

## 長期タバコ煙吸入のラット視覚毒性 (図4)

難波 龍人 (大阪医科大学眼科学教室  
主任：東 郁郎 教授)

## Tobacco Smoke and Derangement of the Visual Function in Rats

Tatsuto Namba

Department of Ophthalmology, Osaka Medical College

## 要 約

ラットを用いたタバコ弱視のモデル実験を行った。毎日5時間、紙巻きタバコ15本分のタバコ煙の吸入により5週目より VEP の潜時延長を認め、10週目には対照群に対して35%の潜時延長を認め統計学的に有意であった。32週間経過後に3週間の吸入中止期間をおいても VEP の変化は戻らず、視覚系に対する障害を確認した。ERG は正常を示したことより、この障害は主に視神経を含む中枢視覚系であると考察した。またタバコ煙中にはシアンと共に多量の一酸化炭素が含まれており、タバコ弱視の病因を考える上でニコチン、ビタミン B<sub>12</sub>、シアンのみならず一酸化炭素の関与も十分に検討する必要があると思われる。(日眼 91:801-806, 1987)

キーワード：タバコ弱視、VEP 頂点潜時、一酸化炭素、シアン、ラット

## Abstract

The chronic effects of tobacco smoke on the visual system of rats were investigated. Tobacco smoke of 15 cigarettes were daily inhaled within a five-hour period by six Wistar rats and the derangement of visual functions were compared with those of the same number of non-smoking controls. At the fifth week of inhalation, the peak latency time of P1 wave of VEP significantly prolonged, and at the tenth week, this prolongation was more marked with 35% delay compared to the control ( $p < 0.01$ ). Even after discontinuance of inhalation for three weeks from the 32nd week to the 35th week, no improvement of the prolongation was found. Though no histopathological abnormalities were detected in the optic nerve or the central visual system, the functional damage seemed to be permanent. Since all the ERG records and histopathological findings of the retina during the experiment were normal, the responsible lesion for the abnormal VEP was considered to be at the optic nerve or the central visual system. Although the participation of carbon monoxide in tobacco amblyopia was not considered in previous literature, we thought that carbon monoxide as well as cyanoid, vitamin B<sub>12</sub> and nicotine might be the causative agent which induced the above prolongation of the P1 wave of VEP, because a large quantity of carbon monoxide was contained in tobacco smoke. (Acta Soc Ophthalmol 91: 801-806, 1987)

Key words: Tobacco amblyopia, VEP peak latency time, Carbon monoxide, Cyanoid, Rat

## I 緒 言

近年、喫煙の害に対する関心が高まっているが、視

覚系で喫煙と関連する疾患としては、以前よりタバコ弱視あるいはタバコ・アルコール弱視が知られており、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏との関連なども推定されている。し

別刷請求先：569 大阪府高槻市大学町2-7 大阪医科大学眼科学教室 難波 龍人

Reprint requests to: Tatsuto Namba, M.D. Dept. of Ophthalmol., Osaka Medical College  
2-7 Daigaku-machi, Takatsuki 569, Japan

(昭和62年4月4日受付) (Accepted April 4, 1987)

かし、そのメカニズムを明確な実験で究明しようとした研究はあまりない。そこでタバコ弱視において喫煙中の直接の原因物質、その視機能系での作用部位、作用機序などを検討することは重要であると考え、今回ラットの実験モデルを用いて喫煙の視機能系への作用を電気生理学、生化学、組織学の各視点より観察し検討を行った。その結果、VEP 潜時、血中シアン濃度、血清ビタミン B<sub>12</sub>濃度などに興味ある所見を得たのでここに報告する。

## II 実験対象と方法

実験動物として、Wistar 系雄ラット 6 匹を吸入群として 9 週齢 (平均体重 210g) よりタバコの吸入を行い、6 匹を対照群とした。吸入前および吸入後 32 週にわたって定期的に flash ERG, flash VEP, 末梢神経伝導速度の測定を行った。VEP の変化が明らかになった後、各臓器の組織を光学顕微鏡にて観察を行った。また 32 週よりタバコ吸入を中止し、3 週間後 ERG と VEP を測定した。

