

[研究区分 : 学際的・先端的研究 (A)]

研究テーマ : フグ毒テトロドキシンの尿中排泄メカニズムに関する研究	
研究代表者 : 生命環境学部 環境科学科 助教・松本拓也	連絡先 : takuya62@pu-hiroshima.ac.jp
共同研究者	
【研究概要】 フグ食中毒は、毎年発生し、食品衛生上の重大な課題である。フグ毒の主要な排泄経路は尿中排泄であると推定される。本研究では、ブタ腎近位尿細管由来 LLC-PK1 細胞を用いてフグ毒の排泄機構を調べた。LLC-PK1 細胞によるフグ毒の輸送には、温度依存性が認められたことから、トランスポーターを介した経細胞輸送であることが確認できた。トランスポーター阻害剤を共存させて輸送阻害を調べると、テトラエチルアンモニウムならびに L-カルニチン添加区でフグ毒の輸送量が低下したことから、有機カチオントランスポーターやカルニチントランスポーターの関与が考えられた。	

【研究内容・成果】

目的

日本近海に生息するトラフグ属魚類は、肝臓、卵巣、皮膚などの特定の組織にフグ毒を高濃度に蓄積しており、有毒部位を誤って食べた場合は、フグ食中毒を発症する。フグ毒の主成分はテトロドキシン(以下、TTX と略記)で、ヒトの体内に取り込まれると心筋や骨格筋などの神経伝達を遮断する神経毒として作用し、呼吸不全で死に至る。食中毒患者の血中 TTX は、摂取後 24 時間前後で検出できなくなり、尿中には摂取後 5 日間まで検出されるが、TTX の代謝や解毒に関わるメカニズムは未解明である。そこで本研究では、ブタ腎臓近位尿細管由来 LLC-PK1 細胞を用いて TTX の尿中排泄メカニズムを調べた。

実験方法

ブタ腎臓近位尿細管由来 LLC-PK1 細胞を 10%ウシ胎児血清含有 DMEM 培地で 24 ウェルのトランスウェルに播種し、37°C、5%CO₂ 大気下にて 1 週間培養して細胞単層膜を形成させた。アスピレーターで培地を除去後、LLC-PK1 細胞の尿細管側(頂端膜側:Apical membrane side)または血管側(基底膜側:Basal membrane side)のウェルに、50 μM TTX を含む緩衝液(pH7.4)を加えて 4°Cまたは 37°Cでインキュベートした。TTX 溶液を加えた側とは反対側の緩衝液を経時的に回収し、LLC-PK1 細胞によって輸送された TTX 量を高速液体クロマトグラフィー質量分析計 LC/MS/MS で定量した。

実験結果

① LLC-PK1 細胞単層膜による排泄方向の TTX 経細胞輸送活性の評価

LLC-PK1 細胞単層膜による排泄方向(B→A)の TTX の輸送は、インキュベート開始 5 分後には 0.087 ± 0.015 nmol/mL/cm²、15 分後には 0.214 ± 0.030 nmol/mL/cm² と見積もられ、60 分後には 1.237 ± 0.229 nmol/mL/cm² に達し、5 分後の値に比べて有意に増加し、その増加量は 14 倍であった($p < 0.01$)。4°Cにおける TTX の輸送は、インキュベート開始から 5 分後には 0.034 ± 0.008 nmol/mL/cm²、15 分後には 0.062 ± 0.017 nmol/mL/cm² と見積もられ、60 分後には 0.247 ± 0.032 nmol/mL/cm² となり、5 分後の値に比べて有意に増加した($p < 0.01$)。しかしながら、その増加量は 7.2 倍と見積もられ、37°C条件下の増加率に比べて低下した。インキュベート開始から 60 分後の 4°Cにおける

