

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 13 日現在

機関番号：25406

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850144

研究課題名(和文)フグ毒テトロドトキシンのヒト消化管吸収メカニズムの解明

研究課題名(英文)A study of intestinal absorption mechanism of tetrodotoxin.

研究代表者

松本 拓也 (MATSUMOTO, Takuya)

県立広島大学・生命環境学部・助教

研究者番号：30533400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、フグ毒テトロドトキシシン(TTX)の消化管吸収メカニズムを明らかにするため、ヒト大腸癌由来Caco-2細胞による消化管吸収モデルを利用してTTXの吸収を調べた。その結果、TTXの消化管吸収経路は、トランスポーターが関与する経細胞輸送経路であることが示された。さらに、トランスポーター阻害剤を利用した吸収阻害試験により、TTXの輸送には、いくつかの有機イオントランスポーターが関わっていることが示唆された。これらの成果は、TTXの輸送を担うトランスポーターの特定に繋がることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Puffer fish contains a powerful neurotoxin, tetrodotoxin (TTX) in liver, ovary, and skin. Puffer fish poisoning develops after the ingestion of these toxic tissues. Today, puffer fish poisoning occurs annually in Japan and many other countries and regions. This study examined the transport of TTX in human intestinal Caco-2 cell monolayers, and revealed that the transport of TTX across Caco-2 cell monolayers was achieved by transcellular transport pathway. Transport inhibition assay suggested that the transport of TTX was mediated by organic ion transporters. Identification of transporters that mediate intestinal absorption of TTX merit further research.

研究分野：農学

キーワード：フグ テトロドトキシシン 食中毒 消化管吸収 Caco-2細胞 トランスポーター 食品衛生

1. 研究開始当初の背景

日本近海に生息するフグ科魚類は、主に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ため、誤って有毒な部分を食べた場合は、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)と呼ばれ、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(呼吸困難)により死に至る。我が国では、フグ食中毒の発生を防ぐため、フグの取扱いに免許や資格制度を導入し、昭和58年、厚生労働省の通知によって食用可能なフグの漁獲海域や種類と部位を定めた結果、フグ料理を提供する営業者による食中毒は大幅に減少したが、現在でも、家庭や無資格者による誤った調理や不注意による事故は絶えず、フグ食中毒による死者数は、年間食中毒死者数の過半数を占めている。このようにフグ食中毒は、食品衛生上の重大な問題であり、フグの食品としての安全性を確保しなければならない。

これまでに研究代表者らは、フグの毒化機構の解明研究で、トラフグの成魚に投与したTTXは、腸管から速やかに吸収されて血液中に到達し、肝臓に濃縮されること、トラフグ成魚の有毒部位である肝臓へのTTXの取り込みには、ナトリウムイオンに依存性を示すトランスポーターが関与すること、トラフグの幼魚にTTXを投与すると、肝臓のTTX濃度は一時的に上昇するものの漸減し、胆汁中のTTX濃度が上昇することを明らかにし、TTXの胆汁排泄に薬物排泄トランスポーターの関与を示唆した。

一方、ヒトでは、食中毒患者の血中のTTXは、摂取後12~24時間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ことが報告されているが、TTXの代謝や解毒に関わる詳しいメカニズムは明らかにされていない。TTXの代謝に関する研究は、動物実験で投与したTTXが血中や尿中に検出された報告や食中毒患者の血液および尿中のTTXの機器分析法に関する報告などで、代謝メカニズム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、研究代表者らが進めているフグの毒化機構の解明研究に比べて遅れている。TTXによる食中毒症状は、食後20分から3時間程度の短時間で現れることから、フグの有毒部位を摂取した患者の消化管では、フグの有毒部位が消化されてTTXが消化管から吸収されていると推定されるため、消化管における吸収メカニズムを薬物動態学的に調べるのが重要である。また、現在のフグ食中毒に対する治療法は、呼吸の維持などの対症療法しかないため、効果的な治療法の開発が急務である。本研究により、TTXの消化管吸収メカニズムが明らかになれば、対症療法のほかに、TTXを消化管から吸収させないなどの新たな治療方法を開発できると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト大腸癌由来Caco-2細胞を利用し、*in vitro*にてTTXの消化管吸収を調べ、そのメカニズムを明らかにすることを目的とする。Caco-2細胞は、一定の条件下で培養すると、ヒト小腸上皮粘膜状の単層膜を形成する。Caco-2細胞には、ヒトの小腸と同様に、様々な種類のトランスポーターと呼ばれる機能性膜タンパク質が発現し、物質の消化管吸収や排泄に関与している。そこで、Caco-2細胞を培養して細胞単層膜を形成し、どのようなタイプのトランスポーターがTTXの吸収に関わっているのかTTX吸収試験を行うて調べた。

