

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：82505

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592690

研究課題名(和文) 神経ガス中毒治療剤オキシム類が持つ毒性機序の解明

研究課題名(英文) Investigation of the toxic mechanism of oximes which are used in 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：4-PAOは、有機リン中毒で抑制されたAChEを再活性化させ、BBBを通過することから、脳内の解毒効果が期待されるが、それ自体の毒性に関する研究報告はほとんど認められない。そこで、ECG測定システムを用いてラット心筋収縮能に対する4-PAOの影響について調べたところ、房室伝導系に対して強い抑制作用を持つことが示唆された。さらに、40 $\mu$ M濃度では、4-PAOだけでなく2-PAMもK<sup>+</sup>-EDTA-ATPase活性を有意に低下させ、オキシム類がミオシン分子を介してATPase活性に影響を与える可能性が示唆された。一方、4 $\mu$ M濃度の各種オキシム類は有意に抑制せず、今後さらに詳細な検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：The pyridinium aldoxime methiodide (PAM)-type oxime 4-PAO, which can reactivate AChE inhibited by alkylphosphonate and penetrate the blood-brain barrier, is expected to be effective for reactivating blocked cholinesterase in the brain. However, the toxicity of 4-PAO has not yet been investigated in detail. The present study investigated the effects of 4-PAO on the contractile activity of the rat heart using electrocardiography analysis. 4-PAO was suggested to inhibit the atrioventricular conduction system more strongly than 2-PAM. In addition, not only 4-PAO but also 2-PAM inhibited the inherent K<sup>+</sup>-EDTA-ATPase catalytic activity of myosin, indicating that oximes might interact directly with the catalytic center of the myosin molecule. No significant inhibition was observed for less than 4 $\mu$ M 4-PAO, 2-PAM, 4-PAPE, obidoxime and DAM, which correspond to the clinical dose of 2-PAM. Further studies are required to clarify the mechanism of 4-PAO toxicity.

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：4-PAO 2-PAM cardiac effect ECG actomyosin ATPase

1. 研究開始当初の背景

(1) 1995年、東京地下鉄サリン事件が発生し、最終的に13人が亡くなり、6000人以上の中毒症状を伴った被害者をもたらしたが、当時、治療薬として2-PAMが投与された。このように、サリン等の神経ガス暴露時に、日本では主たる治療薬として2-PAMが用いられている。しかしながら、1992年、急性有機リン中毒治療において、アトロピン単独と2-PAM併用では治療効果に差がなかったと報告されているように、近年、多くの研究者が2-PAMの効果については懐疑的とし、その有効性については未だ結論に至っていない。その原因の一つに、2-PAMがほとんどBBBを通過できないことがあげられる。すなわち、これまで2-PAMが脳内に効果がないとする報告とBBBを通過するとした報告があり、明らかな結論を得ていなかったが、2003年、研究代表者らは、Rat brain microdialysis systemを用いて、2-PAMがBBBを約10%通過することを明らかにした。これは、2007年にPetroianu et al.によって妥当な数字であると報告された。しかしながら、この程度では、実際のサリン暴露時の移行量はさらに少ないと推測され、速やかにBBBを通過可能な解毒剤開発が必要であることを意味する。

(2) 研究代表者らは、2006年に数十種類の新規パム類似体を有機合成し、その中から比較的AChE再活性能型が高く、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て、そのBBB通過レベルを調べた。その結果、2種類の化合物の通過を確認し、中でも4-PAOは、約30%の通過率を示し、中枢神経系のAChE再活性に有効である可能性を示唆した。さらに、これら新規パム類似体のLC-MS/MSを用いた各種臓器からの新規定量法についても確立することができた。

(3) 2-PAMの効果に否定的であるもう一つの理由として、2-PAMを含めたオキシム類の毒性である。1956年、Kewitz and Wilsonは、2-PAMの主たる毒性としてRespiratory paralysisについて言及した。その後、1958年、Jagar et al.は、2-PAM 15-20mg/kg 静注後、めまい、霧視、複視、眼調整障害あるいは頭痛などが生じたことを報告するなど、その多くは副作用に関する臨床的報告がほとんどであった。2009年、研究代表者らは、ラット心筋を用いて、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を初めて調べた。その結果、異なったオキシム類の毒性の強さに比例してその酵素活性が抑制されることを確認し、さらに発生するフリーラジカルがミトコンドリア電子伝達系の抑制に深く関与している可能性を確認した。

