19. Gunn ratに対するChinoformの長期投与成績

小坂　淳夫，　島田　宜浩，　福原　純一
窪田　政寛
（岡山大・医・第一内科）

Ⅰ 目 的

経口投与されたchinoformの一部は消化管より吸収された後に体内での代謝過程を経て，尿，尿中に排泄される[1)]。この際は肝臓におけるグルクロン酸抱合が，もっとも重要視されている。一方，ＳＭＯＮの病因としてchinoform中毒説が報告されているが，この場合は非抱合の遊離chinoformが問題になっている。したがって，グルクロン酸抱合能が殆んど欠如し，黄疸を有するGunn ratにおける実験は極めて意義のあるものと思われる。以上のような考えから，以下の３つの実験を行った。

Ⅱ 実験方法

実験１　chinoform投与Rat の成長曲線について

方法：使用したRat は昭和４５年１１月１７日生の同腹のGunn ratであり，里帰りした１匹の白鼠と９匹のまだらRat（非黄疸）を含み，雌４匹，雄6匹であった。そのうち，雌1匹と雄2匹を選びChinoformを投与した。

Chinoformはエマホルムとして６０㎎／体重１０００ｇを粉末飼料に混じて投与した。飼料は予め摂取状態を調べ，体重の変化に応じて３日毎に飼料中のChinoform含有率を調整し，投与量の誤差はほぼ１０％以下にとどめ得た。

飼育状態：Rat は常に１７～１８℃に調整された動物室において飼育した。

実験は昭和４６年1月５日に開始し，６日目より上記の如く３週間Chinoform投与を続け，連日ないし3日目毎の午後に体重を測定し，毛並み，便ならびに全体の健康状態を観察した。

実験２　Rat 体内でのChinoform滞溜状態の変動について

方法：使用したRat は昭和４５年１１月１７日生の雄1匹と昭和４５年９月２２日生の雌1匹合計２匹のGunn rat 黄疸例と昭和４５年９月２２日生の雄1匹，昭和４５年１０月１１日生の雄1匹，雌1匹，昭和４５年１１月１７日生の雄1匹合計４匹の非黄疸Gunn rat に昭和４６年1月７日生の雌1匹と昭和４６年1月１１日生の雄1匹の計２匹のGunn rat より里帰りした白鼠を用い，実験１と同様の投与法で昭和４６年３月１５日よりエマホルムを全例に投与開始した。また，エマホルム投与中の昭和４６年６月２２日より^{125}Ⅰ Chinoformを上記飼料に混入し，whole body countingにより，ファントームにした１０ｇの飼料との測定比から，各Ratの体内Chinoform 停滞量を計算した。投与期間は１６日間である。測定は毎日午後８時～１０時に行なった。

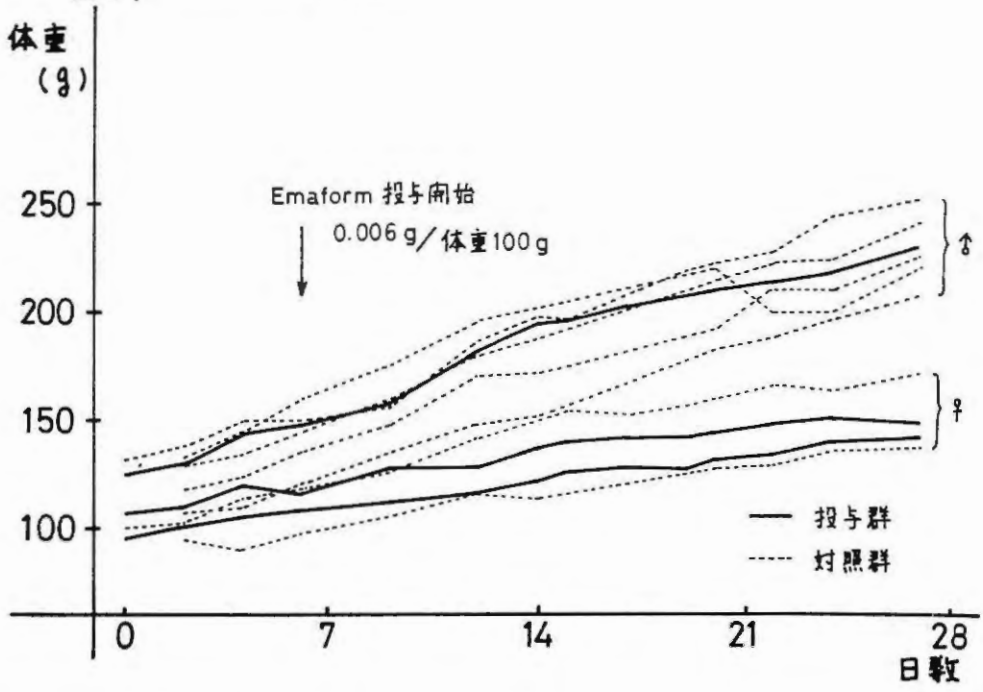
実験３　Chinoformを１年間連続投与したRat の臨床的変化の観察

実験２の終了後，さらにエマホルムの投与を続け，１年間飼育し，長期間のエマホルム投与中における全身の健康状態の変動を観察した。

Ⅲ　結　果

実験１：図１に示される如く，３週間の成長曲線において雄群，雌群ともに投与群と対照群の間に

図１．　Gunn rat成長曲線



は，成長状態に有意の差は認められなかった。また臨床上見るべき変化はいずれの群においても認め得ず，３週間後，歩行跳躍および水中遊泳時間においても差がなかった。

実験２：Chinoform含有飼料による飼育は３カ月を越えたが，病的状態はいずれのRat にも見出し難く，黄疸Gunn ratにおいて特別発育の悪い傾向はなかった。^{125}Ⅰ Chinoform投与による成績は図２の如くで，投与開始後ほゞ４日目より平担となり，Gunn rat 黄疸例ではやゝ高値の体内保有傾向を投与終了まで持続した。投与終了後は急速に下降し，中止３日後にはほゞ前値に復したが，Gunn rat 黄疸例でわずかに下降の遅延傾向が認められた。

実験３：Chinoform含有飼料による１年間の飼育の結果については，全Rat は極めて健康で，毛並み，運動状態，飼料摂取状態などに病的所見はみられず，全例が順調に生存し得た。また，黄疸gunn ratの２匹も同様であり，特別の差異はなかった。

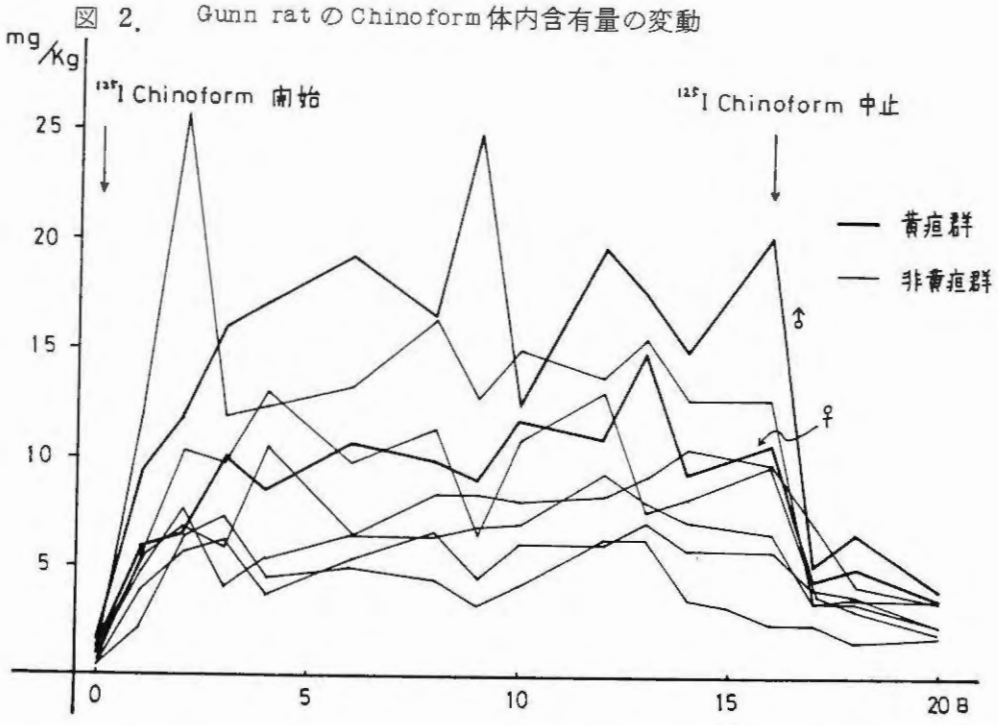
Ⅳ　断　案

黄疸例では，グルクロン酸抱合能が殆んど欠如している Gunn rat を用いて，Chinoform投与実験を行ない以下の結論を得た。

1）成長曲線について：里帰りした白鼠１匹を含む，10匹の非黄疸 Gunn rat（雄6匹，雌4匹）を

用い，そのうちの3匹（雄1匹，雌2匹）にChinoformが90%に含有されるエマホルムを60㎎／体重1000ℊの割合に投与し，4週間の成長状態を検討した。その結果，投与群の3匹の体重増

