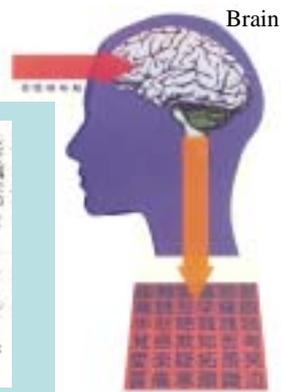
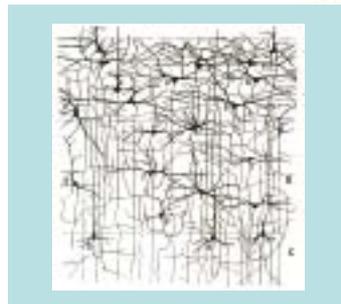


化学物質の神経系への有害性評価のあり方
 Requirements for Hazard Assessment of
 Chemical Substances and the Nervous System

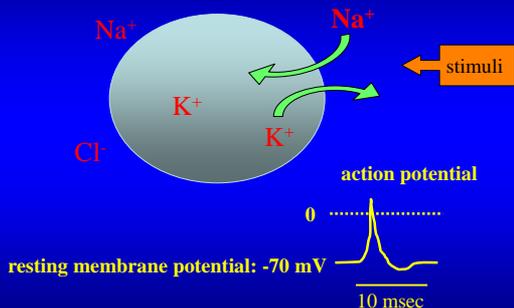
高坂 新一 (国立精神・神経センター神経研究所)

Shinichi Kohsaka
 (National Institute of Neuroscience)

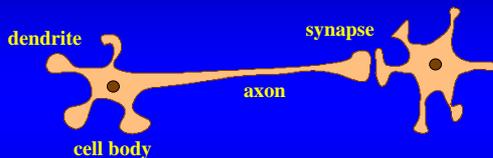
Information Processing
 by neuronal network



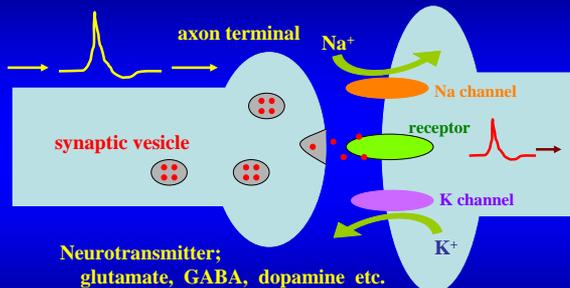
Neuron



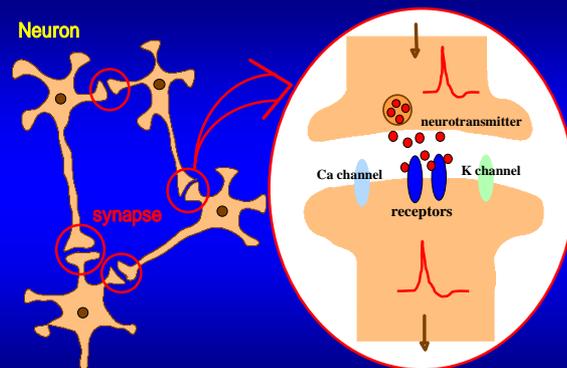
neuron



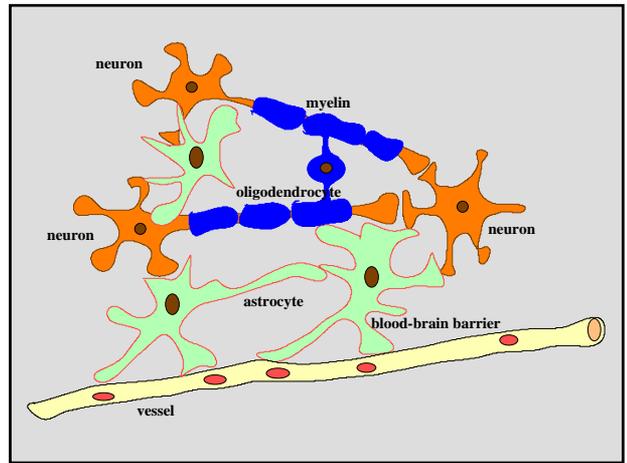
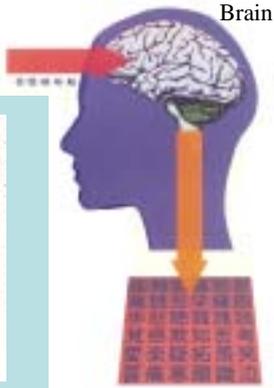
action potential



