

①NPC1

フルネーム：Neural progenitor cell proliferation assay

使用細胞：human neural progenitor cell proliferation (NPC1)

App B1 より

三次元浮遊球として培養されたプライマリーヒト神経前駆細胞(hNPC)は、脳発生のいくつかの重要なプロセスを表すことができる。神経前駆細胞増殖アッセイ(NPC1)では、hNPCを3次元球体として96ウェルプレートに平板培養し、試験化合物に曝露する。これにより、NPCの増殖過程を研究することができる。このDNT特異的エンドポイントは、一般的な細胞生存率および細胞毒性と組み合わせて検討される。ヒトの皮質NPC増殖は、障害された場合、脳発達の変化をもたらす、認知機能障害を引き起こす脳発達中の重要な過程である。現在、皮質NPC増殖は多くの過程の1つであり、OECD TG426では、特定の脳領域の神経病理学的評価と神経行動学的試験によって評価される。

②～⑦NPC2-5

フルネーム：

Neural progenitor cell migration and differentiation assay

② NPC2a:radial glia migration

③ NPC2b:neuronal migration

④ NPC2c:oligodendrocyte migration

⑤ NPC3:neuronal differentiation

⑥ NPC4:neuronal morphology

⑦ NPC5:oligodendrocyte differentiation

使用細胞：human neural progenitor cell migration and differentiation (NPC2-5)

App B2 より

神経前駆細胞遊走・分化アッセイ(NPC2-5)では、hNPCを細胞外マトリックス上に平板培養し、ニューロスフィアから遊走・分化させる。これにより、放射状グリア移動、ニューロンおよびオリゴデンドロサイトの移動、ならびにニューロンおよびオリゴデンドロサイトへの分化および神経突起伸長が検査できる。これらのDNT特異的エンドポイントを、一般的な細胞生存率および細胞毒性と組み合わせて検討する。細胞の移動と分化は、脳の発達の重要な過程であり、障害された場合には、脳の発達に変化をもたらす、認知機能障害を引き起こす可能性がある。現在、皮質NPCの遊走および分化に関連するプロセスは多くのプロセスの一部であり、OECD TG426では、特定の脳領域の神経病理学的評価および神経行動学的試験によって評価されている。

⑧UKN2

フルネーム：Circular migration inhibition of NCC(cMINC)assay,UKN2

使用細胞：migration of human neural crest cells (cMINC; UKN2)

App B3 より

人工多能性幹細胞(iPSC)から作製したヒト神経堤細胞(NCC)を用い、胎児発育中の神経幹細胞(NCC)遊走障害を評価する。画像解析により、移動した NCC 数および細胞生存率を同時に測定し、化学物質に 24 時間曝露後の細胞の移動と細胞死に関して測定される。この方法のデータは、発達障害および奇形、例えば、胎児発育中の化合物曝露に起因する神経管欠損または頭蓋顔面奇形を予測することを意図している。この方法は十分に確立された予測モデルではあるが、正式な検証は受けていない。中規模の化合物ライブラリーのスクリーニングに使用されている。

⑨UKN4

フルネーム：NeuriTox test,UKN4

使用細胞：neurite outgrowth in human dopaminergic neurons (NeuriTox; UKN4)

App B4 より

神経突起成長段階のヒトニューロン(LUHMES 細胞)を用い、(a)神経系/脳構造の発達障害、(b)毒性物質への曝露による成体神経系への直接的な損傷を評価する。染色された分化中のニューロンの神経突起面積(ニューロンの相互接続性の間接測定として機能する)と細胞生存率を、画像解析にて同時に測定し、神経突起伸長および細胞生存性のプロセスを評価する。この方法のデータは、(a)胎児発育中の化合物曝露によって引き起こされる小児の発達障害、および(b)発達中の神経系、特に神経系のドパミン作動性部分に対する損傷を予測することを意図している。この方法は正式なバリデーションを受けていない。神経毒性のいくつかの側面を予測するが、in vivo 神経毒性試験(TG424)でカバーされている全ての側面ではない。これは中規模の化合物ライブラリーのスクリーニングに用いられる。

