

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：82505

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462845

研究課題名(和文) 血液脳関門通過性オキシム類による有機リン中毒の解毒に関する研究

研究課題名(英文) A novel detoxification treatment for organophosphorus poisoning by using BBB penetrative oximes

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：地下鉄サリン事件にて、救命時解毒剤2-PAMが投与されたにも関わらず亡くなられた被害者の解剖では、末梢AChE活性は回復したが脳内AChE活性は回復しなかった。これは2-PAMのBBB通過能が乏しいためと考えられ、よりBBB通過能の高い解毒剤の開発を検討した。脂溶性オキシム4-PAOが十分なラットBBB通過能とAChE回復能を示すことがわかり、ラットを用いたin vivo解毒実験を行った。脳内AChE活性を12.5%まで阻害したラットに4-PAOを継続静注したところ、脳内AChE活性が定量的に回復し、8mg/kg投与時で79.3%まで回復し、4-PAOが新たな解毒剤となり得る可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In Tokyo subway sarin attack in 1995 in Japan, 2-PAM was used for remedy of victims; however, it was insufficient for reactivation of inhibited AChE in CNS of victims since it does not penetrate BBB. In order to develop more effective antidote, we studied the direct reactivation of sarin-inhibited AChE in rat brain by BBB-penetrative oxime. Among the N-alkyl 4-pyridinealdoximes, only 4-PAO (side chain length: n-C8) showed enough BBB permeability and AChE reactivation activity. Sarin-inhibited rats (brain AChE inhibited to 12.5%) was prepared by safe sarin analogue INMP, and then administered 4-PAO by continuous infusion at 0 (negative control), 1, 3, or 8 mg/kg with 0.4 mg/kg of atropine. After 4 hours and 20 min, the inhibited rat brain AChE was quantitatively recovered by 4-PAO. At 8 mg/kg of 4-PAO, the inhibited brain AChE activity was recovered from 12.5% to 79.3% ± 12.3%. This study suggests that 4-PAO has both adequate delivery across BBB and in vivo AChE reactivating capacity.

研究分野：毒性学

キーワード：アセチルコリンエステラーゼ 脳内活性回復 4-PAO 2-PAM サリン類似体 サリン阻害ラット

1. 研究開始当初の背景

(1) 我が国は 1994 年、1995 年と 2 度にわたり神経ガスサリン (図 1 (b)) を用いたテロ被害を受け、また同じく神経ガス VX ガスを用いた殺人事件も起こる等、本来戦場でしか用いられないはずの神経ガスによる被害を一般市民が経験した。特に 1995 年の東京地下鉄サリン事件においては、死者 13 名、負傷者 6000 名を超える大惨事となった。この事件では、被害者にオキシム系解毒剤 2-PAM が投与されたにも関わらず亡くなられた例が複数見られた。

神経ガスは、神経伝達物質アセチルコリン (ACh) が神経伝達を終了後これを分解する酵素アセチルコリンエステラーゼ (AChE) を阻害する (図 1 (a) ~ (c))。これによりヒトは過剰な神経伝達が止まらなくなり重大な神経症状を呈する。解毒剤 2-PAM は、神経ガスにより阻害された神経系の AChE を回復させることにより解毒を行う (図 1 (c) ~ (f))。

