原著

2, 3-Butanedione, 2, 4-Pentanedione および 2,5-Hexanedione の末梢神経毒性に関する 電気生理学的研究

永野 恵*, 三角 順一**, 野村 茂*

AN ELECTROPHYSIOLOGICAL STUDY ON PERIPHERAL NEUROTOXICITY OF 2, 3-BUTANEDIONE, 2, 4-PENTANEDIONE AND 2, 5-HEXANEDIONE IN RATS

Megumi NAGANO,** Junichi MISUMI** and Shigeru NOMURA*

A series of studies was made to clarify the relationship of the chemical structures of 2,3-butanedione (2,3-BDione), 2,4-pentanedione (2,4-PDione) and 2,5-hexanedione (2,5-HDione) to neurotoxicity in terms of *n*-hexane neuropathy and relative neurotoxic potentials, using electrophysiological methods. These compounds are all molecularly symmetrical diketones with 4, 5 and 6 carbons respectively.

A 200 mg/kg dose of each compound was administered subcutaneously five days a week to one of three groups of eight rats. This program continued for 40 weeks in the case of 2,3-BDione and 2,4-PDione and for 14 weeks in the case of 2,5-HDione. Electrophysiological studies of the effects of the compounds on the peripheral nerve were performed by measuring maximum motor conduction velocities (MCV) and sensory conduction velocities (SCV) in the tail nerve of the rats. Residual latencies (RL), motor distal latencies (DL), amplitudes of the muscle action potentials (MAP), and amplitudes of the nerve action potentials (NAP) were also estimated.

A significant slowing of MCV began to be observed in the 2,5-HDione group at the 6th week and in the 2,4-PDione group at 10th week. At 8th week, a significant decrease in SCV was also observed in these two groups. The degree of reduction in both MCV and SCV was more pronounced in the 2,5-HDione group than in the 2,4-PDione group. In the 2,5-HDione group, the MCV values were more strongly affected than the SCV values. On the other hand, in the 2,4-PDione group the SCV values were slowed more than the MCV values.

The amplitudes of MAP and NAP in the 2,5-HDione group decreased significantly at 12th week and at 10th week, respectively. In the 2,4-PDione group, a significant decrease in NAP amplitudes was observed at 16th week and that in MAP amplitudes at 28th week. The 2,3-BDione group showed a decrease in MAP amplitudes at 28th week. The RL and DL were markedly prolonged at an early stage only in the 2,5-HDione group.

The γ -diketone of 6, 7 and 8 normal chains of the aliphatic hydrocarbons has been reported to cause peripheral distal axonopathy with giant axonal degeneration. This disorder is named γ -diketone neuropathy.

In this study, neurotoxic evidence was revealed by 2,4-PDione, which is 5-carbon and symmetrical β -diketone. However, between the 2,4-PDione group and the 2,5-HDione group, some differences exist in clinical and electrophysiological features, suggesting that the mechanisms of

* 熊本大学医学部公衆衛生学教室

** 熊本大学医学部衛生学教室
昭和58年3月3日受付

* Department of Public Health, Kumamoto University Medical School

** Department of Hygiene, Kumamoto University Medical School

Received for publication, March 3, 1983

neurotoxic action in these two compounds may differ.

The compound 2,3-BDione gave no other peripheral neurological findings than a temporal decrease in MAP amplitudes, and therefore may be considered to be non-neurotoxic.

I. はじめに

産業溶剤 *n*-hexane および methyl *n*-butyl ketone (MBK) は人や動物で polyneuropathy を惹起するが、これらは共通の代謝経路を有し、体内で、さらに神経毒性の強い 2,5-hexanedione (2,5-HDione) に代謝される¹⁻⁵⁾ ことが知られている。また、同様の neuropathy は、他の代謝物である 5-hydroxy-2-hexanone, 2,5-hexanediol および 2-hexanol でも実験的に惹起でき⁶⁻⁹⁾、これらは “hexacarbon neuropathy” と呼ばれている。

近年、これらの神経毒性とその化学構造との関連性に興味が注がれ^{6-8,10-18)}、Spencer ら⁶⁾ は炭素数6の diketone でも 2,4-, 2,3-, 1,6-hexanedione には神経毒性がみられないことを、また、O'Donoghue ら¹²⁾ は 2,5-HDione と同様の神経障害が 2,5-heptanedione, 3,6-octanedione でも惹起されることを明らかにした。そして、神経毒性の発現には、炭素数よりもむしろ二つの ketone 間の距離が γ space であることが必要であるとし、これらの neuropathy は “ γ -diketone neuropathy” とも呼ばれるようになった。

化学構造と神経毒性の関連性を明らかにすることは、神経毒性の発現機構を考えるうえで重要であり、さらに、*n*-hexane や MBK に化学構造が類似した多くの産業溶剤が使用されている今日、それらの物質の神経毒性の有無を検討することは意義あることと思われる。

著者らは、これまで、末梢神経障害を実験的に早期に検知する1方法として、ラット尾部混合神経伝導速度の測定を行ってきた¹⁹⁾が、この方法を用いて、上記の3物質の神経毒性が 2,5-HDione > MBK > *n*-hexane の順に強いことを報告した²⁰⁾。さらに、化学構造と神経毒性の関連性を明らかにする目的で、直鎖の脂肪族炭化水素およびその2位あるいは ω -1 位の酸化された炭素数3~8の11の化学物質の末梢神経毒性を比較してきた。その結果、炭素数6の化合物では神経毒性が認められたが、炭素数3の acetone, 炭素数5の 2-pentanone, 炭素数7の 2-heptanone および8の 2-octanone には毒性はみられなかった。また、炭素数4の 2,3-butanedione (2,3-BDione)¹⁴⁾ および5の 2,4-pentanedione (2,4-PDione)⁷⁾ では、一時的な神経伝導速度の低下をみたが、動物数および投与量が十分でなく、その末梢神経毒性の評価はその後の検討課題であった。

