

実験的タバコ弱視発症におけるシアンおよびビタミン B₁₂ 欠乏の関与について

奥 英弘*, 福島 一哉**, 宮田 幹夫**, 若倉 雅登**, 石川 哲**

*大阪医科大学眼科学教室, **北里大学眼科学教室

要 約

我々はタバコ喫煙ラットの視覚障害を検討し、球後視神経に脱髄性変化を認め、視覚誘発脳電位図 (VEP) 頂点潜時が延長する事を報告した。タバコ弱視発症には、シアン解毒障害やビタミン B₁₂ (B₁₂) 欠乏の関与が考えられている。そこでシアンおよび B₁₂ 欠乏による視神経障害を検討するため、タバコ煙に含まれる濃度のシアンガスを、12匹の Wistar 系雄ラットに、1日5時間、52週間にわたり連日吸入させ、内6匹は B₁₂ 欠乏食で飼育した。また他の12匹を対照とし、半数を B₁₂ 欠乏食で飼育した。B₁₂ 欠乏食・シアン吸入ラット6匹の内2匹において、球後視神経中央に脱髄性変化を認めた。組織変化は限局性で、VEP 頂点潜時の延長は認められなかった。低濃度シアンガスの吸入は B₁₂ 欠乏下で視神経障害性を持つと考えられたが、タバコ喫煙実験で認められた明かな VEP 潜時延長をとまなう視神経障害の発症には、ニコチン、一酸化炭素など他の有毒物質の関与が大きいと考えられた。(日眼会誌 95:158-164, 1991)

キーワード: シアン, ビタミン B₁₂, タバコ弱視, ニコチン, 一酸化炭素

Cyanide With Vitamin B₁₂ Deficiency As The Cause of Experimental Tobacco Amblyopia

Hidehiro Oku*, Kazuya Fukushima**, Mikio Miyata**,
Masato Wakakura** and Satoshi Ishikawa**

*Department of Ophthalmology, Osaka Medical College

**Department of Ophthalmology, School of Medicine, Kitasato University

Abstract

The visual toxicity of tobacco smoke was studied and demyelination change of retrobulbar portion of the rat's optic nerve with an elongation of a peak latency time of visual evoked potentials (VEP) was demonstrated. Cyanide detoxication incapacity and deficiency of vitamin B₁₂ (B₁₂) have been considered as possible causes of tobacco amblyopia. In order to elucidate an influence of cyanide poisoning and B₁₂ deficiency on the visual system, 12 male Wistar rats were subjected to 5 hour's daily inhalation of cyanide gas for 52 weeks, the concentration of which was adjusted to that of tobacco smoke. Six rats of these 12 were fed with a lacking B₁₂ diet. Another 12 male Wistar rats were controls which did not undergo inhalation of cyanide gas, and half of them were fed a diet without B₁₂. In 2 out of 6 rats with cyanide and inhalation avel B₁₂ deficiency, demyelination change could be recognized in the central portion of the retrobulbar optic nerve. The histological change was segmental and

別刷請求先: 569 高槻市大学町2-7 大阪医科大学眼科学教室 奥 英弘

(平成2年6月1日受付, 平成2年6月14日改訂受理)

Reprint requests to: Hidehiro Oku, M.D. Department of Ophthalmology, Osaka Medical College.

2-7 Daigaku-machi, Takatsuki 569, Japan

(Received June 1, 1990 and accepted in revised form June 14, 1990)

significant elongation of the peak latency time of VEP was not recognized. Cyanide gas inhalation at a low concentration was proved to be harmful to the optic nerve under the condition of B₁₂ deficiency, but other toxic elements such as nicotine and carbon monoxide may be important factors to cause the more severe changes of the optic nerve with an abnormal VEP response recognized in the experimental tobacco amblyopia. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95: 158-164, 1991)