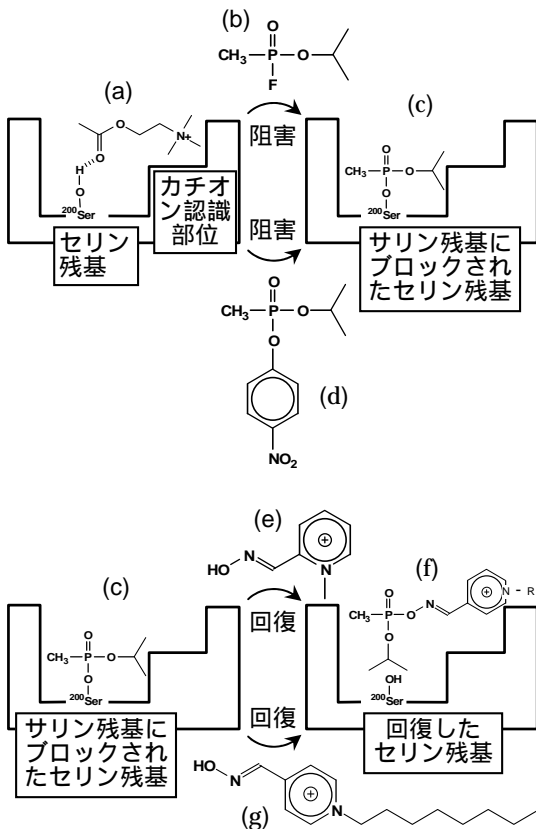


図 1 AChE の活性部位。(a) 正常な AChE 及び本来のリガンドである ACh、(b) 神経ガスサリン、(c) サリン残基によって活性部位の²⁰⁰セリン残基の水酸基をブロックされ不活性化された AChE、(d) サリンと同様の作用を示すが、安定でかつ通常の実験室で安全に取り扱えるサリン類似体 INMP、(e) 解毒剤 2-PAM、(f) 解毒剤により回復した活性部位及び遊離したサリン - オキシム複合体、(g) 2-PAM と同様の作用を示すが BBB も通過する解毒剤 4-PAO。

しかし、地下鉄サリン事件における 2-PAM 投与後の死亡例においては、解剖及び検査の結果、身体末梢部の AChE 活性は 2-PAM により回復していたが、脳内 AChE 活性は回復していなかった。これは 2-PAM の血液脳関門 (BBB) 通過性が乏しく脳に到達しにくいことによるもので、2-PAM の解毒剤としての限界を示したものであり、今後同様の事件があった場合の救命医療に大きな課題を残した。すなわち、神経ガス中毒が重症化した場合、BBB 通過能の乏しい 2-PAM では脳内 AChE 活性の回復が見込めないため、死亡、植物状態化、あるいは重大な後遺症から被害者を救うことが難しくなる。一方、今日でもシリアにおける一般市民へのサリン使用、神経ガスによる殺人、化学兵器ミサイルの可能性等、一般市民に対する神経ガスの脅威はむしろ増しており、BBB を通過し得る新たな解毒剤が必要とされている状況にある。

(2) 研究代表者らは BBB を通過し得る新たな神経ガス中毒解毒剤を開発する目的で、2006 年に脂溶性を有する 2-PAM 類似体約 40 種を新規に合成し、AChE 回復能を調べた結果、2-PAM 類似体、3-PAM 類似体は回復能が低いこと、4-PAM 類似体は側鎖延長・脂溶化により AChE 回復能が上がることを明らかにした。特に高い AChE 回復能を確認し、構造的にも BBB 通過が期待できる、C8 側鎖を持つ合成品 6 種について、2008 年にラット BBB 通過能を調べた。その結果、BBB はオキシム類の側鎖に対して非常に厳しい選択性を示し、唯一、直鎖状の C8 側鎖を有するオキシム 4-PAO (図 1 (g)) のみが BBB 通過能と AChE 回復能を持つことが見いだした。またこの過程で、脳内及び臓器中のオキシム類の LC-MS/MS 分析法も確立している。

2. 研究の目的

神経ガス中毒治療時には、現在 2-PAM (根本療法)、アトロピン及びジアゼパム (対症療法) の 3 剤併用療法が主に用いられているが、その中で唯一根本治療を担う 2-PAM が BBB を通過できず脳の損傷を回復できないため、重症化した時の死亡、植物状態化あるいは重大な後遺症を食い止めることができない。そこで本研究では、2-PAM と同様の AChE 回復能を持ち、BBB を通過して神経ガスにより阻害された脳内 AChE を直接回復でき、かつ 2-PAM と同様生理食塩水溶液として点滴に用いることができ、重症化した被害者の中枢神経系と体幹部の両方の解毒が可能なオキシム系解毒剤を発見することを目的とする。すなわち先に発見した 4-PAO に加えその類似体を複数合成し、その解毒剤としての評価を行う。

