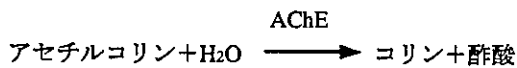
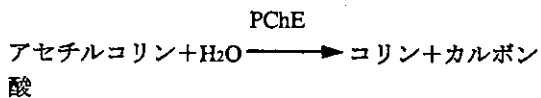


Cholinesterase: AChE)
と呼ばれるものである。



もう1つは血清中に高濃度に分布するものでアセチルコリンのみならず、その他のアシルコリン（ベンゾイルコリン、ブチルコリンなど）を加水分解する酵素で別名 pseudo-cholinesterase: PChE とよばれている。



ヒトの血液では、AChE は血球（血球膜）に局在し、PChE (pseudo) は血漿に局在するので、赤血球 AChE および血漿 PChE を測定すれば血液内 AChE および PChE の消長を知りうるができる。有機リン系農薬およびカーバメート系農薬の作用（中毒）機構が、ChE の抑制であることが判明して以来、ChE の測定は農薬研究に欠くべからず項目となっており、また有機リン系剤・カーバメート剤暴露による中毒診断および健康管理の分野にまで拡大している。

一般に、農薬を撒布する場合や害虫駆除のための殺虫剤撒布では一種類の薬剤のみならず、同時に2種以上の薬剤を用いて作業に従事する場合がみられる。しかしながら、農薬の種類異なるものの組み合わせに

よる複合およびその投与量（暴露量）変化による血中 ChE 活性への影響について、詳細な報告がみあたらない。今回、複数の農薬による複合した毒性の評価のために、2種類の農薬の組み合わせ混合投与を行い、ChE 活性への阻害効果により農薬の複合暴露による影響について調べた。

血清 PChE が高くなる場合として、ネフローゼ症候群や栄養過剰による脂肪肝があげられ、高脂血症や脂質代謝と血清 PChE との関連性において臨床的有用性を見直しが行われている。今回、肥満ラットを作り、肥満状態における ChE および有機リン系殺虫剤の影響について検討した。

B. 実験方法

(1) 材料

標準品

有機リン系剤

・ダイアジノン (Diazinon)

【関東化学】

・フェニトロチオン

(Fenitrothion: MEP)

【関東化学】

・ジクロロボス

(Dichlorvos: DDVP)

【関東化学】

カーバメート系剤

・メソミル (Methomyl) 【関東化学】

試薬

- ・DTNB (5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid)
【和光純薬工業】
- ・アセチルチオコリン【SIGMA 社】
- ・サリチル酸エゼリン【SIGMA 社】
- ・還元型グルタチオン
【和光純薬工業】

実験動物

Wister ハノーバーラット 雄 6 週齢
体重 280g

ChE 測定用試薬

DTNB-緩衝液:DTNB10 mgを 0.9%NaCl 溶液 50 mlに溶解、1/15MSorensen・リン酸緩衝液 (pH8.0) 50 mlを加える。氷室保存 1 週間使用可能。

基質:アセチルチオコリン 75 mgを蒸留水 50 mlに溶解。用事調整、氷浴中に保存。

反応停止液:サリチル酸エゼリン 50 mgを蒸留水 50 mlに溶解、氷室保存。

グルタチオン標準液:還元型グルタチオン 25 mgを蒸留水 100 mlに溶解

試料

ラット (300 g 前後): 12 μ l 全血 (尾

静脈採血)

(2) 実験操作

a) 毒性試験

投与方法

(経口法): 有機リン系及びカーバメート系農薬をカルボキシルメチルセルロース (CMC) を懸濁剤として混合し用いて、1 種類投与実験では半数致死量 (LD₅₀) 値の 1/10~1/20 の濃度で投与した。有機リン系+有機リン系および有機リン系+カーバメートの 2 種混合投与実験では LD₅₀ 値の 1/40 を用いた。そのうちわけとして①有機リン系+有機リン系 (ダイアジノン (D)+フェニトロチオン (F))、②有機リン系+カーバメート系 (ダイアジノン (D)+メソミル (M)) の組み合わせを用いた。1 回の投与量は表 2 に示したごとく、0.2 ml/20 g (体重) で経口投与した。

投与期間: 11 日連続経口投与方法

亜急性 (短期) 経口毒性をみるためラットに毎日、1 日 1 回午前 11 時に投与し、投与前 (午前 10 時) と投与 3 時間後 (午後 2 時) に採血し、血中 ChE 活性 (血漿 PChE・血球 AChE 中) の測定を行った。投与期間は連続で 11 日間 (土日は省いて) 行い、12 日目以降は投与なしで、血中 ChE 活性 (血漿 PChE・血球 AChE 中)

の測定を行った。

b) 肥満ラットを用いた、肥満と血清 ChE および有機リン系殺虫剤の影響による試験

肥満ラットの作成：

肥満ラット作成には表 1 に示したごとく、1 日あたり飼料として 25g (粉末試料：牛脂=75%：25%) を 20 日間与え作成した。対照としては正常食 20g (粉末飼料)/日のコントロールラットと小食 15g (粉末飼料)/日のやせラットを作成し用いた。

投与方法：

肥満ラット、コントロールラットおよびやせラットを対象として、有機リン系剤のジクロルボスを用いて (表 2-1) 毒性試験方法に従って行った。

c) AChE・ChE 測定法 (チオコリンエステル-DTNB 法)

- ① 第 1 遠心管に DTNB-buffer 4 ml をとり、新鮮血適当量を注意深く混合。
- ② この血液希釈液の 2.4 ml を第 2 遠

心管にとり、遠沈 (3,000rpm、5 分) させる。

- ③ 上清検液 1.6 ml を管底の血球を浮遊させぬように試験管 (血漿 PChE) に移しとる。
- ④ 第 1 遠心管 (全血 ChE)、試験管 (血漿 PChE) それぞれに基質 0.4 ml を加え、30°C 恒温槽に入れる。
- ⑤ 10 分後、反応停止液 0.3 ml 添加。
- ⑥ 第 1 遠心管を遠沈 (3,000rpm、5 分) させる。
- ⑦ 盲験用：試験管に DTNB-buffer 1.6 ml を入れ、検体同様に 30°C 恒温槽で基質 0.4 ml と 10 分間反応させ、反応停止液 0.3 ml を加える。
- ⑧ 検量線：試験管にグルタチオン標準液を 0.3 ml、蒸留水を 0.7 ml 加え混和する。
- ⑨ 全血 ChE、血漿 ChE、盲験用、検量線用それぞれ 0.3 ml をマイクロプレートに加え、マイクロプレートリーダー 450nm で吸光度を測定する。(AChE・PChE 測定法、図-1)

