

B-64 鉛化合物の 血液脳関門透過性に関する研究

○谷 修祐^{1*}・中山 亜紀¹・米田 稔¹・森澤 眞輔¹

¹京都大学工学研究科(〒615-8540京都市京都市西京区京都大学桂4都市環境工学専攻環境リスク工学分野)

* E-mail: tani@risk.env.kyoto-u.ac.jp

1. はじめに

鉛は約5000年前から使用されている金属であり、加工しやすさ、腐食されにくさ等の特徴を持つため産業界で幅広い用途を持ち続けている。日本においても鉛は多種多様な製品に利用されており、その国内供給量は2000年において約20万tと他の金属と比べても非常に多い⁽¹⁾。

その一方で、鉛の有害性の歴史も古い。日本においても明治時代、鉛による健康影響が問題になっている。現在では、有鉛ガソリンの使用規制および労働環境の改善等によって、高濃度の鉛曝露による鉛脳症や貧血などの典型的な中毒症状は世界的にもまれとなったが、その一方で、低濃度の環境中鉛の長期曝露によって起こりうる健康影響に関心が集まっている⁽²⁾。

鉛に対するヒトの健康影響としては、造血系、神経系、消化器系それぞれへの影響、生殖発生毒性が報告されている。その中で神経系への影響は血中鉛濃度が高い場合に見られる鉛脳症の他に、最近では血中鉛濃度が低い小児において活動過多や知能指数のわずかな低下等が認められている⁽³⁾。

脳の組織と血液の間には、物質の移動に対して血液脳関門と呼ばれる防衛システムが備わっている⁽⁴⁾。これは、脳の毛細血管の内皮細胞や規定膜の外側を包むグリア細胞などが関与するもので、血液中から、脳が必要とする物質だけを取り込んで神経細胞に届け、有害な物質は通過させないようにする仕組みである。

本研究では鉛の血液脳関門透過性を把握するため、豚脳微小血管内皮細胞を用い血液脳関門*in vitro*モデルを利用した経皮内電気抵抗(transendothelial electrical resistance: TEER)測定実験を行った。また、ICP-MS分析装置を用い脳微小血管内皮細胞の層を通過する鉛量を測定し、血液脳関門透過性を定量的に調査した。

2. 実験方法

(1) 被験物質

本研究では以下に示す鉛化合物4種を実験に使用した。

- ・酢酸鉛三水和物($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)
- ・硝酸鉛($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$)
- ・塩化鉛(PbCl_2)
- ・硫酸鉛(PbSO_4)

それぞれの化学物質は滅菌した超純水に溶解した後、さらにフィルター滅菌を施した。使用した試薬は全て(株)和光純薬製である。

(2) TEER測定実験

豚脳微小血管内皮細胞をCS-C Complete Medium培地((株)大日本住友製薬製)を用い75cm²培養フラスコにてCO₂インキュベーター内でコンフルエント直前まで培養した。その後、細胞を回収し、細胞濃度が 5×10^6 cells/mlになるように培地にて再懸濁した。6穴プレートに3mlの培地を加え、その後BD Falconセルカルチャーインサートをセットしインサート上に細胞懸濁液2ml(1×10^6 cells/well)を加えた。その後、CO₂インキュベーターにてコンフルエントに達するまで培養した。

図1に血液脳関門モデルの模式図を示す。

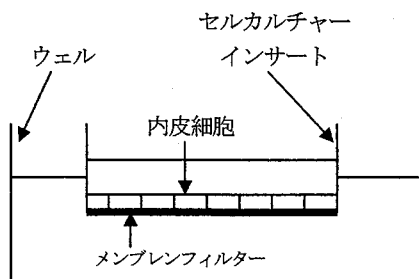


図1 脳血液関門を模した実験系模式図

その後、各濃度に調整した被験物質2 μ lをインサート上培養液に添加し、6時間後まで1時間ごとに培地中のメンブレンフィルターと内皮細胞の電位差をMillipore Millicell-ERSを用いて測定した。また、細胞を播種していないメンブレンフィルターのみの電位差を測定し、実験結果からの差にメンブレンフィルターの面積4.2(cm^2)を乗じTEER値($\Omega \cdot \text{cm}^2$)を計算した。

