

血清中の非抱合型キノホルムの定量

田 村 善 蔵 (東大 薬学部)

I 緒 言

キノホルムと SMON 発症との関連が注目され、疫学的調査が進められている現在、キノホルムの生体内に於ける動態を研究することは重要である。経口投与された適量のキノホルムは肝で抱合され水溶性となつて速やかに尿中に排泄されるといわれている。しかし著者らはすでにキノホルムを投与された患者の尿から遊離のキノホルムまたは鉄キレート を証明しており、これらのことは大量投与あるいは何らかの原因によって抱合能を上まわるキノホルムが吸収されると、遊離のキノホルムが血中をまわる可能性を示しており、これは脂溶性であり、しかも Fe, Co, Cu, Zn 等多くの金属イオンとキレートを生成する能力を持つためにその生体における影響は重大であろう。即ちキノホルムの急性毒性および SMON との関連は生体内におけるこれらの非抱合型のキノホルムの存在を考慮することなしには論じられないだろう。そこで著者らはウサギにキノホルムを経口投与し、血清中の非抱合型活性キノホルムを測定することを試みた。

II 方 法

ウサギの耳静脈より約 2 ml をヘパリンで潤した注射器を用いて採血し、分離した血清 1 ml に氷冷下 10% TCA 1 ml, ベンゼン 4 ml および内部標準物質として γ -BHC 10 μ g を含む酢酸エチル 0.1 ml を加えよく振とうする。これを遠心分離してベンゼン層をとり、水洗した後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、減圧乾固する。次に酢酸エチル 0.1 ml および無水トリフルオロ酢酸 0.1 ml を加え TFA 化し、ガスクロマトグラフに注入する。ピーク高比から定量を行なう。添加回収実験の回収率はほぼ 100% であった。

III 結 果

図 1 の如くキノホルム投与ウサギの血中非抱合型のキノホルムが存在することが認められた。なお同様の方法によって、それらの尿および胆汁からも非抱合型のキノホルムが検出された。

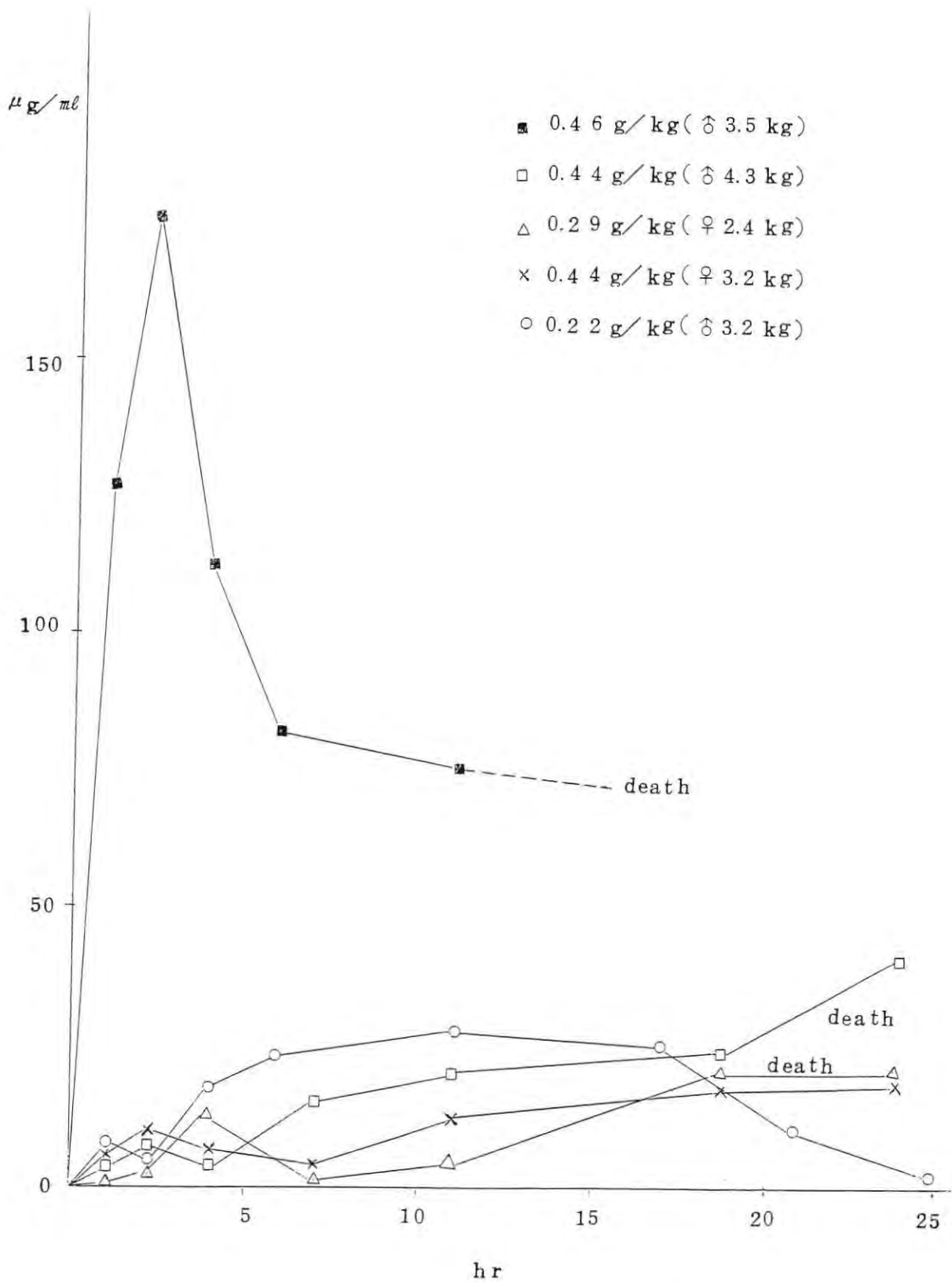
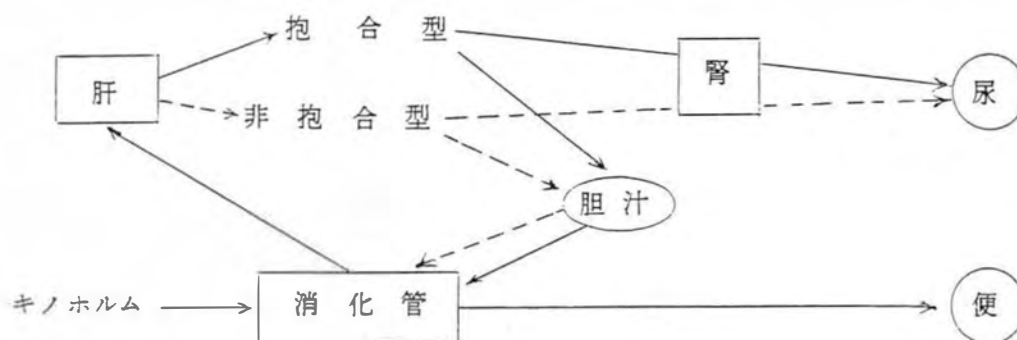


図1 キノホルム経口投与後の家兎血清中の非抱合型キノホルム

IV 考 察

これまでの知見を総合するとキノホルムの主な代謝排泄経路はつぎのようになる。



図の実線は従来から知られていた系路であり，点線はキノホルムを投与された患者の尿および抱合能を上まわる量のキノホルムを投与されたウサギの血清，尿，胆汁を用いて著者らが実証したものである。しかしこの測定法で抱合体の一部が遊離型として測り込まれる可能性が残るので，今後キノホルムのグルクロナイドおよび硫酸エステルを合成し，これらを含めて信頼性の高い分析法を確立して行く必要がある。

