

## 各種脳神経疾患患者髄炎の生化学的研究

特に髄液内  $265\text{ m}\mu$  の吸収を示す物質の固定を中心として

京都大学医学部外科第1講座（指導：荒木千里教授）

小 沢 和 恵

〔原稿受付 昭和38年3月11日〕

BIOCHEMICAL STUDIES ON C. S. F. IN  
VARIOUS PATIENTS,  
IN PARTICULAR REFERENCE TO THE IDENTIFICATION OF THE  
SUBSTANCE WHICH HAS ITS MAXIMUM ABSORPTION AT  $265\text{ m}\mu$ 

by

KAZUE OZAWA

From The 1st Surgical Division, Kyoto University Medical School

(Director : Prof CHISAO ARAKI)

SPIEGEL and KOVACS observed a specific absorption at  $265\text{ m}\mu$  in C. S. F. from a patient of acute brain injury. From this, he claimed that there was an increase of nucleic acid in C. S. F. of these patients. SPIEGEL also prepared thin sections of a cat's spinal cord and added to them C. S. F. which was obtained from the patient who had head injury. These sections were incubated for a certain period and stained with NISSLE staining method. He noticed the disappearance of NISSLE granules, chromatolysis, in the anterior horn cells and concluded that there occurred an increase of ribonuclease in C. S. F. after head injury.

Thus, they believed that the nucleic acid determination in the C. S. F. would give us the best indication of estimating the degree of organic damage of the brain.

In this experiment, the biochemical studies of similar line were carried out on C. S. F. from the various neurological and neurosurgical patients.

## METHOD

C. S. F. obtained by lumbar puncture or ventricular tap. The fluid obtained was immediately kept in ice or dry ice and examined within 4 hours at the latest.

To determine the maximum absorption, 1cc of C. S. F. was diluted with 2cc of distilled water and then the absorption curve between  $240\text{ m}\mu$  and  $300\text{ m}\mu$  of the ultra-violet portion was obtained by D. U. BECKMAN's spectrophotometer.

For the identification of ascorbic acid in C. S. F., ascorbic acid oxidase was obtained from pumpkins through the purification according to the NELSON's method. When 0.1cc of this enzyme containing solution was added to 1cc of C. S. F., the absorption of ascorbic acid disappears completely within about 3 minutes.

In the determination of the ascorbic acid content in C. S. F., 1cc of C. S. F. was diluted with 2cc of 0.2 M citrate-phosphate buffer (PH 5.7) and 0.1 cc of ascorbic acid oxidase was added. The decrease of optical density at 265  $m\mu$  following oxidase reaction was interpreted as the amount of ascorbic acid.

In the determination of ribonuclease activity in C. S. F., the absorption of ascorbic acid at 265  $m\mu$  was completely nullified first, and then ribonuclease activity was determined according to the KUNITZ's method.

## RESULTS

### (1) Ultraviolet spectrum of C. S. F.

Even in C. S. F. taken from the patients who were considered to be normal neurologically, such cases as appendicitis, inguinal hernia, or hemorrhoids, the maximum absorption at 265  $m\mu$  was also noticed. This opposed to the opinion of SPIEGEL or KOVACS that the maximum absorption at 265  $m\mu$  was specifically present in C. S. F. of head injury patients.

During the determination with D. U. BECKMAN spectrophotometer, though it was to a minor degree, it was found that the maximum absorption at 265  $m\mu$  decreased gradually as time passed. Since nucleic acid shows a very stable ultraviolet absorption at 260  $m\mu$ , it is quite unlikely that its absorption disappears in a short period of time.

(2) Biochemical examination of the substance which has its maximum absorption at 265  $m\mu$ .

1 cc of C. S. F. from the head injury patient added with 0.2 cc of 60% perchloric acid was centrifuged with 5000 G at 0°C for 5 minutes. The precipitate was dissolved into 1cc of distilled water and the absorption curve in ultraviolet portion was obtained.

The supernate was neutralized with 4N KOH to remove P. C. A. and centrifuged with 2500 G at 0°C for 5 minutes. The absorption curve of this supernate was also obtained. Neither in the supernate nor in the precipitate, absorption at 265  $m\mu$  was found. C. S. F. taken from 40 patients of various neurosurgical cases were also studied by the uranyl acetate method, the absorption curve in ultraviolet portion revealed the same results both in the supernate and the precipitate.

The absorption at 265  $m\mu$  disappeared immediately by adding  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{FeCl}_2$  and  $\text{HgCl}_2$  to C. S. F. When cysteine was added to the C. S. F. after the lumbar puncture, there found nearly no decrease in the maximum absorption.

Judging from these experimental results, it is rather difficult to consider that the absorption at 265  $m\mu$  is due to nucleic acid, and it is presumed that this may be due to ascorbic acid which has its maximum absorption at the same wave length.

### (3) Identification of ascorbic acid in C. S. F.

If nucleic acid of sizable amount exists in C. S. F., there should remain the absorption at 260  $m\mu$  even after the removal of ascorbic acid.

Then, to C. S. F. taken from the various cases such as, brain tumor, epilepsy, brain injury, cerebral vascular lesion and PARKINSON's disease, ascorbic acid oxydase was added. In no sample did the absorption reveal a peak at 260  $m\mu$ .

Though there noticed maximum absorption at 280  $m\mu$  in C. S. F. from the brain

tumor cases or in xanthochromic C. S. F., this was probably due to protein. Because the protein determination made according to the FOLIN-CIOCALTEU'S method revealed fairly high protein contents in these C. S. F. samples.

Thus the maximum absorption at  $265\text{ m}\mu$  was proved to be due to ascorbic acid, and the decrease in absorption by incubation or other procedure should be explained by the autoxidative process of ascorbic acid.

#### (4) Ribonuclease in C. S. F.

As mentioned above, SPIEGEL considered, through his histochemical study, that there was an increase of ribonuclease in C. S. F. of a head-injury patient.

This problem was also investigated in the present study.

Ribonuclease activity was relatively high even in C. S. F. of neurologically normal patients. In C. S. F. from the cases of brain injury, epilepsy, diseases of extrapyramidal system and others, there was no marked increase of activity, the only exception appeared in cases of the xanthochromic cerebrospinal fluid, which showed high activity.

