

エバポレーション時の液性を炭酸カリウムにて中性付近に設定することにより、DMP の回収率を向上させることができた。なお、エバポレーション時の液性は DEP、DMTP および DETP の回収に影響を与えなかった。したがって、我々が検討した尿中 dialkyl phosphate 測定系において、比較検討を行った 4 種の pH のうち、pH 8 が最適な液性であることが示唆された。エバポレーション時の液性を調整することにより DMP の回収率が向上した機序については明らかではない。しかし、酸性条件下では DMP がイオンの形で存在していることに依存している可能性が考えられる。次に最適抗酸化剤の選択とその添加濃度について検討を行った。その結果、SoD を 10 mg/ml (尿)の濃度で添加することにより、DMTP、DETP からの DMP、DEP の産生は 1 %以下まで抑制することができた。また、データに示していないが、抗酸化剤 SoD 10 mg/ml (尿)は DMP、DEP の測定に影響を与えることは確認できなかった。ゆえに我々は尿中 dialkyl phosphate 測定系における抗酸化剤 SoD 10 mg/ml (尿)を最適濃度とした。さらに我々はサンプル前処理過程において固相抽出操作を加えることにより GC/MS 分析に費やす時間は既報と比較し、飛躍的に短縮させることができた。また、サンプル中の不純物を高度に除去したことにより、分析機器の汚染も最小限に抑制することができた。今回検討した尿中 dialkyl

phosphate 測定条件を用い、DMP、DEP、DMTP および DETP を測定した時の検出限界はそれぞれ 10、1、0.3、0.3 ppb 程度であった。これらの検出限界は既報に比べ、同等であるかまたは 1/3 程度であった。

5. まとめ

以上の結果より、我々が検討した dialkyl phosphate 測定法は迅速、簡便かつ高感度に尿中から DMP、DEP、DMTP および DETP 測定できる測定法であることが示唆された。

5. 今後の展望

我々は今回確立した dialkyl phosphate 測定法を用いて、ジクロロボス、ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオンなどの有機リン系化合物を日常的に取り扱う作業者の暴露の実態と健康状態の関係を明らかにすべく、それら暴露作業者の協力を得て尿中 dialkyl phosphate 測定を施す予定である。また、尿中 dialkyl phosphate の高感度測定が可能となったため、一般環境レベルでの有機リン系化合物への暴露量を明らかにする研究も進める予定である。

GC/MS を用いた有機リン系化合物尿中代謝産物の

高感度測定法の確立

A. 研究目的

我々はヒト尿を対象に迅速、高感度かつ再現性のよい尿中有機リン酸系代謝産物濃度測定法の確立を目指し、尿中 DAP の至適抽出法、およびガスクロマトグラフィー/質量分析計 (GC/MS) 測定条件について各種検討を行い、さらに確立した測定系を用いて一般健常人の尿を実際に測定し、一般環境中での有機リン系化合物の暴露レベルのモニタリングを試みた。

B. 研究方法

1. 材料

試薬

Dimethyl phosphate tetramethyl-ammonium salt (DMP) 【林純薬工業】
Diethyl phosphate (DEP) 【林純薬工業】
Dimethylthiophosphate ammonium salt (DMTP) 【林純薬工業】
Diethylthiophosphate ammonium salt (DETP) 【林純薬工業】
Dibutylphosphate (DBP, 内部標準物質) 【関東化学】

(以上の物質はすべてメタノールに溶解して使用した)

α -Bromo-2,3,4,5,6-pentafluorotoluene (PFBBr) 【林純薬工業】
塩化ナトリウム 【和光純薬工業】
無水硫酸ナトリウム 【和光純薬工業】
炭酸カリウム 【関東化学】

ジエチルエーテル 【関東化学】
acetonitril 【関東化学】
n-hexane 【関東化学】
toluene 【関東化学】
acetone 【関東化学】
Florisil PR 【和光純薬工業】
BONDESIL-PSA 【GL science】
Ascorbic acid 【関東化学】
SODium disulfite (SOD) 【関東化学】
Pyrogallol 【米山薬品工業】

2. GC/MS システム (PerkinElmer 社製 Turbo Mass システム)

・GC の条件

カラムは DB-5MS (30 m × 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。

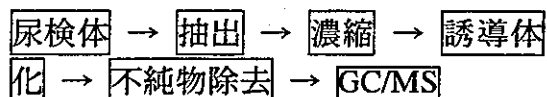
・MS の条件

イオン源: 250 °C、電子イオン化 (EI) 法: 70 eV、界面温度: 300 °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。

3. 至適条件の設定

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 DBP 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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、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。

