

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：32644

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659749

研究課題名（和文） 家屋火災時のガス中毒に対する特異的解毒剤の開発

研究課題名（英文） Development of Specific Antidotes for CO and CN Poisoning in House Fire

研究代表者

川口 章 (KAWAGUCHI AKIRA)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：30195052

研究成果の概要（和文）：

家屋火災では、一酸化炭素（CO）やシアン化水素（HCN）が発生し、いまだに多くの犠牲者が出ている。COは血色素と結合して外呼吸を阻害し、シアン化物イオン(CN⁻)は酸素代謝酵素に結合して内呼吸を阻害する。我々はCOに対してHemocyclodextrin (HemoCD)、CN⁻に対してはImidazolecyclodextrin (ImCD)という高親和性の全合成鉄ポルフィリンを同志社大と共同で開発し、体外実験 (*in vitro*) により基本的検討の後、動物実験 (*in vivo*) によって現行の治療法と比較し、従来なかった家屋火災時の急性ガス中毒の特異的解毒剤としての有用性を検討した。

ImCD 体外(*in Vitro*) 実験により、用量依存性にCN⁻の毒性を中和することを示した[1]。大量合成に成功したため、動物実験(マウス*in vivo*) によって、最新の治療法(ヒドロキソコバラミンOHCbl)と同等で、従来型の治療法より優れた解毒効果を確認できた。*In vivo*前投与において、OHCblを上回る無呼吸抑制効果を認め[2]、*in vivo*後投与において、呼吸抑制の早急な回復などOHCblより強力な解毒作用を報告した[2]。

HemoCD 体外(*in Vitro*) 実験によりCO結合能は確認できた。CO中毒に拮抗するだけの大量合成が困難なため、微量で効果を発揮する酸素運搬体としての有用性を先に検討している。この途上でCN⁻の親和性を持ちながら人工酸素運搬体の特性を併せ持つHemoCD3の簡易合成に成功し、その特性を報告した[3]。これらの超分子化合物は迅速に尿中に排泄されるため、そのCN⁻抱合率を測定することでCN⁻解毒のための必要量の推定がリアルタイムで可能である反面、血中滞在時間を延ばす[4]ことで人工酸素運搬体としての効果も期待される。実用化のために今後も検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：

There still are numerous victims of premature death from carbon-monoxide (CO) and hydrogen-cyanide (HCN) poisoning in house fire. CO combines tightly to hemoglobin to inhibit outer respiration and CN⁻ ion (CN⁻) interferes intracellular mitochondrial electron transfer cascade to block inner respiration. We collaborate with Doshisha University to develop supramolecular complex of iron porphyrin and cyclodextrin dimer as a specific antidote for CO (Hemocyclodextrin: HemoCD) as well as an antidote for CN⁻ (Imidazolecyclodextrin: ImCD). In this study, we evaluate these antidotes first *in vitro* and then *in vivo* in animal experiments to compare their function with traditional antidotes or saline infusion as the control.

In *in vitro* CN⁻ toxicity studies [1], we found that ImCD reverse the CN⁻ toxicity in a dose dependent manner; while an equimolar dose of ImCD completely reversed the CN⁻ toxicity in terms of cytochrome activity and cell viability, hydroxocobalamine (OHCbl) protected only 80% of the cytochrome activity compared with the control cells without CN⁻ challenge. In *in vivo*, ImCD pretreatment significantly reduced the incidence of apnea after intra-gastric KCN administration (ImCD 0/9, OHCbl 5/9, Saline 9/9, P<0.05). In post-treatment study as a therapeutic use, ImCD was associated with significantly early resumption of spontaneous regular respiration after CN⁻ induced apnea

compared to OHCbl ($P < 0.05$). Nonetheless, 24-h survival was equivalent between the animals treated with antidotes, which were significantly higher than the saline-treated controls (ImCD 8/9, OHCbl 8/9, Saline 0/9).

Mass production of HemoCD was complicated and therefore failed to allow systematic evaluation against CO poisoning since the amount of CO causing *in vivo* poisoning was several orders higher than that of HemoCD production. Meantime, we develop HemoCD3, which is more potent as an antidote for CN^- , able to function as an oxygen carrier and simple to be produced [3]. Combined capability of HemoCD3 (CN^- antidote and O_2 carrier) may allow utility after CO or CN^- poisoning in the house fire.

These supramolecular CD complex have a short intravascular retention time, which may allow real-time CN^- monitoring in the urine to titrate their dose and to decide the timing to stop/start administration. Meanwhile, chemical modification to prolong the vascular retention time [4] may also allow its use as an artificial O_2 carrier as well.

