

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 名古屋市立大学 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、3年計画の初年度であり、「マウス由来ニューロンおよびミクログリアを用いた実験系の基礎構築」を年度目標として設定し、研究を実施した。本年度の目標である実験系の基礎構築はほぼ完了し、本年度の成果として、(1) ニューロンに対する毒性評価、(2) ミクログリアに対する毒性評価、(3) ニューロンとミクログリアの毒性比較、(4) ミクログリアの細胞機能（遊走能）に対する影響、(5) ミクログリアの細胞機能（食食能）に対する影響、(6) ミクログリアのカルシウムイメージング実験系の構築（分担研究者：原口）、(7) 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（分担研究者：加藤）に成功した。

本年度の成果として金属元素は、ミクログリアに対する毒性および細胞機能に種々の影響を及ぼすことが明らかとなった。加えて、その作用はニューロンと異なることが今回初めて明らかとなった。本年度で得られた成果は、次年度以降に予定している共培養実験の基盤となるデータであり、次年度以降の研究計画がスムーズに行える状況となった。

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・講師

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非常に重要な因子である。

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ンスを保っており、細胞の内外でも厳密に調整さ

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

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

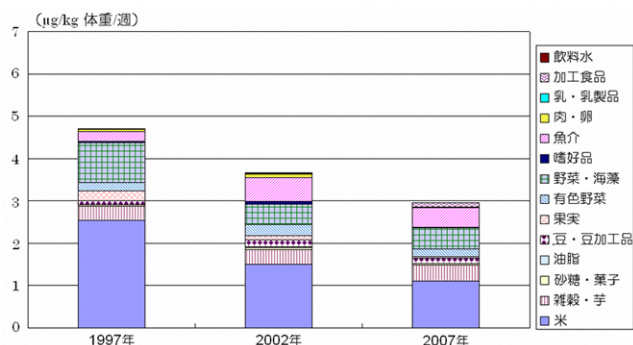


図1) 食品からのカドミウム摂取量の経年変化
厚生労働省ホームページより引用

(<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)。

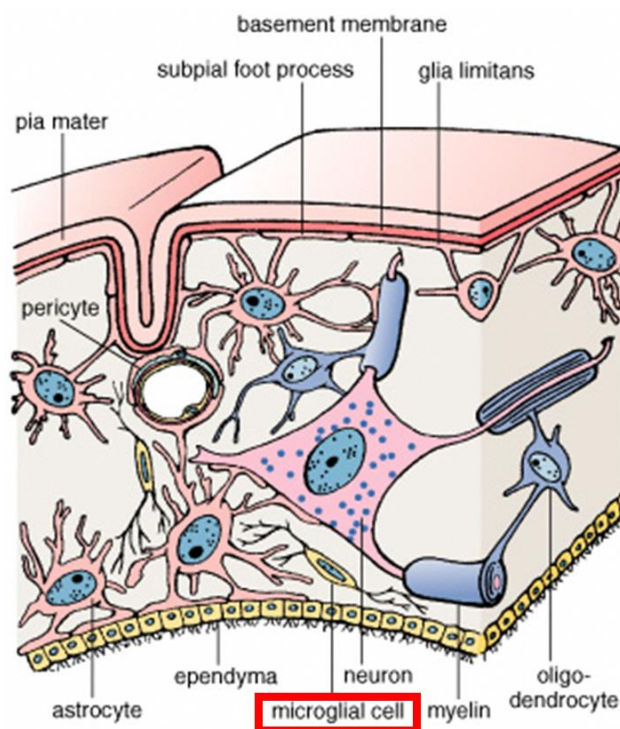


図2) 脳に存在する細胞

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、近年その重要性が注目され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) ニューロンに対する毒性評価

ニューロンに対する毒性試験は、酵素活性測定法である WST-8 法を用いて行った。Neuro2A 細胞を 2×10^4 cells/ml で 96well プレートに播種し、翌日、各金属元素 (リチウム、カリウム、ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、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、カドミウムおよびアルミニウム) を添加した。24 時間後に WST-8 を添加し、2 時間後に 450nm の吸光度をプレートリーダーを用いて測定した。得られた吸光度から、金属未添加の細胞群を生存率 100%として、細胞増殖抑制率を算出した。毒性評価の指標として一般的に用いられる 50%細胞増殖抑制濃度 (IC50) を算出し、評価

を行った。

(2) ミクログリアに対する毒性評価

ミクログリアに対する毒性試験は、酵素活性測定法である WST-8 法を用いて行った。BV2 細胞を 2×10^4 cells/ml で 96well プレートに播種し、翌日、各種金属元素 (リチウム、カリウム、ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、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) を添加した。24 時間後に WST-8 を添加し、2 時間後に 450nm の吸光度をプレートリーダーを用いて測定した。得られた吸光度から、金属未添加の細胞群を生存率 100%として、細胞増殖抑制率を算出した。毒性評価の指標として一般的に用いられる 50%細胞増殖抑制濃度 (IC50) を算出し、評価を行った。