このように、一連の研究は、神経ガス中毒治療における新たな治療法を確立する上でその成果が期待されているものである。

2. 研究の目的

神経ガス中毒治療において、現在、2-PAM、アトロピン及びジアゼパムの3剤併用による治療が一般に用いられているが、その主たる解毒機序は神経剤によって活性を失ったAChE活性を2-PAMが復活させるとするものである。近年、多くの研究者が2-PAMの効果については懐疑的であり、その大きな原因の一つに2-PAM自体の持つ毒性があげられる。すなわち、2-PAMをはじめとするオキシム類の心毒性については、臨床的な報告が大多数を占め、それらの毒性機序に関する詳細な検討はほとんど行われてこなかった。研究代表者がこれまでに明らかにしてきたBBB通過可能な新規解毒剤候補4-PAOにおいても、LD<sub>50</sub>が小さいなど、それ自体の毒性は強く、しかしながらその詳細は不明のままである。

本研究では、4-PAOを含めたオキシム類投与後の房室伝導系に与える影響についての検討、あるいは心筋Actomyosin ATPase活性に対する影響等について詳細に検討し、これまでに明らかにしてきたミトコンドリア電子伝達系酵素抑制との関連など、オキシム類自体が持つ毒性機序を明らかにすることを目的としており、これにより神経ガス中毒治療における新たな治療法の確立を目指そうとするものである。

3. 研究の方法

(1) オキシム類及び生体試料

4-[(hydroxyimino)methyl]-1-octylpyridinium bromide (4-PAO)、4-[(hydroxyimino)methyl]-1-(2-phenylethyl) pyridinium bromide (4-PAPE)、2-PAM、Obidoxime、Diacylmonoxime (DAM) がオキシム類として用いられた。これらの化学構造式を図1に示す。生体試料としてはSDラット(12-18週齢、295-385g)を用い、動物実験は科学警察研究所動物実験倫理委員会の承認を得て行った。

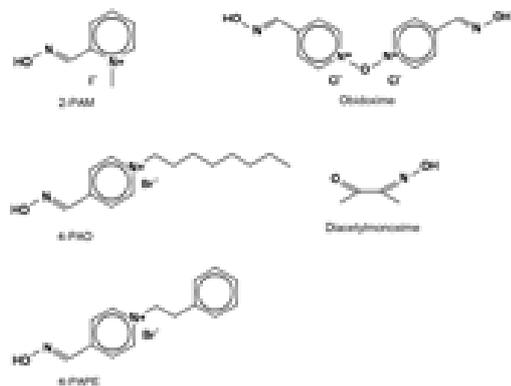


図1 2-PAM、4-PAO、4-PAPE、Obidoxime、DAMの化学構造

## (2) 循環動態計測システムによる解析

房室伝導系に対する影響についての検討として、Softron ECG Processor SP2000がデータ解析に用いられた。ラットはPentobarbital 麻酔下で心拍数及び ECG 波形の安定を確認した後、生食に溶解したオキシム類(50 $\mu$ mol/kg, n=4)を尾静脈より投与し、データを採取した。

## (3) Actomyosin の作製

ラット心臓を用い、Malhotra et al. 及び Yoshida et al.の方法を参照して作製を行った。すなわち、心筋1gを5mLのBuffer A(50mM KCl, 10mM imidazole-HCl pH7.0, 1mM EDTA, 0.5mM PMSF, 10mM 2-mercaptoethanol)で30secホモジナイズ後、5mLのBuffer Aを加え、5000gで10min遠心。次に、Myofibrilを含んだ沈渣が1% Triton X-100を含んだ20mLの冷Buffer Aの下(30min)で回収された。再度、5000gで10min遠心後、4mLの0.6M KCl, 10mM imidazole-HCl pH7.0, 0.5mM PMSF, 10mM 2-mercaptoethanolを加え、氷上に20min静置。10000gで10min遠心後、上清を30mLの10mM imidazole-HCl pH6.5で希釈し、40min氷上に静置。Actomyosinが14000gで30minの遠心により回収され、1mLの0.3M KCl, 10mM imidazole-HCl 7.0, 50% glycerol, 0.5mM PMSF, 10mM 2-mercaptoethanolに溶解された。タンパク濃度はBCA Protein Assay Kitを用いて決定された。

