

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

神経堤細胞の機能解析による評価法の開発

研究分担者	国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第四室長 宇佐見 誠
研究協力者	宮島 敦子
研究協力者	入江 智彦

要旨

ラット神経堤細胞遊走実験法を用いて、発達神経毒性を有すると考えられる化学物質として、クロルピリホスの神経堤細胞に及ぼす影響を調べた。ラット 10.5 日胚から菱脳部の神経管を摘出して培養し、培養 24 時間目にクロルピリホスを培養液に添加した。培養期間中に神経管から遊出する神経堤細胞の広がりを測定し、神経堤細胞の遊走を調べた。その結果、25  $\mu\text{M}$  以上のクロルピリホスにより、形態変化を示す細胞が散見され、細胞毒性によると考えられた。神経堤細胞の遊走に及ぼす影響として、培養 48 時間までは 50  $\mu\text{M}$  までは促進傾向が認められ、100  $\mu\text{M}$  では抑制傾向が認められた。培養 48 から 72 時間では、最低濃度の 6.25  $\mu\text{M}$  以上で抑制傾向が認められ、25  $\mu\text{M}$  以上で有意差が認められた。神経堤細胞の遊走促進をより高感度に調べることができる方法として、培養 18 時間で神経管を除去すると、クロルピリホス (100  $\mu\text{M}$ ) は神経堤細胞の遊走を促進する場合もあったが、72 時間では遊走の抑制傾向が認められた。これらのことから、クロルピリホスは、神経堤細胞の遊走に対して複数のメカニズムを介して影響を及ぼすと考えられた。以上のように、ラット神経堤細胞遊走実験法により、発達神経毒性を有する化学物質の神経堤細胞に及ぼす影響を明らかにすることが出来た。本実験法は、毒性発現メカニズムに基づいた化学物質の発達神経毒性評価法として有用であると考えられた。

A. 研究目的

近年、子供の学習障害や自閉症などの発達障害が増加しているが、その原因として化学物質の関与が指摘されている。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、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。

また、神経堤細胞のうち、頭部神経管に由来する頭部神経堤細胞の異常では、顔面の奇形などの形態形成に及ぼす影響も認められる。神経堤症による顔面奇形と同様の奇形は、胚のレチノイン酸への過剰暴露においても生じることから、神経堤細胞は化学物質によ

る毒性の標的組織となり得ると考えられている。しかし、適切な実験法が確立されていないため、化学物質の神経堤細胞機能に及ぼす影響は、ほとんど調べられていない。

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、ラット神経堤細胞を用いた実験法の確立を目指した。

本実験法を利用することにより、神経堤細胞遊走に影響する化学物質とそのメカニズムを同定し、ヒトにおける当該化学物質に対する高暴露集団およびメカニズムに關与す

る遺伝子疾患等を有する集団などの、ハイリスク集団について、疫学的調査の基盤的情報を提供すると共に、健康影響の予防のための方策となる情報を得られることが期待される。

初年度は、神経系の発生に影響を及ぼすことが知られているバルプロ酸をモデル化学物質として用いて、ラット神経堤細胞遊走実験法の発達神経毒性評価法としての有用性について検討した。次年度は、内分泌攪乱作用を有する環境汚染物質であるトリブチルスズをモデル化学物質として用いた。最終年度である今年度は、神経発達毒性が報告されている農薬であるクロルピリホスをモデル化学物質として用いた。

## B. 研究方法

### 1. 動物

ウィスターラット (Crj:WI, 日本チャールスリバー) を用いた。発情前期の雌ラットを雄と終夜同居させ、妊娠ラットを得た。同居中の深夜を妊娠 0 日として起算した。妊娠 10.5 日に、妊娠ラットから初期着床胚を摘出して実験に用いた。

### 2. ラット神経堤細胞の培養

摘出したラット初期着床胚から、電解研磨したタングステン針を用いて、菱脳部を切り出し、物理的に神経管を取り出した。体幹神経堤細胞を用いる場合は、前肢芽の部位から神経管を同様の方法で取り出した。取り出した神経管を、培養シャーレ (Becton, Dickinson and Company) に培養液 (10% Fetal Bovine Serum を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium, 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 時間目にクロルピリホスを含む培養液に交換して、48 時間まで培養した。クロルピリホスは、ジメチルスルホキシドに溶解して用いた。

