

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：34504

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K18047

研究課題名（和文）長期間にわたるラマン分光測定による培養神経細胞の化学物質毒性評価法の開発

研究課題名（英文）Development of an evaluation method for chemical toxicity of long-term cultured neurons using Raman spectroscopy

研究代表者

橋本 剛佑（Hashimoto, Kosuke）

関西学院大学・生命環境学部・助教

研究者番号：30868831

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では神経細胞が作る神経回路網の発達状態が化学物質に対する感受性に影響を与えるという仮説を検証した。培養15、30、60日目の神経細胞にビスフェノールA(BPA)を添加し、添加後5時間まで、1時間毎に神経細胞のラマンスペクトルを取得し、主成分分析による解析を行った。培養15、30日目のBPA添加群とコントロール群でチロシンに帰属できるスペクトル変化が観測された。BPAがもたらす発達神経毒生の本質は未成熟な神経回路網中の神経細胞に緩やかかつ長期的に続く興奮毒性であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって得られた大きな発見の一つは、神経細胞のBPAに対する応答が培養日数によって異なることであった。成熟した神経細胞ではBPA曝露によるラマンスペクトルに変化がみられなかったのに対し、未成熟な神経細胞ではBPA曝露によってラマンスペクトルの変化が観測された。本研究結果は、ラマン分光法が化学物質が神経細胞へもたらす影響をきたまま評価できることを示している。また神経細胞を長期間培養しながら測定し続けることのできる光学系を確立することに成功し、BPAのような内分泌かく乱物質の他、マイクロプラスチックやウイルスの毒性評価に応用することができるようになった。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we examined the relation between the developmental stage of neuron and susceptibility to bisphenol A (BPA). BPA was added to the neurons on days 15, 30 and 60 of culture. Raman spectra were obtained from the live neurons every hour up to 5 hours after addition of BPA. The collected spectra were analyzed by principal component analysis. The spectral change was observed during the BPA treatment in the datasets of 15 and 30 days of culture, and the spectral changes could be attributed to tyrosine. In contrast, no spectral changes were observed in the dataset of 60 days of culture. It is suggested that the neurodevelopmental toxicity due to BPA is a gradual and long-lasting excitotoxic effect on the neurons in the immature developmental stages.

研究分野：生体分子分光学

キーワード：ラマン分光法 神経細胞 ビスフェノールA 発達神経毒生 ケモメトリックス 薬剤感受性

## 1. 研究開始当初の背景

化学物質が胎児や小児の脳発達にもたらす影響は生涯の健康や特定の病気にかかるリスクに直結していると考えられ (DOHaD 仮説), 化学物質と脳発達の関わりに対する社会的関心は高い。例えば、「内分泌かく乱物質であるビスフェノール A(BPA)を妊娠ラットに投与すると産仔が多動性を示す」報告(Ishido et al., *J. Neurosci. Res.*, 76(3), 423-433, 2004)がある。これは化学物質が胎児の脳発達に影響し、生後もその影響が強く残ることを示唆している。

従来、化学物質の脳発達におよぼす影響の評価に動物が用いられるが、動物愛護の観点から近年は代替法として細胞を用いた評価法が提案されている。細胞を用いた評価法として、細胞の突起長計測などの形態学的手法、パッチクランプ法などの活動電位計測による細胞機能分析、神経細胞発達マーカー分子の染色による分子イメージングが挙げられる。しかし、これらの手法は神経細胞の発達の一つの側面をみているに過ぎない。また、これらの従来法は細胞の固定や電極の挿入などを伴い侵襲性が高く、神経細胞の形態、機能、分子ダイナミクスを長期にわたり追跡することが困難であることが問題である。この問題を解決するためには、神経細胞の分子ダイナミクスと機能を同時並行で長期間にわたり解析できる方法を確立することが重要である。

