

岡山医学会雑誌

第68巻9号 (第731号)

昭和31年9月30日発行

615.777.25 : 577.15

パラチオン分解酵素に関する研究

I. 血清のパラチオン分解能について

山口県立医科大学臨床病理学教室 (主任：柴田 進教授)

医学士 椎 木 悌 二

〔昭和31年5月1日受稿〕

昭和27年以来パラチオンが稲のニカメイ虫の防除に多量に使用される様になつて以来、一連の有機燐製剤が農薬界の寵児となつたが、従来の農薬とはその作用が異り、浸透が強いので取扱いの不備、不注意により数多の犠牲者を出すに至つた¹⁾、パラチオン (parathion) diethyl-p-nitrophenyl thiophosphate がニカメイ虫を殺す機転はまだ明かにされていない。薬剤が強いコリンエステラーゼ (ChE) 活度抑制作用を有することは周知の事実であるが、ChEは昆虫の生理に殆ど関係を有せず、その神経興奮に際してシナプス及び末端装置にアセチルコリンの分泌を見ない点から想像するとパラチオンが昆虫の ChE 活度を失わせることによつてこれを殺すのだとは考えられない²⁾。しかし人に於てはこの ChE 活度抑制作用が中毒の有力な原因である。一説によれば本薬剤は ChE に結合してこれを失活さす³⁾が、自らも ChE によつて diethyl phosphate と p-nitrophenol に分解されると云う^{3,4)}。実際に本薬剤中毒患者の尿から p-nitrophenol が検出されることは古くから知られている事実である⁵⁾。また肝切片にパラチオンを作用さすと一旦 p-nitrophenol を生じ、次いで更に分解されて別の無毒物質になるという報告も

ある⁶⁾。

私はパラチオン中毒の研究中偶然にもヒトの血清がある特定の条件に於て本薬剤の分解を促進することを発見し、この分解促進能力を測定する方法を考案したから、ここにそれを報告する。なお同時に血清パラチオン分解能の本態についてもふれて見たい。

実験方法

パラチオン分解促進能力の測定法

試薬

- 1) 重曹-炭酸曹達緩衝液 (pH 9.37) : 特級試薬を使用して $1/10\text{M}$ - NaHCO_3 水溶液 (8.4g/dl) および $1/10\text{M}$ - Na_2CO_3 水溶液 (無水物として 10.6g/dl) をつくり、2.5 : 7.5 容比に混合する。
- 2) パラチオン乳濁液 富士化学パラチオン乳剤 (47%) 0.4ml を H_2O (蒸溜水) でうすめて 5.0ml にする。
- 3) 5 N-HCl : 一級品塩酸 (12N, 比重 1.18) を H_2O で 2.4 倍にする。
- 4) 0.7 N-NaOH : Merck または特級品苛性ソーダを以つて 2.8g/dl 水溶液をつくる。
- 5) エチルエーテル (一級品)

操作

(1) 試験管 A 及び B を用意し、各々に血清 0.2ml および H_2O 0.5ml を入れ、B はコルク栓で密栓して沸騰水に 8 分間漬け、とり出して直ちに流水で冷却する。

(2) A, B ともに緩衝液 1.0ml およびパラチオン乳濁液 0.5ml を加えて混和し、すぐ $37^\circ C$ の恒温槽につけ、1 時間放置する。

(3) 時間が来たらとり出して各々に 5 N-HCl を 1 滴ずつ落とし、エーテル 5.0ml を加えて試験管にコルク栓をしてはげしく 40 回上下に振盪して放置する。エーテル層が分離したら、これを傾斜して別の試験管に移し残余のエーテル層をピペットで殆ど完全に吸い取って同じ試験管に入れる。この抽出操作を前後 3 回繰返えし、エーテル層を全部集める。

(4) これに 0.7 N-NaOH 5.0ml を加えてコルク栓をして 40 回はげしく上下に振盪する。濾液が分離したらエーテル層をアスピレーターで吸引して完全に除き、アルカリ層を東洋濾紙 No. 7 で濾し、透明な濾液を集める。

