

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 10 月 23 日現在

機関番号：35416

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592669

研究課題名(和文) 神経系細胞に対するサリン類似化合物の細胞骨格制御系を介した毒性機構研究

研究課題名(英文) Research for the cellular effects of a Sarin-like organophosphorous agent through cytoskeletons.

研究代表者

牧田 亨介 (Makita, Ryosuke)

広島都市学園大学・健康科学部・准教授

研究者番号：20321812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：サリン、ソマンなどの有機リン系神経剤の直接的毒性機構を検討するために、サリン類似物質BIMPを用いヒト神経由来細胞への影響を観察した。細胞免疫染色とWestern blottingの2つの手法により検討したところ、対照の有機リン系薬剤に比べBIMPが細胞骨格を不安定化するという結果が得られたが、その後の試行において、安定した結果が得られない状況となってしまった。

研究成果の概要(英文)：To determine cellular mechanisms of poisoning by organophosphorous agents Sarin and Soman, we analyzed effects of BIMP to culture cell-lines from human nervous system. By immunocytochemistry and Western-blotting, we obtained results that BIMP destabilized polymerization of cytoskeletons of the cells. However, the results were instable itself; we failed to obtain repeatability of the results between our experiences.

研究分野：医歯薬学

キーワード：神経剤 法医学 救急医学

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

### 1. 研究開始当初の背景

平成7年に発生し、社会に大きな衝撃を与えた地下鉄サリン事件では12名の死者と5,000名を超える被害者を出し、未だに多くの犠牲者が後遺症に苦しんでいる状況にある。

サリン、ソマン等の有機リン系神経剤について、生体に対するその毒性機構は、一般的にはアセチルコリンエステラーゼ(AChE)阻害を介したコリン作動性神経系の異常亢進、すなわちコリン作動性毒性機構によるものと考えられている。この毒性機構については、急性症状が消退した後には器質的な異常が残る危険性は少なく重篤な後遺症は残らないものとされており、曝露者、すなわち地下鉄サリン事件被害者にみられる長期的な愁訴の訴えは、いずれも Post-traumatic stress disorders (PTSD)とされてきてしまっている。

しかし、我々はすでに地下鉄サリン事件犠牲者の解剖結果から、亜急性有機リン剤中毒症である遅発性神経障害の発症例を報告しており、さらに非コリン性毒性作用による障害や、神経剤による血漿タンパクのチロシン亜リン酸化、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPase への結合なども報告されている。

一方、サリン・ソマンの毒性研究の中では、神経系のみならず心臓に対しても心病変を発症させることが報告されており、急性サリン中毒患者に血圧の上昇が観察されている。

サリン・ソマンは他の有機リン剤と比べ、aging が極めて早く、メチルフォスホン酸エステルとして AChE のセリン残基の水酸基と結合するため、長期にわたる AChE 活性阻害が生じると言われている。この現象は生体内において、セリン残基のみならず、細胞内情報伝達系において重要な役割を担うタンパク質のスレオニン・チロシン残基においても起こり得る現象であり、リン酸化に変わり水酸基がメチルフォスホン酸化され、メチルフォスフォンスレオニン、メチルフォスフォノチロシンとなり、脱リン酸化に抵抗性を示すこととなる。

これらのことから神経剤には、従来認知されていたコリン性の急性毒性以外に、神経剤特有の、他の有機リン剤にはない神経組織に対する(おそらく亜急性・慢性に分類される)毒性機構が存在し、曝露を受けた被害者に器質的障害を発生させているという可能性が推察されている。

我々は、これまでのこの非コリン性毒性作用の機序について研究を重ねてきた。日本ではその製造、使用が厳しく制限されているサ

リン、ソマンに代わり、構造類似揮発性有機リン製剤 BIMP (bis (isopropyl methyl) phosphonate) および BPMP (bis (pinacoly methyl) phosphonate) を作成し、これらを用い動物実験を行ったところ、いずれの薬剤を用いても神経剤投与で生じるとされる痙攣発作を生じさせることができ、サリン・ソマンの毒性機構の解明において非常に有用なデバイスであることを見出した。これを用いることにより、神経剤の主な毒性発現機構と考えられている ACh 濃度の上昇のみでは説明のつかない脳内 PLC の活性化・ラット培養アストロサイトの形態変化を明らかにしてきた。さらに、細胞内情報伝達系の一翼を担う MAP キナーゼ系活性化も確認されている。

### 2. 研究の目的

本研究において、我々は神経剤の非婚性毒性作用のうち、いまだその詳細について知見がなかった、神経組織を構築する個々の細胞に対する直接的毒性機構を明らかにするための実験を行った。神経組織由来の培養細胞を用いた実験系で解析を行った。

予備的な実験において、サリン類似物質 BIMP を用い、ヒト神経系由来細胞の培養環境に投与した際の細胞への影響を観察したところ、ニューロン由来細胞・非ニューロン由来細胞のいずれにおいても、BIMP 曝露後、細胞に至るまでの間に、細胞の辺縁部が spiky な形状をとるようになる細胞の変形がみられた。

この結果から、細胞骨格分子の安定性、およびその制御因子が BIMP により負の制御を受けていると考え、これらの分子が神経剤の標的であるのではないかと推察した。生体内の、細胞骨格分子およびその制御経路に含まれる各種のタンパク質が、神経剤によりメチル亜リン酸化修飾を受け活性の変化を示す可能性を検証し、その機構による細胞・組織の動態への影響を解明すること、さらには神経剤による亜急性(および慢性)中毒症状とそれに対する治療法・症状の悪化を防ぐための予防的処置についての知見を得る事を研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

