

4. キノホルムの体液中濃度の測定 (I)

宇野 豊三, 北沢 式文, 前田 温

(京大病院・薬剤部)

I はじめに

従来、キノホルムは水に対する溶解度が少ないことから、消化管からの吸収はきわめて微量であり、安全な腸内殺菌剤と考えられていた。しかし最近、ラジオアイソトープを用いた研究から、キノホルムの吸収が比較的良好であることが認められ、さらにキノホルムの生体内挙動、特に体内分布、尿中排泄率等に関する知見は増しつつある。しかし経口投与後の血中濃度を消化管吸収との関係において検討した報告は殆んど見当たらない。著者らはこの点に関してさらに詳細に検討を行なうために、まず血液中のキノホルム量を測定する方法を確立した。またこの方法を用いて、経口投与後のラットの血中キノホルム量を経時的に測定し、さらに連続経口投与した場合の結果とを併せて検討を行なった。それらから得られた結果より、キノホルムが従来の薬物とは異なり、特異な生体内移行を示すことが明らかとなった。

II 実験材料および方法

1. キノホルム

スモン調査研究協議会より配布されたものをエタノールを用いて精製した後実験に供した。

2. 試薬および溶媒

本研究に用いた試薬および溶媒はすべて特級、あるいはスペクトル用のものである。

3. 動物実験

経口投与後の血中濃度の測定

体重150～220g Wistar系雄性ラットにそれぞれ所定量のキノホルムの水性懸濁液(水の量は2mlに固定)を胃ゾンデを用いることにより投与した。投与後、定められた時間にラット尾部の切断によって採血し、下記の定量法により含有されるキノホルムの測定した。

4. 定量法

ラット尾部の切断により得られた血液0.1 mlを蒸留水1 mlに加えて溶血し、これに30%トリクロル酢酸2 mlを加えて除蛋白を行なう。遠心分離して上澄液2 mlを4 mlのベンゼンにて抽出を行なう。このベンゼン層の3 mlをとり減圧下で溶媒を留去した後、ビリジン0.5 mlを加えて溶解する。この液にビストリメチルシリルアセトアミド2滴を加えてシリル化した後、再び溶媒を留去して、得られた残留物をクロロホルム4 mlに溶解する。この一定量を用いてガスクロマトに注入し得られたクロマトグラムから面積法により含有しているキノホルムを定量する。ここに用いたガスクロマト装置は、島津製作所製GC-5A.F.I.Dであり、1.5m SG3-15のガラスカラムを用い、充填剤はポリエチレングリコール20M.20%, Support.celite 545, Mesh60~80のもので

ある。測定するに際しての条件は、Column Temp. 150°C Carrier Gas N_2 40 ml/min, H_2 Flow Rate 40 ml/min, Air Flow Rate 700 ml/min, Range 0.064 mV, Sensitivity 10^3 (M Ω), Injection Port Temp は 100°C である。

5. 薄層クロマト

Kieselgel F_{254} による Merck 社製 DC-Alufolin を用いた。展開溶媒はクロロホルム：アセトンの 6：4 の混合溶媒である。

Ⅲ 結果及び考察

1. 検量線の作成

キノホルムを含まない血液 0.1 ml に 1 ml 蒸留水を加えて溶血し、種々の既知濃度のキノホルム溶液 (0.005 N NaOH sol.) を一定量加えて、定量法に従って、検量線を作成し図 1 に示す結果を得た。回収率を測定するために、上記の定量法において血液の代りに蒸留水を用いて同様に操作を行ない、それぞれ図 1 と全く重なる直線を得た。このことより、本定量法による場合、血液による障害が全く認められないことが明らかである。

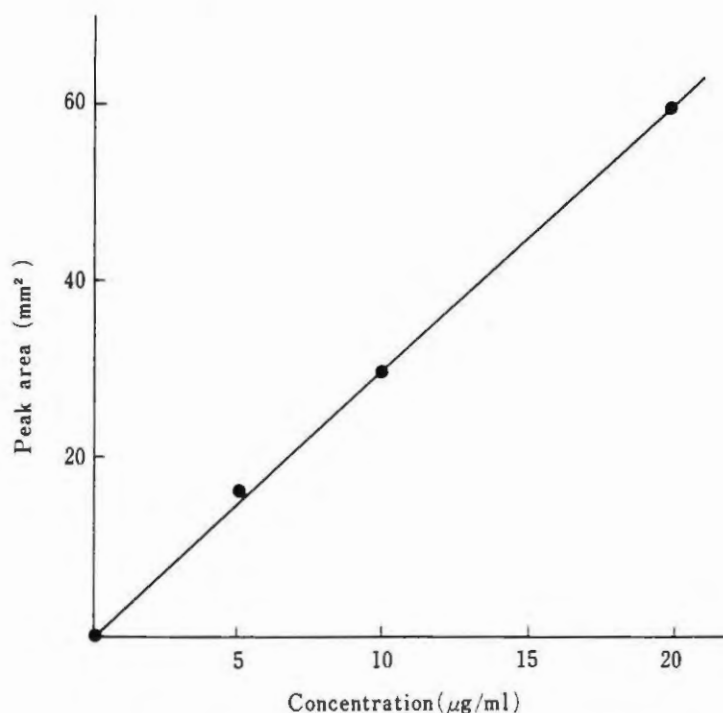


図 1. Calibration curve of free chionoform (rat)

2. 代謝物の検討

上記定量法により、ガスクロマトグラフィーで検出されるものが、未変化のキノホルムであるか、あるいは代謝物であるかを検討するために、薄層クロマトグラフィー及びヨードデンブロン反応により検討した。本実験においてはキノホルムのシリル化物が強い蛍光を発することを利用し、定量法で得られたキノホルムのシリル化体を薄層クロマトにより検討した。その結果、ラットの血液中からは、

唯一のスポットが得られた。これは未変化のキノホルムを用いてシリル化したもののスポットと一致するRf0.58の値であった。一方、生体試料から同様の操作を行なって得られたキノホルムシリル化体をHClで加熱分解後、ヨードデンプン反応によって遊離ヨードの存在を検討した結果から遊離ヨードの存在を確認した。これらの結果より、上記定量法で測定される物質は、未変化のキノホルムそのものであることが明らかとなった。

3. 経口投与後の血中濃度の推移

ラットにキノホルム10mg/2ml水性懸濁液を経口投与した後の血中濃度を追跡した結果、図2を得た。投与直後には、20μg/mlの血中濃度が得られ漸次減少する傾向が認められたが、この図2より明らかなように、この物質の血中よりその半量が消失するに要する時間即ち生物学的半減期は著しく長く、投与後144時間経過した後も尚、相当量が血中に残存していることが明らかである。このことよりキノホルムは長時間生体内に滞留することが明らかとなった。

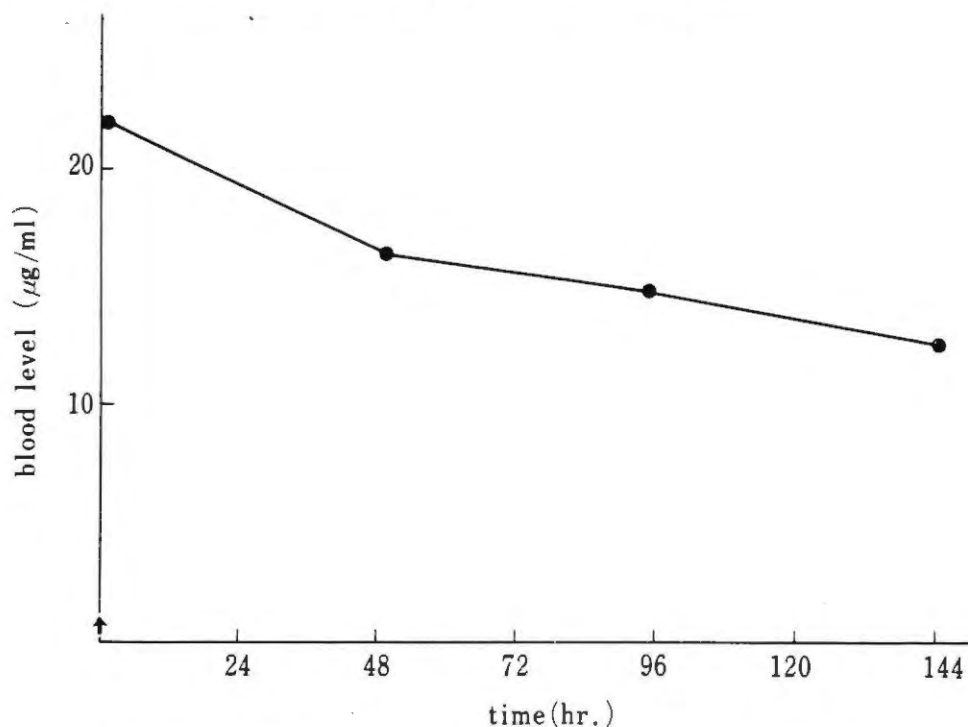


図2. Blood level of chinofom after oral administration
10 mg/day

さらに投与量を増加すると、その血中濃度は、図3に示すように、一様に減少する傾向を示しているがその24時間の過程のなかにおいてさまざまな変化を呈していることが明らかである。この変化には画一性がなく個体間の変動が著しいことが認められた。通常の薬物では、投与量を増せば、血中濃度もそれに対応して増大することが明らかであるが、キノホルムの場合、このような関係が存在しないことが考えられる。すなわち、450mg/Kg投与した場合でも2回の実験結果はそれぞれ異なった値が得られ、また、投与量が90mg/Kgの方が1800mg/Kgを投与した場合より高い血中濃度を与えている。このように著しい個体間のバラツキさらに投与量と血中濃度との間に対応する関係が