図 2.　Gunn ratのChinoform体内含有量の変動



加はいずれもコントロール群と差がなく，また，歩行，跳躍，水中遊泳時間にも差がなかった。

2）Chinoformの体内滞溜状態：雄雌各1匹の黄疸Gunn rat，雄3匹，雌1匹の非黄疸Gunn ratおよびGunn rat より里帰りした白鼠雄雌各1匹の合計10匹を用いてエマホルム60㎎／体重1000ℊを長期間連続投与しているが，投与開始より4ケ月後に^{125}I Chinoformを飼料に混入し，whole body countingによりChinoform の体内滞溜状態を検討した。その結果，放射性Chinoformの体内滞溜量はいずれも投与開始後，最初は次第に増加し，4日目より平担になり，投与中止後急速に下降した。この際に黄疸Gunn rat の2匹では他の例よりもやゝ高値で平担となり，投与中止後の下降にもやゝ遅延の傾向があった。この成績は黄疸Gunn ratの成績をも含めて，長期連続投与においても体内のChinoform量は一定のレベルに保たれ，次第に増加し続けるものではないことを示している。

3）12ケ月連続投与：上記2）に記載した10匹のrat を対象として同量のChinoformの投与を続け，投与開始より12カ月間観察した。その結果，黄疸Gunn ratを含む全例に，毛並みの変化，成育の遅延，その他臨床上病的と見做される所見はなく，全例健康なまゝ12カ月を経過したと判定された。

4）以上1)，2)，3）に示すように，黄疸例ではグルクロン酸抱合能がほとんど欠如しているGunn rat を用いた実験においても，放射性Chinoformの体内滞溜状況がやゝ高い傾向を示したのみで，成長曲線および12カ月の長期投与実験の結果から，Chinoform中毒を示す所見は全く得ら

れなかつた。

文　献

1) 島田宜浩ほか：Chinoformの吸収ならびに排泄の状態．1971．医学のあゆみ．78：83
2) 小坂淳夫ほか：SMON患者の肝機能成績ならびにGunn rat に対するキノホルム投与実験．スモン調査研究協議会（昭．46年3月12日，東京都市センター）49席，53頁．
3) 小坂淳夫ほか：Gunn rat に対するキノホルムの長期投与．スモン調査研究協議会（昭．46年7月24日，東京都市センター）18席。

20. スモンの病理学的研究
キノホルムの組織化学的証明について

武内　忠男，桜間　信義，　三隅　哲朗

（熊本大・医・病理学第二講座）

1　緒言

Subacute myelo-optico-neuropathy　（ＳＭＯＮ）の原因は，多くの人々の研究によりキノホルムによるものであるらしいことがわかってきたが，動物における再現性と，患者の材料からキノホルムを実証検出することの必要性が要求された。他方その原因がキノホルムとすれば，スモンの病理学的変化がどのような作用機序によって起るか検討する必要がある。そこで私共は，キノホルムの組織化学的証明法を考案し，これを応用して臓器組織内の当該物質の検出を試み，その組織内分布を明らかにし，その病理解明の手がかりを得ようと企画した。

そのために，先ず手初めとして，第１に，合成chinoform glucuronide[3)]を酵素基質として，組織細胞内のβ－glucuronidaseの作用を応用し，それにより組織化学的に分解させたキノホルムを組織細胞内に沈着させ，その切片を使用して，顕微鏡的に可視下にもってくるという方法を試みた（図１）。そして，その組織化学的方法が確実にキノホルムを証明しているということを確めた。次いで，第２に^{131}Ｉ－chinoformをうさぎに経口投与し，その臓器組織におけるキノホルムの分布をみるために，^{131}Ｉ－chinoformのオートラジオグラフを試み，実際の中毒におけるキノホルムの組織内分布との比較を可能にした。第３に，考案した方法を用いてキノホルム中毒に応用してみた。

実験材料およびキノホルムの組織化学的証明法について。

（Ｉ）実験材料

1) β－glucuronidaseを用い組織化学的方法でキノホルムを沈着させた切片の作製。

合成chinoform glucuronide１０㎎を0.1 ＮNaOH2滴を加えた留水１０㎖に加温しながら溶かす。室温で冷却後 0.1 ＮHCl で pH 7.0 に補正する。この液をＡ液とする。Ａ液１０㎖に pH 5.2 のacetate buffer １０㎖を加え酵素基質液とする。

うさぎを断頭し，瀉血後新鮮肝組織切片をとり出し，１５～２０mμのクリオスタット切片を作る。未固定切片あるいは瞬時アセトンで固定した切片を３７℃，１時間前記基質液に作用させる。留水で水洗し，この切片について，キノホルムの組織化学的証明法の確立を試みることにした。

2) ^{131}Ｉ－chinoformを経口投与したうさぎの組織切片作製。

体重1100gmから1300gm のうさぎを用い，2.9μci（２３㎎）／100gmの^{131}Ｉ－chinoform を経口投与し，投与後１，２，４時間してと殺した。肝，腎，坐骨神経，脊髄をとりだし，ホルマリン固定の後，dipping 法によりＮＲ－Ｍ２乳剤（サクラ）を用い

マイクロオートラジオグラフを作製するとともに，同じ連続切片を用いて，キノホルムの組織化学的証明法を試みた。

3) キノホルム中毒うさぎの組織切片について。

初回量４０㎎／Kgで与え始め，漸増し，最終量１６０㎎／Kgで，８４日目で死亡し，総量19.1ｇのエマホルム（キノホルムを９５％含有）を与えたうさぎの肝を用いて，キノホルムの組織化学的証明法を試みた。

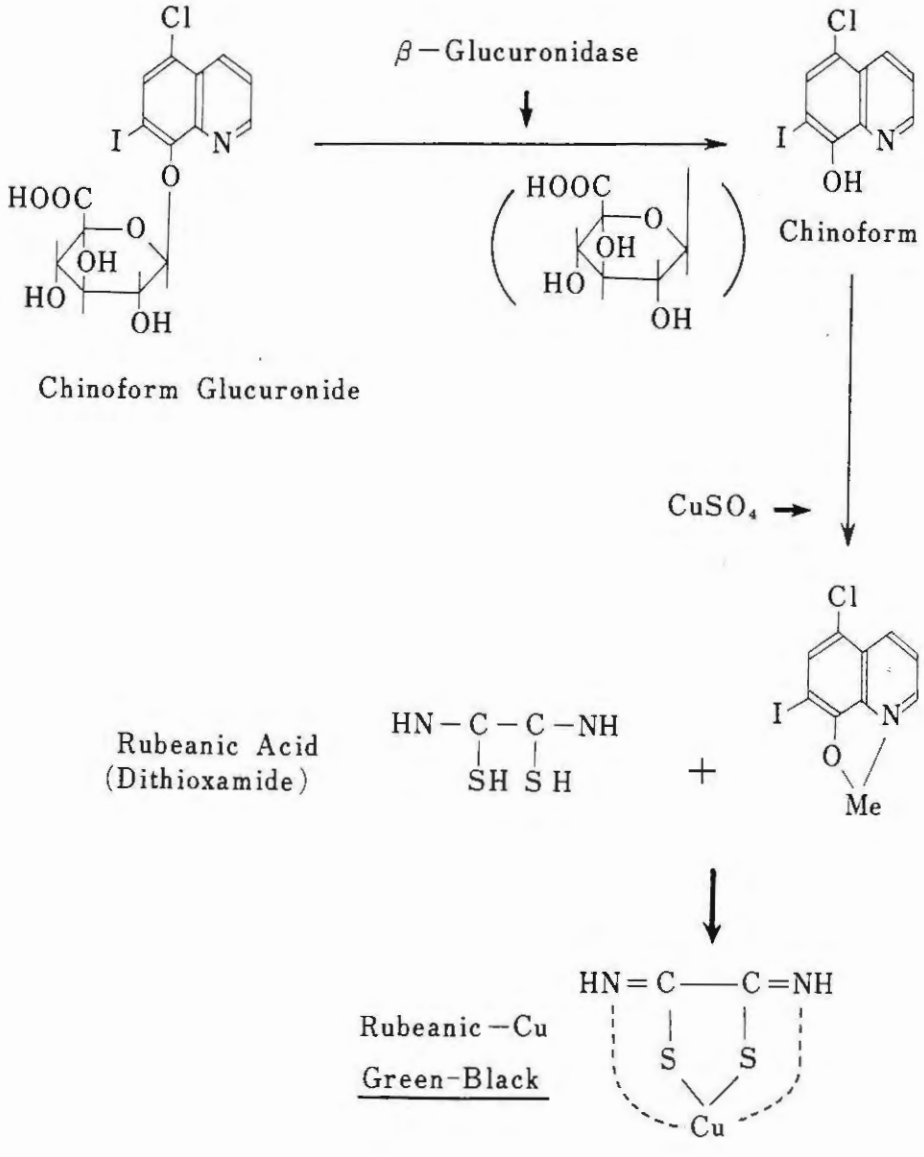


図１．　β-glucuronidaseにより組織化学的にキノホルムを沈着させた切片について、銅塩を用いるキノホルムの組織化学的証明法の原理

Ⅱ）キノホルムの組織化学的証明法について。

オキシンの誘導体であるキノホルムを，組織化学的に証明するには２つの方法があると考えられる。の１つは，適当な金属をキノホルムとキレートまたは結合させて，これを組織細胞内に沈着させ，

沈着した金属をその金属の組織化学的証明法により証明することにより，キノホルムを間接的に証明する方法である。他の１つは，キノホルムを適当な金属とキレートさせて組織に沈着させ，適当なpHの下で起る螢光を螢光顕微鏡で観察し，キノホルムの存在を確かめる方法である。これら二つの方法論にしたがい，キノホルムの組織化学的証明法を考案することにした。

