

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いる。その中でも神経毒性は重篤な症状を引き起こし、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、ニューロンと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年計画の最終年度であり、R2からR3年度で実施した基礎的検討を礎にヒト由来細胞での検討を行った。特に本研究では、ヒアリング時に委員の先生方から「ミクログリア+ニューロンの評価系を目指せばより望ましい」との貴重なコメントを頂き、共培養系での評価を最終目標として研究を実施してきた。

最終年度である本年度において、研究分担者である原口および加藤と共に、最終目標であったヒト由来細胞での共培養系を構築することに成功し、共培養系が重要であることを示唆する知見を得ることができた。加えて、神経毒性に個人差が存在している等の可能性も示され、副次的にも重要な知見を得ることができた。

今回、共培養系を用いて初めて明らかになった複雑な事象は、今後の研究課題として推進する必要があるが、ヒト由来細胞での共培養評価系の構築という最終目標に対しては到達できたと考えられる。

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

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、我々は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

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

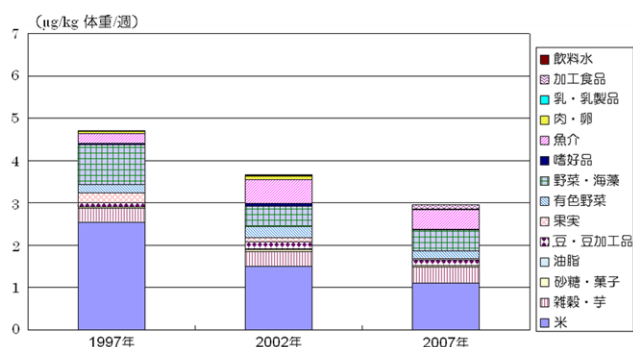


図1) 食品からのカドミウム摂取量の経年変化  
厚生労働省ホームページより引用

(<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,

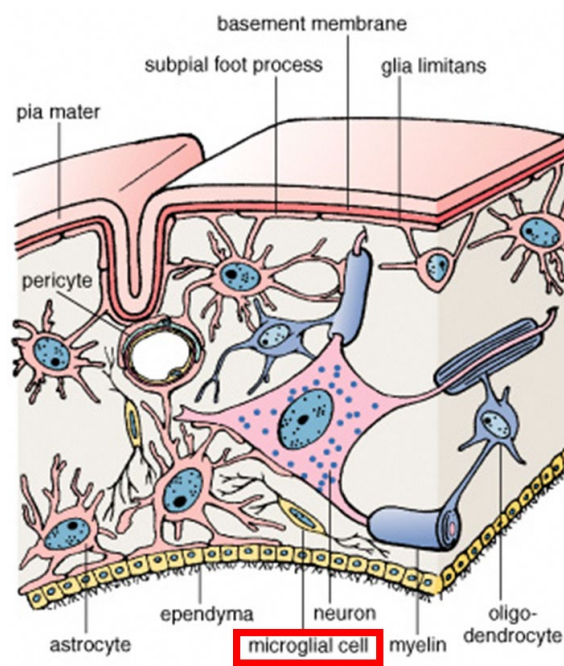


図2) 脳に存在する細胞

Ross MH, Histology 4th Edition より引用

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)。

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

ヒト由来ニューロンは、文献 (Fujii H, et al., Brain Res. 1613, 59-72 (2015)) を参考に間葉系幹細胞から誘導した。ニューロンへの誘導は 2 段階で行った。まず、DMEM の基本培地に N2 サプリメントと塩基性線維芽細胞成長因子と上皮成長因子を加えた誘導培地で培養した。その後、Neurobasal Medium を基本培地として B27 サプリメント、サイクリック AMP、L アスコルビン酸、イソブチルメチルキサンチンを加えた誘導培地で培養し、間葉系幹細胞からニューロンを誘導した。

ヒト由来ミクログリアは、文献 (Ohgidani M. et al., Sci Rep, 4, 4957 (2014)) を参考に、単球から

誘導した。単球を RPMI を基本培地として顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、インターロイキン 34 を加えた誘導培地で培養し、ミクログリアを誘導した。

