クロルピリホス投与がラット網膜電図に及ぼす影響

Effect of Administration with Chlorpyrifos on Electroretinogram in Rats

関西医科大学公衆衛生学教室

吉川 日出男・吉田 宗弘・原 一郎

Hideo Yoshikawa, Munehiro Yoshida and Ichiro Hara

Department of Public Health, Kansai Medical University, Moriguchi

Changes in electroretinograms (ERG) due to administration of chlorpyrifos were examined in rats. Male Wistar rats were intraperitoneally injected with chlorpyrifos (0.2 mmol/kg body weight), and their cholinesterase (ChE) activities and ERG were measured at various times after the injection. Amplitudes of A and B waves in ERG were more than 50% decreased and latencies of the waves were prolonged 10–20% from 5 h to 2 d after the injection. At the same time, activities of ChE in plasma, erythrocytes, brain and retinochoroid were remarkably decreased. However, the amplitudes and latencies recovered to the control level more rapidly than the ChE activities of the erythrocytes, brain and retinochoroid.

Injection into rats of 0, 0.002, 0.01, 0.05 or 0.25 mmol/kg of chlorpyrifos showed that the chlorpyrifos-induced changes of ERG were dose-dependent, and that a level of 0.05 mmol/kg caused a 50% decrease in the A or B wave 5 h after the injection.

These results indicate that chlorpyrifos caused abnormal ERG characterized by decreased amplitudes and prolonged latencies of A and B waves and that the abnormal ERG did not always correspond to the decreased retinochoroid or brain ChE activities.

Key words: Chlorpyrifos, Electroretinogram, Cholinesterase, Organophosphorus insecticide

クロルピリホス, 網膜電図, コリンエステラーゼ, 有機リン系殺虫剤

緒 言

クロルピリホス (*O,O*-diethyl-*O*-(3,5,6-trichloro-2-pyridinyl) thiophosphate) は、ニカメイチュウ、ヨトウムシなどの大型昆虫の駆除に有効な有機リン系殺虫剤であり、わが国においては、とくにシロアリ防除用の薬剤として使用量が增大している。シロアリ防除作業は、床下などの狭い場所で薬剤を散布するため、クロルピリホスの高濃度曝露が生じることが認められている^{1,2)}。

有機リン剤の生体に及ぼす影響としては、血中コリンエステラーゼ (ChE) 活性の低下がよく知られている³⁾。事実、クロルピリホスの高濃度曝露を受けているわが国のシロアリ防除作業員においては、血漿または血球 ChE 活性の低下していることが報告されている^{2,4)}。しかし、血中の ChE 活性は有機リン剤の曝露指標として有用なものであり、有機リン剤の生体に対する中毒作用を直接

的に示すものではない。有機リン剤の中毒作用は神経系に生じるため、そのことを客観的に検出する目的では、脳波や末梢神経伝導速度を測定することが試行されている^{5,6)}。

一方、1970年代の初めに、長野県佐久地方に多発した視力低下、視野狭窄、屈折異常を主訴とする眼障害に有機リン剤の関与している可能性が指摘されて以来⁷⁾、有機リン剤の網膜や視神経に対する影響が注目を集めている。動物実験においては、薬物の網膜に及ぼす影響を客観的に評価する目的で、網膜電図 (Electroretinogram: ERG) を測定することが行われている⁸⁾。佐久の眼障害者の中には、ERG に異常を示す者が存在することが報告されており⁷⁾、動物実験においても、いくつかの有機リン剤は ERG に明らかに影響を及ぼすことが認められている^{9–11)}。われわれも、クロルピリホスの高濃度曝露を受けていたシロアリ防除作業員において、ERG の異常を認め

た¹²⁾。しかし現在までのところ、動物実験において、クロルピリホスと ERG の関係を直接に検討した報告は見いだせない。

本研究は、シロアリ防除作業者に認められた ERG の異常がクロルピリホス曝露によるものかどうかを判断するための基礎的知見を得る目的で、ラットにクロルピリホスを 1 回腹腔内投与した時の ERG の変化を、経時的、量的に検討したものである。

