

令和元年6月17日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26340039

研究課題名(和文)細胞内亜鉛イオンによる化学物質の細胞毒性の増強・抑制メカニズム解析

研究課題名(英文)Effects of zinc ion on the cytotoxicity of chemicals

研究代表者

小山 保夫(OYAMA, Yasuo)

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学域)・教授

研究者番号：80214229

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：私達は多くの化学物質に囲まれて生活をしている。安全かつ安心な生活の為には化学物質の毒性について認識することが必要である。毒性の基礎情報の一つに細胞毒性(細胞致死作用)がある。化学物質による細胞死の原因としてカルシウムイオンの関与が示唆されることが多かった。本研究では酸化ストレスによる細胞死に亜鉛イオンが深く関与していることを示し、多くの化学物質の細胞毒性にカルシウムイオンと同様に亜鉛イオンが関係していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

健康維持の目的で亜鉛サプリメントは広く利用されているが、亜鉛欠乏症と異なり、亜鉛過剰症については症状が重篤でないことで関心は低い。まして、亜鉛の影響で化学物質の毒性増強が起こる可能性を検討している報告はない。私達は生体レベル濃度の亜鉛が化学物質(日用化学物質・医薬品等)の細胞毒性の増強を起こすことを明らかにした。よって、亜鉛サプリメントと医薬品の組み合わせで、予想外の健康被害を起こす可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We are surrounded by many chemicals. It is necessary to recognize the toxicity of chemical substances for our safety life. Cytotoxicity is one of the basic information on chemical toxicity. Involvement of calcium ion has been suggested as a cause of cell death by chemical substances. In this study, we show that zinc ion is deeply involved in cell death due to oxidative stress, and it is also clarified that zinc ion is involved in the cytotoxicity of many chemicals as well as calcium ion.

研究分野：毒性科学

キーワード：亜鉛イオン

1. 研究開始当初の背景

生体や細胞機能における亜鉛の生理的役割が発見される以前から、亜鉛を利用する疾病治療/発症・進行予防は広く行われている。現在では健康維持の目的で亜鉛サプリメントは広く利用されているが、亜鉛欠乏症と異なり、亜鉛過剰症については症状が重篤でないことで関心は低い。まして、亜鉛の影響で化学物質の毒性増強が起こる可能性を検討している報告はない。生体レベル濃度の亜鉛が化学物質（環境汚染物質・日用化学物質・医薬品等）の細胞毒性の増強を起こす（2006-2013年の業績）。しかし、亜鉛には細胞保護作用も観察される。申請研究では化学物質の細胞毒性に対する亜鉛イオン（ Zn^{2+} ）の背反的作用・機序を解明する。また、新たな毒性物質候補の「 Zn^{2+} をキレートする脂溶性化学物質」の特性（理論と異なる）を明らかにする。亜鉛の生理・病理的役割から成果の波及性は高く、環境科学・トキシコロジーへの寄与は大きい。

2. 研究の目的

(1) 多くの化学物質の細胞毒性に活性酸素種が関係している。それらの酸化ストレスによる細胞死に於ける亜鉛の毒性科学的役割を明らかにする。現在、活性酸素種（この実験では H_2O_2 ）の酸化ストレスによる細胞死に細胞内 Zn^{2+} は促進的作用、カルシウムイオンフォア A23187 の細胞内 Ca^{2+} 負荷ストレスによる細胞死に抑制的作用という実験成績を得ており、さらに細胞死メカニズム解析を進めている。上記のストレスによる細胞膜 Zn^{2+} 透過および細胞内 Zn^{2+} 遊離の変化のメカニズム解明現在、温度依存性 Zn^{2+} 透過機構が細胞膜に存在すること、細胞内チオール量と細胞内 Zn^{2+} 濃度変化に逆相関があることを明らかにしている（Hashimoto et al., *Toxicology In Vitro* 2009; Kawanai et al., *Toxicology Letters* 2009）。上記のストレスによる細胞内 Zn^{2+} 動態変化および Zn^{2+} による細胞毒性変化のメカニズムを解明する。

