

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18887

研究課題名(和文) 低濃度メチル水銀の解毒薬・予防薬の創薬

研究課題名(英文) Search for compounds that suppress the effects of low-dose methylmercury

研究代表者

中村 亮介 (Ryosuke, Nakamura)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：50383659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：免疫反応が亢進している病態である食物アレルギー及びアトピーモデルマウスにおいて、メチル水銀(MeHg)は病態を増悪しなかった。

また、生薬由来化合物からMeHgの毒性に効果を示す化合物の探索を行い、オレアノール酸のサポニン誘導体であるSA006が抗MeHg活性を持つことを見出した。SA006は、細胞内へのMeHg取込みを抑制することで抗MeHg作用を示すことが示唆された。また、in vivoにおいてもSA006は肝臓、腎臓、脾臓、小脳、大脳において臓器中の総水銀量を減少させた。以上より、SA006は臓器へのMeHg蓄積を抑制することでMeHgの影響を抑える可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Methylmercury (MeHg) did not exacerbate the pathology of food allergy and atopy model mice in which the immune response is enhanced.

Herbal derived compounds were explored about inhibitory effects of methylmercury (MeHg) toxicity. SA006 treatment significantly increased cell viability and suppressed cellular intake of MeHg in MeHg exposure cells. To verify the therapeutic effects of these compounds on the MeHg toxicity, mice were administered MeHg with/without pretreatment of SA006 5 times a week for 4 weeks. SA006 significantly decreased MeHg accumulation in liver, kidney, spleen, cerebrum and cerebellum. These results suggested SA006 inhibits MeHg toxicity by suppressing an accumulation of MeHg in organs.

研究分野：毒性学

キーワード：メチル水銀 抗メチル水銀薬 サポニン化合物

1. 研究開始当初の背景

わが国は、水銀汚染を原因とした深刻な健康被害を呈する水俣病を経験した。一方、世界規模で見ると、アマゾン川流域や中国等、未だ深刻な水銀汚染が認められる地域が存在する。水銀は工業的に有用な物質であるため、温度計や圧力計等の計器、電極、水銀灯、歯科用アマルガムなど多様な用途があり、これらの製造・使用・廃棄の工程で排出される。また、水銀は地殻に含有するため、食物中の水銀濃度をゼロにすることはできない。水銀は主として環境中に存在する微生物によってメチル水銀 (MeHg) へ変換される。MeHg は食物連鎖により濃縮されるため、マグロ等の高次消費者へ蓄積し、それらを摂取することで、我々は微量ながらも絶えず MeHg ばく露を受け続けている。

高濃度 MeHg ばく露は、水俣病に代表される神経毒性をはじめとして腎臓、肝臓、心臓等生体内の様々な臓器へ影響を及ぼすことが示されている。一方、MeHg の免疫系への影響や分子レベルでの MeHg 毒性の作用点は未だ不明である。

また近年、MeHg の胎児期のばく露が運動機能に影響を与える可能性 (Suzuki K et al. Environ. Res. 2010) や、成人期において“耐容週間摂取量”相当の低濃度 MeHg を魚介類を介して長期間摂取することで、心疾患のリスクを高める可能性 (Yaginuma-Sakurai K et al. Neurotoxicol. Teratol. 2010) が示唆されており、現在のわが国におけるばく露状況に即した、低濃度反復ばく露によっても健康へ悪影響を与える可能性が懸念される。

MeHg 急性中毒に対しては、キレート作用を持つ N アセチルシステインや 2,3 ジメルカプトプロパンスルホン酸等が用いられ、MeHg の体外排出を促進することで臨床薬として使われている。実験的には、 α -トコフェロールやグルタチオン等の化合物が MeHg による神経傷害に対し保護的に働くと考えられる。また、近年、天然物由来の化合物の抗 MeHg 作用に関しての検討結果から、ワサビやブロッコリーに含まれるイソチオシアネートが MeHg の毒性を *in vivo* において抑制することが報告された (Toyama T et al. Environ. Health Perspect. 2011)。しかし、これらは高濃度 MeHg ばく露に対する効果を検討しており、マグロなどの MeHg を含有する食事から日常的にばく露されるような MeHg の低濃度・反復ばく露に対する解毒薬研究はみられない。