V 要 旨

抱合能を上まわる量のキノホルムが消化管から吸収されると非抱合型のキノホルムが体内を廻り，胆汁や尿に排泄されることがわかった。

生体試料からの非抱合型キノホルムの微量分析

田 村 善 蔵 (東大 薬学部)

I 方法の検討

1. ガスクロマトグラフィー (GC) による分析

微量のキノホルムを分析するために検出器には特異性および感度に優れた ECD を使用した。次にキノホルムとその関連化合物についてアセチル (Ac) 体, メチル体 (Me) 体を調製し, GC の条件を設定した。(表 1) 実際の分析にあたっては, 主として Ac 体を用いた。また, キノホルムを定量する場合は 5, 7 - di - Cl - 8 - hydroxyquinoline を内部標準物質として 0.1 ~ 3 μ g の範囲で良好な検量線が得られた。

表1 RELATIVE RETENTION TIMES

condition		2%XF-1105	10%SE-52	2%OV-17	2%QF-1
		190°	190°	190°	150°
8-hydroxyquinoline		50ml/min	85ml/min	65ml/min	50ml/min
		1.5mx0.4mm	1.5mx0.4mm	2.0mx0.4mm	1.5mx0.4mm
5-chloro-	Ac	0.66	0.64	0.66	0.71
	Me	7.50	0.50	0.48	0.41
5,7-dichloro-	Ac	1.00*1	1.00*2	1.00*3	1.00*4
	Me	0.63	0.68	0.56	0.42
5,7-dibromo-	Ac	2.01	2.03	2.35	2.02
	Me	1.27	1.36	1.31	0.80
5-chloro-7-iodo-	Ac	2.08	2.13	2.55	2.09
	Me	1.31	1.44	1.38	0.81

The retention times for *1, *2, *3 and *4 are 4.7, 3.3, 9.8 and 11.5 min respectively.

2. アルミナによる吸着および溶出

生体試料中のキノホルムを分析するためには, 前処理法の検討が重要であり, 著者らはアルミナによ

る特異的な吸着および溶出を検討した。

a 吸着

キノホルムの溶液にアルミナを加え振盪するとキノホルムを完全に吸着し、有機溶媒中でこのアルミナに紫外線をあてると黄色の蛍光を発する (Feigl: Spot Tests)。特にアセトン、酢酸エチル中での蛍光は目による鑑別に感度がよい。20~30 mg のアルミナを用いれば絶対量 0.3 μ g の検出も可能であり、スクリーニングテストとして役立つ。

b 溶出

一旦アルミナに吸着したキノホルムは種々の有機溶媒で溶出されない。アルミナの溶解を最少限におさえ、キノホルムを能率よく溶出する条件を検討した結果、NaF 溶液を加え、よく振盪した後、ベンゼン抽出を行なう方法を見出した。

3. 生体試料からの抽出

キノホルムは生体試料中の高分子物質に強く吸着される傾向がある。そこで抽出方法を種々検討した結果、溶離剤としてピリジン、抽出剤としてベンゼンを用いる方法が最良であった。

以上、検討の結果より図 1、図 2 に示す分析操作法を設定した。

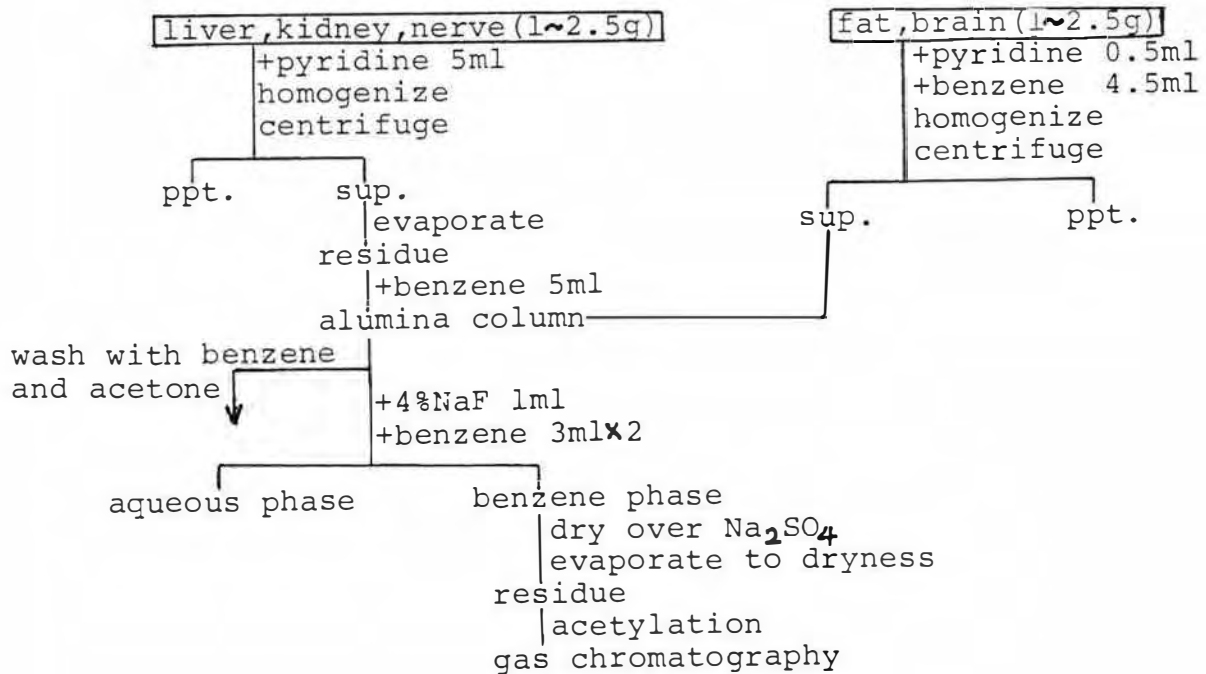


図 1

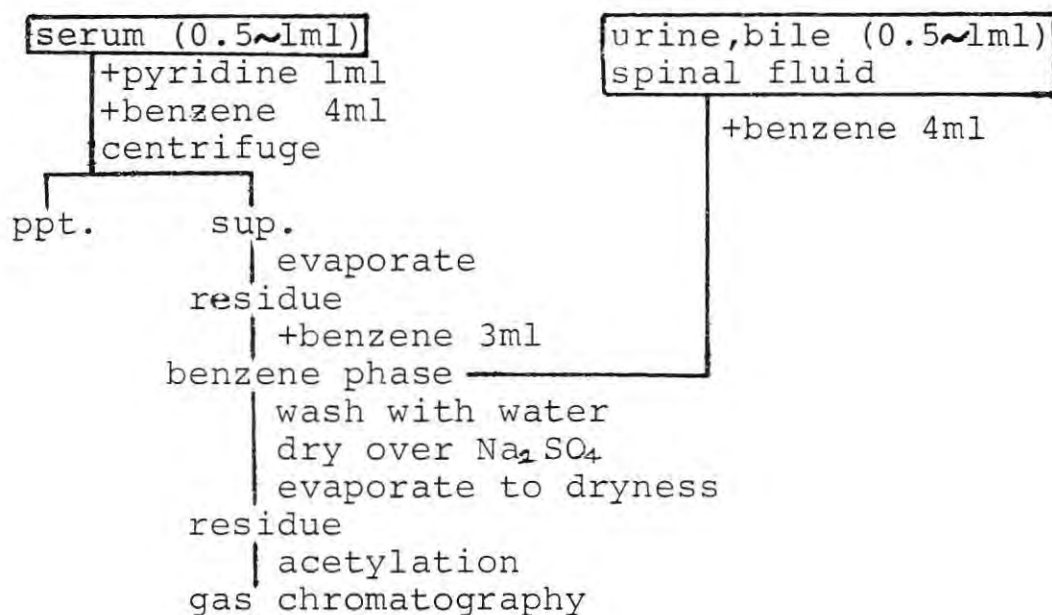


図 2

Ⅲ 考 察

臓器および組織の分析に関しては本法はまだ半定量法の段階で、肝および脂肪をホモジナイズした試料にキノホルムを添加し、回収率を調べると30~40%であった。今後試料からの抽出率、アルミナへの吸着、溶出の条件等を検討して定量法にまで発展させる計画である。