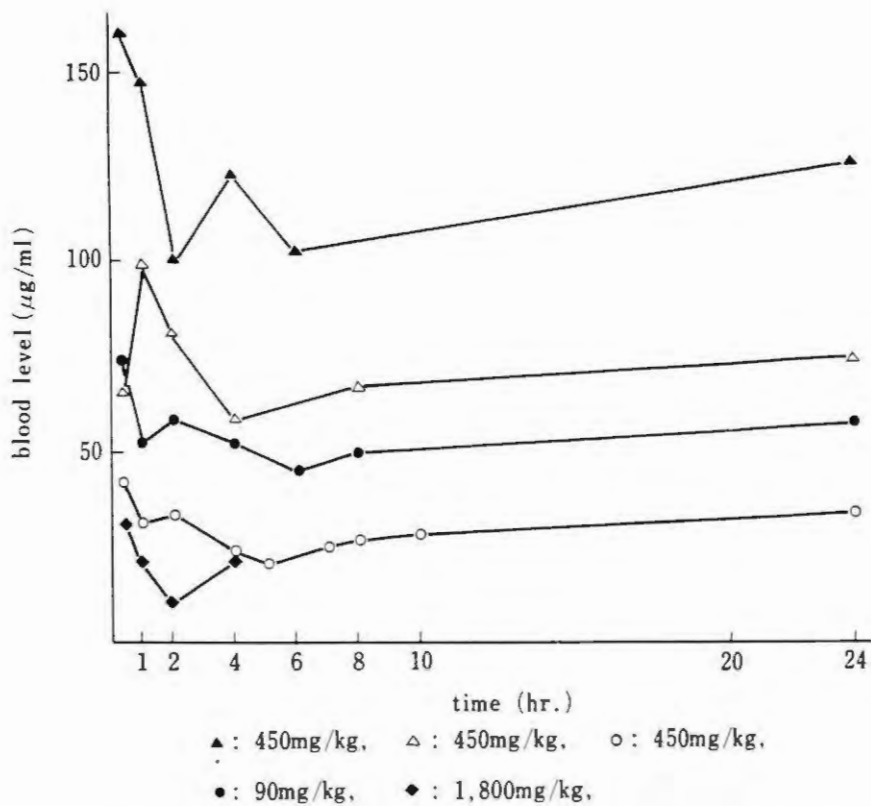


図3. Blood level of chionoform after oral administration in various doses

認められないことから、投与量から血中濃度を予測することは、消化管内の移行状況を検討した結果、極めて困難である。また、他の実験において経口投与後のラットを開腹すると、キノホルムは、その大部分が5～6時間後には小腸部を通過し、一部が回盲部に認められたにすぎなかった。このことよ

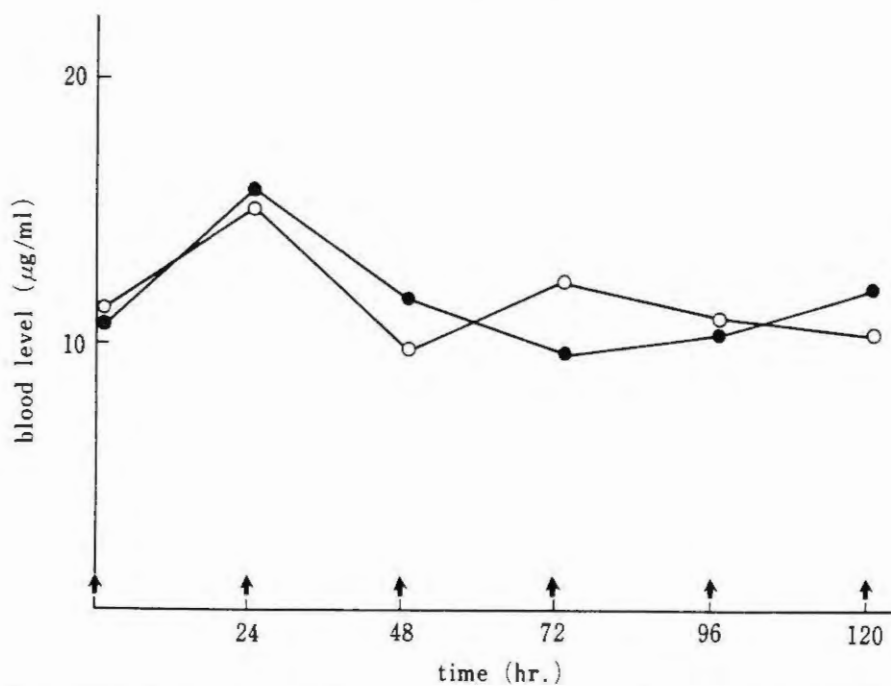


図4. Blood level of chionoform after repeated oral administration 5 mg/day

り小腸部位からのキノホルムの吸収は、5～6時間でほぼ終了していることが予想される。

3. 連続経口投与後の血中濃度の推移

図4には、キノホルムを5mg/body 連日投与した場合の血中濃度の推移を示した。一回あるいは、2回投与後、血中濃度は約10 μ g/mlにも達するが、それ以降は、キノホルム投与しても、それに応じて血中濃度の上昇は認められずほぼ一定の値が維持されていることが明らかとなった。これらの原因について今後検討を行なう予定である。

5. キノホルムの体液中濃度の測定(II)

宇野 豊三, 北沢 式文, 小室 徹雄
前田 温

(京大病院薬剤部)

I はじめに

前報において、キノホルムを経口投与したあとのラットの血中濃度の推移にみられた特異性について報告した。

経口投与後の最高血中濃度と投与量との間には一定の関係が認められず、血中よりの減衰は持続的であることが認められた。また、連続経口投与の場合、初回投与により血中濃度の上昇は認められるが、2回以降の投与により、この薬剤の半減期および投与間隔より予想される血中濃度の上昇は認められなかった。

今回は、150gのラットの静脈内にキノホルムを投与し、血中濃度の変化を観察し、このキノホルムの前述した特異性について考察した。

II 実験方法

動物実験 静脈注射後の血中濃度の測定 静脈内投与の場合、 5×10^{-4} N NaOH にキノホルムを $400 \mu\text{g}/\text{ml}$ の割合に溶解した溶液を用時調製し、その 0.5 ml または 0.25 ml をラット下肢大腿部静脈より、徐々に投与を行ない、前報の方法によりキノホルムの測定を行なった。

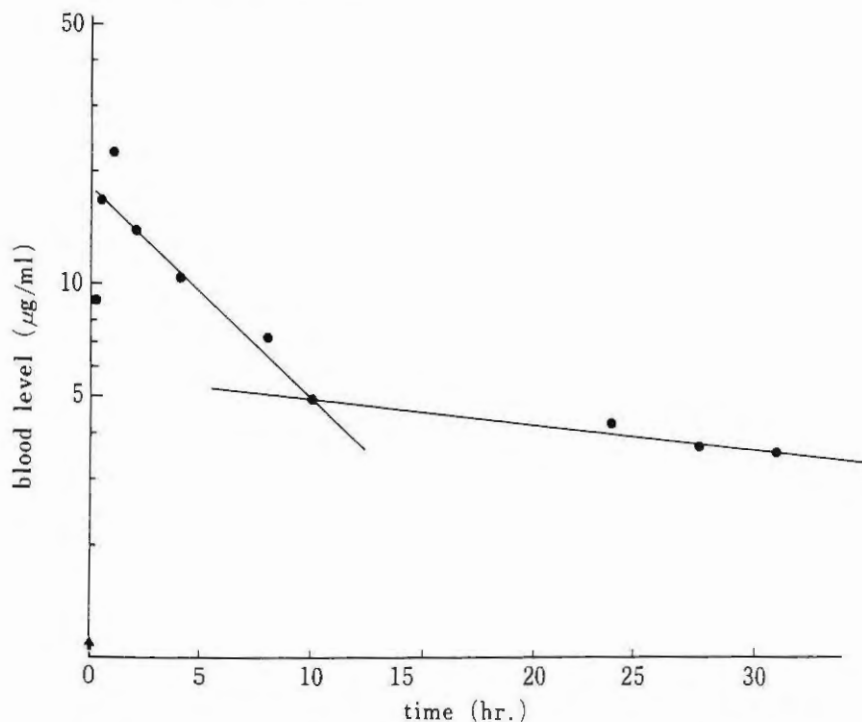


図1. Intravenous administration of chionoform $200 \mu\text{g}/\text{ml}$

Ⅲ 結果及び考察

ラットに静注した場合の血中濃度推移 図1は、120～220gのラットの下肢大腿部静脈よりキノホルムを投与した場合の血中濃度の推移を示した。他の薬剤において認められているように、投直後には一旦、急速に減衰して(α -Phase)、その後は極めて徐々に減衰する(β -Phase)ことが認められた。また、投与量を変えて静注した場合、投与量に比例して血中濃度の上昇が認められ、血中濃度と投与量との間に相関性が認められた。しかし、経口投与、連続投与の場合は、そのような相関性は認められなかった。

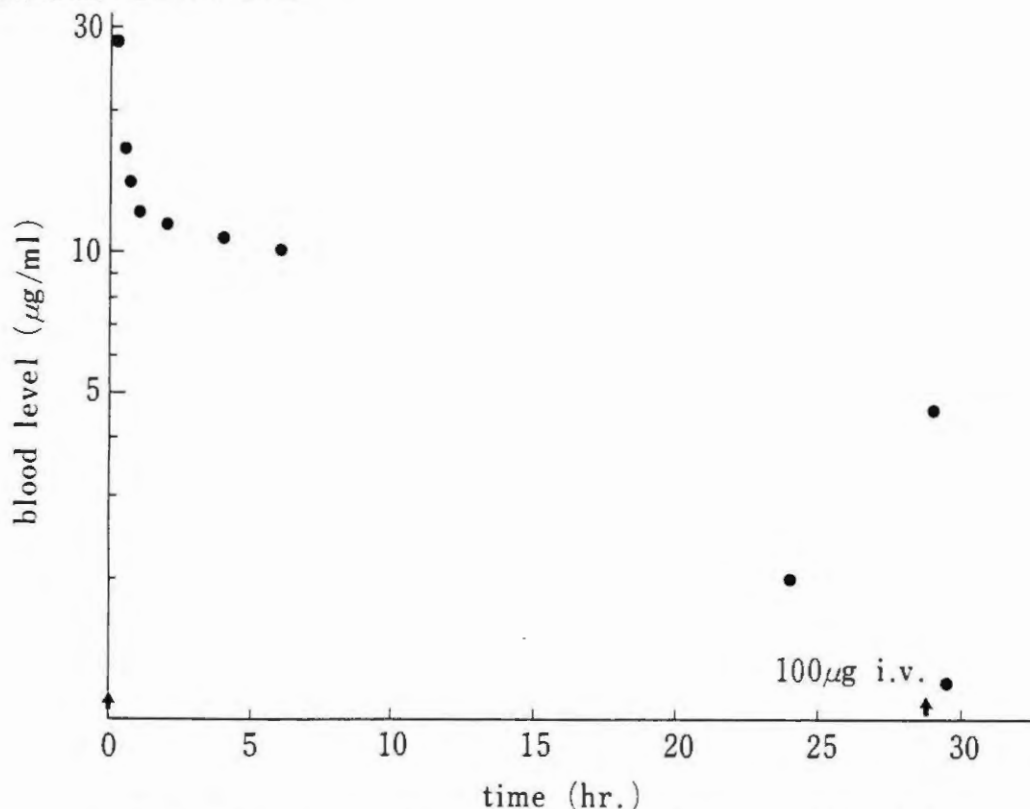


図2. Intravenous administration of chionoform 200µg/ml

図2は、血中濃度が減衰した後、投与量を変えてキノホルムを再び静注した場合の血中濃度の時間変化を示している。図からもわかるように投与量に比例した血中濃度変化を示している。更に、消失パターンも同様の傾向を示している。キノホルムを静注した場合と、経口投与した場合とを比較してみると、その血中濃度パターンが著しく異なっていることが明らかとなった。静注の場合に、投与量に比例した血中濃度が得られたということは、経口投与の特異なパターンの原因や生体内移行の種々の段階のなかでも特に吸収の段階、あるいは更に吸収されたキノホルムが、採血部位に致達するまでの過程に問題があるように思われる。即ち、肝臓あるいは、脂肪組織等の特定部位への大量の蓄積が生ずるために血中濃度が上昇しない可能性が示唆されるが、この点について、更に詳細に検討する必要があると思われる。

