ビタミンB₁ 欠乏家兎に於ける亞硫酸曹達法 (尿脚氣反應)の實驗的研究

岩手醫大工藤内科 葛 但 夫

Experimental Studies on Sodium Sulphite Method to find the Urine Beriberi
Reaction in the Rabbits which lack Vitamine B₁.

Tadao Kuzu

(本論文の要旨は昭和27年4月内科学會總會及び同年6月東北消化器病學會にて発表した。)

I 緒 言

1940~1943年 Williams 等が人の實驗的ビタミンB₁ 欠乏症の研究に於いて葡萄糖投與後の血中焦性葡萄糖量の動搖を報告しB₁ が体内焦性葡萄糖代謝に關係ある事を發表して以來幾多の研究者によりB₁ と体内糖質代謝とは密接なる關係にあり此のB₁ が欠乏すると体内糖質代謝障害を來たし血中焦性葡萄糖量の増加を示す事が實驗的に證明されている。此の体内に於ける焦性葡萄糖は Co-Carboxylase により炭酸を分離し, Acetaldehyd を生じ尿中に排泄されて來るのであるが、ビ B₁ 欠乏時に於いては此の Co-Carboxylase の低下により尿中に於ける Acetaldehyd が減少を示して來る。此の尿中に於ける Acetaldehyd の増減を目標とし体内に於けるB₁ 欠乏状態を知らんとして工藤教授により創案されたのが此の亞硫酸曹達法による尿脚氣反應である。余は此の亞硫酸曹達法に就いて家兎を使用し動物實驗を行いB₁ 欠乏動物の尿と亞硫酸曹達法との關係に於いて聊か興味ある成績を得たので此處に報告して御参考に供する次第である。

II 亞硫酸曹達法

試藥, 1. 無水亞硫酸曹達液 (水 500 cc に對し無水亞硫酸曹達 6.15gr を溶解す), 2. 0.02% フクシン溶液

方法, 被檢尿 5 cc を小ビーカーにとり中性の場合は pH 6.8~7.0 に, 弱酸性の場合は pH 6.4~

6.6 に夫々修正しそれに上記フクシン溶液 2 cc を加えマイクロピウレットにて亞硫酸曹達を滴下しそのフクシンの赤色が脱色するに要した亞硫酸曹達の滴數を読む。中性, 弱酸性に修正するためには 3% 醋酸溶液, 1.5% 苛性ナトリウム溶液を使用し指示藥としてはリトマス試験紙, pH 決定には比色試験紙(B.T.B.M.R.)を使用せり。尙試藥であるが此の無水亞硫酸曹達溶液は通常5日以上の使用には堪えず, 又使用に當つては先ず必ず小ビーカーにフクシン溶液 2 cc をとり亞硫酸曹達 1 滴を滴下し完全に脱色する場合のみ試藥として使用した。又フクシンは仲々溶解し難きを以て使用前 5~7 日に調製して置いたものを使用した。

III 實驗方法

家兎は雌雄何れも健康なものを選び, 採尿の必要ある關係上圖の如き箱に 1 頭宛收容し臥藁は喰するを以て此れを用いず冬季は室内に入れて保温に留意し, 飼料は毎朝 10 時に與え午後 4 時まで自由に飽食せしめ, それ以後は飼料は勿論水も與えず夜間空腹時の尿を採集し被檢尿とした。採集せる尿は試験前一度濾過し不純物を除去してより被檢尿とした。

IV 家兎に於ける實驗成績

1). 白米食飼養試験, 家兎に白米を單獨で與えた脚氣様疾患, 又ビタミンB₁ 欠乏症に關する研究は數多く報告されているが, 一部淺井氏等(1930) は此の單獨飼養の場合の種々なる症狀に反對し,

第 1 圖

- (イ) 金網(開閉自由の戸)
- (ロ) 細い金網で兎糞丈残る様にしてある。
- (ハ) トタン張りの傾斜
- (ニ) 尿流出口
- (ホ) 採尿容器
- (ヘ) 引出式にして(ロ)の部分にある兎糞を取り出せる様にしてある。

