

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

ヒト抹消血誘導型ミクログリア細胞技術を用いた食品の神経毒性評価システムの開発

令和3年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 扇谷 昌宏

令和4（2022）年 5月

目 次

I. 総括研究報告		
ヒト抹消血誘導型ミクログリア細胞技術を用いた 食品の神経毒性評価システムの開発	-----	1
扇谷昌宏		
II. 分担研究報告		
1. ミクログリアおよびニューロンを用いた共培養系での カルシウムイメージング実験系の構築とその影響	-----	7
原口祥典		
2. ヒト抹消血誘導型ミクログリア細胞実験系の構築	-----	10
加藤隆弘		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	13

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
総括研究報告書

ヒト末梢血誘導型ミクログリア細胞技術を用いた食品の神経毒性評価システムの開発

研究代表者 扇谷 昌宏 旭川医科大学 講師

研究要旨

生体内には様々な種類の金属元素が存在しており、生命ならびに健康の維持に重要な役割を担っている。そしてそれらの大部分は、食事として食品から摂取している。また近年では、金属元素を含有したサプリメントが数多く市販されており、国民にとって身近な存在となっている。金属元素は過剰状態や欠乏状態に陥ると様々な疾病を誘発することも知られており、本邦の歴史からも特に神経毒性には注意が必要である。これまで、神経毒性はニューロン（神経細胞）のみで評価されてきたが、近年脳細胞の一種であるミクログリアに注目が集まっている。

本研究は、申請者が開発したヒト末梢血誘導型ミクログリア細胞技術を用いて、従来のニューロンのみによる神経毒性評価ではなく、ミクログリアとの相互作用を含めたヒトレベルの評価系の構築を最終的な目的としている。

本年度は、R2年度に行った実験系の基盤構築の成果を活かして、マウス由来ミクログリアおよびニューロンの共培養系を用いた評価系を確立し、毒性評価を行った。

本年度の成果としてミクログリアおよびニューロンの共培養系において、ニューロン単独培養とは異なる毒性を示す金属種が存在していることを初めて明らかにすることができた。加えて、共培養系のみで遺伝子発現変化を伴う反応が起こっており、単独培養と共培養では細胞の状態が大きく変化している可能性も示唆された。さらに、細胞内シグナル伝達に重要なカルシウムイメージング実験においても共培養系では単独培養と異なる結果が得られた（分担研究者：原口）。これは従来のニューロン単独培養での毒性評価では真の（生体を反映した）毒性評価には不十分であることを示唆しており、本研究の意義を示す重要な成果である。

加えて、ヒト末梢血誘導型ミクログリア細胞を用いた実験系の構築も順調に進めており、評価系に最適な細胞条件を確立した（分担研究者：加藤）。

研究分担者氏名・所属研究機関名及び
所属研究機関における職名

原口祥典・佐賀大学・研究員
加藤隆弘・九州大学・准教授

ンスを保っており、細胞の内外でも厳密に調整されている。しかしながら、そのバランスが崩れ、過剰状態や欠乏状態に陥ると様々な疾病を誘発することになる（表1）。先に述べたように、我々は食品から金属元素を摂取しているため、食品中の金属元素の種類や含有量は我々の健康に直結する

A. 研究目的

生体内には様々な種類の金属元素が存在しており、生命ならびに健康の維持に重要な役割を担っている。そして、それらの大部分はあまり意識することなく、食事として食品から摂取している。また近年では、金属元素を含有したサプリメントが数多く市販されており、意識的に摂取を行うこともでき、国民にとって身近な存在となっている。健康な状態では、それらの金属元素は一定のバラ

表1) 各種金属元素の生体機能と欠乏症]

金属	必須	機能	欠乏症
Li	○	甲状腺・内分泌機能の調節	成長障害、造血障害
K	○	浸透圧・酸塩基平衡の保持	筋力低下、けいれん、不整脈
Na	○	浸透圧・酸塩基平衡の保持	筋力低下、脳神経症状
Ca	○	骨や歯の構成成分、血液凝固、筋収縮	高血圧、動脈硬化、骨密度の低下
Gd	×	毒性が非常に強い、体内蓄積性あり	
Mg	○	骨や歯の構成成分、酵素の活性化	めまい、筋力低下、発汗
Mn	○	神経伝達に関与	成長遅延
Zn	○	神経伝達に関与	生殖能力低下、骨異常

非常に重要な因子である。

食品からの金属元素の摂取は生命ならびに健康の維持に重要であることは間違いないが、食品に含まれる金属元素の一部には毒性が高く、注意が必要な金属元素も存在している。その代表例がカドミウムである。カドミウムは、土壌または水などの環境中に広く存在し、米、野菜、果実、肉、魚など多くの食品に含まれている。本邦においては米から摂取する割合が多く、米の摂取量の低下に伴って全体の摂取量も減少しているが、米以外の食品からの摂取量は変化しておらず、注意が必要である（図1）。さらに、カドミウムの毒性は腎不全と骨軟化症が主とされてきたが、神経系への影響も懸念されていた（カドミウムの毒性評価に当たっての検討事項について、薬事・食品衛生審議会食品分科会毒性部会、2003年6月）。当時は、厚生労働科学研究班より、実験動物に対しカドミウムの注射により投与した研究では、カドミウム

