

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11566

研究課題名(和文)新規PAM類似体の脳内活性に関する検討

研究課題名(英文)Study on activity of novel PAM analogues in brain

研究代表者

櫻田 宏一 (Sakurada, Koichi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

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

研究成果の概要(和文)：サリン暴露時の中枢神経系に効果的な新規解毒剤開発として、麻酔薬の投与、サリン類似体INMP暴露後の急性症状の確認、新規PAM類似体4-PAOおよびアトロピンの静脈連続投与、効果確認および脳内AChE活性測定とした、一連の実験系を確立した。実験系の中で、従来使用の活性基質ATChに替わり、AChE選択性の高いとされるMATP+が有用であることを確認した。その際、MATP+はオキシム類によって直接加水分解されることが明らかとなったが、臨床濃度では脳内活性値の評価に影響を与えないことが示唆された。しかしながら、MATP+使用にあたり、オキシム類濃度に配慮すべきことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サリン等の解毒剤として認可されている2-PAMはBBBをほぼ通過できないことから、脳内の解毒に有効な薬は存在しない。我々は、これまで数十種類の新規PAM類似体を有機合成し、その中で4-PAOが極めて有望であることを明らかにしてきた。本研究では、ラットを用いたin vivo実験として、麻酔投与後、サリン類似体INMP暴露から4-PAOおよびアトロピン連続投与、脳内AChE活性測定までの一連の実験系を確立し、4-PAOが脳内に効果的である可能性を明らかにした学術的および社会的意義は大きいと考える。また、AChE活性基質としてMATP+の新たな性状を明らかにできた点も意義あるものとする。

研究成果の概要(英文)：To develop novel antidotes that is effective for the CNS after sarin poisoning, a series of experimental systems were established, including anesthetic administration, confirmation of acute symptoms after exposure of sarin analog INMP, continuous intravenous administration of the novel PAM analog 4-PAO and atropine, confirmation of changes in symptoms, and measurement of AChE activity in the brain. In the system, MATP+ which is considered to have higher AChE selectivity was confirmed to be better than the conventionally used active substrate ATCh. Simultaneously, although it was clarified that MATP+ was directly hydrolyzed by oximes, it was suggested that the clinical concentration of antidote did not affect the evaluation of brain activity. However, it was indicated that the oxime concentration should be considered when using MATP+.

研究分野：法医学

キーワード：急性中毒学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 松本サリン事件(1994年)と東京地下鉄サリン事件(1995年)では、合わせて21人が亡くなり、6千人以上の被害者をもたらしたが、今なお数千人の被害者が重篤なままとされている。当時、主たる治療薬として Pralidoxime (2-PAM) が投与されたが、亡くなった被害者の脳内での AChE 活性は回復していないことが報告され (Nagao et al., *Toxicol Appl Pharmacol* 144:198-203)、中枢神経系に効果がない可能性が指摘されていた。それまでも、2-PAM が脳内で効果がないとする報告 (Bodor et al., *Science* 190:155-156, 1975; Shek et al. *J Med Chem* 19:113-117, 1976) と、BBB を通過するとした報告 (Hobbiger et al., *Biochem Pharmacol* 16:455-462, 1966; Milosevic et al., *Nature* 210:206, 1966) があり、明らかな結論を得ていなかったことから、研究代表者らは、2003年に 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 (Sakurada et al., *Neurochem Res* 28:1401-1407, 2003)、さらに 2007年に Petroianu et al. (*J Appl Toxicol* 27:350-357, 2007) によっても再確認された。しかしながら、この程度では、サリン暴露時には 2-PAM が脳内に移行する前に消費されるなど、実際の移行量はさらに少なくなることが推測され、速やかに BBB を通過できる解毒剤の開発が必要であることを意味した。2006年、研究代表者らは、数十種類の新規 PAM 類似体を有機合成し (Ohta et al., *Pharmaceut Res* 23: 2826-2833, 2006)、その中から比較的 AChE 再活性が高く、構造的に BBB 通過が期待される PAM 類似体を選択して、その BBB 通過の程度を調べた。その結果、4-[(hydroxyimino)methyl]-1-octylpyridinium bromide (4-PAO) は約 30% 通過することを確認した (Okuno et al., *Toxicol Appl Pharm* 227:8-15, 2007)。

