ラットの血清コリンエステラーゼ活性およびアイソザイム に及ぼす有機リン化合物の影響と解毒剤 PAM の効果

Effects of Organophosphorus Compounds and the Efficacy of PAM
on Rat Serum Cholinesterase Activity and Isoenzyme

東京歯科大学衛生学教室

山中すみへ・市岡功己・西村正雄

Sumie Yamanaka, Katsumi Ichioka and Masao Nishimura

Department of Hygiene, Tokyo Dental College, Tokyo

A variety of organophosphorus compounds with low acute toxicity levels are widely used as pesticide. This paper reports on the effects of several organophosphorus compounds and 2-pyridine aldoxime methiodide (PAM) on rat serum cholinesterase (ChE) activity and isoenzyme. The following results were obtained.

1. Twenty bands of serum ChE isoenzyme from normal rats were detected by electrophoretic separation on polyacrylamide gradient gel. The inhibition patterns of separated ChE isoenzyme obtained by incubated it in vitro with various organophosphorus oxon-types were different.

2. The serum ChE activity in rats was inhibited by the administration of various organophosphorus compounds ($1/2$ LD₅₀, p.o.). The spontaneous recovery of the enzyme was comparatively rapid in rats treated with Dichlorvos or Parathion, but it was slow in those treated with Fenitrothion or Pyridaphenthion. The effects of PAM which had been administered at the same time on the recovery of the serum ChE activity was marked in those rats treated with Parathion or Pyridaphenthion.

3. Serum ChE isoenzyme patterns in rats administered various organophosphorus compounds were different, but each of them was similar to the respective pattern inhibited in vitro. Of the twenty bands of serum ChE isoenzyme, band 7 was specifically reactivated by the administration of PAM, and PAM was effective in reactivating serum ChE to rats treated with Parathion or Pyridaphenthion, which specifically had inhibited band 7 of ChE isoenzyme.

4. Of the twenty bands of non-specific ChE isoenzyme, acetylcholinesterase activity was highest in band 4, 5, 7, and butyrylcholinesterase activity was highest in band 5.

PAM seemed to be able to reactivated the high acetylcholinesterase activity in band 7 of ChE isoenzyme, and it was effective only for those organophosphorus compounds which specifically had inhibited band 7, such as Parathion and Pyridaphenthion.

はじめに

有機リン化合物の中毒は、主としてコリンエステラーゼ (ChE と略す) 活性が阻害され体内にアセチルコリン (ACh) を蓄積するためによることは周知の事実である。

ところが、有機リン化合物には、急性毒性が強く散布中の中毒事例が多いために特定毒物に指定されている TEPP や Parathion があり、一方、急性毒性が弱いため普通物に分類されているナンコール、Marathion (一

般名、マラソン)、Fenitrothion (一般名、スミチオン) や Pyridaphenthion (一般名、オフナック) などもあり、それらの LD₅₀ 値にかなりの差異がある¹⁾。

また最近の傾向として、作用機序が明らかで急性毒性が弱く、しかも蓄積性のない有機リン化合物が防疫用殺虫剤として選ばれ広く使用されつつあるが、これらの低毒性有機リン化合物には、Parathion に対する特効的解毒剤である 2-pyridine aldoxime methiodide (PAM と略す) が一般的に有効でないという問題点がある。しか

Table 1 Chemical names, trade names and LD₅₀ values of experimental pesticides

Pesticide	Trade name	Chemical name	LD ₅₀ value (p.o. in rat)
Parathion	Parathion	0, 0-diethyl 0-(<i>p</i> -nitrophenyl) phosphorothioate	10 mg/kg
Dichlorvos	DDVP	2, 2-dichlorovinyl dimethyl phosphate	110
Fenitrothion	Sumithion	0, 0'-dimethyl 0-(3-methyl-4-nitrophenyl) phosphorothioate	340
Pyridaphenthion	Ofunack	0, 0'-diethyl-0-(3-oxo-2-phenyl-2H-pyridazine-6-yl) phosphorothioate	800
Prothiophos	Tokuthion	2, 4-dichlorophenyl ethyl S-propyl phosphorothiothionate	1, 700

し低毒性有機リン化合物の中にも Pyridaphenthion のように PAM の解毒効果が認められるものもある²⁾。

このような有機リン化合物に対する PAM の有効性の差異や、急性毒性 LD₅₀ 値の差、あるいは中毒症状のちがいは、ChE 阻害作用のメカニズムのちがいによるものと考えられる。