3. 研究の方法

①Caco-2細胞単層膜によるTTXの吸収評価

Caco-2細胞を24ウェルのカルチャープレートに装着したトランズウェルに播種して3週間培養し、細胞単層膜を形成させた(図1)。このCaco-2細胞単層膜の頂端膜側(消化管腔側)に50 μM TTXを含む緩衝液を加え、37°Cでインキュベートした。基底膜側(血管側)の緩衝液を経時的に回収し、吸収方向へ輸送されたTTXを高速液体クロマトグラフ質量分析計(LC/MS/MS)で定量した。さらに、TTXの輸送に及ぼす緩衝液のpHとインキュベーション温度の影響も調べた。

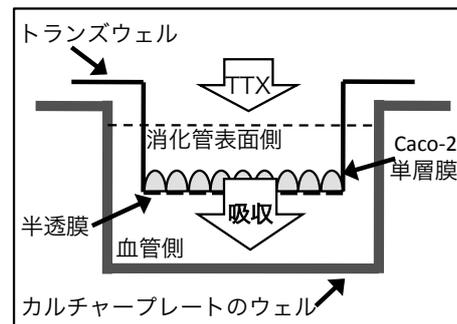


図1. Caco-2細胞単層膜を用いた消化管吸収モデル。

②Caco-2細胞単層膜によるTTXの排泄評価

Caco-2細胞単層膜を形成後、①とは反対に、Caco-2細胞の基底膜側に50 μM TTXを含む緩衝液を加え、37°Cでインキュベートした。頂端膜側の緩衝液を回収し、排泄方向へ輸送されたTTX量を定量した。吸収評価の場合と同様に、TTXの輸送に及ぼす緩衝液のpHとインキュベーション温度の影響も調べた。

③Caco-2細胞単層膜によるTTXの吸収阻害試験

24ウェルのカルチャープレートに装着したトランズウェルでCaco-2細胞を3週間培養して細胞単層膜を形成後、頂端膜側に50 μM TTXと各種トランスポーター阻害剤を含む緩衝液を加え、37°Cでインキュベートした。インキュベーション終了後、基底膜側の緩衝液を回収し、吸収方向に輸送されたTTXをLC/MS/MSで定量した。

④トランスポーター発現メンブランによる TTX 輸送活性測定

ヒトの薬物排泄トランスポーターである MDR 1 (Multi-drug resistance 1), BCRP (Breast cancer resistance protein), MRP1 (Multidrug resistance associated protein 1) および MRP2 を昆虫細胞に過剰発現させて調製した市販の細胞膜を用いて, 付属の実験方法説明書に従って薬物排泄トランスポーターの TTX 輸送活性を調べた。

4. 研究成果

①Caco-2 細胞単層膜による TTX の吸収と排泄

最初に, Caco-2 細胞単層膜による吸収方向の TTX 輸送量を経時的に調べた(図 2)。Caco-2 細胞単層膜の頂端膜側に相当する培養ウェル上面に 50 μ M TTX を含む緩衝液を添加すると, TTX は, 細胞単層膜を介して基底膜側に相当する下面側ウェルへ輸送され, その TTX 量は経時的に増加した。細胞単層膜を境界として培養ウェルと上面側と下面側を異なる pH の緩衝液で満たして pH 勾配が形成された状態(頂端膜側 pH6.0, 基底膜側 pH7.4)と同一の緩衝液を使用して pH 勾配がない状態(両側とも pH7.4)で TTX 輸送量を比較すると, 両者の間に有意な差は見られず, TTX の輸送に pH 勾配を輸送駆動力とする傾向は観察されなかった。