### 1. タバコ吸入室

タバコの吸入には、図 1 のような内容量 320 l の 1 面がガラス張りの金属製の箱を用いた。中に 3 段の棚を設置し、その下方の 2 段に傾斜をつけタバコ煙を誘導すると共に煙中のタール分の一部を附着除去した。最上段にラットの飼育箱を乗せ自然呼吸によりタバコ煙を吸引させた。タバコ煙は、最下段に毎分 0.52 l で送入し最上段天板より自然排気した。煙の吸入は、毎日紙巻きタバコ (Mild Seven®) を 15 本分、約 5 時間で行った。この間の吸入室内の粉塵量の測定には、柴田科学器械工業のデジタル粉塵計 Model P5L を用い、記録には Kanomax Model 5184 を使用した。酸素濃度の測定には、光明理化学工業の北川式酸素警報器 OMA-3A

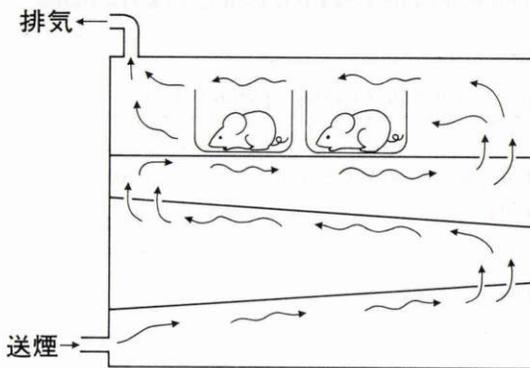


図 1 タバコ煙吸入室

を使用した。二酸化炭素濃度には北沢産業の直読ガス検知管ガステック® CO<sub>2</sub>2L, 一酸化炭素濃度には同 CO1LL と 1L と光明理化学工業の一酸化炭素測定器 TPA-102 も用いて測定した。シアシガス濃度は、吸入室内の空気 500cc を 3 塩化酢酸 20% 液内に通し酸加水分解を行いアルカリ金属塩および土類塩としたものと、加水分解せずにロダン化合物も含めた総量としての両方をガステック CN12L およびピリジンピラゾン法<sup>1)</sup>にて測定した。

### 2. Flash ERG

刺激、測定には Eiraku Electric Co. LTD の ERG Scope Type ER-502 を用い、ラットはベノキシール点眼による角膜表面麻酔のみ施行し、内面を光沢白色塗装した暗箱内に拘束した。閃電極は、白金線の特製コンタクトレンズを作製し角膜頂点に置いた。不閃電極は、針電極を頭皮下に置き、接地電極は耳介に置いた。30 分暗順応後、刺激は 20J キセノンランプに、白色フィルターを用いて diffuser として使用し、30cm の距離より刺激を行い、内面白色の暗箱と共に Ganzfeld の刺激を狙った。a 波、b 波および律動様小波を時定数 0.3 と 0.003 で記録した。

### 3. Flash VEP

測定は池田ら<sup>2)3)</sup>の方法に準じて施行した。刺激には三栄測器の Photo Stimulator 3G21-P, 増幅には Nihon Kohden の Dual-Beam Memory Oscilloscope VC-10, 加算には Nihon Kohden の Averager DAT-1100 を用い、記録には Yokogawa Electric Works の X-Y Recorder Type 3077 を使用した。ラットは無麻酔にて拘束し、刺激は 1J キセノンランプを用いて 50 cm の距離から行った。閃電極は後頭結節の前 18mm の頭皮下に、不閃電極は後頭結節の前 10mm の頭皮下に置いた。接地電極は両耳介に置いた。加算は、3 秒間隔にて 32 回行った。

### 4. 末梢神経伝導速度測定

測定には尾を用いた。刺激には Nihon Kohden の Electronic Stimulator Model MSE-3R を用い、増幅には Nihon Kohden の Universal Dual-Beam Oscilloscope VC-7A, Biophysical Amp AVM-2 を用いた。パラフィン浴槽を用いて恒温下で施行した。刺激、測定には針電極を用いた双極誘導で行い、測定電極は尾端部に置き長間隔の刺激電極を尾根部に、短間隔の刺激電極を尾端部より、測定電極と短間隔の刺激電極の間に接地電極を置いた。長間隔は約 170mm, 短間隔は約 50mm で潜伏時間の差より伝導速度を求めた。刺

