有機リン剤被曝者の非散布時期におけるコリンエステラーゼ活性と
グルタチオンの相関関係について

松枝 澄, 塚田則生,^{1a)} 内山 充,^{1b)} 工藤尚義^{1c)}
弘前大学教養部,^{1a)} 東北大学薬学部,^{1b)} 工藤内科^{1c)}

The Relationship between the Activity of Cholinesterase
and Level of Glutathione in Human Blood by Organophosphorous Insecticides
Poisoning during Cease Operation of the Winter Season

SUMU MATSUEDA, NORIO TSUKADA,^{1a)}
MITSURU UCHIYAMA,^{1b)} and NAOYOSHI KUDO^{1c)}
Department of General Education (Science), Hirosaki University,^{1a)}
Pharmaceutical Institute, Tohoku University,^{1b)} and
Kudo Medical Establishment^{1c)}

(Received February 12, 1973)

Serum and erythrocyte cholinesterase activities became low in men poisoned by organophosphorus insecticides more than six months after the end of insecticide operation in winter. The decreased cholinesterase activity was temporarily recovered by oral administration of 300 mg of glutathione daily for 4 weeks.

著者らは前報²⁾でメチルパラチオン急性および慢性中毒患者について 1), 血清コリンエステラーゼ (*pseudo*-ChE) 活性値が健常者に比して著しく低下していること, 2), 全血グルタチオン(GSH)値は健常者に比して特に有意の差は認められなかったこと, 3), 急性中毒患者に GSH を静注すれば血清 ChE の回復が見られたこと, 4) GSH 負荷による全血 GSH 値と血球コリンエステラーゼ (*true*-ChE) の変動パターンは平行関係が見出されたことなどの所見より有機リン農薬による ChE 阻害および回復現象と GSH 間に関係のあることを示唆した。

前回メチルパラチオン急性および慢性中毒患者を取扱ったので今回は上記患者の発生した地域内において農薬散布(現在, 1971年4月より禁止されている)終了後6カ月以上をへて常識的にメチルパラチオンそのものの形で未分解残留は考えられない時期の3月13日より5月31日までの期間中に集団検診を行ない, 後述する対照に該当する者を選んで被曝者とし, 被曝者の血清 ChE 活性値の測定, 3), 被曝者の全血 GSH 値の測定を行なった。

そして 1)–3) を都市在住の健常者のそれぞれと比較した。ついで被曝者に GSH 300 mg を毎日経口投与し, 4週間継続した場合, 4), 血清 ChE 活性値の変動, 5), 血球 ChE 活性値の変動, 6), 全血 GSH 値の変動などを経時的に測定し, その後, 無処置1週間後に再度 4)–6) を測定した。これらの結果について報告する。

実験材料および方法

1) 供試血液 健常者は都市に在住し, 男子は本学々生, 女子は学生および看護婦で自他覚的に異常所見を認めない者を選んだ。採血は朝, 空腹時に行ない, しゅう酸ナトリウム(2 mg/ml) 処理を行なって保存することなく直ちに測定した。メチルパラチオン急性および慢性中毒についての便宜上の対照点については前報²⁾に記載した通りであるが, 被曝者として採血した者は, 集団検診によって a), 頭痛, 眩暈, 食思欠如, 嘔吐感など(中毒者特性主訴) および b), 疲労および脱力感, 眼がかすむ, 口渇, 手足の麻痺感, 肩腰および狭心痛その他の主訴のあるもので, 被曝者の90%以上は10年以上メチル

1) Location : a) Bunkyo-cho, Hirosaki, Aomori (青森県弘前市文京町); b) Aobayama, Sendai, Miyagi (宮城県仙台市荒巻字青葉); c) Miyuki-cho, Hirosaki, Aomori (青森県弘前市御幸町)。

2) 松枝 澄, 三上光布, 大滝義博, 工藤尚義, 生化学, 44, 299 (1972)。

パラチオンを主とする有機リン農薬に直接間接接触し、リンゴ果樹園あるいは水稻作およびその兼業者で年齢は30歳以上である。前報²⁾ではツメ慢性中毒者の対照のなかに肝機能、TTT および ZTT 値の異常が数えられたが、今回の被曝者のほとんど全員(98%)は肝機能が正常値を示していることが著しい相異点である。

2) 血清および血球 ChE 活性値測定法 Michel 法³⁾に従って Δ pH を測定して ChE 活性値を決定した。pH meter は HG-2 形デジタル pH 計(電気化学計器社製)を使用した。

3) 全血 GSH 値定量法 Patterson および Lazaraw によるアロキサン 305 法⁴⁾を使用し、細部の点は前報²⁾に準じた。305 m μ の吸光度は日立139型分光光度計(日立製)を使用した。