6. キノホルムの体液中濃度の測定(III)

宇野 豊三, 北沢 式文, 前田 温
小室 徹雄, 田畑 美津子, 上能 伊公雄

(京大病院薬剤部)

右京 成夫

(京大内科)

I はじめに

本研究に関する第一報, 第二報において, キノホルムを連続投与したラットの血中濃度の推移はその投与経路によって著しく異なったパターンを示すことを報告し, さらに本物質の生体内移行に関する詳細な検討の必要であることを示唆してきた。これらの報告のなかで特に

1. キノホルムの血液よりの消失は徐々に行なわれる。
2. 経口投与後にみられる血中濃度は投与量との間に, 他の薬剤で認められるような相関関係が認められない。

などの結果をヒトにおいても認め得る結果を得たので報告する。

昭和45年9月以来キノホルム製剤の販売が停止されており, ヒトにおける本物質の生物薬剤学的研究の実施が不可能である現在, 本物質の生体内移行に関してヒトとラットの間に相関を示唆するデータが得られたことの意義は大きいものと考える。

II 実験方法

1. 血液の取得

京大病院第一内科の患者で, キノホルムを服用した経験を有する者, 服用経験のない者を投薬記録より選び, さらに健康人の血液を用いて検討を加えた。

2. 定量法の検討

定量法は第一報で報告した方法を用いたが, 採血量, 操作途中のクロロホルム量, さらに, ガスクロマトに注入する量を増減することによって検出限界を $0.01 \mu\text{g}/\text{ml}$ とすることが可能であった。

III 結果および考察

得られた結果を表 I に示す。表において, 投与総量(TOTAL DOSE(g))の欄には, 1日投与量に投与日数を乗じ, さらに市販製剤中に含まれるキノホルム量に換算したものである。この欄に(+)とあるのは投与記録には投与に関する記載はないが, 被験者が訪院前に, あるいは市販のキノホルム製剤を購入して服用した経験を認めたものである。服用中止後の月数の欄には, 服用中止後, 測定のために採血を行なった時点までの月数を表わしている。月数の不正確なものには(?)を付している。

表 I の結果から明らかなように, 被験者の血液中に検出し得たキノホルム量は必ずしも投与総量と相関関係が認められない。また同様にキノホルム量と服用中止後の月数の間にも明らかな相関性は

認められていない。

何れにしても投与中止後、多数の年月を経過した後でもなお、血液中にキノホルムが検出されることは、本物質が生体内移行像において従来知られている他の薬剤とは異なっていることは明らかである。今後なお詳細な検討が必要であることを示唆するものと考えられる。

表 I

MAME	AGE	SEX	TOTAL DOSE(g)	MONTH AFTER AD.	CONC. OF CHIN. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
(1) T.N.	20	M	0	—	0
(2) T.K.	29	M	0	—	0
(3) M.T.	25	F	+	?	0
(4) T.I.	26	M	0	—	0
(5) T.Y.	22	F	49.5	53	0
(6) Y.M.	70	F	156.25	18	0.18
(7) H.M.	65	F	165.9	18	0.67
(8) M.K.	17	F	3.6	46	0.26
(9) B.Y.	36	F	25.2	10	0.64
(10) S.M.	40	M	138.5	20	0.72
(11) K.M.	45	F	183.7	20	0.19
(12) Y.N.	53	M	+	?	0

N 文 献

- 1) 田村善蔵：“血清中の非抱合型キノホルムの定量”
スモン調査研究協議会研究報告書 № 3, P. 173 (S. 45)
“生体試料からの非抱合型キノホルムの微量分析”
同上 № 3, P. 179
- 2) 松岡理ら：“標識キノホルムによる代謝、分布の研究”
同上
- 3) Krüger -Thiemer
“The Role of the Therapeutic Regimen in Dosage Design.”
Chemotherapia Vol 10 61 (65/66')
- 4) Gerhard Levy
“Comparative Pharmacokinetics of Coumarin Anticoagulants II.”
J.P.S. 57(1): 68 ('68)

7 Chinoforn- ^{14}C の代謝(第1報)

浦久保 五郎, 城戸 靖雅, 長谷川 明
池淵 秀治, 永松 国助
(国立衛生試験所)

I 緒言

キノホルムによるS.M.O.N症状の発現が、或種のキノホルム代謝産物に由来する可能性を想定した。そこで実験動物にキノホルムを一回または連続投与したときの尿中キノホルム代謝産物を定性および定量的に追求する目的で、まずキノホルムによりS.M.O.N発現を認めない実験動物例として、今回ラットについて検討した。その結果、キノホルムおよびその代謝産物(おもに抱合体)の尿中排泄の様相は、ラットに関しては一回投与、連続投与群間にまったく差異は認められなかった。

II 実験方法

II.1 キノホルム- ^{14}C の合成

II.1.1) 5-Chloro-8-hydroxyquinoline-2 (または-4)- ^{14}C の合成
2-amino-4-chlorophenol 0.286g, 2-nitro-4-chlorophenol 0.173g, glycerol 0.284g および glycerol-1- ^{14}C 2.5 mCi にメタノール 0.3 mlを加えて加熱溶解し、十分混和したのちメタノールを減圧で留去した。これに濃硫酸0.747gを加え、油浴中で $120^{\circ}\sim 138^{\circ}$ に60分間加熱したのち、浴温を 170° にあげて2-nitro-4-chlorophenolを留去した。冷後、水10mlを加えて不溶物をろ去し、ろ液に氷冷下に30%水酸化ナトリウム溶液を加えてpH5とした。析出した沈殿をろ取し、活性炭を加えて希エタノールから2回再結晶を行ない、淡黄色針状晶(mp 132°)0.237g(glycerolからの収率42.8%)を得た。これは標品との混融およびTLCから、5-chloro-8-hydroxyquinolineであることを確認した。

II.1.2) キノホルム- ^{14}C の合成

5-chloro-8-hydroxyquinoline- ^{14}C 0.216gを0.7%水酸化カリウム溶液18mlに溶かし、これに3.7%ヨウ化カリウム溶液5.5mlおよび10%次亜塩素酸ナトリウム溶液0.75mlを逐々に加えたのち5%塩酸を加えてpH6.8とし、1夜室温に放置した。析出した沈殿をろ取し、これに10%酸性亜硫酸ナトリウム溶液50mlを加えて30分間攪拌したのち沈殿をろ取した(0.328g, 収率89.3%), エタノールから再結晶して白色針状晶(mp 190°)0.173g(収率47.3%)を得た。標品との混融およびTLCでキノホルムであることを確認した。

なお以上述べたキノホルム- ^{14}C の合成系路は図1に示すとおりである。

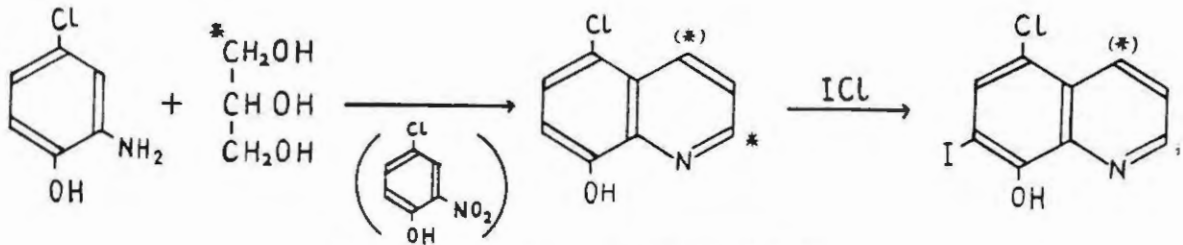


図1 Chinoform-¹⁴Cの合成系路

II・2 代謝実験

II・2・1) 投与および試料の採取

①1回投与：ウィスター系ラット（体重約100g）3匹(♂)にキノホルム-¹⁴C 水性懸濁液 1ml（ 2.4×10^7 dpm，キノホルム 4.35mg および CMC 0.4 mg を含む）をゾンデを用いて経口投与し，糞尿分離型代謝ケージを用いて飼育し，投与後 24 時間ごとの糞および尿を採取した。

②連続投与：①と同じラットを 3 群（対照群 3 匹，定用量群 5 匹，増用量群 7 匹，いずれも ♂）に分け，表 1 に示した用量の CMC（対照群）またはキノホルム-CMC 懸濁液を 20 日間連日ゾンデを用いて経口投与し，21 日目に生存した 11 匹にキノホルム-¹⁴C-CMC 懸濁液（ 2.6×10^7 dpm，キノホルム および CMC 各 5 mg）を投与した。投与後代謝ケージ内で飼育し，キノホルム-¹⁴C 投与 5 日目まで，各群の 24 時間糞，尿を採取した。

表1 各群の薬剤投与量

対 照 群		定 用 量 群		増 用 量 群	
投与量 (CMC)	投与日数	投与量 (キノホルム [*])	投与日数	投与量 (キノホルム [*])	投与日数
4mg/kg/day/4ml	5日	40mg/kg/day/4ml	20日	40mg/kg/day/4ml	5日
6	"		"	60	"
9	"		"	90	"
12	"		"	120	"