激は、70Vで刺激時間は0.05msecで行った。

5. 組織学的検査

VEPの変化を確認後、ネブタール麻酔下にて左心室より1%パラホルムアルデヒドと1.25%グルタルアルデヒドを含む液で還流固定した。各組織を摘出し、さらに0.1M カゴジレイト緩衝液で洗浄、1%四酸化オスミウムにて後固定した。アルコール脱水、エポキシ樹脂包埋後、トルイジンブルー染色にて観察した。

6. 生化学的検査

ビタミンB<sub>12</sub>は、ヘパリン採血後、血清を分離し、これに約20ppmのKCNを含むグルタミン酸緩衝液を加え、熱湯にて加熱し、シアノコバラミンの形で抽出する。これを<sup>57</sup>Coを用いたセファゾックス固相法<sup>4)</sup>にて測定した。

血中シアンは、ヘパリン採血した全血を10%硫酸中に入れHCNの形で気化させ0.1N水酸化ナトリウムにて溶解捕捉する。これをピリジンピラゾロン法にて測定した。

一酸化炭素濃度は、粉塵量と同様、比較的速やかに上昇し、770ppm付近で送煙終了まで安定していた。これは、環境基準を遙かに超えた極めて高い値と言えた。シアンガス濃度も同じようなカーブを描き安定していたが、2ppmを超えることはなく環境基準内に収っていた。またロダン化合物もほぼ同じ濃度で経過し2ppmは超えなかった。

二酸化炭素濃度は、タバコを燃焼したガスとラットの呼吸により幾分増加したが、0.8%を超えず環境基準内に収っていた。酸素濃度も同様の理由によりやや低下したが、これもまた18%を割ることはなく環境基準に適合する範囲内であった。以上より、本実験中においては二酸化炭素の影響は無視でき、また低酸素状態にもなっていなかったと言える。

2. ERG

タバコ吸入群と対照群との間には、潜時、振幅とも

III 結果

1. 各ガス濃度

各ガス濃度は図2のごとくである。粉塵量は、送煙直後より速やかに上昇し、その後送煙終了まではほぼ横這い状態であり、このことより煙の濃度は極めて安定していたと言える。

