

4. キノホルム部会報告

a. 動物実験

報告者 大 月 三 郎

SMONとキノホルムとの関連が、緑舌、緑尿便の観察、この緑色物質がキノホルムの鉄キレート物質であること、ならびにSMON患者におけるキノホルムの内服状況から注目された。これ以来、各種動物における実験的キノホルム投与におけるSMONの臨床症状と病理変化の再現、ならびにキノホルムの生体への影響が研究されてきた。

I. 各動物におけるキノホルムによる実験的投与の報告 (表1)

キノホルムの毒性について、従来、けいれんを主とする急性中毒が、イヌ、ネコおよびマウスについて認められ、組織学的には脳で非特異的所見が知られていたにすぎない。経口投与によるLD₅₀はモルモットで175 mg/kg, ラットで1,000 mg/kg, 小猫で約400 mg/kgである。末梢神経病変の最初の記載はRoeschら(1965)によるラットでの報告であるが、これはオキシキノリンの誘導体である5-nitro-8-hydroxyquinolinによるものであり、キノホルムではない。

わが国のキノホルム投与実験は、45年9月以降、井形らの家兎への静脈内投与、池田らのニワトリ、マウス、江頭らのモルモット、立石らのイヌへの経口投与で開始された。現在までのキノホルム投与実験を臨床症状発症の有無に拘らず、動物別にまとめて表1に記載した。外国における報告は急性短期間投与のものが多く、慢性持続性投与実験は主としてわが国で行われたものである。

II. キノホルムによる慢性中毒症状 (表2)

1. キノホルム投与動物の症状

サル(11/14)、イヌ(雑犬21/39、ビーグル犬7/9)、ネコ(6/27)、ウサギ、ニワトリ、ウズラにおいて、キノホルムまたはCMCあるいはサパミン添加キノホルムの持続投与によって神経症状の発現をみた。(括弧内は発症数/実験数)。

1) 神経症状

(1) 運動障害: サル、イヌ、ネコ、ウサギ、ニワトリ、ウズラにおいて認められ、両側対称性に出現し、後肢に強く、前肢では軽いか、認められない程度である。イヌ、ネコでは両下肢運動麻痺、脱力、失調、筋萎縮、両下肢腱反射亢進が明らかであった。運動障害は軽症の段階では休息により回復する傾向が認められた。また軽症では階段の昇降によって運動障害が顕在化

表1. キノホルム実験的投与 (報告者, 年次別, 動物別)

動物	年次	報告者	備考	動物	年次	報告者	備考
サル・カニ クイザル	46.3~ 47.2	高橋理明ら	ECHO-21 ウイルスと併用	ラット	1970	Brücknerら	in vitro 呼吸, 蛋白合成 睡眠
	46.3	新宮 正久		ラット	46.3	小坂淳夫ら 小口喜三夫ら 高橋康夫ら	
日本ザル カニクイザル	46.7	立石 潤ら					培養神経組織 消化管吸収
	46.12	大西晃生ら				松本淳治ら 米沢 猛 林 正弘ら	
イヌ・雑犬	1964	Fischer	急性中毒死	マウス	1969	Püschnerら	飼料に混入
	1965	Hangrtner	"		45.11	池田良雄ら	一部 i.p., i.v. 飼料に混入
	"	Schantzら	"		46.3	松橋 直ら	
	"	Roesch	"		"	森 尚義ら	
	1967	Müller	"		"	齊藤 守	培養神経組織 脳, 肝ミトコンド リア呼吸
	45.11	立石 潤ら	四塩化炭素(一部) 合併 便秘処理(一部)		"	米沢 猛	
	46.3~ 47.2	俵寿太郎ら	マイコプラズマ 併用(一部)		46.3~ 46.12	八木国夫ら	
	46.7~ 46.12	金光正次ら	CMCの併用効 果検定		46.5	矢野雄三ら	皮下注 各種農薬, 四 塩化炭素合併
	47.2	立石 潤ら			47.2	上田喜一ら	
	ネコ	1944	Davidら		急性中毒死	モルモット	1944
1965		Hangartner	外用薬による 急性中毒死	45.11	江頭靖之ら		
1970		Brücknerら	脳灌流法による グルコース, アミ ノ酸代謝	ハムスター	46.3	江頭靖之ら	農薬合併
46.12		大月三郎ら		ニワトリ	45.11 ~47.2	池田良雄ら	鶏胚培養 神経組織
47.2		立石 潤ら	Viomycinによ る腎障害(一部)	46.3	光岡 知足		
47.2	立石 潤ら		47.2	別府 宏圀			
ウサギ	45.11	井形昭弘ら	i.v.	ウズラ	47.2	江頭靖之ら	in vitro, 坐骨神経活動 電位, 腹部上皮電位
	46.3~ 46.7	大西晃生ら	i.v.		46.3	八木国夫ら	
	46.3	向山昌郎ら	MgO併用(一部)	トノサマ ガエル			
	"	早瀬正二ら	i.v., i.p.				
	46.3~ 47.3	三好和夫ら	i.v., 糖代謝, 尿 中MMA in vitro, carbo- nic anhydrase				
	46.12	山田英智ら					