### 3. ラット神経堤細胞の観察

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付着及び遊走細胞の広がりを観察した。

### 4. データの解析

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つないでできる図形を円とみなして、そのピクセル数で表される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。

(倫理面への配慮)

動物の使用にあたっては国立医薬品食品衛生研究所の「動物実験に関する指針」を遵守した。

## C. 研究結果

### 1. クロルピリホスのラット神経堤細胞遊走に及ぼす影響

クロルピリホス (6.25, 12.5, 25, 50 および 100  $\mu$ M) を培養 24 時間目に添加して、ラット神経堤細胞に及ぼす影響を調べた。その結果、25  $\mu$ M 以上のクロルピリホスにより、形態変化を示す細胞が散見され、細胞毒性によると考えられた (図 1)。

神経堤細胞の遊走に及ぼす影響として、培養 48 時間までは 50  $\mu$ M までは促進傾向が認められ、100  $\mu$ M では抑制傾向が認められた。培養 48 から 72 時間では、最低濃度の 6.25  $\mu$ M 以上で抑制傾向が認められ、25  $\mu$ M 以上で有意差が認められた (図 2)。

一方、神経堤細胞の遊走促進をより高感度に調べることができる方法として、培養 18 時間で神経管を除去すると、クロルピリホス (100  $\mu$ M) は神経堤細胞の遊走を有意に促進した (図 3)。

遊走促進作用の確認および神経管の部位の違いによる神経堤細胞への影響を調べるために、頭部および腹部神経管を培養し、培養 18 時間で神経管を除去して、24 時間目にクロルピリホスを添加し 72 時間まで培養した。その結果、培養 48 時間では、クロルピリホスの影響は殆ど認められなかったが、培養 48 時間では、頭部神経堤細胞には遊走の抑制傾向が認められたが、腹部神経堤細胞には遊走の促進傾向が認められ、神経管の部位の違いによる影響が示された (図 4)。

## D. 考察

ラット神経堤細胞遊走実験法により、発達神経毒性を有するクロルピリホスの神経堤

細胞ら及ぼす影響を調べた。その結果、クロルピリホスは、神経堤細胞の遊走に相反する作用を示したが、長時間の暴露では、細胞毒性によると考えられる遊走抑制作用が認められた。また、神経管の部位による影響の違いが認められた。これらのことから、クロルピリホスは、神経堤細胞の遊走に対して複数のメカニズムを介して影響を及ぼすと考えられる。

以上の結果から、発達神経毒性評価法として、本実験法は、化学物質の神経堤細胞機能阻害が関与する影響の評価法として有用であると考えられる。

## E. 結論

ラット神経堤細胞遊走実験法により、発達神経毒性を有するクロルピリホスの神経堤細胞に及ぼす影響を調べた。クロルピリホスは、神経堤細胞の遊走に、促進と抑制の相反する作用を示したが、長時間の暴露では、細胞毒性によると考えられる遊走抑制作用が認められた。クロルピリホスは、神経堤細胞の遊走に対して複数のメカニズムを介して影響を及ぼすと考えられた。本実験法は、化学物質の神経堤細胞機能阻害が関与する発達神経毒性評価法として有用であると考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- [1] Usami M., Mitsunaga K., Irie T., Miyajima A. and Doi O. Proteomic analysis of ethanol-induced embryotoxicity in cultured post-implantation rat embryos. *The Journal of Toxicological Sciences* 39: 285–292 (2014).
- [2] Usami M., Mitsunaga K., Irie T. and Nakajima M. Various definitions of reproductive indices: a proposal for combined use of brief definitions. *Congenital Anomalies* 54: 67–68 (2014).
- [3] Kim S.-R., Kubo T., Kuroda Y., Hojyo M., Matsuo T., Miyajima A., Usami M., Sekino Y., Matsushita T. and Ishida S. Comparative metabolome analysis of cultured fetal and adult hepatocytes in humans. *The Journal of Toxicological Sciences* 39: 717–23 (2014).
- [4] Usami M., Mitsunaga K., Irie T.,

Miyajima A. and Doi O. Simple in vitro migration assay for neural crest cells and the opposite effects of all-trans-retinoic acid on cephalic- and trunk-derived cells. *Congenital Anomalies* 54: 184–8 (2014).

