

新生仔ラット大脳皮質の初代培養神経系細胞における メチル水銀の毒性に及ぼす細胞密度の影響

Influence of Cell Density on Toxicity of Methylmercury in Primary Cultures of Neural Cells from Cerebral Cortex of Newborn Rats

足立 達美¹⁾・多田 浩紀¹⁾・倉橋 聖哉¹⁾・鈴木 康之²⁾・柳澤 泰任¹⁾

Tatsumi ADACHI¹⁾, Hiroki TADA¹⁾, Seiya KURAHASHI¹⁾, Yasuyuki SUZUKI²⁾ and
Yasuhide YANAGISAWA¹⁾

メチル水銀のような有害化学物質の蓄積や毒性発現に細胞密度が影響を与えるかどうかを明らかにするために、新生仔ラット大脳皮質から調製した神経系細胞を、無血清培地を用いて高密度または低密度で培養し、種々の濃度のメチル水銀をシステイン複合体として曝露し、システインのみを曝露した場合と生細胞数の比較を行った。高密度で培養した場合は、低密度で培養した場合よりも、低濃度のメチル水銀の曝露によって生細胞数の低下が認められ、同じ曝露濃度の場合にはその低下率が大きい傾向を示した。水銀蓄積量は、高密度で培養した方が低密度培養の場合よりも高い値を示したことから、神経系細胞を高密度で培養すると低密度で培養した場合よりも水銀蓄積量が高くなるため、メチル水銀の影響が強く現れた可能性が考えられる。従って、神経系細胞へのメチル水銀の蓄積や毒性発現に対して細胞密度が重要な因子の一つであると考えられる。

I. はじめに

水銀^{1,2)}は、原子番号 80、原子量 200.59 の金属元素であり、常温、常圧において液体で存在するという特殊な性質を有している。また、広い温度範囲でほぼ一定かつ高い体膨張率を示すため、その化学的及び物理学的性質

を活用して、工業、医療、研究、日用品などの様々な分野で利用されてきた³⁾。しかし、同時に、水銀は生物に対する高い毒性を有しており、公害原因物質、環境汚染物質としても問題となっている。本研究で用いるメチル水銀は、1956年に熊本県水俣市で発生が確認された水俣病の原因物質である⁴⁾。メチル水銀は、消化管から容易に吸収され、血液-脳関門などの組織関門を容易に通過する^{1,2)}。メチル水銀はチオール基に対する親和性が高いため、血漿中ではアルブミン、システイン、グルタチオンなどのチオール化合物と結合して存在している^{3,5)}が、システインと結合したメチル水銀は中性アミノ酸輸送系により脳内に取り込まれる^{6,7)}。メチル水銀の神経毒性に関しては、成人では小脳皮質の顆粒細胞や大脳皮質の視覚中枢、運動及び知覚中枢、聴覚中枢など、比較的限

連絡先：足立達美 tadachi@cis.ac.jp

1) 千葉科学大学薬学部薬学科

Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Chiba Institute of Science

2) 千葉科学大学薬学部薬科学科

Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Chiba Institute of Science

(2021年9月30日受付, 2022年1月31日受理)

定された部位に起こることが明らかになっている²⁾。

中枢神経系は、神経細胞とグリア細胞によって構成されている。神経細胞は核などの細胞小器官のある細胞体、他の細胞からの刺激を受け取る樹状突起、他の細胞へ電気信号を発する軸索で構成されており、活動電位を発生させることで他の細胞に情報を伝達、処理する役割を担っている⁸⁾。また、グリア細胞の一つであるアストロサイトは神経細胞の支持、放出された神経伝達物質の吸収・除去、細胞外イオン濃度の恒常性維持などの役割を担っている⁹⁾。

我々はラット胎仔大脳半球由来の神経系細胞の初代培養系におけるグリア細胞の分化、発達が細胞密度の影響を受けることを明らかにしてきた⁹⁾。一方、ヒト脳微小血管周皮細胞を用いた研究では、高密度培養時の方が低密度培養時よりもメチル水銀に対する感受性や水銀蓄積量が低いことが報告されている¹⁰⁾。さらに、ヒト脳微小血管内皮細胞においても、メチル水銀の蓄積量が細胞密度の影響を受けることが明らかになっている¹¹⁾。このように培養条件、特に細胞密度は、細胞の分化、発達だけでなく、有害化学物質の蓄積や毒性発現に影響を与えると考えられるが、細胞密度とメチル水銀の細胞への蓄積や毒性との関係についてはほとんど検討されていない。