このような ChE 阻害作用の質的な差異を明らかにするために、ラットの血清 ChE に及ぼす有機リン化合物の影響や、PAM 投与の効果を、ChE 活性値の変動とともに ChE アイソザイムの変化から調べることにした。

アイソザイムの研究は、近年、ChE, GOT, LDH, CPK や AIP など日常の臨床検査にまで発展し、疾患の一診断法となっており、とくに ChE アイソザイムは遺伝学的にも特異な酵素であることから遺伝研究の分野で多くの報告がある³⁻⁶⁾。また、イエバエなどの衛生害虫における感受性、抵抗性系統での ChE アイソザイムのちがい⁷⁻⁹⁾や、阻害パターン¹⁰⁻¹³⁾、その他、数種の動物における発生と組織 ChE アイソザイムの特異性¹⁴⁻¹⁷⁾や、ヒトにおける疾患との関係¹⁸⁻²⁰⁾ など数多くの研究報告がある。

しかし、哺乳動物での有機リン化合物の影響や解毒剤 PAM の効果を、ChE アイソザイムから追求した報告はほとんどない。

そこで、ラットの血清を用いて、まず *in vitro* で各種有機リン化合物を作用させ、ChE アイソザイムの阻害パターンを調べて有機リン化合物の差異を確認したうえで、次に有機リン化合物を投与した場合の *in vivo* における血清 ChE 活性値の変動やアイソザイムの阻害パターンとの関連を調べた。さらにまた解毒剤 PAM の効果を、ChE 活性値とアイソザイムパターンから解析することにより、各種有機リン化合物の ChE 阻害作用のちがいを量および質の両面から追求した。

方 法

1. 試薬および装置

1) 使用した有機リン化合物

本論文で使用した有機リン化合物を、Table 1 に薬剤名、商標名、化学名の順に示し、本文中ではすべて薬剤名を用いた。またラットに有機リン化合物を投与する際、LD₅₀ 値の 1/2 量を経口投与したので、Table 1 には、ラットの経口 LD₅₀ 値¹⁾も併せて示した。

なお、*in vitro* の実験では、P=S 結合の有機リン化合物の場合にはその活性型 (P=O 結合, oxon-type) の化合物も使用したが、いずれも各々の農薬製造関連会社より供試されたものである。

2) PAM 注射液

解毒剤 PAM は、住友化学工業製のパム注射液 (500 mg/20 ml 含有のアンフル) を使用した。

3) 電気泳動用緩衝液 (pH 8.35)

Tris (hydroxymethyl) aminomethane (0.09 M), ホウ酸 (0.08 M), Disodium ethylenediamine tetraacetate (0.003 M) を混合した pH 8.35 の緩衝液を用いた。

4) ChE アイソザイム染色用試薬

(i) リン酸緩衝液 (pH 6.8)——ヤトロン社製のインスタントリン酸緩衝液用粉末 (pH 6.8) を用いて 0.1 M 濃度に調整した。

(ii) 1% α -ナフチル酢酸・アセトン溶液——sigma 社製の α -naphthyl acetate 1 g を特級アセトンに溶解し 100 ml とした。

(iii) ファーストバイオレット B 塩——sigma 社製の Fast Violet B salt を使用した。

5) 特異的 ChE アイソザイム染色用試薬

(i) 染色原液——硫酸銅 (CuSO₄) 1.5 g, グリシン 1.9 g, 塩化マグネシウム (MgCl₂) 5.0 g, マレイン酸 8.8 g

を30%硫酸ナトリウム溶液 (Na_2SO_4) 1.0 l に溶解させたのち、飽和水酸化ナトリウム溶液 (NaOH) にて pH 7.0 に調整して使用した。

(c) 染色液——染色原液 100 ml に、アセチルコリン又はブチリルコリンの基質 100 mg を加えて使用した。基質としては sigma 社製の iodide acetyl thiocholine と iodide butyryl thiocholine を用いた。

6) 電気泳動装置

Pharmacia Fine Chemical 社製の Pharmacia Electrophoresis Apparatus GE-2/4 と、Polyacrylamide gradient gel PAA 4/30 を用いた。すなわち 4~30% の濃度勾配のあるポリアクリルアミドゲル PAA 4/30 の1枚のゲルに12試料を注入したのち、泳動槽に電気泳動用緩衝液 (pH 8.35) 2.8 l を入れた泳動装置 GE-2/4 に取り付け、350 V で3時間電気泳動した。