4) 血漿 GSH 値定量法 しゅう酸ナトリウム(2 mg/ml) 処理を行なった血液 3 ml を使用し、これを 3000 rpm 5 分間遠心分離して血漿をえた。これを 1 ml 使用して方法は上記 3) と同様に行なった。

5) その他 試薬、器具などについては前報²⁾に準じた。

結果および考察

1) 被曝者の血清 ChE 活性値

被曝者と健常者のそれぞれの血清 ChE 活性値を Table I に示した。健常者の 0.91 ± 0.03 (宇尾野⁵⁾によれば健常者値 $0.63-1.0$ (Michel 法), また野口⁶⁾によれば健常者値 $0.80-1.1$ (柴田, 高橋法) に比較して被曝者の 0.64 ± 0.03 は明らかに ChE 活性値の低下を示した。この値は前報²⁾で報告したメチルルパラチオン急性中毒患者値, 0.58 ± 0.02 ; 慢性中毒患者値, 0.60 ± 0.04 と比較すると, 前回の慢性中毒患者と今回の被曝者間に特に有意の差は認められなかった。

2) 被曝者の血球 ChE 活性値

血球 ChE 活性値について健常者と被曝者のそれを比較して Table II に示した。血球 ChE 活性値は被曝男子で 0.43 ± 0.04 , 女子で 0.40 ± 0.04 で, いずれも健常者に比較して著しい低下を認めた。著者らは, すでにラットを使用した場合には, エチルパラチオンによって血清 ChE 阻害度は僅少で, 却って血球 ChE 活性が著しい阻害を受けたことを報告した。⁷⁾ この場合は被曝者の血

TABLE I. Comparison of Human Serum Cholinesterase Activity of Normal Health with Poisoning by Methylparathion after Cease Operation during the Winter Season

	No. of samples	Activity (Δ pH)
Poisoning	54	0.64 ± 0.03
Normal health	12	0.91 ± 0.03

Data are shown as means $\pm$ s.e.

TABLE II. Comparison of Erythrocyte Cholinesterase Activity of Normal Health with Poisoning by Methylparathion after Cease Operation during the Winter Season

	No. of samples	Activity (Δ pH)
Poisoning		
male	16	0.43 ± 0.04
female	43	0.40 ± 0.04
mean	59	0.41 ± 0.04
Normal health		
male	14	0.73 ± 0.05
female	11	0.56 ± 0.04
mean	25	0.65 ± 0.10

Data are shown as means $\pm$ s.e.

TABLE III. Comparison of Blood Glutathione of Normal Health with Poisoning by Methylparathion after Cease Operation during the Winter Season

	No. of samples	Blood GSH(mg/dl)
Poisoning	37	40.4 ± 1.89
Normal health	12	40.8 ± 2.09

Data are shown as means $\pm$ s.e.

球 ChE 活性値の著しい低下が同様に認められた。

3) 被曝者の全血 GSH 値

結果 1) および 2) に記述した血清および血球 ChE 活性値が被曝者では, 健常者に比して低下を示していたが, その時点での全血 GSH 値を Table III に示した。被曝者の全血 GSH 値, 40.4 ± 1.89 は健常者値, 40.8 ± 2.09 と有意の差は全く認められなかった。メチルパラチオン急性中毒値, 37.8 ± 1.26 ; 慢性中毒値, 38.7 ± 1.26 と比較しても同様であった。

4) 被曝者に対する GSH 経口投与の影響

- 3) H. O. Michel, "Clinical Chemistry," ed. by J. Richard and M. D. Henry, John Weatherhill Inc., 1966, p. 494.
- 4) J. Patterson, A. Lazaraw, L. Levery, *J. Biol. Chem.*, **177**, 197 (1949).
- 5) 宇尾野公義, 日本臨床, 1971年度増刊, 日本臨床社, 1971, p. 490.
- 6) 野口義圀, "グルタチオン研究の進歩," 診断と治療社, 東京, 1969, p. 171.
- 7) 松枝 澄, 大滝義博, 三上光布, 工藤尚義, 生化学, **45**, 91 (1973).

a) 血清 ChE 活性値の変動 被曝者に対して 4 週間、毎日 GSH 300 mg を経口投与し、2 週間および 4 週間目に血清 ChE 活性値を測定し、その後無治療状態で 1 週間放置し、再度活性値を測定した結果を Fig. 1 に示した。投与期間に比例して回復しているが、ついで無治療状態になると再び活性値の低下が認められた。これに関して Mortensen ら⁸⁾によれば、GSH の生体内消費速度は早く、ラットの例で半減期 ($T_{1/2}$) は 65 時間といわれている、著者らの場合、ヒトを対照としているので半減期は正確には分らないが、実験結果からかなり早いと思われる。したがって、血清 ChE 回復のためにはさらに長期間投与の必要性が示唆される。このように著者らの結果は生体内 GSH と血清 ChE 活性値の相関性として注目される。なお、著者らはすでに GSH がメチルパラチオン阻害血清 ChE 賦活に関係していることについて言及している。⁹⁾