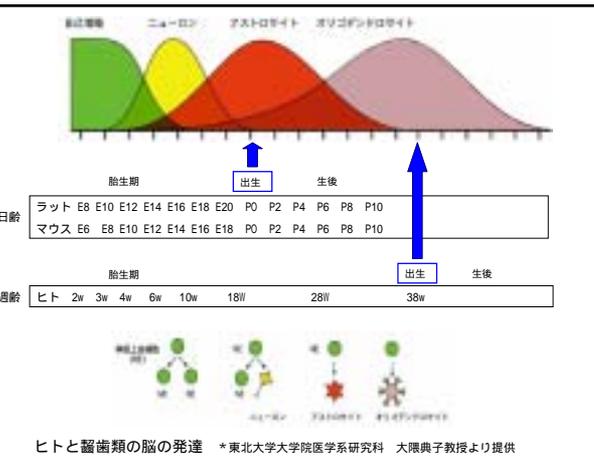
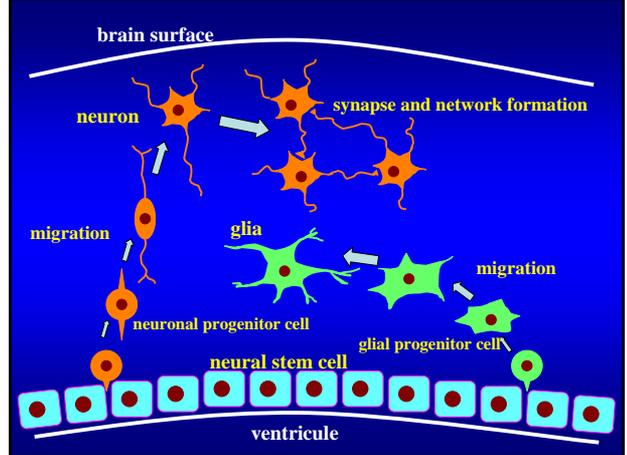
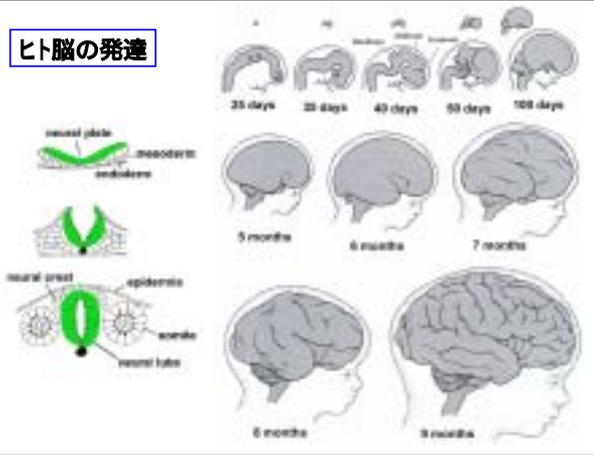
Neuron



Information Processing by neuronal network



ヒト脳の発達



	試験ガイドライン	供試動物	検査項目	試験の目的
急性神経毒性試験	11農産第6283号 OECD 424 US OPPTS 870.6200	ラット	一般症状、機能検査、病理組織学的検査	急性中毒のリスク評価（誤飲、誤食、暴露事故等）
反復経口投与神経毒性試験	11農産第6283号 OECD 424 US OPPTS 870.6200	ラット	一般症状、機能検査、眼科的検査、病理組織学的検査	食品、飲料水からの長期的暴露によるリスク評価
Developmental Neurotoxicity study	US OPPTS 870.6300	ラット	一般症状、機能検査、病理組織学的検査	妊娠中から授乳期間中の胎児/小児における暴露のリスク評価
急性経口投与神経毒性試験	11農産第6283号 OECD 418 US OPPTS 870.6100	ニワトリ	一般症状、生化学的検査、病理組織学的検査	急性中毒のリスク評価（誤飲、誤食、暴露事故等）
28日間反復経口投与神経毒性試験	11農産第6283号 OECD 419 US OPPTS 870.6100	ニワトリ	一般症状、機能検査、病理組織学的検査	食品、飲料水からの長期的暴露によるリスク評価