These results were not accord to the histochemical determination of ribonuclease activity through the chromatolysis of the anterior horn cells of the spinal cord.

#### (5) Determination of ascorbic acid content in C. S. F.

Since the absorption at  $265\text{ m}\mu$  of C. S. F. was proved not due to nucleic acid but ascorbic acid, ascorbic acid content of C. S. F. in various neurosurgical patients was determined. The patients were divided into following 5 groups : neurologically normal cases, patients within a month from mild or moderate head injury, cases with posttraumatic complaints, those who had subjective symptoms and passed over a month after the injury, brain tumor cases, and patients of other diseases.

In each pathological group, the amount of ascorbic acid was lowered, comparing with the normal group, and the decrease in ascorbic acid was most remarkable in the group of cases with posttraumatic complaints, then getting less marked in the groups of brain tumor, other diseases and cases within a month after head injury, in this order.

## CONCLUSION

1. UV absorption of C. S. F. at  $265\text{ m}\mu$  proved, through enzymatical study, to be due to ascorbic acid.

2. On the basis of available evidences, spontaneous decrease in UV absorption of C. S. F. is not due to degradation of nucleic acid but autoxidation of ascorbic acid.

3. Content of RNase in C. S. F. from the patients of head injury was not increased as compared with that of the neurologically normal cases.

4. Ascorbic acid of C. S. F. was decreased only in the patients with prolonged subjective complaints after head injury.

## 目 次

### 緒 言 実 験 方 法 実 験 成 績

#### 1. 脳外科領域における各種疾患患者髄液の紫外

### 部吸収スペクトル

#### 2. 髄液内 $265\text{ m}\mu$ の紫外部吸収を示す物質の生化学的同定

##### i) 髄液の $265\text{ m}\mu$ の吸収低下と髄液内酵素

- ii) 髄液内核酸の有無に関する生化学的検索  
 3. Chromatolysis と RNase  
 4. 各種脳神経疾患患者髄液中のアスコルビン酸

## 緒 言

髄液中には、265m $\mu$  に Peak をもつ特有の紫外吸収スペクトルを示す物質が存在することが知られているが、この物質がなにかという点に関しては現在まで一致した見解を得るにいたっていない。1948年 Spiegel が、はじめてこの吸収スペクトルを急性頭部外傷患者の髄液に認めた時彼はこれを核酸に由来するものと考えた<sup>1)</sup>。すなわち頭部外傷にさいして患者の髄液中に核酸が増加するものと判断しさらにこの物質は病状の軽快とともにしだいに減少し、正常の吸収スペクトル——すなわち、いわゆる hyperbolic curve——にもどることも併せて報告している。(図1)

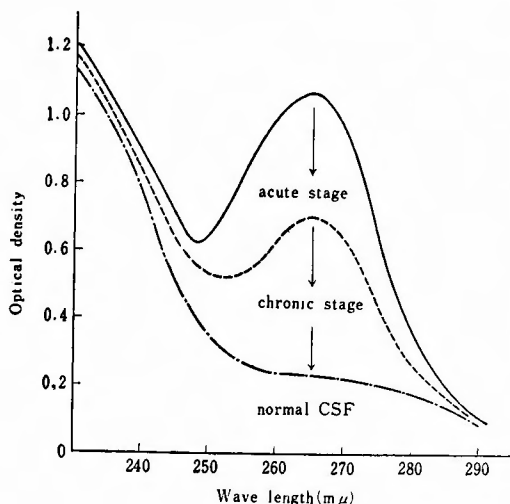


図1 Change in ultra violet absorption spectrum of CSF in a case of head injury

他方彼はネコの脊髓組織切片を作り、これに、頭部外傷患者の髄液を滴下して、一定時間孵置したのち、ニッスル染色をおこなうと、前角細胞内のニッスル顆粒の消失、すなわち chromatolysis が発生する事実を発見した。しかもこの chromatolysis の程度が脳損傷の重篤さと略々比例関係を示すことから chromatolysis を発生せしむるに十分な髄液の最大希釈度が脳損傷の程度、予後を判定する指標となり得ると主張した<sup>2)</sup>。すなわち彼の考えによると外傷による脳組織の損傷がリボ核酸水解酵素(以下 RNase と略称する)の活性

含有量  
 総括並びに考按  
 結 語

を高め脳細胞中のリボ核酸を分解する結果 Chromatolysis を発生せしめさらにこのさい多量の RNase とともに細胞中のリボ核酸ないしその分解物である各種ヌクレオチドが髄液中に流入するために髄液の 265 m $\mu$  における吸収が増加するというのである。

これに対し1947年 Strait<sup>3,4)</sup>らは260m $\mu$  付近に認められる吸収は核酸によるものでなくて、同様の吸収を示すアスコルビン酸によるものと反論した。1953年 Spiegel はふたたびこの問題をとりあげ実験的にけいれんをおこしたイヌの髄液について検索した結果髄液中のアスコルビン酸の存在は一応肯定<sup>5)</sup>したが、なお核酸も存在すると主張し一方 Kovacs<sup>6)</sup>は1954年この吸収物質はアスコルビン酸ではなく、核酸にほかならぬと報じ、これは脳膜炎、癲癇、頭部外傷などの髄液に増加し、しかも各種疾患について、それぞれ、specific な紫外吸収スペクトルを示す事実から、本法が神経疾患の鑑別診断に簡便かつ迅速な臨床検査手段となり得ることを強調した。

現在一般には、この物質を核酸とする考えが支配的であり、各種脳疾患の診断、予後の判定にある程度役立つものと考えられているようである。しかしながらこの物質に関する詳細な化学的検索および同定、さらにこれに関連した酵素化学的検索は殆んどなされておらずその臨床的意義に関しても依然不明な点が多い。

これらの点を解明すべく本研究においては各種の生化学的、酵素化学的手段を用い、この物質の吟味をおこない、さらにその臨床診断的意義についても検討した。

## 実験方法

腰椎穿刺あるいは脳室穿刺によつて髄液を採取し、ただちにこれを氷中またはドライアイス中に保存し、おそくとも採取後4時間以内に測定をおこなうこととした。血液が混入した髄液は全部これを除外した。

