

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10422

研究課題名（和文）無機ヒ素とマンガンの複合暴露による脳神経細胞障害における相互作用の解明

研究課題名（英文）Interaction between inorganic arsenic and manganese in brain neuronal damage due to combined exposure to inorganic arsenic and manganese

研究代表者

人見 敏明 (Toshiaki, Hitomi)

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90405275

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）：無機ヒ素（iAs）とマンガン（Mn）は認知機能障害の原因物質であるが、iAsとMnの複合暴露での影響は不明である。iAs暴露による血液脳関門（BBB）のタイトジャンクション（TJ）傷害の発生は確認されたが、Mn暴露では確認されなかった。一方、iAsとMnの複合暴露では、MnはiAs単独のBBBのTJ傷害が増強した。iAsとMnの複合暴露の現実から、当該研究の意義と必要性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

無機ヒ素（iAs）やマンガン（Mn）暴露からの認知機能障害に関する解明研究は公衆衛生学において重要な課題である。さらに、慢性ヒ素中毒の発生地域ではMnの同時暴露も存在し、複合暴露による影響の検証が必要である。rat in vitro-BBB modelは、iAsとMnの複合暴露ではBBBのTJ傷害の増強の確認が可能となり、実験動物の代替法になり得るin vitro-BBB modelであった。

研究成果の概要（英文）：Inorganic arsenic (iAs) and manganese (Mn) are causative agents of cognitive dysfunction, but the effects of combined exposure are unknown. We speculate that the cognitive dysfunction caused by iAs exposure may have a mechanism of action whereby tight junction (TJ) injury of the blood-brain barrier (BBB) occurs first, followed by stepwise injury of glial cells and neurons by iAs that have penetrated the BBB. Mn is more likely to transfer to brain tissue than iAs, but the detailed mechanisms of BBB on TJ are unknown. In validation experiments using the rat in vitro BBB model, combined exposure to iAs and Mn increased BBB TJ injury compared to exposure to iAs alone. Furthermore, validation using human brain neurons and rat astrocytes confirmed that combined exposure to iAs and Mn was associated with increased toxicity compared to exposure to each alone. This study highlights the need for research to elucidate the cognitive dysfunction in combined exposure to iAs and Mn.

研究分野：衛生学

キーワード：ヒ素 マンガン 複合暴露 血液脳関門 認知能力障害 認知機能障害 小児 成人

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

無機ヒ素 (iAs) の飲料水汚染が原因で発生した慢性ヒ素中毒はアジアや中南米諸国にて大規模に発生し、現在でも終息に至っていない¹⁾。慢性ヒ素中毒の発生地域における新たな健康影響の問題として、小児の認知能力 (cognitive abilities) の障害や成人での認知機能障害が疫学研究にて明らかになった²⁾。また、非ヒ素汚染地域において食事から摂取する iAs による小児の認知能力への影響も危惧されている¹⁾。

他方、マンガン (Mn) は人においてエッセンシャル元素であるが、しかし、成人では過剰暴露では脳神経障害が発生し、パーキンソン病やアルツハイマー病が知られている。一方、小児における認知機能障害は、アジアや南米での慢性ヒ素中毒発生地域において確認されている。

近年、食事からの過剰な iAs や Mn の摂取から欧州食品安全機関は許容上限摂取量を検討している。すなわち、iAs と Mn は共に認知機能障害の原因物質であり、それらの複合暴露は慢性ヒ素中毒の発生地域、そして、日常の食事において現実存在しており、iAs や Mn の単独暴露に対する複合暴露についての解明が必要と考えている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、iAs、Mn、iAs と Mn 暴露による認知機能障害に関して、その中間過程での作用機序、特に、BBB の TJ 傷害に与える相乗作用の有無について検証を試みた。さらに、iAs と Mn における毒性の相乗作用も不明であることから、ヒトや動物の神経細胞やアストロサイトのモデル細胞を用いて検証を試みた。