(2) 特定化学物質の細胞毒性への細胞内 Zn^{2+} の関与とメカニズムを明らかにする。環境汚染物質としての「特定化学物質」を中心に、それらの細胞毒性に細胞内 Zn^{2+} が促進的にあるいは抑制的に関与しているか。もし、関与しているならば、メカニズムを明らかにする。特定化学物質としての有機金属化合物、難分解性化学物質、また、日用品・医薬品に含まれる界面活性剤を検討対象として実験を行う。現在、有機金属化合物では methylmercury（Kawanai et al., *Toxicology Letters* 2009）と tri-n-butyltin（Oyama et al., *Toxicology* 2009）界面活性剤で polysorbate 80（Oyama et al., *Toxicology In Vitro* 2010）が細胞内 Zn^{2+} 濃度を上昇させることを報告している。また、アゾール系抗菌剤で imidazole 系化合物は細胞内 Zn^{2+} 濃度を上昇させるが、triazole 系化合物では影響がないことを見出している（Kinazaki et al., *Toxicology In Vitro* 2009）。

3. 研究の方法

以下の動物実験については徳島大学動物実験委員会から許可を得ている（許可番号 05279番）。化学的ストレスに脆弱な細胞のラット胸腺細胞に各種化学物質（研究成果参照）を作用させ、蛍光化学手法を用いて細胞内 Zn^{2+} 動態を含む細胞膜動態・細胞内イオン物質動態を測定し、化学物質の細胞毒性への Zn^{2+} の関与メカニズムを解析した。

4. 研究成果

化学物質の亜鉛イオン依存性細胞毒性について解析を行い、以下の実験成績を得た。

(1) 生物殺菌な化学物質（殺菌剤、防腐剤、農薬など/塩化ベンザルコニウム、ブチルハイドロキノン、クロロタロニルなど）については細胞内亜鉛イオン濃度を変化を伴う細胞毒性が広く認められた。よって、カルシウムイオンと同様に亜鉛イオンも細胞死メカニズムに深く関与していることが示唆できた。

(2) 上記の生物殺菌な化学物質以外、コーヒー飲料成分（ヒドロキシヒドロキノン、ビニルカテコール）や細菌のクロラムセンシング分子（オキソドデカノイルホモセリンラクトン）にも細胞内亜鉛イオン濃度上昇を起こさせる作用が確認できた。但し、ヒドロキシヒドロキノンでは亜鉛イオン依存性・非依存性の両方の細胞毒性が考えられた。

(3) 通常、化学物質が誘発する酸化ストレスによる細胞死は細胞内亜鉛イオン濃度上昇により促進する。しかし、細胞内亜鉛イオン濃度上昇や細胞内チオール低下を起こす農薬ジラムが過酸化水素による細胞死を抑制するという現象が確認できた。即ち、細胞死に関係するような要因については促進的な現象が認められているにも関わらず、細胞死が抑制（もしくは遅延）されるという擬似的な細胞保護作用（Pseudo-cytoprotective action）が起こってし

まった。Pseudo-cytoprotective action という用語は Google Scholar で検索を行っても出て来ない。細胞毒性という分野では見逃されてきた現象と考えられる。

<引用文献>

Erika Hashimoto, Toshihisa Oyama, Keisuke Oyama, Yumiko Nishimura, Tomohiro Oyama, Toshiko Ueha-Ishibashi, Yoshiro Okano and Yasuo Oyama : Increase in intracellular Zn²⁺ concentration by thimerosal in rat thymocytes: Intracellular Zn²⁺ release induced by oxidative stress, *Toxicology In Vitro*, Vol.23, No.6, 1092-1099, 2009. Takuya Kawanai, Masaya Satoh, Koji Muraio and Yasuo Oyama : Methylmercury elicits intracellular Zn²⁺ release in rat thymocytes: Its relation to methylmercury-induced decrease in cellular thiol content, *Toxicology Letters*, Vol.191, No.2-3, 231-235, 2009.

