

鳥類コリンエステラーゼ活性測定に関する基礎的研究

第一法 Michel 法による測定について

Studies on the Determination of Avian Cholinesterase Activity

Part 1. On the Determination of Avian Cholinesterase Activity by Michel's Method

佐藤 秀男 長谷川 恩

Hideo Sato and Megumi Hasegawa

まえがき

環境汚染物質として、有機塩素系化合物の持つ重要性が指摘せられ、1971年5月以降この物質を含む農薬・殺虫剤の製造、使用禁止の措置がとられて以来、有機りん系化合物が、農薬、殺虫剤の主流として用いられるようになって

いる。これらの有機りん製剤は、本来コリンエステラーゼ（以下 ChE と略す）阻害剤であり、この種の農薬の中毒に際しては、早期から著しい ChE 活性の低下をきたし、従って、ChE 活性値の測定は、有機りん化合物中毒の診断には不可欠なものとされている。

この中毒では、先ず赤血球 ChE 活性が減り、ついで血漿 ChE 活性が減少し、回復に際してはこの逆に、先ず血漿 ChE 活性が正常に向って増えはじめ、赤血球 ChE 活性の方は遅れるといわれているところから、有機りん系化合物中毒の測定に際しては、赤血球 ChE 活性を測定する方が望ましいことは、既に赤堀ら¹⁾も指摘しているところである。

しかし、古く MENDEL ら²⁾ および AUGUSTINSSON³⁾ により報告せられ、また我が国にあっては TANABE ら⁴⁾ が観察したごとく、鳥類、魚類においては、赤血球 ChE は非常に少ないか、あるいは全く存在しないとされているのである。

一方、実験動物としてのウズラの有用性については、その体質が強健であり、繁殖が容易である点、ニワトリに比べて飼料費、飼育面積が少なくすむ点、成鳥でもその体重が 100 g 前後で、取扱いが容易な点などの有利性から、極めて高い評価を受けるようになり、最近では農薬および残留分解物の生体に及ぼす影響の検査、検定にこの動物を用いる機会が急激に増加している⁵⁾。

従ってこの鳥が有機りん系化合物の生体影響の調査、研究のために用いられることが多くなってくることは当然予想されるところであり、この化合物の生体影響の重大な手がかりとして、ChE 活性の知見を得ることは、極めて重要であると考えられる。

われわれはこの目的に沿う一連の基礎的研究を進めつつあるが、ここにその第一報として、鳥類 ChE 活性を、Michel 法⁷⁾ に基づいて試験した結果について報告する。

実験材料および方法

1) 供試血液

本実験は主として当研究所で飼育中のウズラ (*Coturnix coturnix japonica*) のほか、ガチョウ、ニワトリ、並びに札幌市立動物園で採取したオオハクチョウ、アヒル、マガモ、ハトの血液を用いた。うちウズラは Japanese quail と呼ばれている種類で、日本生物科学研究所よりふ化後 4 週令で購入し、当研究所で 3~4 カ月間飼育したものである。

2) 酵素試料

- a) 血漿：上記の血液を 3000 rpm, 10分間遠心分離し、その 0.05 ml を供試した。
- b) 溶血液：血球を Michel 法に従い、Saponin で溶血したもの他、別法としてこの材料にさらに 100 Volt 100 mA, で 3分間超音波処理をしたものを用いた。供試容量は 1.0 ml である。
- c) 脳抽出液：動物を全採血した後、すみやかに全脳をとり出し、秤量後、冷却蒸留水を10倍量加え、ガラスホモジナイザーで磨砕し、3000 rpm, 10分間遠心分離後、上清を採取した。供試容量は 1.0 ml である。

3) ChE 活性測定法

Michel 法⁷⁾にしたがい、 ΔpH を測定した。

4) 試 薬

基質は Acetylcholine chloride (ACh) [第一製薬], Acetylthiocholine Iodide (ATChI) [Sigma] を用いた。阻害剤は Physostigmine (Eserine) [Merck] を用いた。溶血剤は Saponin, 対照血清としては Monitrol-1 [Dade] を使用した。

