

博士論文

医薬品開発での痙攣発作リスクの新評価法：
膜電位イメージングによる神経回路機構解析

徳島文理大学大学院薬学研究科
薬学専攻 博士課程

内海 雄一

指導教授 富永貴志

令和六年提出

目次

略語・用語一覧	3
第1章 緒論	5
1-1 研究の背景	5
1-1-1 医薬品の開発における痙攣発作リスク評価の重要性	5
1-1-2 <i>in vitro</i> 痙攣発作リスク (seizure-liability) 評価の現状	7
1-1-3 痙攣発作の発生メカニズム	8
1-1-4 電位感受性色素 (Voltage Sensitive Dye; VSD) の特徴及び応用	9
1-2 研究の目的	12
第2章 痙攣発作リスク (seizure-liability) 評価の先行研究調査	13
2-1 序論	13
2-2 方法	13
2-2-1 検索ワードの設定	13
2-2-2 文献の選択	13
2-2-3 文献内容の分類	14
2-3 結果	14
2-3-1 文献検索及び選択結果	14
2-4 文献内容の分類結果	14
2-5 先行研究調査のまとめ及び考察	15
第3章 マウス海馬スライスにおける膜電位感受性色素イメージングを用いた <i>in vitro</i> 痙攣発作リスク評価	17
3-1 序論	17
3-2 方法	18
3-2-1 VSDによるスライス作製と染色	18

3-2-2	刺激と電気生理学的計測	19
3-2-3	VSD 光信号の計測	19
3-2-4	使用した薬物	20
3-2-5	データ処理と統計学的処理	20
3-3	結果	21
3-3-1	痙攣発作誘発性化合物の fEPSP slope に対する影響	21
3-3-2	VSD イメージングを用いた痙攣発作誘発性化合物の神経細胞の活動に対する影響	22
3-3-3	痙攣発作誘発性化合物の VSD 光信号応答に対する影響	22
3-3-4	トレース波形の定量化パラメータ設定及び解析	23
3-3-5	痙攣発作誘発性化合物の PR-ratio に対する影響	23
3-4	考察	25
3-4-1	既報の <i>in vitro</i> 脳スライス実験との比較 (スループット・濃度範囲)	25
3-4-2	CA1 領域の生理学的反応をモニターするための fEPSP	26
3-4-3	VSD イメージングによる神経細胞活動の可視化	28
3-4-4	VSD アッセイパラメータによる神経機能への直接的な薬理学的影響の探索	28
3-5	結論	30
第4章	総括	31
	図表一覧	32
	謝辞	53
	参考文献	54
	業績リスト	70

略語・用語一覧

ACSF: artificial cerebrospinal fluid [人工脳脊髄液]

AMPA: α -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid [α -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソキサゾールプロピオン酸]

CA1: cornu ammonis 1

CA3: cornu ammonis 3

CMOS: complementary metal oxide semiconductor

EEG: electroencephalogram [脳波]

EPSP: excitatory postsynaptic potential [興奮性シナプス後電位]

fEPSP (s) : field excitatory postsynaptic potential (s) [フィールド興奮性シナプス後電位]

FOB: functional observational battery [機能観察総合評価法]

4AP: 4-aminopyridine [4-アミノピリジン]

GABA: γ -aminobutyric acid

GZ: gabazine [ガバジン]

IC₅₀: half maximal inhibitory concentration [50%阻害濃度]

ICH: International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use [医薬品規制調和国際会議]

MEA: multi-electrode array [多電極アレイ]

NMDA: N-methyl-D-aspartic acid [N-メチル-D-アスパラギン酸]

Pilo: Pilocarpine [ピロカルピン]

PiTX: picrotoxin [ピクロトキシン]

PR-ratio: stratum pyramidale vs. stratum radiatum optical signal ratio [PR 比]

SP: stratum pyramidale [錐体細胞層]

SR: radiatum: stratum radiatum [放射状層]

VSD: voltage sensitive dye [電位感受性色素]

第1章 緒論

1-1 研究の背景

1-1-1 医薬品の開発における痙攣発作リスク評価の重要性

医薬品の開発は、膨大な時間・コストのかかるプロセスである。医薬品が承認されるまでに、12~15年の期間がかかる (Roses, 2008)。この間、前臨床試験や臨床試験の結果に基づいた申請資料を規制当局に提出する必要がある。さらに、その承認を得るためのプロセスが必要となる (図 1)。この全体のプロセスにかかるコストは平均で約 2000 億円と報告されている (Paul et al., 2010)。医薬品の開発で、候補化合物がこのプロセスから脱落することは大きな損失となる。

前臨床試験で候補化合物が脱落する主な原因は、その化合物の物理化学特性の制御よりも、生体の生理に対する安全性課題にあることが知られている (Waring et al., 2015)。生体の生理に対する安全性課題-すなわち毒性 (toxicity) とは、化学物質等が生体や臓器などに与える悪影響を示す。臨床試験において、候補化合物の約 34%は、他の臓器等への影響ではなく、中枢神経系で顕在化する副作用により脱落している (Cook et al., 2014, 図 2)。中枢神経系の毒性評価は重要な課題である。

前臨床試験での中枢神経系の毒性検出には、ICH ガイドライン S7A (安全性薬理試験ガイドライン) に基づき Irwin 法 (Irwin, 1968) 又は FOB (Moser et al., 1995) を用いたラットやマウスなどのげっ歯類の行動試験を中心とした *in vivo* 評価が行われている。特に、前臨床試験では、痙攣発作 (seizure) が良く観察される中枢神経系毒性の一つである (Authier et al., 2016b)。

痙攣発作は、脳神経細胞の過剰な電気活動を原因とする筋肉の緊張や運動、行動、感覚及び意識状態の一時的な異常である。臨床試験においては、重大な副作用とみなされ試験中止の原因となる。医薬品候補化合物が痙攣発作を起こす指標を、痙攣発作リスク (seizure-liability) 評価という。痙攣発作は全身症状として顕在化するが、脳での過剰興奮から生じる症状である。このため、特に初期の医薬品開発や安全性試験においては、*in vitro* 脳スライスを用いた電気生理学的手法を用いた神経回路の過剰興奮の検出が多く利用されている (Easter et al., 2007, 2009; Accardi et al., 2016)。

近年では、ラット、イヌ、サル、ミニブタなどの様々な動物種の海馬脳スライスを用いた痙攣発作リスクの評価が行われている。海馬神経回路が選ばれる理由は、生理的応答がよく知られていること、てんかん等の脳の過剰興奮の焦点とされているためである。実際、多く痙攣誘発薬及び抗痙攣薬に対して感受性があることが示されている (Accardi et al., 2018)。動物全体を対象とする *in vivo* 試験では、EEG (脳波) 解析で電気生理学的に痙攣発作が検出可能であるが、前臨床試験で行われる安全性試験に組み込まれることが少ない (Authier et al., 2016c)。

一般の試験と同様に *in vivo* 試験は *in vitro* 試験に比べ実験にかかる規模が大きくなる傾向があり負荷が高くなる。このため、これらの中枢神経系での痙攣発作の検出評価は、現在、前臨床試験の後半になるまで評価されないため、痙攣発作が出た場合、医薬品の開発期間に大きな影響を及ぼす可能性がある。

以上のことから、開発期間の初期から実行可能で検証能力の高い *in vitro* の痙攣発作リスク (seizure-liability) 評価法を開発し、創薬早期での実施を可能にすることは、医薬品開発企業にとって重要な課題になると考えられる。

1-1-2 *in vitro* 痙攣発作リスク (seizure-liability) 評価の現状

in vitro 試験の中でも、電気生理学的手法の延長である多電極アレイ (MEA) を利用した痙攣発作リスク評価の研究報告が、近年増加している (図 3)。MEA は、微小電極 (直径 10 ~ 30 μm) が基板の上に配置され、微小電極上の細胞の電気活動を細胞外で電位計測するシステムである。このシステムは、リアルタイムでの測定が可能であり、長期の実験にも適している。これらの特性から、MEA を用いた医薬品の痙攣発作リスク評価法への関心が高まり、国内外で積極的な研究が展開されている。

日本では、ヒト iPS 細胞応用安全性コンソーシアム (CSAHi, Consortium for Safety Assessment using Human iPSC Cells) が神経チームを設立し、試験評価系の構築に取り組んでいる。米国では、環境保健科学研究所 (HESI, The Health and Environmental Sciences Institute) の Translational Biomarkers of Neurotoxicity (NeuTox) Committee が試験評価系の実現可能性を検討している (Shirakawa and Suzuki, 2020; Roberts et al., 2021)。

MEA は原理的に細胞外計測であり、スライス標本のような神経回路活動が計測できるはずであるが、スライス表面との接触面ではスライスへのガス供給が絶たれることや、良好な接触ができて長期の計測は困難であることから現実的な応用は限られている。もっぱら分散培養系で用いられるが、この場合は分散培養で痙攣発作リスクが検証できるかどうかについて慎重な検討が必要となる。また、分散培養の場合は培養にかかる時間も問題である。

現在の段階では、前臨床試験における *in vitro* での痙攣発作リスクを評価する標準的な試験デザインやガイドラインは確立されていない状況である。そのため、前臨床試験における痙攣発作リスク評価は、イオンチャネル機能や神経伝達物質放出の変化に対する医薬品候補化合物のメカニズム検索に焦点を当てるのが一般的である。

1-1-3 痙攣発作の発生メカニズム

痙攣発作につながるメカニズムは明確ではない。痙攣発作を起こす必要条件となる脳の過剰興奮は、シナプスのシグナル伝達の変化やイオンチャネルの内因性興奮性から説明できるものもある。シナプスレベルでは、興奮性グルタミン酸作動性 (AMPA、NMDA、カイニン酸受容体など) や抑制性シグナル (GABA、グリシンなど) の変化が、痙攣発作を引き起こし得るメカニズムとされている (Fukata and Fukata, 2017)。内因性興奮性では、活動電位の発生と伝播に重要な電位依存性ナトリウム (Na^+)、カリウム (K^+) 及びカルシウム (Ca^{2+}) イオンチャネルの機能調節の関与が指摘されている (Kaplan et al., 2016; Köhling and Wolfart, 2016; Rajakulendran and Hanna, 2016)。また、海馬や扁桃体の神経細胞死が大脳辺縁系ネットワークの興奮/抑制のバランスを変化させることで、痙攣発作が起こりえることも知られている (Sloviter, 1994; Baram et al., 2011)。

すなわち痙攣発作の発生メカニズムは、神経細胞の興奮性、神経回路の興奮性などを調節する複数の薬理的ターゲットや細胞機構が関与する複雑なプロセスであることがわかっているものの、どの脳領域でどの様に過剰興奮性が亢進することが痙攣発作につながるかも含め基本的な情報を探索する段階にある。このため、MEAのような分散培養系を対象とする実験手法、行動解析及び EEG 解析よりも、実験動物を用いた過剰興奮発生のメカニズムを検証可能な *in vitro* (スライス標本) での神経回路応答の計測手法の開発が適切と考えられる。

スライス標本での神経回路応答性の計測には長く電気生理学的手法が使われ、計測される計測値と生理学的メカニズムの応答は比較的良くわかっている。一方、スライス標本をつかっても、使用される電極の数が少ないため、空間的な解像度において厳し

く制限される。一部の箇所から詳細な情報が得られるが、ネットワークダイナミクスの全体像が不足してしまうのが現状である (Karadas et al., 2018)。

痙攣発作のような脳の広範な神経回路の過剰興奮を検証するためには、より包括的な計測方法の開発が待たれていた。

1-1-4 電位感受性色素 (Voltage Sensitive Dye; VSD) の特徴及び応用

In vitro 脳スライスを用いた電気生理学的手法には、電極の数を増やせない制約や、個々の細胞の活動を測定することが困難という欠点がある。このような問題を解決する手法の一つとして、電位感受性色素 (Voltage Sensitive Dye; VSD) による光計測法がある (Grinvald and Hildesheim, 2004; Homma et al., 2009; Tominaga et al., 2013, 2018)。Voltage sensitive dye (VSD) は、神経細胞の細胞膜に取り込まれ、膜内外の電位差 (膜電位) に比例的な光特性変化を示す分子プローブである。この色素を用いることで、ミリ秒オーダーで変化する膜電位変化を光学的に計測し、神経細胞の活動電位とシナプスの受容電位を網羅的に可視化することができる。光計測法は、高い時間分解能を持ち、複数の細胞の活動を同時に記録することが可能であり、従来の電気生理学的手法では困難だった詳細なネットワークの動態を研究するための有用な手段となると考えられる。

VSD を用いて、神経活動による高速な膜電位変化を記録するためには、カメラシステムに高い時間分解能が要求される。さらに、VSD の膜電位変化に対する応答は、 10^{-4} から 10^{-5} (変化率) と非常に小さいため、ダイナミックレンジの広くかつノイズの小さなカメラが必要で、ノイズ (機械的ノイズ、振動) の低い条件でないと信頼性のあるデータを取得することができない。

VSD はその応答速度から、高速応答色素と低速応答色素に分けられる (表 1)。神経回

路の動態解析では数ミリ秒単位の電位変化から計測する必要があり、神経回路の解析では高速応答色素が用いられる。高速応答色素の応答速度は nsec に及び、色素としての応答時間は十分に早い。VSD は大別して水溶性の高い色素と、脂溶性の高い色素があり、使用する VSD は、実験に応じて、選択する必要がある。例えば、スライス標本においては、水溶性の吸光色素の RH-155 は染色しやすいが、洗い流されてしまうため、長期間の測定には適していない (冨永 and 冨永, 2011)。また、吸光色素は染色料に応じた校正ができないので、より正確な膜電位応答を測るには蛍光色素が用いられる。蛍光色素の一つである Di-4-ANEPPS は非常によい特性を有している (Loew et al., 1992) が、脳組織での使用においては染色方法などに課題がありあまり使用されていなかった。Di-4-ANEPPS を DMSO で溶解するのではなく、エタノールを溶媒に用いることで最適な色素となることが報告されている (Tominaga et al., 2000)。

また、脳スライスの標本を容易に取り扱うために、アクリル樹脂のリングにミリポア社のメンブレンフィルター (OMNIPORE MEMBRANE FILTERS, 0.45 μm ; JHWP01300) を貼りつけたものにスライスを載せ、これをチャンバーシステムにはめ込むように固定し、スライスが動くことなく、ガスや生理塩溶液の良好な交換を可能になった (Tominaga et al., 2000)。このように、VSD 光計測法には多くの技術的課題 (カメラシステム・光学系の確立、VSD の選択・染色法の確立及びスライス標本作成・長期計測の確立) があつたが、生理機能の定量的な解析が可能となった (Tominaga et al., 2000, 2019)。

海馬は記憶や学習の鍵となる神経回路である。実際、海馬のスライ標本-中でも CA1 野は、記憶学習に関係した基礎研究や、認知症関連の脳研究でこれまでに最もよく研究されている神経回路標本であり、脳神経科学の最も代表的な神経回路モデルとなっている。特にその解剖が比較的単純な層構造をしていることが、研究材料としての利

点の一つである。この特性があることは神経回路の光学的計測にとっても大きな利点であり、組織から計測される光学信号を、神経細胞の樹状突起、細胞体などの膜構造からの信号として解析することで、信号の変化と細胞機構の対応をよくとることができる。すなわち、海馬 CA1 野の放射状層 (stratum radiatum; SR) の光信号は、先端樹状突起 (apical dendrite) の応答として解釈することが可能である。また、錐体細胞層 (stratum pyramidale; SP) の光信号を細胞体の応答として評価することができる。この関係を用いることにより、海馬 CA1 野の光信号の変化を錐体細胞の各膜区分の電気生理学的特性の変化として評価することが可能となる。このような利点を活かして多くの VSD による海馬の光計測研究が行われている (Grinvald et al., 1982; Barish et al., 1996; Tominaga et al., 2000, 2001, 2002; Inoue et al., 2001; Mochida et al., 2001; Aihara et al., 2005; Mann et al., 2005; Chang and Jackson, 2006)。

痙攣発作誘発の機構は未だに決まっていないが、てんかんで見られる過剰興奮との関連は明らかである。てんかんの発生領域（焦点）として、前脳、側頭葉が挙げられるが、側頭葉性てんかんは、てんかんの代表的なモデルとして研究されている。海馬は側頭葉てんかんモデルにおいて、痙攣発作の誘発に重要な役割を果たしていることが知られている (Schwartzkroin, 1994)。

以上のことから、VSD を用いて痙攣発作リスク評価を海馬で行うことは有用であると考えられる。さらに、海馬スライス標本は、脳に存在する神経回路やシグナル伝達経路をある程度保持しているため、VSD を用いた痙攣発作リスク評価のモデルシステムとして利用できると考えられる (図 4)。

1-2 研究の目的

本論文では、医薬品開発における痙攣発作リスク評価の現状を把握するために PubMed 検索による先行研究調査を行い、それらの考察を行った。また、陽性対照物質としてピクロトキシン (PiTX)、ガバジン (GZ)、4-アミノピリジン (4AP) 及びピロカルピン (Pilo) を代表的な痙攣発作誘発化合物として選定した。マウスの海馬スライスにおける神経回路機能を Di-4-ANEPPS を用いた VSD ベースのアッセイによる定量・可視化を検討した。この検討により、痙攣発作リスクの新しい評価法を提案することを目的とした。