図-1 AChE・PChE 測定法 (チオコリンエステル-DTNB 法) フローチャート

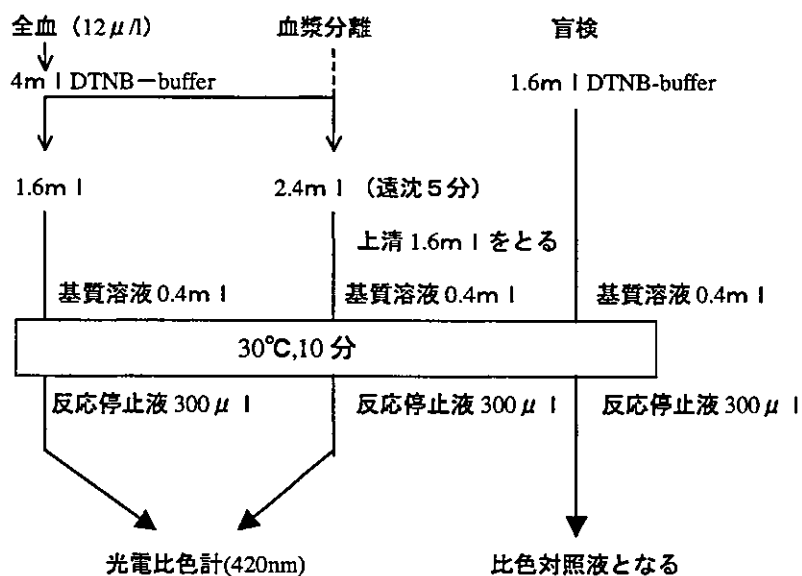


表1 肥満ラットの作成

	飼育前体重	飼育後体重	粉末飼料	牛脂	1日量
肥満ラット	98 g	229 g	75%	25%	25g/日
コントロールラット	90 g	201 g	100%	0%	20g/日
やせラット	90 g	184 g	100%	0%	15g/日

表2-1 1剤による投与濃度

	投与濃度	LD ₅₀ に対する投与比率	LD ₅₀
ダイアジノン	50 mg/kg	1/20	1000 mg/kg
フェニトロチオン	150 mg/kg	1/10	1500 mg/kg
メソミル	5 mg/kg	1/10	50 mg/kg
ジクロルボス	5 mg/kg	1/25	124 mg/kg

表 2-2 2 剤混合による投与濃度

2 種混合		投与濃度
有機リン系 +有機リン系	ダイアジノン+フェ ニトロチオン	50 mg/kg + 7.5 mg/kg
有機リン系 +カーバメート系	ダイアジノン+メソ ミル	50 mg/kg + 2.5 mg/kg

C. 結果及び考察

実験 1 ; 農薬の種類とコリンエステラーゼ活性の変化

1 剤反復投与

急性期毒性試験 (投与~72 時間(3 日目))

図 1-1 及び表 3-1 に示したごとく、有機リン系剤 (ダイアジノン・フェニトロチオン) による ChE 活性阻害では、赤血球中の AChE において、フェニトロチオンとダイアジノンでは投与 3 時間後の低下は少なく経日とともに徐々に低下し、72 時間後では活性値は約 60%まで低下していた。一方血漿中の PChE において、フェニトロチオンでは農薬投与 3 時間後では約 44%の低下がみられその後変化は小さく、72 時間後でもほぼ 3 時間後の低下率と同じであった。ダイアジノンでは投与 3 時間後で約 63%と活性値の低下がみられ、その後の変化はフェニトロチオン同様小さく 72 時間後では活性値は約 60%を示した。従って、有機リン剤のコリンエ

ステラーゼ への影響で、ダイアジノンでは従来からの報告のごとく 72 時間までの急性中毒時には PChE の低下率が AChE より大きかった。

カーバメート系剤 (メソミル) による ChE 活性阻害では、赤血球中の AChE において、メソミルでは農薬投与 3 時間後の活性上昇がみられ (活性値は約 110%)、以後時間経過と共に徐々に漸増し 72 時間後では活性値は約 124%まで上昇した。一方血漿中の ChE においても農薬投与 3 時間後ですでに約 120%の上昇がみられ 72 時間後でも AChE 同様活性値が約 130%まで上昇する結果となった。

短期 (亜急性) 毒性試験 (投与開始後 72 時間(3 日目)~432 時間(18 日目))

図 1-2 及び表 3-1 で示したごとく、投与開始後 72 時間(4 回目)~432 時間(18 日目)での有機リン系剤は、赤血球中の AChE において、フェニトロチオンでは 3 日目以降も低下し続

け、12 日目にてラットの 2 匹が致死に至った。ダイアジノンで投与 3 日目以降、投与ごとの 11 日目までは低下し、その後の 12 日目以降の未投与期間では徐々に上昇し 18 日目には投与前の活性の 74%まで戻っていた。一方血漿中の PChE において、フェニトロチオンで AChE と同様 3 日目以降も低下し続け、12 日目にてラットの 2 匹が致死に至った。ダイアジノンでは投与 3 日目以降、投与ごとの 11 日目までは低下し、その後の 12 日目以降の未投与期間では徐々に上昇し 18 日目には投与前の活性の 104%まで戻っていた。

投与開始後 72 時間(3 日目)~432 時間(18 日目)でのカーバメート系剤(メソミル)による ChE 活性阻害では、赤血球中の AChE および PChE とも同様に 7 日目以降から低下を示し、11 日目までは低下し、その後の 12 日目以降の未投与期間では徐々に上昇し 18 日目には AChE および PChE 共投与前の活性より高く、それぞれ 143%100%であった。このようにカーバメート系剤(メソミル)では農薬の投与に対して、図 1-1 に示したごとく投与から 1 週間の急性期では投与による上昇がみられた。報告によればメソミルは有機リン系剤に比べて活性値の低下は急激であるが生体内代謝は速やかで排泄も早く、ChE

