

幹細胞を利用した代替法開発 — *in vitro* 神経毒性評価法 —

住友化学株式会社 生物環境科学研究所

小林 久美子

はじめに

近年、欧州REACH (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals) や日本の化審法 (化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律) では、既存化学物質を含む全ての化学物質を対象として、数量に応じたリスク評価を行う事が求められている^{1), 2)}。従って、膨大な数の化学物質の安全性評価が必要となり、動物福祉や評価の効率化の観点から実験動物を用いない各種代替法の開発が進められている。代替法開発の一環として当社は2011年から5年間、経済産業省のプロジェクト「石油精製物質等の新たな化学物質規制に必要な国際先導的有害性試験法の開発」に参画し、*in vitro*神経毒性試験法の開発を行った。

ところで、神経細胞により構成される脳は運動・記憶・思考などの情報伝達機能を制御する組織であり、化学物質の神経細胞への影響 (神経毒性) を調べることはヒト健康影響を評価する上で重要な項目の一つと

なっている。その神経毒性は、化学物質の「神経細胞の形態 (構造)」と「神経細胞の情報伝達機能」に対する影響を調べる事で評価できる³⁾。

胎児期から幼児期頃における神経回路形成期に、神経細胞は、その産生 (神経への分化)、増殖、神経突起の伸長・結合などを活発に行う事で神経回路を形成する。化学物質への曝露がこの時期に起こると、神経細胞の産生や神経突起の伸長等の「神経細胞の形態」に影響を及ぼす一方、神経回路形成後での曝露では加えて「神経細胞の情報伝達機能」にも影響を及ぼすと考えられている⁴⁾。

そこで、*in vitro* (試験管内) で上記の多様な神経毒性を幅広く捉える為に、マウスES細胞 (embryonic stem cells) を活用し、*in vivo* (生体内) の神経発達過程を*in vitro*で再現した。神経回路形成期の「神経細胞の形態」への影響を評価する為に、①神経分化、及び、②神経突起伸長を指標とし、又、神経回路形成後の「神経細胞の情報伝達機能」への影響評価では、

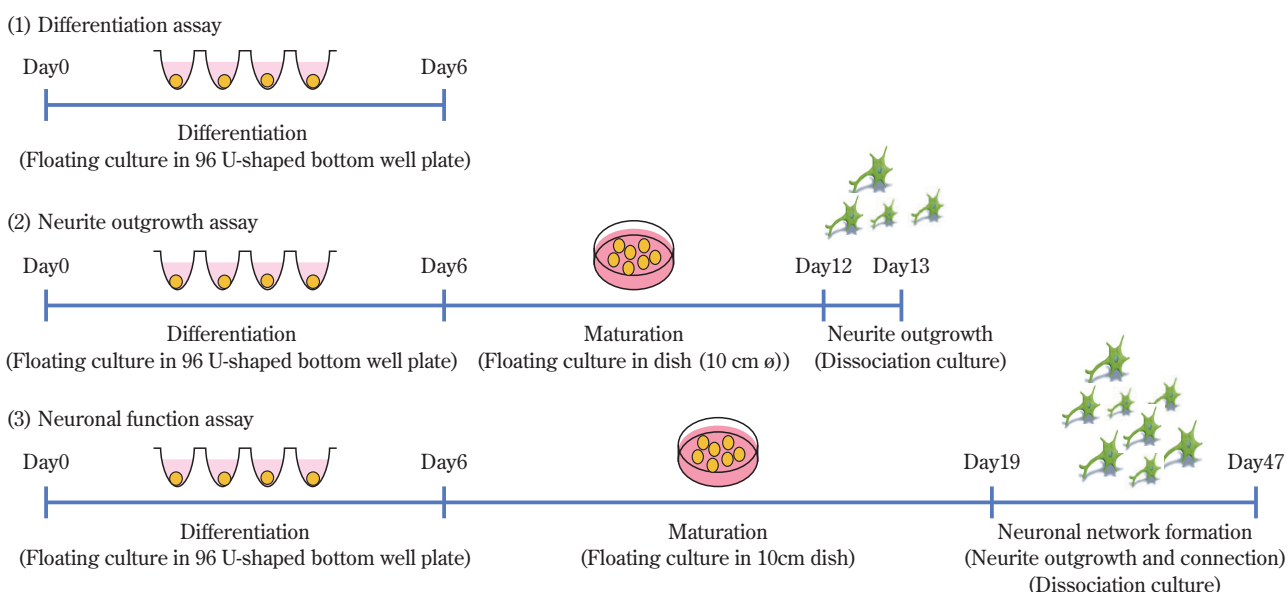


Fig. 1 Three *in vitro* neurotoxicity assays using mouse ES-induced neurons

③神経細胞の電気活動機能を指標に用いる事とした。

マウスES細胞からの神経細胞作製

ES細胞は試験管内でさまざまな細胞に分化する能力を持っている。我々はマウスの受精卵から作製したES細胞から、球状の細胞塊（胚様体）を経て神経細胞へと分化する神経細胞作製方法を確立した。本分化誘導法を基盤技術として、以下の各評価法の開発を行った（Fig. 1）。

