

氏 名 (本籍)	鎌 田 亮 (福 島 県)
学 位 の 種 類	博士 (獣医学)
学 位 記 番 号	獣医博甲第 8 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 1 3 年 3 月 1 3 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岩手大学
学 位 論 文 題 目	Mechanisms of Organophosphorus-Induced Delayed Neurotoxicity
審 査 委 員	主査 岩手大学 教授 小林 晴 男 副査 帯広畜産大学 教授 西 村 昌 数 副査 岩手大学 教授 岡 田 幸 助 副査 東京農工大学 教授 小久江 栄 一 副査 岐阜大学 教授 武 脇 義

論 文 の 内 容 の 要 旨

一般に有機リン化合物は、acetylcholinesterase (AChE) 活性の阻害作用によって、急性の神経毒性を発現する。しかし、一部の有機リン化合物は、曝露後 1-2 週間の潜伏期の後に、下肢の進行性弛緩性麻痺を特徴とする遅発性神経毒性 (organophosphorus-induced delayed neurotoxicity, OPIDN) を引き起こし、形態学的に末梢神経系、脊髄、脳幹および小脳における神経軸索の膨化・変性をもたらす。この OPIDN の発現機序として、神経組織内に存在する酵素 neuropathy target esterase (NTE) の阻害およびその後の NTE の不可逆的な経時変化が提案されてきた。しかしこの説には、NTE 阻害と OPIDN 徴候の発現との間に時間的ギャップがあること、NTE 活性を高度に阻害する薬物が必ずしも OPIDN を発症させる訳ではないこと、などの問題点があり、NTE 阻害と OPIDN 徴候の発現との関連は不明のままである。

第 1 章では、NTE と OPIDN 発現能との関連性の有無を確認する目的で、OPIDN 高感受性動物であるニワトリおよび低感受性動物であるウズラを用いて、OPIDN 誘発に関連する薬物を投与し、経時的な症状変化を観察するとともに NTE 活性を測定した。OPIDN 誘発性有機リン化合物である diisopropyl phosphorofluoridate (DFP) を投与したニワトリでは、NTE 活性は顕著に抑制され、典型的な OPIDN の症状も観察された。しかし、NTE 阻害作用を持つ phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を投与したニワトリでは、OPIDN の症状は観察されなかった。またウズラでは、DFP および PMSF 投与群においてニワトリと同様に顕著な NTE 活性阻害が認められたにもかかわらず、症状は全く観察されなかった。したがって、NTE の活性阻害と OPIDN 発現との関連性は否定される結果となった。

第 2 章では、有機リン化合物は神経細胞内で何らかの機能性物質に結合し、その機能を

障害することによって OPIDN を発症させると仮定し、その機能性物質を見つける目的で、ニワトリの脳・脊髄の膜および可溶性画分標本を作製し、 $[^3\text{H}]$ で標識した DFP の特異的結合能を検討した。その結果、 $[^3\text{H}]$ DFP は NTE 活性の大部分を占める膜画分だけではなく可溶性画分においても結合能を示し、脳よりも OPIDN が発症しやすい脊髄で強い結合能を示すことを明らかにした。さらに、種々の結合阻害物質を用いてこの $[^3\text{H}]$ DFP 結合部位の特性について検討した。各画分において、最も強く $[^3\text{H}]$ DFP 結合を阻害した薬物は非標識 DFP であり、OPIDN 非誘発性有機リン化合物である paraoxon は膜画分において強い阻害を示したが、可溶性画分での阻害作用は低かった。OPIDN 誘発性有機リン化合物である mipafox も各画分において高い阻害を示し、脊髄可溶性画分で顕著であった。AChE 阻害剤である eserine、NTE 活性阻害剤である PMSF および NTE の外因性基質である phenyl valerate は各画分において、高濃度存在下においてのみ弱い結合阻害を示した。

