

キノホルムの視覚毒性に関する電気生理学および組織病理学的検討

山田 修三¹⁾, 沖坂 重邦¹⁾, 吉井 大¹⁾, 水川 淳¹⁾, 築島 謙次²⁾¹⁾防衛医科大学校眼科学教室, ²⁾国立身体障害者リハビリテーションセンター眼科

要 約

目的: キノホルムをカニクイザルに経口投与し, 視神経, 網膜に及ぼす影響を検眼鏡, 視覚電気生理検査ならびに組織病理検査により評価する。

方法: カニクイザル 5 匹にキノホルムを 100 mg/kg から漸増し, 最長 14 か月(総量 227.4 g/kg)まで経口投与した。眼底検査, 網膜電図(ERG)・視覚誘発電位(V-EP)検査および摘出眼球の組織病理検査を経時的に 10 年まで行った。

結果: 視神経乳頭は早期には境界がやや不鮮明であったが, 末期には色調がやや退色するのみであった。VEP 最大振幅は早期から急激に低下し, ERG a, b 波, 律動様小波の振幅も徐々に低下した。投与中止 37 か月後以降 VEP, ERG の振幅は有意に回復していた。2.5

か月では視神経の軸索腫大, ミエリン鞘の配列の乱れがみられ, 5.5 か月では乳頭隣接網膜の神経線維層の腫大がみられ, 12.5 か月では網膜内層の核濃縮がみられた。投与中止後 9 年では視神経軸索の腫大は消失しミエリン鞘の配列も正常化していた。

結論: キノホルム投与により網膜や視神経の機能は早期から低下したが, 投与中止後には改善傾向がみられた。組織像では視神経軸索・ミエリン鞘の変性がキノホルム投与中は続いていたが, 投与中止後の変性の進行はなかった。(日眼会誌 107: 76-83, 2003)

キーワード: キノホルム, カニクイザル, 網膜・視神経, 電気生理学, 組織病理学

Electrophysiological and Histopathological Study on Visual Toxicity of Cloioquinol

Shuzo Yamada¹⁾, Shigekuni Okisaka¹⁾, Masaru Yoshii¹⁾, Atsushi Mizukawa¹⁾ and Kenji Yanashima²⁾¹⁾Department of Ophthalmology, National Defense Medical College²⁾Eye Clinic, National Rehabilitation Center Hospital for the Disabled

Abstract

Objective: To evaluate the effect of cloioquinol on the optic nerve and retina of rhesus monkeys by ophthalmoscopy, electrophysiology and histopathology.

Methods: Cloioquinol was given orally to 5 monkeys, gradually increasingly from 100 mg/kg/day up to 14 months (total dosage 227 g/kg). Ophthalmoscopy, electroretinogram (ERG), visual evoked potential (VEP) and histopathological examination of enucleated eyeballs were done periodically up to 10 years.

Results: The margin of the optic disc was not clear at the early stage, but the colour became atrophic at the late stage. VEP maximum amplitude decreased quickly at the early stage and the amplitude of ERG a and b waves and oscillatory potential decreased gradually. 37 months after the discontinuation of administration of VEP, ERG amplitude increased gradually. Swelling of axons and disorganization of the myelin sheath were noticed

2.5 months after beginning treatment. Swelling of the peripapillary nerve fiber layer was seen 5.5 months after beginning treatment. Karyorrhexis was seen in the inner layer of the retina after 12.5 months. Axonal swelling disappeared and the myelin sheath became reorganized 9 months after the discontinuation of treatment.

Conclusions: Cloioquinol produced an early decrease of electrophysiological function, but recovery of function was seen after discontinuation of treatment. The degeneration of axons and myelin sheath continued during treatment, and interruption of the degeneration was seen after discontinuation of treatment.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 107: 76-83, 2003)

Key words: Cloioquinol, Rhesus monkey, Retina and optic nerve, Electrophysiology, Histopathology

別刷請求先: 359-8513 所沢市並木 3-2 防衛医科大学校眼科学教室 山田 修三

(平成 14 年 4 月 12 日受付, 平成 14 年 7 月 18 日改訂受理)

Reprint requests to: Shuzo Yamada, M. D. Department of Ophthalmology, National Defense Medical College, 3-2 Namiki, Tokorozawa 359-8513, Japan

(Received April 12, 2002 and accepted in revised form July 18, 2002)

I 緒 言

キノホルム(以下, CQ)による薬害は, 亜急性脊髄視神経末梢神経症(subacute myelo-optico-neuropathy, SMON)としてよく知られている。1954 年から我が国で多発し始め, 一時多くの発症をみたが, 1970 年に下痢治療薬 CQ の中毒によることが明らかにされ, 発売中止とともに発症がみられなくなった。腹部症状(激しい腹痛, 腹部膨満, 便秘など)と神経症状(急性, 亜急性の知覚障害)が必発だが, 視力障害も 10~40% 生じており失明に至ることもあった¹⁾²⁾。

CQ は消化管から吸収され, 肝臓・腎臓に集積し, 胆汁・尿に高濃度に排泄される。体内分布は脂肪組織にかなり高濃度にみられ, 神経系では末梢神経に高い分布がみられており, 後根神経節・半月神経節・網膜などにも取り込みが証明されている。視機能としては, 視力低下, 中心暗点, 視神経萎縮, 色覚異常などが報告³⁾されている。

薬害としての CQ の視機能へ及ぼす影響を明確にするため, CQ を漸増的に経口投与したカニクイザルの眼底検査, 網膜電図(electroretinogram, ERG), 視覚誘発電位(visual evoked potential, VEP)を経時的に行い, 視覚電気生理学的変化とその組織病理学的変化を併わせて検討し, 興味ある知見が得られたので報告する。

