髄液中神経伝達物質, アミノ酸およびフリーラジカル関連物質の 脳血管障害患者における変化

江頭 亨¹⁾ 後藤 浩²⁾ 武田 弘志³⁾ 高田 香³⁾ 松宮 輝彦³⁾

〈要 約〉 老年期の脳血管障害者の髄液を用い、髄液中の神経伝達関連物質、アミノ酸およびラジカル関連物質を同時に測定し、高齢者と老年期の脳血管障害患者の髄液中のこれら生化学的マーカーの変化を比較検討した。

Acetylcholinesterase (AChE) 活性は高齢者対照者に比較して、脳血管障害者で低値を示したが、特にC群 (脳梗塞後遺症および脳出血後遺症の患者で、長谷川式簡易知能評価スケールで比較的低値を示した者) で著明であった。一方, choline 含量は、脳血管障害者で増加傾向を示した。髄液中のアミノ酸含量は、脳血管障害者で alanine の増加傾向を、glycine および glutamate の低下傾向が見られたが、脳血管障害者群間では有意な差はなかった。髄液中の epinephrine (E), norepinephrine (NE) および 3-methoxy-4-hydroxyphenylethylene glycol (MHPG) 含量には有意な変化は認められなかったが、5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) および homovanillic acid (HVA) 含量は高齢者対照群に比べ脳血管障害で低下傾向が、dihydroxyphenyl acetic acid (DOPAC) 量では増加傾向が見られた。老化と関係が深いと考えられている superoxide dismutase (SOD) 様活性は高齢者対照群と脳血管障害者間および脳血管障害者群間では有意差は見られなかった。これらの測定結果は、高齢者および老年期の脳血管障害による脳機能低下の病態の把握に有用である。

Key words: 髄液, 脳血管障害, アミノ酸, 神経伝達物質, スーパーオキシドジスムターゼ

(日老医誌 1999; 36: 256—261)

緒 言

脳血管障害, 特に脳梗塞患者における脳機能の回復は, その後の運動機能回復に繋がる重要な問題である。また, 老年期における脳血管障害は老年期痴呆疾患への移行の可能性が充分推察される。このような脳血管障害に伴う意欲低下, 精神障害などの精神症状の発現に中枢神経系の各種神経伝達物質の量的異常やこれらの物質の合成・代謝酵素活性の異常が関与すると考えられている¹⁾。そこで脳機能を神経生化学的に反映すると考えられる髄液中の神経化学的マーカーを測定し, それらの物質の変動の意義を評価する事は, 脳機能回復のためのより有効な治療に寄与できるものと推察される。これまで老年期の脳血管障害患者の髄液をもちいて, 神経伝達関連物質である acetylcholine (以下 ACh)²⁾, choline³⁾, G4型 Acetylcholinesterase (以下 AChE)⁴⁾, モノアミンおよびその代謝物⁵⁾, カテコールアミン関連酵素⁶⁾, アミノ酸含

量⁷⁾の各々についての報告は多い。しかし, これらの物質および老化に関連したラジカル関連物質を同時に測定した報告はない。

今回, 中枢神経系のコリン作動性神経系に関係する AChE 活性および choline 含量, アドレナリン, ドーパミンおよびセロトニン作動性神経系に関与する norepinephrine (以下 NE), epinephrine (以下 E), 3-methoxy-4-hydroxy phenylethylene glycol (以下 MHPG), dihydroxy phenyl acetic acid (以下 DOPAC), homovanillic acid (以下 HVA), 5-hydroxyindole acetic acid (以下 5-HIAA) 含量, アミノ酸として glutamate, arginine, alanine, threonine, taurine, glycine 含量および老化に関連しているラジカル関連物質として superoxide dismutase (以下 SOD) 活性を同時に測定し, 高齢者と老年期の脳血管障害患者における変化を比較検討した。