2. in vitro における ChE アイソザイム阻害の検索方法

Wistar 系正常雄性ラットの腹部大動脈より採血した血液の血清 20 μl づつを、PAA 4/30 のゲル試料室12ヶ所に注入して 350 V で3時間電気泳動した。泳動後直ちにゲルをピアノ線で4等分に切断し、各々のゲルを、有機リン化合物 (Parathion の oxon-type, Prothiophos とその oxon-type, Dichlorvos, Fenitrothion とその oxon-type) の 10^{-8} ~ 10^{-3} M 濃度含むリン酸緩衝液 (pH 6.8) 100 ml 中で浸漬して、37°C で30分間前処理することにより、in vitro で有機リン化合物と作用させた (なお、対照ゲルはリン酸緩衝液のみで前処理した)。前処理の後、荻田の方法⁵⁾により、1% α -ナフチル酢酸・アセトン溶液 1 ml とファーストバイオレット-B塩 0.3 g を加えて、37°C で60分間 incubate することにより ChE アイソザイムを染色し、対照ゲルとの比較により阻害パターンを調べた。

3. 経口投与によるラットの血清 ChE への影響の検索方法

Wistar 系雄性ラット (6~7 週齢) に有機リン化合物を LD_{50} 値¹⁾の 1/2 量経口投与した。

すなわち、Parathion では 5 mg/kg, Dichlorvos 55 mg/kg, Fenitrothion 170 mg/kg, Pyridaphenthion 400 mg/kg, Prothiophos 850 mg/kg を各々 1 群10匹づつ経口投与した。また解毒剤 PAM の投与群では、有機リン化合物の投与と同時に PAM 100 mg/kg を腹腔内注射により投与した。投与後、1, 3, 6, 24 時間後に採血し、その血清を以下の ChE 活性値の測定や ChE アイソザイムおよび特異的 ChE アイソザイムの検索に用いた。

1) ChE 活性値の測定

Michel 法ともよばれる硝子電極による pH 低下度測定法²¹⁾により測定したが、ラットの血清の場合には活性が低いので試料量を 0.2 ml とした。なお活性値はいずれも対照群に対する percentage (%) で示した。

2) ChE アイソザイムの検索法

ラットの血清 20 μl を、in vitro における条件と同じく 350 V で3時間電気泳動し、泳動後直ちに、リン酸緩衝液中で α -ナフチル酢酸を基質として、またファーストバイオレット-B塩を用いたジアゾ染色による ChE アイソザイム染色を行った。

3) 特異的 ChE アイソザイムの検索法

ラット血清中の特異的 ChE, すなわちアセチルコリンエステラーゼ (AChE), およびブチリルコリンエステラーゼ (BuChE) のアイソザイムの検索は、黒瀬の方法⁸⁾を改良して行った。すなわち、泳動後のゲルを、iodide acetyl thiocholine 又は iodide butyryl thiocholine の基質を含んだ特異的 ChE 染色液中で、37°C 3時間浸漬して incubate することによって、白色の zone として検出した。

結果および考察

1. in vitro におけるラット血清 ChE アイソザイムに及ぼす有機リン化合物の影響

正常ラットの血清 ChE は、本法では Fig. 1 のように 20 コのアイソザイムに分離された。原点寄りの高分子側から順にバンド 1~20 に符号し、Fig. では活性値の強い主なバンドにのみ符号で示した。

血清 ChE を電気泳動により分離した後で、in vitro で各種有機リン化合物と incubate することで ChE 阻害を調べたが、まず Prothiophos とその oxon-type および Fenitrothion とその oxon-type の場合の ChE アイソザイムの阻害の zymogram が Fig. 2 である。

Fig. 1 Zymogram of serum ChE isoenzyme in normal rats

Fig. 2 Zymogram of rat serum ChE isoenzyme after electrophoretic separation incubated it with Fenitrothion, prothiophos and their oxon-types in concentration of 10^{-4} M

Fig. 3 Zymogram of rat serum ChE isoenzyme after electrophoretic separation incubated it with the oxon-type of Parathion (10^{-4} M)

有機リン化合物のうち、Prothiophos や Fenitrothion のような $P=S$ 結合 (チオール型) のものは、それ自身 ChE 阻害作用が少なく、肝内酵素により変換を受け、 $P=O$ 結合 (oxon-type) の活性型となつてはじめて強力な阻害作用を示すことが明らかとなっている²²⁾ので、当然のことであるが、Prothiophos や Fenitrothion では、 10^{-4} M 濃度でも ChE アイソザイムの阻害が少ない。Prothiophos ではわずかに全体的な活性の低下がみられるだけであり、また Fenitrothion でも少し阻害がみら