Key words: Cyanide, Vitamin B₁₂, Tobacco amblyopia, Nicotine, Carbon monoxide

I 緒 言

我々はラットを用いタバコ煙を副流煙として喫煙させ、その視機能に対する影響を観察してきた¹⁾²⁾。その結果 VEP 上 N₁, P₁ 頂点潜時の延長を認め²⁾、さらに喫煙52週では球後視神経において、グリアおよび間質の増加、神経繊維の脱落、髄鞘の脱髄性変化などを認めた²⁾。従来タバコ弱視の原因としては、タバコ煙に含まれるシアン化合物と、その解毒に有用とされるビタミン B₁₂ (以下 B₁₂ と表わす) の欠乏が重要視されてきた³⁾。われわれの実験でもタバコ煙中にシアン化合物が含まれる事¹⁾、それに伴い喫煙ラットの血中シアン化合物の増加、赤血球中 B₁₂ の低下を認めた²⁾。シアン化合物は Leber 病でも重要視されているが⁴⁾、視神経に対する慢性毒性に関する研究は少なく、また視神経障害をきたすには致死量近い量を必要とする⁵⁾。一方タバコ煙中のシアン化合物濃度は極めて低濃度であり¹⁾、ニコチンや一酸化炭素など他の無視できない有毒物質も存在する¹⁾。今回我々はタバコ弱視発症におけるシアンおよび B₁₂ 欠乏の関与を確認するため、B₁₂ 欠乏食で飼育したラットにタバコ煙に含まれていた低濃度のシアン化合物を吸入させ、その視機能に対する影響を生理学的、組織学的に検討する一方、B₁₂ 欠乏食による各組織内 B₁₂ 含有量の変化を検討し、興味ある所見を得たので報告する。

II 実験方法

実験動物として Wistar 系雄ラットを用いた。12匹のラットに9週齢体重約200gよりシアンガスを吸入させた。シアンガスはシアン化カリウム溶液(KCN)を電動ポンプで硫酸溶液中に滴下して、シアン化水素ガス(HCN)として発生させた。シアン化水素ガスは、タバコ喫煙実験で使用したのと同じチャンパー内へタバコ煙同様3時間導かれ、以降2時間で排気孔から完全に排気される。同チャンパー内でタバコ煙同様に、シアン化水素ガスを連日5時間吸入させた¹⁾。チャン

パー内のシアン化水素ガス濃度は、タバコ副流煙中に認められた濃度である2ppm程度¹⁾になる様にシアン化カリウム溶液の濃度および滴下速度を調整した。その内6匹については離乳後体重約80g(4週齢)よりB₁₂欠乏食で飼育した。また他の12匹を、それぞれ6匹ずつ普通食とB₁₂欠乏食で飼育して対照とした。従って実験動物は各群6匹で以下の様になる。1) 普通食・シアン吸入群、2) 欠乏食・シアン吸入群、3) 欠乏食群、4) 対照。

視機能検査として bright flash ERG および flash VEP を用いた。測定方法は既報の方法に従った¹⁾²⁾。

組織学的検査

シアンガス吸入後52週の時点で、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灌流固定した。なおその直前にB₁₂、シアンの各血中濃度測定のため心臓採血を行った。摘出した組織は0.1%コジレット緩衝液で洗浄し、1%四酸化オスミウムにて後固定した。エタノール系列で脱水後、エポキシ樹脂にて包埋し、トルイジンブルー染色にて光学顕微鏡で観察した。超薄切片は酢酸ウラニウム、クエン酸鉛にて二重染色し電子顕微鏡にて観察した。

生化学的検査

B₁₂はヘパリン採血後遠心分離にて、赤血球、血清を分離し、KCN添加グルタミン酸緩衝液を加え熱湯加熱し、シアノコバラミンの形で抽出し、Co⁵⁷を用いた radioimmunoassay (RIA) ⁶⁾にて測定した。またB₁₂欠乏食による各組織内のB₁₂含有量の変化を見るため、普通食および欠乏食で約1年飼育したラット各3匹を屠殺し、大脳、小脳、視神経、網膜、座骨神経および肝臓を摘出し、生理食塩水下でホモジナイズし、遠心分離後その上清を用いてRIAにて測定した。

シアンはヘパリン採血した全血を10%硫酸中に入れシアン化水素ガスを発生させ、0.1%水酸化ナトリウムにて捕捉し、ピリジンピラゾロン法⁷⁾にて測定した。検定には Student t test を用いた。

