

家畜の血清Cholinesteraseに関する臨床学的研究

XI. 実験的症例における血清Cholinesterase (S-ChE) 総活性値とS-ChE isoenzyme分画の動態

森園 充・岩月妙子・阿久沢正夫

(家畜内科学研究室)

平成2年8月9日 受理

Clinical Studies on Serum Cholinesterase in Domestic Animals

XI. Studies on the change in the serum total activity and fraction of isoenzyme in Cholinesterase occasioned by drug administration and surgical operation

Mitsuru MORIZONO, Taeko IWATSUKI, Masao AKUZAWA

(Laboratory of Veterinary Medicine)

獣医領域におけるS-ChEの臨床的意義については低毒性有機磷酸剤の連続投与時に中毒症状を示し、総活性値が低活性を示す¹⁾以外に他の疾患との明確な関係を示す報告がないことから、著者らは前報^{2,3)}において、家畜のS-ChE活性値と肝機能との関係を、健康なイヌ、ウマ、ウシ、ブタのS-ChEと血清アルブミンとの関連性、CCl₄投与による肝臓障害犬並びに肝障害を主徴とするイヌの臨床症例について検討し、肝機能とS-ChE総活性及びS-ChE isoenzyme分画活性値との関係を明らかにした。

そこで、本報においては動物用医薬品として使用されている低毒性有機磷酸剤の経口投与による影響をウマ、イヌで検討し、ついで、胆管結紮による実験的閉塞性黄疸とS-ChEとの関係を検討した。さらに、イヌの脾臓ではChEが特異的に著しい高活性を示し⁴⁾、isoenzyme分画数も他の臓器に比較して最も多く検出され⁵⁾、S-ChEと脾機能との関連性が示唆されたことから、実験的に発症させた真性糖尿病犬及び脾臓摘出犬におけるS-ChE活性値とS-ChE isoenzyme分画活性値の変動を調べ、脾機能との関連性を検討した。

材料及び方法

1. 実験動物

実験に使用した畜種はイヌ、ウマの2種で、イヌは鹿児島市保健所で捕獲された野犬で年齢は1~9才の範囲で、体重は10~15kgの範囲のもの24頭を使用し、ウマは鹿児島大学家畜病院で飼育されている

サラブレッド種、♀1頭（体重377kg）を使用した。各個体はいずれも臨床的に健康と思われるものである。

2. 使用薬剤と投与法

実験症例における低毒性有機磷酸剤（Neguvon: O,O-dimethyl 2, 2, 2-trichloro-1-hydroxyethyl-phosphonate, Cythioate: O,O-dimethyl O-p-sulfamoylphenylphosphorothioate）及びAlloxanの薬剤別投与量、投与方法はTable 1に示す。

Table 1. Doses and routes of administration in drugs used in the study.

| Drug | No. | Dose | Route |
|-----------|---------|-----------|-----------------------|
| Neguvon | Horse 1 | 100mg/kg | Oral administration |
| Cythioate | Dog 1,2 | 3mg/kg | Oral administration |
| | 3,4 | 6mg/kg | |
| | 5-7 | 15mg/kg | |
| | 8 | 12.6mg/kg | |
| Alloxan | Dog 1-5 | 100mg/kg | Intravenous injection |
| | 6 | 200mg/kg | |
| | 7 | 300mg/kg | |

3. 外科的処置による実験法

手術はバルビツール酸系の麻酔下開腹手術により実施した。

胆管結紮実験では4頭のイヌを使用して胆管切斷を行い、断端は結紮を施した。

脾臓摘出実験には5頭のイヌを使用し、いずれも鈍性分離により脾臓を摘出した。

4. 採血及び血清分離

ウマは頸静脈より、イヌでは大多数頸静脈、一部

前腕正中皮靜脈より採血した。

採血はNeguvon投与実験では、投与前と投与後1, 3, 6, 9, 12, 24時間、以後24日までは毎日1回で、32日までは1日おきに行ない、Cythioate投与実験では、投与前と、3, 6 mg/kg例では30分と8時間まで1時間おきに、15mg/kg例では3, 6, 9, 12, 24時間、以後7日まで毎日1回、連続投与では第1回投与後24時間で第2回投与を行ない、第2回投与後6時間、以後7日まで毎日1回採血を行なった。胆管結紮及びAlloxan投与と脾臓摘出実験では、術前と投与後6, 12, 18, 24時間、以後14日まで毎日1回採血を行い、脾臓摘出例では術後23日まで行なった。

血清分離は採血後、約1時間室温に放置し約3000 r.p.m.で10~15分間遠心分離して行った。血清は清浄な試験管に移し、密栓して、Freezer (-20°C) に保存した。

5. S-ChE総活性値の測定方法と測定器械

S-ChE総活性値の測定は著者⁶⁾らの方法で行い表現単位はIU(μM/ml/min/30°C)である。測定器械はヤマト科学のウォーターバスインキュベーターBT21、及び日立101型分光光度計である。

6. S-ChE isoenzymeの検出法と測定器械

polyacrylamideゲルを支持体とするdisc電気泳動法で血清蛋白の分離を行った。

泳動後ゲルを2等分し、1つをS-ChE isoenzyme染色に、他の1つを蛋白染色に供試した。

[A]. Disk電気泳動法

1). 試薬

polyacrylamideゲル作製用試薬及び電気泳動用緩衝液の調整は、Per Juul⁷⁾の方法に従った。

2). ゲル作製法

ゲル作製法は、Ornstein, Davisの原法に基づく中村⁸⁾の方法を一部修正して用いた。すなわち、試料ゲルについては、血清10μlを直接column内に注入し、試料ゲル溶液を加え、columnを静かに転倒して混合した。

3). 通電

電気泳動槽はエムエス器械KKのものを、定電圧、定電流装置は東洋製作所のものを使用した。通電条件はcolumn 1本あたり3mAの定電流で行った。泳動時間は1.5~2時間とした。

4). ゲル切開法

ゲルの縦割2分は著者⁹⁾らの方法に従った。

[B]. ゲルの蛋白染色法

a) 試薬

(1) 脱色液：7%酢酸液

(2) 染色液：0.5 Aniline blue溶液(7%酢酸で溶解したもの)

b) 操作

切開したゲルの一片を、染色液で1時間染色し、染色後、脱色液中に入れ、余分の色素を洗い出す。蛋白分画のみが鮮明になるまで脱色液を取りかえる。脱色を完了したゲルは7%酢酸液(脱色液)中に保存した。

[C]. ゲルのS-ChE isoenzyme染色法

S-ChE isoenzyme染色は、Per Juul⁷⁾の変法に従ったが、基質については濃度5×10⁻³M/lのpropionyl thiocholine iodide(PTC)を使用し²⁵⁾、incubation時間は1.5時間で行なった。以下の操作は原法通りである。

[D]. デンシトメトリー

蛋白染色及びS-ChE isoenzyme染色を行ったゲルはdensitometerにより各分画の濃度を記録した。本実験に使用したdensitometerは、明日香工業製のOZUMOR-82型自記濃度計である。測定時の条件はslit幅0.2mm, slitの長さは4mm, filterはNo.61(610nm), 試料送り速度は40mm/minである。測定するゲルは7%酢酸溶液を満たした液槽に入れ、染色されない透明なゲルの部分をblankとして測定を行なった。

densitometry後、各分画の濃度とパターンが記録されている記録紙より、S-ChEの各isoenzyme分画の活性比と易動度を計算した。活性比は総濃度に対する百分率で求め、さらに活性値に換算した。易動度はalbuminの易動度を100とした時の各isoenzyme分画の相対易動度で示した。そして各isoenzyme分画は易動度の大きい順にC₁, C₂, C₃と命名した。

実験成績

1. Neguvon投与実験

一般臨床所見：ウマは投与後1時間20分頃に横臥し、肛門弛緩、軟便排出などの症状が見られた。3時間では体表の刺繍の死亡が観察され、食欲消失。12時間後で起立し、食欲は回復した。横臥中の呼吸数は減少したが、体温脈拍には異常なく、食欲の回復状態は投与前よりもかえって旺盛となった。

S-ChE総活性値の変化は、Fig. 1, 2に示す。投与直後から活性値の低下がみられ6時間後最低活性となり、96.7%の阻害率が見られた。以後徐々に回復するが、32日後もまだ完全に投与前の値に回復して

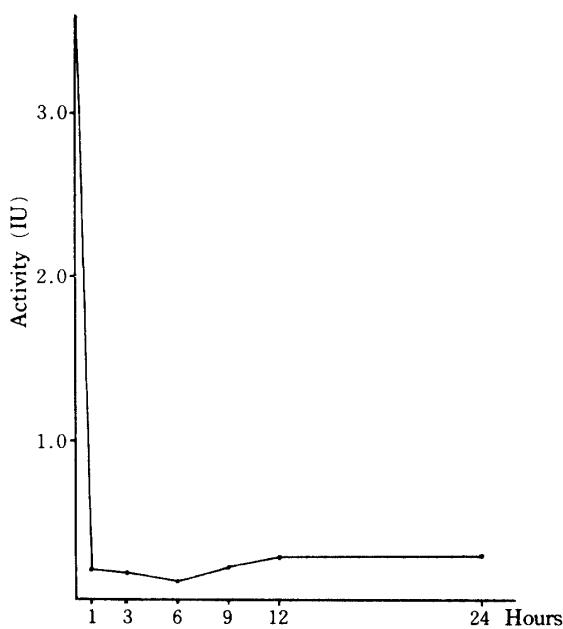


Fig. 1 Change in the total activity of serum cholinesterase after the peroral administration of Neguvon (100mg/kg) in a horse.

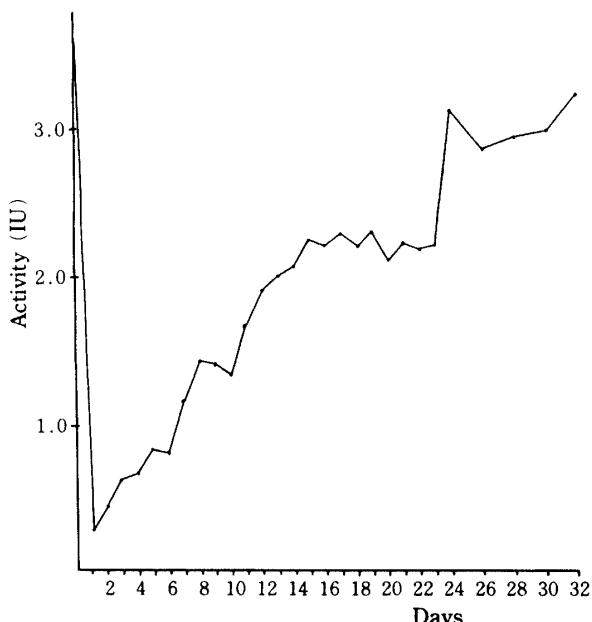


Fig. 2 Change in the total activity of serum cholinesterase after the peroral administration of Neguvon (100mg/kg) in a horse.

