

髄液中の Acetylcholine の定量について

京都大学医学部外科学教室学第1講座 (指導: 荒木千里教授)

中 原 弘

〔原稿受付 昭和33年6月26日〕

ACETYLCHOLINE IN THE CEREBROSPINAL FLUID

by

HIROMU NAKAHARA

The First Surgical Division, Kyoto University Medical School

(Director: Prof. Dr. CHISATO ARAKI)

In experimental head injuries in cats and dogs BORNSTEIN observed the appearance of acetylcholine (Ach.) in the cerebrospinal fluid together with the accompanying changes on the electroencephalogram (EEG). He also observed that when atropine was administered to those animals, the clinical symptoms and the EEG changes improved. TOWER and McEACHERN noticed the appearance of Ach. in the cerebrospinal fluid of patients after epileptic seizures, or after receiving heavy head injuries, and found that though choline-esterase (ChE.) in the cerebrospinal fluid was normal in the former, it was increased in the latter: he also found there was a relation between the rise and fall of Ach. in the cerebrospinal fluid and the severity and improvement of symptoms.

It has been claimed that Ach. never exists in the normal cerebro-spinal fluid but that the excessive or prolonged neuronal activity gives rise to the release of a large amount of Ach., after which a part of the Ach. that has escaped the destruction due to ChE. of the cell membrane, passes through the intercellular space and diffuses into the cerebrospinal fluid, bestowing ill effects on the surrounding cells. In order to block the harmful action that the Ach. released by head injuries exerts on the surrounding cells, WARD advocated atropine therapy to patients of head injuries and said that the dramatic effects were observed in some cases.

In order to precisely examine the appearance of Ach. in the cerebrospinal fluid after head injuries, I reinvestigated the methods of measurement of Ach. in the cerebrospinal fluid.

For the measurement of Ach., there are two ways: chemoassay and bioassay. As the amount of Ach. which appears in the cerebro-spinal fluid is extremely small, it cannot be measured by chemoassay because of its insufficient sensitivity. Therefore, I preferred the method of bioassay, using the rectus (abdominis) muscle of a frog or the longitudinal muscle of a leech. Though the sensitivity to Ach.

of the rectus muscle of a frog differs according to the species of the frog, I used the rectus muscle of a common frog in this country; "tonosama" frog (*Rana nigromaculata*). (Fig. 1) As for the longitudinal muscle of a leech, that of the "chisui" leech (*Hirdo nipponica* WHITMAN) or "shimaishi" leech (*Herpobdella lineata* O. F. MÜLLER) was used.

Before and after the measurement of Ach. in the fluid to be examined, the control tests of the liquids containing the Ach. of known concentrations are made in the same way and the degree of contraction of the muscle is compared with that of the fluid to be examined. Hitherto, there are two methods for recording the degree of muscle contraction in the mechanogram drawn for a certain time, for instance, for a duration of three minutes, on a white glazed paper blackened with soot. The first method is to make a standard graph of the angles of the contraction curves to the base line in various contraction curves obtained by the liquids containing Ach. of various known concentrations, and then to measure the angle in the curve obtained by the fluid to be examined and to compare it with the standard graph. The second method is to make a standard graph showing the distances from the highest point to the base of the curves obtained in the liquids containing various concentrations of Ach., and then to measure the similar top-base distance in the mechanogram for the fluid to be examined and to compare it with the standard graph. Having made a comparison of the two methods, I preferred the latter method because it was easier to practice and more precise.

In the test experiment using the Ach. diluted with RINGER solution, it was found that muscular contractions were brought about for several times by the Ach. solution of a certain concentration but the height of each contraction decreased successively. (Fig. 8) However, in this experiment, muscular contractions should be unaltered, at least, for several times. Thus in order to minimize the decrease in sensitivity, the eserine of the same concentration as that used for eserization (to be explained later) of muscles and a small amount of glucose were added to RINGER solution. The result was satisfactory. (Fig. 10)

Eserine concentration, adequate to eserization of the muscle, is said to be about 10^{-5} M. But in the experiments in which I examined the muscle contraction caused by eserine itself, it was found to be at a concentration of $10^{-5} \times 6$ M. that a very slight contraction was noticed for the first time. (Fig. 12) Therefore, for the measurement of Ach. in this study, the fluid containing $10^{-5} \times 2$ M. or $10^{-5} \times 3$ M. eserine was used. The time required for complete eserization of the muscle at room temperature was 30 minutes. The influence of pH. on the muscle contraction caused by Ach. was negligible within the limits from pH. 6.0 to p. H. 8.0. (Fig. 14)

As to the influence of osmotic pressure, no great change in muscle contraction was observed with the difference in salt osmotic pressure of the body fluid both of a man and of a frog (whereas colloidal osmotic pressure had some effect).

