

B-17 急性脳症, Reye症候群と髄液中オクトパミン 第1報 測定法と臨床的応用

研究協力者 原 口 宏 之 北九州総合療育センター

共同研究者 畑 実 ・ 渡 辺 ひさ子 北九州総合療育センター

Reye症候群の病態は不明な点が多いが、脳障害発現の基礎には肝ミトコンドリア病変の存在が指摘されている¹⁾。一般に肝性脳症 (hepatic encephalopathy)は肝硬変に続発するものが多く、本症候群と同一に論ずるには適当でない面もある。しかし肝性脳症における異常を明らかにすることは、Reye症候群の病像解明の一助となる可能性も持っていると思われる。

ラットの実験的肝性脳症では、脳や心臓に生体アミンの一種であるオクトパミンの増加が認められ^{2,3)}ヒトの肝性脳症でもオクトパミンが血液や尿中に増加していることが知られている⁴⁻⁶⁾さらにReye症候群の剖検脳においてもオクトパミン増加の報告がある⁷⁾。オクトパミンはノルエピネフリンと似た性質を持つが、作用は極めて弱いために偽神経伝達物質 false neurotransmitter と呼ばれる⁸⁾。肝性脳症においては、異常に増加したこの物質が脳障害の発生に何らかの役割を演じているという仮説も提起されている⁹⁾。

今回、髄液中オクトパミン濃度を測定するために、高速液体クロマトグラフ法に電気化学検出器を装備したシステムを用いて、操作が簡単で、感度の優れた測定法を開発し、臨床に応用したので報告する。

方 法

1) 分析機器：高速液体クロマトグラフ機は東洋曹達工業のHLC-803A、電気化学検出器は同社のEC-8を使用した。充填剤は逆相クロマト用TSK-GEL ODS-120A p-5を4×300mmのカラムにつめて用いた。凍結乾燥機は東京理化社製FD-5型を使った。

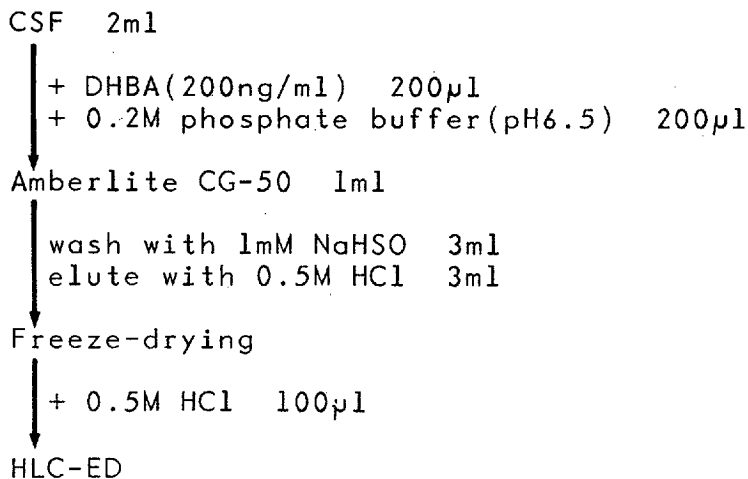
2) 試薬：標準品のオクトパミン、3, 4-ジヒドロキシベンズアルデヒド (DHBA)、ノルエピネフリン、ドーパミン、チラミンはSigma社製品を、他の試薬はすべて特級を用いた。アンバーライト (CG) IRC-50 T-1は活性化して、ガラス管カラムに1mlを入れた。

3) クロマト条件 (表1): 移動相は Fujita ら⁹⁾の報告に従い, クエン酸5.25 g, 酢酸ナトリウム4.10 g, 水酸化ナトリウム2.90 g, 食塩23.20 g に再蒸留水を加えて1 lとし, 酢酸 (約1 ml) でpH 5.10に調製した。流速は毎分0.7 ml, 分析は室温で行い, 設定加電圧は+800 mVとした。

