

201035025A

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

個体の成長期における神経系および肝臓系細胞の機能解析による  
化学物質の健康影響評価法に関する研究  
(H22-化学-一般-004)

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 宇佐見 誠

平成 23 (2011) 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

個体の成長期における神経系および肝臓系細胞の機能解析による  
化学物質の健康影響評価法に関する研究  
(H22-化学-一般-004)

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 宇佐見 誠

平成23（2011）年5月

# 目 次

## I. 総括研究報告

- 個体の成長期における神経系および肝臓系細胞の機能解析による  
化学物質の健康影響評価法に関する研究----- 1  
宇佐見 誠

## II. 分担研究報告

1. 神経堤細胞の機能解析による評価法の開発-----27  
宇佐見 誠
2. 発達成長期ニューロン・グリア新生評価法-----41  
佐藤 薫
3. 神経幹／前駆細胞を用いた化学物質評価システムの構築-----49  
諫田 泰成
4. 胎児肝細胞による化学物質への細胞応答のゲノミクス、メタボロミクス解析-----55  
石田 誠一
5. 胎児肝細胞による化学物質への細胞応答のエピゲノム解析-----55  
宮島 敦子
6. 周産期における薬物動態関連因子の発現解析-----77  
簾内 桃子

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----83

## IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----84

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
総括研究報告書

個体の成長期における神経系および肝臓系細胞の機能解析による  
化学物質の健康影響評価法に関する研究

研究代表者 宇佐見 誠 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第四室長

研究要旨

本研究は、神経系および肝臓系の細胞を組み合わせることにより、発生・発達・再生過程の神経系においてのメカニズムのみならず薬物動態を考慮したヒトへの外挿を可能とする、個体の成長期における化学物質の健康影響評価法の確立を目的とする。本年度は、実験系の確立として、神経堤細胞の機能解析法、発達成長期の脳神経系におけるニューロン・グリア新生評価実験法、神経幹/前駆細胞の培養法、及び胎児肝細胞の培養を確立した他、胎児・新生児肝における薬物動態関連因子の発現解析に関する検討を行った。

神経堤細胞の機能解析による評価法として、ラット神経堤細胞遊走実験法を確立した。ラット妊娠 10.5 日胚の菱脳部神経管を、周辺組織の物理的除去後に、培養容器に付着させて培養する。培養 24 時間および 48 時間で求められる細胞の広がりや円と見なされる半径の比を遊走量として、被験物質の影響を評価する。

生後初期脳のオリゴデンドロサイト新生に化学物質が及ぼす影響について薬理的に検討可能な *in vitro* 評価系を確立した。生後 1-3 日齢ラットの脳矢状面切片脳室下帯に eGFP を組み込んだレトロウィルスを滴下することにより神経幹細胞および前駆細胞を標識した後、切片培養し、オリゴデンドロサイト前駆細胞数およびその遊走を評価指標とすることに成功した。

ヒト成長期の中枢神経系に対する化学物質の影響を評価する方法として、ヒト Embryonic Carcinoma 細胞株 NteraT2/clone D1 からヒト神経幹/前駆細胞のモデルとなる細胞を構築した。

ヒト胎児肝細胞の単層培養とそれを分化誘導した肝芽細胞の単層培養、肝芽細胞のスフェロイド培養、および、ヒト成人肝細胞の *in vitro* 培養系について、メタボローム解析を行った結果、胎児肝細胞由来の細胞では、成人肝細胞に比べ胆汁酸の生合成が低いこと、グルクロン酸抱合能が低いことを示唆する結果を得た。また、成人肝細胞においてオルニチン回路の活性化が認められた。

成長期のヒト肝細胞における薬物代謝酵素および薬物動態関連因子の発現の特性およびそれらの化学物質への暴露による影響を、遺伝子レベルで調べるために、成長期および成熟期ヒト肝細胞の薬物代謝酵素系の特性調査、成長期ヒト肝細胞の収集並びに遺伝子解析サンプルの調製法を検討した。

究分担者氏名・所属研究機関名及び  
所属研究機関における職名

佐藤 薫	国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第一室長
諫田 泰成	国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第二室長
石田 誠一	国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第三室長
宮島 敦子	国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部第二室長
簾内 桃子	国立医薬品食品衛生研究所 薬理部主任研究官

A. 研究目的

化学物質の健康影響に対する感受性は、成体に比べて成長期の個体において高いと考えられている。また、成長期における健康被害は長期間にわたる場合や、恒久的な障害が起る場合があるため、化学物質の適切な健康影響評価は非常に重要である。一方、個体の成長期は動物実験の結果からヒトへの外挿が難しい時期である。そのため、毒性発現メカニズムの解明に基づく評価法が必要であるが、体系的な方法は見あたらない。

そこで本研究では、個体の成長期における化学物質の健康影響評価法を確立することを目的として、(1)神経堤細胞の遊走等機能解析法、(2)発達成長期脳神経系ニューロン・グリア新生評価法、(3)学習などの高次機能に影響を与える神経幹／前駆細胞を用いた方法、(4)成体における代謝データを利用可能な胎児・新生児期の肝臓による化学物質代謝の解析法を確立する。神経系および肝臓系の細胞を組み合わせることにより、発生・発達・再生過程の神経系においてのメカニズムのみならず薬物動態を考慮したヒトへの外挿を可能とする、化学物質の健康影響評価法の確立を目指す。

本研究では、化学物質の安全対策の観点から、国民の健康と生活環境の維持・向上に資する成果が期待される。すなわち、成長期等の化学物質に対する感受性の高い個体を対象とする、メカニズムのみならず薬物動態を考慮した実験データのヒトへのより確かな外挿を可能とする化学物質の健康影響評価により、化学物質による健康被害を受けやすい遺伝的・環境的要因を持つハイリスク集団を特定し、健康被害を予防することが期待される。また、成体での実験結果から経験的に決められている、化学物質の暴露許容量を設定するための安全係数について、感受性の高い個体についても安全を確保できるような、実験データに基づく決定法の確立に寄与することが期待される。

化学物質による健康被害が生じてしまった場合には、被害の軽減および治療法の開発に資すると考えられる。さらに、細胞系を利用した迅速かつ簡便な化学物質のリスク評価という特色により、グローバルな化学物質管理のための、化学物質の効率的な評価手法として活用されることが期待される。複合的な化学物質の影響評価に応用し、体系的・総合的な評価手法として発展させることにより、新たな毒性学的概念の確立に資する。

本年度は、実験系の確立として、神経堤細胞の機能解析法、発達成長期の脳神経系におけるニューロン・グリア新生評価実験法、神経幹／前駆細胞の培養法、及び胎児肝細胞の培養を確立する他、胎児・新生児肝における薬物動態関連因子の発現解析を行う。

神経堤細胞は、脊椎動物における個体発生の限られた時期に存在し、胚の隅々に遊走した後に末梢神経、グリア細胞などの神経系細

胞を含む様々な細胞に分化することにより、個体の機能発育および形態形成に重要な役割を果たす。そのため、発生過程における神経堤細胞の誘導、遊走、分化などにおける異常は、神経堤症と総称される神経芽細胞腫などの神経系の異常を含むさまざまな疾患を引き起こす。

本研究では、神経堤細胞の特徴的な機能である細胞遊走を主な指標とする、形態形成期に重要な役割を果たす神経堤細胞の機能に及ぼす化学物質の影響を調べる方法を確立し、個体の成長期における化学物質の健康影響評価法の一つとして用いることを目的とする。神経堤細胞実験法としては、初期着床胚をまるごと培養するラット全胚培養法との比較実験が可能であり、解析が容易な、ラット神経堤細胞遊走実験法の確立を目指した。

グリア前駆細胞であるオリゴデンドロサイトはニューロンの髄鞘を形成するグリアであり、発達期にこの細胞が十分に作られないと重篤な認知障害を引き起こされることが示唆されている。また、オリゴデンドロサイトが特異的に失われる脳疾患である多発性硬化症では、しびれ、運動麻痺、歩行障害などが現れる。従って、発達期のオリゴデンドロサイトの正常な分化、遊走は脳神経系が健全に発達するためには欠かせない過程であるが、これまでにオリゴデンドロサイトの発達に着目した評価系は確立されていない。

本研究では、放射状に遊走するグリア前駆細胞、特にオリゴデンドロサイト新生への影響評価系を確立する。オリゴデンドロサイト発達を緑色蛍光蛋白質（enhanced Green Fluorescent Protein: eGFP）標識細胞を含む培養前脳矢状面切片を採用した実験法の確立を目指した。

