

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
 Zn^{2+} 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

本学位論文は下記の公刊原著論文から構成されている。

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.

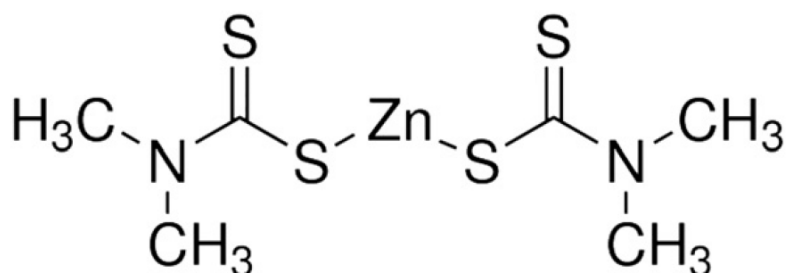
目次

論文抄録	5
1. 緒言	8
2. 実験方法	10
2. 1. 細胞標本	10
2. 2. 試薬	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. 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 H_2O_2 細胞毒性の抑制	36
3. 3. 2.	H_2O_2 による細胞死プロセスへのジラムの影響	37
3. 3. 3.	H_2O_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.	H_2O_2 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_2O_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_2O_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.	考察	44
4. 1.	ジラムによる細胞内 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.	毒性科学・環境科学的意義について	46
5.	略語集	47
6.	引用文献	48
7.	謝辞	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 Zn^{2+} 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 Zn^{2+} 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 Zn^{2+} 恒常性が破綻して細胞死に繋がる可能性が予想される。本研究ではまず、(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 Zn^{2+} 動態に対する影響を精査した。また、 Zn^{2+} はいわゆる Ca^{2+} 感受性蛍光プローブの蛍光増

強（見かけ上は細胞内 Ca^{2+} 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 Zn^{2+} 濃度がジラムの細胞毒性に与える影響を調べ、 Zn^{2+} 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） Zn^{2+} 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 Zn^{2+} が関わることにより複雑になる可能性が高い。そこで、 H_2O_2 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 Zn^{2+} 濃度変化、細胞内 Ca^{2+} 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 Zn^{2+} 濃度の上昇を起こした。ジラムによる細胞内 Zn^{2+} 濃度の上昇は外液 Zn^{2+} 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 Zn^{2+} 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 Zn^{2+} 除去で遅延し、 ZnCl_2 添加により促進した。ジラムによる細胞死は細胞内 Zn^{2+} 濃度と正の相関を示した。ジラムによる細胞内 Zn^{2+} 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、 Zn^{2+} 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、 Zn^{2+} は抗酸化性元素として知られており、 ZnCl_2 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 ZnCl_2 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 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 H_2O_2 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 H_2O_2 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。 Zn^{2+} はリンパ細胞の細胞内シグナルであり、 Zn^{2+} を含むジラム等は細胞内 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 Zn^{2+} 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。

1. 緒言

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+} 恒常性の破綻は細胞の質的变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、 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 CdCl_2) 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 による細胞膜の Cd^{2+} 透過性亢進によるものと推定した。ここから周期律表で Cd^{2+} と同じカテゴリーに入り生体内にある金属イオンの Zn^{2+} 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 ZnCl_2 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、 H_2O_2 の細胞毒性と Zn^{2+} の関係も注目され、マイクロモル濃度 ZnCl_2 の添加が H_2O_2 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、 Zn^{2+} 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 Zn^{2+} 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 Zn^{2+} 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 Zn^{2+} 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 Zn^{2+} 透過性が亢進する可能性もある (Matsui et al., 2010)。よって、細胞内 Zn^{2+} 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 Zn^{2+} 動態に対する影響を精査した。加えて、 Zn^{2+} はいわゆる Ca^{2+} 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、 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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 Zn^{2+} 濃度がジラムの細胞毒性に与える影響を調べ、 Zn^{2+} 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 Zn^{2+} 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 Zn^{2+} の作用との関係から複雑になる可能性が高い。そこで、(3) H_2O_2 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. 実験方法

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。



化学物質の細胞毒性
in vitro 実験

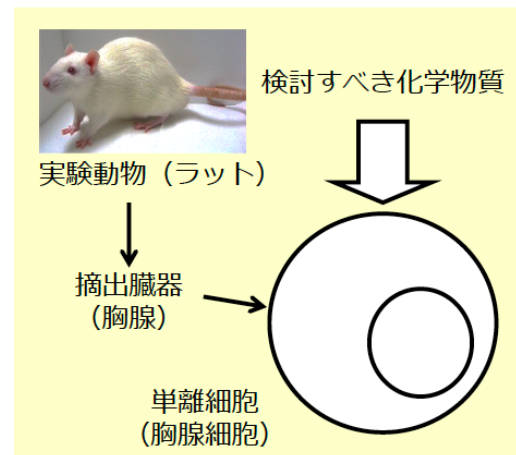


図2：浮遊細胞の解析準備方法

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1mm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50µm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°C 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 Cl⁻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。

Table 2. Fluorescent probes

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-Dichlorofluorescein 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 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

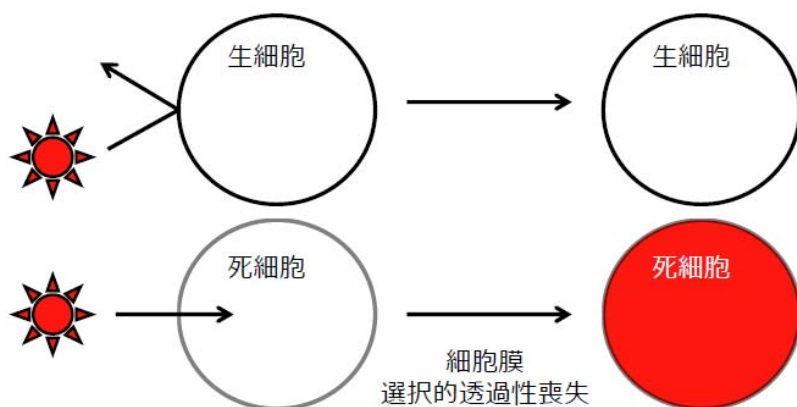
化学物質の細胞毒性を簡便かつ迅速に評価するためには、化学物質の細胞に対する何からの影響を容易に捉えることが可能な生理的、病理的指標の設定が必要である。本研究では細胞生死判別以外に、生細胞の細胞内 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 濃度、細胞内酸化還元状態の指標として細胞内グルタチオン量（非タンパク質性チオール量）および活性酸素種活性（ H_2O_2 とスーパーオキシドアニオン）、さらに従来の細胞の生死判別（live or

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 Zn^{2+} 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 -



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

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

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。

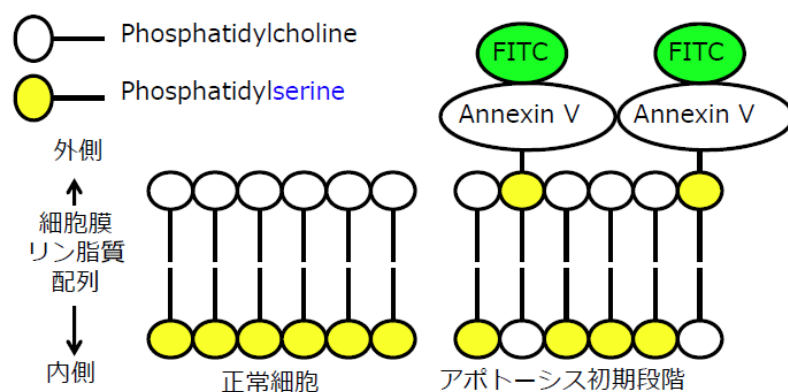


図4：細胞死プロセスにおける細胞膜リン脂質の状態変化

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ため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 Ca²⁺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 Ca²⁺と Zn²⁺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 Ca²⁺をキレートする。この際の蛍光強度変化が細胞内 Ca²⁺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 -