(2) 4-PAO を含めた 4-PAM 群が有用である可能性が示唆されたことから、LC-MS/MS を用いた各種臓器からの新規定量法開発 (Sakurada and Ohta, *J Chromatogr B* 878:1414-1419, 2010)、毒性に関する検討 (Sakurada et al. *Toxicol Lett* 189:110-114, 2009)、側鎖の長さや脂溶性と BBB 透過性との関連 (Voicu et al., *Talanta* 122:172-179, 2014; Voicu et al., *Anal Bioanal Chem* 407:7135-7144, 2016) を明らかにしてきた。これらの結果から、現時点で 4-PAO が最も有望な化合物であると考えられることから、*in vivo* での実験に取り組むこととした。すなわち、ラットに対してサリン類似体 isopropyl 4-nitrophenyl methylphosphonate (INMP) を暴露して脳内 AChE 活性を抑制させ、急性症状を確認後、4-PAO およびアトロピン連続投与により、症状の消退および AChE 活性復活の可能性を明らかにする実験に着手したところである。

2. 研究の目的

(1) サリン等の神経剤に対して、現在、2-PAM、アトロピンおよびジアゼパムの 3 剤併用療法が用いられているが、その中でサリンによってリン酸化された AChE を 2-PAM が脱リン酸化させ、AChE を復活させる機序が最も重要である。しかしながら、2-PAM は BBB をほぼ通過できないことから、現在、中枢神経系に効果的な解毒剤は存在しない。すなわち、2-PAM に替わる脳内に有効な新規解毒剤開発は必須であり、速やかに実施すべき研究課題であると考えられる。

(2) 研究代表者らはすでに新たな解毒剤候補として 4-PAO が有望であることを明らかにしてきた。本研究では、ラットを用いた *in vivo* での実験系として、麻酔後のサリン類似体 INMP 投与、痙攣等の中毒症状の確認、4-PAO 連続投与、採取した脳内の AChE 活性測定、とした一連の実験系の確立を目指す。また、より精度の高い AChE 活性測定法として、新たに用いた活性基質 MATP+ の評価およびその性状について明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ラットを用いた *in vivo* での 4-PAO 活性測定系の確立

2-PAM による解毒機序を図 1 に示す。サリンのよってリン酸化された AChE は、2-PAM によって脱リン酸化され、その活性を復活させる。研究代表者らは、サリン類似体 INMP を用いて、同様にリン酸化させた AChE に対して 4-PAO を投与し、その解毒効果を *in vitro* ですでに明らかにしている。図 2 には、2-PAM に対する 4-PAO を含んだ 4-PAM 類の AChE 再活性の程度および BBB 通過率を示している。以前の予備的研究において、ラットに対し麻酔後、INMP 投与して急性中毒症状を発現させ、期待される新規解毒剤候補 4-PAO およびアトロピンを連続投与し、採取した脳内 AChE 活性の改善を明らかにしている。その際、麻酔薬としてジエチルエーテルを用いたが、麻酔薬としてのエーテル使用について、多くの関連する専門誌の実験規定外との指摘を受けた。また、研究代表者の所属機関の変更により、新たな実験施設となり、用いる器材や測定機器の変更を余儀なくされたことから、新たな実験系の構築が必要となった。そこで、8-10 週齢の雄 Wistar ラットに対して、エーテルに替わる麻酔薬を用いた新たな実験系による一連の活性測定系の構築を試みた。

(2) 脳内 AChE 活性測定

採取した脳から血液を良く洗い落とし、100mg あたり 0.95mL となるよう PBS を加え、ホモジネート。遠心後の上清を採取し、脳 100mg に対して 1mL となるよう PBS を加え、ラット脳 100mg/mL 抽出液を準備。この 10 倍希釈液 50 μ L に対して、Ellman 変法を用いて測定を行った。すなわち、試料 50 μ L に 2mM の 1,1-dimethyl-4-acetylthiomethylpiperidinium iodide (MATP+) 200 μ L 加

