九州大学学術情報リポジトリ Kyushu University Institutional Repository

ジチオカルバメート系抗真菌剤ジラムのZn2+依存性 細胞毒性

片岡,裕美子

https://doi.org/10.15017/2534525

出版情報:Kyushu University, 2019, 博士(臨床薬学), 論文博士 バージョン: 権利関係:

博士論文

2019年

ジチオカルバメート系抗真菌剤ジラムの Zn²⁺依存性細胞毒性

> バイエル薬品株式会社 (元徳島大学大学院研究生) 片岡裕美子

1. Kanemoto-Kataoka, Y., Oyama, T.M., Ishibashi, H., Oyama, Y. (2015). Dithiocarbamate fungicides increase intracellular Zn^{2+} levels by increasing influx of Zn^{2+} in rat thymic lymphocytes. Chemico-Biological Interactions (Elsevier), 237, 80–86.

2. Kanemoto-Kataoka, Y., Oyama, T.M., Ishibashi, H., Oyama, Y. (2017). Zinc is a determinant of the cytotoxicity of Ziram, a dithiocarbamate fungicide, in rat thymic lymphocytes: possible environmental risks. Toxicology Research (Royal Society of Chemistry), 6, 499–504.

3. Kanemoto-Kataoka, Y., Oyama, K., Oyama, T.M., Ishibashi, H., Oyama, Y. (2018). Ziram, a dithiocarbamate fungicide, exhibits pseudo-cytoprotective actions against oxidative stress in rat thymocytes: Possible environmental risks. Environmental Research (Elsevier), 160, 232–238.

目次

論文抄録				
1.	緒	言		8
2.	実	、 験方法		10
2.	1.	細胞	回標本	10
2.	2.	試薬	ŝ	12
2.	3.	測定	方法	13
2.	3.	1.	測定機器(フローサイトメーター)	13
2.	3.	2.	生理的・病理的パラメーターの蛍光化学的測定について	13
2.	3.	2. 1	. 細胞生死判別 — 細胞傷害・細胞死評価について	14
2.	3.	2. 2	2. 細胞内 Zn ²⁺ と Ca ²⁺ 濃度の変化の測定	15
2.	3.	2. 3	. 細胞内酸化還元状態評価	16
3.	実験	結果		19
3.	1.	ジラ	・ムによる細胞内 Zn ²⁺ 濃度の上昇	19
3.	1.	1.	ジチオカルバメート農薬による細胞致死率と FluoZin-3 蛍光強 度の変化	19
3.	1.	2.	ジチオカルバメート農薬による Fluo-3 蛍光強度の増強	21
3.	1.	3.	ジラムによる FluoZin-3 蛍光強度上昇に対する ZnCl ² と Zn ²⁺ キ レート剤の影響	22
3.	1.	4.	ジラムによる FluoZin-3 蛍光強度上昇に対する低温の影響	23
3.	1.	5.	ジラムによる 5CMF蛍光強度の変化	25
3.	1.	6.	アネキシンV陽性生細胞のジラムによる増加の Zn ²⁺ 依存性	26
3.	2.		ジラムによる細胞死における決定因子としての Zn ²⁺	29
3.	2.	1.	ジラムによる細胞死	29
3.	2.	2.	ジラムによる細胞致死率上昇に対する Zn ²⁺ キレート剤の効果	31
3.	2.	3.	ZnCl ₂ によるジラム細胞毒性の増強	31
3.	2.	4.	ZnCl ₂ によるジラム細胞毒性増強の低温による抑制	33
3.	2.	5.	ジラム、ZnCl ₂ とそれらの組み合わせによる細胞内グルタチオ ン量の変化	34
3.	2.	6.	ジラム、ZnCl ₂ とそれらの組み合わせによる細胞内活性酸素量の変化	35

3.	3.	酸化	ヒストレス下におけるジラムによる擬似的細胞保護作用	36
3.	3.	1.	ジラムによる H2O2 細胞毒性の抑制	36
3.	3.	2.	H ₂ O ₂ による細胞死プロセスへのジラムの影響	37
3.	3.	3.	H ₂ O ₂ による細胞内非タンパクチオール量の低下に対するジラム の作用	38
3.	3.	4.	H2O2による細胞内 Ca ²⁺ 濃度上昇に対するジラムの作用	39
3.	3.	5.	H ₂ O ₂ による細胞内 Zn ²⁺ 濃度上昇に対するジラムの作用	40
3.	3.	6.	細胞内カルシウム負荷による細胞死に対するジラムの作用	42
3.	3.	7.	H ₂ O ₂ によるミトコンドリア膜電位脱分極に対するジラムの作用	43
4.	老	≶察		44
4.	1.	ジラ	ラムによる細胞内 Zn ²⁺ 濃度の上昇メカニズムについて	44
4.	2.	ジラ	ラムによる細胞死における決定因子として Zn ²⁺	45
4.	3.	酸化	ヒストレス下でのジラムによる擬似細胞保護作用について	45
4.	4.	毒性	生科学・環境科学的意義について	46
5.	略	語集		47
	引用文献			40
6.	5	用乂曽	A	48
6.	5	用乂爵	А	48

7. 谢辞 53

 Ca^{2+} が各種の細胞機能に深く関与しているのは周知の事実であり、化学物質による 細胞毒性に細胞内 Ca^{2+} 濃度の持続的上昇を関連付ける報告は多くなされている。しか し、 Ca^{2+} 以外の生体内金属イオンが化学物質の細胞毒性に関与していることについて の報告は少ない。 Zn^{2+} については毒性の報告よりも有用性を示す報告が多く存在する ものの、 Zn^{2+} が細胞毒性に関与しないのか、検討が必要である。本検討を行うことは 衛生化学・医療薬学・環境科学の側面から考えて、非常に重要な情報をもたらすこと と期待される。本研究では化学構造式の中に Zn^{2+} を含むジチオカルバメート系抗真菌 剤の Zn^{2+} 依存性細胞毒性に焦点を当て研究を行った。ジチオカルバメート系抗真菌剤 は農業において農作物を真菌感染から防御する目的で広く用いられている(図1)。 さらに、農業だけでなく、有機錫に代わる防汚剤として船舶塗料にも用いられており、 環境リスクについて高い関心が持たれている。

図1:ジチオカルバメート系殺菌剤ジラムの化学構造式



ジチオカルバメート系抗真菌剤の細胞レベルでの研究では酸化ストレスを誘発し、 酸化・還元の適切な維持に必要な細胞内非タンパク質性チオール量を減少させること が報告されている。一般に酸化ストレスを受けた細胞では、タンパク質あるいは非タ ンパク質が有するチオールのジスルフィドが変化する際に Zn²⁺遊離を伴うと考えられ ている。また、酸化ストレスにより細胞膜の Zn²⁺透過性が亢進する可能性もある。こ れらのことから、細胞内 Zn²⁺恒常性が破綻して細胞死に繋がる可能性が予想される。 本研究では先ず、(1)ジチオカルバメート系抗真菌剤の中でも中毒による死亡例の 報告があり、催奇形性やパーキンソン病の進行を高める可能性が指摘されているジラ ム [Ziram: ビス (N,N-ジメチルジチオカルバミド酸) 亜鉛] に注目し、細胞内 Zn²⁺動 態に対する影響を精査した。また、Zn²⁺はいわゆる Ca²⁺感受性蛍光プローブの蛍光増 強(見かけ上は細胞内 Ca²⁺濃度上昇)を起こすため、これによる作用のミスリーディ ングが起こっていないかも検討した(原著論文 1)。続いて、(2)生体あるいは環 境レベルの Zn²⁺濃度がジラムの細胞毒性に与える影響を調べ、Zn²⁺が細胞毒性の決定 因子であることの検討を行った(原著論文2)。さらに、(3)Zn²⁺については抗酸 化性が広く認められており、酸化ストレスを受けている細胞に対するジラムの作用で は Zn²⁺が関わることにより複雑になる可能性が高い。そこで、H₂O₂ で酸化ストレスに 曝された細胞に対するジラムの作用を検討した。実験にはラットから摘出した胸腺か らリンパ細胞(胸腺細胞)にフローサイトメーターと各種蛍光プローブを適用し、細 胞生死判別、細胞膜リン脂質配列変化、細胞内 Zn²⁺濃度変化、細胞内 Ca²⁺濃度変化、 細胞内非タンパク質性チオール量変化、活性酸素量変化、ミトコンドリア膜電位変化 に対するジラムの影響を検討した(原著論文3)。

ジラムなどのジチオカルバメート抗真菌剤は細胞致死量以下の濃度で細胞内 Zn²⁺濃 度の上昇を起こした。ジラムによる細胞内 Zn²⁺濃度の上昇は外液 Zn²⁺に依存していた。 ジラムは細胞内非タンパク質性チオール量を減少させたが、この減少は Zn²⁺除去下で は起こらなかった。さらに、ジラムは胸腺細胞のアポトーシス様細胞死プロセスを促 進した。この細胞死プロセスは Zn²⁺除去で遅延し、ZnCl₂添加により促進した。ジラム による細胞死は細胞内 Zn²⁺濃度と正の相関を示した。ジラムによる細胞内 Zn²⁺濃度上 昇は低温下で抑制され、その細胞毒性も低温処理により著明に抑制された。これらの 結果から、Zn²⁺はジラムの細胞毒性に関与する要因であることが示唆された。一方、 Zn²⁺は抗酸化性元素として知られており、ZnCl₂の単独処理によって細胞内非タンパク 質性チオール量は増加した。しかし、細胞致死量以下のジラムと ZnCl₂の同時処理で は非タンパク質性チオール量は激減した。この組み合わせは細胞内 Zn²⁺濃度を著明に 増加させることから、細胞内 Zn²⁺濃度の過度な上昇が酸化ストレスを引き起こし、そ れが細胞毒性・細胞死に繋がっていると考えられる。

以上の結果から、ジラムの Zn^{2+} 依存性細胞毒性が示されたが、 H_2O_2 による細胞死の プロセスに対するジラムの影響を検討したところ、 H_2O_2 による細胞死をジラムは低濃 度から抑制し、 H_2O_2 による細胞毒性に対するジラムの影響は予想とは逆の効果として 観察された。 H_2O_2 存在下において、ジラムは正常な生細胞は激減させたが死細胞の増 加を抑制し、細胞死の前段階にある細胞を増加させることが明らかとなった。ジラム と H_2O_2 の組み合わせでは、細胞内 Zn^{2+} 濃度の著明な上昇を起こし、細胞内非タンパク 質性チオール量も激減した。それにも関わらず、細胞致死率の上昇は抑制されたこと

らから、ジラムは細胞保護作用を有すると予想されたものの、ジラムは細胞死プロセスにおける H₂O₂の作用を増強しており、この細胞保護作用は見かけ上の効果であることが考えられる。細胞保護的にみえる作用はジラムが H₂O₂によるミトコンドリア膜の脱分極を有意に減少させたためである。よって、ジラムは細胞保護に関与する効果より、細胞死プロセスを遅延させる効果が高い可能性が示唆された。

