

キノホルム感受性・抵抗性ラットを用いた過去の研究とその後についての調査

勝山 真人（京都府立医科大学大学院医学研究科中央研究室 RI 部門）

研究要旨

「目的」

著者はキノホルムの毒性に関する過去の論文を調査する過程で、1986年には既に田村善藏博士（慶應義塾大学病院）、堀眞一郎博士（東京都神経科学総合研究所）らによって「キノホルム感受性および抵抗性ラット」が樹立されていたことを知った。当時は主にキノホルム投与後の吸収・分布・代謝等が解析されていたが、現在この2系統のラットが存在していれば、全ゲノムやトランスクリプトームの比較解析などによりキノホルム感受性に関わる遺伝子を同定できる可能性が高い。一方2002年当時、ヒューマンサイエンス研究資源バンク（現・医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンク）において、キノホルム感受性および抵抗性ラットの2細胞期胚が保管されていたことをWeb上で発見した。そこでこの2細胞期胚の行方を調査した。

「方法」

医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンクの問い合わせ先へメールを送付し、担当者からの返答を得た。以後は関係すると思われる連絡先とメールによるやり取りを繰り返した。

「結果」

医薬基盤・健康・栄養研究所の担当者からの返答は、「ヒューマンサイエンス研究資源バンクは動物胚バンク事業を2011年3月末に閉じ、資源は寄託者に返却したと伺っている」とのことであった。寄託者は「ワイエヌニューテクノロジー研究所のU氏」とのことであったが、同社はフェニックスバイオ（東広島市）に子会社化された後、特殊免疫研究所（東京都）に事業譲渡されたとのことであった。Web上でU氏が現在フェニックスバイオの役員であることをつきとめ、同社の問い合わせ先へメールを送付したところ、同社担当者およびU氏から返答を得た。U氏によると、ヒューマンサイエンス研究資源バンクから試料を返却されたか記憶が定かでない、あるとすれば特殊免疫研究所宇都宮事業所だ、とのことであった。そこで同社宇都宮事業所に問い合わせたが、試料の行方に関する返答は得られなかった。再度医薬基盤・健康・栄養研究所に問い合わせたところ、当時の記録が残っておらず、研究資源バンクにおいて資源化を断念したのかもしれないとのことであった。

「結論」

キノホルム感受性および抵抗性ラットの凍結胚の行方をつかむことはできなかった。当時の研究者の退職、研究資源バンクの組織再編、寄託業者の子会社化・事業譲渡といった複数の要素が絡み合ったこともあるが、長い年月が流れたことも試料散逸の大きな要因と考えられる。

A. 研究目的

亜急性脊髄視束神経症（スモン）はクリオキノール（キノホルム製剤）の過量投与により引き起こされた薬害であることは紛れもない事実である。しかし日本以外の国では大きな社会問題とはならず、また未だ発症の分子機構の全容が明らかでないため、スモンについて外国の研究者から大きな誤解を受けている印象がある。

2019年にアメリカの Perez らにより次のような論文が発表され、薬理学の分野でインパクトファクターの高い雑誌に掲載された。キノホルムが ABC トランスポーターによる cAMP の排出を阻害することが毒性のメカニズムであり、日本人に多い ABCC4 の G2269A 変異、ABCC11 の G538A 変異では細胞内 cAMP レベルが上昇し、キノホルムによる毒性が出やすい（感受性が高い）というものである¹⁾。しかしこれらの遺伝子多型とキノホルム感受性との関係については科学的な証明を全く行っていない単なる推論であり、ABCC11 の 1 塩基変異が東アジア人と欧米人、あるいは現在の日本人の祖先と言われる弥生人と縄文人の耳垢のタイプの違い（乾型、湿型）を決定しているという話を転用したに過ぎないものと考えられた。

著者がこの話をスモン研究班の会議の場で紹介したところ、岐阜大学の深尾敏幸教授（故人）によるスモン患者さんの遺伝子多型の解析を通してこの説の正誤を検証し、論文として発表しようということになった。そして深尾教授の遺志を受け継がれた大西秀典先生、松本英樹先生らによって、この説が間違いであることが見事に証明された（論文発表 1）。

内外にスモンに関する正しい情報を発信するためにも、キノホルムによるスモン発症の分子機構の完全解明は喫緊の課題である。発症の直接の引き金となる「キノホルム標的分子」と、発症のしやすさに影響を及ぼす分子が別々である可能性も存在し、後者をコードする遺伝子はいわば「キノホルム感受性（を決定する）遺伝子」である。一方 50 年以上にわたるスモンに関する調査研究班の活動において、現在研究を行っている我々が見過ごしている研究成果もあるのではないかと考え、著者は大学図書館の書庫で古い文献を取得したり、Web 上でキーワード検索を行ったりして

