

13 神経毒性に着目した鉛のヒト健康リスク評価に関する研究

京都大学 谷修祐 中山亜紀 米田稔 森澤眞輔

Study on the human health risk assessment focused on the neurotoxicity of lead

Kyoto University Shusuke TANI, Aki NAKAYAMA, Minoru YONEDA, Shinsuke MORISAWA

1. はじめに

鉛は約5000年前から使用されている金属であり、加工しやすさ、腐食されにくさ等の特徴を持つため産業界で幅広い用途を持ち続けている。

しかし、鉛に対するヒトの健康影響として造血系、神経系、消化器系それぞれへの影響、生殖発生毒性が報告されている。その中で神経系への影響は血中鉛濃度が高い場合に見られる鉛脳症の他に、最近では血中鉛濃度が低い小児において活動過多や知能指数のわずかな低下等が認められている¹⁾。

脳の組織と血液の間には、物質の移動に対して血液脳関門と呼ばれる防衛システムが備わっている²⁻⁸⁾。これは、脳の毛細血管の内皮細胞や規定膜の外側を包むグリア細胞などが関与するもので、血液中から、脳が必要とする物質だけを取り込んで神経細胞に届け、有害な物質は通過させないようにする仕組みである。

また、脳における神経系には大きく分けて神経細胞とグリア細胞という二種類の細胞に分けられる。神経細胞の基本的な機能として、神経細胞へ入力刺激が入ってきたときに活動電位を発生させ、他の細胞に情報を伝達することがあげられる。一つの神経細胞に複数の細胞から入力したり、活動電位が起きる閾値を変化させることにより、情報の修飾が行われる。

本研究では鉛の血液脳関門透過性を把握するため、豚脳微小血管内皮細胞を用い血液脳関門 *in vitro* モデル^{9, 10)}を利用した経皮内電気抵抗(transendothelial electrical resistance: TEER)測定実験を行った。また、ICP-MS 分析装置を用い脳微小血管内皮細胞の層を通過する鉛量を測定し、血液脳関門透過性を定量的に調査した。また、鉛化合物の神経影響を調査するため、ラットおよびヒトのグリア細胞、神経細胞を用いた神経細胞毒性実験を行った。そしてリスク評価を行うためPBPKモデルを用いたシミュレーションを行いその妥当性を検討した。

2. 実験方法

2.1 被験物質

本研究では以下に示す鉛化合物3種を実験に使用した。

- ・酢酸鉛三水和物($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)
- ・硝酸鉛($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$)
- ・塩化鉛(PbCl_2)

2.2 TEER 測定実験

豚脳微小血管内皮細胞をCS-C Complete Medium 培地((株)大日本住友製薬製)を用い75cm²培養フラスコにてCO₂インキュベーター内でコンフルエント直前まで培養した。その後、細胞を回収し、細胞濃度が5×10⁵cells/mlになるように培地にて再懸濁した。6穴プレートに3mlの培地を加え、その後BD Falcon セルカルチャーインサートをセットしインサート上に細胞懸濁液 2ml(1×10⁶cells/well)を加えた。その後、CO₂インキュベーターにてコンフルエントに達するまで培養した。その後、各濃度に調整した被験物質 2μl をインサート内培養液に添加し、6時間後まで1時間ごとに培地中のメンブレンフィルターと内皮細胞の電位差をMillipore Millicell-ERSを用いて測定した。また、細胞を播種していないメンブレンフィルターのみの電位差を測定し、実験結果からの差にメンブレンフィルターの面積 4.2(cm²)を乗じ TEER 値(Ω・cm²)を計算した。

2.3 ICP-MS 分析装置による鉛透過性実験

TEER測定実験と同条件で血液脳関門モデルを作製し、インサート内に各濃度に調整した被検物質2 μ lを添加した。その後6日間、1日ごとにウェル内の培地を0.5ml採取し、超純水4.5mlを加えた。その後、0.45 μ mのフィルターを用いてろ過し、これをサンプルとした。ICP-MS分析装置HEWLETT PACKARD 4500 SERIESを用いて各サンプルの鉛濃度を測定した。検量線の作成には絶対検量線法とインジウムを内標準物質とした内標準法を併用し、サンプル内の鉛濃度決定を行った。

2.4 鉛の神経細胞毒性実験

今回の実験ではラット脳種細胞(グリア細胞)由来 C6 細胞、ラット副腎髄質褐色細胞(神経細胞)由来 PC12 細胞、ヒト星状細胞種(グリア細胞)由来 CCF-STTG1 細胞、ヒト胚腫瘍細胞(神経細胞)由来 NT2/D1 細胞を使用した。