### (2) 使用金属

実験に使用した金属は、カドミウム、コバルト、マンガンおよび銅の塩化物を使用した。前年度までの基礎検討で、上記 4 種類の金属がニューロン単独と共培養系で IC50 値に比較的大きな差が認められたため使用した。

### (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 (図 3)。

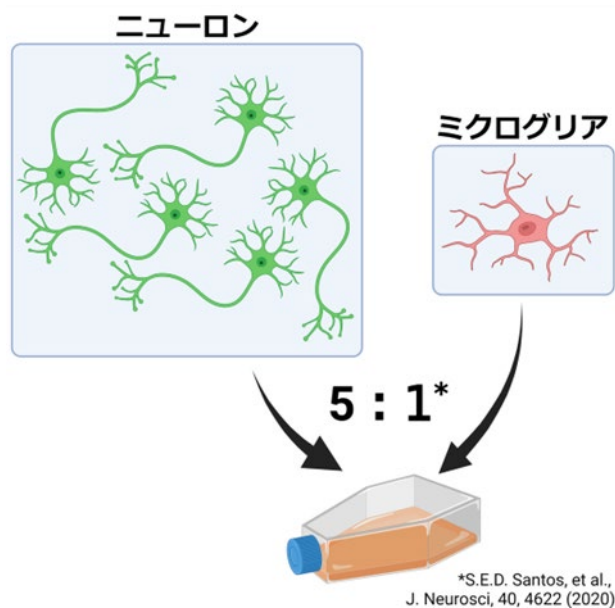


図 3) 本研究で用いた共培養系

ニューロンおよびミクログリアの共培養系は、上記で作成したニューロンおよびミクログリアを用いた。ニューロンを 96well プレートで作成し、10cm ディッシュで作成したミクログリアをニューロンのプレートに播種し、オーバーナイトの培養後実験に用いた。

#### (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。

(倫理面への配慮)

本研究は、倫理審査委員会の承認を受け、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

#### (1) ヒト由来ニューロンの作成と毒性評価

ヒト由来ニューロンは、複数の方法を検討した結果、間葉系幹細胞から誘導する方法を採用した。理由としては、①ニューロンとして確立された手法であること、②公的細胞バンクから幹細胞の入手が可能であること、③ニューロンへの誘導日数が短期 (1 週間) であることが挙げられる。iPS 細胞由来のニューロンは多くの研究で用いられているが、誘導に長期間 (数週間から数ヶ月) を必要とし、細胞の管理がデリケートであるため高い技術力が必要となる。本研究課題は神経毒性のスクリーニングにおける評価系構築が目的であるため、実学的な観点からも iPS 細胞ではなく、間葉系幹細胞由来のニューロンを採用した。

ニューロンの作成は (研究方法 B-1) に記載の方法で作成し、96well プレートを用いたハイスルー

ット可能な評価系を構築できた。(図 4)

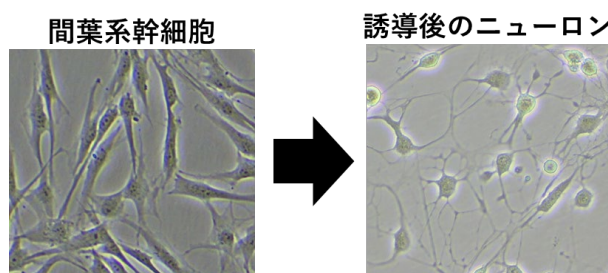


図 4) ヒト由来ニューロンの作成

ニューロン単独での毒性評価の結果、金属種によって毒性が大きく変化することが明らかとなった。金属種間での比較で興味深いのは、カドミウムに対する毒性が他の金属と比べて耐容量が比較的大きいことがあげられる。(図 5)

今回は 2 名のドナー由来の間葉系幹細胞からそれぞれニューロンを作成し、実験に用いた。その結果、本実験で使用した 4 種すべての金属種において IC50 の値が異なっており、毒性に個人差が存在している可能性が示唆された。(図 5)