そこで本研究では、新生仔ラット大脳皮質から調製した神経系細胞を高密度または低密度で培養し、種々の濃度でシステイン複合体としてメチル水銀を曝露し、メチル水銀の毒性発現に及ぼす細胞密度の影響を調べ、その原因を水銀蓄積量の面から考察した。

II. 実験方法

1. 実験動物

日本クレア株式会社より8週齢で購入した雌雄のWistar系ラットを馴化期間後に交配し、妊娠ラットは出産までケージ毎に1匹ずつで飼育し、生後24時間以内の新生仔を実験に使用した。ラットは温度(22±2°C)、湿度(55±10%)、及び、照明時間(12時間:7:00点灯、19:00消灯)が制御されている飼育室に収容し、実験動物用飼料(Laboratory Animal Diet, PMI Nutrition International)と飲料水(水道水)を自由摂取させた。

実験は、千葉科学大学動物実験委員会の承認を得て、本学動物実験規定に従い実施した。

2. 神経系細胞の初代培養

神経系細胞の調製は既報^{9,12)}に準じて行った。ラット新生仔にペントバルビタールナトリウムを投与してから脳を摘出し、最小必須培地(MEM)の入ったシャーレの中で脳幹部などを除去して大脳皮質を得た¹²⁾。次に、実体顕微鏡下で髄膜を除去し¹²⁾、Dispase IIとDNase Iで処理した後、パスツールピペットで分散して細胞を得た⁹⁾。

得られた細胞はセルストレイナー(Falcon)でろ過し、ろ液を遠心分離(1,000 rpm, 5 min)してから上清を除去し、培地[B27 Supplement(Gibco)を加えたNeurobasal-A Medium(Gibco)]で細胞を再懸濁した。この細胞懸濁液を、細胞密度が 5.0×10^6 cells/mm²(高密度)または 5.0×10^5 cells/mm²(低密度)になるように、ポリエチルイミン(Sigma)をコートした24穴プレート(Falcon)または35 mm ディッシュ(Falcon)に撒き込み、2日間培養して実験に用いた。

3. メチル水銀の曝露

塩化メチル水銀(東京化成株式会社)をL-システイン(和光純薬株式会社)と1:1のモル比となるように精製水に溶解し、培養開始の2日後にメチル水銀の最終濃度が10~1,000 nMとなるように培地に添加した。生細胞数を測定する際には、対照としてシステインのみを最終濃度が1,000 nMとなるように添加した。

4. 生細胞数及び水銀蓄積量の測定

生細胞数の測定は、既報⁹⁾に準じて以下のように実施した。メチル水銀曝露の2、4、6日後に、24穴プレートの各ウエルに11%グルタルアルデヒドを最終濃度が1%になるように加えて細胞を固定した。培地を吸引除去して精製水で洗浄した後に、0.1%クリスタルバイオレットで染色し、10%酢酸で溶出した色素の吸光度(595 nm)を測定した。

水銀蓄積量の測定は、既報¹²⁾に準じて以下のように実施した。メチル水銀曝露の1、2、3日後に、35 mm ディッシュの培地を吸引除去し、リン酸緩衝生理食塩水(カルシウム、マグネシウム不含)[PBS(-)]で洗浄後、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)溶液に細胞を溶解して水銀蓄積量測定用の試料とした。試料中の総水銀量は加熱気化水銀分析装置MA-2(日本インスツルメンツ株式会社)を用いて、タンパク質量はBio-rad DC Protein Assay Kitを用いて測定し、水銀蓄積量はタンパク質量当たりの総水銀濃度(µg Hg/mg protein)で表した。

5. ウェスタンブロッティング

アストロサイトのマーカータンパク質であるグリア繊維酸性タンパク質(GFAP)のウェスタンブロッティングは既報⁹⁾に準じて以下のように実施した。培養2及び4日後に、細胞をLaemmli's bufferに溶解して、65°Cで15分間加熱後、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)を行った。Nitrocellulose blotting membrane(GE Healthcare)にタンパク質を転写してブロッキングを行った後、一次抗体であるanti-GFAP(Sigma)またはanti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase monoclonal antibody(GAPDH)(Chemicon International)を反応させ

