

---

急性パラコート中毒による肺線維化の機構とその進展阻止

治療薬の探索的研究

---

15590571

平成 15 年～平成 17 年度科学研究費補助金

基盤研究 (C) (2)

研究成果報告書

平成 18 年 4 月

研究代表者 塩野 寛

(旭川医科大学・医学部・副学長)

# 目 次

吉松 隆一 (1)

## (1) はしがき

## (2) 研究組織

## (3) 研究経費

## (4) 研究成果

発表

概要

論文



Paradiazolium



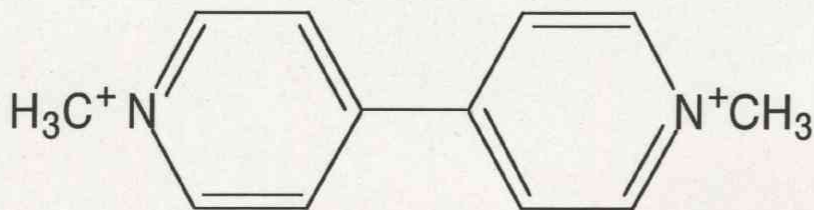
MPBT

## (1) はしがき

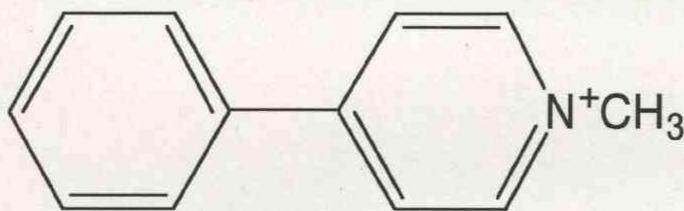
パラコート (PQ) は、世界的に広く使用されている除草剤である。急性毒性は肺及び腎に障害を起こし、慢性毒性は中枢神経障害を及ぼすことが知られている。救急医学の進歩にも関わらず、未だにその急性中毒による死亡率は高く、特異的な治療法は確立していない。

我々は、PQ への低濃度慢性暴露が、中枢神経に脆弱な状態を惹起し、神経変性疾患を誘発する可能性を報告してきた。PQ は、血液脳関門を中性アミノ酸トランスポーターを介して通過し、その後の中枢毒性はドパミントランスポーター (DAT) を介したドパミン神経毒性である。PQ の慢性中枢毒性機序は、グルタミン酸放出を起点とする興奮性毒性であり、その細胞死をドパミン D2/3 受容体作動薬が有効に抑制した。

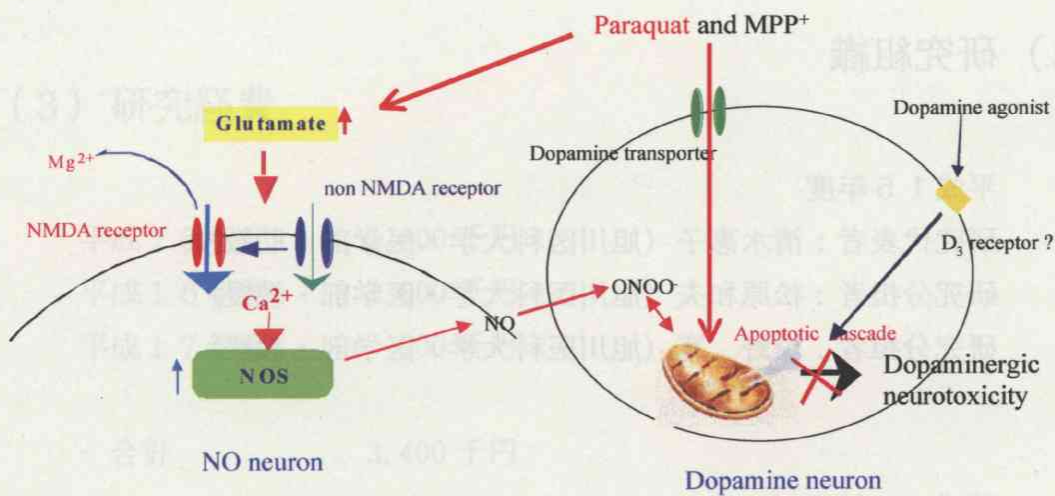
一方、末梢におけるドパミン受容体存在部位は、肺と腎臓のみであり、PQ による主な障害部位と一致する。そこで、本研究は PQ の急性末梢毒性における、細胞障害機序及びドパミン系関与の検討を目的とした。



