

神経毒性・発達神経毒性試験の代替法のOECD TG提案を目指した AOP475公定化のためのバリデーション研究

関野祐子¹、筒井泉雄¹、田邊思帆里²、金村米博³、吉田祥子⁴

1. 東京大学、 2. 国立医薬品食品衛生研究所、 3. 大阪医療センター、 4. 豊橋技術科学大学

【研究課題の背景】 化学物質や医薬品の神経毒性試験・発達毒性試験は重要な試験である。現在、OECDテストガイドラインNo. 424 (neurotoxicity study) and No. 426 (developmental neurotoxicity study)で検査されており、検査項目は、個体の行動観察 (FOB)、学習記憶試験、神経病理試験などからなる。これらの試験にかかる動物数や時間が膨大であること、毒性評価には熟練を要すること、さらにヒトへの外挿性が低いこと、が問題となっている。世界的にはこれらの問題点を克服する代替法の開発が求められている。代替法開発のためには、化合物が最初に作用する生体内分子との相互作用に始まり、その後段階的に発生する生体反応のカスケードを経て、最終的に個体の有害反応につながる「有害性帰結経路 (Adverse Outcome Pathway ; AOP) を整理することが重要である。カスケードの途中段階を調べるインビトロ試験をつなぐことにより、実験動物に頼らない毒性試験法が確立できる。我々はLRI研究 (8-10期) で、初代培養神経細胞の樹状突起スパインに局在するドレブリンクラスター数を定量解析するための頑健な実験方法を開発し、神経毒性/発達神経毒性のインビトロ試験として確立した。樹状突起スパイン内のドレブリン消失がシナプス可塑性を抑制するという既知の治験と組み合わせることにより、「学習記憶障害を有害事象とする」神経毒性/発達神経毒性に関する有害性帰結経路 (AOP) を開発し、AOP475としてAOPwikiに登録した。

【研究目的】 AOP475の予測性、再現性、リスク判断基準、化合物の種類に対する適応範囲、動物種の範囲など、を示すための種々のバリデーション研究を行う。最終的には、「規制利用の妥当性審査」に必要な実験を行い論文投稿するとともに、既存の文献情報を収集してAOPwikiを完成する。

【AOPの作り方】 化学物質などのストレスが生体内のどの部位にどのように作用して有害影響を引き起こすか、一連の反応経路でつなぐ。化合物が生体内分子と相互作用する初めの段階を、Molecular initiating Event (MIEといい、最終のAdverse outcome (AO)にいたるプロセスをKey Event (KE)でつないでいく。MIE,KE,AOはこれ同士の関係性をKey Event Relationshipで表現する。KEは通常、変化の方向性、増加する (UP)と減少する (down)、というように変化の方向性ととも記述される (Fig.1)。