III 結 果

1. シアンガス濃度

検知管（ガステック CN12L[®]）にて測定したシアン化水素ガス濃度は、送煙後1時間で2から4ppmを示し、その後送煙終了時まで一定していた。

2. 体重変化

シアン吸入開始後26週経過した時点での体重は、普通食・シアン吸入群325.0±4.2g、欠乏食・シアン吸入群324.3±4.5g、欠乏食群391.2±18.8g、対照群433.7±18.5gであった。対照とその他の群の間には、1%以下の危険率で有意な体重差が認められた。しかし普通食・シアン吸入群と欠乏食・シアン吸入群の間

表1 普通食とB₁₂欠乏食で1年飼育したラットの血液および組織内B₁₂濃度(平均±SD)を示す。赤血球は生理食塩水で洗浄し、1500Gで15分間遠心分離した後に測定。

	普通食	B ₁₂ 欠乏食	検定(P)
血 清	0.91±0.17	0.05±0.01(ng/ml)	<0.05
赤 血 球	0.29±0.04	0.10±0.02(ng/ml)	<0.01
網 膜	0.58±0.11	0.22±0.05(ng/eye)	<0.05
視 神 経	27.7±4.9	20.0±2.8 (ng/g)	>0.05
大 脳	31.5±3.4	15.2±3.4 (ng/g)	<0.01
小 脳	56.0±11.4	16.0±4.1 (ng/g)	<0.05
座骨神経	20.3±4.5	8.1±3.1 (ng/g)	<0.05
肝 臓	37.8±2.7	7.1±2.4 (ng/g)	<0.01

の体重差は有意でなかった (p>0.05)。

3. 生化学検査

各組織のB₁₂含有量を表1に示す。神経組織B₁₂含有量は、血清レベルに比較して非常に高く、普通食飼育のラットでは単位湿重量あたりでは肝組織と同程度の含有量が認められた。また血清濃度は赤血球内濃度に比べ約3倍の濃度を示した。B₁₂欠乏食で1年間飼育したラットの血清B₁₂値は、0.05ng/mlと対照の10%以下に低下しており、逆に赤血球内濃度の方が血清濃度よりも高い値を示した。視神経、網膜をはじめ各組織のB₁₂含有量は、低下しているものの、血清値に比較すると十分保存されていた。また貧血所見は認めず赤血球容積の増大も認めなかった。

シアンを吸入させたラットの血中シアン濃度は前回のタバコ喫煙実験同様に、52週吸入後0.2μg/mlの値で検出された²⁾。

4. VEP

前回同様に約100msecに認められる陰性波をN₁として検討すると²⁾、普通食・シアン吸入、欠乏食・シ

表2 VEP N₁潜時の変化を表す。平均±標準偏差(SD)。(単位 msec)

	対 照	欠 乏	シアン吸入	欠乏・シアン吸入
負 荷 前	98.4±6.2	82.2±7.4	81.6±7.6	82.0±4.0
52 週 後	108.6±8.8	82.6±14.6	86.3±4.6	98.6±13.9
潜時延長	1.12±0.10	1.01±0.08	1.01±0.08	1.11±0.12

