

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：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792089

研究課題名（和文） シアン化合物中毒に対する新たな全合成解毒剤に関する研究

研究課題名（英文） Supramolecular ferric porphyrins and a cyclodextrin dimer as an antidote for cyanide poisoning.

研究代表者

山際 武志 (YAMAGIWA TAKESHI)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：70439727

研究成果の概要（和文）：本研究ではシアン化物中毒に対する新たな解毒剤（イミダゾール・シクロデキストリン；以下 $\text{Fe}^{\text{III}}\text{PIm3CD}$ ）の有効性を検討した。培養細胞（マウス線維芽細胞）および実験動物（マウス）のいずれにおいても、 $\text{Fe}^{\text{III}}\text{PIm3CD}$ はシアン化カリウムに対して良好な解毒効果を有しており、この解毒効果は既存の解毒剤（コバルト製剤）と比較してもより効果が高いことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to evaluate an imidazole cyclodextrin ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{PIm3CD}$) which we have developed as an antidote for acute cyanide poisoning. Both *in vitro* study using murine fibroblast cell and *in vivo* study using mice, $\text{Fe}^{\text{III}}\text{PIm3CD}$ demonstrated a significant antidotal effect against potassium cyanide, which was more effective than that of existing antidote (cobalt compounds).

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	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：シアン化合物、解毒剤、イミダゾール・シクロデキストリン

1. 研究開始当初の背景

シアン化物はミトコンドリア・チトクロームオキシターゼと強力に結合することで、重篤な中枢神経系や呼吸器系に致死的症状を急速に呈するため、早期の解毒剤投与が必要である。従来、シアン化物中毒はテロリズムの脅威として認識されてきたが、近年では家屋火災で発生するシアン化水素中毒が一酸化炭素中毒と並び、熱傷患者の急性期死亡における主原因の1つとして注目され、その対策は大きな社会的意義を有している (Baud FJ,

N Engl J Med 1991)。既存の解毒剤には亜硝酸剤やコバルト製剤（ヒドロキソコバラミン；以下 OHCbl ）がある。しかしながら、亜硝酸剤は組織低酸素の増悪が問題となる。また、 OHCbl は血清蛋白存在化ではシアンイオンとの結合定数が極端に低下すること (Watanabe K, et al. Kitagishi H, ACS Med Chem Lett 2011; 2: 943-947.) や、波長ピークが OHCbl 532nm、メトヘモグロビン 510nm、カルボキシヘモグロビン 548nm) による血液検査所見への干渉といった問題が指摘され

(Lee J, et al. Ann Emerg Med. 2007; 49: 802-805.)、本邦でも普及していない。

我々は、2010年に同志社大学理工学部と共同でシアン化物に対する新たな解毒剤として、シクロデキストリン二量体と鉄ポルフィリンから成る超分子錯体（イミダゾール・シクロデキストリン：以下 $\text{Fe}^{\text{III}}\text{PIIm3CD}$ ）を合成した（産業財産権：2010-157599）。

2. 研究の目的

シアン化物中毒に対する新たな解毒剤である $\text{Fe}^{\text{III}}\text{PIIm3CD}$ の有効性を検討すること。

3. 研究の方法

(1) *In vitro*における $\text{Fe}^{\text{III}}\text{PIIm3CD}$ の有効性；マウス線維芽細胞株（NIH-3T3）を $1 \times 10^4/\text{well}$ で96ウェルプレートに播種し、一晚培養した。シアン化カリウム（KCN）5~10mMと0.6~10mMの $\text{Fe}^{\text{III}}\text{PIIm3CD}$ もしくはOHCblを細胞に同時添加し、1時間培養した。その後、MTTアッセイ、トリパンプルー色素排除試験を行い、細胞のチトクローム活性及び生存率を評価した。

(2) *In vivo*における $\text{Fe}^{\text{III}}\text{PIIm3CD}$ の有効性；セボフルレンによる全身麻酔下でBALB/cマウスに右内頸静脈に静脈路を確保、更に胃管から100%致死量相当のKCN（15mg/kg = 0.23mmol/kg）を投与し、心拍数、呼吸数を20分間観察する急性シアン中毒マウスモデルを作成した。

①前投与実験：中毒マウスモデルに対して、KCN投与直前に生理食塩水、 $\text{Fe}^{\text{III}}\text{PIIm3CD}$

（0.23mmol/kg）、OHCbl（0.23mmol/kg）を急速静注（各n=9）した。

②後投与実験：中毒マウスモデルに対して、呼吸停止を確認した直後に、 $\text{Fe}^{\text{III}}\text{PIIm3CD}$ 、OHCblを0.23mmol/kgを急速静注し、さらに同量を10分間持続静注した（各n=9）。各解毒剤の評価は24時間生存率、呼吸数、心拍数で行った。

(3) $\text{Fe}^{\text{III}}\text{PIIm3CD}$ の血液検査所見への影響；SDラットから採取した動脈血液に0.4~

1.6mMの $\text{Fe}^{\text{III}}\text{PIIm3CD}$ 、OHCblを添加し、動脈血液中カルボキシヘモグロビン（CO-Hb）濃度、メトヘモグロビン（Met-Hb）濃度を測定した。（各n=5） *波長ピーク； $\text{Fe}^{\text{III}}\text{PIIm3CD}$ 422nm, CO-Hb 548 nm, Met-Hb 510nm

