

原 著

## 鶏卵における Neuropathy Target Esterase 活性と有機リンの影響

斎藤 亜矢<sup>1)</sup> 割田 貴之<sup>1)</sup> 大久保 朋一<sup>2)</sup>  
津田 道雄<sup>3)</sup> 中村 健司<sup>1)</sup> 坂部 貢<sup>4)</sup>  
木村 穰<sup>1,3)</sup>

- 1) 東海大学伊勢原研究推進部実験動物センター
- 2) 東海大学伊勢原研究推進部教育・研究支援センター
- 3) 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学
- 4) 東海大学医学部基礎医学系生体構造機能学

## The effect of organophosphate on neuropathy target esterase activity in chicken embryos

Aya Saito<sup>1)</sup> Takayuki Warita<sup>1)</sup> Tomoichi Ohkubo<sup>2)</sup> Michio Tsuda<sup>3)</sup>  
Kenji Nakamura<sup>1)</sup> Kou Sakabe<sup>4)</sup> Minoru Kimura<sup>1,3)</sup>

- 1) Animal Care Center, Research and Development Division, Isehara Campus, Tokai University
- 2) Educational and Research Support Center, Research and Development Division, Isehara Campus, Tokai University
- 3) Department of Molecular Life Science, School of Medicine, Tokai University
- 4) Department of Human Structure and Function, School of Medicine, Tokai University

### 要約

シックハウス症候群は有機リン等の揮発性化学物質によって引き起こされる疾患である。今回、この有機リン代謝に大きく関与するとされる Neuropathy Target Esterase の活性について、その基質である Lysolecithin を多く含む鶏卵を利用して、発生段階における酵素活性の変化と有機リンによる活性の阻害効果を検討した。その結果、受精後6日目以降より、鶏卵中での脳内本酵素活性の増加は脳重量増加に比

《キーワード》シックハウス症候群、鶏卵、有機リン、DDVP、neuropathy target esterase、出血

受付：平成23年8月7日 採用：平成23年8月10日

別刷請求宛先：木村 穰

〒259-1193 伊勢原市下糟屋143 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

Received: August 7, 2011 Accepted: August 10, 2011

Reprint Requests to Minoru Kimura, Department of Molecular Life Science, School of Medicine, Tokai University, 143 Shimokasuya, Isehara, Kanagawa 259-1193, Japan

して急速に活性を増加させること、また、14日目に、水溶性の有機リン DDVP (dichlorvos: ジメチル2,2-ジクロロビニルホスフェイト) を致死量以下 (50mg/kg) で鶏卵内に接種したところ、30分以内に酵素活性が低下し、その後、徐々に活性を回復することが判明した。さらにほぼ全例で脳内硬膜下に出血を認めたことから、有機リンの脳血管系に対する影響が示唆された。(臨床環境20: 54~60, 2011)

## Abstract

Sick House Syndrome is a disease caused by volatile chemical compounds such as organophosphorus (OP). Because Neuropathy Target Esterase (NTE) is thought to participate in OP metabolism, we examined the enzyme activity of brain extracts in the presence of OP and DDVP (Dichlorvos: Phosphoric acid 2,2-dichloroethyl dimethyl ester) during chicken development as one of the bioassay systems on the toxicity of OP. Chicken embryos contain a lot of lysolecithin, the native substrate of NTE. Our experiments revealed that the NTE activity in a chicken's brain rapidly increases after fertilization when compared with the pattern of the wet weight increases. In addition, when the chicken embryos were exposed to water-soluble OP and DDVP, at a concentration of 50 mg/kg on the 14th day after fertilization, enzyme activity decreased within 30 minutes, and after 3 hours it gradually recovered. Almost all embryos (98%: 107/109 total embryos) exposed to any dose of DDVP showed hemorrhage under the endocranium in the brain. (Jpn J Clin Ecol 20: 54~60, 2011)

《Key words》 sick house syndrome, chicken embryo, organophosphate, DDVP, neuropathy target esterase, hemorrhage

## I. はじめに

シックハウス症候群とは、主として住宅に由来する様々な健康障害の総称である。室内の空気を汚染する原因物質に関する調査、研究は比較的進んでいるが、発症に至るメカニズムや感受性遺伝子等の発症素因に関する研究は余り進んでいない。