冒頭でも触れた通り、近年、ジラムを含むジチオカルバメート類抗菌剤の利用が増加していることから、環境・健康に対するリスクに関心が持たれている。Zn²⁺はリンパ細胞の細胞内シグナルであり、Zn²⁺を含むジラム等は細胞内Zn²⁺恒常性を破綻させ、リンパ細胞に機能不全を起こさせる可能性がある。実際、いくつかの農薬は免疫毒性を示し、ジラムについてもインビトロ条件ではあるものの、免疫細胞の活性を低下させている。ジラムの環境中での毒性を考慮する上で、重要なポイントとなるのは環境中における亜鉛濃度である。これまで、環境中の金属イオン濃度を踏まえた上で化学物質の毒性が論じられることは無かった。亜鉛には排出基準は設定されているが、多くの産業排水に亜鉛は含まれている。さらに、地域により土壌の亜鉛含有量は異なっており、環境中でジラムの細胞毒性を増強する亜鉛濃度は存在する。上記のことから、環境中の亜鉛濃度はジラムの細胞毒性を増強することが予想されることから、ジラムのZn²⁺依存性細胞毒性および疑似細胞保護作用は毒性科学・環境科学分野で重要な学術的意義を有する。

 Ca^{2+} は各種の細胞機能に深く関与している(Bootman et al., 2006; Iino, 2010)。それ らで最初に明らかにされたのは筋収縮における Ca^{2+} の役割である(Ebashi and Endo, 1968; Fye, 1984)。その後、 Ca^{2+} 受容タンパク質の発見(Kakiuchi and Yamazaki, 1970; Cheung, 1980)で細胞内シグナルにおける Ca^{2+} の役割についての研究は大きく進展した。 Ca^{2+} の生理機能発現は細胞内 Ca^{2+} 濃度変化(濃度上昇)がトリガーとなることから、 細胞内 Ca^{2+} の恒常性の維持は生体にとって非常に重要であるが(Carafoli, 1987)、細 胞内 Ca^{2+} 回恒常性の破綻は細胞の質的変化あるいは細胞死に繋がる(Schanne et al., 1979)。細胞内と細胞外の Ca^{2+} 濃度は1万倍以上差があることもあり、化学物質によ る細胞膜イオン透過性変化は細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に繋がる。また、化学物質による小 胞体/細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 遊離が小胞体 Ca^{2+} 枯渇を起こし、それがストア作 動性 Ca^{2+} 流入(細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇)を引き起こすメカニズムについても多くの知見 が得られている(Parekh, and Penner, 1997; Smani et al., 2004)。以上のことから、化学 物質による細胞毒性に細胞内 Ca^{2+} 濃度の持続的上昇が関与することが予想される。

しかし、Ca²⁺以外の生体内金属イオンが化学物質の細胞毒性に関与していることに ついてはあまり報告がない。Oyama ら(2006, 2007)は抗真菌剤クロトリマゾール (CTZ)と環境汚染物質カドミウム(実験は CdCl₂)の併用で細胞生存率が著明に低下 することを見出し、それが CTZ よる細胞膜の Cd²⁺透過性亢進によるものと推定した。 ここから周期律表で Cd²⁺と同じカテゴリーに入り生体内にある金属イオンの Zn²⁺も化 学物質(医薬品を含む)の細胞毒性に関与するのではないかと考えるに至った。実際、 イミダゾール系抗真菌剤を用いた細胞レベルの実験では ZnCl₂ 添加により細胞生存率 の著明な低下が観察されている(Matsui et al., 2008)。また、化学物質の細胞毒性が酸 化ストレス亢進を伴うことが多いことから、H₂O₂ の細胞毒性と Zn²⁺の関係も注目され、 マイクロモル濃度 ZnCl₂ の添加が H₂O₂ 細胞毒性を増強することが明らかにされている

(Matsui et al., 2010)。ところが、Zn²⁺については毒性の論文よりも有用性の論文がは るかに多い(Salgueiro et al., 2000; Yakoob et al., 2011)。また、酸化ストレスについて も Zn²⁺は抗酸化的に働くとされている(Prasad, 2009)。上記のことからも、亜鉛を含 む化学物質の細胞毒性に Zn²⁺が関与しているのかを検討することが必要である。本研 究を行うことは、衛生化学・医療薬学・環境科学の側面から考えて、極めて重要な視 点を有している。

本論文では構造式に中に Zn²⁺を含むジチオカルバメート系抗真菌剤の Zn²⁺依存性細 胞毒性に焦点を当てた。ジラムのようなジチオカルバメート系抗真菌剤は農業におい て農作物を真菌感染から防御する目的で広く用いられているだけでなく(Berrada et al., 2010; Tsakiris et al., 2011; López-Fernández et al., 2012) 、有機錫に代わる防汚剤として 船舶塗料にも用いられている(Voulvoulis et al., 1999; Dafforn et al., 2011)。これらのこ とからジチオカルバメート系抗真菌剤が農業・漁業などに影響を及ぼすのか、その環 境リスクについて関心が持たれている(Caldas et al., 2004, 2006, 2011; Lozowicka et al., 2015)。細胞レベルでの研究ではジチオカルバメート系抗真菌剤は酸化ストレスを誘 発し、細胞内非タンパクチオール量を減少させることが報告されている(Calviello et al., 2006; Domico et al., 2007; Grosicka-Maciąg et al., 2013; Matei et al., 2013) 。 一般に酸化 ストレスを受けた細胞では、タンパク質あるいは非タンパク質性のチオールがジスル フィドに変化する際に Zn²⁺遊離を伴うことが考えられている(Maret, 1994)。また、 酸化ストレスでは細胞膜 Zn²⁺透過性が亢進する可能性もある(Matsui et al., 2010)。 よって、細胞内 Zn²⁺恒常性が破綻して細胞死に繋がる可能性が考えられる。そこでま ず、(1)ジチオカルバメート系抗真菌剤(特にジラム)の細胞内 Zn²⁺動態に対する 影響を精査した。加えて、Zn²⁺はいわゆる Ca²⁺感受性蛍光プローブの蛍光増強を起こ すことが知られていることから、Ca²⁺感受性蛍光プローブの蛍光増強による見かけ上 の細胞内 Ca²⁺濃度上昇が起こっていないかも検討、確認を行った(原著論文 1)。次 に、(2)生体あるいは環境レベルの Zn²⁺濃度がジラムの細胞毒性に与える影響を調 べ、Zn²⁺が細胞毒性の決定因子である可能性を探った(原著論文2)。さらに、前述 のように Zn²⁺については抗酸化性が広く認められており、酸化ストレスを受けている 細胞に対するジラムの作用では Zn²⁺の作用との関係から複雑になる可能性が高い。そ こで、(3)H₂O₂で酸化ストレスに曝された細胞に対するジラムの作用を検討した (原著論文3)。そして、これらの研究から"Pseudocytoprotective actions"という化学物 質の細胞毒性では新しい概念を導き出した。その概念の衛生化学・医療薬学・環境科 学的意義を考察する。

2.1. 細胞標本

実験標本としてラット胸腺細胞を利用した。同標本を用いた理由は以下の通りであ る。(1)同標本は、細胞を単離するための酵素処理などを必要とせず、機械的手順 のみで細胞浮遊液を短時間(30分間未満)で簡便に調製することが可能である。本研 究では細胞膜及び細胞内イオン・物質動態を非侵襲的に測定するために各種の蛍光プ ローブとフローサイトメーターを用いており、正常生細胞を多く含む細胞浮遊液が必 要である。(2)胸腺細胞はアポトーシスを中心とする細胞死プロセスの研究で多く の研究者が用いており(McConkey et al, 1994; Yang and Ashwell, 1999; Quaglino and

Ronchetti, 2001) 、細胞死プロセスの指標が標 準化されている。このために化学物質の細胞 毒性についての実験を行う上で使いやすい標 本と考えられる(図2)。(3)いくつかの 化学物質を投与した動物実験で胸腺萎縮が観 察されること(Snoeij et al., 1988; Roggero et al., 2006)、若年者の免疫系機能における胸腺細 胞の役割が明確であること等(Shanley et al., 2009)、細胞レベルの実験成果を生体レベル に外挿する場合に必要な情報が揃っている。



図2:浮遊細胞の解析準備方法

単離細胞 (胸腺細胞)

摘出臓器

(胸腺)

細胞浮遊液を調製する過程は以下のとおりである。

(1) 雌雄の区別なく、6 週齢から 10 週齢の Wistar ラットからエーテルによる安楽 死直後に胸腺を摘出し、氷冷下で胸腺から血管・結合組織を取り除き、約 1 mm 間隔 でスライスする。なお、本研究における動物実験は、文部科学省が示した基本指針お よび日本学術会議が策定したガイドラインを踏まえた「徳島大学動物実験管理規則」 および「徳島大学動物実験委員会規則」に従って実施した。

(2) スライスした胸腺を氷冷したタイロード液中でピペッティングあるいは振盪し て胸腺細胞を組織から拡散させる。

(3) 胸腺細胞が浮遊したタイロード液を直径が約 50 µm のメッシュを通して細胞浮 遊液とする。 (4) 氷冷した細胞浮遊液は 36-37℃ で 1 時間インキュベーションした後に実験に供 する。

血漿成分を含む細胞浮遊液では化学物質が血漿タンパク質に吸着する可能性がある。 細胞レベルでの化学物質の作用発現濃度の推定は難しくなるので、本研究ではタイ ロード液(Table 1)を用いて実験を行った。

Table 1. Composition of Tyrode's solution

NaCl	150 mM
KCl	5 mM
CaCl ₂ (*)	2 mM
MgCl ₂	1 mM
Glucose	5 mM
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (**)	5 mM

(*) カルシウム除去タイロード液では CaCl2 を添加しないで、エデト酸ナトリウム

(Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid, disodium salt) 500 µM を添加した。

(**) pH 緩衝剤で NaOH 2-3 mM を添加して pH を 7.3-7.4 に調整した。これにより Na⁺ 濃度は 152-153 mM となる。

備考: (1) 細胞浮遊液中のアニオンは計算上 161 mM CIとなる。(2) タイロード 液を調整する前の蒸留水中の Zn 濃度は 3.6 ± 5.0 nM である。しかし、塩類でタイロー ド液を調製した段階で 32.4 ± 4.0 nM、さらに細胞浮遊液の段階で 216.9 ± 14.4 nM とな る (Sakanashi et al., 2009) 。実験上、避けられないレベルの Zn²⁺が細胞浮遊液中に存 在している。

2.2.試薬

以下の試薬を本研究では用いた。Table2 に蛍光色素 Table3 に一般試薬を示す。

Fluo-3-AM	同仁化学研究所 (熊本、日本)	
FluoZin-3-AM	Invitrogen, Molecular Probes (Eugene, OR, USA)	
5-Chloromethylfluorescein diacetate (5-CMF-DA)	Invitrogen, Molecular Probes	
Propidium iodide	同仁化学研究所	
Annexin V-FITC	Invitrogen, Molecular Probes	
Dihydroethidium	Invitrogen, Molecular Probes	
2,7-Dichlorofluorescin diacetate (DCFH-DA)	Invitrogen, Molecular Probes	
5-(and-6)-Chloromethyl- 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H ₂ DCF-DA)	Invitrogen, Molecular Probes	
JC-1	Invitrogen, Molecular Probes	

Table 2. Fluorescent probes

Table 3. Specific reagents

Ziram	東京化成(東京、日本)
Thiram	東京化成
Zineb	和光純薬
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	和光純薬
Diethylenetriamine-N,N,N',N",N"- pentaacetic acid (DTPA)	同仁化学研究所(熊本、日本)
N,N,N',N'-tetrakis(2-Pyridylmethyl) ethylenediamine (TPEN)	同仁化学研究所
A23187	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Hydrogen peroxide	和光純薬

2. 3. 測定方法

2.3.1. 測定機器 (フローサイトメーター)