髄液の最大吸収は髄液1ccに蒸留水2ccを加えて3倍に希釈し、ベックマン(DV)分光光度計により紫外外部吸収曲線をとつてもとめた。

髄液の265 m $\mu$  吸収低下を髄液内酵素との関係を検索するにあつては、キューベットに頭部外傷患児髄液1ccをとり、これに生理的食塩水2ccを加えて3倍に希釈し、25°Cに孵置して265m $\mu$ の吸収を時間的に追

い、その途中で、各々 1 μM のアデニン、キサンチンなど核酸関連物質あるいは 1 μM の塩化水銀を加えた。

蛋白、核酸沈澱剤の影響をみるには、髄液 1 cc に 60 % 過塩素酸の 0.2 cc を加え遠心分離 (5000 × g, 5 分, 0 °C) をおこない、その沈澱は蒸留水 1 cc に溶解した後、紫外外部吸収スペクトルをとり、その上清は加えた過塩素酸除去のため 4 規定苛性カリで中和し、遠心後 (2500 × g, 5 分, 0 °C) 上清の紫外外部吸収スペクトルを測定した。

又 Mac Fadyen 試薬 (2.5 % 過塩素酸にウラニウム酢酸を 0.25 % に溶解したもの) を使用した場合には髄液 1 cc に試薬 2 cc を加え、遠心分離後 (5000 × g, 5 分, 0 °C) 上清、沈澱の紫外外部吸収スペクトルを各々測定した。

pH 効果は pH1 ~ pH2 は塩酸 - 塩化ナトリウム緩衝液、pH3 ~ pH6 はクエン酸 - 磷酸緩衝液、中性近くは磷酸緩衝液、pH10 近くはグリシン - 苛性ソーダ緩衝

液を使用した。

金属の影響の観察には E. D. T. A. (ethylenediamine-tetraacetic acid) 3 μM, 硫酸銅あるいは塩化鉄 0.1 μM を加えた。

チステインは腰椎穿刺直後髄液 1 cc につき 3 μM のわりあいに加えその効果を検討した。

アスコルビン酸酸化酵素は Nelson の方法<sup>8,9)</sup> に準じて、南瓜より精製した (表 1)。酵素溶液は常時 -10 °C 以下に保存し 2 ヶ月以内に使用したがその間活性低下はほとんど認められなかつた\*。その酵素溶液 0.1 cc を髄液 1 cc に添加すると約 3 分間で図 2 のごとく髄液の 265 mμ の吸収は完全に消失した。

RNase 測定の際には、髄液内には 265 mμ に吸収をもつアスコルビン酸があり、しかも pH 5 近くでは、比較的安定であるため、まずアスコルビン酸酸化酵素によってその吸収を完全に消失させる。その後 Knitz の方法に準じて、その RNase 活性を測定した。すなわち遠心用試験管に髄液 1 cc, 上述のアスコルビン酸

表 1 Summary of purification procedure (Ascorbic acid oxidase)

| Fraction                                                                | Total volume (ml) | Total units | Specific activity (units/mg dry weight) | Specific activity (units/mg protein) | Recovery (%) |
|-------------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------|-----------------------------------------|--------------------------------------|--------------|
| 1. Crude extract                                                        | 640               | 1839.86     | 0.06                                    | —                                    | 100          |
| 2. (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fraction             | —                 | —           | —                                       | —                                    | —            |
| 3. Reprecipitation with (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 115               | 215.280     | 1.10                                    | 1.300                                | 12           |
| 4. Elute from alumina                                                   | 40                | 149.76      | —                                       | 2.135                                | 8            |

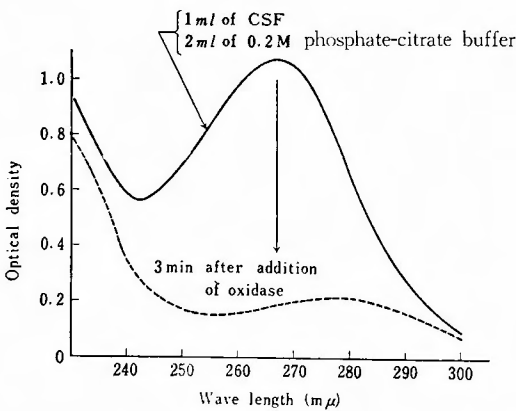


図 2

酸化酵素 0.1 cc を加え、室温に 7 分孵置する。その後リボ核酸溶液 1 cc を加え、23 °C 2 時間孵置したのち、Mac Fadyen 試薬 2 cc を加えさらに 23 °C 30 分孵置する。ついで遠心分離をおこないその上清について 260 mμ の紫外外部吸収を測定した。そのさい 260 mμ における吸光度の 0.1 の上昇を 1 単位とした。なお基質として用いたリボ核酸 (東京化成) は Knitz の方法<sup>10)</sup> に準じて、氷酢酸による沈澱法を数回くりかえすことによって精製し、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチドの混在していない事をたしかめた。このリボ核酸を酢酸緩衝液 (0.1 モル pH 5.0) で 0.2 % に溶解し基質とした。

アスコルビン酸の定量にあたっては、腰椎穿刺より測定までの間に起こる髄液アスコルビン酸の自動酸化を防ぐために、チステイン、グルタチオンの添加など、

\* なお酵素溶液 0.2 cc, 265 mμ の吸光度は 0.03 以下である。

いろいろの試みをおこなつたが、けつきよく、腰椎穿刺後髄液をただちにドライアイス中に入れることによって少なくとも8時間、その自動酸化を防ぎ得ることが判つたので本法を採用した。

なお、髄液を生理的食塩水、蒸留水で希釈すると、その内に含まれるごく微量の金属イオンの存在により、あるいはpHの影響によつて、アスコルビン酸の自動酸化が促進されることが予想される。そこで種々検討した結果、0.2モルのクエン酸—リン酸緩衝液<sup>11)</sup> (pH 5.7) が、もつとも目的にかなつた緩衝液となり得るこ

とを予備実験でたしかめこれを採用した。すなわち、髄液1ccをクエン酸—リン酸緩衝液(0.2モル pH5.7)で希釈し、それにアスコルビン酸酸化酵素0.1ccを付加する。酵素を作用させたのち吸光度0.1の低下を1単位とした。

