

機関番号：82505

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592133

研究課題名（和文） 神経ガス中毒治療における新規パム類似体の解毒作用に関する研究

研究課題名（英文） Study of effects of novel PAM analogues on the treatment of poisoning by nerve agents

研究代表者

櫻田 宏一（SAKURADA KOICHI）

科学警察研究所・法科学第一部・室長

研究者番号：10334228

研究成果の概要（和文）：抑制されたアセチルコリンエステラーゼ（AChE）活性の解毒作用を持ち、血液脳関門（BBB）通過可能な新規パム類似体について、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法（LC-MS/MS）による各種臓器からの至適検出条件を検討し、その定量法を確立することができた。さらに、これらオキシム類自体が持つ毒性機序を明らかにするための検討として、ミトコンドリアコリンオキシダーゼ（ChOD）及びチトクロームcオキシダーゼ（CyCOD）活性に対する影響について調べたところ、オキシダーゼ活性を直接抑制するだけでなく、発生する活性酸素種がその毒性発現に深く関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：A liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method was validated and applied to the *in vitro* determination of novel PAM-type oximes, which can penetrate the blood-brain barrier (BBB) and reactivate acetylcholinesterase (AChE) inhibited by alkylphosphonate in various organs. It was indicated that the LC-MS/MS method could be a reliable method with high precision and accuracy for quantification of PAM-type oximes in various biological samples. On the other hand, although the oximes are potential antidotes to poisonings that inhibit AChE, but they are also toxic. To investigate the mechanism of their toxicity, the effects of oximes on the enzymes choline oxidase (ChOD) and cytochrome c oxidase (CyCOD) of the respiratory chain in mitochondria were examined. The results showed that the toxicities of oximes might be related to their inactivation of mitochondrial oxidase enzymes and generation of reactive oxygen species.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	0	1,700,000
2009年度	600,000	0	600,000
2010年度	500,000	0	500,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	0	2,800,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：神経ガス、オキシム、パム、2-PAM、4-PAO、BBB

1. 研究開始当初の背景

(1) サリン等の神経ガス中毒治療において、現在、AChE活性を復活させるために2-PAMが

解毒剤として用いられている。しかし、実際にはBBB通過がほとんど期待できず、呼吸停止が先行する急性サリン中毒では、サリン暴

露後 2-PAM が投与されても中枢性の呼吸障害を改善させることは困難であると考えられている。化学テロの危険が増大する中において、神経ガス中毒治療における新たな治療法の開発は急務であると考えられる。

(2) サリン暴露時には、治療薬として 2-PAM、アトロピン及びジアゼパムの 3 剤併用が一般に用いられているが、その主な解毒機序は神経剤によって活性を失った AChE 活性を 2-PAM により復活させるとするものである。1995 年、東京地下鉄サリン事件が発生し、12 人の死亡者と 5,000 人以上の中毒症状を伴った患者をもたらしたが、当時、治療薬として 2-PAM が投与された。しかしながら、司法解剖後の検討により、末梢の血液中では 2-PAM の解毒効果が認められたが、脳組織中では明らかな効果が見られなかった。この結果はこれまで 2-PAM が脳内に効果がないとする報告に一致するが、以前より、2-PAM の BBB 通過を示唆する研究報告も多くあり、明らかな結論を得ていなかった。2003 年、研究代表者は、Rat brain microdialysis system を用いた信頼度の高い手法により、2-PAM の BBB 通過が約 10% であることを明らかにした。しかしながら、サリン暴露時には 2-PAM が脳内に移行する前にかかなり消費され、実際の移行量はさらに少なくなることが推測されることから、速やかに BBB を通過できる解毒剤の開発が求められている。