今回の実験では、まだ神経毒性の明らかでない対称性

diketone の 2,3-BDione と 2,4-PDione の二つの化合物を再びとりあげ、2,5-HDione を positive control として、これらの神経毒性を電気生理学的方法を用いて比較検討した。

II. 材料および方法

1. 実験動物

実験には Donryu 系雄性ラット 32 匹を用い、2,3-BDione 群、2,4-PDione 群、2,5-HDione 群および対照群の各群8匹ずつとした。投与開始時の動物の平均体重は 259 ± 17 g で、各群間に体重の差はみられなかった。

実験期間中、体重と食餌摂取量の測定ならびに一般症状の観察を行なった。

2. 投与物質と投与方法

投与物質は、市販の一級 2,3-butanedione (=diacetyl $\text{CH}_3\text{COCOCH}_3$, 和光純薬)、試薬特級 2,4-pentanedione (=acetylacetone $\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{COCH}_3$, 和光純薬) および 2,5-hexanedione (=acetonylacetone $\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{COCH}_3$, 東京化成工業) であった。

投与量は、3物質とも 200 mg/kg/day とし、2,3-BDione および 2,4-PDione は週5日、40週間、2,5-HDione は週5日、14週間にわたって、ラット背部皮下に反復投与した。

3. 電気生理学的測定

測定方法については、すでに詳細に報告した^{8,19)}。ラットの尾部における電極の位置を、近位部をA点、中央部をB点、末梢部をC点とすると、A-B間、B-C間、A-C間の距離は成長に伴って増加したが、その増加程度は各群間で差は認められなかった。

測定項目は、①運動神経および知覚神経最大興奮伝導速度 (以下 MCV および SCV)、②筋活動電位 (MAP) および神経活動電位 (NAP) の振幅 (peak to peak)、③残差潜時 (residual latency, RL)、④末梢部位潜時 (distal motor latency, DL) であった。なお、MCV は尾部近位部 (A→B) で、SCV は尾部全体 (C→A) と近位部 (B→A) および遠位部 (C→B) の3部位でその値を求めた。

電極は脳波用針電極を用いた。刺激は 0.3 msec の矩形波を用い、刺激頻度は 1 Hz、時定数は 0.01 sec とした。刺激の強さは just supramaximal で行なった。導出された MAP および NAP は増幅して addscope に写し、X-Y recorder に記録した。

Fig. 1. Changes in the mean body weight during the experimental period. Rats were subcutaneously injected with 200 mg/kg/day of 2,5-HDione 5 days/week for 14 weeks, 2,3-BDione and 2,4-PDione throughout the 40 week experiment. Significant levels for Figs. 1-7: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, as compared with the control values by t -test.

測定時の室温は 28~30°C とした。また、おのおののラットの皮膚温をソケイ部と尾部の 3 点でチェックし、各群間で差がないよう考慮した。

Ⅲ. 結 果

1. 投与量

40 週目までの平均総投与量は、2,3-BDione 群で 16.6 ± 1.6 g, 2,4-PDione 群で 12.3 ± 1.1 g であった。2,5-HDione 群では、急激な体重減少と著明な後肢麻痺のため、14 週で投与を中止し、この時までの平均総投与量は 4.2 ± 0.2 g であった。また、2,4-PDione 群でも 5 例のラットで、実験途中に急激な体重減少や歩行障害などの急性症状が出現したため、数回にわたり 1~3 日間投与を中止した。

2. 体重および食餌摂取量

各群の平均体重の変化を Fig. 1 に示す。2,3-BDione 群では投与開始時より実験終了時まで体重抑制はみられなかった。2,4-PDione 群と 2,5-HDione 群では、投与開始後 3 週目より、対照群に比し、有意 ($p < 0.01$, $p < 0.05$) な体重増加抑制が観察された。2,5-HDione 群では、10 週目より体重の著明な減少がみられた。投与中止後 1 週間は体重はさらに低下したが、その後は徐々に増加し、40 週目には対照群よりもなお低値であったが有意差はなかった。

各群の 1 日の平均摂餌量は、対照群および 2,3-BDione 群の 20~28 g に比し、2,4-PDione 群で 2~10 g, 2,5-HDione 群で 2~6 g の摂餌量の減少がみられた。2,5-

HDione 群の摂餌量は、投与中止後は徐々に増加し、対照群のそれとはほぼ同様になった。

3. 動物の一般症状

2,3-BDione 群では、投与開始後 12 週目頃に一時的に四肢の脱力様状態が観察されたが、その後の一般症状の変化はみられなかった。20 週目頃より、背部の注射部位に潰瘍を形成した。

2,4-PDione 群では、投与後 10 日目頃から全例で、投与直後の一過性の漿液性流涎が観察され、実験終了時まで続いた。3 週目頃から毛並の乱れが生じ、8 例中 6 例に後肢あるいは四肢の脱力が認められた。このうち 1 例では尿失禁およびよろめき歩行が観察されたが、4 週目の電気生理学的測定時の麻酔後死亡した。5 週目には 7 例中 1 例で、歩行時の開脚および尾部の緊張が観察され歩行困難に陥ったが、4 日間の投与中止で歩行可能となった。8 週目には、7 例中 4 例で後肢麻痺、11 週間には全例で四肢脱力が観察され、2 例が歩行困難になった。19 週目頃より動きの鈍麻が著明になり、体全体を地面にはいつくばらせるような歩行を示した。重症の 3 例は腹側位に横臥し動かなかった。5 例で尾部をもって逆さにした時の後肢合掌、3 例で体をもち上げた時のみの尾部痙攣が観察された。20 週目、24 週目には、それぞれ 1 例ずつが極度の体重減少と後肢麻痺に陥り死亡した。これらの症状の出現には個々のラットで個体差が観察され、2 例では体重減少と四肢脱力以外の顕著な神経症状は認められなかった。

2,5-HDione 群では、投与後 3 週目頃より 8 例中 7 例

Fig. 2. Changes in the maximum motor conduction velocity (MCV) in the proximal part of rat's tail nerve.