キノホルムと金属は溶液の状態においてのみキレートまたは結合する。したがって，溶媒を選ぶことは重要な条件となる。選んだ溶媒中でキノホルムとキレートまたは結合しうる金属を選ぶことが次に重要な条件である。金属をキレートまたは結合させキノホルムを組織化学的に証明する方法においては，まずキノホルムが溶解しうるいくつかの溶媒を選び，試験管内でこれらの溶媒中にとかしたキノホルムと金属の反応を調べた。次に選んだ溶媒の中にキノホルムと結合しうる金属を溶かし，上に述べた実験材料の切片をこの中に浸漬し，金属をキノホルムと結合させ組織細胞に沈着させ，その金属の組織化学的証明法によりこの金属を証明した。この様にして，金属塩を用いるキノホルムの組織化学的証明法の条件を確立し，上に述べた実験材料の切片を用い，さらにその有用性を確かめていった。

螢光を用いる組織化学的証明法においては，西川[1]にしたがい酢酸を溶媒に用いた。試験管内で，キノホルムと金属を酢酸にとかし，それらのキレート物をつくり，その沈澱物をろ紙でとり，いろいろなpH においたあと，螢光顕微鏡で観察した。最も強い螢光を発する金属を用い，螢光を用いるキノホルムの組織化学的証明法を確立した。さらにこの方法の有用性を上に述べた実験材料の切片を用いて確めた。

Ⅲ 成 績

（A）キノホルムの組織化学的証明法について。

Ⅰ）金属塩を用いる証明法について。

(1) 溶媒について

キノホルムはエタノール，メタノール，酢酸，クロロホルム，Tween等に溶解するが，水には殆んどとけない。その中でTween８０へのキノホルムの溶解量が不明であったので，実験を行って調べたところ，１ρのキノホルムはふっとうしたTween８０，２１$m\ell$に溶けることがわかった。

キノホルムがよくとけ，しかも組織への影響の少いアセトン，酢酸，Tween８０を溶媒に選び実験を行ったところ，Tween８０で最も良い結果が得られた。

(2) 金属塩について。

表１にしめしたように，Tween８０中でのキノホルムと金属の反応をみてみた。金属塩の内，銅，鉄，銀および水銀がキノホルムと結合した。その内，銅，銀および水銀との結合物は沈澱を生じたが，水銀はキノホルムとの反応が遅く，組織化学には不適当であることを知った。鉄との反応は非常に早いが，沈澱物を作らないので，これも不適当ではないかと考えたが，β

－glucuronidaseを用い組織化学的方法でキノホルムを沈着させた切片において，きわめて微量の鉄塩でもよい結果が得られた。

表1　Chylating Agents for Chinoform dissolved in Tween 80

Chemicals	Solubility in Tween 80	Precipitation	Coloration of Reaction
$MgCl_2$	good	−	non
$ZnCl_2$	〃	−	non
$Co(NO_3)_2$	〃	−	non
$FeCl_3$	〃	−	green
$P_2O_5 \cdot 24WO_3$	〃	−	non
$HgCl_2$	poor	++	yellow
$SnCl_2$	good	−	non
$AgNO_3$	〃	+++	yellowish
$BaCl_2$	〃	−	non
$CuSO_4$	〃	++	yellow
$NiCl_2$	〃	−	non
$K_2Cr_2O_7$	〃	−	non

(3)　Tween８０の濃度について。

Tween８０の濃度が高ければ高い程キノホルムの溶解度も高くなり，金属との化合物も多くなることが考えられる。しかし，濃度が高くなれば，組織への影響は悪い。そこで比較的濃度の低い４%，６%，８%，１０%，１２%，１６%の濃度のTween８０について調べたところ，１０%，１２%，１６%のものはほぼ等しく良い結果が得られたので，１０%Tween８０溶液を用いる事にした。

(4)　硫酸銅，塩化第２鉄，硝酸銀の濃度について。

金属塩が１０%Tween８０中に飽和に近い量で溶けている程，その金属とキノホルムとの化合物は多くなると考えられる。しかし，鉄塩の濃度はあまり高いと組織への不定沈着があり，コントロールにも沈着した鉄が観察され，量が多ければかえってよくないことがわかった。実験の結果，鉄塩の濃度は5×10^{-2} mM 以下の塩化第２鉄で充分であった。硫酸銅，硝酸銀の量は，１０%Tween80 に飽和量に近いと考えられる３ mM が適当である事がわかった。

以上の成績より，以下述べる３つの金属塩を用いたキノホルムの組織化学的証明法を確立した。

a)　銅塩を用いるキノホルム証明法。

1) 資料切片を3mM $CuSO_4$ を溶かした１０％Ｔｗｅｅｎ８０液中に２時間浸漬。

2) 流水で３０分程水洗。

3) 留水で水洗後新しく作った次の液に３７℃で１２時間作用させる（容器は密栓して使用）。

0.1 %ルベアン酸無水アルコール溶液…２－５㎖

１０%酢酸ナトリウム水溶液……１００㎖

4) 水洗。

5) ケルンエヒテロートで対照染色。

6) 脱水，キシロールで透徹後中性バルサムで封入する。

結果：陽性反応は緑色を帯びた黒色を呈する。

註釈：この方法は特異性が高い。しかし，もともと組織内に銅がないことを組織化学的に証明されている場合にのみ有効である。銅が証明される場合は稀であるが，銅が証明された場合は他の方法を併用するとよい。

b) 鉄塩を用いるキノホルム証明法。

1) 資料切片を5×10^{-2} mM $FeCl_3$ を溶かした１０％Ｔｗｅｅｎ８０液の中に１時間浸漬。

2) 再蒸留水で充分洗う。

3) ２%フェロシアン化カリウム，１%塩酸等量混合液に１５～３０分間入れる。

4) 再蒸留水で洗う。

5) ケルンエヒテロートで対照染色。

6) 脱水，キシロールで透徹後，中性バルサムで封入する。

結果：陽性反応は青藍色を呈する。

註釈：この方法は組織内にもともと鉄が存在していないことを組織化学的に証明されている場合にのみ有効である。鉄を含む物質としてヘモジデリンが組織内に存在する場合が多いが，この場合は５%修酸水溶液３時間処理の後この方法を行えばよい。さらになお鉄が証明される場合は他の方法を併用する。

c) 銀塩を用いるキノホルム証明法。

1) 資料切片を3mM 硝酸銀を含む１０％Ｔｗｅｅｎ８０液の中に２時間浸漬。

2) 再蒸留水でていねいに洗う。

3) 新しく作った次の液に３７℃で２～５時間入れる。

0.1% ルベアン酸無水アルコール溶液…２～５㎖

局方アンモニアの１００ 倍稀釈液……２～５㎖
（局方アンモニア１ ：水９９）
留水……１００㎖

4) 水洗。

5) ケルンエヒテロートで対照染色。

6) 水洗。

7) 脱水，キシロールで透徹後，中性バルサムで封入する。

結果：陽性反応は黒褐色を呈する。

註釈：理論的にはもともと組織にあった銀および1価の水銀との鑑別を要するが，通常の組織内にはこれらのものはないのでその必要はない。

II) 螢光を用いる証明法について。

表2 Properties of Chinoform-Metal Compounds

Metal-ions	pH for Precipitation	Colors of Precipitation	Fluorescence	Colors of Fluorescences
Li^{+}	5.0	white	+	dark orange
Na^{+}	5.0	white	+	dark orange
K^{+}	5.2	white	+	dark orange
Cu^{++}	4.8	yellow-green	+	dark orange
Ag^{+}	4.5	white	+	dark orange
Mg^{++}	4.8	white	+	dark orange
Ca^{++}	4.8	white	+	dark orange
Cd^{++}	5.3	white	++	yellow green
Ba^{++}	4.7	white	+	dark orange
Zn^{++}	7.6	yellow-green	++	orange
Al^{+++}	5.5	yellow-green	+++	yellow green
Ga^{+++}	8.6	yellow	+++	orange
Hg^{++}	5.2	orange	-	-
Zr^{++++}		dark green	+++	orange
Pb^{++}	4.8	white	++	yellow green
Sn^{++}	6.0	yellow-green	++	yellow green
Cr^{+++}	5.2	white	+	dark orange
Mn^{++}	5.4	white	+	dark orange
Fe^{++}	4.7	black	-	-
Ni^{++}	5.3	yellow-green	-	-

-; no fluorescence, +; slight, ++; middle, +++; intense,

表2に示すように，酢酸にとかしたキノホルムは，ガリウム，アルミニウム，亜鉛，ジリコニ

ウム，カドミウム，鉛等とキレートし，適当なpHにおいて螢光を発することがわかった。その中でガリウムおよびアルミニウムとキノホルムのキレート物はpH8.6 附近の螢光が最も強かった（図２）。そこで次のようなキノホルム証明法を確立した。

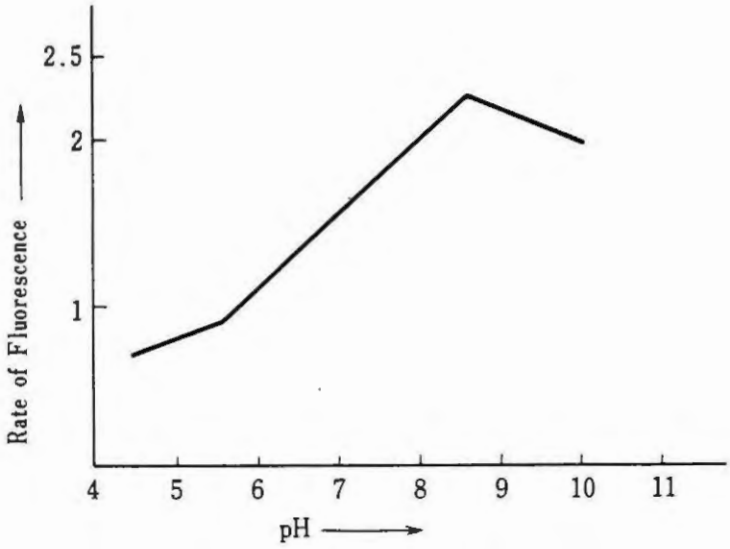


図２．　Change of Fluorescence Intensity of Ga-Chinoform Chelate Compound at pH.
(The fluorescence rate is set up 1 unit at pH 5.5)