Paraquat



MPP<sup>+</sup>



### パラコートによるドパミン神経細胞死の機構

PQは細胞外液のグルタミン酸濃度を上昇させる。一方、PQは、ドパミントランスポーターによりドパミン神経に取り込まれ、ミトコンドリア呼吸鎖を阻害する。グルタミン酸はNMDA受容体を活性化しCa<sup>2+</sup>を流入させ、NOの産生を高める。NOは、パラコートによる呼吸鎖阻害と相まって、恐らくperoxynitriteを経て更にミトコンドリア傷害を惹起する。このような機構でPQによってドパミン神経は脆弱になり、更に加齢や内因性の神経毒による酸化的ストレスが加わって脱落する。

(興学園・前学園・学大特別川版) 頁 補遺：香野俊彦編

興学園

(興学園・前学園・学大特別川版) 頁 補遺：香野俊彦編

(興学園・前学園・学大特別川版) 頁 補遺：香野俊彦編

(興学園・前学園・学大特別川版) 頁 補遺：香野俊彦編

(興学園・前学園・学大特別川版) 頁 補遺：香野俊彦編

興学園

(興学園・前学園・学大特別川版) 頁 補遺：香野俊彦編

(興学園・前学園・学大特別川版) 頁 補遺：香野俊彦編

(興学園・前学園・学大特別川版) 頁 補遺：香野俊彦編

(興学園・前学園・学大特別川版) 頁 補遺：香野俊彦編

## (2) 研究組織

平成15年度

研究代表者：清水恵子（旭川医科大学・医学部・助教授）

研究分担者：松原和夫（旭川医科大学・医学部・教授）

研究分担者：塩野 寛（旭川医科大学・医学部・教授）

平成16年度

6月まで

研究代表者：清水恵子（旭川医科大学・医学部・助教授）

研究分担者：松原和夫（旭川医科大学・医学部・教授）

研究分担者：塩野 寛（旭川医科大学・医学部・副学長）

7月以降

研究代表者：塩野 寛（旭川医科大学・医学部・副学長）

研究分担者：松原和夫（旭川医科大学・医学部・教授）

研究分担者：安積順一（旭川医科大学・医学部・助教授）

研究分担者：浅利 優（旭川医科大学・医学部・助手）

平成17年度

研究代表者：塩野 寛（旭川医科大学・医学部・副学長）

研究分担者：松原和夫（旭川医科大学・医学部・教授）

研究分担者：安積順一（旭川医科大学・医学部・助教授）

研究分担者：浅利 優（旭川医科大学・医学部・助手）

### (3) 研究経費

|        |         |
|--------|---------|
| 平成15年度 | 1,600千円 |
| 平成16年度 | 1,000千円 |
| 平成17年度 | 900千円   |
| 合計     | 3,400千円 |

Paraoxal leads to dopaminergic isoval vulnerability in organotypic midbrain culture  
Keiko Shimizu, Kazuo Masubata, Ko-ichi Ohnaki, Hisashi Shimizu *Neurosci. Res.* 46:519-521, 2003.

Prilidoxime iodide (PAM) penetrates across the blood-brain barrier. Sakurada K, Masubata K, Shimizu K, Shimizu H, Seto Y, Tsuge K, Yoshino M, Sakai I, Mukoyama H, Takatori T. *Neurochem. Res.* 28:1401-7, 2003.

Cefazolin, a beta-lactam antibiotic, easily penetrates the blood-brain barrier and causes edema independently by glutamate release. Ohnaki K, Masubata K, Fujimori S, Shimizu K, Awaya T, Sano M, Chiba K, Hayashi N, Shimizu H. *J. Neural Transm.* 12:1523-1535, 2004.