いない。

使用したウマのChE isoenzymeの正常ザイモグラムはC₂分画を欠除するTypeIII²⁴⁾に属する。

Neguvon投与によるisoenzyme patternの日内変化はFig. 3に示す。各分画とも総活性値の低下に伴って、分画活性は低下するが、bandの消失したものは見られなかった。C₃, C₄, C₅, C_{6,7}分画は3時間で最

低活性値を示し、C₁分画は総活性値と同じ6時間後に最低となった。また易動度の大きい分画の方が阻害され易い傾向を示した。

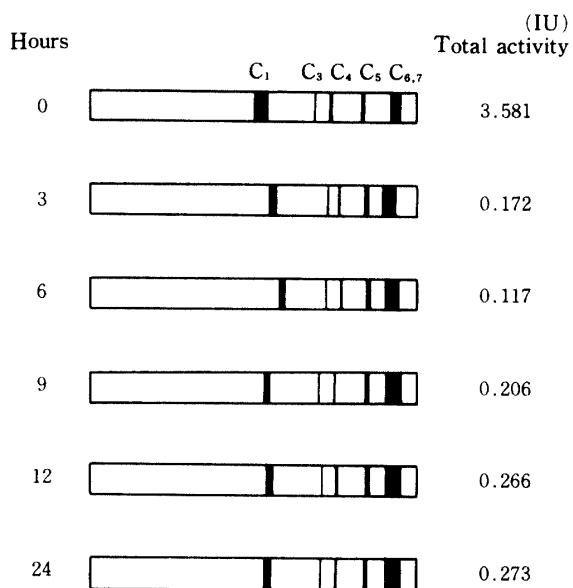


Fig. 3 Change in isoenzyme patterns of serum cholinesterase after the peroral administration of Neguvon (100mg/kg) in a horse.

isoenzyme各分画活性値の経日変化は、Fig. 4に示す。活性値の回復の速さは各分画で異なっており、C₄, C₅分画は24日目、C₃分画は30日目で回復した。C_{6,7}分画は26日目7.6%の阻害率まで回復するが、再び減少して32日目より回復の傾向を示すが、投与前より0.21IUの低下が見られる。C₁分画の回復速度は各分画の中で最も遅かった。

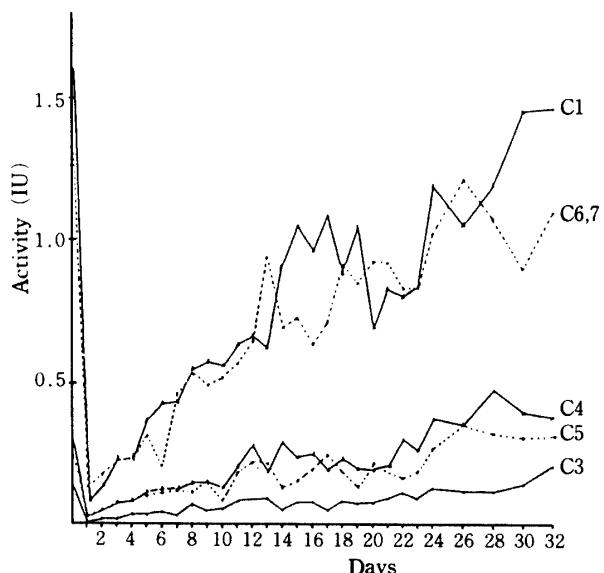


Fig. 4 Change of the isoenzyme activity in serum cholinesterase after the peroral administration of Neguvon (100mg/kg) in a horse.

2. Cythioate投与実験

全例のイヌにおいて流涎、嘔吐などの一般臨床症状の変化は観察されなかった。

S-ChE総活性値の変化はFig. 5～8に示す。

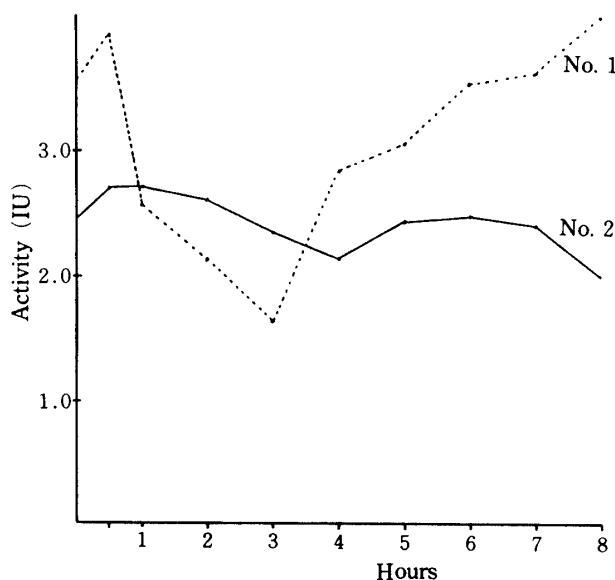


Fig. 5 Change in the total activity of serum cholinesterase after the peroral administration of Cythioate (3mg/kg) in two dogs.

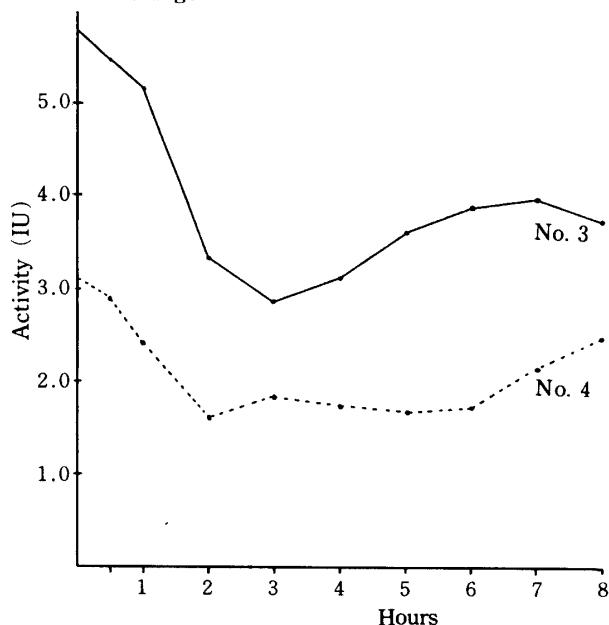


Fig. 6 Change in the total activity of serum cholinesterase after the peroral administration of Cythioate (6mg/kg) in two dogs.

3 mg/kg投与例では、3時間で54%阻害された例 (No. 1) と4時間で13.3%阻害された例 (No. 2) があつたが、両者とも6時間で総活性値は回復した。

6 mg/kg投与例では、2時間で47.6%阻害された例 (No. 4) と、3時間で50.5%阻害された例 (No.

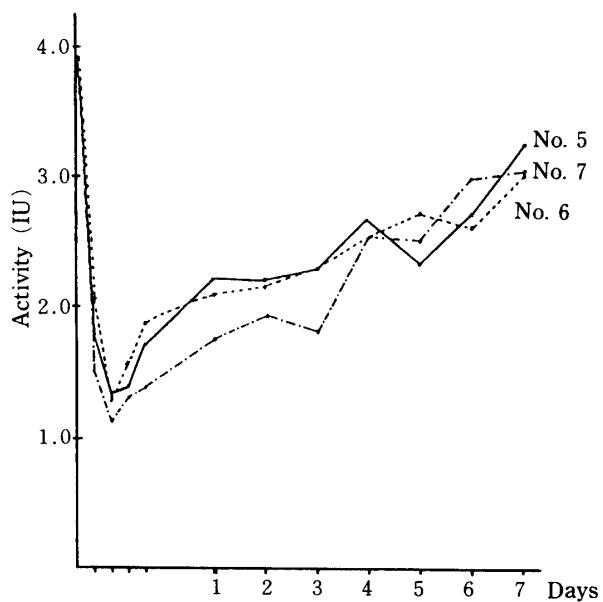


Fig. 7 Change in the total activity of serum cholinesterase after the peroral administration of Cythioate (15mg/kg) in three dogs.

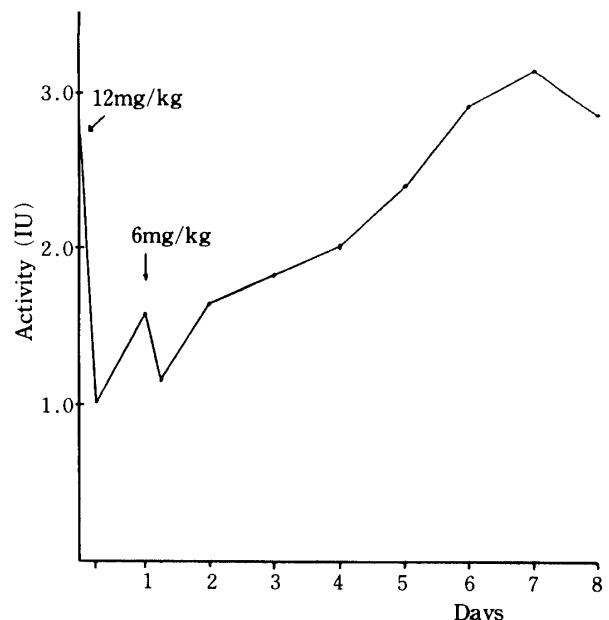


Fig. 8 Change in the total activity of serum cholinesterase after the peroral administration of Cythioate (12mg/kg and 6mg/kg) in a dog (No. 8).

3) があつたが、両者とも8時間ではまだ回復していない。

15mg/kg投与例 (No. 5, 6, 7) では、いずれも投与後総活性値の急激な低下が見られ、6時間で最低活性値を示し、阻害率は65.5～70%であった。また7日後ではまだ回復していない。

連続投与例 (No. 8) では、第1回投与 (12mg/kg) 後6時間で63%阻害され、24時間で42.5%の阻害率まで回復し、第2回投与 (6 mg/kg) 後6時間で57.7%

阻害され 6 日後活性は完全に回復した。

S-ChE isoenzyme の変化については $15\text{mg}/\text{kg}$ 投与例と連続投与例 ($12\text{mg}/\text{kg}$ と翌日 $6\text{mg}/\text{kg}$) で行い、その成績は Fig. 9 ~ 12 に示す。

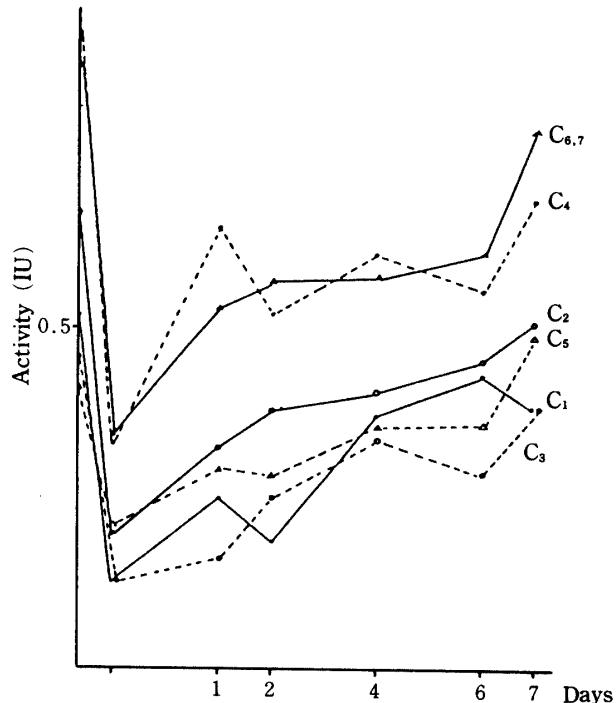


Fig. 9 Change of the isoenzyme activity in serum cholinesterase after the peroral administration of Cythioate (15mg/kg) in a dog (No. 5).

