パラチオン中毒家畜の脳コリンエステラーゼについて

小原 甚三・中島 英男・石井 進

(農林省家畜衛生試験場調査第2部 部長: 石井 進)

(昭和 30 年 9 月 1 日受付)

I. はし が き

有機燐剤の普及に伴い人畜の中毒事故の多発が報ぜられている。⁽¹⁾ 人の中毒の生前診断には血清又は血球のコリンエステラーゼ(以下 ChE と略記)活性値の測定が行われ、⁽²⁾ 家畜においても試みられているが、⁽³⁾ 反芻動物及び鳥類ではもともと血清 ChE 活性値が低く^(4,5,6) 診断のためには用いがたい憾みがある。

私共は、最近野外に於て有機燐剤中毒として処置されている家畜が、果して悉く有機燐剤による中毒死であるか否か疑わしい場合が屢々あり、死後診断の重要性を痛感していたので、今回実験的にパラチオン中毒死せしめた鶏及び山羊の脳 ChE 活性値を測定し、本法による死後診断の可能性を検討した所、正常動物との間に著しい差を認めたので報告する。

II. 実験材料

脳の ChE 活性値は部位によつて非常に差があるが、^(7,8) 大中動物脳では大脳皮質部を、小動物脳では大脳半球をそのまま秤量し、生理食塩液で適宜倍数のホモジェネートを作り酵素液とした。対照脳は実験室飼養の動物脳及び屠場材料を用い、中毒脳はパラチオンを経口投与して中毒せしめた鶏及び山羊の脳を使用した。脳以外の臓器についても 2, 3 測定した。

III. 実験方法

定量法は HESTRIN⁽⁹⁾ のアセチルコリン(以下 ACh と略記)定量法を、宮崎等^(10,11) が ChE 定量法に応用した方法によつた。

試薬:

1) M/30 燐酸緩衝液 KH_2PO_4 4.545 g を水にとかし 1000 cc としたものを 2 容と、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 11.93 g を水にとかして 1000 cc としたものを 8 容を混合する。(PH 7.4)

2) ACh 液 (基質) ACh クロライド (第一製薬

オビソート) 0.1 g を水にとかして 50 cc にする。氷室に貯え 4 日毎に更新。本液は約 0.011M 溶液で、反応時の終末濃度は 0.0027M となる。

3) 2M 塩酸ヒドロキシルアミン $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ 13.9g を水にとかして 100 cc とする。氷室に貯え 1 週間毎に更新する。

4) 3.5M 水酸化ナトリウム NaOH 70 g を水にとかして 500 cc とする。

5) 塩酸 HCl conc 1 容を水 2 容に稀釈する。

6) 0.37M 塩化第 2 鉄液 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 25 g を水 250 cc にとかす。

酵素液: 生組織 0.5 g 乃至 1.0 g を秤量し、POTTER & ELEVEHJEM のホモジェナイザー⁽¹²⁾ で 10 乃至 20 倍の生理食塩液ホモジェネートを作り、これを必要に応じて適宜生理食塩液で稀釈したものを酵素液として用いた。実施に当つては、1 組織について 10 倍、20 倍、40 倍のように、倍数稀釈したもの各 1 cc をとつて 3 本づつを 1 系列とし活性値を測定するようにした。これらの操作は氷冷しつつ行なつた。

実施: 緩衝液 2 cc に酵素液 1 cc をとり、これに ACh 1 cc を加えて混合し、37°C 恒温槽に 1 時間放置。とり出して NH_2OH 1 cc NaOH 1 cc を加えて混合、2~3 分放置後、 HCl 1 cc を加え、更に塩化鉄液 1 cc を加えると、赤褐色に発色する。除蛋白のためトリクロール醋酸 1 cc を加えて後濾過し、直ちに 540 m μ で比色する。反応液の全量は 9 cc となる。

コントロール及び活性度: 比色時の零点対照としては、ACh の代りに水 1 cc 酵素液の代りに食塩液 1 cc を加え、同様操作したものを用いた。別に、酵素液の代りに生理食塩液 1 cc を入れたものを ACh の自然水解の対照とし、また既知 ACh 量(本法では 2 mg)の吸光度とした。これを A とし、酵素を加えたものの吸光度を B とすると、B は残存 ACh 量をあらわす。これより $\frac{A-B}{A}$ を活性度の比較に用いた。従つて分解 ACh 実量 mg/hour は、これを 2 倍することによつて求められる。

Fig. 1. Relation between the ChE Activity and Multiple Dilution of the Homogenate.