それぞれの細胞を 75cm²培養フラスコ(PC12 のみ poly(D-lysine) コーティング 100mm ディッシュを使用)を用い CO₂ インキュベーター内でコンフルエント直前まで培養した。その後、細胞を回収し、5 $\times$ 10⁵cells/ml になるように培地に再懸濁した。細胞懸濁液を 96 穴プレートに 100 μ l(5 $\times$ 10⁴cells/well)ずつ分注し、CO₂ インキュベーターにて 24 時間前培養した。前培養後、各濃度に調整した被検物質 10 μ l を各ウェルに添加し、CO₂ インキュベーターにて 48 時間培養した。曝露試験終了後、Cell titer-Glo Reagent (Promega 社製) 100 μ l を添加し、2 分間静置し、ルミネッセンサーを用いて発光のカウント数を測定した。その結果から、超純水のみを曝露した結果(コントロール)と比較して生存率を計算した。

2.5 PBPK シミュレーション

本研究では Physiologically-based pharmacokinetics (PBPK)モデルとして日高¹⁰⁾が構築したモデルを使用した。日高モデルは、肺、血流の良い組織群、血流の悪い組織群、骨、腎臓、肝臓の6つのコンパートメントから成り立っており、それぞれが血流で結ばれている。本研究ではこのモデルに脳のコンパートメントを追加しシミュレーションを行った。

3. 結果

図1に酢酸鉛を用いたTEER測定実験で得られた結果を示す。酢酸鉛0.5 μ Mの曝露により実験開始時のTEER値137.6($\Omega \cdot \text{cm}^2$)は6時間後に115.5($\Omega \cdot \text{cm}^2$)に低下した。また酢酸鉛10 μ M曝露でのTEER値は6時間で135.5($\Omega \cdot \text{cm}^2$)から25.2($\Omega \cdot \text{cm}^2$)に低下した。以上の結果より鉛化合物の曝露により濃度・時間依存的にTEER値の減少が観察された。

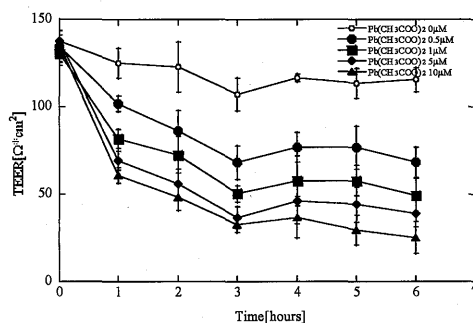


図1 TEER 値の経時変化(酢酸鉛)

また、ICP-MS 分析による酢酸鉛透過量測定実験の結果を図2に示す。

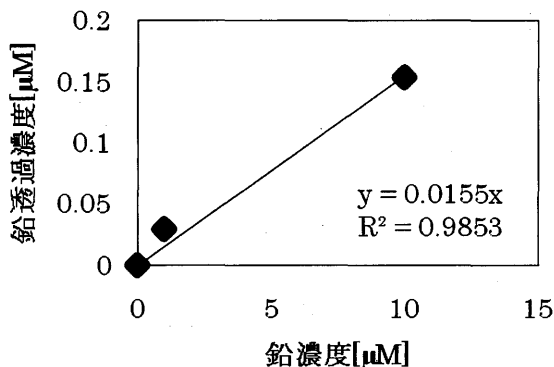


図2 鉛濃度に対する鉛透過速度近似曲線

酢酸鉛 1μM および 10μM での透過実験より得られたグラフから鉛濃度に対する透過速度を求めるとその近似式は $y = 0.0155x$ となった。

図3に酢酸鉛を用いた細胞毒性試験で得られた結果を示す。

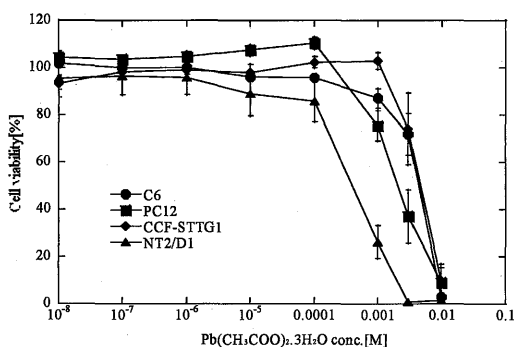


図3 細胞生存率の変化 (酢酸鉛)

酢酸鉛曝露によりグリア細胞である C6 細胞、CCF-STTG1 細胞は曝露濃度 3mM まで生存率の減少を示さず、10mM において生存率の減少を示した。また、神経細胞である PC12 および NT2/D1 において、PC12 は 3mM から、NT2/D1 は 1mM から生存率の減少が見られた。

