

## ジチオカルバメート系抗真菌剤ジラムのZn<sup>2+</sup>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 :

氏 名 : 片岡 裕美子

論文題名 : 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

区 分 : 乙

## 論 文 内 容 の 要 旨

$Ca^{2+}$ 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報告は少ない。以前の報告から、抗真菌剤トリクロマゾールとカドミウムの併用で細胞生存率が顕著に低下することが見いだされた。本研究ではカドミウムと同じ亜鉛族元素である亜鉛 ( $Zn^{2+}$ ) も化学物質の細胞毒性に関与するのではないかと仮説をたて、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  $Zn^{2+}$ 依存性細胞毒性の検討を行った。ジチオカルバメート系抗真菌剤は農作物を真菌感染から防御する目的で用いられるだけでなく、有機錫に替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。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、細胞内非タンパク質性チオール量 (酸化・還元の適切な維持) を減少させることが報告されている。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結合が変化する際に  $Zn^{2+}$ の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や、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 (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。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事の検討を行った。さらに、 $Zn^{2+}$ 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  $Zn^{2+}$ が関わることにより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。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。

ジラムなどのジチオカルバメート系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、

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。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ことから、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、 $H_2O_2$ 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。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は、環境・健康に対するリスクに関心が持たれている。 $Zn^{2+}$ 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。ジラムについても *in vitro* 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。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。ジラムは水溶性が高いため生体内への蓄積性はあまり大きくないと考えられる。しかしながら、野生動物の体内でジラムの生物濃縮が起こるとジラムの毒性が発現する可能性は否定できない。以上のことからジラムの  $Zn^{2+}$ 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。