

# スモン調査研究協議会研究報告書

No.9

昭和 46 年度キノホルム部会研究報告

昭和 47 年 3 月

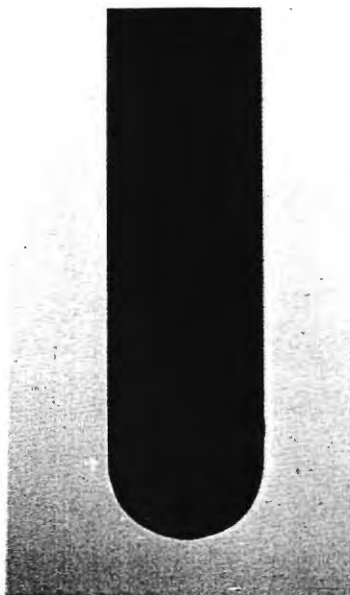
スモン調査研究協議会



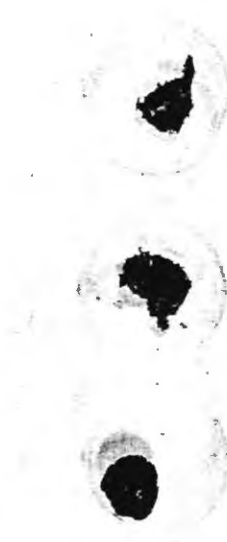
Green Tongue in a Patient with SMON



Hairy Appearance of the Green Tongue with Hyperkeratosis  
(Microphotograph of Unstained Material)



Dark Green Urine Excreted from a Patient with SMON



Green Feces Excreted from a Patient with SMON

Crystalline and Amorphous Material in the Sediment of the Green Urine  
(Microphotograph)





スモン調査研究協議会

昭和46年度 キノホルム部会員名簿

|    |    |   |     |                      |
|----|----|---|-----|----------------------|
| 池  | 田  | 良 | 雄   | 国立衛生試験所毒性部           |
| 上  | 田  | 喜 | 一   | 東京歯科大学衛生学教室          |
| 故  | 浮  | 田 | 忠之進 | 東京大学薬学部衛生裁判化学教室      |
| 右  | 京  | 成 | 夫   | 京都大学医学部第1内科          |
| 宇  | 野  | 豊 | 三   | 京都大学薬学部薬品分析学教室       |
| 浦  | 久保 | 五 | 郎   | 国立衛生試験所放射線化学部        |
| 江  | 頭  | 靖 | 之   | 国立予防衛生研究所病理部         |
| 太  | 田  | 邦 | 夫   | 東京大学医学部病理学教室         |
| 大  | 月  | 三 | 郎   | 岡山大学医学部神経精神医学教室      |
| 緒  | 方  | 正 | 名   | 岡山大学医学部公衆衛生学教室       |
| 小  | 川  | 勝 | 士   | 岡山大学医学部病理学教室         |
| 奥  | 田  | 邦 | 雄   | 千葉大学医学部内科            |
| 奥  | 野  | 良 | 臣   | 大阪大学微生物病研究所          |
| 金  | 光  | 正 | 次   | 札幌医科大学衛生学教室          |
| 河  | 合  |   | 忠   | 日本大学医学部駿河台病院臨床病理科    |
| 黒  | 岩  | 義 | 五郎  | 九州大学医学部脳神経病研究所神経内科   |
| 小  | 坂  | 淳 | 夫   | 岡山大学医学部第1内科          |
| 白  | 木  | 博 | 次   | 東京大学医学部脳研究所病理部       |
| 祖父 | 江  | 逸 | 郎   | 名古屋大学医学部第1内科         |
| 武  | 内  | 忠 | 男   | 熊本大学医学部病理学教室         |
| 田  | 村  | 善 | 蔵   | 東京大学薬学部薬品化学分析教室      |
| 俵  |    | 寿 | 太郎  | 岡山大学医学部微生物学教室        |
| 椿  |    | 忠 | 雄   | 新潟大学脳研究所神経内科         |
| 豊  | 倉  | 康 | 夫   | 東京大学医学部脳研究所神経内科      |
| 花  | 野  |   | 学   | 東京大学薬学部製剤学教室         |
| 松  | 岡  |   | 理   | 放射線医学総合研究所障害基礎研究部第4室 |
| 三  | 好  | 和 | 夫   | 徳島大学医学部第1内科          |
| 八  | 木  | 国 | 夫   | 名古屋大学医学部第1生化学教室      |
| 山  | 田  | 英 | 智   | 東京大学医学部解剖学教室         |
| 米  | 沢  |   | 猛   | 京都府立医科大学病理学教室        |

五十音順

## 序

部会長 江 頭 靖 之

キノホルム部会は本協議会が46年度から部会制をとるにあたって新たに設けられた部会である。ここに部会成立のいきさつと研究目標等を記し、あわせてこれまでの研究進捗状況の概要を述べて序にかきたい。

話がいささか遡るが、昭和44年の秋、本協議会が発足した当時スモンの原因についてすでに感染説、ビタミン欠乏ないし代謝障害説、各種の中毒説からアレルギー説まで各様の推測がおこなわれていた。それぞれに大なり小なりの根拠があったが、スモン患者の発生状況、臨床症状や剖検所見までも説明するには具体的な証拠が不十分で、説得力に乏しかった。そのような折であったから協議会は、会員を疫学、臨床、病原、病理という四つの方法論的専門分野に分け、まずスモンの原因究明への確実な足掛りを求めるための研究組織をつくった。当時スモン患者発生に地域集積性があることが強調されたため、ウイルス、マイコプラズマを含む微生物が原因として有力視された。一方症状の一つである緑舌を執拗に追求したグループの着目がやがて実を結び、翌45年初夏には糞便や尿まで緑色にすることがあるこの緑色物質がキノホルムの鉄キレート物であると同定された。この成果は別のグループによって直ちにスモン患者のキノホルム剤服用調査へと進められた。その結果キ剤への疑が深まるとともに、早くも9月上旬には厚生省によってキ剤使用見合せという行政措置がとられた。その後全国のスモン患者を対象とした服用調査成績もキノホルム原因説を支持する結果となったが、これを否定するデータは少なかった。

このようにして昭和46年度を迎えた。具体的にウイルスやキノホルムという原因因子が挙げられてくると、それら因子の一つ一つを十分に検討することが当然とられるべき方針でありそれに向って会員の専門知識を集約的に動員することが要請された。なぜならばその解決は患者諸氏の不安の軽減や治療対策と病気の予防方針決定のために緊急かつ切実だからである。従って研究組織の中にも、端的に微生物とキノホルムを標榜した研究グループを作ることになった。同時に協議会は冒頭に述べた通りに、班制から部会制へと発展的な編成替えをおこない、微生物部会とキノホルム部会とが、疫学・保健社会、治療予後、病理の各部会とならんで編成された。

キノホルム部会の発足にあたって、先ずスモン患者の発生状況、臨床的事項、病理所見についての特殊性を列挙し、これらがキノホルムによって説明できるか否かを検討し、それぞれの項目について調査、確認、検索等を要する問題点とその重要度とを整理した。その中には、外国におけるキ剤使用の実状を知ること、感染説の有力な根拠となった病院の症例についてキ剤服用調査をすること、低発

生地域の住民の服用状況についての諸調査およびキノホルムを服用していないスモン患者の精査が含まれていたが、すでに疫学臨床関係の2部会が実働しているので、この方面の研究はすべて両部会に任せることにした。

いきおいキノホルム部会はそれ以外、言いかえると実験室的手段でおこなえる範囲で、キノホルムとスモンとの関係の有る無しをあきらかにするための研究を担当することになった。その結果として、キノホルム部会という名称からすれば、キノホルム関係の臨床・疫学等を含むべきであるにもかかわらず、内容的に全領域に及ばないことになった。これを多少とも補ったとすれば、協議会がこの年度から各部会における発表や討論の内容をその都度全員に速報するという方法をとったこと、年度末の協議会総会において総合討論の時間を予定したこと、および臨床各科所属の会員のうち実験室的手段によるデータを発表してきた方は当部会員にお願いしたことである。

以上のような事情から、協議会研究報告書の46年度のシリーズの編集に際しても、キノホルム服用者に関する臨床（治療予後）疫学等のデータはすべてそれぞれの部会報告に収録され、本キノホルム部会報告には含まれていないことをとくにお断りしておかねばならない。

目前の課題であるキノホルムとスモンとの因果関係を実験室内の研究手段によって明らかにするために次の4重点研究目標をかかげた。1) キノホルムを経口投与することによって、実験動物に、できれば2種以上の動物にスモン患者の定型的病変にできるだけ近い病変を起させることが急がれた。これが確実になればキノホルムによる人体スモン研究に対して有力な基盤が得られ、それをモデルとして各方面への進展が可能になる。2) 因果関係を明らかにする上で次に重要なのは投与されたキノホルム自身が神経系に達しそこに障害が起るまで滞留しているか否かの問題であり、3) 同時に体内キノホルムの定性的定量的の証明法が是非とも開発されなければならない。これはスモン症例におけるキノホルム服用の有無の客観的証明に欠かせないし、さらには動物種や個体間の発症の難易を攻める一つの重要な手掛りも与えることが期待される。4) キノホルムの体内への吸収、その後の代謝過程と神経その他への作用機構の研究も欠かせない。

以上のような研究目標をかかげ、しかも限られた予算をできるだけ効率よく使うために、標識キノホルムやビーグル犬のような高価な研究材料を共同購入する方法もとられた。そのためにある部会員には自由な発意にもとづいた研究が後廻しになるようなことも生じたと思うが、幸に部会員の協力が得られた。年度内に3回開かれた当部会の研究会において研究発表とならんで、研究方針や結果の整理についても長時間討論された。

実験室内手段によって達成すべき第1の目標はイヌ、ネコを用いて略々達せられた。<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup> その後本報告書ができあがるまでに、サルとウサギについてもキノホルムを経口投与によって脊髄のゴル束に明らかな病変が発生したという発表があった。

すなわちそれらの動物の神経の病理組織像は、人体スモンの定型的組織変化と同じ範疇に属する病変と判断され、その投与法、1日投与量、投与期間などについても患者例とそれほどかけ離れた条件ではないといつてよかろう。第2の目標に対して標識キノホルムが有効に使われて病変部への滞留など注目すべき成果が得られたが、長期間にわたる実験については予算上も施設、技術の点でも制約があって問題が将来に残された。第3の目標については、有力な生化学的ならびに組織化学的証明法が開発されて応用の道が開かれたのは大きな収穫であった。第4の目標に対する研究もすぐれた発想にもとづいたデータが数多く発表された。一方、中毒過程の追求に必要な基礎的知識の積上げの不足もおおいきれず、すべての過程が早急には解明されないとしても、原稿締切りの後にも着々と成果があがりつゝあることはまことに喜びにたえない。

以　　上

## 目 次

|                                        |    |
|----------------------------------------|----|
| スモン調査研究協議会キノホルム部会員名簿                   | i  |
| 序                                      | ii |
| 1.キノホルムの毒性に関する研究                       | 1  |
| 2.マウスのキノホルム長期経口投与実験                    | 10 |
| 3.キノホルムの蛍光分析                           | 16 |
| 4.キノホルムの体液中濃度の測定 (I)                   | 22 |
| 5.キノホルムの体液中濃度の測定 (II)                  | 27 |
| 6.キノホルムの体液中濃度の測定 (III)                 | 29 |
| 7.Chinoform- <sup>14</sup> C の代謝 (第一報) | 31 |
| 8.ウズラを用いたキノホルム投与実験                     | 38 |
| 9.キノホルムによると思われる肝内閉塞性黄疸                 | 47 |

|                                          |     |
|------------------------------------------|-----|
| 10.キノホルムの神経毒性に関する動物実験                    | 49  |
| 11.標識キノホルムの生体内分布, 代謝                     | 84  |
| 12.キノホルム投与量と発症の関係 Retrospective の調査      | 133 |
| 13.カニクイ猿を使用してのキノホルムの経口投与実験               | 136 |
| 14.乳化剤の配合がキノホルムによるスモン発症に及ぼす影響            | 139 |
| 15.CMC が経口投与したキノホルムの血中出现に及ぼす影響           | 144 |
| 16.キノホルムを投与した動物血清の血球凝集反応                 | 148 |
| 17.SMON 患者血清のマスマスペクトログラフによる微量成分元素の分析     | 151 |
| 18.SMON および実験的キノホルム中毒における末梢神経病変の形態学的比較研究 | 156 |
| 19.Gunn rat に対する Chinoform の長期投与成績       | 162 |
| 20.スモンの病理学的研究 キノホルムの組織化学的証明について          | 166 |

|                                        |     |
|----------------------------------------|-----|
| 21.スモン患者の血清ヨウ素とキノホルムの関係                | 182 |
| 22.キノホルムグルクロナイドの代謝・排泄                  | 184 |
| 23.胆汁酸によるキノホルムの可溶化                     | 186 |
| 24.血清キノホルムの微量定量法                       | 187 |
| 25.肝・腎中のキノホルムの微量定量法                    | 190 |
| 26.スモン剖検例の臓器中のキノホルムの測定成績               | 193 |
| 27.キノホルムによるラットの末梢神経障害の電子顕微鏡的観察         | 195 |
| 28.キノホルム投与による臓器金属含有量の影響                | 198 |
| 29.C <sup>14</sup> -キノホルムのラット生体内における分布 | 201 |
| 30.C <sup>14</sup> -キノホルム排泄の化学的形態      | 204 |
| 31.キノホルム投与ラットの末梢神経代謝                   | 207 |
| 32.放射線標識キノホルムのマウス、イヌの神経系への摂取、分布、および滞留  | 210 |

|                                             |     |
|---------------------------------------------|-----|
| 33.培養神経組織（鶏胚脊髄後根神経節）におけるキノホルムの影響            | 227 |
| 34.ラットに於けるキノホルムの消化管吸収に及ぼす製剤化の影響             | 236 |
| 35.標識キノホルムの代謝，分布に関する研究                      | 244 |
| 36.キノホルム糖尿病家兎の作成（繰返し静注）                     | 261 |
| 37.キノホルム糖尿病家兎の尿中メチルマロン酸（MMA）排出              | 265 |
| 38.キノホルムの carbonic anhydrase（Zn 含有）に対する阻害効果 | 267 |
| 39.キノホルムの睡眠に及ぼす影響                           | 270 |
| 40.ミトコンドリアの呼吸調節におよぼすキノホルムおよびその類似物質の作用       | 278 |
| 41.キノホルムのミトコンドリアへの影響                        |     |
| —キノホルムの脱共役作用とキレートイオンとの関係                    | 280 |
| 42.蛙の座骨神経の活動電位および蛙腹部上皮の短絡電流                 |     |
| および蛙皮抵抗におよぼすキノホルムの影響化学的形態                   | 281 |
| 43. $^{14}\text{C}$ -キノホルムの組織切片へのとり込み       | 283 |



|                                                 |     |
|-------------------------------------------------|-----|
| 44.キノホルムのラット脳へのとりこみについて                         | 284 |
| 45.実験的キノホルム中毒の神経病理 (I) 一次知覚ニューロン                | 287 |
| 46.後根神経節培養に及ぼすキノホルムの影響                          | 293 |
| 47.キノホルムの障害作用に対する増強因子の研究<br>—各種農薬前処理による障害加算性の追求 | 302 |
| 48.キノホルム投与家兎の筋電位と病理所見との対比                       | 313 |

# 1. キノホルムの毒性に関する研究

池田 良雄, 戸部 満寿夫, 小林 和雄  
鈴木 幸子, 川崎 靖

( 国立衛生試験所・毒性部 )

## I. 緒 言

キノホルムの毒性を明らかにする目的で、動物（ニワトリおよびモルモット）による毒性実験を行っており、既に成績の一部を昨年度の研究報告書に発表した。

今回、ニワトリを用いて性差および年令差によるキノホルムの毒性の差を見るために実験を行ったので報告する。

## II. 幼鶏による実験

方法 前報で用いたと同じ局方キノホルムを同じ方法で3カ月間に亘り、1日1回 連続経口投与（但し日曜日を除く）した。

動物は孵化後7週令のニワトリ雄雌各々20羽で、これを雄雌各々5羽からなる4群に分け、キノホルムの投与量に対応して低用量（ $200\text{ mg/Kg/day}$ ）、中用量（ $500\text{ mg/Kg/day}$ ）、および高用量（ $1000\text{ mg/Kg/day}$ ）群とし、残り1群を対照群とした。

一般症状および体重を毎日観察・測定し、3カ月目に動物を解剖して血液学的検査、血液の生化学的検査、および病理組織学的検査を行った。

## 結 果

### 1. 体重

体重の推移を図1に示す。雌の低用量群を除いて処置群ではいずれも対照群に比べ増加の抑制傾向を示す。しかし、用量間には一定の傾向が殆んど見られない。

### 2. 一般症状

雄では、低用量で1例に2週間後に流涎を認めるが間もなく消失する。中用量群では3週頃1例に鶏冠、肉髯（にくぜん）、口腔粘膜の褪色（貧血様症状）および軽度の歩行障害が生じ、その翌日死亡した。また別の1例は5週頃から同様の症状を呈し、3日後に末期状態になる。また他の1例は明らかな症状の発現なく6週後に死亡した。高用量群では3週頃1例に流涎が認められ、その後約1週して貧血様症状と軽い歩行障害が現われ、さらに10日後に死亡した。また別に2例が約5週頃に流涎を呈したが、その後自然に回復する。さらに、他の1例は約4週後から軽度の跛行を示し、その後弱い貧血様症状を示したが、漸次これらの症状が消褪した。

一方雌では、低用量および中用量群ともに対照群と比べほとんど差がなく、死亡例も出現しない。高用量群では4週後に1例が舌表面の黒褐色化を呈し、2日後弱い貧血様症状が認められ、さらにその10日後に死亡した。別に1例が約8週後に特異な症状の発現なく死亡した。

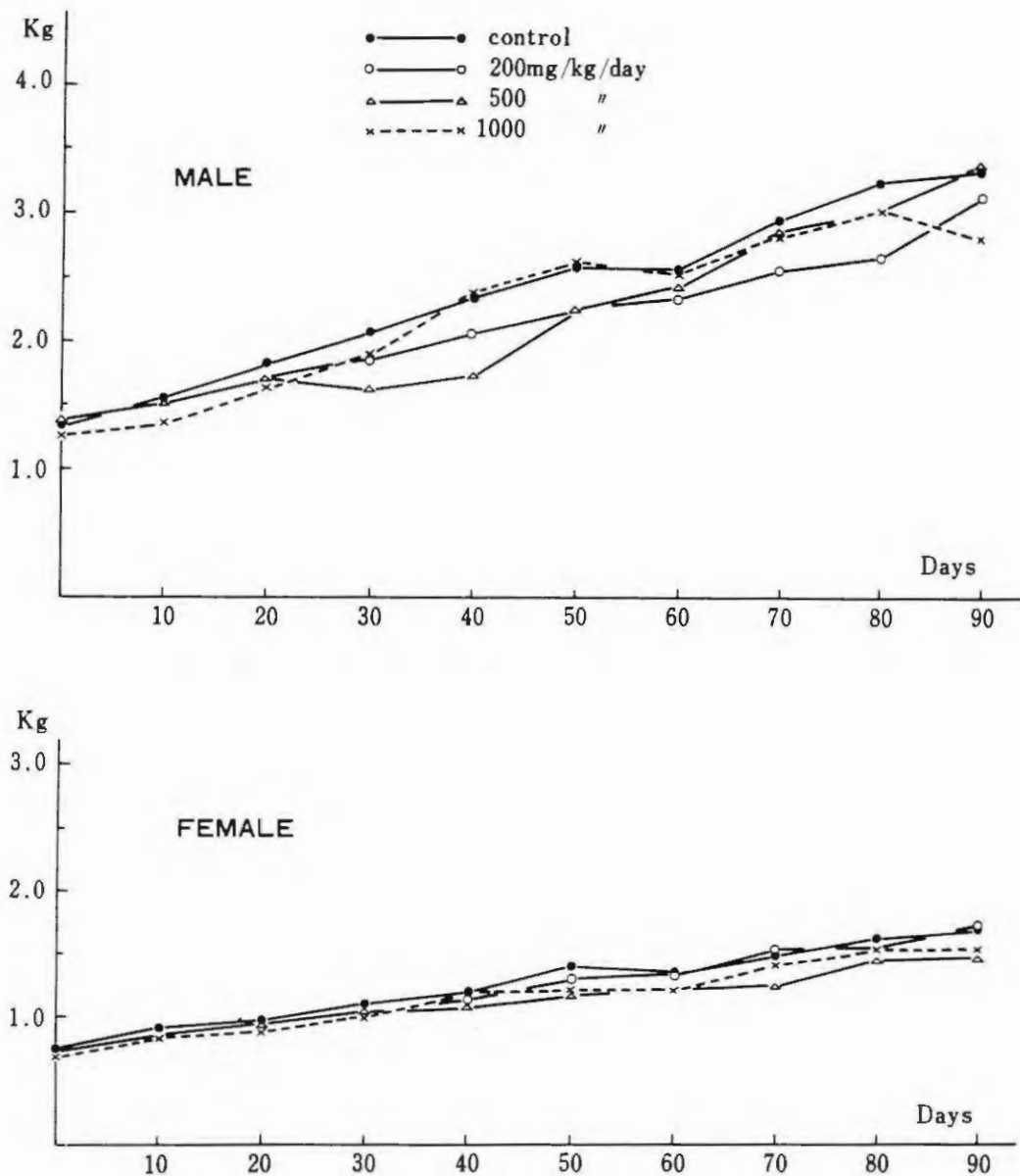


Fig. 1 Growth curves

### 3.死亡率

自然死した動物の出現状態は表 1 に示すとうりで、雄雌ともにキノホルム投与によると考えられる一定の傾向が認められない。

### 4.血液学的検査

3 カ月目に実施した赤血球数、赤血球容積 (Ht)，総ヘモグロビン量 (Hb) の測定成績を表 2 に示す。

雄雌ともに全ての処置群で赤血球数の減少傾向を生じ、さらに雄では Ht 値の減少が認められる。しかし、これらの変化には用量間に著しい差を見ない。

Tab. 1 Mortality

| Group   | Dose<br>mg/Kg/day | Animal |        | Month |     |     | Sum of<br>death |
|---------|-------------------|--------|--------|-------|-----|-----|-----------------|
|         |                   | sex    | number | 1     | 2   | 3   |                 |
| Control | 0                 | m      | 5      | 0/5   | 0/5 | 1/5 | 1               |
|         |                   | f      | 5      | 0/5   | 0/5 | 1/5 | 1               |
| Low     | 200               | m      | 5      | 0/5   | 0/5 | 1/5 | 1               |
|         |                   | f      | 5      | 0/5   | 0/5 | 0/5 | 0               |
| Middle  | 500               | m      | 5      | 1/5   | 2/4 | 0/2 | 3               |
|         |                   | f      | 5      | 0/5   | 0/5 | 0/5 | 0               |
| High    | 1000              | m      | 5      | 0/5   | 1/5 | 0/4 | 1               |
|         |                   | f      | 5      | 0/5   | 2/5 | 0/3 | 2               |

Tab. 2 Hematological findings

|        | Group   | No. of<br>animals | Red cell<br>( $\times 10^4$ ) | Ht<br>(%)        | Hb<br>(mg/dl)   |
|--------|---------|-------------------|-------------------------------|------------------|-----------------|
| Male   | Control | 4                 | 291.0 $\pm$ 23.48             | 40.6 $\pm$ 3.15  | 10.7 $\pm$ 1.43 |
|        | L       | 4                 | 244.0 $\pm$ 22.52             | 30.9 $\pm$ 2.17  | 10.1 $\pm$ 2.33 |
|        | M       | 2                 | 273.5                         | 34.8             | 8.9             |
|        | H       | 4                 | 241.3 $\pm$ 30.10             | 31.5 $\pm$ 5.26  | 9.7 $\pm$ 0.70  |
| Female | Control | 4                 | 279.8 $\pm$ 23.89             | 36.8 $\pm$ 4.48  | 8.7 $\pm$ 1.80  |
|        | L       | 5                 | 248.2 $\pm$ 24.20             | 38.8 $\pm$ 4.86  | 8.9 $\pm$ 0.30  |
|        | M       | 5                 | 249.0 $\pm$ 34.02             | 34.1 $\pm$ 3.09  | 8.2 $\pm$ 2.14  |
|        | H       | 3                 | 252.0 $\pm$ 16.64             | 43.8 $\pm$ 17.97 | 9.2 $\pm$ 1.64  |

\*  $P < 0.05$ \*\*  $P < 0.01$ 

## 5. 血液の生化学的検査

血清中のブドウ糖，総蛋白量，およびアルカリ性ホスファターゼ活性（AIP）の測定結果は表 3 に示すとおりである。

Tab. 3 Biochemical analysis of serum

|        | Group   | No. of animals | Glucose<br>mg/dl | Protein<br>g/dl | ALP<br>u     |
|--------|---------|----------------|------------------|-----------------|--------------|
| Male   | Control | 4              | 191 ± 15.2       | 4.2 ± 0.79      | 40.5 ± 5.67  |
|        | L       | 4              | 164 ± 27.4       | 4.2 ± 0.45      | 35.8 ± 6.38  |
|        | M       | 2              | 194              | 4.6             | 34.7         |
|        | H       | 4              | 190 ± 28.7       | 3.7 ± 1.59      | 26.0 ± 18.62 |
| Female | Control | 4              | 234 ± 57.8       | 5.1 ± 0.24      | 50.2 ± 37.41 |
|        | L       | 5              | 225 ± 24.0       | 5.3 ± 0.80      | 28.3 ± 11.36 |
|        | M       | 5              | 205 ± 20.4       | 4.8 ± 0.79      | 30.0 ± 3.48  |
|        | H       | 3              | 222 ± 45.6       | 4.9 ± 0.36      | 30.0 ± 12.23 |

ブドウ糖および蛋白量には群間に殆んど差を見ないが、ALPでは雄雌ともに処置群でいずれも低値を示す。

#### 6.臓器重量

臓器湿重量の実測値および体重比を表4, 5に示す。

雄では、心および肺重量の減少傾向が、また肝重量の増加傾向が実測値と体重比でともに認められる。さらに脾重量が低用量群で増加、高用量群で逆に低下の傾向を示す。

雌では、雄と同様に心および肺重量の減少傾向を見るが、肝重量については殆んど対照群と差を見ない。しかし、腎重量が処置群でやゝ高値を呈する。脾重量はいずれの処置群でも軽度に低い用量間には一定の傾向を認めない。

### Ⅲ. 成鶏による実験

方法 幼鶏の実験で用いたと同じ局方キノホルムを同じ方法で1日1回3カ月間連続して経口投与した。なお、症状が発現した例では、その症状の程度が重篤と判断された時点で投与を中止し、症状回復の徴を見たとき再び投与を開始する中断方式を実施した。

動物は雄の成鶏10羽を用い、これを5羽からなる2群に分け、中用量(500 mg/Kg/day)および高用量(1000 mg/Kg/day)群とした。

一般症状および体重を毎日観察・測定し、3カ月目に動物を解剖し、血液学的検査、血液の生化学的検査、および病理組織的検査を行った。

### 結 果

#### 1.体重

3カ月間の体重の推移を初期体重を基準とする増加率で示す。中用量群では殆んど増減を見ないが、高用量群では実験開始直後より減少し、40~50日で最低(-17~-18)に達し、以後その減少が続く。

Table . 4 Absolute organ weights

|        | Group   | No. of animals | Brain g       | Heart g        | Lung g         | Liver g         | Kidney g       | Spleen g      |
|--------|---------|----------------|---------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|---------------|
| Male   | Control | 4              | 3.8<br>± 0.09 | 14.5<br>± 2.24 | 17.5<br>± 2.84 | 57.3<br>± 10.36 | 18.0<br>± 0.83 | 4.9<br>± 0.72 |
|        | L       | 4              | 3.8<br>± 0.09 | 11.6<br>± 3.90 | 15.4<br>± 4.05 | 74.1<br>± 11.0  | 16.7<br>± 3.18 | 7.4<br>± 3.20 |
|        | M       | 2              | 3.6           | 14.4           | 12.5           | 94.0            | 23.6           | 6.9           |
|        | H       | 4              | 3.9<br>± 0.36 | 10.0<br>± 3.83 | 13.7<br>± 4.76 | 68.9<br>± 20.23 | 15.1<br>± 7.33 | 3.5<br>± 1.82 |
| Female | Control | 4              | 3.4<br>± 0.14 | 6.8<br>± 0.33  | 10.2<br>± 1.88 | 30.9<br>± 3.32  | 8.9<br>± 0.81  | 3.6<br>± 1.29 |
|        | L       | 5              | 3.4<br>± 0.16 | 5.7<br>± 1.15  | 7.9<br>± 1.38  | 30.2<br>± 4.23  | 10.2<br>± 3.66 | 2.5<br>± 0.72 |
|        | M       | 5              | 3.4<br>± 0.20 | 5.1<br>± 0.94  | 7.4<br>± 1.05  | 26.9<br>± 5.54  | 8.2<br>± 0.64  | 2.2<br>± 0.12 |
|        | H       | 3              | 3.4<br>± 0.25 | 5.2<br>± 1.03  | 7.4<br>± 0.91  | 26.0<br>± 2.20  | 9.8<br>± 0.56  | 2.7<br>± 3.23 |

Table . 5 Relative organ weights

|        | Group   | No. of animals | Brain          | Heart          | Lung           | Liver                       | Kidney         | Spleen         |
|--------|---------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------------------|----------------|----------------|
| Male   | Control | 4              | 0.11<br>± 0.01 | 0.42<br>± 0.04 | 0.51<br>± 0.06 | 1.69<br>± 0.42              | 0.53<br>± 0.04 | 0.14<br>± 0.02 |
|        | L       | 4              | 0.12<br>± 0.02 | 0.35<br>± 0.09 | 0.45<br>± 0.08 | 2.25<br>± 0.30              | 0.50<br>± 0.06 | 0.22<br>± 0.08 |
|        | M       | 2              | 0.11           | 0.39           | 0.33           | 2.80                        | 0.71           | 0.22           |
|        | H       | 4              | 0.15<br>± 0.03 | 0.35<br>± 0.06 | 0.49<br>± 0.32 | 2.48 <sup>*</sup><br>± 0.32 | 0.53<br>± 0.16 | 0.12<br>± 0.05 |
| Female | Control | 4              | 0.21<br>± 0.02 | 0.41<br>± 0.04 | 0.61<br>± 0.11 | 1.84<br>± 0.14              | 0.53<br>± 0.04 | 0.22<br>± 0.09 |
|        | L       | 5              | 0.18<br>± 0.10 | 0.37<br>± 0.06 | 0.51<br>± 0.08 | 1.96<br>± 0.23              | 0.66<br>± 0.25 | 0.16<br>± 0.04 |
|        | M       | 5              | 0.26<br>± 0.06 | 0.39<br>± 0.07 | 0.57<br>± 0.10 | 2.06<br>± 0.51              | 0.64<br>± 0.15 | 0.15<br>± 0.06 |
|        | H       | 3              | 0.23<br>± 0.02 | 0.36<br>± 0.07 | 0.51<br>± 0.05 | 1.79<br>± 0.08              | 0.68<br>± 0.02 | 0.18<br>± 0.05 |

\* P &lt; 0.05

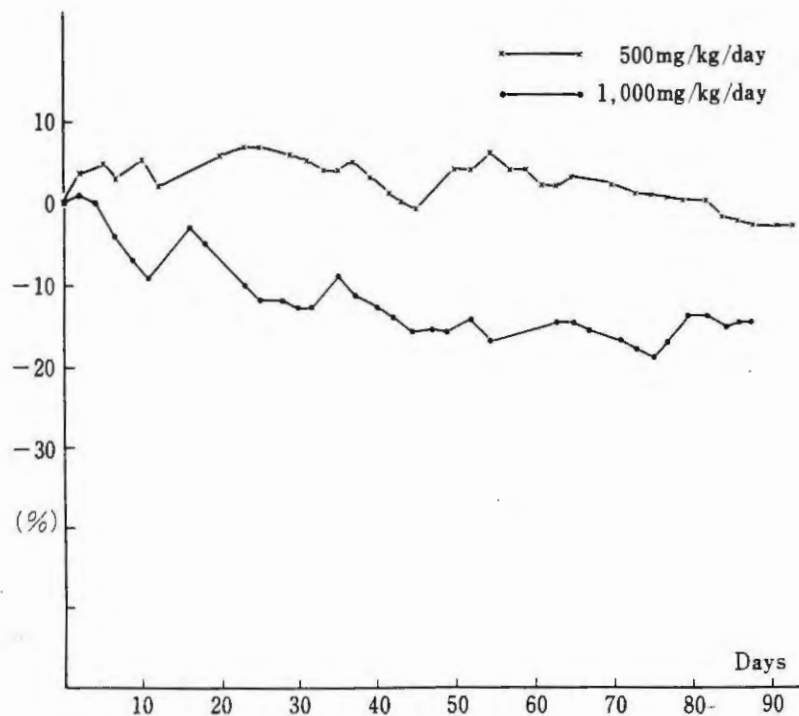


Fig. 2 Growth rates

## 2.一般症状

高用量群で投与開始8日後から1例に下痢を伴う歩行障害が生じ、同時に他の4例が両下肢趾の軽度のしんせんを呈する。その翌日には1例の歩行障害例ではその程度が強くなり殆んど立位を保つことが不能となる。その後3日間薬物投与を中止したが12日目に死亡する。他の4例中1例は15日目に歩行不能状態で死亡し、残る3例は薬物投与の断続を繰返しながら、1例が89日目に死亡し2例が3カ月間生存したが、いずれも強度の歩行障害を認める。

中用量群では、38日目に2例、79日目に1例で、高用量群と同様に下痢を伴う歩行障害が出現し、前2例は49と87日目に死亡する。79日目に発症した1例は、その後薬物投与の中断を繰返し、3カ月目まで生存し、残り2例は実験期間中、明らかな症状の発現を認めない。

## 3.死亡率

自然死した動物の出現状況は表6に示すとおりである。中用量群では2カ月および3カ月で各々1例、また高用量では1カ月で2例、3カ月で1例の死亡を見る。

## 4.血液学的検査

88日目に実施した血液学的検査の成績は表7に示すとおりである。

中用量群と高用量群の間には赤血球数、Ht値、およびHb値とも殆んど差がなく、対照例(1例)との間にも著しい差を見ない。

Tab. 6 Mortality

| Group  | Dose<br>mg/Kg/day | No. of<br>Animals | Month |     |     | Sum of<br>death |
|--------|-------------------|-------------------|-------|-----|-----|-----------------|
|        |                   |                   | 1     | 2   | 3   |                 |
| Middle | 500               | 5                 | 0/5   | 1/5 | 1/4 | 2               |
| High   | 1000              | 5                 | 2/5   | 0/3 | 1/3 | 3               |

Tab. 7 Hematological findings

| Group   | No. of<br>animals | Red cell<br>( $\times 10$ ) | Ht<br>(%)       | Hb<br>(mg/dl)   |
|---------|-------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|
| Control | 1                 | 353                         | 41.5            | 13.5            |
| M       | 3                 | 334.3 $\pm$ 8.62            | 45.2 $\pm$ 2.93 | 16.6 $\pm$ 0.48 |
| L       | 3                 | 367.0 $\pm$ 30.6            | 45.0 $\pm$ 5.63 | 14.4 $\pm$ 2.91 |

## 5.血液の生化学的検査

90日目の解剖時に実施した血清のブドウ糖、総蛋白量、アルカリ性ホスファターゼ活性(AIP)および尿素窒素量の測定結果を表8に示す。中用量群に比べ高用量群でAIPが低値を示すが、対照値との間には差がない。

Tab. 8 Biochemical analysis of serum

| Group   | No. of<br>animals | Glucose<br>(mg/dl) | Protein<br>(g/dl) | AIP<br>(u)       | U-N<br>(mg/dl)  |
|---------|-------------------|--------------------|-------------------|------------------|-----------------|
| Control | 1                 | 280.7              | 4.10              | 5.57             | 2.46            |
| M       | 3                 | 143.3 $\pm$ 7.64   | 4.50 $\pm$ 0.59   | 15.67 $\pm$ 6.97 | 2.65 $\pm$ 0.49 |
| L       | 2                 | 227.7              | 4.52              | 5.57             | 2.11            |

## 6.臓器重量

臓器湿重量の実測値および体重比を表9, 10に示す。高用量群で肝および腎重量が、いずれも低用量群あるいは対照値を上回る。

## 考 察

キノホルムの毒性が、動物の性差あるいは年令差によって影響されるか否かを検索するために、幼



Tab.9 Absolute organ weights

| Group   | No. of animals | Brain (g) | Heart (g) | Lung (g) | Liver (g) | Kidney (g) | Spleen (g) |
|---------|----------------|-----------|-----------|----------|-----------|------------|------------|
| Control | 1              | 3.4       | 14.3      | 8.4      | 21.8      | 7.3        | 1.6        |
| M       | 3              | 3.6       | 12.4      | 11.3     | 32.1      | 11.9       | 1.8        |
| L       | 2              | 3.4       | 15.0      | 10.4     | 48.9      | 15.4       | 2.2        |

Tab.10 Relative organ weights

| Group   | No. of animals | Brain | Heart | Lung | Liver | Kidney | Spleen |
|---------|----------------|-------|-------|------|-------|--------|--------|
| Control | 1              | 0.18  | 0.75  | 0.44 | 1.14  | 0.38   | 0.08   |
| M       | 3              | 0.17  | 0.77  | 0.71 | 1.53  | 0.57   | 0.09   |
| L       | 2              | 0.16  | 0.71  | 0.49 | 2.32  | 0.73   | 0.10   |

鶏および成鶏の両性を用いて3カ月間の亜急性毒性試験を行った。

性差については、幼鶏の一般症状で雄雌で若干の差が見られ、やゝ雄群で症状が強い傾向を見るが、その他には特に性差による変化の差は認められなかった。また成鶏での性差については雄雌で実験時期が異なること、またキノホルム投与の条件が異なることなどがら必ずしも正確な比較はできないが、全般的に性による著しい差があると考えられる成績はないものと推測された。

一方年令差については、一般症状でかなり著しい差が認められた。即ち、幼鶏ではその主症状が貧血様症状で、歩行障害は軽度でかつ少数例にみられるに過ぎない。一方成鶏ではその主症状は歩行障害で、貧血様症状を殆んど見ない。またその死亡率についても年令差が著しく、成鶏で明らかに高率を示す。

この年令差による毒性の差の出現機構については、不明であるが、キノホルム投与量を体重Kg当りで設定したことが、一つの原因と考えることもできよう。

即ち、1回当りのキノホルム投与総量は成鶏でより高いからである。しかし、このことに対しては、今回の実験で成鶏の500mg投与群と幼鶏の1000mg群では、総量としてはむしろ幼鶏の方がやゝ高いにも係わらず、その死亡率は成鶏で高く、かつ症状の内容に著しい差のあることから、必ずしもキノホルム投与量の差によってのみ説明しえないことが示されたと見てよい。

年令差によってキノホルムの生体内代謝率あるいは、その様式が異なったり、あるいは、キノホル

ムによって影響を受ける組織臓器の状態が年齢によって変わることが、その毒性差の成因と関係することが考えられるが、それを裏付ける現象を今回の成績から見出すことは出来なかった。

#### 総 括

動物の性差および年齢差によって、キノホルムの毒性に差が生ずるか否かを究明する目的で、前報で発表した雌の成鶏に対比して雄の成鶏と、両性の成鶏によつてキノホルム連続経口投与実験を3カ月間に亘って行なった。

幼鶏では貧血症状が主徴として出現するが、成鶏（雄）では雌と同様に歩行障害が高率に出現する。また死亡率では成鶏が高く、その毒性に年齢による差のあることが強く推測される。

一方性差による毒性像の相異は今回の実験成績からは必ずしも明らかでなかった。

なお、組織学的検索を終了した時点で、さらに検討する予定である。

## 2. マウスのキノホルム長期経口投与実験

上田 喜一, 河合 正計, 前橋 浩

(東京歯科大・衛生)

### I 緒言

S MON病の原因物質がキノホルムであるとしても、他の物質、例えば農薬などの協同作用の有無が未解決であるし、マウスによる発症を証明したものもない。今回マウスを用いて有機りん剤または有機塩素剤とキノホルムの同時投与群とキノホルム単独投与群とを比較し、さらに肝障害をおこさせる目的で四塩化炭素を投与したものにキノホルムを長期投与した群も比較検討した。

### II 実験動物

実験動物としてはICR系マウス♀(20~25g)5週令のものをを用い、各群10匹とし、3ヶ月目に5匹を殺し、各種検査を行い、残余の5匹は6ヶ月飼育した。キノホルムはポリエチレングリコールに予め溶解し、有機りん剤としてはスミチオンの50%乳剤を、有機塩素剤としては農薬用BHCをポリエチレングリコールに予め溶解し、これらを市販の牛乳に混ぜ、十分に攪拌し、懸濁液を作り、給水瓶により水の代りに自由に給餌した。なお農薬用BHCの組成は $\alpha$ :69.31%,  $\beta$ :9.72%,  $\gamma$ :15.10%,  $\delta$ :5.87%であった。肝障害群としては実験開始前日に0.5%四塩化炭素0.5 ml/匹を皮下注射した。

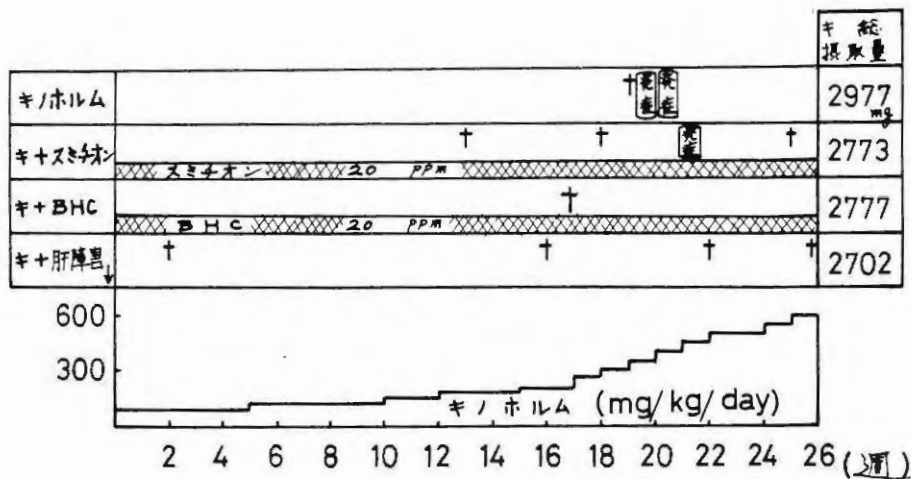


図1 キノホルム投与量と経過

キノホルムは図1に示すように漸増方法により90 mg/Kg/dayより600 mg/Kg/dayまで投与した。スミチオンおよびBHCは全期間20 ppmを投与した。

### III 実験成績および考察

実験期間中の1日1匹当りの牛乳摂取量の経過を図示すれば図2の通りでばらつきが多いが、全期間の平均を求めれば図2の右端のグラフの通りでキノホルム混入牛乳の投与群は対照群に比しその量

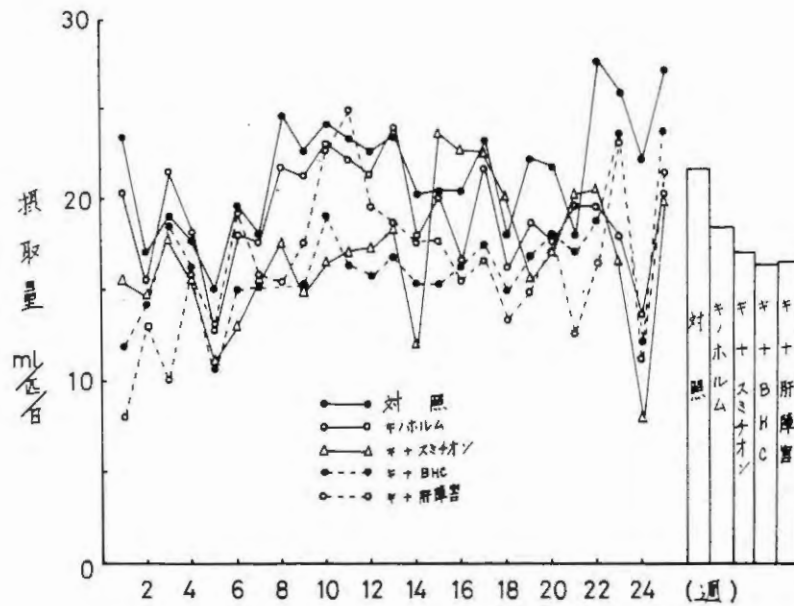


図2 牛乳摂取量

は少く、キノホルム単独投与群は他の群に比し多かった。スミチオンおよびBHC混入牛乳は臭のため摂取量が少なかったと考えられる。次に各群の3ヶ月までの体重増加曲線および平均増加体重は図3に示すように、各群共殆んど差がみられなかったが、6ヶ月の体重漸加曲線および平均増加体重は

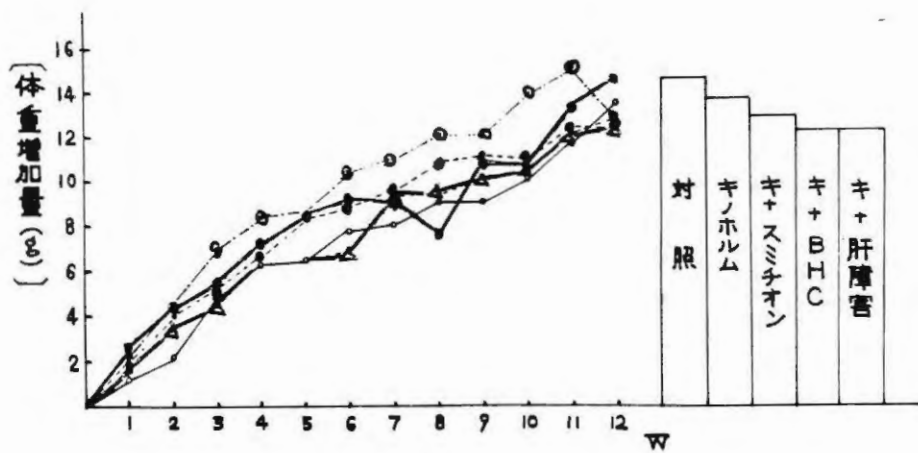


図3 体重増加曲線 (3ヶ月)  
g/匹

図4に示すようにキノホルム単独投与群は著しく減少し、他のものも対照群に対して明らかに差があった。3ヶ月まではキノホルムの摂取は最高150 mg/Kg/dayで、それ以後漸次キノホルムの投与量を増加するに従い、体重増加量は少く、またはむしろ体重減少がみられ、キノホルムの影響がみられた。3ヶ月で10匹中5匹を殺し、これらの各群の血清中キノホルム量を東大薬学部田村研究室にて定量してもらった結果、対照群は0、キノホルム投与群は0.03  $\mu$ g/ml、キノホルム+スミチ

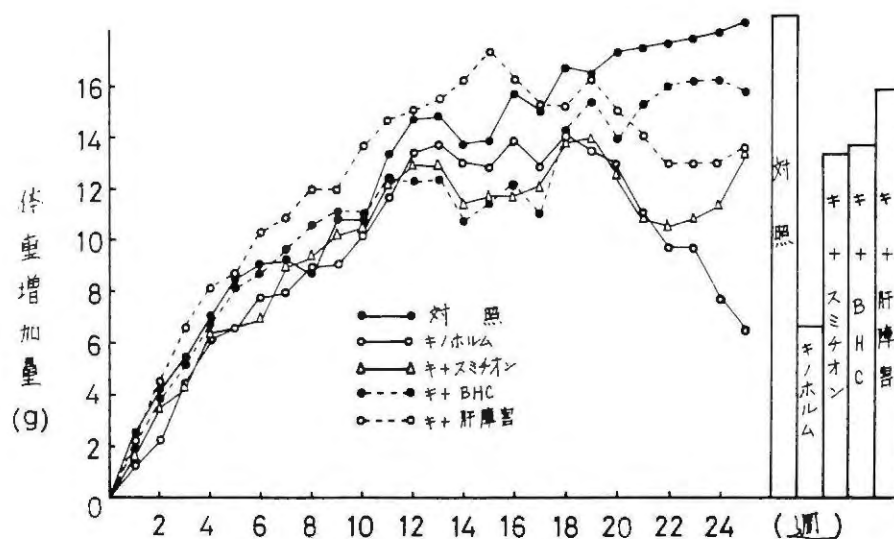


図4 体重増加曲線 (6ヶ月)

オン投与群は $0.01 \mu\text{g}/\text{ml}$ , キノホルム+BHC投与群は $0.02 \mu\text{g}/\text{ml}$ , キノホルム+肝障害群は $0.04 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。SMON病患者の血清中キノホルムは $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 位といわれているので、この程度の血清中濃度では体重や臨床症状にも影響のないのが当然といえよう。また3ヶ月目の血清のGOTは表1に示す通りで、各群共対照群に比し、差はなく、肝障害はみられず、四塩化炭素投与群も治癒したものと考えられる。

表1 12週のGOT

| 群 \ 個体番号 |              | 1   | 2  | 3   | 4   | 5   | 平均  |
|----------|--------------|-----|----|-----|-----|-----|-----|
| 1        | 対 照          | —   | —  | 92  | 112 | 128 | 110 |
| 2        | キノホルム群       | 77  | —  | 98  | —   | 167 | 114 |
| 3        | キノホルム+スミチオン群 | —   | 65 | 119 | 222 | —   | 135 |
| 4        | キノホルム+BHC群   | 132 | —  | 52  | 68  | —   | 84  |
| 5        | キノホルム+肝障害群   | 132 | —  | —   | 92  | 105 | 110 |

次に症状および死亡状況であるが、その経過は図1に示す通りで、3ヶ月まではキノホルム+肝障害群が第2週に1匹死亡した他は各群共死亡例はなかったが、それ以後キノホルムを漸増するに従い、キノホルム群では19週に1匹、キノホルム+スミチオン群では13週、18週、25週に各1匹が、キノホルム+BHC群では17週に1匹、キノホルム+肝障害群では16週、25週、26週に各1匹が死亡した。

発生症状は肝障害群は実験開始後1～2日間は動作がにぶく、ケージの隅にうづくまるようにして

いたが、それ以後は次第に回復し、元気になり、他の群共3ヶ月までは何ら特別な症状は観察されなかった。12週以後キノホルム投与量を漸増したが、18週目頃よりキノホルム投与群中2匹が異常興奮状態を示し、毛並が悪くなり、次いでこれらは19週または20週になると歩行がにぶくなり、



写真1.

キノホルム投与例(19週目)  
(350mg/kg/day)ドルフィン現象



写真2.

キノホルム投与例(19週)  
(350mg/kg/day)後趾屈曲位(伸筋麻痺)

臀部が床について後肢で体を維持できず、よちよち歩きの状態、すなわちドルフィン現象を示し、（写真1参照）さらに尾を上げて空中につるし、次いで床におろすと通常は後趾は開いて接地するがこれらは屈曲位で接地する。すなわち後趾の伸筋麻痺症状がみられた。（写真2参照）さらにこれらのマウスは毛なみが極めて悪くなり、つやは殆んどなく、運動は極めて低下し、ケージ内でうずくまる状態となり、さらに尾をもち上げ、空中につるした状態にすれば通常のマウスは四肢を張たような状態で、前、後肢共動かし、もがくような状態を示すが、これらのマウスは後肢は特に左右の肢が交叉し、坐骨神経麻痺を疑はしめた。（写真3参照）、その後これらの症状が若干よくなったり、悪くなったりを繰り返して1～2週で死亡した。またキノホルム+スミチオン投与群でも21週目に同様の発症例が1匹あった。牛乳摂取量よりみて、6ヶ月のキノホルム総摂取量は図1に示す通りでキノホルム投与群が最も多く、平均1匹当たり2977mg、他の群は平均2702～2777mgであり、キノホルム摂取量の多い群で発症がみられ、農薬による作用はみられなかった。



写真3.

キノホルム投与例（20週）（400mg/kg/day）

後肢交叉現象（坐骨神経麻痺）

3ヶ月目に殺した例の病理組織学的検査ではキノホルム+肝傷害群の一部に肝の脂肪変性像と背髄の前角神経に軽度の空胞形成がみられたのみで特異な変化はみられなかった。

発症例および6ヶ月目の病理組織学的検査および電子顕微鏡による観察は現在検討中である。

なお3ヶ月目における各群の肝の小片をエポキシ樹脂にて包埋し、約20μの切片としたのちX線マイクロプロブアナライザーによってヨード（特性X線波長 $K\alpha = 3.15\text{\AA}$ ）の検出を行ったが、全く検出出来なかった。

#### Ⅳ まとめ

キノホルム投与によるマウスの発症および他の物質の協同作用を検討するため農薬の有機りん剤（スミチオン）と有機塩素剤（BHC）を牛乳中にキノホルムと共に懸濁させ、水の代りにマウスに投与した。キノホルムの投与量は初め90 mg/kg/dayより始め漸増方式として3ヶ月目まで（150 mg/kg/day）までは、各群共に何ら影響はみられなかった。その後増加量を増すと共にキノホルム投与群では19週目（350 mg/kg/day）および20週目（400 mg/kg/day）にドルフィン現象、後肢の伸筋麻痺症状、後肢の交叉現象などの後肢支配神経の麻痺症状があらわれた。またキノホルム＋スミチオン投与群では21週（450 mg/kg/day）に1例発症した。他のものは特別な症状はみられなかったが、期間中キノホルム群は1匹、キノホルム＋スミチオン群3匹、キノホルム群＋BHC群1匹、キノホルム＋肝傷害群は3匹が死亡した。キノホルム投与群に発症例がみられたのは牛乳摂取量より考えてキノホルム摂取量が多かったためと思われ、スミチオンおよびBHC混合投与による影響はみられなかった。なお発症例および6ヶ月目の病理組織学的検査および電子顕微鏡による観察は現在なお続行中である。

#### Ⅴ 文 献

- 1) 上田喜一, 他: マウスのキノホルム長期投与実験（1972）, スモン調査研究協議会キノホルム部会, 第3回研究会



### 3. キノホルムの蛍光分析

上田 喜一, 河合 正計, 前橋 浩

(東京歯科大・衛生)

#### I 緒言

オキシンは各種金属イオンと錯塩を形成し、従来より広く定性、定量分析試剤として用いられており、特に8位にOH基を導入したオキシキノリンは試薬自身の蛍光性は極めて小さいと考えられる、金属錯塩の生成により蛍光性が増大し、蛍光分析試剤として有用とされている。一方キノホルムは7-ヨード-5-クロル-8-オキシキノリンであるので、これに金属を加えることにより発蛍光性物質が形成されることが考えられる。従って蛍光強度の大きな錯塩形成の金属イオンをみつけることにより、キノホルムの定量が可能であり、さらにこの方法により組織化学的に組織中のキノホルムの同定が可能であると考え各種の実験を行った。

#### II キノホルム金属錯塩の蛍光について

キノホルム(2mg/ml 0.1N NaOH) 2.0mlに各種金属溶液( $ZrOCl_3$ ,  $GaCl_3$ ,  $Y(NO_3)_3$ ,  $ZnSO_4$ ,  $CdCl_2$  各100  $\mu g/ml$ ) 2.0mlを加え、これに0.1N-HClを加えることによりpHを変化させ、沈澱形成状態を観察した。その結果はpHの低下により沈澱物形成は特別の変化はなく、白色～黄色の沈澱物を形成した。次にこの混合溶液を濾過し、濾紙に付着した沈澱物を自然乾燥後、紫外線発生装置( $\lambda = 365 m\mu$ )により蛍光の強さを肉眼的に観察した。その結果は表1に示す通りで、蛍光の強さは $Ga > Zn > Zr > Y$ ,  $Cd$ の順であった。

表1 キノホルムと金属キレートの蛍光性

| 金 属 | 蛍 光 性 | P H        |
|-----|-------|------------|
| Ga  | +++   | 9.24 ~ 7.8 |
| Zn  | ++    | 9.75 ~ 5.6 |
| Zr  | +     | 9.6 ~ 6.1  |
| Y   | —     | 9.20 ~ 6.4 |
| Cd  | —     | 9.7 ~ 6.0  |

#### III キノホルム-Ga 錯塩の溶媒中の蛍光について

0.5%キノホルム(0.1N NaOH) 1.0mlに $GaCl_3$ (100  $\mu g/ml$   $H_2O$ ) 1.0ml, 20%  $CH_3COONH_3$  5.0mlおよび $H_2O$  20mlを加え、0.1N NaOHでpHを8.5~10.0に調整し、これよりクロロホルムまたはビリジン・ベンゼン(1:9)混合液30mlで抽出を行った。このキレート生成物の蛍光強度を蛍光比色計により調べた。励起波長曲線および蛍光波長曲線は図1に示す通りで、両抽出液共励起波長は420m $\mu$ であり、ビリジン・ベンゼン抽出液の最大蛍光波長は525m $\mu$ にあり、クロロホルム抽出液のそれは530m $\mu$ にあった。

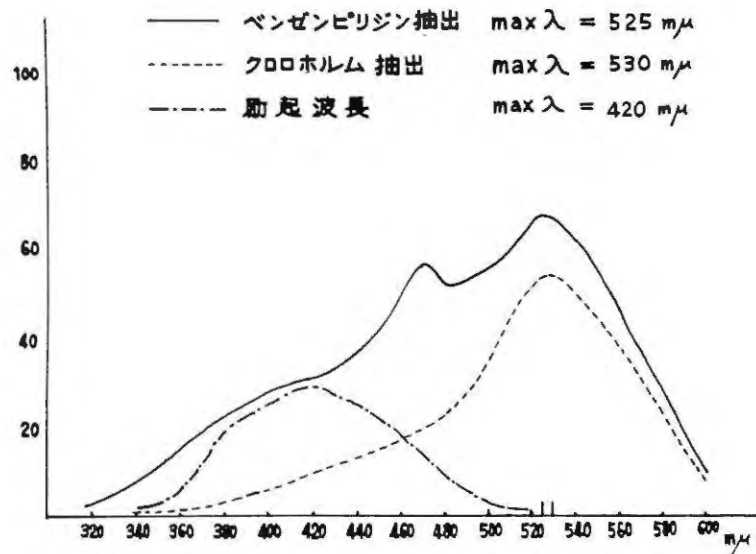


図 1 螢光波長曲線

そして螢光強度はベンゼン・ピリジン抽出液の方が大であった。上記錯塩溶液の pH を 8.55 , 9.0 および 9.5 と変化させてベンゼン・ピリジン液で抽出し、螢光強度を測定したが、pH 9.0 以上では差はなかった。

次に前述の方法で加えるキノホルム量を変えて検量線を作製すれば図 2 の通りで、キノホルムの検出限界はピリジン・ベンゼン抽出時  $0.3 \mu\text{g} / 30 \text{ ml}$  であり、クロロホルム抽出時は  $0.5 \mu\text{g} / 30 \text{ ml}$  であった。さらに溶媒抽出後 24 時間目に測定したところ螢光強度は 45 ~ 75 % に低下し、経過時間により値が低下することがうかがえた。

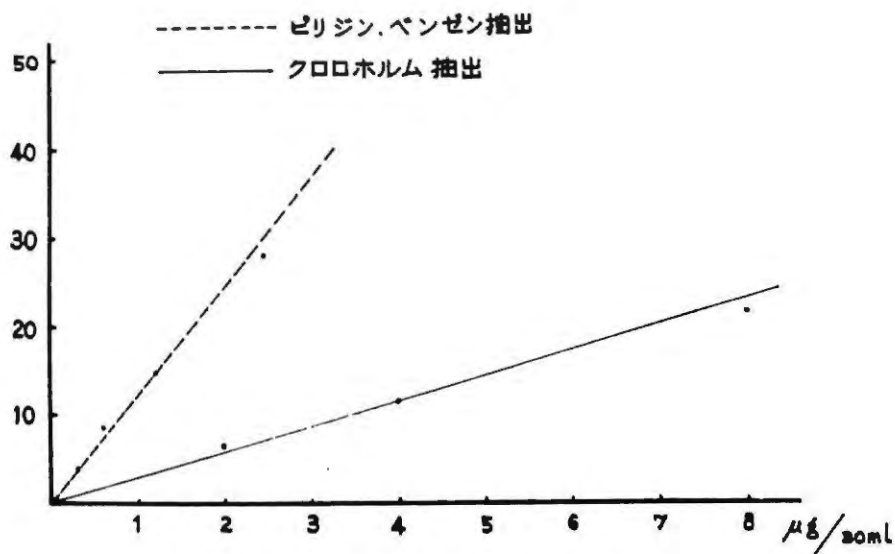


図 2 キノホルム検出限界

#### IV 臓器中キノホルムの蛍光法による定量

臓器中キノホルムの定量を行なうためラットの肝、腎、脳を1.0 gにつき生理食塩水9.0 mlを加えてホモゲナイズし、この液に適当量のキノホルムを加え、これにGaCl<sub>3</sub>を加えてpHを9.0以上に調整して溶媒により抽出し、回収率を求めた。肝内には自然蛍光物質が多くあり、これらの自然蛍光を調べると図3に示すように、励起波長はピリジン・ベンゼン(1:9)抽出液は360, 400および470mμにあり、クロロホルム抽出液は470mμであり、キノホルム-Ga錯塩の励起波長とは異なる。そこで励起波長420mμによる自然蛍光の強さをみると図4に示すように蛍光は殆んどな

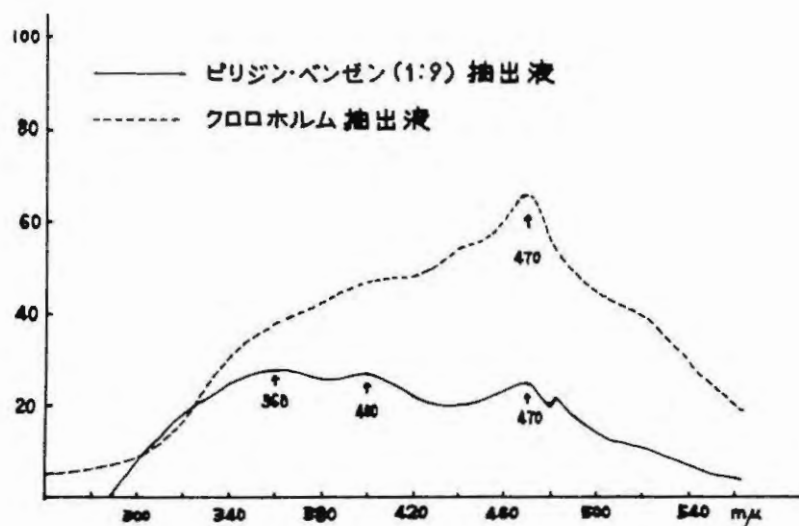


図3 肝の自然蛍光の励起波長

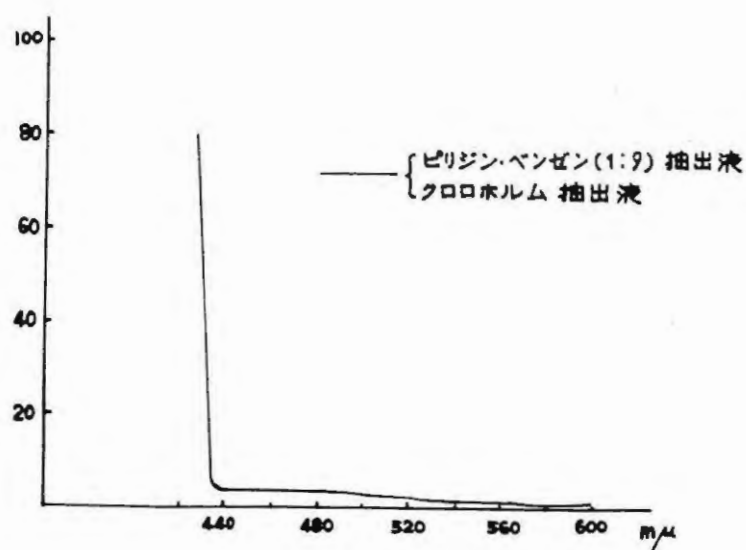


図4 肝の自然蛍光の強さ  
(励起波長420mμによる)

かった。そこで前述のようにキノホルムおよびGa液を添加したものを溶媒で抽出した場合の励起波長をみると図5に示すように水溶液と同じ420m $\mu$ にあり、420m $\mu$ で励起させた蛍光波長曲線は図6に示す通りでピリジン・ベンゼン抽出液は最大波長530m $\mu$ に、クロロホルムは525m $\mu$ にあり、

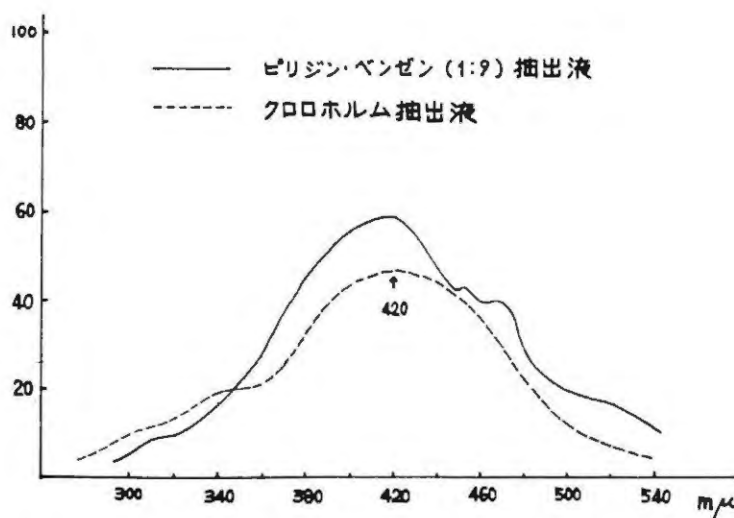


図5 肝+キノホルム+Gaの励起波長

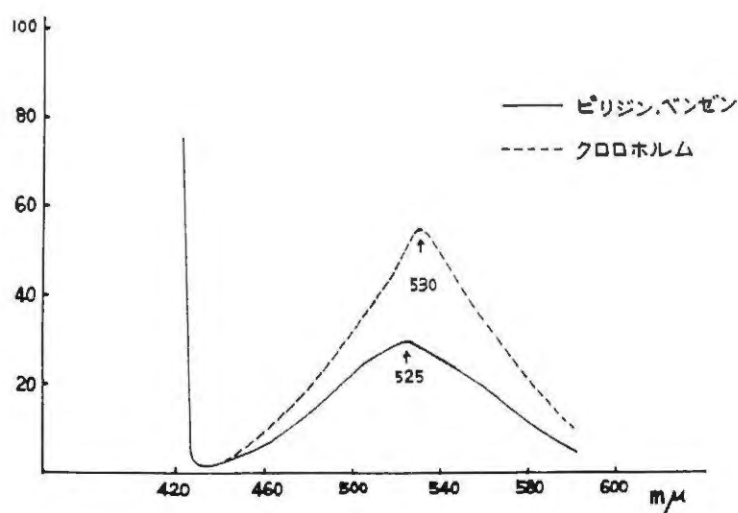


図6 肝+キノホルム+Gaの蛍光波長曲線  
励起波長=420m $\mu$

前者と同様であり、肝内の自然蛍光により妨害されないことがわかった。そこで肝などについて添加実験を行い、これら臓器内のキノホルムの検量線を作製すれば図7に示す通りで、これら臓器ホモジネートの代りに蒸留水を用いた対照液と比較すると各臓器共抽出率は極めて悪く、臓器の種類、濃度により異なるが、ピリジン・ベンゼンによる抽出は23.6~8.6%の回収率で、クロロホルムによ

る抽出は33～60%の回収率で、対照（キノホルム水溶液）と異なりピリジン・ベンゼン抽出よりクロロホルム抽出の方がよかった。そこで生体試料の分析にはクロロホルム抽出を用いることとした。

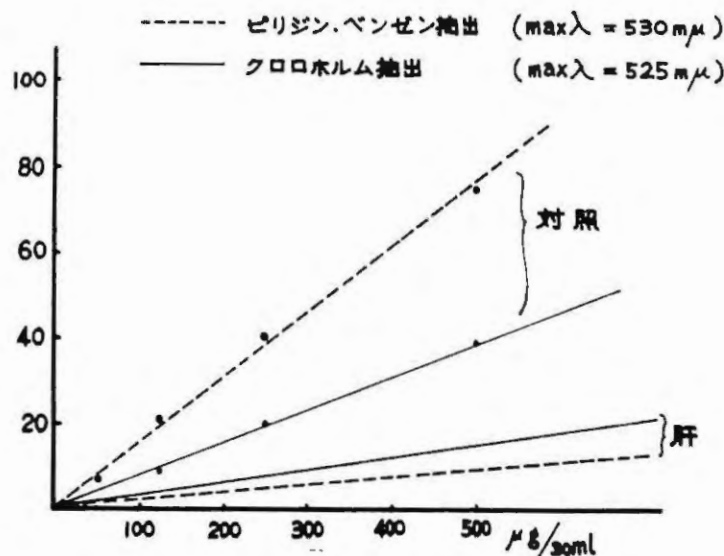


図7 キノホルム検量線

#### V 家兎に対するキノホルム投与実験

家兎（♂ 3.2 Kg）に200 mg/Kgのキノホルム（CIBAエンテロビオフォルム 250 mg/0.4 g 使用）を100 mlの蒸留水に懸濁させ、3日間耳静脈より点滴注射した。3日後家兎は腰部より後肢に麻痺があらわれた。この家兎の肝、腎、脳内のキノホルムを前述の方法により蛍光定量を行ったが、キノホルムを検出することは出来なかった。これは検出感度が鈍いためと考えられる。

表2 キノホルムの組織化学的検出法

1. 臓器を軽くホルマリン固定
2. クレオスタートで切片作製（10～14 µ）
3. 氷酢酸10 ml + GaCl<sub>3</sub> 500 mgに2～5分間浸漬
4. 氷酢酸10 ml + GaCl<sub>3</sub> 500 mgに1N NaOHでpH 8.6にした液に10分浸漬
5. 十分に水洗
6. グリセリン包埋

またこれらの臓器についてキノホルムの組織化学的検出法（熊大医武内らの法）（表2参照）によりキノホルムの検出を試みたが、肝には陽性で主としてKupper氏細胞内にキノホルム-Ga 錯塩の蛍光顆粒を認めたが、他の臓器については検出出来なかった。

今回実施した蛍光定量法はキノホルムを臓器内より抽出するのではなく、キノホルム-Ga 錯塩を溶媒で抽出したために検出感度が悪かったのかもしれないので、今後さらにキノホルムを抽出分離し、その後Ga液を加えてキノホルム-Gaの錯塩の蛍光により定量する方法について検討する考えであ

## VI まとめ

キノホルムが一種のオキシシンであることから、キノホルムが金属と錯塩を形成し、蛍光を発すると考え、キノホルムに各種金属を加え、これらの錯塩形成の条件、蛍光強度などを検討した結果、Ga が最も有用であることを知った。ついで臓器中キノホルムの定量を行うため、臓器ホモジネートにGa 液を加え、このキノホルム-Ga 錯塩の抽出液、励起波長、蛍光波長などの検討を加えた。抽出液はクロロホルムがよいが、回収率は臓器により異なり33~60%で低く、励起波長420m $\mu$ 、蛍光波長は530m $\mu$ であった。次いで家兎にキノホルム200mg/kg/dayを3日間耳静脈より点滴注射した結果、家兎は3日後、腰部より後肢にかけ麻痺が現われたが、この家兎の脳、肝および腎中のキノホルム量を蛍光法により測定したが、回収率の低いことと感度不良のため測定出来なかった。また熊大医武内らの法により組織化学的にキノホルムを証明しようとしたが、肝のクーパー氏細胞内にキノホルム-Ga 錯塩の蛍光顆粒を認めただけで他は検出出来なかった。

今回は臓器よりキノホルム-Ga 錯塩の抽出を試みたが、満足すべき結果はえられなかったので、今後キノホルムを抽出分離し、その後Ga 液を加えてキノホルム-Ga 錯塩の蛍光により定量する方法について検討する考えである。

## VII 文 献

- 1) 上田喜一, 他: キノホルムの蛍光分析(1972), スモン調査研究協議会, キノホルム部会, 第3回研究会

## 4. キノホルムの体液中濃度の測定 (I)

宇野 豊三, 北沢 式文, 前田 温

(京大病院・薬剤部)

### I はじめに

従来、キノホルムは水に対する溶解度が少ないことから、消化管からの吸収はきわめて微量であり、安全な腸内殺菌剤と考えられていた。しかし最近、ラジオアイソトープを用いた研究から、キノホルムの吸収が比較的良好であることが認められ、さらにキノホルムの生体内挙動、特に体内分布、尿中排泄率等に関する知見は増しつつある。しかし経口投与後の血中濃度を消化管吸収との関係において検討した報告は殆んど見当たらない。著者らはこの点に関してさらに詳細に検討を行なうために、まず血液中のキノホルム量を測定する方法を確立した。またこの方法を用いて、経口投与後のラットの血中キノホルム量を経時的に測定し、さらに連続経口投与した場合の結果とを併せて検討を行なった。それらから得られた結果より、キノホルムが従来の薬物とは異なり、特異な生体内移行を示すことが明らかとなった。

### II 実験材料および方法

#### 1. キノホルム

スモン調査研究協議会より配布されたものをエタノールを用いて精製した後実験に供した。

#### 2. 試薬および溶媒

本研究に用いた試薬および溶媒はすべて特級、あるいはスペクトル用のものである。

#### 3. 動物実験

##### 経口投与後の血中濃度の測定

体重150～220 g Wistar系雄性ラットにそれぞれ所定量のキノホルムの水性懸濁液(水の量は2 mlに固定)を胃ゾンデを用いることにより投与した。投与後、定められた時間にラット尾部の切断によって採血し、下記の定量法により含有されるキノホルムの測定した。

#### 4. 定量法

ラット尾部の切断により得られた血液0.1 mlを蒸留水1 mlに加えて溶血し、これに30%トリクロル酢酸2 mlを加えて除蛋白を行なう。遠心分離して上澄液2 mlを4 mlのベンゼンにて抽出を行なう。このベンゼン層の3 mlをとり減圧下で溶媒を留去した後、ビリジン0.5 mlを加えて溶解する。この液にビストリメチルシリルアセトアミド2滴を加えてシリル化した後、再び溶媒を留去して、得られた残留物をクロロホルム4 mlに溶解する。この一定量を用いてガスクロマトに注入し得られたクロマトグラムから面積法により含有しているキノホルムを定量する。ここに用いたガスクロマト装置は、島津製作所製GC-5A.F.I.Dであり、1.5 m SG3-15のガラスカラムを用い、充填剤はポリエチレングリコール20M.20%, Support.celite 545, Mesh60~80のもので

ある。測定するに際しての条件は、Column Temp.  $150^{\circ}\text{C}$  Carrier Gas  $\text{N}_2$   $40\text{ ml/min}$ ,  $\text{H}_2$  Flow Rate  $40\text{ ml/min}$ , Air Flow Rate  $700\text{ ml/min}$ , Range  $0.064\text{ mV}$ , Sensitivity  $10^3 (\text{M}\Omega)$ , Injection Port Temp は  $100^{\circ}\text{C}$  である。

#### 5. 薄層クロマト

Kieselgel  $\text{F}_{254}$  によるMerck社製DC-Alufofinを用いた。展開溶媒はクロロホルム：アセトンの6：4の混合溶媒である。

### Ⅲ 結果及び考察

#### 1. 検量線の作成

キノホルムを含まない血液  $0.1\text{ ml}$  に  $1\text{ ml}$  蒸留水を加えて溶血し、種々の既知濃度のキノホルム溶液 ( $0.005\text{ N NaOH sol.}$ ) を一定量加えて、定量法に従って、検量線を作成し図1に示す結果を得た。回収率を測定するために、上記の定量法において血液の代りに蒸留水を用いて同様に操作を行ない、それぞれ図1と全く重なる直線を得た。このことより、本定量法による場合、血液による障害が全く認められないことが明らかである。

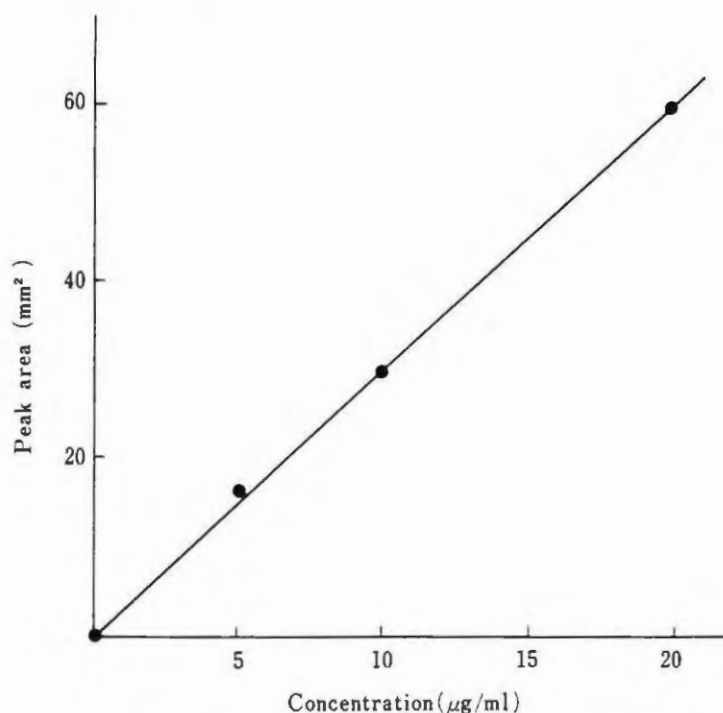


図1. Calibration curve of free chionoform  
( rat )

#### 2. 代謝物の検討

上記定量法により、ガスクロマトグラフィーで検出されるものが、未変化のキノホルムであるか、あるいは代謝物であるかを検討するために、薄層クロマトグラフィー及びヨードデンプン反応により検討した。本実験においてはキノホルムのシリル化物が強い蛍光を発することを利用し、定量法で得られたキノホルムのシリル化体を薄層クロマトにより検討した。その結果、ラットの血液中からは、



唯一のスポットが得られた。これは未変化のキノホルムを用いてシリル化したもののスポットと一致する  $R_f 0.58$  の値であった。一方、生体試料から同様の操作を行なって得られたキノホルムシリル化体を  $HCl$  で加熱分解後、ヨードデンプン反応によって遊離ヨードの存在を検討した結果から遊離ヨードの存在を確認した。これらの結果より、上記定量法で測定される物質は、未変化のキノホルムそのものであることが明らかとなった。

### 3. 経口投与後の血中濃度の推移

ラットにキノホルム  $10\text{ mg}/2\text{ ml}$  水性懸濁液を経口投与した後の血中濃度を追跡した結果、図2を得た。投与直後には、 $20\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$  の血中濃度を得られ漸次減少する傾向が認められたが、この図2より明らかなように、この物質の血中よりその半量が消失するに要する時間即ち生物学的半減期は著しく長く、投与後144時間経過した後でも尚、相当量が血中に残存していることが明らかである。このことよりキノホルムは長時間生体内に滞留することが明らかとなった。

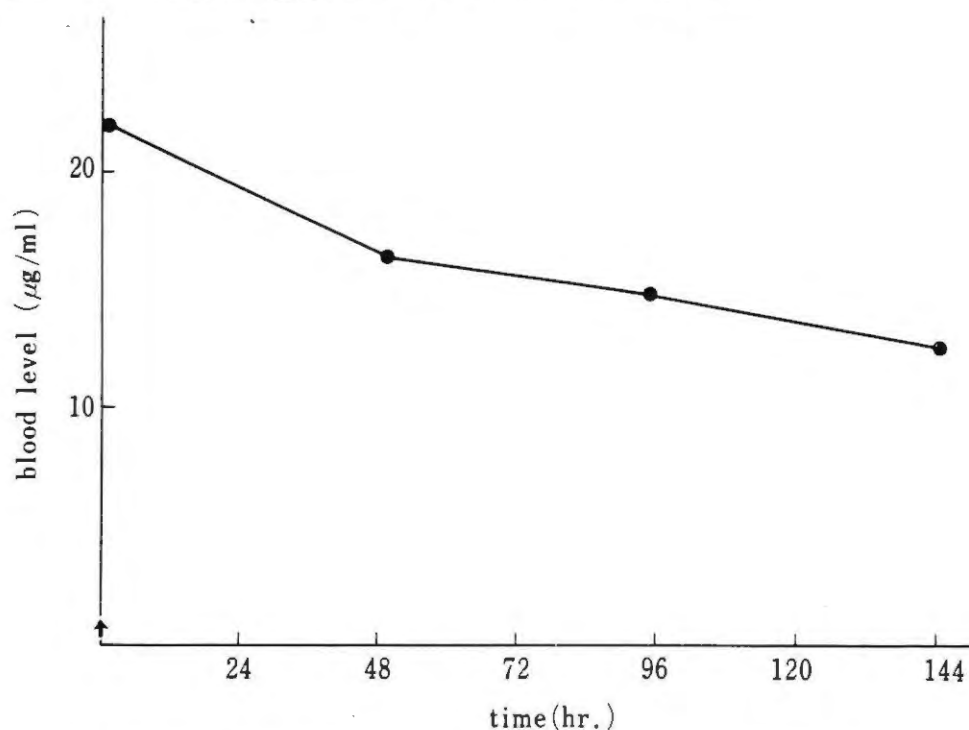


図2. Blood level of chionoform after oral administration  
10 mg/day

さらに投与量を増加すると、その血中濃度は、図3に示すように、一様に減少する傾向を示しているがその24時間の過程のなかにおいてさまざまな変化を呈していることが明らかである。この変化には画一性がなく個体間の変動が著しいことが認められた。通常の薬物では、投与量を増せば、血中濃度もそれに対応して増大することが明らかであるが、キノホルムの場合、このような関係が存在しないことが考えられる。すなわち、 $450\text{ mg}/\text{Kg}$  投与した場合でも2回の実験結果はそれぞれ異なった値が得られ、また、投与量が $90\text{ mg}/\text{Kg}$ の方が $1800\text{ mg}/\text{Kg}$ を投与した場合より高い血中濃度を与えている。このように著しい個体間のバラツキさらに投与量と血中濃度との間に対応する関係が

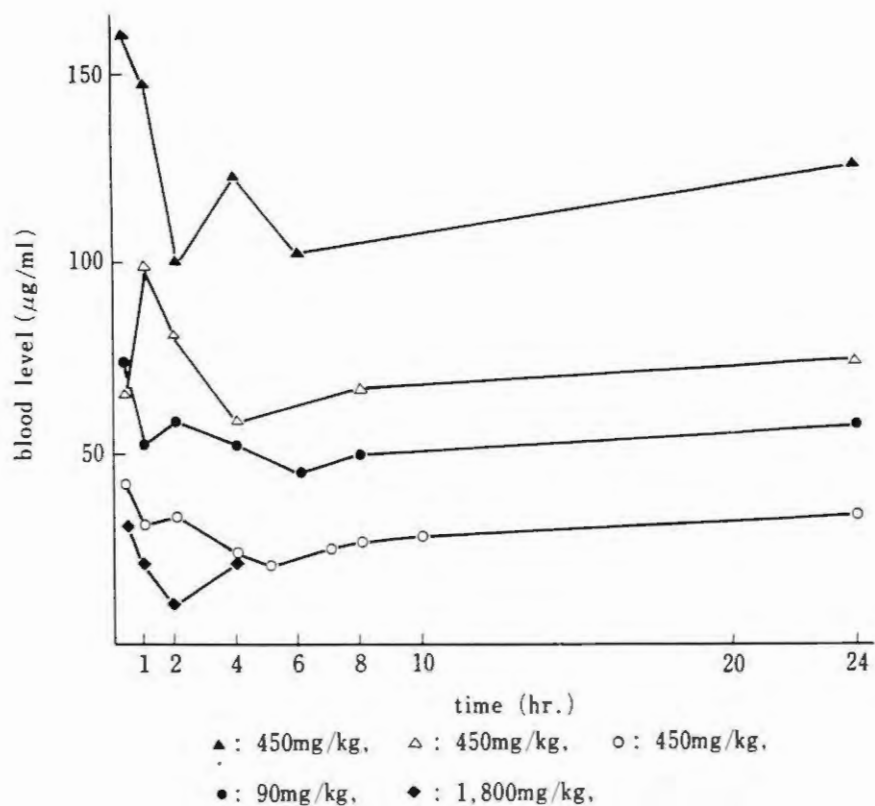


図3. Blood level of chionoform after oral administration in various doses

認められないことから、投与量から血中濃度を予測することは、消化管内の移行状況を検討した結果、極めて困難である。また、他の実験において経口投与後のラットを開腹すると、キノホルムは、その大部分が5～6時間後には小腸部を通過し、一部が回盲部に認められたにすぎなかった。このことよ

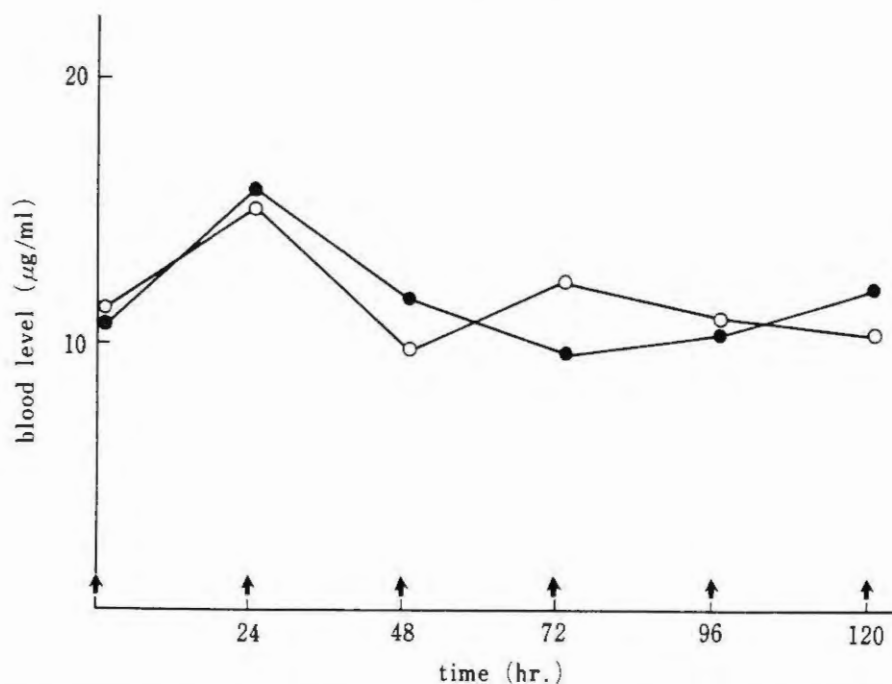


図4. Blood level of chionoform after repeated oral administration 5 mg/day

り小腸部位からのキノホルムの吸収は、5～6時間でほぼ終了していることが予想される。

### 3. 連続経口投与後の血中濃度の推移

図4には、キノホルムを5 mg/body 連日投与した場合の血中濃度の推移を示した。一回あるいは、2回投与後、血中濃度は約10  $\mu$ g/mlにも達するが、それ以降は、キノホルム投与しても、それに応じて血中濃度の上昇は認められずほぼ一定の値が維持されていることが明らかとなった。これらの原因について今後検討を行なう予定である。

## 5. キノホルムの体液中濃度の測定(II)

宇野 豊三, 北沢 式文, 小室 徹雄

前田 温

(京大病院薬剤部)

### I はじめに

前報において、キノホルムを経口投与したあとのラットの血中濃度の推移にみられた特異性について報告した。

経口投与後の最高血中濃度と投与量との間には一定の関係が認められず、血中よりの減衰は持続的であることが認められた。また、連続経口投与の場合、初回投与により血中濃度の上昇は認められるが、2回以降の投与により、この薬剤の半減期および投与間隔より予想される血中濃度の上昇は認められなかった。

今回は、150gのラットの静脈内にキノホルムを投与し、血中濃度の変化を観察し、このキノホルムの前述した特異性について考察した。

### II 実験方法

動物実験 静脈注射後の血中濃度の測定 静脈内投与の場合、 $5 \times 10^{-4}$  N NaOH にキノホルムを  $400 \mu\text{g}/\text{ml}$  の割合に溶解した溶液を用時調製し、その  $0.5 \text{ ml}$  または  $0.25 \text{ ml}$  をラット下肢大腿部静脈より、徐々に投与を行ない、前報の方法によりキノホルムの測定を行なった。

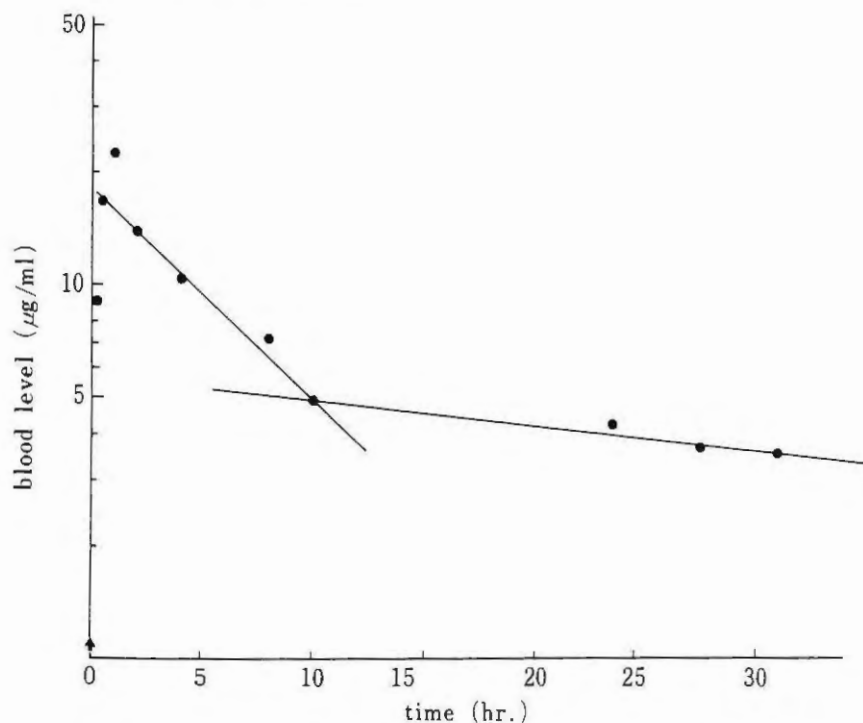


図1. Intravenous administration of chionoform  $200 \mu\text{g}/\text{ml}$

### Ⅲ 結果及び考察

ラットに静注した場合の血中濃度推移 図1は、120～220gのラットの下肢大腿部静脈よりキノホルムを投与した場合の血中濃度の推移を示した。他の薬剤において認められているように、投直後には一旦、急速に減衰して( $\alpha$ -Phase)、その後は極めて徐々に減衰する( $\beta$ -Phase)ことが認められた。また、投与量を変えて静注した場合、投与量に比例して血中濃度の上昇が認められ、血中濃度と投与量との間に相関性が認められた。しかし、経口投与、連続投与の場合は、そのような相関性は認められなかった。

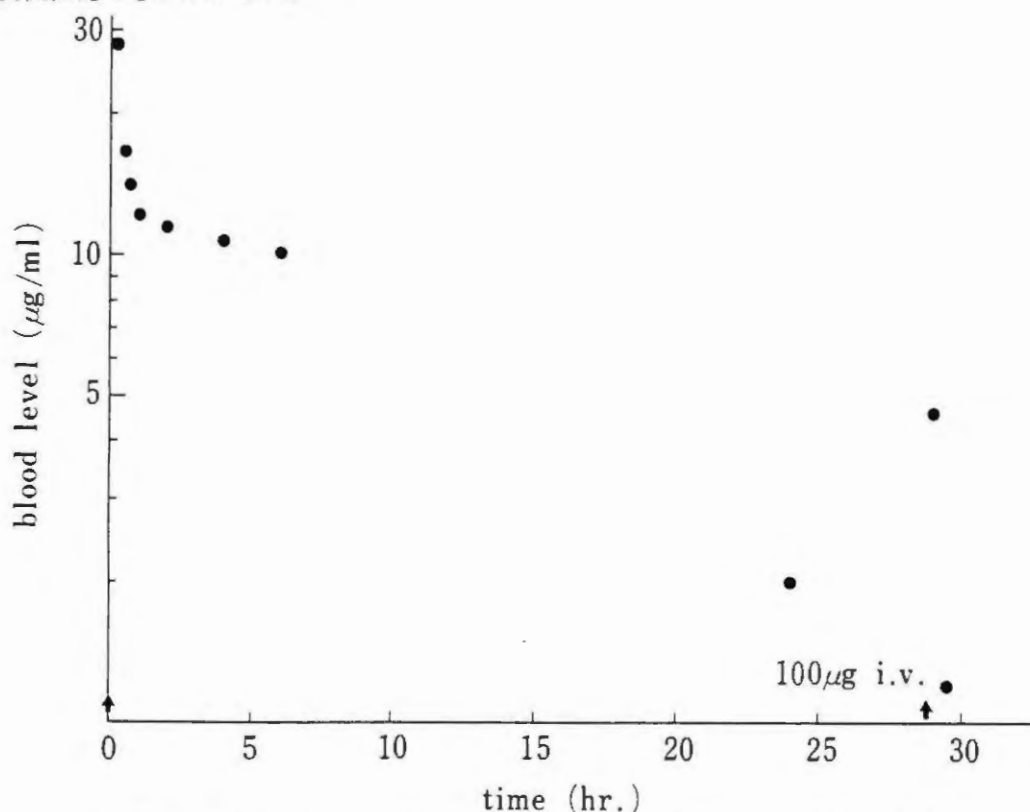


図2. Intravenous administration of chionoform 200μg/ml

図2は、血中濃度が減衰した後、投与量を変えてキノホルムを再び静注した場合の血中濃度の時間変化を示している。図からもわかるように投与量に比例した血中濃度変化を示している。更に、消失パターンも同様の傾向を示している。キノホルムを静注した場合と、経口投与した場合とを比較してみると、その血中濃度パターンが著しく異なっていることが明らかとなった。静注の場合に、投与量に比例した血中濃度が得られたということは、経口投与の特異なパターンの原因や生体内移行の種々の段階のなかでも特に吸収の段階、あるいは更に吸収されたキノホルムが、採血部位に致達するまでの過程に問題があるように思われる。即ち、肝臓あるいは、脂肪組織等の特定部位への大量の蓄積が生ずるために血中濃度が上昇しない可能性が示唆されるが、この点について、更に詳細に検討する必要があると思われる。

## 6. キノホルムの体液中濃度の測定(Ⅲ)

宇野 豊三, 北沢 式文, 前田 温  
小室 徹雄, 田畑 美津子, 上能 伊公雄

(京大病院薬剤部)

右京 成夫

(京大内科)

### I はじめに

本研究に関する第一報, 第二報において, キノホルムを連続投与したラットの血中濃度の推移はその投与経路によって著しく異なったパターンを示すことを報告し, さらに本物質の生体内移行に関する詳細な検討の必要であることを示唆してきた。これらの報告のなかで特に

1. キノホルムの血液よりの消失は徐々に行なわれる。
2. 経口投与後にみられる血中濃度は投与量との間に, 他の薬剤で認められるような相関関係が認められない。

などの結果をヒトにおいても認め得る結果を得たので報告する。

昭和45年9月以来キノホルム製剤の販売が停止されており, ヒトにおける本物質の生物薬剤学的研究の実施が不可能である現在, 本物質の生体内移行に関してヒトとラットの間に相関を示唆するデータが得られたことの意義は大きいものと考える。

### II 実験方法

#### 1. 血液の取得

京大病院第一内科の患者で, キノホルムを服用した経験を有する者, 服用経験のない者を投薬記録より選び, さらに健康人の血液を用いて検討を加えた。

#### 2. 定量法の検討

定量法は第一報で報告した方法を用いたが, 採血量, 操作途中のクロロホルム量, さらに, ガスクロマトに注入する量を増減することによって検出限界を $0.01 \mu g/ml$  とすることが可能であった。

### III 結果および考察

得られた結果を表Iに示す。表において, 投与総量(TOTAL DOSE(g))の欄には, 1日投与量に投与日数を乗じ, さらに市販製剤中に含まれるキノホルム量に換算したものである。この欄に(+)とあるのは投与記録には投与に関する記載はないが, 被験者が訪院前に, あるいは市販のキノホルム製剤を購入して服用した経験を認めたものである。服用中止後の月数の欄には, 服用中止後, 測定のために採血を行なった時点までの月数を表わしている。月数の不正確なものには(?)を付している。

表Iの結果から明らかなように, 被験者の血液中に検出し得たキノホルム量は必ずしも投与総量と相関関係が認められない。また同様にキノホルム量と服用中止後の月数の間にも明らかな相関性は

認められていない。

何れにしても投与中止後、多数の年月を経過した後でもなお、血液中にキノホルムが検出しうることは、本物質が生体内移行像において従来知られている他の薬剤とは異なっていることは明らかである。今後なお詳細な検討が必要であることを示唆するものと考えられる。

表 I

| MAME      | AGE | SEX | TOTAL DOSE(g) | MONTH AFTER AD. | CONC. OF CHIN.<br>( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) |
|-----------|-----|-----|---------------|-----------------|-----------------------------------------------|
| (1) T.N.  | 20  | M   | 0             | —               | 0                                             |
| (2) T.K.  | 29  | M   | 0             | —               | 0                                             |
| (3) M.T.  | 25  | F   | +             | ?               | 0                                             |
| (4) T.I.  | 26  | M   | 0             | —               | 0                                             |
| (5) T.Y.  | 22  | F   | 49.5          | 53              | 0                                             |
| (6) Y.M.  | 70  | F   | 156.25        | 18              | 0.18                                          |
| (7) H.M.  | 65  | F   | 165.9         | 18              | 0.67                                          |
| (8) M.K.  | 17  | F   | 3.6           | 46              | 0.26                                          |
| (9) B.Y.  | 36  | F   | 25.2          | 10              | 0.64                                          |
| (10) S.M. | 40  | M   | 138.5         | 20              | 0.72                                          |
| (11) K.M. | 45  | F   | 183.7         | 20              | 0.19                                          |
| (12) Y.N. | 53  | M   | +             | ?               | 0                                             |

#### N 文 献

- 1) 田村善蔵：「血清中の非抱合型キノホルムの定量」  
スモン調査研究協議会研究報告書Ⅲ, P. 173 (S. 45)  
「生体試料からの非抱合型キノホルムの微量分析」  
同上 Ⅲ, P. 179
- 2) 松岡理ら：「標識キノホルムによる代謝、分布の研究」  
同上
- 3) Krüger -Thiemer  
「The Role of the Therapeutic Regimen in Dosage Design」  
Chemotherapia Vol 10 61 (65/66')
- 4) Gerhard Levy  
「Comparative Pharmacokinetics of Coumarin Anticoagulants II」  
J.P.S. 57(1): 68 ('68)

## 7 Chinoform- $^{14}\text{C}$ の代謝(第1報)

浦久保 五郎, 城戸 靖雅, 長谷川 明

池淵 秀治, 永松 国助

(国立衛生試験所)

### I 緒言

キノホルムによるSMON症状の発現が、或種のキノホルム代謝産物に由来する可能性を想定した。そこで実験動物にキノホルムを一回または連続投与したときの尿中キノホルム代謝産物を定性および定量的に追求する目的で、まずキノホルムによりSMON発現を認めない実験動物例として、今回ラットについて検討した。その結果、キノホルムおよびその代謝産物(おもに抱合体)の尿中排泄の様相は、ラットに関しては一回投与、連続投与群間にまったく差異は認められなかった。

### II 実験方法

#### II.1 キノホルム- $^{14}\text{C}$ の合成

##### II.1.1) 5-Chloro-8-hydroxyquinoline-2 (または-4)- $^{14}\text{C}$ の合成

2-amino-4-chlorophenol 0.286g, 2-nitro-4-chlorophenol 0.173g, glycerol 0.284g および glycerol-1- $^{14}\text{C}$  2.5 mCi にメタノール 0.3 mlを加えて加熱溶解し、十分混和したのちメタノールを減圧で留去した。これに濃硫酸 0.747gを加え、油浴中で $120^{\circ}\sim 138^{\circ}$ に60分間加熱したのち、浴温を $170^{\circ}$ にあげて2-nitro-4-chlorophenolを留去した。冷後、水10mlを加えて不溶物をろ去し、ろ液に氷冷下に30%水酸化ナトリウム溶液を加えてpH 5とした。析出した沈殿をろ取し、活性炭を加えて希エタノールから2回再結晶を行ない、淡黄色針状晶(mp $132^{\circ}$ ) 0.237g (glycerolからの収率42.8%)を得た。これは標品との混融およびTLCから、5-chloro-8-hydroxyquinolineであることを確認した。

##### II.1.2) キノホルム- $^{14}\text{C}$ の合成

5-chloro-8-hydroxyquinoline- $^{14}\text{C}$  0.216gを0.7%水酸化カリウム溶液18mlに溶かし、これに3.7%ヨウ化カリウム溶液5.5mlおよび10%次亜塩素酸ナトリウム溶液0.75mlを除々に加えたのち5%塩酸を加えてpH 6.8とし、1夜室温に放置した。析出した沈殿をろ取し、これに10%酸性亜硫酸ナトリウム溶液50mlを加えて30分間攪拌したのち沈殿をろ取した(0.328g, 収率89.3%), エタノールから再結晶して白色針状晶(mp $190^{\circ}$ ) 0.173g (収率47.3%)を得た。標品との混融およびTLCでキノホルムであることを確認した。

なお以上述べたキノホルム- $^{14}\text{C}$ の合成系路は図1に示すとおりである。



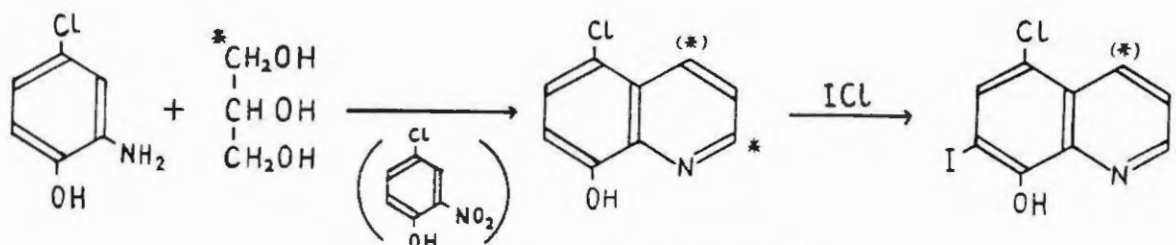


図1 Chinoform-<sup>14</sup>Cの合成系路

## II・2 代謝実験

### II・2・1) 投与および試料の採取

①1回投与：ウィスター系ラット（体重約100g）3匹(♂)にキノホルム-<sup>14</sup>C 水性懸濁液1ml（ $2.4 \times 10^7$  dpm，キノホルム4.35mgおよびCMC 0.4 mgを含む）をゾンデを用いて経口投与し，糞尿分離型代謝ケージを用いて飼育し，投与後24時間ごとの糞および尿を採取した。

②連続投与：①と同じラットを3群（対照群3匹，定用量群5匹，増用量群7匹，いずれも♂）に分け，表1に示した用量のCMC（対照群）またはキノホルム-CMC懸濁液を20日間連日ゾンデを用いて経口投与し，21日目に生存した11匹にキノホルム-<sup>14</sup>C-CMC懸濁液（ $2.6 \times 10^7$  dpm，キノホルムおよびCMC各5mg）を投与した。投与後代謝ケージ内で飼育し，キノホルム-<sup>14</sup>C投与5日目まで，各群の24時間糞，尿を採取した。

表1 各群の薬剤投与量

| 対 照 群          |      | 定 用 量 群                   |      | 増 用 量 群                   |      |
|----------------|------|---------------------------|------|---------------------------|------|
| 投与量 (CMC)      | 投与日数 | 投与量 (キノホルム <sup>*</sup> ) | 投与日数 | 投与量 (キノホルム <sup>*</sup> ) | 投与日数 |
| 4mg/kg/day/4ml | 5日   | 40mg/kg/day/4ml           | 20日  | 40mg/kg/day/4ml           | 5日   |
| 6 "            | "    | "                         | "    | 60 "                      | "    |
| 9 "            | "    | "                         | "    | 90 "                      | "    |
| 12 "           | "    | "                         | "    | 120 "                     | "    |

\*キノホルムに対して10%のCMCを含む。

### II・2・2) 採取試料の処理

採取した尿は水を加えて一定量とし，その一部を全尿放射能の測定にあてた。残りの試料を等量のベンゼン-ピリジン（9：1）混合溶媒で3回抽出し，有機層と水層に分画した。水可溶部はさらにII・2・3)に従って操作した。

糞は風乾したのち乳鉢で細粉とした。

### II・2・3) 尿中水可溶成分の分画

II・2・2)で得た水可溶部に酢酸を加えてPH4とし，沈殿が完結するまで5%酢酸鉛溶液を加えたのち遠心分離した。上清にアンモニア水を加えてPH8とし，さらに5%酢酸鉛溶液を加えて

殿を完結させたのち遠心分離した。上清はさらにアンモニアアルカリ性とし、生成した沈殿を分離した。

PH 4, 8 および強アルカリ性で得た上記の沈殿をそれぞれ 100 ml の水に懸濁させ、これに硫化水素を通じて鉛を除き、そのろ液を減圧濃縮、乾固した。

以上で得た試料の一部についてはリン酸緩衝液 (PH 4.6) 中、 $\beta$ -Glucuronidase と 38° で 48 時間 incubate したのち、加水分解液を等量のベンゼン-ピリジン (9:1) で 3 回抽出し、有機層および水層に分画した。

#### II・2・4) 放射能の測定

①尿中全放射能：II・2・2) の全放射能測定用尿試料の一定量 (1~2 ml) を湿式酸化し、 $^{14}\text{CO}_2$  をシンチレーター溶液 (PPO 5 g, dimethyl-POPPOP 0.3 g, ethanolamine 100 ml, methylcellosolve 300 ml, toluene 600 ml) に導入し、吸収させたのち液体シンチレーションカウンター (日本無線医理学研究所製 Model LSC-601) で放射能を測定した。

②尿有機層分画の放射能：II・2・2) の有機層分画の一定量をシンチレーター溶液 (PPO 8 g, dimethyl-POPPOP 0.4 g に toluene を加えて 1000 ml とした) に加え、液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。

③糞中全放射能：糞の乾燥粉末試料の一定量 (100 ml 以下) を湿式酸化法で酸化し、①と同様に放射能を測定した。

#### II・2・5) クロマトグラフィーによる尿中代謝産物の検索

エタノール/酢酸/水 = 7/1/2 を展開溶媒として、ペーパークロマトグラフィー (ろ紙: Whatman No. 1) および薄層クロマトグラフィー (薄層板: ポリアミド) を行なった。クロマトグラム上の放射性スポットは Packard 社製 Radiochromatogram scanner (Model 7200) および日本無線医理学研究所製 Aloka Thin-layer chromatogram scanner を用いて測定し、検出した。

### III 結果および考察

キノリン骨格の合成には種々の方法が知られているが、今回は最も一般的に行なわれる Skraup 法に従って合成を試み、5-chloro-8-hydroxyquinoline を 42.8% の好収率で得た。またキノホルム- $^{14}\text{C}$  の比放射能は  $2.49 \mu\text{Ci}/\text{mg}$  ( $760.7 \mu\text{Ci}/\text{mmole}$ ) で、今回の動物実験の目的には十分満足すべき比放射能を示した。

II・2 に従って、上記のキノホルム- $^{14}\text{C}$  を動物に投与して得られた糞、尿中の放射能は表 2, 3, 4 に示すとおりである。ただし表中の数値は各群に属する 3~5 匹の動物の平均値で示した。

表 2 尿の全放射能（投与量に対する％）

| キノホルム<br>— <sup>14</sup> C<br>投与後の経過日数 | 動物<br>数 | 連 続 投 与 群 |         |         | 一回投与群   |
|----------------------------------------|---------|-----------|---------|---------|---------|
|                                        |         | 対 照 群     | 定 用 量 群 | 増 用 量 群 |         |
|                                        |         | 3 匹       | 3 匹     | 5 匹     | 3 匹     |
| 1 日                                    |         | 27.68 %   | 19.43 % | 16.20 % | 17.93 % |
| 2 日                                    |         | 1.07      | 0.69    | 1.63    | 2.70    |
| 3 日                                    |         | 0.11      | 0.09    | 0.20    | 0.11    |
| 4 日                                    |         | 0.05      | 0.02    | 0.05    | 0.03    |
| 5 日                                    |         | 0.03      | 0.02    | 0.04    | 0.02    |

表 3 尿の溶媒抽出有機層の全放射能（1日尿の全放射能に対する％）

| キノホルム<br>— <sup>14</sup> C<br>投与後の経過日数 | 動物<br>数 | 連 続 投 与 群 |         |         | 一回投与群  |
|----------------------------------------|---------|-----------|---------|---------|--------|
|                                        |         | 対 照 群     | 定 用 量 群 | 増 用 量 群 |        |
|                                        |         | 3 匹       | 3 匹     | 5 匹     | 3 匹    |
| 1 日                                    |         | 3.10 %    | 0.32 %  | 1.90 %  | 2.56 % |
| 2 日                                    |         | 3.54      | 0.53    | 4.18    | 2.66   |
| 3 日                                    |         | 3.79      | 15.30   | 4.86    | —      |
| 4 日                                    |         | 3.99      | 12.01   | 4.68    | —      |
| 5 日                                    |         | 3.93      | 4.33    | 5.51    | —      |

表 4 糞の全放射能（投与量に対する％）

| キノホルム<br>— <sup>14</sup> C<br>投与後の経過日数 | 動物<br>数 | 連 続 投 与 群 |          |         | 一回投与群   |
|----------------------------------------|---------|-----------|----------|---------|---------|
|                                        |         | 対 照 群     | 定 用 量 群  | 増 用 量 群 |         |
|                                        |         | 3 匹       | 3 匹      | 5 匹     | 3 匹     |
| 1 日                                    |         | 89.56 %   | 112.77 % | 80.53 % | 49.14 % |
| 2 日                                    |         | 12.26     | 9.23     | 18.00   | 1.73    |
| 3 日                                    |         | 0.45      | 6.09     | 1.28    | 0.14    |
| 4 日                                    |         | 0.23      | 0.04     | 0.13    | 0.02    |
| 5 日                                    |         | 0.15      | 0.15     | 0.06    | 0.02    |

尿の全放射能および経日的排泄の様相はいずれの群にも著明な差は認められず、投与後5日間のうちに投与量の約18～29％が尿中に排泄されることを示している。表3から明らかなように、これらのうち17～30％が非抱合体の状態で排泄されている。

糞中の排泄量が第1日目にすでに100%をこえ、あるいは5日間の糞、尿排泄量の積算値が連続投与群においてはいずれも100%以上を示していることは、かなり実験誤差を物語っているが、しかし対照群を含めて連続投与群は投与後第1日目に80~100%を糞中に排泄するのに対して、一回投与群は約50%である。これはCMCが糞中へのキノホルムの排泄促進作用を示すものといえよう。しかし一方ではCMCがキノホルムによるSMON発現にプラスの効果を持つことも考えると、この効果はCMCがキノホルムの吸収助剤的役割（今回の実験の、尿の全放射能値からは推論できないが）をもかねているのか、あるいはSMON発現にはまったく別の作用を持つものかは興味深い。

尿の溶媒抽出有機層のラジオペーパークロマトグラムの一例を図2に示す。このほかのいずれの群から得た試料もまったく同じパターンを示し、キノホルムのほか、未知化合物（これはRf値から5-chloro-8-hydroxyquinolineと推定されるが、分画操作中のartifactである可能性が強く、目下検討中である）のピークを認めた。

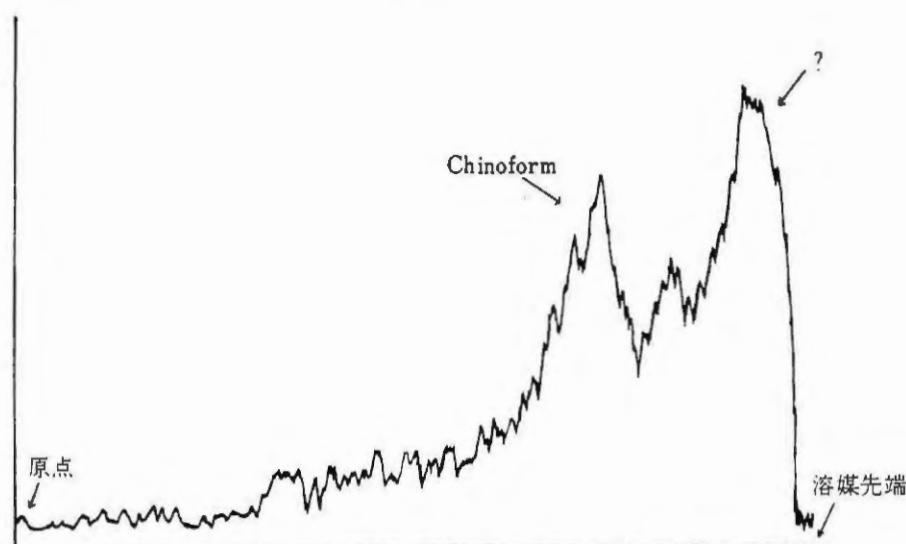


図2. 連続投与群尿有機層のラジオペーパークロマトグラム

水溶性画分の鉛塩処理に際して、本来はグルクロナイドおよびサルフェイトはPH8の沈殿画分に移行することが予想されたが、PH4および強アルカリ性画分にも放射能が分散し、いずれの分画ともラジオクロマトグラムのパターンは同一で2個の放射性スポットを認めた（図3、4）。このうち1個のスポットはキノホルムのグルクロナイドにRfの一致をみた。他は未確認ではあるがサルフェイトと考えられる。

鉛塩処理して得られた分画を $\beta$ -Glucuronidaseで水解し、有機溶媒で抽出すると、有機層中にはキノホルムおよび未知物質（図2のそれと同一物質）を検出した（図5）。

以上からキノホルム- $^{14}\text{C}$ 投与時のラットにおける代謝産物は、今回検討した投与方法のいかにかわらず、定性的差異は認められずに遊離のキノホルムのほか、そのグルクロナイドおよびサルフェイトと思われるものであった。

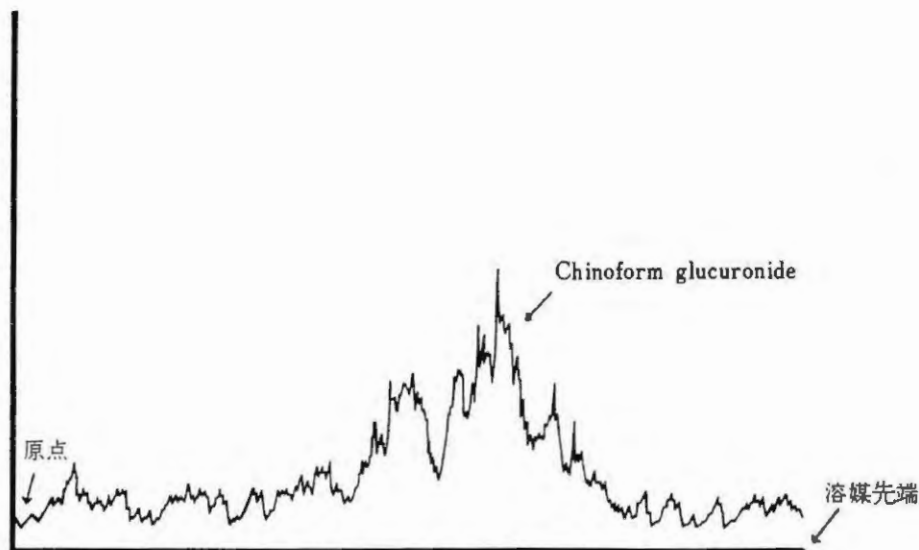


図3. 連続投与群尿水層のラジオペーパークロマトグラム

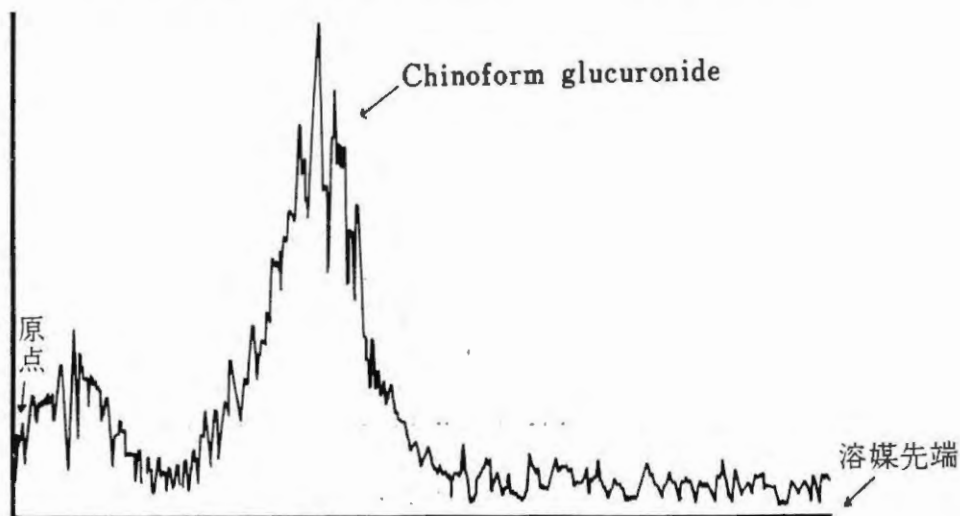


図4. 増用量群尿水層のラジオ薄層クロマトグラム

ラットにおいてはキノホルムによるSMON様症状の発現に成功した例はない。したがって、今回ラットの代謝産物としてキノホルムの抱合体以外に検出されなかったことは、もしキノホルムによるSMON発症に抱合体以外のminor metaboliteが関与しているかもしれないという観点から立って考えてみると、SMON発症動物では、ラットではみられない他の代謝産物の産生があるという事、すなわちキノホルム代謝に種差があるということが予想され得る。

#### N 結 語

Skraup 法に従ってglycerol-1- $^{14}$ C を標識原料としてキノホルム- $^{14}$ Cを合成した。キノホルムの連続投与と一回投与時の尿中代謝産物の定性、定量的差異を検討したが、両者の間に著明な差異は認められなかった。ラットはキノホルムによってSMON様症状を発現しないことか

キノホルムの minor metabolite が S M O N の発症に関連あるとの見方をするならば、キノホルム代謝には種差がある可能性が予想された。

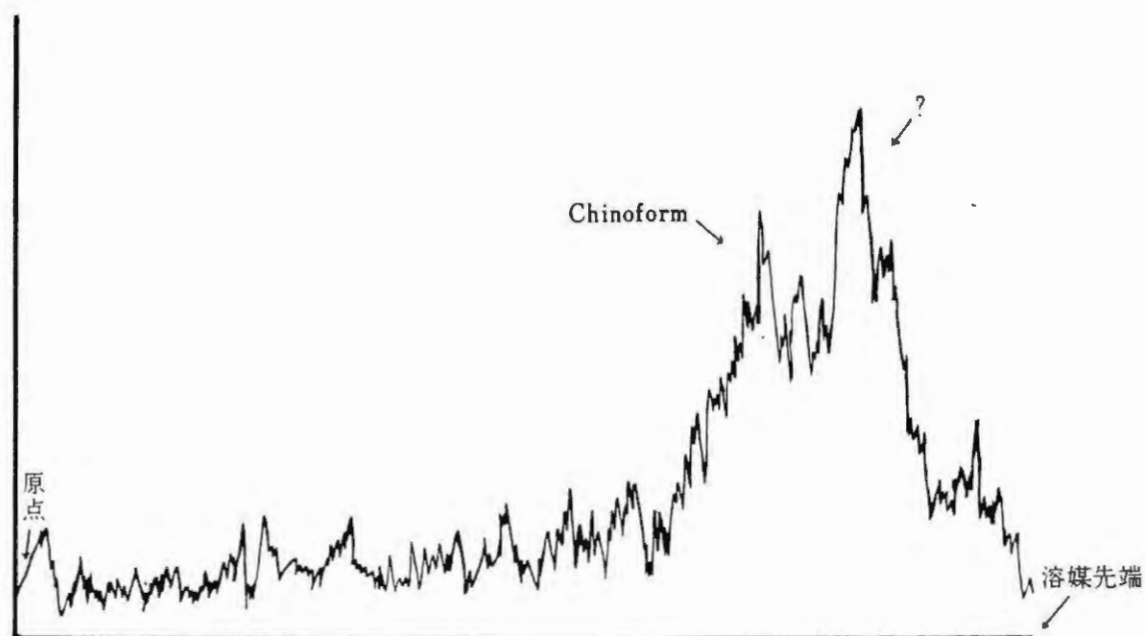


図5．一回投与群尿水層水解後の有機層のラジオペーパークロマトグラム

## 8. ウズラを用いたキノホルム投与実験

大滝サチ 江頭 靖之

(予研・病理)

### I 緒言

キノホルムがSMONの原因として疑われはじめたのは昭和45年で、患者の舌や排泄物の着色理由の追究と臨床疫学的事実に基づいており、動物実験によるSMONの再現が、不可欠のこととして要請された。同年秋には家兎(井形、<sup>1)</sup>豊倉)、46年3月にはニワトリ(池田<sup>2)</sup>ら)、イヌ(俵<sup>3)</sup>ら、大月<sup>4)</sup>ら)による実験で早くもかなり有望な成績が得られた。その後立石らは雑犬による実験で、病理組織学的にもあらゆる点でヒトのSMONと一致する所見を発表し、ビーグル犬でもそれに近い結果を得た。

著者らは昭和46年2月からウズラを用いて投与実験を行った。これは池田らのニワトリでの歩行障害の出現に希望をもち、これに近縁で、且つわれわれの研究室においてより多数を扱って良好な飼育管理を行い得る条件にあったことによるものである。はじめ、昭和46年2月より、一定量(10~200 mg/Kg/day)を90日間投与を続けたが、臨床所見は何も現れなかった。そのころ、イヌで投与量を段階的に増すことによって、最もヒトのSMONに類似する所見が報告されたので、<sup>3)</sup>それにならった実験を8月末に再開した。平均2~3週ごとに漸増した大量のキノホルム投与によって全例が発症、斃死(又は瀕死時屠殺)に終り、病理所見はなお不十分ながらも、一定の陽性所見と見做される成績を得た。

### II 実験材料および方法

ウズラは、日本生物科学研より購入した体重100g前後の雑種で、計30匹、雌・雄を区別せずに使用した。三ないし四羽を一区画: 20×15×13cm<sup>3</sup>のステンレスケージで飼育、市販の配合粉末飼料を約50g、水で泥状にして1日1回与えた。

キノホルムは、班より分与された原末で、10~15%の割合にCMC(Carboxyl methyl cellulose)を加えて蒸留水に懸濁、ホモジナイザーにかけて均質にした。投与には20ccの注射器の先に、ネラトンのカテーテルを10cmに切断したゴム管を接続し、前記懸濁液を容積で定量し、1日1回、朝の空腹時に、胃内に注入した。

### III 実験群およびその投与方法

1)一定量連続投与実験(昭和46年2月1日~5月20日): 30羽中27羽を7群に分けた。I~IV群(各4羽)は経口投与群で、休日を除く毎日それぞれ200, 100, 50および10mg/Kgを投与した。その他のVとVI群(4羽および3羽)は腹腔内に、10又は5mgを週2回注射し、残り3



羽を対照群とした。以上の方式で、経口投与60回、腹腔注射20回のところで、以後の薬用量をそれぞれ二倍に増量して更に経口30回、腹腔10回を重ねたが、何ら異常を認めなかったので実験を中止した。(この間の1羽ごとの総投与量はキノホルム実量で、I群2.4g(体重Kg当り2.4g), II群1.2g, III群600mg, IV群120mg, 腹腔注射の2群ではそれぞれ30mg, 15mgにすぎない)。

2) 漸増投与実験(昭和46年8月23日一同47年4月4日): 約3ヶ月の休薬期間をおいて上記ウズラを使用した。新たにA群(旧I, V群合せ): 8羽, B群(旧II, VI群): 6羽, C群(旧III群と新たな3羽): 6羽, D群(旧IV群): 4羽に分け, A群: 400mg/kg/day, B群: 200mg/kg/day, C群: 100mg/kg/day, D群: 20mg/kg/day からはじめて, 2週間からはそれぞれを1.5倍(A群: 600mg/kg/day)に増量, 4週間には当初量の2倍(A群: 800mg/kg/day), 5週後に3倍(同1200mg/kg/day)に増量, ここでA, B群に各一羽発症をみた。更に6週後には4倍(同1600mg/kg/day), 8週後には6倍(同2400mg/kg/day)に増量, 2羽が発症, 斃死した。以後は9週目に当初量の5倍(同2000mg/kg/day)に減量し, 10週後には再び7.5倍(3000mg/kg/day)に増し, 11週には6倍(同2400mg/kg/day)に下げる等, 主に発病とその保持を目指して, 多少の不規則性をもってかなり思い切った漸増投与を続けた。(Fig. 1)