- [5] Usami M., Mitsunaga K., Miyajima A., Takamatu M., Kazama S., Irie T., Doi O., and Takizawa T. Effects of 13 developmentally toxic chemicals on the migration of rat cephalic neural crest cells in vitro. *Congenital Anomalies* (2015).
- [6] Irie T., Kikura-Hanajiri R., Usami M., Uchiyama N., Goda Y., and Sekino Y. MAM-2201, a synthetic cannabinoid drug of abuse, suppresses the synaptic input to cerebellar Purkinje cells via activation of presynaptic CB1 receptors. *Neuropharmacology* 95: 479–491 (2015).

## 2. 学会発表

- [1] 宇佐見 誠, 高松 美奈, 風間 崇吾, 満長 克祥, 入江 智彦, 宮島 敦子, 土井 守, 滝沢 達也. 化学物質が培養ラット神経堤細胞の増殖に及ぼす影響に関する研究. 第55回日本先天異常学会学術集会. 横浜 (2015).

## 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。

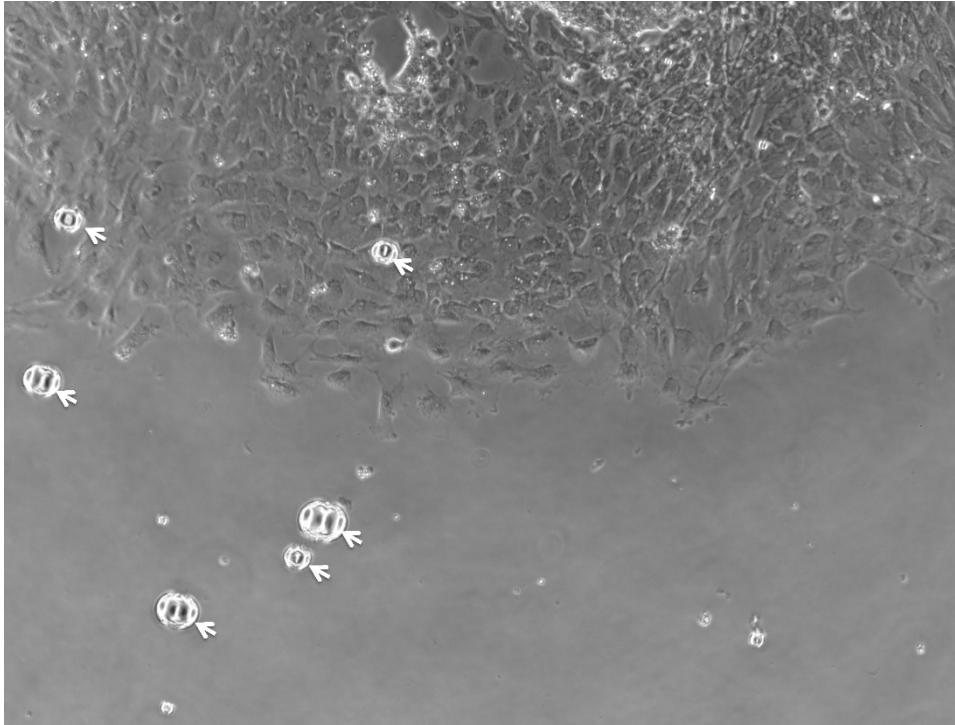


図 1. ラット神経堤細胞の形態に及ぼすクロルピリホスの影響

ラット 10.5 日の神経管から遊走する神経堤細胞を 48 時間培養した。培養 24 時間目からクロルピリホス (100  $\mu$ M) を培養液に添加した。矢印は形態異常を起こした細胞を示す。

