

瞳し、指標に遅れて散瞳する遅延性瞳孔反応パターン（逆台形パターン）がVDT作業負荷後に見られる例があった。その逆の台形型反応も認められる点は過去に土屋らの報告を支持する。この瞳孔反応は自律神経系の副交感神経が優位になったために生ずると考えられている。この異常は現在最も流行している携帯メールによる長時間の打ち込み作業で影響を受ける。輻輳がほとんど影響を受けずに眼精疲労でも輻輳・解散系と瞳孔反応とに解離を認る症例が見られた点は興味深い。調節負荷（D）に対する輻輳、すなわち AC/A 比、調節負荷に対する縮瞳（P/A: Pupil /Accommodative Convergence）、輻輳負荷に対する縮瞳（P/AC）は年齢による差はあるものの生涯一定値を示し 60 歳前後まで特殊例を除き正確に計測出来る。これらの因子が極めて正確に変動する事は眼球追従運動と共にカリフォルニア州では、最も正確な生体因子として「酔っ払い運転」の他覚的表示法として現場で盛んに使用されている。言い換えると微量の化学物質による生体の反応がいかにか正しく眼球運動系、瞳孔系、調節系を測定して異常を捉えられるかである。この領域に関する一般医師の認識は極めて低い。今後さらなる教育と知識の普及が重要である。激しい携帯電話のメール打ち込み長時間作業などでは縮瞳率の微妙な変動を惹起し、輻輳が減少する症例が存する事、かつ、他覚的データとして我々は得ている。P/AC の乱れを同時に加味し考察することにより、複雑な IT 作業などにより生ずる

眼精疲労が全身疲労の一つの部分症状として先ず出現していることが明きらかになりつつある。今後はこれら進歩した自律神経検査法を駆使して、臨床・健診に応用することにより、今まで不明とされ精神神経系機能異常とされて問題にされなかった諸症状の正確な判定に役立つと考えられる。これらの事は米国の最先端の中毒研究者、Kilburn, K 教授(南カリフォルニア大) や、Weiss B 教授 (New York 大) の論文や発表では常識になっている。(6) (7) (8) (9)。

## E. 結論

新しく開発された調節刺激による瞳孔反応及び輻輳、開散を測定出来る機器を利用して VDT 症候群を有する症例、さらにシックハウス症候群を同時に有する症例を検討し興味ある結果を得た。正常者では調節刺激による縮瞳率は年齢により減少するが 50 歳までは縮瞳率は約 48%~32%に分布した。これに反してシックハウス症候群合併をしている VDT 患者は縮瞳率がさらに減少し、その分布を 27%~19%に減少していた。輻輳は正常であったが眼瞼痙攣を思わせる波形が検出された。これらの結果を基に自律神経障害の可能性を考えた。

## 図の説明

図 1 : トライイリスで測定した正常者の波形 (25 歳男性)

上から指標 (遠方→近方→遠方----) 左右瞳孔反応 : 縮瞳及び散瞳、

眼球運動：幅湊及び開散

図2：VDT 症候群と SHS 症候群の合併が示唆される症例（20歳女性）気中濃度（ホルムアルデヒド、トルエン）が基準値以上であった時の所見瞬目極めて多し、瞳孔反応も小さい。

図3：同じ症例の室内対策後の所見（気中濃度改善後の所見）瞬目極端に減少、瞳孔、幅輦反応 殆ど正常化

図4：正常者の年齢別縮瞳率折れ線グラフとVDT症候群を疑う被験者の縮瞳率、小さい黒丸 VDT症候群の疑い、大きな黒丸VDT症候群と、シックハウス症候群合併が考えられた3症例、縮瞳率の著明な低下あり。

図5：シックハウスとVDT 業務の空気汚染の模式図左：機器の使用と空気の汚れの可能性 右：外部からの新鮮空気の導入と能率の上昇デンマーク工科大学での対策

謝辞

本研究遂行にあたり、症例の提供をうけ、研究援助をいただいた、鈴木武敏医師、平岡真理医師、袴田直俊（浜松ホトニクス）諸氏に感謝する。

F. 健康危険情報；特になし

G. 研究発表

1：論文発表

1) 石川哲 新瞳孔計シンポジウム(特集) 神経眼科 18:137-153,2001

2) 石川哲 正常瞳孔反応データ 神経眼科 18:154-156,2001

3) Tonori,H, Aizawa Y, Ojima,M et al. Anxiety and depressive states in Multiple Chemical SensitivityTohoku J. Exp. Med193:115-126,2001

4) Ozima,M, Tonori H, SatoT et al. Odor perception in patients with Multiple Chemical SensitivityTohoku J. Exp.Med198:163-173,2002

5) 石川哲 環境医学と神経眼科 神経眼科 19:153-154,2002

6) 宮田幹夫、坂部貢、松井孝子他 MCS患者のホルムアルデヒド負荷試験と瞳孔 神経眼科 19:155-161,2002

7) 坂部貢、宮田幹夫、石川哲、角田和彦 シックハウス症候群と脳循環 神経眼科 19:162-168,2002

8) 北條祥子 日本におけるMCS患者のスクリーニング用問診票としてのQ E E S Iの使用 神経眼科 19:169-175,2002

9) 角田和彦、北條祥子、吉野博他 アレルギー児童が思春期に受ける化学物質の影響 神経眼科 19:176-187,2002

10) 吉野博、天野健太郎、飯田望他 シックハウスの現状：室内空気と健康との関係 神経眼科 19:188-200,2002

11) 石川哲 VDT症候群と現代労働の特徴 大阪保険医雑誌 44:41-45,2003

12) 石川哲（平成15年度医科器械受賞論文）赤外線電子瞳孔計の開発医科器械学

73 : 746-750,2003

1 4) 石川哲、坂部貢、宮田幹夫 Sick House Syndrome 呼吸器科 4:363-368,2003

1 5) 石川哲 シックハウス症候群・化学物質過敏症の診断に関する合意事項 日本臨床環境医学会雑誌 12:96-100,2003

1 6) 石川哲、坂部貢、宮田幹夫 多種類化学物質過敏症における神経炎症性および神経内分泌性機構の関与 日本臨床環境医学会雑誌 12 : 42-49,2003

1 7) 坂部貢、宮田幹夫、石川哲 化学物質過敏症の見方・考え方神経眼科 20:350-354,2003

1 8) 石川哲シックハウス症候群・化学物質過敏症と診断—医師の立場から公共建築 46:27-30,2004

1 9) Ishikawa S, Miyata,M, Sakabe,K Hazardous health effects due to elevated levels of indoor chemicals—Present status of Chemical Sensitivity :Sick House Syndrome—Indoor Air(in press),2004

