

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、前もってコラーゼを塗布したカバーガラス上に植え付け、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 μ 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 μ g/ml, 1 μ g/ml および 0.1 μ 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・アルデヒ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 μ 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は一致している(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 μ g/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 μ g/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 μ g/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 μ g/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 μ g/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 μ g/ml以上の濃度で、それ以下の濃度では影響はないと言い得る。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 μ g/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

$\mu\text{g}/\text{ml}$ 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、 $1\sim 10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 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 $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 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、 $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 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 $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 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 $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 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關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 $0.1\ \mu\text{g}/\text{ml}\sim 10\ \mu\text{g}/\text{ml}$)
2. キ剤 $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 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のものである。
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。

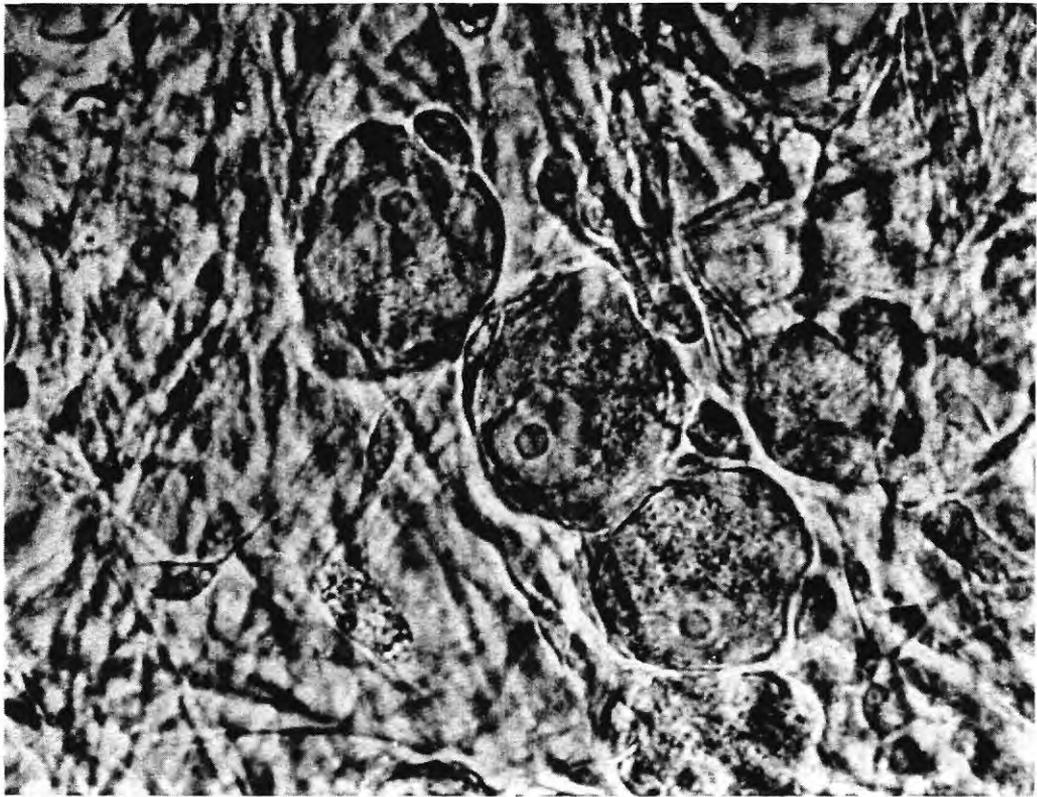
4. キ剤1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 投与群では神経細胞の変化は少く、髄鞘に10～14日後に慢性節状変性、髄鞘解離などの変化をおこす。
5. キ剤0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では2ヶ月間投与に拘らず培養組織には殆んど変化は見られない。

参考文献

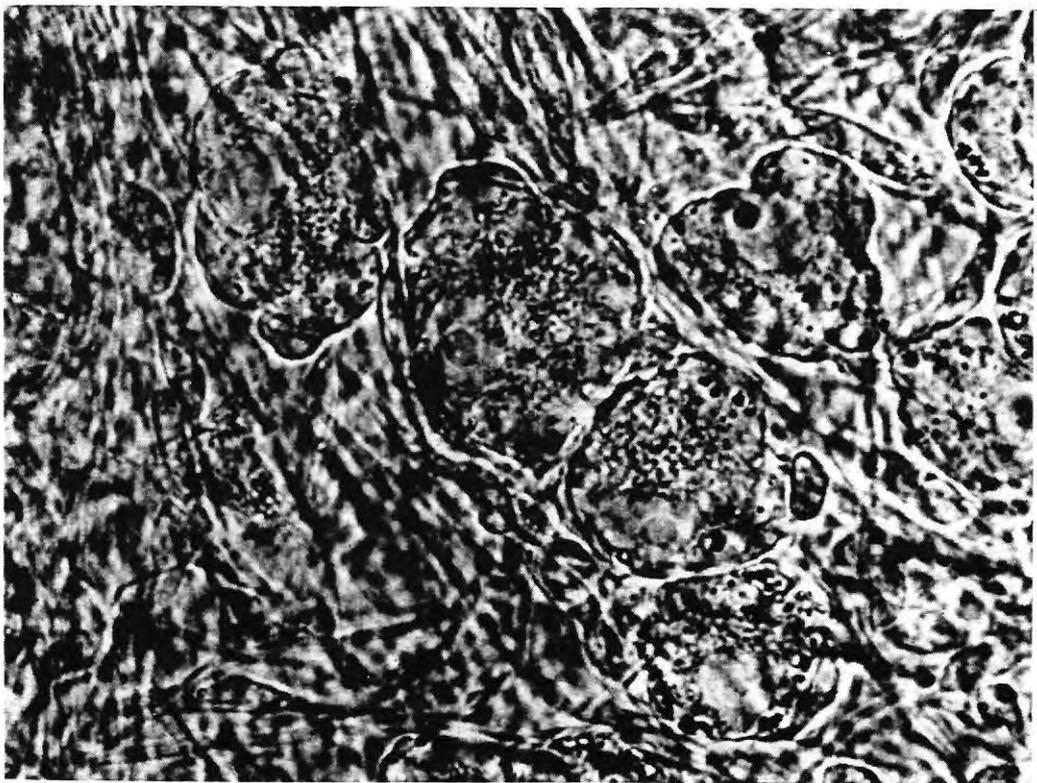
- 1) 別府宏圀, その他2名: 培養神経組織におよぼすキノホルムの影響。スモン調査研究協議会報告, キノフォルム部会, 第3回研究会報告, 7, 1972.
- 2) 大月三郎: 動物におけるキノホルム投与実験。スモン調査研究協議会報告, 総会号, 10, 1972.
- 3) 八木国夫, 他3名: ミトコンドリアの呼吸調節におよぼすキノホルムの影響。スモン調査研究協議会報告, キノフォルム部会, 第1回研究会報告, 2, 1971.
- 4) 八木国夫, 他3名: キノホルムの脳ミトコンドリアの呼吸に及ぼす影響ならびにキノホルム類似物質の肝ミトコンドリアの呼吸調節に及ぼす影響。スモン調査研究協議会報告, 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