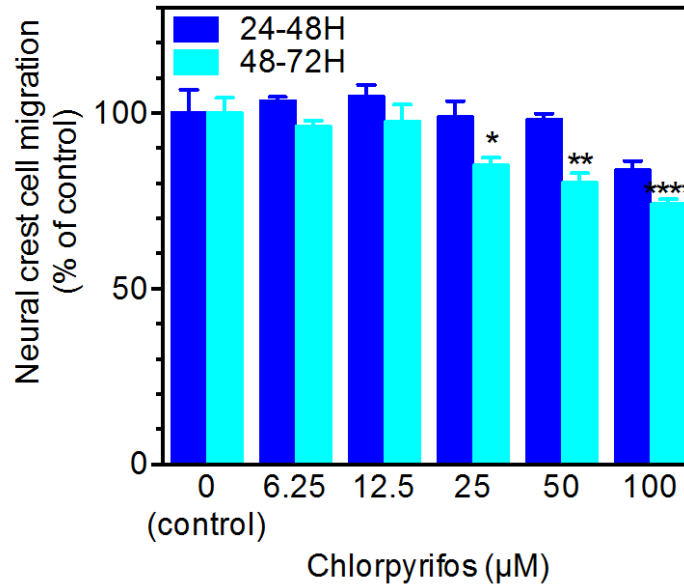


図2. ラット神経堤細胞の遊走に及ぼすクロルピリホス (chlorpyrifos) の影響  
 ラット 10.5 日の神経管から遊走する神経堤細胞を 72 時間培養した。培養 24 時間目からクロルピリホスを培養液に添加した。平均値と標準誤差を示す。「\*」は対照群と比較して統計学的な有意差があることを示す (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ )。

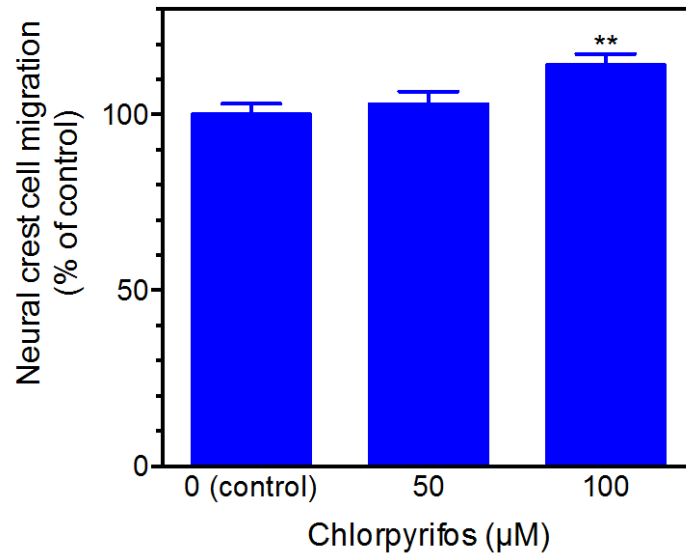


図3. ラット神経堤細胞の遊走に及ぼすクロルピリホス (chlorpyrifos) の影響  
ラット 10.5 日の神経管から遊走する神経堤細胞を 48 時間培養した。培養 24 時間目からクロルピリホスを培養液に添加した。平均値と標準誤差を示す。「\*」は対照群と比較して統計学的な有意差があることを示す (\*\*  $p < 0.01$ )。神経管を培養 18 時間目に除去した。

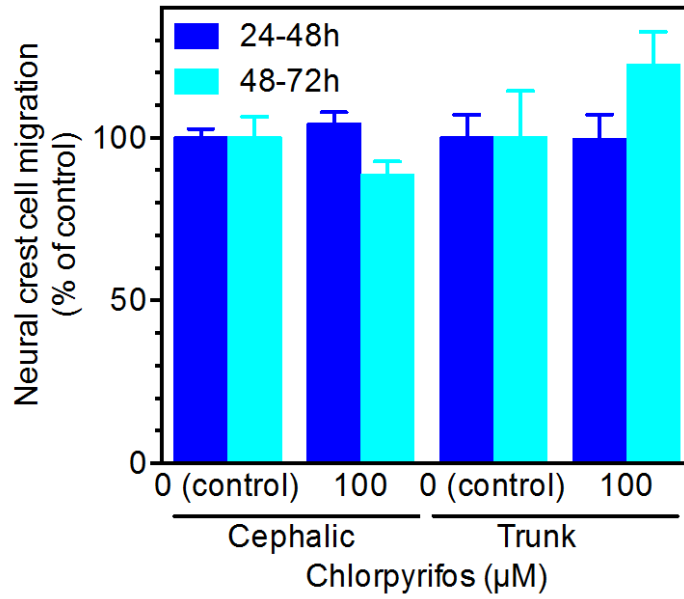


図4. ラット頭部 (cephalic) および腹部 (trunk) 神経堤細胞の遊走に及ぼすクロルピリホス (chlorpyrifos) の影響  
 ラット 10.5 日の神経管から遊走する神経堤細胞を 72 時間培養した。培養 24 時間目からクロルピリホスを培養液に添加した。平均値と標準誤差を示す。神経管を培養 18 時間目に除去した。