Though there were individual differences, the threshold of sensitivity to the Ach. of the rectus muscle of the frog was usually 0.01 γ /cc but with the acetone-

sensitization test advocated by Hsi-CHUN CHANG and others the threshold became 0.004 γ /cc. (Fig. 15) The sensitivity to Ach. of the longitudinal muscle of a leech was higher but as the muscle expanded and contracted, to a certain extent, by the load and, moreover, as the reaction was so sharp that a slight stimulation caused a change in length, it was quite difficult to manipulate and therefore inadequate for practice. It was also impossible in a leech muscle to increase acetylcholine sensitivity by adding acetone.

In twelve patients of cerebral concussion, cerebrospinal fluids were punctured 20 minutes or more after the head injury and examined but no Ach. was detected. In three cases of severe head injury (cerebral contusion) the faintly hemorrhagic cerebrospinal fluid was examined during the period from 40 minutes to three days after the injury but in all cases Ach. was negative.

In the experimental animals, I struck the parietal region with a mallet or surgically damaged a part of the brain. The former procedure was done in sixteen cases of dogs and four of cats. After the injuries which were from slight to fatal, suboccipital puncture was periodically repeated and Ach. in the cerebrospinal fluid (with no or only slight mixture of blood) was measured by using the rectus muscle of a frog, but only 0.0034 γ /cc of Ach. was detected in the one case of cats; the remaining cases all showed no Ach. reaction. In cases of surgical injury of the brain, the cranium was opened, and the cerebral cortex was destructured through the dura mater with a needle, or contused with a forcep or with a glass rod after opening the dura mater. Then cerebrospinal fluid was taken by suboccipital puncture and examined with the rectus muscle of a frog. However it was only seldom seen that an Ach. value was from 0.0063 γ /cc to 0.052 γ /cc.

The cerebrospinal fluid in fourteen cases of epileptics in the seizure-free periods, and in three cases during seizures or immediately after seizures was taken by suboccipital puncture and the Ach. was measured, but all of them showed negative results. Moreover, intravenous Pentazol was given to three epileptics in order to provoke a seizure, and the cerebrospinal fluid was taken by suboccipital puncture immediately after or within 10 minutes after the seizure. Besides, in five dogs electric shock was done after which suboccipital cerebrospinal fluid was taken. All of the Ach. measurements by applying these fluids to the longitudinal muscle of a leech gave negative results.

Thus in my study, there were only few cases in which Ach. appeared in the cerebrospinal fluid after head injuries etc. Moreover, the Ach. in the fluid in such cases was less in amount than what had been reported and tended to appear in a shorter time after head injuries.

緒 言

1946年 Bornstein¹⁾は犬及び猫に実験的頭部外傷を与え、髄液中に Acetylcholin (Ach) の出現を認めると同時に Elektroencephalographie (E. E. G.) にも

変化を来すことを証し、且つ Atropine 投与により、その際の臨床症状の好転並びに E. E. G. の改善を認めた。

又逆に Ach を後頭下穿刺により大槽内に注入すると、E. E. G. 及び臨床症状の上に、頭部外傷に続発す

る変化と良く似た変化を来すこと、及び之が適量の Atropine 注射により防止可能であることを述べている。Tower 及び Mc Eachern⁷⁾ は顛癇発作後の患者や重症頭部外傷患者の髄液中に種々の程度に Ach の出現を認め、Choline-esterase (ChE) が前者では normal、後者に於ては異常を呈することを発見し、又、髄液中の Ach の消長と症状恢復とは関連があることを認めた。元来正常髄液中には Ach は決して存在しないと云われているが異常に強度な神経活動は多量の Ach を放出し、その際細胞膜の ChE による破壊を免がれた Ach が細胞間隙を通り、周囲細胞に異常効果を与え、髄液中に拡散して出現すると云われている。頭部外傷の作用によつて放出されたこの Ach の周囲細胞に与える cholinergic 作用を block する意味で Ward⁹⁾ は頭部外傷患者に Atropine 療法を提唱し、一部には劇的な効果を認めている。然し乍ら確実な効果を認めたものは全症例の20%であると云い、又連日 0.1g と云う用量は彼自ら述べている如く中毒量に近いと思われ、事実全使用例中約25%に心臓に明瞭な変化を認め、為に心臓疾患のある患者にはこの療法は行い得なかつた。Ruge¹⁰⁾ は犬を用いた頭部外傷の実験で、髄液中に Ach の出現を認め、副交感神経性の症状が Atropine 又は Atropine と Banthine の混合投与により恢復する事を認めている。

