

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20592124

研究課題名(和文) 神経剤の循環器系における非コリン性毒性作用の解析

研究課題名(英文) Research for non-cholinergic toxicity of a sarin-like organophosphate on animal cardiovascular system.

研究代表者

長尾 正崇 (NAGAO MASATAKA)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：80227991

研究成果の概要(和文)：

神経剤類似物質BIMPをラットに静脈投与したところ、高用量BIMPにより持続的な血圧上昇および心拍数増加が見られた。各種神経遮断薬の前投与実験から、この作用はアセチルコリン動作性神経を介さない血管および心臓への直接作用である可能性が示された。

このうち血管細胞への直接作用を観察するため、ラット血管平滑筋細胞のiNOS遺伝子発現に対するBIMPの効果を検証した。BIMPがiNOS発現に影響を及ぼす結果が得られたが、その作用については更なる検証が必要である。

研究成果の概要(英文)：

We administered intravenously a sarin-like organophosphate BIMP into rats and found that high doses of BIMP caused increases both of blood pressure and heart rate. Pretreatment of some blockers showed that these effects of BIMP might not be mediated by cholinergic-neuron, but act directly on blood vessels and hearts of the animals injected BIMP.

To examine the direct effect to vessels, we analyzed the effect of BIMP to iNOS expression in rat aortic smooth-muscle cells. The results showed that BIMP modified efficiency of iNOS induction, but these works were required further validation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：法医学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：① 急性中毒学 ② 救急医学 ③ 神経剤

1. 研究開始当初の背景

平成7年に発生し、社会に大きな衝撃を与えた地下鉄サリン事件では12名の死者と5,000名を越える被害者を出し、未だに多くの犠牲者が後遺症に苦しんでいる状況にある。しかしながら、サリン、ソマン等の有機リン系神経剤の生体への毒性機序はアセチルコリンエステラーゼ(AChE)阻害を介したコリン作動性神経系の異常亢進によるものと考えられており、急性症状が消退した後には、重大な後遺症は残らないものとされ、これらの曝露者の愁訴はいずれも Post-traumatic stress disorders (PTSD)とされている。

我々はすでに地下鉄サリン事件犠牲者の中で、亜急性有機リン剤中毒症である遅発性神経障害の発症例を報告しており、さらに近年、神経剤によるAChE阻害によるコリン作動性毒性作用のみならず非コリン性毒性作用による障害や神経剤による血漿タンパクのチロシン亜リン酸化やNa⁺, K⁺-ATPaseへの結合も報告されている。また、*in vitro*において有機リン剤がDNAに結合するという報告もあり、5000人を越える被曝者が今後何らかの器質的障害を呈する可能性は否定できない。

そこで我々は、これまでのこの日コリン性毒性作用の機序について研究を重ねてきた。即ち、日本ではその製造、使用が厳しく制限されているサリン、ソマンの構造類似不揮発性有機リン製剤 bis (isopropyl methyl) phosphonate (BIMP)および bis (pinacolyl methyl) phosphonate (BPMP)を作成し、これらを用いた動物実験を行ったところ、いずれの薬剤を用いても神経剤投与で生じるとされる痙攣発作を生じさせることができ、サリン・ソマンの毒性機構の解明において非常に

有用なデバイスであることを見出した。これを用いることにより、神経剤の主な毒性発現機構と考えられているACh濃度の上昇のみでは説明のつかない脳内PLC γ の活性化・ラット培養アストロサイトの形態変化を明らかにしてきた。さらに、細胞内情報伝達系の一翼を担うMAPキナーゼ系活性化も確認されている。

一方、サリン・ソマンの毒性研究の中では、神経系のみならず心臓に対しても心病変を発症させることが報告されており、急性サリン中毒患者に血圧の上昇が観察されている。サリン・ソマンは他の有機リン剤と比べ、agingが極めて早く、メチルフォスホン酸エステルとしてAChEのセリン残基の水酸基と結合するため、長期にわたるAChE活性阻害が生じると言われている。この現象は生体内において、セリン残基のみならず、細胞内情報伝達系において重要な役割を担うタンパク質のスレオニン・チロシン残基においても起こり得る現象であり、リン酸化に変わり水酸基がメチルフォスホン酸化され、メチルフォスホノスレオニン、メチルフォスフォノチロシンとなり、脱リン酸化に抵抗性を示すこととなる。

さらに、有機リン剤であるジクロロボスの1回投与によってプロテインキナーゼの活性の亢進とそれに伴うチュブリンとMAP-2のリン酸化の亢進が認められており、その結果、微小管の構造変化が観察されている。したがって、神経剤の非コリン性毒性作用として細胞内情報伝達系の攪乱は生体にとって非常に重篤な後遺障害を引き起こす可能性が考えられる。