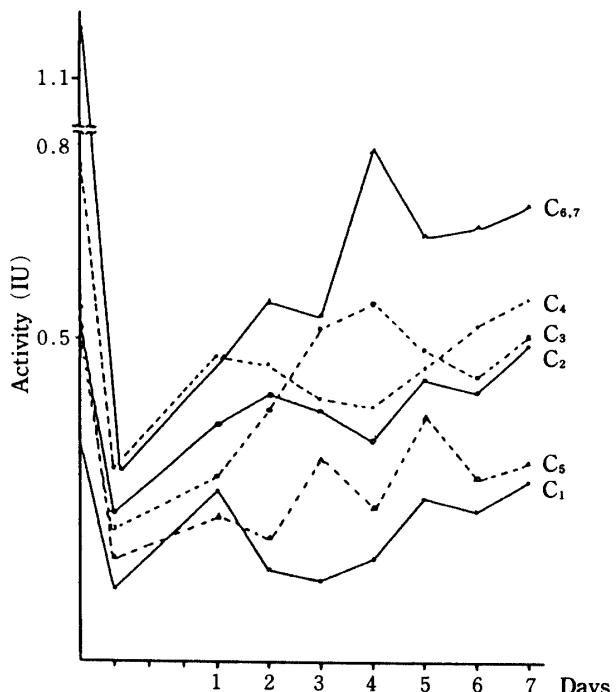


Fig. 10 Change of the isoenzyme activity in serum cholinesterase after the peroral administration of Cythioate (15mg/kg) in a dog (No. 6).

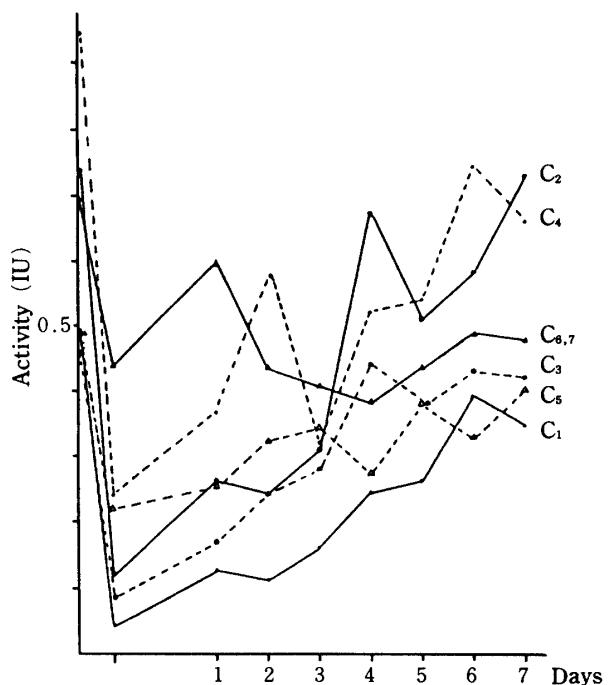


Fig. 11 Change in the isoenzyme activity of serum cholinesterase after the peroral administration of Cythioate (15mg/kg) in a dog (No. 7).

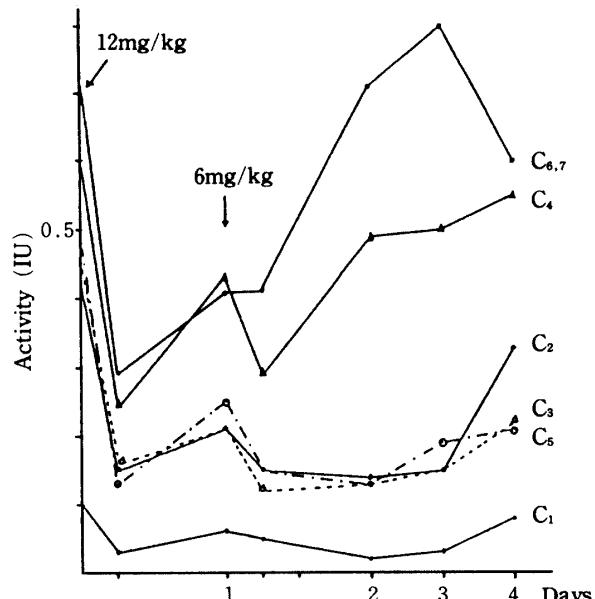


Fig. 12 Change in the isoenzyme activity of serum cholinesterase after the peroral administration of Cythioate (12mg/kg and 6 mg/kg) in a dog (No. 8).

$15\text{mg}/\text{kg}$ 投与例 (No. 5 ~ 7) では、No. 7 の C_{6,7} 分画以外は、全例において 6 時間で各分画とも最大の阻害率を示し、易動度の大きい方が阻害されやすい結果になった。回復の速度は C₃ > C₂ > C₅ > C₁ > C₄ > C_{6,7} 分画の順位が見られた。

連続投与例 (No. 8) では、第 1 回投与時における阻害率の大きさは C₅ > C₁ > C₂ > C₃ > C₄ > C_{6,7} 分画の順

位を示したが、第2回投与では $C_3 > C_5 > C_2 > C_4 > C_1$ 分画の順位で、第1回と第2回とでは阻害率に順位に変動を来たした。回復の速度は $C_{6,7} > C_4 > C_2 > C_1 > C_3 > C_5$ 分画の順位が見られた。

3. 胆管結紮実験

一般臨床所見：No.1は8日目殺処分し、病理解剖に供した。No.4では7日目頃より腹膜炎を併発して、腹水貯留を認め、14日に病理解剖に供した。No.2, 3は16日に死亡した。いずれも実験開始2日目より顕著の黄疸を発し、4日目血中total bilirubinは4mg/dl程度に達している。また尿中のウロビリノーゲン（-）、ビリルビン（+++）を呈した。

S-ChE総活性値の変化はFig. 13に示す。

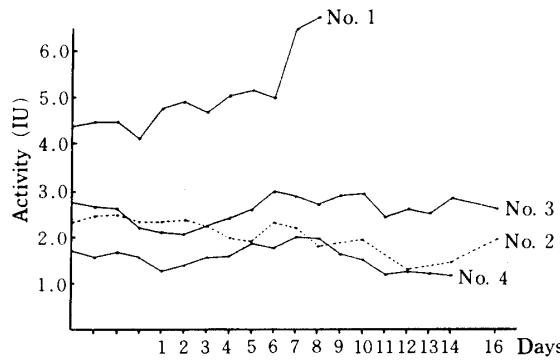


Fig. 13 Change in the total activity of serum cholinesterase after the experimental ligation of bile duct in dogs.

総活性値はNo.1では7日目より上昇しているが、No.2では漸減の傾向があり、No.3, 4では、術前の値を上下する変動を示した。

S-ChE isoenzyme活性値の変動はFig. 14～19に示す。

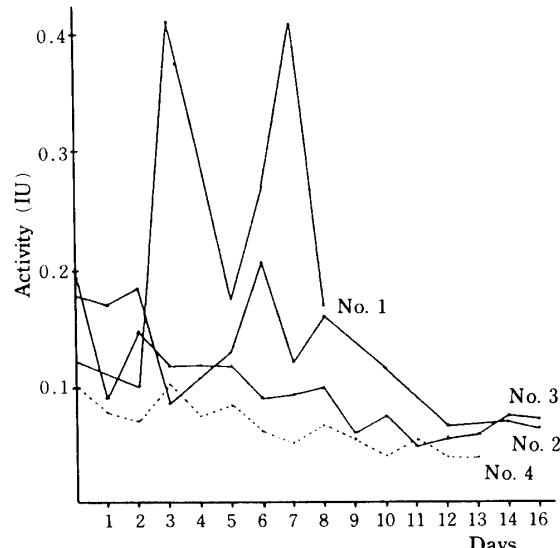


Fig. 14 Change in the activity of an isoenzyme fraction (C_1 band) in serum cholinesterase after the experimental ligation of bile duct in dogs.

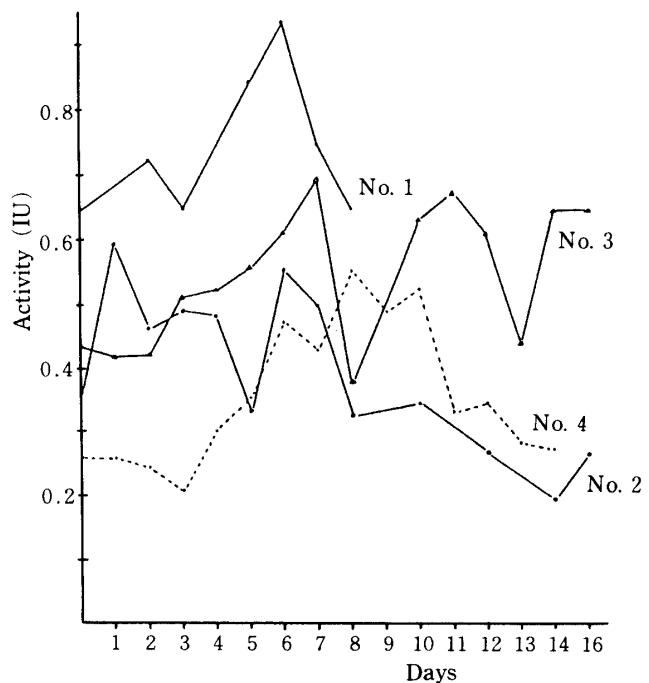


Fig. 15 Change in the activity of an isoenzyme fraction (C_2 band) in serum cholinesterase after the experimental ligation of bile duct in dogs.

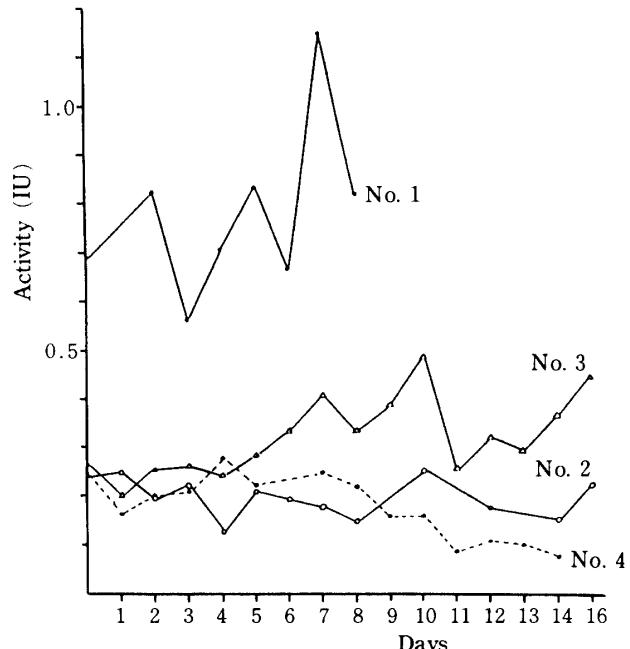


Fig. 16 Change in the activity of an isoenzyme fraction (C_3 band) in serum cholinesterase after the experimental ligation of bile duct in dogs.

総活性値の上昇したNo.1は各分画とも上昇の傾向にあり、特に C_1 分画の上昇は顕著であった。

No.2, 3, 4では C_1 分画はいずれも低活性を示し、 C_2 分画のみ全例、術前の1.5～2.2倍の上昇を示し C_3 分画はNo.3のみ1.9倍に上昇を示したが、No.2,

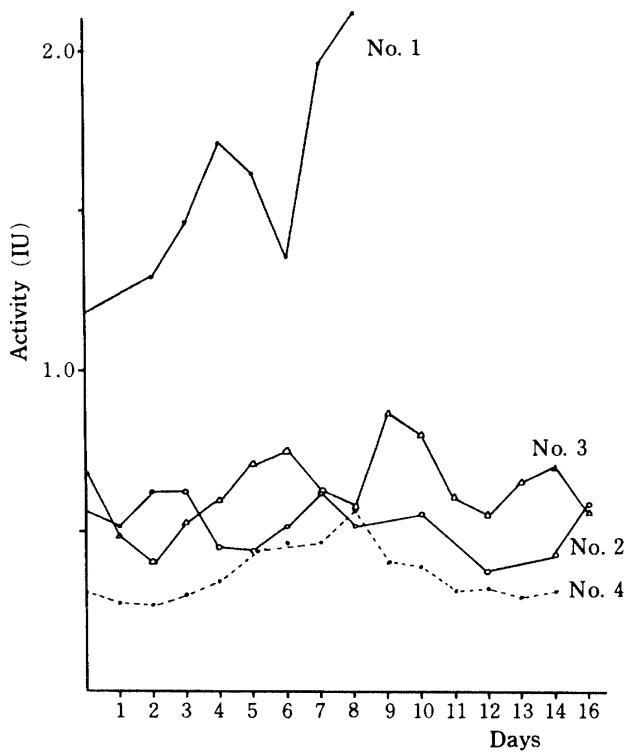


Fig. 17 Change in the activity of an isoenzyme fraction (C₄ band) in serum cholinesterase after the experimental ligation of bile duct in dogs.