Toshihisa Oyama, Keisuke Oyama, Takuya Kawanai, Tomohiro Oyama, Erika Hashimoto, Masaya Satoh and Yasuo Oyama : Tri-n-butyltin increases intracellular Zn²⁺ concentration by decreasing cellular thiol content in rat thymocytes, *Toxicology*, Vol.262, No.3, 245-249, 2009.

Tomohiro Oyama, Keisuke Oyama, Toshihisa Oyama, Shiro Ishida, Yoshiro Okano and Yasuo Oyama : Zinc at clinically-relevant concentrations potentiates the cytotoxicity of polysorbate 80, a nonionic surfactant, *Toxicology In Vitro*, Vol.24, No.3, 737-744, 2010.

Akio Kinazaki, Yoko Sakanashi, Tomohiro Oyama, Haruka Shibagaki, Kohei Yamashita, Erika Hashimoto, Yumiko Nishimura, Shiro Ishida, Yoshiro Okano and Yasuo Oyama : Micromolar Zn²⁺ potentiates the cytotoxic action of submicromolar econazole in rat thymocytes: Possible disturbance of intracellular Ca²⁺ and Zn²⁺ homeostasis, *Toxicology In Vitro*, Vol.23, No.4, 610-616, 2009.

5 . 主要な発表論文等

[雑誌論文](計29件)

Yumiko Nishimura-Danjobara, Keisuke Oyama, Tomohiro Oyama, Kumio Yokoigawa, Yasuo Oyama, Modification of cell vulnerability to oxidative stress by N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine-lactone, a quorum sensing molecule, in rat thymocytes, *Chemico-Biological Interactions*, 査読有 Vol.302, pp. 143-148, 2019. (DOI: 10.1016/j.cbi.2019.02.006)

Naohiro Imura, Masamichi Ae, Rin Hoshino, Masami Abe, Tatsuya Yamamuro, Keisuke Oyama, Yasuo Oyama, Membrane hyperpolarization and depolarization of rat thymocytes by azoxystrobin, a post harvest fungicide, *Chemico-Biological Interactions*, 査読有 Vol.300, pp. 35-39, 2019. (DOI: 10.1016/j.cbi.2019.01.006)

Tomomi Inoue, Maika Kinoshita, Keisuke Oyama, Norio Kamemura, Yasuo Oyama, Captan-induced increase in the concentrations of intracellular Ca²⁺ and Zn²⁺ and its correlation with oxidative stress in rat thymic lymphocytes, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 査読有 Vol.63, pp. 78-83, 2018. (徳島大学機関リポジトリ <https://repo.lib.tokushima-u.ac.jp/ja/112166>, DOI: 10.1016/j.etap.2018.08.017)

Takumi Kishida, Yurie Funakoshi, Yuya Fukuyama, Sari Honda, Toshiya Masuda, Yasuo Oyama, Conflicting actions of 4-vinylcatechol in rat lymphocytes under oxidative stress induced by hydrogen peroxide, *Drug and Chemical Toxicology*, 査読有 Vol.6, pp. 1-6, 2018. (徳島大学機関リポジトリ : <https://repo.lib.tokushima-u.ac.jp/ja/111990>, DOI: 10.1080/01480545.2018.1492604)

Takumi Kishida, Kenji Akiyoshi, Erdenedalai Erdenebat, Enhetomuru Anu, Shoji Imai, Yasuo Oyama, Cellular adverse actions of dibromoacetonitrile, a water bacterial control, at sublethal levels in rat thymocytes, *Toxicology In Vitro*, 査読有 Vol.51, pp. 145-149, 2018. (徳島大学機関リポジトリ : <https://repo.lib.tokushima-u.ac.jp/ja/111989>, DOI: 10.1016/j.tiv.2018.05.011)

Yurie Funakoshi, Ayako Azuma, Mizuki Ishikawa, Satoru Itsuki, Yasuaki Tamura, Kaori Kanemaru, Shogo Hirai and Yasuo Oyama, Cytometrical analysis of the adverse effects of indican, indoxyl, indigo, and indirubin on rat thymic lymphocytes, *Toxicology*