⑩UKN5

フルネーム：PeriTox test,UKN5

使用細胞：neurite outgrowth in human iPSC-derived immature dorsal root ganglia (iDRG) neurons (PeriTox; UKN5)

App B5 より

神経突起成長段階におけるヒト iPSC 由来の未成熟後根神経節(iDRG)ニューロンを用い、(a)(末梢)神経系の発達障害、(b)毒物への曝露による末梢神経系への直接的な障害を評価す

る。染色された分化中のニューロンの神経突起面積(ニューロンの相互接続性評価に役立つ)と細胞生存率を、画像解析により神経突起伸長と細胞死の過程を測定する。この方法のデータは、(a)胎児発育中の化合物曝露によって引き起こされる小児の発達障害、および(b)発達した神経系、特に末梢神経系への損傷を予測することを意図している。この方法は正式なバリデーションを受けていない。神経毒性のいくつかの側面を予測するが、in vivo 神経毒性試験(TG424)でカバーされている全ての側面ではない。中規模の化合物ライブラリーのスクリーニングに用いられる。AOP-279(AOPwiki ID) / ETR09N (EU-ToxRisk AOP タスク ID) (微小管相互作用薬による末梢神経障害)と関連付けられている。

⑪Cortical Initiation

フルネーム：Rat Cortical Neurite Outgrowth Assay(NOG)

使用細胞：Screen for Changes in Neurite Outgrowth Due to Chemical Exposure in Neurons Derived from Rat Primary Cortical Cells

App B6 より

神経突起伸長の変化をスクリーニングする。本アッセイは、in vitro で発生神経毒性の可能性のある多数の化合物をスクリーニングするために開発された。神経発生過程では、多くの過程で神経回路網を形成する。神経突起伸長過程は毒性物質によって影響を受け、発達神経毒性を引き起こす可能性がある。

個々のニューロンの神経突起(最終的には軸索と樹状突起)が外側に伸長し、他のニューロンと結合し、最終的に細胞間ネットワークを生み出す。このアッセイは、細胞体および神経突起の免疫細胞化学的標識を介して、ラット初代培養細胞における神経突起伸長を自動画像解析により検出する。幼若な神経突起の数と長さの変化が定量化され、30%以上の抑制が a hit calling となる。アッセイは、96 ウェルプレート上で実施され、化学物質の中～高スループットスクリーニングを可能にする。

⑫Cortical Maturation

⑬Cortical Synapto

フルネーム：Rat Cortical Synaptogenesis and Neurite Maturation Assay

使用細胞：Synaptogenesis and neurite maturation assay in rat primary cortical neurons.

App B7 より

シナプス形成は、神経細胞が神経伝達を促進する特殊な接触部位を確立する神経系の発達において重要な過程である。化学物質への幼若期曝露は、後のライフステージで神経系機能の持続的な障害を引き起こすことがある。これらの影響はしばしばシナプスの異常な発生の結果である。シナプス形成および神経突起成熟アッセイは、げっ歯類の初代神経培養(大

奴皮質)におけるシナプス形成を調べるために自動高内容画像分析(HCA)技術を用いる。培養開始 15 日間で *in vitro* (DIV)皮質ニューロンは極性神経突起(すなわち、軸索と樹状突起)のネットワークを形成し、シナプス前タンパク質のシナプシン発現は経時的に増加する。点状シナプシンタンパク質の樹状突起への近接した局在も増加し、シナプス形成の増加が確認されている。

⑭Cortical MEA

フルネーム：Rat Cortical Network Formation Assay(NFA)

使用細胞：Screen for Developmental Neurotoxicity in Rat Cortical Neurons via Assessing Changes in Neural Network Formation Parameters During Extended Chemical Exposure