(5) A および B の濾液各々 2.0ml に H_2O 5.0ml を加えて希釈し、石英液槽 (1.0cm) に入れ、島津 Beckman (QB) 分光光度計にかけ (光源: タングステンランプ) 波長 $397m\mu$ における吸光度を読む。

(6) あらかじめ p-nitrophenol を 0.7 N-NaOH にとかけてこしらえた標準液 (0.00, 0.63, 1.25, 2.50, 5.00 および 10.00 γ/ml) について作製した検量線に A および B の吸光度を照し合せて各々の濃度 α および $\beta \gamma/ml$ を求める。血清パラチオン分解能力は $87.5 \times (\alpha - \beta) \gamma/ml$ として与えられる。

本測定法の吟味

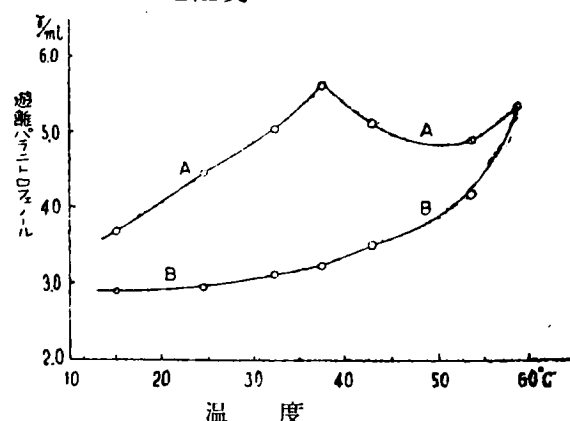
この方法を考案した直接の動機は全く偶然の観察であつた——パラチオンがアルカリ性メチウムに於て p-nitrophenol を放出して無効物質になるといわれていたので⁷⁾、それをためそうと思つてパラチオン乳剤に重曹・炭酸曹達緩衝液 (pH 9.37, 血清アルカリフォスファターゼ定量に使用していたもの) を加えて $37^\circ C$ 恒温槽に入れる時、ついでにヒト

血清を少量これに添加して見たところ、血清を混じた管が他のものに比べてずっと明瞭に黄染することを知つた。この観察から血清がパラチオンの加水分解を促進する物質をかなり多量に含んでいると推定されたので、この分解促進能力を測定する方法を工夫したのである。パラチオンは褐色ないし赤褐色の液体で水にとけにくいから、そのままでは血清と混ざることが出来ない。故に私はこれを膠質状態に分散させた富士化学の乳剤を使用した。

(1) 至適温度

血清 0.2ml に H_2O 0.5ml を加えて沸騰水に 8 分間つけるとその蛋白質が変性する。これに緩衝液 1.0ml およびパラチオン乳濁液 0.5ml を混じて $15^\circ \sim 58^\circ C$ に 1 時間加温すると図 1 の曲線 BB に見る如くかなり多量の p-nitrophenol 遊離を見、殊に温度が $40^\circ C$ をこすと加速度的に盛になる。これに反して血清 0.2ml に H_2O 0.5ml を加え、全然熱処理をせず、緩衝液 (1.0 ml) とパラチオン乳濁液 (0.50 ml) を混じたものは同じ図の曲線

図 1. パラチオンの血清による分解の至適温度



実験条件: 温度を変化させた外は全く本文記載の通り、本法における定量誤差は大きくても 0.03 γ/ml (即ち 3 単位) を超えない、A と B の差は誤差の 20—80 倍であるから、それが定量誤差の産物でないことは明かである。