「神経細胞の形態」評価法1：神経分化への影響評価法の開発

神経細胞への分化に重要な役割を果たす遺伝子の発現量の変化を指標として分化への影響を評価した。我々は、神経分化の際に発現が誘導されるTubb3及びReIn遺伝子に着目し、その発現量と相関して発光量に変化する「光るES細胞（Tubb3_Luc細胞及びReIn_Luc細胞）」を作製した。この「光るES細胞」を用いた種々の検討により、化学物質による神経分化への影響を迅速かつ簡便に評価できる方法を構築した。具体的には、前述の分化誘導法で培養した「光るES細胞」に化学物質を添加し、分化開始後6日間、細胞からの発光量を測定するという簡便な方法である。神経回路形成期の神経細胞に毒性を引き起こすことが報告されているホウ酸では、本評価法で低濃度から発光量の低下が認められ、毒性がないとされているエチレングリコールエチルメチルエーテルでは発光量に影響は認められず、期待通りの結果が得られた（Fig. 2）。神経毒性の15陽性

物質、17陰性物質について同様の評価を行った結果、Tubb3_Luc細胞及びReIn_Luc細胞での全体の予測率（陽性・陰性物質を正しく判定した割合）は、それぞれ72%及び80%と良好であった。

「神経細胞の形態」評価法2：神経突起伸長への影響評価法の開発

細胞イメージアナライザーにより神経細胞の形態を高速かつ簡便に自動測定し、神経突起伸長への影響を評価する手法の開発を行った。まず、複雑な神経細胞の形態を自動認識させる為に細胞密度や染色方法を最適化した。次いで、神経細胞の染色像を自動撮影し、神経突起と細胞体を区別するパラメータを神経細胞の線の連続性、長さ、太さ等から設定し、神経突起の長さを自動定量できる方法を開発した。この自動定量法を用い、ES細胞分化開始後12日目に化学物質を添加し、24時間後に伸長した神経突起の長さから毒性の有無を判定する評価法を構築した（Fig. 3）。本手法を用いて、ヒトの疫学的調査で子供の脳の成長に影響を及ぼすことが報告されている（メタ）亜ヒ酸ナトリウムや塩化メチル水銀（II）を含めた神経毒性を有する化学物質、及び、サッカリンやドデシル硫酸ナトリウム等の神経毒性を示さない化学物質について評価した。塩化メチル水銀（II）では、神経突起の長さの低下から神経突起伸長の抑制が示唆されたが、サッカリンでは神経突起の長さへの影響は認められなかった（Fig. 4）。14陽性物質及び11陰性物質について評価した結果、全体の予測率は84%であった。

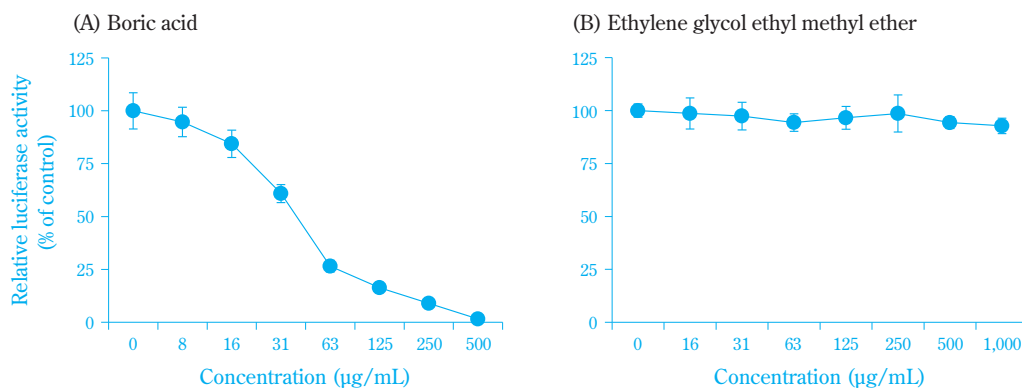


Fig. 2 Luciferase activity of ReIn-Luc cells treated with boric acid (A: positive chemical) and ethylene glycol ethyl methyl ether (B: negative chemical) during the differentiation period day 0 to 6. Data represent the mean \pm S.D. (n=6). Control: non-treated cells

