

キノホルムの神経毒性に関する基礎研究

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

我が国で多発した亜急性脊髄視束神経症 (スモン) が、当時多用された整腸剤キノホルム (一般名: クリオキノール) による薬害と判明してから 50 年以上が経過した。当研究班は発足当初から、スモン発症の原因究明のために様々な観点から研究を行ってきた。しかしキノホルムによるスモン発症のメカニズムは未だその全容が明らかでない。

現在当研究班では主に培養神経系細胞を用い、キノホルムの神経毒性発現のメカニズムについて分子レベルで明らかにしつつある。またスモン患者のバイオバンクを構築し、スモンと抗酸化酵素の遺伝子多型との相関についても研究を遂行している。

この3年間で得られた主な成果は以下の通りである。

- 1) 培養神経芽細胞腫において、キノホルムが細胞内に亜鉛を流入させるとともに、銅シャペロン ATOX1 の酸化型への変換により銅の代謝障害を引き起こし、ドパミン 水酸化酵素の成熟阻害を介してノルアドレナリンの生合成を阻害することを見出した。
- 2) 培養神経芽細胞腫において、キノホルムがミトコンドリア毒として作用することを明らかにした。
- 3) 培養アストロサイト株において、キノホルムが autolysosome の形成不全を伴うオートファジーと、ミトコンドリアにおける活性酸素種 (ROS) の産生を引き起こすことを見出した。
- 4) スモンとキノホルム酸化還元酵素 1 遺伝子 (NQO1) の機能喪失型多型 C609T との相関を解析したところ、スモン患者 125 症例における C609T 多型の頻度と日本人の平均的頻度に有意な差は認められなかった。またスーパーオキシドジスムターゼ 1 遺伝子 (SOD1) の機能低下型多型についても同様であった。一方海外から発表された cAMP の輸送体遺伝子 ABCC4、ABCC11 の日本人に多い遺伝子多型とスモンの発症頻度との相関の可能性については、否定される結果が得られた。
- 5) キノホルムによる脊髄後角細胞に対するシナプス伝達増強作用が TRPA1 チャネルを介するものであることを明らかにした。

【研究目的】

亜急性脊髄視束神経症 (スモン) は猛烈な腹痛に引き続き、特有のしびれ感が足先から下肢全体、あるいは腹部・胸部にまで上行する神経疾患であり、下肢の痙縮や脱力をきたす。重症例では視力障害や失明、さらには脳幹障害による死亡例まで存在する。1960 年代に我が国で多発し、同時に各地で集団発生したこと

から新たな感染症が疑われ、大きな社会問題となった。1970 年に、多くの患者で見られた緑色の舌苔、緑尿、緑便の成分分析が行われた結果、整腸剤として多用されたキノホルム (一般名: クリオキノール) と鉄イオンのキレート化合物であることが判明した。キノホルム製剤の使用禁止以降新たな患者の発生が止まったことから、スモンはキノホルムによる薬害と確定した。

キノホルムは metal protein attenuating compounds (MPACs) の一種であり、キレート作用により金属酵素の活性中心から金属を奪い失活させるという性質を持つ。これがキノホルムの抗菌作用のメカニズムであった可能性が高い。そして金属イオンを介する蛋白の凝集を抑制することから、近年海外において神経変性疾患に対する改善効果が注目され、医薬品としての価値が見直されている。オーストラリアの製薬企業 Alterity Therapeutics (旧 Prana Biotechnology) がキノホルムを基に開発した PBT-1033 (PBT2) はアルツハイマー病とハンチントン病に対して第 2 相試験が行われるまでに至ったが、一定の症状改善効果が認められたとする同社の報告に対して、結果の解釈に懐疑的な意見も存在する。一方同社は別のキノホルム類縁化合物・ATH434 について、パーキンソン病・運動障害に対する第 1 相試験を完了し、多系統萎縮症に対する希少疾病用医薬品 (オーファンドラッグ) としての承認をアメリカ食品医薬品局 (FDA) から既に取得している。