頭部外傷後髄液中に Ach の出現することは今や定説化しているようであるが、この正確な追試を行う為に、先ず髄液中の Ach の定量法について検討してみた。

実 験

Ach の定量法には種々方法があるが化学的方法と生物学的方法とに大別することが出来る。化学的方法で簡単且つ十分な感度を持つた方法があれば理想的であるが、最も優れた方法といわれる1949年 Hestrin⁵⁾ の Hydroxylamine を使つた比色定量法でも終末溶液の Ach 濃度上昇 $5\mu\text{M}/\text{cc}$ (900 γ)、下界は約 $0.04\mu\text{M}/\text{cc}$ (約7 γ) であると云われ、一方髄液中に出現すると云われる Ach 濃度はこれよりも遙かに微量であるから、この方法では測定不可能である。それで我々の実験は生物学的方法によつた。

使用動物

生物学的方法には1929年 Dale と Dudley が家兎を用いて以来種々動物が使用されているが、用いる器官乃至反応は3群に分類出来る。

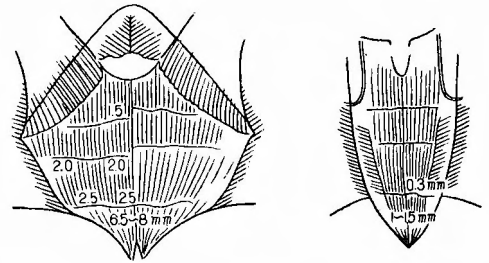
第1群—Ach による筋肉又は小腸の収縮をみる方法。筋肉は蛙、蛭のもの、小腸は家兎、モルモット等のもの。

第2群—心臓運動の抑制制度を知る方法。家兎、蛙、二枚貝等。

第3群—血圧を利用する方法。猫、兎等が使用された。

このうち最も鋭敏なのは海産二枚貝 *Venus mace-naria* の心臓収縮抑制制度を利用する方法で、文献⁹⁾によれば最低 $5 \times 10^{-5}\gamma/\text{cc}$ を測定し得ると云われている。Chang 及び Gaddum は最も満足すべき test objects として蛙腹直筋、及び蛭背筋²⁾ を挙げているが、この方法は感度が比較的鋭敏である事、使用法簡単で複雑な装置等を必要としない事、比較的容易に入手し得る事、等の利点があるので、我々は蛙腹直筋又は蛭背筋を使用する事にした。

文献¹⁰⁾によれば Ach に対する感度は蛙の種類によつて異なるようで、我が国には両棲綱無尾目の10数種を産するが、最も普遍的なのは“がま” (*Bufo vulgaris*) 及び“とのさまがえる” (*Rana nigromaculata*) であるから最初“がま”を使用して見たが成熟した“がま”の腹直筋は第1図に示す如く非常に大きく、最も厚い



第 1 図

Bufo vulgaris 380g 男 *Rana nigromaculata* 55g 男

所は 6.5mm~8mm あり、薄い所で 1.5mm~2mm ある。一方“とのさまがえる”では薄い所で 0.3mm 位で丁度紙の様に半透明で内臓も透見出来る程である。従つて“がま”腹直筋では、Ach で一旦収縮させた場合、Ringer 液で洗滌して元へ戻すのに“とのさまがえる”の腹直筋に比して2倍以上の時間をかけても、尚完全には恢復し難い。又冬期になると“がま”は Ach に対する感度が特に低下して来るように思われ、相当高濃度でも反応しない場合がある。“とのさまがえる”は降霜前に体表に傷のないものを注意して土中に囲うと、十分使用に耐えるので、我々は“とのさま

がえる”を使用することにした。

筋標本採取法

従来蛙を不動性にする為に錐で延髄を破壊していたが、それでは反射運動が残り、刺激を与えると下肢を相当強力に動かすので、我々は次のような方法をとった。即ち写真1のように鼓膜の後縁を結ぶ正中線上で錐を脊椎間に刺し、その錐を尾側に向い脊椎孔内に刺入すると、下肢に強直性の痙攣を起し、完全に麻痺して固定台不用となる。この操作は慣れると全然出血もなく、濡れ布巾を掛けておくと、夏季でも蛙は24時間以上生きている。筋肉片の採取は大きく腹部皮膚に正中切開を加え、写真2のように鋼状突起の下端から側方に4~5mm、更に下方に25mm~30mmの短冊形の筋肉片を採取した。



写真 1.

