

令和元年6月12日現在

機関番号：25406

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18750

研究課題名(和文) フグ毒テトロドトキシンの腸管吸収と尿中排泄のメカニズムの解明

研究課題名(英文) Study on the mechanism of intestinal absorption and urinary excretion of pufferfish toxin tetrodotoxin

研究代表者

松本 拓也 (Matsumoto, Takuya)

県立広島大学・人間文化学部・准教授

研究者番号：30533400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、消化管と腎臓由来の培養細胞を用いて、フグ毒テトロドトキシンの(以下、TTXと略記)の消化管吸収と尿中排泄メカニズムを評価した。その結果、有機カチオンを輸送するトランスポーター(OCTNやOCT)がTTXを腎臓から尿中へ排泄していることが示唆された。また、ヒトの腸管におけるTTXの吸収に関わるトランスポーターの探索については、有機アニオン輸送ポリペプチドOATPや薬物排泄トランスポーター-MRPおよび有機カチオントランスポーターOCTが関与してい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

フグ毒テトロドトキシンの(TTX)の腸管吸収や尿中排泄に関する知見はほとんどない。フグ毒が、ヒトの体内へどのように吸収され、排泄されるのかを明らかにすることが食中毒対策として必要であるため、本研究を実施した。本研究で得られた成果は、フグ食中毒の治療法の開発に進展する可能性がある。即ち、TTXの腸管吸収に関与するトランスポーターを特異的に阻害することでTTXの腸管吸収を抑制し、血中TTXレベルを低下させることができれば、致死率の低下や症状の緩和が望める。さらに、今回明らかにした尿中排泄に関与するトランスポーターを活性化させる何らかの方法が確立できれば、TTXの排泄を促進して早期回復が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the digestive tract absorption and urinary excretion mechanism of pufferfish toxin tetrodotoxin (TTX) using cultured cell lines of the digestive tract and kidney. The results suggested that organic cation transporters (OCTN and OCT) excrete TTX from the kidney into the urine. In addition, it was suggested that organic anion transport polypeptide (OATP), multidrug resistance protein (MRP), and organic cation transporter (OCT) were involved in the absorption of TTX in human intestinal tract.

研究分野：水圏生命科学

キーワード：フグ毒 テトロドトキシンの 腸管吸収 尿中排泄 トランスポーター Caco-2 LLC-PK1 MDCK II

## 様式 C-19, F-19-1, Z-19, CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

日本近海に生息するフグ類は、肝臓や卵巣および皮膚などの特定の組織にフグ毒を高濃度に蓄積している。誤ってフグ類の有毒部位を食べた場合は、フグ食中毒を発症する。フグ毒の主要成分はテトロドトキシン(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、重篤な場合は呼吸筋麻痺による換気不全で死に至る。我が国では、フグ食中毒は毎年発生し、その死者数は年間食中毒死者数の半数以上を占めるため、これを改善することは食品衛生上極めて重大な課題である。このため、食品としてのフグの安全性を確保するためには、フグ中毒の防止策を最優先に講じなければならない。フグ食中毒は、瀬戸内海沿岸地域で多発しており、その発生原因の7割が家庭における素人料理である。日本沿岸に生息するフグ科魚類の多くは強力なNa<sup>+</sup>チャネル毒であるテトロドトキシン(TTX)をもち、一般に肝臓、卵巣、皮の毒性が強い。フグの有毒部位を摂取すると、血中TTXは摂取後12~24時間で検出できなくなるが、尿中には摂取後5日間まで検出される。しかしながら、ヒトにおけるTTXの代謝や解毒に関わる生体機能は明らかにされていない。TTXの代謝に関する文献は、動物実験で投与したTTXが血中および尿中に検出された報告やフグ食中毒患者の血液および尿中TTX分析方法に関する報告などで、腸管吸収や尿中排泄の実態解明をめざした研究例はほとんどない状態であり、食中毒の発生源であるフグの毒化機構の解明研究に比べて遅れている。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、ヒト腸管上皮由来Caco-2細胞とブタ腎近位尿細管由来LLC-PK<sub>1</sub>細胞を利用して、TTXの腸管吸収と腎排泄(尿中排泄)のモデル実験を行い、TTXの輸送に関わるトランスポーター(細胞膜で物質の輸送を担う機能性膜タンパク質)を特定して解毒経路を明らかにし、フグ食中毒治療法への応用をめざした。