きた。すると驚くことに、過去に「キノホルム感受性ラット」「キノホルム抵抗性ラット」が樹立され、それらを用いて当研究班において研究が行われていたことを知るに至った。しかもそれらのラットの凍結胚が資源としてバンクに保管されている可能性を見出した。この 2 系統のラットが現存していれば、全ゲノムやトランスクリプトームの比較解析などによりキノホルム感受性に関わる遺伝子を同定できる可能性が高い。そこでキノホルム感受性・抵抗性ラットの凍結胚の行方を調査した。

B. 研究方法

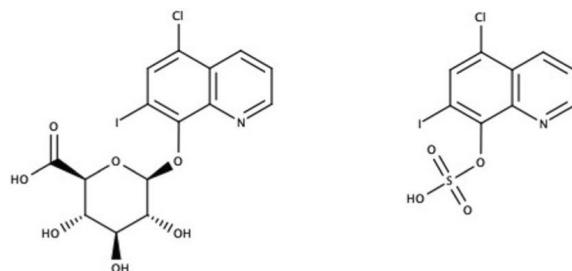
最初に過去の原著論文や、スモンに関する調査研究班の研究報告書を読み直した。

キノホルム感受性・抵抗性ラットの凍結胚の行方については、まず医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンクの問い合わせ先へメールを送付し、担当者からの返答を得た。以後は関係すると思われる連絡先とメールによるやり取りを繰り返した。

C. 研究結果

【キノホルムの代謝経路に関する過去の論文】

過去の論文を見直している過程で、キノホルムの代謝・無毒化に関する重要な報告を発見した。1983 年に田村善蔵博士（当時は東京大学医学部附属病院薬剤部）らによるラットを用いた実験で、経口投与されたキノホルムが小腸から吸収される過程でグルクロン酸抱合や硫酸抱合を受け無毒化されることが既に報告されていた（図 1）。ラットではこの代謝が比較的活発であり、キノホルムの経口投与による毒性発現、すな



グルクロン酸抱合体

硫酸抱合体

図 1 キノホルム抱合体

わちスモンの症状の再現が困難である主要因なのではないかと議論されていた²⁾。

【キノホルム感受性・抵抗性ラットを用いた過去の研究】

1992年発行の医学のあゆみ (Vol. 163、NO. 2、1992.10.10) に、東京都神経科学総合研究所 (当時) の堀眞一郎博士、田邊等博士らによる「キノホルム毒性に対して感受性の高いラットと低いラットの近交系化」という論文が掲載されていた。キノホルム投与による致死率が高いラット (感受性ラット) と低いラット (抵抗性ラット) が存在し、それらを何代も交配することでライン化することに成功したというものである。そこでこれらのラットを用いて実験を行っている原著論文を探査した。生後1日目のラットに皮下投与で150mg/kgのキノホルムを投与したところ、感受性ラットではキノホルムの血中濃度が高く維持された一方、抵抗性ラットではキノホルムの血中濃度が低下しグルクロン酸抱合体、硫酸抱合体の濃度が上昇したという報告が、1986年に田村、堀らによってなされた³⁾。一方平成6年度スモン調査研究班研究報告書において、20週齢の雄性ラットに1mgのキノホルムを静脈内投与した場合、その血中濃度の変化に両ラットで有意な差はなかったと田邊らは報告している。

【キノホルム感受性・抵抗性ラットの凍結胚の行方調査】

著者は2002年当時、ヒューマンサイエンス研究資源バンク (現・医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンク)において、キノホルム感受性および抵抗性ラットの2細胞期胚が保管されていたことをWeb上で発見した (<http://reproduction.jp/jrd/jpage/vol48/480502.html>)。そこでこの2細胞期胚の行方を調査するため、まず医薬基盤・健康・栄養研究所に問い合わせのメールを送付した。同研究所の担当者からの返答は、「ヒューマンサイエンス研究資源バンクは動物胚バンク事業を2011年3月末に閉じ、資源は寄託者に返却したと伺っている」とのことであった。寄託者は「ワイエスニューテクノロジー研究所のU氏」とのことであったが、同社はフェニックスバイオ (東広島市) に子会社化された後、特殊免疫研究所 (東京都) に事業譲渡されたとのことであった。Web上で

