

# 北大阪地区 S M O N 患者の細菌血清学的検索

三輪谷 俊夫 ( 阪大微研 )

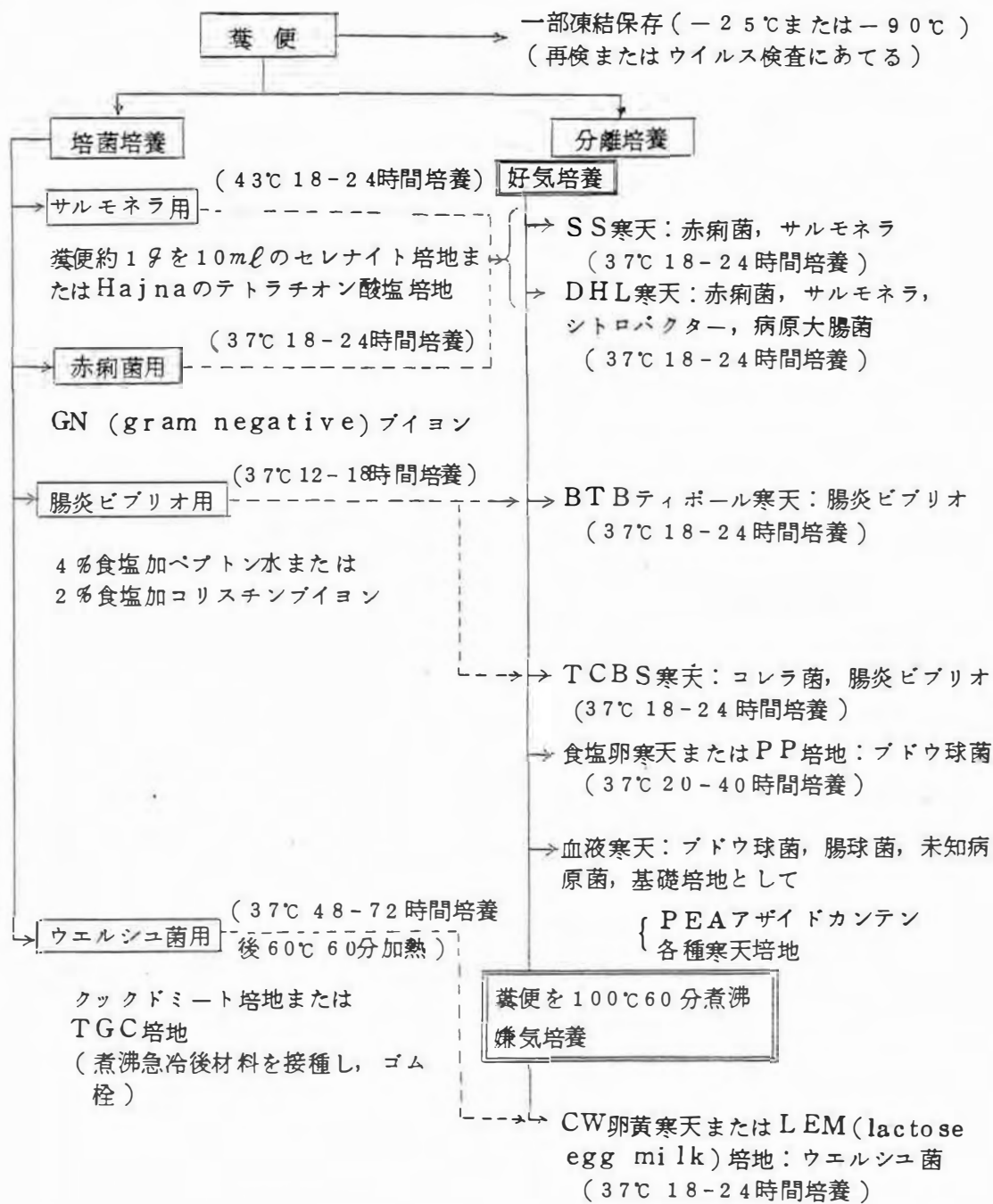
## I はじめに

スモン調査研究協議会の病原班員として腸内細菌に関する研究に参加するよう呼びかけられた私として、SMONにみられる腹部症状から、細菌学的検索目標に腸管感染原因菌のうち *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, 腸炎ビブリオおよび病原ブドウ球菌を重視した。昭和41年のことだったと思うが、大阪府立病院に入院中のSMON患者の糞便から *Salmonella* (CまたはE1群)が高頻度に分離され、且つこの分離株に対する患者血清の凝集価が比較的特異的に上昇しているという私信をえていたため、当初は特に *Salmonella* に重点をおき、日常検査術式に従って昭和45年1月より検索を開始した。

## II 材料および方法

- 1) 患者材料：いずれも北大阪地区にある吹田市民病院，新千里病院，阪大病院，微研病院および大手前病院に通院または入院中のSMON患者（確定診断のもののみ）より採取されたものである。
- 2) 糞便の培養検査法：説明を簡略にするため患者糞便の細菌培養検査の進め方を表1にまとめた。これは細菌性食中毒を含む急性胃腸炎のときの日常検査法<sup>1)</sup>である。但し、*Clostridium* に関しては、食中毒の際には検査材料（増菌の場合も）を100℃60分加熱するが、SMON患者のときは60℃60分加熱することにした。
- 3) SMON患者の血清学的検索：大阪府立病院において昭和41年度にSMON患者の糞便より分離した *Salmonella* (E1群)の加熱(100℃, 2時間)死菌，ホルマリン(0.5%)死菌に対するSMON患者血清中の凝集素価を検べた。術式はWidal反応に準じたが、小沢ら<sup>2)</sup>の示唆により反応条件は37℃および50℃の湯槽中にて15～18時間反応させてのち肉眼的に判定した。
- 4) リコール(髄液)よりの病原細菌および *Mycoplasma* の培養検査法：病原細菌に関しては血液寒天，TGCブイヨン，Trypticase Soy broth を用い、*Mycoplasma* に関しては尾形ら<sup>2)</sup>の方法にのっとり次の培地を用いた。

表1 患者糞便の細菌培養検査の進め方



a) 分離用培地 (Mycoplasma用)

Difco-PPLO agar	70ml
メンブラン・フィルター(0.2μ)・濾過滅菌ウマ血清	20ml
2.5%酵母(ニッテン)加熱抽出液	10ml
0.2%DNA(thymus)(NBC)	1ml
M-K2HP4	2ml

2.5 % thallium acetate 1 ml

100,000 U/ml Penicillin G 1 ml

(ときに Amphotericin B を 10 r/ml の割に添加する)

b) 増菌用培地 (Mycoplasma用)

5% ウマ血液寒天斜面 (基礎培地は Difco-brain heart infusion agar) に上記分離用培地から寒天をぬいたもの (すなわち, Difco-PPLO broth で調製したもの) を重層し, 増菌培養として使用した。

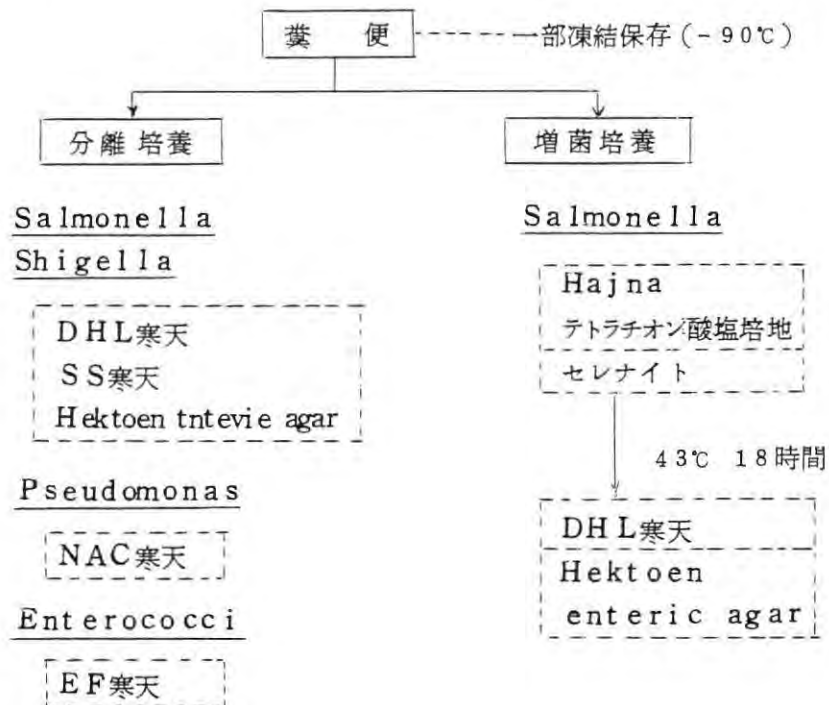
### III 結 果

1. 糞便の細菌学的検索

昭和45年6月14日までに提出された47検体について表1の術式に従って検査した結果, 菌検出率は Salmonella 0/47, Shigella 0/47, 腸炎ビブリオ 0/47, Staphylococcus aureus 1/12, Clostridium 20/47 であった。