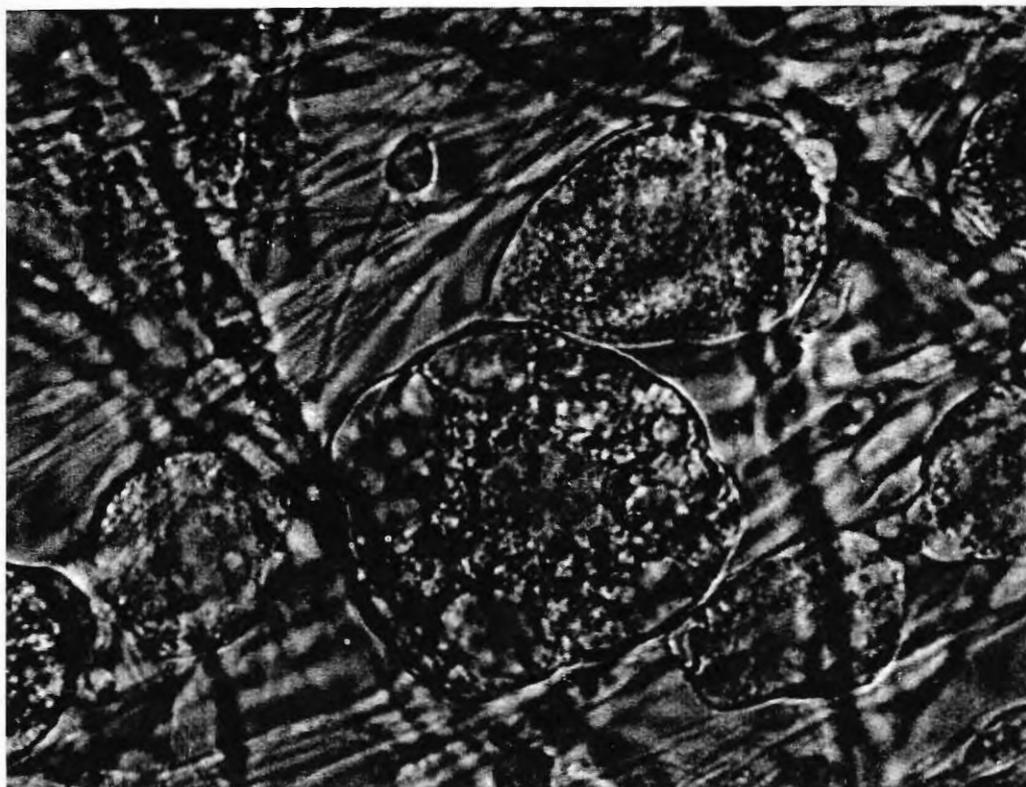


图 2

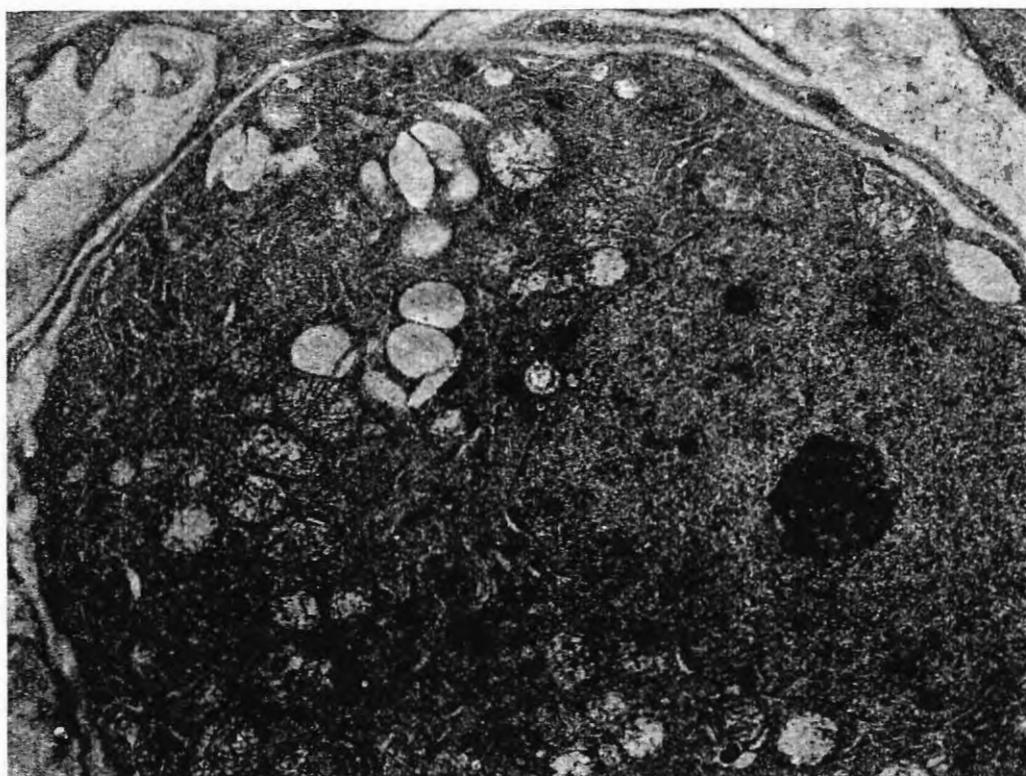
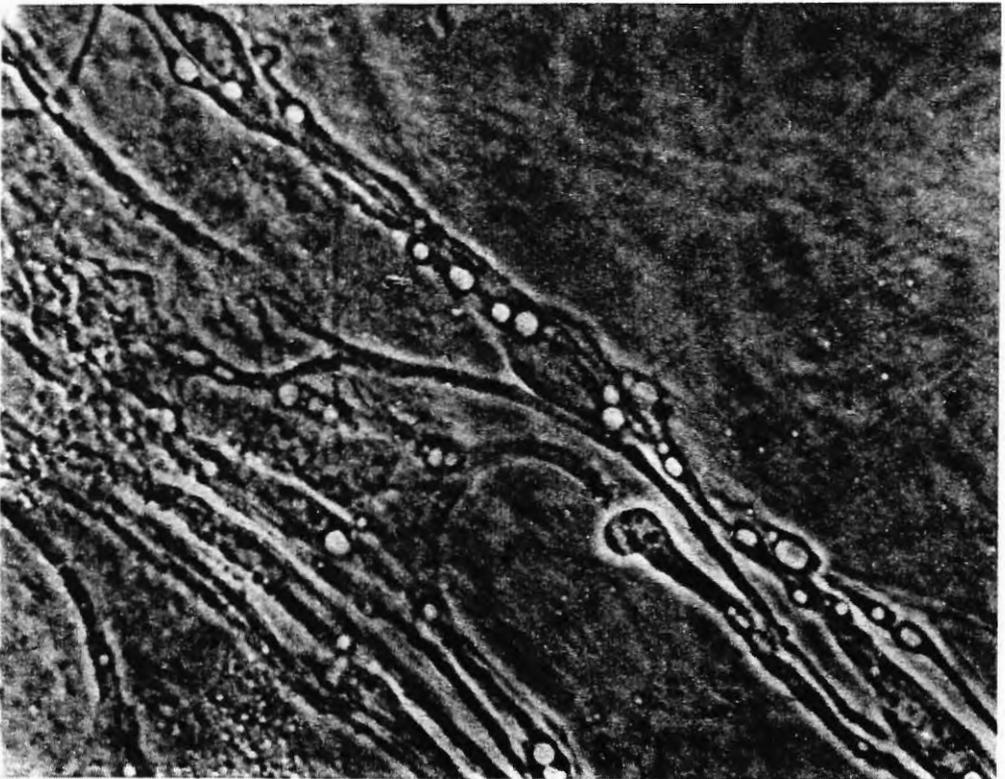