れるが、その oxon-type とは明らかに異なる阻害パターンであった。そこで以後の *in vitro* の実験ではいずれも、生体内で直接 ChE 阻害作用を示す活性型の oxon-type を作用させることにした。

最も急性毒性の強い有機リン化合物である parathion の oxon-type (Paraoxon) を *in vitro* で作用させた場合の阻害パターンを Fig. 3 に示したが、 10^{-6} M 濃度でもバンド12, 18のアイソザイムが残存しているだけで、他のアイソザイムはほとんど阻害されており、非常に阻害作用が強いことを示した。

次に Dichlorvos を 10^{-7} ~ 10^{-4} M 濃度で作用させた場合の阻害パターンが Fig. 4 であるが、各アイソザイムによって Dichlorvos に対する感受性が異なり、Dichlorvos の濃度に準じて徐々に各アイソザイムが阻害されることがわかる。すなわち、Dichlorvos の 10^{-7} M 濃度では、バンド12, 13, 14, 15, 16, 18のアイソザイムが阻害され、 10^{-6} M 濃度ではバンド4, 17が、さらに 10^{-5} M 濃度ではバンド5, 7が阻害され、また 10^{-4} M 濃度ではバンド8, 9がわずかに残存するだけでほとんどのアイソザイムが阻害されたが、バンド19のアイソザイムが比較的阻害されにくいことを示した。

Fig. 4 Zymogram of rat serum ChE isoenzyme after electrophoretic separation incubated it with Dichlorvos in concentrations from 10^{-7} M to 10^{-4} M

また Fenitrothion の oxon-type を 10^{-7} ~ 10^{-4} M 濃度で作用させた場合の阻害パターンが Fig. 5 であるが、Dichlorvos とは異なるパターンであった。Fenitrothion の oxon-type の 10^{-7} M 濃度では、バンド4, 5, 12, 13, 14, 15, 17, 18のアイソザイムが阻害され、さらに 10^{-6} M 濃度ではバンド7, 19のアイソザイムが阻害さ

Fig. 5 Zymogram of rat serum ChE isoenzyme after electrophoretic separation incubated it with the oxon-type of Fenitrothion in concentrations from 10^{-7} M to 10^{-4} M

Fig. 6 Zymogram of rat serum ChE isoenzyme after electrophoretic separation incubated it with the oxon-type of Prothiophos in concentrations from 10^{-7} M to 10^{-4} M

れ、 10^{-5} M、 10^{-4} M 濃度では余り阻害パターンが変わらず、バンド 8、9 のアイソザイムだけが阻害されずにわずかに残存した。

また同じように Prothiophos の oxon-type についても 10^{-7} ~ 10^{-4} M 濃度で作用させた ChE アイソザイムの zymogram を Fig. 6 に示したが、特徴的な阻害パターンであった。Prothiophos の oxon-type の 10^{-7} M 濃度でバンド 12、16 のアイソザイムが阻害され、さらに 10^{-6} M 濃度でバンド 4、5、19 が完全に阻害されたが、 10^{-4} M 濃度でもバンド 7、13、14、17、18 のアイソザイムは

ほとんど阻害されず、とくにバンド 7、17、18 のアイソザイムは 10^{-3} M 濃度でも阻害されず、抵抗性があることを示した。

ラットの血清 ChE の主なアイソザイムについて、各種有機リン化合物に対する感受性をみると、バンド 4、5 のアイソザイムは Fenitrothion や Prothiophos で阻害されやすいが、Dichlorvos には比較的阻害されにくい。またバンド 7 のアイソザイムは Prothiophos では全く阻害されなかった。バンド 17、18 のアイソザイムは Fenitrothion では阻害されやすいが、Prothiophos で阻害されにくく、また逆にバンド 19 のアイソザイムは Prothiophos で阻害されやすく Dichlorvos で阻害されにくいという結果であった。このことから各アイソザイムの有機リン化合物に対する感受性がかなり異なるといえよう。

以上のことから、ラットの血清 ChE に、*in vitro* で各種有機リン化合物を作用させた場合、化合物の種類によってアイソザイムの阻害パターンがかなり異なり、また 20 コのアイソザイムの各化合物に対する感受性も異なることが明らかとなった。

2. 有機リン化合物の経口投与によるラット血清 ChE 活性値への影響

in vitro でのラット血清 ChE アイソザイムに及ぼす影響が、有機リン化合物によりかなり異なることがわかったが、次にラットの生体内における有機リン化合物の ChE 阻害作用のちがいをみるために、まず量的な差異として ChE 活性値の変動を調べた。

