

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2.0~3.0kg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測定の時期的関係を示した。

尿中MMAの排出測定は、キノホルム60mg/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5~20mg/l(1日量として2~8mg/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 1g負荷した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60mg/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、期間につい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。

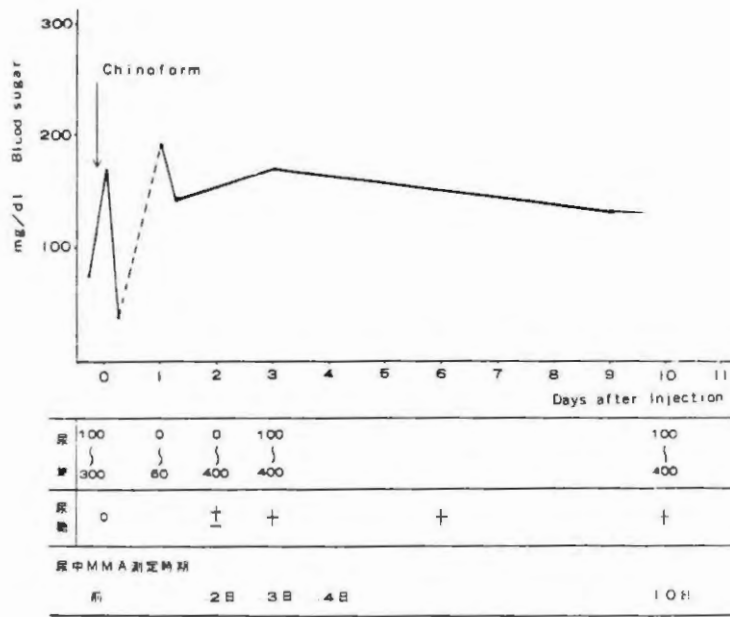


図 I Chinoform 糖尿病家兎と尿中 MMA 量測定時期

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 B₁₂ 代謝よりみた SMOON の病態生理と B₁₂ 治療, スモン調査研究協議会報告書, № 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 $ZnSO_4$ 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 したものとおよび同様 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

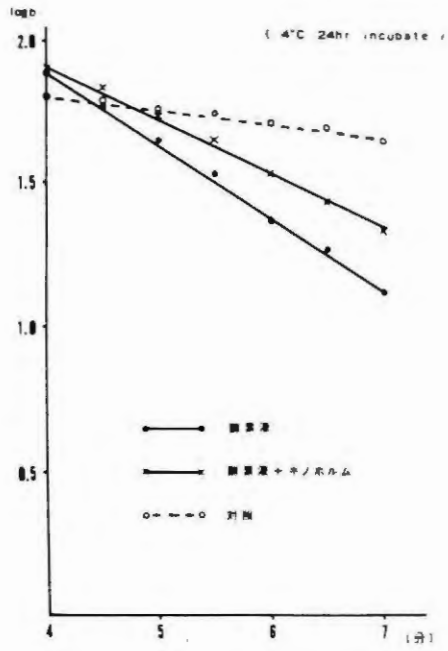


図1 炭酸脱水酵素活性に対するキノホルムの阻害効果

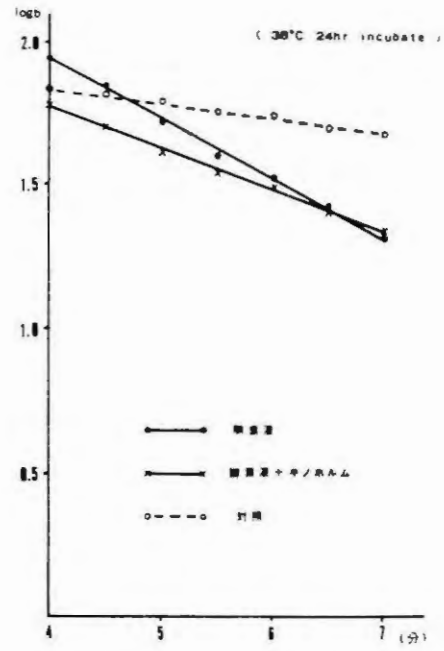


図2 炭酸脱水酵素活性に対するキノホルムの阻害効果

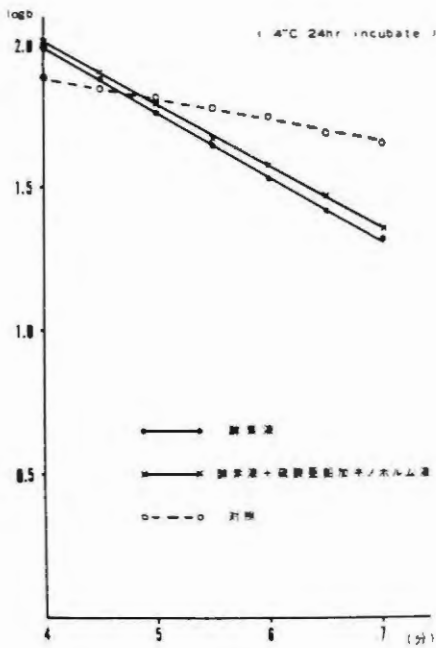


図3 炭酸脱水酵素に対するキノホルム硫酸亜鉛液の阻害効果

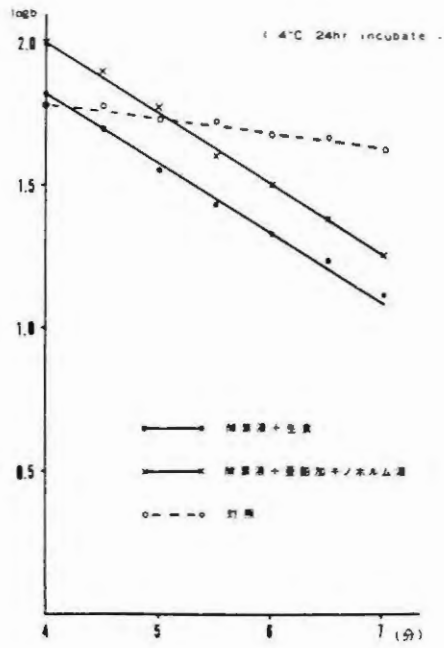


図4 炭酸脱水酵素活性に対するキノホルム硫酸亜鉛液の阻害効果

ムのキレート能を $ZnSO_4$ および 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、その分布は大脳とくに、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 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シん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，№.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。¹⁾