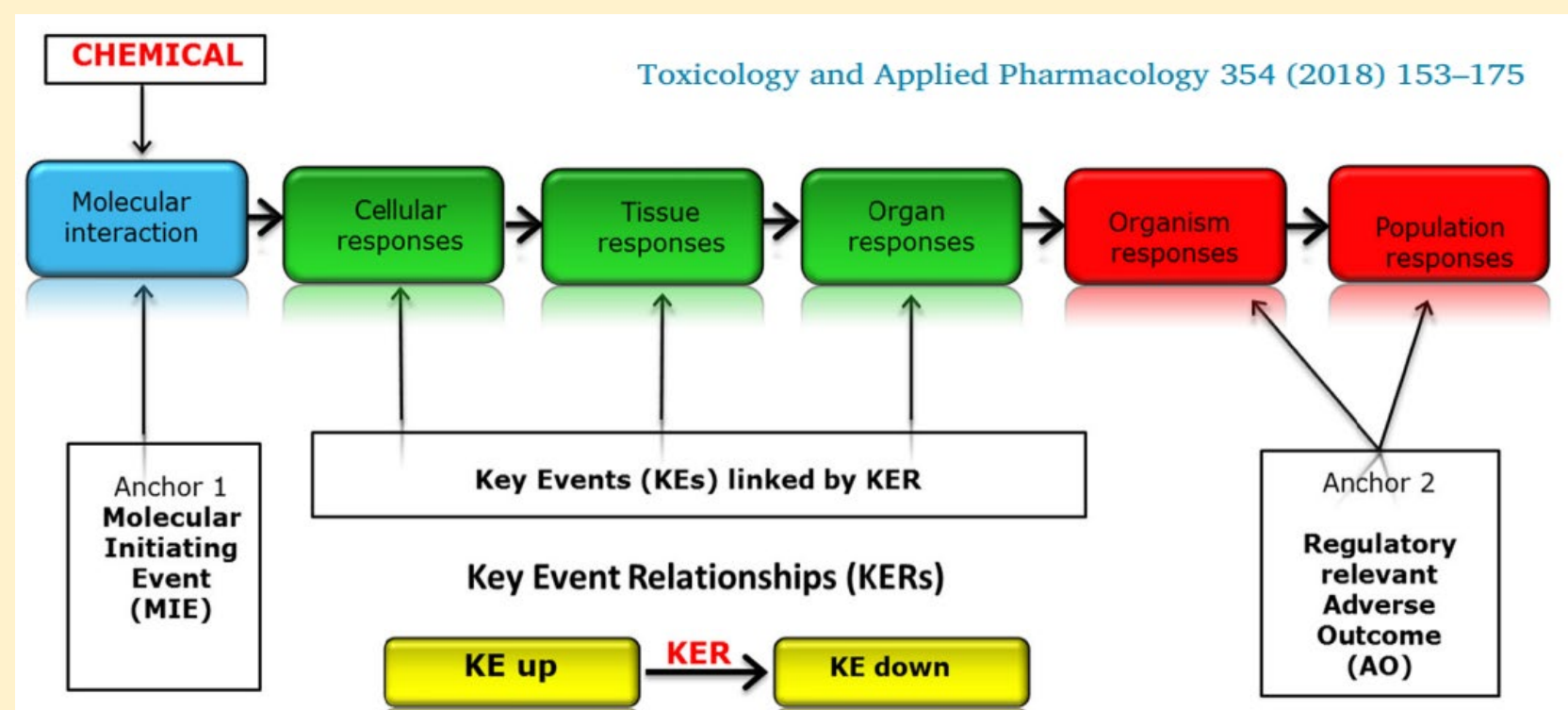


Fig.1 the Adverse Outcome Pathway (AOP) framework. An AOP is triggered by a Molecular Initiating Event (MIE), an initial interaction with a biological target (Anchor 1) that leads to a sequential cascade of cellular, tissue and organ responses (Key Events), linked to each other by key event relationship (KER) to result in an adverse outcome (AO) of regulatory relevance.