各種有機リン化合物を経口投与により LD_{50} 値の 1/2 量を投与してから、1、3、6、24 時間後に採血したラットの血清 ChE の活性値を対照群に対する percentage として示したのが Fig. 7 である。有機リン化合物によって

Fig. 7 Inhibition of serum ChE activity in rats treated with organophosphorus compounds

Fig. 8 Effects of PAM on serum ChE activity in rats (significant difference with/without PAM)

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

投与後のラット血清 ChE 活性の阻害の程度や自然回復の速さがかなり異なる。Dichlorvos や Parathion では ChE 活性の阻害が比較的少ないのに対して、Prothiophos ではかなり阻害が著しいといえる。また Parathion や Dichlorvos, Prothiophos では、24時間後には回復の傾向がみられ、比較的 ChE の回復が早い。Fenitrothion や Pyridaphenthion では24時間後でも、阻害が最も著しく、自然回復が遅いことを示した。Pyridaphenthion での回復の遅い傾向は、堤らの家兎の結果²⁾とよく一致している。

このような血清 ChE 活性の阻害の変動は、振せんや流涎、流涙、眼出血などのラットの中毒症症状の発現とは一致せず、症状の発現からおくれて、血清 ChE 活性の阻害が著しくなるようであった。この理由としては、中毒の発現は血清 ChE の阻害よりも症状と直接関係する組織、臓器の ChE 活性が阻害されるためと考えられるが、この点についてはラットの組織、臓器の ChE 活性の変動をみることによって今後検討されるべきであろう。

また有機リン化合物によって、ラットの血清 ChE 活性の阻害率がかなり異なるのは、今回の投与が LD₅₀ 値の 1/2 量であり、中毒死の直接的な原因が血清 ChE の低下というよりも、呼吸中枢のマヒなどの因子が大きいため、LD₅₀ 値と血清 ChE 活性の阻害率が直接的ではないことを示していると思われる。

次に、血清 ChE 活性の回復に及ぼす解毒剤 PAM の効果を調べたものが Fig. 8 である。有機リン化合物を LD₅₀ 値の 1/2 量投与した場合の ChE 活性に対する回復効果をみたものであるが、PAM の効果が有意に認められたのは Parathion と Pyridaphenthion, Prothiophos であった。一方、Dichlorvos と Fenitrothion では PAM の有意な ChE の回復効果は認められなかった。今回の PAM の投与は、有機リン化合物の投与と同時にやって

いるが、投与後3時間で最も PAM の ChE 回復効果がみられ、6時間後ではその効果が少なくなり、さらに24時間後には Parathion に対しても ChE 活性の回復がみられなくなっている。したがって、PAM の ChE 活性の回復効果が期待されるのは短時間であって、反復使用が効果的であるという定説²⁾は、今回のラットの結果にも示された。

有機リン化合物中毒に対する PAM などのオキシム剤の解毒効果に関しては、多くの報告²³⁻²⁷⁾があり、脳や血液の ChE 活性の回復や、死亡に対する救命効果などについても報告されている。しかし脳や血清の ChE 活性の回復効果と救命効果とは直接的には一致せず、オキシム剤によって脳や血清の ChE 活性の回復があっても救命効果が認められないことがある²⁶⁾。今回の結果でも、Parathion や Pyridaphenthion では、血清 ChE 活性の明らかな回復とともに中毒症状の軽減もみられたが、Prothiophos では、血清 ChE 活性の有意な回復が認められたにもかかわらず、症状の軽減はあまりみられなかった。

これらのことから、ChE 活性の量的な回復だけでは、PAM の解毒効果を判定するには不十分であり、ChE 活性の質的な変動を把握する必要があるように思われた。

そこで、有機リン化合物による血清 ChE 活性の阻害や PAM による回復効果を、血清 ChE アイソザイムによる質的な変動から追求した。

3. 血清 ChE アイソザイムに対する有機リン化合物の影響と PAM の回復効果

有機リン化合物を経口投与により、また PAM を腹腔内注射により投与してから3時間後あるいは24時間後に採血したラットの血清 ChE のアイソザイム像は Fig. 9 に示した。まず、Prothiophos の投与では、バンド 4, 5, 12と19のアイソザイムが著しく阻害されたが、バンド 7 と17, 18のアイソザイムが阻害されず、*in vitro* におけ

Fig. 9 Zymogram of serum ChE isoenzyme in rats, 3hrs. or 24 hrs. (*)
after administration of organophosphorus compounds and PAM.