シックハウス症候群の原因化学物質の一つとされる Chlorpyrifos (クロルピリフォス: チオリン酸=O-(3,5,6-トリクロロピリジン-2-イル)=O, O-ジエチル) など是有機リン化合物に属するが、一般に有機リン物質は人体に有害な物質とされ、多くは水に溶けにくい。農薬等に多用される DDVP (dichlorvos: ジメチル2,2-ジクロロビニルホスフェイト) はわずかに親水性の有機リン化合物であり、その毒性についても報告がある。しかし有機リンに対して、まずその処理を行なう酵素は Acetylcholinesterase であり、急性毒性に関与すると思われる<sup>1,2)</sup>。

我々は、シックハウス症候群の患者群と健常群とを比較して、疾患の感受性につながる遺伝子多型に関する研究を進めてきた。その中でも、

*PNPLA6* 遺伝子の 1 カ所の SNP (Single Nucleotide Polymorphism: 遺伝子多型) が疾患抵抗性を示すこと、さらに、*PNPLA6* 遺伝子がコードする NTE (neuropathy target esterase) は、患者群で優位に酵素活性が高いことを明らかにしてきた(投稿準備中)。

現在のところ、NTE は、細胞膜のリン脂質 (Phospholipid) の代謝を制御するとされ、その活性中心等が詳しく解析されている。また、種を超えて微生物に至るまで活性中心のアミノ酸配列が保存されていることや、配列の良く似た酵素 (Neuropathy Target Esterase Related Enzyme) の存在も知られている<sup>3~8)</sup>。マウス脳の NTE が Lysophospholipase であることが明らかになり<sup>9)</sup>、Lysolecithin は鶏卵に多く含まれることから、NTE の酵素活性が高い生物材料と考えられ、今回の研究に至っている。

有機リンと NTE の関係については、湾岸戦争以後、米軍兵士が帰国後 1 ヶ月後ぐらいに神経麻痺に至る場合があり<sup>10)</sup>、その原因が NTE の阻害であることが考えられ、*pnpla6* 遺伝子ノックアウトマウスが作成された<sup>11,12)</sup>。NTE ノックアウト

トマウスは胎性致死となることから、NTE は発生期における生存に必須であると考えられている<sup>11,12)</sup>。また、NTE ヘテロ型欠損マウスは多動を示し、少量の有機リン投与でうずくまり、致死率も高くなることから、湾岸戦争後神経症候群のモデルと考えられた。しかし、毒性学者の中には有機リンが NTE の活性中心のセリン残基に共有結合した後に、化学的な変化を起こした aged esterase が神経に作用すると考えるグループもあり、結論は出ていない<sup>13)</sup>。その後さらに神経特異的な NTE ノックアウトマウスが作成され、生存はするが、成体マウスでは神経変性疾患を起こして、神経細胞に空胞でき、細胞数が減少することが報告されている<sup>14)</sup>。

また、NTE の異常とヒト疾患との関連性として、興味深い論文が報告されている<sup>15~19)</sup>。それは家族性 NTE 遺伝子変異の家系調査から、NTE の遺伝子変異が検出されたことであり、NTE の異常は、若年性、両側性、進行性に手足の筋肉が変性する劣性の運動神経疾患を発症することが推測された。すなわち NTE 変異は、ヒトにおいて NTE に関連した運動神経変性を呈することから、NTE は神経系において重要な機能を有することが示唆される。

NTE が神経発生と神経細胞体の維持に必須の酵素であることは明らかになりつつあるが、シックハウス症候群の一因子である有機リンの曝露と NTE 活性の変化については不明な点が多い。そこで、シックハウス症候群と NTE 活性の関係をさらに追求するために、有機リンの曝露と NTE 活性レベルの変化を詳細に検討した。これらの基礎データを元にして、シックハウス症候群の患者を診断する一指標となることを目指すと共に、患者の NTE 活性の日内変動、有機リン曝露との関係等を精査して、予防への応用も目標としている。