Ⅳ 要 旨

生体試料からピリジンとベンゼンを用いて非抱合型キノホルムを抽出し、アルミナに吸着させて洗った後、NaF水溶液で溶出し、アセチル体としてガスクロマトグラフィーを行なう方法を開発した。

SMON患者の臓器および組織へのキノホルムの貯留について

田村善蔵（東大・薬学部），豊倉康夫（東大・医学部）

I 緒 言

投与されたキノホルムがどのように体内に貯留するかを見るためにウサギにキノホルムを経口投与し，前報で開発した微量分析法を用いて各臓器への沈着および貯留を調べた。また長期間キノホルムを服用し，中止後しばらくして死亡したSMON患者の各臓器および尿中からキノホルムの検出を試みた。

II 方法と結果

まず，ウサギに各々200 mg/kgのキノホルムを1回経口投与後，3日および2.5ヶ月後における各臓器および体液中の非抱合型キノホルムを分析した（表1）。

Period after CF Administration	liver μg/g	fat μg/g	brain μg/g	nerve μg/g	serum μg/ml	bile μg/ml
3 days	>5	>5	>1	N.D.	1.4	>5
2.5 months	N.D.	>0.1	N.D.	N.D.	0.03	N.D.

N.D. : not detected

表1 キノホルム経口投与（200 mg/kg）後のウサギの各種臓器及び体液中への貯留

肝，脳，胆汁には3日後ではキノホルムが検出されたが，2.5ヶ月後では検出されなかった。これに対して脂肪，血清では2.5ヶ月後でも検出された。神経は坐骨神経を用いたがいずれからも検出できなかった。今後キノホルムの投与量を変えたり，連続投与した場合の貯留を検討する必要がある。

次にSMONで死亡した3例の患者の臓器を分析した（表2）。肝では3例中，全例に微量のキノホ

ホルムを検出した。これらの患者には通常の臨床検査では肝障害は認められないが、このような患者の肝にも微量のキノホルムが貯留することが判明したので、これが肝機能に何らかの影響を及ぼしている可能性がある。またこの3例の腎からはキノホルムを検出できなかったが、井形らは腎障害を伴ったSMON患者に多量のキノホルムの貯留を認めている。脂肪は腸管のまわりのものを用いたが3例全部から検出された。ウサギの実験でも見られたこの事実はキノホルムが脂肪に富んだ臓器や組織に長期間貯留することを推定させる。神経では患者1の坐骨神経のみから確実に証明されたが他の2例では検出できなかった。

($\mu\text{g}/\text{g}$)

Patient	Period after CF Treatment	liver	kidney	fat	nerve
1	9 months	>0.5	N.D.	>0.3	>0.1
2	3 months	>0.05	N.D.	>0.05	N.D.
3	1 month	>0.05	N.D.	>0.05	N.D.

N.D. : not detected

表2 SMON患者の各種臓器へのキノホルムの貯留

患者1はしばしば再燃をみた例であるが、死直前再燃時の尿中から抱合型を含めてTotalで約 $0.03\mu\text{g}/\text{ml}$ のキノホルムを検出した。その他、2例のSMON患者の尿についても調べたが検出できなかった。

以上、非抱合型キノホルムがSMON患者の体内に長期間貯留していたことを明らかにしたがこの事実がスモン発症との関連を考える上で一つのカギとなる可能性がある。

III 要 旨

キノホルム投与を中止9ヶ月後に死亡したSMON患者の肝、腸管の脂肪および坐骨神経からそれぞれ $0.5\mu\text{g}/\text{g}$ 、 $0.3\mu\text{g}/\text{g}$ 、 $0.1\mu\text{g}/\text{g}$ 以上のキノホルムが検出された。なおこの患者の再燃時の尿に微量の抱合型キノホルムが含まれていた。

SMON患者のイソケトピン酸負荷試験

田村善蔵（東大・薬学部），豊倉康夫（東大・医学部）

I 緒 言

イソケトピン酸（Isoketopinic acid，以下 Iso と略）は Vitacampher の代謝物で人に経口投与した場合，大部分は肝でグルクロン酸抱合を受け（Iso-G）一部はそのまゝ尿中に排泄される。したがって Iso を投与後尿中に排泄される Iso-G および Iso を測定すれば肝のグルクロン酸抱合能が測定でき，これが一種の肝機能検査法として利用される可能性があり，東大・薬・分析化学教室と東大・医・第一内科とが協力してこの方法の有用性を検討中である。

今回は SMON 患者のグルクロン酸抱合能を調べる目的で 10 例に対して本負荷試験を実施した。

II 方 法

1. 実施要領

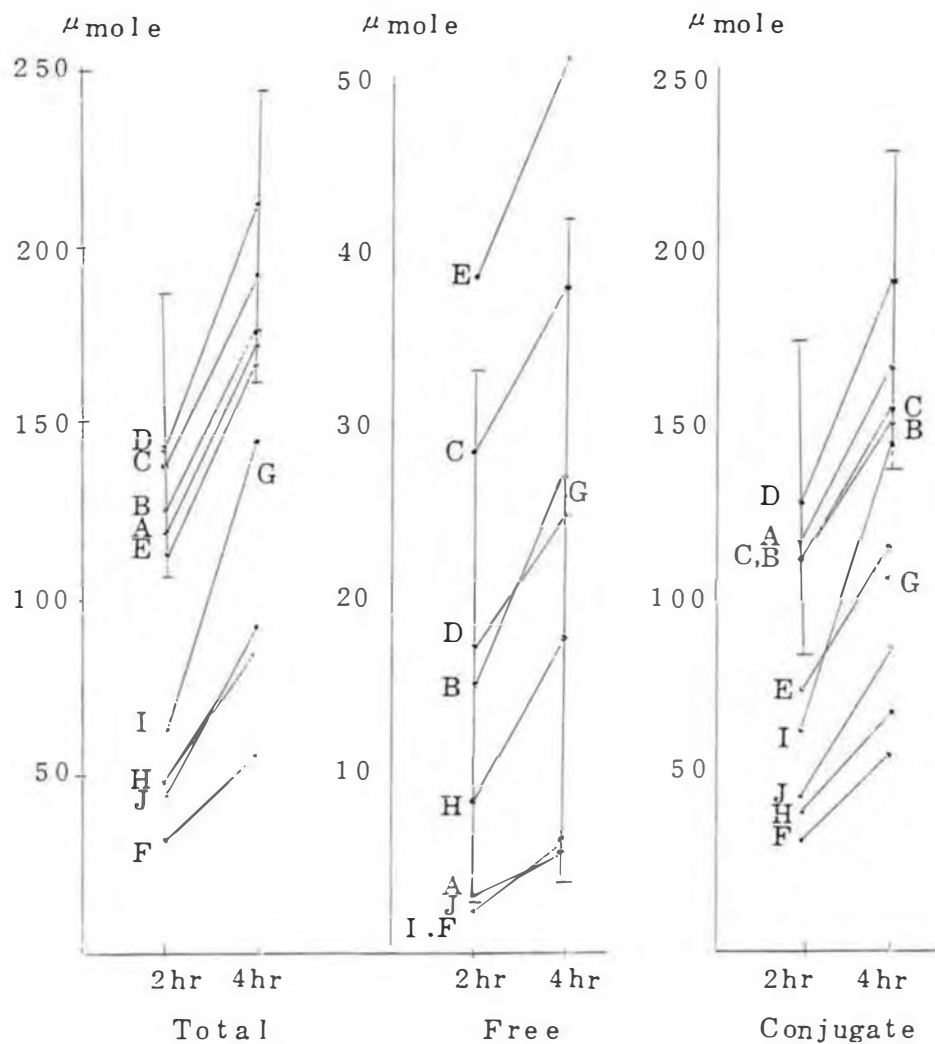
早朝空腹（午前 7 時頃）に Iso と重そうを混合した試薬（Iso 300 μ mole, NaHCO₃ 50 mg）を水 50 ml に溶解して患者に飲ませる。患者の摂取水分量が制限されていなければ，さらに適当量の水を飲ませる。投与後 2 および 4 時間目の尿を正確に尿コップにとる。

