ビタミン B₁ 欠乏ラットにみられる Muricide 反応について

小野寺憲治, 只野 武, 酒井 兼司, 木皿 憲佐

東北薬科大学薬品作用学教室*

小 倉 保 己

東北大学歯学部薬理学教室**

(昭和53年4月19日〔特〕)

要約: 雄ラットを用いてビタミンB₁欠乏飼育を行ない飼育経過にともなう情動行動の変化を正常群, pair-fed 群と比較検討し, あわせて情動行動と関連性が示唆されている脳内ポリアミン含量, スペルミジン (SPD) およびスベルミン (SPM) についても検討を加えた結果, 次のような実験成績が得られた. 1) muricide 反応はビタミンB₁欠乏群で飼育7日目より出現し, 経日的に出現率の増加がみられ, 飼育14日で20%, 飼育21日で47%, 飼育28日で61%, 飼育30日で78%であり飼育30日までに2例の死亡が同時に観察された. Pair-fed 群では飼育14日で1例出現し飼育30日で15%の出現率であった. ビタミンB₁欠乏ラットにみられる muricide 反応の特長はかみつ়部位が一定しないこと, mouse-killing はするが mouse-eating までにはいたらないことである. マウスの死体に対しては取り除くに激しく抵抗を示したがチョークやクギなどにはかみつ়ことはしなかった. 2) thiamine hydrochloride 1 mg/kg i.p. 投与の muricide 反応に対する回復効果は欠乏飼育30日および欠乏飼育21日投与においても認められなかった. しかし, 飼育21日投与群では投与後1日で55%の出現率であり飼育30日投与群の1日後の100%と比較して有意な低下が認められた. 3) 情動スコアについてはビタミンB₁欠乏ラットに attack response の上昇が飼育28日で認められた以外著明な反応は認められなかった. 4) ビタミンB₁欠乏ラットの muricide 反応に際してはマウスに対する licking, mounting が経日的に減少し飼育末期では著明に低下した. 5) 脳内ポリアミン含量はビタミンB₁欠乏群の飼育30日において正常群, pair-fed 群と比較して有意な低下が認められた. また, 飼育21日に thiamine hydrochloride 1 mg/kg i.p. 投与し飼育30日で断頭・定量を行なうとビタミンB₁欠乏群のポリアミン含量は正常レベルまで回復した. この時点での killer-rat, non-killer-rat の SPD 値, SPM 値には有意な差は認められなかった.

緒 言

実験動物にビタミンB₁欠乏飼育を行なうと痙攣, 振戦, 痙性麻痺, 反弓緊張ならびに旋回運動などの異常行動が起こることは周知の事実である¹⁻³⁾. 最近これら異常行動に加えてビタミンB₁欠乏飼育雌ラットに muricide 反応が起こるとも, Vorhees ら⁴⁾によって報告された. しかし, この muricide 反応の発生の詳細については依然不明である. また, ビタミンB₁欠乏飼育ラットの情動行動がどのように変化するかについての報告は全くみられない.

そこで今回著者らは雄ラットのビタミンB₁欠乏飼育によって muricide 反応が惹起されるか否かを検討し, 併せてこれらラットの情動性の変化についても検討を加えた. さらに, 情動行動との関連性が示唆されている脳内 polyamine⁵⁾ がビタミンB₁欠乏飼育によりどのような変化をうけるかを検討し, 若干の興味ある知見を得たので報告する.

* 〒983 仙台市小松島4-4-1

** 〒980 仙台市星陵町4-1

実験材料および方法

1. 実験動物および飼料

生後35日 (75~85 g) の Wistar 系雄ラット (舟橋農場産) を用い、一匹毎金網ケージ (17×25×37 cm) にて飼育した。ラットは3群 (ビタミンB₁欠乏群, 正常群および pair-fed 群) に分け飼育観察した⁹⁾。飼料はビタミンB₁が全く含まれないビタミンB₁欠乏食 (日本クレア), ビタミンB₁欠乏食 100 g につき thiamine hydrochloride 0.5 mg の割合で添加したビタミンB₁添加食 (日本クレア) の2種類を用いた⁷⁾。