Fig. 1. Effect of an Oral Administration of 300 mg of Glutathione Daily for 4 Weeks and under Nontreatment for a Week on the Serum Cholinesterase Activity of Methylparathion Poisoning

b) 血球 ChE 活性値の変動 a) と同じ時点で血球 ChE 活性値の経時的変化を測定して Fig. 2 に示した。GSH 負荷期間中は活性値は直線的に回復していることは注目される。後述のように経口負荷の GSH が血球内に取込まれる量は 2% 以下と推定されるが、中尾ら¹⁰⁾によれば GSH はそのまま赤血球膜を通過するが、その量は 60 分で 2.6% と低いが、赤血球機能を有意にかえると考えられている。赤血球 GSH は補酵素としての

Fig. 2. Effect of Glutathione on the Erythrocyte Cholinesterase Activity under the Same Condition as Fig. 1

Fig. 3. Effect of Glutathione on the Blood Glutathione under the Same Condition as Fig. 1

作用があるといわれ、赤血球外液 GSH が充分高濃度である場合、赤血球 GSH 濃度はかなり高目を示すことが考えられている。

c) 全血 GSH 値の変動 a) と同じ時点において全血 GSH 値を測定して、その経時的変化を Fig. 3 に示した。経口負荷時は直線的に増加しているが無投与状態で全くもとに戻る。このことは a) で述べた Mortensen らがラットで観察した事実がヒトの場合もあてはまることを示している。

d) GSH の血球内取込み 血球内への GSH の取り込みを調べた結果を Fig. 4 に示した。ここに GSH の血球内への取り込みの表示法として、有形成分中の GSH に対して血漿中 GSH の割合を P.G. 値 (%) とした。

8) R. A. Mortensen, M. I. Haley, H. A. Elder, *J. Biol. Chem.*, **218**, 269 (1956).

9) 松枝 澄, 大滝義博, 三上光布, 工藤尚義, *生化学*, **45**, 88 (1973).

10) 中尾喜久, 服部理男, 八幡義人, "グルタチオン研究の進歩," 診断と治療社, 東京, 19649, p. 94.

P.G. 値の低下は GSH の血漿内から血球内への移行を示している。Fig. 4 に示したように約 2% の移行が起っていることが確認された。これは GSH の経口負荷により血漿内の濃度が充分高くなる為それに伴って血球 GSH の濃度がこれと平衡的に高められるものと考えら

Fig. 4. Change the Values of GSH in the Whole Blood and Plasma under the Same Condition as Fig. 1, and P.G. Value

—x—: the whole blood GSE (mg/dl)

—o—: the plasma GSH (mg/dl)

—●—: P.G. value (%)

(GSH (mg/dl) in plasma/GSH (mg/dl) in corpuscle) × 100 it shows the taking of GSH into the corpuscle

れる。

5) GSH の薬理効果について

上田¹¹⁾ は有機リン中毒マウスを使用して, *in vivo* で ChE 復活剤の無効量に GSH を添加して 100% 救命効果をあげたが, 作用機序は脱メチルかあるいは ChE 賦活か不明であるとしている。著者らの場合 GSH の著しい効果は認められたが, 作用機序は今のところ断言出来ない。現在, ラット, 豚およびヒト血液を用いて *in vitro* で GSH の効果について研究継続中である。

結 論

以上の結果を要約すると次のようになる。

1) メチルパラチオンを主とする有機リン農薬散布地域で薬剤散布終了後 6 ヶ月以上経過した時点で被曝者の血清および血球 ChE 活性値を測定して健常な都市在住者に比して両者の低下を認めた。

2) 被曝者の全血 GSH 値, 肝機能(ZTT および TTT 値) は健常者と有意の差は認められなかった。

3) 被曝者に 4 週間, 毎日 GSH, 300 mg を経口投与した。期間中は血清および血球 ChE 活性値は回復したが, 投与を中止すれば旧態に復する。

謝辞

本研究にご協力を仰いだ弘前大学理学部長 佐藤光雄教授, 藤田 昂薬剤部長, および青森リング試験場所員各位に感謝致します。

11) 上田喜一, “グルタチオン研究の進歩,” 診断と治療社, 東京, 1969, p. 75.