Tandospirone, a 5-HT<sub>2A</sub> agonist, ameliorates movement disorder via non-dopaminergic systems in rats with unilateral 6-hydroxydopamine-generated lesions. K. Masubata, K Shimizu, M Sano, K. Ogawa, T. Awaya, T. Yamada, T. Noda, M. Satomi, K. Ohnaki, S. Chiba, Y. Tsuki and H. Shimizu *Brain Res.* 2006 (in press).

#### 【口頭発表】

清水恵子、松原和夫、塩野高純、倉持、早太郎、中野による米州毒性薬物の解明とその臨床応用の探求（第20次日本毒薬学会総会（旭川）2004）

## (4) 研究成果

賞登実務 (2)

### 発表リスト

### 概要

### 論文

田子 001, 2

博台

平成17年度

5月以降

研究代表者：橋本志子（旭川医科大学、医学部、助教授）

研究分担者：松原和夫（旭川医科大学、医学部、教授）

研究分担者：塚野 寛（旭川医科大学、医学部、助学長）

5月以降

研究代表者：塚野 寛（旭川医科大学、医学部、助学長）

研究分担者：松原和夫（旭川医科大学、医学部、教授）

研究分担者：安積新一（旭川医科大学、医学部、助教授）

研究分担者：渡利 寛（旭川医科大学、医学部、助学）

平成17年度

研究代表者：塚野 寛（旭川医科大学、医学部、助学長）

研究分担者：松原和夫（旭川医科大学、医学部、教授）

研究分担者：安積新一（旭川医科大学、医学部、助教授）

研究分担者：渡利 寛（旭川医科大学、医学部、助学）

発表リスト

【雑誌論文】

清水恵子・松原和夫・塩野寛他 急性パラコート中毒による末梢毒性機構の解明とその阻止薬の探求 日本法医学雑誌 58 巻 1 号 p77 (2004)

Paraquat induces long-lasting dopamine overflow through the excitotoxic pathway in the striatum of freely moving rats. Shimizu, K., Matsubara, K., Ohtaki, K., Fujimaru, S., Saito, O., Shiono, H., *Brain Res.*, 976:243-52, 2003.

Paraquat leads to dopaminergic neural vulnerability in organotypic midbrain culture Keiko Shimizu, Kazuo Matsubara, Ko-ichi Ohtaki, Hiroshi Shiono *Neurosci. Res.*, 46:523-32, 2003.

Pralidoxime iodide (2-pAM) penetrates across the blood-brain barrier. Sakurada K, Matsubara K, Shimizu K, Shiono H, Seto Y, Tsuge K, Yoshino M, Sakai I, Mukoyama H, Takatori T., *Neurochem. Res.*, 28:1401-7, 2003

Cefoselis, a beta-lactam antibiotic, easily penetrates the blood-brain barrier and causes seizure independently by glutamate release. Ohtaki K, Matsubara K, Fujimaru S, Shimizu K, Awaya T, Suno M, Chiba K, Hayase N, Shiono H., *J. Neural Transm.*, 12:1523-1535, 2004.

Tandospirone, a 5-HT<sub>1A</sub> agonist, ameliorates movement disorder via non-dopaminergic systems in rats with unilateral 6-hydroxydopamine-generated lesions. K. Matsubara, K Shimizu, M Suno, K. Ogawa, T. Awaya, T. Yamada, T. Noda, M. Satomi, K. Ohtaki, K. Chiba, Y. Tasaki and H. Shiono *Brain Res.* 2006 (in press).