使用した薬物は thiamine hydrochloride (和光純薬) で生理食塩液に溶解し腹腔内投与した。

2. 実験方法

ビタミンB₁欠乏飼育期間中, 体重測定, 飼料摂取量の測定を連日行ない, pair-fed 群の飼料量はビタミンB₁欠乏ラットの摂取量の経日的に記録した平均摂食量と同じ量を添加食で2日間ビタミンB₁欠乏群および正常群の飼育よりずらして与えた。

1) 情動行動採点法

Ueki らの方法^{8,9)}に従い, 飼育前, 飼育後3, 7, 14, 21, 28 および30日に次の項目ならびに基準に従って刺激に対する反応性を採点した。すなわち, a) 鼻先に差出した棒に対する attack response, b) 尾を鉗子でつまんだときの startle response, c) 捕獲や取り扱いに際しての struggle response, d) テスト中の鳴き声 (vocalization) である。

a) および b) の項目については, score 0: 無反応, score 1: 対象への関心, score 2: 対象への防禦または逃避の行動, score 3: かみつくなどの攻撃的行動, score 4: 攻撃的行動の採点を行なった。c) の項目については, score 0: 無抵抗, 著明な筋弛緩, score 1: 捕獲や取り扱いが容易, score 2: 捕獲や取り扱いが容易だが, 軽度の筋緊張, score 3: 筋緊張, 捕獲や取り扱いが困難, score 4: 捕獲が極めて困難, 著明な筋緊張の採点を行なった。d) の項目については, score 0: 全く鳴かない, score 1: ときどき鳴く, score 2: 頻回に激しく鳴くの採点を行なった。e) の項目の観察時間は5分間とし, intruder としてのマウスに対する muricide 反応を検討し, 同時に sniffing, mounting, licking および biting の回数も記録した。

2) 脳内 polyamine の分離定量法

3群とも, B₁欠乏飼育前, 飼育12日, 飼育30日の3時点において定量を行なった。Polyamine の分離定量法は Endo and Ogura¹⁰⁾ の方法に従い, p-cellulose column による溶出液について TNBS 反応により発色, 分光法により比色定量した。

3) 有意差の検定

得られた結果は, student's t-test および χ^2 検定により有意差の検定を行なった。

実験成績

1. ビタミンB₁欠乏飼育により誘発される muricide 反応

ビタミンB₁欠乏飼育7日よりビタミンB₁欠乏群に muricide 反応が認められた。この反応の特長はかみつく部位が一定しないが首, 頭へのかみつきが多く, mouse-killing は行なうが mouse-eating までは到らないことである。さらに, 死体の除去には激しく抵抗を示したが, チョークやくぎなどに対しては, かみつくことはしなかった。この反応は一度出現すると実験終了まで持続した。

Muricide 反応の発生率はビタミンB₁欠乏飼育経過とともに増加し, ビタミンB₁欠乏群で飼育14日で20% (20例中4例), 飼育21日で47% (19例中9例), 飼育28日で61% (18例中11例), 飼育30日で78% (18例中14例) であり, 飼育30日までに2例の死亡例が観察された。一方, pair-fed 群では飼育14日で20例中1例, 飼育30日では20例中3例 (15%) に muricide 反応が認められた。正常群では全く認められなかった (Fig. 1)。

ビタミンB₁欠乏飼育30日目に muricide 反応が観察された14例に thiamine 1 mg/kg を投与しこの反応が消失するか否かを検討した。

Thiamine 投与1日後および10日後においても本反応は認められ, thiamine 投与1日後には反応の出現しな

かった4例にも認められ、全例がこの反応を示した。Thiamine 投与10日後に、成長が順調に回復しても本反応は18匹全例に認められ、100%の出現率を依然示した (Fig. 1)。しかし、ビタミンB₁欠乏飼育21日目に thiamine 1 mg/kg を投与した場合には、飼育30日での出現率が55% (20例中11例) であり、ビタミンB₁欠乏飼育30日目に thiamine を処理した thiamine 処理群の1日および10日後の出現率と比べ有意な出現率の減少が認められた (χ^2 検定: $p < 0.05$) (Fig. 2)。

なお、ビタミンB₁欠乏飼育30日目に心拍数減少 ($\frac{B_1 \text{欠乏群} 348}{\text{正常群 } 570}$, beats/min) や反弓緊張が認められたが、thiamine 投与によってこれらの症状は投与24時間後にすみやかに回復した。また、欠乏飼育30日目の欠乏群の平均体重は 86 g であったが、thiamine 投与10日後においては 150 g まで回復した。

Fig. 1. Effects of thiamine deficiency on muricide response in rats.