Fig. 3. Changes in the sensory conduction velocity (SCV) in the proximal part of rat's tail nerve.

で後肢の脱力が観察され、5週目には2例で後肢交差現象がみられた。7週目頃から毛並の乱れが著明となった。11週目頃には全例で後肢あるいは四肢の脱力が重篤化し、後肢で耳の後ろがかけなくなった。その後、6例が後肢の弛緩性麻痺に陥り、歩行困難となった。極度の体重減少のため、14週目に投与を中止したが、中止後2週間は症状はさらに重篤化した。その後、症状は徐々に改善傾向を示し、実験終了時にはかなりスムーズな歩行が可能になった。

4. 電気生理学的所見

1) ラット尾部の MCV および SCV の変化

ラット尾部近位部における MCV (A→B) の変化を Fig. 2 に示す。2,3-BDione 群では、実験終了時まで MCV の低下はみられなかった。2,4-PDione 群では、10週目より対照群に比し、有意の低下 ($p < 0.01$) を示した。18, 22, 28, 40週目では統計学的有意差はみられなかったが、実験終了時まで対照群に比し常に低値で

あった。2,5-HDione 群では、6週目で有意の低下 ($p < 0.05$) を示し始め、投与中止後4週目 (18週目) には 19.1 ± 2.4 m/sec となり、対照群の 43.8 ± 2.2 m/sec の 44% になった。その後 MCV は徐々に改善傾向を示したが、投与中止後26週目 (40週目) でもなお対照群に比し有意の低値 ($p < 0.01$) を示した。

尾部近位部 SCV (B→A) の変化を Fig. 3 に示す。

2,4-PDione 群では、近位部 SCV は8週目より対照群に比し有意の低下 ($p < 0.05$) を示し、その後、28週目を除いて実験終了時まで統計学的に有意の低下がみられた。2,5-HDione 群では、8週目に有意の低下 ($p < 0.01$) を示し始め、投与を中止する14週目まで減少し続けた。投与中止後4週目 (18週目) で、この群の近位部 SCV は 35.6 ± 4.0 m/sec と最低値を示し、対照群 55.4 ± 2.3 m/sec の 64% に減少したが、その後徐々に改善に向かった。しかし、MCV 同様、最終測定時でもなお、対照群に比し有意の低下 ($p < 0.01$) がみられた。

Fig. 4. Changes in the sensory conduction velocity (SCV) in the distal part of rat's tail nerve.

Fig. 5. Changes in the amplitude of MAP stimulated at point A and evoked at point C of rat's tail.

尾部遠位部 SCV (C→B) の変化を Fig. 4 に示す。2, 4-PDione 群, 2, 5-HDione 群とも 10 週目より遠位部 SCV は有意の低下 ($p < 0.05$, $p < 0.01$) を示し, この傾向は実験終了時まで続いた。2, 5-HDione 群では, 投与中止後 4 週目に最低値 23.1 ± 0.65 m/sec を示し, これは対照群の SCV 値の 43.8% であった。

尾部全体の SCV では, 2, 4-PDione 群と 2, 5-HDione 群の両群で, 6 週目より有意の低下が観察された。

2, 3-BDione 群では SCV の低下は観察されなかった。また, MCV および SCV の低下度は, すべての部位で $2, 5\text{-HDione} > 2, 4\text{-PDione}$ であった。

2) MAP および NAP の振幅の変化

尾部 A 点で刺激し C 点で導出した MAP (A→C) の振幅の変化を Fig. 5 に示す。2, 3-BDione 群では 28 週目に, 2, 4-PDione 群では 28 週目と 40 週目にのみ, 対照群に比し, MAP の振幅の有意の低下がみられた。2, 5-HDione 群では, 12 週目より有意に低下 ($p < 0.05$) し

始め, 投与中止後 2 週目 (16 週目) で対照群 3.4 ± 1.0 mV に比し, 0.32 ± 0.3 mV と最低値を示した。また, この時 1 例で MAP が導出不能となった。その後 MAP の振幅は徐々に改善に向かい, 投与中止後 16 週目 (30 週目) までは有意の低下 ($p < 0.01$) がみられたが, 中止後 26 週目 (40 週目) では, 対照群との間に統計学的有意差はなかった。

尾部 C 点で刺激し A 点で導出した NAP (C→A) の振幅の変化を Fig. 6 に示す。2, 3-BDione 群では 28 週目より対照群に比し低下の傾向にあったが, 統計学的有意差はなかった。2, 4-PDione 群では, 16 週目で NAP の振幅は有意に低下 ($p < 0.05$) し始め, 最終測定時まで明らかな低下を示した。2, 5-HDione 群では, 10 週目より明らかな低下 ($p < 0.01$) を示し始め, 投与中止後 4 週目 (18 週目) および 6 週目 (20 週目) で最低値となった。また, 投与中止後 2 週目, 4 週目で 1 例, 6 週目で 2 例において, 刺激の 100 回加算を行なっても, MAP

Fig. 6. Changes in the amplitude of NAP stimulated at point C and evoked at point A of rat's tail.