2. 分析法

a) Free Iso : 尿 1 ml を共栓つき 10 ml の遠沈管にとり，10% HCl 3 滴を加え酸性とする。これに内部標準物質である cinnamic acid クロロホルム溶液（148.2 mg/100 ml）0.2 ml を加え，さらにエーテル 4 ml を加えて 2 回抽出する。エーテル層を芒硝で乾燥後，ジアゾメタン・エーテル溶液を加えメチル化し，乾固後アセトン溶液としてガスクロマトグラフィー（条件：5% Neopentylglycol succinate (1.5 m \times 4 mm)，160 $^{\circ}$ ，N₂ 60 ml/min，HFID）を行なう。Iso と Cinnamic acid のピーク高比を求め，あらかじめ作製した検量線によって Iso の量を算出する。

b) Total Iso : 尿 1 ml をとり 1 N NaOH 3 滴を加え 70 $^{\circ}$ ，10 分間加温する。冷後これに 10% HCl 6 滴を加え酸性とした後 a) と同様に操作する。

c) Conjugated Iso : Total Iso と Free Iso との差を Conjugated Iso とする。



健常者の平均値 $\pm 2\sigma$

図

III 結果と考察

表に示すように SMON 患者 10 例の殆どが他の肝機能検査で正常と見なされるにも拘らず本負荷試験では健常者との間に有意の差が認められた。この実験結果からだけでは、これらの SMON 患者が先天的にグルクロン酸抱合能が低かったものか、キノホルムの服用によって抱合能の低下を来たしたものであるかの結論を出すことは出来ない。また消化管の吸収異常も考慮に入れる必要もあるので、今後これらの問題点を解明してゆく計画である。

患者	性	年齢	GOT	GPT	AL-P	膠質反応	⊕中止後 期 間	その他
A	♂	45	22	22	5.7	—	6ヶ月	中等症
B	♂	28	18	16	5.7	—	6ヶ月	〃
C	♀	39	29	27	3.2	—	約 3ヶ年	やゝ重症
D	♀	37	22	22	2.4	ZS 6	5ヶ月	〃
E	♀	34	30	28	4.4	ZS 12 T 6	9ヶ月	重症
F	♂	33	9	16	3.2	ZS 7 T 3	4ヶ月	人工肛門
G	♀	65	15	8	7.0	ZS 4.1 T 1.1	約 2ヶ年	失明
H	♀	65	30	9	6.0	ZS 4.2 T 1.0	6ヶ月	重症失明
I	♀	58	30	19	18.8	ZS 16	8ヶ月	軽症
J	♀	65	31	22	5.0	ZS 3	約 1 2ヶ月	軽症

AL-P < 10, ZS < 12, T (Thymol) < 4 が正常

表

IV 要 旨

早朝空腹時イソケトピン酸 300 μ mole を経口投与し, 2時間および4時間までに尿中に排泄されるイソケトピン酸グルクロナイドの量を測定するとSMON患者10例中5例は健常者の平均値 $\pm 2\sigma$ より低値を示した。

マウスの抗ヒツジ赤血球抗体産生 に及ぼすキノホルムの影響

松橋 直，渡辺 貞，芳賀邦夫，臼井美津子，成内秀雄（東大医科研）

キノホルム製剤をウサギ，イヌ等に投与することにより，SMON類似の症状をひき起こすことが井形ら，俵らによって報告されているが，マウスを用いて，我々も検討し，同時にヒツジ赤血球に対する抗体の産生におよぼす影響について検索を行った。その結果は，我々が用いたキノホルム剤投与量では，SMON様症状をうることはできなかつたが，抗ヒツジ赤血球溶血素の産生を抑制する例がかなりの高頻度に出現するので，以下に報告する。

I 実験材料と方法

1. キノホルム製剤：腹腔内あるいは静脈注射には，エンテロビオホルム（チバ薬品）を使用し，経口投与にはキノホルム（岩城薬品）を使用した。
2. マウス：表1に示すようにDDD系またはDDN系を使用し，大部分は雌を使用した。
3. 投与方法
 - a 腹腔内あるいは静脈注射：0.3mlの食塩水にエンテロビオホルム0.9mg、あるいは，0.3mlの食塩水にエンテロビオホルム0.9mgとアリナミン0.2mgを含むように調製し，オートクレイブで15分間滅菌し，体温に近い温度に保ち，よく混和して注射を行なった。
 - b 経口投与：カルボキシメチルセルロースの0.5%溶液0.2mlにキノホルム剤を3mg，2mg，および1mgを含むよう調製し，投与した。
4. ヒツジ赤血球の注射：ヒツジ赤血球を無菌的に滅菌生理食塩水で洗浄し，20%の浮遊液を作り，0.1mlをマウスの腹腔内に注射した。
5. 採血：採血は，20%ヒツジ赤血球浮遊液0.1mlを腹腔内に注射後，4日目，6日目，8日目，および，11日目に1部採血を行ない実験に使用した。なお，第2回注射では，抗原注射前，1日目，および，3日目に，1部採血を行なった。
6. 溶血素価の測定
 - a 抗血清：10倍より倍数稀釈を行なった。
 - b 緩衝液：GVBを使用した。
 - c 補体：10倍稀釈液を使用した。