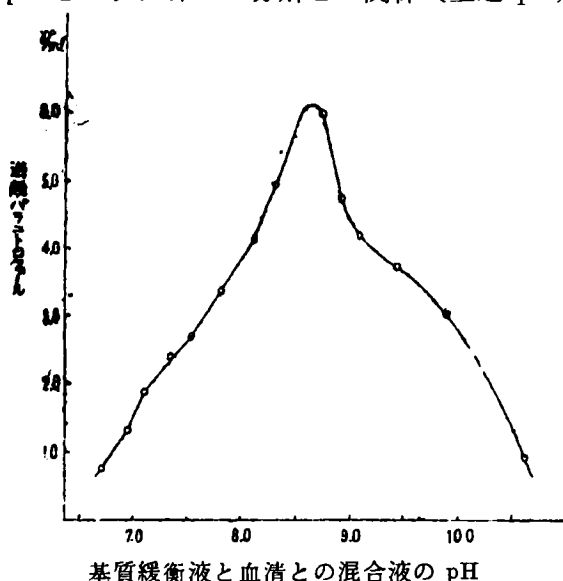
AA に示す様に、常に加熱したもの (BB) より多くの p-nitrophenol を生ずるが、これは $37^\circ C$ に最大の p-nitrophenol 遊離点を有し、それ以上の温度ではかえつて p-nitrophenol 産

生が減り、58°C に至つて熱処理をした BB と全く同一になる。故に A と B の遊離 p-nitrophenol 差は 37°C で最大である。斯様に 15°~58°C の温度域に於て AA が BB より高い分解能力を示すのはおそらく血清内の易熱性物質がパラチオン分解にあづかるためだろうと考えられる。そしてこの易熱性物質の作用が最大限に発揮される至適温度は 37°C であると考ええる。

(2) 至適 pH

ヴェロナール緩衝液 (pH 6.70~8.10)⁸⁾ 及び重曹・炭酸ソーダ緩衝液 (pH 8.30~10.66) を使用して実験方法の項に記した操作に準じて (温度 37°C) メチウムの pH と血清易熱性物質によつて遊離して来る p-nitrophenol の量 (図 1 の AA~BB に相当) との関係をしらべると図 2 に見る如く pH 8.6~8.8 に於て最大の遊離量が得られた。即ちこの易熱性物質の作用は pH 8.6~8.8 で最も著明であるから、これを至適 pH と見做してよい。私の経験では重曹・炭酸ソーダ緩衝液 1.0ml に血清 0.2ml を混ざると丁度 pH 8.6~8.8 になる。

図 2. 緩衝液、基質および血清を混じた液の pH とパラチオンの分解との関係 (至適 pH)

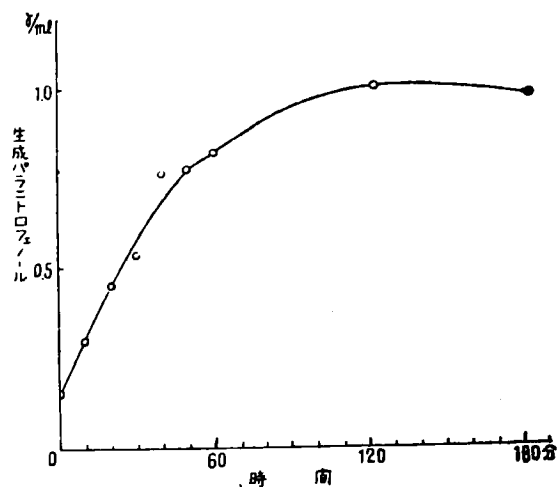


実験条件：緩衝液の pH を変化させた外は全く本文内記載の通り、pH 10.66-8.30 の区間は NaHCO₃-Na₂CO₃ 緩衝液、pH 8.10-6.70 の区間はベロナール緩衝液を使用した。

(3) 加温時間

至適 pH 8.6~8.8, 至適温度 37°C に於て本測定法の加温時間を 0 分から 180 分の範囲で発動させ、非熱処理血清により遊離される p-nitrophenol の量 (図 1 の AA に相当) をしらべると図 3 に示す通り 50 分目までは略々直線的に増加するが、60 分目頃から平坦部にはいり、120~180 分では極限值に達して不変となる。60 分目の遊離量は 120 分目のおよそ 80% である。故に 37°C 1 時間の加温が最適と判断される。

図 3. 血清のパラチオン分解により生成したパラニトロフェノールの時間的推移



(4) パラチオン乳濁液の濃度

この方法で指定した濃度の 1/4~3 倍の範囲にわたつて検討して見た (37°C, pH 8.8) が、表 1 に見る如く富士化学パラチオン乳剤の 0.4ml を蒸留水で 5ml にうすめたものが最も多量に p-nitrophenol を遊離させ、これ以上濃い液およびこれ以下のうすい液ではパラニトロフェノールの遊離量がすくなくつた。