Fig. 7. Changes in motor distal latency (5cm in the distal part of rat's tail nerve).

は導出不能であった。その後振幅は徐々に改善傾向にあったが、投与中止後 26 週目 (40 週目) でも、対照群 $18.7 \pm 5.5 \mu V$ に比し、2,5-HDi-one 群 $8.9 \pm 3.8 \mu V$ となお有意の低下 ($p < 0.01$) を示した。

3) RL と DL の変化

対照群の RL の範囲は、ほぼ、 $0.4 \sim 1.1$ msec であった。2,3-BDi-one 群および 2,4-PDi-one 群では実験期間中 RL の遅延は観察されなかった。2,5-HDi-one 群では 4 週目で有意の遅延 ($p < 0.05$) を示し始め、投与中止後 8 週目で、RL は対照群の 0.74 ± 0.14 msec に比し、 2.58 ± 1.86 msec にまで遅延したが、その後改善傾向にあった。投与中止後 16 週目 (30 週目) では対照群に比しなお有意の遅延がみられたが、中止後 26 週目 (40 週目) にはほぼ正常になった。

DL の変化を Fig. 7 に示す。対照群の DL は動物の成長に伴い、8~10 週目までは短縮の傾向にあったが、その後、ほぼ、 $1.6 \sim 1.9$ msec の範囲で安定した。2,3-

BDi-one 群では DL の遅延はみられなかった。2,4-PDi-one 群では、22 週目と 26 週目にのみ、一時的に遅延 ($p < 0.05$, $p < 0.01$) がみられた。また、2,5-HDi-one 群は、2 週目よりすでに有意の遅延 ($p < 0.05$) を示し、投与中止後 4 週目 (18 週目) には 4.83 ± 1.16 msec と、対照群 1.70 ± 0.1 msec の約 3 倍の DL の遅延が観察された。その後 DL は改善傾向にあったが投与中止後 26 週目 (40 週目) でもなお有意の差 ($p < 0.01$) がみられた。

IV. 考 察

著者らは、これまで、脂肪族炭化水素化合物の化学構造と神経毒性の関連性を明らかにする目的で、MBK および 2,5-HDi-one に構造が類似した 11 の物質の末梢神経毒性を、電気生理学的手法を用いて比較検討してきた^{7,8,14,16,20}。今回は、2,5-HDi-one の対称性 diketone に着目し、前回の実験^{7,16} では投与量および投与期間が

十分でなく、その毒性の評価が困難であった炭素数4および5の対称性 diketone である 2,3-BDione および 2,4-PDioneを再びとりあげ、その末梢神経毒性を 2,5-HDione の毒性と比較検討した。

2,5-HDione の神経毒性は、すでに病理組織学的²¹⁻²³⁾ならびに電気生理学的手法^{20,24)}を用いて明らかにされている。後者の方法を用いた著者らの前回の実験²⁰⁾では、2,5-HDione の 400 mg/kg/day の反復皮下投与により、18日目(平均総投与量 1.4 g/匹)に MCV および SCV の有意の低下を観察している。また、小野ら²⁴⁾は、2,5-HDione の 0.05 ml/匹/day の経口投与で2週目に MCV および SCV の低下を、また、0.1 ml/匹/day で1週目に MCV、4週目に SCV の低下をみたことを報告している。

今回の実験では、2,5-HDione の 200 mg/kg/day、週5日、14週の皮下投与で、3週目に体重の有意の低下をみ、また、この頃より後肢の脱力が観察された。

この群における電気生理学的所見では、MCV、SCV、MAP および NAP の振幅、RL、DL のすべてにおいて、対照群との間に有意な低下あるいは遅延がみられた。その所見の出現時期およびその時の平均総投与量は①DL(2週目、0.62 g/匹)、②RL(4週目、1.11 g/匹)、③MCV(6週目、1.74g/匹)、④SCV(尾部全体の SCV: 6週目、1.74 g/匹、近位部 SCV: 8週目、2.36 g/匹、遠位部 SCV: 10週目、3.01 g/匹)、⑤SCVの振幅(10週目)、⑥MCVの振幅(12週目、3.58 g/匹)であり、DL、RL が非常に早い時期に遅延すること、神経伝導速度の低下が筋および神経活動電位の振幅の低下より先立って低下することが特徴的であった。また、Fig. 8 に示すごとく、神経伝導速度の低下度は、尾部近位部 MCV>遠位部 SCV>近位部 SCV となっており、2,5-HDione の神経毒性はより運動優位の dying-back 型で

あることが電気生理学的にも示唆された。

また、上記の電気生理学的所見はdose-dependent であり、しかも、投与中止後4~8週間はさらに所見の進展がみられ、その後徐々に改善に向かった。しかし、投与中止後26週目でもなお、MCV、SCV、NAP の振幅および DL において、対照群との間に有意差が観察された。

2,4-PDione は、分子量 100 の透明な液体で金属とキレートを生成することでよく知られているが、ほかに接着剤、メッキ用、燃料添加剤としての用途もある。この物質の毒性については、わずかに急性毒性の報告があるのみで、詳細な毒性の検討はほとんどなされていない。また、溶剤として使用されている *n*-pentane および 2-pentanone が、*n*-hexane や MBK 同様、人および動物の体内で ω -1 酸化をうけて 2,4-PDione に代謝されるかどうか不明である。2,4-PDione の急性毒性は、2,5-HDione 同様、中等度であり、前者の経口 LD₅₀ はラット 1,000 mg/kg であるいは 800 mg/kg、後者は 2,700 mg/kg と報告されている。