実験方法

1. 実験動物とクロルピリホスの投与方法

いずれの実験においても、ラットは 12 時間周期（8 時～20 時に点灯）の明暗条件下で飼育し、クロルピリホス投与は午前 9～10 時の間に実施した。

(1) 実験 1

体重約 200 g の Wistar 系雄ラットを 2 群に分け、1 群にはオリーブ油に溶かしたクロルピリホス (0.2 mmol/kg body weight)、他の 1 群にはオリーブ油のみを、それぞれ 1 回腹腔内投与した。投与 5 時間、1 日、2 日、3 日、7 日、14 日、および 21 日後に、両群より 5 匹ずつのラットを無作為に選んで ERG を測定した。また、同時に両群のラットを 4 匹ずつ処理して、心臓採血を行い、脳と眼球を摘出した。

(2) 実験 2

体重約 200 g の Wistar 系雄ラットを 4 匹ずつ 5 群に分け、それぞれに 0、0.002、0.01、0.05、および 0.25 mmol/kg body weight のクロルピリホスをオリーブ油に溶かして腹腔内に投与した。投与 5 時間および 2 日後に ERG を測定し、3 日後に血液、脳および眼球を採取した。

2. 測定方法

(1) ERG の測定と数値化

ラットを、ドロレプタン® (三共、成分：ドロペリドール 2.5 mg/ml) 0.05 ml とケタラール® 50 (三共、成分：塩酸ケタミン 57.6 mg/ml) 0.2 ml の筋肉注射により麻酔後、脳定位固定装置にて頭部を固定し、左眼にミドリリン® P (参天製薬、成分：トロピカミド 0.5%、塩酸フェニレフリン 0.5%) を点眼して散瞳させ、頭皮下に不関電極、耳介に接地電極を設置し、30 分間暗所に静置して暗順応させた。暗順応終了後、ただちに左眼にベノキシール® (参天製薬、成分：塩酸オキシブプロカイン 0.4%) を点眼して眼球を麻酔し、角膜頂点に不関電極として先端を U 字型にした白金線 (0.5 mmφ) を接触させ、左眼の前 30 cm の位置から 1.2 joule の出力 (出力装置：光刺激

装置 SLS-3100 (日本光電社)) でフラッシュ光を照射し、ERG 測定装置 (日本光電社 MEB-7102) を用いて周波数 1～1000 Hz で ERG を測定した。

ERG の測定においては、フラッシュ光を 10 s 間隔で 10 回照射し、各照射によって得られる ERG を加算平均したものを記録した。また、測定中に角膜が乾燥するのを防止するため、随時、生理食塩水を点眼した。Fig. 1 に、対照群ラットの ERG の 1 例とその解析方法を示した。ERG の解析は、最初の陰性波である A 波と、陽性波の中で最大の振幅を示す B 波を対象とし、Fig. 1 に従って振幅と潜時を計測した。

Fig. 1 The method of measurement of amplitudes and latencies in the electroretinogram. 1, Amplitude of the A wave; 2, amplitude of the B wave; 3, latency of the A wave; 4, latency of the B wave.

(2) ChE 活性の測定

血球および血漿 ChE 活性の測定は、血球浮遊液と基質としてヨウ化アセチルチオコリンを用いる方法で実施した¹³⁾。

摘出した脳組織は 9 倍量の生理食塩水を用いてホモジナイズした。また、眼球は水晶体と硝子体を注意深く除去し、残った網脈絡膜を解剖用ハサミを用いて細片にきざみ、0.5 ml の生理食塩水でホモジナイズした。脳および網脈絡膜のホモジネート中の ChE 活性は、血中 ChE 活性に準じて測定した。

3. 統計処理

実験成績は平均値±標準誤差で示した。実験 1 における各測定日ごとの対照群とクロルピリホス投与群との差の検定、および実験 2 における対照群と各レベルのクロルピリホス投与群との差の検定は、分散分析を実施した後、Bonferroni の対比較にて行った¹⁴⁾。