した。

(2) 視力障害: イヌ, ネコにおいて壁にぶつかるとか, 餌に気づかぬ等の行動から推定された。

(3) 知覚障害: サルで両上下肢の知覚鈍麻の報告があるが, 知覚障害は動物実験においては客観的に証明困難である。

(4) 雑犬で稀に持続性尿失禁が長期にわたり観察された。

2) 一般症状

体重減少あるいは増加の停止，摂食量の減少，下痢，時に便秘，緑便，嘔吐などが認められた。ニワトリでは流涎，開口症状がみられた。

SMON特有の腹部症状については，動物実験では認めることは困難であるが，雑犬とネコの各1例において頻回の嘔吐後，腸重積症による死亡例があった。

2. キノホルム経口投与量と症状の発現

神経症状発症時の1日投与量を動物別にみると，サル，ビーグル犬，ニワトリ，ウズラは大量を要し，雑犬，ネコ，ウサギでは約100～150 mg/kgであった。ラット，マウス，モルモット，ハムスターでは，現在までの投与量では発症が認められていない。

発症までの経口による総投与量においては，ウズラ，ニワトリ，サルで大量を要し，雑犬，ネコ，ウサギではほぼ4g/kgであり，ビーグル犬では13g/kgであった。

神経症状の発症に要するキノホルム量には，種族差が認められ，イヌでは系統差がみられた。なおこの際，飼育条件が問題となるが，雑犬では飼料のちがいによって，発症までに要するキノホルム量には変化がなかった。

キノホルム投与はfixed doseあるいは漸増法が行われたが，イヌ，ネコではけいれんなどの急性中毒死をさけるために，主として漸増法が用いられた。ビーグル犬の場合，230mg/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日と比較的一致していた。

表 2. キノホルム経口投与動物の症状とキノホルム量

動物	神経症状 麻痺・失調，視力障害	発症時1日投与量 (mg/kg/day)	発症までの総投与量 (g/kg) (平均)
サル	+	200～700	約30
イヌ { 雑犬 ビーグル犬	+	60～144	1.7～16.6 (4.1)
	+	350～450	7.4～17.9 (13.0)
ネコ	+	90～250	1.5～10.5 (5.7)
ウサギ	+	125～150	1.5～4.5
ラット		(1000)*	
マウス		(150)*	
モルモット		(240)*	
ハムスター		(500)*	
ニワトリ	+	500	10～20
ウズラ	+	600～3000	9～240

*括弧内は使用された最高量

3. キノホルムとの合併処置

キノホルム自体の神経毒性に加えて，他の処置が中毒症状の出現の速さと強さに関係するか

否かについて、2, 3の検討が行われた(表1の備考)。雑犬における便秘処置では発症が僅かにはやまる。CMC添加と無添加を比較すると、CMC添加群に高率、重篤な神経症状を認めた。またキノホルムで発症した雑犬にマイコプラズマを併用したところ、失明、前肢麻痺をきたしたという報告がある。その他、ネコにおけるViomycin, ウサギにおけるMgOの併用, マウス, ハムスターにおける各種農薬, マウスにおける四塩化炭素の併用, モルモットにおける開腹手術などが試みられたが、これらの動物ではさ程の影響は認められなかった。たゞ雑犬でキノホルム35 mg/kg/dayを投与し、3ヶ月以上発症しなかったものに四塩化炭素を負荷したところ、同量のキノホルムで2ヶ月後に発症を認めた1例がある。

しかし動物のキノホルムに対する感受性には、かなりの個体差が認められるので、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。

III. 病理所見

1. 神経系(表3)

ヒトのSMONの神経病理の特徴に従って、脊髓長索路、とくに頸髄薄束と腰髄錐体路、脊髓後根神経節、末梢神経、視束、オリブ核の順に、実験動物の病変を概観する。

1) 脊髓後索の変化は、サル、イヌ、ネコ、ニワトリ、ウズラで報告された。これらは頸髄上部から延髄下部に強い、薄束を中心にした左右対称性連続性の変性で、イヌ、ネコでは胸髄

表3. キノホルム中毒動物の病理所見

	頸髄薄束	錐体路	脊髓灰白質	後退神経節	末梢神経	視束	オリブ核
サル	+	+	+	+	+		
イヌ 雑犬	+	+	+	+	+	+	+
ビーグル犬	+	+		+	±	+	
ネコ	+	+	+	+	+	+	+
ウサギ				(+)	+		
ラット	±	±	+		(+)		
マウス					+		
モルモット							
ハムスター							
ニワトリ	+	+			+		
ウズラ	+	±					

(+): 電顕的変性 ±: 未確認

中部、重症例では腰髄上部にもみられるが、下位脊髓ほど範囲は狭く、変化も弱い。重症のイヌ、ネコの延髄下部および頸髄上部では薄束のみならず楔状束にも変化が及ぶが、その変化はつねに薄束よりも軽い。

軽症のイヌ，全例のネコ，一部のサル，ニワトリ，ウズラでは，まず軸索の膨化，空胞変性，脱落と喰食細胞の出現がみられるのが普通で，光顕ではこの時期には髄鞘自体の変化は目立たないが，軸索との間隙拡大，軸索の脱落などのため組織が粗しょう化し，髄鞘染色でやゝ明るく見える。しかし正常でも大径線維の多い部分は，一般に髄鞘染色でやゝ淡染するため，コントロールとの対比が必要である。病変の進んだイヌ，ネコでは軸索の脱落，喰食細胞の増生がまし，髄鞘の変化も次第に明瞭となり，膨化，髄鞘球の出現などがみられ，髄鞘染色で淡明化が目立った。