今回、2,4-PDione の 200 mg/kg の反復皮下投与で、2週目よりすでに体重の増加の抑制が観察され、この傾向は最終投与時まで続いた。また、一般症状として、注射直後の漿液性の流涎、動きの鈍麻、よろめき歩行、歩行時の開脚、尾部座攀、歩行困難、横臥といった神経症状が観察された。これらの症状は、Table 1 に示すごとく、2,5-HDione による一般症状とはかなり異なっており、より中枢部位の障害を示唆するものであった。また、2,4-PDione 群における上記症状の発現には個体差があり、影響の少ないラットもいること、症状は急速に悪化するが、歩行困難となった後投与を4~5回中止するとある程度症状の回復がみられるといった特徴も観察された。

Table 1. Clinical findings of rats intoxicated by 2,5-hexanedione and 2,4-pentanedione.

Clinical finding	2,5-hexanedione	2,4-pentanedione
Weight loss	卅	++
Salivation immediately after injection	—	++
Dullness of movement	++	++
Paralysis of hindlimb	卅 (flaccid)	+(7/8) (spastic)
Gait disturbance	++	+(3/6)
Crossing phenomenon	+(5/8)	+(5/6)

The degree of findings was classified on the following basis: —, not shown; +, shown in part of animals; ++, shown in all animals; and 卅, markedly shown in all animals. Figures in parentheses indicate the number of animals with clinical findings/total number of animals observed.

Table 2. Comparison of electrophysiological findings between 2,5-hexanedione and 2,4-pentanedione groups.

Electrophysiological findings	2,5-hexanedione	2,4-pentanedione
Decrease in MCV	≡	+ ~ ≡
Decrease in SCV	≡	≡
Degree of decreases in MCV and SCV	MCV > SCV	SCV > MCV
Degree of decreases in dist-SCV and prox-SCV	dist-SCV > prox-SCV	dist-SCV = prox-MCV
Delay in RL	≡	—
Delay in DL	≡	±
Decrease in amplitudes of MAP	≡ ~ ≡	+
Decrease in amplitudes of NAP	≡ ~ ≡	+ ~ ≡

—, not significant; ±, temporally significant; +, significant at $p < 0.05$; ≡, $p < 0.01$; ≡, $p < 0.001$ as compared with the control values by t -test

Fig.8. Changes in the MCV and SCV ratio of the 2,5-hexanedione and 2,4-pentanedione groups to the control group at each measurement time.

2,4-PDione 群における神経障害は、電気生理学的所見でも示唆されたが、Table 2 に示すごとく、2,5-HDi-one 群に比し、やはりその特徴を異にしていた。この群ではまず、①SCV (尾部全体の SCV : 6 週目, 17 g/

匹, 近位部 SCV : 8 週目, 2.32 g/匹, 遠位部 SCV : 10 週目, 2.90 g/匹), 次いで②MCV (10 週目, 2.90 g/匹) の低下が観察された。これらの神経伝導速度の低下度は、2,5-HDione 群では投与量の増加に伴って MCV,

SCV と対照群の約 50% 値まで低下するのに比し, 2,4-PDione 群では, SCV, MCV とともに実験期間中, 常に対照群の 80~95% 値の範囲内にあった (Fig. 8). また, この群における低下度は $SCV > MCV$ であり, SCV においては, 近位部 SCV と遠位部 SCV の低下度にはほとんど差がなく, 2,5-HDione 群でみられるような遠位部優位の障害パターンとは異なっていた. また, 上記の神経伝導速度の低下より遅れて, 16 週目より NAP の振幅の低下がみられ, MAP の振幅はさらに遅れて, 28 週目と 40 週目で有意に低下した. さらに, 2,5-HDione 群でみられた DL の著明な変化はこの群では観察されず, 22 週目と 26 週目に対照群に比しわずかな有意の遅延がみられたのみであった. また, この群における RL は, 実験終了時まで対照群に比し何ら遅延を示さず, 神経筋接合部の障害は電気生理学的には示唆されなかった.

著者らの前回の 2,4-PDione, 200 mg/kg (一時的に 300 mg/kg) の 107 日間投与 (平均総投与量 4.1 g/匹) 実験⁷⁾では, 体重減少, 流涎, 運動失調などの症状の出現にもかかわらず, 電気生理学的所見では, 103~107 日目の最終測定時に尾部遠位部 SCV と NAP の振幅のわずかな有意の低下をみたのみであった. しかし今回, 投与後 6 週目 (1.71 g/匹) ~ 10 週目 (2.90 g/匹) で SCV の有意の低下が, また 10 週目に MCV の有意の低下が観察された. これらの相違点については, 動物の個体差が影響していると思われるが, さらに検討を要すると思われる.

2,3-BDione は, 化学的には MEK から合成される分子量 86 の黄色い液体であるが, 実際の産業現場における使用記載はなく, またその毒性も未詳である. 2,3-BDione の還元物質である MEK はそれ自体には神経毒性はないが^{26,27)}, *n*-hexane や MBK の神経毒性を増強^{2,27~29)}させることが報告されている. DiVincenzo ら¹⁾は, MEK をモルモット腹腔内に投与し, その代謝物として血清中に 2-butanol, 2,3-butanediol, 3-hydroxy-2-butanone を検出しているが, 2,3-BDione は検出されていない. 前回の著者らの 2,3-BDione, 400 mg/kg の投与実験¹⁶⁾では, 2,3-BDione を希釈せずにラット背部皮下に反復投与したところ, 注射部位に潰瘍を形成したため, 61 日間で投与が困難となった. そのため, 平均総投与量は 4.1 g/匹と, 他の物質に比しやや少なく, 神経障害を惹起するのに十分な量ではなかったかもしれない. 今回は, 注射用蒸留水による 2,3-BDione の 2 倍希釈により, 200 mg/kg/day で 40 週間 (平均総投与量 16.6 g/匹) の連続投与が可能であった. その結果, MAP の振幅が, 28 週目に一時的な低下を示したもの

の, 他の電気生理学的所見では末梢神経毒性を示唆する変化を見出すことができなかった.