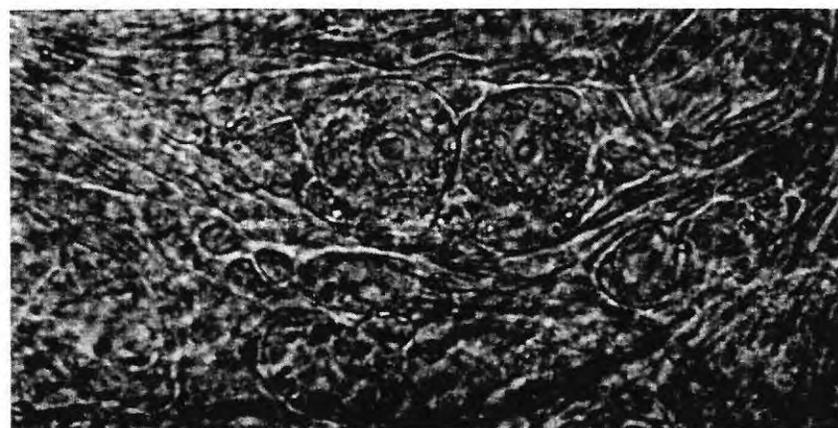
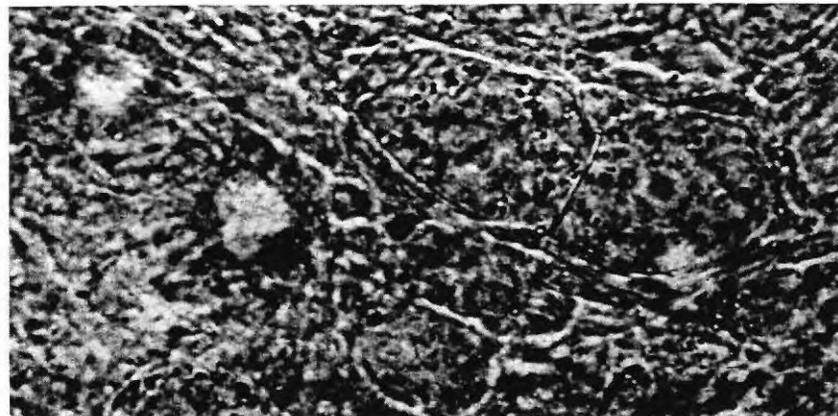
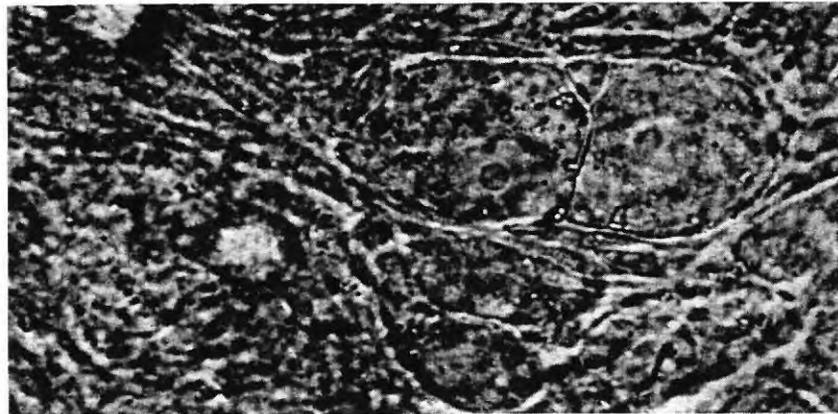
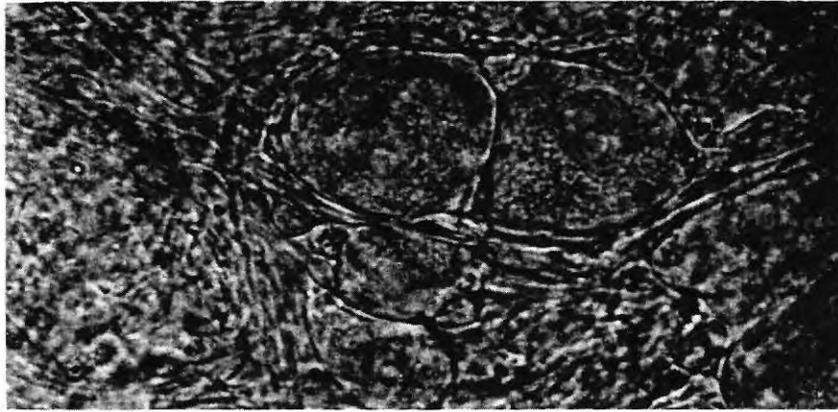
图 3