活性値の回復期間が短いとされている¹⁾が、低下は遅れて見られ、回復は速いものであった。

1 剤による血液 ChE への影響で、有機リン剤では従来の報告のごとく、急性中毒時には PChE の方が敏感に反応し、活性値の回復も速い結果を示した。短期(亜急性)中毒時(投与開始後 72 時間(3 日目)~432 時間(18 日目))では AChE の方が低下率が大きく、回復も遅延する結果を示した。今回農薬投与量の算出基準に LD₅₀の数値を参照に、その 1/10~1/20 を用いたが、フェニトロチオンにおいてはラットに対する投与量が多すぎたことが死亡の一因である可能性があった。報告によれば有機リン系剤は ChE と容易に結合して、ChE の ACh の分解能を低下させる。それに対してカーバメート剤は ChE とゆるく複合体を作ってその活性を阻害する。有機リン剤の ChE 活性阻害は ChE との化学的結合によるものといわれており、今回の結果から農薬による ChE への影響で、LD50 からの比率がほぼ同程度に依る場合は、有機リン剤による ChE への阻害がカーバメート剤による阻害より強く表れた結果が示された。

実験 2 ; 農薬を 2 種混合投与する複合暴露による ChE 活性の変化

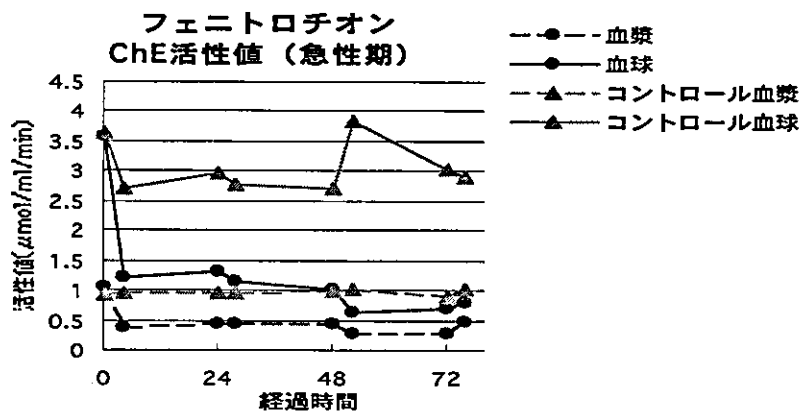
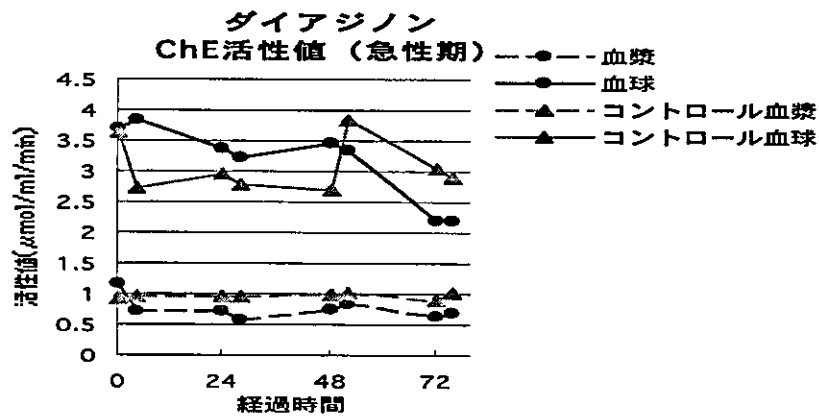
急性毒性試験（投与開始～72 時間(3 日目 4 回目投与時)）および短期（亜急性）毒性試験（投与後 72 時間(3 日目)～432 時間(18 日目)）

図 2 及び表 3-2 に示したごとく、①有機リン系+有機リン系（ダイアジノン(D)+フェニトロチオン (F)）および②有機リン系+カーバメート系（ダイアジノン(D)+メソミル (M)）による ChE 活性阻害では、赤血球中の AChE および PChE ともに農薬投与 3 時間後の低下がみられ、以後時間経過と共に徐々に低下し 72 時間後では活性値は①(D+F)では AChE 36%、PChE 45%、②(D+M)では AChE 41%、PChE 50%と低下した。AChE と PChE の低下率の比較では 48 時間（2 日目）までは PChE が敏感に反応し、72 時間（3 日目）以降は両者とも活性低下が続き、投与ごとの 11 日目までは低下し、その後の 12 日目以降の未投与期間では徐々に上昇し 432 時間（18 日目）には投与前の活性で、①(D+F)では AChE 56%、PChE 100%、②(D+M)では AChE 63%、PChE 85%まで戻っ

ており、急性期では PChE が敏感に反応していたが、432 時間（18 日目）では AChE の低下率が大きかった。2 剤混合投与において、①有機リン系+有機リン系（D+F）および②有機リン系+カーバメート系(D+M)の急性期（投与～72 時間(3 日目)）および短期（亜急性）（投与後 72 時間(3 日目)～432 時間(18 日目)）共、有機リン剤のダイアジノン 1 剤投与時とほぼ同様な ChE 阻害パターンがみられたが、興味深いことに②有機リン系+カーバメート系(D+M)の 432 時間(18 日目)で特に PChE で①有機リン系+有機リン系 (D+F) の PChE より、強い阻害を受けていた。これらは表 3-1 で示されているようにカーバメート剤（メソミル）1 剤では ChE への阻害で活性上昇の結果が示されているが、反対にカーバメート剤に有機リン剤が加わった 2 剤混合では ChE への活性阻害で低下率が大きくなった結果となり、複合毒性の評価の難しさが示されている。