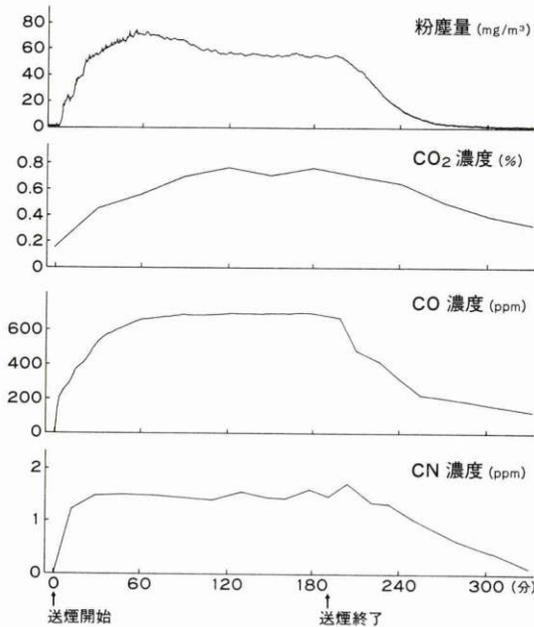


図2 タバコ煙吸入室内のガス濃度の時間的変化

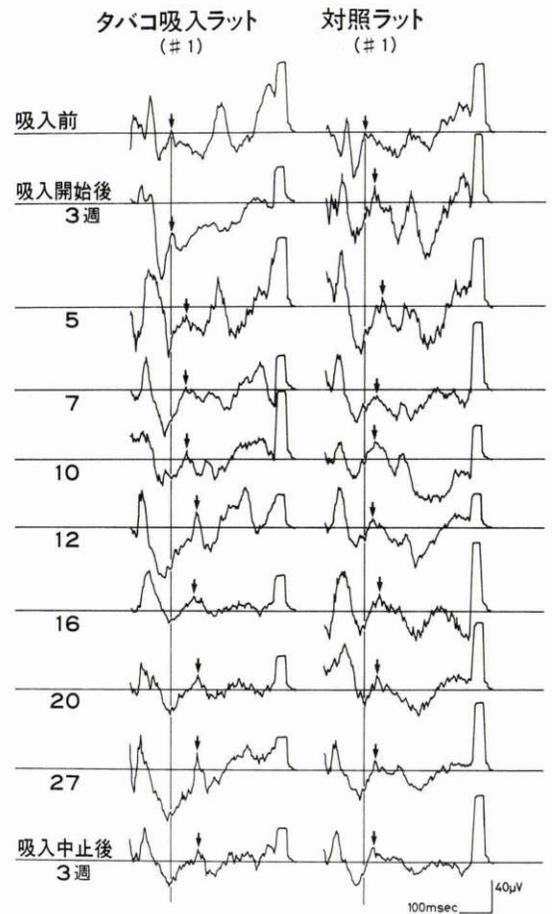


図3 代表症例の VEP. 矢印で示した波を P<sub>1</sub>とし、主として判定に用いた。

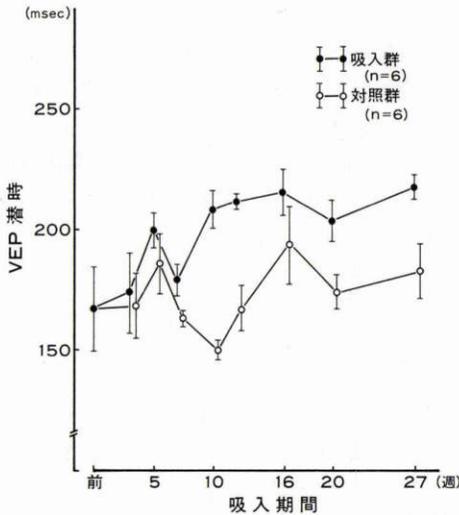


図4 吸入群および対照群のVEP P<sub>1</sub>の頂点潜時。吸入5週目より差は有意で ( $p < 0.05$ )、10週目以降はその差はさらに顕著となった ( $p < 0.01$ )。

有意な差は認められなかった。

### 3. VEP

ラットのVEPの各波の命名には種々あるが、今回の実験では最も安定していた図3の矢印で示した波をP<sub>1</sub>とし、主として判定に用いた。VEPの各波は、タバコ吸入群、対照群ともに週齢が進むに従い潜時が徐々に遅れた。しかし、タバコ吸入群においては対照群に比べ、早期に潜時の遅れが現れ、また大きかった。このことはP<sub>1</sub>において特に著しく、5週目より遅れ始め、統計的に有意であった ( $p < 0.05$ , 図4)。10週目からは対照群と明らかな差を生じた ( $p < 0.01$ )。また32週目より吸入中止後3週間後のVEPに中止前に比べ大きな変化は認められず、VEP変化は不可逆であった。検定にはStudent's t testを用いた。

### 4. 末梢神経伝導速度

タバコ吸入群と対照群の間には有意な差は認められなかった。

### 5. 眼底および組織学的検査

実験の全経過を通じて、眼底は検眼鏡的に異常は認められなかった。27週目の組織学的検査にても視神経、網膜に明らかな変性は認められなかった。

### 6. 生化学的検査

吸入32週目の血中シアンは、タバコ吸入群が0.2 $\mu$ g/mlであり、対照群の0.1 $\mu$ g/ml以下と比べ有意に上昇していた。ビタミンB<sub>12</sub>は、吸入群1,650pg/ml、対照群2,500pg/ml以上と吸入群において有意に低い血清

値を示した。

## IV 考 按

タバコの視機能に対する影響はなお十分解明されていないが、喫煙による視力低下については19世紀より既に報告があり、タバコ弱視、タバコ・アルコール弱視として知られている。ヒトにおいて乳頭黄斑線維の変性の報告があり、視神経障害を来たすとしている<sup>5)</sup>。またヒト喫煙者の症例ではVEPの潜時の延長が認められた<sup>6)</sup>とする報告と認められなかったとする報告<sup>7)</sup>がある。