## II. 材料と方法

鶏卵を用いた実験は東海大学動物実験委員会の承認のもとに行なわれた。

### 1. 鶏卵の処置

有精鶏卵（ポリスブラウン）を 37℃ に設定し

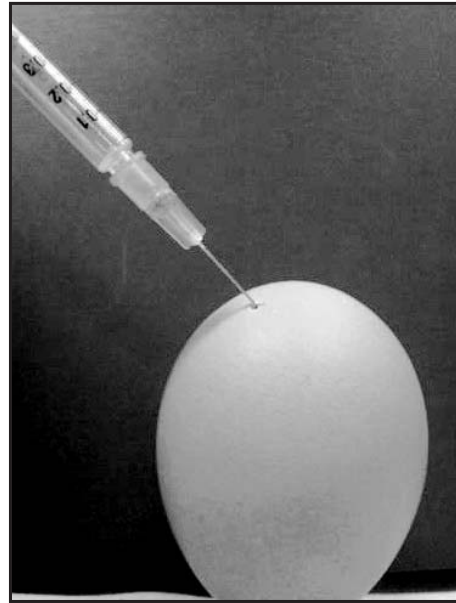


図 1 鶏卵への DDVP 投与方法

た湿度約60%の孵卵器内で DDVP 標準品（和光純薬工業株式会社、大阪府：日本）投与する日程まで孵卵した。予め投与する日の胚重量の平均値を求め、その平均値を用いて DDVP の量を算出し、水溶液を調整した。針で鈍端部に穴を開け、注射器を差し込み、胚を避けるように注意して DDVP 水溶液100ul を卵殻内に注入した（図1）。DDVP 曝露後、指定時間経過後に胚を取り出し、脳の重量を測定後、NTE 活性測定の日まで -80℃ で保存した。

### 2. NTE 活性の測定<sup>20,21)</sup>

NTE 活性は Phenyl valerate を基質とする加水分解酵素であるが、その活性は数多くのエステラーゼと区別するため Paraoxon の阻害に抵抗性で Mipaflox の阻害に感受性の活性として定義される (Kayyali US. et al., 1991, Atkins J et al., 2000)。NTE 活性は生じたフェノールの比色分析により決定。採取した脳を緩衝液 (50mM Tris-HCl, pH8.0, 20mMEDTA) 添加後、総量10倍のホモジネートを作成し、10℃、2000rpm で15分間遠心し、上清をサンプルとする。mipaflox 添加（終濃度0.2mM）あるいは無添加の2本を用意し、paraoxon (0.8mM) 存在下で37℃、20分間処理した後、基質である phenyl

valerate (0.5ml : 終濃度5.3mM, 0.063%DMFA, 0.028%TritonX-100) を加え、さらに20分間インキュベーションする。反応停止液 (0.5ml : 0.25 mg/ml 4-aminoantipyrine, 36mg/ml SDS) を加えたのち、hexacyanoferrate (0.375ml : 4 mg/ml potassium ferricyanide) を入れ、490nm で吸光度を測定する。測定値から検量線を引き、NTE 活性を求めた。

### Ⅲ. 結果と考察

#### 1. 各種実験動物の NTE 活性

有機リン曝露に対する *PNPLA6* 遺伝子の機能を明確にする為には、NTE 活性を定量することが重要である。しかし、ヒト血中の NTE 活性を測定することでさえ、酵素の安定性や活性測定方法が基本的に多くのエステラーゼが体内に存在する中で、Paraoxon 耐性で Mipafox 感受性のエステラーゼ活性を NTE 活性として評価する間接的な方法を利用せざるを得ない点で比較的困難である。そこで、各種実験動物の NTE 活性を定量して、生物種間での NTE 活性の違いを比較検討した (図2)。その結果、マウスやラット等に対して、ニワトリは、NTE 活性が著しく高い事が判明した。また、鶏卵は、有機リンの曝露を定量的に行なうことが可能で、Lysolecithin が卵黄に多い点で活性がやはり高いことが予想され、NTE 活性レベルを容易に測定することができる。そこで、対象とする実験動物をニワトリに選定し、鶏卵を用いて、有機リンの曝露