さらに罹病期間3カ月以上の雑犬6頭，ネコ1頭では軸索，髄鞘ともに崩壊し，中性脂肪粒が遠位薄束内にピマン性に出現し，肥大星状膠細胞やGliaresernが多くみられ，線維性グリオゼも認められた。イヌ，ネコの延髄後索核にも組織の粗しょう化，類球体形成，神経細胞の変性などが認められた。

これらの変性部位には炎症性変化はいずれも報告されていない。

2) 脊髄錐体路の変化は，一部のサル，イヌ，ネコ，ニワトリ，ウズラで報告され，腰髄から下部胸髄にかけて，側索および一部，前索にもみられた。この病変の性質は頸髄薄束の変性と同一であるが，その程度は軽く，軸索の変性と組織の粗しょう化にとゞまることが多い。しかし重症の雑犬，ネコの側索錐体路には，髄鞘にも変化が及び，prelipidの出現もみられた。

3) 脊髄灰白質，とくに，腰髄前角の神経細胞の変性，クロマトリーゼ，消失，ノイロノファギーが一部のサルにみられ，軽度の神経細胞の変性，類球体形成はイヌ，ネコ，ラットでも観察された。

4) 脊髄後根神経節では，光顕的に神経細胞の変性，崩壊ならびに外套細胞と一部，遊走細胞の増加，subcapsuleに軸索の腫大と渦巻形成などが殆んど全例の雑犬，ネコと一部のサルなどに認められた。しかし後根神経節は人工変化を伴いやすく，加齢その他の影響も加わるため，まぎらわしい変化については厳密なコントロールとの検討を要する。一部のイヌ，ネコで検索された半月神経節にも脊髄後根神経節と同様の変性がみられた。また家兎では電顕でも変化が報告された。

5) 末梢神経では光顕的变化が，ほぼ全例のサル，多数のイヌ，ネコ，ウサギ，ニワトリと一部のマウスで，電顕的变化がイヌ，ウサギ，ラットで確認された。これらの変化は一般に下肢の大径有髄線維の末端部に強い傾向があるが，イヌ，ネコでは上腕神経にも変性が認められた。

イヌ，ウサギでは有髄線維の髄鞘と軸索，無髄線維，シュワン細胞の種々の異常所見が明らかにされた。

6) 視神経系の変化は多数のイヌ，ネコで確認された。この変化は脊髄薄束と同様に視束遠位部に一般に強いが，少数のネコではむしろ視神経に強い例外もみられた。病変の性質も脊髄

薄束とほぼ同一で、軽症の動物では軸索の変性、喰食細胞の侵入にとゞまるが、重症のイヌ、ネコでは髄鞘も破壊され、中性脂肪粒と著明な星状膠細胞の増生もみられた。また少数のネコで細長い核をもつ間葉性細胞の増加をみたが、炎症性細胞は見られなかった。視束の変化との関連で網膜の神経細胞の変化も検討されたが、一部のイヌ、ネコでは多極神経細胞の変性、脱落が疑われ、グリヤの反応もみられた。

7) SMONでかなり特異的な変化といわれるオリブ核の変性は少数の雑犬、ネコでみられた。これらの動物では神経細胞の変性、軽度の脱落とそれに伴うグリヤ集簇、稀に星状膠細胞のヒマン性増加がみられたが、ヒトで報告された神経突起の肥大による糸状体形成ははまだ見付けていない。

8) その他の神経系の特異的な変化は、殆んど認められないが、イヌ、ネコで脳幹神経核や海馬回の神経細胞の軽度の変性および稀れに、小脳プルキニエ細胞の変性がみられた。さらにヒトで屢々指摘された自律神経の変化は、イヌ、ネコの腹腔内神経節、腸管壁内および隣内の神経細胞、その他の臓器内の自律神経線維、頸部迷走神経、胸髄側角神経細胞などにつき検討したが、いずれも変化は軽度で、その評価は今後の検討に待ちたい。

2. 一般臓器

内臓では肝、腎の変化がサル、イヌ、ネコ、マウス、ニワトリで報告された。肝では肝細胞の変性、壊死、Kupffer星細胞の腫大、腎では近位尿細管上皮細胞の変性、壊死がかなり共通して報告された。またイヌ、ネコでは褐色色素顆粒がこれらの胞体内に屢々認められた。脾では一部のイヌ、ネコ、ウサギでLangerhans島の細胞変性が報告された。腸管ではマウスの上皮細胞変性などの他に、壊死を伴う腸重積症が一部のイヌ、ネコで、巨大結腸症が1頭のイヌで認められた。

3. 合併処置の病変に及ぼす影響

一部のイヌ、ネコへの便秘処置、四塩化炭素、Viomycin、マイコプラズマの合併は、神経病変に有意差を及ぼさなかった。しかしCMC負荷イヌではキノホルム単独群より病変も高度との報告がある。

4. 臨床症状と病理変化の相関

一部の動物に臨床症状と病理の不一致がある。すなわち、ビーグル犬、ネコなどで未発症のものにもすでに頸髄薄束、視束などに高率に初期変化がみられ、また臨床的に視力障害の見落された一部の雑犬、ネコの視束に高度の変性がみられた。