この現象は実臨床を考えた場合に当然であることは理解できるが、実際に evidence として差異が明らかになったことは極めて重要な知見である。本知見は、これまでの株化細胞や齧歯類を用いた実験系では明らかにできなかった事実であり、真の (より生体を反映した) 神経毒性評価系にヒト由来細胞系が重要であることを示唆している。

#### (2) ヒト由来ミクログリアの作成と毒性評価

ヒト由来ミクログリアは、研究代表者が開発した手法であり (研究方法 B-2) に記載の方法で作成した。96well プレートを用いたハイスルーット可能な評価系はこれまでに行っていなかったが、本研究課題 (R2-R3 年度) によって最適化することに成功した。(図 6)

ミクログリア単独での毒性評価の結果、金属種によって毒性が大きく変化することが明らかとなった。興味深い知見として、ニューロンよりも各種金属 (コバルトを除く) に対する毒性感受性が

圧倒的に高い可能性が示された (図 5)。通常の培養実験において、グリア細胞とニューロンではニューロンの方が圧倒的にデリケートな対応が必要であることが多い。しかし、本結果ではマイクログリアの方が金属毒性に sensitive であることが明らかとなった。特にカドミウムに関してはかなり差異が大きい。本結果を単純に適用することはできないが、イタイイタイ病の病態にマイクログリアが影響を及ぼしている (もしくは、受けている) 可能性が考えられる。

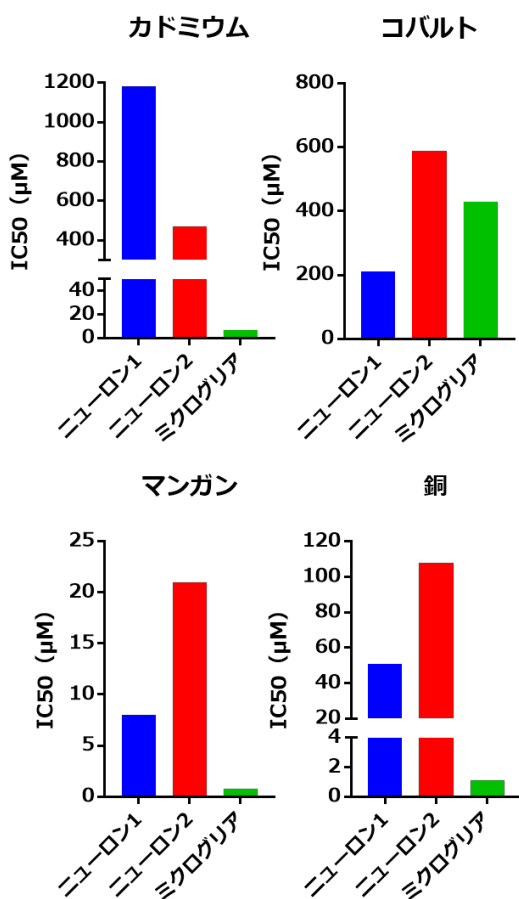


図 5) ニューロンおよびマイクログリア単独での毒性評価

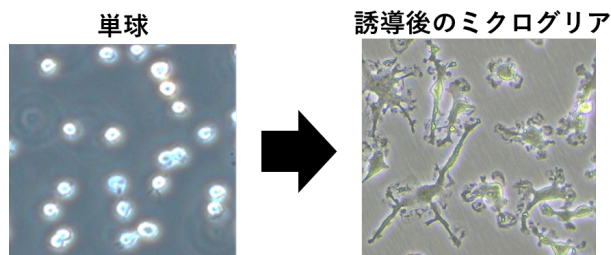


図 6) ヒト由来マイクログリアの作成

### (3) ヒト由来ニューロンおよびマイクログリア共培養系の作成と毒性評価

ヒト由来ニューロンおよびマイクログリアを用いた共培養系は (研究方法 B-3) に記載の方法で作成した。

共培養系での毒性評価の結果、金属種によって毒性が大きく変化することが明らかとなった。加えて、それぞれの単独培養と比べて毒性が大きく異なる傾向がみられた。(図 7) これらの知見は、ニューロン・マイクログリア、それぞれ単独培養のみでは十分な毒性評価を行えていない可能性を示唆しており、共培養系による評価が重要であることを示している。