昭和45年6月15日以後は, Salmonella, Shigella の分離に好成績をえた Hektoen enteric agar をも使用して表2に表すような検索方法によって SMON 患

表2 SMON患者糞便の細菌培養検査法



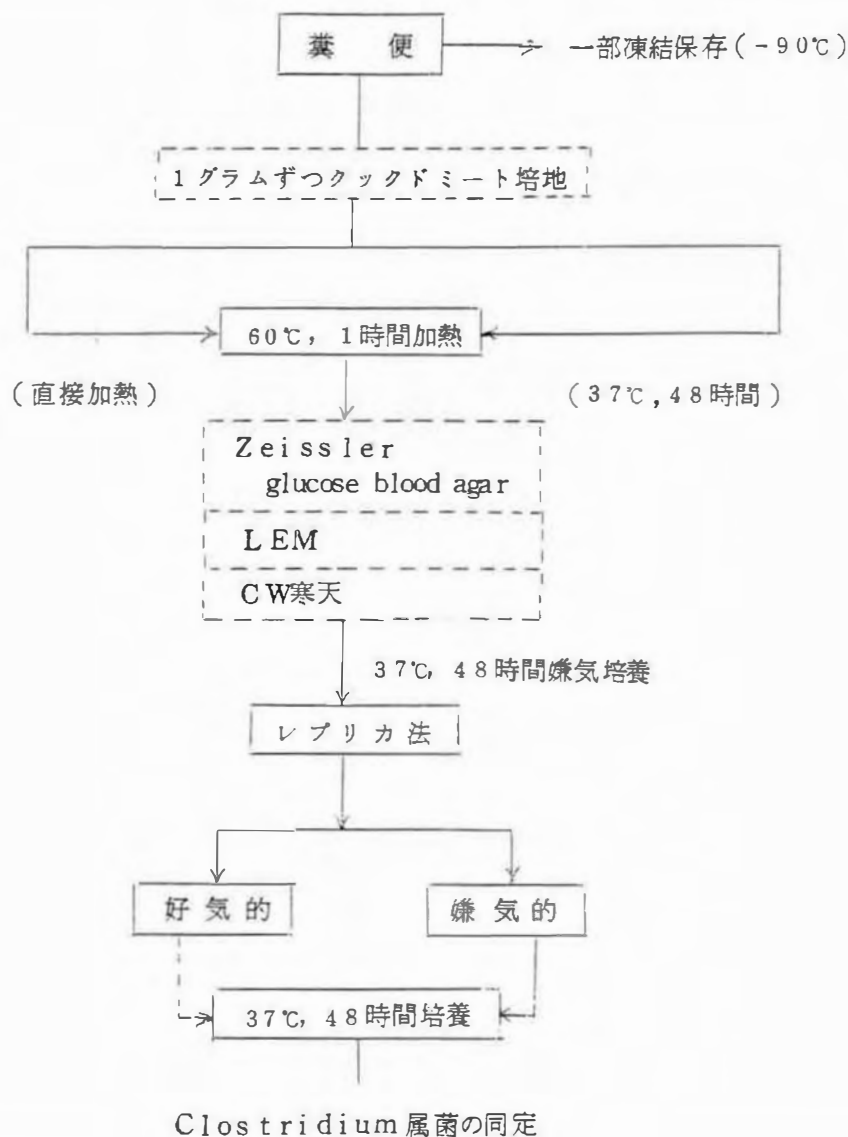
者18例について Salmonella, Shigella, Pseudomonas, 腸球菌, Clostridium に重要をおき, 菌の検索を行なった。その培養検査の結果は表3に示すように, やはり



Salmonella, Shigella は検出されなかった。しかし, Clostridium に関しては 15/18 例に検出され, しかも 1 検体より 1~3 種類の菌種が認められている。

このように高頻度に Clostridium 属菌が検出されたため, 非 SMON の糞便材料 50 例について表 4 に示す術式に従って Clostridium 属菌の検索を試みたところ, 表 5 に示すよ

表 4 Clostridium 属菌の培養検査法



うに分離培養法によって検出率に多少のずれがみられるが, 綜括的にみて 49/50 例の高頻度で Clostridium 属菌が検出された。

以上の如く菌の検索にあたって今までのところ SMON に特有なものは検出していない。

表5 非SMONの糞便からのClostridium属菌の検出率

検査件数50例 うち陰性1例	菌検出 例数	分離方法別にみた菌検出例数		
		直接加熱処理	増菌培養と 加熱処理	2方法とも 陽性
検出菌種				
<i>C. perfringens</i>	26	19	1	6
<i>C. bifermentans</i>	35	1	23	11
<i>C. butyricum</i>	2	1	1	0
<i>C. difficile</i>	2	1	1	0
その他（同定中）	40	12	24	4
計	105			

## 2. 血清学的検索

方法の項で記載したように、大阪府立病院において昭和41年度にSMON患者の糞便中より分離したSalmonella（E1群株、小沢敦班員の私信によると2相菌の誘導によりS. meleagridisである）の分与を受け、本菌の加熱（100℃、2時間）およびホルマリン（0.5%）死菌に対するSMON患者血清中の凝集価を患者38名について反応温度37℃と50℃で検べた結果を表6に示す。非SMON血清30検体の凝集価は表示しなかったが、表6の結果は非SMONの血清と比較して優位の差は認められなかった。

## 3. リコールからの病原細菌とくにMycoplasmaの検索

大手前病院から8例、吹田市民病院から5例、提出されたSMON患者のリコールについて前項に記載した培地を使用し、分離培養に際しては好氣的（5% CO<sub>2</sub>添加）並びに嫌氣的（嫌気ジャーを使用し10% CO<sub>2</sub>添加窒素ガスに置換）培養を併用し、2週間培養したが、いずれも菌は検出されなかった。

表6 SMON患者の糞便より分離した *Salmonella* (E1) の加熱死菌  
ホルマリン死菌に対するSMON患者血清中の凝集素価



検体	血清希釈					
	×10	×20	×40	×80	×160	×320
24	37℃ホルマリン死菌					
25						
26	37℃ホルマリン死菌	50℃加熱死菌				
27	37℃ホルマリン死菌	50℃加熱死菌	50℃ホルマリン死菌			
28						
29						
30						
31						
32	37℃ホルマリン死菌					
33						
34						
35	50℃加熱死菌	50℃ホルマリン死菌				
36	37℃ホルマリン死菌					
37	37℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌				
38	37℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌			
39	37℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌		
40	37℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌		
41	37℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌			
42						

検体	血清希釈					
	×10	×20	×40	×80	×160	×320
43	50℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌			
44	50℃ホルマリン死菌					
45						
46						
47	50℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌				
48						
49	50℃ホルマリン死菌					
50	37℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌			
51	37℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌			
52						
53						
54	37℃ホルマリン死菌					
55	37℃ホルマリン死菌					
56						
57	37℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌				
58	37℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌				
59	37℃ホルマリン死菌					
60						
61	50℃ホルマリン死菌					

#### IV 考 察

SMON患者について病原細菌の検索，血清学的検索を試みたが，実験成績から明らかなようにすべて陰性におわった。

一方，SMON患者の緑色色素の本態がキノホルムであることが田村ら<sup>3)</sup>によって指摘されたことに端を発し，SMONとキノホルムの関係が椿ら<sup>4)</sup>によって疫学的に大きくクローズアップされ，井

形，豊倉<sup>ツノ</sup>によって動物実験で実証された。その他多くの人々によってキノホルムがSMONの重要な原因物質であるらしいという証拠が提出されている。著者らはニワトリのヒナを用いて，キノホルム投与によるSMON様症状の発現と腸管感染の関係を追求している。

## V 結 論

北大阪地区にある吹田市民病院，新千里病院，阪大病院，微研病院および大手前病院より提出されたSMON患者（通院または入院中の確定診断がくだされたもののみ）材料について細菌学および血清学的検索を行なった。

- 1) 糞便65検体について腸管感染症の原因菌の検索を行なったが，Clostridium属菌以外は陰性であった。Clostridium属菌は $35/65$ の検出率であったが，非SMONの糞便からの検出率は $49/50$ であり，菌種，および菌量からみてSMONの場合の方が検出率は低い。
- 2) 大阪府立病院においてSMON患者の糞便より分離されたSalmonella E1群株に対する凝集価をSMON患者血清38例について検べたが，凝集価の特異的な上昇は認められなかった。
- 3) リコール13例について病原菌とくにMycoplasmaの検索を試みたが陰性であった。

共同研究者：

倉堀知弘，竹田美文，今村邦男，大川貞二，上村高明

## 文 献

- 1) 三輪谷俊夫：腸管感染症の細菌学的検索，臨床検査，14(12)，139～146，1970
- 2) 小沢敦ほか：SMONの週辺——特に細菌血清学的な立場から——医療，24(9)，23～31，昭和45年
- 3) 吉岡正則，田村善蔵：SMON患者の緑色色素の本態，医学のあゆみ，74(7)，320～322，1970
- 4) 椿 忠雄ほか：SMONの原因について，日本神経学会第34回関東地方会発表，1970年9月5日
- 5) 井形昭弘，豊倉康夫：キノホルムによる神経系障害に関する研究——キノホルム静注家兎における末梢神経障害，医学のあゆみ，75(6)，309～310，1970