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2.000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2.000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2.000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。

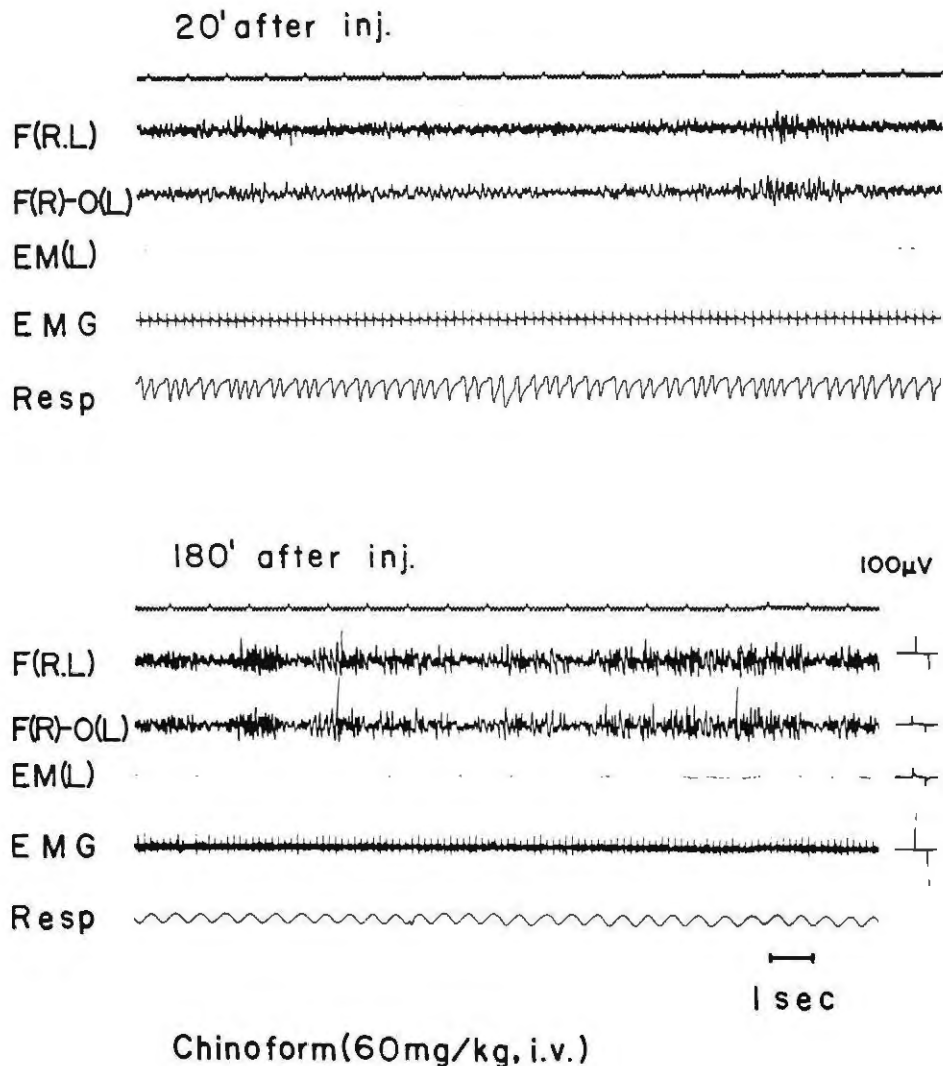
2. 慢性実験: ネラトン・カテーテル(3号)の先端5.0cmを、短かく切断した1/2注射針に緊縛固定し、生理的食塩水2.000を毎日1回注腸したものを対照群(3匹)とし、実験群(3匹)としてはキノホルム(90 mg/kg)に生理的食塩水2.000を加えたものを同様に注腸した。

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（30 mg/kg）の静注，およびキノホルム60 mg/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. 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

