は調査例が少ないので正確な傾向は不明であるが、大腸菌群陰性のものがあり、またコルク栓より平均一般細菌数も少なかった。

(2) 水筒水と原水との比較

1) 調査日

昭和37年6月8日

2) 対象

(1)の調査で対象とした37例の水筒水のうち細菌学的汚染を示した32例につき、各家庭を訪問して水筒につめた原水を採水した。この際不在のため12例は採水が出来なかったもので、可能であった20例について行なった。他に水筒水の水質が適であった1例も加えて21例を対象とした。

3) 方法

一般細菌数および大腸菌群につき衛生試験法に従って行なった。

4) 調査結果

Table II に調査結果を示す。表に示すように21例中7例をのぞいては細菌学的に清浄であった。したがって清浄水13例はいずれも水筒に入れたのちに汚染を受けたものと考えられる。原水が汚染を受けていたものは水筒水でさらに著しい汚染を示していた。

2. 考察

(1) 水筒水の水質は理化学的試験では汚染がいく分認められたが、詳細は原水との比較をまたなければならない。

(2) 細菌学的汚染は極めて著しくかつ一般的であった。この汚染は原水が清浄な場合にも一般的に認められるので、水筒内での汚染によるものと認められる。

(3) 水筒の材質としてはアルマイトとポリエチレンが用いられている。両者の間に認むべき汚染差はない。しかしコルク栓は汚染を増大させるようで、ポリエチレン栓が望ましいと思われる。

以上に基つき水筒水を清浄に保つためには次の対策が必要と考えられる。

(1) 水筒特に栓の洗浄を充分にし、できれば熱湯消毒を行なうことが望ましい。

(2) 水筒水による汚染と同時に使用する児童、生徒の手による汚染も考えられるので、飲用時の手洗いを励行することが望ましい。

終りに実験に協力された辻田二郎、加納和子、西川裕子、村瀬洋子、福原彰の諸君に感謝の意を表する。

(37. 7. 3)

有機燐製剤による血中コリンエステラーゼの阻害とPAMによる回復(I)

東北大学医学部薬学科 奥井誠一、渡辺精子、橋本幸子

The Inhibition of Human Blood Cholinesterase by Organophosphorus Compounds and the Reactivation by PAM (I)

Seiichi Okui, Seiko Watanabe, Yukiko Hashimoto

(Institute of Pharmacy, School of Medicine, Tohoku University)

When six organophosphorus compounds of P=S type (Parathion, Methylparathion, Malathion, Ekin, Baycid and Sumithion) were treated with the oxidative reagent (bromine water), the inhibition of cholinesterase activity by these phosphorus compounds was markedly increased. Similar tendency was found in the case of thiol and sulfoxide type compounds.

When these oxidized organophosphorus compounds were present, the reactivation rate of cholinesterase activity by PAM was elevated significantly. In contrast to these inhibitors dimethoate did not show the increased inhibition of cholinesterase activity by the oxidative treatment and in this case the effectiveness of PAM was also unchanged.

まえがき

有機燐製剤による中毒の場合、コリンエステラーゼ阻害の回復剤として 2-Pyrimidine Aldoxime Methiodi-

de (PAM) が治療に用いられているが、このPAMについては注目すべきいくつかの問題点がある。まづコリンエステラーゼ (以下 ChE と略) 阻害剤である有機燐製

剤や Carbamate 製剤による中毒の治療に PAM がいづれの場合にも有効とは限らず、むしろ一部の有機磷製剤および Carbamate 製剤にはほとんど無効であり、その他の有機磷製剤に対しても治療上の効果に差がみとめられる点である^{1),2)}。さらにこれを *in vitro* で観察した場合、同様に各有機磷製剤に対する PAM の効果に差異が認められるが、さきの *in vitro* における治療効果とは一致しない。これらの現象は Wilson ら³⁾ の提唱した有機磷製剤による ChE の阻害機構さらには PAM による回復機構のみでは十分に説明しえない点であり、このことは最近広く用いられつつある低毒性の有機磷製剤について特にいえる現象である。

ここで著者らは有機磷製剤の生体内における酸化的な代謝を考慮して、これによる ChE に対する阻害力の変化を検討し、さらに PAM による回復率の変化を比較検討することによって上記問題点の解決のいとぐちを得んとして実験を行なった。