使用薬品

Eserine, Acetylcholine 及び冷血動物用 Ringer-Lock 液の3つである。

1) Eserine—潮解性の強い硫酸塩を避けて、潮解性のないサリチル酸塩を使用した。Eserine は溶液のまま、でよく、時日とともに漸次分解してRuberineを生じ、赤色を呈するので、少量の溶液を作り魔法瓶の氷中に貯える。

2) Acetylcholine—Ovisot (第一製薬製)を使用した。之も非常に潮解しやすく、アンプルの底に白色の固い結晶の盤固着しているが、取り出して秤量中に吸湿して潮解してゆくの、実験の Standard として、是非とも正確な値を知る必要上、次のような操作を行つた。第2図の如くアンプルの底近く硝子切で横にきづを入れた後、之を正確に秤量する。秤量後熱硝子棒で罅を横に拡大してアンプルを一周すると簡単に

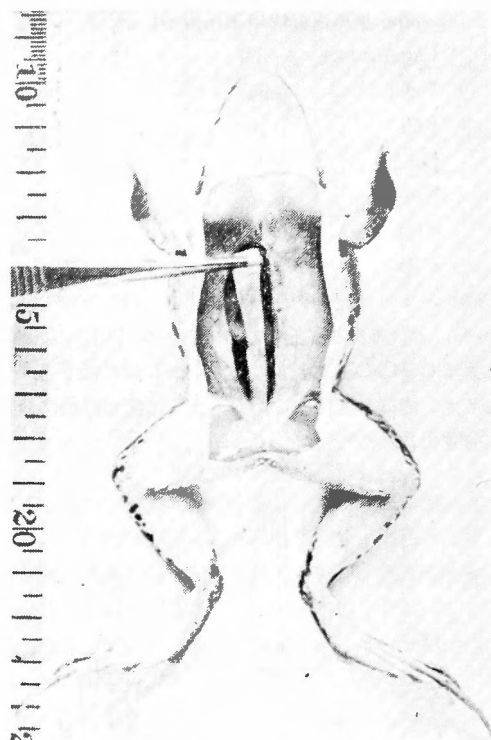
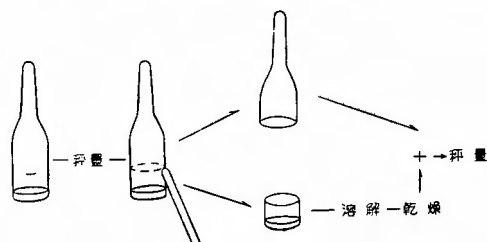


写真 2.



第 2 図

上下に割れるが、この下の Ach の固着した部分をメスコルペンへ入れ均等に溶解後、この硝子片を取り出し水洗乾燥後、上部の硝子片と一緒に再び秤量し、前回の値との差からAchの量を知るのである。このAchは非常に不安定な薬物で温湯や、アルカリによつて直ちに分解すると云われるので、之も魔法瓶中に保存する。

3) 冷血動物用 Ringer-Lock 液—初め冷血動物用 Ringer 液単独を使用した。後述の理由により、次の処方の Eserine 加冷血動物用 Ringer-Lock 液を使用した。