ラマン分光法は光を物質に照射し、その物質を構成する分子固有の波長情報をもつラマン散乱光を分光することで物質の分子組成や構造を分析する手法である。ラマン分光法は細胞や組織を非破壊・非標識で測定できるという利点を有する。研究代表者はラマン分光法を用いて神経細胞を生きたまま長期間にわたり測定し、培養日数の経過に伴った特徴的なスペクトル変化を抽出することに成功した(Hashimoto ら, *Analyst*, 2015)。また、従来は固定・染色をしないと判別できなかった神経細胞の興奮性・抑制性を、ラマン分光法によって生きたまま非染色で判別することに成功した(Hashimoto ら, *Analyst*, 2018)。これらの結果はラマン分光法が神経細胞の発達や機能に関わる分子ダイナミクスを生きたまま分析できることを示唆している。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、化学物質が神経細胞におよぼす長期的な影響を、細胞が生きたまま検出できる技術を開発することである。これまでの研究で、ラマン分光法が神経細胞の発達に関わる分子組成変化を分析できることが示された(Hashimoto ら, *Analyst*, 2015)。これはラマンスペクトルから神経細胞の発達状態を予測できるモデルを確立できることを意味している。化学物質に曝された神経細胞のラマンスペクトルをこの予測モデルに投影することで、化学物質が神経細胞の発達を阻害するかどうかを追跡できるのではないかと着想を得た。本研究の目的を達成するために実施した研究は次の2つである。一つ目は、ラマンスペクトルから神経細胞の発達状態を予測するモデルの構築と検証である。抗がん剤の一種であるシトシンアラビノシド(ara-C)を曝露させた神経細胞から取得したラマンスペクトルを、神経細胞の発達状態分析モデルにプロットし、ara-Cの神経細胞発達に対する毒性を評価した。二つ目は培養神経細胞の発達状態の違いと神経細胞のBPAに対する応答の相関を調べた。

## 3. 研究の方法

### (1) 化学物質に対する神経細胞の応答のリアルタイムラマン分析法の確立

胚齢 18 日目のラット海馬から得た神経細胞の初代培養系を使用した。ポリエチレンイミンでコートした石英ガラスポトムディッシュ上に 250 細胞/mm<sup>2</sup> の密度で細胞を播種し、培養を開始した。培養 3 日目の神経細胞に ara-C を最終濃度 0 (コントロール), 5, 25 μM で 24 時間曝露させた。その後、培養 4, 10, 15 日目の神経細胞の核からラマンスペクトルを取得した。ラマン測定には試料台に小型 CO<sub>2</sub> インキュベーターが搭載された自作共焦点ラマン顕微鏡を使用した。励起波長 785 nm, 測定点におけるレーザーパワーは 35 mW, 露光時間 90 秒とし、対物レンズは 60 倍の水浸レンズ(NA1.1)を使用した。

### (2) 培養神経細胞の発達状態と BPA に対する応答の相関研究

胚齢 18, 19 日 Wistar ラットから海馬を摘出した。海馬をパインで分散させ、細胞懸濁液を調製した。φ35 mm の石英窓付きディッシュ 1 枚あたり 2.4×10<sup>5</sup> 個の細胞を播種した。培養 15, 30, 60 日目の神経細胞に BPA を添加した。BPA の最終濃度は 0, 25, 100 μM の 3 通りである。神経細胞の樹状突起および軸索の長さを計測するため、MAP2, Tau1 をターゲットにした蛍光免疫染色を行った。BPA を 30 分, 1, 2, 3, 4, 5 時間曝露した神経細胞を生きたまま、自作の CO<sub>2</sub> インキュベーター付き共焦点ラマン顕微鏡でラマン測定を行った。励起波長は 785 nm, 測定点でのレーザーパワーは 58 mW, 対物レンズは 60 倍の水浸レンズ(NA=1.20)を使用した。露光時間は 60 秒に設定した。得られたラマンスペクトルを前処理し、主成分分析(PCA)を行った。また、膜電位感受性色素 FluoVolt (サーモフィッシャー)を用い、BPA 曝露 5 時間後の神経細胞の膜電位変化を計測し、発火間隔を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 化学物質に対する神経細胞の応答のリアルタイムラマン分析法の確立