実験動物では知覚障害が証明しにくい、剖検では末梢知覚神経、脊髄後索の変化は多くの動物で報告され、そのほか、前・側索上行路の変化も指摘されている。

また電顕的検索のなされたイヌ、ウサギ、ラットなどで発症以前に末梢神経、脊髄後根神経節、脊髄白質、視神経の変化が報ぜられている。

まとめ

1. 臨床

キノホルム中毒サル、イヌ、ネコ、ウサギ、ニワトリ、ウズラにみられた運動麻痺、失調は両側性に出現し、後肢に強いところはヒトのSMONと同一で、イヌにみられた後肢の腱反射亢進、尿失禁もSMONに似る。視力障害はイヌ、ネコで認められたが、SMONで重要な異常感覚、知覚鈍麻などを実験動物で客観的に証明する検査法の確立が望まれる。SMON特有の腹部症状も実験動物で認めることは困難である。

2. 病理

SMONの病理の特徴である末梢神経、脊髄後根神経節、脊髄長索路の変性は、多くの実験動物において再現され、視束の変化もイヌ、ネコで確認された。その組織像はヒトのSMONと差がみられない。

しかしSMONでは自律神経系、延髄オリブ核などの病変が指摘されたが、検索された動物が少いので、さらに検討を要する。

3. その他

キノホルム中毒動物の神経症状発症時の1日投与量および総投与量が、ヒトのSMONのそれに比し多いことは、種族差、基礎疾患の影響も考えられ、さらに検討を要する。

4. キノホルム部会報告

b. 標識キノホルムの代謝と分布

報告者 豊倉康夫

本協議会の昭和45年度第3回総会、46年度キノホルム部会第1回、第2回および第3回研究会において、合計30の標識キノホルムによる研究が発表された（関係班員11、関係施設14）。以下はその概要である（発表者名は省略）。

研究の目的、ねらい

スモンとキノホルムとの因果関係が明らかになるにしたがって、生体に投与されたキノホルムの吸収、代謝、臓器別分布、排泄の機構を知ることはキノホルムによるスモン発症のPathogenesisを追求するための必須の条件である。この目的のために、放射性標識キノホルムによる実験が1つのきわめて有力な手段であることはいうまでもない。とくに以下のような情報を得るために各種実験が企画された。

- ① 経口的に投与されるキノホルムは果して、どの程度吸収されるのか？ また、これは投与量や投与方法のちがいによって変動するか？
- ② 体内に吸収されたキノホルムの各臓器、組織レベルの取りこみ、滞留の分布はどうか？ また、果して神経系組織にとりこまれるか？ そして、それはヒトおよび実験動物にみられる神経系病変の部位および強さと一致するか否か？
- ③ 体外への排泄経路およびその速度は？
- ④ 吸収、滞留および排泄されるキノホルムの化学的形態はどうか？
- ⑤ 標識キノホルムの種類、動物の種類によって差があるか？

以上について得られる情報が、今までに知られているスモンの臨床的事実、ヒトおよび実験動物における病理組織学的所見との対比において、スモンのキノホルム病因論と本質的に矛盾するか、支持するかを検討された。

研究に用いたアイソトープおよび実験動物

用いられたRIは ^{131}I 、 ^{125}I 、 $2,3,4-^{14}\text{C}$ 、 $2,4-^{14}\text{C}$ の4種の標識キノホルム、および ^{14}C -glucoseである。

1部のin vitro実験を除き、すべてin vivoの投与実験であり、動物はマウス、ラット、家兔、ネコ、イヌ（雑種およびビーグル）が用いられた。

研究成果の重点

I. 消化管からの吸収

1. 吸収の事実の再確認

外国文献では1930年頃に、キノホルムの吸収を示唆する報告があり、服用後の血中ヨ一素の上昇や経口投与後の尿からの回収によって証明されていたが、その事実はとくにわが国では一般には充分認識されていなかった。

本協議会では、家兎に経口投与後に血清や胆汁内に非抱合型キノホルムを証明（化学的に）した報告や、動物への経口投与による神経系病変作製の成功の報告等によって、すでに吸収の事実が推定されていたが、標識キノホルムを経口投与後に、消化管以外の臓器組織や尿、血液の中に放射活性を証明することによって、明らかに再確認された。

このことは動物のみならず、1名の篤志者で¹³¹I キノホルム100 μ Cおよびエマホルム0.5gの同時経口投与の実験でも、血中、尿中の放射能証明によって確認されている。なお、本実験では、髄液中への有意の移行は確認されなかった。

2. 吸収率の推定と投与量による変化

尿中に排泄される総放射能が投与量に対して占める比率や、経口投与の2時間後に消化管以外の身体部分に存在する総放射能が全身に存在する放射能に対して占める比率から見て、キノホルムが消化管よりかなり速やかに吸収されることが明らかとなった。マウスやラットでは、ヒトの薬用量（10～20 mg/kg）の経口投与で、ほぼ20～30%の吸収率と推定される。投与量を増すと、吸収率は低下するが、吸収絶対量は、薬用量の範囲では、ほぼ直線的に増加することが分った。また反復長期投与による吸収率の変化はみられず、体外への排泄の促進傾向が認められた。

ただし、後述するような肝腸循環を特徴とするキノホルムのような薬剤については、正確な吸収率を求める実験手段が現在はなく、上記の方法で得られた数値はあくまで最低限のものを示しているに過ぎない。

3. 投与剤形の問題

オリーブ油溶解、CMC乳化、水懸濁のいずれでも吸収が認められ、これまでのRI実験の結果からは、剤形の相違によって吸収率が著しく異なるという所見は未だ得られていない。しかし、この問題は将来、検討の要が残されている。