これらの髄液中の物質や酵素活性を測定することにより, 脳血管障害による脳機能低下の病態を把握し, 治療や予後の推定に役立てることができるものと思われる。

方 法

(1) 対象: 脳卒中発作後2カ月以上経過し, 症状が安定している脳梗塞後遺症および脳出血後遺症の患者, 平

1) T. Egashira: 大分医科大学薬理学教室

2) H. Goto: 湯布院厚生年金病院理学療法科

3) H. Takeda, K. Takada, T. Matsumiya: 東京医科大学薬理学教室

受付日: 1998. 9. 28, 採用日: 1998. 11. 13

均年齢66歳(54~89歳)を対象とした。非脳血管障害患者として、変形性膝関節症患者、平均年齢70歳(52~83歳)を対象とした。

以上の患者を以下の4群に分けた。

対照群：非脳血管障害患者(14名、長谷川式簡易知能評価スケールでスコア26~30)

A群：脳出血後遺症患者(17名、長谷川式簡易知能評価スケールでスコア21~28)

B群：脳梗塞後遺症患者(12名、長谷川式簡易知能評価スケールでスコア22~29)

C群：脳梗塞後遺症および脳出血後遺症の患者で、長谷川式簡易知能評価スケールで比較的低値を示した者(7名、スコア11~19)

髄液試料：髄液採取に先立ち、担当医が研究の主旨を十分説明し、協力を依頼後、承諾を得られた患者の髄液を用いた。髄液は腰椎穿刺を施行して3.0ml採取し、ただちに液体窒素にて凍結、測定まで-80℃で保存した。

(2) モノアミンおよびその代謝物の測定：髄液10μlを酸化還元スクリーン検出モードを導入した多重クロマトリー高速液体クロマトグラフィーシステムに直接注入し、E, NE, MHPG, DOPAC, HVA, 5-HIAA量を同時測定した⁸⁾。

(3) AChE活性：AChE活性はEllmanら⁹⁾による分光学的方法により測定した。0.1Mリン酸緩衝液pH8.0, 0.01M dithio bisnitro-benzoate (DTNB), 髄液および0.75M acetylthiocholine iodideを加え37℃で反応により産生される5-thio-2-nitrobenzoic acid量を分光光度計を用い、412nmの吸光度の変化を経時的に測定した。酵素活性は5-thio-2-nitro benzoic acid生成量(mU/ml)で表した。

(4) choline含量測定：髄液に0.2M perchloric acidを加えて遠心分離し、除蛋白した。これに0.2M KHCO₃を加えて中和し、0.5mmのフィルターを通した濾過液を高速液体クロマトグラフィー電気化学検出器を備えたエイコム社製コリン、アセチルコリン分析システムBAC300に注入しcholine量を測定した。

(5) アミノ酸測定：髄液100μlを用い、全自動高速液体クロマトグラフィーを用いたアミノ酸分析装置(JLC-300, 日本電子)で測定した。

(6) SOD測定：ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系でO₂を発生させ、スピントラップ剤5,5'-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO)を用いたスピントラップ法により、DMPO-OOHアダクトに変えた。このシグナルを電子スピン共鳴装置分光光度計(ESR装置, JES-RE1X, 日本電子)にて測定した。この発生系にSOD標品または髄液を添加することで、定量化およ

Fig. 1 髄液中の Acetylcholinesterase (AChE) 活性

Fig. 2 髄液中の choline 含量

び含量を測定した¹⁰⁾。

(7) 有意差検定

それぞれの測定結果は平均値±標準偏差(mean±S.D.)で示した。また、群間の有意差検定はStudent's t-testおよびWilcoxon 1 sampleを用い、危険率5%未満(p<0.05)を有意差あり、P<0.1を傾向として表記した。

結 果

(1) コリン作動性神経系の生化学的マーカーの変動

老齢対照者の髄液中のAChE活性は30.5±5.6mU/mlであった。一方、脳血管障害者群では老齢対照者に比較して、有意に低下し、A群では16.1±5.4mU/ml、B群では16.0±4.8mU/mlであった。特に長谷川式簡易知能評価スケールで比較的低値を示したC群では髄液中AChE活性の著明な減少が見られた(図1)。一方、中枢ではAChの合成に使われ、AChの分解で生じるcholine含量を髄液中で測定したところ、老齢対照者で3.0±0.7nmol/mlであった。老齢対照者と比較して脳血管障害者のA群では有意差は認められなかったが、脳血管障害者のBおよびC群では有意に増加していた(図2)。しかし、脳血管障害者間では有意差は認められなかった。