AOP475 : グルタミン酸受容体への結合 (MIE) が、学習記憶障害 (AO) を引き起こすAOP作成

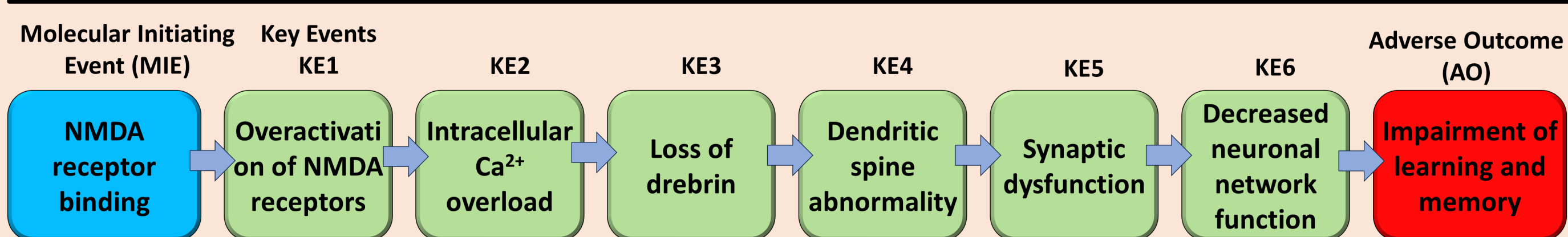


Fig.2 現在提案しているAOP 475

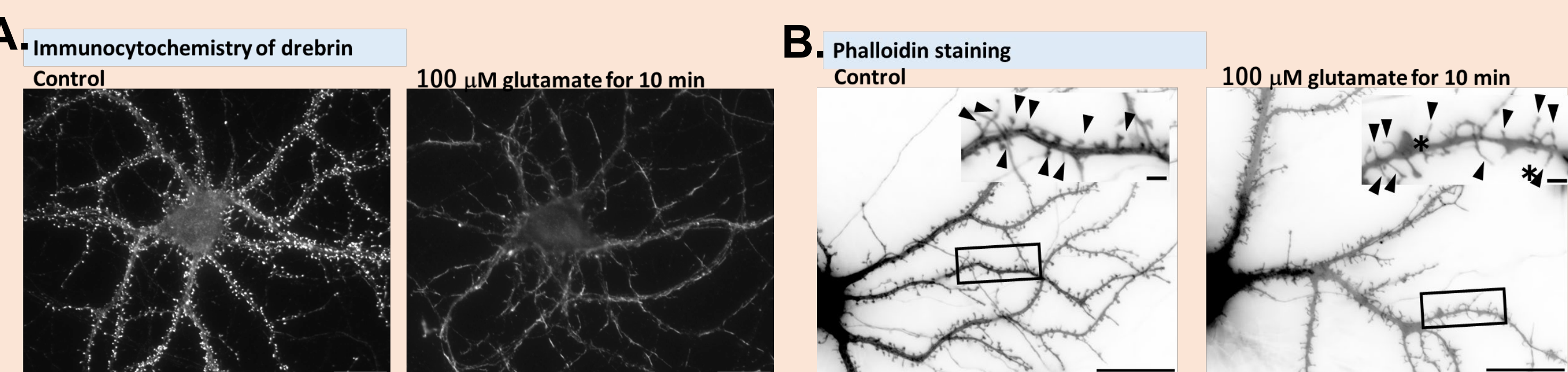


Fig.3 化合物のNMDA受容体への結合 (MIE) が、KE1,KE2 (既存のKE) を経由して、樹状突起スパインからのドレブリン消失 (A : KE3) と樹状突起スパインの形態変化 (B : KE4) をもたらした。