一方、共培養系でみられた現象は、単にニューロンとマイクログリアの毒性を平均化したという単純なものではなかった。例えば、マンガンやコバルトでは共培養系にすることでニューロン・マイクログリアの単独培養よりも IC50 が増大する (毒性が低下する) という現象が起きている。またこれらの反応は金属種によって異なっている。つまり、共培養系で起きている現象は非常に複雑な相互作用による可能性も示唆された。事実、マイクログリアは、ニューロンに対し保護的にも攻撃的にも影響を及ぼすことが知られている。これらの知見に関しては今後の継続的な研究が必要であり、大変興味深い。

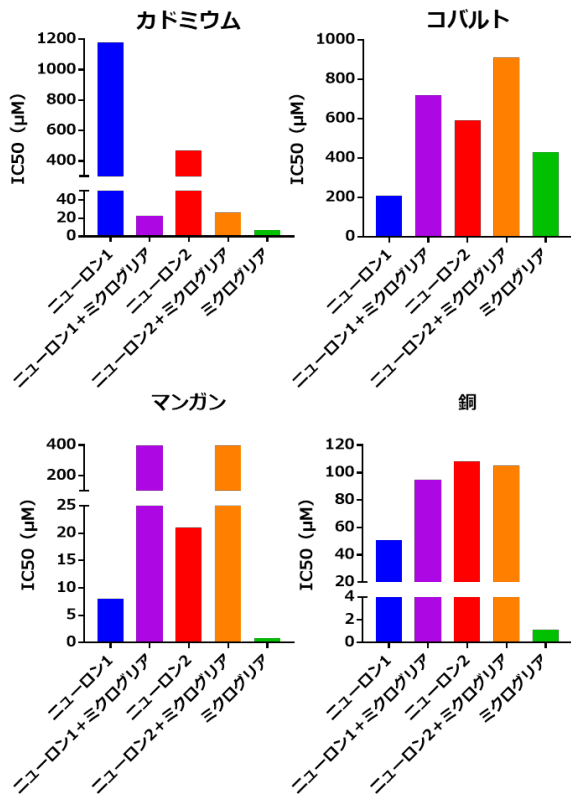


図 7) 共培養系による毒性評価

#### D. 結論

本年度は3年計画の最終年度であり、R2 から R3 年度で実施した基礎的検討を礎にヒト由来細胞での検討を行った。特に本研究では、ヒアリング時に委員の先生方から「ミクログリア+ニューロンの評価系を目指せばより望ましい」との貴重なコメントを頂き、共培養系での評価を最終目標として研究を実施してきた。

最終年度である本年度において、最終目標であったヒト由来細胞での共培養系を構築することに成功し、共培養系が重要であることを示唆する知見を得ることができた。加えて、神経毒性に個人差が存在している可能性が示され、副次的にも重要な知見を得ることができた。

今回、共培養系を用いて初めて明らかになった複雑な事象は、今後の研究課題として推進する必要があるが、ヒト由来細胞での共培養評価系の構

築という最終目標に対しては到達できたと考えられる。

なお、今回示唆された神経毒性に対する個人差の可能性は非常に重要であり、どの程度の差が存在するのかを、2名だけではなく複数名の規模で明らかにする必要がある。これが明らかになると日本人における神経毒性のキャパシティレンジを知ることができる。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 学会発表 合計 3 件

- 1) 種類：学会発表。発表者：扇谷昌宏。学会名：第 26 回グリア研究会。日時：2022 年 12 月 3 日。会場：名古屋市。
- 2) 種類：学会発表。発表者：扇谷昌宏。学会名：第 44 回日本生物学的精神医学会。日時：2022 年 11 月 4 日。会場：東京。
- 3) 種類：学会発表。発表者：扇谷昌宏。学会名：第 35 回日本動物実験代替法学会。日時：2022 年 11 月 18 日。会場：静岡。

##### 市民向け説明会 合計 2 件

- 1) 種類：研修会での講演。発表者：扇谷昌宏。講義名：旭川市放課後児童クラブ支援員研修会。日時：2022 年 10 月 26 日。場所：オンラインで実施。
- 2) 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：2023 年 2 月 1 日。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