結 果

1. 実験1

Fig. 2 に, 0.2 mmol/kg のクロルピリホス投与後の, 血漿, 赤血球, 脳および網脈絡膜の ChE 活性の経時変化をまとめた。クロルピリホス投与によって各組織中の

Fig. 2 Changes in cholinesterase activities of plasma, erythrocytes, brain and retinochoroid after injection with chlorpyrifos: (○), control (not injected); (●), injected with chlorpyrifos. Rats were intraperitoneally injected with chlorpyrifos (0.2 mmol/kg body weight). One unit of cholinesterase activity is expressed as 1 μ mol thiocholine released per minute. Circles and bars show means and SE ($n=4$), respectively. Significant differences from control group were observed at $p<0.05$ (*), $p<0.01$ (**) or $p<0.001$ (***).

ChE 活性はいずれも顕著に低下しており, 投与5時間後の測定では対照群に比較して, 血漿が17, 赤血球が24, 脳が31, 網脈絡膜が48%の値を示した。低下した ChE 活性の回復は血漿がもっとも速やかであり, 投与7日後の測定において対照群の75%の値を得た。これに対して, 赤血球, 脳および網脈絡膜 ChE 活性の回復は遅く, 投与14日後の測定においてようやく対照群の70%前後の値を認めた。

Fig. 3 に, 0.2 mmol/kg のクロルピリホス投与5時間

Fig. 3 Electretinogram of a rat 5 h after injection with chlorpyrifos: a) control (not injected); b) injected with chlorpyrifos. Experimental conditions were the same as those described in Fig. 2.

Fig. 4 Changes in amplitudes and latencies of electretinograms in rats after injection with chlorpyrifos: (○), control (not injected); (●), injected with chlorpyrifos. Experimental conditions were the same as in Fig. 2. Circles and bars show means and SE ($n=5$), respectively. Significant differences from the control group were observed at $p<0.05$ (*), $p<0.01$ (**) or $p<0.001$ (***).

Table 1 Effects of various levels of chlorpyrifos on cholinesterase activities in rats.

Dose (mmol/kg)	Plasma (unit/ml)	Erythrocytes (unit/ml)	Brain (unit/g protein)	Retinochoroid
0 (Control)	0.68±0.05	1.25±0.06	47.2±2.5	78.3±6.3
0.002	0.60±0.05	1.23±0.18	44.8±5.6	72.2±9.7
0.01	0.56±0.05*	0.91±0.11*	35.4±5.8	67.3±5.1
0.05	0.46±0.02**	0.47±0.07***	23.2±1.8**	60.7±5.6*
0.25	0.29±0.02***	0.10±0.06***	17.0±1.3***	39.1±8.9**

Rats were intraperitoneally injected with chlorpyrifos and their blood, brains and ophthalmos were collected 3 days after the administration. One unit of cholinesterase activity is expressed as $1 \mu\text{mol}$ thiocholine released per minute. Values are means±SE for 4 animals. Significant differences were observed from the control group at $p<0.05$ (*), $p<0.01$ (**) or $p<0.001$ (***) .

後のラット ERG の 1 例を対照群ラットと比較して示した。クロルピリホス投与によって ERG の A 波と B 波の振幅は顕著に減少し、潜時の延長も観察された。

Fig. 4 に、クロルピリホス投与後の ERG の A 波および B 波の振幅と潜時の経時変化をまとめた。A 波、B 波ともにその振幅は投与 2 日後までは対照群の 50% 以下に減少したままであった。しかし、その回復は ChE 活性の回復よりも明らかに速く、A 波においては 3 日後に対照群の 75% 以上の値にまで回復していた。B 波の振幅も、A 波振幅よりはやや遅いものの、投与 3 日後から回復し始め、投与 7 日後の測定において対照群の 69% の値を認めた。一方、潜時は A 波、B 波ともクロルピリホス投与 2 日後まで 10~20% 程度の延長を認めた。