蛍光プローブ名 : FluoZin-3-AM (Molecular Probes)

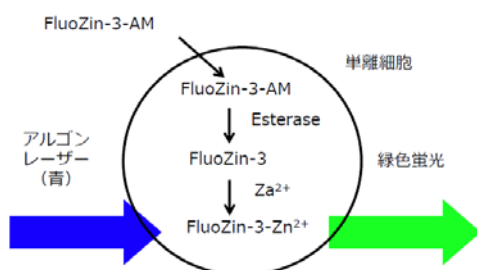


図 5 : フローサイトメーターによる細胞内 Zn²⁺濃度測定

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)

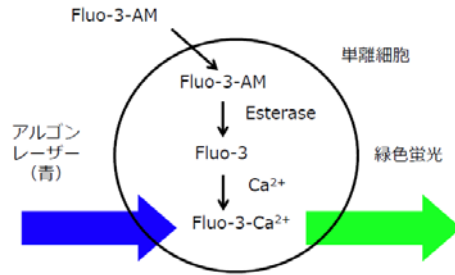


図 6 : フローサイトメーターによる細胞内 Ca²⁺ 濃度測定

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

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

蛍光プローブ名 : 5-Chloromethylfluorescein diacetate (5-CMF-DA、Molecular Probes)

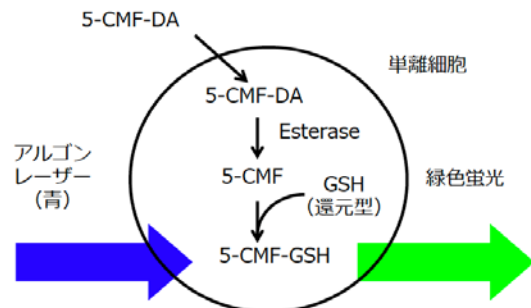


図 7 : フローサイトメーターによる細胞内グルタチオン量の計測測定

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^- 産生増大を意味する。実験では DMSO に溶解させた dihydroethidium を 10 μM 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膜を透過し、細胞内の esterase により CM-H₂DCF になる。これは H_2O_2 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、 H_2O_2 の産生が多いということになる。実験では細胞に 10 μM 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)

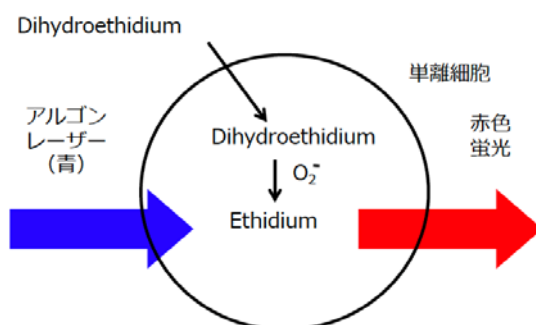


図 8 : フローサイトメーターによるスーパーオキシドアニオンの検出

3. 実験結果

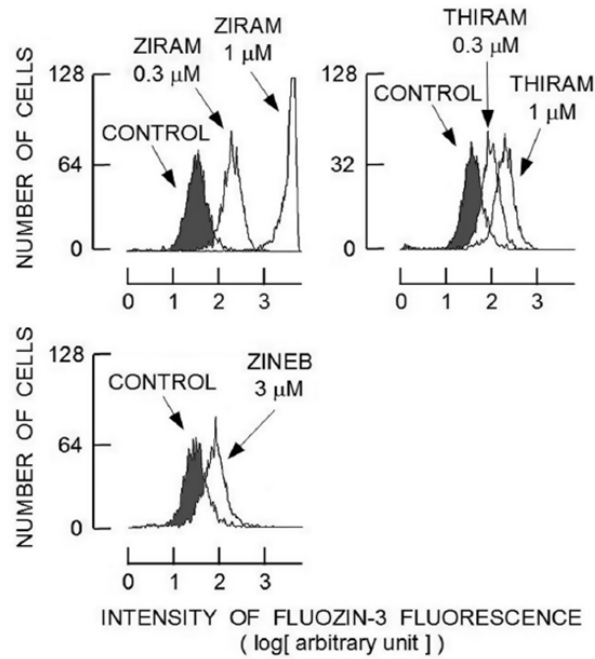
3. 1. ジラムによる細胞内 Zn^{2+} 濃度の上昇 (原著論文1)

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 9 A に示すように、ジラム (0.3-1 μM)、チラム (0.3-1 μM) およびジネブ (3 μM) 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 Zn^{2+} 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 9 B 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 μM 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 μM 以上で、ジネブでは 1 μM 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。

(A)



(B)

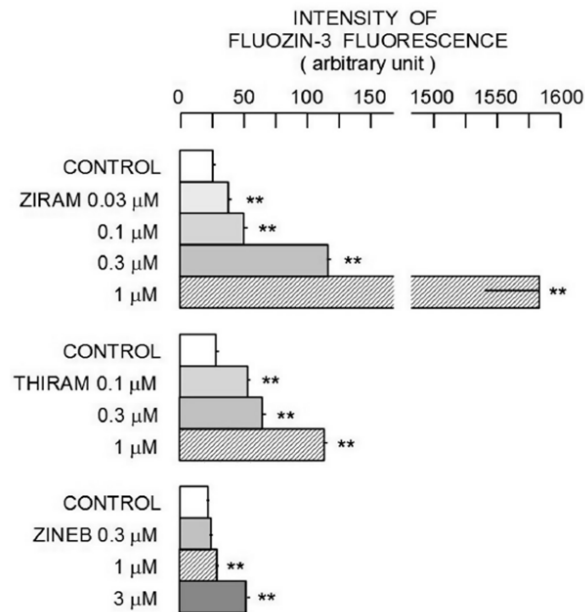


図 9 : ジチオカルバメート殺菌剤による FluoZin-3 蛍光の変化 (A) ジラム、チラム、およびジネブによって誘導された FluoZin-3 蛍光の変化。各ヒストグラムは 2000 細胞で構成している。殺菌剤の効果を薬物添加の 30 分後に検討した。(B) 0.03~1 μM のジラム、0.1~1 μM のチラム、および 0.3~3 μM のジネブを用いた FluoZin-3 蛍光の平均強度の変化。これらの効果は薬物添加の 30 分後に検討した。棒グラフおよびエラーバーは、それぞれ 4 つのサンプルの平均値および標準偏差を示す。(**) は対照群と薬物添加群との有意差 (P < 0.01)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

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 μM 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 μM) 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。