第2章 痙攣発作リスク (seizure-liability) 評価の先行研究調査

2-1 序論

前臨床試験における中枢神経系の毒性評価は、主に Irwin 法又は FOB などの *in vivo* 試験が中心であったが、2014 年以降、MEA を含む *in vitro* 痙攣発作リスク (seizure-liability) 評価の研究が国内外で積極的に展開されている。そのため、*in vivo* 試験を含め、痙攣発作リスク評価の先行研究調査を PubMed 検索により行い、医薬品開発における痙攣発作リスク評価の現状を把握し、それらの考察を行った。

2-2 方法

2-2-1 検索ワードの設定

医薬品開発における痙攣発作リスク評価については、seizure-liability というワードが使用されていることから、「seizure-liability」を設定し、PubMed で検索した (検索日：2023 年 8 月 31 日)。

2-2-2 文献の選択

PubMed により検索された文献について、review 及び reprint に該当するものは、除外した。また、文献の内容について、医薬品開発又は drug-induced seizure に関連のないも

のも除外した。

2-2-3 文献内容の分類

選択された文献の内容について、試験種 (*in vivo/in vitro*)、用いた動物・細胞等 (Species; Rat, Mouse, Dog, Monkey, Zebrafish, Rodent cells, Human iPS cells)、評価法 (Method; Brain slice electrophysiology, Brain slice MEA, Cells MEA, EEG, Machine learning, Principal component analysis (PCA), Other) 及び研究限界 (Limitation) をキーワードとして分類を行った。

2-3 結果

2-3-1 文献検索及び選択結果

seizure-liability で PubMed 検索した結果、57 報の文献がヒットした。その内、2-2-2 により、34 報の文献を選択した (表 2)。

2-4 文献内容の分類結果

試験種 (*in vivo/in vitro*) 及び用いた動物・細胞等 (Species; Rat, Mouse, Dog, Monkey, Zebrafish, Rodent cells, Human iPS cells) の分類結果は、表 2 に示した。試験種について、*in vivo* が 12 報、*in vitro* が 24 報となった (同一文献内で *in vivo* 及び *in vitro* を実施している場合はそれぞれカウントした)。用いた動物・細胞等について、Human iPS cells (11 報) が一番多く、次いで Rat (10 報)、Rodent cells (10 報)、Dog (6 報) となった。

評価法 (Method; Brain slice electrophysiology, Brain slice MEA, Cells MEA, EEG, Machine learning, Principal component analysis (PCA), Other) の分類結果は、表 3 に示した。評価方法について、Cells MEA (細胞を用いた MEA 計測、13 報) が一番多く、次いで EEG (8 報)、Brain slice electrophysiology (7 報) となった。研究限界 (Limitation) の分類結果は、表 4 に示した。研究限界を記載した文献は、16 報であった。

2-5 先行研究調査のまとめ及び考察

先行研究調査の分類結果から、医薬品開発における痙攣発作リスク評価に関する重要な情報及び示唆を得ることができた。

試験種に関して、*in vivo* 試験 (12 報) よりも *in vitro* 試験 (24 報) が多く報告されていた。EEG を用いた報告が *in vivo* 試験では多かったが、医薬品開発の安全性試験では一般的ではない。通常、医薬品開発における痙攣発作の検出は、ICH S7 ガイドラインに記載されている Irwin 法 (Irwin, 1968) 又は FOB (Moser et al., 1995) に従い、ラット、マウス、サル又はイヌ等が使用されている。また、FOB は、8 匹/用量、3 用量での実施されることが多い (Authier et al., 2016b) ため、必要な薬物量や時間的な制約が考えられる。したがって、痙攣発作リスク評価において、*in vitro* 試験の重要性が示唆された。

評価で用いられた動物・細胞等に関して、従来用いられてきた Rat や Rodent cells に加え、Human iPS cells (11 報) が最も多く報告された。これは、ヒトと動物の種差を補完する有力なツールとして注目されている。ただし、iPS 細胞を用いる場合は、測定までに 2~8 週間の培養期間が必要であり (Tukker et al., 2020b, 2020a; Ishibashi et al., 2022, 2023; Matsuda et al., 2022; Yokoi et al., 2022; Rockley et al., 2023; Zhai et al., 2023)、iPS 細胞由来のオルガノイドの場合は、3 ヶ月の培養期間 (Yokoi et al., 2021) が必要である。こ

のため、測定までの期間及びコスト面において、デメリットがあると考えられた。

評価方法に関して、Cells MEA (細胞を用いた MEA 計測、13 報) が最も多く報告された。これらの評価法は、24~96 well プレートを用いることで、*in vivo* 試験や他の *in vitro* 試験に比べて高いハイスループット性を持ち、近年は国内外で積極的に利用されている。また、Machine learning や Principal component analysis (PCA) を用いた評価法 (Zhang et al., 2011; Ishibashi et al., 2021, 2022, 2023; Matsuda et al., 2021, 2022; Lipponen et al., 2023) についても報告され、その有用性が示されている。

研究限界 (Limitation) に関して、*in vivo* 試験、*in vivo* 試験を問わず、種差 (ヒトと動物の違い)、評価 (実験) デザイン上、痙攣発作リスクを検出できない可能性があること、評価法の検証のためには、より多くの化合物を評価することが挙げられる。現状において、痙攣発作リスク評価 (法) は、発展途上にあり、今後の評価方法の確立や、他の情報 (血中濃度、薬物動態、代謝物) を加味した評価が求められると考えられた。

第3章 マウス海馬スライスにおける膜電位感受性色素

イメージングを用いた *in vitro* 痙攣発作リスク評価

(本章の内容に関しては、*Front. Cell. Neurosci.* 17:1217368 (2023) に発表済み)

3-1 序論

薬剤誘発性の痙攣発作は、主に興奮性神経伝達の亢進、抑制性神経伝達の低下、又はその両方のアンバランスが原因となる。このような薬物の有害反応は、薬剤の臨床使用の失敗や有望な薬剤の市場撤退、薬剤のセカンドラインへの格下げにつながる可能性がある。そのため、前臨床試験の初期段階で痙攣発作を検出するスクリーニングアッセイは、リード化合物の最適化に寄与し、候補化合物の選択に大きく貢献する可能性がある。

in vitro 痙攣発作リスク評価の手法として、海馬スライスを用いた電気生理学的実験においては、Schaffer 側枝経路 (SC) に電気刺激を与え、CA1 領域における錐体細胞層の集合スパイク及びその面積を測定し、これらを評価の指標としている。集合スパイクは、神経細胞の発火活動の総和を示しており、化合物の痙攣発作リスクを反映するものと考えられる。しかし、従来の電気生理学的手法では、設置できる電極数に制約があり、個々の細胞の活動を測定することが困難であった。それらを解決するために、膜電位感受性色素 (VSD) を利用することで、ミリ秒単位で膜電位変化を光学的に測定し、神経回路の微細な変化の可視化・定量化することが可能となった。

本章では、海馬スライス標本の VSD アッセイにより、神経細胞の活動電位とシナプスの受容電位を測定し、その結果から *in vitro* での新しい痙攣発作リスク評価法を提案し

た。

3-2 方法

3-2-1 VSD によるスライス作製と染色

すべての動物実験は、徳島文理大学実験動物委員会の承認を得たプロトコルに従って行った。4~7週齢の雄マウス (C57BL6) を深部イソフルラン麻酔下で断頭し、厚さ 350 μm の海馬スライス標本を作成した。スライス標本の作成、VSD の調製や染色は、富永ら (Tominaga et al., 2019) が発表した方法を採用した (図 5)。

具体的な手順として、脳を氷冷人工脳脊髄液 (ACSF; 124 mM NaCl、2.5 mM KCl、2 mM CaCl₂、2 mM MgSO₄、1.25 mM NaH₂PO₄、26 mM NaHCO₃ 及び 10 mM グルコース、pH7.4, 95% O₂/5% CO₂ 混合ガスでバブリング) 中で急速に冷却した。5 分間冷却した後、海馬を周囲の皮質とともに切り離し、海馬構造全体を寒天ブロック上に置いた。腹側の垂直面側をシアノアクリレート接着剤でビブラトーム (VT-1000 及び VT-1200S、Leica) に取り付け、海馬を含む 350 μm 厚の横断切片を切り出した。各切片をメンブレンフィルター (Omnipore, JHWP01300、孔径 0.45 μm 、Merck Millipore Ltd., MA, USA) が固定されたプレキシガラスリング (内径 11 mm、外径 15 mm、厚さ 1~2 mm) 上のフィルターに移した。

プレキシガラスリングをモイストチャンバー内で 95% O₂/5% CO₂ 混合ガスを ACSF を通して連続的にバブリングしながら、28°C の温度で 25 分間保ち、その後室温に戻した。1 時間のインキュベーション後、スライスを 100-110 μL の VSD 染色液 [0.1 mM Di-4-ANEPPS (D-1199, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA), 2.7% エタノール, 0.13%

CremophorEL (Sigma-Aldrich Co.) , 50% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich Co.) , 50% ACSF] で、20 分間染色した。スライスは記録前に遮光して室温で少なくとも 1 時間インキュベートした。

3-2-2 刺激と電気生理学的計測

海馬スライス標本は、プレキシガラスリングごとサブマージチャンバーに移し、1 mL/min の速度で 31°C に加温した ACSF を連続的に灌流し、95% O₂/5% CO₂ 混合ガスでバブリングした。Ag/AgCl ワイヤを挿入した内部に ACSF を満たしたガラス電極を刺激用電極及び記録用電極として使用した。これらの電極により、Schaffer 側枝経路 (SC) 刺激による Cornu ammonis 1 (CA1) の放射状層 (SR) のフィールド興奮性シナプス後電位 (fEPSP) を測定した。

フィールド電位の記録は、差動増幅器 (モデル 3000 ; AM Systems, WA, USA ; ローパスフィルター 3 kHz、ハイパスフィルター 0.1 Hz、ゲイン 100) を用い、ESTM-8 のアナログ入力を 10 kHz サンプリングし、16 ビットの AD コンバーターでデジタル化を経て、コンピューターに入力された。電気生理学的データの解析はこれらの記録に対して行われた。なお、電気生理学的計測と光計測は互いに影響を及ぼさなかった。

刺激周波数は、実験中ずっと 0.05 Hz を維持した。刺激強度は、電気刺激装置 (ESTM-8, Brainvision, Inc.) 及び IgorPro (WaveMetrics Inc.) のマクロプログラムで制御した。

3-2-3 VSD 光信号の計測

VSD 光信号の計測は電気生理学的計測と同時に行った。スライス標本の上方に焦点距

離が 20 mm の水浸対物レンズ (開口数 =0.35、Brainvision Inc.、東京)、1.0 倍のライカマイクロシステムズ (投影レンズ)、ダイクロイックミラー ($\lambda = 575 \text{ nm}$)、励起フィルター ($\lambda = 530 \pm 30 \text{ nm}$) 及び発光 ($\lambda > 590 \text{ nm}$) フィルターからなる落射蛍光顕微鏡を設置した。スライス標本からの蛍光は、CMOS カメラ (MiCAM02、Brainvision Inc.) で取得し計測した。VSD 蛍光の初期蛍光量に対する変化の割合 ($\Delta F/F$) を光信号として用いた。MiCAM02 カメラ (12bit ADC, 4.5×10^5 well depth, 70 dB) で 0.6 ms/frame で撮影した。また、光信号は、 $5 \times 5 \times 3$ (水平 \times 垂直 \times 時間; $\sigma \approx 1$) のガウシアンカーネルを用いて、空間的及び時間的に 2 回フィルタリングし、光信号の解析は、IgorPro ソフトウェア (WaveMetrics Inc.) で行った。なお、フィールド電位記録も MiCAM02 システムのアナログ入力に取り込み、電気生理学的データと光信号の時間相関を継続的に確認した。

3-2-4 使用した薬物

本章で用いた痙攣発作誘発性化合物の濃度、溶媒及び作用機序は表 5 に示した。ピクトキシシン (PiTX)、SR955331 (ガバジン:GZ)、4-アミノピリジン (4AP) 及びピロカルピン塩酸塩 (Pilo) で Sigma-Aldrich Co.及び Tocris から入手した。これらの化合物のストック溶液 (1000 \times) は、各々の溶媒で調製し、分注後には-20 $^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。使用直前には、これらの溶液を、酸素を含んだ ACSF で希釈して使用した。その他の試薬は国内の代理店から入手した。

3-2-5 データ処理と統計学的処理

電気生理学的記録では、SR に設置した電極から 30 秒ごとに (合計 204 回) フィールド

電位を取得し、fEPSP slope を算出した (図 6A、B)。同時に、VSD 光学データも 30 秒ごとに記録 (0.6 ms/frame×512 frame、トータル 307.2 ms) し、SR 及び SP の反応波形を取得した。1 つの脳スライスから 307.2 ms の記録が 204 件取得されることになる。光信号と電気生理学的信号は、Igor Pro ソフトウェアで開発されたカスタムマクロを用いて同時に解析された。すべてのデータは平均 ± 標準誤差で表示し、n はスライス数を表す。統計解析は R 統計ソフトウェアパッケージ (4.1.2; R Core Team, 2021) を用いて行った。統計学的有意差は、一元配置分散分析の後に Dunnett の検定を実施し、*p* 値が 0.05 未満の場合を有意差ありと判断した。図中では統計学的有意差を示す記号を、ns (有意差なし)、* (*p* < 0.05)、** (*p* < 0.01) 及び *** (*p* < 0.001) で表記した。

3-3 結果

3-3-1 痙攣発作誘発性化合物の fEPSP slope に対する影響

興奮性シナプス後場電位 (fEPSP) は、神経細胞入力に対する直接的なシナプス応答として重要である。そのため、本研究では、fEPSP slope (図 6B) を CA1 領域の生理学的反応のモニタリングとして用いた。図 6 に示す実験スキームで、痙攣発作性化合物である PiTX (1~100 μM)、GZ (0.1~10 μM)、4AP (10~100 μM) 及び Pilo (10~100 μM) を用いて、それぞれ 3 濃度 (低、中、高濃度) で試験し、fEPSP slope に及ぼす影響を調べた (図 7A-D)。

その結果、PiTX は高濃度 (100 μM) で fEPSP slope を有意に減少させ ($68.63 \pm 1.39\%$ 、*p* < 0.001)、中濃度 ($\geq 1 \mu\text{M}$) の GZ も同様であった ($80.39 \pm 2.43\%$ 、*p* < 0.05; $40.94 \pm 2.46\%$ 、*p* < 0.001)。Pilo は、低濃度 ($\geq 10 \mu\text{M}$) で fEPSP slope を強く減少させた ($26.80 \pm$

1.47%、 $21.02 \pm 1.66\%$ 、 $19.70 \pm 1.43\%$ 、 $p < 0.001$)。4AP は中濃度 ($40 \mu\text{M}$) では fEPSP slope を有意に上昇させたが ($133.16 \pm 2.39\%$ 、 $p < 0.05$)、高濃度 ($100 \mu\text{M}$) では slope を上昇させる傾向があった。

3-3-2 VSD イメージングを用いた痙攣発作誘発性化合物の神経細胞の活動に対する影響

fEPSP と同時に VSD イメージングを用いて、Schaffer 側枝経路刺激に対する神経細胞活動の伝播パターンを観察した (図 8)。

その結果、PiTX は中濃度 ($10 \mu\text{M}$) でより顕著で応答時間の長い神経興奮を引き起こした。また、高濃度 ($100 \mu\text{M}$) で顕著な効果が観察された (図 8B 左上)。同様に、GZ は中濃度以上 ($\geq 1 \mu\text{M}$) で、同様の顕著な持続的で大きな神経興奮を示した (図 8B 右上)。さらに、4AP も中濃度以上 ($\geq 40 \mu\text{M}$) において、同様の応答が見られた (図 8B 左下)。一方で、Pilo は低濃度以上 ($\geq 10 \mu\text{M}$) で CA1 領域における神経興奮の減弱が認められた (図 8B 右下)。

3-3-3 痙攣発作誘発性化合物の VSD 光信号応答に対する影響

SR (刺激電極と記録電極の中央部、図 9A) における光信号の波形を比較し、各化合物の効果を評価した (図 9)。各化合物濃度及び処理時間の条件は、3-3-1 と同様である。

PiTX は高濃度 ($100 \mu\text{M}$) で持続反応の上昇を引き起こし、GZ は中濃度以上 ($\geq 1 \mu\text{M}$) で同様の反応を引き起こした (図 4Bi、Ci)。4AP は高濃度 ($100 \mu\text{M}$) で即時ピークの明確な上昇がみられ、中濃度以上 ($\geq 40 \mu\text{M}$) では持続反応の上昇を引き起こした (図 9Di)。一

方、Pilo は即時ピークの振幅の顕著な減少を引き起こした (図 9Ei)。

3-3-4 トレース波形の定量化パラメータ設定及び解析

トレース波形の定量化し、さらに詳細に解析した。即時ピーク値 (immediate peak)、即時後ピーク値 (post-immediate peak) 及び持続反応値 (sustained response) の 3 つのパラメータを設定した (図 9Bi~Ei)。各化合物濃度及び処理時間の条件は、3-3-1 と同様である。