2. : 学会・講演発表

多数につき省略

H.知的財産権の出願・登録状況

特になし

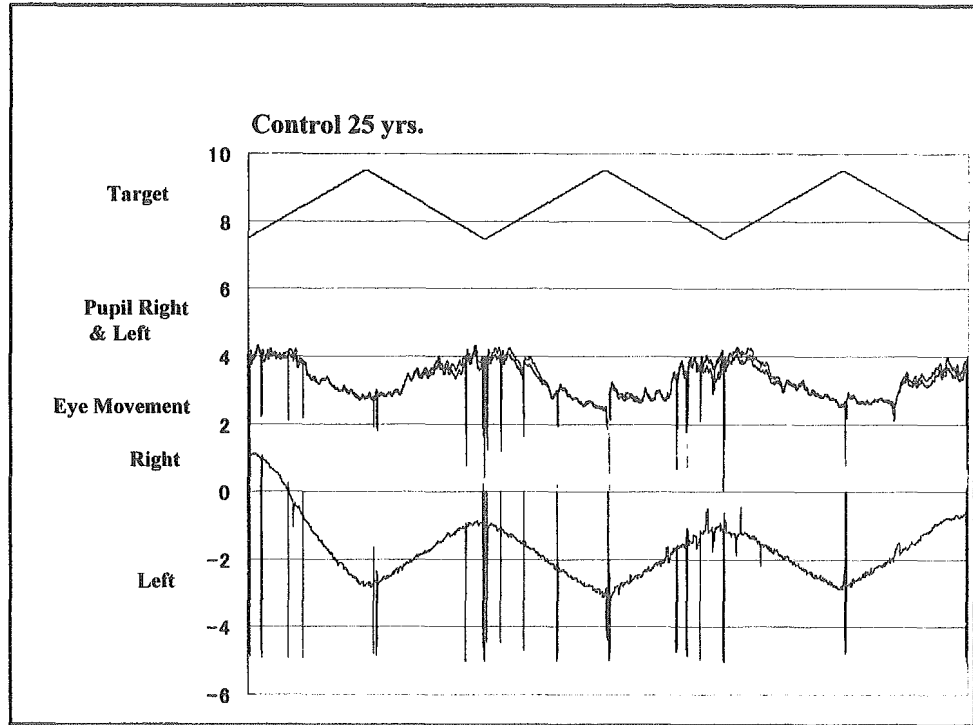
## 文献

1. VDT と眼：石川哲、VDT 医学マニュアル 26-34 金原出版、石川哲編集 1989
2. 白内障手術前後の近見時眼球運動、瞳

孔反応、立体視 石川均、陶山秀夫、石川哲他、眼科手術、17:89-92,2004

3. VDT 作業者の近見反応における自律神経機能について 土屋邦彦、青木繁、石川哲他、日本の眼科、63:508-511,1992
4. VDT 作業者にみられる調節・瞳孔異常について 中村芳子、近江源次郎、木下茂、眼紀 42:1273-1278,1991
5. Ishikawa,S. Examination of the near triad in VDU (Visual Display Unit) operators. Ergonomics (England) 33:787-798,1990
6. VDT 従事者における近見反応、小嶋良宏、青木繁、石川哲、北里医学 22:620-626,1992
7. Kilburn,K.H. Chemical Brain Injury, van Nostrand Reinhold, New York,1998
8. Weiss,B. et al. Neurotoxicity of the visual system. Raven Press,1980
9. Weiss,B. Pediatrics (American Academy) April 22,2004:Warns of neurological effects of pesticides on children(beyond pesticides)