3. 研究の方法

iAs と Mn の試験試薬：

三酸化ヒ素 (iAs^{III}) と塩化マンガン () 四水和物 (Mn) を用い、実験では iAs^{III} は 10 μM に固定し、Mn は 10 - 500 μM の範囲にて単独と複合暴露にて検討した。

細胞毒性試験：

ヒト神経芽腫細胞株 (SH-SY5Y) とラットグリオーマ細胞株 (C6) の 2 種類を用い、37 °C、5%CO₂ 条件下で培養した。SH-SY5Y 細胞と C6 細胞を 96well プレートに播種し、翌日、iAs と Mn を単体および複合暴露を行い、24 時間後に Cell Counting Kit-8 (CCK-8, 同人化学研究所) を添加し、マルチラベルリーダー (ARV0x4, PerkinElmer) にて吸光度 450nm を測定した。

BBB-TJ 傷害の評価：

BBB-TJ 傷害は、Wistar 系ラットの初代脳毛細血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトを共培養して作製した rat *in vitro*-BBB model (PharmaCo-Cell) を用い (図 1)、経内皮電気抵抗 (transendothelial electrical resistance, TEER) 値を TEER measurement system (Millicell ERS-2, Merck Millipore) を用いて測定した³⁾。

データ解析：

測定値の統計解析は、一元配置分散分析 (One-way ANOVA、Tukey HSD) にて行った。

4. 研究成果

(1) iAs^{III} と Mn 単独暴露、および、iAs^{III} と Mn 複合暴露での細胞毒性の比較

ヒト神経芽腫細胞株 (SH-SY5Y) での検討：

iAs^{III} は 10 μM、Mn は 10 - 200 μM、iAs^{III} (10 μM) + Mn (10, 100, 200 μM) の実験群において、CCK-8 法での細胞毒性を評価した。iAs^{III} は対照群に比較して毒性が強く発現し (p < 0.01)、Mn は iAs^{III} に比較して毒性が弱い濃度依存的な発現を認めた (p < 0.01)。これに対して、iAs^{III} と Mn の複合暴露では iAs^{III} 単独よりも Mn の存在により毒性が増強する傾向を確認した (p < 0.01) (図 2)。

