

## 第4回日本生殖発生毒性フォーラム案内(2)

早秋の候、時下ますますご清祥のこととお慶び申し上げます。

第4回日本生殖発生毒性フォーラムのご案内を下記の通りご連絡申し上げます。本年も、新型コロナウイルス感染を考慮し、Web開催することに決定いたしました。今回は「環境要因と仔の発達」「代替法を用いた発生毒性の予測」を企画しており、興味ある内容になると思いますので、是非ご参加下さい。また、同施設、同企業の方にもお知らせいただければ幸いです。

なお、Webへのアクセスは事前参加登録が必須となります。

日時：2022年11月12日(土)13時～17時

会場：Web開催(Zoom)

会費：2000円(学生無料)

参加方法：参加をご希望の方は11月4日(金)までに本案内をお送りしている担当者(日本生殖発生毒性フォーラム幹事) 又は日本生殖発生毒性フォーラム代表幹事・千原 ([kazuhiro.chihara@sumitomo-pharma.co.jp](mailto:kazuhiro.chihara@sumitomo-pharma.co.jp))宛へ電子メールにて、①氏名、②企業名・団体名、③メールアドレスのご連絡及び下記口座へ参加費の入金をお願い致します。入金確認後、接続先URL、ログインID、パスワードをお知らせします。参加者お一人ごとにログインIDとパスワードを発行しますので、参加者全員のメールアドレスのご連絡をお願いします。

➤振込口座<ゆうちょ銀行からお振込みの場合>

記号14030、番号56566431

名前：ニホンセイシヨクハッセイドクセイフォーラム

➤<他金融機関からのお振込みの場合>

店名408、店番408、普通、口座番号5656643

入金の際は下記の点にご注意いただきますよう、よろしくお願い致します。

\*振込手数料はご負担ください。

\*振込は個人名でお振込ください。

\*ご所属名でお振込みの際は、担当幹事又は代表幹事までメールでご氏名、ご所属、振込日、振込金額をご連絡下さい。

プログラム

1. 基礎教育講演 (1)

「母胎の環境要因と仔の脳機能の発達の関わりを紐解く神経発生毒性学的アプローチ」

駒田 致和 先生 (近畿大学 理工学部 生命科学科)

2. 基礎教育講演 (2)

「発生毒性試験代替法－催奇形性発現機序に基づくゼブラフィッシュ胚の利用と応用」

田崎 純一 先生 (花王株式会社 安全性科学研究所)

3. 話題提供

(1) 「幼若ラットを用いた生後早期の医薬品曝露が及ぼす社会性行動変化について」

服部 篤紀 先生 (塩野義製薬株式会社)

(2) 「Implementation of New Alternative Methods into regulated toxicology assays.

-Increasing predictivity of compound teratogenicity and endocrine disruption through the zebrafish model.-」

Carles Cornet Bartolomé, PhD (ZeClinics)

基礎教育講演（1）

母胎の環境要因と仔の脳機能の発達の関わりを紐解く神経発生毒性学的アプローチ

近畿大学 理工学部 生命科学科

駒田 致和

細胞の増殖や分化、移動などが盛んにおこなわれる胎生期の脳神経系は、化学物質やストレス曝露、感染症の罹患などの環境要因に対して高感受性です。この時期の分化や成熟、投射などの神経細胞の細胞動態へ影響は、先天奇形や脳機能異常の原因となりえます。

例えばエタノールやバルプロ酸の胎児期曝露は、様々な臓器の奇形、活動量の亢進や社会的相互作用の異常、学習障害などの発達障害を誘発します。大脳皮質の形態形成異常が発達障害の原因の一つだと考えられており、同時に脳内において免疫担当細胞であるミクログリアの異常な活性化を伴う神経炎症が引き起こされています。この脳内炎症は直接、あるいは間接的に神経細胞の増殖や分化、投射に異常を誘発する可能性があります。さらにこの脳内炎症は化学物質の胎児期曝露特有のものではなく、胎児期の様々なストレス曝露、さらには感染症への罹患によって幅広く起きている現象であることが示唆されています。つまり、大脳皮質の形態形成や機能成熟が脳内炎症によって妨げられ、それが自閉症などの発達障害の原因となっている可能性があります。ミクログリアはシナプス可塑性に関与しており、発達時期の神経回路の構築にも関与していることから、その機能的異常が自閉症の発症原因の一つであることがわかっています。ただ、これらの疾患への関与は生後から成熟後にかけてであり、胎児期のミクログリアの異常と先天奇形や脳機能障害との相関についてはまだわかりません。