すなわち、各種有機磷製剤の *in vitro* における血液 ChE の阻害と PAM による回復を求め、ついで有機磷製剤を *in vivo* で酸化して酸化体の ChE 阻害力および PAM による回復率を観察したところ、後者においてやや *in vitro* に平行した結果を得た。

1. 実験方法

各種有機磷製剤の血清および血球中の ChE の *in vitro* における阻害と PAM による回復の関係をみるために、以下の実験を行なった。

(1) コリンエステラーゼ阻害剤

用いた有機磷化合物の名称と純度は次のとおりである。

Parathion (95%)	Methylparathion (98%)
Malathion (95%)	Ekatin (93%)
Baycid (93%)	Sumithion (99%)
Estox (91%)	Dimethoate (99.4%)
TEPP (40%乳剤)	Methyldimethone(92%)

(2) コリンエステラーゼ

人血清中のいわゆる Pseudo-cholinesterase および血球中の True-cholinesterase を用いた。すなわち、血清および血球を分離して、pH 7.4 の Phosphate Buffer でそれぞれ、15 倍、50 倍に希釈して用いる。

(3) ChE 阻害度測定

Hestrin⁴⁾ による比色法を用いる。

1) 試 薬

① 緩衝液：リン酸一カリウム (KH_2PO_4) 9.076 g, リン酸二ナトリウム ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 95.52 g を再蒸留水にとかし全量を 1 L としたものを用时 5 倍希釈す

る。

② メチル硫酸ネオスチグミン注射液

③ アセチルコリン溶液：塩化アセチルコリン 0.1 g を緩衝液にとかし 100 ml とする。

④ 2M 塩酸ヒドロキシルアミン溶液

⑤ 3.5M 水酸化ナトリウム溶液

⑥ 塩酸 (1 : 2)

⑦ 塩化鉄液：塩化第二鉄 ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 10.0 g を 0.1N 塩酸にとかし 100 ml とする。

2) 実施法

比色対照用 A, 酵素活性 0 % 用 B, 酵素活性 100 % 用 C なる試験管のほかに、各種濃度の ChE 阻害剤を入れる試験管を用いて次のようにおこなう。試験管 A, B, C には再蒸留水 1 ml, 阻害剤用の試験管には各種濃度の阻害剤を 1 ml ずつ入れて、10 分間 37° の恒温槽中においた後、A, B には酵素液 (血清を緩衝液で 15 倍に希釈) を 1 ml とネオスチグミン液 1 滴, 他の試験管には酵素液を 1 ml を加えて 1 時間 37° において酵素阻害反応を行ない、次に A に緩衝液 1 ml, 他の試験管にはアセチルコリン溶液 1 ml を加えて 37° で 40 分間おき、アセチルコリンの分解を行なう。ついで全試験管に塩酸ヒドロキシルアミン溶液と水酸化ナトリウム溶液の等量混合液 2 ml を加えて 15 分間室温に放置後、塩酸 (1 : 2) および塩化鉄液をそれぞれ 1 ml 加える。

A をブランクとして 530 mμ で比色定量する。

上の操作で得た Optical density (O.D.) から次のような計算方法で ChE の残効活性度を求める。

$$\frac{\text{B の O.D.} - \text{各種濃度阻害剤の O.D.}}{\text{B の O.D.} - \text{C の O.D.}} \times 100 \\ = \text{ChE 残効活性度 (\%)}$$

(4) 阻害 ChE の PAM による回復率測定

この目的には 6 本の試験管を用いる。すなわち ① は ChE を有機磷製剤で 80 % 阻害した後 PAM で回復させるもの、② は阻害したままで PAM を加えないもの、③ は阻害せず ChE の本来の活性を示すものとし、①' ~ ③' はそれぞれの対照用とする。まづ ① の試験管に (3) の実験から求めた 80 % 阻害濃度に相当する阻害剤を 1 ml とり、37° で 10 分間放置後、酵素液 1 ml を入れ 37° で 1 時間酵素阻害を行なう。その後 PAM 溶液 ($1 \times 10^{-3}\text{M}$) 1 ml を加え 37° で 20 分間保温後、アセチルコリン溶液 1 ml を加え、以後の操作は (3) の場合と同様に行なう。② の試験管にも 80 % 阻害濃度の阻害剤 1 ml を入れ、① の試験管より 20 分おくらせて 37°, 10 分間保温する。その後酵素液 1 ml を加え 37° で 1 時間 ChE 阻害を行ない ① の試験管と同時にアセチルコリン溶液を加え、(3)

