SHORT COMMUNICATION

実験的アクリルアミド・ニューロパチーに対する Methylcobalamin の投与効果

—— 組織定量的検討 ——

大 西 晃 生^{*1} 黒 岩 義 五 郎^{*2} 大 郷 利 治^{*3}

(受付：1978年10月31日)

The Effect of Methylcobalamin on the Experimental Acrylamide
Neuropathy—— Morphometric Study ——

Akio OHNISHI^{*1} Yoshigoro KUROIWA^{*2}
and Toshiharu OHGO^{*3}

^{*1,2} Departments of Neuropathology and Neurology, Neurological Institute, Faculty of Medicine, Kyushu University

^{*3} Section of Toxicology and Experimental Biology Research, Eizai, Co., Ltd.

This study was designed to evaluate the effect of methylcobalamin on the myelinated fiber degeneration produced by acrylamide intoxication in rats. Twelve Sprague-Dawley rats were fed a stock diet with water containing 500 ppm acrylamide ad libitum for three weeks. During additional three weeks, the acrylamide was withdrawn.

Methylcobalamin, 500 μ g/kg, was intramuscularly administered to 6 rats as the test and 0.675% NaCl solution was intramuscularly administered to 6 rats as the control for the period of 6 weeks. All rats developed a waddling and paretic gait after twelve days of intoxication. In the control, two rats died on the 19th and 20th days of intoxication, respectively. No rats died in the test. Three test and two control rats were sacrificed at a time, and both the sural and the peroneal nerves

^{*1} 九州大学医学部脳研神経病理

〒812 福岡市東区馬出 3-1-1

^{*2} 同上神経内科

^{*3} エーザイ K. K. 生物研究所

harvested were processed for morphometric studies at the end of the 3rd and 6th weeks of the experiment.

In teased fiber analysis the frequency of axonal degeneration of myelinated fibers was lower in tests than in control rats for each of four different nerves (the proximal, at mid thigh, and distal, at ankle, sural nerves and proximal, at mid thigh, and distal, at knee, peroneal nerves). It was significantly lower in test than in control rats ($p < 0.02$) in the combined test of the four different nerves. Although the density of myelinated fibers was higher in test than in control rats, the difference between the test and control rats was not significant. The total number of myelinated fibers in test rats was significantly greater than in control rats for both proximal and distal sural nerves ($p < 0.05$ and $p < 0.01$).

The data suggested that methylcobalamin may have played a protective role against the axonal degeneration and subsequent loss of myelinated fibers in acrylamide neuropathy of rats.

Key Words : Methylcobalamin, Morphometry, Acrylamide neuropathy, Axonal degeneration, Myelinated fiber

緒 言

各種末梢神経疾患における methylcobalamin 治療の有効性はすでに二重盲検同時対照法により明らかにされている¹⁾。しかしどのような機序にもとづいて methylcobalamin 治療の有効性が生じるかについて現在の段階では未知の点が多い。一方 methylcobalamin の神経組織に対する作用の基礎的研究では、坐骨神経圧挫による神経線維の Waller 変性抑制効果およびその再生促進効果が示唆され²⁾、同時に methylcobalamin は圧挫後 5～7 日における Schwann 細胞の蛋白代謝を亢進させ、軸索再生に対して促進的に作用する可能性が示されている³⁾。

我々はヒトの末梢神経疾患でしばしばみられる dying back 現象を実験的に呈するラットのアクリルアミド・ニューロパシーにおいて、methylcobalamin 投与がラットの末梢神経病変にどのような影響を及ぼすかを定量的な組織病理学的方法⁴⁾⁵⁾を用いて検討した。

材料と方法

平均体重 160 g の Sprague-Dawley ラット 12 頭に acrylamide 500 ppm 含有飲料水を 3 週間投与し、その後 3 週間 acrylamide を含まない飲料水を投与した。このうち 6 頭のラットには methylcobalamin ($\text{CH}_3\text{-B}_{12}$ と略) $500 \mu\text{g/kg}$ を筋肉内投与し ($\text{CH}_3\text{-B}_{12}$ 投与群, test 群), 他の 6 頭には 0.675% NaCl を筋肉内投与した ($\text{CH}_3\text{-B}_{12}$ 非投与群, control 群)。Acrylamide 投与終了時 (実験開始 3 週間後) および実験開始 6 週間後に test 群では 3 頭ずつ, control 群では 2 頭ずつ腓腹神経と腓骨神経の光学顕微鏡による組織病理学的検討を盲検法により行った。腓腹神経については、各腓腹神経の近位部 (大腿中央部腓腹神経) および遠位部 (足関節部腓腹神経) で、ときほぐし線維の condition 分類⁶⁾、有髄線維密度 (数/ mm^2)、神経束総横断面積 (mm^2)、神経当りの総有髄線維数、有髄線維の平均直径を得た。腓骨神経についてはときほぐし線維の condition 分類を各腓骨神経の近位部 (大腿中央部腓骨神経) および遠位部 (膝関節部腓骨神経) で行った。Test 群 (6 頭)

Fig. 1 実験経過.