## 実験成績

### 1) 脳外科領域における各種疾患患者髄液の紫外部吸収スペクトル

まず脳外科領域における各種疾患患者髄液について

表 2

| Diagnosis                        |                             |               | Total No.<br>of sample | No. and distribution of maxima at wave<br>length in m $\mu$ |            |     |     |     |     |   |  |
|----------------------------------|-----------------------------|---------------|------------------------|-------------------------------------------------------------|------------|-----|-----|-----|-----|---|--|
|                                  |                             |               |                        | 260                                                         | 265<br>267 | 270 | 275 | 280 | 285 |   |  |
| Head injury                      | Type I                      | Acute stage   | 1                      | 1                                                           |            |     |     |     |     |   |  |
|                                  |                             | Chronic stage | 1                      | 1                                                           |            |     |     |     |     |   |  |
|                                  | Type II                     | Acute stage   | 7                      | 7                                                           |            |     |     |     |     |   |  |
|                                  |                             | Chronic stage | 2                      | 2                                                           |            |     |     |     |     |   |  |
|                                  | Type III                    | Acute stage   | 2                      | 1                                                           |            |     |     | 1   |     |   |  |
|                                  |                             | Chronic stage | 2                      |                                                             |            |     |     | 1 1 |     |   |  |
| Vascular disease                 | Subarachnoidal bleeding     |               | 2                      |                                                             |            |     |     | 1 1 |     |   |  |
|                                  | Arterio-venous malformation |               | 5                      | 5                                                           |            |     |     |     |     |   |  |
|                                  | Aneurysma                   |               | 2                      | 2                                                           |            |     |     |     |     |   |  |
| Extrapyra-<br>midal disease      | Spasmodic torticollis       |               | 2                      | 1                                                           |            |     |     | 1   |     |   |  |
|                                  | Parkinson's disease         |               | 2                      | 1                                                           |            |     |     | 1   |     |   |  |
|                                  | Athetosis                   |               | 1                      | 1                                                           |            |     |     |     |     |   |  |
| Undiagnosed neurological disease |                             |               | 8                      | 8                                                           |            |     |     |     |     |   |  |
| Neurologically normal            |                             |               | 5                      | 4                                                           |            | 1   |     |     |     |   |  |
| Brain tumor                      | Glioma                      |               | 3                      |                                                             |            |     |     |     | 3   |   |  |
|                                  | Meningioma                  |               | 5                      | 2                                                           |            | 3   |     |     |     |   |  |
|                                  | Pituitary tumor             |               | 3                      |                                                             |            |     | 1 1 |     | 1   |   |  |
|                                  | III-Ventricle tumor         |               | 1                      | 1                                                           |            |     |     |     |     |   |  |
|                                  | Multiple myeloma            |               | 1                      | 1                                                           |            |     |     |     |     |   |  |
|                                  | Metastatic tumor            |               | 1                      |                                                             |            |     |     | 1   |     |   |  |
| Miscellaneous<br>disease         | Epilepey                    |               | 6                      | 5                                                           |            |     |     |     |     | 1 |  |
|                                  | Cerebral palsy              |               | 1                      | 1                                                           |            |     |     |     |     |   |  |
|                                  | Brain abscess               |               | 1                      |                                                             |            |     |     |     | 1   |   |  |
|                                  | Arachnoidal cyste           |               | 1                      | 1                                                           |            |     |     |     |     |   |  |
|                                  | Cervical strain syndrome    |               | 2                      | 2                                                           |            |     |     |     |     |   |  |
|                                  | Trigeminal neuralgia        |               | 1                      |                                                             |            |     |     | 1   |     |   |  |
|                                  | Radiculitis                 |               | 1                      |                                                             |            |     |     | 1   |     |   |  |
|                                  | Benzol intoxication         |               | 1                      | 1                                                           |            |     |     |     |     |   |  |

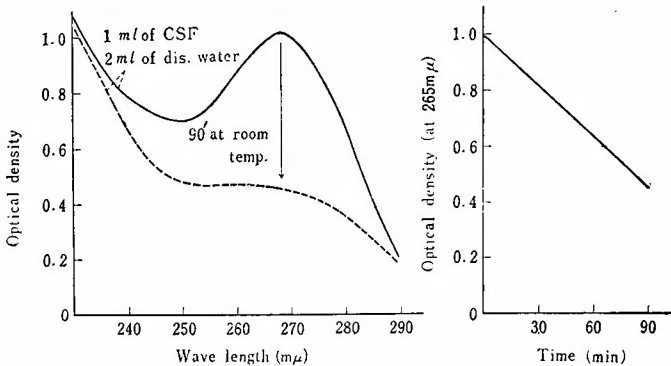


図 3 Effect of incubation

Spiegel, Kovacs の方法に準じて、紫外部吸収スペクトルをとり、その最大吸収部位を求めた。その結果を表 2 に示したが、これを要約すると次のようになる。

① 265m $\mu$  よりも 267m $\mu$  に最大吸収を示すものが比較的多い。

② 脳腫瘍患者髄液とくに glioblastoma multiforme の極大吸収部位は、蛋白の増加によるためか長波長の方角にずれる傾向がみられる。

③ 対照として採取した虫垂炎、ヘルニア、痔核など、神経学的に正常と思われる患者の髄液にも 265m $\mu$  の極大吸収が証明された。すなわち 265m $\mu$  に認められる極大吸収は Spiegel, Kovacs らの主張するごとく、頭部外傷の髄液にのみ特異的に存在するものではなく、他の神経疾患あるいは神経疾患以外の症例の髄液にさえ、みいだされることが判つた。

ここでわれわれは、髄液の 265m $\mu$  の吸収がはたしてなにを由来するものであるかを知るため、実験の基礎条件を厳密に吟味することを試みた。

## 2) 髄液内 265m $\mu$ の紫外部吸収を示す物質の生化学的同定

### i) 髄液の 265m $\mu$ 吸収低下と髄液内酵素

ベックマン (D. V) 分光光度計で測定中。

軽度ではあるが 265m $\mu$  の最大吸収は時間の経過とともにしだいに減少し、室温に放置すると図 3 のごとく約 90 分でその吸収は完全に消失する。

この現象について Kovacs は、髄液は室温に放置するとしだいにアルカリ性に傾くため (Katzenelbogen)<sup>12)</sup> 髄液内の極微量の核酸が、なんらかの変化を受けるか、あるいは髄液内に存在するある特殊の酵素によって、その極大吸収が変化するのであると考えている<sup>13)</sup>。また Spiegel も、酵母リボ核酸を、頭部外傷患者髄液