(2) 髄液中のアミノ酸含量

表1 髄液中のアミノ酸含量

	アミノ酸量: nmol/ml			
	老齡対照群 (n = 14)	A 群 (n = 17)	B 群 (n = 12)	C 群 (n = 7)
Glycine	7.36±2.70	6.55±1.79 [#]	6.55±2.01 [#]	6.77±2.47 [#]
Threonine	31.05±10.26	29.97±4.26	28.43±6.28	30.03±5.34
Alanine	36.20±5.9	37.65±10.35 [#]	38.55±8.56 [#]	39.79±10.14 [#]
Taurine	5.38±1.32	6.43±1.60	6.59±1.49	5.77±1.94
Arginine	20.83±3.94	19.79±3.06	22.11±3.61	20.77±2.69
Glutamate	752.2±97.8	681.7±80.2 [#]	689.4±76.0 [#]	677.5±81.7 [#]

p < 0.1 vs 老齡対照群

髄液中のアミノ酸として glycine, threonine, alanine, taurine, arginine および glutamate 含量を測定し表1に示した。アミノ酸含量は、老齡対照者と脳血管障害者群では有意な差は認められなかったが、脳血管障害者で alanine 含量の増加傾向を、また、glycine および glutamate 含量の低下傾向が見られた。しかし、脳血管障害者間では有意差は見られなかった。

(3) 髄液中のモノアミン類およびその関連代謝物含量
モノアミンのうち E, NE およびその代謝物である MHPG の髄液中含量を測定したところ、老齡対照者ではそれぞれ $0.32 \pm 0.03 \text{ ng/ml}$, $0.61 \pm 0.26 \text{ ng/ml}$ および $8.38 \pm 1.05 \text{ ng/ml}$ であった。脳血管障害者の A, B および C 群で同様に E, NE および MHPG 含量を測定したが、老齡対照者との間には有意な差は認められなかった。また、脳血管障害者間でも有意な変化は認められなかった。ドーパミンの代謝物である DOPAC および HVA 含量を測定したところ、老齡対照者ではそれぞれ $39.1 \pm 11.9 \text{ ng/ml}$ および $36.4 \pm 10.3 \text{ ng/ml}$ であった。同様に脳血管障害者で測定したところ、老齡対照者に比較して有意差はなかったが、脳血管障害者で DOPAC 含量の増加傾向が (A 群: $63.07 \pm 28.27 \text{ ng/ml}$, B 群: $52.14 \pm 19.2 \text{ ng/ml}$, C 群: $53.55 \pm 10.3 \text{ ng/ml}$)、脳血管障害者の A ($30.3 \pm 9.9 \text{ ng/ml}$) および C 群 ($23.7 \pm 10.9 \text{ ng/ml}$) で HVA 含量の低下傾向が見られた。一方、セロトニンの代謝物である 5-HIAA の髄液中含量は老齡対照者で $22.5 \pm 7.4 \text{ ng/ml}$ であった。脳血管障害者の 5-HIAA の髄液中含量は老齡対照者に比較して有意差はなかったが、A ($19.1 \pm 1.0 \text{ ng/ml}$) および C 群 ($18.5 \pm 3.5 \text{ ng/ml}$) で 5-HIAA 含量の低下傾向が見られた。しかし、脳血管障害者間では有意な変化は認められなかった。

(4) 髄液中の SOD 活性

老化にフリーラジカルが深く関っている事が知られているが、そのフリーラジカルのうち活性酸素を消去する酵素である SOD 様活性を、活性酸素消去能から測定し

た。老齡対照者の髄液中の SOD 様活性は $6.1 \pm 1.3 \text{ unit/ml}$ であった。老齡対照者と脳血管障害者群を比較したが、有意差はなく、また、老齡脳血管障害者間でも有意差は見られなかった。

考 察

髄液は脳の細胞外液とある部分共通の性質をもっていると考えられている。すなわち神経伝達物質の放出や代謝物の排出は脳局所細胞外液中へと移動し、これが髄液へと流出してくる。このことから、髄液で神経伝達物質やその代謝産物を測定し、その結果から脳機能を推定できると考えられている。