3. 研究の方法

(1) 4-PAO 以外のオキシムの検討

我々が 2008 年に見出した BBB 通過性オキ

シム 4-PAO (4-[(hydroxyimino)methyl]-1-octylpyridinium bromide) は、2-PAM の置換位置を変えた 4-PAM に脂溶性の直鎖 C8 側鎖を持たせた化合物である (図 1 (g)、図 2 (a)及び(b))。我々は 2006 年に C2~C10 までの側鎖を持つオキシム類について、鎖長に応じて AChE 回復能が直線的に上昇することを確認しており、特に、側鎖長が C10 である 4-PAD (4-[(hydroxyimino)methyl]-1-decylpyridinium bromide、図 2 (c)) は、側鎖長 C8 である 4-PAO の 1.28 倍の AChE 回復能を持ち、かつ合成品では最大の AChE 回復能を示すことを確認している。また BBB はモノピリジニウム系オキシムとして唯一直鎖状側鎖を持つもののみ通過を許すことも確認しているため、4-PAD は 4-PAO 同様解毒剤として有望な化合物と考えられた。しかし、当時は側鎖長 C12 以上のオキシム類の BBB 通過性は LC-MS/MS の制限により測定できず、また側鎖長が C12 を超えるオキシムも合成できなかった。

そこで今回は、新たに側鎖長 C12 である 4-PAL (4-[(hydroxyimino)methyl]-1-laurylpyridinium bromide、図 2 (d)) 及び側鎖長 C14 である 4-PAT (4-[(hydroxyimino)methyl]-1-laurylpyridinium bromide、図 2 (e)) を新規合成し、4-PAO、4-PAD と合わせて BBB 通過性解毒剤としての評価を行うこととした。

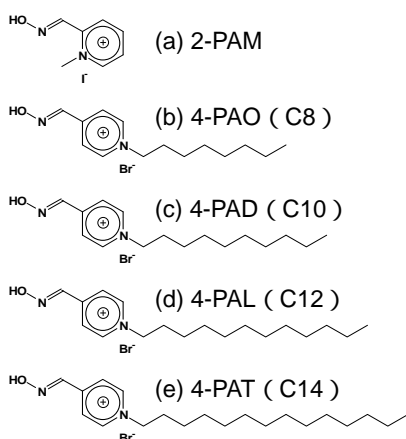


図 2 2-PAM 及び 4-PAO とその類似体 4-PAD、4-PAL 及び 4-PAT の構造

(2) 動物実験

BBB 通過能が知られていない 4-PAD、4-PAL 及び 4-PAT の 3 種については、ラット BBB 通過能及び水溶性を検討し、4-PAO と比較した。ラット BBB 通過能の測定は、我々が 2008 年に開発したブレインマイクロダイアリシス法によって行うこととした。その結果を受けて、4 種類中、最も BBB 通過能の高いものについて、実際にサリン中毒状態にしたラットに点滴投与し、脳内 AChE 活性を回復できるかどうか確認することとした。全ての動物実験は科学警察研究所動物実験委員会の承認を得た後、SD ラット (6~8 週、211~475 g)

を用いて行った。

(3) ラット脳内 AChE 活性の測定

脳を細切混合後、約 0.5 g を精秤し、50 mL 容粉碎用カプセルに入れ、安井機械製 Multi-Beads Shocker を用い、室温、3000 rpm で 10 秒間粉碎しペーストを得た。これにリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を 100 mg あたり 0.95 mL 加え、再度 Multi-Beads Shocker を用い室温、3000 rpm で 10 秒間ホモジナイズした。得られたホモジネートは 3500 × g、4 で 30 分間遠心分離し、上清を採り、PBS を加え 100 mg/mL 脳抽出原液とした。その 50 μL を 1.5 mL 容ディスポーザブルチューブに採った。ブランクコントロール用には、代わりに PBS 50 μL を採った。これに、AChE に対し選択的な試薬である 1,1-Dimethyl-4-acetylthiomethylpiperidinium iodide (MATP+) の 10 mM PBS 溶液 200 μL を加え、37 で 30 分間インキュベートした。この溶液を 5,200 × g で遠心分離後、405 nm の吸収を SpectraMax Plus 384 型分光計で測定した。データはブランクコントロールの値を差し引いた後用いた。統計解析にはステューデントの t 検定を用いた。データは平均 ± 標準偏差で表示し、統計的有意水準は 5% とした。