フローサイロメーターは細胞浮遊液に含まれる細胞をそのサイズ、形態、細胞内に ある物質密度などの性状により、細胞群として識別・分類できる機器である。細胞の 識別・分類にレーザー光を用いることから、多様な蛍光プローブ(または蛍光抗体) を利用すれば、細胞浮遊液中の細胞群について細胞膜・細胞内動態(膜電位、細胞内 の各種イオン濃度、各種酵素活性、活性酸素種、細胞内小器官活性、細胞内物質、細 胞生死判別など)を測定できる。

このフローサイトメーター(日本分光、CytoACE150)の通常原理は以下のようなも のである。細胞浮遊液(単細胞、単離細胞あるいは単細胞生物を浮遊させた液)を直 径 0.05~0.1 mm の細い管を通すことで、細胞が一個一個遊離した形になり、それらに レーザー光(本実験ではアルゴン・レーザー/波長 488 nm/青色)を照射する。細胞 に当たったレーザー光は細胞の大きさを反映する前方散乱光(forward angle scatter)と 細胞の生物学的性状(あるいは細胞内性状)を反映する側方散乱光(right angle scatter 又は side scatter)の2種類の散乱光として検出される。これらの光学的な信号は電気 的な信号に変換され、蛍光強度として情報処理される。細胞を蛍光プローブで染色し た場合、側方散乱光をビームスプリッターにより分け、特定の波長領域のフィルター を通して蛍光プローブに特有の波長領域の蛍光強度を計測できる。波長領域が異なれ ば、2種類以上の蛍光プローブが同時に適用できる。本研究で使用した機器では緑色 蛍光(波長 530 nm 前後)と赤色蛍光(600 nm 前後)を呈する蛍光色素を用いること が可能である。このようにして、少なくとも4つの指標(細胞サイズ、細胞内性状、 2種類の蛍光プローブの蛍光強度)を毎秒 200-300 個の速度で測定できる。この蛍光 プローブによる細胞蛍光を利用して、以降に示す細胞の生理的、病理的指標を測定す る。なお、機器に付属するソフト(Version 3.06/日本分光)にてデータ解析を行った。

2.3.2.生理的・病理的パラメーターの蛍光化学的測定について

化学物質の細胞毒性を簡便かつ迅速に評価するためには、化学物質の細胞に対する 何からの影響を容易に捉えることが可能な生理的、病理的指標の設定が必要である。 本研究では細胞生死判別以外に、生細胞の細胞内 Zn²⁺、Ca²⁺濃度、細胞内酸化還元状 態の指標として細胞内グルタチオン量(非タンパク質性チオール量)および活性酸素 種活性(H₂O₂ とスーパーオキシドアニオン)、さらに従来の細胞の生死判別(live or dead) という二元的な評価方法に dying という動的な概念を導入した細胞傷害・細胞 生死判別を行った。これら結果から Zn²⁺の化学物質細胞毒性への関与を解き明かした。

2.3.2.1.細胞生死判別 — 細胞傷害・細胞死評価について

細胞の生死判別は主に propidium iodide (励起波長 488 nm/蛍光記録波長 600±20 nm) を用いて行った。また、細胞死以前に起こる細胞膜リン脂質配列の変化は annexin V-FITC (励起波長 488 nm/蛍光記録波長 530 ± 20 nm) を propidium iodide と併用して検 出した。



図3:フローサイトメーターによる細胞計測 - 細胞生死判別 -

細胞の生死判別については細胞膜選択的透過性の変化を利用する方法が多い。細胞 の生細胞の識別のみなら、esterase 基質の蛍光プローブ(エステル化蛍光プローブ)を 用いれば良い。これは脂溶性があり拡散によって細胞膜を通過し、細胞内で esterase により加水分解される。この分解産物は水溶性で細胞膜は透過しにくい。すなわち、 細胞膜が正常であれば細胞内に保持され、細胞は蛍光を呈する(図3)。しかし、前 述のように、この生細胞の評価には問題が残る。その理由は、評価対象の生細胞には 全く正常な細胞(intact live cells)の他に、細胞死のプロセス(dying)にある生細胞 (細胞膜の選択的透過性が失われていない細胞)が存在しているためである。プロセ スには apoptosis、necrosis、 またはその組み合わせと細胞死には多様な様式がある。 特に、apoptosis のプロセスにある細胞の膜は「選択的透過性」の機能を保持している ので、生細胞と評価される可能性が高い。さらに、膜透過性の非特異的な亢進(水溶

蛍光プローブ名: Propidium Iodide (Molecular Probes)

性蛍光プローブによる細胞の染色など) は一般的には necrosis による細胞死を意味す ると考えられるが、染色の程度から apoptosis のプロセスの評価も可能である。それは apoptosis の進行段階で蛍光プローブの細胞膜の透過速度が正常な細胞と較べると増加 していることを利用する。つまり、短時間のプローブ処理では necrosis を起こしてい る細胞は強く染色されるのに対して、apoptosis を起こしている細胞は軽度に染色され、 正常な生細胞はほとんど染色されないという評価方法である。実際、digitonin で処理 した細胞と H₂O₂ で処理した細胞を propidium で染色した場合、前者の場合は無蛍光 の細胞と強い propidium 蛍光を呈する細胞の二つのピークに分かれるのに対して、後 者では前述の2つのピークの他に弱い propidium 蛍光を呈する細胞のピークも認めら れる (Okazaki et al., 1996)。

次に、蛍光プローブの膜透過性の変化のみから評価するのではなく、細胞膜のリン 脂質状態の変化から細胞死プロセスの評価を試みた(図4)。正常な細胞では細胞膜 リン脂質は phosphatidylcholine を外側に、phosphatidylserine を内側に露出している。 ところが、apoptosis の初期段階では phosphatidylserine が外側に露出してくる。この phosphatidylserine に特異的に結合する annexin V-FITC を利用して apoptosis の初期段階 にある細胞を検出する方法である(Koopman et al., 1994)。FITC で蛍光標識した annexin V を胸腺細胞に用いると、この膜の apoptosis 時の変化を蛍光化学的に捉える ことができた。よって、propidium iodide と FITC 蛍光標識した annexin V を同時に用 いることで、正常な生細胞、apoptosis 初期の細胞、死細胞および apoptosis 末期の細胞 あるいは necrosis 過程の細胞を識別した。



図4:細胞死プロセスにおける細胞膜リン脂質の状態変化

2.3.2.2.細胞内 Zn²⁺と Ca²⁺濃度の変化の測定 近年、Zn²⁺についても細胞内シグナルとして役割が認められるようになり、細胞内 Zn²⁺濃度変化についても蛍光色素により容易に評価できるようになった。本論文の実 験では FluoZin-3-AM を用いた(図5)。この FluoZin-3 蛍光測定(励起波長 488 nm/ 蛍光測定波長 530 ± 20nm) に propidium iodide を組み合わせることで得られる情報量を 格段に増やすことが可能である。この実験の原理は細胞内 Ca²⁺指示蛍光の Fluo-3 蛍光 と ethidium 蛍光の組み合わせで行ったもので、amyloid β-protein (Oyama et al., 1995) や methylmercury chloride (Okazaki et al., 1997)の細胞毒性の評価実験で用いられている。 この ethidium bromide と propidium iodide は同じ特性を有する蛍光プローブである。細 胞内 Zn²⁺蛍光指示薬の FluoZin-3-AM(エステル型化合物)は細胞膜を通過し、細胞内 の esterase により加水分解されて FluoZin-3 になる。この FluoZin-3 は細胞内に保持さ れて細胞内 Zn²⁺とキレートを形成する。この Zn²⁺とキレートした FluoZin-3 の蛍光を測 定することで細胞内 Zn²⁺濃度の変化を蛍光化学的に測定できる(Gee et al., 2002)。実 験では propidium iodide を同時に細胞浮遊液に適用し、FluoZin-3 蛍光で細胞内 Zn²⁺濃 度変化を測定しながら、同時に propidium 蛍光で死細胞と生細胞の識別を行った。細 胞には、propidium 蛍光と FluoZin-3 蛍光を同時に示すものがあり、生死の二元的な基 準では説明できない細胞群が存在することが明らかになった。この細胞群は propidium 蛍光の経時的検討から生から死に移行する過渡的な細胞群(つまり、dying)である。 よって、このような細胞は FluoZin-3 蛍光を有していても、細胞内の FluoZin-3 が細胞 からリークしているので正確な測定はできない。そこで、本研究では FluoZin-3 蛍光は propidium 蛍光を呈していない細胞膜が正常な生細胞からのみ記録した。

細胞内 Ca^{2+} 濃度変化については Fluo-3-AM で行った(Kao et al., 1989) (図6)。 Fluo-3-AM は Ca^{2+} と Zn^{2+} の違いはあるものの基本測定原理は FluoZin-3-AM と同じであ る。エステル型化合物の Fluo-3-AM は細胞膜を透過し、細胞内で esterase により加水 分解されて Fluo-3 になる。Fluo-3 (励起波長 488nm/蛍光測定波長 530 ± 20 nm) は細 胞内に保持され Ca^{2+} をキレートする。この際の蛍光強度変化が細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を 反映する。この Fluo-3 蛍光の測定も propidium 蛍光を呈していない生細胞からのみ 行った。

フローサイトメーターによる細胞計測 - 細胞内Zn²⁺濃度 -





図5:フローサイトメーターによる 細胞内 Zn²⁺濃度測定

フローサイトメーターによる細胞計測 - 細胞内Ca²⁺濃度 -

蛍光プローブ名:Fluo-3-AM(同仁化学研究所)



図6:フローサイトメーターによる 細胞内 Ca²⁺ 濃度測定

2.3.2.3. 細胞内酸化還元状態評価

酸素は強い酸化力をもった分子である。細胞はミトコンドリアにより TCA 回路でア セチル CoA を酸化し、最終産物として二酸化炭素と水を排出する。その過程でアデノ シン三リン酸が産生される。それと同時に活性酸素種も発生する。しかし、細胞は活 性酸素種を処理する抗酸化メカニズムを有しており、正常な状態では酸化的ストレス はない。ところが、化学物質によりミトコンドリアが障害を受けると活性酸素種が過 剰に産生されたり、抗酸化メカニズムが抑制されたりし、細胞は酸化ストレスに曝さ れる。よって、細胞内の酸化還元状態を評価することは重要である。本研究では、蛍 光プローブを利用して抗酸化物質の細胞内グルタチオン量の評価と活性酸素種のスー パーオキシドアニオンと H₂O₂の量の変化を評価した。

細胞内グルタチオン量の測定に 5-chloromethylfluorescein diacetate (5CMF-DA、 Molecular Probes Inc.)を用いた(図7)。5CMF-DA は細胞膜を通過して細胞内に入る。 細胞内において esterase により加水分解されて 5CMF になる。この 5CMF で検出でき

るのは細胞内の非タンパク質性チオー ルである。細胞内の非タンパク質性チ オールの大部分はグルタチオン(還元 型)であるので、5CMF 蛍光は細胞内 グルタチオン量を評価していることに なる(Chikahisa et al., 1996)。5CMF-DA(500 nM)の細胞への適用直後か ら 5CMF 蛍光強度の急激な増大が認 められ、30分以内に蛍光強度は定常 状態に達した。従って、細胞内グル タチオン量の測定は 5CMF 蛍光が安

<u>フローサイトメーターによる細胞計測</u> - 細胞内グルタチオン(GSH)量 -

蛍光プローブ名: 5-Chloromethylfluorescein diacetate



図7:フローサイトメーターによる細胞内グルタ チオン量の計測測定

定するのはプローブ適用後 30 分に行うことがよい。細胞膜に障害がある細胞では細胞内に 5CMF を保持できない。よって、5CMF 蛍光の測定も propidium iodide に染まらない生細胞で行った。