(3) 研究代表者らは、2006 年に多くの新規パム類似体の合成を行い、その中から比較的 AChE 再活性の程度が高く、構造的に BBB 通過が期待される 6 種類のパム類似体を選択した。それらの BBB 通過を調べたところ、4-PAO が約 30% の通過率であることが確認でき、中枢神経系の AChE 再活性に有効である可能性が明らかとなった。このように、神経ガス中毒治療における新たな治療法を確立するための研究は、極めて重要であり、また早期の成果が期待されているものであると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 研究代表者は、すでに実験で使用可能なサリン、VX 及びソマン類似体並びに多くの新規パム類似体 (2-PAM、3-PAM、4-PAM のメチル基の鎖長の異なる alkyl 基あるいは benzyl 基をつけたもの等) を有機合成し、サリン類似体 INMP によって抑制された AChE 活性に対して比較的解毒効果が高く、BBB 通過可能なパム類似体を得ている。そこで、本研究では、解毒剤として期待される新規パム類似体の BBB 通過機序あるいはそのクリアランスメカニズムについて明らかにするための基礎的検討として、LC-MS/MS を用いた各種臓器から

の高感度な新規パム類似体の定量法について確立する。

(2) 2-PAM を含めたオキシム類は本来 Respiratory paralysis に代表される毒性を持つことが知られ、そのため 2-PAM 投与時にも決められた濃度にて点滴静注することが推奨されている。研究代表者は、BBB 通過を確認した新規パム類似体を含め、新たに有機合成した多くの化合物も比較的毒性の強いことを確認しており、これらオキシム類の毒性に対処するための研究もまたこれまでとは異なった視点からの新たな治療法開発に重要であると考えている。しかしながら、2-PAM をはじめとしたオキシム類の毒性機序に関する詳細な検討はこれまでほとんど行われてこなかった。そこで、本研究では、オキシム類の毒性機序を明らかにするための基礎的検討として、オキシム類の心筋ミトコンドリア酵素系に対する影響について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) LC-MS/MS による各種臓器からの新規パム類似体の検出法の検討

① 新規パム類似体の種類及び生体試料

4-[(hydroxyimino)methyl]-1-octylpyridinium bromide (4-PAO)、4-[(hydroxy-imino)methyl]-1-decylpyridinium bromide (4-PAD)、4-[(hydroxyimino)methyl]-1-lauryl pyridinium bromide (4-PAL、内部標準 IS として)、4-[(hydroxyimino)-methyl]-1-(2-phenylethyl)pyridinium bromide (4-PAPE) が用いられた。Wister 系ラット尾静脈より 10% LD₅₀ 量がそれぞれ投与され、3 時間後に採取された脳、肝臓、肺及び腎臓が試料として用いられた。

② 試料及び stock solution の調整

各種臓器 200mg をそれぞれ 0.1% formic acid で pH3 に調整した 4mM ammonium acetate 400 μ L 及び 8nM 4-PAL/Me-OH 400 μ L (IS) でホモジナイズし、12,000 \times g で 10min 遠心後、除タンパクして、その上清を試料として用いた。4-PAO、4-PAD、4-PAPE 及び 4-PAL の stock solution は、それぞれ 470、526、454 及び 582 μ g cation/g ではじめに準備し、その後調整して LOD あるいは linearity 等の評価に用いられた。

③ LC-MS/MS 条件

LC separation は、Inertsil ODS-4 カラムを用い、Waters 社製 Alliance 2695 series LC 装置が用いられた。Mobile phase は、methanol と 4mM ammonium acetate (pH3) の linear gradient elution で、流速 0.2mL/min 及び injection volume 10 μ L で実施された。Mass spectrometric analysis は、Waters 社製 Micromass Quattro-micro API 装置が用いら

れ、positive modeでESIがion productionのために使われた。詳細な conditions は表 1 に示した。

表 1 パム類似体の至適 MRM 条件

Precursor ion (M ⁺)	Cone voltage	Transition 1 (Detection/Quantification)		Transition 2 (Confirmation)	
		Product ion	Collision Energy	Product ion	Collision energy
4-PAO	235.18	38	123.06	20	79.04
4-PAD	263.21	40	123.06	22	57.07
4-PAL	291.24	44	123.06	24	57.07
4-PAPE	227.12	30	105.07	18	77.04