そこで今回のセミナーでは、発生、発達期の環境が脳神経系の形態形成や機能発達に及ぼす影響について、大脳皮質の形成や、細胞増殖、神経新生、移動や神経投射といった組織構築における重要な現象に重点を置きながら説明します。さらに、その際に環境因子による影響を受ける、ミクログリアの異常な活性化を伴う神経炎症について着目し、胎児期のミクログリアの異常が先天異常や発達障害に関連する可能性や、脳内炎症とミクログリアは先天異常や発達障害の予防法のターゲットになりうるか、について考察します。

さらに、高次脳機能の異常の最終表現型である行動異常について、発達期から成熟期にかけて自発的活動量の亢進や、社会的相互作用の異常など発達障害様の行動異常について解析を行っています。従来の解析に加え、非侵襲性の記憶・学習試験、集団環境下での行動異常について、最新の研究成果と合わせてその特徴について概説します。

**Keywords** 大脳皮質、発達障害、神経炎症、ミクログリア、行動異常

基礎教育講演 (2)

発生毒性試験代替法－催奇形性発現機序に基づくゼブラフィッシュ胚の利用と応用

花王株式会社 安全性科学研究所

田崎 純一

近年、動物を用いない生殖発生毒性試験代替法の開発が世界的に進められており、発現機序が複雑な催奇形性評価代替法の開発が望まれている。催奇形性試験代替を実現するためには、催奇形性発現機序に基づいた催奇形性発現ポテンシャルの精緻な評価が不可欠である。我々はゼブラフィッシュ胚をモデルに口蓋裂や小顎症などの頭蓋顔面奇形の催奇形性評価を行うべく、頭蓋顔面奇形発症機序を解析してきた。哺乳類で頭蓋顔面奇形を誘発する12種の化学物質を暴露すると、ゼブラフィッシュ胚の神経頭蓋と顔面頭蓋に形態異常（口蓋裂や小顎症など）が見られ、これらは頭蓋の軟骨細胞数の減少と分化・成熟異常に起因していた。さらに頭部神経堤細胞マーカーの発現変動が顕著に見られた。つまりゼブラフィッシュ胚の頭蓋顔面奇形は、頭部神経堤細胞の発生・分化異常という哺乳類と同じ機序で発現することが示唆された (Liu et al., 2020; Narumi et al., 2020)。そこで神経堤細胞の発生動態を指標にした頭蓋顔面奇形の予測・評価が可能だと考えた。

本発表では頭蓋顔面奇形の精緻な予測・評価を実現するため、神経堤細胞を可視化したトランスジェニックゼブラフィッシュを作製し、「頭部神経堤細胞の発生・分化異常」を指標にした頭蓋顔面奇形評価の結果を紹介する。催奇形性物質を暴露したゼブラフィッシュ胚を継時的に蛍光観察すると、いずれの催奇形性物質においても神経堤細胞の遊走が阻害され、口蓋と上顎・下顎骨格の由来となる第一咽頭弓に形態異常が生じた。さらに神経堤細胞の細胞分裂が抑制され細胞死が亢進しており、これらの個体では頭蓋顔面奇形が生じた。つまり神経堤細胞の発生・分化異常により頭蓋顔面奇形が誘発されるという直接的な証拠を示すと共に、神経堤細胞の発生動態を指標にした頭蓋顔面奇形ポテンシャルの予測・評価が本評価系で可能であることが分かった。

最後にゼブラフィッシュ胚モデルの応用の一つとして、疾患モデルとしてのゼブラフィッシュを、頭蓋顔面奇形を伴う疾患に着目し、疾患の再現とその病態解析を検討したため紹介する。

今後は臨床情報や他のモデル生物の情報を統合し、ゼブラフィッシュ胚を用いた催奇形性評価や疾患モデルの確立に繋げる。

話題提供 (1)