☒ 4



☒ 5



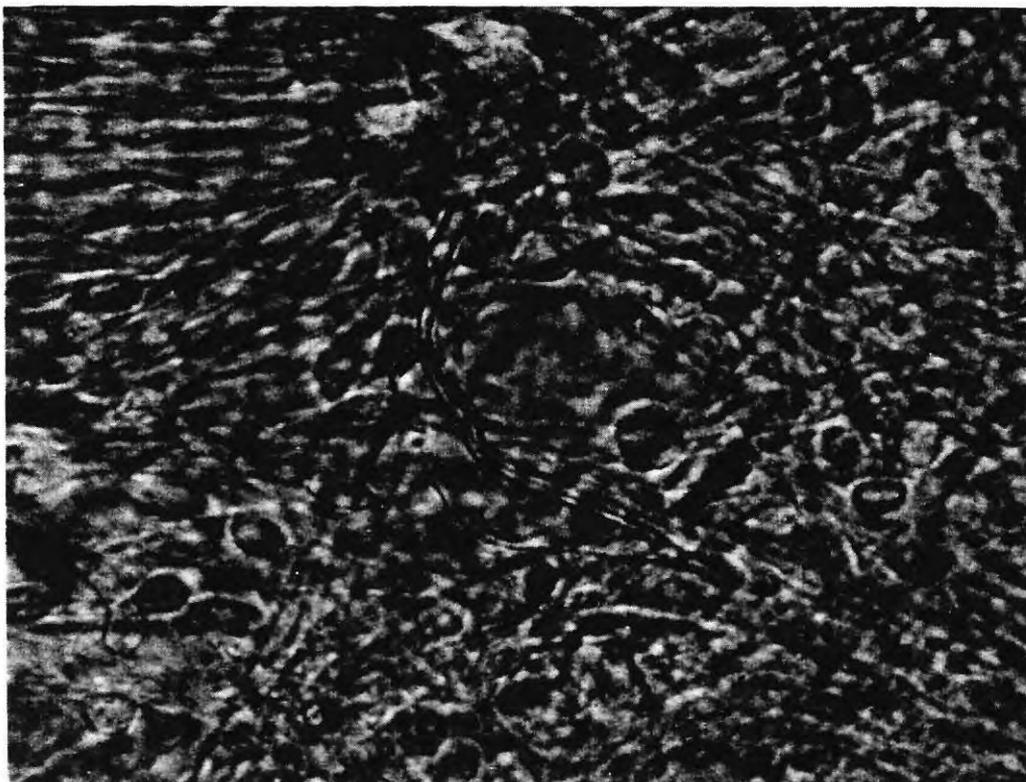


图-7

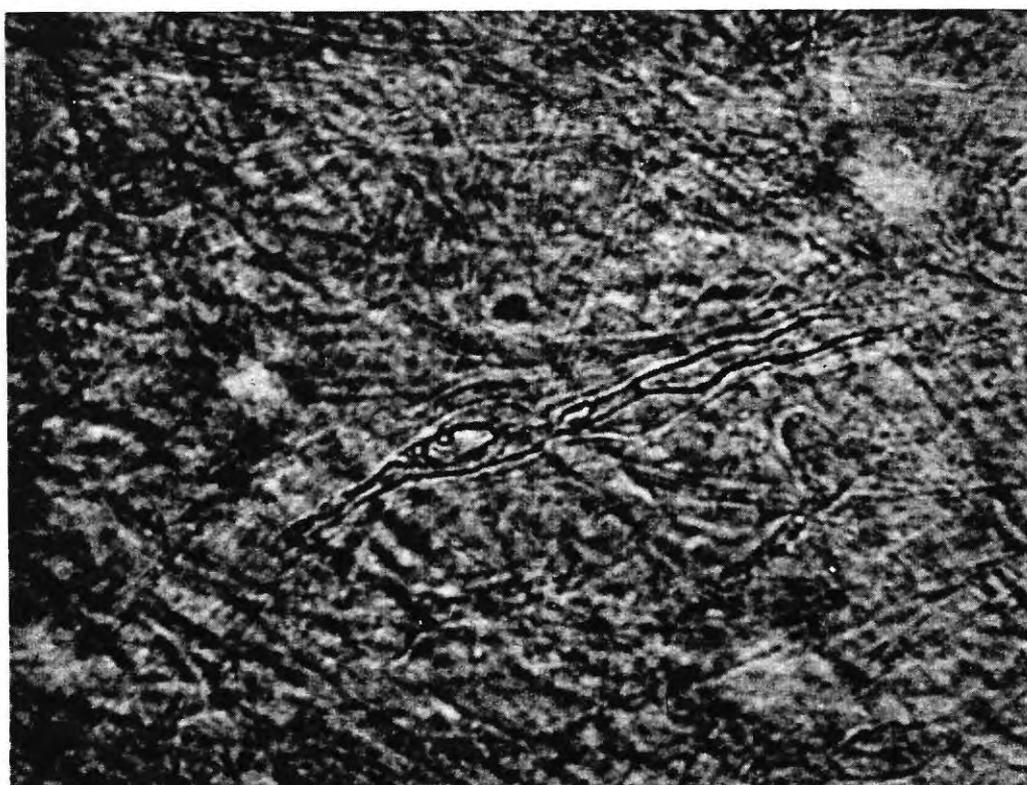


图-8

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、病因論的原因は中毒性、乃至代謝障害性のものであると考えていた。

更にもうその際、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 Fe^{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つたらうし、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 α -、 β -、 γ -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る農薬(エチル・パラチオン、バイテックス、セビン、メタジストックス)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る。

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の状態が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なった。

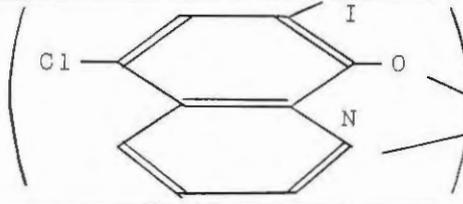
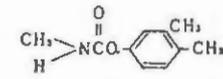
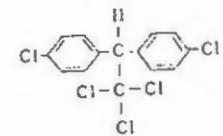
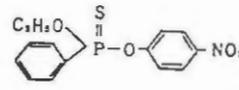
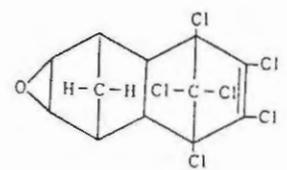
II. 実験

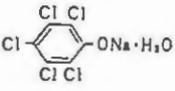
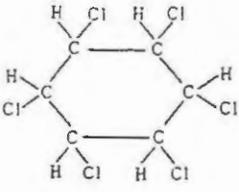
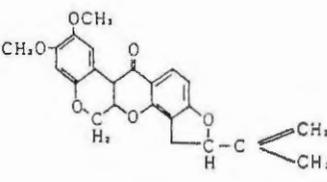
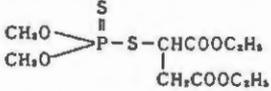
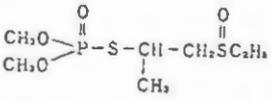
まえがきで述べてきた如く、今回は我が国で広く問題となっている農薬汚染の実態を考慮し、メオバル、DDT、EPN、エンドリン、PCP-Na、リンデン、マラソン、エストックス以上の8種農薬の前処置、その後投与したキノホルムの病変、如何に作用したかをマウスを用いて検討してみた。

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バル、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—

 chinoxalinum		Fe
1 MPMC (Meobal) 「メオバル」	 3,4-xylyl methylcarbamate メチルカルバミン酸3,4-キシリル	劇物 〔人畜〕 経口(マ) : 57.1 経皮(マ) : 120 〔魚類〕B コイ : >10(原)
2 DDT (DDT)	 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane 1,1,1-トリクロル-2,2-ビス(p-クロロフェニル)エタン	〔人畜〕 経口(マ) : 300~400 (ラ) : 250 経皮(ウ) : 150 〔魚類〕 乳剤C, その他B コイ : 0.25(原) ニジマス : 0.0048(乳) ヒメダカ : 0.08(原) 〔蜜蜂〕 中程度
3 EPN (EPN)	 ethyl p-nitrophenyl phenylphosphonothionate フェニルホスホノチオ酸O-エチル O-p-ニトロフェニル	毒物(1.5%以下は劇物) 〔人畜〕 経口(マ) : 24 (ラ) : 35~45 経皮(ウ) : 50~150 〔魚類〕B コイ : 0.35(原) ヒメダカ : 0.75(原) 〔蜜蜂〕 大
4 ディルドリン (dieldrin)	 1,2,3,4,10,10-hexachloro-6,7-epoxy-1,4,4a,5,6,8-octalene	劇物 〔人畜〕 経口(マ) : 38 (ラ) : 約60 経皮(ウ) : 約150 〔魚類〕規制 コイ : 0.018(原) : 0.021~0.32(乳)