IV 実験成績: 発病のみられた漸増投与実験について記載する。

#### 1) 発病状況

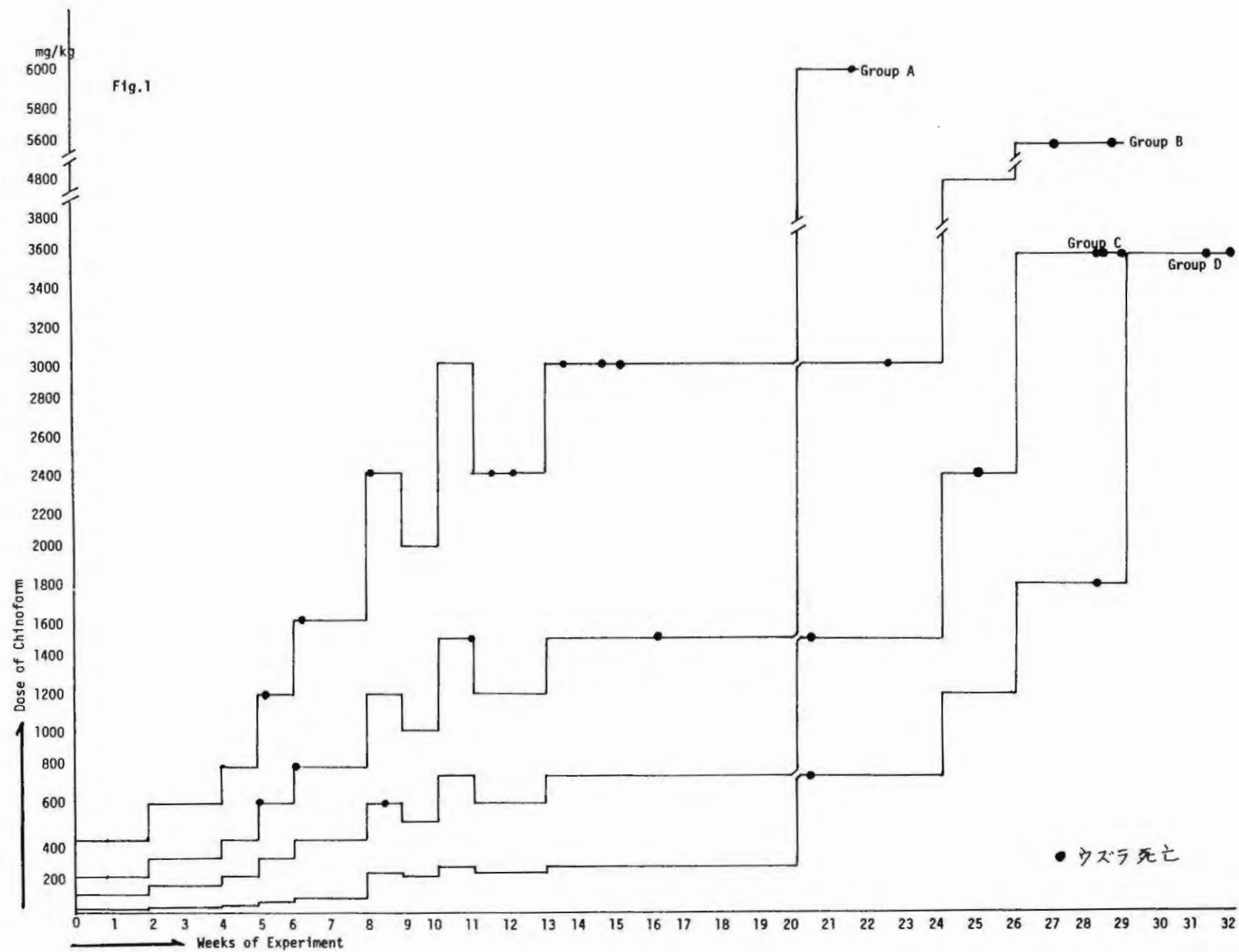
対照ウズラや発病前の正常ウズラは, 日中狭いケージの中を始終立って歩きまわり, ケージの外に出して追い立てれば低く飛ぶことがあるが, ニワトリの様に地上にうずくまることは少い。発病は, 運動が鈍くなり羽をふくらませてうずくまることで気付かれ, 体重が減少し, つかまえた時の脚の蹴りが弱くなる。後には全く坐ったままとなり, 首はよく動き, えさをついばむことは出来るが, 外へ出して追いたてても羽をバタつかせるだけで歩くことや立っていることは困難となる。次第に飼料の残量がふえ, 経口投与時開口を拒むようになる。このような状態は, はじめて発病を疑い出してから一両日で到達することが多く, それが1~3日, 稀に1週以上つゞいて突然死亡するのが常であり, 病的状態のまま生き延びさすことは困難であった。発病はおおむね増量した1~2日目に認められることが多い。結局, 47年4月4日(D群1/4)を最後に, 対照群を除いた全例が同じ様に発病してのち斃死(又は瀕死時屠殺)して実験を終了した。(Fig. 1の●印はウズラ死亡時を表す)

#### 2) 発病—斃死と薬用量との関係

漸増投与を続けたところ, 散発的に病状を示すウズラが現れたが, その発病頻度はおおむね投与量の多いA群, 次いでB, C群の順に高く, 1, 2の例外を除くと, 任意の時期の積算発病例数はほぼA, B, C, Dの順に多い状態で経過した。

各ウズラの死亡時の1日投与量(final dose), 総投与量(cumulative dose)および投与期間等をTable 1に示した。漸増投与による“致死量”は, A群では1200~6000mg/





kg/day (1羽につき120~600mg), 5倍の個体差が示され, B群では600~5600 mg/kg/day で9.3 倍差, C群: 600~3600 mg/kg/day で6倍差, D群750~3600mg/kg/day で4.8 倍差があり, 全群を通じては600~6000 mg/kg/day で10倍差が示された。従って5~10倍程度の個体差があると判断される。又, キノホルムを漸増投与されたこれらウズラは半数が2400 mg/kg/day (1羽につき 1日240 mg) に達したところで死亡した結果になる。

Table 1

Final dose and cumulative dose of chionoform in each bird

| Group No. | Final dose     | Cumulative dose | Days of administration |
|-----------|----------------|-----------------|------------------------|
| A 1       | 1200 mg/kg/day | 17800 mg/kg     | 37                     |
| " 2       | 2400 "         | 44200 "         | 57                     |
| " 3       | 2400 "         | 96800 "         | 80                     |
| " 4       | 2400 "         | 107800 "        | 85                     |
| " 5       | 3000 "         | 127000 "        | 95                     |
| " 6       | 3000 "         | 139000 "        | 100                    |
| " 7       | 3000 "         | 154000 "        | 106                    |
| " 8       | 6000 "         | 283000 "        | 151                    |
| B 1       | 600 "          | 7700 "          | 35                     |
| " 2       | 1500 "         | 43100 "         | 77                     |
| " 3       | 1500 "         | 86000 "         | 113                    |
| " 4       | 3000 "         | 159500 "        | 158                    |
| " 5       | 5600 "         | 263300 "        | 189                    |
| " 6       | 5600 "         | 313700 "        | 200                    |
| C 1       | 600 "          | 10450 "         | 60                     |
| " 2       | 1500 "         | 58750 "         | 142                    |
| " 3       | 2400 "         | 100450 "        | 175                    |
| " 4       | 3600 "         | 165250 "        | 198                    |
| " 5       | 3600 "         | 165250 "        | 198                    |
| " 6       | 3600 "         | 179650 "        | 203                    |
| D 1       | 750 "          | 12650 "         | 142                    |
| " 2       | 1800 "         | 65900 "         | 198                    |
| " 3       | 3600 "         | 127100 "        | 221                    |
| " 4       | 3600 "         | 134300 "        | 225                    |

総投与量は, 予備実験のそれ(前述の通り2.4g~15mg)を含めて, 7.7g~313.7g/kg (1羽につき0.77g~31.37g)と大きく開いており, 投与ウズラの半数は総投与量12.7gで

死亡している。

### 3) 病理組織学的所見

屠殺又は斃死ウズラは、開胸、開腹および頭蓋切開を行ってのち、等張・中性ホルマリンに固定のち脊髄を脊柱に入ったまま取出して、イオン交換樹脂を沈めた5%蟻酸で脱灰したのち截断し、の諸臓器と共に型の如くパラフィンに包埋、標本作製した。H・E染色の他、神経系についてはロシアン染色、ラクソール・ファスト青(髄鞘染色)とヘマトキシリンの重染色、およびHome法鍍銀軸索染色等を行った。

脊髄の所見は、上記の処置にも拘らず、大部分を占める死亡例では自家融解のため不明瞭又は全観察不能で、3羽の屠殺例と死后時間の短い少数例のみの検索を余儀なくされた。他の諸臓器もほぼ同じ状態であった。

ウズラの脊髄は人間や哺乳類のそれに比し各構成要素に量的差があることと、腰髄・背正中部に派(lumbo-sacral sinus)があることを除けば、ほぼ同じ部位に同じneuronや線維が位置しており、大よそ同じ目での検索が可能の様である。<sup>5)</sup>その結果、脊髄には、病状から期待されたものより軽い<sup>6)-9)</sup>が、ほぼ人体SMON例と対比出来る所見が得られた。すなわち、主として後索知覚路に一致して、左右対称性の軸索変性が認められた(Fig. 2-4)。この変化はGoll束に相当する正中寄りの部分により強く、Burdach束に相当する側方寄りではより軽い<sup>5)</sup>が、全体としての変化が軽いためか、両者の境界は不明瞭である。強拡大で軸索染色標本をみると、軸索が変性-膨化して消失に至る過程が認められる(Fig. 4)。その他、側索(Fig. 5)や前索(Fig. 6)の運動領にも軽微な変化がみられるが、後索(Fig. 3)に比しはるかに軽く、病変は知覚路に優位に認められた。なお、これら病変はまだ初期の段階にあり髄鞘変性には至っていない。その他、標本に現れた後根神経線維や神経節にも変性や細胞脱落を示すものがあり、ところによりリンパ球様細胞浸潤をも認めた。しかし、より上位の中樞神経系を含め、髄鞘変性又は炎症性病変はどこにも認められない。末梢神経は末検索であり、内臓諸臓器には一定の所見は認められていない。

### V 考 按

ウズラを用いて人間のSMONを再現する試みを行ったについては、第一に動物種選定の問題がある。著者らがウズラを用いたのは、緒言に述べた通り、キノホルムをニワトリに投与して有望な所見<sup>2)</sup>が得られたとの報告に刺激され、又、当研究室での便宜をも考えてのことである。

実験の結果はすでに述べた通り、種々の点でSMONと対比出来る所見を示しつつも、他方多くの不備もおおむねない。その中、生前の病状については、小動物では観察が限られており、殊に知覚異常の立証は不可能に近い。しかし客観的に認め得た脚の運動障害は殆どのウズラに共通してみられ、頸や羽の動きと比べると単なる全身衰弱の部分現象とは異り、一応陽性所見として採り得ると思われる。しかし、眼の症状を備えた例が遂に得られなかったのは、ウズラとしては実験期間が充分でないまゝ死亡したためかもしれない(後述)。この経過の短かさは、病理所見にも大きく影響してい

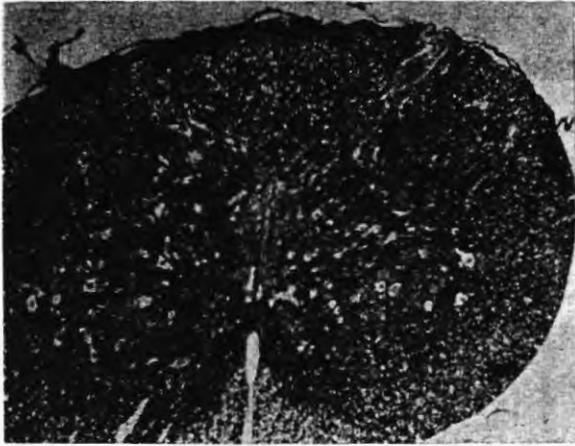


Fig. 2  
ウズラB群No.3 頸髄  
(LFB+HE染色)×40

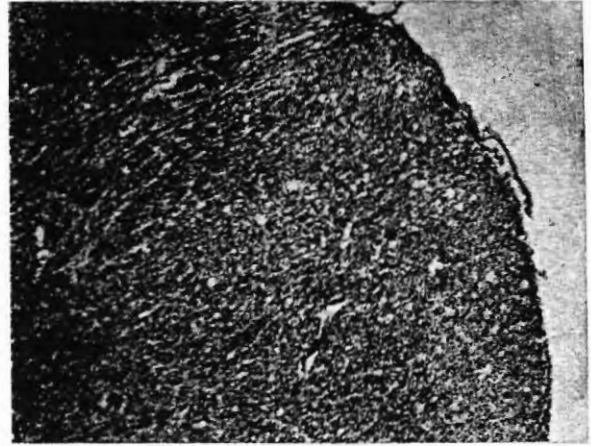


Fig. 5  
ウズラB群No.3, 頸髄側索  
(LFB+HE染色)×100

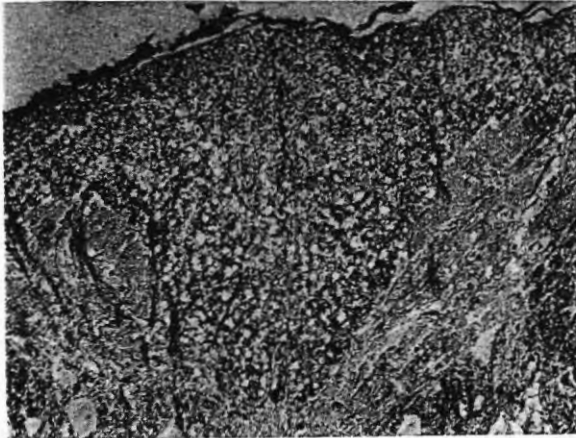


Fig. 3  
ウズラB群No.3, 頸髄後索  
(LFB+HE染色)×100

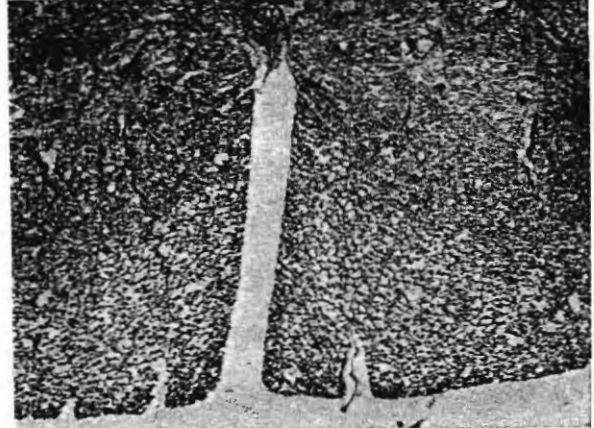


Fig. 6  
ウズラB群No.3, 頸髄前索  
(LFB+HE染色)×100

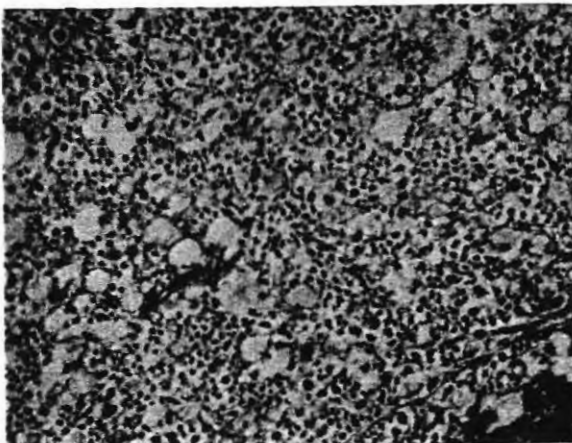


Fig. 4  
ウズラB群No.3, 頸髄後索  
(Homes法軸索染色)×400

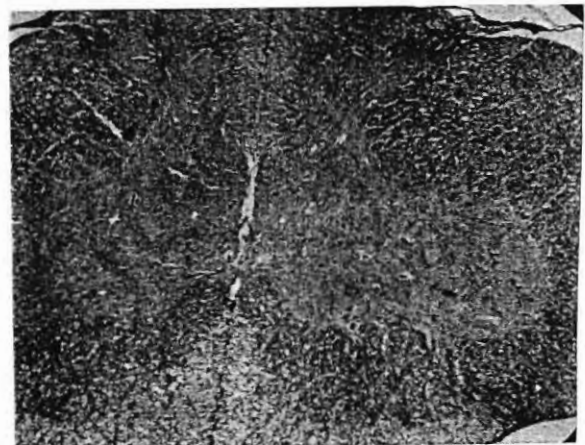


Fig. 7  
対照ウズラNo.1, 頸髄  
(LFB+HE染色)×40

る。

SMONの病理所見について、スモン調査研究協議会病理部会では、全国から剖検例を集め、部会員の検討を経て、SMON病変の診断基準を定めた。うち必発の所見としては、末梢神経および脊髄長索路の、左右対称性の性があり、知覚路優位で且つ末梢寄りに強い、という原則をもつことが挙げられている。<sup>10)</sup>

この所見を実験的に再現するに当っては、第一に病変が質的にneuronの変性であること、第二に病変の特有な局在、との2点について本質的な一致が必要であらう。一方では、一次性脱髄や炎症や、他の病機が認められないことも要求される。

この様な原則的立場のみから言えば、上述の実験ウズラでの所見は矛盾するところはない。しかし何分、定型的なSMON剖検例やイヌなどの実験での所見に比べると、変化は総じてはるかに軽い。また眼の所見はみられなかった。

ウズラで観察されたこれらの所見程度の変化をSMON症例に求めると、全国から集めたSMON<sup>10)</sup>剖検例のうち、明らかにSMONであるとされた114例中の軽症例を挙げることが出来よう。これは症例№10(9病日)、№11(1ヶ月)、№25(3ヶ月)、№27(40日)、№32(9日)、№48(1ヶ月)、№61(記載なし)、№99(25日)、№102(19日)、№111(28日)、№136(1ヶ月)の11例で、これらの所見はFig. 8-11に代表される様に、前記の診断基準を辛うじて最少限に備えているにすぎず、まだ髄鞘変性や修復の所見の少い、軸索変性のみの病変であることが多い。以上の例は、1例を除き、すべて1ヶ月半以内の比較的経過の短い例である。全SMON剖検例114例のうち、1ヶ月半以内の例は僅か17例、1ヶ月以内の例は11例で約1割にすぎないことから、ここに挙げた11例は特に経過の短い例である。典型的所見を備えた例は殆どが発病後3ヶ月以上を経た例であり、殊に視神経に所見を認めた例は、組織検索例69のうち28例(55.1%)で、すべて2ヶ月半以上を経過しており、それ以前の例には明らかな所見を欠いている。臨床所見について記載のあった94例中、視力障害の記された例は65例(69.1%)で、これら死亡に至った、重症に属すると思われる例ですら、1/3乃至半数は視力障害や視神経の所見を欠いている様である。

人体剖検例の大多数が、数ヶ月から年余に及ぶ経過を経て死亡していることに比すれば、著者らのウズラでの実験は、SMONの再現としては先ず病日が不足であったのではないかと考えられ、病変の軽いことも当然の結果と考えねばならない。

最後に、薬用量という点で、人体に投与され発症した際のキノホルム量に比して多すぎるという疑問が残る。通常、薬理作用の実験では個体差に10倍、種属差に10倍程度の考慮がなされると言う。ウズラでのキノホルムによる発病一致死量には、個体差が5~10倍あった。ヒトとの種属差は、人体へのキノホルム製剤の1日投与量2~3g(キノホルム量:1.2~2.7g)が、患者体重50kgとして24~54mg/kgにあたるのに対して、ウズラの最少発症量600mg/kgはヒトの11~25倍に相当する。この場合、ヒトでの発病は知覚異常で知り得るのに対し、ウズラではより重症に相当



する運動障碍の起った時点ではじめて認められることをも考慮して、本実験での「発症時」投与量は、実は多すぎ、増量は急ぎすぎたため、死亡を早めたということになるかも知れない。一旦「発症」を認めてからは薬を増量することを控え、延命に努めたが余り成功しなかったことも量の多さのためと見られるデータである。運動障碍を指標として発症をみる限り、ウズラでの発症量と致死量との開きはかなり狭いものの様である。

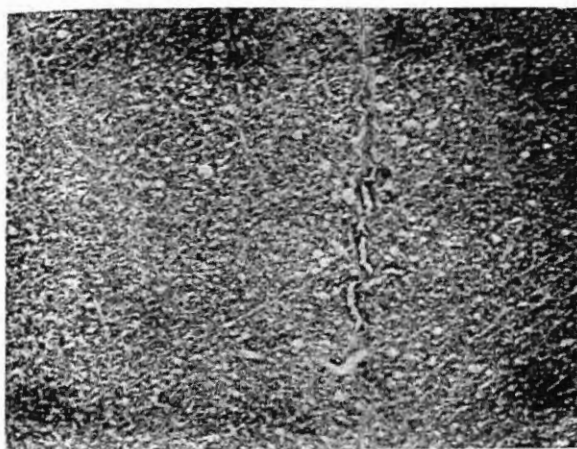


Fig. 8  
人体SMON例(№.11, 17才女, 経過  
1月)頸髄後索Golgi束  
(LFB+HE染色)×40

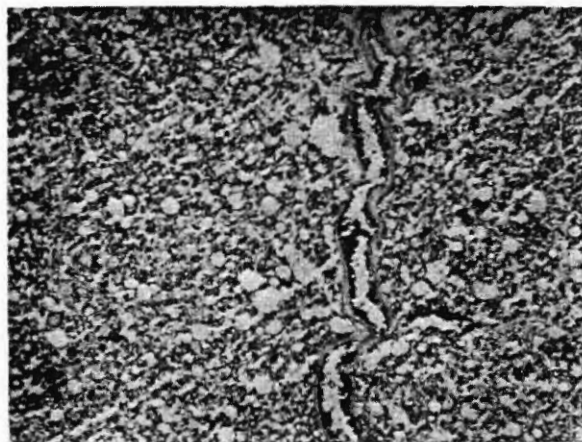


Fig. 9  
№.8の強拡大(LFB+HE染色)×100

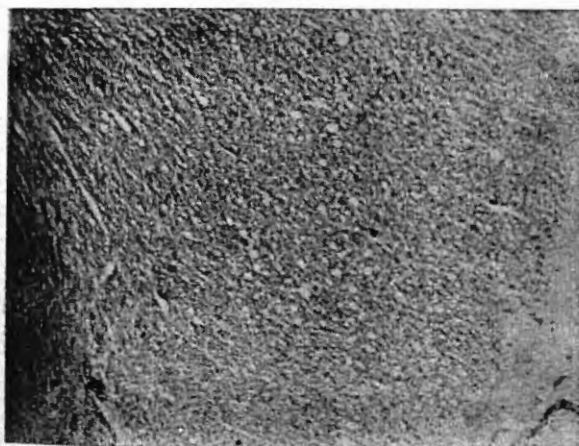


Fig. 10  
人体SMON例(№.11, 17才女, 経過  
1月)腰髄側索錐体路  
(LFB+HE染色)×40



Fig. 11  
№.10の拡大(LFB+HE染色)×100

## V まとめ

ウズラを用いたキノホルム投与実験で、患者に投与された量に準じた一定量の長期投与では陰性であったが、漸増投与して、平均2400mg/kg/dayの大量のキノホルムで、全例が肢の運動障害を

主徴として発症，斃死又は瀕死時に屠殺され，病理組織学的に，軽症乃至早期のSMONに一致する所見が得られた。

## 文 献

- 1) 井形昭弘，豊倉康夫：キノホルムによる神経系障碍に関する研究—キノホルム静注家兎における末梢神経障碍；医学のあゆみ，75，309—310，1970
- 2) 池田良雄，戸部満寿夫，鈴木康雄，小林和雄，鈴木幸子，川崎靖：キノホルム毒性に関する研究；スモン調査研究協議会報告書，№3，190—199，1971
- 3) 立石潤，池田久男，斎藤章，黒田重利，早原敏之，大月三郎：SMONと同一の脊髓後索変性を示した慢性キノホルム中毒犬；医学のあゆみ，77，205—206，1971
- 4) 立石潤，黒田重利，斎藤章，大月三郎：純系ビーグル犬におけるキノホルム経口投与実験；医学のあゆみ，81，770—771，1972
- 5) Kappers, A., Huber, G.C. & Crosby, E.C.: The comparative anatomy of the nervous system of vertebrates, including man, vol. 1, 202—220 (the spinal cord of birds), HAFNER Publishing Company, New York, 1960
- 6) 松山春郎，小川恵弘，仲村禎夫，秦順一：SMONの病理；最新医学，24，2469—2478，1969
- 7) 白木博次，小田雅也：“SMON”の神経病理学；最新医学，24，2479—2509，1969
- 8) 小川勝士，堤啓，元井信：岡山地方のSMON剖検例；スモン調査研究協議会研究報告書，№4，18—48，1971
- 9) 小宅洋：SMONの病理組織学的研究；スモン調査研究協議会研究報告書，№4，49—58，1971
- 10) スモン調査研究協議会病理部会：全国SMON剖検例の組織学的検討・同報告書，№10，1972

## 9. キノホルムによると思われる肝内閉塞性黄疸

志方 俊夫, 遠藤 久子

(東大病理)

藤原 研司, 堺 隆弘, 織田 敏次

(東大・第一内科)

最近 S M O N がキノホルム中毒であるという考え方が強くなるにつけ、肝におけるキノホルムの代謝、排泄などが問題になっているが、これとは別に人体例で肝内閉塞性黄疸を伴う肝傷害がおそらくキノホルムにより起こることをわれわれは見出した。これは従来から肝内閉塞性黄疸の成因を検索していたところ、たまたまその一症例が S M O N 様の神経症状を起こしたこと<sup>1)</sup>から知られたのである。この症例の肝臓からキノホルムが検出され、同様な肝内閉塞性黄疸を示した他の 3 例でもキノホルムが証明された。これら 4 症例の臨床症状および肝組織像には共通の所見がある。キノホルムの分析は東京大学薬学部薬品分析化学、田村善蔵教授のもとでガスクロマトグラフィーで行なわれた。

これらの症例のうち 3 例は、それぞれ異なった慢性肝疾患の経過中に肝内胆汁うつ滞型の黄疸をきたし肝機能不全で死亡した。<sup>2)</sup>この肝疾患は慢性肝炎、乙型肝炎硬変、脂肪性肝硬変がそれぞれ 1 例ずつである。残りの 1 例は咽頭癌の末期に同様な肝内閉塞性黄疸をきたし死亡した症例である。

この 4 例の肝組織は組織学的にひとつの特異なパターンを示した。すなわち 4 例とも肝外胆道には閉塞を思わせる所見はなく、組織学的にはそれぞれ異なった原疾患(慢性肝炎、乙型肝炎硬変、脂肪性肝硬変)が見られるが、その上加わった変化は共通である。つまり小葉内では程度の差はあるが、肝細胞の空胞変性、とくに核に隣接した部位の空胞形成、Kupffer 星細胞の泡沫細胞化がみられる(図 1)、この所見は実験動物にキノホルムを大量に投与した時の所見と同様な変化である。<sup>4)</sup>小葉または偽小葉の周辺部では小胆管の増生とそのあるものの内腔の拡大、胆汁栓の形成、小胆管周囲における好中球を交えた炎症性細胞反応が認められる(図 2)。胆汁栓の中には普通みられる黄緑色の胆汁栓のほかエオジンで均質に染まるもの、およびヘマトキシリンで青く染まる細顆粒状の物質も認められた。動物にキノホルムを投与した場合かかるいわゆる小胆管炎の像は認められなかった。ただ四塩化炭素とキノホルムを同時に投与すると小胆管増生がみられるが、四塩化炭素単独投与の場合とどの位差があるのか疑問である。

以上の所見から、キノホルムは既存の肝疾患、あるいは重篤な全身性変化があると肝内胆汁うつ滞の傾向を示す肝傷害を起こし組織学的には肝細胞の空胞変性といわゆる小胆管炎 cholangiolitis の像を示すようである。S M O N の患者で臨床的に若干肝臓機能異常を示すことがあってもこのような強い肝傷害を起こす症例が少ないのは、健全な肝臓ではキノホルムを代謝、排泄する能力があるが、既存の肝疾患があるとその代謝も障害されているためにかかる病変を引き起こすものと思われる。



肝内閉塞性黄疸の成立機転、あるいはいわゆる小胆管炎の病変については、肝細胞の障害が原発性で、胆汁酸組成の変化から胆汁のミセル構造が変わり、そのため二次的に小胆管に胆汁うつ滞と炎症性病変を引き起こすという考え方があるが、キノホルムの場合肝細胞の変化もかなり特徴的で強い。<sup>3)</sup> また肝細胞の変化は動物実験の所見と一致する。動物の肝細胞では電顕的に、ミトコンドリアの膨化とクリステの消失、小胞体の拡大、核周辺の空胞形成、キノホルムの結晶と思われる物質の沈着、疎面小胞体の増生などがみられた。<sup>4)</sup>

なおこの4症例では肝以外では脾にいずれも著明な変化がみられた。

#### 文 献

- 1) 井形昭弘, 藤原研司, 西忠博, 畠山正己: 肝および腎にキノホルム沈着をみた1症例(予報), 医学のあゆみ, 75, 491, 1970
- 2) 藤原研司, 堺隆弘, 兼高達式, 鈴木宏, 織田敏次, 志方俊夫: 肝硬変に見られた著明な肝内胆汁鬱滞とその成因に関する考察, 肝臓12, 458, 1971
- 3) Popper, H. & Schaffner, F.: Pathophysiology of cholestasis. Human Path., 1, 1, 1970
- 4) 志方俊夫, 藤原研司, 遠藤久子, キノホルムによる肝傷害の病理, 肝臓13, 497, 1972

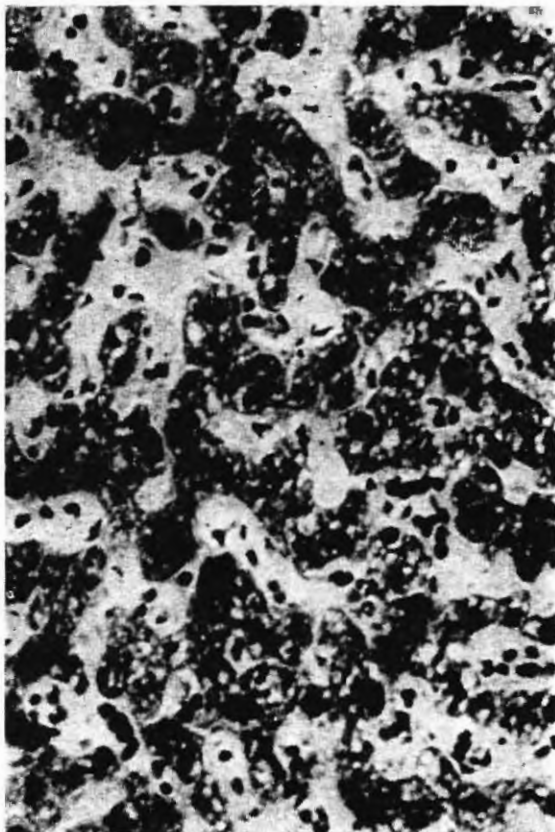


図 1

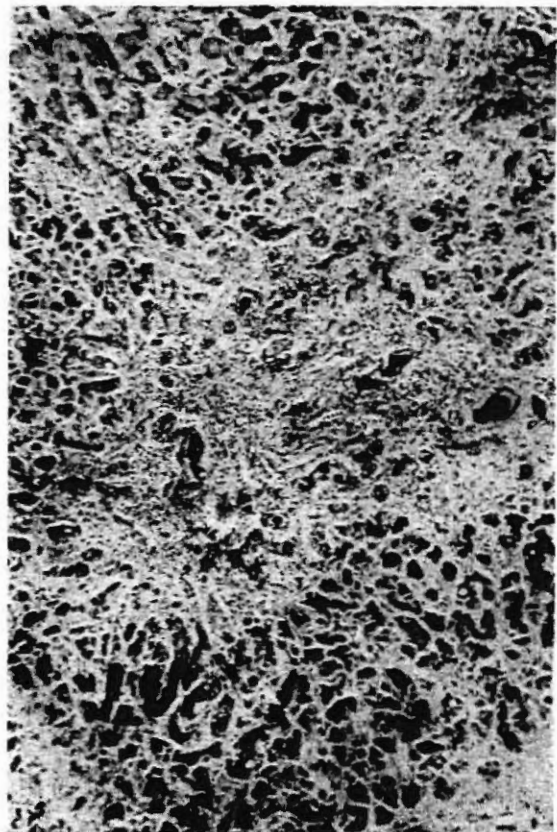


図 2

## 10. キノホルムの神経毒性に関する動物実験

大月 三郎, 渡辺 昌祐, 立石 潤, 斉藤 章, 黒田重利

(岡山大・医, 神経精神)

### 内 容 目 次

- I 雑犬, ビーグル犬, ネコ, サルに対する経口投与実験
- II 慢性中毒動物の病理学的研究
- III 慢性中毒イヌ末梢神経の電顕的研究
- IV 放射性キノホルムのMicro-autoradiography.

#### I 雑犬, ビーグル犬, ネコ, サルに対する経口投与実験

前年度報告書で雑犬に対するキノホルム経口投与実験の一部を報告した。<sup>1)</sup>その後, 罹病期間の長い慢性中毒動物で, 典型的な Myelo-optic neuropathy を認めたので, これらの動物実験をまとめた。

##### 材料および方法

動物 雑犬25頭(うち1頭はビーグル犬と同時に追試, 4頭がコントロール), 純系ビーグル犬14頭, 生後14カ月の雌(2頭は予備実験に使用, 5頭がコントロール), 猫32頭, (うち5頭がコントロール), 日本猿2頭(うち1頭がコントロール)を用い, 雑犬24頭は病院食, 1頭は固型飼料, ビーグル犬は全例固型飼料(日本クレアKK製CD-1)で飼育した。猫には煮魚およびネコ用カンズメ食, 猿には果物, 野菜, イモ類を与えた。

キノホルム製剤 実験当初は市販のEmaform(キノホルム90%+CMC10%)およびEntero-vioform(キノホルム93%+Sapamine 7%)を用いたが, 回収処置以降はSMON協議会を通じて提供された両製剤を使用した。

投与方法 雑犬21頭およびビーグル犬9頭には上記製剤を牛乳に懸濁して朝夕2回経口投与し, 猫27頭には飼料に混じり1日1回投与した。猿1頭は当初食餌または飲料水に混じり投与したが, 服用量が不正確なため1日1回鼻腔ゾンデにより懸濁水を注入した。

後述の急性中毒死を避けるため, 大多数の動物では漸増的に投与量を増し, 発症後も維持量又は更に漸増量を投与した。全身状態の悪化した場合, および一部の動物で休薬効果を見る目的以外は, 休まず投与を続行した。その詳細は表1, 2, 3に示した。

合併処置 1. キノホルムの腸管からの吸収促進を意図して, 便秘処置(Buscopan 注2A/day 10日+タンナルビン2.0, ビスマス2.0/1日の持続的内服)を投薬雑犬3頭とコントロール雑犬1頭に行った。2. キノホルム少量投与雑犬とコントロールの各1頭に肝, 腎障害作製の目的で四塩化炭素0.500/kgを3日間投与した。3. 猫2頭に腎障害作製の目的でViomycin 300mg/kg

を筋注した。

## 実験成績

### 1 臨床経過

表1 雑犬へのキノホルム投与実験(附, 猿)

| 動物<br>No. | 性 | 体重<br>(Kg) | キノホルム投与量(太字は発症<br>時の1日当り投与量)<br>(mg/Kg/day×days) | 発症まで<br>のキノホルム総投<br>与量<br>(mg/Kg) | 発症日<br>(日目) | 罹病期間<br>(日) | 剖検<br>(日) |
|-----------|---|------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------|-------------|-----------|
| 慢性中毒雑犬    |   |            |                                                  |                                   |             |             |           |
| 1         | M | 1.6        | 112×28                                           | 3136                              | 28          | 1           | 1         |
| 2         | F | 1.0        | 72×12→117×62                                     | 8118                              | 75          | 1           | 1         |
| 3*        | M | 1.4        | 65×1→77×10→97×2→128×9                            | 2053                              | 21          | 2           | 1         |
| 4         | M | 1.0        | 72×12→117×37                                     | 2502                              | 26          | 24          | 1         |
| 5         | M | 5          | 72×8→108×9→144×75                                | 3708                              | 32          | 50          | 1         |
| 6*        | F | 1.6        | 56×1→68×10→84×2→112×64                           | 1688                              | 20          | 58          | 1         |
| 7         | F | 1.0        | 72×97→90×87                                      | 9054                              | 120         | 65          | 18        |
| 8         | F | 1.2        | 60×55→97×124                                     | 5822                              | 81          | 99          | 18        |
| 9         | F | 1.0        | 52×5→72×5→90×18→117×167                          | 3176                              | 36          | 159         | 19        |
| 10        | F | 9          | 40×44→60×119→80×106→142×22                       | 3140                              | 67          | 224         | 29        |
| 11        | F | 1.0        | 90×10→117×179(194日目より休薬)                         | 16578                             | 144         | 239         | 38        |
| 12        | F | 6          | 60×41→90×13→120×                                 | 5790                              | 72          | 300以上生存中    |           |
| 13        | F | 6          | 120×5→150×5→213×10→300×                          | 4380                              | 23          | 120以上生存中    |           |
| 急性中毒死雑犬   |   |            |                                                  |                                   |             |             |           |
| 14*       | M | 1.1        | 82×1→98×1                                        |                                   | 2           | 1           |           |
| 15        | M | 2.5        | 72×2                                             |                                   | 2           | 1           |           |
| 16        | F | 1.1        | 33×3                                             |                                   | 3           | 1           |           |
| 17        | M | 1.3        | 126×1.5                                          |                                   | 1.5         | 3.5         |           |
| 18        | F | 1.5        | 24×28                                            |                                   | 1           | 27          | 2         |
| 非発症雑犬     |   |            |                                                  |                                   |             |             |           |
| 19        | F | 5          | 72×13→108×9→144×65                               |                                   |             |             | 8         |
| 20        | F | 1.0        | 35×118(50日目, CCl <sub>4</sub> 負荷)                |                                   |             |             | 11        |
| 21        | F | 9          | 35×155                                           |                                   |             |             | 15        |
| 対照雑犬      |   |            |                                                  |                                   |             |             |           |
| 22*       | M | 1.1        |                                                  |                                   |             |             | 1         |
| 23        | M | 1.4        |                                                  |                                   |             |             | 5         |
| 24        | M | 1.2        |                                                  |                                   |             |             | 5         |
| 25        | F | 8          | CCl <sub>4</sub> 負荷                              |                                   |             |             | 長期生存      |
| 猿         | F | 5          | 120×17→150×23→234×16→324×27                      | 17982                             |             |             | 8         |

※:便秘処置合併

雑犬(表1)キノホルム投与21頭中、4頭が急性中毒死、1頭はキノホルム投与直後から食欲減退し、全身衰弱のため28日目に死亡、3頭が臨床的に無症状であったが、他の13頭に慢性中毒による神経症状を認めた。

表2 ビーグル犬へのキノホルム投与実験

| 動物<br>No.                          | 性 | 体重<br>(Kg) | キノホルム投与量(太字は発症<br>時の1日当り投与量)<br>(mg/Kg/day×days)                           | 発症まで<br>のキノホルム総投<br>与量<br>(mg/Kg) | 発症日<br>(日目) | 罹病期間<br>(日) | 剖検日<br>(日目) |
|------------------------------------|---|------------|----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| Emaform(90%キノホルム+10%CMC)           |   |            |                                                                            |                                   |             |             |             |
| 1                                  | F | 8.6        | 47×8→103×9→154×9→199×10<br>258×10→364×6                                    | 9443                              | 45          | 7           | 52          |
| 2                                  | F | 8.1        | 49×8→110×9→161×9→211×10<br>268×10→350×10→427×16                            | 17953                             |             |             | 73          |
| 3                                  | F | 7.7        | 52×8→113×9→159×9→206×10<br>265×10→414×10→401×24→296×30                     | 14922                             | 64          | 63          | 127         |
| 4                                  | F | 8.6        | 47×8→103×9→150×9→197×10<br>246×10→333×10→390×24→300×                       | 10803                             | 57          | 90          | 以上生存中       |
| 5                                  | F | 8.5        | 26×3→38×3→51×3→76×3→102×3<br>128×3→152×8→154×25→180×8<br>200×3→220×5→250×1 |                                   | 29          | 7           | 69          |
| Enterovioform(93%キノホルム+7%Sapamine) |   |            |                                                                            |                                   |             |             |             |
| 6                                  | F | 8.1        | 85×7→115×3→187×3→287×3<br>353×3→413×11→442×12→287×                         | 14129                             | 45          | 90          | 以上生存中       |
| 7                                  | F | 7.4        | 93×7→124×3→200×3→307×3<br>379×3→430×11→407×12→279×                         | 15527                             | 50          | 90          | 以上生存中       |
| 8                                  | F | 9.8        | 70×7→92×3→153×3→236×3→301<br>×3→351×11→332×12→253×                         | 7361                              | 32          | 90          | 以上生存中       |
| 9                                  | F | 8.6        | 80×7→119×3→173×3→269×3<br>335×3→401×11→424×12→295×                         | 13927                             | 46          | 90          | 以上生存中       |
| Control                            |   |            |                                                                            |                                   |             |             |             |
| 10                                 | F | 8.7        |                                                                            |                                   |             |             | 長期生存中       |
| 11                                 | F | 8.5        |                                                                            |                                   |             |             | 長期生存中       |
| 12                                 | F | 7.8        |                                                                            |                                   |             |             | 長期生存中       |
| 13                                 | F | 6.0        |                                                                            |                                   |             |             | 143         |
| 14                                 | F | 6.5        |                                                                            |                                   |             |             | 143         |

ビーグル犬(表2)雑犬にみられた如き急性中毒死は避けられたが、キノホルム剤投与ビーグル犬3頭中の1頭(No.2)は食欲不振、体重減少により衰弱していたところ、73日目に鎖をからませて死亡。その他の8頭はすべて神経症状を呈したが、とくに6頭は著明であった。

表3 猫へのキノホルム投与実験

| 動物<br>No.       | 体重<br>(Kg) | キノホルム投与量(太字は発症<br>時の1日当り投与量)<br>(mg/Kg/day×days)        | 発症まで<br>のキノホ<br>ルム総投<br>与量<br>(mg/Kg) | 発症日<br>(日目) | 罹病期間<br>(日) | 剖検日<br>(日目) |
|-----------------|------------|---------------------------------------------------------|---------------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| 1               | 0.9        | E300×4                                                  |                                       |             |             | 5           |
| 2               | 1.0        | E270×7                                                  |                                       |             |             | 8           |
| 3               | 2.8        | E100×7                                                  |                                       |             |             | 8           |
| 4               | 3.1        | E58×5→87×3                                              |                                       |             |             | 9           |
| 5               | 4.0        | E90×12                                                  |                                       |             |             | 13          |
| 6               | 1.4        | E200×13                                                 |                                       |             |             | 14          |
| 7               | 2.3        | E117×13                                                 |                                       |             |             | 14          |
| 8               | 3.6        | E-V95×13                                                |                                       |             |             | 14          |
| 9               | 3.6        | E-V103×16                                               |                                       |             |             | 17          |
| 10              | 1.0        | E270×12→540×9                                           |                                       |             |             | 22          |
| 11              | 2.7        | E100×12→200×12                                          |                                       |             |             | 25          |
| 12              | 1.5        | E180×12→360×14                                          |                                       |             |             | 27          |
| 13              | 3.0        | E <b>90</b> ×27                                         | 1440                                  | 16          | 13          | 29          |
| 14              | 3.0        | E90×30                                                  |                                       |             |             | 31          |
| 15              | 1.1        | E246×12→490×20                                          |                                       |             |             | 33          |
| 16              | 4.0        | E90×12→135×22                                           |                                       |             |             | 35          |
| 17 <sup>※</sup> | 2.7        | E100×12→200×22                                          |                                       |             |             | 35          |
| 18              | 2.9        | E93×51                                                  |                                       |             |             | 52          |
| 19              | 2.6        | E104×12→208×42                                          |                                       |             |             | 55          |
| 20              | 2.4        | E112×15→225×43                                          |                                       |             |             | 59          |
| 21 <sup>※</sup> | 2.8        | E100×12→200×46                                          |                                       |             |             | 59          |
| 22              | 0.8        | E257×26→515×14→771×21                                   |                                       |             |             | 62          |
| 23              | 2.2        | E126×12→ <b>250</b> ×55                                 | 7012                                  | 35          | 33          | 68          |
| 24              | 3.2        | E84×15→ <b>169</b> ×59                                  | 9034                                  | 62          | 13          | 75          |
| 25              | 4.0        | E-V <b>93</b> ×95                                       | 5487                                  | 60          | 36          | 96          |
| 26              | 3.4        | E106×12→ <b>159</b> ×110                                | 10653                                 | 90          | 33          | 123         |
| 27              | 4.0        | E45×6→68×14→ <b>90</b> ×9→113×9<br>135×29→180×30→225×97 | 2032                                  | 29          | 165         | 194         |
| Control         |            |                                                         |                                       |             |             |             |
| 28              | 2.5        |                                                         |                                       |             |             | 31          |
| 29              | 0.8        |                                                         |                                       |             |             | 51          |
| 30              | 1.2        |                                                         |                                       |             |             | 生存          |
| 31              | 3.5        |                                                         |                                       |             |             | 〃           |
| 32              | 4.0        |                                                         |                                       |             |             | 〃           |

E: Emaform, E-V: Enterovioform

※: Viomycin 負荷合併

猫(表3)食欲不振,下痢,全身衰弱により早期に死亡するものが多かったが,急性けいれん死は確認出来なかった。生前に6頭(No. 13, 23, 24, 25, 26, 27)に神経症状を確認し,とくにNo.27は重篤であった。

猿(表1)実験末期に食欲減退し,とくに下肢のヤセが目立ち,坐り込むことが多く,筋脱力を疑わせたが84日目に肺炎を併発して死亡した。

## 2.急性中毒症状

キノホルム投与後,雑犬4頭が1~3日の投薬で唾液流出,不穏状態などに引きつづき痙攣重積状態となり死亡した。この際のキノホルム量は33~125 mg/Kg/dayで動物の個体差がうかがわれた。痙攣をまぬがれた雑犬も投薬初期には一般に食欲が減退し,嘔吐や吃逆もみられ,1頭はその後,全身衰弱のため死亡した。この時期をすぎると一般に食欲も回復するが,眼瞼,肛門周囲のただれや脱毛などの皮膚粘膜症状は残ることがあった。

急性中毒死した4頭の剖検では,大脳半卵円中心の新鮮軟化巣,側頭葉皮質下,脊髓灰白質などの小出血巣,海馬角,扁桃核,延髄背側核などの神経細胞の変性など非特異的变化が認められた。

猫は全身衰弱により早期に死亡するものが多かったが,急性中毒雑犬の如く数回の投薬で痙攣重積死をとげたものはいなかった。

ビーグル犬,猿には急性中毒死や痙攣発作などは観察されなかった。

## 3.慢性中毒症状

キノホルム投与動物は急性期をすぎるとやや食欲も回復し,体重減少もとまる。さらに投薬を続けるうちに雑犬13頭,ビーグル犬8頭,猫6頭に以下の神経症状が臨床的に観察された。

初期には運動負荷とくに階段の昇降により腰の横揺れと不安定性が生じ,歩行が不自然になり,足もつれがみられる。これらは休息により回復するが,病勢の進行とともに後肢の脱力と,失調性,痙攣性歩行が著明となり,休息効果もみられなくなる。後肢ではさらに筋萎縮と腱反射亢進の傾向がみられた。前肢は後肢に比し犯されにくい,末期にはともに罹患する。腰部以下の失調も増強するため絶えず左右に動揺し,とくに排尿,便の体位がとれず,坐ったまま又は壁にもたれて行なった。重篤な雑犬では屢々,足が足関節で反屈したままひきずって歩こうと努力し,そのため後肢に擦過創が絶えなかった。針による痛覚刺激も2,3の動物では後肢が前肢に比し低下している如く思われた。長期罹患雑犬,ビーグル犬,猫では壁や階段におつかることから視力低下に気付かれたが,眼底写真からは対照動物に比し有意な差はみられなかった。さらに2頭の雑犬(No. 8, 12)では体動のたびに尿失禁が観察された。この時期にも食欲や全身状態は一般に良好で,とくに休薬した雑犬(No.11)は体重が著明に増加し,活気が出て来たが,神経症状は殆んど改善されなかった。

## 4.神経症状の発症とキノホルム投与量

大多数の動物に漸増的投薬を行なったが,急速投与を行った(No.13)を除いた雑犬12頭では1日当りキノホルム量は60~144 mg/Kgで発症した。この量を開始してから発症までの日数は2



頭( №.2, 11 )の例外を除き7～28日で、一般に1日投与量の多いものは短期間に発症し、1日

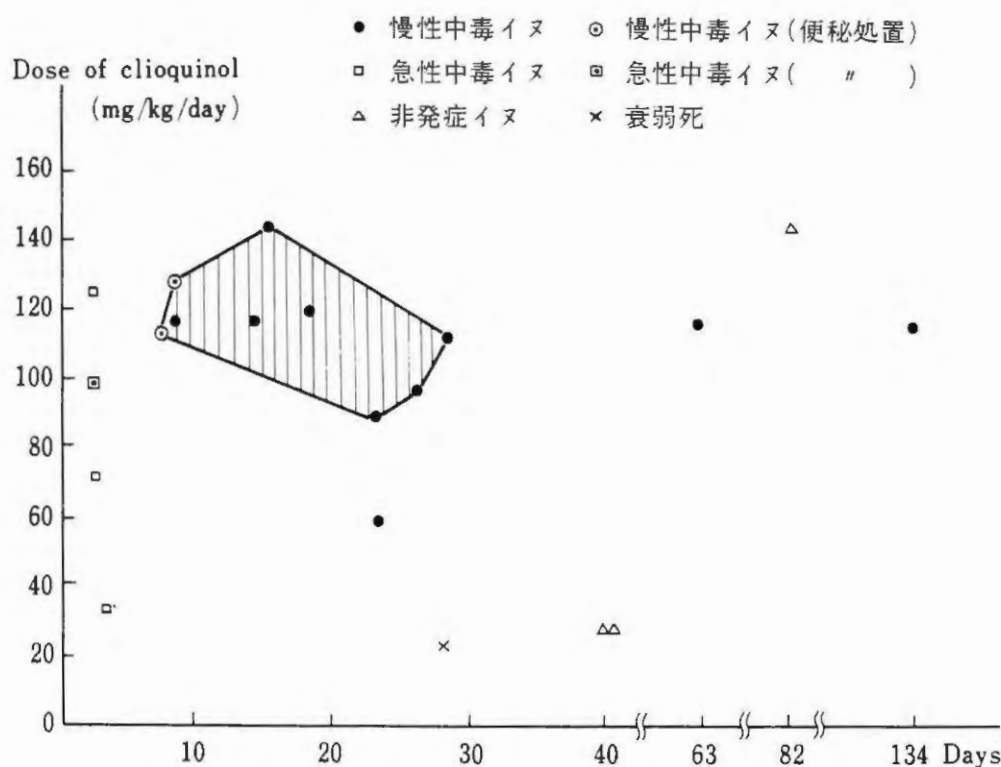


図1. キノホルム中毒量と同量開始後、発症までの日数(雑犬)

量の少ないものはやや長時間を要し、図1の如く斜線部分に9頭が入る。しかし少量で比較的短期間に発症した1例( №.10 )と大量にも係らず長期投与を要した2例( №.2, 11 )の例外がある。このうち №.2 は妊娠中でキノホルム投与にも抱らず、54日目の出産までは無症状であったが、出産後21日目に発症した。また発症までの総投与量でみると表1の如く、3頭の雑犬( №.6, 7, 11 )にかなりのバラツキがあり、犬の個体差と思われるが、残りの9頭の平均値及び標準偏差は  $4.161 \pm 1.984 \text{ g/Kg}$  であった。

本実験に使用した8頭のビーグル犬( №.1-4, 6-9 )はキノホルム1日投与量、約350～450 mg/Kg の範囲で発症したが、発症までかなり急速に増量しているため、時間をかければもう少し少量で発症したかもしれない。一応230 mg/Kg/day 以降の漸増期間につき、発症までの日数をみると19～37日と比較的に一致していた。いづれにせよ、1日投与量は雑犬の場合のほぼ2～5倍の高値であった。またビーグル犬の発症( №.2 は死亡 )までのキノホルム総投与量はEmaform 群とEntero-Vioform 群で大差がなく、各々の平均値は  $13.280$  と  $12.737 \text{ g/Kg}$  であった。また8頭全部の平均値は  $13.008 \pm 3.506 \text{ g/Kg}$  で、これも雑犬の場合の約3倍強の大量であった。さらにビーグル犬と同一条件で飼育した雑犬( №.13 )も総投与量  $4.38 \text{ g/Kg}$  で発症し、ビーグル犬との差が確認された。

猫は短期に死亡するものが多かったため、神経症状の発症に必要なキノホルム量は算定困難であっ

たが、典型的発症猫（No. 27）では1日投与量90 mg/Kg，総投与量2.032 g/Kgで発症，他の5頭の臨床発症猫も90～250 mg/Kg/dayで発症しており，雑犬とほぼ同一傾向を示すものと思われる。

猿は臨床的に発症日が確認しがたいが，死亡時には1日投与量324 mg/Kg，総投与量17.982 g/Kgで，明らかに雑犬，猫に比し多量で，ビーグル犬よりも多いと思われる。

#### 5.臨床検査成績

主に雑犬，ビーグル犬につき以下の血液化学検査，血液検査を施行した。

表4 ビーグル犬，血液検査所見

| 動物<br>No.      | 総蛋白<br>(g/dl) | 空腹時<br>血糖<br>(mg/dl) | GOT<br>(u.) | GPT<br>(u.) | 血色素量<br>(%) | ヘマトクリット<br>(%) | 赤血球数<br>( $\times 10^4$ ) | 白血球数   | 白血球分類(%) |    |   |   |    |    |
|----------------|---------------|----------------------|-------------|-------------|-------------|----------------|---------------------------|--------|----------|----|---|---|----|----|
|                |               |                      |             |             |             |                |                           |        | ST       | SG | E | B | M  | LY |
| Emaform群       |               |                      |             |             |             |                |                           |        |          |    |   |   |    |    |
| 1              | 6.2           | 100                  | 25          | 31          | 134         | 51             | 680                       | 13,350 | 5        | 70 | 1 | 1 | 2  | 21 |
| 2              | 6.0           | 102                  | 33          | 29          | 98          | 51             | 668                       | 5,650  | 1        | 56 | 1 | 2 | 3  | 37 |
| 3              | 6.4           | 126                  | 25          | 31          | 100         | 51             | 815                       | 12,700 | 1        | 44 | 0 | 1 | 5  | 49 |
| 4              | 6.4           | 97                   | 25          | 28          | 99          | 53             | 796                       | 11,350 | 3        | 62 | 1 | 0 | 3  | 31 |
| Enterovioform群 |               |                      |             |             |             |                |                           |        |          |    |   |   |    |    |
| 6              | 6.6           | 94                   | 22          | 26          | 105         | 55             | 851                       | 10,900 | 5        | 67 | 1 | 0 | 2  | 25 |
| 7              | 6.6           | 90                   | 37          | 27          | 95          | 50             | 687                       | 7,500  | 6        | 48 | 2 | 0 | 3  | 41 |
| 8              | 6.6           | 97                   |             |             | 102         | 51             | 721                       | 11,850 | 6        | 54 | 2 | 0 | 2  | 36 |
| 9              | 6.0           | 102                  | 20.5        | 30          | 104         | 54             | 590                       | 8,900  | 0        | 64 | 3 | 2 | 5  | 26 |
| Control群       |               |                      |             |             |             |                |                           |        |          |    |   |   |    |    |
| 10             |               | 97                   |             |             |             |                |                           |        |          |    |   |   |    |    |
| 11             | 6.0           | 112                  | 25          | 24          | 88          | 43             | 630                       | 10,550 | 2        | 57 | 5 | 0 | 10 | 26 |
| 12             | 6.0           | 101                  | 43          | 30          | 110         | 43             | 508                       | 11,800 | 4        | 62 | 0 | 1 | 2  | 31 |
| 13             | 6.0           | 116                  | 33          | 48.5        | 96          | 51             | 612                       | 7,850  | 1        | 61 | 0 | 0 | 4  | 34 |

ビーグル犬の血液検査は投薬開始後30日目に，股動脈から採血し施行した。被検査項目では，投薬群と非投薬群に有意な差はみられなかった。



表5 雑犬、血清中 VitaminB<sub>6</sub> 濃度 (単位: mγ/ml 血清)

| 動物<br>No. | 処 置       | TotalB <sub>6</sub> | PAL+PAM+PIN | PAL   | PAL-P |
|-----------|-----------|---------------------|-------------|-------|-------|
| 1         | キノホルム     | 2 3.7               | 1 0.5       | 1 5.2 | 1 5.2 |
| 2         | 〃         | —*                  | —*          | 1 5.2 | 1 4.8 |
| 3         | 〃         | —*                  | —*          | 1 4.0 | 8.0   |
| 4         | 〃         | 1 2 5               | 4 3.8       | 5 8.0 | 6 2.0 |
| 5         | 〃         | 2 8                 | 1 1.0       | 1 4.0 | 2 1.0 |
| 6         | 〃         | —*                  | —*          | 4 0.2 | 8.8   |
| 7         | 〃         | 9 8.7               | 4 9.4       | 4 6.0 | 9.0   |
| 8         | INH+キノホルム | 8 4                 | 5 5.3       | 7 0.0 | 5.0   |
| 9         | INH       | 4 3.4               | 4 9.4       | 2 5.0 | 9.0   |
| 10        | 無 処 置     | 7 7.7               | 5 6.6       | 3 0.0 | 1 5.0 |
| 11        | 〃         | 6 5.2               | 2 1.1       | 3 2.0 | 1 7.0 |

定量法: (Saccharomyces Caarls- (田村法による蛍光定量法)  
bergensisによるBioassay)

—\*: 菌の増殖を認めず。

雑犬11頭の血清中VitaminB<sub>6</sub>の定量を行なった。キノホルム単独投与7頭, INHと合併1頭, INH単独投与1頭, 無処置2頭の間に有意な差はみられなかったが, キノホルム投与の3頭ではS. Caarlsbergensisの増殖が阻害された。(本検査には中外製薬KK総合研究所の御協力を得た)。

#### 考 按

1. 急性中毒 雑犬, ネコでは早期に死亡するものが多く, とくに雑犬では急性痙攣死が屢々観察された。この痙攣閾値に関しては動物に個体差がみられ, またビーグル犬, サルは急性中毒症状が殆んどみられぬところから, 動物の種族差, 系統差も大きいと思われる。三好らはキノホルムが家兎に血糖値の変動をもたらすことを見出した<sup>2)</sup>が, あるいはこれが急性期の痙攣の原因の1つかもしれない。われわれの雑犬1頭でもキノホルム急性投与後, 血糖の変動を認めたが, 慢性投与ビーグル犬では有意な差がみられなかった。

2. 慢性中毒 両下肢の運動麻痺, 脱力, 筋萎縮, 腱反射亢進と痙性, 失調性歩行などの神経症状から成り, とくに脊髄性失調症状が中心症状であった。また長期罹患雑犬, ビーグル犬, ネコなどに視力障害がみられたが, これはわれわれの実験で初めて確認された所見である。これらの慢性中毒症状はヒトのSMONと同一であるが, 後者に特異的な下肢の異常知覚については, 動物では証明困難であ

る。またSMONの神経症状に前駆する腹部症状や自律神経症状についても、動物での再現は困難であるが、一部の雑犬、ネコの剖検で証明された腸重積症、巨大結腸症などはこれらを反映したものと思われる。上記の神経症状は罹病期間の長期化、キノホルム投与の持続につれて重篤化するが、一部の雑犬で試みた休薬によっては、神経症状は殆んど改善されない。また後述の如く、臨床的に神経症状の出現する以前に、キノホルム投与動物の病理変化はすでに出現している事実が認められた。

3.キノホルム投与量および合併処置 各種動物の神経症状の発症に要するキノホルム量には大差がみられ、またイヌでは雑犬とビーグル犬に系統差が認められた。発症時の1日投与量を動物別にみると、サル、ビーグル犬では大量を要し、雑犬、ネコでは約100～150 mg/Kgの範囲と思われる。これは多くのSMON患者の1日服用量20～40 mg/Kgと比較して、後者でも2.5～7.5倍の多量である点があげられる。しかしSMON患者と実験動物では投薬前の身体条件に差があることから、この程度の服用量の差は問題にならぬとの討論もなされた。さらに発症までに要するキノホルムの総投与量についても実験動物の種族差、系統差が明らかにされた。また2、3の動物ではキノホルムに対し極端に弱い個体と強い個体があり、キノホルムの腸管からの吸収、解毒、排泄などの代謝機構に個体差があることが考えられる。さらに妊娠雑犬(Ⅵ.2)が出産までは発症せず、出産後は他の雑犬と同一条件で発症した事実も興味がある。また長期投薬動物にキノホルムによると思われる腎、肝障害が高率に見出されたが、かかる内臓障害がキノホルムの解毒、排泄障害をもたらし、神経発症に拍車をかける悪循環も考えられる。以上からキノホルム以外の合併処置が、発症の速さと強さに与える影響について種々の検討がなされた。

慢性中毒雑犬のうち、便秘処置を合併した2頭(Ⅵ.3、6)はいづれも少量のキノホルムで短期間に典型的臨床一病理所見を示した。またキノホルム製剤に添加されている界面活性剤の影響につき、<sup>3)</sup>金光らは雑犬にCMC添加および無添加キノホルムを投与し、CMC添加群に高率に重篤な神経症状を認め、CMCが腸管からのキノホルムの吸収を促進すると推論した。他の添加界面活性剤であるSapamineについては実験がなされていないが、われわれのビーグル犬の成績ではCMC添加群とSapamine添加群に差がみられなかった。さらに雑犬ではマイコプラズマを併用することにより臨床症状が重篤化したとの俵らの報告がある。<sup>4)</sup>

ネコに対するViomycinによる腎障害の作製はさほどの影響を与えなかったが、ヒトの常用量に近い少量のキノホルム(35 mg/Kg/day)を50日投与し、発症しなかった雑犬(Ⅵ.20)に四塩化炭素を負荷したところ、2ヶ月後の剖検で脊髄後索に病変を認めた。しかし動物のキノホルムに対する感受性には前述の如く、かなりの個体差があるところから、これらの合併処置の発症への影響を結論するには、なお慎重を要するものと思われる。いづれにせよ、これらの合併処置のみでは神経症状は発現せず、キノホルムに一次的病因があることには疑問の余地はない。

## ま と め

キノホルムの神経毒性を調べるため雑犬21頭、純系ビーグル犬9頭、猫27頭、猿1頭にキノホ

ルム製剤を長期経口投与した。その結果、雑犬13頭、ビーグル犬8頭、猫6頭にSMONのような臨床症状がみられ、投薬を続けることにより重篤化した。この慢性中毒症状は両下肢の運動麻痺、脱力、筋萎縮、腱反射亢進と痙性、失調性歩行などの神経症状から成り、とくに脊髓性失調が中心症状であった。また長期罹患動物では視力障害もみられ、SMONと同一であった。

しかし動物のキノホルムに対する抵抗性には種族差、系統差が認められ、また個体差も大きいことが推定された。

## II 慢性中毒動物の病理学的研究

### 材料および方法

動物および実験方法はIと同一で、以下の動物番号は表1, 2, 3による。

**剖検** キノホルム服用動物およびコントロールの大部分はネブタール麻酔下に瀉血剖検したが、急性中毒死動物は死後なるべく早期に剖検した。慢性中毒動物のうち雑犬2頭、ビーグル犬5頭はいまだに神経症状を有したまま生存させている(47年5月現在)。剖検は全身臓器について行ない、10%中性化ホルマリン溶液に固定後、パラフィン包埋または凍結切片を作製し、H-E染色、髄鞘染色(Woelke 又はK-B)、軸索染色(Bodian)を全例に行ない、必要に応じてNissl, Holzer, Masson, 脂肪染色その他を行った。また末梢神経については生検材料のEpon包埋、ときほぐし線維法を合併した。

### 慢性中毒動物の病理所見

#### 内臓所見

内臓の主要な病変は腎、肝にみられた。腎では近位尿細管上皮細胞の変性が屢々みられ、核の変性、消失と胞体に豊富な脂肪顆粒の出現などが認められた(図2)。またこの部位の胞体に無染色でも、H-E染色でも同じ黄褐色の顆粒がみられた(図3)。その大きさは細胞核大のものから微細顆粒状のものまで種々で、小さいものはヘモジデリンに似るが鉄染色で染まらず、ビクリン酸飽和アルコールなどでも抽出されないところからホルマリン色素も鑑別される。われわれのAutoradiographyの経験からこれはキノホルム顆粒と思われるが、FeCl<sub>3</sub>溶液では染まらず、クロロホルムを長期間作用させてもとけないところから、抱合型キノホルム顆粒と思われた。その他、遠位尿細管や糸球体には著変をみなかった。

肝でも高率に肝細胞の変性、壊死と脂肪顆粒の出現(図4)、Kupffer 星細胞の腫大などがみられ、また腎尿細管上皮細胞にみられたものと同一の黄褐色顆粒が肝細胞、Kupffer 星細胞、細胞、細胆管などにみられた。また一部の動物の腎、肝では非特異的炎症巣が認められ、雑犬No.5ではジステンバーの病巣と思われた。

消化管では雑犬No.4、猫No.26(図5)で広汎な腸重積症を認め、また雑犬No.2では巨大結腸症もみられ(図6)後述の腹部自律神経系の変化と関係があると思われた。

その他、脾のLangerhans 島細胞の変性が疑われた以外には、内臓々器に著変を認めなかった。

#### 神経系所見

脊髓 慢性中毒動物のうち剖検をすでに行った雑犬11頭、ビーグル犬4頭、猫27頭、猿1頭の全例の頸髄Goll束に変性を認めた。このうち罹病期間の短い雑犬( №. 1, 2, 3 )ネコ、ビーグル犬( №. 1, 5 )および神経所見の軽微あるいは見落した猫、ビーグル犬( №. 2 ), 猿などにも延髄後索核周辺部から頸髄上部後索に限局した変性がみられた。この後索の変性はGoll束の正中部から左右対称的に始まり、頭側ほど強い連続的变化で、まず軸索の膨大、空胞化と髄鞘との間の空隙形成がみられた( 図7 ) ついで喰食細胞の遊走も認められたが、この時期の髄鞘には光顕的变化はいまだ有意でなかった。一方、罹病期間の長い雑犬( №. 6, 7, 8, 9, 10, 12 ), 猫( №. 27 ), ビーグル犬 №. 3 では頸髄後索の変性は、その拡がりに変性の強度を減しながら、連続的に腰髄上部にまで及び( 図8~11 ) 延髄下部および頸髄上部ではGoll束のみならずBurdach 束にも病変が波及する。延髄下部では図8の如く変性した後索線維はGoll核およびBurdach 核の背側およびGoll核の中隔にかけてW字型に分布する。頸髄上部では図9の如くGoll束を中心に、脊髓背縁ではBurdach 束にも拡がる楔形の分布が雑犬、ビーグル犬にみられたが、猫では図10の如く、この部のGoll束の分布は特異であった。これらの部位では軸索の変性は高度で、完全に消失する線維も多く、髄鞘の崩壊も著明で、中性脂肪滴を組織中又は喰食細胞中に多量に認める。喰食細胞とともに肥大した、屢々2核の星膠細胞もみられるが、線維性グリオーゼは病変の重篤さに比し弱い傾向があり、そのため組織は粗穢化する。

長期罹患動物では腰髄および胸髄下部の錐体路、とくに側索路にGoll束と同質の変性を認めたが( 図11 ), その程度は頸髄Goll束の病変に比し常に弱い。さらに頸髄側索、とくに脊髓小脳路に軽度の軸索の変性がみられた。脊髓灰白質では腰仙部前角神経細胞の中心性クロマトリーゼ、萎縮、空胞形成、まれに神経突起の類球体形成やグリア集簇などもみられた。しかし胸髄側角の自律神経細胞には著変はみられなかった。脊髓根および馬尾の変性は末梢神経に比し弱い、後根の変化は前根に比しやや強い。

脊髓後根神経節では、ほぼ全例で神経節細胞のクロマトリーゼ、空胞化、核の消失から胞体の崩壊にいたる変性が認められ、外套細胞も増加し、基底膜下に侵入し、軸索の肥大、渦巻形成などもみられた( 図12, 13 )。これらの変化は一般に腰髄神経節に強いが、下部頸髄神経節でも認められた。

末梢神経は坐骨一、腓腹一、上腕神経を全例検索した。罹病期間の短い動物では、パラフィン切片の光顕的变化はつかみ難いが、Epon包埋切片又はときほぐし線維法( 図14 ) では、髄鞘に空胞、脱落、髄球の形成などが早期に認められた。しかし長期罹患動物では明らかな軸索および髄鞘の崩壊、Schwann 細胞および結合織成分の増加、節間距離の短い再生像と思われる所見などが得られた。これらの変性は一般に下肢の大径有髄線維の末端部に頻度が高いが、脊髓白質とことなり、個々の神経線維については節性に犯される、非連続的と思われる病変も混在していた。小径有髄線維および無

髄線維の変化は一般に弱かった。長期罹患動物では上腕神経にも同様の変化がみられた(図15)。

自律神経系は腹腔神経節、内臓々器内外の自律神経節および少数の動物では横隔神経につき検索した。腹腔神経節では神経細胞のクロマトリーゼが、全体に認められ(図16)、腸管筋層内、腓内神経節などで神経細胞の崩壊とSchwann細胞の増殖がみられたが(図17)、これらは脊髄後根節の変性に比し一般に弱い。横隔神経にも、また前記の如く胸髄側角の自律神経細胞にも著変を認めなかった。

視神経系 長期罹患動物の頸髄Goll束と同一の重篤な変性が雑犬4頭(№.7, 8, 9, 12)(図18)、猫№.27(図19)、ビーグル犬№.3(図20)の視神経系にみられた。すなわち軸索の変性、脱落、髄鞘の崩壊と豊富な中性脂肪顆粒、喰食細胞および肥大星膠細胞の出現などがみられた(図21, 22)。また2, 3の動物では細長い核を有した結合織性細胞の増生が強かった。これらの変性は視束の遠位部に強く、視交叉を通り視神経にも連続的に及ぶが、視交叉の背側部および視神経の周辺部はやや変性が軽かった。その他の動物でも雑犬2頭(№.10, 19)ビーグル犬2頭(№.1, 5)猫22頭に軸索の変性が主として視束遠位部に認められた。しかし3頭の猫(№.7, 21, 22)では変性はむしろ球後視神経に強い傾向がみられた。

外側膝状体では神経細胞のクロマトリーゼや類球体形成などが少数の動物にみられた。(図23)一方、眼球を検索した大多数の動物で乳頭一黄斑部を中心に検鏡したが、内神経節細胞層の多極神経細胞の変性、脱落と一部でグリヤの増生を認め、コントロールとの差がみられた。

脳幹では延髄下部の後索線維の変性は前述したが、Goll核では神経細胞の変性、基質の粗糲化、稀に類球体などがみられ(図24)線維性グリオーゼの観察された例もあった。(雑犬№.6)Burdach核の変性は一般にGoll核より弱い、延髄上部では副楔状核にも変性が及ぶ。また下オリーブ核、副オリーブ核、外側網様核、三叉神経脊髄路核などにも神経細胞の変性と軽度のグリヤ反応をみるものがあった。また脊髄小脳路、下小脳脚、背外側弓状線維などにも種々の程度の変性を認めた。

橋では三叉神経運動核の神経細胞の変性(図25)上オリーブ核のびまん性グリオーゼ(図26)などが認められた。中脳では黒質、赤核などに著変はないが、四丘体を中心に星膠細胞の増生のみられたものもあった。脳幹の神経根ではV, X, XII脳神経根に軽度の軸索変性があり、三叉神経の半月神経節では脊髄後根神経節と同質の、やや軽い変性がみられた。

小脳では一般に著変をみないが、プルキンエ細胞の軽度の変性や、少数のtorpedoを認めた例があった。

間脳では第3脳室周辺神経核、とくに視束上核の神経細胞の変性脱落と軽度のグリオーゼが認められた。大脳では運動領の神経細胞を含めて変化に乏しく、僅かに扁桃核、海馬回の神経細胞の変性と星膠細胞の増生をみる程度であった。

神経系の炎症性病変 雑犬(№.5)では脳室壁、大脳、小脳、脊髄などの髄液に接する外縁に炎症



性小病巣が散在し、エオジン好性核内封入体があり、腎、肝にみられた炎症性変化とともにジステンパーの合併が疑われた。また慢性中毒末期に後肢の創傷をもった雑犬1頭(№8)で、新鮮な静脈炎が神経系を含めて全身臓器に散在性に認められた。また深部電極を前もって挿入した猫では挿入傷にそった小出血、軟化とともに少数の多核白血球の混在があり、また同処置を受けた猫(№26)では広汎な化膿性髄膜炎の像を認めた。しかしこれらの動物の炎症像は上述の変性巣とは明らかに区別される合併所見と考えられ、その他の動物では神経系に炎症反応はまったく認められなかった。

## 考 察

### キノホルム慢性中毒動物とSMONの病理の比較的検討。

キノホルム慢性中毒動物の病変の質と局在はかなり均一性を持ち、とくにわれわれの犬、猫ではあまり例外をみなかった。すなわち病変は変性であり、局在は脊髄後索、視束、後根神経節、末梢神経に主座を持つ、従ってこの全体像はヒトのSMONの病理とほぼ同一といえるが、その個々の異同につき検討する。われわれの慢性中毒動物に共通な所見は、延髄後索核周辺から頸髄上部にかけて強いGolli束を中心とした左右対象性、連続性の変性で、下部脊髄に移るほど、その強さと範囲が狭くなり、重症例ではBurdach束にも波及する。この変性は軸索にはじまり、ついで髄鞘も犯され、発症から3~5カ月で脂肪顆粒も出現する。これらはSMONの剖検所見とも一致し、キノホルム中毒動物の基本症状と思われる。この変性の広がりや強さは臨床症状の重篤度発症から屠殺または死亡までの罹病期間に比例し、キノホルムの総投与量にもほぼ比例する。しかし投与後5日目に死亡した猫の脊髄にも、すでに軸索の微細な変性は始っており、予想以上に早く、この部の変性はおこるものと思われる。キノホルム非投与コントロール動物にはかかる変化は一切認められなかった。

脊髄錐体路の変化は、脊髄後索の変性と同様にその遠位部、即ち下部腰髄に強い連続性の変性で、主として側索にみられ、一部で前索も犯される。この病変の性質も頸髄Golli束の変性と同一であるが、その程度は常に軽い。

ヒトのSMONでも稀に腰髄錐体路の変性の方が頸髄Golli束の変性より強い例があるが、全体的には後者の病変の方がより重篤で、キノホルム投与動物の病変と矛盾しない。

脊髄灰白質、とくに腰髄前角の神経細胞の種々の程度の変性はSMONでもみられるが、一部の猿<sup>5)</sup>にみられた神経細胞の脱落にまでいたる重篤な変性はSMONにみられず、キノホルム慢性中毒動物に強い傾向と思われる。

脊髄後根神経節および一部の動物で検索された三叉神経節の変性は、加令その他の影響を差引いてコントロール動物の所見に比し、明らかに有意の差があった。この病変の性質もSMONとほぼ同一と思われる。

末梢神経の初期病変はパラフィン包埋切片の光顕像では、人工産物と区別しにくいことがある。とくに髄鞘の蜂巢状変化や、軸索の圧挫による腫大などは厳密に除外しなければならなかった。この時期にはEpon包埋又はときほぐし線維法が有用であった。しかし長期罹患動物ではパラフィン標本で

も著変が認められ、軸索の崩壊が髄鞘の変化よりも重篤で、大径有髄線維の末端部に強い傾向は、いわゆる "dying back" neuropathy などの neuronal な変性像に近い。しかし、ときほぐし法による個々の神経線維については、髄鞘が節性に犯された部と健全に保たれた節が隣接するものもみれ、節性脱髄の混在も否定出来ない。われわれの慢性中毒犬、猫の自律神経系の変化は、SMON 重症例の病理よりもやや弱い印象をうけるが、腸重積症や巨大結腸症の存在は、腸管の自律神経障害を示唆するものといえよう。

視神経系の変性は慢性中毒犬、猫で確認されたが、他の動物では報告されていない。また Bruckner<sup>6)</sup>らは猫に 100~300 mg/Kg/day の Vioform 又は Entero-Vioform を 90 日間経口投与し、網膜および視神経に症状を認めないと報告したが、視束やその他の神経系についての記載はない。しかし、われわれはキノホルム 90 mg/Kg/day, 13 日間投与の猫 (♂5) ですでに視束遠位部の軸索の腫大を認めている。この視束の病変も脊髄長索路と同様に遠位部に強い、左右対称性、連続性の変化が主体であるが、少数の猫ではむしろ視神経の変性の方が強い例外例もみられた。病変の質も脊髄 Goll 束とほぼ同一の変性であった。一部の発症犬、猫の網膜の多極神経細胞の変性が確認され、視束病変との関連が指摘される。これらの病変は SMON 重症例と差がない。

その他の病変としては、SMON にかなり特有といわれるオリブ核の神経突起の肥大、増生による糸状体形成<sup>7)</sup>はいまだキノホルム中毒動物では認められず、またこの部位でのグリア細胞の増生の程度も弱い。一方、延髄後索核、網様核などの変性は、犬、猫では屢々みとめられ、SMON に比しやや強いと思われる。小脳、大脳にはキノホルムに特異的な病変は殆んど認められなかった。僅かに扁桃核、海馬回の神経細胞に変性像と星膠細胞の反応がみられたが、その他には SMON 同様に著変をみなかった。

以上の如く、キノホルム慢性中毒動物にみられた共通の病理像は特異的な myelo-optic neuropathy であり、ヒトの SMON の所見と本質的な差がみられない。したがってキノホルムが動物に、ヒトの SMON と同一の病態を起すことに関しては議論の余地はないものと思われる。

## ま と め

臨床的に SMON のような神経症状の観察された慢性キノホルム中毒雑犬、ビーグル犬、猫の剖検で典型的な myelo-optic neuropathy を認めた。

これはヒトの SMON の病変と本質的な差はなかった。さらに臨床発症の有無に拘らず、慢性キノホルム投与動物の剖検例のすべてに、頸髄 Goll 束の軸索に始まる変性があり、脊髄後根神経節、末梢神経、視束にも高率に変性を認めた。また短期投与猫にみる如く、これらの変化は、予想外に早く始まるものと思われ、臨床症状の重篤度、罹病期間、キノホルムの総投与量にほぼ比例して重篤化する。

これらの病変の特異性とヒトの SMON の病理との異同性について考察した。

### Ⅲ 慢性中毒イヌ末梢神経の電顕的研究

ヒト S M O N の腓腹神経の電顕所見については、現在まで、大田<sup>8)</sup>、宮川<sup>9)</sup>、松山<sup>10)</sup>等により報告されている。大田は onion bulb 形成を、宮川等は髄鞘、Schwann 細胞の変化を、松山は neurofilament の増加を中心に述べている。我々はキノホルム慢性中毒犬の腓腹神経において、電顕所見の上でもヒト S M O N のそれに類似性があるか否かを検索し、ひいてはキノホルムの末梢神経に対する形態学的 pathogenesis を考察するため、本研究を行なった。

#### 検索方法

表 6 投薬開始より発症と腓腹神経生検時期

| No.         |   | onset | biopsy | No.              |                  | onset | biopsy                  |
|-------------|---|-------|--------|------------------|------------------|-------|-------------------------|
| 投<br>薬<br>群 | 1 | 21d.  | 23d.   |                  | 6                | 144d. | 286d.<br>(休薬後<br>142d.) |
|             | 2 | 20d.  | 58d.   |                  |                  |       |                         |
|             | 3 | (—)   | 82d.   |                  |                  |       |                         |
|             | 4 | 36d.  | 195d.  |                  |                  |       |                         |
|             | 5 | 81d.  | 180d.  |                  |                  |       |                         |
|             |   |       |        | 非<br>投<br>薬<br>群 | 1<br>2<br>3<br>4 | }     | (—)                     |
|             |   |       |        |                  |                  |       |                         |
|             |   |       |        |                  |                  |       |                         |
|             |   |       |        |                  |                  |       |                         |

検索対象は 6 頭の投薬群、4 頭の対照群よりなる計 10 頭の雑種の成犬である。いずれも老令化した犬は含まれていない。投薬群の 6 頭の内訳は、12 頭の慢性症状発現犬より 5 頭、投薬非発症の犬 3 頭より 1 頭をえらんだ。5 頭のうちの 1 頭には、症状発現後、休薬期間をおき、時期を異にして左右各側の腓腹神経を生検したので、検索した神経組織片は投薬群より 7 個、対照群を入れると計 11 個となる。投薬開始より症状発現までの時間は表 6 に示す通りである。発症から生検までの期間は 3 日から 239 日間となる。

試料採取部位は、腓骨外顆後上部を局所麻酔下に切開し、腓腹神経を露出し、3%グルタルアルデヒド磷酸緩衝固定液 (PH 7.4) を滴下しながら、注意深く切除した。採取した組織片は、ただちに同液中で 1 mm<sup>3</sup> 大に細切され、4℃に保ちながら同液中に 2 時間固定され、2%osmic 酸磷酸緩衝固定液で 2 時間後固定された。上昇エタノール系列で脱水後、Luft の方法に従ってエボン包埋を行ない、ガラスナイフ、MT-1 型 Porter Blum Ultramicrotome で超薄切片を作成した。切片は支持膜なしのシートメッシュ上にとり、酢酸ウラニル、クエン酸鉛による二重染色をほどこした。カーボン蒸着を行なった後 H U - 1 1 型電子顕微鏡を使って写真撮影を行なった。直接撮影



倍率は3000～15000倍である。

生検した組織片の一部はパラフィン包埋の後各種染色を行ない、エポン包埋ブロックより、1μ切片を作り、パラフェニレンジアミン染色を行なった。又、すべての犬について、ときほぐし線維法による検索も併用した。

### 電顕所見

光顕所見は第Ⅱ章で述べた如く、軸索変性が主体をなし、ときほぐし法ではmyelin球がみられた。詳細は省略する。

#### 1) 軸索

A：有髄線維 軸索は23日の短期投薬犬から長期投薬犬に至るまで、neurofilamentの増加が、対照群に比べて明かに認められ(図27a, 27b)，正常又は変性mitochondriaの集積像も高頻度にみられた(図28)。時々軸索変化に伴なって、髄鞘の層板離開, myelin ovoidの出現等の軽度の髄鞘変化がみられた。稀に軸索が正常で軽度の髄鞘変化を示すものがあるが、恒常的にみられたのは軸索内neurofilamentの増加である。mitochondriaの集積像は少数にみられるものでなく、短期投薬犬から休薬犬においてもみられた。これらのmitochondriaは正常な形態を示すものと共に、腫大したり、クリステが消失しているものもみられた(図28)。長期投薬犬では、これらの変化に加えて、軸索膜の変化がみられた(図30)。軸索膜は各部分より内方へ向って鬚状に陥入したり、vesicleを作ったり、時には髄鞘成分を内方へとりこんでいる事がある。休薬犬においては、neurofilamentの増加、mitochondriaの変化に加えて、時々neurotubulusも増加していたり、グリコーゲン顆粒が散在してみられたり、大小の空胞形成を示す事が多い(図29)。

B：無髄線維 無髄線維の軸索は有髄線維のそれに比べて、neurofilamentの増加もあまり著明でなく、変性mitochondriaや軽度の空胞形成が時折みられたが、比較的变化が軽い。

#### 2) 髄鞘

髄鞘の変化は軸索の変化程、恒常的にみられるものではないが、多様な変化を示した。それらは、Schwann細胞内のmyelin ovoid形成、髄鞘層板各層の変化、髄鞘の蜂巢化、薄層化ないし消失等の変化に集約できる。myelin ovoidはSchwann細胞胞体内に1～数個が完全に遊離したり(図31)，本来の髄鞘よりの突出像としてあらわれる。遊離したmyelin ovoidは変性をうけ、本来のmyelinよりも電子密度が高いのが通例である。この変性myelinの附近にグリコーゲン様顆粒が多数出現してみられる事が多い。髄鞘層板の変化は、最外層より外方に向うループ形成や、微細顆粒を併なう中間層の層板離開像がみられた。髄鞘の蜂巢化はRanvier絞輪部附近にみられる事が多く、薄層化又は消失像は、脱髄の初期像を示すものであろうが、時折みられた。

3) Schwann細胞 Schwann細胞の変化は胞体外形の変化と胞体内小器管の変化との二つに分けられる。前者にはonion bulbやBüngner bandの形成がある。onion bulbは横

断切片において1個の有髄線維を殆んど一層のSchwann細胞突起が円弧状にとりかこんでおり(図32),重層の形態を示さず,みられた頻度も少なかった。Büngner bandは数個以上のSchwann細胞突起が,一定の接触面を保って,皿状に多数集合し,それらが全体として1つの基底膜にかこまれるものである(図33)。Schwann細胞胞体内の変化としては,前述のグリコーゲン様顆粒の多数の存在の他に,細線維の増加,濃縮されたmitochondriaの集積が,休業犬でみられた。

間質成分の変化として,毛細管内皮細胞のpinocytosisの亢進や, fibroblastの粗面小胞体の拡大が著明な所見であった。

### 考 察

neurofilamentの増加は投薬期間の長短をとわず,一貫してみられた恒常的な変化であってキノホルムの末梢神経に対する基本的な変化であると思われる。松山は4例のSMON患者(うち2例はキノホルム剤の服用が明らかである)の腓腹神経生検により得られた電顕所見において,髄鞘やmitochondriaの変化もみられるが,基本的病変はneurofilamentの増量であると結論している<sup>10)</sup>。我々の検索結果と考えあわせると,キノホルムの慢性反復投薬は,末梢神経において,ヒトでも犬でも,neurofilamentの増加を惹起する事が証明された。薬物投与の動物実験において,neurofilamentの増加を一次性変化として結論しているものに,Prineasのacrylamideの猫に対する中毒実験がある。彼は末梢神経のみならず,神経筋接合部のterminal axoplasmic expansionにも,延髄ゴル核のboutons terminauxにも,neurofilamentの増加を認め,acrylamideによるdying back neuropathyのpathogenesisをneurofilamentの増量によるaxonal flowの低下と推論している。我々の検索では,腓腹神経のみの検索であるので,彼の推論にまで達し得ないが,末梢神経のみについて云えば,ほぼ同質の病変と思われる。

軸索内mitochondriaの集積像については,Webster<sup>12)</sup>がWaller変性の初期にparanodalに一過性にmitochondriaが多数集積する事を報告しているが,キノホルム投薬実験にみられたmitochondriaは必ずしもparanodalに集積するものでなく,ほぼ全投薬期間を通じて高頻度にみられた。<sup>13)</sup>八木等はラット脳において,キノホルムが生化学的にmitochondriaの酸化的磷酸化における脱共役剤として作用すると報告しており,このmitochondriaの変化と何らかの相関関係が想定される可能性がある。

髄鞘の変化として頻繁にみられたmyelin ovoidには多数のグリコーゲン様顆粒がみられた。この顆粒の由来については,myelin digestionのために出現したのか,変性myelinの崩壊産物なのか不明である。<sup>14)</sup>NathanielはWaller変性実験においてmyelin digestionを行なうのは増加したりボゾームであるとしているが,我々の検索では増加したりボゾームはみられなかった。その他の変化を含めて髄鞘病変は節性脱髄にみられるような高度の変化はなく軽度であった。髄鞘と同一の系に属すSchwann細胞においても,その変化は軸索のそれに比べれば軽度であ

15)  
って, onion bulb 形成にしても, その頻度は少なく, その形態も原始的なものであった。Dyck は繰り返された demyelination と remyelination が, onion bulb 形成の必要条件であると述べているが, 我々の検索結果は彼の見解を裏づけるものといえる。

以上よりして, neuropathy の電顕像を従来の概念に従って, 節性脱髄, Waller 変性, dying back 又は neuronal type の三者に大別するとするなら, 犬のキノホルム neuropathy のそれは, neuronal type の範疇に属するものと云えよう。

#### ま と め

キノホルム投薬を行なった 6 頭の雑種成犬の腓腹神経を生検し, 電顕的検索を行ない次の結果を得た。

1) 軸索の変化が基本的病変であり, それは neurofilament の増加, 正常又は変性 mitochondria の集積, 軸索膜の変化としてあらわされる。

2) Schwann 細胞膜系の変化も存在するが, 軽度であり, 二次的变化と思われる。

3) 犬の実験的キノホルム neuropathy の電顕像は neuronal type の範疇に属する。

4) ヒト SMON の腓腹神経の電顕像との類似性が犬においても認められた。

#### Ⅳ 放射性キノホルムのマイクロオートラジオグラフィー

##### 実験方法

放射性キノホルムは  $^{131}\text{I}$ —,  $^{125}\text{I}$ —, および  $^{14}\text{C}$ —キノホルムを用い, 実験動物は犬, 猫, ラット, マウスを用いた。雑犬では 1 頭には体重 Kg 当り 0.02 mCi の  $^{131}\text{I}$ —キノホルムを静注し, 5 分後に屠殺した。3 頭は 0.1 mCi の  $^{131}\text{I}$ —キノホルムを腹腔内投与し 1 時間半で屠殺した。他の 2 頭では 1.3 mCi の  $^{131}\text{I}$ —キノホルムを経口投与し 3 時間後に検索した。ビーグル犬は 2 頭を用い体重 Kg 当り 0.1 mCi の  $^{131}\text{I}$ —キノホルムを腹腔内投与し 1 時間半後に屠殺した。猫は 1 匹であり 0.06 mCi の  $^{131}\text{I}$ —キノホルムを静注し 5 分後に屠殺した。ラットは合計で 14 匹 (うち 3 匹には四塩化炭素投与) を用い, 放射性キノホルムは  $^{131}\text{I}$ —,  $^{125}\text{I}$ —キノホルムであり, その量は 1.25  $\mu\text{Ci}$  から 12  $\mu\text{Ci}$  であり, 投与方法は静注, 腹腔内投与, 経口投与によった。検索は 5 分から 3 日の間で種々の時間でおこなった。マウスは 5 匹を用い,  $^{14}\text{C}$ —キノホルムを 0.3  $\mu\text{Ci}$  から 2  $\mu\text{Ci}$  を静注し, 5 分ないし 2 時間で屠殺した。屠殺後, いずれも 10% 中性ホルマリン溶液で固定し, パラフィン切片および凍結切片を作り, 乳剤として  $\text{NR-M}_2$  (SAKURA) を用いてディップし, 1~4 週間露光後現象し, ケルンエヒト赤で後染色し鏡検した。

##### 成 績

まず犬および猫では  $^{131}\text{I}$ —キノホルムの静注, 腹腔内投与による差異はなく, 大脳ではすべてに特異的とり込みはみられず, 軟脳膜, 血管内皮細胞などの他にはわずかに散在性に分布を認めるのみで皮質, 髄質には差がなくベツ細胞を含め神経細胞にはほとんどみられなかった。ただし腹腔内投与雑

犬の1頭には脈絡叢に著明なとり込みがみられた(図34)。小脳でも同様に著明なとり込みはみられないが、顆粒層外層に軽度の分布がみられた。間脳では全例の第Ⅲ脳室底面のグリアに著明なとり込みがみられ、雑犬では視束上核の神経細胞(図35)およびビーグル犬1頭と猫では視床外側核にもとり込みがみられた。脳幹では中脳水道周囲、第Ⅳ脳室底部グリアにほぼ全例にとり込みがみられ、とくに雑犬ではオリブ核(図36)、迷走神経核、三叉神経核のグリア、ビーグル犬の1頭では迷走神経核のグリアに集まる傾向があった。さらに雑犬では動眼神経核、外転神経核、赤核、青斑核、延髄背側運動核、延髄網様体などの神経細胞、猫でも三叉神経核の神経細胞胞体に強いとり込みがみられた(図37)。しかしビーグル犬ではかかる神経細胞へのとり込みはみられなかった。脊髄では灰白質とくに前角神経細胞胞体に著明なとり込みが雑犬にみられた(図38)。神経細胞以外では脊髄軟膜、グリア、血管壁、脊髄中心管上皮細胞などに軽いとり込みをみるのみであった。この傾向は猫でもみられたが、ビーグル犬ではほとんど目立たなかった。白質には後索を含めてとくに有意なとり込みはなかった。脊髄根では雑犬で後根に分布を認めたが前根では軽度であった。脊髄後根神経節および一部で検索した半月神経節では雑犬は全例に神経細胞および外套細胞に強いとり込みがあり(図39)、ビーグル犬および猫でもこの傾向は確かめられた。末梢神経では雑犬およびビーグル犬にとり込みがみられ(図40)、Schwann細胞胞体に強く、その他は軸索、髄鞘の区別がしにくい例が多かった。筋肉への分布も雑犬でみられた。眼球ではビーグル犬の網膜に分布があった。経口投与をおこなった雑犬2頭では静注、腹腔内投与と比較して量的な差はあるものの同じ傾向の分布を示し、脊髄、後根神経節(図41)、末梢神経(図42)などの神経系に黒点が見い出された。一般臓器では腎は近位尿細管上皮細胞に著明な分布が雑犬および猫でみられ(図43)、糸球体および髄質への分布はわずかであった。肝ではビーグル犬で小葉中心性に肝細胞に強いとり込みがあったが(図44)、雑犬および猫ではびまん性に肝細胞、Kupffer星細胞、細胆管などに分布していた(図45)。脾ではLangerhans島の腺細胞に集まる傾向が全例にみられ、とくにビーグル犬で著明であった(図46)。腸管へのとり込みはあまり特異的なものはなかったが、脾およびリンパ節には全例に分布をみた。その他肺にもみられた。

正常ラットでは神経系は脳室周囲のグリアに少量の分布をみるのみで、それ以外はほとんどなく、神経細胞へのとり込みもなかった。一般臓器では肝細胞、腎の近位尿細管上皮細胞に軽度にとり込みをみた。四塩化炭素負荷群では神経系は正常群でみられた以外に、視床グリア、延髄背側運動核、小脳のPurkinje細胞に分布を認めた。脊髄では灰白質の神経細胞胞体にとり込みがあり、その他に後根、軟膜、中心管にもみられた。一般臓器では腎の近位尿細管上皮細胞に特異的とり込みがみられ、肝にもびまん性に認めた。マウスでは神経系では側脳室から第Ⅳ脳室にかけての脳室上皮細胞、小脳顆粒層に分布がみられ、脊髄では軟膜、中心管、後根に分布とみた。坐骨神経にはびまん性に認められた。が、いずれの部位でも神経細胞へのとり込みはなかった。一般臓器では肝、腎にびまん性に一部では脾のLangerhans島にとり込みをみた。

## 考察および結論

本実験では<sup>131</sup>I-キノホルムを用いているものもあり、ヨードの遊離が問題となる。われわれはあらかじめ甲状腺ブロックをしており、甲状腺へのとり込みはラジオオートグラフィーでは認められず、またハツカネズミでは<sup>131</sup>I-キノホルムと<sup>14</sup>C-キノホルムの臓器内分布に大差がないことを確かめている。ヨードの遊離に関して<sup>125</sup>I-キノホルムをヒトに投与後24時間で0.4%の<sup>125</sup>Iが遊離するとの報告があるが、今回の実験は短時間で検索しており、ヨードの分離は問題にならないと考える。したがって本実験のアイソトープの分布はキノホルムの分布とほぼ一致すると考える。上に述べた生体内分布の差異から、動物の種族差、strain差が、そして四塩化炭素負荷で示された如く、肝、腎障害などの個体差の存在があるのではと推測される。標識キノホルムの種類、その投与量では明らかな差は認め難く、投与方法では雑犬で経口投与法は静注、腹腔内投与と比較して、その量的な差はあるものの同じ傾向の分布を示した。

われわれの雑犬、ビーグル犬、猫のMicro-autoradiographyおよび放射化学的分析から、前項の慢性キノホルム中毒病変のPathogenesisを考えてみたい。キノホルムは容易に神経系にとり込まれ、とくに末梢神経、網膜などに高い放射能が証明され、脊髄後根神経節、脊髄および脳幹などでは神経細胞への分布がみられた。一方、後索を含めた脊髄白質、視束、大脳皮質などへのキノホルムの分布は少なかった。このキノホルムの分布様式から、以下の仮説が考えられる。すなわち、脊髄Goll束、視束の変性は脊髄後根神経節、網膜神経節の神経細胞の代謝障害によるもので、末梢神経の変性については知覚線維は脊髄後根神経節の、運動線維は脊髄前角細胞の障害に続くものと、さらにキノホルムが末梢神経に直接侵入し、障害する機序も仮定出来る。しかし腰髄錐体路の変性についてはオートラジオグラフィーからはいまだ説明不可能である。

## 文 献

### I

- 1) 大月三郎, 奥村二吉: キノホルム経口投与によるイヌの慢性中毒実験, スモン調査研究協議会研究報告書No.2 臨床班研究報告, 29, (昭和46年3月)
- 2) 三好和夫: Chinoformによる実験的糖尿病, スモン調査研究協議会研究報告書No.2, 200, (昭和46年3月)
- 3) 金光正次, 笠井美智子: キノホルムによるスモンの実験的研究—CMC配合の効果, スモン調査協議会キノホルム部会第1回研究会(昭和46年7月)
- 4) 俵寿太郎ら: スモンの犬による動物実験例, スモン調査研究協議会(昭和46年3月)

### II

- 5) 高橋理明ら: カニクイ猿に於けるキノホルム投与実験(続報), スモン調査研究協議会キノホルム部会第3回研究会(昭和47年2月)
- 6) Bruecknerら: Tierexperimentelle Untersuchungen bei langdauernder Verabreichung von hohen Dosen von Iod-chlor-8-hydroxy-Chinolin mit besonderer Beruecksichtigung moeglicher



toxischer Augenveraenderungen. *Arzneim. Forsch.*, 20:575-577, 1970.

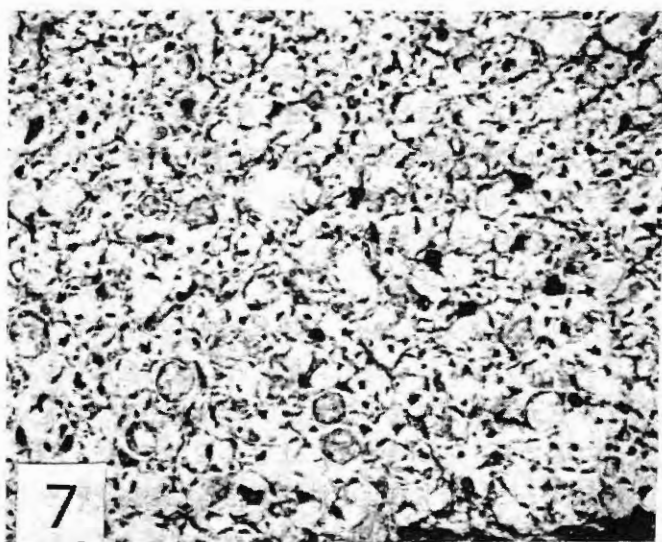
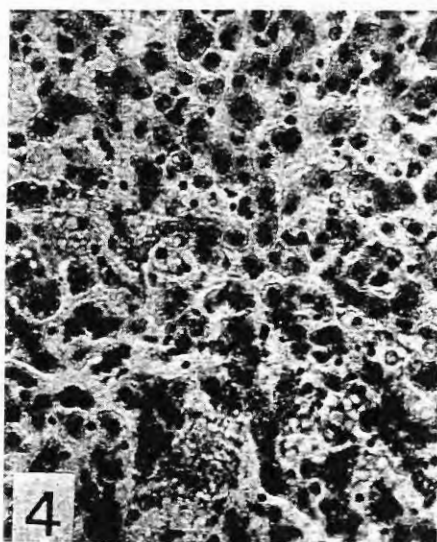
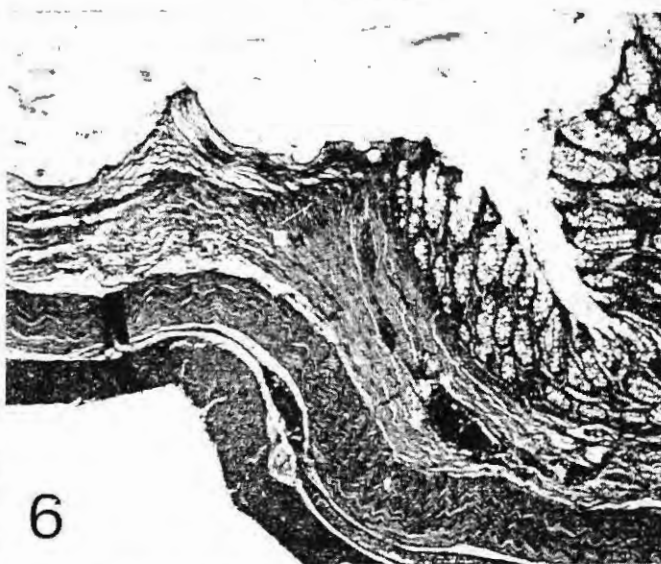
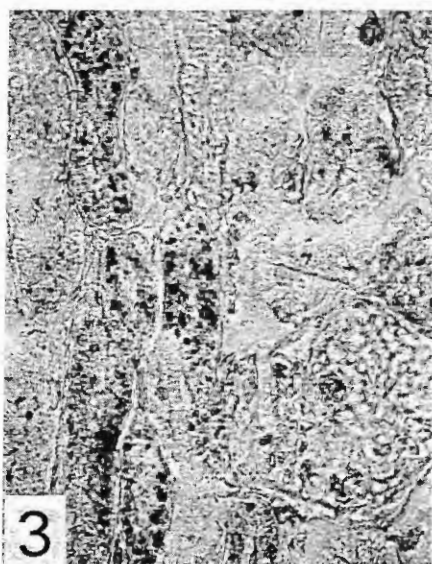
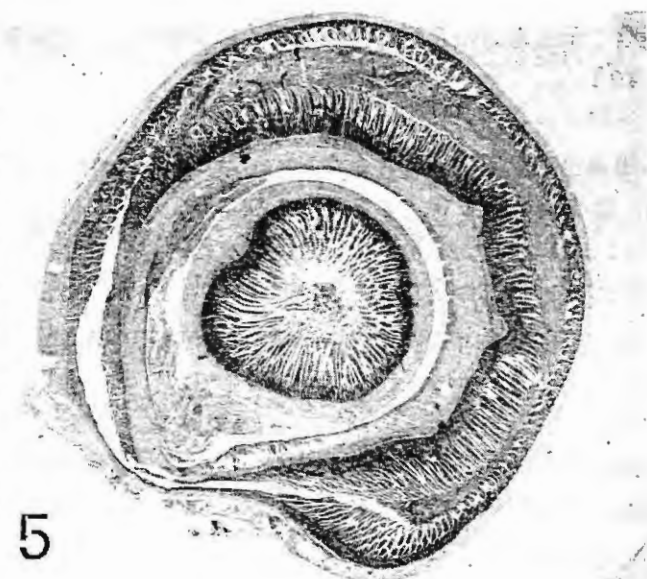
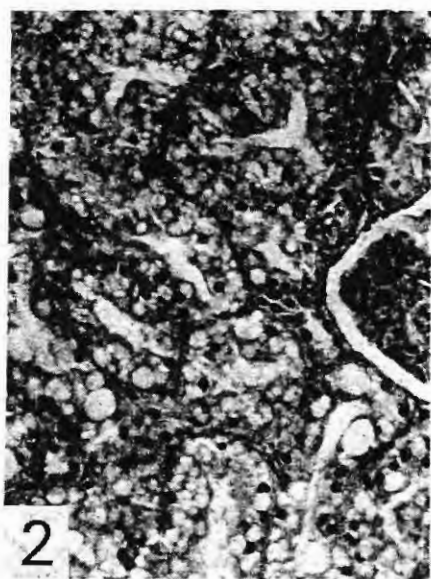
- 7) 堤啓：岡山地方の「腹部症状を伴う脳脊髄症」の剖検例について。臨床神経, 11, 229-235, 1971。

### Ⅲ

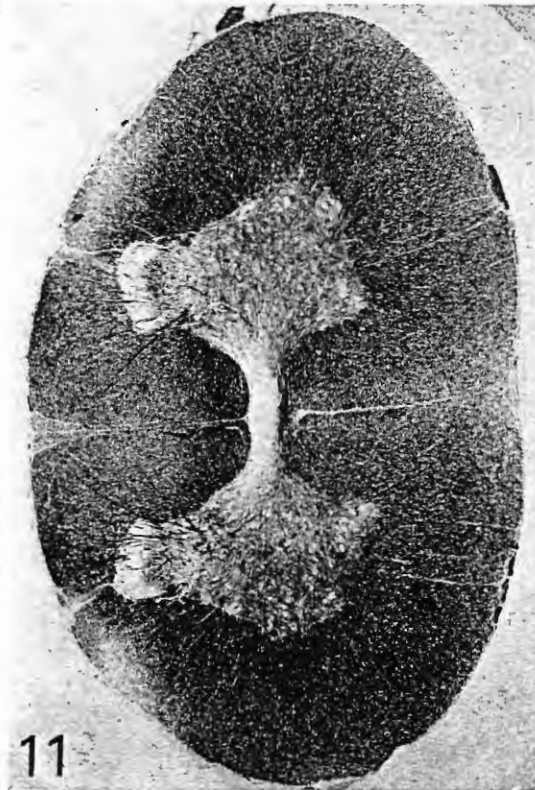
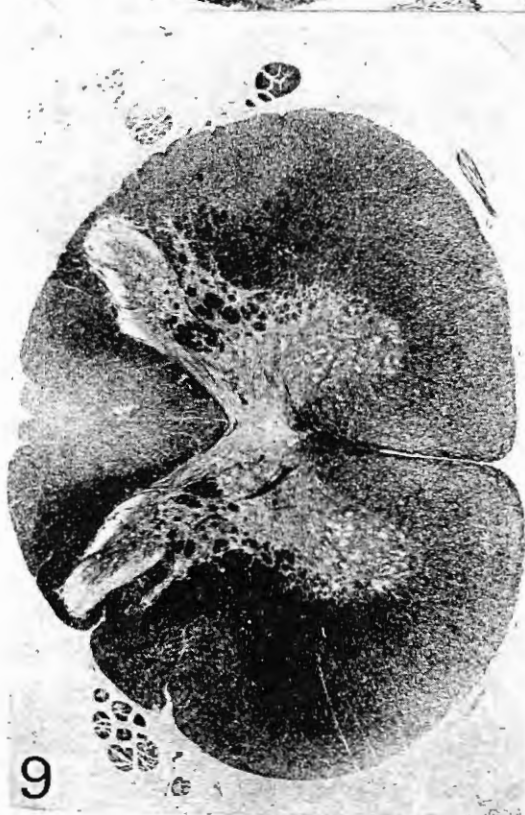
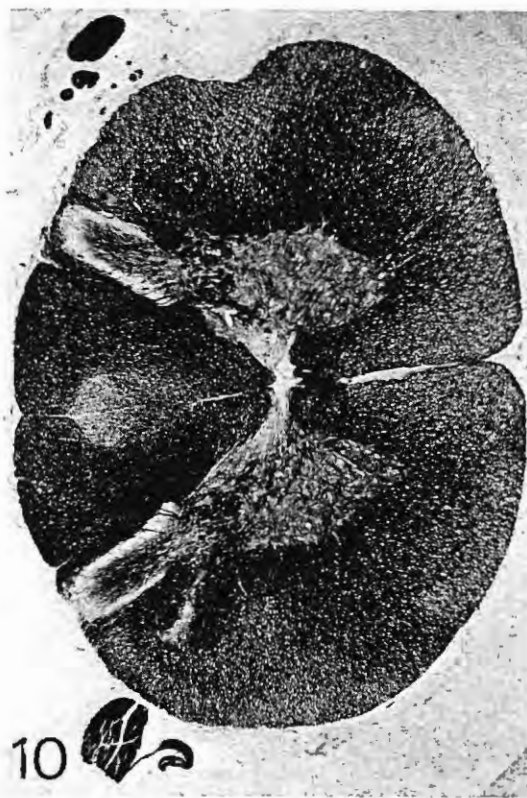
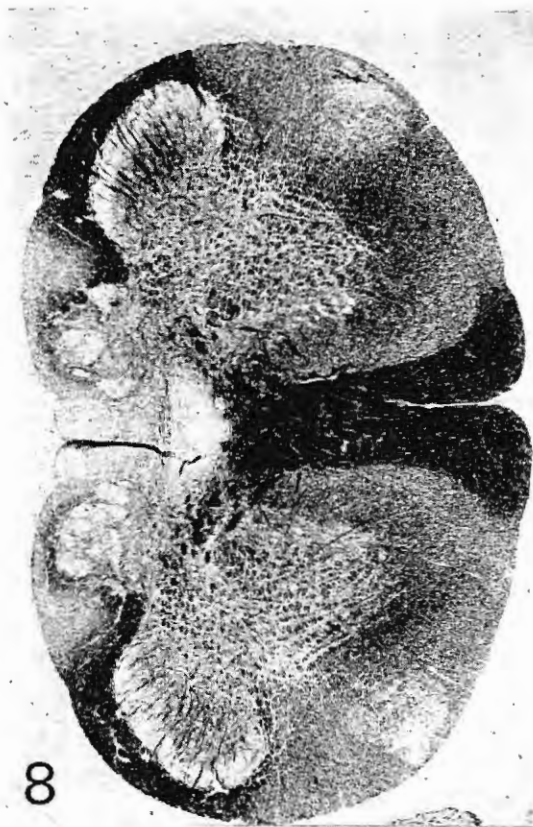
- 8) 大田典也：腹部症状に伴う Myeloneuropathy (SMON) における腓腹神経の微細構造, 臨床神経, 10, 487, 1970。
- 9) TAIHEI MIYAKAWA et al: *Acta neuropath.*, 16:17, 1970.  
TAIHEI MIYAKAWA et al: Electron Microscopical Study of a Nerve Biopsy from a case in the Chronic State of "Subacute Myelo-Optico-Neuropathy". *Acta neuropath.*, 19:323 1971。
- 10) 松山春郎, 平井修司: SMON の腓腹神経の電子顕微鏡的研究, スモン調査研究協議会研究報告書 №4 病理班研究報告, 103, (昭和46年3月)
- 11) Prineas J.: The Pathogenesis of Dying-back Polyneuropathies. Part 1.1. An Ultrastructural Study of Experimental Acrylamide Intoxication in the Cat. *J. Neuropath. & Exper. Neurol.*, 28:598 1969。
- 12) Webster, H. DE F.: Transient, Focal Accumulation of Axonal Mitochondria During the Early Stages of Wallerian Degeneration. *J. Cell Biol.*, 12:361, 1962。
- 13) 八木国夫, 勝又義直, 萩原昌子, 山中直樹: キノホルムの脳ミトコンドリアの呼吸に及ぼす影響ならびにキノホルム類似物質の肝ミトコンドリアの呼吸調節に及ぼす影響, スモン調査研究協議会キノホルム部会第2回研究会 (昭和46年12月)
- 14) Nathaniel, E. J. H., & Pease, D. C.: Degenerative Changes in Rat Dorsal Roots During Wallerian Degeneration. *J. Ultrastruct. Res.*, 9:511, 1963。
- 15) Dyck, P. J.: Experimental Hypertrophic Neuropathy. *Arch. Neurol.*, 21:73, 1969。

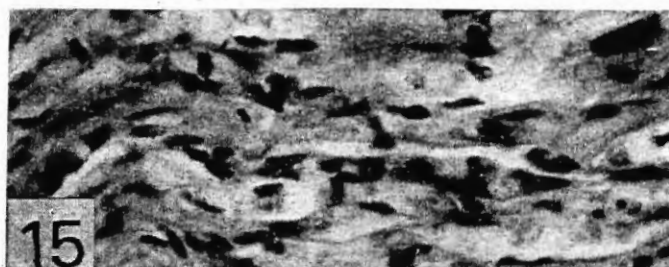
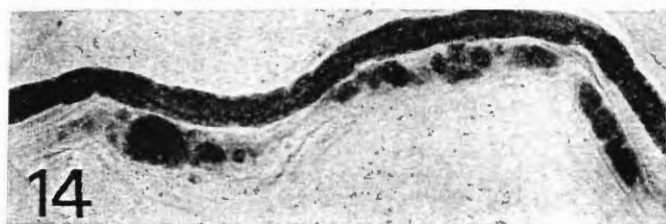
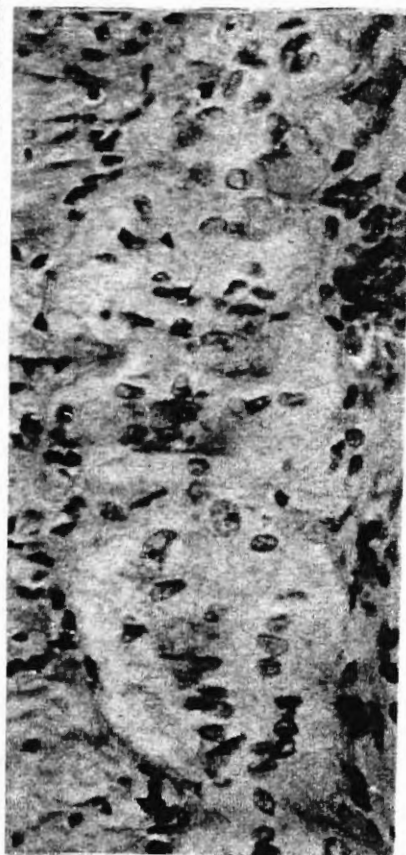
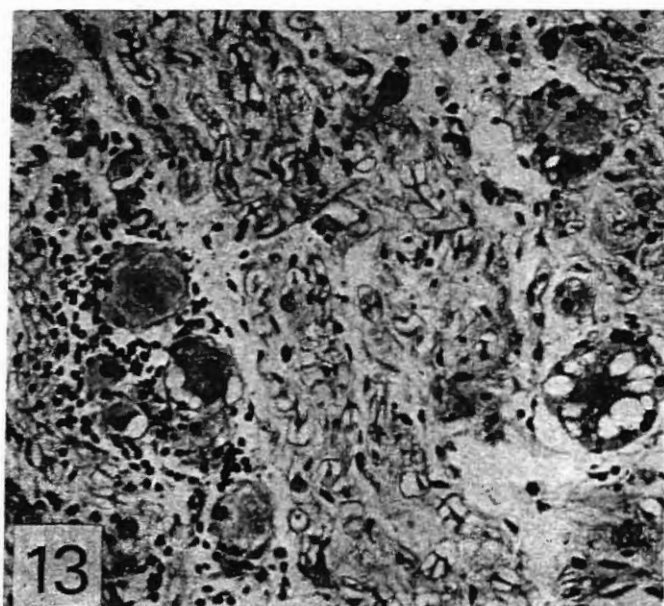
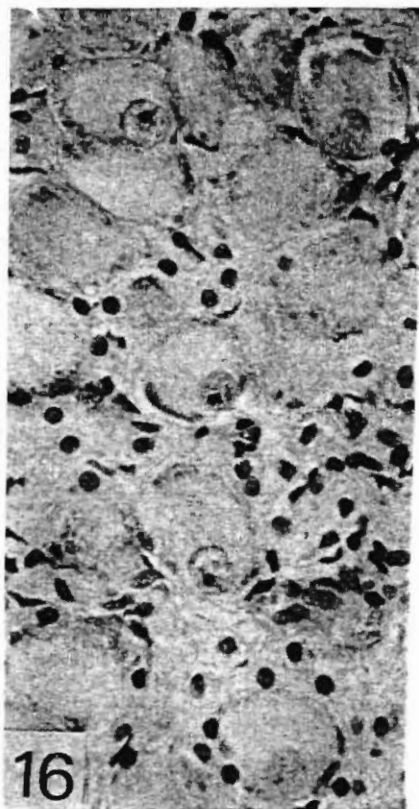
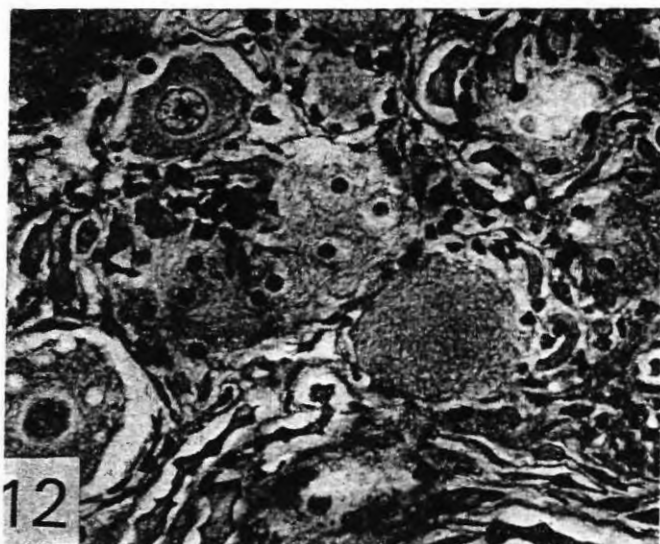
### 写真の説明

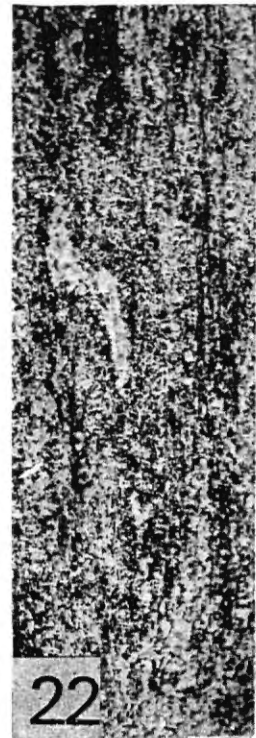
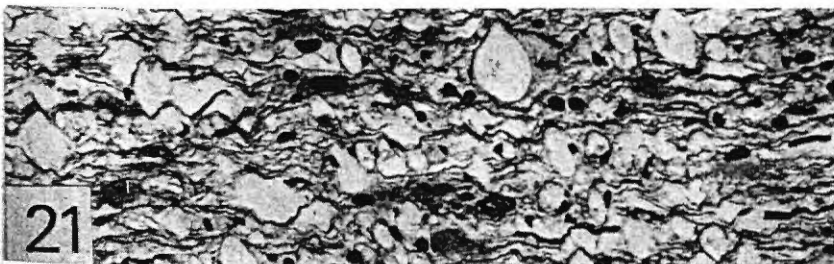
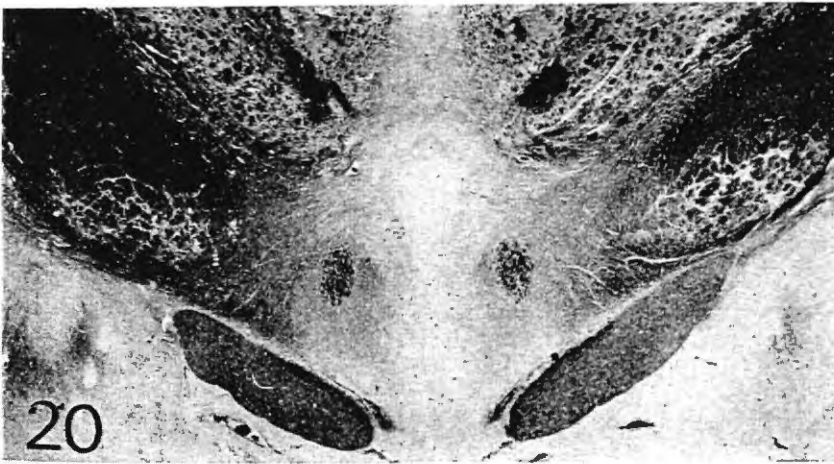
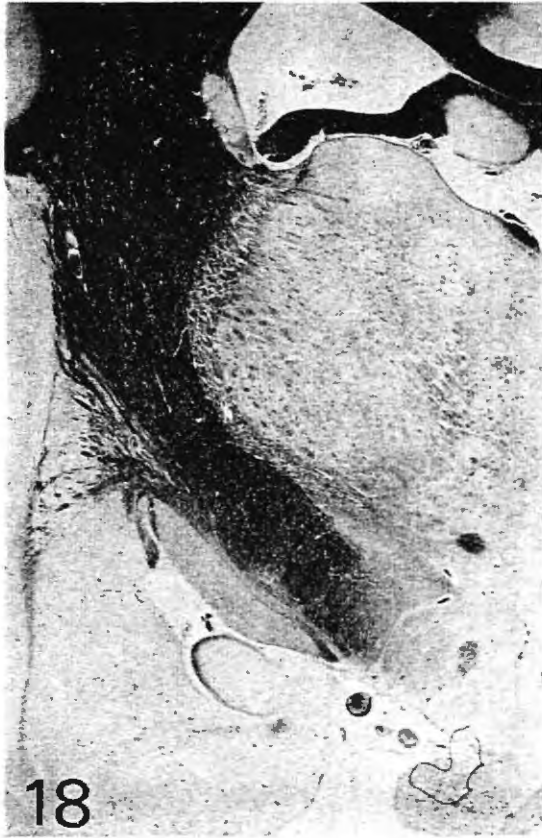
- 図 2 ネコ №27, 腎の近位尿細管の変性。H-E, ×200。
- 図 3 雑犬 №9, 腎の近位尿細管上皮細胞中のキノホルム顆粒。無染色 ×250。
- 図 4 雑犬 №7, 肝細胞の脂肪変性。Sudan III, ×250。
- 図 5 ネコ №26, 腸重積症。H-E。
- 図 6 雑犬 №9, 巨大結腸症。H-E。
- 図 7 サル第2頸髄 Goll 束, 軸索の腫大, 空胞化, 脱落と喰食細胞の侵入。Bodian, ×400。
- 図 8 ビーグル犬 №3, 延髄後索核附近の後索線維の W 字型の変性, Woelke。
- 図 9 ビーグル犬 №3, 第1頸髄後索の変性。Woelke。
- 図 10 ネコ №27, 第1頸髄 Goll 束の変性。Woelke。
- 図 11 雑犬 №12, 第3腰髄錐体側索路, 前索路と一部 Goll 束の変性。Woelke。
- 図 12 ネコ №27, 仙髄後根神経節の神経細胞の空胞化, 核の消失, 外套細胞の侵入, 軸索の肥大。Bodian, ×400。



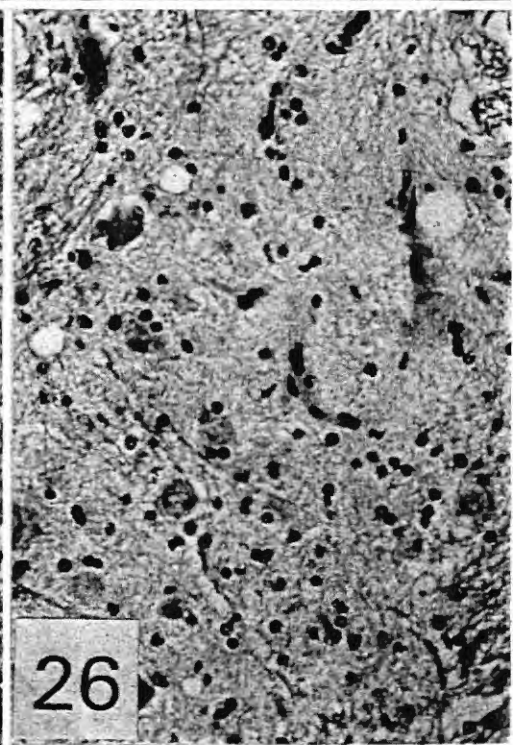
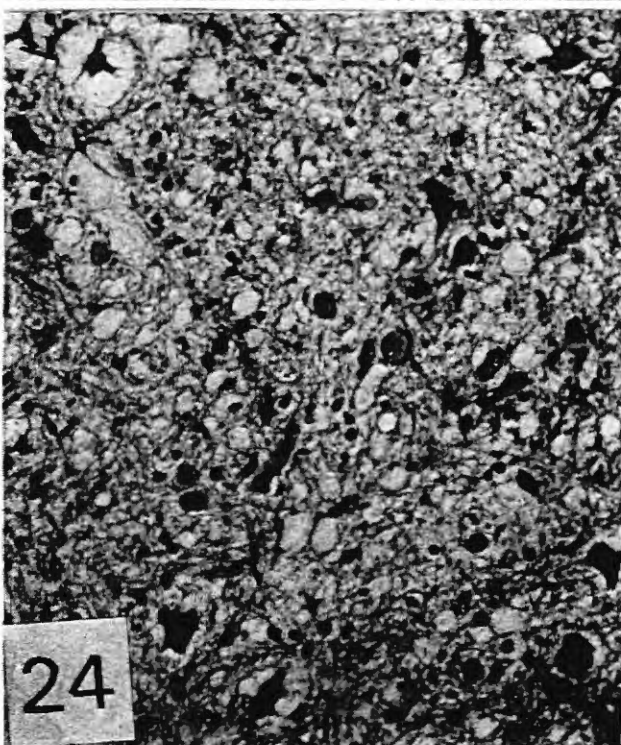
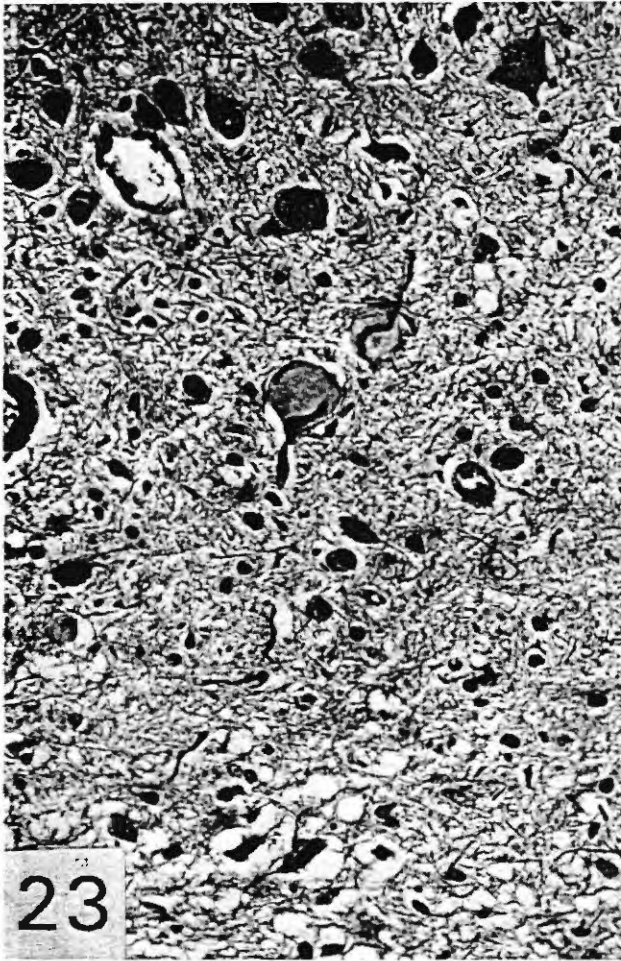