☒ 1



☒ 2

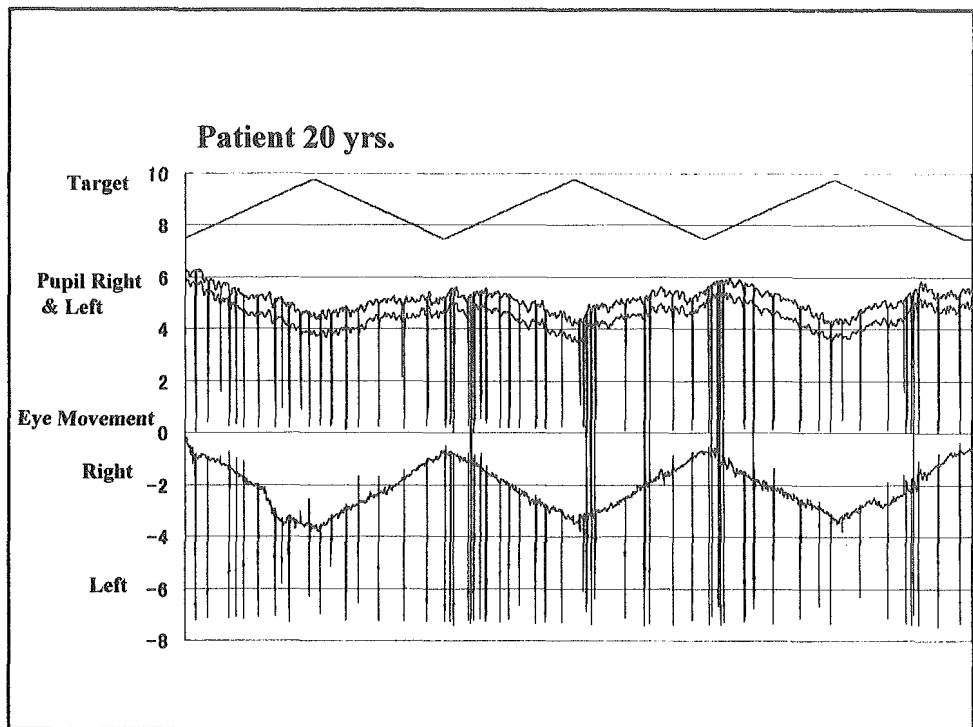


图 3

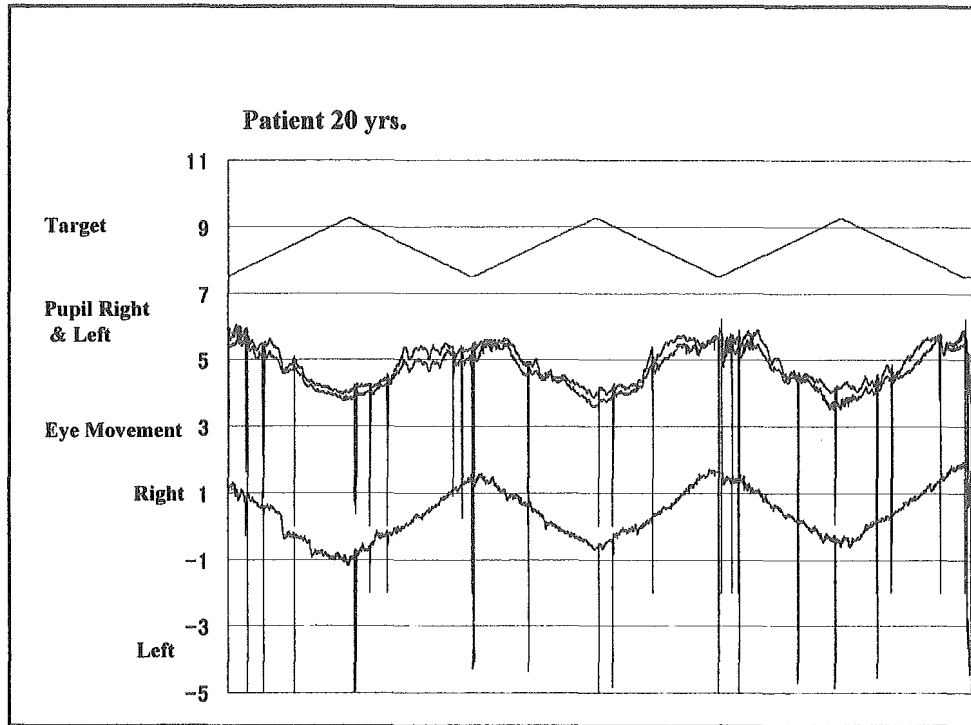
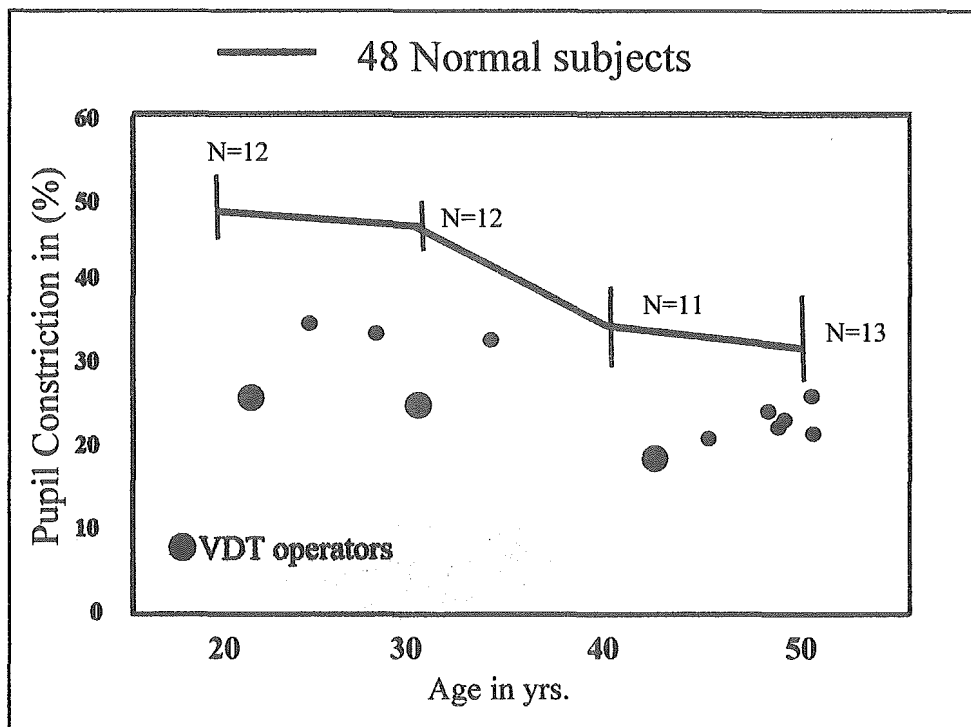


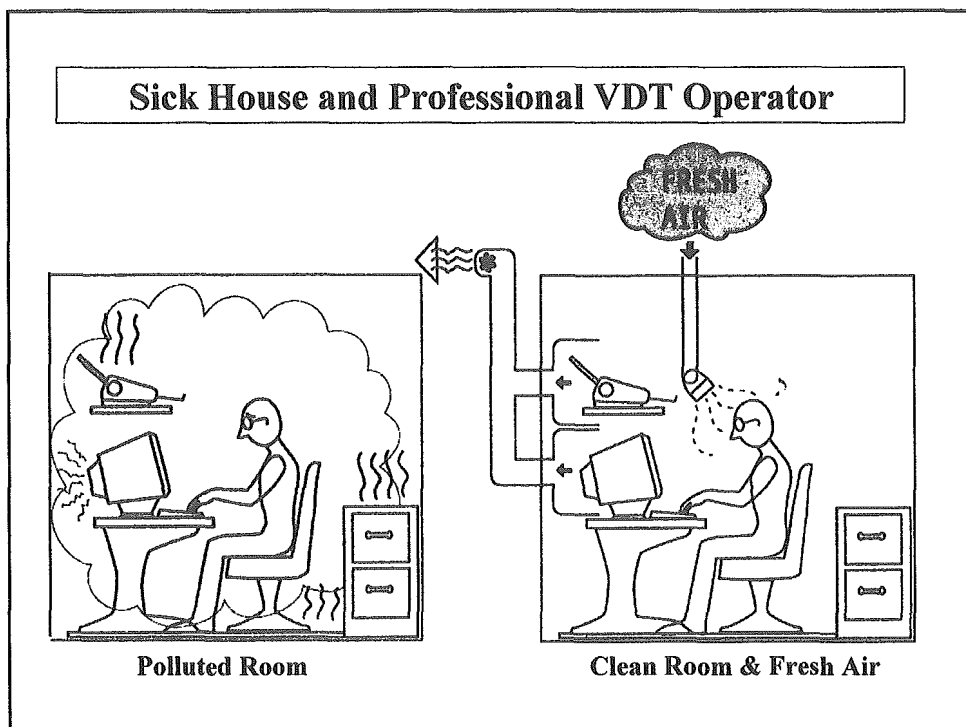
图 4



左

右

图 5



平成15年度厚生労働科学研究費補助金（がん予防等健康科学総合研究事業）  
「微量化学物質によるシックハウス症候群の病態解明、診断・治療対策に関する研究」  
分担研究報告書

リン酸エステル類の多様で複雑な神経・精神毒性  
～低容量・連続曝露および反復曝露の危険性の再評価に向けて～

石川 哲

北里研究所病院臨床環境医学センター長

研究要旨

有機リン化合物（リン酸エステル類）による多様で複雑な慢性中毒については、1978年に有機リン系農薬による目及び神経系の慢性障害が、臨床的に詳しく報告された。(1) その中で、有機リンによりアセチルコリンエステラーゼだけでなく、他の多くのセリン加水分解酵素群（リパーゼ、カルボキシルエステラーゼなど）が阻害されることがすでに指摘されていた。(1)

90年代に入り米国や欧州で脳生理学に関する研究が進み、特に2000年以降、脳を始め体の各部の代謝を担う多くの加水分解酵素群が有機リン化合物（リン酸エステル類）により阻害されることで、多様で深刻な神経・精神障害を引き起こすメカニズムが次々と解明されつつある。

(1) リン酸エステル類は、思考力や記憶力、情動といった高度な脳機能に深刻な悪影響を及ぼすことが分子生物学のレベルでわかってきた。

リン酸エステル類により、脂肪酸アミド加水分解酵素（FAAH）と呼ばれる、情動や精神活動といった高度な脳機能に深く関与する物質群の量的調整を司る酵素が、阻害を受けることが明らかにされた。(2; 3) FAAHの阻害は、アセチルコリンエステラーゼの阻害で見られるような身体的な激しい症状には直結しないとされているが、一方で、FAAHにより調整される脳内の生理活性物質群が、人間の高度な知性や情動を司る鍵となる物質群であり、これらの物質の過剰や欠乏は人の精神活動や、睡眠・食欲といった基本的な欲求に重大な影響を及ぼすことが、最新の脳生理学の研究により次々と明らかになってきている（表1）。

