

核磁気共鳴法によるアコニチン中毒の研究

清水 寛,*^{a)} 原田 寛子^{b)}^{a)}徳島大学医学部解剖学第二教室, ^{b)}徳島大学医学部法医学教室

Validity of using nuclear magnetic resonance to study aconitine intoxication in animals

Hiroshi SHIMIZU^{a)} and Hiroko HARADA^{b)}^{a)}Department of Anatomy, School of Medicine, The University of Tokushima^{b)}Department of Legal Medicine, School of Medicine, The University of Tokushima

(Received September 30, 1985)

Abstract

The present study was undertaken to examine whether ¹H-NMR and ³¹P-NMR were valuable methods to study pathogenesis of aconitine intoxication in rats and rabbits.

Analysis by ¹H-NMR spectrum of the D₂O-extracts from organs or tissues of animals with aconitine intoxication allowed to quantitate simultaneously concentrations of lactate, pyruvate and several other substances of low molecular weight. Similarly, ³¹P-NMR was also found to be useful and rapid parameter to quantitate the ratio of creatine phosphate, ATP (α , β , γ), ADP (α , β), sugar-P and Pi to total phosphate contained in the extracts.

These results indicate that use of NMR (¹H-NMR and ³¹P-NMR) may provide a valuable procedure to study pathogenesis of aconitine intoxication and its cause of death.

Key words ¹H-NMR, ³¹P-NMR, aconitine, LDH, CPK, metabolites, lactate, organ, post

Abbreviations ADP; adenosine diphosphate, ALP; Alkaline phosphatase, ATP; adenosine triphosphate, BUN; blood urea nitrogen, CPK; creatine phosphokinase, LDH; lactate dehydrogenase, NMR; nuclear magnetic resonance

緒 言

核磁気共鳴法 (NMR) の生体系への利用は、近年益々注目を集めている。NMR は、非破壊的に、しかも迅速に組織や臓器を測定できる点で、他の方法に比べて優れているにもかかわらず、東洋医学的分野への応用は、未だほとんどなされていない。

そこで私どもは、アコニチン中毒死家兎臓器の生化学的变化を、¹H-NMR 及び ³¹P-NMR による迅速同時定量法で測定し、併せて、その血液の生化学的性状についても検討したので報告する。

材料と方法

¹H-NMR は新しく開発した方法で、水のプロトンシグナルを除去して資料中の有機物の共鳴シグナルを得る方法であり、内部基準法により定量する。この ¹H-NMR 法によると、低分子の有機酸すなわち、乳酸、ピルビン酸、酢酸等及びグルコース、アラニン、プロピレングリコール (麻酔剤の溶解補助剤)、アルコール等の同時定量ができる (Fig. 1)。