コントロール群のスペクトルデータセットを主成分分析(PCA)し、化学物質に曝されていない神経細胞の発達評価モデルを構築した。主成分(PC)1で培養4日目のデータ集団と培養10,15日目のデータ集団に分かれ、PC1で正常な神経細胞の発達状態を説明できると考えられる。(図1)次に、ara-Cが神経細胞の発達に影響するかどうかを検証するため、コントロール群のデータセットで作成された主成分空間に ara-C 曝露細胞群から取得したラマンスペクトルを投影した。最終濃度 5  $\mu\text{M}$  の ara-C を曝露した神経細胞では PC1 のスコア値の分布がコントロール群のものとは大きく変わらなかった。一方、最終濃度 25  $\mu\text{M}$  の ara-C 曝露条件では、培養10,15日目のデータ集団が正常な培養4日目の神経細胞のデータ集団と大きく重なっており、たとえ24時間という短期間の曝露であってもその影響は残り続け、結果として神経細胞の発達を遅らせることが示唆された。(図2)

以上の結果は化学物質による外部刺激が神経細胞発達へ与える影響をラマン分光法によって評価できる可能性を示唆している。今後はBPAなどの内分泌かく乱物質を神経細胞に曝露させ、その影響をより長期間にわたって追跡する予定である。

##### (2) 培養神経細胞の発達状態とビスフェノールAに対する応答の相関研究

BPA曝露5時間後の神経細胞に対して免疫蛍光染色を行い、樹状突起や軸索の長さの計測を実施した。(図3)いずれの培養日数、BPA濃度条件においても有意差は見られず、短期的なBPA曝露は神経細胞の形態に影響を与えないことが分かった。

各培養日数におけるコントロール群(BPA未処理群)とBPA処理群のラマンスペクトルをPCAで解析した。いずれの培養日数においてもコントロール群とBPA 25  $\mu\text{M}$  曝露群のスペクトルの分散は重なっており、両者を判別する主成分軸は見つからなかった。(図4)次にコントロールとBPA 100  $\mu\text{M}$  曝露条件の神経細胞から得られたラマンスペクトルをPCAで解析した。培養15日目のデータセットではPC5の軸、培養30日目のデータセットではPC6の軸上でコントロールとBPA 100  $\mu\text{M}$  曝露条件のデータ集団は完全に重複

しておらず、100  $\mu\text{M}$  のBPA曝露が細胞内の分子組成に変化を与えることが示唆された。(図5)培養15日目と30日目のデータセットのPCAにおいて、コントロールと100  $\mu\text{M}$  BPA曝露間での神経細胞の分子組成の違いを反映する主成分軸のローディングプロットから、チロシンに帰属できるバンドが観測された。(図6)BPA曝露によって細胞内のチロシン濃度が上昇することが示唆された。一方、培養60日目の神経細胞のラマンスペクトルをPCAで解析すると、コントロール集団と100  $\mu\text{M}$  BPA曝露集団を判別する主成分軸を見つ

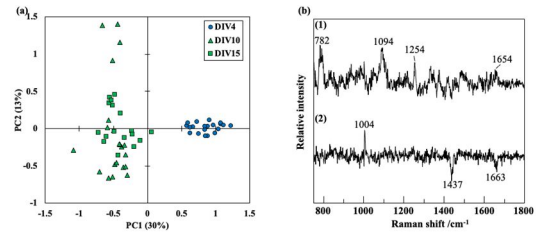


図1 PCA used with control dataset. Score plot (a), Loading plot of PC1 (b(1)) and PC2 (b(2)).