d ヒツジ赤血球浮遊液：1%ヒツジ赤血球浮遊液を使用した。

溶血素価はMicrotiterにより測定した。

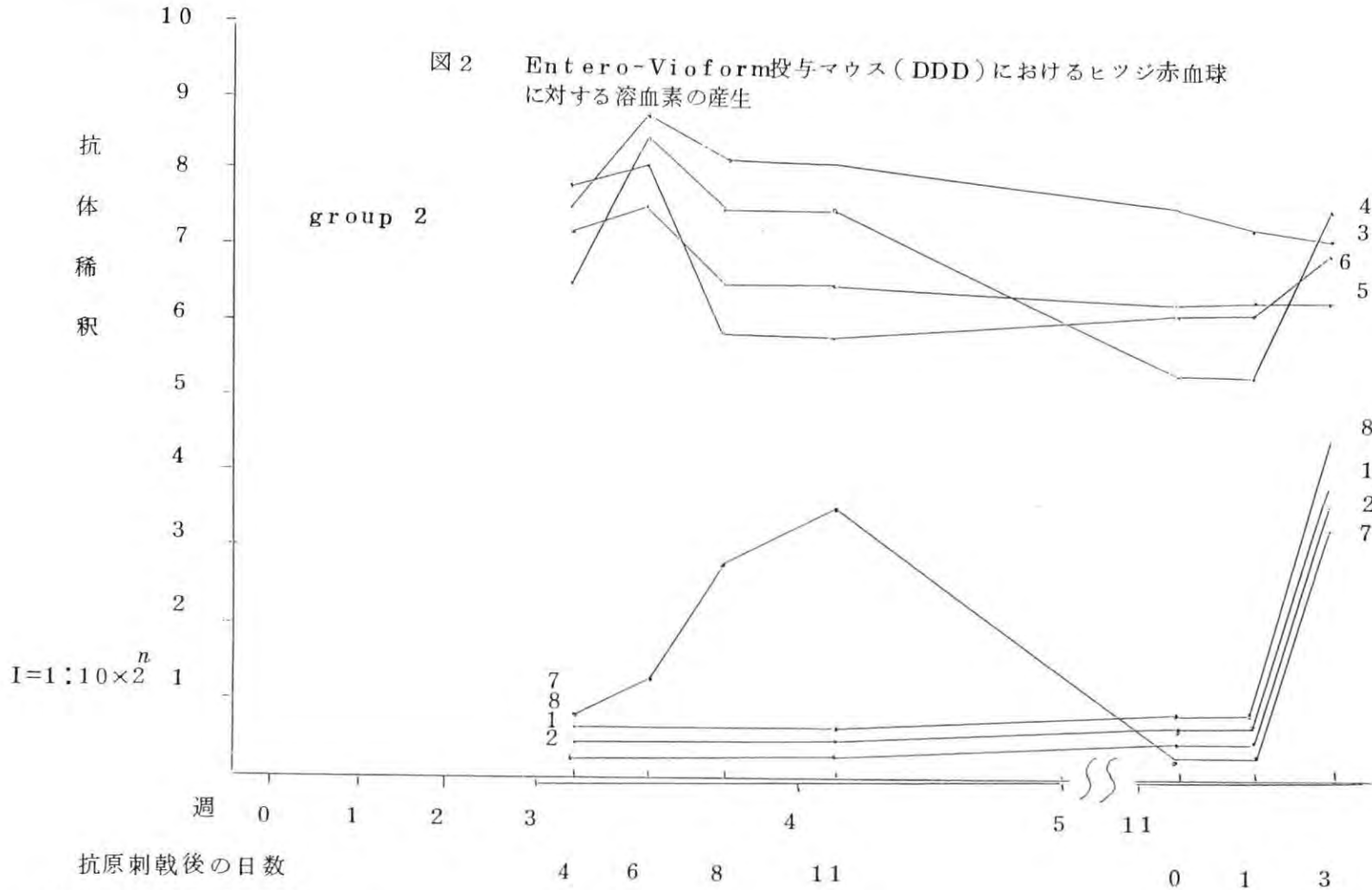
II 成 績

キノホルム剤をマウスに腹腔内，静脈内，経口的に隔日または，連日に投与し，その間にヒツジ赤血球を注射し対応する抗体の産生を溶血反応を用いて検討した（表1）。

キノホルム剤投与群では， $\frac{1}{5}$ ～ $\frac{2}{5}$ 前後のマウスで抗体産生が悪く溶血素価は，1：10以下であった。しかし残りのマウスは対照群と同様で，多くは1：80～160以上の溶血素価を示した。キノホルム剤投与マウスの溶血素価の変動について，代表例を図1，2に示しておく。この傾向はキノホルム剤の投与方法にはあまり関係ないらしく，何れもほぼ同じような成績であった。キノホルム剤投与量については，まだ十分なる検討が加えられていないが，0.9 mg/匹/日を連日，または隔日に投与した時，比較のおこりやすいようである。抗体産生が悪かったマウスでも，キノホルム投与中止後，ヒツジ赤血球を再注射すると，抗体産生がみられ，これは，2ME感受性であった。この現象については目下検討中である。

表1 マウスにおけるキノホルム投与法と溶血素価

実験群	マウス			キノホルム投与法			麻痺	死亡	ヒツジ赤血球注射(20% 0.1ml/匹)							
	系	雌雄	匹	mg/匹×日, 経路	日数	総計(mg)			注射時のキノホルム投与量小計	第1回注射4~6日 溶血素価・匹数			第2回注射1~3日 溶血素価・匹数			
										<1:10	1:10 ~ 1:20	1:40≤	<1:10	1:10 ~ 1:10	1:40≤	
1	DDD	雌	9	0.9×15 ip	隔日	13.5	0	0	6.3	4	0	5	1	0	8	
2	"	"	8	(アリナミン ip)	"	"	0	0	"	4	0	4	0	0	8	
3	DDD	雌	5	0.9×11 iv	隔日	9.9	0	0	5.4	2	0	3	/			
4	"	"	5	(アリナミン iv)	"	9.9	0	0	5.4	1	0	4				
5	DDN	雌	5	0.9×11 ip	連日	9.9	0	0	6.3	2	0	3	/			
6	"	"	5	1.8×11 ip	"	19.8	0	0	12.6	0	0	5				
7	"	"	5	0		0	0	0	0	0	0	5				
8	DDD	雌	10	0.9×13 ip	連日	11.7	0	0	6.3	3	0	7	0	0	10	
9	"	"	10	4.5×13 ip	"	58.5	0	0	31.5	2日	2	6	0	0	10	
10	"	"	10	0		0	0	0	0	1(4日) 0(6日)	1	8	0	0	10	
11	DDN	雄	10	3×2 po	連日	6	?1日	2	解剖	6.0	2	0	2	/		
12	"	雌	8	2×3 1×5 po	"	11	?2日 ?2日 ?7日(1)	3 → 3	解剖 1 解剖 3	4.0	0	0	5			
13	"	"	8	1×8 po	"	8	0	0	2.0	0	2	6				
14	"	"	8	0(CMC)		0	0	0	0	0	1	7				
15	DDD	雌雄	22	/			/		/		0	0	22	0	0	14
16	DDN		30								0	1	29			
17	DDNetc		41								0	2	39			



$I=1:10 \times 2^n$

900r-E. VIOFORM } / 0.3 ml
200r ALINAMIN }
i.p

20% SRBC 0.1 ml
i.p

Ⅲ 考察と結論

以上のような少数例の実験群から結論を導き出すことは危険であるが、我々の条件では、マウスにキノホルム剤を投与することにより神経麻痺症状をおこすことはできなかったが、しかし、ヒツジ赤血球に対する抗体の産性を抑制することができるものもあった。この抗体の産生抑制の特徴は、ALSや他の抗体産生抑制剤にみられるようなものと異なり、抑制効果がある群と、無効群とに、明らかに2分される点である。すなわち、抗体産生抑制群では、いわゆる、免疫学的無反応者(non-responder)のような態度をとっている。しかし、キノホルム剤の効果がなくなったと思われる時期に、ヒツジ赤血球を再注射すると、抗体産生がみられ、しかも、産生される抗体は、2ME感受性のものであるから、この時点で1次反応が起ったものと考えられよう。したがって、抗体産生抑制群では、抗原の認識が第1回のヒツジ赤血球で行われなかったために、免疫学的記憶も、もたれなかったものと思われる。これに反し、無効群では、対照マウスにヒツジ赤血球を注射した場合と同様の反応がみられている。

キノホルム剤投与マウスで、何故、このような抗体産生抑制群を無効群に分かれるかについては、その成立機序について目下検討を続けている。

キノホルムの毒性に関する研究

池田良雄、戸部満寿夫、鈴木康雄、小林和雄、鈴木幸子、川崎 靖

(国立衛生試験所 毒性部)

I 結 言

スモン患者で特異な緑色舌苔を呈する例のあることが井形ら⁽¹⁾によって指摘され、さらに患者の尿中⁽²⁾に緑色物質が見出されスモンと緑色物質との関連が注目されるに至った。その後田村⁽³⁾はこの緑色物質がキノホルムであることを同定し、さらに椿らはこの結果に基づいて疫学的調査を行い、キノホルムとスモンとの密接な関係を指摘した。