当研究班は発足当初から、スモン発症の原因究明のために様々な観点から研究を行ってきた。しかし未だキノホルムによるスモン発症のメカニズムの全容解明に至っていないのは、以下の理由によると思われる。まず、1970 年代から 1980 年代にかけては、分子レベルで薬物の作用機序を解明する手法が確立していなかったと考えられる。そしてスモンは主に我が国で多発したため、国外の研究者による研究はあまりなされてこなかった。国内においても創薬に直結する研究が重視される昨今、薬の副作用や薬害の研究に取り組もうという研究者は少ない。当研究班においても基礎研究が一時期途絶えていたため、過去の貴重な研究成果を現在に活かしていない側面もある。またキノホルムは脂溶性が高く様々な分子と相互作用することが考えられ、そのことが毒性発現メカニズムの解釈・説明を困難にしていることも事実である。

キノホルムおよびその類縁化合物の臨床への再応用に警鐘を鳴らし、新たな薬害を阻止することは当研究班の使命であり、そのためにもキノホルムの神経毒性の分子基盤の解明は必須かつ喫緊の課題であると考え、基礎研究に取り組んでいる。

【キノホルムによる銅シャペロン ATOX1 の酸化を介したノルアドレナリン合成阻害】

キノホルムはかつて腸性肢端皮膚炎 (小腸上皮細胞に発現する亜鉛取り込み輸送体 ZIP4 の遺伝子異常による亜鉛欠乏症) の治療薬として使用されていた。キノホルムが亜鉛補充による症状の改善を増強することから、キノホルムが細胞内に亜鉛イオンを導入するイオノフォアとしての作用を利用していたものと考えられる¹⁾。そして胃切除術後に銅欠乏による脊髄視神経障害が見られた事例²⁾や、過剰な亜鉛を含有する入れ歯安定剤の使用により銅欠乏による脊髄多発神経障害が発生した事例³⁾が存在する。さらにスモンと銅欠乏による脊髄神経障害の臨床症状・神経解剖学的病巣分布に共通点があることから⁴⁾、「スモンは亜鉛の過剰・銅欠乏による神経障害ではないか」という仮説を立て、キノホルムが細胞内の銅・亜鉛イオンの挙動に与える影響を解析した。

著者らが以前行った DNA チップによる遺伝子の網羅的発現解析では、SH-SY5Y 細胞をキノホルムで刺激した際に、亜鉛などの金属イオン濃度の上昇により転写が促進されるメタロチオネイン類の発現誘導が認められていた。そこで細胞内の亜鉛レベルを測定したところ、50 μ M のキノホルムで 1 時間刺激すると、細胞内の亜鉛レベルは有意に上昇した。次にキノホルムが銅代謝に影響を与える可能性を考え、細胞内の銅レベルを刺激 24 時間まで測定したところ、50 μ M のキノホルムは刺激 24 時間で有意に銅レベルを上昇させた。濃度依存性を調べたところ、キノホルムは 20 μ M 以上の濃度で刺激 24 時間後の銅レベルを有意に上昇させた。

キノホルム刺激 1 時間で細胞内に流入する亜鉛とは対照的に、刺激 24 時間でレベルが上昇する銅は代謝障害により蓄積すると考えられたことから、銅輸送に重要な役割を果たす銅シャペロン ATOX1 に着目した。ATOX1 は分子内に 3 つのシステイン残基を持ち、そのうちの 2 つは銅イオンを配位する活性中心 metal binding domain を形成している⁵⁾。そこでキノホルム刺激により ATOX1 の活性中心のシステインが酸化され失活するのではないかと考え、DNA マレイミド試薬を用いてシステイン残基のレドックス状態のモニタ