幼若ラットを用いた生後早期の医薬品曝露が及ぼす社会性行動変化について

塩野義製薬株式会社

服部 篤紀

幼若期は成長に伴い急速な骨格の成長や神経回路等の機能の発達を遂げるため、この時期に医薬品の曝露を受けると行動に障害が生じる可能性がある。ヒトは3歳までに複数回の全身麻酔を経験すると、その後学習障害や注意欠陥多動性障害の発症リスクが上昇すると報告されている。また、妊娠期においても抗てんかん薬の胎内曝露により出生児の精神疾患罹患率が増加することも報告されている。このように臨床において、発達段階における医薬品の曝露と精神疾患との関係性が明らかになりつつある。一方、医薬品は承認申請の過程において、幼若試験や中枢試験を含む各種試験を実施しており、懸念がないあるいは軽微なものが臨床試験に進むことができる。しかし、一般的に実施されている幼若動物を用いた毒性試験において、上記に挙げたような臨床における副作用を十分評価できているとは言い難い。精神疾患には不安、多動、社会性の欠如、学習障害といった様々な表現型が認められる。このうち、臨床でのみ確認されるが、非臨床試験では評価されていない社会性の欠如に着目した。

本話題提供では、複数化合物に関して社会性行動に及ぼす影響を調べるため実施した Reciprocal social interaction test や Open field test といった行動評価方法の紹介やその方法を用いた実例について紹介させていただく。

話題提供 (2)

Implementation of New Alternative Methods into regulated toxicology assays.

-Increasing predictivity of compound teratogenicity and endocrine disruption through the zebrafish model.-

ZeClinics, Head of Toxicology Area

Carles Cornet Bartolomé, PhD

Acute and long-term exposure to environmental chemicals is a risk not only for the environment but also for human health. Exposure to chemicals during embryonic development may result in drastic effects ranging from abnormal growth of anatomical structures to lifelong mental disabilities. Furthermore, humans are also at risk at their adulthood as growing evidence suggests that alterations of the endocrine system induced by the exposure to such environmental chemicals severely compromise human health. The establishment of rapid, reliable and cost-effective methodologies for detecting developmental toxicity of chemical substances, as well as the so-called endocrine-disrupting (ED) compounds and the effects associated with their exposure, is a pressing need for both the scientific community and regulatory agencies.

In the era of the 3Rs principles implementation there is a strong interest in the seek for new experimental methods to reduce animal testing. Small fish like zebrafish has proven an excellent experimental system and suitable alternative model to animal testing because of the large degree of conservation with higher vertebrates. Additionally, zebrafish have several experimental advantages, namely ex utero rapid development, embryo transparency, and large progenies. All these make zebrafish a competitive model for high-throughput screening of potential teratogenic and ED compounds in a fast and cost-effective manner.

Here, we will present the last developments on the use of zebrafish larvae in predicting teratogenic and ED compounds in humans. In a first section, we will present the establishment of an innovative automated high-throughput screening platform for teratogenic drugs. The platform was validated by testing on zebrafish larvae a library of 31 known compounds classified as teratogens and non-teratogens in mammals and by assessing 16 phenotypical parameters related to embryo development. Our results show a high correlation with humans: 87.50% sensitivity, 81.82% specificity and 74.19% accuracy, increasing the prediction level reported in rodents. Importantly, based on the results obtained in this validation study, we have developed a deep learning algorithm, able to discriminate all the defined phenotypic parameters, sort larvae as positive or negative for qualitative phenotypes and extract values from quantitative ones. In a second section, we will present a robust high-throughput assay to detect potential ED compounds. Changes at the transcriptomic level (messenger RNA content, mRNA) have been identified as biomarkers of ED exposure. In this study, we exposed embryonic zebrafish to the natural ligands 17  $\beta$ -estradiol, testosterone, and 3,3',5-triiodo-L-thyronine (T3), and identified eight genes representing the three major endocrine axes – estrogenic, androgenic and thyroid. The identified genes were subsequently validated using six previously reported ED compounds.

The results obtained pave the way for the integration of zebrafish in novel regulatory guidance documents as a reliable alternative model for the improvement of human teratogenicity and ED compounds prediction.

**Keywords:** zebrafish, endocrine disruption, Developmental toxicity, Artificial intelligence, NAMs