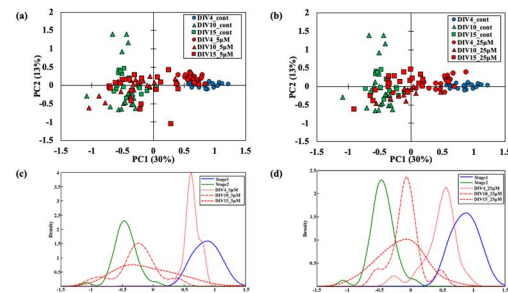


図2 Raman spectral data sets obtained from neurons exposed to ara-C were projected to the PCA space of the control group (final concentration 5  $\mu\text{M}$  (a), 25  $\mu\text{M}$  (b)). (c) and (d) show the density distributions of PC1 scores. Stage 1 comprises the control data set at DIV4, and stage 2 comprises the control data set

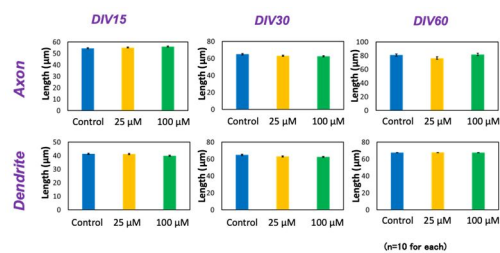


図3 蛍光免疫染色による神経細胞の軸索と樹状突起の長さを比較した結果。上段のパネルは軸索、下段のパネルは樹状突起の計測結果を示している。パネルの列はDIV(培養日数)を示しており、左列から培養15,30,60日目を示している。

ることができなかった。これまでの報告で、ラマンスペクトルから培養 15, 30 日目の神経細胞は成熟の途中段階であり、培養 60 日目以降に成熟することが示唆されている。本実験結果は神経細胞の成熟状態が BPA への感受性と関連していることを示唆している。BPA 未処理群と処理群間のラマンスペクトルの違いを示すローディングプロットに、興奮性の神経伝達物質であるノルアドレナリンの合成元であるチロシンのバンドが観測されたことから、BPA により神経細胞が過剰に興奮させられることが示唆された。

膜電位感受性色素を用いて BPA 曝露 5 時間後の神経細胞の電気活動を観察した。培養 15, 30 日目に BPA を 100  $\mu\text{M}$  曝露すると発火間隔が短くなること分かった。(図 7) この結果は神経細胞が未成熟(培養 15, 30 日目)な段階では BPA が過剰な興奮を引き起こすことを示唆しており、ラマン分光法による解析結果と整合性が取れている。

以上より、未成熟な神経細胞が BPA に曝されることで、神経細胞は過剰に興奮することが示唆された。今後は BPA によって引き起こされる未成熟な神経細胞の興奮の影響が、その後の神経細胞の成熟にどのような影響が出るのかを調べる予定である。

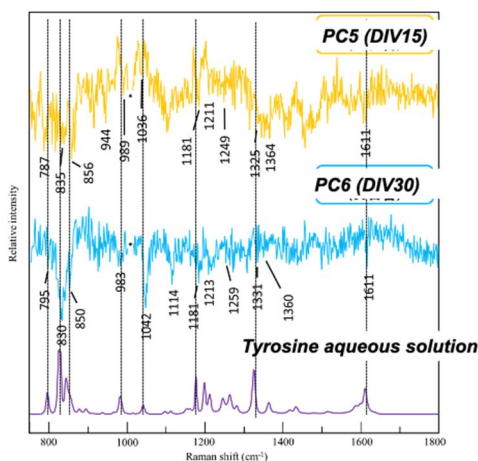


図 6 BPA 未処理(コントロール)群と BPA 処理群(最終濃度 100  $\mu\text{M}$ )のラマンスペクトルの違いを示す PCA ローディングプロット。(上, 中央) 下に純粋なチロシン水溶液のラマンスペクトルを示している。