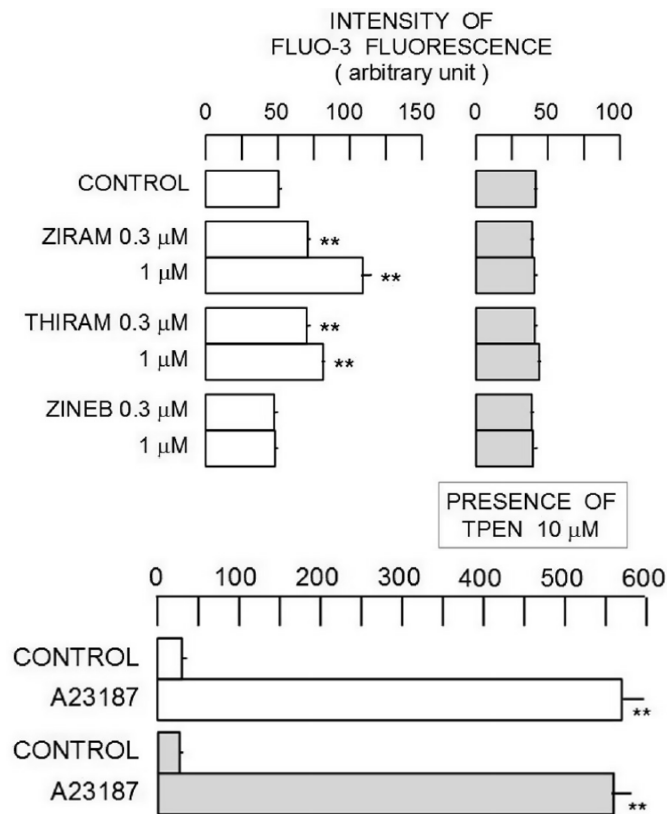


図 10 : 10 μM TPEN の非存在下または存在下でのジチオカルバメート殺抗真菌剤 (上段パネル) および A23187 (下段パネル) による Fluo-3 蛍光の平均強度の変化を示す。それらの効果を適用後 30 分で検討を行った。棒グラフおよびエラーバーは、それぞれ 4 つのサンプルの平均値および標準偏差を示す。(**) は対照群と薬物添加群との有意差 ($P < 0.01$) を示す

3. 1. 3. ジラムによる FluoZin-3 蛍光強度上昇に対する $ZnCl_2$ と Zn^{2+} キレート剤の影響

ジラムによる細胞内 Zn^{2+} 濃度上昇に関する Zn^{2+} の由来を検討する目的で、細胞外液に $3 \mu M$ $ZnCl_2$ (細胞外 Zn^{2+} 濃度上昇)、細胞膜不透過性 Zn^{2+} キレート剤 DTPA ($10 \mu M$) 及び細胞膜透過性 Zn^{2+} キレート剤 TPEN ($10 \mu M$) をそれぞれ添加して、ジラムの作用を検証した。図 1 1 に示すように、 $ZnCl_2$ 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 Zn^{2+} 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 Zn^{2+} 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 Zn^{2+} 濃度の上昇は細胞外 Zn^{2+} に依存していること (細胞外からの Zn^{2+} 流入) が明らかになった。

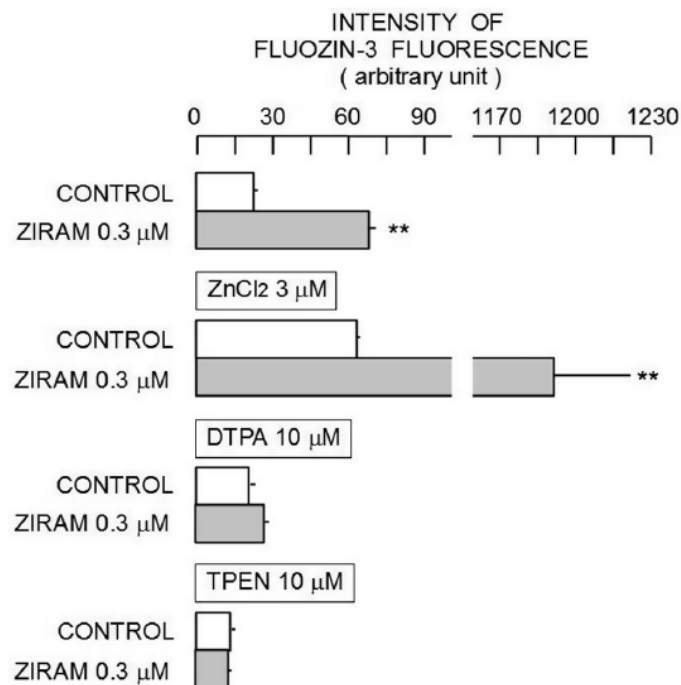
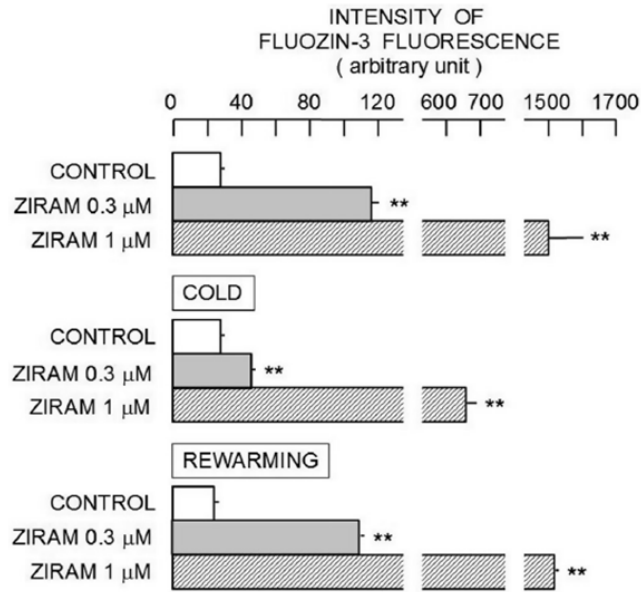


図 1 1 : $ZnCl_2$ および Zn^{2+} キレート剤存在下でのジラムによる FluoZin-3 蛍光の平均強度の変化を示す。細胞を、 $3 \mu M$ の $ZnCl_2$ 、 $10 \mu M$ の DTPA、または $10 \mu M$ の TPEN で 10 分間処理した後、 $0.3 \mu M$ のジラムを添加した。効果は、ジラム添加の 30 分後に検討を行った。棒グラフおよびエラーバーは、それぞれ 4 つのサンプルの平均値および標準偏差を示す。(**) は対照群と薬物添加群との有意差 ($P < 0.01$) を示す

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°C の低温条件ではジラム (0.3-1 μM) による FluoZin-3 蛍光強度の増強は著明に減弱した (図 1 2)。これらを摂氏 36-37°C 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。

(A)



(B)