### 3. 研究の方法

#### (1)ブタ腎臓近位尿細管由来LLC-PK<sub>1</sub>細胞を用いたTTXの尿中排泄実験

ブタ腎臓近位尿細管由来LLC-PK<sub>1</sub>細胞を24ウェルのトランズウェル(培養面積0.3cm<sup>2</sup>)に10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地で播種し、37°C、5%CO<sub>2</sub>大気下で1週間培養して細胞単層膜を形成させた。培地を除去後、LLC-PK<sub>1</sub>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50μM 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-PK<sub>1</sub>細胞によって輸送されたTTX量をLC/MS/MS分析で求めた。また、TTXの排泄方向(血管側から尿細管側方向)の輸送に関わるトランスポーターを調べるため、50μM TTXに各種トランスポーター阻害剤(5mM)を共存させ、阻害剤によるTTX輸送の阻害効果を調べた。

#### (2)ヒト腸管上皮由来Caco-2細胞を用いたTTXの腸管吸収実験

Caco-2細胞(0.9×10<sup>4</sup> cells/0.3 mL)を24日間培養して細胞単層膜を形成させた半透膜性の24wellトランズウェルに、transport buffer (pH7.4)を頂端膜側に0.3 mLまたは基底膜側に1 mL加えてそれぞれ2回洗浄後、細胞単層膜の電気抵抗値を測定した。測定後、そのトランズウェルを1 mLのtransport buffer (pH7.4)を加えた新しい24wellコンパニオンプレートに移し、37°Cのウォーターバスで10分間プレインキュベートした。Caco-2細胞単層膜の頂端膜側または基底膜側の緩衝液をアスピレーターで吸引し、50μM TTXと各種阻害剤(Probenecid, Verapamil, TEA, L-carnitine, PAH, BSP)を含む同緩衝液を頂端膜側に0.3 mL加え、37°Cで30分間インキュベートした。インキュベート後、基底膜側の緩衝液1 mLをエッペンドルフチューブに回収し、吸収方向に輸送されたTTX量をLC/MS/MS分析で定量した。

### 4. 研究成果

#### (1)ブタ腎臓近位尿細管由来LLC-PK<sub>1</sub>細胞を用いたTTXの尿中排泄実験

##### ①LLC-PK<sub>1</sub>細胞単層膜によるTTXの経細胞輸送活性の評価

LLC-PK<sub>1</sub>細胞単層膜によるTTXの尿細管側(頂端膜側: Apical)から血管側(基底膜側: Basal)への再吸収方向(A→B)の輸送を経時的に調べた(Fig. 1)。37°CのTTX輸送濃度は、インキュベート開始5分後には0.052±0.013nmol/mL/cm<sup>2</sup>、15分経過後には0.155±0.040 nmol/mL/cm<sup>2</sup>と見積もられ、その後も増加して60分経過後には0.483±0.126 nmol/mL/cm<sup>2</sup>に達し、5分経過後の値に比べて9倍に増加した(p < 0.01)。4°CのTTX輸送濃度は、5分経過後には0.012±0.002 nmol/mL/cm<sup>2</sup>、15分経過後には0.026±0.002 nmol/mL/cm<sup>2</sup>と見積もられ、その後も僅かに増加して60分経過後には0.091±0.007 nmol/mL/cm<sup>2</sup>となり、5分経過後の値に比べて有意に増加したが、増加の割合は37°Cの場合に比べて低く7.5倍だった(p < 0.01)。次に、LLC-PK<sub>1</sub>細胞単層膜によるTTXの血管側(基底膜側: Basal)から尿細管側(頂端膜側: Apical)への排泄方向(B→A)の輸送を経時的に調べた(Fig. 2)。37°CのTTX輸送濃度は、インキュベート開始5分後には0.087±0.015 nmol/mL/cm<sup>2</sup>、15分経過後には0.214±0.030 nmol/mL/cm<sup>2</sup>と見積もられ、その後も増加して60分経過後には1.237±0.229nmol/mL/cm<sup>2</sup>に達し、5分経過後の値に比べて14倍に増加した(p < 0.01)。4°CのTTX輸送濃度は、5分経過後には0.034±0.008 nmol/mL/cm<sup>2</sup>、15分経過後には0.062±0.017 nmol/mL/cm<sup>2</sup>と見積もられ、その後も僅かに増加して60分経過後には

0.247±0.032 nmol/mL/cm<sup>2</sup> となり、5 分経過後の値に比べて有意に増加したが、増加の割合は 7 倍で 37°C の場合に比べて低下した ( $p < 0.01$ )。以上の結果から、温度を低下させると、いずれの輸送方向でも TTX の輸送濃度が大幅に低下することが明らかとなり、LLC-PK<sub>1</sub> 細胞単層膜による TTX の輸送は、物質の濃度勾配に依存して単純拡散により細胞間隙(タイトジャンクション)を通過する細胞間隙輸送ではなく、細胞膜上の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された。