神経幹／前駆細胞は、胎児および成体に存在する未分化な細胞で神経細胞などへの分化能を有する。中枢神経系の発達に加えて、学習などの高次機能に寄与することが知られている。発達期に化学物質に暴露されて神経幹／前駆細胞に影響が出る場合には、その後長期にわたり中枢神経毒性が出る可能性が考えられる。従って、神経幹／前駆細胞を用いることによって、特に発達期における化学物質のリスクを評価できる可能性がある。

化学物質の健康影響評価法に使用可能なヒト神経幹／前駆細胞のソースとしては、初

代培養細胞および幹細胞が考えられる。しかし、ヒト神経幹／前駆細胞の初代培養細胞は入手が困難であり、また倫理的な問題があることから現実的ではない。幹細胞としては、ヒト Embryonic Stem (ES) 細胞やヒト induced pluripotent stem cells (iPS) 細胞、ヒト Embryonic carcinoma (EC) 細胞などがある。

ヒト ES 細胞の場合には初代培養細胞と同様に倫理的な障害があり、また培養の過程で脱分化することがある。ヒト iPS 細胞の場合には、様々な形質を有する細胞に分化誘導されるために、形質が安定した細胞が得られず、健康影響評価のモデル細胞には適さないと考えられる。

一方、ヒト EC 細胞はヒト胎児の繊維芽細胞から樹立され、神経系を含む多くの組織への分化能を有する。不死化されていることから形質も安定で、モデル細胞として扱える可能性が高い。しかし、ヒト EC 細胞から神経幹／前駆細胞への分化誘導法は確立されていない。そこで、本研究では、ヒト EC 細胞を用いてヒト神経幹／前駆細胞のモデル細胞の作製を行い、化学物質の健康影響評価システムの開発を目指した。

個体の成長期である胎児・新生児においても、肝臓は重要な外来性化学物質の代謝器官であると共に、その毒性発現の標的器官でもある。また、胎児・新生児の肝臓は、成体と比べて、化学物質に対する感受性および代謝能などの機能に差異がある。そのため、個体の成長期における化学物質の健康影響評価においては、成長期の肝臓の感受性および機能を評価できる実験法が必要である。

本研究では、これまでに我々が研究してきたヒト胎児由来肝細胞培養実験法を、化学物質の健康影響評価に利用する方法を確立する。本年度は、ヒト胎児由来培養肝細胞の特徴を明らかにするために、ヒト成体由来培養肝細胞とともに、細胞内代謝物についてメタボローム解析を行った。

肝臓の薬物代謝酵素および薬物動態関連因子は、化学物質の健康影響評価において体内動態に関与する重要な因子であるだけでなく、化学物質の代謝活性化などの毒性発現およびステロイドホルモン等生体内基質の生合成と密接に関連している。そのため、その発現変動は個体の成長に大きな影響を及ぼす可能性がある。

しかし、実験動物とヒトとの間には、発現

している CYP 酵素の種類、量そして酵素学的性質などの点で種差が認められることから、化学物質の暴露がヒト成長期に及ぼす健康影響を予測するためにはヒト組織を利用した検討が必要である。日本国内におけるヒト組織の入手は極めて困難であるが、成長期および成人ドナー由来の市販ヒト肝細胞を海外から入手し、各成長期における薬物代謝酵素および薬物動態関連因子の特性、および化学物質暴露による影響を明らかにすることで、化学物質がヒト成長期に与える影響の予測に貢献できると考えられる。

本研究では、成長期のヒト肝細胞における薬物代謝酵素および薬物動態関連因子の発現の特性およびそれらの化学物質への暴露による影響を、遺伝子レベルで調べる。本年度は、成長期および成熟期ヒト肝細胞の薬物代謝酵素系の特性調査、成長期ヒト肝細胞の収集並びに遺伝子解析サンプルの調製法を検討した。

## B. 研究方法

### 1. ラット神経堤細胞遊走実験法

ウィスター系ラット (Crj:WI, 日本チャールスリバー) の妊娠 10.5 日胚から、タングステン針を用いて、物理的に菱脳部神経管を取り出した。取り出した菱脳部神経管を、培養シャーレ、培養マルチプレート又は培養用スライドチャンバー (Becton, Dickinson and Company) に培養液(10% Fetal Bovine Serum, GIBCO)と共に入れ、炭酸ガスインキュベーター内で、5% CO<sub>2</sub>、37°Cにて培養した。培養 24 時間及び 48 時間に、神経管から遊走した細胞すべてを含む領域を、位相差顕微鏡 (BZ-900、株式会社キーエンス) で撮影し、神経管の培養容器底面への遊走細胞の広がりを観察した。細胞の撮影画像ファイルを画像解析ソフト ImageJ (Rasband, W.S. ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2009) で開き、最外側の神経堤細胞をポリゴンツールで繋いでできる図形を円とみなして、その面積から計算した半径を神経堤細胞の遊走距離として解析した。

### 2. オリゴデンドロサイト新生実験法

生後 1-3 日齢ラットの前脳矢状面切片標本を作成し (150 μm) トランスメンブレン

(Millipore) 上に静置し培養した。培養切片の脳室下帯 (subventricular zone: SVZ) に eGFP tag を組み込んだ改変型レトロウイルス (NIT-eGFP; J Neurosci 19(19) 8487-97, 1999) を 500 nl 注入することにより神経幹細胞および前駆細胞を標識した。1-7 日後に環流固定し前脳矢状面切片標本 (150  $\mu\text{m}$ ) を作成し eGFP 標識細胞の遊走経路を確認した。また、eGFP 標識細胞の分化マーカー蛋白質 (A2B5, O1, O4, GFAP など) 発現について免疫組織化学的に検討した。オリゴデンドロサイトの出現率算出および培養前脳矢状面切片との比較のために 20  $\mu\text{m}$  の薄切切片 7-8 枚中の eGFP 標識細胞および eGFP (+) O1 (+) 細胞の総細胞数をそれぞれ計数した。

### 3. ヒト神経幹/前駆細胞培養実験法

ヒト EC 細胞株 NT2 を、 $10^6$  cells/dish の割合で非接着性のペトリディッシュ (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) に播種した。培養 1 週間後にレチノイン酸 (All-Trans Retinoic Acid 10  $\mu\text{M}$ , Sigma-Aldrich) を添加して、さらに 1 週間培養を行った。得られた sphere を 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  fibronectin (Sigma-Aldrich) でコートしたスライドガラスに置いてパラホルムアルデヒドで固定後、抗 Nestin 抗体 (Chemicon Group, Millipore Corporation, Temecula, CA, USA) により免疫抗体染色を行った。得られた Neurosphere を 0.25% トリプシン (Gibco BRL) により single cell にした後、1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  fibronectin (Sigma-Aldrich) でコートしたガラスボトムディッシュ (BD Biosciences) に播種し、10% FBS を含む増殖培地にて 2 週間培養した。パラホルムアルデヒドで固定後、抗  $\beta$ -tubulin-III 抗体 (Chemicon) により免疫抗体染色を行った。

### 4. ヒト胎児由来培養肝細胞のメタボローム解析

ヒト胎児肝細胞 (CS-ABI-3716) を、DS ファーマバイオメディカル (株) より購入して、同社の CSC Complete Medium を用いて、5%  $\text{CO}_2$  を含む気相下 37°C で、6 日間で単層培養を行い (Matsushita et al, 2003)、メタボローム解析のサンプルとした。

ヒト胎児肝細胞の播種後、培養 4 時間後に培地交換を行い、1 mM 酪酸ナトリウムを含んだ CSC Complete Medium で 8 日間培養を行うことで、肝芽細胞の誘導を行った

(Kiyota, 2007)。アルブミンとサイトケラチン 19 をマーカーとするフローサイトメーターでの解析では、1 mM 酪酸ナトリウムでの肝芽細胞の誘導効率は約 30% である。8 日間培養した細胞から、メタボローム解析のサンプルとした。

肝芽細胞の三次元培養には、WE を基本培地とする Hormone Defined Medium (HDM 培地) を用いた (Matsushita et al, 2003, 2006)。ヒト胎児肝細胞を HDM 培地に懸濁し、 $8 \times 10^5$  cells/dish の密度で播種した。播種後 2 日目に、1 mM 酪酸ナトリウムを含んだ HDM 培地に交換し、さらに 6 日間培養を行った後、メタボローム解析のサンプルとした。