るその oxon-type の阻害パターンとよく似ていた。

また、Dichlorvos の投与では、バンド12, 18のアイソザイムが阻害されており、これも *in vitro* でバンド12, 18のアイソザイムを比較的阻害しやすいという結果と一致している。

次に Parathion の投与では、バンド7のアイソザイムが特異的に阻害されているが、その他のアイソザイムはあまり阻害されていない。

Fenitrothion と Pyridaphenthion では、投与24時間後に、血清 ChE 活性の阻害が著しかったので、3時間後と24時間後のアイソザイム像を比較して示している。Fenitrothion の投与では、3時間後にバンド12, 13, 14, 15, 18のアイソザイムが阻害され、24時間後にはさらにそれらの阻害が著しくなり、バンド4, 5, 17のアイソザイムも阻害された。この場合もやはり、*in vitro* での Fenitrothion の oxon-type の阻害パターンと一致した傾向であった。このように、有機リン化合物の *in vivo* における血清 ChE の阻害パターンと、*in vitro* におけるその活性型の阻害パターンと比較的類似していることから、有機リン化合物による血清 ChE アイソザイムの阻害パターンは、ある程度 *in vitro* による実験から把握できるといえよう。

また Pyridaphenthion の投与では、3時間後にはバンド7のアイソザイムが特に阻害され、バンド4, 12も少し阻害されているが、24時間後にはさらにそれらの阻害が著しくなっていることがわかる。

次に PAM を同時に腹腔内注射した場合の、血清 ChE アイソザイムの回復効果をみると、バンド7のアイソザイムを回復する効果が明らかに認められ、特異的にバンド7のアイソザイムを著しく阻害する Parathion や Pyridaphenthion において PAM の ChE 回復の効果が大きくあらわれた。

一方、バンド7のアイソザイムを余り阻害しない Dichlorvos, Prothiophos や Fenitrothion では、PAM の投与によりバンド7のアイソザイムが強くなる傾向がみられるが、他のアイソザイムの阻害が回復されないために解毒効果がみられないといえよう。とくに血清 ChE 活性値では PAM の有意な効果が認められた Prothiophos でも、バンド7のアイソザイムだけが回復して、活性値だけは有意に上昇しているが、その他のアイソザイムは全く回復しないために、症状も軽減しなかったものと考えられる。

以上のことから、各有機リン化合物の投与によって血清 ChE アイソザイムが阻害されるが、その阻害パターンは有機リン化合物によってかなり異なり、*in vitro* における活性型による阻害パターンは、生体内における阻害パターンをある程度反映しうることがわかった。また解毒剤 PAM の血清 ChE の回復は、バンド7のアイソザイムにおいてみられ、バンド7のアイソザイムを特異的に阻害する Parathion や Pyridaphenthion において PAM の効果が大きくあらわれることが明らかとなった。

4. ラット血清の特異的コリンエステラーゼアイソザ

イムに対する有機リン化合物の影響

前述までの血清 ChE アイソザイムは、 α -naphthyl-acetate を分解するいわゆる esterase のアイソザイムであり、非特異的 ChE ともいわれるアイソザイムであったが、血清中の特異的 ChE のアイソザイムを検索する目的で、Iodide acetyl thiocholine および Iodide butyryl thiocholine を基質として、血清中のアセチルコリンエステラーゼ (AChE)、およびブチリルコリンエステラーゼ (BuChE) のアイソザイムについて調べた結果が Fig. 10 である。

Fig. 10 Zymogram of serum ChE isoenzyme in normal rats

ラットの血清中の20コの特異的 ChE アイソザイムのうち、AChE 活性が認められるのは、バンド4, 5, 6, 7, 12, 17の各アイソザイムであり、とくにバンド4, 5, 7のアイソザイムに AChE 活性が強く、一方、BuChE 活性は、バンド5のアイソザイムに最も強く、バンド6, 7, 12, 17のアイソザイムにもわずかに活性を示した。

一般に血清 ChE は、pseudo-ChE ともよばれ、基質特異性が少なく、BuChE 活性も強いといわれているが、今回のラットの血清 ChE アイソザイムの結果からは、BuChE 活性よりも、AChE 活性の方が強いことを示唆した。これは、Anderson ら¹⁷⁾が、ラットの血清 ChE は、脳の ChE よりも butyryl ester に対する特異性が高いと説明しながらも、血清 ChE は BuThCh (butyryl thiocholine) よりも AThCh (acetyl thiocholine) をより加水分解しやすいという結果を示していることと一致していた。

