

# 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 mg/Kg/day)、中用量(500 mg/Kg/day)、および高用量(1000 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。

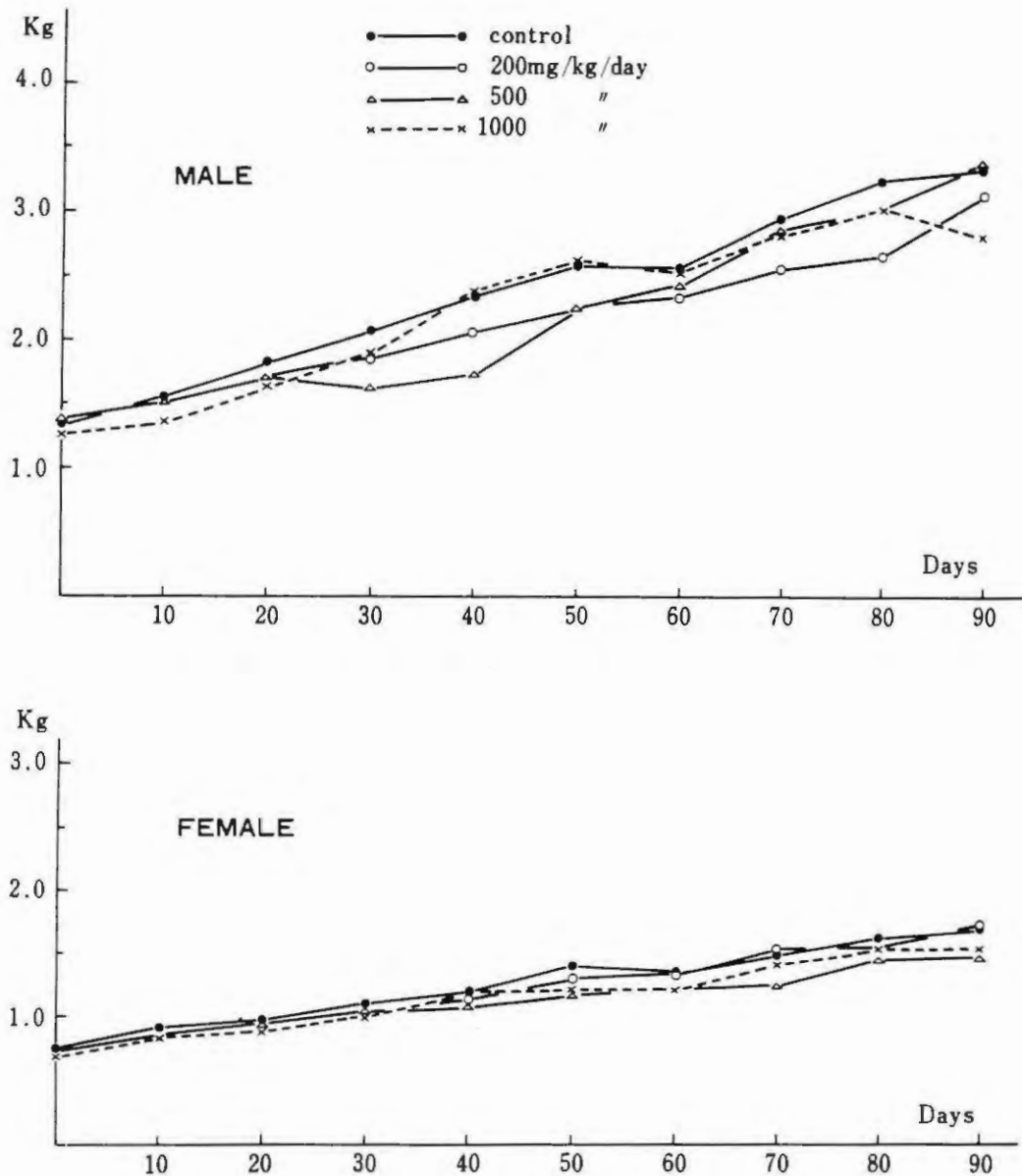


Fig. 1 Growth curves

### 3.死亡率

自然死した動物の出現状態は表1に示すとおりで、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 mg/Kg/day	Animal		Month			Sum of 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 animals	Red cell ( $\times 10^4$ )	Ht (%)	Hb (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 &lt; 0.05