1) 誘導体化時の温度および時間についての検討

DAP の誘導体化には PFBBr を用いた。PFBBr による誘導体化では、DMTP

と DETP は室温あるいは高温において速やかに反応するが、DMP と DEP は高温で反応させる必要がある。反応溶媒であるアセトニトリルの沸点は 82 $^{\circ}$ C であるため、80 $^{\circ}$ C を DAP が迅速に誘導体化される温度であると考えた。したがって 80 $^{\circ}$ C における DAP の誘導体化産物の生成量と反応時間を検討した。1 mg/L DMP、DEP、DMTP、DETP、DBP を 50 μ l ずつスクリー蓋付き試験管にとり、PFBBr 50 μ l、アセトニトリル 1 ml、炭酸カリウム 20 mg を加えて、80 $^{\circ}$ C の恒温槽(0-180 分)にて誘導体化を行い、各 DAP を GC/MS を用いて測定した。

2) 抗酸化剤についての検討

DMTP および DETP は高温条件下で反応させると DMP および DEP に分解されやすいことは既に報告されており(図-1)、我々の予備検討からも 80 $^{\circ}$ C での誘導体化反応ではそれらの分解が確認できている(図-4A)。そこで、この分解を防ぐべく各種抗酸化剤の DMTP および DETP の分解抑制効果について検討し、尿中 DAP 測定に至適な抗酸化剤を選定した。尿 5 ml に 1 mg/L DMTP および DETP を 50 μ l ずつ加えたものに、抗酸化剤として、アスコルビン酸、SOD および pyrogallol を 50 mg ずつ加え、以後、基本操作に基づいて偽 DMP および偽 DEP の産生量を比較することにより、抗酸化剤の効果について検討した。

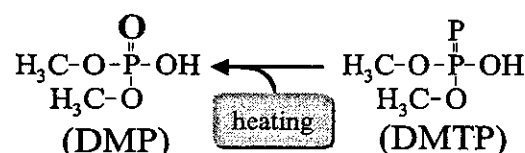


図-1 熱による DMTP から DMP への分解

3) 濃縮時の溶液 pH についての検討

尿 5 ml に 1 mg/L DMP および DEP を 50 μ l ずつ加えたもの、DMTP および DETP を 50 μ l ずつ加えたものを用いて検討を行った (DMTP および DETP の分解による偽 DMP および DEP の混入を避けるため)。抽出液の pH は濃縮前に添加する炭酸カリウムの量を変えて (0、5、10、15 および 20 mg) それぞれ (pH 2、3、4、6 および 8) に設定して、基本操作に基づき各 DAP を測定した。

4) 誘導体化後に行う精製操作のクロマトグラフ

および調整サンプルの安定性に対する効果

尿 5 ml に各 1 mg/L DAP を 50 μ l ずつ添加して、1)2)3)で得た至適条件下で検体の前処理を施し、誘導体化後にカラム(図-2)を用いた精製過程を追加し、クロマトグラフおよびサンプルの安定性について比較検討した。

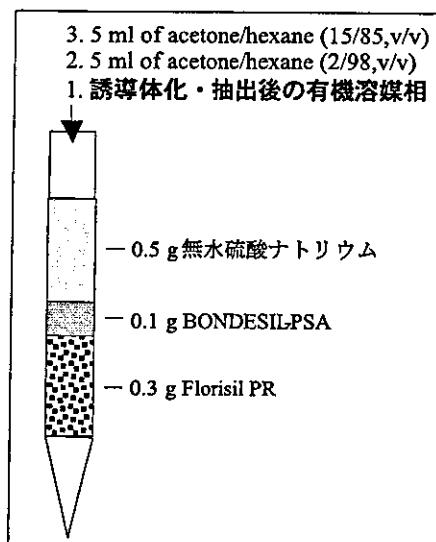


図-2 精製カラムの構成

誘導体化された各 DAP はヘキサンによって抽出された後、そのヘキサンをカラムに通すことにより吸着剤に保持される。次にアセトン/ヘキサン(2:98 v/v) 5 ml で不純物を溶出した後、アセトン/ヘキサン(15:85 v/v) 5 ml にて誘導体化された各 DAP を溶出して窒素ガスにて蒸発乾固を行いトルエン 100 μ l で溶解後、GC/MS にて分析を行った。これらのサンプルをサンプル調整 36 時間後まで経時的に分析し、クロマトグラフのピーク形状や各 DAP の安定性を観察し、カラム精製の効果について検討した。

4. 再現性に関する検討

尿 5 ml に各 DAP を加え(1-500 μ g/L)、以上の検討から得られた至適条件を用いた DAP 測定系にて測定し検量線を作成した。また、尿 5 ml に各 DAP を 50 μ g/L となるように添加し、回収率、日内変動(n=6)および日差変動