Fig. 2. Effects of thiamine hydrochloride (1 mg/kg i.p.) on muricide response in thiamine deficient rats on the 21st day of experimental feeding.

2. ビタミンB₁欠乏ラットの情動行動

Attack response: 飼育28日目に、ビタミンB₁欠乏群では2点の反応を示しているのに対し、正常群では0.9点、pair-fed 群では0.8点であり、ビタミンB₁欠乏群の attacking の回数は pair-fed 群および正常群と比較し有意に増加した ($p < 0.05$)。しかし、飼育30日では pair-fed 群も増加し、正常群と比較して有意な増加は認められるものの、ビタミンB₁欠乏群との有意な差は認められなかった (Fig. 3)。thiamine 投与によって投与1日後では投与前と変化が認められず投与10日後においては正常群も増加し、3群間に有意な差は認められなくなった (Fig. 4)。

Struggle response: 正常群では飼育7日以後はほぼ一定で struggle の点数は1点であった。飼育30日で pair-fed 群およびビタミンB₁欠乏群で増加傾向を示すものの、thiamine 投与によっても、反応には何らの影響も認め

られなかった (Fig. 3, Fig. 4).

Startle response および vocalization: 3 群ともいずれの測定時期においても有意な変動は認められなかった。

Fig. 3. Changes in emotional behavior of thiamine deficient rats. a); $p < 0.05$ when compared with control group. a, b); $p < 0.05$ when compared with control and pair-fed groups.

Fig. 4. Effects of thiamine hydrochloride (1 mg/kg i.p.) on emotional behavior in thiamine deficient rats. a); $p < 0.05$ when compared with control group.

3. ビタミン B₁ 欠乏のマウスに対する反応

ビタミンB₁欠乏ラットにみられる muricide 以外のマウスに対する反応性を検討した (Fig. 5).

Licking: licking はビタミンB₁欠乏飼育 21, 28および30日目にはほぼ1回で, 正常群および pair-fed 群と比較し有意な減少が認められた ($p<0.01$). さらに, thiamine 1 mg/kg 投与によっても, ビタミンB₁欠乏群は正常群および pair-fed 群と比較し有意な減少を依然示したままであった.

Mounting: ビタミンB₁欠乏群の mounting は飼育21日で pair-fed および正常群と比較し有意な減少を示した. 飼育28日以後より mounting 反応は全く消失し, thiamine 投与後においても消失したままであった.

Sniffing: ビタミンB₁欠乏群で飼育28日より正常群と比較し有意な減少 ($p<0.01$) を示したが, pair-fed 群との差は認められなかった.

Biting: 飼育21日目にビタミンB₁欠乏群は他の2群と比較し, 有意な減少が認められた. その後, いずれの時点の測定に於ても有意な変動は認められなかった.

Fig. 5. Effects of thiamine deficiency on response to the intruder in rats. ●—● thiamine deficient group, ●.....● control group and ○—○ pair-fed group. a); $p<0.01$ when compared with control group, a, b); $p<0.01$ when compared with control and pair-fed groups.

Table 1. Effect of thiamine deficiency on polyamine contents in brain.

Days after feeding		Polyamine contents (n mol/g wet weight)		
		Control group	Thiamine deficient group	Pair-fed group
Spermidine content	0	279.70±23.00		
	12	289.55± 4.55	324.53±11.09	319.66±14.17
	30	293.45±10.51	206.86±18.74*	286.88±16.96
Spermine content	0	150.62±20.92		
	12	153.90±11.06	144.12± 9.50	154.29± 9.15
	30	140.60± 2.61	81.60± 6.90*	122.13± 5.36

Each value represents the mean±S.E.

*; $p<0.01$ when compared with control and pair-fed groups.