(3) ICP-MS分析による鉛透過性実験

TEER測定実験後のインサート、ウェル内それぞれの培地をサンプルとして回収し、ICP-MS分析装置HEWLETT PACKARD 4500 SERIESを用いて各サンプルの鉛濃度を測定した。なお、あらかじめ培地を溶媒にし各濃度に調整した鉛化合物を用い、検量線を作成することで濃度決定を行った。

3. 実験結果および考察

図2～5に今回の実験で得られた結果を示す。

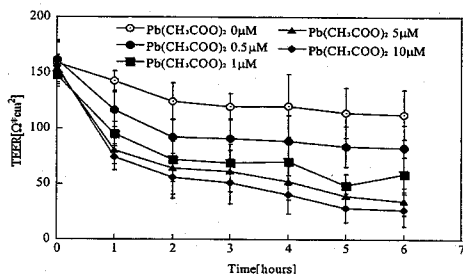


図2 酢酸鉛におけるTEER測定値

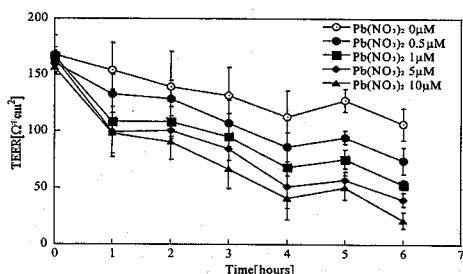


図3 硝酸鉛におけるTEER測定値

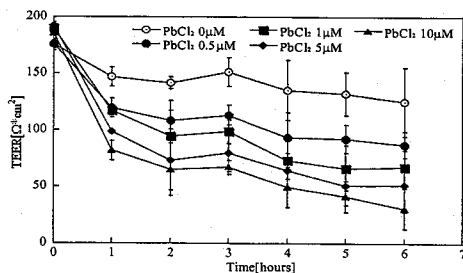


図4 塩化鉛におけるTEER測定値

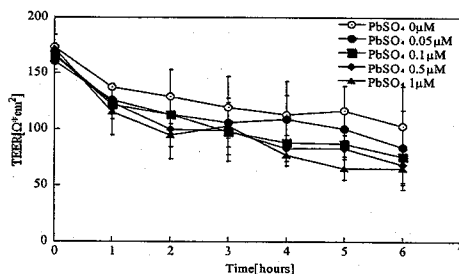


図5 硫酸鉛におけるTEER測定値

酢酸鉛0.5 μ Mの曝露によりTEER値は6時間後158($\Omega \cdot \text{cm}^2$)から112($\Omega \cdot \text{cm}^2$)に低下した。また酢酸鉛10 μ M曝露でのTEER値は6時間後156($\Omega \cdot \text{cm}^2$)から26($\Omega \cdot \text{cm}^2$)に低下した。以上の結果より鉛化合物の曝露による濃度・時間依存的にTEER値の減少が観察された。硝酸鉛、塩化鉛、硫酸鉛においても同様の関係が示された。

また、ICP-MS分析による鉛透過量測定実験の結果を表1～4に、各鉛化合物の各濃度における移行率の推移を図6に示す。

表1 酢酸鉛におけるICP-MS分析結果

曝露濃度	鉛量[μ g]	収率[%]	移行率
0 μ M	insert	0.00	-
	well	0.00	
0.5 μ M	insert	0.10	54.6
	well	0.01	
1 μ M	insert	0.17	47.4
	well	0.03	
5 μ M	insert	0.70	37.0
	well	0.07	
10 μ M	insert	0.78	20.6
	well	0.08	

表2 硝酸鉛におけるICP-MS分析結果

曝露濃度	鉛量[μ g]	収率[%]	移行率
0 μ M	insert	0.00	-
	well	0.00	
0.5 μ M	insert	0.23	100.0
	well	0.01	
1 μ M	insert	0.41	100.0
	well	0.04	
5 μ M	insert	1.85	96.3
	well	0.14	
10 μ M	insert	2.83	73.9
	well	0.24	

表3 塩化鉛におけるICP-MS分析結果

曝露濃度	鉛量[μg]	収率[%]	移行率
0μM	insert 0.00	-	-
	well 0.00		
0.5μM	insert 0.07	41.7	0.15
	well 0.01		
1μM	insert 0.11	31.3	0.22
	well 0.02		
5μM	insert 0.51	29.2	0.19
	well 0.10		
10μM	insert 0.91	26.4	0.20
	well 0.19		