³¹P-NMR は、急性心臓死における心臓、肝臓、腎臓及び骨格筋の高エネルギーリン酸化合物の動態

*〒770 徳島市蔵本町3丁目18-15
Kuramoto-3, Tokushima 770, Japan

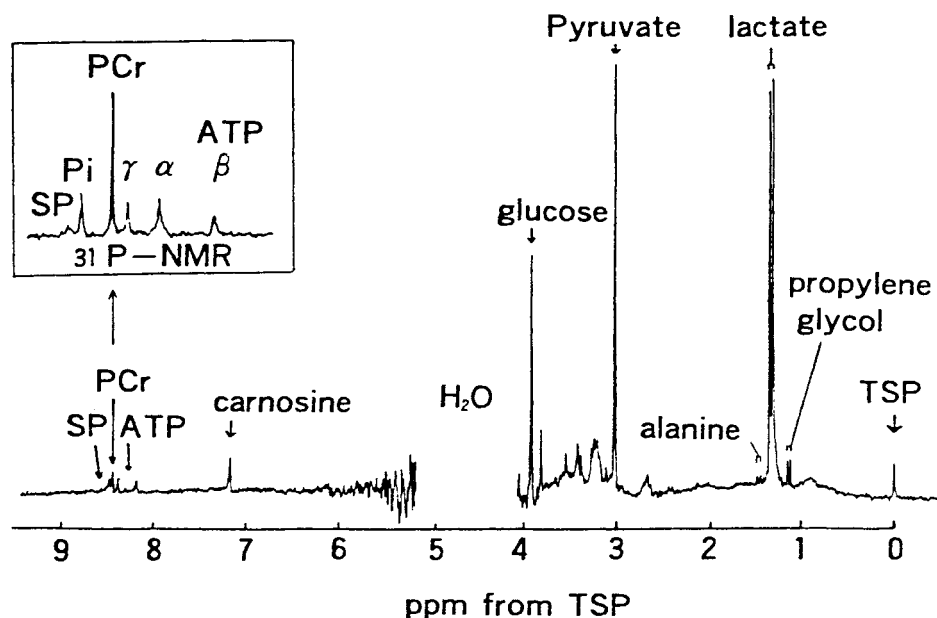


Fig. 1 200 MHz ^1H -NMR spectra of H_2O extracts of dorsal muscle from rat at 0 hour post-mortem.

把握の一手段として応用した。

^1H -NMR 及び ^{31}P -NMR 測定は、いずれも資料を前処理なしで測定できるという利点をもつ。

実験データに基づき、アコニチン急性中毒死過程での臓器の anoxia 及び hypoxia の程度やグリコーゲンの消耗の様子等について考察を加えた。

I. 方法¹⁾

(1) ^1H -NMR: 日本電子超電導 NMR 分光器を用い、100 又は 200 MHz で測定した。内部基準には、TSP を用い積算 40 回、所要 160 秒で行なった。実験動物は日本白色種家兎の雄、体重 2.5 kg 及び Wistar 系ラットの雄、体重 250 g を用いた。ペントバルビタール (P.) 麻酔下、両側頸動脈切断による出血失血死を基準として、アコニチン急性心臓死について、 ^1H -NMR スペクトルを観測した。

^1H -NMR 及び ^{31}P -NMR の資料は、死直後諸臓器の一部を採取した (室温 17~20°C)。 ^1H -NMR 資料は、組織 1 g を氷冷下生食水とホモジナイズ後、3000 rpm, 5 min, 冷却遠心分離し、その上清 400 μl に、4 mM $\cdot$ TSP 40 μl (最終 TSP 濃度 0.4 mM, CH_3 当り 1.2 mM) を加えて、homogated-decoupling 法により、 ^1H -NMR 測定を行なった。

(2) ^{31}P -NMR: 日本電子 FX-200 MHz を用い、80.76 MHz で測定した。実験動物は、上記と同じ

である。実験方法は、アコニチン急性心臓死における intact な心臓、肝臓、腎臓及び骨格筋について、死直後可及的速やかにドライアイス、水中にて操作した。これらの諸臓器について、 ^{31}P -NMR スペクトルを観測した。

II. 材料

アコニチン急性心臓死を惹起させるための薬剤としては、ウチダの烏頭〔ヤマトリカブト *Aconitum deflexum* Nakai. カラトリカブト *Aconitum carmichaeli* Deboux 又はその他同属植物 (*Ranunculaceae*) の塊根で、総アルカロイド 0.37%, アコニチン 0.188% を含有する〕を用いた。烏頭 40 g を熱湯 200 ml 中で約 20 分間煎じて 100 ml として、カニューレにて経口的に胃内に注入した。急性心臓死を惹起させるための薬剤としてペントバルビタール (P.), メタンフェタミン (M.), ベンゼン (B.), 等を用い、比較対照のための資料とした。

結 果

1. ^1H -NMR

比較対照のための基準とした出血失血死では、心筋の乳酸値は死直後では低値を示し、死後 30 分、

Table I Death from bleeding concentration of metabolites in heart muscle of rabbits as determined by 100 MHz ^1H -NMR.