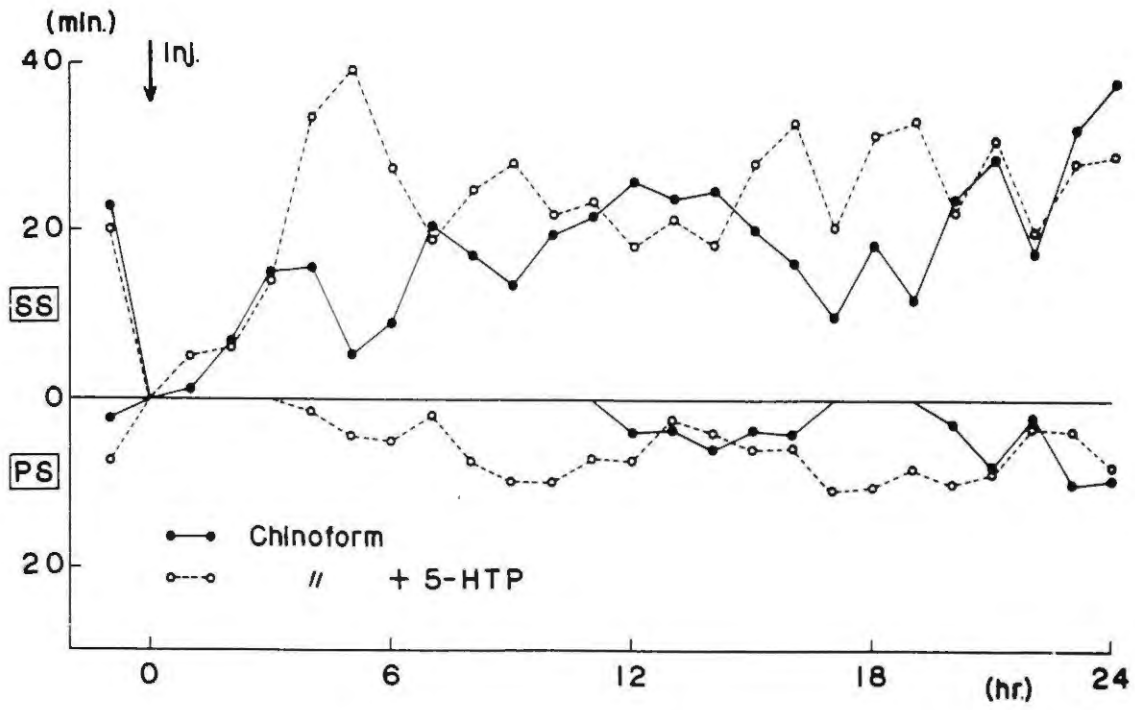
* : $P < 0.02$ ** : $P < 0.01$

TT: 24hrs

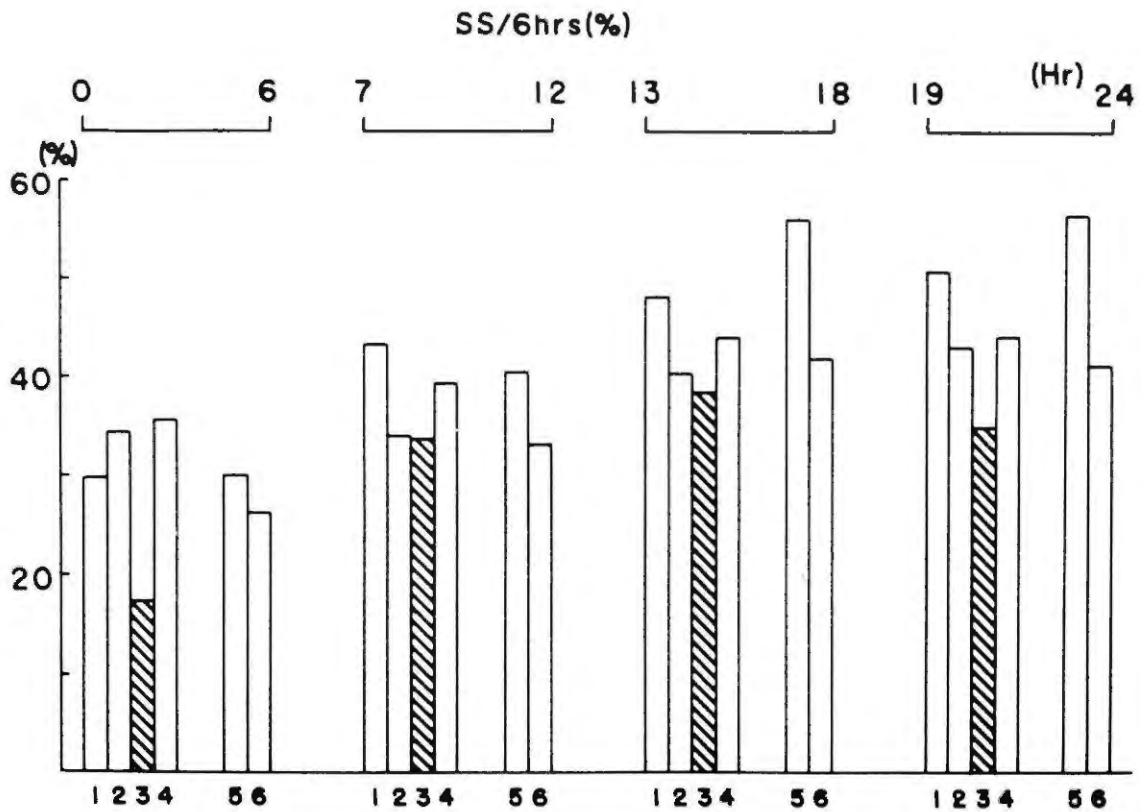
第1表の成績を6時間ごとに分けた場合には、第3, 第4図のようになり、最初の6時間におけるSS, PSの抑制が著明である。

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。

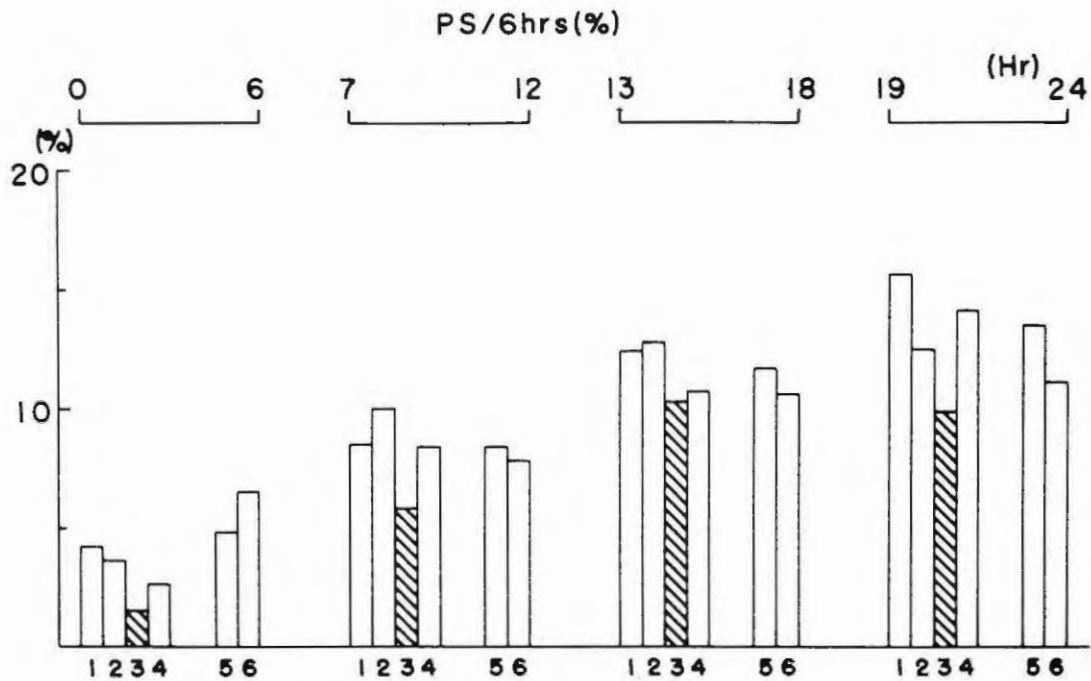
3. 行動: 第5図に示すように、体重の変化について実験群, 対照群(9月27日までは平均値を示す)について比較したところによると、最初の2月間においては実験群の体重増加度が大であったが、その後においては著明な差異は認められなかった。また、同期間の摂水量, 糞便数は対照群に多