リングを行った。DNA マレイミド処理を行わない場合、ATOX1 は約 7kDa のバンドとして検出され、キノホルムによる蛋白量の変動は認められなかった。DNA マレイミドで処理したサンプルでは、DNA マレイミドが 1 つ結合した「酸化型」と考えられる 20 kDa 弱のバンドと、DNA マレイミドが 3 つ結合した「還元型」と考えられる約 40 kDa のバンドが検出された。50 μ M のキノホルム刺激により約 40 kDa のバンドは消失した。経時変化を確認したところ、キノホルム刺激 4 時間で約 40 kDa のバンドは消失した。

銅の代謝障害により、ドパミン 水酸化酵素 (DBH) やリジルオキシダーゼ (LOX) といった銅依存性分泌酵素の成熟・分泌が阻害されると考えられたため、これらの酵素の培地中への分泌をウエスタンブロット法により解析した。50 μ M のキノホルム刺激により、細胞中の LOX 前駆体蛋白量は有意に増加した。DMSO を添加した場合に培地中に検出された DBH や成熟型 LOX は、50 μ M のキノホルムで刺激した場合には検出されなくなった。DBH の培地中への分泌は 20 μ M 以上の濃度のキノホルムにより有意に抑制された。

DBH はドパミンをノルアドレナリン (NA) に変換する酵素である。キノホルムによる DBH の成熟・分泌阻害により NA 合成が阻害されるものと考え、細胞内の NA レベルを ELISA 法により測定した。未分化の SH-SY5Y 細胞および dbcAMP で NA 神経様に分化させた細胞のどちらにおいても、20 μ M 以上の濃度のキノホルムにより細胞内の NA レベルは有意に低下した。

ATOX1 の酸化による活性低下が DBH の成熟・分泌阻害に関わることを証明するため、ゲノム編集により ATOX1 ノックアウト細胞を樹立したところ、ATOX1 ノックアウト細胞では mock 細胞に比して DBH の分泌が抑制されていた。

以上のことから、キノホルムは亜鉛の流入と ATOX1 の酸化による銅の代謝障害を引き起こし、DBH などの銅依存性酵素の成熟・分泌を阻害することにより、NA の生合成を阻害することが明らかとなった。キノホルムは亜鉛の流入による ER ストレスや銅の蓄積による酸化ストレスの亢進といった神経細胞死

の原因となる現象とともに、NA 合成の阻害といった神経の機能障害を引き起こすことが示唆された。

キノホルムは銅・亜鉛イオノフォアとして知られているが、短時間での銅の流入は観察されなかった。血清を含む培地中の銅の 95% 程度はセルロプラスミンに結合しており、遊離している銅の濃度は亜鉛濃度の 1/10 程度であることが理由と考えられる。ヒトの血中においても同様であり、キノホルムは人体に対しても亜鉛イオノフォアとして機能するものと考えられる。

キノホルムが ATOX1 を酸化するメカニズム、および亜鉛の流入が ATOX1 の活性に与える影響は現在のところ不明であるが、亜鉛が銅と競合して ATOX1 から ATP7A への銅輸送を阻害する可能性が考えられる⁶⁾。

DBH の成熟・分泌阻害による NA 合成の阻害は、交感神経系や、青斑核から脊髄後角への下行性疼痛抑制系の機能障害につながる可能性がある。スモンの初期症状である猛烈な腹痛は、副交感神経系の過剰亢進による腸管収縮に由来していた可能性が考えられる。また下行性疼痛抑制系の機能障害がスモンにおける感覚異常の一因であった可能性も考えられる。一方 LOX はコラーゲンとエラスチンの架橋形成を担う酵素であるが、神経系では筋萎縮性側索硬化症患者の脊髄で発現が亢進していること⁷⁾、また LOX のプロペプチドの過剰発現でプルキンエ細胞の樹状突起の分枝が抑制されることが報告されている⁸⁾。キノホルムによる LOX 前駆体の発現誘導と成熟・分泌阻害がスモンの発症に関与するかについては、さらなる検討が必要である。

