

25. 肝・腎中のキノホルムの微量定量法

田村 善蔵

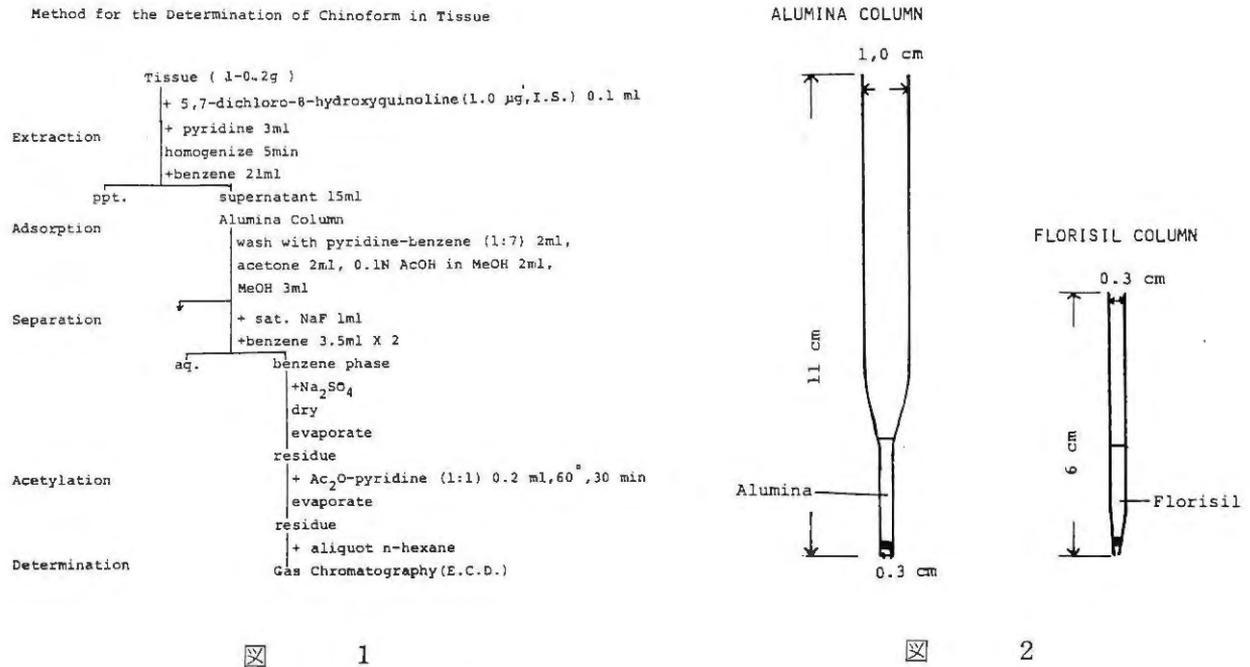
(東大・薬学部・薬品分析化学)

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

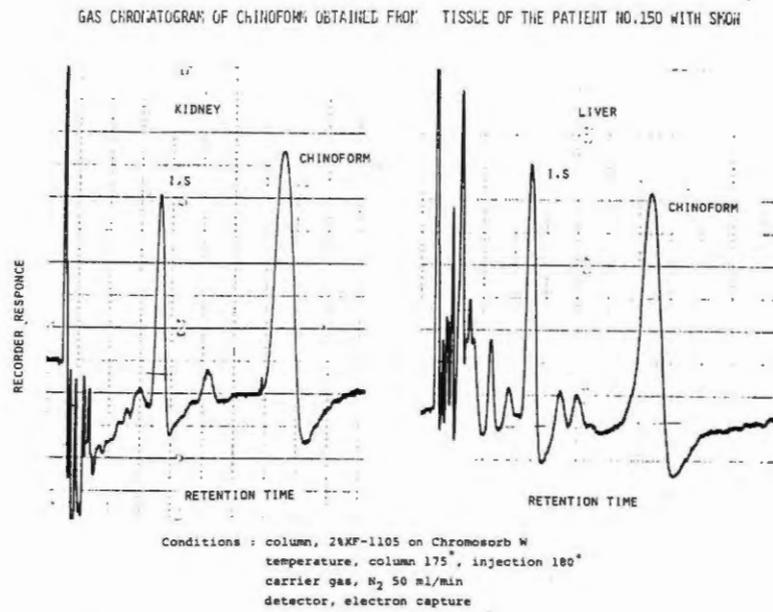
田村らによって報告された生体試料からのキノホルムの微量定量法¹⁾に検討を加図1のような定量法を作成した。