又 Funk氏(1913)は鳩白米病が Nicotin 酸で輕快せりと報告しているが、余は白米偏食で實驗を行つた。尙此の場合當然ビ B_1 以外のビタミンも欠乏して來ると考えられるが、 B_1 同様体内に於いて合成される爲、体内に於いて最も B_1 を多く消費する白米偏食を行う事により大凡の状態を推定する事が出來ると考えられる。

白米飼養方法：白米は更に有効成分を破壊する(志賀、草間 1910)目的で米飯としたものと、よく水洗しそれを一晝夜水に浸けて乾燥したものとを以て飼養し、食塩は1日量2瓦(淺井1930)を超えぬ程度に米飯とよく混じ水と共に與えた。

経過：最初2～3日は米飯を嫌うものもあるが日を経るに従つて次第に飽食し4週目頃より次第に食慾減退を示す様になりその攝取量も半量位となる。此の頃より家兎の運動も緩慢となり箱の一隅より仲々動かなくなつて來る。体重は3～4週目頃より著明に減退し始め体温も此の時期になる

と低下を示し $37.0^{\circ}\text{C} \sim 38.0^{\circ}\text{C}$ 台を示す。末期に到れば食慾も全く減退し麻痺を起す様になると全く食餌を攝らず2～3日、長くとも5日にして斃死する。此の麻痺の診斷は村田氏(1922)、淺井氏(1970)等の方法によつた。

即ち、1. 家兎の四肢を兩手を以て把え此れを横臥の位置に置くと健康なる家兎は何等の困難も覺えず直ちに四肢の上に直立するが、運動麻痺を起したものでは數回起ち上るを試みて後に起立す。2. 家兎背部の皮膚をつまみ1尺位の高さより放下すれば麻痺のあるものは腹部を床に打ちつけた後に起立する。3. 健康家兎の鼻尖に点火せる燐寸を持ち來れば直ちに家兎は逸走するも麻痺あるものに於いては後肢を中心に体位を廻轉して此れを回避す。4. 横臥位の位置より直立の位置に移らんとするや常に前肢のみ運んで体位を整調す。5. 跏坐の姿勢をとる場合後肢は健常動物の場合より遙かに前方に位置す。

又尿量も次第に減少を示し、1～2日置き又は1週以上も排尿を見ないものもある。又毎日の如く排尿を見る家兎は滴數(亞硫酸曹達滴數、以下滴數と言う。)の減少が間隔をおいて排尿を見る家兎よりも早い様である。以上の如き経過をとつた家兎尿の平均滴數を表示すると表1、表2の如くなる。又家兎6號はその経過も速かで白米飼養を行つてより22日目に於いて著明なる後肢麻痺を來たし麻痺發現後5日にして斃死している此の最も経過の速い6號の滴數を表示すれば表3の如くなる。

2) 玄米食飼養試驗。糠中に有効成分の含有している事は鈴木氏等(1911, 1912)衣笠氏等(1922)により明らかであるが、此の試験の場合此等糠中の有効成分をそのまゝ與え飼養する事が目的なのであるから玄米はそのまゝ與え此れに數20%を混じて與え他は前記白米食飼養試験と全く同様にした。此の場合は最初より食慾減退を示す事なく、8週間にわたつてその経過を観察した。此の成績を表示すると表4、5の如くなる。此の場合は白米飼養の場合の如く著しい滴數の減少も示さず、又村田氏(1922)の言う如き麻痺も認められなかつ

表 1

番 號	1 號 ♂ 2.5k	2 號 ♂ 3.0k	3 號 ♀ 4.1k	4 號 ♀ 3.0k	5 號 ♂ 3.5k	6 號 ♀ 2.9k
週	中 性 酸 性	中 性 酸 性	中 性 酸 性	中 性 酸 性	中 性 酸 性	中 性 酸 性
I	8 11	9 11	9 10	9 11	9 11	8 11
II	9 11	7 8	6 7	7 8	6 8	6 7
III	9 12	7 9	6 7	9 10	8 9	6 6
IV	9 10	7 8	7 7	7 8	9 10	6 6
V	6 8	6 6	6 6	7 8	6 8	
VI	6 8	7 7	6 6	6 7	7 8	
VII		5 6	6 6	6 7	6 8	
VIII			5 6			