PBPK モデルを日本人の成人男性に適応し、日常生活における一般人の血中鉛濃度を求めた。一日の経口鉛摂取量は堀口ら(堀口(1980))が報告したデータの最小値である 70μg/day とし、空气中鉛濃度は環境庁大気保全局の環境モニタリングデータ(環境庁大気保全局(1972-1997))より 1994 年度のデータを使用し 0.005μg/m³ とした。以上の条件でシミュレーションを行い血中鉛濃度を計算すると 29μg/L と計算され、モル濃度換算で 0.14μM となった。

4. 結論

- (1)本研究によって得られた結果から鉛化合物が濃度・時間依存的に経皮内電気抵抗値を減少させることが示された。
- (2)ICP-MSでの測定により鉛の透過量が定量的に示された。このことから血液中に取り込まれた鉛が血液脳関門に影響を及ぼしその細胞間密着結合を開放し、鉛が脳内に取り込まれ神経影響を引き起こしている可能性があることが示唆された。この結果は血中鉛濃度から脳への移行量を推定する際に有用である。
- (3)鉛化合物はグリア細胞よりも神経細胞に対して感受性があり、ラットとヒトにおける種差があることが示

唆された。この結果は神経毒性影響および、健康リスク評価を行う際に有用である。

(4)PBPKモデルを用いて計算した血中鉛濃度から脳への移行濃度、および神経細胞への影響を考察した。

今後、更なる研究を行い、鉛の体内動態モデルに血液脳関門透過性等を組み込むことで、神経影響に着目したヒト健康リスク評価手法の構築に取り組むことを目指している。

参考文献

- 1)中西準子、小林憲弘、内藤航(2006) 丸善株式会社 詳細リスク評価書シリーズ9 鉛。
- 2)Harry GJ, Billingsley M, Bruinnik A, Campbell IL, Classen W, Dorman DC, Galli C, Ray D, Smith RA, Tilson HA(1997) *In vitro* techniques for the assessment of neurotoxicity.; Environ Health Perspect;106(I): 131-158.
- 3)Madara JL(1998) Regulation of the movement of solutes across tight junctions. Annu Rev Physiol 60: 121-142.
- 4)Igarashi Y, Utsumi H, Chiba H, Yamada-sasamari Y, Tobioka H, Kamimura Y, Furuuchi K, Kokai Y, Nakagawa T, Mori M, Sawada N(1999) Glial cell line-derived neurotrophic factor induces barrier function of endothelial cells forming the blood-brain barrier. Biochem Biophys Res Commun 261: 108-112.
- 5)Rubin LL, Staddon JM(1999) The cell biology of the blood-brain barrier. Annu Rev Neurosci 22: 11-28.
- Cucullo L, Hallene K, Dini G, Dal Taso R, Janigro D(2004) Glycerophosphoinositol and dexamethasone improve transendothelial electrical resistance in an *in vitro* study of blood-brain barrier. Brain Res 997:147-151.
- 6)Launer R, Bauer R, Linz B, Pittner F, Peschek GA, Ecker G, Fried IP, Noe CR(2004) Development of an in vitro blood-brain barrier model based on immortalized porcine brain microvascular endothelial cells. Il Farmaco 59: 133-137.
- 7)Lee HS, Namkoong K, Kim DH, Kim KJ, Cheong YH, Kim SS, Lee WB, Kim KY(2004) Hydrogen peroxide-induced alterations of tight junction proteins in bovine brain microvascular endothelial cells. Microvasc Res 68: 231-238.
- 8)Lu W, Tan YZ, Hu KL, Jiang XG(2005) Cationic albumin conjugated pegylated nanoparticle with its transcytosis ability and little toxicity against blood-brain barrier. Int Pharm 295: 247-260.
- 9)Boveri M, Berezowski V, Price A, Slupec S, Lenfant AM, Benaud C, Hartung T, Cecche R, Prieto P, Dehouck MP(2005) Induction of blood-brain properties in cultured brain capillary endothelial cells: comparison between primary glial cells and C6 cell line. Glia 51:187-198.
- 10)Cecchelli R, Dehouck B, Descamps L, Fenart L, BueE-Scherrer V, Duhem C, Lundquist S, Rentfel M, Torpier G, Dehouck MP(1999) *In vitro* model for evaluating drug transport across the blood-brain barrier.; Adv Drug Delivery Rev 36: 165-178.
- 11) 日高大彰(1999); 鉛、ベンゼン、MTBEのリスクアセスメントに関する研究～ガソリンの組成変化と健康リスクの変遷～; 京都大学大学院工学研究科修士論文。

キーワード: ヒト健康リスク、鉛、神経毒性、血液脳関門

Key Words: Human health risk, lead, neurotoxicity, blood-brain barrier