# スモン患者の腸内細菌叢とキノホルム

中谷林太郎，中野英一，山崎恵子，吉田洋子，犬上洋子，扇和子，後藤延一（国立公衆衛生院），光岡知足（理化学研究所），井形昭弘（東京大学脳研究所），小沢敦，後藤甚作（国立東京第二病院），大村一郎（国立呉病院）

## I 緒 論

腹部症状がスモンの必発症状の一つであることから，スモンの病原を探るためには，細菌学的にも十分な検討が行なわれなければならない。その研究の一つとして，われわれはスモン患者の腸内細菌叢が，健康人のそれと比較して変化がみられるか否か，もしみられるとすれば，いかなる種類の菌群に増加または減少がみられるかを明らかにし，それが，スモンとどのような関係にあるかを検討するため研究を行なった。

## II 材料および方法

検査材料：表1に示すように，国立呉病院入院スモン患者（1970年5月29日）10例と，東大神経内科の入院および外来患者を主とする東京地域のスモン患者41例（1970年6月～12月）の新鮮排泄便を用いた。これらの患者の病期は単一ではなく，発病後数年のものも新鮮患者も含まれていて，また腹部症状も必ずしも一定でなく，とくに検体採取時に下痢を呈していた例は比較的少数であった。なお対象として引用した健康人大便の細菌叢は，すでに光岡（発表予定）

表1. 検査対象

対 象	地 域	例 数	合 計
スモン患者	呉	10	51
	東京 <sup>※</sup>	41	
健康人	東京	35	35

※東大，三栄，中島，関東中央，東京  
医科歯科大の各病院

が23才～85才の成人について検査した35例の成績である。厳密な意味での対照としては，各スモン例に適切に対応する非スモン例をとるべきであったが，現在の段階で大まかな目安をつけるという意味では，これを対照として比較することで十分な意味があると考えた。

検体の処理：腸内細菌叢のバランスは，排便後きわめて急速に変化しやすいので，検体は新鮮排出便を用い，輸送する場合には，嫌氣的に保存した0.05% L-cystein HCL・H<sub>2</sub>O，0.1% agar加Brain heart infusino broth (Difco) 9 mlに約1gの検体を取りこれを氷冷し，極力菌叢の変化を防ぐ措置をとった，検査は排便後できるだけ短時間に行ない，長くとも24時間以内には培地への接種が終わるようにした。

検体の希釈は嫌気性希釈液 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4.5g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6.0g, L-cystein HC H<sub>2</sub>O 0.5g, Tween 80 0.5g, Agar 1.0g, 精製水 1.000ml)<sup>3) 4)</sup> で10倍段階を行ない, その10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup> 希釈を非選択培地に, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-7</sup> を選択培地に接種した。

培地・培養法・成績の判定: 表2に示す培地を用い, 光岡ら<sup>3) 4)</sup>の方法に準拠して実施した。

表2. 検索培地と培養法

	使用培地	対象菌種	培養法
非 選 択 培 地	EG agar	嫌気性菌	CO <sub>2</sub> 置換スチール ウール法, 3~4日 好気性, 1~2日
	BL agar	グラム陽性嫌気性菌	
	Trypticase soy	好気性菌	
	blood agar		
選 択 培 地	BS agar	<u>Bifidobacterium</u>	CO <sub>2</sub> 置換スチール ウール法, 3~4日
	CS agar	<u>Catenabacterium</u>	
	NBGT agar	<u>Bacteroidaceae</u>	
	Neomycin Nagler agar	レンチナーゼ陽性 <u>Clo-</u> <u>stridium</u>	
	変法VS agar	<u>Veillonella</u>	CO <sub>2</sub> 置換, 2日 好気性, 2日 好気性, 1日 好気性, 2~3日
	変法LBS agar	<u>Lactobacillus</u>	
	TATAC agar	<u>Streptococcus</u>	
	DHL agar	<u>Enterobacteriaceae</u>	
	PEES agar	<u>Staphylococcus</u>	
	Potato dextrose agar	真菌類	

上述の如く, 適当に希釈した検体を培地に定量的に塗布し, 所定の培養後, 發育した集落について菌種の同定, 大便1g中の各菌群の数を算定した。

### III 成 績

健康人とスモン患者の大便1g中の総菌数および各菌群の菌数を対数によってあらわし, その均値を対比した成績は表3の通りである。

総菌数はスモン患者群では健康人群より約  $\frac{1}{5}$  に減少していた。この減少の主因を各菌群別菌数の変動に求めてみれば, 健康人で最優勢菌叢を構成する Bacteroidaceae, Catenabacterium および Bifidobacterium などの偏性嫌気性菌群の著明な減少に起因していることが明らかであり, またこれらの菌群の検出率をみると, スモン患者群では Catenabacterium および Bifidobacterium の検出率が著しく低下していることが認めら

た。

Lactobacillus は菌数としては健康人で大便中の総菌数の0.1% 足らずを占めるにすぎない菌群であるが常に検出されるのに対し、スモン患者では検出率78%に低下し、また検出例における菌数も減少していることが認められた。

一方Streptococcus や Enterobacteriaceae の菌群は、両群とも全例に検出されてはいるが、菌数を比較すると、スモン患者群の方がやや多い傾向にあることが観察された。

Veillonella に関しては、両群間に検出率の差はなかつたが、検出例における菌数は、スモン患者群の方がかなり高かつた。

Staphylococcus はスモン患者群での検出率が著明に低下していた反面、検出例の菌数は逆にスモン患者群において増加していることがうかがわれた。

Clostridium および Yeast も、検出率はスモン患者群では低かつたが、菌数には差がみられなかつた、その他の菌群に関しては、両群とも検出例が少ないので比較は困難である。

なお、Enterobacteriaceae に属する菌群中で、通常は優勢を示す乳糖発酵性大腸菌の菌数が比較的少ない例が多く、それに代って乳頭非発酵性菌 (Proteus, Citrobacter 等) や Klebsiella などが多く認められる場合が少なからずあった。

表3 健康人とスモン患者の腸内細菌叢の比較

菌種	健康人大便 (35例)			スモン患者大便 (51例)		
	平均 <sup>a</sup> (log/g)	検出範囲 <sup>b</sup>	検出率 (%)	平均 <sup>a</sup> (log/g)	検出範囲 <sup>b</sup>	検出率 (%)
<u>Bacteroidaceae</u>	10.2	8.1 ~ 11.2	97	9.2	6.2 ~ 10.8	96
<u>Catenabacterium</u>	9.7	7.3 ~ 10.9	91	8.7	3.8 ~ 10.5	75
<u>Bifidobacterium</u>	9.9	8.3 ~ 10.7	94	8.8	5.7 ~ 10.4	82
<u>Peptostreptococcus</u>	8.7	3.0 ~ 10.4	34	8.3	6.4 ~ 10.0	33
<u>Lactobacillus</u>	7.4	3.7 ~ 9.8	100	6.5	3.0 ~ 9.1	78
<u>Streptococcus</u>	8.2	5.3 ~ 10.6	100	8.7	4.5 ~ 10.6	100
<u>Enterobacteriaceae</u>	8.2	4.1 ~ 10.5	100	8.4	4.7 ~ 10.3	100
<u>Clostridium</u>	6.2	3.2 ~ 9.0	67	5.9	2.5 ~ 9.1	49
<u>Veillonella</u>	4.5	2.3 ~ 9.3	67	6.9	2.3 ~ 9.3	65
<u>Staphylococcus</u>	3.9	2.3 ~ 7.3	94	5.2	2.2 ~ 10.1	61
<u>Bacillus</u>	3.1	2.6 ~ 3.5	5.7	6.4	2.6 ~ 8.3	20
Mold	2.5	2.3 ~ 3.0	14	3.2	3.2	2.0
Yeast	3.8	2.3 ~ 6.9	74	4.2	2.3 ~ 8.7	59
Total	10.7	9.9 ~ 11.2		10.0	6.9 ~ 11.0	

a 検出された例のみの平均値

b 全く検出されない例を除く

さて、今回の成績を個々の例についてさらに分析・考察を考えてみた。すなわち、Catenabacterium、Bifidobacterium、Lactobacillus および Bacteroidaceae の菌数が著明に減少している点、また Streptococcus、Enterobacteriaceae、Veillonella、Staphylococcus が比較的増加している点を総合的に考慮して、細菌叢のバランスの乱れの甚しいものを「異常」とみなし、その程度の軽い例を「やや異常」として腸内細菌叢の異常例数を健康人群とスモン患者群との間で対比してみた。その成績は表4に示されている。これによれば、スモン患者群では異常な細菌叢を示す例が著明に多いことが明らかにされた。