表 2

表 3

表 4

番 號	1 號 ♂ 3.6k	2 號 ♀ 3.4k	3 號 ♀ 2.3k	4 號 ♀ 1.4k	5 號 ♀ 1.4k
週	中 性 酸 性	中 性 酸 性	中 性 酸 性	中 性 酸 性	中 性 酸 性
I	11 15	6 13	15 20	6 9	16 23
II	11 14	11 14		14 13	13 16
III	10	11 14	14 20		12
IV	6	9 11			13 16
V	7	10 14	13 18	10	9
VI	12	18 14	12 15	8 10	9
VII	12	13 11	9 9	10 14	9 11
VIII	15	20 13	16 9	13	

た、恐らくは、糞を混合せるためならんと思われる。

3) 青菜食飼養試験。主としてクローバー、キャベツ、大根葉を交互に與え自由に飽食せしめ別に

表 5

飼養量に制限を加える様な事はしなかつた。勿論夜間に飼料を與えぬ事は前試験と變りない。斯かる飼料を與える時は家兎は最も正常の状態にあり尿量も多く色は淡黄、淡黄褐色にしてアルカリ性を呈し、穀類飼養の場合の如く濃厚なる尿を見ず

表 6

番 號	1 號 ♂ 1.8k	2 號 ♀ 1.4k	3 號 ♀ 1.4k	4 號 ♀ 1.3k	5 號 ♀ 1.6k
週	中 性 酸 性	中 性 酸 性	中 性 酸 性	中 性 酸 性	中 性 酸 性
I	13 21	20 27	15 21	18 26	17 24
II	17 23	14 19	17 21	18 22	17 25
III	15 21	15 25	16 21	19 22	16 23
IV	18 24	17 23	16 22	16 23	14 20

表 7

濾過も容易であつた。此の成績を示せば表6, 7の如くなる。此の場合の経過観察は4週を以て打切つた。

4) 飢餓食飼養試験。此の試験は白米食飼養の場合其の体重の減少著しき故其の對照として、白米食飼養とは別に最もビタミンに富んだ飼料を與え其の絶對量を制限し徐々に其の体重の低下を來たす様にした。飼料としては新鮮なる卵の花50瓦、糠50瓦、青菜40瓦、食塩は1日量2瓦を超えぬ様に卵の花、糠によく混じ経過を観察した。体重の減少は僅少宛ではあるが常に認められ尿量は白米飼養、玄米飼養の場合の如く少量ではなくほとんど毎日排尿を見る事が出來た。体温は 38.4°C ~ 39.2°C の間を示し体重の減少に従い其の体温も稍々低下を示し 38.0°C 台を示すに到るが白米飼養の場合の如く 37.0°C 台を示す様な事はなかつた。此れは飢餓状態は示すが必要栄養素は或る程度補給されているため体重減少は認めるが体内酸化作用の著しい低下は呈し難いためと思われる。又滴数は表8, 9に於いて見られる如く少し宛ではあるが次第に減少を示している。長い経過を観察した場合或る程度のビタミン B_1 缺乏症状を示すかも知れないが白米飼養の場合の如く著明ではないと考えられる。それは絶對量に於いては不足であつても或る程度腸内菌によつて、合成が行われるからである。

5) Oxythiamin 負荷試験。1940~1941年Tracy, Elderfield が製した Pyriethiamin が Wolley, White(1943)により廿日鼠に對して B_1 缺乏症状を起さしめ、又 Soodak, Cerecedo (1944)は Oxythiamin が廿日鼠に對して抗ビタミン性を示し多發性神経炎、其の他の B_1 欠乏症状を起さしめ得た

表 8

番 號	1號		2號		3號		4號	
	♂ 2.4k	♀ 2.4k	♂ 2.5k	♀ 2.5k	♂ 1.4k	♀ 1.4k	♂ 1.4k	♀ 1.4k
週	中性	酸性	中性	酸性	中性	酸性	中性	酸性
I	16	22	14	18	14	16	15	20
II	17	23	15	21	13	16	14	19
III	15	22	17	24	12	14	11	15
IV	14	17	16	23	12	17	12	17
V	14	17	16	20	10	13	10	13
VI	13	16	14	18	10	14	12	13
VII	14	15	16	19	9	11	8	10