た。洗浄後、二次抗体 (anti-mouse IgG peroxidase conjugate、Sigma) を反応させてから、ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) を用いて化学発光を検出した。GFAP 発現量は、GAPDH 発現量で補正した。

6. 統計

一元配置分散分析後にダンカンの新多重範囲検定 (Duncan's new multiple range test) を行った。有意水準は 0.05 (5%) とした。

III. 結果・考察

メチル水銀をシステイン複合体として種々の濃度で曝露して 2、4、6 日後の生細胞数を調べた結果を図 1 に示す。メチル水銀曝露後の生細胞数をシステインのみを加えた場合 (メチル水銀 0 nM) と比較すると、2、4、6 日後の全ての時点で高密度培養の場合は 100 nM 以上のメチル水銀の曝露で、低密度培養の場合では 300 nM 以上の曝露で有意な低下が認められた (図 1)。また、メチル水銀の曝露濃度が同一の場合の生細胞数を低密度培養と高密度培養の間で比較すると、2 日後では 300 nM 以上の曝露で、4 日後では 100 nM 以上の曝露で、6 日後では 100~500 nM の曝露で高密度培養の方が低密度培養よりも有意に低い値を示した (図 1)。本研究で用いた新生仔ラット大脳皮質由来の初代培養細胞には、新生仔ラット小脳の初代培養細胞¹⁴⁾と同様に神経細胞だけでなくアストロサイトも含まれている (図 3 参照) が、メチル水銀に対する感受性は神経細胞に比べてアストロサイトの方が低いと考えられる¹²⁾ことから、本研究で用いたメチル水銀濃度では主に神経細胞が影響を受けていると考えられる。

次に、細胞密度に起因する生細胞数の差の理由を推察するために、メチル水銀曝露後の神経系細胞における水銀蓄積量の経時変化を調べた (図 2)。メチル水銀 100 nM を曝露した神経系細胞における水銀蓄積量は、低密度で培養した場合には 1、2、3 日後でほぼ同じ値であったが、高密度で培養した場合には有意差はなかったものの 3 日目に減少傾向が認められた (図 2)。水銀蓄積量に及ぼす細胞密度の影響を調べると、1 及び 2 日後では高密度で培養した細胞の方が低密度で培養した細胞よりも有意に高い値であったが、3 日後にはその差は消失した (図 2)。これらの結果は、神経系細胞を高密度で培養した場合には低密度で培養した場合よりも、比較的早い時期から水銀蓄積量が高くなっており (図 2)、これがメチル水銀による生細胞数の低下率の違い (図 1) に結びついていることを示唆する。このように、比較的早期の水銀蓄積量はその後の生細胞数と密接に関連していると推察されるが、類似した関係は培養アストロサイトを用いた実験においても観察されている¹²⁾。また、メチル水銀 100 nM