コリン作動性神経系は、学習・記憶との関わりから、痴呆疾患では重要視されている¹¹⁾。ACh や AChE は中枢の神経細胞から分泌され、髄液に移行することが実験的にも証明されている¹²⁾。そこで、ACh や AChE の髄液中の濃度を脳血管障害患者で検討することは、脳血管障害による痴呆の早期診断、早期治療に寄与するものと思われる。今回、髄液中の ACh および choline 含量を測定したが、ACh はほとんど検出不可能であった。脳血管障害例において、髄液中の ACh 濃度測定は重要であるが、現時点では困難であり、採取方法や測定法の改良が必要であろう。一方、choline 含量は老齡対照者に比較して、脳血管障害患者で有意に高値を示した。この事は、脳血管障害患者では、ACh の代謝が亢進しているか、または、choline の再取り込みの低下が考えられる。しかし、choline は食事やその他の生理的合成・代謝系によりその濃度が維持される可能性が高いため、髄液中の choline を ACh の分解物としてのみ判断する事はできない。これらの事より、髄液中の ACh や choline 含量の変化を脳血管障害の指標とするには難点がある。一方、髄液中の AChE 活性に関しては、Alzheimer 型痴呆で G4 型 AChE 活性の低下が、また、脳血管性痴呆や大便秘でも低下傾向があるとの報告が多い⁴⁾。G4 型

AChE は AChE アイソザイムのうち、神経組織由来のもので、いわゆる真の AChE であり、コリン作動性神経内で軸索流により運ばれ細胞外に分泌される。このことから、髄液中の AChE 活性の測定は、脳のコリン作動性神経機能の情報を得る手段として繁用されている⁴⁾。今回の成績でも、脳血管障害者は高齢対照者に比較して有意に低値を示し、特に長谷川式簡易知能評価スケールで比較的低値を示した脳血管障害者でその低下が著明であった。このことは、脳血管障害の後遺症として、コリン作動性神経系が障害を受け、G4型 AChE の髄液中への移行が減少したために活性低下が見られたものと思われる。

髄液中の遊離アミノ酸濃度の加齢変化や脳血管性痴呆、Alzheimer 型痴呆での変化について有意に低下や増加するとの報告があり、一定した報告は得られていない。この理由は不明であるが、脳血管性痴呆では血液脳関門の機能低下や脳血管透過性の亢進が報告されており、血管からアミノ酸が髄液へ漏出した可能性も考えられている。しかし、今回我々が検討したアミノ酸類の髄液中濃度は高齢対照者と脳血管障害者との間に有意な変化は認められなかった。おそらく今回検討した脳血管障害者がそれほど痴呆が進行していなかったためと思われる。しかし、高齢対照者との間に有意差は見られなかったが、alanine 値の増加傾向、glycine および glutamate 値の低下傾向が見られた。alanine 値の増加傾向や glycine 値の低下傾向の作用機序は不明であるが、glutamate 値に関しては、若年者¹³⁾に比較して高齢者で、また、高齢対照者に比較して高齢脳障害者で低値を示す事や、過剰の glutamate が細胞毒性作用を有することなどから、髄液中の glutamate 値は老化のマーカーや脳血管障害のマーカーとなる可能性が考えられる。

髄液中のモノアミン類およびその代謝物濃度の低下は脳血管障害においても中枢神経系ニューロンの機能低下を反映するものと考えられる。しかし、アミノ酸含量の場合と同様に一定した報告は得られていない¹⁴⁾¹⁵⁾。今回、著者らが脳血管障害者の髄液について検討した成績では、E、NE およびその代謝物である MHPG は、高齢対照者と脳血管障害者および脳血管障害者間では有意な変化は認められなかった。ドーパミンの代謝物である DOPAC 含量は脳血管障害者で増加傾向に、HVA 含量は低下傾向にあった。この事は、脳血管障害者における脳内のドーパミンは MAO (Monoamine Oxidase) により DOPAC に代謝される経を主に通るものとおもわれる。一方、5-HIAA 含量は脳血管障害者の一部で低下傾向が見られた。今回の我々の成績では、モノアミン類の