App B8 より

このマルチウェル微小電極アレイ(mwMEA)ネットワーク形成アッセイは、*in vitro* でニューロンの相互接続ネットワーク(「ニューラルネットワーク」)発生の形成を妨害する可能性がある多数の化合物をスクリーニングするために開発された。神経系の発生過程では、多くの過程が機能的で健全な神経回路網を形成する。これらの重要な神経発達過程は、潜在的な毒性物質によって中断され、発達神経毒性を引き起こす可能性がある。このアッセイは、発達期間にわたる機能的ニューロンネットワークの形成の障害をモニターするように設計されている。すなわち、*in vivo* および *in vitro* ニューロン発達の間、ニューロンはプロセスを作り、それらをつなぐシナプスを形成し、互いに連絡し合うニューロンのネットワークを形成する。神経回路網形成の評価は、48 ウェルの mwMEA プレート上の初代皮質培養物を対象とする化学物質で処理し、ネットワーク活動の発達中の 12 日間にわたる電気活動の変化をモニターすることによって達成される。このアッセイは、ネットワーク活性の様々な側面を記述する 17 のパラメータの評価を提供する。このアッセイでは、細胞生存率および細胞の健全性のインウェル評価を含む多重化アプローチを採用している。48 ウェルプレートを使用すると、化学物質の中程度のスループットのスクリーニングが可能になる。

⑮hN initiation

フルネーム：Neurite outgrowth assay in a human iPSC derived neurons

使用細胞：Screen for Changes in Neurite Outgrowth Due to Chemical Exposure in Neurons Derived from human Induced Pluripotent Stem Cells.

App B9 より

神経突起伸長の変化をスクリーニングする本アッセイは、発達神経毒性評価における多数の化合物をスクリーニングするために開発された。神経系の発生過程では、多くの過程において神経回路網を形成する。これらの重要な神経発達過程は、毒性物質によって障害され、

発達神経毒性を引き起こす可能性がある。これらの過程の中には、神経突起伸長がある。すなわち、個々のニューロンの神経突起(最終的には軸索と樹状突起)が外側に伸長し、他のニューロンと結合し、最終的に細胞のネットワークが形成される。

このアッセイは、iPSC ベースの細胞培養における神経突起の伸長を、細胞体および神経突起の免疫細胞化学的標識を介して評価するために、自動画像分析プロトコルを採用した。最終的には、幼若な神経突起の数と伸長の変化が定量化され、30%以上の抑制が a hit call となる。アッセイは、96 ウェルプレート上で実施され、化学物質の中～高スループットスクリーニングが可能である。

⑩hNP1 Apop

⑪hNP1 Prolif

フルネーム：Human Neural Progenitor Proliferation, Cytotoxicity and Apoptosis Assay

使用細胞：Screen for Changes in Neuron Proliferation Due To Chemical Exposure.

App B10 より

神経増殖を評価する本アッセイ (High Content Imaging Assay to Screen for Proliferation) は、発達神経毒性評価における多数の化合物をスクリーニングするために開発された。神経系の発生過程では、多くの過程で神経回路網を形成する。これらの重要な神経発達過程は毒性物質によって障害され、発達神経毒性を引き起こす可能性がある。これらの過程の中には増殖がある。神経回路の機能は、発生中に産生される細胞数の変化に大きく影響される。神経幹細胞の増殖への影響は、不正確な細胞数の生成または神経幹細胞の分化における欠陥をもたらす。アポトーシスは、小頭症または巨脳症(Homen,et.2015)を引き起こし得る。アポトーシスは、神経系の発生において重要な役割も果たすプログラム細胞死の一形態である。特に、神経発生の際に神経網に組み込まれない細胞は、しばしばアポトーシスを起こす。化学物質への曝露はアポトーシスの変化をもたらし、そのような変化は、増殖の変化と同様に、神経系の細胞数を変化させ、発生神経毒性を引き起こすことがある。このアッセイは自動解析装置を用いて、核および増殖細胞体の免疫細胞化学的標識により、ヒト神経前駆細胞株中の増殖細胞数を決定する。最終的に、増殖細胞数の変化が定量化され、30%以上の減少が a hit call となる。アッセイは 96 ウェルプレート上で実施され、化学物質の中～高スループットスクリーニングを可能にする。化学物質の毒性およびアポトーシスによる死亡を決定するために、市販のアッセイを用いて 96 ウェルプレートにおいて細胞生存率およびアポトーシス測定を同時に実施する。