PiTX は即時ピーク値には影響を与えなかったが、高濃度 (100 μM) では持続反応値を上昇させた (6.65 ± 0.97 , $p < 0.001$)。GZ は高濃度 (10 μM) で即時ピーク値を下降させ (3.97 ± 0.15 , $p < 0.001$)、持続反応値を上昇させた (7.47 ± 1.24 , $p < 0.001$)。4AP はまた、高濃度 (100 μM) で即時ピーク値を上昇させ (6.36 ± 0.24 , $p < 0.05$)、中濃度以上 (≥ 40 μM) で持続反応値を上昇させた (3.17 ± 0.28 及び 3.91 ± 0.33 , $p < 0.001$)。一方、Pilo は低濃度以上 (≥ 10 μM) で即時ピーク値を下降させた (2.32 ± 0.15 , 1.90 ± 0.14 , 1.65 ± 0.14 ; それぞれ $p < 0.001$) が、持続反応値には影響しなかった。

さらに、最大持続反応値と即時後ピーク値の差を ΔSPi 値として計算した (図 9Bii-Eii)。PiTX 及び Pilo は、 ΔSPi 値に影響は無かったが、GZ は中濃度 (1 μM) で ΔSPi 値を下降させ (-1.87 ± 0.32 , $p < 0.05$)、高濃度 (10 μM) で ΔSPi 値を上昇させた (0.86 ± 0.62 , $p < 0.01$)。4AP は、中濃度以上 (≥ 40 μM) で、 ΔSPi 値を上昇させた (0.93 ± 0.23 及び 1.40 ± 0.18 , それぞれ $p < 0.001$)。

3-3-5 痙攣発作誘発性化合物の PR-ratio に対する影響

SRの光信号はEPSPに依存し、SPの光信号はスパイクに依存することが報告されている (Tominaga et al., 2009)。そのため、先端樹状突起で発生するEPSPに対して、細胞体で活動電位が発生する割合 (EPSP-活動電位発火制御) の指標として、SR応答に対するSP応答の比 (PR-ratio) を採用し、解析を行った。各化合物の影響を比較するため、各化合物濃度及び処理時間の条件は、3-3-1と同様で行った。

その結果、各化合物の代表的なVSD光信号応答の波形 (10 V刺激及び55 V刺激)は、図9Bi-Eiと同様の変化を示した (図10Aii)。PR-ratioは興奮性と抑制性との比率の指標であり、特に弱い刺激レベルでは細胞体への抑制性入力に敏感に反応することが分かっている (Tominaga et al., 2009)。図10Bi~Eiは、PR-ratioの算出に必要なSP及びSRの最大即時ピーク値の各濃度と刺激強度による変化を示している。PiTXとGZのSP応答とSR応答の最大値は、濃度の増加とともに上昇しなかった (図10Bi, Ci)。4APは濃度依存的にSP応答とSR応答の最大値を増加させ (図10Di)、Piloは濃度依存的に減少させた (図10Ei)。PR-ratioは、各測定点におけるSP応答の最大即時ピーク値とSR応答の最大即時ピーク値の比として計算した (図10Ai、赤色塗りつぶし菱形)。

図10Bii-Eiiは、それぞれ弱刺激 (10 V) と飽和刺激 (55 V) について計算したPR-ratioの比較を表している。PiTXは、10 V刺激と55 V刺激の両方について、中濃度以上 ($\geq 10 \mu\text{M}$) で平均PR-ratioの有意な上昇を示した (図10Bii)。同様に、GZは中濃度以上 ($\geq 1 \mu\text{M}$) で平均PR-ratioを上昇させる傾向を示し、55 V刺激でのみ有意差が観察された (図10Cii)。これらの所見は、PiTXとGZによる細胞体での抑制作用の低下を示唆している。一方、4APは中濃度以上 ($\geq 40 \mu\text{M}$) で平均PR-ratioの上昇を示したが、この効果は10 V刺激に限られた (図10Dii)。つまり、E-S関係 (興奮性入力と神経細胞のスパイク発火の間の関連性) への影響は最小限であることが示された。一方、Piloは弱刺激及び飽

和刺激において、それぞれ中濃度及び低濃度以上 (30 μM 及び $\geq 10 \mu\text{M}$) で平均 PR-ratio の低下傾向を示したが、ともに有意差は認められなかった (図 10Eii)。

したがって、PiTX と GZ は細胞体での抑制作用を明らかに低下させ、PR-ratio の顕著な上昇をもたらした。一方、4AP は E-S 関係にわずかな影響しか及ぼさず、Pilo は PR-ratio にほとんど影響を及ぼさず、選択した刺激に対して有意差を示さなかった。

3-4 考察

痙攣発作リスク評価において、海馬スライス電気生理学的手法などの *in vitro* 脳スライスアッセイは、初期の安全性薬理の評価に採用されている (Easter et al., 2007; Accardi et al., 2016)。このアッセイの予測率は 89% と比較的高いが (Easter et al., 2009)、げっ歯類とヒトの間には種差が観察されている (Löscher, 2009; Bankstahl et al., 2012; Nagayama, 2015)。VSD でのアッセイではミリ秒単位で膜電位の変化を測定し、神経細胞の活動電位とシナプスの受容器電位を包括的に視覚化することが可能である (Tominaga et al., 2009)。この特性を活用して、本研究では動物モデル及びヒトで発作を誘発するとされる 4 つの化合物が、電気生理学的パラメータ (fEPSP slope) 及び VSD 光学応答に与える影響を検討した。知る限りでは、本研究は VSD ベースのアッセイを用いた *in vitro* 痙攣発作リスク評価への初の適用例を示している。

3-4-1 既報の *in vitro* 脳スライス実験との比較 (スループット・濃度範囲)

医薬品開発において、スクリーニングアッセイのスループット性は極めて重要である。この点においては、細胞を用いた MEA 測定 (Zhai et al., 2021) にある程度の優位性

があり、iPS細胞にも使用できる測定方法である (Tukker et al., 2018, 2020b)。しかしながら、痙攣発作が複雑なプロセスで引き起こされる性質を考慮すると、動物試験は依然として必要である。脳スライス実験は、痙攣発作リスク評価のスループット性の向上において、大きな前進を示している。さらに重要なことは、スライス実験により、神経ネットワークの機能へのアクセスが可能になることから、痙攣発作メカニズムの理解を向上させることができると考えられる。

脳スライス実験のスループット性 (Easter et al., 2007; Accardi et al., 2018; Zhai et al., 2021) は、一個体の動物の脳から生理学的な組織を収集するための実験手順によって決定されるが、データを収集するために必要な時間は、実験手順に関係なく比較的一貫している。例えば、Easterらの研究 (Easter et al., 2007) では、単一の化合物のデータを収集するのに約 70 分 (5つの濃度、2つの刺激応答関係)であったのに対し、本研究では刺激応答関係の記録を含めて 100 分であった。ただし、VSD アッセイは、刺激の伝播の変化の範囲と程度を視覚化でき、記録された画像の視野の任意の部分で定量的な分析が可能である利点がある。

本研究で使用された痙攣発作誘発性化合物の濃度範囲について、既報の脳スライスを用いた痙攣発作リスク評価 (電気生理学的手法及び MEA) で痙攣発作性反応が検出された濃度範囲と比較した (表 6)。その結果、PiTX、GZ 及び 4AP の濃度は既存のアッセイの範囲内であった。Pilo は VSD ベースのアッセイでは検出されなかったが、これについては 3-4-3 で議論した。

3-4-2 CA1 領域の生理学的反応をモニターするための fEPSP

本研究では、シナプス活動を直接反映する方法として、fEPSP を用いてスライスの生

理的活動をモニターした。痙攣発作活動は、シナプス前系統及び後系統の両方におけるさまざまな生理的過程によって引き起こされる可能性がある。痙攣発作誘発性化合物による変化は、シナプス後細胞の変化に加えて、シナプスに由来する変化を反映するはずである。

電気生理学的実験の結果より、PiTX と GZ で fEPSP slope の減少が観察された (図 7Aii, Bii)。おそらく、シナプス前 GABA_A 受容体を介したグルタミン酸作動性伝達のトニック促進 (tonic facilitation) が GABA_A 受容体阻害薬により阻害されたものと考えられる (Jang et al., 2005)。これは、GABA_A 受容体拮抗薬の海馬の抑制解除の複雑さを示唆している (Bast et al., 2017)。4AP の fEPSP slope の増加は、以前に報告されたように、中濃度 (40 μ M) で観察された (Barish et al., 1996)。しかし、高濃度 (100 μ M) では、以前の報告 (Wheeler et al., 1996) とは対照的に、4AP に有意差は認められなかった。4AP の高濃度 (100 μ M) では増加傾向が観察されたが (図 7Cii)、単一の濃度の処理ではなく、低濃度から高濃度への 4AP 投与濃度の累積適用が影響している可能性が推察された。さらに、fEPSP slope の濃度依存的な減少が Pilo で観察されたが、Pilo 誘発側頭葉てんかんのラットモデルでは、てんかん状態発症後に海馬スライスで fEPSP slope の減少が観察された (Postnikova et al., 2021)。このように、各痙攣発作誘発性化合物の fEPSP slope に及ぼす影響は、概ね既報と通りであった。

これらの観察結果は、痙攣発作誘発性化合物によるシナプス変化を浮き彫りにしていると考えられた。しかし、後述の VSD イメージングでは、錐体細胞層における出力機能とともに、放射状層における EPSP 成分 (図 8) だけでなく、PR-ratio としての入出力機能 (図 10) 及び異なる時間窓における変化 (図 9 : 即時ピーク値-即時後ピーク値-持続反応値比率) にもアクセスすることができる。これにより、個々の化合物が痙攣発作を誘発するメカニズムの違いが明らかになるかもしれない。

3-4-3 VSD イメージングによる神経細胞活動の可視化

PiTX、GZ 及び 4AP は、海馬スライスにおいてより大きく持続時間の長い神経興奮を起こすことがわかった(図 8B)、痙攣発作様反応が検出できることが示された。

Pilo の痙攣発作性反応は、VSD イメージングでは検出されなかったが、ラット皮質ニューロンを用いた多電極アレイ (MEA) でも検出できないことが報告されている (Bradley et al., 2018)。同様に、ヒト人工多能性幹細胞 (hiPSC) 由来の神経細胞やげっ歯類の初代皮質細胞を用いた MEA でも、Pilo の用量依存的で明確な痙攣発作原性反応は検出されなかった (Tukker et al., 2020b)。Pilo 誘発痙攣発作モデル動物の海馬スライスを用いた VSD イメージングでは、嗅内皮質から CA1 野に直接入力する皮質-アンモン角経路の顕著な活性化が示されており (Ang et al., 2006)、薬物によって複数の経路を分析する必要があることが示唆された。

3-4-4 VSD アッセイパラメータによる神経機能への直接的な薬理学的影響の探索

本研究では、VSD 反応波形について、即時ピーク値、即時後ピーク値及び持続反応値の 3 つのパラメータを定義した (図 9)。Pilo を除くすべての化合物において、SR における VSD 光信号応答の波形は持続反応の上昇を示し、痙攣発作性反応が確認された (図 9E)。GABA_A 受容体のアンタゴニストでは、高濃度 (100 μM) の PiTX と中濃度以上 ($\geq 10 \mu\text{M}$) の GZ で持続反応値の上昇が観察された。GABA_A 受容体に対する PiTX の IC₅₀ は 1.15 μM であり、GZ のそれは 0.2 μM である (Ueno et al., 1997; Ng et al., 2017) ことか

ら、痙攣発作性反応の活性濃度の差は、受容体の IC_{50} の差に関係していると考えられた。4AP は中濃度以上 ($\geq 40 \mu\text{M}$) で持続性反応値と ΔSPi 値 (図 9Di, ii) の上昇を示した。4AP の処理は、最初のシナプス反応に続く遅延脱分極を引き起こしたが (Barish et al., 1996; 図 9Di)、PiTX と GZ は長時間の脱分極反応を誘導した (図 9Bi, Ci)。この現象は、4AP の薬理効果であるカリウム電流の阻害によるものと考えられ、同様の現象はラットの脳切片でも観察されている (Barish et al., 1996)。

これらのことから、VSD 光信号のトレース波形について、即時ピーク値 (immediate peak)、即時後ピーク値 (post-immediate peak) 及び持続反応値 (sustained response) の 3 つのパラメータを定義し、定量化することにより、神経機能に対する薬理学的影響の探索ができる可能性が示唆された。

SR の光信号は EPSP に依存し、SP の光信号はスパイクに依存することが報告されている (Tominaga et al., 2009)。そのため、先端樹状突起で発生する EPSP に対して、細胞体で活動電位が発生する割合 (EPSP-活動電位発火制御) の指標として、SR 応答に対する SP 応答の比 (PR-ratio) を採用した。PiTX と GZ は PR-ratio を上昇させた (図 10Bii, Cii) ことから、これらの化合物は GABA 受容体のシャント作用を低下させ、スパイク発火の閾値を下げることで発作反応を誘導している可能性が示唆された (Mann and Paulsen, 2007)。同様に、4AP は弱刺激 (10 V) で PR-ratio の上昇を示し (図 10Dii)、スパイク発火の閾値を下げ、発作反応を誘導する可能性を示している。4AP は低濃度以下 ($\leq 40 \mu\text{M}$) では D 型カリウムチャネルを阻害し (Storm, 1988)、高濃度では A 型カリウムチャネルを阻害することが知られている (Gutman et al., 2005)。カリウムチャネルに対するこれらの作用は、錐体細胞の E-S 発火機能に影響を与え、PR-ratio の修飾に寄与すると考えられる。しかしながら、4AP の PR-ratio は 55 V 刺激で有意な変化を示さなかったことから (図 10Dii)、遅延再分極 (図 9Di, ii) が発作反応を誘導している可能性が示唆された。

以上の結果は、膜電位応答を直接反映する VSD アッセイのパラメータを用いて、神経細胞機能に対する直接的な薬理学的影響を捉えることにより、未知の発作原性化合物の作用機序を調べる上で有用であると考えられた。

3-5 結論

本章では、新しい *in vitro* 痙攣発作リスク評価法の提案を目的とし、マウス海馬スライスの VSD アッセイを実施した。このアプローチにより、電気刺激の伝播状態を可視化し、VSD のトレース波形及び PR-ratio の解析を通じて、痙攣発作誘発性化合物の特性を明らかにした。

このアッセイのスループット性は、従来の電気生理学的アッセイと比べ、多くの情報量が得られると考えられた。

Pilo の痙攣発作リスクの検出には、まだ課題が残っているものの、海馬スライスの VSD アッセイは、創薬の初期段階で痙攣発作誘発性化合物を同定するために有用であることを示唆していると考えられた。この手法を用いることで、医薬品研究開発における遅れを軽減し、痙攣発作誘発のメカニズムや関連する痙攣発作誘発性化合物のリスクに関する知見を提供するものと期待される。

第4章 総括

第1章：研究背景として、医薬品開発における痙攣発作のリスク評価が重要であること、*in vitro*での痙攣発作リスク評価の現状、痙攣発作の発生メカニズム、そしてVSDの特徴とその応用について述べた。

第2章：先行研究をキーワードによって分類し、痙攣発作リスク評価の現状を把握した。報告数から、*in vitro*試験の重要性が浮かび上がった。評価対象としてヒトiPS細胞の利用が増えつつあるが、長期の培養期間が必要であるという問題点が指摘された。また、細胞を用いたMEAの利用が増加しているが、その際に評価の限界や種差による課題が示唆された。痙攣発作リスク評価は、まだ発展途上であり、より包括的な評価法の必要性が強調された。

第3章：新しい*in vitro*の痙攣発作リスク評価法を提案するために、マウス海馬スライスを用いたVSDアッセイを行った。VSDアッセイによる可視化により、痙攣発作性化合物の神経細胞への影響を示し、新たなアプローチを提案した。さらに、VSD波形の解析により、薬理学的影響の探索が可能となり、神経細胞機能に対する薬物の影響を検出できる可能性が示された。この海馬スライスを用いたVSDアッセイは、*in vitro*における痙攣発作リスク評価法として今後の展開が期待される。