4. ビタミン B₁ 欠乏ラットの脳内 polyamine 量

飼育12日目に於て, spermidine (SPD) 量および spermine (SPM) 量の変動は認められなかったが, 飼育30

日目に於て, ビタミンB₁欠乏群の SPD 量は 206.86 nmol/g と pair-fed 群 (286.88 nmol/g), 正常群 (293.45 nmol/g) と比較し有意な減少を示した (Table 1). SPM 量も SPD 量と同様に正常群および pair-fed 群の値と比較し有意な減少を示した (Table 1).

また, 飼育21日目に thiamine 1 mg/kg を投与し, 飼育30日目に断頭を行ない, ビタミンB₁欠乏ラットの脳内 polyamine 含量に対する thiamine の回復効果を検討した結果, SPD および SPM 含量はともにほぼ正常レベルまで回復を示した (Table 2).

また, この際 killer-rat と non-killer-rat の polyamine 含量を検討した結果, SPD 量および SPM 量は killer-rat および non-killer-rat の間に有意な差は認められなかった (Table 2).

Table 2. Reversal effect of thiamine hydrochloride on polyamine contents in rats.

Group	Polyamine contents (n mol/g wet wt.)	
	Spermidine	Spermine
Killer-rat	291.82±5.09	140.38±5.49
Non-killer-rat	298.63±6.12	141.61±6.65
Total	295.20±3.9	141.00±4.0

Each value represents the mean±S.E.

On the 30th day of experimental feeding, the rats were sacrificed and polyamine levels were determined after a single injection of thiamine HCl on the 21st day.

考 察

Muricide 反応の出現は嗅球損傷¹¹⁾, 単独隔離飼育¹²⁾あるいは Δ^9 -tetrahydrocannabinol 投与¹³⁾などによって惹起されることは周知の事実である. 今日, 著者らは muricide 反応がビタミンB₁欠乏飼育雄ラットに起こり, この反応が欠乏飼育経過とともに増加し, 一度生ずると実験終了まで持続することを認めた. この反応が雌ラットに生じ, さらに thiamine 投与により回復することはすでに Vorhees ら⁴⁾によって報告されているが, この反応に伴う情動性の変化については全く不明であった. 著者らはビタミンB₁欠乏ラットには情動過多があまりみられず, 著明な muricide 反応が雄ラットに起こることを認めた. また, この反応は thiamine 投与によっても回復しえないことも同時に認めた. この結果は Vorhees ら⁴⁾の報告と異なるものである.

嗅球摘出¹¹⁾あるいは単独隔離ラット¹²⁾は捕獲に対して激しい抵抗性を示したり, 棒に対する attack response や vocalization が激しいことが知られている. 今実験のビタミンB₁欠乏ラットに於ては嗅球摘出や isolation ラットにみられるような情動スコアの著しい変動はほとんど認められず, わずかに飼育28日目に正常群および pair-fed 群との間に attack response の有意な上昇がみられたにすぎなかった. また, attack response の観察に於て, 飼育日数が経過するごとに score の上昇がみられたが, これは正常群および pair-fed 群でもみられることからビタミンB₁欠乏に特有な症状ではなく, 飢餓および isolation 効果が加味された結果と推察される.

ところで, 本実験の飼育条件と類似性のある Δ^9 -tetrahydrocannabinol 投与により誘発される killer-rat はマウスを isolation ラットのように首からかみ始め, ところかまわずかみつ, 死体の除去に際しては激しく抵抗し, チョークやクギなどに対してもかみつくようになり, mouse-eating を行なうという報告が Ueki ら¹³⁾によりなされている. ビタミンB₁欠乏飼育による killer-rat に於ては死体の除去に際しては激しい抵抗を示すものの, mouse-eating に到る例は全く認められなかった. また, かみつく場所は一定してはいないが, 中でも首や頭にかみつく例が最も多く認められた. マウスの死後, 死体に対する関心はあまりなく, チョークやクギなどに対する反応もあまりみられなかった. この muricide 反応は正常群には全くみられなかった. また, 飢餓が本反応を増強するとの報告¹⁴⁾や本実験で pair-fed 群では15%のラットに発生をみたことから isolation 効果は無視できるが, 飢餓の影響が加味されているものと推察される. 一方, muricide 以外のマウスに対する反応性を検討すると正常群および pair-fed 群に於て観察したいずれの反応も飼育経過と共にそれら回数が増加する傾向がみられ

た (Fig. 5).