表 1. パラチオン乳濁液の濃度と遊離して来るパラニトロフェノールの量

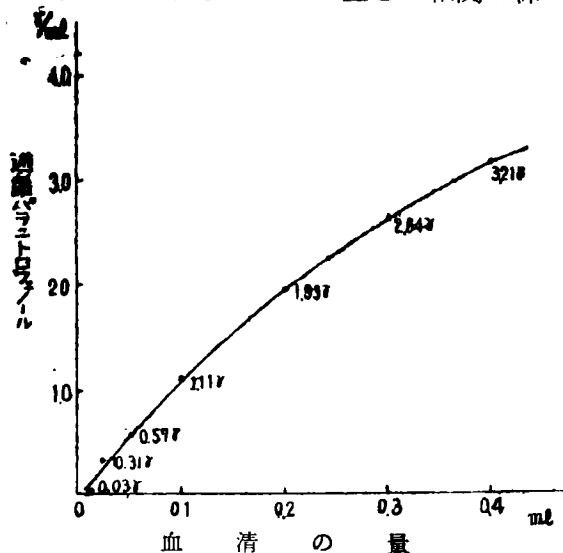
パラチオン濃度倍数	遊離したパラニトロフェノール
1/4	0.16 γ/ml
1/2	1.27
1	1.60
2	1.12
3	0.61

即ち本法のパラチオン乳濁液濃度が最適であることがわかった。

(5) 血清の量と遊離 p-nitrophenol 量との関係

本法に於て血清の量を 0.013ml-0.40ml の区間にわたつて変動させ、易熱性物質による遊離 p-nitrophenol の量 (図 1 の AA-BB に相当) をしらべたが、図 4 に示す様に 0.05~0.40ml の間では血清の量に比例して直線的に p-nitrophenol 遊離量が増加するのを知つた。故に本法で指定した血清使用量 0.20ml は適当と考えられる。

図 4. 使用する血清の量と遊離して来るパラニトロフェノールの量との相関々係



(6) エーテルによる p-nitrophenol の抽出
 本法に於て使用しているエーテル 5ml による 3 回抽出はパラチオン乳濁液と血清の混合液内に生じた p-nitrophenol の 96~98 % を回収する (表 2)。

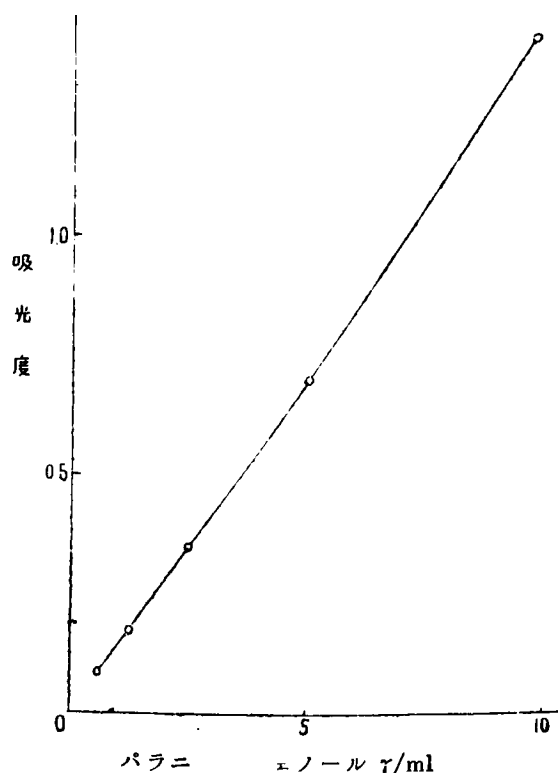
(7) 検量線

この方法で注意すべきは抽出してアルカリ液層に移行させた p-nitrophenol を必ず Beckman 分光光度計で比色することである。Beckman 分光光度計にかけるとパラニトロフェノールは 397 m μ (波長幅 6 m μ になる様スリット幅を調節) に於て最大吸収を示し、0.00~10.00 γ /ml の濃度範囲で原点を通る直線的検量線を与える (図 5)。普通の濾光板光電比色計では検量線が著しく彎曲するから自信を以