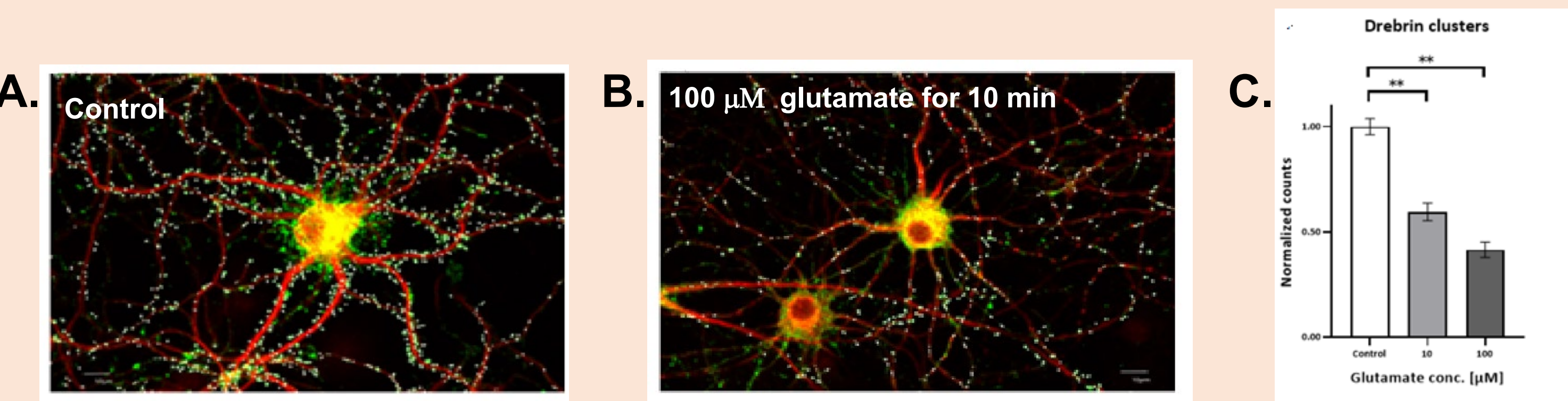
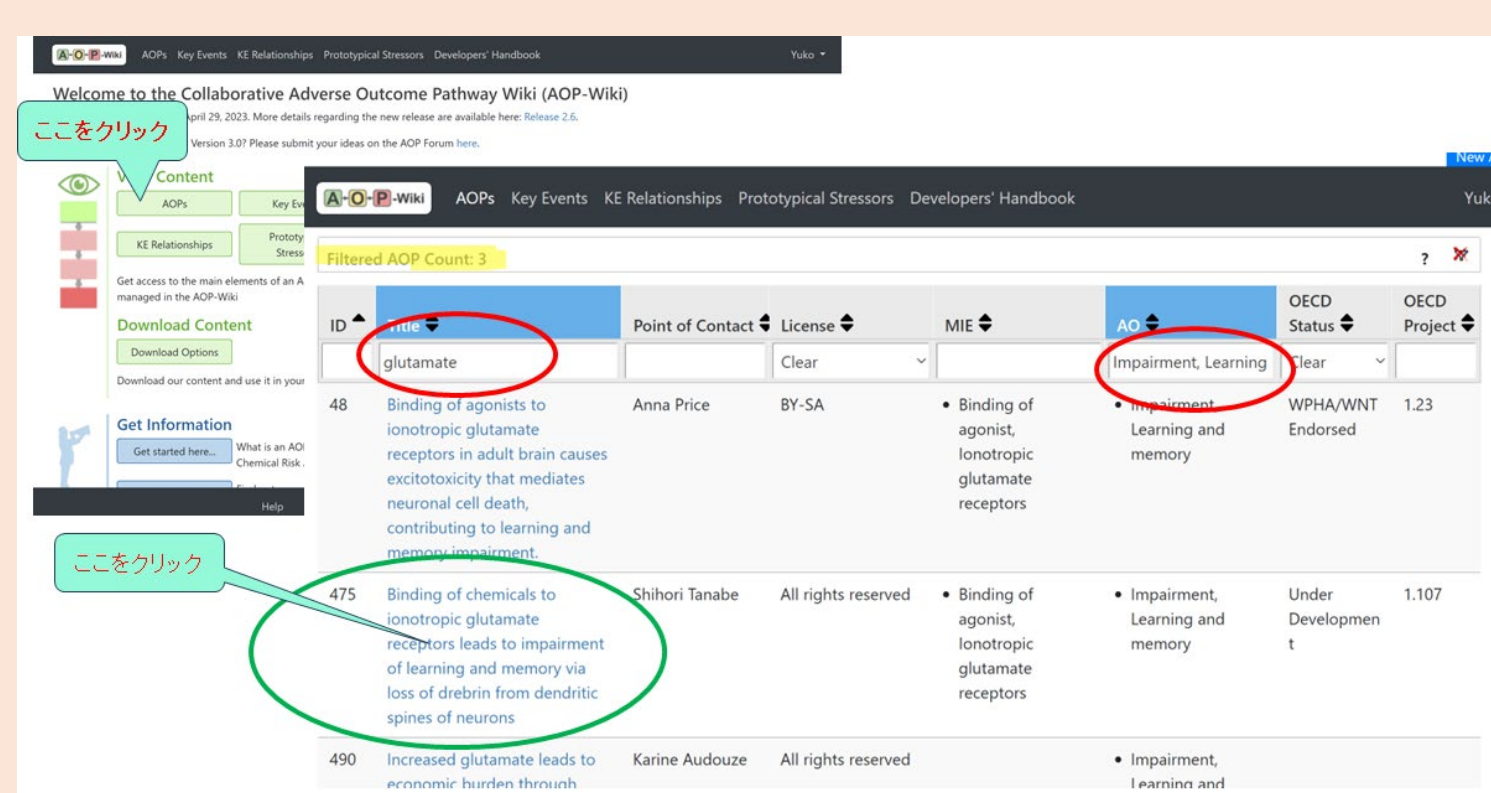


