

血中 superoxide dismutase 活性の加齢による 変動および環境汚染物質による阻害

第 3 報

環境汚染物質による血中 superoxide dismutase の阻害作用
〔シアン化合物、農薬(ジメチルジチオカーバメイト, パラコ
ート製剤グラモキソン)について〕

岡山大学医学部公衆衛生学教室 (主任: 緒方正名教授)

大学院 植 田 和 子

(昭和52年12月24日受稿)

緒 言

赤血球中の SOD はヘモクプレインであり, 銅を含む酵素であると言われている¹⁾。そして赤血球の SOD はシアンイオンによって阻害されることが報告されている²⁾。本酵素は生体内で生成される superoxide free radical の scavenger であるのでその酵素活性の増減が生体に与える影響は大きい。シアンの生体内での解毒機構は酵素ロダネースによってチオシアンに代謝されることが報告されている³⁾。このようにして解毒されたチオシアンになお SOD の阻害作用があるかどうか, また現在広く用いられているシアンの類似物質アセトニトリルに阻害作用があるかどうかについて検討をおこなった。一方農薬のうちではカーバメイト系殺菌剤が数多く使用されているが⁴⁾、特にジラム型ジチオカーバメイト系の化合物はその構造が銅・鉄のキレート試薬⁵⁾であるジエチルジチオカーバメイト⁶⁾に酷似しており, 従って血中 SOD に対して阻害作用を有することが推定される。またパラコートは除草剤として現在広く使われその中毒例は致命率が高く⁷⁾社会的にも問題となっている。その毒性の一部は生体内で superoxide free radical を発生するため特に SOD 活性の低い肺組織を破壊するためであると報告されている。以上の知見から上記の物質について血中 SOD の阻害作用の検討を

おこなったのでその成績をここに報告する。

実験材料および方法

シアンカリ, チオシアン, プロピオニトリル, ブチルニトリル, アセトニトリル, ジメチルジチオカーバメイトおよびパラコートは試薬特級を, グラモキソン(パラコート製剤)は除草剤として実際に用いられているものを, SOD は牛血液より精製した純品(Sigma 社)を使用した。試薬はそれぞれ純水に溶かして阻害実験に使用した。また対照実験として, 阻害の検討に用いた試薬について xanthine oxidase を加える前に反応液に試薬を添加し, NBT を還元しないことと, xanthine oxidase を加えて NBT を還元することを, つまり試薬自体が本実験の反応系で, superoxide free radical を発生したり, xanthine oxidase を阻害したりしないことを確認した。反応液に前もって阻害を求める試薬を混和し, その中にヒトの赤血球の粗抽出液(クロロホルム・エタノール抽出液, 前報による)と純 SOD を加えて, 前報と同様にその活性値を求めた。阻害剤を含まないコントロールの最大阻害率の 1/2 の濃度を 1 単位として阻害試薬を加えてどの程度活性値が低くなっているのか%で示した。反応は pH 10.2, 温度 25±0.5℃でおこなった。

実験成績

血中 SOD の阻害作用が認められたものはシアン、ジメチルジチオカーバメイト、パラコートおよびグラモキソンであった。一方チオシアンは 40 mM、ニトリル化合物は 20 mM でも阻害は認められなかった。

1, シアンイオンの阻害作用

SOD 活性(コントロールに対する%)と、シアンの濃度との関係は[図1]に示すごとくで、その50%阻害濃度は、ヒト赤血球の粗酵素抽出液に対して、0.036 mM、ウシの血液から精製した純酵素液に対して0.043 mM であった。

2, ジメチルジチオカーバメイトの阻害作用

銅のキレート試薬として用いられるジエチルジチオカーバメイトについてはすでに SOD 阻害作用があることが報告されている²⁾。一方これに類似の物質で殺菌剤ジメチルジチオカーバメイトの血中 SOD に対する阻害は、[図2]に示すごとく、その50%阻害濃度が粗酵素抽出液で0.66 mM、精製酵素液で0.96 mM であった。

3, パラコートおよびグラモキシソンの阻害作用

パラコートの阻害作用を[図3]に示す。その50%阻害濃度は粗酵素抽出液で0.96 mM、精製酵素液で1.09 mM であった。また実際に農薬として使用されているグラモキソンについては[図4]に示すごとく50%阻害濃度が粗酵素抽出液で0.0054 mM、精製酵素液で0.0084 mM を示し、パラコートに比してそれぞれ約180倍、130倍と阻害作用が極めて高いことがわかった。

