



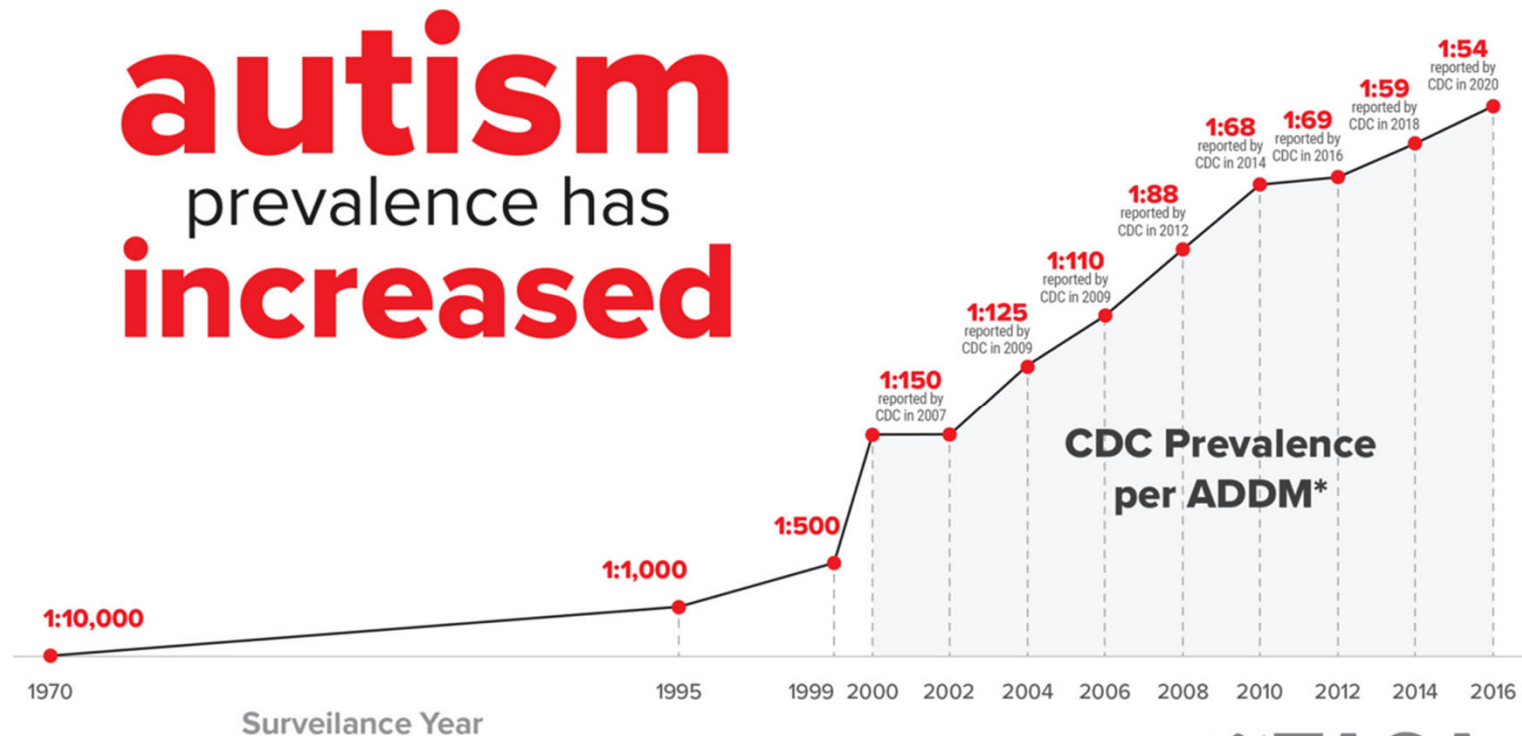
日化協LRI 研究報告会
2021年8月20日



発達神経毒性のAOP解明に資する
神経炎症評価系の開発

三重大学大学院医学系研究科 統合薬理学
西村 有平

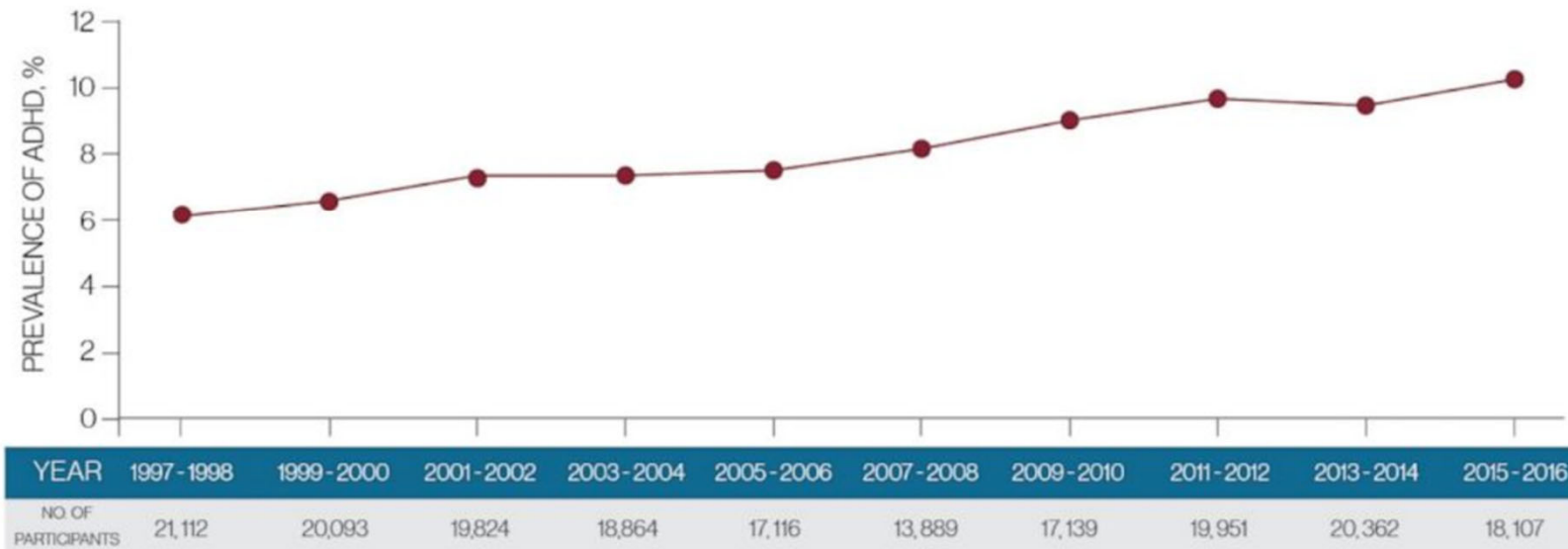
神経発達障害 (Neurodevelopmental disorders: NDD) の有病率は増加している



*ADDM (Autism and Development Disabilities Monitoring Network)