表4. 健康人とスモン患者の腸内細菌叢の異常例数の比較

対 象	例 数	異 常	やゝ異常	正 常	異 常 率 (%)	
					異常+やゝ異常	異常のみ
スモン患者	51	28	7	16	69	55
健 康 人	35	1	2	32	8.6	2.9

最近、高須ら<sup>5)</sup>は、一部のスモン患者に緑毛舌が特異的なことを重視し、それにひきつづいて井形ら<sup>1)</sup>により一部のスモン患者に特異的な緑便・緑尿が発見されたことから、スモン患者における緑色物質がにわかに注目されはじめ、その本態に関する解析が急速に展開された。そして吉岡・田村<sup>6)</sup>によって、それがキノホルムと $Fe^{3+}$ のキレート化合物であることが明らかにされ、キノホルム中毒がきわめて有力なスモンの病因として登場した。

そこでわれわれは、検索した上記51例のスモン患者の腸内細菌叢をキノホルム服用との関係において検討した。すなわち、大便採取前7日間以内にキノホルム製剤を服用していた群と非服用群とに分けて、各群の細菌叢の異常率および各種菌群の検出率並びに菌数を比較してみた(表5, 6)。その結果、服用群に異常率が高く、また検出率・菌数においても、スモン患者と健康人との間で観察された相違とほぼ同様な傾向が、キノホルム服用群と非服用群との間でも存在することが観察され、Bacteroidaceae および Catenabacterium の検出率並びに菌数、Clostridium および Staphylococcus の検出率は、健康人群に比べキノホルム服用群において非服用群よりも低下が著しく、Enterobacteriaceae の菌数は、キノホルム非服用群では健康人群と同じ値であるのに対し、キノホルム服用群では著しい増加がみられ、また Streptococcus の菌数の増加においても、キノホルム服用群の方が顕著であった。これに対し、Bifidobacterium および Lactobacillus の変動はこれとやや異なり、キノホルム服用群で検出率が著明に低下しているにもかかわらず、検出例における菌数はキノホルム非服用群の方がむしろ低かった。このやや矛盾した事実と、Bifidobacterium が *in vitro* においてキノホルム  $60 \mu/ml$  に対してもなお耐性であることと総合すれば、Bifidobacterium の減少～消失の原因はキノ

表5 キノホルム服用スモン患者とキノホルム非服用スモン患者の腸内細菌叢の比較

	キノホルム非服用 (35例)		キノホルム服用 (16例)	
	平均 (log/g)	検出率 (%)	平均 (log/g)	検出率 (%)
<u>Bacteroidaceae</u>	9.3	100	9.0	88
<u>Catenabacterium</u>	8.8	83	8.4	56
<u>Bifidobacterium</u>	8.7	89	9.0	69
<u>peptostreptococcus</u>	8.3	31	8.3	38
<u>Lactobacillus</u>	6.4	80	6.8	75
<u>Streptococcus</u>	8.5	100	9.1	100
<u>Enterobacteriaceae</u>	8.2	100	8.6	100
<u>Clostridium</u>	5.8	63	6.2	19
<u>Veillonella</u>	6.9	66	7.0	63
<u>Staphylococcus</u>	5.1	63	5.6	56
<u>Bacillus</u>	6.5	20	6.4	19
Mold	3.2	2.9	0	0
Yeast	4.5	60	3.6	56
Total	10.1		10.0	

ホルム直接の殺菌作用とは考えられず、むしろ生体の病的状態とより深い関連をもっていることが推察される。同様の現象は、すでに HAENEL<sup>2)</sup> が、病的状態では疾病の種類に関係なく Bifidobacterium の減少がみられることを報告している。

最後に、以上のようなスモン患者の腸内細菌叢の異常が、スモンといかなる因果関係を有するかについて考察しよう。われわれが取

扱ったスモン患者には、発病後すでにかかりの月日を経過したものも含まれているから、その結には生体の異常状態、薬剤など各種の要因が強く影響しているものと考えられる。腸内細菌叢の常をもたらした原因として、キノホルムを含む何らかの原因によっておきた神経症状の1つの発としての腸管生理の異常あるいは腹部症状の結果としての細菌叢の異常が考えられるし、一方でスモン患者に多く服用されているキノホルムなどの薬剤の直接の殺菌作用としての腸内細菌叢のバランスの攪乱が考えられ、この両者が複雑にからみ合って表現されている場合も少なくないものと

表6 スモン患者のキノホルム服用、非服用と腸内細菌叢の異常例数の比較

キノホルム服用	正常*	異常	異常率 (%)
+	4	12	75
-	19	16	46
計	23	28	55

\*やや異常を含む

定される。しかしながら、これらの異常を惹起する前段階におけるスモンの前駆腹部疾患の原因や、発病のための生体側の素因などの発病初期における病因や、腸内細菌叢の異常とスモンの病像の進展との関係については現在のところなお不明で、今後さらに検討が進められなければならない。

## V 要 約

スモン患者51例について大便細菌叢の検索を行ない、健康人のそれと比較したところ、スモン患者では異常な細菌叢を示す例が著しく多いことが明らかとなった。すなわち、総菌数は、スモン患者では健康人の約 $1/5$ に減少し、Bacteroidaceae、Catenabacterium、Bifidobacterium およびLactobacillus の菌数は約 $1/10$ に減少し、これとは逆に、Streptococcus、Enterobacteriaceae およびVeillonella は2～200倍に増加していた。

さらに、これを大便採取前7日間以内にキノホルム製剤を服用していた群と非服用群とに分けて検討してみたところ、服用群に明らかに異常率が高く、とくにBacteroidaceae、Catenabacterium、Streptococcus およびEnterobacteriaceae などの菌群の菌数における健康人との相違は、非服用群に比べて、さらに著しいことが認められた。一方、Bifidobacterium およびLactobacillus の検出率は、キノホルム服用群の方が低いが、検出例における菌数は、むしろ非服用群より高かった。

## 文 献

1. 井形昭弘, 高須俊明, 豊倉康夫. (1970)  
SMON患者糞便中の緑色物質(予報). 医学のあゆみ 72: 637-638.
2. HAENEL, H. (1965) Gesetzmäßigkeiten in der Zusammensetzung der fäkalen Mikroflora. Eubiose und Dysbiose der menschlichen Darmbesiedlung. Ernährungsforschung 10: 289-301.
3. 光岡知足. (1970) 腸内フローラとその分離法, モダンメディア 16: 171-185.
4. MITSUOKA, T. SEGA, T. und YAMAMOTO, S. (1965)  
Eine verbesserte Methodik der qualitativen und quantitativen Analyse der Darmflora von Menschen und Tieren. Zbl. f. Bakt. I. Orig. 195: 445-469.
5. 高須俊明, 井形昭弘, 豊倉康夫. (1970)  
SMON患者にみられる緑毛舌について. 医学のあゆみ 72: 539-540.
6. 吉岡正則, 田村善蔵. (1970) SMON患者の緑色色素の本態. 医学のあゆみ 74: 320-322.



# SMON患者の緑尿および緑便に含まれる緑色物質の本態

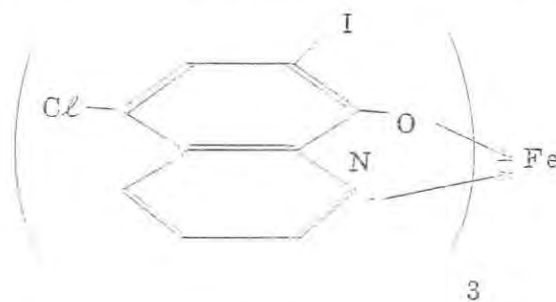
田村善蔵（東大薬学部）

## I 緒言

SMON患者の症状悪化時にしばしばみられる緑色舌苔、緑便および緑尿などが臨床において一つのナゾとされていたので、<sup>1)</sup> この色素の本態を究明することを目的として以下の実験を行なった。

## II 方法と結果

本学医学部 井形博士、三楽病院 長谷部博士より提供された緑尿<sup>2)</sup>（2/3日分）から色素を図1のように精製している際に多量の微黄色結晶AおよびBを得た。このAおよびBは同一物質であり、その融点（175°分解）、元素分析、IR、UVおよびNMR—スペクトルからキノホルムと同定された。キノホルムは $Fe^{3+}$ とキレートを作り緑色を呈すことから色素の本態は



ではないかと考え、これを合成した。<sup>3)</sup> 合成色素と分離精製した緑色物質を $CH_2Cl_2$  溶媒でUV—スペクトルを比較すると全く一致した。