The results suggest that ImCD, HemoCD and HemoCD3 appear to be promising compounds as specific antidotes for CN^- and CO poisoning and O_2 carrier, which are desirable and useful in gas intoxication in house fire. There need to be a lot more studies to explore these compounds further to expedite its clinical use in the future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2800000	840000	3640000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：蘇生学・家屋火災・有毒ガス・蘇生・外呼吸・内呼吸

1. 研究開始当初の背景

家屋火災では、一酸化炭素 (CO) やシアン化水素 (HCN) が発生し、その吸入により、いまだに多くの犠牲者が出ている。COは血色素と結合して外呼吸を阻害し、シアン化物イオン(CN^-)は酸素代謝酵素に結合して内呼吸を阻害するため、一般的な酸素吸入による救命率は高くない。我々はCOに対してHemocyclodextrin (HemoCD)、 CN^- に対してはImidazolecyclodextrin(ImCD)という高親和性の全合成鉄ポルフィリンを同志社大学と共同開発した。何れも静脈内投与により血中のCOや CN^- を特異的に抱合し速やかに尿中排泄されるため、火災現場で鑑別診断を待たずに合併投与できる。本研究では、体外実験 (*in vitro*) により基本的検討の後、動物実験(*in vivo*)によって現行の治療法と比較し、従来なかったガス中毒の特異的解毒剤として開発することを目指している

2. 研究の目的

家屋火災や自殺企図でのCO中毒・ CN^- 中毒の頻度は高いが、現場での鑑別は困難であり、蘇生法はいまだ確立されていない。これらのガス中毒に対してHemoCDとImCDをそれぞれ高親和性で安全な吸着剤、特異的な蘇生剤として有用性を検討し、臨床的な実用化に向けた検討を行なう。

3. 研究の方法

ImCD:培養細胞を用いた体外実験において、解毒作用の用量・作用関係を同定し、他薬剤との優位性を検討する。次にマウス *in vivo* において、KCN胃内投与前後の投与による血行動態、呼吸動態、酸素代謝動態を詳細に観察し、他薬剤との優位性を検討する。

HemoCD：培養細胞を用いた体外実験や生体実験に供するだけの大量合成に努める一方、脳血管バリアーを通過する特性を利用した酸素運搬体・エネルギー代謝促進剤としての有用性を脳虚血・再還流モデルで検討する。

4. 研究成果

ImCD

体外実験により、用量依存性にシアン化水素 (HCN) の毒性を中和することが判明した[1]。培養細胞を用いた *in vitro* 実験において、シアン化カリウム (KCN) と等モルを加えることで、その毒性を完全に中和した。すなわちシアンを加えていない対照群と同等にシアン毒性から保護されることが判明した。最新の治療法として比較のため用いたヒドロキシコバラミンでは、等モルを加えてもシアンを加えていない対照群細胞の約8割しか生存していなかったことから、ImCDはヒドロキシコバラミンより強力な解毒作用を有することが示唆された[2]。ImCDの大量合成に成功したことで、引き続いてマウス *in vivo* における実験を

実施することができた。KCN胃内投与直前（前投与モデル）では、KCN投与後の無呼吸発作の発生率がヒドロキシコバラミン投与群より有意に少なかったが、24時間および7日後の生存率は同等であった。KCN胃内投与による呼吸停止後の静脈内投与（後投与モデル＝治療投与モデル）では、ヒドロキシコバラミン投与群より呼吸再開までの時間が短く、呼吸数も高く保たれたが、24時間および7日生存率に有意差は見られなかった。以上よりKCN投与前もしくは投与後の呼吸停止後に用いたマウス *in vivo* での治療的効果は、少なくともヒドロキシコバラミンと同等で、亜硝酸ナトリウムなど従来型の治療法より統計学的に優れた解毒効果を確認できた[2]。

HemoCD

微量で効果を発揮する酸素運搬体としての有用性を先に検討している。サルに静脈内投与すると血中ヘモグロビンからCOを奪って脳血管バリアーを通過することが推測された（未発表データ）ため、その生理学的意義について検討中である。CO中毒に拮抗するだけの大量合成が極めて困難なため、化学合成が比較的簡易なHemoCD3の合成を行い、その物理特性を検討している。HemoCD3はシアン解毒剤としてImCDより強力であり、しかも酸素運搬体としての特性も併せ持っていることが判明している[3]。このため、火災現場でのガス中毒に対して、予想していたImCD+HemoCDの合併投与よりも、HemoCD3単独投与で治療が可能となることも予想される。