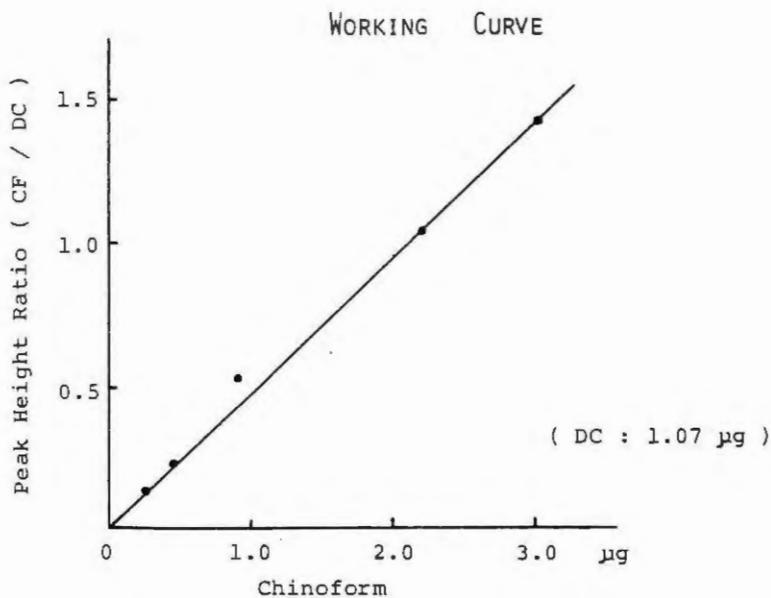
組織をピリジンおよび内部標準物質である 5, 7-ジクロロ-8-ヒドロキシキノリンと共に、ステンレス製刃、ガラスカップ付ホモジナイザー(日本精機 K. K)で冷時完全にホモジナイズし、ベンゼンを加えて再び攪拌し、最終的にピリジン・ベンゼン(1:7)になる様にして抽出を行った。ステンレス製刃へのキノホルムの吸着はほとんど認められなかった。

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ガ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 μg 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



☒ 3



☒ 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 added (n mole)	recovery measured 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 μg のキノホルムを定量する場合には0.1 μg 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(E C D 使用) を用いて組織1~0.1 μg 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 $\mu\text{g}/\text{g}$)

患者No.	年齢	参 考	総投与量 (g)	換算1日 服用量 (g)	死亡時に 近い連続 服用量(g)	最終服用日 から死亡ま での日数	組織学的診断	ホルマリン 固定期間 (月)	キノホルムの定量値 ($\mu\text{g}/\text{g}$) 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	腎盂腎炎	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	腎盂腎炎	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OsO₄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