ヒト成人肝細胞は、BIOPREDIC 社よりヒト非凍結肝細胞 (12.5  $\text{cm}^2$  フラスコ接着、製品番号 HEP220-FL12) 3 ロットを購入し、3 日間培養した細胞から解析用のサンプルを調製した。

代謝物質の測定はヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ社に委託し、ヒト胎児肝細胞および成人肝細胞から回収した代謝物質について、CE-TOFMS (キャピラリー電気泳動-質量分析法キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計) により測定した。測定結果から、ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ社の有するデータベースをもとに、代謝物質を同定した。

### 5. 周産期薬物動態関連因子の発現解析

市販凍結ヒト肝細胞選択時の添付代謝データから、各薬物代謝酵素のデータと年齢との相関について調べた。ヒト成長期における凍結ヒト肝細胞を、Gibco Invitrogen Cell Cultures 社、BD Biosciences 社、XenoTech 社、Celsis 社および Tissue Transformation Technologies 社から購入した。ヒトの成長期を以下の 4 期間に分類した。すなわち、生後 7~10 日間 (新生児期)、新生児期以降 1 才までの期間 (乳児期)、1 才から 6 才までの期間 (幼児期)、6 才以降 12 才までの期間 (学童期) に分け、該当する肝細胞をドナーあたり 2 バイアル以上の収集を開始した。また、可能な限り誘導能評価に利用できる接着型ヒト肝細胞を優先して収集した。

(倫理面への配慮)

動物実験においては国立医薬品食品衛生

研究所「動物実験の適正な実施に関する規程」に従い、動物愛護の精神に則って実験を進めた。

ウイルスおよび遺伝子組み換え動物の取り扱い「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」（所謂カルタヘナ法）および国立医薬品食品衛生研究所「遺伝子組換え実験安全管理規則」に準拠して取り扱った。

ヒト胎児肝細胞は、米国 ABI 社がインフォームドコンセントを得て研究用に取得したものを、DS ファーマバイオメディカル(株)より購入した。

ヒト初代肝細胞は市販されているものであり、ドナー情報は連結不可能匿名化されており倫理的に問題はない。しかし、適宜倫理委員会に申請をし、審査承認を経たのち実施した。

凍結ヒト肝細胞は、個人情報確実に連結不可能匿名化されている市販品で、国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会において審査「非該当」と判断されたものを使用した。

## C. 研究結果

### 1. ラット神経堤細胞遊走実験法

ラット神経堤細胞は、妊娠 10.5 日頃の胚から摘出した神経管を、フィブロネクチンでコートした培養容器に付着させて培養することにより、培養容器底面に遊出し、放射状に広がるように遊走する。そこで、培養液に被験化学物質を添加し神経堤細胞の遊走に及ぼす影響を調べる実験法を検討した(図 1)。

胚の摘出時期、神経管の摘出法、培養容器、などを検討した結果、ラット妊娠 10.5 日胚の菱脳部神経管を、周囲組織を物理的に除去した後に、化学的表面処理としてプライマリア®処理された培養容器で培養すると、神経堤細胞の良好な遊出および遊走が認められた。培養 24 および 48 時間における細胞の広がりを目で見なして、それらの面積から求められる半径の比を遊走距離とすると、簡便で定量的にバラツキを小さくして解析することが出来た(図 2, 表 1)。また、培養終了後の細胞は、二次元電気泳動法および免疫組織化学的方法などによる、タンパク発現解析に用いることが出来た。

陽性対照物質として、胚の過剰暴露により

神経堤症に似た症状を誘発することおよび神経堤細胞遊走に対する阻害作用が報告されている、オールトランス-レチノイン酸を用いて、本研究で確立したラット神経堤細胞遊走実験法の有用性について検討した結果、ラット全胚培養法において、胚の形態異常および発育抑制を示す濃度である 10  $\mu\text{M}$  のオールトランス-レチノイン酸の存在下で、対照群と比較して、約 10%の有意な遊走阻害作用が認められた(図 3)。

以上のことから、本実験法は神経堤細胞遊走実験法として有用であると考えられた。

### 2. オリゴデンドロサイト新生実験法

前脳矢状面切片培養の培地を検討した結果、Neurobasal 培地を基本培地とすることにより、大脳皮質層構造を保持し、*in vivo* に近い状態で培養することが出来た。

生後 2 日齢ラット SVZ に NIT-eGFP を注入し、8 日齢で還流固定し、矢状面切片 (150  $\mu\text{m}$ ) を作成し観察したところ、eGFP 標識細胞は SVZ の前後軸を通って遊走する群と放射状に大脳皮質表面へ向かって遊走する群にわかれた (図 4)。生後 2 日齢ラット前脳矢状面切片を作成し、直ちに NIT-eGFP を滴下し 6 日間培養した場合も上記の場合と同様に、eGFP 標識細胞は SVZ の前後軸を通って遊走する群と放射状に大脳皮質表面へ向かって遊走する群にわかれた。以上のことから、培養前脳矢状面切片において、eGFP 標識細胞は *in vivo* と同様の経路を遊走することが確かめられた。次に、培養前脳矢状面切片中の eGFP 標識細胞の分化と *in vivo* の分化に対応について検討した (図 5)。①生後 2 日齢ラット SVZ に NIT-eGFP を注入し、5 日齢で還流固定し作成した前脳矢状面切片 (150  $\mu\text{m}$ )、②生後 2 日齢ラット前脳矢状面切片 (150  $\mu\text{m}$ ) に NIT-eGFP を滴下し 3 日間培養した標本、のそれぞれにおける eGFP 標識細胞の分化マーカー発現、細胞分布を比較した。①、②ともに、グリア前駆細胞マーカーである A2B5 の発現は SVZ 内に限られ、白質では発現している細胞は見られなかった。オリゴデンドロサイト前駆細胞マーカーである O4 の発現は SVZ にはほとんど見られず、白質で多くの陽性細胞を確認した。さらに、アストロサイトマーカーである GFAP については、SVZ、白質ともに陽性細胞を確認した。以上の結果は培養前脳矢状面切片に



において eGFP 標識細胞は *in vivo* と同様の分化パターンを示すことが確認された。

生後 1-3 日齢は、特にオリゴデンドロサイト新生が活発な時期であることが知られている。そこで、eGFP 標識細胞中の O1 (O4 と同じくオリゴデンドロサイト前駆細胞マーカー) (+) 細胞出現率について上記①、②の標本間で比較した (図 6)。①の標本では  $14.28 \pm 1.439\%$ 、②の標本では  $13.13 \pm 1.114\%$  の細胞が O1 (+) 細胞となり、①と②ではオリゴデンドロサイト新生がほぼ同じ出現率で起こっていることが確認された。

eGFP 標識細胞を含む培養前脳矢状面切片を細胞分裂阻害剤である AraC で処理 (1, 5 mM, 24 hr) したところ、eGFP 標識細胞の分布範囲は明らかに狭くなっていた (図 7A)。eGFP 標識細胞数を計測したところ、有意に減少していた (図 7B)。また、eGFP 標識細胞に占める O1 (+) 細胞の比率も有意に減少していた (図 7C)。これらの結果から AraC は神経幹細胞および前駆細胞の分裂を抑制すること、神経幹細胞および前駆細胞の分裂が抑制されるとオリゴデンドロサイト前駆細胞の遊走および分化がさらに抑制されることが示された。以上の結果から、eGFP 標識された神経幹細胞および前駆細胞を含む前脳矢状面切片培養系がオリゴデンドロサイト新生に化学物質が及ぼす影響評価を薬理的に解析できる実験系であることが示された。

### 3. ヒト神経幹/前駆細胞培養実験法

ヒト NT2 細胞はディッシュに接着した状態で未分化状態のまま増殖する (図 8A)。非接着性のペトリディッシュを用いてヒト NT2 細胞の浮遊培養を行い、さらに神経系に分化をコミットさせるためにレチノイン酸で処理を行った結果、細胞塊 (sphere) が形成されることが明らかになった (図 8B)。

この sphere の発現マーカーを免疫抗体染色によって検討したところ、未分化な神経幹/前駆細胞のマーカーである nestin の発現が観察された (図 9A)。Sphere から単離した個々の細胞においてもほぼ 100% の細胞が nestin 陽性であった (図 9B)。これらの結果から、この sphere は neurosphere であることが示唆された。