代謝産物である HVA や 5-HIAA の髄液中の含量は、脳血管障害で低下する傾向を示した。しかし、前述の様に施設により一定した結果が得られていないのが現状である。この理由として、基礎的には、血液中から髄液への混入の有無、血液-脳-髄液関門が正常であるか否か、髄液中の濃度勾配の問題¹⁶⁾、さらに測定されたものが脊髄でなく脳に由来しているか否か、また、臨床的には、神経症状の重症度との関係、すなわち脳血管障害の急性期では髄液中モノアミン濃度は高値を示すがこれらの変化はいつまで持続するか、また慢性期のモノアミンの動態と臨床病態との関連性は、などが問題点として考えられる。

近年、老化と SOD との関連性が注目されているがその詳細は明らかではない¹⁷⁾。また、髄液中の SOD についての報告も少なく、神経疾患の一部で髄液中の SOD 値が上昇することが報告されている¹⁸⁾。今回の我々の測定で、高齢対照者の髄液中の SOD 様活性は 6.1 ± 1.3 unit/ml であり、小児の髄液の値 (1.4 ± 0.8 unit/ml) に比較して著しい高値を示した。脳中の SOD 比活性は長寿な高等動物ほど高い活性を示す事¹⁹⁾から、髄液中 SOD 様活性の高値は、老化の指標とすることができると可能性を持つ事を示唆している。しかし、高齢対照者と脳血管障害者間では有意差はなく、脳血管障害の重症度とは相関しないものと思われる。

今回測定した髄液中の神経化学的マーカーは老化、特に老年期の脳血管障害（痴呆を含む）により、変化するとの報告が多いものを選択したが、一部を除いて、変動が著明でなかった。これは、今回対象とした脳血管障害者が慢性の脳梗塞、脳出血後遺症者であったこと、痴呆スコアの評価から障害が比較的軽症であったことからこのような結果が得られたものと思われる。しかし、高齢対照者に比較して脳血管障害者の髄液中の AChE 活性の有意な低下、choline 含量の増加、モノアミン類では、5-HIAA、HVA 含量の低下傾向、DOPAC 量の増加傾向、アミノ酸のうち alanine 含量の増加傾向、glycine および glutamate 含量の減少傾向が見られた。これらは、老年期の脳血管障害のマーカーとして、基礎的に充分利用出来る興味深い所見であり、今後症例数を重ね、検討を要すると思われる。