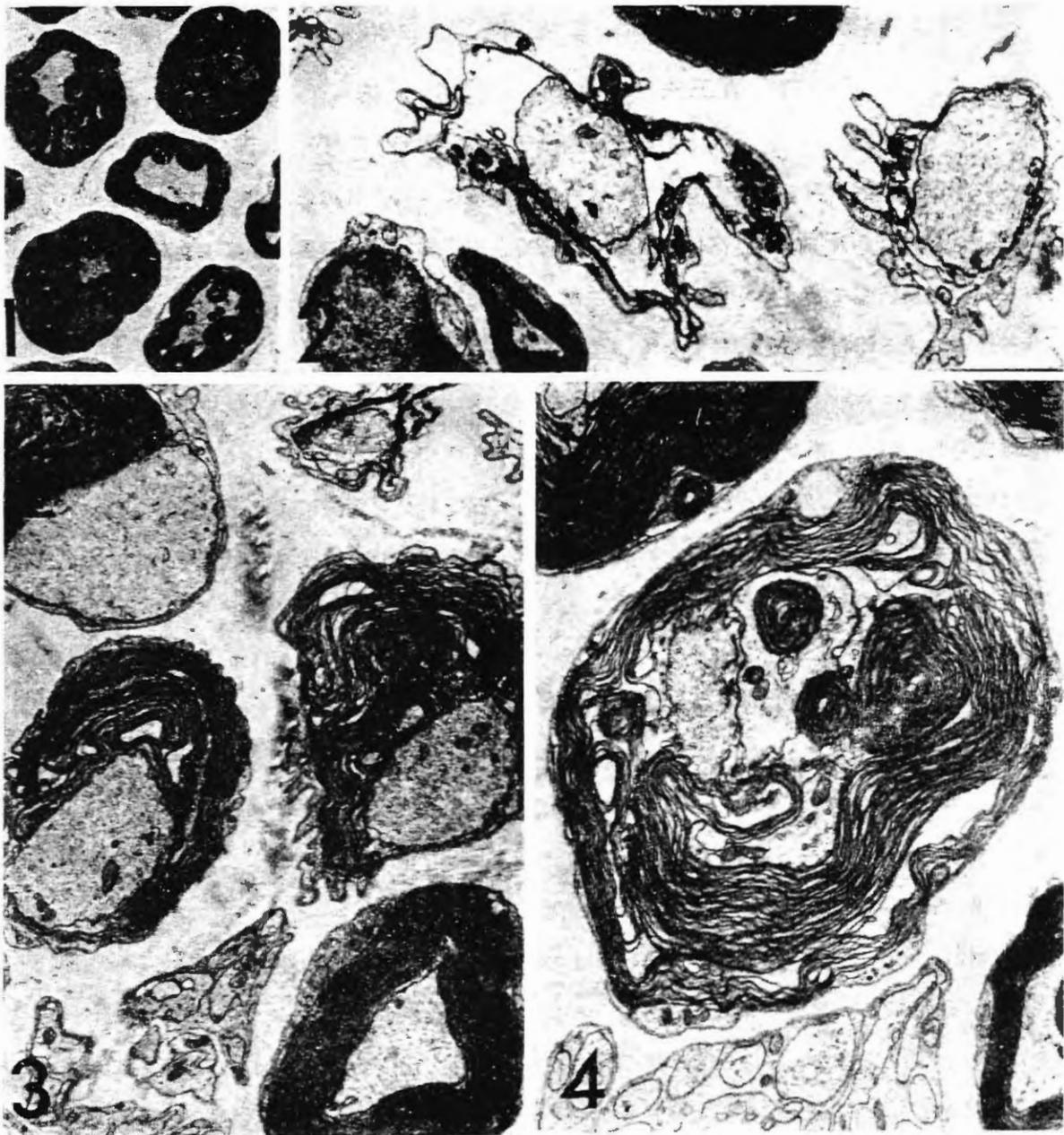


図1: 500 mg/kg daily, for 30 day (x2,200).

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)もあり興味を持たれる。

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³⁾

(新潟大学脳研究所神経内科)

キノホルムが, SMONの¹⁾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²⁾であることが証明された。オキシソ系薬剤は, 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ソ系薬剤である。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Mn³⁾測定法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, 抗菌作用のほか種々の作用があり, 今回金属とのキレート作用の面より, SMON³⁾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 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
〃 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
〃 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
〃 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
〃 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
〃 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
〃 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)

梶 忠雄

(同神経内科)

われわれは昨年9月、¹⁾ 梶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 μ c/0.4ml 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型シンチレシオ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位に下降してしまふ。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

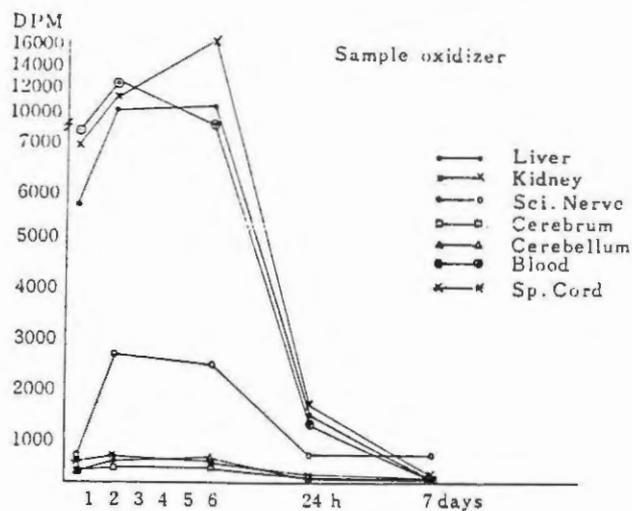


図1 Distribution of C^{14} chinoform in various rat organs.