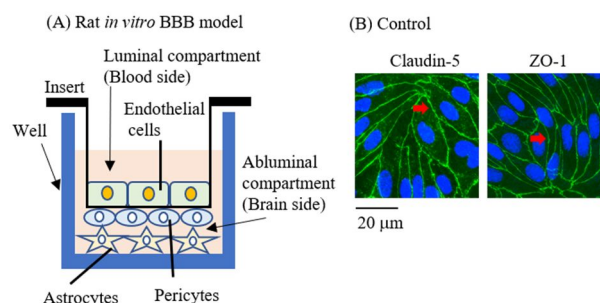


図1 rat *in vitro*-BBB model

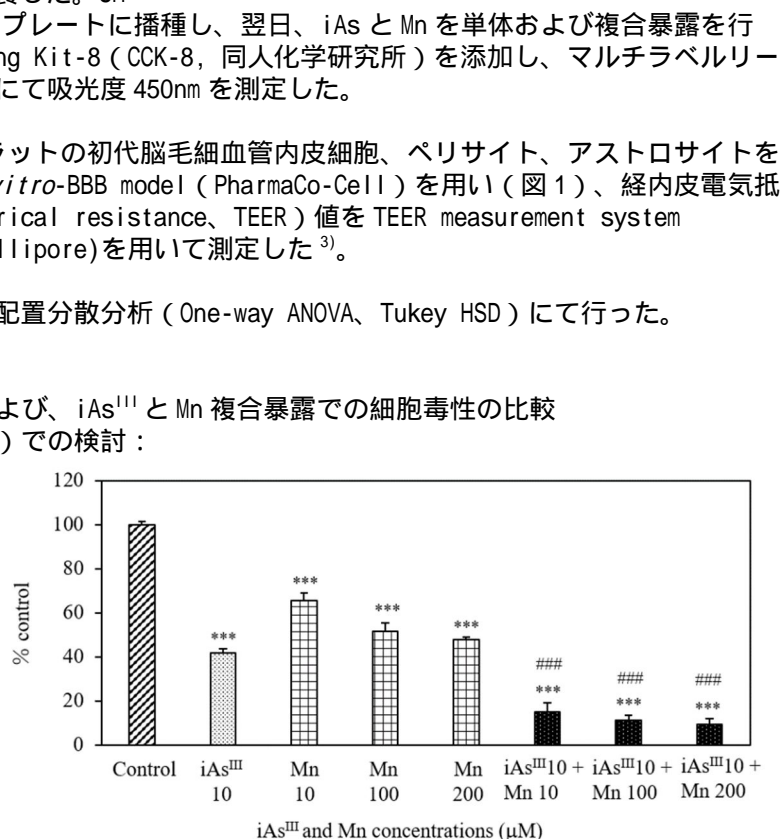


図2 ヒト神経芽腫細胞株でのCCK-8法による毒性比較
***, p < 0.001 vs control. ####, p < 0.0001 vs iAs^{III} (10 μM).

ラットグリオーマ細胞株(C6)での検討：

iAs^{III}は10 μM、Mnは250と500 μM、iAs^{III}(10 μM)+ Mn(250, 500 μM)の実験群において、CCK-8法での細胞毒性を評価した。iAs^{III}は対照群に比較して毒性が強く発現し(p < 0.01)、MnはiAs^{III}に比較して毒性が弱い、高濃度では毒性を認めた(p < 0.01)。これに対して、iAs^{III}とMnの複合暴露ではiAs^{III}単独よりもMnの存在により毒性が増強する傾向を確認した(p < 0.01) (図3)。

SH-SY5YとC6細胞を用いた毒性試験から、MnはiAs^{III}の毒性を相乗的に増加させる作用が明らかになったが、そのメカニズムは不明であり解明が必要である。

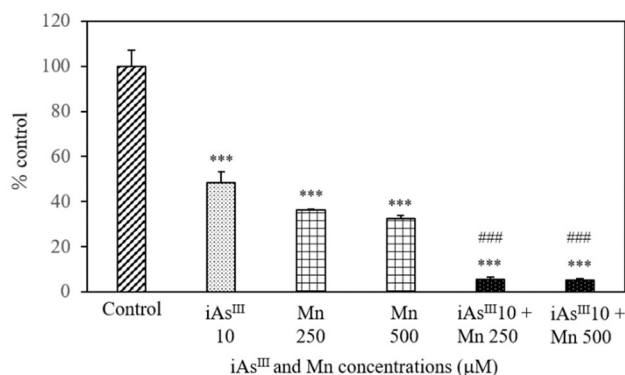


図3 ラットグリオーマ細胞株でのCCK-8法による毒性比較 ***, p < 0.001 vs control. ###, p < 0.001 vs iAs^{III} (10 μM).

(2) rat *in vitro*-BBB model での TJ 傷害の比較：

iAs^{III}は10 μM、Mnは10 - 200 μM、iAs^{III}(10 μM)+ Mn(10, 100, 200 μM)の実験群において、それぞれの試験試薬を rat *in vitro*-BBB model の luminal compartment (blood side) に添加して24時間培養した。24時間目のTEER値は、iAs^{III}では対照群に比較してTJ傷害が発現し(p < 0.01)、しかし、Mnはいずれの濃度でもTJ傷害を認めなかった。これに対して、iAs^{III}とMnの複合暴露ではiAs^{III}単独よりもMnの存在によりTJ傷害が発現した(p < 0.01) (図4)。すなわち、MnはiAs^{III}のTJ傷害を相乗的に作用する可能性が示唆され、他のTJ傷害の指標にての確認も必要となる。