“hydrocarbon neuropathy”における化学構造と神経毒性の関連性に関する研究は, いくつかの電気生理学的方法を用いた報告があるが, 神経障害の有無を判断するテクニックとしてほとんどが臨床症状あるいは病理組織学的方法を用いて検討している. 著者ら³⁰⁾は, 2,5-HDione の神経毒性を電気生理学的手法と病理組織学的方法 (光顕レベル) を同時に用い, 経時的に比較検討した. その結果, 2,5-HDione の 200~300 mg/kg/day, 週 5 日の皮下投与により, 2 週目に脊髄後根および尾部神経でわずかな軸索の腫張, 4 週目に MCV および SCV の統計学的に有意な低下, そして 6 週目に, 病理学的に明らかな軸索の膨化を認めている. 今回, 2,5-HDione の 200 mg/kg 投与で, 2 週目にすでに DL の遅延, 6 週目に MCV, SCV の低下を認めたことは, この電気生理学的手法が, 末梢神経障害を *in vivo* で早期に検知できる有用な方法であることを示唆している. また, 今回, 神経毒性の示唆された 2,4-PDione では, その中毒ラットの症状と電気生理学的所見の異常の程度との間には必ずしも相関がなく, 臨床症状の有無で神経障害を判断するのは困難であった.

一方, 最近, これらの神経毒性の作用機序に関する研究が進められている. 2,4-PDione は 2,5-HDione よりも炭素数が一つだけ少ない対称性 diketone であるが, これらの物質の神経への作用部位あるいは神経毒性発現の作用機序の相違については明らかでない. Sabri らは, 2,5-HDione や MBK が神経組織内に存在する解糖系酵素, phosphofructokinase (PFK), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) および α -glycerophosphate dehydrogenase (GPDH) を阻害し³¹⁾, その結果として生じたエネルギー産生障害が, この neuropathy の軸索変性をおこすという仮説³²⁾をたてている. Howland ら³³⁾は, 上記の酵素に加えて, 2,5-HDione や acrylamide が, *in vitro* で, 同じく解糖系酵素である enolase をも阻害することを述べ, 末梢神経障害を惹起する神経毒物が解糖系の酵素阻害という共通の攻撃パターンをもつことを示唆している. また, Gillies ら^{34~36)}は, 2,5-HDione が解糖系ではなくステロイド生合成を阻害することを, Mendell ら³⁷⁾は, MBK 中毒ラットで, 速い軸索流が障害をうけていることを, Selkoe ら³⁸⁾は神経の組織培養実験で, *n*-hexane, MBK および 2,5-HDione が細胞毒性を有することを報告している. しかし, これらの実験は, Mendell らの報告以外はすべて *in vitro* の実験であり, 解糖系酵素 GAPDH の阻害

作用の強さは $MBK > 2,5\text{-HDione}$ であるといった *in vivo* の実験と相異なるデータも示されている。GAPDH は、その活性中心として求核基である SH 基を有しており、MBK や 2,5-HDione, あるいは 2,4-PDione 分子中のカルボニル基の正に部分荷電した C 原子と S^- が結合するであろうことは容易に想像できる。また、同じく、カルボニル基の負に部分荷電した O 原子は、プロトン受容体となり、酵素やその他の生体構成成分と、たやすく水素結合するかもしれない。しかし、この化学的な結合の問題からだけでは γ -diketone neuropathy における特異的な毒性の作用機序、あるいは、2,5-HDione と 2,4-PDione の毒性発現機構の相違を説明することはできない。また、Graham ら³⁹⁾ および DeCaprio ら⁴⁰⁾ は、2,5-HDione が蛋白中のアミノ基と共有結合し、ピロール環を形成することを報告しており、これらの神経障害の詳細な作用機序の究明は今後の課題である。

今後、化学構造と神経毒性の関連性を検討するために、さらに多くの物質の神経毒性に関するデータを集積する必要があると思われる。

V. ま と め

n-hexane, MBK の神経毒性に関し、化学構造と神経毒性の関連性を検討する目的で、両者の共通代謝産物で強い神経毒性を有する 2,5-HDione と、同じく炭素数 4 および 5 の対称性 diketone である 2,3-BDione および 2,4-PDione の 3 物質の末梢神経毒性を、ラット尾部神経を用いて電気生理学的に比較検討し、以下の結論を得た。

1) 2,3-BDione の皮下投与により、一時的に四肢の軽い脱力様状態が観察されたが、その後は全身状態もよく、なんら神経症状も認めえなかった。電気生理学的所見では、一時的に MAP の振幅の低下が認められたものの、ほかには対照群との間になんら差異を認めえず、 α -diketone である 2,3-BDione は末梢神経毒性を有さないと思われる。

2) 2,4-PDione 投与により、体重増加抑制、流涎、動きの鈍麻、よろめき歩行、歩行時の開脚、尾部痙攣、歩行困難および横臥といった一般症状が観察され、中枢神経系の障害が示唆された。電気生理学的所見の特徴として、①SCV, MCV の低下がみられるが、その低下度は 2,5-HDione 群における低下度よりも小さく、しかも $SCV > MCV$ であること、SCV においては尾部近位部と遠位部の低下率に差がなく、2,5-HDione 群にみられるような遠位部優位の障害パターンではないこと、②RL, DL の遅延がほとんど観察されず、神経筋接合部の