【口頭発表】

清水恵子・松原和夫・塩野寛他 急性パラコート中毒による末梢毒性機構の解明とその阻止薬の探求 第 88 次日本法医学会総会 (旭川) 2004

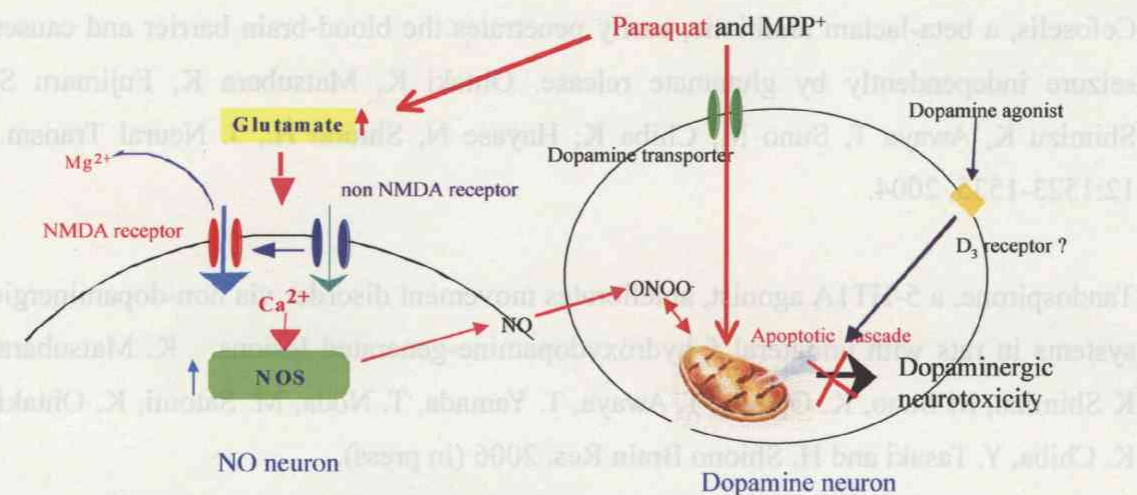


## 概要

パラコート (PQ) は、世界的に広く使用されている除草剤である。急性毒性は肺及び腎に障害を起し、慢性毒性は中枢神経障害を及ぼすことが知られている。救急医学の進歩にも関わらず、未だにその急性中毒による死亡率は高く、特異的な治療法は確立していない。

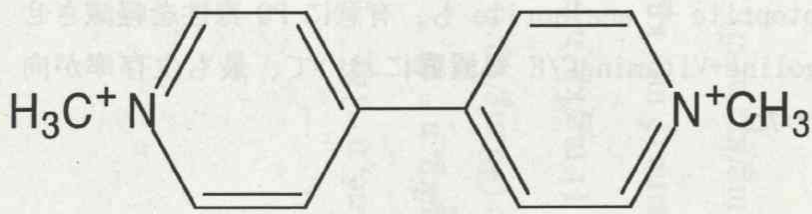
我々は、PQ への低濃度慢性暴露が、中枢神経に脆弱な状態を惹起し、神経変性疾患を誘発する可能性を報告してきた。PQ は、血液脳関門を中性アミノ酸トランスポーターを介して通過し、その後の中枢毒性はドパミントランスポーター (DAT) を介したドパミン神経毒性である。PQ の慢性中枢毒性機序は、グルタミン酸放出を起点とする興奮性毒性であり、その細胞死をドパミン D<sub>2/3</sub> 受容体作動薬が有効に抑制した。

一方、末梢におけるドパミン受容体存在部位は、肺と腎臓のみであり、PQ による主な障害部位と一致する。そこで、本研究は PQ の急性末梢毒性における、ドパミン系関与の検討を目的とした。

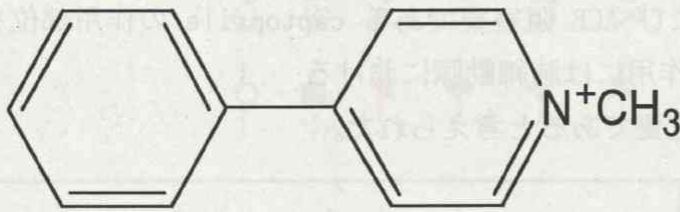


### パラコートによるドパミン神経細胞死の機構

PQは細胞外液のグルタミン酸濃度を上昇させる。一方、PQは、ドパミントランスポーターによりドパミン神経に取り込まれ、ミトコンドリア呼吸鎖を阻害する。グルタミン酸はNMDA受容体を活性化しCa<sup>2+</sup>を流入させ、NOの産生を高める。NOは、パラコートによる呼吸鎖阻害と相まって、恐らくperoxynitriteを経て更にミトコンドリア傷害を惹起する。このような機構でPQによってドパミン神経は脆弱になり、更に加齢や内因性の神経毒による酸化的ストレスが加わって脱落する。