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)

樫 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 β -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0.5MNH₃・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。

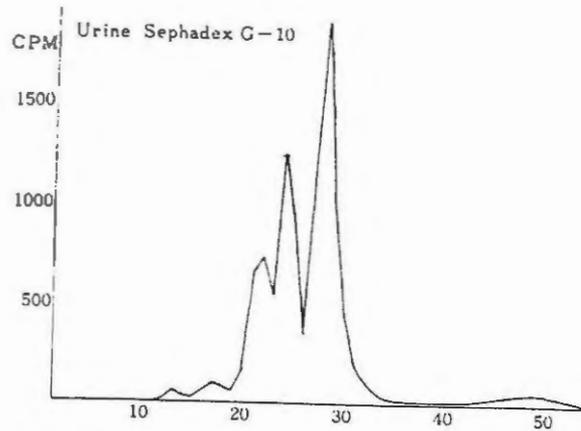


図1 C¹⁴キノホルム投与ラットの尿のSephadex-G-10による溶出パターン

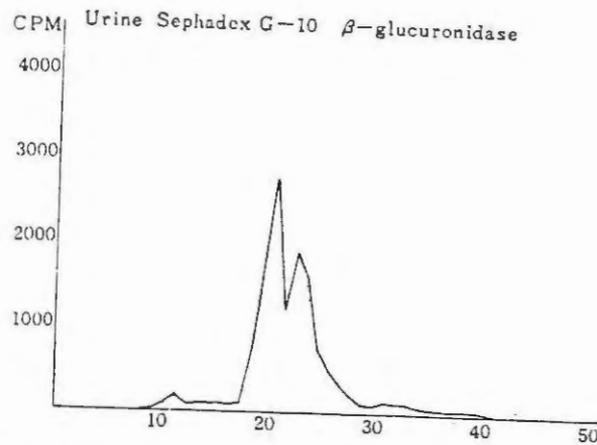


図2 C¹⁴キノホルム投与ラットの尿をβ-glucuronidase処理したもののSephadex-G-10パターン

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C¹⁴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β-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C¹⁴キノホルム・グルクロナイドであり、IIは多分β-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C¹⁴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、Sephadax

—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, およびノ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 μ 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ように思われる。

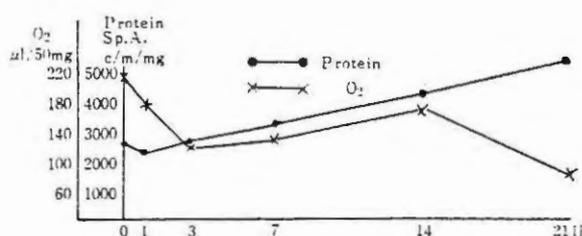


図 1

(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。

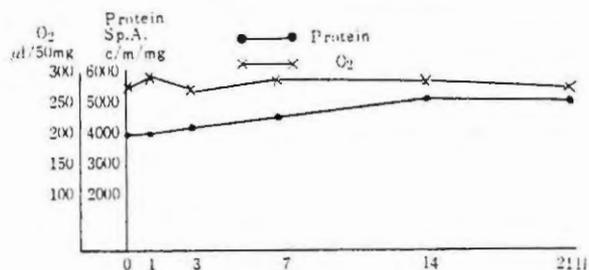


図 2

(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、SMON¹⁾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。

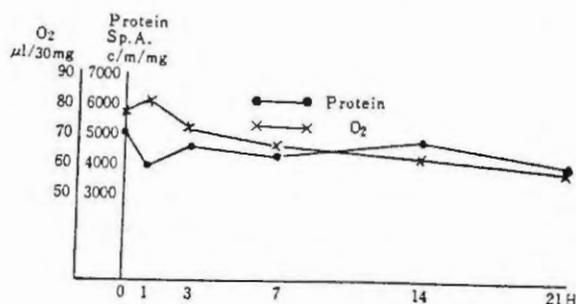


図 3

(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へ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。