図表一覧

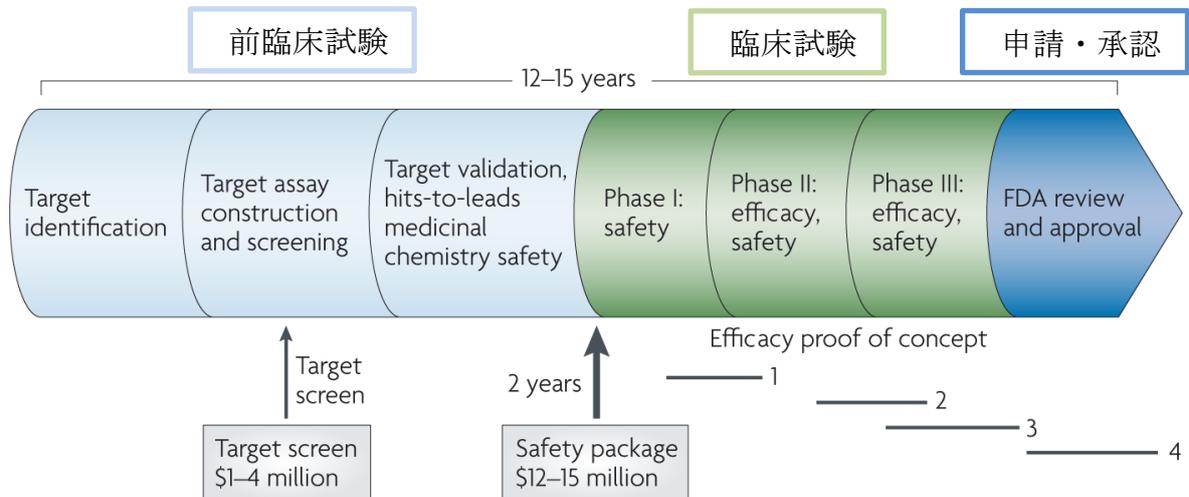


図 1 医薬品が承認されるまでの一連のステップの要約

[Roses, 2008 より引用]

医薬品開発は、一般的に前臨床試験及び臨床試験、そして規制当局への申請・承認から成り立っており、その過程には、12~15年の期間と2000億円のコストが必要であると言われている。前臨床試験は、基本的に標的の同定 (target identification)、標的のアッセイ構築及びスクリーニングの実施 (target assay construction and screening)、標的のバリデーション、良好な物性を持つリード化合物及び安全性 (毒性) 確認 (target validation, hits to leads medical chemistry safety) などで構成される。臨床試験は、Phase I (健常人での安全性確認)、Phase II (小規模の対象患者での安全性・有効性) 及び Phase III (大規模の対象患者での安全性・有効性) で構成される。

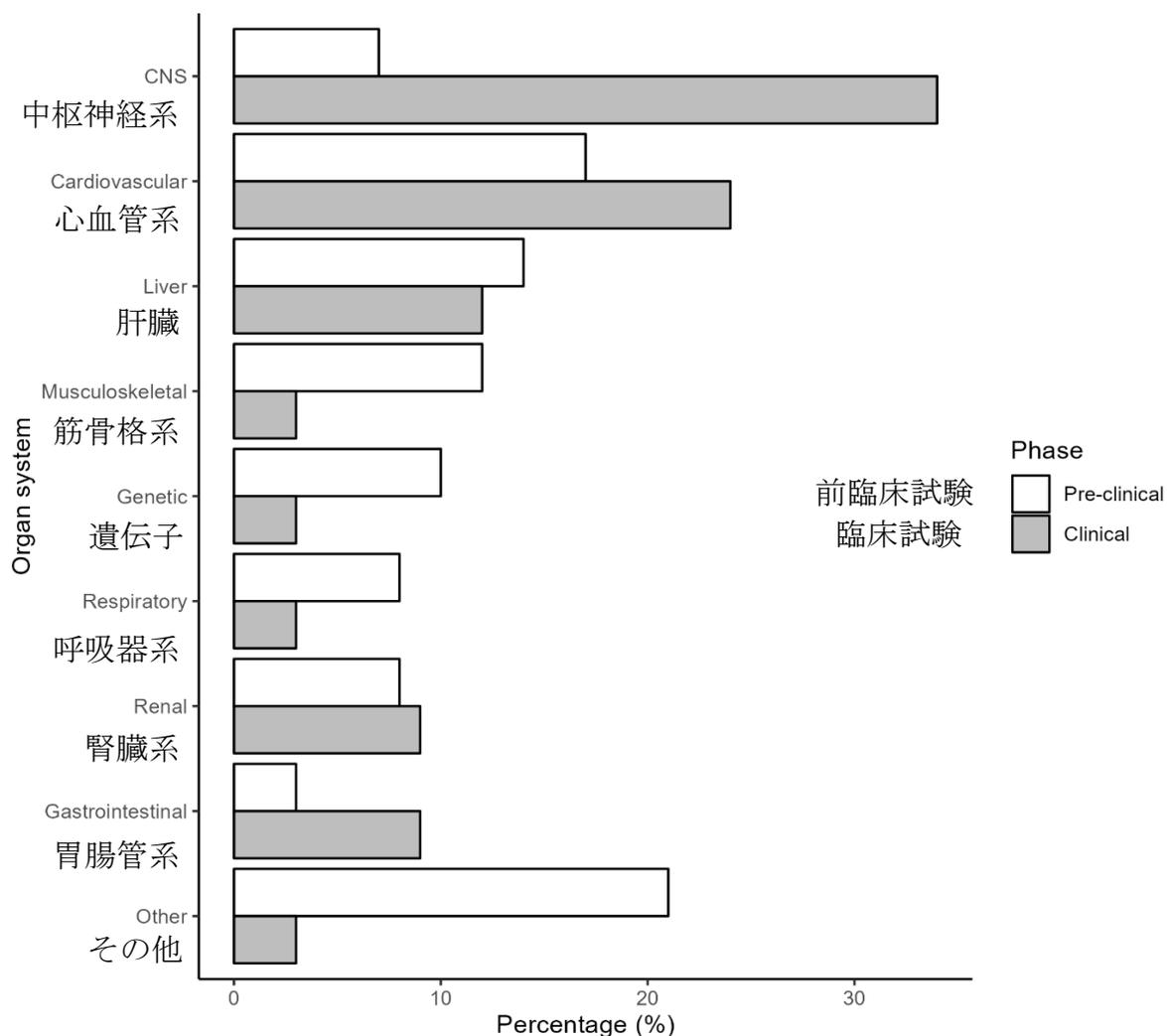


図2 臓器・組織系別のプロジェクトの失敗の割合（前臨床及び臨床試験）

[Cook et al., 2014 のデータから作成]

前臨床試験では、候補化合物が脱落する主な原因は、毒性であることが知られており、臨床試験においても、医薬品候補化合物の約 34%が中枢神経系の副作用により脱落している。したがって、中枢神経系の毒性評価が重要であると考えられる。

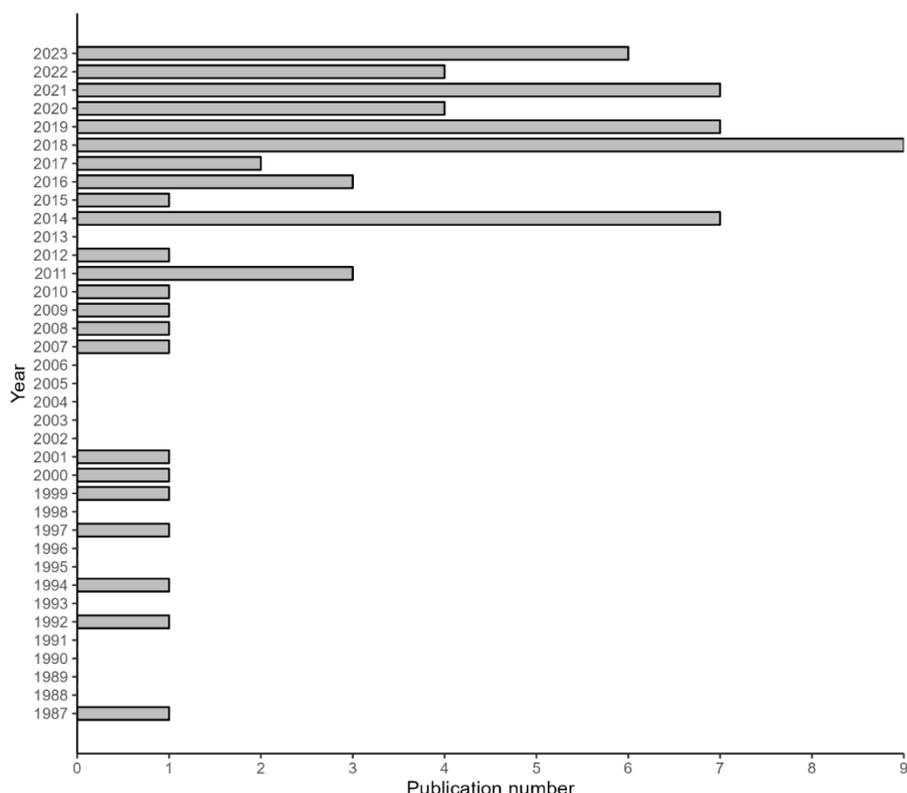


図3 seizure-liability (痙攣発作リスク) の論文数の推移 (1987~2023年)

[PubMed 検索で seizure-liability (痙攣発作リスク) を入力し、年ごとの論文数で示される csv ファイルを改変して作成]

【図の説明及び本文の要約】

多電極アレイ (MEA) を含む *in vitro* での痙攣発作リスク評価の研究報告が、近年増加している。しかしながら、現在の段階では、前臨床試験における *in vitro* での痙攣発作リスクを評価する標準的な試験デザインやガイドラインは確立されていない状況である。特に、前臨床試験では、痙攣発作 (seizure) は、良く観察される中枢神経系毒性の一つであることが報告されている。痙攣発作の検出は、前臨床試験の後半になるまで、評価されないため、痙攣発作がある場合は、医薬品開発のタイムスケジュールに大きな影響を与えることになる。以上、*in vitro* の痙攣発作リスク (seizure-liability) 評価法を開発し、創薬の早期に実施することは、企業にとって重要な課題になると考えられる。

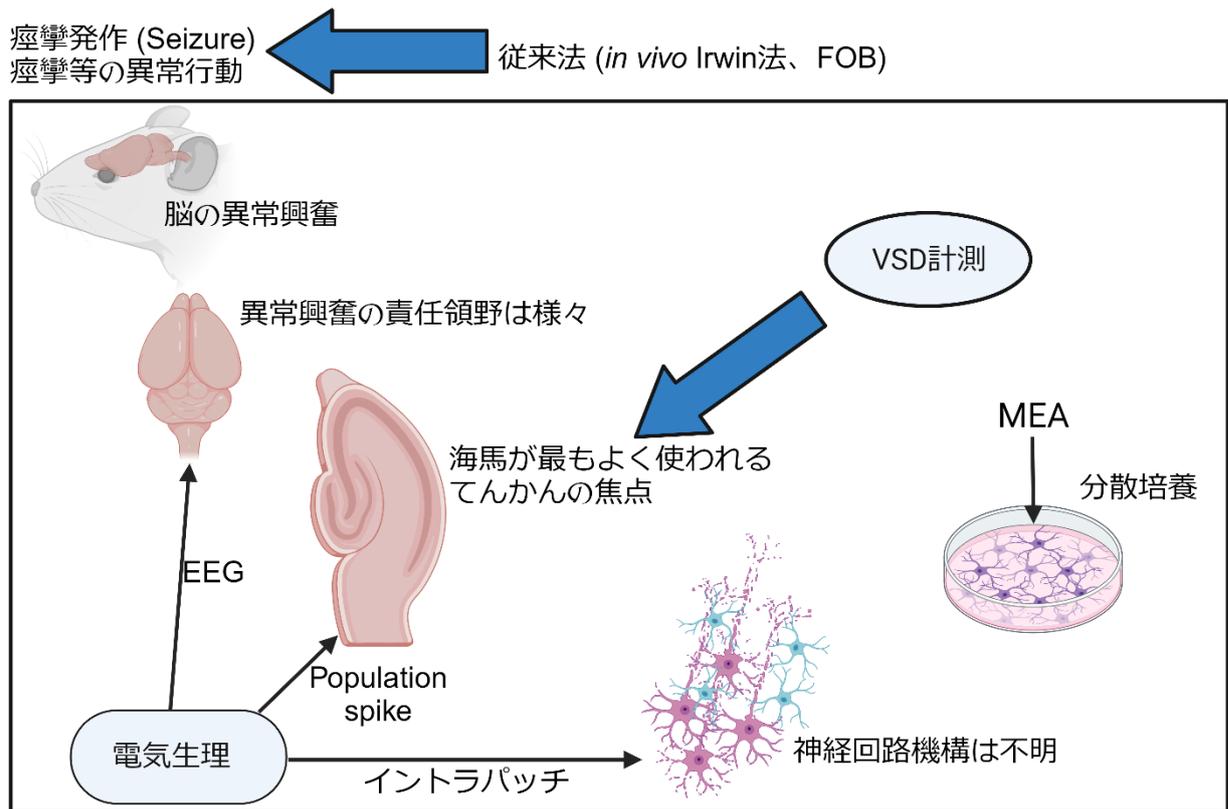


図 4 痙攣発作評価法の概略図

痙攣発作は脳の異常興奮が原因で引き起こされる。現状、痙攣発作の評価は、*in vivo* 試験 (Irwin 法又は FOB) に依存している。MEA は、分散培養系を用いて行われることが多く、神経ネットワークが不完全 (分化不均一性、成熟度など) であると考えられる。電気生理学的手法では EEG (脳波)、海馬スライスの Population spike (集合スパイク)、イントラパッチ (細胞内電極記録) などがあるが、VSD 計測は、脳全体、海馬の神経回路などの神経細胞レベルで広い適用範囲がある方法である。VSD を用いて痙攣発作リスク評価を海馬で行うことは有用であると考えられる。さらに、海馬スライス標本は、脳に存在する神経回路やシグナル伝達経路をある程度保持しているため、VSD を用いた痙攣発作リスク評価のモデルシステムとして利用できると考えられる。

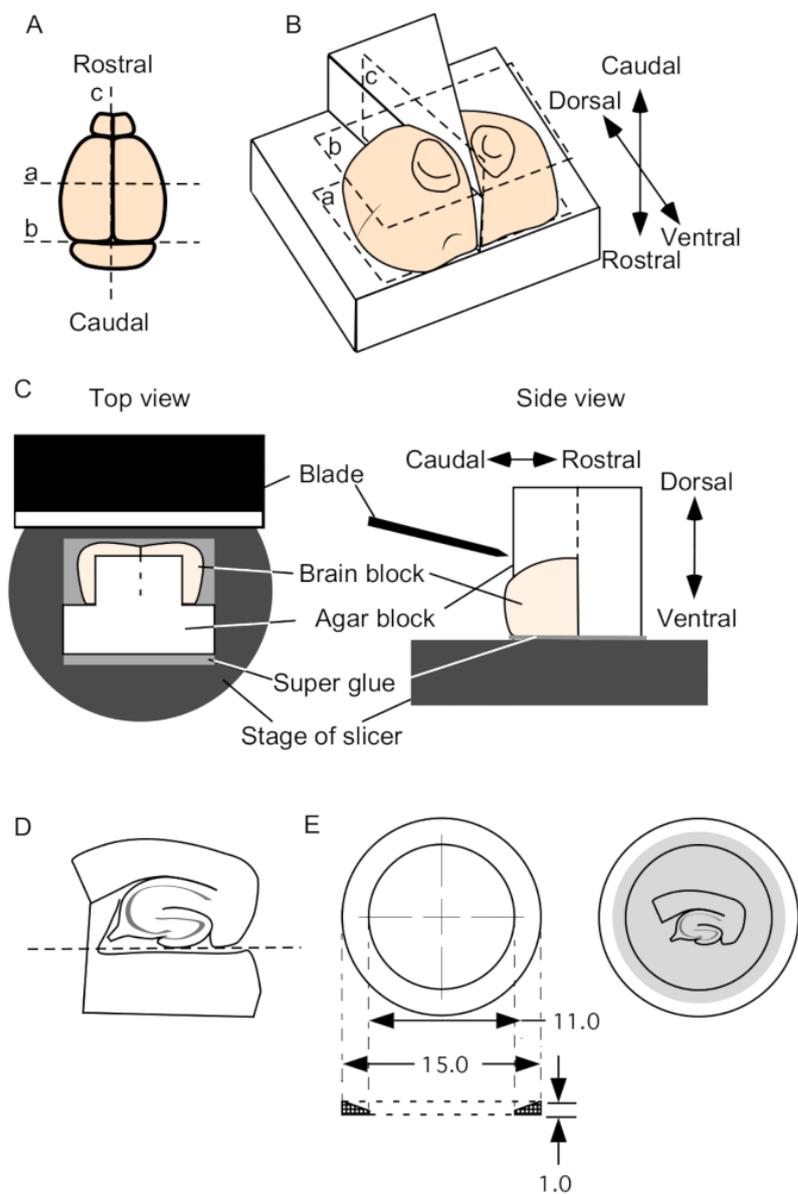


図5 マウス脳からの海馬スライス標本の作成

[Tominaga et al., 2019 より引用]

(A) 脳の切断方法の模式図。(B) 切断後の寒天ブロックへの載せ方。(C) スライサーでの切断様式。(D) 海馬切片 (脳幹部をカット)。(E) メンブレンフィルター (孔径 0.45 μm) 付きのプレキシガラスリング。Rostral は鼻側 ; Caudal は尾側 ; Dosal は背側 ; Ventral は腹側。