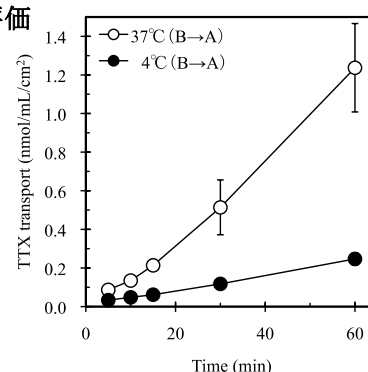


Fig. 1 LLC-PK1 細胞単層膜による排泄方向の TTX 輸送量の経時変化

TTX の輸送は、37°C 条件下と比較して 20% まで大幅に減少した ($p < 0.01$)。

② LLC-PK1 細胞単層膜による再吸収方向の TTX 経細胞輸送活性の評価

LLC-PK1 細胞単層膜による再吸収方向 (A→B) の TTX の輸送は、インキュベート開始 5 分後には 0.052 ± 0.013 nmol/mL/cm², 15 分後には 0.155 ± 0.040 nmol/mL/cm² と見積もられ、60 分後には 0.483 ± 0.115 nmol/mL/cm² に達し、5 分後の値に比べて有意に増加し、その増加量は 9 倍であった ($p < 0.01$)。4°C における TTX 輸送量は、インキュベート開始 5 分後には 0.012 ± 0.002 nmol/mL/cm², 15 分後には 0.026 ± 0.002 nmol/mL/cm² となり、60 分後には 0.091 ± 0.007 nmol/mL/cm² と見積もられ、5 分後の値に比べて有意に増加した ($p < 0.01$)。しかしながら、その増加量は 7.6 倍で、37°C 条件下の増加率に比べて低下した。インキュベート開始から 60 分後の 4°C における TTX の輸送は、37°C 条件下と比較して 19% まで大幅に減少した ($p < 0.01$)。

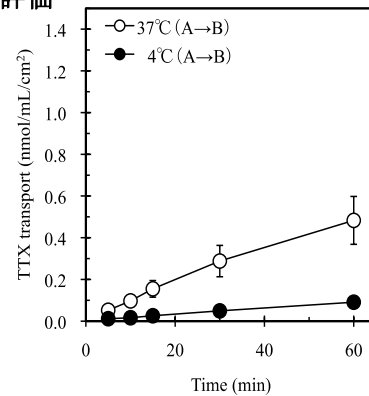


Fig. 2 LLC-PK1 細胞単層膜による再吸収方向の TTX 輸送量の経時変

以上の結果から、LLC-PK1 細胞による TTX の輸送は、物質の濃度勾配に依存して単純拡散によって細胞間隙の密着結合を通過する「細胞間隙輸送」ではなく、トランスポーターによって細胞内外へ輸送される「経細胞輸送」であることが確認できた。

③ トランスポーター阻害剤による LLC-PK1 細胞単層膜の TTX 輸送阻害試験

TTX と各種トランスポーター阻害剤を共存させて排泄方向の輸送阻害を調べた (Fig. 3)。コントロールの TTX 輸送量を $100 \pm 7\%$ とすると、多剤排泄トランスポーター (Multidrug Resistance-associated Protein; MRP) ならびに有機アニオントランスポーター (Organic Anion Transporter; OAT) の輸送基質であるプロベネシドを添加した場合は、TTX 輸送量が $52 \pm 8\%$ に有意に低下した ($p < 0.05$)。OAT の輸送基質である *p*-アミノ馬尿酸 (PAH) を添加すると、TTX 輸送量は $63 \pm 11\%$ に低下したがコントロールとの有意差は見られなかった ($p > 0.05$)。これらのことから、有機アニオン系の物質を輸送するトランスポーターの中では、OAT よりも MRP が TTX の輸送に関与している可能性が考えられた。次に、有機カチオントランスポーター (Organic Cation Transporter; OCT), カルニチントランスポーター (Organic Cation Transporter Novel type; OCTN) ならびにカチオン系薬物排泄トランスポーター (Multidrug And Toxic compound Extrusion; MATE) の輸送基質であるテトラエチルアンモニウム (TEA) を添加すると、TTX 輸送量は $42 \pm 10\%$ に有意に低下した ($p < 0.05$)。さらに、OCTN の輸送基質である L-カルニチンを添加すると、TTX 輸送量は、 $47 \pm 11\%$ に有意に低下した ($p < 0.05$)。

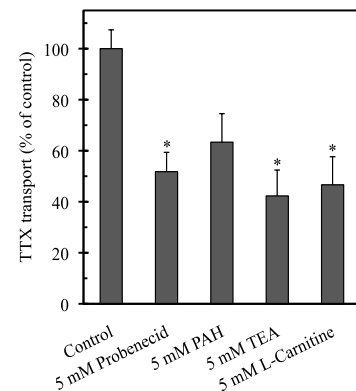


Fig. 3 LLC-PK1 細胞単層膜による TTX の輸送に及ぼす阻害剤の効

以上の結果から、TTX の排泄方向の輸送には、薬物排泄トランスポーター MRP、有機カチオントランスポーター OCT やカルニチントランスポーター OCTN が深く関わっていると推測された。