto Ishibashi, Nami Nagafuku, Naoki Matsuda, Ikuro Suzuki, In Vitro Pain Assay Using Human iPSC-Derived Sensory Neurons and Microelectrode Array, Toxicological Sciences, 188(1), 131-141, 2022
6. Remi Yokoi, Mikako Shibata, Aoi Odawara, Yuto Ishibashi, Nami Nagafuku, Naoki Matsuda, Ikuro Suzuki, Analysis of signal components < 500 Hz brain organoids coupled to microelectrode array: A reliable test-bed for preclinical seizure liability assessment of drugs and screening of antiepileptic drugs, Biochemistry and Biophysics Reports, 28, 101148, 2021
7. Yuto Ishibashi, Aoi Odawara, Kenichi Kinoshita, Ai Okamura, Takafumi Shirakawa, Ikuro Suzuki, Principal Component Analysis to Distinguish Seizure Liability of Drugs in Human iPS Cell-Derived Neurons, Toxicological Sciences, 24, 184(2), 265-275, 2021
8. Aoi Odawara, Naoki Matsuda, Yuto Ishibashi, Remi Yokoi, Ikuro Suzuki, 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

特許

1. 鈴木郁郎, 石橋勇人, 脳から取得される波形データに対してバースト解析を行う方法、コンピュータシステム、プログラム、ならびに、バースト解析を用いて標的の状態を予測する方法、コンピュータシステム、プログラム、特許第 7138995 号
2. 鈴木郁郎, 石橋勇人, 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 6558786 号

学会発表

国際会議

1. Yuto Ishibashi, Nami Nagafuku, Ikuro Suzuki, Toxicity risk assessment method for compounds using human iPS cell-derived neurons, Neuroscience 2022, 2022
2. Yuto Ishibashi, Kazutoshi Ogawa, Ikuro Suzuki, The electrophysiological responses to antibacterial drugs in human iPSC-derived neurons demonstrate the classification of antibacterial drug encephalopathy in clinical, SAFETY PHARMACOLOGY SOCIETY VIRTUAL MEETING, 2020
3. Yuto Ishibashi, Naoki Matsuda, Aoi Odawara, Remi Yokoi, Ikuro Suzuki, Prediction Methods for Seizure Liability and MoA of Drugs Based on the Electrophysiological Activities of hiPS Cell-Derived Neurons, SOT2020 59th Annual Meeting & ToxExpo, 2020
4. Yuto Ishibashi, Misaki Shimizu, Sayuri Takahashi, Remi Yokoi, Naoki Matsuda, Aoi Odawara, Ikuro, Suzuki, Separation of drug effects in human iPS cell-derived neurons using MEA system, Neuroscience 2019, 2019
5. Yuto Ishibashi, Aoi Odawara, Ikuro Suzuki, Drug-induced seizure-like activities in cultured human iPSC-derived neuron, ISSCR 2019 Annual Meeting, 2019
6. Yuto Ishibashi, Aoi Odawara, Naoki Matsuda, Ikuro Suzuki, Classification of drug-induced seizure-like activities in cultured human iPSC-derived neurons, SOT2019 58th Annual meeting, 2019
7. Yuto Ishibashi, Aoi Odawara, Ai Okamura, Kenich Kinoshita, Takafumi Shirakawa, Ikuro Suzuki, Evaluation of convulsant-induced firings in cultured human iPS cell-derived neurons using principal component analysis, Neuroscience 2018, 2018
8. Yuto Ishibashi, Aoi Odawara, Takafumi Shirakawa, Kenichi Kinoshita, Ai Okamura, Norimasa Miyamoto, Atsuko Ojima, Takuya Kondo, Rie Hando, Kaoru Morimura, Kaoru Sato, Ikuro Suzuki, CSAHi study: Detection of drug-induced seizure-like activities of 3 convulsants at 6 facilities using micro-electrode arrays in combination with human iPS cell-derived neurons, SPS 2018 Annual meeting, 2018

国内会議

1. 石橋勇人、黒田妙子、松田直毅、鈴木郁郎、MEA 計測によるアストロサイトのオシレーション検出と痙攣化合物への応答解析、第 14 回日本安全性薬理研究会学術年会、2023
2. 石橋勇人、永福菜美、鈴木郁郎、ヒト iPS 細胞由来ドーパミンニューロンの電気活動に基づく依存症誘発薬の評価、第 96 回日本薬理学会学術年会、2022
3. 石橋勇人、永福菜美、鈴木郁郎、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの電気活動を指標とした化合物の毒性リスク評価法の検討、第 13 回スクリーニング学研究会、2022
4. 石橋勇人、木村新伍、鈴木郁郎、ヒト iPS 細胞由来ドーパミンニューロンの電気活動を用い