II 方 法

体重 3.1~4.3 kg の雌カニクイザル 6 匹を対象とし, うち 1 匹は対照とした。CQ 粉末を粉砕したバナナと攪拌させローガストビーンガムとキサントンガムの等量混合したものを混ぜて固化した食餌を, 朝空腹時カニクイザル 5 匹に経口投与した。CQ を含まない同様の食餌を与えた 1 匹を対照とした。CQ 食餌投与は月曜日から土曜日まで行い, 日曜日は CQ を含まない同様の食餌を与えた。CQ 投与量は 100 mg/kg から開始し, 3 週目から 150 mg/kg, 5 週目 200 mg/kg と 2 週間毎に漸増し, 14 か月で総量 227.4 g/kg に達した。その後 CQ 投与を中止し 10 年まで観察を続けた。

視覚電気生理学的検査には, 日本光電社製万能 2-4 現象オシロスコープ(VC-9), データ処理装置 ATAC-350, ERG PHOTIC STIMULATOR を用いた。ERG は両眼角膜を陽極としてヒト小児用白金電極, 眉間に陰極, アースを右耳介に置き, 0.5% トロピカマイド(ミドリン P[®])で散瞳, 30 分の暗順応の後, 20 J ストロボフラッシュ刺激で測定した。VEP は陽極を後頭結節, 陰極を眉間, アースを右耳介に置き, 5% 塩酸ケタミン(ケタラール[®]) 1.5 ml 筋注麻酔後 30 分で 0.6 J 10 Hz フリッカ刺激の 100 回加算で測定した。cone ERG は, 白色光, 青色光, 緑色光, 赤色光を 0.6 J 10 Hz フリッカ刺激の 50 回加算で測定し, 青, 緑, 赤色光はそれぞれ 450, 550,

表 1 キノホルム投与前の網膜電図(ERG), 視覚誘発電位(VEP)構成要素(n=12)

ERG	
a 波振幅	135.30 ± 22.50 μV.
b 波振幅	206.80 ± 46.42 μV.
a 波頂点潜時	9.7 ± 1.9 msec.
b 波頂点潜時	38.7 ± 9.8 msec.
VEP	
最大振幅	55.40 ± 9.70 μV.
頂点潜時	84.80 ± 8.94 msec.

平均値 ± 標準偏差

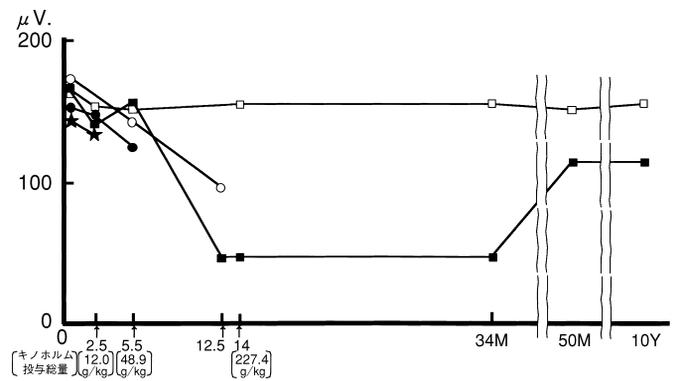


図 1 網膜電図(ERG) a 波振幅の変化。

★: サル A ●: サル B ○: サル C ■: サル D □: 対象

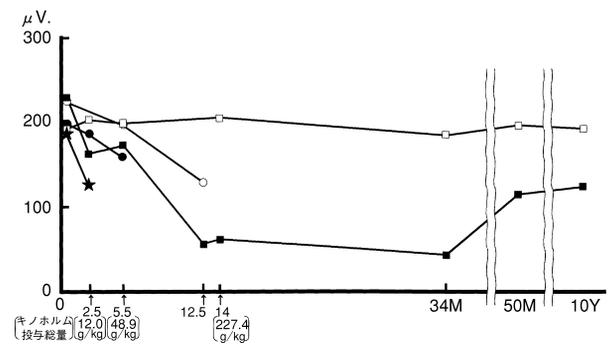


図 2 ERG b 波振幅の変化。

700 nm の干渉フィルタを用い, 光量を一定にするため ND フィルタで補正した。検眼鏡による眼底検査および電気生理学的検査はそれぞれ CQ 投与前, 投与後 1 か月(CQ 総量 3.0 g/kg), 2.5 か月(CQ 総量 12.0 g/kg), 5.5 か月(CQ 総量 48.9 g/kg), 12.5 か月(CQ 総量 198.6 g/kg), 14 か月(CQ 総量 227.4 g/kg), 34, 50 か月, 10 年で施行した。検定には χ^2 検定を用い $p < 0.05$ を有意差ありとした。

組織病理学的変化は, CQ 投与開始後 2.5 か月(CQ 総量 12.0 g/kg), 5.5 か月(CQ 総量 48.9 g/kg), 12.5 か月(CQ 総量 198.6 g/kg), 10 年で, それぞれ 5% 塩酸ケタミン(ケタラール[®]) 1.5 ml 筋注麻酔後眼球摘出し検討した。摘出した眼球は 1.0% グルタルアルデヒド

表 2 キノホルム投与後・眼球摘出前の ERG, VEP 構成要素 (n=12)

ERG	
a 波振幅	116.30 ± 14.33 μV.
b 波振幅	129.95 ± 16.94 μV.
a 波頂点潜時	12.7 ± 3.0 msec.
b 波頂点潜時	34.0 ± 7.7 msec.
VEP	
最大振幅	29.68 ± 10.08 μV.
頂点潜時	93.84 ± 2.60 msec.