④ 各種臓器の calibrator

各種臓器のホモジナイズ試料に、4-PAO 0.235-941 μg cation/mL の 10 種類、4-PAD 0.263-1053 μg cation/mL の 10 種類あるいは 4-PAPE 0.227-908 μg cation/mL の 10 種類、それぞれ 200 μL と IS 1165 μg cation/mL (4000pM) が加えられた。それらは再度ホモジナイズされ、遠心及び除タンパク後の上清が用いられた。最終的に、それらは alkylPAMs の 1-4000pM (10 濃度) の calibrator として用いられた。

(2) オキシム類のミトコンドリアオキシダーゼ活性に対する影響の検討

① オキシム類の種類及びミトコンドリア分画の作製

2-PAM, obidoxime, diacetylmonoximeoy 及び 4-[(hydroxy-imino)methyl]-1-decylpyridinium bromide (4-PAD) が用いられた。ミトコンドリア分画は、Wister 系ラットの心臓を用いて作製され、そのタンパク濃度は Pierce の BCA assay kit を用いて決定された。

② ChOD 及び CyCOD 活性の測定

ChOD活性は、cholineが分解されて産生した H₂O₂が、peroxidase存在下で発色基質を酸化し、red quinoneを産生させることから、その 500nmの吸光度を測定することでその活性を決定した。一方、CyCOD活性は、ferric cytochrome c (CyC) を ferrous CyC に変化させるために ascorbic acid でインキュベートして調整され、経時的な 500nmの吸光度変化を測定することでその活性を決定した。

4. 研究成果

(1) LC-MS/MS による各種臓器からの新規パム類似体の検出法の検討

① Product ion scan spectra

4-PAO、4-PAD、4-PAL 及び 4-PAPE の product ion scan spectra を図 1 に示した。これらカチオンがその確認に用いられた。

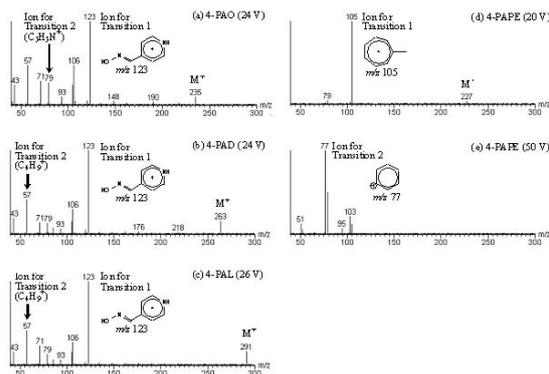


図 1 4-PAO(a)、4-PAD(b)、4-PAL(c) 及び 4-PAPE(d:20V, e:50V) の product ion scan spectra

② LC separation

4-PAO、4-PAD、4-PAL 及び 4-PAPE をそれぞれ 4nM ミックスした溶液の MRM クロマトグラムを図 2 に示した。各ピークは十分な分離が見られ、同時分析が可能であった。また、organ matrices からの影響もなく、すべて 20min 以内に検出された。