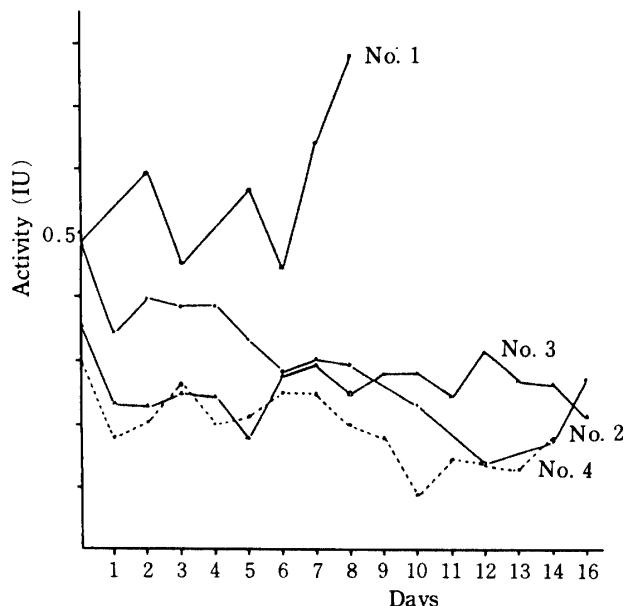


Fig. 18 Change in the activity of an isoenzyme fraction (C₅ band) in serum cholinesterase after the experimental ligation of bile duct in dogs.

4 では一過性にやや上昇したものの、低下の傾向を示し、C₄分画はNo. 3 のみ1.8倍に上昇したが、No. 2, 4 では術前の値を上下する変動を示し、C₅分画は低

下の傾向を示し、C_{6,7}分画は6日頃1.09～1.16倍に上昇するが、以後低下の傾向を示した。

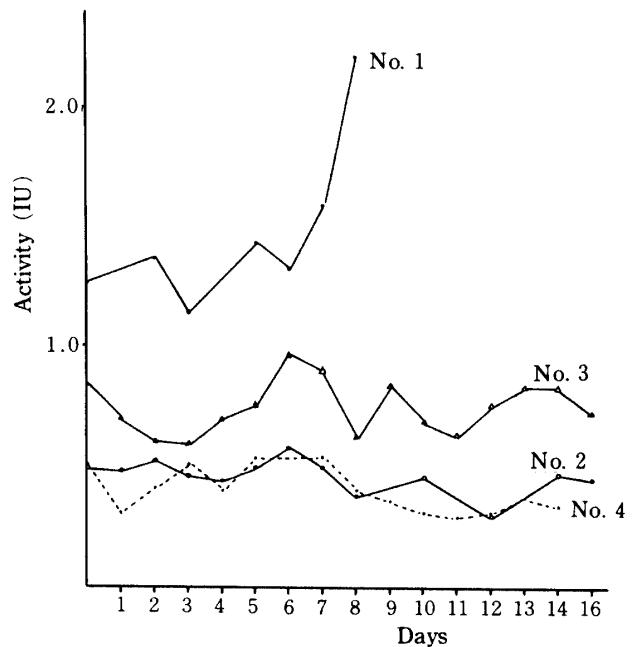


Fig. 19 Change in the activity of isoenzyme fractions (C₆ and C₇ band) in serum cholinesterase after the experimental ligation of bile duct in dogs.

S-ChEとGOT, GPT, ALP活性との関係はFig. 20～23に示した。

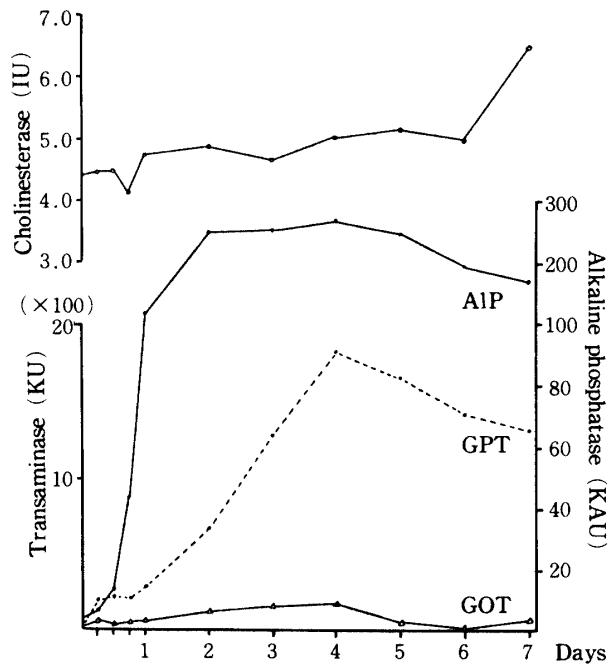


Fig. 20 Change in the activity of serum cholinesterase, serum transaminase (GOT, GPT) and serum alkaline phosphatase (ALP) after the experimental ligation of bile duct in a dog (No. 1).

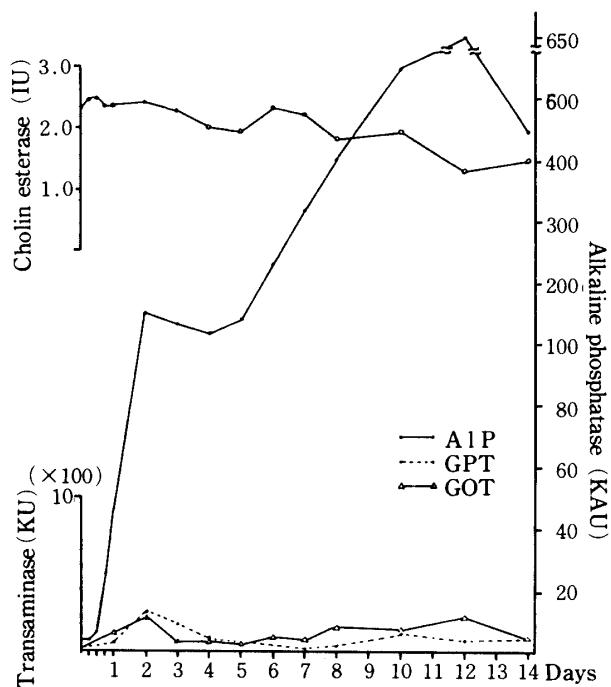


Fig. 21 Change in the activity of serum cholinesterase, serum transaminase (GOT, GPT) and serum alkaline phosphatase (AIP) after the experimental ligation of bile duct in a dog (No. 2).

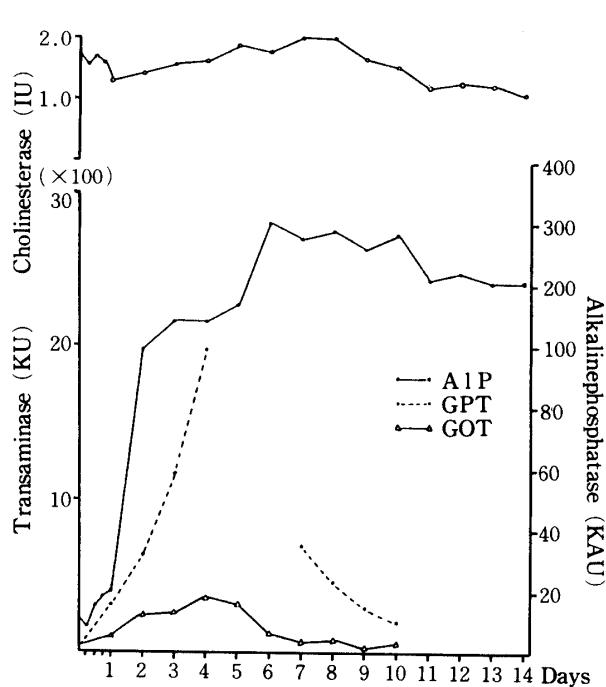


Fig. 23 Change in the activity of serum cholinesterase, serum transaminase (GOT, GPT) and serum alkaline phosphatase (AIP) after the experimental ligation of bile duct in a dog (No. 4).

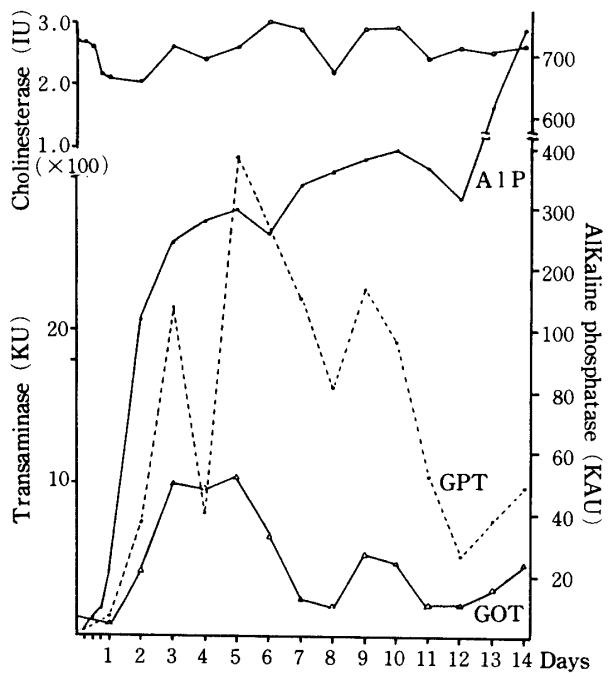


Fig. 22 Change in the activity of serum cholinesterase, serum transaminase (GOT, GPT) and serum alkaline phosphatase (AIP) after the experimental ligation of bile duct in a dog (No. 3).

CCl₄投与実験と比べて、GOT, GPTの上昇はそれほど著しくないが、AIPの顕著な上昇が見られる。

S-ChEとGOT, GPT, AIPとの間には相関は見られなかった。

4. Alloxan投与実験

一般臨床所見：100mg/kg投与のNo.1～No.3のイヌは元気であったが、食欲はやや衰え、No.3は7日目頃から軽い下痢がみられた。No.4は元気食欲なく、5日間生存した。No.5は18時間後まで状態は良好であったが、その後不安苦悶状態に陥り、流涎、意識・知覚消失、筋肉硬直などの症状を呈し、24時間後に死亡した。200mg/kg投与のNo.6は元気食欲がなく、10日間生存した。全例において多飲、瘦削が見られ、尿糖は強陽性を呈した。血糖は100mg/kg投与例では、投与後6時間で140～200mg/dl程度に上昇し、18～24時間では30～50mg/dl程度に一過性の下降を示した。その後250mg/dl以上を維持した。200mg/kg投与例では3時間で100mg/dlに上昇したが、低血糖が24時間まで続き、その後200mg/dlに上昇し、これを維持した。

300mg/kg投与例（No.7）は注射後10分頃から泡沫を吐き、20分程で死亡し、血液所見は得られなかつた。

S-ChE総活性値の変化はFig. 24(100mg/kg), Fig. 25 (200mg/kg)に示す。

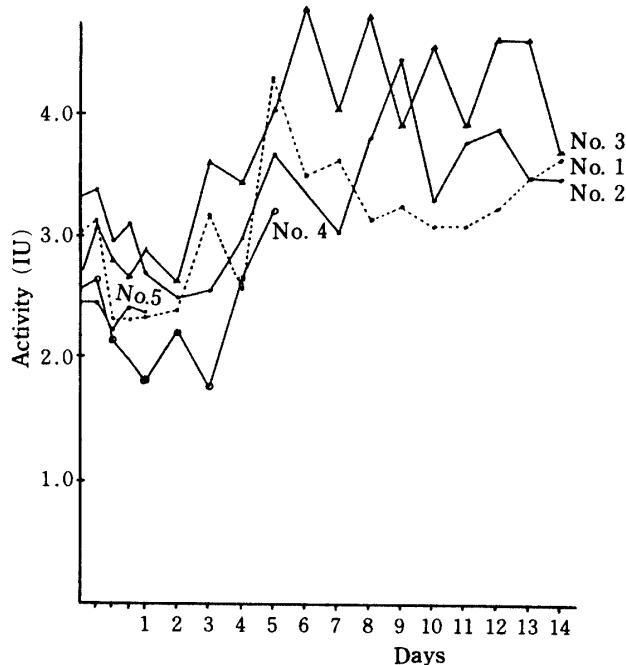


Fig. 24 Change in the total activity of serum cholinesterase after the intravenous administration of Alloxan (100mg/kg) in a dog (No. 1 - 5).