II. 全身滞留および体外排泄

1. 全身滞留率の時間的变化と投与量の影響

全身滞留率が直接測定されたのは、本協議会での成績が最初である。

1回投与の場合、投与経路（経口、静注、皮下注、腹腔内注）の如何にかかわらず、3日目までの体外への排泄はかなり速やかで、マウスの場合3日後には全身滞留率は10%以下となり、

それ以後ゆるやかに漸減する。経口投与の場合には、他の投与方法にくらべて排泄がやや速い。

投与量を増すと、全身滞留率はやや低下するが、この際、吸収絶対量は増加するので、全身滞留量はむしろ増大する。

2. 体外への排泄経路の再確認

従来から知られていたように尿を糞を介して排泄されること、且つ大部分は最初の1日間に排泄されることが確かめられた。

3. 反復投与時の全身滞留

反復長期間投与によって全身滞留率は低下すること、全身滞留量は一定限度以上に増加しないことが分った。

Ⅲ. 体内における挙動

1. 体内分布

従来ほとんど見るべき報告がなかったが、本協議会では、全身凍結マクロオートグラフィー、マイクロオートグラフィーおよび液体シンチレーション測定法によるサンプル計測等の手段を用いて、臓器組織レベル、細胞レベルの分布につき詳しい情報が蓄積された。

体内に入ったキノホルムは肝臓と腎臓に先づ最も強く集中し、胆汁と尿の中に高濃度に排出される。非経口投与の場合でも、胆汁からの排泄が大であるため腸管内には高濃度の標識化物質が存在する。

この排泄系2臓器よりかなり低くなるが、体内諸臓器にも広く分布する。脂肪組織にもかなり高濃度に分布する。

末梢神経系には、マウス、ラット、ネコ、イヌのいずれにおいてもかなり高い摂取が認められたことは重要であり、各報告者の一致する成績であった。イヌ、ネコでは後根神経節、半月神経節に、イヌでは脊髄神経根や網膜にもかなり高い摂取が証明された。中枢神経系（脳脊髄実質）への摂取レベルは、これらにくらべると低い。たゞ、下垂体へのとりこみは比較的高い傾向を示している。

マイクロオートグラフィーでは、脊髄後根神経節、半月神経節の神経細胞と外套細胞、脊髄後根、末梢神経、間脳の第3脳室底グリア、網膜、脳幹の神経細胞、脊髄前角細胞等にとりこみが認められているが、動物差によって、また雑種犬とビーグル犬との間で多少の差がある。

一般臓器のマイクロオートグラフィーでは、腎の近位尿細管上皮細胞、肝細胞、脾のランゲルハンス島の腺細胞（とくにビーグル犬）等への分布が認められた。

キノホルムのラット脳細胞以下のレベルでのとりこみについての実験では、先づミクロゾーム分画に多く、またfree mitochondriaに多い。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という知見とあわせ考え興味深い。

2. 肝腸循環の実証とその重要性

糞便中に抱合型キノホルムを認めたことから、胆汁への排泄があることは従来からも推測されてはいたが、今回のRI実験で胆汁中にきわめて高濃度に排泄される事実が明らかとなったのは上述の如くである。のみならず、胆汁へ排泄されたキノホルム（主として抱合体）が1部腸管から再吸収される事実が、標識キノホルムを投与したラットの放射性胆汁を経口的投与した場合に消化管以外に見出される放射能の存在から、はじめて実証され、キノホルムの肝腸循環の事実が確認された。放射性胆汁の腸管からの再吸収は個体によってかなりの変動があるが、投与2時間後の平均吸収率は $13.7 \pm 3.9\%$ で、遊離型キノホルムの経口投与の場合のそれと大差がない。

肝腸循環の事実は、生体内のキノホルム代謝を考える場合、極めて重要である。

3. 臓器別滞留

各臓器内の濃度は最初の24時間以内に著明に減少し、次いでゆるやかな漸減を示す。脂肪組織では、初期の高濃度から比較的急に減少する。

坐骨神経などの末梢神経では、ピークへの到達がやゝおくれるが、初期の高濃度が他臓器にくらべて比較的長く保たれることが証明され、これは重要な所見と考えられる。

IV. 体内における化学的性質の変化

1. 尿中の化学的形態

キノホルム投与後、尿中に排泄される関連物質の大部分がグルクロン酸または硫酸との抱合体であることは、従来からも証明されていたが、今回ラットの尿中には上記の2抱合型の他に未同定のものや、蛋白との結合型もあるらしいということが示された。

2. 胆汁中の化学形態

既に胆汁中の非抱合型の存在は証明されていたが、今回のRI実験でも、胆汁中のキノホルムの大部分が抱合型であり、これに少量の非抱合型が混在することが分った。

3. 各臓器組織の有機溶媒溶性分画

クロロホルムあるいはクロロホルム-メタノールで抽出されたものが、これと有機溶媒不溶性分画の和に対して占める比率は、脂肪組織、坐骨神経等で高く、血清では低い。

4. 血清中の化学的形態

血清中では、キノホルムのほとんどすべてが血清アルブミンと電気泳動易動度を同じくすることが放射能測定によって確かめられた。

5. 体内におけるヨウ素の遊離

^{131}I 標識および ^{14}C 標識キノホルムの全身分布像が、投与後1時間ではほぼ同じであるのに対し24時間後には1部差異を生じていること、およびその差異と無機 $\text{Na } ^{131}\text{I}$ の分布像との異同とから、マウス体内でのヨウ素遊離は1時間以後24時間以内に多少起こっているものと推定された。