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。

実験群に綠色便の排泄が注腸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。

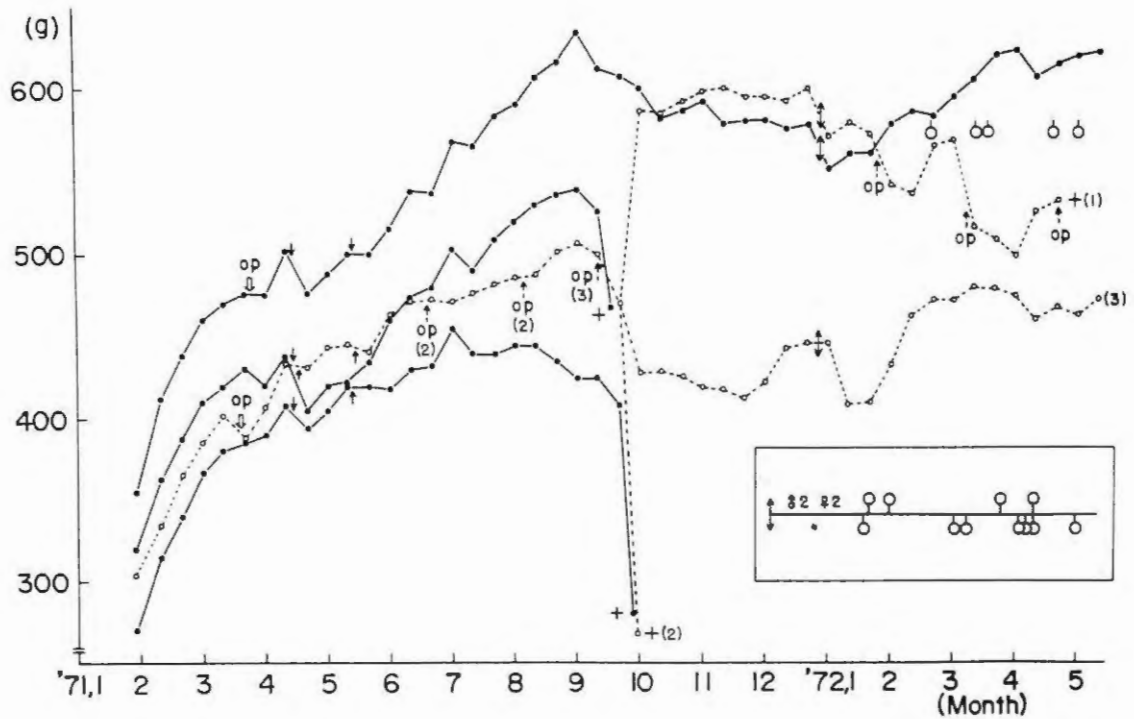
実験群3匹のうち1匹は注腸後7.5月(9月17日), 1匹は8月後(9月27日)に死亡しているが, いずれも鼻出血, 振戦, 体温低下, 知覚過敏, 急激な体重減少のほか前者は便秘(1昼夜の糞便数1個), 後者は綠色便のみの下痢症状を呈して死亡した。

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



第5図．実験群と対照群の行動の比較．縦軸は体重，横軸は年月（昭和47年5月1日まで）。

●—●：キノホルム注腸ネズミ，○—○：対照ネズミ，ただし9月末までの対照群の体重は3匹の平均値を表わし，括弧内は動物の番号を表わす。OP⇨：ポリグラフ用手術，OP⇦：化膿切開用手術，→：ポリグラム記録，↔：雌雄交配，♂：分娩，+：死亡。

キノホルムの静注によってSSの減少，PSの減少傾向がおこり，その減少がいずれも5-HTPの追加によって除かれることは，Matsumoto & Jouvet²⁾の成績から判断して，キノホルムは脳内のセロトニンのみを減少させるものと考えられる。なおPSの減少度は統計的に有意差がなく，しかも5-HTPの追加によって回復することはUrsinがネコにおいて証明しているように，SSの減少による二次的影響であることは明らかである。

また，キノホルムのSS抑制効果が注射後最初の6時間に著明であることはPCPA (Para-chlorophenylalanine) が投与後30～60時間後にSS抑制効果を現わすこととは対象的な効果である⁴⁾。すなわち，効果の発現時間の異なることは作用点の異なることを示すものであり，PCPAがトリプトファン酸化酵素レベルにはたらいでセロトニン合成を抑制するのに対して，キノホルムはセロトニンを分解するモノアミン酸化酵素レベルにはたらいで，セロトニンの減少を直接に促進させるものと解釈すべきであろう。

実際に，SMON患者3名にトリプトファン2gを与えて，尿中にセロトニンの最終代謝産物である5-HIAA (5-Hydroxy indol acetic acid)の増量することを認めている柴田⁵⁾らの成績はこの考えを裏書きするものであろう。

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探る必要がある、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⁶⁾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⁷⁾、キノホルム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、^{8,9)}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。

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れば、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^{10,11)}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ふ仮説の下に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 (O h) の鉄キレートである^{1,2)} ことがわかってから, S M O NとO hとの関係が注目をあつめている。そこでO h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 (M t) 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O h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O hから肝臓で生成されるキノホルムグルクロナイド⁴⁾は脱共役剤としての作用を有しないことがわかった³⁾。さらにO hの類似物質である8-ヒドロキシキノリン, 5, 7-Br-8-ヒドロキシキノリン, 5-Cl-8-ヒドロキシキノリン, および5, 7-I-8-ヒドロキシキノリンのM t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O h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³⁾のごとく行なった。白ネズミ脳のミトコンドリアはBasford⁵⁾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⁶⁾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M t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M t (図1 a) に4.2 m M O h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。