4. 研究成果

(1) 4-PAO 以外のオキシムの検討

まず 4-PAO 及び類似体 4-PAD、4-PAL、4-PAT について水溶性を検査した結果、C10 側鎖を有する 4-PAD までは水溶性であったが、C12 側鎖を有する 4-PAL 以降は生理食塩水に溶解せず、点滴に用いるのは困難であることがわかった。また我々は、4-PAO 及び 4-PAD の AChE 回復能については 2006 年に明らかにしているが、今回 4-PAL 及び 4-PAT の AChE 回復能については、これらに水溶性がないことから測定できなかった。

ブレインマイクロダイアリシス法では、BBB を通過してラット脳内に入ったオキシム類が、脳内に設置された透析膜プローブを通過することにより脳外に導かれ検出される。その予備実験として各化合物の透析膜通過能を測定する必要があるが、4 化合物の透析膜通過能は鎖長延長とともに低下し、4-PAT ではゼロとなった。脂溶性オキシム類は分子内に脂溶性部分とイオン性部分を持ち界面活性剤としての構造を有するため、水溶性を失うのに伴い、4-PAT は透析膜の細孔を通過できない大きさのミセルを形成したものと考えられた。従って、4-PAT は BBB 通過能を測定できないため、以降の実験からは除外することとした。

またブレインマイクロダイアリシス法では、透析膜プローブを通じて脳外に導かれたオキシム類を LC-MS/MS により分析する必要があるが、我々が 2008 年に開発した ODS-LC-MS/MS 法では、生体試料中オキシムに

関しては、C10以上の側鎖を有するオキシム類は生体脂質の妨害のため分析できず、BBB通過能の測定も不可能であった。そこで、図3に示すように、長鎖オキシム類を分析可能なHILIC-LC-MS/MS法を今回新たに開発した。