表 9

と報告している。余も幸い武田研究所の松川泰三博士の御好意により此の Oxythiamin (N-(2'-methyl-4'-hydroxy-Pyrimidyl-(5'))-methyl-4-methyl-5-β-hydroxyethyl-thiazolium chloride hydrochloride) (以下簡単に Oxythiamin と記す) を入手する事が出來たので此れを家兎に負荷せしめ先ず白米飼養と同時に負荷せしめた場合と青菜飼養の状態に於いて負荷せしめた場合とに分けて實驗を行つた。此の Oxythiamin は皮下注射法により負荷せしめた。

i) 白米飼養をなし Oxythiamin 体重1kg あたり0.05mg負荷せし場合。此の場合は家兎の幼若如何を不問、最初より滴数の減少を示し其の状態をしばらく繼續し、体重の軽い幼若家兎は経過も早く7~10日で斃死しているが、経過の比較的長い家兎に於いては2~4週後に於いて滴数の増加を來たして來る。結局 Oxythiamin 0.05mg 負荷では抗ビタミン性作用が、著明ではない様である。表10, 11で明らかであるが白米單獨飼養の場合に比して最初より滴数の減少を見る事が特徴である。

表 10

番 號	1號		2號		3號		4號		5號	
	♀ 3.0k	♂ 3.0k	♀ 2.4k	♂ 2.4k	♀ 1.4k	♂ 1.4k	♂ 2.2k	♀ 2.0k	♂ 2.0k	♀ 2.0k
週	中性	酸性	中性	酸性	中性	酸性	中性	酸性	中性	酸性
I	8	10	9	9	7	8	6	8	6	7
II	7	8	7	8	6	7			6	8
III	8	9	6	8					7	9
IV	8	9	6	8					7	9
V	8	9								

表 11

ii) 青菜飼養をなし Oxythiamin 体重1kg あたり 0.05mg 負荷せし場合、青菜を制限する事なく飽食せしめたため各家兎も非常に元氣がよく、体重減少、体温低下、等を示さず滴數も亦10滴以下を示さない。此れを表示すれば表12、13の如くなる。

表 12

番 號 週	1號 ♂ 2.5k		2號 ♀ 2.4k		3號 ♀ 2.2k		4號 ♀ 2.4k	
	中性	酸性	中性	酸性	中性	酸性	中性	酸性
I	12	14	12	14	12	15	14	17
II	13	17	11	15	13	16	13	15
III	12	15	11	14	10	13	11	13
IV	12	14	11	15	12	15	12	14
V	10	12	11	13	10	12		

表 13

iii) 白米飼養をなし Oxythiamin 体重1kg あたり 0.5mg 負荷せし場合、i) の場合と全く同様に飼養し経過を観察した。此の場合に於いても最初より滴數は少なく日を経るに従つて5~6滴(中性、弱酸性ともに)を示し斃死するものが多い。此の様に最初より甚しい減少を示すにも不拘、各家兎は別に食欲減退を示す譯けでもなく、第1週の終り頃より著明に滴數が減少を示し永い経過をとるものは6週、短きは3週にして、経過の長い家兎

は何れも後肢に著明なる麻痺を認める事が出来比較的経過の速い2號(3週)5號(3週)には何れも麻痺は認められなかつた。体温も37.0°C~38.8°Cの間を示す事が多く、麻痺を起して來ると37.0°C以下を示す様になる。余の研究では完全麻痺を起して來る場合は35.5°C~36.0°Cを示した。本試験の特異とする点は体重の減少著明ならざる内に滴數の減少を示し、経過も速く白米單獨飼養の場合に比して2週間も速い。又麻痺を起して來ると1日以上経過をとる例もない事である。此の成績を表示すれば表14、15の如くなる。