FAAHの阻害は、これまでNTEやアセチルコリンエステラーゼの阻害が少ないとされてきた有機リン化合物（例えば、フェニトロチオンやダイアジノン）でも非常に高い阻害を示すことが指摘されている。(3)

FAAHの阻害により次の生理活性物質の蓄積が既にわかっている。

アナンダミド (anandamide:アラキドン酸エタノールアミド) :

体内で作られる内在性大麻様物質 (endogenous cannabinoid) の一種で、短期記憶の消去を始めとする精神・神経機能の制御に関与する。有機リンにより大麻様物質の蓄積が起こるということは、有機リンにより脳内が大麻を吸ったのと同様な状態になるといえる。

他の脂肪酸アミド群 :

現在までに、オレイン酸アミド (oleamide)、パルミチン酸エタノールアミド (palmitoylethanolamide)、オレイン酸エタノールアミド (oleoylethanolamide) の阻害が詳しく研究されている。

表1. FAAHの阻害により蓄積する生理活性物質と対応する症状。

FAAHの阻害により蓄積する生理活性物質	対応する症状	文献
アナンダミド (アラキドン酸エタノールアミド)	記憶障害、思考力低下、知力低下、うつ、統合失調症様症状、低体温、無痛覚	(4-6)
オレイン酸アミド	傾眠 (絶えず眠くなる)	(7)
パルミチン酸エタノールアミド	末梢無痛、抗炎症性	(8) (9)
オレイン酸エタノールアミド	摂食障害 (過食・拒食)	(10)

## (2) 低容量・連続曝露による慢性症状

リン酸エステル類は、人体に入ると速やかに代謝され残留蓄積しにくいとされているため、これまで低容量・長期連続曝露についてほとんど注意が払われてこなかった。しかし、低容量・連続曝露により酵素の慢性的な活性低下が起こり、それによる代謝不全から種々の生理活性物質の過剰・欠乏が生じ、様々な慢性の障害を引き起こすと考えられる。

則ち :

酵素の阻害が続くことにより、代謝されなくなった生理活性物質の蓄積が起こり、過剰になった生理活性物質により、様々な精神・神経障害が起こる。

例) : NTE (神経障害標的エステラーゼ) の阻害により、リソレシチン (リン脂質の2つの脂肪酸から、ひとつの脂肪酸が加水分解された代謝物) が蓄積すると神経の鞘が無くなる脱髄が起こる。さらにリソレシチンの蓄積は、虚血性心疾患や多動を引き起こす。(11) 臨床的にも有機リンの慢性中毒患者に動脈硬化の症例が報告されている。(12)

有機リンによる体内の酵素の阻害が蓄積する。

例) : NTEのように、ゆっくりと働き阻害を受けた場合活性が回復するのに何週間もかかる酵素の場合、既に起こった阻害が回復しないうちに次の阻害が起こることが繰り返されると、酵素の活性が積算的にどんどん低下していくことになると考えられる。NTEの場合、約70%の阻害が遅発性神経障害の発症の目安とされている。この場合、理論的には、1日あたりわずか0.33%のNTE阻害が持続すると、ほぼ1年でNTE阻害が70%



に達することになる。

(3) 遺伝子の多型 (Polymorphism) とヒトの有機リンに対する耐性の個人差  
有機リン化合物に対して特に感受性の高い人たちがいることは、経験的によく知られている。しかし、従来これらのケースは、遺伝子に欠損や異常のある特異体質とみられがちで、有機リンの使用における基準値の策定にあたって十分に配慮されてこなかった。

近年、遺伝学の進歩により遺伝子の型には個人差があることがむしろ自然であり、「どの型が正常で、他の型が異常」というのではなく、「正常」な遺伝子にも多様な塩基配列のパターンが存在することがわかっている。これが「遺伝子の多型 (Polymorphism)」と呼ばれている。

有機リンを解毒する酵素である、ヒトのパラオキシナーゼ (PON1) の場合：

多型の例として、パラチオンとダイアジノンの解毒活性についてパラチオンに強い遺伝型の人、ダイアジノンの解毒活性が低く、逆にパラチオンの解毒活性の低い遺伝型の人、ダイアジノンの解毒に強いことが知られている。(18)

健康な成人の統計的な調査によれば、ヒトのPON1のリン酸エステル類の解毒の活性は、遺伝子の塩基配列のわずかな違いにより活性の高い人と低い人の間で、十倍以上の差がある。(13)

ヒトのPON1の活性の分布は、正規分布ではなく、PON1の活性の高い人中程度の人、低い人という3つの分布の山があることが報告されている。(13) 従ってPON1の活性の低い人も、相当数にのぼりこれらの人たちの中で有機リンに接触する機会の多い人が、有機リンによる慢性障害を発症しているケースが多いと考えられる。

PON1は、通常は動脈硬化を防ぐ役目を担っており有機リンの解毒を行うために使われると動脈硬化が進むことが考えられる。(14)

有機リンを解毒するPON1の遺伝子の多型と同時に、有機リンにより阻害を受けるそれぞれの酵素 (NTE, FAAHなど) にも当然遺伝子の多型による活性の個人差があると考えべきである。従って、これらが組み合わさって生ずる有機リンへの耐性の個人差は、非常に大きなものとなり得る。今後は、有機リンに対するハイリスクグループに健康被害が発生しないよう、特に配慮する必要がある。

また、有機リンは脳神経毒であるため脳の発達段階にある胎児や子供は、特に感受性が高いことがわかっている。妊娠中の女性や小児・児童の生活環境が有機リンで汚染されないように十分な配慮がなされなければならない。

#### (4) カルボキシルエステラーゼの阻害

カルボキシルエステラーゼは、肝臓などの内臓に主に存在し体内に入ってくる様々な化学物質や体内で作られる多様なエステル、アミド、チオエステル類などの生理活性物質を代謝する重要な酵素である。

このカルボキシルエステラーゼが、有機リンにより阻害されることが動物実験で確認さ

れた。(15) カルボキシルエステラーゼは、有機リンにより、アセチルコリンエステラーゼよりも遥かに阻害されやすい。この酵素が有機リンにより阻害されると、外部から入ってくる多様な化合物が代謝できなくなるため、有機リンの曝露の後、アレルギー疾患の発症や悪化、さらに、化学物質過敏症が起こることを説明できる。

#### (5) ブチリルコリンエステラーゼの阻害

ブチリルコリンエステラーゼ (BuChE) は、血清中のコリンエステラーゼまたは擬似コリンエステラーゼとも呼ばれている。この酵素は、有機リンによりアセチルコリンエステラーゼよりも阻害されやすい。(15; 16) ブチリルコリンエステラーゼは、大きなエステル結合などを持つ化学物質の代謝を担っている。有機リンによりこの酵素が阻害されると、麻酔時に筋弛緩剤として用いられる succinylcholine や mivacurium の代謝が遅れ、患者に呼吸麻痺などが起こる可能性がある。また、アスピリンの代謝ができずに毒性が出る。(16)