図 1-1 1 剤投与による ChE 活性の変化

(急性期) <<有機リン系剤>>



(急性期) <<カーバメート系剤>>

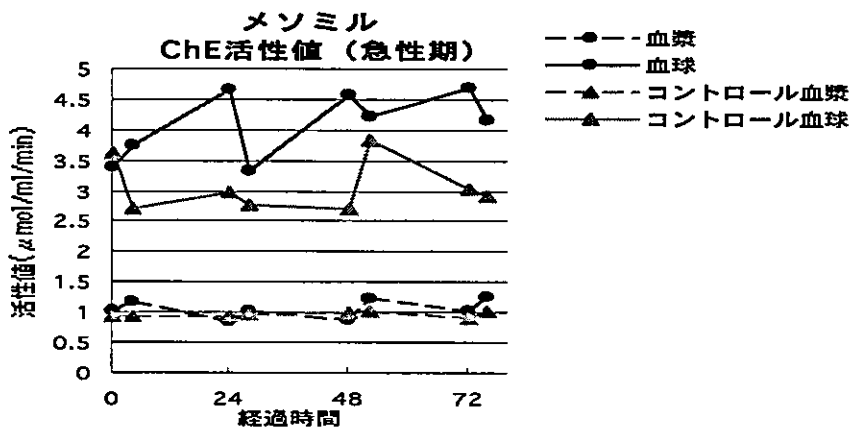
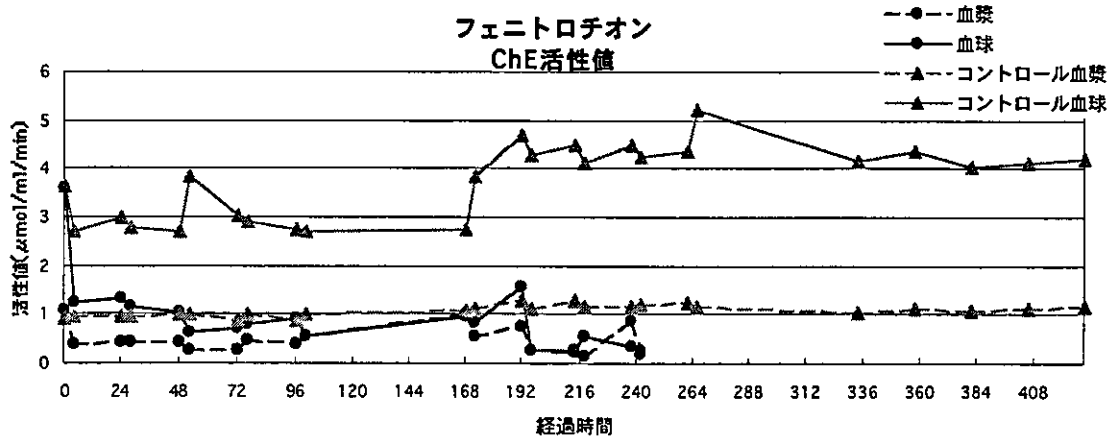
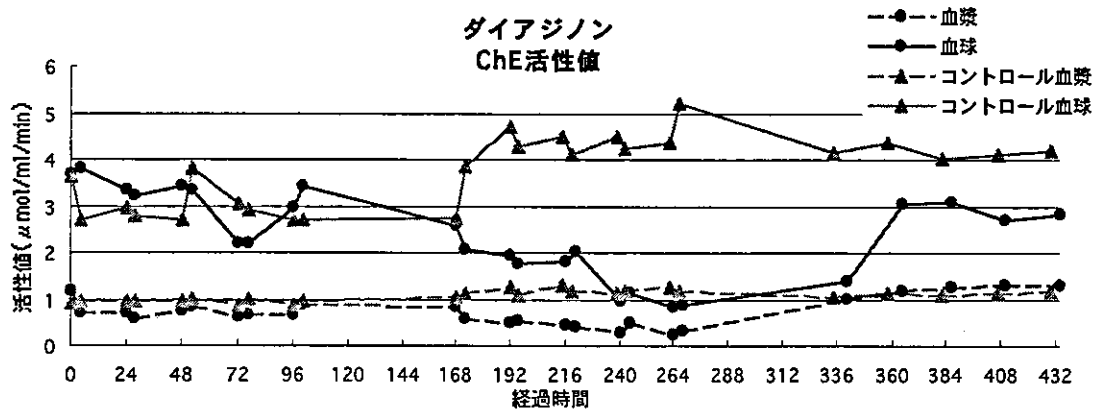


図 1-2 (短期 (亜急性期) <<有機リン系剤)



(短期 (亜急性期) <<カーバメート系剤>>

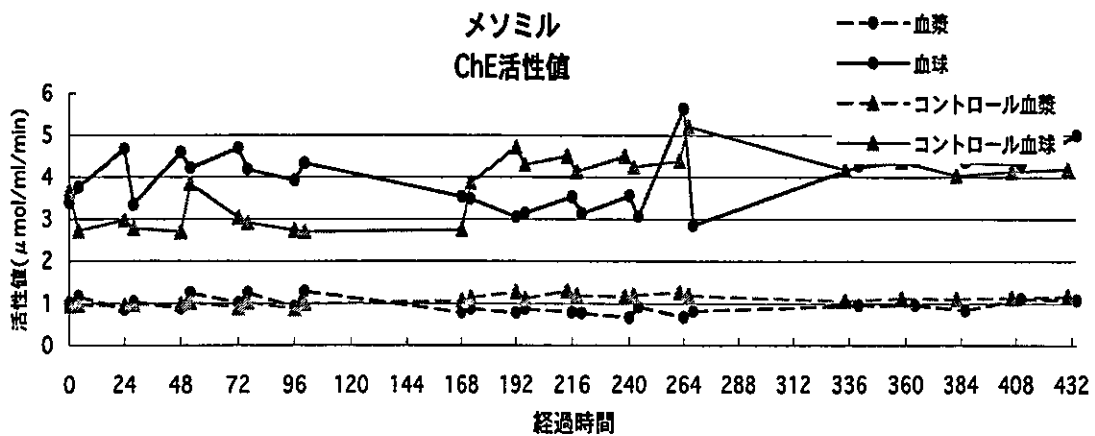


表 3-1 1 剤投与による ChE への阻害 (投与前の活性に対する相対活性 (%))

		3h	24h	48h	72h	168h	264h	336h	432h
			1 日	2 日	3 日	7 日	11 日	14 日	18 日
ダイアジノン	AChE	101	87	91	60	55	23	38	74
	PChE	63	50	67	60	55	27	100	104
フェニトロチオン	AChE	33	33	19	22	21	6	—	—
	PChE	44	41	32	45	50	18	—	—
メソミル	AChE	110	100	122	124	50	83	120	143
	PChE	120	100	114	130	85	73	100	100
無投与	AChE	75	76	105	80	103	138	111	114
	PChE	110	100	100	100	110	115	100	120