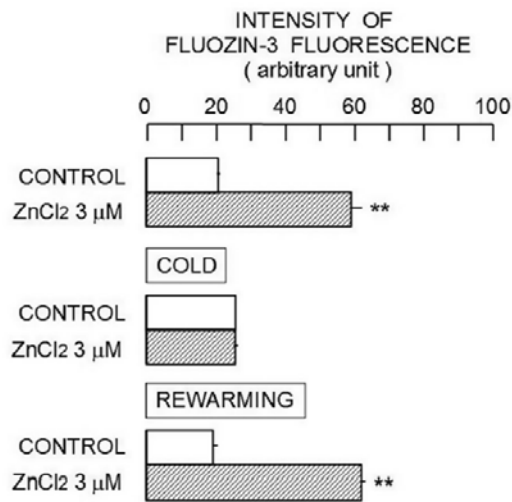
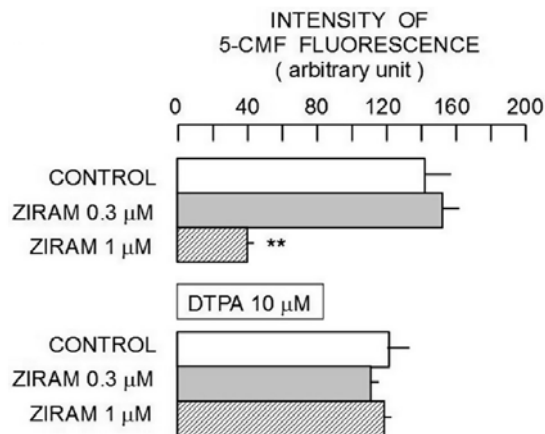


図 12 : 低温条件下でのジラムおよび ZnCl₂ の効果 (A) 低温条件下で 0.3-1 μ M のジラムにより増強された FluoZin-3 蛍光の平均強度の変化を示す。これらの薬物効果は、ジラム添加後の 30 分で検討を行った。(B) 低温条件下での FluoZin-3 蛍光の平均強度の 3 μ M ZnCl₂ による変化を示す。この効果は、ZnCl₂ 添加の 30 分後に検討を行った。低温条件の場合、細胞浮遊液を氷水浴中で 10 分間インキュベートしてから、ジラムまたは ZnCl₂ の添加を行った。棒グラフおよびエラーバーは、それぞれ 4 つのサンプルの平均値および標準偏差を示す。(**)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

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 μM のジラムの 1 時間処理で 5CMF 蛍光は、図 1 3 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 1 3)。

(A)



(B)

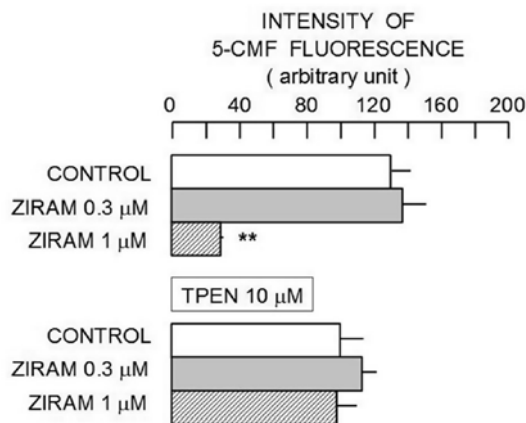
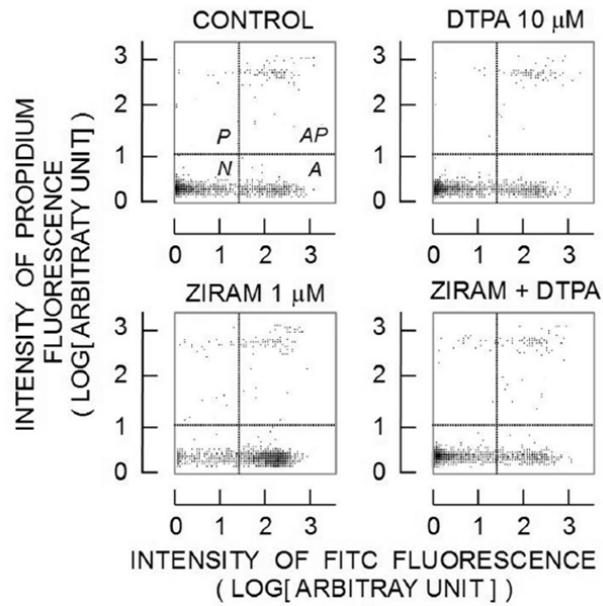


図 1 3 : Zn^{2+} キレート剤の効果 (A) 10 μM DTPA の非存在下または存在下、0.3-1 μM ジラムによる 5CMF 蛍光の平均強度の変化。 (B) 10 μM TPEN の非存在下または存在下、0.3-1 μM ジラムによる 5CMF 蛍光の平均強度の変化。ジラム添加の 10 分前に DTPA または TPEN を細胞浮遊液に加えた。その効果は、ジラム添加の 60 分後に検討を行った。棒グラフおよびエラーバーは、それぞれ 4 つのサンプルの平均値および標準偏差を示す。(**) は、対照群と薬物投与群との有意差 ($P < 0.01$) を示す。

3. 1. 6. アネキシンV陽性生細胞のジラムによる増加の Zn^{2+} 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 μM) および Zn^{2+} キレート剤 DTPA (10 μM) の効果をアネキシンV-FITCを用いて検証した。図6に示すように 1 μM 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 μM 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。

(A)



(B)

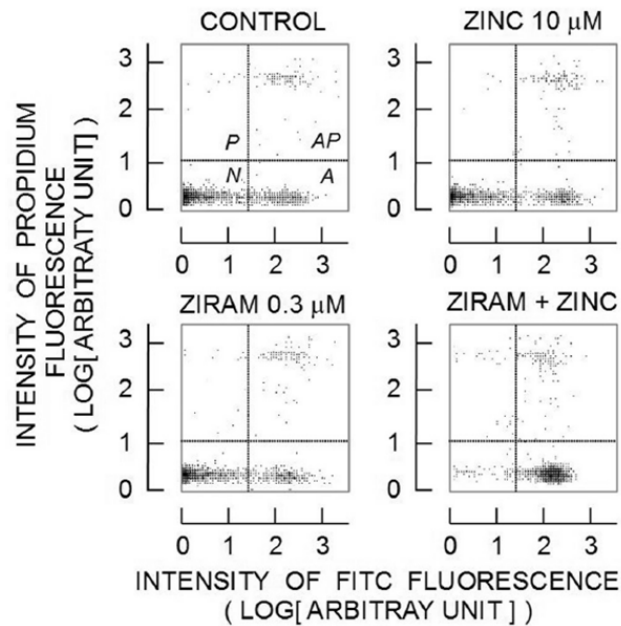


図 14 : アネキシン V-FITC およびヨウ化プロピジウムによって分類される細胞集団のジラム、 ZnCl_2 、DTPA とこれらの組み合わせによる変化 (A) 1 μ M の OIT、10 μ M の DTPA、およびそれらの組み合わせ (ZIRAM + DTPA) による蛍光サイトグラム (縦軸プロチウム蛍光、横軸 FITC 蛍光) の変化。これらの効果は薬物添加 1 時間後に検討した。N, A, P および AP の領域は、正常生細胞、アネキシン V 陽性生細胞、死細胞およびアネキシン V 陽性死細胞の集団をそれぞれ示す。各サイトグラムは 2000 個の細胞から構成した。(B) 0.3 μ M ジラム、10 μ M ZnCl_2 (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。