*キノホルムに対して10%のCMCを含む。

II・2・2) 採取試料の処理

採取した尿は水を加えて一定量とし，その一部を全尿放射能の測定にあてた。残りの試料を等量のベンゼン-ピリジン（9：1）混合溶媒で3回抽出し，有機層と水層に分画した。水可溶部はさらにII・2・3)に従って操作した。

糞は風乾したのち乳鉢で細粉とした。

II・2・3) 尿中水可溶成分の分画

II・2・2)で得た水可溶部に酢酸を加えてPH 4とし，沈殿が完結するまで5%酢酸鉛溶液を加えたのち遠心分離した。上清にアンモニア水を加えてPH 8とし，さらに5%酢酸鉛溶液を加えてお

殿を完結させたのち遠心分離した。上清はさらにアンモニアアルカリ性とし、生成した沈殿を分離した。

PH 4, 8 および強アルカリ性で得た上記の沈殿をそれぞれ 100 ml の水に懸濁させ、これに硫化水素を通じて鉛を除き、そのろ液を減圧濃縮、乾固した。

以上で得た試料の一部についてはリン酸緩衝液 (PH 4.6) 中、 β -Glucuronidase と 38° で 48 時間 incubate したのち、加水分解液を等量のベンゼン-ピリジン (9:1) で 3 回抽出し、有機層および水層に分画した。

II・2・4) 放射能の測定

① 尿中全放射能: II・2・2) の全放射能測定用尿試料の一定量 (1~2 ml) を湿式酸化し、 $^{14}\text{CO}_2$ をシンチレーター溶液 (PPO 5 g, dimethyl-POPPOP 0.3 g, ethanolamine 100 ml, methylcellosolve 300 ml, toluene 600 ml) に導入し、吸収させたのち液体シンチレーションカウンター (日本無線医理学研究所製 Model LSC-601) で放射能を測定した。

② 尿有機層分画の放射能: II・2・2) の有機層分画の一定量をシンチレーター溶液 (PPO 8 g, dimethyl-POPPOP 0.4 g に toluene を加えて 1000 ml とした) に加え、液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。

③ 糞中全放射能: 糞の乾燥粉末試料の一定量 (100 ml 以下) を湿式酸化法で酸化し、①と同様に放射能を測定した。

II・2・5) クロマトグラフィーによる尿中代謝産物の検索

エタノール/酢酸/水=7/1/2 を展開溶媒として、ペーパークロマトグラフィー (ろ紙: Whatman No. 1) および薄層クロマトグラフィー (薄層板: ポリアミド) を行なった。クロマトグラム上の放射性スポットは Packard 社製 Radiochromatogram scanner (Model 7200) および日本無線医理学研究所製 Aloka Thin-layer chromatogram scanner を用いて測定し、検出した。

III 結果および考察

キノリン骨格の合成には種々の方法が知られているが、今回は最も一般的に行なわれる Skraup 法に従って合成を試み、5-chloro-8-hydroxyquinoline を 42.8% の好収率で得た。またキノホルム- ^{14}C の比放射能は $2.49 \mu\text{Ci}/\text{mg}$ ($760.7 \mu\text{Ci}/\text{mmole}$) で、今回の動物実験の目的には十分満足すべき比放射能を示した。

II・2 に従って、上記のキノホルム- ^{14}C を動物に投与して得られた糞、尿中の放射能は表 2, 3, 4 に示すとおりである。ただし表中の数値は各群に属する 3~5 匹の動物の平均値で示した。

表2 尿の全放射能（投与量に対する％）

キノホルム - ¹⁴ C 投与後の経過日数	動物 数	連続投与群			一回投与群
		対照群	定用量群	増用量群	
		3匹	3匹	5匹	3匹
1日		27.68 %	19.43 %	16.20 %	17.93 %
2日		1.07	0.69	1.63	2.70
3日		0.11	0.09	0.20	0.11
4日		0.05	0.02	0.05	0.03
5日		0.03	0.02	0.04	0.02

表3 尿の溶媒抽出有機層の全放射能（1日尿の全放射能に対する％）

キノホルム - ¹⁴ C 投与後の経過日数	動物 数	連続投与群			一回投与群
		対照群	定用量群	増用量群	
		3匹	3匹	5匹	3匹
1日		3.10 %	0.32 %	1.90 %	2.56 %
2日		3.54	0.53	4.18	2.66
3日		3.79	15.30	4.86	—
4日		3.99	12.01	4.68	—
5日		3.93	4.33	5.51	—

表4 糞の全放射能（投与量に対する％）

キノホルム - ¹⁴ C 投与後の経過日数	動物 数	連続投与群			一回投与群
		対照群	定用量群	増用量群	
		3匹	3匹	5匹	3匹
1日		89.56 %	112.77 %	80.53 %	49.14 %
2日		12.26	9.23	18.00	1.73
3日		0.45	6.09	1.28	0.14
4日		0.23	0.04	0.13	0.02
5日		0.15	0.15	0.06	0.02

尿の全放射能および経日的排泄の様相はいずれの群にも著明な差は認められず、投与後5日間のうちに投与量の約18～29％が尿中に排泄されることを示している。表3から明らかのように、これらのうち17～30％が非抱合体の状態では排泄されている。

糞中の排泄量が第1日目にすでに100%をこえ、あるいは5日間の糞、尿排泄量の積算値が連続投与群においてはいずれも100%以上を示していることは、かなり実験誤差を物語っているが、しかし対照群を含めて連続投与群は投与後第1日目に80~100%を糞中に排泄するのに対して、一回投与群は約50%である。これはCMCが糞中へのキノホルムの排泄促進作用を示すものといえよう。しかし一方ではCMCがキノホルムによるSMON発現にプラスの効果を持つことも考えると、この効果はCMCがキノホルムの吸収助剤的役割(今回の実験の、尿の全放射能値からは推論できないが)をもかねているのか、あるいはSMON発現にはまったく別の作用を持つものかは興味深い。

尿の溶媒抽出有機層のラジオペーパークロマトグラムの一列を図2に示す。このほかのいずれの群から得た試料もまったく同じパターンを示し、キノホルムのほか、未知化合物(これはRf値から5-chloro-8-hydroxyquinolineと推定されるが、分画操作中のartifactである可能性が強く、目下検討中である)のピークを認めた。

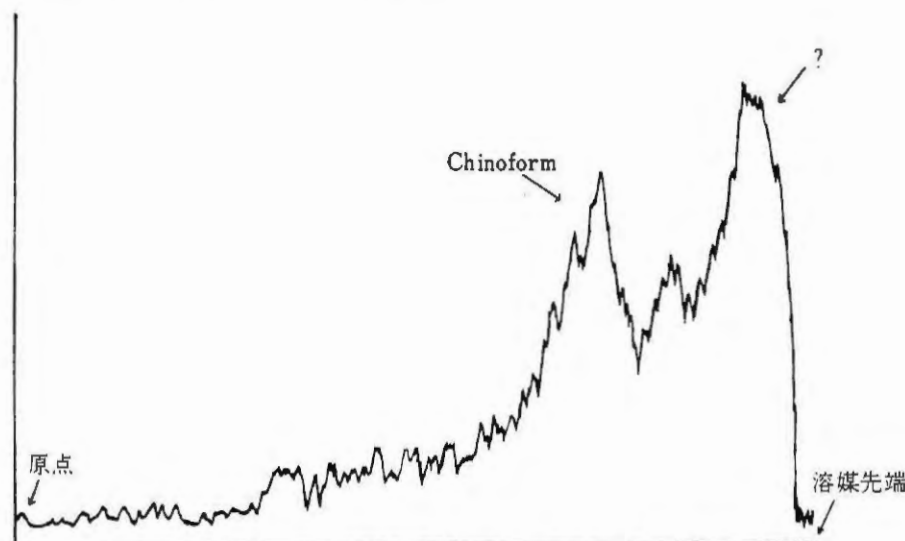


図2. 連続投与群尿有機層のラジオペーパークロマトグラム

水溶性画分の鉛塩処理に際して、本来はグルクロナイドおよびサルフェイトはPH8の沈殿画分に移行することが予想されたが、PH4および強アルカリ性画分にも放射能が分散し、いずれの分画ともラジオクロマトグラムのパターンは同一で2個の放射性スポットを認めた(図3, 4)。このうち1個のスポットはキノホルムのグルクロナイドにRfの一致をみた。他は未確認ではあるがサルフェイトと考えられる。

鉛塩処理して得られた分画を β -Glucuronidaseで水解し、有機溶媒で抽出すると、有機層中にはキノホルムおよび未知物質(図2のそれと同一物質)を検出した(図5)。

以上からキノホルム- ^{14}C 投与時のラットにおける代謝産物は、今回検討した投与方法のいかにかわらず、定性的差異は認められずに遊離のキノホルムのほか、そのグルクロナイドおよびサルフェイトと思われるものであった。