表 2. エーテルによるパラニトロフェノールの抽出

抽出回数	パラニトロフェノール	各回抽出量の全量への比率
1	7.44 γ /ml	82.4 %
2	1.77	12.9
3	0.30	3.3
4	0.13	1.4
5	trace	〃
計	9.04	100.0
1	7.60	79.6
2	1.37	14.3
3	0.37	3.9
4	0.10	1.5
5	0.10 以下	0.7
計	9.54	100.0
1	6.55	69.3
2	1.93	20.4
3	0.60	6.4
4	0.20	2.1
5	0.15	1.8
計	9.43	100.0

図 5. 本法の検量線



つて比色出来ない また定量の感度がずつと悪くなる。

(8) 血清易熱性物質のパラチオン分解能は Ni^{++} の存在によつて阻止される。

血清易熱性物質のパラチオン分解能は Ni^{++} の混入によつて強く阻止される。即ち血清 0.2ml を H_2O 0.5ml でうすめ、これに重曹・炭酸ソーダ緩衝液 1.0ml を加え、硫酸ニッケル NiSO_4 溶液（可及的少量）を添加し、最後にパラチオン乳濁液を以つて全液量を 2.2ml にして本法に準じて血清易熱性物質のパラチオン分解能（図 1 の AA-BB）を測定したが、この際上記全液量内の Ni 濃度が $2 \times 10^{-2} \text{Mol}$ に達すると Ni の阻止作用が顕著になり、 Ni を添加しなかつた場合の 4～8% におさえられることを確認した。

(9) 本法の精度

同一血清について二重測定を行つた場合の定量値のくいちがいは 2% をこえなかつた（表 3）。

考 按

前節の吟味に述べた内容から明かな通り、血清のパラチオン分解促進物質は熱に弱く、温度が 58°C になると効力を失い、特定の pH 範囲（8.6～8.8）に於て最大の能力を発揮し、血清の量に比例して分解も盛になるが、パラチオンの量が余り多いと血清のパラチオン分解能がおさえられる。これらの性質はいずれも酵素のそれに一致する。酵素は易熱性物質でその活度の至適 pH 及び至適温度を有し、その量に正比例して活度が旺盛になるが、基質を一程度以上に増加するとかえつて活度が衰える（すくなくとも増加しない）のを通則とする⁹⁾。パラチオンの分解が Ni^{++} によつて抑制される事実もまた血清内に含まれているパラチオン分解促進物質が酵素であるという見解を支持する。私が調べた範囲ではこの易熱性物質が酵素であることを否定する所見はなかつた。従つて私は血清のパラチオン分解能力は酵素作用にもとずくと見做してよいと思う。文献をあさつたところ Aldrige¹⁰⁾ が 1953 年にパラチオン類似の E 600 (diethyl-p-nitrophenyl phosphate) を分解する酵素を

表 3. 本法の精度（二重測定のくいちがい）

PNP 測定値 (γ/ml)	PNP 測定値 (γ/ml)	二重測定 の喰違い (%)	PNP 測定値 (γ/ml)	PNP 測定値 (γ/ml)	二重測定 の喰違い (%)
1.60	1.60	0.0	4.40	4.40	0.0
6.60	6.30	4.2	4.40	4.40	0.0
3.46	3.46	0.0	2.30	2.30	0.0
3.50	3.50	0.0	2.95	2.95	0.0
3.27	3.20	2.2	2.95	2.93	0.7
3.70	3.70	0.0	4.15	4.25	2.4
3.60	3.80	5.5			
3.85	3.75	2.6			
2.60	2.65	3.8			
6.46	6.46	0.0			
6.60	6.70	1.5			
6.55	6.70	1.5			
7.20	7.00	2.8			
2.72	2.68	1.5			
3.30	3.30	0.0			
3.40	3.40	0.0			
4.10	4.20	2.4			
5.40	5.27	2.5			
3.60	3.60	0.0			
3.56	3.50	1.7			
3.45	3.25	6.0			
5.68	5.45	4.2			
3.10	3.00	3.3			
3.20	3.34	4.3			
2.24	2.24	0.0			
2.85	2.80	1.8			
2.50	2.70	8.0			
2.00	2.00	0.0			
2.10	2.20	4.7			
4.30	4.40	2.3			
4.30	4.30	0.0			