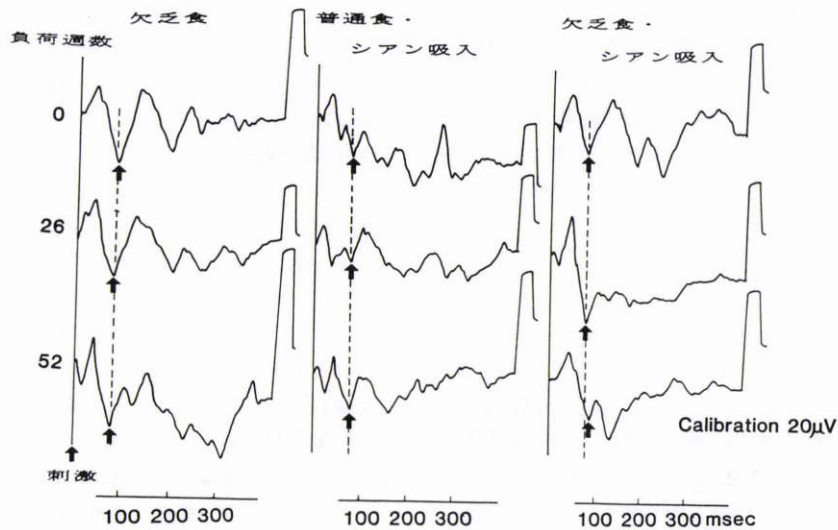


図1 各群でのVEP波形。calibration=20μV。各群とも52週経過時のVEP N₁潜時はほとんど延長していない。

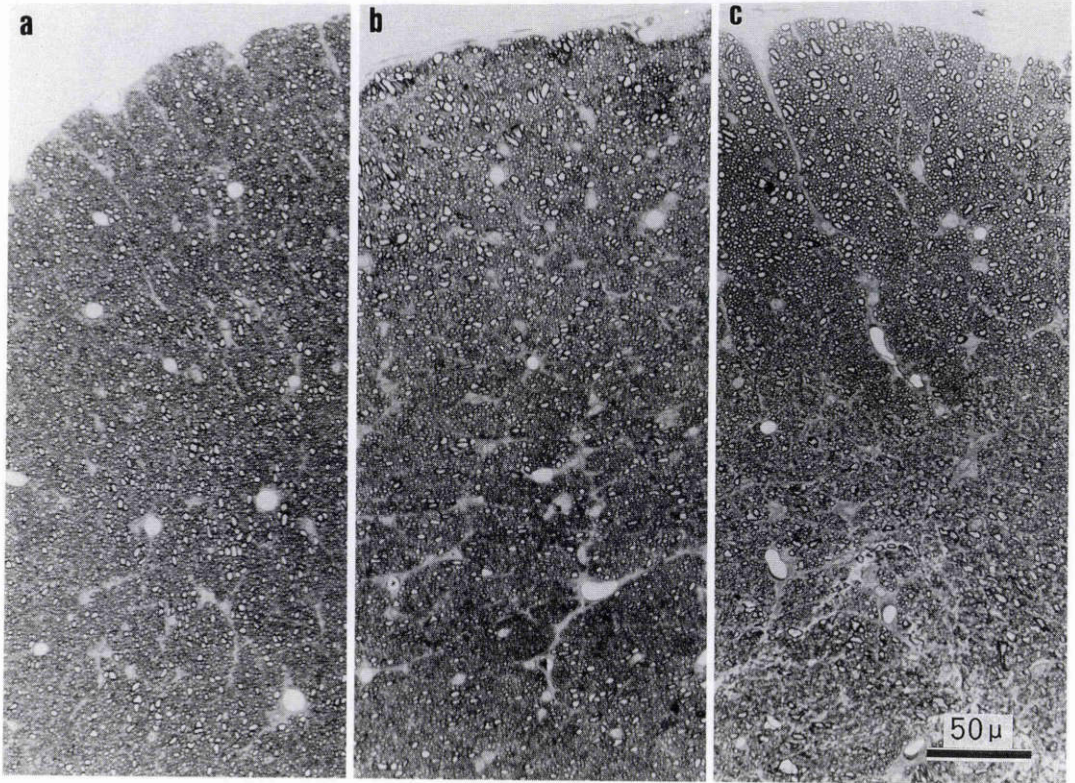


図2 視神経横断面の光学顕微鏡写真。トルイジンブルー染色×280. a) 欠乏食, b) 普通食・シアン吸入, c) 欠乏食・シアン吸入群ラットよりの組織切片. c) では視神経周辺部は正常構造を保っているが, 中央部の神経繊維の配列が乱れ, グリアよりの突起が神経繊維間に分け入る様に伸びている.

ン吸入, 欠乏食の各群のラットでは, N₁潜時はシアン吸入負荷前で約80~85msec 付近に認められた. 図1に VEP の変化を示す. また表2に吸入前後の N₁潜時の変化を示す. 潜時延長の割合は, それぞれのラットについて, 吸入後の潜時を吸入前の潜時で除して求めた. 図1に示す様に普通食・シアン吸入群, 欠乏食群, 対照群とも N₁潜時の延長は認められなかった. 欠乏食・シアン吸入群では, N₁潜時は延長傾向を示したが, 対照と比較して有意な変化ではなかった.

5. ERG

a 波, b 波の潜時振幅には各群とも変化を認めなかった.