(6) リン酸エステル類は、これまでに知られていない非常に多くの酵素を阻害している可能性がある。

農薬だけでなく、難燃剤・可塑剤として使われるものを含め、すべてのリン酸エステル類は、リン原子を取り巻く分子構造が共通であり、その基本構造により原理的に、水酸基を持つアミノ酸（セリンというアミノ酸）を活性部位にもつすべての酵素（ほとんどすべての代謝を担う酵素がこれに相当する）の活性を阻害しうる。その中で、リン酸エステル類の個々の分子構造の2次的な差異により、特異的に阻害する酵素の種類が決定されている。

従って、これまでに知られていない酵素群も阻害されていることが考えられる。

例)： 最近、ジアシルグリセロールリパーゼやモノアシルグリセロールリパーゼの阻害、(2) 消化酵素 (Trypsin, elastase,  $\alpha$ -chymotrypsin など)、(17) 血液凝固因子 (Thrombin, Plasmin, Kallikrein など)(17) の阻害が報告された。

(7) 有機リンによる大気汚染がすでに常態化している。

東京都内の住宅、オフィスの室内空気及び外気について、35種類の半揮発性有機化合物 (SVOC) を測定した。その結果、室内空気中から可塑剤 10 種、有機リン系難燃剤 10 種、有機リン系殺虫剤 4 種が検出された。室内で検出された有機リン系殺虫剤ではフェニトロチオン  $1.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$  であった。外気においては、有機リン系殺虫剤のジクロロボスが 90%以上の測定地点で検出され、都内の大気は広くジクロロボスにより汚染されていることがわかっている。(19)

(8) 脱・有機リンに産業界はすでに対応できる。

可塑剤・難燃剤については、非有機リン・非ハロゲン系の安全性の高い製品がすでに国内の数社によって開発され、商品化されつつある。欧州の REACH 動向も踏まえ安全な物質開発に力を注ぐべきであろう。

農薬については、先進各国が、integrated pest control および環境保全・持続型農薬の場合もより低毒性で効果の高い例えばピレスロイド系をはじめとする室内用および農業用殺虫剤等が開発・販売されている。有機農業で使われている古典農薬の利用や国内で開発された誘引剤（フェロモン）による害虫駆除や天敵の利用など、より環境安全性の高い農業がすでに日本では一部で実施され始めている。これらを活用することにより、酵素阻害作用が強い有機リン系農薬およびカーバメート系農薬を出来るだけ使わない農業への転換が可能な段階にきている。

#### （9）まとめ

リン酸エステル類が、農薬として用いられ始めてから既に半世紀以上になる。その間、次々と新しいリン酸エステル化合物が農薬として合成され、地球規模で使用が拡大し続けてきた。

毒性については、誤って多量に摂取したケースや局所的汚染・食物の残留農薬が目ざれ食物への残留や農薬使用者の単発的な曝露とそれによる急性中毒に対する規制のみが取られてきた。

現在、有機リン系農薬は農地の殺虫剤・除草剤としてだけでなく、松枯れ防止や、公園・街路樹・個人の庭等での使用が増大し、屋内でも公共施設や交通機関を始め、幼稚園・病院に至るまで、年に何度か散布され、また家電製品、自動車、建材等に、難燃剤・可塑剤として多用されている。これらが揮発してガス化し、生活環境でのリン酸エステル類による大気汚染が発生している。

脳科学を中心とした最近の研究により、有機リンの低容量・長期曝露による脳・精神・神経系への影響が、従来考えられていたよりも遥かに深刻かつ広範囲に及び多くの場合、本人が気づかないうちに進行し、知性や情動、神経機能にダメージを与えることが徐々に明らかになってきた。

近年、わが国では学童の知力を各国と比較した国別の順位が年々低下し児童・学生の学力低下も問題化してきている。有機リンによる大気汚染との関係も懸念されている。シックハウス問題もこの点もよく踏まえて今後の研究を進展させなければならない。なぜならば有機リン剤の神経毒性に関する研究は 1970 年代、日本の研究がその先端を走ったからである。

#### 文献

1. 石川 哲. 有機リンの慢性中毒, *Scientific American*, (日本語訳: 日本経済新聞社), 68-82, 1978.
2. Quistad GB, Sparks SE and Casida JE. Fatty Acid Amide Hydrolase Inhibition by Neurotoxic Organophosphorus Pesticides. *Toxicology and Applied Pharmacology* 173: 48-55, 2001.
3. Quistad GB, Sparks SE, Segall Y, Nomura DK and Casida JE. Selective Inhibitors of Fatty Acid Amide Hydrolase Relative to Neuropathy Target Esterase and Acetylcholinesterase: Toxicological Implications. *Toxicology and Applied Pharmacology* 173: 56-65, 2001.

- Applied Pharmacology* 179: 57–63, 2002.
4. Varvel SA and Lichtman AH. Evaluation of CB1 Receptor Knockout Mice in the Morris Water Maze. *J. Pharm and Exp. Ther.* 301: 915–924, 2002.
  5. Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, Hermann H, Tang J, Hofmann C, Zieglgansberger W, Di Marzo V and Lutz B. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* 418: 530–534, 2002.
  6. Clement AB, Hawkins EG, Lichtman AH and Cravatt BF. Increased Seizure susceptibility and proconvulsant activity of anandamide in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *J. Neurosci.* 23: 3916–3923, 2003.
  7. Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner EA and Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 384: 83–87, 1996.
  8. Calignano A, La Rana G, Giuffrida A and Piomelli D. control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature* 394: 277–281, 1998.
  9. Lambert DM, Vandevorode S, Jonsson KO and Fowler CJ. The palmitoylethanolamide family: a new class of anti-inflammatory agents? *Curr. Med. Chem.* 9: 663–674, 2002.
  10. Fu J, Gaetani S, Oveisi F, Lo Verme J, Serrano A, de Fonseca FR, Rosengarth A, Luecke H, De Giacomo B, Tarzia G and Piomelli D. Oleyethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR- $\alpha$ . *Nature* 425: 90–93, 2003.
  11. Quistad GB, Barlow C, Winrow CJ, Sparks SE and Casida JE. Evidence that mouse brain neuropathy target esterase is a lysophospholipase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 7983, 2003.
  12. Ishikawa S. Ophthalmopathy due to Environmental Toxic Substances Especially Intoxication by Organophosphorus Pesticides. *J. Jpn Ophthalmol Soc.* 100: 417–432, 1996.
  13. Beltowski J, Wojcicka G and Marciniak A. Species- and substrate-specific stimulation of human plasma paraoxonase 1 (PON1) activity by high chloride concentration. *Acta Biochimica Polonica* 49: 927–936, 2002.
  14. Shih DM, Furlong CE and al. e. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 394: 284–287, 1998.
  15. Bencharit S, Morton CL, Xu Y, Potter PM and Redinbo MR. Structural basis of heroin and cocaine metabolism by a promiscuous human drug-processing enzyme. *Nature Structural Biology* 10: 349, 2003.
  16. Sparks SE, Quistad GB and Casida JE. Organophosphorus pesticide-induced butyrylcholinesterase inhibition and potentiation of succinylcholine