Eserine 加冷血動物用 Ringer-Lock 液

Eserine $10^{-5} \times 2 \sim 3M$

NaCl 0.65

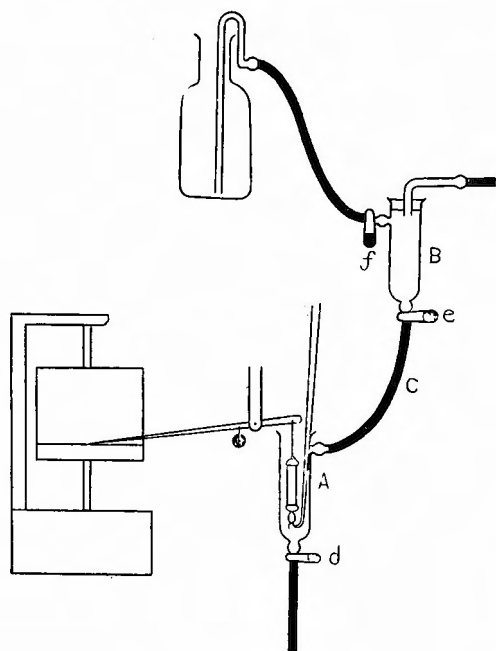
KCl 0.02

CaCl₂ 0.02NaHCO₃ 0.02

Glukose 0.2

H₂O 100.0

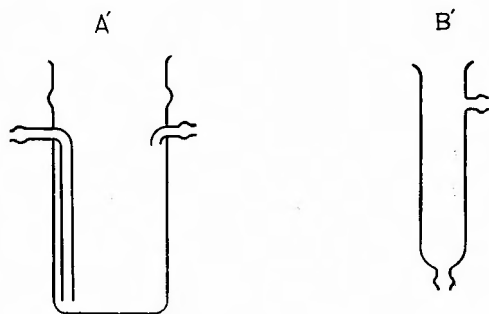
尚注意すべきは Ringer-Lock 液の pH. を蛙の体液の pH. と同じ 6.8 に修正するのであるが、修正後長時間放置すると CaCO₃ の沈澱を生じ、pH. 値の低下とともにイオン濃度が変化するから、pH. は使用直前に修正すべきである。



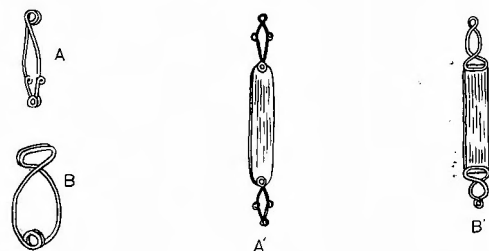
第 3 図

測定装置

第 3 図の如きものを使用した。筋標本は A の硝子容器の中につるし、塗煤した円筒紙上に横桿で描記させる。A の容器については、通常第 4 図の A' のような容器が使用されているが、之は底部に液が残留して濃度が不正確になり、又内部の硝子管の為に洗滌にも不便であり、又小型にすると、この内部の硝子管が操作の邪魔になるので、第 4 図の B' のような内容 6cc のものを使用した。セルビンについては、従来第 5 図の A のような鉄製のものが使用されているが、錆びやすい事



第 4 図



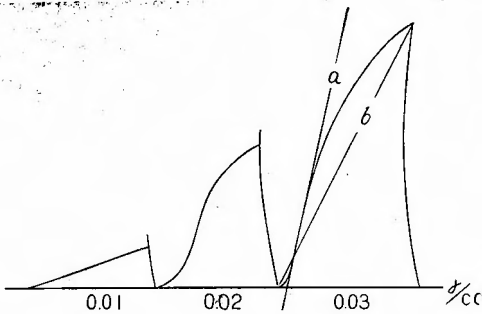
第 5 図

と筋肉片の一部しか挟めないで、我々は B のような幅の少々広いステンレス製のものを使用した。筋標本を横桿に連結する糸としては、湿度に上より伸縮し、且つ巻癖のある絹糸をさけ、釣糸の 1 厘ビニール糸を使用した。

Ach 測定法

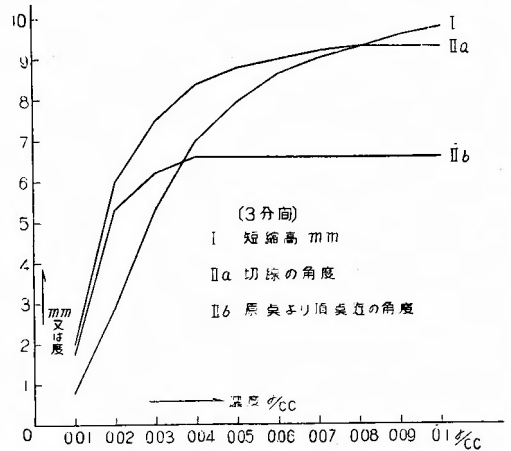
生物学的検査法では、その原理として、被検液中の Ach の定量の前後に、既知濃度の Ach 液を作用せしめその時の筋標本の収縮の度を被検液による収縮の度と比較して定量する。収縮の度を比較するのに、従来 2 つの方法が用いられている。その 1 つは各種濃度の Ach 液による筋収縮曲線を油煙紙上に描かせ、其の曲線が基線となす角度を測り、Ach 濃度を横軸に、各濃度に相当する収縮曲線の角度を縦軸にとつて Ach 濃度感度曲線を描いておき、次に被検液による筋収縮の上昇角度を測つて、さきのグラフよりその濃度を決定する方法である。他の 1 つは被検液の測定前後に、既知濃度の Ach 液による筋収縮を起させる事は同様であるが、Ach 感度曲線は横軸に Ach 濃度、縦軸に一定時間内の基準線よりの収縮高を以てグラフを作り、被検液についても同様同一時間内の収縮高を測り、それをグラフにあてはめてその濃度を出す方法である。