6. 組織学的変化

図2に視神経横断面の光学顕微鏡写真, 図3に電子顕微鏡写真を示す. 光学顕微鏡下では対照と比較して, 欠乏食群, 普通食・シアン吸入群とも著明な変化を認めず, 神経繊維は比較的厚い髄鞘に包まれ, グリアか

らでる突起によって, 神経繊維束をなしていた. 血管周囲の間質やグリアの増加も著明ではなかった. 欠乏食・シアン吸入群の内2匹において, 球後約3mmの眼窩内視神経横断面中央部に限局性に神経繊維の配列の乱れを認め, グリアよりの突起が神経繊維の間を分け入る様に伸びていた. 視神経周辺部は正常の組織像を呈していた. 電子顕微鏡下では, 欠乏食群, 普通食・シアン吸入群とも髄鞘は比較的よく保たれていた. 欠乏食・シアン吸入群では, 光学顕微鏡下で変化が認められた視神経中央部で, 髄鞘の菲薄化, 無髄神経繊維の増加など脱髄性変化が認められた. 軸索の変化は比較的軽微であった.

網膜には各群とも特に変化を認めなかった.

IV 考 按

タバコ煙にはシアン化合物が含まれており⁸⁾, 低栄養状態の高齢者にタバコ弱視の発症が多く, またタバ

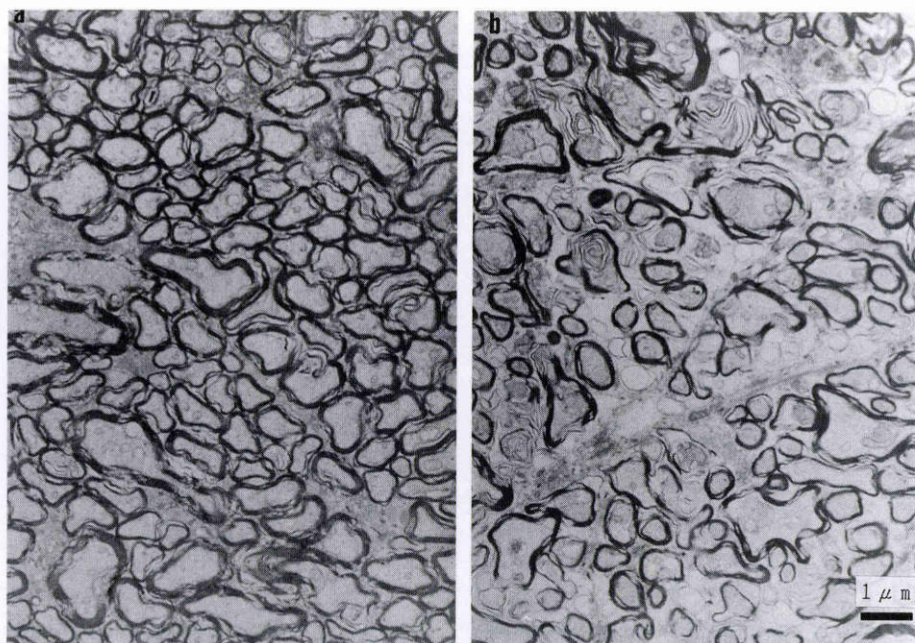


図3 視神経の電子顕微鏡写真($\times 6,500$). a) 欠乏食, b) 欠乏食・シアン吸入群ラット. a) に比べ b) では神経繊維の減少を認め、髄鞘の菲薄化が強く、間質が増大している。

コ弱視患者の血清 B_{12} 値が低下していた事⁹⁾などが、タバコ弱視発症におけるシアン (CN) および B_{12} 欠乏説の根拠のひとつになっている。正常ではシアンは主として肝臓の rhodanese により無毒なチオシアン (SCN) に代謝される¹⁰⁾。さらに血中 B_{12} 量とシアン、チオシアン量は逆相関関係にある事が知られている¹⁰⁾。Leber 病では先天的に rhodanese が欠損しており¹¹⁾、血中シアノコバラミン (CN- B_{12}) 量が増加している¹⁰⁾。これらの事実はシアンの解毒に B_{12} が密接に関係している事を示しており、シアンをシアノコバラミンとして解毒している可能性が示唆される。タバコ弱視患者でも血中シアノコバラミン量が増加している事¹⁰⁾、タバコ弱視の治療にはヒドロキソコバラミン (OH- B_{12}) が有効で、シアノコバラミンの効果が少ない事など¹²⁾、タバコ弱視の発症にシアンの解毒障害が関与していると思われる事実が知られている。しかし実験的にシアンによる視神経障害を作製するには致死量近くの濃度が要求され⁵⁾、また視神経よりも大脳白質の方がシアンによる障害を受けやすい⁵⁾。さらに慢性的に少量のシアンを投与しても、視神経障害の発症は認められていない¹³⁾。そのためタバコ弱視の発症には B_{12} 欠乏による影響の方が大きく関与しているという