実 験 結 果

哺乳動物について実施した経験に基づいて⁸⁾, ウズラを主とした数種の動物についての赤血球, ならびに血漿の ChE 活性の測定を行なった結果を表1に示した。本表に明らかごとく, $\Delta pH/hr$ より見たウズラ, ニワトリ, ガチョウの赤血球 ChE 活性値は, 殆んど0に近かった。一方血漿の $\Delta pH/hr$ はそれぞれ 0.80, 0.55, 0.24である。

表1 各種動物の ACh ($1 \times 10^{-2} M$) による赤血球, 血漿 ChE 活性値の比較

	赤 血 球 ($\Delta pH/hr$)	血 漿 ($\Delta pH/hr$)
ウズラ ♂	0.02	0.80
ウズラ ♀	—	—
ニワトリ ♂	—	—
ニワトリ ♀	0.02	0.55
ガチョウ ♂	—	—
ガチョウ ♀	0.02	0.24
マウス ♂	0.20	2.21
マウス ♀	0.18	2.48
ラット ♂	0.21	0.68
ラット ♀	0.35	2.17

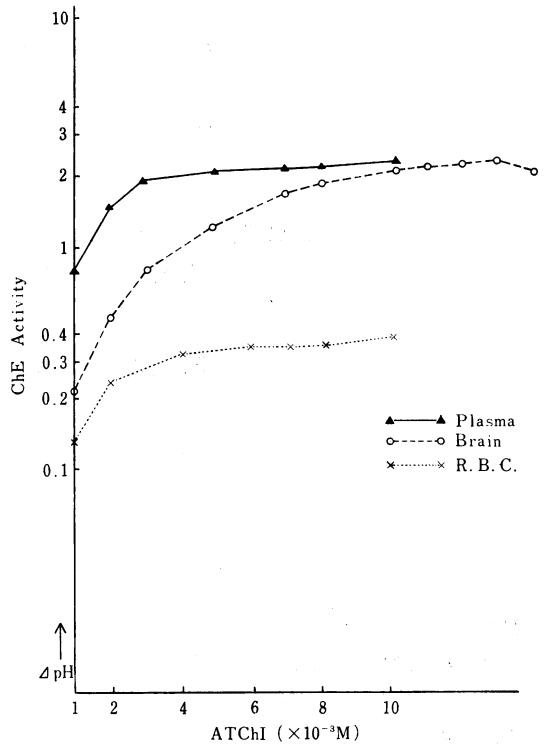
この実験の結果, 鳥類赤血球 ChE 量の存在が僅かであると考えられるので, VOSS & SACHSSE⁹⁾ の報告に従い, 基質を ATChI に代える試みを実施した。基質濃度を $3 \times 10^{-3} M$, そして測定した結果は表2の如くで, この濃度によるウズラ, マウスの赤血球 ChE 活性値の間には差を認めない。

表2 ATChI によるウズラ, マウスの赤血球 ChE 活性値

基質濃度	1×10^{-3} ($\Delta pH/hr$)	2×10^{-3} ($\Delta pH/hr$)	3×10^{-3} ($\Delta pH/hr$)
ウズラ ♂	0.10	0.17	0.23
ウズラ ♀	0.11	0.20	0.20
マウス ♂	—	—	0.24
マウス ♀	—	—	0.25

基質を変えたので, ウズラの血漿, 脳, 赤血球 ChE 活性の基質に対する影響を見た。(Fig. 1) この結果から赤血球, 血漿 ChE 活性測定には $5 \times 10^{-3} M$, 脳 ChE 活性測定には $8 \times 10^{-3} M$ を使用することとした。

Fig. 1. Effect of Substrate Concentration on Cholinesterase Activity.