Table 1 Chromatographic condition

Chromatograph	HCL-803A
Detector	Electrochemical Detector EC-8
Column	TSK-GEL ODS-120A p-5
Mobile phase	Citric acid, Sodium acetate, NaOH, NaCl, Acetic acid-mixture (pH5.1)
Flow rate	0.7ml/min
Temperature	Ambient
Oxidation potential	+800mV vs Ag/AgCl

Fig 1 Analytical procedure



4) 操作法 (図1): 髄液2.0 mlに内部標準の DHBA 溶液 (200 ng/ml) 200 µlと0.2 Mリン酸緩衝液 (pH6.5) 200 µlを加え, 全量をアンバーライト・カラムにかける。1 mM次亜硫酸ナトリウム3.0 mlでカラムを洗滌後, 0.5M塩酸3.0 mlの溶出分画を凍結乾燥し, 0.5M塩酸100 µlで溶解, その20 µlを注入して分析した。濃度は内部標準との peak-height ratioで算出した。

5) 対象患児：点頭てんかん5例にレンノックス症候群5例で、いずれも抗てんかん薬を服薬中であるが、L-DOPAは投与されていない。朝絶食にして午前10時頃に腰椎穿刺を行い、初流の5~10 mlの一部を分析まで -80°C で保存した。

成 績

1) 設定加電圧：加電圧を増加すると、図2の如くオクトパミンの感度は700 mVを超す附近から800 mVまで急激に増す。一方 DHBA の感度増大は緩徐で、電圧の増加とともに直線的な増加を示した。

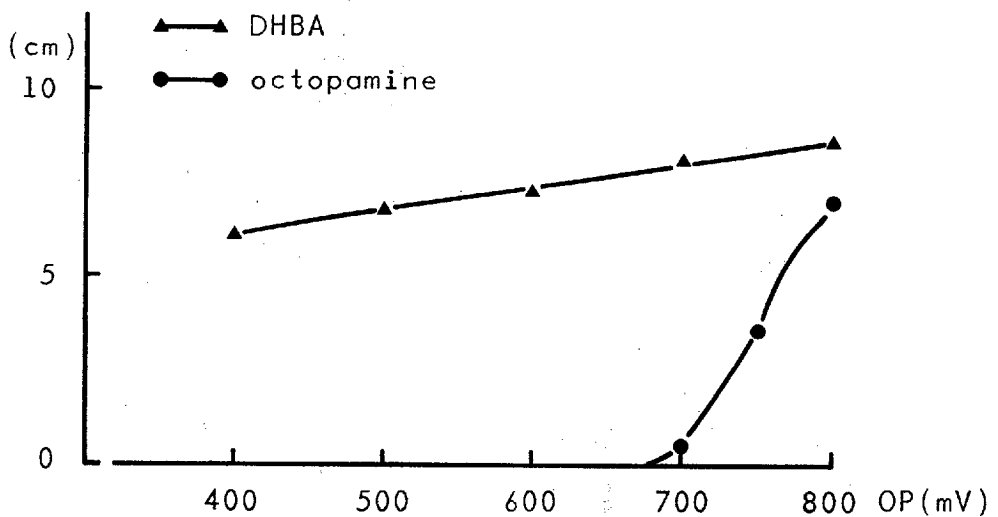


Fig 2 Sensitivity of monoamine by electrochemical detection

2) アンバーライト分画：次亜硫酸分画にはアミン類は全く検出されず、0.5M塩酸2および3 ml分画に溶出することが判明した(図3)。溶出率はオクトパミンが99.9%で、DHBAは94.2%であった。

3) クロマト保持時間：図4は標準品のクロマト分離図である。保持時間はノルエピネフリン8.0分、オクトパミン12.0分、エピネフリン13.5分、DHBA16.0分、ドーパミン29.0分にチラミン42.0分であった。実際に髄液試料を分析すると(図5)、ドーパミンおよびチラミンは検出されず、分析は20分以内に終了した。ノルエピネフリンおよびエピネフリン相当部位にピークを認める症例もあったが、検討は行っていない。

4) 検量線および精度：図6に示す如く、オクトパミン濃度200 ng/mlまで、計算比と濃度との間に直線性が認められた。なお最小検出感度は5 ng/mlであった。変動係数をみると、同一測定内では5.5%、測定間では8.3%であった。また蛍光分析法⁹⁾との間には $r = +0.87$ の相関関係がみられた。