さらに、neurosphere 由来の神経幹/前駆細胞を fibronectin でコートしたディッシュを用

いて培養することにより分化誘導を行い、神経分化マーカーである  $\beta$ -tublin-III で染色した。その結果、図 10 に示すように、ほぼすべての細胞は  $\beta$ -tublin-III 陽性であり、主に神経細胞に分化誘導されることが示唆された。また、得られた細胞は未分化な細胞であることが示唆された。

### 4. ヒト胎児由来培養肝細胞のメタボローム解析

ヒト胎児肝細胞、肝芽細胞 (単層培養) および肝芽細胞 (三次元培養、スフェロイド培養) における CYP3A4 活性は、胎児肝細胞 (単層培養) → 肝芽細胞 (単層培養) → 肝芽細胞の三次元培養と、徐々に活性が増大していた (図 11)。

ヒト胎児肝細胞および成人肝細胞から回収したサンプルについて、代謝物質の同定および定量を行った。全測定結果を用い、各サンプルを代謝物質の相対的存在量によりクラス分けした。統計解析は階層的クラスタリングと主成分分析によった (図 12、13)。

階層的クラスタリング (図 12) は、胎児肝細胞に由来する 3 種のサンプル、胎児肝細胞の単層培養、肝芽細胞の単層培養、肝芽細胞のスフェロイド培養が、それぞれレプリカサンプル (n=3) 間で再現性の良い測定値を与えたことを示していた。成人肝細胞由来のサンプルは階層的クラスタリングで、レプリカ間で近似したパターンを示してはいるが、胎児肝細胞由来サンプルと比較するとばらつきが大きかった。

主成分分析の結果 (図 13) は階層的クラスタリングの結果を反映していた。図 13 では、第 1 主成分と第 2 主成分を用い、各サンプルを群分けした。その結果、胎児肝細胞の単層培養、肝芽細胞の単層培養、肝芽細胞のスフェロイド培養は各レプリカサンプルが非常に近傍にプロットされた。また、成人肝細胞由来のサンプルはレプリカ間でばらつきが大きかったが、これはサンプルの由来するドナーの個人差を反映すると考えられる。

図 11 に示す薬物代謝酵素の活性から判断すると、胎児肝細胞を肝芽細胞、さらにそのスフェロイド培養としていくに従い、成人肝細胞に近い細胞機能を発現する様分化誘導される。

そこで胎児肝細胞、肝芽細胞の単層培養、肝芽細胞の単層培養、肝芽細胞のスフェロイ

ド培養、成人肝細胞の順で存在量に変化する代謝物質を抽出した。具体的には、上記培養の4条件を1から4までランク付けし、各代謝物質の存在量との相関係数を求め、無相関検定を行い有意水準が0.05以下の代謝物質を選定した。その結果、72の代謝物質を選定された。その72の代謝物質の測定値をもとに行った主成分分析の結果を図14に示す。各サンプルの分離を比較すると第一主成分で胎児肝細胞の単層培養→肝芽細胞の単層培養→肝芽細胞のスフェロイド培養→成人肝細胞の序列を持って分離されていた(図14下段)。そこで、72の代謝産物を第一主成分における因子負荷量をもとに序列化した。その序列において上位10位までの代謝物質と下位10位までの代謝物質の各サンプルにおける相対的発現量を図15に示した。その結果、因子負荷量の絶対値が大きい代謝産物には、cysteine、taurine、glucuronic acid、urea、ornithineなどが含まれていた。

次に、測定結果の代謝経路の観点からの解析を試みた。図14の主成分分析で因子負荷量の絶対値が大きかった代謝物質について、代謝経路との関係を調べたところ、システインの代謝経路(図16)とオルニチン回路(図17)に複数の代謝物質が含まれていた。成人肝細胞にはシステインが非常に多量にプールされていた。

#### 5. 周産期薬物動態関連因子の発現解析

肝細胞購入時に添付のヒト肝細胞 CYP 代謝活性と抱合酵素活性データにおける年齢依存性の変化について検討した。CYP 代謝活性は、活性レベルの高い CYP3A4、CYP2C8、CYP2C9 と活性レベルの低い CYP1A2、CYP2B6、CYP2C19、CYP2D6 の2つに分類された。CYP1A2、CYP2B6、CYP2C19、CYP2D6 群では年齢依存的な変化は認められなかった。また、CYP3A4、CYP2C8、CYP2C9 でのバラツキは特に大きく、同様に年齢依存的な変化も認められなかった。また、性および人種に起因するいずれの変動も認められなかった。

ヒト凍結肝細胞は、新生児期2ロット、乳児期は5ロットを、幼児期4ロットおよび学童期は1ロットの肝細胞を入手した。

凍結ヒト新生児肝細胞の融解法の確認、および細胞が新生児期に特徴的な特性を保持しているか否かについて予備的検討を行っ

た結果、胎児期および乳児期に多く発現することが知られている CYP3A7 の発現を検出できた。

#### D. 考察

##### 1. ラット神経堤細胞遊走実験法

化学物質の神経堤細胞機能に及ぼす影響を調べる実験系として、ラット神経堤細胞遊走実験系を確立した。この実験法は、タンパク発現の解析が可能であり、毒性発現機序に基づく評価法として有用であると考えられる。毒性発現機序を推定できるバイオマーカータンパクの同定などにより、将来的には神経堤幹細胞などの株化細胞におけるタンパク発現に及ぼす影響を調べることによる健康影響評価法への発展が期待できる。

神経堤細胞遊走阻害の作用機序としては、細胞の遊走への直接作用の他に、他の細胞における遊走の足場となる分子の合成阻害、走化性因子の合成・分泌阻害等が考えられる。本実験法では基本的には、細胞遊走への直接作用を検出する方法である。しかし、細胞遊走の解析法の検討において、移動量に対応する半径の差に比べて半径の比のバラツキが小さいことから、本実験法における細胞遊走は培養組織片の大きさに依存すると考えられる。この依存性は、神経管からの分泌物および遊出細胞数によると思われることから、本実験で検出される遊走阻害作用には、神経管を介した影響を含む可能性がある。

陽性対照物質として用いたオールトランス-レチノイン酸による遊走阻害は阻害率と対照群の移動距離から、平均  $54 \mu\text{m}$  と計算される。これは神経堤細胞1個の大きさ程度でしかないが、神経管からの遊走を直線距離として測定したものであるため、胚においては、遊走阻害による影響はより大きいと考えられる。いずれにしても、本実験法は  $50 \mu\text{m}$  程度の遊走阻害を検出できる感度を有し、化学物質の神経堤細胞遊走に及ぼす影響を評価するために、十分な感度があると考えられる。

##### 2. オリゴデンドロサイト新生実験法

放射状に遊走するグリア前駆細胞、特にオリゴデンドロサイト新生への影響評価系を確立した。この理由としては、この時期にほとんどのオリゴデンドロサイト新生が起るため成長後の影響が甚大であること、放射状の遊走の方が RMS 遊走よりも早く進むた

め少ない培養日数での評価が可能であること、などがあげられる。

ピリミジン系抗がん剤の一種である AraC (商品名: キロサイド) は、細胞分裂阻害剤として基礎研究でも使用されている。細胞分裂阻害のメカニズムとしては細胞内で迅速にシトシンアラビノシドトリフォスフェート (cytosine arabinoside triphosphate) に変換され、S 期の DNA にダメージを与えるためである。また、DNA ポリメラーゼ、RNA ポリメラーゼ を阻害することも知られている

(The Chemotherapy source book Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. pp. 80, 2008)。

AraC は eGFP 標識細胞数を減少させた。また、O1 (+) 細胞数の出現率も低下させた。これは、SVZ の神経幹細胞および前駆細胞が、何回かの分裂を経て、オリゴデンドロサイト前駆細胞含有率を上昇させながら分化していくことを示唆している。以上のように、AraC を用いることにより、eGFP 標識された神経幹細胞および前駆細胞を含む前脳矢状面切片培養系で薬理的検討が可能であることが示された。