本研究は「スモンは亜鉛の過剰・銅代謝障害による神経障害である」ことを細胞レベルで証明した成果であり、キノホルムによるスモン発症メカニズムの一端を説明するものと考えている。(論文発表 1; 京都府立医科大学 2020 年 10 月 13 日プレスリリース「キノホルムが神経伝達物質の生合成を阻害することを発見 ~ 薬害スモンの発症メカニズムの一端が明らかに ~)。

【キノホルムのミトコンドリア毒性】

著者らは ATOX1 以外の銅関連タンパク群についてもキノホルムによる発現や機能への影響があるのでは

ないかと考え、その発現変化について解析した。ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞において、キノホルムはミトコンドリア呼吸鎖複合体（シトクロム c オキシダーゼ）に銅を運搬するシャペロン SCO1 と SCO2⁹⁾、および複合体構成タンパクのミトコンドリア内膜への挿入活性を持つ COX18¹⁰⁾ の発現を mRNA レベルで抑制した。そこでキノホルムのミトコンドリア毒性について、さらに解析を進めた。

ミトコンドリア呼吸鎖複合体 活性測定キットを用い、24 時間の刺激によるキノホルムの複合体 活性への影響を調べたところ、キノホルムは 20 μ M 以上の濃度でその活性を低下させた。またガラクトース含有無血清培地で培養することにより酸化的リン酸化に依存した ATP 産生を測定したところ、キノホルムは 10 μ M 以上の濃度で ATP 産生を有意に抑制した。しかしキノホルムはグルコース含有培地で培養した際の ATP 産生能には影響を及ぼさなかった。また 2 時間の刺激では細胞毒性（細胞膜の完全性の破綻）は増加傾向を示したが、有意なものではなかった。

今回、キノホルムのミトコンドリア毒性は細胞毒性に先立って観察され、また 20 μ M 以上で観察される細胞増殖の抑制に対して 10 μ M という、より低濃度で観察された。このことは複合体 会合因子群の転写抑制とは別に、キノホルムが直接ミトコンドリアに対して毒性を及ぼす機構が存在することを示唆している。キノホルムのミトコンドリアへの作用については「スモン調査研究協議会研究報告書 NO. 9 昭和 46 年度キノホルム部会研究報告」に八木国夫博士や田村善蔵博士らにより報告され、後に英文誌にも掲載されている¹¹⁾。キノホルムがミトコンドリアの酸化的リン酸化に対して脱共役剤として作用するというものであるが、この実験ではラット肝臓の単離ミトコンドリアに対して 400 μ M という高濃度のキノホルムを使用している。今回の実験では、培養細胞に対して 10 μ M という濃度でキノホルムが酸化的リン酸化に依存した ATP 産生を抑制することを示しており、*in vitro* とはいえより生体に近い条件であっても、キノホルムがミトコンドリア毒として作用することを証明できたと考えている。ただし、無血清培地かつグルコース非存在下という特殊な条件での測定であり、生理的条件下でも同様の現

象が起きるかどうかは不明である。また ATP 産生の抑制がせいぜい 50% 程度であること、さらに有意差が付かないとは言え細胞毒性が増加傾向を示していることから、ミトコンドリア毒性の寄与が小さくネクロシスが主体である可能性も捨てきれない。

【培養アストロサイト株を用いた研究】

武藤・水谷らはマウスアストロサイト株 KT-5 細胞を用い、キノホルムがグリア系の細胞に及ぼす影響について解析している。

キノホルムはオートファジーのシグナルである LC3-II、p62 の発現を誘導したが、p62 のその後の発現低下が観察されなかったことから、autolysosome の形成不全を引き起こしているものと考えられた。キノホルムはリソソーム水解酵素活性の低下を引き起こしたが、リソソームの pH には影響を及ぼさなかった。さらにキノホルムは活性酸素種 (ROS) の産生亢進を引き起こした (論文発表 2)。そこでこのキノホルムによるオートファジー・リソソームシステムの機能異常を介する毒性発現に ROS が関与するかを解析した。