U氏が現在フェニックスバイオの役員であることをつきとめ、同社の問い合わせ先へメールを送付したところ、同社担当者およびU氏から返答を得た。U氏によると、ヒューマンサイエンス研究資源バンクから試料を返却されたか記憶が定かでない、あるとすれば特殊免疫研究所宇都宮事業所だ、とのことであった。そこで同社宇都宮事業所に問い合わせたが、試料の行方に関する返答は得られなかった。再度医薬基盤・健康・栄養研究所に問い合わせたところ、当時の記録が残っておらず、研究資源バンクにおいて資源化を断念したのかもしれないとのことであった。

D. 考察

キノホルム感受性および抵抗性ラットの凍結胚の行方をつかむことはできなかった。

現在この2系統のラットが凍結胚として保管されていれば、成体ラットに戻すという過程を経なくとも、全ゲノムの比較解析などによりキノホルム感受性に関わる遺伝子を同定できた可能性が高い。過去のスモン研究班の研究報告書によると、少なくとも平成6、7年度頃まではこれらのラットを用いた研究が行われていた。過去に当研究班においてこのような素晴らしい研究が行われていたにも関わらず、現在研究に携わる我々がその成果を活用できていないのは非常に残念であり、この試料散逸は痛恨の極みである。現在の我々の研究成果についても、次代の研究者らに引き継がれ活用されるよう対策を講じる必要がある。

一方キノホルムがグルクロン酸抱合や硫酸抱合によって無毒化されるという過去の報告は、スモンの発症のしやすさに特定の遺伝子が関与するか、つまりいわゆるキノホルム感受性遺伝子が存在するかを考慮する上で非常に重要な知見である。一例を挙げると、抗がん剤のイリノテカンドによる白血球減少や下痢といった重篤な副作用の発生の個体間差に、肝臓におけるグルクロン酸抱合に関わる酵素の遺伝子多型が関与することはよく知られている。イリノテカンドは肝臓で活性代謝物SN-38に変換され抗腫瘍作用を発揮するが、SN-38はUDPグルクロン酸転移酵素(UGT)によって抱合反応を受け不活化された後腸管に排泄される。UGTの1分子種であるUGT1A1の遺伝子多型UGT1A1*28

あるいはUGT1A1*6を持つ患者では、UGT1A1の活性低下によりイリノテカンの重篤な副作用の発現率が高くなることが知られている⁴⁾。キノホルムの代謝に関わる酵素に遺伝子多型が存在するとすれば、それがスモン発症のしやすさに個体間差を生じさせる要因となり得る。スモンバイオバンクの活用に際し、グルクロン酸抱合や硫酸抱合によってキノホルムを無毒化する酵素群については、いわゆるキノホルム感受性遺伝子の最有力候補として注視する必要がある。

E. 結論

キノホルム感受性および抵抗性ラットの凍結胚の行方をつかむことはできなかった。当時の研究者の退職、研究資源バンクの組織再編、寄託業者の子会社化・事業譲渡といった複数の要素が絡み合ったこともあるが、長い年月が流れたことも試料散逸の大きな要因と考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsumoto H, Sasai H, Kawamoto N, Katsuyama M, Minamiyama M, Kuru S, Fukao T, Ohnishi H. Founder genetic variants of ABCC4 and ABCC11 in the Japanese population are not associated with the development of subacute myelo-optico-neuropathy (SMON). *Mol Genet Genom Med.* 2022; 10: e1845.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 文献

- 1) Perez DR, Sklar LA, Chigaev A. Clioquinol: To harm or heal. *Pharmacol Ther.* 2019; 199: 155-163.
- 2) Kotaki H, Yamamura Y, Tanimura Y, Saitoh Y, Nakagawa F, Tamura Z. Intestinal absorption and metabolism of clioquinol in the rat. *J Pharmacobiodyn.* 1983; 6: 881-887.
- 3) Kotaki H, Hori S, Saitoh Y, Nakagawa F, Tamura Z. Absorption, distribution and metabolism of clioquinol in clioquinol-sensitive and -resistant

neonatal rats. *J Pharmacobiodyn.* 1986; 9: 970-974.

- 4) Sai K, Saeki M, Saito Y, Ozawa S, Katori N, Jinno H, et al. UGT1A1 haplotypes associated with reduced glucuronidation and increased serum bilirubin in irinotecan-administered Japanese patients with cancer. *Clin Pharmacol Ther.* 2004; 75: 501-515.