5) 髄液試料の分析：髄液中のオクトパミン濃度は(表2)、点頭てんかんは平均43.0 ng/ml (21.0

~89.9 ng/ml) で、レンノックス症候群では平均24.9 ng/ml (13.1~35.9 ng/ml) であった。

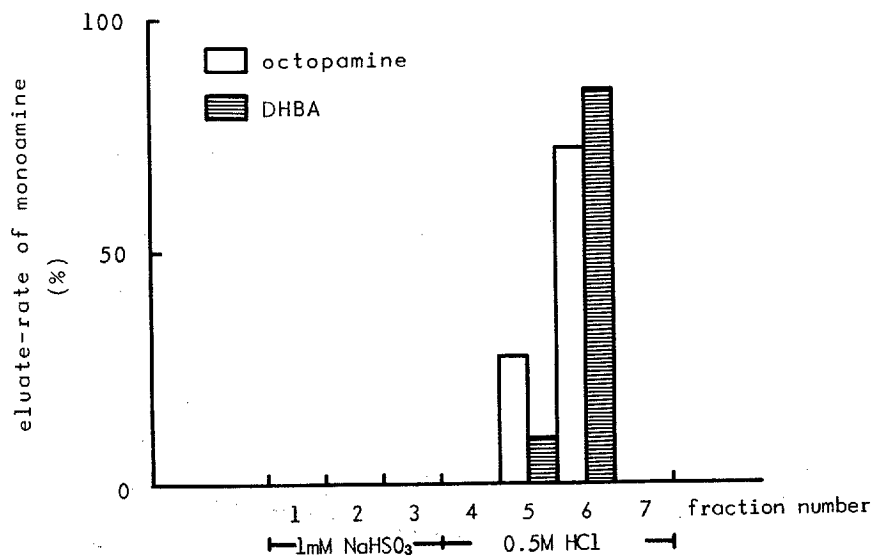


Fig 3 Fractionation of monoamine by using Amberlite CG-50

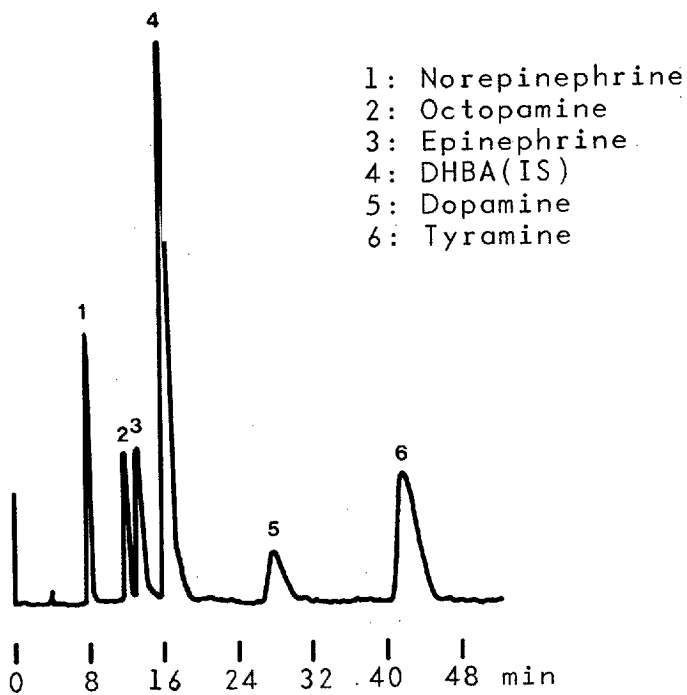


Fig 4 Chromatogram of monoamines by HLC-ED

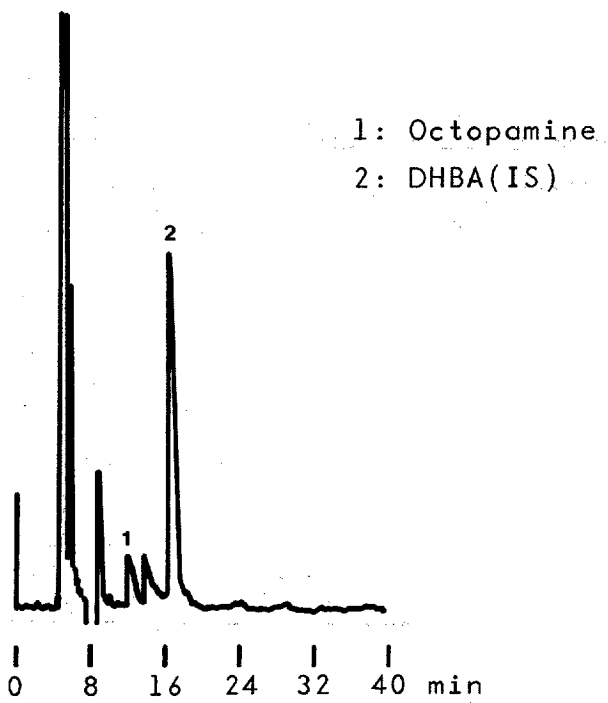


Fig 5 Chromatogram of octopamine in CSF by HLC-ED

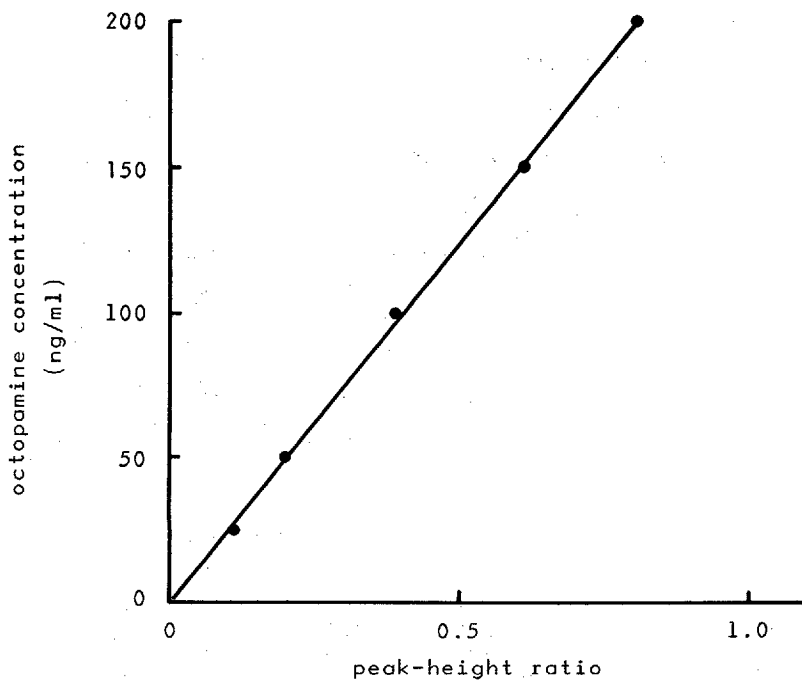


Fig 6 Calibration curve for octopamine

Table 2 CSF octopamine concentration in some convulsive disorders

Subject	Age	Octopamine (ng/ml)
Infantile spasm		
T.Y.	0: 3	21.0
Y.S.	1: 5	56.1
S.T.	1: 8	25.6
I.M.	1: 9	22.4
T.Y.	2: 0	89.9
Lennox Syndrome		
J.H.	6: 0	13.1
J.I.	6: 0	35.9
Y.K.	6: 5	24.0
Y.M.	8:10	19.3
Y.K.	11: 1	32.1

考 察

1) 測定法：今回検討した測定法は、操作が簡単で精度が良く、蛍光比色法とも良い相関を示しており、検出感度からみても髄液中オクトパミン濃度測定には十分応用できる方法である。髄液中には妨害ピークはみられなかったが、ノルエピネフリンおよびエピネフリンに相当する位置にピークの出現する例があり、この点に関しては今後追求したい。