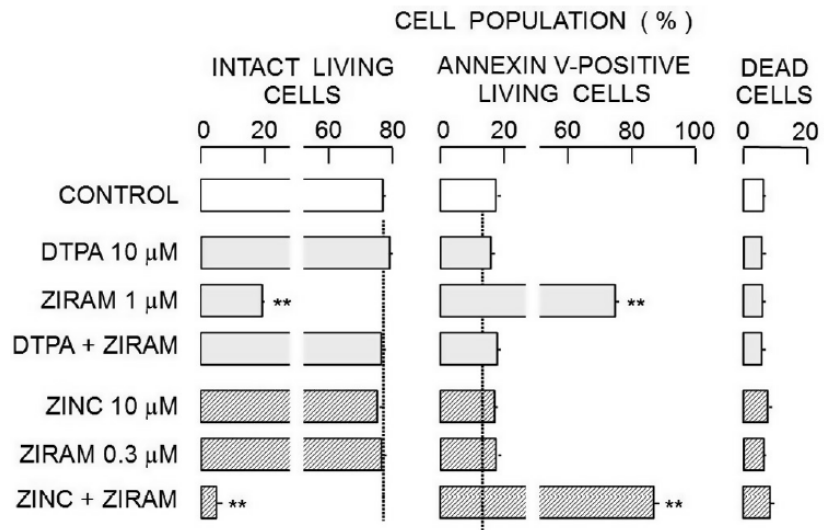


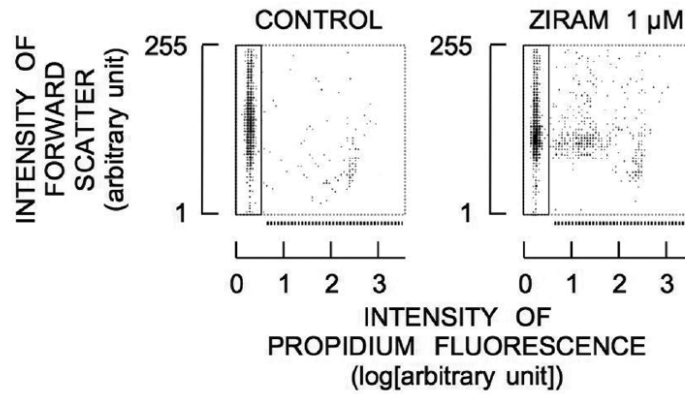
図 15 : ジラム、ZnCl₂、DTPA とそれらの組み合わせによって起こる細胞集団の割合の変化。棒グラフおよびエラーバーの値は、それぞれ4回の実験の平均および標準偏差として表した。死細胞集団は、図6に示すように、PおよびAPの領域からなっていた。(**)は、対照群と薬物投与群との有意差 (P<0.01) を示す。

3. 2. ジラムによる細胞死に決定因子としての Zn^{2+} (原著論文 2)

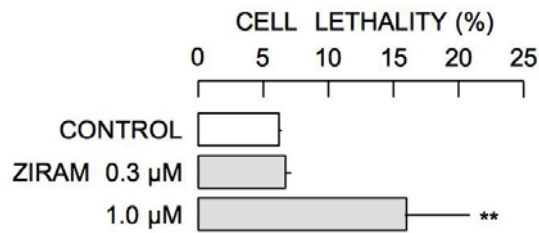
3. 2. 1. ジラムによる細胞死

ジラム (1 μM) 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 1 6)。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 μM 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 μM 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 μM 付近と考えられた。

(A)



(B)



(C)

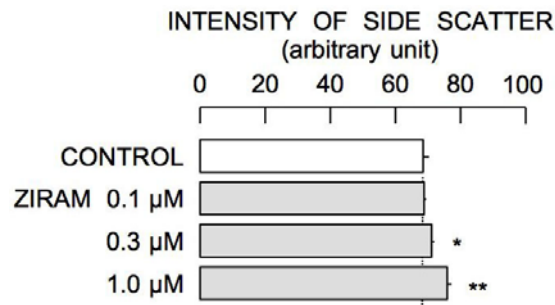


図 16 : ジラムによって誘発された細胞致死率の変化。

(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 Zn^{2+} 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 1 7 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。

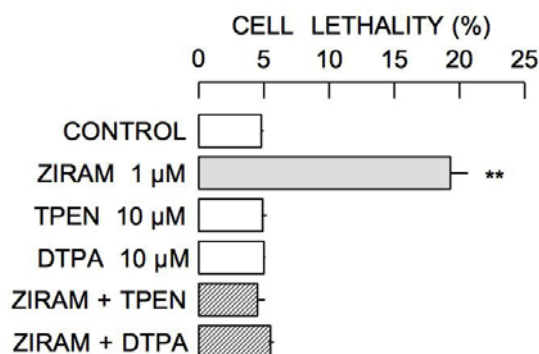
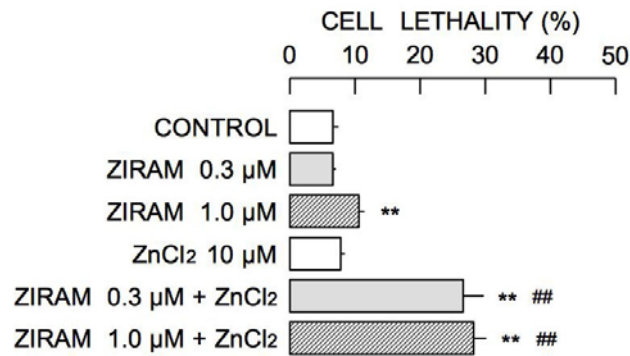


図 1 7 : ジラムの細胞毒性に及ぼす Zn^{2+} キレート剤 (DTPA および TPEN) の影響。棒グラフおよびエラーバーは、それぞれ 4 つのサンプルの平均値および標準偏差を示す。(**) は、対照群 (CONTROL) とジラムもしくはそれぞれの Zn^{2+} キレート剤またはその両方で処置した細胞群との間の有意差 ($P < 0.01$) を示す。

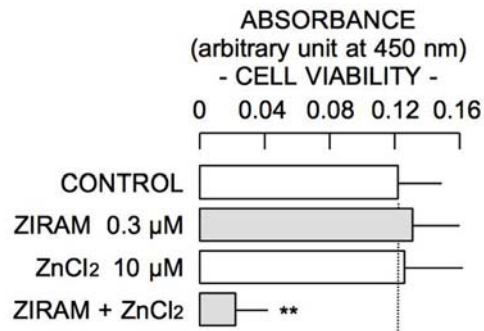
3. 2. 3. $ZnCl_2$ によるジラム細胞毒性の増強

ジラムの 0.3 μ M は細胞致死濃度以下であるが細胞内 Zn^{2+} 濃度の軽度の上昇を起こす。この濃度のジラムと $ZnCl_2$ の組み合わせは細胞内 Zn^{2+} 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 $ZnCl_2$ 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 $ZnCl_2$ 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 1 8 A)。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 Zn^{2+} 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 $ZnCl_2$ 依存性増強が確認された (図 1 8 B)。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)



(B)



(C)

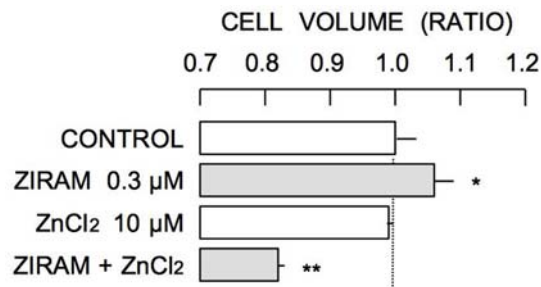


図 18 : ジラムによる細胞毒性の ZnCl_2 による変化。
棒グラフおよびエラーバーは、それぞれ 4 つのサンプルの平均値および標準偏差を示す。(**) は、対照群 (CONTROL) とジラムもしくは ZnCl_2 、またはその両方で処置した細胞群との有意差 ($P < 0.01$) を示す。(##) は、 ZnCl_2 を処理した細胞と処理していない細胞のグループ間の有意差 ($P < 0.01$) を示す。

