

## 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 :

## 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

氏名 片岡 裕美子

### 【目的】

$Ca^{2+}$  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(1, 2)。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。Oyama らの報告から、抗真菌剤トリクロマゾールとカドミウムと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(3, 4)。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。

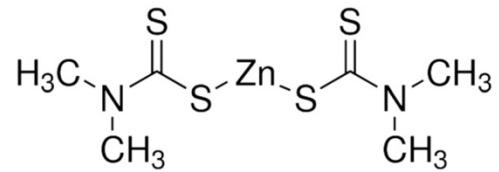


図1:ジチオカルバメート系殺菌剤ジラムの科学構

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(図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事の検討を行った。

### 【実験方法】

本研究は細胞浮遊液を短時間で簡便に取得可能なラット胸腺細胞を用いた。さらに、胸腺細胞はアポトーシス研究に多く用いられているだけでなく、幾つかの化学物質を胸腺細胞へ作用させた際に、細胞萎縮を引き起こすことなどから、化学物質による細胞動態や細胞内シグナルの解析に有効である。

化学物質による細胞毒性や細胞死などを評価するため本研究ではフローサイトメーターを用いた。フローサイトメーターを用いることで、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・分類が可能となり、浮遊細胞を蛍光プローブで標識しておくことで、各種イオン濃度、活性酸素、細胞内物質、細胞生死判別を行った。

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。

### 【結果】

ジラム(0.3-1  $\mu M$ )、チラム(0.3-1  $\mu M$ ) およびジネブ(3  $\mu M$ ) 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  $Zn^{2+}$  濃度が上昇したことを示唆する。細胞内  $Zn^{2+}$  とキレートを形成し、フローサイトメーターを用いた蛍光観察から、細胞内  $Zn^{2+}$  濃度を蛍光化学的に測定できる FluoZin-3 に対する作用強度はジラムが特に高く、次いでチラム、ジネブの順であ

った(図2)。

この結果を踏まえ、本研究で検討するジチオカルバメート農薬にはジラムを用いることとした。

ジラムなどのジチオカルバメート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

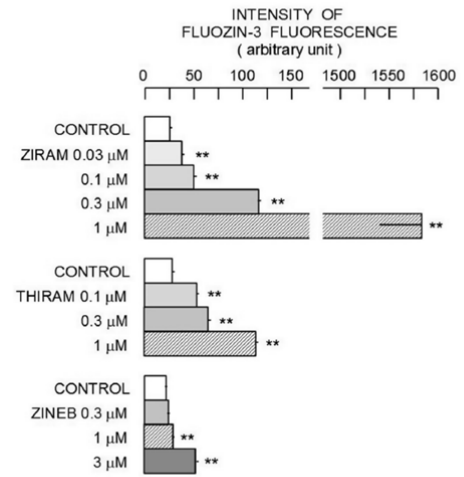


図2：ジチオカルバメート殺菌剤によるFluoZin-3 蛍光の変化

質性チオール量は増加した(図3)。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於ける  $H_2O_2$ 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。

図3：ジラムと  $ZnCl_2$ の単独および併用処理による蛍光の強度変化

図3: Bar chart showing the intensity of 5-CMF fluorescence (arbitrary unit) for CONTROL, ZIRAM 0.3 μM, ZnCl2 10 μM, and ZIRAM + ZnCl2. The x-axis ranges from 0 to 100. ZIRAM 0.3 μM and ZnCl2 10 μM show a significant increase in fluorescence intensity compared to the control, indicated by double asterisks (\*\*). The combination of ZIRAM + ZnCl2 shows a significant decrease in fluorescence intensity compared to the control, indicated by double asterisks (\*\*).