キノホルム (20 μ M) により誘発される細胞死は、抗酸化剤である N-アセチルシステインの共処理により有意に抑制された。またキノホルムで誘発される細胞内 MAP キナーゼのリン酸化、キノ酸化還元酵素 1 (NQO1) の発現誘導、LC3-II 発現の変化が、ミトコンドリアの ROS を除去する Mito-TEMPO (100 μ M) の 1 時間前処理で著明に抑制された。さらにキノホルムによる細胞内 ROS 産生もほぼ完全に抑制されると同時に、細胞形態変化も抑制された。

先に述べた著者らによる培養神経芽細胞腫における実験結果も考え合わせると、キノホルムの毒性の少なくとも一部はミトコンドリアの機能障害を介するものと考えられる。

【スモンの疾患感受性遺伝子に関する研究】

大西・松本らはスモンが日本で多発したこと、また一部のキノホルム服用者にのみスモンが発症したことが、抗酸化酵素をコードする遺伝子の遺伝子多型に起因するのではないかと考え研究を進めている。

最近培養細胞の増殖とゼブラフィッシュの視覚機能

を評価する系において、キノホルムの毒性が抗酸化酵素であるキノン酸化還元酵素 1 (NQO1) の発現により減弱することを示す論文が発表された¹²⁾。NQO1 遺伝子には機能喪失多型 C609T (rs1800566) が知られており、そのキノン還元活性はヘテロ (C/T) で約 30%、ホモ (T/T) で数%にまで低下する。そして日本人を含むアジア人でこの遺伝子多型の頻度が高い。そこで NQO1 遺伝子の C609T 多型とスモン発症の相関の可能性について検討した。全国から計 125 名のスモン患者の血液を採取し、抽出した DNA から多型部位の塩基配列を決定したところ、C/C が 39 例、C/T が 68 例、T/T が 18 例であった。大規模日本人遺伝子多型データベース (Human Genetic Variation Database : HGVD) においては C/C が 471 名、C/T が 542 名、T/T が 197 名であり、スモン患者ではヘテロの C/T が多い傾向が認められたが、統計学的には有意な差ではなかった。またこの多型と視力、運動機能といったスモンの重症度との相関について解析したが、有意な相関は認められなかった。また NQO1 遺伝子の転写活性に影響するとされるプロモーター領域の - 1221 (A > C) 多型 (rs689455) について 45 名のスモン患者について解析したが、上述の C609T 多型と完全に一致し、連鎖が考えられた。さらに NQO1 の活性低下に関与するとされる他の 1 塩基多型 rs10517、rs689452、rs689456 についても解析したが、いずれもスモン患者で有意に多いものではなかった。

次に同じく抗酸化酵素であり、スーパーオキシドを過酸化水素に変換する酵素の一種であるスーパーオキシドジスムターゼ 1 (SOD1) の遺伝子多型に着目した。日本人に特に多い機能低下型の多型 (rs2070424、rs4998557、rs4816405) について解析を行ったところ、優性遺伝モデルでの比較 (自施設対照との比較)、劣性遺伝モデルでの比較 (自施設対照との比較)、アレル頻度での比較 (HGVD との比較、日本人多層オミックス参照パネル jMorp との比較、自施設対照との比較) のいずれにおいても有意差は認められなかった。

キノホルム感受性の高低を抗酸化酵素である NQO1 の遺伝子多型のみで説明することは困難と考えられる。キノホルムの毒性は酸化ストレスのみによるものではなく、また培養細胞やゼブラフィッシュの系とは異なる