Fig.4 ラット胎仔由来凍結海馬神経細胞を培養して21日後のドレブリンクラスター数に対するグルタミン酸の作用 A: 溶媒コントロールの培養細胞の樹状突起スパインに局在するドレブリンクラスター、B: 100 μMグルタミン酸を10分間処理した場合のドレブリンクラスター、C: 定量解析結果



参考 : AOP475へのアクセス法

Loss of drebrin (KE3)の計測法

1.ラット胎仔由来凍結海馬神経細胞を用いたアッセイ法

2. ELISA法による定量的解析

A. 凍結海馬神経細胞培養と免疫細胞染色

B. ドレブリンクラスター数の自動測定法 (CQ1とセルパスファインダー)

ELISA kit, AlzMed Inc.

Dose (ng/ml)	Human neuron ELISA system		R²	S.E.M	LOD
	OD450	IC50			
100	2.188	1458.00	0.989	0.020	ND
1000	2.141	8548.00	2.349	10616.00	-0.956
10000	0.261	8220.00	0.248	4860.00	ND

海馬初代培養神経細胞のドレブリン染色像を用いた毒性評価法の検証 : ロテノンの発達神経毒性と神経毒性評価

ロテノンはマメ科植物デリスの根より得られる農業用殺虫剤の有効成分である。ラットにおいて黒質線条体の神経細胞死をもたらすことが知られており、パーキンソン病の動物実験モデル作成に利用されている。我々はロテノンの神経毒性作用とドレブリンの神経細胞内局在変化との関係を、ラット胎仔由来凍結海馬神経細胞を用いた初代培養神経細胞 (21 DIV) を使って調べた。CQ1・セルパスファインダーに搭載されているAI学習機能を使って、溶媒コントロールの神経細胞体のドレブリン分布と100 μMグルタミン酸を10分間投与した神経細胞体のドレブリンの局在変化の学習を実施した。ロテノンの神経毒性発現にNMDA受容体との分子相互作用が関与するか否かを調べる目的で、ロテノン (1,3,10,30 μM) を21 DIVで1時間投与した。その結果、グルタミン酸処理された神経細胞体内のドレブリンの局在変化とロテノン処理された神経細胞体内のドレブリン局在変化との間に類似性が認められ、濃度依存的な変化も認められた。このことからロテノンの神経細胞毒性にはNMDA受容体を介したプロセスが包含されている可能性が示唆された (Fig.5)。さらに神経細胞死より前に樹状突起スパインからドレブリンが消失する実験条件を見出した (Data not shown)。今後はNMDA受容体との関係性を明らかにするための阻害薬実験を行う。