謝辞：本研究に際し、多数のサンプルを提供して戴いた湯布院厚生年金病院内科、衛藤 宏先生に深謝いたします。

文 献

- 1) 中村重信、亀山正邦：老年痴呆における神経伝達物質。精神科 MOOK No. 8 (島薗安雄、保崎秀夫、長谷川和夫

- 編), 金原出版, 東京, 1984; p 79—89.
- 2) 岩佐英明: 脳血管性痴呆とアセチルコリン. 臨床成人病 1992; 22: 1432—1433.
 - 3) 池田淑夫, 友田桂子, 大城公恵, 奥山真司, 藤木嘉明, 伊藤哲彦: アルツハイマー型痴呆における脳脊髄液中アセチルコリン動態と記憶機能. 精神薬療基金研究年報 1991; 第22集, 1—6.
 - 4) Nakano S, Kato T, Nakamura S, Kameyama M: Acetylcholinesterase activity in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and senile dementia. J Neurol Sci 1986; 75: 213—223.
 - 5) 川上正人, 伊東 亨: 脳血管障害の知的機能低下例における髄液中モノアミン代謝物質へのCV-2619 (イデベノン) 錠の影響. 脳神経 1986; 38: 187—193.
 - 6) 宮田 学, 山尾 哲, 中村重信, 宇高不可思, 亀山正邦: 老年痴呆および多発梗塞痴呆における神経伝達物質の動態. 臨床神経学 1981; 21: 491—497.
 - 7) Togi H, Abe T, Hashiguchi K, Takahashi S, Nozaki Y, Kikuchi T: A significant reduction of putative transmitter amino acids in cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease and spinocerebellar degeneration. Neurosci Lett 1991; 126: 155—158.
 - 8) Takeda H, Matsumiya T, Shibuya T: Detection and identification modes for the highly sensitive and simultaneous determination of various biogenic amines by coulometric highperformance liquid chromatography. J Chromatogr 1990; 515: 265—278.
 - 9) Ellman GL, Courtney KD, Andres V. Jr, Featherstone RM: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol 1961; 7: 88—95.
 - 10) Takayama F, Egashira T, Yamanaka Y: Effect of diclofenac, a non-steroidal anti-inflammatory drug, on lipid peroxidation caused by ischemia-reperfusion in rat liver. Jpn J Pharmacol 1994; 64: 71—78.
 - 11) 岩田 悟: 髄液コリンエステラーゼと痴呆との関係について. 名市大医誌 1988; 39: 301—329.
 - 12) Chubb IW, Goodman S, Smith AD: Is acetylcholinesterase secreted from central neurons into the cerebrospinal fluid? Neuroscience 1976; 1: 57—62.
 - 13) 山田謙慈, 杉山一彦, 藤田浩史, 井上圭太郎: 脳梗塞における髄液中神経伝達物質の変動に関する臨床的研究. IRYO 1992; 46: 592—602.
 - 14) 福田英俊, 中村重信, 原 健二, 宇高不可思, 亀山正邦: 各種神経疾患における髄液5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) 濃度の検討. 臨床神経学 1989; 29: 1192—1194.
 - 15) Wester P, Puu G, Reiz S, Winblad B, Wester PO: Increased monoamine metabolites and cholinesterase activities in cerebrospinal fluid of patients with acute stroke. Acta Neurol Scand 1987; 76: 473—479.
 - 16) Wood JH: Neurochemical analysis of cerebrospinal fluid. Neurology 1980; 30: 645—651.
 - 17) Harman D: Free radical theory of aging: Role of free radicals in the organization and evolution of life, aging, and disease processes, In: Free Radicals, Aging and Degenerative Diseases, Johnson JE (ed), Alan R. Liss. Inc., New York. 1986; p. 3—49.
 - 18) Marttila RJ, Vijanen M, Toivonen E, Ikonen H, Rinne UK: Superoxide dismutase-like activity in the Parkinson's disease brain. Adv Neurol 1990; 53: 141—144.
 - 19) Tolmasoff JM, Ono T, Culter GR: Superoxide dismutase: Correlation with life-span and specific metabolic rate in primate species. Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77: 2777—2781.

Abstract

Alterations in Neurotransmitter, Amino Acid and Free Radical Related Substances in Cerebrospinal Fluid in Patients with Cerebrovascular Diseases.

Toru Egashira¹⁾, Hiroshi Goto²⁾, Hiroshi Takeda³⁾, Kaori Takada³⁾ and Teruhiko Matsumiya³⁾.

Acetylcholinesterase (AChE), choline, monoamine and its metabolite, amino acid and superoxide dismutase (SOD) levels were measured in cerebrospinal fluid (CSF) in patients with cerebrovascular diseases. Patients were classified into the following four groups; controls: normal subjects without neurological disease, group A: cerebral hemorrhage, group B: cerebral infarction, group C: patients with mental impairment, including those in groups A and B, and a low score on Hasegawa's Dementia Rating Scale. CSF AChE level of groups A, B and C was decreased significantly, while choline concentration from patients showed a increase compared with that of control cases. CSF alanine concentration showed a tendency to increase, while glycine and glutamate tended to decrease. CSF epinephrine, norepinephrine or 3-methoxy-4-hydroxyphenylethylen glycol concentrations of groups A, B and C did not exhibit a significant difference from that in control cases. Some cases with cerebrovascular diseases showed low concentrations of both CSF 5-hydroxyindole acetic acid and homovanillic acid. However, dihydroxyphenyl acetic acid concentration was higher than in control cases. The CSF SOD level was not significantly from that in control cases. The changes in neurochemical substances in the CSF support their use as markers of cerebrovascular disease-related change.

Key words : *Cerebrospinal fluid, Cerebrovascular diseases, Amino acid, Neurotransmitter, Superoxide dismutase*
(Jpn J Geriat 1999; 36: 256—261)

¹⁾Department of Pharmacology, Oita Medical University.

²⁾Department of Physiotherapy, Yufuin Koseinenkin Hospital

³⁾Department of Pharmacology, Medical College of Tokyo