V. 動物差の問題

各種の動物実験が用いられたが、これまでの所、見出された差異の多くは量的なばらつきである。例えば、脳脊髄実質への摂取、後根への摂取はイヌ、ネコで、マウス、ラットよりやや強く、イヌでもビーグルは雑種よりもやや弱い。マイクロオートグラフィーでは動物差によるばらつきがやや目立つが、例数が充分でない現在、結論は差控えたい。

VI. 条件負荷動物への投与実験

四塩化炭素負荷ラットでは各臓器、とくに中枢神経、坐骨神経のクロロホルム可溶性分画の占める比率が増加し、細胞レベルでの摂取では、腎の近位尿細管上皮細胞、肝細胞、Kupffer細胞、隣神経系組織等において、非負荷動物にくらべて明らかに増加している。

またアレルギー性腎炎負荷ラットについての投与実験では、血液キノホルムの減少率が対照にくらべて明らかに少なく、坐骨神経、腎における滞留が多い。

VII. In Vitroの実験

組織切片へのキノホルムのとりこみは、とくに坐骨神経、脂肪組織、筋肉などに多く、また興味あることは Fe^{3+} イオンの存在下では全般にとりこみが増加する。

キノホルム投与動物の神経組織の ^{14}C -glucoseの摂取は、対照動物にくらべ低下している。その他、血清や組織からのキノホルムの抽出率、あるいはカラムからの回収率を見るために標識キノホルムが利用された。

要約と今後の問題点

以上が、スモン調査研究協議会およびそのキノホルム部会において得られた研究成果の概要であるが、従来ほとんど明らかでなかったキノホルムの生体内分布と代謝に関して、わずか1年の間にこれほど多くの重要な知見が集積されたことは、従来類例をみない進歩である。とくに重要な結論は以下の如くである。

- ① キノホルムは腸管よりかなりよく吸収される。
- ② 体外排泄は尿、糞を介してかなり速やかであるが、3日以後はゆるやかに漸減する。
- ③ 体内に入ったキノホルムは肝、腎に最も強く集中し、胆汁、尿から高濃度に排泄される。
- ④ 胆汁中に排泄されたキノホルムは、再び腸管より吸収され、肝腸循環が成立する。
- ⑤ 投与量を増すと全身滞留率は低下するが、吸収絶対量は増加する。
- ⑥ 神経系の組織レベルの分布では、坐骨神経等の末梢神経、後根神経節、脊髄神経根、網膜等、ヒトおよび実験動物のスモンにみられる主要病変部位に一致した部分に強い分布がみられるが、中枢神経系へのとりこみは全般に少なく、脊髄後索における特異的なとりこみは認められていない。
- ⑦ 坐骨神経等の末梢神経では、初期の高濃度が他臓器にくらべて比較的長く持続する。

- ⑧ 予め病的状態に作られた動物では，対照にくらべて異なった代謝および分布を示す。
- ⑨ 以上の結果はキノホルム病因論と本質的に矛盾しない。

今後に残された問題も多いが，とくに吸収，排泄，代謝過程におけるキノホルムの化学形態，剤形，動物差，組織にとりこまれたキノホルムの組織障害機序，各種病的状態負荷時の検討等であろう。

4. キノホルム部会報告

c. 体内キノホルムの分析と生化学

報告者 田村善蔵

緒言

昭和45年6月スモン患者の緑尿および緑便から緑色物質が単離され、これがキノホルムの鉄キレートであることが判明し、同時にスモン患者の尿中に投与されたキノホルムの約10%が結晶状態で見出だされた。この発見は同年6月30日に開かれた会議で報告され、疫学調査のきっかけを作ったが、同時にスモン患者に於けるキノホルムの代謝に関しても重大な示唆を与えていた。

すなわち、キノホルムは水にはほとんど溶けないために、従来から消化管吸収が少なく、したがって副作用の少ない薬品であると思われてきた。近年の研究により、この考えは誤りであり、服用したキノホルムの20~50%が消化管から吸収されることがわかったが、それでもなお吸収されたキノホルムの大部分は肝臓で抱合をうけ、グルクロナイドまたは硫酸エステルとなり、無毒化されて胆汁中および尿中に排泄されるとされている。

しかし上記の発見は、スモン患者では細胞毒であるキノホルムのかかなりの量が解毒されないまま体内を廻っていた可能性を示すものであり、その後ガスクロマトグラフィーにより緑色舌苔からもキノホルムが検出されるに及んでその疑いはますます濃くなった。

そこでスモンとキノホルムの関係を明らかにするために、生体試料中のキノホルムの分析と病態生化学的な検討を行なうことになった。

研究成果

上述のごとく、キノホルムとその代謝物のうち中毒に関係するものはキノホルム自身であろうとの見地から、まずキノホルムの微量定量法が検討された。その結果血清および肝臓、腎臓などに含まれるキノホルムをピリジンとベンゼンで抽出し、フロリジルまたはアルミナに吸着させて分離し、アセチル化してガスクロマトグラフィーを行ない、電子捕捉検出器で測定する方法が作られた。