	<p>7,8,8a-octahydro-endo-1,4-exo-5,8-dimethanonaphthalene, (HEOD)85%以上 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</p>	<p>ヒメダカ：0.004(原) ニジマス：0.027(乳) 〔蜜蜂〕 大</p>
<p>5 PCP (pentachlorophenol-sodium)</p> <p>〔PCP〕</p>	 <p>sodium pentachlorophenoxide ナトリウムペンタクロルフェノラート</p>	<p>劇物(1%以下を除く) 〔人畜〕 経口(マ)：約82 経皮(マ)：約154 〔魚類〕指定 コイ：0.10(原)</p>
<p>6 リンデン (lindane)</p> <p>ロテノン (rotenone)</p> <p>〔デリス〕</p>	 <p>1,2,3,4,5,6-hexachlorocyclohexane (γ体99%以上) 1,2,3,4,5,6-ヘキサクロルシクロヘキサン</p>  <p>rotenone 〔ロテノン〕</p>	<p>劇物(1.5%以下を除く) 〔人畜〕 経口(マ)：74 〔魚類〕 乳剤C, その他B ヒメダカ：0.1(原) ニジマス：0.036(乳) コイ：0.31(原) ：0.26(乳) 〔蜜蜂〕 大</p> <p>劇物(2%以下を除く) 〔人畜〕 経口(ラ)：132 経皮(ウ)：>940 〔魚類〕C コイ：0.032(原) モツゴ：0.002~0.02 (原, 24h) ヒメダカ：0.008(原) 〔蜜蜂〕 ほとんどなし</p>
<p>7 マラソン (malathion)</p> <p>〔デリス〕</p>	 <p>S-(1,2-di(ethoxycarbonyl)ethyl) dimethyl phosphorothiothionate ジチオリン酸 S-[1,2-ビス(エトキシカルボニル)エチル]O, O-ジメチル</p>	<p>〔人畜〕 経口(マ)：369 経皮(ウ)：776 〔魚類〕B コイ：14(原) ヒメダカ：0.75(原) 〔蜜蜂〕 大</p>
<p>8 ESP (Estox)</p> <p>〔エストックス〕</p>	 <p>S-(2-ethylsulfinyl-1-methylethyl)dimethyl phosphorothiolate チオリン酸 S-(2-エチルスルフィニル-1-メチルエチル)O, O-ジメチル</p>	<p>劇物 〔人畜〕 経口(マ)：57.8 経皮(マ)：264 〔魚類〕A コイ：>40(原) ：>10(乳)</p>

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LD₅₀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匹づつ死亡を認めた。

表 2 - 病 理 組 織 変 化

Chinoformum 15mg/day/Mouse		死亡例	Thymus Lymph n. Spleen (atr. kar- yorrhexis)	Stomach Intestine (M. inj, etc.)	Liver (atr. ploidy ↑, coag. deg. etc.)	Brain (acid deg.)	Spinal cord (後索の脱化 (神経節変化))	キノホルム 障害増強度	
2日 2日	7日間								
↑	↑	↑							
農薬 1/2 LD ₅₀ /3回		10日							
1	メオパール (MPMC) (20mg/kg×3)	キノホルム -	0/2	±	±	±	≡	一~±	↓
			0/2	-	-	-	-	一~±	
2	DDT (200mg/kg×3)	キノホルム -	1/2	+	-	±	+	±	↓
			0/2	-	-	-	-	-	
3	EPN (10mg/kg×3)	キノホルム -	0/2	±	-	-	-	+	↓
			0/2	-	-	-	-	-	
4	エンドリン (25mg/kg×3)	キノホルム -	2/2	+	±	-	水腫様変化	±~+	↑
			1/2	-	-	-	-	+	
5	PCP. Na (25mg/kg×3)	キノホルム -	2/2	+	+	-	水腫様変化	±~+	↑
			1/2	-	-	-	-	-	
6	リンデン (10mg/kg×3)	キノホルム -	1/2	≡	+	±	≡	+	↑
			0/2	-	-	-	-	-	
7	マラソン (200mg/kg×3)	キノホルム -	0/2	+	≡	+	≡	±~+	↑
			0/2	-	-	±	-	+	
8	エストックス (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 $4/5$ を示したものがあつた。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つた。

脊髓に於ては HE, Bodian 及び Luxolfastblue 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つた。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、齒状回の神経細胞に Eosinophilic degeneration (好酸性変性乃至壊死) を明瞭に且つ有意に認めた。

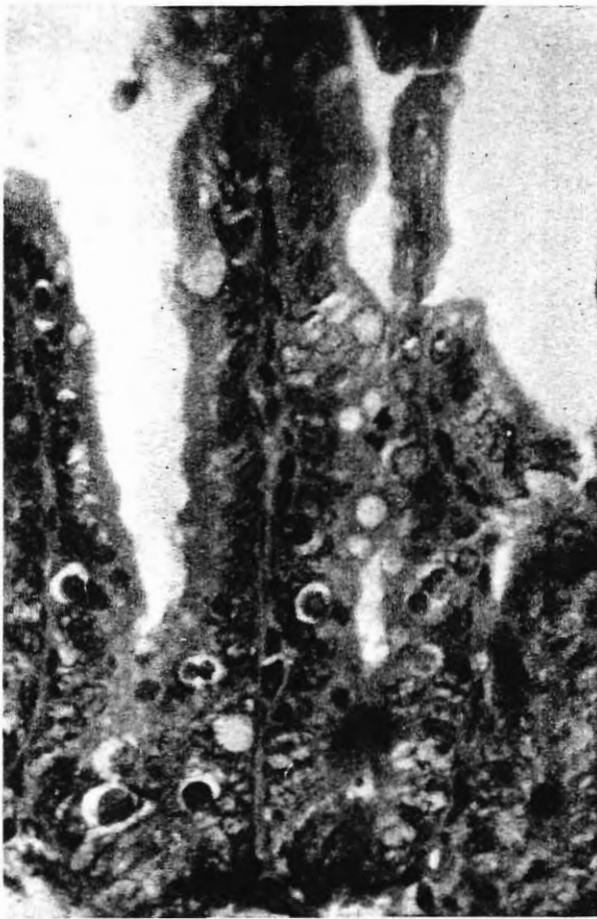
農薬・キノホルム併合投与例に於てはリンデン、マラソン、エストックス群に於て腸管上皮細胞の増殖部位に核崩壊が更に高まる事が認められた。(Photo 1) 又、大腸に於ても同様の傾向を示した。

脳の海馬回、齒状回の好酸性変性はメオパール、リンデン、マラソン、エストッ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つた。EPN, エンドリン, PCP-Na, リンデン, マラソン, エストックス例ではキノホルム投与例と同様脊髓後索 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, エストックスに於て腸管上皮細胞の増殖障害は増強性を示した。