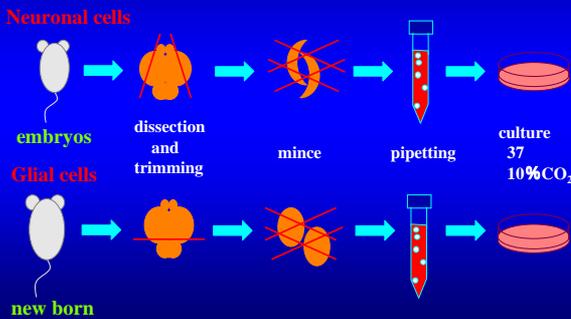
培養細胞を用いた有害性評価の利点

- 1) げっ歯類の脳神経系の発達の簡過程は遺伝プログラムも含めヒトのそれと極めて類似している。
- 2) 神経細胞、グリア細胞それぞれの細胞について培養技術が既に確立されている。
- 3) 培養細胞やスライスを用いることにより、ヒトの胎児期での脳神経系の初期発生における発達のみならず、可塑性を含む出生後の発達までを観察することが可能である。
- 4) 細胞の生死は当然のこととして、神経細胞の機能や神経回路網での情報処理までを比較的簡便かつ迅速に判定可能である。
- 5) 評価に要する時間が短縮されることから、ある程度多数の検体を扱うことが可能である。
- 6) 化学物質の影響を鋭敏に検出できる。

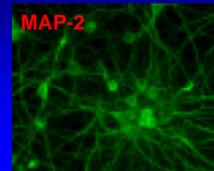
神経細胞や神経回路網の機能評価

- 1) 神経幹細胞の分裂、移動の観察
- 2) 神経細胞、グリア細胞の成熟程度の判定
- 3) 神経伝達物質の放出量の測定
- 4) 神経伝達物質受容体の定量
- 5) シナプス関連蛋白の定量
- 6) 神経細胞の電氣的興奮の画像によるイメージング
- 7) 神経回路網の発達の画像によるイメージング
- 8) 神経の可塑性(長期増強、抑圧)の観察

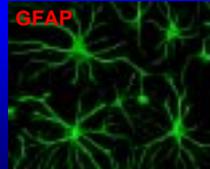
Preparation of neural primary cells



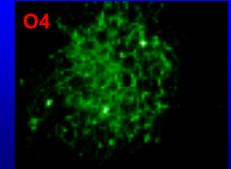
neuron



astrocyte



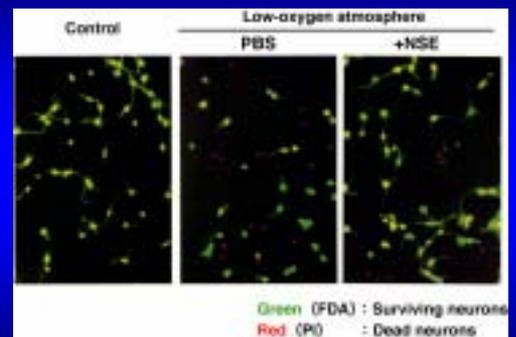
oligodendrocyte



培養神経細胞の生死を判定する方法

方法	原理
PI法	死細胞の染色法 構造が崩れなくなった細胞膜を透過し、DNAと結合したプロピジウムヨウ化染料 (PI) を検出
ヘキスト染色法	死細胞の染色法 アポトーシスの特徴である核断片化を検出
MTTアッセイ法	生細胞の検出法 生細胞中のミトコンドリア内コハク酸脱水素酵素の活性を細胞の生存指標とした試験法
AnneXinV染色法	死細胞の染色法 細胞膜構造の変化により露出したホスファチジルセリンと結合したAnneXinVを検出
流出DNA測定法	死細胞の検出法 死細胞から放出される乳酸脱水素酵素 (LDH) の活性を細胞の死滅指標とした試験法