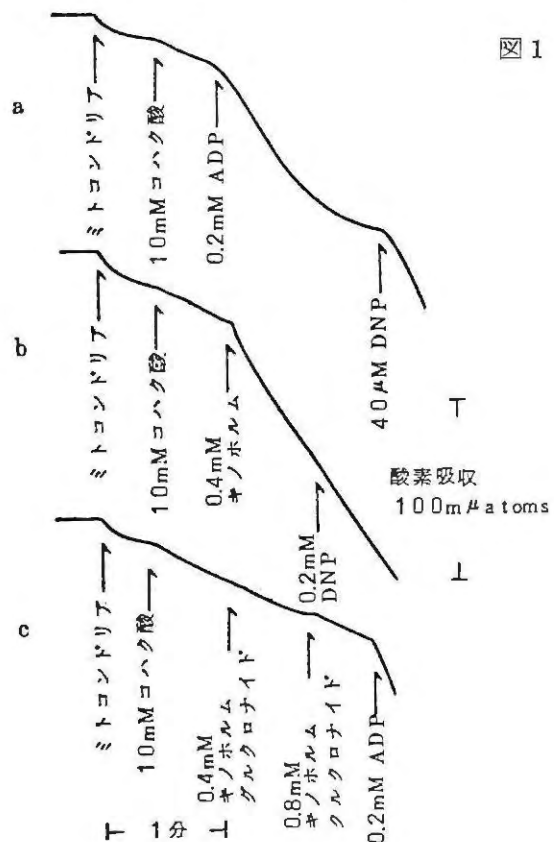


図1

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を単離していくので、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

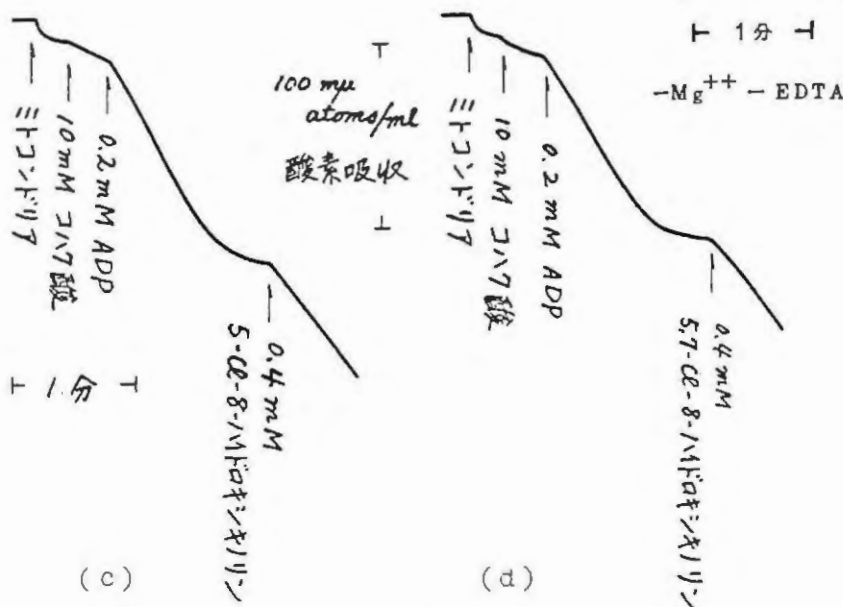
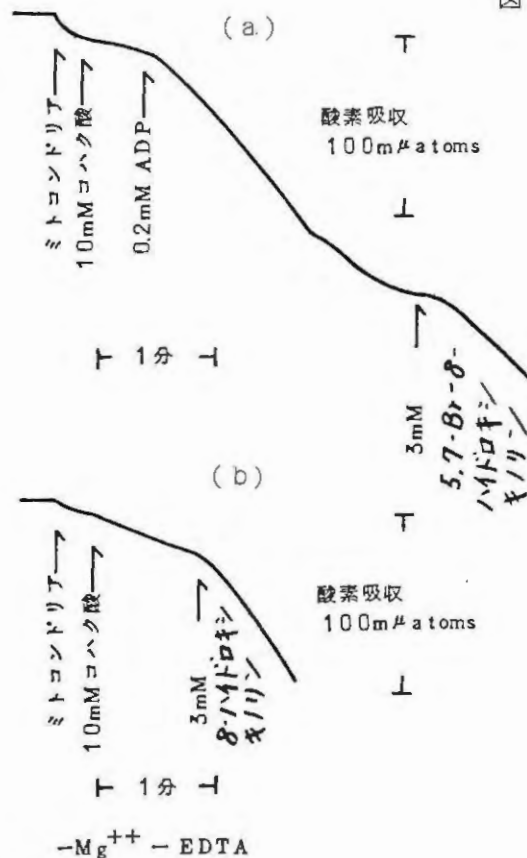
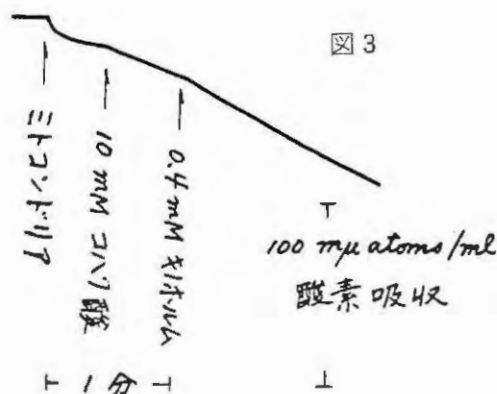


図3



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^{1,2)}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4 a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4 b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。