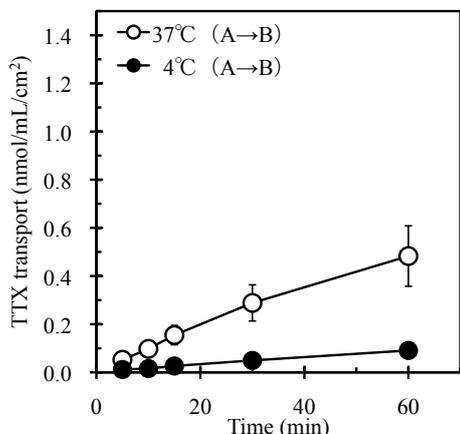


Fig. 1 LLC-PK<sub>1</sub> 細胞単層膜による TTX の再吸収方向への輸送(37°C: n = 6、4°C: n = 5)

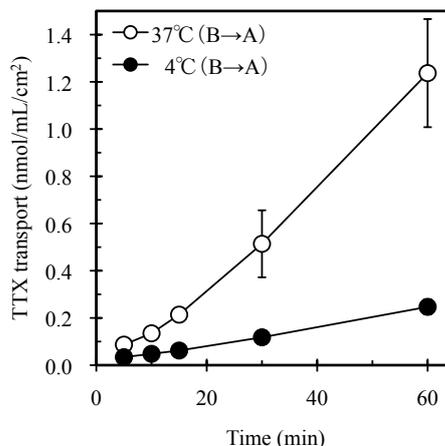


Fig. 2 LLC-PK<sub>1</sub> 細胞単層膜による TTX の排泄方向への輸送(37°C: n = 6、4°C: n = 5)

## ②LLC-PK<sub>1</sub> 細胞単層膜の TTX 輸送に及ぼすトランスポーター阻害剤の影響

50 μM TTX と 5 mM の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±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ドを添加した場合には、TTX 輸送量が 52±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±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±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±11% に有意に低下した ( $p < 0.05$ )。TTX の尿中排泄への MATE の関与を調べるため、MATE 阻害剤の影響を調べた (Fig. 4)。コントロールの TTX 輸送量を 100±10% とすると、MATE1 ならびに MATE-2K の阻害剤である MPP+ 添加区、MATE1 阻害剤のセファレキシリン添加区および MATE-2K 阻害剤であるオキサリプラチン添加区の TTX 輸送量は、それぞれ 92±12%、85±10% および 88±5% に低下したが、いずれも有意差は認められなかった ( $p > 0.05$ )。一方、MATE と OCT の阻害剤であるシメチジンを添加した場合、TTX 輸送量は 60±6% に有意に低下した ( $p < 0.05$ )。以上の結果から、カチオン系トランスポーターの中では、OCT と OCTN が TTX の輸送に関与している可能性が考えられた。

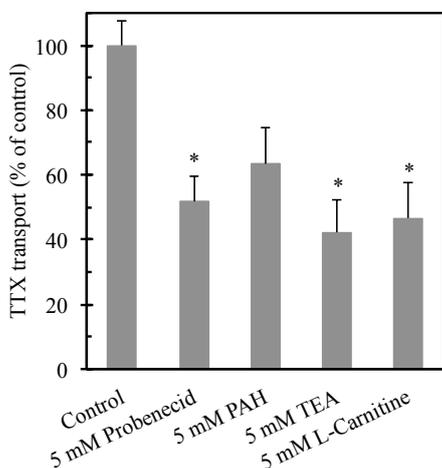


Fig. 4 LLC-PK<sub>1</sub> 細胞単層膜による TTX の排泄方向の輸送に及ぼすトランスポーター阻害剤の阻害効果① (n = 4)

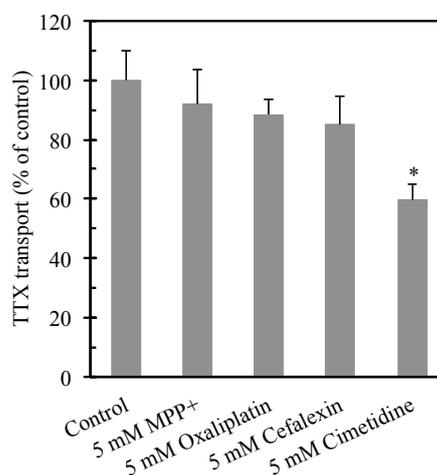


Fig. 5 LLC-PK<sub>1</sub> 細胞単層膜による TTX の排泄方向の輸送に及ぼすトランスポーター阻害剤の阻害効果② (n = 3)