次に, Caco-2 細胞単層膜による TTX 輸送速度に及ぼすインキュベーション温度の影響を調べた(図 3)。インキュベーション温度が 37°C の場合の TTX 輸送速度を 100% とすると, インキュベーション温度を 4°C に低下させると, 吸収方向の輸送速度と排泄方向の輸送速度は, 25% 以下に有意に低下した。このことから, Caco-2 細胞単層膜による TTX の輸送は, 細胞間のタイトジャンクションを濃度勾配に従って単純拡散により通過する細胞間隙輸送ではなく, 細胞膜からトランスポーターによって細胞内へ取り込まれ, 細胞内から再び細胞外へトランスポーターを介して輸送される経細胞輸送経路であることが示唆された。

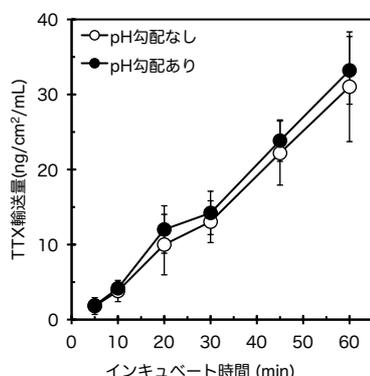


図 2. Caco-2 細胞単層膜による TTX 吸収量の経時変化. TTX 輸送量(平均値±標準誤差)は, pH 勾配あり(頂端膜側 pH6.9, 基底膜側 pH7.4)と pH 勾配なし(頂端膜側 pH7.4 基底膜側 pH7.4)の条件下で測定した。

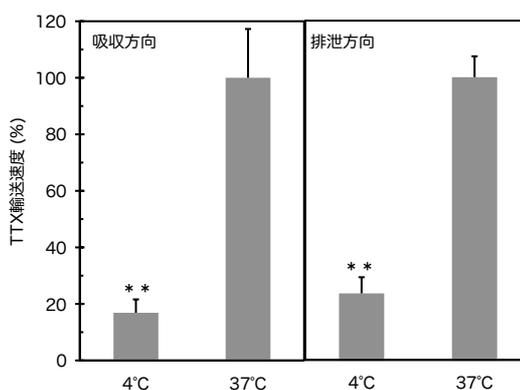


図 3. Caco-2 細胞単層膜による TTX 輸送速度に及ぼすインキュベーション温度の影響. TTX 輸送速度(平均値±標準誤差)は, 37°C で測定した値を 100% として表示した. 平均値の有意差は, $P > 0.01$ (***) で示した。

②Caco-2 細胞単層膜による TTX の吸収阻害試験

Caco-2 細胞単層膜による TTX の経細胞輸送に関わるトランスポーターを調べるため, Caco-2 細胞単層膜の頂端膜側に相当する培養ウェル上面に 50 μ M TTX と 5 mM の各種トランスポーター阻害剤を含む緩衝液を添加し, 吸収方向の TTX 輸送試験を行った(図 4)。対照区の TTX 輸送量を 100% とすると, 5 mM p-アミノ馬尿酸 (PAH) 添加区では, 有意差はないものの, TTX 輸送量が 7 割程度まで低下した。また, 緩衝液中の塩化ナトリウムを同濃度の塩化コリンで置換すると (Na^+ 置換), TTX 輸送量は, 2 割まで有意に低下した。