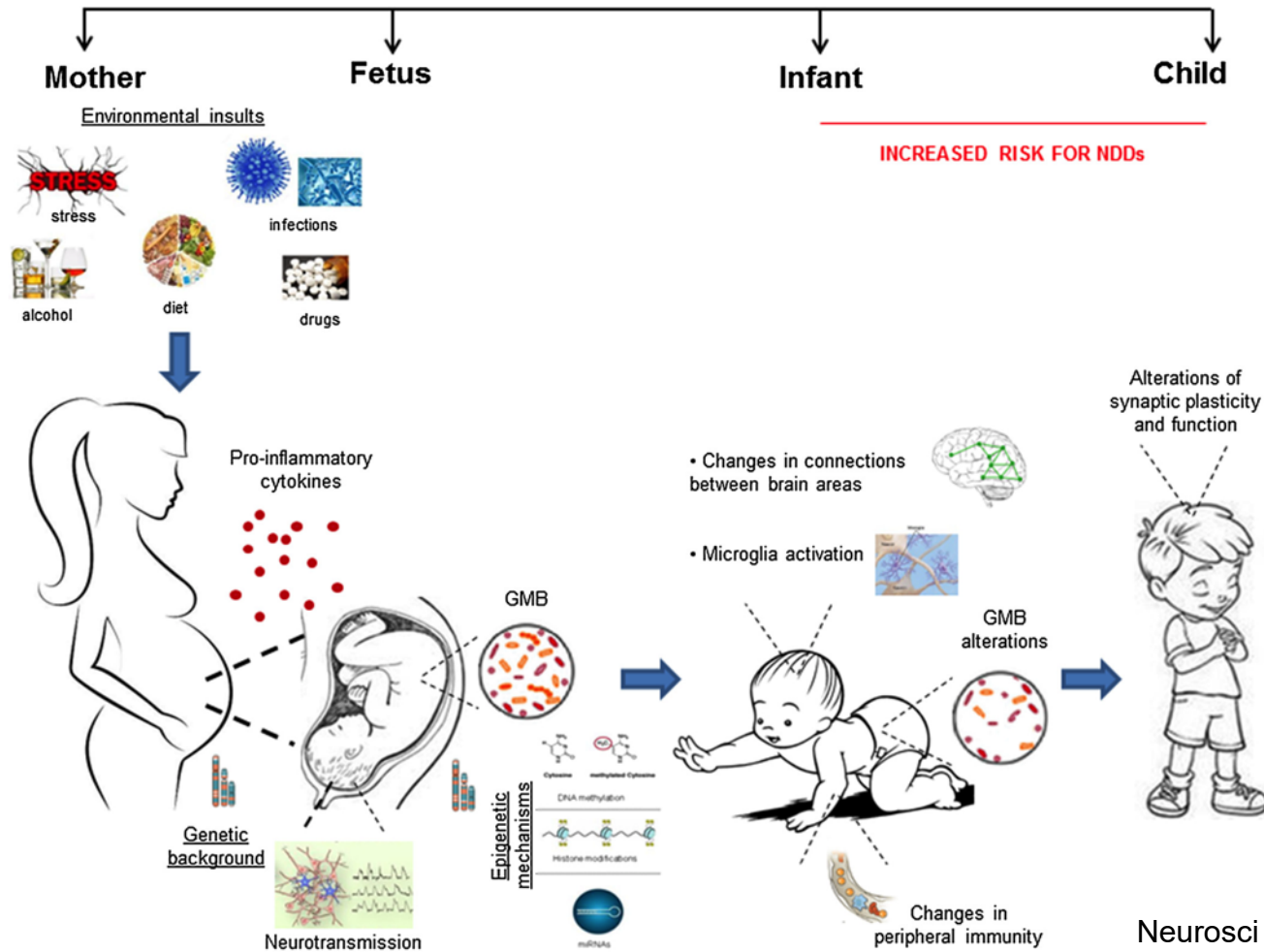
NDDの有病率は増加している

REPORTS OF ATTENTION-DEFICIT/HYPERACTIVITY DISORDER (ADHD) IN U.S. CHILDREN AGES 4 TO 17



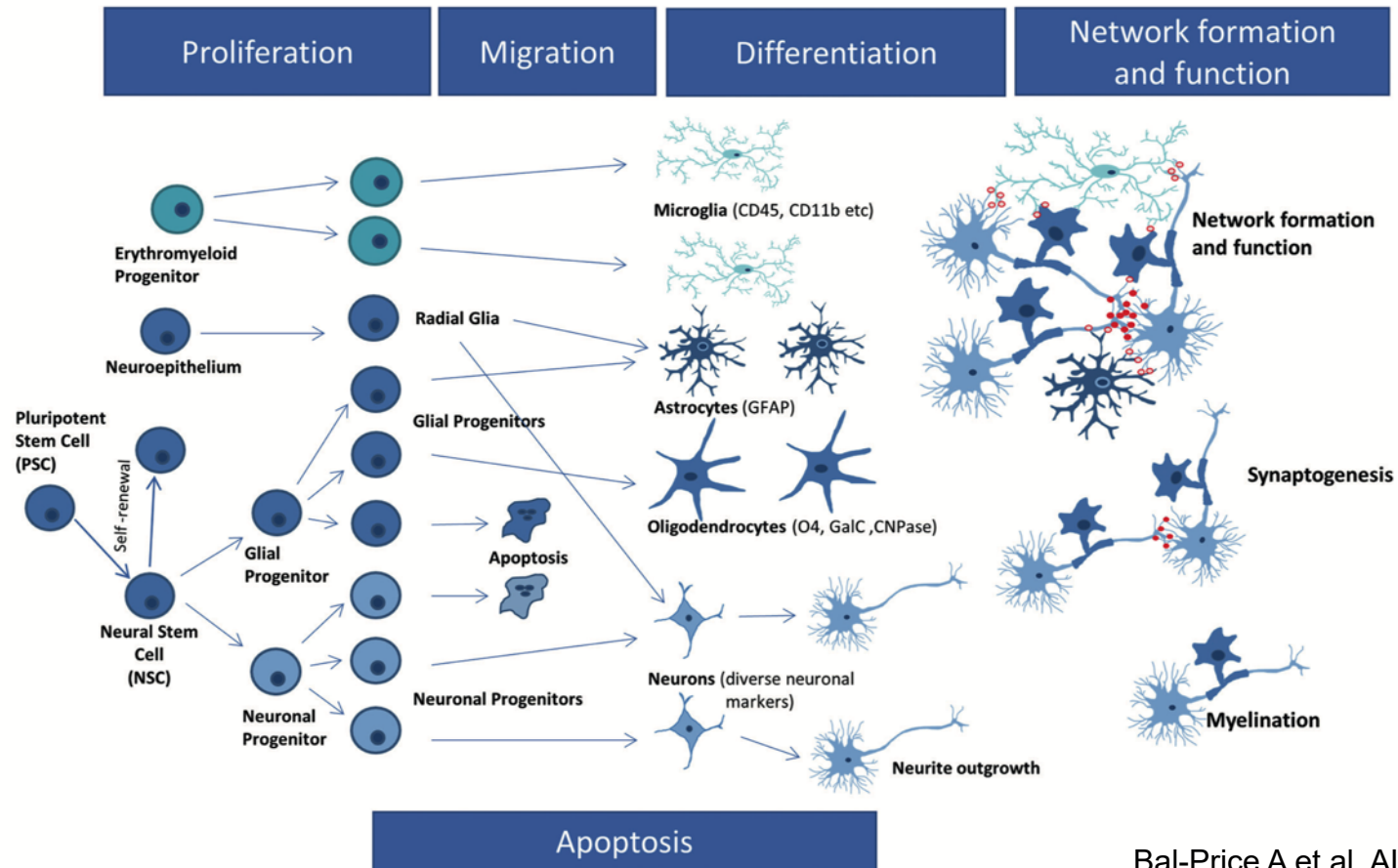
SOURCES: Journal of the American Medical Association (JAMA)

Risk factors for developing NDDs



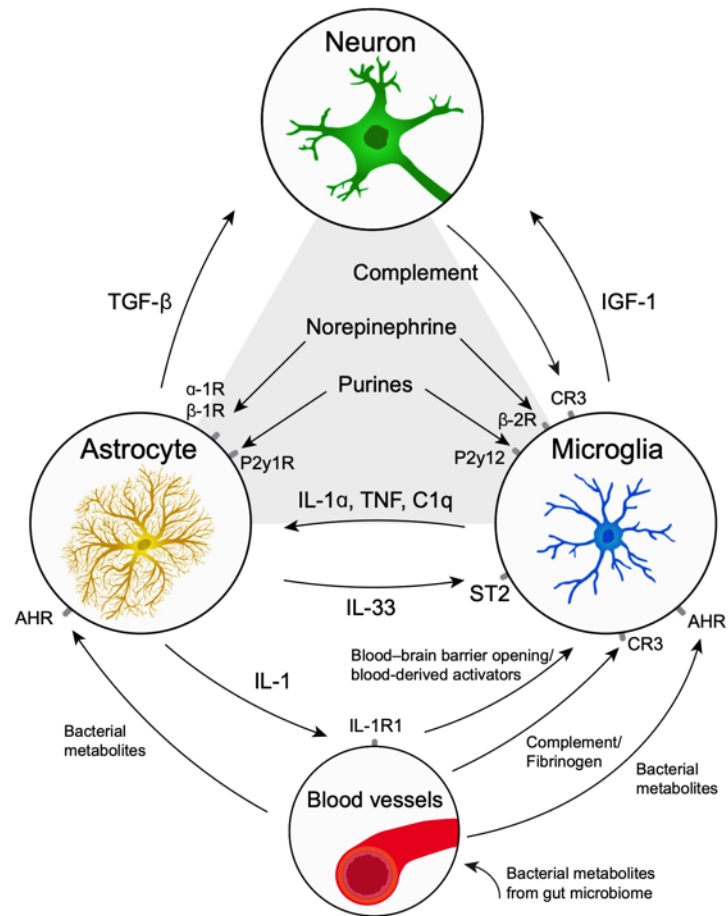
Cattane N et al
Neurosci Biobehav Rev (2020)

