

## 審査の結果の要旨

氏名 二 川 治 子

カルバメート殺虫剤は農薬として世界中で使用されている。その薬理作用及び毒作用はコリンエステラーゼ (ChE) 阻害であり、神経伝達物質であるアセチルコリンをシナプス間隙に蓄積させ、コリン作動性神経を過剰に興奮させることによって、害虫に対しては殺虫効果を発揮し、ヒトに対しては重篤な中毒を発症する。本研究において申請者は、カルバメート殺虫剤の1つである 2-sec-butylphenyl methylcarbamate (BPMC) に大量に暴露された場合を想定してウサギに静脈内投与したところ、ChE 阻害以外の作用により急性死を生ずることを見出した。この知見に基づき、BPMC による急性中毒症の処置法に関する情報を提供するために、急性死の機序を明らかにした。

### 1. 中枢及び循環動態に対する作用

BPMC をウサギに静脈内投与すると、痙攣、縮瞳、流涎などの ChE 阻害剤に特徴的な症状が認められ、中枢及び末梢部位の ChE 活性が抑制された。これらの異常症状及び ChE 活性の抑制には、代表的な ChE 阻害剤であるフィゾスチグミンや類似構造を持つカルバメート殺虫剤と明確な違いは認められなかった。一方、呼吸と血圧のパターンを調べると、フィゾスチグミンでは投与終了後から血圧が上昇し、その後呼吸停止し死亡したが、BPMC では投与中から急激に血圧が低下し、その後呼吸停止し死亡した。アトロピン (20  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ , *i.v.*) を前処置すると、フィゾスチグミンでみられた血圧上昇及び急性死は抑制されたが、BPMC でみられた血圧低下及び急性死は抑制されなかった。これらの急性死に対する人工呼吸の影響を調べると、フィゾスチグミンによる急性死は抑制されたが、BPMC による急性死は影響を受けなかった。また、BPMC はノルエピネフリン (NE, 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) 静脈内投与による昇圧も抑制した。これらのことから、BPMC の致死原因は ChE 阻害以外の作用による末梢性の循環機能不全であることが示唆された。

### 2. 摘出心筋及び血管平滑筋に対する作用

BPMC による循環機能不全の機序を明らかにするため、申請者はその摘出心筋及び血管平滑筋に対する作用を検討した。BPMC は摘出左心室乳頭筋の電気刺激による収縮と摘出大動脈の  $\text{K}^+$  (40 mM) 収縮を強く抑制した。さらに、BPMC の摘出大動脈収縮抑制の機序を詳細に検討した。BPMC は NE (1  $\mu\text{M}$ ) による収縮よりも  $\text{K}^+$  (40 mM) による持続的収縮を強く抑制した。BPMC に

よる  $K^+$ 収縮抑制の程度は、細胞外液の  $K^+$ 濃度を変化させても変わらなかったが、 $Ca^{2+}$ チャネルアゴニストである  $S(-)$ -BAY K 8644 (100 nM) を細胞外液に添加することによって弱まった。 $K^+$ によって増加させた張力と細胞内  $Ca^{2+}$  レベルを同時に測定し、BPMC を適用すると、細胞内  $Ca^{2+}$  レベルは張力に平行して減少した。一方、BPMC は  $Ca^{2+}$ -free 溶液中でのカフェイン (20 mM) ならびに NE (1  $\mu$ M) による一過性収縮を抑制しなかった。これらのことから、BPMC による循環機能不全の機序として、心筋及び血管平滑筋収縮の抑制が示唆された。さらに、血管平滑筋収縮の抑制は、L 型  $Ca^{2+}$ チャネルを介する細胞外からの  $Ca^{2+}$ 流入の抑制によることが示唆された。

### 3. 心筋 L 型 $Ca^{2+}$ チャネル電流に対する作用

BPMC による  $Ca^{2+}$ 流入抑制の機序を明らかにするため、申請者はモルモット単離心室筋細胞の L 型  $Ca^{2+}$ チャネル電流に対する作用をホールセルパッチクランプ法を用いて調べた。BPMC は可逆的かつ濃度に依存して  $Ca^{2+}$ チャネル電流を抑制した。ピーク電流の 50%抑制濃度は  $5.2 \times 10^{-4}$  M であり、摘出乳頭筋収縮の 50%抑制濃度  $1.3 \times 10^{-4}$  M に近似していた。また、BPMC はピーク電流を抑制すると共に  $Ca^{2+}$ チャネル電流の減衰速度を著明に促進した。この促進は細胞外液の  $Ca^{2+}$ を  $Ba^{2+}$ に置換しても認められたため、電位依存性の不活性化過程の促進によると考えられた。これを支持するように、 $Ca^{2+}$ チャネル電流の不活性化過程を 2 成分にフィッティングすると、BPMC は電位依存性不活性化を反映する遅い成分の不活性化を促進していることが明らかになった。このことは、BPMC ( $3 \times 10^{-4}$  M) が不活性化曲線を過分極方向に 12.7 mV シフトさせたことから支持された。さらに、BPMC による  $Ca^{2+}$ チャネル電流の不活性化速度の促進は代表的な  $Ca^{2+}$ 拮抗薬 (ジルチアゼム、ニフェジピン、ベラパミル) に比べて顕著であった。これらのことから、BPMC は心筋の L 型  $Ca^{2+}$ チャネル電流を抑制することが明らかとなった。さらに、BPMC は L 型  $Ca^{2+}$ チャネルの不活性化を著明に促進する特徴を持っていたことから、他の  $Ca^{2+}$ 拮抗薬とは異なった機序で  $Ca^{2+}$ チャネルを抑制する可能性が示唆された。

以上のように、BPMC は心筋及び血管平滑筋の L 型  $Ca^{2+}$ チャネルを抑制することにより、ChE 阻害作用からは予想できない循環機能不全による急性死を生ずることが明らかとなった。本研究によって、散布中の事故や誤飲などによって大量の BPMC に暴露された場合には、一般に行われている ChE 阻害剤中毒に対する処置だけでは危険であることが、初めて示唆された。これは実際の臨床例が報告される以前に実験動物レベルで危険性を予測し得たという点で、意義深いものと考えられる。実際の処置に当たっては、血圧をモニターし、低下

時にはノルエピネフリンなどの心血管収縮薬の処置が必要であることが提案されている。さらに、BPMC は他の  $\text{Ca}^{2+}$ 拮抗薬とは異なった機序で L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルを抑制する可能性があることから、 $\text{Ca}^{2+}$ チャンネル研究に有用なツールとなる可能性が示唆された。これらの成果は、毒性学における機能解析の重要性とこの化合物の実験ツールとしての有用性を示したものであり、博士（薬学）の学位に値すると判断した。