に加えると、その 260m $\mu$  の吸収が、しだいに低下することから、髄液内に特殊な酵素が存在すると主張している。

しかしながら、核酸の 260m $\mu$  の吸収は、その構成成分たるプリンあるいはピリミジン塩基に由来するものであり、このプリン・ピリミジン塩基が開環して、はじめてその核酸およびその関連物質に特有な紫外部の吸収が消失するものである<sup>7)</sup>。生体内においては、まだプリンあるいはピリミジン塩基を開環する酵素はみいだされていないのであるが、このような酵素が髄液内に存在するかいなかを、たしかめるためにつぎのような実験をおこなつた。図 4 のごとくアデニンを加えると、その紫外部の吸収のため、その吸光度は急に増大するが、ふたたび対照と平行して低下しはじめ、1 時間あまりを経過して、対照の吸光度の低下が停止すると、アデニンを付加した方の吸光度の低下も同様に止まり、その後 24 時間経過してもそれ以上の低下は認められなかつた。このことは加えたアデニンはまったく変化を受けていないことを意味しており、その他の

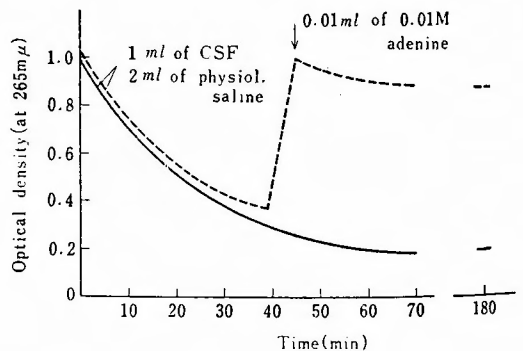


図 4 Effect of added adenine

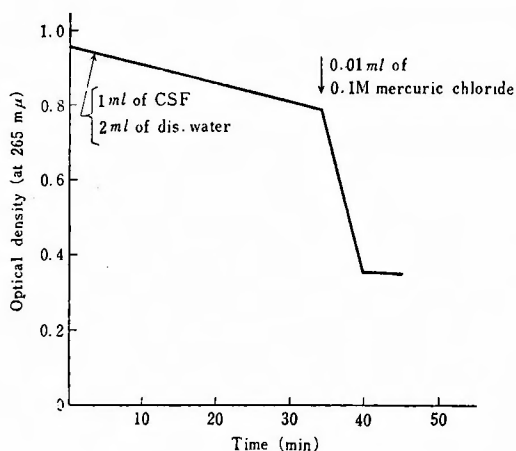


図5 Effect of mercuric chloride

核酸関連物質についても試みたが、同様な結果を得た。

またこの265mμの吸収の低下が酵素作用によるものであるとするならば、酵素 (SH) 活性の阻害剤である塩化水銀を加えることによって吸収の低下は防ぎ得る筈である。

しかるに図5に示すように塩化水銀を加えるとその265mμの吸収はかえって瞬時に消失した。これらの実験から髄液内には、核酸の紫外外部吸収を低下あるいは消失させるような、特殊な酵素は存在しないことがあきらかであり、またこの吸収の低下は非酵素的な化学反応によることが明らかとなった。

## ii) 髄液内核酸の有無に関する生化学的検索

### a) 核酸、蛋白沈澱剤の影響

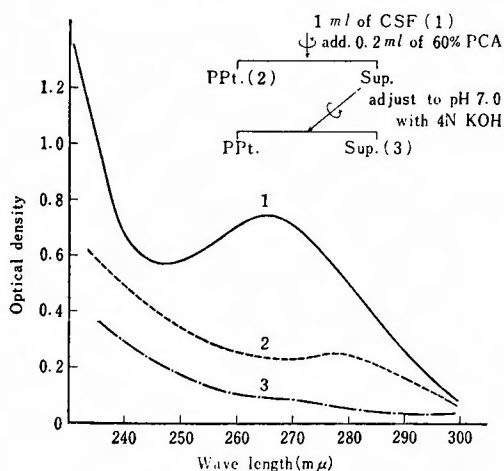


図 6

図6のように核酸、蛋白沈澱剤である過塩素酸、あるいは酢酸ウランを加え、遠心分離後、その上清、沈澱の紫外外部吸収スペクトルを測定した。

髄液内に核酸あるいは核酸関連物質が存在するならば、酸可溶性のヌクレオチド、オリゴヌクレオチドは上清に、核酸は沈澱にきて、それぞれ260mμ近くに特有の紫外外部吸収を示すはずである。しかし各種疾患患者症例70名の髄液について行なつた検索では、図6のごとく、上清、沈澱のいずれにも、紫外外部吸収は認められなかつた。

### b) pH, 温度の影響

図7は pH による髄液の265mμの吸収の変動を示し

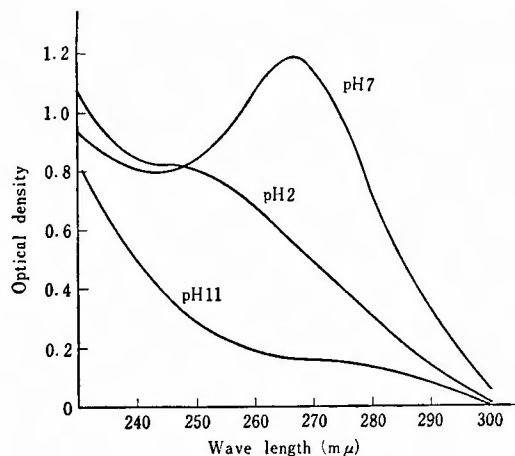


図 7

たものである。酸性に傾くと (pH2), その紫外外部吸収は短波長にずれている。もし265mμの吸収が核酸に由来するものならば、逆に長波長にずれるはずである。また熱すると髄液の265mμの吸収は消失する。