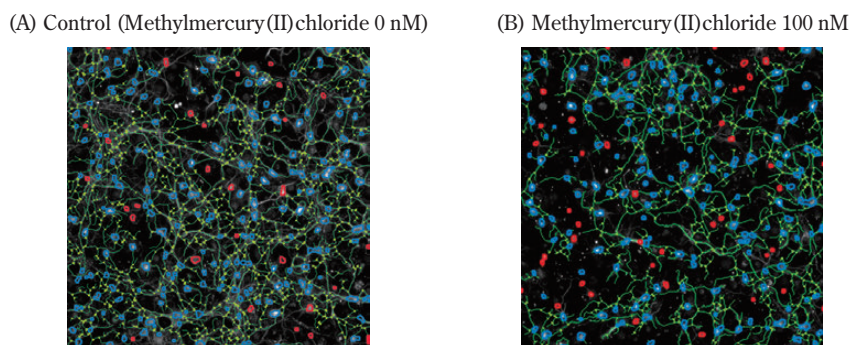


Fig. 3 Automatically discerned mouse ES-induced neurons using an imaging analyzer
Representative images treated with methylmercury(II)chloride 0 nM (A) and 100 nM (B), respectively.
Blue circle: alive neurons, red circle: dead cells, green lines: neurites

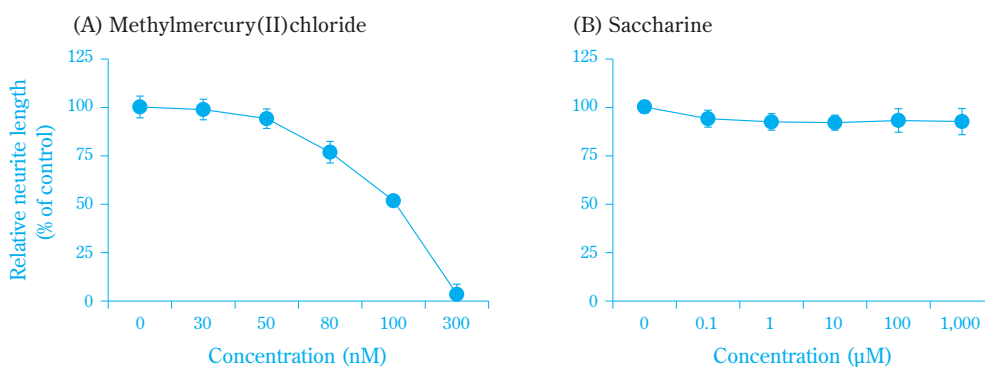


Fig. 4 Total neurite length treated with methylmercury(II)chloride (A: positive chemical) and saccharine (B: negative chemical)
Data represent the mean \pm S.D. (n=6). Control: non-treated cells

「神経細胞の情報伝達機能」評価法：神経細胞の電気活動機能への影響評価法の開発

神経細胞は電気活動により情報を伝達する為、多点電極アレイ (multi electrode array) を利用して、「神経細胞の情報伝達機能」を神経細胞の電気活動 (シグナル) として捉えて評価する手法を構築した。多点電極アレイとは64点の平面電極が装着された培養皿 (Fig. 5) のことで、この中で神経細胞を培養すると、平面電極に接触した神経細胞のシグナルを簡便に記録できるものである。

神経細胞は周りの神経細胞と結合する事で神経回路を形成し情報を伝達する。神経回路の形成には、神経細胞だけでなくグリア細胞 (神経組織を構成する神経細胞ではない細胞) が重要な役割を果たすことが知られている為、まず、両細胞を同時に誘導する培養方法を確立した (Fig. 6)。ところで、多点電極で記録され

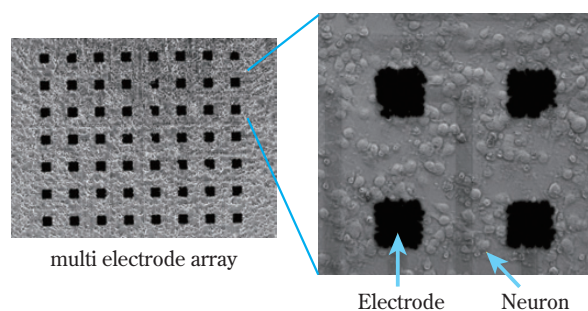


Fig. 5 Neuronal culture on multi electrode array

るシグナルは、神経回路の未形成下では、個々の細胞で独立して観測されるが、一旦、神経回路が形成されると各細胞のシグナルが同調 (同期) して観測される。この現象を利用し、培地中に添加する栄養因子や培養日数などの条件検討を通して神経回路の形成方法を

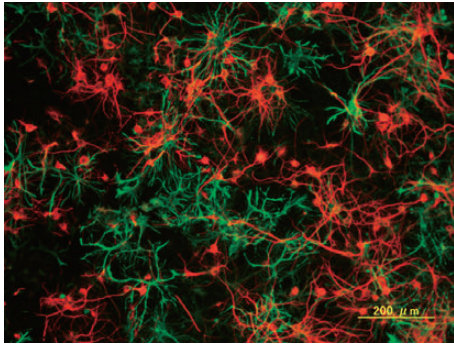


Fig. 6 Neurons and glia cells derived from mouse ES cells
Red: neurons, green: glia cells