(n=5)について検討した。検出限界は signal-to-noise ratio=3 を用いて算出した。

5. 一般健常人の尿中 DAP の測定

本研究で見出した至適尿 DAP 測定条件図-8 を用いて一般健常人の尿中 DAP を測定した。対象者は愛知県在住の一般成人男性(36.5±11.1 歳; mean ±SD) 23 名で、一時尿を採取し、得られた尿検体を 10 ml のポリプロピレンチューブ試験管に移し、尿中 DAP 分析まで-80 °C で保存した。対象者からは、有機リン系化合物尿中代謝産物測定に関する同意を得た。さらに本研究は、名古屋大学医学部倫理委員会の審査で承認を得た。

C. 研究結果及び考察

1. 尿 DAP 測定の至適化

1) 誘導体化反応時の温度および時間に関する検討

多くの有機リン系化合物は尿中に DAP として排出されるが、通常、リン酸塩の形では極性が高く気化しないため GC/MS で測定できない。そこで、誘導体化という処理を行うことによって気化しやすい化合物に変換してから GC/MS 測定に供する必要がある。誘導体化反応時間による各 DAP の peak-area は図-3 に示す通りである。チオリン酸型である DMTP および DETP は誘導体化剤である PFBBBr と瞬時に反応が起きていることがわかる。さらに各 DAP ともに反応開始 15 分後にはすでに誘導体化反応が最大

に達している。反応開始 15 分以降、特に DAP の誘導体化物質の生成量に大きな変化はなかった。ゆえに、PFBBBr を用いた DAP の誘導体化反応は 30 分間、80 °C でインキュベーションすることにより、効果的に行われていることが明らかとなり、この誘導体化反応条件を至適条件とした。

2) 抗酸化剤について

図-4A で示すように、DMTP、DETP のみを尿に添加し、抗酸化剤を添加していない測定系では DMP、DEP が多く検出されていることから DMTP、

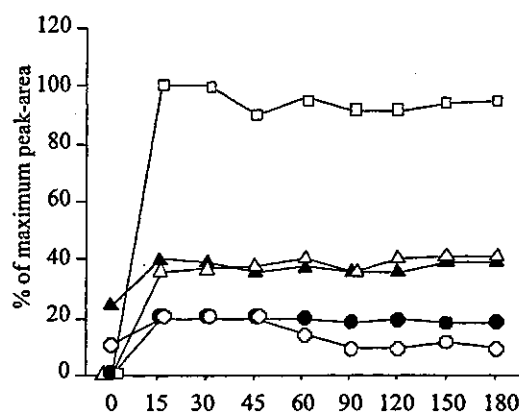


図-3 誘導体化反応時間による生成物量の変化
●:DMP,○:DMTP,△:DEP,▲:DETP,□:DBP

DETP から DMP、DEP に変換されていることがわかる。図-4B に示すように、アスコルビン酸および SOD を添加した測定系では DMTP および DETP からの DMP、DEP の産生を抑制しているが、Pyrogallol にはその効果が見られなかった。また、アスコルビン酸を用いた測定系では GC/MS 分析におけるクロマトグラムに夾雑ピークが多く確認された (data not shown)。

現時点ではアスコルビン酸を尿に添加することによりなぜ夾雑ピークが出現したかわからないが、既に報告されている論文でも同じような現象が発生している(Ueyama ら, 2003)。残念ながら、誘導体化時における DMTP、DETP から DMP、DEP への変換に関する検討を行った報告は非常に少ない。Hardt ら(2000)は、これらの変換

は約 10 %であったと記載している。今回我々は抗酸化剤 SOD を事前に尿へ添加することにより、誘導体化時における DMTP、DETP から DMP、DEP への変換を 1 %以下に抑制することができた。ゆえに我々は SOD を尿中 DAP 測定法における至適抗酸化剤と判断し、以下の実験では 10 mg SOD/L of urine を用いることとした。