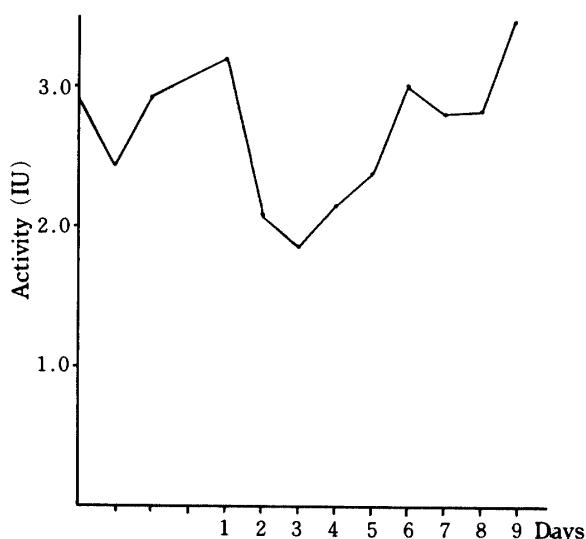


Fig. 25 Change in the total activity of serum cholinesterase after the intravenous administration of Alloxan (200mg/kg) in a dog (No. 6).

100mg/kg投与 (No. 1 ~ 5) の総活性値は24~48時間にかけて投与前の値より低下し、経過の悪いものほど、減少が大きく長く続いた。以後上昇して、5~6日目をpeakとして、投与前の1.4~1.9倍の範囲に上昇し、以後増減を繰り返すが、依然活性値はやや高いという所見が見られる。200mg/kg (No. 6) の総

活性値は2~5日目では投与前より低活性を示している。

S-ChE isoenzyme活性値の変動は100mg/kg投与例について行いFig.26~29に示す。

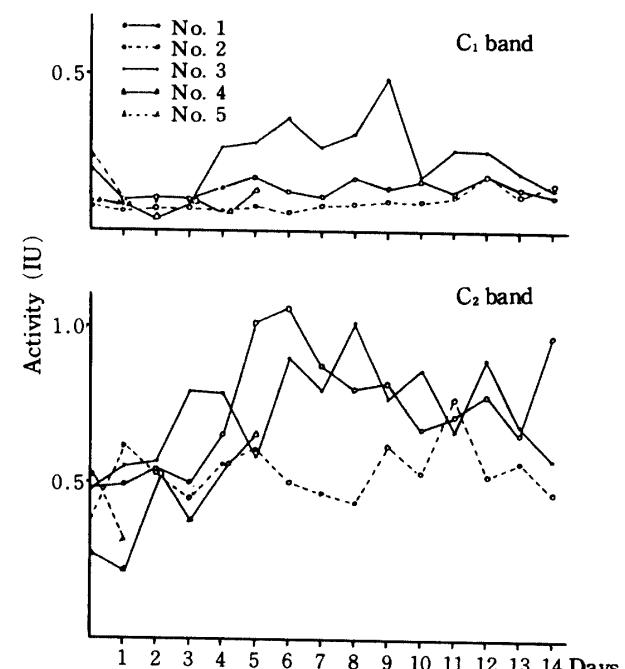


Fig. 26 Change in the activity of isoenzyme fractions (C₁ and C₂ band) in serum cholinesterase after the intravenous administration of Alloxan (100mg/kg) in 5 dogs.

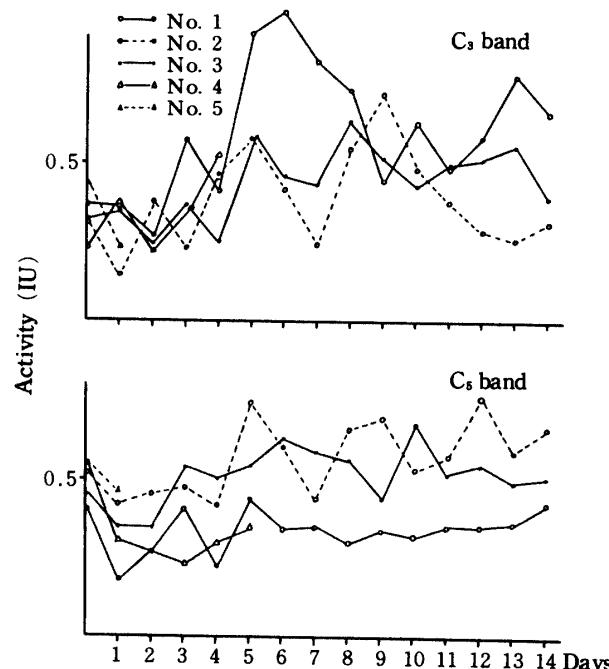


Fig. 27 Change in the activity of isoenzyme fractions (C₃ and C₅ band) in serum cholinesterase after the intravenous administration of Alloxan (100mg/kg) in 5 dogs.

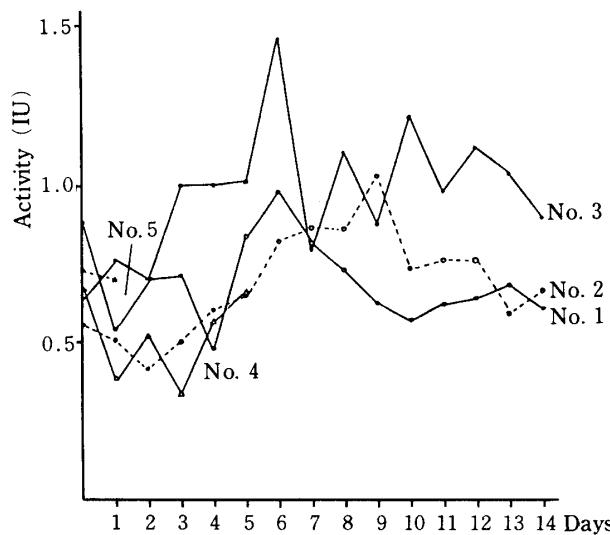


Fig. 28 Change in the activity of an isoenzyme fraction (C₄ band) in serum cholinesterase after the intravenous administration of Alloxan (100mg/kg) in 5 dogs.

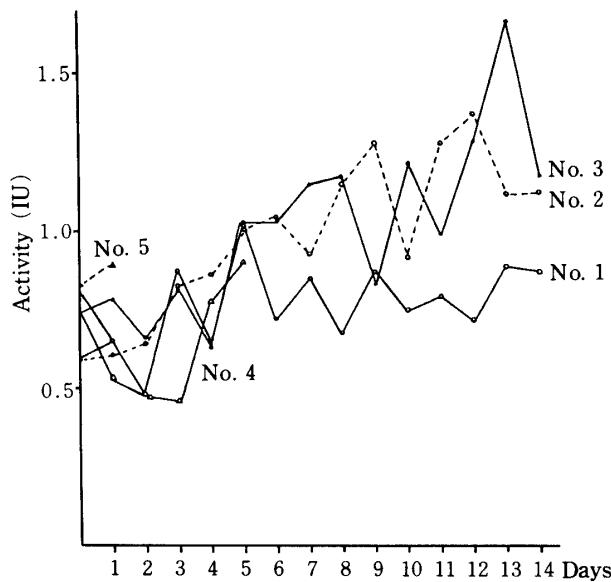


Fig. 29 Change in the activity of isoenzyme fractions (C₆ and C₇ band) in serum cholinesterase after the intravenous administration of Alloxan (100mg/kg) in 5 dogs.

No. 5 では C₁, C₂, C₃ 分画の著明な低下が見られた。他の 4 例 (No. 1 ~ 4) では、C₁ 分画は No. 2 を除くと上昇の傾向があり、No. 3 では、著明な上昇であった。C₂ 分画は全例において上昇の傾向があり、平均して 2.1 倍の上昇であった。C₃ 分画活性値は 1 ~ 2 日にわたり一過性に低下したのち上昇し、5 ~ 9 日の間に peak を示し、平均 2.3 倍の上昇を示した。C₄ 分画活性値は No. 2, 3 は平均 1.8 倍の上昇を示したが、No.

1, 4 は投与後低下の傾向にあった。C₅ 分画活性値は No. 2, 3 は平均 1.3 倍とやや上昇したが、No. 1, 4 では明らかに低下の傾向が見られた。C_{6,7} 分画活性値は投与後 2 ~ 4 日に一過性の減少を示すものもあるが、以後平均 2 倍の上昇がみられた。最終日 C₁, C₂, C₃, C_{6,7} 分画では投与前の分画活性値を上回る成績が見られる。

5. 脾臓摘出実験

一般臨床所見：No. 1 は 6 日間生存、No. 2 は 23 日後病理解剖に供し、No. 3 は 2 日間、No. 4 は 3 日間、No. 5 は 8 日間生存した。No. 2 は術後一週間は元気食欲消失し、その後食欲がやや出てきた。No. 1, 3, 4 は最初は食欲があったが、状態が急に悪化して早期に死亡した。No. 5 は元気食欲消失し状態が悪かった。全例において下痢、血便、消化不良などが見られ、No. 1, 2, 5 では瘦削が、著しく 2 ~ 3 日目より肝実質性の黄疸を生じ、特に No. 5 に顕著な黄疸が見られた。全例において血糖は 12 ~ 24 時間で 250mg/dl に達し、死亡時まで過血糖が観察され、24 時間後より尿糖の陽性 (+++) を確認した。

S-ChE 活性値の術後 24 時間内の変化は Fig. 30 に、また、経日変化は Fig. 31 に示す。

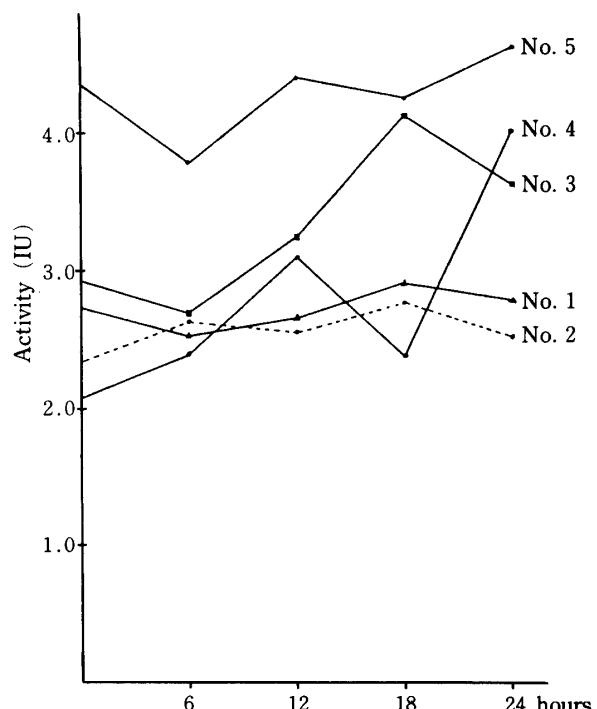


Fig. 30 Change in the total activity of serum cholinesterase after the experimental pancreatectomy in 5 dogs.