この方法により、キノホルムと平衡関係にある金属キレートはキノホルムとして定量される。

キノホルムのグルクロナイドはこの定量法を妨害しないが、不安定な硫酸エステルがどう影響するかは不明であり、臓器のホルマリン固定が抽出率に及ぼす影響も今後の検討に残されている。

このような方法によって、キノホルムの服用をやめて1カ月たったスモン患者の血清から約10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のキノホルムが検出されたが、同時にキノホルムを服用せずにスモンになったといわれる血清ヨウ素値の異常に高い1人の患者の血清からも、ほぼ同量のキノホルムが検出された。

また、キノホルムの服用を中止してから9カ月たって死亡したスモン患者の新鮮な肝臓、腸管のまわりの脂肪組織、坐骨神経から、それぞれ1gにつき0.5 μg 以上、0.3 μg 以上、0.1 μg 以上のキノホルムが検出され、神経にも長期間貯留することが示された。

しかし病理部会のスモン剖検例のうち21例について、ホルマリン固定された肝、腎に含まれるキノホルムを定量したところ、表1のような結果となり、貯留量に個体差が大きいことがわかった。なお、腎臓のキノホルム含量が極めて高かったNo 103の患者は末期に腎盂腎炎を起していた。

なお、ガスクロマトグラフィーに代わりうる定量法として、Al³⁺、Ga³⁺などによる蛍光定量法が検討されており、将来の発展が期待される。

一方、キノホルムの特性を利用した組織化学的検出法が検討され、Fe³⁺による緑色発色、Ga³⁺による黄色蛍光、Cu²⁺とルベアン酸を用いる間接染色法が開発された。これらは併用することによって信頼性が高まり、放射能キノホルムによるマイクロオートラジオグラフィーと同様の結果が得られるので、患者組織への適用も可能となった。

以上のスモン患者試料についての検討から、服用されたキノホルムが長期間体内に留まることがわかったので、その薬害作用を明らかにするために動物実験による種々の生化学的な研究が行なわれた。

まず、水に溶けないキノホルムがどうして吸収されるかについて、キノホルムが胆汁酸の弱アルカリ性水溶液(10%, pH 9)にかなりよく溶ける(1mg/ml)ことが示された。つぎに、各組織への到達と貯留に関しては、脂溶性であるキノホルムが血清(アルブミン)にはよく溶けることがわかった。

また、細胞への毒性については、静注されたキノホルムが脳神経細胞のミトコンドリアに比較的濃厚にとり込まれることがわかり、さらにin vitroの実験で、キノホルムがミトコンドリアの酸化的リン酸化に対して脱共役作用を現わし、この際2価金属イオンを必要とすること、キノホルムのグルクロナイドはこのような毒作用を全く示さないことがわかった。

また、鶏胚の後根神経節を、血清と種々の濃度のキノホルムを含む培地で培養し、8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度にするると神経に変性が認められ、生長が抑えられることがわかった。

つぎに、キノホルムの代謝に関して、キノホルムのグルクロナイドをラットに25mg/kg程静注し、尿と胆汁を採取して分析したところ、グルクロナイドは徐々に組織内の 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。

考 察

以上の結果を総合すると、キノホルムによるスモンの発症を、ある程度説明することができる。すなわち、何らかの原因で抱合能を上回る量のキノホルムが吸収され、血清の遊離キノホルム濃度が長時間あるレベル（10 µg/ml?）に保たれると、これに伴って神経組織内のキノホルム濃度が高まり、細胞の新陳代謝を障害して神経の変性をもたらすと考えられるのである。

しかしスモン発生の歴史的変遷や、種差や個体差が大きいという現実を含めて、上記の仮説を確かめるためには、更に多くの検討を行なわなければならない。インケトピン酸を投与して尿中への抱合排泄速度を調べたところ、スモン患者10例中5例が異常な低値を示したが、このような吸収、抱合、排泄に関与する因子として、剤形、投与方法、消化管の状態、腸肝循環、腸内細菌や生体組織中のβ-グルクロニダーゼ活性、肝の抱合能、肝と腎の排泄機能などの検討が残されており、キノホルム硫酸エステル合成が待たれる。

また、中毒発現の機構に関しては、血中濃度と発症との関係、金属イオンの関与、細胞膜・細胞内酵素系への影響、細胞内でのキノホルムの存在状態、minor metabolitesの検索と薬理作用、外的因子など、今後に残された問題は多い。

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 µg/g）

患者 No.	年 令	合 併 症	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 (µg/g)		
									肝 臓	腎 臓	
103	33	なし	419	1.35	総投与量	1	スモン	33	4.1	42.3	
19	59	脳軟化	204	0.9	"	12	未定	30	0.8	3.6	
13	63	腸切除	177	0.9~1.8	26	4	スモン	41	3.0	7.5	
100	61	なし	140	0.9~1.0	38	1	"	71	0.4	0.8	
114	41	結核→肺、腎	124	1.5	総投与量	1	"	31	2.5	1.2	
102	77	なし	120	1.8	"	4	"	55	0.4	0.4	
150		なし	116	1.2	"	4	未定	28	4.1	5.0	
111	59	脳軟化	103	1.8	"	1	スモン	39	2.2	2.9	
110	40	なし	103	1.8	"	1	"	44	0.1	検出せず	
151	53	なし	79	1.2	"	2	"	27	9.5	9.5	
109	67	糖尿病	78	0.9~1.35	"	2	"	79	1.8	0.8	
108	60	腎病変	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	なし	42	1.2	"	120	"	45	2.1	1.9	
76	72	高血圧	12	0.9	"	2年 9カ月	"	38	検出せず	検出せず	
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	脳異常	死亡前15カ月は服用していない					非スモン	46	0.4	0.5
49	43	腎化膿	入院した病院では投与していない					"	74	検出せず	検出せず
20	39	脳膜炎	同上					"	49	"	"

