

【背景】

有機リン剤は、農薬として世界中で広く使用されているが、神経剤として戦争やテロに悪用されることが大きな社会問題となっている。その一般的な毒性機序は、アセチルコリンエステラーゼ (AChE) を阻害することにより引き起こされることが知られている。しかし近年、いくつかの有機リン剤において DNA 障害ミトコンドリアの機能不全、炎症応答などの AChE 阻害を介さない毒性機序の存在が示唆・報告されている。これら有機リン剤の引き起こす多岐に渡る毒性を解明することは、有機リン中毒に対する最適な治療や予後に対処するうえで非常に重要である。本研究では、AChE 阻害を介さない毒性機序の解明を目的に、有機リン剤の一つであり、地下鉄サリン事件で使用されたサリンに注目し、当研究室にて合成したサリンと同様のリン酸基を持つ有機リン剤 bis(isopropyl methyl)phosphonate (BIMP) を用いてヒト神経芽細胞腫由来細胞株 SK-N-SH 細胞に対する毒性機序を検討した。

【研究】

SK-N-SH 細胞は DMEM に 10%FBS と 1%抗生物質を添加した培地で培養した。BIMP を暴露し細胞毒性を検討する際には薬剤の強い効果を検討するため FBS の濃度を 1%に落とした培地を用い BIMP を種々の濃度、時間で暴露し検討した。

まず、BIMP による SK-N-SH 細胞に対する細胞毒性を検討するために、光学顕微鏡による細胞の形態観察と MTT アッセイによる細胞活性、LDH アッセイによる細胞傷害性を検討した。SK-N-SH 細胞に BIMP を暴露すると細胞は形態変化や空胞形成を示し、細胞死を起し浮遊する細胞が増加した。また MTT アッセイにおいては BIMP 濃度依存的に細胞活性が低下し、LDH アッセイにおいては BIMP の濃度依存的に細胞傷害性の増加が示された。以上の結果より BIMP は SK-N-SH 細胞において細胞の形態変化を伴う細胞毒性を示すことが明らかになった。次に BIMP による細胞死のタイプを明らかにするためウェスタンブロット法を用いてアポトーシス細胞死に関係する caspase-9、caspase-3、PARP の検討を行った。BIMP は SK-N-SH 細胞に対し濃度依存的に caspase-9、caspase-3 の切断を誘導し、caspase-3 の標的のひとつである PARP の切断を増加させ、時間依存的に caspase-3 の切断を誘導した。以上の結果より BIMP はアポトーシス細胞死を誘導することが明らかになった。また、caspase-9 の切断を介するアポトーシス細胞死はミトコンドリア経路であることが知られることから、BIMP の暴露によりミトコンドリアの機能不全を引き起こしてアポトーシス細胞死を誘導することが示唆された。

さらに、近年有機リン剤による炎症応答においてその発現上昇が報告されている COX に注目し、BIMP 暴露による COX の発現をウェスタンブロット法を用いて検討した。その結果、BIMP は SK-N-SH 細胞に対して、時間依存的に COX-2 の発現を上昇させたが、COX-1 には影響を与えなかった。以上より BIMP は COX-2 の発現上昇を伴う炎症反応を示すことが示唆された。また、非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)の中で非選択的 COX 阻害剤である ibuprofen で処置することで BIMP による毒性が減弱されることが認められた。ibuprofen は BIMP による細胞活性の減少を抑制し、さらに、caspase-3 の切断を抑制した。また興味深いことに、ibuprofen は BIMP による COX-2 の発現上昇も抑制することが観察された。ibuprofen は通常 COX の酵素活性を阻害することで PGs の合成を抑制することで知られる。しかし近年の研究において ibuprofen は COX の活性阻害以外にも神経系の保護作用が示唆されている。本検討においても ibuprofen のもつ神経保護作用が BIMP の毒性を減弱させたのではないかと推察される。以上の結果より、SK-N-SH 細胞に対し

BIMPを暴露することで引き起こされる細胞死と炎症反応はNSAIDsであるibuprofenにより抑制できることが示唆された。

【結語】

本研究では、BIMPはSK-N-SH細胞におけるミトコンドリアの機能障害を誘導し、アポトーシス細胞死を引き起こすことを明らかにした。また、COX-2の発現上昇を誘導し炎症反応を引き起こす可能性が示唆された。さらに、ibuprofenが、BIMPによるアポトーシス細胞死とCOX-2の発現上昇を抑制することを発見した。これはibuprofenによるCOXの活性阻害だけではなく何らかの作用でBIMPによる毒性を減弱させているものと推察される。近年、NSAIDsが有機リン剤の毒性を抑制することが報告されている。本検討の結果はそれらの報告と同様の結果となったが、BIMPによる毒性の中心的な標的はいまだ不明であり、またその毒性を減弱させたibuprofenの作用についても更なる検討が必要と考える。