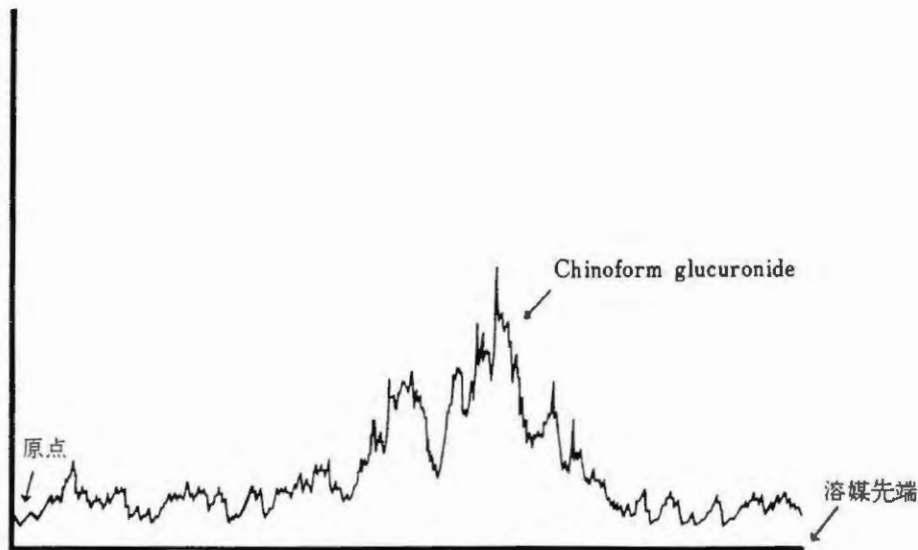


図3. 連続投与群尿水層のラジオペーパークロマトグラム

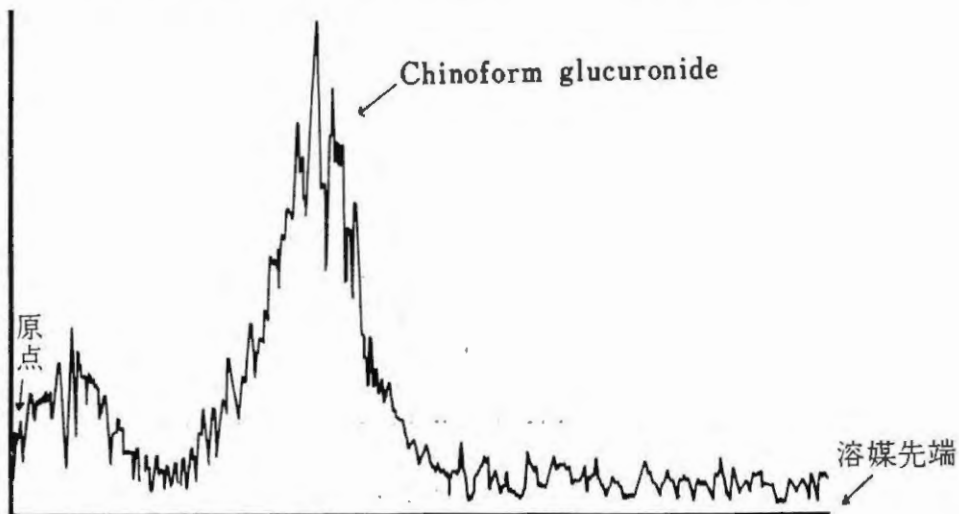


図4. 増用量群尿水層のラジオ薄層クロマトグラム

ラットにおいてはキノホルムによるSMON様症状の発現に成功した例はない。したがって、今回ラットの代謝産物としてキノホルムの抱合体以外に検出されなかったことは、もしキノホルムによるSMON発症に抱合体以外のminor metaboliteが関与しているかもしれないという観点から立って考えてみると、SMON発症動物では、ラットではみられない他の代謝産物の産生があるという事、すなわちキノホルム代謝に種差があるということが予想され得る。

IV 結語

Skraup法に従ってglycerol-1-¹⁴Cを標識原料としてキノホルム-¹⁴Cを合成した。キノホルムの連続投与と一回投与時の尿中代謝産物の定性、定量的差異を検討したが、両者の間に著明な差異は認められなかった。ラットはキノホルムによってSMON様症状を発現しないことか

キノホルムの minor metabolite が S M O N の発症に関連あるとの見方をするならば、キノホルム代謝には種差がある可能性が予想された。

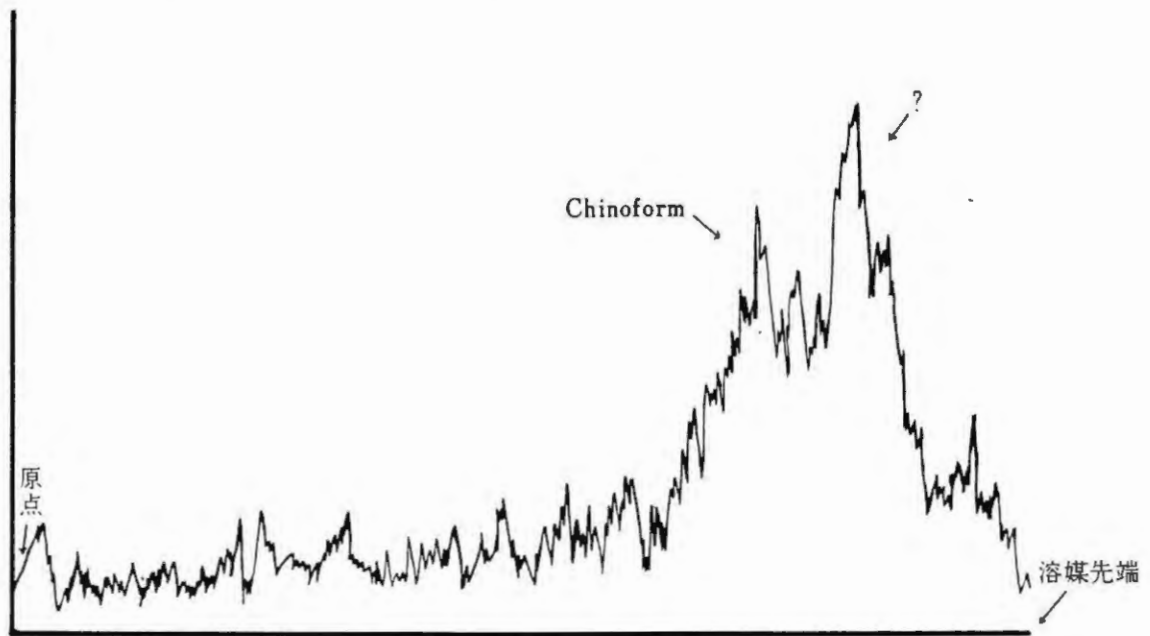


図5. 一回投与群尿水層水解後の有機層のラジオペーパークロマトグラム

8. ウズラを用いたキノホルム投与実験

大滝サチ 江頭 靖之

(予研・病理)

I 緒言

キノホルムがSMONの原因として疑われはじめたのは昭和45年で、患者の舌や排泄物の着色理由の追究と臨床疫学的事実に基づいており、動物実験によるSMONの再現が、不可欠のこととして要請された。同年秋には家兎(井形、豊倉¹⁾)、46年3月にはニワトリ(池田ら²⁾)、イヌ(俵ら、大月ら)による実験で早くもかなり有望な成績が得られた。その後立石らは雑犬による実験で、病理組織学的にもあらゆる点でヒトのSMONと一致する所見を発表し、³⁾ ビーグル犬でもそれに近い結果を得た。⁴⁾

著者らは昭和46年2月からウズラを用いて投与実験を行った。これは池田らのニワトリでの歩行障害の出現に希望をもち、これに近縁で、且つわれわれの研究室においてより多数を扱って良好な飼育管理を行い得る条件にあったことによるものである。はじめ、昭和46年2月より、一定量(10~200 mg/Kg/day)を90日間投与を続けたが、臨床所見は何も現れなかった。そのころ、イヌで投与量を段階的に増すことによって、最もヒトのSMONに類似する所見が報告されたので、³⁾ それにならった実験を8月末に再開した。平均2~3週ごとに漸増した大量のキノホルム投与によって全例が発症、斃死(又は瀕死時屠殺)に終り、病理所見はなお不十分なながらも、一定の陽性所見と見做される成績を得た。

II 実験材料および方法

ウズラは、日本生物科学研より購入した体重100g前後の雑種で、計30匹、雌・雄を区別せずに使用した。三ないし四羽を一区画: 20×15×13cm³のステンレスケージで飼育、市販の配合粉末飼料を約50g、水で泥状にして1日1回与えた。

キノホルムは、班より分与された原末で、10~15%の割合にCMC(Carboxyl methyl cellulose)を加えて蒸留水に懸濁、ホモジナイザーにかけて均質にした。投与には20ccの注射器の先に、ネラトンのカテーテルを10cmに切断したゴム管を接続し、前記懸濁液を容積で定量し、1日1回、朝の空腹時に、胃内に注入した。

III 実験群およびその投与方法

1)一定量連続投与実験(昭和46年2月1日-5月20日): 30羽中27羽を7群に分けた。I~IV群(各4羽)は経口投与群で、休日を除く毎日それぞれ200, 100, 50および10mg/Kgを投与した。その他のVとVI群(4羽および3羽)は腹腔内に、10又は5mgを週2回注射し、残り3

羽を対照群とした。以上の方式で、経口投与60回、腹腔注射20回のところで、以後の薬用量をそれぞれ二倍に増量して更に経口30回、腹腔10回を重ねたが、何ら異常を認めなかったので実験を中止した。(この間の1羽ごとの総投与量はキノホルム実量で、I群2.4g(体重kg当り24g)、II群1.2g、III群600mg、IV群120mg、腹腔注射の2群ではそれぞれ30mg、15mgにすぎない)。

2) 漸増投与実験(昭和46年8月23日一同47年4月4日): 約3ヶ月の休薬期間を置いて上記ウズラを使用した。新たにA群(旧I, V群合せ): 8羽, B群(旧II, VI群): 6羽, C群(旧III群と新たな3羽): 6羽, D群(旧IV群): 4羽に分け, A群: 400mg/kg/day, B群: 200mg/kg/day, C群: 100mg/kg/day, D群: 20mg/kg/day から始めて, 2週間からはそれぞれを1.5倍(A群: 600mg/kg/day)に増量, 4週間には当初量の2倍(A群: 800mg/kg/day), 5週後に3倍(同1200mg/kg/day)に増量, このでA, B群に各一羽発症をみた。更に6週後には4倍(同1600mg/kg/day), 8週後には6倍(同2400mg/kg/day)に増量, 2羽が発症, 斃死した。以後は9週目に当初量の5倍(同2000mg/kg/day)に減量し, 10週後には再び7.5倍(3000mg/kg/day)に増し, 11週には6倍(同2400mg/kg/day)に下げる等, 主に発病とその保持を目指して, 多少の不規則性をもってかなり思い切った漸増投与を続けた。(Fig. 1)