- toxicity in mice. *J. Biochem. Molecular Toxicology* 13: 113-118, 1999.
17. Quistad GB and Casida JE. Sensitivity of Blood-Clotting Factors and Digestive Enzymes to Inhibition by Organophosphorus Pesticides. *J. Biochem Molecular Toxicology* 14: 51-56, 2000.
  18. Brophy VH, Hastings MD, Clendenning JB, Richter RJ, Jarvik GP and Furlong CE. Polymorphisms in the human paraoxonase (PON1) promoter. *Pharmacogenetics* 11: 77-84 2001.
  19. 齋藤育江, 大貫 文, 瀬戸 博, 上原眞一, 鈴木孝人、室内空气中化学物質の実態調査（フタル酸エステル類及びリン酸エステル類等）：平成 12 年度、東京衛研年報 53, 191-198, 2002.

平成15年度厚生労働科学研究費補助金（がん予防等健康科学総合研究事業）  
「微量化学物質によるシックハウス症候群の病態解明、診断・治療対策に関する研究」  
分担研究報告書

最近の有機リン研究（2002-2003）（翻訳と解説）

石川 哲、宮田幹夫、坂部 貢 北里研究所病院臨床環境医学センター

研究要旨

ある種の有機リン剤は、接触または吸入により神経症状を惹起する。2003年にカリフォルニア大学中毒研究学の Casida 教授らはマウスに EOPF を摂取させると少量摂取では神経障害標的エステラーゼ活性を低下させ多動を生じることを明らかにした。この研究は、有機リン剤の神経毒性を説明するための重要な論文である。これをきっかけとして脳への影響が次々と解明されつつある。以下、その要点を翻訳する。

Loss of neuropathy target esterase in mice links organophosphate exposure to hyperactivity

Christopher JW, Matthew L Hemming, Duane M Allen, Gary B Quistad, John E Casida, & Carrolee Barlow. Nature Genetics 33: 477-485, 2003

要約 神経障害標的エステラーゼ (Nte) は神経系の発生に関与し、有機リン殺虫剤や化学兵器により引き起こされる神経変性の標的である。この研究は、遺伝子型で Nte が欠損しているマウスを作成した。Nte<sup>-/-</sup>マウスは胎生8日目に全例死亡する。Nte<sup>+/-</sup>マウスは脳内の Nte 活性が低く、Nte 阻害剤である octylphosphonofluoridate (EOPF) 暴露で野生型に比べると高い死亡率を示す。Nte<sup>+/-</sup>は多動を示し、EOPF を体重 kg あたり 1mg 処置した野生型(Nte<sup>+/+</sup>)では少し Nte 活性が下がるのみであったが多動性が認められた。これらの結果は、遺伝的にまた化学物質暴露で Nte 活性が低下すると、哺乳動物に神経症状としての多動症が引き起こされること、そして EOPF 毒性は Nte の阻害作用から直接、惹起され Nte の aging 変化とは関係がなかった。

略語

- Nte 神経障害標的エステラーゼ  
Nte <sup>+/+</sup> 野生型神経障害標的エステラーゼ遺伝子型  
Nte <sup>+/-</sup> 対遺伝子の一方のみ神経障害標的エステラーゼ遺伝子を有する型  
Nte <sup>-/-</sup> 神経障害標的エステラーゼ遺伝子欠損型  
EOPF Nte 阻害有機リン剤  
OPIDN 有機リン起因性神経障害  
ADHD 注意欠陥多動性障害

## 1. 緒言

有機リン殺虫剤及び化学兵器の急性毒性はアセチルコリンエステラーゼの阻害作用による 1、2)。ある種の有機リン剤には遅延毒性がある。ヒトでは、有機リン剤は単独で、また複合で遅延慢性毒性を発揮することが湾岸戦争退役軍人や慢性被曝者に発生している 3-9)。遅延毒性で最もよく知られているのは有機リン起因性神経障害 (organophosphate-induced delayed neuropathy: OPIDN) である。OPIDN の最近までの情報は 3 万名以上の症例と、実験モデルとしてのニワトリに見られる後足麻痺の結果によっている。OPIDN は脊髄神経の長い線維と末梢神経の変性で引き起こされる下肢の麻痺を特徴としている。標的タンパクとしては Nte が想定されている 10、11)。

有機リン剤毒性には多段階の仮説がある。(i) 有機リンはアセチルコリンエステラーゼよりも Nte を選択的に阻害する。(ii) 神経障害は Nte 活性が 70-90%まで低下して発現する 11、12)。(iii) Nte は活性部位のセリン残基にリンが結合する。(iv) alkoxy 群を失うことが (aging と言われているが)、活性部位にマイナス荷をもったリンを残す。(V) 中毒による機能障害が増幅して神経の変性を引き起こす 10-13)。しかしこのように有機リンの毒性が多く仮説の上に成り立っていることは、逆に有機リンが多く標的に働くことを示しているともいえる。さらに NTE の阻害作用も一つの表面的機構なのかもしれない。ヒト Nte とマウス NTE の一次構造を決定することは生理的機能を明らかにするものではないが、*Dorsophila melanogaster swiss cheese*(SWS)タンパクとの相同性を示した 14-15)。SWS は胎児の生存には必須のものではないが、SWS 遺伝子欠損のハエは神経線維のグリア細胞の取り巻きが分厚くなりすぎて、神経線維の変性を引き起こして死亡する 16)。生物的には、Nte とおなじ SWS で分かっているのはこれだけである。そのために、哺乳動物での Nte の役割と、有機リンによる阻害結果を明らかにすることが重要である。マウス及びヒト Nte 遺伝子コードの解読は、Nte 機能、有機リン中毒での役割を解明するための基本ステップである。ニワトリ有機リン中毒の神経病理及び中毒 11、12、20、21) とは像が異なるが、マウスへの有機リンの効果は有用なモデルである 17-19)。マウスの有機リンによる亜急性神経毒性は、Nte 阻害作用と Nte 可逆性阻害剤による予防効果についてはニワトリの OPIDN と同様であるが、毒性の発現時期および高い死亡率の点では異なっている 19、21、22)。

本論文では、Nte のマッピングと特徴、そして Nte ゲノムの位置を報告し、Nte 欠損マウスの系統について記載する。*D. melanogaster* の SWS と異なり、Nte は胎児の生存に必須である。さらに今回の実験で、Nte のヘテロタイプの Nte<sup>+/-</sup>を有するマウス脳の Nte 活性低下、運動性亢進と、EOPF に対する感受性の亢進が認められた。この実験が示すこ