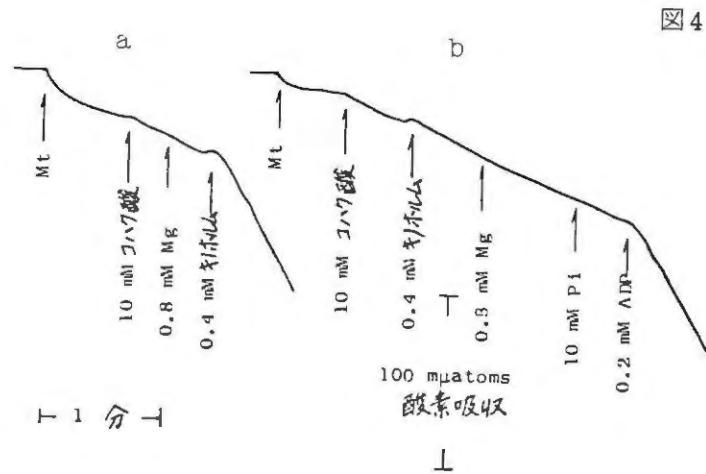


図4

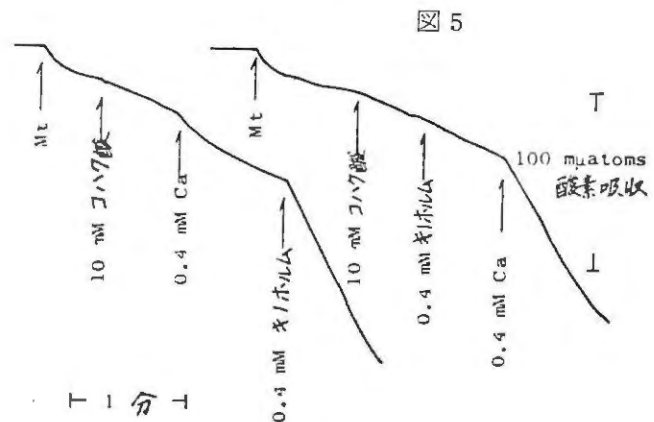


図5

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1 ℓ中に、NaCl 16.5 g, KCl 0.25 g, CaCl₂ 0.3 gおよびNaHCO₃ 0.2 gを含むものである。

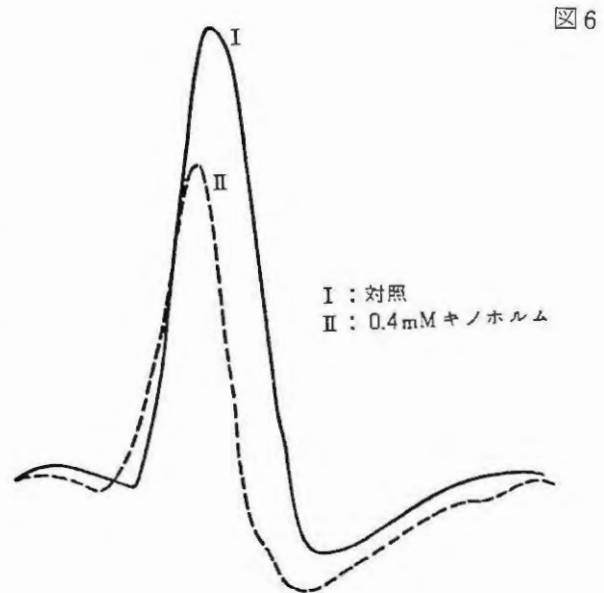


図6

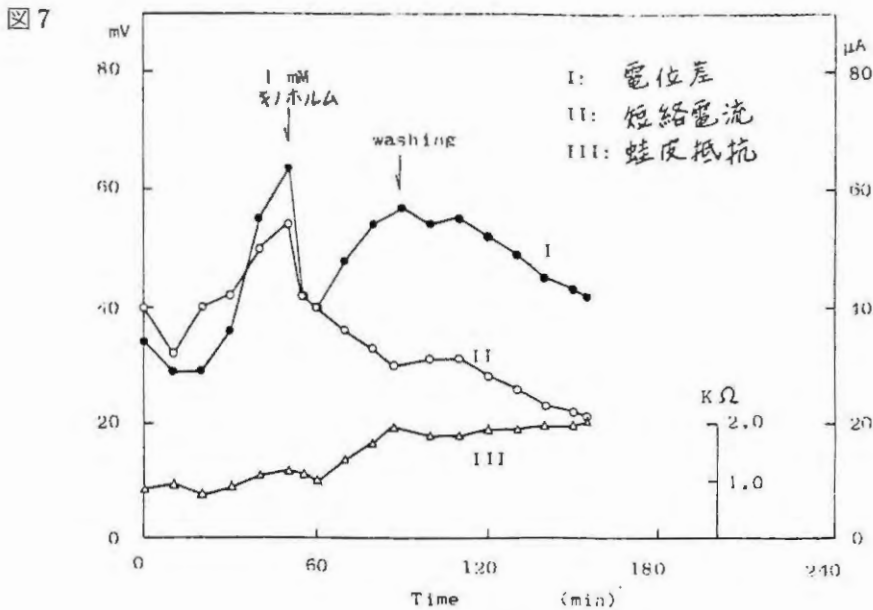


図7

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}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}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患者の緑舌等にChの 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, Fe^{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300mg (坐骨神経のみ50mg) を実験に用いた。この際大脳, 肝, 腎, 筋肉は厚さ1mmの切片とした。

用いた反応液 (pH7.4) は100ml中にNaCl 10.9gr, KCl 0.042gr, CaCl_2 0.024gr, NaHCO_3 0.02gr, glucose 0.2grおよび牛血清アルブミン0.5grを含むものである。 ^{14}C -Chは6.6 m $\mu\text{Ci/ml}$ とし, coldと合わせ10 m $\mu\text{moles/ml}$ となるよう反応液中に加えた。反応液は5mlとし, 25℃で振盪反応させ, 30分後にその反応上清0.1mlをとり, Aloka100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 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 Fe^{3+} キレート化合物であることを考え合わせるとChの Fe^{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 (m $\mu\text{moles/g}$)	
	- FeCl_3 系	+ 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