Paraquat



MPP<sup>+</sup>

## 1. 生命曲線を用いた検討

### 【実験方法】

C57BL マウス(20-23 g)に、PQ (60 mg/kg) の皮下投与 20 分前に各薬物を腹腔内へ前投与した。PQ 投与後、1 時間、3 時間、6 時間後に各薬物を腹腔内投与し、引き続き次の 2 日間は 1 日 2 回、更に 2 日間は 1 日 1 回投与した。PQ 単独投与群 (control) には、生理食塩水を同じ回数腹腔内投与した。薬物の効果は、生存率として比較検討した。

生存分析は、Kaplan-Meier 法を用いて生命表を作成し、Log-rank test を用いて検定を行った。

### 【結果】(図 1 及び図 2)

- PQ と saline の投与マウス (コントロール) は、投与後 5 日で約 90%死亡した。
- 中性アミノ酸、DAT 阻害薬 (GBR-12909 および nomifensine)、ドパミン D2 受容体拮抗薬(haloperidol)、ドパミン D1/2 受容体拮抗薬(chlorpromazine)は、PQ 急性中毒に対する生存率向上に関与しなかった。
- 一方、D2/3 受容体刺激薬である cabergoline は、有意に死亡率を低下させた。また、抗酸化薬として知られる vitamin C と E の組み合わせや抗酸化作用を有す

る ACE 阻害薬である captoprile や enalaprile も、有意に PQ 毒性を軽減させた。Captoprile+caber-goline+Vitamin C/E 処置群において、最も生存率が向上し、生存率は 71%であった。

### 【考察】

- PQ 毒性の軽減は、従来から指摘されている抗酸化作用を有する薬物に顕著に認められる他、ドパミン刺激薬にも弱いながら認められた。
- このドパミン刺激薬および ACE 阻害薬である captoprile の作用部位を考えると、PQ の肺毒性の保護作用には肺細動脈における酸化ストレスの抑制が重要であると考えられた。

(次ページ及びその次のページは生存曲線)