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 Zn²⁺濃度上昇は低温（4度）処理により完全に抑制される（図 1 2）。ZnCl₂ による細胞内 Zn²⁺濃度上昇も低温で抑制される（図 1 2）。ジラム 1 μM による細胞死も、ジラム（1 μM）と ZnCl₂（10 μM）の組み合わせによる細胞死も低温により抑制された（図 1 9）。これらの結果からもジラムの細胞毒性に Zn²⁺が関与することが示唆された。

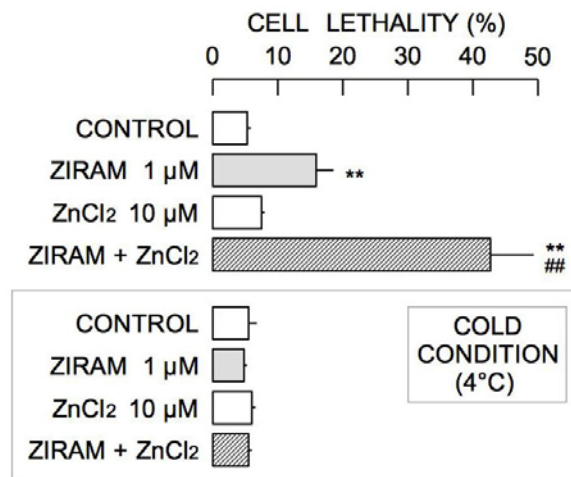


図 1 9：低温条件下でのジラムの細胞毒性。

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、 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
 細胞の ZnCl_2 処理は細胞内 Zn^{2+} 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 ZnCl_2 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 20)。ジラムと ZnCl_2 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 20)。この結果はジラムと ZnCl_2 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。

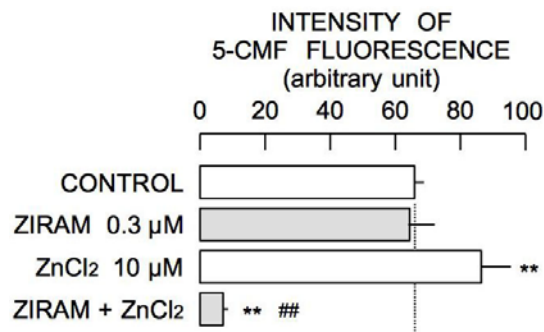


図 20 : ジラムと ZnCl_2 の単独および併用処理による 5CMF 蛍光の強度の変化。棒グラフおよびエラーバーは、それぞれ4つのサンプルの平均値および標準偏差を示す。(**) は、対照群 (CONTROL) とジラムもしくはジラムと ZnCl_2 の組み合わせで処理した細胞群との有意差 ($P < 0.01$) を示す。(##) は、ジラムと ZnCl_2 もしくは他の群と同時に処理された細胞群間の有意差 ($P < 0.01$) を示す。

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 2 1 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 2 1 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。

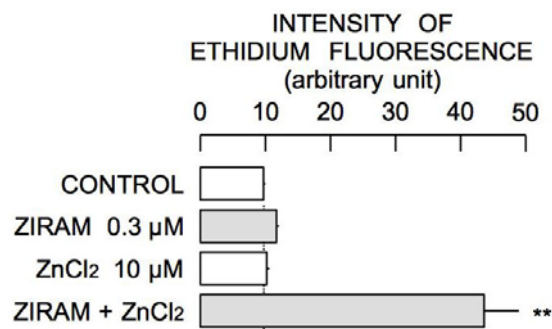


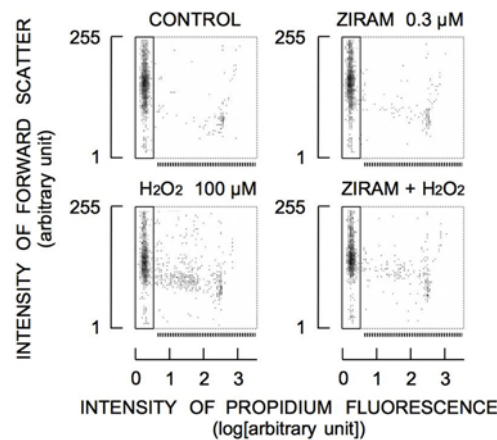
図 2 1 : ジラムと ZnCl₂ の単独および併用処理を行った際のエチジウム蛍光の強度の変化。棒グラフとエラーバーは、それぞれ 4 つのサンプルの平均値および標準偏差を示す。(**) は、対照群 (CONTROL) とジラムもしくはジラムと ZnCl₂ の組み合わせで処理した細胞群との有意差 (P < 0.01) を示す。(##) は、ジラムもしくは ZnCl₂ および他の群で同時に処置された細胞群間の有意差 (P < 0.01) を示す

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 2 2 A に示すように、100 μM 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 μM の共存で著明に抑制された。図 14B に 0.003 μM から 1 μM 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)

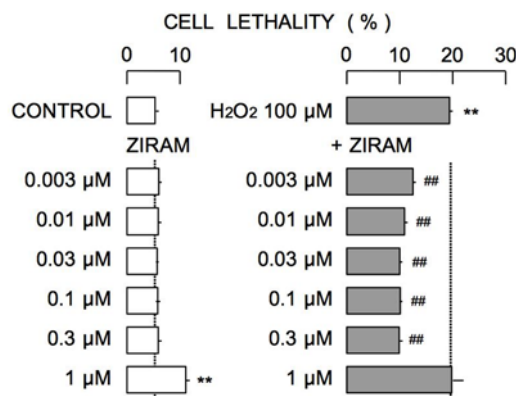
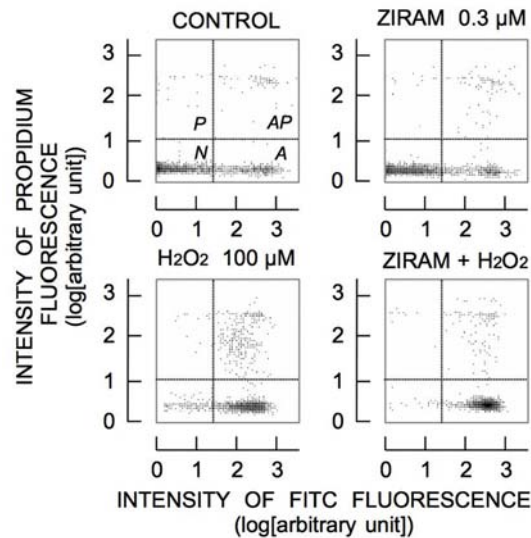


図 2 2 : ジラム、H₂O₂ の単独および併用処理による PI 蛍光を示す細胞集団の変化。これらの効果は、それぞれの処理後の 3 時間後に検討を行った。(A) ジラム、H₂O₂ そしてそれらの組み合わせによるサイトグラムの変化 (縦軸前方散乱/細胞サイズ、横軸 PI 蛍光/死細胞)。各サイトグラムは 2500 細胞で構成した。サイトグラム下部の点線は、PI 蛍光を示す細胞群を示す。(B) ジラムもしくはジラム+ H₂O₂ 処理後の細胞致死率 (PI 蛍光を示す細胞の割合)。(**) は、対照群 (対照) と薬物処理細胞との有意差 (P < 0.01) を示す。(##) は、H₂O₂ で処理した細胞と H₂O₂ 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 2 3 A に示すように、100 μM 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 μM) 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 2 3 B に結果を示す。