今試みに 2~3 の濃度の Ach 液により 3 分間筋収縮曲線を描かせしめると第 6 図の様な曲線を得るが、



第 6 図

第一の方法、即ち曲線の上昇角度を測る方法によると、0.01 γ /cc 程度の低濃度では上昇角度は簡単に測定出来るが、0.03 γ /cc $\sim$ 0.05 γ /cc 程度では収縮曲線に脚の部が生じ、又更に高濃度では脚の部は著しく短縮するか消失するが、曲線が円弧状をなすので、この上昇角度は厳密には測定困難であり、仮りに脚の部を除外し、それにつゞく上昇部分の切線を以て測るとしても矢張り多分に主観的となり、不正確である。(a線)そこで、若し一定時間、例えば正確に3分間収縮曲線を描記せしめ、この曲線の頂点と原点を結ぶ直線をひきそれと基準線とのなす角度を測定値として採用し得る筈であるが、(b線)それにはキモグラフィヨンの廻転速度を正確に一定にしなければならない。次に第2の方法では、一定時間、仮りに正確に3分間収縮曲線を描記せしめ、その曲線の頂点の基準線からの高さを測定すればよく、廻転速度は無関係である。今この第一の方法と第二の方法により、前述の0.01 γ /ccより0.1 γ /cc迄の各濃度に於ける各筋収縮曲線から感度曲線を作成し、比較検討して見ると第7図の如くである。即ち第2の収縮高測定法による感度曲線は第1の上昇角度測定法による曲線に比し傾斜大なる故に、測定能力大なりと云い得る。又0.01 γ /cc $\sim$ 0.04 γ /cc間及び、0.06 γ /cc $\sim$ 0.1 γ /cc間が略、直線状をなすことも測定上便利



第 7 図

であり、又収縮高を測ることは角度測定より遙かに簡便である。又収縮高は塗煤油煙の厚薄や、始動時終末時等に於ける廻転速度の変化には無関係である。

以上の理由により、我々は感度曲線作成には第2の方法、即ち収縮高を測る方法によつた。

Standard 作成

被検液中の Ach 濃度測定には、前述の如く既知濃度の Ach 液による感度曲線を描いておき、次いで被検液による筋収縮を測つて Ach 濃度を求めるのであるから、先ず標準 Ach 濃度感度曲線を正確に作っておかねばならない。

当初0.01 γ /ccから0.1 γ /cc迄の標準Ach液を作り、それによつて筋収縮を起させると、Ach濃度が大なるにも拘らず、かえつて収縮高が減ずる場合があつた。そこで試みに0.05 γ /ccの同一濃度で、収縮を繰返し起して見ると、写真3及び第8図のように同一濃度にも拘らず、収縮高は確実に減衰してゆく。之は収縮、即ち筋標本の Ach に対する感度の低下であり、之は第一の方法、即ち収縮曲線の上昇角度から検討しても同

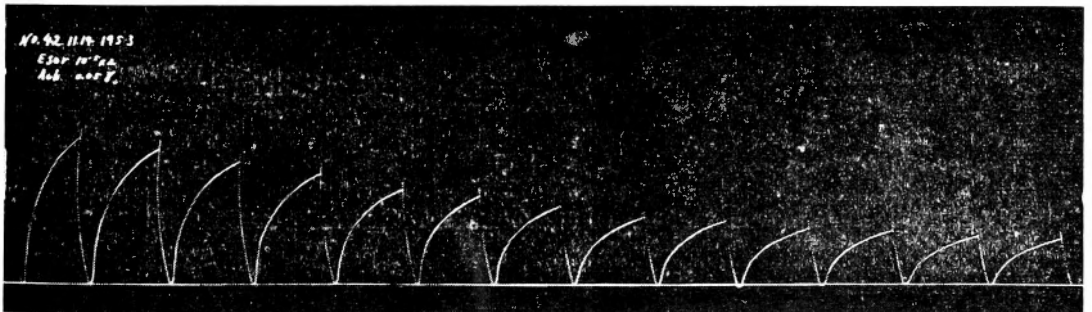


写真 3.