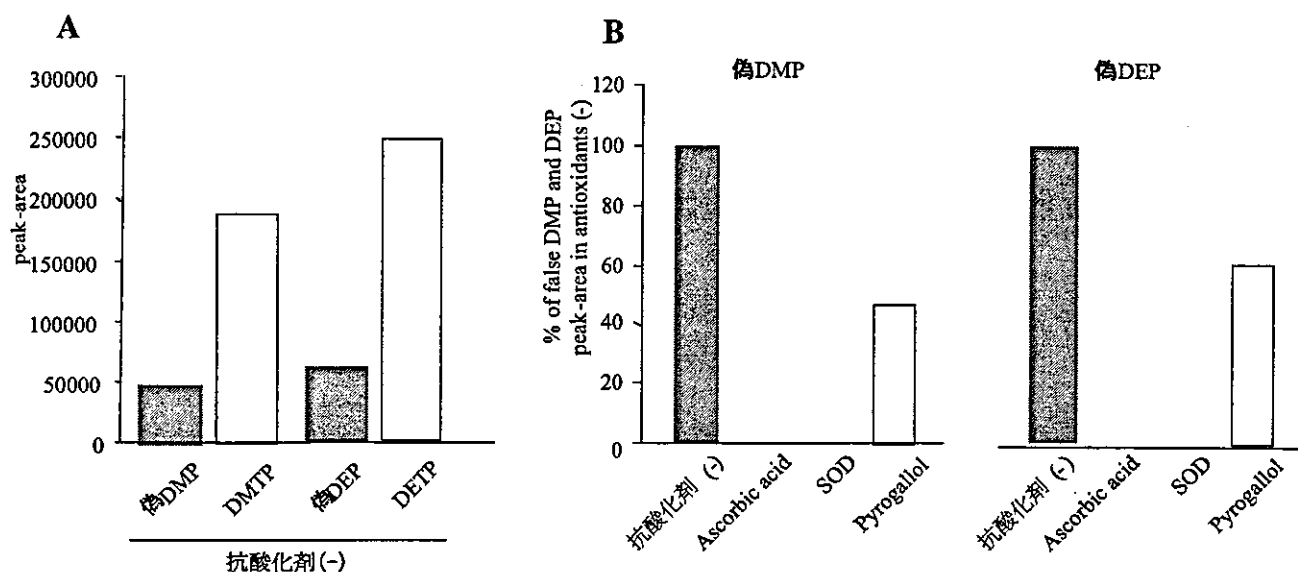


図4 (A)誘導体化時における DMTP および DETP からの偽 DMP および偽 DEP 産生量 (n=3), (B) 偽 DMP および偽 DEP 産生量に対する各種抗酸化剤の効果(n=3)

3) 濃縮時の溶液 pH について

抽出溶媒の pH を炭酸カリウム各種調整し、pH 6 で得られた peak-area を 100 %として、各 DAP の回収を比較した(図-5)。すべての DAP について、pH 2、pH 3、pH 4 のときは pH 6 および pH 8 と比べその peak-area は低値であり、溶媒の pH を調整することにより DAP の検出感度は変化するこ

とが明らかとなった。抽出溶媒を pH 8 に調整した場合、DMP および DEP でその平均値は pH 6 よりも高値を示したが、DMTP および DETP では低値となる傾向があった。しかし、データには示していないが、pH 8 に調整した場合、各 DAP の回収の再現性が pH 6 に比し乏しいため、pH 6 が至適条件と設定した。これらの現象の原因は明らかにはできていないが、

可能性としては各 DAP において pH 2 ではその回収が劇的に低値であることから、DAP の有する pK_a (pH 1-2)(Daughton ら, 1976)が関与している可能性が考えられるが、詳細は不明

である。以後の実験において、窒素ガスにて濃縮される抽出溶媒は炭酸カリウム 15 mg の添加により pH 6 へ液性を調整することとした。

施したことによりそれまで出現していたクロマトグラフ中の未知ピークが激減し(data not shown)、基線の安定化も実現した。

尿中 DAP の安定性に関しては -80°C で 12 ヶ月以上安定であることは報告されているが(Nutley ら, 1993)、調整サンプルの経時的安定性について検討した報告はほとんどないため、我々は調整サンプル中の各 DAP の安定性について調整直後のものを 100 %として、サンプル調整 36 時間後までの変化を比較した(図-6)。カラム精製を施したものは、すべての DAP について室温において 36 時間以上安定であったが(CV %:1.7-3.1 %)、カラム精製を施さない場合は DMTP および DETP で経時的な上昇がみられた(CV %:>8.5 %)。さらにカラム操作を加えてクロマトグラフ中の夾雑ピークを減少させたことにより、GC/MS 分析に費やす時間は既報と比較し飛躍的に短縮させることができた。以上の結果に加え、PFBBBr は DAP との反応性はよいものの催涙性が強いいため、これを含む溶液は非常に取り扱いにくく、さらに GC/MS 機器装置にも悪影響を与えるということが既に報告されているため、PFBBBr も除去できるカラム精製は、サンプル調整中で有用な操作過程であることが示

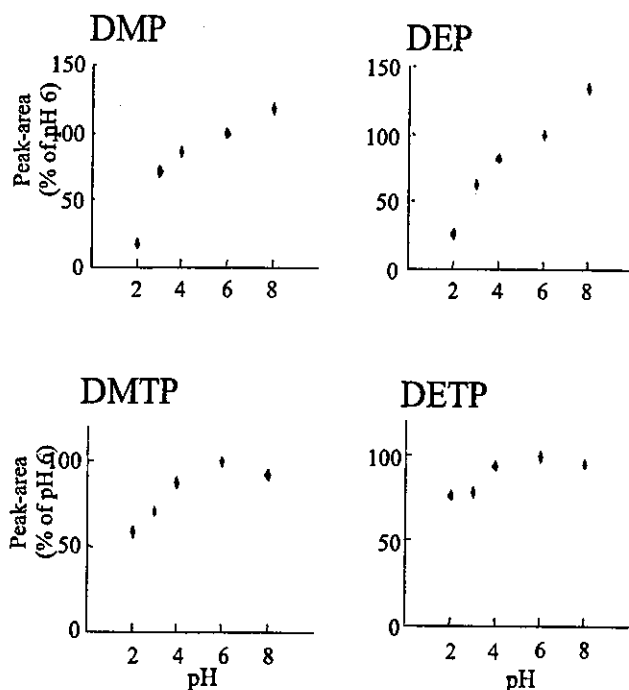


図-5 DAP 抽出溶媒 pHがおよぼす各 DAP 回収に対する影響(n=3)