と同じように実施する。③は①の阻害剤のかわりに再蒸留水 1 ml を入れて①の試験管と同時に、①と同様の操作を行なってゆく。しかし①に PAM 液を入れるときに③には緩衝液を 1 ml 加える。①'~③'は各々①~③と平行して操作を行なうが、アセチルコリン溶液のかわりに緩衝液を 1 ml 加える。③'を比色ブランクとし、530m μ での optical density を求め、次のように回復率を得る。

$$\frac{\text{②の O. D.} - \text{①の O. D.}}{\text{②の O. D.} - \text{③の O. D.}} \times 100 = \text{回復率\%}$$

(5) 血球 ChE を用いた場合の回復

人血液を遠心分離して得た血球を 0.9% 食塩水で 3 回洗い、阻害剤を加えて 37° で血球 ChE を阻害し、再び 0.9% 食塩水で 3 度洗じょうして余分の阻害剤を除き、遠心分離して阻害血球 ChE を得る^{5), 6)}。阻害率を 80% に調整する場合、二、三の阻害剤では溶血をおこすので、それらについては溶血をおこさない最高阻害率

の阻害血球 ChE を用いて PAM による回復を試みた。なお、阻害剤はすべて 0.9% 食塩水溶液になるよう調整する。

遠心して得た阻害血球は緩衝液で 50 倍に希釈して溶血させ、その 1 ml を阻害酵素液として回復の実験に供した。前記血清 ChE の場合の回復実験の条件と同一とするためこれにまず 1 ml の再蒸留水を加える。アセチルコリン溶液を加えて 40 分間 37° でアセチルコリン分解を行なう操作以後は全く(3)と同様であり、PAM 1 ml を加えて回復を行なう操作は(4)の実施法と同じである。

(6) 有機燐製剤の酸化体の ChE 阻害と PAM による回復

有機燐製剤は生体に入ると酸化体となりさらに強い毒性を示すといわれる。著者らはこの点に注目して *in vitro* で酸化反応⁷⁾を行なわせて、ChE 阻害と回復率の変化を検討した。

Table 1

有機燐製剤名	構 造 式	血清 ChE 50% 阻害 濃度 (mol 濃度)	血清 ChE 50% 阻 害濃度 ブロム酸 化後 (mol 濃度)
Parathion	$\text{C}_2\text{H}_5\text{O} \text{---} \text{P}(=\text{S}) \text{---} \text{O} \text{---} \text{C}_6\text{H}_4 \text{---} \text{NO}_2$	$2.2 \times 10^{-4} \text{ } ^{7)}$	2.5×10^{-8}
Methylparathion	$\text{CH}_3\text{O} \text{---} \text{P}(=\text{S}) \text{---} \text{O} \text{---} \text{C}_6\text{H}_4 \text{---} \text{NO}_2$	$3.2 \times 10^{-5} \text{ } ^{7)}$	1.1×10^{-6}
Methyldimethone	$\text{CH}_3\text{O} \text{---} \text{P}(=\text{O}) \text{---} \text{S} \text{---} \text{C}_2\text{H}_4 \text{---} \text{SC}_2\text{H}_5$	4.5×10^{-5}	2.26×10^{-6}
Malathon	$\text{CH}_3\text{O} \text{---} \text{P}(=\text{S}) \text{---} \text{S} \text{---} \text{CH}(\text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5)_2$	9.1×10^{-5}	7.6×10^{-7}
Ekatin	$\text{CH}_3\text{O} \text{---} \text{P}(=\text{S}) \text{---} \text{S} \text{---} \text{C}_2\text{H}_4 \text{---} \text{S} \text{---} \text{C}_2\text{H}_5$	4.1×10^{-5}	1.4×10^{-5}
Baycid (B4895)	$\text{CH}_3\text{O} \text{---} \text{P}(=\text{S}) \text{---} \text{O} \text{---} \text{C}_6\text{H}_3(\text{CH}_3)(\text{SCH}_3)$	1.4×10^{-4}	5.4×10^{-7}
Sumithion	$\text{CH}_3\text{O} \text{---} \text{P}(=\text{S}) \text{---} \text{O} \text{---} \text{C}_6\text{H}_3(\text{CH}_3)(\text{NO}_2)$	1.3×10^{-4}	6.3×10^{-7}
Estox (B4741)	$\text{CH}_3\text{O} \text{---} \text{P}(=\text{O}) \text{---} \text{S} \text{---} \text{CH}(\text{CH}_3) \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{S}(=\text{O}) \text{---} \text{C}_2\text{H}_5$	2.1×10^{-4}	2.7×10^{-6}
Dimethoate	$\text{CH}_3\text{O} \text{---} \text{P}(=\text{S}) \text{---} \text{S} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CONHCH}_3$	5.5×10^{-4}	6.5×10^{-4}
TEPP	$\text{C}_2\text{H}_5\text{O} \text{---} \text{P}(=\text{O}) \text{---} \text{O} \text{---} \text{P}(=\text{O}) \text{---} \text{OC}_2\text{H}_5$	1.32×10^{-8}	—