またこの合成色素が薄層クロマトグラフィーより精製色素と一致することが確認された。さらに緑便より $CH_2Cl_2$  抽出した色素とも一致した。（図2）

Green urine (500ml) from a SMON patient

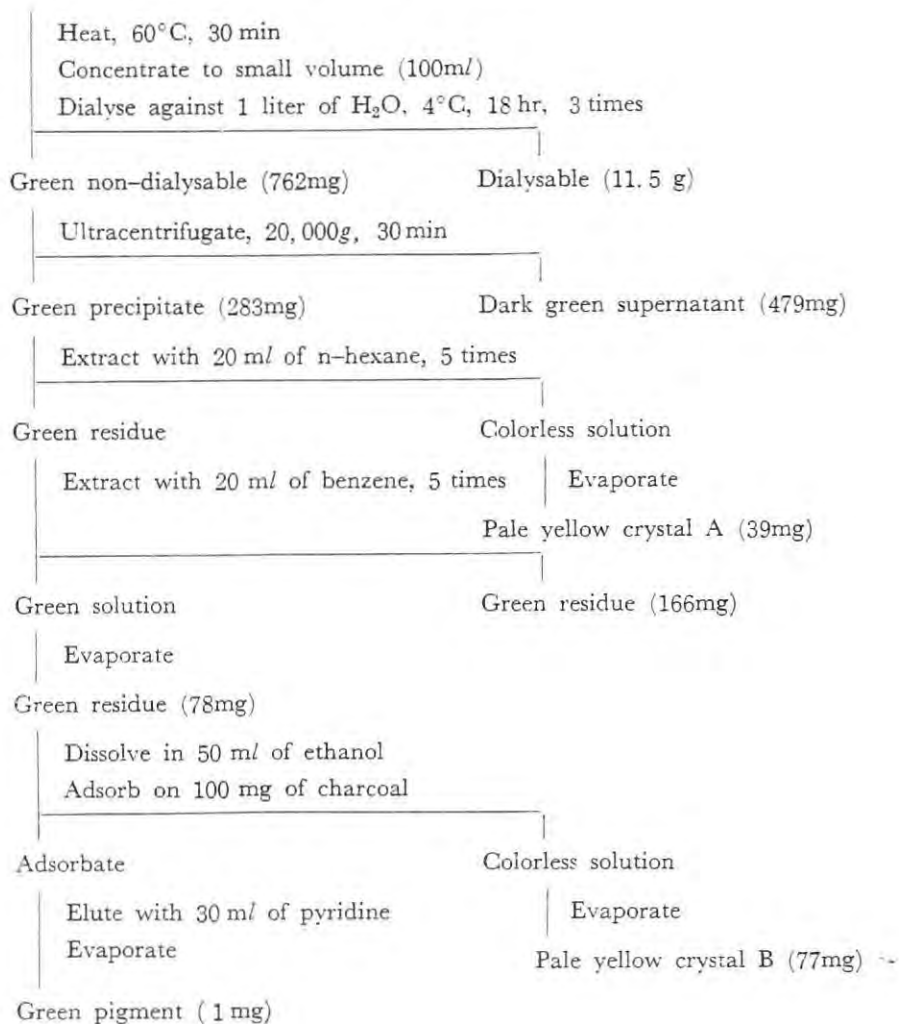


図1 緑尿からの分離

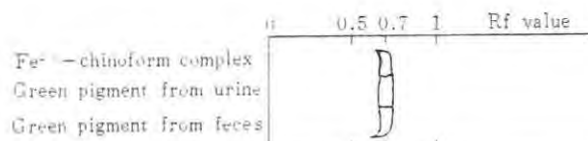


図2 酢酸で展開したシリカゲルG上の薄層クロマトグラム



### Ⅲ 考 察

これらの結果より投与薬剤を調べると、キノホルム（1日2g）とフマル酸第一鉄を服用していることがわかった。正常人尿に0.25%キノホルムのメタノール溶液を滴下しても緑色は生じなかった。さらに第二鉄塩を加えたところ緑色となった。したがって吸収されたキノホルムと同じく服用していた鉄剤と反応して尿が緑色を呈したと思われる。

以上、述べた様にSMON患者の尿中にはキノホルムが抱合体としてではなく、鉄キレートあるいは遊離のかたちで多量に（投与量の10%程度）排泄されていたが、この事実はSMONの病因解明に大きな手懸りとなるだろう。

### Ⅳ 要 旨

SMON患者の緑尿，緑便に含まれる緑色物質はキノホルムの鉄(Ⅲ)キレートであった。

なお，この緑尿中には多量の遊離キノホルムが排泄されていた。

### 文 献

- 1) 井形，高須，豊倉：医学のあゆみ，72，539，1970，同，72，637，1970
- 2) 井形，長谷部，辻：日本医事新報，No.2421，P25，1970
- 3) 吉岡，田村：医学のあゆみ，74，320，1970

# SMON患者の緑色舌苔からの キノホルムの検出

田 村 善 蔵 (東大 薬学部)

## I 緒 言

著者らはSMON患者の緑尿および緑便中の緑色物質がキノホルムの鉄キレートであることを前報で明らかにしたが、舌苔の緑色物質については組織と強固に結合して溶媒抽出が困難であったため直接証明できなかった。

そこでキノホルムのガスクロマトグラフィー(GC)を検討し、これにより緑色舌苔中のキノホルムの存在を追究した。

## II 方法と結果

キノホルムのトリフルオロアセチル(TFA)誘導体、トリメチルシリル(TMS)誘導体およびアセチル(Ac)誘導体の保持時間は表1に示す通りである。本研究においてはTFA誘導体により実際にキノホルムの分析を行ったが、TFA化に際して金属キレートからは金属イオンが脱離し、遊離のキノホルムと同一の誘導体を生じた。

表1 保持時間 (min)

column* temperature- carrier gas	2% OV-1 (1.5m × 4 mm) 170° 60ml/min	2% OV-17 (2 m × 4 mm) 180° 100ml/min	2% QF-1 (1.5m × 4 mm) 150° 60ml/min	2% XF 1105 (2 m × 4 mm) 180° 85ml/min
BHC (i.s.)	5.95	9.15	3.05	2.80
Chinoform-TFA	9.20	13.40	5.06	3.75
Chinoform-TMS	18.85	22.65	5.77	6.50
Chinoform-Ac	19.90	45.50	14.85	8.45

\* Glass tube was packed with each stationary phase on Gas-Chrom P (60~80 mesh)

〔操作法〕 キノホルム(約5~50 μg)に酢酸エチル0.1 mlおよび無水トリフルオロ酢酸0.05 mlを加え、1~2 μlを直接ガスクロマトグラフに注入する。

SMON患者の緑色舌苔に含まれる緑色物質はアセトン、ベンゼン、クロロホルム等で抽出されなかったため、緑色舌苔をピリジンに浸し、1週間放置したところ、緑色舌苔が褐色に変わった。そこでピリジン層を減圧乾固し、操作法に従ってTFA化後GCを行うと、2% QF-1および2% OV-

Iのカラムでキノホルムに一致するピークを認めた。(図1参照)。またピリジン抽出後の残渣を酢酸エチルと無水トリフルオロ酢酸によってTFA化しながら抽出するとさらに多量のキノホルムが検出され、2%OV-17, 2%XF-1105のカラムによっても検出された。従って緑色舌苔にキノホルムが含まれることは確実である。

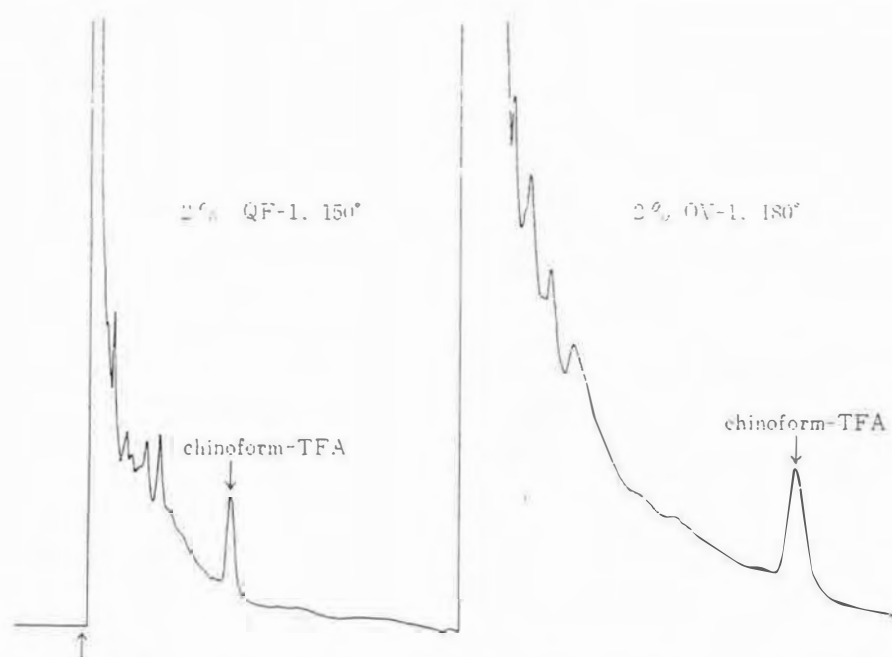


図1 緑色舌苔からのキノホルムの検出 (検出器: 水素炎イオン化検出器)