図 2 2 剤混合投与による ChE 活性の変化

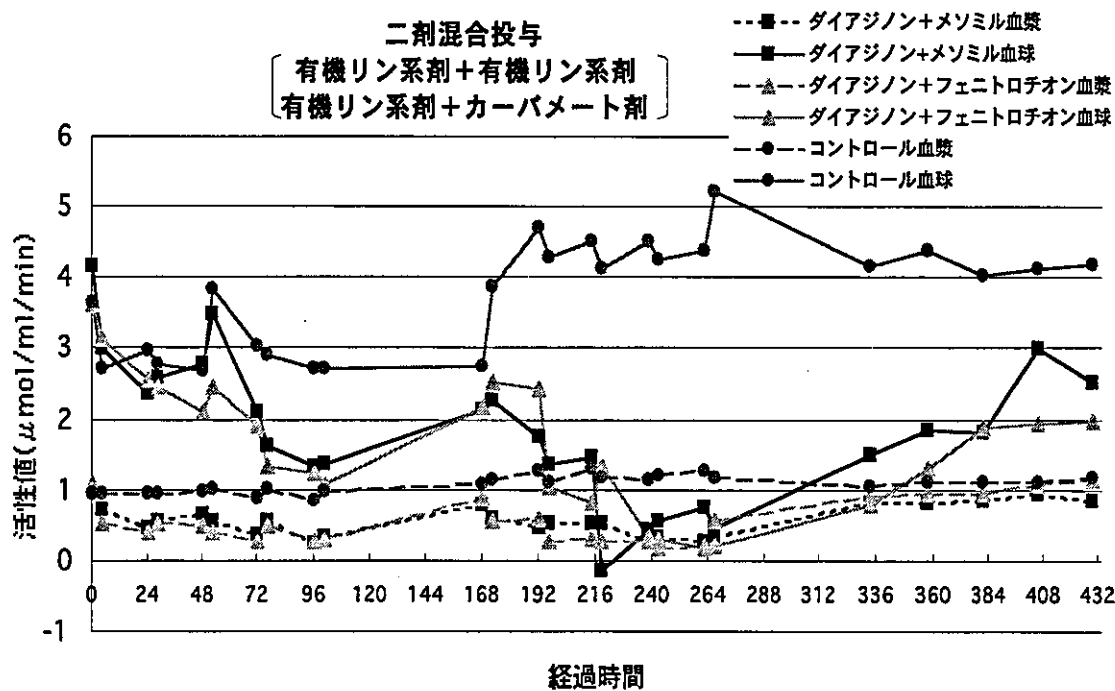


表 3-2 2 剤投与による ChE への阻害 (投与前の活性に対する相対活性 (%))

		3h	24h	48h	72h	168h	264h	336h	432h
			1 日	2 日	3 日	7 日	11 日	14 日	18 日
ダイアジノン + フェニトロチオン	AChE	86	69	69	36	69	8	22	56
	PChE	55	55	36	45	55	55	82	100
ダイアジノン + メソミル	AChE	73	63	85	41	54	12	39	63
	PChE	80	60	50	50	60	35	85	85
無投与 (生食)	AChE	76	76	105	78	105	141	114	114
	PChE	100	100	100	100	115	120	110	125

図 3 肥満・やせラットへの有機リン剤 (ジクロロボス) 投与による ChE 活性の変化

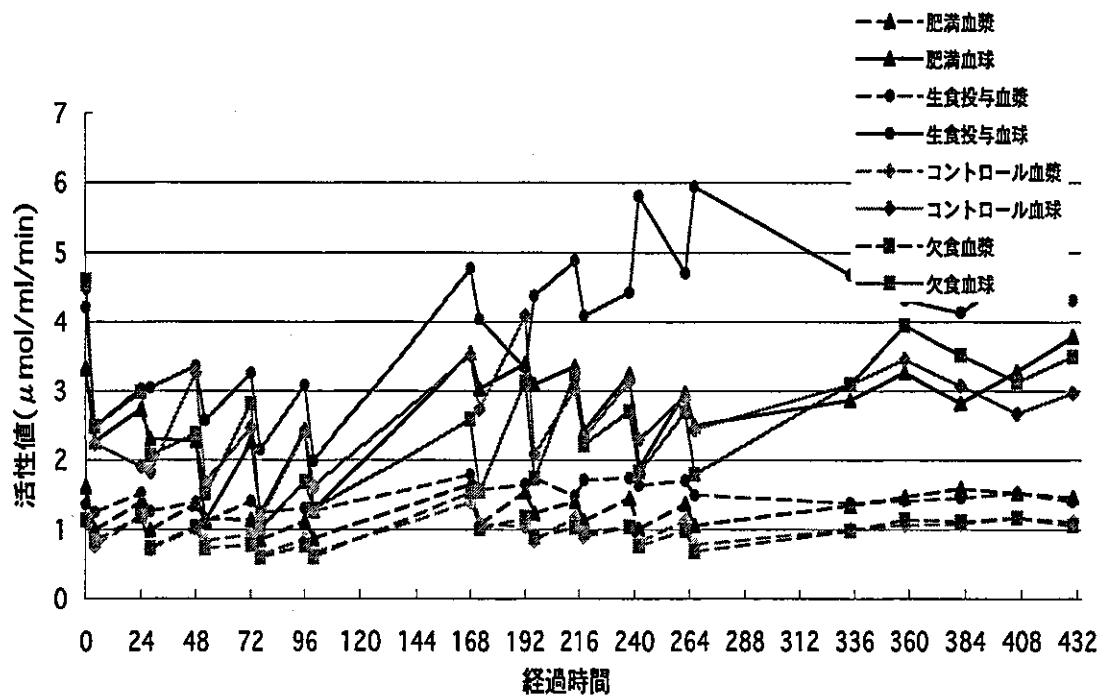


表 3-3 肥満・やせラットへの有機リン剤(ジクロロボス)投与による ChE の変化

(投与前の活性に対する相対活性 (%))

		3h	24h	48h	72h	168h	264h	336h	432h
			1 日	2 日	3 日	7 日	11 日	14 日	18 日
肥満	AChE	67	70	36	36	91	76	85	114
	PChE	63	63	69	50	63	63	88	94
やせ	AChE	54	44	33	22	33	39	67	78
	PChE	82	68	64	55	91	68	91	91
正常	AChE	49	42	40	29	62	56	69	66
	PChE	75	70	80	75	105	90	100	100
無投与 (生食)	AChE	60	71	60	52	98	114	114	102
	PChE	92	92	85	92	123	123	115	115