\*\* P &lt; 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 mg/dl	Protein g/dl	ALP 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 ± 0.09	14.5 ± 2.24	17.5 ± 2.84	57.3 ± 10.36	18.0 ± 0.83	4.9 ± 0.72
	L	4	3.8 ± 0.09	11.6 ± 3.90	15.4 ± 4.05	74.1 ± 11.0	16.7 ± 3.18	7.4 ± 3.20
	M	2	3.6	14.4	12.5	94.0	23.6	6.9
	H	4	3.9 ± 0.36	10.0 ± 3.83	13.7 ± 4.76	68.9 ± 20.23	15.1 ± 7.33	3.5 ± 1.82
Female	Control	4	3.4 ± 0.14	6.8 ± 0.33	10.2 ± 1.88	30.9 ± 3.32	8.9 ± 0.81	3.6 ± 1.29
	L	5	3.4 ± 0.16	5.7 ± 1.15	7.9 ± 1.38	30.2 ± 4.23	10.2 ± 3.66	2.5 ± 0.72
	M	5	3.4 ± 0.20	5.1 ± 0.94	7.4 ± 1.05	26.9 ± 5.54	8.2 ± 0.64	2.2 ± 0.12
	H	3	3.4 ± 0.25	5.2 ± 1.03	7.4 ± 0.91	26.0 ± 2.20	9.8 ± 0.56	2.7 ± 3.23

Table . 5 Relative organ weights

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

\* P &lt; 0.05

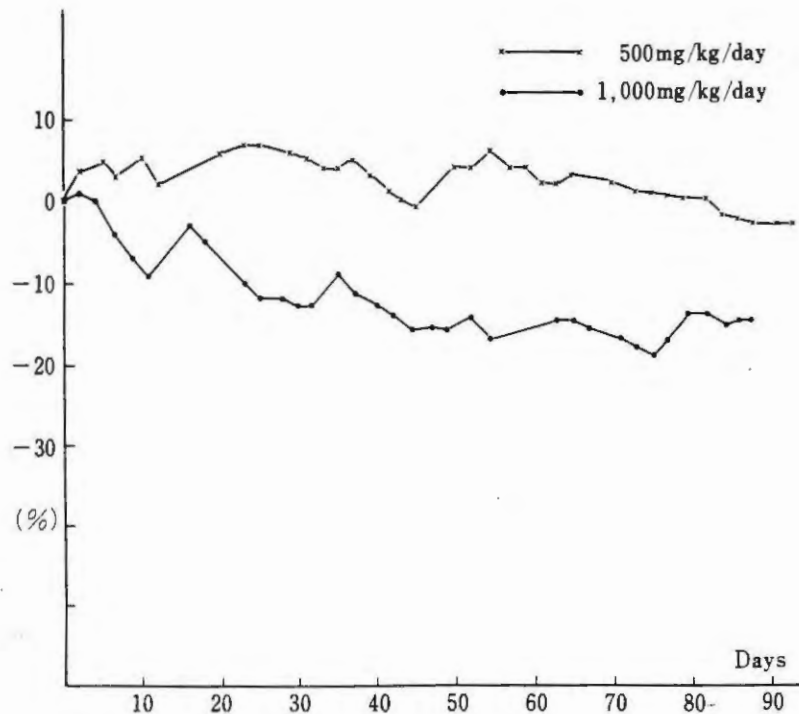


Fig. 2 Growth rates

## 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 mg/Kg/day	No. of Animals	Month			Sum of 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 animals	Red cell ( $\times 10$ )	Ht (%)	Hb (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 animals	Glucose (mg/dl)	Protein (g/dl)	AIP (u)	U-N (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廻る。