第 3 章では、この結合部位の生体内での変化を調べるために、OPIDN 誘発に関連する薬物を投与したニワトリから投与後 24 時間および 8 日の脳・脊髄の膜および可溶性画分標本を作製し、 $[^3\text{H}]$ DFP の特異的結合量を測定するとともに NTE および AChE 活性を測定した。投与後 24 時間における $[^3\text{H}]$ DFP 結合は、DFP 投与群において各標本ともに顕著な結合阻害を示したが、投与後 8 日では、膜画分においては結合の阻害は回復したにもかかわらず、可溶性画分において顕著な結合阻害が持続した。このときの回復の相違には、NTE および AChE 活性との関連性は認められなかった。以上の結果より、OPIDN 発症に関与する DFP の特異的結合部位は可溶性画分に存在し、NTE および AChE 活性部位とは異なることが示唆された。

第 4 章では、この OPIDN 発症に関係すると思われる DFP の結合部位を単離するために、DFP の結合阻害実験に感受性の高かった脊髄の可溶性画分をゲル濾過クロマトグラフィーにより細分離し、採取した各フラクションの $[^3\text{H}]$ DFP 結合量を測定するとともに NTE および AChE 活性を測定・比較した。 $[^3\text{H}]$ DFP 結合量の測定から、脊髄可溶性画分には DFP との結合能を有する部位が 3 点存在していることが判明した。各酵素の活性を示すフラクションと比較すると、 $[^3\text{H}]$ DFP 結合を示す部位のうち 2 つは NTE または AChE 活性を示すフラクションに相当していたが、残りの 1 部位は NTE や AChE 活性に対して関連性は認められなかった。したがって、DFP 結合部位には NTE および AChE 活性に依存しないものが存在し、その部位は OPIDN 発症に関与する独自のものである可能性が示唆された。

本研究により、OPIDN 誘発性有機リン化合物である DFP の結合部位は脳および脊髄の可溶性画分にも存在し、膜画分よりも OPIDN との関連性が高いことが明らかにされた。さらに、可溶性画分には既知の酵素である NTE および AChE の活性部位とは異なる DFP 結合部位が存在することが明らかにされた。したがって、OPIDN の発症のメカニズム解明には、NTE または AChE 活性の阻害ではなく、この結合部位と有機リン化合物との相互作用の必要性を考慮に入れるべきである、との結論に至った。

審 査 結 果 の 要 旨

有機リン化合物には、曝露後 1-2 週間の潜伏期の後に、下肢の進行性弛緩性麻痺を特徴とする遅発性神経毒性 (OPIDN) を引き起こすものがある。OPIDN の発現機序として、神経

組織内に存在する neuropathy target esterase (NTE) の阻害およびその後の NTE の不可逆的な経時変化が提案されてきたが、NTE 阻害と OPIDN 徴候の発現との関連性は明らかにされていない。本申請者は、OPIDN 誘発性有機リン化合物である diisopropyl phosphorofluoridate (DFP) を用いて OPIDN の発現機序に関して研究を行った。

NTE と OPIDN 発現能との関連性の有無を確認する目的で、OPIDN 高感受性動物ニワトリおよび低感受性動物ウズラを用いて、OPIDN 誘発に関連する薬物を投与し、経時的に症状の観察および NTE 活性の測定を行った。DFP を投与したニワトリでは、NTE 活性は顕著に抑制され、典型的な OPIDN の症状も観察された。しかし、NTE 阻害作用を持つ PMSF を投与したニワトリでは、OPIDN の症状は観察されなかった。ウズラでは、DFP および PMSF 投与群において顕著な NTE 活性阻害が認められたにもかかわらず、症状は全く観察されなかった。したがって、NTE の活性阻害と OPIDN 発現との関連性は否定された。

新しい OPIDN 発症機序として、有機リン化合物は神経細胞内で何らかの機能性物質に結合し、その機能を障害することによって OPIDN を発症させると仮定し、その機能性物質を見つける目的で、ニワトリの脳・脊髄の膜および可溶性画分標本を作製し、 $[^3\text{H}]$ で標識した DFP の特異的結合能を検討した。その結果、 $[^3\text{H}]\text{DFP}$ は NTE 活性の大部分を占める膜画分だけではなく可溶性画分においても結合能を示し、脳よりも OPIDN が発症しやすい脊髄で強い結合能を示すことを明らかにした。