## (4) Mg<sup>2+</sup>-ATPase 及び K<sup>+</sup>-EDTA-ATPase 活性

Mg<sup>2+</sup>-ATPase 活性は、0-40 $\mu$ M濃度のオキシム類の存在下、10mM imidazole-HCl pH7.0, 10mM Na<sub>3</sub>, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 5 $\mu$ M free Ca<sup>2+</sup>, 0.1mg/mL actomyosin, 1mM ATPを含んだ溶液下(37 $^{\circ}$ C)で測定された。一方、K<sup>+</sup>-EDTA-ATPase 活性は、10mM imidazole-HCl pH7.0, 10mM Na<sub>3</sub>, 10mM EDTA, 0.6M KCl, 0.1mg/mL actomyosin, 1mM ATPを含んだ溶液下(37 $^{\circ}$ C)で測定された。反応液中のInorganic phosphateはLanzetta et al.の方法を参照して決定し、酵素活性は直線性のある4つのポイントを使って決定された。

## 4. 研究成果

### (1) オキシム類の房室伝導系に与える影響

4-PAO 50 $\mu$ mol/kg 静脈投与後3分までの ECG 波形データの一部を図2A-Dに示す(ただし、上段の連続波形は第II誘導)。波形データから得られた解析結果を表1にまとめて示す。4-PAO 投与後1minでHRはControlに対して経時的に有意な減少を示し( $P < 0.01$ )、3minにはさらに高度に低下した( $P < 0.01$ )。同時にRRは経時的に増大し、3minで有意な増大を示した( $P < 0.01$ )。また、PRは投与直後から、PDは1minで延長を示すように見え、P波の電位は投与後1minでControlに対して減少傾向を示した。QTの長さは1minでControlに対して増加を示しているように見

えたものの、QRSに有意な変化は認められなかった。このように、投与直後から洞性徐脈が出現し、1min後には洞停止が出現するなど、4-PAOは洞結節における刺激生成を抑制し、房室ブロックを惹起させる可能性が示唆された。



図2-A 4-PAO (50 $\mu$ mol/kg) 静注前の ECG データ



図2-B 4-PAO 静注直後の ECG データ



図2-C 4-PAO 静注後1minでの ECG データ

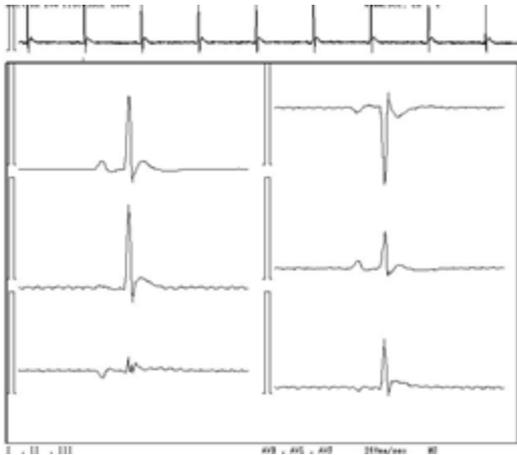


図 2-D 4-PAO 静注後 3min での ECG データ

表 1 4-PAO 静注後の ECG データ

Measurement	Control	0 min	1 min	3 min
HR (bpm)	346.5 ± 32.0	324.5 ± 24.0	193.8 ± 10.4*	147.8 ± 46.6*
PD (msec)	18.5 ± 1.3	19.5 ± 3.4	36.5 ± 17.7	47.5 ± 16.2
QRS complex (msec)	15.0 ± 0.8	16.8 ± 2.1	16.5 ± 2.9	18.0 ± 2.8
RR interval (msec)	174.3 ± 15.9	185.8 ± 14.0	310.0 ± 16.7	435.3 ± 127.6*
PR interval (msec)	48.5 ± 0.6	54.8 ± 4.8	62.5 ± 9.7	88.25 ± 35.4
QT interval (msec)	80.5 ± 7.8	89.0 ± 4.3	101.3 ± 8.7	115.0 ± 34.5
P wave (mV)	13.3 ± 2.7	13.3 ± 3.8	0.5 ± 8.7	0.5 ± 5.8
R wave (mV)	77.3 ± 8.8	75.3 ± 7.4	78.3 ± 9.6	73.5 ± 9.9
S wave (mV)	-14.5 ± 5.7	-9.0 ± 5.7	-3.5 ± 4.4	-9.0 ± 6.7
T wave (mV)	18.0 ± 4.0	25.0 ± 11.1	13.8 ± 7.6	16.8 ± 4.2