### III 考 察

さきに科学警察研究所の孤塚氏らによってSMONの緑色舌苔中に異常に多量のヨウ素が含まれていることが発見され、<sup>1)</sup>これがキノホルムであると推定されていたが、上記の実験事実からキノホルムの存在が確認された。従って舌苔中の緑色物質も緑尿や緑便と同様にキノホルムの $Fe^{3+}$ キレートであることが確実となった。<sup>2)</sup>

キノホルムおよび $Fe^{3+}$ キレートがSMON患者の舌苔に蓄積される機構は今後解明すべき問題であろう。

### IV 要 旨

SMON患者の緑色舌苔にもキノホルムが含まれていることが判明した。

### 文 献

- 1) 孤塚寛, 他: 医学のおゆみ, 75, 372, 1970
- 2) 今成, 田村: 医学のおゆみ, 75, 547, 1970

# 生体組織よりキノホルム検出の試み

## — 螢光比色法その他一、二の方法 —

上田喜一，河合正計，前橋浩，矢崎武，  
山中すみへ（東京歯科大学衛生学教室）

### I 実験計画

SMONの病因としてキノホルムが疑われる以上，この物質またはその代謝物質が神経組織に存在することを定量的に検出し，症状の重さと濃度とを関連づけることが必要である。さらに病理組織学的に特有の病変部位に高濃度に局在することを証明できればさらに確実となるであろう。

8-オキシキノリンは各種金属の螢光分析用試薬としてオキシンの名で実用化されている。キノホルム（5-クロル-7-ヨード8-オキシキノリン）も当然このような性質を有すると考えられる。ヨウ素のような重ハロゲンの導入は螢光度を減少させるといわれるが，この点はキレートさせる金属の選択により打消す方針をとった。

今回は予備試験として，ラットおよびマウスの経口亜急性中毒実験時の脳，脊髄，肝，腎について検出の可能性を検討した。

組織内局在性については螢光顕微鏡による組織化学的検出を試みた。

また物理学的組織化学法としてエレクトロンプローブマイクロアナライザーの応用も試みた。

ガスクロマトグラフ法では水素炎イオン化検知器に比較して数百倍ないし千倍の高感度であるとされる電子捕獲型検知器（エレクトロン・キャプチャー・デテクター）を応用してみた。

### II 実験方法

1) キノホルムとキレートする金属の中で，螢光が強く，しかも溶媒抽出が可能であるものを選び出す目的で，オキシンのに関する研究報告<sup>1) 2)</sup>から類推し， $Mg^{2+}$ ， $Zn^{2+}$ ， $Al^{3+}$ ， $Y^{3+}$ ， $La^{3+}$ ， $Zr^{4+}$ を選んだ。ガスクロマト法にも応用する関係からベンゼンを抽出溶媒とする予定なので，上記キノホルム錯塩のベンゼン溶液中の励起波長，螢光波長，螢光度を日立螢光光度計により測定した。

#### 2) 中毒動物

皮下或は筋注投与も試みたが，剖検時に注射局所に残留する濃厚キノホルムによる汚染を生じたので，経口投与方法を採用した。

どんりゆう系ラット（体重100～150g）にキノホルム（田辺製薬呈供）懸濁液を胃内に強制投与した。

亜急性中毒とし、薬量レベルは1000 mg/kg, 450 mg/kg群は2日間隔で計4回、150 mg/kg, 50 mg/kg群は連日10日間経口投与した。

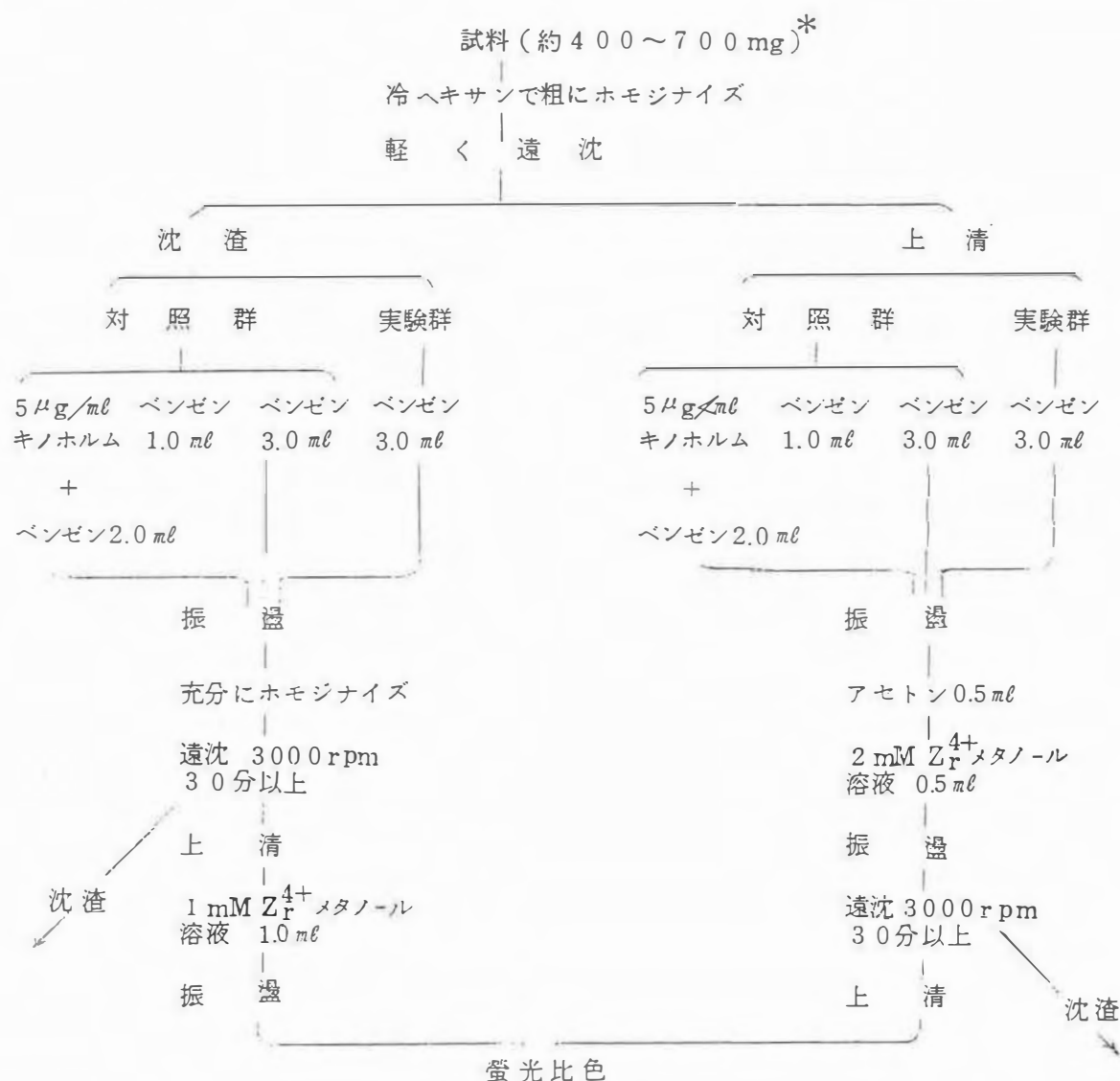
### 3) 組織からの抽出および蛍光比色

クロロホルム抽出も可能であるが、ガスクロマトグラフ用試料と兼用の場合不都合であるので、ベンゼンを採用した。

対照群の組織も相当程度の盲蛍光を呈するので、対照群の数匹からのそれぞれの組織を混合平均し、これにキノホルム標品一定量を添加して内部標準を毎回作製し、蛍光比色の基準とした。

抽出の操作を図式で示した(表1)。蛍光比色は八木式微量蛍光光度計(UM-S型)を使用し、励起光選択フィルターUV-V<sub>1</sub>, 励起光遮断フィルターUV-O<sub>1</sub>, 蛍光選択フィルターFL-B<sub>2</sub>を選んだ。

表 1



\* 対照群試料は、数匹分の試料を磨砕し、これより検体相当重量をとり、平均された対照として使用する。但し通常内部標準法をとるから対照群は2倍量を使用する。

### III 実験成績

1) 標品ジルコニウム・キノホルム錯塩はベンゼン中で励起波長386 m $\mu$ で最強の蛍光(波長520 m $\mu$ )を示し、検出限度は0.01  $\mu$ g/mlで、後述のガスクロマトグラフ法より50倍程度高感度であった。0.1~0.2  $\mu$ g/mlの範囲でほぼ直線性が得られた。

#### 2) 実験動物組織濃度

中毒動物はいずれも中毒神経症状を示さなかった。

測定値は表2に示すように個体差による変動が大きい、1000mg/kg群では全8例に定量可能な値が示され、450mg/kg群では測定限界以下(検出せず=N.D.)の例が現われ、それ以下の薬量レベルでは測定可能な例数の方が少ない。