4. 研究成果

(1) $\text{Fe}^{\text{III}}\text{PIIm3CD}$ は10mMまでは有意な細胞障害性を認めなかった。また、KCNによるチトクローム活性の抑制や細胞生存率の減少に対して $\text{Fe}^{\text{III}}\text{PIIm3CD}$ は用量依存的な解毒効果を示した（図1a,1b）。MTTアッセイにおいてKCNと等モルを添加した場合、対照（培地のみ）と有意差を認めなかった。（ 0.39 ± 0.017 vs 0.41 ± 0.016 ; $p=0.59$ ）一方、OHCblも用量依存的な解毒効果を認めたものの、KCNと等モルを添加してもなお、対照と有意差を認めた（ 0.53 ± 0.025 vs 0.69 ± 0.006 ; $p<0.001$ ）。

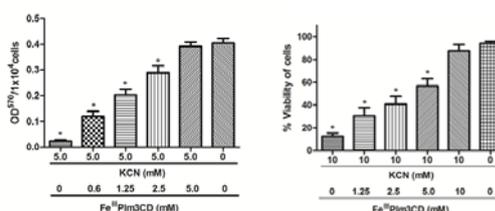


図1a チトクローム活性

図1b 細胞生存率

(2) ①前投与実験： $\text{Fe}^{\text{III}}\text{PIIm3CD}$ 投与群の24時間生存率は89%でOHCbl 89%と同等で、生理食塩水0%より有意に良好であった（図2）。 $\text{Fe}^{\text{III}}\text{PIIm3CD}$ 投与群の無呼吸発症例数は0例でOHCbl 5例、生理食塩水9例より有意に少なかった。

②後投与実験： $\text{Fe}^{\text{III}}\text{PIIm3CD}$ 投与群の24時間生存率は100%でOHCbl 89%と同等で、生理食塩水0%より有意に良好であった（図3）。 $\text{Fe}^{\text{III}}\text{PIIm3CD}$ 投与群において無呼吸からの呼

吸数の回復までの時間がOHCbl投与群より有意に早かった。

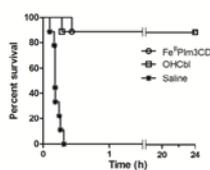


図 2

24 時間生存率；前投与

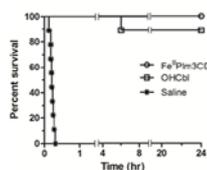


図 3

24 時間生存率；後投与

(3) Fe^{III}PIm3CD 添加群 (0.4~1.6mM) は生理食塩水添加群と比較してCO-Hb値に有意差を認めなかった。一方、OHCbl添加群ではCO-Hb値が有意に上昇した。Met-Hb値はFe^{III}PIm3CD添加群で生理食塩水群より有意に上昇するが、その程度はOHCbl添加群より軽度であった。(図4)

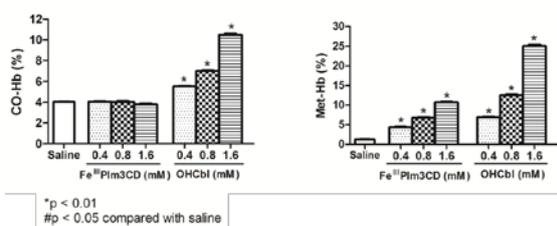


図 4 解毒剤添加による血中濃度への影響

以上のように、Fe^{III}PIm3CDはKCNの毒性に対して*in vitro*、*in vivo*において既存の解毒剤と同等以上の解毒効果を有していることが明らかとなった。

今後の展望として、薬物動態や安全性を詳細に検討した上で、①Fe^{III}PIm3CDに高分子化合物を結合させ血中半減期を調節し、シアン化物の毒性に対してより適した薬物動態にしていく、②テロリズムや災害現場で多数傷病者に投与に適した方法（筋肉注射等）についても検討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)

- ① Yamagiwa T, Kawaguchi AT, Saito T, Inoue S, Morita S, Watanabe K, Kitagishi H, Kano K, Inokuchi S. Supramolecular ferric porphyrins and a cyclodextrin dimer as an antidote for cyanide poisoning. *Human and Experimental Toxicology*, 査読有,2013, in press.

[学会発表] (計 6 件)

- ① 山際武志、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；マウス*in vivo*における検討、第40回日本救急医学会総会、2012年11月15日、京都
- ② Yamagiwa T, Imidazole cyclodextrin as a novel antidote for acute cyanide poisoning: Comparison with existing antidotes. 16th International Society of Burn Injury (ISBI 2012). September 10, 2012. Edinburgh (Scotland)
- ③ 山際武志、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、第39回日本救急医学会総会、2011年11月19日、東京
- ④ Yamagiwa T, Imidazole cyclodextrin; totally synthetic supramolecular complex as an antidote for cyanide poisoning. 38th Congress of European Society of Artificial Organs. October 10, 2011. Porto (Portugal)
- ⑤ Yamagiwa T, Imidazole cyclodextrin as an antidote against cyanide poisoning, *in vitro* and *in vivo* study. The International Association of Forensic Toxicology (TIAFT 2011). September 30, 2011. San Francisco (USA)
- ⑥ 山際武志、*In 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、第33回日本中毒学会総会、2011年7月31日、岐阜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山際 武志 (YAMAGIWA TAKESHI)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：70439727