### 3. ヒト神経幹/前駆細胞培養実験法

ヒト EC 細胞から神経幹/前駆細胞への分化誘導系を構築した。ヒト NT2 細胞は様々な細胞への分化能を有しており、ES 細胞のコントロールとなる細胞として使用されてきた。我々は、ES 細胞の分化や癌幹細胞の作製に使用される非接着性のディッシュを用いて、sphere の作製に成功した。一般に、接着細胞は接着できない環境下においては apoptosis や anoikis などの細胞死が誘導されることが知られている。EC 細胞においても細胞死を起こす細胞が認められたが、sphere を形成する細胞は浮遊の状態を増殖できることが明らかになり、特定の細胞が選択されて増殖していると考えられる。

sphere は未分化な神経幹/前駆細胞マーカーである nestin を発現していることから、神経幹/前駆細胞によって形成される neurosphere であることが示唆された。さらに、Neurosphere から単離した細胞を用いてレチノイン酸による分化誘導を行った場合、ほとんどの細胞は神経細胞に分化し、アストロサイトやオリゴデンドロサイトなど他の中枢神経系の細胞は認められなかった。この結果

から、neurosphere は多分化能を有する神経幹細胞より分化のステージが進んでおり、多くは神経前駆細胞である可能性が考えられた。しかしながら、他の分化条件でグリアなどの他の細胞に分化する可能性も否定できないことから、神経幹細胞と神経前駆細胞の割合に関してはマーカー分子の発現などを検討する必要がある。

化学物質のリスク評価は、従来、実験動物の行動薬理などを指標に行われているが、種差の問題がある。また、細胞に関しては動物由来やヒト由来の神経細胞株を用いて検討されているものの、適切なモデル細胞や毒性の指標などは開発されておらず、in vitro 健康影響評価系はまだ確立されてはいない。今後は、本研究で作製したヒトモデル細胞を用いて、化学物質による未分化状態、分化能、増殖などに対する影響を検討する。さらに、そのメカニズムをベースとして健康影響評価の指標を探索し、ヒトにおけるデータと比較することにより成長期における化学物質の健康影響評価系の構築を目指す。

### 4. ヒト胎児由来培養肝細胞のメタボローム解析

ヒト胎児肝細胞の培養、並びに、それを分化誘導したヒト肝芽細胞の平面培養とスフェロイド培養を行った。各培養条件で培養した細胞の CYP3A4 活性を測定すると、胎児肝細胞 (単層培養) →肝芽細胞 (単層培養) →肝芽細胞の三次元培養と、徐々に活性が増大していた。また、それらの比較対照とするためにヒト成人肝細胞について、非凍結の初代培養細胞を3ドナー分入手し培養した。一定期間培養後、それぞれからメタボローム解析用サンプルを調製した。メタボローム解析結果をもとに、代謝物質を階層的クラスタリングすると、各培養条件におけるレプリカサンプル間で代謝物質の存在量の再現性が高いことが示された。この結果は主成分分析でも示された。いずれの解析でもヒト成人肝細胞サンプルで比較的大きなばらつきが認められるが、これは、ヒト成人肝細胞サンプルが初代培養サンプルであり、各サンプルが異なるドナーに由来することによる個人差を反映した結果と考えられる。

主成分分析においては、各サンプル間で関連性が認められなかった。しかしながら、薬物代謝酵素の活性から判断すると、胎児肝細

胞を肝芽細胞、さらにそのスフェロイド培養としていくに従い、成人肝細胞に近い細胞機能を発現する様分化誘導されると推測される。そこで、胎児肝細胞、肝芽細胞の単層培養、肝芽細胞の単層培養、肝芽細胞のスフェロイド培養、成人肝細胞の順で存在量に変化する代謝物質を抽出した。その結果、72の代謝物質が選定されたので、それらを用いて、再度主成分分析を行った。得られた主成分のうち、特に第1主成分で各サンプルをプロットすると、胎児肝細胞の単層培養→肝芽細胞の単層培養→肝芽細胞のスフェロイド培養→成人肝細胞の序列を持って分離されていた。72の代謝産物を第1主成分における因子負荷量をもとに序列化すると、その序列における上位10位および下位10位までの代謝物質の相対的発現量は分化の進行に伴い増加または減少していた。

測定により半定量された化合物について既知の代謝経路図に描画した。結果を検討すると、主成分分析で第1主成分における因子負荷量の序列で上位にあった *cysteine*、*taurine*、*glucuronic acid* はシステインを中心とする代謝経路、*urea*、*ornithine* はオルニチン回路に含まれていた。

システインは成人肝細胞で  $10^6$  細胞あたり 589 pmol と非常に高く蓄積されていた。システインの細胞内濃度は、アミノ酸の中でも最も低いとされており、ヒト肝癌由来培養細胞 HepG2 における測定値は  $10^6$  細胞あたり 45 pmol であり、それと比較しても存在量が高いことがわかる。

システインからはタウリンが生合成されることが知られているが、その生合成過程にある *cysteinsulfinic acid* は同様の傾向を示すにもかかわらず、その下流にある *taurine* はヒト成人肝細胞で存在量が最も低かった。この結果は、ヒト成人肝細胞では *taurine* に至る生合成の活性が下がっているか、*taurine* の消費が生合成を上回っているか、の二つの解釈が可能である。*taurine* は肝臓において、*cholic acid* と結合することで胆汁酸の一つである *taurocholic acid* となる。今回の測定では *taurocholic acid* は検出できなかったが、同じく胆汁酸に含まれる *glycocholic acid* (図 16 中青枠で示す) の生合成はヒト成人肝細胞で最も高かった。このことより、*taurine* に関しても、多くが *taurocholic acid* の生合成に用いられている可能性が高いと考えられる。今回

の結果は、胎児肝細胞由来の細胞では、成人肝細胞に比べ胆汁酸の生合成が低いことを示唆している。既に、2才以前の正常乳児の十二指腸液総胆汁酸値は2才以降のそれより低値を示すとの報告(小田原ら、1976、調剤指針 日本薬剤師会編)もあり、胆汁酸合成においては、胎児肝細胞は胎児・新生児期の肝機能を反映していると考えられた。

オルニチン回路の中間体がヒト成人肝細胞で増加傾向にあった。オルニチン回路はアミノ酸の代謝の過程で遊離してきたアンモニアを尿素に変えて無毒化する代謝経路である。この回路が活性化されているということは、成人肝細胞ではアンモニア代謝が盛んに行われていることを示していると考えられる。このことは、オルニチン回路の反応の律速段階であるアンモニアと炭酸からカルバモイルリン酸を生成する反応を触媒する酵素であるカルバモイルリン酸シンターゼ I をアロステリックに活性化する *N-acetyl glucuronic acid* が成人肝細胞で存在量が高い(図 17 中青枠で示す)ことから支持されると考える。本経路の活性化についての意義は現時点では不明であるが、胎児・新生児期の肝機能を成人と区別する特徴なのかもしれない。

以上の結果から、これらの代謝回路により解毒化される化学物質に対して、胎児肝細胞に由来する系では成人肝細胞に比べ解毒活性が低いことが予測され、より低濃度の暴露で細胞毒性が発現することが予想される。