しかし、ビタミンB₁欠乏群に於て、licking および mounting の回数は飼育21日から正常群および pair-fed 群に比べ有意な減少を示した。また、sniffing は正常群と比較して有意の減少が飼育28日および30日にみられたが pair-fed 群との有意な差は認められなかった。これらのことは muricide 反応が惹起された場合には数回の biting で致命傷を与える場合が多く、また殺した後はマウスの死体への関心が少ないため biting の回数の減少がみられると思われる。以上のように、ビタミンB₁欠乏ラットに於ては各情動行動 score の著明な上昇を伴うことなしに muricide 反応を惹起するのが特長と思われる。

Thiamine の回復実験に於ては通常その用量ならびに投与時期が問題となる。この点については福富¹⁵⁾によって種々検討が加えられているが、thiamine 1 mg/kg は回復実験としては大量であり、Vorhees ら⁴⁾の回復実験の2倍量以上にあたる。しかし、今回の実験に於て muricide 反応が惹起したラットにこの用量の thiamine を投与しても回復効果は認められなかった。しかし、この用量を投与すると投与24時間後には異常行動の消失や心拍数および食欲の回復がみられ、以後の成長も順調であった。さらに、thiamine 投与後にビタミンB₁添加食にきりかえてもこの反応は持続することを著者らは同様に認めている(未発表)。これらのことより今回、回復実験に用いた投与量、投与回数については問題がないと考えられる。thiamine の投与時期についてはさらに検討し、thiamine をビタミンB₁欠乏飼育21日目に投与すると一度誘発された muricide 反応が消失することはないが、thiamine をビタミンB₁欠乏飼育30日で投与した群と比べ、この反応の抑制が出現率の上で認められた。以上の事実によりビタミンB₁欠乏によって誘発される muricide 反応は一度出現すると回復せず、さらに thiamine 投与によっても回復し得ないが、thiamine の前投与により muricide 反応発生の予防効果が得られるものと考えられる。本反応が thiamine 投与によっても回復しない機作については全く不明であるが、muricide 反応のような攻撃性行動は繰り返しテストをおこなうと獲得した行動が消失されにくくなるという報告¹⁶⁾もありこの点からの検討、さらに長期のビタミンB₁欠乏飼育に比べて中枢神経の不可逆的障害が起こるとの報告¹⁷⁻¹⁹⁾があることより情動系に関与する部位での器質障害が起こっている可能性も考えられ、病理学的検討が必要と思われる。

ビタミンB₁欠乏ラットにおいては欠乏末期には生化学的変化が多種にわたり、これらが行動変化と結びつくかについては不明である²⁰⁾。今回の実験は長期飼育の条件であり、著者ら⁵⁾が3週間の isolation により誘発される aggressive マウスの脳内 SPD 量は対照群と比較して有意な増加を示すことを報告していることから、ビタミンB₁欠乏ラットに muricide 反応を起こした際には脳内 polyamine 量も変動を示すことが想定される。そこでこの点について検討を加えた結果、ビタミンB₁欠乏飼育30日において、ビタミンB₁欠乏群に SPD 量および SPM 量の減少が認められた。また Table 2 に示すように、thiamine 投与により polyamine の正常レベルまでの回復は認められるものの muricide の消失は認められなかった。本実験において polyamine 量の変動と muricide 反応が結びつくような知見は得られなかった。このことと著者ら²¹⁾によって嗅球摘出による killer および non-killer ラットの脳内 polyamine に有意な変動を認めていないことを併せ考えると、ラットではこれら polyamine の変化が情動変化と結びつきがたいものと思われる。

以上のような著者らが観察したラットでの muricide 反応は人のビタミンB₁欠乏症状としては知られていない。しかし、ビタミンB₁欠乏が付随して起こる慢性アルコール中毒や Wernicke-Korsakoff 症候群²²⁾の際に錯乱状態や狂暴性をおびえることと考え併せると今後どのような薬物により回復するか興味もたれる。

謝辞：本研究に際し、種々の御配慮をいただきました武田薬品株式会社・篠崎英男博士に感謝致します。なお、本論文の要旨は第51回日本薬理学会総会にて発表したものである。