実験 3 ; 肥満と血中 ChE および有機リン系殺虫剤の影響

急性毒性試験 (投与~72 時間(3 日目)) および短期 (亜急性) 毒性試験 (投与後 72 時間(3 日目)~432 時間(18 日目))

図 3 及び表 3-3 に示したごとく、肥満・やせ・正常体重ラットの比較では急性期 (投与~72 時間(3 日目)) では 3 者間とも AChE 低下率は時間とともに大きくなっているが 3 者間での比較ではやせラットが大きい傾向であった。72 時間(3 日目)以降は徐々に活性上昇がみられ 432 時間(18 日目) ではやせ・正常体重ラット AChE のそれぞれは 78%、66%と低下率が大きかったが、肥満ラットの AChE は 114%と活性の回復が速く投

与時より強い活性が示された。一方、PChE に関しては肥満ラット・やせ・正常体重ラットで、農薬投与 3 時間後から低下が 72 時間後までみられ、その後ゆっくりと上昇し 432 時間(18 日目)での肥満・やせ・正常体重ラット間の PChE 比較ではそれぞれ 94%、91%、100%とやせラットの回復がおくっていた。従って、実際の有機リン剤農薬等の殺虫剤撒布の人達の暴露状況を ChE 活性の動きよりみると、急性中毒期 (~3 日目) では AChE および PChE で体型からの活性への影響はみられないが、短期中毒期 (亜急性: 2 週~3 週目) では正常体重のヒトに比して肥満のヒトでは AChE が高めに現れる傾向が予想される。

高脂血症における血清 ChE 活性値

の上昇が報告され、その上昇の機序の第 1 に、脂質合成速度の亢進に伴って産生されるリポタンパクからの ChE の遊離の増加が示され、第 2 に脂質代謝回転速度の増加により ChE の基質であるアシルコリンの蓄積が生じ、肝における ChE 合成が亢進し増加することが示されている。肥満では脂質の代謝亢進が考えられ第 1 の機序が関係するものと考えられた。

D. 結論

1 剤投与による ChE への阻害について

1) 急性中毒時における有機リン系農薬（ダイアジノン、フェニトロチオン）による ChE への阻害では血漿 PChE の方が敏感に作用し、低下も速やかで、低下も血球 AChE より大きい結果を示した。

2) 短期（亜急性）中毒時および急性中毒回復期における有機リン系農薬（ダイアジノン、フェニトロチオン）による ChE への阻害では、血球 AChE の方が低下率が大きい。したがってこのような場合の診断的用途には血球 ChE の方が優れていると思われる。

2 剤混合投与による ChE への阻害について

1) 急性中毒時における①有機リン系+有機リン系 (D+F) および②

有機リン系+カーバメート系(D+M)の混合薬剤による ChE への阻害では投与後 48 時間までは両者①②で血漿 PChE の方が敏感に作用し、低下も速やかで、低下も血球 AChE より大きい結果を示した。

2) 短期（亜急性）中毒時および急性中毒回復期における①有機リン系+有機リン系 (D+F) および②有機リン系+カーバメート系(D+M)の混合薬剤による ChE への阻害では血球 AChE の方が低下率が大きい。したがってこのような場合の診断的用途には血球 AChE の方が優れていると思われる。なおカーバメート系農薬 1 剤では ChE への阻害が認められなかったが、カーバメート系+有機リン系の混合薬剤では ChE への相乗阻害が認められた。個々の薬剤で低毒性であっても日常接する農薬（殺虫剤）は複数であり、また農薬以外の化学物質も加わることが考えられるから、ここで見られるように複合した毒性の評価が重要となることが示唆された。

3) 実際の有機リン剤農薬等の殺虫剤撒布の人達の暴露状況を ChE 活性の動きよりみると、正常体重のヒトに比して肥満のヒトでは AChE が高めに現れる傾向が予想される。

参考文献

- 1) 上田喜一、平田潔：農薬中毒—基礎と臨床—，(1978) 南江堂
- 2) 吉村正一郎、早田道治、森博美：急性中毒情報ファイル第3版,p21～82,(1996)廣川書店
- 3) 木本正七郎、千田重雄：最新有機薬品化学 第3版稿版,(1987) 廣川書店
- 4) 伊規須英輝、松村浩彦、松岡雅人；赤血球膜アセチルコリンエステラーゼ,JUOEH (産業医科大学雑誌) 16(3)p253～262(1994)
- 5) 石松維世、伊規須英輝、田中勇武；フェニロチオン粉剤反復吸入暴露実験によるChE活性の低下:JUOEH (産業医科大学雑誌) 10(1)p71～75(1998)
- 6) 河合忠、玄蕃昭夫、屋形稔：異常値のメカニズム p189～194(2000)医学書院
- 7) 赤堀四郎、沖中重雄:臨床酵素学 p339～348(1964) 朝倉書店
- 8) WORLD HEALTH ORGANIZATION:IPCS Enviromental Health Criteria 133 Fenitorothion (1992), 178 Methomyl(1996), 198 Diazinon (1998)
- 9) 田嶋嘉雄：実験動物学—技術編—p183～185(1997) 朝倉書店
- 10) 藤井儔子、小山良修：動物実手技—ラットを中心として—p103～112(1975)協同医書出版
- 11) 高垣善男、坂口孝、鍵山直子：長期動物実験 p214～219(1981)清至書院
- 12) 白須泰彦、松岡理：新しい毒性試験と安全性の評価 p145(1975)ソフトサイエンス社
- 13) 奥木実：実験動験 取り扱いと実験手技 p107～109(1968) 南江堂
- 14) 藤原公策、堀内茂友：毒性試験講座4 毒性試験に用いられる実験動物 p494～497(1990)地上書館
- 15) 日本実験動物技術者協会編：図解・実験動物技術集 p22～27(1998)アドスリー

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

化学物質によるヒト生殖・次世代影響の解明と内分泌かく乱作用
検出のための新たなバイオマーカーの開発
— 殺虫剤散布作業者の尿中代謝物モニタリングと自覚症状—

分担研究者

柴田 英治 愛知医科大学医学部衛生学講座
上島 通浩 名古屋大学大学院医学系研究科
社会生命科学講座環境労働衛生学
高木 健次 名古屋大学医学部保健学科検査技術科学専攻