Condition	Intensity (approx.)
CONTROL	~50
ZIRAM 0.3 μM	~80
ZnCl2 10 μM	~90
ZIRAM + ZnCl2	~20

## 【考察】

<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、これらの真菌剤が細胞内  $Zn^{2+}$ 濃度の上昇を起すことが示唆された。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。細胞内への  $Zn^{2+}$ 流入には細胞膜の  $Zn^{2+}$ 輸送体 Zip2、Zip12 および Zip14 が関係しており(5, 6, 7)、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ことから、細胞内への  $Zn^{2+}$ の輸送には上記の Zn 輸送体が強く関与している事が示唆された。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することができる。

ジラムは細胞内  $Zn^{2+}$  濃度上昇を引き起こすだけではなく、細胞内非タンパク質性チオール量を減少させた。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。酸化ストレスを受けることで、ジラムが  $Zn^{2+}$  を保持出来なくなるにより、細胞内  $Zn^{2+}$  濃度上昇が引き起こされると考えられる。

#### <ジラムによる細胞死における決定因子としての $Zn^{2+}$ >

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た。以上の事からもジラムの細胞毒性には  $Zn^{2+}$  依存性が確認されたことから、ジラムによる細胞死では  $Zn^{2+}$  が決定的な因子であることが示唆された。 $ZnCl_2$  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)は増加するが、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。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非タンパク質性チオール量は有意に増加した。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。

#### <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り、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、 $H_2O_2$  による細胞死をジラムは低濃度から抑制したことから、 $H_2O_2$  による細胞毒性に対するジラムの影響は予想とは逆の作用が観察された。 $H_2O_2$  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るものの、死細胞の増加は抑制された。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ることが本研究から明らかになっていることから、ジラムの細胞保護と考えるよりも、ジラムによる細胞死プロセスの遅延の可能性が高いと考えられる。

#### <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類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(8, 9, 10)、近年、さらに防汚剤としての利用が増えていることから(11)、環境・健康に対するリスクに関心が持たれている。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、本研究からも細胞毒性を示す結果を得ており(12)、さらにいくつかの農薬は免疫毒性を示す(13)。

ジラムは構造上、 $Zn^{2+}$  をキレートしていることから、環境中における毒性を考慮する際は、環境中亜鉛濃度変化に注目する必要がある。地域によってその濃度はことなるものの、多くの産業排水に汚染されている河川水中の亜鉛濃度は  $2.1 \mu M$  から  $102.4 \mu M$  である。本研究でも用いた  $ZnCl_2$  濃度は  $10 \mu M$  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。続いて、環境中のジラム濃度を検討すると、米国カルフォルニア州の農場付近の地上水で  $0.032 \mu M$  から  $0.141 \mu M$  との報告がある(14)。本研究において  $0.3 \mu M$  のジラムと  $10 \mu M$  の亜鉛で胸腺細胞の細胞致死率は上昇していることから、環境中の  $Zn^{2+}$  濃度とジラム濃度は高い値を推移し、生物の生存に影響を及ぼす可能性がある。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。

#### 【引用文献】

1. Parekh, A. B. and Penner, R., 1997. *Physiol. Rev.* 77(4), 901-930.
2. Smani, T., et al., 2004. *Nat. Cell Biol.* 6(2), 113-120.
3. Oyama, T. M., et al., 2006. *Toxicology* 228(2-3), 269-179.
4. Oyama, T. M., et al., 2007. *Toxicol In Vitro* 21(8), 1505-1512.
5. Gaither, L.A., et al., 2000. *J. Biol. Chem.* 275, 5560-5564.
6. Pinilla-Tenas, J.J., et al., 2011. *Amer. J. Physiol.-Cell Physiol.* 301, C862-C871
7. Chowanadisai, W., et al., 2013. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 110, 9903-9908.
8. Lin, M.T., et al., 2006. *Nature* 443, 787-795.
9. Berrada, H., et al., 2010. *Food Control* 21, 36-44.
10. Tsakiris, I.N., et al., 2011. Stoytcheva, M. (Ed.). *InTech.* 253-268.
11. Dafforn, K.A., et al., 2011. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 453-465.
12. Wilson, S., et al., 2004. *Environ. Toxicol.* 19, 554-563.
13. Corsini, E., et al., 2013. *Toxicol.* 307, 123-135.
14. Office of Pesticide Programs, Washington DC, USA, 2008