ウズラ赤血球中の ChE 量の存在を知る目的で Block Test を行なった。赤血球の溶血剤は Saponin を使用し, Eserine は $7 \times 10^{-5} M$ で実施した。表3に示す結果では, 阻害率が非常に低く, また変動係数がかかなり高いため, Michel 法による測定は実用的でないと考えられる。

表3 ウズラ赤血球のサボン処理による ChE 活性値

検 査 個 体	測定値 ($\Delta pH/hr$)	Eserine 阻害率 (%)
1	0.31	3.1
2	0.30	6.7
3	0.34	8.8
4	0.32	9.4
5	0.24	1.3
6	0.26	3.5
7	0.25	8.0
8	0.26	3.8
平均値±標準偏差	0.285 ± 0.037	5.58 ± 3.47
変動係数 (%)	12.98	62.19
1	0.33	3.0
2	0.29	6.9
3	0.30	10.1
4	0.26	6.2
5	0.35	2.5
6	0.27	4.0
7	0.27	2.3
8	0.27	1.8
平均値±標準偏差	0.293 ± 0.032	4.60 ± 2.89
変動係数 (%)	10.92	62.83

更に AUGUSTINSSON ら¹⁰⁾が報告しているように、ChE が赤血球膜と強く結合していると考えられているので、溶血液に超音波処理を加えることとした。この結果は表4に示す通りであって、この追加処理による変化は認められず、鳥類赤血球中には ChE 以外のエステラーゼが多く存在するものと考えられる。

表4 ウズラ赤血球の超音波処理による ChE 活性値

検査個体	測定値 (ΔpH/hr)	Eserine 阻害率 (%)	
♂	1	0.30	4.8
	2	0.30	7.0
	3	0.26	10.0
	4	0.29	5.0
	平均値±標準偏差	0.288±0.019	6.7±2.41
変動係数 (%)	6.6	35.97	
♀	1	0.30	5.4
	2	0.31	7.0
	3	0.28	8.0
	4	0.30	3.8
	平均値±標準偏差	0.298±0.013	6.05±1.84
変動係数 (%)	4.4	30.46	

ウズラ脳の ChE 活性値は表5に示した通りであるが、この検体での Eserine による阻害率は94%と高く、この鳥の脳中 ChE 量はかなり多いことが認められた。なお基質を $4 \times 10^{-2}M$ より濃くした場合には、基質過剰による阻害作用が生じた。

表5 ウズラの全脳 ChE 活性値

検査個体	測定値 (ΔpH/hr)	Eserine 阻害率 (%)	
♂	1	1.78	93.8
	2	1.89	94.7
	3	1.87	93.6
	4	1.75	94.9
	5	1.96	94.4
平均値±標準偏差	1.85±0.085	94.28±0.563	
変動係数 (%)	4.6	0.60	
♀	1	1.84	95.1
	2	1.93	93.3
	3	1.87	94.7
	4	1.89	94.7
	5	1.75	95.4
平均値±標準偏差	1.856±0.068	94.64±0.805	
変動係数 (%)	3.7	0.85	

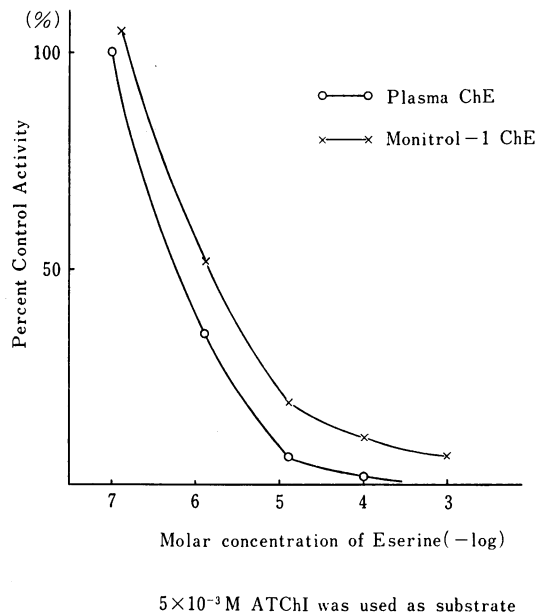
表6にウズラの血漿 ChE 活性値を示す。Eserine による Block Test も同様に実施したが、得られた阻害率は脳 ChE の場合とほぼ同程度であった。ただし脳 ChE 活性値では認められなかった雌雄差が、血漿 ChE の場合には認められている。