## 考 察

キノホルムの毒性が、動物の性差あるいは年齢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。

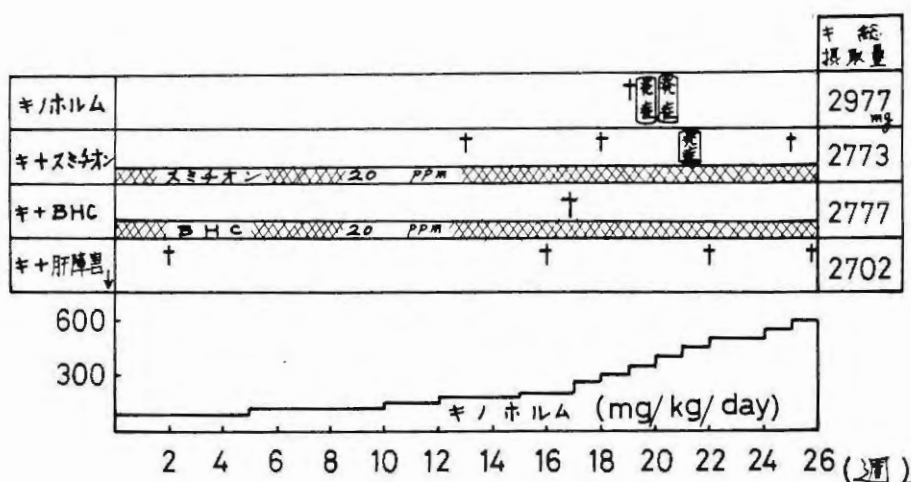


図1 キノホルム投与量と経過

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の通りではらつきが多いが、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