4) 精製操作の効果について

各種 DAP を誘導体化しヘキサン抽出を施した後、調整サンプルの不純物を取り除くために各種吸着剤を用いたカラム精製を行った。カラムには硫酸ナトリウム、弱陰イオン交換樹脂である PSA およびフロリジルを充填したものを用い、脱水、未反応 PFBBBr および脂質系の不純物除去を目指した。その結果、カラム精製を

峻された。

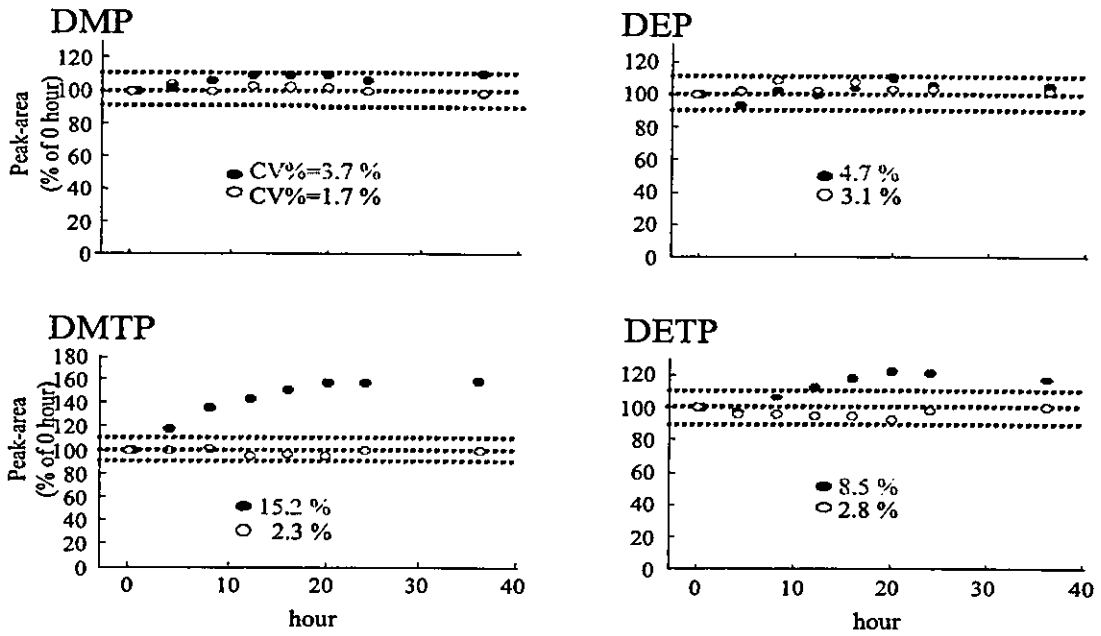


図-6 各種吸着剤を用いたサンプル精製がおよぼす調整サンプル中 DAP の室温での安定性に対する(n=3), 効果○; カラム精製あり●; カラム精製なし

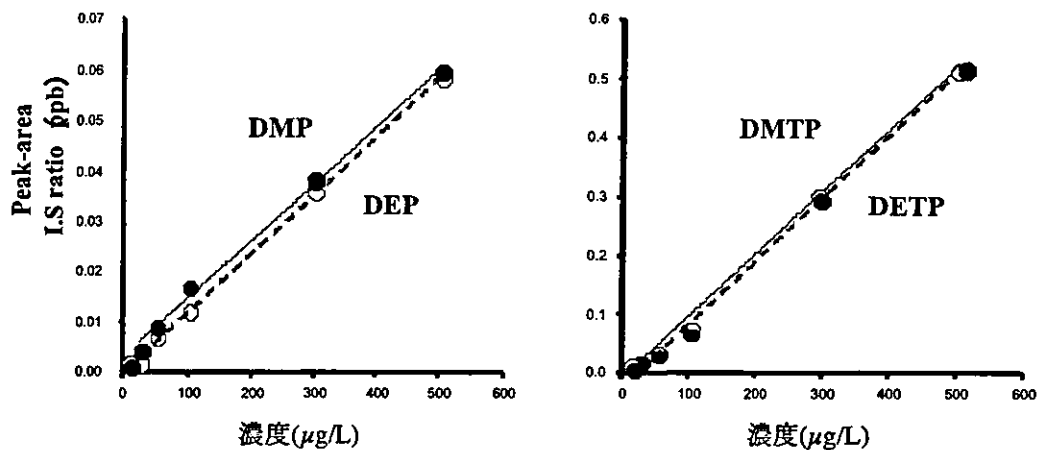
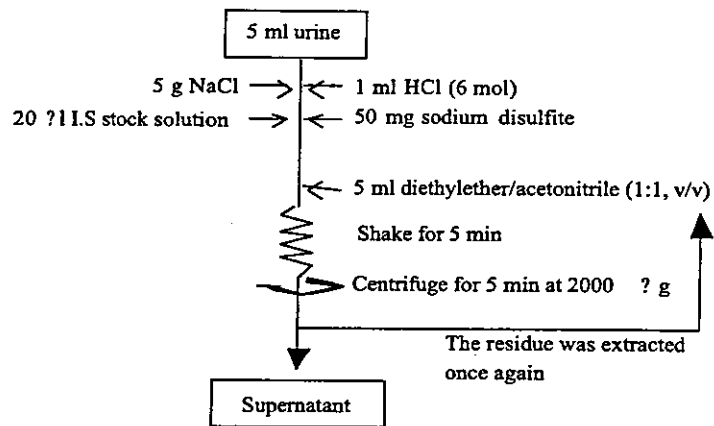