表4 硫酸鉛におけるICP-MS分析結果

曝露濃度	鉛量[ng]	収率[%]	移行率
0μM	insert 0.00	-	-
	well 0.00		
0.05μM	insert 3.98	29.6	0.54
	well 2.16		
0.1μM	insert 7.13	31.1	0.81
	well 5.77		
0.5μM	insert 59.87	34.9	0.21
	well 12.41		
1μM	insert 74.04	22.2	0.24
	well 17.89		

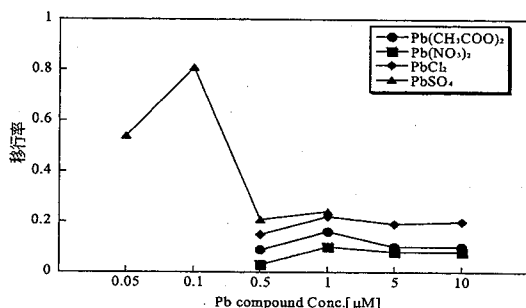


図6 各鉛化合物の移行率の推移

それぞれの鉛化合物において曝露濃度0.5μM以上での移行率の推移は0.8~0.25の範囲でおおよそ一定の推移を示した。しかし、硫酸鉛0.05μM、0.1μMにおいてはそれよりも高い値を示した。

血液脳関門は微小血管内皮細胞の複雑な密着結合によって形成されており、一種のフィルター働きをして血液中から脳内に移行する物質と移行させない物質とを選別している。内皮細胞は脳微小環境の恒常性を維持するために生物学的な障壁を備える密接な細胞間結合で繋がっている。この関門の独特な性質は一つには隣接した細胞間の隙間無く密着した結合密着状態に起因すると考えられる。血液脳関門は血液中の物質から脳や神経系を保

護し、血液から中枢神経系へのイオンや溶質の輸送を制限している²⁾。一方、経皮内電気抵抗の測定は*in vitro*での血液脳関門の密着結合の機能性を定量化する容易な方法である³⁾。経皮内電気抵抗は脳微小血管内皮細胞間の密着結合への小さなイオンの浸透性を表し、経皮内電気抵抗の絶対値は主に細胞間の密着結合の量と複雑性に依存していると考えられる。

本実験において鉛化合物による曝露でTEER値の減少が認められたことは脳微小血管内皮細胞の細胞間密着結合が鉛化合物によって開放されたことを示唆している。また、ICP-MS分析実験によりウェル側に鉛が検出されたことにより本実験で使用した*in vitro*での血液脳関門モデルにおいて鉛が通過することが示された。しかし、TEER測定実験において0μMにおける値が時間経過とともに低下しておりモデルの形成が不十分であることも考えられ、再実験の必要があると思われる。また、ICP-MSの測定において鉛の収率が硝酸鉛を除いて低い水準になった。この原因は、細胞や培養ディッシュ等プラスチック器具への吸着が考えられ、現在よりよい方法での定量を検討中である。

4. まとめ

本研究によって得られた結果から鉛化合物が濃度・時間依存的に経皮内電気抵抗地を減少させることが示された。また、ICP-MSでの測定により鉛の透過量が定量的に示された。このことから血液中に取り込まれた鉛が血液脳関門に影響を及ぼしその細胞間密着結合を開放し、鉛が脳内に取り込まれ神経影響を引き起こしている可能性があることが示唆された。この結果は血中鉛濃度から脳への移行量を推定する際に有用である。今後は鉛の神経細胞に対する毒性実験やその他バイオマーカーの測定を行い、鉛の神経影響を調査していく必要があると思われる。

5. 参考文献

- 1) 中西準子、小林憲弘、内藤航；丸善株式会社；詳細リスク評価書シリーズ9 鉛；2006
- 2) Harry et al.; *In vitro* techniques for the assessment of neurotoxicity.; *Environ Health Perspect*;106(1): 131-158; 1997
- 3) Gonzales-Marica L et al.; Tight junction formation in cultured epithelial cells (MDCK).; *J Membr Biol*; 86: 113-121; 1985