Fig. 2 ときほぐし線維. 上部の二本の有髓線維はミエリン球が鎖状配列を呈する軸索変性を示している. 残りの一本の有髓線維は正常. オスミウム染色, $\times 300$

と control 群 (4 頭) 間でこのような所見に有意差がみられるか否かを推計学的に検討した.

結 果

両群において Fig. 1 に示すように体重増加の抑制が acrylamide 投与中に認められ, acrylamide 投与開始後 12 日目ごろより後肢の動揺性および麻痺性歩行が認められた. Control 群では acrylamide 投与開始後 19 日目および 20 日目に 1 頭ずつ死亡した. Test 群では死亡例はなかった. 4 週以降 acrylamide を含まない飲料水の投与期間には両群において著明な体重増加が認められた (Fig. 1).

ときほぐし線維の観察では, ミエリン球が鎖状配列を示す軸索変性所見が主所見として認められ

Fig. 3 Acrylamide 投与 3 週間後の遠位部腓腹神経横断像.
A: control 群, B: test 群
A では B に比較し myelin ovoid の出現頻度が高い. エポソ包埋トルイジンブルー染色, $\times 600$

Table 1 近位部および遠位部腓腹神経と腓骨神経における軸索変性所見の出現頻度

Teased fiber abnormality*		
	Control (n=4)	Test (n=6)
Sural N. (proximal)	16.0±2.8**	8.3±1.9 (p<0.05)
Sural N. (distal)	15.5±4.3	9.7±2.7 (N.S.)
Peroneal N. (proximal)	7.5±1.9	6.7±2.0 (N.S.)
Peroneal N. (distal)	19.0±7.9	8.0±2.2 (N.S.)
Mean of all nerves	14.5±2.4	8.2±1.0 (p<0.02)

* expressed by % ** Mean±S.E.

Table 2 近位部および遠位部腓腹神経における有髄線維密度ならびに神経当りの総有髄線維数

Myelinated fiber density* of sural nerve		
	Control (n=4)	Test (n=6)
Sural N. (proximal)	15,612±2367	17,887±1128 (N. S.)
Sural N. (distal)	11,327± 970	14,657±1268 (N. S.)

Myelinated Fiber Number of Sural Nerve		
	Control (n=4)	Test (n=6)
Sural N. (proximal)	726±153	1070±69 (p<0.05)
Sural N. (distal)	577± 35	807±42 (p<0.01)

* Number/mm² of fascicular area ** Number/nerve

たが、節性脱髄所見は認められなかった (Fig. 2). 近位部および遠位部腓腹神経と腓骨神経における軸索変性所見の出現頻度の平均値を Table 1 に示した. 検索した4神経において, test 群では control 群に比較して軸索変性の出現頻度は低値を示した. 各神経における両群間の軸索変性の出現頻度の推計学的検討では近位部腓腹神経においてのみ有意差 ($P<0.05$) がみられた. 4神経の軸索変性の出現頻度を combine した結果では, test 群で control 群に比較して軸索変性の出現頻度は有意に ($P<0.02$) 低値を示した.

近位部および遠位部腓腹神経における有髄線維密度を Table 2 に示した. 両神経において test 群では control 群に比較して平均有髄線維密度は高値を示したが, 両群間に推計学的な有意差は認められなかった.

近位部腓腹神経の神経束総横断面積は, control

群 $0.0488\pm0.0094\text{ mm}^2$ (平均値±SE), test 群 $0.0605\pm0.0041\text{ mm}^2$, 遠位部腓腹神経の神経束総横断面積は control 群 $0.0515\pm0.0028\text{ mm}^2$, test 群 $0.0560\pm0.0030\text{ mm}^2$ で両群間に推計学的な有意差は認められなかった.

近位部および遠位部腓腹神経における神経当りの総有髄線維数を Table 2 に示した. 両神経において, test 群では control 群に比較し推計学的に有意に ($P<0.05\sim0.01$) 神経当りの総有髄線維数が高値を示した.