これらサイクロデキストリン超分子化合物の血液中滞在時間は、ヒドロキシコバラミンに比較して短く、1時間以内に約9割が尿中に排泄される。これは尿中に排泄された化合物のシアン抱合度を計測することで追加投与の必要性や治療打ち切りなど投与量やそのタイミングを推測できる臨床的な利点がある。このような利点はあるものの、酸素運搬体として長時間血液中中に滞在するような加工の試行にも成功している[4]。従来にない新たな薬剤として今後も開発の促進が望まれるが、実用化にあたっては更なる検討が必要である。

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4件）

1. Yamagiwa T, Sito T, Inokuchi S, Kawaguchi AT. Importance of pH in *in Vitro* assessment

of cyanide toxicity. *Tokai J of Exp Clin Med* 2013; under review 査読あり

2. Yamagiwa T, Kawaguchi AT, Sito T, Inoue S, Morita S, Watanabe K, Kitagishi H, Kano K, Inokuchi S, et al. Supramolecular ferric porphyrins and a cyclodextrin dimer as an antidote for cyanide poisoning. *Human and Experimental Toxicology* 2013; in press. 査読あり
3. Watanabe K, Kitagishi H, Kano K. Supramolecular iron porphyrin/cyclodextrin dimer complex that mimics the functions of hemoglobin and methemoglobin. *Angew Chem Int Ed* 2013; 25: 1-5 査読あり
4. Karasugi K, Kitagishi H, Kano K. Modification of a dioxygen carrier, with PEGylated dendrons for extension of circulation time in the bloodstream. *Bioconjugate chem.* 2012 ;23:2365-2376 査読あり

〔学会発表〕（計11件）

- ①青酸に対するイミダゾール配位超分子鉄ポルフィリン(ImCD)の解毒効果
日本救急医学会総会
2012年11月13日～2012年11月15日 山際, 京都府/日本
- ② Imidazole Cyclodextrin as a Novel Antidote for Acute Cyanide Poisoning: Comparison with Existing Antidotes
国際熱傷学会 2012年9月10日 山際, エデンバラ/イギリス
日本救急医学会総会 2011年10月18日
- ③ Liposome-encapsulated hemoglobin enhances chemotherapy to suppress tumor growth and metastasis in mice.
ASAIO 2012年6月16日 川口, サンフランシスコ/アメリカ
- ④ Liposome-encapsulated hemoglobin is protective immediately prior to reperfusion in 2-hour cerebral ischemia model in the rat.
ASAIO 2012年6月16日 川口, サンフランシスコ/アメリカ
- ⑤ Imidazole cyclodextrin as an antidote for acute cyanide poisoning.
ASAIO 2012年6月14日 川口, サンフランシスコ/アメリカ
- ⑥ Effect of liposome-encapsulated hemoglobin on low-grade cardiopulmonary exercise in the rat.
ASAIO 2012年6月16日 川口, サンフランシスコ/アメリカ
- ⑦ Therapeutic use of liposome-encapsulated hemoglobin alleviates hearing loss after transient cochlear ischemia and reperfusion in the gerbil.
ASAIO 2012年6月14日 川口, サンフランシスコ/アメリカ

スコ/アメリカ

⑧Imidazole cyclodextrin (ImCD), totally synthetic supramolecular complex as an antidote for cyanide poisoning.

ESAO&IFA0 2011年10月9日 山際,ポルト/ポルトガル

⑨ Imidazole Cyclodextrin (ImCD) as an antidote for Cyanide Poisoning: In Vitro and In Vivo Results The International Association of Forensic Toxicologists.

TIAFT 2011年9月30日 山際,サンフランシスコ/アメリカ

⑩急性シアン化合物中毒に対する新たな全合成解毒剤”イミダゾールシクロデキストリン”の in vitro における効果 山際,エディンバラ/イギリス

⑪In vitro におけるシアン化合物に対する解毒剤の評価方法の確立

日本中毒学会総会 2011年7月30日 山際,エディンバラ/イギリス

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称：循環補助薬

発明者：川口章、森本克己、金田伸一

権利者：テルモ株式会社

種類：特許

番号：特許 2011-201940 号

出願年月日：2011年9月15日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川口 章 (KAWAGUCHI AKIRA)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：30195052

(2) 研究分担者

猪口 貞樹 (INOKUCHI SADAKI)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：60160008

(3) 連携研究者

加納 航治 (KANO KOJI) (H24年度)

同志社大学・理工学部・教授

研究者番号：60038031