Post-mortem time Metabolites	0 hr	0.5 hr	1 hr	3 hr	8 hr
Lactate	$19.6 \pm 1.9^{\text{mM}}$	$31.9 \pm 2.2^{\text{mM}}$	$31.8 \pm 4.7^{\text{mM}}$	$25.5 \pm 5.1^{\text{mM}}$	$28.6 \pm 5.3^{\text{mM}}$
Pyruvate	7.4 ± 1.8	11.8 ± 1.9	9.3 ± 1.8	9.7 ± 2.6	10.2 ± 2.8
Glucose	2.4 ± 0.6	3.9 ± 0.7	2.9 ± 0.9	3.9 ± 1.7	2.9 ± 1.5

Table II Death from bleeding concentration of metabolites in dorsal muscle of rabbits as determined by 100 MHz ^1H -NMR.

Post-mortem time Metabolites	0 hr	0.6 hr	1 hr	3 hr	8 hr
Lactate	$25.1 \pm 2.5^{\text{mM}}$	$23.8 \pm 3.1^{\text{mM}}$	$29.4 \pm 7.8^{\text{mM}}$	$18.8 \pm 6.9^{\text{mM}}$	$15.9 \pm 3.4^{\text{mM}}$
Pyruvate	11.4 ± 3.2	12.3 ± 3.0	13.8 ± 3.7	13.2 ± 6.5	9.1 ± 3.8
Glucose	3.0 ± 0.6	4.6 ± 0.3	4.7 ± 0.4	3.9 ± 1.9	3.5 ± 2.0

Table III Death from acute aconitine poisoning concentrations of metabolites in heart muscle of rats* as determined by 100 MHz ^1H -NMR.

Post-mortem time Metabolites	0 hr	1 hr	3 hr	6 hr
Lactate	$14.7 \pm 1.3^{\text{mM}}$	$17.3 \pm 1.0^{\text{mM}}$	$20.3 \pm 0.9^{\text{mM}}$	$12.1 \pm 3.5^{\text{mM}}$
Pyruvate	3.5 ± 0.7	4.5 ± 0.5	4.5 ± 0.4	2.2 ± 2.0
Glucose	0.9 ± 0.5	1.7 ± 0.9	1.5 ± 0.7	0.9 ± 0.7

*Male rats of wister strain, weighing about 200 g, were sacrificed by aconitine.

Table IV Death from acute aconitine poisoning concentrations of metabolites in dorsal muscle of rats* as determined by 100 MHz ^1H -NMR.

Post-mortem time Metabolites	0 hr	1 hr	3 hr	6 hr
Lactate	$53.5 \pm 4.9^{\text{mM}}$	$32.3 \pm 9.9^{\text{mM}}$	$30.5 \pm 8.5^{\text{mM}}$	$28.7 \pm 5.2^{\text{mM}}$
Pyruvate	18.2 ± 2.2	13.1 ± 5.5	10.5 ± 4.7	10.5 ± 2.9
Glucose	4.5 ± 1.1	4.7 ± 1.8	2.7 ± 1.9	3.3 ± 1.3

*Male rats of wister strain, weighing about 200 g, were sacrificed by aconitine.

60 分と急激に上昇した (Table I)。

一方、アコニチン急性心臓死では、死亡直前の anoxia が強いので、心筋の死後の乳酸産生が少なく、グルコースの死後の増加もほとんどみられなかった (Table III)。