4. キノホルム部会報告

d. まとめ

報告者 江 頭 靖 之

スモンの原因としてキノホルムに疑が持たれてから約半年後の昭和46年度はじめには、すでに疫学班、臨床班がスモン患者についてキノホルムの服用調査をはじめており、その後疫学部会、治療予後部会として継続された。そのようなとき新しくキノホルム部会が編成されたので、この部会の担当領域は、主として実験的手段によるキノホルムとスモンとの諸問題の研究になった。協議会の第3年度の終りである今月までという一応の期限つきで、ある程度まとまりのある結果を出すために、キノホルムとスモンとの因果関係の解明に直接関与しようと思われる課題として重点順に次の4目標をかかげた。1. 実験動物におけるスモンの再現、2. 慢性キノホルム中毒と神経病変発生の関係の明確化、3. 体内キノホルムの生化学的ならびに組織化学的証明法の確立、4. キノホルムの代謝と作用機序、である。2月末の第3回研究会までに発表された部会員の報告は70題に及び、その内容は大月、豊倉、田村の3部会員によって述べられている通りである。

動物に長期にわたってキノホルムを経口投与することによって、人間のスモンに近い症状と病変とを起すことは、実験室内手段でキノホルムとスモンとの因果関係の解明に貢献するかなめとなる課題であった。少なくともイヌ、ネコの2種類の動物にキノホルムを長期に経口投与することによって生じた病理組織学的変化は、病巣の分布、病変の性質、変性の進行過程、にいたるまでヒトのスモンの組織変化とよく似ており、臨床的にも知覚異常の有無はわからないが、後肢に運動障害が観察され、ある動物は視覚喪失を思わせる挙動を示した。すなわち、キノホルムによって動物にスモン病変または近似的なスモン病変をつくり得たものである。また最近ビーグル犬でも投与量をふやすことによって同様のことが起りはじめている。また、サル、ウサギ、ニワトリ、ウズラ等を用いた実験でも上述の病変の一部または軽い変化とした意味づけでよい観察結果が得られている。以上の実験成績から考えると、ヒトにキノホルムを投与した場合にもスモン様病変が起る可能性が強いとすることは医学常識上それほどの飛躍ではないのであるまいか。

このほか、雑犬とビーグル犬における発症量の差は人種間のスモン発生頻度の問題に暗示を与え、肝臓負荷によるキノホルムの取込みの促進、剤形が吸収や血中濃度、さらにイヌの発症率に与える影響等はスモンの発症条件を示唆する実験といえる。第2の研究課題である慢性キノホルム中毒実験における神経病変発生の問題は取り組む前に解決されなければならない多くの

条件があって、その方面の基礎的に重要な研究がおこなわれた。すなわち、 ^{14}C 標識と ^{131}I 標識の比較、投与量、投与期間、投与回数等が吸収率に及ぼす影響等のデータである。またキノホルムの生体内分布が幾つかの機関で各種の動物について熱心に調べられた。いろいろの経路で投与された後、短時間から2週間までの材料について多くの測定や比較がなされ、神経系では末梢神経に比較的長く貯留する傾向が述べられた。

第3の体液や組織中のキノホルムの定量組織化学的証明法の開発も順調に進められ、あるものは完成し、他も大いに期待が持たれる段階にある。最後のキノホルムの代謝と作用機序に関する発表は神経系へのキノホルムの直接の取込み、脳ミトコンドリアの吸収に及ぼす影響、糖代謝に関するもの等、示唆に富むものであったが、この方面は殆んど未解決の問題ばかりで今後次第に重点的研究課題となるべき領域である。

残された問題

キノホルムの障害作用の研究はたかだか半年余であり、スモンとの関係についても不明な点が多いのは当然であり、今後はこれらの解明に力を注がねばならない。

1. キノホルム経口投与後の血中濃度と発症との関係。

この観察により、キノホルムの作用の人種差、個体差、年令差、性差、動物差等について理解する手掛りを得る意味で重要である。

2. キノホルム非服用または少量服用のスモン患者についての精査と追跡。

血中や臓器中のキノホルムの微量定量法、死亡例についてはキノホルムの組織化学的証明法の完成が症例検討の際に貢献する。技術の開発改善と表裏一体で進むべきである。

3. 慢性キノホルム中毒症を起す動物（現在ではイヌまたはネコ）を用いて、長期投与されたキノホルムの神経組織内の存在と病変形成との関係を明らかにすること。もしこの方向で陰性成績が出たらかなり根本的に作用機序を考えなおす必要がある。

4. キノホルムの作用機序とくに腸管からの吸収および神経病変の発生病理

こゝ1年余りの研究の中でこれに関したものが約10題あるが、いずれも研究の糸口をつかんだ段階で、すべては今後の研究にかかっている。

5. スモン患者が日本に著しく多いことはキノホルムの使用量と人種による毒性の差で説明することができるかも知れない。しかし、別にかなり重要な因子が作用している可能性を否定することもできない。今後の重要課題の一つである。