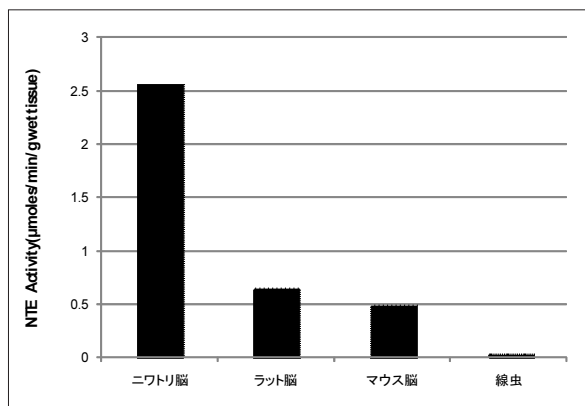


図2 異なる動物種における NTE 活性

に対する NTE 活性を測定する実験を行った。

#### 2. 発生期におけるニワトリの脳重量と NTE 活性の関係

ニワトリ胚は、発生期2日目ないし3日目より脳が形成されて、以降出生期にかけて脳重量が増加していく。一方、NTE 活性は、発生期6日目以降より脳重量とほぼ比例して急速に酵素活性が増加する (図3)。NTE 活性が脳の発生とともに飛躍的に増大することを利用して、発生期14日目に有機リンを定量的に投与して、有機リン曝露が神経発生に与える影響を解析した。

#### 3. NTE 活性に影響を及ぼす有機リン濃度

有精鶏卵の発生期14日胚に対して、様々な濃度の有機リン (DDVP) を鶏卵に投与した後、発生期15日胚の脳を採取して NTE 活性を定量した (図4)。その結果、正常発生の NTE 活性と比較して、25mg/kg DDVP では約 1/2、50mg/kg DDVP では約 1/3 へと NTE 活性は低下した。形態に見た目の変化はなかった。

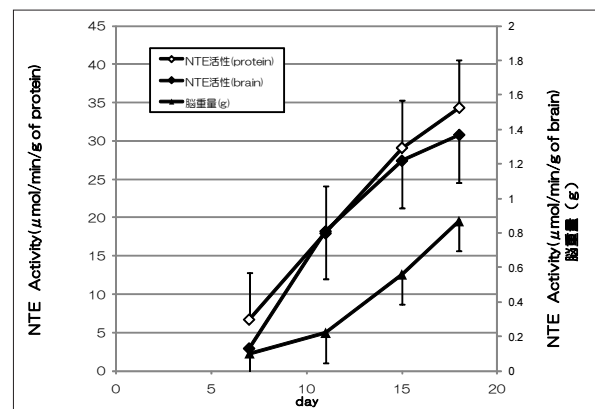


図3 鶏卵発生における脳重量と NTE 活性の増加

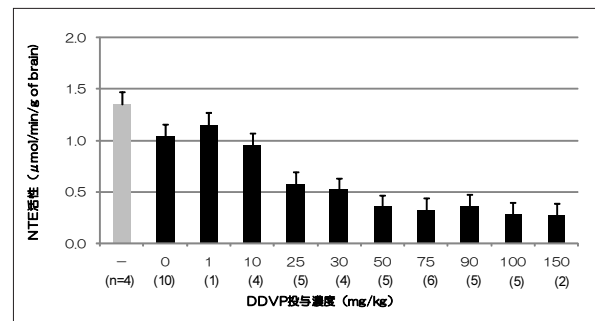


図4 DDVP 投与による脳内 NTE 活性の低下

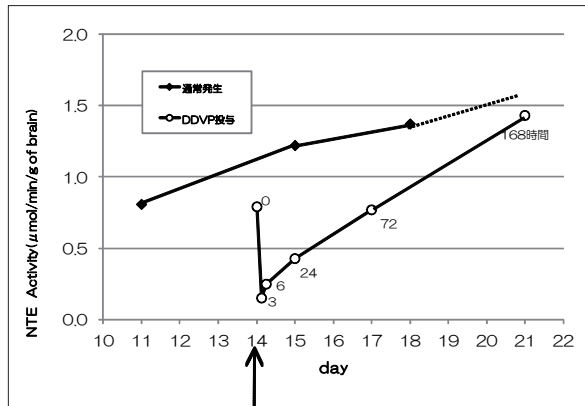


図5 DDVP投与後の脳内NTE活性の経時的変化(1)