骨格筋においては、乳酸値は死直後から高値を示し、対照群出血失血死 (Table II) に比べて死後の増量は認められなかった (Table IV)。

2. ^{31}P -NMR

アコニチン中毒死の心筋については、死直後す

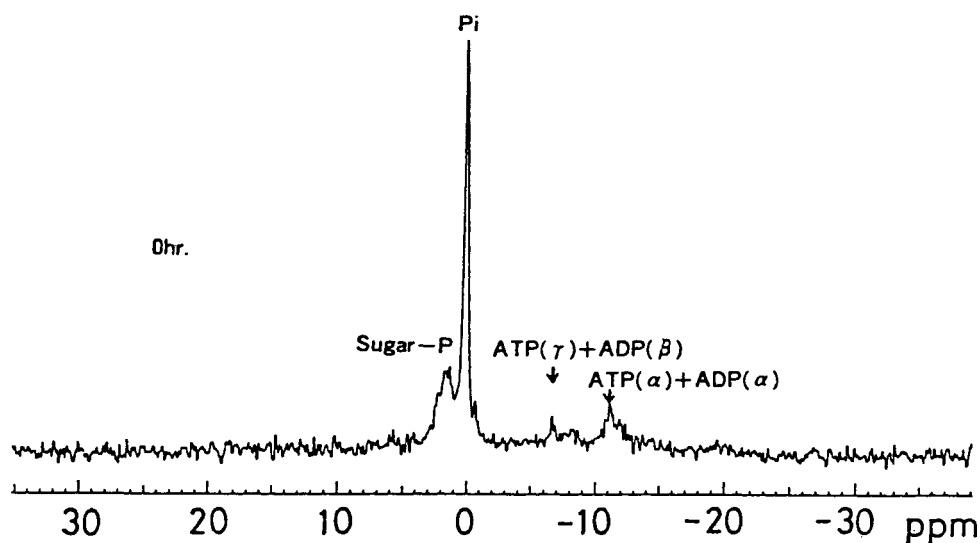


Fig. 2 80.76 MHz ^{31}P -NMR spectra of herat muscle from rabbit killed by aconitine poisoning.

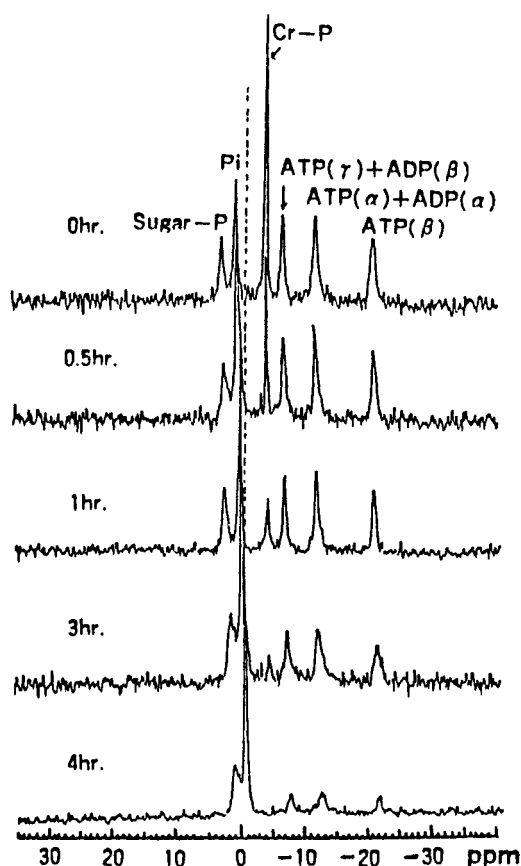


Fig. 3 80.76 MHz ^{31}P -NMR spectra of dorsal muscle from rabbit taken at 0hr, 0.5hr, 1hr, 3hr, and 4hr. post-mortem (death of bleeding).