1）$GaCl_3$ を飽和にした２５％酢酸液の中に資料切片を２時間浸漬する。

2）氷酢酸に１０－２０％のアンモニアを滴定しpH 8.6に調整した液に３０分入れる。

3）留水で水洗。

4）乾燥，封入液を用いずカバーグラスだけで封入しパラフィンで封ずる。

結果：陽性所見は橙黄色の螢光を示す。

註釈：この方法で得られた橙黄色の螢光は特異的である。

（B）それぞれの材料切片について確立されたキノホルムの組織化学的証明法により得られた結果とその有用性について。

1）β－glucuronidaseを用いキノホルムを組織化学的に沈着させた切片について。

私共は始めてキノホルムの組織化学的証明を行うためには，組織細胞内に間違いなくキノホルムを沈着せしめて，そのものを先ず証明する方法を確認し，これを応用して，実際のキノホルム中毒例に応用するのが合理的であると考えた。そのために，β－glucuronidase活性の高い肝組織切片およびＡＨ１３細胞を用いて，田村らにより合成された chinoform glucuronide を酵素基質として，細胞内酵素を作用せしめ，細胞内の特定部位に分解キノホルム沈着せしめる方法をとった。この切片について，金属塩を用いるキノホルム証明法（図１参照）および螢光法を用いる証明法を行った。

金属キレート法による組織化学的証明法では，肝細胞の原形質にβ－glucuronidaseの存在する部おそらくlysosomesに一致して，3つの金属塩を用いる方法とも，同じようにキノホルムが間接的に証明された。銅塩を用いた方法では黒緑色調に，鉄塩を用いた方法では青藍色に，銀塩を用いた方法では黒褐色調に，それぞれ顆粒状の物質に着色して観察された（写真1，2，3，4参照）。

これらのキノホルム証明法は，金属とのキレートないし結合を応用した方法であるので，もともと組織に存在する金属を証明する可能性があり，鑑別を充分にしなければならない。そのためには対照検索を充分に実施しなければならない。予め銅，鉄，銀などのそれぞれの組織化学的証明法をやってみて，それらが証明されないことを確かめておく必要がある。対照標本の必要性はそこにある。しかし，一般には，銅や銀などは組織化学的に証明される程臓器組織内には存在しないし，病的な場合に銅を証明しえても特定の組織のみである。また通常金属の証明されない神経組織などに証明される場合は尚更問題とならない。ただ鉄は通常の人または動物の組織中にかなり存在し，鉄を証明する組織化学的方法を行えば，臓器によって異るがかなりの部にそれが証明される。従って，これを用いるキノホルムの組織化学的証明法ではその鑑別を充分注意しなければならない。組織中で鉄はヘモジデリンで証明されることが殆んどである。これは方法において述べた様に前処理で除外できるし，普通染色標本で容易に鑑別される。私共が考案した銀を用いる証明法ではさらに1価の水銀との鑑別が必要である[4]。しかし，通常の生体内にはこれはほとんど存在せず，組織化学的にも証明されないので鑑別の必要はほとんどない。

もう一つの問題として，キノホルム以外に銅，鉄または銀と結びつくものが組織にあって，これと結びついたそれらを証明する可能性がこのキノホルム証明法にあると考えられる。しかし，キノホルムを飲んでいない人または動物の組織切片を銅，鉄，銀をそれぞれ溶かしたTween80液の中に浸漬し，それぞれの金属の組織化学的証明法を行ったが，これをしないものとの差はなかったので上の可能性は否定できた。

従って，この銅，鉄，または銀の金属塩を用いるキノホルムの組織化学的証明法は，充分なコントロールと比較してキノホルムを特異的に証明しうることがわかった。

螢光法では橙黄色の螢光が細胞全体に淡くびまん性にみられることが多い。しかし，よく検出された場合は金属塩法と同じ細胞内のおそらくlysosomesに一致した部に螢光を認めることができた。

この方法の場合は螢光の弱い点が問題となったが，ガリウムを使用した場合の螢光法は，一応目的を達することができた。一般に，西川の論文[2]にあるように，キノリン環で5位と7位の位置にハロゲン元素が存在すると，金属とキレートして見られる螢光はオキシンの場合とくらべ著しく弱くなる。キノホルムは構造式の第5位に塩素が，第7位に沃素がそれぞれついてい

てそのために螢光が著しく弱められる。しかし，ガリウムとの結合は比較的螢光を保ち，他の金属の場合よりよい結果が得られた点は注目される。

この螢光を用いるキノホルム証明法は，キノホルム，ガリウムのキレート化合物が比較的特異な螢光を発し，特異性も高い。しかし，この方法はなお螢光が弱く，それを強めようとすれば局在性が悪くなり，従ってかなりの量のキノホルムが存在しなければ証明する事ができない欠点がある。さらに螢光性の強い物質をさがす必要があろう。

2) ^{131}I－chinoformを経口投与したうさぎの組織切片について。

β－glucronidaseを用いて，キノホルムを組織化学的に沈着させた切片について，キノホルムを組織化学的に証明する実験により，これらの方法がキノホルムを証明しうることがわかった。また逆に，これらの方法のいくつかはβ－glucronidaseの組織化学的証明法にもなりうることがわかった。

しかし，生体内にはいった中毒キノホルムはそのまま細胞内のlysosomesにはいりうるし，組織内金属ともキレートして沈着しうるし，また肝ではglucuronide として処理されうるので，実際の中毒症の際の細胞内分布は簡単ではないと考えられる。そこで^{131}I－chinoform を動物に経口投与し，オートラジオグラフでキノホルムの実在と組織細胞内局在とを確かめる方法をとり，同時に同一組織における連続切片について組織化学的証明法を試み，それらにより証明されたキノホルムの存在が一致するかどうかを検討した。

^{131}I－chinoformのオートラジオグラフでは銀粒子は，肝では，肝細胞に主として証明され，時間と共に増強した（写真５，６）。類洞内皮では肝細胞より取込がわるく投与後２時間では比較的に強い取込みがみられた。腎では，尿細管主部の上皮に最も強い取込みがあり，投与後１時間で既に強い反応をみた。その他の尿細管上皮にも軽度の出現をみた。脊髄では，灰白質，白質ともにグリア細胞にその取込みがあり，神経細胞とその線維には証明が困難だった。末梢神経では，その神経線維に明らかに銀粒子の出現がみられた。そして，ここではSchwann 細胞の周辺部にその粒子を認めた。

組織化学的証明法では，銅，鉄，銀の何れの金属塩を用いる方法でも，同様に同じ局在で証明された。肝では肝細胞形質内の一部の領域（恐らくlysosomesないしphagosomesか）に顆粒状に出現する（写真７，８，１１）。Kupffer 細胞においても同様の現われ方をする。腎では，尿細管上皮の原形質内に顆粒状に出現し，この局在は管腔内面に接する側に多い傾向があるが（写真９，１０），投与後経過したものは必ずしもそうではない。グリア細胞内でも微小顆粒状に認められ，また末梢神経では，主として軸索の部に一致して顆粒状反応をしめした（写真１２参照）。

この結果，オートラジオグラフによる^{131}I－chinoformの組織細胞内分布と，キノホルムの組織化学的証明法によった組織細胞内分布とは全く一致した成績を示し，それらがよく目的

	オートラジオグラフ 1hr	2hrs	4hrs	組織化学的証明
肝臓：				
肝細胞	++	+++	+++	+++
Kupffer細胞	(+)	(+)	±	+ − +++
胆管上皮細胞	(+)	++	(+)	−
腎臓：				
糸球体	+	(+)	(+)	−
尿細管主部上皮細胞	+++	+++	++	+++
遠位尿細管上皮細胞	++	++	++	+
集合管	(+)	(+)	(+)	−
脊髄				
灰白質				
神経細胞		±	−	−
グリア細胞		+	+	(+)
白質				
グリア細胞		+	+	+
神経線維		∓	∓	−
中心管上皮		+	+	−
坐骨神経				
神経線維		+	++	+

表３　組織化学的証明法とオートラジオグラフにより証明された^{131}Ｉ－キノホルムの分布

を達成していることを確認した。

3）キノホルム中毒うさぎの組織切片について。

金属キレート法として銅，鉄，銀を用いる方法も，螢光法としてガリウムを用いる方法でも，同じ局在でキノホルムを証明した。肝細胞とKupffer 細胞質のおそらくlysosomesと思われる部に，顆粒状にそれを検出した。しかし，核には証明されなかった。

4）人のキノホルム中毒肝切片について。

最後に，実際において有用であるかどうかを確認するために，人のキノホルム中毒患者の剖検材料で，しかも田村らにより化学的にキノホルムが証明された肝（東大剖検例）について私共の方法を試みてみた。

銅，鉄，銀塩を用いた何れの方法の場合も，組織化学的に一致した局在で証明が可能であった（写真１５，１６）。ガリウムを用いた螢光法の場合とも同じ局在を示した（写真１４）。肝細胞ではキノホルムは顆粒状に証明され，小さな顆状から比較的大きなものまでが細胞内に種々の割合に証明されたが，核には陰性であった。またKupffer 細胞の肥大したものの胞体内に粗大顆粒状に証明された。