(図中の数字DDVP投与(↑)からの経過時間を示す。別に求めた通常発生でのNTE活性グラフも示す)

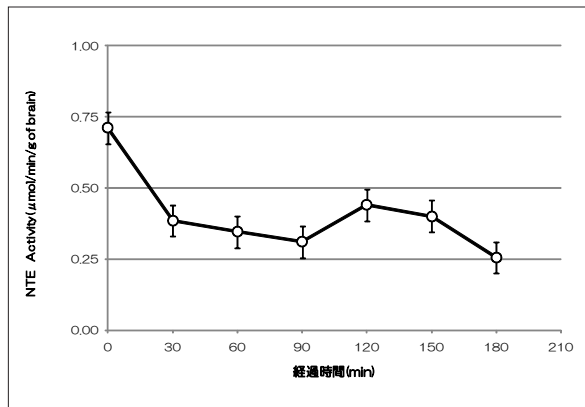


図6 DDVP投与後の脳内NTE活性の経時的変化(2)

#### 4. DDVP投与後の経時的なNTE活性変化

上の実験で重篤なNTE活性の減少を引き起こすと判定された、50mg/kg濃度のDDVPを用いて、投与以降の経時的なNTE活性を詳細に定量した(図5)。DDVP投与3時間後には、非常に大きく酵素活性低下が認められた。さらにこの影響は、DDVP投与6時間後まで続き、以降は経時的に阻害の程度が緩和されていった。最終的に、発生期21日胚の脳では、正常発生18日目胚のNTE活性とほぼ同程度まで回復した。

#### 5. DDVP投与後3時間までのNTE活性変化

DDVP投与3時間後には、酵素活性低下を認めたことから、投与以降30分毎のNTE活性変化

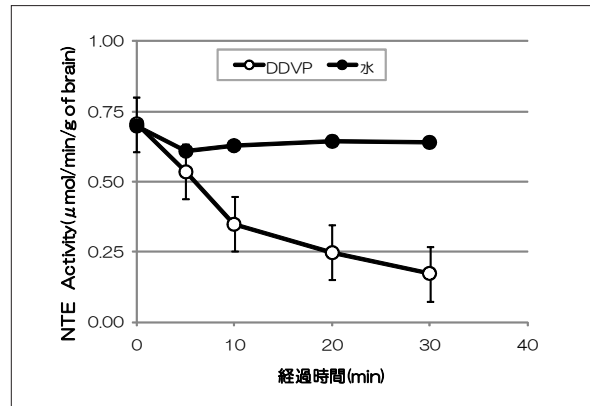


図7 DDVP投与後の脳内NTE活性の経時的変化(3)

を解析した(図6)。

その結果、NTE活性の低下は、この条件では、DDVP投与後30分ですでに影響が現れ、3時間後までは持続するように見受けられた。さらに、DDVP投与の影響は、非常に短時間で効果をもたらすことも分かり、DDVP投与30分後には約1/2へとNTE活性は低下した。

#### 6. DDVP投与後30分までのNTE活性変化

DDVP投与は、極めて短時間の間にNTE活性を低下させる効果が分かったことから、投与以降から分単位のNTE活性変化を解析した(図7)。DDVPは、投与後すぐに効果を示し、NTE活性の低下を引き起こした。また、その低下は経時的投与後30分以降まで持続することが明らかになった。

#### 7. 有機リン曝露による発生期鶏胚の組織学的異常

これまでの解析結果で示したように、DDVPは、投与後速やかにNTE活性に影響をもたらし、大きく酵素活性が低下することが判明した。本実験系に使用したニワトリ胚は、マウスやラット等の実験動物と比較して、著しくNTE活性が高く、有機リン曝露が発生過程の脳や神経細胞にどのような影響を与えるのかを解明する為有効な系であるといえる。