Research, 査読有 Vol.7, pp. 513-520, 2018. (徳島大学機関リポジトリ : <https://repo.lib.tokushima-u.ac.jp/ja/111988>, DOI: 10.1039/C7TX00244K)

Mizuki Ikeda, Junji Deguchi, Shota Fukushima, Ai Qingyu, Norihiro Katayama, Hajime Miura, Yasuo Oyama, Some adverse actions of chlorothalonil at sublethal levels in rat thymic lymphocytes: Its relation to Zn²⁺, Environmental Toxicology and Pharmacology, 査読有 Vol.59, pp. 61-65, 2018. (徳島大学機関リポジトリ : <https://repo.lib.tokushima-u.ac.jp/ja/111987>, DOI: 10.1016/j.etap.2018.03.006)

Kazuki Noma, Hironari Akaike, Yuki Kurauchi, Hiroshi Katsuki, Yasuo Oyama and Norio Akaike, Effects of triphenyltin on glycinergic transmission on rat spinal neurons, Environmental Research, 査読有り Vol.163, pp. 163-193, 2018. (徳島大学機関リポジトリ : <https://repo.lib.tokushima-u.ac.jp/ja/111986>, DOI: 10.1016/j.envres.2018.02.005)

Honoka Wada, Keisuke Oyama, Risa Kamae, Toshiya Masuda, Kaori Kanemaru, Kumio Yokoigawa, Yasuo Oyama, Zinc-dependent and independent actions of hydroxyhydroquinone on rat thymic lymphocytes, Drug and Chemical Toxicology, 査読有 Vol.9, pp. 1-6, 2018. (徳島大学機関リポジトリ : <https://repo.lib.tokushima-u.ac.jp/ja/111979>, DOI: 10.1080/01480545.2018.1429462)

Yumiko Nishimura-Danjobara, Keisuke Oyama, Kumio Yokoigawa, Yasuo Oyama, Hyperpolarization by N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine-lactone, a quorum sensing molecule, in rat thymic lymphocytes, Chemico-Biological Interactions, 査読有 Vol.283, pp. 91-96, 2018. (徳島大学機関リポジトリ : <https://repo.lib.tokushima-u.ac.jp/ja/111985>, DOI: 10.1016/j.cbi.2018.02.008)

Yumiko Nishimura-Danjobara, Keisuke Oyama, Kaori Kanemaru, Keiko Takahashi, Kumio Yokoigawa, Yasuo Oyama, N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine-lactone, a quorum sensing molecule, affects cellular content of nonprotein thiol content in rat lymphocytes: Its relation with intracellular Zn²⁺, Chemico-Biological Interactions, 査読有り Vol.280, pp. 28-32, 2018. (徳島大学機関リポジトリ : <https://repo.lib.tokushima-u.ac.jp/ja/111976>, DOI: 10.1016/j.cbi.2017.12.013)

Yumiko Kanemoto-Kataoka, Keisuke Oyama, Tomohiro Oyama, Hitoshi Ishibashi, Yasuo Oyama, Ziram, a dithiocarbamate fungicide, exhibits pseudo-cytoprotective actions against oxidative stress in rat thymocytes: Possible environmental risks, Environmental Research, 査読有 Vol.160, pp. 232-238, 2018. (徳島大学機関リポジトリ : <https://repo.lib.tokushima-u.ac.jp/ja/111982>, DOI: 10.1016/j.envres.2017.09.027)

Norio Kamemura, Keisuke Oyama, Kaori Kanemaru, Kumio Yokoigawa, Yasuo Oyama, Diverse cellular actions of tert-butylhydroquinone, a food additive, on rat thymocytes, Toxicology Research, 査読有 Vol.6, pp. 922-929, 2017. (徳島大学機関リポジトリ : <https://repo.lib.tokushima-u.ac.jp/ja/111981>, DOI: 10.1039/C7TX00183E)