Fig. 2. The ChE Activity of several Animal Brains (hydrolysed ACh mg/wet tissue g/hr.).

Table 1. The ChE Activity of the Normal and Poisoned Brains in Fowls and Goats.

Dilution		× 20	× 40	× 80	× 160	Remarks
normal fowl	1		1.0	0.94	0.56	
	2		1.0	0.84	0.46	
	3		1.0	0.94	0.54	
poisoned fowl	1		0.08	0.02	0	died from the oral administration of 100 mg "parathion"
	2		0.03	0.01	0	died from 50 mg "parathion"
	3		0	0	0	died from 15 mg "
	4		0.80	0.42	0.16	killed next morning, 10 mg administration
	5		0.91	0.51	0.20	ditto, 5 mg administration
normal goat	1	0.50	0.33	0.18		
	2	0.55	0.34	0.24		
	3	0.46	0.24	0.12		
poisoned g.	1	0.07	0	0		died from 30 mg/kg "parathion"

IV. 実験成績

1) ホモジエネートの稀釈度と活性度の関係: 先づ脳ホモジエネートを倍数稀釈した場合の, 稀釈度と活性度 $\frac{A-B}{A}$ が比例するかどうかを試した. 結果は Fig. 1 のようで, 略々直線関係にあるが, 稀釈度が濃い場合及び薄い場合には彎曲してくる. 各動物脳の活性度に応じて, 概ね $\frac{A-B}{A}$ が 0.5~0.6 附近となる稀釈度を求めた結果, 牛, 馬では 10 倍, 豚, 山羊では 20 倍, 兎, モルモットでは 80 倍, 鶏では 160 倍稀釈脳ホモジエネートが適当なことを認めた.

2) 各動物脳の ChE 活性値及び鶏, 山羊の臓器

別活性値: 上の測定によつて, 各動物の脳 ChE 活性値を湿潤組織 1 g, 1 時間当りの分解 ACh mg 量であらわすと, 牛, 馬約 10 mg, 豚, 山羊約 20 mg, 家兎約 90 mg, モルモット約 100 mg, 鶏約 150 mg, で鶏脳が最も活性度が強かつた. (Fig. 2)

また鶏の臓器別活性度は脳, 睪丸, 肝の順で腎, 脾には殆んど活性がなく, 山羊では小脳, 睪丸, 大脳の順で肝, 腎には殆んど活性が認められなかつた. また牛の肝も活性を認めなかつた.

3) パラチオン中毒動物の脳 ChE 活性値: 鶏: 体重約 1.5 kg の鶏 3 羽に, パラチオン乳剤 (25%) 100 倍液をホールピペットを以て嚥嚥に注入し, 1

Fig. 3. The ChE Activity of Normal and Poisoned Fowl Brains Kept in a Refrigerator.

羽には実量 100 mg 2 羽には実量 50 mg を与え、10 分後に斃死したものを直ちに採脳、型の通り測定した。結果は Table 1 のようで、160 倍酵素液では活性を示さず、80 倍液では $\frac{A-B}{A}$ が 0.01 及び 0.02、40 倍液では 0.03 及び 0.08 程度で何れもその活性値は極度に低下していた。又別にパラチオン乳剤 250 倍液を実量 15 mg 投与、25 分で斃死した例では、40 倍酵素液でも活性が認められなかつた。実量 10 mg、5 mg 投与鶏で、生きのびたものを翌朝殺して測定した例でも、活性は低下しており、ノルマル脳の約 $\frac{1}{2}$ であつた。

山羊：山羊は唯 1 例であるが、体重 35 kg のものを絶食後、50 倍液、実量 30 mg/kg を投与し、2 時間で斃死した例を採脳測定した。その活性度は 40 倍酵素液で 0.20 倍酵素液で 0.07 で、鶏と全く同様な成績を示した。(Table 1)