2. 研究の目的

本研究では

(1). MeHg の免疫機能への影響、特に免疫機能が更新しているアレルギー病態に対する MeHg の影響

(2). 低濃度 MeHg の毒性を抑制する化合物の探索

低濃度 MeHg の毒性抑制作用を示す生薬由

来化合物の *in vitro* スクリーニング

in vivo における MeHg 毒性抑制作用の検証
解毒効果のある化合物の MeHg 毒性抑制メカニズムの解析を行うことを目的とし、MeHg の毒性予防・治療のための新たな知見を得ることを目指した。

3. 研究の方法

(1). MeHg の免疫機能への影響の検討

食物アレルギーモデルマウスの病態に対する MeHg の影響

マウスに卵白アルブミン (OVA) をばく露することで食物アレルギーモデルマウスを作製した。並行して MeHg (0.02, 1 mg/kg) を週 5 回 6 週間にわたり経口投与し、投与終了 24 時間後に血清を採取し、血清中の抗体 (OVA 特異的 IgE, OVA 特異的 IgG1)、サイトカイン (IL-4, IL-13, IFN- γ) 濃度を測定した。

アトピーモデルマウスの病態に対する MeHg の影響

マウスにダニ抗原をばく露することでアトピーモデルマウスを作製した。並行して MeHg (0.02, 1, 5 mg/kg) を週 5 回 4 週間にわたり経口投与し、投与終了 24 時間後に血清を採取し、血清中の抗体 (総 IgE, 総 IgG)、サイトカイン (IL-4, IL-13, IFN- γ) 濃度を測定した。

(2). MeHg 毒性予防・軽減作用を持つ生薬由来化合物の探索

生薬由来化合物から MeHg の毒性予防・軽減作用を持つ化合物を見出すため、*in vitro* でスクリーニングし、*in vivo* でその効果を検証した。

MeHg 毒性予防・軽減作用を持つ生薬由来化合物のスクリーニング

MeHg の毒性影響の評価には MeHg 吸収部位である腸管を想定し、ヒト腸管由来の Caco-2 細胞を用い検討を行った。細胞に生薬由来化合物 (1-5000 nM) を前処理の後 MeHg (0.1-10 μ M) をばく露し、24 時間培養後に細胞生存率を指標に影響評価した。次に、MeHg 毒性抑制効果が認められた化合物を Caco-2 細胞へ前処理した後、20 分後に放射標識した $^{14}\text{CH}_3\text{HgCl}$ を細胞にばく露し、30 分後に放射活性を測定することで、Caco-2 細胞内への MeHg 取込みに対する候補化合物の効果について検討した。

MeHg 毒性予防・軽減作用を持つ生薬由来化合物の効果の検証 (*in vivo*)

MeHg に関して、神経症状を主とした中毒を起こしうる高濃度ばく露群及び実社会においてばく露しうる低濃度ばく露群を含む複数条件を設定し検討を行った。*in vitro* スクリーニングによって得られた候補化合物を前投与し、1 時間後に MeHg をばく露した。MeHg および化合物は週 5 回 4 週間経口投与した。

ばく露期間中は週 1 回の体重測定を行った。最終ばく露 24 時間後に解剖し、脳、肝臓、腎臓、胃、小腸、盲腸、大腸を採取した。MeHg ばく露部位である消化管や、脳・肝臓・腎臓といった水銀が蓄積する部位の MeHg 含有量を測定することで、MeHg の体内蓄積及び排出への影響について検討した。

4. 研究成果

(1). MeHg の免疫機能への影響の検討

腸管を介して免疫惹起される食物アレルギーモデルマウスにおいて、抗原である OVA ばく露によって誘導された血清中の抗体 (OVA 特異的 IgE, OVA 特異的 IgG1) やサイトカイン (IL-4, IL-13) は MeHg のばく露によって大きな影響は受けなかった (図 1)。