(3) ニューロンとミクログリアの毒性比較解析

方法 (1) および (2) で得られた結果を基に、IC50 ベースで毒性の比較解析を行った。

(4) ミクログリアの細胞機能 (遊走能) に対する影響

ミクログリアにおける遊走能の評価は、タイムラプスイメージングにより経時的な細胞移動を定量した。BV2 細胞を 2×10^4 cells/ml でガラスボトムディッシュに播種し、翌日、金属元素を添加した。24 時間後にインキュベーションユニットを接続した顕微鏡にセットし、3 時間のタイムラプスイメージングを行った。撮像した動画をモーションキャプチャーソフトを用いて細胞の移動を定量化し、解析を行った。

(5) ミクログリアの細胞機能 (食食能) に対する影響

ミクログリアにおける食食能の評価は、FITC 標識ビーズを添加し、イメージサイトメーターを用いて定量を行った。BV2 細胞を 2×10^4 cells/ml

で 24well プレートに播種し、翌日、金属元素を添加した。24 時間後に FITC 標識蛍光ビーズを添加し、6 時間後にスクレーパーを用いて細胞を回収した。イメージサイトメーターを用いて細胞当たりの蛍光ビーズ取り込み量を算出し、解析を行った。

(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

(1) ニューロンに対する毒性評価

ニューロンに各金属元素を添加し毒性評価を行ったところ、IC50 ベースでマンガン>カドミウム>銅>ガドリニウム>亜鉛>ニッケル>コバルト>鉄>リチウム>カルシウム>カリウム>マグネシウム>ナトリウムの順に毒性が高いことが明らかとなった(図 3)。また、今回の設定濃度においては、アルミニウム、クロムの毒性は見られなかった。

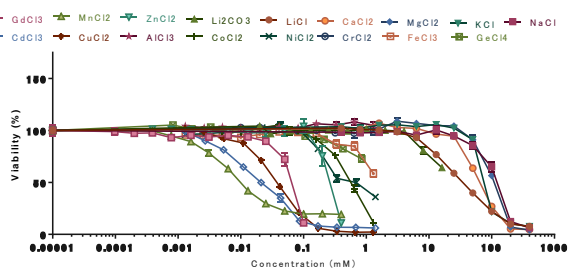


図 3) 金属元素のニューロンに対する毒性評価

(2) ミクログリアに対する毒性評価

ミクログリアに各金属元素を添加し毒性評価を行ったところ、IC50 ベースでカドミウム>マンガン>ガドリニウム>銅>コバルト>ニッケル>鉄>亜鉛>リチウム>カリウム>カルシウム>マグネシウム>ナトリウムの順に毒性が高いことが明らかとなった(図 4)。また、今回の設定濃度にお

いては、アルミニウム、クロムの毒性は見られなかった。興味深いことに、低濃度において多くの金属元素で細胞賦活効果(生存率の増大)が見ら

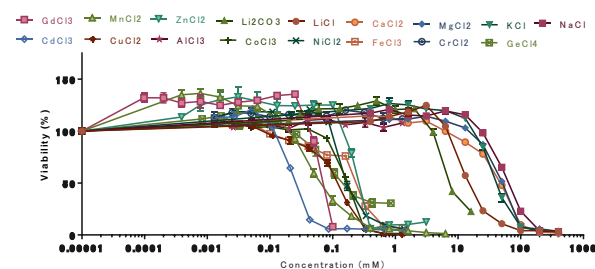


図 4) 金属元素のミクログリアに対する毒性評価

れた(図 4)。

(3) ニューロンとミクログリアの毒性比較解析

毒性試験の結果から、①ニューロンとミクログリアでほぼ同程度の毒性を示す金属としてカドミウム、ガドリニウム、亜鉛、カルシウム(図 5)、②ニューロンの方により強い毒性を示す金属としてマンガン、銅(図 6)、③ミクログリアの方により強い毒性を示す金属としてコバルト、リチウム、マグネシウム、鉄、ニッケル、カリウム、ナトリウム(図 7)が明らかとなった。