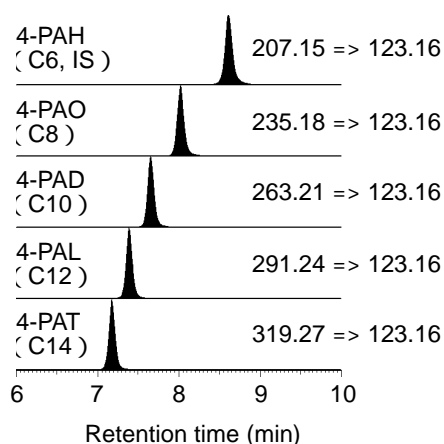


図3 長鎖オキシム類のHILIC-LC-MS/MS

以上のブレインマイクロダイアリシス-HILIC-LC-MS/MS法で測定したオキシム類のラットBBB通過能を図4に示す。

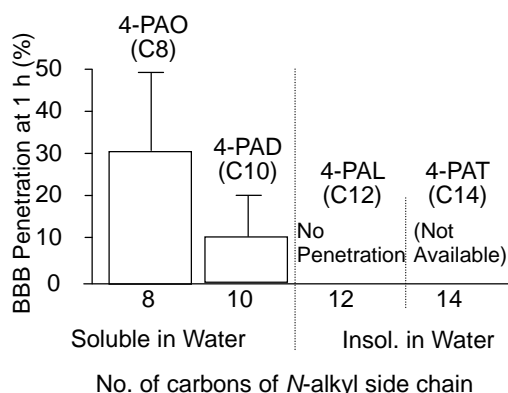


図4 長鎖オキシム類のラットBBB通過能

図4に示すように、側鎖長C8以降、側鎖の延長とともにオキシム類のBBB通過能は急激に減少し、特に水溶性を失った4-PALでは完全にBBB通過能が失われた。一般に、化合物がBBBを通過するには脂溶性であることが必要とされているが、本結果は、適度な水溶性もまた同時に必要とされることを示している。2006年の研究成果より、これまで合成した脂溶性オキシム類約40種の中では、4-PADのAChE回復能が最大であり、二番目に大きい4-PAOの1.28倍であることが明らかになっているが、4-PAOのBBB通過能が4-PADの3倍であることを考えると、BBB通過性解毒剤としては、4-PADより4-PAOの方が有望と判断された。4-PAL及び4-PATについては、BBB通過能がないかもしくは測定できないこと、AChE回復能も測定できないこと、水溶性

がなく点滴剤としての使用も不可能であることから、以降解毒剤の候補から除外した。以上から、これまでに合成した脂溶性オキシム類約40種の中で唯一、偶然にも、高いAChE回復能、BBBを通過するのに必要な脂溶性及び適切な水溶性、そして点滴剤として使用可能な水溶性の全てを同時に有していることが明らかとなった4-PAOを、最終的なBBB通過性オキシム系解毒剤候補として選定し、以降の動物実験に用いることとした。

(2) *in vivo* ラット脳内AChE活性回復実験

ラット尾部静脈より、AChE阻害剤として、我々がかつて2006年に開発した、安定でかつ通常の実験室で安全に取扱可能なサリン類似体INMP (Isopropyl *p*-Nitrophenyl Methylphosphonate、図1(d))を0.15 mg/kg単回投与したところ、いずれも5分以内に痙攣及び直立不能を示した。INMP投与5分後から、尾部静脈より、アトロピンを1.2 mg/kg/hで20分間(0.4 mg/kg)投与することで、全頭ともINMP投与4時間20分後の時点で生存し、この時点で脳内AChE活性は正常ラットと比較して $12.5 \pm 2.3\%$ ($n=5$, $87.5 \pm 2.3\%$ 阻害、図5(a))まで阻害されていた。

アトロピン投与開始と同時に、4-PAOを2 mg/kg/hで0、0.5、1.5及び4時間(0(4-PAO非投与群)、1、3及び8 mg/kg投与群、いずれも $n=5$)投与した。全ラットについてアトロピン投与開始4時間後より15分間症状を観察し、INMP投与より4時間20分後安楽死、脳を取り出し脳内AChE活性を測定した。この投与法は、実際にヒト中毒時に行われる点滴治療をスケールダウンしたものである。なお、4-PAOの抗痙攣作用も調べるため、現行の3剤併用療法において用いられるジアゼパムは今回投与しなかった。

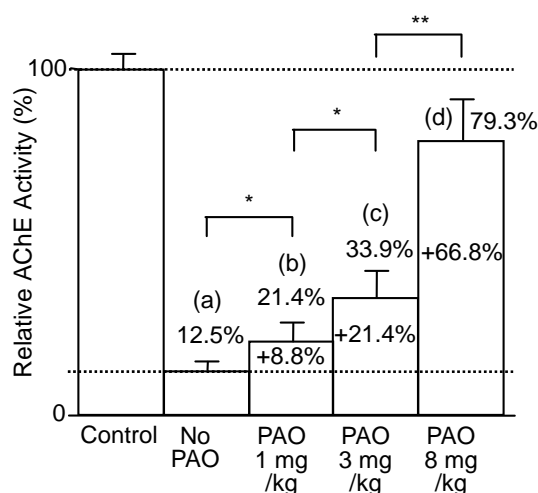


図5 4-PAOの持続静注によるサリン阻害ラット脳内AChE活性の回復。(a) 4-PAO非投与群(アトロピン0.4 mg/kgのみ投与)、(b) 4-PAO 1 mg/kg及びアトロピン0.4 mg/kg投与群、(c) 4-PAO 3 mg/kg及びアトロピン0.4

mg/kg 投与群, (d) 4-PAO 8 mg/kg 及びアトロピン 0.4 mg/kg 投与群。棒グラフの高さはサリン阻害ラット脳内 AChE 活性、その上のバーは標準偏差を示す。* : P < 0.01、** : P < 0.0001。