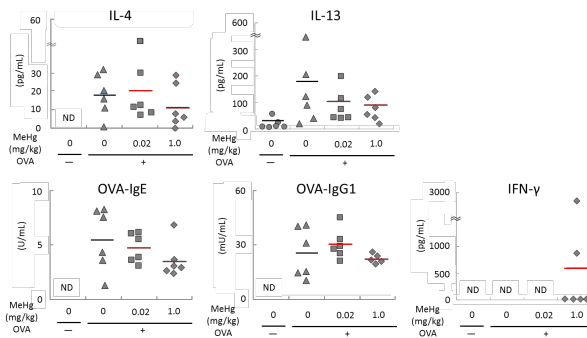


図 1 食物アレルギーモデルマウスにおいて MeHg が Th2 アレルギー関連因子の血清濃度へ及ぼす影響

次に、食物アレルギーとは異なる経路で免疫惹起されるアトピー性皮膚炎モデルマウスへの MeHg 反復ばく露による免疫機能への影響について解析した。ダニ抗原感作によって誘導された血清 IL-13, 総 Ig-E, 総 IgG は MeHg ばく露によって大きな影響は受けなかった (図 2)。

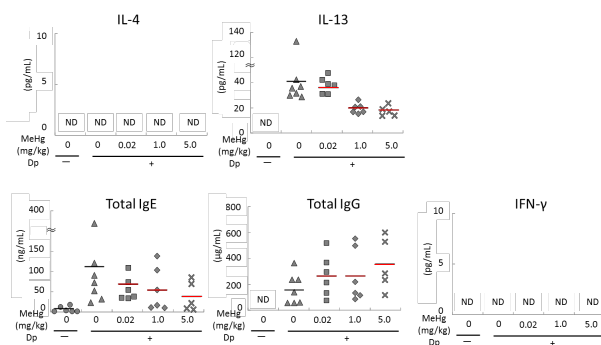


図 2 アトピーモデルマウスにおいて MeHg が Th2 アレルギー関連因子の血清濃度へ及ぼす影響

以上より、抗原の種類やばく露経路によらず、MeHg は抗原ばく露により亢進している免疫状態を少なくとも増悪はしないことが示唆された。

(2). MeHg 毒性予防・軽減作用を持つ生薬由来化合物の探索

来化合物の探索

MeHg 毒性予防・軽減作用を持つ生薬由来化合物のスクリーニング

オレアノール酸をアグリコンとするサポニン誘導体及び、市販のサポニン、ステロイド化合物について抗 MeHg 作用を検討したところ、オレアノール酸の C3 位グルコース結合体 (SA006) は添加濃度に応じて MeHg ばく露による細胞死を抑制する傾向が認められ、4 μ M の前処理によって有意な細胞死抑制効果が認められた。(図 3)

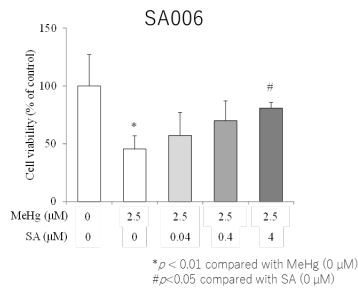


図 3 MeHg による細胞死に対するサポニン化合物の効果

MeHg による細胞死を抑制する効果が認められた SA006 について Caco-2 細胞への MeHg 取込みへの影響について検討した。各化合物を Caco-2 細胞へ 20 分間前処理し、5 μ M の MeHg を 30 分間ばく露したところ、4 μ M SA006 の前処理により細胞内 MeHg 量の有意な減少が認められた (図 4)。

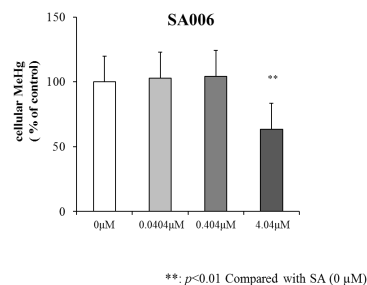


図 4 MeHg の細胞内取り込みに対するサポニン化合物の効果

以上より Caco-2 細胞において、SA006 は細胞内への MeHg 蓄積を抑制することで MeHg 毒性抑制作用を示すことが示唆された。

MeHg 毒性予防・軽減作用を持つ生薬由来化合物の検証 (in vivo)

In vitro で MeHg 毒性抑制作用が示唆された SA006 について in vivo において効果を検証した。週 5 回、4 週間にわたり SA006 及び MeHg をマウスに経口投与し、解析を行った。