【図 5 の説明及び本文の要約】

4~7 週齢の雄マウス (C57BL6) を深部イソフルラン麻酔下で断頭し、脳を氷冷人工脳脊髄液 (ACSF; pH7.4, 95% O₂/5% CO₂ 混合ガスでバブリング) 中で急速に冷却した。5 分間冷却した後、海馬を周囲の皮質とともに切り離し、海馬構造全体を寒天ブロック上に置いた。腹側の垂直面側をシアノアクリレート接着剤でビブラトームに取り付け、海馬を含む 350 μm 厚の横断切片を切り出した。各切片をメンブレンフィルターが固定されたプレキシガラスリング上のフィルターに移した。プレキシガラスリングをモイストチャンバー内で 95% O₂/5% CO₂ 混合ガスを ACSF を通して連続的にバブリングしながら、28°C の温度で 25 分間保ち、その後室温に戻した。1 時間のインキュベーション後、スライスを 100-110 μL の VSD 染色液で、20 分間染色した。スライスは記録前に遮光して室温で少なくとも 1 時間インキュベートした。海馬スライスは、プレキシガラスリングを使ってサブマージチャンバーに移し、31°C に加温した ACSF を 1 mL/min の速度で連続的に灌流し、95%/5% O₂/CO₂ 混合ガスでバブリングした。

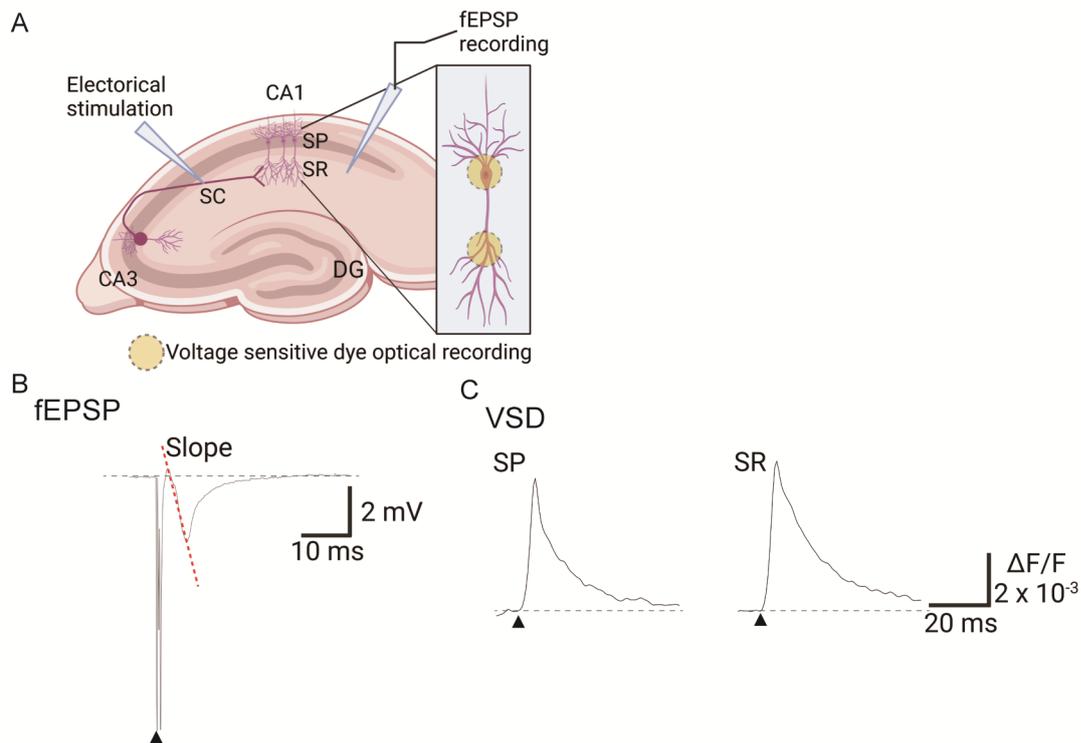


図 6 実験スキーム：マウス海馬スライスにおける電位感受性色素 (VSD) と電気生理学的信号の記録

(A) 光及び電気生理学的信号の記録配置を示す模式図。(B) SR のフィールド電極で記録したフィールド興奮性シナプス後電位 (fEPSP) のトレース波形。(C) SP 又は SR の VSD 光信号のトレース波形。黒く塗りつぶした三角形は電気刺激を示す。画像は BioRender.com で作成。DG は歯状回、SC は Schaffer 側枝、SP は錐体層、SR は放射状層、 $\Delta F/F$ は VSD 蛍光の変化量と初期蛍光量の比。

【図 6 の説明及び本文の要約】

ガラス電極を刺激電極及び記録電極として使用し、Schaffer 側枝経路 (SC) 刺激による Cornu ammonis 1 (CA1) の放射状層 (SR) のフィールド興奮性シナプス後電位 (fEPSP) を測定し、VSD 光信号は SR 及び SP から取得した。電気生理学的記録では、SR に設置した電極から 30 秒ごとに (合計 204 回) フィールド電位を取得し、fEPSP slope を算出した (図 6A、B)。同時に、VSD 光信号も 30 秒ごとに記録 ($0.6 \text{ ms/frame} \times 512 \text{ frame}$ 、トータル 307.2 ms) し、SR 及び SP の反応波形を取得した (図 6A、C)。

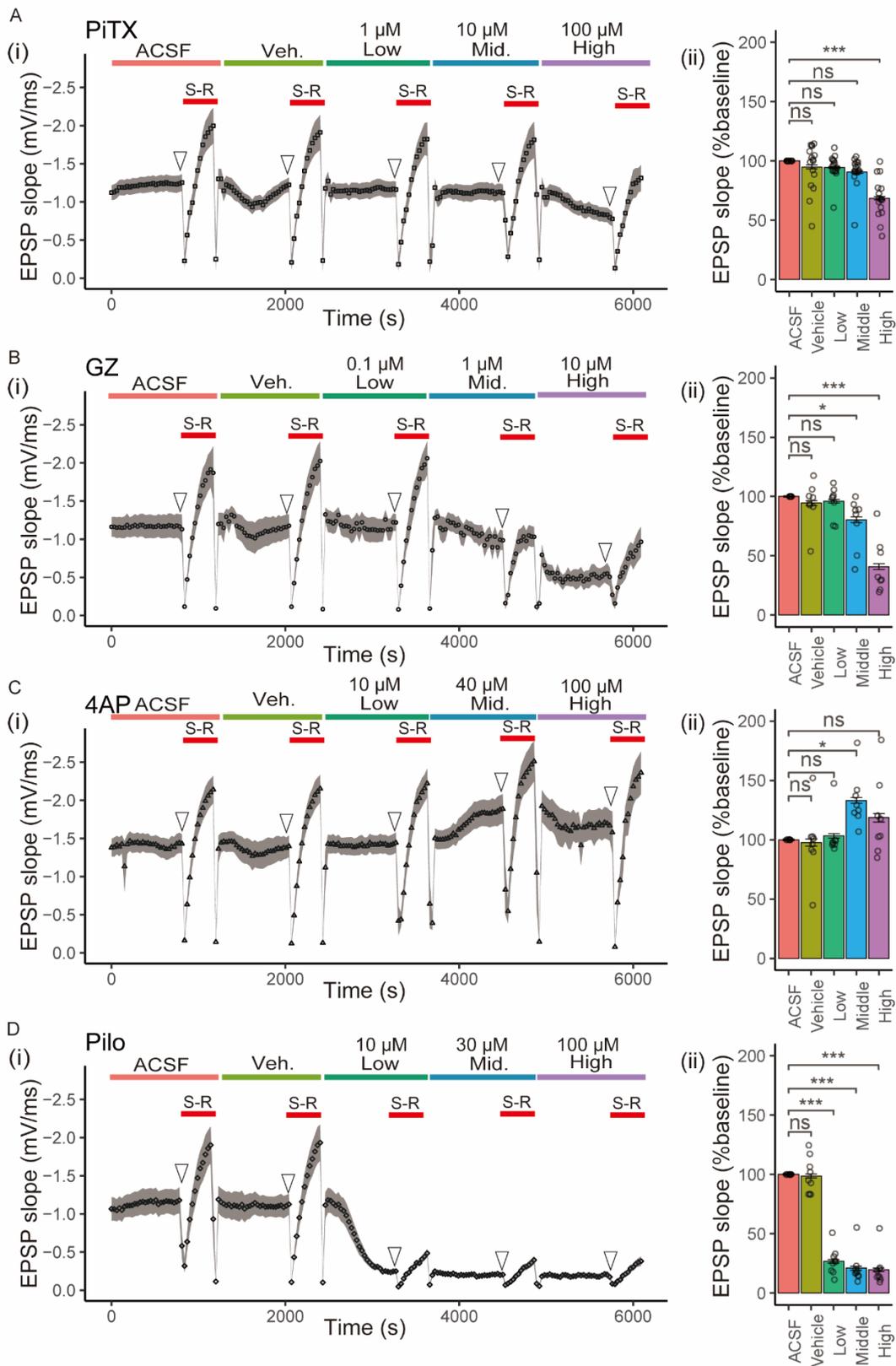


図7 痙攣発作誘発性化合物の fEPSP slope に対する影響

(i) ACSF、溶媒 (Veh.) 及び各化合物 [(A) ピクロトキシシン (PiTX)、(B) ガバジン (GZ)、(C) 4-アミノピリジン (4AP)、(D) ピロカルピン (Pilo)] の3濃度 [低-中-高濃

度] で、1 濃度あたり 20 分間ずつ作用させた後の fEPSP の傾きの時間経過。刺激-反応 (S-R) の関係は、化合物の各濃度で行われた (赤実線)。(ii) fEPSP slope に対する化合物の効果の平均データまとめ。平均 fEPSP slope は、(S-R) 関係の前の fEPSP 勾配 (開矢印) の 10 データポイントから算出した。すべてのエラーバーは、 $n = 8\sim 16$ スライス標準誤差。 $*p < 0.05$; $***p < 0.001$; ns は有意差なし (Dunnett の検定)。fEPSP は野性興奮性シナプス後電位 ; EPSP は興奮性シナプス後電位 ; Mid.は中濃度。

【図 7 の説明及び本文の要約】

神経細胞の興奮性シナプス後場電位 (fEPSP) は神経細胞への入力に対する直接的なシナプス応答で重要である。痙攣発作誘発性化合物である PiTX、GZ、4AP、Pilo の異なる濃度を使用して CA1 領域で実験を行い、fEPSP slope への影響を調査した。結果として、PiTX と GZ は高濃度で fEPSP slope を減少させ、GZ は中濃度でも同様だった。一方、Pilo は低濃度で強く fEPSP slope を減少させた。4AP は中濃度で上昇を示したが、高濃度では以前の報告と異なり、有意な変化は見られなかった。4AP の高濃度では増加傾向があったが、低濃度からの累積適用が影響している可能性が示唆された。Pilo は fEPSP slope の濃度依存的な減少を示し、てんかん発症後の海馬スライスでも同様の減少が観察された。これらの結果は既存の報告と一致した。

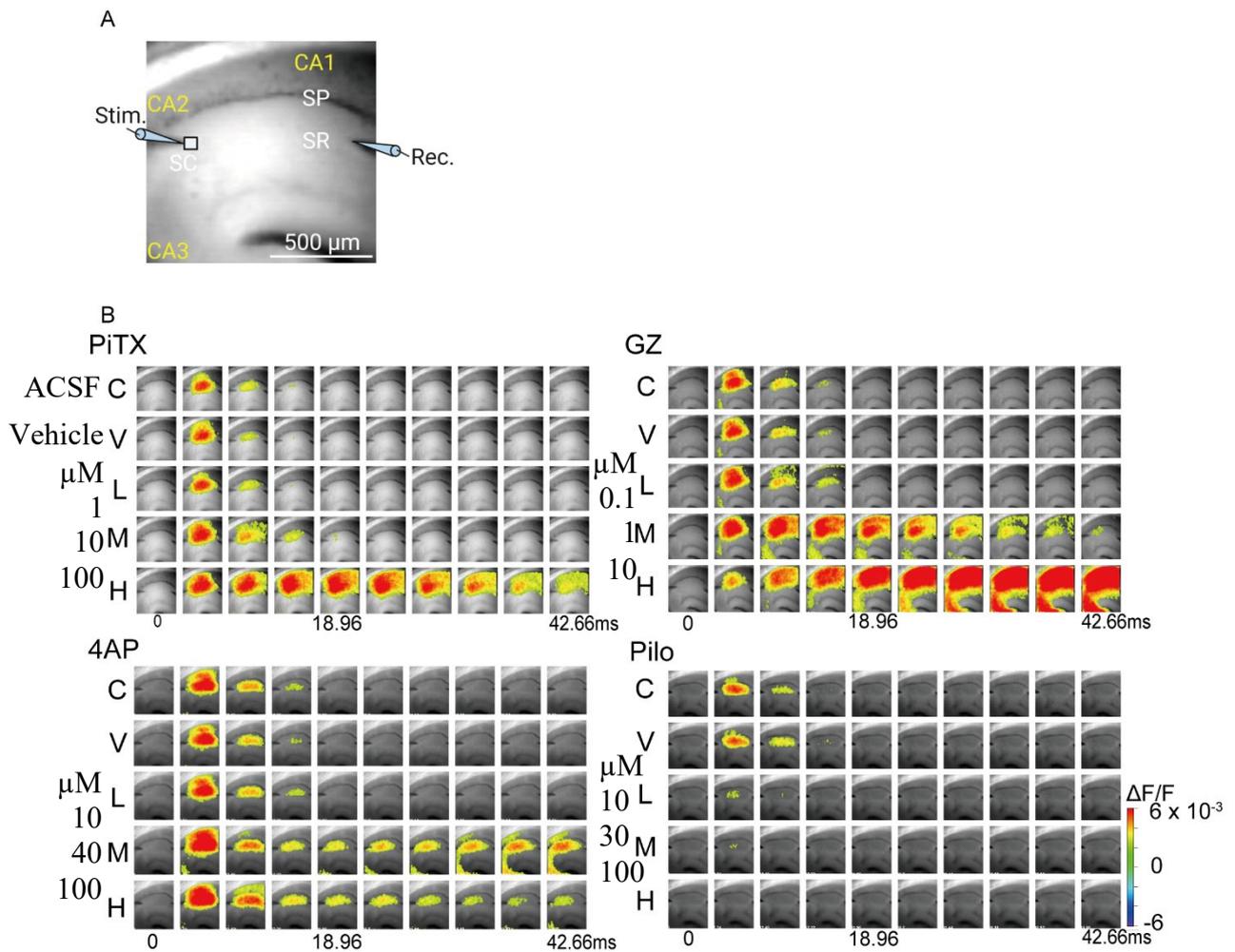


図 8 海馬への単一刺激による神経活動に対する痙攣発作誘発性化合物の影響

(A) 90×80 ピクセルの高速カメラで撮影したマウス海馬スライスの明視野画像。

(B) 電気刺激後の誘発神経活動の広がりパターン (代表例)。一連の画像は、電気刺激後の神経活動マップである：PiTX (左上)、GZ (右上)、4AP (左下)、Pilo (右下)。電位変化は、各ピクセルの蛍光の変化量として測定され、右下のスケールで示されるように擬似カラーに変換され、スライスの蛍光画像に重ねている。PiTX はピクロトキシン、GZ はガバジン、4AP は 4-アミノピリジン、Pilo はピロカルピン、C はコントロール (ACSF)、V は溶媒、L は低濃度、M は中濃度、H は高濃度、 $\Delta F/F$ は電位感受性色素蛍光の変化量と初期蛍光量の比。

【図 8 の説明及び本文の要約】

痙攣発作における神経細胞の異常な興奮を理解するため、VSDイメージングを使用して神経細胞の活動を観察した。PiTX、GZ、4APは海馬スライスにおいて神経活動領域の拡大と伝播時間の延長を引き起こし、痙攣発作様反応を示した。これらの物質は、神経活動領域の拡大と持続反応の上昇をもたらし、4APは遅延性の脱分極によって影響を与えた。一方で、Piloによる痙攣発作性反応はVSDイメージングでは検出されなかった。Piloに対する痙攣発作性反応の検出は困難であり、複数の経路を分析する必要があることが示唆された。