平均値 ± 標準偏差

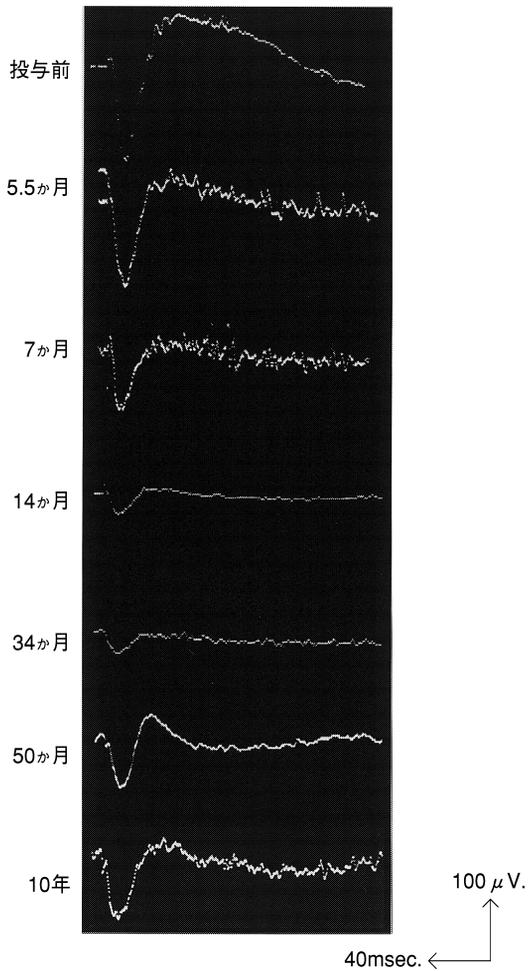


図 3 ERG の経時的変化(サル D の右眼).

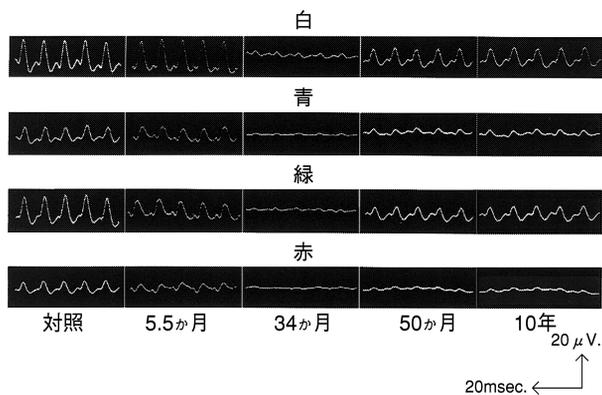


図 4 cone ERG の経時的変化(サル D).

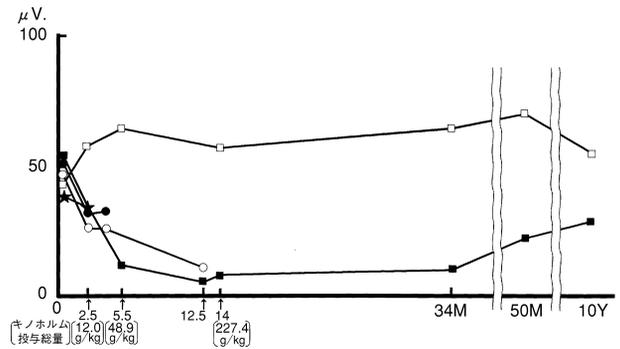


図 5 視覚誘発電位 (VEP) 最大振幅の変化.

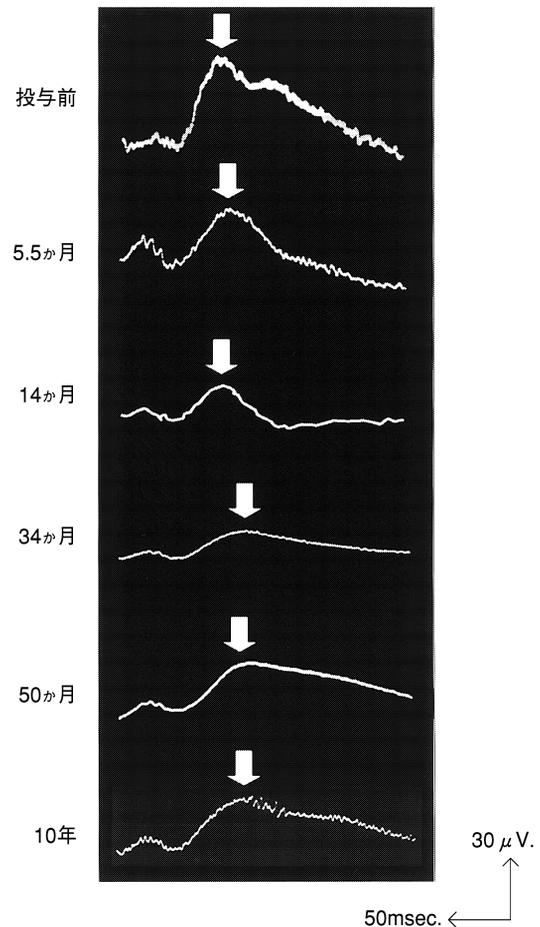


図 6 VEP の経時的変化(サル D).

と 2.5% ホルマリン混合液 (pH 7.2 0.15 mol リン酸緩衝液) で固定後、毛様体扁平部で二分し、後極部から乳頭黄斑を含む組織片および球後視神経を切り出し、エタノール系列脱水後エポキシ包埋した。厚さ 1 μm の薄切片を作製し、トルイジン青染色して光学顕微鏡で観察した。また、超薄切片をウラン・鉛二重染色して透過電子顕微鏡で観察した。