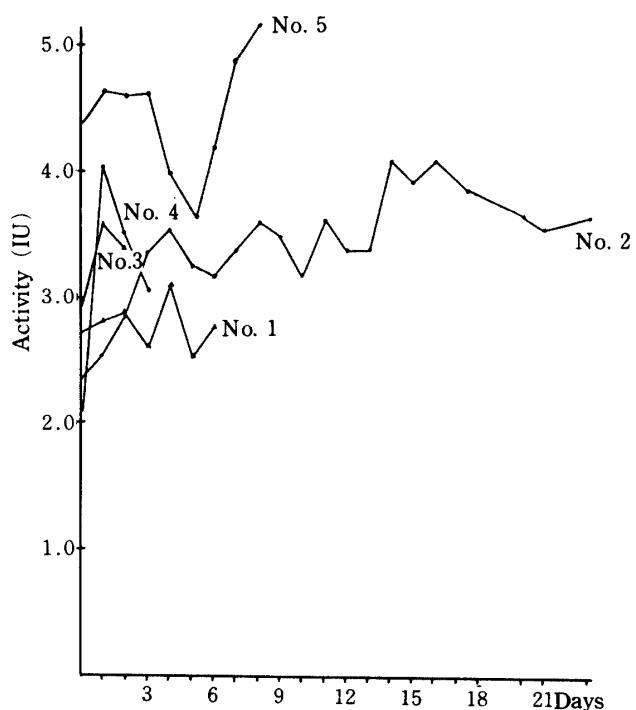


Fig. 31 Change in the total activity of serum cholinesterase after the experimental pancreatectomy in 5 dogs.

総活性値は早期死亡したNo.3, 4では、18~24時間に1.4~1.9倍と明らかな上昇が見られた。一週間前後生存したNo.1, 5では、それぞれ0.92~1.14, 0.83~1.18倍という術前の活性値を僅かに上下する範囲で変動し、顕著な増減は見られなかった。長く生存したNo.2では、活性値は上昇の傾向を示し、術前の1.5倍程度を示した。

GOT, GPT, AIP活性の変化はFig. 32, 33に示す。

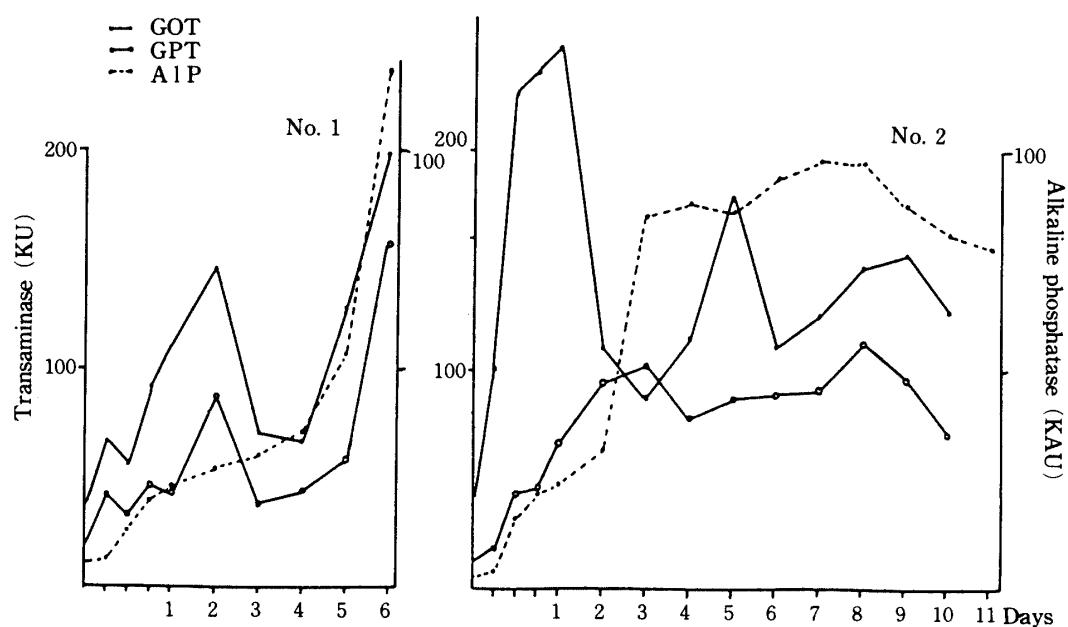


Fig. 32 Change in the activity of serum transaminase (GOT, GPT) and serum alkaline phosphatase (AIP) after the experimental pancreatectomy in dogs (No. 1 and 2).

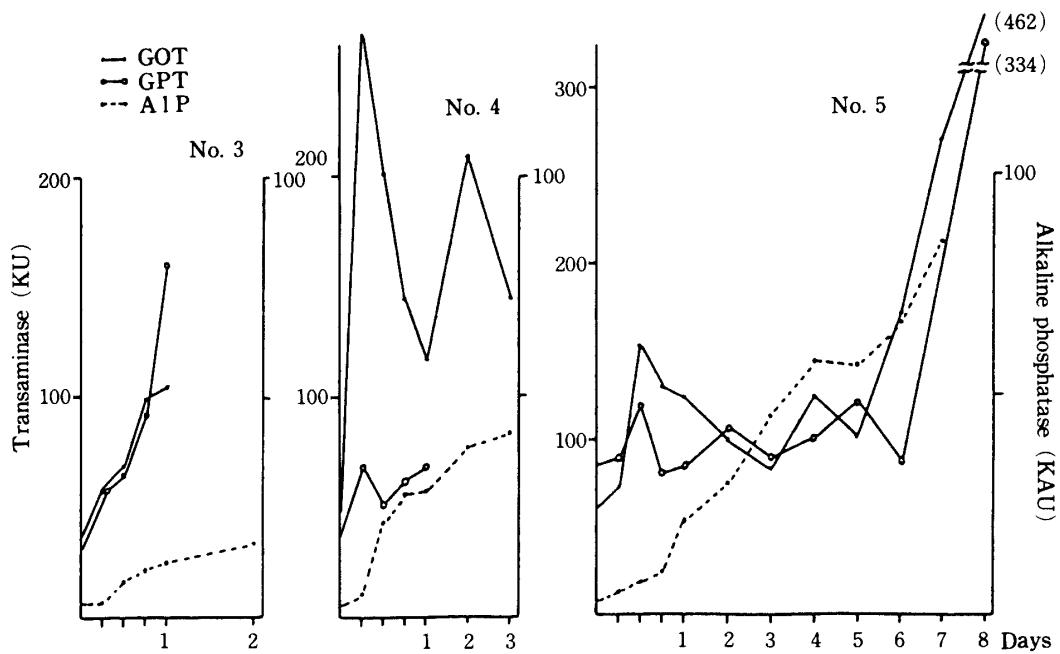


Fig. 33 Change in the activity of serum transaminase (GOT, GPT) and serum alkaline phosphatase (AIP) after the experimental pancreatectomy in dogs (No. 3 - 5).

GOT, GPT活性は早期より上昇し、特にNo.5では顕著な上昇を示す。AIP活性はNo.1で6日目、No.2で3日目急上昇するが、No.3, 4では変動はあまり大きくない。AIP活性は100KAU前後の上昇で胆管結紉

実験に比べるとその程度は極めて小さい。

S-ChE isoenzyme活性値の変化はFig. 34~36に示す。

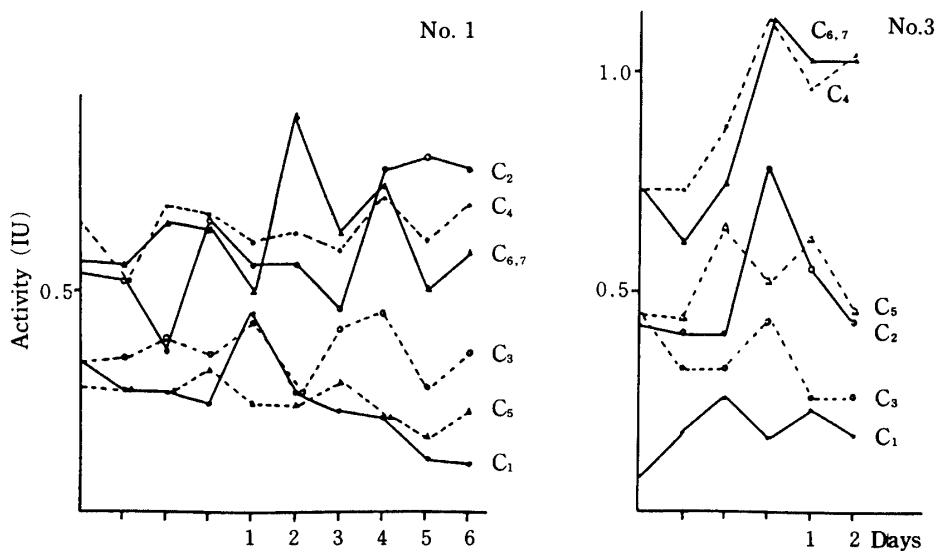


Fig. 34 Change in the activity of isoenzyme fractions (C₁-C₇ band) in serum cholinesterase after the experimental pancreatectomy in dogs (No. 1 and 3)

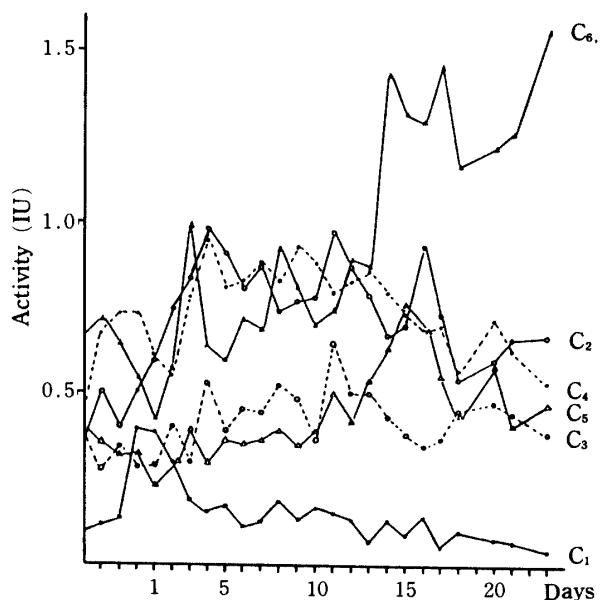


Fig. 35 Change in the activity of isoenzyme fractions (C₁-C₇ band) in serum cholinesterase after the experimental pancreatectomy in a dog (No. 2).