考 案

本実験においてチオシアンに SOD の阻害作用が認められない事実は、シアンイオンはチオシアンまで解毒すると、SOD に対するその毒性は失なっている事が推測される。一方、アセトニトリル中毒の臨床像はアセトニトリル分子が生体内において分解しながら増加しているシアンイオンの作用が加わったものであると言われている³⁾。シアンイオンに SOD 阻害作用が認められたことから、アセトニトリルの SOD に対する作用が注目されたが本実験においては阻害作用は認められなかった。それ故にアセトニトリル中毒の際には分解して生じるシアンイオンのみが SOD 阻害作用を有すと考えられる。

一方ジメチルジチオカーバメイトはジラム型ジチオカーバメイト系殺菌剤として土壌消毒にウリ類の

苗枯病を予防する目的でジメチルアンバムという商品名で広く用いられている。今後生体内投与と実験を行なう予定にしている。パラコートの生体内における毒性については明らかでないが、肺に強い障害をおよぼす説明として、superoxide free radical を生体内で生成し、SOD 活性の低い肺組織にその作用をおよぼすと言われている。本実験でパラコートがさらに SOD 阻害作用を有することが認められたことは新しい知見であり、今後生体内実験との対応が必要であると考えられる。さらにパラコート製品であるグラモキシソンの阻害作用が極めて強いことは注目すべきことである。グラモキソンは、パラコートを24%含み賦形剤として界面活性剤が添加されている。本研究より農薬についてはその基本となる化合物の毒性のみならず、賦形剤についての毒性の考慮がさらに必要なことを意味すると考える。なお牛赤血球より精製した純 SOD に対する阻害度が人赤血球粗抽出液に対するより低いことは種属差によるものと考えられる。

結 論

ヒトの血中 SOD の抽出液(クロロホルム・エタノールによる)およびウシの血中 SOD 精製液を用いて、シアン、チオシアン、アセトニトリル、ジメチルジチオカーバメイト、パラコートおよびグラモキソンによる阻害作用を検討した結果以下に示す成績が得られた。

1, シアンイオンには SOD 阻害作用が認められ、その50%阻害濃度は、ヒト赤血球の粗酵素抽出液で0.036 mMウシ血液の精製酵素液で0.043 mM であった。

2, シアンイオンの生体内の代謝産物であるチオシアンイオンは粗酵素液および精製酵素液で SOD 阻害作用を示さなかった。

3, アセトニトリルは粗酵素液および精製酵素液で SOD 阻害作用を示さなかった。

4, ジメチルジチオカーバメイトは SOD 阻害作用を示し、その50%阻害濃度は粗酵素液で0.66 mM 精製酵素液で0.96 mM であった。

5, パラコートは SOD 反応を抑制しその50%阻害濃度は粗酵素抽出液で0.96 mM、精製酵素液で、1.09 mM であった。また実際に農薬として使用されているグラモキソン(界面活性剤が添加)の SOD 反応の抑制は極めて強く、50%阻害濃度は粗酵素液で0.054 mM、精製酵素液で0.0084 mM であった。