考えも¹⁴⁾存在する。また実験的に B_{12} 欠乏性視神経症が作製され報告されている¹⁵⁾¹⁶⁾。

今回タバコ煙中に含まれる低濃度のシアン化合物の長期吸入が、単独あるいは B_{12} 欠乏下で、視神経障害を生じうるかどうかを検討するために本実験を行った。そのためシアンガス濃度は前回視神経障害を作製できたタバコ副流煙中の濃度¹²⁾²⁾とできるだけ同じにした。その結果シアンガス濃度は最大 2~4ppm を示し、また血中シアン化合物濃度も $0.2\mu\text{g/ml}$ と前実験と同じ濃度であった²⁾。タバコ煙と異なる点は、タバコ煙中では様々な形で存在したシアン化合物を、今回の実験ではシアン化水素ガス (HCN) として吸入させた点である。シアン化水素は毒性が強く、一方タバコ煙中にはチオシアンなど無毒なシアン化合物が存在する可能性もあり、タバコ煙に比較するとシアンによる毒性は、いくらか強かった事が予想される。

ラットは糞食をするため、 B_{12} 欠乏ラットの作成には飼育方法が難しく、また純粋の欠乏実験では受精直後より B_{12} 欠乏食で飼育した雌ラットより出生、授乳したラットが一般には用いられる¹⁶⁾。今回の実験はヒトで生じうる程度の B_{12} 欠乏が、シアンの毒性を増強させているかを検討するために行ったもので、 B_{12} 欠乏食

は離乳後より開始した。本実験の条件下でも、B₁₂血清濃度は0.05ng/mlと著しく低下しており、B₁₂欠乏の影響を見るには十分な欠乏状態であったと考えられる。実験途中での死亡例はなく、低濃度のシアンをB₁₂欠乏下で長期にわたって吸入させる事ができた。

前回のタバコ喫煙実験では、球後視神経に脱髄性変化を認め、そのため VEP 頂点潜時の延長を認めた²⁾。B₁₂は血清での低下は有意ではなかったが、赤血球内 B₁₂量の低下を認めた²⁾。今回の実験では各群とも VEP N₁潜時の有意な延長は認められなかった。組織学的には欠乏食・シアン吸入群において視神経中央部に脱髄性の変化を認める事ができた。組織変化は比較的限局しており、視神経周辺部は正常構造を保っていた。そのため VEP 頂点潜時の有意な延長は認められなかったと考えられる。欠乏食群、普通食・シアン吸入群では組織学的にも変化を認める事ができなかった。B₁₂欠乏とシアン吸入を組み合わせた群にだけ視神経の組織変化を認めた事は、やはり両者の密接な関連性を示していると思われる。大脳白質に対する影響は検索出来ていないので不明である。過去の報告⁵⁾より考えて、大脳白質にも障害が及んでいる可能性は十分考えられるが、ラットには行動上の異常は認めなかった。

シアンの神経毒性はミトコンドリア内の cytochrome oxidase の¹⁷⁾阻害に基づき、細胞内呼吸が阻害され、組織が酸素欠乏に陥る事に起因する。最近の研究では、エネルギー欠乏により細胞内カルシウム濃度の恒常性が崩れ、増加した細胞内カルシウムイオンが細胞障害性をもち、また神経伝達物質の放出にも影響を及ぼす事が解明されている¹⁸⁾。さらに細胞内の酸素欠乏に伴って、細胞膜脂質の過酸化が促進され¹⁹⁾、脂質の過酸化と脱髄との関連性が示唆されている。一方 B₁₂は中枢神経系において B₁₂依存酵素を介しメチル基転移反応に関与しており、その欠乏は髄鞘、シナプス、細胞膜などの重要な構成物質であるレシチンの合成障害をきたす²⁰⁾²¹⁾。また B₁₂は重要な神経伝達物質であるアセチルコリンの合成にも関与していると考えられている²²⁾。さらにメチルコバラミン(CH₃-B₁₂)の投与はグリア細胞におけるメチオニン合成を促進し²³⁾、ニューロン障害時に増加するメチオニン需要に応える事で神経修復作用を促進する事が知られている。このように B₁₂は髄鞘をはじめニューロンの機能維持に重要な働きを持っている。