実験終了後に, 実験に使用した Caco-2 細胞単層膜を回収し, 細胞内部に蓄積した TTX 量を測定した(図 5)。対照区の細胞内蓄積量を 100% とすると, 5 mM テトラエチルアンモニウム (TEA) 添加区および 5 mM L-カルニチン添加区の TTX 蓄積量は, 6 割程度まで有意に低下した。

以上の結果から, Caco-2 細胞による TTX の吸収には, PAH を輸送する有機アニオントランスポーター, TEA および L-カルニチンを輸送する有機カチオントランスポーターなど有機イオン系トランスポーターが関与していることが示唆された。

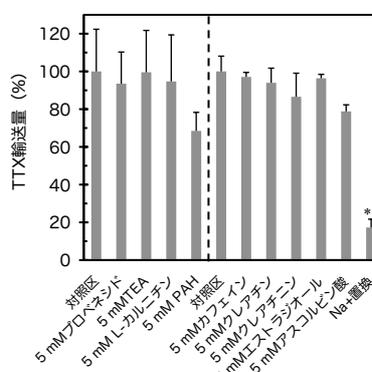


図 4. Caco-2 細胞単層膜による吸収方向の TTX 輸送に及ぼす各種トランスポーター阻害剤の影響. Caco-2 細胞単層膜の頂端膜側に 50 μ M TTX と 5 mM 阻害剤を含む緩衝液を加え, 37°C で 30 分間インキュベートしたときの TTX 輸送量を平均値±標準誤差で示した. 平均値の有意差は, $P > 0.01$ (***) で示した。

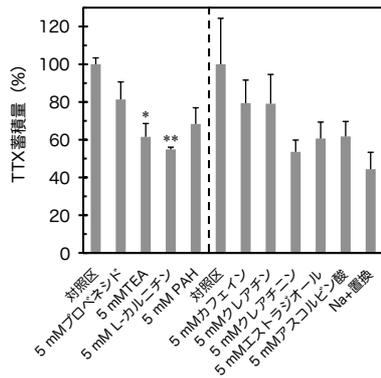


図5. Caco-2 細胞単層膜による吸収方向の TTX 輸送に及ぼす各種トランスポーター阻害剤の影響。Caco-2 細胞単層膜の頂端膜側に 50 μ M TTX と 5 mM 阻害剤を含む緩衝液を加え、37°C で 30 分間インキュベートしたときの細胞内 TTX 蓄積量を平均値 \pm 標準誤差で示した。平均値の有意差は、 $P > 0.01$ (***) または $P > 0.05$ (*) で示した。

④ トランスポーター発現メンブランによる TTX 輸送活性測定

ABC トランスポーターファミリーは、ATP の加水分解エネルギーを利用して濃度勾配に逆らって物質を輸送する薬物排泄トランスポーターである。本実験では、このうち、消化管に発現している BCRP, MDR1, MRP1 および MRP2 の TTX 輸送活性を ATP の分解活性を指標に評価した(図6)。BCRP は、これら4つの中で最も TTX 輸送活性が高く、次に MRP2 が続いた。MDR1 と MRP1 の TTX 輸送活性は同じレベルで、BCRP の 1/5 程度であった。薬物排泄トランスポーターは、腸管で吸収される異物を再び消化管管腔内へ排泄する役割があることから、消化管で吸収される TTX の一部は、BCRP 等の薬物排泄トランスポーターによって、再び管腔内へ排泄されている可能性が考えられた。

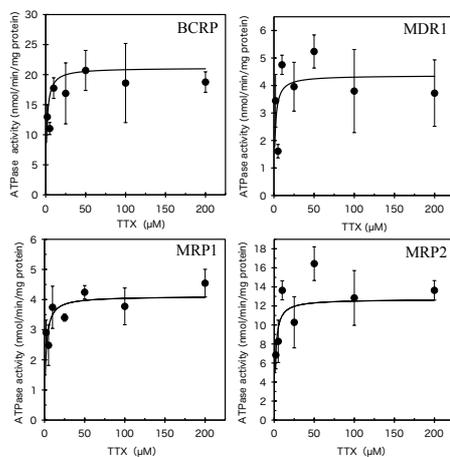


図6. 薬物排泄トランスポーター発現メンブランによる TTX の輸送活性測定。BCRP, MDR1, MRP1 および MRP2 を個別に発現させた市販のメンブランを 0~200 μ M TTX を含む緩衝液でインキュベートし、TTX 輸送活性を測定した。