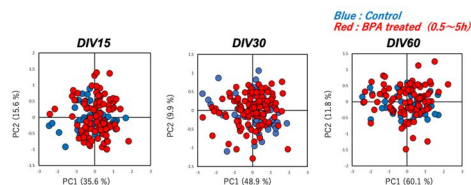


図 4 コントロール群(青)と 25  $\mu\text{M}$  BPA 処理群(赤)のラマンスペクトルの PCA スコアプロット。DIV は培養日数を示す。

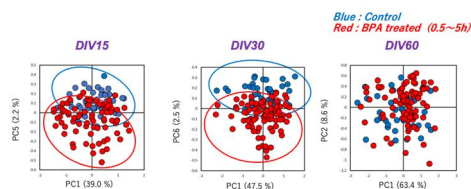


図 5 コントロール群(青)と 100  $\mu\text{M}$  BPA 処理群(赤)のラマンスペクトルの PCA スコアプロット。DIV は培養日数を示す。

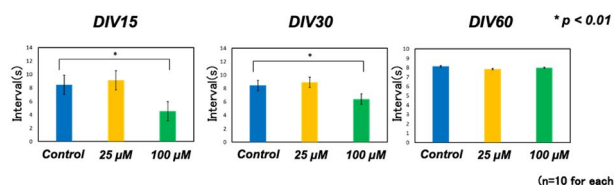


図 7 膜電位感受性色素を用いた神経細胞の自発発火間隔の測定結果。DIV は培養日数を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 橋本剛佑, 佐藤奨悟, 森山美優, 佐藤英俊	4. 巻 RTM-22-15-25
2. 論文標題 ラマン分光法による化学物質の発達神経毒性モニタリング技術の開発	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 レーザー学会第566回研究会報告書	6. 最初と最後の頁 11-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 橋本 剛佑, 佐藤 英俊	4. 巻 40(8)
2. 論文標題 ラマン分光法と多変量解析で視る神経細胞の分化と機能	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 月刊OPTRONICS	6. 最初と最後の頁 95-99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto Kosuke, Morisawa Yusuke, Tortora Mariagrazia, Rossi Barbara, Ozaki Yukihiro, Sato Hidetoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Attenuated Total Reflection Far-Ultraviolet (ATR-FUV) Spectroscopy is a Sensitive Tool for Investigation of Protein Adsorption	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Applied Spectroscopy	6. 最初と最後の頁 793-800
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/00037028211070835	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 橋本剛佑, 佐藤奨悟, 森山美優, 佐藤英俊
2. 発表標題 ラマン分光法による化学物質の発達神経毒性モニタリング技術の開発
3. 学会等名 レーザー学会第566回研究会「光・レーザーの医学・生物学応用」
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋本剛佑, 佐藤英俊
2. 発表標題 顕微ラマン分光法を用いた化学物質の発達神経毒性評価法の開発
3. 学会等名 レーザー顕微鏡研究会第47回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋本 剛佑, 佐藤 奨悟, 森山 美優, 岩崎 啓太, 佐藤 英俊
2. 発表標題 ラマン分光法を用いた化学物質の神経発達毒性評価法の開発
3. 学会等名 レーザー学会学術講演会第43回年次大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 橋本剛佑, 佐藤英俊
2. 発表標題 顕微ラマン分光法で観察する神経細胞の発達過程
3. 学会等名 第6回フォトニクスワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kosuke Hashimoto, Hidetoshi Sato
2. 発表標題 A study on development of living neuron with bisphenol A using Raman spectroscopy
3. 学会等名 Pacifichem2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kosuke Hashimoto, Yusuke Morisawa, Mariagrazia Tortora, Barbara Rossi, Yukihiro Ozaki, Hidetoshi Sato
2. 発表標題 Study on ATR-FUV spectroscopy for investigation of electronic structure and transitions of proteins
3. 学会等名 Pacifichem2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤奨悟, 橋本剛佑, 佐藤英俊
2. 発表標題 ラマン分光法を用いた神経細胞のビスフェノールAへの感受性の分析
3. 学会等名 レーザー学会第42回年次大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------