Survival rate

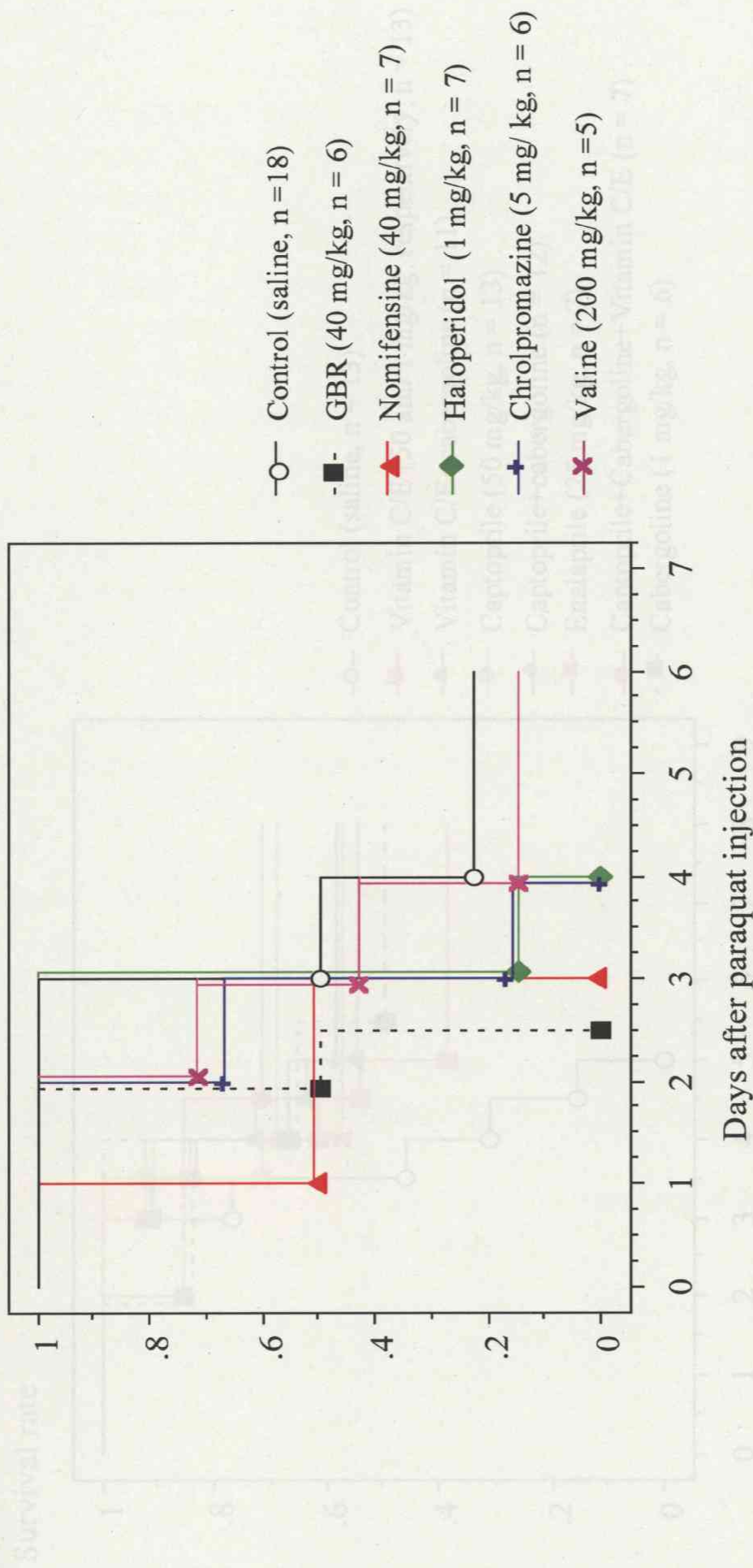
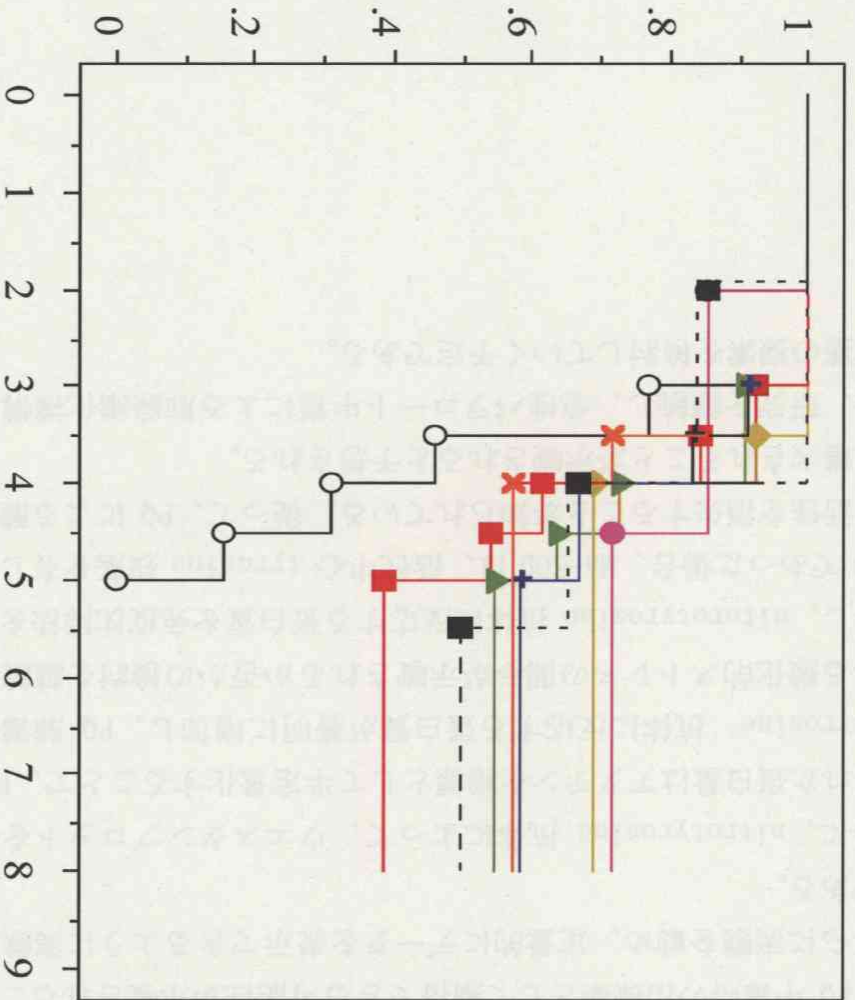