図-7 尿中に各種DAPを添加した時の検量線

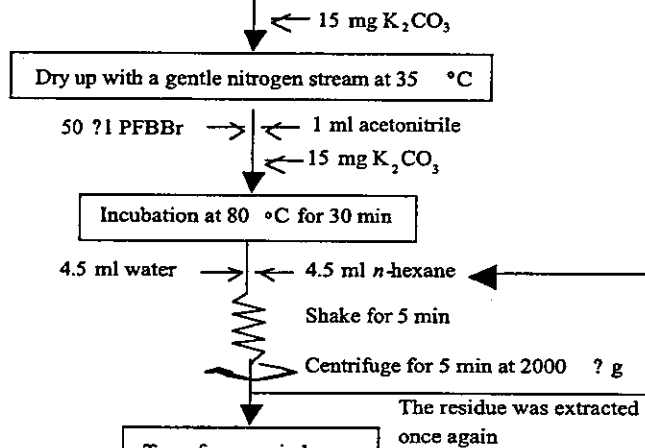
Table 1. 本測定法による尿中DAP測定における日内変動、日差変動、回収率および検量線

Dialkyl phosphates	日内変動 Pooled urine spiked concentration 50 μg/L (n=6)		日差変動 Pooled urine spiked concentration 50 μg/L (n=5)	検量線 (1, 5, 20, 60, 100, 300 and 500 μg/L)	
	Inprecision (%)	Recovery (%)	Inprecision (%)	Linear range (μg/L)	Correlation coefficient (r)
DMP	10.5	60.5	12.2	1-500	0.9533-0.9992
DEP	13.8	82.7	13.3	1-500	0.9968-0.9976
DMTP	10.0	91.4	9.2	1-500	0.9886-0.9992
DETP	8.4	92.4	14.2	1-500	0.9836-0.9974

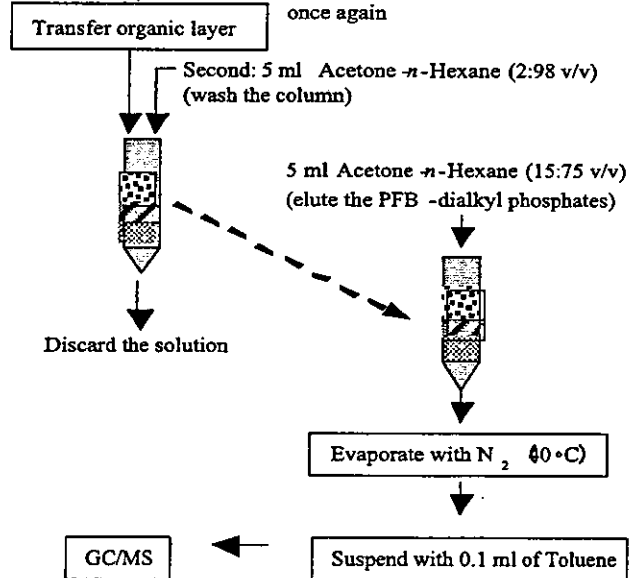
1. Extraction



2. Derivatization



3. Clean-up



3. Measurement

図-8 尿中 DAP 測定法のフローチャート

5) 本測定法の精度に関して

各 DAP の検量線(1-500 µg/L)を作成したところ、すべて良好な直線性を得ることができた(図-7) (Table 1)。検出限界 (LOD) は、DMP:0.3 µg/L、DEP:0.05 µg/L、DMTP:0.1 µg/L および DETP:0.1 µg/L であった。日内変動 (CV %) は、DMP:10.5、DEP:13.8、DMTP:10.0、DETP:8.4 であり、日差変動 (CV %) は、DMP:12.2、DEP:13.3、DMTP:9.2、DETP:14.2 であった。回収率 (%) は、DMP:60.5、DEP:82.7、DMTP:91.4、DETP:92.4 であった。これらのまとめを Table 1 に示す。