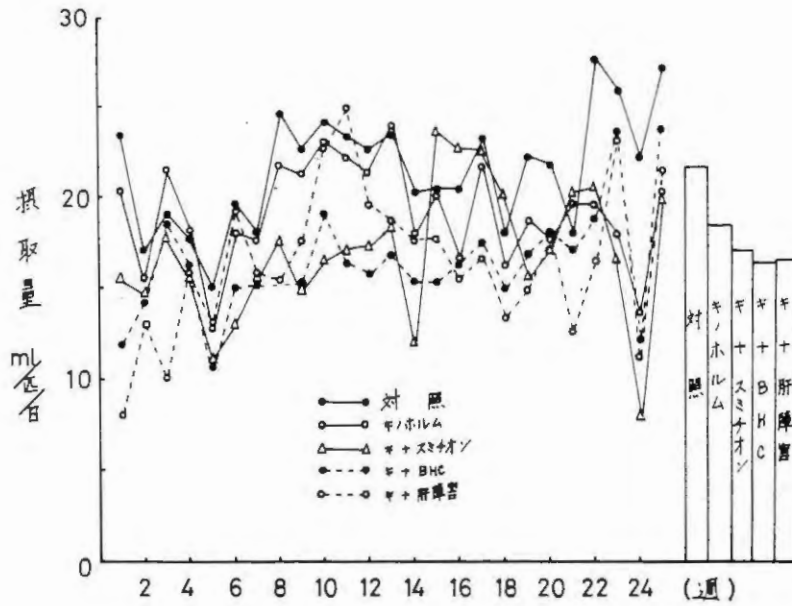


図2 牛乳摂取量

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

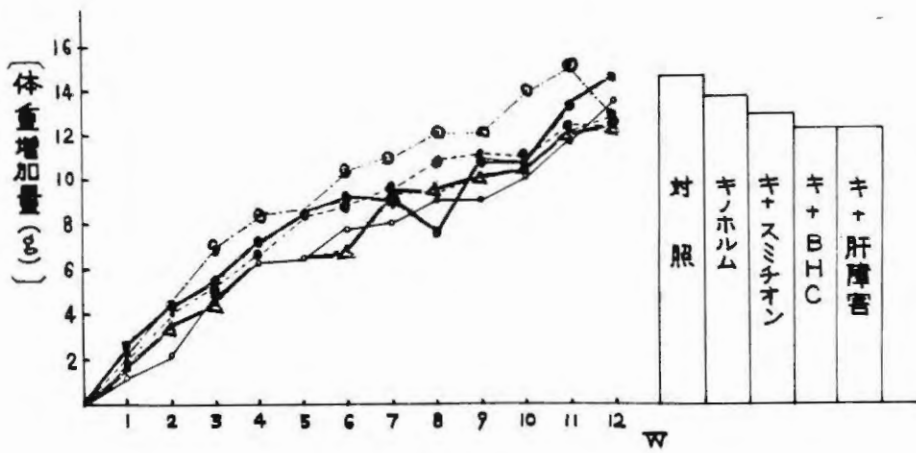


図3 体重増加曲線 (3ヶ月)  
g/匹

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0.03μg/ml、キノホルム+スミチ

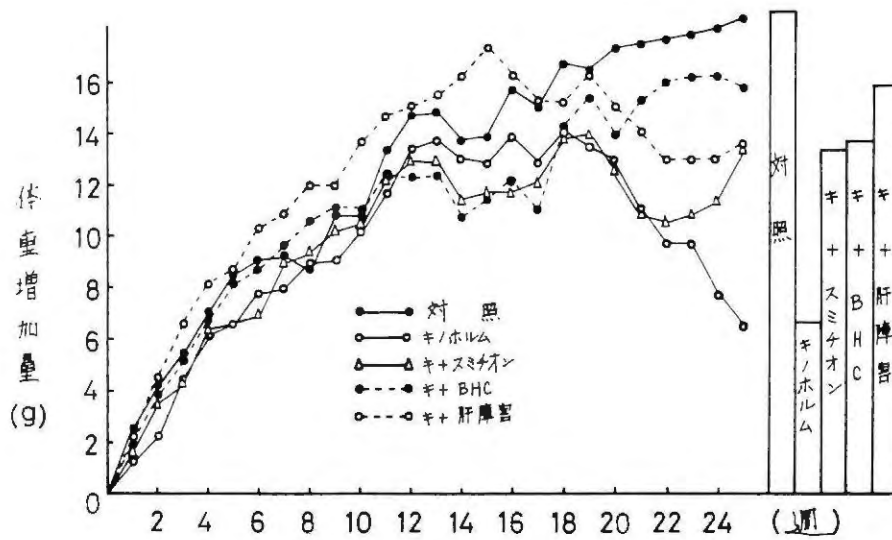


図4 体重増加曲線 (6ヶ月)