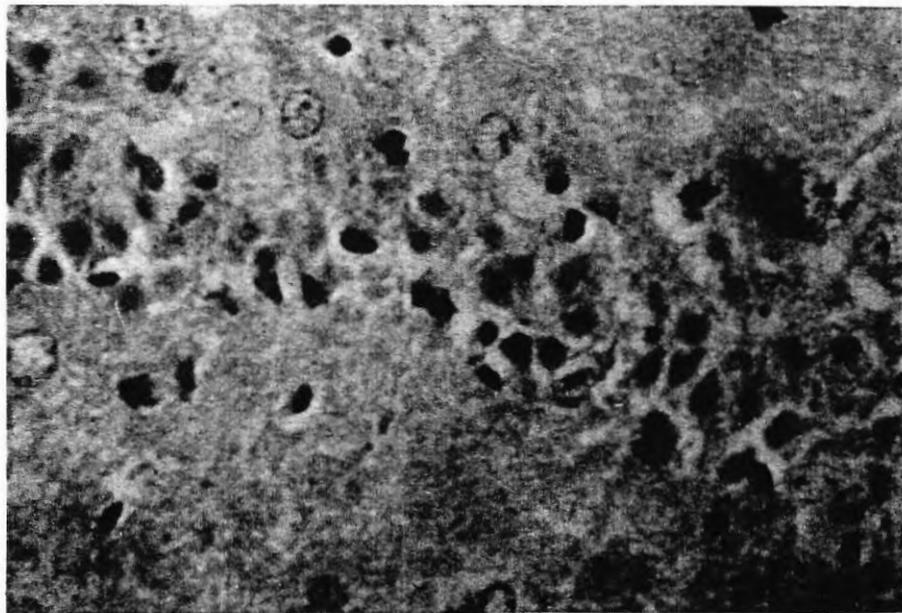
腸管上皮細胞の増殖障害性を示すことは、キノホルム投与例に於て特異的であり、スモン患者の人体剖検例に於ける腸管粘膜の萎縮と間質の細胞浸潤を武内は注目しているが、この点との関連があるものと考えられる。

又、脳の病変に於ても同様に海馬回、齒状回の神経細胞の好酸性変性の割合を高めているものもある、スモンの特徴的病変を脊髓にマウスを用いては作り難いと言われているが、投与量の検討によつてはもっと明瞭な病変を作り得るかも知れない。一応、脊髓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。