なお標準血清の Monitrol-1 およびウズラ血漿の Eserine による阻害曲線を Fig. 2 に図示した。

表6 ウズラ血漿 ChE 活性値

検査個体	測定値 (ΔpH/hr)	Eserine 阻害率 (%)	
♂	1	1.87	93.5
	2	1.94	94.8
	3	1.77	95.7
	4	1.80	93.0
	5	1.85	95.2
	6	1.90	93.7
平均値±標準偏差	1.85±0.063	94.32±0.94	
変動係数 (%)	3.4	1.0	
♀	1	1.36	94.1
	2	1.51	93.6
	3	1.55	95.9
	4	1.47	93.0
	5	1.21	90.3
	6	1.09	95.1
平均値±標準偏差	1.37±0.182	93.67±1.95	
変動係数 (%)	13.28	2.08	

Fig. 2. Percent Inhibition of Plasma and Monitrol-1 Cholinesterase by Eserine.



ウズラの対照として行なった哺乳動物ならびに鳥類に関する ChE 活性値の測定結果、および Eserine による Block Test の結果は、表7、表8にかかげた如くであった。表に見られるように、赤血球 ChE 阻害率は、ヒト、ウシ、モルモット、マウス、ウサギの順に、血漿ではモルモット、ヒト、マウス、ウサギ、ウシの順に低くなり、鳥類にあってはハトの血漿 ChE 阻害率が高い。

表7 哺乳動物の赤血球, 血漿 ChE 活性値
(基質 ATChI)

	動物種	測定値 (ΔpH/hr)	
		測定値	Eserine 阻害率 (%)
赤血球	ヒト	0.96	93
	ウシ	0.73	90
	モルモット	0.54	60
	マウス	0.28	46
	ウサギ	0.37	23
血漿	ヒト	1.86	98
	ウシ	0.08	91
	モルモット	1.50	100
	マウス	2.47	98
	ウサギ	0.40	95
	ラット	0.36	—
	ラット	1.35	—

表8 ウズラ以外の鳥類の赤血球, 血漿 ChE 活性値

動物種	赤血球		血漿	
	測定値 (ΔpH/hr)	Eserine 阻害率 (%)	測定値 (ΔpH/hr)	Eserine 阻害率 (%)
オオハクチョウ	0.19	37	0.57	86
アヒル ♀	0.25	28	0.69	93
マガモ ♂	0.17	12	0.70	97
〃 ♀	0.18	25	0.71	97
ハト ♂	0.22	9	1.92	100
〃 ♀	0.20	21	2.24	99
ニワトリ ♂	0.30	9	0.90	89

考 察

既に述べた如く、鳥類赤血球においては ChE の存在については否定的な見解が多く認められている。しかし有機りん系化合物の生体影響を論ずる場合にあっては、この ChE 活性値への影響の如何に頼ることは、現在殆んど唯一の手がかりであることも事実であり、かつその影響が赤血球 ChE において速かに現われ、長く認められる点からも、この変動に注目することは極めて重要と言わねばならない。

もちろん赤血球 ChE の存在を知る手段としては、第2報以下に取扱う予定のガスクロマトグラフィーによるなど幾つかの方法があるが、ここに取扱った pH の変化を手がかりとした Michel 法はその一つの手段であることも事実である。

しかし ΔpH によって示される赤血球 ChE の活性値の変化は、哺乳動物を対象とした実験の場合には十分にその価値が認められ、われわれもこの方法によって、有機りん系殺虫剤の生体影響についての研究を実施してきた⁸⁾。

一方、実験動物として各種鳥類、ことにウズラ (*Coturnix coturnix japonica*) を用いることは、近時ますます多くなり、米国などにおいては、むしろマウス、ラットの哺乳小動物に代わって、このものが生体影響実験の供試動物と

して用いられることが多くなってきている。

さらに、有機塩素系化合物に代わって、今後の環境汚染原因物質ないしは生体影響関係物質として、有機りん系化合物が多くの問題を提供することも、今日の趨勢としてはさけ難い所であり、この化合物の安全性評価についても、まだ不明の点が多く残されている所から、これらの物質についての生体影響試験の必要性は極めて高いと言わねばならない。