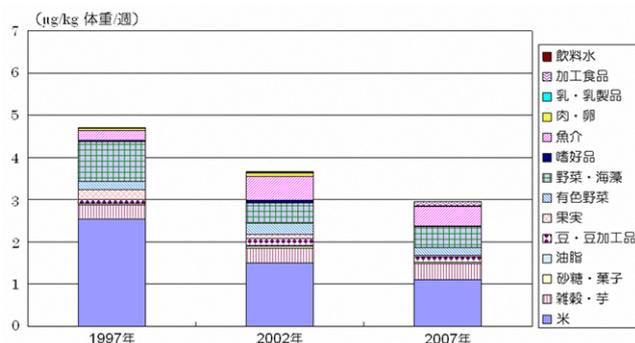


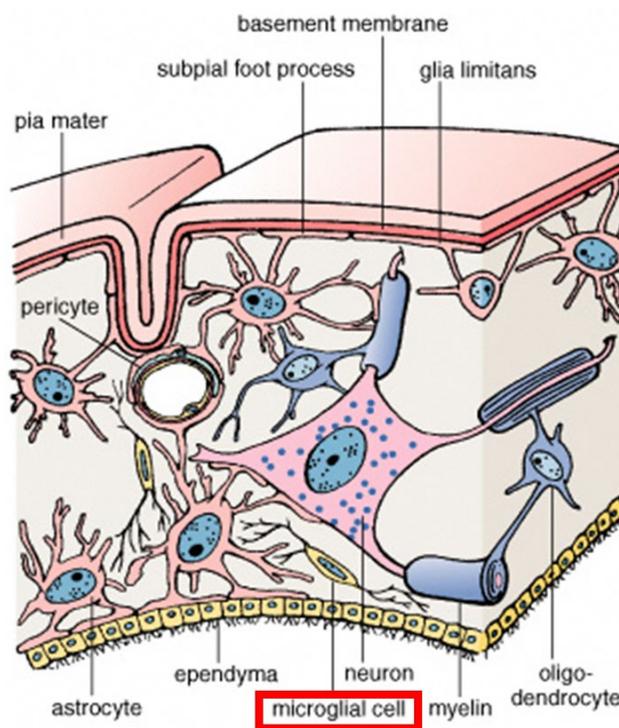
図1) 食品からのカドミウム摂取量の経年変化
厚生労働省ホームページより引用

(<https://www.mhlw.go.jp/houdou/2003/12/h1209-1c.html>)

は血液脳関門に阻まれて脳へ簡単には移行しなかったということが報告されている。ところが近年、血液脳関門は鉄壁の防御ではなく、生体の様々な状態に応じて変化することが明らかになってきた。事実、カドミウムは脳に到達し、神経毒性を示すことが多くの研究により報告されている (Leal RB, et al., Cadmium Neurotoxicity and Its Role in Brain Disorders, Metal Ion in Stroke, Springer, NY, 2012)。このように、これまでは血液脳関門によって保護されている（血液脳関門を通過できない）と考えられてきた金属元素が実際

は脳内に移行し、神経毒性を呈しているという事実は、近年明らかにされたものであり、国民の健康に直結する極めて重要な知見である。

我々の脳には、様々な種類の細胞が存在しており、その中心的な役割を担っているのはニューロン（神経細胞）であることはよく知られている。しかしながら近年、グリア細胞と呼ばれるニューロン以外の細胞に注目が集まっている（図2）。特に、脳内で唯一の免疫細胞であるミクログリアは、移動し傷害部位に集まる機能（遊走能）や異物を細胞内に取り込む機能（貪食能）やサイトカインを産生する機能を有しており、他の脳細胞とは異質の細胞である。特に、胎生期から発達期には、神経の分化誘導やシナプスの刈り込みにおいて不可欠な存在であり、次第に樹状に突起を伸展した Ramified 様の形態へと変化し、静止型として脳内の微細な環境変化を監視し続けている。最近では、定常的にシナプスの監視やシナプスの形成にも関与していることが報告されている (Miyamoto, A., et al., Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex, Nat. Commun. 2016)。



2 図2) 脳に存在する細胞

Ross MH, Histology 4th Edition より引用

さらに興味深いことに、ミクログリアは血液脳関門の透過性に影響していることも近年明らかにされた (Haruwaka K, et al., Dual microglia effects on blood brain barrier permeability induced by systemic inflammation, Nat. Commun., 2019)。このように、ミクログリアは様々な精神神経疾患の病態への関与が示唆されている極めて重要な脳細胞である (Salter, M. W., and B. Stevens, Microglia emerge as central players in brain disease, Nat Med, 2017)。

しかし、ミクログリアの重要性は近年明らかにされたものであり、脳神経科学以外の分野 (食品安全分野など) では未だにニューロンを中心とした研究が大部分を占めている。事実、過去の厚生労働科学研究における食品の安全性確保推進事業においてもミクログリアを対象にした研究は皆無である。本研究課題は、近年その重要性が目まぐるしく注目を集めているミクログリアに焦点を当て、これまで血液脳関門仮説によって見逃されてきた金属元素の神経毒性を評価することを目的としている。