え、37 で 30min インキュベート。遠心後の上清 25 μ L に対してマイクロプレート上で 2mM の 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB)25 μ L および PBS50 μ L を加え、405nm の吸光度を測定した。

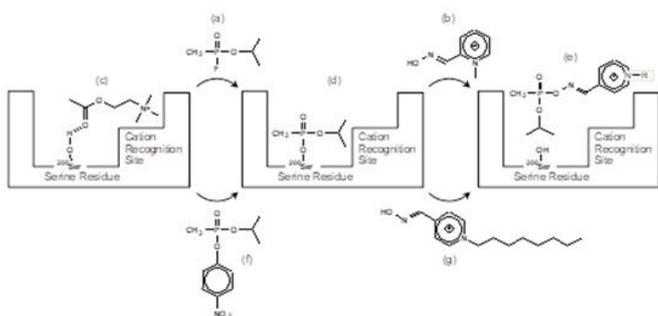


図1 サリン、2-PAM およびそれら類似体と AChE 活性部位との関連

(a) サリン、(b) 2-PAM、(c) 正常な AChE に結合した Ach、(d) サリンによって不活性化された AChE、(e) 解毒され復活した活性部位およびリン酸化 PAM、(f) サリン類似体 INMP、(g) 4-PAO

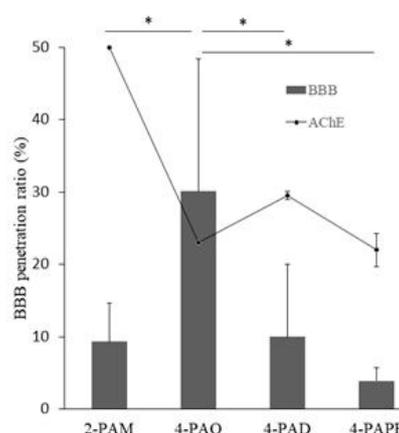


図2 4-PAM 類似体の 2-PAM に対する AChE 相対活性と BBB 通過性の比較

(3) AChE 活性測定基質の比較およびオキシムとの反応

これまで用いてきた AChE 活性測定基質 Acetylthiocholine (ATCh) は、Butyrylcholinesterase (BuChE) にも反応するとされていたことから、脳内のより精度の高い AChE 活性値を求めるために、新たな基質である MATP+ との反応性の比較を試みた。すなわち、同濃度の ATCh と MATP+ に対して、同濃度のヒト赤血球由来精製 AChE およびヒト血清由来精製 BuChE を用いて、それぞれの感度および特異性を調べた (n=3)。また、ラット血液に対する各基質の反応性を LC-MS/MS (Waters Xevo TQ-S, Ascentis-C18 (150 \times 2mm/2 μ m)) にて確認した。さらに、従来の ATChE はオキシム類のよって容易に加水分解されることが明らかとなっているが、MATP+ とオキシム類との反応性は不明である。そこで、0.0001-0.5mM (n=3) の 4-PAO、2-PAM および Diacetylmonoxime (DAM) との反応性を明らかにし、脳内活性値の評価に影響するか否かを検討した。統計解析は、Turkey-Kramer 法による多重比較検定を行った (P<0.01)。