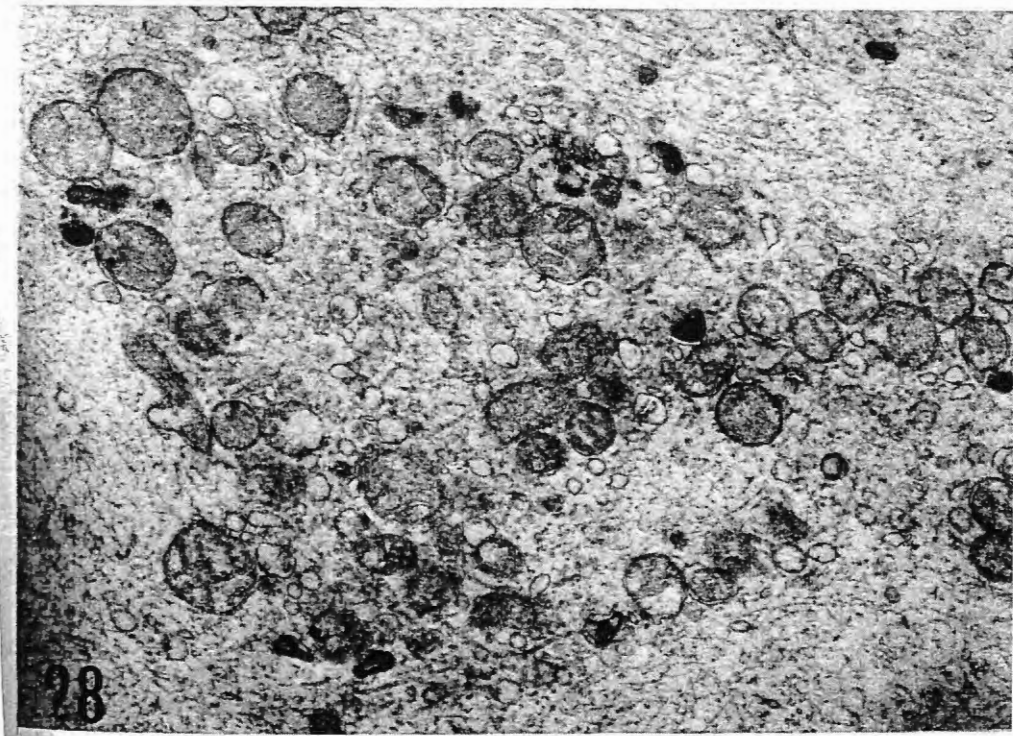
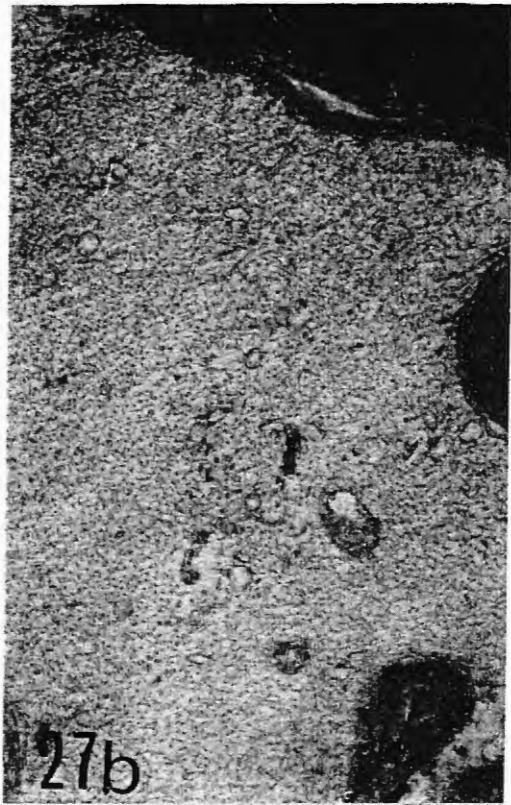
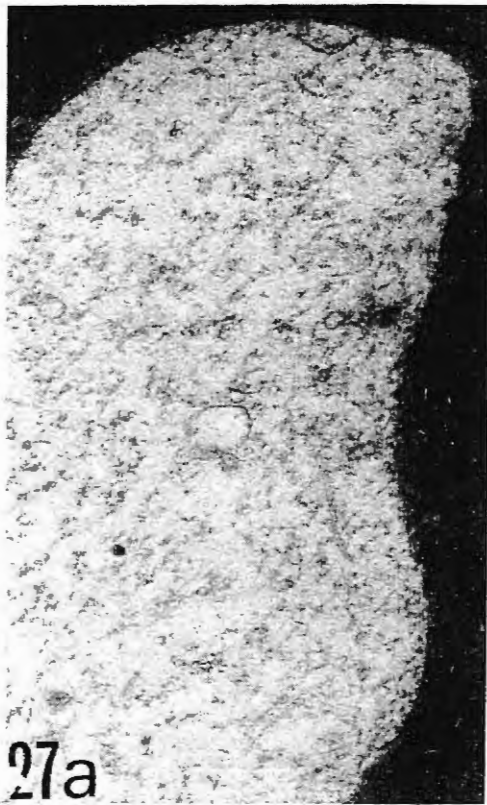


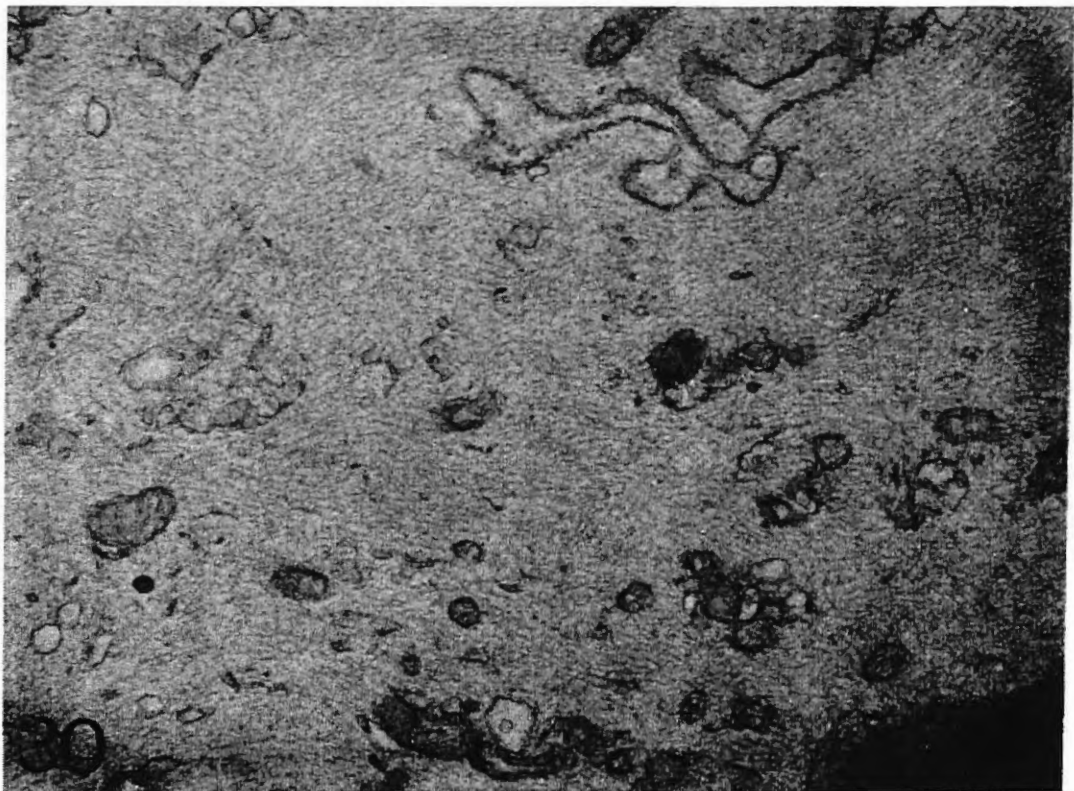
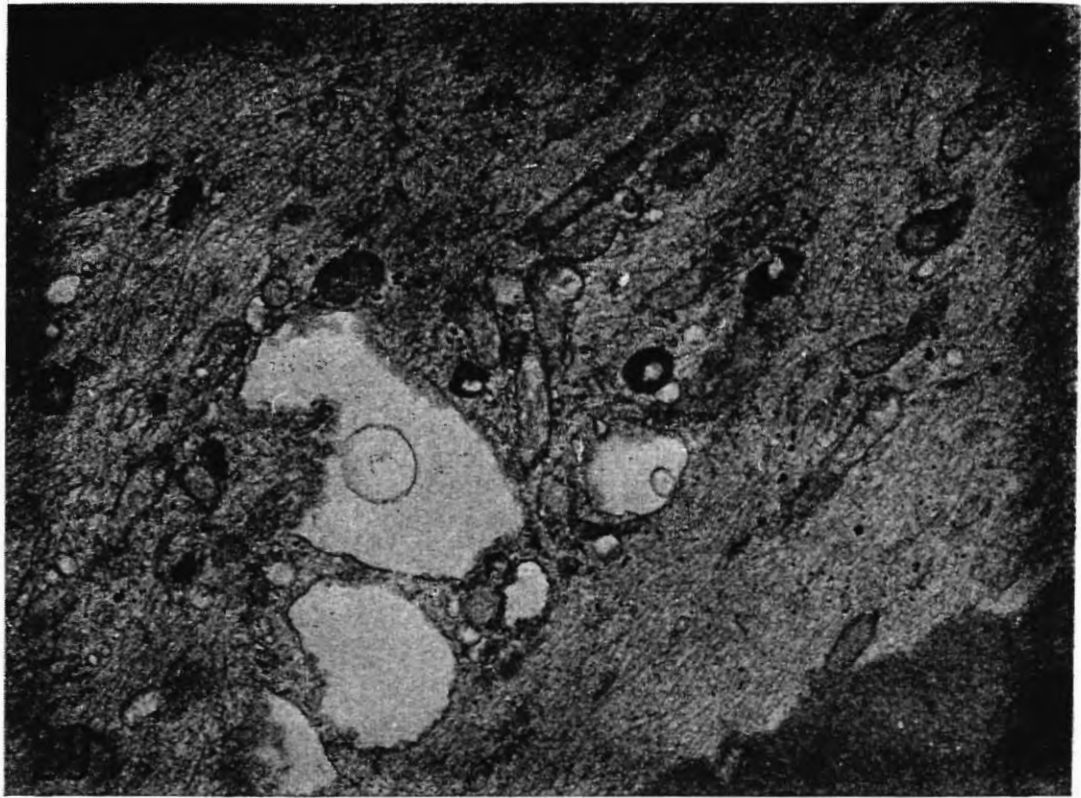




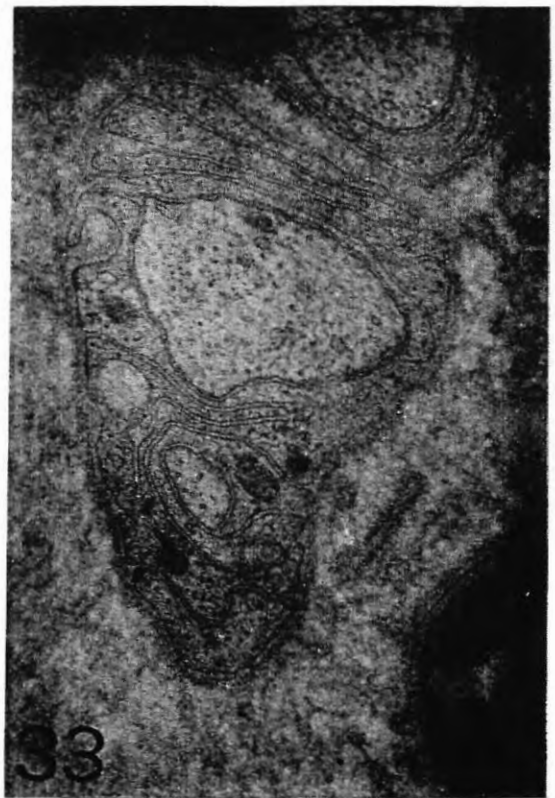




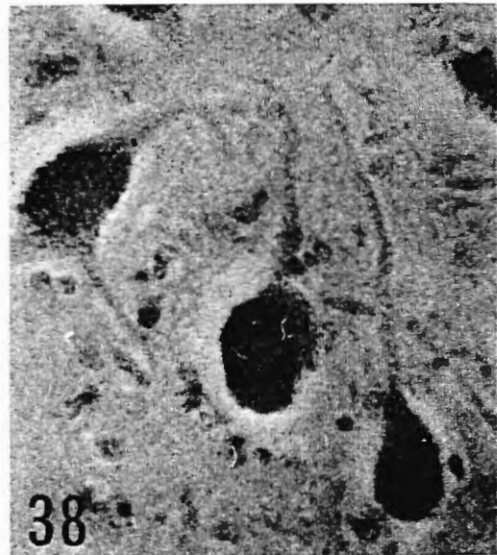
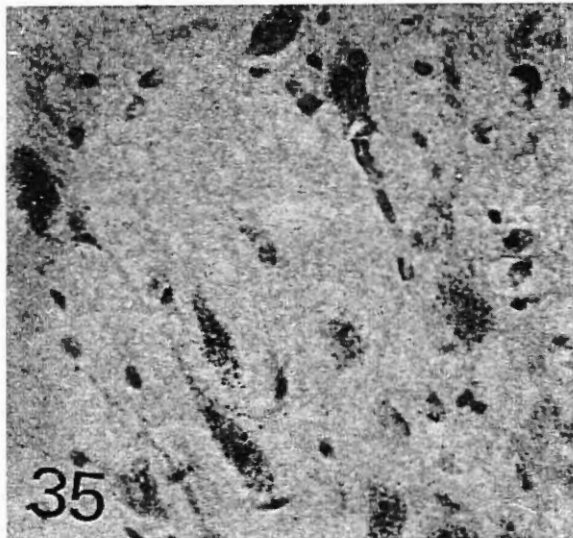
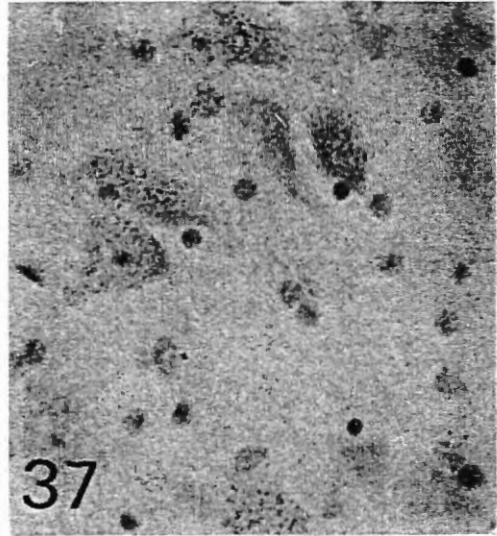
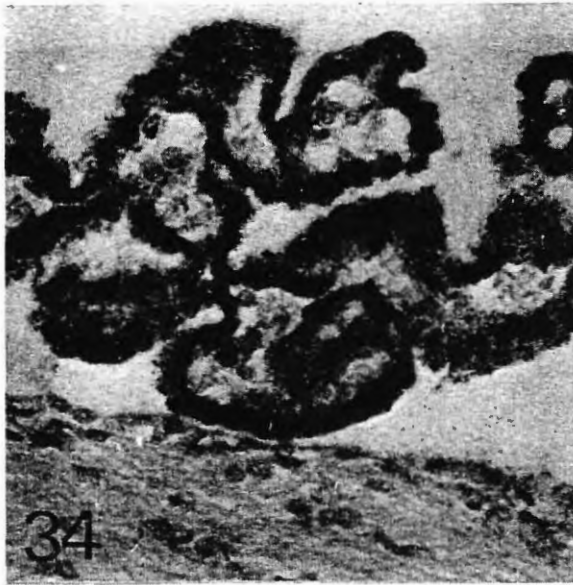


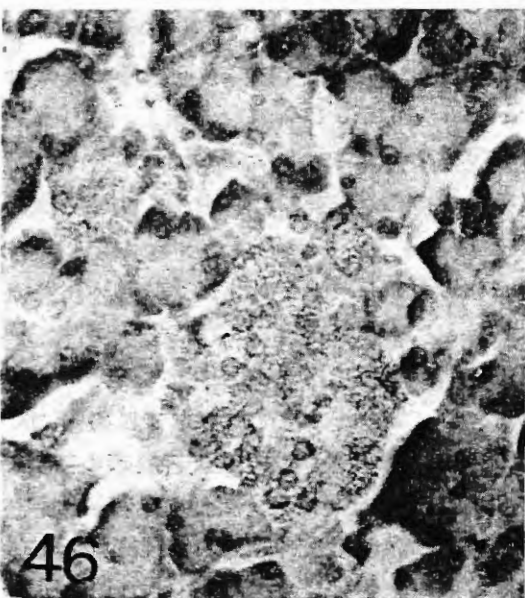
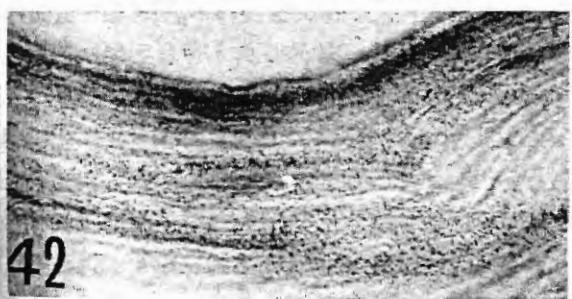
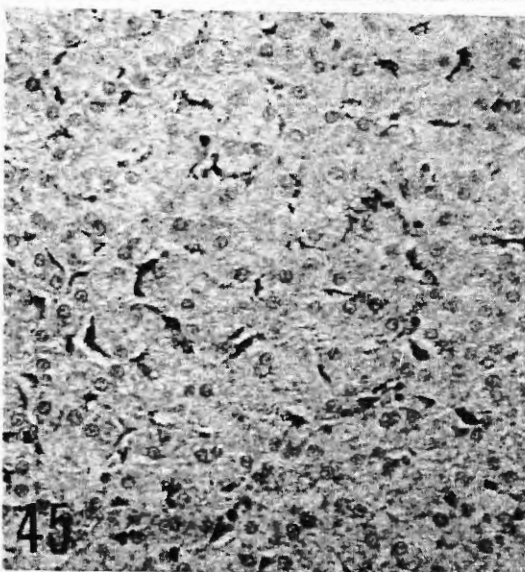
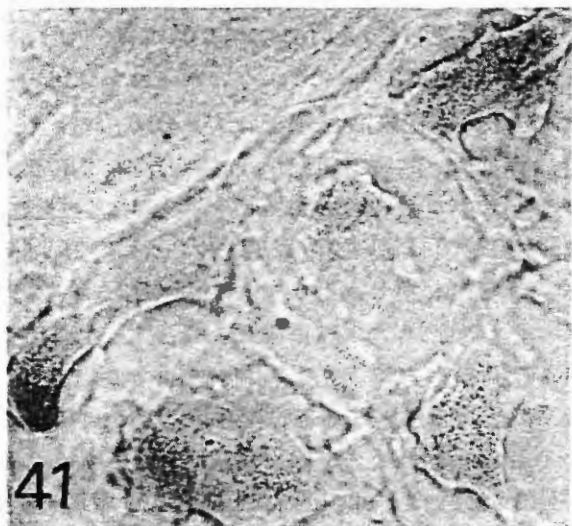
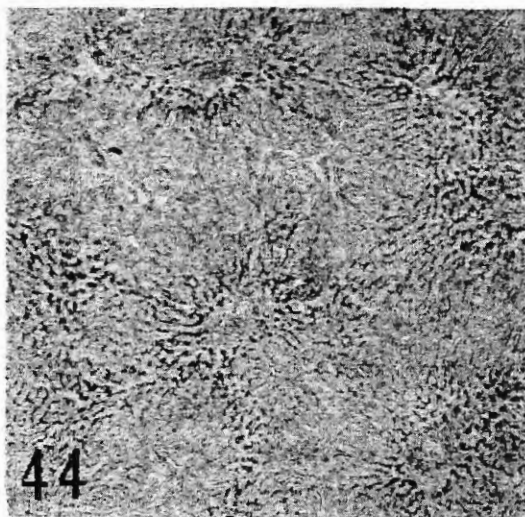
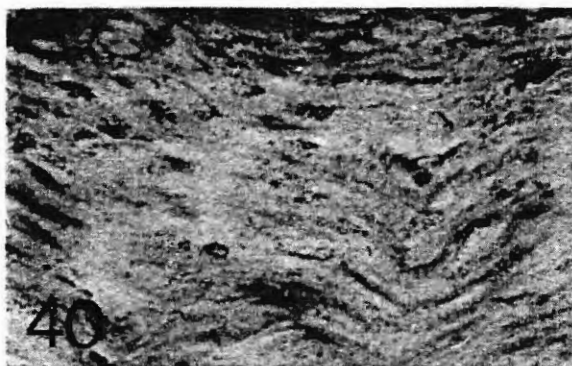












- 図13 サル仙髄後根神経節，神経細胞の変性，外套細胞および少数の円形細胞増殖。H-E,  $\times 250$ 。
- 図14 雑犬№3，腓腹神経のときほぐし法，下方の線維は殆んど崩壊，上方の線維はほぼ正常。 $\times 400$ 。
- 図15 雑犬№9，上腕神経の高度の変性。H-E,  $\times 400$ 。
- 図16 ネコ№27，腹腔神経節の神経細胞の中心性クロマトリーシスと軽度の核の変性もみられる。Nissl,  $\times 400$ 。
- 図17 雑犬№10，小腸のAuerbach神経叢の神経細胞の変性とSchwann細胞の増殖。H-E,  $\times 400$ 。
- 図18 雑犬№8，視束の撰択的変性。Woelke。
- 図19 ネコ№27，視束末端部の変性。Woelke。
- 図20 ビーグル犬№3，視束の変性。Woelke。
- 図21 ネコ№27，視束の強拡大，神経線維は殆んど断裂。Bodian,  $\times 400$ 。
- 図22 雑犬№9，視神経の脂肪顆粒。Sudan III,  $\times 100$ 。
- 図23 ネコ№27，外側膝状体にみられた類球体，下方は視束。Bodian,  $\times 400$ 。
- 図24 雑犬№1，延髄Goll核の神経細胞変性，類球体，基質の粗穢化。H-E,  $\times 250$ 。
- 図25 雑犬№9，三叉神経運動核の神経細胞の変性。H-E,  $\times 250$ 。
- 図26 雑犬№8，上オリブ核のびまん性膠細胞増生。H-E,  $\times 250$ 。

### Ⅲ（電顕的研究）写真説明

- 図27a 対照犬，正常腓腹神経軸索（ $\times 5000$ ）。
- 図27b 投薬犬№2，軸索内のneurofilamentは対照に比べて著明に増加（ $\times 5000$ ）。
- 図28 投薬犬№2，軸索内の正常又は変性mitochondriaの著明な集積（ $\times 10000$ ）。
- 図29 投薬犬№6，239日間休薬。neurofilamentとneurotubulusの著明な増加がみられ，変性mitochondriaの集積，大小の空胞形成がみられる。軸索内全面にグリコーゲン粒子が散在している（ $\times 8500$ ）。
- 図30 投薬犬№6，142日間休薬。neurofilamentの著明な増加があり，上方に軸索膜の内方襞状陥入像がみられる（ $\times 6000$ ）。
- 図31 投薬犬№1，Schwann細胞内の数個のmyelin ovoidは髄鞘本体よりも電子密度が高い。myelin ovoid附近に多数のグリコーゲン様顆粒がみられる。（ $\times 5000$ ）
- 図32 投薬犬№1，有髄線維を一層のSchwann細胞突起がとりかこむonion bulb形成（ $\times 6500$ ）。
- 図33 投薬犬№1，Büngner band形成。いくつかのSchwann細胞突起が無髄神経と共に一つの基底膜にとりかこまれている。（ $\times 6500$ ）

### 写真の説明（オートラジオグラフィー）

- 図34 <sup>131</sup>I-キノホルムi.p.投与雑犬，側脳室脈絡叢への放射性の分布， $\times 400$ 。
- 図35 同，視束上核の神経細胞への分布， $\times 400$ 。
- 図36 同，オリブ核ではグリアに集中， $\times 400$ 。
- 図37 i.v.投与ネコ，三叉神経核の神経細胞への分布， $\times 400$ 。
- 図38 i.p.投与雑犬，腰髄前角神経細胞への集中， $\times 400$ 。
- 図39 同，頸髄後根神経節の神経細胞および外套細胞への分布， $\times 400$ 。
- 図40 同，坐骨神経の主としてSchwann細胞への分布， $\times 400$ 。
- 図41 経口投与雑犬，腰髄後根神経節への同様な分布， $\times 400$ 。

- 図42 同, 坐骨神経へのびまん性の分布,  $\times 250$ 。  
 図43 i.p.投与雑犬, 腎の近位尿細管上皮細胞への集中,  $\times 250$ 。  
 図44 i.p.投与ビーグル犬, 肝小葉中心性分布,  $\times 100$ 。  
 図45 i.p.投与雑犬, 肝のKupffer肝細胞, 細胆管へのびまん性分布,  $\times 250$ 。  
 図46 i.p.投与ビーグル犬, 脾のLangerhans島への分布,  $\times 400$ 。

## 2. 原著, 綜説, その他の記録

- 1) SMONと同一の脊髄後索変性を示した慢性キノホルム中毒犬 医学のあゆみ, 77:205, 1971 立石潤, 池田久男, 斉藤章, 黒田重利, 早原敏之, 大月三郎。
- 2) Metabolism of  $^{14}\text{C}$ -iodochlorohydroxyquinoline(Chinoform) in mice Acta Med.Okayama, 25:199, 1971 Ogata, M., Watanabe, S., Tateishi, J., Kuroda, S., Tomokuni, K. and Otsuki, S.
- 3) 放射性キノホルムのハツカネズミ, ダイコクネズミにおける蓄積および排泄 医学と生物学, 83:9, 1971 緒方正名, 友国勝麿, 林澄子, 渡辺昌祐, 立石潤, 黒田重利, 大月三郎, 安藤醇。
- 4) 放射性キノホルムの神経組織への移行 医学と生物学, 83:15, 1971 渡辺昌祐, 立石潤, 黒田重利, 大月三郎, 緒方正名, 友国勝麿, 安藤醇。
- 5)  $^{14}\text{C}$ -キノホルムのハツカネズミ生体内分布 医学と生物学, 83:77, 1971 緒方正名, 渡辺昌祐, 立石潤, 黒田重利, 大月三郎。
- 6) 四塩化炭素中毒ダイコクネズミにおける  $^{131}\text{I}$ -キノホルムの代謝 医学と生物学, 83:81, 1971 渡辺昌祐, 立石潤, 黒田重利, 大月三郎, 緒方正名, 友国勝麿
- 7) キノホルム剤使用中止約一年後のスモン患者の予後 日本医事新報, 2470:31, 1971 池田久男, 矢吹聖三, 東博文, 早原敏之, 馬場修, 高橋幸夫。
- 8)  $^{131}\text{I}$ -キノホルム投与イヌのラジオオートグラフィー 医学と生物学, 83:91, 1971 立石潤, 黒田重利, 渡辺昌祐, 斉藤章, 大月三郎, 緒方正名。
- 9)  $^{131}\text{I}$ -キノホルムの静脈内注射後のダイコクネズミ臓器内蓄積量の時間経過 医学と生物学, 83:197, 1971 緒方正名, 渡辺昌祐, 立石潤, 林澄子, 黒田重利, 大月三郎。
- 10)  $^{131}\text{I}$ -キノホルムのイヌにおける生体内分布 医学と生物学, 83:203, 1971 緒方正名, 渡辺昌祐, 立石潤, 黒田重利, 林澄子, 大月三郎。
- 11) キノホルム慢性経口投与ネコにみられたMyelo-Optico-Neuropathy 医学のあゆみ, 79:536, 1971 立石潤, 黒田重利, 斉藤章, 大月三郎。
- 12) Myelo-optic neuropathy induced by clioquinol in animals. Lancet, 1971/II 1263 Tateishi, J., Kuroda, S., Saito, A. and Otsuki, S.
- 13) アレルギー性腎炎ダイコクネズミにおける  $^{131}\text{I}$ -キノホルムの代謝 医学と生物学, 83:303, 1971 渡辺昌祐, 立石潤, 黒田重利, 大月三郎, 緒方正名。
- 14) SMONと同一の病理所見を示した慢性キノホルム中毒イヌ 医学と生物学, 83:309, 1971 立石潤, 斉藤章, 黒田重利, 大月三郎。
- 15) キノホルム慢性経口投与サル病理所見 医学と生物学, 83:313, 1971 立石潤, 斉藤章, 黒田重利, 大月三郎。
- 16) 慢性キノホルム中毒犬の病理所見 神経進歩, 16:477, 1972 立石潤, 池田久男, 斉藤章, 黒田重利, 早原敏之。
- 17) 脳灌流法によるキノホルム急性投与の脳機能及び脳グルコースアミノ酸代謝に及ぼす作用 医学



と生物学, 84:153, 1972 渡辺昌祐, 中島良彦, 河野沢与, 鈴木常夫, 江原嵩, 井口欽也, 田口冠蔵, 大月三郎。

- 18) Strain-differences in dogs for neurotoxicity of clioquinol  
Lancet(1972/I 1289) Tateishi, J., Kuroda, S., Saito, A. and Otsuki, S.
- 19) Myeloneuropathy in dogs induced by iodoxyquinoline.  
Neurology,(22:702,1972) Tateishi, J., Ikeda, H., Saito, A., Kuroda, S.  
and Otsuki, S.

### 3. 学会発表

- 1) 放射性キノホルムの生体内分布ことに神経組織への侵入 第10回日本神経学会中国, 四国地方会, 昭和46年7月3日, 緒方正名, 渡辺昌祐, 立石潤, 黒田重利, 大月三郎。
- 2) 慢性キノホルム中毒犬の末梢神経の電子顕微鏡的観察 第13回日本神経病理学会学術研究会, 昭和47年3月31日, 斉藤章, 立石潤, 黒田重利。
- 3) キノホルム慢性経口投与実験(続報)ならびに放射性キノホルムの Micro-autoradiography 第13回日本神経病理学会学術研究会, 昭和47年3月31日, 立石潤, 黒田重利, 斉藤章, 渡辺昌祐, 池田久男, 大月三郎。
- 4) キノホルム慢性投与動物実験(続報) 第13回日本神経学会総会, 昭和47年5月13日, 立石潤, 斉藤章, 黒田重利, 渡辺昌祐, 池田久男, 大月三郎。
- 5)  $^{131}\text{I}$  キノホルムのイヌにおける生体内分布 第13回日本神経学会総会, 昭和47年5月13日, 緒方正名, 大月三郎, 渡辺昌祐, 立石潤, 黒田重利。
- 6)  $^{131}\text{I}$  又は  $^{14}\text{C}$  キノホルムの生体内分布の時間経過 第13回日本神経学会総会, 昭和47年5月13日, 緒方正名, 大月三郎, 渡辺昌祐, 立石潤, 黒田重利。
- 7) 各種動物における放射性キノホルムのミクロラジオオートグラフィー 第13回日本神経学会総会, 昭和47年5月13日, 黒田重利, 斉藤章, 立石潤, 渡辺昌祐, 大月三郎。

### 4. 班会議研究発表

- 1) イヌに於けるキノホルム経口投与実験ならびに  $^{131}\text{I}$  キノホルムの Autoradiography 昭和46年7月24日, 大月三郎, 池田久男, 渡辺昌祐, 立石潤, 斉藤章, 黒田重利。
- 2) 四塩化炭素及びアレルギー性腎炎負荷ラットにおける  $^{131}\text{I}$  キノホルムの代謝, 臓器別分布 昭和46年7月24日, 大月三郎, 渡辺昌祐, 立石潤, 黒田重利, 緒方正名, 友国勝麿, 林澄子。
- 3)  $^{131}\text{I}$  -  $^{125}\text{I}$  -  $^{14}\text{C}$  キノホルム生体内分布の時間経過 昭和46年7月24日, 緒方正名, 友国勝麿, 林澄子, 大月三郎, 渡辺昌祐, 立石潤, 黒田重利。
- 4) 脳灌流法によるキノホルム急性投与の脳機能と脳グルコース代謝に及ぼす作用 昭和46年12月15日, 大月三郎, 渡辺昌祐, 中島良彦, 河野沢与, 鈴木常夫, 江原嵩, 井口欽也, 田口冠蔵。
- 5)  $^{131}\text{I}$ ,  $^{14}\text{C}$  キノホルム生体内分布の時間経過(続報) 昭和46年12月15日, 緒方正名, 林澄子, 大月三郎, 渡辺昌祐, 立石潤, 黒田重利。
- 6) 犬, 猫におけるキノホルム投与実験(続報) I. キノホルム慢性経口投与実験 II. 放射性キノホルムの Micro-autoradiography 昭和46年12月15日, 大月三郎, 池田久男, 渡辺昌祐, 立石潤, 斉藤章, 黒田重利。
- 7) 標識キノホルム生体内分布, 代謝(ネコ, ラット及び動物差について) 昭和47年2月28日 緒方正名, 大月三郎, 渡辺昌祐, 立石潤, 黒田重利。
- 8) 標識キノホルムの生体内分布, 代謝(犬による実験成績) 昭和47年2月28日, 緒方正名, 人見硬, 大月三郎, 渡辺昌祐, 立石潤, 黒田重利。

- 9) 放射性キノホルムのMicro-autoradiography (その3) 昭和47年2月28日, 大月三郎, 渡辺昌祐, 立石潤, 斉藤章, 黒田重利, 緒方正名。
- 10) イヌ, ネコに於けるキノホルム投与実験(第4報) I. 純系ビーグル犬に於けるキノホルム慢性経口投与実験(第1報) 昭和47年2月28日, 大月三郎, 立石潤, 斉藤章, 黒田重利。
- 11) イヌ, ネコに於けるキノホルム投与実験(第4報) II. キノホルム投与ネコの病理所見(続報) 昭和47年2月28日, 大月三郎, 立石潤, 斉藤章, 黒田重利。
- 12) 慢性キノホルム中毒犬の末梢神経の電顕的研究 昭和47年2月28日, 大月三郎, 斉藤章, 立石潤, 黒田重利。
- 13) 動物におけるキノホルム投与実験 昭和47年3月13日, 大月三郎。



## 11. 標識キノホルムの生体内分布, 代謝

緒方 正名, 友国 勝鷹, 人見 硬, 吉良 澄子

(岡山大・医・公衆衛生)

大月 三郎, 渡辺 昌祐, 立石 潤, 黒田 重利

(岡山大・医・神経精神)

### 緒 言

キノホルム (Iodochlorohydroxyquinoline) は、古くからアメーバ赤痢の特効薬や一般下痢症の治療薬として、広く用いられてきた薬剤である。然しその生体内の動態についての研究は比較的少い。

<sup>1)</sup> David 等は 1933 年すでに、キノホルムのアメーバ赤痢の効果について報告を行っている。その際、投与した患者の糞が緑色となることを認め、且つそれが患者に対するキノホルム投与の指標となることを述べている。またキノホルムを家兎に 10 日間、100 mg/kg 経口投与では、病変は見出されないが、250 mg/kg 1 回経口投与した家兎は死亡した。その際、肝臓に脂肪変性及び一部の壊死が認められたが、一方腎臓尿細管にも変化を認めている。このことはキノホルムの腸管吸収を推定させていると考える。

その後、動物を用いてキノホルムの吸収及び排泄を調べた研究が進められた。

<sup>3)</sup> Haskins 等は 1953 年、Vioform を経口投与 (20~280 mg/kg / 1 日・5 日間) し、12.7~50.5% をグルクロン酸又は硫酸抱合体として回収した。その際、彼等はキノホルムの投与量の少ない (20 mg/kg) 時の尿中排泄量は 46% であって、多い時 (200 mg/kg) のそれ (14%) より明かに多い事を述べている。しかし、これらの知見、特に吸収量については後述の如く胆汁排泄の考慮が必要であると考えられる。

<sup>2)</sup> 一方、人体におけるキノホルム経口投与後の吸収に関しては、David が 1945 年 diodoquine を投与後、血中の diodo 値が 45.6~432.75  $\mu\text{g}/\text{dl}$  (正常値 5.3~18.02) であることより、キノホルムについても iod イオンの吸収があることを推定している。次いで、<sup>15)</sup> Sönksen 等はキノホルム投与 (1 日 500 mg・2 週間) 後、血清蛋白結合度 (P・B・I) の明かな上昇 (直後の値・118  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ) を認めている。

<sup>12)</sup> 次いで、Liewendahl 等 (1967 年) は正常者及び甲状腺機能亢進者に <sup>125</sup>I キノホルム を 0.1~1.0 mg/kg, 1 回経口投与後平均 43.6% が尿中に排泄されること、及びその吸収は速く、投与後 4 時間に血漿濃度が最高値になることを認めている。その血漿からの消失は初期の半減期が 0.3 日、末期のそれは 11 日であることを認めている。また甲状腺中に投与量の 0.4% の放射能値が 24 時間後にみいだされる事を述べている。

<sup>13)</sup> 次いで、彼等は 1967 年に <sup>125</sup>I キノホルム 投与後 4 時間に血清中のキノホルムは主として遊離の

型であり、一部はグルクロン酸及び硫酸抱合物の型で存在することを述べている。その際、透析法により遊離キノホルムが血漿と結合することを述べている。また、尿中のキノホルムは主としてグルクロン酸、一部は硫酸抱合物の型で排泄されることを濾紙クロマトグラフで証明している。又その際、糞中に微量のグルクロン酸及び硫酸抱合物の存在を認め、腸肝循環の存在を推定している。

14)  
Berggren は1967年にキノホルムを4～6才の子供6名に経口投与して(0.25 g・1回) 10時間内に平均12.6%が、主としてグルクロン酸抱合型で尿中に排泄されることを過塩化鉄反応によつて証明している。

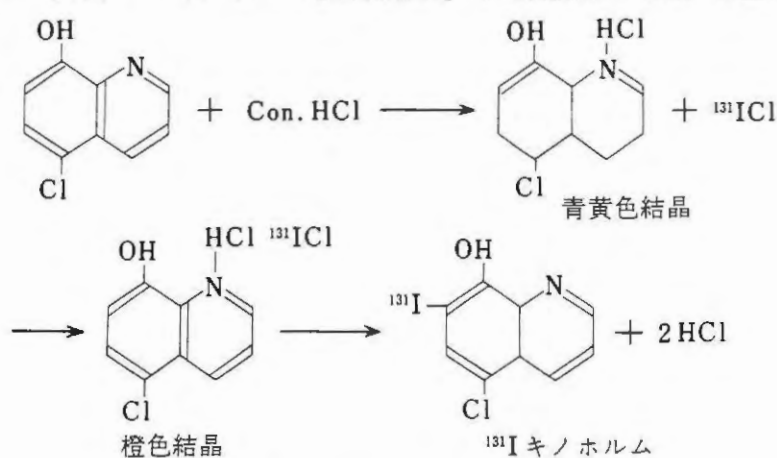
21)  
一方、椿らが1971年にキノホルム中毒とS M O Nの間に関係があることを報告して以来、キノホルムの生体内分布、代謝の研究が要請された。

しかしながら、腸管から吸収されたキノホルムについて、①血液中の Carrier は何か、②どのような臓器に蓄積しやすいか、③中枢神経において血液脳関門を通過するかいなか、④坐骨神経等の末梢神経系に分布するか否か、⑤胆汁に排泄され腸肝循環をするか、という事については明かでない。

22)  
私共は1971年3月のスモン協議会において、キノホルムが坐骨神経に分布・蓄積することを証明し又、胆汁に排泄される事を予測した。その後1971～1972此点に関して一連の研究を報告した。これらの成績を中心として、キノホルムの生体内の動態についてその吸収・生体内分布、排泄、特に神経系への分布及び、腸肝循環を中心として研究を行つてその結果の一部をすでに発表した。その成績を総括してここに報告する。

#### 材料及び方法

5)  
材料：Ⅰ)  $^{131}\text{I}$  及び  $^{125}\text{I}$  標識キノホルムの合成：Das & Mukherji の合成法に準じて、5-chloro-8-hydroxy quinoline と  $^{131}\text{I}$  iodine monochloride より以下の反応を用いて、 $^{131}\text{I}$  又は  $^{125}\text{I}$  キノホルムを合成した。その純度は99%、収量は40%であった。



犬・ネコ等に用いた  $^{131}\text{I}$  キノホルムは、第一化学製のものである。

Ⅱ)  $^{14}\text{C}$  キノホルムは、2・3・4- $^{14}\text{C}$  キノホルム(第一化学製、比放射能1.63 mc/mM)を用いた。純度は99%である。

Ⅲ) 投与方法及び動物：実験の目的により、実験動物として ddN ハツカネズミ(雌・体重約20g)

Wistar系ダイコクネズミ（雌・体重約200g）ネコ・雑犬・ビーグル犬を用いた。放射性キノホルムの投与方法としては、経口投与、腹腔内、尾静脈注射を用い、キノホルム剤の投与には水性懸濁液及び溶解液として、1/10～1/20 NaOH, CMC懸濁液を用いた。その概要を（表1）

表1. 放射性キノホルムの各種動物に対する投与条件

| 実 験    | 動 物           | 核 種                              | 溶 媒        | 投 与 方 法  | 投 与 量                  |
|--------|---------------|----------------------------------|------------|----------|------------------------|
| 表・10・A | Wistarダイコクネズミ | $^{131}\text{I}, ^{125}\text{I}$ | 水・CMC      | 静注・経口・腹腔 | 1.25～6.3 $\mu\text{C}$ |
| 表 9    | Wistarダイコクネズミ | $^{131}\text{I}$                 | 0.05N NaOH | 静 注      | 12 $\mu\text{C}$       |
| 表 5    | ddNハツカネズミ     | $^{14}\text{C}$                  | 0.05N NaOH | 静 注      | 0.2 $\mu\text{C}$      |
| 図 9    | Wistarダイコクネズミ | $^{131}\text{I}$                 | 0.05N NaOH | 静 注      | 12 $\mu\text{C}$       |
| 表 11   | Wistarダイコクネズミ | $^{14}\text{C}$                  | 0.10N NaOH | 腹 腔      | 33 $\mu\text{C}$       |
| 表 14   | ビーグル犬         | $^{14}\text{C}$                  | 0.05N NaOH | 腹 腔      | 250 $\mu\text{C}$      |
| 表 12   | 雑犬（体重5kg）     | $^{131}\text{I}$                 | CMC        | 腹 腔      | 0.5mC                  |
| 表 15   | 雑犬（体重1.6kg）   | $^{131}\text{I}$                 | CMC        | 経 口      | 1.25mC                 |
| 表 16   | 雑犬（体重1.6kg）   | $^{131}\text{I}$                 | CMC        | 経 口      | 1.25mC                 |
| 表 13   | 雑犬（体重8.8kg）   | $^{131}\text{I}$                 | 0.05N NaOH | 腹 腔      | 1.00mC                 |
|        | ビーグル犬（体重10kg） | $^{131}\text{I}$                 | 0.05N NaOH | 腹 腔      | 1.00mC                 |
|        | キノホルム服用ビーグル犬  | $^{131}\text{I}$                 | 0.05N NaOH | 腹 腔      | 1.00mC                 |
| 表 17   | ネコ（体重3kg）     | $^{14}\text{C}$                  | 0.10N NaOH | 腹 腔      | 200 $\mu\text{C}$      |

に示す。 $^{131}\text{I}$ 又は $^{125}\text{I}$ キノホルム投与実験においては、あらかじめ1%沃度加里水を実験1日前より飲料水として与え、甲状腺ブロックを行なった。

#### 方法：I）資料の調整

A）臓器中の放射能値； $^{14}\text{C}$ キノホルムの放射能値の測定には、測定すべき臓器サンプルを秤量し（約20～40mg）Solune 1.0 mlに溶解した後、Toluene-PP0-POP0P Systemにて測定した。B）クロロホルム可溶性成分の放射能値；臓器内遊離キノホルムを分離する目的でクロロホルムを用いた。即ち臓器の1に対して約5倍量のクロロホルムを加えて、ホモゲナイザーで約10分間攪拌後遠沈してクロロホルム分画を分離した。

II）放射能値の測定：A） $^{131}\text{I}$ 及び $^{125}\text{I}$ キノホルムの測定；日本無線製ウエル型シンチレーション放射能自動測定装置DBC-207型を用いて、測定した。試料の前後にバックグラウンドを測定しその平均値をバックグラウンドとした。各試料は、5分間～10分間、2回測定し、平均した。計算により $^{131}\text{I}$ の物理的減衰の影響を消去した。尚、放射能値測定の資料の調整については、実験成績の項

に述べる。

B)  $^{14}\text{C}$ キノホルムの測定; Packard Liquid Scintillation Spectrometer を用いた。

クロロホルム溶性分画の測定は臓器の湿重量を測定し、湿重量の30-50gを秤量し、ソルエン (Soluenne) 0.5 mlを加え加温し、その3倍の蒸留水を加えて Potter および Elvehjem 型の テフロン Homogenizer を用いて homogenate を作成した後に溶解し、3mlの chloroform を加えて再び homogenize した。遠心沈殿によって chloroform 層をカウント用バイアル 内にて通風蒸発乾固させた後、0.5 mlメタノール・ハイアミンに溶解した。ついで PPO, POPOP を含有した toluene 15 mlを加え、Liquid Scintillation Spectrometerに よって放射能値を測定した。全分画については湿重量10-15mgを秤量し、Soluenne 0.5 mlを 加え加温溶解後、PPO, POPOPを含有した toluene 15 mlを加え同様に放射能値を測定 した。クロロホルム不溶性分画の放射能値の測定についても、Soluenne 溶解法を用いた。

### Ⅲ) 負荷動物への投与実験

#### A) 四塩化炭素負荷実験:

Wistar系ダイコクネズミ雌に、四塩化炭素1.5 ml/kgを胃管より屠殺72時間前に与え脂肪肝 をおこさせた。3日後、 $^{131}\text{I}$ キノホルム12  $\mu\text{C}$ を尾静脈より投与し、24時間後の臓器内分布を調べ た。

#### B) アレルギー性腎炎負荷実験:

ダイコクネズミに、Seegalの方法<sup>4)</sup>に準じてアレルギー性腎炎を負荷した。すなわち、ダイコク ネズミの腎臓細片に4倍量の0.9% NaClを加え、同量の Freund adjuvantを加え、1回 3ml, 週2回の割合にウサギに筋注した。4回の筋注後、ウサギ血清をダイコクネズミに2 ml/kgの割合 で3日間連続尾静脈注射した。3-4日後より著明な蛋白尿を認め又、組織学的にも腎炎を認めた。

$^{131}\text{I}$ キノホルム静注後、1時間及び4時間で採血し、血中の全分画、クロロホルム可溶分画、同不 溶分画の減衰率を測定した。

## 成 績

### 1 定量法の検討

#### A) $^{14}\text{C}$ キノホルムの定量

定量法については Soluenne 溶解法を用いているので、Sampleの Color quenching について、ことに血液、胆汁において問題となる。それ故、同一 Sampleを Oxidizer法による 測定成績と比較した。そして血球以外はほとんど一致した結果を得た(表2.A)ので試料のほとんどは Soluenne 溶解法を用いて放射能値を測定した。また、 $^{14}\text{C}$ キノホルムによって、キノホルムは血球 <sup>12)</sup> に吸着される量の少ない(約7%)事が認められ、Liewendahlら(3.15-5.70%)とほぼ一致 したので、 $^{14}\text{C}$ キノホルムの放射能値を測定し、標準とした。

## B 中枢神経における分布濃度の算出

臓器内に含有される血液成分に由来する放射能を除去する事が、特に投与後短時間の測定で、血液キノホルム放射能の高い場合には必要である。それ故、犬および猫の実験および $^{14}\text{C}$ キノホルムを用

表2  $^{14}\text{C}$ キノホルム投与ビーグル犬の組織内キノホルム及び遊離キノホルム定量法の検討  
(250 $\mu\text{C}$ ・50mgの $^{14}\text{C}$ キノホルムをCMC乳化後、5.8kgビーグル犬の腹腔内に注射)

表2.A Soluene 溶解法とOxidizer法の比較(dpm/ml)

|     | Soluene 溶解法 | Oxidizer 法 |
|-----|-------------|------------|
| 血 清 | 9,625       | 9,455      |
| 胆 汁 | 5,080,286   | 5,051,720  |

表2.B 大脳におけるクロロホルム抽出率の変動  
(4回抽出の計を100%とする。)

|         |               |              |
|---------|---------------|--------------|
| 1 回 抽 出 | 5,016 (dpm/g) | 86.33 % (比率) |
| 2 回 抽 出 | 543           | 9.35 %       |
| 3 回 抽 出 | 142           | 2.44 %       |
| 4 回 抽 出 | 109           | 1.88 %       |

表2.C クロロホルム抽出法とビリジンベンゼン抽出法の比較(dpm/g 湿重量)

| 臓 器       | 全 抽 出 分 画 | ク ロ ロ ホ ル ム<br>抽 出 分 画 | ビ リ ジ ン ベ ン ゼ ン<br>抽 出 分 画 |
|-----------|-----------|------------------------|----------------------------|
| 大 脳       | 0.416     | 0.166                  | 0.152                      |
| 腎 臓       | 5.90      | 1.29                   | —                          |
| 胆 汁       | 1,453     | 22.1                   | 12.1                       |
| 小 腸 内 容 物 | —         | 18.6                   | 10.1                       |

いたハツカネズミの実験成績については、<sup>7)</sup> Lajtha, <sup>16)</sup> Bosse, の結果を参考として、組織内の血液含量を基礎とし、血液由来の放射能を差し引いた上で臓器内濃度を計算した。その他のものは差し引かぬものを記載した。

## C 臓器内クロロホルムの回数にともなう抽出効果

大脳において、血液クロロホルムを4回くり返し抽出し、4回までの計を100 %として各回の抽出率をみた(表2B)。第1回で86.3%, 第2回目9.4%, 第3回目2.4%, 第4回目1.9%が抽出された。一方小腸内容物については(表3), 少なくとも2回の抽出が必要である事がわかった。

表3 小腸内容物におけるクロロホルム抽出率(ハツカネズミ)  
 $^{14}\text{C}$ -キノホルム(1.63 mCi/mM)375 mgを尾静脈注射1時間後の小腸内容物

| クロロホルム抽出値 |              | %     |
|-----------|--------------|-------|
| 1 回       | 32,055 dpm/g | 5.46  |
| 2 回       | 23,923       | 4.08  |
| 3 回       | 13,329       | 2.27  |
| 4 回       | 14,854       | 2.53  |
| 総 計       | 84,161       | 14.35 |
| 水 層       | 502,501      | 85.65 |

遊離キノホルムは極めて難水溶性であるが、わずかに水に溶解する(Merk Index, 1968)。従って、微量の遊離キノホルムは、クロロホルム不溶分画(水溶分画および pelet)に残存していると思われるが、量的にはわずかであるので一応除外した。

#### D クロロホルム抽出法と他の溶剤による抽出法との比較

遊離キノホルムの抽出には、各種の抽出法が用いられている。熱アルコール(Merk Index)<sup>14)</sup>、クロロホルム<sup>17)</sup>、<sup>34)</sup>に溶解し、ビリジン、ベンゼン、クロロホルム、などに組織より溶出されうることが試みられている。

ビリジン、ベンゼン抽出率と、クロロホルム抽出率を、大脳、腎臓、胆汁、小腸内容物について比較した(表2C)。いずれもクロロホルム抽出率がややすぐれていた。また  $^{14}\text{C}$ キノホルムでは抽出サンプルの color quenching がクロロホルム抽出に少なく、Solubene 溶解法による全分画の放射能測定と比較する場合には有利であると考えられる。但しキノホルムのグルクロン酸抱合物<sup>14)</sup>については Berggren, [1967]の文献があるが、硫酸抱合物の抽出については記載がないので、今後別に検討を必要とする。

#### II. キノホルムの吸収, 分布, 代謝

現在、遊離キノホルムの carrier についての明瞭な研究は行なわれていない。この点を明らかにするために以下の研究を行なった。

##### A) 生体内遊離キノホルムの carrier

##### 1. 血液における研究

まず血液のうち赤血球との結合については  $^{14}\text{C}$ キノホルム投与ビーグル犬の Oxidizer 法によ



る放射能値の測定による値は、血液9,625 cpm/g 湿重量、血漿9,455, 血球669であって前述の如く血球は約7%に過ぎなかった。それ故に血清における carrier について、以下の実験を行なった。

## 2. 血清における研究

a) in vivo study;  $^{14}\text{C}$  キノホルムをマウスに注射し2日後、血清を分離して濾紙電気泳動〔緩衝液; Veronal, Veronal Na, ( $\mu=0.1$ )〕を行ない radio activity を測定した。その結果放射能値は血清 Albumin に局存することが認められた(図1)。b) in vitro

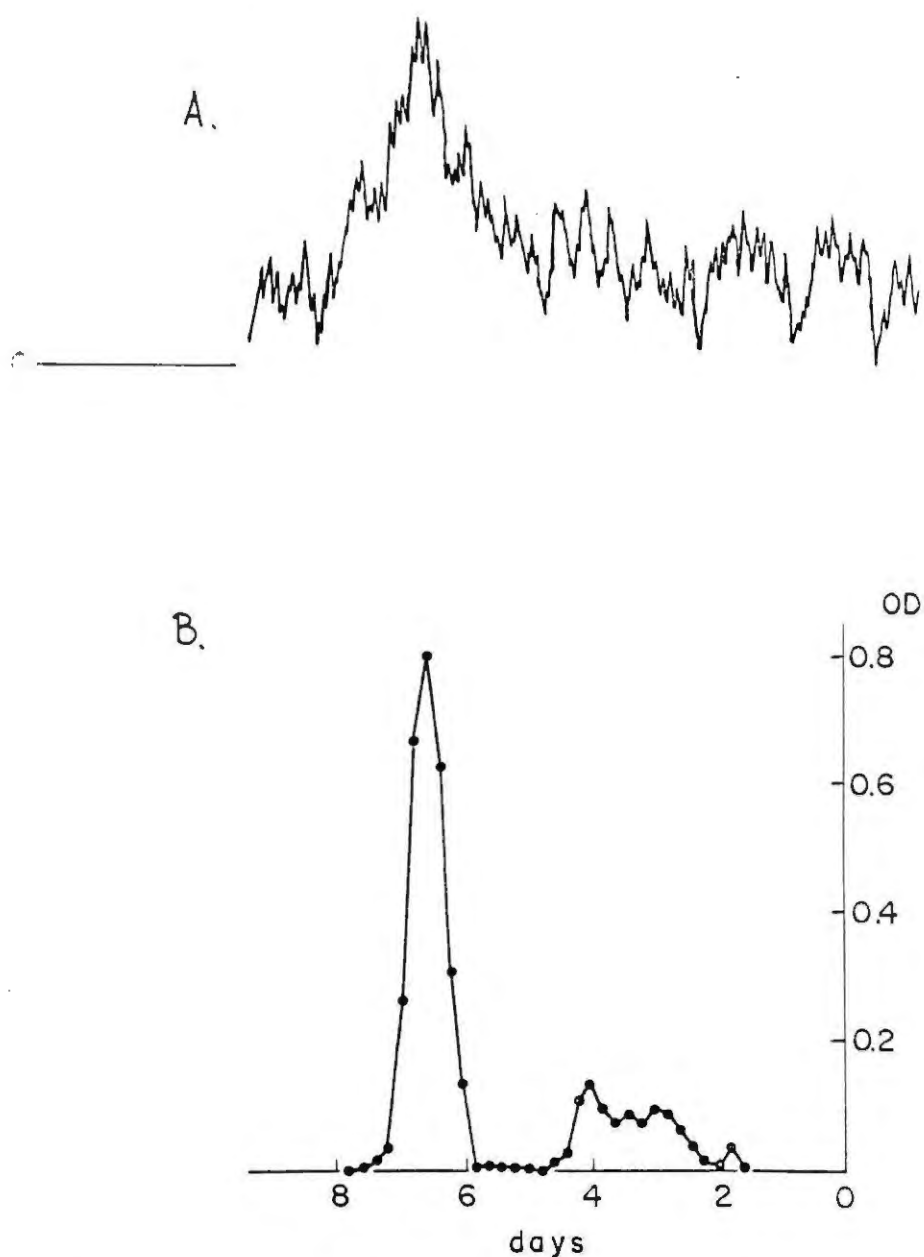


図1  $^{131}\text{I}$  キノホルム経口投与マウスの radio paperelectrophoresis

横軸：泳動距離

縦軸：A・放射能値 B・蛋白量

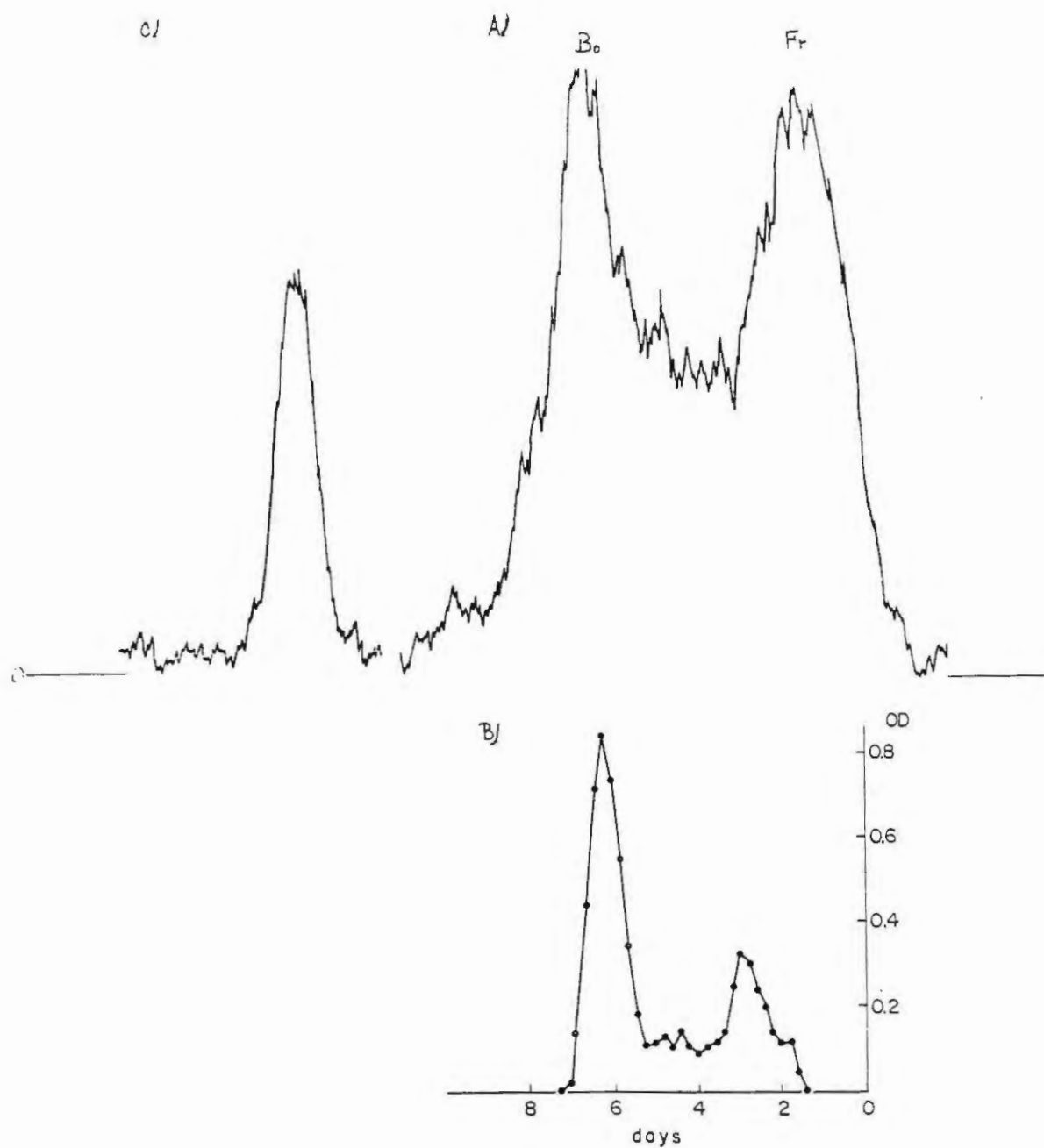


図2 マウス血清に遊離 $^{14}\text{C}$ キノホルム添加後の radio paperelectrophoresis

縦軸: A・放射能値 ( $B_o$  は結合キノホルム・ $Fr$  は遊離キノホルム)  
 B・蛋白量  
 C・遊離キノホルム

study; mouse 血清に  $^{14}\text{C}$  キノホルム ( $0.04\mu\text{C}/\text{ml}$ ) を  $1/2$  量加えて、同じ条件で濾紙電気泳動を行なった。放射能値は血清 Albumin 及び原点に認められた。原点に放射能値が認められるが、遊離キノホルムによるものと同じ位置である (図 2)。

以上総括して血清中の遊離キノホルムの carrier は血清 Albumin と考えられる。

#### B) 腸胆道 (腸肝) 循環

胆汁中の放射能値、またはそれより計算したキノホルム量 ( $\text{cpm}/\text{ml}$ ) または  $\mu\text{g}$  キノホルム/ $\text{ml}$  値は、血液 ( $^{131}\text{I}$  キノホルム)、または血清 ( $^{14}\text{C}$  キノホルム) 中の  $32\sim 500$  倍に及んでいる。(表 5, 11, 12, 13, 14, 15) (図 14)。 $^{14}\text{C}$  キノホルム 静注ハツカネズミの十二指腸内容物の中にはクロロホルム溶性分画には放射能は全分画の  $14.4\%$  を示した (表 3)<sup>注)</sup>。 $^{14}\text{C}$  キノホルム 投与マウスの胆汁中のクロロホルム溶性分画には少量であったが  $\beta$  グルクロニダーゼ作用後増加した (表 4)。次いで  $^{14}\text{C}$  キノホルム 投与マウス及びビーグル犬の胆汁のペーパークロマトグラム ( $n\text{-butanol} : 0.5\text{M ammonia} : \text{ethanol} : \text{water} = 20 : 20 : 2 : 1 \text{ v/v}$ ) を行った後

表 4  $^{14}\text{C}$  キノホルム  $1\mu\text{C}$  尾静脈投与ハツカネズミ (1 時間後、腸肝循環)  $0.1\text{N}$  NaOH に溶解後投与

|                                  | クロロホルム可溶 | 水 溶 分 画   |
|----------------------------------|----------|-----------|
| 肝 臓                              | 113,508  | 72,814    |
| 小 腸                              | 34,560   | 41,232    |
| 大 便                              | 396,203  | 4,293,438 |
| 胆 汁<br>( $\beta$ -グルクロニダーゼ)<br>+ | 37,588   | 47,941    |
| 胆 汁<br>( $\beta$ -グルクロニダーゼ)      | 11,353   | 73,000    |

dpm/g 湿重量

に、放射能値を測定した。マウス胆汁のクロマトグラムでは遊離キノホルムは front (前端) に存在する。胆汁の場合は微量にしか認められなかった (図 3)。ビーグル犬では  $\beta$ -グルクロニダーゼ作用後のラジオペーパークロマトグラムは (図 4) に示す如く  $R_f = 0.33$  のピークは減少し, front の放射能値のピークが出現する。それ故に放射能値の主峯は、グルクロン酸抱合物の部に存在することが認められた (図 4)。ついでマウスを用いた実験については、 $^{14}\text{C}$  キノホルム 投与後小腸内容物のクロロホルム溶性分画 (遊離型) のキノホルムは全分画の  $14\%$  を示した (前述)<sup>注)</sup>

以上を総括すれば、キノホルムは主としてグルクロン酸抱合物の形で胆汁に放出され、その一部は腸内細菌や腸粘膜で再び遊離の形となって吸収され、他の部は抱合物の形で再吸収されと思われる。

一方、 $^{131}\text{I}$  キノホルム 投与、 $^{14}\text{C}$  キノホルム 投与 ハツカネズミ の小腸に含まれる放射能値の半減期

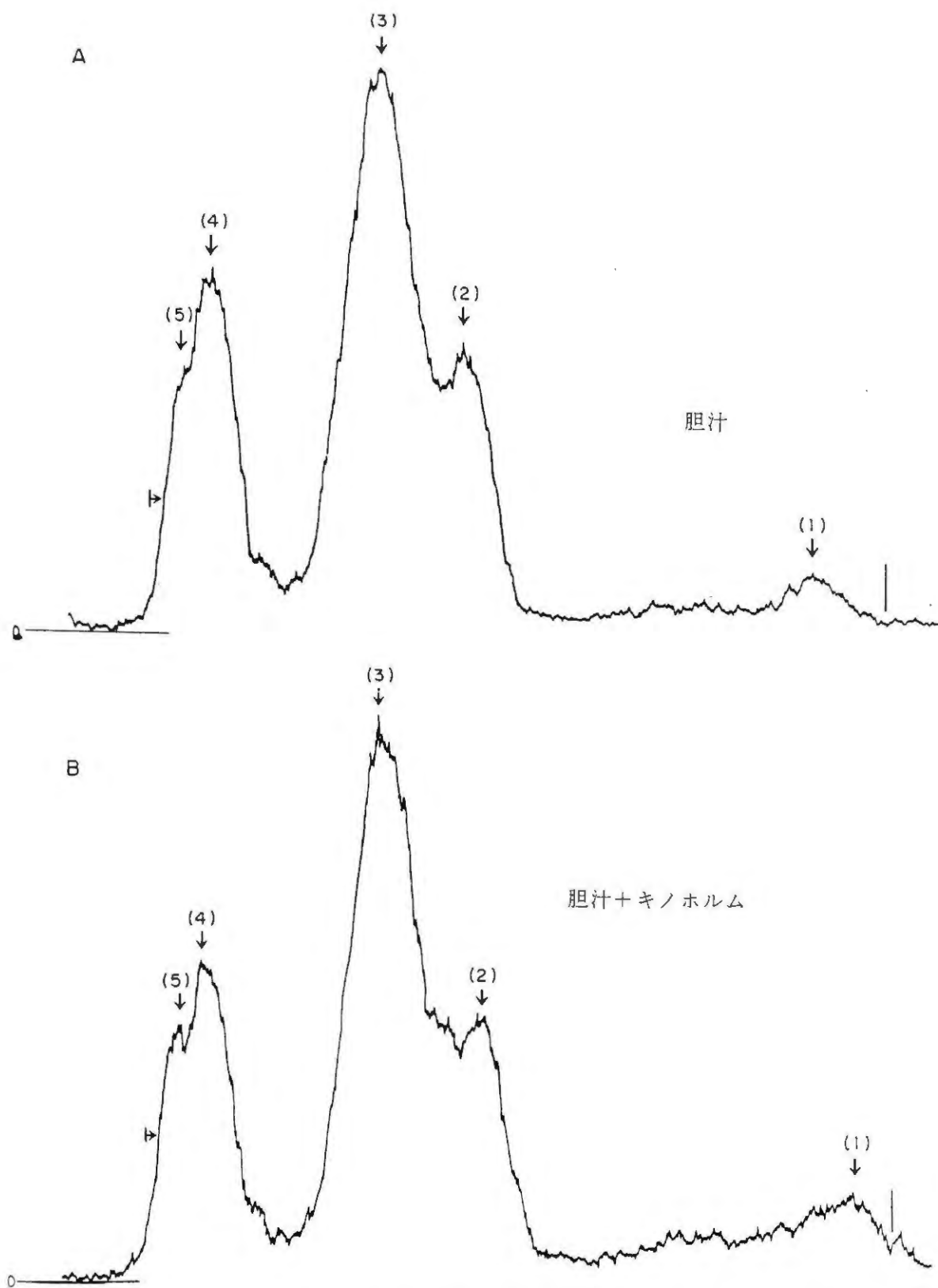


図3  $^{14}\text{C}$ キノホルム尾静脈注射1時間後のハツカネズミの胆汁中の radio paper chromatogram (注射量  $1\ \mu\text{C}$ )

A: 遊離キノホルムの添加前

B: 添加後

縦軸: 放射能値

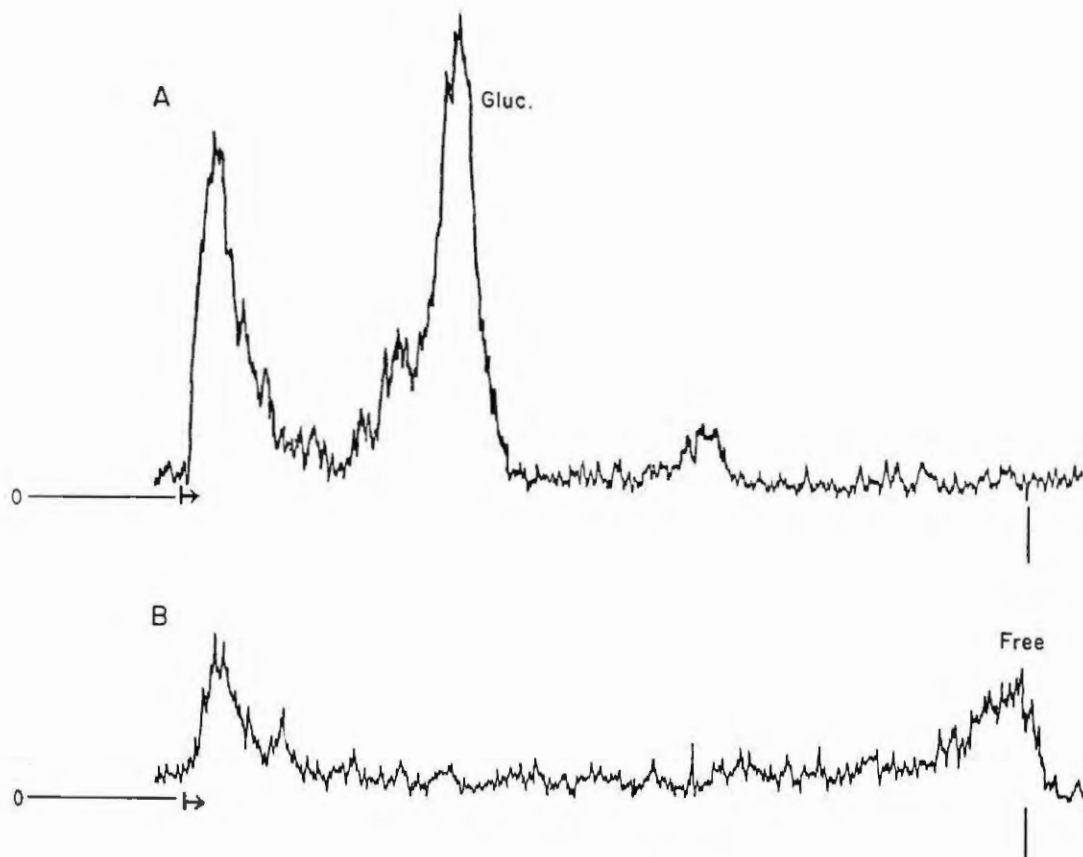


図4  $^{14}\text{C}$ キノホルム投与後のビーグル犬の胆汁の radio  
paper chromatogram (投与量図3に同じ・腹腔内注射)

A:  $\beta$ -グルクロニダーゼ作用前

B:  $\beta$ -グルクロニダーゼ作用後

(主峯が減少し先端の遊離キノホルムが増加している) Gluc=グルクロン  
酸抱合物

縦軸: 放射能値

は、全分画、クロロホルム溶性共に他臓器に比較して長い(後述)。この要因の一部としてキノホルムの再吸収が考えられる。なお、 $^{14}\text{C}$ キノホルム(1.6 mc/mM)を一匹当り375 $\mu\text{g}$ を0.3 mlの0.05 N・NaOHに溶解して尾静脈に注射後の臓器分布を調べた(表5, 図6)。

(a) 1時間後の放射能値; 一般臓器: 湿重量当たりの放射能値は、腎臓・血液・肝臓・肺臓・脂肪・小腸・脾臓の順に高かった。小腸内容物にも放射能値は認められた。

神経系: 坐骨神経は、中枢神経より高い(1~3倍)値が認められ、特にクロロホルム可溶性分画に高かった。

胆汁: 胆汁には1 g 当り血漿の約56倍の放射能値が認められた。小腸内容物中のクロロホルム抽出液(遊離キノホルムの指標)は全分画の14.3%であった<sup>注)</sup>(表4, 前述)。

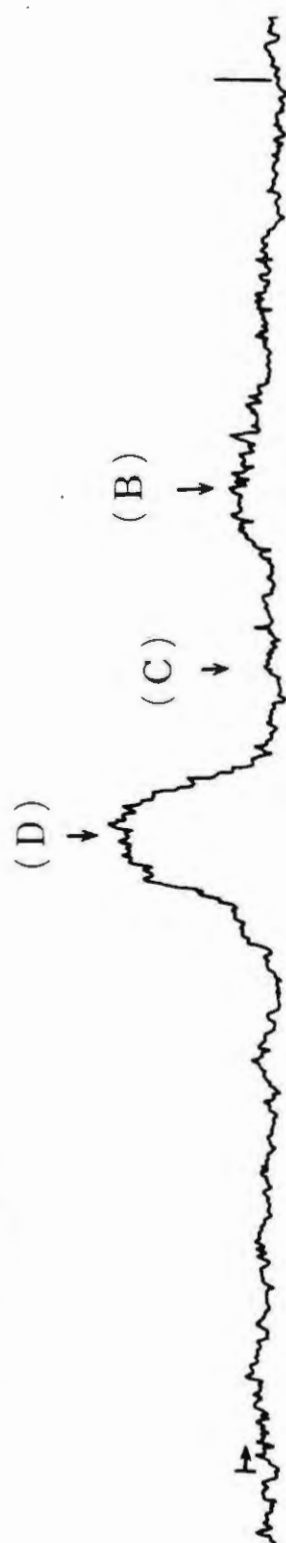
表5 ハツカネズミ(各6匹)に $^{14}\text{C}$ キノホルム尾静脈注射後の臓器分布〔1.63mc/mMを(約0.2 $\mu\text{C}$ , 375 $\mu\text{g}$ )投与〕

| 臓器 \ 時間 | 1 時 間 後          |                 |                   | 3 時 間 後         |                 |                | 8 時 間 後        |                |                |
|---------|------------------|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|         | 全カウント            | クロロホルム<br>可 溶   | クロロホルム<br>不 溶     | 全カウント           | クロロホルム<br>可 溶   | クロロホルム<br>不 溶  | 全カウント          | クロロホルム<br>可 溶  | クロロホルム<br>不 溶  |
| 血 液     | 40.3 $\pm$ 8.3   |                 |                   | 10.6 $\pm$ 3.3  |                 |                | 8.8 $\pm$ 5.8  |                |                |
| 大 脳     | 2.9 $\pm$ 1.2    | 11.3 $\pm$ 0.5  | 1.1 $\pm$ 0.3     | 1.3 $\pm$ 0.6   | 0.5 $\pm$ 0.2   | 0.4 $\pm$ 0.3  | 0.6            | 0.2 $\pm$ 0.1  | 0.4 $\pm$ 0.1  |
| 小 脳     | 2.6 $\pm$ 0.5    | 1.4 $\pm$ 0.3   | 1.0 $\pm$ 0.2     | 1.0 $\pm$ 0.6   | 0.6 $\pm$ 0.4   | 0.5 $\pm$ 0.4  | 1.0            | 0.4 $\pm$ 0.2  | 0.9 $\pm$ 0.7  |
| 脳 幹     | 2.4 $\pm$ 0.7    | 2.0 $\pm$ 0.3   | 1.3 $\pm$ 0.9     | 1.1 $\pm$ 0.7   | 0.7 $\pm$ 0.4   | 0.6 $\pm$ 0.3  | 0.8 $\pm$ 0.3  | 0.3 $\pm$ 0.1  | 0.3 $\pm$ 0.2  |
| 腰 骨 髄   | 2.5 $\pm$ 0.4    | 1.7 $\pm$ 0.5   | 0.8 $\pm$ 0.2     | 1.7 $\pm$ 0.9   | 1.0 $\pm$ 0.9   | 0.6 $\pm$ 0.5  | 0.9 $\pm$ 0.4  | 0.5 $\pm$ 0.3  | 0.4 $\pm$ 0.3  |
| 坐 骨 神 経 | 2.4 $\pm$ 0.5    | 2.7 $\pm$ 2.5   | 1.5 $\pm$ 0.7     | 2.3 $\pm$ 1.4   | 1.6 $\pm$ 2.3   | 1.8 $\pm$ 2.1  | 2.4            | 1.4 $\pm$ 1.2  | 1.2 $\pm$ 0.5  |
| 肝 臓     | 36.9 $\pm$ 10.8  | 12.8 $\pm$ 4.6  | 28.8 $\pm$ 10.5   | 18.2            | 6.3 $\pm$ 2.4   | 12.4 $\pm$ 7.7 | 10.8 $\pm$ 3.1 | 2.4 $\pm$ 1.5  | 10.4 $\pm$ 4.6 |
| 腎 臓     | 169.0 $\pm$ 70.2 | 99.6 $\pm$ 48.6 | 286.8 $\pm$ 142.9 | 66.6 $\pm$ 59.2 | 28.7 $\pm$ 26.8 |                | 53.3           | 12.4 $\pm$ 9.8 |                |
| 脂 肪     | 14.5 $\pm$ 4.4   | 10.9 $\pm$ 9.0  | 6.6 $\pm$ 1.8     | 5.5 $\pm$ 4.9   | 3.4 $\pm$ 2.4   | 2.0 $\pm$ 1.1  | 2.7 $\pm$ 2.1  | 0.8 $\pm$ 0.3  | 1.6 $\pm$ 0.7  |
| 肺 臓     | 33.3 $\pm$ 9.1   | 14.5 $\pm$ 5.8  | 15.9 $\pm$ 6.3    | 13.4            | 6.7 $\pm$ 3.1   | 5.6 $\pm$ 2.6  | 8.0 $\pm$ 1.6  | 3.2 $\pm$ 1.8  | 4.5 $\pm$ 1.6  |
| 小 腸     | 12.7 $\pm$ 7.8   | 4.5 $\pm$ 1.9   | 13.4 $\pm$ 10.8   | 11.1 $\pm$ 5.2  | 3.9 $\pm$ 2.5   |                | 6.7            | 1.7 $\pm$ 1.5  | 1.7 $\pm$ 0.8  |
| 脾 臓     | 8.8 $\pm$ 2.3    | 5.4 $\pm$ 1.5   | 5.1 $\pm$ 0.6     | 5.3 $\pm$ 1.8   | 2.3 $\pm$ 1.1   | 2.7 $\pm$ 1.3  | 2.3            | 0.8 $\pm$ 0.3  | 1.3 $\pm$ 0.2  |
| 胆 汁     | 2270.1           |                 |                   | 1248.6          |                 |                | 1492.9         |                |                |

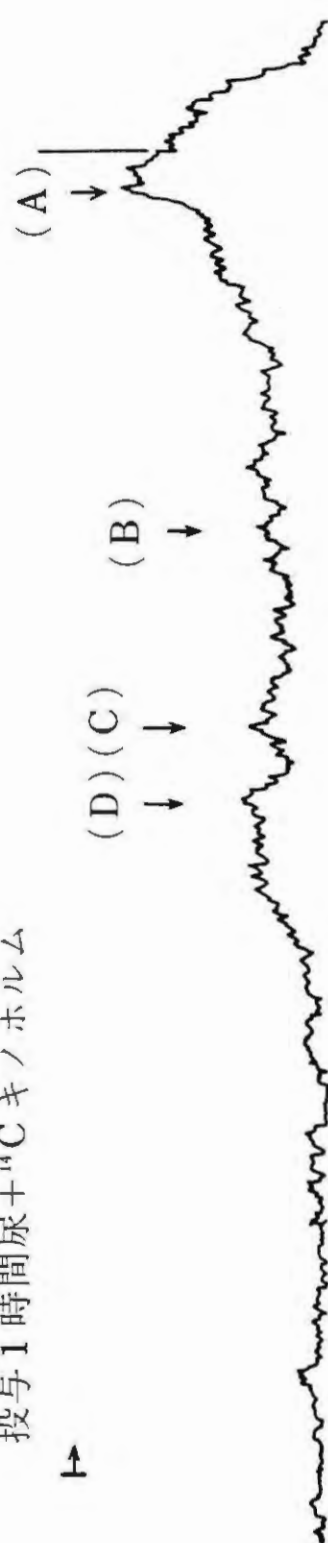
(各時間6匹使用)全分画は各分画の $\mu\text{g}$ /臓器湿重量g( $\pm\sigma$ )



投与1時間尿



投与1時間尿+ $^{14}\text{C}$ キノホルム



正常尿+ $^{14}\text{C}$ キノホルム



図5.  $^{14}\text{C}$ キノホルム投与1時間後のハツカネズミの尿のradio paper-chromatogram(投与量図3に準じ、静脈内注射)注;尿は胆汁と異りfreeのキノホルムは殆んど存在しない。  
縦軸:放射能値

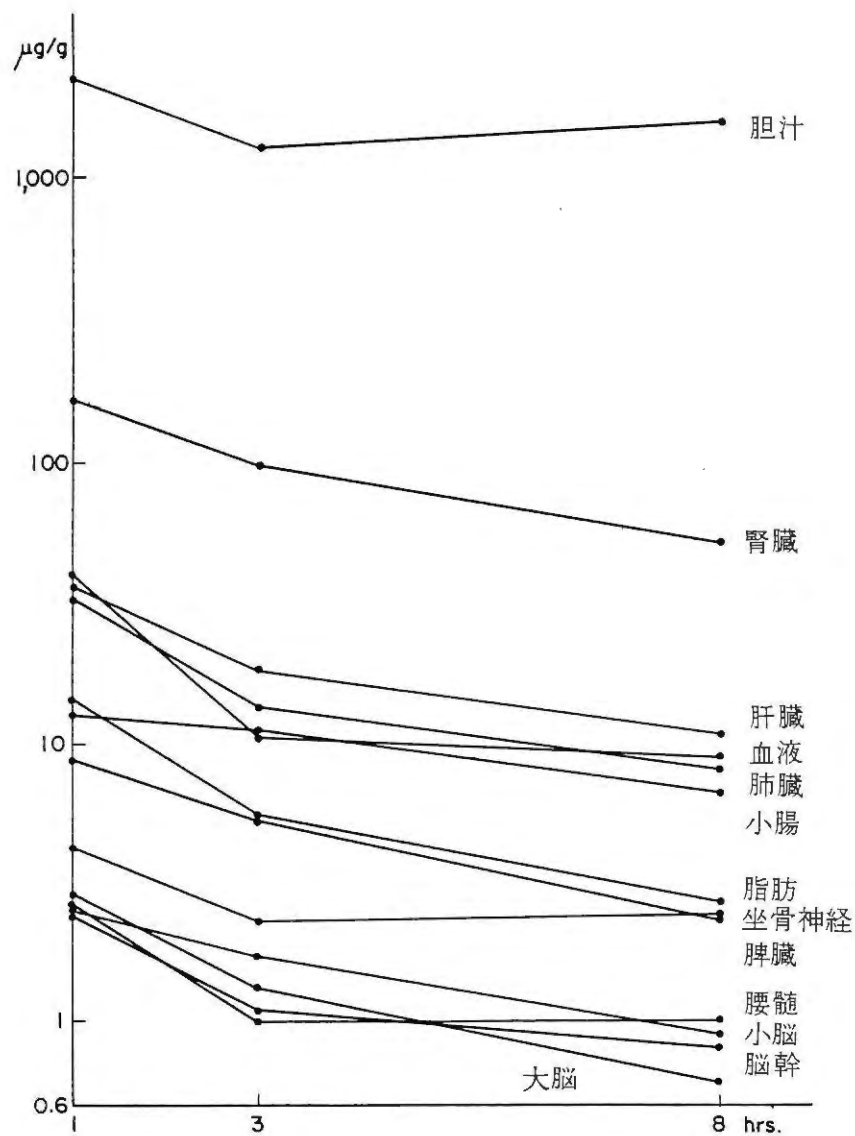


図6 ハツカネズミに $^{14}\text{C}$ キノホルム尾静脈注射後の臓器分布 ( $\mu\text{g/g}$  湿重量)

- (b) 半減期；一般に各臓器の減少度の差は少ないが、小腸の半減期が長い傾向が認められた。クロロホルム溶性分画においても同じ傾向があった。この事実は、キノホルムの胆汁に排泄後の再吸収に関係があると推定される。
- (c) クロロホルム溶性分画；全分画に対するクロロホルム分画の比率は、一般臓器よりも中枢および末梢神経系に高く、脂肪に富む臓器に遊離キノホルムが入りやすい事が推定され、この事はp-amino馬尿酸等は脳関門を通りにくいという報告と一致する。またすべての臓器に於て時間と共に遊離キノホルムの比率は減少するので遊離キノホルムが結合キノホルムに変化していることが考えられる

(表5)。この成績は血漿を透析した場合、透析され得るキノホルム抱合物全分画に対する比率が注射後の時間と共に増加するという Liewendahl<sup>12)</sup> の成績と一致する。

表6  $^{14}\text{C}$  キノホルム経口投与によるハツカネズミ (4匹) 臓器内分布  
(1.5 mg を 0.15 mg C・M・C 添加, 胃ゾンデにより投与)

|      |    |                  |
|------|----|------------------|
| 大    | 脳  | $0.61 \pm 0.10$  |
| 小    | 脳  | $0.87 \pm 0.07$  |
| 脳    | 幹  | $0.94 \pm 0.22$  |
| 頸    | 髄  | $1.06 \pm 1.02$  |
| 腰    | 髄  | $0.89 \pm 0.31$  |
| 坐骨   | 神経 | $1.12 \pm 0.43$  |
| 肝    | 臓  | $13.55 \pm 1.88$ |
| 腎    | 臓  | $24.39 \pm 3.18$ |
| 十二指腸 |    | $20.06 \pm 5.64$ |
| 結    | 腸  | $5.64 \pm 2.07$  |
| 脾    | 臓  | $2.87 \pm 0.79$  |
| 肪    | 肪  | $2.21 \pm 0.57$  |
| 肺    | 臓  | $4.40 \pm 1.68$  |
| 血    | 漿  | $8.10 \pm 2.34$  |

( $m \pm \sigma$ )  $\mu\text{g}/\text{湿重量}$

## 2) $^{14}\text{C}$ キノホルムのハツカネズミ経口投与 (3時間後) (表6)

ハツカネズミ (20 g) 4匹に  $^{14}\text{C}$  キノホルムを一匹あたり 1.5 mg を C・M・C・0.15 mg に加えて蒸留水 0.375 ml に溶かして経口投与し、3時間後に瀉血致死せしめた。

一般臓器；放射能値は、腎臓・十二指腸・肝臓・血漿・結腸・肺臓・脾臓・脂肪の順に高かった。

神経系；神経系にも放射能値の分布が認められたが、坐骨神経は、中枢神経系よりやや高かった。分布量と投与量との注射法との比較については後述する。

## 3) $^{131}\text{I}$ キノホルム経口投与ハツカネズミの生体内及び臓器内放射能値 (1～8日の経過)

経口投与は放射性キノホルムに非放射性キノホルムを加え、体重約 20 g の ddN 系ハツカネズミに 20 mg/kg (12.5  $\mu\text{C}/\text{kg}$ ) の割合に希釈し、胃ゾンデを用いて投与した。

a) 1回投与時；放射能値の対数値は投与後の時間に対して、直線関係を示しながら減衰する。投与24時間後の全身の放射能値は38%で、48時間後には1.1%の残留しか認めなかった (図7)。

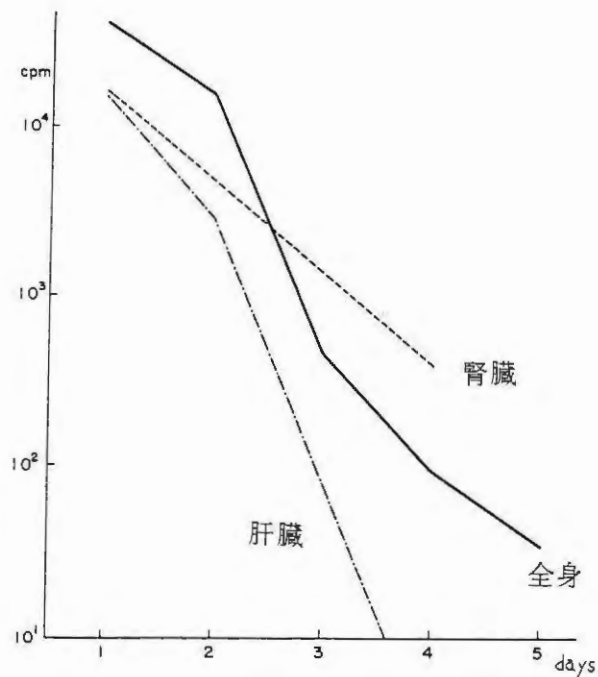


図7  $^{131}\text{I}$  キノホルムをハツカネズミに経口投与後の放射能値の経日変動

————— 全身放射能値  
 - - - - - 肝臓放射能値  
 - · - · - 腎臓放射能値

その半減期は第1日17時間・第2日5時間であった。第1日には腸管残留キノホルムのため半減期の半減期・10時間は、肝臓のそれ(第1日の半減期・14時間)よりもすみやかであり、キノホルムが腎臓に集積して尿中に排泄される経過が推定された。なお、 $1.25\mu\text{C}$  腹腔内投与時にも全分画

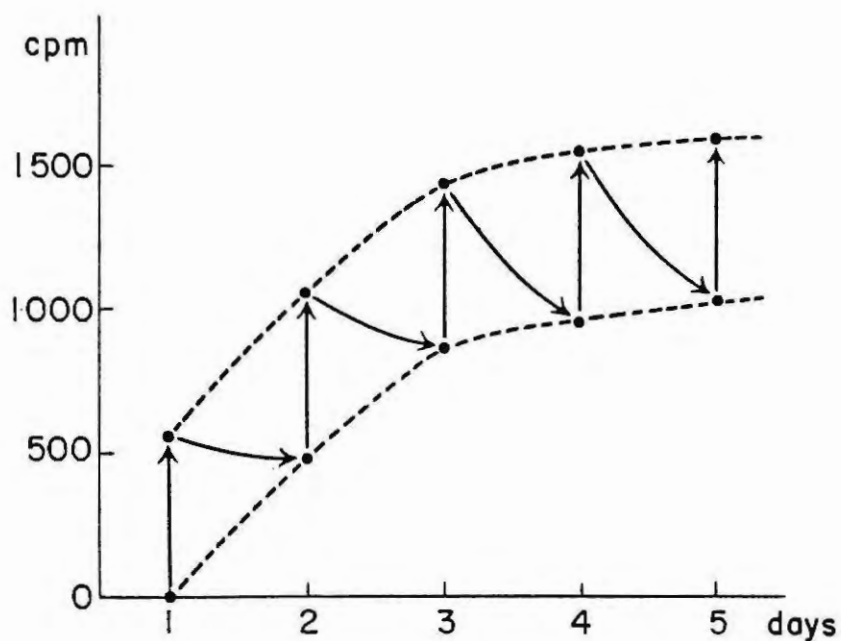


図8  $^{131}\text{I}$  キノホルム連続(1日1回)経口投与後のハツカネズミの全身計数

表 7 Roach の理論による計算値 (腸管内)

(Cは投与量)

| 吸収率 | 吸 収<br>時 間 | 投 与<br>間 隔    | 半減期  | 投与<br>前後 | 1 回     | 2 回     | 3 回     | 4 回     | 5 回     | 6 回     | 7 回     | 8 回     | 9 回     | 10 回    | 11 回    |
|-----|------------|---------------|------|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 20% | 4 h        | 24 h          | 12 h | 前        | 0       | 0.119 C | 0.148 C | 0.156 C | 0.158 C | 0.158 C |         |         |         |         |         |
|     |            |               |      | 後        | 0.307 C | 0.384 C | 0.403 C | 0.407 C | 0.409 C |         |         |         |         |         |         |
| 20% | 4 h        | 8 h<br>(1日3回) | 12 h | 前        | 0       | 0.09 C  | 0.148 C | 0.184 C | 0.207 C | 0.221 C | 0.230 C | 0.235 C | 0.239 C | 0.241 C | 0.243 C |
|     |            |               |      | 後        | 0.123 C | 0.201 C | 0.250 C | 0.281 C | 0.300 C | 0.312 C | 0.320 C | 0.325 C | 0.328 C | 0.329 C | 0.330 C |
| 20% | 12 h       | 24 h          | 12 h | 前        | 0       | 0.043 C | 0.054 C | 0.056 C | 0.057 C | 0.057 C |         |         |         |         |         |
|     |            |               |      | 後        | 0.108 C | 0.135 C | 0.142 C | 0.144 C | 0.144 C |         |         |         |         |         |         |
| 15% | 4 h        | 24 h          | 12 h | 前        | 0       | 0.089 C | 0.111 C | 0.117 C | 0.118 C | 0.119 C |         |         |         |         |         |
|     |            |               |      | 後        | 0.23 C  | 0.288 C | 0.302 C | 0.306 C | 0.307 C |         |         |         |         |         |         |
| 15% | 4 h        | 8 h<br>(1日3回) | 12 h | 前        | 0       | 0.068 C | 0.111 C | 0.138 C | 0.155 C | 0.166 C | 0.173 C | 0.177 C | 0.179 C | 0.181 C | 0.182 C |
|     |            |               |      | 後        | 0.092 C | 0.151 C | 0.188 C | 0.211 C | 0.225 C | 0.234 C | 0.240 C | 0.244 C | 0.246 C | 0.247 C | 0.248 C |
| 15% | 12 h       | 24 h          | 12 h | 前        | 0       | 0.032 C | 0.040 C | 0.042 C | 0.043 C | 0.043 C |         |         |         |         |         |
|     |            |               |      | 後        | 0.081 C | 0.101 C | 0.107 C | 0.108 C | 0.108 C |         |         |         |         |         |         |
| 40% | 4 h        | 24 h          | 12 h | 前        | 0       | 0.283 C | 0.366 C | 0.394 C | 0.402 C | 0.404 C |         |         |         |         |         |
|     |            |               |      | 後        | 0.639 C | 0.832 C | 0.890 C | 0.907 C | 0.912 C |         |         |         |         |         |         |
| 40% | 4 h        | 8 h<br>(1日3回) | 12 h | 前        | 0       | 0.192 C | 0.320 C | 0.406 C | 0.464 C | 0.502 C | 0.528 C |         |         |         |         |
|     |            |               |      | 後        | 0.25 C  | 0.418 C | 0.530 C | 0.605 C | 0.658 C | 0.690 C |         |         |         |         |         |

及びクロロホルム溶性分画において、坐骨神経に高い分布が認められた。又胆汁には1 g 当り血液の8倍の放射能値が認められた。

b) 連日経口投与時；ハツカネズミに  $^{131}\text{I}$  キノホルム (20 mg/kg, 250  $\mu\text{C}$ /kg) を毎日連続投与し、体内に残留する放射能値を全身計数法により測定した (図8)。その成績は体内蓄積量の増加にたがって排泄量も増加するために、第5日目には計数はほぼ平衡状態に達することがわかった。またその際の各回投与前の体内蓄積量は、5日後では1回投与の約2倍であることが認められた。Roach<sup>11)</sup>の理論によるキノホルムの推定計算値は〔表7〕に示す。

表8  $^{125}\text{I}$  キノホルムをハツカネズミに3  $\mu\text{C}$  静注1日後の臓器分布 (放射能値, cpm)

| 動物 |                       | 血液/g     | 胆汁/g         | 小腸/g       | 眼球/g         | 尿/1日量<br>(0.5 ml) |
|----|-----------------------|----------|--------------|------------|--------------|-------------------|
| 1  | クロロホルム<br>可溶成分<br>全分画 | —<br>646 | ÷ 0<br>4,540 | —<br>775   | 40<br>4,820  | —<br>—            |
| 2  | クロロホルム<br>可溶成分<br>全分画 | —<br>725 | 220<br>4,820 | —<br>1,170 | ÷ 0<br>2,760 | 94,950<br>645,150 |

#### 4) $^{125}\text{I}$ キノホルムのハツカネズミへの静脈注射後の臓器内分布 (表8)

3  $\mu\text{C}$  の  $^{125}\text{I}$  キノホルムをハツカネズミの尾静脈に注射し、24時間後の放射能値を測定した。特に注目すべきことは、胆汁中に1 g 当り血液の6.6—7.0倍の放射能値が認められ、かつ、その放射能値はクロロホルム不溶で、水に可溶性の成分に多く存在することであり、キノホルムの一部は肝臓で抱合され、胆汁中に放出されることを結論づけている。そして、小腸にはかなりの放射能値が認められる。この結果、キノホルムの一部は腸肝循環を行なうことが推定される。放射能値の存在は眼球にも認められるが、その成分は主として、クロロホルムに不溶性で、水に可溶性の分画であった。又、坐骨神経には中枢神経の2—5倍の放射能値の分布を、全分画及びクロロホルム溶性分画に認められた。

#### C-2 ダイコクネズミ

##### 1) $^{131}\text{I}$ キノホルム、ダイコクネズミ尾静脈注射 (1—24時間後)

ダイコクネズミ (約200 g, 雌) 各群6匹に、 $^{131}\text{I}$  キノホルム12  $\mu\text{C}$  を尾静脈に注射後の臓器分布を調べた〔表9・図9〕

一般臓器；注射後1時間においては、腎臓・肝臓・肺臓・脂肪・血液・小腸の順である。

末梢神経系；坐骨神経に高い蓄積が認められた。そしてその値は中枢神経系の3—4倍を示した。

中枢神経系；腰髄・脳幹・小脳・大脳の順であって、腰髄が大脳・小脳にくらべてやや高かった。



表 9  $^{131}\text{I}$  キノホルム尾静脈注射ダイコクネズミ (12 $\mu\text{C}$ ) の臓器内放射能値分布 (cpm)

|      | 1 時 間 後           |                  |                  | 3. 5 時 間 後       |                |                | 2 4 時 間 後      |              |                |
|------|-------------------|------------------|------------------|------------------|----------------|----------------|----------------|--------------|----------------|
|      | 全測定               | クロロホルム可溶分画       | クロロホルム不溶分画       | 全測定              | クロロホルム可溶分画     | クロロホルム不溶分画     | 全測定            | クロロホルム可溶分画   | クロロホルム不溶分画     |
| 血 液  | 7,772<br>(701)    | 1,008<br>(117)   | 3,151<br>(1,029) | 3,094<br>(271)   | 186<br>(63)    | 2,800<br>(334) | 2,657<br>(-)   | 13<br>(5)    | 1,359<br>(461) |
| 大 腦  | 1,105<br>(292)    | 527<br>(145)     | 579<br>(147)     | 277<br>(75)      | 162<br>(37)    | 143<br>(46)    | 167<br>(52)    | 21<br>(12)   | 145<br>(43)    |
| 小 腦  | 1,391<br>(414)    | 1,056<br>(348)   | 335<br>(69)      | 218<br>13(31)    | 76<br>(29)     | 143<br>(24)    | 111<br>(22)    | 0            | 111<br>(22)    |
| 脳 幹  | 1,469<br>(527)    | 739<br>(253)     | 730<br>(724)     | 558<br>(190)     | 461<br>(164)   | 123<br>(33)    | 112<br>(21)    | 19<br>(10)   | 92<br>(23)     |
| 腰 髓  | 1,601<br>(405)    | 1,392<br>(439)   | 209<br>(36)      | 630<br>(333)     | 392<br>(195)   | 238<br>(142)   | 182<br>(34)    | 69<br>(56)   | 113<br>(37)    |
| 坐骨神経 | 4,365<br>(1,527)  | 2,681<br>(895)   | 1,686<br>(632)   | 2,613<br>(802)   | 1,688<br>(473) | 924<br>(335)   | 996<br>(274)   | 257<br>(107) | 739<br>(355)   |
| 眼 球  | 605               | -                | -                | 472<br>(4)       | -              | -              | -              | -            | -              |
| 肝 臓  | 14,961<br>(4,535) | 4,628<br>(1,582) | 5,484<br>(1,337) | 8,010<br>(1,220) | 1,812<br>(365) | 4,894<br>(650) | 4,016<br>(484) | 495<br>(142) | 3,066<br>(488) |
| 腎 臓  | 16,807<br>(2,222) | 5,299<br>(1,208) | 9,947<br>(1,739) | 9,619<br>(1,641) | 1,592<br>(119) | 9,458<br>(649) | 6,764<br>(635) | 513<br>(23)  | 3,437<br>(390) |
| 脾 臓  | 3,416<br>(1,023)  | -                | -                | 3,909<br>(327)   | -              | -              | 2,632<br>(539) | -            | -              |
| 脂 肪  | 9,336<br>(3,107)  | -                | -                | 6,344<br>(1,798) | -              | -              | -              | -            | -              |
| 小 腸  | 6,922<br>(139)    | -                | -                | 1,832<br>(192)   | -              | -              | 1,538<br>(595) | -            | -              |
| 肺 臓  | 11,347<br>(3,028) | -                | -                | 8,884<br>(1,850) | -              | -              | 4,879<br>(-)   | -            | -              |

( ) 内は平均誤差

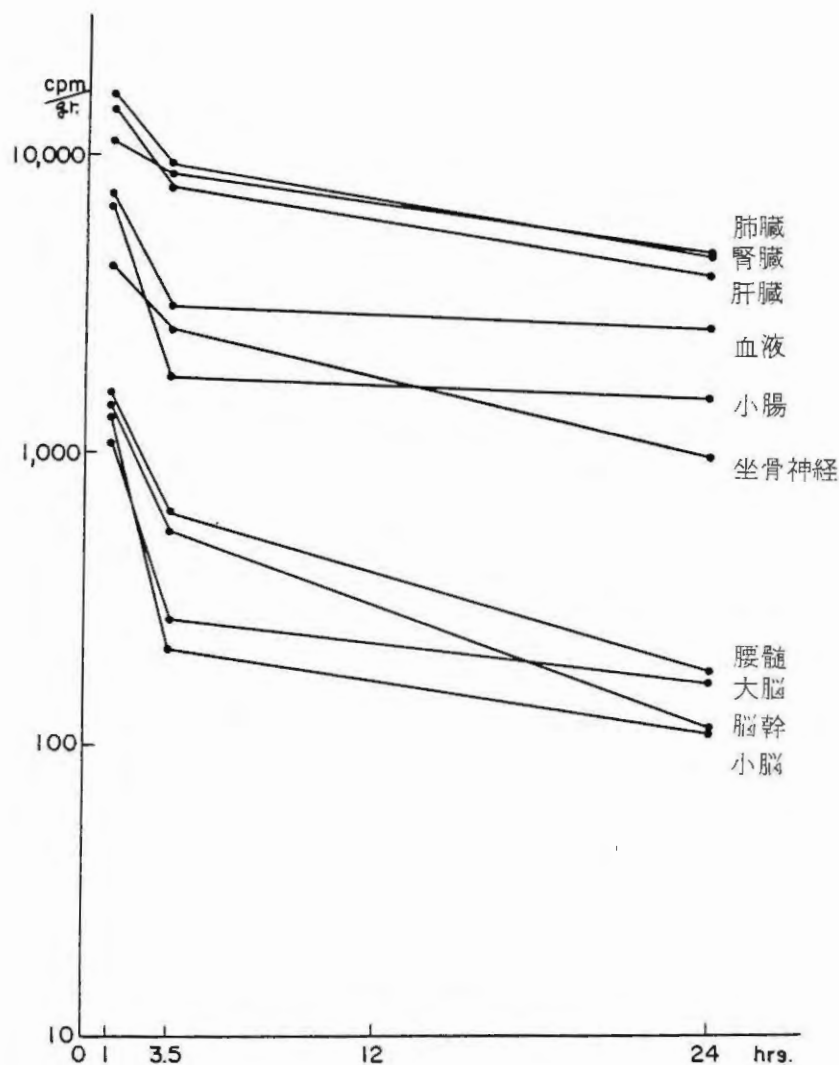


図9  $^{131}\text{I}$  キノホルム 静脈注射ダイコクネズミの各臓器における放射能値の時間的変動  
(縦軸 cpm / gr 湿重量)

クロロホルム 溶性分画；1時間後一般臓器では全放射能値の約  $1/4$  を示したが、神経系では高く  $1/2$  以上を示した。そして、時間の経過とともに減少し、遊離キノホルムが減少し、抱合キノホルムに変化することが推定された。

半減期；一般臓器では大差がないが、肺臓及び小腸の半減期が比較的長い。後者はキノホルムの再吸収と関係ある事実と推定される。また、神経系では坐骨神経の半減期が明かに長く、但つ、クロロホルム 溶性分画の残留量が多い。この事実はダイコクネズミに、キノホルム投与で、坐骨神経炎を発症させるという小口の報告との関係を推定させるものである。<sup>29)</sup>

## 2) $^{131}\text{I}$ キノホルムのダイコクネズミ経口投与 (比較的長期の経口・8日後)

経口投与は放射性キノホルムに非放射性キノホルムを加え、体重  $1\text{ kg}$  当り  $20\text{ mg}$  の割合に希釈し、胃ゾンデを用いて投与した(表10, 図10)。

表 10 沃度標識キノホルムの生体内分布 (ダイコクネズミ, 日数単位の変動)

表 A  $^{131}\text{I}$  キノホルムの神経組織への移行 (cpm/g)

|                           | 1 日 後                  |             |                          |                                            |                            |                                            |             |                                            | 2 日後                   |             | 4 日後                   |             | 8 日後                   |                                            |
|---------------------------|------------------------|-------------|--------------------------|--------------------------------------------|----------------------------|--------------------------------------------|-------------|--------------------------------------------|------------------------|-------------|------------------------|-------------|------------------------|--------------------------------------------|
| 投与方法                      | 経 口<br>( 6.3 $\mu$ c ) |             | 腹 腔 内<br>(1.25 $\mu$ c ) |                                            | 静 脈 内 ☆<br>( 4.0 $\mu$ c ) |                                            |             |                                            | 経 口<br>( 6.3 $\mu$ c ) |             | 経 口<br>( 6.3 $\mu$ c ) |             | 経 口<br>( 6.3 $\mu$ c ) |                                            |
| 実 験 番 号                   | I                      | II          | VIII                     |                                            | IX                         |                                            | X           |                                            | III                    | IV          | V                      | VI          | VII                    |                                            |
|                           | 全<br>分<br>画            | 全<br>分<br>画 | 全<br>分<br>画              | ク<br>ロ<br>ロ<br>ホル<br>ム<br>可<br>溶<br>分<br>画 | 全<br>分<br>画                | ク<br>ロ<br>ロ<br>ホル<br>ム<br>可<br>溶<br>分<br>画 | 全<br>分<br>画 | ク<br>ロ<br>ロ<br>ホル<br>ム<br>可<br>溶<br>分<br>画 | 全<br>分<br>画            | 全<br>分<br>画 | 全<br>分<br>画            | 全<br>分<br>画 | 全<br>分<br>画            | ク<br>ロ<br>ロ<br>ホル<br>ム<br>可<br>溶<br>分<br>画 |
| 大 脳                       | 95                     | 100         | 26                       | 0                                          | 24                         | 15                                         | 23          | 0                                          | —                      | 84          | 90                     | 0           | 0                      | 7                                          |
| 小 脳                       | 400                    | 90          | 68                       | 0                                          | 7                          | 0                                          | 86          | 0                                          | 261                    | —           | 0                      | 0           | 0                      | 17                                         |
| 脳 幹                       | 194                    | 77          | 0                        | —                                          | 95                         | 50                                         | 200         | 64                                         | 241                    | 97          | 0                      | 0           | 0                      | 0                                          |
| 頸 髄                       | 125                    | 96          | 0                        | 0                                          | 95                         | 0                                          | 293         | 0                                          | 335                    | 360         | 40                     | 0           | 0                      | 0                                          |
| 腰 髄                       |                        |             |                          |                                            | 95                         | 0                                          | 271         | 125                                        |                        | 390         |                        |             | 16                     | 0                                          |
| 坐骨神経                      | 1,013                  | 813         | 1,052                    |                                            | 562                        | 350                                        | 466         | 26                                         | 783                    | 551         | 350                    | —           | 261                    | 127                                        |
| 血 液                       | 872                    | 538         | 102                      |                                            | 2,230                      |                                            | 848         |                                            | 124                    | 692         | 73                     | 43          | 62                     |                                            |
| アイソトープ<br>投与量 ( $\mu$ c ) | 6.3                    | 6.3         | 1.25                     |                                            | 4.0                        |                                            | 1.2         |                                            | 6.3                    | 6.3         | 6.3                    | 6.3         |                        |                                            |

☆  $^{125}\text{I}$  キノホルム

表 B  $^{125}\text{I}$  キノホルム投与ラットの臓器内分布 (9 $\mu\text{C}$ をCMC添加後経口投与3回)  
(毎日投与1日後, cpm/g 湿重量)

|                |                   | 肝     | 腎     | 脾   | 血 漿   | 血 球 | 脂 肪 | 坐骨神経 |
|----------------|-------------------|-------|-------|-----|-------|-----|-----|------|
| キノホルム<br>投与ラット | クロロホルム<br>可 溶 成 分 | 165   | 94    | 61  | 73    | 254 | 80  | 45   |
|                | 全 分 画             | 1,655 | 1,160 | 463 | 2,442 | 686 | 240 | 283  |

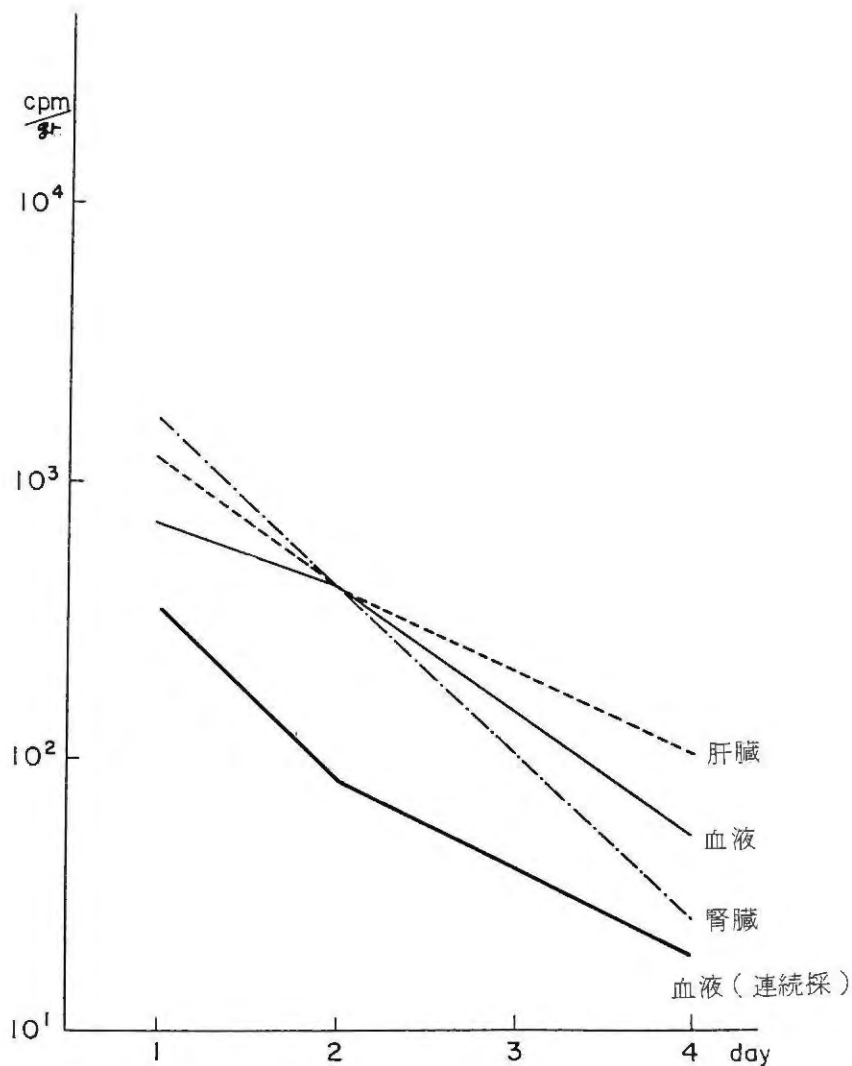


図 10  $^{131}\text{I}$  キノホルム経口投与ダイコクネズミの血液及び臓器放射能値の経日変動  
(縦軸, cpm/gr 湿重量)

- a) 血液；血液中の放射能値は速かに減少し，48時間後に24時間値の24%，72時間後には3%であり，減衰の半減期は12時間であった。
- b) 腎臓；腎臓の放射能値は対照の血液よりはるかに高く，かつ，速かに減少し，半減期は12時間を示した。
- c) 肝臓；肝臓においても血液より高い放射能値が認められ，その半減期は14時間であった。
- d) 肝細胞分画；肝細胞分画中では上清 (98.5 cpm/mg)，マイクロゾーム (67.2 cpm/mg)，及びミトコンドリア (14.0 cpm/mg)，核 (10.4 cpm/mg) の順に放射能値が検出された。
- e) 末梢神経系；坐骨神経系における分布量が高く，但つ，蓄積の傾向を示しその半減期は約3.2日を示すことは重要な所見と考えられる。なおアクリルアミド中毒の際分布の特異性は長期放置後に明確<sup>28)</sup>になると言われる。
- f) 中枢神経系；その分布量は，末梢神経系に比べて低かったが，血液残留量測定量 (中枢神経系の

11)  
1%)を差引いても、なおその残留が認められた。

g) 尿中の放射能値; ダイコクネズミに  $^{131}\text{I}$  キノホルムを経口投与後の1日目における尿中の放射能値は247,413cpm/ml, 2日目66,979cpm/ml, 3日目3,071cpm/mlであった。7日間の放射能値より投与キノホルム放射能値を除して算出した吸収比はほぼ10~13%であった。この値は胆汁排泄値が含まれないので常用量20mg/kgを1回与えた際の最少の吸収値と考えられる。

又  $^{125}\text{I}$  キノホルム3回経口投与後の成績においても坐骨神経に高い分布が認められた。(表10B)

3)  $^{14}\text{C}$  キノホルムのダイコクネズミ腹腔内注射(1.5時間後)

$^{14}\text{C}$  キノホルム  $33\mu\text{C} \doteq 6.67\text{mg}/1\text{匹}$  (体重200g) を腹腔内注射1.5時間後に瀉血致死せしめ、臓器放射能を測定した(表11)。

表11  $^{14}\text{C}$  キノホルムのダイコクネズミ生体内臓器分布  
(1時間30分敢,  $33\mu\text{C}$   $0.1\text{N}$   $\text{NaOH}$  溶解腹腔内注射法で投与)

|     |    |      | * $\mu\text{g}/\text{g}$ 湿重量 |
|-----|----|------|------------------------------|
| 臓 器 |    |      | キノホルム量*                      |
| 血   |    | 漿    | 486.6                        |
| 前   | 頭  | 葉    | 14.19(2.92)                  |
| 小   |    | 脳    | 25.66                        |
| 脳   |    | 幹    | 32.82                        |
| 頸   |    | 随    | 24.50                        |
| 腰   |    | 随    | 51.69                        |
| 視   | 神  | 経    | 23.79                        |
| 頸部  | 後根 | 神経節  | 31.85                        |
| 上   | 腕  | 神経   | 28.96                        |
| 坐骨  | 神経 | (近位) | 35.25(7.24)                  |
| 肺   |    | 臓    | 61.50                        |
| 肝   |    | 臓    | 247.3(50.82)                 |
| 脾   |    | 臓    | 517.3                        |
| 膵   |    | 臓    | 307.0                        |
| 小   | 腸  | 壁    | 1,765                        |
| 小   | 腸  | 内容物  | 4,632                        |
| 腎   |    | 臓    | 509.3(104.7)                 |
| 脂   | 肪  | 組織   | 202.1                        |
| 顎   | 下  | 腺    | 31.65                        |

括弧内は血漿に対する比率(百分率)

一般臓器；脾臓・腎臓・膵臓・肝臓・小腸壁・肺臓の順で小腸内容物に特に高く、脂肪組織にも導入される。

末梢神経系；坐骨神経・頸部後根神経節・上腕神経・視神経の順であって、中枢神経系の1～2倍程度である。

中枢神経系；腰髄・脳幹・小脳・頸髄・前頭葉の順に分布する。

なお、<sup>14</sup>Cキノホルムのダイコクネズミの生体内代謝に関して高橋等<sup>36)</sup>は遊離キノホルムが組織のクロロホルム不溶性分画に存在することを証明している。同時にキノホルムはグルクロン酸抱合物として尿中に排泄されることを薄層クロマトグラムで証明している。

### C-3 犬

1) 雑犬およびキノホルム服用犬に<sup>131</sup>Iキノホルム腹腔内注射(3時間後)(表12)

表12 <sup>131</sup>Iキノホルム投与3時間後、健康イヌ及びキノホルム慢性投与イヌの臓器別分布  
(0.5mcをほぼ体重の等しい雑犬に腹腔内投与した)

|       | キノホルム服用犬  |            |            | 健康犬     |            |            |
|-------|-----------|------------|------------|---------|------------|------------|
|       | 全分画       | クロロホルム可溶分画 | クロロホルム不溶分画 | 全分画     | クロロホルム可溶分画 | クロロホルム不溶分画 |
| 血液    | 6,901     | —          | —          | 11,442  | —          | —          |
| 脳脊髄液  | —         | —          | —          | 42      | —          | —          |
| 前頭葉   | 736       | 241        | 409        | 438     | 181        | 182        |
| 海馬    | 612       | —          | —          | 518     | —          | —          |
| 中脳    | 189       | —          | —          | 498     | —          | —          |
| 小脳    | 790       | 320        | 402        | 468     | 100        | 258        |
| 脳下垂体  | —         | —          | —          | 2,438   | —          | —          |
| 頸髄    | 1,420     | 399        | 720        | 745     | 460        | 100        |
| 胸髄    | 103       | —          | —          | —       | —          | —          |
| 腰髄    | 2,455     | 1,066      | 557        | 833     | 294        | 348        |
| 視神経   | 3,247     | —          | —          | 1,378   | —          | —          |
| 坐骨神経  | 4,124     | 1,649      | 1,738      | 1,125   | 288        | 937        |
| 後根神経節 | 2,890     | 800        | 2,392      | 2,773   | —          | 168        |
| 胆汁    | 2,004,732 | —          | —          | 114,084 | 400        | 113,680    |

注) 胆汁の放射能値が高い

$^{131}\text{I}$  キノホルム 0.5 ml を健康犬とキノホルム服用犬に腹腔内注射投与した。

#### 非服用犬

一般臓器；胆汁には血液の10倍の分布が認められる。健康犬の腎臓は放射能 6,775 cpm/g, また、脾臓とリンパ腺に放射能が認められた。

末梢神経系；後根神経節と視神経，坐骨神経の順に分布が認められる。

中枢神経系；大脳，中脳，小脳よりも，頸髄腰髄の分布が高い。一方，脳下垂体に高い分布が認められる。

#### キノホルム服用犬

中枢神経系；脊髄は一般に大脳より高い。

末梢神経系；坐骨神経，視神経，後根神経節に分布する。

又胆汁には血液の30倍の分布の認められるのは注目すべきである。

キノホルム投与のために血中の放射能値は，非投与群の1/2に下がっている。キノホルム投与の有無にかかわらず，胆汁の比率が特に後者に高いことは，肝臓の抱合酵素の induction に関係があるのかもしれない。

#### 2) 犬を用いる実験

##### (a) 雑犬 $^{131}\text{I}$ キノホルム腹腔注射 (1.5時間後)

$^{131}\text{I}$  キノホルム 1 mc (比放射能 3 mc / 26 mg) を 1/10 N · NaOH に溶解後，腹腔注射麻酔で1.5時間後瀉血致死せしめ，臓器を摘出した(表13)。

一般臓器；腎・肝・十二指腸・脂肪・結腸・肺・脾・顎下線の順の濃度 (cpm/g 湿重量) で分布が認められる(表13)。この成績はほぼ <sup>49)</sup> Keberle らの成績と一致する。

末梢神経系；半月神経節，坐骨神経，後根神経，腓骨神経，視神経，上腕神経の順で濃度が認められ，その値は中枢神経系の約2倍であって，中枢神経系では脊髄の高い例以外は濃度差は認められない。それ故に，後根神経節は腰髄よりやや濃度は高く，網膜は視神経よりやや濃度は高い。

##### (b) ビーグル犬の $^{131}\text{I}$ キノホルム腹腔注射の健康雑犬との比較； $^{131}\text{I}$ キノホルム 1 mc · 比放射能 3 mc / 26 mg を 1/10 N NaOH に溶解後腹腔注射麻酔下で1.5時間後瀉血致死せしめ，臓器を摘出した(表13)。

一般臓器；腎・肝に特に高く，その血液に対する比率は雑犬より高い。ついで結腸・脾・十二指腸・肺・脾・舌筋・顎下線の順の濃度である。舌筋，顎下線の比較的高い分布は，<sup>18~20)</sup> SMON の緑舌と関係があるかもしれない。血液に対する肝臓の濃度は特に高い。また，十二指腸内容物の放射能値の高いことは腸肝循環と関係があると考えられる。

末梢神経系；上腕および坐骨神経に特に高く後根神経節，腓骨神経，半月神経節の順に高い。視神経は比較的低い。一方，網膜と下垂体には高い分布が認められる。その約50%はクロロホルム溶性成分である。



表 13 犬に  $^{131}\text{I}$  キノホルムを腹腔内投与 1.5 時間後の臓器中の放射能値 (cpm/g 臓器湿重量)  
(S.A. 3 mc / 2.6 mg のもの 1 mc 投与)

| 犬<br>臓<br>器 | 健康犬 (雑犬)  |               |               | ビーグル健康犬          |                  |               | ビーグル<br>[キ]服用犬 |
|-------------|-----------|---------------|---------------|------------------|------------------|---------------|----------------|
|             | 全カウント     | クロロホルム<br>可 溶 | クロロホルム<br>不 溶 | 全カウント            | クロロホルム<br>可 溶    | クロロホルム<br>不 溶 |                |
| 血 液         | 63,412    |               |               | 51,651           |                  |               | 1,374          |
| 髄 液         | 712       |               |               | 453              |                  |               | 19             |
| 大 脳         | 10,271    | 5,321         | 2,027         | 6,046            | 4,430            | 1,671         | 635            |
| 海 馬         | 9,354     | 5,721         | 2,052         | { 7,795<br>5,394 | { 6,696<br>3,737 |               | 115            |
| 下 垂 体       | 33,971    |               |               | 26,541           |                  |               | 752            |
| 小 脳         | 9,882     | 5,881         | 1,066         | 6,114            | 4,389            | 1,626         | 70             |
| 頸 髄         | 12,737    | 8,908         | 651           | 6,237            | 5,634            | 696           | 142            |
| 胸 髄         |           | 8,872         | 771           | 6,586            | 6,123            | 787           | 171            |
| 腰 髄         | 13,159    | 10,506        | 595           | 6,626            |                  |               | 136            |
| 視 神 経       | 21,176    |               |               | 7,200            |                  |               | 588            |
| 網 膜         | 23,541    |               |               | 21,071           |                  |               | 405            |
| 水 晶 体       | 2,835     |               |               | ,337             |                  |               | 218            |
| 後根神経節       | 23,369    |               |               | 22,205           |                  |               | 707            |
| 半月神経節       | 32,409    |               |               | 17,975           | 8,740            | 5,499         | 276            |
| 坐骨神経        | 29,187    | 16,897        | 9,947         | 37,146           | 26,164           | 8,427         |                |
| 腓骨神経        | 22,632    | 13,800        | 6,990         | 21,258           | 15,006           | 5,910         |                |
| 筋 肉         | 11,342    |               |               | 8,850            |                  |               | 502            |
| 上腕神経        | 20,408    | 17,342        | 2,543         | 42,512           | 8,679            | 23,966        | 644            |
| 尿           | 4,592,006 |               |               | 2,288,564        |                  |               | 71,234         |
| 胆 汁         | 2,058,914 |               |               | 1,711,388        |                  |               | 78,357         |
| 腎 臓         | 216,199   |               |               | 193,781          |                  |               |                |
| 肝 臓         | 117,071   |               |               | 170,557          |                  |               |                |
| 脾 臓         | 28,754    |               |               | 25,994           |                  |               | 292            |
| 肺 臓         | 39,212    |               |               | 29,894           |                  |               | 385            |
| 脾 臓         |           |               |               | 47,576           |                  |               | 490            |
| 十二指腸        | 71,809    |               |               | 29,899           |                  |               |                |
| 結 腸         | 52,649    |               |               | 128,456          |                  |               |                |
| 舌 筋         |           |               |               | 21,006           |                  |               |                |
| 腸 内 容 物     |           |               |               |                  |                  |               | 396,872        |
| 脂 肪         | 64,982    |               |               |                  |                  |               |                |
| 顎 下 腺       | 24,945    |               |               | 17,546           |                  |               |                |

表 1 4 ビーグル犬に  $^{14}\text{C}$  及び  $^{131}\text{I}$  キノホルム投与後の組織内分布  
( $^{14}\text{C}$  は  $250\mu\text{C}$   $50\text{mg}$  を  $5.8\text{kg}$  の犬に腹腔内投与)

| 臓 器       | 血 液 に 対 す る 比 率 %     |                        | $^{14}\text{C}$ キノホルム | $^{131}\text{I}$ キノホルム |
|-----------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
|           | $^{14}\text{C}$ キノホルム | $^{131}\text{I}$ キノホルム | $\mu\text{g/g}$ 湿重量   | $\text{cpm/g}$ 湿重量     |
| 血 液       | 100.0                 | 100.0                  | 2,753                 | 51,651                 |
| 髄 液       | 21.0                  | —                      | 0.058                 | —                      |
| 前 頭 葉     | 15.1                  | 11.7                   | 0.416                 | 6,046                  |
| 側 頭 葉     | 9.8                   | —                      | 0.271                 | —                      |
| 小 脳       | 12.3                  | 11.8                   | 0.340                 | 6,114                  |
| 中 脳       | 15.2                  | —                      | 0.418                 | —                      |
| 下 垂 体     | 41.1                  | 51.4                   | 1.131                 | 26,541                 |
| 頸 髄       | —                     | 12.1                   | —                     | 6,237                  |
| 胸 髄       | 17.2                  | 12.8                   | 0.473                 | 6,586                  |
| 腰 髄       | 18.2                  | 12.8                   | 0.502                 | 6,626                  |
| 後 根 神 經 節 | 36.9                  | 43.0                   | 1.016                 | 22,205                 |
| 坐 骨 神 經   | 31.9                  | 70.0                   | 0.878                 | 37,146                 |
| 腓 骨 神 經   | 22.3                  | 41.2                   | 0.614                 | 21,258                 |
| 硝 子 体     | 2.0                   | —                      | 0.056                 | —                      |
| 水 晶 体     | 0.8                   | —                      | 0.023                 | —                      |
| 網 膜       | —                     | 40.8                   | —                     | 21,071                 |
| 視 神 經     | 17.6                  | 15.9                   | 0.485                 | 7,200                  |
| 上 腕 神 經   | 45.5                  | 82.3                   | 1.252                 | 42,512                 |
| 半 月 神 經 節 | 19.5                  | 34.8                   | 0.536                 | 17,975                 |
| 胆 汁       | 52,742                | 3,313                  | 1,452.96              | 1,711,388              |
| 尿         | 9,629                 | 4,330                  | 265.27                | 2,288,564              |
| 肝 臓       | 444.8                 | 330.3                  | 12.254                | 170,557                |
| 副 腎       | 346.7                 | —                      | 9.55                  | —                      |
| 腎 臓       | 214.3                 | 375.2                  | 5.903                 | 193,781                |
| 十二指腸内容物   | 6,773.6               | 57.9                   | 186.6                 | 29,899                 |
| 脾 臓       | 48.5                  | 50.3                   | 1.336                 | 25,994                 |
| 肺 臓       | 58.8                  | 57.9                   | 1.619                 | 29,894                 |
| 小 腸 壁     | 34.9                  | —                      | 0.960                 | —                      |
| 脾 臓       | 477                   | 92.1                   | 13.145                | 47,576                 |
| 卵 巢       | 87.3                  | —                      | 2.406                 | —                      |
| 唾 液 腺     | 24.6                  | 34.0                   | 0.678                 | 17,546                 |
| 舌 筋       | 35.6                  | 40.7                   | 0.981                 | 21,006                 |
| 脛 骨 筋     | 15.5                  | —                      | 0.421                 | —                      |