キノホルムの副作用あるいは毒性に関しては若干の報告を見るが、それらのいづれでもスモン病像の特徴とされる知覚異常、末梢神経ならびに脊髄の変化を具備した変化を示すものは見当らない。われわれはキノホルムの毒性を一層明らかにする目的でニワトリおよびモルモットによる急性ならびに長期毒性実験を行っているが、現在までに得た成績について報告する。

II ニワトリによる実験

方 法 検体として局方キノホルムを用い、これをゼラチンカプセルに封入し、いづれも経口で一回および連続(毎日1回)投与を行った。

動物は体重1.2～1.5 Kgの市販のホワイトコーニッシュ種のメンドリで、一回投与実験では1群1～2羽からなる5群を、また連続投与実験では1群6羽からなる4群を用いた。一回投与実験では死亡および一般症状を観察指標とし、連続投与実験では一般症状、体重、死亡率、および死亡した動物と末期症状を呈した動物を殺してそれぞれの病理的検索を観察指標とした。なお殺処分は先づ1.0ℓの生理的食塩水による全身灌流を行い、続いて10%ホルマリンで同様に灌流した。

病理組織学的検索は、肉眼的所見を記録し臓器(脳、脊髄、坐骨神経、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓)を秤量した後、10%ホルマリンで固定し、切片を作製し、H-E重染色、Sudan III染色を行い、別に脊髄についてはLuxol fast blue cresyl echt violet、Masson's Trichrome 染色を行った。

結 果

一回投与実験：300～7000 mg/kg のキノホルムを一回経口投与した後2週間観察した。

7000 mg を投与した例では投与後凡そ7時間までは変化を認めないが20～24時間後、緑色便の排泄をみ、両眼瞼を閉じ勝で、口腔内に粘液が充満し、殆んど自発運動がなくなる。死亡状況は表1に示すとおりである。

表1.	投与量 (mg/kg)	死亡率
	300	0/2
	1000	0/2
	3000	0/2
	5000	2/2 (12日, 14日)
	7000	1/1 (7日)

7000 mg を与えて死亡した例では、腸粘膜の殆んど全域に亘って充血し、腺胃部に小潰瘍を認める。

連続投与実験：4群に0, 200, 500, および1000 mg/Kg/day のキノホルムを経口投与し、0および200 mg 群は現在(46.2.18日)115日、また500 mg 群では44日を経過した。

体重の推移

図1に開始後35日間の体重変化を示す。200 mg および500 mg 群では初期凡そ2週間に亘ってやや減少傾向を示すがその後は対照群と差がなくなる。しかし1000 mg 群では3日目頃より減少傾向が生じ、初期体重に比べ5日目では約10%, 20日前後では約20%減少を示す。

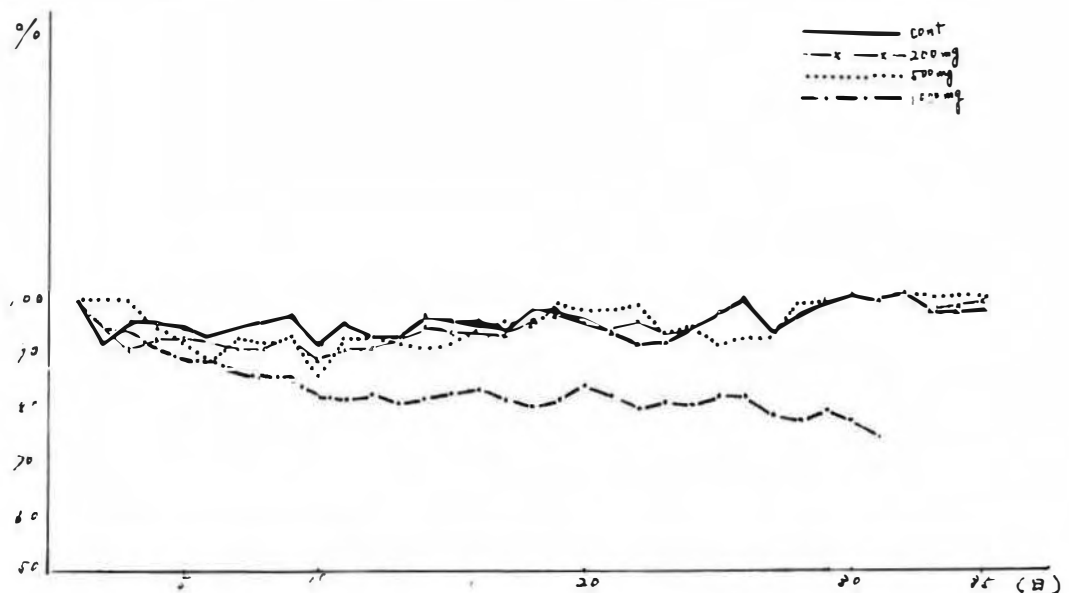


図1 体重変化率

一般症状（表2）

200 mg 群：実験開始後115日を経過したが、対照群に比べ差がなく、変化を認めない。

500 mg 群：20日目に2例が軽度の体重減少を伴う歩行障害（写真参照）ないしは歩行困難，開口症状を呈し，うち1例は21日目に殺処分し，他の例は28日目に死亡した。

1000 mg 群：12日目に2例，その後14，18，20，および25日目にそれぞれ1例づつ，体重の減少を伴う歩行障害（写真参照）ないしは歩行困難，後趾伸展麻痺，深部知覚異常（亢進），流涎，開口症状，舌の肥厚などの諸症状を呈する。歩行障害はその後強まり，殆んど自発運動がなくなり末期へと移行する。症状発現から末期までの間隔は短いもので12時間，長いもので11日を要する。

表2

投与量 (mg/Kg)	発症例数	死 亡 率			
		10	20	30	35 (日)
0	0/6	0/6	0/4	0/4	0/4
200	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
500	2/6	0/6	0/6	2/6	0/4
1000	6/6	0/6	3/6	1/3	2/2

死 亡 率（表2）

自然死をおこした動物は500 mg 群で28日目に1例と1000 mg 群で19日目（18日目に発症）に1例でほかの500 mg で1例と1000 mg の5例はいずれも末期症状を呈したために殺処分したものである。なお対照群で12日目に2例を殺処分して比較に供した。

剖検所見

500 mg 群：2例について解剖したが，肉眼的に殆んど対照群の所見と差がなく，変化を認めない。

1000 mg 群：全例で肝の表面に微細な黄色斑点が彌漫性に認められ，やゝ褪色を呈する。また2例において舌表面が痲皮状を呈するが，その他の臓器および組織に変化をみない。

組織学的所見

組織学的検索を終った1000 mg/kg/day を投与し12日目に前述の症状を呈し，同日に殺処分した1例について述べる。肝の中心性の脂肪変性が認められ，末梢神経（坐骨神経）の軸索変性および髄鞘脱落，脊髓前索および後索の変性像が認められる。

III モルモットによる実験

方 法 検体として局方キノホルムを用い，ニワトリの場合と同様に経口による一回投与と連続投

与実験を行った。

検体の投与剤形は一回投与ではオリーブ油に懸濁して、また連続投与では5% lecithin 液に検体を3.3%の割合に懸濁したものと、別にゼラチンカプセルに封入した2種類とした。動物は体重300g前後の雌のモルモットを用い、一回投与実験では投与後2週間に亘って一般症状と死亡を観察し、連続投与実験では、一般症状、体重、死亡率を観察し、死亡動物と末期症状を呈した動物を放血して殺し病理学的検査を行った。