Data are expressed as mean ± standard deviation

HR, heart rate; PD, duration of the P wave

\* P < 0.01 compared with control

一方、2-PAM 50 μmol/kg 静脈投与後の波形データから得られた解析結果を表 2 に示す。2-PAM では PD がわずかに増大するように見える他、いずれも有意な変化を示さなかった。Calesnick et al. は、ヒトに本実験とほぼ同濃度の 2-PAM 15mg/kg を静注する実験を行い、投与後にわずかに脈拍が変化し、一時的な血圧上昇が見られたもののその他に変化はなかったとしており、本実験における 2-PAM の結果はほぼ一致する。これらの結果より、4-PAO は 2-PAM に比べ房室伝導系に与える影響の強いことが示唆された。

表 2 2-PAM 静注後の ECG データ

Measurement	Control	0 min	1 min	3 min
HR (bpm)	342.0 ± 14.3	367.0 ± 22.3	364.3 ± 21.2	361.3 ± 20.1
PD (msec)	18.3 ± 1.9	17.8 ± 2.1	20.3 ± 4.7	27.0 ± 10.9
QRS complex (msec)	16.8 ± 1.7	16.5 ± 1.7	16.8 ± 2.5	18.3 ± 1.0
RR interval (msec)	175.8 ± 7.6	164.0 ± 10.0	165.8 ± 9.0	167.8 ± 11.9
PR interval (msec)	46.5 ± 2.4	46.8 ± 4.0	47.0 ± 5.2	50.0 ± 7.8
QT interval (msec)	70.5 ± 18.8	65.8 ± 14.5	66.3 ± 15.8	62.0 ± 13.5
P wave (mV)	13.0 ± 2.2	14.3 ± 2.7	13.0 ± 2.2	8.5 ± 11.2
R wave (mV)	56.3 ± 20.0	74.0 ± 15.1	72.5 ± 15.0	69.8 ± 16.6
S wave (mV)	-27.0 ± 15.7	-26.8 ± 13.7	-26.0 ± 15.1	-26.0 ± 13.3
T wave (mV)	11.0 ± 3.8	12.5 ± 4.8	10.8 ± 5.9	11.3 ± 3.3

HR, heart rate; PD, duration of P wave

Data are expressed as mean ± standard deviation

## (2) Actomyosin ATPase 活性に対する影響

Mg<sup>2+</sup>-ATPase 活性に対する 4-PAO の 0.04-40 μM 濃度での影響を調べた。その結果、図 3-A に示すように、いずれの濃度でも Control に対して有意な変化を示さなかった。同様に、2-PAM に対しても有意な変化が認め

られなかった (図 3-B)。4 μM 濃度 (2-PAM の臨床濃度相当) での 4-PAO、2-PAM、4-PAPE、obidoxime 及び DAM との比較を図 2-C に示すが、有意な違いは認められなかった。