上記のことから、酸化ストレスの原因は活性酸素種である。よって、活性酸素種の 産生を蛍光プローブで測定した。スーパーオキシドアニオン(O_2)の測定は dihydroethidium (Invitrogen, Molecular Probes, Inc.)を、 H_2O_2 の測定は 5-(and-6)chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H₂DCF-DA) (Invitrogen, Molecular Probes, Inc.)を用いた(図8)。前者の dihydroethidium は細胞内で O_2 によ り酸化され ethidium になる。これが細胞の ethidium 蛍光(励起波長:488 nm/測定波 長 530 ± 20 nm)となる。よって、ethidium 蛍光が増強する程、細胞内の dihydroethidium が O_2 により酸化されたことになり、それは O_2 で生増大を意味する。 実験では DMSO に溶解させた dihydroethidium を 10 μ M 濃度で細胞に適用し、添加後 60 分目に細胞から ethidium 蛍光を測定した。後者の 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H₂DCF-DA) はエステル化合物であるので細胞 腹を透過し、細胞内の esterase により CM-H₂DCF になる。これは H₂O₂により酸化され て CM-DCF 蛍光(励起波長 488 nm/測定波長 530 ±20 nm)となる。よって、CM-DCF 蛍光強度が大きいほど、H₂O₂の産生が多いということになる。実験では細胞に 10 μ M 濃度の CM-H₂DCF-DA を適応し、適応後 60 分後に細胞から CM-DCF 蛍光を測定した。

フローサイトメーターによる細胞計測 - スーパーオキシドアニオンの検出 -

蛍光プローブ名: Dihydroethidium (Molecular Probes)



図8:フローサイトメーターによる スーパーオキシドアニオンの検出 3. 実験結果

3.1. ジラムによる細胞内 Zn²⁺濃度の上昇 (原著論文1)

3.1.1.ジチオカルバメート農薬による細胞致死率とFluoZin-3 蛍光強度の変化

ジラム (ZIRAM, 0.1-1 μM) 、チラム (THIRAM, 0.3-1 μM) とジネブ (ZINEB, 1-3 μM) の 3 時間処理で、ラット胸腺細胞の致死率(生存率)は変化しなかった。よっ て、以下の実験は細胞致死濃度以下で行った。

図9A に示すように、ジラム (0.3-1 μ M)、チラム (0.3-1 μ M) およびジネブ (3 μ M)の1時間処理で FluoZin-3 蛍光ヒストグラムは高蛍光強度方向にシフトした。これらはジチオカルバメート農薬により細胞内 Zn²⁺濃度が上昇したことを示唆する。FluoZin-3 蛍光は、ジラムとチラムの添加後、急速に上昇し、30 分以内にピーク値に達し定常状態になった。よって、以降の実験では FluoZin-3 蛍光の測定は農薬添加後30 分後に行った。図9B にジチオカルバメート農薬による FluoZin-3 蛍光強度変化の濃度・反応曲線を示す。ジラムは 0.03 μ M 以上の濃度で濃度依存性に蛍光強度を有意に上昇させた。チラムは 0.1 μ M 以上で、ジネブでは 1 μ M 以上で蛍光強度の有意な増強が観察された。FluoZin-3 蛍光強度に対する作用強度はジラム>チラム>ジネブの順であった。



図 9:ジチオカルバメート殺菌剤による FluoZin-3 蛍光の変化 (A) ジラム、チラム、 およびジネブによって誘導された FluoZin-3 蛍光の変化。各ヒストグラムは 2000 細胞 で構成している。殺菌剤の効果を薬物添加の 30 分後に検討した。 (B) 0.03~1 µM のジラム、0.1~1 µM のチラム、および 0.3~3 µM のジネブを用いた FluoZin-3 蛍光の 平均強度の変化。これらの効果は薬物添加の 30 分後に検討した。棒グラフおよびエ ラーバーは、それぞれ 4 つのサンプルの平均値および標準偏差を示す。 (**) は対照 群と薬物添加群との有意差 (P<0.01) を示す。

(A)

(B)

3.1.2. ジチオカルバメート農薬による Fluo-3 蛍光強度の増強

図10に示すように、ジラムとチラムの 0.3-1 μ M 濃度で細胞を 1 時間処理すると Fluo-3 蛍光が増強した。同濃度のジネブでは蛍光強度に変化はなかった。これらの結 果から、ジラムとチラムでは細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇したことを示唆する。しかし、細 胞内 $Zn^{2+}をキレートする細胞膜透過性 TPEN (10 \mu M)$ で処理した細胞では、いずれの 農薬でも Fluo-3 蛍光強度の増強は観察されなかった。これらのことから Fluo-3 蛍光の 増強は Ca^{2+} ではなく Zn^{2+} によるものと考えられた。なお、金属2価イオン・イオノホ アである A23187 による Fluo-3 蛍光強度の増強は Ca^{2+} 依存性で、TPEN では減弱しな かった。



図 10:10 µM TPEN の非存在下または存在下でのジチオカルバメート殺抗真菌剤 (上段パネル)および A23187 (下段パネル)による Fluo-3 蛍光の平均強度の変化を 示す。それらの効果を適用後 30 分で検討を行った。棒グラフおよびエラーバーは、 それぞれ 4 つのサンプルの平均値および標準偏差を示す。(**)は対照群と薬物添加 群との有意差 (P<0.01)を示す 3.1.3.ジラムによる FluoZin-3 蛍光強度上昇に対する ZnCl₂ と Zn²⁺キレート剤の影響 ジラムによる細胞内 Zn²⁺濃度上昇に関する Zn²⁺の由来を検討する目的で、細胞外液 に 3 μM ZnCl₂ (細胞外 Zn²⁺濃度上昇)、細胞膜不透過性 Zn²⁺キレート剤 DTPA (10 μM) 及び細胞膜透過性 Zn²⁺キレート剤 TPEN (10 μM) をそれぞれ添加して、ジラム の作用を検証した。図11に示すように、ZnCl₂ 添加でジラムによる FluoZin-3 蛍光増 強は著明に亢進した。逆に、細胞外 Zn²⁺をキレートする DTPA の添加では著しく減弱 した。また、細胞内 Zn²⁺をキレートする TPEN ではジラムの反応は消失した。よって、 ジラムによる細胞内 Zn²⁺濃度の上昇は細胞外 Zn²⁺に依存していること(細胞外からの Zn²⁺流入)が明らかになった。



図 11: ZnCl₂および Zn²⁺キレート剤存在下でのジラムによる FluoZin-3 蛍光の平均強 度の変化を示す。細胞を、3 µM の ZnCl₂、10 µM の DTPA、または 10 µM の TPEN で 10 分間処理した後、0.3 µM のジラムを添加した。効果は、ジラム添加の 30 分後に検 討を行った。棒グラフおよびエラーバーは、それぞれ 4 つのサンプルの平均値および 標準偏差を示す。(**)は対照群と薬物添加群との有意差(P<0.01)を示す

3. 1. 4. ジラムによる FluoZin-3 蛍光強度上昇に対する低温の影響

胸腺細胞では細胞外 Zn^{2+} の細胞内流入は温度感受性である。そこで、ジラムによる 細胞外 Zn^{2+} 流入の温度感受性の有無を検討した。3-4℃の低温条件ではジラム (0.3-1 μ M) による FluoZin-3 蛍光強度の増強は著明に減弱した (図12)。これらを摂氏 36-37℃に戻すと FluoZin-3 蛍光増強は回復した。よって、ジラムによる細胞内 Zn^{2+} 濃度上 昇には温度依存性細胞外 Zn^{2+} 流入が関与していることが明らかになった。外液 Zn^{2+} 性 の細胞内 Zn^{2+} 濃度上昇は低温で完全に抑制されたが、ジラムによる上昇は完全には抑 制されない。よって、2 つ以上の成分があると考えられた。



図 12:低温条件下でのジラムおよび ZnCl₂の効果 (A)低温条件下で 0.3-1 μ M の ジラムにより増強された FluoZin-3 蛍光の平均強度の変化を示す。これらの薬物効果は、 ジラム添加後の 30 分で検討を行った。 (B)低温条件下での FluoZin-3 蛍光の平均強 度の 3 μ M ZnCl₂による変化を示す。この効果は、ZnCl₂添加の 30 分後に検討を行った。 低温条件の場合、細胞浮遊液を氷水浴中で 10 分間インキュベートしてから、ジラム または ZnCl₂の添加を行った。棒グラフおよびエラーバーは、それぞれ 4 つのサンプ ルの平均値および標準偏差を示す。 (**) は、対照群と薬物投与群との有意差 (P <0.01)を示す。

(A)

(B)

3.1.5. ジラムによる 5CMF 蛍光強度の変化

細胞内 Zn^{2+} 濃度の著明な上昇は酸化ストレスを誘発することが知られている。よっ て、ジラムによる細胞内 Zn^{2+} 濃度上昇が酸化ストレスを誘発しているかを、細胞内非 タンパク質性チオール量変化から検討した。細胞内非タンパク質性チオール量は 5CMF 蛍光で評価した。1 μ M のジラムの1 時間処理で 5CMF 蛍光は、図13に示す ように激減した。このジラムによる 5CMF 蛍光強度減弱は Zn^{2+} キレート剤の添加によ り起こらなかった(図13)。

(A)

(B)



図 13: Zn²⁺キレート剤の効果 (A) 10 µM DTPA の非存在下または存在下、0.3-1 µM ジラムによる 5CMF 蛍光の平均強度の変化。 (B) 10 µM TPEN の非存在下また は存在下、0.3-1µM ジラムによる 5CMF 蛍光の平均強度の変化。ジラム添加の 10 分 前に DTPA または TPEN を細胞浮遊液に加えた。その効果は、ジラム添加の 60 分後 に検討を行った。棒グラフおよびエラーバーは、それぞれ 4 つのサンプルの平均値お よび標準偏差を示す。 (**) は、対照群と薬物投与群との有意差 (P < 0.01) を示す。

3.1.6.アネキシンV陽性生細胞のジラムによる増加のZn²⁺依存性

ジラムによる細胞内 Zn^{2+} 濃度上昇と細胞内非タンパク質性チオール量低下は細胞死 を誘発する可能性がある。そこで、細胞死プロセスに対するジラム、 $ZnCl_2$ (10 μ M) および Zn^{2+} キレート剤 DTPA (10 μ M) の効果をアネキシンV-F I T Cを用いて検証 した。図6に示すように 1 μ M ジラムによるアネキシンV陽性生細胞の増加は DTPA 存在下では観察されなかった。また、0.3 μ M ジラム単独ではアネキシンV陽性細胞は 増加しないが、 $ZnCl_2$ との組み合わせでは著明に増加した(図14)。これらの結果か らジラムによる細胞死プロセスの進行には Zn^{2+} が関係していることが明らかになった。 これらの結果は図15にまとめた。



図 14: アネキシン V-FITC およびヨウ化プロピジウムによって分類される細胞集団 のジラム、ZnCl₂、DTPA とこれらの組み合わせによる変化 (A) 1 μ M の OIT、10 μ M の DTPA、およびそれらの組み合わせ (ZIRAM + DTPA) による蛍光サイトグラム (縦軸プロチウム蛍光、横軸 FITC 蛍光)の変化。これらの効果は薬物添加1 時間後 に検討した。 N, A, P および AP の領域は、正常生細胞、アネキシン V 陽性生細胞、 死細胞およびアネキシン V 陽性死細胞の集団をそれぞれ示す。各サイトグラムは 2000 個の細胞から構成した。 (B) 0.3 μ M ジラム、10 μ M ZnCl₂ (ZINC) およびそれらの 組み合わせ (ZIRAM + ZINC) による細胞集団の変化。