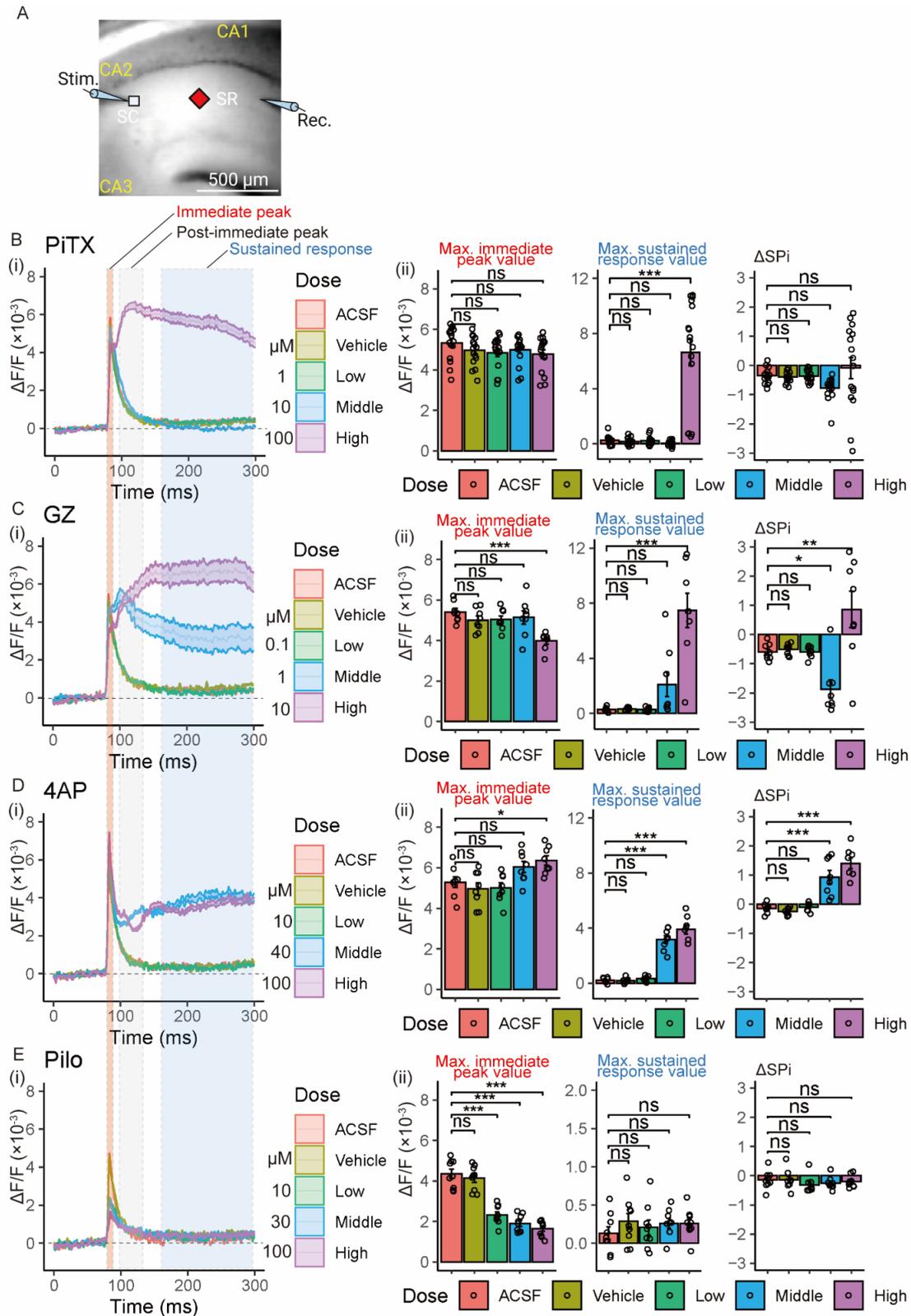


図9 SRにおける単一刺激後のVSD光信号応答波形解析

(A) 光信号検出のための記録セットアップの説明図 (90×80ピクセルの高速カメラ)

システムで撮影)。3つのパラメータ (Immediate peak、Post-immediate peak 及び

Sustained response) の最大値を解析に利用した。図は BioRender.com で作成。

(B-E) (i) VSD 光信号応答波形の変化の比較。実線と対応する斜線部分は、 $n=8\sim 16$ スライスから得られた平均値 \pm 標準誤差を表す。(ii) 各処理濃度における VSD 光信号応答の最大 immediate peak の比較 (左パネル)、最大 sustained response の比較 (中央パネル) 及びデルタ最大値 (Sustained response - Post-immediate peak ; ΔSPi) の比較 (右パネル)。効果は $n=8\sim 16$ スライスの平均 $\Delta F/F \pm$ 標準誤差として描かれている。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns, 有意差なし (Dunnett の検定)。ACSF、人工脳脊髄液 ; PiTX、ピクロトキシシン ; GZ、ガバジン ; 4AP、4-アミノピリジン ; Pilo、ピロカルピン ; VSD、電位感受性色素 ; SC、シャプファー側副 ; SP、錐体層 ; SR、放射状層。

【図9の説明及び本文の要約】

痙攣発作を誘発する化合物の作用メカニズムを解明するため、トレース波形を定量化して解析を行った。即時ピーク値、即時後ピーク値、持続反応値の3つのパラメータを設定し、分析を行った結果、Piloを除く化合物では持続反応値の上昇と痙攣発作性反応が確認された。GABA_A受容体のアンタゴニストでは異なる活性濃度が観察され、これは受容体のIC₅₀の差に関連している可能性が示唆された。4APの処理では持続反応値と ΔSPi 値の上昇があり、これはカリウム電流の阻害によるものと考えられた。VSD光信号のトレース波形に基づく定量化は、神経機能への薬理学的影響を探る手法として有望であることが示唆された。

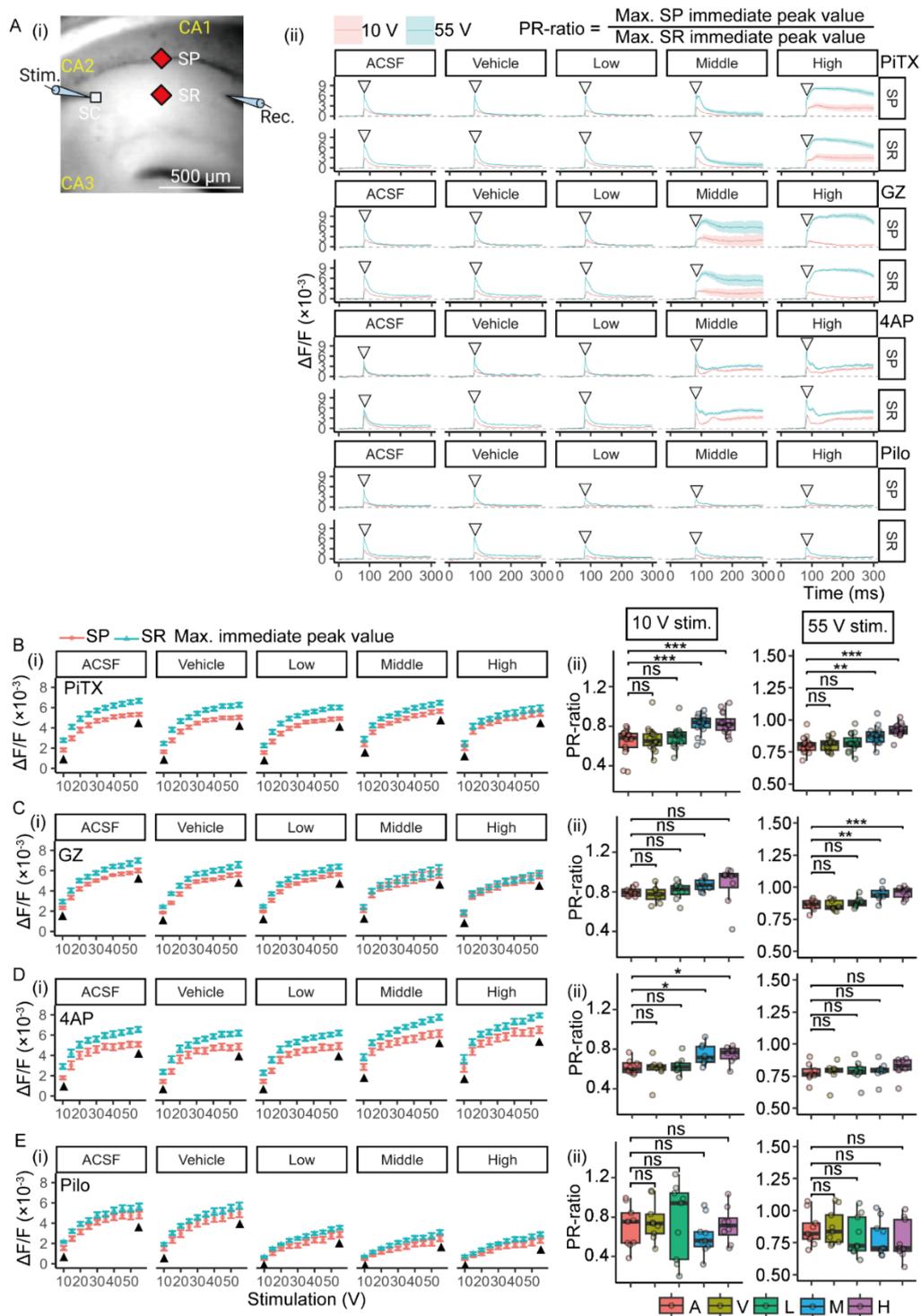


図 10 神経回路機能 (E-S カップリング) 評価のための電圧感受性色素 (VSD) 光信号応答解析

10~55 V の漸増刺激で光信号を記録するための配置を示す図。光信号の測定点は、(A) (i) の画像の赤い塗りつぶしの菱形で示す。SP と SR のピークの最大値は、(A) の (ii) の

画像で白抜き逆三角形で表す。PR-ratio は、SP と SR のピーク値の比として定義される。(B-E) (i) 各濃度・刺激強度における SP と SR の最大即時ピーク値の変化を示す。黒色塗りつぶし三角形は 10 V と 55 V の最大即時ピーク値を示す。プロットは $n = 8\sim 16$ スライスの平均±標準誤差として図示されている。(ii) 弱刺激 (10 V) と飽和刺激 (55 V) における PR-ratio の比較。 $n=8\sim 16$ スライスでの PR-ratio の箱ひげ図。 * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns, 有意差なし (Dunnett の検定)。VSD, 電位感受性色素; PiTX, ピクロトキシン; GZ, ガバジン; 4AP, 4-アミノピリジン; Pilo, ピロカルピン; $\Delta F/F$, 電位感受性色素の蛍光の最初の蛍光量に対する変化の割合; SR, 放射状層; SP, 錐体層; C, コントロール; V, 溶媒; L, 低濃度; M, 中濃度; H, 高濃度。

【図 10 の説明及び本文の要約】

SR の信号は、EPSP に依存し、SP の信号はスパイク（発火）に依存することが報告されている。そのため、尖端樹状突起で発生する EPSP に対して、SR 応答に対する SP 応答の比 (PR-ratio) を採用し、解析を行った。PiTX と GZ は GABA 受容体のシャント作用を低下させ、スパイク発火の閾値を下げることで発作反応を引き起こす可能性が示唆された。一方、4AP は低い刺激電圧でスパイク発火の閾値を下げ、発作反応を誘導する可能性が示唆された。4AP はカリウムチャンネルを阻害し、神経細胞の E-S 発火機能に影響を与えることで PR-ratio を変化させたが、一部の条件では有意な変化を示さなかった。これらの結果は、膜電位応答を直接反映する VSD アッセイのパラメータを用いて、神経細胞機能に対する直接的な薬理学的影響を捉えることにより、未知の発作原性化合物の作用機序を調べる上で有用であると考えられた。

表 1 Voltage sensitive dye の種類と特徴

	Dyes	Toxicity	Solubility
Fast voltage sensitive dyes	Di-4-ANEPPS	Low	Amphiphilic
	RH795	Low	Hydrophilic
	RH414	Low	Hydrophobic
Slow voltage sensitive dyes	RH155	High	Hydrophilic
	RH1691	Low	Amphiphilic
	DiBAC4 (3)	Low	Hydrophobic

表 2 選択した文献の試験種及び用いられた動物・細胞等で分類した結果

Study	In vitro/In vivo		Species								
	In vitro	In vivo	Dog	Human iPS cells	Minipig	Monkey	Mouse	Other	Rat	Rodent cells	Zebra fish
Accardi et al., 2018	✓		✓		✓	✓				✓	
Authier et al., 2016a		✓				✓					
Authier et al., 2019		✓	✓			✓				✓	
Bassett et al., 2014		✓	✓			✓				✓	
Bradley et al., 2018	✓										✓
Breidenbach et al., 2019		✓	✓								
Cassar et al., 2017		✓									✓
Delaunois et al., 2020	✓	✓	✓								
Easter et al., 2007	✓									✓	
Engers et al., 2018		✓					✓				
Fan et al., 2019	✓									✓	✓
Hermann and van Amsterdam, 2015	✓									✓	
Ishibashi et al., 2021	✓			✓							
Ishibashi et al., 2022	✓			✓							
Ishibashi et al., 2023	✓			✓							✓
Koseki et al., 2014		✓									✓
Kreir et al., 2018	✓										✓
Lipponen et al., 2023	✓										✓
Lu et al., 2023	✓			✓							
Markgraf et al., 2014	✓	✓								✓	
Matsuda et al., 2021		✓								✓	
Matsuda et al., 2022	✓			✓							
Rockley et al., 2023	✓			✓							✓
Scott et al., 2014	✓						✓				
Steidl et al., 2019	✓									✓	
Tukker et al., 2020a	✓			✓							✓
Tukker et al., 2020b	✓			✓							✓
van der Linde et al., 2011		✓	✓								
Winter et al., 2008		✓									✓
Yokoi et al., 2021	✓			✓							
Yokoi et al., 2022	✓			✓							
Zhai et al., 2021	✓									✓	✓
Zhai et al., 2023	✓			✓							✓
Zhang et al., 2011	✓							✓			
Total	24	12	6	11	1	4	2	1	10	10	3

表 3 選択した文献の評価法で分類した結果

Study	Brain organoid MEA	Brain slice electrophysiology	Brain slice MEA	Ca ²⁺ oscillation	Cells MEA	EEG	Gene expression	Ion channel panel	Locomotor activity	Machine learning	Phenotypic seizure assay	Principal component analysis (PCA)
Accardi et al., 2018		✓										
Authier et al., 2016a						✓						
Authier et al., 2019						✓						
Bassett et al., 2014						✓						
Bradley et al., 2018					✓							
Breidenbach et al., 2019						✓						
Cassar et al., 2017									✓			
Delaunois et al., 2020						✓		✓				
Easter et al., 2007		✓										
Engers et al., 2018											✓	
Fan et al., 2019			✓		✓							
Hermann and van Amsterdam, 2015		✓										
Ishibashi et al., 2021					✓							✓
Ishibashi et al., 2022					✓							✓
Ishibashi et al., 2023					✓							✓
Koseki et al., 2014									✓			
Kreir et al., 2018					✓							
Lipponen et al., 2023							✓			✓		
Lu et al., 2023				✓								
Markgraf et al., 2014		✓				✓						
Matsuda et al., 2021						✓				✓		
Matsuda et al., 2022					✓					✓		
Rockley et al., 2023					✓			✓				
Scott et al., 2014		✓										
Steidl et al., 2019		✓	✓									
Tukker et al., 2020a					✓							
Tukker et al., 2020b					✓							
van der Linde et al., 2011						✓						
Winter et al., 2008									✓			
Yokoi et al., 2021	✓											
Yokoi et al., 2022					✓							
Zhai et al., 2021		✓			✓							
Zhai et al., 2023					✓							
Zhang et al., 2011										✓		
Total	1	7	2	1	13	8	1	2	3	4	1	3