病理学的検査は肉眼的所見を記録した後、臓器(脳、脊髓、末梢神経(坐骨神経)、肝、腎)を10%ホルマリンで固定し、ニワトリの場合と同様に切片を作製した。

結果

一回投与実験：100、200、300および1,000 mg/Kg を一回経口投与すると、1,000 mg/Kg 投与後4時間前後に緑色尿の排泄をみるが外に著しい症状をみない。200 mg では6日目、300 mg で5日目に、また1,000 mg では4日目に死亡するが、死の1日前からいづれも四肢の運動障害を認める。投与後2週間の死亡状況は表3に示すとおりである。

表3	投与量(mg/kg)	死 亡
	100	0/1
	200	1/1
	300	2/2
	1000	1/1

連続投与実験：投与量と投与剤形を変えて2種の実験(i, ii)を行った。

i) 2群(各群7匹)の動物に各々10および50 mg/Kg の検体を毎日1回胃ゾンデで12週間経口投与し、別の1群(6匹)には懸濁液のみを同期間投与して対照とした。

一般症状

10 mg および50 mg 群ともに特に症状の発現をみないが、10 mg 群で8週目、また50 mg 群で9週目にそれぞれ1例が強い体重減少を伴って死亡する。50 mg 群の1例では死の前日から後肢の運動障害が軽度に認められる。

体 重

12週間の体重の推移を図2に示す。

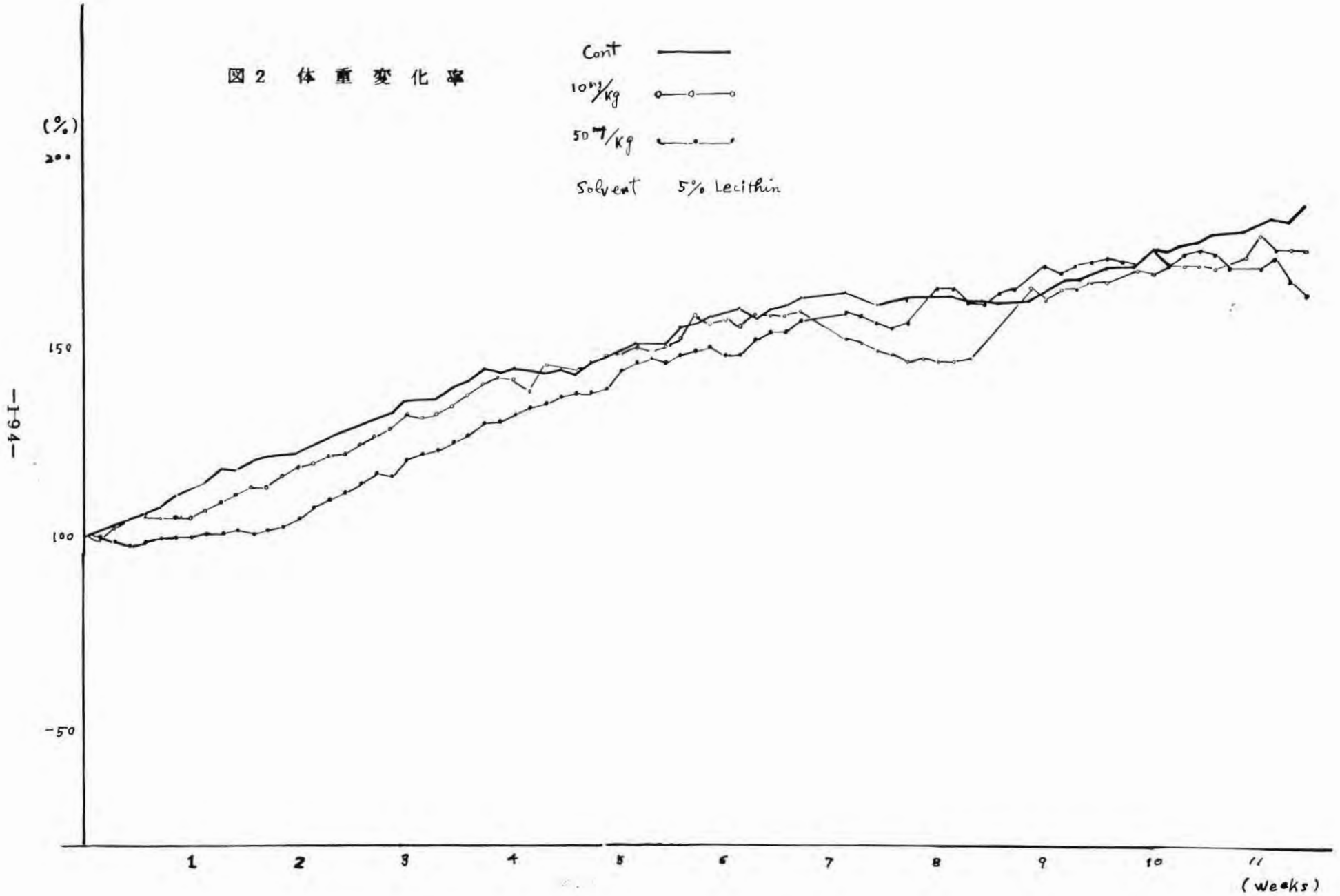
10、50 mg 群ともに対照群に比べ増加の抑制を生じ、開始後4週前後までは50 mg でその差が強い。12週目では、それぞれ6例の平均で対照群が642.2g、10 mg 群で578.3g、また50 mg 群で537.7gである。

死 亡 率

10 mg で8週目に、また50 mg 群で9週目にそれぞれ1例が死亡するが、ほかに死亡例を

图2 体重变化率

Cont ———
10^{mg}/kg ○—○—
50^{mg}/kg ●—●—
Solvent 5% Lecithin



みない。死亡した2例ではいずれも肉眼的に脂肪肝を認めるが、ほかに変化像をみない。

病理学的所見

12週目に全動物を解剖して行った肉眼的検査では対照群で2/6例、10および50mgとともに4/6例に肝表面の微細(経0.5mm程度)な白色斑点の散在が認められ、また50mg群では全例に腎の褪色を認める。

ii) 一群7匹からなる3群に検体を0, 50, および100mg/Kg/day をカプセルに封入して毎日1回口腔内に投与し、現在(46.2.18日)85日を経過した。

一般症状

50mg および100mg 群ともに特に症状の発現を認めない。50mg 群で4日目に1例、また100mg 群で、4, 6, 13および75日目に各々1例が死亡するが、これらはいずれもその数時間ないし1日前から後肢の運動障害が軽度に認められる。

体 重

体重の推移は図3に示すとおりで、投与開始直後から50mg, 100mg ともに増加が強く抑制され、ことに100mg では著しく40日以降殆んど体重の伸びがみられない。

死 亡 率

50mg 群で1/7, また100mg で4/7の死亡を生じ、対照群では死亡例をみない。

死亡した5例ではいずれも肝表面に無数の微細な白色斑点の出現がみられ、100mg では脾および腎の褪色が軽度にみられる。さらに、100mg で75日目に死亡した例では腎の褪色が強度で表面が凹凸状を呈し、かつ表面に微細な白色斑点をみる。

IV 考 察

キノホルムの致死量については、その経口LD50がモルモット⁽⁴⁾で凡そ175mg/Kg, ラット⁽⁵⁾で10g/Kg以上というように動物種による差が大きいことが伺われるが、今回のニワトリおよびモルモットの結果でもその差の著しいことが明らかであった。