神経発達の基本的経路



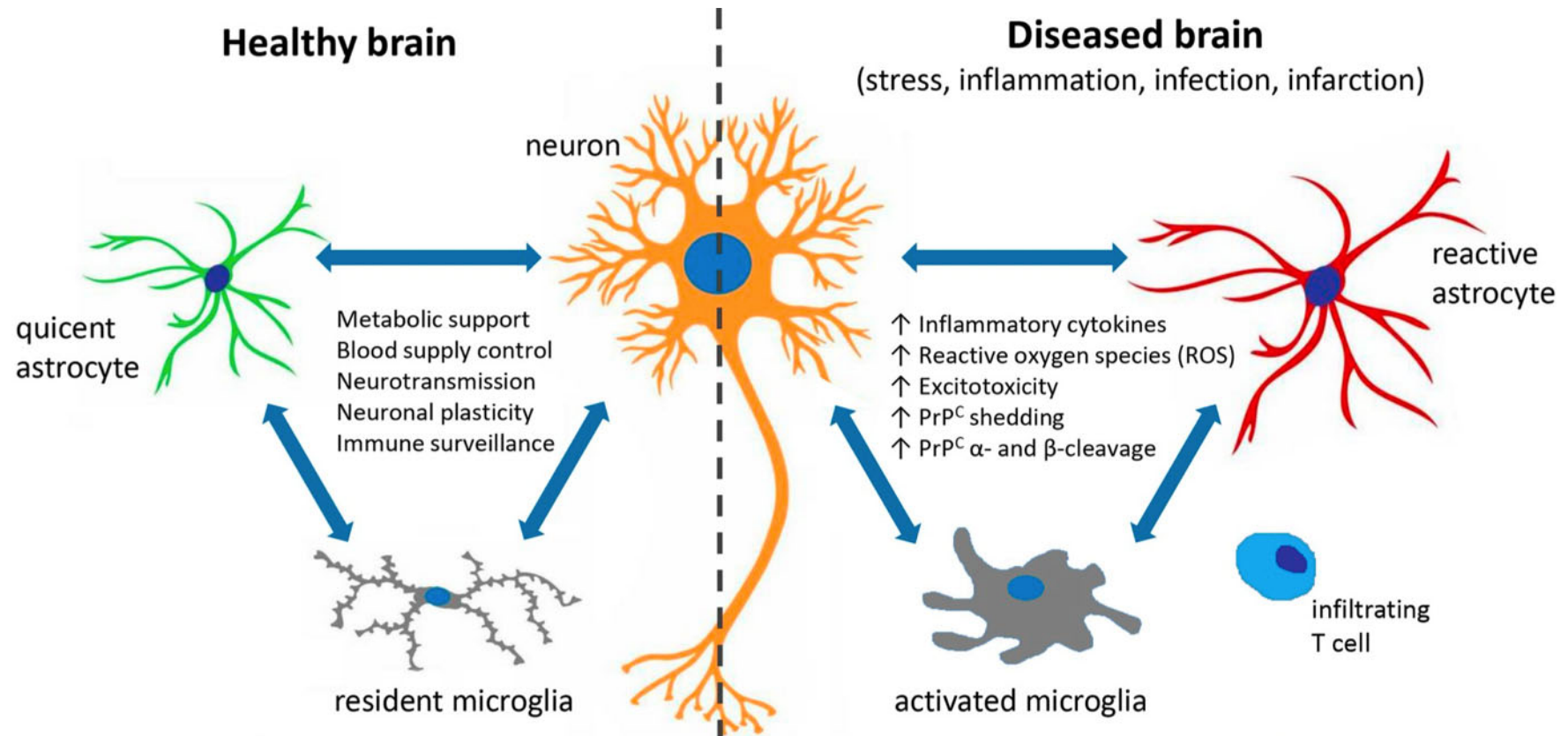
Bal-Price A et al ALTEX (2018)

中枢神経系の細胞間コミュニケーション

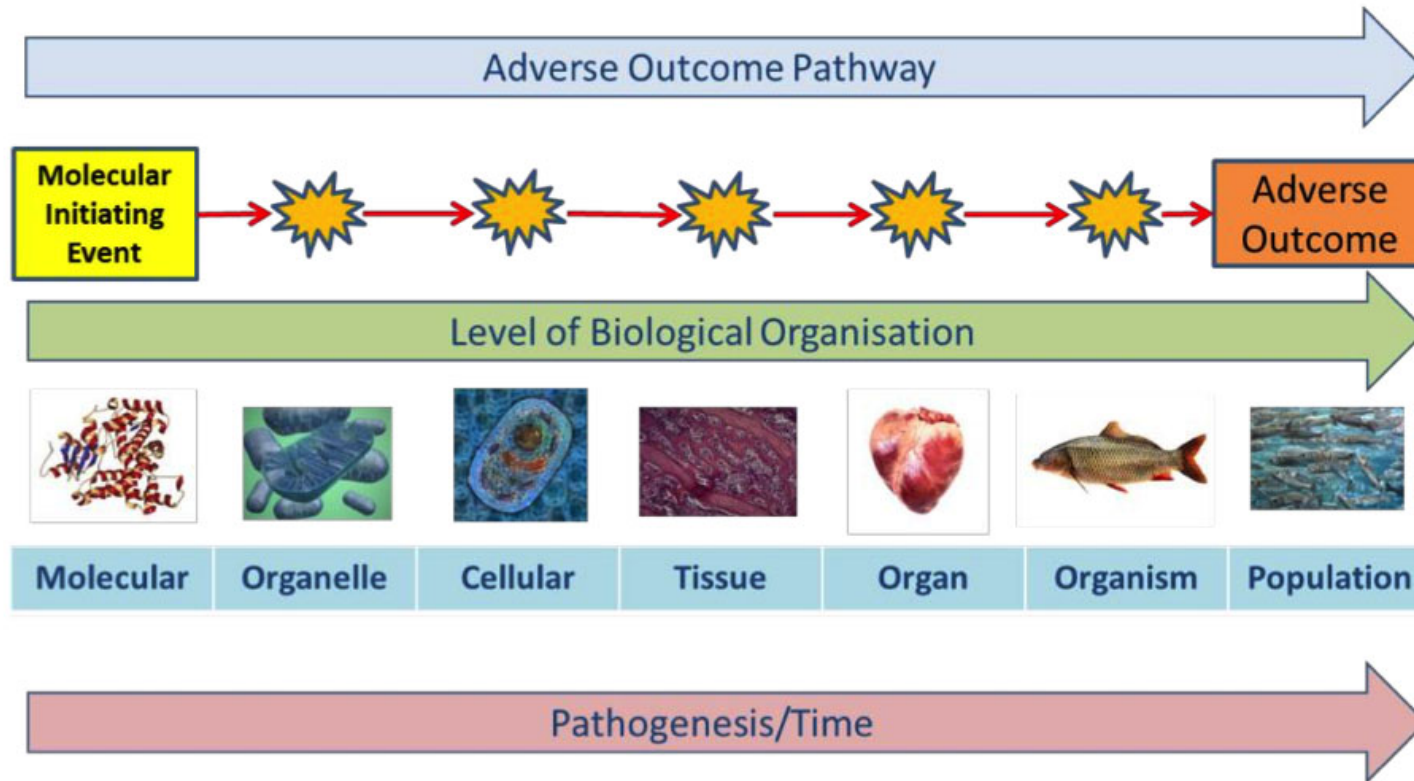




Vainchtein ID et al
Trend Neurosci (2020)

中枢神経系における神経・免疫のクロストーク

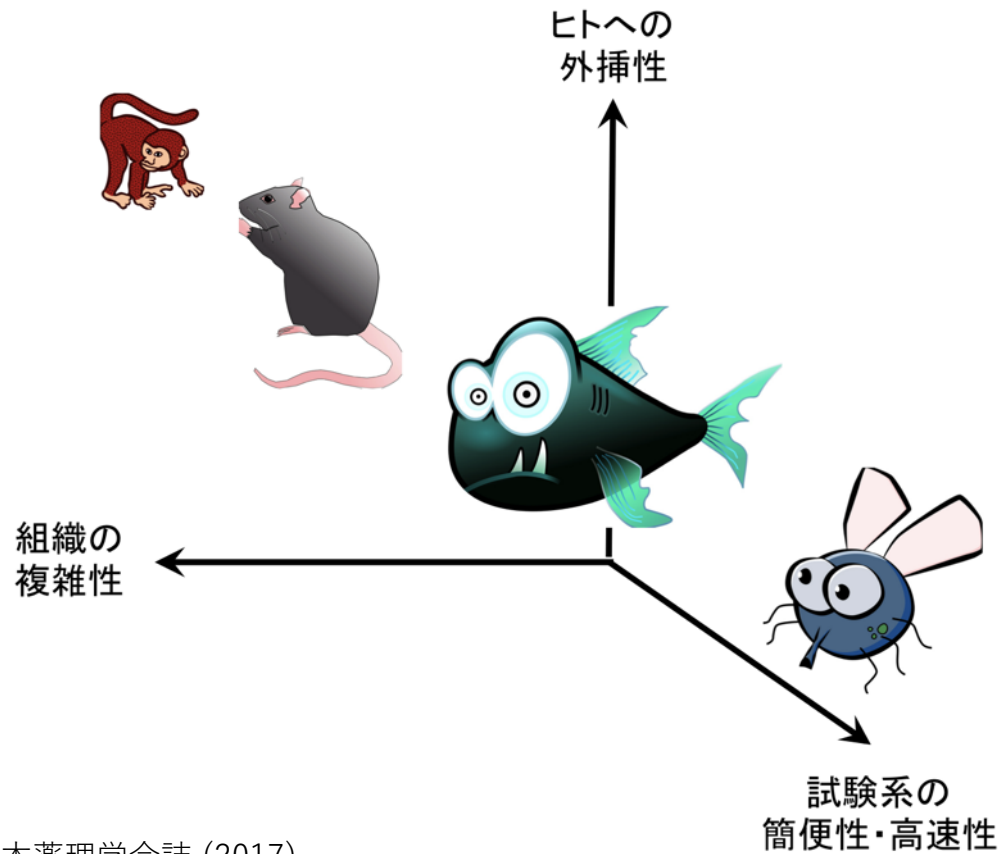


Adverse Outcome Pathway (AOP)



 = Key Event
 = Key Event Relationship

様々なモデル生物の特徴



Regulation on 3Rs and Alternative Models

3Rs: Replacement,
Reduction, & Refinement



EURLS-ECVAM European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing:

Recommendation on the Zebrafish Embryo Acute Toxicity Test Method (ZFET) for Acute Aquatic Toxicity Testing in Jul 2014.