B. 研究方法

(1) 使用細胞

マウス由来の BV2 細胞株 (ミクログリアとして) および Neuro2A 細胞株 (ニューロンとして) を実験に使用した。

(2) 使用金属

実験に使用した金属は、リチウム、亜鉛、マンガン、銅、ニッケル、クロム、鉄、コバルト、ガドリニウム、カドミウム、ガリウムおよびアルミニウムの塩化物を使用した。

(3) ニューロンおよびミクログリアの共培養系の構築

生体 (脳) ではニューロン単独ではなく、グリ

ア細胞であるミクログリアが存在している。本研究はヒトでの神経毒性評価系の構築が最終目標であるため、ただ、単純にニューロンとミクログリアを 1 : 1 で混合するのではなく、より生体を模倣する実験系を用いた。文献検索の結果、ヒトのニューロンとミクログリアの細胞数の比率が 5 : 1 であることが報告 (Sandra E. Dos Santos, et al., J. Neurosci.) されており、本実験の参考にした。本研究での共培養系とは、Neuro2A 細胞と BV2 細胞を細胞数比 = 5 : 1 で混合し、培養したものとしている (図 3)。

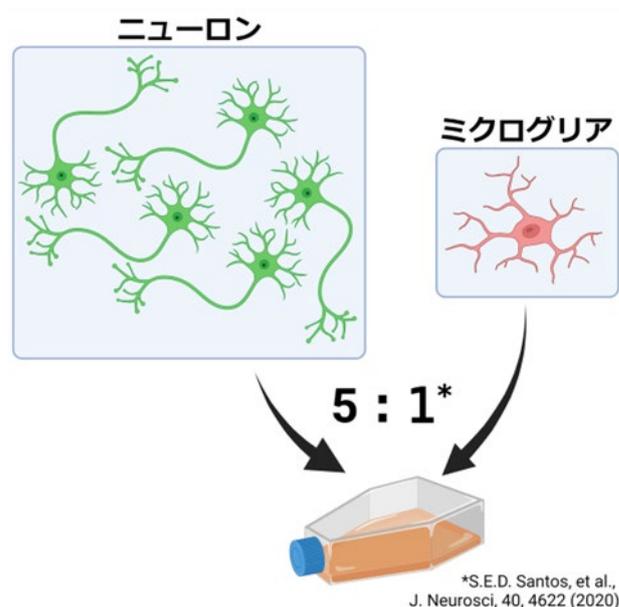


図 3) 本研究で用いた共培養系

(4) 毒性評価

毒性評価は、酵素活性測定法である WST 法を用いて測定を行った。細胞を 96 穴プレートに播種し、24 時間後に各金属種を添加した。添加 24 時間後に WST-8 試薬を添加し、吸光度を測定した。得られた吸光度から生存率を算出した。50%細胞増殖抑制濃度 (IC50 値) は、濃度依存性の生存率曲線から Graphpad Prism ソフトウェアを用いて算出した。

(5) FACS を用いた共培養後の細胞分取

共培養の影響を細胞ごとに評価するため、共培

養後の細胞集団を回収し、FACS を用いてニューロンとミクログリアに分離して回収した。分離には CD11b 抗体を用いて、CD11b 陽性細胞をミクログリア、陰性細胞をニューロンとした。なお、コントロールとして用いた単独培養の細胞も FACS を用いて同様の操作を行った (図 4)。

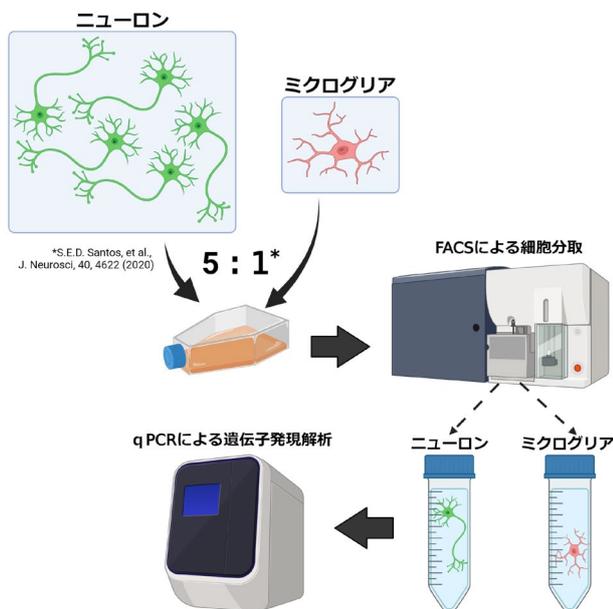


図 4) FACS を用いた細胞分取と遺伝子解析方法

(6) 遺伝子発現解析

FACS によって分取した細胞は、Total RNA を抽出し、cDNA ライブラリを合成した。その後、リアルタイム PCR 装置を用いて、各種遺伝子発現を解析した。対象とした遺伝子は、ニューロン・ミクログリアの障害性と関連が深い神経炎症に関わる遺伝子を用いた。

(倫理面への配慮)