研究協力者

五藤 雅博 五藤労働衛生コンサルタント事務所
斎藤 勲 東海コープ商品安全検査センター
上山 純 名古屋大学医学部保健学科検査技術科学専攻

研究要旨

殺虫剤撒布職域従業員を対象に尿中代謝物および血中コリンエステラーゼ活性の測定と自覚症状調査をおこなった。代謝物は有機リン殺虫剤(4種類のジアルキルリン酸(DAP))およびピレスロイド(3-フェノキシ安息香酸)について測定した。

尿中代謝物による曝露管理は作業員への負担が少なく、高濃度はもちろん低濃度曝露をも鋭敏に反映する点で、作業管理への応用が可能であり、今後殺虫剤、農薬等を取り扱う作業員だけでなく、非曝露一般集団に対する曝露指標としても有用と考えられる。また、子供ができないという訴えは44名中4名で集団として特に問題となる数値ではなく、生まれた子について第1～4子及び全子で誕生月による偏りは観察されなかった。

A. 研究目的

殺虫剤、農薬は近年、その一部が内分泌攪乱化学物質とされるなど、生殖系への影響が懸念されている。現在は室内環境などで問題にされているが、これらの化学物質に職業的に曝露されている作業者の曝露実態は十分に明らかになっていない。ジクロルボス、ダイアジノン、フェントロチオン、マラチオンなど有機リン系化合物は、農薬として広く世界で使用されているほか、ゴキブリ、ダニなどの衛生害虫の駆除にも使われており、一般環境中にも存在している(Bardin ら, 1994)。有機リン系化合物は、神経刺激伝達物質アセチルコリン分解作用をもつコリンエステラーゼ活性の阻害によって神経中毒を引き起こすことにより殺虫効果を発揮するが、ヒトに対しても大量の曝露により急性、慢性中毒を引き起こすことがよく知られているため、ヒトでの正確な曝露評価が必要とされている(Steenland ら, 1994)。この目的で血中コリンエステラーゼ活性を指標とした有機リン系化合物の曝露評価が現在行われているが、赤血球コリンエステラーゼを優位に阻害する薬剤と血清(または血漿)コリンエステラーゼを優位に阻害する薬剤があること、低用量曝露の指標としては鋭敏でないことより、通常行わ

れるように1種類のコリンエステラーゼの測定のみでは長期低用量曝露の評価指標としては十分ではない(Maroni ら, 1986; Shafik ら, 1971)。そこで近年、有機リン系化合物の尿中代謝産物である尿中ジアルキルリン酸(DAP)の排泄量を指標とした新たな曝露評価法が注目されている。

ほとんどの有機リン系化合物は、DAPのうち、ジメチルリン酸(DMP)・ジエチルリン酸(DEP)・ジメチルチオリン酸(DMTP)・ジエチルチオリン酸(DETP)のいずれかに代謝されて尿中に排出される(図 1)(Bravo ら, 2002)。しかしこれまでに報告されている尿中 DAP の測定法は、操作が煩雑で長時間を要するうえ、検出感度も十分ではなかった(Hardt ら, 2000; Barr ら, 2004; Oglobline ら, 2001)。近年は、一般環境に比べ高濃度曝露が起こりうる有機リン系化合物取り扱い作業者においても、コリンエステラーゼ活性が阻害されて低下することは大きく減っており、尿中代謝物の生物学的モニタリングによる有機リン曝露評価を行い、労働衛生管理に生かすことが必要である。

我々は今回、殺虫剤を撒布する約 50 の事業場を組織する業者団体が自主的に実施する定期健康診断にあわせ、尿中代謝物および血中コリンエステラーゼ活性の測定と自覚症状調査を

おこなった。尿中有機リン代謝物(4種類の DAP の測定は、本報告書の別稿で高木らが述べたガスクロマトグラフ-質量分析計を用いた簡便な測定法を用いて行った。これにより、血液中コリンエステラーゼ活性に影響を与えない低濃度の有機リン剤曝露における生物学的モニタリング手法の道を開くことができた。

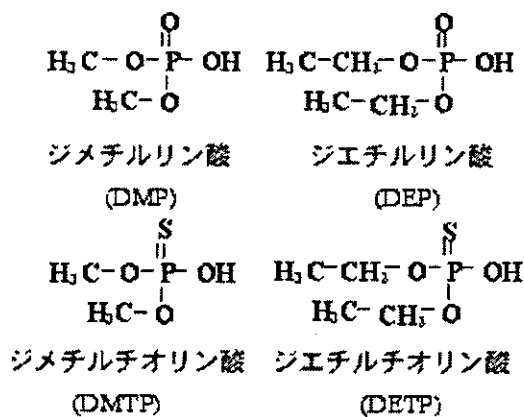


図 1 尿中に検出される主なジアルキルリン酸

B. 研究方法

本調査研究は平成 16 年 12 月の 3 日間、某市の健康診断機関内の設備を利用し、業者団体が主催する定期健康診断に組み込む形で行った。この団体を構成するのは従業員数が 30 名未満の中小の事業所で、単一企業に所属し、地理的に分散している事

業所、地元の単独事業所などが中心である。この業者団体は過去 30 年以上にわたり、独自に定期健康診断の活動を継続的に行ってきた。以下に本調査研究で受診者に対して共通に行った項目を列挙する。

血圧

検尿一般(潜血、蛋白、糖、ウロビリノーゲン、ケトン体、比重、pH)

尿中有機リン代謝物 (DMP、DEP、DMTP、DETP)

血球数(赤血球数、白血球数、ヘモグロビン濃度、血小板数)

血液生化学 (AST、ALT、 γ -GTP、血清コリンエステラーゼ、赤血球コリンエステラーゼ)

血中脂質 (総コレステロール、中性脂肪、HDL コレステロール)

空腹時血糖

なお、上記項目のうち、尿中有機リン代謝物については受診日当日の早朝尿を試料として使用した。早朝尿の採取については、あらかじめ業者団体の事務局を通じて受診希望者に依頼を行った。当日の受診者に対しては健診結果の集団としての解析、及び早朝尿中の有機リン代謝物定量について直接口頭と文書による説明の上、同意書にサインをいただいた。