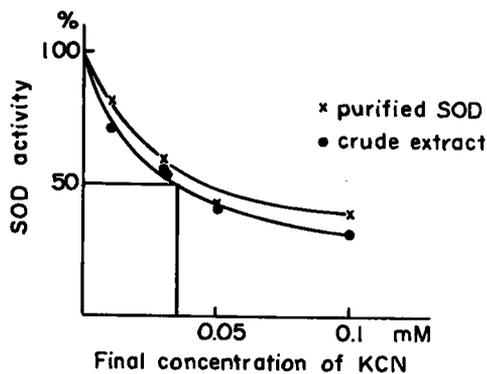


Fig. 1 Inhibition by KCN

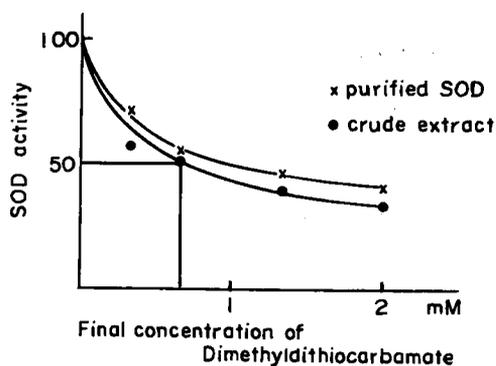


Fig. 2 Inhibition by Dimethyldithiocarbamate

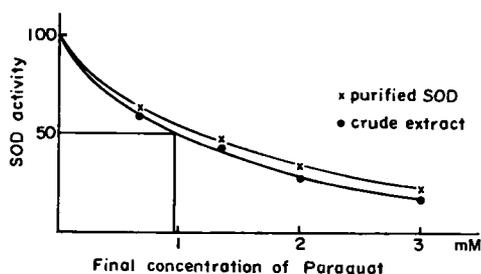


Fig. 3 Inhibition by Paraquat

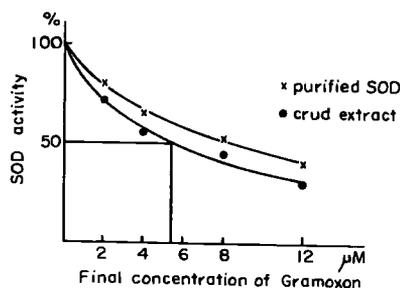


Fig. 4 Inhibition by Gramoxon

稿を終るにあたり、本研究に対して終始変わらぬ御指導と御校閲を賜りました恩師緒方正名教授に深く感謝の意を表します。またパラコートに関する情報をいた

だきました麻酔学教室の実験室の皆様、蓬郷智子氏、長谷川亨研究生はじめ御世話になりました教室の皆様の御理解と多大の援助に深く感謝の意を表します。

参 考 文 献

- 1) McCord, J. M. and Fridovich I. : Superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049—6055, 1969.
- 2) Weisger, R. A. and Fridovich I. : Superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*, **248**, 3582—3592 (a), 4793—4796 (b), 1973.
- 3) Fasset, D. W. : Cyanides and nitriles. *Indust. Hyg. toxicology.*, **2**, 1991—2036, 1962.
- 4) 日本植物防疫協会：農薬要覧, 1976.
- 5) 武藤聡雄：農薬概説. 技報堂, 110—114, 1970.
- 6) 坂口武一, 上野景平：金属キレートII. 南江堂, 144—145, 1968.
- 7) Richard, E. H., Feticitas, S. C. and Gerald, C. : In vivo inhibition of superoxide dismutase in mice by diethyldithiocarbamate. *J. Biol. Chem.*, **251**, 2182—2185, 1975.
- 8) Montgomery, M. R., Paraquat toxicity and pulmonary superoxide dismutase. *Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **16**, 155—158
- 9) 厚生省事務局編, 農薬事故統計表. 1976.

The levels of human erythrocyte superoxide dismutase activity
classified by age and *in vitro* inhibition by some polluting agents

Part 3 *In vitro* inhibition of cytoplasmic superoxide dismutase
by some polluting agents

(cyanide ions, nitriles, dimethyldithiocarbamate, paraquat and Gramoxon)

Kazuko UEDA

Dept. of Public Health, Okayama Univ. Med. School

(Director : Prof. Masana Ogata)

In vitro inhibition of cytoplasmic SOD by cyanide ions, nitriles, dimethyldithiocarbamate, paraquat and Gramoxon was determined. In this experiment NBT reduction in aerobic xanthine oxidase system was used. Inhibition by polluting agents against crude extract of SOD of human erythrocytes and purified SOD from bovine blood.

The following results were obtained.

- 1, Potassium cyanide inhibits SOD reaction, giving 50 percent inhibition at 0.036mM in crude extract of human blood and 0.043mM in purified bovine blood SOD.
- 2, No inhibition was observed by nitriles up to 20mM both in crude extract and purified SOD.
- 3, Sodium thiocyanate gives no inhibition up to 40mM both in crude extract and purified SOD.
- 4, Dimethyldithiocarbamate inhibits SOD reaction giving 50 percent inhibition at 0.66 mM in crude extract and 0.96 mM in purified SOD.
- 5, Paraquat inhibits SOD reaction giving 50 percent inhibition at 0.06mM in crude extract and 1.09mM in purified SOD. And Gramoxon containing 24 percent paraquat and certain surfactants gives 50 percent inhibition as low as 0.0054mM in crude extract and 0.0084 in purified SOD.