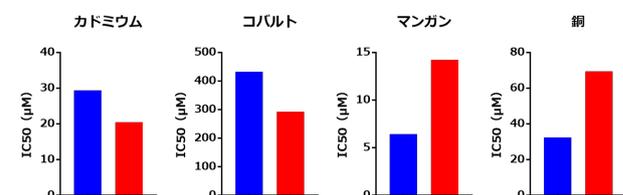
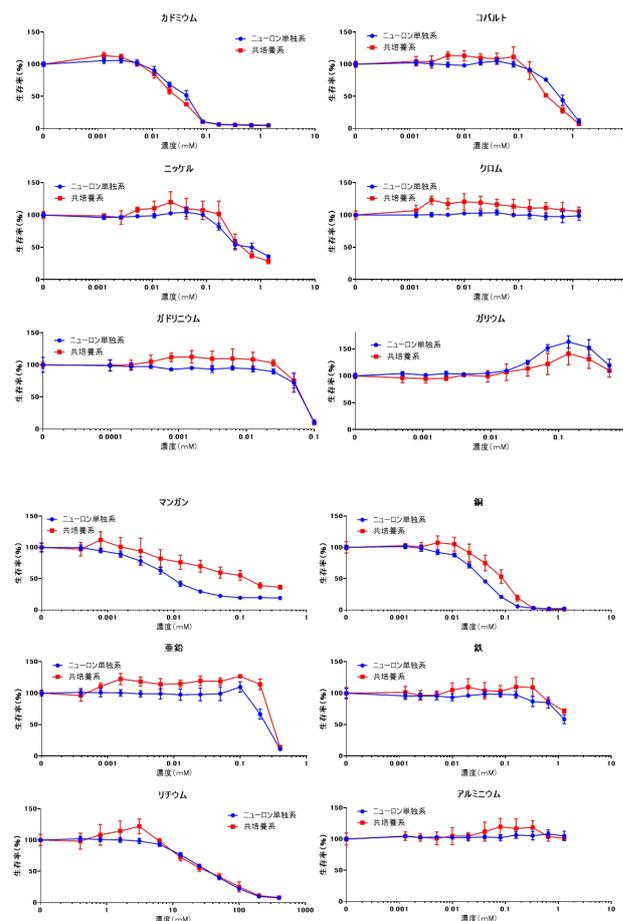
本研究は、株化細胞のみを用いた実験であり、倫理面において特筆すべき事項は存在しない。

C. 研究結果と考察

(1) 共培養系を用いた毒性評価

ニューロン単独およびミクログリアとの共培養系を用いて毒性評価を行ったところ、金属の種類

によって①共培養系の方がニューロン単独よりも毒性が強い金属 (カドミウム、コバルト)、②ニューロン単独の方が共培養系よりも毒性が強い金属 (マンガン、銅、亜鉛)、③共培養系およびニューロン単独で毒性に大きな差がない金属 (ニッケル、クロム、鉄、ガドリニウム、ガリウム、リチウム、アルミニウム) が明らかとなった (図 5)。



(図 5) 共培養系を用いた毒性評価

ニューロン単独培養を青色で、ミクログリアとの共培養系を赤色で示している。

(2) 共培養によるニューロンおよびミクログリアへの影響

共培養後に FACS を用いてニューロンおよびミクログリアを分取し、遺伝子発現解析を行ったところ、どちらの細胞においても神経炎症関連遺伝子の発現に変化が見られた。炎症性 (M1 ; TNF α 、CD86、IL1 β 、IL6)・抗炎症性 (M2 : IL10、ARG1、MRC1) 遺伝子の発現変化に規則的なパターンは見られなかったが、どちらの細胞においても程度は様々だが、変化は見られた。

興味深いことに、ミクログリアと比べて、ニューロンでの遺伝子発現変動が大きい傾向が明らかとなった。共培養での細胞数は、ニューロン：ミクログリア=5：1であり、ミクログリアは20%程度であるが、ニューロン単独と比べて遺伝子発現にこれだけの差が生じているのは重要な発見であり、共培養系の重要性を示唆するものである(図6、7)。