以上 37 例二重測定の喰違い (%)

$$\text{平均} = \frac{69.9}{37} = 1.88 \%$$

発見し、これを A-esterase と命名していることを知つた。彼によれば E 600-esterase (A-esterase) は 68°C 5 分間の加熱により失活し、 50°C 5 分間の加温ではわずかに活度を害せられる。活度の至適 pH は 7.4～7.6 で、硫酸銅及び p-chloromercuribenzoic acid により抑制され、sodium iodoacetate もこの酵素の活度を阻止する。この酵素は globulin 分屑に存在すると云う。これとパラチオン分解酵素とを

比較すると、既に述べたところから明かな通り至適 pH 及び抑制剤がちがつている。パラチオン分解酵素は硫酸銅によつて多少失活するが、それよりも強く硫酸ニッケルの添加によつて活度を抑制される。パラチオン分解酵素は血清アルカリフォスファターゼ¹¹⁾と同一の至適 pH を有している。しかし私がしらべた範囲では血清パラチオン分解能力は血清アルカリフォスファターゼ活度に平行せず、それと無関係であつた(表3)。また血清アルカリフォスファターゼは fluoride により抑制されるが、パラチオン分解能はこれに影響されなかつた。

パラチオンは生体内に於てコリンエステラーゼ (ChE)¹¹⁾ に結合し、これを失活せしめるが、パラチオン自身は ChE との結合によつて S を失ひ O をとり入れ paraoxon*——パラチオンよりも更に毒性の強い物質で、一部の人はパラチオンの生体に対する毒性を本物質に帰している——となり、やがて diethylphosphate-ChE 結合物と p-nitrophenol に分解すると考えられて来た²⁾。パラチオンを肝スライスに加えると一過性により毒性の強い物質を生ずる事実はこの見解を支持する⁶⁾¹³⁾。この種の意見によればパラチオンを分解して p-nitrophenol を生ずる物質は ChE だと結論されるが、私が云うパラチオン分解物質は ChE と異つた性質を持つている。先ず ChE の至適 pH は 6.7~7.7¹⁴⁾ であつて、パラチオン分解物質のそれよりも酸性側に偏している。また ChE はエゼリンによつて著明に活

度を抑制されるが、パラチオン分解物質はすこしも影響を受けなかつた。従つて ChE がパラチオンの分解にあずかることは間違いないとしても、この他にもつとそれよりも分解能の強い酵素が血清内に存在すると想像せざるを得ない。事実私は ChE 活度とパラチオン分解能とは平行しないことを観察している(表4)。要するに私が血清内に見出したパラチオン分解能を有する物質は酵素的性格を有しているが、それは従来パラチオン中毒に関連して考察されたどの酵素ともちがつたものであると云えるだろう。

結 論

私は偶然の機会にヒト血清がパラチオンを分解する現象を知り、これをくわしく検討するために自ら定量法を案出した。そしてこの定量法の使用及びその吟味実験を通して血清パラチオン分解能が酵素作用にもとづくものと推定した。この酵素はアルカリフォスファターゼ、コリンエステラーゼ及び A-エステラーゼ (E-600 エステラーゼ) などとは異なる性質を示した。私の定量法によつて測定した血清パラチオン分解能の数値は男子 : $134 \pm 45 \gamma/\text{ml}$, 女子 : $180 \pm 62 \gamma/\text{ml}$ であつたが、その詳細は別の報告で述べることにする。

擧筆するに臨み、御懇篤なる御指導と御校閲の労を賜つた恩師柴田進教授に深甚なる謝意を表し、併せて御校閲を賜つた岡山大学医学部緒方益雄教授並に大田原一祥教授に深甚なる感謝を捧げる。