2. 研究の目的

血圧上昇という AChE 阻害によるコリン作動性毒性作用では説明のつかない非コリン性中毒症状が急性サリン中毒患者に認められたという事実から、本研究では、神経剤の循環器系における非コリン性毒性作用を *in vivo*、*in vitro* で検討することを目的とする。

神経剤類似有機リン剤 BIMP をラットに投与し循環器的影響を観察し、更に循環器系に影響を与える交感神経・副交感神経に対する各種遮断薬などを作用させ、ACh 動作性神経作用の影響を除外し循環危機感への直接影響の有無を確認する。それが確認された場合、各器官、細胞レベルへの作用について解析を行う。

3. 研究の方法

Wistar rat (9-11 週齢) を Isoflurane 麻酔 (2.5%) 後呼吸管理下において大腿動静脈よりカニューレーションを行い、BIMP および可逆的 ChE 阻害薬 neostigmine を静脈内に bolus 投与 (1 ml/kg) した。5 分間隔で追加投与を行ない、血圧、心拍数の変動を観察した。

続いて、BIMP および neostigmine 投与の前に各種遮断薬、阻害剤を予め投与し影響を観察した。非選択的ムスカリン性アセチルコリン受容体遮断薬 atropine (0.1 mg/kg)、自律神経節遮断薬 hexamethonium (C6, 30 mg/kg)、非選択的 α および β 受容体阻害薬 (phentolamine 1 mg/kg および propranolol 0.3 mg/kg) を上記と同様に投与後、BIMP あるいは neostigmine を投与し、心拍および血圧を測定した。

また、血管平滑筋細胞を単離・培養し、ここに神経剤を直接作用させる実験系として、雄 Sprague-Dawley ラットの動脈から分離

した細胞を 10% ウシ血清を含む DMEM で培養、8~17 回継代したものを rVSMC (ラット血管平滑筋細胞) として使用した。70~80% コンフルエントの状態が無血清培地にて 24 時間培養後、LPS (最終濃度 0.1 mg/ml)、BIMP (同 10 μ M)、DFP (同 10 μ M) を添加し刺激開始とした。溶媒としてはエタノールを用い、エタノールの最終濃度は 0.1% となるようにした。

各時点で細胞を PBS でリンス後、TRIzol にて回収し total RNA を抽出、精製した。ReverTra Ace qPCR Rt kit で逆転写処理を行い、cDNA を基に iNOS 遺伝子発現量の推移をリアルタイム PCR で観察した。リアルタイム PCR 反応系は Cyber Premix ExTaqII を使用した。得られた iNOS mRNA 量の数値は並行して計測した β -アクチン mRNA 量で標準化し、各条件下での比較を行った。

また BIMP の細胞への直接作用を確認する実験として、ヒト神経組織由来培養細胞株 (神経芽腫由来細胞 SK-N-SH、アストロサイト由来細胞 CCF-STTG1) を用い BIMP を添加し影響を観察した。各々の細胞を 1.3×10^4 cells/cm² の濃度で播種し、BIMP を 75 μ M、300 μ M の濃度で添加し培養を行った。24 または 48 時間後に固定し、ファロイジンによる抗アクチン染色および抗チューブリン抗体による蛍光染色により細胞骨格を可視化した後、共焦点レーザー顕微鏡により細胞の形態と細胞骨格の染色度合いを観察した。

4. 研究成果

血圧、心拍数に対する BIMP の効果

BIMP を 0.3 mg/kg の用量でラットに投与したところ、一過性の心拍数低下とそれに伴う血圧低下が認められた。この効果は、低用量の neostigmine (0.01-0.1 mg/kg 以上) 投与によっても同様に観察され、また atropine

(0.1 mg/kg) の前投与により観察されなくなった。よって BIMP によるこの心拍数・血圧低下作用は、BIMP のコリンエステラーゼ阻害作用による副交感神経亢進作用 (Parasympathomimetic effects) であると考えられる。この推察は、phentolamine (1 mg/kg) および propranolol (0.3 mg/kg) の前投与によってこの効果がより明確となったことから支持される。

一方、BIMP を高用量 (0.6mg/kg) で投与すると、低用量時とは異なり著明な血圧上昇作用および心拍数増加作用を示した。その効果は neostigmine を投与した場合と比較して有意に大きかった。これは、心臓迷走神経の神経節および末梢効果器接合部でのアセチルコリン濃度上昇による交感神経亢進作用 (Sympathomimetic effects) である可能性が考えられる。

しかし、この効果が顕著に現れることを想定し α および β 受容体阻害薬の前投与の影響を観察したが、心拍数現象がより顕著に現れるという予想に反し、高用量 BIMP 投与により心拍数とは無関係に血圧が上昇した。また C6 (30 mg/kg) を前投与し高用量 BIMP への影響を観察したが、こちらも期待に反し心拍数の低下は見られず、むしろ血圧および心拍数の上昇作用が著明に増強された。

このことから、この効果は心臓迷走神経の神経節および末梢効果器接合部における作用ではなく、BIMP が末梢抵抗血管および心臓に直接作用して血圧上昇ならびに心拍上昇をもたらしている可能性が示唆された。