4) 脳材料を氷室保存の場合の ChE 活性値の変化：中毒脳を病性鑑定等のため、遠方に送付する場合を仮定し、ノルマル及び中毒脳を氷室に保存して活性度の変化を追求した。

鶏：ノルマル対照としては、鶏脳 10 個を氷室に保存し、2 例づつを(大脳半球を使つて 1 個の鶏脳で 2 回使用した)略々毎日 11 日まで測定し、又肉屋から購入した材料によつて同様測定した。中毒脳は例数が少いので当日及び 4 日目、6 日目に測定した。その変化は Fig. 3 のようで、ノルマル脳では 8 日目までは略々その力価は変らないのに対し、中毒脳では時日の経過につれて活性が恢復するような結果が得られた。しかし同じ稀釈倍数を比較した場合には、中毒脳の氷室 6 日保存のものにおいて、その活性値はノルマル脳の約 $\frac{1}{4}$ であり、明かな差が見られた。

山羊：ノルマル及び中毒脳それぞれ 1 個を用い、皮質部を同じように切りとり日を追うて測定したが、鶏の場合と同様、ノルマル脳では 10 日まで概ね同程度の力価を保持したのに対し、中毒脳では 4 日目、7 日目となるにつれて活性増加の傾向がみられた。しかし 7 日目脳で同じ稀釈倍数を比較した場合、中毒脳の活性値はノルマル脳の $\frac{1}{2}$ 程度で鶏脳の場合と同様明確な差が認められた。

V. 考 按

以上 HESTRIN の鉄アセトヒドロキサミン酸法によつて、ノルマル脳と中毒脳の ChE 活性値を測定したが、測定法及び実験結果について若干検討したい。先づ磷酸緩衝液の濃度を色々変えて (M/30 緩衝液 1 c.c から M/15 3 c.c まで) PH と発色の関係を見ると、濃度が増すにつれて PH は上り、発色は低下した。本法では HCl 酸性とした時、PH が 1.2 ± 0.2 以内にあることが条件とされるが、M/30 2 c.c の場合が概ね PH 1.2 吸光度 1.3 となり安定してくる。宮崎等は M/15 2 c.c を用いているが、私共は上の成績から M/30 2 c.c を使用した。

次に HESTRIN は、ヒドロキサミン酸が鉄と結合して発色する際、磷酸根、硫酸根、硼酸根が存在するとこれらが鉄とせり合い発色を阻害すると述べ、検討の結果鉄が高濃度に存在すれば影響なく、終末鉄濃度 $150 \mu\text{M/cc}$ の場合には磷酸 $50 \mu\text{M/cc}$ までは阻害しないが、鉄濃度 $110 \mu\text{M/cc}$ の場合には磷酸各 50. 30. 10 $\mu\text{M/cc}$ の存在で、その発色に差がみられるとしている。本実験においては M/30 磷酸緩衝液 2 cc を用いたから磷酸の終末濃度は $7.5 \mu\text{M/cc}$ となり、鉄は $111 \mu\text{M/cc}$ となるので恐らく影響はないものと考える。

次に本法は ACh の定量法であるから、ノルマル脳乃至中毒脳そのもので、ACh を検出できるのではないかと考えたが、中毒脳においても発色は認められなかつた。これは本法の感度にもよると思われる。又 ACh の代りにアセトン、醋酸、プロピオン酸、酪酸、グリセリン、グルコース、グルタミン酸、 α -ケトグルタル酸を、ACh と同モルまた 2 倍程度に加え、発色の有無を検した結果、グルコースでは薄桃色に、 α -ケトでは黒褐色の発色をみた。しかしこれらの発色の吸光極大は、鉄アセトヒドロキサミン酸の吸光極大とは異つており、ACh の場合と同様脳ホモチエネートそのものでは発色をみないので、脳内に存在するとしてもこれらの物質による影響

はないものと思われる。

次に酵素液の調製法として、宮崎等はホモチエネートを氷室放置後、その遠心上清を用いており、MENDEL & RUDNEY¹³⁾ は、ホモチエネート遠心沈渣を再浮游して用いている。私共は NACHMANSOHN 等¹⁴⁾ の実験から、全ホモチエネートを直ちに使用する方法によつた。このことは、特異的 ChE が神経表面乃至赤血球膜に位置すること^(6,15,16) 又赤血球 ChE 測定の際、血球液と溶血液で活性度に差のないこと⁽¹⁷⁾ から妥当と思われる。