り、人体では NQO1 の機能喪失変異があってもそれを補完する経路がはたらいっていると考えられる。

一方 Perez らは cAMP の輸送体である ABCC4 と ABCC11 の日本人に多い遺伝子多型 ABCC4 rs3765534 (c.G2268A, p.E857K)、ABCC11 rs17822931 (c.G538A, p.G180R) がスモンの発症頻度と相関があるかのような報告をしている¹³⁾。そこでこれらの遺伝子多型の頻度についても解析したが、スモン患者における頻度と HGVD における頻度に全く差がなかったことから、論文にまとめ発表した。スモンに関する誤った情報を正すことも研究班の責務であり、独自の遺伝子解析による研究成果を公表した初めての事例となった (論文発表 3)。

ところで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、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¹⁴⁾。さらに 1986 年には既に「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。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。そこで関係各方面に連絡を取り調査したが、キノホルム感受性および抵抗性ラットの凍結胚の行方は杳として知れなかった。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、長い歳月が流れたことも試料散逸の大きな要因と考えられる。

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、スモンの疾患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。スモンバイオバンクの活用の際し、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、スモンの疾患感受性遺伝子の最有力候補として注視する必要がある。この辺りの薬物代謝酵素群や薬物輸送体の遺伝子多型に関しては、現在臨床で用いられる抗がん剤などで研究が進んでおり、いわゆる「ファーマコゲノミクス」の研究手法を本研究にも導入する必要があるのかもしれない。

【キノホルムによる脊髄の興奮性シナプス伝達増強作用のメカニズム】

吉田・山中らはラット脊髄スライス標本を用いた whole-cell patch-clamp 法による電気生理学的解析により、キノホルムによる興奮性シナプス伝達増強作用のメカニズムを検討した。

記録した自発性興奮性シナプス後電流 (sEPSC) は AMPA/ カイニン酸受容体拮抗薬の 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) 存在下では完全に消失したことから、グルタミン酸を介する反応であった。100 μM のキノホルムを 5 分間灌流投与すると脊髄後角細胞の sEPSC の頻度の有意な増加が観察されたが、TRPA1 チャンネル拮抗薬の HC-030031 (50 μM) 存在下ではキノホルムによる sEPSC の頻度および振幅の程度に変化は観察されなかった。以上の結果から、キノホルムは脊髄後角細胞に入力する末梢神経線維中枢端の終末部に存在する TRPA1 チャンネルを活性化し、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の放出を促進することが示唆された。疼痛、異常感覚といったスモンの下肢感覚障害にこれらの機序が関与する可能性が考えられる。

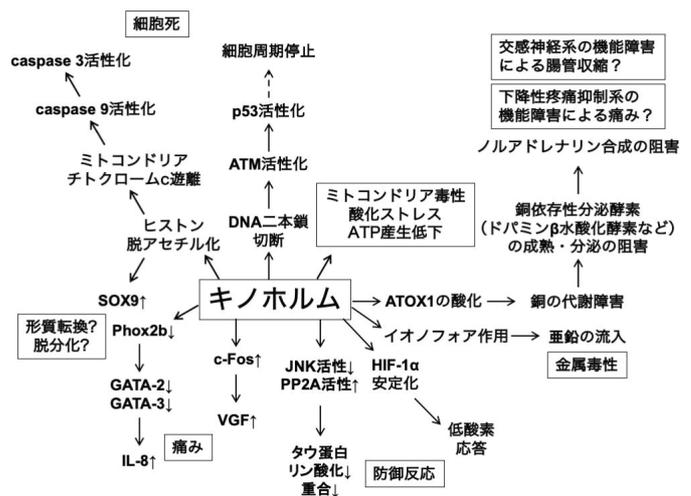


図1 キノホルムの様々な作用と神経毒性

【結論】

キノホルムによる神経毒性発現機構について、その一端を明らかにすることができた。これまでに得られた成果を図1にまとめた。

スモン発症のメカニズムの全容解明のためには、キノホルムの神経毒性に関する基礎研究を遂行するとともに、我が国でスモンが多発した理由を明らかにするためにスモンの疾患感受性遺伝子を同定することも必要である。患者さん方に対しては丁寧な説明を行いながら、バイオバンクを活用した研究を遂行する必要がある。