Keisuke Oyama, Norikazu Miyoshi, Yasuo Oyama, Cytometric analysis on cytotoxicity of 4,4 -methylenediphenyl diisocyanate, a chemical allergen, in rat thymocytes, Fundamental Toxicological Sciences, 査読有 Vol.4, No.4, pp. 173-178, 2017. (徳島大学機関リポジトリ : <https://repo.lib.tokushima-u.ac.jp/ja/111202>, DOI: 10.2131/fts.4.173)

Yumiko Kanemoto-Kataoka, Tomohiro Oyama, Hitoshi Ishibashi, Yasuo Oyama, Zinc is a determinant of the cytotoxicity of Ziram, a dithiocarbamate fungicide, in rat thymic lymphocytes: Possible environmental risk, Toxicology Research, 査読有 Vol.6, pp. 499-504, 2017. (徳島大学機関リポジトリ : <https://repo.lib.tokushima-u.ac.jp/ja/111983>, DOI: 10.1039/C7TX00052A)

Tsuyoshi Mitani, Ahmed Elhossany Elmarhomy Ibrahim, Luvsandorj Dulamjav, Enkhtumur Anu, Shohei Saitoh, Shiro Ishida, Yasuo Oyama, Zinc-related actions of sublethal levels of benzalkonium chloride: Potentiation of benzalkonium cytotoxicity by zinc, Chemico-Biological Interactions, 査読有 Vol.268, pp. 31-36, 2017. (徳島大学機関リポジトリ : <https://repo.lib.tokushima-u.ac.jp/ja/111111>, DOI: 10.1016/j.cbi.2017.02.017)

Risa Kamae, Shoko Nojima, Kenji Akiyoshi, Shoki Setsu, Sari Honda, Toshiya Masuda, Yasuo Oyama, Hydroxyhydroquinone, a by-product of coffee bean roasting, increases

intracellular Ca^{2+} concentration in rat thymic lymphocytes, Food and Chemical Toxicology, 査読有 Vol.102, pp.39-45, 2017. (徳島大学機関リポジトリ: <https://repo.lib.tokushima-u.ac.jp/ja/111018>, DOI: 10.1016/j.fct.2017.01.025, PubMed: 28153638)

Hiroto Imai, Fumiya Kita, Sho Ikesugi, Masami Abe, Shizuka Sogabe, Yumiko Nishimura-Danjobara, Hajime Miura, Yasuo Oyama, Cetylpyridinium chloride at sublethal levels increases the susceptibility of rat thymic lymphocytes to oxidative stress, Chemosphere, 査読有 Vol.170, pp. 118-123, 2017. (徳島大学機関リポジトリ: <https://repo.lib.tokushima-u.ac.jp/ja/111974>, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.12.023)

Maki Takeda, Keisuke Oyama, Norio Kamemura, Kaori Kanemaru, Keizo Yuasa, Kumio Yokoigawa, Yasuo Oyama, Change in plasma membrane potential of rat thymocytes by tert-butylhydroquinone, a food additive: Possible risk on lymphocytes, Food and Chemical Toxicology, 査読有 Vol.109, No.1, pp. 296-301, 2017. (徳島大学機関リポジトリ: <https://repo.lib.tokushima-u.ac.jp/ja/111984>, DOI: 10.1016/j.fct.2017.09.017)

Kayo Nonami, Shohei Saitoh, Yumiko Nishimura-Danjobara, Shiro Ishida, Yasuo Oyama, Chlorhexidine possesses unique cytotoxic actions in rat thymic lymphocytes: Its relation with electrochemical property of membranes, Environmental Toxicology and Pharmacology, 査読有 Vol.48, pp. 17-21, 2016. 徳島大学機関リポジトリ: <https://repo.lib.tokushima-u.ac.jp/ja/110890>, DOI: 10.1016/j.etap.2016.09.024)