一方、その症状として、Entero-Vioform を治療の目的で1回与えたイヌで投与後数時間で生ずる“てんかん様発作”が報告されているが、今回の1回投与実験ではニワトリ、モルモットともに、特に著しい症状の発現を見なかった。その理由は不明であるが、その一つとして種差をあげることができるかも知れない。キノホルムの連続投与実験については詳細な検索を行ったと見られる報告は見当たらないが、Püschner & Fankhauser⁽⁷⁾(1969)がキノホルムを0.6~1.0%添加した飼料で2週間マウスを飼育した成績は今回のニワトリの成績と関連して興味深い。

即ち、彼等によれば早い例では開始4時間から片側性あるいは両側性の四肢攣縮・しんせんなどの神経症状が認められ、その後鎮静状態となり、病理組織学的に開始後2~3日でアンモン角さら

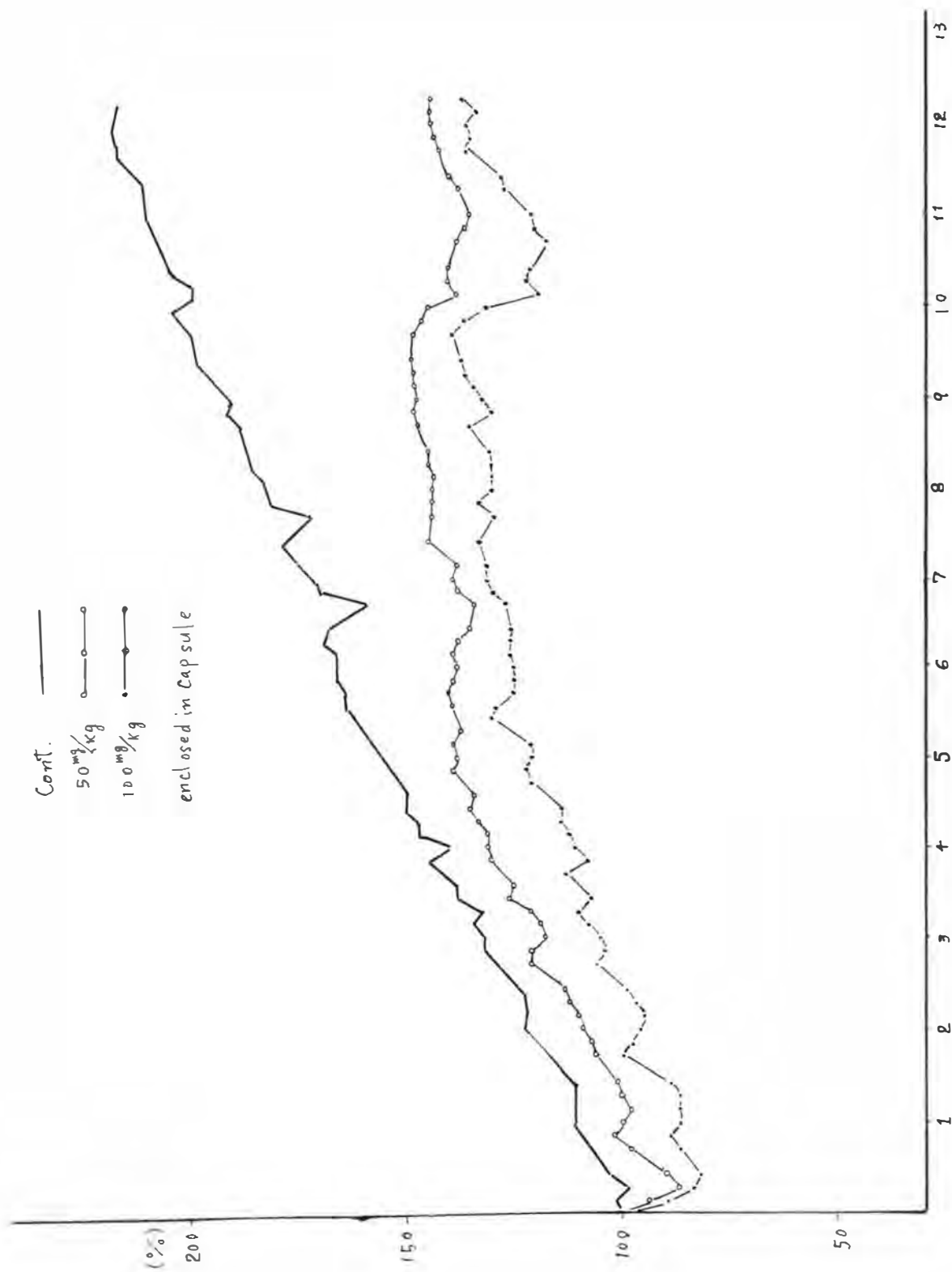


图3 体重变化率

扁桃核に壊死性の神経細胞を認めるといふ。この報告や、イヌでの“てんかん様けいれん”はいづれもキノホルムが中枢神経系に対して影響することを示すものとみられ500および1000 mg/Kg/dayのニワトリで生じた麻痺性の歩行障害ないしは歩行困難が神経系の障害によることを支持する成績と考えられる。しかしこの2つの報告例では症状の発現がいづれも極めて短時間でみられる点で、ニワトリの成績と相異なる。

⁽⁸⁾ 豊倉らはキノホルムを連続して静注したウサギで末梢神経の髄鞘脱落を見ている。またキノホルムの近縁物質の一つである5-nitro-8-hydroxyquinoline⁽⁹⁾を投与したマウス、ラット、およびネコで四肢あるいは下半身の麻痺と坐骨神経の髄鞘脱落が認められているが、これらの成績もニワトリでの末梢神経の変化を支持するものと考えられる。

しかしニワトリでみられた脊髄の変化については、他にこれを示唆する報告がなく、今後の検索を待たなければならない。

また1000 mg/Kg/dayのニワトリでみられた舌の肥厚については、まだ詳細な検索が済んでいないが、スモン患者で特異な舌苔がみられることと関連して特に注目すべき現象と考えられる。

モルモットの実験では成績で明らかなように軽度の後肢の麻痺がみられたが、その発現と死との間隔が長くて1日程度であることから、それがキノホルムに特有な作用によるのか、あるいは死に前駆する一般的症状であるかは組織学的検索を行った後で結論すべきであろう。

なお、この実験でキノホルムの100 mg/Kg/dayをオリーブ油に懸濁して3匹のモルモットに経口投与したところ、カプセルに封入して与えた場合とで死亡の状態に差がみられたことは、剤形の差による作用発現の時間的差あるいは強度差を示唆するものとして、考慮すべき問題と言えらる。

V 総 括

ニワトリおよびモルモットを用いキノホルムの急性ならびに長期毒性実験を行った。

急性実験ではその経口致死量がモルモットでは200 mg/Kg、ニワトリでは5000 mg/Kgと推定された。

長期実験では、ニワトリに於て両側性の歩行障害が500 mg/Kg/day 経口以上で高頻度に出現し同時に末梢神経および脊髄前索、後索の変化を示す1例を認めた。

引 用 文 献

1. 高須俊明ら：スモン研究協議会 1970；医学のあゆみ 72：539，1970
2. 井形昭弘ら：日本医事新報，2421：25，昭45
3. 田村善蔵，吉岡正則：スモン研究協議会 1970；医学のあゆみ，74：320，1970
4. David, N.A. et al. : Am. Jr. Trop. Med ; 24: 29, 1944

5. Brückner, R. et al : *Arz.Mittel Forsch* ; 20 : 575 , 1970
6. Hangartner, P : *Schweiz. Arch. Tierheilkd* ; 107 : 43 , 1965
7. Püschner , H. und Fankhauser, R ; *Schweiz. Arch. Tierheilkd* ;
111 : 371 , 1969
8. 豊倉康夫ら : スモン研究協議会 1970
9. Roesch, E. et al : *Arch. Toxikol* ; 20 : 313 , 1965