### c) 金属およびチスチンの影響

硫酸銅、塩化鉄を加えると、数分で髄液の265mμの吸収は消失してしまう。このことは髄液内265mμを有する物質は、金属イオンの触媒作用で、空気中の酸素によって酸化を受けるものと推定される。そこで還元剤であるチスチン、グルタチオンを腰椎穿刺直後髄液に加えた場合には、図8のごとく、265mμの吸収の低下はほとんど認められなかつた。

以上のような種々の実験結果から、265mμにみられる吸収が核酸に由来するという考えは完全に否定できたものと考えてよい。したがって、かかる吸収が同じ波長において、極大吸収を示すアスコルビン酸に由来するものではないかという疑が生じてくる。実際純粋



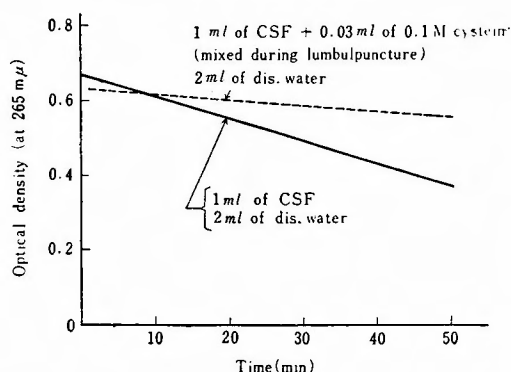


図8 Effect of cysteine

なアスコルビン酸について、上述の各実験をくりかえしたところ、髄液についておこなった諸検査成績と、まったく一致した結果が得られた。

- a) アスコルビン酸酸化酵素によるアスコルビン酸の同定ならびに髄液内核酸の有無に関する検索。

アスコルビン酸酸化酵素は、アスコルビン酸を特異的に酸化して、 $265\text{m}\mu$ の吸収を消失せしむる酵素作用を示す。そこでこの酵素を髄液に作用させて、髄液内アスコルビン酸を酵素的に証明すると同時に、他方、もし核酸が存在するなら、アスコルビン酸酸化酵素によつてその吸収を消失せしめたのちも、 $260\text{m}\mu$ 近くに吸収は残るはずであるから、核酸の有無をも検討することがができるわけである。

そこで、正常髄液、脳腫瘍、癲癇、頭部外傷、脳血管性障害、パーキンソン氏病など各種脳疾患症例70名の髄液に、それぞれ上述の酵素を作用せしめたのち、その紫外吸収スペクトルを見たが、 $260\text{m}\mu$ 付近に依然として吸収の認められた例は1例もなかった。すなわち髄液1cc中には、少なくとも検出可能な量の核酸は存在しないと考えてよい。

もつとも脳腫瘍患者の髄液、あるいは、Xanthochromic な髄液では、 $280\text{m}\mu$ 近くに最大吸収が認められたが、Folin-Ciocalteuの法で同時に測定した髄液蛋白量と比較検討した結果、この吸収は蛋白に由来するものとする得る。

すなわち、 $265\text{m}\mu$ に認められた極大吸収がアスコルビン酸に由来したことはいつそう確実に立証されたわけであり、孵置その他の操作で極大吸収が低下したことは、おそらくアスコルビン酸の自動酸化によるものと理解すべきであろう。

### 3) Chromatolysis と RNase

はじめにのべたように、ネコの脊髓の組織切片を作製し、頭部外傷患者髄液を滴下して、一定時間孵置したのちツッスル染色をほどこすと、前角細胞に Chromatolysis<sup>14)</sup>が発生していることから、頭部外傷患者髄液には、RNaseが増加していると考え、さらにその酵素活性を表わす目的で Chromatolysis をはじめて起し得るに十分な髄液の最大希釈度を用いている。

Kovacs は、脊髓炎、脳膜炎、真性癲癇などの髄液に RNaseが増加すると主張している<sup>15)</sup>。本研究において

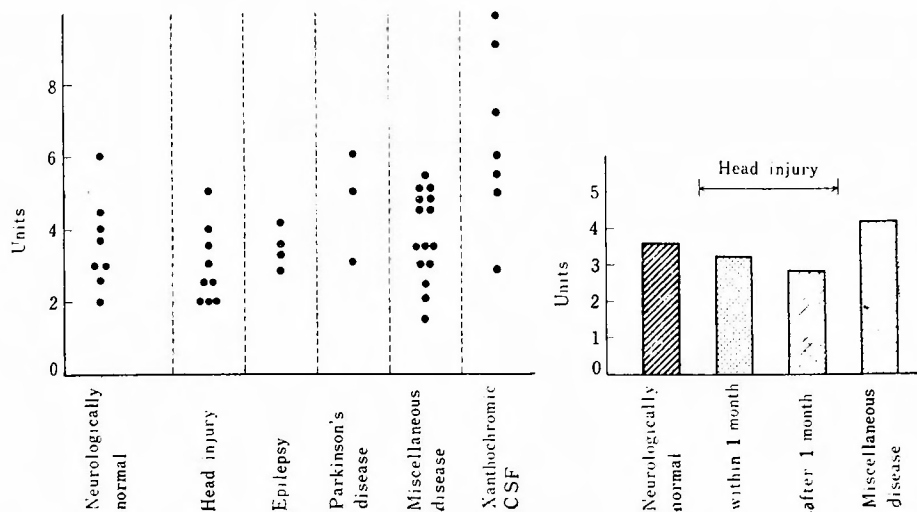


図9 RNase in cerebrospinal fluid

もやはりこの問題を検討した。

かくして総数46例の患者について測定をおこなつたのであるが、図9のごとく大体2～6単位の間にある。頭部外傷をはじめ、癲癇、錐体外路系疾患その他の疾患においてもとくに著明な増加は認められず、ただXanthochromicな髄液において、比較的高い値が認められたにすぎない。すなわちこれらの結果は、さきへのべた組織化学的な検査結果と一致しなかつたわけである。