⑤ まとめ

本研究では、TTX の消化管吸収メカニズムを明らかにするため、ヒト大腸癌由来 Caco-2 細胞を利用して、TTX を輸送するトランスポーターを調べた。TTX の吸収量と細胞内蓄積量は、有機イオンである TEA, L-カルニチンおよび PAH により低下したことから、有機イオントランスポーターが TTX の輸送に関与している可能性が考えられた。具体的には、TEA の輸送体である有機カチオントランスポーター(OCT), L-カルニチンの輸送体であるカルニチントランスポーター(OCTN), そして PAH の輸送体である有機アニオントランスポーター(OAT)や有機アニオン輸送ポリペプチド(OATP)の関与が考えられる。さらに本研究では、TTX の排泄方向の輸送には、薬物排泄トランスポーターの BCRP が大きく関与していることが示唆された。本研究により、TTX を輸送するトランスポーターをある程度まで絞り込むことができた。TTX の代謝に関わるトランスポーターの役割を明らかにできれば、新たなフグ食中毒の治療や予防に繋がると期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

①望月桂花, 原田浩幸, 松本拓也. ヒト腸管由来 Caco-2 細胞によるフグ毒テトロドキシンの輸送. 2015 年度 第 21 回 Hindgut Club JAPAN シンポジウム, 2015 年 12 月 5 日, 専修大学 神田キャンパス (東京都千代田区)

②石崎優衣, 望月桂花, 安井香菜, 松本拓也. ヒト薬物排泄トランスポーターによるテトロドキシンの輸送活性測定. 平成 27 年度日本水産学会春季大会, 2015 年 3 月 28 日, 東京海洋大学 品川キャンパス (東京都港区)

③望月桂花, 安井香菜, 石崎優衣, 松本拓也. ヒト腸管由来 Caco-2 細胞によるフグ毒の吸収と排泄. 平成 27 年度日本水産学会春季大会, 2015 年 3 月 28 日, 東京海洋大学 品川キャンパス (東京都港区)

[図書] (計 1 件)

①長島裕二, 松本拓也. 日本臨床社. 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.30 神経症候群(第 2 版)-その他の神経疾患を含めて-V (担当:分担執筆 範囲:フグ毒), 680-683, 2014 年.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

(1) ホームページ

① 県立広島大学研究主総覧

<https://hiris.pu-hiroshima.ac.jp/profile/ja.URMx8jJYneLsbeTC2WjIYA==.html>

(2) 講演等（計 3 件）

① 松本拓也. 生物のふしぎ フグとフグ毒の話. 平成 27 年度県立広島大学模擬講義, 広島県立広島高等学校, 広島県呉市, 2015 年 10 月 22 日.

② 松本拓也. フグの毒化機構と食中毒. 平成 26 年度文部科学省指定スーパーサイエンスハイスクール事業サイエンス講座, 広島県立広島国泰寺高等学校, 広島市中区, 2014 年 9 月 3 日.

③ 松本拓也. 身近な危険生物と自然毒. 平成 25 年度県立広島大学市民公開講座, 県立広島大学庄原キャンパス, 広島県庄原市, 2013 年 11 月 19 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 拓也 (MATSUMOTO TAKUYA)
県立広島大学・生命環境学部・助教
研究者番号：30533400

(2) 研究協力者

- ① 石崎 優衣 (ISHIZAKI YUI)
県立広島大学・生命環境学部・学部生
- ② 望月 桂花 (MOCHIZUKI KEIKA)
県立広島大学・生命環境学部・学部生
- ③ 安井 香菜 (YASUI KANA)
県立広島大学・生命環境学部・学部生