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

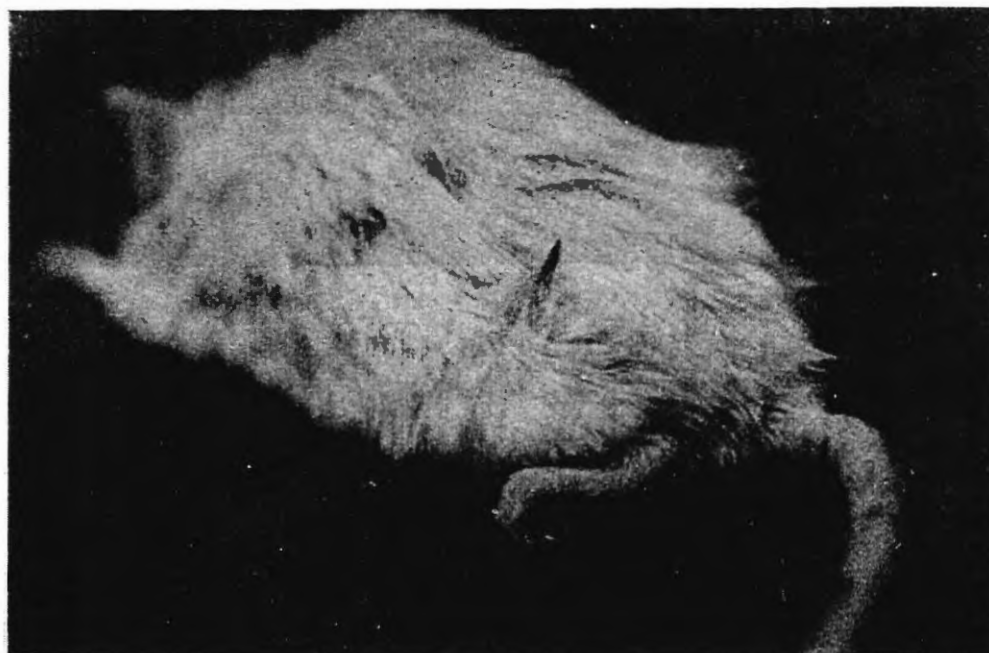


写真2.

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線マイクロプロー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、水の代わ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。

#### VI 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と考えられる。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<sub>3</sub>, GaCl<sub>2</sub>, Y(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, CdCl<sub>2</sub> 各100μg/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(λ=365mμ)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	PH
Ga	卅	9.24~7.8
Zn	卅	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<sub>3</sub>(100μg/ml H<sub>2</sub>O) 1.0ml, 20% CH<sub>3</sub>COONH<sub>3</sub> 5.0mlおよびH<sub>2</sub>O 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ピリジン・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420mμであり、ピリジン・ベンゼン抽出液の最大蛍光波長は525mμにあり、クロロホルム抽出液のそれは530mμにあった。



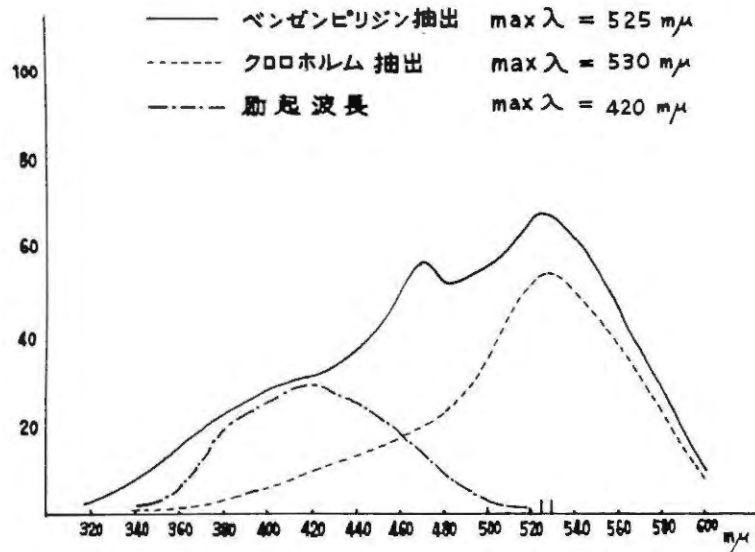


図 1 螢光波長曲線

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 μg / 30 ml であり、クロロホルム抽出時は 0.5 μg / 30 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。