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¹⁴C-キノホルムのとりこみ

画 分	蛋白質量		放射活性		RSA*	添加実験
	mg	%	cpm	%		RSA*
(A) 核および細胞片	22.3	4.5	927	7.8	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
マイクロゾーム	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、マイ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) 柏俣重夫, 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, 夫々エンテロピオフォルム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%OsO₄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

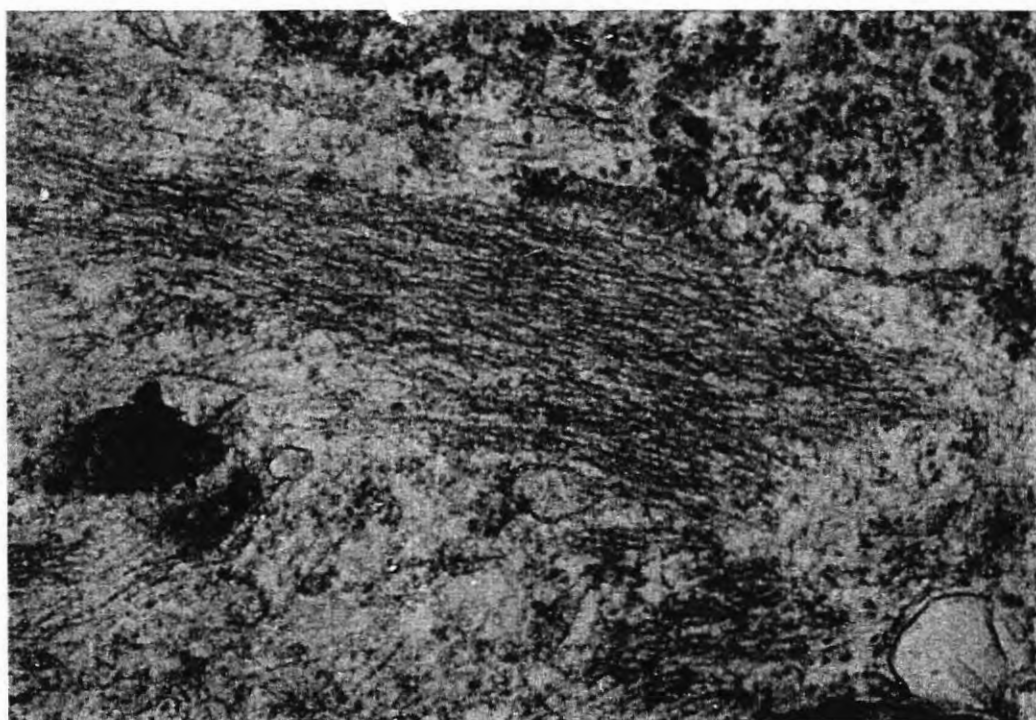
(II) 電 顕

1) Goll核

Goll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。

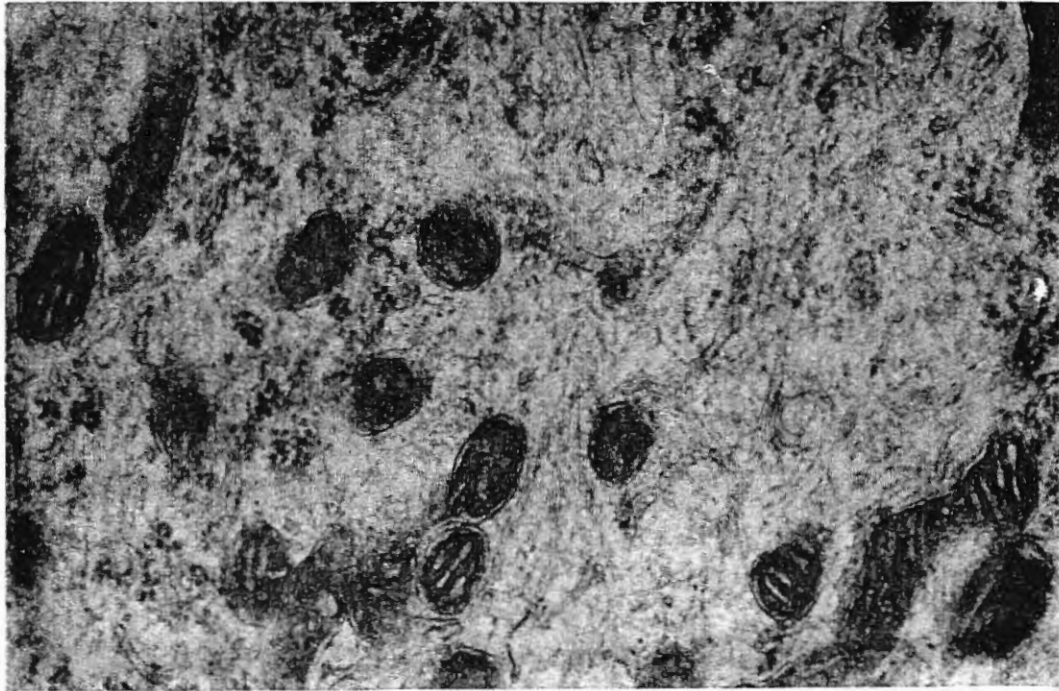
2) 後根神経節

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 0.222μ (S. D. 0.046μ) 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 0.466μ (S. D. 0.466μ) 中毒家兎 0.394μ (S. D. 0.282μ) 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。

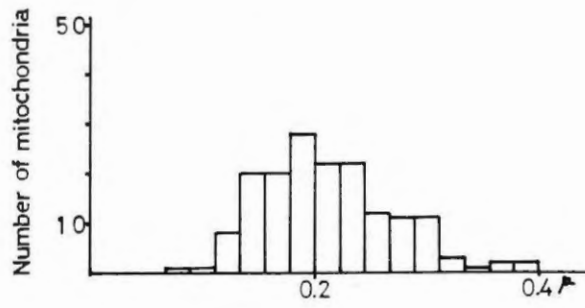
核小体のsegregationが認められ, pars amorphaが数個所に分れている所見がみられた (図6)。