以上の諸点を総合する時、鳥類赤血球における ChE の存在に関する正確な知見を得、既に諸報告に見られる如く鳥類赤血球にあっては、ChE は存在しないか、あるいは極めて微量に存在するという理解が、正しいか否かを確かめることは、非常に重要なことと考えられるのである。

われわれの今回の実験においても、表1に示したように、ウズラ、ニワトリ、ガチョウの赤血球 ChE 活性はほとんど0に近かった。この結果は TANABE ら⁹⁾のそれと一致し、一応赤血球 ChE の存在については否定的な結論が得られる。

しかしウズラにおいて ChE が少ないことは、血漿中においても同様であって、われわれの測定によれば、マウス、ラットの場合の約1/3相当量と推測される。

即ち、Michel 法で測定する限りにおいて、ウズラの血液系の ChE の存在量が、基本的に少ないということが言えるかも知れない。(表1) 但し現実的な方法として考える場合、ChE 活性値測定の基質としての ACh は得られる値が低いことが言われており、少なくとも ATChI を用いるべきことは、VOSS & SACHSSE¹⁰⁾ など多くの学者によって主張されている。

事実われわれの場合も、基質を ATChI に代えることによって、ウズラ赤血球 ChE 活性値は、ACh を基質として測定した場合の、マウス、ラットのそれとほぼ近い値を示すことが認められた。従って Michel 法により、ウズラを実験動物として有機りん系化合物の生体影響を検査する場合には、基質の選定が極めて重要であり、少なくとも人間を対象としての臨床検査の常法として使用されている ACh は不適當であると言わねばならない。今回の実験においては、これ以後の検査における使用基質はすべて、ATChI を使用することとした。

この赤血球 ChE 量が少ない事実を確かめるため、赤血球溶血液に ChE 失活剤の Physostigmine (Eserine) を添加し、Block Test によりその ChE 量を測定するのであるが、その結果は表3, 4に見る如く、極めて低い阻害率を示し、かつこの雌雄各8個体の測定結果を取りまとめて見ても、その標準偏差・変動係数が高く、事実上測定は非常に困難であった。なおこの同様の Block Test をウズラの血漿および脳 ChE について実施した結果は、非常に高い阻害率が得られ、かなり多量の ChE が存在しているものと考えられる。(表5, 6)

また赤血球 ChE 活性値に基く鳥類での低値が、哺乳動物および鳥類の赤血球の構造によることも考えられる。即ち鳥類赤血球は有核細胞であるのに対し、人間を含め各種哺乳類赤血球においては、核は存在しない。あるいはこの核の存否とは無関係に、AUGUSTINSSON¹⁰⁾は ChE と赤血球膜との強い結合を想定している。このような点から物理的にこの赤血球を破壊し、これらの細胞成分と ChE との結合を解くことにより、赤血球 ChE を正確に測定し得るのではないかとこの予測によって、赤血球液を超音波処理した。

この結果は Saponin による化学的処理の結果得られた値とほぼ同じであって、本実験の範囲内においては、鳥類赤血球における ChE の細胞構造との結合が、その測定値の低くあらわれる理由であろうとの想定は否定されると考える。

以上の如き一連の測定結果から、鳥類の赤血球中には、ChE 以外のエステラーゼが、哺乳動物と比較して多いことが推測された。

先に触れたように、鳥類についての実験に際しては、基質として ATChI を使用することが望ましい。従って、今後われわれの研究室では、基質として ATChI を用いる。そこで比較の意味で一応 ATChI を用いた各種の動物赤血球の測定をも併せて実施した。表 7, 8 は参考の意味においてその結果の取りまとめとして掲げたものであるが、哺乳動物に関する結果は従来報告された結果と大差は認めなかった。鳥類赤血球 ChE に関しては、これまでほとんど調査した報告がなく、われわれとしては今後とも機会を得てこのデータを追加して行きたいと考えている。