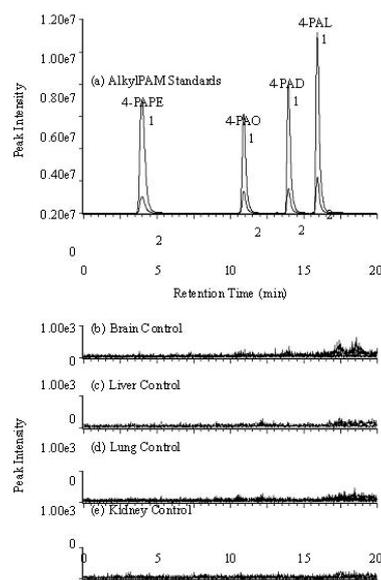


図 2 4-PAO、4-PAD、4-PAL 及び 4-PAPE の MRM クロマトグラム

③ 検量線

ラット脳、肝臓、肺及び腎臓における 4-PAO、4-PAD 及び 4-PAPE の LOD、LOQ、定量範囲及び検量線の直線性について表 2 にまとめて示した。

表 2 各種臓器におけるパム類似体の LOD、LOQ、定量範囲及び検量線の直線性

Matrix	PAMs	LOD (µg/g)	LOQ (µg/g)	Quantification range (µg/g)	r ²
Brain	4-PAO	0.235	0.470	0.470-941	0.9967
	4-PAD	1.05	2.63	2.63-1053	0.9899
	4-PAPE	0.0908	0.227	0.227-908	0.9988
Liver	4-PAO	0.235	0.470	0.470-941	0.9980
	4-PAD	2.63	5.26	5.26-1053	0.9989
	4-PAPE	0.227	0.454	0.454-908	0.9972
Lung	4-PAO	0.235	0.470	0.470-941	0.9852
	4-PAD	2.63	5.26	5.26-1053	0.9876
	4-PAPE	0.227	0.454	0.454-908	0.9772
Kidney	4-PAO	0.235	0.470	0.470-941	0.9998
	4-PAD	1.05	2.63	2.63-1053	0.9987
	4-PAPE	0.227	0.454	0.454-908	0.9989

④ Precision and accuracy

Intra-day 及び Inter-day の precision 並びに accuracy は、肝臓試料を用い、4-PAO における 2 つの濃度で決定された。これらの結果を表 3 に示した。

表 3 4-PAO の肝臓における Precision 及び accuracy

Spiked concentration	Intra-day (n = 5)		Inter-day (n = 5)	
	23.5 µg/g	2.35 µg/g	23.5 µg/g	2.35 µg/g
Mean concentration	24.7	2.42	24.2	2.29
Standard deviation	3.57	0.449	4.07	0.412
RSD (%)	14.4	18.6	16.8	18.0
Accuracy (%)	105	103	103	97.2

⑤ 4-PAO 投与後の各種臓器試料からの LC-MS/MS 分析

4-PAO の 10 % LD₅₀ 量 (0.889mg/kg) がラット尾静脈より投与され、3 時間後に採取された脳、肝臓、肺及び腎臓試料から LC-MS/MS 分析による定量が行われた。その結果を表 4 にまとめて示した。

表 4 4-PAO 投与後の各種臓器における濃度

Organ	Administered alkylPAM	n	Mean (µg/g)	SD
Brain	4-PAO	5	7.60	1.32
Liver	4-PAO	5	26.8	2.82
Lung	4-PAO	5	76.4	24.9
Kidney	4-PAO	5	638	266

SD: standard deviation

(2) オキシム類のミトコンドリアオキシダーゼ活性に対する影響の検討

① ChOD 活性における 2-PAM の抑制効果
ChOD 活性に対する 2-PAM の影響を調べたと

ころ、red quinone の産生は有意に抑制され、それは濃度依存的であった。その結果を図 3 に示した。さらに、2-PAM の本活性検出系に対する影響について調べた。その結果、表 5 に示したように、2-PAM は直接 ChOD を抑制している可能性が示唆された。