実施法：飽和ブロム水 0.5 ml を 100 ml の再蒸留水に加えて、ブロム水溶液をつくる。各種濃度阻害剤 0.9 ml に上記ブロム水溶液 0.1 ml を加え全量 1 ml とし、よくふりまぜて、ただちに酵素液を加え前回と同様操作する。

2. 実験結果ならびに考察

(1) 各種有機リン製剤の ChE 阻害力とその酸化による変化について

有機リン製剤を *in vitro* で酸化した場合、その濃度と血清 ChE 阻害との関係を酸化前後で比較すると Fig. 1 のようである。

Fig. 1

なお、50% 阻害濃度は Table 1 に示すようになる。

上記結果を総合すると、一般に P=S 体は酸化によって著しく ChE 阻害力が增大することが、またメチルジメトンのごときチオール体、エストックスのごとくスルホオキシド体も酸化によって ChE 阻害力の増大することが認められた。これは酸化によってそれぞれ P=O 体、S オキサイドとなり^{9), 10)}、さらにエストックスの場合はスルホン体となって阻害力を増しているものと考えられる¹⁰⁾。Dimethoate は酸化によって全く阻害力の変化を示さず、Ekatin は阻害力を増すがわずかである。S を含まぬ有機リン製剤は当然阻害力に変化を生じない。

これらの結果から、動物に対する毒性はきわめて大きいにもかかわらず *in vitro* の ChE 阻害はさほどでないもの、たとえば Methylparathion 等の作用を説明することができる。

in vitro の酸化によっては ChE 阻害力は極めて増大するにもかかわらず動物に対する毒性の比較的弱いもの、たとえば Malathion, Sumithion 等に対しては、それらが生体内では酸化され難いか、または酸化されるまえに分解されてしまうという可能性が考えられる。

(2) 有機リン製剤により阻害された ChE の PAM による回復について

阻害された酵素への PAM の反応時間と回復率との関

係は一般に約 20 分間 PAM を作用させた場合安定した値が得られたので¹¹⁾回復反応時間としてこの値をとったが、P=S 体のうちには PAM によって直ちに回復現象を起すものがあり、この点是有機リン製剤の阻害機構の上でさらに検討を加える必要がある。

ブロム酸化前後における各種有機リン製剤による阻害酵素の PAM での回復率は Table 2 のようである。

PAM による回復率の実験結果から一般に ChE 阻害力の高いものは回復率も高い傾向が見られる。酸化処理前には回復のほとんど見られなかったものでも、酸化によって ChE 阻害力が増大したものは回復率もそれにしたがって増大することが認められる。Dimethoate は酸化により全く ChE 阻害力に変化がないが、PAM による回復率もほとんど変化しない。

これらの傾向は従来治療面で見られていた PAM の効果にはほぼ平行するものである。

血球 ChE 阻害の場合、阻害剤の濃度は血清 ChE の場合よりも数倍高いものを用いたが、血球細胞膜の透過性の問題および有機リン製剤に含まれている界面活性剤による溶血の問題等を考慮して、さらに検討を要するものと思われる。

Table 2

有機リン製剤	回復率		酸化体の回復率	
	血清	血球	血清	血球
Parathion	75%	81%	85%	93%
Methylparathion	52	62	82	90
Malathion	21	0~10	63	32
Ekatin	0	0	30	21
Baycid	0	0	60	51
Sumithion	15	10	88	78
Estox	55	71	68	60
Dimethoate	0	0	10	0
TEPP	91	93	~	~

3. 結 論

各種有機リン製剤の人血液コリンエステラーゼに対する阻害度およびその PAM による回復率を測定し、有機リン製剤を *in vitro* で酸化することによるそれらの阻害、回復の様子の変化を比較検討した。