## (2) ヒト腸管上皮由来 Caco-2 細胞を用いた TTX の腸管吸収実験

Caco-2 細胞単層膜による吸収方向の TTX 輸送量に及ぼすトランスポーター阻害剤の影響を調べた。コントロールの TTX 輸送量を 100%とすると、0.5 mM ベラパミルおよび 5 mM *p*-アミノ馬尿酸(PAH)添加区の TTX 輸送量は、約 7 割まで有意に低下した ( $p < 0.05$ )。一方、5 mM ブロモスルホフタレイン (BSP) 添加区の TTX 輸送量は 137%まで増加した ( $p > 0.05$ )。5 mM プロベネシド、5 mM テトラエチルアンモニウム (TEA) および 5 mM L-カルニチン添加区の TTX 輸送量は、それぞれ 8 割程度まで低下したが有意差は認められなかった( $p > 0.05$ )。実験に使用した 6 種類の阻害剤のうち、5 つの阻害剤で TTX 輸送量が低下し、低下率の大きいものから、ベラパミル>PAH>プロベネシド>L-カルニチン>TEA という順になった。TTX 輸送を有意に低下させたベラパミルと PAH、次いで低下率の大きかったプロベネシドは、有機アニオン輸送ポリペプチド(OATP) やカルニチントランスポーター(OCTN)、多剤耐性輸送体 (MDRs)、有機アニオントランスポーター(OAT)、多剤耐性関連タンパク (MRP) の輸送基質である。これらのトランスポーターのなかでヒトの腸上皮細胞に発現し吸収方向の輸送に働くトランスポーターは OATP2B1 と MRP3 であり、Caco-2 細胞の頂端膜側と基底膜側に発現している OATP および MRP3 が TTX の輸送に関与している可能性が考えられた。そこで、TTX 輸送への関与が示唆されたこれらのトランスポーター遺伝子(OATP2B1, OCT1 および MRP3)を過剰発現させた MDCKII 細胞を構築し、TTX の細胞内蓄積および経細胞輸送の経時変化を評価した。MDCK-OCT1 は TTX の添加から 2 分後にコントロールに比べて約 1.5 倍多く蓄積した。MDCK-OATP2B1 は 10 分後には約 2.2 倍の蓄積量 となった。OATP2B1 および OCT1 は、TTX を細胞内へ取り込み、TTX の細胞内蓄積を促進させていることが示唆された。また、MDCK-MRP3 の TTX 輸送量を対照区と比較すると、2 分間の輸送実験で MDCK-MRP3 が約 2 倍多く輸送したことから、MRP3 は TTX の細胞内から血管側への取り込みに関与していることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- (1) Takuya. Matsumoto, Yui Ishizaki, Keika Mochizuki, Mitsuru Aoyagi, Yoshiharu Mitoma, Shoichiro Ishizaki, Yuji Nagashima. Urinary excretion of tetrodotoxin modeled in a porcine renal proximal tubule epithelial cell line, LLC-PK<sub>1</sub>. *Marine Drugs* 15 (7) 225, 2017. Doi:10.3390/md15070225.

[学会発表] (計 5 件)

- (1) トラフグの有機カチオントランスポーターoct6 をコードする slc22a16 遺伝子のクローニング. 松下直樹, 高橋晶子, 山本千里, 松本拓也, 長島裕二. 平成 30 年度年度日本水産学会秋季大会 2018 年 9 月 16 日. 広島大学 東広島キャンパス (東広島市)
- (2) トラフグのカルニチントランスポーターoctn2 をコードする slc22a5 遺伝子のクローニング. 松本拓也, 高橋晶子, 青柳 充, 大竹才人, 三苦好治, 石崎松一郎, 長島裕二. 平成 30 年度年度日本水産学会春季大会 2018 年 3 月 28 日. 東京海洋大学 品川キャンパス(東京都港区)
- (3) Carrier-mediated transport of tetrodotoxin in porcine renal proximal tubule epithelial cell line LLC-PK1 monolayers. Takuya Matsumoto, Yui Ishizaki, Keika Mochizuki, Mitsuru Aoyagi, Yoshiharu Mitoma, Shoichiro Ishizaki, Yuji Nagashima. The JSFS 85th Anniversary commemorative international symposium. 2017 年 9 月 22 日. 東京海洋大学 品川キャンパス (東京都港区)
- (4) トラフグ薬物排泄トランスポーターBcrp をコードする Abcg2 遺伝子のクローニング. 松本拓也, 北島冴美, 青柳充, 三苦好治, 石崎松一郎, 長島裕二. 平成 29 年度年度日本水産学会春季大会 2017 年 3 月 26 日. 東京海洋大学 品川キャンパス (東京都港区)
- (5) フグ毒テトロドトキシンの尿中排泄機構に関する研究. 松本拓也, 石崎優衣, 望月桂花. 第 63 回毒素シンポジウム 2016 年 7 月 15 日. (山形県天童市)

[その他]

ホームページ等

県立広島大学研究者総覧

(<https://hiris.pu-hiroshima.ac.jp/profile/ja.4s3XB301rQE9IfOGXOcbBw==.html>)

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。