日内変動、日間変動および回収率のデータは既報(Hardt ら, 2000; Barr ら, 2004; Oglobline ら, 2001)と比較し、ほぼ同じか少し劣っている。しかし、他の GC/MS を使用した尿中 DAP 測定法よりもいずれの DAP 測定においても約 10 倍、検出感度を向上させることができた。これらの結果は、本測定のと適条件である抽出溶媒濃縮時における至適 pH を検討したこと、さらにカラム精製過程を加えることにより、夾雑ピークが減少し、さらにクロマトグラムの基線が劇的に安

定化したことに起因すると考えられる。これまでの基礎的検討で得られた至適尿中 DAP 測定法の詳細を図-8 に示す。

2. 一般健常人の尿中 DAP 測定

本研究で検討した尿中 DAP 測定法を用いて、職業的に有機リン系化合物の暴露を受けていない一般健常人の尿(23 検体)を測定したところ、その平均値は、DMP:28.8 µg/L、DEP:5.0 µg/L、DMTP:16.1 µg/L、DETP:3.4 µg/L であった(Table 2)。尿中 DAP 測定における典型的なクロマトグラムを図-9 に示す。これらの結果より、我々は日頃から有機リン系化合物を体内に吸収していることが明らかとなった。これらのデータは過去にイタリア (Aprea ら, 1996)、ドイツ(Hardt ら, 2000)、アメリカ(Barr ら, 2004)で報告されている値と類似しており、尿中 DAP の測定のみでは体内に吸収された化合物の同定や定量は困難であるが、日本においても同じような量の有機リン系化合物の暴露が起きていることがわかる。

Table 2. 職業的な有機リン系化合物の暴露を受けていない一般健常人男性 (23人) の尿中DAP濃度

Dialkyl phosphates	Detection frequency (%)	Mean (? g/L of urine)	Median (? g/L of urine)	Maxmum (? g/L of urine)
DMP	100	28.8	17.7	127.0
DEP	87	5.0	1.0	30.6
DMTP	89	16.1	1.2	191
DETP	75	3.4	1.4	32.7

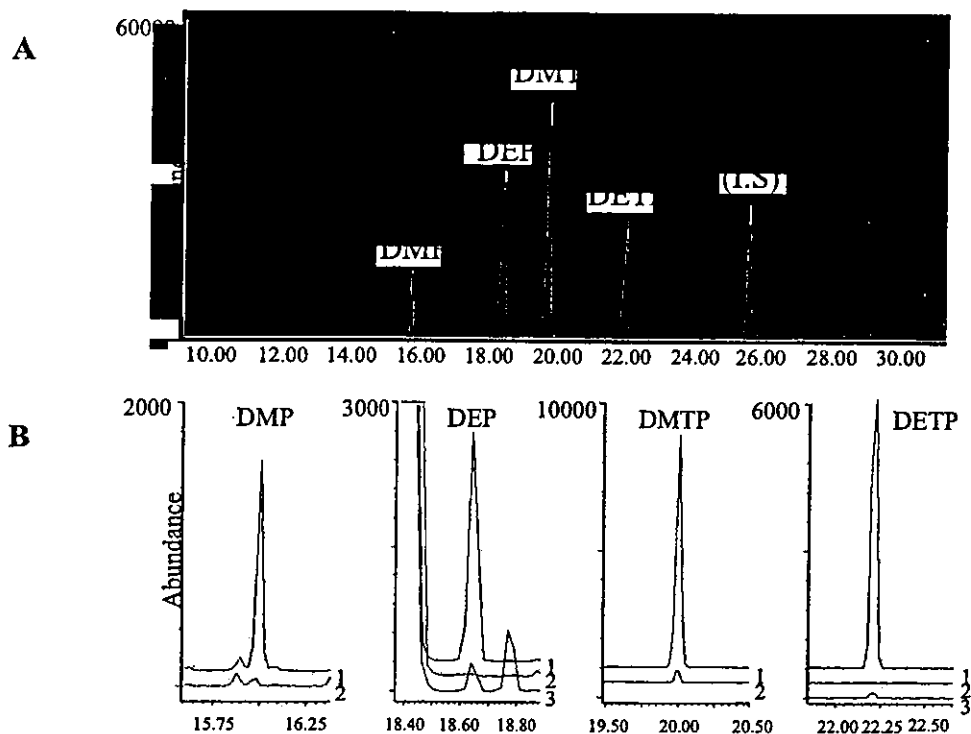


図-9 (A)尿中DAPを抽出・精製し、GC/MS TIC mode(m/z 80-350)で分析して得られた典型的なクロマトグラム (10mg DAP/L,urine), (B)SIM mode (m/z 110,258,110,213 および 335)を使用したクロマトグラム.