このような取り組みによって、薬害スモンの風化の防止と新たな薬害発生の阻止に寄与したいと考えている。

【研究発表】

1. 著書

- 1) Mutoh T. Drug discovery in Alzheimer's disease using metal chelators: Warning toward their uses. In: Hamano T, Mutoh T editors. Autophagy Dysfunction in Alzheimer's Disease and Dementia (Elsevier), Chapter 15, 2022. ISBN 978-0-323-89906-2.

2. 論文発表

- 1) Katsuyama M, Kimura E, Ibi M, Iwata K, Matsumoto M, Asaoka N, Yabe-Nishimura C.

Clioquinol inhibits dopamine- α -hydroxylase secretion and noradrenaline synthesis by affecting the redox status of ATOX1 and copper transport in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Arch Toxicol* 2021; 95: 135-148.

2) Mizutani Y, Maeda T, Murate K, Ito S, Watanabe H, Mutoh T. Clioquinol kills astrocyte-derived KT-5 cells by the impairment of the autophagy-lysosome pathway. *Arch Toxicol* 2021; 95: 631-640.

3) 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.

4) 泉尚史, 谷口亘, 西尾尚子, 山中学, 曾根勝真弓, 太地良, 筒井俊二, 中塚映政, 山田宏, 吉田宗平. 脊髄後角における興奮性シナプス伝達に対するキノホルムの作用. *脊髄機能診断学* 2020; 41: 1-5.

5) 豊島至. Clioquinol の毒性容量と毒性濃度. *あきた病院医学雑誌* 2020; 8: 5-13.

6) 豊島至. Clioquinol 毒性濃度と添加血清. *あきた病院医学雑誌* 2022; 10: 5-10.

7) 豊島至. Clioquinol に対する血清成分の耐毒性. *あきた病院医学雑誌* 2022; 10: 11-16.

8) Lin G, Zhu F, Kanaan NM, Asano R, Shirafuji N, Sasaki H, Yamaguchi T, Enomoto S, Endo Y, Ueno A, Ikawa M, Hayashi K, Yamamura O, Yen S-H, Nakamoto Y, Hamano T. Clioquinol Decreases Levels of Phosphorylated, Truncated, and Oligomerized Tau Protein. *Int J Mol Sci* 2021; 22: 12063.

3. 学会発表

1) 勝山真人. キノホルムによる神経毒性発現のメカニズムに関する研究 (シンポジウム「スモン原因解明から 50 年」). 第 74 回国立病院総合医学会. 2020 年 10 月 17 日. 新潟.

2) 勝山真人, 矢部千尋. クリオキノールは銅シャペロン ATOX1 の酸化還元状態を変化させドパミン水酸化酵素の分泌とノルアドレナリン合成を阻害す

る. 第 94 回日本薬理学会年会. 2021 年 3 月 10 日. 札幌.

3) 勝山真人. 薬害スモンを引き起こしたクリオキノール (キノホルム) によるノルアドレナリン合成阻害. 第 48 回日本毒性学会学術年会. 2021 年 7 月 7 日. 神戸.

4) 勝山真人. 薬害スモンの発症メカニズムの完全解明に向けて (公募シンポジウム「クスリのリスクを科学する: 基礎から臨床, 過去から未来へ」). 第 96 回日本薬理学会年会. 2022 年 12 月 2 日. 横浜.

5) Mizutani Y, Murate K, Mutoh T. Clioquinol elicits cytotoxic effects on cultured astrocytes through the impairment of the autophagy-lysosome pathway. *American Academy of Neurology Annual Meeting*. Toronto, Canada. May 1, 2020.