驚いたことに、今回DDVPを投与したニワトリ胚は、50mg/kgの投与群では58個体中56個(97%)が、また0.5mg/kg-150mg/kgの範囲で109個体中107個体(99%)の胚において脳硬膜下出血を認めた(図8)。低濃度でも全例に出

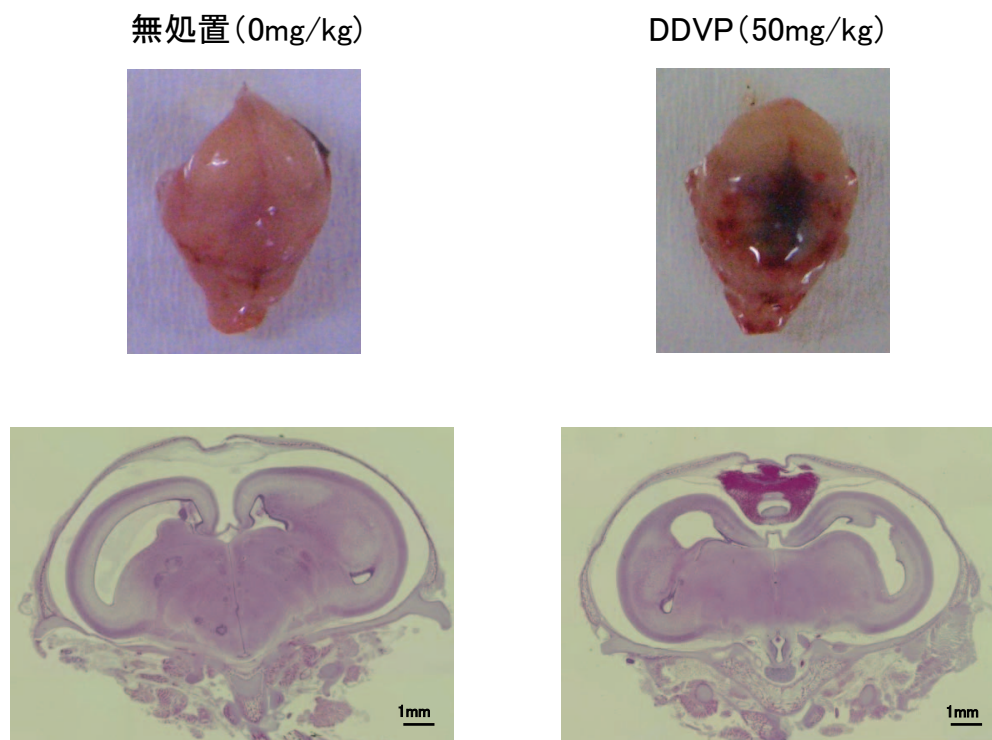


図8 DDVP投与による発生期ニワトリ胚の組織学的異常

血があったことは特筆に値すると思われる。有機リン中毒者に消化管出血の例が報告されていることと考え合わせると、鶏胚の場合、DDVPが中枢神経系の血管に障害をもたらし、結果として脳と硬膜の間に出血をもたらしたと考えたとしてもあながち荒唐無稽なことではない。すなわち、有機リン曝露が、NTE活性の低下をもたらすだけでなく、実際に中枢神経系の血管障害を引き起こす可能性を示したことから、ニワトリ胚を用いた解析は、感受性の高い有効な解析系であるといえる。

今後は、この出血の原因を明らかにするとともに、これら基礎データを元にして、シックハウス症候群の患者を診断する為の解析系を樹立することを目標としたい。さらに、有機リン曝露が発症の原因と推察される患者に対して、NTE活性の日内変動と有機リン曝露との因果関係等を解明して、慢性有機リン中毒等との比較に注意しつつシックハウス症候群に対する予防と治療を進展させたいと考えている。

#### 謝辞

本研究は平成21-22年度厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)(相澤好治班長)および平成23年度東海大学連合後援会の研究助成を受けて行われたものである。また、著者の大久保以外にも東海大学伊勢原研究推進部教育・研究支援センターの方々には大変お世話になった。ここに謝意を表する。