中枢神経；大脳・小脳・延髄は雑犬に比べて低く，そして脊髄の分布はやや高い。髄液には放射能値はほとんど認められない。

キノホルム服用犬；腹腔や血液中に残存する非放射性キノホルムの影響により，投与した放射性キノホルムの比放射能の低下等によって，各臓器への放射能の導入が低かった。臓器相互の比較では，神経系において後根神経節，上腕神経，視神経における放射能値が高い。また下垂体は高い傾向があり，非服用犬に比べて臓器分布のスペクトルの差は認められなかった。

### 3) ビーグル犬の $^{14}\text{C}$ キノホルム腹腔内投与

体重 5.8 kg に  $^{14}\text{C}$  キノホルム 250  $\mu\text{C}$ ，50.0 mg を C・M・C で乳化後，腹腔内注射投与した。

$^{14}\text{C}$  キノホルム投与ビーグル犬の分布は， $^{131}\text{I}$  キノホルムの成績とほぼ等しい（表 14）。

一般臓器；脾・肝・副腎・腎・血漿・卵巣・肺・脾・舌筋・小腸・小腸壁・唾液の順である。そして卵巣の高い分布は注目すべきであると思われる。

末梢神経系；上腕神経・後根神経節・坐骨神経・腓骨神経・半月神経節・視神経の順である。すなわち，腓骨神経は坐骨神経よりやや低い。一方，下垂体に高い濃度の分布が認められる。

中枢神経系；いずれも末梢神経の  $1/2 \sim 1/3$  を示す。また，脊髄は大脳，小脳よりやや高い傾向がある。

4) 雑犬  $^{131}\text{I}$  キノホルム経口投与；投与条件；雑犬 2 匹に  $^{131}\text{I}$  キノホルム 1.25 mC，90 mg を C・M・C で乳化経口投与し，3 時間後に瀉血致死せしめた（表 15）。

経口投与の場合は，腹腔内注射法に比べて腎・肝投与量に対する比率は低い（後述）。

一般臓器；分布の順位は，腹腔内注射法のそれと大差は認められないが，腎・肝・血液・脂肪・十二指腸・肺・舌下腺・脾・脾・筋肉の順の濃度で放射能値は比較的高い。

末梢神経系；坐骨神経，上腕神経，半月神経節，後根神経節の順に放射能がみられる。末梢神経系の放射能値は中枢神経系の 6～10 倍の値を示し，腹腔内投与法より差が大である。なお，網膜にも末梢神経よりやや高い濃度の分布が認められる。

中枢神経系；脊髄では頸髄がより高いが，脊髄の濃度は大脳・小脳よりやや高い。クロロホルム可溶性分画の全分画に対する比率は，腹腔内注射法に比べて著しく低く，腹腔内注射法，経口投与法の比率について，前頭葉では，（72.4%：7.2%），坐骨神経では（62.9%：26.3%）の値が得られた（表 13，表 15）。即ち経口投与法の方が遊離キノホルムは少い。

### C-4 ネコ；

1)  $^{14}\text{C}$  キノホルムの腹腔内注射，1.5 時間後ネコ（体重 0.75 kg）に 200  $\mu\text{C}$  を腹腔内注射後 1.5 時間の生体内分布を使用した。

一般臓器；肺・脾・肝・小腸・脂肪・副腎・腎・血漿・顎下腺・筋肉・脾臓の順を示した。副腎に対する作用は不明である。

表 15 雑犬に  $^{131}\text{I}$  キノホルム経口投与後の組織内分布 1.25mc, 90mg を CMC 乳化後 1.6kg の同腹仔に投与 (総キノホルム量, cpm/g 臓器湿重量)

| 臓 器       | average   | case 1    | case 2    |
|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 血 液       | 52,634    | 53,485    | 51,783    |
| 髄 液       | 946       | 11,374    | 517       |
| 前 頭 葉     | 2,811     | 2,701     | 2,919     |
| 海 馬       | 2,841     | 2,740     | 2,942     |
| 小 脳       | 3,003     | 2,794     | 3,212     |
| 脳 幹       | 3,993     | 3,645     | 4,340     |
| 頸 髄       | 4,575     | 5,049     | 4,101     |
| 胸 髄       | 4,182     | 5,147     | 3,217     |
| 腰 髄       | 4,060     | 4,144     | 3,976     |
| 坐 骨 神 經   | 23,378    | 27,366    | 19,389    |
| 後 根 神 經 節 | 15,109    | 21,047    | 9,170     |
| 半 月 神 經 節 | 16,588    | 21,878    | 11,297    |
| 上 腕 神 經   | 22,206    | 27,230    | 17,181    |
| 網 膜       | 26,272    | 27,879    | 24,664    |
| 硝 子 体     | 11,318    | 14,177    | 8,459     |
| 水 晶 体     | 2,193     | 1,489     | 2,896     |
| 筋 肉       | 11,115    | 12,201    | 10,029    |
| 尿         | 1,874,431 | 1,874,431 | 2,690,884 |
| 胆 汁       | 778,319   | 778,319   | 698,995   |
| 肝         | 58,756    | 58,756    | 62,352    |
| 腎         | 61,215    | 61,215    | 72,651    |
| 脂 肪       | 36,929    | 36,929    | 30,214    |
| 脾         | 16,688    | 16,688    | 15,116    |
| 十 二 指 腸   | 27,061    | 27,061    | 35,399    |
| 十二指腸内容物   | 870,356   | 870,356   | 1,665,002 |
| 肺         | 25,920    | 25,920    | 25,571    |
| 脾         | 15,347    | 15,347    | 10,784    |
| 舌 下 腺     | 19,660    | 19,660    | 22,587    |

末梢神経系；上腕神経・坐骨神経（近位は遠位よりやや高い），頸部後根神経節・半月神経節・馬尾・視神経の順を示した。

中枢神経系；中枢神経組織では，橋・中脳・海馬・小脳の順に高かった。頸髄においては，前索・側索・後索・灰白質に分けて分布をみたが病理所見のみられる後索に，特に高い濃度の分布はみられなかった。

胆汁；胆汁中には，血液の約500倍のキノホルムが認められ，ビーグル犬とともに他の動物にくらべて著しく高かった（表16）。

表16 クロロホルム溶性分画と全分画との関係  
（ ）は腹腔内注射，経口投与，cpm/g 臓器湿重量

|        | 全 分 画  | クロロホルム<br>溶 性 分 画 | クロロホルム<br>不 溶 性 分 画 | 溶性分画比  |         |
|--------|--------|-------------------|---------------------|--------|---------|
| 血 1    | 53,485 | 2,344             | 51,141              | 4.3 %  |         |
| 2      | 51,983 | 2,149             | 49,834              |        |         |
| 液 平均   | 52,634 | 2,247             | 50,488              |        |         |
| 前 1    | 2,701  | ,110              | 1,504               | 7.2 %  | (72.4%) |
| 頭 2    | 2,921  | ,149              | 1,840               |        |         |
| 葉 平均   | 2,811  | ,130              | 1,672               |        |         |
| 坐 1    | 27,366 | 6,921             | 19,466              | 26.3 % | (62.9%) |
| 骨 2    | 19,389 | 4,904             | 13,762              |        |         |
| 神 経 平均 | 23,378 | 5,913             | 16,604              |        |         |
| 肝 1    | 55,159 | 17,817            | 34,873              | 34.5 % |         |
| 2      | 62,352 | 21,100            | 39,134              |        |         |
| 臓 平均   | 58,756 | 19,459            | 37,004              |        |         |
| 腎 1    | 49,779 | 8,030             | 39,100              | 17.9 % |         |
| 2      | 72,651 | 12,378            | 54,273              |        |         |
| 臓 平均   | 61,215 | 10,204            | 46,687              |        |         |

<sup>131</sup>I キノホルム経口投与（表15の犬）の成績と腹腔内注射（表13の雑犬をクロロホルム可溶性，不溶性成分比より算出）の成績との比較

表 17  $^{14}\text{C}$  キノホルム 腹腔内投与ネコの生体内臓器分布とその小動物との比較  
(1時間30分後)

|   |        |           | ネ コ            | ハツカネズミ       | ダイコクネズミ      |
|---|--------|-----------|----------------|--------------|--------------|
|   |        |           | I . P .        | I.P. (1時間)   | I . P .      |
| 血 |        | 清         | 15.14          | 46.3 ± 8.3   | 486.6        |
| 前 | 頭      | 葉         | 0.549(0.62)    | 2.9 ± 1.2    | 14.19(2.92)  |
| 海 |        | 馬         | 2.810          | —            | —            |
| 小 |        | 脳         | 1.380          | 12.6 ± 0.5   | 25.66        |
| 中 |        | 脳         | 4.200(27.74)   | —            | —            |
|   | 橋      |           | 6.457          | 2.4 ± 0.7    | 32.82        |
| 下 | 垂      | 体         | 8.253          | —            | —            |
| 頸 | 髓 (全体) |           | —              | —            | 24.50        |
| " | 前      | 索         | 4.647          | —            | —            |
| " | 側      | 索         | 6.861          | —            | —            |
| " | 後      | 索         | 5.082          | —            | —            |
| " | 灰      | 白質        | 6.082          | —            | —            |
| 胸 |        | 髓         | 6.991          | —            | —            |
| 腰 |        | 髓         | 6.736          | 2.5 ± 0.4    | 51.69        |
| 視 | 神      | 経         | 6.603          | —            | 23.79        |
| 半 | 月      | 神 経 節     | 10.53          | —            | —            |
| 頸 | 部      | 後 根 神 経 節 | 10.62          | —            | 31.85        |
| 馬 |        | 尾         | 9.081          | —            | —            |
| 上 | 腕      | 神 経       | 24.42          | —            | 28.96        |
| 坐 | 骨      | 神 経 (近位)  | 18.49(122.13)  | 4.2 ± 0.5    | 32.25(7.24)  |
| " |        | (遠位)      | 15.95          | —            | —            |
| 硝 | 子      | 体         | 0.42           | —            | —            |
| レ | ン      | ズ         | 0.52           | —            | —            |
|   | 肺      |           | 249.6          | 33.3 ± 9.1   | 61.50        |
| 肝 |        | 臓         | 172.7(1,140.7) | 36.9 ± 10.8  | 247.3(50.82) |
| 脾 |        | 臓         | 191.4          | 8.8 ± 2.3    | 517.3        |
| 膵 |        | 臓         | 20.06          | —            | 307.0        |
| 小 | 腸      | 壁         | 162.5          | —            | 6,765        |
| 小 | 腸      | 内 容 物     | 1,028          | —            | 4,632        |
| 膵 |        | 臓         | 40.39(266.7)   | 169.0 ± 70.2 | 509.3(104.7) |
| 副 |        | 腎         | 43.77          | —            | —            |
| 脂 | 肪      | 組 織       | 135.1          | 14.5 ± 4.4   | 202.1        |
| 筋 |        | 肉         | 1.586          | —            | —            |
| 顎 | 下      | 腺         | 26.65          | —            | 31.65        |
| 胆 |        | 汁         | 7,498(49,524)  | 2270.1       | —            |
|   | 尿      |           | 1,409          | —            | —            |

単位:  $\mu\text{g/g}$  湿重量

表 18 各種動物にキノホルム投与後臓器中の放射能値の血漿  $^{14}\text{C}$ ，血液  $^{131}\text{I}$  のそれに対する比率 (%)

| 核 種       | $^{14}\text{C}$                 |                                  |                           |                                  |                        | $^{131}\text{I}$            |                           |                           |         |
|-----------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------|----------------------------------|------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------|
| 投 与 動 物   | ビーグル犬                           | ネ コ                              | ダイコクネズミ                   | ハツカネズミ                           | ハツカネズミ                 | ビーグル犬                       | 雑 犬                       | 雑 犬                       | ダイコクネズミ |
| 投 与 法     | 腹腔内                             | 腹腔内                              | 腹腔内                       | 尾 静 脈                            | 経 口                    | 腹腔内                         | 腹腔内                       | 経 口                       | 尾 静 脈   |
| 投 与 量     | 250 $\mu\text{C}$<br>50mg/5.8kg | 200 $\mu\text{C}$<br>40mg/0.75kg | 33 $\mu\text{C}$<br>6.6mg | 0.2 $\mu\text{C}$ ***<br>0.375mg | 1.5mg+0.15<br>mg (CMC) | 1mc (8.8kg)<br>SA(3mc/26mg) | 1mc(経口同ジ)<br>SA(3mc/26mg) | 1.25mc 90mg<br>+CMC/1.6kg | 12mc    |
| 投 与 時 間   | 1.5                             | 1.5                              | 1.5                       | 1.0                              | 3.0                    | 1.5                         | 1.5                       | 3.0                       | 1.0     |
| 前 頭 葉*    | 15.1                            | 3.8                              | 2.9                       | 7.2                              | 7.5                    | 11.7                        | 16.2                      | 5.3                       | 14.2    |
| 小 脳       | 12.3                            | 8.7                              | 5.3                       | 6.5                              | 14.2                   | 11.8                        | 15.6                      | 5.7                       | 17.9    |
| 脳 幹       | 15.1                            | 42.4                             | 6.7                       | 6.0                              | 11.6                   | 15.1                        | 15.3                      | 7.6                       | 18.9    |
| 下 垂 体     | 41.0                            | 54.5                             |                           |                                  |                        | 51.4                        | ****53.6                  |                           |         |
| 頸 髄       |                                 | 28.0                             |                           |                                  |                        | 12.1                        | 20.6                      | 8.7                       |         |
| 胸 髄       | 17.2                            | 46.0                             |                           |                                  |                        | 12.8                        |                           | 8.0                       |         |
| 腰 髄       | 18.2                            | 44.5                             | 10.6                      | 6.2                              | 11                     | 12.3                        | 20.8                      | 7.7                       | 20.6    |
| 網 膜       |                                 |                                  |                           |                                  |                        | 40.8                        | 37.1                      |                           |         |
| 視 神 経     | 17.6                            | 43.6                             | 4.9                       |                                  |                        | 13.9                        | 33.4                      |                           |         |
| 半 月 神 経 系 | 19.5                            | 70.0                             |                           |                                  |                        | 34.8                        | 51.4                      |                           |         |
| 後 根 神 経 系 | 36.9                            | 70.1                             | 6.5                       |                                  |                        | 43.0                        | 37.6                      | 28.7                      |         |
| 坐 骨 神 経   | 32                              | 122                              | 7.2                       | 10.4                             | 13.8                   | 70.0                        | 46.0                      | 44.4                      | 56.2    |
| 肝 臓       | 445                             | 1,140                            | 51.0                      | 92.0                             | 167                    | 330                         | 185                       | 112                       | 193     |
| 腎 臓       | 214                             | 267                              | 105                       | 419                              | 301                    | 375                         | 341                       | 116                       | 217     |
| 脾 臓       | 477                             | 133                              | 63.0                      |                                  |                        | 92.1                        |                           | 29.0                      |         |
| 脂 肪       |                                 | 135                              |                           | 36.0                             | 27.0                   |                             | 103                       | 70.0                      | 120     |
| 胆 汁       | 52,742                          | 49,524                           |                           | 5,632                            |                        | 3,313                       | 3,247                     | 1,479                     |         |
| 腸 内 容**   | 4,773                           | 1,028                            | 952                       |                                  |                        | 57.9                        |                           |                           |         |
| 十 二 指 腸   | 34.9                            | 1,073.3                          | 362.7                     | 31.5                             | 247.7                  |                             | 113.2                     | 51.4                      | 89.1    |
| 尿         | 9,629                           | 1,409                            | 952                       |                                  |                        |                             | 7,242                     |                           |         |

\* ダイコクネズミ，ハツカネズミは大脳中頭頂葉を含む

\*\* 主として十二指腸

\*\*\* (SAは1.63mc/mMで他動物と異なる)

\*\*\*\* 海馬 注) ダイコクネズミ

ハツカネズミ

200g  
20g



# D 動物における臓器分布の比較(表 17, 18)

投与方法及び核種に分けて比較した。注射法は一般に腹腔内注射 1.5 時間後を用いた。そしてダイコクネズミ、ハツカネズミの静脈内注射 1 時間後を加えた。経口投与方法(ハツカネズミ、雑犬)は投与後 3 時間のものを用いた。

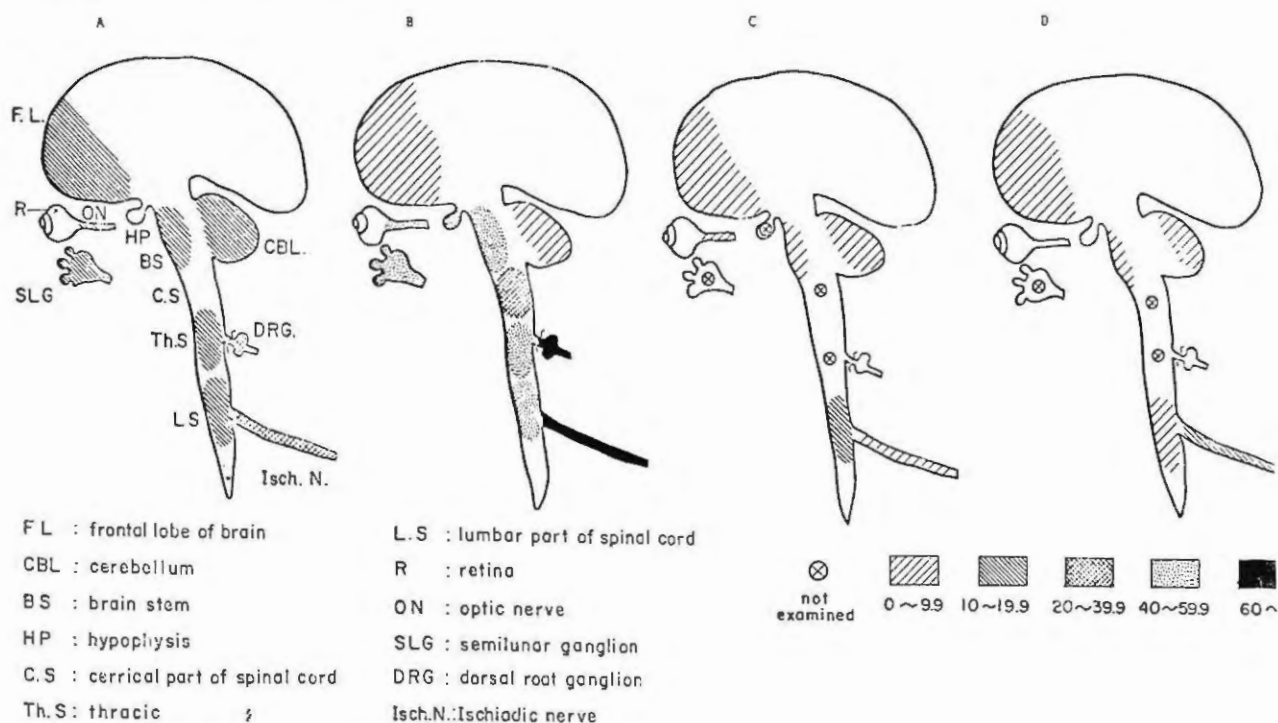


図 11 各種動物に  $^{14}\text{C}$  キノホルム投与後の神経系における放射能値の分布(血漿のそれとの比で表はす)

A ビーグル犬 B ネコ C ダイコクネズミ D ハツカネズミ  
A, B, C, は腹腔内注射, D は尾静脈注射

## 1) 腹腔内及び静脈内注射

a)  $^{14}\text{C}$  キノホルム投与(図 11, 表 18)〔ビーグル犬, ネコ, ダイコクネズミ, ハツカネズミ〕

中枢神経系: 前頭葉, 小脳; (血漿比 3~15%), ビーグル犬, ネコ, ハツカネズミ, ダイコクネズミの順に高い。脳幹; (6~42%), ネコに高い。腰髄; (6~45%), ネコ, ビーグル犬, ダイコクネズミ, ハツカネズミの順である。脳幹及び脊髄; ネコが特に高く, ビーグル犬も腰髄では小動物の約 2 倍である。

末梢神経系: 坐骨神経; (7~122%) 何れの動物でも中枢神経に比べて大である。(1.5~15 倍) がネコ, ビーグル犬は小動物より大である。後根神経節; (7~70%) ネコ(頸髄のもの) ビーグル犬に高く, ダイコクネズミに低い。中枢神経の(1.5~10 倍)を示す。半月神経節; (20~70%); ネコ次でビーグル犬の順に高い。視神経(5~44%); ネコに高く次でビーグル犬である。ハツカネズミは低い。下垂体; (41~55%) ネコ, ビーグル犬何れも高い値を示した。

一般臓器: 脂肪; (36~135%) ネコに高く, ハツカネズミに低い。肝臓; (0.5~1.1 倍),

ネコ、ビーグル犬に高く、ハツカネズミ、ダイコクネズミに低い。腎臓；（10～50倍）ハツカネズミ、大動物、ダイコクネズミの順に高い。胆汁；（50～527倍）ビーグル犬、ネコに特に高く、ハツカネズミに低い。腸内容物；（9～48倍）ビーグル犬に高く、ネコ、ダイコクネズミはこれ等より低い。尿；（9～96倍）ビーグル犬に特に高く、ネコ、ダイコクネズミに低い。

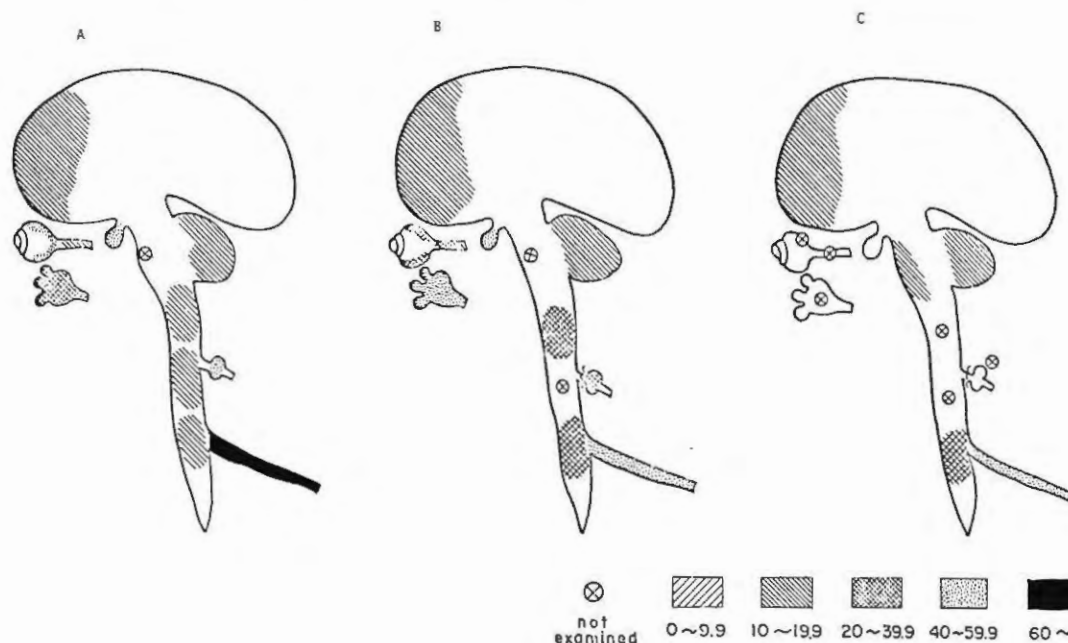


図 12 各種動物に  $^{131}\text{I}$  キノホルム投与後の神経系における放射能値の分布（血液のそれとの比で表はす）

A ビーグル犬 B 雑犬 C ダイコクネズミ

A, Bは腹腔内注射, Cは尾静脈内注射

b)  $^{131}\text{I}$  キノホルム投与（ビーグル犬、雑犬、ダイコクネズミ）（図 12, 表 18）

中枢神経系；大脳、小脳（血液比 12～18%）：何れの動物も大差はない。脳幹（7.6～19%）ダイコクネズミが高い。脊髄：（12～21%）雑犬はビーグル犬より高い。ハツカネズミの腰髄も比較的高い。

末梢神経系；坐骨神経：（46～70%）中枢神経系の 3～5 倍の濃度が何れの動物にも認められる。ビーグル犬が雑犬、ダイコクネズミよりやや高かった。後根神経節（29～43%）、ビーグル犬、雑犬何れも高い濃度が認められた。半月神経節（35～51%）雑犬、ビーグル犬何れも高かった。網膜（37～41%）ビーグル犬、雑犬何れも高い値が認められた。視神経（14～33%）雑犬はビーグル犬より高い値であった。視神経の値は網膜より低い。

一般臓器；肝臓は（1.9～3.3倍）ビーグル犬に高かった。腎臓（22～37%）ビーグル犬、雑犬はダイコクネズミより高かった。胆汁（32～33倍）ビーグル犬、雑犬では殆んど等しかった。

尚  $^{14}\text{C}$  キノホルムによる分布と  $^{131}\text{I}$  キノホルムによるそれとの比較では、 $^{14}\text{C}$  の場合は測定の上、血漿に対する値で  $^{131}\text{I}$  の場合は血液に対するそれである。血球の放射能値は血液の約 7% であ

る。それ故に  $^{131}\text{I}$  では約 50% の値となるので、臓器に対する比率は  $^{14}\text{C}$  の約 2 倍 となって示されている。それ故 50% を乗じて  $^{14}\text{C}$  と比較すべきであろう。尙前述の如くビーグル犬では分布の比率の差異は少いが、ダイコクネズミでは差異が認められる。例数の問題もあるが注射法の差異の影響かもしれない。一方において 1 つの臓器で比較した際に  $^{14}\text{C}$  キノホルムの分布の濃度が  $^{131}\text{I}$  キノホルムより高いことは、キノホルムより沃度の遊離したものの、微量の存在を推定せしめるものである。

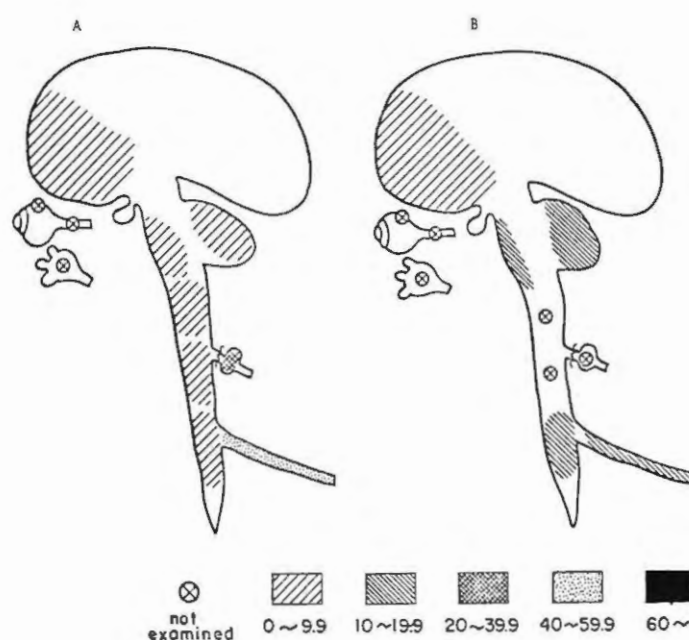


図 13 雑犬及びハツカネズミに標識キノホルム経口投与後の神経系の分布（雑犬は  $^{131}\text{I}$  キノホルム投与で、血液に対する比率で表はし、ハツカネズミは  $^{14}\text{C}$  キノホルム投与で血漿に対する比率で表はす。）

## 2) 経口投与法

### 1. 臓器分布 (図 13)

$^{14}\text{C}$  キノホルム経口投与のハツカネズミの分布を静脈注射の例と比較した。坐骨神経の濃度のやや低かった他には、その分布は静脈注射に比べて特別の差異は認められない (図 13 と図 11 の比較)

$^{131}\text{I}$  キノホルムを雑犬に経口投与した場合の濃度は (表 18) の如く、中枢神経系より坐骨神経及び後根神経節に高く、その分布は、腹腔内注射法に比べて特別の差異は認められない (図 13 と図 12 の比較)。

### 2. 投与量について

$^{14}\text{C}$  キノホルムは静脈注射法では、ハツカネズミに 0.375 mg 投与で血漿濃度は、1 時間後  $4.03\mu\text{g/g}$  湿重量、3 時間後  $10.6\mu\text{g/g}$  湿重量を示した。経口投与法では 1.5 mg 投与で 3 時間後  $8.1\mu\text{g/g}$  湿重量である。即ち、4 倍の量を投与して 1 時間後 1/5、3 時間後 4/5 の値を示している。

$^{131}\text{I}$  キノホルムは腹腔内注射法で、雑犬 (6.4 kg) 8.7 mg/mg 投与で 1.5 時間後、血液中 63,412

cpm / g 湿重量であり、比放射能の測定をすると、551, 684mg×cpm/mc×g である。経口投与法では、雑犬 (1.6 kg) 90 mg / 1.25mc 投与で 52, 634 cpm / g 湿重量である。同様の測定をすると、3, 789 648mg×cpm/mc×g である。即ち、約10倍投与し、1/4体重の犬で7倍の濃度<sup>3)</sup>を示していた。

以上の計算は時間で異なるが一般にキノホルムの吸収投与等でことなり13~51%<sup>3)</sup>である事と対応を示している。

経口投与の場合には、クロロホルム溶性分画のキノホルム量が、尾静脈注射法に比べて少なく、遊離キノホルムに比べてグルクロン酸抱合物の多いことが認められた (前述)。

#### E 負荷動物への投与実験

放射性キノホルムは大部分がグルクロン酸抱合後、速やかに尿中に排泄されることが明らかになった。したがってキノホルム中毒を発生しやすくする条件として肝臓でのグルクロン酸抱合能の低下、腎臓における排泄障害が考えられる。それ故肝臓および腎臓の障害動物におけるキノホルム代謝を調べた。

表 19 <sup>131</sup>Iキノホルムを四塩化炭素負荷ダイコクネズミに静注2時間後の臓器内分布

| 臓 器  | 四 塩 化 炭 素 負 荷 群 (3) |          |          |                   |          |          | 正 常 群 (3)         |          |          |                   |          |          |
|------|---------------------|----------|----------|-------------------|----------|----------|-------------------|----------|----------|-------------------|----------|----------|
|      | クロロホルム<br>可 溶 分 画   |          |          | クロロホルム<br>不 溶 分 画 |          |          | クロロホルム<br>可 溶 分 画 |          |          | クロロホルム<br>不 溶 分 画 |          |          |
|      | 算術<br>平均            | 平均<br>誤差 | 百 分<br>率 | 算術<br>平均          | 平均<br>誤差 | 百 分<br>率 | 算術<br>平均          | 平均<br>誤差 | 百 分<br>率 | 算術<br>平均          | 平均<br>誤差 | 百 分<br>率 |
| 大 脳  | 31                  | 12       | 35.1     | 57                | 29       | 64.9     | 23                | 13       | 12.8     | 159               | 47       | 87.2     |
| 小 脳  | 118                 | 56       | 57.2     | 88                | 36       | 42.8     | 0                 | 0        | 0        | 121               | 24       | 100      |
| 脳 幹  | 44                  | 31       | 46.3     | 51                | 21       | 53.7     | 21                | 18       | 17.3     | 101               | 25       | 82.7     |
| 腰 髄  | 51                  | 42       | 31.4     | 112               | 56       | 68.6     | 75                | 62       | 38.0     | 123               | 40       | 62.0     |
| 坐骨神経 | 631                 | 386      | 40.6     | 924               | 254      | 59.4     | 280               | 117      | 25.8     | 807               | 87       | 74.0     |
| 肝 臓  | 356                 | 99       | 23.4     | 1,163             | 457      | 76.6     | 540               | 90       | 13.9     | 3,345             | 534      | 86.1     |
| 腎 臓  | 788                 | 401      | 22.1     | 2,772             | 1,191    | 77.9     | 560               | 25       | 13.0     | 3,749             | 425      | 87.0     |

単位は dpm / g 湿重量 ( ) は例数

1) 四塩化炭素負荷ダイコクネズミ ; (表 19) で示す如く大脳, 小脳, 脳幹, 坐骨神経, 腎臓のいずれの臓器においても, 対照動物より放射能値が高かった。この傾向は小脳, 脳幹, 坐骨神経で特に著明であった。

次に, クロロホルム可溶性分画の全分画に対する比率を求めると, 中枢神経(大脳, 小脳, 脳幹)および坐骨神経, 肝臓, 腎臓のいずれにおいても,  $^{131}\text{I}$  キノホルムは対照より著明に高かった。

表 20 A 腎炎負荷群の血液放射能量 (cpm / ml, 血液) の経時変動

| 群           | 番 号 | 1 時 間  |          |             | 4 時 間  |          |             |
|-------------|-----|--------|----------|-------------|--------|----------|-------------|
|             |     | 全 分 画  | クロロホルム溶性 | クロロホルム不溶性分画 | 全 分 画  | クロロホルム溶性 | クロロホルム不溶性分画 |
| 正<br>常<br>群 | 1   | 12,960 | 720      | 9,310       | 2,490  | 260      | 1,800       |
|             | 2   | 29,580 | 1,550    | 26,120      | 11,270 | 90       | 10,160      |
|             | 平均値 | 21,665 | 1,135    | 17,715      | 6,875  | 175      | 5,980       |
| 腎<br>炎<br>群 | 1   | 12,870 | 700      | 8,180       | 6,560  | 310      | 4,790       |
|             | 2   | 17,910 | 1,020    | 13,950      | 14,460 | 260      | 12,270      |
|             | 平均値 | 15,390 | 860      | 11,070      | 0,510  | 285      | 8,530       |

2) 腎炎ダイコクネズミ ; (表 20 A) に示すごとく, 血液中の減衰は1時間の放射能値を100 % とすれば, 68.3 % であり, 対照群の32.3 % より著しく減衰が遅延していた。これをクロロホルム不溶性分画について調べても, 同様に対照群より著しく減衰の遅延が認められた。

2 腎炎負荷動物は, 対照群にくらべて, 肝臓, 腎臓, 脂肪, 肺臓の放射能の蓄積が高く, 特に腎臓では, 全分画で正常例のその約30倍, クロロホルム可溶性分画では約30倍クロロホルム不溶性分画では50倍の値を示した(表 20 B)。中枢神経においても腎炎群は正常群より幾分高い濃度を示し, 腰髄においてその差は大であった。坐骨神経では腎炎負荷群に約1.5倍の貯留が認められた。

## 考 按

### I $^{131}\text{I}$ キノホルムと $^{14}\text{C}$ キノホルムによる分布の差異

$^{131}\text{I}$  キノホルムは生体内において, 一部  $^{131}\text{I}$  が遊離し, かつそれによる放射能値が誤差となると言われている。それ故, 正確な測定には  $^{14}\text{C}$  を用いることが望ましい。しかし, 犬においては  $^{131}\text{I}$  キノホルムの生体内分布と  $^{14}\text{C}$  キノホルムのそれとの間には本質的な差異は認められない。 $^{131}\text{I}$  キノホルム法は  $^{14}\text{C}$  キノホルムの第1近似として用いる。

表 20 B 腎炎負荷及び正常群（ダイコクネズミ）における  $^{131}\text{I}$  キノホルム臓器分布の比較（4時間）

| 臓器   | 全 分 面          |             | クロロホルム可溶分面    |           | クロロホルム不溶分面     |           |
|------|----------------|-------------|---------------|-----------|----------------|-----------|
|      | 腎 炎 群          | 正 常 群       | 腎 炎 群         | 正 常 群     | 腎 炎 群          | 正 常 群     |
| 血液   | 10,460± 3,948  | 3,094± 271  | 286± 29       | 186± 63   | 8,528± 3,743   | 2,800±334 |
| 大脳   | 274± 113       | 277± 75     |               |           |                |           |
| 小脳   | 297± 100       | 218± 31     |               |           |                |           |
| 脳幹   | 720± 441       | 558± 190    |               |           |                |           |
| 腰髄   | 1,266± 115     | 630± 333    |               |           |                |           |
| 坐骨神経 | 4,283± 353     | 2,613± 802  |               |           |                |           |
| 眼球   | 986± 91        | 552± 4      |               |           |                |           |
| 肝臓   | 9,548± 1,514   | 8,010±1,220 | 2,361± 599    | 1,812±365 | 7,187± 671     | 4,890±650 |
| 腎臓   | 305,108±76,343 | 9,619±1,641 | 48,755±10,183 | 1,592±119 | 256,353±53,409 | 4,956±659 |
| 脾臓   | 12,554± 9,175  | 3,909± 327  |               |           |                |           |
| 脂肪   | 4,169± 241     | 6,344±1,798 |               |           |                |           |
| 小腸   | 7,500± 689     | 1,832± 192  |               |           |                |           |
| 肺臓   | 7,868± 1,248   | 8,784±1,850 |               |           |                |           |

単位 cpm/g 湿重量

## II 遊離キノホルムの定量

臓器におけるキノホルムの毒性は、遊離キノホルムによって代表される。それ故に、臓器内分布では特に、遊離キノホルムの測定が必要である。遊離キノホルムの測定には、薄層又は濾紙クロマトグラムによる分離後の測定が必要である。しかし、その操作はかなり煩雑で多数の材料の処理は不可能である。それ故に、クロロホルム溶性分面の放射能をもって遊離キノホルムの近似推定値として使用した。又、 $^{131}\text{I}$  キノホルム投与の際イオン化した沃素はクロロホルムに溶解しないので、遊離キノホルムを測定するクロロホルム溶性分面には遊離沃素は存在しない。

## III Carrier

キノホルムは約 7% 以外は赤血球と結合しないので、キノホルムの carrier としては血漿の成分が考えられる。一般には多くの薬品や色素の carrier として、血清アルブミン等が考えられている。標識キノホルムについても、同様にそれをハツカネズミに *in vivo* に投与し、又はハツカ

ネズミの血清に *in vitro* に添加した際の放射能値は、血清アルブミン分画に見出される。それ故に、キノホルムの carrier は明かに血清アルブミンであると考え（図 1, 2）。

#### IV 腸胆道循環

胆汁中の 1 ml 当りの放射能値は、注射後では血清のそれの約 30~500 倍に及んでいる。一方において胆汁の分泌量は、犬では 50~60 ml / 日の値が報告されている。一方、第 1 日の尿中の分泌濃度は、血液の約 30 倍である。そして抱合キノホルムは腸内細菌や腸管壁の  $\beta$  グルコニダーゼによって遊離の形となり、<sup>注)</sup> この一部の遊離キノホルムは抱合キノホルムに加わって吸収され得ると考えられる（表 3, 図 3）。なお、図 14 はキノホルムの生体内動態を総括一覧したものである。

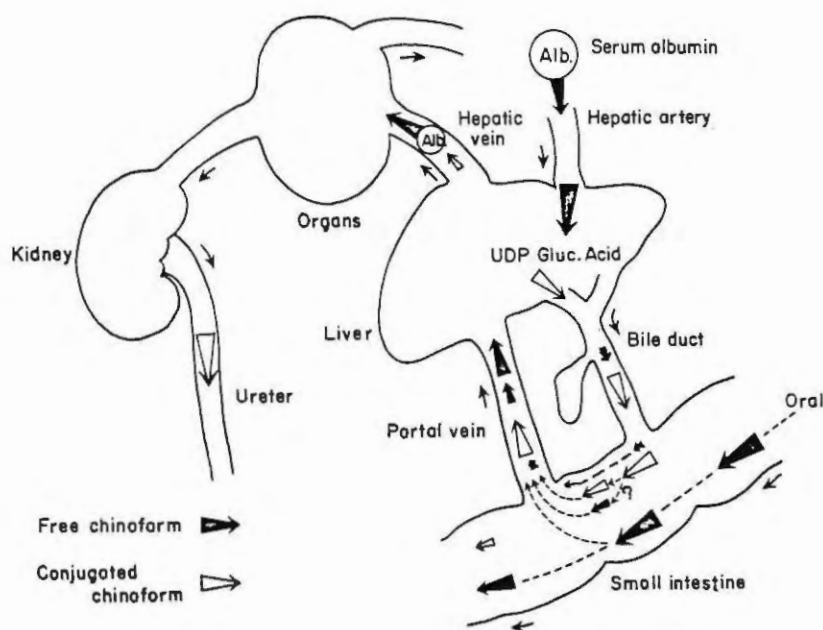


図 14 キノホルムの吸収排泄及び腸肝循環

経口投与による遊離キノホルムは門脈より吸収される。血液中では遊離キノホルムは主に血清アルブミンと結合し、結合キノホルムはそのまゝの形で臓器に移行する。結合キノホルムは腎より排泄されるが一部は胆汁中に排泄される。そしてその一部は細菌および腸管粘膜<sup>注)</sup>により遊離型となり再吸収される。微量の遊離型も胆汁に排泄される。

#### V 1 回及び連続経口投与の影響

すべての物質はそれが生体内に吸収された場合にその吸収される物質を  $a$  とし、吸収比を  $k_1$  とする。その際吸収される量は  $K_1 a$  である。一方において、生体より排泄される量は生体内の蓄積量  $x$  に比例する。この比例常数を  $k_2$  とする。そして時間  $t$  に従う増加率を  $\frac{dx}{dt}$  とすれば、 $\frac{dx}{dt} = k_1 a - k_2 x$  であらわされる。Roach の理論を用いて種々の条件における投与回数による蓄積値は表 7 に示した。（図 8）。

#### VI 臓器列分布



$^{131}\text{I}$ ・一部  $^{125}\text{I}$  又は  $^{14}\text{C}$  キノホルムを用いて、ハツカネズミ (表 4, 5, 6, 8, 17) ダイコクネズミ (表 9, 10, 11, 17), ビーグル犬 (表 13, 14), 健康犬 (表 12, 13, 15), ネコ (表 17) の各臓器より、キノホルム分布を調べた。いずれの動物においても調べたすべての臓器組織に分布していることが判った。以下各臓器について述べる (表 18, 19, 21)。

1) 腎臓; 体内に入ったキノホルムは、先ず肝臓と腎臓に強く集積していることがわかる。特に腎臓においては集積が高いことはキノホルムの排泄臓器であることから当然であり、尿中でも高い放射能が貯えられている。尿中のキノホルムはすべてが抱合型 (可溶物) である (図 5) が、腎臓におけるキノホルムの約 3 分の 1 はクロロホルム溶性で遊離キノホルム (表 5, 9) であった。このことは遊離キノホルムにその毒性を認められている所から、腎臓に存在する遊離キノホルムにより腎機能障害が加わり、キノホルムの腎排泄を阻害する可能性が考えられる。事実、アレルギー腎炎を負荷した動物では対照群とくらべて著しく高い腎臓への蓄積がみられている (表 8)。ミクロオートラジオグラ<sup>39)</sup>ムによる腎臓内でのキノホルムは主として、近位尿細管上皮細胞でのとり込みがみられ、キノホルムは glomerus で排泄されて尿細管で再吸収されていると考えられる。腎臓内キノホルムの蓄積は、大体血液の減衰曲線に平行して速かに減衰する (図 7・B) が、血液に対する濃度比は、一般臓器<sup>9)</sup>の中では最も高く保たれている。一方グルクロン酸抱合物は尿細管で排泄される説もある。

2) 肝臓; 肝臓におけるキノホルムの蓄積は、腎臓と共に高く、いづれの動物においても共通していた。そのうちクロロホルム溶性分画の占める割合は約 34.5% で、遊離キノホルムが臓器の  $1/3 \sim 1/2$  を占めていることがわかった。しかし時間経過につれて遊離キノホルムの占める割合は減少し、24 時間後には約 12% になる (表 9)。そして抱合後は血中及び胆道に放出されると考える。

3) 十二指腸; 十二指腸壁のキノホルム濃度は、ネコ・ダイコクネズミ (表 17, 9) において高い。減衰率が低く坐骨神経とともに、他臓器よりも半減期が長かった。クロロホルム溶性分画にも同じ傾向が認められた (表 9)。このことは、腸肝循環による再吸収と何らかの関連をもつものかもしれない。

4) 十二指腸内容物; 十二指腸内容物においては、極めて高いキノホルムの集積がみられた。ハツカネズミではその 14.4% はクロロホルム抽出のできる遊離キノホルムで腸肝循環の可能性を示している。<sup>注)</sup>

5) 脂肪; 脂肪組織においては、尾静脈注射法による場合には (表 5, 9), 肝臓・腎臓について高い濃度の蓄積があり、クロロホルム溶性でも比較的多かった (表 5 等)。経口投与の場合には幾分低い濃度分布を示した。又、半減期は比較的長く、体内キノホルム停留の場所となり得ると考える。

6) 血液; 血液中のキノホルムはほとんどすべてアルブミン結合していることをすでに示した (図 1, 図 2) が、時間と共に減衰していることがわかる。表 9 のダイコクネズミの実験で明かなように、1 ~ 3.5 時間における第 1 相の減少度が強く、次の第 2 相 (3.5 - 24 時間) の減少度が少い。この 2 相において、血液の半減期を計算すると、第 1 相で 1 時間 50 分であった。このうちクロロホルム可溶分画のそれは、第 1 相・1 時間、第 2 相・14 時間、クロロホルム不溶分画では、第 1 相・14 時間、

第2相・19時間30分であった。静脈注射後1時間ではクロロホルム可溶分画が約1/4を占めているが、3.5時間後にはほとんど抱合しているものと考えられる。

7) 脾臓；ダイコクネズミ及び犬において脾臓に(表11, 13, 14)も脾臓・肺臓に等しいほど<sup>37</sup>の放射能がみられている。又、ラジオオートグラフでは脾臓のβ細胞に分布することが明らかになった<sup>31)</sup>又、下垂体には末梢神経とほぼ同レベルの蓄積がみられる(表18)。このことは、実験的糖尿病をキノホルムによって、起さしめうる<sup>31)</sup>ことが調らべられており、その作用機序の解明に役立つであろう。その際、脾臓と下垂体と両組織の関与が考えられる。

8) 淋巴腺における分布はキノホルムの抗体産生抑制作用<sup>30)</sup>と関係があるかも知れない。

9) 中枢神経組織；キノホルムの中枢神経組織侵入程度は他臓器にくらべて最も少く、血液脳関門に保護されていることを示しているが、犬、ネコ、ハツカネズミ、ダイコクネズミ何れも脳組織に含まれる血液成分に由来する放射能を差し引いても明かに有意の侵入は認められている。クロロホルム溶出分画比の血液又は血漿より高い事もこの事実を指している。

9-a) 大脳・海馬・小脳・脳幹及び脳下垂体；ビーグル犬及び雑犬(表12, 13, 15),ネコ(表17)などの大動物を用いて、中枢神経組織中での部位別濃度を調べた。大脳・海馬・小脳・脳幹での有意差はほとんど認められていないが、脳幹においてやや高い濃度(表15, 17)を示した。一方、ハツカネズミには大脳のアンモン角に病変が認められるという報告がある。

中枢神経系において脳血液関門の機能の低い比較的入りやすい部位として、1. pineal 2. area postrema 3. posterior pituitary 4. supraoptic crest 5. inter columnar tubercleなどが知られており、上述した下垂体において高い濃度が認められた結果と一致している。網膜には末梢神経とほぼ同一レベルのとり込みがみられた。視神経及び網膜の分布はキノホルム中毒時の視神経の<sup>8)</sup>障害と関係があるかも知れない。

9-b) 脊髓；脊髓におけるキノホルムの分布はすべての動物において、大脳・小脳・脳幹に比べてやや高い傾向が認められる。

ネコにおいて(表17)頸髄の前索・側索・後索・灰白質での分布濃度差をみたが、ほぼ homogeneous な分布をしていることがわかった。キノホルム中毒における脊髓は後索に限局した特異的変性が認められているが、その部位におけるキノホルム分布には特異性はなく、この点については病変部位とキノホルム分布の不一致点である(この点の詳細については後述する)。

10) 末梢神経系；末梢神経では、いづれの部分も中枢神経の5~10倍の濃度が認められ、このことはいづれの動物にも共通していた。又、半減期は長かった。

10-a) 視神経；脊髓程度の分布がみられたが、雑犬とビーグル犬において、網膜の濃度と視神経のキノホルム分布濃度を比較すると明かに網膜が高かった(表18)。それ故、網膜の神経節細胞の機能が失われることによるSMON犬における実験的キノホルム中毒の変性が考えられるが、顕微鏡下の変性研究と比較が必要である(脳神経であるがこの項に入れた)。

10-b) 後根神経節；脊髄レベルに比べると、ビーグル犬（腰髄）、雑犬（腰髄）、ネコ（頸髄）、ダイコクネズミ（腰髄）に比べて高い濃度が認められた。その値は脊髄より高い。それ故、末梢神経の導入に加うるに、イソニコチン酸ヒドラジッド中毒の例のように神経節細胞の機能が失われ、一方の末端である側索の変性と、他方の末端である坐骨神経の変性が生ずることが推定される。即ち、dying back disease の形で病変を生じ得ると考える。後根神経節のミトコンドリアの変性と関係ある事実かもしれない。

10-c) 半月神経節；後根神経節と同程度の強い放射能濃度がみられている。

10-d) 坐骨神経；中枢神経の5-10倍の濃度が、いずれの動物でも認められ、その半減期も著しく長い。ダイコクネズミの静脈投与実験（表9）で、1・3.5時間後の残存放射能から計算した半減期は3時間20分で第2相（3.5，24時間）では14時間30分であった。又、ハツカネズミに1回投与した  $^{131}\text{I}$  キノホルムが、8時間後にも坐骨神経にのみ認められている（表9）。

ネコで、坐骨神経に比較的近位・遠位の濃度差をみたが有意差はなかった（表19）。なお、腓骨神経は坐骨神経よりやや低かった。このことから、末梢神経における axonal flow の役割は少いと考えられる。

10-e) 上腕神経；キノホルム中毒の際、病変の比較的少ない上腕神経にもやや低い放射能の分布が認められる。坐骨神経との差異について今後研究を行いたいと考えている。

## Ⅶ 臓器内分布の総括

### A) キノホルム臓器分布の動物差の総括

後根神経節への侵入率が高く、血液脳関門の働きが弱いことが、実験動物に発病させやすい事実を説明するかも知れない。キノホルム投与後1～1.5時間の血漿又は血液キノホルム濃度に対する臓器濃度の比率(%)を比較すると（表18，21），次の点が注目される。

1. 後根神経節では、ネコが最高、ビーグル犬及び雑犬がこれに次いでおり、病変をおこしにくいダイコクネズミは明かに低かった。
2. 腰髄は  $^{14}\text{C}$  キノホルムでは、ネコが最も高く、小動物では低い。又その分布は後根神経節より低い。
3. 坐骨神経の分布は中枢神経系より高く、ネコ、雑犬、ビーグル犬に高い。小動物では  $^{131}\text{I}$  キノホルム注射ダイコクネズミの分布が高かった。
4. 網膜は血液の37-41%（ $^{131}\text{I}$  キノホルム）で視神経より高い。
5. 視神経の分布はダイコクネズミでは少く（5%），犬，ネコでは18～44%と高い（ $^{14}\text{C}$  キノホルム）。
6. 胆汁は、ビーグル犬，ネコでは血漿の500倍で特に高かった（ $^{14}\text{C}$  キノホルム）。
7. 尿中には血漿の9～96倍の放射能値がみいだされた（ $^{14}\text{C}$  キノホルム）。
8. 小腸内容物の放射能はビーグル犬では48倍で最も高く、ダイコクネズミ，ネコでは約9.5倍を

表 2 1 各種動物による臓器別分布の総括（腹腔内注射の場合，ハツカネズミのみ静注）

|              | ビーグル犬 <sup>131</sup> I                                                | 健康雑犬 <sup>131</sup> I                                            | ネ コ <sup>14</sup> C                         | ダイコクネズミ <sup>14</sup> C                                     | ハツカネズミ <sup>14</sup> C             | ビーグル犬 <sup>14</sup> C                            |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------------------|
| 中枢神経         | 血液濃度の 1/8～1/10<br>で雑犬にくらべてやや低い <sup>2)</sup>                          | 血液濃度の 1/5<br>～1/6 <sup>2)</sup><br>脊髄の導入がやや高い                    | 血漿濃度の 1/3～1/30<br>脊髄・前索・側索・後索・灰白質での分布に濃淡はない | 血漿濃度の 1/8～2/17<br>半減期(時間) 30分                               | 血漿濃度の 1/7～<br>1/14 半減期(時間) 2時間 43分 | 血漿濃度の 1/6<br>～1/8 でネコより高い。脳幹はネコより低い              |
|              | オートラジオグラムでの神経細胞への侵入が少い                                                | オートラジオグラムで神経細胞への侵入を証明できる                                         |                                             | オートラジオグラムで脳幹・脊髄の神経細胞への侵入を証明することがむづかしい                       |                                    |                                                  |
| 末梢神経         | 血液の 1/2～2/3<br>中枢神経の 2～8 倍                                            | 血液の 1/2<br>視神経・半月神経節がビーグルよりやや高い                                  | 血漿の 1～2 倍, 中枢神経の 2～5 倍, 坐骨神経で近位・遠位の差はない     | 血漿の 1/10～2/3<br>坐骨神経の半減期 3 時間 20分, 1 回投与で 8 日後にも放射能がみられる    | 血漿の 1/10<br>半減期 2 時間 47 分          | 血漿濃度の 1/3<br>～1/5, 視神経・後根神経節・半月神経節・坐骨神経何れもネコより低い |
|              | 上腕神経・坐骨神経・半月神経節・後根神経節・視神経にキノホルムの高い移行がみられるが, 坐骨神経への侵入はオートラジオグラムで証明しにくい |                                                                  |                                             |                                                             |                                    |                                                  |
| 肝 臓          | 血液濃度の 3 倍で雑犬より高く, オートラジオグラムの所見と一致する                                   | 血液濃度の 2 倍                                                        | 血漿濃度の 10 倍以上で他の動物より高い                       | 血漿濃度の 1/2～2 倍                                               | 血漿濃度以下                             | ネコより低い<br>血漿の 4 倍                                |
| 腎 臓          | 血液濃度の 2～4 倍                                                           | 血液濃度の 1～3 倍                                                      | 血漿濃度の 2～3 倍                                 | 血漿濃度の 1～3 倍                                                 | 血漿濃度の 4 倍                          | 血漿の 2 倍でネコよりやや低い                                 |
|              | いずれの動物も近位尿細管上皮細胞にとり込みが多い                                              |                                                                  |                                             |                                                             |                                    |                                                  |
| 胆 汁          | 胆汁移行が血液の 30 倍を示している                                                   | 血液濃度の 30 倍 ビーグルと <sup>131</sup> Iではひとしい <sup>12)</sup>           | 血漿濃度の 500 倍                                 |                                                             | 血漿濃度の 50 倍                         | 血漿の 500 倍でネコと等しい                                 |
| 血 液<br>そ の 他 | 発症までの投与量が雑犬の 3～4 倍 1 日量 350～450mg/kg 総投与量 13008±3506 mg/kg (大月, 立石他)  | 発症をおこしやすい 1 日投与量 60～145mg/kg 総投与量 $4161 \pm 1984$ mg/kg (大月, 立石) | 血液より臓器に速かに移行<br>発症を雑犬と同程度におこしやすい (大月, 立石他)  | 半減期 1 時間 50 分<br>一般に病変がおこりにくく 1000 mg/kg 投与で坐骨神経の電顕病変のみ(小口) | 半減期 1 時間                           |                                                  |

示した( $^{14}\text{C}$ キノホルム)。

しかし詳細に観察すれば  $^{131}\text{I}$ キノホルムの例のみであり、尾静脈注射法であるので明確ではないが、未検である。後根神経節、半月神経節、網膜、視神経を除いてはダイコクネズミのそれが雑犬と大差のない場合がある。投与方法による差異も考えられるが、一方動物による神経細胞のキノホルム感受性の差異も否定出来ない。

#### B) 各種動物において共通した分布の総括

1. キノホルムの神経分布に、血液脳関門の機能の弱い部分に入りやすい。即ち、末梢神経(坐骨、後根神経、半月神経節)には、中枢神経の約5~10倍の濃度が認められる。坐骨神経節の半減期は長い。そして坐骨神経の附着の他に dying back による神経病変の発生形式が仮定される。
2. 中枢神経では、脊髓における分布がやや高い他は濃度差は認められない。且つ脊髓では後索・側索・灰白質・前索の濃度差は比較的少い。
3. 下垂体、網膜に高い濃度分布がみられる(犬および猫の一部)。
4. 一般臓器では、ほぼ腎臓・肝臓・脾臓・小腸・脂肪・肺臓・脾臓の順に分布し、すべての臓器に分布している。日数単位の半減期では、放射能値の高い腎臓が短く、腎に集積後の排泄が予測される。
5. クロロホルム溶性分画/全分画比より推定される遊離キノホルム/総キノホルム比は①血中では時間と共に減少する ②中枢神経系に高い ③経口投与法は注射法より低い傾向がある。

#### C) 犬の病変との関係

感覚神経系; 後索の変性; 後根神経節細胞及び末梢知覚神経の放射能値の高いことより末梢神経の附着の他に dying back disease として説明され得るであろう。視神経に関しては網膜より説明は可能であろうが、網膜の神経細胞のミクロオートグラフィ及び、鏡検像との詳しい対比が必要である。

運動神経系; 頭頂葉を含む大脳のとりこみが①1%含有と計算されている血液中の放射能値を差引いてもなお存在すること。②〔クロロホルム溶性分画/全分画〕比が大脳は血液より高いこと。より、その可能性は存在するが、一方その値は後根神経節細胞、末梢神経より低い。それ故、側索の変性を分布のみより説明することは現在では困難である。今後研究を行い度いと考えている。

#### VII 負荷実験の考察(表19, 20)

四塩化炭素負荷により脂肪肝を起させた動物では、対照群にくらべて、生体内に分布する全キノホルムに対する遊離キノホルムの割合が増加することが明かになった(表19)。これは、四塩化炭素肝障害による活性グルクロン酸、および活性硫酸の減少が主たる原因であると考えられるが、一方、<sup>6)</sup>肝臓の $\beta$ -グルクロニダーゼ活性が四塩化炭素で増加するとの報告もあり、その一因となり得ると考えられる。いづれにせよ肝障害負荷により遊離キノホルムの神経組織内の貯留が増加し、キノホルム中毒を発症しやすくすることが考えられる。又、腎臓の排泄能力を減少させると、血液中の放射性キノホルムの半減期が延長し、体外への排泄量が低下することがキノホルム中毒を起させやすくと



考えられる。事実、臓器分布でも腎炎負荷群ではすべての臓器において増加していた。ことに、クロロホルム可溶分画についても同様に腎炎負荷により、また、腎炎負荷ダイコクネズミでは、腎臓においては著明なキノホルムの蓄積が認められ(表20)、このことはオートラジオグラムでも確認され<sup>37)</sup>た。腎においては上位尿細管に集中し、腎盂には認められなかった。このことから、キノホルムの腎からの排泄は尿細管を経由するものと考えられる。アレルギー性腎炎により何らかの影響が尿細管におよび、尿細管の排泄能力の低下があつて、キノホルムが、血清及び臓器に蓄積されと考えられる。ことにクロロホルム可溶キノホルムの増加が認められることは、腎の病変を悪化させる可能性をもっており、このことがキノホルム中毒を増悪させる荷重因子となって悪循環をおこす可能性が考えられる。<sup>41,43)</sup> S M O N と腎障碍の関係についてのキノホルムの果す役割については今後の詳しい検討を必要とする。一方において血清中の遊離キノホルムの半減期が延長することは、キノホルムの毒性が遊離キノホルムによると考えられている所から意義がある。

### 結 論

- 1) 生体内キノホルム投与後、および添加後試験管内の血清の radio-paper-electrophoresis によって、キノホルムの carrier は血清アルブミンであると考えられる。
- 2) キノホルムは腸・肝・胆道循環を行なう。また胆汁に血液の約30~500倍に及ぶ濃度が存在する。胆汁中に遊離キノホルムは極めて少なく、主としてグルクロン酸抱合物として存在する事が radio paper-chromatograph で証明された。腸内細菌及び腸粘膜によって、一部は遊離キノホルム型となる(14.4%<sup>注)</sup>)。そして、小腸のクロロホルム溶性分画の半減期が長いので、小腸より吸収されと考えられる。
- 3) キノホルムの神経組織への分布は、血液脳関門の少く移行しやすい部に多い。a:末梢神経(坐骨神経、後根神経節、半月神経節)に入る。後根神経節の神経細胞に対する導入の成績よりは、dying back neuropathy による形式が考えられる。坐骨神経の半減期は長い。b:中枢神経(大脳、小脳、脊髓)には、脊髓にやや高いが放射能値には大差がない。その血液含量を1%として、血液放射能値を除外してもなお、放射能の存在が認められる。脊髓では一例であるが後索、側索、灰白質、前索の著明な濃度差は認められなかった。c:脳下垂体には高い分布が認められる。d:網膜にその分布は高い。
- 4) 一般臓器分布;腎臓・肝臓・脾臓・小腸・脂肪・肺・脾臓の順序に分布する。腎では半減期が短く、排泄が速い。脂肪に分布することはそれが体内蓄積の原因となりうると考えられる。
- 5) 臓器分布の動物差;イヌ・ネコはダイコクネズミ、ハツカネズミに比べて中枢神経系や、後根に対する放射能値が高く、その中毒の発生しやすい点と対応する。<sup>131</sup>Iキノホルムの尾静脈投与ではダイコクネズミの中枢神経の分布はやや高かった。犬のうちではビーグル犬は雑犬に比べて、前頭葉・小脳・脊髓に対する放射能値がやや低い。
- 6) 頻回投与の影響;5回目の経口投与で、whole body の放射能値は平衡に達し、その量は1

回投与の約2倍量である。

7) 四塩化炭素負荷；ダイコクネズミでは中枢および末梢神経系の遊離キノホルムによる放射能値が高く，馬杉腎炎を発生させたダイコクネズミではキノホルムの血中濃度の減少が少なく，腎臓および肝臓に蓄積される事が見い出された。

#### 文 献

- 1) David, N.A., Johonstone, H.G., Reed, A.C. & Leake, C.D.; The treatment of amebiasis with iodochlorohydroxyquinoline (Vioform, N.N.R.), J. Amer. Med. Ass., 100;1658-1669, 1933
- 2) David, N.A.; Uncontrolled use of oral amebicides, J. Amer. Med. Ass. 129, 572, 1945
- 3) Haskins, W.T. & Luttermoser, G.W.; Urinary Excretion of Vioform and Diiodoquin. J. Pharmacol. Exp. Ther. 109, 201-205, 1953
- 4) Seegal, B.C., Harson, M., Gaynor, E.C. and Rothenberg, M.S.; Glomerulonephritis produced in dogs by specific antisera. The course of the disease resulting from injection of rabbit antidogplacenta serum or rabbit antidogkidney serum; J. Exp. Med. 102, 789-805, 1955
- 5) Das, A. & Mukherji S.L.; a new approach to synthesis of dihalogenated 8-quinolinol derivatives. J. Org. Chem. 22, 1111-1112, 1957
- 6) 河田肇, 小泉岳夫, 伊丹淳一, 和田竜七, 志水洋二; グルクロン酸抱合に関する実験的研究, Reports on Guronsan 中外製薬株式会社 東京. 56-61, 1957
- 7) Lajtha, A., Furst, S., Gerstein, A. & Waelsch, H.; Amino acid and protein metabolism of the brain: Turnover of free and protein bound lysine in brain and other organs. J. Neurochem. 1, 289-300, 1957
- 8) Hobbs, H.E., Sorby, A. & Freedman, A.; Retinopathy following chloroquine therapy. Lancet II, 478-480, 1959
- 9) Ganong, W.F.; Review of Medical physiology. 4, p 531 Lange Medical Publications, Canada 1963
- 10) Roeach, E., Roeach, A. & Haffter, D.; Polyneuropathie durch 5-nitro-8-hydroxychinoline in Tierexperimenten. Arch Toxikol 20, 313-322, 1965
- 11) Roeach, S.A.; A more rational basis for air sampling programs. Amer Industr Hyg. Ass. J. 27, 1-12, 1966
- 12) Liewendahl, K. & Lamberg, B.A.; Metabolism of <sup>125</sup>Iodochloroxyquinoline in man. I. Absorption binding and excretion. Nuclearmedizin 6, 20-31, 1967
- 13) Liewendahl, K. & Lamberg, B.A.; Metabolism of <sup>125</sup>Iodochloroxyquinoline in man. II. Absorption binding and excretion, Nuclearmedizin, 6, 32-43, 1967
- 14) Berggren, L. & Hansson, O.; Absorption of intestinal anti-



septics derived from 8-hydroxyquinolines. Clin. Pharmacol. Ther. 9, 67-70, 1968

15) Sönksen, P.H., Ekins, R.P., Stevens, H.G., Williams, E.S. & Narbarro, J.D.N.; Serum-levels of protein-bound iodide and thyroxine after a course of Clioquinol, Lancet II, 425-426, 1968

16) Bosse, J.A. & Wasserman, O.; On the blood content of guinea-pig tissues, Pharmacology (Basel) 4, 273-277, 1970

17) 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, 309-310, 1970

18) 祖父江逸郎, 安藤一也; 腹部症状を伴う Myeloneuropathy (SMON) についてのこれまでの展望と問題点, 最新医学 24, 2390-2402, 1970

19) 高須俊明, 井形昭弘, 豊倉康夫; SMON患者にみられる緑毛舌, 神経症状とキノホルムの関連, 日本医事新報 2427, 24-32, 1970

20) 田村善蔵; 生体試料からの非抱合型キノホルムの微量分析, スモン調査研究協議会研究報告書 No 3, 176-178, 1970

21) 椿忠雄, 本間義章, 星充; SMONの原因—キノホルムとの関連について, 臨床神経学 11, 126, 1971

22) 緒方正名, 友国勝磨, 本並一二三, 島田宣浩, 小坂淳夫, 安東醇, 渡辺昌祐, 大月三郎;  $^{131}\text{I}$ キノホルムの生体内代謝, スモン調査研究協議会, 1971(3月), 東京

23) 大月三郎, 池田久男, 渡辺昌祐, 立石潤, 斉藤章, 黒田重利; イヌにおけるキノホルム慢性経口投与実験ならびに  $^{131}\text{I}$ キノホルムの Autoradiography, スモン調査研究協議会キノホルム部会第一回研究会, 1971(7月), 東京

24) 大月三郎, 渡辺昌祐, 立石潤, 黒田重利, 緒方正名, 友国勝磨, 林澄子; 四塩化炭素及びアレルギー性腎炎負荷ラットにおける  $^{131}\text{I}$ キノホルムの代謝・臓器別分布, 同上

25) 緒方正名, 友国勝磨, 林澄子, 大月三郎, 渡辺昌祐, 立石潤, 黒田重利;  $^{131}\text{I}$ ・ $^{125}\text{I}$ ・ $^{14}\text{C}$ キノホルム生体内分布の時間経過, 同上

26) 緒方正名, 林澄子, 大月三郎, 渡辺昌祐, 立石潤, 黒田重利;  $^{131}\text{I}$ ・ $^{14}\text{C}$ キノホルム生体内分布の時間経過(続報), 同上

27) 大月三郎, 池田久男, 渡辺昌祐, 立石潤, 斉藤章, 黒田重利; 犬・猫におけるキノホルム投与実験(続報) I キノホルム慢性経口投与実験 II 放射性キノホルムの microautoradiography, 同上

28) 橋本和夫, 安藤剛; アクリルアミドによる神経障害作用の研究, 第44回日本産業医学会講演集 東京, 228, 1971

29) 小口喜三夫, 佐藤猛, 椿忠雄; キノホルム投与ラットの末梢神経の電顕学的研究, スモン調査研究協議会研究報告会抄録集 55, 1971

30) 松橋直等; スモン調査研究協議会研究報告追加討論, 1971

31) 三村和夫, 大音康郎, 中野益弘他; キノホルムによる実験的糖尿病, 四国医誌 27, 169-170, 1971

32) 難波昌弘, 篠井格, 藤井靖久, 谷崎勝郎, 三好勇夫, 谷崎一郎; 腎不全に続発した SMON の 2 症例, 臨床神経学 11, 154, 1971

33) 緒方正名, 友国勝磨, 林澄子, 渡辺昌祐, 立石潤, 黒田重利, 大月三郎, 安藤醇; 放射性キノホルムのハツカネズミ, ダイコクネズミにおける蓄積および排泄, 医学と生物学 83(1), 9-14,

1971

- 34) 緒方正名, 渡辺昌祐, 立石潤, 黒田重利, 大月三郎;  $^{14}\text{C}$ キノホルムのハツカネズミ生体内分布, 医学と生物学 83(2), 79-82, 1971
- 35) 緒方正名, 渡辺昌祐, 立石潤, 黒田重利, 林澄子, 大月三郎;  $^{131}\text{I}$ キノホルムの静脈内注射後のダイコクネズミ臓器内蓄積量の時間経過, 医学と生物学 83(4), 197-201, 1971
- 36) 高橋康夫, 荒木一明 生体内におけるキノホルムの運命とその作用, 第74回日本神経学会抄録, 134-137, 1971
- 37) 立石潤, 池田久男; キノホルム経口投与による犬の慢性中毒症状について, 医学のあゆみ 76, 611, 1971
- 38) 立石潤, 池田久男, 斉藤章, 黒田重利, 早原敏之, 大月三郎; SMONと同一の脊髄後索変性を示した慢性キノホルム中毒犬, 医学のあゆみ 77, 205-206, 1971
- 39) 立石潤, 黒田重利, 渡辺昌祐, 斉藤章, 大月三郎, 緒方正名;  $^{131}\text{I}$ キノホルム投与犬のラジオ・オートグラフィー, 医学と生物学 83(3), 91-96, 1971
- 40) 立石潤, 池田久男, 斉藤章, 早原敏之, 黒田重利; 慢性キノホルム中毒犬の病理所見, 第12回日本神経病理学会で発表
- 41) 丹羽豊郎, 松井正二; 急性腎盂炎に続発した腹部症状を伴う脳脊髄炎の一剖検例, 臨床神経学 11, 26, 1971
- 42) 山田英智, 東浅英夫; 実験的キノホルム中毒の神経病理, スモン調査研究協議会キノホルム部会第2回研究プログラム 19-20, 1971
- 43) 梅原千治, 室生勝, 今井竜雄; 急性腎不全で死亡せる急性脊髄炎(スモン?)の二症例, 臨床神経学 11, 26, 1971
- 44) 渡辺昌祐, 立石潤, 黒田重利, 大月三郎, 緒方正名, 友国勝磨, 安藤醇; 放射能キノホルムの神経組織への移行, 医学と生物学 83(1), 15-19, 1971
- 45) 渡辺昌祐, 立石潤, 黒田重利, 大月三郎, 緒方正名, 友国勝磨; 四塩化炭素中毒ダイコクネズミにおける  $^{131}\text{I}$ キノホルムの代謝, 医学と生物学 83(2), 81-83, 1971
- 46) 緒方正名, 大月三郎, 渡辺昌祐, 立石潤, 黒田重利; 標識キノホルム生体内分布・代謝(ネコ, ラット及び動物差について), スモン調査研究協議会キノホルム部会第3回研究会, 1972(3月), 東京
- 47) 緒方正名, 入見硬, 大月三郎, 渡辺昌祐, 立石潤, 黒田重利; 標識キノホルムの生体内分布・代謝(犬による実験成績), 同上
- 48) 大月三郎, 渡辺昌祐, 立石潤, 斉藤章, 黒田重利, 緒方正名; 放射性キノホルムの micro-autoradiography(その3), 同上
- 49) H. Keberle, K. Schmid, Hp. Egger; Vioform Resorption, Verteilung und Ausscheidung beim Tier, Personal Communication, 1972
- 50) 高垣玄吉郎; 脳関門系 裕田裕三篇, 脳の生化学 p92-101 朝倉書店 東京 1969
- 51) Retzlaff, K; Z. exper. Med, 34, 133, 1923
- 52) Qka, T; Tohoku J. exp. med., 6, 489, 1925
- 53) 町田, 長崎医学会雑誌, 14(8), 昭和11.

(注)

キノホルムが胆汁に排泄され種差はあるがその大部分は抱合型、一部分は遊離型である。それらが何れも腸管より再吸収される。一方、キノホルムの抱合物が遊離の形になりうるか、否かについて、そのモデルとして考えうるビリルビンについては、腸管内で腸管内諸物質及び腸管上皮により吸収に際して遊離型になると云うRetzlaff<sup>51)</sup>の文献、及びこれに対し遊離型になり難く、動物差が存在すると述べている岡<sup>52)</sup>、町田<sup>53)</sup>などの文献があるので、腸管における遊離型えの変換については今後の詳細な検討を必要とする。腸内細菌群の差も考えられる。

## 12. キノホルム投与量と発症の関係 Retrospective の調査

奥田 邦雄, 渡辺 誠介, 川口 新一郎

スモン患者に対するキノホルム剤使用の調査は、発症からすでに数年を経過しており、また訴訟問題もからんで、必ずしも容易ではない。

今回我々は、千葉県スモン対策地方協議会が実施したスモン研究協力謝金希望患者19名の面接の際、キノホルム剤について知りえた成績と、千葉市某公立病院において慢性腸炎などによりキノホルム剤が処方された患者について病歴およびアンケートによる追跡調査を行ったので、これらを中心に報告する。

### I 千葉県スモン研究協力謝金希望患者について

対象は19例で男3例女16例であるが、謝金入院治療を希望し、本人の負担が20,000円以上のものである。性や年齢はあまり問題にできない。神経症状発現時期は、昭和34年に2例、ついで41年3例、42年1例、43年2例、44年7例、45年4例となっている。症状はこれまでの報告の如く鼠径部以下の強度の異常知覚を有し著しく歩行が障害されているものが半数を占めており、視力の異常は19例中6例にみられた。

カルテなどによりキノホルム剤の使用が確認されたものが19例中12例あり、確認はできなかったが疑が濃厚なものが3例、残り4例が不明であった。すなわち約79%に関連があると考えられる。

使用されたキノホルム剤はエマホルムが半数を占め、ついで複合ワカ末が3例、強力メキサホルム2例、エンテロビオホルム1例であった。

神経症状発現までの使用量の明らかな7例についてみると表1の如くであった。

またこれらの大多数は神経症状発現後もキノホルム剤の投与は続けられていた。患者の体重は測定していないので、体重当りの量は不明である。

表1

| キノホルム量 × 日数                    |    |   |     |
|--------------------------------|----|---|-----|
| 1350                           | mg | × | 15日 |
| 1350                           | mg | × | 22日 |
| 1350                           | mg | × | 24日 |
| 1200                           | mg | × | 14日 |
| 1080                           | mg | × | 10日 |
| (800 mg × 4日) + (600 mg × 34日) |    |   |     |
| 900                            | mg | × | 84日 |

## II 某公立病院におけるキノホルム投与患者の追跡調査について

千葉県某公立病院内科の御協力により、44年2月～45年9月の間に過敏性大腸・慢性腸炎などの病名でキノホルム剤を2週以上連続投与された52例のカルテを選び神経症状発現の有無を調べた。投薬後引続き来院しカルテから現在の症状が判明しているものが24名あり、残りについては健康調査表の形式をとり質問事項の中にスモンの症状を含めて、この回答から判定した。

この病院で使用されていたキノホルム剤はすべて強力メキサホルムであり、処方量は常用量の1.5～2.0g、あるいは3～6錠であるが、期間は2週より203日に及んでいる。

これを井形教授のDose Duration Patternにプロットすると図1のようで、46例が発症の可能性を示す範囲内にあるが、スモンが疑われるのは2例であった。1例は600mgを56日間投与された肺結核と腸炎の63才の男性であり、もう1例は600mgを120日投与された胃下垂症の35才の女性である。この他、「目がかすむ」という項にチェックしたのが2例あり、いずれも800mg 14日投与されたものであった。

これらの症例はいずれもアンケート調査によるものであって、同病院に通院中にはカルテに神経症状の記載がない。同病院の医師はスモンの症状を熟知されているが、アンケートの質問事項は患者を刺激しないように配慮したためやゝ不充分であるので、機会をみて直接診察するように努めたい。

### 考 按

スモン患者における調査ではキノホルム剤の1日量は1000mgを越すものが大部分であった。一方、消化器疾患に投与された場合の調査では、服用期間が著しく長期に亘っているにもかかわらず1日の使用量が比較的少ないためか典型的な発症者をみていない。これらの点から我々は一日量と日数を比較すれば一日量の方により比重がかゝると考える。腹部症状自身がキノホルム剤に起因するかという問題については、疑われる1例を経験しているがまだ十分な検討を加えていない。

キノホルム剤の中でもエマホルムが多いのは、単に市場性のみならず乳化剤による吸収と共に1gあたりのキノホルム含有量が90%と高いのにもかかわらず、エンテロビオホルムあるいは強力メキサホルムと同量処方してしまった恐れがうかがわれる。

更にキノホルムが問題となってからスモン類似疾患を調べ直してみると、自律神経失調によるアクロバステジーの1例と変形性腰椎症によるニューロバシーとされていた1例が発症前に整腸剤としてキノホルムを常用していたことが判明した。

腹部症状が典型的でなかったために別の診断がされた場合はかなり多いと思われるのでキノホルム中毒症という立場から類似疾患についても再検討する必要があると思われる。

### 結 論

千葉県におけるスモン研究協力希望患者19例につきキノホルム剤投与の有無を調べ、19例中15例79%に関連があると判定された。

某病院において消化器症状に対してキノホルム剤が2週間以上連続投与された52例につきカルテ

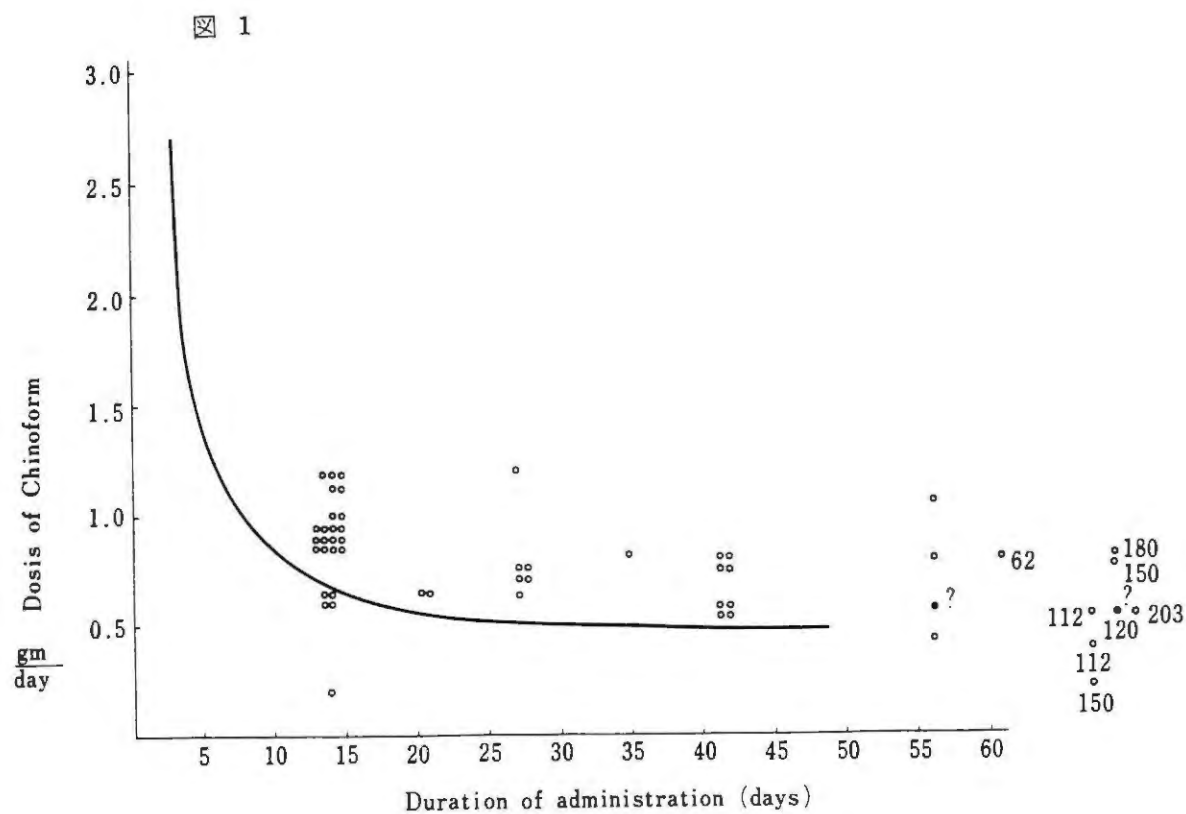
及びアンケートによる追跡調査を行い、2例の疑わしい症例を見出した。

腹部症状が典型的でなかったためにスモンとされなかった症例について、キノホルム中毒症の立場から再検討する必要があると考える。

# 文 献

中江公裕・井形昭弘：S M O N 発症とキノホルム投与状況との関連についての理論的考察

医学のあゆみ，76：667－669，S46・2・27



### 13. カニクイ猿を使用してのキノホルムの経口投与実験

高橋 理明, 納寿 一郎, 奥野 良臣

( 阪大微研 )

岡野 錦弥

( 阪大・病理 )

谷口 春生

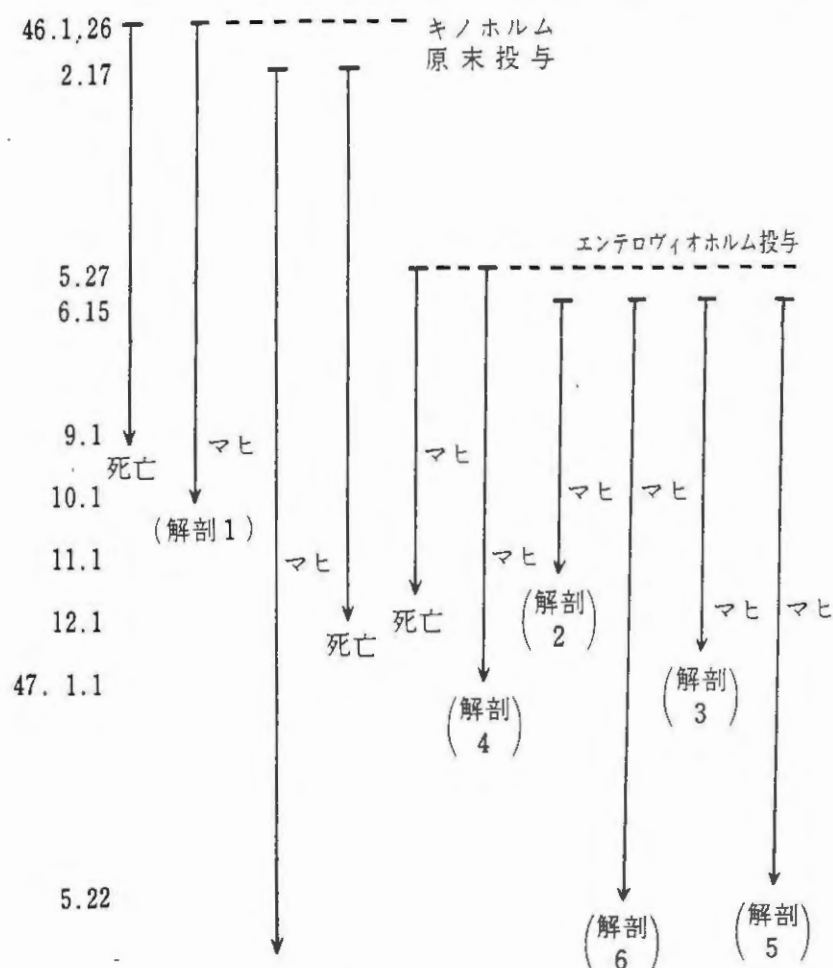
( 大阪府立成人病センター, 病理 )

#### I 目 的

私共はさきにキノホルム経口投与によりカニクイ猿に後肢マヒの生ずることを報告したが更にこの実験を進め, 特に病理学的に人のスモン類似の病変を呈するかどうかをしらべることに重点をおいた。

#### II 材料方法

カニクイ猿合計10匹(1.3~2.0Kg)を4群に分け(2, 2, 2, 4匹), キノホルム(主としてエンテロヴィオホルム500mg/day/匹)を飲料水にまぜて経口投与した。



カニクイ猿に対するキノホルムの経口投与



## 成績

### 1) 第1群の猿(1.3Kg, 2匹)

1月26日よりキノホルム純末(田辺製薬)500mg/day/匹を投与したが水に難溶性のせいもあってか5月に至るも何ら症状を呈さなかった。そこで5月27日より水によくとけるエンテロヴィオホルムを500mg/day/匹を用いた。1匹は9月初旬死亡し他の1匹は9月末に後肢マヒをおこし10月4日に解剖した(解剖例1)

### 2) 第2群の猿(1.3, 1.5Kg 2匹)

2月17日よりキノホルム純末の経口投与開始, 5月に至るも症状がでないため第1群と同じく5月27日よりエンテロヴィオホルムにきりかえ投与を続行した。1匹は11月中旬に後肢マヒをおこし他の1匹は11月21日に死亡した。

### 3) 第3群の猿(1.3, 1.5Kg 2匹)

5月27日よりエンテロヴィオホルムの経口投与を開始, 1匹は9月末後肢マヒをおこし, 投与を中止したが11月4日死亡, 他の1匹は11月中旬後肢マヒをおこし, 翌1月7日に解剖した(解剖例4)

### 4) 第4群の猿(2.0Kg 4匹)

6月15日よりエンテロヴィオホルムの投与を開始, 9月末に2匹後肢マヒをおこしうち1匹は11月1日に解剖(解剖例2)他の1匹は投与を中止し翌年5月24日に解剖(解剖例6)11月中旬他の2匹も後肢マヒをおこし, うち1匹は12月1日に解剖(解剖例3)他の1匹は投与を中止し翌年5月22日に解剖(解剖例5)

以上の通りキノホルム経口投与開始後, 3~9月で10匹のカニクイ猿の殆ど全例が程度の差はあるが後肢マヒをおこした。

## 病理組織学的所見

HE, LFB, LFB-H E 2重染色, 軸索染色及び凍結切片に関してSudanIVによる脂肪染色を主として行った。他に全臓器についてもHE染色により組織学的に検索した。なお健常な猿についても同様の組織標本作製して対照とした。

背髄に於ける組織学的変化はLFB染色において明らかであった。解剖例1では髄鞘の変性が背髄に於て一般にビマン性にみられ前, 側, 後索ともいはゆる蒼白化の状態が認められ明瞭な限局巣がみとめられなかった。背髄神経では殊に後根神経に極めて著明な髄鞘変性を証明し得た。

解剖例2では髄鞘変性は前例に比しより顕著で一般に後索及び側索にやゝ限局した一層高度な髄鞘変性を認めた。これらの変化は人体に於けるSMONの背髄変化に比較的近いと思はれる。なお後根背髄神経の髄鞘変性は前例同様に顕著であった。又前角神経細胞も部分的に核融解, 濃縮などの所見を呈していた。Gliosisの傾向もみられ又後根神経節細胞の変性を認めるものもあった。

解剖例3, 4に関しては解剖例2程著明な変化は一般にみられなかった。これらの解剖例は何れも

マヒ症状がおこってから解剖までの期間が1ヶ月以内であり人体例程著明な変化がみられなかったのは発病後解剖迄の期間の短かったことも関連していると思はれる。解剖例5, 6に関しては目下標本作製中である。

#### 要 約

合計10匹のカニクイ猿(1.3~2.0Kg, 4群, 2, 2, 2, 4匹)にキノホルム(主としてエンテロヴィオホルム, 1匹あたり500mg/day)を飲料水にまぜて長期間経口投与して変化を観察した。2匹の死亡例を除き3~9ヶ月の投与後全部が後肢のマヒをおこした。

うち4匹は病理解剖したがマヒ直後に解剖した例では髄鞘の変性が背髄に於て一般に瀰漫性にみられ, マヒ出現後1ヶ月で解剖した例では後索及び側索にやゝ限局した高度の髄鞘変性がみられた。しかし一般に病理変化は人体例程著明でなく, これには発病後解剖までの期間も関係していると思はれこの点について目下追求中である。

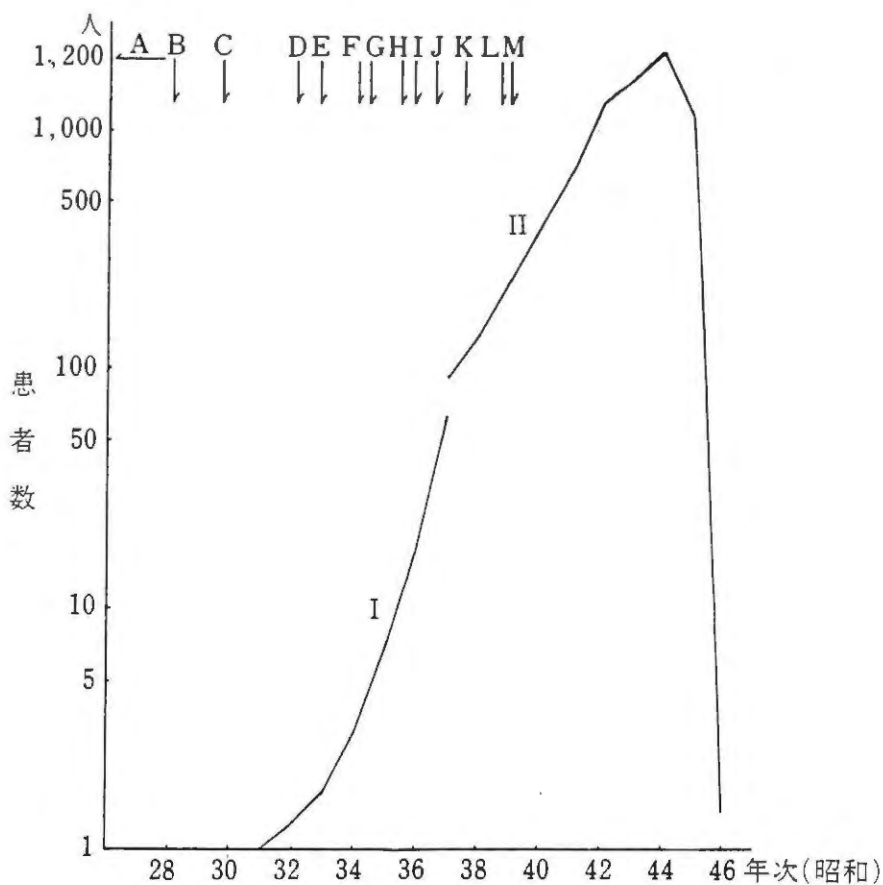
## 14. 乳化剤の配合がキノホルムによるスモン発症に及ぼす影響

金光 正次, 笠井 美智子

(札幌医大・衛生)

キノホルム(キ剤)<sup>1)</sup>が日本薬局方に収載されたのは昭和14年で、以後急性胃腸炎やアメーバ赤痢に著効があり、かつ安全な薬物として広く使用されてきた。キ剤の使用見合せと共にスモンが激減したことは、これを本病の原因と確定する有力な根拠の1つになったが、これは流行終息との関連を採り上げたもので、流行の出現理由を説明するには十分でない。

本病が出現したのは昭和30年頃からで、キ剤の使用開始とは年次的にかなりのズレがある。近年になってキ剤の薬効を高めるために各種の乳化剤を配合したものが市販されるようになった。乳化キ剤の国内生産が初まったのは昭和28年<sup>2)</sup>からで、スモンの出現と年次的に一致する(図1)。このことからわれわれは乳化剤の配合がキ剤によるスモンの発症を増強するのではないかと考え、イヌを用いて実験した。



I : 前川班<sup>7)</sup>、II : スモン調研協<sup>8)</sup>の資料

A : 乳化剤配合以前、B-M : 各社の乳化キ剤の製造販売年次

図1. 乳化剤添加キノホルムの国内生産とスモン発生との年次的関係

## 実験方法

使用薬物：キ剤としてスモン調査研究協議会から分与されたキノホルムの純末と、乳化剤としてはキシダ化学工業製のカルボキシ・メチルセルローズ（CMC）を使用した。

イヌ：体重8.0-14.2 Kgの雑犬14頭（雌12，雄2頭）に駆虫薬を与え，1週後にそれを表1の如く4群に分けた。

薬剤投与方式：立石ら<sup>3)</sup>の方式を参考にしてキ剤は30 mg/kg/dayから始め，4日毎に20 mg/kg/day ずつ増量し，150 mg/kg/day に達した後はこれを維持量とした。CMCの配合はエマホルムに準じてキ剤の10.6%とした。またCMC群にはこれを15.9 mg/kg/day ずつ連続投与したが，下痢のため中断したものもある。薬剤は1日量を1回分としてオブラートに包み，ミートボールあるいはマッシュポテトに封入して経口投与した。宿便措置などは一切行わない。

## 観 察

雨天の日を除いて毎朝500 mの歩行と走行をおこなわせれた後，17階段の昇降を繰り返して動作を観察し，発症したイヌはその動作を映画に撮影した。そのほか筋電図，血液と尿の検査を行い，12頭を剖検した。

## 成 績

### 1. 臨床的観察

実験開始から43日目までの期間の成績を表1に示した。症状は階段の昇降を反復させた際，最も明瞭に観察することができた。表の+は昇降時の動作が対照群に比べて鈍く，後肢に脱力を認めるもの，++は昇降の途中で階段に座り込み，動けなくなったもの，+++はその中間の症状を示す。CMC附加キ剤群のうち%36は実験途中で妊娠を発見したが，投薬は続行した。キ剤単独投与群では%42のみが発症し，50日後に起立不能になるほど症状が進行したが，投与を中止すると共にやや軽快した。前群の方が高率にしかも少量のキ剤で発症し，発症までの日数も短い。

### 2. 誘発筋電図

実験開始から29-43日の間に，発症犬を含め10頭について後肢諸筋の安静時および受働伸展時の筋電図をしらべた。被検筋はM. tibialis anterior, M. gastrocnemius, M. quadriceps femoris, M. biceps femoris, M. adductorである。表2はその成績をまとめたもので，発症犬のうち3頭のM. tibialis anterior に安静時のfibrillation，2頭のM. adductor に受働伸展時にgrouping voltageとtremorが出現した。その他のイヌには異常を認めない（この研究は北大歯学部生理学教室の横田助教授の援助を受けた）。

### 3. 病理組織学的所見

実験開始から32-96日の間に11頭を剖検し，中枢及び末梢神経組織，その他の諸組織を光顕ならびに電顕的に検査した。光顕的に発症犬の坐骨及び経骨神経に強い髄鞘の変性と部分的消失，筋肉の萎縮を認めた。背髄，視神経，脳には炎症性変化や脱髄を認めることはできなかったが，電顕的

Table 1. Effect of Carboxymethyl Cellulose on the Onset of SMON Syndrome  
in Dogs Administered Orally with Chinoform.

| Medication | No. | Sex | Body weight        | -21 | 22 | 29 | 37  | 43 | Total amount of<br>chinoform given |
|------------|-----|-----|--------------------|-----|----|----|-----|----|------------------------------------|
| Ch+CMC     | 35  | F   | 11.2 <sup>Kg</sup> | —   | +  | +  | ++  | ++ | 17.0 g                             |
|            | 36  | F   | 8.5                | —   | —  | —  | —   | —  | 76.0 (71 days, no symptom)         |
|            | 37  | F   | 14.0               | —   | —  | +  | +++ | ++ | 30.1                               |
|            | 38  | F   | 11.0               | —   | +  | +  | +   | +  | 21.8                               |
|            | 43  | M   | 8.0                | —   | —  | —  | +   | +  | 18.2                               |
| Ch*        | 34  | F   | 14.2               | —   | —  | —  | —   | —  | 81.8 (60 days, no symptom)         |
|            | 40  | F   | 8.5                | —   | —  | —  | —   | —  | 42.1 (46 days, no symptom)         |
|            | 41  | F   | 10.8               | —   | —  | —  | —   | —  | 91.8 (71 days, no symptom)         |
|            | 42  | F   | 11.8               | —   | —  | +  | +   | +  | 39.0                               |
|            | 44  | M   | 9.0                | —   | —  | —  | —   | —  | 51.2 (56 days, no symptom)         |
| CMC        | 33  | F   | 9.0                | —   | —  | —  | —   | —  |                                    |
|            | 39  | F   | 9.5                | —   | —  | —  | —   | —  |                                    |
| Control    | 31  | F   | 11.5               | —   | —  | —  | —   | —  |                                    |
|            | 32  | F   | 9.0                | —   | —  | —  | —   | —  |                                    |

\* chinoform

には背髄に髄鞘の蜂窩性構造，髄鞘と軸索の解離，軸索内小器管の消失などが対照犬に比べて著明であった（この研究は北大医学部第2病理学教室の恩村教授の援助をうけた）。

Table 2. Electromygraphic Examinations of Dogs Administered Orally With Chinoform of Different Kinds

| Medication | No. | Fibrillation of M. tibialis ant. at rest | Grouping voltage and tremor of M. adductor after passive stretch |
|------------|-----|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| Ch+CMC     | 35  | + 29th day                               | (-)*                                                             |
|            | 36  | -*                                       | -                                                                |
|            | 37  | + 36th                                   | (-)                                                              |
|            | 38  | -                                        | + 29th                                                           |
| Ch         | 34  | -                                        | -                                                                |
|            | 40  | -                                        | -                                                                |
|            | 41  | -                                        | -                                                                |
|            | 42  | + 36th                                   | + 29th                                                           |
| CMC        | 33  | -                                        | -                                                                |
|            | 39  | -                                        | -                                                                |

\*(-) and - indicate the absence of abnormal signs until 36th and 43th day, respectively.

#### 4. 血液及び尿の所見

血液についてはGOT, GPT, CPK, 尿素窒素, 血清アミラーゼ, 血糖を検査した。実験開始後19日目のCMC添加キ剤投与群の血糖値の平均値は141mg/dl, キ剤のみの投与群では160mg/dlを示したが, 対照群の測定値に疑いがあったので比較できない。34日目の測定ではいずれの群も80mg/dl前後の値を示し, 正常と判定された。その他の各項目の測定値には異常を認めない。尿にも異常所見はない。

#### 考察とまとめ

スモンが昭和30年頃から出現増加した理由として, 1) キ剤の国内生産量の増加<sup>4)</sup>, 2) 1日用量の増加<sup>4)</sup>があげられているが, この間に使用されたキ剤はほとんどすべてサバミンやCMCなどの乳化剤を含んでいるので, その影響も加わっていると考えねばならない。本報の研究は乳化剤の効果を分離して検討することを目的にした。キ剤が腸管から吸収されることは既に明らかであるが, 本報の成績から<sup>5,6)</sup> キ剤のみでは発症に至らぬ量でも, それにCMCを配合すれば高率にしかも早く発症することが証明された。これはCMCがキ剤の腸管吸収を増強することを強く示唆する。同時にこの成績は乳化キ

剤の普及使用と共にスモンが増加したという想定に実験的根拠を与えたものと考えたい。キ剤のみを投与した群からも1頭が発症したが、人間の場合に比べて1日用量が著しく多く、しかも漸増方式を採っているので同一には論じがたい。また発症犬の中枢神経組織に光顕的に著変を認めなかったのは、剖検までの日数が浅いためと思われる。

#### 文 献

- 1) 慶松：最新医薬品類聚(上)，非凡閣，昭19
- 2) 最近の新薬，5-16集，1954-'65
- 3) 立石，池田：医学のあゆみ，76：611，1971
- 4) 椿，本間，星：スモン調研協班会議報告，昭45，11月
- 5) K.Liewendahl et al.:Nuclear Med., 6:20, 32, 1967
- 6) A.A.Night and J.Miller:Ann.Int.Med., 30:1180, 1949
- 7) 前川，他：日本医事新報，No.2378，1969
- 8) スモン調研協：スモン患者全国実態調査成績(中間報告)，1971



## 15. C M C が経口投与したキノホルムの血中出現に及ぼす影響

笠巻 明子, 笠井 美智子, 金光 正次

(札幌医大・衛生)

前項の研究でキノホルムに C M C を配合してイヌに経口投与すると、スモンの発症を増強すること<sup>1)</sup>が明らかになった。この成績は C M C がキ剤の腸管吸収を促進することを強く示唆する。われわれはキ剤を経口投与したイヌの血中キノホルムを測定することによって、この問題を検討した。

### 実験方法

使用薬剤及び動物：雑犬とビーグル犬各 3 頭にキノホルムの純末を  $50\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$  づゝ 4 日間連続経口投与し、そのうち 3 頭には C M C をキ剤の 10.6 % の割合に添加した。採血は投与前及び投与第 1 日と第 4 日目に経時的に行った。

血中キ剤の定量法：田村らの方法<sup>2)</sup>に従って血清から非抱合型キノホルムを抽出し、硝酸アルミニウム<sup>3)</sup>を加えてそのアルミニウムキレートを作り、蛍光測定法を用いて定量した。

### 成 績

1. 初回投与、投与第 1 日目の雑犬 3 頭の血中キノホルムは 1 時間後に検出され、4～6 時間で最高に達した後減少する。C M C を添加した時の方が血中キノホルムの濃度が早く最高に達し、そのレベルも高く、しかもかなり長い間高い値を維持する(表 1)。No. 1 と No. 2 は同胞犬で、C M C の効果が明瞭に比較できる。ビーグル犬は雑犬に比べて血中キノホルムの出現がやゝおそく、そのレベルも低いが、C M C の効果は明かである。No. 5 と No. 6 は同胞犬で、両者の差異は特に著しい。

投与 4 日目にはキ剤の総投与量が 1 g あるいはそれ以上に達したが、血中キノホルム量は犬種と C M C 添加に関係なく、第 1 日目より著しく減少した。

### 2. 再投与

体重当りキ剤投与量がひとしくても、血中キ剤の出現推移がイヌの個体によってかなり異なるので、個体差の影響を除くために同じイヌについて C M C の効果を観察しようとしてみた。初回投与から 1 か月以上経過し、血中にキ剤が検出されなくなったことを確認した後、初回にキ剤のみを与えたイヌには C M C 添加キ剤を、初回に C M C 添加キ剤を与えた犬にはキ剤のみを、それぞれ  $50\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$  づゝ 4 日間連続投与した。採血は初回と同様に投与第 1 日と第 4 日目に行った。

再投与第 1 日の成績を表 2 に示した。初回投与の時と異なり C M C を添加しても血中キ剤の出現は特に促進されない。しかし雑犬およびビーグル犬の同胞について比較すると、最高値は C M C を添加した方が高く、その後も高い値を維持している。4 日目にはその傾向が認められなくなるが、No. 1 と No. 2 を除くイヌの血中キ剤濃度は初回投与 4 日目に比べ全般的に高い。

同じ個体について初回と再投与の成績を比べると図 1 のようになる。投与されたキ剤の組み合わせのいかんにかゝらず、再投与の時の方が血中キ剤の濃度が早く最高に達する傾向が見られ、No. 1 では

Table 1. Effect of Carboxymethyl Cellulose (CMC) on the Serum Chinoform Level of Dogs Administered Orally with the Drugs (Primary administration)

| Species               |       | Mongrel |        |        | Beagle |     |        |
|-----------------------|-------|---------|--------|--------|--------|-----|--------|
| Days after medication | No.   | 1       | 2      | 3      | 4      | 5   | 6      |
|                       | Sex   | M       | M      | F      | M      | M   | M      |
| Body weight           | 5.0Kg | 5.0     | 5.0    | 5.0    | 6.0    | 4.7 | 6.3    |
|                       | Drug  | Ch*     | Ch+CMC | Ch+CMC | Ch     | Ch  | Ch+CMC |
| Total dosage          |       | 250mg   | 250    | 250    | 300    | 235 | 348    |
| Ist day               | 0 hr  | 0       | 0      | 0      | 0      | 0   | 0      |
|                       | 1     | 1.0**   | 1.3    | 0.3    | 0      | 0   | 3.7    |
|                       | 2     | 0.3     | 0.4    | 0.5    | 2.9    | 0   | 2.4    |
|                       | 4     | 1.2     | 6.0    | 3.5    | 0.7    | 2.1 | 1.5    |
|                       | 6     | 3.6     | 2.3    | 2.2    | 0      | 0.5 | 0.5    |
|                       | 8     | 1.0     | 2.2    | 0.7    | 0      | 0.2 | 0.1    |
|                       |       |         |        |        |        |     |        |
| Total dosage          |       | 1000mg  | 1000   | 1000   | 1200   | 940 | 1392   |
| 4th day               | 0 hr  | 0.5     | 0.6    | 0.1    | 0.3    | 0.1 | 0.1    |
|                       | 1     | 0.9     | 0.5    | 0.2    | 0.2    | 0   | 0      |
|                       | 2     | 0.6     | 1.1    | 0.1    | 0      | 0.3 | 0.3    |
|                       | 4     | 0.9     | 0      | 0.2    | 4.0    | 1.1 | 0.1    |
|                       | 6     | 0.3     | 0      | 0.3    | 0.9    | 0.5 | 0      |
|                       | 8     | 0       | 0      | 0.4    | 0.2    | 0.1 | 0      |
|                       |       |         |        |        |        |     |        |

\*Chinoform, \*\*Amount of chinoform in serum ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

Table 2. Effect of CMC on the Serum Chinoform Level of Dogs Following Secondary Oral Administration with the Drugs.

| Species               |       | Mongrel |      |     | Beagle |        |      |
|-----------------------|-------|---------|------|-----|--------|--------|------|
| Days after medication | No.   | 1       | 2    | 3   | 4      | 5      | 6    |
|                       | Sex   | M       | M    | F   | M      | M      | M    |
| Body weight           | 7.0Kg | 8.0     | 7.0  | 7.0 | 8.0    | 5.0    | 5.9  |
|                       | Drug  | Ch+CMC  | Ch   | Ch  | Ch+CMC | Ch+CMC | Ch   |
| Total dosage          |       | 350mg   | 400  | 350 | 400    | 250    | 295  |
| Ist day               | 0 hr  | 0       | 0    | 0   | 0      | 0      | 0    |
|                       | 1     | 4.1     | 3.1  | 1.3 | 0.4    | 2.4    | 1.8  |
|                       | 2     | 3.4     | 2.0  | 4.9 | 3.9    | 1.8    | 1.0  |
|                       | 4     | 1.5     | 1.7  | 1.3 | 2.1    | 1.0    | 0.8  |
|                       | 6     | 0.8     | 0.8  | 0.3 | 0.8    | 0.5    | 0.5  |
|                       | 8     | 1.0     | 0.5  | 0.3 | 0.2    | 0.3    | 0.5  |
|                       |       |         |      |     |        |        |      |
| Total dosage          |       | 1400mg  | 1600 | 400 | 1600   | 1000   | 1180 |
| 4th day               | 0 hr  | 0       | 0    | 0.5 | 0      | 0.3    | 0.5  |
|                       | 1     | 0       | 0    | 0   | 3.0    | 0.5    | 3.1  |
|                       | 2     | 0.3     | 1.3  | 0.5 | 1.6    | 2.1    | 1.2  |
|                       | 4     | 0.3     | 0.3  | 3.9 | 0.5    | 1.0    | 0.5  |
|                       | 6     | 0.2     | 0    | 2.1 | 0.5    | 0.4    | 0.1  |
|                       | 8     | 0.2     | 0    | 0.7 | 0      | 0.2    | 0.1  |
|                       |       |         |      |     |        |        |      |

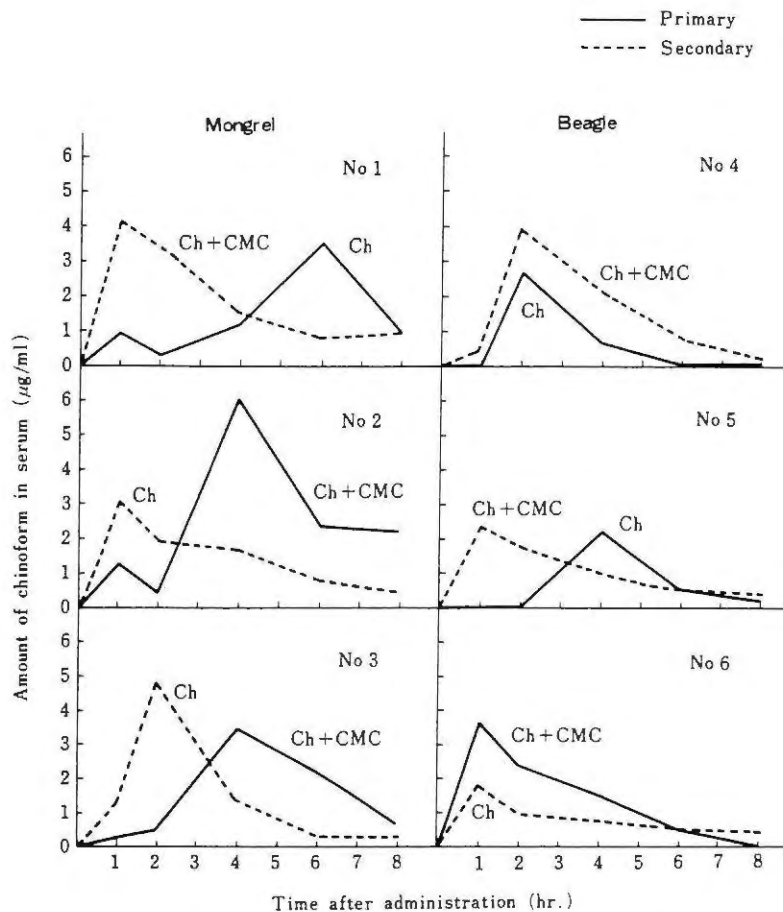


Fig. 1 Comparison of serum chionoform levels of same dogs following primary and secondary oral administration with the drug.

5時間も短縮している。これは初回投与が再投与の成績に何らかの影響を与えたことを推定させる。また初回と再投与の成績を総合すると、CMCを添加した時の方が高い血中キ剤濃度を示した例は6頭のうち3頭あり、キ剤のみを与えた時の方が高い例は全くない。

#### 考察とまとめ

この研究ではスモン発症との関係を考えて血中キノホルムは非抱合型のみを測定したが、初回及び再投与第1日目においては、CMC添加が血中キノホルム濃度を高めることを認めてよいと思う。しかし4日目になるとそのような傾向が消失するので、かゝる一過性の上昇がスモンの発症とどのように関連するかはわからない。また初回投与の後作用(After-effect)が30日以上も残存し、再投与による血中キノホルムの出現に影響を及ぼすのではないと思わせる成績を得た。これがいかなる機序によるかは不明であるが、注目すべきことと思う。しかし本報の成績に関する限り、この後作用は再投与第1日目の血中キノホルムの出現を促進する以外の効果は認めがたい。したがってこの後作用が存在しても同じ個体におけるCMCの効果は認めてよいと思う。

## 文 献

1. 金光, 笠井: 医学のあゆみ, 79:365, 1971
2. 田村, 他: スモン調研協, キノホルム部会, 第2回研究会, 1971, 12月
3. Tsuji, A. et al. : Chem. Pharm. Bull., 19:2209, 1971.

## 16. キノホルムを投与した動物血清の血球凝集反応

笠巻 明子, 笠井 美智子, 金光 正次

(札幌医大・衛生)

<sup>1)</sup> 前報でイヌに1カ月以上の間隔でキノホルムを2回経口投与すると、初回に比べて2回目の方が早く血中にキ剤が出現することを見出した。その機序としてほかの薬物によるアレルギーと同じく免疫<sup>2)</sup>が関係する可能性も考えられる。われわれはこの研究を発表した後に、キ剤の抗原性に関する吉田らの報告を読み、それを追試すると共に、この方法を用いてキ剤を経口投与したイヌならびにスモン患者の血清について血球凝集反応を試みた。

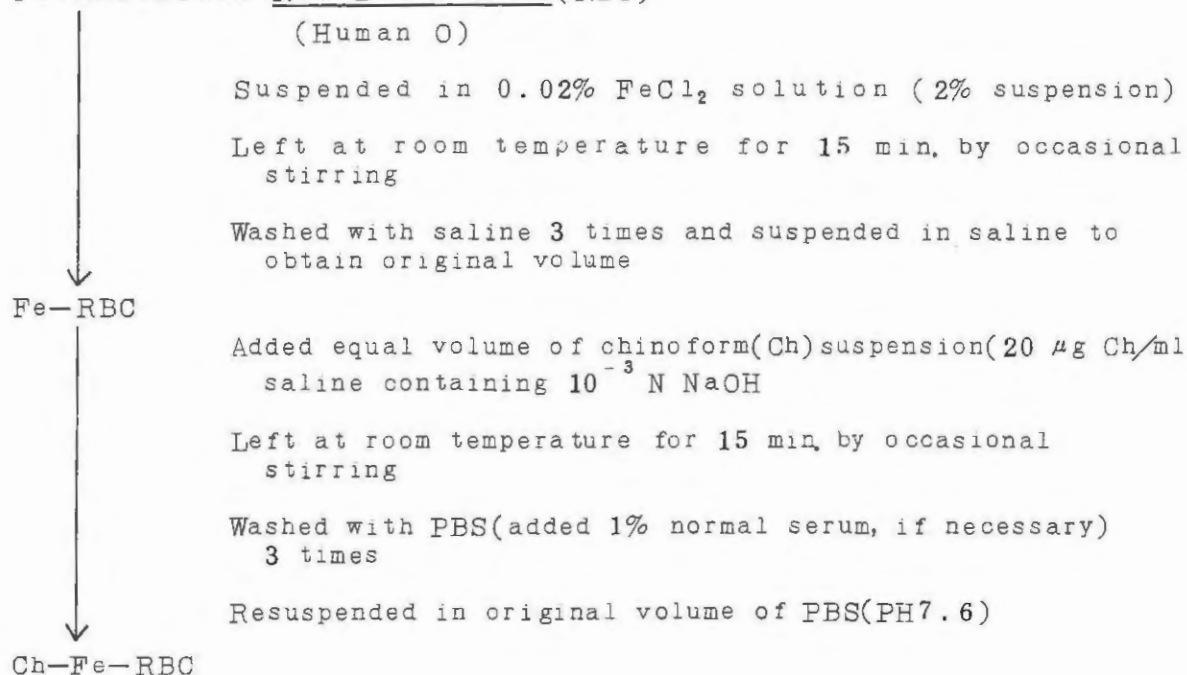
### 実験方法

動物及びキ剤投与。エマホルムの生理食塩水乳化液を4羽の家兎にキノホルム純末に換算して50mgづつ隔日9回腹腔内に注射後採血し、その後同量を隔日4回静脈内に、さらに隔日5日腹腔内追加免疫を行い、各追加免疫後10日目に採血を行った。

イヌは前項の研究に使用した6頭を利用した。たゞしNo.1とNo.2は再投与から引つづき56日間キ剤を経口投与し、最終投与日と中止後20日目に採血した。

キノホルム抗原の作製法：<sup>2)</sup>吉田らの方法に従いフォルマリンで処理した人O型赤血球にFeイオンを介してキノホルムを結合させて感作血球(Ch-Fe-RBC)を作った(表1)。

Table 1. Preparation of Chinoform-sensitized Red Blood Cell  
Formalinized Red Blood Cell(RBC)



血球凝集反応：被検血清を1%のウマ血清を加えたPBS(pH7.6)で階級希釈し、その0.4mlに上記の感作血球の2%浮遊液を0.1ml加え、室温に3～4時間おいた後の凝集像で判定した。この

際キノホルムを結合させない血球 (Fe-RBC) を上述と同じ方法で作って対照抗原とした。

## 成 績

### 1. キノホルム注射家兎血清

腹腔内注射を9回行って23日後に採取した4羽の家兎血清のうち、2～4倍稀釈で不完全凝集を示すものを認めたが明瞭でない。しかしさらに静脈内注射を4回重ねた後10日目に採取した血清では3～24倍稀釈で完全な凝集を示し、さらに腹腔内注射を5回重ねることにより表2の如く24～96倍稀釈まで完全な凝集を示した。

Table 2. Hemagglutinating Reaction of Sera of Rabbits Immunized With Chinoform on 10 days after Second Booster i.p. Injections

| Sera              |       | Serum dilution |     |      |      |      |      |       | Antigens. |
|-------------------|-------|----------------|-----|------|------|------|------|-------|-----------|
|                   |       | 1/3            | 1/6 | 1/12 | 1/24 | 1/48 | 1/96 | 1/192 |           |
| Immunized rabbits | No. 1 | 3+             | 3+  | 2+   | +    | +    | —    | —     | Ch-Fe-RBC |
|                   | No. 2 | 3+             | 3+  | 3+   | 2+   | 2+   | +    | —     |           |
|                   | No. 3 | 3+             | 3+  | 2+   | +    | —    | —    | —     |           |
| Normal rabbit     | No. 5 | —              | —   | —    | —    | —    | —    | —     |           |
| Immunized rabbits | No. 1 | —              | —   | —    | —    | —    | —    | —     | Fe-RBC    |
|                   | No. 2 | —              | —   | —    | —    | —    | —    | —     |           |
|                   | No. 3 | —              | —   | —    | —    | —    | —    | —     |           |
| Normal rabbit     | No. 5 | —              | —   | —    | —    | —    | —    | —     |           |

### 2. キノホルム経口投与犬血清

キノホルムを50mg/kg/day づゝ4日間再投与した6頭のイヌの血清は、いずれも血球を凝集しなかった。しかしそれについて56日間投与を継続したNo. 1とNo. 2の血清は、2～4倍の低い稀釈で完全に血球を凝集し、投与を中止した後20日目の血清でも陽性を示した(表3)。

## 考察とまとめ

家兎にキノホルムを頻回注射すると血清中にキノホルム感作血球と凝集する物質が出現することが証明された。これが抗体かどうかはもっと検討しなければならないが、吉田らの成績は確認できた。しかし彼等が報告したような320～640倍という高い血球凝集価は得られなかった。イヌでは長期にわたってキノホルムを投与すると、低いながらも確実に血球凝集反応が陽性になり、少なくとも20

Table 3. Hemagglutinating Reaction of Sera of Dogs Administered Orally with Chinoform for 56 Days

| Antigens         |                            | Ch-Fe-RBC      |     |     |      | Fe-RBC |     |     |      |
|------------------|----------------------------|----------------|-----|-----|------|--------|-----|-----|------|
|                  |                            | Serum dilution |     |     |      |        |     |     |      |
| Time of bleeding |                            | 1:2            | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:2    | 1:4 | 1:8 | 1:16 |
| No. 1            | End of ad-<br>ministration | 3+             | +   | ±   | -    | -      | -   | -   | -    |
|                  | 20 days<br>thereafter      | 3+             | +   | -   | -    | -      | -   | -   | -    |
| No. 2            | End of ad-<br>ministration | 3+             | ±   | -   | -    | -      | -   | -   | -    |
|                  | 20 days<br>thereafter      | +              | -   | -   | -    | -      | -   | -   | -    |
| Normal dog       |                            | -              | -   | -   | -    | -      | -   | -   | -    |

日間継続した。これは経口投与によるもので、注目に値する成績と思う。しかし現在のところスモン患者血清では陽性成績を得ていない。目下抗原の作製と血清反応について検討を重ねている。

#### 文 献

- 1 笠巻, 笠井, 金光: スモン調研協キノホルム部会研究報告, 昭47, 2月
- 2 吉田・他: 医学のあゆみ, 78: 380, 昭46



## 17. S M O N 患者血清のマススペクトログラフ による微量成分元素の分析

—とくに硫黄の変動について—

河合 忠(日大医・臨床病理)

河野 均也(日大医・臨床病理)

片岡喜久男(国立東Ⅱ病院)

### 研究目的

<sup>1)</sup> 椿ら, および井形らの報告をはじめとするキノホルム剤(以下キ剤と省略)服用とS M O N発症との間の密接なつながりに関する報告, およびキ剤投与動物実験によりS M O N類似の病理形態学的変化を作り得ることに成功した大月らの報告以来, <sup>2)</sup> キ剤服用がS M O N発症の原因をなすものとして確実視されるに至った感がある。しかしながら, 昭和45年9月のキ剤発売中止以後も散発的ではある<sup>3)</sup> にせよ少数例のS M O N発症の報告もみられ, <sup>4) 5) 6)</sup> キ剤服用が唯一無二の病因とすることは危険であろう。さらにキ剤がS M O N発症の原因であると仮定しても, キ剤がS M O Nの神経障害の成立に働らく機構については不明の点が多い。

以上のような点を考慮し, また, 環境汚染による中毒因子も完全に否定し得ないところから, 我々は無機用質量分析装置を用いて血清中の全元素の測定を行ない, 昭和46年3月の本研究協議会において, Mg, Mn, Fe, Cu, Zn, Br, I, Co, Ni, Caの10元素については視察による半定量的測定結果を報告したが, <sup>7)</sup> 今回コンピューターを用いた血清中全元素の無差別的な測定が完結し, 視察による測定に際して明らかな異常を認めた沃素と亜鉛の変動を確認したことに加えて, 硫黄にも著明な変動の存在することが明らかにされた。沃素と亜鉛の変動については, 前回報告した視察による半定量的測定結果とコンピューター分析結果の間に有意の差は認められないことから省略し, 今回は主として硫黄の変動についてのべたい。

### 材料ならびに方法

材料は表1に示すごとく, 前回の報告と同一試料を用いた。すなはち発症後比較的新鮮な10例のS M O N症例(うち4例は6ヶ月後再検した)より得られた血清を用い, 対照としては薬剤を服用中でない20~30才合の男女, 各4名, および最近キ剤服用の既往のある女性1名より得られた血清を用いた。血清は分離後直ちに凍結乾燥し, グラファイト粉末と混じて電極を作り, これを電極として, 日本電子製スパークイオン源付無機用質量分析装置(JMS-01BM)を用いマススペクトルを撮影し, スペクトルの解析には日本電子製小型コンピューター(JEC-6型)を用い無差別的に血清中の全元素の測定を行なった。測定は各試料共3回づつ重複測定を行ないその平均値として求めた。また測定値はいずれも内部標準物質としたC<sub>0</sub>に対する重量パーセントとして求めたが, 試料のイオン化は, その割合が試料により, また元素により多少異なることが知られているため, <sup>8)</sup> 正確な重量を示すものでないことに注意して頂きたい。

表1 症 例

| 症 例<br>番 号          | 年 令 | 性 | キ剤使用            | 最終キ剤使用<br>よりの期 間 | 発症よりの期間     |
|---------------------|-----|---|-----------------|------------------|-------------|
| 1                   | 75  | F | あり              | 1ヶ月              | 1ヶ月         |
| 2 <sup>a</sup><br>b | 16  | M | あり              | 1ヶ月<br>6ヶ月       | 1ヶ月<br>6ヶ月  |
| 3 <sup>a</sup><br>b | 37  | F | あり              | 1ヶ月<br>6ヶ月       | 1ヶ月<br>6ヶ月  |
| 4                   | 55  | M | あり              | 1ヶ月              | 1ヶ月         |
| 5 <sup>a</sup><br>b | 54  | F | あり              | 2ヶ月<br>8ヶ月       | 8ヶ月<br>14ヶ月 |
| 6 <sup>a</sup><br>b | 79  | F | なし <sup>※</sup> | 不 明              | 3ヶ月<br>9ヶ月  |
| 7                   | 22  | M | あり              | 1.5ヶ月            | 3ヶ月         |
| 8                   | 47  | M | あり              | 6ヶ月              | 18ヶ月        |
| 9                   | 46  | M | あり              | 6ヶ月              | 18ヶ月        |
| 10                  | 62  | M | あり              | 6ヶ月              | 6ヶ月         |

※本例はガスクロマトグラフィーにより血清中にキ剤証明済

## 結果

全元素の無差別的な測定によれば、Na, Mg, Al, Si, P, S, Cl, K, Ca, Cr, Fe, Cu, Zn, Br, Rb および I の 16 元素が 23 試料のすべてから検出された。この 16 元素のほか、Sr, Cs, Ba, La, Ce, Pr, Li, B, F, Mn, As, Se, Ag, Ti, V, Co, Ni, Ge の 18 元素が 23 試料中 1~17 試料中から検出された。1~17 試料中から検出されたこれら 18 元素の検出頻度は、次の如くであった。1 試料中のみに検出されたもの (Sr, Cs, Ce, Ti, V, Co, Ni, Ge) 2 試料中 (Ba), 3 試料中 (La, Pr, B), 7 試料中 (As), 11 試料中 (Li, Ag), 16 試料中 (F, Se), 17 試料中 (Mn)。

しかしながら、これら 18 元素については、いずれも S MON 群に共通した所見ではなく、また、正常対照群と S MON 群の間に有意の差があるとも考え難い。

すべての試料中から検出された 16 元素では、視察による半定量的測定結果と同様、沃素と亜鉛に著明な変動が存在することが確認されたほか、硫黄についても表 2 および図 1 に示すごとく、沃素と亜鉛の変動と同様、正常対照群、発症後新鮮な S MON 群、およびキ剤服用中止後ある程度の経過を示す S MON 群の間に著明な変動が存することが明らかである。その他の元素については Fe と Mg が

S M O N 群に軽度の高値を示す傾向がみられたが、他の元素についてはほとんど有意の差があるとは考え難い。

表2 血清マススペクトログラフのコンピューター分析結果

| Case             |     | Mg   | S    | Fe    | Zn    | I       |
|------------------|-----|------|------|-------|-------|---------|
| S<br>M<br>O<br>N | 1   | 2.63 | 24.0 | 0.28  | 0.46  | 0.213   |
|                  | 2 a | 3.00 | 36.5 | 0.30  | 0.56  | 0.0369  |
|                  | b   | 3.53 | 1.39 | 0.21  | 0.099 | 0.00169 |
|                  | 3 a | 1.56 | 23.3 | 0.16  | 0.24  | 0.349   |
|                  | b   | 2.13 | 1.63 | 0.077 | 0.041 | 0.00213 |
|                  | 4   | 2.19 | 38.0 | 0.16  | 0.24  | 0.416   |
|                  | 5 a | 2.09 | 29.0 | 0.069 | 0.10  | 0.0105  |
|                  | b   | 3.56 | 0.87 | 0.50  | 0.022 | 0.00179 |
|                  | 6 a | 1.89 | 26.3 | 0.30  | 0.25  | 0.366   |
|                  | b   | 2.86 | 13.4 | 0.123 | 0.183 | 0.00766 |
|                  | 7   | 2.86 | 39.6 | 0.14  | 0.14  | 0.00939 |
|                  | 8   | 2.84 | 4.79 | 0.24  | 0.080 | 0.00419 |
|                  | 9   | 2.29 | 0.31 | 0.20  | 0.027 | 0.00083 |
|                  | 10  | 3.79 | 0.95 | 0.21  | 0.029 | 0.00229 |
| AV. A            |     | 2.32 | 31.0 | 0.20  | 0.28  | 0.200   |
| AV. B            |     | 3.02 | 1.66 | 0.24  | 0.050 | 0.0022  |
| Cont. AV.        |     | 1.58 | 30.5 | 0.14  | 0.33  | 0.00183 |

AV. A: S M O N 発症後 (キ剤中止後) 1~2ヶ月の平均

AV. B: // 6~18ヶ月 //

Cont. AV.: 対照群平均

硫黄の変動は既に前回の視察による分析結果について報告した亜鉛の変動と類似の推移をたどり、キ剤服用中止後、極めて著るしい減少を示すことが確かめられた。すなわち、図1および表2に示すごとく、正常対照群およびキ剤服用中止後1~2ヶ月目のS M O N症例群ではClに対する硫黄の重量パーセントが、それぞれ30.0%および31.0%であるのに対し、キ剤服用中止後6~18ヶ月目のS M O N群では、その平均値がわずかに1.66%と著減しており、前2群平均値のほぼ5.4%にまで減少している。

環境汚染の面から注目されているCd, P, Hg などに関しては、とくにS M O N群に有意に高値を示す傾向はみとめられなかった。

考案ならびに結語

S H O N 発症の原因として、疫学的調査および動物実験成績などより、キ剤服用がその主役を演じていることがほぼ確実視されるに至っているが、昭和45年9月以降キ剤の投与は完全に中止されていると考えられるにもかかわらず、少数例、散発的ながらS M O Nの発症が報告されており、さらには服用量の差はあるとしても外国に発症例が少ないことなどを考え併せると、S M O N発症のすべて

9), 10)  
の原因をキノホルムに求めることは危険であり、井上らのウイルス説や、環境汚染に起因する中毒因子も可能性の余地として残しておかなければならないと考える。また、キノホルムの服用がSMON発症の唯一の原因であるとしても、その神経障害の成立機序は明らかでない。我々はこれらの問題点を解明すべく、血清中の微量成分元素の無差別的な測定を行なった。その結果は前述の如く、キノホルム服用にもとずくと考えられる沃素の著明な高値と、キノホルム中止後急激な亜鉛と硫黄の減少が存することが明らかとなったが今回のコンピューターを用いての分析によってはじめて明らかにされた硫黄の減少については、キノホルム服用中止後6～18ヶ月目には正常値のほぼ1/20程度にまで減少していることが確かめられた。この様な硫黄の著明な減少が事実であれば、血漿蛋白の合成にも当然障害をおよぼすであろうと考えられるが、実際には血漿蛋白量および分画値にはほとんど異常を認めなかった。このことはマスマスベクトルの撮影に際して試料中元素のイオン化は、元素により多少異なることが知られており、あるいは硫黄のイオン化が、何等かの原因により阻害されたためであり、実際には硫黄の減少は存在しないのかも知れない。キノホルムの投与が中止された現在、人体例についての検索は血清が入手不可能となったことから、この硫黄の減少についての究明は不可能となったが、今後動物実験により究明しなければならない問題であろう。<sup>11)</sup>小坂らの報告によれば、グルクロニルトランスフェラーゼの欠乏したGunn Ratを用いたキノホルム慢性投与実験ではSMON様病像の作製に失敗したとの報告があり、もし硫黄の減少が事実であるとすれば、キノホルムが肝臓において硫酸抱合を受けて処理される可能性もあるところから注目されるべき所見と考える。

<sup>12)</sup>  
その他の元素については、併用薬剤との関係から、祖父江らにより指摘されたAl, Ba, Mg, Caの変動についても検討したが、我々の測定によれば、MgがややSMON群に高値を示す傾向をみとめた次外、いずれも対照群との間に有意の差があるとはいえない難かった。

環境汚染による因子として注目されているCd, Pb, Hgなどについては、いずれも検出国値以下であり、恐らく有意の差はないものと考えられる。

## 文 献

- 1) 椿忠雄, 本間義章, 星充: SMONの原因としてのキノホルムに関する疫学的研究, 日本医事新報, 2448, 29, 1971
- 2) 吉哉泰男, 井形昭弘: 腹部手術後に発症したSMONの検討—キノホルム投与との関連, 医学のあゆみ, 74: 598—599, 1970
- 3) 大月三郎, 池田久男, 立石潤: 慢性キノホルム中毒犬の臨床病理学的検討, スモン調査研究協議会報告, 1971年3月1日
- 4) 三亀宏, 佐藤公身, 福原純一, 窪田政寛, 内藤紘彦, 近藤忠亮, 島田宜浩, 小坂淳夫。  
キノホルムと無関係に発症したSMON症例(1)医学のあゆみ, 79: 641—643, 1971
- 5) 島田宜浩, 福原純一, 窪田政寛, 小坂淳夫, 岩田郁造, 広田滋, 高木新。  
キノホルム剤と無関係に発症したSMON症例(2), 医学のあゆみ; 80, 754—755, 1972
- 6) 小林芳治, 福原純一, 窪田政寛, 島田宜浩, 小坂淳夫。  
キノホルム剤と無関係に発症したSMON症例(4), 医学のあゆみ, 81, 206—207, 1972
- 7) 河合忠, 河野均也, 片岡喜久男, 蓬原三郎。

SMON患者血清のマススペクトログラフによる微量成分元素の分析。

a) スモン調査研究協議会報告 1971年3月1日

b) 医学のあゆみ 77:729-730, 1971

8) 渡辺英二, 内藤統宏, 青山鉄美。

Maffauch-Herjog型マススペクトログラフによる超微量分析。

工業化学雑誌, 67:72-87, 1964。

9) NAKAMURA, Y, INOUE, Y, K.