6) Mizutani Y, Maeda T, Murate K, Watanabe H, Mutoh T. Failure in autophagic cytoprotective responses elicited by clioquinol kills astrocyte KT-5 cells. 第 61 回日本神経学会学術大会. 2020 年 8 月 31 日. 岡山.

7) Zhu F, Lin G, Hamano T, Kanaan NM, Yen S-H, Asano R, Nakamoto, Nakamoto Y. Clioquinol reduces tau phosphorylation and oligomerization: Molecular and cell biology/tau. *Alzheimer's Association International Conference 2020*. Amsterdam, Netherlands. July 27-31, 2020.

【文献】

1) Geiser J, De Lisle RC, Finkelstein D, Adlard PA, Bush AI, Andrews GK. Clioquinol synergistically augments rescue by zinc supplementation in a mouse model of acrodermatitis enteropathica. *PLoS One*. 2013; 8: e72543.

2) Spinazzi M, De Lazzari F, Tavolato B, Angelini C, Manara R, Armani M. Myelo-optico-neuropathy in copper deficiency occurring after partial gastrectomy. Do small bowel bacterial overgrowth syndrome and occult zinc ingestion tip the balance? *J Neurol*. 2007; 254: 1012-1017.

3) Hedera P, Peltier A, Fink JK, Wilcock S, London

- Z, Brewer GJ. Myelopolyneuropathy and pancytopenia due to copper deficiency and high zinc levels of unknown origin II. The denture cream is a primary source of excessive zinc. *Neurotoxicology*. 2009; 30: 996-999.
- 4) Kimura E, Hirano T, Yamashita S, Hirai T, Uchida Y, Maeda Y, et al. Cervical MRI of subacute myelo-optico-neuropathy. *Spinal Cord*. 2011; 49: 182-185.
- 5) Hatori Y, Lutsenko S. The Role of Copper Chaperone Atox1 in Coupling Redox Homeostasis to Intracellular Copper Distribution. *Antioxidants (Basel)*. 2016; 5.
- 6) Badarau A, Basle A, Firbank SJ, Dennison C. Crosstalk between Cu(I) and Zn(II) homeostasis via Atox1 and cognate domains. *Chem Commun (Camb)*. 2013; 49: 8000-8002.
- 7) Malaspina A, Kaushik N, de Belleruche J. Differential expression of 14 genes in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord detected using gridded cDNA arrays. *J Neurochem*. 2001; 77: 132-145.
- 8) Li J, Gu X, Ma Y, Calicchio ML, Kong D, Teng YD, et al. Nna1 mediates Purkinje cell dendritic development via lysyl oxidase propeptide and NF-kappaB signaling. *Neuron*. 2010; 68: 45-60.
- 9) Leary SC, Kaufman BA, Pellicchia G, Guercin GH, Mattman A, Jaksch M, et al. Human SCO1 and SCO2 have independent, cooperative functions in copper delivery to cytochrome c oxidase. *Hum Mol Genet*. 2004; 13: 1839-1848.
- 10) Bourens M, Barrientos A. Human mitochondrial cytochrome c oxidase assembly factor COX18 acts transiently as a membrane insertase within the subunit 2 maturation module. *J Biol Chem*. 2017; 292: 7774-7783.
- 11) Yamanaka N, Imanari T, Tamura Z, Yagi K. Uncoupling of oxidative phosphorylation of rat liver mitochondria by chionoform. *J Biochem*. 1973; 73: 993-998.
- 12) Chhetri J, Dilek J, Davies N, Jacobson G, Dallmann R, Gueven N. NQO1 protects against clioquinol toxicity. *Front Pharmacol*. 2022; 13: 1000278.
- 13) Perez DR, Sklar LA, Chigaev A. Clioquinol: To harm or heal. *Pharmacol Ther*. 2019; 199: 155-163.
- 14) 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.