表 14

番 號 週	1號 ♀ 2.3k		2號 ♂ 2.2k		3號 ♀ 2.3k		4號 ♀ 3.0k		5號 ♀ 2.7k	
	中性	酸性	中性	酸性	中性	酸性	中性	酸性	中性	酸性
I	8	10	10	13	8	9	11	13	7	8
II	8	9	6	7	6	7	8	9	6	7
III	6	8	5	6	5	6	5	6	6	6
IV	6	6			6	6	6	7		
V	6	6								
VI	5	6								

表 15

又此等家兎の死後剖檢による体重と主要臓器(肝、心)を各場合に就いて表示すると表16の様になる。心臓は村田氏(1922)の研究によれば家兎の白米病に於いては心臓は肥大せず萎縮の状態にありと報告し、伊藤氏(1925)は稍と肥大擴張すると言ひ、浅井氏(1930)は家兎に就きその詳細を報告しているがその中で心臓はその体重に比して稍と重き傾向ありとしている。余の場合は死亡時体重に比し比較的大なる比を示している。又肝臓は村田氏によればその重量は健康家兎よりは軽く、

表 16

飼養別	%	体減少率	体重に對する肝臓(%)	体重に對する心臓(%)
白米飼養家兎		48.4%	2.6%	0.56%
飢餓飼養家兎		36.0%	1.8%	0.31%
Oxythiamin 0.05mgr 負荷家兎		38.0%	3.0%	0.53%
Oxythiamin 0.5 mgr 負荷家兎		32.0%	3.7%	0.81%
正常家兎 (16例)			3.7%	0.26%

非脚氣家兎よりは重く、その中間を示している。余の場合に於いてもその体重に比して健康家兎よりは軽く、飢餓飼養家兎よりは重い。

iv) 青菜飼養をなし Oxythiamin 体重1kg あたり 0.5 mg 負荷せし場合、ii) の場合と全く同様に青菜を飽食せしめ 4 週間にわたつて其の経過を観察した。此の場合も各家兎とも元氣よく青菜を充分飽食し、食慾減退、体温の低下は見られず只体重は飼養前の 8.3% 減少を見たのみであつた。尙此の場合特異とする點は各家兎ともその最初の経過中に於いて必ず 2～5 日の下痢を見た事である。然し此の下痢は皆やがて自然治癒し、各家兎に對し種々の障害を興える様な事はなかつた。此の滴數を表示すると表 17, 18 の如くなる。

表 17

番 號 週	1號 ♀ 2.3k		2號 ♀ 2.0k		3號 ♀ 2.0k		4號 ♀ 3.8k	
	中性	酸性	中性	酸性	中性	酸性	中性	酸性
I	8	10	8	10	9	10	11	13
II	9	12	8	10	11	14	11	13
III	9	12	10	14	11	14	10	13
IV	12	15	10	14	11	14	12	14

表 18

V 總括的觀察

人体に於ける脚氣様疾患と思われる患者尿に就いて亞硫酸曹達法の意義ある事は既に工藤教授により發表されたのであるが、更に此れを實驗的に證明すべく動物實驗を行つた。白米單獨飼養の場合に於いては第5週より亞硫酸曹達の滴數著明に減少を示し玄米食飼養、青菜飼養、飢餓食飼養の場合に於いては著明なる滴數の減少を観る事は出来なかつた。只白米飼養家兎に抗ビタミンB₁性物質、Oxythiamin を負荷した場合に於いては最初より滴數の減少を示し特に体重1kg あたり 0.5 mg を負荷した場合は第1週の終り頃より、即ち食慾も減退せず体重の減少も著明ならざる内に著明にその滴數の減少を示しその経過も速かで白米單獨飼養の場合は平均 6 週の経過を示したのであるが、此の場合は平均 4 週で約 2 週も速い。此の抗ビタミン性物質 Oxythiamin を負荷する事により最初よりその滴數の減少を示すと言う事實は此の亞硫酸曹達法とビタミンB₁とは密接なる關係にある事を證明していると思われる。又青菜飼養家兎の Oxythiamin による影響の見られないのは攝取B₁量が Oxythiamin の B₁ の酵素作用を阻止する作用を上廻つてゐる爲と思われる。尙此の亞硫酸曹達法は亞硫酸曹達の性質としてアルカリ性の場合最もよく作用し、従つて滴數も少なくて済むわけである。斯くアルカリ性に傾く場合は往々にして判定を誤る虞れがあるため余は此の點を特に注意して中性(pH 6.8～7.0)をとり更に弱酸性(pH 6.4～6.6)の場合に就いても檢したのである。従つて滴數弱酸性にて 10 滴以下を示す場合はビタミンB₁欠乏の状態にあるものと認定したのである。此の認定の基準は玄米飼養の滴數に置きその滴數は酸性時 12～13 滴であるため誤差として 2 滴を減じ 10 滴としたものである。又此の滴數はその 1 滴は 0.025 cc を意味し前述の 10 滴は亞硫酸曹達 0.25 cc に相當する譯けである。余の使用せるマイクロピウレット 0.1 cc の目盛りは 4 滴に相當するものであつた。