また、各種有機リン化合物の投与によるラットの血清 AChE のアイソザイムの阻害は、非特異的 ChE のアイ

ソザイムの阻害パターンと全く同じであった。すなわち、Parathion と Pyridaphenthion の投与では、バンド7の AChE のアイソザイムが著しく阻害され、逆に Prothiophos の投与では、バンド7のアイソザイムが阻害されず、その他のアイソザイムがほとんど阻害された。また Dichlorvos の投与では、バンド12のアイソザイムが阻害され、Fenitrothion では、バンド12, 18の AChE アイソザイムが阻害された。

また解毒剤 PAM の投与によっても、非特異的 ChE アイソザイムの場合と同じく、バンド7の AChE アイソザイムの回復がみられ、とくにバンド7の AChE アイソザイムを著しく阻害する Parathion と Pyridaphenthion においてその回復効果が大きかった。

このことから、PAM の解毒効果を考える場合、最も AChE 活性の強いバンド7のアイソザイムを阻害する有機リン化合物に対して、その回復効果が大きい、その他のアイソザイムを阻害する Prothiophos や Dichlorvos, Fenitrothion などの場合には、バンド7以外のアイソザイムを回復できないので、解毒効果が期待できないといえよう。

結 論

有機リン化合物の中毒における毒性の差異や解毒剤 PAM の回復効果のちがいを検索する目的で、ラットの血清 ChE 活性値の変動や、ChE アイソザイムの阻害パターンの差異を検討して以下の結論を得た。

1. 正常ラットの血清 ChE は、ポリアクリルアミドグラジェントゲル電気泳動によると、20コのアイソザイムに分離されるが、泳動による分離後、*in vitro* で有機リン化合物を作用させると、有機リン化合物の oxon-type (活性型) では、明らかなアイソザイムの阻害が認められた。その阻害パターンは、有機リン化合物の種類によってかなり異なり、また各アイソザイムの各有機リン化合物に対する感受性が異なることがわかった。

2. 各種有機リン化合物を、LD₅₀ 値の 1/2 量経口投与した場合のラットの血清 ChE 活性値の変動を調べたところ、Dichlorvos や Parathion では比較的自然回復が早い、Fenitrothion や Pyridaphenthion ではその回復が遅かった。また PAM の血清 ChE 回復効果は、Parathion や Pyridaphenthion, Prothiophos で認められたが、Dichlorvos と Fenitrothion ではみられなかった。

3. 各種有機リン化合物を経口投与したラットの血清 ChE アイソザイムの阻害パターンは、*in vitro* における

阻害パターンと類似しており、有機リン化合物によってかなり異なることがわかった。また解毒剤 PAM には、バンド 7 のアイソザイムを回復する効果が認められ、バンド 7 のアイソザイムを特異的に阻害する Parathion や Pyridaphenthion においてその回復効果が大きい、その他のアイソザイムを阻害する Dichlorvos や Prothiosphos, Fenitrothion ではその効果がないことがわかった。

4. ラットの血清 ChE の 20 コのアイソザイムのうち、AChE 活性が強いのは、バンド 4, 5, 7 であり、BuChE 活性が強いのはバンド 5 のアイソザイムであることが明らかとなり、また PAM は AChE 活性の最も強いバンド 7 のアイソザイムに回復効果を示すことを確認した。

以上のことから、有機リン化合物によってラットの血清 ChE 活性の変動やアイソザイムの阻害パターンがかなり異なることが明らかとなった。また解毒剤 PAM は、AChE 活性の最も強いバンド 7 の ChE アイソザイムを回復する効果があり、バンド 7 のアイソザイムを特異的に阻害する Parathion や Pyridaphenthion のような有機リン化合物に対してのみ、解毒効果が現われると結論づけられた。

稿を終るに当たり、本研究に用いた化学物質の供与など種々御協力下さいました住友化学工業株式会社に深謝いたします。

文 献

- 1) 西村正雄, 山中すみへ: 化学物質の急性中毒とその処置(1), 農薬中毒(I), とくに有機リン剤とカーバメート剤による急性中毒とその処置, 月刊薬事, **21**, 1587-1594 (1979).
- 2) 堤 璋二, 小沢玲子, 井本邦彦: Pyridaphenthion の cholinesterase 活性阻害に対する解毒について, 日薬理誌, **72**, 609-618 (1976).
- 3) Harris, H., Hopkinson, D. A. and Robson, E. B.: Two-dimensional electrophoresis of pseudocholinesterase components in normal human serum, Nature, **195**, 1296-1298 (1962).
- 4) Harris, H., Robson, E. B., Glen-Bott, A. M. and Thornton, J. A.: Evidence for non-allelism between genes affecting human serum cholinesterase, Nature, **200**, 1185-1187 (1963).
- 5) 荻田善一: 血清コリンエステラーゼの遺伝生化学的研究, 生物物理化学, **15**, 91-102 (1970).
- 6) 荻田善一: 血清酵素アイソザイムの遺伝生化学的研究,

究, 生物物理化学, **16**, 269-275 (1972).