IV 実験成績: 発病のみられた漸増投与実験について記載する。

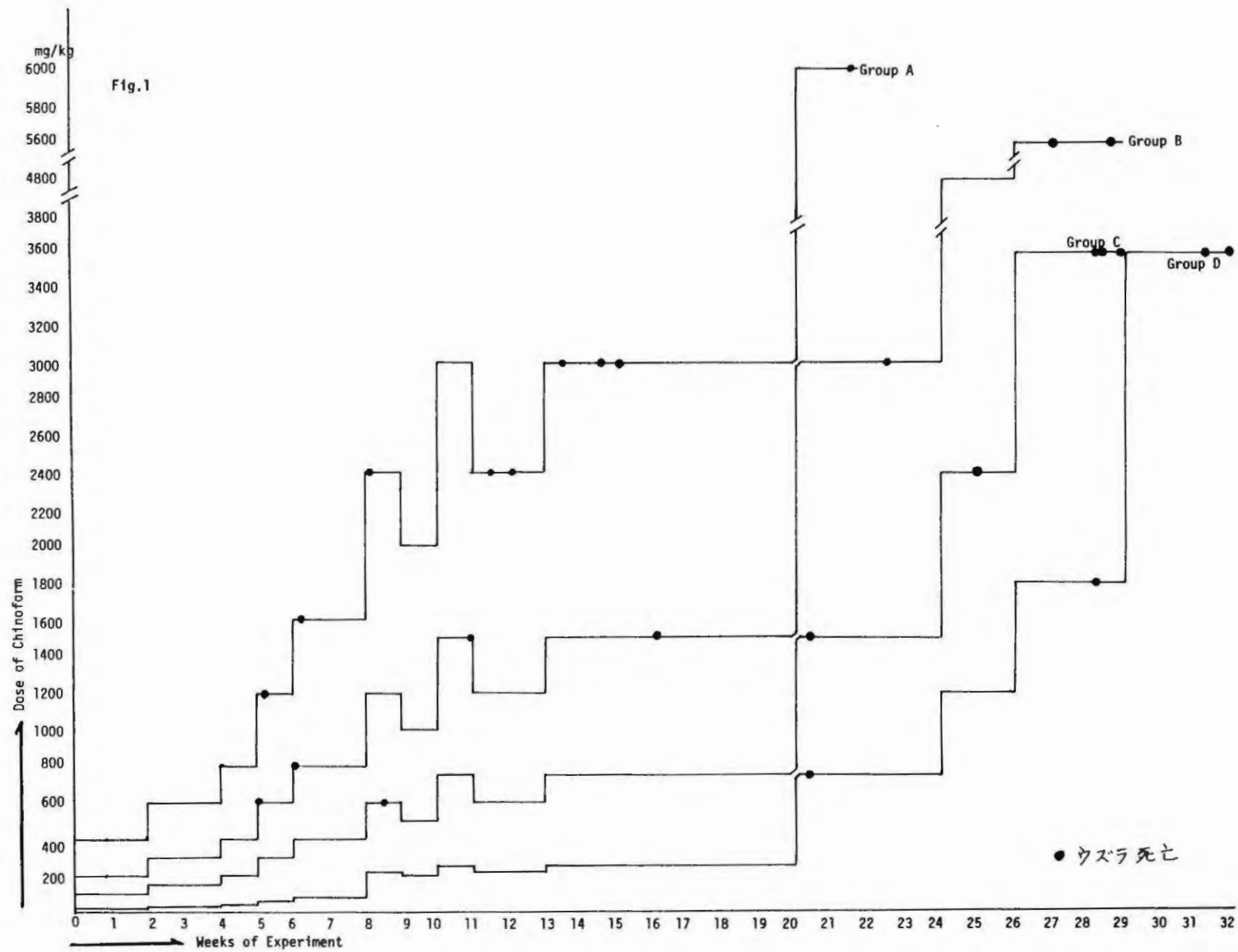
1) 発病状況

対照ウズラや発病前の正常ウズラは, 日中狭いケージの中を始終立って歩きまわり, ケージの外に出して追い立てれば低く飛ぶことがあるが, ニワトリの様に地上にうづくまることは少い。発病は, 運動が鈍くなり羽をふくらませてうづくまることで気付かれ, 体重が減少し, つかまえた時の脚の蹴りが弱くなる。後には全く坐ったままとなり, 首はよく動き, えさをついばむことは出来るが, 外へ出して追いたてても羽をバタつかせるだけで歩くことや立っていることは困難となる。次第に飼料の残量がふえ, 経口投与時開口を拒むようになる。この様な状態は, はじめて発病を疑い出してから一両日で到達することが多く, それが1~3日, 稀に1週以上つゞいて突然死亡するのが常であり, 病的状態のまま生き延びさすことは困難であった。発病はおおむね増量した1~2日目に認められることが多い。結局, 47年4月4日(D群%4)を最後に, 対照群を除いた全例が同じ様に発病してのち斃死(又は瀕死時屠殺)して実験を終了した。(Fig. 1の●印はウズラ死亡時を表す)

2) 発病-斃死と薬用量との関係

漸増投与を続けたところ, 散発的に病状を示すウズラが現れたが, その発病頻度はおおむね投与量の多いA群, 次いでB, C群の順に高く, 1, 2の例外を除くと, 任意の時期の積算発病例数はほぼA, B, C, Dの順に多い状態で経過した。

各ウズラの死亡時の1日投与量(final dose), 総投与量(cumulative dose)および投与期間等をTable 1に示した。漸増投与による“致死量”は, A群では1200~6000mg/



kg/day (1羽につき120~600mg), 5倍の個体差が示され, B群では600~5600 mg/kg/day で9.3 倍差, C群: 600~3600 mg/kg/day で6倍差, D群750~3600mg/kg/day で4.8 倍差があり, 全群を通じては600~6000 mg/kg/day で10倍差が示された。従って5~10倍程度の個体差があると判断される。又, キノホルムを漸増投与されたこれらウズラは半数が2400 mg/kg/day (1羽につき 1日240 mg) に達したところで死亡した結果になる。

Table 1

Final dose and cumulative dose of chionoform in each bird

Group No.	Final dose	Cumulative dose	Days of administration
A 1	1200 mg/kg/day	17800 mg/kg	37
" 2	2400 "	44200 "	57
" 3	2400 "	96800 "	80
" 4	2400 "	107800 "	85
" 5	3000 "	127000 "	95
" 6	3000 "	139000 "	100
" 7	3000 "	154000 "	106
" 8	6000 "	283000 "	151
B 1	600 "	7700 "	35
" 2	1500 "	43100 "	77
" 3	1500 "	86000 "	113
" 4	3000 "	159500 "	158
" 5	5600 "	263300 "	189
" 6	5600 "	313700 "	200
C 1	600 "	10450 "	60
" 2	1500 "	58750 "	142
" 3	2400 "	100450 "	175
" 4	3600 "	165250 "	198
" 5	3600 "	165250 "	198
" 6	3600 "	179650 "	203
D 1	750 "	12650 "	142
" 2	1800 "	65900 "	198
" 3	3600 "	127100 "	221
" 4	3600 "	134300 "	225

総投与量は, 予備実験のそれ(前述の通り2.4g~15mg)を含めて, 7.7g~313.7g/kg (1羽につき0.77g~31.37g)と大きく開いており, 投与ウズラの半数は総投与量12.7gで

死亡している。

3) 病理組織学的所見

屠殺又は斃死ウズラは、開胸、開腹および頭蓋切開を行ってのち、等張・中性ホルマリンに固定のち脊髄を脊柱に入ったまま取出して、イオン交換樹脂を沈めた5%蟻酸で脱灰したのち載断し、の諸臓器と共に型の如くパラフィンに包埋、標本作製した。H・E染色の他、神経系についてはロシアニン染色、ラクソール・ファスト青(髄鞘染色)とヘマトキシリンの重染色、およびHome法鍍銀軸索染色等を行った。

脊髄の所見は、上記の処置にも拘らず、大部分を占める死亡例では自家融解のため不明瞭又は全観察不能で、3羽の屠殺例と死后時間の短い少数例のみの検索を余儀なくされた。他の諸臓器もほぼ同じ状態であった。

ウズラの脊髄は人間や哺乳類のそれに比し各構成要素に量的差があることと、腰髄・背正中部に派(lumbo-sacral sinus)があることを除けば、ほぼ同じ部位に同じneuronや線維が位置しており、大よそ同じ目での検索が可能の様である。その結果、脊髄には、病状から期待されたものより軽いが、ほぼ人体SMON例と対比出来る所見が得られた。すなわち、主として後索知覚路に一致して、左右対称性の軸索変性が認められた(Fig. 2-4)。この変化はGoll束に相当する正中寄りの部分により強く、Burdach束に相当する側方寄りではより軽いが、全体としての変化が軽いためか、両者の境界は不明瞭である。強拡大で軸索染色標本をみると、軸索が変性-膨化して消失に至る過程が認められる(Fig. 4)。その他、側索(Fig. 5)や前索(Fig. 6)の運動領にも軽微な変化がみられるが、後索(Fig. 3)に比しはるかに軽く、病変は知覚路に優位に認められた。なお、これら病変はまだ初期の段階にあり髄鞘変性には至っていない。その他、標本に現れた後根神経線維や神経節にも変性や細胞脱落を示すものがあり、ところによりリンパ球様細胞浸潤をも認めた。しかし、より上位の中樞神経系を含め、髄鞘変性又は炎症性病変はどこにも認められない。末梢神経は末検索であり、内臓諸臓器には一定の所見は認められていない。

V 考 按

ウズラを用いて人間のSMONを再現する試みを行ったについては、第一に動物種選定の問題がある。著者らがウズラを用いたのは、緒言に述べた通り、キノホルムをニワトリに投与して有望な所見²⁾が得られたとの報告に刺戟され、又、当研究室での便宜をも考えてのことである。

実験の結果はすでに述べた通り、種々の点でSMONと対比出来る所見を示しつつも、他方多くの不備もおおむべくもない。その中、生前の病状については、小動物では観察が限られており、殊に知覚異常の立証は不可能に近い。しかし客観的に認め得た脚の運動障害は殆どのウズラに共通してみられ、頸や羽の動きと比べると単なる全身衰弱の部分現象とは異り、一応陽性所見として採り得ると思われる。しかし、眼の症状を備えた例が遂に得られなかったのは、ウズラとしては実験期間が充分でないまゝ死亡したためかもしれない(後述)。この経過の短かさは、病理所見にも大きく影響してい