#### 4) 各種脳神経疾患患者髄液中のアスコルビン酸含有量

以上の実験で、髄液中の265m $\mu$ の吸収が核酸に由来するものではなく、実はアスコルビン酸に由来していることが明らかになつたわけであるが、しからば脳神経外科患者髄液中ではアスコルビン酸はどのような変動を示すかを酵素化学的に検討した。

各神脳神経疾患について髄液のアスコルビン酸含有量を測定した結果を図10に示す。

1) 神経学的に正常な症例すなわち、虫垂炎、ヘルニア、痔核などの患者(14例)で、腰椎麻痺時に採取した髄液について検査したところ、年齢による差異は認められず、アスコルビン酸は4～10単位である。

2) 癲癇、パーキンソン氏病、脳血管性障害などの32例中ただ2例において髄液アスコルビン酸含量の低下が認められたが、他はすべて正常範囲内の値を示した。

3) 頭部外傷患者(20例)については、軽症例で受

傷後1ヵ月以内の症例(8名)では、全症例正常範囲内にあるが、受傷後1ヵ月をへて悪心、嘔吐、頭痛、めまいなどの自覚症状のあるものでは、9例中1例を除き、他はすべて正常値より低下している。なおとくに興味深いことは、受傷後1ヵ月以上を経過していても、自覚症状がほとんどなく、健康診断とか、陥没骨折の整復の目的で入院したような患者では、髄液中アスコルビン酸含有量は、正常範囲内であつたことである。

4) 脳腫瘍患者6名中4名において、髄液内アスコルビン酸の含量は低下していた。

5) 開頭術後の患者の髄液について検討してみると、術後しばらくはきわめて低値を示しており、日数の経過すなわち症状の軽快とともに正常にもどる傾向を示す。脳腫瘍患者で手術を受け、術後ふつうの日常生活の可能となつた4症例ではいずれも髄液内アスコルビン酸含有量は、正常か、むしろ正常より高い値を示した。そのうち1例については、1ヵ月ごとに3回測定したが暫次上昇していた(図10で白点)

6) 正常、頭部外傷1ヵ月以内、外傷後遺症(受傷後1ヵ月をへて、なお自覚症状のあるもの)、脳腫瘍、その他の疾患と5群に分け、ヒストグラムをみると図11のごとくである。すなわち各疾患群とも正常と比較すると、アスコルビン酸含有量は多少とも低下しているが、外傷後遺症患者髄液において、とくに低下の傾向がいちじるしく、ついで、脳腫瘍、その他疾患、頭部外傷1ヵ月内の順になつている。

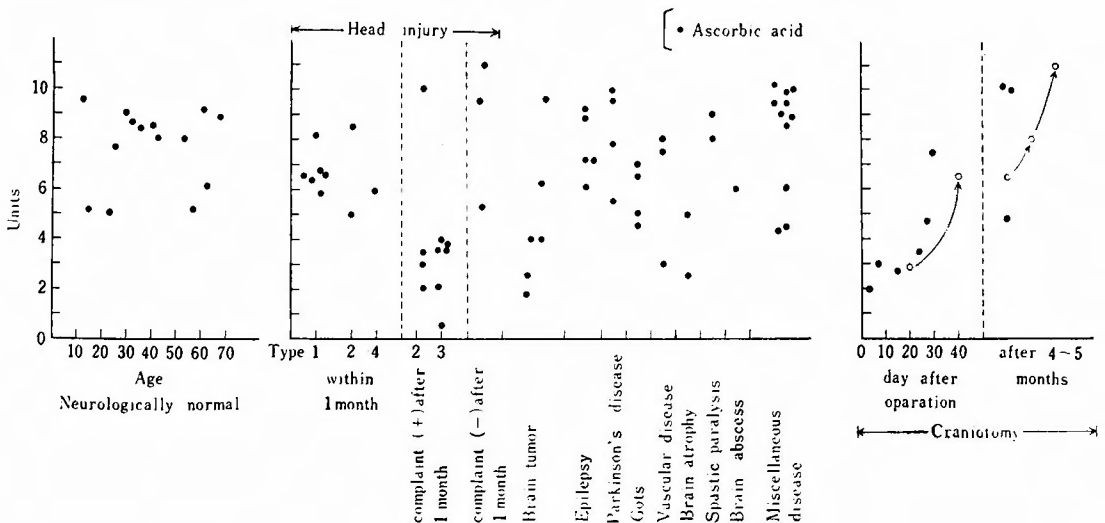


図 10 Ascorbic acid in cerebrospinal fluid.

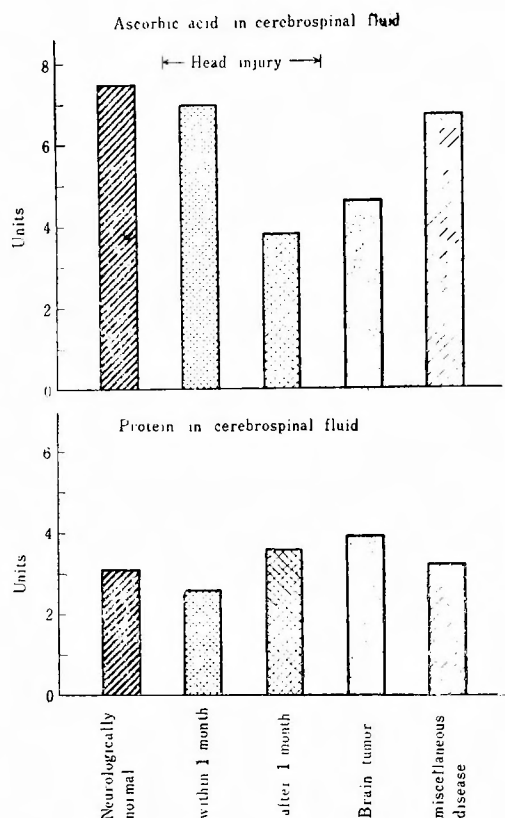


図11 Ascorbic acid in cerebrospinal fluid.