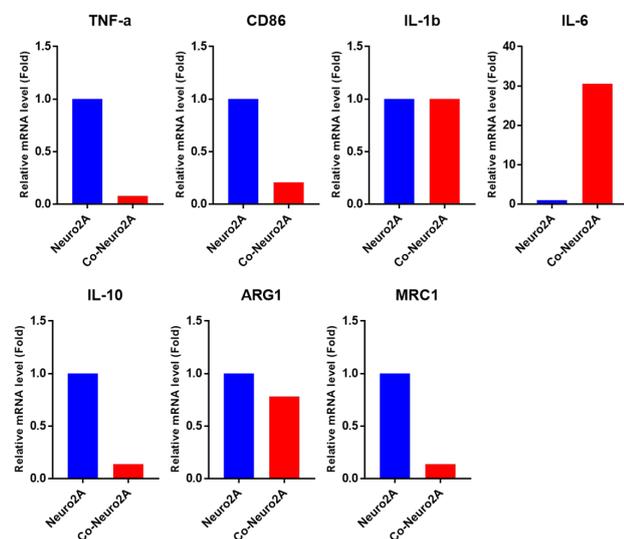


図 6) 単独培養および共培養後でのニューロンにおける各種遺伝子発現

ニューロン単独培養を青色で、ミクログリアとの共培養系を赤色で示している。

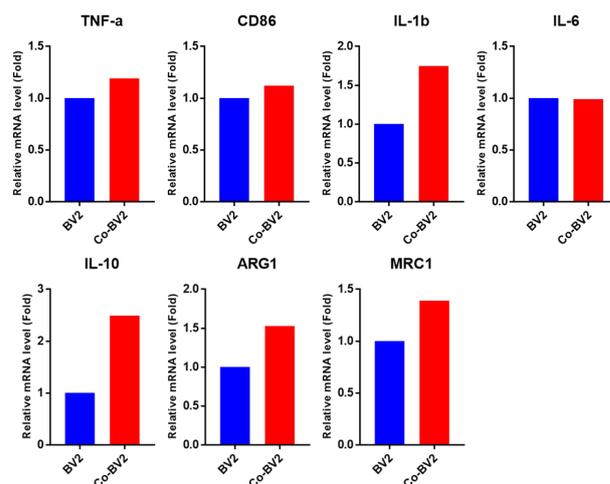


図 7) 単独培養および共培養後でのミクログリアにおける各種遺伝子発現

ミクログリア単独培養を青色で、ニューロンとの共培養系を赤色で示している。

D. 結論

本研究の申請時はミクログリア単独での評価系構築を想定していたが、ニューロンとの共培養系での構築を目指し、R2年度より準備してきた。その成果によって、R3年度では、共培養系においてニューロン単独とは異なる毒性を示す金属種が存在していることを明らかにできた。つまり、従来のニューロン単独での毒性評価では真の(生体を反映した)毒性評価には不十分であることが示唆された。

さらに、共培養のみで遺伝子発現変化を伴う反応が起こっており、単独培養とは細胞の状態が大きく変化している可能性が示唆された。

今後は、ニューロン単独ではなく、グリア細胞も含めた共培養系での実験が標準的な評価方法になる必要があると思われる。

次年度(R4)年度では、R2,R3年度の結果を踏まえて、ヒトでの共培養評価系構築を行う。本研究によって、食品の安全性確保分野における神経毒性評価にミクログリアを加えることの重要性が

初めて明らかとなった。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

学会発表 合計 2 件

1) 種類：学会発表。発表者：扇谷昌宏。学会名：第 25 回グリア研究会。日時：2021 年 12 月 4 日。会場：Web 開催。

2) 種類：学会発表（シンポジウム）。発表者：扇谷昌宏。学会名：第 43 回日本生物学的精神医学会 第 51 回日本神経精神薬理学会。日時：2021 年 7 月 16 日。会場：京都国際会議場。

市民向け説明会 合計 1 件

1) 種類：高校生を対象とした特別講義。発表者：扇谷昌宏。講義名：先端科学技術入門。日時：2022 年 2 月 7 日（水）。場所：愛知工業大学名電高等学校。

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

ヒト抹消血誘導型ミクログリア細胞技術を用いた食品の神経毒性評価システムの開発

分担研究報告書

ミクログリアおよびニューロンを用いた共培養系でのカルシウムイメージング実験系の構築とその影響

研究分担者 原口 祥典 佐賀大学 研究員

研究要旨

カルシウムイメージングとは、細胞内カルシウムの流動を測定し、活動中の細胞内のカルシウムシグナリングを直接観察する手法である。カルシウムシグナリングは、神経伝達物質やホルモンなどの分泌、筋肉の収縮など生命や健康の維持に関与している。つまり、カルシウムイメージングを行うことで、細胞が健康な状態かを判断することが可能となる。一方、カルシウムイメージングは、特殊な機器と豊富な経験が必要な実験系である。特に、細胞ごとに実験条件の検討が必須であり、試薬の負荷時間やバッファー類の塩濃度などを最適化する必要がある。

昨年度は、実験系の基礎構築として単独培養でのカルシウムイメージングを行った。本年度は、ニューロンとミクログリアの共培養系を用いて実験系の構築を行い、共培養系による影響を確認した。

単独培養と共培養を比較すると、基底状態の細胞内カルシウム濃度に有意な差は認めなかったが、興味深いことにATP刺激によるカルシウム濃度の上昇幅に有意な差がみられた。

このことは、単独培養と共培養系では細胞レベルでの反応が異なっていることを示唆しており、共培養系が評価系に重要であることを示唆している。

A. 研究目的

カルシウムイメージングとは、細胞内カルシウムの流動を測定し、活動中の細胞内のカルシウムシグナリングを直接観察する手法である。カルシウムシグナリングは、神経伝達物質やホルモンなどの分泌、筋肉の収縮など生命や健康の維持に関与している。つまり、カルシウムイメージングを行うことで、細胞が健康な状態かを判断することが可能となる。

従来は、ニューロンのカルシウムイメージングが生理学的実験手法の代表例として広く研究されてきたが、近年、ミクログリアのカルシウムイメージングも重要な研究手法の1つとされている（工藤佳久、歯薬療法、2017）。

その一方で、カルシウムイメージングは、高感

度の検出器、蛍光顕微鏡、灌流装置、高性能ワークステーション、暗室、2波長切り替え式フィルターなどの特殊な機器が必要で、手技的にも経験が必要な実験系である。特に、細胞ごとに実験条件の検討が必須であり、試薬の負荷時間やバッファー類の塩濃度などを最適化する必要がある。

昨年度は、実験系の基礎構築として単独培養でのカルシウムイメージングを行った。本年度は、ニューロンとミクログリアの共培養系を用いて実験系の構築を行い、共培養系による影響を確認した。