4. 研究成果

(1) ラットを用いた in vivo での 4-PAO 活性測定

ラット体重測定後、三種混合麻酔薬 (Domitor、Midazolam、Vetorphale) を腹腔内投与。麻酔効果を確認後、尾部静脈に 4-PAO 静注ラインおよびアトロピン静注ラインを留置。DMSO に溶解したサリン類似体 INMP (0.15mg/kg) を静注後、間もなく全身の痙攣、苦悶症状、分泌物の排出を確認。4-PAO (2mg/kg) 連続 1h 投与。同時に、アトロピン (0.4mg/kg) 連続 20min 投与。急性症状の消退を確認しながら、ペントバルビタール腹腔内投与にて安楽死。速やかに脳を採取し、AChE 活性測定を行った。その結果、図 3 にデータの一部を示すが、INMP により約 65% 抑制された AChE 活性は、4-PAO の 1h 連続静脈投与により、約 23% 活性が復活し、以前の研究結果と矛盾しない 4-PAO の有効性を確認することができた。新たに立ち上げた実験系は、今後の詳細な検討に有効であることを確認したが、2本のライン確保の維持が難しく、静脈ラインからの経時的な液漏れなど、安定したデータを採取するためにはさらに改善すべき点が多々あることも明らかとなった。

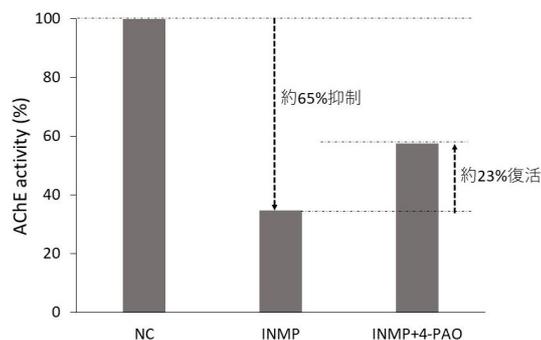


図3 4-PAO 投与後の脳内 AChE 活性の復活
4-PAO (2mg/kg) 連続 1h 投与およびアトロピン (0.4mg/kg) 連続 20min 投与

(2) MATP+/ATCh と AChE/BuChE との反応性

2種類の活性基質 MATP+ および ATCh に対する、精製したヒト赤血球由来の AChE およびヒト血清由来の BuChE の反応性について調べた。その結果、図 4 に示すように、AChE および BuChE はいずれも MATP+ に比べ ATCh に対して有意に高い反応性を示したが、MATP+ でも十分な反応性を示していることが確認された。一方、ATCh は酵素の違いによる有意差は認められなかったが、MATP+

では AChE に対して有意に高い反応性を示し、AChE に対する特異性の高いことが示唆された。さらに、ラット全血および血漿について、活性基質との反応性を LC-MS/MS で解析した結果の一部を図 5 に示す。MATP+ の血漿での活性は高く、BuChE に対する反応性は低いように見える。

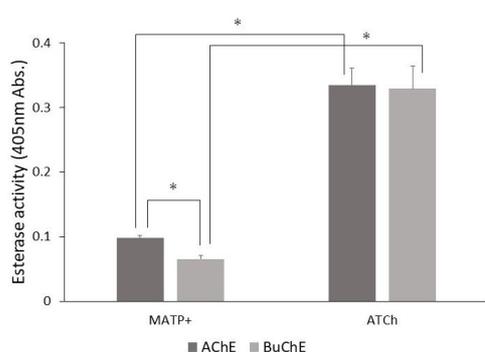


図 4 MATP+/ATCh と AChE/BuChE との反応性の比較

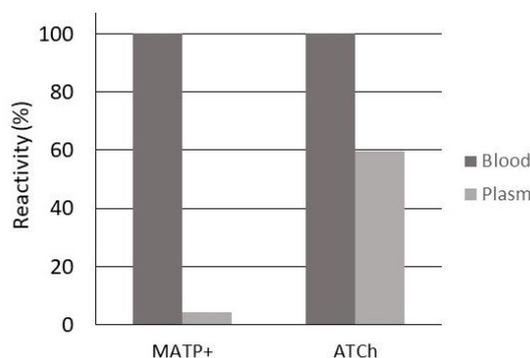


図 5 MATP とラット血液および血漿との反応性の比較

(3) オキシム類の MATP+ に対する反応性と脳内活性値評価への影響について

4-PAO と MATP+ との反応性を明らかにするために、0.01 - 0.5mM の 4-PAO を試料とした AChE 活性について検討した。その結果、図 6 に示すように、0.1mM 以上で有意な活性を示し、濃度依存的に AChE 活性を上昇させた。また、MATP+ 非存在下で非特異な活性は認められなかった。同様に、2-PAM および DAM について調べたところ、図 7 に示すように、いずれも 0.5mM 濃度以上で有意な活性値の上昇を示し、オキシム類が直接 MATP+ を加水分解することが確認された。