次に有機燐剤の脳 ChE 阻害と死の原因であるが、これについては必ずしも一致した結論が得られないわけではなく、脳 ChE の抑制は、死に対して直接責任がないともいわれる。⁽¹⁸⁾

これに対して NACHMANSOHN & FELD¹⁴⁾ は、DFP (diisopropyl fluorophosphate) による家兎の実験で脳 ChE を測定し、斃死したものではその活性が零か零近くに低下するのを認め、生きのびたものでは平均 25% 程度の活性を保持することをみた。佐藤¹⁹⁾ もマウスの実験的パラチオン中毒で略々同様な関係を得ており、AUGUSTINSON⁶⁾ はその綜説で、脳 AChE の欠乏は死を来すと述べている。今回私共が実験的パラチオン中毒家畜によつて得た測定成績は、これらの見解に一致するものであつた。しかし有機燐剤の中で、燐アミド型のもの(例えばベストツクス)は脳に到達せず、その Cholinergic な作用は末梢組織に限るとされるので、⁽²⁰⁾ 恐らく脳 ChE 活性の低下は見られないか或は少ないものと思われ、所謂有機燐剤中毒屍体の全部が脳 ChE の欠乏を来すとは断じ難いと思われる。

次に有機燐剤中毒以外の斃死動物の脳 ChE 活性値の変化については、私共は知る所がない。平井²¹⁾ はモルモット及び家兎のアナフィラキシーショック時における脳及び他の臓器、血液の ChE を測定し脳では認むべき差がなかつたとしている。殺虫剤のモノフロル醋酸では抑制は認められていない⁽²²⁻²³⁾ 私共は、コクシジウム罹患山羊及び流産山羊胎児の死後数時間を経過した脳でノルマル値と殆んど差のないことを認めた。脳疾患による斃死動物の脳については検討の余地があるものと思われるが、現在の所少くともパラチオン剤による急性中毒の家畜の屍体では、脳 ChE 活性が極度に低下することは事実と考える。

中毒脳を氷室保存中、時日の経過と共に活性が恢復するような成績については、パラチオン阻害が或

程度可逆的なのか他の原因によるのか検討を要すると考える。

VI. 結 論

パラチオン中毒家畜の死後診断の目的で、脳 ChE 活性値を Hestrin の鉄アセトヒドロキサミン酸法によつて測定し、次の結果を得た。

1) ノルマル大脳 ChE 活性値測定のための酵素液として、牛、馬 10 倍、豚、山羊 20 倍、家兎、モルモット 80 倍、鶏 160 倍ホモチエネートが適当であつた。

2) ノルマル動物の脳 ChE 活性値を、分解 ACh mg/g/hour で示すと、鶏約 150 mg、モルモット約 100 mg、家兎約 90 mg、豚、山羊約 20 mg、牛、馬約 10 mg で鶏脳が最も強かつた。

3) パラチオン経口投与により斃死した鶏及び山羊脳の活性値は、何れも殆んど零に近い値を示し、生きのびた鶏を翌朝殺した例でも活性値は $\frac{1}{2}$ に低下していた。

4) 氷室に保存して中毒脳と対照脳の活性値を日を追うて比較した結果、対照脳では 8~10 日まで略々一定に活性を保つたが、中毒脳では逐次恢復する傾向が見られた。しかし保存 6 日目の中毒鶏脳では対照の約 $\frac{1}{4}$ 、中毒山羊脳では対照の約 $\frac{1}{2}$ の活性を示すに過ぎず、対照脳とは明かな差が認められた。