表2 ラット経口投与による組織キノホルム量

	1000 mg/kg 2日間隔4回投与	450mg/kg 2日間隔4回投与	150mg/kg 連日投与10回	50mg/kg 連日投与10回
脳 $\mu$ g/g 脳重量	0.78    0.28	0.64	0.15	0.15
	0.14    0.35	0.07	N.D 7 samples	N.D 7 samples
	0.50    0.32	0.1		
	0.36    1.6	N.D 5 samples		
	n = 8	n = 8	n = 8	n = 8
	mean    0.54	mean    0.27		
	median 0.53	median 0.1		
脊髄 $\mu$ g/g 脊髄重量	1.7	3.2	0.13	0.55
	2.8	1.2	0.43	N.D
	2.9	2.2	N.D	N.D
	3.7	N.D	N.D	N.D
	n = 4	n = 4	n = 4	n = 4
	mean    2.8	mean    2.2	mean    0.28	
	median 2.9	median 2.2		

注：脊髄は半数をガスクロマト法の試料としたので例数が少くなる。

N.D = non-detectable

脳と脊髄では、常に後者の濃度が高く、1000 mg/kg群では450 mg/kg群と比較して脳内濃度は2倍程度高いが、これを体重kg当りキノホルム1g投与の場合に換算すると表3に示すようにほぼ等しい値となり、総投与量に比例することを意味する。

脊髄では450 mg/kgの方が投与量に対して高能率に組織に移行していて、脳：脊髄の比は高濃度群では1：5であるのに、450 mg/kg群では1：8になった。

しかし脊髄はガスクロ用試料としてサンプル数が半減しているため統計的信頼度が少く、また450 mg/kg群では検出不能個体が含まれるので公平な平均とは言えないであろう。

表3 投与量と組織濃度との関係

A. 1000 mg/kg 2日間隔 4回経口投与の場合			
脳	0.14 $\mu\text{g/g}$	脳重量	/Chinofom g/kg体重
脊髄	0.7 $\mu\text{g/g}$	脊髄重量	/Chinofom g/kg体重
B. 450 mg/kg 2日間隔 4回経口投与の場合			
脳	0.15 $\mu\text{g/g}$	脳重量	/Chinofom g/kg体重
脊髄	1.2 $\mu\text{g/g}$	脊髄重量	/Chinofom g/kg体重

#### IV 考 察

本実験に使用した抽出法でキノホルムが組織から完全に抽出されたかどうかの検討は不十分である。グルクロナイド型, MgまたはFeとのキレートは抱合の解離, pHの調整, 或は $Zr^{4+}$ を直接試料に作用させるなどの検討を加えなくてはならないと考えられる。

蛍光法は高感度であるが, 波長に特異性が少いので盲蛍光が高い欠点を免れない。これに打勝つためには他の分離法を前処理として併用する必要がある。

これらの諸点を改良した後, 患者試料に応用したいと考える。

#### V その他の検出法

##### 1) キノホルムの組織化学(蛍光)的検出の試み

クリオスタットによる凍結切片をアルコール液で脱水,  $Zr^{4+}$ メタノール溶液(20 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ )に10分間浸し, 無蛍光グリセリンで封入し蛍光顕微鏡で検鏡した。(励起波長365 $m\mu$ )。

キノホルム結晶粉末は強い蛍光を発するが, 中毒動物の臓器では肝の血管壁にのみ蛍光物質の沈着を認めたと, 対照群にも類似所見が認められたので, 他の物質と考えられる。腎, 脊髄では強い蛍光を認めず, 現在のところ満足すべき成績を得られなかった。

##### 2) エレクトロン・プローブ マイクロアナライザー(E PMA)の応用

キノホルム分子中にヨウ素を含有することに着目して, ヨウ素の甲状腺以外の組織に分布すること, ことに局在性を証明すれば組織化学的証明になると考え, 当大学設置の日立XMA-5型を利用した。

ヨウ素の特性X線波長 $L\alpha = 3.14 \text{ \AA}$ であるが, キノホルム標品について波長検査を行うと, この波長で最大特性X線強度を得た。

1000 mg/kg投与群ラットの脊髄を10%ホルマリンに固定した後, クリオスタットで凍結切片(約20 $\mu$ )を作製した。検出操作としては, 試料にアルミニウム蒸着を施し, 波長を3.14 $\text{ \AA}$ に固定して線分析および面分析を行った。脊髄の白質部および灰白質部について, 検出操作を行ったが, いずれからも陽性所見は得られなかった。



EPMAによる検出には相当高濃度の存在が必要なこと，代謝によりヨウ素が離脱している可能性（スイスの文献記載），試料作製法の不完全などの種々の条件の検討が完了していないが，濃度不足が最大原因と考えられる。一応中間報告として経過を報告する。

### 3) ガスクロマトグラフ法

すでに田村らは，キノホルムを沸点の低いトリフルオロ酢酸エステルとしてガスクロ測定（水素イオン化検知器）が可能なことを報告したが，私共は電子捕獲能の大きいヨウ素の分子内存在に着目して，electron capture detectorによる直接ガスクロ分析を試みた。

ガスクロ条件：充填剤 2% DEGS + 0.5% リン酸，担体 Chromosorb WAW, HMDS, ガラスカラム， $\phi 4\text{ mm} \times 1.5\text{ m}$ ，温度 注入部  $172^\circ$ ，カラム  $182^\circ$ ，検出器  $200^\circ$ ，キャリアガス  $\text{N}_2$   $25\text{ ml/min}$

キノホルム標品では  $0.5\text{ }\mu\text{g/ml}$  ベンゼンまで検出可能であったが，生体試料では  $2.5\text{ }\mu\text{g/g}$  程度の検出感度であった。

上記中毒ラットの組織抽出液では 1 例を除き検出不能で，再現性が低かった。これは濃度の点で当然の結果と考えられ，さらに抽出法の改良，抽出液の濃縮の検討が必要であろう。

## VI 要 旨

キノホルムが金属蛍光分析試薬オキシソルと類似構造を有することに着目し，その金属キレートを検討しジルコニウム（Zr）錯塩が最も蛍光が強いことを見出した。

被検中毒ラットはキノホルム懸濁液を胃内に強制注入した。そのレベルは  $1000$  および  $450\text{ mg/kg}$ ，2 日間隔 4 回の 2 群， $150$  および  $50\text{ mg/kg}$ ，連日 10 日間の 2 群。

臓器組織はヘキサソ抽出沈渣を少量のベンゼンで抽出，Zr-メタノール溶液と反応させ，微量蛍光度計で定量した。盲蛍光が高いので対照群の数匹から得た該当臓器のヘキサソ抽出残渣に一定量のキノホルムを添加して内部標準として定量の基準とした。

その結果，最高濃度群の脳  $0.54\text{ }\mu\text{g/g}$ ，脊髄  $2.8\text{ }\mu\text{g/g}$ ， $450\text{ mg/kg}$  群ではそれぞれ  $0.27\text{ }\mu\text{g/g}$  および  $2.2\text{ }\mu\text{g/g}$  を得たが，このレベルでは脳 8 例中 5 例，脊髄 4 例中 1 例の検出不能例があり，さらに低濃度投与群では検出可能例の方が少なくなった。

今回の抽出法では組織存在量の一部しか抽出し得ないという疑があるが，この成績から脊髄には脳の数倍の高濃度に移行することが示された。

同一方法で直接に組織蛍光化学的検出を試みたが成功しなかった。

エレクトロンプローブ マイクロアナライザーによりヨウ素の特性 X 線波長  $3.14\text{ \AA}$  で中毒ラットの組織切片から非破壊的組織化学的検出を試みたが，線分析でも面分析でも陰性所見しか得られなかった。

電子捕獲型検知器を具えたガスクロマトグラフによるキノホルム検出感度は，標品では  $0.5\text{ }\mu\text{g/ml}$



ベンゼンであったが、生体試料からの検出感度は $2.5 \mu\text{g/g}$ 程度で、上記中毒ラットの脳、脊髄からは1例を除き、検出不能であった。

## 文 献

- 1) 西川泰治，重松恒信：無機けい光分析に用いられる有機試薬(1)，ドータイトニュースレター，17(2)，2～10，1969
- 2) 西川泰治：蛍光分析法に関する研究(第10～11報)，オキシン金属錯塩の蛍光特性とその蛍光分析法への適用性について，日本化学雑誌，79，1003-1007，1958
- 3) 今成登志男，田村善蔵：SMON患者の緑色舌苔からのキノホルムの検出。医学のあゆみ，75，10，547-548，1970