Several **OECD guidelines** include zebrafish as a recommended animal models to assess Safety of chemical compounds, such as OECD 203, 210, 212, 229, 236.

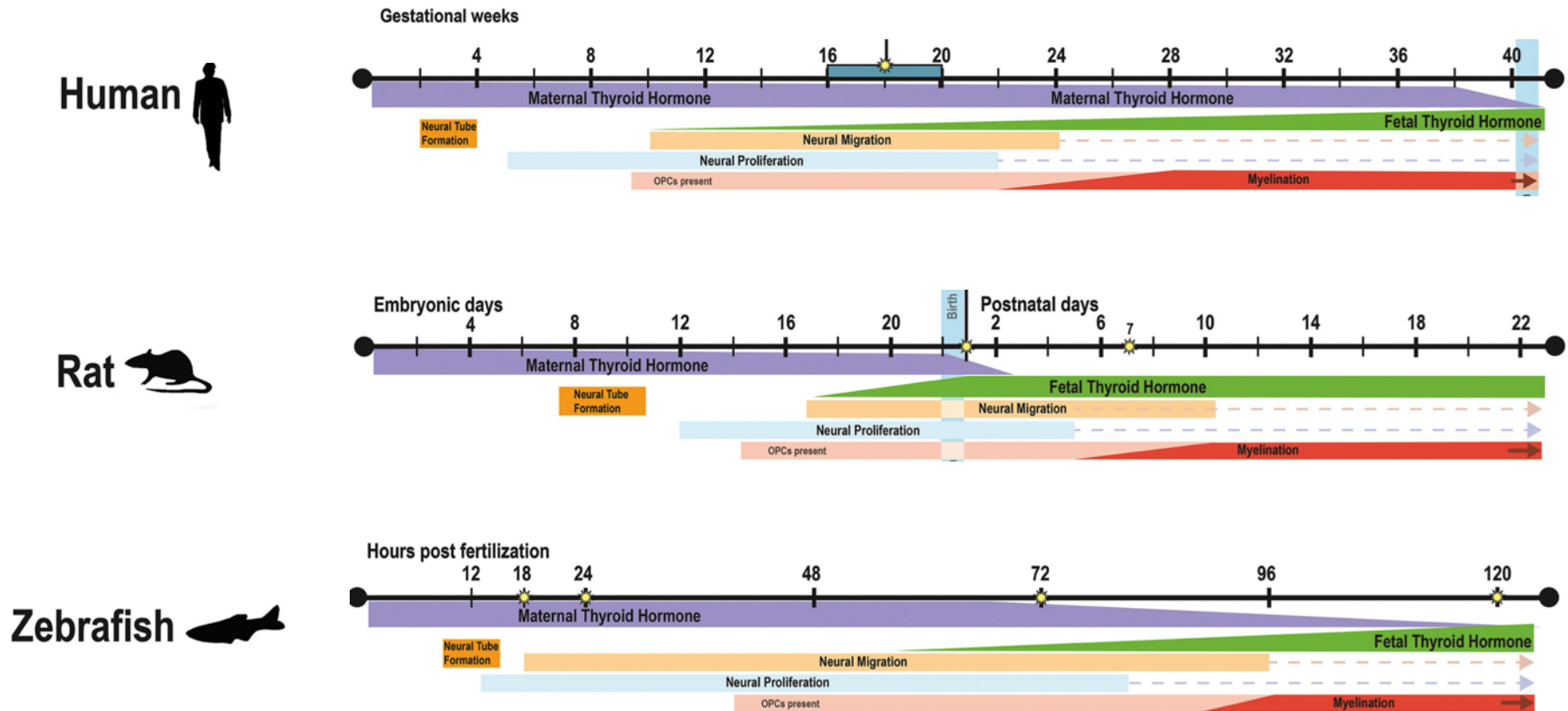


EC Regulation 1223/2009 for **Cosmetic testing:** animal experimentation forbidden--- Alternative models should be used.

* Zebrafish embryos are not considered animals until 5 days post fertilization
(EU Directive 2010/63/EU)

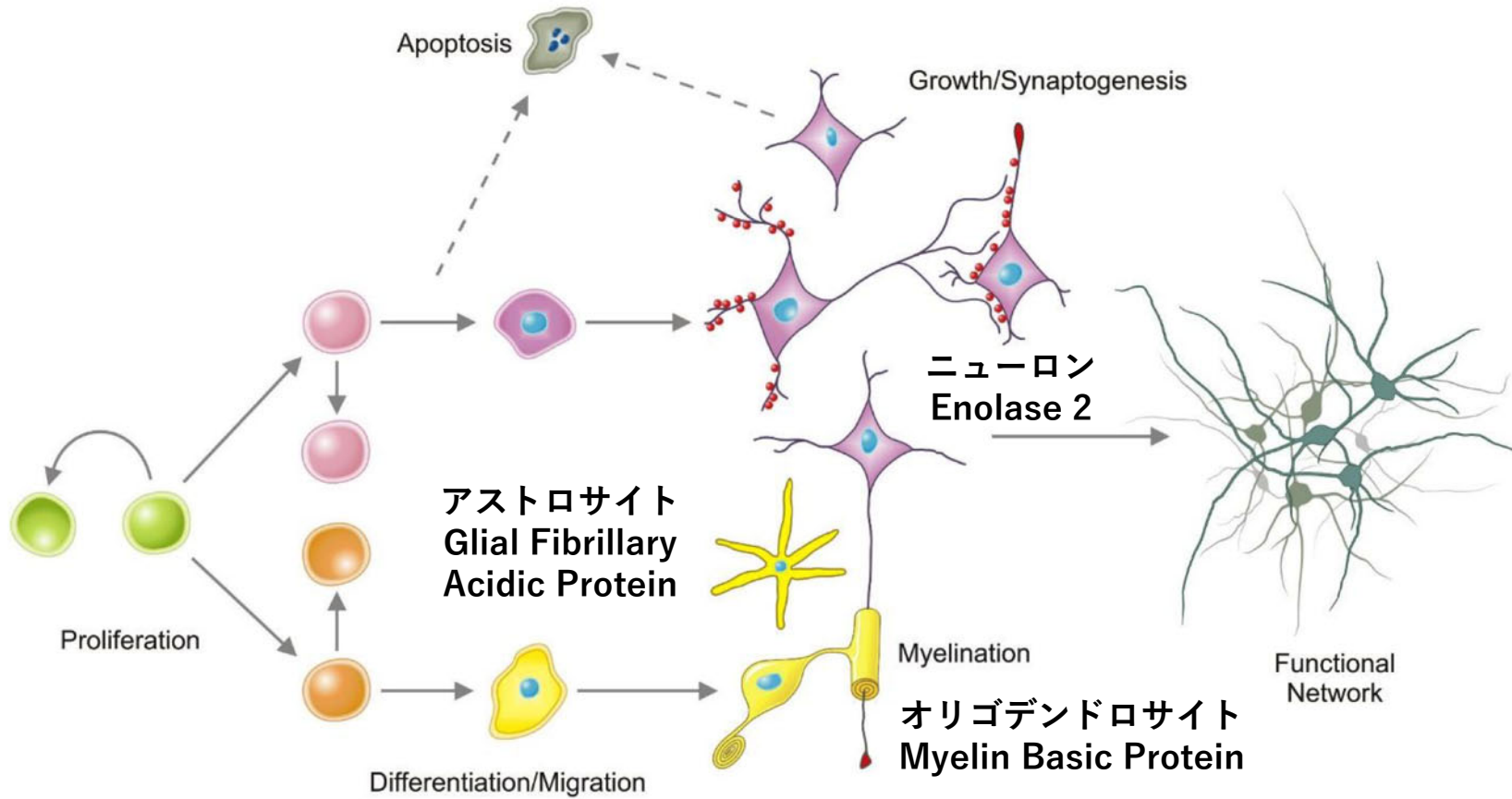
<https://www.youtube.com/watch?v=4n71hhrs8Y4>

ヒト・ラット・ゼブラフィッシュの神経発達比較



Walterl KM et al PLOS One (2019)