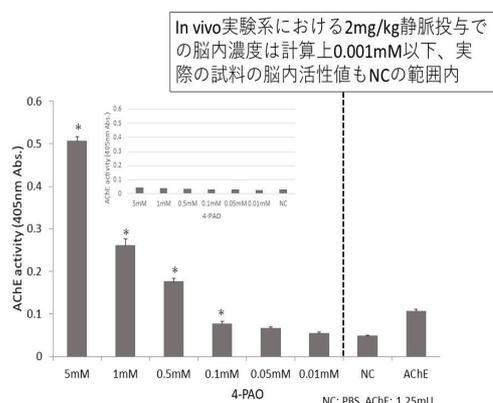


図 6 4-PAO の MATP+ に対する反応性

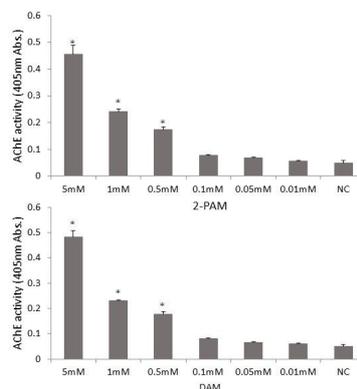


図 7 2-PAM および DAM の MATP+ に対する反応性

以前の研究で、ATCh が 2-PAM によって容易に加水分解され DesATCh となり、2-PAM はアセチル化され、Acetyl2-PAM となることを明らかにした (Sakurada et al. Toxicol Lett 166:255-260, 2006)。図 8 に示すように、4-PAO もまた 0.01mM 濃度以上で ATCh を加水分解した。しかしながら、MATP+ では 0.01mM 濃度では分解されず、LC-MS/MS 分析でも DesacetylMATP+ は検出されないことから、ATCh に比べ MATP+ はより安定した基質であり、AChE 活性測定のための基質としては、特異性の高いことが示唆された。図 1 に示したように、本実験で用いた臨床的な解毒剤の投与濃度において、脳内の 4-PAO 濃度は 0.001mM 以下と計算され、実際の試料中の脳内活性値も NC の範囲内と推定される。LC-MS/MS 分析により、本実験系において脳内に残存する 4-PAO は検出されず、全て消費されているものと考えられた。これらの結果より、MATP+ は新たな活性基質とした有用であることが明らかとなったが、高濃度のオキシム類により直接加水分解される可能性があり、用いる濃度に注意が必要である事が示唆された。

本研究において、中枢神経系に効果的な新規解毒剤候補として、4-PAO の有用性について検討してきたが、上記ラット in vivo での臨床的な投与実験系では未だ不十分であり、今後さらに詳細な検討が必要であると考えられる。

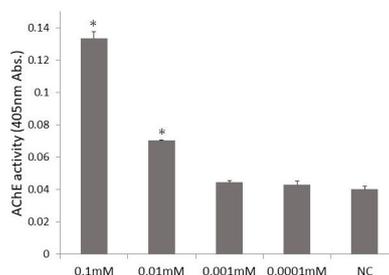


図 8 4-PAO の ATCh に対する反応性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 櫻田 宏一、峰岸 沙希、宇都野 創、大田 隼、田中 千紘、太田 彦人
2. 発表標題 PAM類似体の脳内活性に関する研究～MATP+を用いたAChE活性測定系の検討～
3. 学会等名 第88回日本法医学会学術関東地方会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石井 名実子 (ISHII Namiko) (10782386)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・特任助教 (12602)	
研究分担者	宇都野 創 (UTSUNO Hajime) (60367521)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・特任助教 (12602)	