文 献

- 1) EIJKMAN, C.: *Virchows Arch path. Anat.* **148**, 523 (1897)
- 2) JANSSEN, B. C. P.: *The Vitamins*, Edited by Serell, W. H. and Harris, R. S., Vol. 3, p. 460, Academic Press, Inc., N. Y. (1954)
- 3) LIANG, C. C.: *Biochem. J.* **82**, 429 (1962)
- 4) VORHEES, C. V., BARRETT, R. J. and SCHENKER, S.: *Life Sci.* **16**, 1187 (1975)
- 5) 只野 武・小野木正弘・木皿憲佐：日薬理誌 **70**, 9, (1974)

- 6) 森川 勤: 新潟医学会雑誌 **64**, 249 (1950)
- 7) SUZUKI, Z., FURUNO, K., MURAKAMI, K., FUJITA, T., MATSUOKA, T. and TAKEDA, K.: *I. Nutrition* **94**, 427 (1968)
- 8) UEKI, S., NURIMOTO, S. and OGAWA, N.: *Folia Psychiat. Neurol. japon.* **26**, 227 (1972)
- 9) UEKI, S., NURIMOTO, S. and OGAWA, N.: *Folia Psychiat. Neurol. japon.* **26**, 245 (1972)
- 10) ENDO, Y. and OGURA, Y.: *Europ. J. Pharmacol.* **21**, 293 (1973)
- 11) KUMADAKI, N., HITOMI, M. and KUMADA, S.: *Japan. J. Pharmacol.* **17**, 659 (1967)
- 12) 田中正敏・瀧本英明・小川暢也: 精神医 **10**, 232 (1970)
- 13) UEKI, S., FUJIWARA, M. and OGAWA, N.: *Physiol. Behav.* **9**, 585 (1972)
- 14) PAUL, L., MILEY, W. M. and BAENNINGER, R.: *J. comp. Physiol. Psychol.* **76**, 242 (1971)
- 15) 福富久之: ビタミン **33**, 132 (1966)
- 16) 坂田利家・瀧本英明・児玉純一: 日薬理誌 **71**, 427 (1975)
- 17) PRICKETT, C. O.: *Am. J. Physiol.* **107**, 459 (1934)
- 18) COLLINS, G. H.: *Am. J. Path.* **48**, 259 (1966)
- 19) COLLINS, G. H.: *Am. J. Path.* **50**, 791 (1967)
- 20) 岩田平太郎・井上 章: 日薬理誌 **68**, 1 (1972)
- 21) 今井正幸・桜田 司・管野ルリ子・只野 武・木皿憲佐: 東北薬科大学研究年報 **21**, 9 (1974)
- 22) VICTOR, M., ADAMS, R. D. and COLLINS, G. H.: *The Wernicke-Korsakoff Syndrome*, Edited by Davis, F. A., Philadelphia (1971)

Abstract—Kenji ONODERA, Takeshi TADANO, Kenji SAKAI, Kensuke KISARA and Yasumi OGURA* (Department of Chemical Pharmacology, Tohoku College of Pharmacy, Komatsushima, Sendai 983, Japan and *Department of Pharmacology, School of Dentistry, Tohoku University, Sendai 980, Japan). Muricide induced by thiamine deficiency in the rats. *Folia pharmacol. japon.* **74**, 641~648 (1978).

The emotional behavioral aspects and the interaction between the changes of the polyamine contents and muricide response in thiamine deficient rats were investigated. In the thiamine deficient group, there was evidence of muricide and such increased progressively with advanced thiamine deficient feeding. This muricide was characteristic in the following respects; 1) the killer-rats did not eat but only kill a mouse and it was quite difficult to remove a sacrificed animal from the cage. 2) they bit at random into any body region of the mouse. 3) the killer-rats did not bite inanimate objects such as nails nor chalk. 4) the muricide induced by thiamine deficiency could not be suppressed by a single injection of thiamine HCl. On the 30th day of the experimental feeding, both spermidine and spermine levels in the brain of the thiamine deficient group decreased significantly as compared to the control and the pair-fed groups. Both spermidine and spermine levels were reversed to the control levels with a intraperitoneal administration of thiamine. There were no significant differences in spermine and spermidine levels between the killer-rats and non-killer-rats in the thiamine deficient group.