Ⅳ　総括ならびに考察

上述した様に，キノホルムの組織細胞内存在の実証とその局在を知ることは重要であり，その目的のためには組織化学的方法による外ない。そして確実に，そのものの証明であるという特異性が高くなくてはならない。

螢光を用いるキノホルム証明法は，操作が簡便であり，ガリウムとキレートしたキノホルムは，特異的な螢光を発するために，特異性も高い。しかし，キノホルムの存在が比較的多い場合は，この方法は有効であるが，少い場合は，それを検出し得ない欠点がなお存在している。

キノホルムの金属とキレートする性質を利用した着色性の組織化学的証明法ではかなり微量のキノホルムも検出し得た。キノホルムは，金属とキレートしただけでも発色するが色が弱いので，さらにその金属を組織化学的に証明することにより可視化することができた。この方法は，反応産物の金属結合ないし金属置換発色により，局在の移動性を生じる可能性が考えられる。しかし，操作上で拡散や吸着などの現象を防止すれば，理想的な局在も得ることが可能であり[5]，ここに述べた実験でわかるように，この方法における結果は，確実にキノホルムの所在とほぼ一致したものを示すものであり，局在を違えていることは考えられない。しかし，この方法では，もともと組織に存在する金属を証明する可能性があり，特異性に問題がある。そのために，対照の検索を充分に行えばこの方法によりキノホルムの証明がなし得られるが，一つの方法のみで足りないこともあるだろう。従って螢光法とキレート着色法とを併用あるいは２，３のキレート法を併用することにより，その特異性を確認する方法をとることも必要となる。

Ⅴ　まとめ。

キノホルムの組織化学的証明法を考案し，金属キレート法による光学的顕微鏡法と同じく螢光顕微鏡法との二種類をえた。chinoform－glucuronide を用いβ－glucuronidaseにより分解したキノホルムを確実に組織細胞内に沈着させ，その切片を用いることにより，まず組織化学的証明の可能性と確実性を確めた。さらに，^{131}I－chinoformを投与したうさぎの組織切片を用いてオートラジオグラフと組織化学的所見の一致を確認した。それらを用いて，動物および人のキノホルム中毒切片において応用の可能性を実証した。

主要文献

1　西川泰治：日本化学雑誌　７９，１００３，１９５８
2　西川春治：日本化学雑誌　７９，１００７，１９５８

3 Isao Matsunaga and Zenjo Tamura：Chem. Pharm. Bull. 19, 1056, 1971
4 岡本耕造，上田政雄，前田隆英：顕微鏡的組織化学 医学書院，1965
5 武内忠男，他：酵素組織化学，朝倉書店，昭和43年

写真説明

写真①，②，③，④ β－glucuronidaseにより組織化学的にキノホルムを沈着させた切片について，金属キレート法によりキノホルムを組織化学的に証明した。肝細胞質のおそらくlysosomesと思われる部にキノホルムが顆粒状にみられる。写真①，②，④は鉄を用いた方法による。写真③は銅を用いた方法による。

写真⑤，⑥ ^{131}Ⅰ－chinoformを経口投与したうさぎの肝切片におけるオートラジオグラフ。⑤は投与後1時間のもの。⑥は投与後2時間のもの。細胞質に銀粒子がみられる。

写真⑦，⑧ ^{131}Ⅰ－chinoformを経口投与したうさぎの肝切片について，銅塩を用いたキノホルムの組織化学的証明法を行ったもの。⑦は投与後2時間のもの。⑧は投与後4時間のもの。細胞質に顆粒状にキノホルムがみられる。

写真⑨ ^{131}Ⅰ－chinoformを経口投与したうさぎの腎切片投与後2時間のものについて銅塩を用いたキノホルム証明法を行ったもの。尿細管上皮細胞の細胞質に顆粒状にキノホルムが見られる。

写真⑩ ^{131}Ⅰ－chinoformを経口投与したうさぎ腎切片投与後1時間のものについて鉄塩を用いたキノホルム証明法を行ったもの。尿細管上皮細胞質内に顆粒状にキノホルムがみられる。

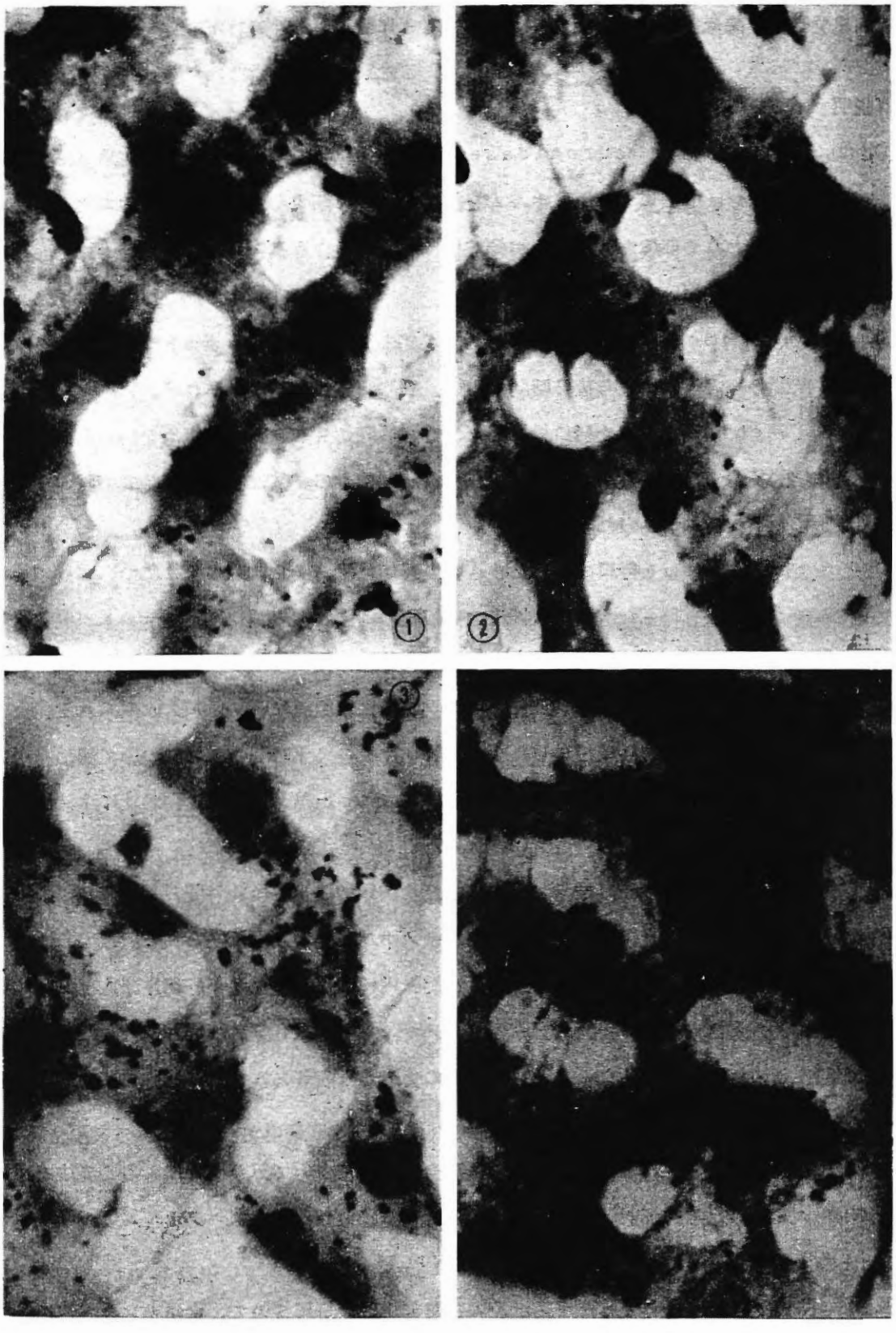
写真⑪ ^{131}Ⅰ－chinoformを経口投与したうさぎ肝切片投与後1時間のものについて銀塩を用いたキノホルム証明法を行ったもの。細胞質のlysosomesと思われる部に顆粒状にキノホルムが見られる。