2. 実験 2

Table 1 に、種々の濃度のクロルピリホスを投与して 3 日後の血漿、赤血球、脳および網脈絡膜の ChE 活性をまとめた。いずれの組織の ChE 活性もクロルピリホス投与量との間に明らかな量-影響関係を示した。

Fig. 5 に、種々のレベルのクロルピリホスを投与して 5 時間および 2 日後の ERG の変化をまとめた。いずれの時間においても、計測した A 波および B 波の振幅と潜時はクロルピリホスの投与量に対応して変化しており、クロルピリホス投与量と ERG の変化の間にも明らかな量-影響関係の成立することが判明した。また、統計学的に有意な変化はいずれの場合も 0.05 mmol/kg 投与において初めて生じた。

考 察

今回の実験の第一の目的は、クロルピリホス曝露が ERG を変化させるかどうかを確認することにあった。実験 1 および実験 2 の結果は、クロルピリホスがラット

Fig. 5 Amplitudes and latencies of electroretinograms in rats 5 h (○) and 2 d (●) after injection with various levels of chlorpyrifos. Circles show means and SE ($n=4$), respectively. Significant differences from the control group were observed at $p<0.05$ (*), $p<0.01$ (**), or $p<0.001$ (***) . The control rats were injected with olive oil alone.

ERG の A 波および B 波の振幅を減少させ、潜時を延長させるというものであった。このことは、われわれがシロアリ防除作業において認めた所見とよく一致しており、作業員の ERG の変化がクロルピリホス曝露によるものであることをうかがわせるものと考えられる。

本実験では、クロルピリホス投与により減少した A 波の振幅は、投与 3 日後に対照群の 75% の数値に回復しており、A 波に対するクロルピリホス 1 回曝露の影響は 2、3 日で消失すると考えられた。しかし、われわれが観察したシロアリ防除作業では、クロルピリホスを散布して 5 日後の測定でも A 波振幅が明らかに減少していた¹²⁾。長時間にわたってクロルピリホスを散布している作業員

のような慢性曝露では、ERG が慢性的に異常を示している可能性が考えられる。

実験2において、0.05 mmol/kg のクロルピリホスを投与したラットは、5時間後にA波およびB波の振幅が対照群に比較してそれぞれ47%と51%の値に減少した。したがって、0.05 mmol/kg (17.5 mg/kg) という曝露量は、A波およびB波の振幅を投与5時間後に50%減少させるのに必要なクロルピリホス量にほぼ一致すると考えられる。ラットに対するクロルピリホスのLD₅₀値は、135~163 mg/kgと報告されており⁹⁾、ERGはその10分の1程度の曝露量で影響を受けると推定される。

ERGの各成分の中で、A波は網膜の光受容細胞より発生する電位であると考えられている¹⁵⁾。この電位は、暗順応させた光受容細胞にフラッシュ光を照射したとき光受容細胞の形質膜の内外に生じるもので、光によって細胞中のサイクリックGMP (cGMP) 濃度が減少し、その結果、形質膜をナトリウムイオンが透過できなくなるために生じることが明らかにされている^{16,17)}。したがって、クロルピリホス (もしくはその代謝物) は、光受容細胞内のcGMPの合成または分解系のいずれかに直接または間接的に作用したと考えられる。

一方、有機リン剤投与によってERGが変化することは、すでに今井 (対象有機リン剤、フェンチオン; 実験動物、ラット)⁹⁾ や Takeda (対象有機リン剤、クロルフェンピリホス; 実験動物、ネコ) ら¹¹⁾ も報告している。彼らは、有機リン剤によるERGの変化は、網膜ChE活性が阻害されたことに起因すると述べている。大脳組織などの中枢神経系では、ChE活性阻害によって蓄積したアセチルコリンが、カルシウムイオンを介して、cGMP濃度を増加させるといわれており¹⁸⁾、このことは彼らの考察を支持するものといえる。しかし、実験1の結果は、クロルピリホス投与後のERGの経時変化と網脈絡膜ChE活性の経時変化との間に、投与後3日目以降に明らかになぜが存在することを示している。また、アセチルコリンの蓄積によりcGMP濃度が増加するためには、アセチルコリン受容体の存在が必須であるが、網膜光受容細胞の形質膜には受容体の存在は知られていない。したがって、有機リン剤の曝露によるERG (とくにA波) の変化に、ChE活性阻害が関与しているかどうかは再検討する必要があるといえる。