B. 研究方法

カルシウムイメージングは、Fura-2AM 試薬を用いて、2波長励起蛍光顕微鏡を用いて測定を行った。

生体（脳）ではニューロン単独ではなく、グリア細胞であるミクログリアが存在している。本研究はヒトでの神経毒性評価系の構築が最終目標であるため、ただ、単純にニューロンとミクログリアを1：1で混合するのではなく、より生体を模倣する実験系を用いた。文献検索の結果、ヒトのニューロンとミクログリアの細胞数の比率が5：1であることが報告(Sandra E.Dos Santos, et al., J. Neurosci.) されており、本実験の参考にした。本研究での共培養系とは、Neuro2A 細胞と BV2 細胞を細胞数比=5：1で混合し、培養したものとしている（図1）。

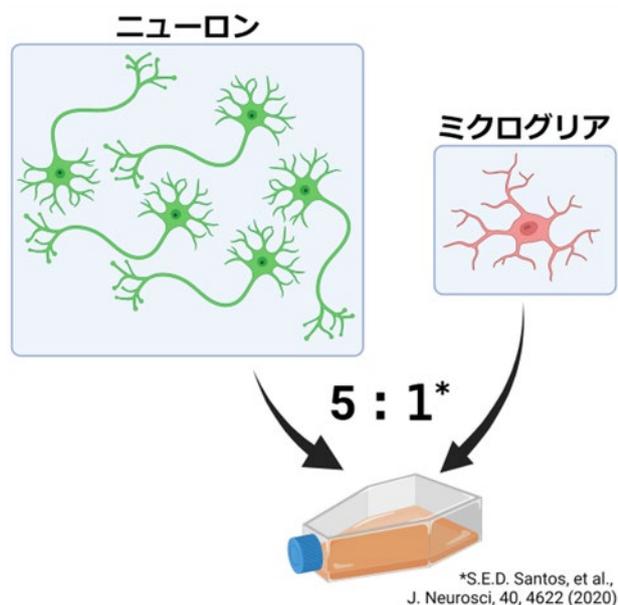


図1) 本研究で用いた共培養系

ミクログリアおよびニューロンをガラスボトムディッシュに播種し、翌日、Fura-2AM 試薬を5 μ Mで30分間の染色を行った。その後、顕微鏡にセットし、バッファの灌流を行った。カルシウムイメージングは、Ratio Imagingによる細胞内カルシウム濃度測定を行った。

また、外部刺激としてニューロトランスマITTERの1つであるATP（アデノシン三リン酸）を用いて細胞内カルシウム濃度の上昇幅（Amplitude）も測定した。

（倫理面への配慮）

本研究は、マウスの株化細胞を用いているため、倫理面において特筆すべき事項は存在しない。

C. 研究結果と考察

まず、共培養条件下でのカルシウムイメージングの実験条件を検討した。昨年度確立したバッファ濃度や染色条件を用いたところ、図2に示すように、ミクログリアとニューロンの共培養系においてもカルシウムイメージングが実施可能であることを確認した。

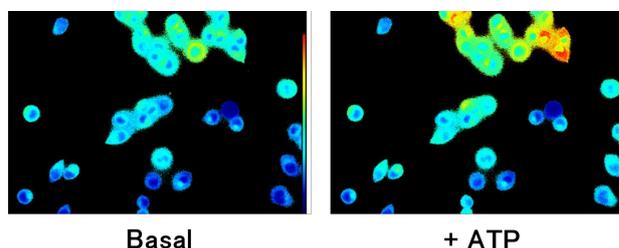


図2) 共培養下でのカルシウムイメージング

次に、単独培養と共培養系での基底状態（Basal）の細胞内カルシウム濃度を比較した。その結果、ミクログリア単独（82.7 \pm 2.5 nM, n=212）とニューロンとの共培養系（85.9 \pm 3.9 nM, n=144）で細胞内カルシウム濃度に有意な差は見られなかった（図3）。

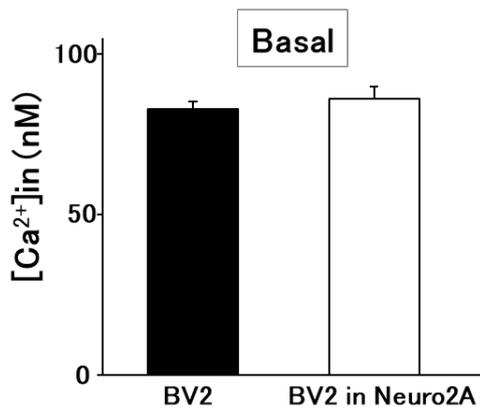


図 3) ミクログリア単独およびニューロンとの共培養系での基底状態の細胞内カルシウム濃度

しかしながら、興味深いことに、ATP による外部刺激を加えた際の細胞内カルシウム濃度の上昇幅 (Amplitude) に違いが見られた。ミクログリア単独では、上昇幅が 84.6 ± 11.1 nM ($n = 209$) であったのに対し、ニューロンとの共培養系では上昇幅が 55.5 ± 6.3 nM ($n = 141$) と有意 ($p = 0.011$) に低い値であった (図 4)。