- た依存症評価法の検証、第 49 回毒性学会学術年会、2022
5. 石橋勇人、永福菜美、鈴木郁郎、ヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いた農薬関連化合物の毒性リスク評価、第 95 回日本薬理学会学術年会、2022
 6. 石橋勇人、永福菜美、鈴木郁郎、ヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いた化合物の毒性リスク評価法の検討、第 13 回日本安全性薬理研究会学術年会、2022
 7. 石橋勇人、木下健一、岡村愛、白川誉史、鈴木郁郎、主成分分析によるラット脳波を用いた薬剤性痙攣リスクの検出、第 48 回日本毒性学会学術年会、2021
 8. 石橋勇人、木下健一、岡村愛、白川誉史、鈴木郁郎、ラット脳波を用いた薬剤性痙攣リスクを検出する新規解析方法、第 12 回日本安全性薬理研究会学術年会、2021
 9. 石橋勇人、横井れみ、鈴木郁郎、in vitro 神経機能の多変量解析による医薬品の毒性・作用機序予測、2020 年度ライフサポート学会制御工学研究会、2020
 10. 石橋勇人、横井れみ、鈴木郁郎、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの痙攣惹起時における抗てんかん薬応答、第 27 回 HAB 研究機構学術年会、2020
 11. 石橋勇人、岡村愛、横井れみ、木下健一、白川誉史、鈴木郁郎、薬理作用から痙攣リスクを直接示唆しない化合物に対する in vitro MEA システムを用いた痙攣リスク評価、第 47 回日本毒性学会学術年会、2020
 12. 石橋勇人、松田直毅、小田原あおい、横井れみ、鈴木郁郎、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの電気活動に基づいた AI による化合物の痙攣毒性および作用機序予測、第 93 回日本薬理学会年会、2020
 13. 石橋勇人、小川和敏、鈴木郁郎、ヒト iPS 神経における抗菌薬応答と臨床における抗菌薬脳症タイプ分類との相関、第 11 回安全性薬理研究会学術年会、2020
 14. 石橋勇人、小川和敏、横井れみ、鈴木郁郎、ヒト iPS 細胞由来神経ネットワークの電気活動を指標とした AAE リスク評価の検討、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
 15. 石橋勇人、小田原あおい、鈴木郁郎、MEA システムを用いたヒト iPS 細胞由来神経ネットワークにおける薬剤性痙攣毒性の検出および作用機序推定を目指した多変量解析、第 10 回スクリーニング学研究会、2019
 16. 石橋勇人、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電気生理学的応答の多変量解析、日本動物実験代替法学会 第 32 回大会、2019
 17. 石橋勇人、横井れみ、小川和敏、小田原あおい、鈴木郁郎、痙攣状態を惹起したヒト iPS 細胞由来ニューロンにおける抗てんかん薬投与時の応答分析、第 53 回日本てんかん学会学術年会、2019
 18. 石橋勇人、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毒性および作用機序推定を目指した多変量解析、日本バイオマテリアル学会東北ブロック講演会、2019
 19. 石橋勇人、小田原あおい、岡村愛、木下健一、白川誉史、鈴木郁郎、ヒト iPS 細胞由来ニュー

- ーロンの MEA データにおける痙攣陽性化合物の毒性検出手法、第 46 回日本毒性学会学術年会、2019
20. 石橋勇人, 小田原あおい, 齋藤裕也, 鈴木郁郎、ヒト iPS 細胞由来ニューロンにおける薬剤性痙攣毒性と作用機序推定を目指した主成分分析およびクラスター分析、第 18 回日本再生医療学会総会、2019
21. 石橋勇人, 小田原あおい, 齋藤裕也, 鈴木郁郎、Principal component analysis for predicting the seizure liability and the mechanism of action of drugs in human iPSC-derived neural network : HESI pilot study、第 92 回日本薬理学会年会、2019
22. 石橋勇人, 小田原あおい, 鈴木郁郎、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの MEA データから痙攣陽性化合物に対する応答の分離および作用機序を分類する手法、日本安全性薬理研究会第 10 回学術年会、2019
23. 石橋勇人, 小田原あおい, 鈴木郁郎、MEA システムを用いたヒト iPS 細胞由来神経ネットワークにおける薬剤性痙攣毒性の検出および作用機序推定を目指した主成分分析、第 9 回スクリーニング学研究会、2018
24. 石橋勇人, 小田原あおい, 岡村愛, 木下健一, 白川誉史, 鈴木郁郎、薬剤性痙攣毒性と作用機序推定を目指したヒト iPS 細胞由来ニューロンの電気活動における解析パラメータの主成分分析、第 45 回日本毒性学会学術年会、2018
25. 石橋勇人, 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薬剤性痙攣誘発応答の周波数解析、第 17 回日本再生医療学会総会、2018
26. 石橋勇人, 小田原あおい, 鈴木郁郎、in vitro ヒト iPS 細胞由来神経ネットワークと in vivo ヒト脳の痙攣発火を比較可能とする周波数解析、第 27 回ライフサポート学会フロンティア講演会、2018
27. 石橋勇人, 小田原あおい, 奥山夏樹, 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活動の周期性解析法の構築と主成分解析、安全性薬理第 9 回学術年会、2018
28. 石橋勇人, 小田原あおい, 鈴木郁郎、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの薬剤性痙攣誘発時の特性を抽出する電気活動波形の周波数成分解析、第 33 回ライフサポート学会大会、2017
29. 石橋勇人, 小田原あおい, 鈴木郁郎、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの薬剤性痙攣誘発を予測可能とする電気活動波形の周波数解析、平成 29 年 電気学会 電子・情報・システム部門大会、2017