また、受診者にはあらかじめ、研

研究者らが作成した問診票に記入を依頼した。問診票の項目は以下の通りである。

殺虫剤取扱い作業歴

最近 3 日間の散布作業の時間、使用した薬剤名

最近 1 カ月間の薬剤散布頻度

薬剤散布頻度の高い季節および低い季節とその頻度

最近 1 カ月に使用した薬剤名

最近 6 カ月間の自覚症状

殺虫剤散布時の症状

急性症状の有無

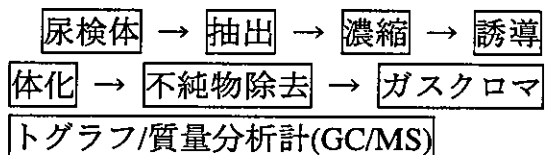
ハチによる虫刺症の既往

既往歴、家族歴、飲酒・喫煙歴

受診日には作業者に面接による問診を行い、問診票への回答内容を確認するとともに、作業管理に必要な情報の聴取を行った。

尿中有機リン代謝物（ジアルキルリン酸）の分析

基本的な測定系の流れは以下の通りである。



尿検体 5 ml に内部標準物質(I.S)である 1 mg/L ジブチルリン酸溶液を 20 μ l、塩化ナトリウム 4 g、6 N 塩酸 1 ml、

ジエチルエーテル/アセトニトリル (1:1 v/v) 5 ml を加え、5 分間攪拌した後、3000 g で 5 分間遠心(4 °C)を行い、上清を別のスクリー蓋付き試験管に移した。尿検体にもう一度ジエチルエーテル/アセトニトリル 5 ml を加えて同様に攪拌、遠心し、上清を 1 回目の上清と同じ試験管に移した。35 °C のヒートブロック上で窒素ガスを噴きつけ、蒸発乾固させた。乾固後、試験管にアセトニトリル 1 ml、 α -Bromo-2,3,4,5,6-pentafluorotoluene (PFBBr) 50 μ l を加えて恒温槽にて反応を行った。その後、蒸留水 4.5 ml、ヘキサン 4.5 ml を加えて攪拌、遠心し、上清（ヘキサン層）を別の試験管に移し、この操作を 2 回繰り返した。ヘキサンは窒素ガスを用いて蒸発乾固させた。残渣をトルエン 100 μ l で溶解し、GC/MS を用いて DAP 濃度を測定した。

使用した GC/MS システム(PerkinElmer 社製 TurboMass システム)の分析条件

・GC

カラムは DB-5MS(30 m \times 0.25 mm、厚さ 1.0 μ m、J&W Scientific, Folsom, CA, USA)を使用した。温度条件は、70 °C(1 分)-5 °C/分で 220 °C まで上昇-15 °C/分で 280 °C まで上昇-280 °C (5 分)、注入口:250 °C とし、キャリアガスは

ヘリウム(純度 99.999 %、流量は 1 ml/min)を用いた。注入量は 1 μ l とした。

・MS

イオン源:250 $^{\circ}$ C、電子イオン化(EI)法:70 eV、界面温度:300 $^{\circ}$ C とし、TIC (Total Ion Chromatogram)法および SIM (Selected Ion Monitoring)法で分析した。各 DAP の検出は、質量/電荷比(m/z) DMP:110、DEP:258、DMTP:110、DETP:213 で行った。

ピレスロイド剤尿中代謝物(3-フェノキシ安息香酸)の測定

尿検体 5 ml に内部標準物質である 2-フェノキシ安息香酸 (10 mg/L in MeOH) を 50 μ l、6 mol/L 塩酸 1 ml を添加したのち、90 $^{\circ}$ C 1 時間のインキュベーションを施した。*n*-ヘキサンを用いた抽出操作を加え、その有機溶媒層を遠心分離・採取した後、窒素ガスを用いた蒸発乾固を行った。残渣に 2 ml の 硫酸-メタノール (1:9 v/v)を加え、60 $^{\circ}$ C に設定したウォーターバス中で 1 時間の誘導体化反応を行った。その後、2.25 ml 水酸化ナトリウム、1.5 ml 精製水、6 ml *n*-ヘキサンを添加、攪拌および遠心操作後、有機溶媒層を別試験管に移し、蒸発乾固を行った。200 μ l トルエンで残渣を溶解後、GC/MS (PerkinElmer

社製 TurboMass システム)にて定性・定量分析を行った。なお、この測定法の検出限界は約 0.1 μ g/L (signal-to-noise ratio=3)であり、日内変動は 8% 以下であった。

C. 研究結果

受診者の属性

17 事業所から 104 名(男 96 名 女 8 名)が受診した。

殺虫剤等散布作業従事年数

受診者 104 名のうち、現在管理職、営業職、間接業務等で最近の薬剤取り扱い頻度が年 1 回に満たない者、研究参加への同意を得られなかった者の合計 18 名を除いた 86 名の殺虫剤、殺鼠剤等薬剤散布作業の従事年数は 8.3 ± 7.5 年であった。

最近 3 日間の散布作業で使用した薬剤名

検診当日

当日に作業を行ったものはいなかった。

検診前日

検査前日に散布作業をした作業者は 35 名、これらの作業者の作業時間は 4.1 ± 3.7 時間であった。

検診 2 日前の散布作業

検査 2 日前に散布作業をした作業者は 19 名、これらの作業者の作業時間は 4.5 ± 2.9 時間であった。

診者が半数を超えており、5 月から 8 月にかけての期間は 70% を超える受診者が頻度が高いと回答した。

使用薬剤

以下の薬剤が挙げられた。

フェニトロチオン、ジクロルボス、ダイアジノン、プロペタンホス、ペルメトリン、フェノトリン、エトフェンプロックス、プラレトリン、フィプロニル、クマリン系殺鼠剤

最近 1 カ月の散布頻度(週あたりの回数、n=86)

下表にみられるように週 2 回以下がほぼ 70% を閉めていた。

頻度	n (%)
1 回未満	13 (15.1)
1 回	22 (25.6)
2 回	25 (29.1)
3 回	9 (10.4)
4 回	8 (9.3)
5 回	6 (7.0)
6 回	4 (4.7)

月	n (%)
1 月	2 (2.3)
2 月	1 (1.2)
3 月	13 (15.1)
4 月	45 (52.3)
5 月	62 (72.1)
6 月	72 (83.7)
7 月	67 (77.9)
8 月	63 (73.2)
9 月	56 (65.1)
10 月	37 (43.0)
11 月	12 (14.0)
12 月	4 (4.7)

散布頻度が高い月(8 名が無回答、n=86)

全体に 4 月から 9 月と回答した受