#### 文献

- 1) 許容濃度の暫定値の提案理由(2010年度)トリクロロホン 産業衛生誌52巻、2010
- 2) 有害性評価書 DDVP <http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000001iz7t-att/2r9852000001izh3.pdf> (2011.8.1)
- 3) Paul Glynn: Neuropathy target esterase. *Biochem J* 344: 625-631, 1999
- 4) Ping-An Chang, Quan Sun, et al.: Molecular cloning and expression analysis of cDNA ends of chicken neuropathy target esterase. *Chem Biol Interact* 172: 54-62, 2008

- 5) Yong Li, David Dinsdale, et al.: Protein Domains, Catalytic Activity, and Subcellular Distribution of Neuropathy Target Esterase in Mammalian Cells. *J Biol Chem* Vol.278, No.10: pp8820-8825, 2003
- 6) Michael J. Lush, Yong LI, et al.: Neuropathy target esterase and a homologous *Drosophila* neurodegeneration-associated mutant protein contain a novel domain conserved from bacteria to man. *Biochem J* 332: 1-4, 1998
- 7) Petra C. Kienesberger, Achim Lass, et al.: Identification of an Insulin-regulated Lysophospholipase with Homology to Neuropathy Target Esterase. *J Biol Chem* Vol.283, No.9: pp5908-5917, 2008
- 8) John E.Casida, Daniel K.Nomura: Organophosphate-sensitive lipases modulate brain lysophospholipids, ether lipids and endocannabinoids. *Chem Biol Interact*, 2008
- 9) Gary B.Quistad, Carrolee Barlow, et al.: Evidence that mouse brain neuropathy target esterase is a lysophospholipase. *PNAS* Vol.100 No.13: 7983-7987, 2003
- 10) Martin Enserink: Gulf War Illness: The Battle Continues. *SCIENCE* Vol.291, 2001
- 11) Christopher J.Winrow, Matthew L. Hemming, et al.: Loss of neuropathy target esterase in mice links organophosphate exposure to hyperactivity. *Nat Genet* vol. 33 april, 2003
- 12) Moser M, Li Y, et al.: Placental failure and impaired vasculogenesis result in embryonic lethality for neuropathy target esterase-deficient mice. *Mol Cell Biol* Vol.24 No.4:1667-1679,2004
- 13) Paul Glynn: NTE:one target protein for different toxic syndromes with distinct mechanisms? *BioEssays* 25.8: P.742-745
- 14) Katerina Akassoglou, Brian Malester, et al.: Brain-specific deletion of neuropathy target esterase/swisscheese results in neurodegeneration. *PNAS* Vol.101 No.14: 5075-5080, 2004
- 15) Shirley Rainier, Melanie Bui, et al.: Neuropathy Target Esterase Gene Mutations Cause Motor Neuron Disease. *Am J Hum Genet* 82: 780-785, 2008
- 16) Ping-An Chang, Yi-Jun Wu: Motor-neuron-diseases and neurotoxic substances: A possible link? *Chem Biol Interact* 180: 127-130, 2009
- 17) Shirley Rainier, James W. Alberts, et al.: Motor Neuron Disease due to Neuropathy Target Esterase Gene Mutation: Clinical Features of the Index Families. *Muscle and Nerve* 43: 19-25, 2011
- 18) Nichole d. Hein, Shirley Rainier, et al.: Motor neuron disease due to neuropathy target esterase gene mutation: Enzyme analysis of fibroblasts from human subjects yields insights into pathogenesis. *Toxicology Letters* 199: 1-5, 2010
- 19) Nichole d. Hein, Jeanne A. Stuckey, et al.: Constructs of human neuropathy target esterase catalytic domain containing mutations related to motor neuron disease have altered enzymatic properties. *Toxicology Letters* 196: 67-73, 2010
- 20) Kayyali US, Moore TB, et al.: Neurotoxic esterase (NTE) assay: optimized conditions based on detergent-induced shifts in the phenol/4-aminoantipyrine chromophore spectrum. *J Anal Toxicol*. Mar-Apr; 15(2): 86-9, 1991
- 21) Jane Atkins and Paul Glynn: Membrane Association of and Critical Residues in the Catalytic Domain of Human Neuropathy Target Esterase. *J Biol Chem* Vol.275 No.32: pp.24477-24483, 2000