III 結 果

CQ 投与群 5 匹のうち、1 匹は CQ の食餌を 1 週間も

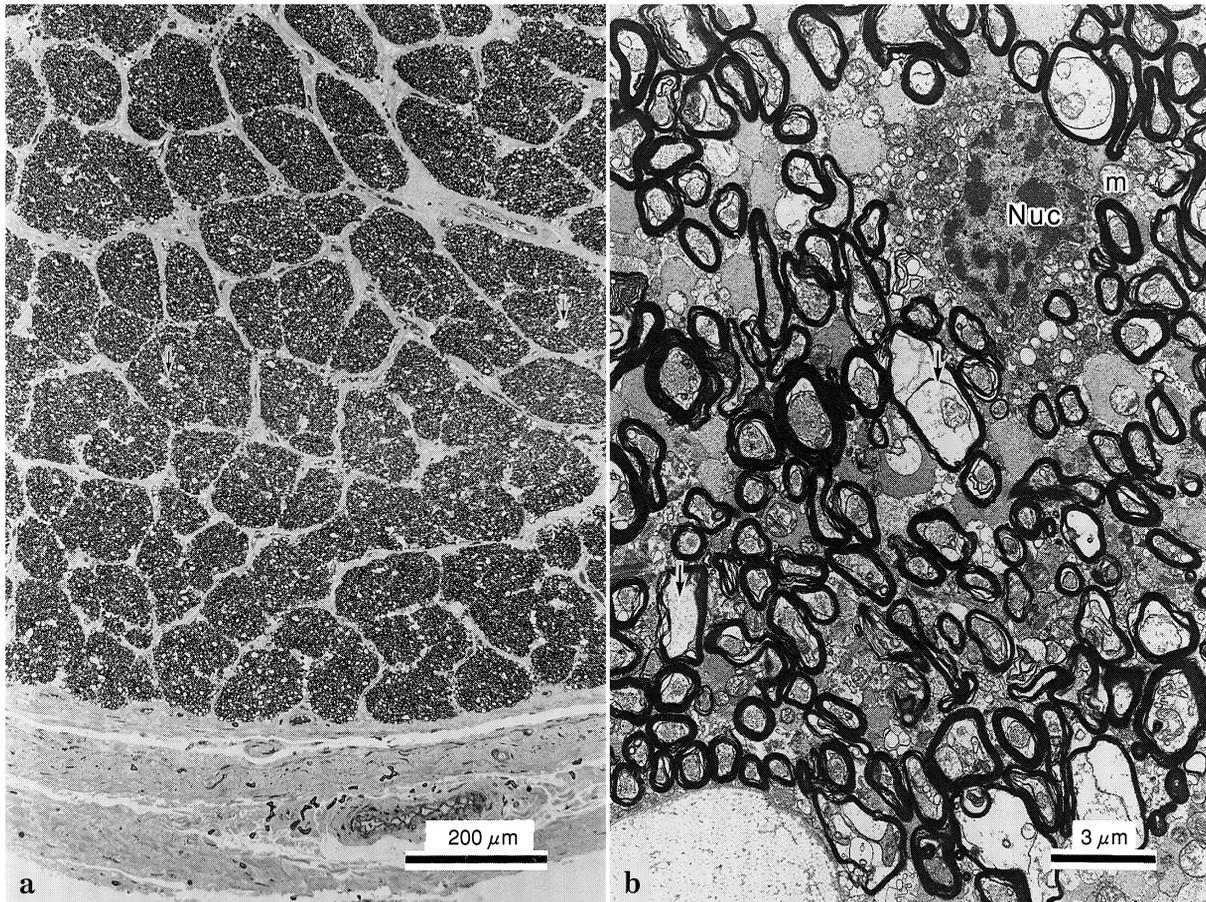


図 7 キノホルム(CQ)投与開始後 2.5 か月 (CQ 総量 12.0 g/kg) の球後視神経の組織像。

a : 疎な結合組織である軟膜中隔も腫脹し、それに取り囲まれた神経線維束には腫大し拡張したもの(細矢印)が多数みられる(トルイジン青)。b : 軸索は腫大し(矢印)、ミトコンドリアも膨化している。ミエリン鞘には配列の乱れている所もある。軸索とミエリン鞘の間に間隙が形成されている。稀突起膠細胞の核(Nuc)には異常ないが細胞質中のミトコンドリア(m)が膨化している。

摂取させることができなかったため、実験から除外した。他の 4 匹をそれぞれサル A, サル B, サル C, サル D とした。サル A は CQ 投与後 2.5 か月 (CQ 総量 12.0 g/kg), サル B は CQ 投与後 5.5 か月 (CQ 総量 48.9 g/kg), サル C は 12.5 か月 (CQ 総量 198.6 g/kg), サル D および対照は 10 年の時点で眼球摘出して検討した。CQ 投与後の糞便と尿の緑色化はサル A で最も早く 3 週目でみられたが、9 週目には全例にみられた。

1. 眼底所見

CQ 投与 2.5 か月後には視神経乳頭境界がやや不鮮明であった。CQ 投与 5.5 か月後では視神経乳頭の境界は明瞭であったが、色調がやや黄白色を帯びていた。その後、CQ 投与後 9 年まで視神経乳頭の色調が黄白色であること以外には、網膜の色調、血管、黄斑にも著変はなかった。

2. 視覚電気生理学的所見

1) ERG a 波の振幅は CQ 投与後 2.5 か月 (総量 12.0 g/kg) までは著明な変化はなかったが、投与後 10 か月 (総量 154.4 g/kg) 頃から急激に低下し、14 か月 (総量 227.4 g/kg), 34 か月には投与前と比べて有意に低下し

ていた。50 か月、10 年では、14, 34 か月に比べて有意に改善していたが、投与前までには回復していなかった (表 1, 図 1)。

2) ERG b 波の振幅は、CQ 投与開始後から 5.5 か月までは徐々に低下し、5.5~14 か月までは急激に低下した。14~34 か月まではほとんど変化なく、その後 50 か月までは徐々に改善していたが、投与前までには回復していなかった。その後 10 年までは著変はなかった (図 2)。

3) ERG a, b 波の頂点潜時には全過程を通じて有意差はなかった (表 2)。ERG 律動様小波は CQ 投与後 5~10 か月で徐々に小さくなり、14 か月にはほぼ消失し、50 か月、10 年後でも明らかな波形はなかった (図 3)。