(B)



図 15:ジラム、ZnCl₂、DTPA とそれらの組み合わせによって起こる細胞集団の割合の変化。棒グラフおよびエラーバーの値は、それぞれ4回の実験の平均および標準 偏差として表した。死細胞集団は、図6に示すように、PおよびAPの領域からなっていた。(**)は、対照群と薬物投与群との有意差(P<0.01)を示す。

3.2. ジラムによる細胞死に決定因子としての Zn²⁺ (原著論文2)

3. 2. 1. ジラムによる細胞死

ジラム(1 μ M) の 4 時間処理で細胞致死率の著明な上昇が認められた(図16)。 このジラムの作用は生細胞において前方散乱強度の低下(細胞萎縮)を伴った。0.3 μ M ジラムでは細胞致死率の有意な上昇は認められなかった。なお、0.3 μ M ジラムで は側方散乱強度の上昇が見られ、細胞内密度(あるいは顆粒性)に変化が起こってい ることが示唆された。よって、ジラムの急性細胞毒性の閾値は 0.3 μ M 付近と考えら れた。



図 16:ジラムによって誘発された細胞致死率の変化。

(A) サイトグラムで表されるジラム誘導変化(縦軸前方散乱/細胞サイズ、横軸プロピジウム蛍光)。 2500 細胞でサイトグラムを構成した。サイトグラム下部の点線は、プロピジウム蛍光を有する細胞(死細胞または損傷した膜を有する細胞)の集団を示している。 (B) ジラムにより誘導された細胞致死率の濃度依存的変化。 (C) ジラムによって誘発された側方散乱(細胞内密度)の濃度依存的変化。棒グラフおよびエラーバーは、それぞれ 4 つのサンプルの平均値および標準偏差を示す。(**)は、コントロール群(CONTROL)とジラム添加細胞群との有意差(P<0.01)を示す。

3.2.2.ジラムによる細胞致死率上昇に対する Zn²⁺キレート剤の効果

図 6 の結果から、ジラムのアネキシンV陽性生細胞数の増加に Zn^{2+} が関与している ことが考えられた。そこで、 Zn^{2+} キレート剤存在下にジラムによる細胞死が起こるか を検討した。図17に示すように、細胞外 Zn^{2+} キレート剤 DTPA と細胞内 Zn^{2+} キレー ト剤 TPEN は 1 μ M ジラムによる細胞致死率増加を抑制した。これらの結果からもジ ラムの細胞毒性に Zn^{2+} が関与していることが示唆できた。



図 17: ジラムの細胞毒性に及ぼす Zn^{2+} キレート剤(DTPA および TPEN)の影響。 棒グラフおよびエラーバーは、それぞれ 4 つのサンプルの平均値および標準偏差を示 す。(**)は、対照群(CONTROL)とジラムもしくはそれぞれの Zn^{2+} キレート剤ま たはその両方で処置した細胞群との間の有意差(P < 0.01)を示す。

3. 2. 3. ZnCl₂によるジラム細胞毒性の増強

ジラムの 0.3 μ M は細胞致死濃度以下であるが細胞内 Zn²⁺濃度の軽度の上昇を起こ す。この濃度のジラムと ZnCl₂ の組み合わせは細胞内 Zn²⁺濃度の著明な上昇を誘発す ることで細胞致死率の上昇を引き起こす。それ故に、ジラムと ZnCl₂ の組み合わせは 細胞致死率を上昇させる可能性が考えられた。10 μ M ZnCl₂ の存在下に 0.3 μ M ジラム で細胞を処理すると、細胞致死率の著明な上昇が起こった(図18A)。これは 1 μ M ジラムの場合も同様であった。これらの結果よりジラムの細胞毒性に Zn²⁺が関与して いることが示唆された。別の評価方法の WST 方法でも、ジラムの細胞毒性の ZnCl₂依 存性増強が確認された(図18B)。この細胞死は細胞萎縮を伴っており(図 10 C)、 アポトーシスの可能性が考えられた。 (A)



図 18:ジラムによる細胞毒性のZnCl₂による変化。

棒グラフおよびエラーバーは、それぞれ4つのサンプルの平均値および標準偏差を示 す。(**)は、対照群(CONTROL)とジラムもしくは $ZnCl_2$ 、またはその両方で処置 した細胞群との有意差(P < 0.01)を示す。(##)は、 $ZnCl_2$ を処理した細胞と処理して いない細胞のグループ間の有意差(P < 0.01)を示す。

3. 2. 4. ZnCl₂によるジラム細胞毒性増強の低温による抑制

ジラムによる細胞内 Zn^{2+} 濃度上昇は低温(4度)処理により完全に抑制される(図 12)。 $ZnCl_2$ による細胞内 Zn^{2+} 濃度上昇も低温で抑制される(図12)。ジラム 1 μ M による細胞死も、ジラム(1 μ M)と $ZnCl_2$ (10 μ M)の組み合わせによる細胞死も 低温により抑制された(図19)。これらの結果からもジラムの細胞毒性に Zn^{2+} が関 与することが示唆された。



図 19:低温条件下でのジラムの細胞毒性。

棒グラフおよびエラーバーは、それぞれ4つのサンプルの平均値および標準偏差を示 す。(**)は、対照群(CONTROL)とジラム、ZnCl₂もしくはその両方で処置した細 胞群との有意差(P < 0.01)を示す。(##)は、ZnCl₂を処理した細胞と処理していない 細胞のグループ間の有意差(P < 0.01)を示す。 3. 2. 5. ジラム、ZnCl₂とそれらの組み合わせによる細胞内グルタチオン量の変化 細胞の ZnCl₂処理は細胞内 Zn²⁺濃度上昇を介して細胞内グルタチオン量を増加させ る(Kinazaki et al., 2011)。10 µM ZnCl₂ で 2 時間処理すると 5CMF 蛍光強度は上昇し たが、0.3 µM ジラムでは蛍光強度は変化しなかった(図 2 0)。ジラムと ZnCl₂の組 み合わせで細胞を処理すると 5CMF 蛍光強度は激減した(図 2 0)。この結果はジラ ムと ZnCl₂の組み合わせが細胞内グルタチオン量を激減させたことを意味する。



図 20:ジラムと $ZnCl_2$ の単独および併用処理による 5CMF 蛍光の強度の変化。 棒グラフおよびエラーバーは、それぞれ 4 つのサンプルの平均値および標準偏差を示 す。(**)は、対照群(CONTROL)とジラムもしくはジラムと $ZnCl_2$ の組み合わせで 処理した細胞群との有意差(P < 0.01)を示す。(##)は、ジラムと $ZnCl_2$ もしくは他 の群と同時に処理された細胞群間の有意差(P < 0.01)を示す。 3.2.6.ジラム、ZnCl₂とそれらの組み合わせによる細胞内活性酸素量の変化

図21に示すようにジラムと ZnCl₂の組み合わせではグルタチオンは枯渇した。 よって、細胞内で酸化ストレスが亢進していると考えられた。そこで、ハイドロエチ ジン(エチジウム蛍光)で細胞内活性酸素量(スーパーオキシドアニオン量)を評価 した。図21に示すように、0.3 µM ジラム、10 µM ZnCl₂、それぞれ単独ではエチジウ ム蛍光強度は変化しなかった。しかし、両者の組み合わせではエチジウム蛍光強度は 著しく増強した。よって、ジラムと ZnCl₂の組み合わせでは細胞内活性酸素量が著明 に上昇することが考えられた。



図 21:ジラムと $ZnCl_2$ の単独および併用処理を行った際のエチジウム蛍光の強度の 変化。棒グラフとエラーバーは、それぞれ4つのサンプルの平均値および標準偏差を 示す。(**)は、対照群(CONTROL)とジラムもしくはジラムと $ZnCl_2$ の組み合わせ で処理した細胞群との有意差(P < 0.01)を示す。(##)は、ジラムもしくは $ZnCl_2$ お よび他の群で同時に処置された細胞群間の有意差(P < 0.01)を示す 3.3.酸化ストレス下におけるジラムによる擬似的細胞保護作用 (原著論文3)

3.3.1. ジラムによる H₂O₂細胞毒性の抑制

図22Aに示すように、100 μ M H₂O₂ で3 時間処理すると死細胞(プロピジウム蛍 光を呈する細胞)が増加した。H₂O₂ による死細胞の増加は細胞致死濃度以下のジラム 0.3 μ M の共存で著明に抑制された。図 14B に 0.003 μ M から 1 μ M の濃度のジラム共 存下の H₂O₂ 細胞毒性の変化を示す。ジラムはそれ自体が細胞毒性を示す濃度よりも低 い濃度で H₂O₂ 細胞毒性を用量依存的に抑制した。

(A)



(B)



図 22:ジラム、 H_2O_2 の単独および併用処理による PI 蛍光を示す細胞集団の変化。 これらの効果は、それぞれの処理後の3時間後に検討を行った。 (A) ジラム、 H_2O_2 そしてそれらの組み合わせによるサイトグラムの変化(縦軸前方散乱/細胞サイズ、 横軸 PI 蛍光/死細胞)。各サイトグラムは2500細胞で構成した。サイトグラム下部 の点線は、PI 蛍光を示す細胞群を示す。 (B) ジラムもしくはジラム+ H_2O_2 処理後の 細胞致死率(PI 蛍光を示す細胞の割合)。(**)は、対照群(対照)と薬物処理細胞 との有意差(P<0.01)を示す。(##)は、 H_2O_2 で処理した細胞と H_2O_2 およびジラム で処理した細胞との有意差(P<0.01)を示す。データは、4つのサンプルの平均細胞 致死率および標準偏差を表す。各コントロールとの比較のために、点線を配置した。 3.3.2.H₂O₂による細胞死プロセスへのジラムの影響

図23Aに示すように、100 μ M H₂O₂ で3 時間処理すると、エリアAのアネキシン V 陽性生細胞とエリア AP の死細胞が増加した。ジラム (0.3 μ M) 単独では細胞集団 には影響は無かった。ジラムと H₂O₂ の組み合わせでは、H₂O₂ 単独の場合と比較して、 エリア N の正常生細胞の減少が促進し、エリア AP の死細胞の増加が抑制された。 よって、エリア A に細胞が集中する形となった。図23B に結果を示す。

(A)



(B)

図 23:ジラム、 H_2O_2 の単独および併用処理によるアネキシン V-FITC および PI で 分類された細胞集団の変化。薬剤処理後 2.5 時間後に効果の検討を行った。 (A) ジ ラム、 H_2O_2 そしてそれらの組み合わせによるサイトグラム(縦軸 PI 蛍光、横軸 FITC 蛍光)の変化。 N、正常生細胞; A、アネキシン V 陽性生細胞; P、アネキシン V 陰性 死細胞、および AP:アネキシン V 陽性死細胞が含まれる。各サイトグラムは 2500 細 胞を含んでいた。 (B)正常生細胞(N)、アネキシン V 陽性生細胞(A)、および 死細胞(P+AP)の割合の変化。値は、4 つのサンプルの平均細胞死亡率および標準偏 差を表す。(**)は、対照群(対照)と薬物処理細胞との有意差(P < 0.01)を示す。 (##)は、 H_2O_2 処理細胞と H_2O_2 およびジラムで処理した細胞との有意差(P < 0.01) を示す。 3.3.1.H₂O₂による細胞内非タンパク質性チオール量の低下に対するジラムの作 用