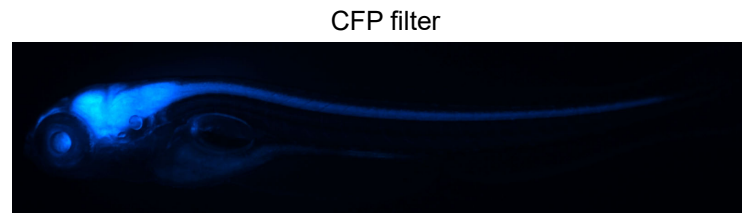
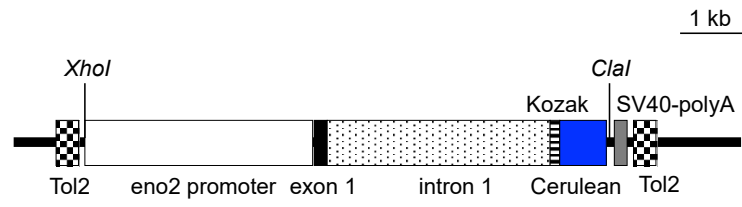
神経分化を可視化するためのマーカー遺伝子



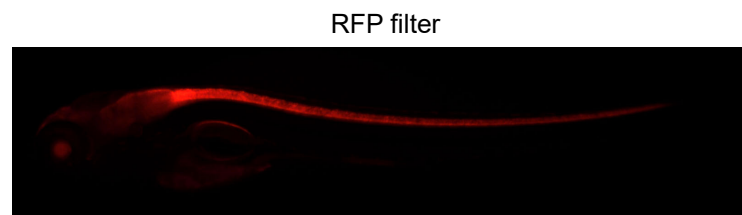
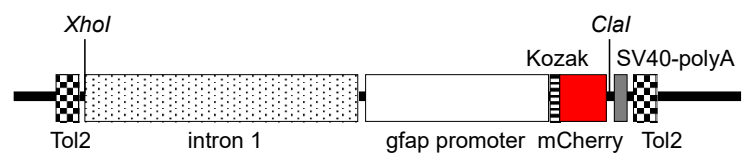
Fritsche E. OECD/EFSA Workshop on DNT (2016)

第2-5期日化協LRI「ゼブラフィッシュの神経分化を指標とする化学物質の発達神経毒性評価手法の開発」

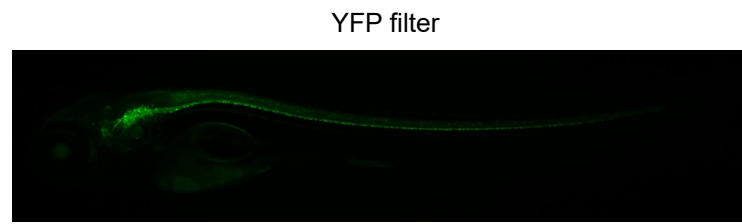
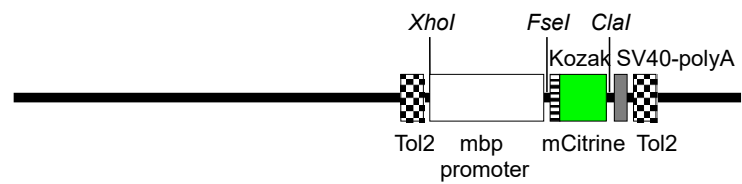
ニューロン
(*eno2*)



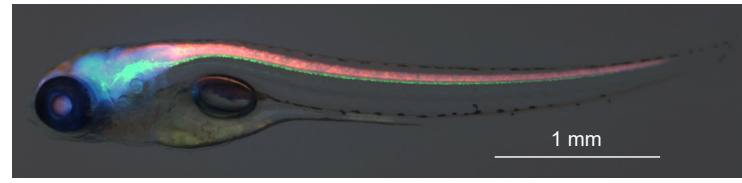
アストロサイト
(*gfap*)



オリゴデンドロサイト
(*mbp*)

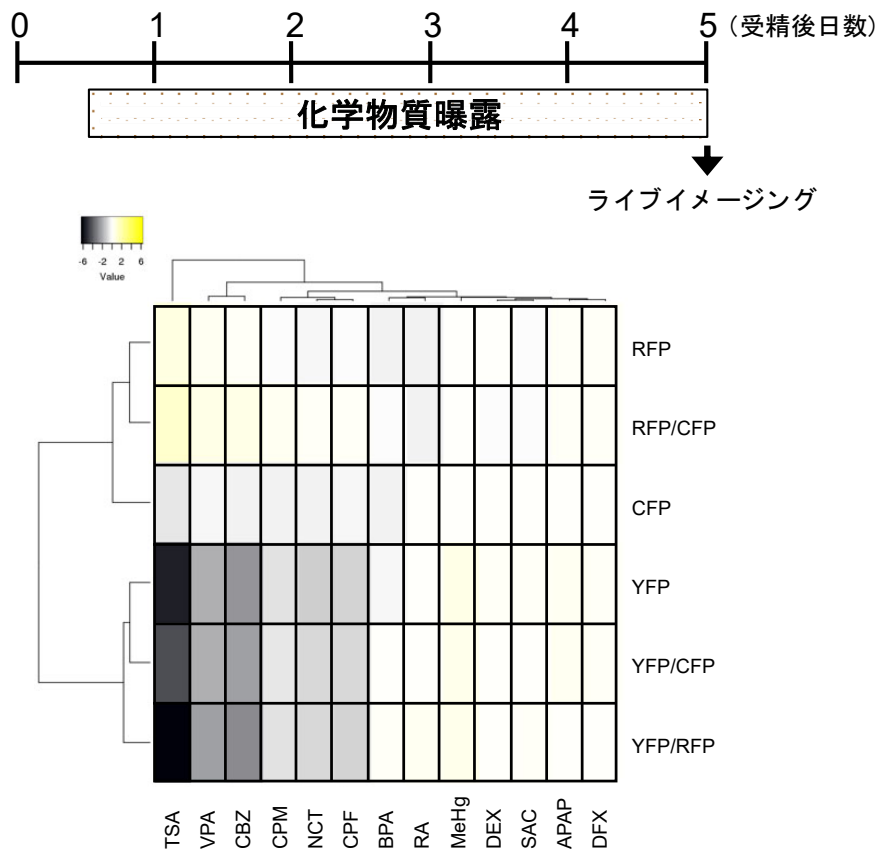


Merged image

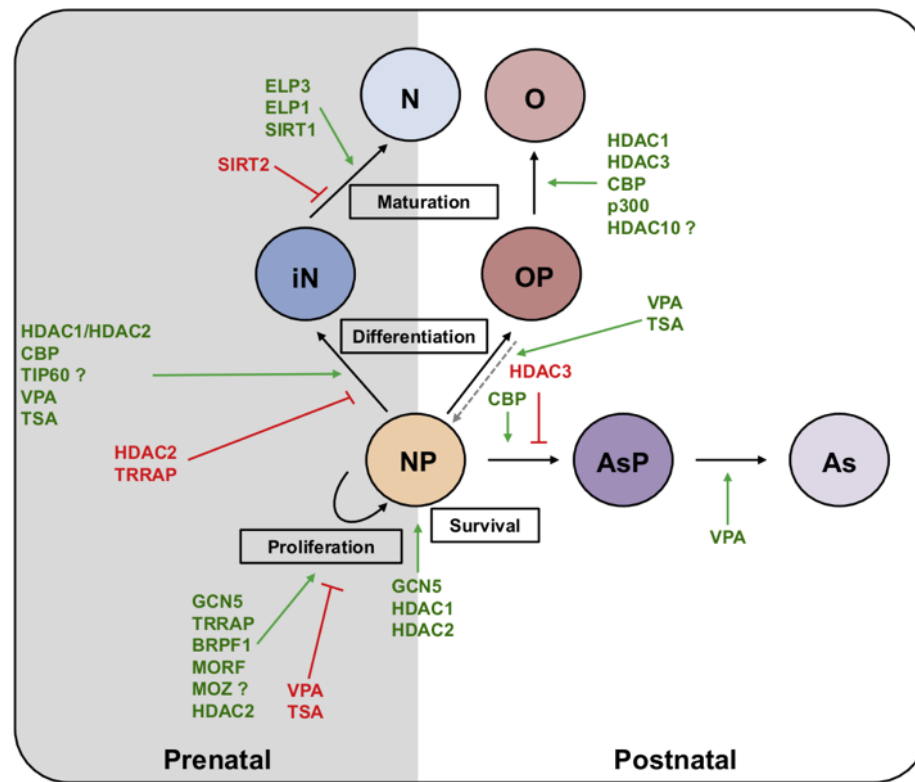


Koiwa J et al. Pharmaceuticals (2019)

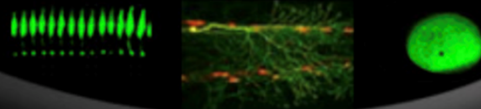
第2-5期日化協LRI「ゼブラフィッシュの神経分化を指標とする化学物質の発達神経毒性評価手法の開発」