(A)



(B)

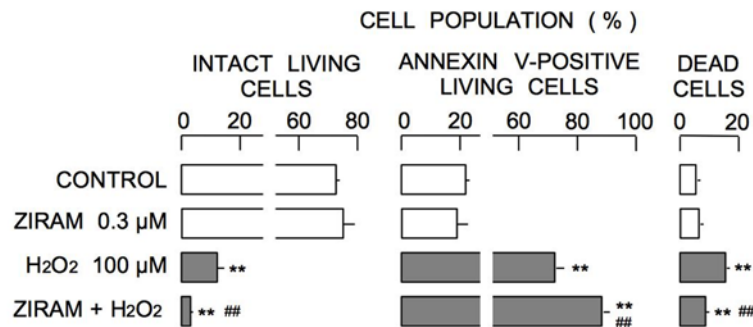
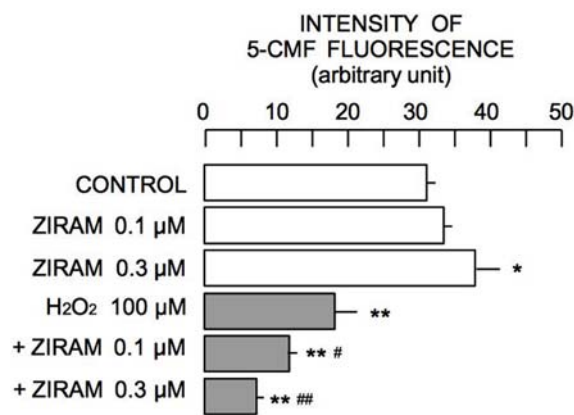


図 2 3 : ジラム、H₂O₂の単独および併用処理によるアネキシン V-FITC および PI で分類された細胞集団の変化。薬剤処理後 2.5 時間後に効果の検討を行った。(A) ジラム、H₂O₂そしてそれらの組み合わせによるサイトグラム(縦軸 PI 蛍光、横軸 FITC 蛍光)の変化。N、正常生細胞; A、アネキシン V 陽性生細胞; P、アネキシン V 陰性死細胞、および AP : アネキシン V 陽性死細胞が含まれる。各サイトグラムは 2500 細胞を含んでいた。(B) 正常生細胞(N)、アネキシン V 陽性生細胞(A)、および死細胞(P+AP)の割合の変化。値は、4つのサンプルの平均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、H₂O₂処理細胞とH₂O₂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. 3. 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 μM) の1時間処理では5CMF 蛍光強度は増強した (図2 4 A)。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 μM 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2 4 B に示した。

(A)



(B)

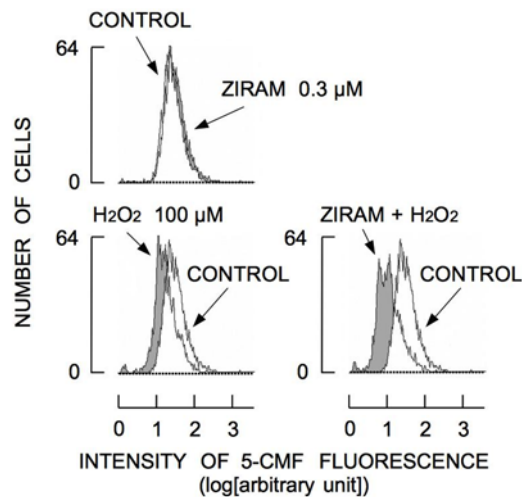
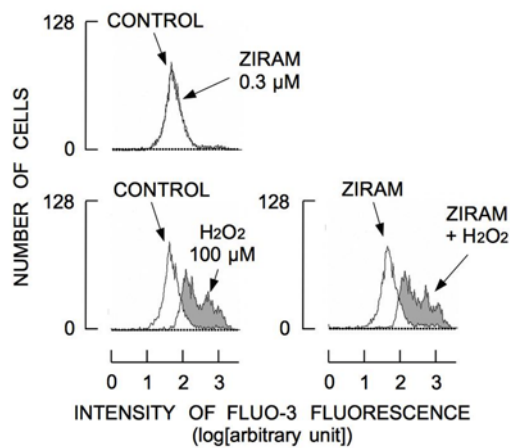


図 2 4 : ジラム、H₂O₂ の単独および併用処理した細胞の 5CMF 蛍光の変化。薬剤適用 1.5 時間後に効果を調べた。(A) それぞれの処理による 5CMF 蛍光のヒストグラムの変化。ヒストグラムは 2500 細胞で構成した。(B) ジラム、H₂O₂ としてそれらの組み合わせで処理した細胞の 5CMF 蛍光の平均強度の変化。値は、4 つのサンプルの平均強度および標準偏差を表す。(*, **) は、対照群 (対照) と薬物処理細胞との有意差 (P < 0.05, P < 0.01) を示す。(#, ##) は、H₂O₂ 処理細胞と H₂O₂ およびジラムで処理した細胞との有意差 (P < 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 H₂O₂ で処理すると細胞内 Ca²⁺濃度は上昇する (Okazaki, et al., 1996)。そして、細胞内 Ca²⁺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 H₂O₂ による細胞内 Ca²⁺濃度の上昇を抑制できるかを検討した。図 2 5 A 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 μM 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 Ca²⁺濃度にジラムは影響を与えなかった。ジラムと H₂O₂ 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ですが、H₂O₂ による Fluo-3 蛍光増強を若干強めた。つまり、ジラムは H₂O₂ による細胞内 Ca²⁺濃度の上昇を抑制しなかった。結果は図 2 5 B に示した。

(A)



(B)

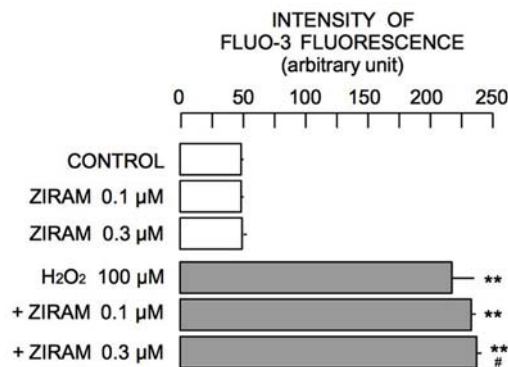
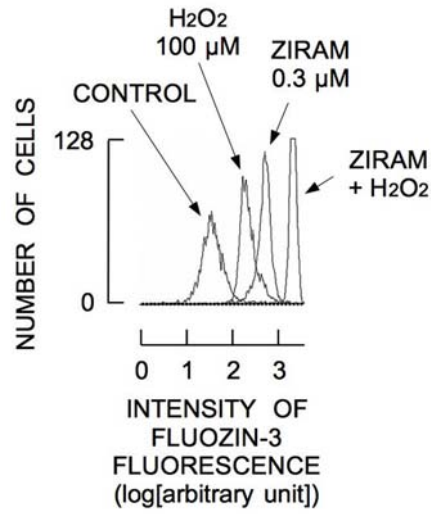