4) cone ERG は 5.5 か月までは対照と比較して有意差はなかったが、34 か月では白、青、緑、赤色光刺激による ERG 振幅はすべて減弱していた。50 か月では白色、緑色光は改善がみられ、青色、赤色光は明らかな改善はなかった (図 4)。

5) VEP の最大振幅は CQ 投与開始後から徐々に低下し、5.5 か月後には投与前と比べて有意に低下し、有

意差は34か月後までみられた。そして50か月後、10年後には有意に改善していたが、投与前までには回復していなかった(図5)。VEP最大振幅の頂点潜時の計測では、全過程において有意な潜時の延長はなかった(図6)。

3. 組織病理学的所見

1) CQ投与後2.5か月(CQ総量12.0g/kg, サルA)では、球後視神経の軟膜中隔に取り囲まれた神経線維束には腫大・拡張したものが多数みられた。電子顕微鏡では軸索は腫大しミトコンドリアも膨化していた。ミエリン鞘の間に間隙が形成されていた。稀突起膠細胞の核には異常ないが、細胞質中のミトコンドリアが膨化していた。篩状板前部および乳頭隣接部網膜の神経線維が腫大していた。神経節細胞層から網膜外層には著変がなかった。

2) CQ投与後5.5か月(CQ総量48.6g/kg, サルB)では2.5か月の組織像とほとんど相違はなかったが、神経線維層の神経線維の腫大はなく、菲薄化が軽度みられた。

3) CQ投与後12.5か月(CQ総量198.6g/kg, サルC)では球後視神経の軟膜中隔に取り囲まれた神経線維束には腫大、拡張が多数みられた。電子顕微鏡では軸索が消失し、ミエリン鞘が離開している所が散見された。軸索とミエリン鞘間に間隙の形成されている所もみられた。篩状板前部および乳頭隣接部網膜の神経線維が菲薄化し、神経節細胞には核濃縮がみられ、細胞数も減少していた。網膜外層には著変がなかった。

4) CQ投与中止後9年(CQ総量227.4g/kg, サルD)では、球後視神経の軟膜中隔に取り囲まれた神経線維束には拡張したものが散見された。軸索が消失し、ミエリン鞘の離開している所はわずかにみられるだけであった。軸索とミエリン鞘間に間隙開大の形成されている所もみられた。星状膠細胞の細胞質中のフィラメントが目立っていた。篩状板前部網膜の神経線維は菲薄化し、後極部網膜の神経線維層も菲薄化し、神経節細胞数も減少していた。網膜外層には著変がなかった。

IV 考 按

経口摂取されたCQは、末梢神経に高濃度に蓄積され、網膜にも取り込まれる。SMON発症後10~40%に視力障害がみられ、その87.5%は発症6か月以内である。視力障害で自覚的障害40%、他覚的にみられたものは27.6%である。他覚的障害とは、主として視神経萎縮などの眼底変化を示すが、これは比較的遅れて現れる³⁾⁴⁾。

SMONの剖検例では眼球直後の乳頭黄斑線維束を集めた耳側の1象限に神経線維の著しい破壊がみられ、網膜では神経線維層の菲薄化、神経節細胞の変性・消失がみられ、この所見は、乳頭黄斑間に著明である。また、

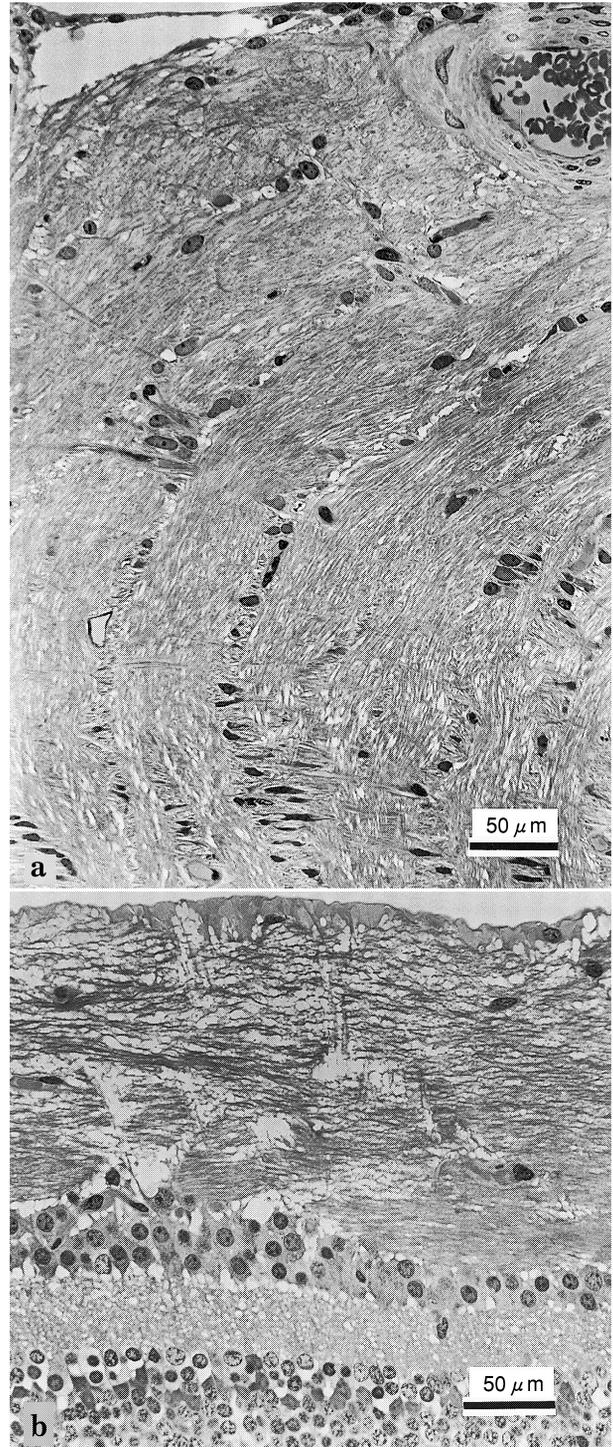


図8 CQ投与開始後5.5か月(CQ総量48.9g/kg)の視神経乳頭篩状板前部および乳頭隣接部の組織像(トルイジン青染色)。

a: 篩状板前部の神経線維が菲薄化している。b: 乳頭隣接部網膜の視神経線維層は腫張している。

内顆粒層の双極細胞にも変性を示し、網膜の障害は視神経の変性に引き続いて網膜神経線維、神経節細胞、双極細胞へと変性が進んでいくものと考えられている^{5)~7)}。