- 7) 荻田善一, 笠井 勉: 薄層電気泳動法における Specific esterase の pH-indicator 法による分離・検出, SABCO J., **1**, 37-41 (1964).
- 8) 安富和男: 数種の有機リン剤ならびにカーバメート剤によるイエバエのエステラーゼ阻害について (第 1 報), 衛生動物, **19**, 44-51 (1968).
- 9) Miyata, T. and Saito, T.: Mechanism of Malathion resistance in the green rice Leafhopper, *Neophotettix cincticeps* Uhler, J. Pesticide Sci., **1**, 23-29 (1976).
- 10) 笠井 勉: 殺虫剤の連合作用に関する遺伝生化学的研究, 防虫科学, **30**, 73-91 (1965).
- 11) Juul, P.: Human plasma cholinesterase isoenzymes, Clin. Chim. Acta., **19**, 205-213 (1968).
- 12) Sakai, K. and Matsumura, F.: Degradation of certain organophosphate and carbamate insecticides by human brain esterases, Toxicol. Appl. Pharmacol. **19**, 660-666 (1971).
- 13) Weber, M. and Trela, F. M.: Studies on the cholinesterase isoenzymes of human blood serum, Folia. Biol., **24**, 223-229 (1976).
- 14) 和田 薫, 赤井三千男: 肝コリンエステラーゼの互換性について, 歯基礎誌, **17**, 201-208 (1975).
- 15) Atherton, R. W. and Lee, I. D.: Changes in the activity and isozymes of acetyl and butyryl cholinesterase during xenopus laevis development, Comp. Biochem. Physiol., **50C**, 27-32 (1975).
- 16) Henderson, N. S.: Acetylcholinesterase isozymes in developing mouse tissues, J. Exp. Zool., **199**, 41-50 (1977).
- 17) Anderson, R. A. and Mikalsen, A.: Substrate specificity, effect of inhibitors and electrophoretic mobility of brain and serum cholinesterase from frog, chicken and rat, Gen. Pharmacol., **9**, 177-181 (1978).
- 18) 黒瀬均二: 血漿 cholinesterase の研究, (II) 実験的研究, 生物物理化学, **16**, 59-67 (1971).
- 19) 三宅洋左, 柴田久雄: 血清中 cholinesterase の isozyme に関する研究, 医療, **28**, 133-136 (1974).
- 20) 柴田久雄, 山田伸夫, 石井公道, 岡部活弥: 血清コリンエステラーゼアイソザイム—特にその臨床的意義, 日消会誌, **76**, 196-204 (1978).
- 21) 西村正雄: コリンエステラーゼ活性値, 職業病検診

- 手技, p. 91-100, 興生社 (1972).
- 22) 北川晴雄, 佐藤哲男: 農薬の毒性, 作用機序, 農薬中毒, p. 17-30, 南江堂 (1978).
- 23) Hobbiger, F.: Protection against the lethal effects of organophosphates by pyridine-2-aldoxime methiodide (PAM), *Brit. J. Pharmacol.*, **12**, 438-446 (1957).
- 24) 山際源二郎: オキシム剤のパラチオン中毒に対する解毒効果, *産業医学*, **2**, 46-60 (1960).
- 25) Natoff, I. L. and Reiff, B. B.: Quantitative studies of the effect of antagonists on the acute toxicity of organophosphates in rats, *Brit. J. Pharmacol.*, **40**, 124-134 (1970).
- 26) Clement, J. G.: Efficacy of Pro-PAM (N-Methyl-1,6-dihydropyridine 2-carbaldoxime Hydrochloride) as a prophylaxis against organophosphate poisoning, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **47**, 305-311 (1979).
- 27) Harris, L. W., et al.: The effect of atropine-oxime therapy on cholinesterase activity and survival of animals intoxicated with P-Nitrophenyl Di-n-Butylphosphinate, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **49**, 23-29 (1979).

(受付 1981年3月9日)