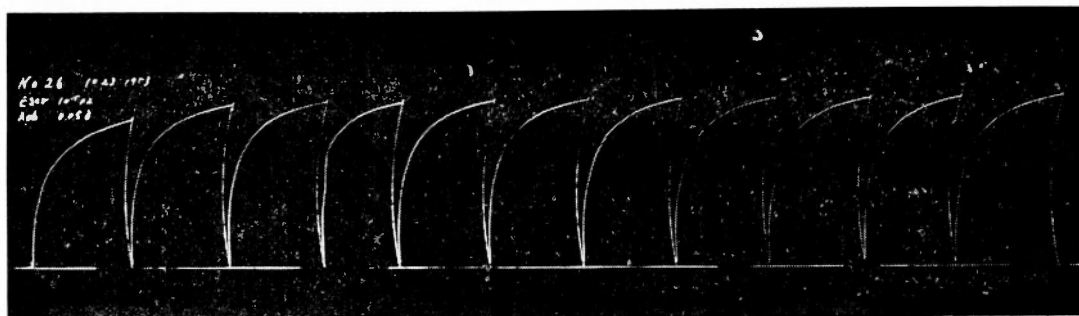
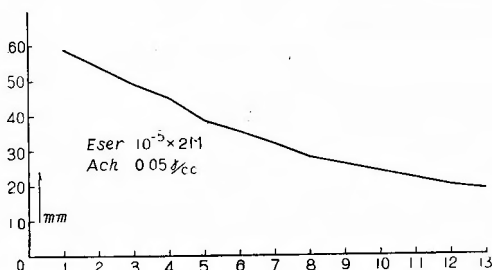
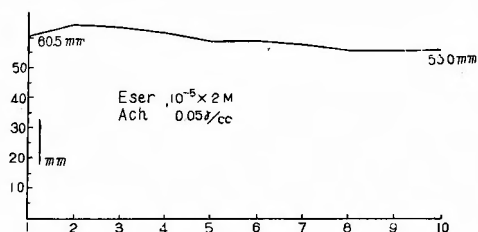


写真 4.



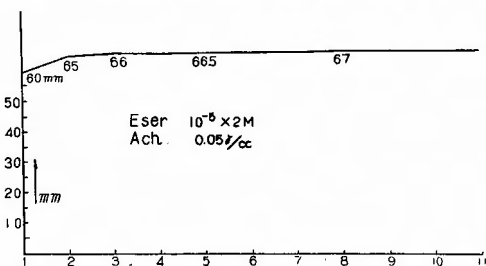
第 8 図

様の感度低下を証明出来る。然るに被検液中の Ach 濃度測定のためには、少くとも数回の収縮の間は感度の変化がないか、少くとも最少限度であることが必要である。感度低下の原因として、筋標本の疲労はその一つの要因として当然考えられるが、第 1 回の実験で Ach 液により収縮せしめられた筋標本は、Ringer 液にて Ach を洗滌除去し元の状態にかえされた後、再び第 2 回目の収縮を行わせるのであるが、この際に Eserinization により増感された筋組織中の Eserine も同時に洗滌除去されて、筋標本の Ach に対する感度が低下するものと考えられる。即ち Eserine は Ach 分解酵素 ChE 作用を抑制するが、両者の作用は可逆的で Eserine が除去されると ChE が働き、Ach に対する感度低下として現れるものと考えられる。そこで洗滌用 Ringer 液中に Eserinization の際と同濃度に Eserine を加え、Ach 洗滌により Eserine が筋組織中より流出しないようにして、再び同様の実験を繰返すと第 9 図の如くなる。即ち洗滌 Ringer 液中に Eserine を添加した場合、減衰度は添加しないものに比し遙かに軽減されたが、尚相当の感度低下は免がれない。又ここで注意すべきは 2～4 回目の収縮に於て第 1 回目よりも多少感度が上昇すること、之は殆んどすべての場合に出現し、又前述の Ringer 液の



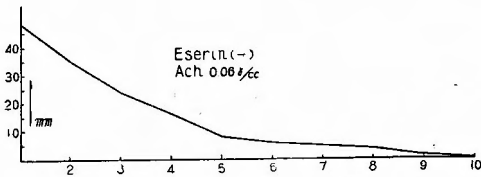
第 9 図

みで洗滌する場合にも出現することがあるが、感度低下が急激な為に第 8 図の如く明瞭でない場合が多い。以上述べた如く、洗滌 Ringer 液に Eserine を添加することにより感度低下は或る程度防止されたが、尚十分とは云えない。我々は種々実験の結果、更に葡萄糖を添加することにより、即ち Eserine 加冷血動物用 Ringer-Lock 液にて洗滌することにより写真 4 及び第 10 図に示す如く略々この目的を達し得た。尚、こ