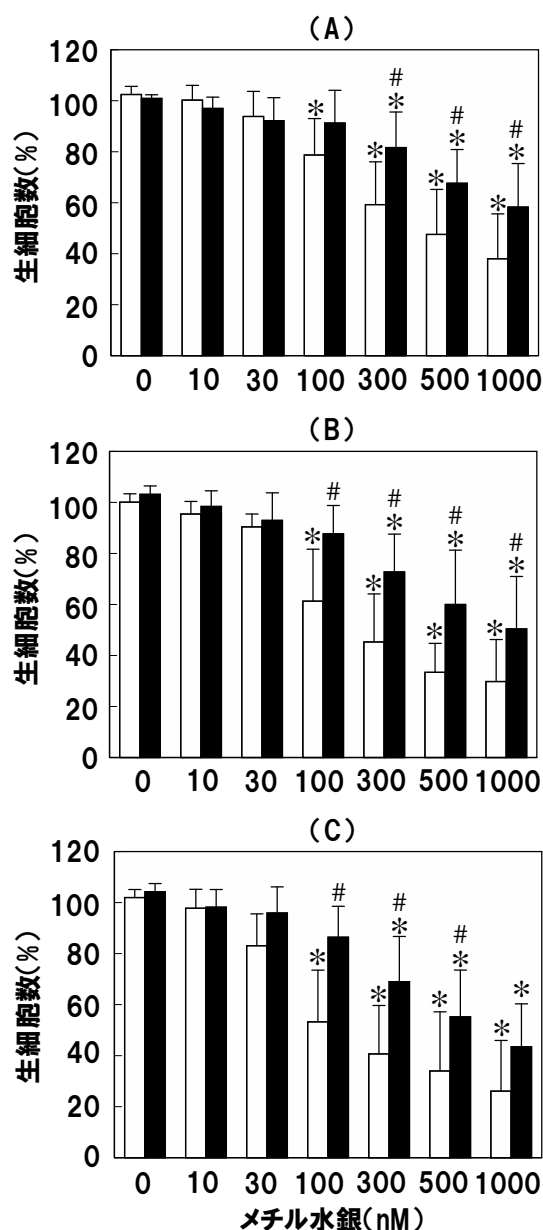


図 1. メチル水銀曝露後の生細胞数に及ぼす細胞密度の影響

□ : 高密度 ■ : 低密度

A : 2 日後、B : 4 日後、C : 6 日後

それぞれの値は、5 ~ 6 回の別の実験から得られた値 (未処理の場合の生細胞数に対する百分率) の平均 ± 標準偏差を示している。

*高密度培養と低密度培養のそれぞれについて、システインのみを曝露した場合の値に対する有意差 ($P < 0.05$)

#同一の曝露時間で高密度培養した場合の値に対する有意差 ($P < 0.05$)

を曝露した場合には、高密度で培養した場合では少なくとも2日後から生細胞数の有意な低下が見られたが、低密度で培養した場合は6日後まで生細胞数の有意な低下は認められなかった(図1)ことから、高密度で培養した場合には生細胞数の低下率の増大に伴って水銀蓄積量が増加し、その結果、低密度で培養した場合との差が消失したのではないかと考えられる。

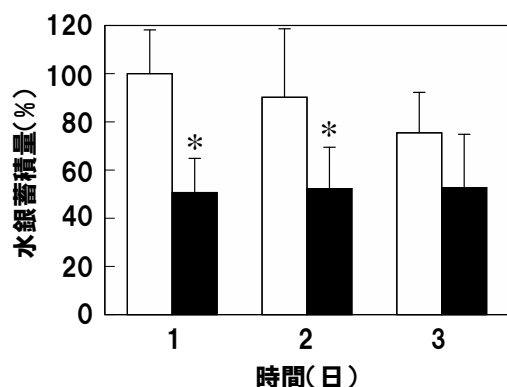


図2. メチル水銀曝露後の水銀蓄積量に及ぼす細胞密度の影響

□ : 高密度 ■ : 低密度

それぞれの値は、4回の別の実験から得られた値の平均 ± 標準偏差を示している [高密度培養した場合の曝露1日後の値 (43.01 ± 7.24 μg Hg/mg protein) を100%とした]。

*同一の曝露時間で高密度培養した場合の値に対する有意差 ($P < 0.05$)

メチル水銀は、血漿中ではアルブミンなどのタンパク質やシステインやグルタチオンなどの低分子量のチオール化合物と結合して存在している^{3,5)}が、組織への移行に関係が深いのは後者であり、血漿中の低分子量のチオール化合物の濃度がメチル水銀の組織移行における重要な因子であることが明らかになっている^{14,15)}。培養細胞へのメチル水銀の移行についても同様であり、特にシステインが重要であることが報告されている¹⁶⁾。一方、神経細胞におけるグルタチオンの合成にはその構成アミノ酸であるシステインの供給が不可欠であるが、初代培養細胞を用いた研究結果からアストロサイトが培地中に分泌するグルタチオンの加水分解産物などが神経細胞に取り込まれてグルタチオン合成に利用されていることが示唆されている^{17,18)}。このように培養アストロサイトは培地中にグルタチオンを分泌することから、アストロサイトの増殖、分化、発達は培地中の低分子量のチオール化合物の濃度、さらにはメチル水銀の細胞への取り込み速度に影響を与える重要な因子である可能性が考えられる。本研究においては水銀蓄積量が細胞密度の影響を受

けていた(図2)が、細胞密度の違いによりアストロサイトの分化、発達などの程度に差が生じて培地中のグルタチオンなどの低分子量チオール化合物の濃度に差が生じたことが原因となっている可能性が考えられる。