ヒトの場合、CQ内服を始めてから神経症状が出現するまでの平均総投与量は64gで、本実験においてサル

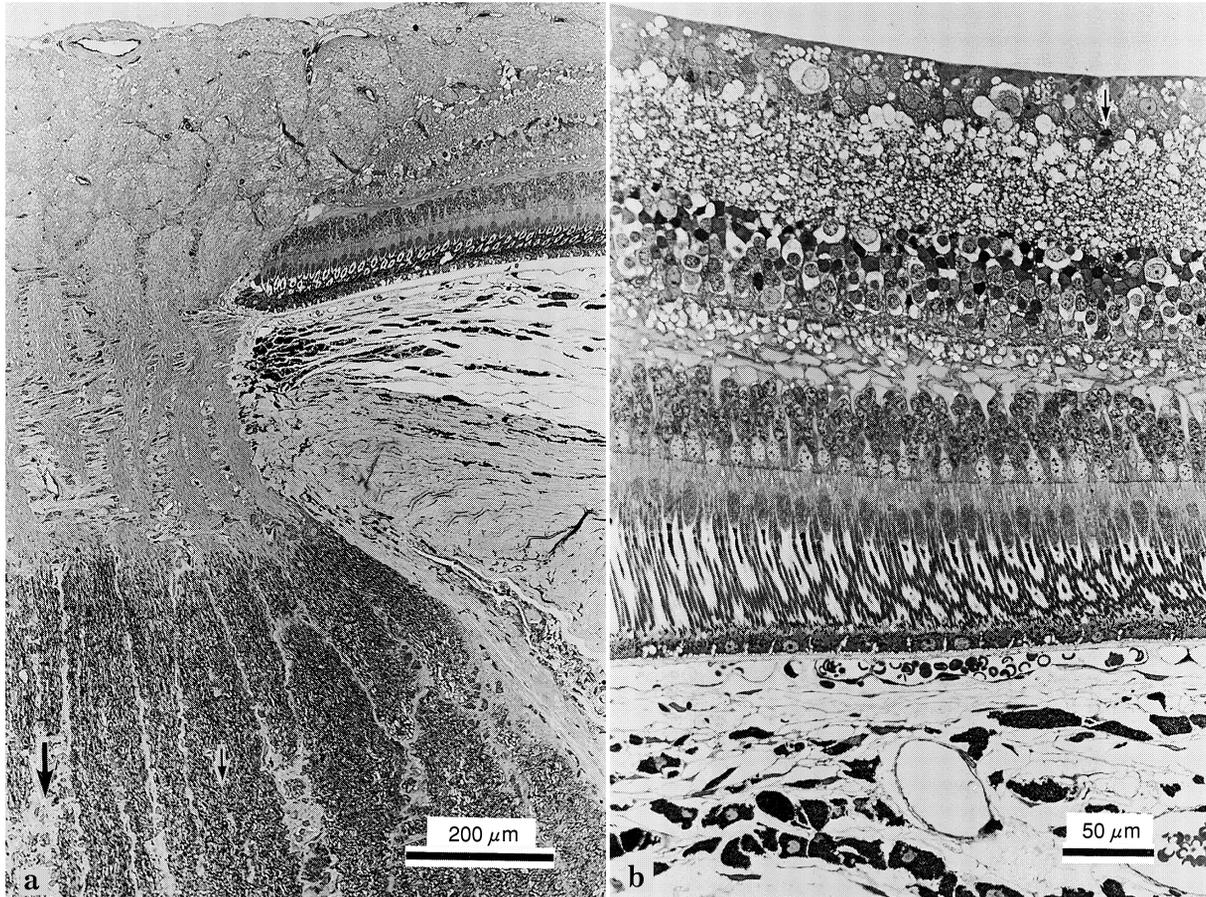


図 9 CQ 投与開始後 12.5 か月 (CQ 総量 198.6 g/kg) の視神経乳頭、後極部の組織像(トルイジン青染色)。
a : 篩状板後部神経線維束には軸索の腫大(細矢印)および軸索、ミエリン鞘の消失している所(太矢印)がみられる。篩状板前部の神経線維には著変はない。b : 後極部網膜内層には核濃縮(矢印)が散見される(細矢印)。

に投与した総量 227.4 g/kg はヒトと比較して視覚障害を惹起するには十分な量と考えられる⁸⁾。

CQ 投与 2.5 か月で、検眼鏡的に視神経乳頭の境界がやや不鮮明な所見は組織像で篩状板前部・乳頭隣接網膜の神経線維層の腫大とよく符合する。この所見は球後視神経線維束の腫大に伴伴するものであり、VEP 最大振幅の低下という電気生理学的所見を裏付けるものと考えられる。

VEP 最大振幅は CQ 投与開始直後から低下し始め、5.5 か月には最も低下し、組織学的にも視交叉近傍の視神経の限局性破壊がみられたことにより、CQ の視神経の原発性障害は証明されている⁹⁾¹⁰⁾。網膜の Müller 細胞と視細胞杆体の機能を反映していると考えられている ERG b 波振幅は、投与開始直後から 5.5 か月までは徐々に低下し、5.5~12.5 か月までは急激に低下していた。アマクリン細胞の機能を示すと考えられている ERG 律動様小波の振幅は 5~10 か月頃低下し、また、網膜視細胞の機能を示すと考えられている ERG a 波の振幅が ERG b 波と同様低下していた。組織病理学的に 5.5 か月の網膜神経線維層の菲薄化がわずかにみられたことにより、網膜障害は視神経から二次的に波及するも