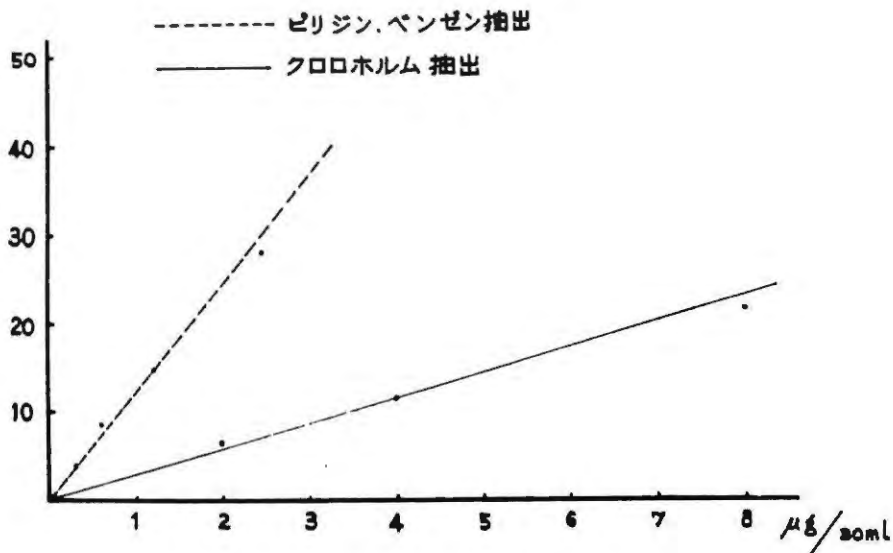


図 2 キノホルム検出限界

#### 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

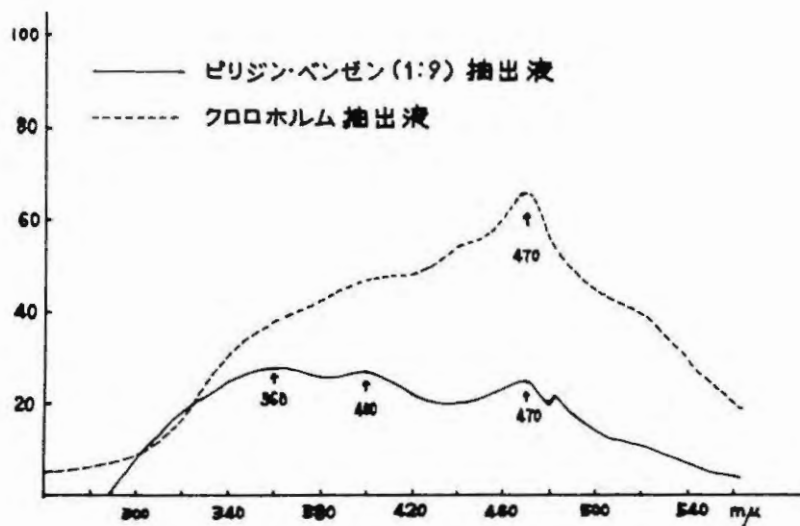


図3 肝の自然蛍光の励起波長

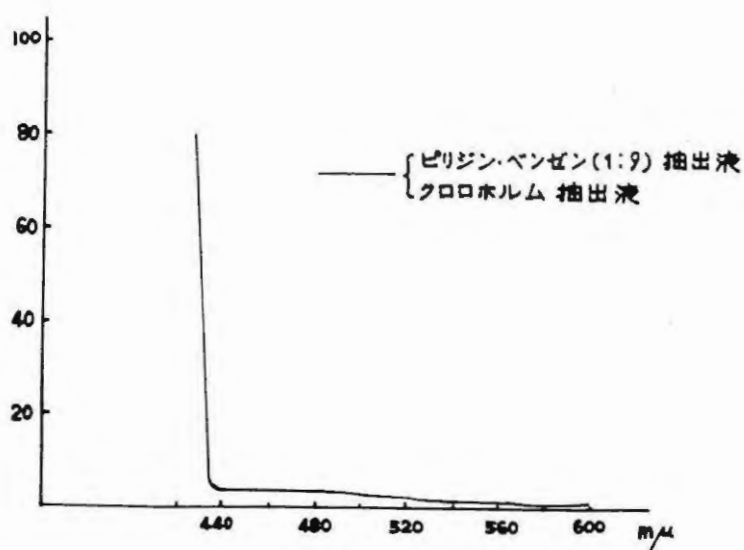


図4 肝の自然蛍光の強さ  
(励起波長420mμによる)