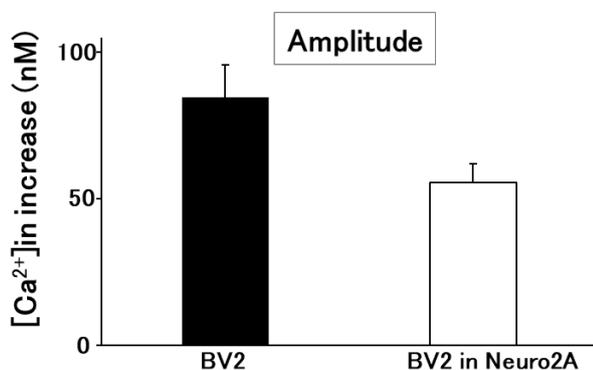


図 4) ミクログリア単独およびニューロンとの共培養系での ATP 刺激による細胞内カルシウム濃度の上昇幅

現時点で、ATP 外部刺激時の共培養における細胞内カルシウム濃度の上昇幅が抑制されているメカニズムについては不明であるが、ニューロンとの相互作用によってこの現象が引き起こされてい

る可能性が高い。この事実は、単独培養と共培養系では細胞応答が異なる可能性を示唆しており、ニューロンおよびミクログリアの共培養系が毒性評価を含む *in vitro* 評価系として重要であることを意味している。

E. 結論

本年度は、ニューロンおよびミクログリアを用いた共培養系でのカルシウムイメージング実験系の構築に成功した。また、共培養下では、ニューロトランスマITTERに対して単独培養時と異なる細胞応答が見られた。この事実は、毒性評価を含む食品安全の *in vitro* 評価系として共培養系が重要であることを示唆している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

ヒト末梢血誘導型ミクログリア細胞技術を用いた食品の神経毒性評価システムの開発

分担研究報告書

ヒト末梢血誘導型ミクログリア細胞を用いた実験系の構築

研究分担者 加藤 隆弘 九州大学 准教授

研究要旨

本研究は、申請者が開発したヒト末梢血誘導型ミクログリア細胞技術を用いて、神経毒性を中心とする食品安全性評価システムの開発を行うことを目的としている。

本年度は、ヒト末梢血誘導ミクログリア細胞を用いた毒性評価系の構築として、細胞内酵素活性を用いて毒性評価を行う測定法である WST 法の実験条件の確立を行った。

播種密度および培地交換の条件などを検討した結果、最適条件 (20 万 Cells/mL、培地交換無し) を確立できた。

昨年度確立した遺伝子解析用の実験条件と合わせて、本年度の成果により、来年度実施する金属毒性の評価にスムーズに移行できる体制が整った。

A. 研究目的

我々の脳には、様々な種類の細胞が存在しており、その中心的な役割を担っているのはニューロン（神経細胞）であることはよく知られている。しかしながら近年、グリア細胞と呼ばれるニューロン以外の細胞に注目が集まっている。特に、脳内で唯一の免疫細胞であるミクログリアは、移動し傷害部位に集まる機能（遊走能）や異物を細胞内に取り込む機能（貪食能）やサイトカインを産生する機能を有しており、他の脳細胞とは異質の細胞である。特に、胎生期から発達期には、神経の分化誘導やシナプスの刈り込みにおいて不可欠な存在であり、次第に樹状に突起を伸展した Ramified 様の形態へと変化し、静止型として脳内の微細な環境変化を監視し続けている。最近では、定常的にシナプスの監視やシナプスの形成にも関与していることが報告されている (Miyamoto, A., et al., Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex,

Nat. Commun. 2016)。

さらに興味深いことに、ミクログリアは血液脳関門の透過性に影響していることも近年明らかにされた (Haruwaka K, et al., Dual microglia effects on blood brain barrier permeability induced by systemic inflammation, Nat. Commun., 2019)。このように、ミクログリアは様々な精神神経疾患の病態への関与が示唆されている極めて重要な脳細胞である (Salter, M. W., and B. Stevens, Microglia emerge as central players in brain disease, Nat Med, 2017)。

それでは、ヒトのミクログリアを用いて実験すれば良いのだが、生検によって中枢神経系からミクログリアを分離し、実験を行うには極めて高いハードルが存在している。その一方で我々は、ヒト由来細胞を用いたミクログリアのトランスレーショナル研究の重要性を以前から認識しており、末梢血の単球からミクログリア細胞を作製する技術を開発し、ヒトのミクログリアをターゲットと

するトランスレーショナル研究を推進してきた。

末梢血誘導型ミクログリア細胞は、通常採血で得られる末梢血から単球を分離し、GM-CSF（顆粒球マクロファージコロニー刺激因子）とIL-34（インターロイキン 34）の 2 種類のサイトカインを添加して 2 週間培養するだけで作製することが可能である（図 1）。当然ながら我々は、末梢血誘導型ミクログリア細胞がヒトのミクログリア細胞としての性質を有しており、単球やマクロファージとは異なる細胞であることを確認している（Ohgidani M. et al., Direct induction of ramified microglia-like cells from human monocytes: Dynamic microglial dysfunction in Nasu-Hakola disease, Sci Rep, 2014）。また、食食能やサイトカイン産生能といったミクログリアとしての細胞機能も有しており、細胞・分子レベルでの解析が可能である。