Pathogenecity of Virus associated with Subacute myels-optico-neuropotly Lancet, i, 223, 1972.

10) 井上幸重, 西部洋子, 中村良子,

スモン患者糞便より高率に分離された新しいウイルス

医学のあゆみ, 72:321-322, 1970

11) 小坂淳夫, 島田宜浩, 福原純一, 窪田政寛, 湯本泰弘, 難波経雄。

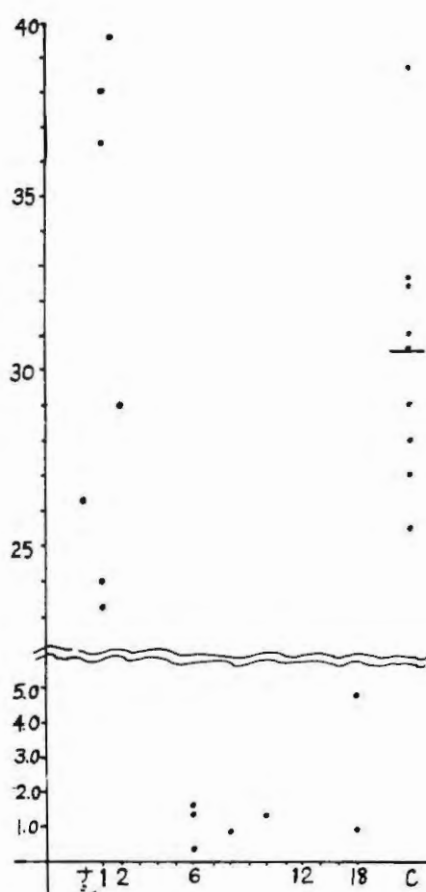
Gunn Ratに対するキノホルムの長期投与スモン調査研究協議会報告, 1971年7月24日

12) 祖父江逸郎, 安藤一也,

SMONとキノホルム一併用薬, 検査に含まれる金属類についての検討,

医学のあゆみ, 77:734-735, 1971

図1 硫黄の変動



## 18. SMONおよび実験的キノホルム中毒における末梢神経病変の形態学的比較研究

黒岩 義五郎, 大西 晃生, 井上尚英

(九大脳研, 神経内科)

### はじめに

SMONの原因としてキノホルムが注目され, 疫学的に両者の因果関係が詳細に検討されてきた。病理学的には, すでに立石らによりSMONに特有の背髄病変がキノホルム投与犬に再現された。しかしながら末梢神経病変について, SMONとキノホルム投与動物とを光顕ならびに電顕レベルで詳細に比較した研究はきわめて少いので報告する。

### 検索対象および方法

対象となったSMON患者は九大神経内科に入院し, 末梢神経生検の承諾をえた11例である。男は2例, 女は9例である。発病年齢は29才から76才に分布し, 平均53.8才である。11例中10例に神経症状出現前にキノホルム服用が確認された。神経症状出現から神経生検までの期間は最短2ヶ月から最長5年1ヶ月に及んでいた。生検部位は腓腹神経で, これを光顕および電顕で観察した。

対象とした動物は家兎41羽, カニクイ猿3頭である。家兎は, 14羽にキノホルムを1日1回100~150 mg/Kgを経口的に与え, 20羽に1週に2~4, 1回13~25 mg/Kgを静注した。対照として3羽は無処置, 4羽はTπ80のみ静注した。

表 1 一般的観察所見

| 対 象   | 例 数    | 食思不振 | 下痢, 便秘 | 体重減少 | 後肢脱力 | 脱毛 |
|-------|--------|------|--------|------|------|----|
| 家 兎   | 経口群 14 | 100  | 80     | 100  | 0    | 0  |
|       | 静注群 20 |      | 100    |      | 100  |    |
|       | 対照群 7  | 14   | 14     | 0    | 0    |    |
| カニクイ猿 | 3      | 100  | 100    | 100  | 100  | 33 |

→数字は%を示す。

カニクイ猿3頭には, いづれも経口的に1日1回80~400mg/Kgのキノホルムを漸増法投与した。

観察期間は家兎は1~12週, カニクイ猿は13~32週である。

観察部位はいづれも坐骨神経で, 家兎は光顕および電顕で, カニクイ猿は光顕で観察した。

### 結 果

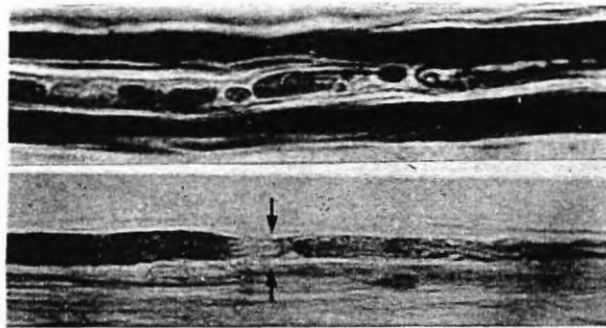
キノホルム投与動物の一般的観察所見は表1に示す。食思不振や体重減少はキノホルム投与例全例に認められ, 下痢, 便秘などの腹部症状もキノホルム投与群に高率に出現をみた。後肢の脱力は家兎では静注群にのみ認められ, カニクイ猿全例に認められた。以上の症状は, キノホルム投与開始後1



～4週以内に出現がみられた。

S M O N 患者の腓腹神経病変；S M O N 患者の腓腹神経は，一般に単位面積あたりの有髄線維数の減少はごく軽度で，有髄線維直径分布のヒストグラムでも，2峰性分布に著明な異常は認められなかった。

しかしながら有髄線維の変化は主としてWaller 変性を呈し，一部に節性脱髄を示す部分もみられた。（図1）



オスミウム染色，神経線維ときほぐし法  
図1：上段はミエリン球の鎖状配列を示す。  
下段は節性脱髄を示す。 ×520

無髄線維にも変性は認められ，しばしばSchwann 細胞の変性所見と同時にそれが認められた。

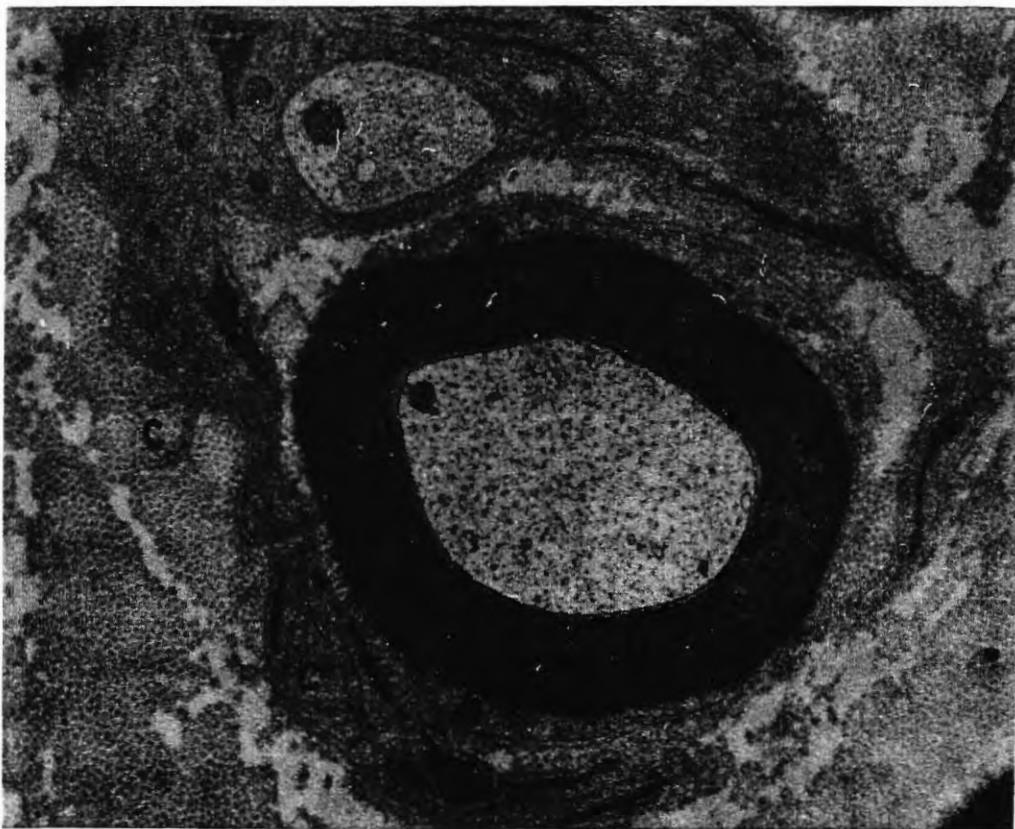


図2：Onion bulb構造 ×10,000



Onion bulb については、光顕でも認められるが、電顕では、onion bulb は数多く観察され 11 例中 7 例にそれが認められた。Schwann 細胞突起の数は比較的少く、1～3 層のものが多くみられた。(図 2)

また無髄線維と小径有髄線維が group をなして認められ、再生を示唆する所見もえられた。(図 3)

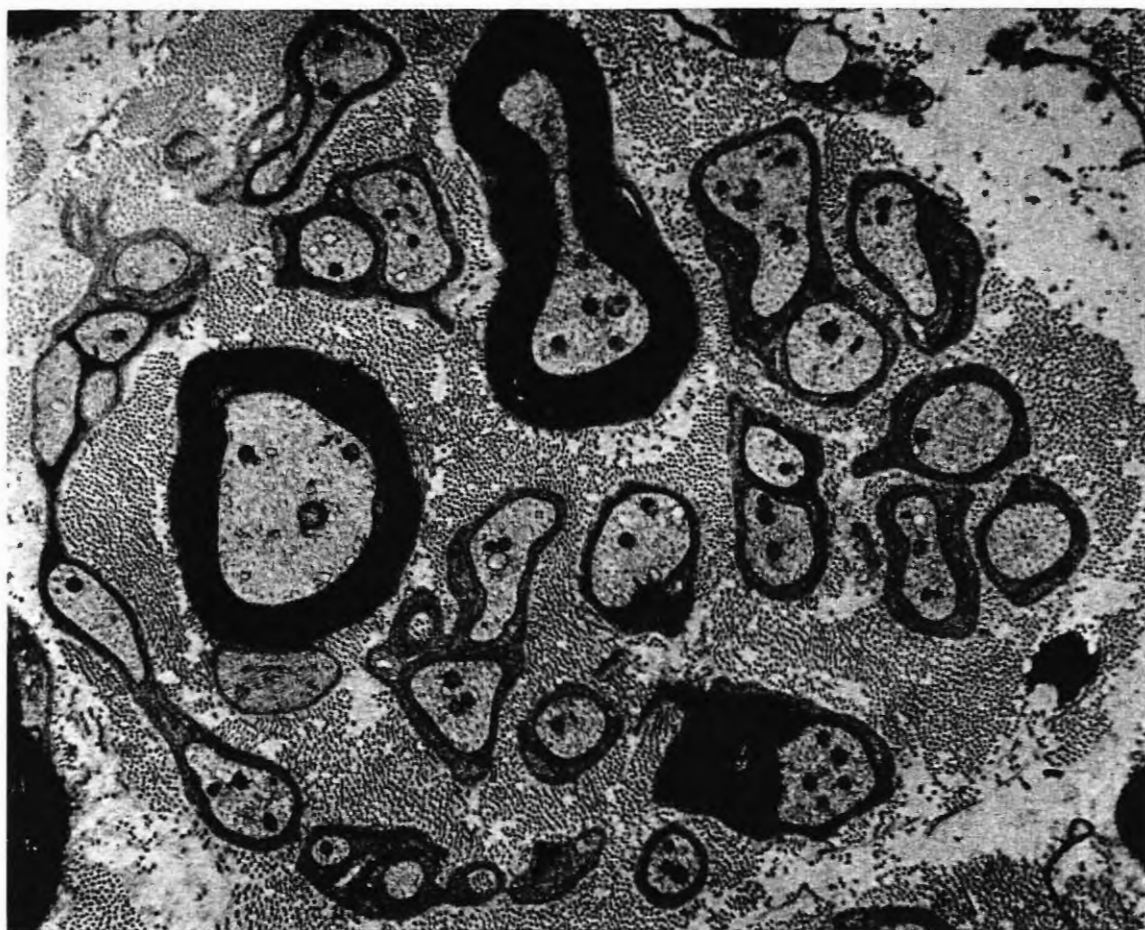


図 3：無髄線維と小径有髄線維が group をなしてみられる。×11,000

その他神経症状発症後 3 ヶ月以上を経過した症例では endoneurium 内の膠原線維の増加が著明であった。

家兎の坐骨神経病変：キノホルム静注および経口投与開始 1 週間後では、光顕では明らかな異常は確認できなかったが、電顕では、Schwann 細胞の小胞体の著明な拡大とラインゾーム様構造物の出現が認められ、本実験の初期病変と解釈した。(図 4)

キノホルム投与開始 2 週間後に、光顕でも Waller 変性を主体とする所見が認められ、電顕では軸索の萎縮と髄鞘の崩壊が著明であった。更に無髄線維の細胞小器官の消失や Schwann 細胞内の

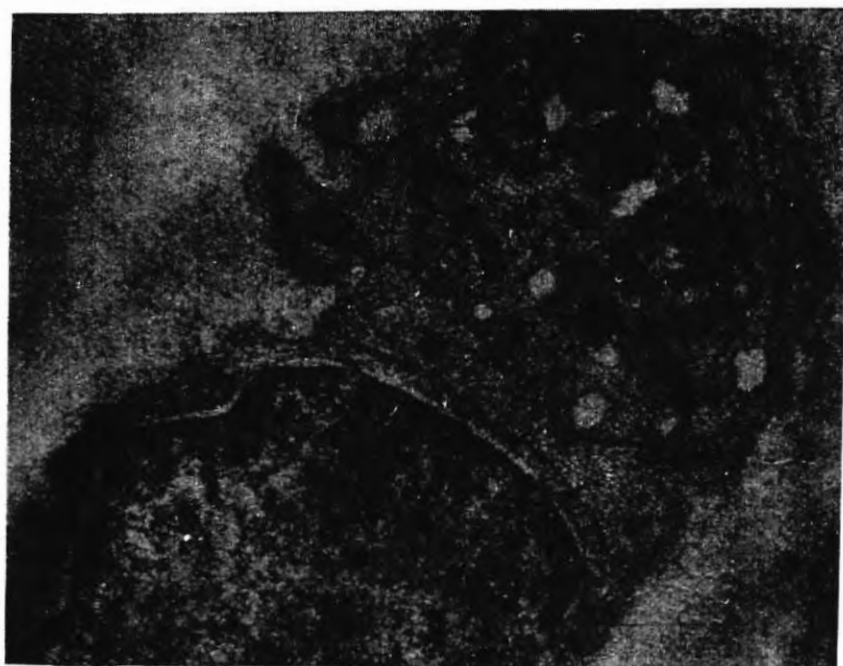


図4 無髄線線原形質内小胞体の拡大とラインゾーム  
用構造物の出現 ×20,000

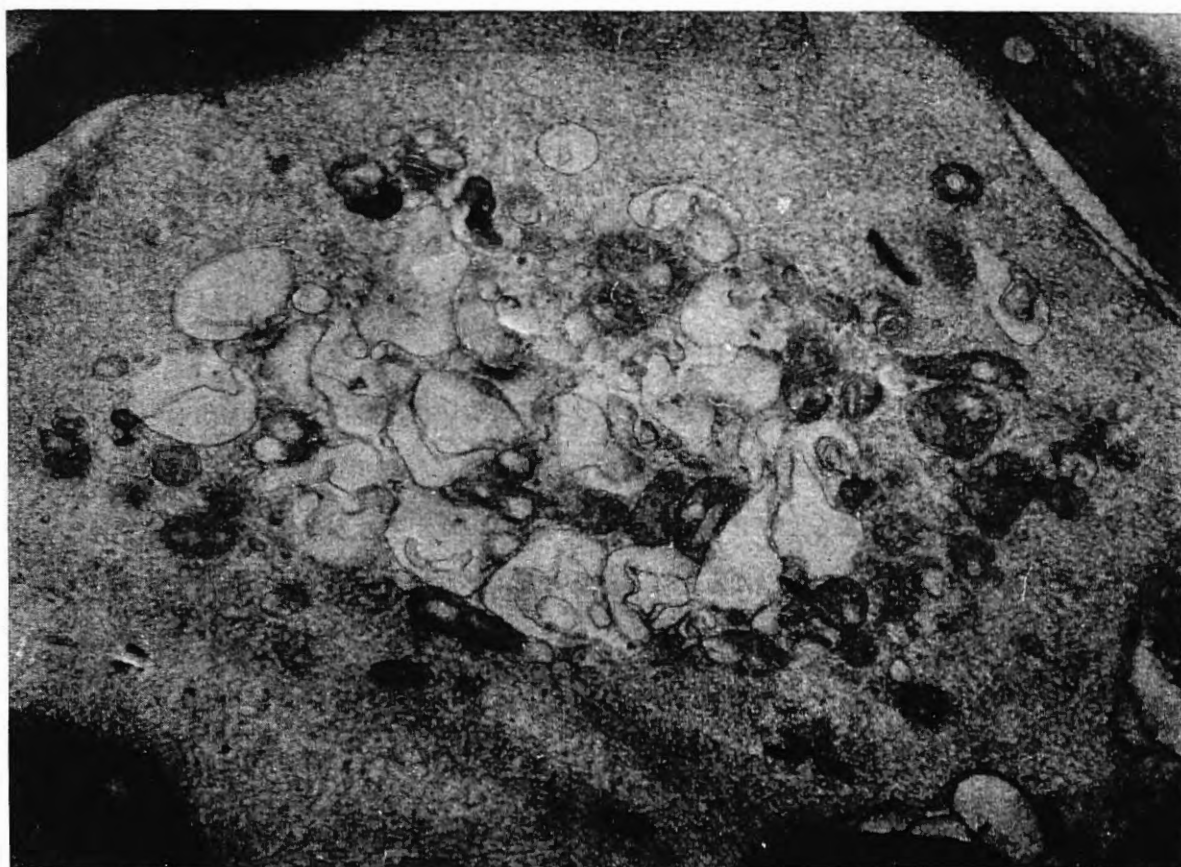


図5 軸索変性を示す ×20,000

脂肪滴の出現や基底膜構造の消失なども認められた。またキノホルムを4～8週間投与し、その後4～12週間無処置した家兎では、小径有髄線維と無髄線維がgroupをなす再生像も認められた。しかしSchwann細胞の増加は明らかではなくonion bulbの形成は認められなかった。

キノホルム静注群では経口投与群に比し、組織病変は強くかつ高頻度に観察される傾向にあったが病変の性質は同一であった。

カニクイ猿の坐骨神経病変：カニクイ猿においても有髄神経線維の変性は軽度であるが、光顕ではWaller変性に一致する所見がえられた。

尚キノホルム投与を行った家兎およびカニクイ猿について、脊髓を検査したが、脊髓には病変は認められなかった。

#### 総括ならびに結論（表2）

表2 総括

|              | S M O N | 家 兎 | カニクイ猿 |
|--------------|---------|-----|-------|
| Waller 変性    | +       | +   | +     |
| 有髄線維 節性脱髄    | ±       | ±   | ±     |
| 無髄線維変性       | +       | +   |       |
| Schwann 細胞変性 | +       | +   |       |
| Onion bulb   | +       | —   |       |

S M O Nの末梢神経の光顕ならびに電顕所見についてはすでに教室の太田が報告したが、今回のS M O N 11例の末梢神経病変についてみると、光顕レベルでは有髄線維の脱落は著明でなかったが、Waller変性が主体であった。またわづかであるが節性脱髄も認められた。

更に電顕では無髄神経やSchwann細胞にも変性が認められ、onion bulb形成や再生を思わせる所見もえられた。

一方実験的にキノホルムを投与した家兎やカニクイ猿においては臨床的にS M O Nと同様、下痢、便秘などの腹部症状が後肢の脱力に先行して認められた。

組織学的には家兎においてもカニクイ猿においてもWaller変性が主体であり、家兎においては電顕で無髄線維やSchwann細胞にも変性が認められ、長期観察例において再生を思わせる所見もえられた。

以上よりS M O Nとキノホルム投与家兎およびカニクイ猿の末梢神経病変を比較した場合、キノホルムの投与方法や投与量に差はあれ、組織学的には、キノホルム投与動物とS M O Nとの変性patternとの間に根本的な矛盾はないものと結論した。

#### 発表論文

- 1 大西晃生，井上尚英，黒岩義五郎：実験的キノホルム中毒家兎における末梢神経病変に関する

研究。

医学のあゆみ：77(5)：274－277. 1971

## 19. Gunn rat に対する Chinoform の長期投与成績

小坂 淳夫, 島田 宜浩, 福原 純一  
窪田 政寛

(岡山大・医・第一内科)

### I 目的

経口投与された chinoform の一部は消化管より吸収された後に体内での代謝過程を経て, 尿,  
尿中に排泄される。<sup>1)</sup>この際は肝臓におけるグルクロン酸抱合が, もっとも重要視されている。一方,  
SMON の病因として chinoform 中毒説が報告されているが, この場合は非抱合の遊離 chin-  
oform が問題になっている。したがって, グルクロン酸抱合能が殆んど欠如し, 黄疸を有する Gu-  
nn rat における実験は極めて意義のあるものと思われる。以上のような考えから, 以下の3つの  
実験を行った。

### II 実験方法

#### 実験1 chinoform 投与 Rat の成長曲線について

方法: 使用した Rat は昭和45年11月17日生の同腹の Gunn rat であり, 里帰りした1匹  
の白鼠と9匹のまだら Rat (非黄疸) を含み, 雌4匹, 雄6匹であった。そのうち, 雌1匹と雄2匹を選び  
Chinoform を投与した。

Chinoform はエマホルムとして 60 mg/体重 1000 g を粉末飼料に混じて投与した。飼料は予  
め摂取状態を調べ, 体重の変化に応じて3日毎に飼料中の Chinoform 含有率を調整し, 投与量の  
誤差はほぼ 10% 以下にとどめ得た。

飼育状態: Rat は常に 17~18℃ に調整された動物室において飼育した。

実験は昭和46年1月5日に開始し, 6日目より上記の如く3週間 Chinoform 投与を続け, 連  
日ないし3日目毎の午後に体重を測定し, 毛並み, 便ならびに全体の健康状態を観察した。

#### 実験2 Rat 体内での Chinoform 滞留状態の変動について

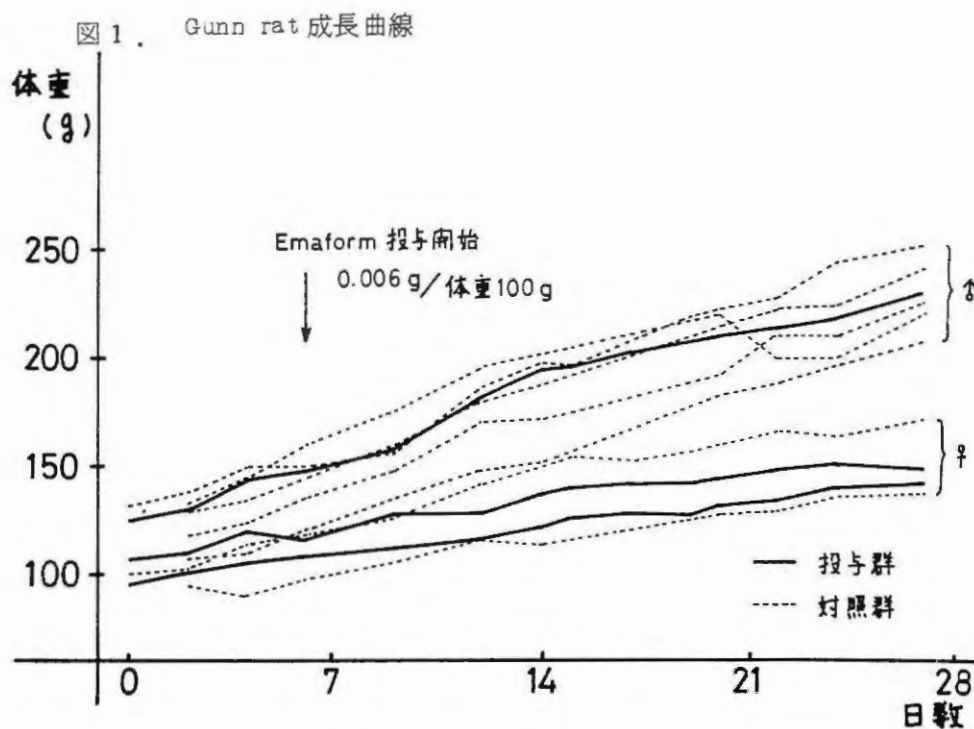
方法: 使用した Rat は昭和45年11月17日生の雄1匹と昭和45年9月22日生の雌1匹合  
計2匹の Gunn rat 黄疸例と昭和45年9月22日生の雄1匹, 昭和45年10月11日生の雄  
1匹, 雌1匹, 昭和45年11月17日生の雄1匹合計4匹の非黄疸 Gunn rat に昭和46年1  
月7日生の雌1匹と昭和46年1月11日生の雄1匹の計2匹の Gunn rat より里帰りした白鼠  
を用い, 実験1と同様の投与法で昭和46年3月15日よりエマホルムを全例に投与開始した。また,  
エマホルム投与中の昭和46年6月22日より<sup>125</sup>I Chinoform を上記飼料に混入し, whole  
body counting により, フアントームにした 10 g の飼料との測定比から, 各 Rat の体内 Chin-  
oform 停滞量を計算した。投与期間は16日間である。測定は毎日午後8時~10時に行な  
った。

実験3 Chinoformを1年間連続投与したRatの臨床的变化の観察

実験2の終了後、さらにエマホルムの投与を続け、1年間飼育し、長期間のエマホルム投与中における全身の健康状態の変動を観察した。

### Ⅲ 結果

実験1：図1に示される如く、3週間の成長曲線において雄群、雌群ともに投与群と対照群の間に



は、成長状態に有意の差は認められなかった。また臨床上見るべき変化はいずれの群においても認め得ず、3週間後、歩行跳躍および水中遊泳時間においても差がなかった。

実験2：Chinoform含有飼料による飼育は3カ月を越えたが、病的状態はいずれのRat<sup>125</sup>にも見出し難く、黄疸Gunn ratにおいて特別発育の悪い傾向はなかった。Chinoform投与による成績は図2の如くで、投与開始後ほぼ4日目より平坦となり、Gunn rat 黄疸例ではやや高値の体内保有傾向を投与終了まで持続した。投与終了後は急速に下降し、中止3日後にはほぼ前値に復したが、Gunn rat 黄疸例でわずかに下降の遅延傾向が認められた。

実験3：Chinoform含有飼料による1年間の飼育の結果については、全Ratは極めて健康で、毛並み、運動状態、飼料摂取状態などに病的所見はみられず、全例が順調に生存し得た。また、黄疸gunn ratの2匹も同様であり、特別の差異はなかった。

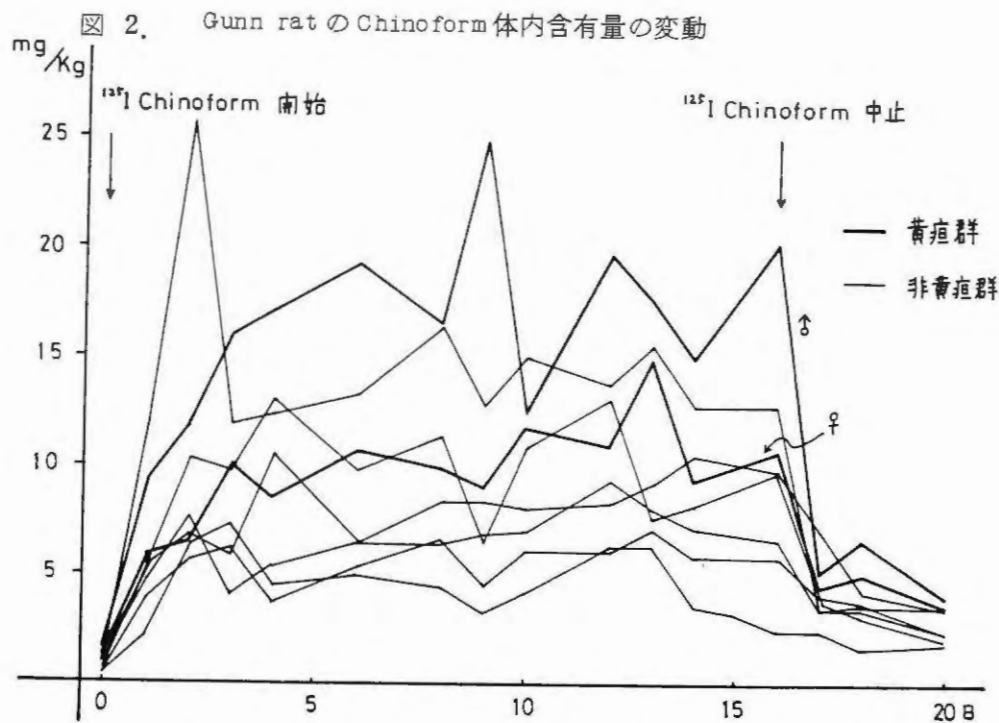
### Ⅳ 断案

黄疸例では、グルクロン酸抱合能が殆んど欠如しているGunn ratを用いて、Chinoform投与実験を行ない以下の結論を得た。

1) 成長曲線について：里帰りした白鼠1匹を含む、10匹の非黄疸Gunn rat(雄6匹、雌4匹)を



用い、そのうちの3匹(雄1匹、雌2匹)にChinoformが90%に含有されるエマホルムを60 mg/体重1000gの割合に投与し、4週間の成長状態を検討した。その結果、投与群の3匹の体重増



加はいずれもコントロール群と差がなく、また、歩行、跳躍、水中遊泳時間にも差がなかった。

2) Chinoform の体内滞留状態：雄雌各1匹の黄疸 Gunn rat, 雄3匹、雌1匹の非黄疸 Gunn rat および Gunn rat より里帰りした白鼠雄雌各1匹の合計10匹を用いてエマホルム <sup>125</sup> 60 mg/体重1000g を長期間連続投与しているが、投与開始より4ヶ月後に <sup>125</sup> Chinoform を飼料に混入し、whole body countingにより Chinoform の体内滞留状態を検討した。その結果、放射性 Chinoform の体内滞留量はいずれも投与開始後、最初は次第に増加し、4日目より平坦になり、投与中止後急速に下降した。この際に黄疸 Gunn rat の2匹では他の例よりもやや高値で平坦となり、投与中止後の下降にもやや遅延の傾向があった。この成績は黄疸 Gunn rat の成績をも含めて、長期連続投与においても体内の Chinoform 量は一定のレベルに保たれ、次第に増加し続けるものではないことを示している。

3) 12ヶ月連続投与：上記2)に記載した10匹の rat を対象として同量の Chinoform の投与を続け、投与開始より12カ月間観察した。その結果、黄疸 Gunn rat を含む全例に、毛並みの変化、成育の遅延、その他臨床病的と見做される所見はなく、全例健康なまま12カ月を経過したと判定された。

4) 以上1), 2), 3) に示すように、黄疸例ではグルクロン酸抱合能がほとんど欠如している Gunn rat を用いた実験においても、放射性 Chinoform の体内滞留状況がやや高い傾向を示したのみで、成長曲線および12カ月の長期投与実験の結果から、Chinoform 中毒を示す所見は全く得ら



れなかつた。

#### 文 献

- 1) 島田宜浩ほか：Chinoformの吸収ならびに排泄の状態．1971．医学のあゆみ．78：83
- 2) 小坂淳夫ほか：SMON患者の肝機能成績ならびにGunn rat に対するキノホルム投与実験．スモン調査研究協議会（昭．46年3月12日，東京都市センター）49席，53頁．
- 3) 小坂淳夫ほか：Gunn rat に対するキノホルムの長期投与．スモン調査研究協議会（昭．46年7月24日，東京都市センター）18席．

## 20. スモンの病理学的研究 キノホルムの組織化学的証明について

武内 忠男, 桜間 信義, 三隅 哲朗

(熊本大・医・病理学第二講座)

### 1 緒言

Subacute myelo-optico-neuropathy (SMON)の原因は、多くの人々の研究によりキノホルムによるものであるらしいことがわかってきたが、動物における再現性と、患者の材料からキノホルムを実証検出することの必要性が要求された。他方その原因がキノホルムとすれば、スモンの病理学的変化がどのような作用機序によって起るか検討する必要がある。そこで私共は、キノホルムの組織化学的証明法を考案し、これを応用して臓器組織内の当該物質の検出を試み、その組織内分布を明らかにし、その病理解明の手がかりを得ようと企画した。

3)  
そのために、先ず手初めとして、第1に、合成 chionoform glucuronide を酵素基質として、組織細胞内の  $\beta$ -glucuronidase の作用を応用し、それにより組織化学的に分解させたキノホルムを組織細胞内に沈着させ、その切片を使用して、顕微鏡的に可視下にもってくるという方法を試みた(図1)。そして、その組織化学的方法が確実にキノホルムを証明しているということを確認した。次いで、第2に<sup>131</sup>I-chionoform をうさぎに経口投与し、その臓器組織におけるキノホルムの分布をみるために、<sup>131</sup>I-chionoform のオートラジオグラフを試み、実際の中毒におけるキノホルムの組織内分布との比較を可能にした。第3に、考案した方法を用いてキノホルム中毒に応用してみた。

実験材料およびキノホルムの組織化学的証明法について。

#### (I) 実験材料

##### 1) $\beta$ -glucuronidase を用い組織化学的方法でキノホルムを沈着させた切片の作製。

合成 chionoform glucuronide 10 mg を 0.1 N NaOH 2 滴を加えた留水 10 ml に加温しながら溶かす。室温で冷却後 0.1 N HCl で pH 7.0 に補正する。この液を A 液とする。

A 液 10 ml に pH 5.2 の acetate buffer 10 ml を加え酵素基質液とする。

うさぎを断頭し、瀉血後新鮮肝組織切片をとり出し、15~20 mm のクリオスタット切片を作る。未固定切片あるいは瞬時アセトンで固定した切片を 37℃、1 時間前記基質液に作用させる。留水で水洗し、この切片について、キノホルムの組織化学的証明法の確立を試みることとした。

##### 2) <sup>131</sup>I-chionoform を経口投与したうさぎの組織切片作製。

体重 1100 gm から 1300 gm のうさぎを用い、2.9  $\mu$ ci (23 mg) / 100 gm の <sup>131</sup>I-chionoform を経口投与し、投与後 1, 2, 4 時間してと殺した。肝、腎、坐骨神経、脊髄をとりだし、ホルマリン固定の後、dipping 法により NR-M 2 乳剤(サクラ)を用い

マイクロオートラジオグラフを作製するとともに、同じ連続切片を用いて、キノホルムの組織化学的証明法を試みた。

### 3) キノホルム中毒うさぎの組織切片について。

初回量  $40 \text{ mg/Kg}$  で与え始め、漸増し、最終量  $160 \text{ mg/Kg}$  で、84 日目で死亡し、総量  $19.1 \text{ g}$  のエマホルム（キノホルムを 95% 含有）を与えたうさぎの肝を用いて、キノホルムの組織化学的証明法を試みた。

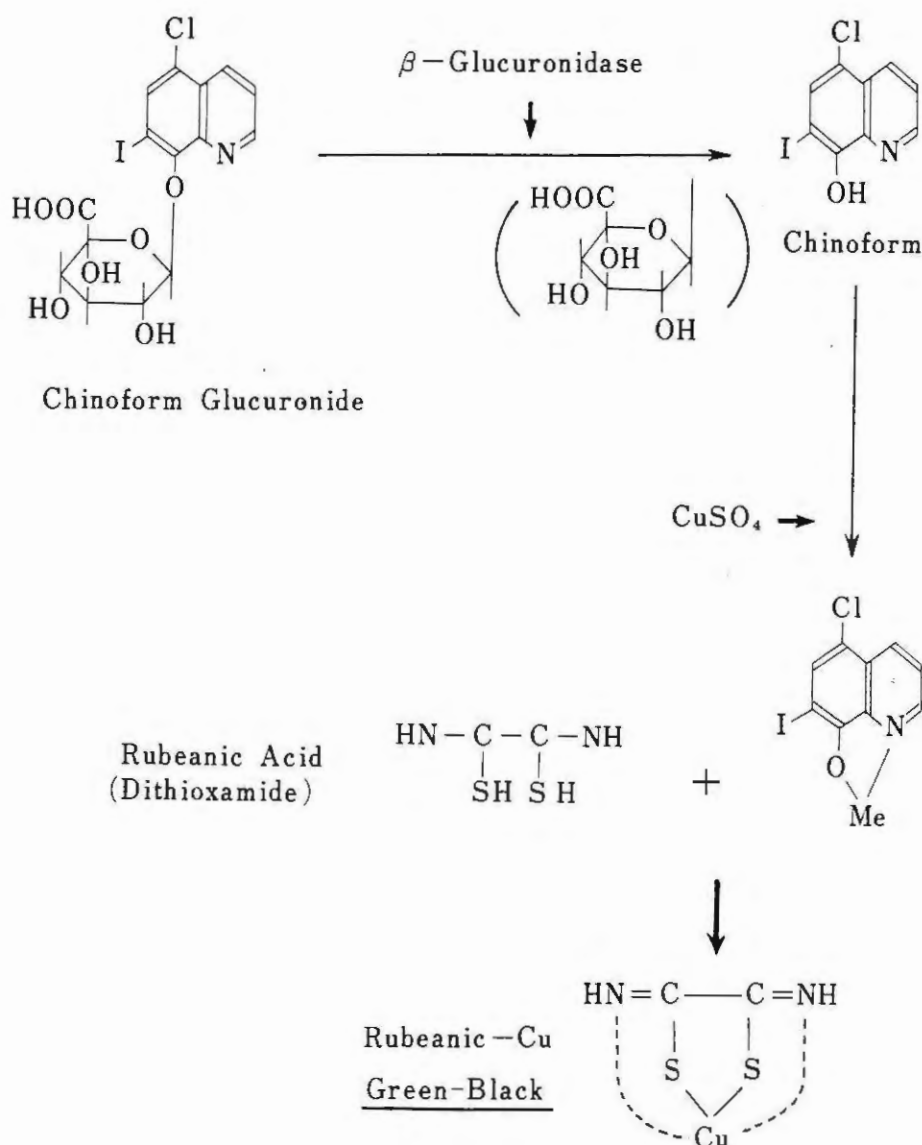


図 1.  $\beta$ -glucuronidase により組織化学的にキノホルムを沈着させた切片について、銅塩を用いるキノホルムの組織化学的証明法の原理

### Ⅱ) キノホルムの組織化学的証明法について。

オキシンの誘導体であるキノホルムを、組織化学的に証明するには 2 つの方法があると考えられる。

① 1 つは、適当な金属をキノホルムとキレートまたは結合させて、これを組織細胞内に沈着させ、

沈着した金属をその金属の組織化学的証明法により証明することにより、キノホルムを間接的に証明する方法である。他の1つは、キノホルムを適当な金属とキレートさせて組織に沈着させ、適当なpHの下で起る螢光を螢光顕微鏡で観察し、キノホルムの存在を確かめる方法である。これら二つの方法論にしたがい、キノホルムの組織化学的証明法を考案することにした。

キノホルムと金属は溶液の状態においてのみキレートまたは結合する。したがって、溶媒を選ぶことは重要な条件となる。選んだ溶媒中でキノホルムとキレートまたは結合しうる金属を選ぶことが次に重要な条件である。金属をキレートまたは結合させキノホルムを組織化学的に証明する方法においては、まずキノホルムが溶解しうるいくつかの溶媒を選び、試験管内でこれらの溶媒中にとかししたキノホルムと金属の反応を調べた。次に選んだ溶媒の中にキノホルムと結合しうる金属を溶かし、上に述べた実験材料の切片をこの中に浸漬し、金属をキノホルムと結合させ組織細胞に沈着させ、その金属の組織化学的証明法によりこの金属を証明した。この様にして、金属塩を用いるキノホルムの組織化学的証明法の条件を確立し、上に述べた実験材料の切片を用い、さらにその有用性を確かめていった。

螢光を用いる組織化学的証明法においては、西川<sup>1)</sup>にしたがい酢酸を溶媒に用いた。試験管内で、キノホルムと金属を酢酸にとかし、それらのキレート物をつくり、その沈澱物をろ紙でとり、いろいろなpHにおいたあと、螢光顕微鏡で観察した。最も強い螢光を発する金属を用い、螢光を用いるキノホルムの組織化学的証明法を確立した。さらにこの方法の有用性を上に述べた実験材料の切片を用いて確めた。

### Ⅲ 成 績

#### (A) キノホルムの組織化学的証明法について。

##### I) 金属塩を用いる証明法について。

###### (1) 溶媒について

キノホルムはエタノール、メタノール、酢酸、クロロホルム、Tween等に溶解するが、水には殆んどとけない。その中でTween 80へのキノホルムの溶解量が不明であったので、実験を行って調べたところ、1gのキノホルムはふつとしたTween 80, 21mlに溶けることがわかった。

キノホルムがよくとけ、しかも組織への影響の少ないアセトン、酢酸、Tween 80を溶媒に選び実験を行ったところ、Tween 80で最も良い結果が得られた。

###### (2) 金属塩について。

表1にしめしたように、Tween 80中でのキノホルムと金属の反応をみてみた。金属塩の内、銅、鉄、銀および水銀がキノホルムと結合した。その内、銅、銀および水銀との結合物は沈澱を生じたが、水銀はキノホルムとの反応が遅く、組織化学には不適當であることを知った。鉄との反応は非常に早い、沈澱物を作らないので、これも不適當ではないかと考えたが、β

— glucuronidase を用い組織化学的方法でキノホルムを沈着させた切片において、きわめて微量の鉄塩でもよい結果が得られた。

表1 Chylating Agents for Chinoform dissolved in Tween 80

| Chemicals                                         | Solubility<br>in Tween 80 | Precipitation | Coloration<br>of Reaction |
|---------------------------------------------------|---------------------------|---------------|---------------------------|
| MgCl <sub>2</sub>                                 | good                      | —             | non                       |
| ZnCl <sub>2</sub>                                 | //                        | —             | non                       |
| Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                 | //                        | —             | non                       |
| FeCl <sub>3</sub>                                 | //                        | —             | green                     |
| P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> · 24WO <sub>3</sub> | //                        | —             | non                       |
| HgCl <sub>2</sub>                                 | poor                      | ++            | yellow                    |
| SnCl <sub>2</sub>                                 | good                      | —             | non                       |
| AgNO <sub>3</sub>                                 | //                        | +++           | yellowish                 |
| BaCl <sub>2</sub>                                 | //                        | —             | non                       |
| CuSO <sub>4</sub>                                 | //                        | ++            | yellow                    |
| NiCl <sub>2</sub>                                 | //                        | —             | non                       |
| K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>     | //                        | —             | non                       |

(3) Tween 80 の濃度について。

Tween 80 の濃度が高ければ高い程キノホルムの溶解度も高くなり、金属との化合物も多くなることが考えられる。しかし、濃度が高くなれば、組織への影響は悪い。そこで比較的濃度の低い4%, 6%, 8%, 10%, 12%, 16%の濃度の Tween 80 について調べたところ、10%, 12%, 16%のものはほぼ等しく良い結果が得られたので、10% Tween 80 溶液を用いる事にした。

(4) 硫酸銅、塩化第2鉄、硝酸銀の濃度について。

金属塩が10% Tween 80 中に飽和に近い量で溶けている程、その金属とキノホルムとの化合物は多くなると考えられる。しかし、鉄塩の濃度はあまり高いと組織への不定沈着があり、コントロールにも沈着した鉄が観察され、量が多ければかえってよくないことがわかった。実験の結果、鉄塩の濃度は  $5 \times 10^{-2}$  mM 以下の塩化第2鉄で充分であった。硫酸銅、硝酸銀の量は、10% Tween 80 に飽和量に近いと考えられる3 mM が適当である事がわかった。

以上の成績より、以下述べる3つの金属塩を用いたキノホルムの組織化学的証明法を確立した。

a) 銅塩を用いるキノホルム証明法。

- 1) 資料切片を3mM  $\text{CuSO}_4$  を溶かした10% Tween 80 液中に2時間浸漬。
- 2) 流水で30分程水洗。
- 3) 留水で水洗後新しく作った次の液に37℃で12時間作用させる(容器は密栓して使用)。

0.1% ルベアン酸無水アルコール溶液... 2~5 ml

10% 醋酸ナトリウム水溶液..... 100 ml

- 4) 水洗。
- 5) ケルンエヒテロートで対照染色。
- 6) 脱水, キシロールで透徹後中性バルサムで封入する。

結果: 陽性反応は緑色を帯びた黒色を呈する。

註釈: この方法は特異性が高い。しかし、もともと組織内に銅がないことを組織化学的に証明されている場合にのみ有効である。銅が証明される場合は稀であるが、銅が証明された場合は他の方法を併用するとよい。

b) 鉄塩を用いるキノホルム証明法。

- 1) 資料切片を  $5 \times 10^{-2}$  mM  $\text{FeCl}_3$  を溶かした10% Tween 80 液の中に1時間浸漬。
- 2) 再蒸留水で充分洗う。
- 3) 2% フェロシアン化カリウム, 1% 塩酸等量混合液に15~30分間入れる。
- 4) 再蒸留水で洗う。
- 5) ケルンエヒテロートで対照染色。
- 6) 脱水, キシロールで透徹後, 中性バルサムで封入する。

結果: 陽性反応は青藍色を呈する。

註釈: この方法は組織内にもともと鉄が存在していないことを組織化学的に証明されている場合にのみ有効である。鉄を含む物質としてヘモジデリンが組織内に存在する場合が多いが、この場合は5% 修酸水溶液3時間処理の後この方法を行えばよい。さらになお鉄が証明される場合は他の方法を併用する。

c) 銀塩を用いるキノホルム証明法。

- 1) 資料切片を3mM 硝酸銀を含む10% Tween 80 液の中に2時間浸漬。
- 2) 再蒸留水でていねいに洗う。
- 3) 新しく作った次の液に37℃で2~5時間入れる。

0.1% ルベアン酸無水アルコール溶液... 2~5 ml

局方アンモニアの100倍希釈液..... 2~5 ml  
(局方アンモニア1:水99)

留水..... 100 ml

- 4) 水洗。
- 5) ケルンエヒテロートで対照染色。

6) 水洗。

7) 脱水，キシロールで透徹後，中性バルサムで封入する。

結果：陽性反応は黒褐色を呈する。

註釈：理論的にはもともと組織にあった銀および1価の水銀との鑑別を要するが，通常の組織内にはこれらのものはないのでその必要はない。

## II) 螢光を用いる証明法について。

表2 Properties of Chinoform-Metal Compounds

| Metal-ions         | pH for<br>Precipitation | Colors of<br>Precipitation | Fluorescence | Colors of<br>Fluorescences |
|--------------------|-------------------------|----------------------------|--------------|----------------------------|
| $\text{Li}^+$      | 5.0                     | white                      | +            | dark orange                |
| $\text{Na}^+$      | 5.0                     | white                      | +            | dark orange                |
| $\text{K}^+$       | 5.2                     | white                      | +            | dark orange                |
| $\text{Cu}^{++}$   | 4.8                     | yellow-green               | +            | dark orange                |
| $\text{Ag}^+$      | 4.5                     | white                      | +            | dark orange                |
| $\text{Mg}^{++}$   | 4.8                     | white                      | +            | dark orange                |
| $\text{Ca}^{++}$   | 4.8                     | white                      | +            | dark orange                |
| $\text{Cd}^{++}$   | 5.3                     | white                      | ++           | yellow green               |
| $\text{Ba}^{++}$   | 4.7                     | white                      | +            | dark orange                |
| $\text{Zn}^{++}$   | 7.6                     | yellow-green               | ++           | orange                     |
| $\text{Al}^{+++}$  | 5.5                     | yellow-green               | +++          | yellow green               |
| $\text{Ga}^{+++}$  | 8.6                     | yellow                     | +++          | orange                     |
| $\text{Hg}^{++}$   | 5.2                     | orange                     | -            | -                          |
| $\text{Zr}^{++++}$ |                         | dark green                 | +++          | orange                     |
| $\text{Pb}^{++}$   | 4.8                     | white                      | ++           | yellow green               |
| $\text{Sn}^{++}$   | 6.0                     | yellow-green               | ++           | yellow green               |
| $\text{Cr}^{+++}$  | 5.2                     | white                      | +            | dark orange                |
| $\text{Mn}^{++}$   | 5.4                     | white                      | +            | dark orange                |
| $\text{Fe}^{++}$   | 4.7                     | black                      | -            | -                          |
| $\text{Ni}^{++}$   | 5.3                     | yellow-green               | -            | -                          |

-; no fluorescence, +; slight, ++; middle, +++; intense,

表2に示すように，酢酸にとかしたキノホルムは，ガリウム，アルミニウム，亜鉛，ジリコニ



ウム、カドミウム、鉛等とキレートし、適当な pH において蛍光を発することがわかった。その中でガリウムおよびアルミニウムとキノホルムのキレート物は pH 8.6 附近の蛍光が最も強かった(図 2)。そこで次のようなキノホルム証明法を確立した。

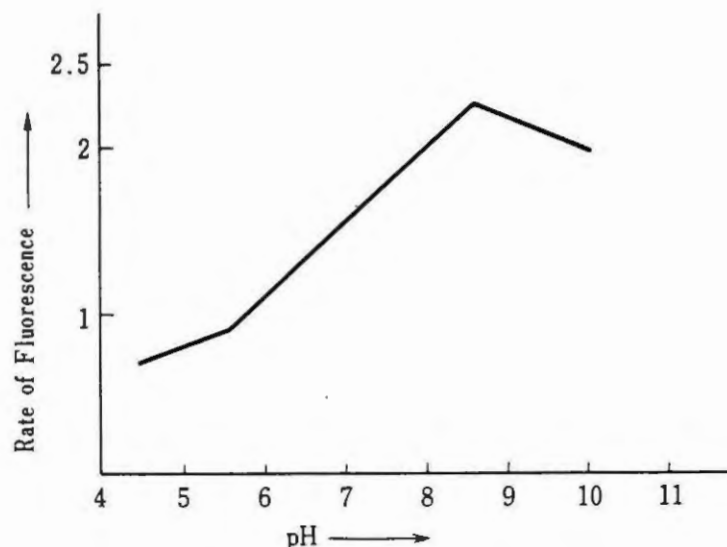


図 2. Change of Fluorescence Intensity of Ga-Chinoform Chelate Compound at pH.

(The fluorescence rate is set up 1 unit at pH 5.5)

- 1)  $\text{GaCl}_3$  を飽和にした 2.5% 酢酸液の中に資料切片を 2 時間浸漬する。
- 2) 氷酢酸に 10—20% のアンモニアを滴定し pH 8.6 に調整した液に 30 分入れる。
- 3) 留水で水洗。
- 4) 乾燥、封入液を用いずカバーガラスだけで封入しパラフィンで封ずる。

結果：陽性所見は橙黄色の蛍光を示す。

註釈：この方法で得られた橙黄色の蛍光は特異的である。

(B) それぞれの材料切片について確立されたキノホルムの組織化学的証明法により得られた結果とその有用性について。

- 1)  $\beta$ -glucuronidase を用いキノホルムを組織化学的に沈着させた切片について。

私共は始めてキノホルムの組織化学的証明を行うためには、組織細胞内に間違いなくキノホルムを沈着せしめて、そのものを先ず証明する方法を確認し、これを応用して、実際のキノホルム中毒例に応用するのが合理的であると考えた。そのために、 $\beta$ -glucuronidase 活性の高い肝組織切片および AH 13 細胞を用いて、田村らにより合成された chinoform glucuronide を酵素基質として、細胞内酵素を作用せしめ、細胞内の特定部位に分解キノホルム沈着せしめる方法をとった。この切片について、金属塩を用いるキノホルム証明法(図 1 参照)および蛍光法を用いる証明法を行った。

金属キレート法による組織化学的証明法では、肝細胞の原形質に $\beta$ -glucuronidaseの存在する部おそらくlysosomesに一致して、3つの金属塩を用いる方法とも、同じようにキノホルムが間接的に証明された。銅塩を用いた方法では黒緑色調に、鉄塩を用いた方法では青藍色に、銀塩を用いた方法では黒褐色調に、それぞれ顆粒状の物質に着色して観察された(写真1, 2, 3, 4参照)。

これらのキノホルム証明法は、金属とのキレートないし結合を応用した方法であるので、もともと組織に存在する金属を証明する可能性があり、鑑別を充分にしなければならない。そのためには対照検索を充分に実施しなければならない。予め銅、鉄、銀などのそれぞれの組織化学的証明法をやってみて、それらが証明されないことを確かめておく必要がある。対照標本の必要性はそこにある。しかし、一般には、銅や銀などは組織化学的に証明される程臓器組織内には存在しないし、病的な場合に銅を証明しえても特定の組織のみである。また通常金属の証明されない神経組織などに証明される場合は尙更問題とならない。ただ鉄は通常の人または動物の組織中にかなり存在し、鉄を証明する組織化学的方法を行えば、臓器によって異なるがかなりの部にそれが証明される。従って、これを用いるキノホルムの組織化学的証明法ではその鑑別を充分注意しなければならない。組織中で鉄はヘモジデリンで証明されることが殆んどである。これは方法において述べた様に前処理で除外できるし、普通染色標本で容易に鑑別される。私共が考案した銀を用いる証明法ではさらに1価の水銀との鑑別が必要である<sup>4)</sup>。しかし、通常の生体内にはこれはほとんど存在せず、組織化学的にも証明されない<sup>4)</sup>ので鑑別の必要はほとんどない。

もう一つの問題として、キノホルム以外に銅、鉄または銀と結びつくものが組織にあって、これと結びついたそれらを証明する可能性がこのキノホルム証明法にあると考えられる。しかし、キノホルムを飲んでいない人または動物の組織切片を銅、鉄、銀をそれぞれ溶かしたTween80液の中に浸漬し、それぞれの金属の組織化学的証明法を行ったが、これをしないものとの差はなかったので上の可能性は否定できた。

従って、この銅、鉄、または銀の金属塩を用いるキノホルムの組織化学的証明法は、充分なコントロールと比較してキノホルムを特異的に証明しうるということがわかった。

蛍光法では橙黄色の蛍光が細胞全体に淡くびまん性にみられることが多い。しかし、よく検出された場合は金属塩法と同じ細胞内のおそらくlysosomesに一致した部に蛍光を認めることができた。

この方法の場合は蛍光の弱い点が問題となったが、ガリウムを使用した場合の蛍光法は、一応目的を達することができた。一般に、西川<sup>2)</sup>の論文にあるように、キノリン環で5位と7位の位置にハロゲン元素が存在すると、金属とキレートして見られる蛍光はオキシンの場合とくらべ著しく弱くなる。キノホルムは構造式の第5位に塩素が、第7位に酸素がそれぞれついでい

てそのために蛍光が著しく弱められる。しかし、ガリウムとの結合は比較的蛍光を保ち、他の金属の場合よりよい結果が得られた点は注目される。

この蛍光を用いるキノホルム証明法は、キノホルム、ガリウムのキレート化合物が比較的特異な蛍光を発し、特異性も高い。しかし、この方法はなお蛍光が弱く、それを強めようとすれば局在性が悪くなり、従ってかなりの量のキノホルムが存在しなければ証明する事ができない欠点がある。さらに蛍光性の強い物質をさがす必要があろう。

2)  $^{131}\text{I}$ -chinoform を経口投与したうさぎの組織切片について。

$\beta$ -glucuronidase を用いて、キノホルムを組織化学的に沈着させた切片について、キノホルムを組織化学的に証明する実験により、これらの方法がキノホルムを証明しうる事がわかった。また逆に、これらの方法のいくつかは  $\beta$ -glucuronidase の組織化学的証明法にもなりうる事がわかった。

しかし、生体内にはいった中毒キノホルムはそのまま細胞内の lysosomes には入りうるし、組織内金属ともキレートして沈着しうるし、また肝では glucuronide として処理されうるので、実際の中毒症の際の細胞内分布は簡単ではないと考えられる。そこで  $^{131}\text{I}$ -chinoform を動物に経口投与し、オートラジオグラフでキノホルムの実在と組織細胞内局在とを確かめる方法を取り、同時に同一組織における連続切片について組織化学的証明法を試み、それらにより証明されたキノホルムの存在が一致するかどうかを検討した。

$^{131}\text{I}$ -chinoform のオートラジオグラフでは銀粒子は、肝では、肝細胞に主として証明され、時間と共に増強した（写真 5, 6）。類洞内皮では肝細胞より取込みがわるく投与後 2 時間では比較的強い取込みがみられた。腎では、尿細管主部の上皮に最も強い取込みがあり、投与後 1 時間で既に強い反応をみた。その他の尿細管上皮にも軽度の出現をみた。脊髄では、灰白質、白質ともにグリア細胞にその取込みがあり、神経細胞とその線維には証明が困難だった。末梢神経では、その神経線維に明らかに銀粒子の出現がみられた。そして、ここでは Schwann 細胞の周辺部にその粒子を認めた。

組織化学的証明法では、銅、鉄、銀の何れの金属塩を用いる方法でも、同様に同じ局在で証明された。肝では肝細胞形質内の一部の領域（恐らく lysosomes ないし phagosomes か）に顆粒状に出現する（写真 7, 8, 11）。Kupffer 細胞においても同様の現われ方をする。腎では、尿細管上皮の原形質内に顆粒状に出現し、この局在は管腔内面に接する側に多い傾向があるが（写真 9, 10）、投与後経過したものは必ずしもそうではない。グリア細胞内でも微小顆粒状に認められ、また末梢神経では、主として軸索の部に一致して顆粒状反応をしめした（写真 12 参照）。

この結果、オートラジオグラフによる  $^{131}\text{I}$ -chinoform の組織細胞内分布と、キノホルムの組織化学的証明法による組織細胞内分布とは全く一致した成績を示し、それらがよく目的

|            | オートラジオグラフ |       |       | 組織化学的証明 |
|------------|-----------|-------|-------|---------|
|            | 1 hr      | 2 hrs | 4 hrs |         |
| 肝臓：        |           |       |       |         |
| 肝細胞        | ++        | +++   | +++   | +++     |
| Kupffer 細胞 | (+)       | (+)   | ±     | + - +++ |
| 胆管上皮細胞     | (+)       | ++    | (+)   | -       |
| 腎臓：        |           |       |       |         |
| 糸球体        | +         | (+)   | (+)   | -       |
| 尿細管主部上皮細胞  | +++       | +++   | ++    | +++     |
| 遠位尿細管上皮細胞  | ++        | ++    | ++    | +       |
| 集合管        | (+)       | (+)   | (+)   | -       |
| 脊髄         |           |       |       |         |
| 灰白質        |           |       |       |         |
| 神経細胞       |           | ±     | -     | -       |
| グリア細胞      |           | +     | +     | (+)     |
| 白質         |           |       |       |         |
| グリア細胞      |           | +     | +     | +       |
| 神経線維       |           | 干     | 干     | -       |
| 中心管上皮      |           | +     | +     | -       |
| 坐骨神経       |           |       |       |         |
| 神経線維       |           | +     | ++    | +       |

表 3  $^{131}\text{I}$ -キノホルムの分布と組織化学的証明法とオートラジオグラフにより証明された

を達成していることを確認した。

### 3) キノホルム中毒うさぎの組織切片について。

金属キレート法として銅，鉄，銀を用いる方法も，蛍光法としてガリウムを用いる方法でも，同じ局在でキノホルムを証明した。肝細胞とKupffer 細胞質のおそらく lysosomes と思われる部に，顆粒状にそれを検出した。しかし，核には証明されなかった。

### 4) 人のキノホルム中毒肝切片について。

最後に，実際において有用であるかどうかを確認するために，人のキノホルム中毒患者の剖検材料で，しかも田村らにより化学的にキノホルムが証明された肝（東大剖検例）について私共の方法を試みてみた。

銅，鉄，銀塩を用いた何れの方法の場合も，組織化学的に一致した局在で証明が可能であった（写真15，16）。ガリウムを用いた蛍光法の場合とも同じ局在を示した（写真14）。肝細胞ではキノホルムは顆粒状に証明され，小さな顆粒から比較的大きなもののまでが細胞内に種々の割合に証明されたが，核には陰性であった。またKupffer細胞の肥大したものの胞体内に粗大顆粒状に証明された。

#### IV 総括ならびに考察

上述した様に，キノホルムの組織細胞内存在の実証とその局在を知ることは重要であり，その目的のためには組織化学的方法による外ない。そして確実に，そのものの証明であるという特異性が高くなくてはならない。

蛍光を用いるキノホルム証明法は，操作が簡便であり，ガリウムとキレートしたキノホルムは，特異的な蛍光を発するため，特異性も高い。しかし，キノホルムの存在が比較的多い場合は，この方法は有効であるが，少ない場合は，それを検出し得ない欠点がお存在している。

キノホルムの金属とキレートする性質を利用した着色性の組織化学的証明法ではかなり微量のキノホルムも検出し得た。キノホルムは，金属とキレートしただけでも発色するが色が弱いので，さらにその金属を組織化学的に証明することにより可視化することができた。この方法は，反応産物の金属結合ないし金属置換発色により，局在の移動性を生じる可能性が考えられる。しかし，操作上で拡散<sup>5)</sup>や吸着などの現象を防止すれば，理想的な局在も得ることが可能であり，ここに述べた実験でわかるように，この方法における結果は，確実にキノホルムの所在とほぼ一致したものを示すものであり，局在を違えていることは考えられない。しかし，この方法では，もともと組織に存在する金属を証明する可能性があり，特異性に問題がある。そのために，対照の検索を充分に行えばこの方法によりキノホルムの証明がなし得られるが，一つの方法のみで足りないこともあるだろう。従って蛍光法とキレート着色法とを併用あるいは2，3のキレート法を併用することにより，その特異性を確認する方法をとることも必要となる。

#### V まとめ。

キノホルムの組織化学的証明法を考案し，金属キレート法による光学的顕微鏡法と同じく蛍光顕微鏡法との二種類をえた。chinoform-glucuronideを用い $\beta$ -glucuronidaseにより分解したキノホルムを確実に組織細胞内に沈着させ，その切片を用いることにより，まず組織化学的証明の可能性と確実性を確めた。さらに，<sup>131</sup>I-chinoformを投与したうさぎの組織切片を用いてオートラジオグラフと組織化学的所見の一致を確認した。それらを用いて，動物および人のキノホルム中毒切片において応用の可能性を実証した。

#### 主要文献

- 1 西川泰治：日本化学雑誌 79，1003，1958
- 2 西川春治：日本化学雑誌 79，1007，1958

- 3 Isao Matsunaga and Zenjo Tamura: Chem. Pharm. Bull. 19, 1056, 1971
- 4 岡本耕造, 上田政雄, 前田隆英: 顕微鏡的組織化学 医学書院, 1965
- 5 武内忠男, 他: 酵素組織化学, 朝倉書店, 昭和43年

# 写真説明

写真①, ②, ③, ④  $\beta$ -glucuronidaseにより組織化学的にキノホルムを沈着させた切片について, 金属キレート法によりキノホルムを組織化学的に証明した。肝細胞質のおそらく lysosomes と思われる部にキノホルムが顆粒状にみられる。写真①, ②, ④は鉄を用いた方法による。写真③は銅を用いた方法による。

写真⑤, ⑥  $^{131}\text{I}$ -chinoformを経口投与したうさぎの肝切片におけるオートラジオグラフ。⑤は投与後1時間のもの。⑥は投与後2時間のもの。細胞質に銀粒子がみられる。

写真⑦, ⑧  $^{131}\text{I}$ -chinoformを経口投与したうさぎの肝切片について, 銅塩を用いたキノホルムの組織化学的証明法を行ったもの。⑦は投与後2時間のもの。⑧は投与後4時間のもの。細胞質に顆粒状にキノホルムがみられる。

写真⑨  $^{131}\text{I}$ -chinoformを経口投与したうさぎの腎切片投与後2時間のものについて銅塩を用いたキノホルム証明法を行ったもの。尿細管上皮細胞の細胞質に顆粒状にキノホルムが見られる。

写真⑩  $^{131}\text{I}$ -chinoformを経口投与したうさぎ腎切片投与後1時間のものについて鉄塩を用いたキノホルム証明法を行ったもの。尿細管上皮細胞質内に顆粒状にキノホルムがみられる。

写真⑪  $^{131}\text{I}$ -chinoformを経口投与したうさぎ肝切片投与後1時間のものについて銀塩を用いたキノホルム証明法を行ったもの。細胞質の lysosomes と思われる部に顆粒状にキノホルムが見られる。

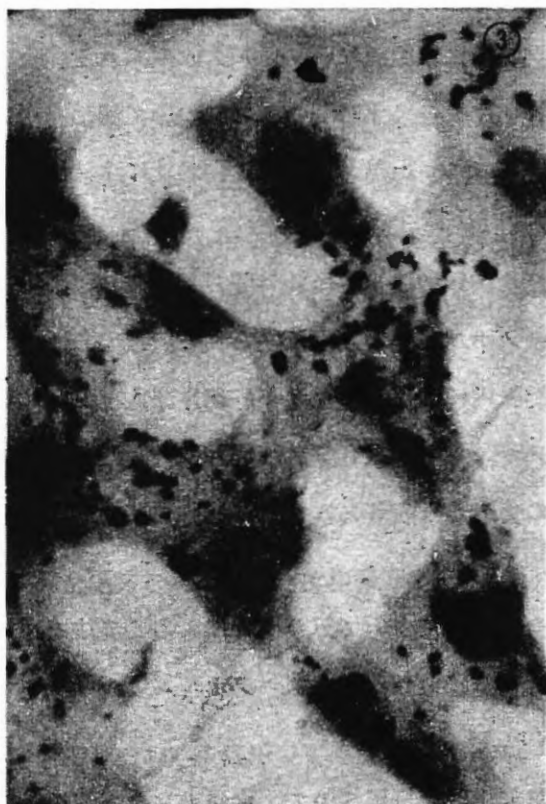
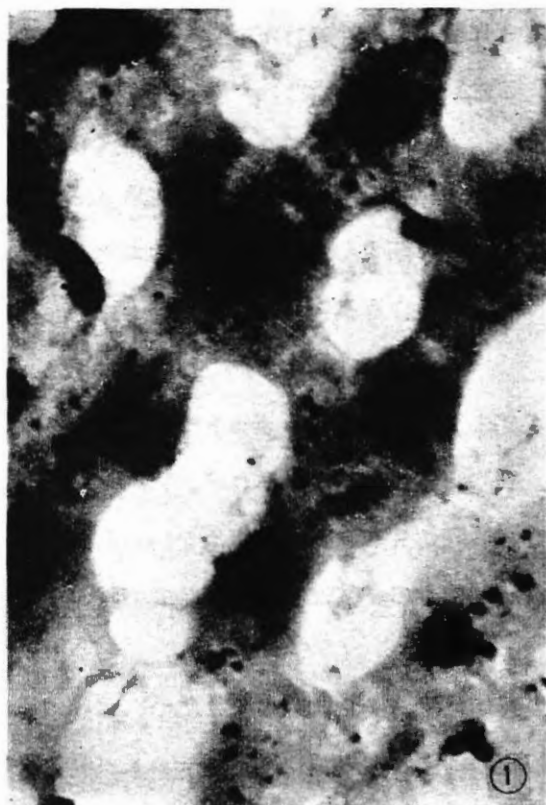
写真⑫  $^{131}\text{I}$ -chinoformを経口投与したうさぎ坐骨神経切片投与後4時間のものについて鉄塩を用いたキノホルム証明法を行ったもの。軸索にキノホルムがわずかにみられる。

写真⑬ エマホルム(キノホルムを95%含有)を門脈内に注入したウサギ肝切片注入後2時間のものについて, ガリウムによる蛍光法を用いたキノホルムの組織化学的証明法を行ったもの。中心静脈周囲にキノホルム・ガリウムのキレート物の蛍光がみられる。さらに細胞質に顆粒状に同じ蛍光が見られる。

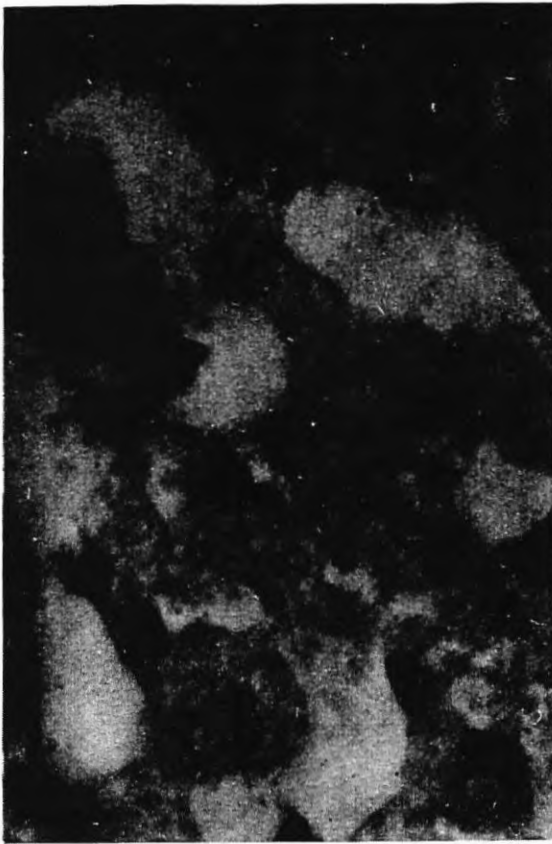
写真⑭ 東大病理より分与されたキノホルム中毒剖検例の肝についてガリウムによる蛍光法を用いたキノホルムの組織化学的証明法を行ったもの。細胞質に顆粒状黄色のキノホルム・ガリウムのキレート物の蛍光がみられる。

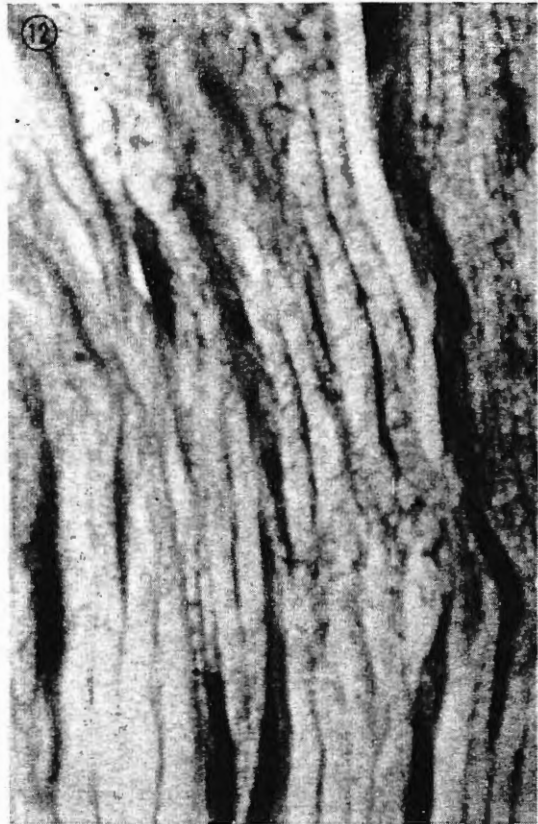
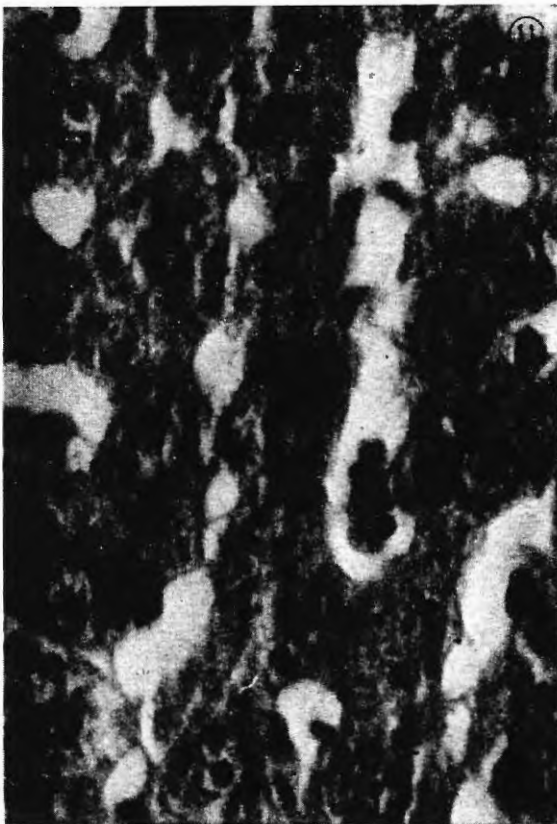
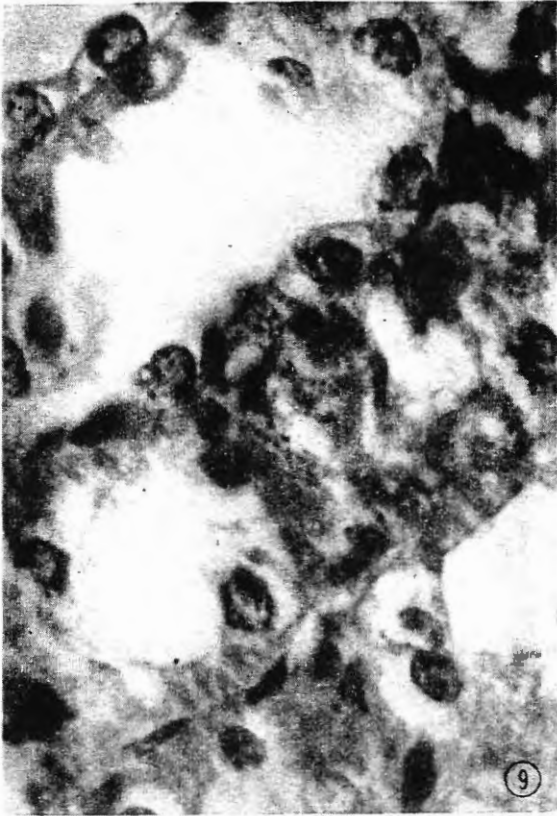
写真⑮, ⑯ 東大病理より分与されたキノホルム中毒剖検例の肝について, 金属キレート法によりキノホルムの組織化学的証明法を行ったもの。肝細胞とKupffer細胞の細胞質に大小種々, 顆粒状にキノホルムが見られる。⑮銅塩を用いたもの。⑯銀塩を用いたもの。

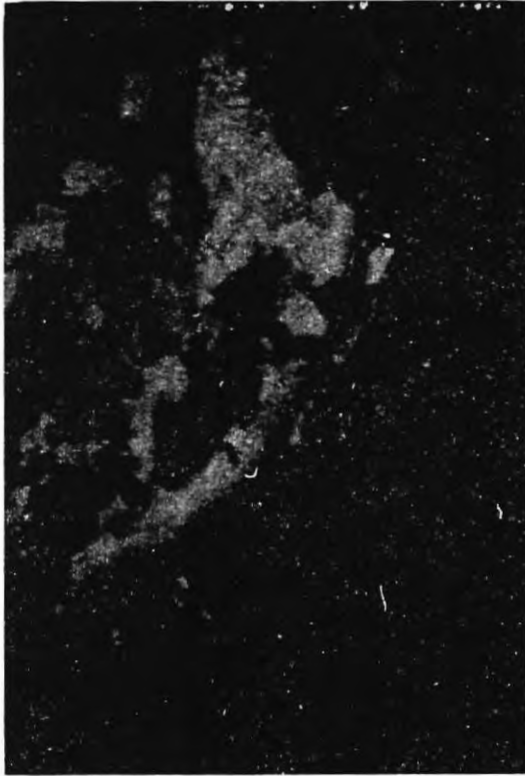












## 21. スモン患者の血清ヨウ素とキノホルムの関係

田村 善蔵

(東大・薬学部・薬品分析学)

### I 緒 言

46年3月のスモン調査研究協議会研究報告会において、河合らは質量分析器を用いて、スモン患者血清の諸元素を測定し、そのうちヨウ素量が正常群にくらべ4.7~280倍にも増加していること<sup>1)</sup>を報告した。これらのなかで、キノホルム剤を服用していないでスモンになったといわれる患者血清中のヨウ素量が、キノホルムを服用したことのあるスモン患者で、キ剤中止後1ヶ月たった血清中のヨウ素量と、ほぼ同じ位に高い値を示している例がある。

キ剤非服用スモン患者血清に大量のヨウ素が存在することは、何を意味しているものなのかということに興味をもたれたので、このキ剤非服用スモン患者(症例6)ならびに対照としてキ剤服用を中止後1ヶ月のスモン患者(症例4)およびキ剤非服用の正常人(症例15)の各1例ずつの乾燥血清からキノホルムの検出を試みた。

### II 方 法

凍結乾燥血清75mg(約1mlの血清に相当する)を秤量して1mlの水に溶かし、ベンゼン・ピリジンで抽出し、水洗し、 $\text{Na}_2\text{S O}_4$ で脱水後アセチル化して、ガスクロマトグラフィーを行った。検出器にはECDを用いた。三種類のカラム、QF-1、SE-30およびXF-1105を用いて、標準品のキノホルムとピークの位置を比較することにより同定した(図1)。

### III 結 果

キ剤服用スモン患者血清からキノホルムが検出された。その濃度は約 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 血清で、キ剤服用中止後1ヶ月の患者とほぼ等しかった(表1)。

### IV 考 察

症例6について河合らのデータは塩素に対するヨウ素量が $2.8 \times 10^{-3}$ であり、我々の値を塩素濃度 $100\text{mg}/\text{l}$ としてそれに換算すると、 $1.2 \times 10^{-3}$ になる。両方法とも測定誤差が相対的に大きいことを考えると、河合らが観察したスモン患者血清のヨウ素上昇は、キノホルムに由来しているとして説明できるであろう。

### V 要 約

キノホルム剤非服用スモン患者乾燥血清から本法によりキノホルムが約 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 検出された。この値は質量分析法によるヨウ素/塩素値から換算したキノホルム値と近似していた。

### 文 献

1) 河合忠ほか：スモン調査研究協議会研究報告書，No. 4(昭和45年度病理班研究報告)153，昭和46年

図 1.

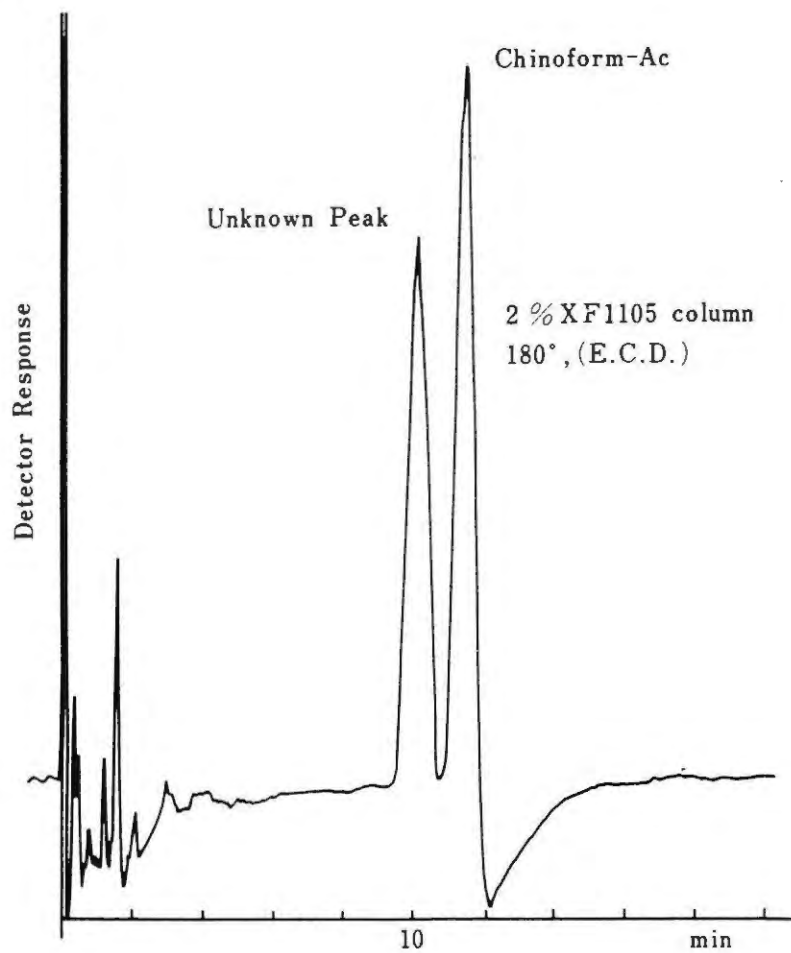


表 1 乾燥血清 75 mg に含まれるキノホルム

| 症例番号と診断 | キ剤使用 | I / C1               | キノホルム        |
|---------|------|----------------------|--------------|
| 4 スモン   | あ り  | $4.5 \times 10^{-3}$ | 約 10 $\mu$ g |
| 6 スモン   | な し  | $2.8 \times 10^{-3}$ | 約 10 $\mu$ g |
| 15 正 常  | な し  | $1 \times 10^{-5}$   | 検出されず        |

## 22. キノホルムグルクロナイドの代謝・排泄

田村 善蔵

( 東大・薬学部・薬品分析化学 )

### I 緒 言

キノホルムの代謝研究の一環として、先に合成したキノホルムグルクロナイド<sup>1)</sup>の分析法を検討し、ラットによる代謝予備試験を行った。

### II 実 験

#### 1 ガスクロマトグラフィーによる分析法の検討

キノホルムグルクロナイドを直接トリメチルシリル化してガスクロマトグラフィーを行うと分解してしまいが、ジアゾメタンでメチルエステルにし、トリメチルシリル化しガスクロマトグラフィー(2% QF-1, 又は2% OV-1; 220°)を行えば定量性はないが分析できる。定量を行うにはβ-グルクロニダーゼで加水分解した後トリフルオロアセチル化してガスクロマトグラフィー(水素炎検出器; 2% XF-1105; 180°)を行う手法をとった。内部標準物質は5, 7-ジブロム-8-ヒドロキシキノリンを使用した。

#### 2 代謝予備試験

図1のような操作法に従って胆汁, 尿中の遊離キノホルムおよびそのグルクロナイドを定量した

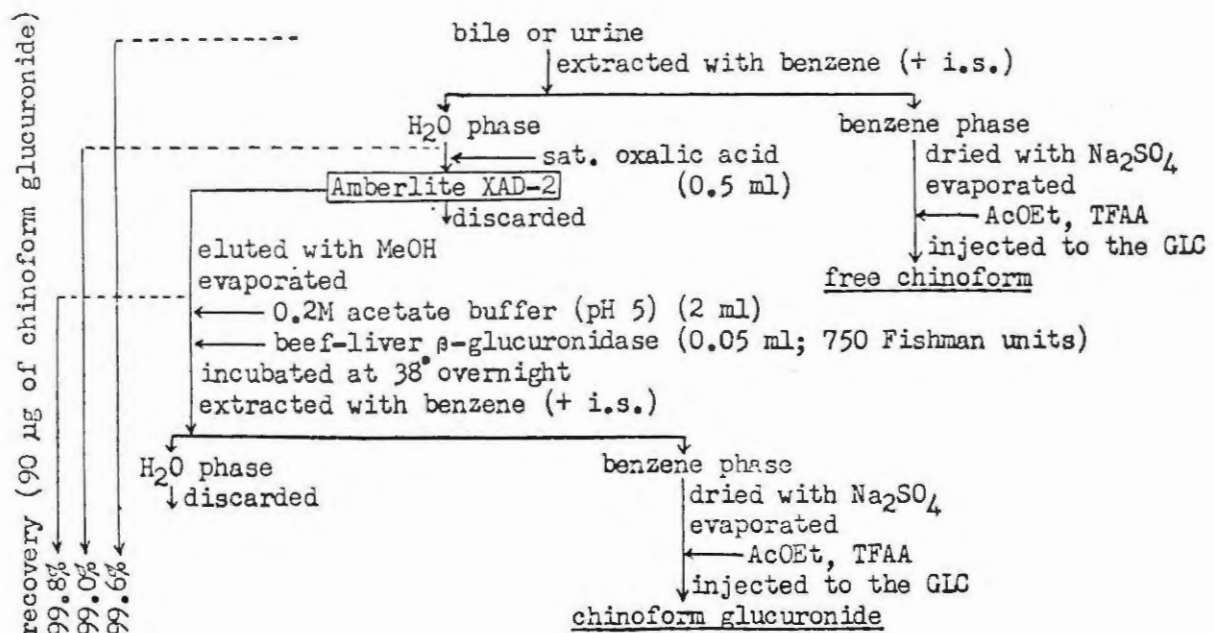


図 1



(添加回収率は図1に示すように定量的であった。

ラット(Whister系, ♂, 330-350 g)をエーテル麻酔し胆管にカニュレーションし経時的に胆汁を採取できるようにし, 一方膀胱の出口を閉め, 膀胱に注射針をさし注射器で経時的に尿を採取できるようにしておく。股静脈より0.9%キノホルムグルクロナイドNa塩溶液を26~27 mg/kg程度投与し経時的に尿, 胆汁を採取し, 上記の方法で分析すると図2に示す結果を得た。

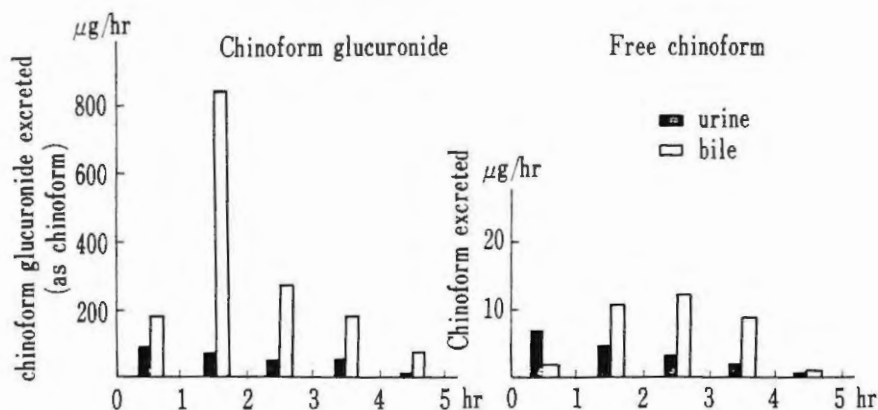


図 2

### Ⅲ 考 察

キノホルムグルクロナイドはラットの組織内のβ-グルクロニダーゼで加水分解され, 遊離キノホルムもそのグルクロナイドも主として胆汁の方に排泄されることがわかった。しかしながら5時間での全排泄量の定量値は, 投与量の32%程度にしか達しない。遊離キノホルムの抽出が不完全のおそれがあり, 抽出分離法自体にも問題点があるものと考えられる。

### Ⅳ 要 約

合成キノホルムグルクロナイドNa塩溶液をラットに26~27 mg/kg股静脈より投与すると, 組織内のβ-グルクロニダーゼで一部加水分解され, 遊離したキノホルムおよびそのグルクロナイドともに主として, 胆汁の方に排泄されることがわかった。

### 文 献

- 1) I. Matsunaga et al : Chem Pharm Bull (Tokyo), 19, 1056, 1971



## 23. 胆汁酸によるキノホルムの可溶化

田村 善蔵

(東大・薬学部・薬品分析化学)

### I 緒 言

各種の実験に行う際、キノホルムの水に対する溶解度の低さが大きな支障になっている。これを克服するため溶解補助剤などを用いる工夫がなされているが、生体成分をその目的に利用できれば好都合である。事実キノホルムが血清に比較的良く溶解することは知られている。一方胆汁酸は経口投与されたキノホルムと腸内で接触することから胆汁酸による可溶化の検討は動物実験において、より生理的な条件を再現する上でも有意義であると思われる。

### II 実験及び結果

キノホルム約1 mg/mlの溶液を作ること为目标とした。

まずキノホルムを0.1 N NaOH中；スターラーでよく攪拌し、溶解させ、2 mg/mlの溶液を調整する。この1 mlに10%タウロコール酸1 mlを添加後、1 N及び0.1 N HClで中和してpH 7~8にすると、約30分間は溶解した状態を保持するが、次第に結晶が析出してくる。デスオキシコール酸、グリココール酸でもほぼ同様である。なお上記のアルカリ溶液を胆汁酸無しで直接中和すると、pH 10.5で結晶が析出する。

### III 考 察

キノホルムの純水に対する溶解度は1  $\mu$ g/mlと言われているが、5%胆汁酸溶液では約pH 9で1 mg/mlの溶液を調製することが可能である。この事実は経口投与されたキノホルムが胆汁酸によって可溶化することを示しており、吸収との関連が示唆されて興味深い。

## 24. 血清キノホルムの微量定量法

田村 善蔵

(東大・薬学部・薬品分析化学)

### I 緒言

キノホルムによるスモン発症の機作を解明するため、スモン患者の血中からキノホルムを検出し、キノホルムの中毒発現と血中レベルとの関係を調べることは重要な課題である。そこでガスクロマトグラフィーを用いて微量のキノホルムを正確に定量する方法を検討した。

### II 方法及び結果

田村によって報告された血清キノホルムの微量分析法<sup>1)</sup>に基づき図1のような定量法を作成した。

Method for the Determination of Chinoform in Serum

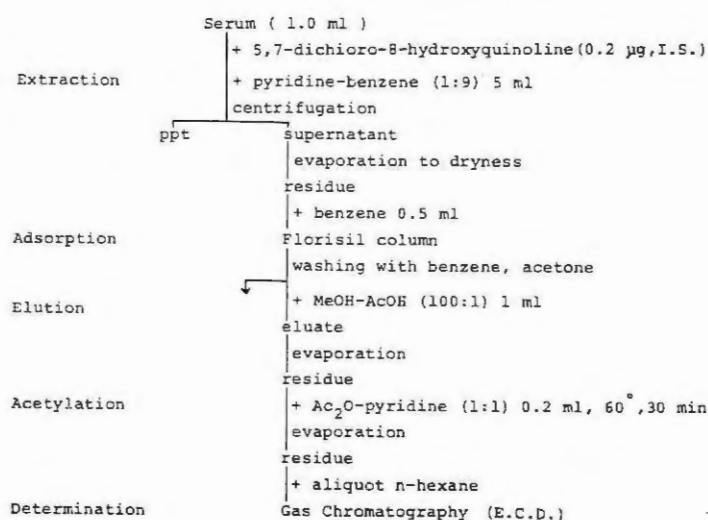


図 1

内部標準物質としては、5,7-ジクロロ-8-ヒドロキシノリンを用いた。定量は内標に対するキノホルムのピーク高比で行うが、一方、ピリジン・ベンゼンによるキノホルムの絶対抽出率を検討するため  $^{14}\text{C}$  キノホルムを血清に添加し、その回収率を調べたところ、表1に示すごとく1回の抽出操作で平均95%の良好な回収率を得た。吸着剤として前報ではアルミナを用いたが、操作の簡便性という点から今回はフロリジルについて調べた。 $^{14}\text{C}$  キノホルムをフロリジルカラムに吸着

表 1

Recovery of added  $^{14}\text{C}$  — Chinoform from Serum by  
Extraction with Pyridine — benzene (1:9)

| added $\mu\text{g}$ | 0.1  | 0.5  | 1    | 3.3  | 5    | 10   | 20   | average |
|---------------------|------|------|------|------|------|------|------|---------|
| recovery            | 92.8 | 95.7 | 98.8 | 98.7 | 94.3 | 93.4 | 92.8 | 95.2    |

させ、ベンゼン、アセトンで順次洗った後、メタノール・酢酸（100:1）で溶出し、その絶対回収率をみると、表2に示すごとく添加量を変えてもほぼ74%の一定値を示した。以上の結果は本定量法における非抱合型キノホルムの抽出、精製操作の信頼性を裏づけるものである。

表 2  
Recovery of  $^{14}\text{C}$ -Chinoform from Florisil Column

| added $\mu\text{g}$ | 0.1  | 0.1  | 0.6  | 1.2  | average |
|---------------------|------|------|------|------|---------|
| recovery %          | 73.9 | 74.1 | 75.5 | 73.3 | 74.2    |

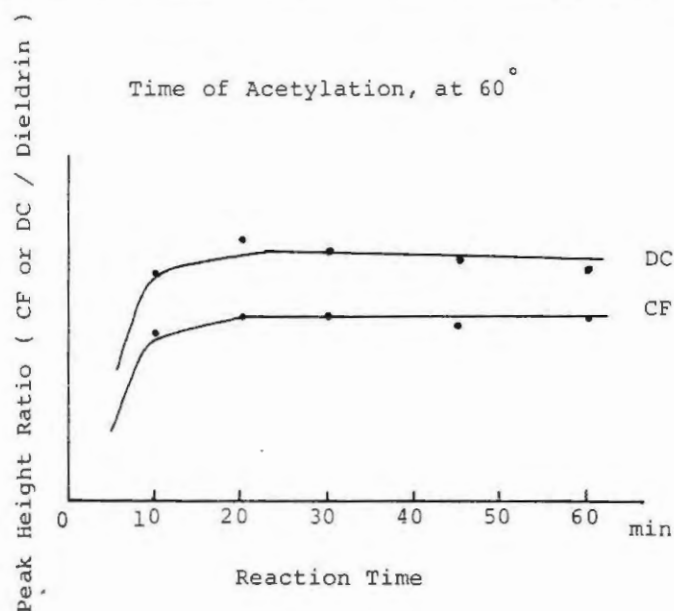


図 2

アセチル化の条件は図2に示すごとくキノホルム、内標とも60°，20分で最高に達するが，反応を充分に行なわせるため30分と決めた。

血清に既知量添加し，全操作を行って得られた検量線は図3に示すように満足すべき直線性を示した。

### Ⅲ 考 察

本操作法により，キノホルム金属キレートも定量的に回収されるため測定値は非抱合型キノホルムの総和を示している。

アルミナカラムを用いても測定出来るが，欠点は操作が簡便でないことである。一方長所は抽出液からキノホルムを直接吸着させ得ること，及び水のような極性溶媒でも充分洗えることなどから，不純物混入の可能性の大きい生体組織を用いる場合にはアルミナの方が有効であろうと思われる。

### Ⅳ 要 約

ガスクロマトグラフィー（ECD使用）を用いて血清1 ml中に含まれるキノホルムを $0.05\mu\text{g}$ まで正確に定量することが出来る信頼性の高い測定法を開発した。

Calibration Curve for Chinoform Added in Serum using  
5,7-Dichloro-8-hydroxyquinoline as an Internal Standard

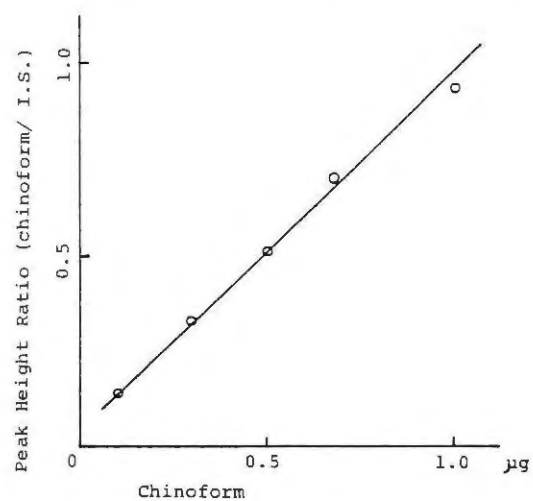


図 3

#### 文 献

- 1) 田村善蔵：スモン調査研究協議会研究報告書，No.3（昭和45年度病原班研究報告），176，昭和46年

## 25. 肝・腎中のキノホルムの微量定量法

田村 善蔵

(東大・薬学部・薬品分析化学)

### I 緒言

臓器中に含まれるキノホルムを正確に定量することは血清キノホルムの定量と同様、スモン発症の機作を解明するために重要である。そこでガスクロマトグラフィー( E C D )を用いる血清キノホルムの微量定量法を、試料の前処理に重点をおき検討し臓器中キノホルムの定量に応用した。

### II 方法及び結果

田村らによって報告された生体試料からのキノホルムの微量定量法<sup>1)</sup>に検討を加図1のような定量法を作成した。

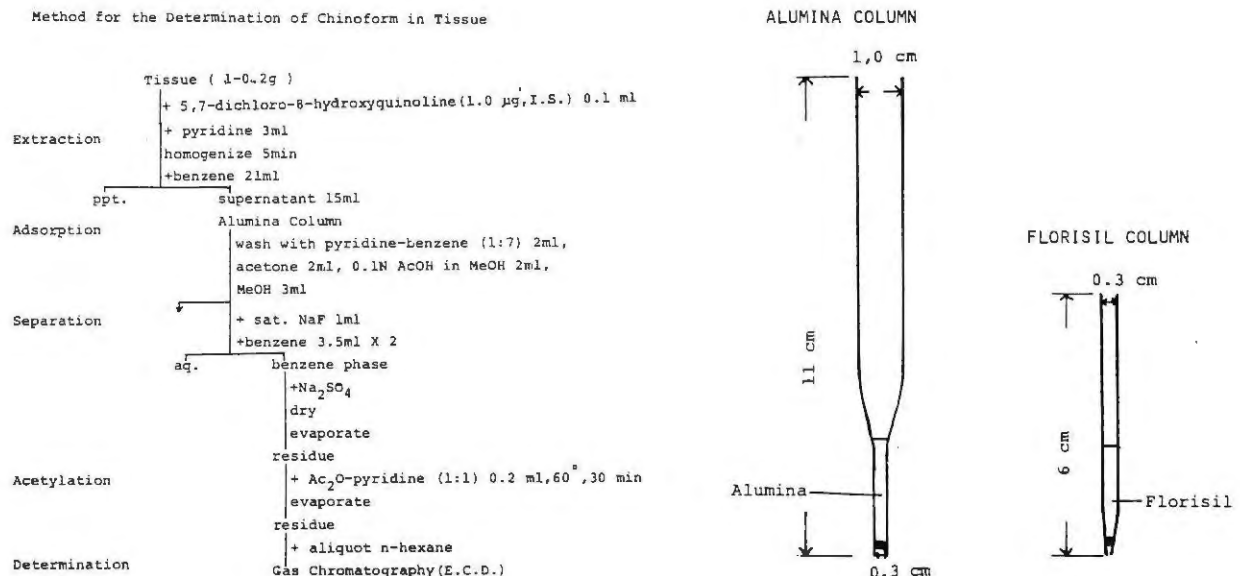


図 1

図 2

組織をピリジンおよび内部標準物質である5,7-ジクロロ-8-ヒドロキシキノリンと共に、ステンレス製刃、ガラスカップ付ホモジナイザー(日本精機K.K)で冷時完全にホモジナイズし、ベンゼンを加えて再び攪拌し、最終的にピリジン・ベンゼン(1:7)になる様にして抽出を行った。

ステンレス製刃へのキノホルムの吸着はほとんど認められなかった。

吸着剤として血清の場合はフロリジルを用いたが組織では不純物の除去が不完全なため、アルミナを採用した。図2に示すようなガラス管にグラスウールをゆるくつめ、アルミナ約200 mgを入れ、カラムを作り、試料を吸着させ、ピリジン・ベンゼン(1:7)、アセトン、0.1 N酢酸(メタノール)、メタノールで順次洗浄した後、飽和NaF溶液1 mlと共にアルミナをガラス棒で押し出す。

ベンゼン3.5 mlを加えよく振とうし、遠沈した後、ベンゼン層を集める。同様の操作をくり返し、

各回毎にキノホルムの抽出率を調べると、45%、20%、15%、10%となった。しかし内標に対するキノホルムの比は常に同一であったので操作の簡便性のため、2回ベンゼン抽出を行うことにした。集めたベンゼン層に $\text{Na}_2\text{S O}_4$ （無水）約100mgを加え1晩放置し、少量含まれるNaF、水、微量の水溶性混入物などを除去する。ベンゼン層を減圧乾固し、無水酢酸0.1 ml、ピリジン0.1 ml加え、60° 30分の条件でアセチル化し、得られたガスクロマトグラムを図3に示す。

定量は内標に対するキノホルムのピーク高比を計算し、図4に示す検量線をもとに行う。内標1.0  $\mu\text{g}$  を添加し、アルミナ処理して得られた検量線は良い直線性を示した。検量線は日差変動があるの

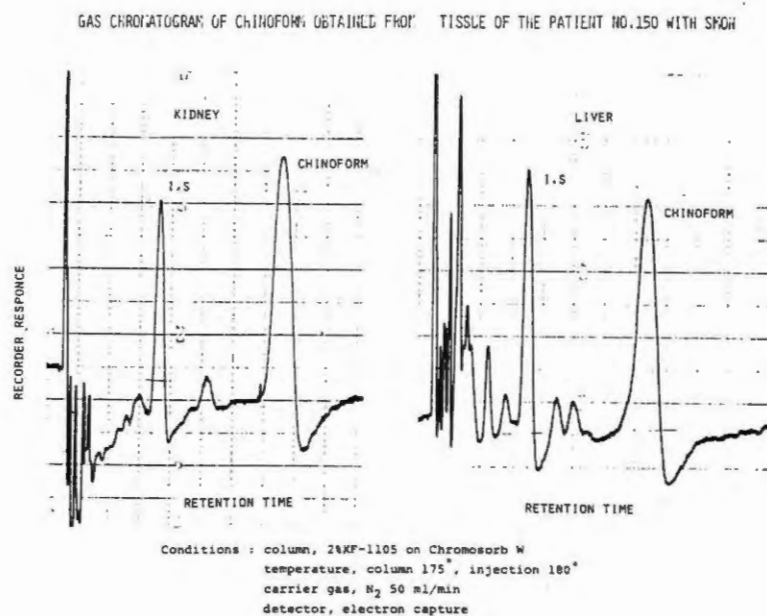


図 3

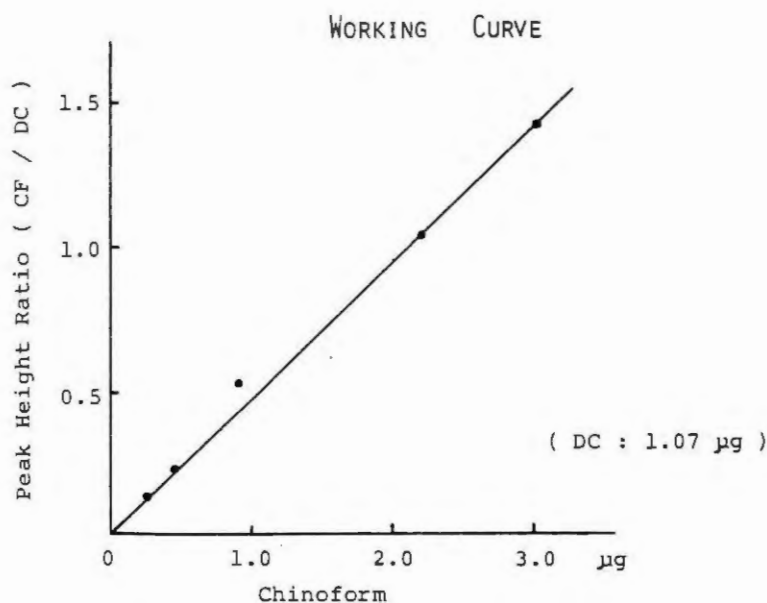


図 4

で各回毎に作成しなければならない。なおキノホルム金属キレートは本操作法により遊離キノホルムとして測定される(表1)。

表 1

Recovery of added Chinoform-Fe Complex  
to Serum by the Present Procedure

| chinoform-Fe<br>added (n mole) | recovery measured<br>as chinoform (n mole) |
|--------------------------------|--------------------------------------------|
| 0.67                           | 1.64                                       |
| 1.34                           | 4.09                                       |
| 2.68                           | 6.90                                       |

chinoform : Fe ( 3 : 1 )

### Ⅲ 考 察

キノホルムおよび内標を直接アセチル化して得られたクロマトグラムをアルミナ処理して得られたものと比較すると、内標に対するピーク高比は前者の方が高くなる。特にキノホルム量が多くなるにつれてこの傾向は顕著になる。その原因について種々検討を行ったが現在のところ不明である。したがって実際の測定にあたっては必ずアルミナ処理を行った時の検量線を用いなければならない。

0.1~0.02  $\mu$ g のキノホルムを定量する場合には0.1  $\mu$ g の内標を用いれば測定可能である。

測定すべき試料がほとんどホルマリン固定されていることから、キノホルムのホルマリン固定による影響を現在検討中である。

### Ⅳ 要 約

ガスクロマトグラフィー( ECD 使用 )を用いて組織1~0.1  $\mu$ g 以上のキノホルムを誤差 $\pm$ 15%で定量する方法を確立した。本法において遊離キノホルムおよびその金属キレートが総量として測定される。

### 文 献

- 1) 田村善蔵: スモン調査研究協議会研究報告書, No. 3 ( 昭和45年度病原班研究報告 ), 176, 昭和46年



## 26. スモン剖検例の臓器中のキノホルムの測定成績

田村 善蔵

( 東大・薬学部・薬品分析化学 )

江頭 靖之

( 予研・病理部 )

### I 緒 言

キノホルムがスモンの原因として注目されているが、スモンの定義が臨床症状にもとづいているのでキ剤を服用していないスモンの問題が残されている。田村により臓器中のキノホルム定量法がほぼ確立されたので、スモン患者の肝臓と腎臓中のキノホルムの測定を試みた。

### II 実 験

材料は病理班によるスモン剖検例の全国調査に関連して、江頭がキ剤服用について調べた中から、a) 死亡近くまでキ剤を大量に服用していた例、b) キ剤服用をやめた後1ヶ月以上経過して死亡した例、c) 調査回答上でキ剤を服用していないと記された例の中から選んで入手した。

### III 結 果

表1に示した。定量値は同一試料について3回測定の平均値として示した。

### IV 考 察

死亡直前まで服用していた患者の肝臓からはすべてキノホルムが検出された。しかし臓器貯留量、投与総量、1日投与量については相関が認められず、むしろ個体差の大きなことがわかった。これは肝・腎ともにキ剤の排泄臓器であるため、その機能の変動が大きく影響しているためと思われる。

このことは、たとえば末期腎干腎炎を起こしていた%103の患者の腎臓に異常に高濃度のキノホルムが貯留していたことから示唆される。また、キ剤投与が不明な場合でも%53、%56のように明らかにキノホルムが検出される例もあった。

表 1 スモン剖検例の臓器中のキノホルムの測定成績 (検出限界:  $0.1 \mu\text{g/g}$ )

| 患者No.                    | 年齢 | 参 考       | 総投与量<br>(g)     | 換算1日<br>服用量<br>(g) | 死亡時に<br>近い連続<br>服用量(g) | 最終服用日<br>から死亡ま<br>での日数 | 組織学的診断  | ホルマリン<br>固定期間<br>(月) | キノホルムの定量値<br>( $\mu\text{g/g}$ )<br>肝 臓 腎 臓 |  |
|--------------------------|----|-----------|-----------------|--------------------|------------------------|------------------------|---------|----------------------|---------------------------------------------|--|
| a) 死亡近くまでキ剤を服用していた剖検例    |    |           |                 |                    |                        |                        |         |                      |                                             |  |
| 103                      | 33 | 腎 孟 腎 炎   | 419             | 1.35               | 総投与量                   | 1                      | ス モ ン   | 33                   | 4.1 42.3                                    |  |
| 19                       | 59 |           | 204             | 0.9                | 〃                      | 12                     | 〃       | 30                   | 0.8 3.6                                     |  |
| 13                       | 63 | 腸 切 除     | 177             | 0.9~1.8            | 26                     | 4                      | 〃       | 41                   | 3.0 7.5                                     |  |
| 100                      | 61 |           | 140             | 0.9~1.0            | 38                     | 1                      | 〃       | 71                   | 0.4 0.8                                     |  |
| 114                      | 41 | 紅 斑 性 狼 瘡 | 124             | 1.5                | 総投与量                   | 1                      | 〃       | 31                   | 2.5 1.2                                     |  |
| 102                      | 77 |           | 120             | 1.8                | 〃                      | 4                      | 〃       | 55                   | 0.4 0.4                                     |  |
| 150                      | 58 |           | 116             | 1.2                | 〃                      | 4                      | 〃       | 28                   | 4.1 5.0                                     |  |
| 111                      | 59 |           | 103             | 1.8                | 〃                      | 1                      | 〃       | 39                   | 2.2 2.9                                     |  |
| 110                      | 40 |           | 103             | 1.8                | 〃                      | 1                      | 〃       | 44                   | 0.1 検出せず                                    |  |
| 151                      | 53 |           | 79              | 1.2                | 〃                      | 2                      | 〃       | 27                   | 9.5 9.5                                     |  |
| 109                      | 67 | 腎 孟 腎 炎   | 78              | 0.9~1.35           | 〃                      | 2                      | 〃       | 79                   | 1.8 0.8                                     |  |
| b) キ剤最終服用日後1ヶ月以上経て死亡した例  |    |           |                 |                    |                        |                        |         |                      |                                             |  |
| 108                      | 60 | 糖尿, 尿毒症   | 368             | 0.6~1.2            | 254                    | 40                     | 〃       | 35                   | 検出せず 検出せず                                   |  |
| 63                       | 66 | 胃 癌 切 除   | 72              | 1.35               | 総投与量                   | 48                     | 〃       | 52                   | 0.2 〃                                       |  |
| 101                      | 61 | 同上, 肺結核   | 583             | 0.9                | 〃                      | 114                    | 〃       | 57                   | 0.1 〃                                       |  |
| 60                       | 69 |           | 42              | 1.2                | 〃                      | 120                    | 〃       | 45                   | 2.1 1.9                                     |  |
| 76                       | 72 | 高 血 圧     | 12              | 0.9                | 〃                      | 2年9ヶ月                  | 〃       | 38                   | 検出せず 検出せず                                   |  |
| c) キ剤を服用していない(不確実を含む)剖検例 |    |           |                 |                    |                        |                        |         |                      |                                             |  |
| 104                      | 39 | 白 血 病     | 服用していない         |                    |                        |                        | 非 ス モ ン | 70                   | 〃 〃                                         |  |
| 56                       | 42 | 結 核       | 入院した病院では投与していない |                    |                        |                        | ス モ ン   | 67                   | 1.1 1.0                                     |  |
| 53                       | 24 | 化膿性腹膜炎    | 死亡前15ヶ月は服用していない |                    |                        |                        | 非 ス モ ン | 46                   | 0.4 0.5                                     |  |
| 49                       | 43 | 腎 化 膿     | 死亡した病院では投与していない |                    |                        |                        | 〃       | 74                   | 検出せず 検出せず                                   |  |
| 20                       | 39 | 同 上       |                 |                    |                        |                        | 〃       | 49                   | 〃 〃                                         |  |

## 27. キノホルムによるラットの末梢神経障害の電子顕微鏡的観察

小口 喜三夫, 佐藤 猛, 椿 忠雄

(新潟大学脳研究所神経内科)

10数年間、病因不明であったSMONは緑舌を契機にSMONの患者から田村ら(1970)によりChinoformが証明され、次いで椿ら(1970)の疫学的研究の裏付けによりChinoformがSMONの主要病因である事が明らかとなった。我々は実験的にラットにChinoformを投与して、坐骨神経に対する障害を電子顕微鏡をもって確かめたので報告する。

### I 方法

雌雄成熟Wister系ラット(体重250~300g)にChinoform powderを0.2%のAgarに懸濁液として、500 mg/kg, 1,000 mg/kgを胃ゾンデ法により連日投与した。

又Chinoformを大量投与するため食欲減退を来す事があり、栄養障害を考慮してミルクを胃ゾンデ法により連日投与した。

500 mg/kg群は投与後10日までに10匹、20日までに2匹、30日までに3匹、1,000 mg/kg群では30日までに5匹を検索した。

全てのラットはpH.7.4の10%磷酸緩衝ホルマリンで灌流し、1%のOsO<sub>4</sub>で後固定した。

Epon-Araldite包埋したものを光学顕微鏡及び電子顕微鏡で観察した。

### II 結果と考按

Chinoform投与中に軽い両後肢の麻痺が認められた。

坐骨神経において500 mg/kgの20日目までのものにMyelinの腫張, Axon-Schwann interfaceの拡大とその間隙へのSpiral lamellaの彎入, LamellaのInvaginationが認められる。30日目以後のものは500 mg/kg, 1,000 mg/kgの両者において差は認められない。Myelinに著明な腫張が認められ、これは大径線維に著しい傾向がある。又この場合Axonも圧排されNeurofilamentの増加が認められる。(図1)

中径線維でもMyelin層構造の離開と不規則な乱れを示し(図3), Myelin Sheath間隙は浮腫状に膨化し、(図4)遂には崩壊する(図2)。又Schwann細胞のCytoplasmが突起状に変化しているもの(図2)まで種々の段階の脱髄の変化が認められる。又Perikaryonの部でAxonal swellingを来しているものも認められるが、投与期間の長期の群のみにおこり、かつ出現は少ないようである。

なお坐骨神経の病変はBundle全体が一様には障害されず、散在的にあるいは1部のBundleに限局性に障害がおこっている。

脳、視神経、脊髄、脊髄後根神経節には病変は認められなかった。

脊髄前角細胞、脊髄後根神経節の神経細胞には全く病変が存在しないで、末梢神経に病変が認めら

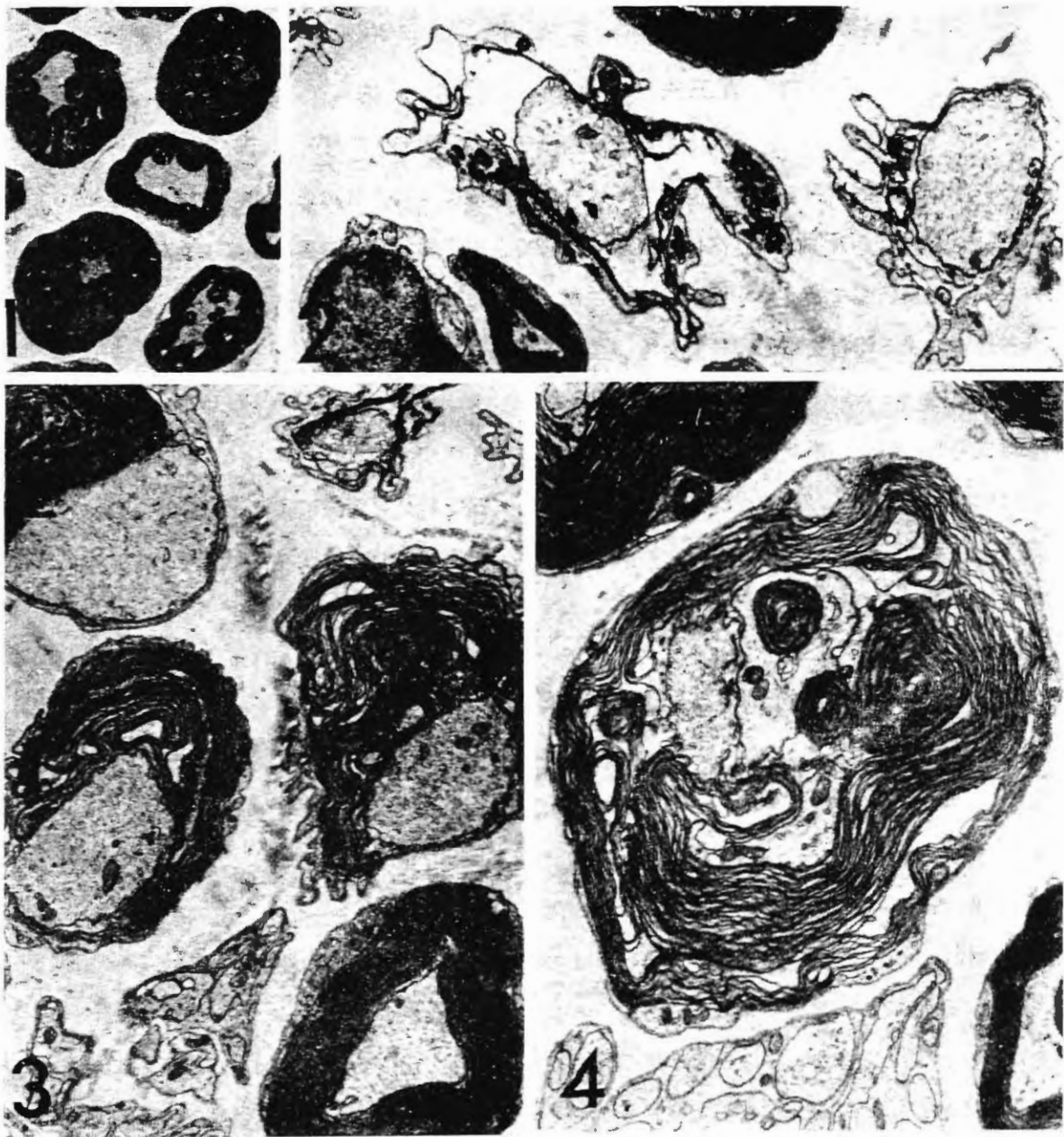


図1: 500 mg/kg daily, for 30 day (x2,200).

図2: 500 mg/kg daily, for 30 days and killed after 60 days (x10,000)

図3, 4: 500 mg/kg daily, for 30 days and killed after 60 days (x7,500)

れるということは、ラットにおいてはChinoformは末梢神経に直接作用して、主としてSchwann細胞に障害を及ぼすものと考えられる。長期群に認められたAxonの変化はMyelinの変化に伴うものと考えられる。しかし一部PerikaryonにAxonal swellingが認められることはSMON患者の末梢神経においてもAxonal swellingが認められ、Axonの変化が主体であるとの主張(白木ら)もあり興味が待たれる。

#### 主要文献

- 1) 椿 忠雄, 他: 日本医事新報 No.2,448:29 昭46

- 2) 白木博次, 他: スモン調査研究協議会研究報告書 No. 4 : 59 昭46.
- 3) Babel, J. et al. : Ultrastructure of the peripheral nervous system and sense organs, ed. by A. Bischoff.