とは、有機リン剤毒性に関係している因子は表面的な機能の変化ではなく、Nte 活性の減少である。今回の研究は哺乳動物の Nte 水準の減少効果を示す最初の報告であり、また有機リン暴露による種々な臨床症状を解析するための有力なモデルを入手し得たと言える。

## 2. 方法

長文になるので省略。

## 3. 結果

Nte および Nte 遺伝子座の特性

省略

Nte 関連遺伝子の同定

省略

Nte 欠乏系マウスの作成

省略

Nte は胎児生存に必須である

Northern-blot 解析で Nte は胎生 7 日目 (E7) に認められ、胎生期を通じて認められる。Nte 対遺伝子の欠損は E7 に死亡する。遺伝子を E8 で観察したが、E8 以降では Nte<sup>-/-</sup>の胎児の割合は減少し、E11 では Nte<sup>-/-</sup>の胎児は検出されなかった。Nte<sup>-/-</sup>胎児は E9 で形態的な異常を示し、その後吸収されていった。E8 以降では Nte が生存に不可欠であることを示している。その作用機構は不明であるが、神経管の閉鎖に関与しているかもしれない。Nte<sup>+/-</sup>マウスは生存可能であり、繁殖可能であった。

Nte 表現型

Nte<sup>+/-</sup>マウスの  $\beta$ -ガラクトシダーゼ染色を行った。Nte 表現型の正常性を示すためである。Nte<sup>+/-</sup>マウス胎児および成体では、高い活性が認められた。特に、E13.5 の胎児では、レンズ (水晶体) 及び脊髄に沿って強い活性が認められた。特に睾丸の Leydig 細胞に著明に認められた。その他、脳特に皮質、小脳のプルキンエ細胞、海馬にも認められた。野生型の睾丸の Leydig 細胞の活性は弱かった。これらの表現型は Northern-blot 解析でも、またハイブリダイゼーションの実験での結果 (15)とも一致する。

Nte<sup>+/-</sup>マウスは Nte の弱い活性を有しているが、アセチルコリンエステラーゼ活性では差がない



対立遺伝子の一側が欠損している効果を見るために、Nte 及びアセチルコリンエステラーゼ活性を測定した。Nte+/-型のマウス脳では、野生型マウスの 40%の Nte 活性しか示さなかった (Fig5a  $p<0.0001$ )。睪丸では Nte 活性減少は軽度であった (Fig5a)。この差は Nte に限ったものであり、アセチルコリンエステラーゼでは Nte+/-と野生型の差が認められなかった (Fig5a)。また、免疫 precipitation 法及び western blott 法で Nte タンパク量を測定したところ、Nte タンパク量は、脳、睪丸、腎臓で低い値を示したが (Fig5a)、肝臓では差がなかった。このように、Nte+/-マウスでは、Nte タンパク量と活性の低下が認められているが、神経病の徴候や病的所見は認められなかった。

#### Nte+/-マウスは有機リン剤に非常に敏感に反応する

有機リン剤の遅延毒性を Nte+/-マウスが、野生型より敏感に示すかどうかを検査した。Nte+/-マウス、野生型マウスの同胞腹腔に 6mg、または 10mg/kg の EOPF を注射した。EOPF の強い NTE 阻害作用は、生体の実験ではマウス、およびニワトリ脳 (IC<sub>50</sub> 0.02-0.04nM)、試験管内の実験ではマウス脳 (85%阻害量 5mg/kg 体重) と判明しているために 19、25)、今回のマウスに使用してみた。有機リン剤処置マウスの臨床所見と Kaplan-Meier plot による死亡率を検討対象とした。Nte+/-マウスでは、6mg、及び 8mg 投与で有意に死亡率が高かった (Fig.6a,b)。EOPF に対する反応として流涙、運動量の低下、けいれんが認められた。EOPF 1mg/kg 体重処置群では、死亡率、神経病理的に異常は認められなかった。これらの結果は、EOPF は直接 Nte 活性を阻害し Nte 機能の喪失が EOPF 毒性を導き出しているものと考えられた。

#### 中等度の Nte 活性低下は運動性が過剰になる

EOPF 低投与量 (1mg/kg 体重) の神経機能の反応を野生型及び Nte+/-マウスについて検討した。EOPF 負荷のない状態では、Nte+/-と野生型の間には逃避反応や聴覚条件付けによる実験及びオープンフィールドテストでの新しい環境への反応とも、有意な差が認められなかった。これは短期の実験であるが、Nte+/-マウスは学習、記憶、不安に大きな欠陥はないと思われた。そこで長期間の行動の差を追跡調査することとした。馴化期間を 3 日間置いて、野生型と Nte+/-マウス (非投与群と EOPF1mg/kg 投与群) のオープンフィールドでの運動能力を検査した。測定項目は 10 日間ごとに、移動軌跡長と垂直方向への運動回数を測定した。Nte+/-マウスは野生群に比べて、非投与時には軌跡長及び垂直方向への運動とも高い値を示した (図 6c, d)。すなわち Nte+/-は表現型が過動傾向にあることを示していた。この過動が Nte 活性が低いためのものか、それとも発生異常からくるものかを確かめるために、1mg/kgEOPF 投与後の運動能力を検査した。EOPF 投

与後には、Nte+/-マウスの活動性が著明に低下した(図 6c、d)。これは既に構成済みになっている Nte の水準がさらに低下したものと思われた。一方野生型マウスでは 1mg/kg 投与後に軌跡長、および垂直方向(6c)への伸び上がり運動(6d)とも有意に活動性が上昇した。その上昇は、EOPF 投与前の Nte+/-マウスの値に匹敵していた。組織学的検査では、投与後では全く異常が認められなかった。以上の結果は、哺乳動物で Nte 活性が先天性であれ、後天性であれ、部分的に阻害されると異常な神経行動を引き起こすことを示していた。

#### 4. 考察

Nte 阻害剤による長期反復暴露は、行動、認識、視覚障害のような永久的、慢性の神経精神障害を引き起こすことが報告されている(1、26)。さらに、例えば殺虫剤と昆虫忌避剤の併用のような、神経毒性物質が組み合わさって使用されると、重篤な脳組織障害を引き起こすかも知れない(3、27)。そのほかにも、殺虫剤暴露で ADHD(attention deficit hyperactive disorder 注意欠陥多動性障害)のような神経行動異常が引き起こされるかもしれないことが分かっている(28、29)。Nte の詳細な役割を確立し、哺乳動物での阻害効果が何をもちょうかを知るためには、種々な問題を解決して行かなければならない。

最も重要な問題は、この酵素が生体内で何をしているかが分かっていないことである。Nte の半分が不活性のマウスを作成したことは、遺伝的にも、また生化学的にも、Nte 活性の阻害が神経学的効果を生じることが確認されたことである。