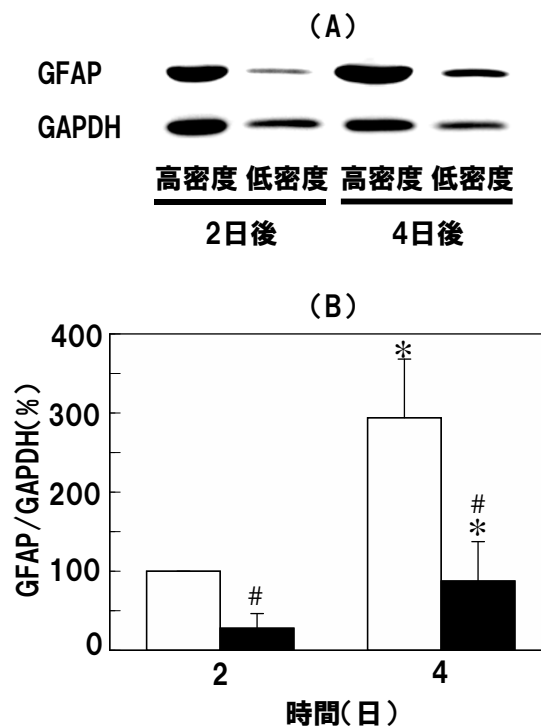


図3. GFAP 発現量に及ぼす細胞密度の影響

(A) 代表的なウエスタンブロットデータ

(B) □ : 高密度 ■ : 低密度

それぞれの値は、7回の別の実験から得られた値の平均 ± 標準偏差を示している (高密度で2日間培養した場合の値を100%とした)。

*高密度培養と低密度培養のそれぞれについて、培養2日後の値に対する有意差 ($P < 0.01$)

#同一の培養時間で高密度培養した場合の値に対する有意差 ($P < 0.01$)

そこで、アストロサイトのマーカータンパク質であるGFAP発現量に及ぼす細胞密度の影響を調べた(図3)。神経系細胞を高密度または低密度で培養し、2及び4日後のGFAPの発現量を調べると、どちらの細胞密度においても時間の経過とともにGFAP発現量が約3倍に有意に上昇した(図3)。同一の培養期間での比較を行うと、高密度培養時のGFAP発現量は低密度培養時よりも約3倍高い値を示し、細胞密度がGFAP発現量に影響を与えていることが明らかになった(図3)。従って、胎仔期のラット大脳半球から得られた神経系細胞⁹⁾と同様に新生仔ラット大脳皮質から得られた神経系細胞においても高密度で培養すると低密度での培養時に比べてアストロサ

イトの分化、発達が促進されていると考えられる。この結果は細胞密度の違いによってアストロサイトから培地中に分泌されるグルタチオン量に差が生じている可能性を示唆するが、細胞密度に起因する GFAP 発現量の違いが培地中の低分子量チオール化合物の濃度にまで影響を与えているかどうかについてはさらに検討が必要である。

細胞密度に起因する水銀蓄積量の差 (図 2) の原因としては、メチル水銀の細胞への取り込みや細胞からの排出に関与するトランスポーターの発現量もその候補として考えられる。メチル水銀の膜輸送には L 型アミノ酸トランスポーター 1 (LAT1) 及び 2 (LAT2) が関与していることが明らかになっている¹⁹⁾ が、血管周皮細胞や血管内皮細胞においては細胞密度がこれらのトランスポーターの発現に影響し、水銀蓄積量にも差が生じることが明らかになっている^{10,11)}。これらの細胞においては高密度培養の方が低密度培養の場合よりも水銀蓄積量が低く^{10,11)}、神経系細胞を用いた本研究の結果 (図 2) とは異なる点も見られるが、水銀蓄積量の差の原因を明らかにするためには、中性アミノ酸トランスポーター発現量のような細胞側の要因について、今後さらに詳細な検討を行う必要があると考えられる。

以上の結果から、高密度で培養した神経系細胞は、低密度で培養した細胞と比べると、水銀蓄積量が高く、その結果、メチル水銀による毒性が強く現れる可能性が示唆された。従って、細胞密度は神経系細胞におけるメチル水銀の毒性や蓄積量に影響を与える重要な因子の一つであると考えられる。