一方、血液中のオクトパミン濃度は正常では1 ng/ml以下であり、血清で10ml位を必要とすることになって問題がある。また尿は妨害物質が多く、薄層クロマトグラフ法など試料の純化操作を加えなくてはならない。尿中のオクトパミン代謝産物の分析も検討課題である。

2) 髄液中のオクトパミン：髄液濃度の測定例は少なく、わが国では杉江ら¹⁰⁾が點頭てんかんの1例で高値を示したと報告しているにすぎない。正常でもオクトパミンは脳内に存在しており、髄液中にも検出できると予測される。他のアミン類と内様に血液—脳関門を通過しないので、髄液中のオクトパミンは中枢神経系に起原を持つものであり、その変動は中枢神経機能を反映していると考えられる。

點頭てんかんの症例がレンノックス症候群よりもやゝ高値を示したが、疾患に特有のものか、あるいは年齢要因が関与しているのかは明らかでない。今後、発達に伴う変化とともに、Reye症候群や急性脳症などについて検討する予定である。

3) オクトパミンの意義：オクトパミンは哺乳類以外の動物にも広く存在しており、神経系では神経終末にノルエピネフリンと共存して、弱い神経伝達作用を持っている⁵⁾。生体内におけるオクトパミン濃度の増加は、表3に示すように肝性脳症²⁻⁵⁾で認められ、さらにReye症候群でも脳組織内での増加が報告されている⁶⁾。また脳症の程度の変化とオクトパミン血中濃度との間には関連があって、昏睡時に最も高くなり、軽快すると濃度も低下することが知られている^{5,6)}。増加したオクトパミンによるノルエピネフリンの作用減弱が、意識障害などの神経症状発現の一因と推測されている⁵⁾。

Table 3 Octopamine concentration in hepatic encephalopathy (HEP) and Reye syndrome

Subject	Specimen	Concentration
Experimental HEP (rat)	brain, heart blood [NE in brain	increase increase decrease]
HEP (human, 200 cases)	blood urine	increase increase
Reye syndrome (6-7 cases)	brain (hypothalamus) [NE, DA in brain	increase decrease]

オクトパミン体内増加の機序としては、肝障害時には前駆物質であるフェニルアラニンやチロシンが増加することや、増加したフェニルアラニンがチロシン・ヒドロキシラーゼ (TH) 活性を阻害するためチラミンが増えることなどが考えられる (図7)⁵⁾。

Reye症候群の剖検脳では、主に視床下部でオクトパミンが増えているのに対して、ノルエピネフリンは減少していたとの事実がある⁷⁾。また本症候群患児の脳室液中では、ホモバニリン酸の著しい増加が認められ¹⁰⁾この現象は脳細胞への侵襲がドーパミンの放出を促がした結果であると考えられており、これらの脳障害では、オクトパミンの増加と同時にカテコラミンの減少が起っていることを示している。そこで治療法のひとつとして、脳内カテコラミンの減少を回復させようという試みが考えられる。ドーパミンの前駆物質であるL-DOPAを患者に投与したところ、明らかな臨床効果が得られたとの報告が数例あり^{8,10)}再検討に値する薬物と思われる。髄液中オクトパミン濃度測定が治療法選択の一指針となりうる可能性を示唆するものである。