Nte がヒト染色体 19p13.3 にマッピングされている。この部位には、ヒトの二つの疾患が存在しているがそのどれもが Nte 機能の障害とは関係ない疾患である。Weil-Marchesani 症候群に関係する変異は、WMS 遺伝子として染色体の 19p13.3-13.2 にマッピングされている。ヒトのムコリピドーシス IV 変異は 19p13.3-13.2 に mucolipin I としてコードされている。同族の 2 番目の Nte-R1 をヒト染色体 9 およびマウス染色体 2 に我々は同定した。Nte-R1 の機能は未知であるが、ニワトリの脳と坐骨神経で異なった分画でエステラーゼ作用に関係している可能性がある(30-32)。我々の今回の結果は、Nte-R1 は胎生期の発生で Nte の代役をするものではなく、また EOPF の作用に反応するものではないことを示していた。Nte-R1 の前駆タンパク質は、Nte の一部遺伝子領域にある NEST 同質性を分かち合っている分解酵素領域を所有している。

Nte は海馬の神経のみでなく、小脳のパーキンジ細胞、脊髄、さらに睾丸の Leydig 細胞や発生期の水晶体に高度に表現されている。そのために Nte 活性の低下は、脳神経系以外にも影響があるものと思われる。Organophosphate phosphamidon は、ラット睾丸の Leydig 細胞や尾部の透明細胞に有害作用を発揮し(33)、diazinon による環境暴露は硬骨魚

類の網膜細胞壊死を引き起こす 34) ことは明記しておくべきことであろう。今回の実験で Nte が胎児生存に必須であることが明らかになった。そしてそれが Nte の阻害の結果であることが明らかになった。哺乳動物の胎児の形成と発達に Nte は根本的な役割を果たしている。

精液の観察を通して、Nte 活性の中等度の低下は、それが遺伝的なものであれ阻害剤によるものであれ、多動性を生じることが判明した。ただこの機序に関しては不明と言わざるを得ない。Nte の生化学的機能はいまだほとんど分かっていないが、生理学的には大いに進捗がみられている。Nte の分解能力はリポソーム膜の伝導性を変化させ、神経毒性を有する有機リン剤は試験管内のこの反応に変化を生じさせる 35)。ヒトの Nte は膜の脂質を加水分解しており、脂質の代謝や細胞シグナルになんらかの役割を果たしていると思われる 36)。Nte は細胞内のシグナル関連要素やサイクリックヌクレオチドで作動しているイオンチャンネルに普通に認められている cNMP-結合性の部位をいくつか持っている 10、36、37)。Nte とカルシウム非依存性フォスホリパーゼ A2 の活性基の周囲のキーとなる部分には非常に相似性が認められる 36)。ここで指摘しておきたい重要なことは、ADHD が脂質代謝障害 38)、殺虫剤暴露 28、29)、そしてラットモデルでイオンチャンネルのコンダクタンスの変化 39) にリンクしていることである。これらをまとめて考えると、哺乳動物では NTE の物質分解能が運動活性とリンクしており、ヒトで Nte 活性の阻害がなんらかの運動障害性に関与していると思われる。

有機リン剤による Nte 阻害で引き起こされるニワトリのニューロパチーはウォーラー軸索変性を引き起こし、1～3週の間空胞化と神経の腫脹を引き起こす 40、41)。ニワトリは OPIDN の研究に好んで用いられるが、このモデルがヒトや他の哺乳動物の有機リン剤の危険性を必ずしも反映するものではなく、また短期毒性、中期毒性、そしてニューロパチーでない長期毒性解析を進める上で必ずしも適切でないことが明らかになってきている 42)。マウスは典型的な OPIDN の反応を示さないこと 21)、は重要であり、またニワトリの OPIDN とマウスの遅延毒性の関係もいまだに明らかになっていない。今回の研究で、Nte+/-マウスの Nte 活性は 40%減少しており、これは野生型マウスで有機リン剤による遅延毒性実験時 19、25) や、ニワトリの OPIDN 11-13) でみられる Nte 活性 70～90%阻害に匹敵している。しかしニューロパチーの徴候は初期にはまったく認められない。しかし Nte+/-マウスは有機リンによる亜急性毒性に極めて弱く死亡率が上昇するため、これ以上の EOPF 投与長期実験は不可能であった。

Nte が有機リン剤によって阻害されて神経系に異常をきたすのは、単に正常の酵素活性が失われるのみでなく、リン酸化された Nte の aging という現象による酵素活性の利得が変化するためであると言われている 17、23)。このような中毒性からの利得異常は各種の

神経変性疾患でも適用されている概念である。すなわち家族性筋萎縮性側索硬化症 49) のような神経変性疾患や、ハンチントン舞踏病 44) のような CAG の配列、すなわちコドン異常からの疾患 (CAG triplet disease) である。いずれにしろ今回の結果では、Nte の部分的な阻害が明らかな過動という神経行動学的な表現結果をもたらした。そして Nte 欠損マウスの実験は、このような表現が Nte 活性の低下に基づくものであり、Nte の aging によるものでないことを示した。Nte+/-マウスの Nte タンパク量の低水準は EOPF の毒作用に非常に反応しやすくして、毒性は機能利得障害というよりも、機能喪失からきているものであることを示していた。

さらに本研究での EOPF による Nte 活性阻害効果は、Nte+/-という Nte 遺伝子の半分が欠落している酵素量の低下している状態と非常に似ていることを示していた。結局ここで明らかになったことは、Nte の阻害が、酵素の aging や利得とは関係なく、直接神経学的効果を発揮しており、そしてその阻害作用こそが哺乳動物の神経系を損なうであろうということである。Nte 遺伝子が半分欠損しているマウスのモデルは、Nte、遅延毒性、OPIDN の解明に大いに役立ち、そして神経ガスや殺虫剤が単独でも、複合汚染でも、ヒトの神経系に障害を与えることの理解に大いに役立つと思われた。

過去半世紀に亘る研究で、重要なことは有機リン剤による障害が湾岸戦争症候群 1、6、26、45) を含めて、単にアセチルコリンエステラーゼ阻害のみでないことが明らかになってきた 1)。Nte 阻害がこれらの二次的な症状には関係しているかもしれない。Nte 欠損マウスの誕生は、哺乳動物の Nte の作用を研究するために重要なステップである。Nte 欠損マウスの出現は有機リン剤による遅延毒性や神経麻痺、ニューロパチーの治療を今後加速するであろう。Nte が神経系に強く表現されることが示され、胎児の発達に必須であることが示された。また対遺伝子の一方が欠損していると、脳の酵素活性が低く、そして EOPF の毒性に高い感受性を示すことが示された。さらに遺伝的であれ、EOPF による後天的障害あれ、中等度に Nte 活性低下が多動症を引き起こすに十分であることが判明した。

これらの研究結果は Nte、遅延毒性そして OPIDN の相互関係を洗い直すべき証拠を示した。ここで明らかなことは、Nte は発生と行動の規制を行っている生体にとっての必須の遺伝子であることが判明した。

## 文献

1. Karczmar, A.G. Acute and long lasting central actions of organophosphorus agents. *Fundam, Appl. Toxicol.* 4:S1-17, 1984
2. Solberg, Y. & Belkin, M. The role of excitotoxicity in organophosphorous nerve agents central poisoning. *Trends pharmacol. Sci.* 18:183-185, 1997