図1. ドパミン受容体阻害薬およびドパミン取込み阻害薬のPQ投与後の生存率に及ぼす影響  
いずれの処置もPQの急性毒性を軽減しなかった。また、ドパミン取込み阻害薬であるGBR-  
12909およびnomifensineそのものにおいても強い毒性を認めた。

Survival rate



- Control (saline, n = 13)
- Vitamin C/E (50 and 1 mg/kg, respectively, n = 13)
- ▲ Vitamin C/E+cabergoline (n = 11)
- ◆ Captopril (50 mg/kg, n = 13)
- Captopril+cabergoline (n = 12)
- ✕ Enalapril (25 mg/kg, n = 7)
- Captopril+Cabergoline+Vitamin C/E (n = 7)
- Cabergoline (1 mg/kg, n = 6)

図2. ドパミン受容体作動薬および抗酸化剤のP/Q投与後の生存率に及ぼす影響  
すべての処置群において、control群と比して有意な生存期間の延長が認められた  
( $p < 0.01$ , Log-rank test)。Control以外の群間での有意差は認められなかった。

## 2. PQによる肺障害とその毒性機構の検討

マウスを用いた実験から得られた生存曲線より、各種抗酸化剤及び ACE 阻害薬は、PQ 毒性を抑制し生存率の向上が認められた。一方、PQ による中枢神経障害を抑制したドパミン作動薬やドパミントランスポーター阻害薬は、肺障害にはむしろ促進的に作用した。ACE 阻害薬は、抗酸化作用があることが知られている。ACE 阻害薬による PQ 毒性軽減には、酸化ストレス抑制が関与していると考えられる。

そこで、この機構を解明するために、PQ 投与後 2 日及び 4 日後の肺組織ホモジネートについて、SDS-PAGE を行った。Cleaved caspase-3 抗体によって、ウェスタンブロットを行い、抗体で染色された蛋白量はアクチンを指標として半定量化を検討した。アポトーシスの指標である Cleaved caspase-3 は、PQ によって、わずかに検出されてきている。この変化は PQ 投与後 2 日後から著明に観察される傾向にあり、Captopril によって、これらの蛋白質の出現が抑制される傾向もみとめられつつある。従って、ACE 阻害薬は PQ による酸化障害を防御し、PQ 中毒時の治療薬として期待できる可能性が示唆されることが否定できず、さらに実験を勧め、定量的にデータを表示できるように実験を勧めていく予定である。

さらに、nitrotyrosine 抗体によって、ウェスタンブロットを行い、抗体で染色された蛋白量はアクチンを指標として半定量化することで、PQ によって、nitrotyrosine 抗体に反応する蛋白質が著明に増加し、PQ 肺毒性に一酸化窒素による酸化ストレスの関与が示唆されるか否かの検討を継続する予定である。もし、nitrotyrosine 抗体に反応する蛋白質を免疫沈降法を用いて精製、Mn-SOD であった場合、Mn-SOD は、活性中心 tyrosine 残基を有し、ニトロ化されると活性を消失することが知られている。従って、PQ による酸化ストレスはさらに増大されることが示唆されると予想される。

以後、研究を継続し、急性パラコート中毒による肺線維化機構とその進展阻止治療薬の探索を検討していく予定である。