### 総括並びに考按

Spiegel, Kovacs らが核酸と信じていた髄液内265m $\mu$ の紫外部吸収は、われわれの酵素学的レベルでおこなった研究で、実はアスコルビン酸にほかならないことが判明した。また彼らが臨床診断的な意味をもたらそうと試みた265m $\mu$ の吸光度は、試料処理中に起こるアスコルビン酸の自動酸化を考慮に入れていないからほとんど信をおくにたりないものと断言できる。

また脳外傷患者髄液が、神経細胞のChromatolysisを起こし得ることは事実であるとしても、従来考えられてきたようにRNaseのみがChromatolysisを起こし得る唯一の要因であると結論することにはなお問題がある。

髄液内酵素の起源に関して、Kaplan は次のような考えをのべた。すなわち正常髄液内の酵素は脳、脊髓などの神経組織および血清から由来するものであり、種々の疾患時に見られる髄液の酵素活性の増加は、つぎの原因によるとのべている。

- ① 髄液内に酵素含有細胞 (enzyme containing cells) の増加
- ② 脳血液関門の透過性の異常
- ③ 脳あるいは脊髓組織の破壊にともなつてその組織の酵素が、髄液に流入する。

ところが、われわれの実験でXanthochromic な髄液では、RNase 活性が増加している例が多い事実、また最近、乳酸脱水素酵素、グルタミン酸-アスパラギン酸アミノ基転位酵素<sup>16-19)</sup> などの髄液内含量が、急性脳血管性障害や脳外傷にさいし増加すると報告されていることなどを考え併せると、これらの諸要因のうち脳・血液関門、あるいは、血液・髄液関門の透過性の異常がもつとも重要な役割をはたすものと思われる。

またChromatolysis が単一の酵素の作用にもとづいて発生すると考えるよりも複合酵素系の作用の連鎖反応によつて、はじめて起こり得ると考えた方がより妥当と思われる。ここにも単一酵素の定量的検査法としての組織化学の応用に限界があると信じられる。

われわれの研究でみられた各種疾患症例の髄液内アスコルビン酸含有量の消長が、病態生理学的になにを示すものか、いまだ不明であるが、頭部外傷陳旧症例にもつとも強く減少していたことはまことに興味深い事実といひ得る。

### 結 論

1) 髄液内の265m $\mu$ の極大吸収を示す物質は各種の生化学的手段による吟味の結果、核酸ないし、その関連物質ではなくアスコルビン酸であることも同定確認し、脳外傷のみならず正常対照例あるいは脳外傷以外の疾患症例の髄液においてもこの265m $\mu$ の吸収を示す物質が存在することが判明した。しかも貯置その他によつて、極大吸収が低下する現象は、アスコルビン酸の自動酸化にもとづくものと信じられる。

2) RNase の活性は、測定したかぎりにおいては、正常髄液においても比較的高く、頭部外傷患者の髄液が特に高いという事実はなかつた。

3) 頭部外傷を含む各種疾患患者髄液中のアスコルビン酸の変動について検索した結果、頭部外傷陳旧症例で、しかも種々の愁訴をもつ後遺症症例において、もつとも著明に減少していた。

稿を終るに当り、始終御指導を戴いた恩師荒木千里教授、石井講師並びに医化学教室の早石教授、久野助教授に深謝致します。

## 文 献

- 1) Spiegel-Adolph, M., Wycis, H. T., and Spiegel, E. A., Federation pro., 5, 156, 1946.
- 2) Spiegel, E. A., Spiegel-Adolph, M., and Wycis, H. T., Association for research in nervous and mental disease, 26, 84, 1946.
- 3) Strait, L. A., Aird, R. B., and Hrenoff, M. K., The ultraviolet absorption spectrum of cerebrospinal fluid: ascorbic versus nucleic acid. Science July., 18, 64, 1947.
- 4) Hach, M. E., The ultraviolet absorption spectrum of human cerebrospinal fluid. Biochem. J., 41, 522, 1947.
- 5) Spiegel-Adolf, M., Umlauf, C. M., and Szekely, E. G., Effects of convulsions induced by electric stimulation on the cerebrospinal fluid. J. Neuropathol, Exper, Neurol, 12, 363, 1953.
- 6) Kovacs, E., Ultraviolet absorption in normal and in pathological cerebrospinal fluid. Can. J. biochem. physiol., 32, 526, 1954.
- 7) Beauen, G. H., Holiday, E. R., and Johnson, E. A., The nucleic acid (Chargaff and Davidson, eds), Academic press, New York, 1: 526, 1955.
- 8) Louett-Janison, P. L., and Nelson, J. M., Ascorbic acid oxidase from summer crook-neck squash (*C. pepo condensa*) J. Am. Chem. Soc. 62, 1409, 1940.
- 9) Dawson, C. R., and Magee, R. J., Methods in enzymology., 2, 831, 1955.
- 10) Mc Donald, M. R., Ribonucleases in "Method in enzymology" Vol. 2, 427, 1955.
- 11) Steinman, H. G., and Dawson, C. R., On the mechanism of the ascorbic acid-ascorbic oxidase reaction. The hydrogen peroxide question. J. Am. Chem., 64, 1212, 1942.
- 12) Katzenelbogen, S., The cerebrospinal fluid and its relation to the blood. Johnes Hopkins press, Baltimore, P 221, 1932.
- 13) Kovacs, E., Autolysis in normal and pathological cerebrospinal fluid. Can. J. Med. Sci., 31, 358, 1953.
- 14) Einnarson, L., In "The metabolism of the nervous system" (Richter) p. 407, pergamon, press, 1957.
- 15) Kovacs, E., Nucleases in the cerebrospinal fluid. Can. J. Med. Sci., 31, 437, 1953.
- 16) Jakoby, R. K., and Jakoby, W. B., Lactic dehydrogenase of cerebrospinal fluid in the differential diagnosis of cerebrovascular disease and brain tumors J. Neurosurg., 15, 45, 1956.
- 17) Miyazaki, M., Comparative serum and cerebrospinal fluid transaminase in acute cerebrovascular disorders. Bull. of the school of medicine, Univ, of Mayland. 42' No 2, april, 1957.
- 18) Green, J. B., Oldewurtel, H. A., and Foreter, F. M., Glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) and lactic dehydrogenase (LDH) activities. Neurology., 9, 540, 1959.
- 19) Man, S. H., Cerebrospinal fluid-glutamic oxaloacetic acid transaminase in patients receiving electroconvulsive therapy and in neurologic diseases. Neurology., 10, 381, 1960.