その結果、ラット脳内 AChE 活性は、4-PAO の投与量に応じて定量的に回復した (図 5)。4-PAO 1 mg/kg 投与群では、 $8.8 \pm 5.1\%$ (3.8-15.3%, $n = 5$, $P < 0.01$) の脳内 AChE 活性回復が見られた (図 5 (b))。同様に 4-PAO 3 mg/kg 投与群では、 $21.4 \pm 6.6\%$ (15.6-31.2%, $n = 5$, 図 5 (c))、4-PAO 8 mg/kg 投与群では、 $66.8 \pm 12.3\%$ (56.3-81.2%, $n = 5$, 図 5 (d)) の脳内 AChE 活性回復が見られた。4-PAO 8 mg/kg 投与群では最終的に、正常ラットと比較して $79.3 \pm 11.3\%$ (68.9-93.8%) まで回復した。また、4-PAO 非投与群では、INMP 投与より 4 時間 5 分後の時点で全個体に痙攣及び直立不能が持続していたのに対し、全ての 4-PAO 投与群で痙攣及び直立不能は消失し、直立及び自力歩行が可能であった。また 4-PAO 8 mg/kg 投与群では、5 匹中 3 匹が食欲を示した。また 4-PAO に起因すると思われる中毒症状は特に観察されなかった。

以上の結果より、本研究は、4-PAO が BBB を通過し、治療に十分な量が脳内に供給されていること、また特に副作用もなく、持続静注により脳内 AChE 活性を直接回復できていることを示した。これはまた、サリン阻害ラットの脳内 AChE 活性の、BBB 通過性オキシム 4-PAO 投与による投与量依存的かつ定量的な直接回復についての初めての報告でもある。

4-PAO の作用及び解毒機構は、BBB を通過する点を除けば現行の 2-PAM と同じであり、十分な水溶性も有することから、従来行われている 2-PAM + アトロピン + ジアゼパム 3 剤併用療法における 2-PAM の代替あるいは併用薬剤の候補として現在最も近い位置にあると考えられ、特に神経ガス事案においては、重症患者の生存率のみならず、救命後の QOL の向上にも寄与できる可能性があると考えられる。

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 3 件)

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, V. Voicu, C. Sărbu, F. Tache, F. Micăle, Ș. F. Rădulescu, K. Sakurada, H. Ohta, A.V. Medvedovici, Talanta, 査読有, 122, 172-179 (2014).

The Forgotten or Underestimated Relevance of Biopharmaceutical-Based Assessments for the Oral Absorption Studies of Oxime Reactivators, Victor A. Voicu, Andrei Valentin Medvedovici, Koichi Sakurada, Hikoto Ohta, Flavian Ștefan Rădulescu, Dalia Simona Miron, Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology, 査読有, 12(7), 743-752 (2016).

Direct reactivation of sarin-inhibited acetylcholinesterase in rat brain by continuous infusion of a blood-brain barrier penetrative oxime, 4-[(hydroxyimino)methyl]-1-octylpyridinium bromide (4-PAO), Nami Takashino, Hikoto Ohta, Ayari Takamura, Ken Watanabe, Tomoko Akutsu, Flavian Ștefan Rădulescu, Victor A. Voicu, Junji Tagami, Koichi Sakurada, Clinical Toxicology, 査読有, in press (2017).

[学会発表](計 1 件)

Effect of side-chain elongation of pyridinealdoxime methiodide-type acetylcholinesterase reactivators on blood-brain barrier penetration, H. Ohta, T. Yamamuro, K. Sakurada, Abstracts of The 52nd Annual Meeting of TIAFT, pp.74 (2014).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

山室 匡史 (YAMAMURO Tadashi)

科学警察研究所・法科学第三部・室長

研究者番号: 80646555