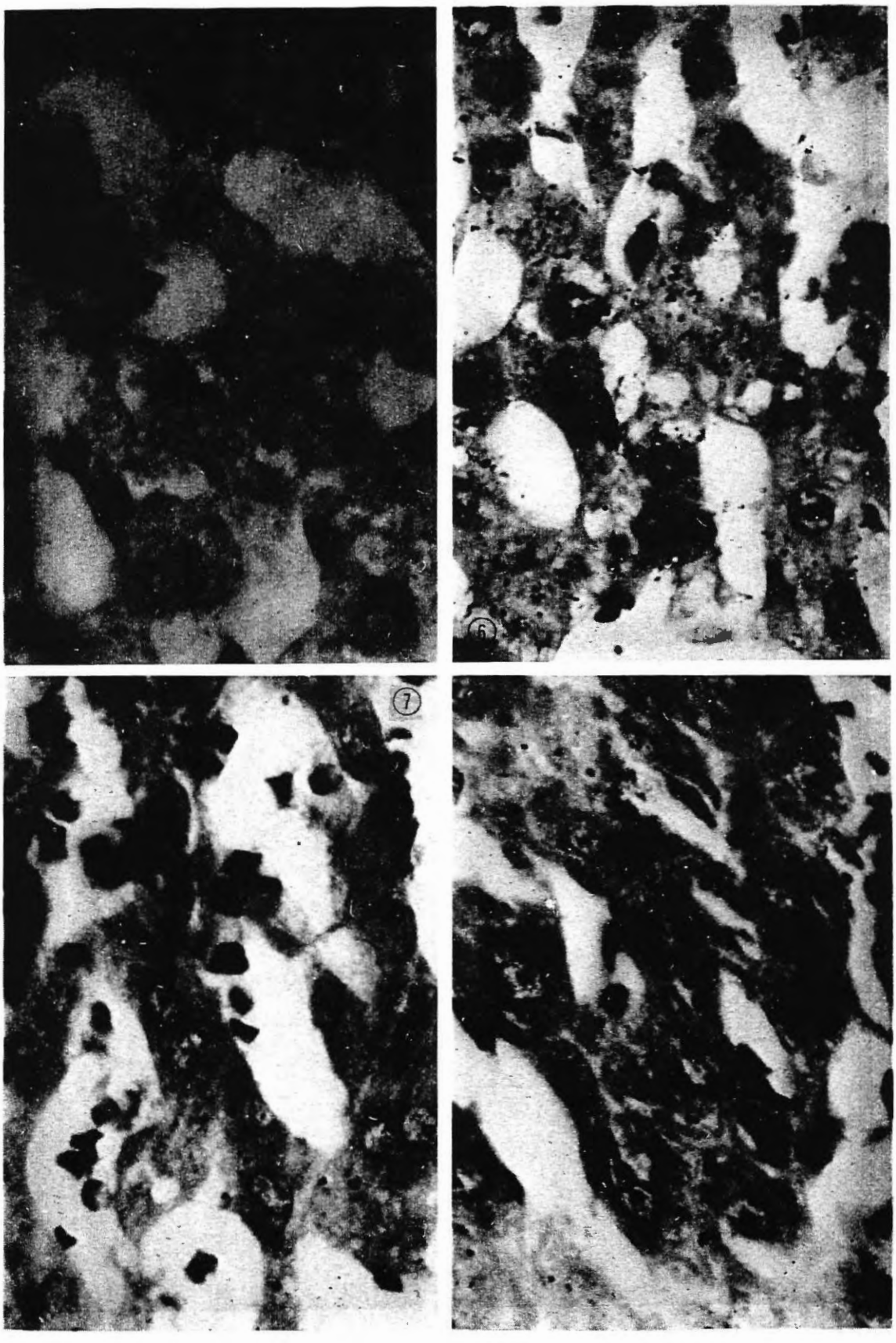
写真⑫ ^{131}Ⅰ－chinoformを経口投与したうさぎ坐骨神経切片投与後4時間のものについて鉄塩を用いたキノホルム証明法を行ったもの。軸索にキノホルムがわずかにみられる。

写真⑬ エマホルム（キノホルムを95％含有）を門脈内に注入したウサギ肝切片注入後2時間のものについて，ガリウムによる螢光法を用いたキノホルムの組織化学的証明法を行ったもの。中心静脈周囲にキノホルム・ガリウムのキレート物の螢光がみられる。さらに細胞質に顆粒状に同じ螢光が見られる。

写真⑭ 東大病理より分与されたキノホルム中毒剖検例の肝についてガリウムによる螢光法を用いたキノホルムの組織化学的証明法を行ったもの。細胞質に顆粒状黄色のキノホルム・ガリウムのキレート物の螢光がみられる。

写真⑮，⑯ 東大病理より分与されたキノホルム中毒剖検例の肝について，金属キレート法によりキノホルムの組織化学的証明法を行ったもの。肝細胞とKupffer 細胞の細胞質に大小種々，顆粒状にキノホルムが見られる。⑮銅塩を用いたもの。⑯銀塩を用いたもの。

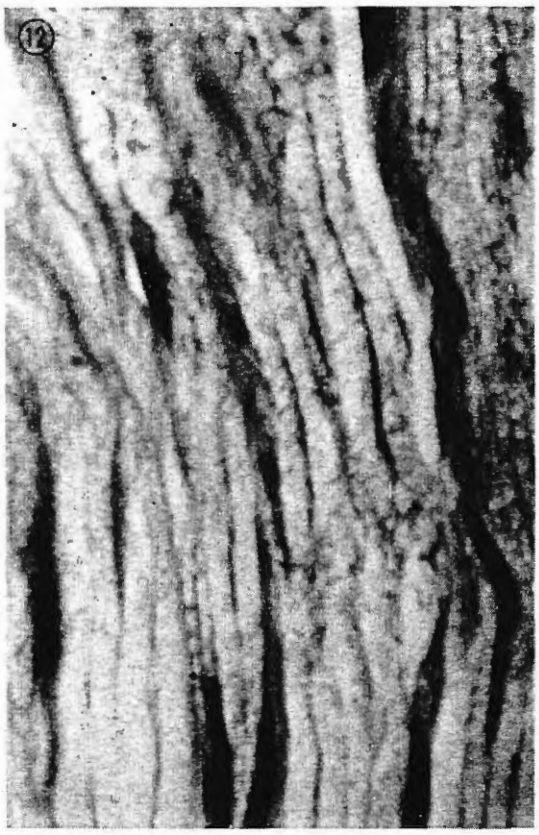

①
②
③

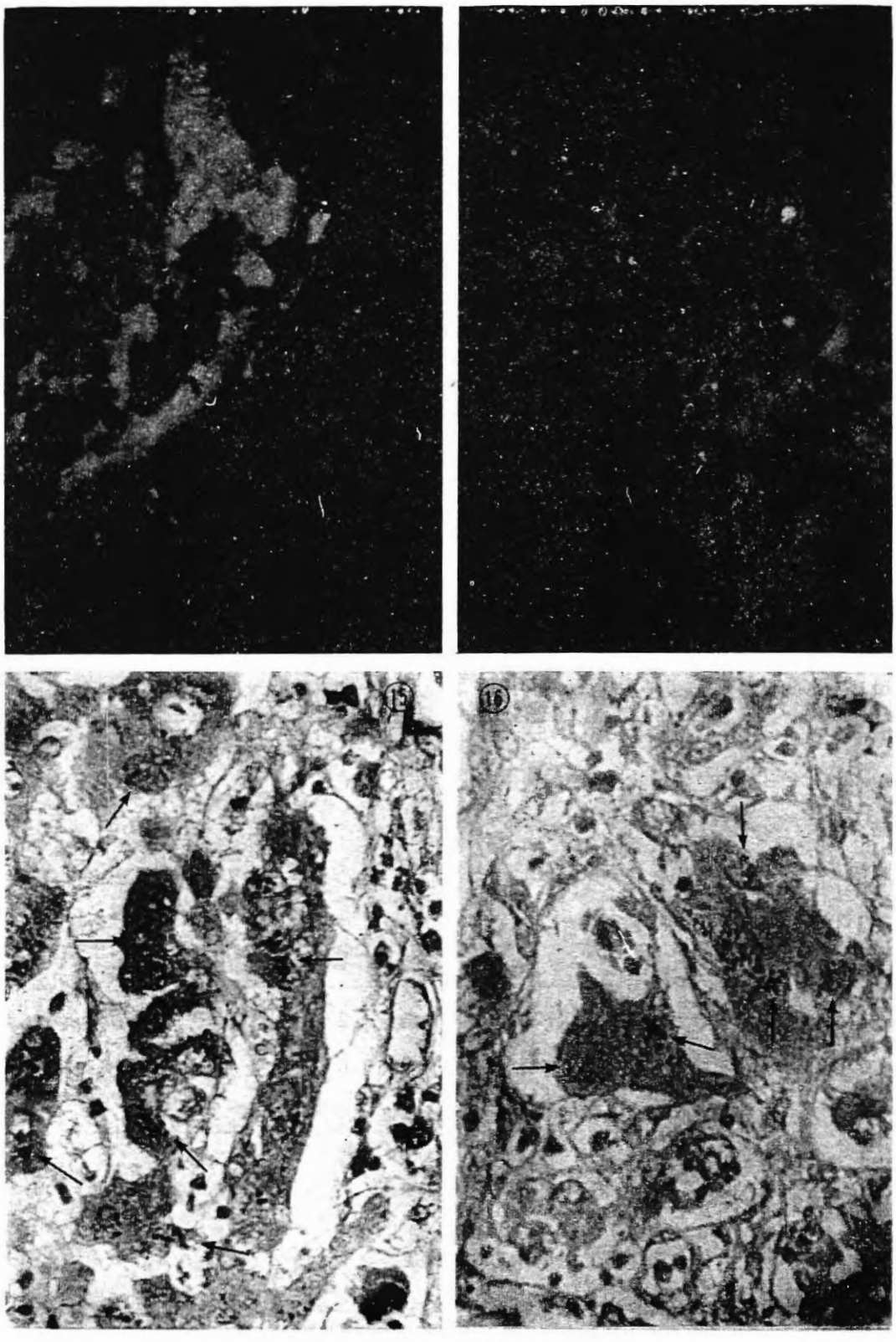


9

10

11


12



21. スモン患者の血清ヨウ素とキノホルムの関係

田村　善蔵

（東大・薬学部・薬品分析学）

Ⅰ 緒　言

４６年３月のスモン調査研究協議会研究報告会において，河合らは質量分析器を用いて，スモン患者血清の諸元素を測定し、そのうちヨウ素量が正常群にくらべ４．７～２８０倍にも増加していることを報告した[1)]。これらのなかで，キノホルム剤を服用していないでスモンになったといわれる患者血清中のヨウ素量が，キノホルムを服用したことのあるスモン患者で，キ剤中止後１ケ月たった血清中のヨウ素量と，ほぼ同じ位に高い値を示している例がある。