障害がみられないこと、③SCV, MCV の低下に続いて NAP および MAP の振幅の低下がみられること、であった。以上より、炭素数 5 の β -diketone である 2,4-PDione は神経毒性を有するが、その特徴は 2,5-HDione のそれとは異なり、より中枢への作用が示唆された。

3) 2,5-HDione 投与により、体重減少、後肢脱力、後肢弛緩性麻痺、尖足、歩行困難等の臨床症状が観察され、電気生理学的に MCV, SCV, NAP および MAP の振幅の低下、RL, DL の著明な遅延が観察された。神経伝導速度の低下度は $MCV > SCV$ であり、SCV においては尾部近位部より遠位部でその低下度は大きく、電気生理学的にも末梢優位の障害パターンがみられた。これらの所見は、投与中止後 4～8 週間はさらに進展し、その後徐々に改善に向かったが、投与中止後 26 週目でもなお MCV, SCV, NAP の振幅および DL において、対照群との間に有意差がみられた。

文 献

- 1) DiVincenzo, G.D., Kaplan, C.J. and Dedinas, J.: Characterization of the metabolite of methyl *n*-butyl ketone, methyl iso-butyl ketone and methyl ethyl ketone in guinea pig serum and their clearance, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 36: 511-522, 1976.
- 2) Abdel-Rahman, M.S., Hetland, L.B. and Couri, D.: Toxicity and metabolism of methyl *n*-butyl ketone, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 37: 95-102, 1976.
- 3) Couri, D., Abdel-Rahman, M.S. and Hetland, L.B.: Biotransformation of *n*-hexane and methyl *n*-butyl ketone in guinea pigs and mice, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 39: 295-300, 1978.
- 4) DiVincenzo, G.D., Hamilton, M.L., Kaplan, C.J. and Dedinas, J.: Metabolic fate and disposition of ^{14}C -labeled methyl *n*-butyl ketone in the rat, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 41: 547-560, 1977.
- 5) DiVincenzo, G.D., Hamilton, M.L., Kaplan, C.J., Krasavage, W.J. and O'Donoghue, J.L.: Studies on the respiratory uptake and excretion and the skin absorption of methyl *n*-butyl ketone in humans and dogs, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 44: 593-604, 1978.
- 6) Spencer, P.S., Bischoff, M.C. and Schaumburg, H.H.: On the specific molecular configuration of the neurotoxic aliphatic hexacarbon compounds causing central-peripheral distal axonopathy, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 44: 17-28, 1978.
- 7) 三角順一, 川上 恵, 椿 健一, 佐竹健三, 野村 茂: 2,5-hexanediol, acetylacetone, acetone および 2-heptanone のラット尾部神経伝導速度におよぼす影響について, *産業医学*, 21: 714, 1979.
- 8) 三角順一, 永野 恵, 野村 茂: 2-Octanone および *n*-Hexane の代謝産物 2-Hexanol の神経毒性に関する実験的研究, *産業医学*, 24: 475-484, 1982.
- 9) Krasavage, W.J., O'Donoghue, J.L., DiVincenzo, G.D. and Terhaar, C.J.: The relative neurotoxicity