にクレアチンリン酸 (Cr-P) は消滅していた。糖リン酸 (Sugar-P, SP) については、総リン酸 (Total Pi) 比で 29% であった。無機リン酸 (Pi) の占める割合は、死亡直後すでに Total Pi 比で 47% に達していた。ATP, ADP 等はほとんど消滅し、わずかに ATP (α)+ADP (α) のシグナルが Total Pi 比で 13% 残存が認められた (Fig. 2)。

対照実験の出血失血死家兎骨格筋については、Fig. 3 の如くである。ここでは死直後においては、かなり残存していた Cr-P が死後急激に消滅し、代って Pi シグナルの増加が観測された。しかも、Pi シグナルは死後時間経過に従って高磁場側にシフトしていた。

腎臓については、死後 1 時間の ^{31}P -NMR シグナルにおいても、ATP 及び Sugar-P の残存状態が他の臓器 (心臓、肝臓等) に比べ良好であり、ATP (α)+ADP (α) のピーク及び Sugar-P の Total Pi 比は各々約 12% 及び 43% と Sugar-P の残存状況が良く、Pi への変化の割合が少ない (Fig. 4)。

このように、腎臓については ^{31}P -NMR スペクトル解析により、アコニチン中毒死過程での死亡前の anoxia の影響を心臓及び骨格筋等筋肉系の臓器に比べて被り難いことを認めた。

肝臓については、急性心臓死を惹起させたその他の毒物 (例えば P., M., B. 等) と同様に、ATP, ADP, Cr.-P, Sugar-P 等シグナルの急激な消滅を認めた。

これらの現象は、アコニチン中毒死過程における

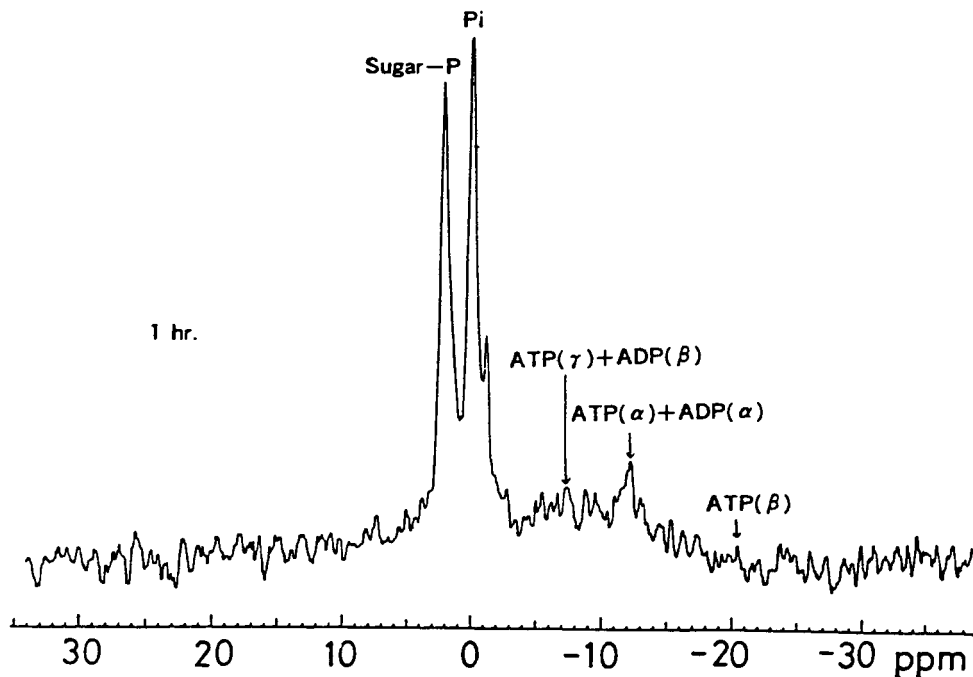
Fig. 4 80.76 MHz ^{31}P -NMR spectra of kidney from rabbit killed by aconitine poisoning.

Table V Concentrations of metabolites in aconitine poisoning of rabbit serum.

