

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

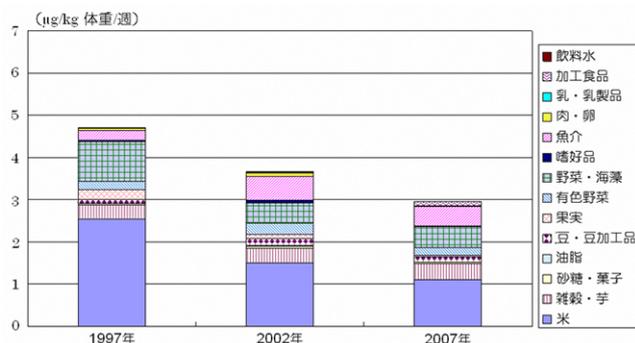


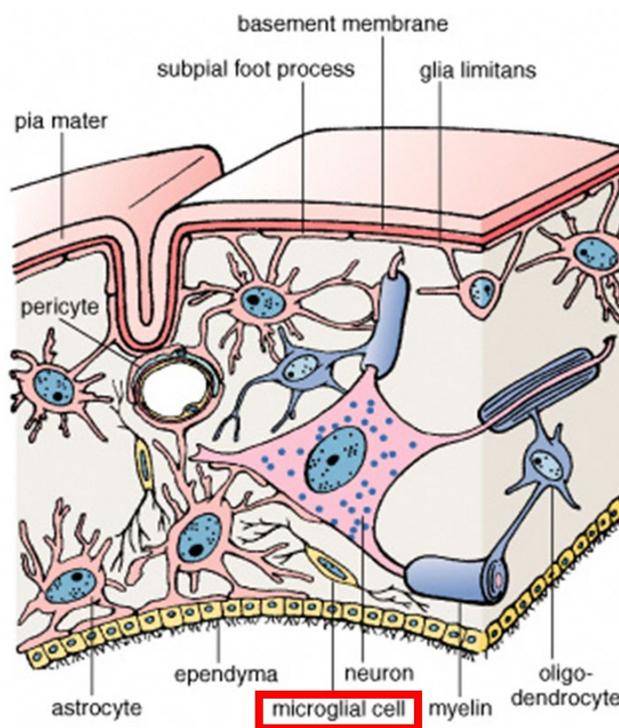
図1) 食品からのカドミウム摂取量の経年変化  
厚生労働省ホームページより引用