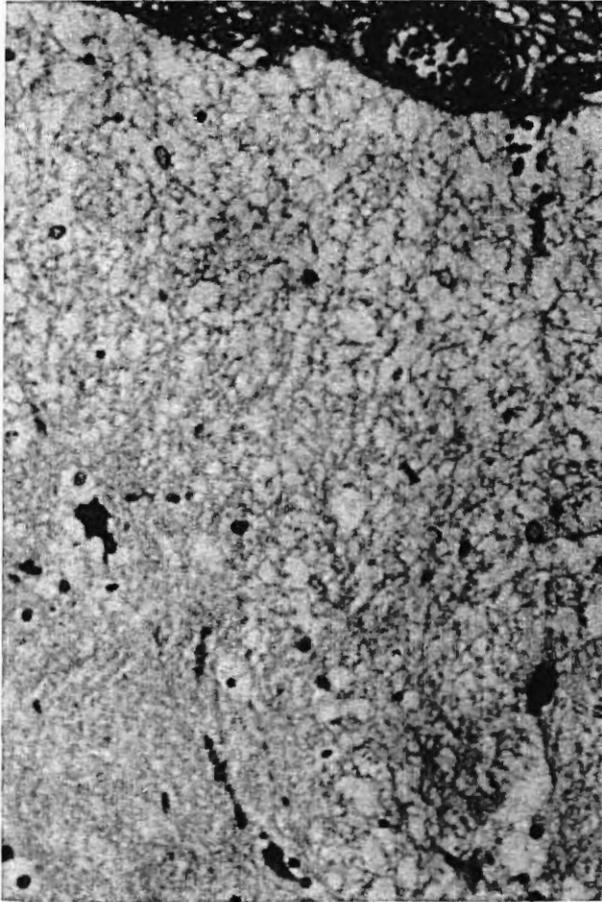
Photo, 1

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



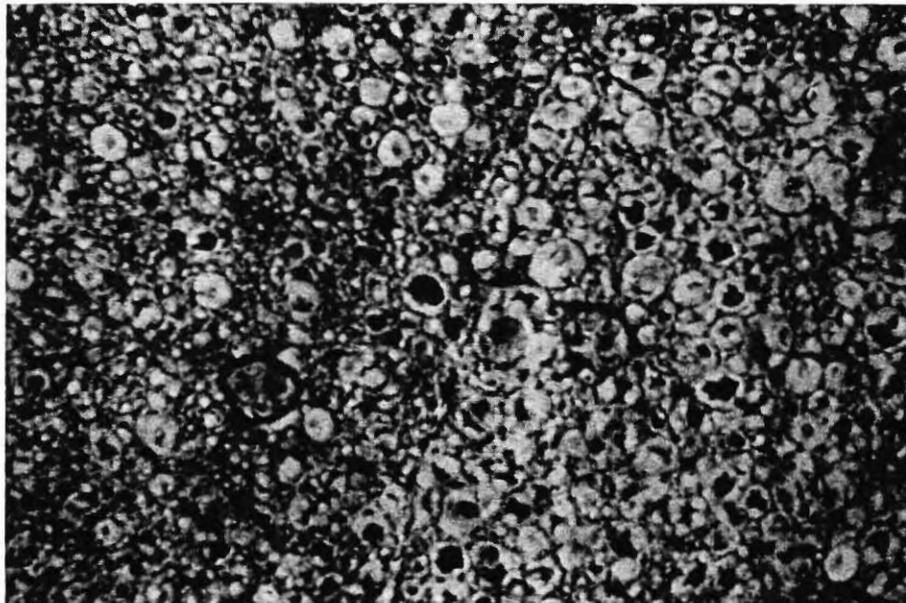
Photo, 2

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。



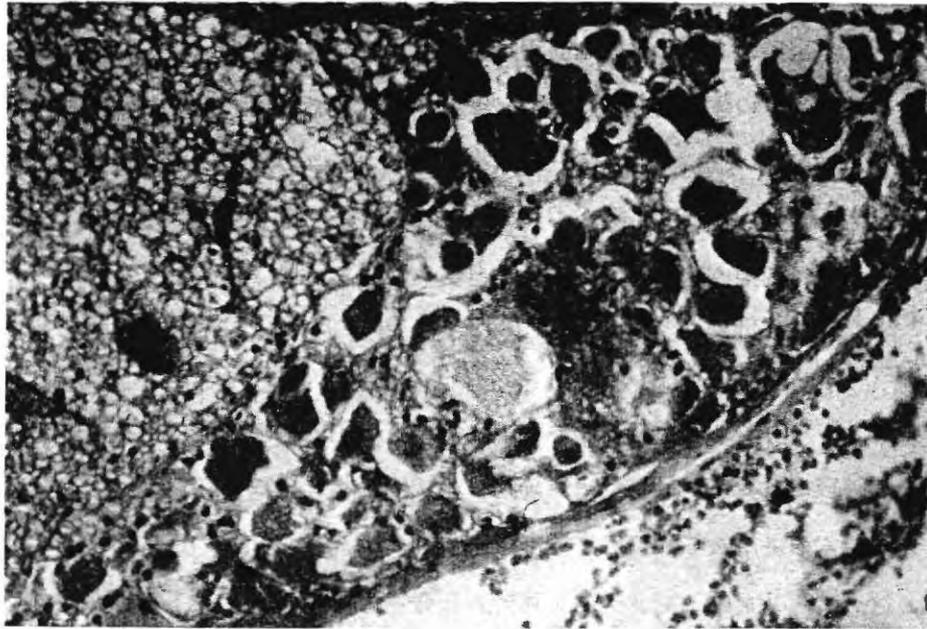
Photo, 3

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，その結果どの様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¹⁴C-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¹⁴C-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等が考えられた。

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}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%含有のエンテロピオホルム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はエンテロピ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

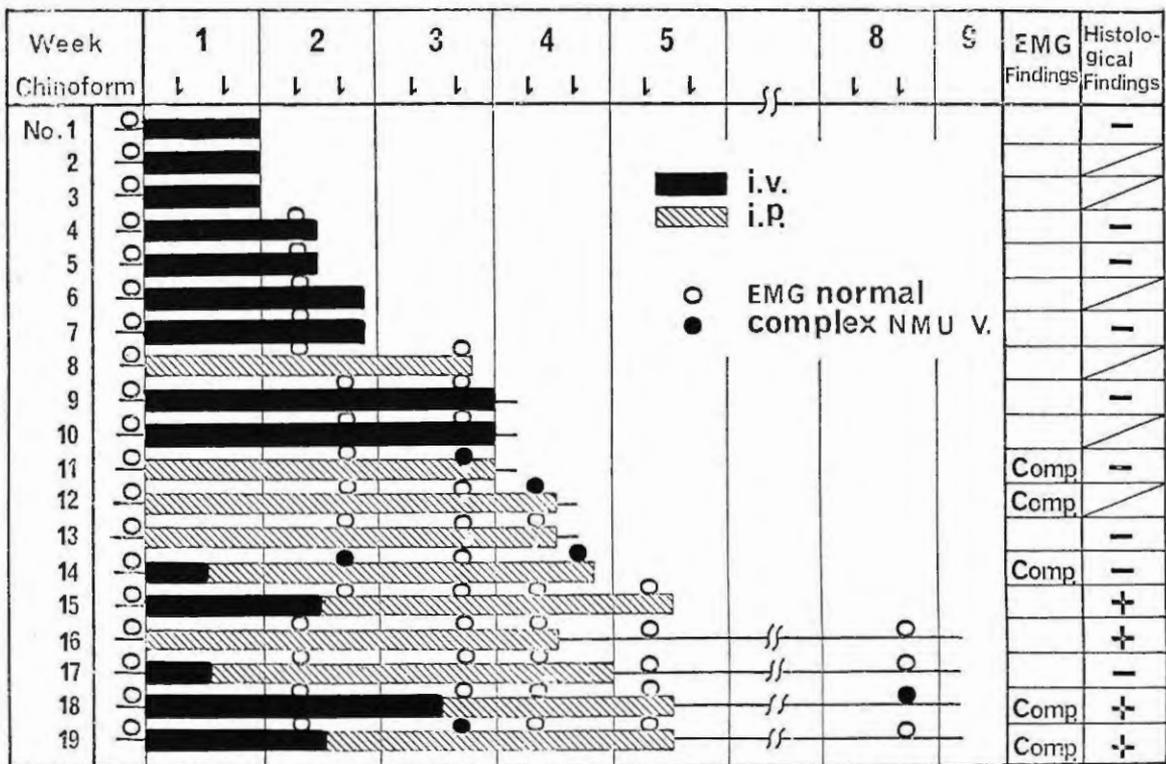


図1 キノホルム投与家兎とEMG

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 μ 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。