のが大部分であるが、網膜原発性障害の可能性も否定することができないと考えられている¹¹⁾。

視路に取り込まれた CQ は、まず視神経の機能を限局的に障害し、続いて Müller 細胞、視細胞杆体の機能を低下させ、さらにアマクリン細胞、視細胞錐体へと影響が及ぶものと考えられる。14 か月 (CQ 総量 227.4 g/kg) で CQ 投与を中止してからは網膜、視神経への影響は進行せず、34 か月後からは徐々に機能が回復していることが視覚電気生理学的に明らかになった。奥田⁴⁾は SMON 患者の 2 年 10 か月の経過観察で、視力障害が進行した症例で視力が回復した例はなかったと報告しているが、視神経や網膜に著明な変性を示す症例を別にする、より長期にわたる経過を追えば、視機能の改善する症例もみられるのではないかと考える。また、奥田⁴⁾は視力良好な症例でも後天性色覚異常を示すことがあると報告している。CQ 投与後 34 か月では、VEP, ERG, cone ERG すべての波形振幅が減弱していたが、投与中止後 36 か月 (投与後 50 か月) で VEP, ERG, cone ERG 白色光、緑色光は明らかに改善しているにもかかわらず、cone ERG の青色、赤色光に明らかな改善がなかったことから、SMON には視力良好な症例でも後天性色

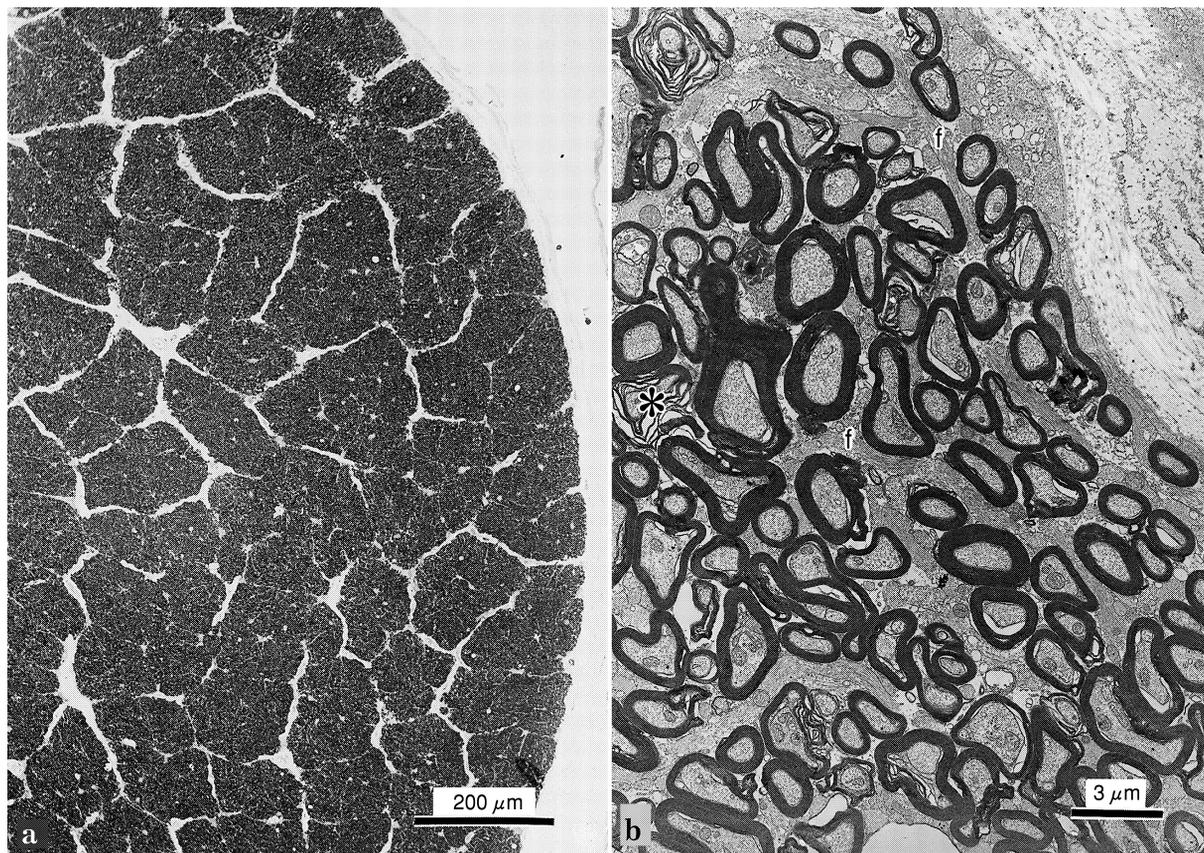


図 10 CQ 投与中止後 9 年の球後視神経の組織像。

a：結合組織の増生した軟膜中隔に取り囲まれた視神経線維束には拡張したものが散見される(トルイジン青染色)。b：軸索が消失し、ミエリン鞘が離開している所(*)が散見される。軸索とミエリン鞘間に空隙の開大の形成されている所もみられる。軟膜中隔は膠原線維が密に集まっている。星状膠細胞の細胞質中のフィラメント(f)が目立っている。