Meta- bolites	Sample No.	Control		aconitine poisoning				
		No : [3]	No : [5]	No : [5]	No : [4]	No : [4]	No : [1]	No : [2]
LDH		71.0	66.0	161.0	152.0	126.0	172.0	149.0
CPK		216.0	171.0	729.0	451.0	434.0	1462.0	430.0
GOT		23.0	14.0	38.0	27.0	14.0	131.0	40.0
GPT		53.0	56.0	62.0	49.0	40.0	100.0	26.0
ALP		7.3	9.3	10.7	8.5	8.1	10.5	8.0
γ -GTP		5.0	6.0	7.0	—	5.0	6.0	7.0

家兎の血液の臨床生化学的検査データとよく一致していた (Table V)。すなわち、烏頭煎液注入開始直前の血液と、胃内注入後、速やかに中毒症状の発現を来した血液及び死直後の血液の生化学的検査結果を比較することにより、正常血に比べて中毒死血では、LDH 及び CPK の顕著な上昇と GOT についても軽度の上昇がみられた。一方、T-Bil, ALP, γ -GTP, BUN, creatinine, Na^+ , K^+ , Cl^- 等については、正常血との間に著変は認められなかった。なお、アコニチン中毒死家兎においては、死後

強直が早期に現われた。

考 察

アコニチン中毒死家兎の高エネルギーリン酸系について、anoxia 又は hypoxia の影響を受けやすい心筋においては、その死後の ATP, ADP 量は、死亡直前の anoxia の影響を強く受けていた。心筋グリコーゲンは、死亡直前の anoxia の程度が強いものほどその消耗が大きく、したがって ATP の生成が減

少している。この ATP の低下事実が、(1)心筋グリコーゲンの減量及び乳酸値の低下、(2)anoxia の影響による死後強直の早期発現という 2 つの心筋死後現象の相互関係を補完していると考ええる。

血清の臨床生化学検査値では、対照群に比べて、LDH と CPK の顕著な上昇と GOT の軽度の上昇が認められた。Ralph Tanz ら⁽²⁾ は、アコニチンにより LDH が著しく上昇し、心拍数が著明に増加することを報告している。しかし、T-Bil, ALP, γ -GTP, BUN, creatinine, Na^+ , K^+ , Cl^- 等は対照群との間に著変は認められなかった。これらの結果から、アコニチンの毒性は、心筋や骨格筋等を標的としており、死直前の心房細動、間代性痙攣等が疑われる。

腎臓に対する障害度は少ないものと考えられる。

今後は、LDH や CPK のアイソザイム測定及び各臓器の病理学的所見についても検討を加え、臨床との関連性を追求して行きたい。

結 論

1. アコニチン中毒死家兎について、 ^1H -NMR スペクトル観測を行なった。その結果は

(1) 心筋では、死直後の乳酸の増量と死後には、あまり増量が認められない事実を確認した。このことは、死亡直前におけるグリコーゲンの消耗が、著しか

ったことを示唆している。すなわち、烏頭中毒死における死亡直前の標的臓器として、心筋をあげることができると考ええる。

(2) 骨格筋でも、死亡直前の激しい痙攣及び資料採取時の筋肉痙攣により、死直後の乳酸は高値を示す。

2. アコニチン中毒死過程の血液の生化学的検査値及び ^{31}P -NMR スペクトルの解析により、腎臓については、正常値との間に著変は認められない。

3. 以上より、今後、核磁気共鳴法 (NMR) の東洋医学分野への応用とその成果が期待される。

本論文の要旨は、第 2 回和漢医薬学会総会において発表した。

文 献

- 1) Harada, H. *et al.*: Identification and quantitation by ^1H -NMR of metabolites in animal organs and tissues. An application of NMR spectroscopy in forensic science. *Forensic Science International* **24**, 1-7, 1984
- 2) Tanz, R. and Opie, L.: Effect of drug or electrically induced tachyarrhythmias on the release of lactate dehydrogenase (LDH) in isolated perfused guinea-pig hearts. I. Comparison of the effects produced by ouabain, calcium, epinephrine and aconitine. *The J. of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **206**(2), 320-330, 1978