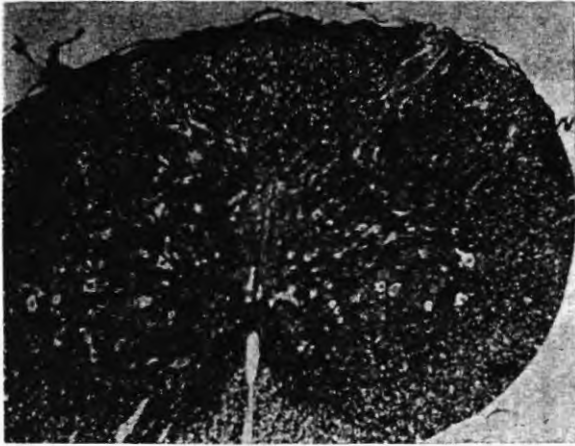


Fig. 2
 ウズラB群№3 頸髄
 (LFB+HE染色) × 40

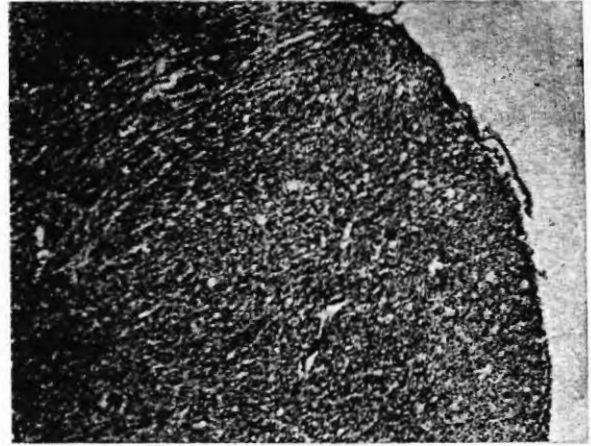


Fig. 5
 ウズラB群№3, 頸髄側索
 (LFB+HE染色) × 100

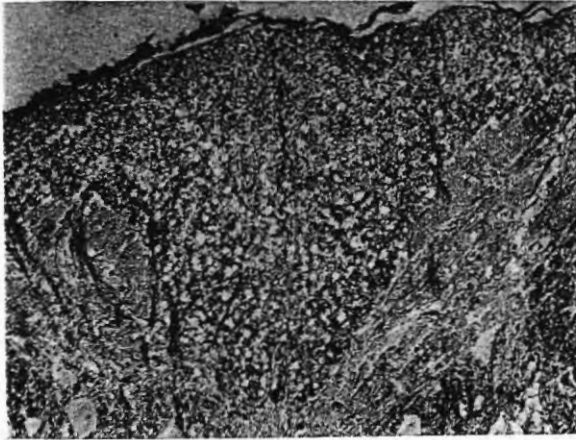


Fig. 3
 ウズラB群№3, 頸髄後索
 (LFB+HE染色) × 100

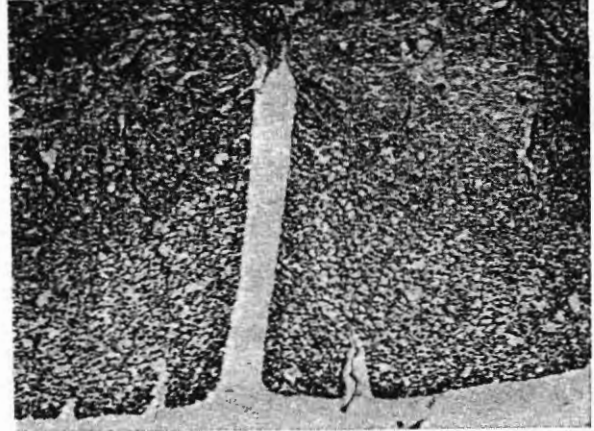


Fig. 6
 ウズラB群№3, 頸髄前索
 (LFB+HE染色) × 100

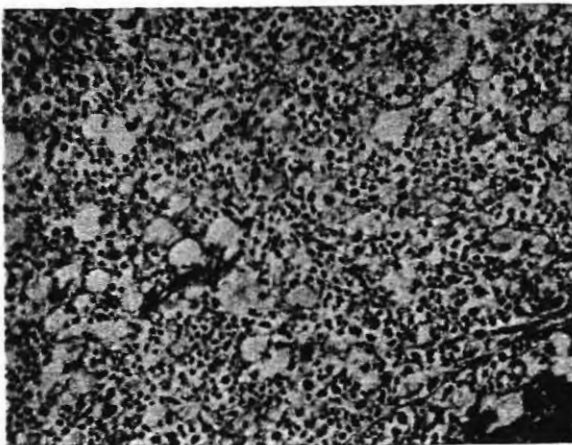


Fig. 4
 ウズラB群№3, 頸髄後索
 (Himes法軸索染色) × 400

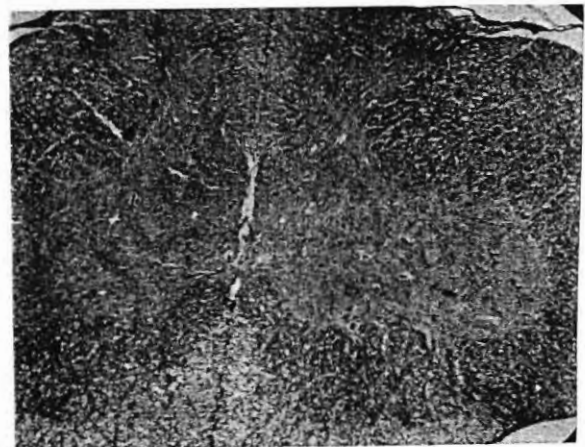


Fig. 7
 対照ウズラ№1, 頸髄
 (LFB+HE染色) × 40

る。

S M O N の病理所見について、スモン調査研究協議会病理部会では、全国から剖検例を集め、部会員の検討を経て、S M O N 病変の診断基準を定めた。うち必発の所見としては、末梢神経および脊髄長索路の、左右対称性の性があり、知覚路優位で且つ末梢寄りに強い、という原則をもつことが挙げられている。¹⁰⁾

この所見を実験的に再現するに当っては、第一に病変が質的に neuron の変性であること、第二に病変の特有な局在、との2点について本質的な一致が必要であらう。一方では、一次性脱髄や炎症や、他の病機が認められないことも要求される。

この様な原則的立場のみから言えば、上述の実験ウズラでの所見は矛盾するところはない。しかし何分、定型的な S M O N 剖検例やイヌなどの実験での所見に比べると、変化は総じてはるかに軽い。また眼の所見はみられなかった。

ウズラで観察されたこれらの所見程度の変化を S M O N 症例に求めると、全国から集めた S M O N 剖検例のうち、明らかに S M O N であるとされた 114 例中の軽症例を挙げることが出来よう。これは症例 № 10 (9 病日)、№ 11 (1 ヶ月)、№ 25 (3 ヶ月)、№ 27 (40 日)、№ 32 (9 日)、№ 48 (1 ヶ月)、№ 61 (記載なし)、№ 99 (25 日)、№ 102 (19 日)、№ 111 (28 日)、№ 136 (1 ヶ月) の 11 例で、これらの所見は Fig. 8-11 に代表される様に、前記の診断基準を辛うじて最少限に備えているにすぎず、まだ髄鞘変性や修復の所見の少ない、軸索変性のみの変性であることが多い。以上の例は、1 例を除き、すべて 1 ヶ月半以内の比較的経過の短い例である。全 S M O N 剖検例 114 例のうち、1 ヶ月半以内の例は僅か 17 例、1 ヶ月以内の例は 11 例で約 1 割にすぎないことから、ここに挙げた 11 例は特に経過の短い例である。典型的所見を備えた例は殆どが発病後 3 ヶ月以上を経た例であり、殊に視神経に所見を認めた例は、組織検索例 69 のうち 28 例 (55.1%) で、すべて 2 ヶ月半以上を経過しており、それ以前の例には明らかな所見を欠いている。臨床所見について記載のあった 94 例中、視力障害の記された例は 65 例 (69.1%) で、これら死亡に至った、重症に属すると思われる例ですら、1/3 乃至半数は視力障害や視神経の所見を欠いている様である。

人体剖検例の大多数が、数ヶ月から年余に及ぶ経過を経て死亡していることに比すれば、著者らのウズラでの実験は、S M O N の再現としては先ず病日が不足であったのではないかと考えられ、病変の軽いことも当然の結果と考えねばならない。

最後に、薬用量という点で、人体に投与され発症した際のキノホルム量に比して多すぎるといふ疑問が残る。通常、薬理作用の実験では個体差に 10 倍、種属差に 10 倍程度の考慮がなされると言う。ウズラでのキノホルムによる発病一致死量には、個体差が 5~10 倍あった。ヒトとの種属差は、人体へのキノホルム製剤の 1 日投与量 2~3 g (キノホルム量: 1.2~2.7 g) が、患者体重 50 kg として 24~54 mg/kg にあたるのに対して、ウズラの最少発症量 600 mg/kg はヒトの 11~25 倍に相当する。この場合、ヒトでの発病は知覚異常で知り得るのに対し、ウズラではより重症に相当

する運動障碍の起った時点ではじめて認められることをも考慮して、本実験での「発症時」投与量は、実は多すぎ、増量は急ぎすぎたため、死亡を早めたということになるかも知れない。一旦「発症」を認めてからは薬を増量することを控え、延命に努めたが余り成功しなかったことも量の多さのためと見られるデータである。運動障碍を指標として発症をみる限り、ウズラでの発症量と致死量との開きはかなり狭いもの様である。

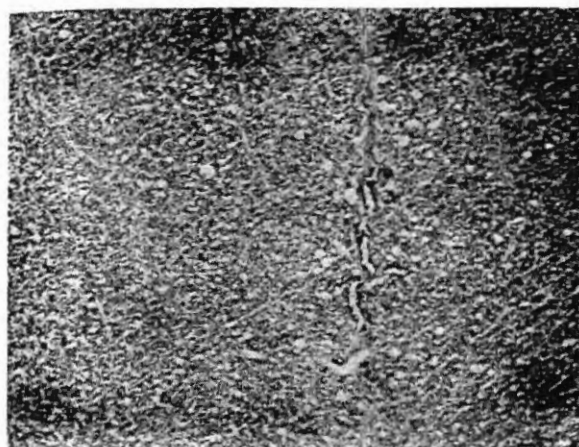


Fig. 8
 人体S MON例(№.11, 17才女, 経過
 1月) 頸髄後索Golgi束
 (LFB+HE染色) × 40

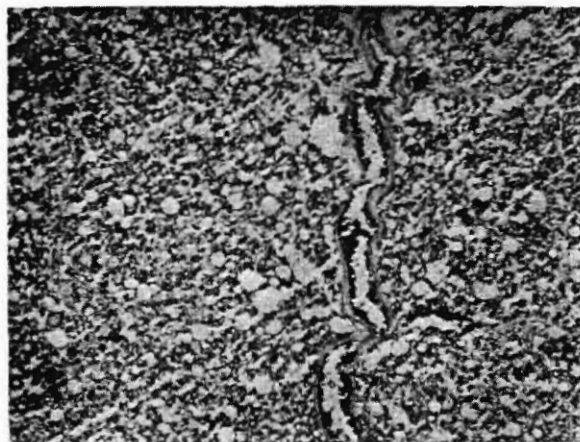


Fig. 9
 №.8の強拡大(LFB+HE染色) × 100

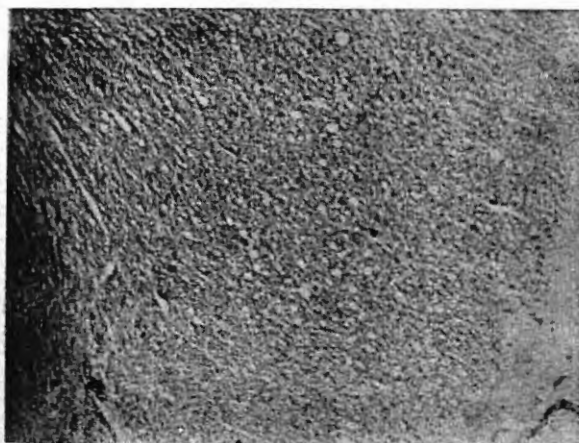


Fig. 10
 人体S MON例(№.11, 17才女, 経過
 1月) 腰髄側索錐体路
 (LFB+HE染色) × 40



Fig. 11
 №.10の拡大(LFB+HE染色) × 100

V まとめ

ウズラを用いたキノホルム投与実験で、患者に投与された量に準じた一定量の長期投与では陰性であったが、漸増投与して、平均2400mg/kg/dayの大量のキノホルムで、全例が肢の運動障害を