B₁₂欠乏とシアンガス吸入を組み合わせたラット視

神経に脱髄性変化を認めた事より、Leber 病の様にシアン解毒機能に欠陥があったり、悪性貧血の様に B₁₂欠乏が強ければ、比較的低濃度のシアン摂取でも視神経障害をきたしうる事が十分考えられた。しかしタバコ喫煙ラットと比較して視神経の組織変化は限局性で、VEP 潜時の延長も認めなかったため、タバコ弱視の発症にはシアンと B₁₂以外に、ニコチンや一酸化炭素なども大きく関与していると考えられる。

今回 B₁₂欠乏食単独では視神経障害を作製する事は出来なかった。しかしラットでも実験的に B₁₂欠乏性視神経症の報告があり¹⁶⁾、B₁₂欠乏が視神経障害発症の重要な因子である事は間違いないようである。しかし一方ではタバコ弱視患者の血清 B₁₂値は低下していないという報告がある²⁴⁾。臨床的に問題になるは血清 B₁₂値が、神経系など組織内 B₁₂の欠乏状態を実際に反映しているかという点である。B₁₂欠乏食で1年飼育したラットの各組織内 B₁₂を見てみると、表1に示す様に、血清濃度が著明に減少していても視神経、網膜、大脳などの組織内 B₁₂の低下が少ない事がわかる。したがって純粋の B₁₂欠乏による視神経障害の発症は、血清 B₁₂値が低下してからかなり後になって発症すると考えられる。また興味深いのは赤血球内 B₁₂量が血清濃度よりも逆に高くなっている事である。正常状態では B₁₂は肝臓に大量に蓄えられているが、脳、網膜、視神経の B₁₂結合蛋白も飽和状態になっていると考えられている²⁵⁾。B₁₂はビタミン B₁など他の水溶性ビタミンよりも分子量が大きく、脳脊髄関門を通過しにくい。したがって中枢神経系への B₁₂の取り込みは能動輸送に依存していると考えられている²⁶⁾。欠乏食で飼育したラットでは肝臓より主要な臓器へ必要量の B₁₂が可能な範囲で輸送されるため、血清濃度が極端に低くても組織内の B₁₂含有量はそれほど低下せず、また赤血球内 B₁₂濃度の方が血清値より高くなるという逆転現象が起こっているのではないかと推測される。一方タバコ喫煙実験では、血清濃度は対照と差がないのに、赤血球内濃度は対照の約50%に低下していた²⁾。このことはタバコ喫煙時には、タバコ喫煙中の種々の毒物により能動輸送が障害されるなどして、血清 B₁₂値で推察するよりも、実際には組織内の B₁₂欠乏が強い場合がある事を示唆していると思われる。さらに神経組織内 B₁₂の中で、血清中で認められているように、生物学的活性のないシアノコバラミン分画が増加しているならば、組織内 B₁₂欠乏はより重篤になると考えられる。今後この点に関しての生化学的な検討が必要で

ある。そしてタバコ喫煙により視神経など中枢神経組織内 B_{12} の欠乏が選択的に生じるのであれば、タバコ弱視はやはり欠乏性視神経症から独立した疾患と考える方が妥当であると思われる。