以上 Michel 法を基礎にして測定を実施する限りにおいて、鳥類赤血球の ChE 量は非常に微量であると言わねばならない。このことは、最初に述べた生体影響研究のための鳥類(殊にウズラ)の有利性にもかかわらず、有機りん系化合物を対象とする場合に、大きな問題を提供することになるのである。

但し、ChE 測定の手段としては $4pH$ に基く Michel 法が唯一の方法ではなく、例えばガスクロマトグラフィーを用いるなどの別法も考慮せねばならないことはもちろんである。われわれは、こうした幾つかの ChE 測定法によって、鳥類赤血球 ChE の問題を更に追及して行くべく、実験を計画、実施中である。

ただし今回の実験の結論としては、鳥類を使用して化学物質の生体影響を検討する場合、とくに有機りん系化合物の毒性試験の場合は、血漿および脳 ChE を基礎として考慮すべきであって、Michel 法による赤血球 ChE は除外せざるを得ないものと考えられる。

結 論

1. 臨床検査において、有機りん系化合物の生体影響を見る場合の常法の一つとされている Michel 法に準じて、ウズラを主として、鳥類の赤血球、血漿、および脳の ChE 活性値を測定した。
2. ACh を基質として測定した場合、ウズラ赤血球の ChE は、 $4pH$ がほとんど 0 であり、基質を ATChI に代えた場合もその値は極めて低く、鳥類赤血球において ChE の存在量が僅かであることが示された。
3. この事実は、ChE 失活剤 Physostigmine (Eserine) を用いての Block Test、および超音波を用いての赤血球破壊試験の結果からも確かめられた。
4. 従って、鳥(ウズラ)を使用して有機りん系化合物の生体影響を検査する場合、赤血球 ChE 活性測定は除外せざるを得ないと考える。
5. われわれは目下 Michel 法以外の ChE 測定法によって、鳥類赤血球 ChE の所在について検討を行なうため、一連の実験を立案、実施中である。

本実験の実施に当たり、種々援助せられた熊谷満科長、服部睦作科長、野呂新一研究員、小川悦子、山本次子の諸氏ならびに、各種鳥類の採血に特別の配慮を賜った札幌市立動物園長中川敏氏、職員各位に対し深く感謝する。

文 献

- 1) 赤堀四郎ら：臨床酵素化学, 341, 朝倉書店 (1964)
- 2) MENDEL, B., et al. : Biochem. J., 37, 473 (1943)
- 3) AUGUSTINSSON, K. B. : Acta Physiol. Scand., 15 Suppl. 52 (1948)
- 4) TANABE, A., et al. : Jap. J. vet. Sci., 33, 111 (1971)
- 5) TANABE, A., et al. : *ibid.*, 69 (1971)
- 6) 田島嘉雄ら：実験動物学—各論, 272, 朝倉書店 (1972)
- 7) MICHEL, H. O. : J. Lab. clin. Med., 34, 1564 (1949)
- 8) 長谷川恩ら：道衛生研究所報 23, 62 (1973)
- 9) VOSS, G., et al. : Toxic. appl. Pharm., 16, 764 (1970)
- 10) AUGUSTINSSON, K. B., et al. : Bioch. Biophys. Acta, 293, 424 (1973)

**Studies on the Determination of Avian
Cholinesterase Activity**

**Part 1. On the Determination of Avian
Cholinesterase Activity by Michel's Method**

Hideo Sato and Megumi Hasegawa
(Hokkaido Institute of Public Health)

One of the most important indices which show the effects of organophosphorus compounds on animals is observed in the decline of cholinesterase (ChE) activity.

But in bird red cell it has been reported that no or very little ChE is present.

The authors designed to make clear the presence

of ChE in red cell, plasma and brain of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) by Michel's method.

No ChE activity could be detected in red cell of this bird by using acetylcholine chloride (ACh) as a substrate, but the esterase activity was showed using acetylthiocholine iodide (ATChI) in place of ACh as the substrate. However, the presence of ChE in this case was also very few.

So it might be concluded that ChE in red cell of this birds is not the suitable index showing the effects of organophosphorus compounds by this pH metric technique.