表 4 研究限界の記載のある文献一覧

Study	Limitations
Accardi et al., 2018	<ul style="list-style-type: none"> げっ歯類とヒトとの種差があるが、一般的な動物モデル(ラット、イヌ、ミニブタ、NHP など)を用いて、<i>in vitro</i> 海馬痙攣発作リスクアッセイを行い、各組織の類似点と微妙な相違点を明らかにすることで、理解を深めることができる。
Authier et al., 2016	<ul style="list-style-type: none"> 部分痙攣発作は脳波で同定できないことがある(焦点性発作放電が遠方や深部にある場合、あるいは神経細胞の集合体が小さすぎて同期した脱分極活動が脳波で検出できない場合)。
Bassett et al., 2014	<ul style="list-style-type: none"> 痙攣発作の活動は必ずしも脳波に反映されるとは限らない。 PTZ と異なる作用機序で痙攣発作を引き起こす場合、PTZ 痙攣発作閾値試験は痙攣発作リスクを反映していない可能性がある。
Cassar et al., 2017	<ul style="list-style-type: none"> 偽陰性率が高い(78%)。
Easter et al., 2007	<ul style="list-style-type: none"> フィズチグミンの評価には、追加解析が必要であった。 実験デザイン上、痙攣性化合物のみが検出される。 BBB 機能の変化や低酸素障害などの慢性的な作用によって痙攣発作を誘発するような化合物を検出できない可能性がある。 海馬スライスアッセイでは、ヒトにおける薬物誘発性痙攣発作と強く関連することが知られている素因が全く考慮されていない
Hermann and van Amsterdam., 2015	<ul style="list-style-type: none"> 海馬 CA1 領域に焦点を当てたアッセイであり、AChR のサブタイプの構成や発現プロファイルが脳領域によって異なるため、他の領域に対して、アッセイ結果を当てはめることが出来ないと考えられる。 最大の情報量を得るためには、海馬全域(又は領域別に)を調べることが望ましいと考えられる。
Ishibashi et al., 2023	<ul style="list-style-type: none"> 化合物を累積で処理しているため、神経伝達物質受容体やイオンチャネルを脱感作することが知られている化合物は、累積処理を避けるべきである。 iPSC 由来のニューロンは成体ニューロンに比べ未熟である可能性がある。そのため、同じ薬剤でも成体神経細胞に対する作用は異なる可能性がある。
Kreir et al., 2018	<ul style="list-style-type: none"> 代謝物による影響や慢性的な暴露による影響を検出することができない。 ラット皮質神経は、セロトニン受容体の発現がないことや、グリシン受容体はヒト(新生児)とラット(成体)で明らかな違いがあり、種差がある。
Lu et al., 2023	<ul style="list-style-type: none"> 評価化合物数(25種類)が比較的少なく、さらなるバリデーションが必要と考えられる。 今回の研究では陽性対照薬(4-AP と KA)の濃度が高すぎたため、Ca²⁺振動を増減させる薬物のカットオフ値をより明確にするためには、これらの薬物をより低濃度で試験する必要がある。 他の <i>in vitro</i> アッセイと比較して、測定パラメータのバラツキが大きい。また、カルシウムトランジェントの臨床的意義を明らかにする必要がある。 本アッセイでは、急性の薬理学的変化に起因する神経細胞活動と痙攣発作リスクの潜在的変化しか検出できない。
Matsuda et al., 2022	<ul style="list-style-type: none"> 開発した AI は、発火パターンの異なる様々なヒト iPS 細胞やげっ歯類神経細胞に対して高い予測精度を示さない。そのため、ヒト iPS 細胞やげっ歯類神経細胞ごとに新たな AI を作成する必要がある。
Rockley et al., 2023	<ul style="list-style-type: none"> 陰性コントロールが一つしか含まれていないこと。
Steidl et al., 2019	<ul style="list-style-type: none"> 本アッセイの感度を上げ、弱い興奮性化合物も検出できるようにすることが望まれる。 本アッセイの検証は 20-30 化合物の評価が必要と考えられる。 化合物の開発段階の初期において、本アッセイの適切な濃度設定が難しいと考えられる。 ラットとヒトの種差。 海馬スライスでの評価のため、海馬以外に作用して、痙攣発作を誘発するものを検出することが出来ない可能性がある。
Tukker et al., 2020	<ul style="list-style-type: none"> 限られた数の化合物で評価している。
van der Linde et al., 2011	<ul style="list-style-type: none"> FEAB (fentanyl/etomidate-anaesthetised Beagle) イヌは中枢神経系への影響を検出することにおいて、信頼性が高く、高感度モデルであると思われるが、麻酔薬が脳波信号に影響する。 このモデルは、痙攣発作活動を伴わない薬物誘発性の行動変化や痙攣(振戦など)の場合には有用ではない。このような特殊な状況では、意識のある動物を用いた研究が必要となる。
Zhai et al., 2021	<ul style="list-style-type: none"> wMFR に対する濃度反応で観測されたばらつきや、同調性に関連するエンドポイントの大きなばらつきなどの技術的限界がある。
Zhai et al., 2023	<ul style="list-style-type: none"> 培養環境で構築したネットワークやシナプスの構成が <i>in vivo</i> とは異なっている可能性がある。 細胞毒性、毒性代謝物、ホメオスタシスの変化、薬物の慢性的な作用を補足的に評価することで、さらなる考察が得られると考えられる。 薬物の遊離血漿中濃度、脳/CSF への暴露量及び <i>in vitro</i> と <i>in vivo</i> アッセイ間の濃度相関に関する情報が必要であると考えられる。

表 5 使用した化合物 (濃度)、溶媒及び作用機序

化合物	使用濃度 (μM)	溶媒	作用機序/用途	参考文献
ピクロトキシン	1, 10, 100	エタノール	GABA _A 受容体アン タゴニストで、痙攣 発作の誘発の研究で 用いられている。	(Mackenzie et al., 2002)
ガバジン	0.1, 1, 10	水	GABA _A 受容体アン タゴニストで、痙攣 発作の誘発の研究で 用いられている。	(Lindquist et al., 2005; Johnston, 2013)
4-アミノピリジン	10, 40, 100	DMSO	カリウムチャンネル の阻害薬で、 <i>in vivo</i> 痙攣発作の誘発の研 究で用いられてい る。	(Peña and Tapia, 2000)
ピロカルピン塩酸塩	10, 30, 100	水	ムスカリン性アセ チルコリン受容体の アゴニストで <i>in vivo</i> 側頭葉てんかん誘発 モデル作成に用いら れる。	(Zimmerman, 1981; Marchi et al., 2007)

表 6 本研究と既報の脳スライス *in vitro* 痙攣発作リスク評価の化合物濃度の比較

化合物	痙攣発作性反応の濃度範囲 (μM)	
	本研究 濃度範囲	既報 濃度範囲 [評価法] (参考文献)
ピクロトキシン	10-100	10-300 [PS number and PS area in EP] (Easter et al., 2007)
		3-300 [PS number and PS area in EP] (Zhai et al., 2021)
		0.2-100 [MEA] (Bradley et al., 2018)
		10-100 [MEA] (Gao et al., 2017; Fan et al., 2019)
ガバジン	1-10	1-10 [MEA] (Bradley et al., 2018)
		0.3-3 [MEA] (Fan et al., 2019)
4-アミノピリジン	40-100	10-100 [PS number and PS area in EP] (Easter et al., 2007)
		1-300 [PS number and PS area in EP] (Zhai et al., 2021)
		11-100 [MEA] (Bradley et al., 2018)
		10-100 [MEA] (Fan et al., 2019)
ピロカルピン	ND	10-1000 [PS number and PS area in EP] (Zhai et al., 2021)
		NEG [MEA] (Fan et al., 2019)

EP, Electrophysiology; MEA, multiwell microelectrode arrays or multi-electrode array;

ND, Not determined; NEG, Negative for seizure liability

謝辞

本論文の作成及び研究の遂行にあたり、ご指導、ご鞭撻とご援助をいただきました本学神経科学講座 教授 富永貴志先生に心より御礼申し上げます。本論文を査読していただきました、本学薬理学講座 教授 山田麻紀先生、衛生薬学講座 講師 桐山賀充先生、生薬・天然物化学講座 教授 代田修先生ならびに第一工科大学 教授 高島一郎先生に心より感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、徳島文理大学神経科学研究所の研究補助として協力いただいた竹歳麻紀子さん、三輪倫子さん、また研究室のメンバーの皆様にも感謝申し上げます。

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. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 93, 59–68. doi: 10.1016/j.vascn.2017.11.003.

Accardi, M. V., Pugsley, M. K., Forster, R., Troncy, E., Huang, H., and Authier, S. (2016). The emerging role of in vitro electrophysiological methods in CNS safety pharmacology. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 81, 47–59. doi: 10.1016/j.vascn.2016.03.008.

Aihara, T., Kobayashi, Y., and Tsukada, M. (2005). Spatiotemporal visualization of long-term potentiation and depression in the hippocampal CA1 area. *Hippocampus* 15, 68–78. doi: 10.1002/hipo.20031.

Ang, C. W., Carlson, G. C., and Coulter, D. A. (2006). Massive and Specific Dysregulation of Direct Cortical Input to the Hippocampus in Temporal Lobe Epilepsy. *J. Neurosci.* 26, 11850–11856. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2354-06.2006.

Authier, S., Accardi, M. V., Paquette, D., Pouliot, M., Arezzo, J., Stubbs, R. J., et al. (2016a). Functional neurotoxicity evaluation of noribogaine using video-EEG in cynomolgus monkeys. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 81, 306–312. doi: 10.1016/j.vascn.2016.04.012.

Authier, S., Arezzo, J., Delatte, M. S., Kallman, M.-J., Markgraf, C., Paquette, D., et al. (2016b). Safety pharmacology investigations on the nervous system: An industry survey.

J. Pharmacol. Toxicol. Methods 81, 37–46. doi: 10.1016/j.vascn.2016.06.001.

Authier, S., Arezzo, J., Pouliot, M., Accardi, M. V., Boulay, E., Troncy, E., et al. (2019). EEG: Characteristics of drug-induced seizures in rats, dogs and non-human primates. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 97, 52–58. doi: 10.1016/j.vascn.2019.03.004.

Authier, S., Delatte, M. S., Kallman, M.-J., Stevens, J., and Markgraf, C. (2016c). EEG in non-clinical drug safety assessments: Current and emerging considerations. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 81, 274–285. doi: 10.1016/j.vascn.2016.03.002.

Bankstahl, M., Bankstahl, J. P., Bloms-Funke, P., and Löscher, W. (2012). Striking differences in proconvulsant-induced alterations of seizure threshold in two rat models. *NeuroToxicology* 33, 127–137. doi: 10.1016/j.neuro.2011.12.011.

Baram, T. Z., Jensen, F. E., and Brooks-Kayal, A. (2011). Does acquired epileptogenesis in the immature brain require neuronal death. *Epilepsy Curr.* 11, 21–26. doi: 10.5698/1535-7511-11.1.21.

Barish, M. E., Ichikawa, M., Tominaga, T., Matsumoto, G., and Iijima, T. (1996). Enhanced Fast Synaptic Transmission and a Delayed Depolarization Induced by Transient Potassium Current Blockade in Rat Hippocampal Slice as Studied by Optical Recording. *J. Neurosci.* 16, 5672–5687. doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-18-05672.1996.

Bassett, L., Troncy, E., Pouliot, M., Paquette, D., Ascah, A., and Authier, S. (2014). Telemetry video-electroencephalography (EEG) in rats, dogs and non-human primates: methods in follow-up safety pharmacology seizure liability assessments. *J. Pharmacol.*

Toxicol. Methods 70, 230–240. doi: 10.1016/j.vascn.2014.07.005.

Bast, T., Pezze, M., and McGarrity, S. (2017). Cognitive deficits caused by prefrontal cortical and hippocampal neural disinhibition. *Br. J. Pharmacol.* 174, 3211–3225. doi: 10.1111/bph.13850.

Bradley, J. A., Luithardt, H. H., Metea, M. R., and Strock, C. J. (2018). In Vitro Screening for Seizure Liability Using Microelectrode Array Technology. *Toxicol. Sci.* 163, 240–253. doi: 10.1093/toxsci/kfy029.

Breidenbach, L., Potschka, H., and Hempel, K. (2019). Exploratory EEG studies for the assessment of neurological liabilities in conscious dogs in early drug development. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 98, 106581. doi: 10.1016/j.vascn.2019.106581.

Cassar, S., Breidenbach, L., Olson, A., Huang, X., Britton, H., Woody, C., et al. (2017). Measuring drug absorption improves interpretation of behavioral responses in a larval zebrafish locomotor assay for predicting seizure liability. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 88, 56–63. doi: 10.1016/j.vascn.2017.07.002.

Chang, P. Y., and Jackson, M. B. (2006). Heterogeneous spatial patterns of long-term potentiation in rat hippocampal slices. *J. Physiol.* 576, 427–443. doi: 10.1113/jphysiol.2006.112128.

Cook, D., Brown, D., Alexander, R., March, R., Morgan, P., Satterthwaite, G., et al. (2014). Lessons learned from the fate of AstraZeneca's drug pipeline: a five-dimensional framework. *Nat. Rev. Drug Discov.* 13, 419–431. doi: 10.1038/nrd4309.

Delaunoy, A., Accardi, M. V., André, V., Authier, S., Bouzom, F., Hebeisen, S., et al. (2020). Unraveling the mechanism and the risk behind seizure liability of lead compounds in a neuroscience project. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 104, 106874. doi: 10.1016/j.vascn.2020.106874.

Easter, A., Bell, M. E., Damewood, J. R., Redfern, W. S., Valentin, J.-P., Winter, M. J., et al. (2009). Approaches to seizure risk assessment in preclinical drug discovery. *Drug Discov. Today* 14, 876–884. doi: 10.1016/j.drudis.2009.06.003.

Easter, A., Sharp, T. H., Valentin, J.-P., and Pollard, C. E. (2007). Pharmacological validation of a semi-automated in vitro hippocampal brain slice assay for assessment of seizure liability. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 56, 223–233. doi: 10.1016/j.vascn.2007.04.008.

Engers, J. L., Childress, E. S., Long, M. F., Capstick, R. A., Luscombe, V. B., Cho, H. P., et al. (2018). VU6007477, a Novel M1 PAM Based on a Pyrrolo[2,3-b]pyridine Carboxamide Core Devoid of Cholinergic Adverse Events. *ACS Med. Chem. Lett.* 9, 917–922. doi: 10.1021/acsmchemlett.8b00261.

Fan, J., Thalody, G., Kwagh, J., Burnett, E., Shi, H., Lewen, G., et al. (2019). Assessing seizure liability using multi-electrode arrays (MEA). *Toxicol. In Vitro* 55, 93–100. doi: 10.1016/j.tiv.2018.12.001.

Fukata, Y., and Fukata, M. (2017). Epilepsy and synaptic proteins. *Curr. Opin. Neurobiol.* 45, 1–8. doi: 10.1016/j.conb.2017.02.001.

Gao, M., Igata, H., Takeuchi, A., Sato, K., and Ikegaya, Y. (2017). Machine learning-based prediction of adverse drug effects: An example of seizure-inducing compounds. *J. Pharmacol. Sci.* 133, 70–78. doi: 10.1016/j.jphs.2017.01.003.

Grinvald, A., and Hildesheim, R. (2004). VSDI: a new era in functional imaging of cortical dynamics. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 874–885. doi: 10.1038/nrn1536.

Grinvald, A., Manker, A., and Segal, M. (1982). Visualization of the spread of electrical activity in rat hippocampal slices by voltage-sensitive optical probes. *J. Physiol.* 333, 269–291. doi: 10.1113/jphysiol.1982.sp014453.

Gutman, G. A., Chandy, K. G., Grissmer, S., Lazdunski, M., McKinnon, D., Pardo, L. A., et al. (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol. Rev.* 57, 473–508. doi: 10.1124/pr.57.4.10.

Hermann, D., and van Amsterdam, C. (2015). Analysis of spontaneous hippocampal activity allows sensitive detection of acetylcholine-mediated effects. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 71, 54–60. doi: 10.1016/j.vascn.2014.12.001.

Homma, R., Baker, B. J., Jin, L., Garaschuk, O., Konnerth, A., Cohen, L. B., et al. (2009). Wide-field and two-photon imaging of brain activity with voltage- and calcium-sensitive dyes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364, 2453–2467. doi: 10.1098/rstb.2009.0084.

Inoue, M., Hashimoto, Y., Kudo, Y., and Miyakawa, H. (2001). Dendritic attenuation of

synaptic potentials in the CA1 region of rat hippocampal slices detected with an optical method. *Eur. J. Neurosci.* 13, 1711–1721. doi: 10.1046/j.0953-816x.2001.01550.x.

Irwin, S. (1968). Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia* 13, 222–257. doi: 10.1007/BF00401402.

Ishibashi, Y., Kimura, S., and Suzuki, I. (2022). Responses to antibiotics in human iPSC-derived neurons based on the clinical antibiotic-associated encephalopathy classification. *J. Toxicol. Sci.* 47, 429–437. doi: 10.2131/jts.47.429.

Ishibashi, Y., Nagafuku, N., Kinoshita, K., Okamura, A., Shirakawa, T., and Suzuki, I. (2023). 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 extrapolation to cerebrospinal fluid concentration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 116675. doi: 10.1016/j.taap.2023.116675.

Ishibashi, Y., Odawara, A., Kinoshita, K., Okamura, A., Shirakawa, T., and Suzuki, I. (2021). Principal Component Analysis to Distinguish Seizure Liability of Drugs in Human iPS Cell-Derived Neurons. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 184, 265–275. doi: 10.1093/toxsci/kfab116.

Jang, I.-S., Ito, Y., and Akaike, N. (2005). Feed-forward facilitation of glutamate release by presynaptic GABA(A) receptors. *Neuroscience* 135, 737–748. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.06.030.

Johnston, G. A. R. (2013). Advantages of an antagonist: bicuculline and other GABA antagonists. *Br. J. Pharmacol.* 169, 328–336. doi: 10.1111/bph.12127.

Kaplan, D. I., Isom, L. L., and Petrou, S. (2016). Role of Sodium Channels in Epilepsy. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6, a022814. doi: 10.1101/cshperspect.a022814.

Karadas, M., Wojciechowski, A. M., Huck, A., Dalby, N. O., Andersen, U. L., and Thielscher, A. (2018). Feasibility and resolution limits of opto-magnetic imaging of neural network activity in brain slices using color centers in diamond. *Sci. Rep.* 8, 4503. doi: 10.1038/s41598-018-22793-w.

Köhling, R., and Wolfart, J. (2016). Potassium Channels in Epilepsy. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6, a022871. doi: 10.1101/cshperspect.a022871.

Koseki, N., Deguchi, J., Yamashita, A., Miyawaki, I., and Funabashi, H. (2014). Establishment of a novel experimental protocol for drug-induced seizure liability screening based on a locomotor activity assay in zebrafish. *J. Toxicol. Sci.* 39, 579–600. doi: 10.2131/jts.39.579.

Kreir, M., Van Deuren, B., Versweyveld, S., De Bondt, A., Van den Wyngaert, I., Van der Linde, H., et al. (2018). Do in vitro assays in rat primary neurons predict drug-induced seizure liability in humans? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 346, 45–57. doi: 10.1016/j.taap.2018.03.028.