その結果、①一般に、P=S 体は酸化によりコリンエステラーゼ阻害力を著しく増大すること、またチオール体およびそのモノオキサイドにおいても酸化によって ChE 阻害力の増大のあることを認めた。② PAM による回復率の低いもののうち、酸化によりコリンエステラーゼ阻害力を増大するものについては、PAM による回

復率も同時に増大している事実を認めた。ジメトエートのごとく酸化により全く阻害力に変化を示さないものは PAM による回復も酸化前後においてほとんど見られない。

以上のように有機リン製剤の酸化体に対する PAM の *in vitro* における効果は治療面における PAM の効力にほぼ平行するものと考えられる。

最後に、本実験に御協力を得た内山充氏、実験の一部を担当した秋山知子氏に感謝する。また有機リン剤の提供をうけた日本特殊農薬株式会社、住友化学工業株式会社三共株式会社にも併せて謝意を表する。(37. 7. 23)

文 献

- 1) D. M. Sanderson, E. F. Edson : J. Pharm. Pharmacol., **11**, 721 (1959).
- 2) D. M. Sanderson : J. Pharm. Pharmacol., **13**, 435 (1961).
- 3) I. B. Wilson, S. Ginsbury : Biochim. Biophys. Acta, **18**, 168 (1955).
- 4) S. Hestrin : J. Biol. Chem., **180**, 249 (1949).
- 5) A. F. Childs, D. R. Davies, A. L. Green : Brit. J. Pharmacol., **10**, 462 (1955).
- 6) 赤堀 : 酵素研究法, **2**, 18 (1960).
- 7) H. O. Fallscheer, J. W. Cook : J. Assoc. Offic. Agr. Chemists, **39**, 691 (1956).
- 8) T. R. Fukuto, R. T. Metcalf, *et al.* : J. Econ. Entomol., **48**, 347 (1955).
- 9) R. T. Metcalf, *et al.* : *Ibid.*, **50**, 338, 399, 527 (1957); **52**, 435 (1959).
- 10) J. S. Bowman, J. E. Caside : J. Agr. Food chem., **5**, 192 (1957).
- 11) 秦, 奥田, 山本, 佐藤, 米田, 吉川 : 衛生化学, **5**, 37 (1957).

アルカリ分解成績体の検出による有機リン酸系殺虫剤の同定について (II)¹⁾

東京大学薬学部衛生裁判化学教室 浮田忠之進, 浜田 昭, 高橋朋子

Identification of Several Organophosphorous Insecticides by Detection of the Alkaline Hydrolysis Products. II. Tyunoshin Ukita, Akira Hamada and Tomoko Takahashi (Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo)

The alkaline hydrolysate of nine organophosphorous systemic insecticides were fractionated by means of paper chromatography and paper electrophoresis. The nine insecticides were Systox, Improved Metasystox (O, O-dimethyl-S-2 (ethylthio) ethyl phosphorothioate), Ekatin (O, O-dimethyl-S-2-(ethylthio) ethyl phosphorodithioate), Thimet (O, O-diethyl-S-2-(ethylthio) methyl phosphorodithioate), Mesyston (O, O-dimethyl-S-2-(ethylsulfoxy) ethyl phosphorothioate), Dimethoate (O, O-dimethyl-S-(N-methylcarbamoyl) methyl phosphorodithioate), Phosdrin (O, O-dimethyl-O-1-methoxycarbonyl-1-propene-2-yl phosphate), Endothion (O, O-dimethyl-thiophosphorylmethyl-2-methoxy-5-pyrone-4) and Pestox-3 (octamethyl pyrophosphoramidate). Some of the main hydrolysis products of each of the insecticides were characterized and identified by comparison with authentic specimens. The results obtained afford a systematic method available for the identification of any one of these insecticides.

著者らは前報¹⁾においてパラチオンを中心とする一群の有機リン酸系殺虫剤の化学的検法として、これらをアルカリ加水分解して生じる成績体につき、濾紙クロマトグラフィーおよび濾紙電気泳動法を併用して検出定性することによって、原薬剤の種類を判定する方法を試みた。この方法によれば各薬剤はそれぞれ特有のパターン

を示しており、この方法が微量の有機リン酸系殺虫剤の検出ならびに同定に有用であることを報告した。この方法は従来これら薬剤について行なわれていた酵素化学的検出法であるコリンエステラーゼ活性の阻害試験が定量的な意味での鋭敏度は大きい、対象とする薬剤の定性が不可能であること、またこの欠点の補償として用いら