細胞致死濃度以下のジラム (0.1 – 0.3 μ M) の1時間処理では5CMF 蛍光強度は増強 した(図24A)。これは細胞内非タンパク質性チオール量(主にグルタチオン)の 増加を意味する。よって、この作用は酸化ストレスに対する細胞保護作用への関与が 考えられた。100 μ M H₂O₂の1時間処理では5CMF 蛍光は著明に減弱したが、ジラム との組合せではさらに蛍光の減弱が観察された。ジラムは H₂O₂の非タンパク質性チ オール量低下作用を増強させたことになった。実験結果は図24Bに示した。 (A)



(B)



図 24:ジラム、 H_2O_2 の単独および併用処理した細胞の 5CMF 蛍光の変化。 薬剤適用 1.5 時間後に効果を調べた。 (A) それぞれの処理による 5CMF 蛍光のヒス トグラムの変化。ヒストグラムは 2500 細胞で構成した。 (B) ジラム、 H_2O_2 そして それらの組み合わせで処理した細胞の 5CMF 蛍光の平均強度の変化。値は、4 つのサ ンプルの平均強度および標準偏差を表す。(*、**)は、対照群(対照)と薬物処理細 胞との有意差(P<0.05、P<0.01)を示す。(#、##)は、 H_2O_2 処理細胞と H_2O_2 およ びジラムで処理した細胞との有意差(P<0.05、P<0.01)を示す。

3.3.4.H₂O₂による細胞内 Ca²⁺濃度上昇に対するジラムの作用

細胞を H_2O_2 で処理すると細胞内 Ca^{2+} 濃度は上昇する(Okazaki, et al., 1996)。そして、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は細胞死に繋がる(McConkey and Orrenius, 1996; Orrenius et al., 2003)。そこでジラムが H_2O_2 による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を抑制できるかを検討した。図25Aに Fluo-3 蛍光ヒストグラムのジラムによる変化を示すが、0.1-0.3 μ M ジラムの1 時間処理では Fluo-3 蛍光を変化させなかった。つまり、細胞内 Ca^{2+} 濃度にジラムは影響を与えなかった。ジラムと H_2O_2 を同時に細胞に作用させると、蛍光ヒストグラム変化では分かりにくいが、 H_2O_2 による Fluo-3 蛍光増強を若干強めた。つまり、ジラムは H_2O_2 よる細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を抑制しなかった。結果は図25B に示した。(A)



(B)

図 25:ジラム、 H_2O_2 の単独および併用処理した細胞の Fluo-3 蛍光の変化。 薬物添加の1時間後に効果の検討を行った。 (A) それぞれの処理による Fluo-3 蛍光 の変化。ヒストグラムは 2500 細胞で構成した。 (B) ジラム、 H_2O_2 そしてそれらの 組み合わせで処理した細胞の Fluo-3 蛍光の平均強度の変化。データは、4 つのサンプ ルの平均強度および標準偏差を表す。 (**) は、対照群(対照) と薬物処理細胞との 有意差 (P < 0.01) を示す。記号(#) は、 H_2O_2 処理細胞と H_2O_2 およびジラムで同時 に処理した細胞との有意差 (P < 0.05) を示す。 3.3.5.H₂O₂による細胞内 Zn²⁺濃度上昇に対するジラムの作用

 H_2O_2 は細胞膜二価金属イオン透過性亢進により細胞外 Zn²⁺の細胞内流入と細胞内非 タンパク質性チオール結合亜鉛の遊離で細胞内 Zn²⁺濃度を上昇させる(Maret, 1994.)。 また、本研究でジラムも細胞外 Zn²⁺流入促進による細胞内 Zn²⁺濃度上昇を起こした (図11)。よって、 H_2O_2 とジラムの組合せでは相加的あるいは相乗的な作用が考え られた。図26Aの FluoZin-3 蛍光ヒストグラムに変化に示すように、 H_2O_2 (100 μ M) 1時間処理とジラム(0.3 μ M)1時間処理で FluoZin-3 蛍光の増強が観察された。これ らの組合せでは FluoZin-3 蛍光の著明な増強が起こった(図26A)。つまり、 H_2O_2 と ジラムの組合せでは細胞内 Zn²⁺濃度の著明な上昇を起こすことになり、これは細胞毒 性の増強と考えられた。結果は図26Bに示した。



図 26:ジラム、 H_2O_2 の単独および併用処理した細胞の FluoZin-3 蛍光の変化。 薬物添加の1時間後に効果を調べた。(A)各処理による FluoZin-3 蛍光の変化。ヒス トグラムは 2500 細胞で構成した。(B)ジラム、 H_2O_2 そしてそれらの組み合わせで処 理した細胞の FluoZin-3 蛍光の平均強度の変化。値は、4 つのサンプルの平均強度およ び標準偏差を表す。(**)は、対照群(対照)と薬物処理細胞との有意差(P <0.01) を示す。(##)は、 H_2O_2 処理細胞と H_2O_2 とジラムで処理した細胞との有意差(P <0.01)を示す。

(B)

(A)

3.3.6.細胞内カルシウム負荷による細胞死に対するジラムの作用

 H_2O_2 による細胞死には細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇も関与する(Okazaki, E., et al., 1996)。 そこで、カルシウムイオノホア A23187 で細胞に Ca^{2+} 依存性細胞死を起こさせ、それ に対するジラムの影響を検討した。細胞を A23187(100 nM)で3 時間処理を行なう と細胞致死率が有意に上昇した(図27)。これに対して致死濃度以下のジラムを同 時に処理すると細胞致死率はさらに上昇した。よって、 Ca^{2+} 依存性細胞死をジラムは 増強することが示唆された。



図 27:ジラム、A23187の単独および併用処理した細胞の致死率の変化。 薬物添加の3時間後に効果を検討した。値は、4つのサンプルの平均細胞死亡率およ び標準偏差を表す。(**)は、対照群(対照)と薬物処理細胞との有意差(P<0.01) を示す。(#、##)は、H₂O₂処理細胞とH₂O₂およびA23187で処理した細胞との有 意差(P<0.05、P<0.01)を示す。

3.3.7.H₂O₂によるミトコンドリア膜電位脱分極に対するジラムの作用

細胞のミトコンドリア膜電位変化は JC-1 蛍光(緑蛍光強度/赤蛍光強度の比)で評価できる。細胞を H_2O_2 (100 μ M) で2時間処理すると JC-1 赤蛍光減弱と緑蛍光増強を起こした。図28に示すように、 H_2O_2 処理で蛍光強度比は増加した。これはミトコンドリア膜電位の脱分極を示す。ジラムとの共存では H_2O_2 による蛍光強度比の変化を減少させた。つまり、 H_2O_2 によるミトコンドリア活性低下に対して、ジラムは保護的に作用したと示唆される。



図 28:ジラム、 H_2O_2 の単独および併用処理した細胞における赤色 JC-1 蛍光に対する緑色 JC-1 蛍光の比の変化。薬剤添加後 2.5 時間で薬物効果の検討を行った。値は、4つのサンプルの平均強度および標準偏差を表す。(**)は、対照群(対照)と薬物処理細胞との有意差(P < 0.01)を示す。#、##)は、 H_2O_2 で処理した細胞と H_2O_2 およびジラムで処理した細胞との有意差(P < 0.05、P < 0.01)を示す。

4. 考察

4. 1. ジラムによる細胞内 Zn²⁺濃度の上昇メカニズムについて

ジラムなどのジチオカルバメート抗真菌剤は亜鉛インジケータである FluoZin-3 蛍光 強度を増強させたことから(図 9)、これらの抗真菌剤が細胞内 Zn^{2+} 濃度の上昇を起 こすことが推定された。細胞内 Zn^{2+} を亜鉛イオンキレート剤である DTPA でキレート することで、ジラムが起こした FluoZin-3 蛍光強度増大はほぼ完全に抑制された(図 1 0)。このことからジラムによる細胞内 Zn^{2+} 濃度の増強は外液 Zn^{2+} に依存していた。 さらに、細胞外 Zn^{2+} 濃度を上昇させるとジラムによる FluoZin-3 蛍光反応は増強したこ と(図 1 1)も外液 Zn^{2+} 依存性を支持する。よって、ジラムは細胞内への Zn^{2+} 流入を 促進していることが考えられた。

通常、細胞内への Zn²⁺流入には細胞膜の Zn²⁺輸送体が関係している(Jeong and Eide., 2013)。これらの中で温度感受性を有する輸送体に Zip2、Zip12 および Zip14 がある (Gaither and Eide, 2000; Pinilla-Tenas et al., 2011; Chowanadisai, 2013)。 ジラムによる FluoZin-3 蛍光強度の増強は低温下では約 1/3 に著明に減弱し、外液 Zn²⁺濃度上昇によ る蛍光増強は完全に抑制された(図12)。これらの結果から、ジラムにより促進す る Zn²⁺流入には 2 通りの経路が考えられた。ジラムが非特異的に細胞膜イオン透過性 を亢進した可能性は、ジラムによる細胞内 Ca²⁺濃度上昇が起こらないことから否定で きる。ジラムは神経細胞等で細胞内 Ca²⁺濃度を上昇させることが報告されている (Han et al., 2003; Jin et al., 2014)。本研究で用いた胸腺細胞でジラムによる Fluo-3 蛍

ムによる蛍光増強は細胞内 Zn^{2+} を TPEN でキレートすると観察されない(図10)。 TPEN は Ca^{2+} による Fluo-3 蛍光強度増強には有意な影響を与えないことから、ジラム による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇については誤認の可能性がある。

ジラムは 5CMF 蛍光強度を減弱させた(図13)。この現象が示すところは、ジラ ムによる細胞内非タンパク質性チオール量の減少である。この蛍光減弱は DTPA と TPEN 存在下では起こらない。非タンパク質性チオール量は還元型グルタチオン量を 意味しており、タンパク質性チオール量の減少は酸化ストレスを受けていることを意 味する。酸化ストレスによってチオール基の -SH がジスルフィド結合(-S-S-)を形 成することから亜鉛イオンを保持できなくなる。よって、ジラムより細胞内 Zn²⁺濃度 が上昇し、それが細胞内チオール量の低下を起こしたと推定できる。細胞内 Zn²⁺濃度 の過度な上昇は酸化ストレスを増大させることから(Sensi et al., 2011; Oyama et al., 2012; Wu et al., 2013)、この推論は妥当と考えられる。さらに、ジラムは胸腺細胞の アポトーシス様細胞死プロセスを促進した(図14、15)。この細胞死プロセスは DTPA により遅延し、 $ZnCl_2$ により促進したことから、 Zn^{2+} 依存性が示唆された。

4. 2. ジラムによる細胞死における決定因子としての Zn²⁺

図8と9の結果は、propidium 蛍光を呈する細胞(死細胞)のジラムによる増加を示 している。さらに、細胞内 Zn^{2+} 濃度を増減させる操作により、ジラムによる細胞致死 率の変化は細胞内 Zn^{2+} 濃度変化と一致している。これらから、ジラムの細胞毒性には Zn^{2+} 依存性が確認できた。ジラムによる細胞毒性は低温処理により著明に抑制された ことからも(図19)、ジラムによる細胞死では Zn^{2+} が決定的な要因であることが支 持される。亜鉛は抗酸化性元素として知られている。実際、 $ZnCl_2$ の単独処理では細胞 内非タンパク質性チオール量(主にグルタチオン)は増加する(図20)。しかし、 致死量以下のジラムと $ZnCl_2$ の同時処理で非タンパク質性チオール量は激減した(図 20)。致死量以下のジラムも $ZnCl_2$ も細胞内活性酸素量は増加させないが、それら を組み合わせると有意に増加した(図21)。前述のように、この組み合わせは細胞 内 Zn^{2+} 濃度を著明に増加させることから、細胞内 Zn^{2+} 濃度の過度な上昇が酸化ストレ スを引き起こし、それが細胞死に繋がっていると考えられる。