血管平滑筋細胞の iNOS 発現に対する BIMP の作用

血管に対する直接の作用として、血管平滑筋における NO 産生を想定しそれに関わる iNOS 遺伝子発現の変化を確認することとし

た。末梢血管において産生される NO (一酸化窒素) は血管を弛緩させ血圧を低下させる方向に作用する。この NO の作用と BIMP の末梢血管に対する直接作用との関連を明らかにするため、NO 産生に関わる NOS (Nitric Oxide Synthetase) のうち誘導型 NOS (iNOS) の遺伝子発現を指標とし、AChE 阻害作用による交感神経、副交感神経系の影響を排除して循環器系に対する神経剤の直接影響を観察する系として、血管平滑筋細胞に直接 BIMP を作用させる実験系を構築し解析を行った。

ラット血管平滑筋細胞を単離培養し培地を LPS (0.1mg/ml) を含むものに交換すると、iNOS mRNA 量は継時的に上昇し添加後 6 時間で最大量を示す。その後徐々に減少を示し、添加後 24 時間で対照とほぼ同量まで減少した。

LPS および BIMP (10 μ M) を含む培地を与えた場合においても、iNOS 発現は刺激後継時的に増加し 6 時間で最大値となった。その後 24 時間経過時には刺激前と同等のレベルまで低下した。LPS 単独による刺激の場合と比較すると、iNOS 発現量は刺激後 1 時間で 1.32 倍、6 時間で 1.87 倍、12 時間で 2.06 倍の値を示し、BIMP が LPS による RASMCs の iNOS 発現を亢進するという結果が得られた。この結果は、BIMP の血管平滑筋への直接作用として弛緩効果＝血圧低下に繋がる事となり、想定した末梢血管への直接作用 (血圧上昇) とは異なる結果となった。

しかし別の実験では、同等の実験条件だったにも関わらず、iNOS 発現量が最大となる刺激後 6 時間において LPS+BIMP 刺激群の iNOS mRNA 量の上昇が LPS 群比 44% となり、逆に LPS 刺激による iNOS 発現上昇を抑制するという結果が出た。この発現上昇抑制は、対象として用いた神経剤ではない有機リン剤 DFP (10 μ M) においても観察され、LPS+DFP 群

の iNOS mRNA 上昇率が LPS 群比 50%であった。即ち、この作用は神経剤の作用というよりも有機リン剤による細胞毒性作用の現れであると考えられるが、BIMP に関しては同一である実験条件下で相反する効果が見られた理由、また、この iNOS 発現に対する作用がラット個体における BIMP の直接作用と同等の現象であるかは、実験条件の再検討を含め慎重に判断する必要があると考えられる。

BIMP の株化神経細胞に対する直接作用

同じく AChE 阻害効果を介さない、BIMP が細胞に直接与える毒性効果を検証する目的で、ヒト神経系由来培養細胞株に BIMP を添加し影響を観察した。比較的高濃度(75 μ M)以上の BIMP 添加により細胞の形態に変化が見られ、細胞周辺の仮足が収縮している例が観察された。この条件下の細胞内では細胞骨格分子が不安定化していることを示唆する結果も得られており、この機構が循環器系での BIMP の作用(末梢血管における抵抗性の変化)と同一の機構に拠るものか検討を行っている。

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 3 件)

1. Soe NN, Ishida T, Ishida M, Sawano M, Abe K, Miho N, Chayama K, Kihara Y, Yoshizumi M. Nifedipine interferes with migration of vascular smooth muscle cells via inhibition of Pyk2-Src axis. *J Atheroscler Thromb.* 16 (2009) pp. 230-238. 査読有.
2. Nakamura S, Kimura M, Goto C, Noma K, Yoshizumi M, Chayama K, Kihara Y, Higashi Y. igarette smoking abolishes ischemic preconditioning-induced augmentation of endothelium-dependent vasodilation. *Hypertension.* 53 (2009) pp. 674-681. 査読有.

3. Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J.* 73 (2009) pp. 411-418. 査読有.

[学会発表] (計 1 件)

1. 牧田亨介、猿渡辰郎、波多野愛子、奈女良昭、長尾正崇 サリン類似神経剤 BIMP による株化神経細胞に対する細胞骨格不安定化作用。第 94 次日本法医学会学術全国集会、2010 年 6 月 25 日、タワーホール船堀

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長尾 正崇 (NAGAO MASATAKA)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：80227991

(2) 研究分担者

吉栖 正生 (YOSHIZUMI MASAO)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：20282626

奈女良 昭 (NAMERA AKIRA)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：30284186

牧田 亨介 (MAKITA RYOSUKE)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：20321812

(3) 連携研究者

前野 善孝 (MAENO YOSHITAKA)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：00145749

加藤 秀章 (KATO HIDEAKI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：30418868