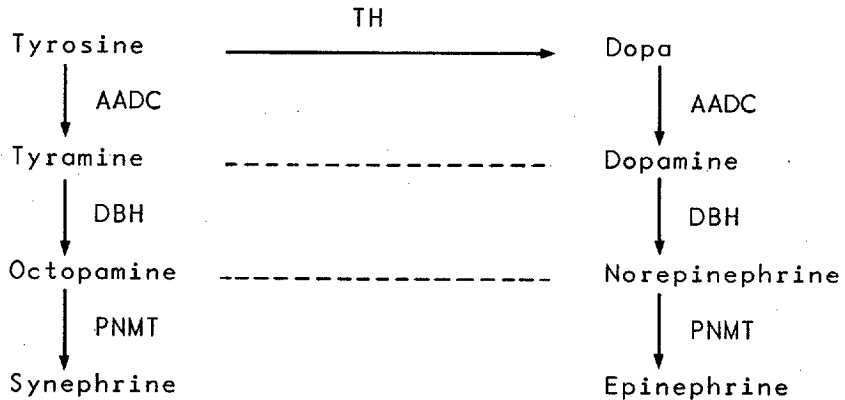


Fig 7 METABOLIC PATHWAY OF CATECHOLAMINE

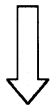
ま と め

脳症病態解明の目的で、高速液体クロマトグラフ法を用いた髄液中オクトパミン濃度測定法を開発した。操作法は髄液2.0mlをアンバーライトにかけ、塩酸溶出分画を凍結乾燥後注入分析し、電気化学的検出を行った。最小検出感度は10 ng/mlで、小児てんかん患者の髄液中オクトパミン濃度は13.1~89.9 ng/mlであり、臨床に応用可能であった。

文 献

- 1) Delong, RG, Glick TH. Encephalopathy of Reye's syndrome : A review of pathogenetic hypotheses. *Pediatrics* 69 : 53-63, 1982.
- 2) Fischer JE, Baldessarini RJ. False neurotransmitters and hepatic failure. *Lancet* 2 : 75-79, 1971.
- 3) Fischer JE. False neurotransmitters and hepatic coma. In : Plum F, ed. *Brain Dysfunction in Metabolic Disorders*. Vol 53. New York : Raven Press, 1974 : 53-73.
- 4) Lam KC, et al. Role of a false neurotransmitter, octopamine, in the pathogenesis of hepatic and renal encephalopathy. *Scand J Gastroent* 8 : 465-472, 1973.
- 5) Manghani KK, et al. Urinary and serum octopamine in patients with portal-systemic encephalopathy. *Lancet* 2 : 943-946, 1975.
- 6) Nespoli A, et al. Pathogenesis of hepatic encephalopathy and hyperdynamic syndrome in cirrhosis : Role of false neurotransmitters. *Arch Surg* 116 : 1129-1138, 1981.
- 7) Lloyd KG, et al. Catecholamine and octopamine concentrations in brains of patients with Reye syndrome. *Neurology* 27 : 985-988, 1977.

- 8) Saavedra JM, Axelrod J. Octopamine as a putative neurotransmitter. *Adv Biochem Psychopharmacol* 15 : 95-110, 1976.
- 9) Fujita K, et al. Fluorescence assay for dopamine- β -hydroxy-lase activity in human serum by high-performance liquid chromatography. *Analyt Biochem* 82 : 130-140, 1977.
- 10) 杉江秀夫, 他。點頭てんかんに対する L-DOPA 療法の試み：脳内カテコラミンの立場から。脳と発達 9 : 455-463, 1977.
- 11) Shaywitz BA, et al. Reye syndrome : Monoamine metabolites in ventricular fluid. *Neurology* 29 : 467-472, 1979.
- 12) Crocker JFS, et al. Levodopa in Reye's syndrome. *Clin Res* 21 : 1033, 1973.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



Reye 症候群の病態は不明な点が多いが、脳障害発現の基礎には肝ミトコンドリア病変の存在が指摘されている。一般に肝性脳症(hepatic encephalopathy)は肝硬変に続発するものが多く、本症候群と同一に論ずるには適当でない面もある。しかし肝性脳症における異常を明らかにすることは、Reye 症候群の病像解明の一助となる可能性も持っていると思われる。

ラットの実験的肝性脳症では、脳や心臓に生体アミンの一種であるオクトパミンの増加が認められ、ヒトの肝性脳症でもオクトパミンが血液や尿中に増加していることが知られている。さらに Reye 症候群の剖検脳においてもオクトパミン増加の報告がある。オクトパミンはノルエピネフリンと似た性質を持つが、作用は極めて弱いために偽神経伝達物質 false neurotransmitter と呼ばれる。肝性脳症においては、異常に増加したこの物質が脳障害の発生に何らかの役割を演じているという仮説も提起されている。

今回、髄液中オクトパミン濃度を測定するために、高速液体クロマトグラフ法に電気化学検出器を装備したシステムを用いて、操作が簡単で、感度の優れた測定法を開発し、臨床に応用したので報告する。