Lindquist, C. E. L., Laver, D. R., and Birnir, B. (2005). The mechanism of SR95531 inhibition at GABA receptors examined in human $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 1\beta 1\gamma 2S$

receptors. *J. Neurochem.* 94, 491–501. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03240.x.

Lipponen, A., Kajevu, N., Natunen, T., Ciszek, R., Puhakka, N., Hiltunen, M., et al. (2023). Gene Expression Profile as a Predictor of Seizure Liability. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 4116. doi: 10.3390/ijms24044116.

Loew, L. M., Cohen, L. B., Dix, J., Fluhler, E. N., Montana, V., Salama, G., et al. (1992). A naphthyl analog of the aminostyryl pyridinium class of potentiometric membrane dyes shows consistent sensitivity in a variety of tissue, cell, and model membrane preparations. *J. Membr. Biol.* 130, 1–10. doi: 10.1007/BF00233734.

Löscher, W. (2009). Preclinical assessment of proconvulsant drug activity and its relevance for predicting adverse events in humans. *Eur. J. Pharmacol.* 610, 1–11. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.03.025.

Lu, H.-R., Seo, M., Kreir, M., Tanaka, T., Yamoto, R., Altrocchi, C., et al. (2023). High-Throughput Screening Assay for Detecting Drug-Induced Changes in Synchronized Neuronal Oscillations and Potential Seizure Risk Based on Ca²⁺ Fluorescence Measurements in Human Induced Pluripotent Stem Cell (hiPSC)-Derived Neuronal 2D and 3D Cultures. *Cells* 12, 958. doi: 10.3390/cells12060958.

Mackenzie, L., Medvedev, A., Hiscock, J. J., Pope, K. J., and Willoughby, J. O. (2002). Picrotoxin-induced generalised convulsive seizure in rat: changes in regional distribution and frequency of the power of electroencephalogram rhythms. *Clin. Neurophysiol. Off. J. Int. Fed. Clin. Neurophysiol.* 113, 586–596. doi: 10.1016/s1388-2457(02)00040-8.

Mann, E. O., and Paulsen, O. (2007). Role of GABAergic inhibition in hippocampal network oscillations. *Trends Neurosci.* 30, 343–349. doi: 10.1016/j.tins.2007.05.003.

Mann, E. O., Tominaga, T., Ichikawa, M., and Greenfield, S. A. (2005). Cholinergic modulation of the spatiotemporal pattern of hippocampal activity in vitro. *Neuropharmacology* 48, 118–133. doi: 10.1016/j.neuropharm.2004.08.022.

Marchi, N., Oby, E., Batra, A., Uva, L., De Curtis, M., Hernandez, N., et al. (2007). In vivo and in vitro effects of pilocarpine: relevance to ictogenesis. *Epilepsia* 48, 1934–1946. doi: 10.1111/j.1528-1167.2007.01185.x.

Markgraf, C. G., DeBoer, E., Zhai, J., Cornelius, L., Zhou, Y. Y., and MacSweeney, C. (2014). Assessment of seizure liability of Org 306039, a 5-HT_{2c} agonist, using hippocampal brain slice and rodent EEG telemetry. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 70, 224–229. doi: 10.1016/j.vascn.2014.08.005.

Matsuda, N., Kinoshita, K., Okamura, A., Shirakawa, T., and Suzuki, I. (2021). Histograms of Frequency-Intensity Distribution Deep Learning to Predict the Seizure Liability of Drugs in Electroencephalography. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 182, 229–242. doi: 10.1093/toxsci/kfab061.

Matsuda, N., Odawara, A., Kinoshita, K., Okamura, A., Shirakawa, T., and Suzuki, I. (2022). Raster plots machine learning to predict the seizure liability of drugs and to identify drugs. *Sci. Rep.* 12, 2281. doi: 10.1038/s41598-022-05697-8.

Mochida, H., Sato, K., Sasaki, S., Yazawa, I., Kamino, K., and Momose-Sato, Y.

(2001). Effects of anisomycin on LTP in the hippocampal CA1: long-term analysis using optical recording. *Neuroreport* 12, 987–991. doi: 10.1097/00001756-200104170-00025.

Moser, V. C., Cheek, B. M., and MacPhail, R. C. (1995). A multidisciplinary approach to toxicological screening: III. Neurobehavioral toxicity. *J. Toxicol. Environ. Health* 45, 173–210. doi: 10.1080/15287399509531988.

Nagayama, T. (2015). Adverse drug reactions for medicine newly approved in Japan from 1999 to 2013: Syncope/loss of consciousness and seizures/convulsions. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 72, 572–577. doi: 10.1016/j.yrtph.2015.05.030.

Ng, C. C., Duke, R. K., Hinton, T., and Johnston, G. A. R. (2017). Effects of bilobalide, ginkgolide B and picrotoxinin on GABAA receptor modulation by structurally diverse positive modulators. *Eur. J. Pharmacol.* 806, 83–90. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.04.019.

Paul, S. M., Mytelka, D. S., Dunwiddie, C. T., Persinger, C. C., Munos, B. H., Lindborg, S. R., et al. (2010). How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 203–214. doi: 10.1038/nrd3078.

Peña, F., and Tapia, R. (2000). Seizures and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus in vivo: role of glutamate- and GABA-mediated neurotransmission and of ion channels. *Neuroscience* 101, 547–561. doi: 10.1016/s0306-4522(00)00400-0.

Postnikova, T. Y., Diespirov, G. P., Amakhin, D. V., Vylekzhanina, E. N., Soboleva, E. B., and Zaitsev, A. V. (2021). Impairments of Long-Term Synaptic Plasticity in the

Hippocampus of Young Rats during the Latent Phase of the Lithium-Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 13355. doi: 10.3390/ijms222413355.

Rajakulendran, S., and Hanna, M. G. (2016). The Role of Calcium Channels in Epilepsy. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6, a022723. doi: 10.1101/cshperspect.a022723.

Roberts, R., Authier, S., Mellon, R. D., Morton, M., Suzuki, I., Tjalkens, R. B., et al. (2021). Can We Panelize Seizure? *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 179, 3–13. doi: 10.1093/toxsci/kfaa167.

Rockley, K., Roberts, R., Jennings, H., Jones, K., Davis, M., Levesque, P., et al. (2023). An integrated approach for early in vitro seizure prediction utilising hiPSC neurons and human ion channel assays. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.*, kfad087. doi: 10.1093/toxsci/kfad087.

Roses, A. D. (2008). Pharmacogenetics in drug discovery and development: a translational perspective. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 807–817. doi: 10.1038/nrd2593.

Schwartzkroin, P. A. (1994). Role of the hippocampus in epilepsy. *Hippocampus* 4, 239–242. doi: 10.1002/hipo.450040302.

Scott, J. S., Bowker, S. S., Brocklehurst, K. J., Brown, H. S., Clarke, D. S., Easter, A., et al. (2014). Circumventing seizure activity in a series of G protein coupled receptor 119 (GPR119) agonists. *J. Med. Chem.* 57, 8984–8998. doi: 10.1021/jm5011012.

Shirakawa, T., and Suzuki, I. (2020). Approach to Neurotoxicity using Human iPSC

Neurons: Consortium for Safety Assessment using Human iPS Cells. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 21, 780–786. doi: 10.2174/1389201020666191129103730.

Sloviter, R. S. (1994). The functional organization of the hippocampal dentate gyrus and its relevance to the pathogenesis of temporal lobe epilepsy. *Ann. Neurol.* 35, 640–654. doi: 10.1002/ana.410350604.

Steidl, E., Gleyzes, M., Maddalena, F., Debanne, D., and Buisson, B. (2019). Neuroservice proconvulsive (NS-PC) set: A new platform of electrophysiology-based assays to determine the proconvulsive potential of lead compounds. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 99, 106587. doi: 10.1016/j.vascn.2019.106587.

Storm, J. F. (1988). Temporal integration by a slowly inactivating K⁺ current in hippocampal neurons. *Nature* 336, 379–381. doi: 10.1038/336379a0.

Tominaga, T., Kajiwara, R., and Tominaga, Y. (2013). VSD Imaging Method of *In Vivo* Brain Preparation. *J. Neurosci. Neuroengineering* 2, 211–219. doi: 10.1166/jnsne.2013.1051.

Tominaga, T., Tominaga, Y., and Ichikawa, M. (2001). Simultaneous multi-site recordings of neural activity with an inline multi-electrode array and optical measurement in rat hippocampal slices. *Pflugers Arch.* 443, 317–322. doi: 10.1007/s004240100707.

Tominaga, T., Tominaga, Y., and Ichikawa, M. (2002). Optical imaging of long-lasting depolarization on burst stimulation in area CA1 of rat hippocampal slices. *J. Neurophysiol.* 88, 1523–1532. doi: 10.1152/jn.2002.88.3.1523.

Tominaga, T., Tominaga, Y., Yamada, H., Matsumoto, G., and Ichikawa, M. (2000). Quantification of optical signals with electrophysiological signals in neural activities of Di-4-ANEPPS stained rat hippocampal slices. *J. Neurosci. Methods* 102, 11–23. doi: 10.1016/s0165-0270(00)00270-3.

Tominaga, Y., Ichikawa, M., and Tominaga, T. (2009). Membrane potential response profiles of CA1 pyramidal cells probed with voltage-sensitive dye optical imaging in rat hippocampal slices reveal the impact of GABA(A)-mediated feed-forward inhibition in signal propagation. *Neurosci. Res.* 64, 152–161. doi: 10.1016/j.neures.2009.02.007.

Tominaga, Y., Taketoshi, M., Maeda, N., and Tominaga, T. (2019). Wide-field Single-photon Optical Recording in Brain Slices Using Voltage-sensitive Dye. *J. Vis. Exp.*, 59692. doi: 10.3791/59692.

Tominaga, Y., Taketoshi, M., and Tominaga, T. (2018). Overall Assay of Neuronal Signal Propagation Pattern With Long-Term Potentiation (LTP) in Hippocampal Slices From the CA1 Area With Fast Voltage-Sensitive Dye Imaging. *Front. Cell. Neurosci.* 12, 389. doi: 10.3389/fncel.2018.00389.

Tukker, A. M., Van Kleef, R. G. D. M., Wijnolts, F. M. J., De Groot, A., and Westerink, R. H. S. (2020a). Towards animal-free neurotoxicity screening: Applicability of hiPSC-derived neuronal models for in vitro seizure liability assessment. *ALTEX* 37, 121–135. doi: 10.14573/altex.1907121.

Tukker, A. M., Wijnolts, F. M. J., de Groot, A., and Westerink, R. H. S. (2018). Human iPSC-derived neuronal models for in vitro neurotoxicity assessment. *Neurotoxicology* 67,

215–225. doi: 10.1016/j.neuro.2018.06.007.

Tukker, A. M., Wijnolts, F. M. J., de Groot, A., and Westerink, R. H. S. (2020b). Applicability of hiPSC-Derived Neuronal Cocultures and Rodent Primary Cortical Cultures for In Vitro Seizure Liability Assessment. *Toxicol. Sci.* 178, 71–87. doi: 10.1093/toxsci/kfaa136.

Ueno, S., Bracamontes, J., Zorumski, C., Weiss, D. S., and Steinbach, J. H. (1997). Bicuculline and gabazine are allosteric inhibitors of channel opening of the GABAA receptor. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 625–634. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-02-00625.1997.

van der Linde, H. J., Van Deuren, B., Somers, Y., Teisman, A., Drinkenburg, W. H., and Gallacher, D. J. (2011). EEG in the FEAB model: measurement of electroencephalographical burst suppression and seizure liability in safety pharmacology. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 63, 96–101. doi: 10.1016/j.vascn.2010.06.002.

Waring, M. J., Arrowsmith, J., Leach, A. R., Leeson, P. D., Mandrell, S., Owen, R. M., et al. (2015). An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14, 475–486. doi: 10.1038/nrd4609.

Wheeler, D. B., Randall, A., and Tsien, R. W. (1996). Changes in action potential duration alter reliance of excitatory synaptic transmission on multiple types of Ca²⁺ channels in rat hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 16, 2226–2237. doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-07-02226.1996.

Winter, M. J., Redfern, W. S., Hayfield, A. J., Owen, S. F., Valentin, J.-P., and Hutchinson, T. H. (2008). Validation of a larval zebrafish locomotor assay for assessing the seizure liability of early-stage development drugs. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 57, 176–187. doi: 10.1016/j.vascn.2008.01.004.

Yokoi, R., Shibata, M., Odawara, A., Ishibashi, Y., Nagafuku, N., Matsuda, N., et al. (2021). Analysis of signal components < 500 Hz in brain organoids coupled to microelectrode arrays: A reliable test-bed for preclinical seizure liability assessment of drugs and screening of antiepileptic drugs. *Biochem. Biophys. Rep.* 28, 101148. doi: 10.1016/j.bbrep.2021.101148.

Yokoi, R., Shigemoto-Kuroda, T., Matsuda, N., Odawara, A., and Suzuki, I. (2022). Electrophysiological responses to seizurogenic compounds dependent on E/I balance in human iPSC-derived cortical neural networks. *J. Pharmacol. Sci.* 148, 267–278. doi: 10.1016/j.jphs.2021.12.006.

Zhai, J., Traebert, M., Zimmermann, K., Delaunois, A., Royer, L., Salvagiotto, G., et al. (2023). Comparative study for the IMI2-NeuroDeRisk project on microelectrode arrays to derisk drug-induced seizure liability. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 107297. doi: 10.1016/j.vascn.2023.107297.

Zhai, J., Zhou, Y.-Y., and Lagrutta, A. (2021). Sensitivity, specificity and limitation of in vitro hippocampal slice and neuron-based assays for assessment of drug-induced seizure liability. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 430, 115725. doi: 10.1016/j.taap.2021.115725.

Zhang, H., Li, W., Xie, Y., Wang, W.-J., Li, L.-L., and Yang, S.-Y. (2011). Rapid and accurate assessment of seizure liability of drugs by using an optimal support vector machine method. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 25, 1848–1854. doi: 10.1016/j.tiv.2011.05.015.

Zimmerman, T. J. (1981). Pilocarpine. *Ophthalmology* 88, 85–88. doi: 10.1016/s0161-6420(81)35072-6.

富永貴志, and 富永洋子 (2011). 実践！膜電位感受性色素による神経回路解析. *生物物理* 51, 092–095. doi: 10.2142/biophys.51.092.

業績リスト

【主論文】

1. Utsumi, Y., Taketoshi, M., Miwa, M., Tominaga, Y., and Tominaga, T. (2023). Assessing seizure liability *in vitro* with voltage-sensitive dye imaging in mouse hippocampal slices. *Front. Cell. Neurosci.* 17, 1217368. doi: 10.3389/fncel.2023.1217368.

【その他の発表業績】

学会発表

国際会議

1. Yuichi Utsumi, Makiko Taketoshi, Nana Ohara, Michiko Miwa, Yoko Tominaga and Takashi Tominaga, *In vitro* assay for seizure liability using voltage-sensitive dye imaging (VSDI) in the mouse hippocampus, e-Poster, NEUROSCIENCE2021 50 th annual meeting, 2021
2. Yuichi Utsumi, Makiko Taketoshi, Yoko Tominaga, and Takashi Tominaga, Investigating the role of the CA2 area in seizure propagation with a voltage-sensitive dye (VSD)-based assay in hippocampal slices: The effects of seizurogenic drugs, e-Poster, NEUROSCIENCE2023, 2023

国内会議

1. 内海雄一、竹歳麻紀子、小原菜夏、三輪倫子、富永洋子、富永貴志、Development of *in vitro* seizure liability assay using voltage-sensitive dye (VSD) imaging in mice hippocampal slices、ポスター発表、第48回日本毒性学会学術年会、2021
2. 内海雄一、竹歳麻紀子、小原菜夏、三輪倫子、富永洋子、富永貴志、A novel *in vitro* seizure liability assay using voltage-sensitive dye (VSD) imaging in mice hippocampal slices、ポスター発表、第44回日本神経科学大会、2021
3. 内海雄一、竹歳麻紀子、小原菜夏、三輪倫子、富永洋子、富永貴志、A novel *in vitro* assay for seizure prediction using voltage-sensitive dye imaging (VSDI) in the mouse

- hippocampus、ポスター発表、The 80th Fujihara Seminar Molecular and cellular mechanisms of brain systems generating individuality、2021
4. 内海雄一、竹歳麻紀子、三輪倫子、富永洋子、富永貴志、A novel *in vitro* assay for seizure prediction using voltage-sensitive dye imaging (VSDI) in the mouse hippocampus、口頭発表、第 13 回日本生物物理学会 中国四国支部大会、2022
 5. 内海雄一、竹歳麻紀子、三輪倫子、富永洋子、富永貴志、*In vitro* assay for seizure liability using voltage-sensitive dye imaging (VSDI) in broad areas around hippocampal system、ポスター発表、Neuro2022 (第 45 回日本神経科学大会/第 65 回日本神経化学会大会/第 32 回日本神経回路学会大会)、2022
 6. 内海雄一、竹歳麻紀子、富永洋子、富永貴志、Investigating the role of the CA2 area in seizure susceptibility with a VSD-based assay in Hippocampal slices: The effects of seizurogenic drugs、ポスター発表、第 46 回日本神経科学大会、2023