4.3.酸化ストレス下でのジラムによる擬似細胞保護作用について

亜鉛は抗酸化性が標榜されている元素である。ジラムは細胞内 Zn²⁺濃度を上昇させ る。ジラムは Zn²⁺依存性の細胞毒性が示されているが、H₂O₂ による細胞毒性に対する ジラムの影響を観察すると予想とは逆の作用が観察された。H₂O₂ による細胞死をジラ ムは低濃度から抑制した(図22、23)。H₂O₂ による細胞死のプロセスに対するジ ラムの影響を調べると、正常な生細胞は激減させたが死細胞の増加は抑制していた (図24、26)。結果として、細胞死の前段階にあるアネキシン陽性生細胞が増加 した。アネキシン陽性生細胞はアポトーシス指標のフォスファチジルセリンが膜表面 に露出した細胞であり、アポトーシス初期段階を意味する(Koopman et al., 1994)。ジ ラムと H₂O₂の組み合わせでは、細胞内 Zn²⁺濃度の著明な上昇を起こし、細胞内非タン パク質性チオール量も激減している(図24、26)。すなわち、H₂O₂ それ自体の細 胞毒性をジラムは強めている可能性が高い。それにも関わらず、最終的な結果である 細胞致死率の上昇は抑制されている状態にある。H₂O₂ による細胞死には Ca²⁺が関与し ている部分もあり、この部分にはジラムはやや促進的であり、H₂O₂による細胞致死率 の抑制を説明できない(図25、27)。細胞致死率変化からジラムの作用を評価す ると、ジラムは H₂O₂による細胞致死率上昇を抑制することから、ジラムは細胞保護作 用を有することになる。しかし、ジラムは細胞死プロセスにおける H₂O₂の作用を増強 しており、この細胞保護作用は疑似と考えられた。細胞保護的と考えられる作用はジ ラムが H₂O₂によるミトコンドリア膜の脱分極を有意に減少させたことである(図2 8)。よって、細胞保護と考えるよりも、細胞死プロセスの遅延の可能性が高い。

4.4.毒性科学・環境科学的意義について

ジラムを含むジチオカルバメート系抗菌剤は植物を真菌類から保護する農薬として 利用され(Lin et al., 2006; Berrada et al., 2010; Tsakiris et al., 2011)、近年、さらに防汚 剤としての利用が増えていることから(Voulvoulis et al., 1999; Dafforn et al., 2011)、環 境・健康に対するリスクに関心が持たれている。 Zn^{2+} はリンパ細胞の細胞内シグナル である(Hirano et al., 2008; Murakami and Hirano, 2008; Haase and Rink, 2009)。ジラム 等は細胞内 Zn^{2+} 恒常性を破綻させ、リンパ細胞に機能不全を起こさせる可能性がある。 実際、いくつかの農薬は免疫毒性を示す(Corsini et al., 2013)。ジラムについても in vitro 条件ではあるが、免疫細胞の活性を低下させている(Wilson et al., 2004)。

ジラムの環境中での毒性を考える上で、重要なポイントになるのは環境中亜鉛濃度 である。従来、環境中の金属イオン濃度を踏まえた上で化学物質の毒性が論じられる ことはなかった。亜鉛には排出基準(日本では 2 mg / L、約 30 µM)は設定されてい るが、多くの産業の排水に亜鉛は含まれている(Gakwisiri et al., 2012)。そのような排 水に汚染されている河川水中の亜鉛濃度(計算濃度)は 2.1 µM から 102.4 µM である (Sayyed and Bhosle, 2010; Ismail et al., 2013; Gomes et al., 2014)。ただ、地域により土 壌の亜鉛含有は異なり、地球化学面からの考慮も必要である。本研究で用いた ZnCl₂ 濃度は 10 µM であり、環境中には、これと同等あるいはそれ以上の濃度で亜鉛が含ま れており、ジラムの細胞毒性を増強することが懸念される。次に、環境中のジラム濃 度は米国カルフォルニア州の農場付近の地上水で 0.032 µM から 0.141 µM との報告が ある (Office of Pesticide Programs, Washington DC, USA, 2008)。本研究において 0.3 µM のジラムと 10 µM の亜鉛で胸腺細胞の細胞致死率は上昇している。ジラムは水溶 性が高いため生体内への蓄積性は大きくないと推測されるものの、野生生物でジラム が蓄積すれば、ジラムの毒性が発現する可能性は否定できない。

5. 略語集

アネキシン V:カルシウム依存性のリン脂質結合タンパク質であり、フォスファチ ジルセリン (PS) と高い親和性を示す。PS はマイナス荷電したリン脂質であり、細胞 膜の内側に局在しているものの、アアポトーシスの初期に細胞膜の外側に表出する。 この現象を利用し、アネキシン V を FITC などで標識し、PS を結合することで細胞の 細胞膜構造を調べるために用いられる。

FluoZin-3: Thermoisher 社が販売する亜鉛のインジケータである。亜鉛イオンと反応 して、蛍光発光が 50 倍に増大することから亜鉛イオンを対象にしたフローサイトメト リーや細胞の蛍光観察を容易にする。

5-CMF (5-chloromethylfluorescein): 非タンパクチオール量

ZINEB:ジネブ(N,N'-エチレンビス(ジチオカルバミン酸)亜鉛。農業用殺菌剤と して農薬として「オーセン」や「ダイファー」といった商品名で野菜や花弁のべと病 やさび病、果実の黒点病や炭疽病に利用されてきた。(引用:ウィキペディア)

THIRAM:チラム。ジチオカルバメート系の殺菌剤。ジネブ同様、農薬などの用途 で広く用いられてきた。

DTPA (Diethylene Triamine Pentaacetic Acid): アミノカルボン酸系キレート剤。五塩 基性塩であり、物理化学的性質は EDTA とよく類似している。工業的には EDTA と同 様にキレート剤として利用されている。しかしながら、EDTA は過酸化水素の安定剤 には不向きであるが、DTPA は優れた安定性を示す。

TPEN (N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridymethyl)ethylenediamine):重金属キレート剤。細胞 内カルシウム濃度の測定する際、亜鉛や鉄などの重金属イオンによって、カルシウム インジケータを標識する蛍光が消光する。この作用を防ぐ目的で TPEN を用いて重金 属をキレートする。

グルタチオン:3 種のアミノ酸からなるトリペプチドであり、抗酸化物質の1 つで ある。フリーラジカルや過酸化物といった活性酸素種から細胞を保護する。

- Berrada, H., Fernández, M., Ruiz, M. J., Moltó, J. C., Mañes, J., & Font, G., 2010. Surveillance of pesticide residues in fruits from Valencia during twenty months (2004/05). Food Control 21, 36-44.
- Berrada, H., Moltó, J., Mañes, J., Font, G., 2010. Determination of aminoglycoside and macrolide antibiotics in meat by pressurized liquid extraction and LC-ESI-MS. J. Sep. Sci. 33(4-5), 522-529.
- Bootman, M. D., Higazi D. R., Coombes S., Roder H. L., 2006. Calcium signalling during excitation-contraction coupling in mammalian atrial myocytes. J. Cell Sci. 119 (Pt 19), 3915-3925.
- Caldas, E.D., De Souza, M.V., Jardim, A.N.O., 2011. Dietary risk assessment of organophosphorus and dithiocarbamate pesticides in a total diet study at a Brazilian university restaurant. Food Add. Contam. 28, 71-79.
- Caldas, E.D., Miranda, M.C.C., Conceição, M.H., De Souza, L.C.K.R., 2004. Dithiocarbamates residues in Brazilian food and the potential risk for consumers. Food Chem. Toxicol. 42, 1877-1883.
- Caldas, E.D., Tressou, J. Boon, P.E., 2006. Dietary exposure of Brazilian consumers to dithiocarbamate pesticides—A probabilistic approach. Food Chem. Toxicol. 44, 1562-1571.
- Calviello, G., Piccioni, E., Boninsegna, A., Tedesco, B., Maggiano, N., Serini, S., Wolf, F.I., Palozza, P., 2006. DNA damage and apoptosis induction by the pesticide Mancozeb in rat cells: involvement of the oxidative mechanism. Toxicol. Appl. Pharmacol. 211, 87-96.
- Carafoli, E., 1987. Intracellular calcium homeostasis. Annu. Rev. Biochem. 56, 395-433.
- Cheung, W. Y., 1980. Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. Science 207(4426), 19-27.
- Chikahisa. L., Oyama, Y., Okazaki, E., Noda, K., 1996. Fluorescent estimation of H₂O₂-induced changes in cell viability and cellular nonprotein thiol level of dissociated rat thymocytes. Jpn. J. Pharmacol. 71, 299-305.
- Chowanadisai, W., Graham, D.M., Keen, C.L., Rucker, R.B., Messerli, M.A., 2013. Neurulation and neurite extension require the zinc transporter ZIP12 (slc39a12). Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 110, 9903-9908.
- Corsini, E., Sokooti, M., Galli, C. L., Moretto, A., Colosio, C., 2013. Pesticide induced immunotoxicity in humans: a comprehensive review of the existing evidence. Toxicol. 307, 123-135.
- Dafforn, K.A., Lewis, J.A., Johnston, E.L., 2011. Antifouling strategies: history and regulation,

ecological impacts and mitigation. Mar. Pollut. Bull. 62, 453-465.

- Domico, L.M., Cooper, K.R., Bernard, L.P., Zeevalk, G.D., 2007. Reactive oxygen species generation by the ethylene-bis-dithiocarbamate (EBDC) fungicide mancozeb and its contribution to neuronal toxicity in mesencephalic cells. Neurotoxicol. 28, 1079-1091.
- Ebashi, S. and Endo, M., 1968. Calcium ion and muscle contraction. Prog. Biophy. Mol. Biol. 18, 123-183.
- Fye, W. B., 1984. Sydney ringer, calcium, and cardiac function. Circulation 69(4), 849-53.
- Gaither, L.A., Eide, D.J., 2000. Functional expression of the human hZIP2 zinc transporter. J. Biol. Chem. 275, 5560-5564.
- Gakwisiri, C., Raut, N., Al-Saadi, A., Al-Aisri, S., Al-Ajmi, A., 2012. A critical review of removal of zinc from wastewater. Proc. World Cong. Eng. 1, 627-630.
- Gee, K.R., Zhou, Z.L., Qian, W.J., Kennedy, R., 2002. Detection and imaging of zinc secretion from pancreatic beta-cells using a new fluorescent zinc indicator. J. Am. Chem. Soc. 124, 776-778.
- Gomes, A.I., Pires, J.C., Figueiredo, S.A., Boaventura, R.A., 2014. Optimization of river water quality surveys by multivariate analysis of physicochemical, bacteriological and ecotoxicological data. Water Resour. Manag. 28, 1345-1361.
- Grosicka-Maciąg, E., Szumiło, M., Czeczot, H., Kurpios-Piec, D., Skrzycki, M., Rahden-Staroń, I., 2013. Modulation of antioxidant defense system by the dithiocarbamate fungicides Maneb and Zineb in Chinese hamster V79 cells and the role of N-acetyl-L-cysteine. Food Chem. Toxicol. 60, 130-134.
- Haase, H., Rink, L., 2009. Functional significance of zinc-related signaling pathways in immune cells. Ann. Rev. Nutri. 29, 133-152.
- Han, S.M., Shin, K.J., Kim, Y.H., Kim, S.H., Lee, T., Kim, E., Ryu, S.H., Suh, P.G., 2003. Thiram and ziram stimulate non-selective cation channel and induce apoptosis in PC12 cells. Neurotoxicol. 24, 425-434.
- Hirano, T., Murakami, M., Fukada, T., Nishida, K., Yamasaki, S., Suzuki, T., 2008. Roles of zinc and zinc signaling in immunity: zinc as an intracellular signaling molecule. Adva. Immunol. 97, 149-176.
- Iino, M., 2010. Spatiotemporal dynamics of Ca2+ signaling and its physiological roles. Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci. 86(3), 244-256.
- Ismail, Z., Salim, K., Othman, S.Z., Ramli, A.H., Shirazi, S.M., Karim, R., Khoo, S.Y., 2013. Determining and comparing the levels of heavy metal concentrations in two selected urban river water. Measurement 46, 4135-4144.