## 5. 周産期薬物動態関連因子の発現解析

妊娠後期に相当する肝細胞では、細胞の形態および非実質細胞の混在が多細胞の調整法の検討が必要であると考えられた。

## E. 結論

ラット神経堤細胞の遊走に及ぼす化学物質の影響を調べるための簡便な実験法を確立した。

生後初期脳のオリゴデンドロサイト新生に化学物質が及ぼす影響について薬理学的に検討可能な *in vitro* 評価系を確立した。

ヒト EC 細胞から化学物質のリスク評価に応用できる可能性がある神経幹/前駆細胞を作製した。

ヒト胎児および成人肝細胞のメタボローム解析において、胎児肝細胞由来の細胞では、

成人肝細胞に比べ胆汁酸の生合成が低いこと、グルクロン酸抱合能が低いことが示唆された。成人肝細胞においてオルニチン回路の活性化が認められた。

成長期および成熟期ヒト肝細胞の薬物代謝酵素系の特性調査、成長期ヒト肝細胞の収集並びに遺伝子解析サンプルの調製法を検討した。

#### F. 健康危機情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Usami M., and K. Mitsunaga. 2011. Proteomic analysis and in vitro developmental toxicity tests for mechanism-based safety evaluation of chemicals. *Expert Rev Proteomics* 8: 2. 153-155.
  - 2) Usami M., K. Mitsunaga, A. Miyajima, M. Sunouchi, and O. Doi. 2010. Complement component C3 functions as an embryotrophic factor in early postimplantation rat embryos. *Int J Dev Biol* 54: 8/9. 1229-1239.
  - 3) Takahashi K., R. Ishii-Nozawa, K. Takeuchi, K. Nakazawa, K. Sato. 2010. Two NSAIDs, niflumic acid and diclofenac, inhibit the human glutamate transporter EAAT1 through different mechanisms. *J Pharmacol Sci* 112, 113-117.
  - 4) Hirata N., Y. Sekino, and Y. Kanda. 2010. Nicotine increases cancer stem cell population in MCF-7 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 403:138-143.
  - 5) Kikura-Hanajiri R, M. Kawamura, A. Miyajima, M. Sunouchi, and Y. Goda. 2010. Determination of a new designer drug, N-hydroxy-3,4-methylenedioxymethamphetamine and its metabolites in rats using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Sci Int* 98(1-3):62-9.
- ##### 2. 学会発表
- 1) Miyajima-Tabata A., M. Nakajima, K. Mitsunaga, M. Sunouchi, O. Doi, Y. Sekino, and M. Usami. 2010. Proteomic approach to embryotoxic mechanisms of indium in cultured rat embryos. XII International Congress of Toxicology, Barcelona.
  - 2) 宇佐見 誠, 満長 克祥, 宮島 敦子, 簾内 桃子, 関野 祐子. 2010. 培養ラット胚における胚本体および卵黄囊膜のプロテオーム解析. 第 55 回日本先天異常学会学術集会, 淡路島.
  - 3) 宇佐見 誠, 宮島 敦子, 満長 克祥, 簾内 桃子, 関野 祐子. 2010. ラット着床胚におけるタンパク質ジスルフィドイソメラーゼのチャージバリエーション発現に関する研究. 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会, 宜野湾.
  - 4) Miyajima-Tabata A., M. Sunouchi, K. Mitsunaga, Y. Yamakoshi, K. Nakazawa, and M. Usami. 2010. Sexing of early postimplantation rat embryos by amplification of *Sry* gene in stored 2-DE samples for developmental toxicity studies. The 49th Annual Meeting of the Society of Toxicology, Salt Lake City.
  - 5) 佐藤 薫, 重本一最上 由香里, 大野泰雄, 関野祐子, ミクログリアは生後初期脳室下帯の神経新生, オリゴデンドロサイト新生を誘導する *Neuro2010* (2010. 9, 神戸市)
  - 6) 高橋華奈子, 中澤憲一, 石井一野澤 玲子, 竹内 幸一, 関野祐子, 佐藤 薫, ナイフルミック酸によるヒトグルタミン酸トランスポーター EAAT1 substrate-gated conductance の調節 *Neuro2010* (2010. 9, 神戸市)
  - 7) 佐藤 薫, 重本一最上 由香里, 大野泰雄, 関野祐子, 生後初期脳におけるミクログリアの役割 内藤コンファランス (2010. 10, 神奈川県湘南市)
  - 8) 高橋華奈子, 中澤憲一, 石井一野澤 玲子, 竹内 幸一, 関野祐子, 佐藤 薫, ナイフルミック酸によるヒトグルタミン酸トランスポーター EAAT1 コンダクタンスの調節 内藤コンファランス (2010. 10, 神奈川県湘南市)
  - 9) 佐藤 薫, 高橋華奈子, 中澤憲一, 石井一野澤 玲子, 竹内 幸一, 関野祐子, ナイフルミック酸によるヒトグルタミン酸トランスポーター EAAT1 の基質依存的な調節 第 84 回 日本薬理学会年会 (2011. 3, 横浜市)
  - 10) 高木 淳平, 佐藤 薫, 鈴木 岳之, パロキセチンはリポポリサッカライドによって引き起こされるグルタミン酸トランスポーター活性の低下を抑制する 第 84 回 日本薬理学会年会 (2011. 3, 横浜市)

- 11) 佐藤 薫、James E Goldman、関野 祐子、  
生後初期脳のリスクアセスメントシステ  
ムの構築、日本薬学会第 132 回年会 (2011.  
3, 静岡市)
- 12) Kanda Y., N. Hirata, W. Lin, Y. Sekino.  
TGF $\beta$ -induced stem cell phenotype in breast  
cancer cells. Keystone Symposia (A8),  
Vancouver, British Columbia, Canada,  
2011.01.21-26.
- 13) 平田尚也、関野祐子、諫田泰成：乳癌細  
胞に含まれる癌幹細胞の割合に対するニコ  
チンの影響、第 10 回再生医療学会、東  
京、2011.03.01-02
- 14) 平田尚也、林和花、関野祐子、諫田泰成：  
MCF-7 細胞における乳癌幹細胞に対する  
エストロゲンの影響、第 84 回日本薬理学  
会、誌上開催、2011.03.22-24
- 15) Hori T., T. Kubo, A. Miyajima, M. Sunouchi,  
K. Nakazawa, Y. Sekino, S. Ozawa, F. More,  
A. Corlu, and S. Ishida. Effects of a newly  
developed 3D-cell culture vessel on drug  
metabolism-related gene expressions in  
HepaRG cells, 第 25 回日本薬物動態学会年  
会 (2010,10)
- 16) 石田誠一. 医薬品の安全性・毒性研究への  
幹細胞の応用 — ガイドライン案作成へ  
の取り組み、日本動物実験代替法学会、第  
23 回大会 (2010,12)
- 17) Sunouchi M., A. Miyajima, R. Hanajiri, Y.  
Gouda. O- and N-Demethylation of  
Levomethorphan by human cytochrome P450  
enzymes. (2011.03.06-10; The 50th Annual  
Meeting of Society of Toxicology,  
Washington D.C.)
- H. 知的財産の出願・登録状況
1. 特許取得  
なし。
  2. 実用新案登録  
なし。
  3. その他  
なし。