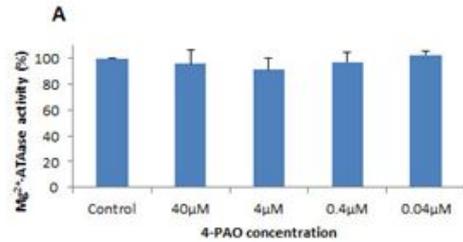


図 3-A Mg<sup>2+</sup>-ATPase 活性に対する 4-PAO (0.04-40 μM) の影響

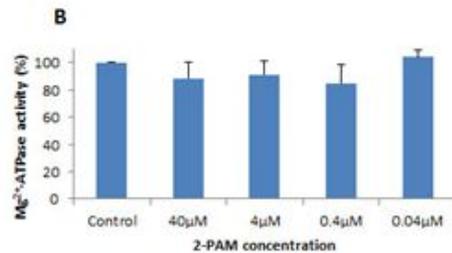


図 3-B 2-PAM (0.04-40 μM) の影響

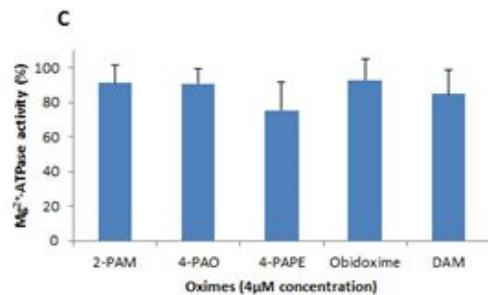


図 3-C 各種オキシム類 (4 μM) の影響

一方、K<sup>+</sup>-EDTA-ATPase 活性に対する 4-PAO の 0.04-40 μM 濃度での影響を調べたところ、図 4-A に示すように、40 μM 濃度では Control に対して 67.9 ± 7.2% まで活性が低下し、有意な抑制が認められた。同様に、2-PAM に対しても、40 μM 濃度では Control に対して 66.8 ± 15.9% まで活性が低下し (図 4-B) 有意な抑制が認められた。また、4 μM 濃度ではいずれも有意な抑制は認められず、オキシム類間での有意差は認められなかった (図 4-C)。

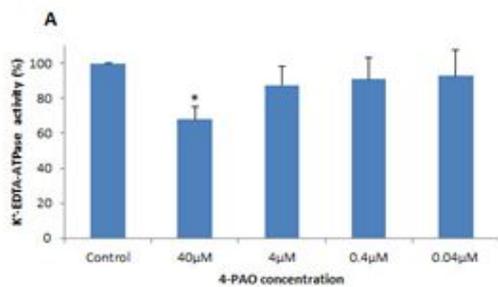


図 4-A K<sup>+</sup>-EDTA-ATPase 活性に対する 4-PAO (0.04 -40µM) の影響

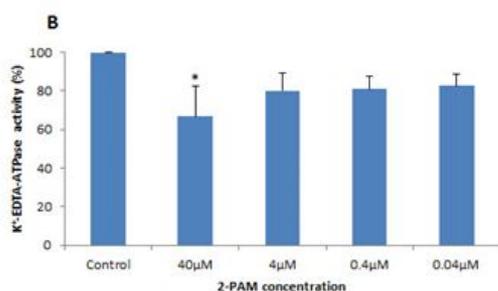


図 4-B 2-PAM (0.04-40µM) の影響

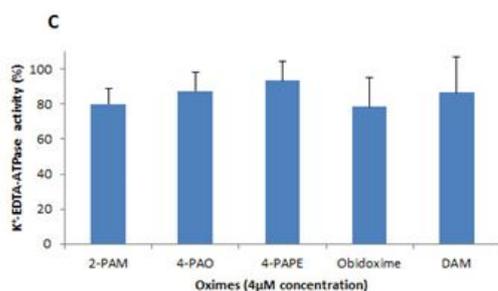


図 4-C 各種オキシム類 (4µM) の影響

本実験において、比較的高濃度のオキシム類が Mg<sup>2+</sup>-ATPase 活性に対しては有意な抑制は示さなかった。しかしながら、K<sup>+</sup>-EDTA-ATPase 活性に対しては有意な抑制を示したことから、オキシム類は myosin 分子を介して何かしら影響を与える可能性が示唆された。以前の研究において、我々は ATP 産生に重要な役割を担う呼吸酵素系に対してオキシム類が抑制的に働き、さらに発生するフリーラジカルがミトコンドリア電子伝達系抑制に深く関与する可能性を報告したが、今後、より詳細な解析を行い、本実験結果との関連についてなど、オキシム類の毒性機序について明らかにしていく予定である。

## 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 1 件)

Victor Voicu, Costel Sârbu, Florentin Tache, Florina Micăle, Ştefan F. Rădulescu, Koichi Sakurada, Hikoto Ohta, Andrei Medvedovici. Lipophilicity indices derived from the liquid chromatographic behavior observed under bimodal retention conditions (reversed phase/hydrophilic interaction): Application to a representative set of pyridinium oximes. *Talanta*, 査読有, Vol.122, 2014, 172-179.

### 〔学会発表〕(計 1 件)

Hikoto Ohta and Koichi Sakurada. Development of BBB-penetrative antidotes for reactivation of inhibited AChE in nerve agent poisoning. 13<sup>th</sup> International Congress of the Romanian Society of Pharmacology, Therapeutics and Clinical Toxicology. June 13<sup>th</sup>, 2012.

## 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)研究協力者

太田 彦人 (OHTA Hikoto)

科学警察研究所・法科学第三部・室長

研究者番号：40392261