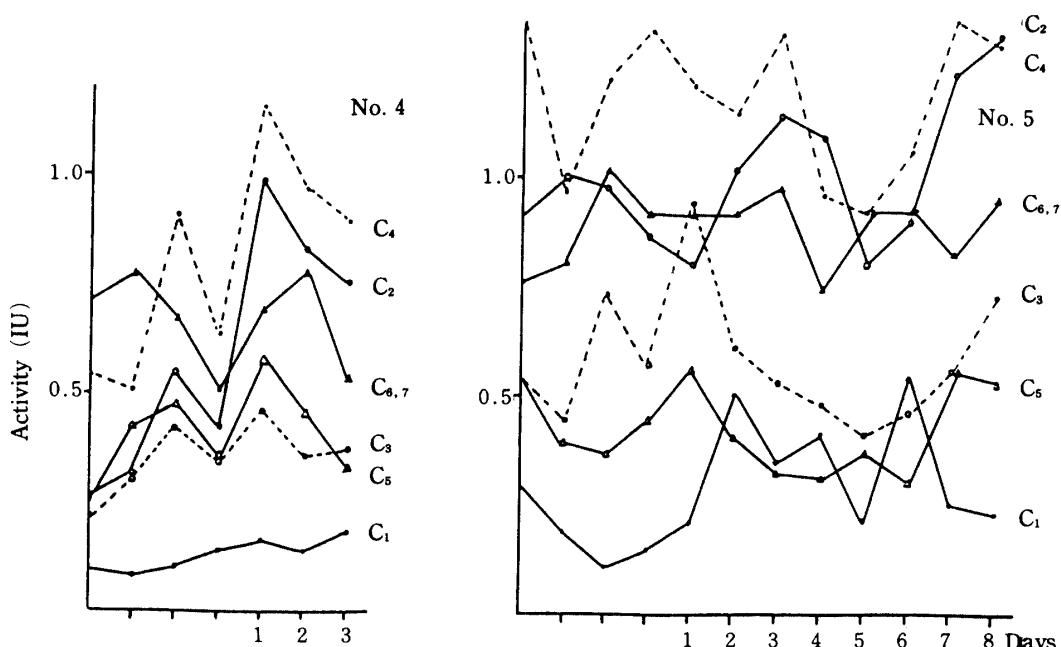


Fig. 36 Change in the activity of isoenzyme fractions (C₁-C₇ band) in serum cholinesterase after the experimental pancreatectomy in dogs (No. 4 and 5).

C₁分画活性値は、4例（No.1～4）で12～24時間にpeakを示し、その中No.1以外は顕著な上昇でpeak後も高活性を維持した。No.5では3日目より活性値は上昇して、6日目peakを示した。C₂分画活性値は、peakの時点は異なるが、全例において著明な上昇の傾向が見られる。No.3のC₃分画活性値は、術前の値より低活性を示したが、4例（No.1, 2, 4, 5）

は上昇の傾向を示した。しかし、No.1, 5ではpeak後活性値が術前の値を下回る傾向がみられた。C₄分画活性値は、No.1では術前の値を上下する変動で、No.5では術前の値より低活性を示すが、術前の各分画活性値の中で最も高活性を示し、この傾向は以後も持続している。No.2～4では上昇の傾向を示し、peak後も高活性を維持した。C₅分画活性値は、No.3,

4は上昇の傾向を示す。No.1, 2, 5は術前より低活性を示すが、No.2では11日目より上昇し、15日目peakを呈し、以後やや活性値は高い。C_{6,7}分画活性値は、No.4では下降の傾向を示し、4例（No.1, 2, 3, 5）ではやや上昇の傾向を示す。また、No.2では14日目以降高活性値を示している。

考 察

1. 低毒性有機燐剤の影響について

ChEを抑制する薬物の種類は数多く存在し、その抑制のメカニズムも複雑である。しかしながら阻害因子の性質により、現在では i) anionic site, ii) anionic site and esteratic, iii) esteratic site の3種に区別され i) ではデカメソニウム、テトラエチルアンモニウム、テトラプロピルアンモニウムなどの薬物が、このカテゴリーに入り、ii) ではフィゾスチグミン、ネオスチグミンなどがこれに属し、iii) の例として大部分の有機燐酸化合物があげられている¹⁰⁾。

ChEと有機燐化合物との反応により生じたphosphorylated酵素化合物は極めて安定したものであり、その分解は徐々に行われる¹⁰⁾。このことは酵素が長期間不活性化されることを意味している。

有機燐剤には、TEPP, parationなど比較的高毒性のものと、diazinon, marathion, DDVP, nankorなど低毒性のものとがあり、本実験で使用したNeguvon, Cythioateは低毒性のものである。一般に微量の有機燐剤は経口投与されると、直ちに消化管から吸収され、体内、主に肝臓で速やかに代謝されて無毒の代謝産物となり、主に尿中に排泄される¹⁰⁾と言われている。本実験でも投与後1時間でS-ChE活性値が低下することから、血中への移行が速いことが示唆される。

Jackobson¹¹⁾らはウマにNeguvonをカテーテル又は飼料に混じて10~100mg/kg 1回投与して、S-ChEの阻害及び臨床症状の変化を観察し、ChEの阻害率は投与量に比例せず、20~69%阻害を示し、100mg/kg投与の1頭が軽い中毒症状を示したと報告している。本実験では100mg/kgで96.7%阻害され、食欲消失、肛門弛緩、横臥などの中毒症状を示し、Jackobsonらに比べてはるかに大きい阻害率であった。橋爪¹²⁾らはイヌにNeguvon50mg/kgを1回経口投与して、S-ChEは投与直後から減少して45.7%になり、4時間頃から回復しはじめ、4日後には投与前の値にほぼ回復し、中毒症状は見られなかつたと報告している。本実験のウマでは、S-ChEは投与直後から減少して、

投与後9日目頃から活性は回復しはじめたが、32日後も完全には回復していない。

Doval¹²⁾らは3~100mg/kgのCythioateをイヌ、ヒツジに経口投与して、投与後短時間内にS-ChEは減少して4時間後イヌで17.65~77.14%, ヒツジで10.65~74.10%と阻害され、阻害の大きさは投与量に比例し、投与量の多いものでは中毒症状を示し、ChE活性の回復には24~72時間を必要としたと報告している。本実験のCythioate投与はDoval¹²⁾らの実験に比べて、3~15mg/kgと少量のため、流涎、嘔吐などの一般臨床症状は見られなかったが、S-ChE活性に明らかに影響を及ぼし、阻害率の大きさは必ずしも投与量に比例せず、ただ投与量の少ない時にはむしろ阻害率が50%程度を示し、投与量の少ない割に阻害率が大きいために回復の速度は遅くなった。

本実験に使用したNeguvonとCythioateはいずれも動物用医薬品として内、外部寄生虫類の殺虫・駆除剤として臨床的に常用されているものである。本実験結果から、流涎、嘔吐などの副作用がある場合は勿論であるが、副作用のない場合においてもS-ChE活性及びisoenzymeレベルに明らかに阻害作用を持続していることから、本剤の使用に際してアトロピンなどの副交感神経抑制剤の使用を必要としていることが示唆された。

2. 胆管結紩との関係について

ヒトでは胆管閉塞の患者ではS-ChE活性は正常範囲内にある¹³⁾。また、肝で合成されたChEは細胞中でリポ蛋白と結合し、ある量に達すると細胞外に出てくる。この際、細胞が壊れて出ると、細胞膜の透過性が変わって出てくるという、いわゆる逸脱というものではない。細胞外に出たChE-リポ蛋白結合物はリポ蛋白リバーゼの働きによりChEが遊離するという考え方¹⁴⁾が、現在ChE流出機構の主流をなしている。

さきに行った、著者³⁾らのCCl₄投与による実験的急性肝炎症例において、GOT, GPTの急激な活性上昇及び血清ビリルビン上昇のpeakに平行して、程度は少ないがS-ChEが上昇することからChEの血中への流出には逸脱的要因が考えられた。そこで、もしこの逸脱的要因があるとすれば、胆道の閉塞性疾患の場合にもAIP同様の上昇がみられるであろうというのが本実験の設定目的であった。

しかし、胆管結紩を行った4症例中、1例の例外を除き、いずれもS-ChEの逸脱的要因は否定された。

3. 脾臓との関連について

さきに、行った著者^{4,5)}らの家畜における臓器ChE

(P-ChE)の研究において、イヌの脾臓のChEの活性は他の臓器に比べて特異的に高い（肝の35倍）ことが明らかになり、さらに、P-ChE isoenzymeの分画数が最も多いことから、S-ChEと脾機能との関連が示唆されたのが本実験の設定目的である。

Alloxan投与による実験的糖尿病では、血糖値は第1期過血糖、第2期低血糖、第3期永続的過血糖と変化する。第1期は副腎と関係しアドレナリン分泌による肝糖原の分解あるいはインシュリン作用の停止あるいは肝への直接作用によるものと考えられている。第2期は脾島β細胞の刺激過程でインシュリンを一挙に流血中に放出するためあるいは脾と無関係に肝における糖生成の障害あるいは副腎皮質と関係すると考えられている。第3期はβ細胞壊死に伴うインシュリン分泌不能による。β細胞の破壊はグルタチオン、チスティン、メチオニンなどのSH基を持つ物質を予め与えておくと糖尿出現を予防できることから細胞または血中グルタチオンなどの減少説とβ細胞には亜鉛反応を示す物質があることから、Alloxanは亜鉛との親和力が強くかつ毒物として働く亜鉛説がある¹⁵⁾。

本実験では100mg/kg投与例ではAlloxan投与による血糖の定型的な過程が見られた。

ヒトでは糖尿病でS-ChE活性値は増加する¹⁶⁾。本実験では24~48時間にかけて投与前の値より低下するが、以後上昇して5~6日目をpeakとして投与前の144~179%の範囲にあり、イヌにおいてもヒトと同様糖尿病でS-ChE活性値は増加する傾向のあることを認めた。

ヒトでは脾臓もP-ChEを多量に含む器官の1つであるが、イヌでは他の臓器に比べて特異的に著明な高活性（血清の約280倍）を示す⁴⁾。Hebb¹⁷⁾らの組織化学的方法によると、イヌの脾臓のP-ChEは腺細胞、ランゲルハンス島、脾液中に見い出され、その活性が脾液分泌後はミトコンドリア内活性が約2倍に上昇することからミトコンドリア内で合成される可能性があると報告している。著者⁵⁾らはイヌでは脾ChE isoenzymeは高活性を反映して、検出バンド数が組織ChE中最多く、S-ChEへの影響度が高いことを示唆しているが、上述の結果から脾疾患において著明なS-ChEの上昇があるとすれば、腺細胞を障害する疾患時であろう。これらの文献より著者らは脾臓摘出によりS-ChEの低下を予想したが、本実験では、長く生存した例では術前の150%の活性値、1週間前後生存した例では術前の活性値を僅かに上下する変

動、早期死亡したものでは18~24時間に142~194%と上昇を示し、いずれも著明な低下は見られず、逆に上昇の傾向を示した。また脾摘により血糖値は上昇して糖尿病発生を見た。

黒瀬¹⁶⁾は高脂血症、高コレステロール血症においてP-ChE活性の高値を認め、脂質代謝との関連性を推測し、ChEにおいても aliesteraseと同様に脂肪属エステラーゼを加水分解する事実はエステラーゼの基質特異性の低い事を実証するもので、ChEも多機能性のエステラーゼの1酵素として研究されるべきだと報告した。Kutty¹⁸⁾らはβ-Lipoprotein (β-LPと以下略す)にChE活性があり、ChE活性はlipoprotein濃度と比例し、ChE阻害剤であるネオスチグミン処理のラットでは血清β-LP減少を示し、またparation中毒患者でβ-LPとcholesterolの著しい減少、回復の間ChE活性の上昇に比例してβ-LPをcholesterolは増加し、β-LPはChEの存在下でpre-β-LPから形成されると考えている。このようにChEと脂質代謝との関連性が指摘されていることから、Alloxan投与犬における糖尿病発症に伴う、S-ChEの上昇は病理組織所見で肝に脂肪滴の沈着像がみられることから、脂質代謝の亢進に起因する現象ではなかろうかと考える。イヌの特異的に高活性を有する脾ChEとS-ChEとの間に緊密な関係があるとすれば、脾摘によりS-ChEは明らかに減少がみられるはずである。しかし、本実験結果では、S-ChEの減少例はなく、逆に僅少ないし著明な上昇がみられ、脾ChEとS-ChEとの関係は否定的なものとなった。Firer¹⁹⁾らはカエルの脾摘により、腹大動脈、平滑筋、肺実質でChE活性は上昇し、副交感神経、体神経系の障害が同時に起きたと報告している。従って、動物は大きく異なるが、本実験にみられた脾摘犬のS-ChEの上昇には、脾摘による副交感神経など自律神経系統の障害も当然関与しているものと考えられる。