なお、ERGのB波はA波の影響を強く受けるため、B波の異常はA波の異常を増幅したものともいえる¹⁹⁾。したがって、ここではA波を中心に考察をすすめた。しかし、ERGのB波は光受容細胞よりも中枢側にその発生起

源を持つので¹⁹⁾、B波振幅の減少の何割かはChE活性阻害で説明可能かもしれない。

ところで、シロアリ防除作業において血中ChE活性を有機リン剤の曝露指標として考えたとき、その値がどのように変化すればERGに影響が生じるかは重要な問題である。実験2の結果は、血中ChE活性が、ERGに比較して、より低濃度のクロルピリホス投与によって変化を示すことを意味している。したがって、少なくとも、ERGの変化に先立って血中ChE活性の低下が生じるといえるだろう。しかし、クロルピリホス投与後の血中ChE活性の回復とERGの経時変化に時間的なずれがあること、および、実際の作業現場では1回曝露ではなく慢性曝露であることから、この点についてのこれ以上の考察は不可能である。

有機リン剤のERGに及ぼす影響についてのいくつかの動物実験は、有機リン剤の種類、動物種、投与量、測定時期、ERGの測定条件などが異なるため直接に比較検討することが困難である。とくに問題なのは、有機リン剤曝露によって、ERG各波の振幅を減少させる結果と増加させる結果の両方が提出されていることである⁹⁻¹¹⁾。現在、この点を解明すべく数種類の有機リン剤のERGに及ぼす影響を同一実験条件下で比較検討中である。

ま と め

クロルピリホス投与の網膜電図 (ERG) に及ぼす影響をラットを用いて調べた。

ラットに、0.2 mmol/kg body weight のクロルピリホスを腹腔内投与し、コリンエステラーゼ (ChE) 活性とERGを経時的に測定した。クロルピリホス投与5時間から2日後の間、ERGのA波およびB波の振幅は50%以上減少し、潜時も1~2割延長した。この時、血漿、赤血球、脳および網脈絡膜ChE活性は顕著に低下していた。しかし、クロルピリホス投与によって変化したERGのA波およびB波の振幅と潜時は、赤血球、脳および網脈絡膜ChE活性より速やかに対照群のレベルに回復した。

種々のレベル (0, 0.002, 0.01, 0.05, 0.25 mmol/kg body weight) のクロルピリホスをラットに投与してERGを測定した。その結果、クロルピリホス投与量とERGの変化 (A波およびB波振幅の減少と潜時の延長) との間には、量-影響関係のあることが判明した。また、投与5時間後にERGのAまたはB波の振幅を約50%減少させるのに必要なクロルピリホス投与量は、0.05 mmol/kgであった。

以上の結果は、致死量よりも1桁少ない投与量のクロ

ルピリホスが異常 ERG (A 波と B 波の振幅の減少と潜時の延長) をラットに起こすこと、およびこの異常 ERG の出現が脳や網脈絡膜 ChE 活性の低下とは必ずしも対応しないこと、を示している。

稿を終えるにあたり、実験に御協力いただいた重実淳子さんに心より感謝の意を表します。なお、本研究遂行の費用は文部省科学研究費 (No. 02770302) によるものである。