合成 BIMP を、ヒト神経芽腫由来細胞株 SK-N-SH およびヒトアストロサイト由来細胞株 CCF-STTG1 の培養条件下に添加し、細胞が生存できる濃度範囲において、細胞の形態に

対する影響を観察した。あくまで個々の細胞に与える影響を観察するため、細胞はシート状ではなく、相互に細胞間接着の見られない単独培養環境下で行った。

細胞の形態及び細胞骨格の状態を、アクチン及びチューブリン(アセチル化チューブリン)に対する免疫染色により観察し、その構築の変化を確認した。対象として、神経剤に分類されない有機リン剤であるDFPを用い、観察にはコンフォーカル蛍光レーザー顕微鏡を用いた。

また培養細胞よりタンパク質を抽出し、アクチンならびにチューブリンに対するWestern Blotting (以下WB)を行い、細胞骨格の量及び安定性の変化を検討し、BIMP添加時に特異的な細胞骨格の変異動態を検討した。

#### 4. 研究成果

まず観察のために、効果が観察でき、同時に培養細胞の生育を障害しないBIMPの濃度および細胞の播種条件を検討した。BIMPおよびDFPの添加後、細胞が48時間以上生存できる限界濃度を確認した。以後の実験はこの濃度の範囲内で行った。

細胞の形態変化を指標に、両者を満たす条件を決定し、それに従いBIMPに曝露した細胞の細胞骨格分子の挙動を細胞免疫染色・WBの両手法において観察した。

しかしながら、実験の試行ごとに結果が異なり安定した結果が得られない状態が続き、BIMPの合成ロットによる活性の差異、細胞の微細な培養条件などの違いなどについて検討を重ねた。

条件検討と並行して、BIMPの効果をより明確に視認できる系として、MAPK系の細胞内シグナル分子のリン酸化状態をWBで確認する系の確立を並行して行った。こちらについても、使用機器の特性などからリン酸化状態を保ったままのタンパク抽出が行えるようになるのに時間がかかった。

・細胞免疫染色において、BIMP処理によりアクチン分子、アセチル化(重合型) -チューブリン分子の染色性の低下が確認された。この効果は、アストロサイト由来細胞であるCCF-STTG1においてより顕著であった。このことは、地下鉄サリン事件の15か月後に死亡したに被害者において、末梢神経の脱髄変性がみられたという知見<sup>1</sup>と矛盾しない。

ただし、分子数の変化の量的把握、細胞膜へのアンカリングに関わる他の分子の動態観察などについては行うことができなかった。

・WBにおいて、細胞骨格のうちストレスファイバー系を生に制御する因子RhoAについて、BIMP処理細胞においてリン酸化(活性化型)RhoAが減少しているというpreliminaryな結果が得られた。

ただしその後、培養条件・測定条件の再現性をとることが困難となり、RhoA全体の量の変化なのか、リン酸化状態の変化なのかについて確たる結果を得るに至らなかった。また、他のリン酸化因子(Ras, Rac1, ROCKなど)についての解析も行うことができなかった。

また、WBによる解析を進めていく中で、各タンパク質のリン酸化状態と垂リン酸化状態(神経剤の直接的影響の証左となる)を鑑別する必要があるという課題が表出し、垂リン酸化タンパク質(または垂リン酸化スレオニン/チロシン)特異抗体の作成について検討したが、本研究の遂行中には実施しなかった。

本研究においては、代表者の技術的問題、ならびに研究機関中に代表者の所属環境が変化したことによる時間的な制約などから、当初予定していた作業スケジュールから著しく遅滞し、1年間の延長を認められたにも拘らず、当初計画のうちごく初期の実験の途上で期間を終了せざるを得なかった。

ただし、脱髄変性障害に代表される神経剤曝露による長期的障害について細胞学的なアプローチの突端として、以降も解析を進めていく予定である。

#### (参考文献)

1. Himuro K1, Murayama S, Nishiyama K, Shinoe T, Iwase H, Nagao M, Takatori T, Kanazawa I. Distal sensory axonopathy after sarin intoxication. Neurology. 1998 Oct;51(4):1195-7.

#### 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0件)

[学会発表](計1件)

1. 長尾正崇、牧田亨介

サリン被害者 法医解所見からの解析

第 38 回日本トキシコロジー学会シンポジ  
ウム

2011 年 7 月 13 日

パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

〔図書〕（計 0 件）

〔その他〕

講演 1 件

1. 牧田亨介、長尾正崇、田中純子、秋田智之、  
坂宗和明、松岡俊彦

サリン曝露後の身体的・精神的自覚症状に  
関する研究

NPO 法人リカバリー・サポート・センター  
主催フォーラム『地下鉄サリン事件から  
20 年 ～民間団体ができたこと・できな  
かったこと～』

2015 年 3 月 15 日

主婦会館プラザエフ（東京都千代田区）

報道関係情報

新聞掲載 2 件

毎日新聞（全国版）朝刊社会面掲載  
2015 年 2 月 25 日

日本経済新聞 朝刊社会面掲載  
2015 年 3 月 16 日

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

牧田 亨介（MAKITA RYOSUKE）  
広島大学・医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：20321812

(2) 研究分担者

長尾 正崇（NAGAO MASATAKA）  
広島大学・医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：80227991

(3) 連携研究者

なし