- of methyl *n*-butyl ketone, *n*-hexane and their metabolites, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 52 : 433-441, 1980.
- 10) Scala, R.A. : Hydrocarbon neuropathy, *Am. Occup. Hyg.*, 19 : 293-299, 1976.
- 11) Johnson, B.L., Setzer, J.V., Lewis, T.R. and Hornung, R.W. : An electrodiagnostic study of the neurotoxicity of methyl *n*-amyl ketone, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 39 : 866-872, 1978.
- 12) O'Donoghue, J.L. and Krasavage, W.J. : Hexacarbon neuropathy : a γ -diketone neuropathy?, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 38 : 333, 1979.
- 13) Katz, G.V., O'Donoghue, J.L., DiVincenzo, G.D. and Terhaar, C.J. : Comparative neurotoxicity and metabolism of ethyl *n*-butyl ketone and methyl *n*-butyl ketone in rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 52 : 153-158, 1980.
- 14) Misumi, J., Kawakami, M. and Nomura, S. : Experimental studies on the relationships between molecular configuration and neurotoxicity of aliphatic hydrocarbon compounds, *Proceedings of the 8th International Conference of Occupational Health in the Chemical Industry, Tokyo*, 141-146, 1980.
- 15) Takeuchi, Y., Ono, Y., Hisanaga, N. and Kitoh, J. : A comparative study on the neurotoxicity of *n*-pentane, *n*-hexane and *n*-heptane in the rats, *J. Ind. Med.*, 37 : 241-247, 1980.
- 16) 川上 恵, 三角順一, 野村 茂 : 2,3-butanedione, 2-pentanone および 2,5-hexanedione のラット尾部神経伝導速度におよぼす影響について, *産業医学*, 22 : 600, 1980.
- 17) Lynch, D.W., Lewis, T.R., Moorman, W.J., Plotnik, H.B., Schuler, R.L., Smallwood, A.W. and Kommineni, C. : Inhalation toxicity of methyl *n*-amyl ketone (2-heptanone) in rats and monkeys, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 58 : 341-352, 1981.
- 18) O'Donoghue, J.L., Krasavage, W.J., DiVincenzo, G.D. and Ziegler, D.A. : Commercial-grade methyl heptyl ketone (5-methyl-2-octanone) neurotoxicity : contribution of 5-nonanone, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 62 : 307-316, 1982.
- 19) Misumi, J. and Nomura, S. : An electrophysiological method for examination *in vivo* of peripheral neuropathy due to organic mercury poisoning in rats, *Arch. Hig. Rada Toksikol.*, 30(suppl.) : 239-243, 1979.
- 20) 三角順一, 川上 恵, 野村 茂 : *n*-hexane, methyl *n*-butyl ketone および 2,5-hexanedione のラット尾部運動神経ならびに知覚神経伝導速度におよぼす影響について, *産業医学*, 21 : 180-181, 1979.
- 21) Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. : Experimental neuropathy produced by 2,5-hexanedione—A major metabolite of the neurotoxic industrial solvent methyl *n*-butyl ketone, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.*, 38 : 771-775, 1975.
- 22) Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. : Ultrastructural studies of the dying-back process, III. The evolution of experimental peripheral giant axonal degeneration, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 36 : 276-299, 1977.
- 23) Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. : Ultrastructural studies of the dying-back process, I. Differential vulnerability of PNS and CNS fibers in experimental central-peripheral distal axonopathies, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 36 : 300-320, 1977.
- 24) 小野雄一郎, 竹内康浩, 久永直見 : 末梢神経伝導速度のラット尾部における測定方法の検討と *n*-Hexane, MBK, 2,5-Hexanedione の毒性の比較研究, *産業医学*, 21 : 528-538, 1979.
- 25) Clayton, G.O. and Clayton, F.E. : *Patty's Industrial Hygiene and Toxicology*, 3rd revised edition, Vol. 2c, 4773-4776, Wiley-Interscience, New York, 1982.
- 26) Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. : Feline nervous system response to chronic intoxication with commercial grades of methyl *n*-butyl ketone, methyl isobutyl ketone and methyl ethyl ketone, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 37 : 301-311, 1976.
- 27) Saida, K., Mendell, J.R. and Weiss, H.S. : Peripheral nerve changes induced by methyl *n*-butyl ketone and potentiation by methyl ethyl ketone, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 35 : 207-225, 1976.
- 28) Couri, D., Hetland, L.B., Abdel-Rahman, M.S. and Weiss, H. : The influence of inhaled ketone solvent vapors on hepatic microsomal biotransformation activities, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 41 : 285-289, 1977.
- 29) Altenkirch, H., Stoltenburg-Diding, G. and Wagner, H.M. : Experimental data on the neurotoxicity of methyl ethyl ketone (MEK), *Specialia*, 15 : 503-504, 1979.
- 30) 永野 恵, 佐藤和子, 衛藤光明, 三角順一, 野村 茂 : 2,5-hexanedione 中毒ラットの電気生理学的ならびに病理組織学的変化について, *産業医学*, 25 : 77-83, 1983.
- 31) Sabri, M.I., Moore, C.L. and Spencer, P.S. : Studies on the biochemical basis of the distal axonopathies—I. Inhibition of glycolysis by neurotoxic hexacarbon compounds, *J. Neurochem.*, 32 : 683-689, 1978.
- 32) Spencer, P.S., Sabri, M.I., Schaumburg, H.H. and Moore, C.L. : Does a defect of energy metabolism in the nerve fiber underlie axonal degeneration in polyneuropathies?, *Ann. Neurol.*, 5 : 501-507, 1979.
- 33) Howland, R.D., Vyas, I.L., Lowndes, H.E. and Argentieri, T.M. : The etiology of toxic peripheral neuropathies : *in vivo* effects of acrylamide and 2,5-hexanedione on brain enolase and other glycolytic enzymes, *Brain Res.*, 202 : 131-142, 1980.
- 34) Gillies, P.J., Norton, R.M. and Bus, J.S. : Effect of 2,5-hexanedione on lipid biosynthesis in sciatic nerve and brain of the rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 54 : 210-216, 1980.
- 35) Gillies, P.J., Norton, R.M., White, E.L. and Bus, J.S. : Inhibition of sciatic nerve sterogenesis in hexacarbon-induced distal axonopathy in the rat, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 54 : 217-222, 1980.
- 36) Gillies, P.J., Norton, R.M. and Bus, J.M. : In-

- hibition of sterogenesis but not glycolysis in 2,5-hexanedione-induced distal axonopathy in the rat, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 59:287-292, 1981.
- 37) Mendell, J.R., Sahenk, Z., Saida, K., Weiss, H.S., Savage, R. and Couri, D.: Alteration of fast axoplasmic transport in experimental methyl *n*-butyl ketone neuropathy, *Brain Res.*, 133:107-118, 1977.
- 38) Selkoe, D.J., Luckenbill-Edds, L. and Shelanski, M.L.: Effects of neurotoxic industrial solvents on cultured neuroblastoma cells: Methyl *n*-butyl ketone, *n*-hexane and derivatives, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 37:768-789, 1978.
- 39) Graham, D.G., Anthony, D.C., Boekelheide, K., Maschmann, N.A., Richards, R.G., Wolfram, J.W. and Shaw, B.R.: Studies of the molecular pathogenesis of hexane neuropathy, II. Evidence that pyrrole derivatization of lysyl residues leads to protein crosslinking, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 64:415-422, 1982.
- 40) DeCaprio, A.P., Olajos, E.J. and Weber, P.: Covalent binding of a neurotoxic *n*-hexane metabolite: Conversion of primary amines to substituted pyrrole adducts by 2,5-hexanedione, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 65:440-450, 1982.

著者への通信先: 永野 恵, 〒860 熊本市本荘 2-2-1 熊本大学医学部公衆衛生学教室 *Reprint requests to* Department of Public Health, Kumamoto University Medical School, Honjo 2-2-1, Kumamoto, 860 Japan (M. Nagano)