文 献

- 1) 須永匡彦, 吉田宗弘, 上田照子, 高坂祐夫, 原 一郎: シロアリ防除作業におけるクロルピリホスの曝露と尿中アルキルリン酸濃度との関係, 産業医学, **31**, 142-149 (1989).
- 2) 浅川富美雪, 實成文彦, 須那 滋, 白石博昭, 真鍋芳樹, 後藤 敦, 中嶋泰知, 島田潤子: シロアリ防除作業におけるクロルピリホス曝露の実態, 日衛誌, **44**, 921-928 (1989).
- 3) WHO: Environmental Health Criteria 63, Organophosphorus Insecticides: A General Introduction, WHO, Geneva, (1986).
- 4) 須永匡彦, 吉田宗弘, 上田照子, 高坂祐夫, 円藤陽子, 安井一清, 林 真矢, 吉川日出男, 橋本美知子, 原 一郎: 防疫作業における有機リン系殺虫剤曝露の指標としての尿中アルキルリン酸濃度, 日衛誌, **44**, 763-770 (1989).
- 5) 久永直見, 竹内康浩, 小野雄一郎, 岩田全充, 舩田和比古, 古池保雄, 斉藤 勲, 五藤雅博, 松本忠雄, 深谷幸生, 奥谷博俊, 関知次郎: 民間防疫作業者の殺虫剤使用と健康の実態(1). 労働条件と脳波所見, 産業医学, **24**, 815-816 (1982).
- 6) 五藤雅博, 松本忠雄, 深谷幸生, 吉富修二, 奥谷博俊, 関知次郎, 久永直見, 竹内康浩, 小野雄一郎, 岩田全充, 青山真知子, 斉藤 勲, 古池保雄: 防疫作業者の殺虫剤使用と健康(3). コリンエステラーゼと末梢神経伝導速度の解析, 産業医学, **25**, 674 (1983).
- 7) 石川 哲: 公害と眼・有機燐と眼: 慢性有機燐中毒症の疫学, 臨床及び実験的研究, 日眼, **77**, 1835-1883 (1973).
- 8) Chan, P-K. and Hayes, A.W.: Assessment of chemically induced ocular toxicity: A survey of methods, In "Toxicology of the Eye, Ear, and Other Special Senses" (Editor: A.W. Hayes), p. 103-143, Raven Press, New York (1985).
- 9) 今井弘子: 有機燐剤の眼毒性に関する研究, 第2報, バイテックス (低毒性有機燐剤) 1回投与後のラットにおける残留性について (特にERGの変化及び血清, 肝, 網膜コリンエステラーゼ活性の時間的変動), 日眼, **79**, 1067-1076 (1975).
- 10) Takeda, Y., Tsukahara, I. and Takaori, S.: Effects of Chlorfenvinphos, an organophosphate insecticide, on afferent transmission in the central visual system, Jap. J. Ophthalmol., **20**, 195-203 (1976).
- 11) Carricaburu, P., Lacroix, R. and Lacroix, J.: Electroretinographic study of the white mouse intoxicated by organo-phosphorus: mevinphos and malathion, Toxicol. Eur. Res., **3**, 87-91 (1981).
- 12) 吉川日出男, 吉田宗弘, 上田照子, 原 一郎, 八木邦子: 防疫作業における有機リン剤曝露の評価とその眼機能への影響, 中毒研究, **3**, 印刷中 (1990).
- 13) 上田喜一: 農薬中毒 (上田喜一, 平木潔編), p. 329-342, 南江堂, 東京 (1978).
- 14) 丹後俊郎: 臨床検査への統計学, 朝倉書店, 東京 (1986).
- 15) 渡辺郁緒, 三宅養三: ERG・EOGの臨床, p. 3-4, 医学書院, 東京 (1984).
- 16) 前田章夫: 生命現象への生化学的アプローチ: 視覚, p. 17-36, 化学同人, 京都 (1986).
- 17) Yau, K-W. and Nakatani, K.: Lightsuppressive, cyclic GMP-sensitive conductance in the plasma membrane of a truncated rod outer segment, Nature, **317**, 252-255 (1985).
- 18) 藤井達三, 寺田 弘, 野村靖幸: 薬物作用と生体膜, p. 273-279, 南江堂, 東京, (1987).

(受付 1989年12月25日 受理 1990年2月19日)