主な有機リン系化合物の吸収経路は明らかではないが、都心部では家庭で使用する殺虫剤や食事中から有機リン系化合物を摂取する可能性が高いという報告もある(Gunderson ら, 1995)。

D. 結語

以上の結果より、我々が各種検討を施した dialkyl phosphate 測定法は迅速、高感度かつ精度よく尿中 DMP、DEP、DMTP および DETP の測定ができる優れた測定法であることが示唆された。

E. 展望

我々は今回確立した高感度尿中DAP測定法を用いて、有機リン系化合物の長期的な低暴露が及ぼす生体

への影響に関する研究を進める予定である。また、ジクロロボス、ダイアジノン、フェニトロチオン、馬拉チオンなどの有機リン系化合物を日常的に取り扱う作業者の暴露の実態と健康状態の関係を明らかにすべく、それら暴露作業者の協力を得て尿中DAP測定も実施する予定である。

文献

- Apra, C. et al., *J. Anal. Toxicol.* **20** (1996), p. 559.
 Bardin, G. et al., *Arch. Intern. Med.* **154** (1994), p. 1433.
 Barr, B. et al., *Environ. Health. Perspect.* **112** (2004), p. 186.
 Bravo, R. et al., *J. Anal. Toxicol.* **26** (2002), p. 245.
 Daughton, G. et al., *J. Agric. Food. Chem.*

24 (1976), p. 236.

Gunderson, L. et al., *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* **78** (1995), p. 1353.

Hardt, J. and Angerer, J., *J. Anal. Toxicol.* **24** (2000), p. 678.

Maroni, M. et al., *Toxicol. Lett.* **33** (1986), p. 115.

Nutley, P. and Cocker, J., *Pest. Sci.* **38** (1993), p. 315.

Oglobline, N. et al., *Analyst.* **126** (2001), p. 1037.

Shafik, M. et al., *J. Agric. Food. Chem.* **19** (1971), p. 885.

Steenland, K. et al., *Am. J. Public. Health.* **84** (1994), p. 731.

Ueyama, J. et al., *J.Chromatogr. B.* **798** (2003), p. 35.

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

— 有機リン系農薬の血液コリンエステラーゼ活性への影響について —

分担研究者 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 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

急性中毒期におけるダイアジノン+フェニトロチオンおよびダイアジノン+メソミルの混合薬剤による ChE への阻害では、血漿コリンエステラーゼ (PchE) の方が速やかにより大きく低下した。短期（亜急性）中毒期および急性中毒回復期においては上記の薬剤による混合暴露では血球 AChE の方が低下率が大きく、診断的用途には血球 AChE の方が優れていると思われた。肥満と血液コリンエステラーゼ活性への影響については、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）では正常体重のラットに比して肥満のラットでは AChE が高めに現れる傾向がえられた。

A. 研究目的

殺虫剤の有用性は、害虫に対する選択毒性に基盤をおいて開発されたものであるが、完全特異性・選択性を期待することは困難であり、一定量以上の暴露があった場合における人体への有害性は容易に考えられる所である。

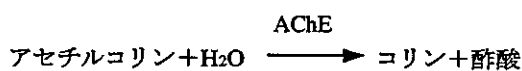
今日使用されている農薬は、それらの化学構造から 4 種類に大別され

ている。

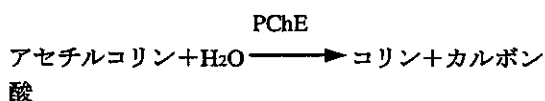
1. 有機リン剤 2. 有機塩素剤 3. 有機フッ素剤 4. カーバメート剤

この内、有機リン剤とカーバメート剤の中毒時には脊椎動物のコリンエステラーゼ活性が阻害される事は周知の通りであり、コリンエステラーゼ活性の測定は農薬研究に欠かせない項目となっている。コリンエステラーゼ (ChE) は、コリンエステル

をコリンと有機酸に加水分解する酵素で、生体内には大別すると2種類があるとされる。1つは赤血球中に高濃度に分布するもので、アセチルコリン(ChE)をはじめごく少数のコリンエステルを基質とする酵素で、アセチルコリンエステラーゼ (true-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が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】

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

カーバメート系剤

・メソミル (Methomyl) 【関東化学】

試料

ラット (300 g 前後) : 12 μ l 全血 (尾
静脈採血)

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】

(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1に示したごとく、0.2 ml/20
g (体重) で経口投与した。

実験動物

Wistar 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。

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表1の量を投与した。

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℃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℃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）

表 1-1 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 1-2 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 + 75 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

(図表等の詳細については平成 16 年度分担研究報告書を参照)

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))

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

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 時間後でわずかな約 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)）

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、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に排泄も早く、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))

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。