MeHg による影響は体重減少として顕著に表れるため週 1 回体重を測定したところ、高濃度 MeHg (5 mg/kg) ばく露群において実験終盤に体重が減少する傾向が認められたが、SA006 は MeHg による体重減少に影響を与えなかった。

投与終了後、食餌由来の MeHg の吸収部位である消化管、及び肝臓、腎臓、脾臓、小脳及び大脳における総水銀濃度を測定した。消化管においては胃、小腸、盲腸、大腸のいずれの部位においても 1.0 mg/kg MeHg ばく露条件において SA006 が臓器中総水銀濃度を減少させる傾向が認められた (図 5)。

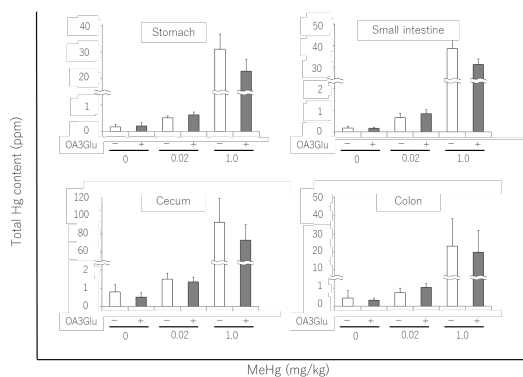


図 5 消化管組織中水銀濃度に対する SA006 の効果

また、肝臓、腎臓、脾臓、小脳、大脳においては、いずれの臓器でも 1.0 mg/kg MeHg ばく露条件において SA006 が有意に臓器中総水銀濃度を減少させた。一方 0.02 mg/kg MeHg ばく露条件において SA006 は臓器中水銀濃度に影響を与えなかった (図 6)。

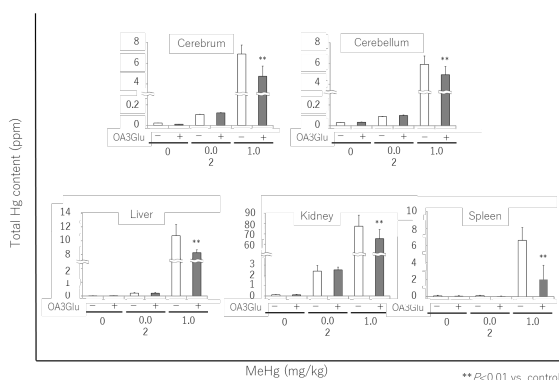


図 6 臓器中水銀濃度に対する SA006 の効果

以上より、SA006 は MeHg の臓器への水銀蓄積を抑制することで MeHg の毒性影響を抑える可能性が示された。

また、SA006 は比較的高濃度の MeHg ばく露において臓器への水銀蓄積を抑制する効果があることが示唆された。今後、SA006 をリード化合物とした MeHg 毒性抑制効果の作用メカニズムに関して解析を進めていく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Nakamura R, Takanezawa Y, Sone Y, Uruguchi S, Sakabe K, Kiyono M. Immunotoxic effect of low-dose methylmercury is negligible in mouse

models of ovalbumin or mite-induced Th2 allergy. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 39: 1353-8, (2016), DOI: 10.1248/bpb.b16-00306, (査読有)

〔学会発表〕(計 3 件)

中村亮介、高根沢康一、曾根有香、浦口晋平、白畑辰弥、岩井孝志、小林義典、田辺光男、清野正子 メチル水銀による神経障害に対する OA3Glu の効果 日本薬学会第 137 年会 2017.3.27、仙台国際センター(仙台市)

中村亮介、高根沢康一、曾根有香、浦口晋平、白畑辰弥、小林義典、清野正子 メチル水銀の神経毒性に対するオレアノール酸 3-グルコシドの効果 フォーラム 2016 衛生薬学・環境トキシコロジー 2016.9.10、昭和大学旗の台キャンパス(東京都)

中村亮介、高根沢康一、曾根有香、浦口晋平、白畑辰弥、小林義典、清野正子 オレアノール酸 3-グルコシドによる抗メチル水銀作用に関する研究 フォーラム 2015 衛生薬学・環境トキシコロジー 2015.9.17、神戸学院大学ポートアイランドキャンパス(神戸市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 亮介 (NAKAMURA, Ryosuke)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：50383659