- Jeong, J., Eide, D.J., 2013. The SLC39 family of zinc transporters. Molec. Asp. Med. 34, 612-619.
- Jin, J., Lao, A.J., Katsura, M., Caputo, A., Schweizer, F.E., Sokolow, S., 2014. Involvement of the sodium–calcium exchanger 3 (NCX3) in ziram-induced calcium dysregulation and toxicity. NeuroToxicol. 45, 56-66.
- Kakiuchi, S., Yamazaki, R., 1970. Calcium dependent phosphodiesterase activity and its activating factor (PAF) from brain studies on cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase (3). Biochem. Biophys. Res Commun. 41(5), 1104-1110.
- Kao, J.P., Harootunian, A.T., Tsien, R.Y., 1989. Photochemically generated cytosolic calcium pulses and their detection by fluo-3. J. Biol. Chem. 264, 8179-8184.
- Kinazaki, A., Chen, H., Koizumi, K., Kawanai, T., Oyama, T. M., Satoh, M., Ishida, S., Okano, Y., & Oyama, Y., 2011. Putative role of intracellular Zn²⁺ release during oxidative stress: a trigger to restore cellular thiol content that is decreased by oxidative stress. J. Physiol. Sci. 61, 403-409.
- Koopman, G., Reutelingsperger, C.P., Kuijten, G.A., Keehnen, R.M., Pals, S.T., van Oers, M.H., 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. Blood. 84, 1415-1420.
- Lin, M.T., Beal, M.F., 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. Nature 443, 787-795.
- Lozowicka, B., 2015. Health risk for children and adults consuming apples with pesticide residue. Sci. Total Environ. 502, 184-198.
- López-Fernández, O., Rial-Otero, R., González-Barreiro, C., Simal-Gándara, J., 2012 Surveillance of fungicidal dithiocarbamate residues in fruits and vegetables. Food Chem. 134, 366-374.
- Maret, W., 1994. Oxidative metal release from metallothionein via zinc-thiol/disulfide interchange. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 91, 237-241.
- Matei, A.M., Trombetta, L.D., 2013. Exposure of rat hippocampal astrocytes to Ziram increases oxidative stress. Toxicol. Ind. Health. 5, 0748233713504809.
- Matsui, H., Oyama, T.M., Okano, Y., Hashimoto, E., Kawanai, T., & Oyama, Y., 2010. Low micromolar zinc exerts cytotoxic action under H₂O₂-induced oxidative stress: Excessive increase in intracellular Zn²⁺ concentration. Toxicol. 276, 27-32.
- McConkey, D.J., Orrenius, S., 1996. The role of calcium in the regulation of apoptosis. J. Leuko. Biol. 59, 775-783.
- Murakami, M., Hirano, T., 2008. Intracellular zinc homeostasis and zinc signaling. Cancer Sci. 99, 1515-1522.

- Okazaki, E., Chikahisa, L., Kanemaru, K., Oyama, Y., 1996. Flow cytometric analysis of the H2O2 induced increase in intracellular Ca2+ concentration of rat thymocytes. Jpn. J. Pharmacol. 71, 273-280.
- Okazaki, E., Oyama, Y., Chikahisa, L., Nagano, T., Katayama, N., Sakamoto, M., 1997. Fluorescent estimation on cytotoxicity of methylmercury in dissociated rat cerebellar neurons: its comparison with ionomycin. Environ. Toxicol. Pharmacol. 3(4), 237-244.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., Nicotera, P., 2003. Calcium: Regulation of cell death: the calcium–apoptosis link. Nature Rev. Molec. Cell Biol. 4, 552-565.
- Oyama, Y., Chikahisa, L., Ueha, T., Hatakeyama, Y., Kokubun, T., 1995. Change in membrane permeability induced by amyloid beta-protein fragment 25-35 in brain neurons dissociated from rats. Jpn. J. Pharmacol. 68 (1), 77-83.
- Oyama, T. M., Oyama, T. B., Oyama, K., Matsui, H., Horimoto, K., Nishimura, Y., Oyama, Y., 2006. Clotrimazole, an antifungal drug possessing diverse actions, increases the vulnerability to cadmium in lymphocytes dissociated from rat thymus. Toxicology 228(2-3), 269-179.
- Oyama, T. M., Oyama, T. B., Oyama, K., Sakanashi, Y., Morimoto, M., Matsui, H., Oyama, Y., 2007. Clotrimazole, an antifungal drug possessing diverse actions, increases membrane permeation of cadmium in rat thymocytes. Toxicol In Vitro 21(8), 1505-1512.
- Oyama, T.M., Saito, M., Yonezawa, T., Okano, Y., Oyama, Y., 2012. Nanomolar concentrations of zinc pyrithione increase cell susceptibility to oxidative stress induced by hydrogen peroxide in rat thymocytes. Chemosphere. 87, 1316-1322.
- Parekh, A. B. and Penner, R., 1997. Store depletion and calcium influx. Physiol. Rev. 77(4), 901-930.
- Pinilla-Tenas, J.J., Sparkman, B.K., Shawki, A., Illing, A.C., Mitchell, C.J., Zhao, N., Liuzzi, J.P., Cousins, R.J., Knutson, M.D., Mackenzie, B., 2011. Zip14 is a complex broad-scope metal-ion transporter whose functional properties support roles in the cellular uptake of zinc and nontransferrin-bound iron. Amer. J. Physiol.-Cell Physiol. 301, C862-C871.
- Prasad, A.S., 2009. Zinc: role in immunity, oxidative stress and chronic inflammation. Curr. Opi. Clini. Nutri. Metabo. Care 12, 646-652.
- Quaglino, D. and Ronchetti, I. P., 2001. Cell death in the rat thymus: a minireview. Apoptosis 6(5), 389-401.
- Roggero, E., Pérez, A. R., Tamae-Kakazu, M., Piazzon, I., Nepomnaschy, I., Besedovsky, H. O., Bottassio, O. A., del Rey, A., 2006, Endogenous glucocorticoids cause thymus atrophy but are protective during acute Trypanosoma cruzi infection. J. Endocrinol. 190(2), 495-503.
- Salgueiro, M. J., Zubillaga, M., Lysionek, A., Sarabia, M. I., Caro, R., De Paoli, T., Hager, A.,

Eng R.W., Boccio, J.B., 2000. Zinc as an essential micronutrient: a review. Nutri. Res. 20, 737-755.

- Sakanashi, Y., Oyama, T.M., Matsuo, Y., Oyama, T.B., Nishimura, Y., Ishida, S., Imai, S., Okano, Y., Oyama, Y., 2009. Zn²⁺, derived from cell preparation, partly attenuates Ca²⁺dependent cell death induced by A23187, calcium ionophore, in rat thymocytes. Toxicol. In Vitro 23, 338-345.
- Sayyed, J.A., Bhosle, A.B., 2010. The study of zinc metal concentration by spectrophotometric method from Godavari River at Nanded, Maharashatra. Der Chemica Sinica J. (Pelagia Res. Library) 1, 104-109.
- Schanne, F. A., Kane, A. B., Young E. E., Farber, J. L., 1979. Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. 206(4419), 700-702.
- Sensi, S. L., Paoletti, P., Koh, J.Y., Aizenman, E., Bush, A.L., Hershfinkel, M., 2011. The neurophysiology and pathology of brain zinc. J. Neurosci. 31, 16076-16085.
- Shanley, D. P., Aw, D., Manley, N. R., Palmer, D. B., 2009. An evolutionary perspective on the mechanisms of immunosenescence. Trends Immunol, 30(7), 374-381.
- Smani, T., Zakharov, S. I., Csutora P., Leno, E., Trepakova, E. S., Bolotina, V. M., 2004. A novel mechanism for the store-operated calcium influx pathway. Nat. Cell Biol. 6(2), 113-120.
- Snoeij, N. J., Penninks, A. H., Seinen, W., 1988. Dibutyltin and tributyltin compounds induce thymus atrophy in rats due to a selective action on thymic lymphoblasts. Int. J. Immunopharmacol. 10, 891-899.
- Tsakiris, I.N., Toutoudaki, M., Kokkinakis, M., Paraskevi, M., Tsatsakis, A.M., 2011. A risk assessment study of Greek population dietary chronic exposure to pesticide residues in fruits, vegetables and olive oil. Pesticides-formulations, effects, fate. Stoytcheva, M. (Ed.). InTech. 253-268.
- Voulvoulis, N., Scrimshaw, M.D., Lester, J.N., 1999. Alternative antifouling biocides. Appl. Organomet. Chem. 13, 135-143.
- Yang, Y. and Ashwell, J. D., 1999. Thymocyte apoptosis. J. Clin. Immunol. 19(6), 337-349.
- Yakoob, M.Y., Theodoratou, E., Jabeen, A., Imdad, A., Eisele, T.P., Ferguson, J., Jhass, A., Rudan, I., Bhutta, Z.A., 2011. Preventive zinc supplementation in developing countries: impact on mortality and morbidity due to diarrhea, pneumonia and malaria. BMC Public Health 11, S23.
- Wilson, S., Dzon, L., Reed, A., Pruitt, M., Whalen, M.M., 2004. Effects of in vitro exposure to low levels of organotin and carbamate pesticides on human natural killer cell cytotoxic function. Environ. Toxicol. 19, 554-563.

Wu, W., Bromberg, P.A., Samet, J.M., 2013. Zinc ions as effectors of environmental oxidative lung injury. Free Radic. Biol. Med. 65, 57-69.

7. 謝辞

本研究に際し、御指導、御鞭撻を賜りました九州大学大学院・薬学研究院・病態 生理学講座・野田百美 准教授に謹んで感謝の意を表します。

副査としてご助言を戴くとともに、本論文の細部にわたりご指導を賜りました九 州大学大学院・薬学研究院・細胞生物薬学講座・田中嘉孝 教授、九州大学大学 院・薬学研究院・分子衛生薬学講座・石井祐次 准教授、並びに九州大学大学院・ 薬学研究院・臨床育薬学講座・島添隆雄 准教授に深く感謝いたします。

また、本論文作成に際し、御指導、御助言を賜りました、徳島大学総合科学部・ 小山保夫教授、北里大学医療衛生学部・石橋仁教授に対し深く感謝いたします。

本論文作成の研究に際しまして、御助言、御協力を賜りました医療法人相生会に しくまもと病院臨床薬理センター博士・小山知博 先生、地方独立行政法人堺市立 病院機構 堺市立総合医療センター外科統括部医師・小山啓介 先生に対し、深く 感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、多大な御協力頂きましたバイエル薬品株式会社の皆様に、心から感謝いたします。

最後に、研究生活を多大なる理解と精神的に支えてくれた両親と、本論文作成に 際し、多大な協力をしてくれた、夫である名古屋大学大学院医学系研究科 医学 部医学科 細胞化学 統合生理学 片岡直也 助教に心より感謝いたします。