## 28. キノホルム投与による臓器金属含有量の影響

神林 敬一郎, 椿 忠<sup>3)</sup>

(新潟大学脳研究所神経内科)

キノホルムが, SMON<sup>1)</sup>の原因として注目されてきたが発生機序については不明の点が多い。SMON患者の舌がしばしば緑色の苔に覆われ, さらに緑便, 緑尿がみられることが知られており, これら緑色物質がキノホルムと鉄の錯塩<sup>2)</sup>であることが証明された。オキシシン系薬剤は, 種々の金属と錯化合物を作ることが知られており, キノホルムもオキシシン系薬剤である。SMONの発生機序をさぐるため, キノホルム投与により生体必須元素のうちMn, Cu, Zn, Ca, Mgなどにつき臓器含有量の変動につき動物実験を試みた。臓器のMnの減少が目立ち他の金属にも複雑な変動をみたので報告する。

### I 材料と方法

成熟ラットに, キノホルム500 mg/kg・日を経口投与し, 日を追って肝, 腎, 大腿筋のMn, Cu, Zn, Ca, Mg含有量を測定した。測定方法は, 湿性灰化後原子吸光分析を行なった。Mnの測定は, キノホルム使用Mn測定法<sup>3)</sup>を変法して行なった。

### II 結果

各金属の各臓器含有量は表1に示し, 数値は表中例数の平均±標準偏差を示した。

Mnの含有量は, 肝ではキノホルム投与後急激に減少をみ, 腎および筋でも減少の傾向をみる。

Cuの含有量は, 腎でキノホルム投与後急激に減少をみる, 肝および筋では変動を認めない。

Znの含有量は, キノホルム投与後肝で増加がみられ, 腎および筋で増加の傾向がみられる。

Caの含有量は, キノホルム投与後肝および筋で増加の傾向がみられ, 腎では一時増加がみられる。

Mgの含有量は, 肝, 腎および筋ともに一時増加をみるが, また前値にもどっている。

### III 考案

キノホルムは, 抗菌作用のほかに種々の作用があり, 今回金属とのキレート作用の面より, SMON<sup>3)</sup>の発生機序をさぐろうと試みた。キノホルム投与でMn含有量の減少をみたことは, MnがpH7~8で良く, キノホルムとキレートすることより生体中のMnの欠乏状態が起こることが推定される。

Mnは, Arginase, Oxydative Phosphorylation, Fatty Acid Synthesis, Cholesterol SynthesisのCofactorとしての作用があり, これらの活性に影響をおよぼしていることが考えられる。

Znの変動については, キノホルムとZnのキレートによる変化, キノホルム中毒で障害された代謝をなんらかの形で代償しようとして変化してきていることが考えられる。後者については, カドミウム中毒, 肝硬変などで臓器のZnの含有量の増加がみられ, 慢性アルコール中毒, 各種の末梢神経障害でもZn代謝の障害がみられることにより推定されるが, キノホルム投与のZnの変動については不明の点が多い。

表 1

|            | 例数 | M n         |             |             | C u        |            |             | Z n         |             |            | C a       |           |           | M g      |           |           |
|------------|----|-------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|------------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|
|            |    | 肝           | 腎           | 筋           | 肝          | 腎          | 筋           | 肝           | 腎           | 筋          | 肝         | 腎         | 筋         | 肝        | 腎         | 筋         |
| 投与前        | 3  | 9.07 ± 0.33 | 5.71 ± 1.04 | 1.35 ± 0.30 | 15.1 ± 2.0 | 33.8 ± 3.1 | 3.70 ± 0.16 | 48.3 ± 1.5  | 55.3 ± 3.6  | 28.1 ± 1.8 | 191 ± 45  | 421 ± 19  | 256 ± 32  | 638 ± 25 | 648 ± 82  | 810 ± 134 |
| 投与後<br>2 日 | 2  | 3.99 ± 1.05 | 3.61 ± 0.10 | 0.88 ± 0.25 | 12.0 ± 3.5 | 16.4 ± 2.2 | 3.81 ± 0.62 | 60.8 ± 7.1  | 83.8 ± 0.1  | 30.6 ± 6.1 | 275 ± 35  | 595 ± 30  | 410 ± 133 | 749 ± 43 | 683 ± 97  | 493 ± 326 |
| 〃<br>4 日   | 2  | 3.18 ± 0.15 | 2.28 ± 1.91 | 0.95 ± 0.51 | 14.5 ± 0.9 | 17.8 ± 5.6 | 3.80 ± 1.01 | 68.5 ± 9.5  | 79.4 ± 11.3 | 31.2 ± 2.0 | 458 ± 45  | 747 ± 211 | 421 ± 36  | 736 ± 35 | 852 ± 55  | 841 ± 88  |
| 〃<br>5 日   | 6  | 2.74 ± 1.10 | 3.03 ± 1.12 | 0.86 ± 0.59 | 11.7 ± 1.4 | 14.9 ± 6.4 | 3.70 ± 0.43 | 72.5 ± 13.2 | 69.9 ± 16.1 | 31.0 ± 3.1 | 500 ± 236 | 671 ± 216 | 380 ± 76  | 746 ± 54 | 804 ± 154 | 950 ± 123 |
| 〃<br>6 日   | 3  | 4.32 ± 0.60 | 5.34 ± 1.24 | 1.00 ± 0.25 | 13.5 ± 1.5 | 11.0 ± 0.9 | 3.62 ± 0.34 | 94.2 ± 5.3  | 87.2 ± 2.5  | 33.2 ± 1.8 | 419 ± 109 | 513 ± 54  | 317 ± 35  | 904 ± 83 | 740 ± 160 | 931 ± 41  |
| 〃<br>7 日   | 2  | 3.18 ± 0.37 | 3.65 ± 1.25 | 1.15 ± 0.38 | 15.5 ± 3.9 | 16.9 ± 0.9 | 4.30 ± 0.77 | 81.6 ± 4.3  | 72.6 ± 7.7  | 28.2 ± 0.6 | 263 ± 10  | 451 ± 17  | 273 ± 12  | 856 ± 5  | 761 ± 3   | 1048 ± 91 |
| 〃<br>8 日   | 3  | 3.22 ± 1.11 | 3.14 ± 0.76 | 1.07 ± 0.34 | 15.0 ± 2.3 | 11.7 ± 4.1 | 3.65 ± 1.92 | 82.4 ± 4.2  | 79.8 ± 8.4  | 42.3 ± 4.7 | 454 ± 42  | 545 ± 87  | 614 ± 373 | 647 ± 25 | 500 ± 68  | 835 ± 100 |
| 〃<br>12 日  | 3  | 3.32 ± 0.56 | 2.65 ± 1.07 | 0.55 ± 0.10 | 12.7 ± 1.6 | 11.9 ± 0.4 | 3.10 ± 0.51 | 79.5 ± 6.7  | 74.3 ± 2.7  | 45.2 ± 1.6 | 493 ± 71  | 579 ± 102 | 435 ± 36  | 729 ± 99 | 588 ± 114 | 808 ± 116 |

平均値±標準偏差，単位はいずれも  $\mu\text{g/g} \cdot \text{dry}$



さらに Cu, Ca, Mg も複雑に変動がみられ, 他の金属についても変動が考えられ, これらが生体になんらかの影響を与えていると推定され, 今後の検討を要すると思われる。

#### 主要文献

- 1) 椿 忠雄, 本間義章, 星 允: 日本医事新報, 2448: 29, 1971.
- 2) 吉岡正則, 田村善蔵: 医学のあゆみ, 74: 320, 1970.
- 3) 神林敬一郎: 医学と生物学, 82: 181, 1971.

## 29. $C^{14}$ -キノホルムのラット生体内における分布

高橋 康夫, 荒木 一明

(新潟大学脳研究所神経薬理)

椿 忠雄

(同神経内科)

われわれは昨年9月、<sup>1)</sup>椿によってスモンのキノホルム説が提案されると同時に、 $C^{14}$ キノホルムあるいは $H^3$ キノホルムの合成とその使用による基礎的検討を企図したが、合成がおくれたために本年4月3日、ようやく、その第1報を日本内科学会総会において報告した。その結果として重要なことは $C^{14}$ キノホルムが坐骨神経に強くとりこまれるという所見であった。

本報告は $C^{14}$ キノホルムをラットに投与した場合の生体内分布とその時間的経過についての報告の一部である。この分布の続報は別に報告する。また別報で排泄についても報告した。

### I 実験方法

実験動物としては200 gのラットを使用し2, 3, 4- $C^{14}$ キノホルム (Sp. Act. 1.63 mc/m mole, 純度99%, 第一化学製) をサラダ油にとかし、6.6  $\mu$ c/0.4 mlを腹腔内に注射した。その後30分, 2時間, 6時間, 24時間, 7日後に断頭し血液を採取すると同時に各臓器を採取した。それぞれの臓器を生理的食塩水で洗浄した後秤量し、おのおの500 mgをPackardのAutomatic sample oxidizerを使用して燃焼させ $C^{14}O_2$ に変え、エタノールアミンにトラップし、これをエタノールでVial中に溶出し、トルエンシンチレーターを添加してPackard 2420型シンチレーションカウンターで測定し、DPMとして算出した。値は単位湿重量gあたりで表現した。この方法による回収率は98%であった。

### II 実験成績および考察

えられた成績は表1のごとくであり、この重要点をわかりやすく図示したのが図1である。これより各臓器内の放射能の分布とその時間的経過がわかる。すなわち大体の傾向として $C^{14}$ キノホルムのとりこみの高いものは血液、肝臓、腎臓であり、次いで坐骨神経に高く、胃、腸もかなり高かった。

大脳、小脳、背髄などの神経系の他の部分は非常に低い放射能を含有しているに過ぎない。その他の臓器はいずれも一般にかなり低い値であった。

時間的経過をみると血液は30分ですでにかなり高いカウントを示すが、2時間後にはさらに上昇し最高に達する。しかし6時間後にはすでに若干下降しており、24時間では急速に最高値の1/6位に下降してしまう。7日後にはほとんど認められない程度にまで減少する。肝臓、腎臓もほぼ血液に近いパターンを示すが6時間では血液より高い放射能を示している。その他の臓器も若干の違いはあってもほとんど同様の時間的パターンを示している。ただ坐骨神経のみは非常に特異であり、24時間後と7日後でほとんど同じ放射能値を示し、かなり高く他臓器の5~10倍であった。なお興味

表1 Distribution of  $C^{14}$ -chinoform in various organs (Sample oxidizer method) DPM/g

|            | 0.5 h | 2 h   | 6 h   | 24 h | 7 d |
|------------|-------|-------|-------|------|-----|
| Cerebrum   | 306   | 412   | 386   | 90   | 40  |
| Cerebellum | 303   | 770   | 636   | 43   | 108 |
| Sp. cord   | 563   | 657   | 580   | 113  | 25  |
| Sci. nerve | 500   | 2556  | 2405  | 472  | 461 |
| Heart      | 1126  | 2005  | 1946  | 156  | 46  |
| Lung       | 1862  | 2874  | 1536  | 318  | 64  |
| Liver      | 5768  | 10432 | 10500 | 1432 | 56  |
| Pancreas   | 823   | 1648  | 2302  | 208  | 116 |
| Spleen     | 546   | 840   | 504   | 170  | 166 |
| Kidney     | 6978  | 11280 | 16064 | 1450 | 100 |
| Stomach    | 814   | 804   | 3780  | 1640 | 40  |
| Intestine  | 418   | 840   | 3390  | 236  | 60  |
| Muscle     | 226   | 538   | 614   | 62   | 44  |
| Blood      | 7280  | 12222 | 7716  | 1268 | 20  |

があることは7日後に断頭した1例で胎児があり、この胎児中に坐骨神経に劣らない高い放射能値が観察されたことである。しかし、この点についてはなお検討の要がある。われわれがこの方法で脂肪のデータを示していないのは若干の問題があったからである。上記のわれわれの方法では各臓器中の全放射能を測定しているわけで分布している $C^{14}$ が遊離キノホルムであるか、抱合キノホルムである

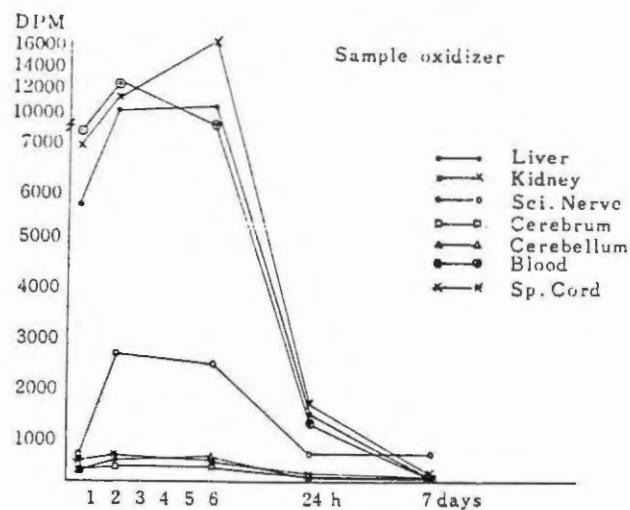


図1 Distribution of  $C^{14}$  chinoform in various rat organs.

かは明らかでない。この問題については別報でふれるが、いずれにせよ $C^{14}$ キノホルムが何らかの機序で坐骨神経にとりこまれ、しかもなかなかそこから離れないことは重要である。

上記のデータに対して血液混在による影響も考えられるので、同様の条件下の臓器の血液の測定を

Gordon らの方法で行なった。その結果、脳、背髄、坐骨神経などはそれぞれ 0.8%, 0.77%, 1.0% の血液含有でしかなく、脾、腎のような 20% 内外の場合と異なり影響は考えられない。坐骨神経の場合、7 日で血液のカウントがほとんどないのに相当のカウントを示すことから問題はないものと思われる。

本研究は文部省科学研究費の援助を受けた。

#### 主要文献

- 1) Tsubaki, T., Honma Y. & Hoshi, M.: Lancet. 7701:696, 1971.
- 2) Gordon, M. G. & Nurnberger. J. I.: J. Histochem. Cytochem. 3:130, 1955.

(本研究はスモン調査研究協議会及び医学のあゆみ 79:137, 1971 に発表)

## 30. $C^{14}$ -キノホルム排泄の化学的形態

高橋 康夫, 荒木 一明

(新潟大学脳研究所神経薬理)

椿 忠雄

(同神経内科)

1)

前報において筆者らは $C^{14}$ キノホルムをラットに投与した場合の放射能の各臓器内分布とその時間的経過について報告した。本報告においては、この $C^{14}$ キノホルムが生体から排泄される場合の化学的形態について現在までにえられた成績を報告する。

### I 実験方法

実験動物は前報と同様にラットであり、 $C^{14}$ キノホルムおよびその投与方法についても前報と同様であり、2, 3, 4- $C^{14}$ キノホルム $6.6\mu C$ を0.4 mlのサラダ油にとかし腹腔内注射した。そのラットはすぐに代謝測定用のケージ(岡崎産業製)に入れ、尿および糞を分離して24時間、2日、3日、4日、5日、6日、7日、とそれぞれ24時間分ずつ集められた。尿は量を測定後、その一定量を濾紙につけた後乾燥させ、Packard automatic sample oxidizerで $C^{14}O_2$ に変えて液体シンチレーション・カウンターで測定した。糞もSample oxidizerで同様に処理して測定した。

また尿の一部(24時間尿の0.5~2.0 ml)をSephadex-G-10のカラム(1.5×150 ml)にかけて水で溶出し、フラクションコレクターで5 mlずつ採取し、各分画の1 mlあるいは2 mlをステンレス皿に乾燥して、Nuclear Chicago low back ガスフローカウンターで測定した。またそのピークの同定のために尿の一定量(1.0~1.5 ml)を $\beta$ -glucuronidase (Sigma, type I) とphosphate buffer pH 7.2あるいはsodium acetate buffer pH 5.0中で37℃, 20時間反応させてから同じカラムにかけ溶出のパターンを分析した。またArylsulfatase(Sigma, type III)と尿一定量をsodium acetate buffer pH 5.0中で37℃, 20時間反応させてから同じようにSephadex-G-10にかけ分析した。

また以上の方法によるデータを確認するために尿およびSephadex-G-10からの各ピークを薄層ラジオクロマトグラフィーで分析した。薄層はMerckのKiesel Gel F254で展開、溶媒は0.5M  $NH_3$ ・nブタノール・エタノール・水(20, 20, 2, 1)の系であり、放射能の測定には日本無線のJTC 201 Radio Scannerを使用した。

### II 実験成績および考察

方法の項で述べたようにして分析した尿および糞の放射能の時間的経過をみると、いずれもほとんど1日で大部分が排泄され、以後は少しずつ排泄されるにすぎない。7日でほとんど大部分が排泄さ

れてしまう。また尿と糞では糞の方が4～5倍多く排泄される。

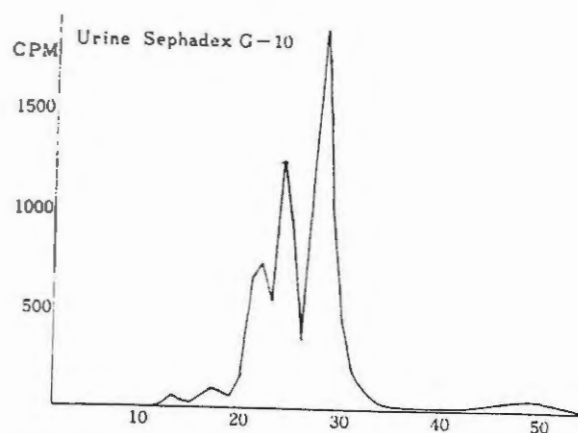


図1  $C^{14}$ キノホルム投与ラットの尿のSephadex-G-10による溶出パターン

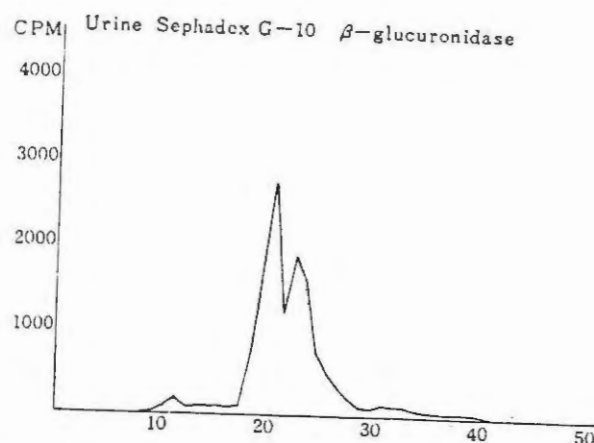


図2  $C^{14}$ キノホルム投与ラットの尿を $\beta$ -glucuronidase処理したもののSephadex-G-10パターン

それで尿のSephadex-G-10で分析した成績であるが図1のようなパターンがえられる。すなわち最初に小さなピークが出るが、これは各分画をLowryの方法で蛋白を定量した場合、蛋白のピークと一致し、蛋白に結合した $C^{14}$ キノホルムであると考えられる。次にでてくる小ピークは現在なお未同定である。次に3つの大きなピークがでてくる。これをI、II、IIIとすると、方法の項で述べたように $\beta$ -glucuronidaseと反応させると図2のようなパターンがえられる。すなわちIIIのピークは消失し、IIのピークは高さが低下する。この成績からIIIは $C^{14}$ キノホルム・グルクロナイドであり、IIは多分 $\beta$ -glucuronidase中に微量混在しているSulfataseによって低下したものではないかと考えられる。それで方法の項で述べたようにしてArylsulfataseと尿を反応させるとピークIIは消失するので、このピークは $C^{14}$ キノホルム Sulfate であると考えられた。

ただしピークIについては現在のところ未同定である。薄層ラジオクロマトグラフィーでの検討でも以上のことが確かめられた。そして遊離キノホルムが尿にほとんど出現しないことも、Sephadex

—G—10, および薄層ラジオマトグラフィーの成績から明らかにされた。

糞においてもクロロホルムメタノール(2, 1)で抽出した分画, およびエーブタノールで抽出した分画で, 薄層ラジオクロマトグラフィーを行ない遊離キノホルムと抱合型キノホルムの存在を認めた。

本研究は文部省科学研究費の援助を受けた。

#### 主要文献

- 1) 高橋康夫, 荒木一明, 椿 忠雄:  $O^{14}$  キノホルムのラット生体内における分布(1), 医学のあゆみ, 79:127, 1971.

(本研究はスモン調査研究協議会及び医学のあゆみ79:175, 1971に発表)



## 31. キノホルム投与ラットの末梢神経代謝

高橋 康夫, 荒木 一明

(新潟大学脳研究所神経薬理)

若林 允甫, 星 允

(同神経内科)

キノホルムが何故SMONを惹起するかという問題に対しては、肝臓に於ける解毒機構の状態、非抱合キノホルムの体内分布の問題、それらのキノホルムの神経組織への到達の可能性などの基本的問題の解明が先づ必要であるが、一方キノホルムが金属とキレートして何らかの酵素作用を失活するか、或はニコチン酸その他のビタミン、助酵素代謝に障害を来す可能性の追求も重要である。

我々は以上の点から考えて、各組織に於ける呼吸及び蛋白代謝を基本的代謝として追求する必要があると考え、出来るだけ自然に近い状態で観察する為に切片を使用して若干の知見を得た。

### I 方法

キノホルム 500 mg/kgを毎日、体重約 200 gの♀ラットに経口投与し、1日、3日、7日、14日、21日で断頭し、直ちに肝臓、脳、坐骨神経、背髄の四組織を切り出し神経以外は切片とし、神経は断片としてKrebs Ringer phosphate pH7.4中でU- $C^{14}$ -glucose 2.5 $\mu$ CとWarburg フラスコ中で30°, 3時間、反応させ呼吸した $C^{14}O_2$ をHyaminに吸収させシンチレーションカウンターで測定又検圧的にも呼吸を測定した。反応終了後、6%PCAで組織をホモジェナイズした後、常法で蛋白を精製し放射能を測定した。背髄以外は各組織とも各時点で4-5例、対照は6-7例であった。

### II 実験成績および考察

得られた成績は各組織で夫々異っているので夫々に就て順次述べることとする。

#### (1) 肝 臓

図1の如く呼吸は $C^{14}O_2$ 生成から見ても検圧的に $O_2$ 消費量からみても、ほぼキノホルム投与日数と共に低下し21日では対照の約1/4になっている。一方 $C^{14}$ -glucoseから蛋白へのincorpは次第に上昇し21日で約2倍になっている。この所見は奇異に思われるが腫瘍などで観察される傾向の軽度のものの様に思われる。

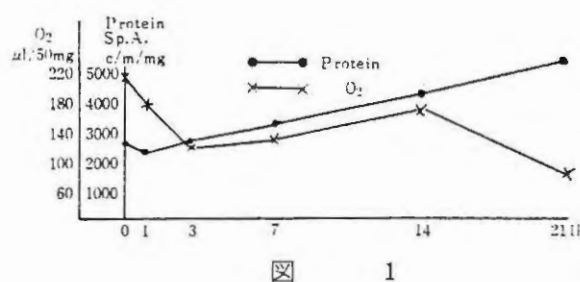


図 1

## (2) 脳

図2の如く大脳皮質切片では $C^{14}O_2$ 生成、 $O_2$ 消費からみて呼吸は殆んど差は認められないが蛋白へのincorpは投与日数と共に僅かに上昇している様な傾向が見られる。

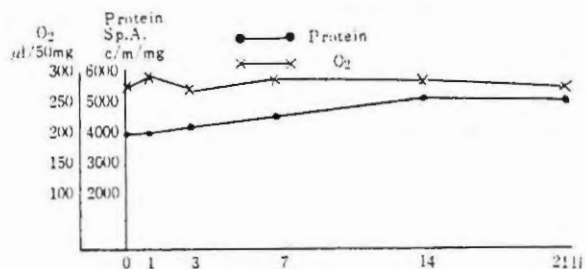


図 2

## (3) 神経

以前我々は坐骨神経の代謝が切断、挫滅などにより著明に変化することを観察していたので、<sup>1)</sup>SMONの神経症状を考へてキノホルム投与ラットでも坐骨神経に就て検索したが、その成績は図3の如くであった。即ち呼吸はキノホルムの投与日数と比例して軽度ではあるが低下して来る。この場合、 $C^{14}$ -glucose から蛋白へのincorpは肝臓、脳と異り、軽度ではあるが低下して来る。これがSchwann細胞の代謝の変化の表現であるかどうか更に検討の要がある。

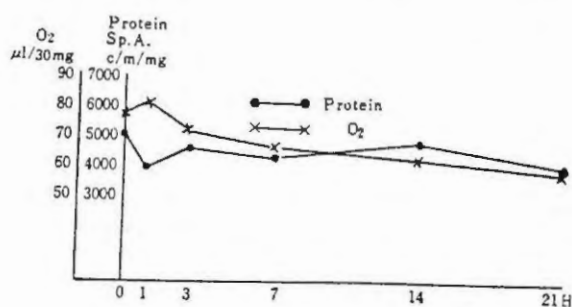


図 3

## (4) 脊 髄

神経症状から考へて背髄に就ても検討する必要が考えられたので現在尙非常に少数ではあるが、背髄組織に就ても測定した。これまでの成績では呼吸も $C^{14}$ -glucose から蛋白へのincorpも低下して来る様に思われたが今後尙多数例で検討する要がある。

### 主要文献

- 1) 高橋康夫他: J. Neurochem. 7: 97, 1961.

(本論文は昭和46年10月16日、日本神経化学会に発表した。)

### 以上3論文の要約

(1)  $C^{14}$ キノホルムをラットに注射或は経口投与して $C^{14}$ キノホルムの生体内における分布を観察した結果、 $C^{14}$ キノホルムは肝、腎などと共に神経系にもとりまされた。併し重要なことは坐骨神経に

7日後も相当高い放射能が含有されていたことである。

(2) 各臓器にとりこまれた $C^{14}$ キノホルムは主としてクロロホルム・メタノール(2:1)混液に抽出される分画で認められた。

(3) 腹腔内に注射された $C^{14}$ キノホルムは大部分が7日以内に排泄されるが特に注射後24時間以内に多い。糞の方が尿より多い。

(4) 尿、糞での $C^{14}$ キノホルムの化学的形態をSephadex G-10及び薄層radiochromatographyで検討した結果、少量の蛋白結合性のものの他、グルクロン酸抱合物、硫酸抱合物の存在を認めた。又糞では遊離 $C^{14}$ キノホルムも存在している様である。

(5) キノホルム毎日500 mg/kg投与したラットの糖質代謝を肝臓、大脳皮質、坐骨神経の切片を使って研究した。 $C^{14}$ 葡萄糖から $C^{14}O_2$ 、蛋白へのとりこみを観察すると大脳皮質では余り変化はないが、肝臓、坐骨神経では変化が認められた。

## 32. 放射性標識キノホルムのマウス，イヌの神経系への摂取，分布，および滞留

豊倉 康夫， 高須 俊明， 青木 芳朗

( 東大・医・脳研・神経内科 )

松岡 理， 柴栖 明

( 科学技術庁放射線医学総合研究所 )

### 内容目次

#### I 研究方法

- 1 標識キノホルム
- 2 動物
- 3 投与方法
- 4 放射能検出法
  - 1) 凍結マクロオートラジオグラフィー
  - 2) サンプル計測 ( 液体シンチレーション計測法 )

#### II 成績

- 1 マウスによる実験成績
  - 1)  $^{131}\text{I}$  標識キノホルムの分布 ( マクロオートラジオグラム )
  - 2)  $^{14}\text{C}$  標識キノホルムの分布—その1 ( マクロオートラジオグラム )
  - 3)  $^{14}\text{C}$  標識キノホルムの分布—その2，および臓器組織別滞留 ( サンプル計測 )
- 2 イヌによる実験成績
  - 1) R I S A の雑犬における分布 ( マクロオートラジオグラム )
  - 2)  $^{131}\text{I}$  標識キノホルムの雑犬における分布 ( マクロオートラジオグラム )
  - 3)  $^{131}\text{I}$  標識キノホルムのビーグル犬における分布 ( マクロオートラジオグラム )

#### III 考察

- 1 神経系への摂取と分布
- 2 神経系における滞留
- 3 その他

#### IV 総括および結論

#### V 発表文献

S M O N の原因がキノホルム内服にある疑いが強まり、キノホルム投与が動物の神経系障害を起すことが確認され始めた時期（昭和45年秋）に、われわれは標識キノホルムの利用によってその体内分布や挙動を明らかにすることを企て、放射線医学総合研究所の協力を得てこれに着手した。

従来の文献には、消化管からの吸収や、体外への排泄、血中濃度などに関する実験報告が散見せられるのみで、体内分布についてはほとんど信頼し得る成績がなく、とくに神経系についての知見は全くなかった。従ってこれらの解明は、S M O N の原因としてのキノホルム内服の役割を一層明確化する上に、またキノホルムによる神経系障害の機序を解明する基礎としても、きわめて重要と考えられた。

本協議会研究報告書第2臨床班研究報告（昭和46年3月）において、われわれの得た最も初期の実験成績の一部をすでに記したが、本編においてはこれまでに得た成績のうち、神経系に関する事項をまとめて報告する。一般的事項については、協同研究者松岡理部会員の報告書に譲る。

## I. 研究方法

### 1 標識キノホルム

$^{131}\text{I}$  標識キノホルムは、最も初期の実験では Haskins らの方法（Amer. J. Trop. Med., 30, 599, 1950）に従って自ら合成したもの、後には第1ラジオアイソトープ研究所で合成されたものを、 $^{14}\text{C}$  標識キノホルムは第1化学で合成されたものを用いた。 $^{131}\text{I}$  標識キノホルムの一部と  $^{14}\text{C}$  標識キノホルムの全部は、本協議会で一括購入の上分与されたものである。これらの比放射能、放射化学的純度は表1に、標識部位は図1に示す。

表1 用いた標識キノホルム

| 核種および名称                  | 比放射能            | 放射化学的純度 | 製造者                      |
|--------------------------|-----------------|---------|--------------------------|
| $^{131}\text{I}$ 標識キノホルム | 0.19 mCi/m mole | *       | 自製<br><br>第1ラジオアイソトープ研究所 |
|                          | 3.9 "           | *       |                          |
|                          | 39.6 "          | 99%     |                          |
| $^{14}\text{C}$ 標識キノホルム  | 1.63 mCi/m mole | 99%     | 第1化学                     |

\* 融点182-3° の帯黄色針状結晶として得られたことからほぼ純粋とみられる。

### 2 動物

用いたマウスはすべてCRF-1（CF#1×RFの1代雑種）雄成熟マウスで体重30g前後のもの計57匹、イヌは雑種1頭、ビーグル犬1頭で、ビーグル犬は本協議会から供与された。別に雑

種犬1頭をRISA投与実験に用いた。マウスの一部は前処置として甲状腺ブロックの目的でNaI溶液を注射した。

### 3 投与方法

静脈内注射は0.1N NaOH 溶液として尾静脈より、腹腔内および皮下注射はオリーブ油に加熱溶解して行ない、経口投与はオリーブ油に加熱溶解するかO/MCで乳化するかあるいは水懸濁した形で胃ゾンデにて行なった。今回報告する実験成績はすべて標識キノホルム1回投与によるものである。各実験における投与量、投与方法などは表2に一括して示す。

### 4 放射能検出法

#### 1) 凍結マクロオートラジオグラフィ

Ullberg 原法の松岡変法(Radioisotopes, 21, 39, 1972)により行なった。すなわち標準化物質を投与した動物を、マウスの場合はクロロホルム吸入によって、 $^{131}\text{I}$ 標識キノホルム犬の場合は動脈血放血、RISA投与犬の場合にはKCl 静注によって殺した後、マウスの場合は全身を、イヌの場合は摘出臓器をドライアイスアセトン混液で 結し、これをマイクロトームで20~60  $\mu$ の切片とし、結状態のまま乾燥した後、工業用X線フィルムサクラタイプNまたはタイプN特型(片面塗布)にコンタクトし、露出現像した。フィルムの上では標識化合物の存在部位は黒化として示される。

#### 2) サンプル計測(液体シンチレーション計測法)

標識化合物に含む組織サンプル(湿重量100mg以下)に、2mlのSolvene TM-100を加え、60°まで加温して溶解した後、トルエンにP.O.P.OおよびP.P.Oをそれぞれ0.1g, 5g/1の割合で加えて作ったシンチレーター10mlを加え、Beckman LS-100 Liquid scintillation systemにて測定した。測定誤差は5%以下である。クエンチングによる計数効率低下の補正は、マウス組織に既知量の $^{14}\text{C}$ 標識トルエンを加えて作ったクエンチングスタンダードについて、外部標準線源チャンネル比と計数効率の関係を示す曲線を作り、これを用いて行なった。

## II. 成績

### 1 マウスによる実験成績

#### 1) $^{131}\text{I}$ 標識キノホルムの分布(マクロオートラジオグラム)

##### a 静脈内投与

1時間後：脳脊髄には背景に比べ有意の黒化があるが、血液のそれよりは低い 坐骨神経、傍

### 5-Chloro-7-Iodo-8-Hydroxy-Quinoline

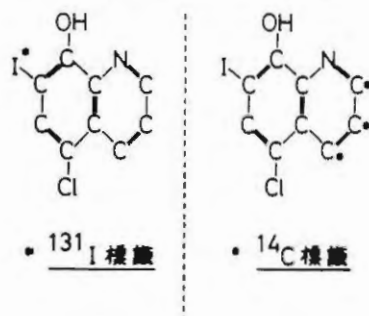


図1 標識キノホルム

表2 動物および標識キノホルムの投与法など

| 動物番号                                                               | 標識キノホルム          |            | 投与法および量            |                              |                           |                           |                          | 投与から屠殺までの時間 | 実験目的   |
|--------------------------------------------------------------------|------------------|------------|--------------------|------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------|--------|
|                                                                    | 核種               | 剤形         | 経路                 | $\mu\text{Ci}/\text{animal}$ | $\text{mg}/\text{animal}$ | $\text{ml}/\text{animal}$ | $\text{mg}/\text{kg}$ 体重 |             |        |
| QI-V-7<br>QI-V-8,9,10                                              | $^{131}\text{I}$ | 0.1 N NaOH | i v.               | 2.0                          | 1.5                       | 0.3                       | 45                       | 1 hr.       | マクロオート |
|                                                                    |                  | 加熱溶液       |                    | 8.1                          | 1.0                       | 0.3                       | 30                       | 1 hr.       |        |
| QI-P-6<br>QI-P-9,10,11<br>QI-P-7<br>QI-P-12,13                     | $^{131}\text{I}$ | オリーブ油      | i p.               | 2.5                          | 2.0                       | 0.6                       | 60                       | 1 hr.       | マクロオート |
|                                                                    |                  | 加熱溶液       |                    | 15.6                         | 1.9                       | 1.0                       | 58                       | 1 hr.       |        |
|                                                                    |                  |            |                    | 25.0                         | 2.0                       | 0.6                       | 60                       | 24 hr.      |        |
|                                                                    |                  |            |                    | 15.6                         | 1.9                       | 1.0                       | 58                       | 24 hr.      |        |
| QC-V-1<br>QC-V-8<br>QC-V-13<br>QC-V-3,4<br>QC-V-5,6                | $^{14}\text{C}$  | 0.1 N NaOH | i v.               | 7.9                          | 1.5                       | 0.3                       | 45                       | 1 hr.       | マクロオート |
|                                                                    |                  | 加熱溶液       |                    | 10.5                         | 2.0                       | 0.4                       | 60                       | 1 hr.       |        |
|                                                                    |                  |            |                    | 7.5                          | 1.4                       | 0.3                       | 43                       | 6 hr.       |        |
|                                                                    |                  |            |                    | 7.9                          | 1.5                       | 0.3                       | 45                       | 24 hr.      |        |
|                                                                    |                  |            |                    | 7.9                          | 1.5                       | 0.3                       | 45                       | 48 hr.      |        |
| QC-P-53<br>QC-P-51<br>QC-P-52                                      | $^{14}\text{C}$  | オリーブ油      | i p.               | 10.0                         | 1.9                       | 0.6                       | 56                       | 2 hr.       | マクロオート |
|                                                                    |                  | 加熱溶液       |                    | 10.0                         | 1.9                       | 0.6                       | 56                       | 6 hr.       |        |
|                                                                    |                  |            |                    | 10.0                         | 1.9                       | 0.6                       | 56                       | 24 hr.      |        |
| QC-O-24<br>QC-O-17<br>QC-O-20<br>QC-O-18<br>QC-O-19<br>QC-O-22     | $^{14}\text{C}$  | CMC乳化      | p.o.<br>(胃管<br>挿入) | 8.7                          | 1.6                       | 0.13                      | 49                       | 2 hr.       | マクロオート |
|                                                                    |                  |            |                    | 20.0                         | 3.8                       | $0.25 \times 2$           | 115                      | 2 hr.       |        |
|                                                                    |                  | オリーブ油      |                    | 8.7                          | 1.6                       | 0.13                      | 49                       | 6 hr.       |        |
|                                                                    |                  | 加熱溶液       |                    | 25.6                         | 4.9                       | $0.25 \times 4$           | 145                      | 24 hr.      |        |
|                                                                    |                  | CMC乳化      |                    | 40.0                         | 7.6                       | $0.25 \times 4$           | 229                      | 24 hr.      |        |
|                                                                    |                  |            |                    | 8.7                          | 1.6                       | 0.13                      | 49                       | 24 hr.      |        |
| QC-P-13~18<br>QC-P-19~24<br>QC-P-25~30<br>QC-P-31~36<br>QC-P-37~42 | $^{14}\text{C}$  | オリーブ油      | i p.               | 4.0                          | 0.76                      | 0.23                      | 23                       | 1 hr.       | サンプル計測 |
|                                                                    |                  | 加熱溶液       |                    | 4.0                          | 0.76                      | 0.23                      | 23                       | 6 hr.       |        |
|                                                                    |                  |            |                    | 4.0                          | 0.76                      | 0.23                      | 23                       | 24 hr.      |        |
|                                                                    |                  |            |                    | 4.0                          | 0.76                      | 0.23                      | 23                       | 48 hr.      |        |
|                                                                    |                  |            |                    | 4.0                          | 0.76                      | 0.23                      | 23                       | 7 days      |        |
| *QC-P-D1<br>**QC-P-D2                                              | $^{131}\text{I}$ | オリーブ油      | i p.               | 5,000                        | 38.5                      | 20                        | 9.6                      | 24 hr.      | マクロオート |
|                                                                    |                  | 加熱溶液       |                    | 8,000                        | 47.2                      | 24                        | 7.8                      | 24 hr.      |        |

\*イヌ(雑種), \*\*イヌ(ビーグル), 他はマウス(計57匹)

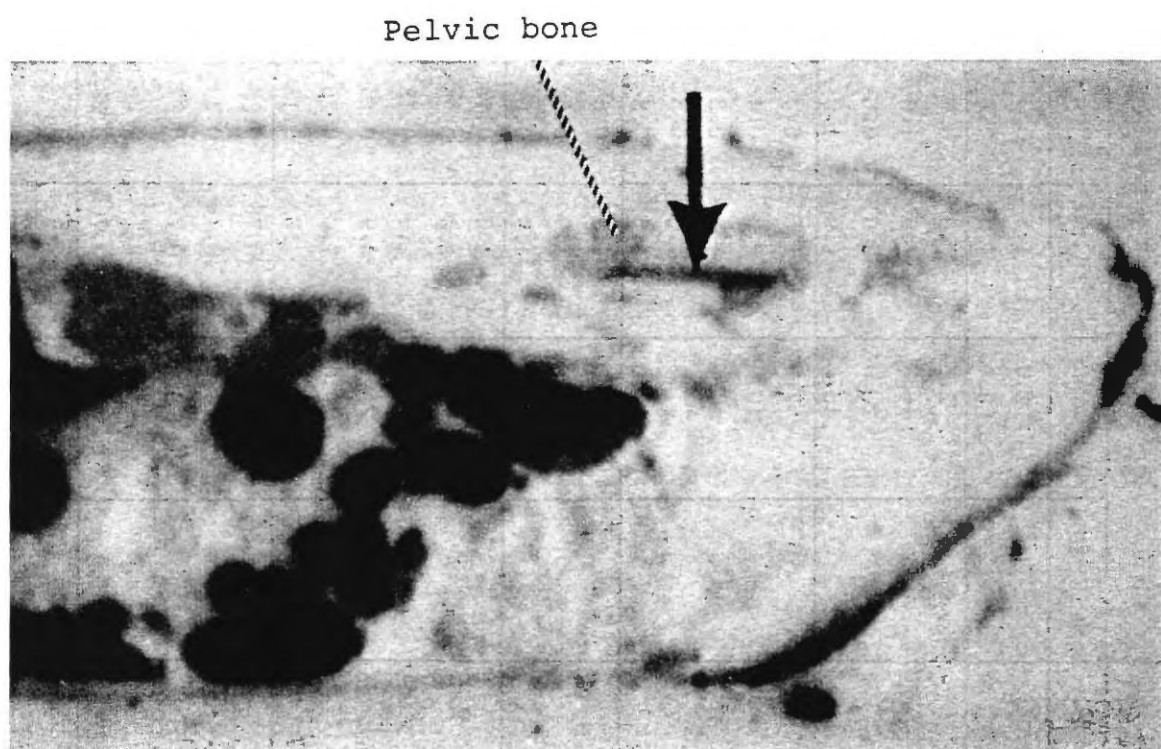


脊柱部の脊髄神経（以下単に脊髄神経と呼ぶ），三叉神経根，および骨格筋の黒化は，血液と同等かまたはこれよりやや高い。

b 腹腔内投与

1時間後：脳脊髄には背景に比べ有意の黒化があるが，骨格筋のそれよりやや低く，いずれも血液のそれよりは低い。なおこのマウスの切片単位面積あたりの放射能計測値（ウエル型シンチレーションカウンターで測定）は，脳：血液＝1：1.1であった。

24時間後：脊髄白質および脳には背景とくらべほとんど有意の黒化は認められない。坐骨神経，脊髄神経には明らかな黒化があり，血液のそれよりも高い（図2）。脊髄中心部（灰白質）の黒化は脊髄白質のそれよりやや高い。



矢印は坐骨神経を示す。

図2  $^{131}\text{I}$  標識キノホルム投与マウスの下半身マクロオートラジオグラム  
（60 mg/kg 腹腔内注射24時間後）矢状断

2)  $^{14}\text{C}$  標識キノホルムの分布—その1（マクロオートラジオグラム）

a 静脈内投与

1時間後：脳脊髄には背景に比べ有意の黒化がある。骨格筋の黒化はこれと同等またはやや高い程度で，三叉神経根，および坐骨神経にはこれらよりもさらに高い黒化が認められる。しかしいずれも血液のそれよりは低い。（図3）

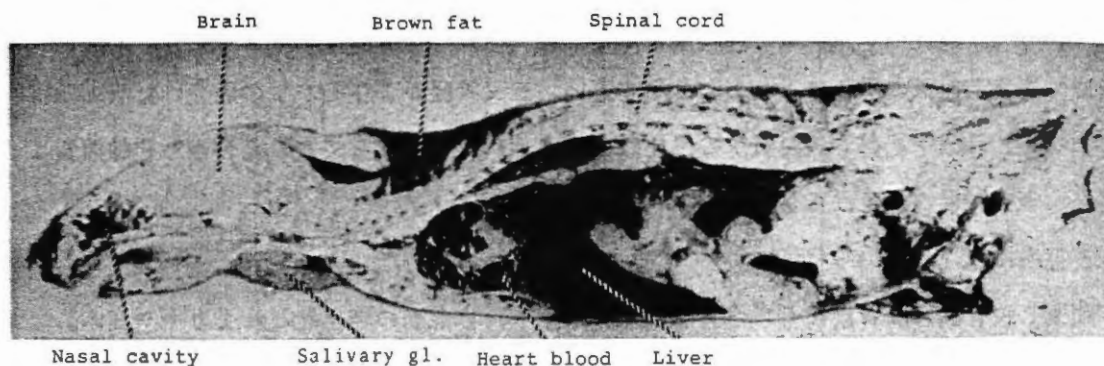
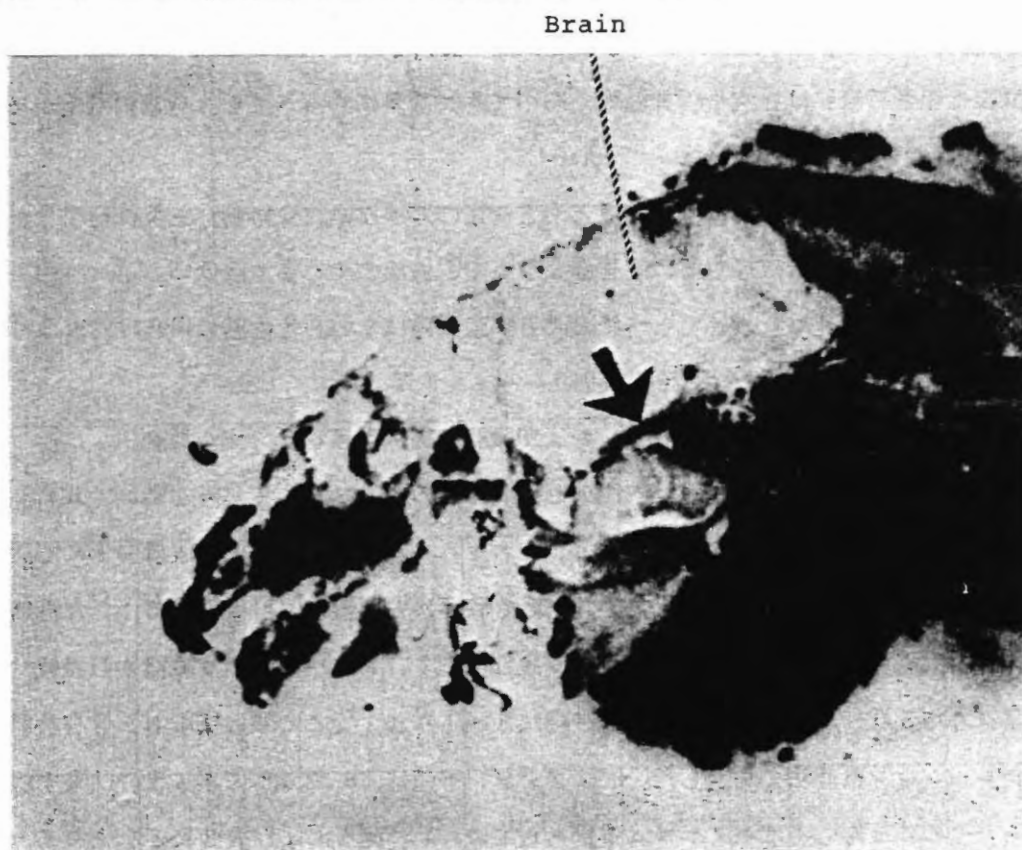


図3  $^{14}\text{C}$  標識キノホルム投与マウスの全身マクロオートラジオグラム  
(60 mg/kg 静注1時間後) 矢状断

6時間後：脳脊髄の黒化は背景よりやや高い程度である。三叉神経およびその根(図4)，脊髄神経，および骨格筋には脳脊髄にくらべて高い黒化があるが，いずれも血液のそれよりは低い。三叉神経およびその根の黒化は，脊髄神経や骨格筋よりもやや高い。



矢印は三叉神経(根部)を示す。

図4  $^{14}\text{C}$  標識キノホルム投与マウスの頭部マクロオートラジオグラム  
(43 mg/kg 静注6時間後) 矢状断

24時間後：脳脊髄の黒化は背景とほとんど同程度で，骨格筋の黒化はこれよりやや高い程度であるが，いずれも血液のそれよりは低い。坐骨神経，脊髄神経の黒化は血液のそれより高い。なおこの時点で脊髄中心部(灰白質)の黒化が脊髄白質のそれよりやや高くなっているのが認められるが，血液のそれよりは低い。

48時間後：脊髄白質および脳の黒化は背景にくらべほとんど有意の差がない。骨格筋の黒化もほぼ同様である。血液の黒化はこれよりやや高い。三叉神経およびその根の黒化は血液とほぼ同程度であるが、脊髄中心部（灰白質）の黒化は血液のそれより（従ってこの場合当然脊髄白質よりも）高く、坐骨神経の黒化はさらに高い。

#### b 腹腔内投与

1時間後：脳脊髄には背景にくらべ有意の黒化があり、骨格筋の黒化はこれよりやや高い。坐骨神経、三叉神経根の黒化は骨格筋とほぼ等しい。脊髄中心部（灰白質）の黒化は脊髄白質のそれよりやや高い。これらはいずれも血液のそれよりは黒化が低い。

6時間後：脳脊髄の黒化は背景よりわずかに高い。骨格筋、および坐骨神経の黒化はこれよりやや高く、たがいにほぼ等しい。三叉神経根の黒化はこれよりやや高い。眼球外膜（網膜、脈絡膜および鞏膜をあわせたもの）にはこれよりさらに高い黒化がある。しかしこれらはいずれも血液のそれよりは低い。

24時間後：坐骨神経には血液や脳脊髄にくらべても、背景にくらべても、有意の黒化がある。

#### c 経口投与

2時間後：脳脊髄の黒化は背景にくらべほとんど有意の差がない。骨格筋、三叉神経根、および坐骨神経の黒化はたがいにほぼ等しく、脳脊髄より高く、血液のそれよりは低い。

24時間後：脳脊髄の黒化は背景にくらべほとんど有意の差はない。骨格筋の黒化はこれよりやや高く、脊髄神経、坐骨神経の黒化はさらに高い。

#### 3) $^{14}\text{C}$ 標識キノホルムの分布—その2, および臓器組織別滞留（サンプル計測）

$^{14}\text{C}$  標識キノホルムを  $23\text{ mg/kg}$  腹腔内注射した30匹のマウスを、投与後1時間、6時間、24時間、48時間、および7日間の5つの時点で、それぞれ6匹ずつクロロホルム麻酔下に心臓血を  $0.1\text{ ml}$  採取し、できるだけ放血した後、坐骨神経（膝窩から骨盤に入る直前まで）、骨格筋（大腿直筋）、脳（大脳半球）、および皮下脂肪（側腹部皮下）、および肝臓の6臓器から組織サンプル（湿重量にして  $50\sim 100\text{ mg}$ 、但し坐骨神経は  $5\sim 10\text{ mg}$ ）をこの順に採取し、含有放射能を液体シンチレーション計測法で測定した。バックグランド値は  $28.3\text{ dpm}$  であった。結果を組織単位湿重量あたりの  $\text{dpm}$  もしくはキノホルム重量として表わし、図5および表3に示した。

#### a 各時点における分布

1時間後：肝臓および皮下脂肪内濃度は血液内のそれより高く、坐骨神経は血液と有意の差はなく、骨格筋と脳は血液より低い。

6時間後：肝臓および坐骨神経内濃度は血液のそれより高く、皮下脂肪よりやや高い。骨格筋は血液とほぼ同レベルで、脳内濃度はこれらより低い。

24時間後：肝臓および坐骨神経内濃度は血液のそれより高く、皮下脂肪と骨格筋は血液よりやや低く、脳はさらに低い。

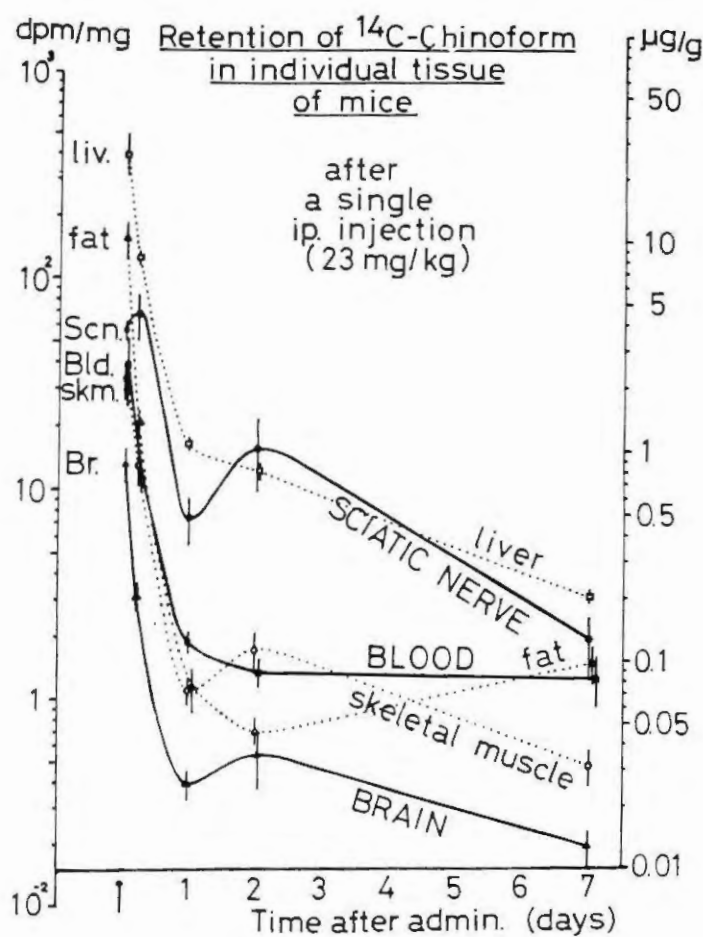


図 5

表 3  $^{14}\text{C}$  標識キノホルム投与マウスの組織内濃度

| 臓器<br>投与<br>後時間 | 血 液                         | 坐骨神経                        | 脳                           | 骨 格 筋                       | 皮下脂肪                        | 肝 臓                          |
|-----------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 1 時間            | 4.217<br>± 0.812<br>(100.0) | 3.461<br>± 0.361<br>( 82.1) | 0.800<br>± 0.143<br>( 19.0) | 2.030<br>± 0.414<br>( 48.1) | 9.555<br>± 1.975<br>(226.6) | 25.910<br>± 5.948<br>(614.4) |
| 6 時間            | 0.769<br>± 0.083<br>( 18.2) | 4.346<br>± 1.067<br>(103.1) | 0.195<br>± 0.022<br>( 4.6)  | 0.812<br>± 0.158<br>( 19.3) | 1.250<br>± 0.170<br>( 29.6) | 8.411<br>± 0.653<br>(199.5)  |
| 24 時間           | 0.119<br>± 0.013<br>( 2.8)  | 0.424<br>± 0.090<br>( 10.1) | 0.022<br>± 0.004<br>( 0.5)  | 0.062<br>± 0.014<br>( 1.5)  | 0.069<br>± 0.017<br>( 1.6)  | 1.043<br>± 0.088<br>( 24.7)  |
| 48 時間           | 0.075<br>± 0.007<br>( 1.8)  | 1.014<br>± 0.367<br>( 24.1) | 0.033<br>± 0.010<br>( 0.8)  | 0.105<br>± 0.022<br>( 2.5)  | 0.082<br>± 0.028<br>( 2.0)  | 0.785<br>± 0.063<br>( 18.6)  |
| 7 日間            | 0.084<br>± 0.018<br>( 2.0)  | 0.163<br>± 0.032<br>( 3.9)  | 0.017<br>± 0.004<br>( 0.4)  | 0.035<br>± 0.006<br>( 0.8)  | 0.141<br>± 0.033<br>( 3.3)  | 0.218<br>± 0.010<br>( 5.2)   |

単位は、組織単位湿重量当りのキノホルム重量 ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )。数値は平均値 (マウス 6 匹の平均値)  $\pm$  標準誤差を示す。( ) 内は、1 時間後の血液内濃度を 100 とした場合の相対的濃度を示す。

低く、脳はさらに低い。

48時間後：坐骨神経と肝臓内濃度は血液のそれより高く、骨格筋と皮下脂肪も血液よりやや高く、脳は血液より低い。

7日後：肝臓、坐骨神経、および皮下脂肪内濃度は血液のそれより高く、骨格筋と脳は血液より低い。

#### b 各臓器組織内滞留

血液内滞留：血液内濃度は初期に急激に低下した後、24時間以後は比較的一定した値を保つ。

坐骨神経内滞留：坐骨神経内濃度は1時間値と6時間値の間で著差なく、24時間で一旦下降した後48時間で増加し、後再び低下する。1時間値は血液のそれと有意の差がないが、6時間、24時間、および48時間値は血液のそれの数倍以上である。7日後には再び血液と著差がなくなる。

脳内滞留：初期に一路減少した後、48時間でやや増加の傾向を示し、後再び低下する。脳内濃度は終始血液のそれよりも低い。

その他：骨格筋内濃度は血液のそれと比較的近接した値をとりながら経過するが、坐骨神経や脳と同じように48時間でやや増加の傾向を示す。皮下脂肪内濃度は最も初期には血液の2倍以上の高値を示すが、その後急減し、24時間以後は血液と著差がない。肝臓内濃度は初期に速やかに後には緩やかに減少し、終始血液のそれより高い値を示す。

## 2 イヌによる実験成績

### 1) RISAの雑犬における分布（マクロオートラジオグラム）

ネンブータル麻酔下に5mCiのRISA（ $^{131}\text{I}$ 標識血清アルブミン、比放射能0.5mCi/mg、第1ラジオアイソトープ研究所製）を静注し、10分後KClの静注で殺した、体重3kgの雄成犬（雑種）のマクロオートラジオグラムでは、脊髓横断面で灰白質に白質より強い黒化を認め、脊髓軟膜に著明な黒化を認めた。脳では血管断面と軟膜に著明な黒化があり、脳実質ではほぼ一様な弱い黒化を示した。

これらRISAの分布像は血液分布を反映するものである。

### 2) $^{131}\text{I}$ 標識キノホルムの雑犬における分布（マクロオートラジオグラム）

ネンブータル麻酔下に5mCiの $^{131}\text{I}$ 標識キノホルムを腹腔内注射（10mg/kg）し、24時間後ほぼ完全に動脈血放血して殺した、体重4kgの雄成犬（雑種）のマクロオートラジオグラムの所見は下記のとおりである。なお異なる臓器の黒化の比較は、それらの切片を同一フィルム上に並べて露出したものによって行なった。

#### a 脳脊髓

脳では、脳室脈絡叢と軟膜にやや強い黒化があるほかは、実質では全体に黒化の度が低く、内部構造の差による差異の度合はごく僅かであったが、例えば大脳皮質と皮質下の髄質とでは髄質がや



や高く，脳梁の白質の黒化は皮質下髄質よりやや低く，海馬采のそれは皮質下髄質のそれよりやや高かった。海馬は外套部皮質より黒化がやや低い。

脊髓では，軟膜にやや強い黒化がある。実質の黒化はこれよりかなり低く，頸髄，胸髄，および腰髄の3レベルのいずれにおいても横断面，縦断面上の分布はほぼ均一で，例えば頸髄Gol1束や腰仙髄錐体路に特に黒化が強いというようなことはなかった。また頸髄，胸髄，腰髄の3レベルの相互の比較では，わずかに頸髄の黒化が強いかわれたが，著差はなかった。（図6）

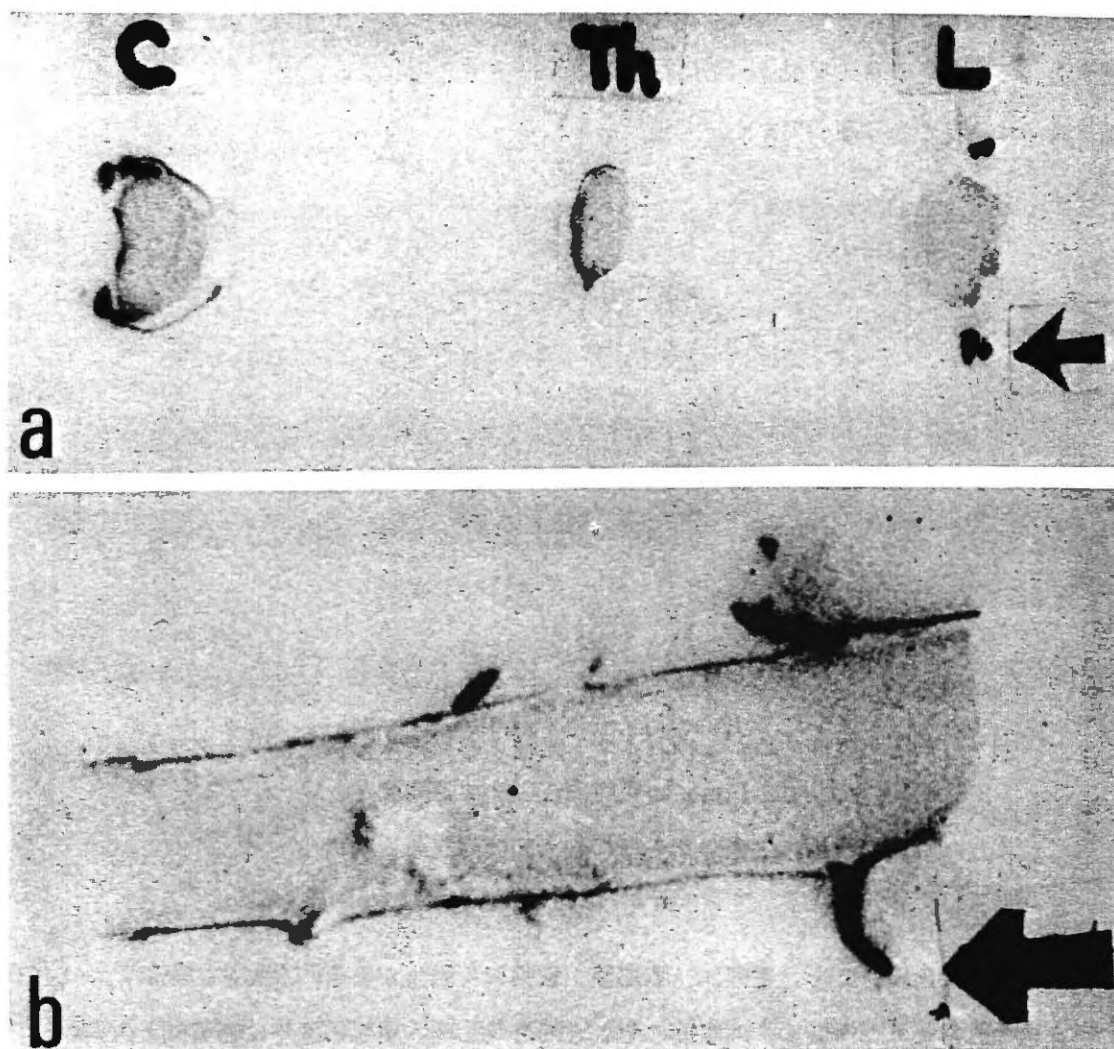


図6  $^{131}\text{I}$  標識キノホルム投与犬（雑種）のマクロオートラジオグラム  
（10 mg/kg腹腔内注射24時間後）

- a 脊髓横断面 C：頸髄， Th：胸髄， L：腰髄  
（C， Th は紙面に向って左が， Lは向って右が腹側） } 矢印は脊髓神経根  
b 脊髓縦断面（紙面に向って右が頭側）

b 脊髄神経根, 脊髄後根神経節, 坐骨神経

これらの黒化はたがいにほぼ等しく, 脊髄実質より一段と強く, 視神経より強く, また前根と後根の黒化に著差は認められなかった。(図6)

c 網膜, 視神経, 視索

網膜の黒化は強く, 全身で最も強い黒化を示す腎臓や肝臓の次に位する。視神経の黒化はこれよりかなり弱い。網膜の黒化は次のような所見から推定された。すなわち, たまたま3層に分離した眼球外膜において最内層は最も強い黒化を示すが(図7), この層は凍結乾燥切片との比較対照から黒色色素を有する層より内側にある。有色素層は網膜の最外層であるので, この最内層は網膜に一致する。なお有色素層にも黒化が強く, このことは視束乳頭部で有色素層が途切れるのに伴ない黒化も途切れることから確かである。

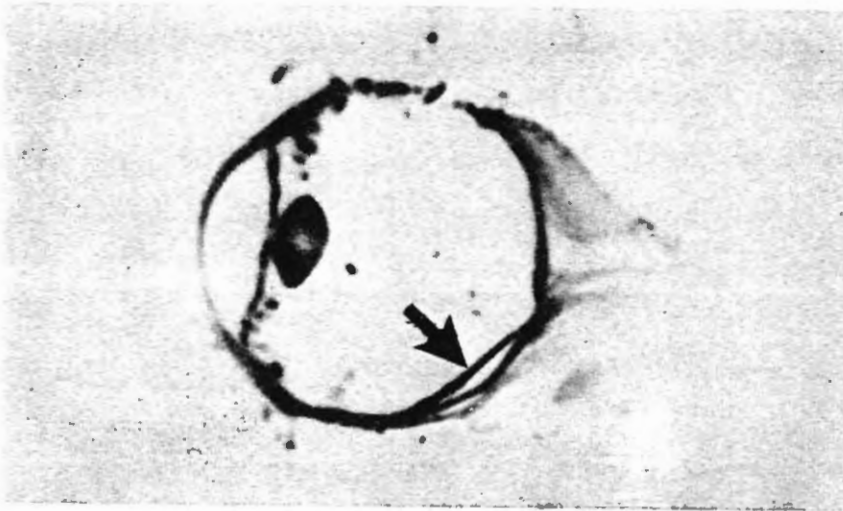


図7  $^{131}\text{I}$  標識キノホルム投与イヌ(雑種)のマクロオートラジオグラム  
(10 mg/kg 腹腔内注射24時間後)

眼球の水晶体辺縁部ならびに視束乳頭部を通る剖面  
矢印は網膜

このほか眼では角膜, 虹彩, 毛様体, 脈絡膜, 鞏膜にも黒化がある。水晶体辺縁部, および視神経の黒化はこれらよりやや低く, 外眼筋のそれとほぼ等しい。視索の黒化は脳実質と大差なく, 視神経とほぼ等しいと推定される。

3)  $^{131}\text{I}$  標識キノホルムのビーグル犬における分布(マクロオートラジオグラム)

ネンブタール麻酔下に8 mCi の  $^{131}\text{I}$  標識キノホルムを腹腔内注射(7.9 mg/kg)し, 24時間後ほぼ完全に動脈血放血を行なって殺した, 体重6 kgの雌成犬(ビーグル)のマクロオートラジオグラムの所見は次のとおりである。

a 脊髄

脊髄実質の黒化はきわめて弱く, 背景にくらべほとんど有意の差異がない。脊髄軟膜には黒化が



ある。脳については現在実験が進行中である。

b 脊髄神経根、脊髄後根神経節、脊髄神経

これら3組織の黒化はたがいにほぼ等しく、かなり強い。前根と後根にはいずれにも黒化があるが、後根の黒化が前根のそれよりやや強いところもある。(図8)

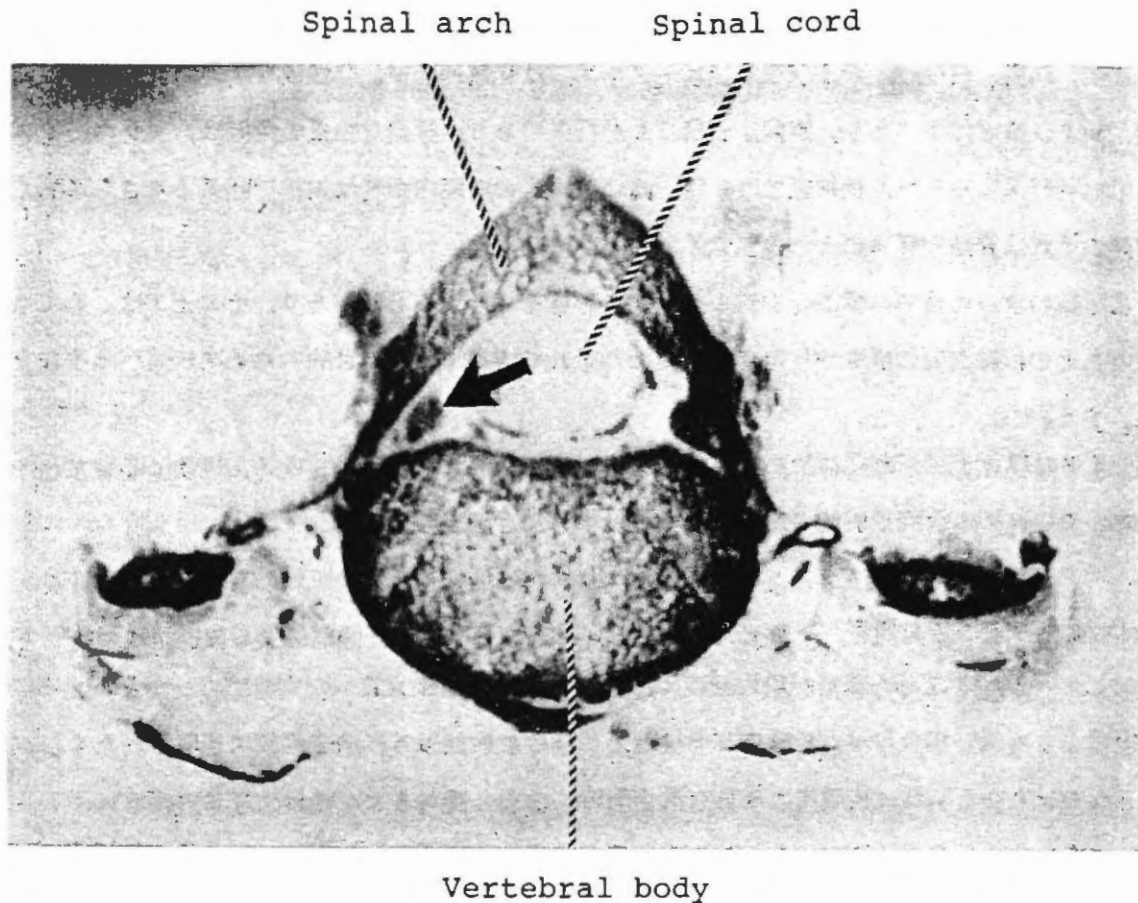


図8  $^{131}\text{I}$  標識キノホルム投与イヌ(ビーグル犬)のマクロオートラジオグラム  
(7.9 mg/kg腹腔内注射24時間後)

最下部胸椎の横断面。矢印は脊髄(腰髄)後根神経節

○ 視神経、眼球外膜

眼球外膜(網膜、脈絡膜および鞏膜をあわせたもの)には強い黒化があり、2層に分離したいずれにも黒化があるが、網膜の同定を可能にするような分離部位は、この実験で得たマクロオートラジオグラムにはなかった。水晶体辺縁部にも黒化がある。角膜の黒化はこれらよりやや低い。前眼房や硝子体には斑状黒化の不規則な集合をみるところもある。視神経にも黒化があるが、角膜にくらべ一段と低い。

### Ⅲ 考察

#### 1 神経系への摂取と分布

放射性標識キノホルム投与マウスおよびイヌ(雑種およびビーグル)の神経系組織には放射能が明

らかに検出された。すなわち標識化物質がそこに存在していた。これは、凍結マクロオートラジオグラムでその部に背景にくらべ明らかに強い黒化があったこと、およびサンプル計測でどのマウス群についても平均値としてはバックグラウンド値にその  $3\delta$  ( $\delta$  は標準偏差値) を加えた値以上の放射能が計測されたことから確かである。この意味で標識化物質が確認されたのは、マウスでは脳、脊髄、三叉神経およびその根、脊髄神経、および坐骨神経、雑犬では脳、脊髄、脊髄神経根、脊髄後根神経節、坐骨神経、網膜、視神経、および視索、ビーグル犬では脊髄神経根、脊髄後根神経節、脊髄神経、視神経、および眼球外膜であり、実験は一部なお進行中である。標識化物質の濃度は、マウス、イヌともに中枢神経系にくらべ末梢神経では一段と高い。イヌの網膜内濃度は末梢神経系よりさらに高く、視神経のそれは脊髄神経系のそれより低く、脳よりやや高い。

次に組織の含む血液内の標識化物質の放射能の影響を除外する必要がある、その上ではじめて血液を除いたその組織実質の摂取が推定される。われわれの実験ではこの目的のため次に述べる手段をとった。すなわち、

(1) イヌはほぼ完全に動脈血放血を、サンプル計測に用いたマウスはできるだけ多く心臓放血を行なった。このため血液内放射能の影響はかなり減少したと考えられる。

(2) マクロオートラジオグラフィーに用いたマウスでは心臓内や大静脈内の血液部分の黒化を、イヌでは放血動脈血の放射能を、それぞれ評価あるいは計測し、これを問題とする臓器組織のそれと比較検討した。後者すなわち臓器組織内濃度よりも高ければ、組織実質への摂取があったといえる。前者が後者よりも低い場合には、組織内に含まれる血液の放射能以外に組織実質に摂取されたものがあるかどうかを決めるには、組織内血液含有量を同時に知る必要がある、これは容易ではない。

(3) マクロオートラジオグラムを、RISA投与で得た血液分布とくらべ、両者が一致平行していないならば血液放射能以外の因子の関与恐らくは組織実質の摂取があったと推定される。

かかる検討の結果は次のごとくである。

すなわち、投与後24時間、および48時間のマウスの脊髄神経、坐骨神経では、組織内濃度が血液内濃度より高いことが示されたので、組織実質の摂取があったといえる。これは投与法を問わない。投与後24時間の雑犬の末梢神経系と網膜、ならびにビーグル犬の末梢神経系については、動脈血放血で血液含量が減っておりしかもその血液の放射能が低いこと、および凍結オートラジオグラム上の黒化度が背景にくらべかなり強いことなどから、組織実質の摂取が推定される。これに対して脳脊髄については、マウスでもイヌでも一般に摂取レベルが低く、しかもほとんど常に血液内濃度よりマウスでは低く、むしろいわゆる血液脳関門の存在が示唆された。

ただし、48時間後のマウスでは脊髄中心部(灰白質)の黒化が白質のそれより高く、しかも血液のそれよりも明らかに高く、組織実質の摂取があったことが示された。また投与後24時間の雑犬の脊髄では、灰白質と白質がたがいに等しい均一な分布を示し、血液分布を示すRISAのそれと著しく異なっていた。

## 2 神経系における滞留

標識キノホルム投与後のマウスの組織内標識化合物濃度は、血液の場合1時間から6時間の間にほぼ1/5に低下し、他の被検臓器でもすべて低下しているのに、坐骨神経ではほぼ同じレベルに保たれている。また24時間から48時間の間に血液内濃度はゆるやかに低下するのに対し、坐骨神経、脳、骨格筋、皮下脂肪などは逆に軽度の増加を示すが、この中で坐骨神経内濃度の増加は約2.4倍でもっとも高い。このようにして坐骨神経では、初期に到達した高濃度が他の被検臓器にくらべ比較的長く（少なくとも48時間後までは）保たれる。この意味で、坐骨神経については標識キノホルム投与後の標識化合物の滞留傾向が強いといえる。

脳については濃度が低く、しかも常に血液のそれよりも低いので、組織実質内の滞留について論ずることは難しい。

## 3 その他

今回得られた実験成績の中には、標識キノホルムに対するいわゆる血液脳関門の存在を示唆する所見がみられた。例えば、マウスの脳内濃度は血液のそれよりも常に低く、また、イヌの脊髄神経根が髄外から髄内に入る途端に凍結マクロオートラジオグラム上の黒化が格段に低下し、中枢神経系の一部とみなされる視神経には脊髄神経根ほど強い黒化がみられなかった。

われわれの得た<sup>131</sup>I標識キノホルムのイヌの神経系における分布を模式的に表わしたのが図9 b.である。一方、慢性キノホルム中毒犬やヒトのSMONの病理組織学的変化の分布を図9 a.に示した。両者の一致不一致を仔細に比較検討すると、例えば病理学的に最も顕著な変化のみられる末梢神経には強い摂取があり、また著明な摂取を示す網膜ではその神経細胞層に著しい病理組織学的変化があることが最近指摘されている。一方中枢神経系における摂取は末梢神経系にくらべはるかに弱く、病理組織変化も特定の神経索を除けば一般には中枢神経系には乏しく、あっても通常は軽い。このように、全体としての摂取のパターンはSMONの病理に矛盾するものではないと考えられる。

頸髄のGoll束には一般に病理組織変化が強く、視索に強い変化をみる例も少なくないが、標識キノホルムの摂取はここには特に強くはなく、むしろ親細胞の存在する脊髄後根神経節や網膜に強い摂取があった。このことはSMONないしキノホルム中毒によるニューロンの変性様式について、1つの示唆を与えるもので、親細胞の代謝障害の結果ニューロンの突起の末端部から変性が始まり、次第に近位へも波及する、いわゆるDying-back neuropathyの変性機序が本症においても関与しているように見えるのであるが、確かなことは今後の慎重な検討にまたねばならない。また、腰仙髄側索については、そこにも、また親細胞部位にも標識化合物の摂取は弱く、この点別途の考慮が必要である。

いずれにしても今回の分布実験はすべて1回投与によるもので、反復投与の際これらの結果がある程度修飾される可能性もないではない。これは今後に残された重要な研究課題である。

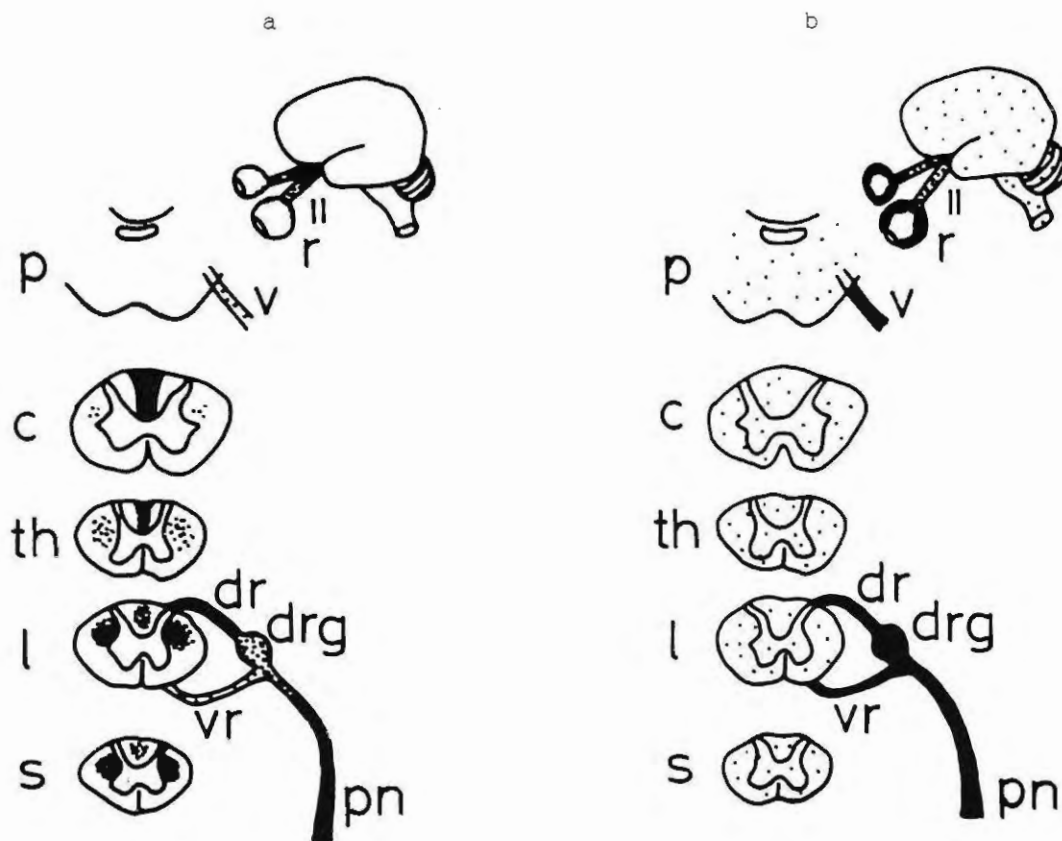


図9 標識キノホルムの分布と、病理組織学的変化の対比

- a SMONまたは慢性キノホルム中毒犬にみられる神経系の病理組織学的変化の分布  
(黒い部分が病変を示す)
- b イヌにおける  $^{131}\text{I}$  標識キノホルムの分布 (黒い部分が標識化物質の存在部位を示す)  
(ただしほぼ  $10\text{ mg/kg}$  腹腔内1回投与24時間後における分布像である)

|           |               |
|-----------|---------------|
| II : 視神経  | l : 腰髄        |
| r : 網膜    | s : 仙髄        |
| v : 三叉神経根 | vr : 脊髓前根     |
| p : 橋     | dr : 脊髓後根     |
| c : 頸髄    | drg : 脊髓後根神経節 |
| th : 胸髄   | pn : 末梢神経     |

またこの実験では、標識化合物がどのような化学形態をとっているかについては直接の情報はない。ただし、これまでに行なった一連の実験の中で、ヨウ素遊離に関してはこれが投与後1時間以後24時間までの間に、数%程度起っているのではないかと考えられる成績を得た(松岡理部会員の報告参照)。

#### IV 総括および結論

$^{131}\text{I}$  標識および  $^{14}\text{C}$  標識キノホルムを用い、マウスとイヌ(雑種およびビーグル)で、1回投与後の神経系への摂取と分布、および滞留について、凍結マクロオートラジオグラフィーおよび液体シン

チレーション計測法によるサンプル計測によって検討した。その結果

- 1 体内に入ったキノホルムは神経系にも入る,
- 2 神経系の中では,末梢神経系および網膜に強く入る,
- 3 末梢神経系に入ったキノホルムは,そこに滞留する傾向が強い,

以上の結論を得た。

## V 発表文献

### 1 原者発表

- 1) 高須俊明, 豊倉康夫, 松岡理: 放射性標識によるキノホルムのマウス体内分布 (1971), 医学のあゆみ, 79, 25.
- 2) 高須俊明, 豊倉康夫, 松岡理: イヌにおける  $^{131}\text{I}$  標識キノホルムの分布および代謝—とくに網膜および視神経への摂取 (1971), 医学のあゆみ, 79, 75.
- 3) 高須俊明, 豊倉康夫, 松岡理: キノホルム (5-Chloro-7-Iodo-8-Hydroxy-Quinoline) の神経系に対する作用機序の研究—第1報  $^{131}\text{I}$  標識キノホルムのマウス消化管からの吸収, 全身滞留, および分布— (1972), 臨床神経学, 12, 131.
- 4) 高須俊明, 豊倉康夫, 松岡理: イヌの神経系への  $^{131}\text{I}$  標識キノホルムの摂取 (1972), 医学のあゆみ, 81, 397.

### 2 本協議会における発表

- 1) 高須俊明, 中西孝雄, 豊倉康夫 (東大脳研神経内科); 松岡理, 栗栖明, 池上四郎 (科学技術庁放医研):  $^{131}\text{I}$  標識キノホルムのマウス体内滞留および分布, 昭和45年度第3回総会 (昭和46年3月2日)
- 2) 豊倉康夫: SMONの臨床, 神経病理ならびに病因に関する研究, スモン調査研究協議会研究報告書, №2, 臨床班研究報告 (昭和46年3月)
- 3) 高須俊明, 豊倉康夫; 松岡理:  $^{14}\text{C}$  標識キノホルムによるキノホルムの生体内分布および代謝の研究, ならびに  $^{131}\text{I}$  標識の場合との比較, キノホルム部会第1回研究会 (昭和46年7月24日)
- 4) 高須俊明, 豊倉康夫; 上野日出男; 松岡理: イヌにおける放射性標識キノホルムの分布および代謝の研究 (第1報), キノホルム部会第1回研究会 (昭和46年7月24日)
- 5) 高須俊明, 豊倉康夫; 上野日出男; 松岡理: イヌにおける  $^{131}\text{I}$  標識キノホルムの臓器分布 (マクロオートラジオグラフィー), キノホルム部会第1回研究会 (昭和46年7月24日)
- 6) 高須俊明, 豊倉康夫; 松岡理: 標識キノホルムによる代謝・分布の研究 (第3報), 1. 消化管からの吸収, および組織内分布に関する補遺, キノホルム部会第2回研究会 (昭和46年12月15日)
- 7) 高須俊明, 豊倉康夫, 松岡理: 標識キノホルムによる代謝・分布の研究 (第3報), 4. イヌにおけるキノホルムの分布・代謝とくに神経系への摂取, キノホルム部会第2回研究会 (昭和46年12月15日)

### 3 学会発表

- 1) 高須俊明, 豊倉康夫; 日本内科学会総会第68回講演会, 演題50への追加討論 (昭和46年4月3日), 日内会誌, 60, 997, 1971 (抄録)
- 2) 豊倉康夫: 日本神経学会第12回総会, 会長講演 (昭和46年4月4日)
- 3) 高須俊明, 豊倉康夫; 松岡理: 放射性同位元素による標識キノホルムの動物体内分布および代謝の研究 (第1報), 日本神経学会第37回関東地方会, 一般演題 (昭和46年5月29日), 臨

床神経学, 11, 781, 1971(抄録).

- 4) 高須俊明, 豊倉康夫; 松岡理: 放射性同位元素による標識キノホルムの動物体内分布および代謝の研究(第2報), 日本神経学会第38回関東地方会, 一般演題(昭和46年9月11日), 臨床神経学, 12, 220, 1972(抄録).
- 5) 高須俊明, 豊倉康夫; 松岡理: 放射性同位元素による標識キノホルムの動物体内分布および代謝の研究(第3報), 日本神経学会第39回関東地方会, 一般演題(昭和46年11月6日), 臨床神経学, 12, 228, 1972(抄録).
- 6) 豊倉康夫, 高須俊明, 塚越広, 東儀英夫; 松岡理; 井形昭弘: 実験動物におけるキノホルム代謝 SMON の病因と関連して, 日本内科学会総会第69回講演会, 一般演題(昭和47年4月6日) 日内会誌, 60, 51, 1971(抄録).
- 7) 松岡理; 高須俊明, 豊倉康夫: 標識キノホルムの体内における挙動, 第45回日本薬理学会総会, 一般演題(昭和47年4月28日).
- 8) 豊倉康夫: 動物実験による副作用の予知性—キノホルム中毒としての SMON を例に, 第45回日本薬理学会総会, シンポジウム(昭和47年4月29日)
- 9) 高須俊明, 豊倉康夫; 松岡理: キノホルムの神経系障害機序の研究, 日本神経学会第13回総会, 一般演題(昭和47年5月13日)

<sup>131</sup>I 標識キノホルムの合成の指導を頂いた放医研薬学研究部池上四郎博士, 実験に協力を頂いた放医研研究生永沼真理子学士(現慶応大学薬化研), 放医研障害基礎研究部上島久正修士, 野田豊学士, 研究の便宜をおはかり頂いた東大医学部脳研神経内科中西孝雄講師に感謝の意を表する。



### 33. 培養神経組織（鶏胚脊髄後根神経節）における キノホルムの影響

豊倉 康夫, 別府 宏閑

（東京大・医・脳研・神経内科）

中井 準之助

（東京大・医・解剖学教室）

S M O N の病因としてキノホルムが指摘されて以後、数多くの動物実験によってキノホルムの神経毒性が証明された。しかしキノホルムが如何なる機序によりこのような神経毒性を発現するかと言う問題、或は発症と投与量の関係等に関しては未だ充分な解明がなされていない。我々は鶏胚脊髄後根神経節の組織培養を用いて次のような幾つかの実験を行ったが、これらの実験によって我々の企図した点は以下の諸点である。

- (1) キノホルム自体が直接に神経毒性を有するか、他の介在因子を必要とするか。
- (2) 毒性を示すとすればその最小中毒量はどれ位か。
- (3) 又、その変化は従来の *in vivo* の中毒実験或はヒトの S M O N の病理所見と如何なる点で類似を示し、如何なる点で異なるか。

#### I 材料と方法

培養組織としては 9-11 日鶏胚の脊髄後根神経節を用い、二重カバーグラス法で培養した。カバーグラスにはコラーゲンを塗布し、1 枚につき 2 ケの神経節を培養した。培養液は人胎盤血清 25%、50% 鶏胚抽出液 25%、Eagle MEM 50% の組成にグルコースを 600 mg% となるように加えたものを用い、3 日毎に新しい液と交換した。キノホルムの添加は次のような方法によって行った。

胎盤血清にキノホルムを懸濁させ 6℃ に一昼夜放置后、3000 r.p.m で 30 分間遠沈を行い、過量のキノホルムを沈澱させたのち上清をとり、これを 0.45μ ミリポアフィルターで濾過してキノホルム飽和血清を作製した。この一部を濃度測定に用い（測定は東大薬学部田村研究室によって行われ、256μg/cc であった）、残りを原液として保存し、要時これを懸濁液作製に用いたものと同じロットの胎盤血清で希釈し必要な濃度を得た。このようにして各濃度のキノホルムを含む血清を作製したのち、それぞれに鶏胚抽出液、Eagle MEM、グルコースを前記のような比率で加えて培養液を調製した。こうして得た培養液は、キノホルムの含有およびその濃度の如何に拘らず pH は 7.6 と一定しており、キノホルムを含むという点を除外すれば、その組成は対照の培養液と全く同一と考えられた。

実験はキノホルムの高濃度短期間の作用と低濃度長期間の作用をみるために、急性実験と慢性実験の二つの部分に分れ、更にその各々の場合について、培養初期の幼若神経組織に及ぼす影響と長期培養後の成熟神経組織に及ぼす影響とを検討した。従って、実験全体としては次の 4 部分から構成されることになる。



### i 急性実験

- a) 幼若培養組織への影響
- b) 成熟培養組織への影響

### ii 慢性実験

- a) 幼若培養組織への影響
- b) 成熟培養組織への影響

観察は通常光学顕微鏡及び位相差顕微鏡を用い、一定期間後一部はフォルマリン固定し H・E, Nissl 染色を行い、一部は F E A 固定後 Bodian 染色を行った。

### i 急性実験

- a) 幼若培養組織への影響

10 日鶏胚の脊髄後根神経節を用い、初めからキノホルムを加えた液で 3 日間培養し、神経線維、シュワン細胞、線維芽細胞等の成長を観察した。培養液中のキノホルム濃度は 2, 4, 8, 16, 32  $\mu\text{g}/\text{cc}$  となるように調製し、各濃度につき 4 枚、計 20 枚の培養を行った。別に対照としてキノホルムを全く含まない液で 3 日間培養した一群を加え、これと比較観察した。

- b) 成熟培養組織への影響

9 日鶏胚の脊髄神経節をキノホルムを含ませ通常の培養液で暫く培養した後、17 DIV (days in vitro) の時点で検鏡し、髄鞘形成が良好で神経細胞にも変性の殆ど認められない培養組織のみを 12 枚選び出し、これを無作為に 4 群に分けた。1 群は対照としてキノホルムを含まない従来通りの培養液で培養し、他の 3 群はキノホルム 32  $\mu\text{g}/\text{cc}$  を含む液でそれぞれ 1, 2, 3 日間培養し対照と比較した。

### ii 慢性実験

- a) 幼若培養組織への影響

11 日鶏胚 10 羽から腰部後根神経節のみを 80 個取り出し、これを無作為に 20 個ずつ 4 群に分け、各群をキノホルム 2, 4, 8  $\mu\text{g}/\text{cc}$  を含む液、及び対照としてキノホルムを含まない液で 17 日間培養した。400 倍で検鏡し各組について神経線維、神経細胞、シュワン細胞等の成長を比較観察するとともに、それぞれの組で 20 個中何個の神経節に髄鞘形成が認められるかを毎日記録し髄鞘形成曲線を作製した。この際神経節 1 個あたりに形成された髄鞘の多寡は問題とせず all or none で判定した。

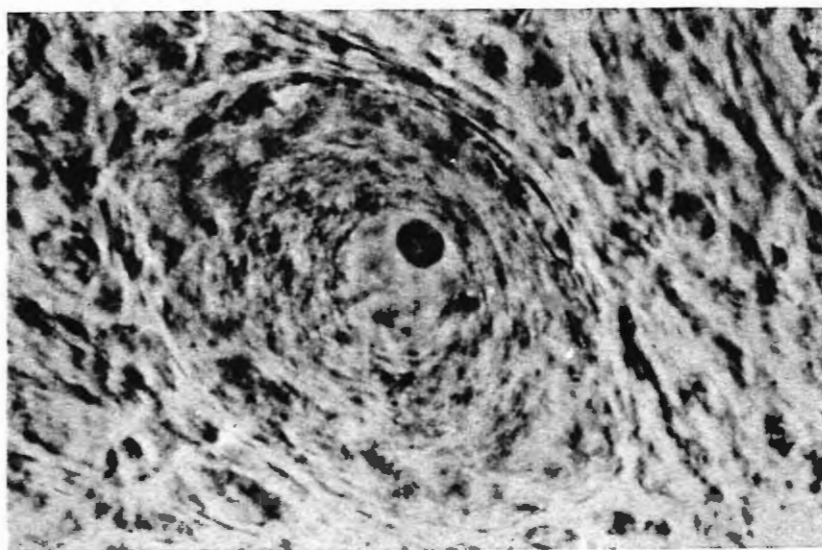
- b) 成熟培養組織への影響

11 日鶏胚の脊髄神経節を 4 週間キノホルムを含まない通常の培養液で培養した後、髄鞘形成が良好でかつ同程度に揃った 8 枚を選び、これを 2 枚ずつ 4 群に無作為的に分けた。各々を 4, 8, 16  $\mu\text{g}/\text{cc}$  のキノホルムを含む液及び対照として全くキノホルムを含まない液で 28 DIV から 45 DIV迄の 17 日間培養し比較した。

## I 結果

正常対照培養所見：9—11日鶏胚の脊髄後根神経節を上記の方法で培養した場合の正常対照所見は以下の如くである。通常移植后12時間位で組織片の周辺から放射状に神経線維が伸び出し、同時にシュワン細胞、線維芽細胞の増殖も周辺に向って進行する。このようにして約10日間は活潑な成長と細胞分裂が続く、増殖帯は次第に周辺へと広がって行く。一方、神経節そのものは次第に平坦となり、培養初期に変性した細胞は清掃され個々の神経細胞が移植片の中に明瞭に観察し得る状態となる。

細菌による Contamination や液もれ等の事故がない限り、すべての培養は1～2週間で極めて安定した状態になる。神経細胞は写真1に見るように数個の衛星細胞によって密に囲まれ、円形の核



(倍率・1000×)

写真1：正常対照培養。20DIVの後根神経節細胞。神経細胞は数ケの衛星細胞によって周囲を密に囲まれ、細胞質には神経原線維及びニッスル顆粒の配列による同心状の繊細な紋理が認められる。は通常細胞の中心よりやや偏在しており、細胞質には神経原線維及びニッスル顆粒の配列による同心状の繊細な紋理が認められる。健全な神経細胞に混って稀には顆粒状変性や空腔変性に陥った神経細胞も認められるが、これらは各神経節について高々数%以下であり、実験開始に先立って充分な観察を行うならば、これらの非特異的かつ例外的な変化を有意のものと誤って解釈する危険性は皆無であると言える。髄鞘の形成は早いもので1週間目頃から神経節周囲に認められ、徐々に太さと数を増しつつ周辺部にも及んで行き、6週間でほぼ完全な成熟をとげる。髄鞘形成の程度は必ずしもすべてに於て一様でなく、各培養組織片毎に多少の差があるが、正常対照培養の場合15—20DIVの間にほぼ9割以上の神経節に於て確実に髄鞘が形成される。以上が正常な後根神経節培養の概略所見であるが、次にキノホルム投与実験群に於ける所見を述べる。

### i 急性実験

#### a) 幼若培養組織への影響

培養初期からキノホルムを含む液で培養し3日目に固定しBodian染色を施したものが写真2である(倍率40×)。比較のため写真の拡大もすべて一定にしてある。32μg/ccでは殆ど

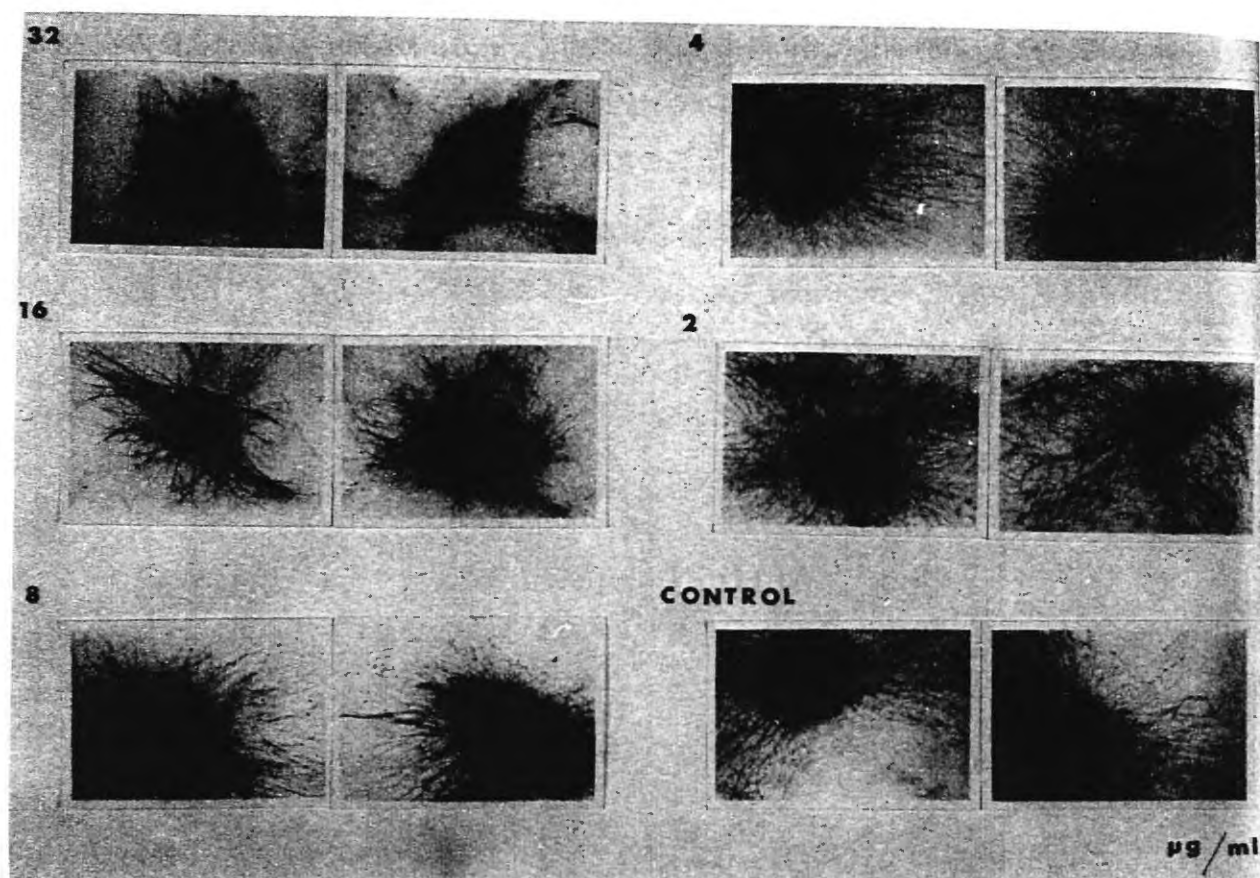


写真2：培養初期からキノホルムを加え、3DIVで固定しBodian染色した(倍率40×)。

各濃度につき2枚ずつの写真が示してあるが、比較のために写真の拡大率もすべて一定にしてある。

神経線維の伸び出しはなく、16μg/ccでは線維の数も長さも対照に比して明らかに劣るが、8μg/ccでは対照との差はやや疑わしくなる。更に4μg/cc、2μg/ccとなると対照群と全く変らない成長を示す。培養初期で神経細胞同志が密に重なり合っているため、個々の神経細胞についての観察は正確に行えないが、伸び出した神経線維の方を強拡大で観察してみると、写真3に見るように、高濃度のキノホルムを与えた群では線維の途中に所々紡錘状、珠数状、あるいはらせん状に膨化した部分が数多く認められた。対照群ではこのような所見は皆無であった。線維全体としても対照例に見るような繊細な網状構造が失われ、針金のような硬い走行を示している。

#### b) 成熟培養組織への影響

培養開始后17日目の脊髄後根神経節は既に充分な成長をとげており、神経節周辺部には太い髄鞘が多数形成されている。神経細胞にも変性像を示すものは殆ど無く、培養としては最も安定した時期といえる。これに32μg/ccのキノホルムを加えると36～48時間目頃から次のよう変化

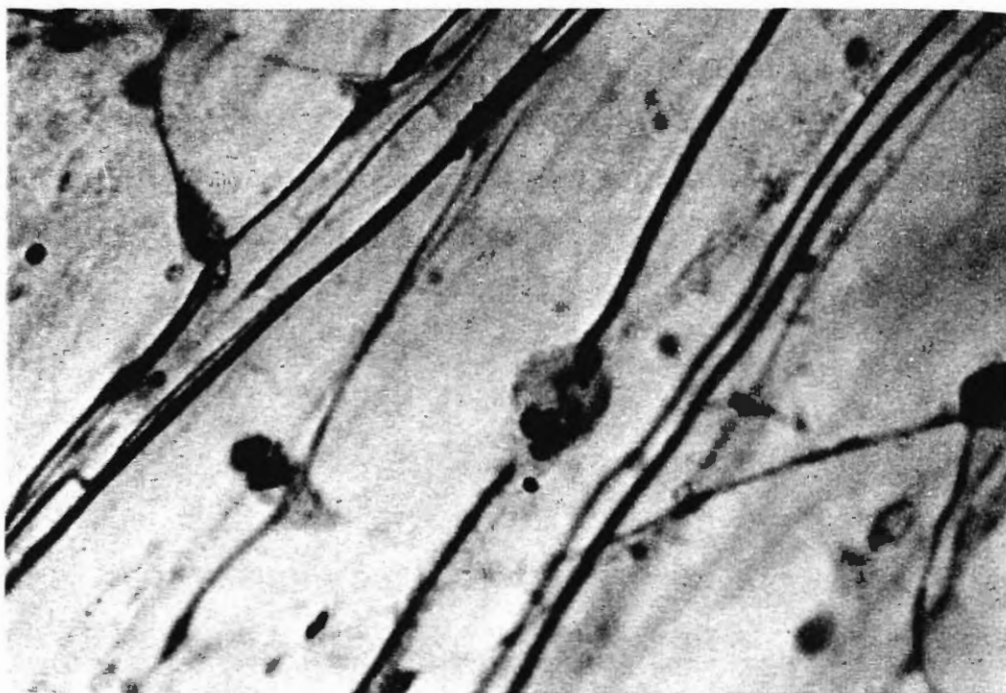


写真3：写真2に示した標本の一部。キノホルム（ $16\mu\text{g}/\text{cc}$ ）によって著明に障害された神経線維。Axoplasm が一部膨化し，中にとぐろを巻いたようにうねった線維を認める（倍率1000 $\times$ ）

が現われて来る。即ち，先に正常培養所見で述べたような神経細胞の繊細な紋理が不明瞭となり，代って粗大，大小不同な顆粒が細胞質内に出現する。細胞体は全体に縮小し辺縁には多少の凹凸が認められ衛星細胞との境界はコントラストを増し部分的には間隙を生じたように見える。衛星細胞

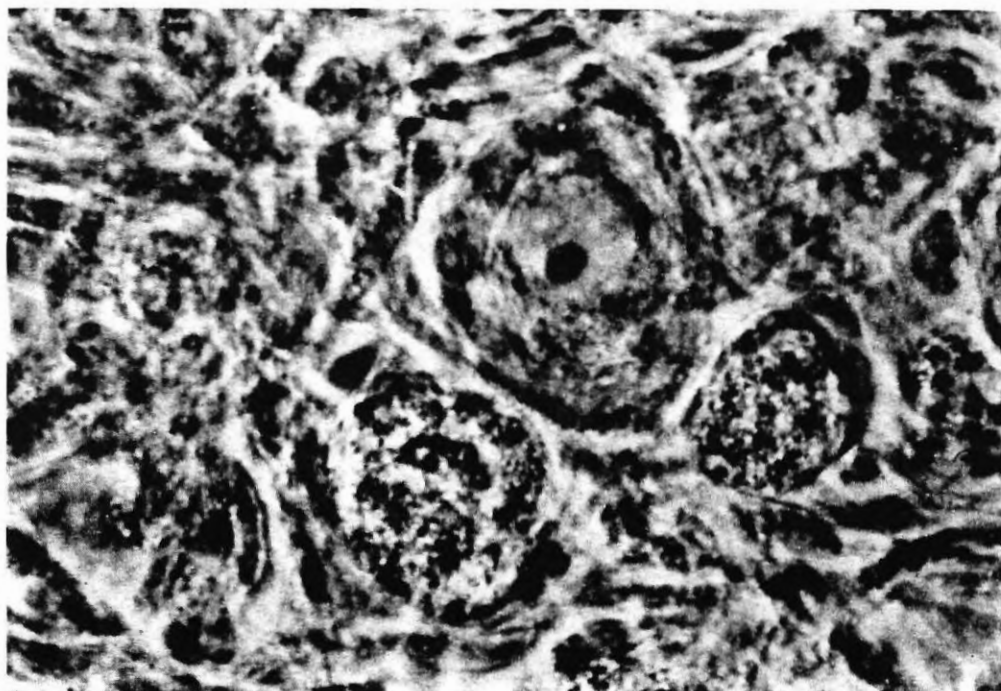


写真4：キノホルム添加（ $32\mu\text{g}/\text{cc}$ ）3日目の所見。大半の神経細胞は顆粒状変性を示し縮小している（倍率1000 $\times$ ）。

そのものの変化は神経細胞の変化より少ないが、紡錘形から不整な球形乃至卵形に近い形となり density を増す。3 日目には大半の神経細胞の細胞質は顆粒状となって縮小し、核の存在も不明瞭となる（写真4）。完全に崩壊して、幾つかの衛星細胞が環状に取囲んでいるために辛うじて神経細胞のあった跡と分る所もある。小型の神経細胞の方が大型のものよりおかされ易い傾向が認められる。髄鞘の変化は少なく、一部にripplingやmyelin dropletの出現を見るが、大半の神経細胞が変性に陥った3 日目の時点でも、なおほぼ健常に近い構造を保っているものが多い。シュワン細胞や線維芽細胞の変化も軽度である。

## ii 慢性実験

### a) 幼若培養組織への影響（髄鞘形成率の変化）

培養初期の成長はキノホルムを含む群（ $8 \mu\text{g}/\text{cc}$ 、 $4 \mu\text{g}/\text{cc}$ 、 $2 \mu\text{g}/\text{cc}$ ）と対照群との間に明らかな差を見出し得なかった。髄鞘形成の始まる時期も図-1 に見るように7 DIVで4群の間に差はない。しかし $8 \mu\text{g}/\text{cc}$ 群では9 DIV頃から他の3群との間に明瞭な差が出て来る。即ち、神経細胞には前記のような顆粒変性像が次第に出現し、一旦形成された髄鞘も変性崩壊して、ついには認め難くなる。線維芽細胞、シュワン細胞の変化は少ないが、対照群に比較すると小さな空胞を含む変性細胞がやや増加している。

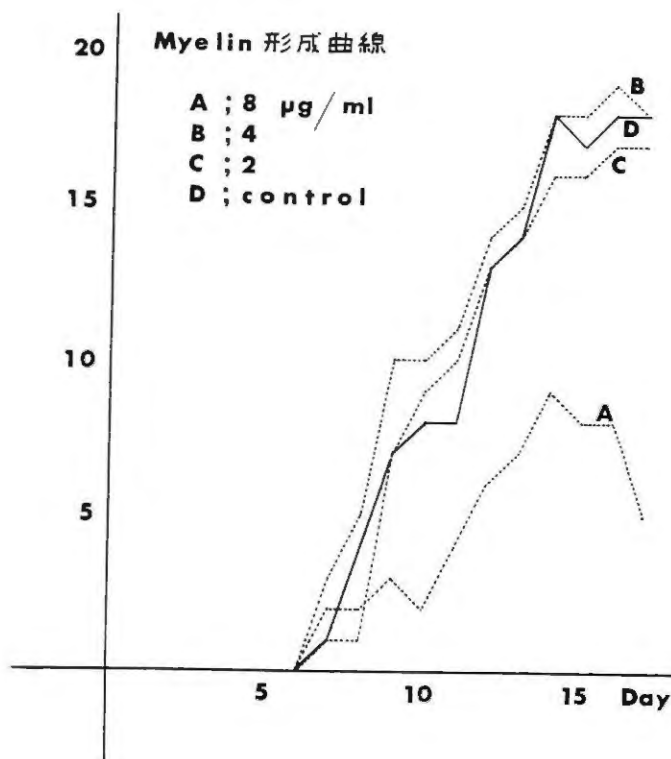


図-1：縦軸は髄鞘形成の認められた神経節の個数  
横軸は培養をはじめてからの日数



b). 成熟培養組織に及ぼす影響

急性実験 ( $32 \mu\text{g}/\text{cc}$ ) の場合に比し、変化の出現する時期は遅れ、 $16 \mu\text{g}/\text{cc}$  で投与后 3-4 日目頃から、 $8 \mu\text{g}/\text{cc}$  で 10 日目頃から徐々に変化が出現する。(1) 神経細胞の顆粒変性を認め、(2) 小型の神経細胞の方がおかされ易く、(3) 神経線維よりも細胞体の方の変化が目立ち、(4) 髄鞘、シュワン細胞、衛星細胞、線維芽細胞等は神経細胞に比し変化が少ない等の点で基本的には急性実

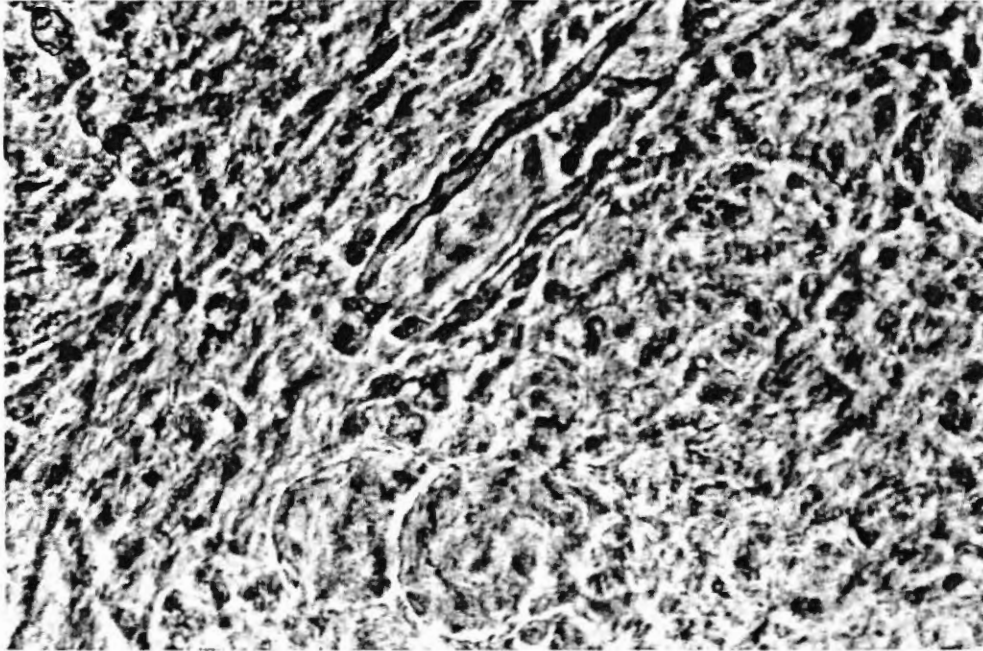


写真5：キノホルム添加 ( $8 \mu\text{g}/\text{cc}$ ) 后 17 日目の所見。写真下方に変性した神経細胞が数ヶあり、左上方に崩壊した髄鞘が認められる (倍率  $400\times$ )。

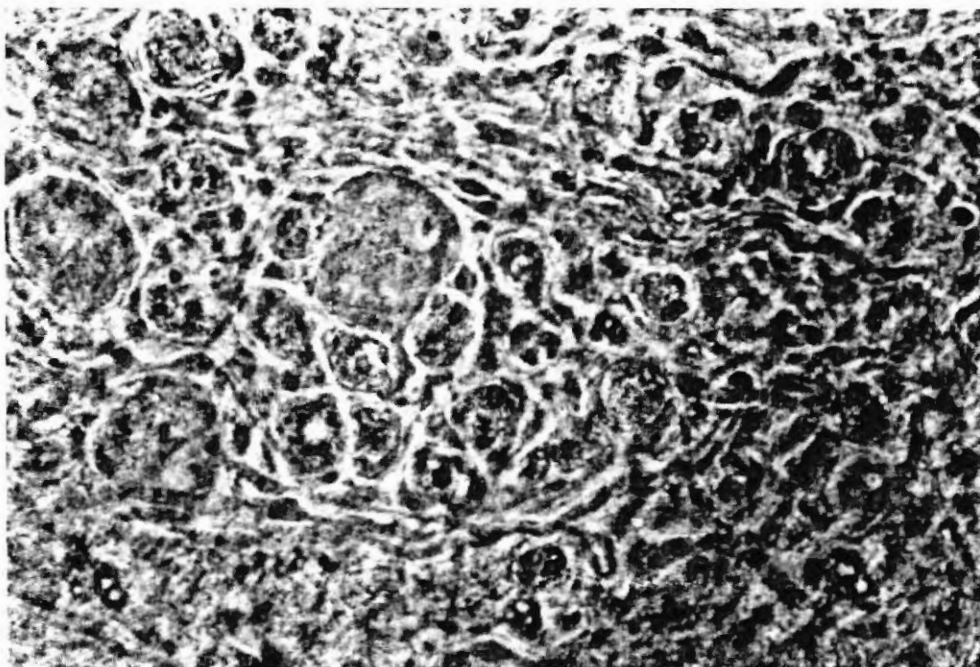


写真6：キノホルム添加 ( $16 \mu\text{g}/\text{cc}$ ) 后 17 日目の所見。神経細胞の顆粒変性。萎縮は更に著しい (倍率  $400\times$ )。

験の結果とよく一致している。キノホルム添加后同一時点での変化を比較するならば、濃度が高い場合程変化も著しいが、写真5, 6 (8  $\mu\text{g}/\text{cc}$ , 16  $\mu\text{g}/\text{cc}$ , 17日目の所見) に見るように低濃度でも長期間投与された場合には高濃度短期間投与の場合以上に著明な変化を示す。大部分の神経細胞は変性萎縮しており、髄鞘の破壊も著しい。しかしこの時点でも極めて少数ながら比較的变化の少ない神経細胞や髄鞘がなお残存している。

### III 考 察

実験的キノホルム中毒における末梢神経、脊髄後根神経節の病理所見を従来の報告からひろってみると次のようなものがある。井形らは家兎坐骨神経で軸索の腫脹、膨化及びこれに伴う髄鞘の崩壊を<sup>4)</sup>報告しており、立石らは犬で神経節細胞の変性・崩壊と衛星細胞の増加、軸索の変性等を記載している。<sup>5)</sup>池田らはニワトリで末梢神経の軸索変性および髄鞘脱落を報告し、<sup>6)</sup>高橋らはカニクイザルで後根<sup>7)</sup>神経節細胞と脊髄神経の変性を報告している。<sup>8)</sup>大西らは末梢神経の変化が著明であるにも拘らず、後根神経節には変化を認めなかった家兎の実験を報告しており、総じて *in vivo* の観察では神経線維の変化の方が神経細胞体の変化よりも著しいという印象がある。細胞体が先か軸索が先かという議論は Neuropathy の発現機構とも関連して興味のある問題であるが、我々の得た結果はこれら<sup>9)</sup>*in vivo* の報告とは逆の印象を与えるものであった。先に米沢がラット及びマウスの培養神経組織を用いて行った実験でも今回の結果と同じような傾向を報告しており、*in vitro* と *in vivo* の差が如何なる理由によるかは不明である。キノホルムの組織内への浸透度の違い、軸索の長さの違い (培養細胞の場合、神経細胞体から軸索先端迄の距離は高々 10 mm 前後である。キノホルム中毒が、長い神経線維の末梢ほど障害を起し易く、次第に近位部におよぶといういわゆる dying-back neuropathy の形をとるものとすれば、このような短い軸索では変化がとらえにくいと言う可能性がある) 等が一つの理由として考えられるかも知れない。

キノホルム中毒発症の条件として、投薬量、血中濃度、中毒量等に関する検討はまだ充分に行われていない。<sup>11)</sup> S MON 調査研究協議会臨床班の報告によれば一日投与量 1.0 ~ 1.5 g の場合通常 3 ~ 4 週間で S MON の発症をみており、これに比較すると多くの動物実験では体重当りはるかに大量のキノホルム投与を行っていることになる。又同じ種の動物をとっても、系或は個体によって発症の程度が著しく異なることは度々指摘されて来たことである。体重当り等量のキノホルムを投与しても吸収、<sup>12)</sup> 抱合能、<sup>13)</sup> 腸肝循環、排泄等が動物間で異なり、その結果血中の非抱合型キノホルム濃度に差を生じ、発症率が異なるという可能性は充分に考え得る。更に又、組織内蓄積量、血液・脳関門の違い、神経細胞自体の抵抗性の違い等も考慮せねばならない。従来の *in vivo* の実験では非抱合型キノホルムの血中濃度を長期間一定に保つことは困難であるが、培養組織を用いる場合には比較的自由にこれを調節することが可能であり、キノホルムの血中濃度と神経組織に及ぼす障害との関係を考察する上で一つの手掛りとなる可能性がある。田村らは S MON 患者の血清中キノホルム濃度を測定し約 10  $\mu\text{g}/\text{cc}$  という値を得ている。<sup>14)</sup> 種の違い (ヒトと鶏)、或は又組織培養と言う特殊な条件に対する考慮な



しに数値のみを論ずることは危険であり、慎重であらねばならないが、田村らの値と今回我々が得た  $4 \mu\text{g} / \text{cc} < \text{最小中毒濃度} < 8 \mu\text{g} / \text{cc}$  という値とがかなり近似している点は興味ある成績と思われる。

#### IV 結 論

1) 鶏胚脊髄後根神経節の組織培養を用いてキノホルムの神経組織に及ぼす影響を観察した。急性実験、慢性実験いずれの場合も  $8 \mu\text{g} / \text{cc}$  以上で神経細胞の変性が認められた。

2) 神経細胞は縮小し、細胞質は顆粒状の変性を示す。小型の神経細胞の方が比較のおかされ易く軸索よりは細胞体の変化の方が目立った。衛星細胞、シュワン細胞、線維芽細胞は神経細胞に比し抵抗性がよかった。

#### 文 献

- 1) Tsubaki, T. et al.: Neurological syndrome associated with Clloquinol, Lancet, 7701: 696—697, 1971.
- 2) 中井準之助編: 組織培養—基礎と応用—, 3版, 朝倉書店, 昭和42年
- 3) 田村善蔵: 生体試料からの非抱合型キノホルムの微量分析, スモン調査研究協議会研究報告書, №3, 176—178, 1971.
- 4) 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: 309, 1970.
- 5) 立石潤, 池田久男: キノホルム経口投与によるイヌの慢性中毒症状について, 医学のあゆみ, 76: 611—612, 1971.
- 6) 池田良雄他: キノホルムの毒性に関する研究, スモン調査研究協議会研究報告書 №3: 190—199, 1971.
- 7) 高橋理明他: カニクイザルを用いてのキノホルム長期経口投与実験, スモン調査研究協議会キノホルム部会第2回研究会, 1971年(12月)
- 8) 大西晃生他: 実験的キノホルム中毒家兎における末梢神経病変に関する研究, 医学のあゆみ, 77: 274, 1971.
- 9) Prineas, J.: The pathogenesis of dying-back polyneuropathies. J. Neuropath. Exp. Neurol., 28: 571—621, 1969.
- 10) 米沢猛: 培養神経組織でのキノホルム中毒実験, スモン調査研究協議会キノホルム部会第1回研究会, 1971年(7月)
- 11) スモン調査研究協議会研究報告書 №2, 1971.
- 12) 田村善蔵: 血清中の非抱合型キノホルムの定量, スモン調査研究協議会研究報告書 №3: 173—175, 1971.
- 13) 高須俊明, 豊倉康夫, 松岡理: キノホルムの神経系に対する作用機序の研究(第1報), 臨床神経, 12: 131—142, 1971.
- 14) 田村善蔵他: スモン患者の血清ヨウ素とキノホルムの関係, スモン調査研究協議会キノホルム部会第1回研究会, 1971年(7月)

## 34. ラットに於けるキノホルムの消化管吸収に及ぼす製剤化の影響

林 正弘, 際田 弘志, 西垣 隆一郎  
不破 亨, 栗津 莊司, 花野 学

(東京大学・薬学部)

キノホルムの消化管に及ぼす製剤化の影響を検討することを目的として以下の研究を行なった。なお吸収性の指標としてはキノホルム代謝物の尿中排泄量を, また実験動物としてはDonryu系雄ラットをそれぞれ用いた。

### I キノホルムの代謝物の尿中よりの定量

キノホルムの尿中代謝物としてはglucuronide及びSulfateの抱合体が知られている。

そこで市販の $\beta$ -glucuronidase(Baehringer社製)はpH4.5に於いて $\beta$ -glucuronidase活性を, pH6.2に於いてarylsulfatase活性を持っていることを利用して, pH調節を行なうことにより, 両抱合体の分離定量を行なうことを試た。

合成したキノホルムglucuronide(東大・薬学部・田村教授より)を $\beta$ -glucuronidaseと38℃にてpH4.5及びpH6.2にてincubateしたところ, いずれのpHにててもglucuronideは100%加水分解を受ることを知った。そこで, 現在のところ, 市販酵素によるキノホルム抱合体の分離定量は不可能であるという上記知見に基づき, 尿をpH6.2に調節後, $\beta$ -glucuronidaseとincubateすることにより, glucuronide及びsulfateの両抱合体を加水分解して, キノホルムを得, これを $\text{FeCl}_3$ のキレート体として比色定量することを行なった。

なお, 尿中の遊離形のキノホルムを定量するために, 尿より遊離形キノホルムを抽出後, 上記のincubationを行なった。glucuronideは尿保存中, 経時的に分解することを知ったので, 以下の実験では採取後の尿は直ちに定量操作に移した。定量操作はchart Iの通りであった。

### II 尿中排泄パターンに及ぼす剤形の影響

粉末薬品の水中への分散性を改善するために, 分散剤としてcarboxymethyl cellulose(CMC)が添加されることがある。キノホルムの市販製剤にはCMCが添加されたものがあったこと, また投与されたキノホルムが消化管中でその分散性が変化すれば, 吸収性にも影響が表れる可能性があるという考えのもとに, 主としてCMCの影響を検討した。

キノホルムの水性懸濁液をCMCの存在下と非存在下で超音波により調製した。CMCの濃度は0.3%とした。膀胱カニュレーションを施し, 一夜絶食後のラットに上記懸濁液を胃ゾンデにより経口投与し, 経時的に尿を採取して, 尿中代謝物を定量した。

ラットに5mgのキノホルムを経口投与した時の, 代謝物の累積尿中排泄率の一例をFig.1に示した。この場合には排泄率曲線には, CMCが存在する時としない時とでは顕著なパターンの差は認められなかったが, 24時間までの排泄率はCMC存在下では15.8%, 非存在下では14.2%であり,

Chart I



若干CMCの影響が認められた。なおこの場合に、遊離キノホルムを定量したところ極めて微量であったので、以後の検討は全て、抱合代謝物についてのみ行なうこととした。

次に投与量を約3倍あげて16mgとした場合について同様の実験を行なった。この場合にはFig 2に示すように、排泄率についてはCMCが存在する時としない時では顕著な差が認められたが、排泄パターンについては、CMCが存在しない場合には、排泄のおくれない場合 (Fig 2a) も、それが認められた場合 (Fig 2b) もあった。

次いでオリーブ油及びポリエチレン・グリコール・300 (PEG 300) にキノホルムを溶解し、そ

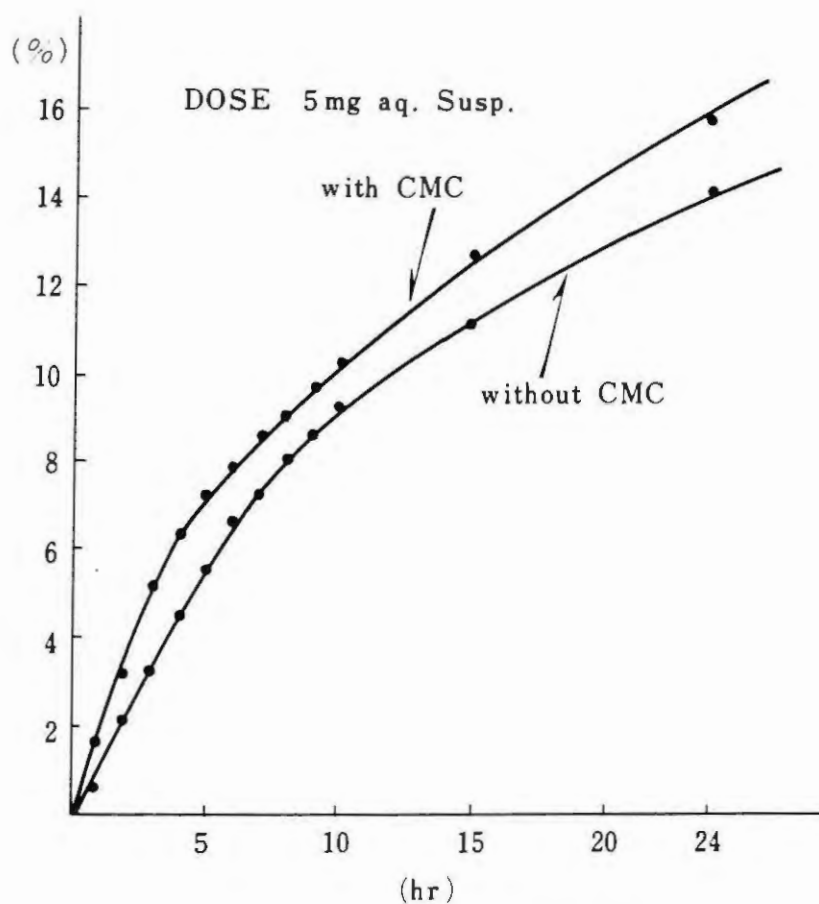


Fig. 1 キノホルムの排泄率曲線

の溶液を経口投与した時の排泄挙動を検討した。その累積排泄率曲線を Fig. 3 及び 4 に示した。オリーヴ油については排泄のおくれが認められた。また PEG 300 溶液投与の場合には、排泄率の低下が認められた。

以上の如く、排泄パターンに及ぼす投与剤形の影響が認められたが、客観的表現の困難なパターン

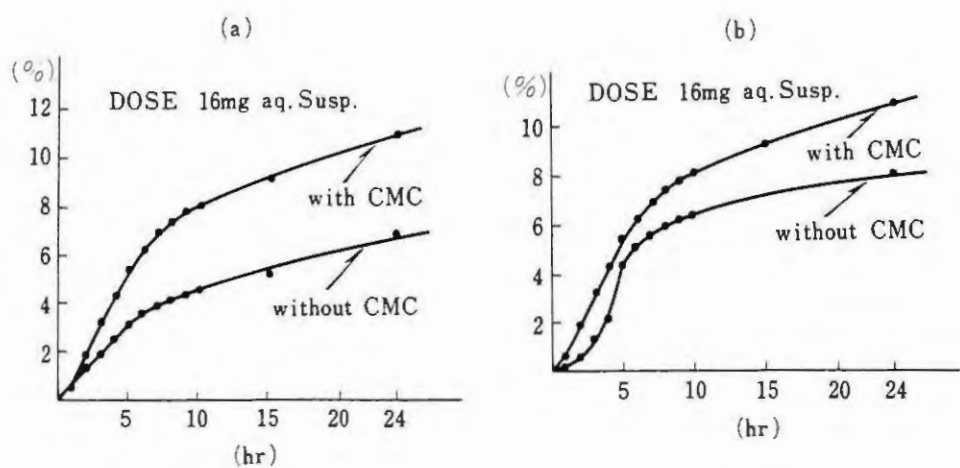


Fig. 2 キノホルムの排泄率曲線

Fig. 3 キノホルムの排泄率曲線

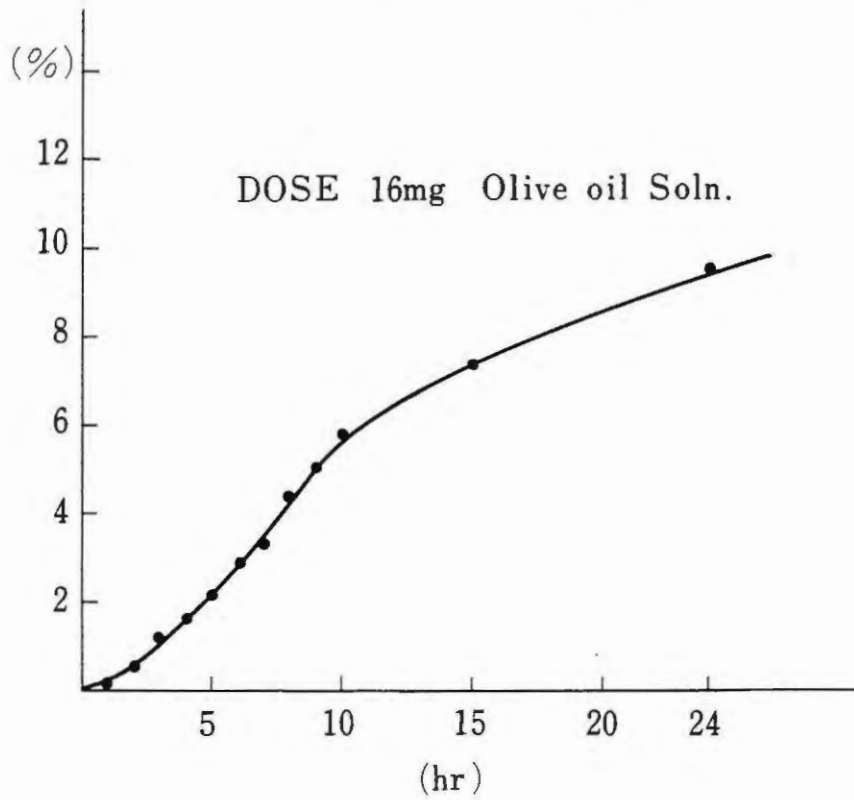
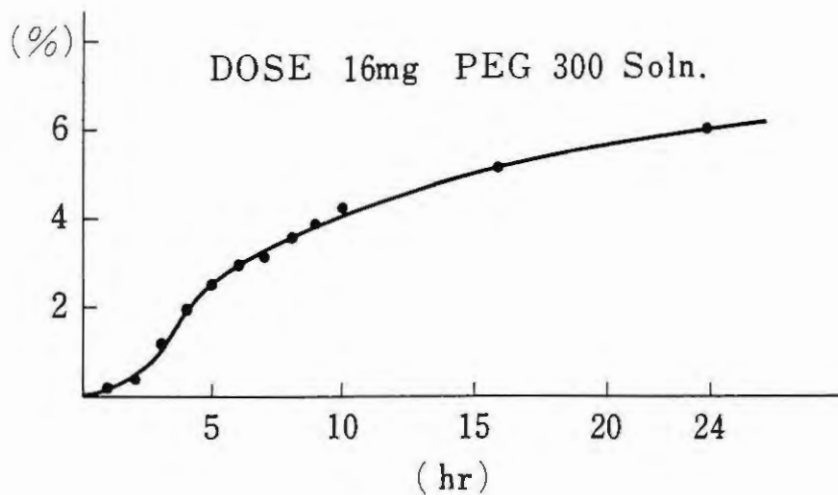


Fig. 4 キノホルムの排泄率曲線



の検討とは別に、24時間までの排泄率について以下の検討を行なった。

### Ⅲ 尿中排泄率に及ぼす剤形の影響

分散剤であるCMCの排泄率に及ぼす影響をキノホルムの投与量5mg及び16mgの2水準について、CMCの存在する時と存在しない時に分けて、各実験を3回くり返して行ない、その時の排泄率を2

元配置の分散分析法により比較検討した。その時の分散分析表をTable Iに示した。投与量及びCMCの存在の有無に関して、双方とも1%の危険率で尿中排泄率には有意の差が認められた。平均排泄率及びその95%信頼限界をFig. 5に示した。Table I及びFig. 5の結果から明らかな如く、キノホルムの投与量が大きい場合には排泄率は低く、またCMCが懸濁液中に存在しないと排泄率が低いことがわかった。また、CMCの排泄率に及ぼす影響はキノホルムの投与量が大きい場合の方が顕著となる傾向を示した。

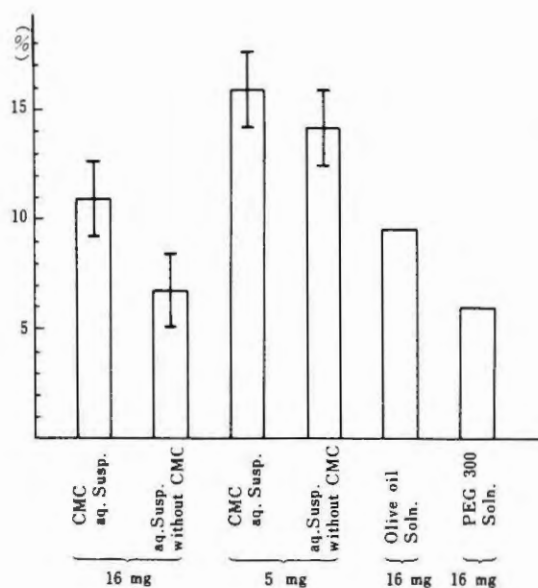
Table I

キノホルムの投与剤形(CMCの有無)  
及び投与量に関する分散分析

|       | S. S.  | $\phi$ | V      | F <sub>0</sub> |    |
|-------|--------|--------|--------|----------------|----|
| A     | 26.11  | 1      | 26.11  | 16.85          | ** |
| B     | 112.24 | 1      | 112.24 | 72.41          | ** |
| A × B | 4.94   | 1      | 4.94   | 3.19           |    |
| A B   | 143.29 | 3      |        |                |    |
| E     | 12.43  | 8      | 1.55   |                |    |

A: Dosage Form.