主徴として発症，斃死又は瀕死時に屠殺され，病理組織学的に，軽症乃至早期のSMONに一致す所見が得られた。

文 献

- 1) 井形昭弘，豊倉康夫：キノホルムによる神経系障碍に関する研究—キノホルム静注家兎における末梢神経障碍；医学のあゆみ，75，309—310，1970
- 2) 池田良雄，戸部満寿夫，鈴木康雄，小林和雄，鈴木幸子，川崎靖：キノホルム毒性に関する研究；スモン調査研究協議会報告書，№3，190—199，1971
- 3) 立石潤，池田久男，斎藤章，黒田重利，早原敏之，大月三郎：SMONと同一の脊髓後索変性を示した慢性キノホルム中毒犬；医学のあゆみ，77，205—206，1971
- 4) 立石潤，黒田重利，斎藤章，大月三郎：純系ビーグル犬におけるキノホルム経口投与実験；医学のあゆみ，81，770—771，1972
- 5) Kappers, A., Huber, G.C. & Crosby, E.C.: The comparative anatomy of the nervous system of vertebrates, including man, vol. 1, 202—220 (the spinal cord of birds), HAFNER Publishing Company, New York, 1960
- 6) 松山春郎，小川恵弘，仲村禎夫，秦順一：SMONの病理；最新医学，24，2469—2478，1969
- 7) 白木博次，小田雅也：“SMON”の神経病理学；最新医学，24，2479—2509，1969
- 8) 小川勝土，堤啓，元井信：岡山地方のSMON剖検例；スモン調査研究協議会研究報告書，№4，18—48，1971
- 9) 小宅洋：SMONの病理組織学的研究；スモン調査研究協議会研究報告書，№4，49—58，1971
- 10) スモン調査研究協議会病理部会：全国SMON剖検例の組織学的検討・同報告書，№10，1972

9. キノホルムによると思われる肝内閉塞性黄疸

志方 俊夫, 遠藤 久子

(東大病理)

藤原 研司, 堺 隆弘, 織田 敏次

(東大・第一内科)

最近 S M O N がキノホルム中毒であるという考え方が強くなるにつけ、肝におけるキノホルムの代謝、排泄などが問題になっているが、これとは別に人体例で肝内閉塞性黄疸を伴う肝傷害がおそらくキノホルムにより起こることをわれわれは見出した。これは従来から肝内閉塞性黄疸の成因を検索していたところ、たまたまその一症例が S M O N 様の神経症状を起こしたことから知られたのである。¹⁾ この症例の肝臓からキノホルムが検出され、同様な肝内閉塞性黄疸を示した他の 3 例でもキノホルムが証明された。これら 4 症例の臨床症状および肝組織像には共通の所見がある。キノホルムの分析は東京大学薬学部薬品分析化学、田村善蔵教授のもとでガスクロマトグラフィーで行なわれた。

これらの症例のうち 3 例は、それぞれ異なった慢性肝疾患の経過中に肝内胆汁うつ滞型の黄疸をきたし肝機能不全で死亡した。²⁾ この肝疾患は慢性肝炎、乙型肝炎硬変、脂肪性肝硬変がそれぞれ 1 例ずつである。残りの 1 例は咽頭癌の末期に同様な肝内閉塞性黄疸をきたし死亡した症例である。

この 4 例の肝組織は組織学的にひとつの特異なパターンを示した。すなわち 4 例とも肝外胆道には閉塞を思わせる所見はなく、組織学的にはそれぞれ異なった原疾患(慢性肝炎、乙型肝炎硬変、脂肪性肝硬変)が見られるが、その上加わった変化は共通である。つまり小葉内では程度の差はあるが、肝細胞の空胞変性、とくに核に隣接した部位の空胞形成、Kupffer 星細胞の泡沫細胞化がみられる(図 1)、この所見は実験動物にキノホルムを大量に投与した時の所見と同様な変化である。⁴⁾ 小葉または偽小葉の周辺部では小胆管の増生とそのあるものの内腔の拡大、胆汁栓の形成、小胆管周囲における好中球を交えた炎症性細胞反応が認められる(図 2)。胆汁栓の中には普通みられる黄緑色の胆汁栓のほかエオジンで均質に染まるもの、およびヘマトキシリンで青く染まる細顆粒状の物質も認められた。動物にキノホルムを投与した場合かかるいわゆる小胆管炎の像は認められなかった。ただ四塩化炭素とキノホルムを同時に投与すると小胆管増生がみられるが、四塩化炭素単独投与の場合との位差があるのか疑問である。

以上の所見から、キノホルムは既存の肝疾患、あるいは重篤な全身性変化があると肝内胆汁うつ滞の傾向を示す肝傷害を起こし組織学的には肝細胞の空胞変性といわゆる小胆管炎 cholangiolitis の像を示すようである。S M O N の患者で臨床的に若干肝臓機能異常を示すことがあってもこのような強い肝傷害を起こす症例が少ないのは、健全な肝臓ではキノホルムを代謝、排泄する能力があるが、既存の肝疾患があるとその代謝も障害されているためにかかる病変を引き起こすものと思われる。

肝内閉塞性黄疸の成立機転、あるいはいわゆる小胆管炎の病変については、肝細胞の障害が原発性で、胆汁酸組成の変化から胆汁のミセル構造が変わり、そのため二次的に小胆管に胆汁うつ滞と炎症性病変を引き起こすという考え方があるが、キノホルムの場合肝細胞の変化もかなり特徴的で強い³⁾。また肝細胞の変化は動物実験の所見と一致する。動物の肝細胞では電顕的に、ミトコンドリアの膨化とクリステの消失、小胞体の拡大、核周辺の空胞形成、キノホルムの結晶と思われる物質の沈着、疎面小胞体の増生などがみられた⁴⁾。

なおこの4症例では肝以外では脾にいずれも著明な変化がみられた。

文 献

- 1) 井形昭弘, 藤原研司, 西忠博, 島山正己: 肝および腎にキノホルム沈着をみた1症例(予報), 医学のあゆみ, 75, 491, 1970
- 2) 藤原研司, 堺隆弘, 兼高達式, 鈴木宏, 織田敏次, 志方俊夫: 肝硬変に見られた著明な肝内胆汁鬱滞とその成因に関する考察, 肝臓12, 458, 1971
- 3) Popper, H. & Schaffner, F.: Pathophysiology of cholestasis. Human Path., 1, 1, 1970
- 4) 志方俊夫, 藤原研司, 遠藤久子, キノホルムによる肝傷害の病理, 肝臓13, 497, 1972

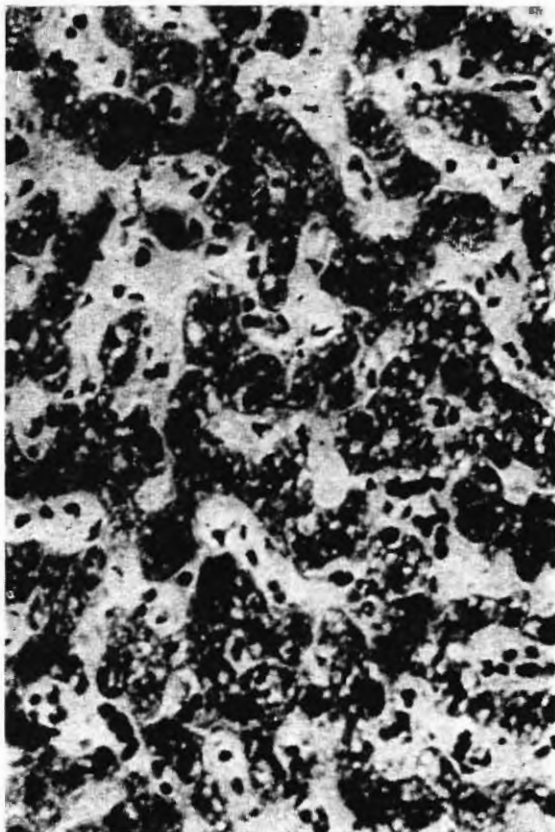


図 1

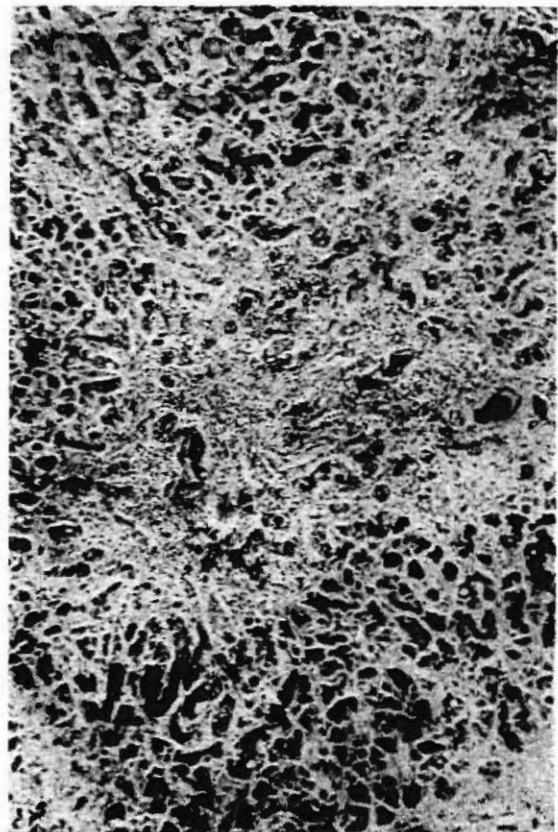


図 2