- ⑳ Eiko Niwa, Tsuyoshi Mitani, Shohei Saitoh, Kaori Kanemaru, Shiro Ishida, Kumio Yokoigawa, Yasuo Oyama, Zinc increases vulnerability of rat thymic lymphocytes to arachidonic acid under in vitro conditions, Food and Chemical Toxicology, 査読有 Vol.96, pp. 177-182, 2016. (徳島大学機関リポジトリ: <https://repo.lib.tokushima-u.ac.jp/ja/110419>, DOI: 10.1016/j.fct.2016.08.008)
- ㉑ Mizuki Ishikawa, Ryosuke Muraguchi, Ayako Azuma, Shogo Nawata, Tetsuya Katsuur, Mutsumi Miya, Tohru Naito, Yasuo Oyama, Cytotoxic actions of 2,2-dibromo-3-nitrilopropionamide, a biocide in hydraulic fracturing fluids, on rat thymocytes, Toxicology Research, 査読有 Vol.5, pp. 1329-1334, 2016. (徳島大学機関リポジトリ: <https://repo.lib.tokushima-u.ac.jp/ja/110172>, DOI: 10.1039/c6tx00027d)
- ㉒ Hiromitsu Tsuzuki, Shota Inoue, Daiki Kobayashi, Gantulga Uuganbaatar, Kaori Kanemaru, Kumio Yokoigawa, Yasuo Oyama, Methyl cinnamate increases cell vulnerability to oxidative stress induced by hydrogen peroxide in rat thymocytes, Fundamental Toxicological Sciences, 査読有 Vol.3, No.3, pp. 121-125, 2016. (徳島大学機関リポジトリ: <https://repo.lib.tokushima-u.ac.jp/ja/110051>, DOI: 10.2131/fts.3.121)
- ㉓ Eri Fukunaga, Shohei Saitoh, Yuya Kurumi, Yurie Ohiwa, Eri Kurozumi, Yasuo Oyama, Cytotoxic actions of N-(2,4,6-trichlorophenyl)maleimide (IT-354), an antifouling agent, in rat thymic lymphocytes, Fundamental Toxicological Sciences, 査読有 Vol.2, No.5, pp. 217-222, 2015. (DOI: 10.2131/fts.2.217)
- ㉔ Eri Fukunaga, Sari Honda, Yuji Hashimoto, Yasuaki Tamura, Shiro Ishida, Yasuo Oyama, Zn^{2+} -dependent increase in cells with phosphatidylserine-exposed membranes after treatment with submicromolar concentrations of 2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one in rat thymocytes, Fundamental Toxicological Sciences, 査読有 Vol.2, No.5, pp. 209-216, 2015. (DOI: 10.2131/fts.2.209)
- ㉕ Shohei Saitoh, Eri Fukunaga, Hana Ohtani, Yasuo Oyama, Zn^{2+} -dependence of the synergistic increase in rat thymocyte cell lethality caused by simultaneous application of 4,5-dichloro-2-octyl-4-isothiazolin-3-one (DCOIT) and H_2O_2 , Chemosphere, 査読有 Vol.135, pp. 447-452, 2015. (DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.10.089)
- ㉖ Eri Fukunaga, Kana Enma, Shohei Saitoh, Yumiko Nishimura-Danjobara, Yasuo Oyama, Norio Akaike, Increase in intracellular Ca^{2+} level by phenylsulfamide fungicides, tolylfluanid and dichlofluanid, in rat thymic lymphocytes, Environmental Toxicology and Pharmacology, 査読有 Vol.40, No.1, pp. 149-155, 2015. (DOI: 10.1016/j.etap.2015.06.004)

- ⑳ Yumiko Kanemoto-Kataoka, Tomohiro Oyama, Hitoshi Ishibashi, Yasuo Oyama, Dithiocarbamate fungicides increase intracellular Zn²⁺ levels by increasing influx of Zn²⁺ in rat thymic lymphocytes, *Chemico-Biological Interactions*, 査読有 Vol.237, pp. 80-86, 2015. (DOI: 10.1016/j.cbi.2015.05.014)
- ㉑ Eri Fukunaga, Tomohiro Oyama, Yasuo Oyama, Elevation of intracellular Zn²⁺ level by 2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one in rat thymocytes: An involvement of a temperature-sensitive Zn²⁺ pathway, *Toxicology Research*, 査読有り Vol.4, No.1, 65-70, Vol.4, No.1, 65-70, 2015. (DOI: 10.1039/C4TX00060As)