B: Dose



I: 95% 信頼市

Fig. 5 キノホルムの尿中排泄率に及ぼす剤形の影響

以上の如く、経口投与したキノホルムの尿中排泄率を指標として、剤形のキノホルムの消化管より<sup>1)</sup>の吸収に及ぼす影響を検討してきたが、生体内のキノホルムの一部は胆汁排泄されるという知見から考えて、排泄率を直ちに吸収率と見なすことはできない。そこでより直接的にキノホルムの吸収性を比較検討すべく、次の如く静注キノホルムの排泄率を基準として経口投与後のキノホルムの吸収率を求めた。

#### IV 経口投与キノホルムの吸収率

キノホルムの水性懸濁液を静注後の尿中排泄パターンはFig. 6の通りであった。投与量は予備実験により、経口投与後24時間までの累積排泄量とほぼ同程度の排泄量を静注時に与えるような投与

量として、1.6 mg及び5 mg経口投与時に対応するものを使用した。なお、投与にはCMC水性懸濁液を用いた。Fig. 6に示すように、high doseとlow doseとでは異なる排泄率を示した。24時間までの排泄率を基準として、経口投与時の吸収率を各剤形、投与量について求めた結果はTable IIの通りであった。

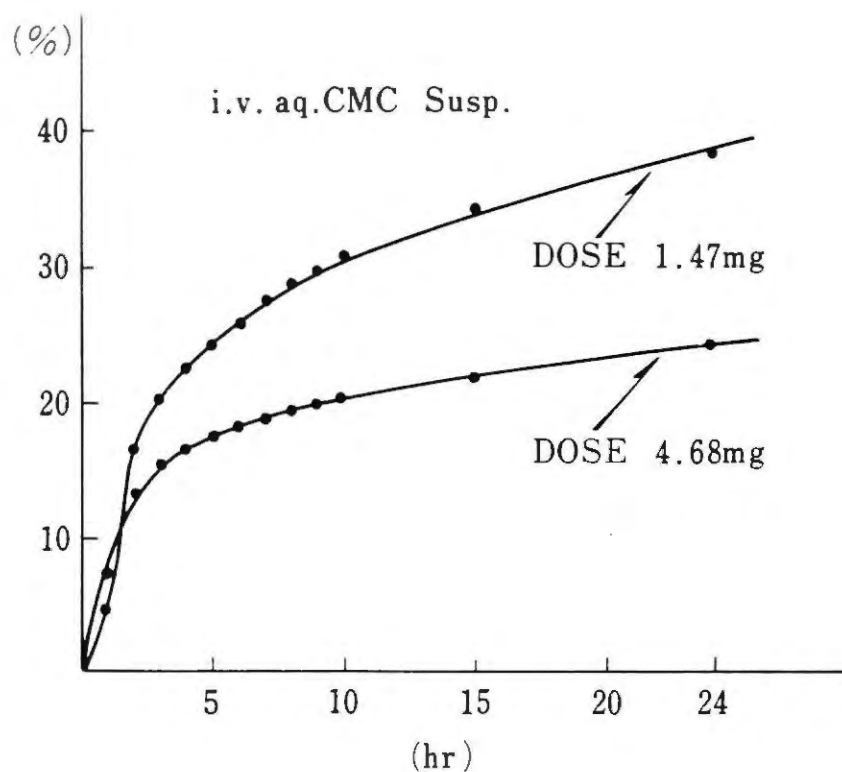


Fig. 6 静注キノホルムの排泄率曲線

Table II キノホルムの各種剤形より吸収率

|        |                       | Urinary Excretion Ratio(24hr) | Availability |
|--------|-----------------------|-------------------------------|--------------|
| 1.6 mg | I.V.                  | 24.4 %                        | 100.0 %      |
|        | CMC aq. SuSp.         | 11.0                          | 45.1         |
|        | aq. Susp. without CMC | 6.8                           | 27.9         |
|        | Olive Oil             | 9.6                           | 39.3         |
|        | PEG 300               | 6.0                           | 24.6         |
| 5 mg   | I.V.                  | 38.6                          | 100.0        |
|        | CMC aq. Susp          | 15.8                          | 40.9         |
|        | aq. Susp. without CMC | 14.2                          | 36.8         |



Table II から明らかな如く, CMC はキノホルムの吸収を増強している。しかもこの効果はキノホルムの投与量の大きい時程強くなる傾向があることがわかった。

なおキノホルム静注後のキノホルムの血中濃度を紫外吸収法により経時的に測定し, これを Chart II の two compartment model により解析したところ, Table III の如き結果を得た。

Chart II

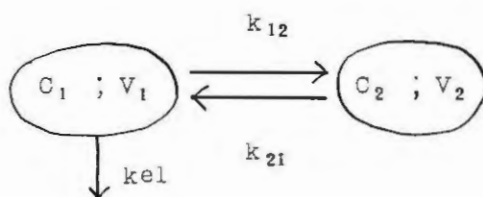


Table III

| 投与量 (mg) | $k_{12}$ | $k_{21}$ | $k_{el}$ | $V_1$ |
|----------|----------|----------|----------|-------|
| 4        | 0.222    | 0.0848   | 0.0639   | 660   |
| 2        | 0.271    | 0.105    | 0.142    | 43    |
| 2        | 0.314    | 0.164    | 0.188    | 42    |

$k : \text{min}^{-1}$

$V : \text{ml}$

## V 考 察

以上キノホルムの消化管よりの吸収に及ぼす剤形の影響を, 尿中排泄量を指標として検討してきたが, このような方法に対して次のような問題が考えられる。

著者らはリボラビン及び陰イオン性色素の胆汁排泄挙動について検討した結果, 投与量が大<sup>2), 3)</sup>きい時には, 投与量の小さい時に比べて急激な胆汁排泄がおこるという知見を得ている。このような胆汁排泄に関する投与量依存性がキノホルムについてもおきるとするならば, Pulse infusion に相当する静注時と, slow infusion に相当する経口投与時とでは, キノホルム代謝物の胆汁及び尿へ排泄される割合は変化する可能性がある。本研究では静注時の投与量を 100 % 吸収量に対応させて, 尿中排泄率より, 吸収量を推定しており, この点は上記の胆汁排泄にかかわる投与量依存性を全く無視していることになる。またキノホルムの主要代謝物であるキノホルム sulfate の標品の完全な合成ができない段階で尿中代謝物を酵素により分解してキノホルムを定量したということから, 酵素分解の条件を十分に検討したとは言い難い点がある。以上のことから, キノホルムの排泄率より, 吸収率を換算する手法には若干の問題点がある。従って排泄率及び吸収率の数値に関しては今後の検討の余地があると考えるが, キノホルムの消化管吸収に及ぼす剤形の影響の有無についての検討に関しては十分な成果が得られたものと考える。

なお今後、吸収率をさらに明確にするためには、キノホルムの体内動態に関する速度論的解析が必要であり、そのためには sulfate 標品の入手と標準となるべき静注形態の検討が必要であると考える。

## VI 結 論

キノホルムの消化管に及ぼす CMC の影響を検討したところ、水性懸濁液にして投与したところでは、CMC はキノホルムの吸収を増強した。またこの効果はキノホルムの投与量の大きい時程大きくなる傾向があった。またキノホルムを溶解する溶媒を用いた液剤よりの吸収は水性懸濁液よりの吸収よりも良好であるとは言えなかった。

## 文 献

- 1) P. Ritter, M. Jerwann, *Arzneim-Forsch* 161, 1647(1966)
- 2) H. Nogami, M. Hanano, S. Awazu, T. Iga, *Chem. Pharm. Bull.*, 18, 228(1970)
- 3) T. Iga, S. Awazu, M. Hanano, H. Nogami, *ibid.*, 18, 2431(1970)

## 35. 標識キノホルムの代謝, 分布に関する研究

松岡 理 (放医研)

豊倉 康夫, 高須 俊明 (東大脳研・神経内科)

栗栖 明 (放医研)

### 目 次

#### I 研究目標

#### II 研究材料

1. 標識化合物の種類と特徴
2. 実験動物
3. 投与溶液の調整と投与方法

#### III 研究方法

1. 全身計測法
2. 全身オートラジオグラフィ
3. 組織の放射化学分析

#### IV 実験結果

1. 投与形態と消化管からの吸収率
2. 吸収率に及ぼすキノホルムの投与量, および長期投与の影響
3. 各種投与方法における全身滞留率の時間的变化
4. 投与量および長期投与の全身滞留率に及ぼす影響
5. 胆汁排泄キノホルムと再吸収
6. マウスにおける全身オートラジオグラフィによる分布の検討
7. イヌにおけるマクロオートラジオグラフィによる臓器内分布の検討
8. サルにおける全身オートラジオグラフィによる分布の検討
9. マウスにおける臓器分布の時間的变化

#### V 考察

#### VI 結論

##### I. 研究目標

本研究の目標は, すでに実験動物への投与によってスモンと類似あるいはほとんど同一の臨床症状, 病理所見が再現されつつあるキノホルムについて, 標識キノホルムを用いることによって, 代謝, 分布の面から定性的, 定量的検討を行い, スモンとキノホルムの関連性をあきらかにすることである。

## II. 研究材料

### 1. 標識化合物の種類と特徴

本研究には図1に示すとき $^{131}\text{I}$ 標識化合物と $^{14}\text{C}$ 標識化合物の両者が実験の内容に応じて使い分けられたが、その根拠になった両者の特徴を列挙すると次の如くである。

$^{131}\text{I}$ 標識化合物は安価で比放射能が $^{14}\text{C}$ 標識より高く(39.6 mCi/m.mol), ガンマ線を放出するのでin vivoの体外計測が可能という利点があるが、半減期が短いため長期実験に不適當であり、かつ標識が $^{14}\text{C}$ 標識の場合にくらべて不安定と考えられ、オートラジオグラムでの解像力も悪い。

$^{14}\text{C}$ 標識化合物は高価で比放射能力が低く(1.63 mCi/m.mol.), 体外計測は不可能という欠点があるが、半減期が長く、長期実験に耐え、標識も安定で、オートグラムでの解像力が高い。この両者のオートグラフィにおける問題点はすでに報告した<sup>1)</sup>。

### 2. 実験動物

実験動物としてはキノホルム代謝の動物差と、実験の容易さの関係で種々の動物が用いられた。すなわちマウス(CRF I: CF #1とRFの一代雑種), ラット(Wistar), イヌ(雑種およびビーグル犬), そしてサル(カニクイザル)がそれぞれの実験によって使い分け使用された。

### 3. 投与溶液の調整と投与方法

キノホルムは水に不溶のため、実験動物に対する投与溶液の調整が非常に大きな問題になる、種々の検討の結果、静脈注射には0.1規定カセイソーダ溶液が、腹腔内注射にはオリーブ油溶液、皮下注射にはオリーブ油溶液、経口投与にはオリーブ油溶液、CMC乳化液、そして水懸濁液が選ばれた。

## III. 研究方法

研究方法としては全身計測、全身オートラジオグラフィ、組織の放射能分析の三つの手段が実験の目的に応じて組合せて用いられた、これらの方法の方法論的意義についてはすでに松岡が論じている<sup>2)</sup>。

### 1. 全身計測法

$^{131}\text{I}$ 標識化合物はARMA C全身カウンターを用いて、マウスのin vivoの全身計測、および消化管吸収率の測定のための摘出消化管、残りの体全体の放射能の測定が行われた。

5-Chloro-7-Iodo-8-Hydroxy-Quinoline

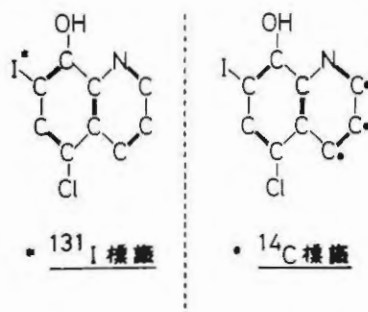


図1 標識キノホルム

## 2. 全身オートラジオグラフィ

松岡が開発した方法<sup>3)</sup>にもとづいて、凍結ボックス内に組込まれ自動化されたマイクロームを用いて全身凍結切片の作製が行われた。

## 3. 組織の放射化学分析

組織の標本は<sup>131</sup>I 標識のものは ウェルカウンターにより、<sup>14</sup>C 標識化合物に関しては組織をソルエント 100にて溶解したのちトルエンシンチレーターを加え、液体シンチレーションカウンターにより計測した。

## IV. 実験結果

### 1. 投与形態と消化管からの吸収率

マウスにオリーブ油溶液<sup>4,6)</sup>，C M C 乳化液<sup>4,6)</sup>，水懸濁の三つの投与形態で経口投与し，2時間後に殺し，全消化管を摘出し，消化管以外の部分，存在する放射能と体全体にとりこまれた放射能との比により吸収率を推定したものが第1表である。表に示すごとくどの投与形態でもキノホルムはかなりよく吸収されることがわかった。

表1 <sup>131</sup>I 標識キノホルムの消化管からの吸収率

m. ± s. e.

| 剤 形           | 投 与 量         | 動 物 数 | 2時間後の推定吸収率   |
|---------------|---------------|-------|--------------|
| オ リ ー ブ 油 溶 解 | 14~24 mg/Kg   | 6 匹   | 23.9 ± 3.5 % |
| C M C 乳 化     | 20 mg/Kg      | 6 匹   | 17.6 ± 4.9 % |
| 水 懸 濁         | ca. 40 mg/Kg  | 5 匹   | 29.4 ± 1.7 % |
| ラット胆汁排泄キノホルム  | ca. 1.2 mg/Kg | 6 匹   | 10.1 ± 1.5 % |

### 2. 消化管吸収率に及ぼすキノホルム投与量と，キノホルム連続投与の影響

一定量の標識キノホルムに非放射性のキノホルムを混合して投与量を変え，吸収率の投与量による変化をしらべた結果は第2図の如くで，吸収率は投与量が増すといちじるしく減少することがわかった。しかしヒトの最大投与量の範囲では吸収の絶対量は投与量の増加と共に増大することがあきらかになった。

市販 C M C 乳化キノホルムを飲料水に混ぜて (0.3g/ℓ) をマウスに2ヶ月以上毎日与えた投与群の消化管からの吸収率の推定の結果は両群の間に有意の差がみとめられなかった。

### 3. 各種投与法における全身滞留率

マウスに経口，静脈，皮下，腹腔の4つの投与法で<sup>131</sup>I 標識キノホルムを1回投与したときの全身滞留率の時間的变化は第3図の如くで，いづれの投与法でも最初の1~2日に急速な減少があり，それにひきつづいてゆるやかな減少がみとめられた。経口投与の場合は吸収されないで直接排泄されるものがあるので最初の1日目の減少が他の投与法にくらべて著しかった<sup>4,6)</sup>

### 4. 投与量および長期連続投与の全身滞留率に及ぼす影響

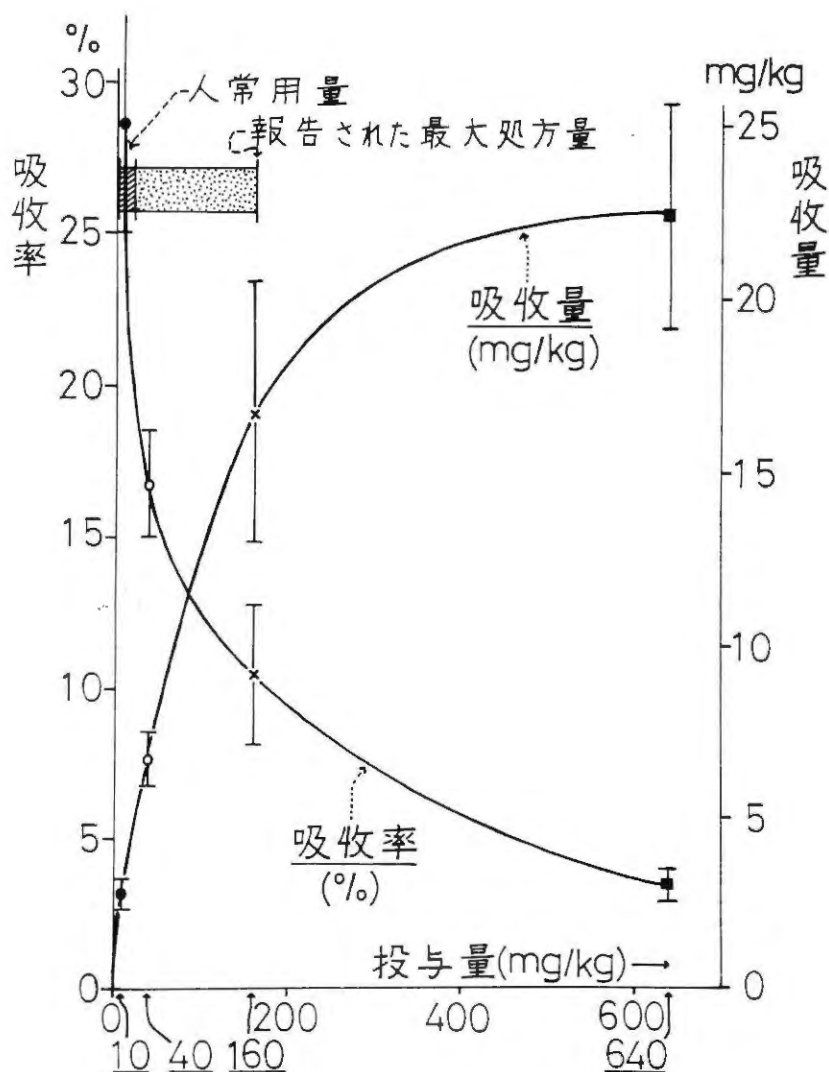


図2  $^{131}\text{I}$  標識キノホルムマウス消化管からの吸収  
— 投与量による変化 —

各群6匹のマウスに  $^{131}\text{I}$  標識キノホルムをそれぞれ、 $10\text{mg/Kg}$ 、 $40\text{mg/Kg}$ 、 $160\text{mg/Kg}$  の投与量になるようにして1回経口投与し、全身滞留率の時間的変化をしらべた結果が第4図a)である。これは体内の絶対量の変化に書き換えたものがりである。図に示すように投与量が増加すると滞留率は低下する、しかし体内の絶体量の滞留は投与量の増加によって増加することがわかった。

2群のマウスの1群に市販CMC乳化キノホルム製剤を飲料水に混ぜて( $0.3\text{g/l}$ ) 2ヶ月以上与えたものと、常水を与えた対照群について投与中止1日後に  $^{131}\text{I}$  標識キノホルム ( $40\text{mg/Kg}$ ) を経口投与して全身滞留率をしらべた結果は第5図の如くで、図5の示す如くキノホルム水投与群は滞留率が対照に比しいじりしく低いことがあきらかになった。

##### 5.胆汁排泄キノホルムと消化管からの再吸収

後述の全身オートラジオグラフィ、組織の放射能分析の結果からキノホルムが非常に早期から胆汁に非常に高濃度に、また長期間にわたって持続することが推定され、肝腸循環が予想されたので、これをラットを用いて実験的にたしかめた。あらかじめ胆管にカニューレションしたラットにオリーブ

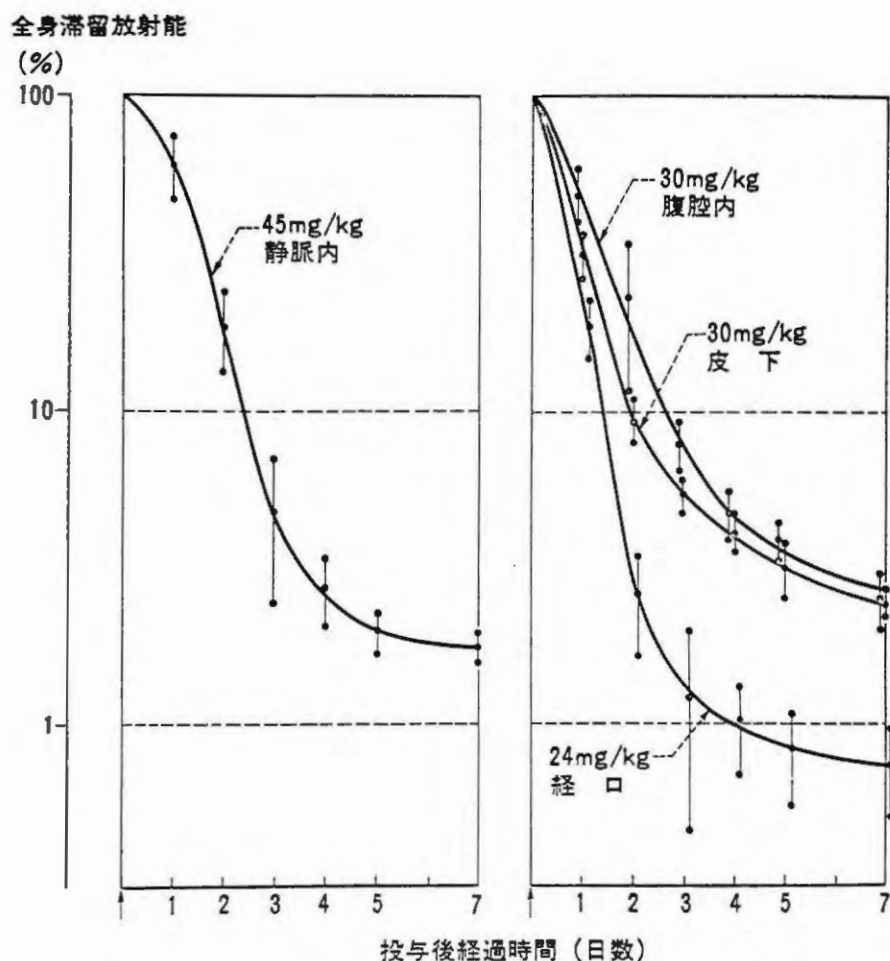


図3  $^{131}\text{I}$  標準キノホルムのマウス体内滞留率の経時的推移

油に溶解したキノホルムを胃ゾンデにより経口的に  $1\text{ ml}$  投与した (キノホルム量として  $5.1\text{ mg/Kg}$ ) , このときの胆汁への  $^{131}\text{I}$  の排泄を胆汁の時間的採取により追跡し, その濃度および投与量に対する排泄量の一例を示したものが第6図である。図に示すごとく投与後4時間の間に投与量の22%が胆汁中に排泄され, その濃度の最大は3時間後であった。これらの胆汁を集め, 均一に混合したものを7匹のマウスに経口的に投与して, 胆汁中に抱合型で排泄されたキノホルムの吸収をしらべた結果は第1表の如くで, 対照に比し少いがかなりの再吸収がみとめられた<sup>8)</sup>。

#### 6. マウスにおける全身オートラジオグラフィ

マウスに  $^{131}\text{I}$  - 標識キノホルムおよび  $^{14}\text{C}$  標識キノホルムを各種の投与法で与え, 凍結全身オートラジオグラムを作った。

##### 1) $^{131}\text{I}$ 標識化合物による検討

$^{131}\text{I}$  キノホルムの静注によって得たオートラジオグラム観察の所見をまとめると次の如くなる。まず静注後1時間のオートラジオグラムは第7図の如くで肝臓, 胃臓, 胆嚢への集中がいちじるしく血液中よりはるかに高い黒化を示した, この外皮ふや鼻腔内にもかなりの黒化がみられた。投与後24時間目の所見では, 第8図に示すごとく, 肝臓, 黒化はいちじるしく減少しているが, 胆嚢



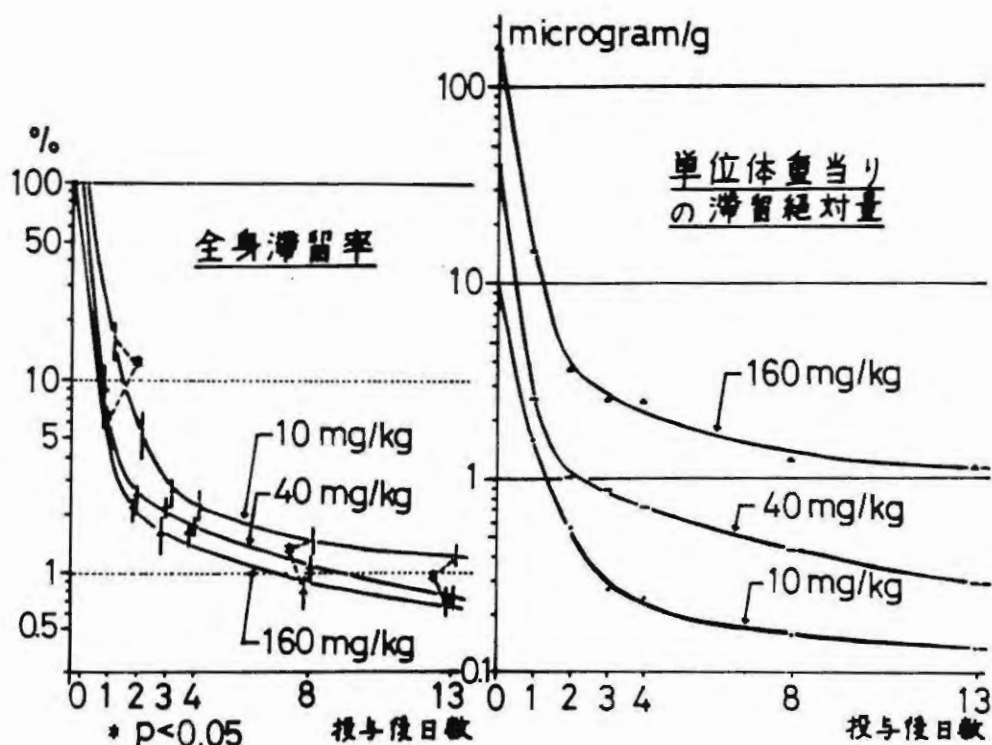


図4  $^{131}\text{I}$  標識キノホルム1回経口投与後のマウス全身滞留  
に及ぼす投与量の影響

および消化管胆汁の黒化が最大で、キノホルムの体外排泄に腎臓以外の胆汁系を介するものが大きいこと、したがって肝腸循環が推定された。神経系に関する全身オートによる検討としては詳細は協同研究者の豊倉の報告にゆづるが、一般に脳背髄等の中樞はいづれの時間でも黒化は非常に低く、それに対し、24時間後のオートグラムでは背髄神経、坐骨神経に著明なとりこみがあることが確認された<sup>4,6)</sup>

$^{131}\text{I}$  標識キノホルムからの  $^{131}\text{I}$  の遊離に関しては、サイロイドブロックを行わないマウスの使用および  $\text{Na}^{131}\text{I}$  単独投与の全身オートおよび後述の  $^{14}\text{C}$  標識キノホルムの分布の比較検討の結果から最初の1時間では問題にならないが24時間後では数%程度の遊離がおきているものと推定された<sup>1)</sup>

## 2) $^{14}\text{C}$ 標識キノホルムの全身オートグラフィによる分布の検討

$^{14}\text{C}$  キノホルムの静脈投与の結果はほぼ  $^{131}\text{I}$  の場合と同様であったが、 $^{131}\text{I}$  標識の場合とことなり甲状腺およびだ液腺への分布の様子がこととなった。静注後1時間での全身分布は第9図の如くで、最高の黒化は腎(とくに腎盂)と胆汁(胆嚢内および腸管内)に認められた。次いで肝、鼻腔の一部の黒化が強く、血液、皮ふ、骨髓、唾液腺、脾臓、坐骨神経の順で黒化の程度は減少した。静注6時間後では、やはり腎、胆汁ついで鼻部の黒化がいちじるしく、次いで肝、血液、皮ふ、Brown

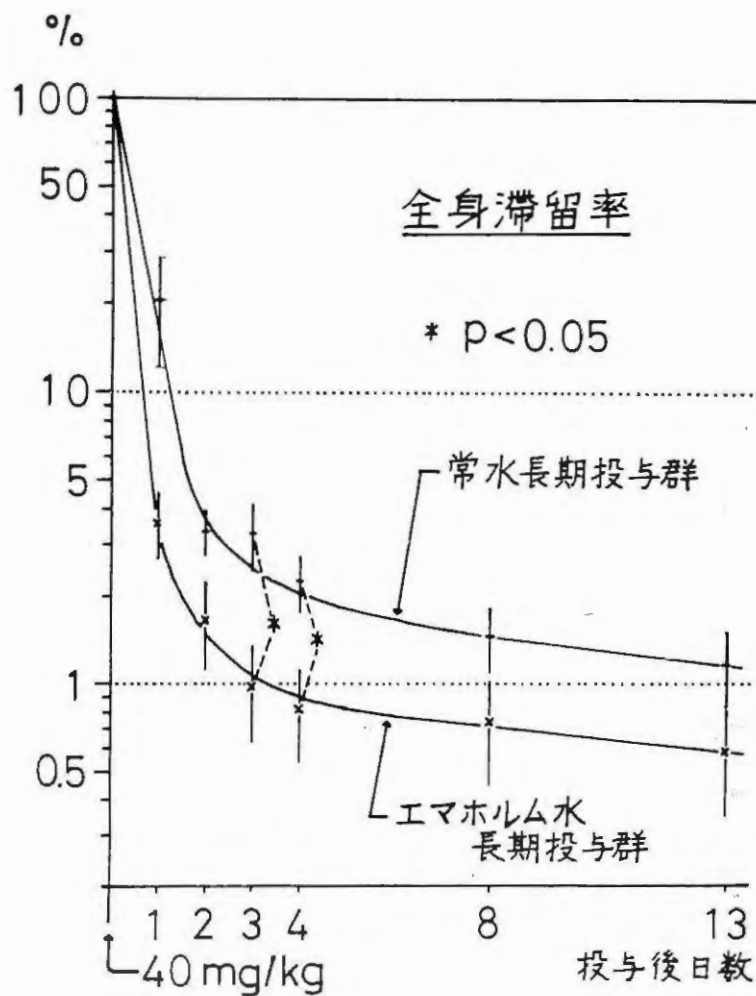


図5  $^{131}\text{I}$  標識キノホルム 1 回経口投与後全身滞留量  
— 長期投与の影響 —

fat, 脾臓, 睪丸, 骨格筋, 背髄神経, 三叉神経の順序で黒化が減少していた。静注 24 時間後になると最高の黒化は胆汁, 腎実質の一部, 鼻腔にありついで肝, 胃内容, 坐骨神経, 背髄神経, 血液の順で黒化の程度は減少した。静注 24 時間後には全体のレベルはかなり下っているがやはり, 胆汁, 肝, 腎の黒化が最も高く, 坐骨神経, 皮ふなどの順で黒化が減少した。これらの成績は肝腸循環が腎からの排泄と共に大きな役割を果していることを推定させるものであり, 末梢神経へのとりこみは中程度であるが初期は周辺組織が高いためあまり目立たないが, 比較的長期にわたって持続し, 周辺組織の黒下が低下すると著明にみとめられるようになることがわかった。

腹腔内投与の場合は初期の腹腔内残存の場合をのぞいて 6 時間以後は静脈内投与の場合とほとんど同じであった。

経口投与はオリブ溶解および CMC 乳化のものを胃ゾンデが投与したが, 24 時間後の分布の

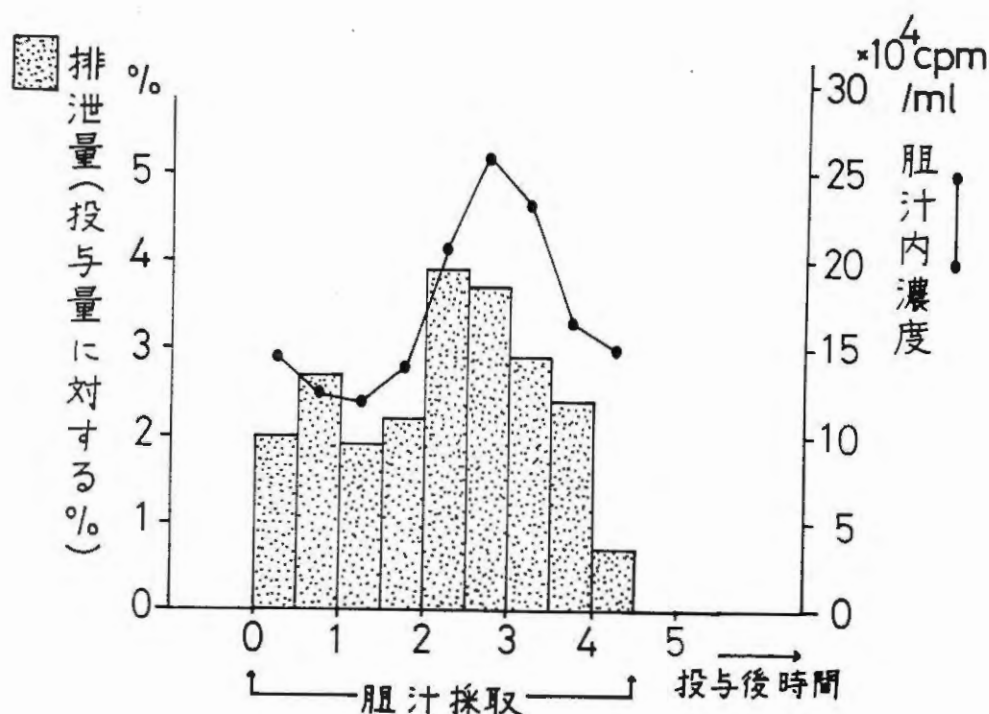


図6  $^{131}\text{I}$  標識キノホルム1回経口投与後  
( $5\text{mg/Kg}$ ) のラット胆汁への排泄

パターンには他の投与方法の場合と大差はなく、経口投与によっても確かに消化管から吸収され、とくにオリーブ油溶解のものの方がよいと思われる成績を得た<sup>4)</sup>

#### 7. イヌにおけるマクロオートによる臓器内分布の検討

キノホルムの投与によりスモンの臨床、病理組織学的所見において最も類似した所見を再現したといわれるイヌについて  $^{131}\text{I}$  標識化合物により検討した、本研究にあたっては全身の各臓器のレベルの比較は摘出した各臓器からの標本を同一フィルムとコンタクトすることにより比較することにし、目標は各々の臓器をその特性を最もよく表示し得る角度でそれぞれ切片を作り、臓器内とくに神経系での分布の微細構造をしらべる点に留意したことと、第2の目標として、従来と全く問題になった臓器中に含まれる血液中のキノホルムのこれらのオートグラムへの寄与の問題をあきらかにする点に留意した。

##### 1) $^{131}\text{I}$ 標識人血清アルブミンによる実験

体重  $3\text{Kg}$  の雑犬に  $5\text{mCi}$  の  $^{131}\text{I}$  標識人血清アルブミンを静注し9分後に  $\text{KCl}$  の静注で殺し、全身の各臓器を摘出し、マクロオートグラフィを行い臓器内の正常血液分布をしらべた。結果の1例として、腎の場合についてキノホルムの分布と比較して示したものを第10図に示す。

背髄断面での血液分布、脳内での血液分布などがこの方法によりあきらかにされた<sup>5)</sup>

##### 2) $^{131}\text{I}$ 標識キノホルムによる実験

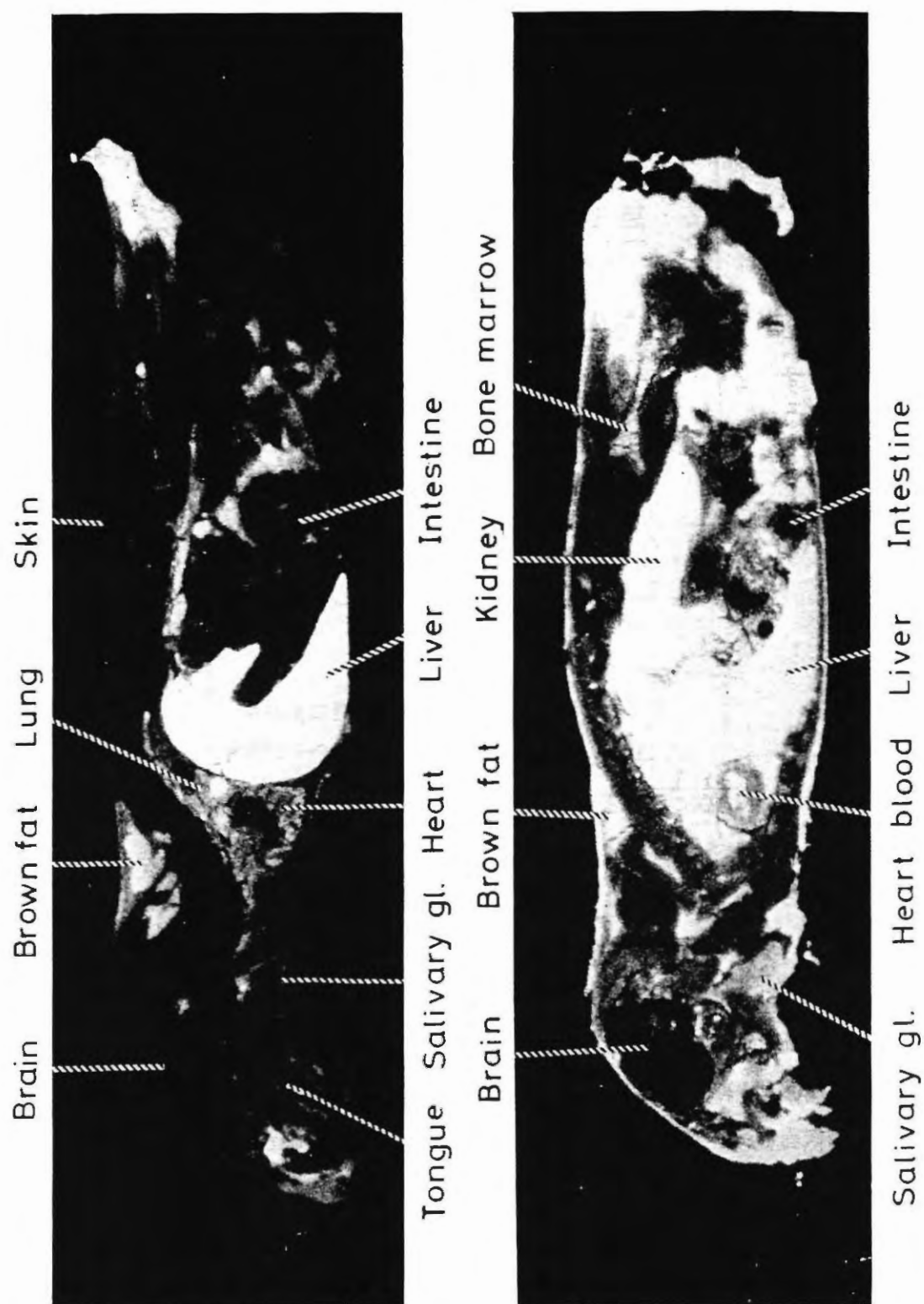


図7  $^{131}\text{I}$ 標識キノホルムによるマウスの全身オートラジオグラム  
( $4.5\text{mg/Kg}$  静注後1時間)

- a 正中を通る矢状断
- b 左側を通る矢状断

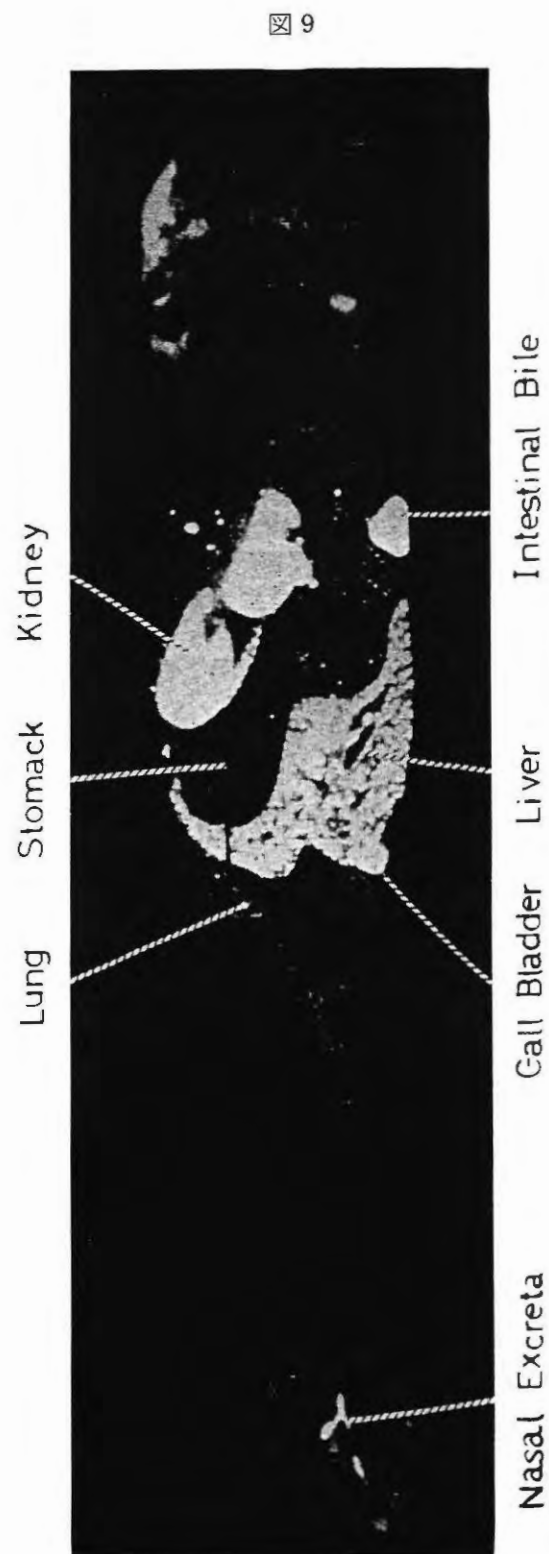
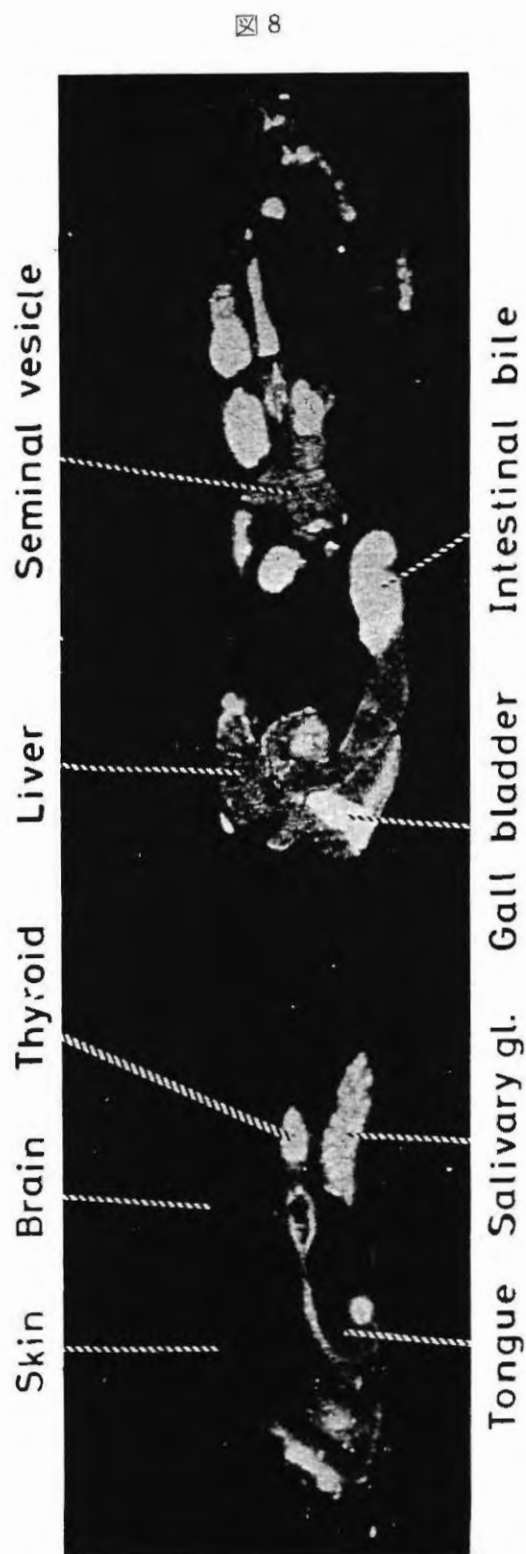
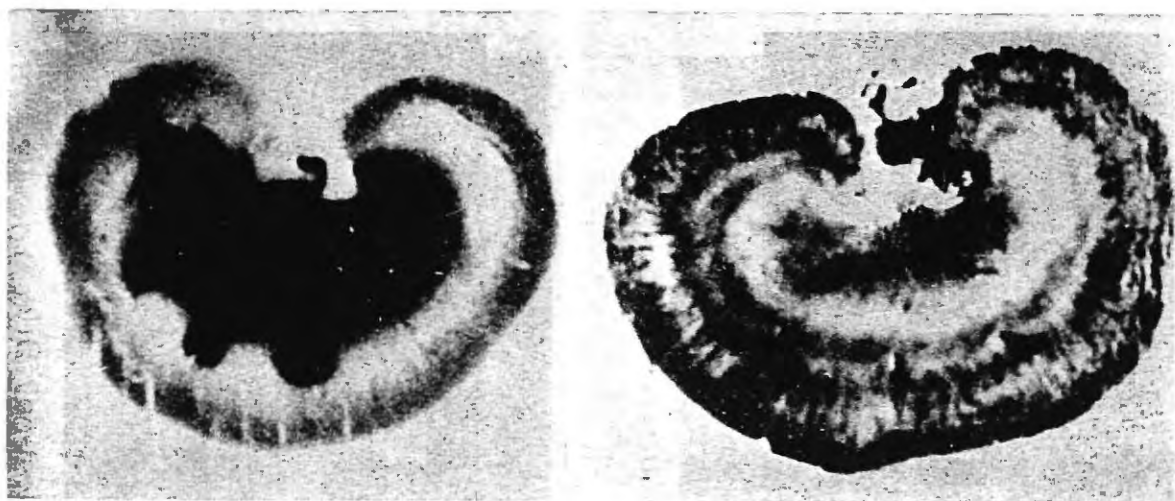


図 8  $^{131}\text{I}$  標識キノホルムによるマウスの全身オートラジオグラム  
( $60\text{mg/Kg}$  腹腔内注射後 4 時間)

正中を通る矢状断面

図 9  $^{14}\text{C}$  標識キノホルムによるマウスの全身オートラジオグラム  
( $45\text{mg/Kg}$  静注後 1 時間)



a. b.

図 10 イヌの腎臓のマクロオートラジオグラム

a  $^{131}\text{I}$  標識キノホルム (  $10\text{mg/Kg}$  腹腔内投与後 24 時間 )

b RISA ( 静注後 10 分 )

4 Kgの雑犬(♂)および6 Kgのビーグル犬(♀)にそれぞれ5 mCiの $^{131}\text{I}$ 標識キノホルムをオリーブ油に溶解したものを腹腔内投与し投与後24時間後に殺して各臓器を摘出し、凍結標本を作った。また観察中に経時的に採血採尿を行い、また解剖に際して胆嚢から胆汁を採取し、それぞれ放射能を測定した。

これらの結果を総括して概要を述べると次のごとくである。まず血中濃度は投与後 3 時間から 24 時間までほぼ一定に、しかも予想以上に低い値に保たれていたのに反し、胆汁中の濃度は 2000 倍近い値を示した。

臓器相互の濃度の比較では大体マウスで観察されたものと同じであったが、特に注目されたのは視神経と共に摘出された眼球の断面が非常に高い黒化を示し、とくに網膜に高くその他の虹彩毛様体、水晶体辺縁部、など眼球のほとんど全部にわたって分布することが第 11 図の如く示された。背髄縦断面のオートグラムでは背髄神経根に高いとりこみが示されるなど神経系に関してかなり興味ある知見が得られたがこれらの詳細は別の報告<sup>5,7)</sup> および協同研究者の豊倉の報告を参照されたい。

これらの知見はいづれもビーグル犬の実験によって更に確認された。

## 8.サルにおける全身オートラジオグラフィによる分布の検討

約600gのカニクイザルに300μCiの<sup>14</sup>C標識キノホルムをオリーブ油に溶解したものを腹腔内に投与し、24時間後に殺して全身オートラジオグラフィを行い、全身分布に関する動物差を検討した。本実験は現時点でまだ終了しておらず今後の検討が続けられる予定であるが、今迄の結果はマウス、イヌにおいて認められたものとは矛盾しなかった。ここでは胆嚢および消化管内胆汁に最大のとりこみを示すオートグラを第12図としてかかげるにとどめる。大量のオリーブ油を投与したため24時

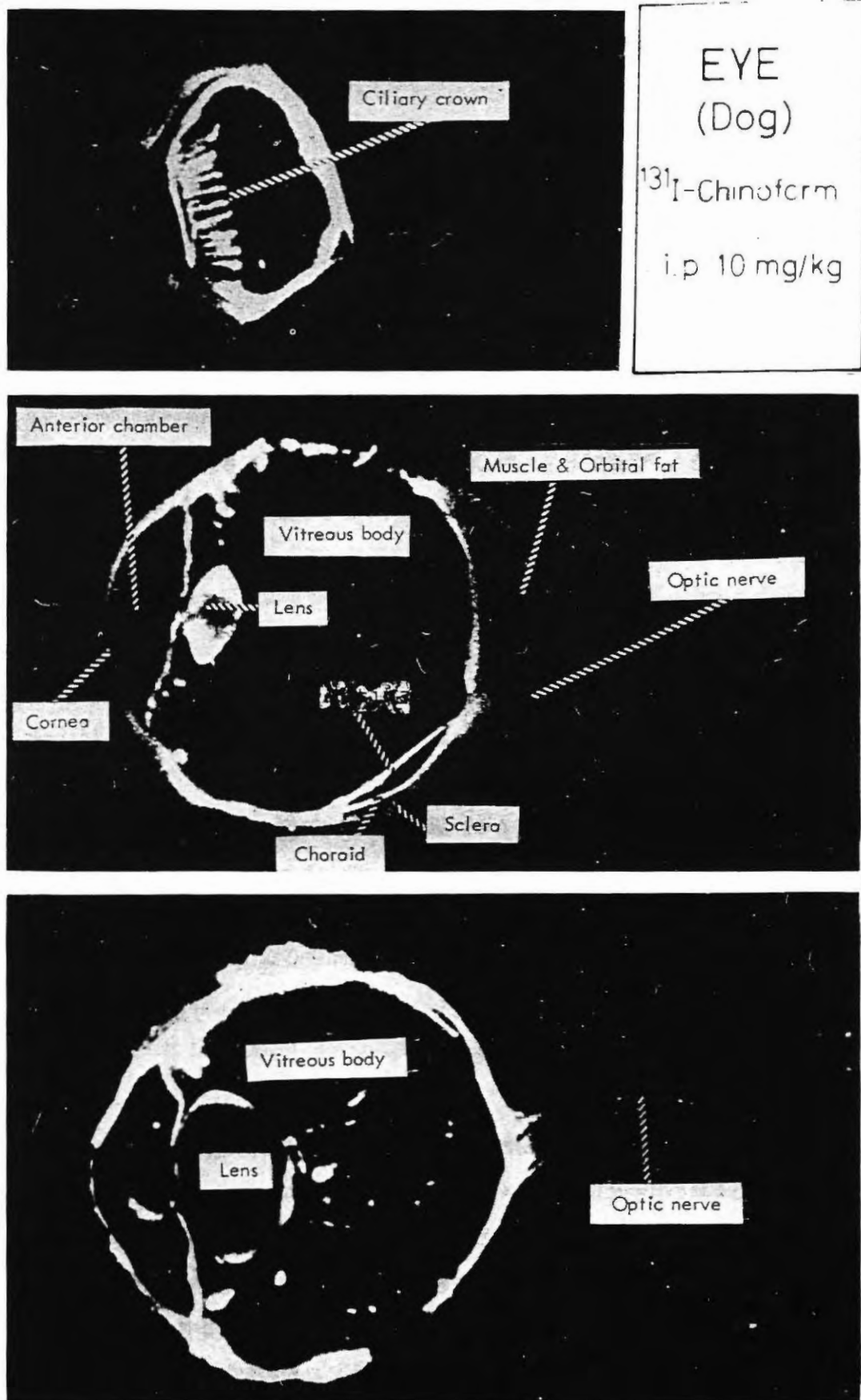


図 11 イヌの眼球および視神経における  $^{131}\text{I}$  標識キノホルムの分布



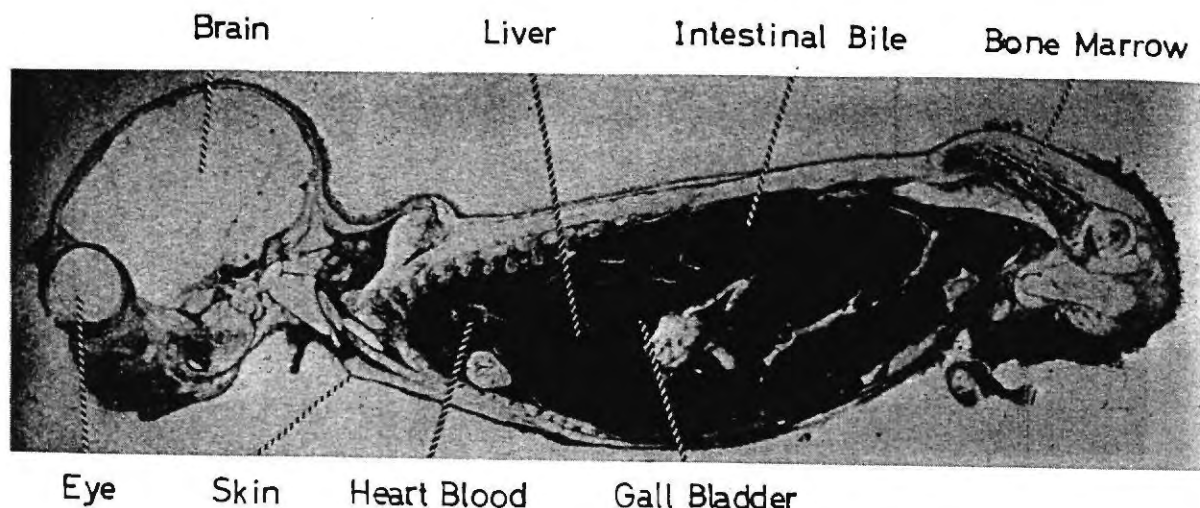


図 12  $^{14}\text{C}$  標識キノホルムによるサルの全身オートラジオグラム

間では腹腔内にオリーブ油の残存をみとめたがキノホルムはその部分からほとんど完全に消失していることが注目された。

#### 9. マウスにおける臓器分布の時間的变化

臓器分布の時間的推移に関してはすでに $^{131}\text{I}$  標識および $^{14}\text{C}$  標識キノホルムによるマウスの全身オートラジオグラフィによって定性的にはほぼ推定されているが、定量的なデータを得るために、マウスに $^{14}\text{C}$  標識キノホルムをオリーブ油に溶かして腹腔内投与し、1 時間後、6 時間後、24 時間後、2 日後、7 日後に各点 6 匹づつを殺して、組織をとりだし、ソルエン溶解法により液体シンチレーション計測を実施した結果は第 13 図の如くである。臓器によって肝臓のように最初のとりこみが高いと急速に減少するものと坐骨神経のように最初は低いとその値があまり減少しないものがあることがわかった。また坐骨神経は常に血液よりも高濃度で、しかも脳にくらべると一桁以上高い値を常に保っていることがあきらかになりキノホルムの末梢神経への特別な親和性が $^{131}\text{I}$  標識のみでなく $^{14}\text{C}$  標識でも確認された<sup>4)</sup>。1 週間以後の経時的变化に関しては現在 3 ケ月までの検討を続けているが最終的データのまとめがまだ終わっていないので今後の報告にゆずる。

#### V. 考 察

水に難溶のキノホルムを如何なる形で動物に投与するかが本研究の開始にあたっての最初の問題点であった。このため実験の目的に応じて種々の投与剤型がこころみられた。水に難溶のキノホルムにもかかわらず、いずれの投与剤型でもかなりの吸収率を示すことがあきらかにされたことは、すでに吸収を示すいくつかの定性的な報告が外国文献にあるにもかかわらず改めて考えさせられた。しかもこの高い吸収率が比放射能の高い $^{131}\text{I}$  標識化合物によって始めてヒトの常用量附近の投与量での吸収測定が可能になったもので、感度の悪い測定法を用いる場合は必然的に高い投与量を用いることになり、そのためいちじるしく低い吸収率を推定する危険性があることをこのデータは示している。キノホルムの連用によって吸収率が変化しないことがみとめられたことは、連続投与が通常の薬物だけに

要性が理解される。

全身オートグラフィの所見および胆汁の測定から肝胆汁系へ移行することはあきらかであるが、他の研究者によってその大部分がグルクロナイド抱合している、或は硫酸抱合しているとすでにあきらかにされている。胆汁中に排泄されたキノホルムが果して再吸収されるか否かを実際にマウスに経口投与して吸収をしらべた結果、通常のキノホルムにはおとるがかなりの吸収率を示したことにより肝腸循環が確実に立証された。このことは坐骨神経などのおそいとこみ、おそい排泄の臓器へのキノホルムの蓄積には重要な意味をもつものと考えられる。

各種の動物の全身オートラジオグラフィおよび種々の臓器のマクロオートラジオグラフィによって通常の組織の放射能分析では解析または発見が困難な情報が多数得られたことは、全身オートの意味および各種の研究法を組合せることの重要性をはっきり認識させた。一つは組織の放射能分析の前の General survey としてどの臓器が問題であるかを、通常は測定項目に入らない多数の臓器のとりこみをあきらかにし、鼻腔内、坐骨神経、三叉神経、背髄神経等のとりこみをあきらかにし得た。もう一つは、イヌにおける摘出臓器のマクロオートグラフィにより臓器内における分布の不均一性をあきらかにし、背髄神経根や節の背髄にくらべて著しいとりこみ、視神経にくらべての眼球の各部とくに網膜への高いとりこみなどはこの方法によって始めてあきらかにし得たものである。サル全身オートグラムにおける腹腔内残存オリーブ油の中から  $^{14}\text{C}$  標識キノホルムが完全に移行している様子などもこの方法によってのみあきらかにし得たものであった。

本研究で得られた以上の実験結果はスモンの病因としてキノホルムの中毒症であると仮定した場合にも、特別の大きな矛盾はなく、かえって、代謝、分布の形態はキノホルム中毒症として説明するのに有利な点が多くあることがあきらかになった。

しかし以上の研究はすべて正常状態の実験動物についてなされたものであることは、スモンの臨床的見地からは前駆症状としての消化症状のある病的状態で投与されていることを考えると、今後は各種の病的状態での代謝研究が望まれるし、反復投与による抱合能の変化、他の酵素係の変化等を考えると、長期反復投与による代謝研究が今後期待されるが、ヒトと実験動物の生物学的時間の相異に由来する投与間隔、投与期間の設定、その他アイソトープ取扱上の技術的困難など、反復投与の実験には多くの問題が残されているが、今後の努力による解決が期待される。

## Ⅵ. 結 論

スモンとキノホルム代謝との相関関係をしらべるため、マウス、ラット、イヌおよびサルの4種の動物に  $^{131}\text{I}$  標識および  $^{14}\text{C}$  標識のキノホルムを各種の投与剤型および各種の投与経路で与え、代謝、分布を検討した。

標識キノホルムはどの投与剤型、どの投与方法でもよく吸収され、体内の各臓器へ分布することがわかった。肝胆道系と腎臓などの排泄系が高く、中枢神経系には非常に低いとりこみに対し、坐骨神経等の末梢神経にはかなりの高いとりこみが投与後、ある程度の時間の経過のちには他の組織にくらべ

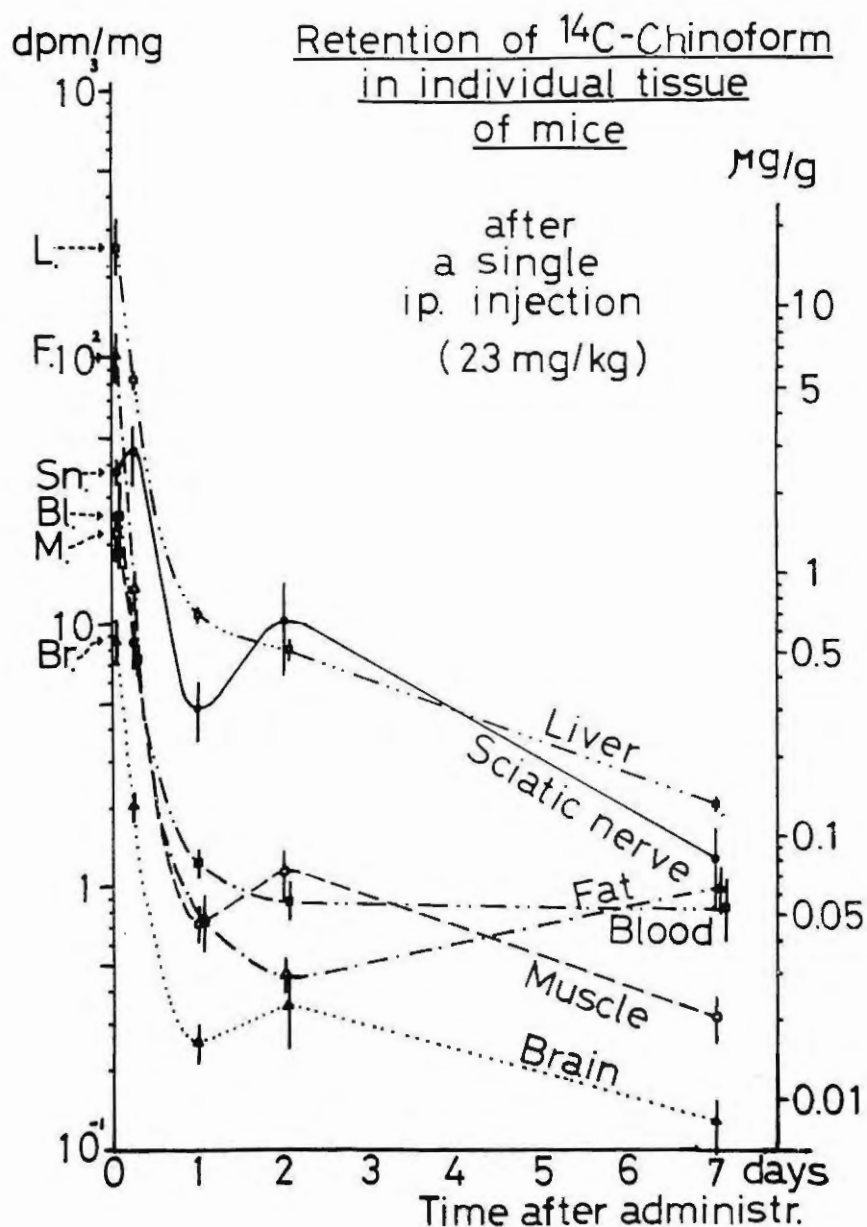


図 13 マウスの臓器における  $^{14}\text{C}$  標識キノホルムの分布の変化

慢性蓄積につながる現象として意義があると考えられる。全身滞留率の時間的变化に関する検討の結果はいづれの投与法でも最初の1～2日の速い減少の成分とそれにつづく非常にゆっくりと減少する成分にわけられ、経口投与の場合の全身滞留率の投与量による変化は、吸収率の変化と、初期の減少の程度が投与量によって変化するためと考えられた。したがって大量投与によって排泄のおそい部分のレベルは比例的ではないが上昇することがあきらかになった。キノホルムの連続投与によっては吸収率は変化しないが、初期の急速排泄部分が常水投与のものにくらべて促進されることは、実験動物による中毒再現に漸増法が用いられているのと考ええると興味があふかい、またヒトではもともと下痢等の消化管の前駆症状があつて投与され、症状が治ゆし、更に便秘等に移行するのと考ええると漸増法の必

て有意に示されることがわかった。

マウス、イヌ、サルの3種の動物についてオートラジオグラフィを実施した結果はキノホルムの分布に本質的な動物差はみとめられなかった。またイヌにおけるマクロオートラジオグラフィにより臓器内分布の微細構造があきらかにされ、とくに眼球と視神経に対するキノホルムの特異なとりこみの関係、背髄と背髄神経根や節の関係など、この方法によってのみ可能な情報が得られた。

ラットとマウスを用いての実験からキノホルムの肝腸循環が立証された。

以上の結果はスモンの病因としてキノホルムを考える場合に特別な矛盾はなく、むしろよく支持すると考えられる。しかし本研究がすべて正常動物によって行われたことは、スモンの場合の消化管の前駆症状のある病的状態に投与されたことに対応する実験的検討と、長期反復投与の場合の代謝、分布の変化検討が今後の問題点として残されている。

#### 文 献 (原著および総説)

- 1) 松岡理, 永沼真理子, 高須俊明: 全身オートラジオグラムの解釈に影響する要因の研究, I 標識元素の種類にもとづく影響, (1)  $^{131}\text{I}$  標識と  $^{14}\text{C}$  標識の場合の比較, Radioisotopes(1972), 21, 23
- 2) 松岡理: 代謝研究と放射能計測(1), 放射線科学(1971)14, 149, 代謝研究と放射能計測(II), 放射線科学(1971), 14, 172.
- 3) 松岡理: 全身オートラジオグラフィ最近の進歩, 臨床科学(1972), 8, 89.
- 4) 高須俊明, 豊倉康夫, 松岡理: 放射性標識によるキノホルムのマウス体内分布および代謝の研究, 医学のあゆみ(1971), 79, 25.
- 5) 高須俊明, 豊倉康夫, 松岡理: イヌにおける  $^{131}\text{I}$  標識キノホルムの分布および代謝 とくに網膜および視神経への摂取, 医学のあゆみ(1971), 79, 75.
- 6) 高須俊明, 豊倉康夫, 松岡理: キノホルム (5-Chloro-7-Iodo-8-Hydroxy-Quinolone) の神経系に対する作用機序の研究 第1報  $^{131}\text{I}$  標識キノホルムのマウス消化管からの吸収, 全身滞留, および分布, 臨床神経学(1972), 12, 131.
- 7) 高須俊明, 豊倉康夫, 松岡理: イヌの神経系への  $^{131}\text{I}$  標識キノホルムの摂取, 医学のあゆみ(1972), 81, 397.
- 8) 松岡理, 高須俊明, 豊倉康夫: 胆汁排泄キノホルムの消化管からの吸収(肝腸循環の実証), 医学のあゆみ(1972), 81, 509.

#### 本協議会における発表

##### I) 昭和45年度第3回総会(昭和46年3月2日)

$^{131}\text{I}$  標識キノホルムのマウス体内滞留および分布

高須俊明, 中西孝雄, 豊倉康夫(東大脳研神経内科); 松岡理, 栗栖明, 池上四郎(放医研)

##### II) スモン調査研究協議会研究報告書 No.2 臨床班報告書, 昭和46年3月, 159-173頁

SMONの臨床, 神経病理ならびに病因に関する研究

豊倉康夫

##### III) キノホルム部会第1回研究会(昭和46年7月24日)

1.  $^{14}\text{C}$  標識キノホルムによるキノホルムの生体内分布および代謝の研究, ならびに  $^{131}\text{I}$  標識の場合との比較

- 高須俊明，豊倉康夫（東大脳研神経内科）；松岡理（放医研）
2. イヌにおける放射性キノホルムの分布および代謝の研究（第1報）  
高須俊明，豊倉康夫（東大脳研神経内科）；松岡理（放医研）
3. イヌにおける I 標識キノホルムの臓器内分布（マクロオートラジオグラフィ）  
高須俊明，豊倉康夫（東大脳研神経内科）；松岡理（放医研）
- IV）キノホルム部会第2回研究会（昭和46年12月15日）  
標識キノホルムによる代謝分布の研究（第3報）
1. 消化管からの吸収，および組織内分布に関する補遺  
高須俊明，豊倉康夫（東大脳研神経内科）；松岡理（放医研）
2. 投与量および長期投与の全身滞留率に及ぼす影響  
松岡理（放医研）；高須俊明，豊倉康夫（東大脳研神経内科）
3. 胆汁排泄キノホルムの再吸収に関する検討  
松岡理（放医研）；高須俊明，豊倉康夫（東大脳研神経内科）
4. イヌにおけるキノホルムの分布代謝，とくに神経系への摂取  
高須俊明，豊倉康夫（東大脳研神経内科）；松岡理（放医研）
- V）キノホルム部会第3回研究会（昭和47年2月28日）  
標識キノホルムによる代謝分布の研究（第4報）  
投与量および長期投与の吸収率に及ぼす影響  
松岡理（放医研）；高須俊明，豊倉康夫（東大脳研神経内科）

### 36. キノホルム糖尿病家兎の作製（繰返し静注）

三好 和夫      大音 康郎      小松 光一  
武田 喜久子      八木田 正聖      松岡 崇人

（徳島大・医・第1内科）

著者らはさきに、実験的糖尿病惹起物質であるオキシシン（8-hydroxy quinoline）とキノホルムが化学構造式においてきわめて類似していることより、実験的に家兎にキノホルム60 mg/kg体重1回静注して糖尿病を作製することに成功し、キノホルムに糖尿病惹起作用のあることを明らかにした。（三好ら，1971a, b）また、同時に主に末梢神経障害のみられることを示した（三好ら，1971a, b）。

今回は家兎にキノホルムとオキシシンを長期間歇投与を行ったときの糖代謝異常と神経障害を検索した。

#### I 動物と実験方法

実験動物には2.4～4.5 kgの家兎を用い、キノホルム群とオキシシン群の2群に分け、長期繰返し静注し、状態を観察しながら血糖値を追跡測定した。

用いたキノホルムはエマホルム（iodochlorhydroxy quinoline 90%+carboxymethylcellulose 10%）で、これを浄水に略々1.0%に混入したものを用い、オキシシン（8-hydroxy quinoline，和光純薬製，特級）は純水に1.0%の割合に混入し、溶解を容易にするため純水100 mlに30滴の割合で1 N HCl を加えた。これらキノホルム，オキシシンの略々1.0%静注液を体重1 kgにつき30 mgの割合で約1週間に1回，長期繰返し静注した。

#### II 実験成績

動物の状態経過。家兎は、キノホルム60 mg/kg1回静注のときとはことなり、キノホルム，オキシシン注射直後に不安様となったり，元気を失ったりはしない。低血糖症状や48時間後における高血糖等はみられず，平常と余り変化がないようにみられた。キノホルム静注家兎では体重はむしろ増加の傾向にあった。しかし，オキシシン静注のものの1羽（%5）は経過中体重減少，脱毛をみとめた。

他の1羽（%6）は体重に変化なく，脱毛等もみとめていない。

神経症状については，明らかな運動麻痺はみとめられないが，経過の途中ではキノホルム，オキシシン静注家兎とも一部の動物では不活発で，とくにオキシシン静注%5は両下肢の脱力が疑われた。

血糖値の変化，キノホルム静注家兎Kでは，キノホルム30 mg/kg静注4回30日後で血糖150 mg/dl，37日（5回静注後）157 mg/dlと高く，さらに81日（10回静注後）154 mg/dl，12回静注後，95日で246 mg/dlと上昇している（表1，図1）。家兎Iでもほぼ同様の傾向がみられる（表1，図1）。

オキシシン30 mg/kg毎週静注家兎，%5，%6では注射後24時間で低血糖等はみられず，11回



| Rabbit | Sex | Initial<br>body<br>weight<br>(kg.) | Doses of chionoform<br>mg/kg (injected week—<br>ly in vein) | Before<br>injec—<br>tion | Blood sugar (whole blood)mg/dl |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--------|-----|------------------------------------|-------------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|        |     |                                    |                                                             |                          | Days after injection           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|        |     |                                    |                                                             |                          | 7                              | 14  | 22  | 30  | 37  | 46  | 54  | 63  | 72  | 79  | 85  | 93  | 100 | 107 | 115 | 126 |
| I      | ♂   | 4.2                                | 30                                                          | 56                       | 90                             | 102 | 88  | 136 | 106 | 102 | 96  | 99  | 105 | 107 | 103 | 103 | 212 | 91  | 133 | 198 |
| K      | ♂   | 4.3                                | 30                                                          | 80                       | 65                             | 80  | 120 | 150 | 157 | 134 | 109 | 120 | 70  | 154 | 160 | 246 | 232 | 106 | 94  | 157 |

表1 Chionoform 30 mg/kg毎週注射家兎の血糖値の変化

| Rabbit | Sex | Initial<br>body<br>weight<br>(kg.) | Doses of oxine mg/kg<br>(injected weekly in<br>vein) | Before<br>injection | Blood sugar (whole blood)mg/dl |     |    |     |     |     |    |     |    |     |
|--------|-----|------------------------------------|------------------------------------------------------|---------------------|--------------------------------|-----|----|-----|-----|-----|----|-----|----|-----|
|        |     |                                    |                                                      |                     | Days after injection           |     |    |     |     |     |    |     |    |     |
|        |     |                                    |                                                      |                     | 1                              | 8   | 17 | 24  | 30  | 38  | 45 | 52  | 60 | 71  |
| No. 5  | ♂   | 2.5                                | 30                                                   | 74                  | 97                             | 86  | 87 | 91  | 94  | 88  | 66 | 100 | 72 | 71  |
| No. 6  | ♂   | 2.5                                | 30                                                   | 65                  | 68                             | 106 | 68 | 123 | 100 | 100 | 64 | 100 | 92 | 104 |

表2 Oxine 30 mg/kg毎週注射家兎の血糖値の変化



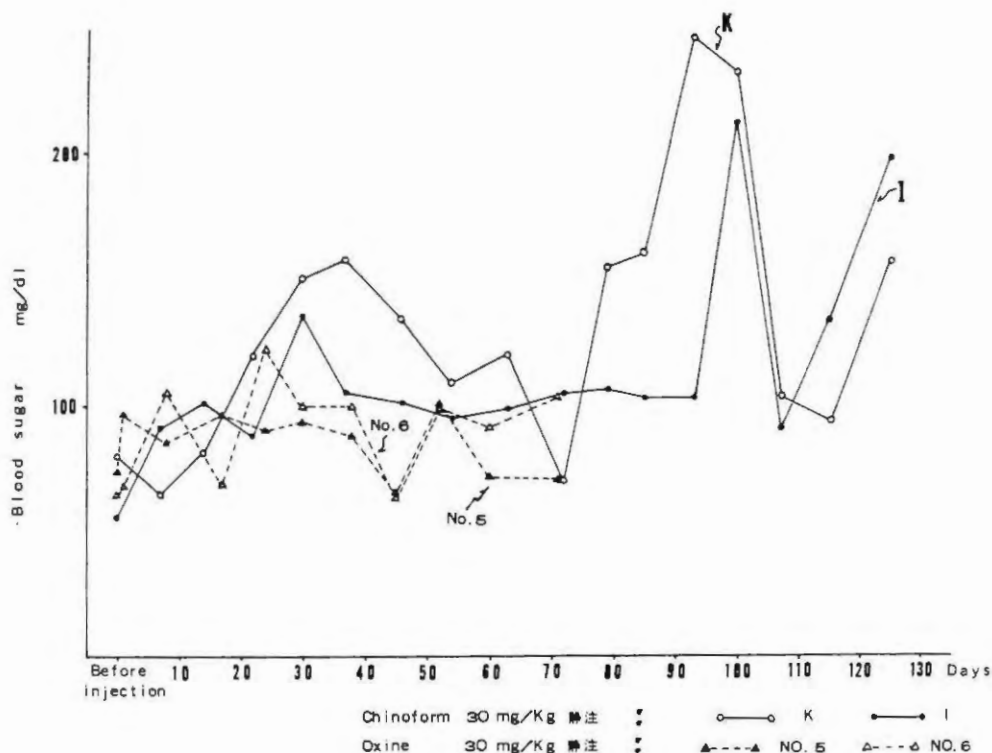


図1 Chinoform 30 mg/kg毎週静注家兎およびoxine 毎週静注家兎の血糖曲線  
静注，67日間で高血糖はみられていない（表2，図1）。

### Ⅲ 総括と結論

家兎にキノホルム，オキシシンそれぞれ体重1 kg 30 mgの割合で毎週，繰返し静注した。

キノホルム静注家兎では間歇少量投与でも30日後に一過性の高血糖，静注10回79日で154 mg/dl，85日で160 mg/dl，93日246 mg/dlと血糖の上昇をみとめた。

オキシシン静注家兎では10回静注70日間の観察では高血糖をみとめえなかった。

神経症状についてはオキシシン，キノホルム静注家兎とも明らかなものはみとめなかったが，一部は不活発で，オキシシン投与No.5では下肢の脱力が疑われた。

キノホルムとオキシシンの分子量はキノホルムがオキシシンの約2倍であり，同じg数の投与であるとモル濃度ではオキシシンがキノホルムの約2倍量となる。しかるに，キノホルム30 mg/kg長期間歇投与で高血糖がみとめられ，オキシシンの同量投与ではみとめられない。すなわち，キノホルムのdiabetogenic actionはオキシシンのそれより強度であることが推定される。

なお，キノホルム投与家兎では神経症状の存在が確認できなかったが，オキシシン投与家兎の1羽で下肢の脱力が疑われた。実験動物の組織学的検索は現在施行中である。

### 文 献

- 1) 三好和夫，大音康郎，中野益弘他6名(1971a)：Chinoformによる実験的糖尿病，四国医誌，27，167～170

- 2) 三好和夫他(1971b) : S M O N 発症と化学物質, スモン調査研究協議会報告書, №. 2, 臨床研究報告, 200 ~ 203.
- 3) 三好和夫, 大音康郎, 松岡崇人他9名(1971) : Chimoform 中毒症にみられる糖代謝異常と尿中M M A 排泄, スモン調査研究協議会, キノホルム部会第1回研究報告書, 4 ~ 5.

### 37. キノホルム糖尿病家兎の尿中メチルマロン酸 (MMA) 排出

三好 和夫      大音 康郎      粟永 篤信

伊勢 浩      八木田 正聖

(徳島大・医・第1内科)

スモンの神経症状が悪性貧血のSCDC (subacute combined degeneration of the cord) と類似し、またスモン患者および糖尿病症例で尿中MMA排出が増加しているという報告がある (右京ら, 1971)。著者らは、著者らの作製したキノホルム糖尿病家兎で尿中MMA排出異常の有無を知ろうとした。

#### I 動物と実験方法

実験動物は2.0～3.0 kgの家兎を用い、キノホルム静注法はすでに発表した方法によった (三好ら, 1971)。

尿中MMAの測定法はイオン交換樹脂にて吸着溶出し、ジアゾ試薬により発色O.Dを測定した (Giorgio, Plaut, 1965)。また併せて薄層クロマトグラフィを用いてチェックした。

#### II 結 果

図Iに、この実験のために作ったキノホルム糖尿病家兎の1例をあげ、尿中MMA測定の時期の関係を示した。

尿中MMAの排出測定は、キノホルム60 mg/kg 1回静注家兎で行ったが、これら家兎ではすでに発表したごとく、キノホルム静注後、初期高血糖ついで低血糖、その後持続性高血糖を来す。尿中MMA測定は、注射前、注射後1～4日の糖尿病発生時、そして注射後10日前後の糖尿病固定時期に行なった。

結果は、主に被検尿量の少量であったことのため、現段階ではつぎのとおりである。

すなわち、キノホルム糖尿病家兎の尿中MMA排出は、△前、△直後 (24時間から4日目まで)、△10日目のいずれも正常家兎と大差なく5～20 mg/l (1日量として2～8 mg/lのレベル) 以上に増量している成績はえられなかった。なお、これらの家兎では、l-Valine 1 g 負荷したものもあるが同じ成績であった被検尿量を増量して検討を行なっている。

#### III 考察と総括

キノホルム60 mg/kg 1回静注家兎には、既報のごとく糖尿病を作製することができるが、尿中MMA排出の特別の増量は、今までの実験では確認できなかった。

しかし、上述のMMA量以下のレベルで差のあることを否定することはできない。また実験家兎は、キノホルム1回静注のものであるので、繰返し投与などキノホルム投与の形や量、期間に関しても検討の要がある。いずれも今後実験を続けて結論をえたい。

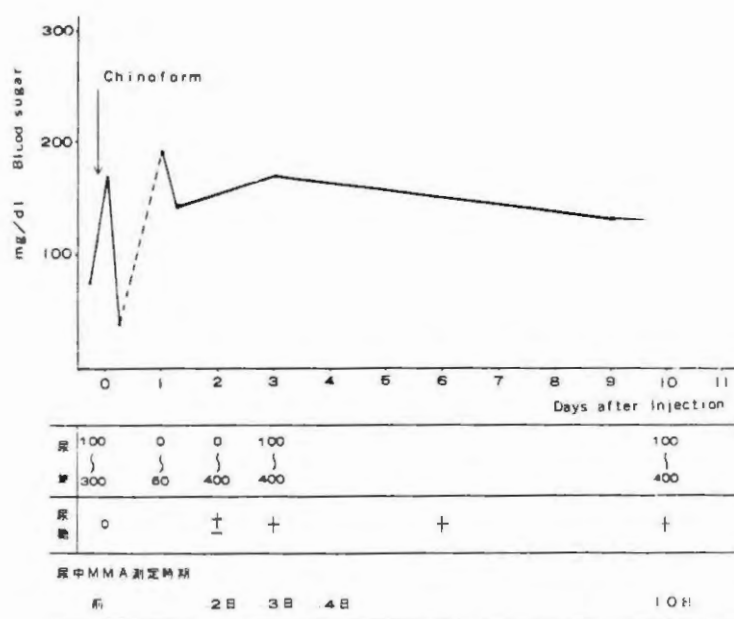


図 I Chinoform糖尿病家兎と尿中MMA量測定時期

#### 文 献

- 1) 三好和夫, 大音康郎, 中野益弘他6名(1971): Chinoformによる実験的糖尿病, 四国医誌, 27, 167~170.
- 2) 右京成夫(1971): ビタミンB<sub>12</sub>代謝よりみたSMONの病態生理とB<sub>12</sub>治療, スモン調査研究協議会報告書, No 2, 臨床班研究報告, 15~24
- 3) Giorgio, A.J., and Plaut, G.W.E. (1965): A method for the colorimetric determination of urinary methylmalonic acid in pernicious anemia, J, Lab, Clin, Med. 66, 667~676
- 4) 三好和夫, 大音康郎, 栗永篤信他4名(1971): キノホルム静注糖尿病家兎の尿中MMA排出, スモン調査研究協議会, キノホルム部会第2回研究報告書, 15.

### 38. キノホルムの carbonic anhydrase (Zn 含有) に対する 阻害効果

三好 和夫    八木田 正聖    武田 喜久子  
大音 康郎

(徳島大・医・第1内科)

私たちは家兎でキノホルム糖尿病作製に成功したのは前述のごとくであるが、キノホルムの dia-  
betogenic action はキノホルムによるラ氏島の Zn キレートによるものと考えられ (三好ら,  
1971), またスモン臨床例でも尿中亜鉛の増加が報じられている (池田ら, 1970)。

これらの事柄からキノホルムは生体内における金属とくに重金属を必要とする反応系に、または金  
属とくに Zn を含有する metalloenzyme にかんがりの影響をおよぼすのではないかと考え、Zn  
含有の metalloenzyme で神経組織に多量に含有される carbonic anhydrase (C.A.)  
に着目し、本酵素活性に対する阻害効果を *in vitro* の実験で観察した。

#### I 試料ならびに実験方法

C.A. はシグマ社製の牛赤血球より抽出されたものを使用し、基質としては重炭酸ソーダ (和光  
純薬) を用いた。キノホルムは Chiba 社製の 100 %キノホルムを使用した。

C.A. の活性測定はワールブルグの検圧計を用い、発生する炭酸ガスの発生速度を測定した。

阻害実験は同一濃度酵素液に、キノホルム生食液を加えたものと、生食のみを加えたものを 38℃  
24 時間 incubate した後、活性値を比較した。

また、キノホルムのキレート能による阻害効果であることを明らかにするために、キノホルム混入  
液に当モルの  $\text{ZnSO}_4$  溶液および Zn を加え、キノホルムのキレート能を滅殺したキノホルム液を  
C.A. 溶液に加え、同様条件で incubate したもののについても活性を測定した。

#### II 実験成績

図 1～4 にその成績を示す。

C.A. に対するキノホルムの阻害効果は 4℃ 24 時間 incubate した場合図 3 のごとく約 33  
%の阻害効果を示す。

同様 C.A. をキノホルムと 38℃ 24 時間 incubate したときは図 4 に示すごとく傾斜となり  
阻害効果は 39 %である。

キノホルムにあらかじめ硫酸亜鉛液を加えて C.A. を incubate したものおよび同様 Zn をあ  
らかじめキノホルムに加えたもので C.A. を incubate した場合の成績を図 3, 4 に示すが、両  
者とも阻害効果はみられていない。

#### III 総括と結論

キノホルムが C.A. に対して阻害効果をもつか否かを *in vitro* の実験で検討し、C.A. 活  
性の阻害されることを認めた。またこれがキノホルムのキレート能に由来するものと考え、キノホル

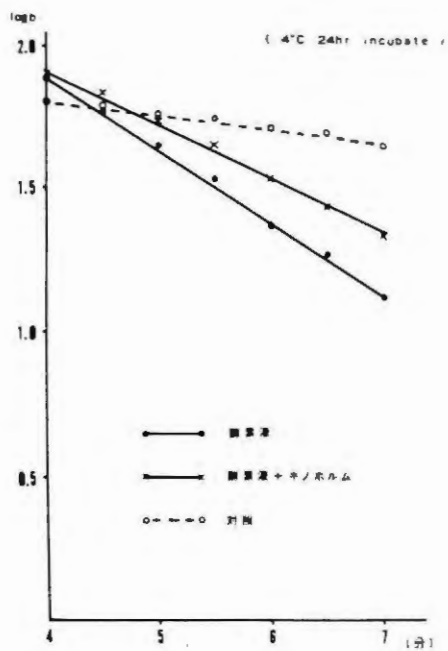


図 1 炭酸脱水酵素活性に対する  
キノホルムの阻害効果

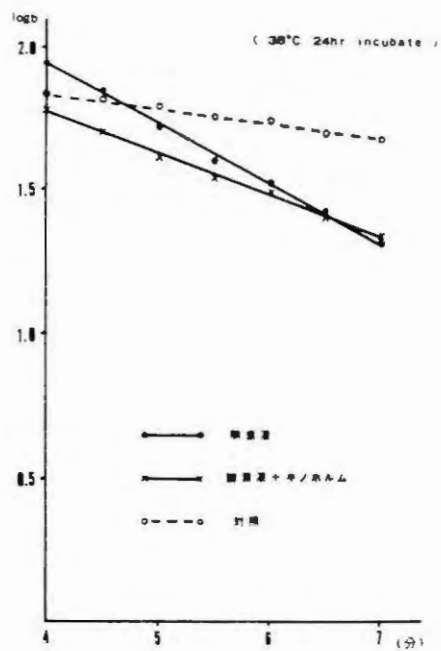


図 2 炭酸脱水酵素活性に対する  
キノホルムの阻害効果

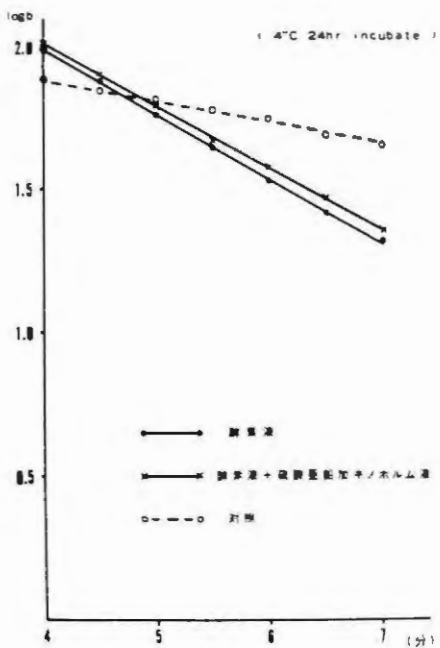


図 3 炭酸脱水酵素に対するキノ  
ホルム硫酸亜鉛液の阻害効果

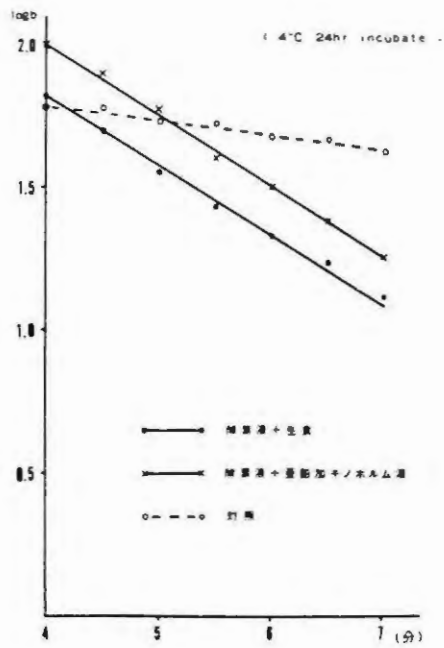


図 4 炭酸脱水酵素活性に対する  
キノホルム亜鉛液の阻害効果

ムのキレート能を  $\text{ZnSO}_4$  および  $\text{Zn}$  で滅殺して阻害効果を検討した。結果は阻害効果をもとめえなかった。キノホルムは metalloenzyme である C. A. に対して軽度によ阻害効果を有し、その阻害はキノホルムのキレート能に由来すると考えた。

これら実験は *in vitro* のものであり、*in vivo* での機序と同一視することはできないが、C. A. は神経組織に多量に存在する酵素であり、何らかの影響を受けるであろうことは充分推定される。神経組織の中でも、その分布は脳とくに、被殻、視床下核等に多く（西村健、1963）、また、脊髄にも存在するとの成績がある（Ashby, 1952）。

文献的にも他の  $\text{Zn}$  含有 metalloenzyme, carboxy peptidase でキノホルムではないが同様キノリン核を有するオキシンでキレートによる阻害効果が認められていること（Vallee, 1955）を併せ考えると、この成績はキノホルムの神経障害の機序解明に一つの手がかりを与えることが考えられる。

#### 文 献

- 1) 三好和夫他（1971）：SMON発症と化学物質，スモン調査研究協議会報告書，No. 2，臨床研究報告，200～203．
- 2) 池田良雄（1970）：スモン患者の尿および舌苔中重金属の分析，厚生省スモン調査研究協議会班会議報告書，昭和45年6月29日
- 3) Vallee, B. L., and Newrath, H. (1955): Carboxypeptidase, a zinc metalloenzyme, J. Biol. Chem., 217, 253～261.
- 4) 西村 健（1963）：抗てんかん剤としての炭酸脱水酵素阻害剤に関する研究，精神神経誌，65, 423～432．
- 5) Ashby, W., Garzoli, R. F. and Schuster, E. M. (1952): Relative distribution patterns of three brain enzymes, carbonic anhydrase choline esterase and acetyl phosphatase, Amer. J. Physiol., 170, 116～170.



### 39. キノホルムの睡眠に及ぼす影響

松 本 淳 治

( 徳島大・医学部・第2生理 )

キノホルムによって末梢神経、脊髓に病理変化の現れることが諸家によって明かにされてきている。そこで、筆者は脳機能のうち、高次神経活動の背景的条件と考えられる睡眠に対して、キノホルムが如何なる効果を示すかについて検討し、さらにキノホルム長期投与の生殖、遺伝などの行動に対する影響について観察を行なった。

#### I. 実験方法

Wistar系、雄ダイコクネズミ(270-380g) 28匹を用い、急性実験と慢性実験に分けて行なった。行動についてはさらに同系、雌雄のダイコクネズミ(145-220g) 14匹を加えて観察を行なっている。

1. 急性実験: Nembutal (35 mg/kg) 麻醉下に手術を行ない、既報の方法に従い、前頭、後頭部脳波、眼球運動、筋電図、呼吸曲線を慢性的に記録できるようにした。<sup>1)</sup>

手術後、10日以上を経た動物の尾静脈に、1/4注射針を用いて生理的食塩水2.0ccを注射したものを対照群とした。キノホルムとしてはエマホルム剤を用い、キノホルム量に換算して60 mg/kgの量に、生理的食塩水2.0ccを加えた(約1%)懸濁液としたものを尾静脈に注射した。また8-オキシキノリン、およびその硫酸塩を同様に注射した。

セロトニンの前駆物質である5-HTPは50 mg/kgにして同じく生理的食塩水2.0ccにとかし、キノホルム静注後、ただちに腹腔内に注射した。

動物は防音防電箱において、行動、摂食、摂水を自由にしておき、注射後24時間のポリグラムを記録し、覚醒、徐波睡眠(SS)、逆説睡眠(PS)に分けて、24時間内に発現したSS、PSの総量、および6時間毎、あるいは1時間毎のそれぞれの量について、実験群と対照群を比較検討した。

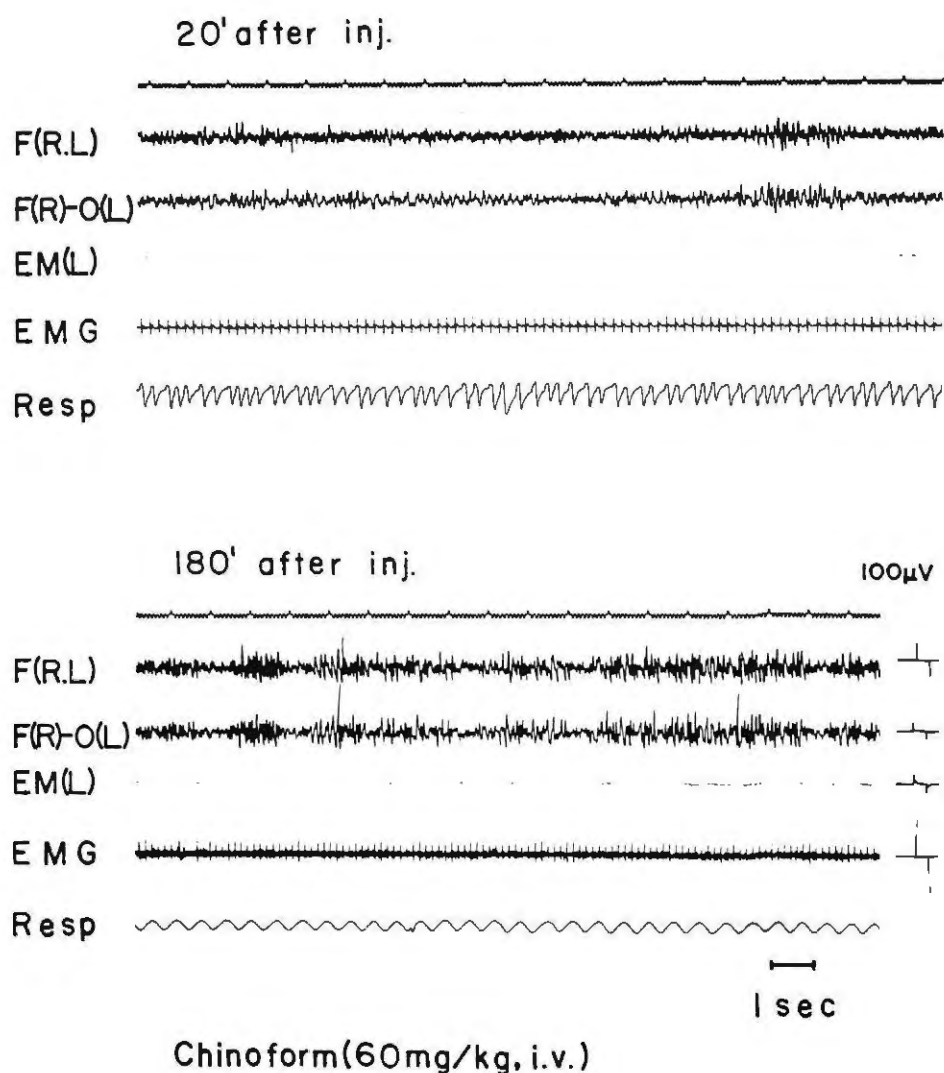
2. 慢性実験: ネラトン・カテーテル(3号)の先端5.0cmを、短かく切断した1/2注射針に緊縛固定し、生理的食塩水2.0ccを毎日1回注腸したものを対照群(3匹)とし、実験群(3匹)としてはキノホルム(90 mg/kg)に生理的食塩水2.0ccを加えたものを同様に注腸した。

注腸開始2月後に、急性実験と同様に手術を行ない、慢性的にポリグラムを記録できるようにし、注腸後24時間の睡眠量について、実験群と対照群を比較検討した。

3. 行動: 慢性実験動物については、注腸毎に体重を測定し、注腸開始(昭和46年1月29日)よりポリグラフ用手術を行なった3月18日まで約2月にわたって摂食、摂水量、糞便数を調べ、同年12月24日より、生存した実験群の1例、対照群の2例に雌ネズミを2匹ずつ交配させてそれぞれの出産回数、異常仔分娩の有無などについて観察した。同時に新しい雌雄ネズミについてもキノホルム注腸群、非注腸群について同様のことを調べ現在にいたっている。

## II. 実験成績

1. 急性実験：キノホルム静注後，動物はしばらく安静状態になるが，その状態は睡眠ではなく，第1図に示すように脳波は低振幅になり，筋電図はほとんど消失し，呼吸は不規則，促迫状になり，いわゆる脱力状態にあるとみなされる。その後，しだいにSSが散発し，連続したSSは3時間後にいたって明瞭に認められている。



第1図．キノホルム静注後，20分，180分におけるポリグラム（上より前頭部，前－後頭部脳波，項筋筋電図，呼吸曲線）

キノホルム静注例では，SS/TT（TT：24時間）は対照群に比較して有意に減少しており（ $P < 0.01$ ），PS/TTも減少傾向を示しているが，その差は有意ではなかった。8-オキシキノリン硫酸塩ではSSのみ有意に減少しているが（ $P < 0.02$ ），キノホルムほどではなく，またPSには影響は見られなかった（第1表，2，3）。

しかし，8-オキシキノリンそのもの（30mg/kg）の静注，およびキノホルム60mg/kgの腹腔

内注射では、24時間におけるSS, PSの出現量には変化は認められなかった。

つぎに、キノホルム(60mg/kg)静注後、ただちに5-HTP(50mg/kg)を腹腔内に注射した場合には、キノホルム単独によるSSの減少, PSの減少傾向はいずれも除かれている(第1表4)。この際、キノホルム単独例(第1表3)と、キノホルム+5-HTP例(第1表4)との間におけるSS/TT値の差は有意であった( $P < 0.05$ )。この関係はさらに1時間毎の睡眠量の変化について見れば明らかとなり、その1例は第2図である。すなわち、キノホルム単独投与例ではとくに注射後6時間内のSSは抑えられ、PSは12時間後にはじめて現われているが、同動物に対してキノホルムと5-HTPを投与した際にはSSの抑制は除かれ、PSの発現も促進されている(第2図)。

第1表・キノホルムその他を投与した際の睡眠量の変化(本文参照)

|   | Drug                   | Dose                           | No | SS/TT       | PS/TT (%) | PS/TS     |
|---|------------------------|--------------------------------|----|-------------|-----------|-----------|
| 1 | Saline                 | 2.0cc, i.v.                    | 4  | 43.1±1.36   | 10.2±1.32 | 19.2±2.63 |
| 2 | 8-Oxychinoline sulfate | 60mg/kg, i.v.                  | 4  | 38.0±2.79*  | 9.8±3.84  | 20.0±6.65 |
| 3 | Chinoform              | 60mg/kg, i.v.                  | 6  | 31.1±5.93** | 6.8±3.49  | 17.3±5.52 |
| 4 | Chinoform + 5-HTP      | 60mg/kg, i.v.<br>50mg/kg, i.p. | 4  | 40.8±3.35   | 8.9±1.92  | 17.9±1.33 |
| 5 | Saline                 | 2.0cc, p.a.                    | 4  | 45.8±3.1    | 9.6±1.03  | 17.4±2.31 |
| 6 | Chinoform              | 90mg/kg, p.a.                  | 5  | 35.7±4.97** | 9.0±1.26  | 20.3±3.0  |

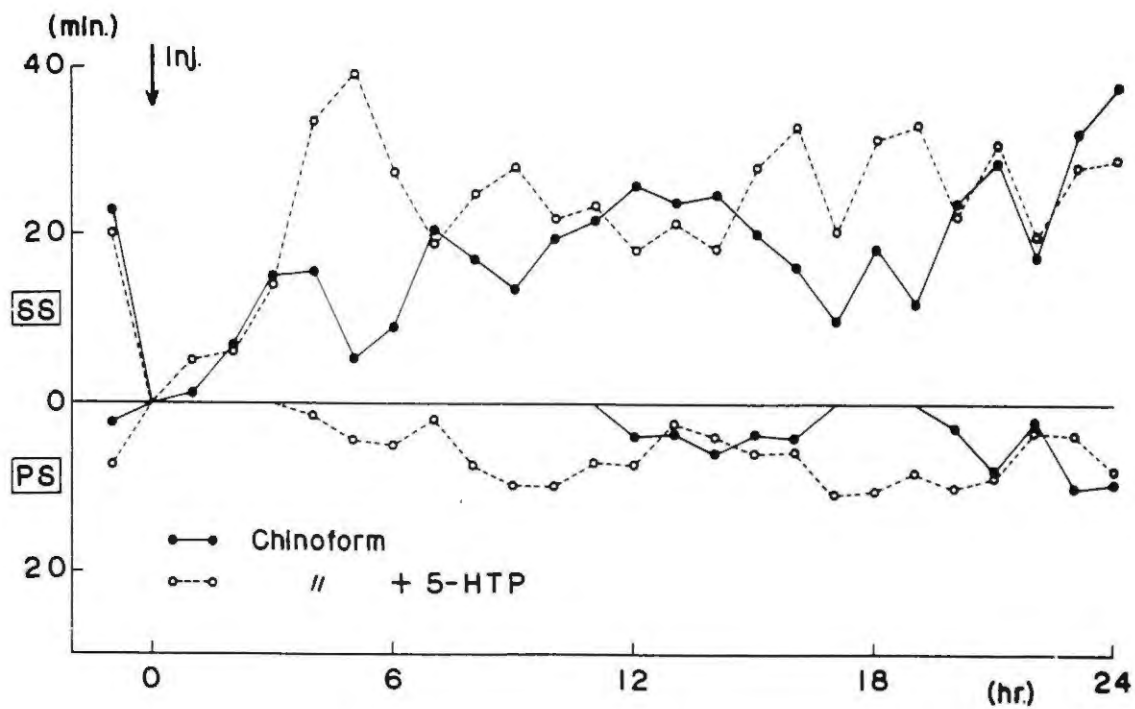
\* :  $P < 0.02$       \*\* :  $P < 0.01$

TT: 24hrs

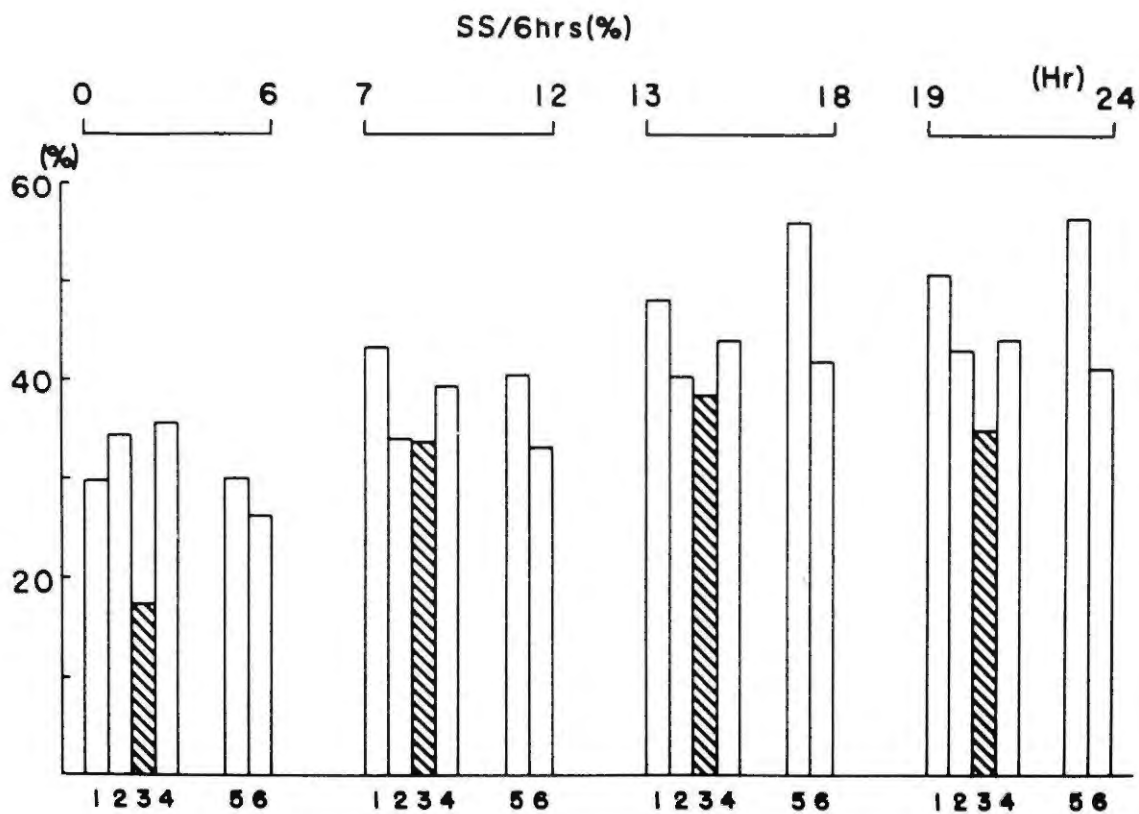
第1表の成績を6時間ごとに分けた場合には、第3, 第4図のようになり、最初の6時間におけるSS, PSの抑制が著明である。

2. 慢性実験: 第1表5, 6に示すように、同一動物について2回記録をしたものもあるが、実験群ではSSが対照群に比較して有意に減少しており( $P < 0.01$ )、PSには影響は見られなかった。しかし、6時間ごとに分けた場合には、とくに最初の6時間に急性実験に見られたような特別な変化は認められなかった。

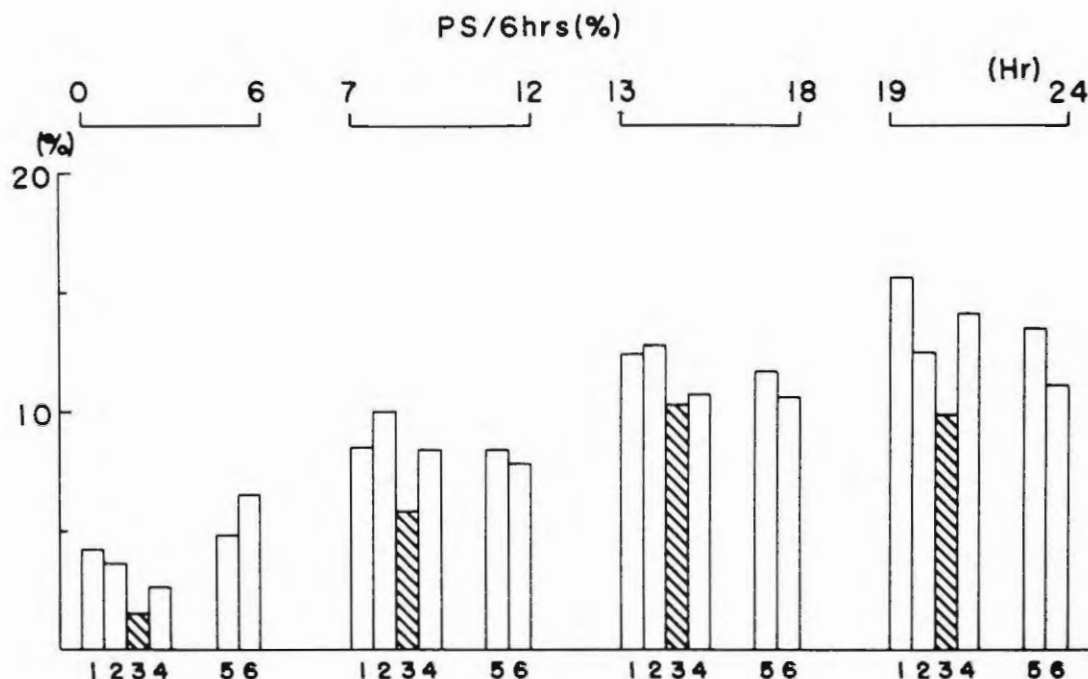
3. 行動: 第5図に示すように、体重の変化について実験群、対照群(9月27日までは平均値を示す)について比較したところによると、最初の2月間においては実験群の体重増加度が大であったが、その後においては著明な差異は認められなかった。また、同期間の摂水量、糞便数は対照群に多



第2図．キノホルム単独投与例と5-HTPを加えた際の1時間毎の睡眠量の変化



第3図．第1表を6時間毎に分けて計算をした際のSS/TT量(横軸の数字は第1表第1列に相当)



第4図. 第3図と同様, PS/TT量

く, 摂食量は実験群に多かった。

実験群に緑色便の排泄が注腸4月後にはじめて認められたが, その以前にすでに排泄されていたのを見逃していたらしく, 改めて12月末より注腸を開始した新しい群については第1日目より認められた。そこで試みに夏季, 冬季に分けて無処置のダイコクネズミにキノホルムの注腸を行なったところ, 夏季にはただちに認められ, 冬季にはしばしば認められないことがあった。

実験群3匹のうち1匹は注腸後7.5月(9月17日), 1匹は8月後(9月27日)に死亡しているが, いずれも鼻出血, 振戦, 体温低下, 知覚過敏, 急激な体重減少のほか前者は便秘(1昼夜の糞便数1個), 後者は緑色便のみの下痢症状を呈して死亡した。

対照群は残存している筋電図用電極より化膿し, 2号は2回の切開手術後に9月末, 1号は3回目の手術中に4月中旬に死亡し, 3号のみが1回の手術を受けた後, 生存している。これに反して, 3匹の実験群については化膿は一度も認められなかった。

昭和46年12月24日より, 生存していた実験群1匹, 対照群2匹にそれぞれ若い雌ダイコクネズミ2匹を交配させたところ5月31日までに, 実験群では5回の妊娠, 分娩が認められ異常仔の出産はなかった。ところが, 対照群では1回の妊娠も見られなかった。同時に若いネズミをキノホルム注射群と非注射群に分けて性行動を観察したが, 前者5回, 後者8回の分娩が認められた。第5図内はその例であり, 上段は前者にあたり雌雄ともキノホルム注腸, 下段は後者にあたり雌のみキノホルムを注腸したが, 下段の場合は後半に別の雌を交配せしめたために比較は困難であった。

### Ⅲ. 考 察

#### 1. 睡眠について

-275-

また、キノホルムの作成過程における前物質としての8-オキシキノリンも同様にSSを抑制するが、キノホルムにくらべるとその作用は弱い。

慢性実験においてはキノホルムのSS抑制効果は急性実験のように最初の6時間にとくに著明であるという様相は見られなかったが、それはキノホルムの投与方法の異なること、および連日のキノホルム投与によるトリプトファン代謝系の適応なども関係するだろう。

今後に残された課題としては、本実験ではキノホルムの睡眠に対する効果はネズミの頭部に固着させたソケットの離脱のために、注腸後約4月までの検討しか行っていないが、さらに生存をつづけているネズミについて長期投与の効果を調べる必要があり、またセロトニンの定量も実施されるべきである。

## 2. 行動について

(1)緑便：キノホルムによる緑色便についてはキノホルムと金属の錯化合物であることが明かにされ<sup>6)</sup>るが、その結合は生体内で行なわれるものであり、成績にのべたように夏季には冬季にくらべて緑色便の排泄されやすいことは何らかの季節的因子が関与するものとおもわれる。

(2)体重の変化など：キノホルム投与後、2月間は実験群の体重増加度は対照群にくらべて大であったが、その後は各種の処置を行なったために比較は困難であった。しかし、対照群がすべて化膿したのに対して、実験群では1匹も認められなかったことはキノホルムの殺菌効果によるのかも知れない。

(3)性行動：8-オキシキノリンがマウスの卵細胞の細胞分裂に異常効果を示すことを知り、キノホルム<sup>7)</sup>注腸ネズミの性機能について調べたが、長期投与の一匹の雄、および新しく注腸をはじめて5月を経過した雌雄からの仔ネズミにも異常は認められなかった。

しかし、長期生存の食塩水連続注腸を行なった2匹が全然妊娠せしめないのに対して、キノホルム注腸ネズミはすでに5月の間に2匹の雌に5回妊娠させている。ダイコクネズミの生殖能力は1.8～2.0年とされており、今回のネズミは生後1年10月でありキノホルムの性機能に対する増強効果があるうかがえる。

## 3. 総括

本報告の一部はすでに短報として発表済みであるが、現在までに得られた以上の成績をまとめてSMONとの関連にあえて言及するならば、つぎのような想像が許されるであろう。<sup>8,9)</sup>

上記のキノホルム連続注腸の結果死亡したネズミの症状はSMONの症状と同一視し得ないが、キノホルムが脳のみならず、全身のセロトニンを減少させるものとしたならば、セロトニンの多量に存在する消化管壁、シナプス前膜などの機能障害が考えられ、消化、感覚、運動機能に異常を生じさせることも考えられる。また、キノホルムがトリプトファン代謝異常をきたすとするならば、トリプトファンの多い牛乳、チーズ類を日常の栄養材料として摂取する西欧人、あるいは乳幼児にはキノホルムによって減少するセロトニンの補給が行なわれ、SMONの発症の少ないことも当然であろう。

なお、キノホルム連続投与によって死亡しなかった例は、かえって対照群よりも生活力が強く、そ



の意味では既往にキノホルムを摂取したがSMON発症の見られなかった人は、キノホルム剤の発売禁止の行なわれている現在においては発症することはないであろう。

また、SMONの際の脳症状については意識障害、神経症状、不眠、などを呈し、さらに自殺者の<sup>10,11)</sup>少なくないことも報告されている。本報告におけるキノホルムの徐波睡眠抑制効果は、直接には不眠を、間接には不眠よりくる鬱病ひいては自殺への推移をある程度説明するであろう。

#### IV. 結 論

ダイコクネズミの睡眠に対する影響から、キノホルムは脳内のセロトニンを減少させるものと考えられ、さらに全身のセロトニンを減少させるという仮説の下にSMON発症とトリプトファン代謝異常の関係に言及した。

また、キノホルムの1年5月にわたる連続投与をつづけたところ、3匹のうち2匹は約8カ月後に特異症状を呈して死亡したが、生存している1匹は対照群よりかえって生活力の旺盛であることを認めた。

#### 文 献

- 1) Matsumoto, J. et al. Proc. Japan Acad., 43: 62-64, 1967.
- 2) Matsumoto, J. et Jouvét, M. C.R.Soc, Biol., 158: 2137-2140, 1964.
- 3) Ursin, R. Brain Res., 20: 91-97, 1970.
- 4) Jouvét, M. Science, 163: 32-41, 1969.
- 5) 柴田幸雄, 他, 第25回日本栄養・食糧学会講演要旨, 146, 昭46年6月(東京).
- 6) 田村善蔵, 厚生省スモン調査研究協議会報告書, 昭45年6月.
- 7) Gouget, P. C.R.Soc.Biol., 164: 1556-1559, 1970.
- 8) 松本淳治, スモン研究協議会研究報告会口演, 昭46年3月(東京).
- 9) 松本淳治, 医学のあゆみ, 80: 461-462, 1972.
- 10) 豊倉康夫, 他, 診療手帖, 28: 15-22, 1970.
- 11) 杉山尚, 花籠良一, スモン研究協議会研究報告会口演, 昭45年11月(東京).