# キノホルムグルクロナイドの合成 およびその性状

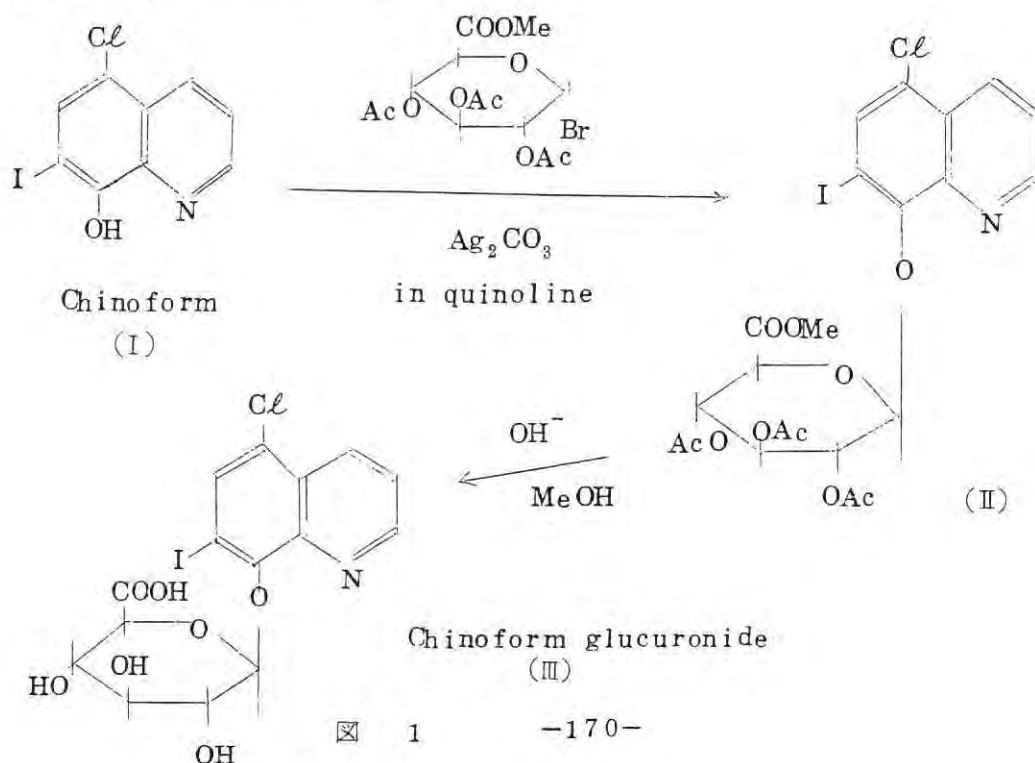
田村善蔵 (東大薬学部)

## I 緒言

キノホルムの抱合体の定量法を確立するため、およびその生体に対する作用を調らべるためにキノホルムのグルクロナイドの合成を試みた。従来Haskinsら<sup>1)</sup>によってキノホルム投与ウサギの尿中より粗なグルクロナイドが分離されているが、いまだ純粋な結晶として分離されていない。

## II 合成<sup>2)</sup>

図1のような経路に従って合成した。すなわちキノホルムとアセトブromグルクロン酸メチルエステルを炭酸銀および焼石膏の存在下キノリン中で24~48時間室温で反応させ40~50%の収率で縮合物(II)を針状晶として得た。融点213~214°,  $[\alpha]_D^{25} -5.0^\circ$  (C=0.35 dioxane), UV  $\lambda_{\max}^{\text{dioxane}}$   $m\mu$  ( $\epsilon$ ): 250(32,300), 305(4,260)。元素分析: 理論値C, 42.50; H, 3.40; N, 2.25, 実測値C, 42.34; H, 3.28; N, 2.27%。マスペクトル:  $M^+$  検出されず,  $M-AcOH$  (562  $m/e$ )。キノホルム (305  $m/e$ ), グルクロン酸部分 (317  $m/e$ ), 沃素 (127  $m/e$ ), アセチル (43  $m/e$ ) を検出する。



縮合物Ⅱをメタノールに懸濁し氷冷下1N NaOHを加え保護基を加水分解し、カチオン交換樹脂カラムを通し、水洗した後、樹脂に吸着したグルクロナイドをピリジン-水(1:9)で溶出し、キノホルムグルクロナイドを80~90%の収率で得た。NaOHの代りに当量のBa(OH)<sub>2</sub>メタノール溶液を氷冷下加え一夜氷室に放置した後当量のシュウ酸を加えpH約4にし沈澱物を除去し母液を濃縮し、クロロホルム抽出した残渣をアセトンで熱時抽出を行い同様な収率でキノホルムグルクロナイドを得た。白色針状晶、融点176~177°(分解)、 $[\alpha]_D^{21} -11.4^\circ$ (C=0.22, MeOH),  $UV \lambda_{max}^{MeOH} m\mu$  (ε):250(31,900), 305(4,470)。元素分析:理論値C, 37.41;H, 2.72;N, 2.91, 実測値C, 37.50;H, 2.73;N, 2.94%。

### Ⅲ 一般的性質

キノホルムグルクロナイドはメタノールに比較的よく溶解する。熱水にも溶解し、冷却するとゲル状になる。アルカリによく溶解する。エタノール、アセトンに難溶であるが加熱すれば溶解する。ベンゼンあるいはクロロホルムに不溶であるので遊離のキノホルムとはベンゼンあるいはクロロホルム抽出で分離できる。

またキノホルムグルクロナイドは遊離キノホルムのようなキレート性はない。

### Ⅳ ガスクロマトグラフィー

イオン交換樹脂、ポリスチレン樹脂などで選択的に生体中からキノホルムグルクロナイドを分離し、ジアゾメタンでカルボキシル基をメチルエステルに導き、ついでピリジン中へキサメチルジシラザンとトリメチルクロシランでトリメチルシリル化し、2% QF-1または2% OV-1, 220°の条件でガスクロマトグラフィーを行えば単一なピークとして分析できる。なおこの分析方法について検討中である。

### Ⅴ β-グルクロニダーゼによる加水分解

0.1M酢酸緩衝液(pH 4.63), 38°で牛肝β-グルクロニダーゼ(東京臓器:100倍稀釈)と基質複合体の解離定数K<sub>m</sub>を測定し比較的加水分解されやすいフェノールフタレインモノグルクロナイド(PMG)と比較した。遊離したキノホルムはALキレートとし蛍光法で測定した。PMGより加水分解を受けやすい(図2)。

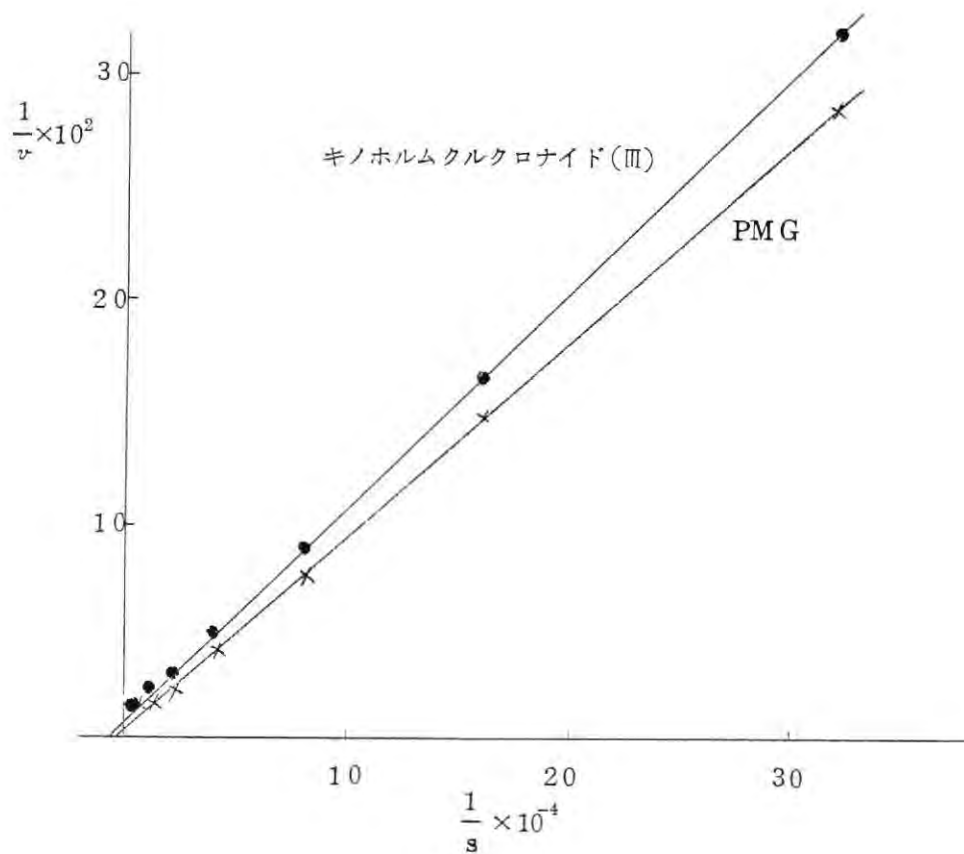


図 2

## VI 要 旨

キノホルムのグルクロナイドを合成した。グルクロナイドは水にとけるが、キレート生成能を欠き、 $\beta$ -グルクロニダーゼで比較的容易に加水分解される。

## 文 献

- 1) W. T. Haskins et al.: J. Pharmacol. Exptl. Therap., 109, 201, 1953.
- 2) I. Matsunaga et al.: Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 19, 1971, in press.