VI 結 論

I 亞硫酸曹達法の實驗的研究を家兎に於て

白米飼養, 玄米飼養, 青菜飼養, 飢餓飼養, 白米飼養と同時に Oxythiamin を負荷した場合と夫々の群に就いて行い, 白米飼養の場合は Oxythiamin を負荷するとしないうに不拘, 後肢麻痺をビタミン B₁ 欠乏症の判定基準とした結果。

1. 白米飼養の場合を除き, 玄米飼養, 青菜飼養, 飢餓飼養, 青菜飼養に Oxythiamin を負荷した場合に於いては何れも 後肢麻痺を認めない。2. 白米單獨飼養にても 飢餓状態に陥る以前にビタミン B₁ 欠乏症を起し得。3. ビタミン B₁ 欠乏症を起した家兎臓器, 就中肝臓はその体重に比して健康家兎よりは小で 飢餓家兎よりは大きく, 心臓はその体重に比して健康家兎, 飢餓家兎よりは大きくある。4. ビタミン B₁ 欠乏症を起して來ても完全麻痺を起さぬ内は 36.0°C 以下を示す事はない。5. 白米飼養家兎の場合, 排尿間隔の長い者は B₁ 欠乏症を比較的起し難い。6. 後肢麻痺を證明する家兎は常に亞硫酸曹達の滴數は少ない。即ち中性では 8 滴以下, 弱酸性では 10 滴以下である。7. 白米飼養の場合, Oxythiamin を負荷する時は最初より其の滴數は減少する。

II 以上の實驗より亞硫酸曹達法と白米飼養とは密接なる關係を有し, 抗ビタミン B₁ 性物質 Oxythiamin を注射する事により此の關係は一層裏付けされた。此等の事實より亞硫酸曹達法はビタミン B₁ 欠乏症の診斷に意義を有する事は明瞭であり臨床的にビタミン B₁ 欠乏乃至脚氣の診斷に用いられ得ると信ずる。

主要参考文献

- 1) Williams R. D., Mason, H. L., Wilder, R.M., and Smith, B.F.: Arch. Int. Med. 66, 785(1940): 69, 721 (1942) Williams, R.D., Mason, H.L., Power, M. H., and Wilder, R.M.: Arch. Int. Med. 71, 38(1943).—2) 志賀, 草間: 東醫新誌 (1669), 1200(1910) (1662) 852, 855(1910).—3) 伊藤: 大醫會誌, 24, 1175 (1925).—4) 伊藤: 日病理誌, 15, 474(1924).—5) 村田: 日病理誌, 11, 1 (1921), 大醫會誌, 20, 398(1922).—6) 淺井: 京醫雜誌, 27, 55 (1930).—7) Funk, C.: J. of Physiol. 46, 173(1913).—8) Tracy, A.H., and Elderfield, R.C.: Science 92, 180 (1940): J. Org. Chem. 6, 54 (1941).—9) Woolley, D.W., and White, A.G.C.: J. Biol.Chem. 149, 285(1943).—10) Soodak, M., and Cerecedo, L.R.: J. Am. Chem. Soc. 66, 1988(1944).