Koiwa J et al. Pharmaceuticals (2019)



Tapias A et al Genom Proteom Bioinfo (2017)



[Japanese](#) | [English](#)

Home (新着情報)

プロジェクトの目的

提供可能な
ゼブラフィッシュ系統

国立遺伝学研究所の
遺伝子トラップ・
エンハンサートラップ
系統リソース

TILLING系統

寄託と提供

実費徴収

- 理化学研究所脳神経科学研究センター
- 国立遺伝学研究所

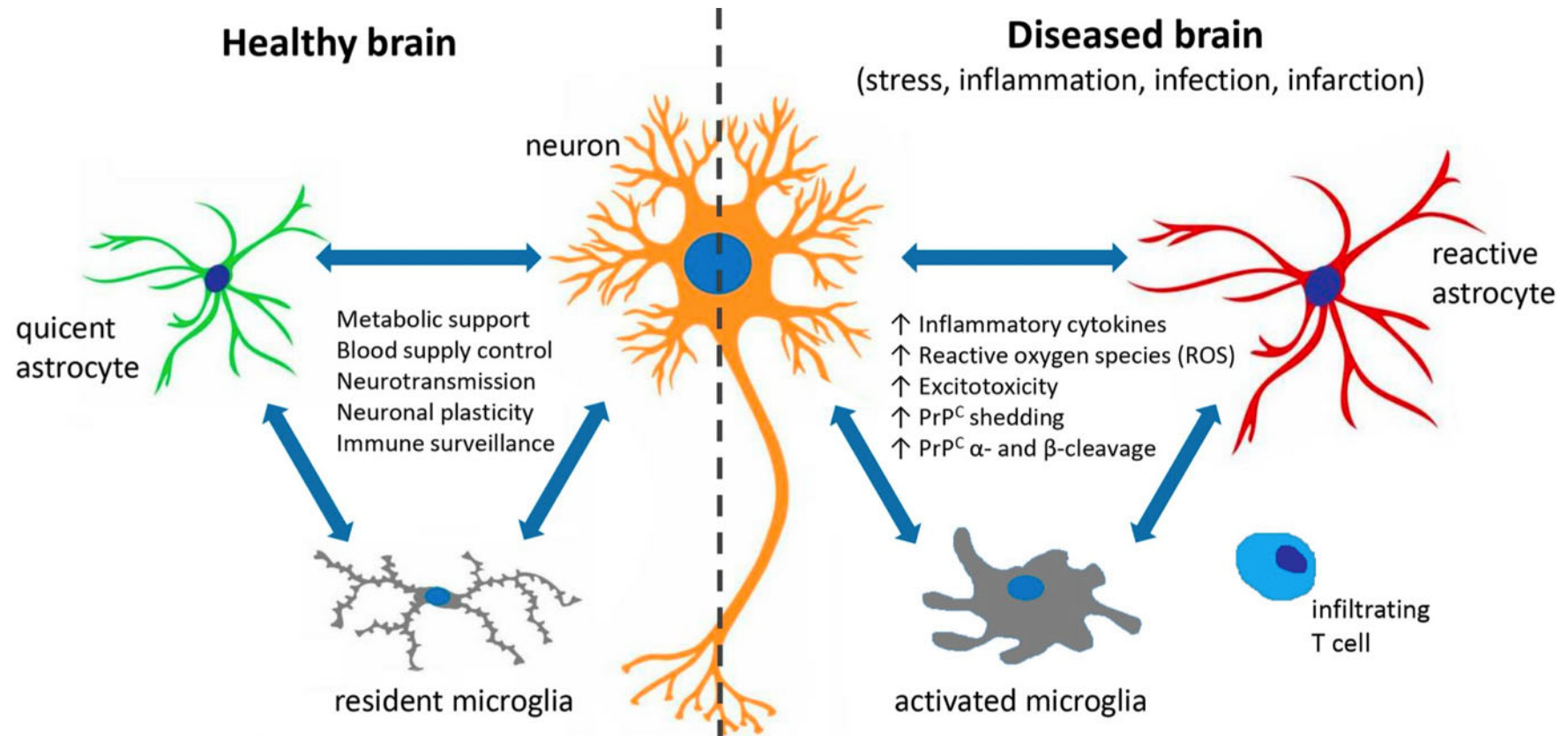
[トップ](#) > [系統探索画面](#) > 系統詳細画面

Strain Name: *Tg (eno2:Cerulean) ; Tg(gfap:mCherry) ; Tg(mbp:mCitrine)*

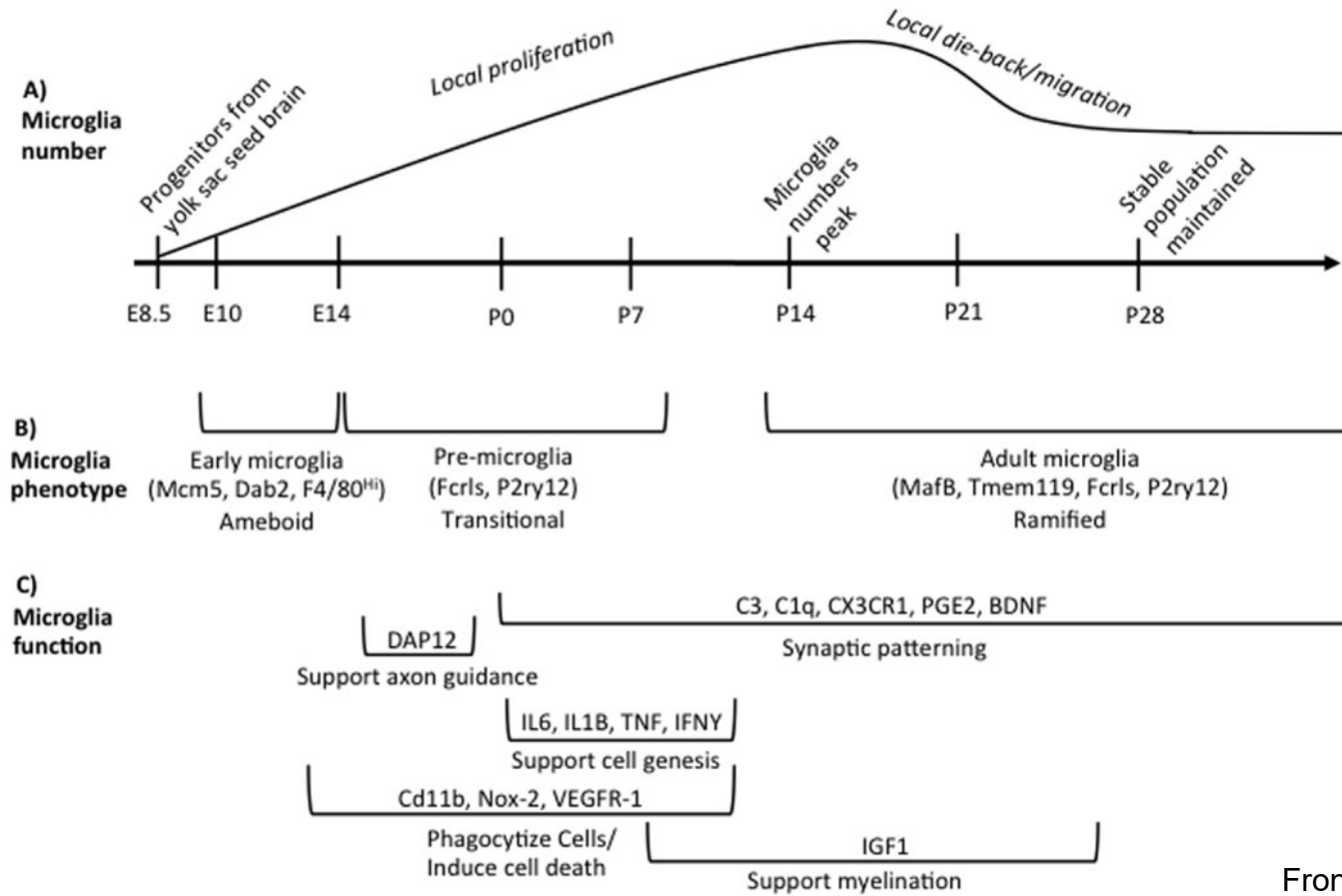
[Request Help](#)

Allele	
Strain Name	<i>Tg (eno2:Cerulean) ; Tg(gfap:mCherry) ; Tg(mbp:mCitrine)</i>
Type	トランスジェニック
Genotype	
Affected Gene	
Origin and Depositor	三重大学(西村 有平)
Link to ZFIN	ZDB-ALT-200413-3 ZDB-ALT-200413-4 ZDB-ALT-200413-5