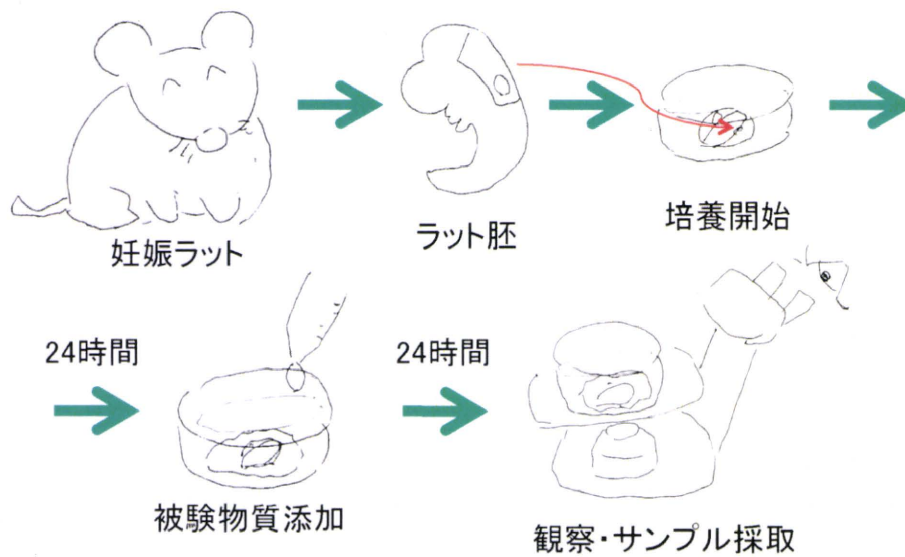


図1. ラット神経堤細胞遊走実験法の概要

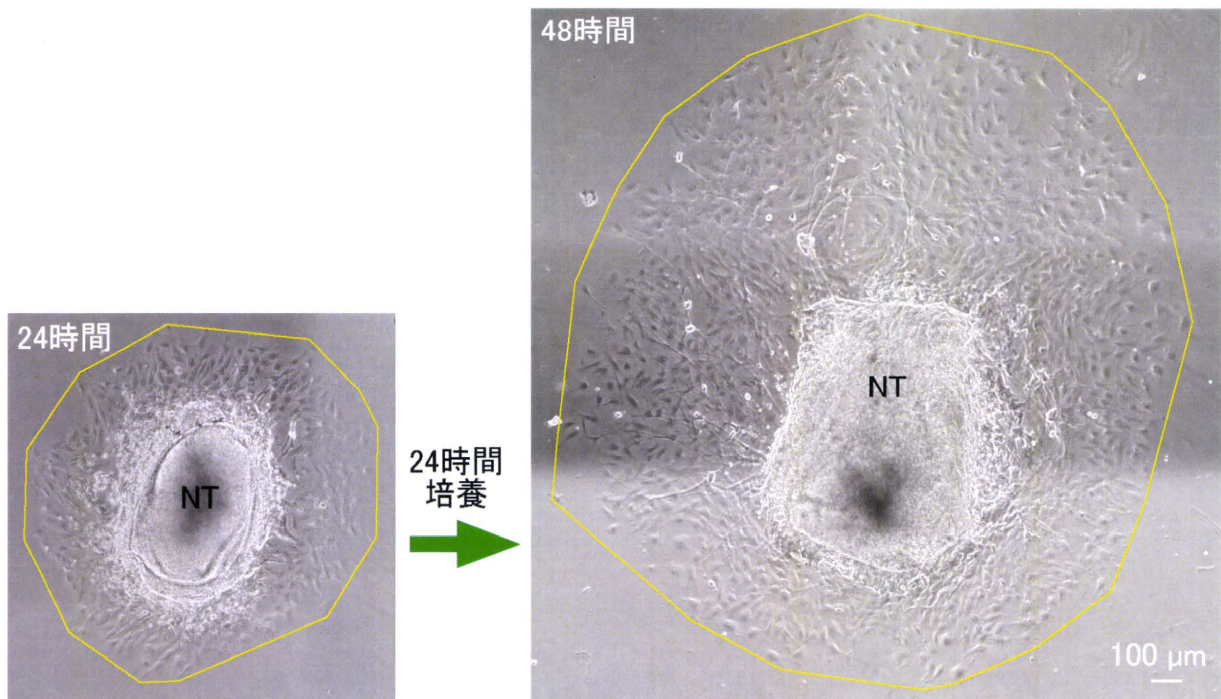


図2. 培養24時間から48時間における神経堤細胞の遊走距離の解析. 画像解析ソフトのポリゴンツールで、最外側の神経堤細胞を繋いだ線(黄色い線)を円とみなして、その内側の面積から計算した半径の比を遊走量とした. NT, 神経管.

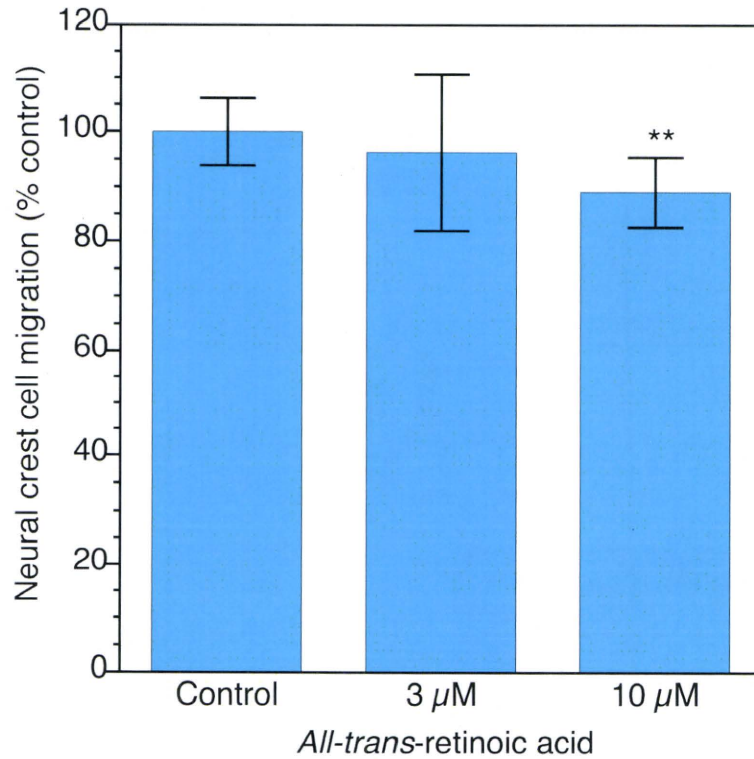
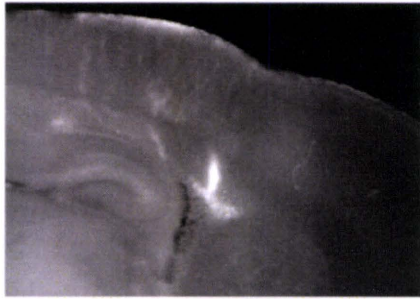


図3. オールトランス-レチノイン酸のラット神経堤細胞の遊走に及ぼす影響. 培養24時間および48時間で求められる細胞の広がりを見なして求められる半径の比から1を引いて増加量とした後に、対照群の増加量を100%として遊走距離を計算した。平均値と標準偏差を示す。\*\*, 対照群と比較して、有意差があることを示す( $p < 0.01$ ). N=9-11.



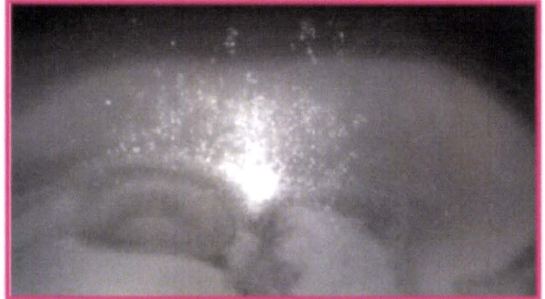
**P2 (Intact brain)**



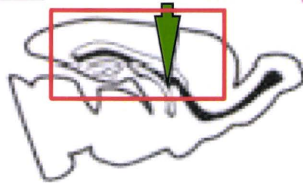
Slice culture



**6 DIV (Cultured slice)**



NIT-eGFP retrovirus



*in vivo*



**P8**

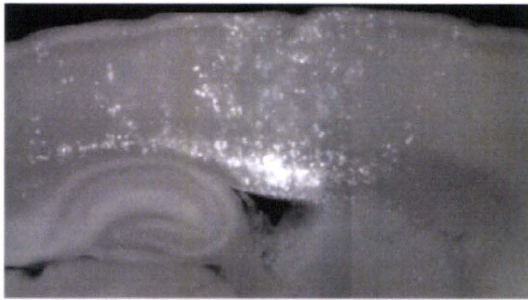


図4. SVZ 神経幹細胞および前駆細胞の可視化、培養前脳矢状面切片における eGFP 標識細胞の遊走経路確認.

生後 2 日齢ラット SVZ に NIT-eGFP を注入し、8 日齢で還流固定し、矢状面切片を作成し観察したところ、eGFP 標識細胞は SVZ の前後軸を通過して遊走する群と放射状に大脳皮質表面へ向かって遊走する群にわかれた (左下)。生後 2 日齢ラットの前脳矢状面切片を作成し、直ちに NIT-eGFP を滴下し 6 日間培養した場合も、上記と同様に、eGFP 標識細胞は SVZ の前後軸を通過して遊走する群と放射状に大脳皮質表面へ向かって遊走する群にわかれた (右)。培養前脳矢状面切片において、eGFP 標識細胞は *in vivo* と同様の経路を遊走することが確かめられた。