図 2 5 : ジラム、H₂O₂ の単独および併用処理した細胞の Fluo-3 蛍光の変化。薬物添加の 1 時間後に効果の検討を行った。(A) それぞれの処理による Fluo-3 蛍光の変化。ヒストグラムは 2500 細胞で構成した。(B) ジラム、H₂O₂ そしてそれらの組み合わせで処理した細胞の Fluo-3 蛍光の平均強度の変化。データは、4 つのサンプルの平均強度および標準偏差を表す。(**) は、対照群 (対照) と薬物処理細胞との有意差 (P < 0.01) を示す。記号 (#) は、H₂O₂ 処理細胞と H₂O₂ およびジラムで同時に処理した細胞との有意差 (P < 0.05) 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

H₂O₂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 1 1)。よって、H₂O₂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 2 6 A の FluoZin-3 蛍光ヒストグラムに変化に示すように、H₂O₂ (100 μM) 1 時間処理とジラム (0.3 μM) 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 2 6 A)。つまり、H₂O₂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 2 6 B に示した。

(A)



(B)

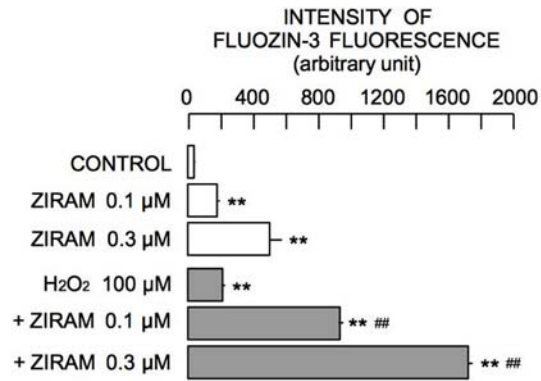


図 26 : ジラム、H₂O₂ の単独および併用処理した細胞の FluoZin-3 蛍光の変化。薬物添加の 1 時間後に効果を調べた。(A) 各処理による FluoZin-3 蛍光の変化。ヒストグラムは 2500 細胞で構成した。(B) ジラム、H₂O₂ そしてそれらの組み合わせで処理した細胞の FluoZin-3 蛍光の平均強度の変化。値は、4 つのサンプルの平均強度および標準偏差を表す。(**) は、対照群 (対照) と薬物処理細胞との有意差 (P < 0.01) を示す。(##) は、H₂O₂ 処理細胞と H₂O₂ とジラムで処理した細胞との有意差 (P < 0.01) を示す。

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

H₂O₂による細胞死には細胞内 Ca²⁺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 Ca²⁺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 2 7)。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、Ca²⁺依存性細胞死をジラムは増強することが示唆された。

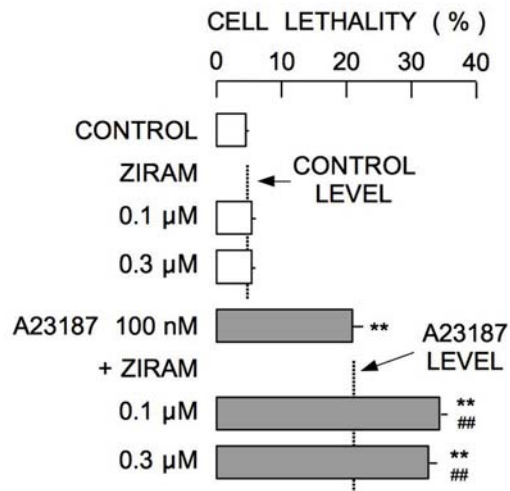


図 2 7 : ジラム、A23187 の単独および併用処理した細胞の致死率の変化。薬物添加の3 時間後に効果を検討した。値は、4 つのサンプルの平均細胞死亡率および標準偏差を表す。(**) は、対照群 (対照) と薬物処理細胞との有意差 (P < 0.01) を示す。(#、##) は、H₂O₂ 処理細胞と H₂O₂ および A 23 187 で処理した細胞との有意差 (P < 0.05、P < 0.01) を示す。

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 H₂O₂（100 μM）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 2 8 に示すように、H₂O₂ 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 H₂O₂ による蛍光強度比の変化を減少させた。つまり、H₂O₂ 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。

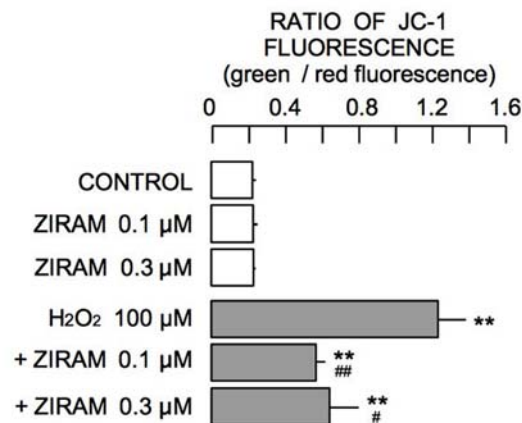


図 2 8 : ジラム、H₂O₂ の単独および併用処理した細胞における赤色 JC-1 蛍光に対する緑色 JC-1 蛍光の比の変化。薬剤添加後 2.5 時間で薬物効果の検討を行った。値は、4 つのサンプルの平均強度および標準偏差を表す。(**) は、対照群（対照）と薬物処理細胞との有意差 (P < 0.01) を示す。#、##) は、H₂O₂ で処理した細胞と H₂O₂ およびジラムで処理した細胞との有意差 (P < 0.05、P < 0.01) を示す。

4. 考察

4. 1. ジラムによる細胞内 Zn^{2+} 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 10）。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 11）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 Zn^{2+} 流入には細胞膜の Zn^{2+} 輸送体に関係している（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 Zn^{2+} 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 Zn^{2+} 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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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 蛍光強度の増加が観察されている。Fluo-3 蛍光は細胞内 Ca^{2+} 濃度の指標となるが、ジラ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はある。

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 Zn^{2+} 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 Zn^{2+} 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 Zn^{2+}

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(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 Zn^{2+} 濃度を上昇させる。ジラムは Zn^{2+} 依存性の細胞毒性が示されているが、 H_2O_2 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。 H_2O_2 による細胞死をジラムは低濃度から抑制した(図22、23)。 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 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ている(図24、26)。すなわち、 H_2O_2 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。 H_2O_2 による細胞死には Ca^{2+} 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、 H_2O_2 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 H_2O_2 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 H_2O_2 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 H_2O_2 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 28）。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 $30 \text{ }\mu\text{M}$ ）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 $2.1 \text{ }\mu\text{M}$ から $102.4 \text{ }\mu\text{M}$ 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 ZnCl_2 濃度は $10 \text{ }\mu\text{M}$ 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 $0.032 \text{ }\mu\text{M}$ から $0.141 \text{ }\mu\text{M}$ との報告がある（Office of Pesticide Programs, Washington DC, USA, 2008）。本研究において $0.3 \text{ }\mu\text{M}$ のジラムと $10 \text{ }\mu\text{M}$ 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卉のべと病やさび病、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-pyridylmethyl)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質といった活性酸素種から細胞を保護する。

6. 引用文献

- 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. Biophys. 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., Czczot, 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., Harootian, 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 Zn^{2+} 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 H_2O_2 -induced oxidative stress: Excessive increase in intracellular Zn^{2+} 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, Maharashtra. *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。