中枢神経系における神経・免疫のクロストーク

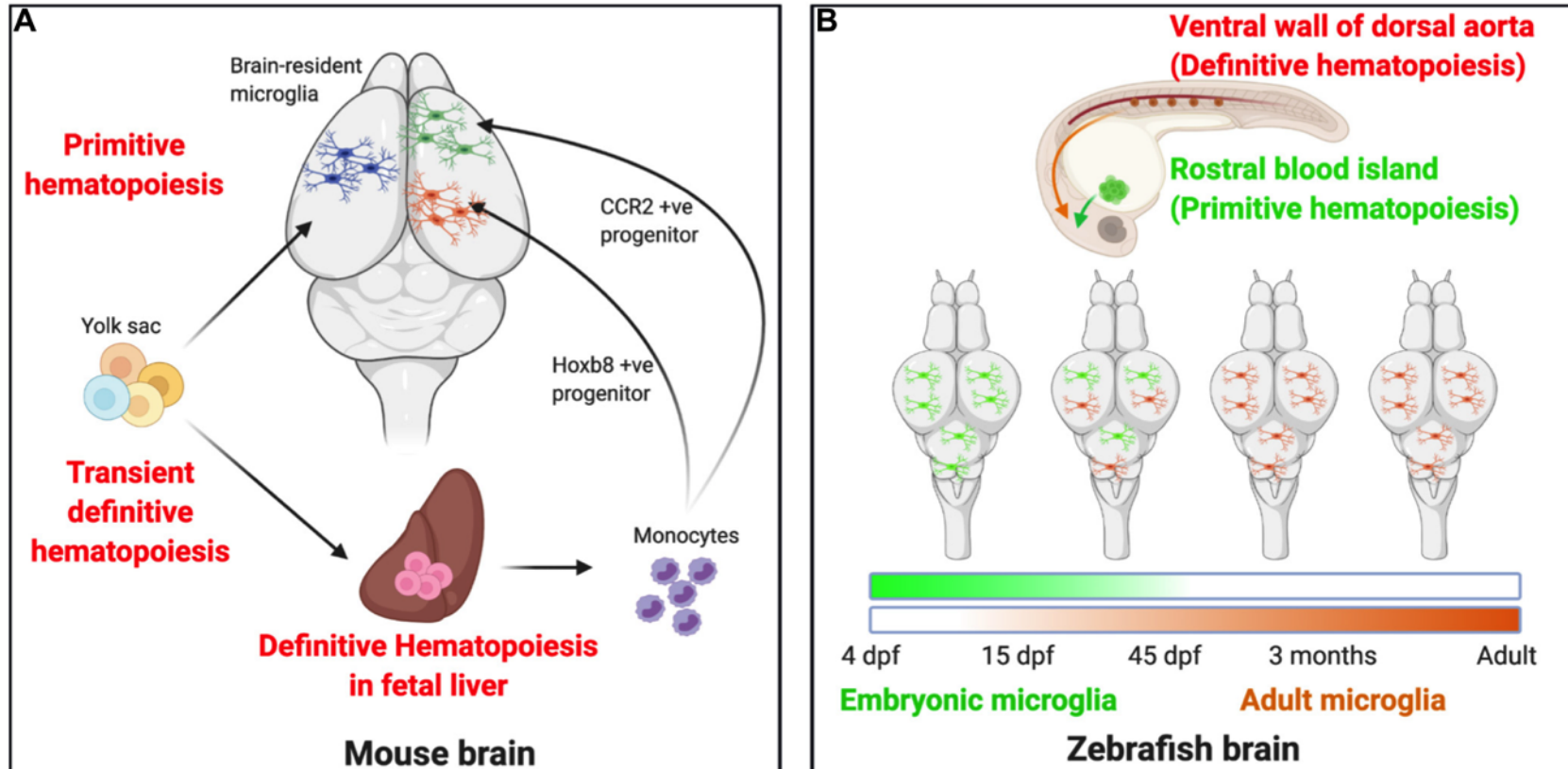


マウスの脳発達におけるミクログリアの役割



Lenz KM et al
Front Immunol (2018)

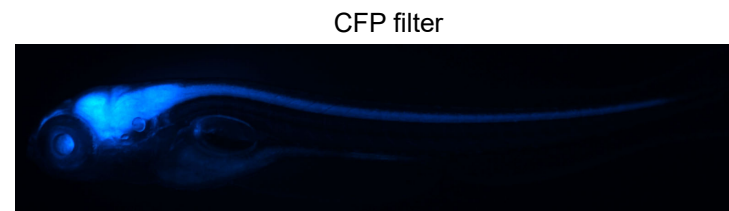
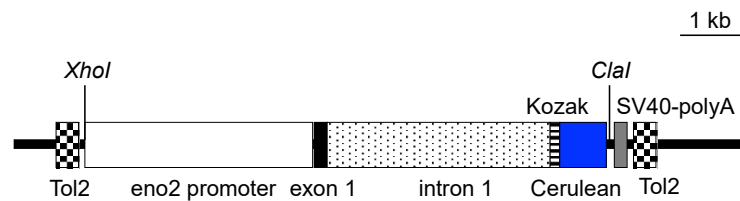
マウスとゼブラフィッシュのミクログリア比較



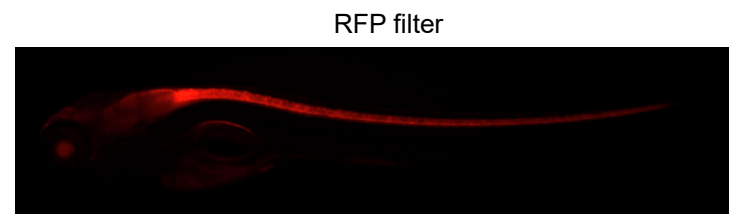
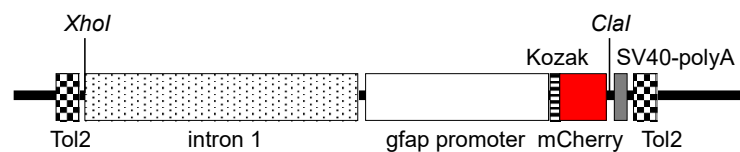
Sharma K et al Front Cell Dev Biol (2021)

日化協LRI「発達神経毒性のAOP解明に資する神経炎症評価系の開発」

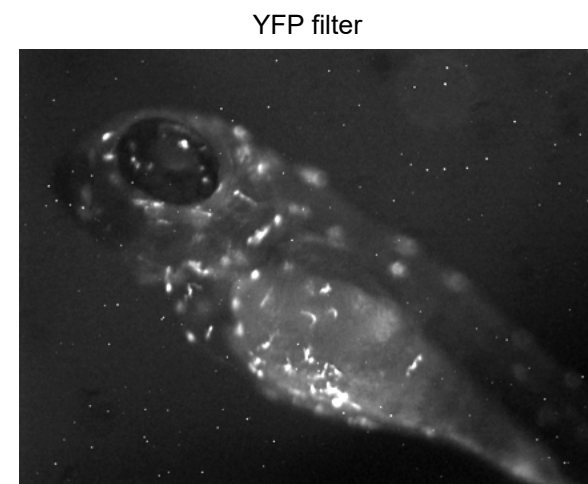
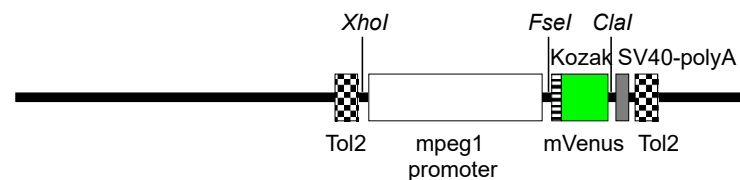
ニューロン
(*eno2*)



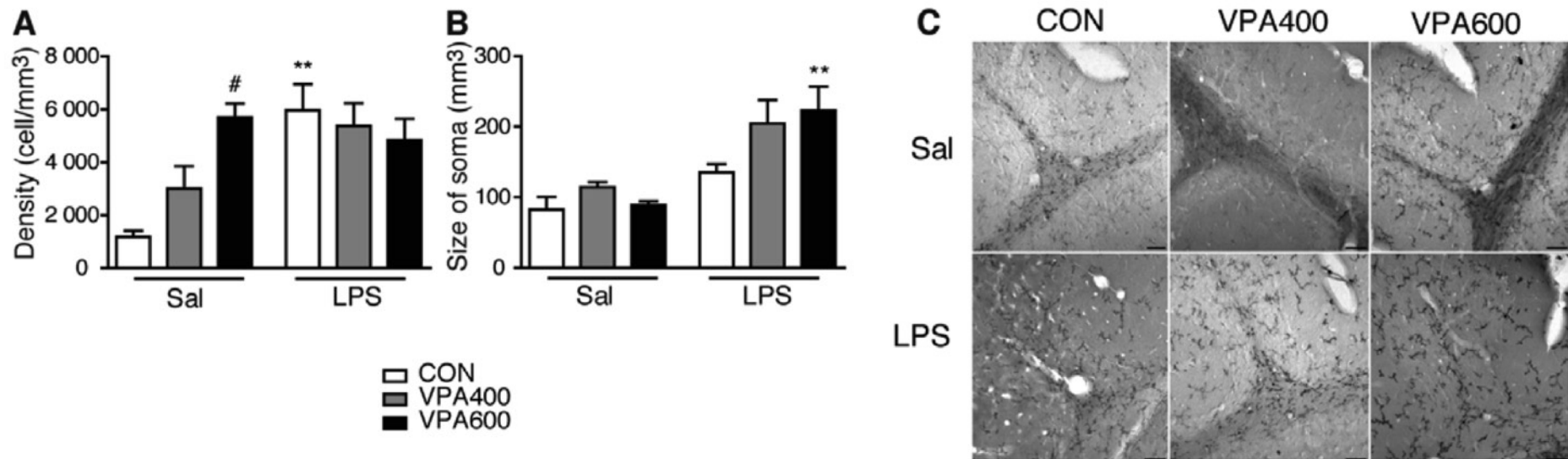
アストロサイト
(*gfap*)