ラットVEPの測定方法は、いまだ確定されておらず関電極の設置場所も一定していない。われわれは池田ら<sup>2)</sup>に準じて測定を行ったが、中毒の検定には波の再現性が最も重要であるため、不安定であった第一波ではなく最初の安定した陽性波をP<sub>1</sub>として判定に用いた。VEP各波の潜時はタバコ煙の吸入期間の経過と共に徐々に延長し、P<sub>1</sub>潜時の延長は有意であった。タバコ・アルコール弱視の初期に、網膜の小血管に怒張、蛇行が認められたとの報告もあり<sup>8)</sup>、脈絡膜循環の血流量が低下するとの報告もある<sup>9)</sup>。しかし今回の実験では、眼底に検眼鏡的な異常は認められず、ERGにおいても潜時、振幅とも対照群との差は認められなかった。このことから、視神経を含む中枢視覚系の障害と考えた。そこで組織学的に視神経、大脳などを観察したが、特に異常を見出せなかった。このことは本実験の吸入32週目の時点では、視機能系の障害は機能的なものであり、おそらくは軸索輸送の障害などに留り、形態的な障害までに至っていないとも考えられた。しかしながらVEPの変化は不可逆の変化であり、すでに器質的な変化が起きていることを暗示する。さらに吸入を続ければヒトと同様の器質的な変化を生じる可能性もあろう。種田ら<sup>10)</sup>は、ラットにおいて極く短期のアルコールの単独負荷にて、VEPの変化のみならず視神経の変性も来すと報告しており、いわゆるタバコ・アルコール弱視では視神経への障害はより早期に認められるものと考えられる。

その発症機序としてタバコ弱視では、ビタミンB<sub>12</sub>欠乏によってタバコ煙中に含まれるシアン代謝が不完全となるため、解毒されていないシアンによって視機能が障害されると言われている<sup>5)11)</sup>。タバコ煙には1,500ppmを越える多量のシアンが含まれているとの報告もある<sup>12)</sup>。このためシアンガスはかなり高濃度を予想していたが、本実験で使用した紙巻きタバコでの

吸入室内の濃度は最高でも2ppmと環境基準を超えなかった。しかしながら血中シアン濃度は有意に上昇しており、Jesticoら<sup>13)14)</sup>の報告を裏付けている。さらに血清ビタミンB<sub>12</sub>も低値であり、喫煙によって胃粘膜に障害を来たしビタミンB<sub>12</sub>の吸収不全に陥っていることが十分考えられる。よって本報告はビタミンB<sub>12</sub>欠乏によりシアンの代謝が障害され、タバコ煙中のシアンが蓄積し視神経を障害するというタバコ弱視の機序を裏付けていると言えよう。しかしタバコ弱視も一種の欠乏性の弱視であり悪性貧血に見られるような視機能障害と同様であるとしているものもあり<sup>5)</sup>、今後検討の余地がある。

いままでタバコ弱視を論ずる上で、一酸化炭素についてはあまり触れられていないが、公衆衛生の分野では以前よりタバコ煙中の一酸化炭素の毒性が取り上げられている。喫煙による室内の空気汚染でも一酸化炭素は高く<sup>15)</sup>、さらにKachulis<sup>16)</sup>は、passive smokingを慢性一酸化炭素中毒の原因として捉えている。体内の一酸化炭素の起源としてタバコは第一に挙げられ、その10~15%は血管外、すなわち酵素などと結合していると言われ、heavy smokerでは、心臓の30%のmyoglobinが一酸化炭素で飽和しており、COHbレベルは8%に達するとされている<sup>17)</sup>。また判断力や運動機能はCOHbが10%を越えなければ障害されないが、一過性の視覚閾値の変化や視覚の僅かな障害はCOHbレベルが5%でも認められ<sup>18)19)</sup>、4.5%以下でも視覚弁別閾に障害を来す<sup>20)</sup>と言われ、視機能は他臓器に比べ一酸化炭素暴露に対して弱いとされている。本実験においても、吸入室内の一酸化炭素濃度は吸入時間中の大部分において700ppmを越えるという高い濃度を示した。タバコ弱視の病因を考える上で一酸化炭素も無視できないと思われる。またシアンの毒性は一酸化炭素の共存によって増強されるとも考えられ、一酸化炭素の視機能に対する影響を今後さらに明らかにする必要がある。またニコチンなどタバコ煙中の他成分の長期暴露による薬理作用についても検討しなければならないであろう。