この $[^3\text{H}]\text{DFP}$ 結合部位の特性を明らかにするために、種々の結合阻害物質を用いて各画分標本における結合阻害実験を行った。各画分において、最も強く $[^3\text{H}]\text{DFP}$ 結合を阻害した薬物は非標識 DFP であり、OPIDN 非誘発性有機リン化合物 paraoxon は膜画分において強い阻害を示したが、可溶性画分での阻害作用は低かった。OPIDN 誘発性有機リン化合物 mipafox も各画分において高い阻害を示し、脊髄可溶性画分で顕著であった。AChE 阻害剤 eserine、PMSF および NTE の外因性基質 phenyl valerate の各画分における親和性は低かった。

この結合部位の生体内での変化を調べるために、OPIDN 誘発に関連する薬物を投与したニワトリから投与後 24 時間および 8 日の脳・脊髄の膜および可溶性画分標本を作製し、 $[^3\text{H}]\text{DFP}$ の特異的結合量、NTE 活性および AChE 活性を測定した。投与後 24 時間における $[^3\text{H}]\text{DFP}$ 結合は、DFP 投与群において各標本ともに顕著な結合阻害を示したが、投与後 8 日では、膜画分においては結合の阻害は回復したにもかかわらず、可溶性画分において顕著な結合阻害が持続した。このときの回復の相違には、NTE および AChE 活性との関連性は認められなかった。以上の結果より、OPIDN 発症に関与する DFP の特異的結合部位は可溶性画分に存在し、NTE および AChE 活性部位とは異なることを示した。

次に、この OPIDN 発症に関係すると思われる DFP の結合部位を単離するために、DFP の結合阻害実験に感受性の高かった脊髄の可溶性画分をゲル濾過クロマトグラフィーにより細分離し、採取した各フラクションの $[^3\text{H}]\text{DFP}$ 結合量を測定するとともに NTE および AChE 活性を測定・比較した。脊髄可溶性画分には DFP との結合能を有する部位が 3 点存在していることが判明した。 $[^3\text{H}]\text{DFP}$ 結合を示す部位のうち 2 つは NTE または AChE 活性を示すフラクションに相当していたが、残りの 1 部位は NTE や AChE 活性に対して関連性は認められなかった。したがって、DFP 結合部位には NTE および AChE 活性に依存しないものが存在し、その部位が OPIDN 発症に関与する独自のものである可能性を示唆した。

本研究により、OPIDN誘発性有機リン化合物であるDFPの結合部位は脳および脊髄の可溶性画分にも存在し、膜画分よりもOPIDNとの関連性が高いことを明らかにした。さらに、可溶性画分にはNTEおよびAChEの活性部位とは異なるDFP結合部位が存在することを明らかにした。したがって、OPIDNの発症のメカニズム解明には、NTEまたはAChE活性の阻害ではなく、この結合部位と有機リン化合物との相互作用の必要性を考慮に入れるべきである、との結論に至った。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

基礎となる学術論文

1. Kamata, R., Suzuki, T., Saito, S., Kofujita, H., Ota, M. and Kobayashi, H. (1999)
Lack of correlation of organophosphorus-induced delayed neuropathy with neuropathy target esterase in hens and Japanese quails *Journal of Health Science* 45: 209-216.
2. Kamata, R., Saito, S., Suzuki, T., Takewaki, T., Kofujita, H., Ota, M. and Kobayashi, H. ()
A comparative study of binding sites for diisopropyl phosphorofluoridate in membrane and cytosol preparations from spinal cord and brain of hens.
NeuroToxicology (in press)
3. Kamata, R., Saito, S., Suzuki, T., Takewaki, T. and Kobayashi, H. ()
Correlation of binding sites for diisopropyl phosphorofluoridate with cholinesterase and neuropathy target esterase in membrane and cytosol preparations from hen.
NeuroToxicology (in press)

既発表学術論文

1. Suzuki, T., Wada, S., Tomizawa, N., Kamata, R., Saito, S., Sato, I., Sugawara, E., Tachikawa, E. and Kobayashi, H. (1998)
A possible role of nitric oxide formation in the vasodilatation of rabbit ear artery induced by a topically applied capsaicin analogue. *Journal of Veterinary Medical Science* 60: 691-697.