#### 40. ミトコンドリアの呼吸調節におよぼすキノホルムおよびその類似物質の作用

八木 国夫, 山中 直樹, 萩原 昌子

勝又 義直, 田村 善蔵

(名大・医・生化学) (東大・薬学・薬品分析化学)

S M O N 患者に認められる緑尿, 緑便および緑舌の本体がキノホルム (Ch) の鉄キレートである<sup>1,2)</sup>ことがわかってから, S M O N と Ch との関係が注目をあつめている。そこで Ch の毒性をしらべる一つの手段として単離したミトコンドリア (Mt) に作用させたところ, 脱共役剤として作用し, しかも, その作用発現に Ch とキレートを作りうるイオンの共存を要することが判明した。また投与された Ch から肝臓で生成されるキノホルムグルクロナイドは脱共役剤としての作用を有しないことがわかった。<sup>3)</sup>さらに Ch の類似物質である 8-ハイドロキシキノリン, 5, 7-Br-8-ハイドロキシキノリン, 5-Cl-8-ハイドロキシキノリン, および 5, 7-I-8-ハイドロキシキノリンの Mt に対する作用を同様に検討したところ, その作用の仕方に若干の相違がみられるが同様にその呼吸解放作用を有することが判明した。

以上のごとく Ch が神経毒である D N P と同様脱共役剤であることは注目に値する。

##### 実験材料と方法

白ネズミ肝ミトコンドリアの調製は既報のごとく行なった。<sup>3)</sup>白ネズミ脳のミトコンドリアは Basford<sup>5)</sup>に従って調製した。キノホルムとその類似物質はいずれも純品を使用した。キノホルムグルクロナイドは田村らの方法<sup>6)</sup>に従って合成した。ミトコンドリアによる酸素の消費は Beckman の酸素電極によって測定した。特に記した場合以外は肝 Mt の結果を示す。

##### 実験結果と考察

図 1 に示すように呼吸調節比 4.2 を示す Mt (図 1 a) に 4.2 m M Ch を添加すると図 1 b に示すように D N P と同様に脱共役剤として作用する。しかし, 図 1 c に示すようにキノホルムグルクロナイドは脱共役剤としての作用を有さない。このことはキノホルムの毒性および解毒作用を考える上でも興味深い。

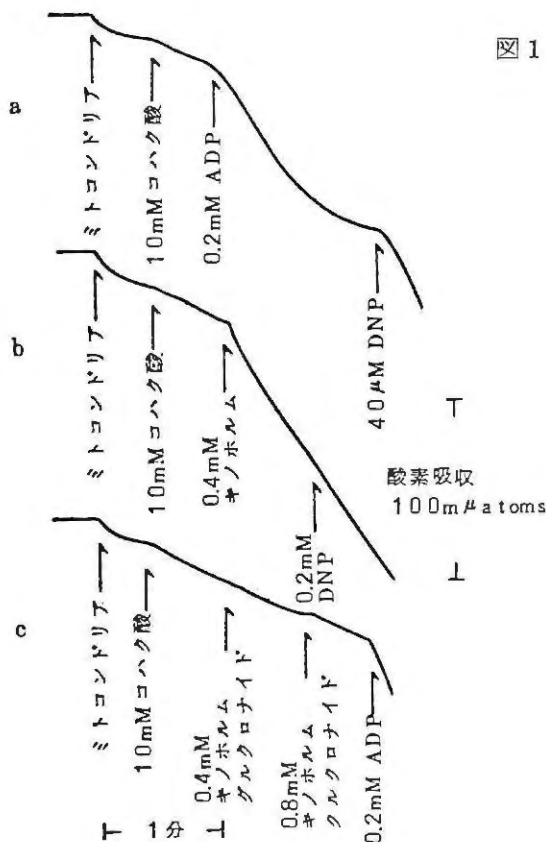


図 1

図2 a, bは5, 7-Cl-Br-8-ハイドロキシキノリンと8-ハイドロキシキノリンの脱共役作用を示すがChに比し、やゝ高濃度必要とし、その作用には無機リン酸の促進効果がみられた。図2 c, dはそれぞれ5-Cl-8-ハイドロキシキノリンと5, 7-Cl-8-ハイドロキシキノリンのMtの呼吸におよぼす影響を観察したものであるが、Chとほぼ同様にMtの呼吸を解放する。

図3はシロネズミ脳のMtの呼吸に及ぼすChの影響を示す。0.4 mM Chの添加によりコハク酸による呼吸は解放されて脱共役する。脳Mtは無傷Mtを単離しにくいので、ここでは脱共役作用の強さは肝Mtと比較できなかった。

図2

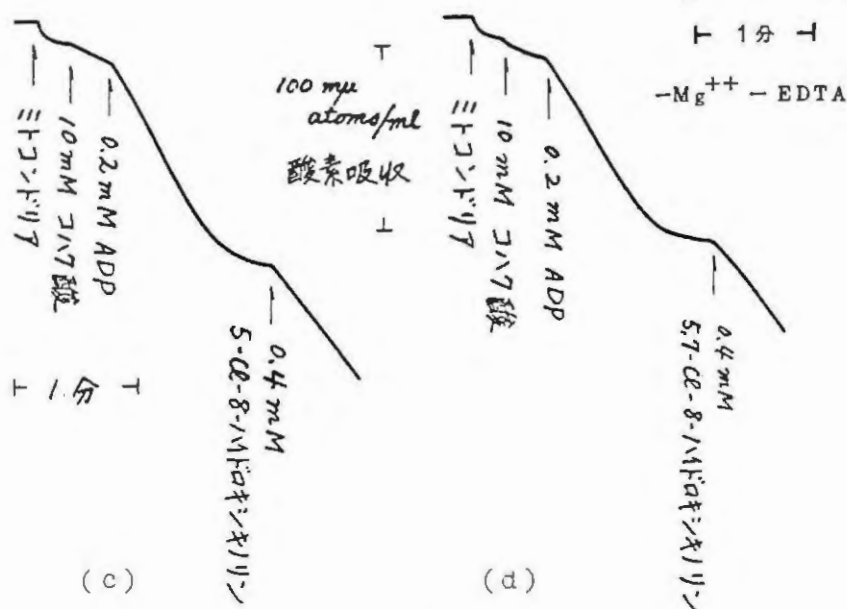
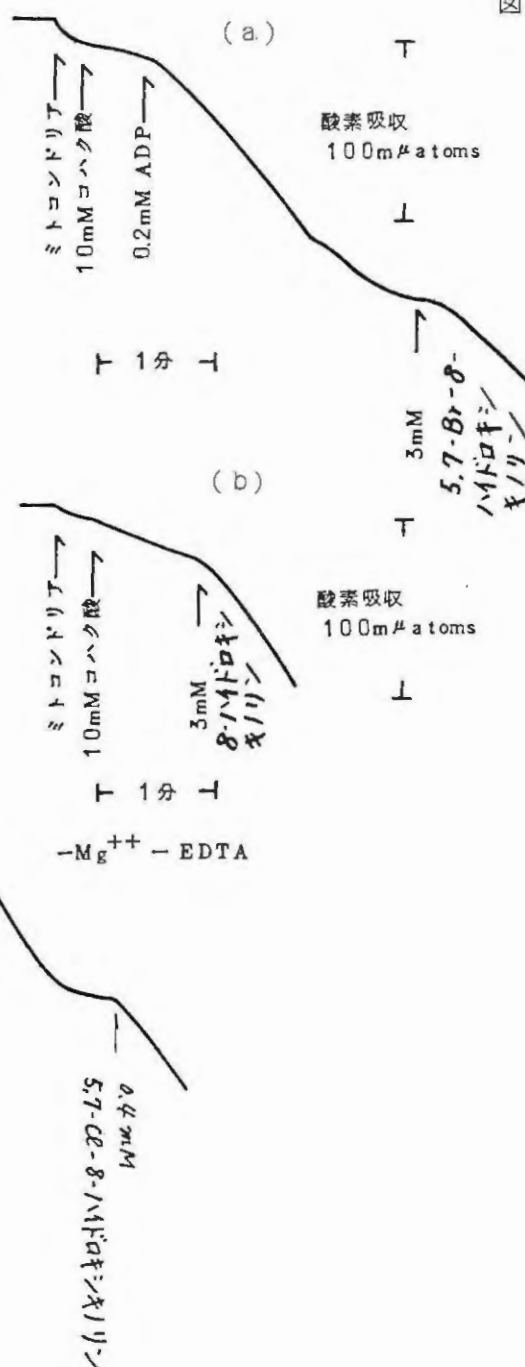
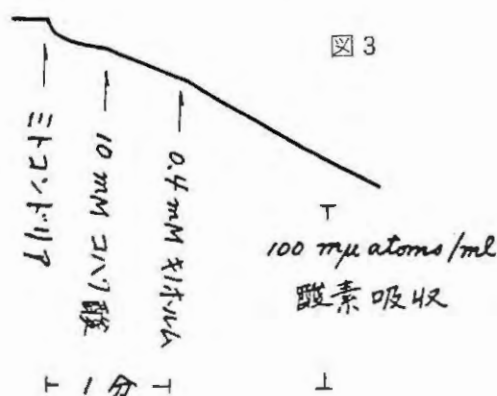


図3



#### 41. キノホルムのミトコンドリアへの影響—キノホルムの脱共役作用とキレートイオンとの関係

八木 国夫, 山中 直樹, 田村 善蔵,  
今成 登志男

(名大・医・生化学) (東大・薬学・薬品分析化学)

S M O N 患者の緑尿, 緑便および緑舌がキノホルムの鉄キレート<sup>1,2)</sup>であることからMtの脱共役作用とキレートを作るイオンとの関連が注目される。そこで鉄イオン, その他各種イオンとChの脱共役作用を検討したところ共存するイオンの種類によってその作用発現に相違を見出した。

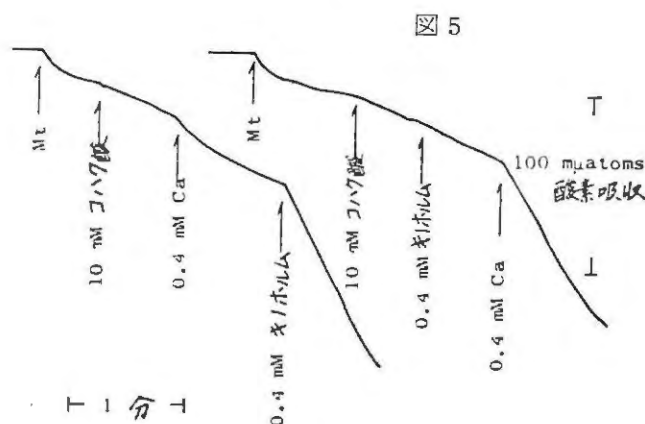
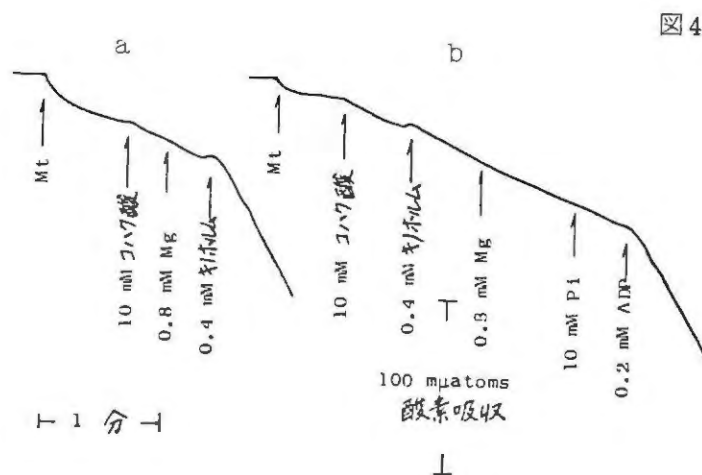
実験材料と方法はI-1と同様である。

##### 実験結果と考察

Mgイオンについては図4aに示すようにCh添加前にMgイオンを添加しておけばその脱共役作用を示す。一方図4bで明らかにようにCh添加後にMgを添加してもその脱共役作用は現われない。またCh-MgキレートはMgイオンの添加がなくても脱共役作用を有する。一方Caイオンの場合は図5に示すようにPiの存在し

ない条件でCaを添加するとCh添加の前でも後でもCaの脱共役作用を示す。Srイオンの場合についてもCaイオンと同様の効果が認められた。Baイオン, MnイオンについてもCh添加によってその脱共役作用が認められるが, Caイオン, Srイオンの場合程その効果が明確ではない。

以上共存する各種キレートイオンによってChの脱共役作用に相違が認められることは, S M O N において生体内金属が注目されている事実や神経系の機能に各種金属が関連していること等を考え合せるとChの毒性を考える上でも興味深い事実である。



## 42. 蛙の坐骨神経の活動電位および蛙腹部上皮の短絡電流 および蛙皮抵抗におよぼすキノホルムの影響

八木 国夫, 勝又 義直, 山中 直樹

(名大・医・生化学)

ChとSMONとの関連においてSMONの神経症状を重視するとChの神経系に与える効果が注目される。この観点からトノサマ蛙の坐骨神経および同じく外胚葉性の腹部上皮につき、それぞれ細胞外誘導法による活動電位および上皮電位、短絡電流を測定した。

### 実験材料と方法

トノサマ蛙を用いて背髄切断により単離した坐骨神経につき細胞外誘導法により活動電位を測定した。刺激は0.1 msec 持続時間の矩形波刺激法で0.4 voltと0.8 voltの電位で刺激した。腹部上皮については食用蛙を上皮固定用セルにセットし、酸素供給と攪拌の目的でエアポンプによる通気を行いながら、カロメル電極および短絡電流発生装置を用いて蛙腹部上皮電位および短絡電流を測定し、その値から抵抗を計算した。用いたリンゲル液(pH 7.4)は1ℓ中に、NaCl 16.5 g, KCl 0.25 g, CaCl<sub>2</sub> 0.3 gおよびNaHCO<sub>3</sub> 0.2 gを含むものである。

図6

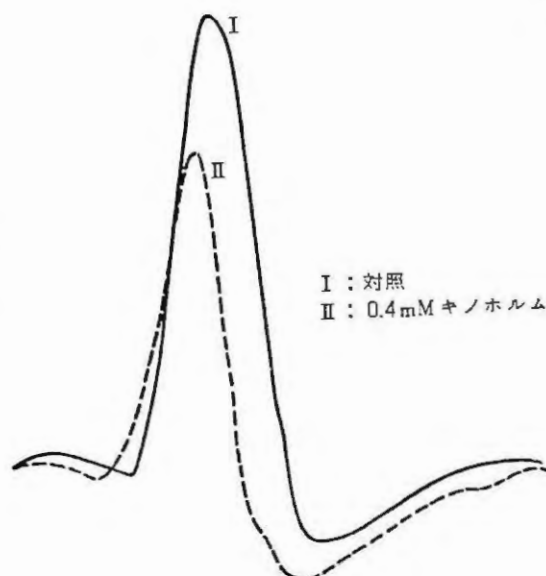
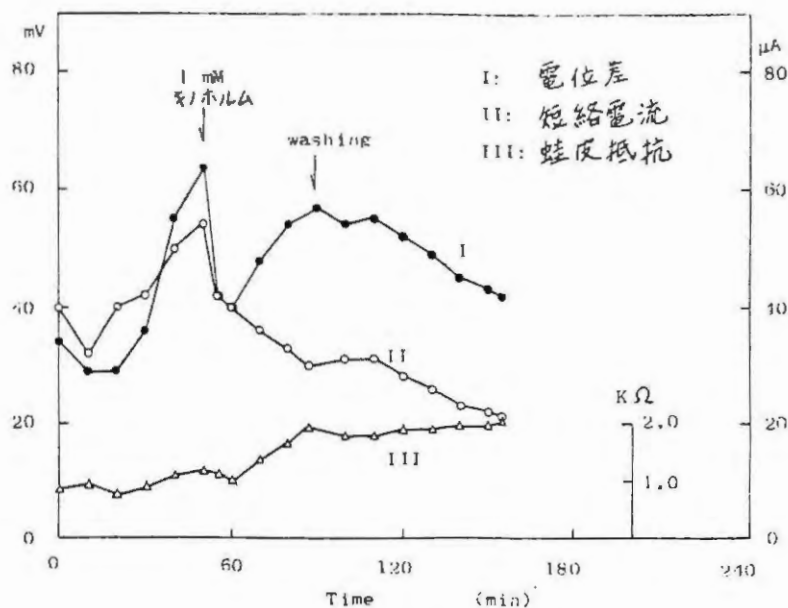


図7



### 実験結果と考察

坐骨神経の細胞外誘導法によって0.4 volt の刺激で測定した活動電位は図6に示す。0.4 mM Ch を添加して5分後に測定すると、その活動電位の出はじめが早くなり、電位そのものは低下する。0.8 volt 刺激でも同様である。

腹部上皮については、図7に示す如く、短絡電流は1 mM Ch 添加により減少するが、電位差は逆に増大する。セル中のリンゲル液を交換(2回)することにより、いわゆる“Washing”により短絡電流は回復の傾向を示すが、腹部上皮の抵抗は高い値を保ったままである。

以上の結果 Ch は蛙坐骨神経および腹部上皮に作用し、その能動輸送等に影響を与えていると考えられるが、Ch が難水溶性であり、Dimethyl sulfoxide にとかして用いていることからその作用も加わっていることもあり、今後さらに検討を要する。

### 43. $^{14}\text{C}$ -キノホルムの組織切片へのとり込み

八木 国夫, 勝又 義直, 山中 直樹

大石 誠子

(名大・医・生化学)

$^{14}\text{C}$ -Ch を与えた動物実験で, Ch が坐骨神経に多量にとり込まれ, 蓄積されることが報告されている。この所見に基づき, *in vitro* で組織切片への Ch のとり込みを検索した。また SMON<sup>7)</sup> 患者の緑舌等に Ch の  $\text{Fe}^{3+}$  キレート化合物が検出され注目されていることから,  $\text{Fe}^{1,2)3+}$  イオンの Ch のとり込みに及ぼす影響を検索した。

#### 実験材料と方法

ウィスター系白ネズミを断頭撲殺して, 各臓器を採取し, 秤量した上で, その 300 mg (坐骨神経のみ 50 mg) を実験に用いた。この際大脳, 肝, 腎, 筋肉は厚さ 1 mm の切片とした。

用いた反応液 (pH 7.4) は 100 ml 中に NaCl 10.9 gr, KCl 0.042 gr,  $\text{CaCl}_2$  0.024 gr,  $\text{NaHCO}_3$  0.02 gr, glucose 0.2 gr および牛血清アルブミン 0.5 gr を含むものである。 $^{14}\text{C}$ -Ch は 6.6 mμci/ml とし, cold と合わせ 10 mμmoles/ml となるよう反応液中に加えた。反応液は 5 ml とし, 25℃ で振盪反応させ, 30 分後にその反応上清 0.1 ml をとり, Aloka 100 シンチレーションカウンターで放射能を測定し, カウントの減少量よりとり込み量を計算した。

#### 実験結果と考察

表 1 に示すごとく, Ch のとり込みは神経系特に坐骨神経に多いことがわかる。またいずれの組織においても  $\text{Fe}^{3+}$  イオンの存在した場合, Ch のとり込み量が増加している。このことはキレートイオンの存在下 Ch が Mt の調節呼吸を解放する I の結果, 緑舌等から単離された Ch の  $\text{Fe}^{3+}$  キレート化合物であることを考え合わせると Ch の  $\text{Fe}^{1,2)3+}$  キレートの作用を検索する上で示唆に富むものである。

表 1 各臓器へのキノホルムのとり込み

|           | キノホルム濃度 (mμmoles/g) |                     |
|-----------|---------------------|---------------------|
|           | - $\text{FeCl}_3$ 系 | + $\text{FeCl}_3$ 系 |
| 1 脳       | 3.88                | 13.01               |
| 2 背 髄     | 4.00                | 8.18                |
| 3 坐骨神経    | 12.26               | 69.33               |
| 4 肝       | —                   | 9.35                |
| 5 腎       | 1.87                | 9.13                |
| 6 筋肉 (大腿) | 8.34                | 10.97               |
| 7 脂肪組織    | 10.65               | 18.58               |



#### 44. キノホルムのラット脳へのとりこみについて

八木 国夫, 鈴木 修, 大石 誠子

(名大・医・生化学)

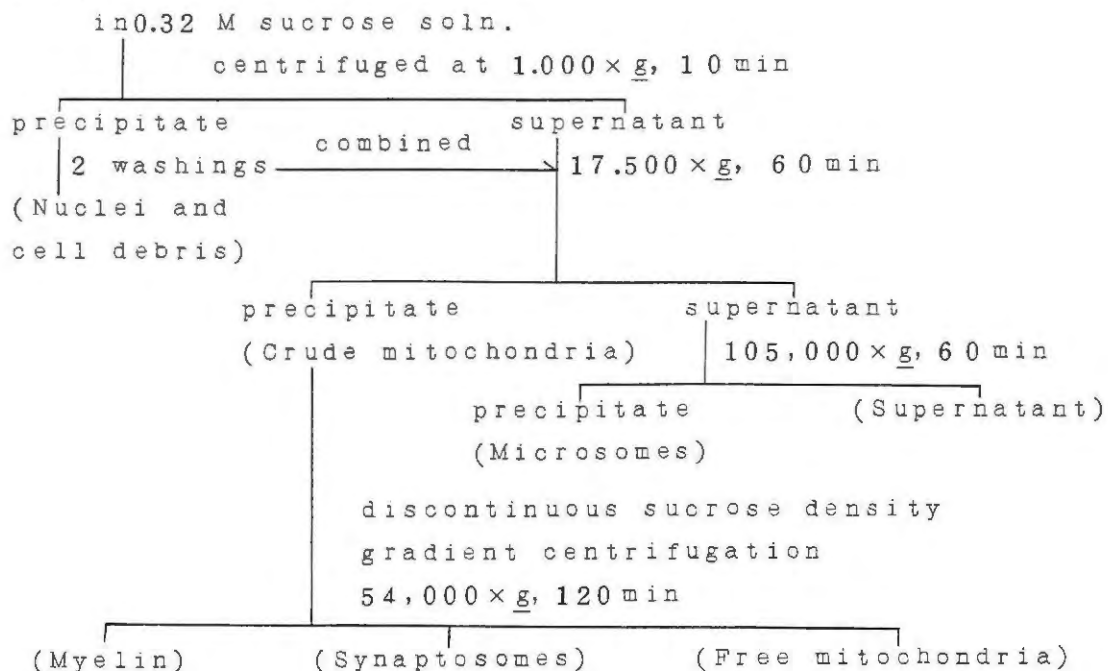
投与されたキノホルムが坐骨神経はもちろん中枢神経にもとりこまれることは既に多くの報告で知られているが、脳へとりこまれたキノホルムの細胞レベル以下での分布については未だ検索されていないので、キノホルムのとりこみについて脳の諸細胞に注目して、そのレベル以下でのキノホルムの分布を検討した。

##### 材料ならびに方法

$^{14}$ C-キノホルム (S.A. 1.63 mci / mmole, 第一化学製) を 0.1 N NaOH 水溶液に 4 mg/ml になるように良く溶解せしめ、2 ml を 400 ~ 500 g ウィスター系雄ラットの股静脈より約 2 分間で注入し、1 時間後に採血すると同時に、断頭し、速やかに脳をとり出し、洗浄除血した後、小脳と脳幹部分を取り除き、0.32 M 蔗糖液中でポッター型テフロンホモゲナイザーで磨碎し、図 8 の如き操作 (8, 9) に従って遠沈分画し、各成分を得て、その放射活性を測定した。分画には日立 P A スピスコ, 同 RPS-25 ローター, ベックマン L4 スピスコ, 同 40 アングルローターを用い、放射能測定には Aloka 250 シンチレーションカウンターを使用した。全操作は 0 ~ 5 °C で行なった。キノホルムと脳細胞画分との親和性を調べるためには、脳のホモジェネートに 0.1 N NaOH 10  $\mu$ l (2  $\mu$ g  $^{14}$ C-キノホルム含有) を添加し、同様に分画しその各放射能を測定した。

10% (w/v) rat brain homogenate

図 8



## 結果と考察

結果を表2にまとめて示す。脳へのとりこみの実験による比活性と、ホモジェネートへの添加実験

表2 ネズミ脳細胞画分への<sup>14</sup>C-キノホルムのとりこみ

| 画 分         | 蛋 白 量  |      | 放 射 活 性 |      | RSA* | 添加実験        |
|-------------|--------|------|---------|------|------|-------------|
|             |        |      |         |      |      | RSA*        |
| (A) 核および細胞片 | mg     | %    | cpm     | %    | 1.73 | 0.82 ± 0.08 |
| 粗ミトコンドリア    | 416.4  | 84.8 | 6535    | 55.1 | 0.64 | 1.32 ± 0.03 |
| ミクロゾーム      | 11.0   | 2.2  | 1362    | 11.5 | 5.20 | 1.34 ± 0.07 |
| 上 清         | 41.4   | 8.4  | 3048    | 25.7 | 3.06 | 0.22 ± 0.04 |
| 総 計         | 491.1  |      | 11872   |      |      |             |
| 回 収 率       | 99.8 % |      | 79.9 %  |      |      |             |
| (B) ミエリン    | 28.4   | 31.0 | 605     | 29.5 | 0.95 | 1.24 ± 0.08 |
| シナプトゾーム     | 48.4   | 52.8 | 677     | 33.1 | 0.63 | 0.92 ± 0.04 |
| 遊離ミトコンドリア   | 14.9   | 16.3 | 766     | 37.4 | 2.29 | 0.91 ± 0.02 |
| 総 計         | 91.7   |      | 2048    |      |      | mean ± S.D  |
| 回 収 率       | 69.3 % |      | 66.4 %  |      |      | = 4         |

\*RSA: Relative Specific activity (%放射活性/1%蛋白)

での比活性とは全く異なった分布傾向を示し、注射されたキノホルムが脳血液関門を通過し細胞に分布した事を支持した。血中放射能の測定によって、脳血管内血液中の放射能が全脳中の放射能の約5分の1であった事も、これを立証した。尚、各画分の乾燥重量と蛋白質量はほぼ平行している(8)ので、比放射能は蛋白当りで算出した。いずれの実験においても細胞画分(A)ではMic, Sup, Nucleus, Crude Mt.の順にとりこみが多い。とくに、ミクロゾームに多く認められることはその解毒機構の可能性と関連して注目される。Supernatantの比活性が、添加実験の値に比して特に高いのは、キノホルムが代謝され、水溶性産物(例えばグルクロン酸抱合や硫酸抱合キノホルム)が溶出したものと思われる。Crude Mitochondria画分をさらに分画したばあい、(B)ではFree Mt.に特に多い。このことはキノホルムがミトコンドリアの酸化的リン酸化において脱共役剤として作用する知見(10)とあわせ考えると興味深い。SynaptosomesよりもMyelinに比較的多くとり込まれ、添加実験でもMyelinにより多く親和性をもっていることは、髄鞘膨化や脱髄現象などの病理所見の説明の一つとなり得ると思われる。

文 献 (39, 40, 41, 42 論文)

- 1) 吉岡正則, 田村善蔵, 医学のあゆみ, 74, 320, 1970
- 2) 今成登志男, 田村善蔵, 医学のあゆみ, 75, 547, 1970

- 3) 山中直樹, 八木国夫, 今成登志男, 田村善蔵, 医学のあゆみ, 76, 919, 1971
- 4) 田村善蔵, 第2回スモン調査研究協議会資料集
- 5) R.E.Basford, Methods in Enzymology, Vol. X, P.96, Academic Press, New York
- 6) Matsunaga, I. and Tamura, Z., Chem.Pharm.Bull., 19, 1056, 1971
- 7) 高橋康夫, 荒木一明, 第1回スモン調査研究協議会資料集
- 8) J.Eichberg, Jun., V.P.Whittaker and R.M.C.Dawson, Biochem. J., 92, 91, 1964
- 9) 柏侯重夫, 第14回日本神経化学会予稿集, P.107, 1971
- 10) 八木国夫, 勝又義直, 萩原昌子, 山中直樹, スモン調査研究協議会第2回キノホルム部会資料集, 1971

## 45. 実験的キノホルム中毒の神経病理

### (I) 一次知覚ニューロン

山田 英智, 東儀 英夫

(東大・医・解剖)

#### 緒 言

我々は家兎を用いキノホルムが神経系各部位の微細構造に及ぼす影響について病理組織学的観察を進めているが、今回はそのうち一次知覚ニューロン(Goll核のaxon terminal, 腰髄後根神経節, 腓腹神経)について検索した結果を報告する。

#### 材料と方法

成熟家兎(体重2-2.5Kg)12羽, 幼若家兎(体重400-500g)5羽に対し, 夫々エンテロビオフォルム0.5g/day(0.2-0.25g/Kg・day), 0.25g/day(0.5-0.6g/Kg・day)を生食水に懸濁し無麻酔のもとに胃ゾンデにより経口的に毎日1日おきに投与した。対照成熟家兎5例には胃ゾンデにより生食水を約1カ月間投与した。

組織学的検索に供した動物は8%paraformaldehyde, 8% sucrose, 0.1N 磷酸緩衝液(P・H・7.2)により経心臓的に灌流固定し, とり出した組織を2%OsO<sub>4</sub>で後固定し, アルコール脱水, エボン包埋した。切片はuranylと鉛で二重染色した。

光顕の観察は約0.5μの切片にトルイジンブルー染色をほどこして行った。

#### 結 果

##### 症 状

成熟家兎12羽のうち2羽は6日目(総投与量1.5g)及び18日目(同4.5g)に後肢の運動麻痺を呈し, これらは麻痺出現の2-3日後に灌流固定に供した。1羽は10日目(総投与量2.5g)後肢の麻痺を呈したが12日目に死亡し, 8羽は12日以内(総投与量3.0g)に麻痺を示さず全身衰弱で死亡した。1羽は30日間何ら神経症状を示すことなく生存した。

幼若家兎では5羽中2羽が16日目(総投与量2.0g), 32日目(同4.0g)に死亡したが残りの3羽は42日間(同5.25g)の観察期間中生存した。いずれも神経症状は示さなかった。

##### 病理組織学的所見

対象家兎2羽と比較しつつ運動麻痺を呈した家兎2羽についてGoll核, 腰髄後根神経節, 腓腹神経を光顕的・電顕的に観察し, 次の所見を得た。

#### (I) 光 顕

Goll核の神経細胞, Goll 索, 後根神経節の神経細胞には光顕的に明らかな病的変化は認められなかった。腓腹神経では大径有髄線維にmyelin splittingが認められた(図1)。



〔図1〕 ×2000

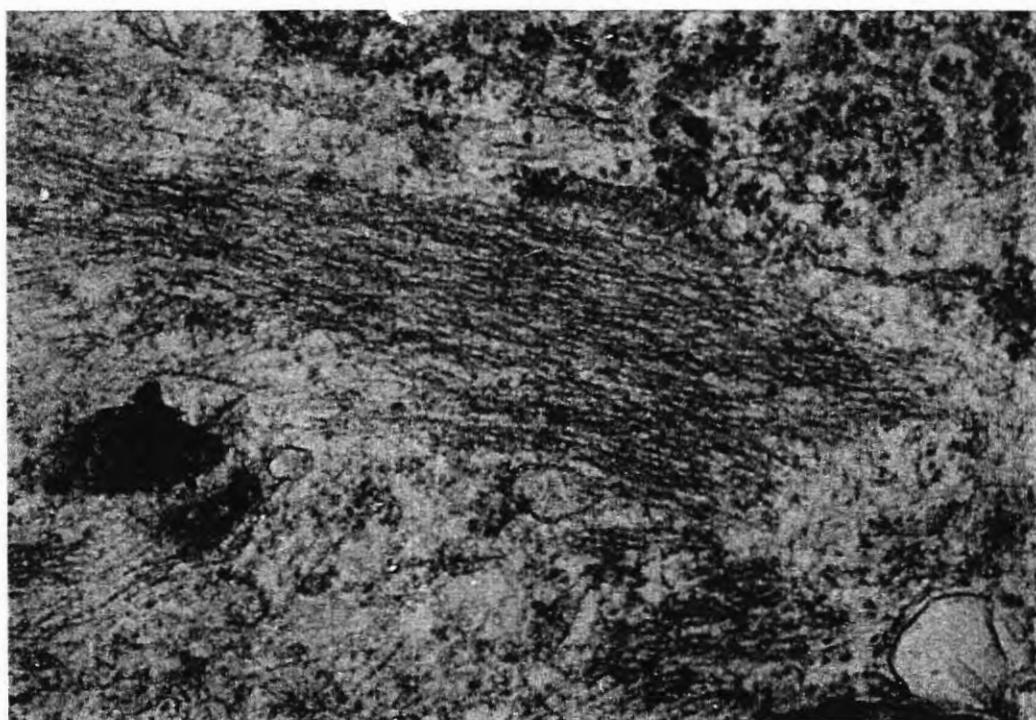
(II) 電 顕

1) Golli核

Golli核の神経細胞, axon terminal には明らかな異常は認められなかった。

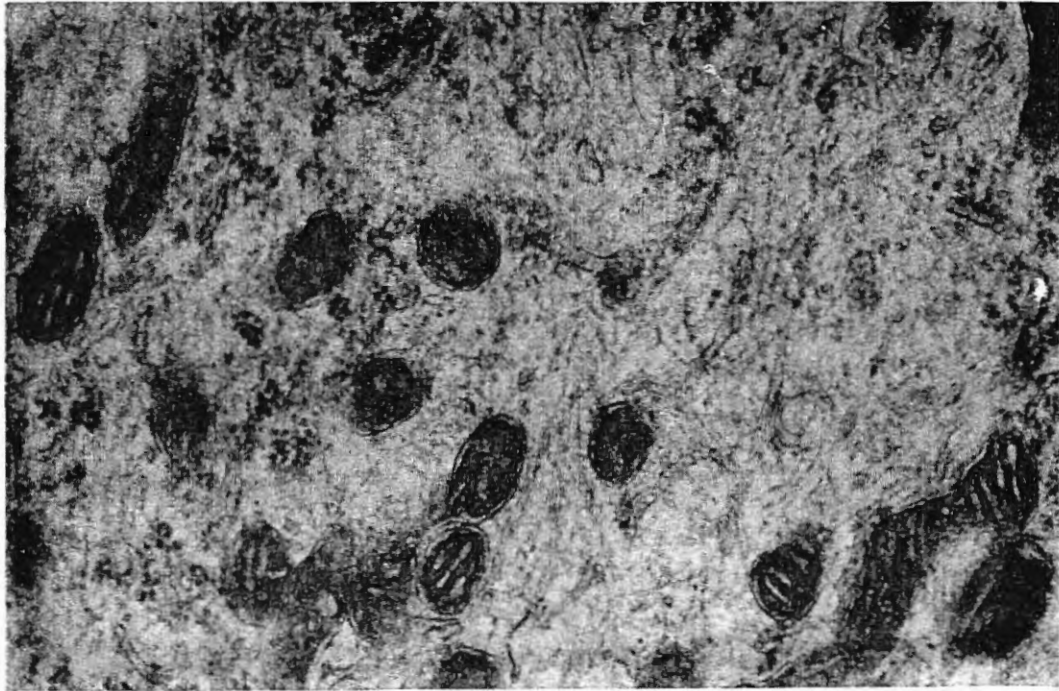
2) 後根神経節

腰髄後神経節では神経細胞のneurofilamentが増加し, 密に束をなして集っている部分も見られた(図2)。neurotubuleはほとんど見出しえなかった。



〔図2〕 ×54,000

大型神経細胞 (light cell, A-cell) ではミトコンドリアが対照に比して小さく, matrix の density の増加, intracrystal space の軽度の拡大がみられた (図3)。このミトコンドリアの異常は satellite cell にみられたが, 小型神経細胞 (dark cell, B-cell) には認められなかった。大型神経細胞のミトコンドリアの長径及び短径について対照家兎



〔図3〕 ×39,000

1例と6日目に麻痺を呈した中毒家兎を比較すると, 短径の平均は対照家兎  $0.222\mu$  (S.D.  $0.046\mu$ ) であり, この差は推計学的に有意であった (図4:  $P < 0.01$ )。長径の平均は対照家兎  $0.466\mu$  (S.D.  $0.0466\mu$ ) 中毒家兎  $0.394\mu$  (S.D.  $0.282\mu$ ) であり  $P < 0.05$  で有意の差であった。

ERは通常のcisternを形成せず, 管状のERが多く, リボゾームはcompactに密集していた (図5)。また, 胞体中にいわゆる核小体類似物質が散見された (図5)。

核膜は, 凸凹が増し, 内膜のfibrous layerがやや厚い細胞がみられた。

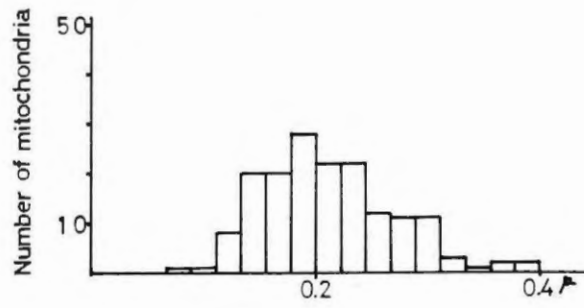
核小体のsegregationが認められ, pars amorphaが数個所に分れている所見がみられた (図6)。

### 3) 腓腹神経

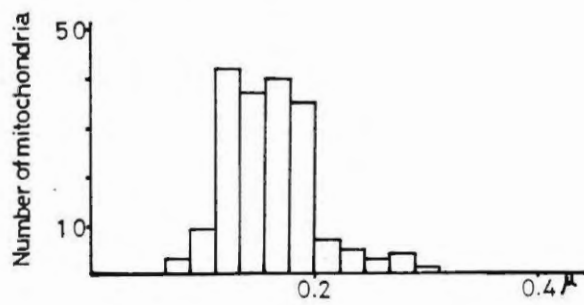
有髄線維のaxonにneurofilamentの増加がみとめられ (図7), 大径有髄線維に選択的にmyelin splittingがみられた。Schwann細胞では一部のERが拡大している像がみとめられたが, そのほかに明らかな変化はみられなかった。

# Frequency distribution for mitochondrial width

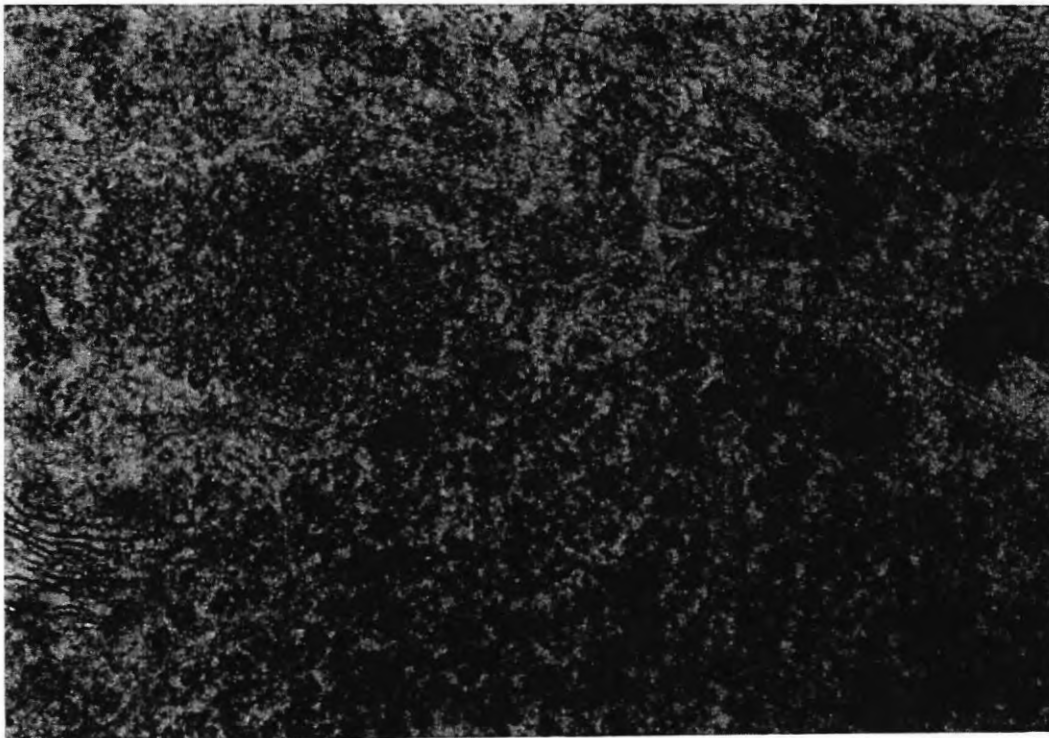
a) Control rabbit



b) Intoxicated rabbit

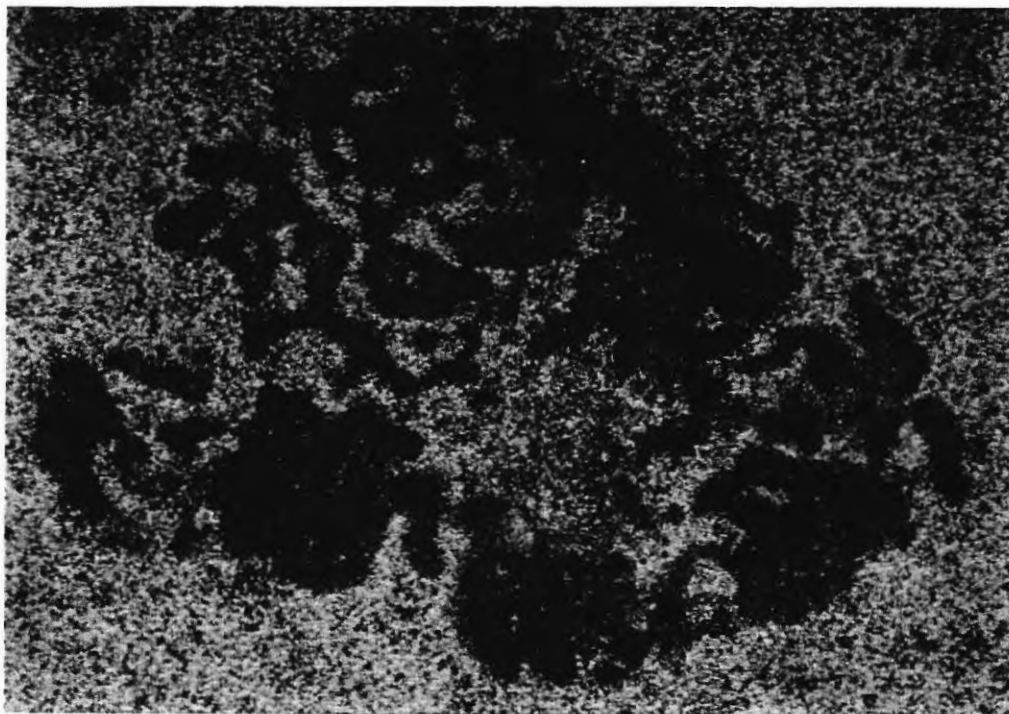


[ 図 4 ]

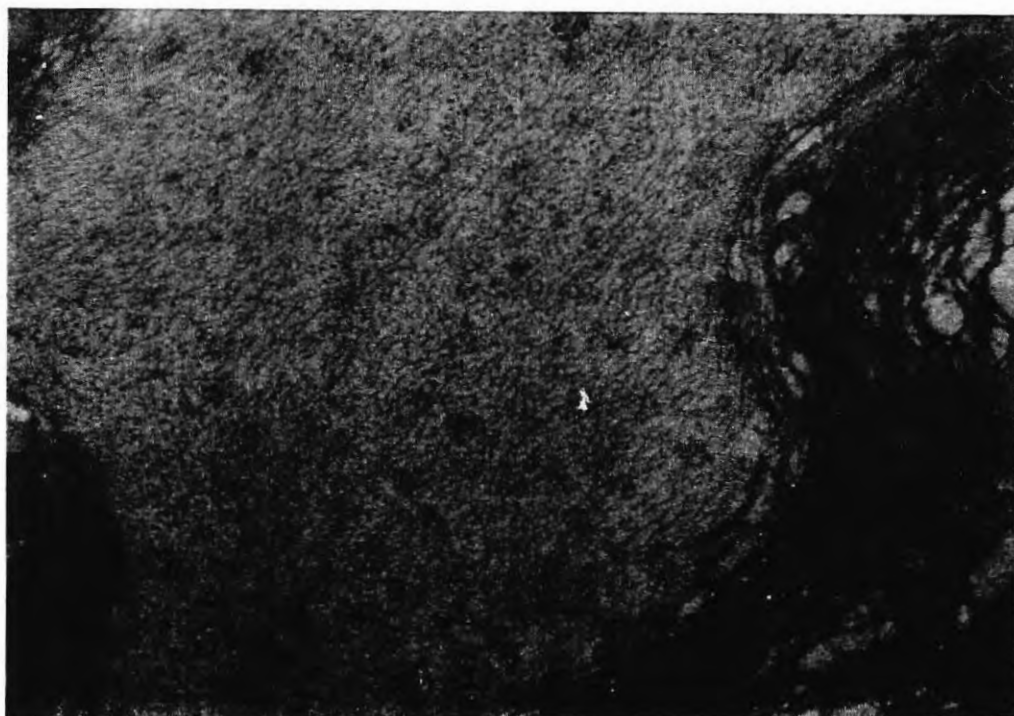


[ 図 5 ]      × 40,800





[ 图 6 ]  $\times 21,000$



[ 图 7 ]  $\times 35,000$

## 考 案

エンテロビオフォルムの体重あたりの投与量が幼若家兎の方が大きいにもかかわらず死亡率、運動麻痺出現率の点で幼若家兎よりも成熟家兎の方が高い点が注目される。

従来、SMONでは軸索変性が主要な病変であるとされているが、今回の初期病変の観察では軸索にも髄鞘にも変化がみられ、形態的にはむしろ後者の変化がより強かった。腰髄後根神経節の神経細胞にみられたミトコンドリアのcondensationは、肝壊死(ラット)腎腫瘍(ハムスター)等で同様の所見の報告があり、FOCP中毒ヒナの神経節細胞でミトコンドリアが正常に比し細いと云<sup>1)</sup>う記載もみられるが、その意味づけは充分なされていない。キノホルム中毒の場合、本剤が脱共役と<sup>2)</sup>して作用するとする生化学的知見があり興味深い。

Neurotubuleが少なく、これと対照的にneurofilamentが増加していることは両者が相互に形態的に移行するという考え方がある点を考慮すると理解できよう。

核小体のsegregationは種々のcarcinogenic agentによる変化と程度は軽度であるが形態的に類似している。

これら神経細胞内小器官にみられた変化のいずれがprimaryの変化であるかは今後の問題として残されている。

## 要 約

1) 成熟家兎(体重2-2.5 Kg) 12羽、幼若家兎(体重400-500 g) 5羽に対し、夫々0.5 g/day, 0.25 g/dayのエンテロビオフォルムをほぼ1日おきに経口投与し、成熟家兎3羽が18以内(総投与量4.5 g)に後肢の運動麻痺を呈した。

2) 対照家兎2羽、麻痺を呈した家兎2羽についてGolli核、腰髄後根神経節、腓腹神経を光顕的、電顕的に比較検討した。

後根神経節細胞では、neurofilamentの増加、mitochondriaのcondensationのほかリボゾームがcompactに密集してtubular ERが増加する所見がみられた。また核膜のindentationの増加、核小体のsegregationも認められた。

腓腹神経では有髄線維の軸索のneurofilamentの増加、大径有髄線維に選択的にmyelin splittingが認められた。Golli核には明らかな変化は認められなかった。

1) vav. S. L : Acta Neuropath. 17 : 103, 1971

2) 八木国夫他 : スモン調査研究協議会(昭和46年3月2日)

## 46. 後根神経節培養に及ぼすキノホルムの影響

米沢 猛, 齊田 孝彦, 佐藤 能史

(京都府立医科大・病理学教室)

S M O N の原因的物質としてキノホルム剤が注目されてより, 数多くのキノホルム中毒実験が種々の動物を用いて行われている。それらの実験の中心となっているものは神経組織におけるキノホルム中毒性病変の研究で, とくにキノホルム投与量と病変の分布との関係が問題となっている。これらの研究によれば神経組織内でのキノホルムによる病変はひとの S M O N と極めて類似した分布を取ることが明らかにされた。これは特に犬を用いての大月等の実験で明らかである。その病変の主なものは S M O N と同様後根神経節より脊髄後索を上行する中枢枝と末梢へ下降する末梢枝, と錐体路の神経線維の変性である。しかもこれら病変は神経細胞体より離れた神経線維の末梢部に著しく, 髄鞘よりも軸索の変化がより顕著である。これらのキノホルムによる変化は S M O N の際の病変に基本的に一致するものではあるが, キノホルムがどのような変性機序を有するかはなを明らかではない。我々はこのキノホルムが有する神経組織への中毒性作用を, より詳細に検索するため培養神経組織にキノホルムを投与し, 生ずる変化を生態学的に観察し, S M O N 剖検によって得られる所見と対比した。

### 実験方法

ラットおよびマウス胎生 15～17 日の胎児の後根神経節を型の如く培養し, 培養後約 1 ヶ月後の完成した培養組織にキノホルムを投与し以後の変化を追求した。

培養方法は胎生 15—17 日のラットの後根神経節を取り出し, 前もってコラジェンを塗布したカバーグラス上に植え付け, 以後毎 3 日に培養液を交換した。培養液は Gey 塩類溶液, Eagle MEM, 馬血清および鶏胚抽出液 (50%) を等量混合したものをを用い, これにブドウ糖が最終濃度 600 mg % になるように加えた。

投与したキノホルムは前もって血清中に溶解したものをを用い, 使用時培養液にて希釈して用いた。これによつてキノホルムの濃度 10  $\mu$ g/ml およびそれ以下のものを調整した。実験に用いた濃度は 10  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml および 0.1  $\mu$ g/ml の三種である。

キノホルム投与後 1 週より 2 ヶ月に亘り観察を続け, その経過中一部は固定, 軸索染色, 髄鞘染色を行い, また一部はグルタル・アルデハイド固定後オスミウム酸再固定を行い電顕観察用資料とした。

### 実験結果

キノホルムによる培養神経組織の変化について, 10  $\mu$ g/ml の濃度投与の所見を見ると, 投与後 2—3 日頃より神経細胞は軽度ながら増大し, 同時に細胞質内の小顆粒の増加が認められる。この変化は日を追って著しくなり, 約 5—6 日頃には神経細胞は凹凸が著しくなり, 細胞質顆粒も増加する。核には異常を認めない。(図 2) さらに一兩日を経過すると神経細胞の胞体は急速に増大し, 細胞質内に多数の空胞を作る。空胞の大きさはさまざまであるが, 細胞の辺縁部に多い。核にはほとんど変化を認

めない。(図3)衛星細胞では5~6日頃より肥大があらわれる。

神経線維での変化は特異的で、その変化はキ剤投与後3日頃よりはじまる軸索の空胞状の変性を特徴とする。この変化は有髄・無髄何れの神経線維にも見られ、培養辺縁部の無髄線維の部をはじめ有髄線維の全長に亘って認められるが、特にランヴィール紋輪部では空胞が大きい。

髄鞘の変化は主として、軸索の変化に基因する二次的のものと思われる。すなわち軸索内に出現した空胞が大いさを増すにつれて機械的に断裂破壊する。従って髄鞘が消失する場所と、軸索の空胞変性のおこり易い場所是一致的である(ランヴィール紋輪部)。この軸索の空胞変性は神経細胞体での同種の変性より早期に出現する。

シュワン細胞での変化は衛星細胞のそれと略々同様であるが、キ剤投与後5-6日頃に軽度の腫脹を示してくる。稀に胞体内に小空胞の出現がみられる。シュワン細胞核での変化は殆んど見られない。

キ剤投与量 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の場合は病変の出現は著しく遅延する。すなわちキ剤投与後10-14日頃より神経細胞の萎縮と軽度の小顆粒の出現が見られる。約1ヶ月間キ剤を連続投与しても、それ以上に病変は進行しない。

しかし神経線維での変化は上述の空胞変性は著明ではなく、むしろ髄鞘の変性が目立っている。すなわち、キ剤投与後10日頃より、ランヴィール紋輪は開大し、髄鞘は徐々に退縮する。これと同時に髄鞘の表面は不平滑となる。時には髄鞘が離開し套状の裂隙を作ることもある。この所見は慢性節状変性の像である。シュワン細胞や衛星細胞の変化は見られない。

キ剤投与量 $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ の場合には長期投与に拘らず(2ヶ月)神経細胞・神経線維何れにも変化は見られない。

これら資料の電顕検索は未だ予備実験の段階にすぎないが、上述神経細胞の顆粒化や軸索の空胞変性は、いずれもミトコンドリアの変性に基づくものである。すなわちミトコンドリアは軽度の腫脹の後(2日)楯の破壊・融解に次いでミトコンドリア膜にも破壊がおこる(3~5日)。ミトコンドリア周囲の神経小管やその他の小器管には変化が見られない。約1週間後にはこのようにして出来た空胞が神経細胞の胞体内、軸索内に充満する。髄鞘の変化は軸索内に空胞が多数集積するまで殆んど変化が見られない。その時期になると髄鞘は軸索内空胞の圧迫によってその層状構造の乱れを生じ、次第に破壊に陥る。

#### 考 按

以上の所見よりキ剤投与量と病変発現とを考えると $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 投与では急性の変化をあらわし、神経細胞は1週以内に重篤な病変を示してくる。これに反し $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の量では1ヶ月の投与によっても神経細胞の病変は萎縮と軽度の顆粒状変性物の出現にすぎず、 $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ では病変は2ヶ月の投与によっても出現しない。このようにキ剤による影響が見られるのは $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度で、それ以下の濃度では影響はないと言え得る。事実未発表のデータではあるが新生マウス小脳での髄鞘形成を見ると $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の濃度でキ剤投与をつづけても髄鞘形成の抑制は見られない。我々の実験の場合10

$\mu\text{g/ml}$ 投与で数日中に神経細胞が死滅することから、それ以上の濃度の投与は行っていないが、 $1 \sim 10 \mu\text{g/ml}$ 投与で神経組織への影響があると考えてよいと思われる。in vivo の実験で $10 \mu\text{g/ml}$ の血清中の濃度が中毒量として重視されていることを考えると、キ剤量に関する限り、本実験の結果とよく一致している。しかしこの実験で重要なことはキ剤濃度と病変との関係である。すなわち、 $10 \mu\text{g/ml}$ では神経細胞および軸索のミトコンドリアには急速な空胞変性が出現し、神経細胞が高度の変性像を示すに至る一週間の経過では神経細胞核・シュワン細胞および髄鞘には殆んど変化がない。これに反し $1 \mu\text{g/ml}$ の濃度では1ヶ月の経過中、ミトコンドリアの空胞変性は神経細胞の一部に見られたのみで、軸索での変化は殆んど見出せなかった。しかし髄鞘の慢性節状変性の像や、髄鞘離開などの所見がキ剤投与後10日以降に出現している。この両群での病変像は一見矛盾するように見えるが、必ずしも矛盾するものではない。というのはミトコンドリアのキ剤に対する耐性(tolerance)が髄鞘保持機構が有する耐性と異なるためと思われる。ミトコンドリアではその変性には比較的大量のキ剤を要し、その経過は急激であるのに反し、髄鞘ではより少量のキ剤によっても影響を受け、その変化が現れるのに長時日を要するわけである。髄鞘保持に対するこのような機構はビタミン欠乏時の髄鞘に見られる。すなわち $B_1$ 拮抗体 オキシサイアミンおよびピリサイアミン投与によって生ぜしめた $B_1$ 欠乏時の神経組織での髄鞘変性は、 $10^{-4}$ モルの場合でも $10^{-8}$ モルの場合でも、ともに10～14日の後に出現する。しかし神経細胞での変性は $10^{-4}$ モルで3～4日後に出現し、 $10^{-8}$ モルでは殆んど変化がない。キ剤投与時の変化もこの $B_1$ 欠乏時の耐性と同様の関係があるのであろう。キ剤 $10 \mu\text{g/ml}$ 投与によって髄鞘に変化が見られないのは、軸索に高度の空胞変性が出現する迄の期間は、髄鞘そのものに変性を生ぜしめるには不十分で、むしろその間に軸索の腫脹にもとづき、機械的に破壊されてしまうのであろう。ミトコンドリアの急速な変性は、ミトコンドリアは細胞内酸化還元機構に関与する酵素の存在する部であり、八木等によって生化学的にキ剤による酸化機構の障害のおこることが報告されたことを形態学的に裏付けるものと思われる。また少量のキ剤投与群に見られる髄鞘の破壊像は、一部は $B_6$ 欠乏時の、一部は $B_1$ 欠乏時の髄鞘変性像に似ている。したがってキ剤のビタミン活性への生化学的検索、ことに $B_1$ に関しては髄鞘保持にはtransketolaseのcoenzymeとしての意義が強調されるところから、この酵素活性に対するキ剤の影響なども検索を要するものであろう。

#### まとめ

1. 後根神経節の培養を行い、培養組織の完成した1ヶ月後、キ剤を投与して神経組織での病変を光顕・電顕観察を行った(キ剤投与量 $0.1 \mu\text{g/ml} \sim 10 \mu\text{g/ml}$ )
2. キ剤 $10 \mu\text{g/ml}$ 投与群では3～4日頃より神経細胞の顆粒状変性、軸索の空胞状変性を来し、6～7日後には神経細胞は著明な空胞変性に陥る。髄鞘の変化は変性した軸索の圧迫による二次的なものである。
3. 上述変化は電顕的にミトコンドリアの空胞変性によるものである。



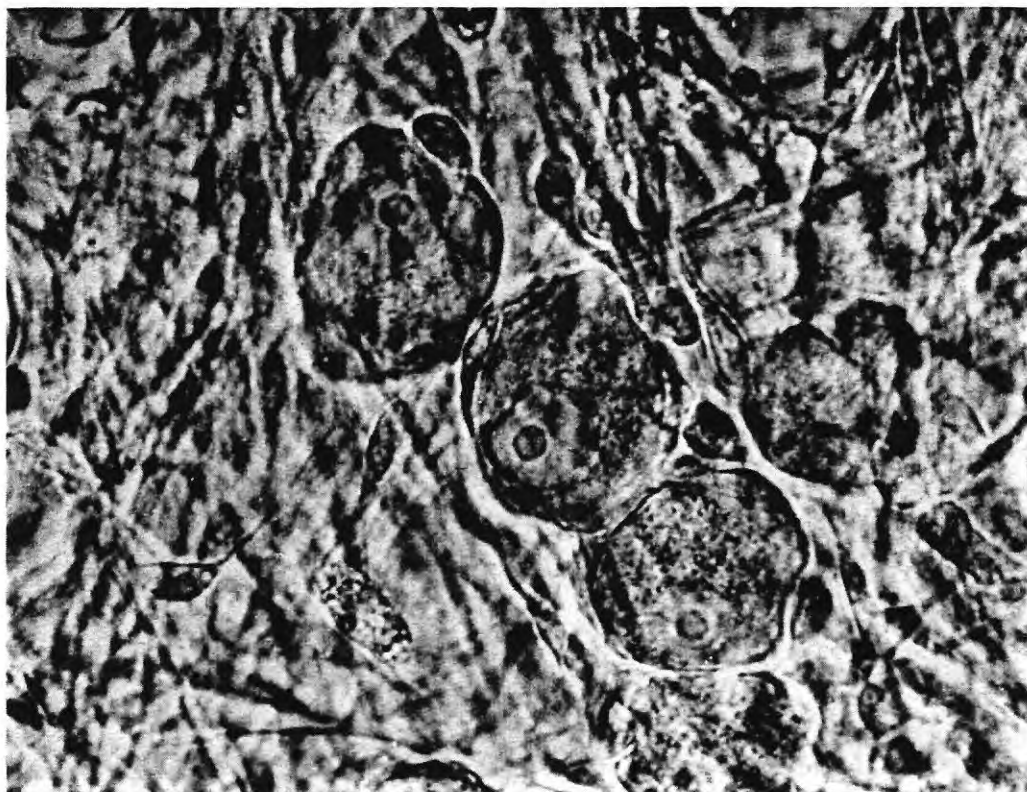
4. キ剤1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 投与群では神経細胞の変化は少く、髄鞘に10～14日後に慢性節状変性、髄鞘解離などの変化をおこす。
5. キ剤0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ では2ヶ月間投与に拘らず培養組織には殆んど変化は見られない。

#### 参考文献

- 1) 別府宏圀, その他2名: 培養神経組織におよぼすキノホルムの影響。スモン調査研究協議会報告, キノフォルム部会, 第3回研究会報告, 7, 1972.
- 2) 大月三郎: 動物におけるキノホルム投与実験。スモン調査研究協議会報告, 総会号, 10, 1972.
- 3) 八木国夫, 他3名: ミトコンドリアの呼吸調節におよぼすキノホルムの影響。スモン調査研究協議会報告, キノフォルム部会, 第1回研究会報告, 2, 1971.
- 4) 八木国夫, 他3名: キノホルムの脳ミトコンドリアの呼吸に及ぼす影響ならびにキノホルム類似物質の肝ミトコンドリアの呼吸調節に及ぼす影響。スモン調査研究協議会報告, キノフォルム部会, 第2回研究会報告, 6, 1971.
- 5) Yonezawa, T. & Iwanami, H.: An experimental study of thiamine deficiency in nervous tissue, using tissue culture technics. J. Neuropath. Exper. Neur. 25: 362, 1966.
- 6) Yonezawa, T., Mori, T. & Nakatani, Y.: Effects of pyridoxine deficiency in nervous tissue maintained in vitro. Ann. N.Y. Acad. Sci. 166: 146, 1969.

#### 附図説明

- 図1 キ剤10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 投与時の後根神経節細胞 1のa投与後24時間・1のb投与後4日 両者は同一視野の無固定材料。
- 図2 キ剤10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 投与, 後根神経節細胞 投与後7日。細胞質は著しい空胞変性に陥っている。無固定標本
- 図3 キ剤10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 投与後24時間の神経細胞電顕像。著明な変化としてミトコンドリアの変性像があげられる。
- 図4 キ剤10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 投与6日。神経線維は空胞状となるが、軸索のミトコンドリアの変性、空胞化による。髄鞘には変化はない。
- 図5 キ剤10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 投与・3日。無髄線維にも図4と同様の変化がみられる。(位相差)
- 図6 キ剤1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 投与時の神経細胞変性の経過を示す。6のaはキ剤投与後3日の所見で、略々正常像を示す。6のbは6日後の所見で、胞体内に小顆粒の出現が見られる。6のcは7日後の所見で、細胞質内顆粒は増加する。6のdは16日後の所見、萎縮と細胞質の顆粒化が見られるが、これ以上の変性像は出現しない。
- 図7 キ剤1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 投与後7日。髄鞘に開離が見られる。
- 図8 キ剤1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 投与後14日。髄鞘の節状の変性消失を示す。



☒ 1 - a



☒ 1 - b



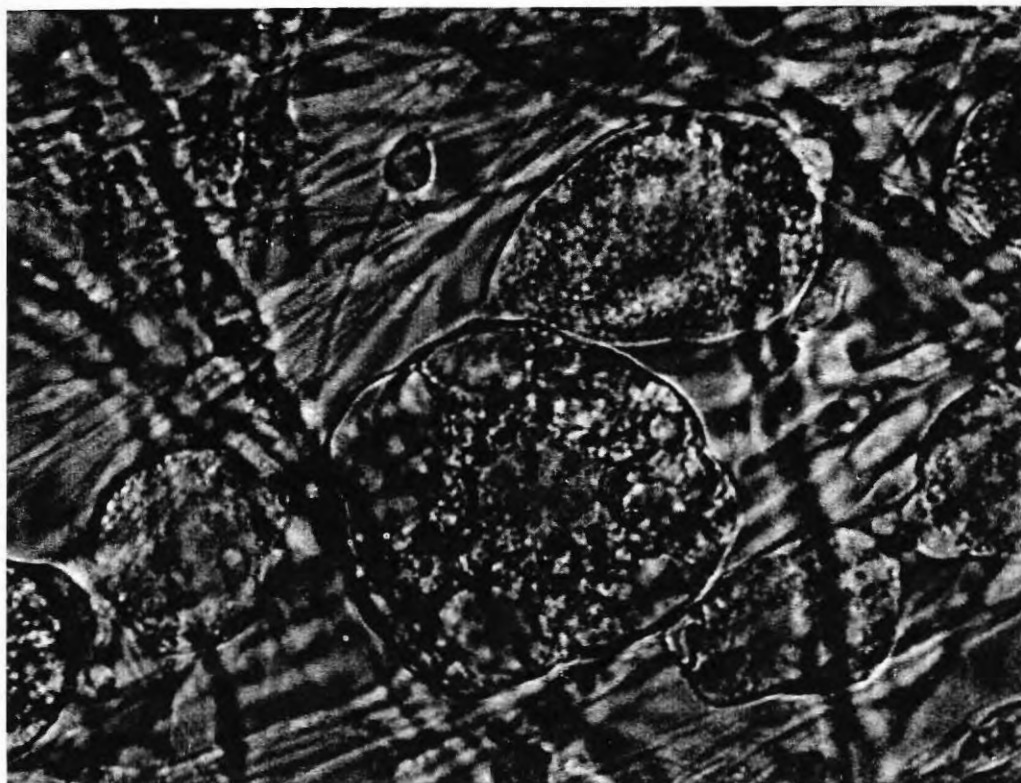


图 2

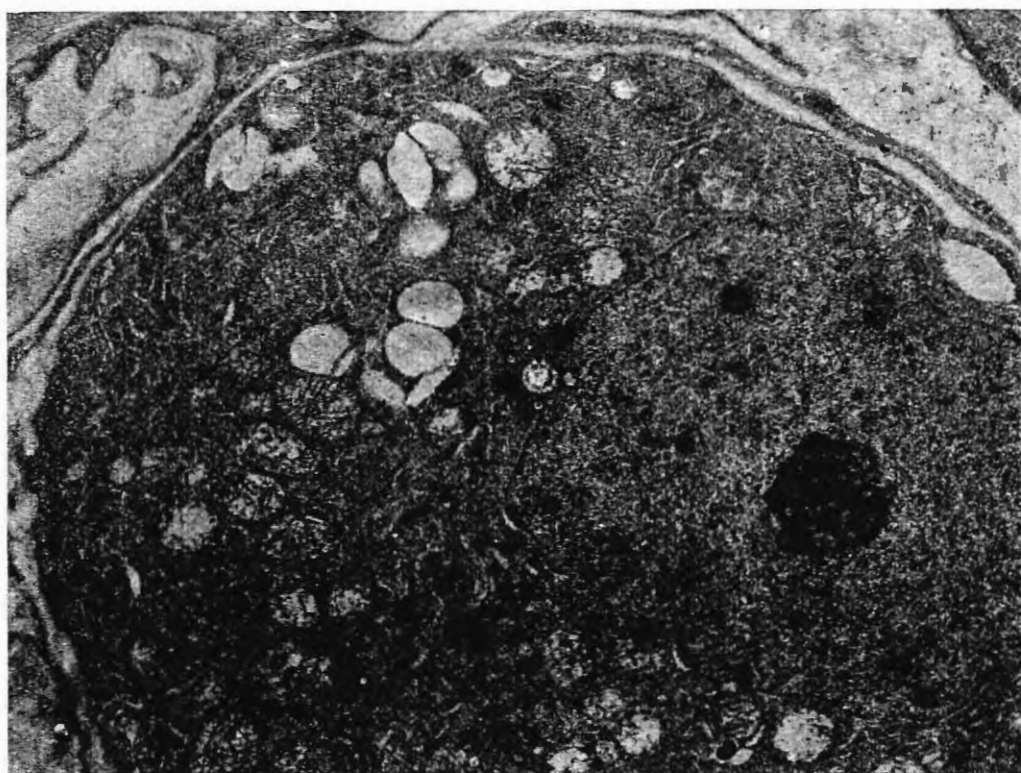
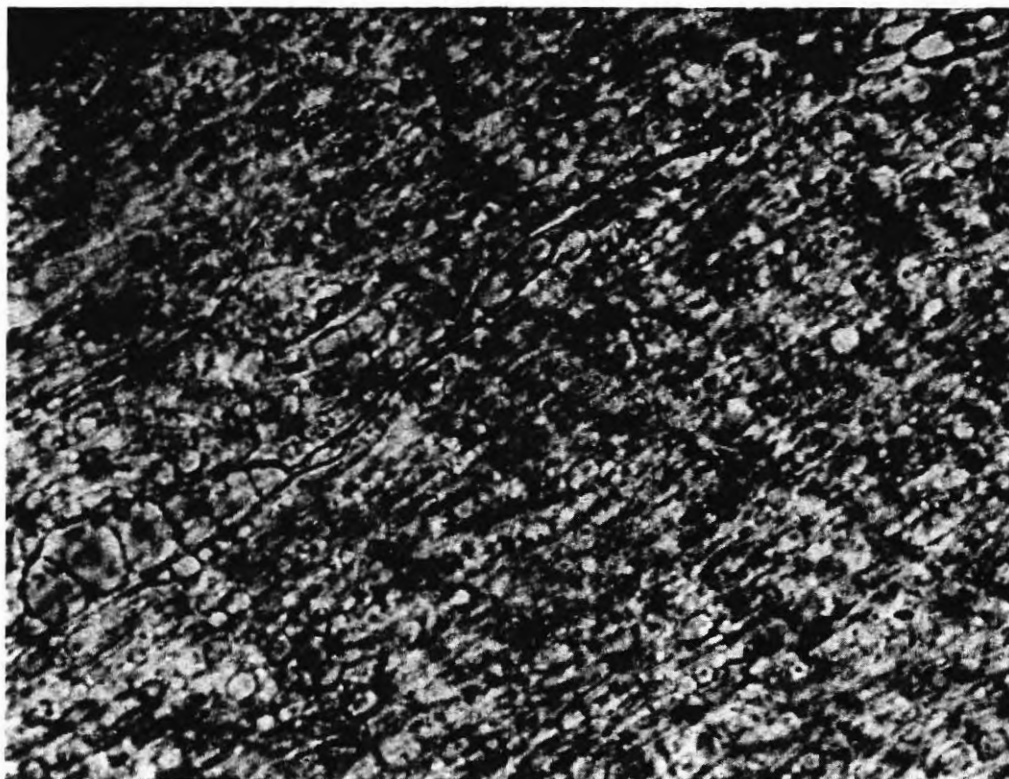
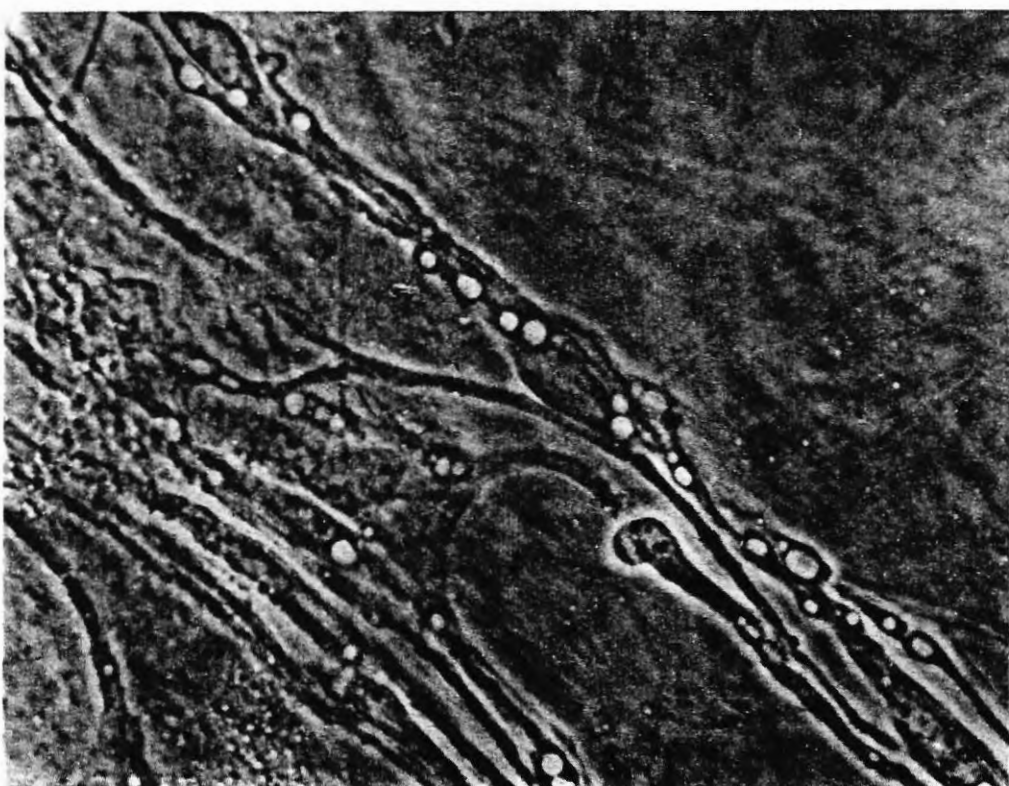


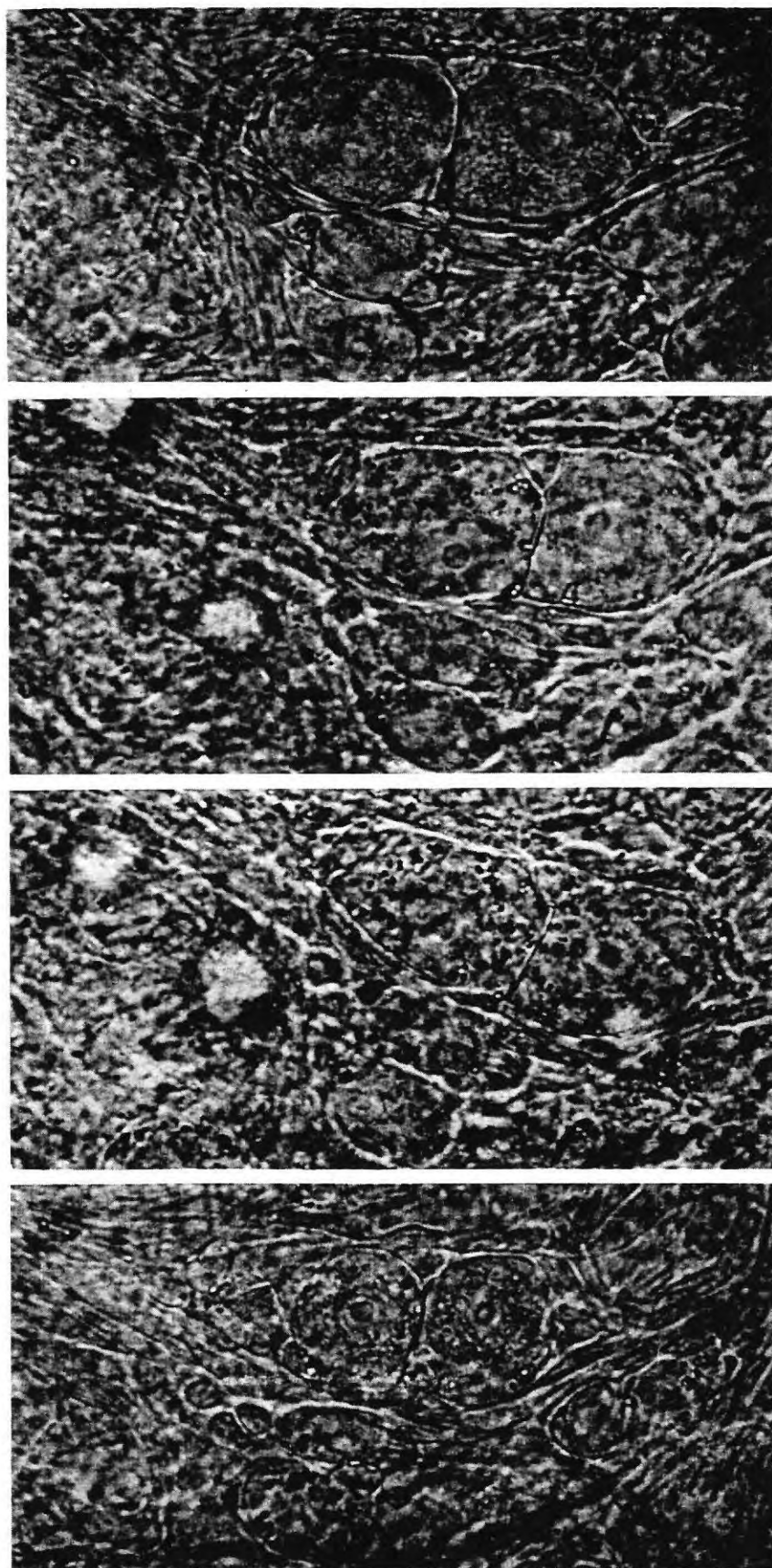
图 3



☒ 4



☒ 5





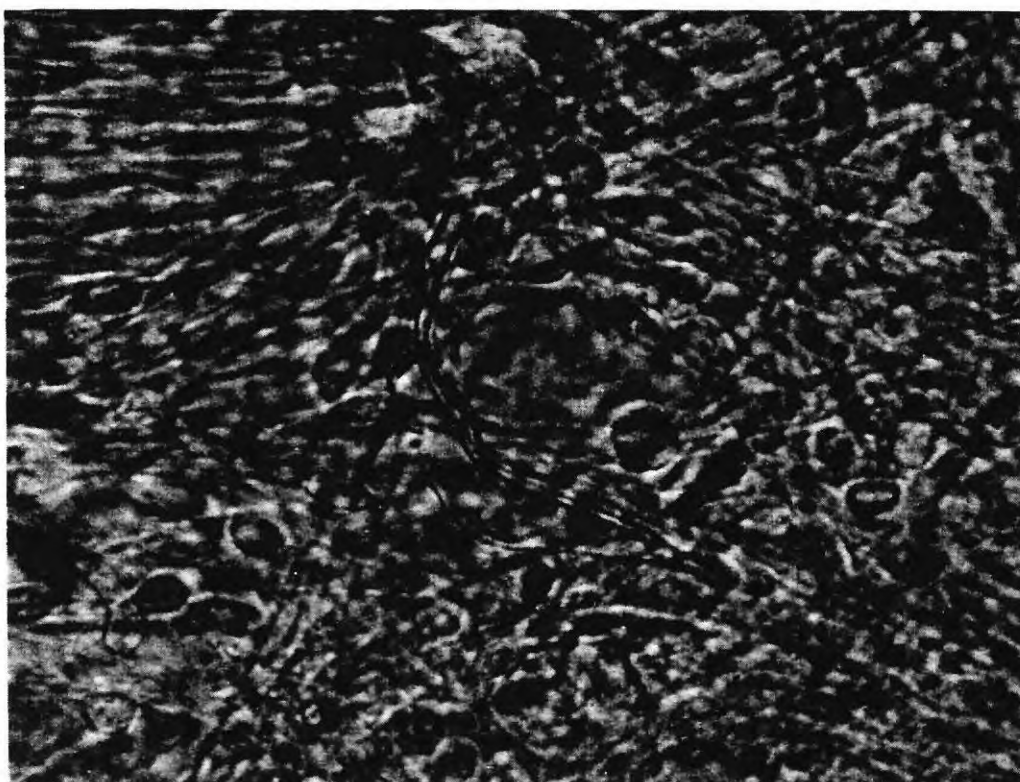


图-7

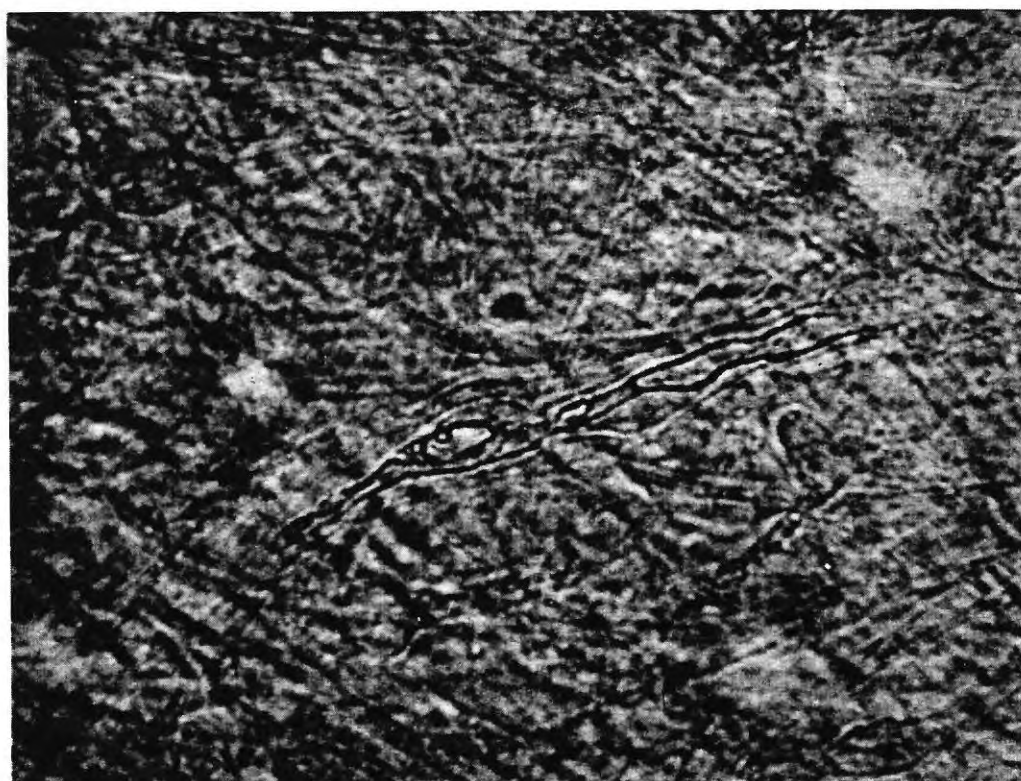


图-8

## 47. キノホルムの障害作用に対する増強因子の研究

— 各種農薬前処置による障害加算性の追求 —

斎藤 守

( 東大・医科学研究所 )

### 1. まえがき

キノホルムは消化器系疾患に用いられていたが、キノホルム投薬前の患者の疾患病状に関しては、あまり明らかにされていない。SMON患者の発生は時期的又は地域的に見て集団的に、又は散発的に起こっていて、地域的には僻地というよりも小都市周辺に発生している事が注目せられていた。又、夏期に多く、虚弱な人や、中年女性に多発の傾向を示し、地域集積性のある事も指摘された。

病理組織学的な立場から、最も重要なスモンの病理学的所見は神経系の病変である。特に脊髄を中心とする病変は左右対称的且つ系統的であることから、私としては、病因論的原因是中毒性、乃至代謝障害性のものであると考えていた。

更にその際、スモン患者に特有ともいふべき病変として緑舌苔が指摘せられていたが、緑舌苔の再発とスモンの神経症状の悪化との間に関連性のあることも注目されていた。その緑色物質の化学的検索が病因解明に繋がると考え、この物質が微生物の代謝産物によるか、否かという事をも問題として、私は井形、本間らと共に二・三の病院のスモン患者の緑舌苔の本態について研究を行なうこととした。

1969年11月、1970年1月の調査に於て16名の舌苔について本間は細菌学的検査を試み、その結果 *pseudomonas aeruginosa* は1例検出されたのみであったのは対し、*mycoplasma* が16例中12例(75%)に発見された(1)。又井上はvirusの分離を報告したが(2)、その培地中からも同様の *mycoplasma* を本間が分離し、virusの単離が問題とされた事があった。この際、注目すべき点は、これら両微生物の培地が淡緑色調を呈した事が協議会の席上、述べられたことである。この事から考えると、緑舌苔の緑色物質が微生物の代謝産物であるという事も一応は考慮する必要があった。

その当時、緑舌苔より分離した緑色物質は東大神経内科の高須により追求が行なわれていた(3)。

加えて、井形はスモン患者から緑舌、緑色便、更に緑色尿を呈する一症例を検索する機会を得て、その尿中に緑色の針状結晶が多量に存在する事実を確かめた。又、本間は更に微生物として新たに *Serratia marcescens* を井原地区のスモン患者18例の内4例に見出した。それらは種々の色調を呈した舌苔部分より分離されたものであったが、それらの株をPPL0液状培地に培養するとその管底に結晶状物質の沈着がみられた。同時に綿球を上記培地中に入れておくと、綿球そのものは、淡青色、淡灰色、淡桃色を示し、これを顕微鏡的に見ると綿繊維上に硝子様物質が付着する事を認めた。

一方、スモン患者の糞便から *mycoplasma* を分離する目的でペニシリン加PPL0液状培地を

加えて、攪拌した後、軽く遠心するとその液の表面にしばしば針状結晶状物質を認めていた。

井形は、前記緑色の針状結晶を有する尿を見出し、比較のため本間のもとに持参したが、その両者の結晶状物質の写真は極めてよく類似していた。この尿中の結晶状物質の量は驚くべき程の大量で化学分析に十分な量と考えられ、直ちに物質分離の段階に入ることが妥当との結論に達した。（その当時、私は海外出張中の為不在であった。）

このスモン患者の尿中の結晶は吉岡、田村により、無色結晶と緑色色素に分離され、その無色結晶は非抱合型のキノホルムであり、緑色色素はキノホルムの $\text{Fe}^{\text{III}}$ 錯化合物である事が発見された(4)。更にその後、緑舌の緑色物質も同一物質である事が同氏らにより明らかにされ、引続きスモン患者の非緑色尿、血清、スモン患者の剖検組織からもキノホルムが検出されるに致った(5)。

結果的には細菌の培養液中に見出される濃緑色の結晶状物質、便中に見出される同様の物質は異なるものであったろうし、又キノホルムとは無縁のものかどうか分らないが、緑色を追い、結晶状物質を求め、遂にキノホルムの大量の結晶につき当たった事は研究のたどる経過の上からは興味深いものである。

一方、池田、戸部らは患者臓器、尿、緑舌苔、緑色尿からMn, Fe, Cu, Zn, Te, Ni, Cd など重金属の含有を認め、特に緑色舌苔、及び尿からはFe, Znが多く見出された事を報告している(6)。

又、裁判科学研究所の川合は、患者よりヨードを検出したが、いずれもキノホルムとの関連性のあるデーターである。

疫学的には、椿はスモンの発生に病院集積性のある事を注目していたが、田村らの緑色物質がキノホルムと鉄のキレート物質であるという発表により、キノホルム服用量を調査した結果、同剤の大量投与がスモンの発生と密接な関係のある事を見出した。

厚生省はこれらの結果によりキノホルム使用を全面的中止に踏切り、以後スモン発生激減した事は周知の如くである。

尚、キノホルム投薬が禁止された以後に於ても、誤って投薬の続けられた患者からスモンが発症した例のあること、キノホルムが投薬されていなかったと考えられていたスモン患者よりキノホルムが尿より検出された例のあること、又少なくとも剖検上、スモンと確認された症例でキノホルムの投薬されていなかった例は、1例も存在しないということが堤によって述べられている。いずれもキノホルムの大量投与がスモンの発症に重要な原因をなしている事がわかる。

一方、中江、井形らによってキノホルム投薬についての詳細な疫学的な調査が進められた(7)。それによるとキノホルム投与状況とスモン発症との関連について、投与量及び投与期間との相互関連表をみると確実に発症する領域と、発症例と非発症例が混在している領域があり、キノホルム服用患者に於ける発症の個人差の起こっている理由を検討するべきであろう。1つにはキノホルム投薬以前の疾病内容が不明であるが、キノホルムの吸収量が体質的個人差に留らず、疾病状態によっても異なるのではないかという点であり、更に吸収したキノホルムに対する解毒作用、特にグルクロン酸抱合能を

減少又は増加せしめる様な他の因子或いは他剤の影響等の作用についての検討が必要と思われる。

他方、昭和46年度までのキノホルムの多量使用の慣行がどの様な経過で進んで来たのか、又、特にキノホルムの極量についてはどの様に扱われてきたのかという疑問が残る。キノホルム(chiniformum)の常用量は1回0.2g 1日0.6gとなっているが、第七改正日本薬局方第一部解説書(1961年)の解説欄の適用には“内服としては細菌性の下痢、胃腸炎などには1日量0.6~1gを3回に分服する、アメーバー赤痢の急性症には、1日量2.0~3.0gを10日間投与、慢性症には1日量0.9~1.5gを1~2週間、細菌性赤痢には1日1.5~2.0gを投与する”。尚薬効欄には“副作用は極めて少ない。本品の代謝に関しては殆ど知られていないが内服された大部分は吸収される事なく、腸管をそのまま通過するものとみなされている”となっている。従ってアメーバー赤痢、細菌性赤痢には常用量をはるかに上回った投与量が認められていた事になる。

キノホルムは吸収量が疾病状態、特に胃腸疾患の病変状態とどの様な関係にあるか、又体内に吸収されたキノホルムがグルクロン酸抱合等の解毒機構の影響を如何に受けていたか、解毒排泄されなかった過剰のキノホルム濃度が神経系の発症に関連していると思われるが、その意味でグルクロン酸抱合について競合する物質はなかったであろうか、或いはグルクロン酸代謝系の活性を増加、又は特に減少させる如き物質との関連を重視して見る必要がある。

農薬に関しては農林省、家畜衛生試験所 本間惣太技官がスモンの原因に関する一考察の中で、スモンの発生は農薬中、特に有機燐剤との関連を指摘している(11)。

又、平木は $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -BHC, Dieldrin, pp'-DDE, pp'-DDTの血清濃度を測定しこれら農薬とスモンとは特に関係がないと報告している。

スモンの病因学的追求に於て農薬の動物実験を鹿野、石川らが(有機燐系農薬としてチオメトン、バイテックス、エストックス)(8)、更に江頭、北邨らは水田に使用されを農薬(エチル・パラチオン、バイテックス、セビン、メタシストックス)を用いて実験がなされている(9)。

又、児玉は農薬の使用とスモン発生との関連について、ジクロロン剤や有機硫黄剤の使用量の推移がスモン発生数と同調するかの如き観を呈すると報告している(10)。

農薬汚染は特に有機塩素系殺虫剤に於て起こっている事が注目せられていて、これら農薬の使用停止にかかわらず、なお、人体汚染は引続いて増加が起こっている。その他の農薬に於ても、具体的な汚染が不明ではあるが、広範囲な汚染が推定される。この様な農薬の汚染による消化器系、肝臓などの慢性的な、又は不顕性的な障害とキノホルムとの関連について、スモン発生の集積性という事も踏えて調査、実験に当たるべきと思われた。

私はスモン患者多発家庭を訪問し、食生活としては農薬を用いている自家栽培野菜を生食状態で多量に摂取している事を知った。食品に対する農薬汚染がキノホルムの過剰投与に対して障害作用を増加せしめている可能性も考えられるので次の障害性スクリーニング実験を行った。

## II. 実験

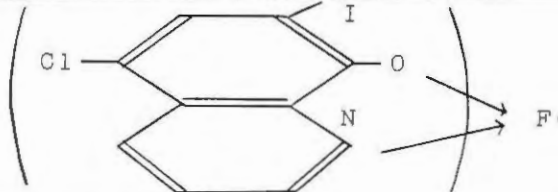
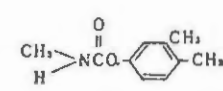
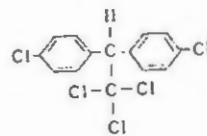
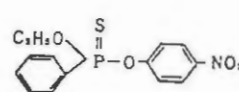
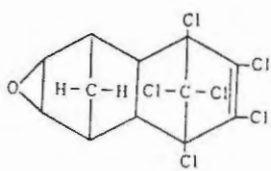


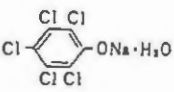
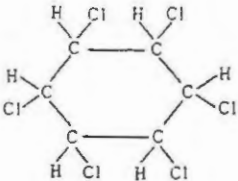
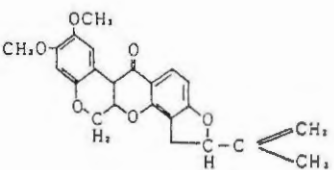
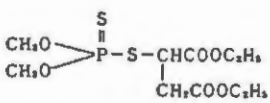
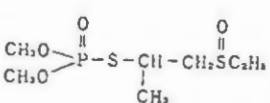
まえがきで述べてきた如く、今回は我が国で広く問題となっている農薬汚染の実態を考慮し、メオパール、DDT、EPN、エンドリン、PCP-Na、リンデン、マラソン、エストックス以上の8種農薬の前処置、その後に投与したキノホルムの病変、如何に作用したかをマウスを用いて検討してみた。

## 1. 方法

農薬としては前回報告に於ける考案によってメオパール、DDT、EPN、エンドリン、PCP-Na、リンデン、マラソン、エストックス以上8種を選んだ(表1)

—表 1—

|                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                               |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="margin-right: 20px;">chinoxformum</div> <div style="text-align: center;">  </div> </div> |                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                               |
| 1 MPMC<br>(Meobal)                                                                                                                                                                                                                                                | <div style="text-align: center;">  </div> <p>3,4-xylyl methylcarbamate<br/>メチルカルバミン酸3,4-キシリル</p>                                     | 劇物<br>〔人畜〕<br>経口(マ) : 57.1<br>経皮(マ) : 120<br>〔魚類〕B<br>コイ : >10(原)                                                                             |
| 2 DDT<br>(DDT)                                                                                                                                                                                                                                                    | <div style="text-align: center;">  </div> <p>1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane<br/>1,1,1-トリクロル-2,2-ビス(p-クロルフェニル)エタン</p> | 〔人畜〕<br>経口(マ) : 300~400<br>(ラ) : 250<br>経皮(ウ) : 150<br>〔魚類〕<br>乳剤C, その他B<br>コイ : 0.25(原)<br>ニジマス : 0.0048(乳)<br>ヒメダカ : 0.08(原)<br>〔蜜蜂〕<br>中程度 |
| 3 EPN<br>(EPN)                                                                                                                                                                                                                                                    | <div style="text-align: center;">  </div> <p>ethyl p-nitrophenyl phenylphosphonothionate<br/>フェニルホスホノチオ酸O-エチル O-p-ニトロフェニル</p>       | 毒物(1.5%以下は劇物)<br>〔人畜〕<br>経口(マ) : 24<br>(ラ) : 35~45<br>経皮(ウ) : 50~150<br>〔魚類〕B<br>コイ : 0.35(原)<br>ヒメダカ : 0.75(原)<br>〔蜜蜂〕<br>大                  |
| 4 ディルドリン<br>(dieldrin)                                                                                                                                                                                                                                            | <div style="text-align: center;">  </div> <p>1,2,3,4,10,10-hexachloro-6,7-epoxy-1,4,4a,5,6,8-octalin</p>                            | 劇物<br>〔人畜〕<br>経口(マ) : 38<br>(ラ) : 約60<br>経皮(ウ) : 約150<br>〔魚類〕規制<br>コイ : 0.018(原)<br>: 0.021~0.32(乳)                                           |

|                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                            | 7,8,8a-octahydro-endo-1,4-exo-5,8-dimethanonaphthalene, (HEOD)85%以上<br>1,2,3,4,10,10-ヘキサクロル-6,7-エポキシ-1,4,4a,5,6,7,8,8a-オクタヒドロ-エンド-1,4-エキソ-5,8-ジメタノナフタリン                                                                                                                                | ヒメダカ：0.004(原)<br>ニジマス：0.027(乳)<br>〔蜜蜂〕<br>大                                                                                                                                                                                                                                  |
| 5 PCP<br>(pentachlorophenol-sodium)<br><br>「PCP」           | <br><br>sodium pentachlorophenoxide<br>ナトリウムペンタクロルフェノレート                                                                                                                                              | 劇物(1%以下を除く)<br>〔人畜〕<br>経口(マ)：約82<br>経皮(マ)：約154<br>〔魚類〕指定<br>コイ：0.10(原)                                                                                                                                                                                                       |
| 6 リンデン<br>(lindane)<br><br>ロテノン<br>(rotenone)<br><br>「デリス」 | <br><br>1,2,3,4,5,6-hexachlorocyclohexane (γ体99%以上)<br>1,2,3,4,5,6-ヘキサクロルシクロヘキサン<br><br><br><br>rotenone<br>〔ロテノン〕 | 劇物(1.5%以下を除く)<br>〔人畜〕<br>経口(マ)：74<br>〔魚類〕<br>乳剤C, その他B<br>ヒメダカ：0.1(原)<br>ニジマス：0.036(乳)<br>コイ：0.31(原)<br>：0.26(乳)<br>〔蜜蜂〕<br>大<br><br>劇物(2%以下を除く)<br>〔人畜〕<br>経口(ラ)：132<br>経皮(ウ)：>940<br>〔魚類〕C<br>コイ：0.032(原)<br>モツゴ：0.002~0.02<br>(原, 24h)<br>ヒメダカ：0.008(原)<br>〔蜜蜂〕<br>ほとんどなし |
| 7 マラソン<br>(malathion)                                      | <br><br>S-[1,2-di(ethoxycarbonyl)ethyl]<br>dimethyl phosphorothiolothionate<br>ジチオリン酸 S-[1,2-ビス(エトキシカルボニル)エチル]O,<br>O-ジメチル                                                                          | 〔人畜〕<br>経口(マ)：369<br>経皮(ウ)：776<br>〔魚類〕B<br>コイ：14(原)<br>ヒメダカ：0.75(原)<br>〔蜜蜂〕<br>大                                                                                                                                                                                             |
| 8 ESP<br>(Estox)<br><br>「エストックス」                           | <br><br>S-(2-ethylsulfinyl-1-methylethyl)dimethyl<br>phosphorothiolate<br>チオリン酸 S-(2-エチルスルフィニル-1-メチルエチル)O,<br>O-ジメチル                                                                                | 劇物<br>〔人畜〕<br>経口(マ)：57.8<br>経皮(マ)：264<br>〔魚類〕A<br>コイ：>40(原)<br>：>10(乳)                                                                                                                                                                                                       |

実験動物としては、6週令のDDDマウス、♂、各群4匹を用い、各農薬は皮下投与によりLD<sub>50</sub>値量(一部推定)の1/2量を3回に分けて第1, 3, 5日に投与し、その後2匹は農薬単独投与群としてそのまま10

日間普通食で飼育し、他の2匹にはキノホルム混合飼料-a) 15mg/日/匹、-b) 7.5mg/日/匹を第8、9日は飼料-a)を投与、後第11、12、13、14日には飼料-b)を投与した。

障害検索の為、死後、又は第14日に屠殺後剖検し病理組織学的に大部分の臓器を調べた。

## 2. 成績

表2に示す如く死亡例では4) エンドリン、5) PCP-Na 群に於てキノホルム投与後2匹、共に死亡し、かつ農薬単独投与でも各1匹ずつ死亡を認めた。

表 2 - 病 理 組 織 変 化

| <div> <div>Chinoformum<br/>15mg/day/Mouse</div> <div> 2日 2日 7日間<br/>↑ ↑ ↑<br/>10日<br/>農薬 1/2 LD<sub>50</sub>/3回 </div> </div> |       | 死亡例 | Thymus<br>Lymph n.<br>Spleen<br>(atr. kar-<br>yorrhexis) | Stomach<br>Intestine<br>(M. inj,<br>etc.) | Liver<br>(atr. ploidy ↑<br>, coag. deg.<br>etc.) | Brain<br>(acid deg.) | Spinal cord<br>(後索の膨化<br>(神経節変化)) | キノホルム<br>障害増強度 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-----|----------------------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------------|----------------------|-----------------------------------|----------------|
| 1メオパール<br>(MPMC)<br>(20mg/kg×3)                                                                                               | キノホルム | 0/2 | ±                                                        | ±                                         | ±                                                | ≡                    | 一〜±                               | ↓              |
|                                                                                                                               | —     | 0/2 | —                                                        | —                                         | —                                                | —                    | 一〜±                               |                |
| 2DDT<br>(200mg/kg×3)                                                                                                          | キノホルム | 1/2 | +                                                        | —                                         | ±                                                | +                    | ±                                 | ↓              |
|                                                                                                                               | —     | 0/2 | —                                                        | —                                         | —                                                | —                    | —                                 |                |
| 3EPN<br>(10mg/kg×3)                                                                                                           | キノホルム | 0/2 | ±                                                        | —                                         | —                                                | —                    | +                                 | ↓              |
|                                                                                                                               | —     | 0/2 | —                                                        | —                                         | —                                                | —                    | —                                 |                |
| 4エンドリン<br>(25mg/kg×3)                                                                                                         | キノホルム | 2/2 | +                                                        | ±                                         | —                                                | 水腫様変化                | ±〜+                               | ↑              |
|                                                                                                                               | —     | 1/2 | —                                                        | —                                         | —                                                | —                    | +                                 |                |
| 5PCP-Na<br>(25mg/kg×3)                                                                                                        | キノホルム | 2/2 | +                                                        | +                                         | —                                                | 水腫様変化                | ±〜+                               | ↑              |
|                                                                                                                               | —     | 1/2 | —                                                        | —                                         | —                                                | —                    | —                                 |                |
| 6リンデン<br>(10mg/kg×3)                                                                                                          | キノホルム | 1/2 | ++                                                       | +                                         | ±                                                | ++                   | +                                 | ↑              |
|                                                                                                                               | —     | 0/2 | —                                                        | —                                         | —                                                | —                    | —                                 |                |
| 7マラソン<br>(200mg/kg×3)                                                                                                         | キノホルム | 0/2 | +                                                        | ++                                        | +                                                | ≡                    | ±〜+                               | ↑              |
|                                                                                                                               | —     | 0/2 | —                                                        | —                                         | ±                                                | —                    | +                                 |                |
| 8エストックス<br>(20mg/kg×3)                                                                                                        | キノホルム | 0/2 | +                                                        | +                                         | +                                                | ≡                    | +                                 |                |
|                                                                                                                               | —     | 0/2 | —                                                        | ±                                         | +                                                | —                    |                                   |                |
| 9オリーブ油                                                                                                                        | キノホルム | 1/2 | +                                                        | ±                                         | +                                                | ≡                    | +                                 |                |
|                                                                                                                               | —     | 0/2 | —                                                        | —                                         | —                                                | —                    | —                                 |                |

(体重は各群ともキノホルム投与後、減少したが各群差はあまり認められなかった。)

\* 組織変化: atr.=atrophy

M.inj.=mitosis injury

coag.deg.=coagulative degeneration

acid.deg.=acidophilic degeneration

病理組織学的にはまずキノホルム単独投与例の病変を述べる。肝に於ては肝細胞の細胞質は萎縮を示し核の ploidy が  $2 \cdot 4 \cdot 8 \cdot 16$  と高まり、グリソン氏鞘週辺部、ならびに中心部に肝細胞の変性像が認められた。胸腺の核崩壊を伴う萎縮、リンパ節、脾等のリンパ装置にも核崩壊が認められ、小腸上皮細胞の増殖部位にも核崩壊が起こる。その数量を正常の有糸核分裂数と比較すると約  $4/5$  を示したものがある。パネット顆粒の減少なども認められ、又間質のリンパ球細胞の浸潤を伴うが、大腸の増殖細胞に於ても少数ながら同様の病変を認めた。精巣にもきわめて軽度の障害作用があり、腎臓は尿管の軽度の拡張以外には著変は認められなかった。

脊髄に於ては HE, Bodian 及び Luxol fast blue 染色を用い鏡検を試みたが、キノホルム投与例に於て後索から側索にかけての髄鞘の膨化が著明で、その範囲境界は不鮮明であった。軸索の膨化及び変性不鮮明化、神経節の一部の萎縮変性も認められた。脳に於ては海馬回、歯状回の神経細胞に Eosinophilic degeneration (好酸性変性乃至壊死) を明瞭に且つ有意に認めた。

農薬・キノホルム併合投与例に於てはリンデン、マラソン、エストロクス群に於て腸管上皮細胞の増殖部位に核崩壊が更に高まる事が認められた。(Photo 1) 又、大腸に於ても同様の傾向を示した。

脳の海馬回、歯状回の好酸性変性はメオパール、リンデン、マラソン、エストロクス投与後キノホルム経続投与例にキノホルム単独投与例と同様高度に認めた (Photo 2), DDT, EPN 例ではむしろ好酸性変性は軽減し、エンドリン, PCP-Na 例に於ては同部位に水腫様変化が特に目立った。EPN, エンドリン, PCP-Na リンデン, マラソン, エストロクス例ではキノホルム投与例と同様脊髄後索 或は側索の髄鞘の膨化 (Photo 3), 後根神経節の神経細胞の変性など (Photo 4, 5) の障害像が認められた。その他の群に於ては特に注目すべき障害像を認めていない。

以上の結果からキノホルムの示す障害像に対して病変として高めているものはエンドリン, PCP-Na, は致死的増強, 生存例についてもリンデン, マラソン, エストロクスに於て腸管上皮細胞の増殖障害は増強性を示した。

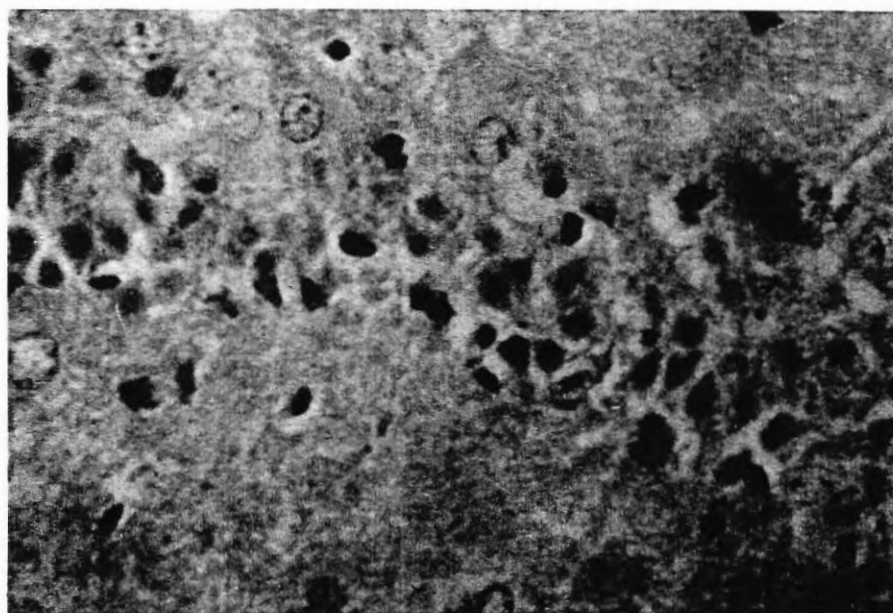
腸管上皮細胞の増殖障害性を示すことは、キノホルム投与例に於て特異的であり、スモン患者の人体剖検例に於ける腸管粘膜の萎縮と間質の細胞浸潤を武内は注目しているが、この点との関連があるものと考えられる。

又、脳の病変に於ても同様に海馬回、歯状回の神経細胞の好酸性変性の度を高めているものもある、スモンの特徴的病変を脊髄にマウスを用いては作り難いと言われているが、投与量の検討によってはもっと明瞭な病変を作り得るかも知れない。一応、脊髄などの障害像も上記の如く認める事が出来たので報告する。



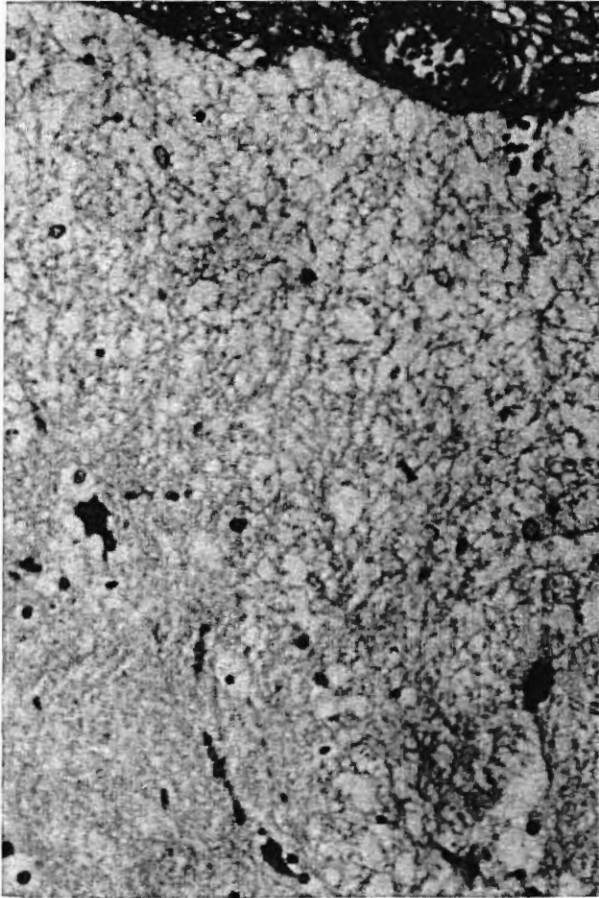
Photo, 1

リンデン投与後，キノホルム継続投与例  
小腸上皮細胞増殖部，核分裂細胞の核崩  
壊乃至凝固壊死



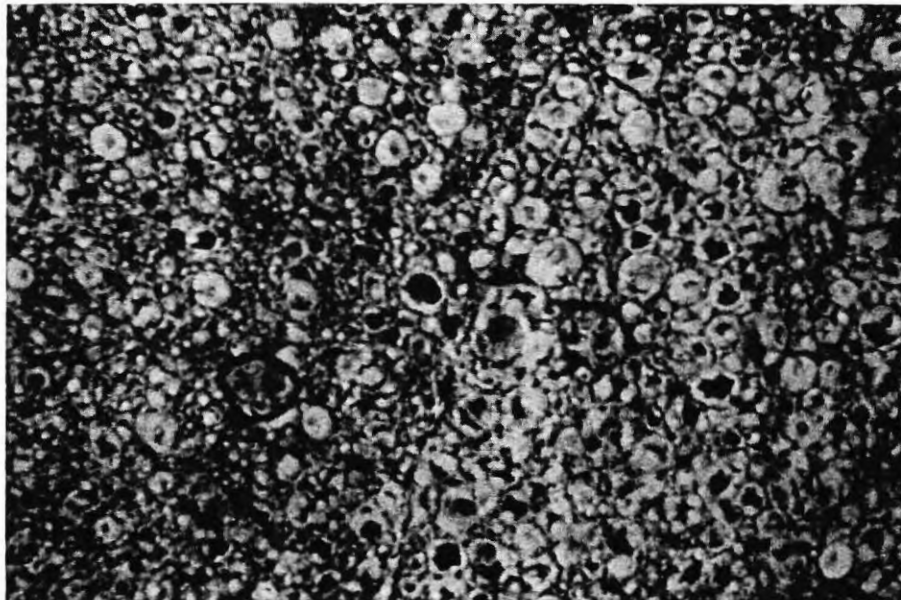
Photo, 2

マラソン投与後，キノホルム継続投与例  
著明な海馬回歯状回の神経細胞の好酸性変性。



Photo, 3

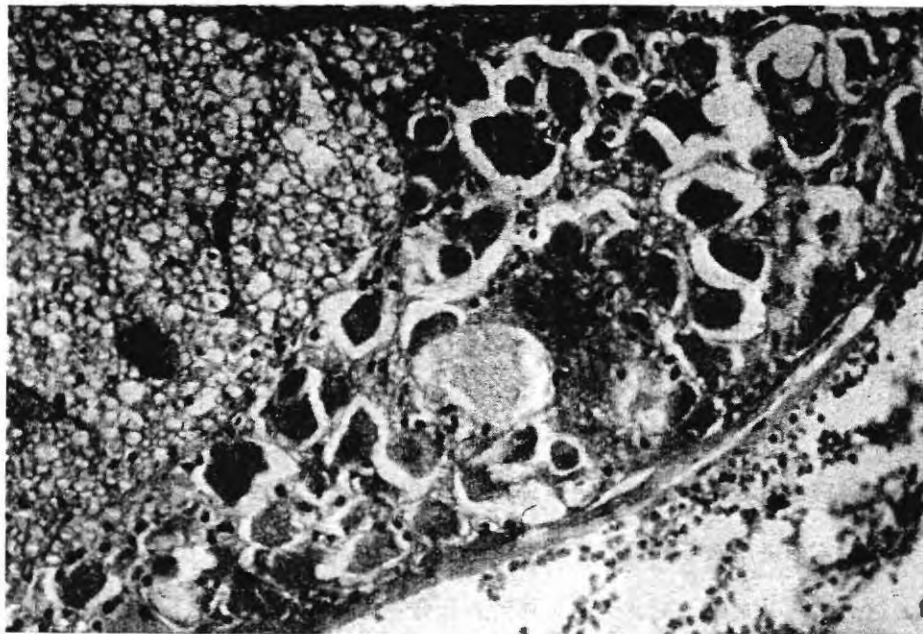
PCP-Na 投与後, キノホルム継続投与  
例の後索髄鞘の膨化(↑印正中線)



Photo, 4

リンデン投与後, キノホルム継続投与例 後根神経の膨化(Bodian染色)





Photo, 5

エンドリン投与後，キノホルム継続投与例  
後根神経節，神経細胞の変性

### 3. 考 察

キノホルム投薬に先立ち上述の様な農薬投与を行ない，その結果どのような障害効果が現われるかマウスを用いて Screening test を行なったが，今回の実験成績からみて次の事が問題点としてあげられる。

- 1) 今回の実験では初回キノホルム投与量が比較的多かった為，死亡例が必要以上出現したのでキノホルム投与量を少量用いて長期飼育実験を行なう事が望まれる。
- 2) 農薬単独投与群に於ては，その投与後 10 日間の観察飼育を行なったが，キノホルム投与前時点に於ける農薬のみの障害性を検討する必要がある。
- 3) 実験動物の選定としては症状などの明瞭な観察が出来るビーグル犬などを用いてマウスによって得られた結果が再現されるかについて，実験を行なうことが望まれる。
- 4) 更に今後の問題として，キノホルムの代謝に関連し  $^{14}\text{C}$ -キノホルムを用いての解毒量を測定し，神経系等障害効果とその部位に於ける  $^{14}\text{C}$ -キノホルムのオートラジオグラフィによる分布状態を調べてみる必要がある。

### Ⅲ 総 括

まえがきではスモン患者の緑舌苔の原因追求に始まり，病因としてキノホルムの大量投与が考えられ実証されて来たいきさつを述べた。

そして中江・井形らの，調査に基づくキノホルムの投与量と投与期間との相互関連表から，キノホルムの大量投与領域では確実にスモンが発症し，以下の領域では発症例と非発症例が混在している事



が認められた。その事実からキノホルム服用患者のスモン発症に於ける個人差の起っている理由として1) キノホルム吸収量の体質的個人差 2) キノホルム投薬以前の疾病内容によって異なるキノホルム解毒能, 3) 他の因子, 或いは他剤の作用によりキノホルムの解毒作用に影響を及ぼしているのではないかと考えられた。

ここでは我国に於て汚染が問題となっている農薬(メオパール, DDT, EPN, エンドリン, PCP-Na, リンデン, マラソン, エストックス)についてキノホルム中毒性の増強の有無をマウスを用いて検討した。

その結果, キノホルムのみを投与した場合, 腸管など増殖細胞に対する障害の他, 脊髄では後索神経の膨化, 後根神経節の変化, 又脳では海馬回, 齒状回の神経細胞の好酸性変性も著明に認められた。又農薬とキノホルムの併用投与群では有機塩化合物のエンドリン, PCP-Na, リンデン剤, 及びジチオリン酸又はジチオリン酸・ジメチルエステル化合物のマラソン, による前処置はその後投与されたキノホルムの特に増殖細胞の障害性を増強せしめる効果がある事が判明した。

今回の実験は障害性の加算性を見る為のScreening test として行なったものである。詳細に研究する為には,  $^{14}\text{C}$ -キノホルムを用い, 且つ症状など明瞭に出現するビーグル犬を用いてキノホルム代謝と発症の関係を追求する必要があると考える。

## 文 献

- 1) 本間遜他, 「SMON患者の舌苔および糞便よりMycoplasmaの検出」  
『スモン調査研究協議会研究報告書』№3 病原班 P. 83
- 2) 井上幸重「SMONのウイルス学的研究」  
『 " " 』№3 病原班 P. 31
- 3) 高須俊明他, 「イヌにおける放射性標識キノホルムの分布および代謝の研究 第1報」  
『 " " 』キノホルム部会 第1回 P. 12
- 4) 田村善蔵, 「SMON患者の緑尿及び緑便に含まれる緑色物質の本態」  
『 " " 』№3 病原班 P. 159
- 5) 田村善蔵, 「SMON患者の緑色舌苔からのキノホルムの検出」  
『 " " 』№3 病原班 P. 162
- 6) 池田良雄, 戸部満寿夫他, 「SMON患者の臓器, 尿, 尿および緑舌苔中の重金属測定」  
『 " " 』№3 病理班 P. 207
- 7) 山本俊一, 中江公裕, 井形昭弘, 「SMONとキノホルムについての疫学的検討」  
『 " " 』疫学部会 第1回 P. 25
- 8) 鹿野信一, 「犬の有機燐実験とSMON」  
『 " " 』№2 臨床班 P. 109
- 9) 江頭靖之, 「4種の農業用殺虫剤を2ヶ月間投与したハムスターに対する殺虫剤+キノホルムの1ヶ月間経口投与実験」  
『 " " 』№4 病理班 P. 190
- 10) 児玉栄一郎, 「秋田県におけるSMONの疫学的研究」  
『 " " 』№1 疫学班 P. 123
- 11) 本間惣太, 「SMONの原因に関する一考察」  
全国スモンの会会員 1970. 3月

## 48. キノホルム投与家兎の筋電図と病理所見との対比

早瀬 正二, 山本 哲男, 岩砂 和雄

安江 隆夫, 棚橋 芳彦, 名和 誠

日江井 恵次

(岐大・医・第2内科)

著者らは、スモン様症状を呈するといわれるキノホルム中毒家兎を実験的に作り、その筋電図学的所見と組織学的所見を検索し、若干の知見を得たので報告する。

### 方 法

キノホルム投与方法としては、次の2つの方法を用いた。第1は2.9～4.4 kgの成熟家兎にキノホルム62.5%含有のエンテロビオホルム30～40 mg/kgを10 mlの生食で懸濁液として週2回静注する方法、我々のこの方法は溶解性が悪く、注射直後に肺硬塞で急死する例が多く見られ、又衰弱死もあり14例中7例の死亡があった。第2はエンテロビオホルムの同量を腹腔内に週2回注射する方法である。これも腹膜炎による衰弱死あるいは筋電図検査中急死する例があった(10例中3例死亡)。

全例とも、経過中に歩行、立ちなおり、痛覚刺激等に対する反射などから判断して、明確な運動障害の症状は見られなかった。筋電図検査は図1の○の時期に行なっている。対象筋は両側大腿部の伸筋群と屈筋群で、電極は同心電極を用いた。家兎は人間と異なり、安静時とか随意収縮時の筋電図を

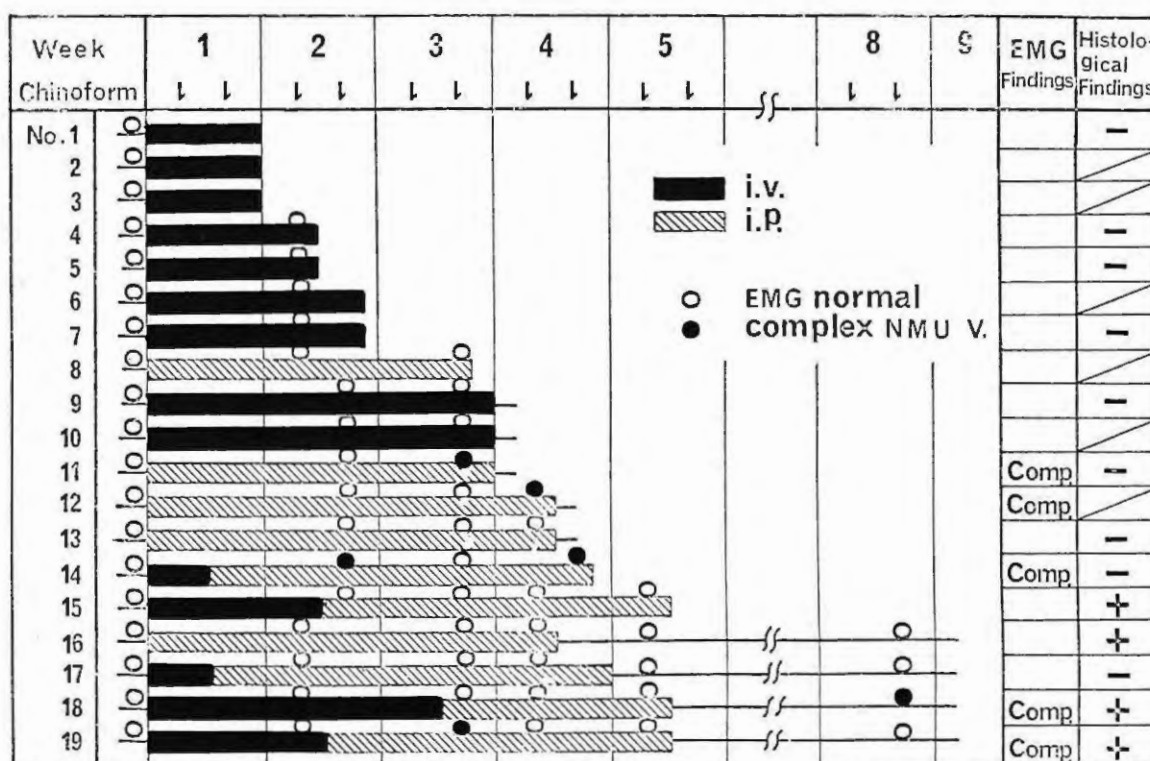


図1 キノホルム投与家兎とEMG

取ることが困難のため、兎の両耳を持ち、後肢を接地させ徐々に持ち上げた時とか、他動的に屈伸させた時に、単一 Unit が連続して出現するのを記録し判定した。したがって Fibrillation, Fasciculation, Reduced interference Voltage 等については検索出来なかった。

全体ともキノホルム注射前に筋電図検査を行いその正常範囲を求めた。単一 Unit の電圧は 250  $\mu$ V ~ 2 mV にわたっており、持続時間は全て 15 msec 以内であった。そこで我々は持続時間 20 msec 以上、5 相性以上の NMU を Complex NMU Voltage として筋電図検査を行った。

#### 成績並に考案

図-1 の○が正常、●が Complex NMU Voltage を認めたものである。第2週目では №14 に、第3週では №11, 19 に、第4週では №12, 14 に、第8週では №18 に Complex NMU Voltage が認められた。又 №6, 9, 12 には Reduced interference Voltage があるかのように観察されたが判定困難であった。

以上19例中 Complex NMU Voltage は早いものでは2週目から出現し始め、8週以内では5例に出現した。このように19例中5例にしか異常波形を認め得なかったが、これは家兎という筋電図検査が非常に困難な対象で、しかも大腿部の筋に限ったことによるためであり、Complex NMU Voltage がさらに多く出現する可能性は大いにあると考えられよう。

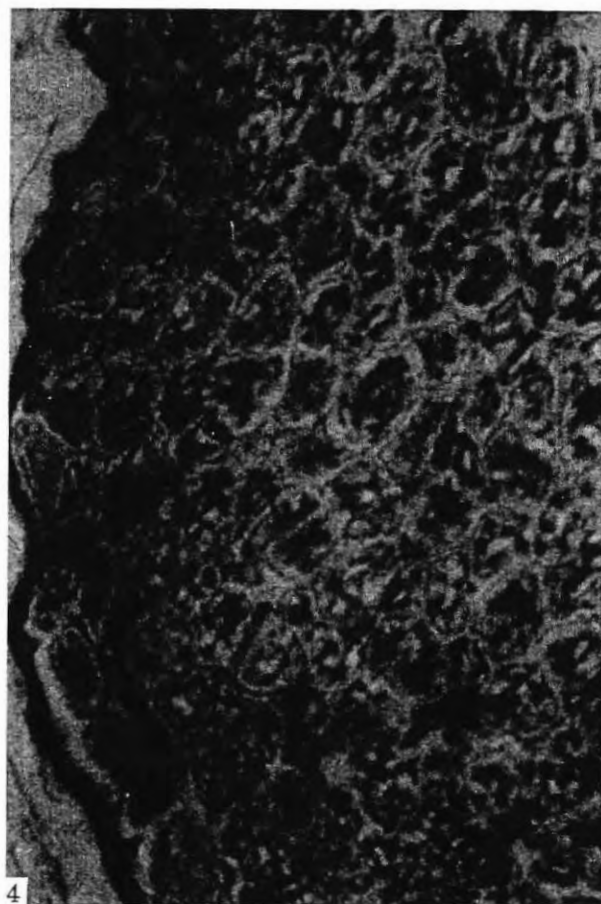
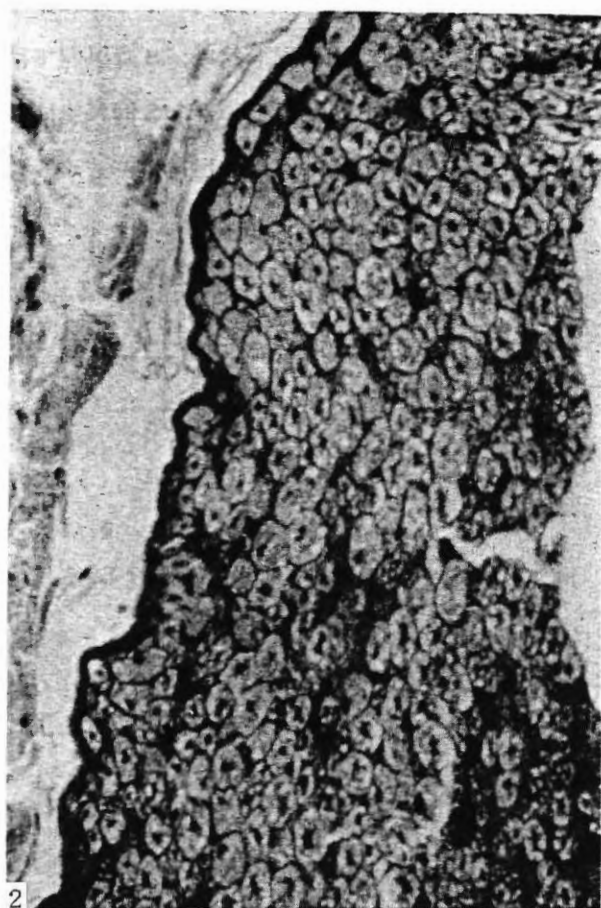
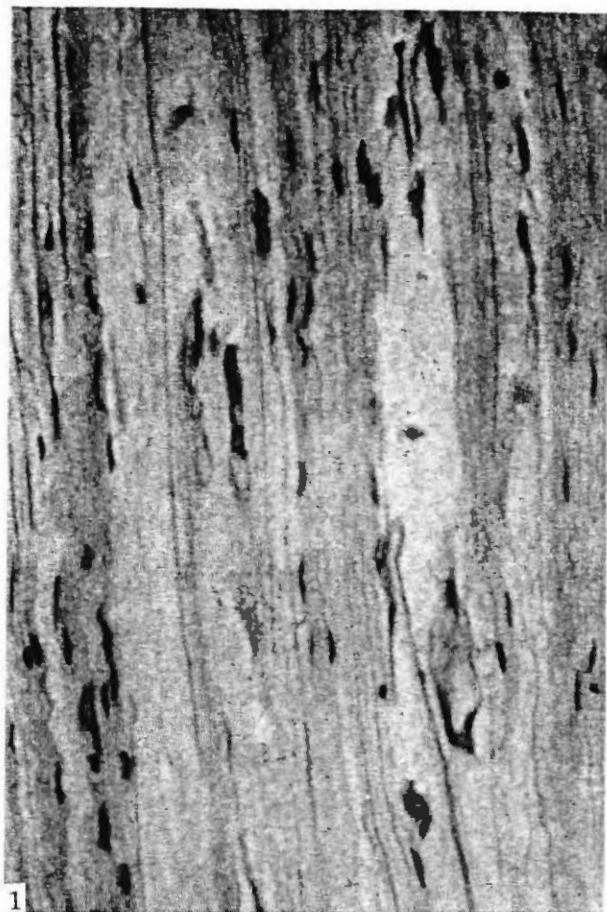
4週、8週目に剖検し、死亡したものはその直後に剖検して、組織学的検索を脊髓、坐骨神経、大腿四頭筋、肺、肝、腎について行なった。肺では小血管が閉塞しそれによる小硬塞巣が散見され周囲に炎症性細胞浸潤を認めた。肝では空胞変性(№4)とか脂肪肝(№5)認めるのがあった、筋肉では変性及び萎縮像は特に認められなかった。脊髓は胸髄と腰髄(写真-5, 6)について検索したが全例とも特に変化を認めなかった。坐骨神経については №15, 16, 18, 19, に変性像を認めている。写真-1, 2, は №15 の坐骨神経の H. E. 染色であり、変化は軽度であるが軸索は変性萎縮あるいは崩壊を示している。写真-3, 4, は同部の Luxol Fast blue 染色であるが、髄鞘は膨化し正常構造が失われている。

以上坐骨神経に変性を認めたものは、5週以上生存した №15, 16, 17, 18, 19 の5例のうち4例であった。坐骨神経の全長にわたって組織学的検索を行なったのではなく、ごく一部分について調べたものであるが、キノホルム投与回数の多いもの程、即ち生存期間の長いもの程坐骨神経に変性が見られるようであった。坐骨神経に変性の見られた4例のうち、2例は生前の筋電図で Complex NMU Voltage を認めているが他の2例では Complex を認めえなかったことは、対象が兎という筋電図をとるのが困難な動物であったことによるのであろう。

#### 総括

キノホルム中毒家兎19例において、後肢筋に筋電図検査を行ない、Complex NMU V. は早

いものでは2週目より出現し始め、8週以内では5例に出現しており、5週以上生存した5例中4例に坐骨神経の変性像を認めそのうち2例に生前 Complex NMU Voltage を認めた。即ち Complex NMU Voltage の出現はキノホルム中毒家兎における末梢神経の変性像を反映しているものと考えられる。



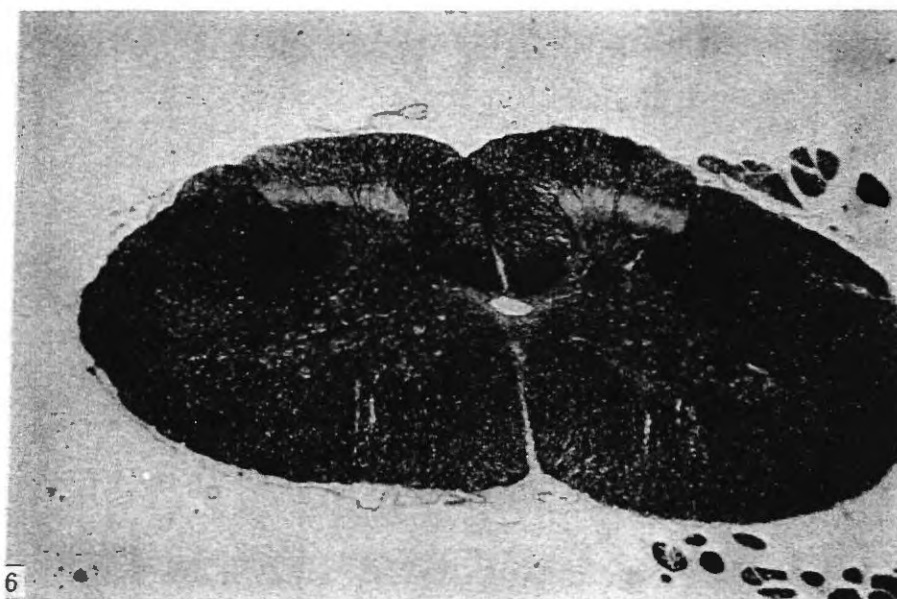
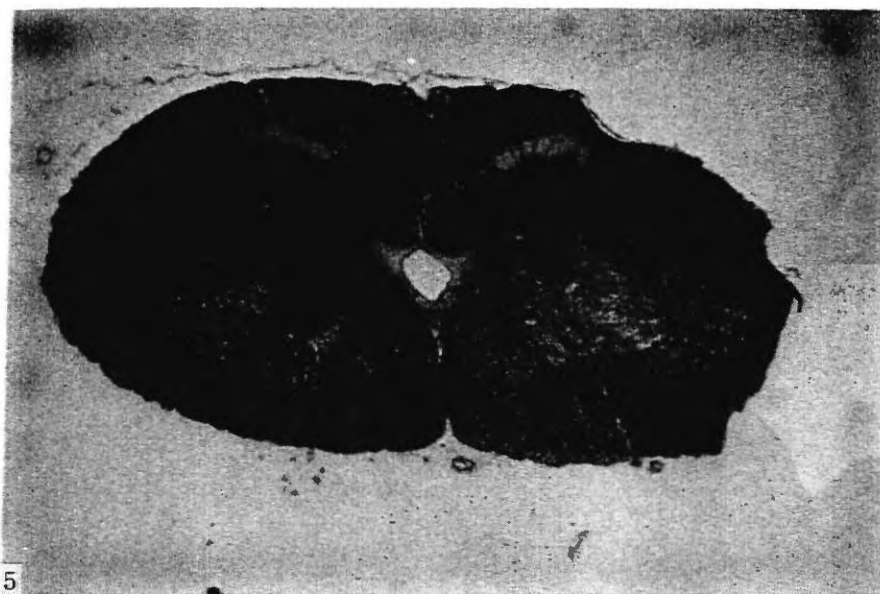


写真 キノホルム投与家兔



スモン調査研究協議会研究報告書  
No. 9

昭和46年度キノホルム部会研究報告

昭和47年3月25日発行

発行所 スモン調査研究協議会  
東京都品川区上大崎2-10-30  
国立予防衛生研究所内

代表者 甲 野 礼 作

印刷所 瑞穂印刷産業有限公司  
渋谷区幡ヶ谷3-69-5