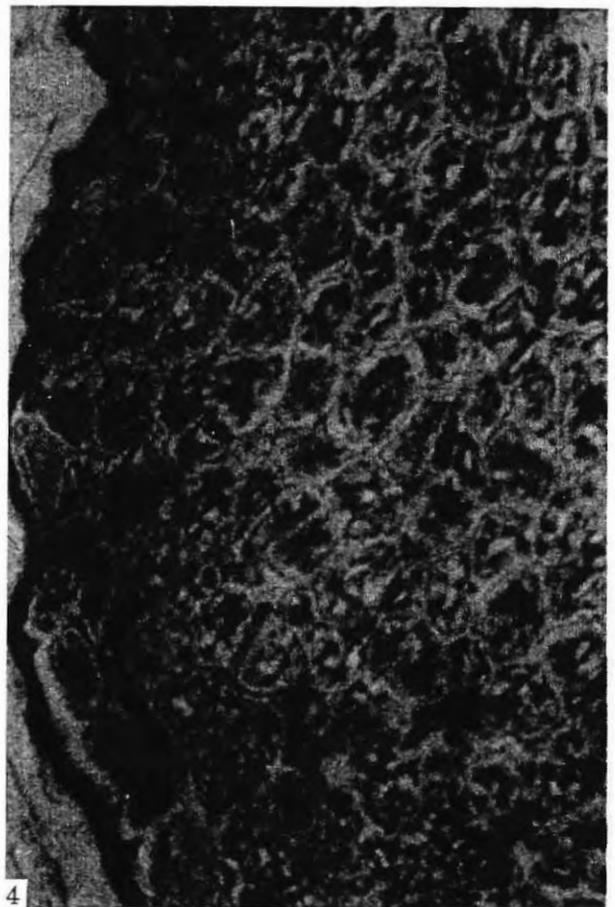
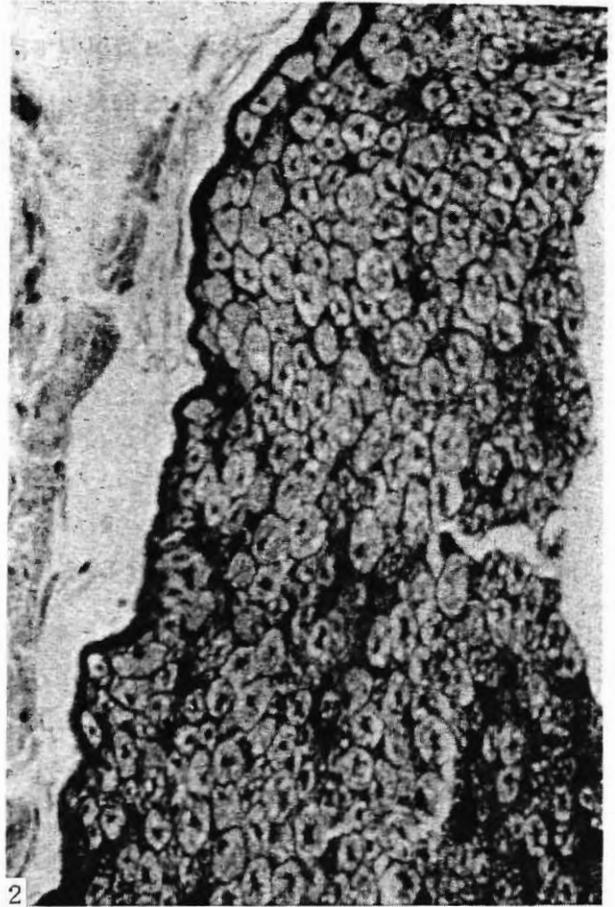
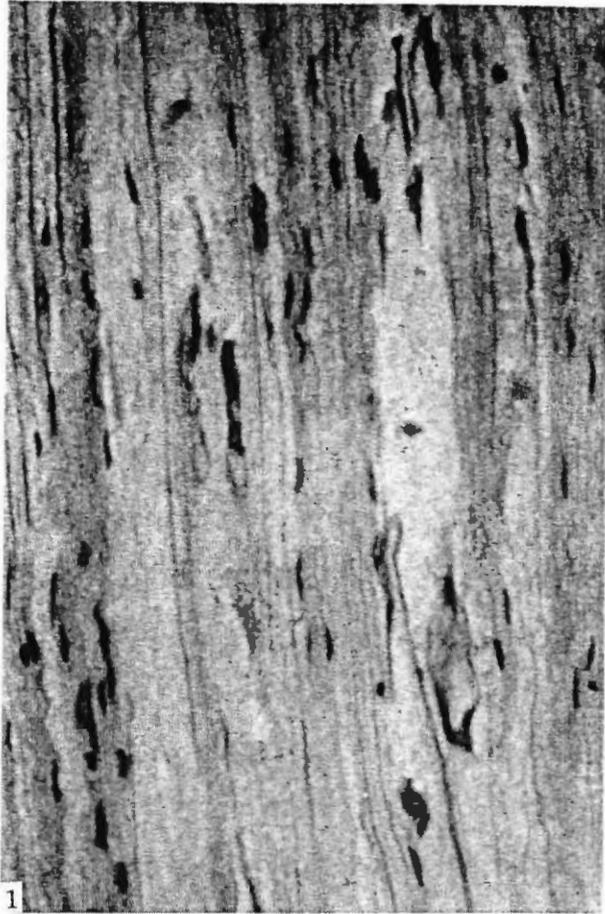
4 週、8 週目に剖検し、死亡したものはその直後に剖検して、組織学的検索を脊髄、坐骨神経、大腿四頭筋、肺、肝、腎について行なった。肺では小血管が閉塞しそれによる小硬塞巣が散見され周囲に炎症性細胞浸潤を認めた。肝では空胞変性 (4%) とか脂肪肝 (5%) 認めるのがあった、筋肉では変性及び萎縮像は特に認められなかった。脊髄は胸髄と腰髄 (写真-5, 6) について検索したが全例とも特に変化を認めなかった。坐骨神経については 15%、16%、18%、19% に変性像を認めている。写真-1, 2, は 15% の坐骨神経の H. E. 染色であり、変化は軽度であるが軸索は変性萎縮あるいは崩壊を示している。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。坐骨神経に変性が見られた 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。



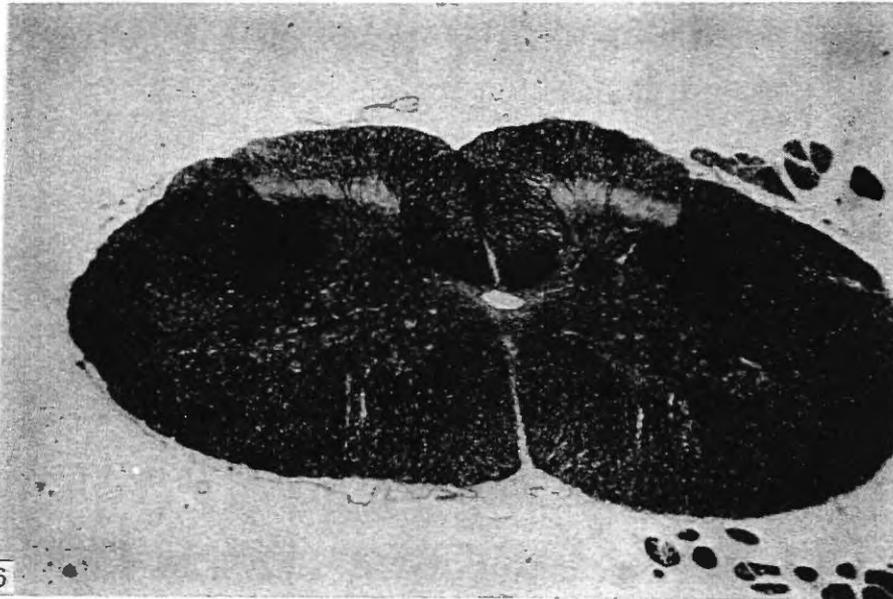
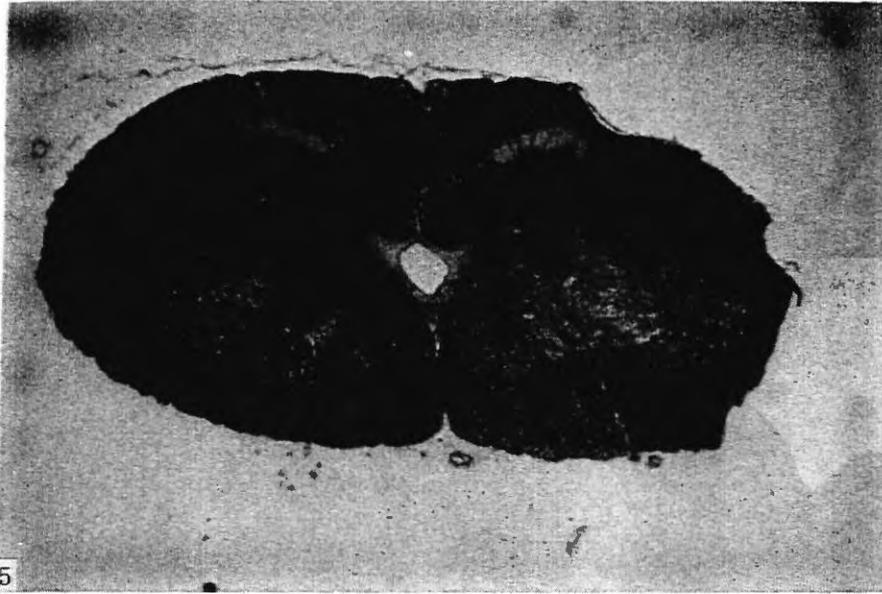


写真 キノホルム投与家兔

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