キ剤非服用スモン患者血清に大量のヨウ素が存在することは，何を意味しているものなのかということに興味がもたれたので、このキ剤非服用スモン患者（症例６）ならびに対照としてキ剤服用を中止後１ケ月のスモン患者（症例４）およびキ剤非服用の正常人（症例１５）の各１例づつの乾燥血清からキノホルムの検出を試みた。

Ⅱ 方　法

凍結乾燥血清７５㎎（約１mlの血清に相当する）を秤量して１mlの水に溶かし，ベンゼン・ピリジンで抽出し，水洗し，Na_2SO_4で脱水後アセチル化して，ガスクロマトグラフィーを行った。検出器にはＥＣＤを用いた。三種類のカラム，ＱＦ－１，ＳＥ－３０およびＸＦ－1105を用いて，標準品のキノホルムとピークの位置を比較することにより同定した（図１）。

Ⅲ 結　果

キ剤服用スモン患者血清からキノホルムが検出された。その濃度は約１０μg／ml血清で，キ剤服用中止後１ケ月の患者とほぼ等しかった（表１）。

Ⅳ 考　察

症例６について河合らのデータは塩素に対するヨウ素量が2.8×10^{-3}であり，我々の値を塩素濃度１００mEq／lとしてそれに換算すると，1.2×10^{-3}になる。両方法とも測定誤差が相当に大きいことを考えると，河合らが観察したスモン患者血清のヨウ素上昇は，キノホルムに由来しているとして説明できるであろう。

Ⅴ 要　約

キノホルム剤非服用スモン患者乾燥血清から本法によりキノホルムが約１０μg／ml検出された。この値は質量分析法によるヨウ素／塩素値から換算したキノホルム値と近似していた。

文　献

1）河合忠ほか：スモン調査研究協議会研究報告書，No．４（昭和４５年度病理班研究報告）１５３，昭和４６年

図1.

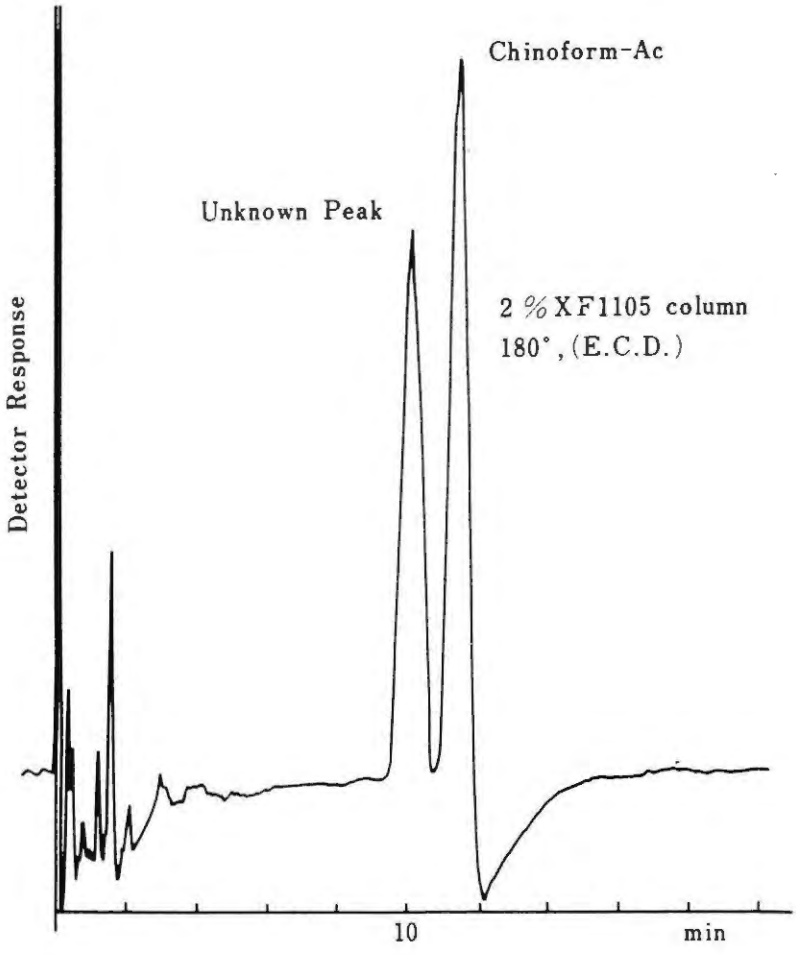


表1　乾燥血清75㎎に含まれるキノホルム

症例番号と診断	キ剤使用	I／Cl	キノホルム
4　スモン	あり	4.5×10^{-3}	約10 μg
6　スモン	なし	2.8×10^{-3}	約10 μg
15　正常	なし	1×10^{-5}	検出されず

22. キノホルムグルクロナイドの代謝・排泄

田村　善蔵

（東大・薬学部・薬品分析化学）

I 緒 言

キノホルムの代謝研究の一環として，先に合成したキノホルムグルクロナイド[1]の分析法を検討し，ラットによる代謝予備試験を行った。

II 実 験

1 ガスクロマトグラフィーによる分析法の検討

キノホルムグルクロナイドを直接トリメチルシリル化してガスクロマトグラフィーを行うと分解してしまうが，ジアゾメタンでメチルエステルにし，トリメチルシリル化しガスクロマトグラフィー(2％ＱＦ－1，又は2％ＯＶ－1；220°）を行えば定量性はないが分析できる。定量を行うにはβ－グルクロニダーゼで加水分解した後トリフルオロアセチル化してガスクロマトグラフィー（水素炎検出器；2％ＸＦ－1105；180°）を行う手法をとった。内部標準物質は5，7－ジブロム－8－ヒドロキシキノリンを使用した。

2 代謝予備試験

図1のような操作法に従って胆汁，尿中の遊離キノホルムおよびそのグルクロナイドを定量した

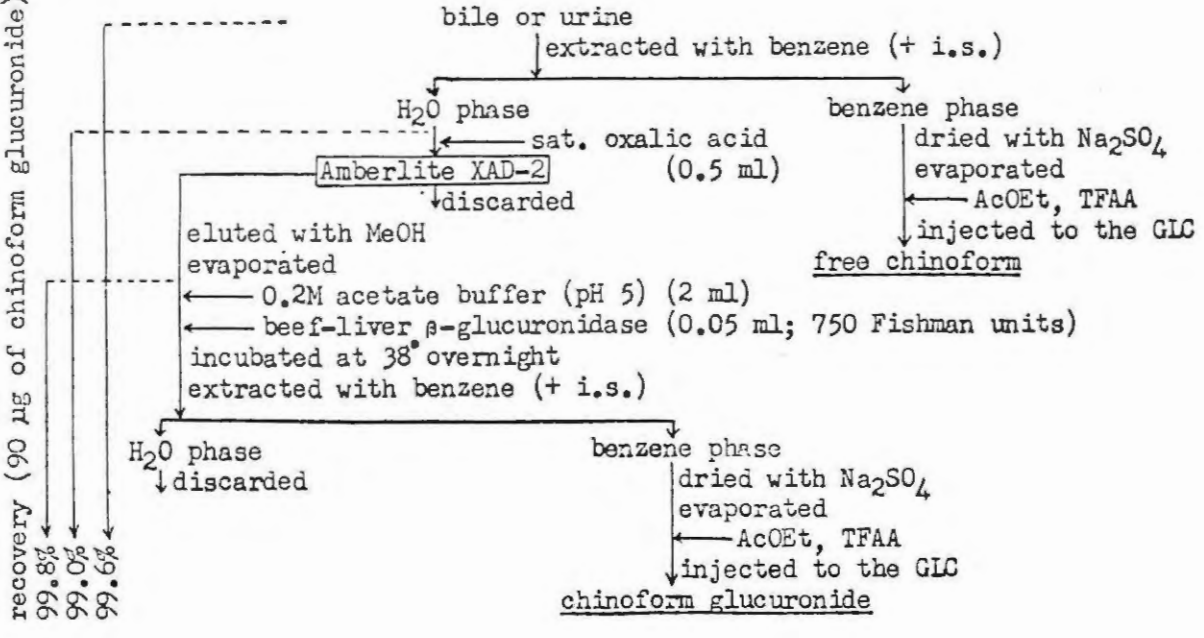


図　1

（添加回収率は図１に示すように定量的であった。

ラット（Ｗｈｉｓｔｅｒ系，♂，３３０－３５０ｇ）をエーテル麻酔し胆管にカニュレーションし経時的に胆汁を採取できるようにし，一方膀胱の出口を閉め，膀胱に注射針をさし注射器で経時的に尿を採取できるようにしておく。股静脈より０．９％キノホルムグルクロナイドNa 塩溶液を２６～２７㎎／㎏程度投与し経時的に尿，胆汁を採取し，上記の方法で分析すると図２に示す結果を得た。

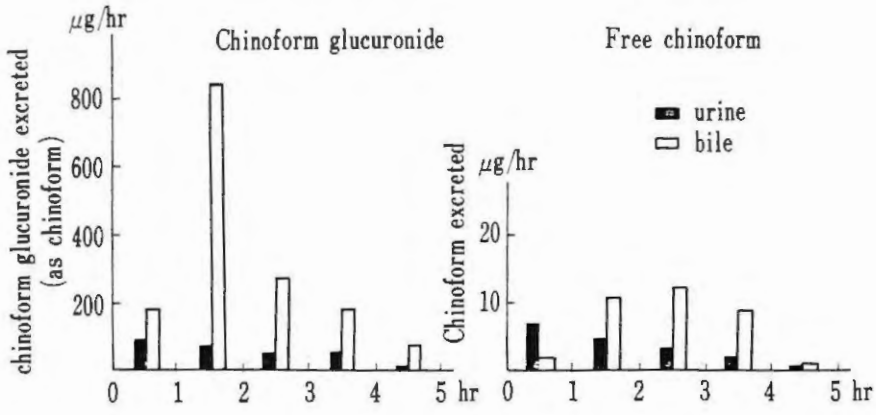


図　２

Ⅲ　考　察

キノホルムグルクロナイドはラットの組織内のβ－グルクロニダーゼで加水分解され，遊離キノホルムもその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。しかしながら５時間での全排泄量の定量値は，投与量の３２％程度にしか達しない。遊離キノホルムの抽出が不完全のおそれがあり，抽出分離法自体にも問題点があるものと考えられる。