ミクログリア
(*mpeg1*)

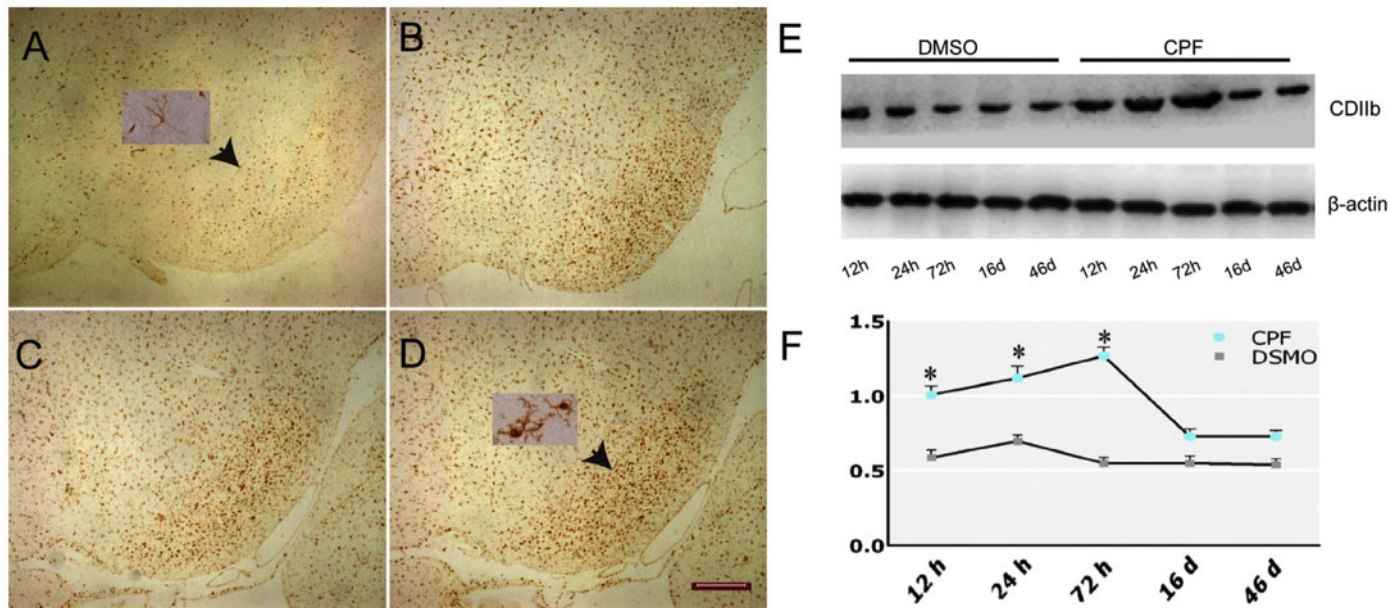


発達期のバルプロ酸曝露によるマウス小脳のマクログリア変化



At GD12.5, pregnant mice were injected subcutaneously with 400 or 600 mg/kg of VPA. Control animals were injected with saline solution (CON). The Mice (9–11 weeks of age) were injected intraperitoneally either with 25µg/kg LPS or with sterile saline solution (Sal). Two hours after the injection, the mouse brains were subjected to IHC.

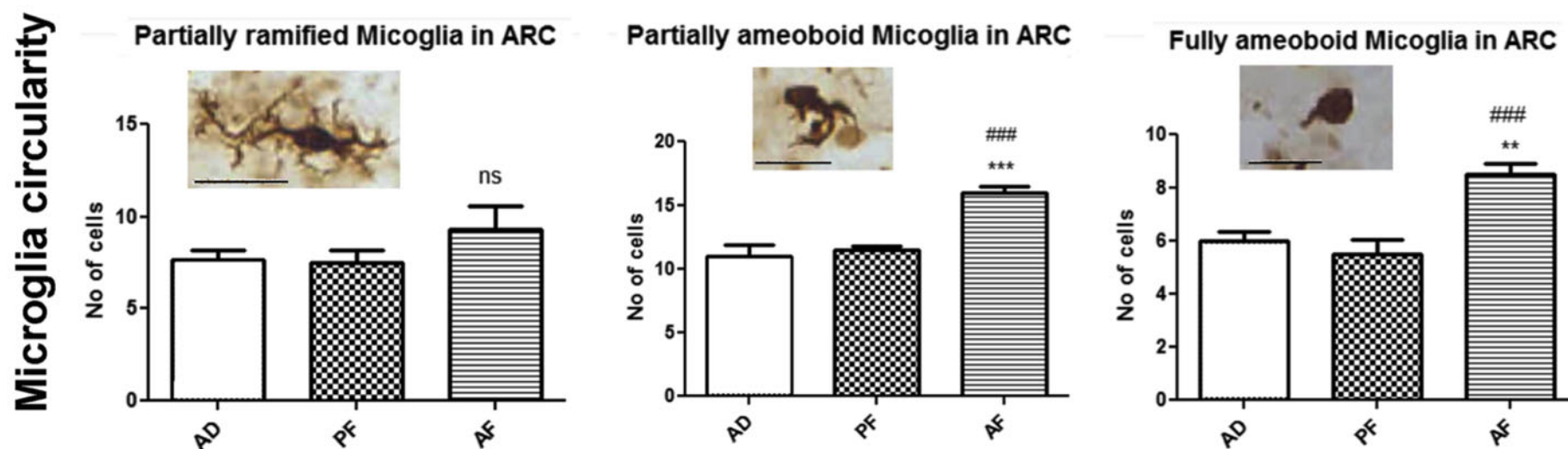
発達期のクロルピリフォス曝露によるラット黒質のミクログリア変化



CPF was injected subcutaneously at a dose of 5 mg/kg given daily at PND 11–14. Control animals received vehicle injections on the same schedule. (A) 12 h after treatment with DMSO, (B) 12 h after treatment with CPF, (C) 24 h after treatment with CPF, (D) 72 h after treatment with CPF. (E, F) CD11b protein of each groups was measured by Western blots.

Zhang J et al Toxicology (2015)

発達期のエタノール曝露によるラット海馬のミクログリア変化

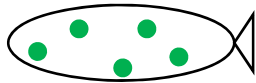


In vivo studies were conducted by feeding rat pups with oral gavage of a milk formula containing 11.34% ethanol (vol/vol) twice daily at 2 h intervals, yielding a total daily ethanol dose of 2.5 g/kg (**AF**), fed with isocaloric control (**PF**), or they were left in the litter with the mother (**AD**). The feedings were conducted at 10:00 AM and 12:00 PM daily for 5 days (Postnatal days 2–6).

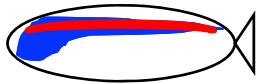
日化協LRI「発達神経毒性のAOP解明に資する神経炎症評価系の開発」

1年目

ミクログリアにmVenus
を発現する1色ZFを作製



ニューロンにCerulean
アストロサイトにmCherry
を発現する2色ZFを作製

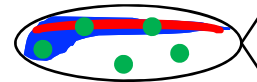


陽性・陰性化学物質を発達期の
ZFに曝露し、生存率に影響を
与えない濃度を決定

2年目

ミクログリアにmVenus
を発現する1色ZFと
ニューロンにCerulean
アストロサイトにmCherry
を発現する2色ZFを交配

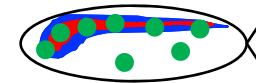
ミクログリアにmVenus
ニューロンにCerulean
アストロサイトにmCherry
を発現する3色ZFを作製



3年目

陽性・陰性化学物質を発達期の
3色ZFに曝露し
蛍光in vivoイメージングを実施。

Cerulean領域内のmVenus面積
mCherry領域内のmVenus面積
ミクログリア形態、などを計測し
中枢神経系におけるミクログリア・
ニューロン・アストロサイトへの
影響を解析



日本化学工業協会LRI関係者各位に
心より感謝申し上げます