本研究では、我々が開発した末梢血誘導型ミクログリア細胞技術を用いて、食品安全分野における神経毒性の評価系を構築することを目的としている。

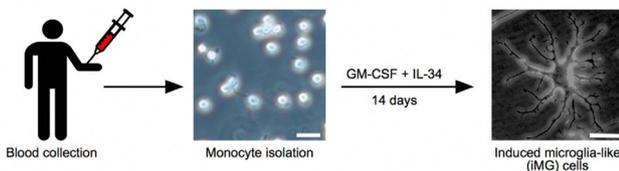


図 1) 末梢血誘導型ミクログリア (iMG) 細胞

B. 研究方法

本年度は、ヒト末梢血誘導型ミクログリア細胞を用いた毒性評価実験系の構築を行った。

ヒト末梢血誘導型ミクログリア細胞の作成は以下の手順で行った。採血した末梢血から単球を分離し、24well プレートに播種した。翌日、10ng/ml の GM-CSF と 100ng/ml の IL-34 含有 RPMI 培地に交換し、2 週間培養した。

毒性評価は、細胞内酵素の活性を測定し、生存率を算出する WST 法を用いて行う予定である。そこで、WST 法を用いた実験条件の最適化として、細胞の播種密度および培養中の培地交換の必要性を検討した。

細胞密度は、20 万、30 万、40 万 Cells/mL の条件で播種したものを比較した。培地交換は、2 週間の誘導培養中の 7 日目に全量交換、半量交換、交換無しの条件を比較した。

（倫理面への配慮）

本研究は、九州大学倫理審査委員会の承認を受け、採血に関しては、医師がインフォームド・コンセントを行い、安全面・倫理面に十分に配慮して実施した。

C. 研究結果と考察

まず、細胞の播種密度を検討した結果、20 万 Cells/mL の播種密度が WST ホルマザン（WST が細胞内酵素によって代謝された物質）に由来する吸光度が最も高い結果となった（図 2）。

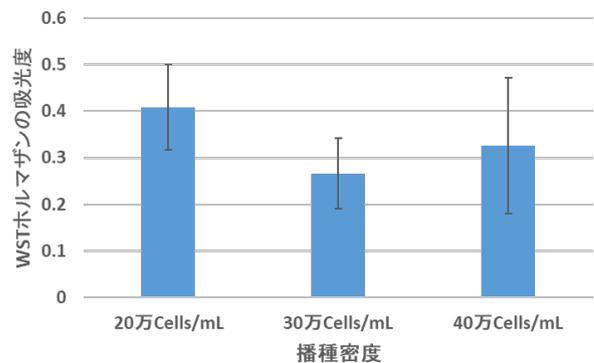


図 2) 最適な播種密度の条件検討

次に、誘導中の培地交換について、検討した。先ほどの実験で最適播種密度として見いだした 20 万 Cells/mL で細胞を播種し、誘導期間の 7 日に培地を全量交換、半量交換、交換無しの条件で比較した。吸光度測定および顕微鏡観察の結果、培地を交換しなかったものと半量交換したものに大きな差は見られなかった。しかし、全量交換した細胞は、死細胞が確認でき、吸光度も低い値となった。培地交換は培養中の細胞をインキュベーターから出し、クリーン・ベンチ内で交換操作を行うため、コストおよびコンタミネーションのリスクが増加する。そのリスクと今回の結果を総合的に鑑みると、誘導中の培地交換は不要であると判断した。

なお、今回は 2 名の被験者からミクログリア細胞を作製して実験しており、多少の個人差も確認できた。この個人差はコンパニオン診断など、より個人差を重要視した際の評価に重要であり、興味深い。ただ、今回は神経毒性評価系の構築という一般的な条件を検討するため、平均化した値で評価した。

D. 結論

本年度は、ヒト末梢血誘導型ミクログリア細胞を用いた実験系の構築に成功した。昨年度確立した遺伝子解析用の実験条件と合わせて、本年度の成果により、来年度実施する金属毒性の評価にスムーズに移行できる体制が整った。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし

別添5

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
なし					

厚生労働大臣 殿

機関名 旭川医科大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 西川 祐司

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 ヒト末梢血誘導型マイクログリア細胞技術を用いた食品の神経毒性評価システムの開発

3. 研究者名 (所属部署・職名) 医学部・講師

(氏名・フリガナ) 扇谷 昌宏・オウギダニ マサヒロ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	九州大学	<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 佐賀大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 兒玉 浩明
(公 印 省 略)

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 ヒト末梢血誘導型ミクログリア細胞技術を用いた食品の神経毒性評価システムの開発
3. 研究者名 (所属部署・職名) 医学部 客員研究員
(氏名・フリガナ) 原口 祥典 (ハラグチ ヨシノリ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

- (留意事項)
- ・該当する□にチェックを入れること。
 - ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立大学法人九州大学

所属研究機関長 職 名 総長

氏 名 石橋 達朗

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 ヒト末梢血誘導型ミクログリア細胞技術を用いた食品の神経毒性評価システムの開発

3. 研究者名 (所属部署・職名) 大学院医学研究院・准教授

(氏名・フリガナ) 加藤 隆弘・カトウ タカヒロ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	九州大学倫理審査委員会	<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。