稿を終えるにあたり、ご校閲いただきました東 郁郎教授に深謝いたします。またご指導いただきました北里大学医学部眼科学教室の石川 哲教授、宮田幹夫助教授に深謝し、ご協力いただきました奥 英弘先生、北里ヘルスサイエンスセンターの小西淑人、佐古博恒の両先生に感謝いたします。

## 文 献

- 菅野三郎：ビリジンピラゾロン法。大気汚染研究協議会編：大気汚染ハンドブック(1)(測定法)。東京、コロナ社、205—206, 1975。
- 池田 潔, 辻澤宇彦, 難波龍人他：トルエンの視覚毒性に関する研究。第90回日本眼科学会総会, 四日市, 三重, 1986。
- 池田 潔, 難波龍人, 青木 繁他：ラットのVEPおよびERGの測定条件。神眼 投稿中。
- Wide L, Killander A: A radiosorbent technique for the assay of serum vitamin B<sub>12</sub>. Scand J Clinical Laboratory Investigation 27: 150—159, 1971.
- Duke-Elder S: System of Ophthalmology, vol 12, Henry Kimpton, London, 145—155, 1971.
- Krumsiek J, Kruger C, Patzold U: Tobacco-alcohol amblyopia neuro-ophthalmological findings and clinical course. Acta Neurol Scand 72: 180—187, 1985.
- Kupersmith MJ, Weiss PA, Carr RE: The visual-evoked potential in tobacco—alcohol and nutritional amblyopia. Am J Ophthalmol 95: 307—314, 1983.
- Frisen L: Fundus changes in acute mal-nutritional optic neuropathy. Arch Ophthalmol 101: 577—579, 1983.
- 井上 康：喫煙の脈絡膜循環に及ぼす影響。第90回日本眼科学会総会, 四日市, 三重, 1986。
- 種田芳郎, 奥脇賢一, 佐古博恒他：エタノールの視覚毒性に関する実験的研究。ラットアルコール視神経症の生理組織学的研究, 第91回日本眼科学会総会, 京都, 1987。
- Darby PW, Wilson J: Cyanoide, smoking and tobacco amblyopia: Observations on the cyanoide content of tobacco smoke. Brit J Ophthalmol 51: 336—338, 1967.
- Miller NR: Walsh and Hoyt's Clinical Neuro-ophthalmology, vol 1, Baltimore/London, Williams & Wilkins, 273—295, 1982.
- Jestico JV, O'Brien MD, Teoh R, et al: Whole blood cyanoide levels in patients with tobacco amblyopia. J Neurol Neurosurg Psychiatry 47: 573—578, 1984.
- Poulton J, Rylance GW, Taylor AW, et al: Serum thiocyanate levels as indicator of passive smoking in children. Lancet 2: 1405—1406, 1984.
- Sterling TD, Dimich H, Kobayashi D: Indoor byproduct levels of tobacco smoke: A critical review of the literature. J Air Pollut Control Assoc 32: 250—259, 1982.
- Kachulis CJ: Secondhand cigarette smoke as

- a course of chronic carbon monoxide poisoning. *Postgrad Med* 70 : 77-79, 1981.
- 17) **Spencer PS, Schaumburg HH** : Experimental and Clinical Neurotoxicology. Baltimore/London, Williams & Wilkins, 373-394, 1981.
- 18) **Halperin MH, McFarland RA, Niven JL, et al** : The time course of the effects of carbon monoxide on visual thresholds. *Jour Physiol* 146 : 583-593, 1959.
- 19) **Stewart RD** : The effect of carbon monoxide on humans. *J Occup Med* 18 : 304-309, 1976.
- 20) **McFarland RA, Roughton FJW, Halperin MH, et al** : The effects of carbon monoxide and altitude on visual thresholds. *Jour Aviation Med* 15 : 381-394, 1944.
-