以上の結果からパラチオン中毒家畜の死後診断法として、本法による脳 ChE 活性値の測定は価値あるものと思われる。

終りに種々御教示賜つた公衆衛生院佐藤徳郎先生に深甚な謝意を表する。

文 献

- 1) 広岡一治：日獣会誌，8，345 (1955)
- 2) 沖中重雄，西川光夫，吉川政己他：日本医事新報，1533 号 3544 (1953)
- 3) 小原甚三，石井 進：日獣会誌，7，308 (1954)
- 4) STEDMAN, E., STEDMAN E. & A. C. WHITE: *Biochem. J.*, **27**, 1055 (1933)
- 5) MENEDL, B., MUNDELL, D. B. & H. RUDNEY: *Ibid.*, **37**, 473 (1943)
- 6) KLAS-BERTIL AUGUSTINSON: *The Enzymes*, **1**, 443 (1950)
- 7) 後藤重弥：日新医学，**37**, 434 (1950)
- 8) 中脩三編：神経化学，医学書院 (1954)

- 9) HESTRIN, S. *J. Biol. Chem.*, **180**, 249 (1950)
- 10) 宮崎英策, 大原弘通, 今野章: 札幌医紀要, **2**, 13 (1951)
- 11) 松永昭: 熊本医誌, **29**, 256 (1955)
- 12) POTTER, V. R. & C. A. ELEVEHJEM: *J. Biol. Chem.*, **114**, 495 (1936)
- 13) MENDEL, B. & H. RUDNEY: *Biochem. J.*, **37**, 59 (1943)
- 14) NACHMANSON, D. & E.A. FELD: *J. Biol. Chem.*, **171**, 715 (1947)
- 15) 医学のあゆみ: **14**, 210 (1952)
- 16) 沖中重雄, 吉川政己: 日新医学, **37**, 1 (1953)
- 17) 玉井明: 生化学, **22**, 32 (1950)
- 18) 沖中重雄, 吉川政己: 日新医学, **40**, 371 (1953)
- 19) 佐藤徳郎: 公衆衛生院 未発表
- 20) D. R. DAVID: *J. Pharm. & Pharmacol.*, **4**, 1 (1954)
- 21) 平井正明: アレルギー, **3**, 254 (1954)
- 22) 鈴木芳男, 丸山素弘: 三共高峰研究所, 未発表
- 23) RUDOLPH PETERS: 化学の領域(下郡山訳), **9**, 38 (1955)

STUDIES ON THE BRAIN CHOLINESTERASE ACTIVITY IN ANIMALS POISONED WITH “PARATHION”

Jinzo OBARA, Hideo NAKAJIMA and Susumu ISHII

The 2nd Research Division, National Institute of Animal Health. Chief: Dr. S. ISHII

(Received for Publication Sept. 1, 1955)

This paper deals with the possibility for the postmortem diagnosis of “Parathion”-poisoned animals by estimating the brain cholinesterase activity. The method used is the modified Hesterin’s ferric-acethydroxamic acid reaction. The results obtained are as follows;

1) The relation between the cholinesterase activity and multiple dilution of the homogenate was found to be approximately linear, but it was necessary to make the homogenate to the optimum dilution corresponding to the cholinesterase activity of the brain of each animal. The optimum dilutions of the homogenate obtained were 10 folds in a horse and a cattle, 20 folds in a pig and a goat, 80 folds in a rabbit and a guinea pig, and 160 folds in a fowl.

2) The activities calculated with the hydrolysed acetylcholine mg. per wet brain tissue g. per hour were about 10 mg. in a horse and a cattle, 20 mg. in a pig and a goat, 90 mg. in a rabbit, 100 mg. in a guinea pig, and 150 mg. in a fowl.

3) On the other hand, the brain cholinesterase activity of a poisoned fowl and a goat, which had died from the oral administration of “Parathion,” was demonstrated to be reduced approximately to zero and it was also found to be reduced to one-half compared with the activity of a normal brain, even in a surviving fowl which was killed in the next morning.

4) Furthermore, the activity of normal and poisoned brains, kept in a refrigerator, was examined during the next 6 to 10 days. The activity showed no considerable changes until 8 or 10 days in the normal brain, and it seemed to recover gradually in the poisoned brain. Nevertheless, a distinct difference was seen between both activities, since the poisoned brain indicated only one-quarter in a fowl and only one-half in a goat compared with the normal brain on the 6th day.

From the experimental results described above, the estimation of the cholinesterase activity of the brain is considered to be useful for the postmortem diagnosis of "Parathion"-poisoned animals.