

京都大学	博士 (工学)	氏名	谷 修祐
論文題目	鉛の神経毒性に着目したヒト健康リスク評価手法の構築		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>本論文は、鉛の神経毒性を、細胞実験とPBPKモデルによるシミュレーションによって評価する手法を開発した結果をまとめたものであって、5章からなっている。</p> <p>第1章では鉛のさまざまな性質について述べるとともに鉛の毒性に対する報告を整理した。そして本研究の研究目的を定め、被験物質を酢酸鉛(II)三水和物、硝酸鉛(II)、塩化鉛(II)に設定した。</p> <p>第2章では鉛の血液脳関門への影響を調べるため <i>in vitro</i> 血液脳関門実験モデルを用い、経皮内電気抵抗測定実験と鉛透過量測定実験を行い以下の結果を得た。</p> <p>(1)豚脳微小血管内皮細胞を用いた <i>in vitro</i> 血液脳関門モデルを用いた経皮内電気抵抗測定実験により、鉛化合物曝露において経皮内電気抵抗値が時間、鉛化合物濃度それぞれに依存して低下することが示された。経皮内電気抵抗値の低下により、鉛化合物曝露によって血液脳関門を形成する豚脳微小血管内皮細胞のタイトジャンクションが減少したことを示唆している。また、各鉛化合物 <math>10\mu\text{M}</math> 曝露における経皮内電気抵抗値の比較により、鉛化合物の種類によらず、同等にその値が低下していることから、鉛化合物の陰イオン部分には関係なく、鉛によって経皮内電気抵抗値が低下していることが示されている。このことは、鉛そのものが血液脳関門に影響を与えていることを示唆している。</p> <p>(2) <i>in vitro</i> 血液脳関門モデルを用いた鉛透過試験で ICP-MS を用いた測定結果から、脳側を模しているウェル側で、鉛が存在することが確認された。このことは鉛曝露によって血液脳関門が解放され、解放された血液脳関門を通過して鉛が脳に取り込まれていることを示唆している。</p> <p>(3) <i>in vitro</i> 血液脳関門モデルにおいて曝露日数と鉛の透過量に関しては直線関係を示し、鉛の透過速度係数は鉛の濃度によらず一定であることが示された。この結果はPBPKモデルを構築する際には、脳における臓器・組織-血液間分配係数が鉛濃度に関係なく一定であり、定数として決定できることを示している。</p> <p>第3章では鉛化合物の神経毒性に対する容量反応関係を明らかにするためラットおよびヒト由来のグリア細胞、神経細胞を用いた生存率試験を行い、以下の結果を得た。</p> <p>(1)鉛化合物曝露に対する神経毒性試験において鉛化合物の種類による各種細胞への生存率曲線に差異は見られなかった。</p>			

(2) 酢酸鉛(II)三水和物濃度 3mM においてそれぞれの細胞の生存率はラット由来グリア細胞 C6 で 71.8%、神経細胞 PC12 で 37.1%、ヒト由来グリア細胞 CCF-STTG1 で 74.1%、神経細胞 NT2/D1 で 0.6%を示すなど、グリア細胞と神経細胞を比較したとき、神経細胞において生存率の低下が見られた。これにより細胞腫の違いが表れることが示唆された。また、ラット由来神経細胞とヒト由来神経細胞を比較したときヒト由来神経細胞においてより生存率の低下が見られ、種差による違いが表れることが示唆された。

(3) 酢酸鉛(II)三水和物、硝酸鉛(II)濃度 10mM の曝露においてはいずれの細胞腫においても 10%以下の生存率を示した。これにより高濃度の鉛化合物曝露においては細胞毒性を示すことが示された。

(4) 本章での実験結果から鉛に対する感受性が一番高かったヒト神経細胞 NT2/D1 における細胞死への影響を及ぼさない最大鉛濃度は  $1.0 \times 10^{-6}$  [M]となった。この濃度を超えると細胞死の影響が表れると考えられ、この値を神経毒性のエンドポイントの濃度としてリスク評価に使用できると考えられる。

第 4 章では鉛に対するヒト PBPK モデルについて検討し、新たに脳のコンパートメントを加えたモデルを構築し、健康リスク評価シミュレーションを行い、以下の結果を得た。

(1) ラットにおける曝露実験データを用いて脳における臓器・組織-血漿間分配係数を再設定し、その値の生物学的根拠を検討した。

(2) 改良した PBPK モデルを用い、鉛の摂取量から脳への蓄積量を推定し、神経系に着目したリスク評価を行った。鉛の暫定週間耐容摂取量を用いてシミュレーションを行った結果、約 150 日で各臓器および血中の鉛濃度は定常状態に達した。このときの脳中鉛濃度は  $1.4 \times 10^{-7}$  [M]と推定され、ヒト神経細胞 NT2/D1 の生存率に影響を及ぼす濃度である  $1.0 \times 10^{-6}$  [M]の約 1/10 であった。

(3) ヒト神経細胞 NT2/D1 の生存率に影響を及ぼす濃度である、 $1.0 \times 10^{-6}$  [M]に達する鉛濃度を、亜慢性、急性それぞれの曝露条件下でシミュレーションより求めた。その結果、亜慢性では  $25 \mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{bw}\cdot\text{day})$ を毎日摂取することで、急性では  $1\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{bw})$ を一度に摂取することで脳中鉛濃度が設定値を超えることを示した。

第 5 章は結論であり、本論文で得られた成果について要約している。

( 論文審査の結果の要旨 )

本論文は、鉛の神経毒性を細胞実験により明らかにする手法を開発した成果をまとめたものである。得られた主な成果は以下のとおりである。

1. 豚脳微小血管内皮細胞を用いた *in vitro* 血液脳関門モデルを用いた経皮内電気抵抗測定実験により、鉛化合物曝露において経皮内電気抵抗値が時間、鉛化合物濃度それぞれに依存して低下することから、鉛化合物曝露によって血液脳関門を形成する微小血管内皮細胞のタイトジャンクションが減少することを明らかにした。また *in vitro* 血液脳関門モデルを用いた鉛透過試験で脳側を模したウェル側に鉛が取り込まれることを示した。

2. 鉛化合物の神経毒性に対する容量反応関係を明らかにするためラットおよびヒト由来のグリア細胞、神経細胞を用いた生存率試験を行い、まず、鉛化合物の種類による各種細胞への生存率曲線に差異は見られないことを示した。次に酢酸鉛(II) 3mM における生存率についてグリア細胞と神経細胞を比較したとき、神経細胞においてより大きな生存率の低下が見られたことから、細胞種によって、鉛の毒性に違いが表れることを示した。またラット由来神経細胞とヒト由来神経細胞を比較したとき、ヒト由来神経細胞においてより生存率の低下が見られたことから、種差による違いが現れる可能性を示した。

3. 脳のコンパートメントを加えた鉛に対するヒト PBPK モデルを構築し、鉛の暫定週間耐用摂取量を摂取し続けた場合、脑中鉛濃度はヒト神経細胞 NT2/D1 の生存率に影響を及ぼすと推定された濃度の約 1/10 だが、血中鉛濃度は幼児等への影響が懸念される濃度となることを示した。このように健康リスク評価シミュレーションを行い、PBPK モデルと神経細胞毒性試験結果を用いることで、ヒト神経毒性の定量的評価を行うことができる可能性を示した。

以上、本論文では、鉛の神経毒性を細胞実験と PBPK モデルを用いたシミュレーションにより評価できる可能性を示した。得られた成果は、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成23年2月23日、論文内容とそれに関連した試問を行った結果、合格と認めた。