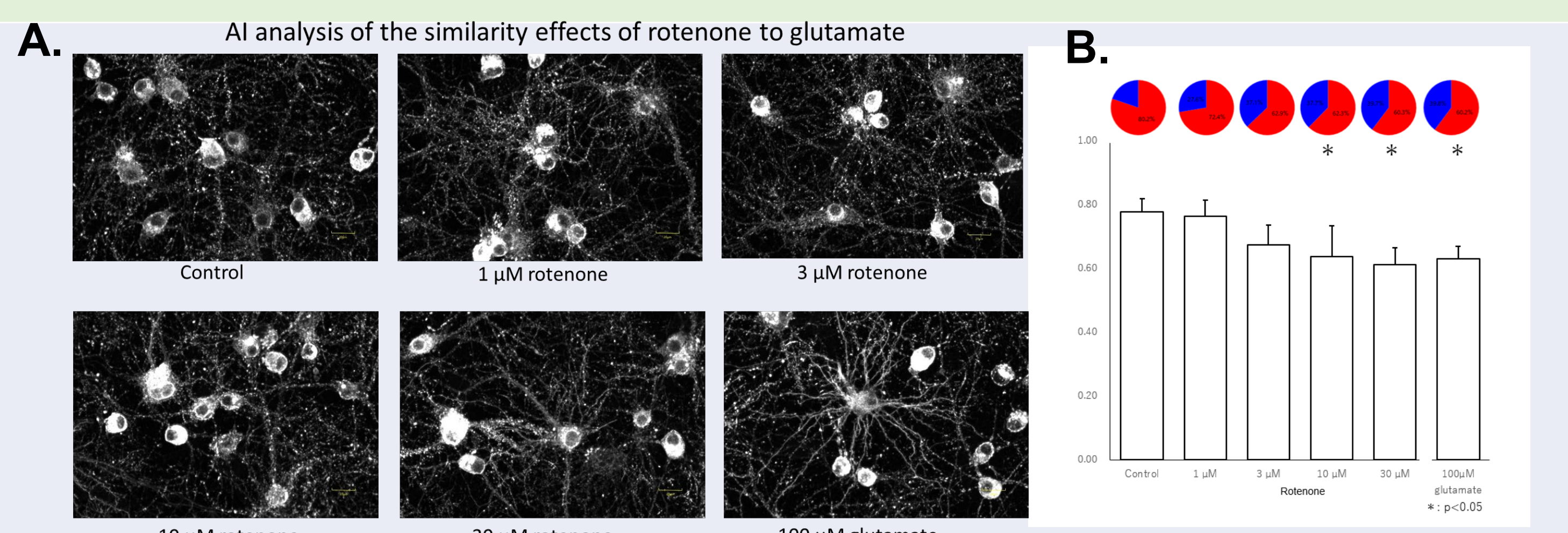


Fig.5 ドレブリン細胞内分布に対するロテノンのグルタミン酸の作用との類似性に関するAI解析結果 A: 各濃度のロテノン投与後1時間のドレブリン分布への作用と100 μMグルタミン酸10分間の作用の代表例 B: 細胞体周辺部のドレブリン分布変化に関して、グルタミン酸投与群との類似細胞の割合の変化 (パイチャートの青部分)。3 μMロテノンから細胞体のドレブリン分布の変化が見られた。

SUMMARY

- The impairment of learning and memory occurs even in the absence of neuronal cell death.
- The loss of drebrin from dendritic spines of cultured neurons is a suitable key event linked to the impairment of learning and memory.
- Drebrin expression levels can be measured by immunocytochemistry.
- AI analysis also represented neurotoxic risk of rotenone quantitatively.
- The quantitative analysis of drebrin cluster using neuronal culture will promote the accumulation of data on the neurotoxicity of chemical substances.

This work was supported by the Japan Chemical Industry Association (JCIA) Long-range Research Initiative (LRI) to YS, and the Regulatory Science Research Grant from MHLW (2020-2022) to YS. Contact to Yuko Sekino, PhD. yukos@g.ecc.u-tokyo.ac.jp