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、

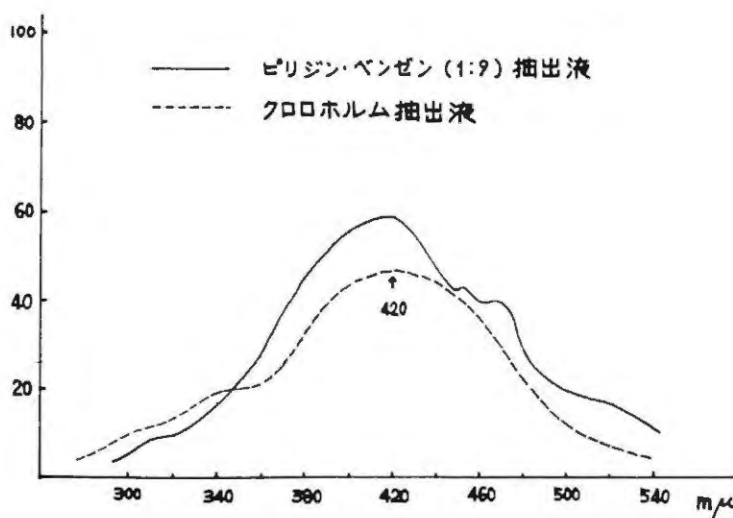


図5 肝+キノホルム+Gaの励起波長

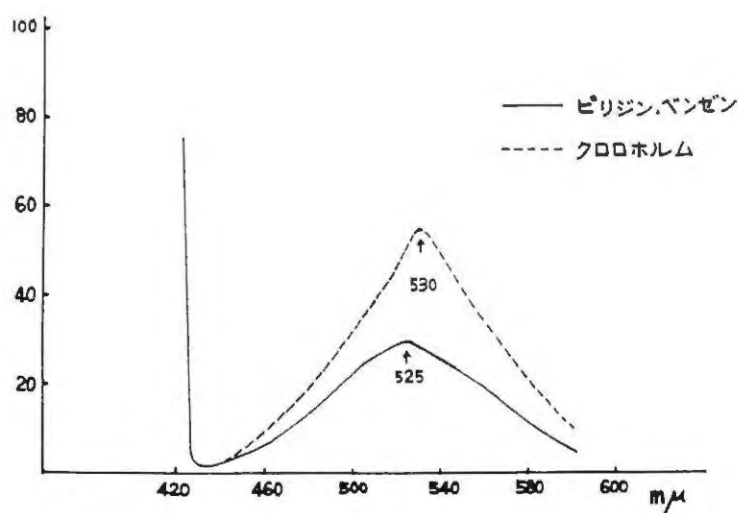


図6 肝+キノホルム+Gaの蛍光波長曲線  
励起波長=420m $\mu$

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。

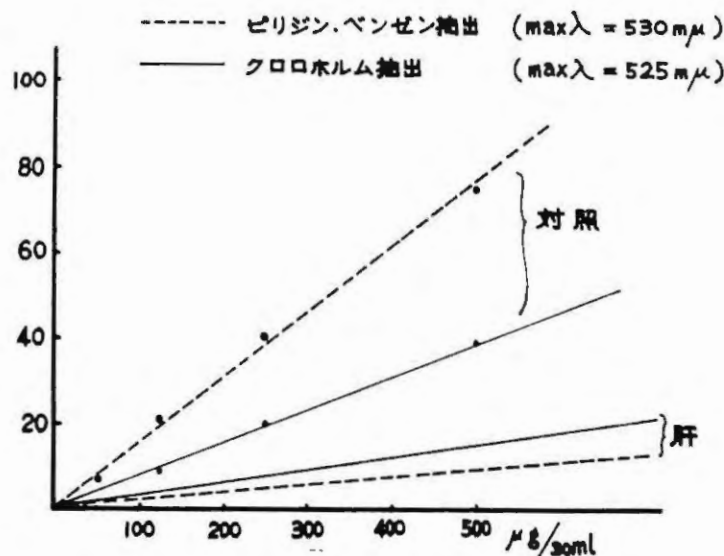


図7 キノホルム検量線

#### 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られたが、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ソニンであることから、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420nm、蛍光波長は530nm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