Ⅳ　要　約

合成キノホルムグルクロナイドNa 塩溶液をラットに２６～２７㎎／㎏股静脈より投与すると，組織内のβ－グルクロニダーゼで一部加水分解され，遊離したキノホルムおよびそのグルクロナイドともに主として，胆汁の方に排泄されることがわかった。

文　献

1) I.Matsunaga et al ：Chem Pharm Bull（Tokyo），19，1056，1971

23. 胆汁酸によるキノホルムの可溶化

田村　善蔵

（東大・薬学部・薬品分析化学）

Ⅰ　緒　言

各種の実験に行う際，キノホルムの水に対する溶解度の低さが大きな支障になっている。これを克服するため溶解補助剤などを用いる工夫がなされているが，生体成分をその目的に利用できれば好都合である。事実キノホルムが血清に比較的良く溶解することは知られている。一方胆汁酸は経口投与されたキノホルムと腸内で接触することから胆汁酸による可溶化の検討は動物実験において，より生理的な条件を再現する上でも有意義であると思われる。

Ⅱ　実験及び結果

キノホルム約1 mg／mlの溶液を作ることを目標とした。

まずキノホルムを0.1 N NaOH中；スターラーでよく攪拌し，溶解させ，2 mg／mlの溶液を調整する。この1 mlに10％タウロコール酸1 mlを添加後，1 N及び0.1 N HClで中和してpH 7～8にすると，約30分間は溶解した状態を保持するが，次第に結晶が析出してくる。デスオキシコール酸，グリココール酸でもほぼ同様である。なお上記のアルカリ溶液を胆汁酸無しで直接中和すると，pH 10.5で結晶が析出する。

Ⅲ　考　察

キノホルムの純水に対する溶解度は1 μg／mlと言われているが，5％胆汁酸溶液では約pH 9で1 mg／mlの溶液を調製することが可能である。この事実は経口投与されたキノホルムが胆汁酸によって可溶化することを示しており，吸収との関連が示唆されて興味深い。

24. 血清キノホルムの微量定量法

田村　善蔵

（東大・薬学部・薬品分析化学）

Ⅰ 緒 言

キノホルムによるスモン発症の機作を解明するため，スモン患者の血中からキノホルムを検出し，キノホルムの中毒発現と血中レベルとの関係を調べることは重要な課題である。そこでガスクロマトグラフィーを用いて微量のキノホルムを正確に定量する方法を検討した。

Ⅱ 方法及び結果

田村によって報告された血清キノホルムの微量分析法[1]に基づき図1のような定量法を作成した。

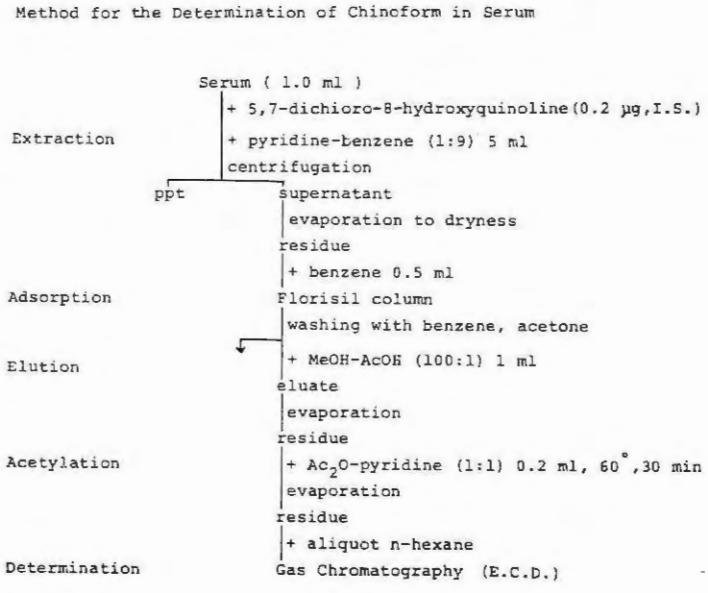


図　　1

内部標準物質としては，５，７－ジクロロ－８－ヒドロキシノリンを用いた。定量は内標に対するキノホルムのピーク高比で行うが，一方，ピリジン・ベンゼンによるキノホルムの絶対抽出率を検討するため ^{14}C キノホルムを血清に添加し，その回収率を調べたところ，表1に示すごとく１回の抽出操作で平均９５％の良好な回収率を得た。吸着剤として前報[1]ではアルミナを用いたが，操作の簡便性という点から今回はフロリジルについて調べた。^{14}C キノホルムをフロリジルカラムに吸着

表　　1

Recovery of added ^{14}C — Chinoform from Serum by Extraction with Pyridine — benzene (1 : 9)

added µg	0.1	0.5	1	3.3	5	10	20	average
recovery	92.8	95.7	98.8	98.7	94.3	93.4	92.8	95.2

させ，ベンゼン，アセトンで順次洗った後，メタノール・酢酸（100：1）で溶出し，その絶対回収率をみると，表2に示すごとく添加量を変えてもほぼ74%の一定値を示した。以上の結果は本定量法における非抱合型キノホルムの抽出，精製操作の信頼性を裏づけるものである。

表　　2

Recovery of ^{14}C-Chinoform from Florisil Column

added μg	0.1	0.1	0.6	1.2	average
recovery %	73.9	74.1	75.5	73.3	74.2

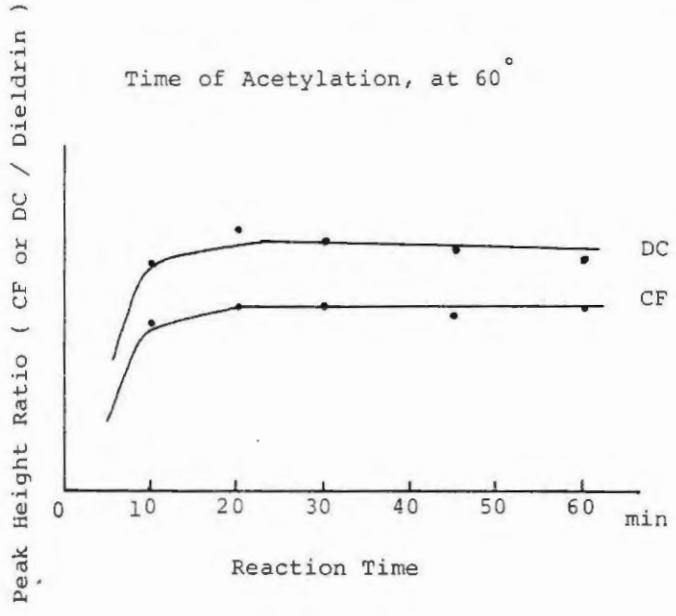


図　　2

アセチル化の条件は図2に示すごとくキノホルム，内標とも60°，20分で最高に達するが，反応を充分に行なわせるため30分と決めた。

血清に既知量添加し，全操作を行って得られた検量線は図3に示すように満足すべき直線性を示した。

Ⅲ 考 察

本操作法により，キノホルム金属キレートも定量的に回収されるため測定値は非抱合型キノホルムの総和を示している。

アルミナカラムを用いても測定出来るが，欠点は操作が簡便でないことである。一方長所は抽出液からキノホルムを直接吸着させ得ること，及び水のような極性溶媒でも充分洗えることなどから，不純物混入の可能性の大きい生体組織を用いる場合にはアルミナの方が有効であろうと思われる。

Ⅳ 要 約

ガスクロマトグラフィー（ＥＣＤ使用）を用いて血清１㎖中に含まれるキノホルムを０．０５μｇまで正確に定量することが出来る信頼性の高い測定法を開発した。

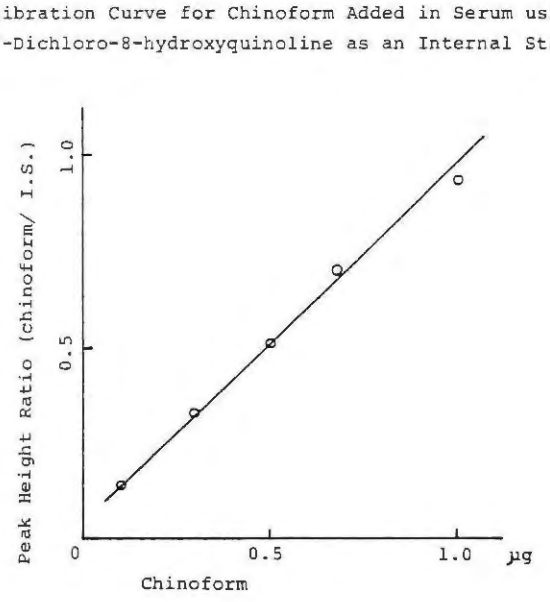


図　　3

文　献

1）田村善蔵：スモン調査研究協議会研究報告書，№3（昭和４５年度病原班研究報告），１７６，昭和４６年