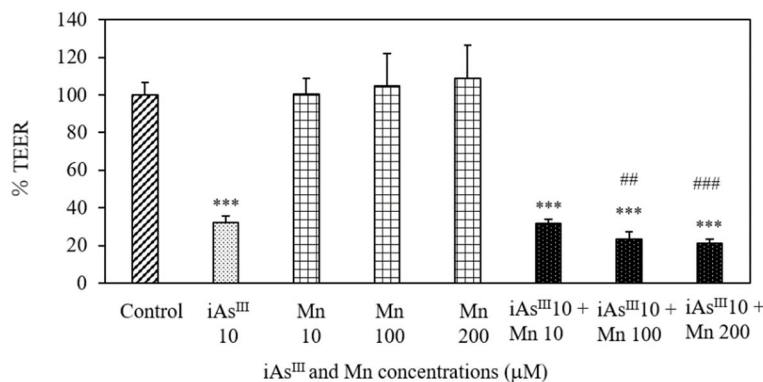


図4 rat *in vitro*-BBB model での TJ 傷害の比較 ***, p < 0.001 vs control. ##, p < 0.01; ###, p < 0.001 vs iAs^{III} (10 μM).

(3) まとめ

SH-SY5YとC6細胞を用いてiAs^{III}とMnの単独、そして、iAs^{III}とMnの複合暴露でのCCK-8法での細胞毒性を検討した結果、Mnの毒性はエッセンシャル元素でありiAs^{III}に比較して弱い傾向であった。本研究において注目した、iAs^{III}とMnの複合暴露はiAs^{III}単独暴露より毒性の増加がSH-SY5YとC6細胞において共通して確認されたが、メカニズムの解明は今後の課題である。他方、rat *in vitro*-BBB modelを用いてBBBのTJ傷害を評価した結果、MnはTJ傷害を発生しなかった。iAs^{III}は酸化ストレス作用にてBBBのTJ傷害を発生する知見は、我々の先行研究と一致していた³⁾。これまでの疫学研究において、iAsやMn暴露はそれぞれ認知機能障害の原因物質であることが明らかになり、さらに、iAsとMnの複合暴露の機会も存在しており、本研究から、iAs^{III}とMnの複合暴露ではiAs暴露よりTJ傷害を増強することが明らかになり、この様な背景から、当該研究の意義と更なる充実の必要性が明らかになった。

(4)文献

1. Yamauchi H, Yoshida T, Takata A. Arsenic exposure and health effects: Differences by chemical structure, chemical form and arsenic methylation capacity. In: Huq SMI, editor. Arsenic in the environment - Sources, impacts and remedies. London: IntechOpen; 2023. <https://doi.org/10.5772/intechopen.1001454>
2. WHO. Arsenic. 2022. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/arsenic>
3. Yamauchi H, Hitomi T, Takata A. Evaluation of arsenic metabolism and tight junction injury after exposure to arsenite and monomethylarsonous acid using a rat in vitro blood-Brain barrier model. PLoS One 2023,18(11):e0295154. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0295154>.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamauchi H, Hitomi T, Takata A.	4. 巻 18(11)
2. 論文標題 Evaluation of arsenic metabolism and tight junction injury after exposure to arsenite and monomethylarsonous acid using a rat in vitro blood-Brain barrier model.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0295154
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0295154.	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 人見敏明、高田礼子、山内博
2. 発表標題 Rat in vitro BBBモデルで評価した3価ヒ素暴露によるタイトジャンクション傷害
3. 学会等名 第94回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2024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
研究分担者	高田 礼子 (Takata Ayako) (30321897)	聖マリアンナ医科大学・医学部・教授 (32713)	
研究分担者	山内 博 (Yamauchi Hiroshi) (90081661)	聖マリアンナ医科大学・医学部・教授 (32713)	

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
---------	---------