稿を終えるにあたり北里大学電子顕微鏡センター技術員の皆様の御協力に感謝いたします。

文 献

- 1) 難波龍人：長期タバコ煙吸入のラット視覚毒性。
日眼会誌 91：801—806, 1987.
- 2) 奥 英弘, 福島一哉, 佐古博恒, 他：タバコ喫煙の視覚毒性。日眼会誌 93：617—624, 1989.
- 3) Foulds WS, Chisholm IA, Pettigrew AR：The Toxic optic neuropathies. *Br J Ophthalmol* 58：386—390, 1974.
- 4) Wilson J：Leber's hereditary optic atrophy：A possible defect of cyanide metabolism. *Clin Sci* 29：505—515, 1965.
- 5) Lessel S：Experimental cyanide optic neuropathy. *Arch Ophthalmol* 86：194—204, 1971.
- 6) Wide L, Killander A：A radiosorbent technique for the assay of serum vitamin B_{12} . *Scan J Clin Lab Invest* 27：150—159, 1971.
- 7) 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.
- 8) Darby PW, Wilson J：Cyanide, smoking, and tobacco amblyopia：Observations on the cyanide content of tobacco smoke. *Br J Ophthalmol* 51：336—338, 1967.
- 9) Foulds WS, Chisholm IA, Brontë-Stewart J, et al：Vitamin B_{12} absorption in tobacco amblyopia. *Brit J Ophthalmol* 53：393—397, 1969.
- 10) 亀山正邦：神経系疾患におけるシアン代謝, とくに ALS におけるシアン代謝障害について。臨床神経 20：999—1007, 1980.
- 11) Cagianut B, Rhyner K, Furrer W, et al：Thiosulphate-sulphur transferase (rhodanese) deficiency in Leber's hereditary optic atrophy. *Lancet* Vol. II：981—982, 1981.
- 12) Foulds WS, Chisholm IA, Brontë-Stewart J, et al：The optic neuropathy in pernicious anemia. *Arch Ophthalmol* 82：427—432, 1969.
- 13) Brontë-Stewart J, Pettigrew AR, Foulds WS：Toxic optic neuropathy and its experimental production. *Trans Ophthalmol Soc U.K.* 96：355—358, 1976.
- 14) Victor M：Tobacco-alcohol amblyopia. *Arch Ophthalmol* 70：313—318, 1963.
- 15) Victor M：Neuro-ophthalmic disorders due to alcoholism and malnutrition, In Smith JL (ed)：Neuro-Ophthalmology Focus 1980, New York, Masson Publishing, 357—378, 1981.
- 16) 雨宮次生, 河田哲夫, 前川昭男：ビタミン B_{12} 欠乏ラットの眼病理像。内野治人編, 京都シンポジウム, メチル B_{12} をめぐって, 東京, 協和企画通信, 80—85, 1987.
- 17) Schubert J, Brill WA：Antagonism of experimental cyanide toxicity in relation to the in vivo activity of cytochrome oxidase. *J Pharmacol Exp Ther* 162：352—359, 1968.
- 18) Jhonson JD, Meisenheimer TL, Isom GE：Cyanide-induced neurotoxicity：Role of neuronal calcium. *Toxicol Appl Pharmacol* 84：464—469, 1986.
- 19) Jhonson JD, Conroy WG, Burris KD, et al：Peroxidation of brain lipids following cyanide intoxication. *Toxicology* 46：21—28, 1987.
- 20) 中沢恒幸, 水野鐘二, 菅野剛史：Methylcobalamin とりん脂質, 特に phosphatidylethanolamine のメチル化による phosphatidylcholine 合成経路の意義。ビタミン 46：319—323, 1972.
- 21) 田中信夫, 鈴木英史, 佐野茂顕, 他：ビタミン B_{12} と末梢神経障害。臨床成人病 14：41—49, 1981.
- 22) Nadeau A, Roberge AG：Effect of vitamin B_{12} supplementation on choline acetyltransferase activity in cat brain. *Internat J Vit Nutr Res* 58：402—406, 1988.
- 23) 中沢恒幸, 鈴木孝尚, 井上収司：メチル B_{12} の神経系におけるリン脂質合成。黒岩義五郎編, 箱根シンポジウム, 神経系とメチル B_{12} , 東京, 協和企画通信, 54—60, 1981.
- 24) 稲田雅美：ビタミン B_{12} と神経疾患。内科 52：1051—1056, 1983.
- 25) 宮田幹夫：ビタミン B_{12} (1)。神眼 1：114—115, 1984.
- 26) 稲田雅美：中枢神経へのビタミン B_{12} の移送機構。ビタミン 55：122—123, 1981.