文

- 1) 厚生省 有機燐製剤講習会テキスト、厚生省 (東京) 1954.
- 2) Duspiva, F.: Zum Wirkungsmechanismus moderner synthetischer Insektizide. *Angew. Chem.*, 66 : 541—551, 1954.
- 3) 平木潔, その他 パラチオン(ホリドール)中毒

献

- の臨床, 診断と治療, 43 : 14—26, 1955.
- 4) 平木潔その他 : パラチオン中毒の発生機転, 日本医事新報, 1613 : 1447—1457, 1955.
- 5) Pestemer, M.: Zur Ausscheidung von p-Nitrophenol im Urin nach Einwirkung von Pflanzenschutzmittel "E605" *Angew. Chem.*,

* paraoxon は別名 E600 と呼ばれている。Aldridge はこれが A-esterase によつて分解されると主張している。しかしここに述べた見解では ChE によつて paraoxon が p-nitrophenol になると考えるのである。私のパラチオン分解酵素は A-esterase とは別の存在であるから、パラチオンを分解する過程に於て paraoxon を経由するか否か断言出来ない。

- 66 ; 551—553, 1954.
- 6) 佐藤徳郎・ラツテ臓器ホモジェネート上清によるパラチオンの活性化と不活性化について, 昭和29年度農林省応用研究, 新農薬の人間に対する影響に関する研究 (第4中間報告), 農林省農業改良局研究部農薬中毒研究班, 1955.
 - 7) 平木潔, 山口義雄, 木村基一郎: 農薬ホリドール中毒の臨床, 治療, 36 : 832—841, 1954.
 - 8) 柴田 進: 光電比色を中心とする臨床化学の技術, 金芳堂 (京都, 東京) 1951.
 - 9) Cantarow, A., and Schepartz, B.: Biochemistry. Saunders (Philadelphia, London). 1954.
 - 10) Aldridge, W. N.: Serum esterases. 2. An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. Biochem. J. 53 ; 117—124, 1953.
 - 11) Bodansky, M., and Bodansky, O.: Biochemistry of Disease. Mac Millan (New York), 1951.
 - 12) 平木潔: パラチオン (ホリドール) 中毒に就いて, 日赤医学, 8 : 8—27, 1955.
 - 13) Kilby, B. A.: Anticholinesterases. The metabolic conversion of certain organic phosphorus compounds into anticholinesterases. Chemistry & Industry, (May 8) ; 524—528, 1954.
 - 14) Shibata, S., and Takahashi, H.: A simple procedure for the estimation of serum cholinesterase by means of comparator with phenol red as indicator. Bull. Yamaguchi Med. School, 1 ; 188—197, 1953.

Department of Clinical Pathology, Yamaguchi Medical College.
(Director: Prof. Dr. S. Shibata)

Studies on Parathion-Splitting Enzyme.

Part 1. Parathion-splitting activity of blood serum with special reference to its estimation.

By

Teiji Shiigi

During the course of our study on parathion (organophosphorus insecticide) poisoning we happened on the discovery that the human blood serum promoted the decomposition of this insecticide. A procedure for the estimation of the promoting activity of blood serum in splitting parathion was developed to examine this phenomenon quantitatively. In this procedure, the mixture of serum, emulsion of parathion and bicarbonate-carbonate buffer of pH 10 in a fixed proportion was incubated at 37°C for an hour, and the amount of paranitrophenol liberated from parathion was measured by colorimetry to express the splitting activity in terms of r of paranitrophenol per ml of serum. A new enzyme that had not hitherto been described was supposed to be responsible for the parathion-splitting activity of serum after careful examination of its property with special reference to the ambient conditions (pH of the medium, temperature, amount of substrate used, inhibitor, etc.). The enzyme was quite different from alkaline phosphatase, cholinesterase and A-esterase (E-600 esterase) which had been believed to be concerned with the detoxication of parathion. Normal range of parathion splitting activity of human serum by the proposed method of the author was $134 \pm 45 r/ml$ for males and $180 \pm 62 r/ml$ for females.