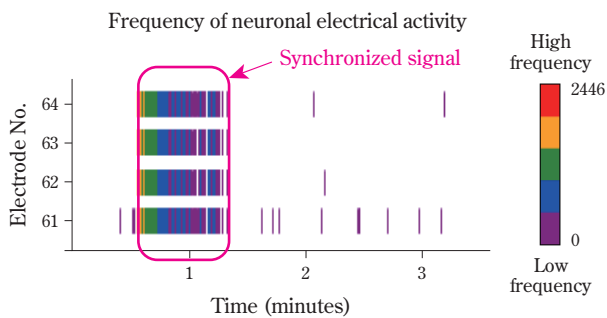


Fig. 7 Graphic representation of neuronal electrical activity occurrences on multi-electrode array
Synchronized electrical activity was observed.

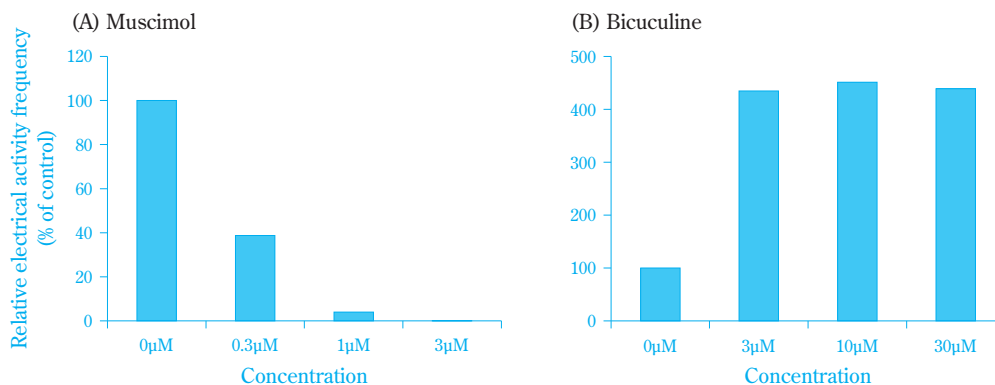


Fig. 8 Neuronal electrical activity treated with muscimol (A: neuronal activity depressant) and bicuculline (B: neuronal activity stimulant)
Control: non-treated cells

確立した。同条件下、グリア細胞が産生し始める分化開始後19日目の細胞を多点電極アレイ上で3-4週間培養しシグナルを観測した結果、神経細胞同士が結合して情報伝達機能を発現していることを示唆する「同期した電気活動」を確認することができた (Fig. 7)。神経細胞の情報伝達を抑制する化学物質ムシモール、あるいは、その情報伝達を亢進させる化学物質ビククリンを添加し、シグナルを測定した。その結果、前者では神経細胞の電気活動の減少が、後者では増加が認められた (Fig. 8)。以上の様に、マウスES細胞から作製した神経細胞を用いた化学物質による情報伝達機能への影響評価法を構築することができた。

おわりに

これまで、神経毒性評価法としては動物を用いた *in vivo* 評価法が主流であったが、近年、米国や欧州を中心に *in vitro* 評価法の構築や整備が盛んになってきている。当社でも、この技術革新の潮流に乗り遅れることなく、マウスES細胞から分化誘導した神経細胞を用いて、各種神経毒性の *in vitro* 評価法を開発した。

一般的に *in vitro* 評価法では、動物福祉に加えて、多数検体の処理、経費削減及び時間短縮など様々なメリットがある。従って、既存化学物質の規制強化への対応だけでなく、製品開発段階においても効率的に安全性の高い化学物質を見出すことに活用できる。今後、更なる検証を通して予測率の向上に努め、当社製品の開発・維持の為に、今回開発した *in vitro* 神経毒性評価法を活用してゆきたい。

引用文献

- 1) 経済産業省, “化審法におけるスクリーニング評価・リスク評価”, http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/kasinhou/information/ra_index.html (参照2017/3/30).
- 2) 田中 弘幸, NEW GLASS, **22** (4), 48 (2007).
- 3) “Guidelines for Neurotoxicity Risk Assessment”, *Federal Register*, **63** (93), 26926 (1998).
- 4) B. Z. Schmidt, M. Lehmann, S. Gutbier, E. Nembo, S. Noel, L. Smirnova, A. Forsby, J. Hescheler, H. X. Avci, T. Hartung, M. Leist, J. Kobilák and A. Dinnyés, *Arch. Toxicol.*, **91**, 1 (2017).