3) 腓腹神経

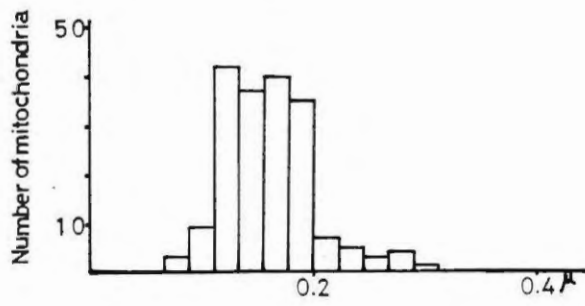
有髄線維のaxonにneurofilamentの増加がみとめられ (図7), 大径有髄線維に選択的にmyelin splittingがみられた。Schwann細胞では一部のERが拡大している像がみとめられたが, そのほか明らかな変化はみられなかった。

Frequency distribution for mitochondrial width

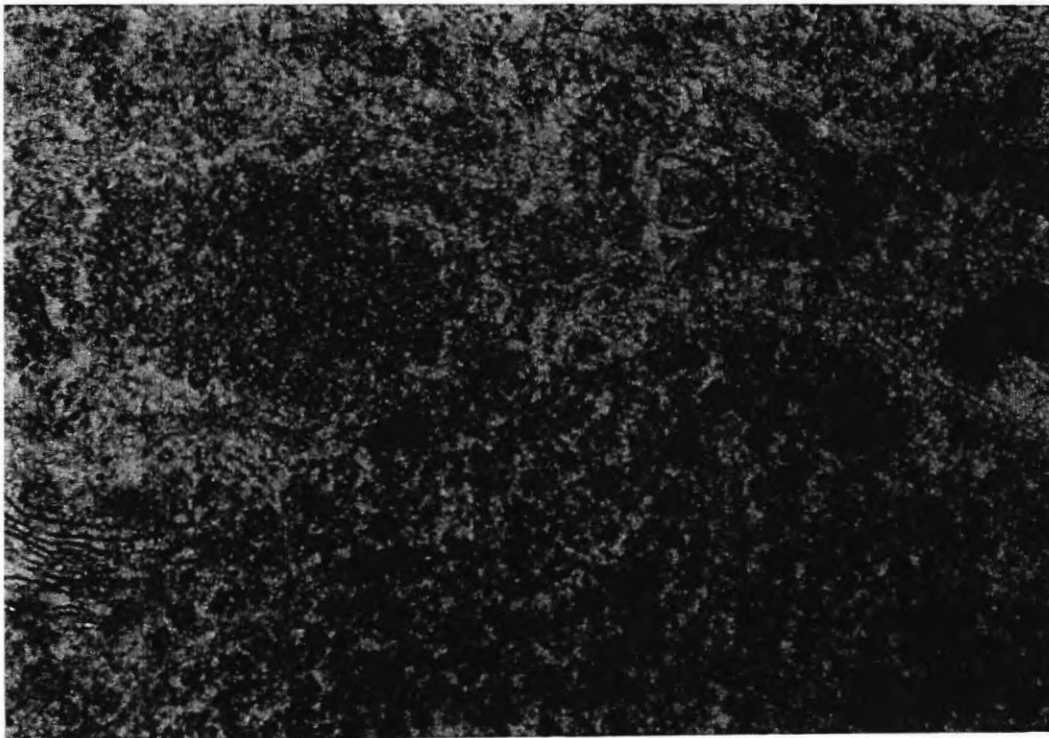
a) Control rabbit



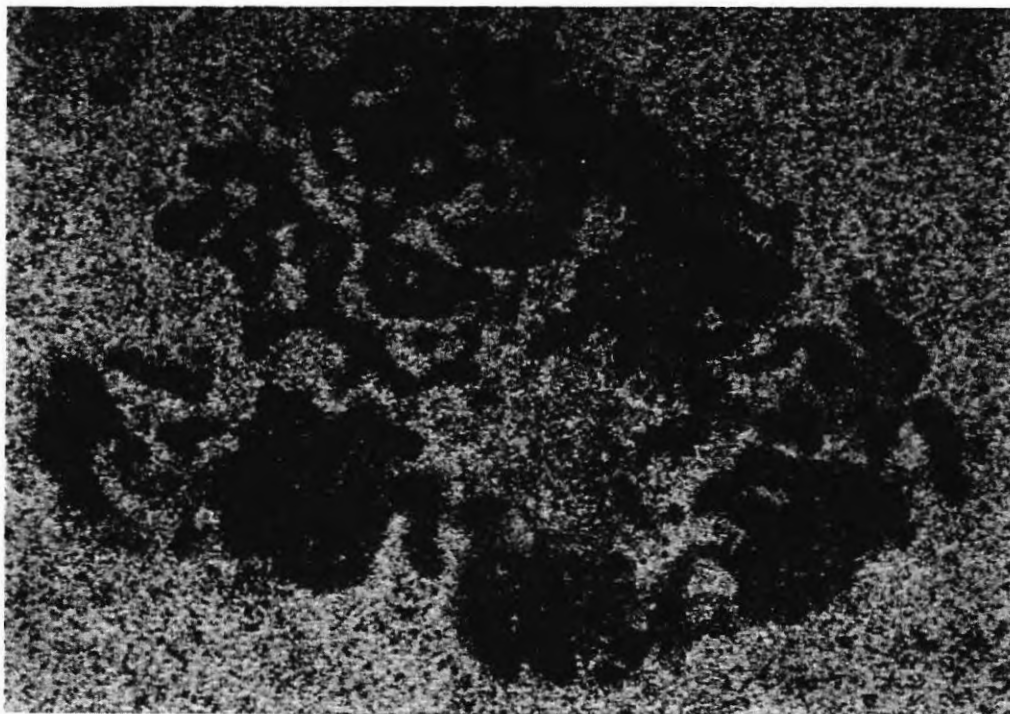
b) Intoxicated rabbit



[图 4]



[图 5] × 40,800



[6] × 21,000



[7] × 35,000

考 案

エンテロピ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¹⁾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、本剤が脱共役として作用するとする生化学的知見²⁾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のエンテロピオフォルムを毎日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)