参考文献

- 1) 喜田村正次, 近藤雅臣, 滝澤行雄, 藤井正美, 藤木素士 : 水銀, 講談社サイエンティフィック, 東京, 1976.
- 2) World Health Organization (WHO): Environmental Health Criteria 101, Methylmercury, WHO, Geneva, 1990.
- 3) Yasutake A, Hirayama K, Inoue M: Mechanism of urinary excretion of methylmercury in mice. *Arch Toxicol*, 63, 479-483, 1989.
- 4) Hirayama K, Yasutake A, Adachi T: "Mechanism for renal handling of methylmercury", *Advances in Mercury Toxicology*. Suzuki T, Imura N, Clarkson TW, eds. Plenum Press, New York, 121-134, 1991.
- 5) Yasutake A, Adachi T, Hirayama K, Inoue M: Integrity of the blood-brain barrier system against methylmercury acute toxicity. *Jpn J Toxicol Environ Health*, 37, 355-362, 1991.
- 6) Kerper LE, Ballatori N, Clarkson TW: Methylmercury transport across the blood-brain barrier by an amino acid carrier. *Am J Physiol*, 262, R761- R765, 1992.
- 7) Adachi T: Characteristic effects of L-methionine on tissue distribution of methylmercury in mice. *J Health Sci*, 52, 174-179, 2006.
- 8) 泰羅雅登, 中村克樹 : 第 4 版 カールソン 神経科学テキスト 脳と行動, 丸善出版, 東京, 2013.
- 9) Adachi T, Takanaga H, Sakurai Y, Ishido M, Kunimoto M, Asou H: Influence of cell density and thyroid hormone on glial cell development in primary cultures from embryonic rat cerebral hemisphere. *J Neurosci Res*, 69, 61-71, 2002.
- 10) Hirooka T, Fujiwara Y, Minami Y, Ishii A, Ishigooka M, Shinkai Y, Yamamoto C, Satoh M, Yasutake A, Eto K, Kaji T: Cell-density-dependent methylmercury susceptibility of cultured human brain microvascular pericytes. *Toxicol in Vitro*, 24, 835-841, 2010.
- 11) Hirooka T, Fujiwara Y, Shinkai Y, Yamamoto C, Yasutake A, Satoh M, Eto K, Kaji T: Resistance of human brain microvascular endothelial cells in culture to methylmercury: cell-density-dependent defense mechanisms. *J Toxicol Sci*, 35, 287-294, 2010.
- 12) Adachi T, Kunimoto M: Acute cytotoxic effects of mercuric compounds in cultured astrocytes prepared from cerebral hemisphere and cerebellum of newborn rats. *Biol Pharm Bull*, 28, 2308-2311, 2005; corrected in *Biol Pharm Bull*, 33, 930, 2010.
- 13) Sakaue M, Takanaga H, Adachi T, Hara S, Kunimoto M: Selective disappearance of an axonal protein, 440-kDa ankyrin_b, associated with neuronal degeneration induced by methylmercury. *J Neurosci Res*, 73, 831-839, 2003.
- 14) Hirayama K: Effects of combined administration of thiol compounds and methylmercury chloride on mercury distribution

- in rats. *Biochem Pharmacol*, 34, 2030–2032, 1985.
- 15) Adachi T, Yasutake A, Hirayama K: Influence of dietary levels of protein and sulfur amino acids on the fate of methylmercury in mice. *Toxicology*, 93, 225–234, 1994.
- 16) Wang W, Clarkson TW, Ballatori N: γ -Glutamyl transpeptidase and l-cysteine regulate methylmercury uptake by HepG2 cells, a human hepatoma cell line. *Toxicol Appl Pharmacol*, 168, 72–78, 2000.
- 17) Dringen R, Pfeiffer B, Hamprecht B: Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione. *J Neurosci*, 19, 562–569, 1999.
- 18) Wang XF, Cynader MS: Astrocytes provide cysteine to neurons by releasing glutathione. *J Neurochem*, 74, 1434–1442, 2000.
- 19) Simmons-Willis TA, Koh AS, Clarkson TW, Ballatori N: Transport of a neurotoxicant by molecular mimicry: the methylmercury–L-cysteine complex is a substrate for human L-type large neutral amino acid transporter (LAT) 1 and LAT2. *Biochem J*, 367, 239–246, 2002.