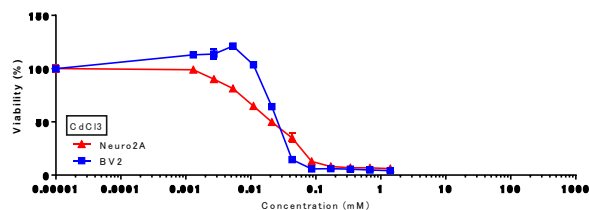


図 5) ニューロン(赤線)とミクログリア(青線)で同程度の毒性(IC50)を示すカドミウム

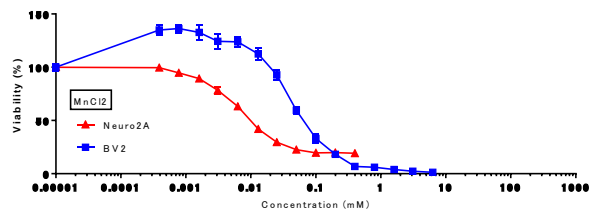


図 6) ニューロン(赤線)の方により強い毒性(IC50が低い)を示すマンガン

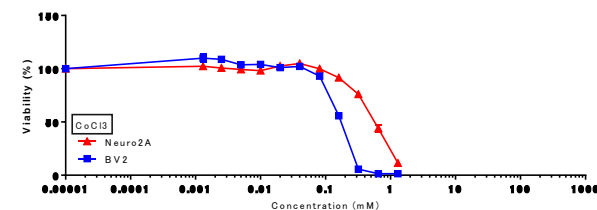


図 7) ミクログリア(青線)の方により強い毒性(IC50が低い)を示すカドミウム

(4) ミクログリアの細胞機能（遊走能）に対する影響

ミクログリアの重要な細胞機能の一つに遊走能がある。金属元素を添加しタイムラプスイメージングで細胞をトレースした結果、金属種によって遊走能に異なる影響がみられた（図 8）。現在、詳細にパラメーターを解析中である。

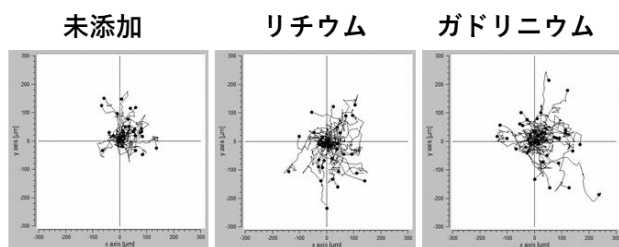


図 8) ミクログリアの遊走能（軌跡は細胞の移動を示す）に及ぼす金属元素の影響

(5) ミクログリアの細胞機能（食食能）に対する影響

近年、ミクログリアがニューロンのシナプスを食食することが脳機能に重要であることが報告され、注目されている。金属元素を添加した際のミクログリアの食食能を測定した結果、食食能に異なる影響が見られた。現在、詳細にパラメーターを解析中である。

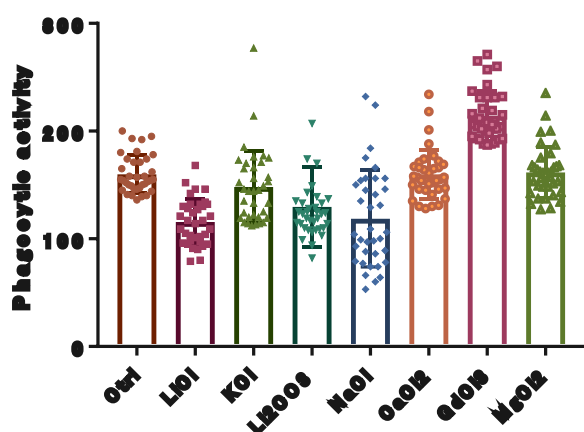


図 9) ミクログリアの食食能に及ぼす金属元素の影響

D. 考察

毒性試験の結果、①ミクログリアとニューロンではほぼ同様の毒性を示す金属元素（カルシウム、カドミウム、ガドリニウム、亜鉛）、②ニューロンの方により強い毒性を示す金属元素（マンガン、銅）、③ミクログリアの方により強い毒性を示す金属元素（リチウム、マグネシウム、コバルト、鉄、ニッケル、カリウム、ナトリウム）が明らかとなった。

ミクログリアとニューロンでは毒性が異なる金属元素（上記②と③）が存在しており、ミクログリアの方がニューロンよりも高い毒性を示す金属種が多く存在した。これは、ミクログリアの方がニューロンよりも金属元素に対する感受性が高い可能性を示唆している。さらに、IC50 ベースでは同程度の毒性を示したカドミウムにおいても、低濃度においてはニューロンに対する毒性が高い傾向を示したが、高濃度では逆にミクログリアに対して高い毒性を示した（図 5）。

また、近年その重要性が注目されているミクログリアの細胞機能（遊走能・食食能）においても金属元素の影響を受け、金属種によって作用が異なることが明らかとなった。

これらの結果は、ニューロンとミクログリアで金属元素に対する毒性を含む感受性に違いが存在していることを意味しており、食品安全の分野において従来のニューロンのみを対象にしていた研究だけでは神経毒性の評価は不十分であることを示唆している。

E. 結論

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。

本年度は、ニューロンおよびミクログリア単体での評価を行い、実験基盤の構築が達成された。

次年度に予定しているニューロンとミクログリアの共培養系は、本年度に構築した実験基盤を用いて初めて実施可能となるものであり、本年度の成果は、次年度に活用されるものである。

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