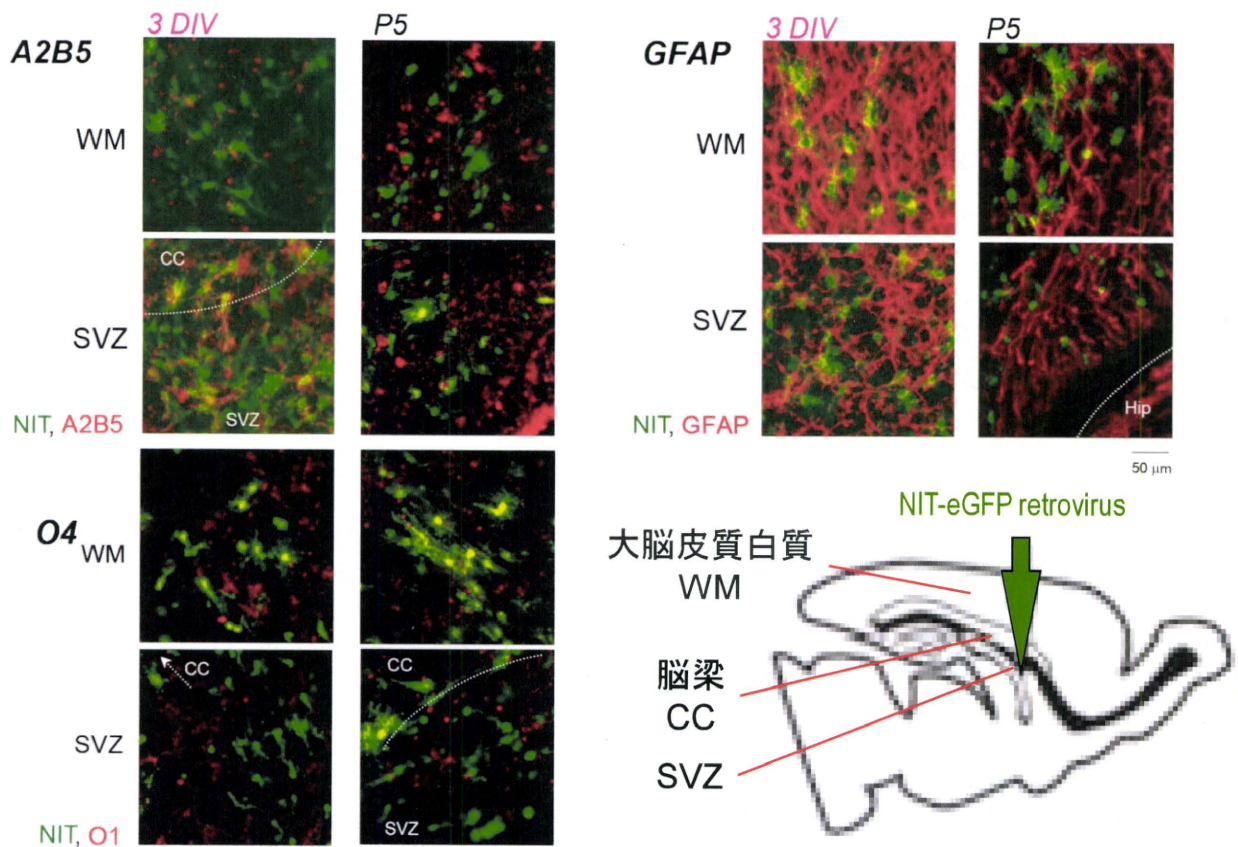
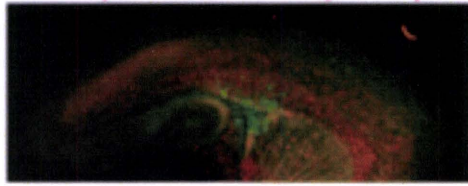


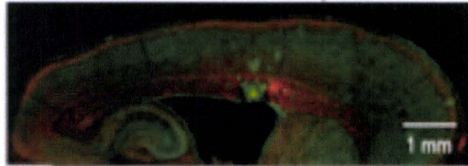
図5. 培養前脳矢状面切片における eGFP 標識細胞の分化マーカー発現。

生後2日齢ラット SVZ に NIT-eGFP を注入し、5日齢で還流固定し作成した矢状面切片、生後2日齢ラット前脳矢状面切片に NIT-eGFP を滴下し3日間培養した標本、のそれぞれにおける eGFP 標識細胞の分化マーカー発現、細胞分布を比較したところ、両者共にグリア前駆細胞マーカー A2B5 の発現は SVZ 内に限られ、白質では発現している細胞は見られなかった。オリゴデンドロサイト前駆細胞マーカー O4 の発現は SVZ にはほとんど見られず、白質で多くの陽性細胞を確認した。アストロサイトマーカーである GFAP については、SVZ、白質ともに陽性細胞を確認した。以上の結果は培養前脳矢状面切片において eGFP 標識細胞は *in vivo* と同様の分化パターンを示すことが確認された。

3 DIV (cultured slice) 150  $\mu$ m



P5 (Intact brain) 20  $\mu$ m x 7-8



	cultured slice	Intact brain
eGFP(+) cell No.	381.2 $\pm$ 521.7	469.5 $\pm$ 56.58
O1 (%eGFP(+) cells)	13.13 $\pm$ 1.114	14.28 $\pm$ 1.439

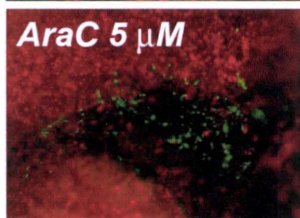
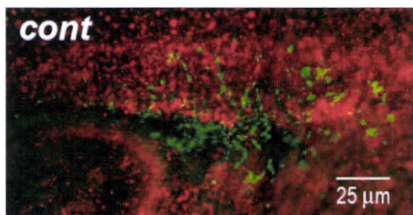
Sum

NIT, O1

図6. 培養前脳矢状面切片におけるオリゴデンドロサイト新生の定量的検討。

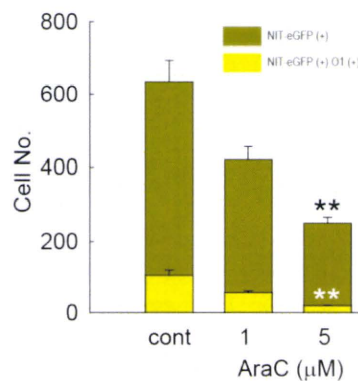
生後2日齢ラットSVZにNIT-eGFPを注入し、5日齢で還流固定し作成した矢状面切片、生後2日齢ラット前脳矢状面切片にNIT-eGFPを滴下し3日間培養した標本とで、eGFP標識細胞中のO1(+)細胞出現率を比較した。両標本ともにオリゴデンドロサイト新生がほぼ同じ出現率で起こっていることが確認された。

A

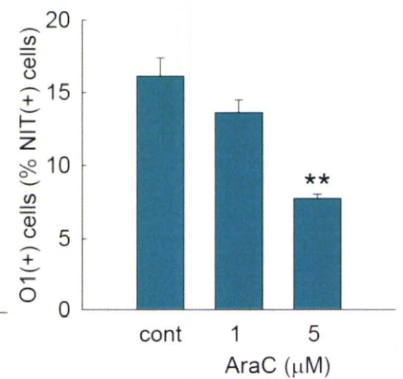


NIT, O1

B



C



\*:p<0.05, \*\*:p<0.01 vs. control, N=6, Tukey's test following ANOVA

図7. eGFP標識された神経幹細胞および前駆細胞を含む前脳矢状面切片培養系を用いた薬理的検討—AraCのオリゴデンドロサイト新生に対する影響。

A: eGFP標識細胞を含む培養前脳矢状面切片をAraC処理したところ、eGFP標識細胞の分布範囲は明らかに狭くなっていた。B: eGFP標識細胞数を計測したところ、有意に減少していた。C: eGFP標識細胞に占めるO1(+)細胞の比率も有意に減少していた。AraCは神経幹細胞および前駆細胞の分裂を抑制すること、神経幹細胞および前駆細胞の分裂が抑制されるとオリゴデンドロサイト前駆細胞の遊走および分化がさらに抑制されることが示された。

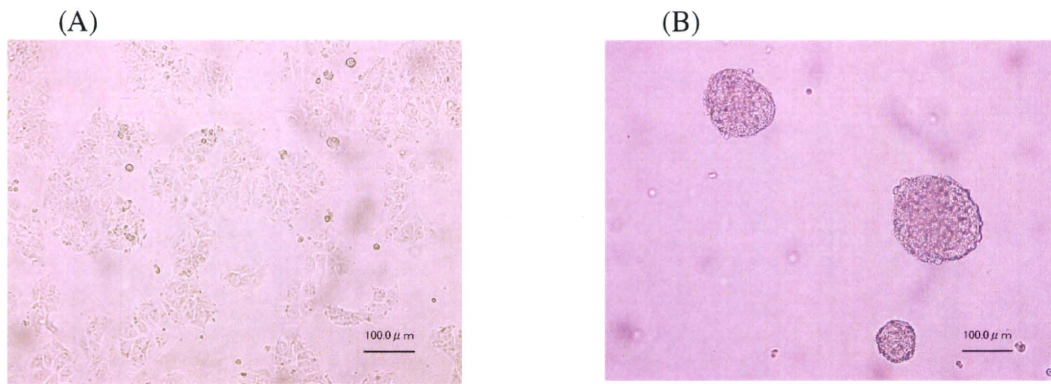


図8. NT2細胞を用いた neurosphere の作製.

(A) NT2 細胞の接着培養。 (B) NT2 細胞から浮遊培養により作製した neurosphere。 (Bar: 100μm)