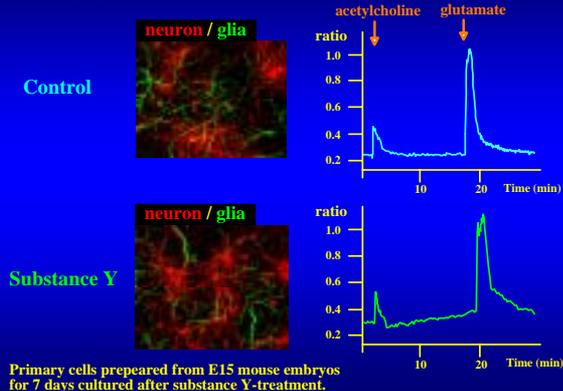
Propidium iodide assay



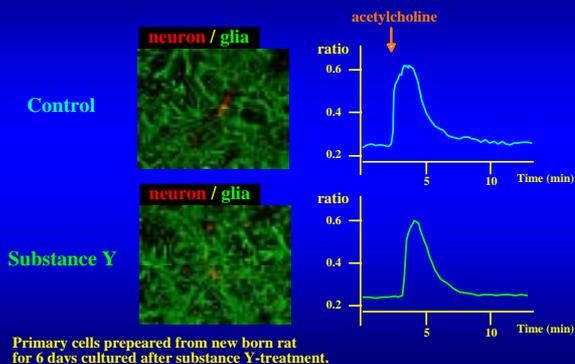
神経細胞や神経回路網の機能評価

- 1) 神経幹細胞の分裂、移動の観察
- 2) 神経細胞、グリア細胞の成熟程度の判定
- 3) 神経伝達物質の放出量の測定
- 4) 神経伝達物質受容体の定量
- 5) シナプス関連蛋白の定量
- 6) 神経細胞の電氣的興奮の画像によるイメージング
- 7) 神経回路網の発達の画像によるイメージング
- 8) 神経の可塑性(長期増強、抑圧)の観察

Effect of substance Y on response to neurotransmitters in neurons



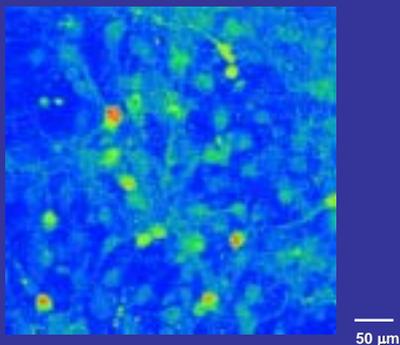
Effect of substance Y on response to neurotransmitter in glial cells



神経細胞や神経回路網の機能評価

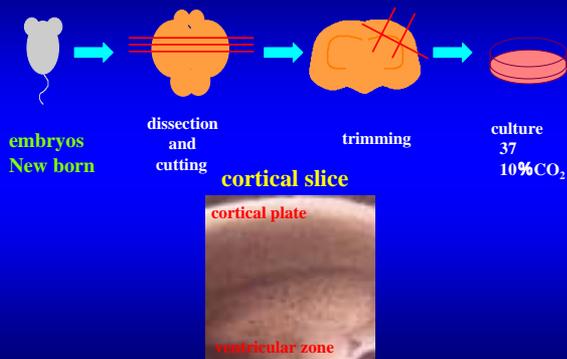
- 1) 神経幹細胞の分裂、移動の観察
- 2) 神経細胞、グリア細胞の成熟程度の判定
- 3) 神経伝達物質の放出量の測定
- 4) 神経伝達物質受容体の定量
- 5) シナプス関連蛋白の定量
- 6) 神経細胞の電氣的興奮の画像によるイメージング
- 7) 神経回路網の発達の画像によるイメージング
- 8) 神経の可塑性(長期増強、抑圧)の観察

Synaptic activities in cultured neuronal cells



Detected by Ca²⁺ imaging on fura-2 loaded hippocampal cells

Preparation of cortical slices

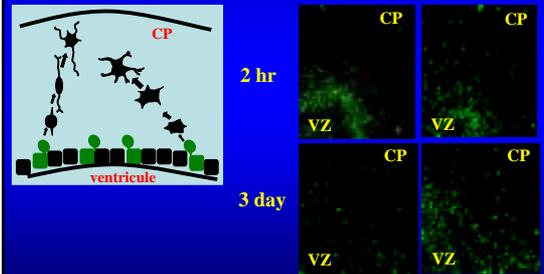


神経細胞や神経回路網の機能評価

- 1) 神経幹細胞の分裂、移動の観察
- 2) 神経細胞、グリア細胞の成熟程度の判定
- 3) 神経伝達物質の放出量の測定
- 4) 神経伝達物質受容体の定量
- 5) シナプス関連蛋白の定量
- 6) 神経細胞の電氣的興奮の画像によるイメージング
- 7) 神経回路網の発達の画像によるイメージング
- 8) 神経の可塑性(長期増強、抑圧)の観察