近位部腓腹神経の有髄線維平均直径は, control 群 $4.56\pm0.19\text{ }\mu\text{m}$ (平均値±SE), test 群 $4.53\pm0.13\text{ }\mu\text{m}$, 遠位部腓腹神経の有髄線維平均直径は control 群 $4.07\pm0.15\text{ }\mu\text{m}$, test 群 $4.08\pm0.15\text{ }\mu\text{m}$ で両群間に明らかな差を認めなかった.

考 察

Acrylamide によるニューロパチー^{7)~9)}では典型的な軸索変性がみられ、その病変は遠位部に強調されることより、dying back 現象を呈するニューロパチーの実験モデルの1つとして適切であると考えられる。事実本実験の control 群では、acrylamide 500 ppm 含有飲料水投与3週間で、ときほぐし線維分析において約10~20%の頻度で軸索変性を呈する有髄線維が観察されたことより、このような実験的ニューロパチー動物において methylcobalamin 投与効果を組織定量的な方法を用いて検討することは妥当であると考えられる。

本実験では、①acrylamide 投与中に control 群では2匹のラットが死亡したが、test 群 (methylcobalamin 投与群) では死亡例がなかったこと、②ときほぐし線維による異常有髄線維の出現頻度が methylcobalamin 投与群で control 群より明らかに低値を示したこと、③神経当りの総有髄線維数が methylcobalamin 投与群で control 群より明らかに高値を示したことより、methylcobalamin は acrylamide によるラットの有髄線維の変性頻度を抑制する可能性が存在すると判断された。どのような機序により有髄線維の変性頻度が抑制されたかについては本実験からは不明であるが、methylcobalamin の神経組織における蛋白代謝亢進作用³⁾がこのような変性抑制作用と密接な関係があるものと推定された。

結 語

実験的アクリルアミド・ニューロパチーに対して methylcobalamin がどのような影響を及ぼすかを組織定量的に検討した。Methylcobalamin 投与ラットではコントロール・ラットに比較して、軸索変性を示す異常有髄線維の出現頻度が低くまた有髄線維の変性・脱落の程度が軽度であった。

文 献

1) 亀山正邦, 阿部鏡太郎, 飯田光男ほか: Me-

thylcobalamin の脊髄および末梢神経疾患に対する治療効果—二重盲検同時対照法による検討—。臨床と研究, 49: 241-244 (1963)。

- 2) 山津清実, 金子武稔, 北原晟文ほか: 末梢神経の変性ならびに再生に関する薬理学的研究。第1報。坐骨神経圧挫ラットの筋重量減少ならびに筋電図ボタンに対する Methylcobalamin および Cobamide の影響。日薬理誌, 72: 259-268 (1976)。
- 3) 山津清実, 山西嘉晴, 金子武稔ほか: 末梢神経の変性ならびに再生に関する薬理学的研究。第2報。坐骨神経圧挫ラットの圧挫側神経組織タンパク画分へのラベルアミノ酸のとりこみならびにシュワン細胞核分裂に対する Methylcobalamin の影響。日薬理誌, 72: 269-278 (1976)。
- 4) Ohnishi, A., Schilling, K., Brimijoin, W. S. et al.: Lead neuropathy. 1) Morphometry, nerve conduction, and choline acetyltransferase transport: new finding of endoneurial edema associated with segmental demyelination. J. Neuropath. Exp. Neurol., 36: 499-518 (1977)。
- 5) 大西晃生: 実験的 adriamycin neuropathy. 神経内科, 8: 383-385 (1978)。
- 6) Dyck, P. J., Stevens, J. C., Mulder, D. W. et al.: Frequency of nerve fiber degeneration of peripheral motor and sensory neurons in amyotrophic lateral sclerosis. Morphometry of deep and superficial peroneal nerves. Neurology (Minneapolis), 25: 781-785 (1975)。
- 7) Fullerton, P. M. and Barnes, J. M.: Peripheral neuropathy in rats produced by acrylamide. Brit. J. Ind. Med., 23: 210-221 (1966)。
- 8) Prineas, J.: The pathogenesis of dying-back polyneuropathies. II. An ultrastructural study of experimental acrylamide intoxication in the cat. J. Neuropath. Exp. Neurol., 28: 598-621 (1969)。
- 9) Schaumburg, H. H., Wisniewski, H. M. and Spencer, P. S.: Ultrastructural studies of the dying-back process. 1. Peripheral nerve terminal and axon degeneration in systemic acrylamide intoxication. J. Neuropath. Exp. Neurol., 33: 260-284 (1974)。