脾摘実験では同時にGOT、GPT、AIPの上昇を認め、特に黄疸の顕著な例ではより高活性を示した。脾摘により肝障害をひきおこした理由は、脾内外分泌機能の消失による糖代謝の不全とこれに伴う脂質代謝の亢進、消化管での消化と吸収不全などが、肝臓の負担を急激に増大し、継発的に肝機能を低下させたものと考える。

4. S-ChE isoenzyme

人医領域では、ガン患者のS-ChE isoenzymeの分離が悪いこと²⁰⁾、神経病ではisoenzymeの易動度が減少すること²¹⁾、超音波療法ではisoenzymeは選択的に

賦活されたり、失活したりする²²⁾などの各種疾患とS-ChE isoenzymeとの関連性については次第に解明されつつあるが、いずれにしてもS-ChE isoenzyme patternの臨床的研究に関する報告は極めて少ない。これはS-ChE isoenzymeはsubunitで構成され、LDH、AIPのような臓器由来性はないと言われることに起因しているものと考えられる。

低毒性有機燐酸剤に関する獣医領域でのS-ChE isoenzymeレベルの臨床的報告はみられず、わずかに当教室の鶴田の成績²³⁾があるのみである。鶴田のBTCを基質とする井内らの原法によるイヌのS-ChE isoenzymeでは4本のbandが検出され、Neguvon投与実験によってC₁、C₂分画と易動度の大きい分画で阻害が著明であったとする報告が見られ、著者らの測定法と検出分画数の多少の差はあるが、大筋において著者らの実験結果と一致している。従って低毒性有機燐による中毒でのS-ChE isoenzyme分画活性は、程度の差はあるが、全分画とも阻害され、易動度の大きい分画の方が阻害の程度が大きい傾向を示すと言えよう。また回復の速さは各分画で異なり易動度の小さい分画は早く、阻害率の一番大きい分画では遅い傾向を示す。各分画で有機燐に対する感受性の異なる理由は分からぬが、易動度の大きい分画に阻害が著明な点から考えて、酵素結合蛋白の分子量の大きさの差異も若干影響しているものと思われる。

CCl₄投与実験³⁾では総活性値がpeakを示す時、程度は異なるが各分画とも高活性値を示し、特にC₁、C₂分画は著明であったが、胆管結紮の総活性値の上昇した本実験例でも同様な傾向を示した。また、総活性値の低下し、各分画活性値が低減する実験例においても、C₂分画だけは特異的に増加を示していることは、肝機能障害時にみられた現象と同一であり、胆管閉塞が肝機能に及ぼす影響から、S-ChEの臓器特異性は依然として否定はできない。

Alloxan投与により人工的に脾のラ島β細胞を破壊して糖尿病をおこした実験では、脂肪代謝亢進との関連で、特徴的なpatternが期待されたが、各分画とも初め低下が見られるのみで、後半C₂、C₃、C_{6,7}分画では上昇を示し、C₁分画は1例のみ顕著な上昇を示し、C₄、C₅分画では上昇例と低下例があり、一定の傾向はみられなかった。

脾摘ではC₁、C₂分画は全例において著明な上昇を示し、長く生存した例ではC₅分画が15日前後、C_{6,7}分画が後半上昇の傾向を示し、肝障害と酷似したpattern

³⁾が見られた。この現象は、脾摘後の時間差を有することから、脾摘により、肝における代謝の過重負担の結果肝障害をひきおこしたもので、脾摘特有のものではないと考える。

要 約

実験的症例におけるS-ChE総活性値とisoenzyme活性値の変化を検討した結果次の知見が得られた。

1. 低毒性有機燐剤 (Neguvon・Cythioate) の経口投与によりS-ChE総活性値は低下した。isoenzyme活性は各分画とも低下するが、その程度は易動度の大きい分画に著明であった。このS-ChE活性の低下は、流涎、嘔吐などの副作用の有無にかかわらず存在した。

2. 実験的胆管結紮例では、S-ChE総活性値の変動は少なく、一定の傾向は得られなかつたが、isoenzyme分画は易動度の大きいC₂分画にいずれも明らかな上昇を認めた。

3. Alloxan投与による実験的糖尿病例では、S-ChE総活性値はいずれも上昇したが、その程度は小さく(1.4~1.8倍)、isoenzyme分画活性では易動度の大きいC₁、C₂、C₃分画と最も易動度の小さいC_{6,7}分画の上昇を認め、中庸の易動度を有するC₄、C₅分画には一定の傾向は認められなかつた。

4. 脾臓摘出例では、S-ChE総活性値は軽度の上昇(1.2~1.9倍)を示し、isoenzyme patternは肝機能障害に酷似する傾向が認められた。

5. 3、4の結果から、イヌで特異的に高活性を有する脾ChEは直接的にはS-ChEとは無関係であることが判明した。

文 献

- 橋爪敬三郎、松本治康、石川尚明、佐々木寧：犬の血清および臓器のコリンエステーゼ活性におよぼす有機燐剤 Bayer L 13/59の影響。日獣会誌、17, 472~475 (1964)
- 森園 充、柵 秀人：家畜の血清Cholinesteraseに関する臨床学的研究 III. 犬の血清Cholinesterase活性値並びに血清cholinesteraseと血清albumineとの関連性の検討。鹿大農学術報告、27, 127~130 (1977)
- 森園 充、岩月妙子、秋永祐治、山内達男、阿久沢正夫、渡辺 茂、田代哲之、坂本 紘：家畜の血清Cholinesteraseに関する臨床学的研究 VIII. 家畜の血清Cholinesterase活性値と肝機能との関係。鹿大農学術報告、31, 75~82 (1981)
- Morizono, M., and Akinaga, U.: Studies on Tissue Cholinesterase in Domestic Animals. I. Method in Determination of Tissue cholinesterase Activity in

- Domestic Animals. *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.*, **17**, 201~217 (1981)
- 5) Morizono, M., and Akinaga, U. : Studies on Tissue Cholinesterase in Domestic Animals. II. Detection of Tissue Cholinesterase Isoenzyme in Domestic Animals. *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.*, **17**, 219~234 (1981)
- 6) 森園 充, 桃 秀人: 家畜の血清Cholinesteraseに関する臨症学的研究 I. 家畜の血清Cholinesteraseの測定法. 鹿大農学報告, **27**, 115~121 (1977)
- 7) Juul, P. : Human plasma cholinesterase isoenzymes. *Clin. Chim Acta.*, **19**, 205~213 (1968)
- 8) 中村正二郎: Disc電気泳動法. 臨床病理, 特11, 72~88(1967)
- 9) 森園 充, 仮屋善弘, 西山實光: 家畜の血清Amylaseに関する臨床学的研究 II. 家畜の血清amylase isozymeの検出. 鹿大農学報告, **23**, 257~266 (1973)
- 10) Silver, A. : The biology of cholinesterase. chapter II Anticholinesterase 449~489 American Elsevier Pub, New York. (1974)
- 11) Jackobson : ネグポン末文献抄録 (武田薬品) より引用
- 12) Doval, C. P. and Gupta, I. : Effect of cythioate on cholinesterase activity in erythrocytes and plasma and transaminase activity in serum of sheep & dogs. *Indian J. Exp. Biol.*, **14** 193~194 (1976)
- 13) 宇尾野公義: コリンエステラーゼ. 日本臨床, **31**, 584~589 (1973)
- 14) 北村元仕編: 血清酵素の異常 8, コリンエステラーゼ, P.235, 医学書院 東京 (1985)
- 15) 医学大辞典 第13版 P.44 南山堂, 東京 (1964)
- 16) 黒瀬均二: 血漿cholinesteraseの研究. I. 臨床的研究, II. 実験的研究. 生物物理化学, **16**, 51~67 (1971)
- 17) Hebb, C. and Hill, K. J. : Distribution of cholinesterase in the mammalian pancreas. *Quart. J. Expl. Physiol.*, **40**, 168~175 (1955)
- 18) Kutty, k. M., Redheendran, R. and Murphy, D. : Serum cholinesterase "Function in lipoprotein metabolism" *Experientia*. **33**, 4, 420~422 (1977)
- 19) Firer, L. D. and Khamitov, K. S. : On the Kinetics of the cholinesterase of frog smooth muscle organs after removal of the pancreas. *Bull. Exptl. Biol. Med. U.S.S.R.* **44**, 1298~1301 (1957)
- 20) Dubbs, C. A., Vivonia, C. and Hilburn, J. M. : Subfraction of human serum enzymes. *Science*. **131** 1259 (1960)
- 21) Svensmark, D. : Effect of sialidase on electrophoretic properties of human serum cholinesterase. *Med. Bull.*, **8**, 28 (1961)
- 22) Dubbs, C. A. : Ultrasonic effects on isoenzymes. *Clin. Chem.*, **12**, 181 (1966)
- 23) 鶴田 剛: 犬における異常型血清コリンエステラーゼ検出のためスクリーニングテストと薬剤投与による血清コリンエステラーゼ総活性値とアイソザイム活性比との関係について. 鹿児島大学大学院農学研究科獣医学専攻修士論文 (1972) 未発表
- 24) 森園 充, 大前清武: 家畜の血清Cholinesteraseに関する臨床学的研究 VII. 著者らの検出法による家畜の血清 Cholinesterase正常Zymogramの定量的検討. 鹿大農学報告, **30**, 185~191 (1980)
- 25) 森園 充, 桃 秀人: 家畜の血清Cholinesteraseに関する臨床学的研究 IV. 家畜の血清Cholinesterase isoenzymeの検出法. 鹿大農学報告, **27**, 131~139 (1977)

Summary

This study revealed the changes of total activities and isoenzyme activities in serum cholinesterase (S-ChE) in dogs occasioned by the experimental operations.

1. Total activity decreased with the peroral administration of relatively low toxic organophosphate drugs (Neguvon and Cythioate). Activities of all the fractions in the isoenzyme decreased, and the rate was significant in fractions mobilizing faster than others. The decrease of activity seemed to be unrelated to the presence of adverse reactions, such as salivation and vomiting.

2. In the cases of bile duct ligated experimentally, total activity changed without consistent tendency, and the activity of C₂ fraction of isoenzyme, fast in mobility, showed a significant increase in all the cases.

3. In the cases of diabetes mellitus induced experimentally by alloxan, total activities increased within a small extent (1.4-1.8 times) comparing with those of preadministration; and in the activity of isoenzyme, fractions of C₁, C₂ and C₃, fast in mobility, as well as those of C₆ and C₇, slow in mobility, showed high activities, on the other hand, those of C₄ and C₅, moderate in mobility, showed no consistent tendency in the activity-change.

4. In the cases of experimental pancreatectomy, total activity increased slightly higher (1.2-1.9 times) than that of the preoperation. Isoenzyme pattern tended to resemble that of hepatic dysfunction.

5. From the results of the above 3rd and 4th experiments, S-ChE was ascertained to have no direct relationship with ChE in the pancreas of dogs, which was fixed to be specifically higher than that in any other organs.