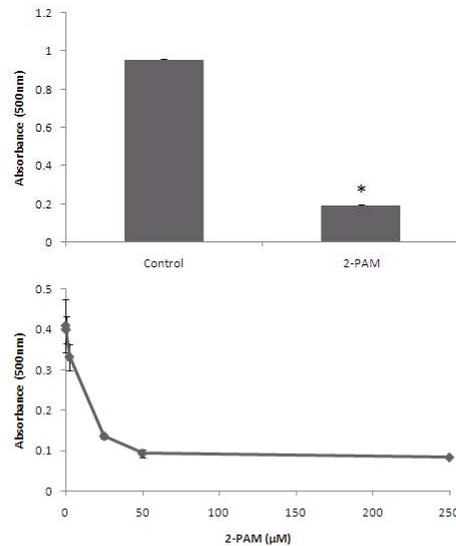


図 3 ChOD 活性に対する 2-PAM の抑制

表 4 ChOD 活性検出系における 2-PAM の影響

Assay	Red quinone (A _{500nm})	
	PBS	2-PAM
Control	0.953 ± 0.004	0.194 ± 0.003 *
No Choline	0.128 ± 0.013 **	0.109 ± 0.005
No ChOD	0.114 ± 0.005 **	0.105 ± 0.011
No ChOD + 0.03% H ₂ O ₂	0.307 ± 0.007 ***	0.311 ± 0.008

*Significant (P<0.005) compared with control PBS.

** Significant (P<0.005) compared with control PBS.

*** Significant (P<0.005) compared with No ChOD.

② 各種オキシムの ChOD 活性に対する影響
2-PAM、obidoxime 及び diacetylmonoxime について ChOD 活性に対する影響を調べた。その結果、2-PAM より解毒作用の強い obidoxime は、精製された ChOD 活性をより強く抑制し、解毒作用の弱い diacetylmonoxime は、その抑制の程度が小さかった。その結果を図 4 に示した。

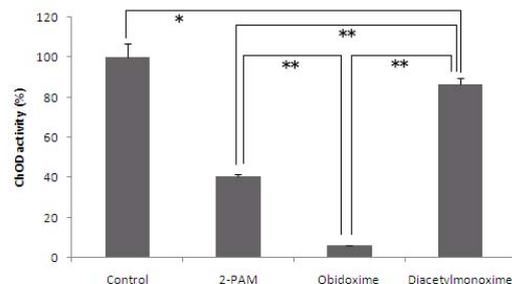


図 4 各種オキシムの ChOD 活性に対する影響の比較

③ ミトコンドリアオキシダーゼ活性における各種オキシムの影響
 ミトコンドリア分画におけるChOD活性について調べたところ、2-PAMにおいては75%まで活性が抑制されたものの、obidoxime及びdiacetylmonoximeでは有意な抑制が見られず、より毒性の強い4-PADではcontrolの200%まで逆に活性が上昇した。この結果を図5に示した。一方、ミトコンドリア分画におけるCyCOD活性においても、ChOD活性と同様の傾向が明らかとなったことから、オキシム類がミトコンドリアオキシダーゼ活性を直接抑制するだけでなく、発生するH₂O₂のような活性酸素種がその毒性発現に深く関与している可能性が示唆された。

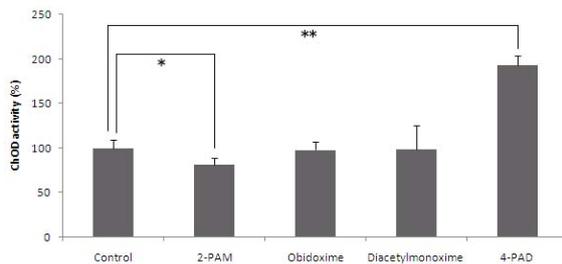


図5 ミトコンドリア ChOD 活性に対する各種オキシムの影響

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2件)

① Koichi Sakurada, Hikoto Ohta. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of the pyridinium aldoxime 4-PAO in brain, liver, lung, and kidney. J Chromatogr B, 査読有, Vol. 878, 2010, 1414-1419.

② Koichi Sakurada, Hiroshi Ikegaya, Hikoto Ohta, Hisayo Fukushima, Tomoko Akutsu, Ken Watanabe. Effects of oximes on mitochondrial oxidase activity. Toxicol Lett, 査読有, Vol. 189, 2009, 110-114.

[学会発表] (計1件)

① 櫻田宏一、神経ガス中毒治療における新規パム類似体のBBB通過に関する検討、第92次日本法医学総会、平成20年4月24日、長崎市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻田 宏一 (SAKURADA KOICHI)
 科学警察研究所・法科学第一部・室長
 研究者番号：10334228

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：