(<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)。

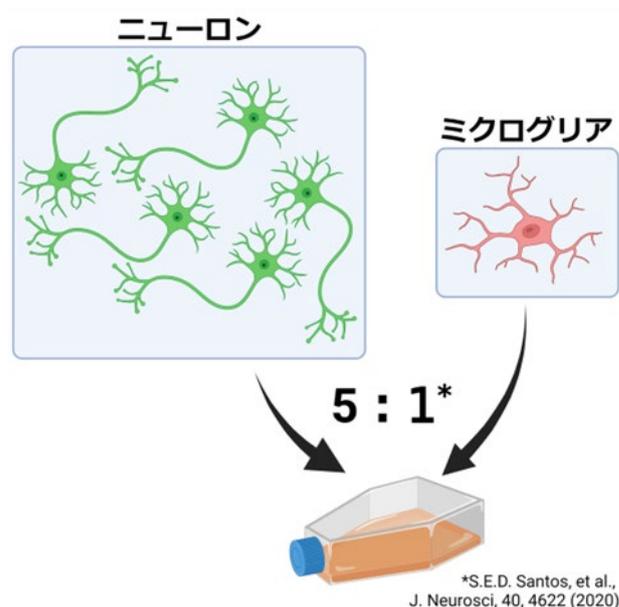


図 3) 本研究で用いた共培養系

### (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)。

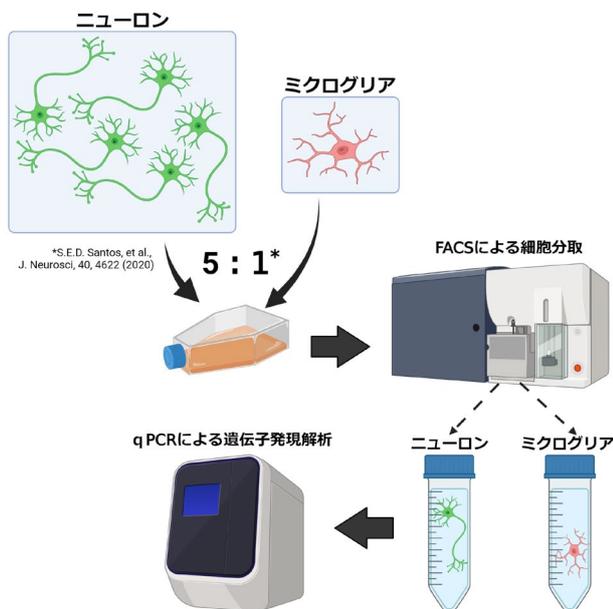


図 4) FACS を用いた細胞分取と遺伝子解析方法

### (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)

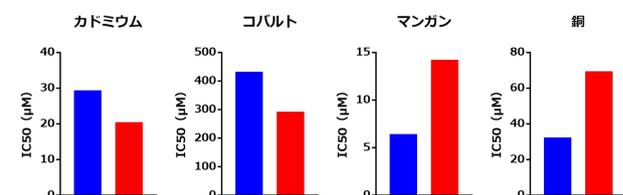
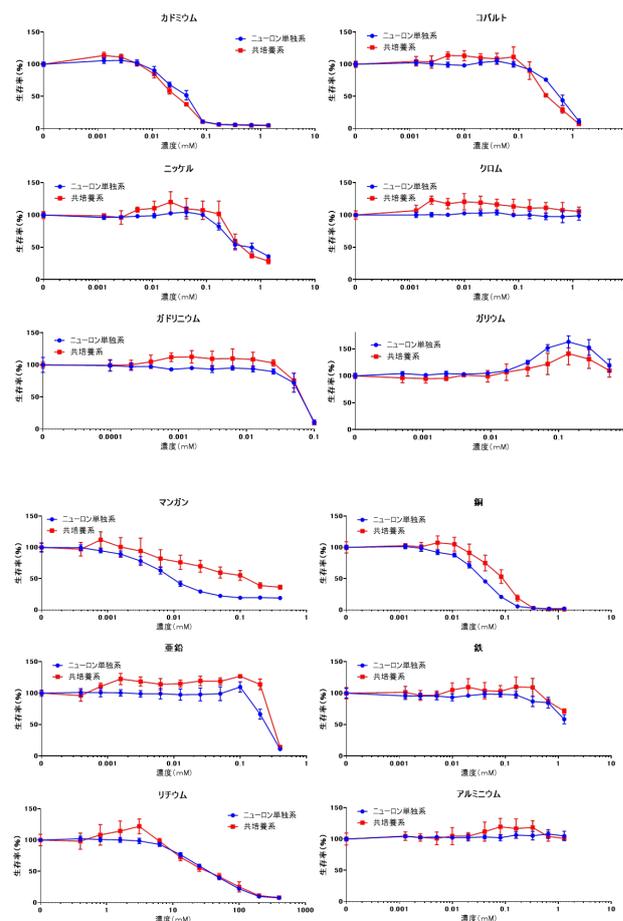
本研究は、株化細胞のみを用いた実験であり、倫理面において特筆すべき事項は存在しない。

## 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 $\alpha$ 、CD86、IL1 $\beta$ 、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)。

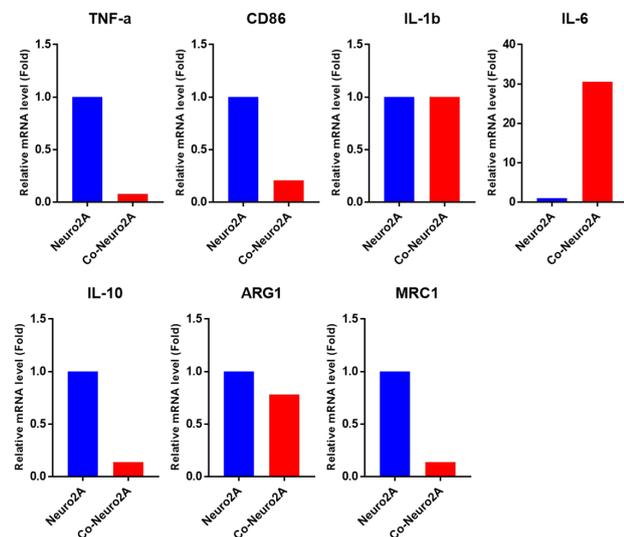


図 6) 単独培養および共培養後でのニューロンにおける各種遺伝子発現

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。

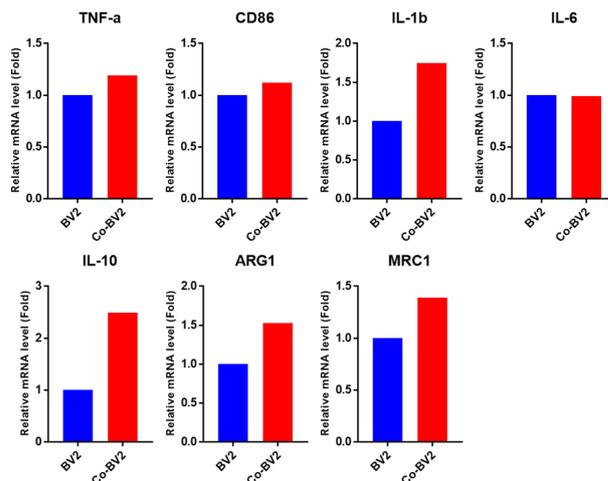


図 7) 単独培養および共培養後でのミクログリアにおける各種遺伝子発現

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