覚異常が起り得ると考えられる。

今回サルを用いた実験で、ヒトと同様に CQ による視機能の障害は比較的早期(2.5 か月)に生じ、検眼鏡、電気生理学および組織病理学的にも著明な障害が生じていることが証明された。CQ 投与を中止した 12.5 か月と比較して、投与中止 9 年後の視機能は電気生理学的には改善がみられたが、組織像からどのように解釈したらよいのだろうか。サルでは CQ 投与中は視神経、網膜に変性が進行するが、CQ 中止により組織病理学的にも変性は進行せず、機能的には残存した視神経の軸索輸送が亢進することを意味しているのであろうか。CQ 投与 2.5 か月と CQ 投与中止後 9 年の球後視神経を比較すると軸索の腫大は消失し、ミエリン鞘の配列も正常化していることから、軸索の変性・消失は機能回復を障害するほど重篤ではなかったと考え、CQ 投与中止後に電気生理学の所見が改善してきていることも説明できると考える。すなわち、軟膜中隔は CQ 投与 2.5 か月では腫脹していたが、CQ 投与中止後 9 年では反応性の結合組織増生も惹起せずに、反対に星状膠細胞のフィラメントが増生して神経線維束の拡張したものもみられていることから説明できる。

組織病理学的に球後視神経の軸索腫大、ミエリン鞘配列の乱れは、CQ 投与後 2.5, 5.5, 12.5 か月でほぼ同様の所見であったことから、CQ のサル視神経への毒性は蓄積効果ではなく、ある一定の閾値が存在するものとする。今回の実験に用いた CQ 量では、視神経・網膜に機能的回復力が残されており、形態学的には障害が進行していなかったものとする。多くの臨床例において、CQ 投与中止後数か月してから視機能が回復すると報告¹²⁾されている。今回の実験がこの報告を支持しているものとする。

文 献

- 1) 井形昭弘：SMON の臨床。神経進歩 16：853—860, 1972.
- 2) 祖父江逸郎, 安藤一也：腹部症状を伴う Myeloneuropathy。神経進歩 15：510—524, 1971.
- 3) 祖父江逸郎：キノホルム中毒。現代精神医学大系 15 B 1 版, 中山書店, 東京, 202—215, 1977.
- 4) 奥田親士：SMON における眼変化。眼紀 22：305—310, 1971.
- 5) 奥田親士, 沖坂重邦：スモン SMON。眼科 28：1300—1301, 1986.

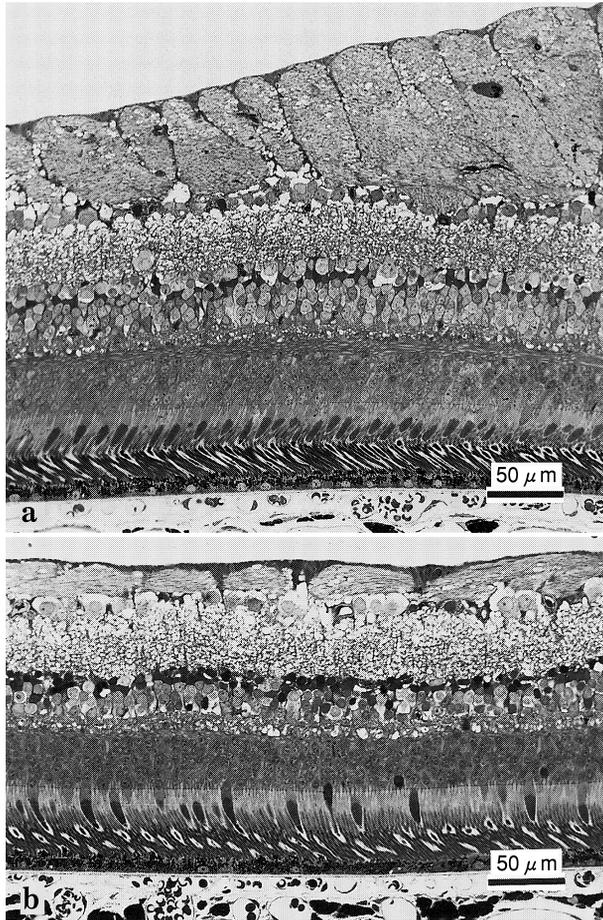


図 11 CQ 投与中止後 9 年の乳頭隣接部および後極部の組織像(トルイジン青染色)。

a : 乳頭隣接部網膜の視神経線維層は菲薄化し, 神経節細胞数が減少しているが, 網膜外層には著変をみない。b : 後極部網膜の神経線維層は菲薄化し, 神経節細胞数が減少しているが, 網膜外層には著変をみない。

- 6) 奥田観士, 上野脩幸: SMON における眼組織の変化について。日眼会誌 74 : 1145—1151, 1970.
- 7) Goto M, Akahane K, Kato K, Fukuda H : Impairment of visual system of beagles orally ingesting clioquinol. J Toxicol Sci 7 : 19—25, 1982.
- 8) 祖父江逸郎, 安藤一也: SMON における腹部症状, キノホルム投与, 神経症状発現の相互関連についての分析。医学のあゆみ 82 : 354—355, 1972.
- 9) 沖坂重邦, 山田修三, 水川 淳, 門田裕子, 築島謙次, 大滝恒夫, 他: キノホルム経口投与によるカニクイザルの視機能へ及ぼす影響(第 2 報)。厚生省特定疾患スモン調査研究班 昭和 62 年度研究報告書, 101—104, 1987.
- 10) 沖坂重邦, 門田裕子, 水川 淳, 山田修三: キノホルム経口投与によるカニクイザルの視機能へ及ぼす影響(第 3 報)。厚生省特定疾患スモン調査研究班 昭和 63 年度研究報告書, 52—55, 1988.
- 11) 沖坂重邦, 水川 淳: キノホルム経口投与によるカニクイザルの視機能へ及ぼす影響(第 5 報)。厚生省特定疾患スモン調査研究班 平成 2 年度研究報告書, 61—65, 1990.
- 12) Grant WM, Schuman JS : Toxicology of the Eye, 4th ed. Charles C Thomas Publisher, Springfield, Ill, 412—413, 1993.