Effect of substance X on proliferation of neural stem cells

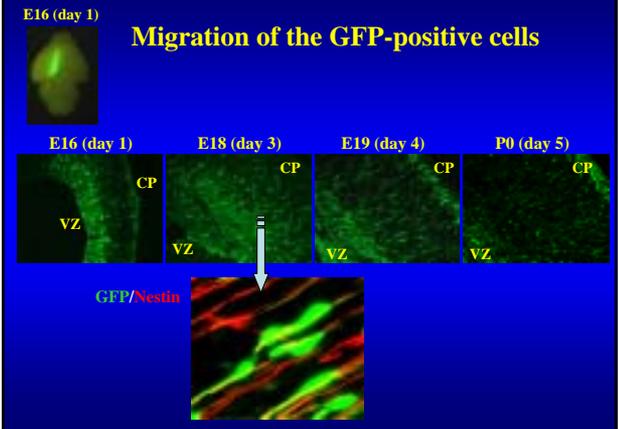
Incorporation of bromo-deoxyuridine



神経細胞や神経回路網の機能評価

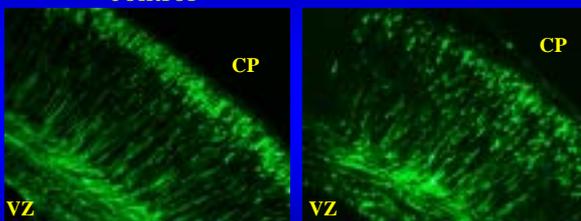
- 1) 神経幹細胞の分裂、移動の観察
- 2) 神経細胞、グリア細胞の成熟程度の判定
- 3) 神経伝達物質の放出量の測定
- 4) 神経伝達物質受容体の定量
- 5) シナプス関連蛋白の定量
- 6) 神経細胞の電氣的興奮の画像によるイメージング
- 7) 神経回路網の発達の画像によるイメージング
- 8) 神経の可塑性(長期増強、抑圧)の観察

Migration of the GFP-positive cells



Effect of substance X on migration of immature neurons

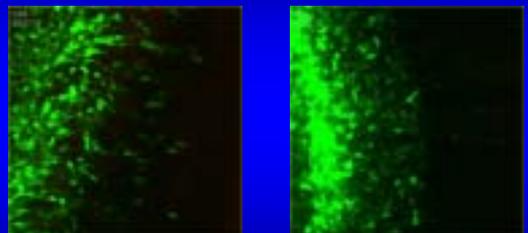
control substance X-treatment



E19 (day 4)

Effect of substance X on migration of immature neurons

control substance X-treatment



E17 (2 day): time-laps analysis for 10 hr

培養細胞を用いた有害性評価の利点

- 1) げっ歯類の脳神経系の発達の簡過程は遺伝プログラムも含めヒトのそれと極めて類似している。
- 2) 神経細胞、グリア細胞それぞれの細胞について培養技術が既に確立されている。
- 3) 培養細胞やスライスを用いることにより、ヒトの胎児期での脳神経系の初期発生における発達のみならず、可塑性を含む出生後の発達までを観察することが可能である。
- 4) 細胞の生死は当然のこととして、神経細胞の機能や神経回路網での情報処理までを比較的簡便かつ迅速に判定可能である。
- 5) 評価に要する時間が短縮されることから、ある程度多数の検体を扱うことが可能である。
- 6) 化学物質の影響を鋭敏に検出できる。

結論 - Conclusion -

化学物質の神経系への有害性の評価に関しては、すべての化学物質を従来行われている評価法へ持ち込むことは不可能なことから、その前段階、即ち1次スクリーニングの評価として、神経系の培養細胞を用いた評価が有用と考えられる。

It is impossible to examine all chemical substances with the currently available methods for assessing hazards to the nervous system. It is, therefore, more effective to employ a method using cultured neural cells as the first phase screening assessment.

ご清聴 ありがとうございました

Thank you for your attention.



国立精神・神経センター
National Institute of Neuroscience



<http://www.ncnp.go.jp>