第 10 図

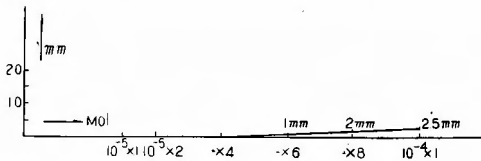
の際にも初期に漸次感度が上昇し、3～4 回後に略一定となる。この感度一定になるに要する回数は室温の高い程少く、低い程多い傾向がある。次にこゝで更に検討を要する問題は筋の Ach 感度低下防止に、葡萄糖のみの添加では如何と云う点である。即ち Eserine を含まぬ Ringer-Lock 液にて実験を繰返してみると第 11 図の如く著明な感度の低下を示す。即ち感度低下防



第 11 図

止にはこの両者の合併が是非必要なことが証明された。

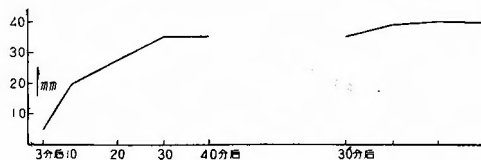
Eserine の濃度—筋標本の Eserinization の際と洗滌液中に添加する Eserine 量とは同一としたが、この Eserinization の際の Eserine 濃度は $10^{-5}M$ 程度と云われている。実験的に Eserine そのものによる筋収縮につき検討してみたが、第 12 図に示す如く $10^{-5} \times 6M$ に至り、初めて極く軽度の収縮が認められるが $10^{-5} \times 4M$ 迄は全く無影響である。又 $10^{-5}M$ よ



第 12 図

り $10^{-5} \times 4M$ 迄使用してみて、その間に殆んど相違を認めない。我々は $10^{-5} \times 2M$ 又は $10^{-5} \times 3M$ 液を使用した。

Eserine 増感時間—Eserinization の時間は従来 30 分と云われている。果して 30 分で十分であるか、又更に短時間でも足りるのではないかと云う疑問を持ち次の実験を試みた。之は当然温度及び Eserine 液濃度に関係すると思われるが、室温 $24^{\circ}C$ 、Eserine 濃度 $10^{-5} \times 2M$ では略々 30 分で完了する。即ち第 13 図の左側に示す如く、30 分（第 4 回目収縮）で最高感度に達



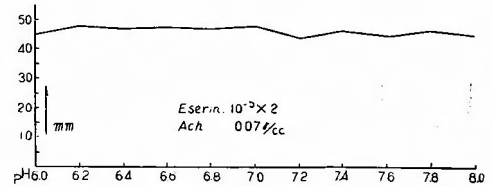
第 13 図

している。然し乍ら、こゝに考慮すべき事は、前述の如く Eserinization 後に於ては、同一条件で 2～4 回 Ach. 収縮を繰返して後、始めて最高感度に達するということである。この反復の影響の程度を知る為に、

同一蛙の反対側の腹直筋を使用して 30 分間 eserinize し、Ach の同一濃度により収縮を繰返すと、第 13 図の右側に示す如く第 3 回目で最高感度に達し、然もその感度上昇傾向を左右比較してみると、Eserine が明らかに時間的に感度に関与し、且略々 30 分で Eserinization が完了することがわかる。

pH. の影響—蛙の体液の pH. は 6.8 で、人間の髄液のそれは 7.4～7.6 である。又、人血清の ChE の至適 pH' は 8.4～8.5 で pH 値を下げれば当然作用低下してくるが馬血清の ChE は pH 6.0 以下では作用しないと云われている。従つて採取した被検髄液は直ちに Eserine を加えると同時に pH. 6.0 にして測定準備完了迄冷蔵しておくが、之を測定する際に、改めて蛙の体液の pH 6.8 に、再補正を要するか、否かを検討してみた。

pH. 6.0 から pH. 8.0 迄 0.2 の差で 11 段階に亘つて収縮せしめると、第 14 図に示すように、殆んど pH. による変化を認めない。之の点、海産二枚貝 *Venus maccanaria* の Ach 実験でも pH. の広範囲の変化によつて成績に影響を受けない、と云われていることとよく一致する。



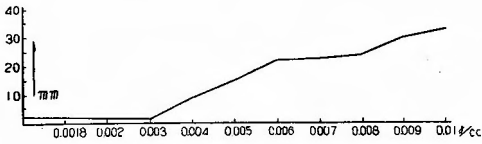
第 14 図

浸透圧の影響—蛙の体液の浸透圧は人間のそれよりも低いから、採取髄液を種々に稀釈して作用せしめた場合に、そのことが筋収縮に何等か影響すると思われる。それで冷血動物用 Ringer-Lock 液を温血動物用 Ringer-Lock 液と適当に混合して、即ち塩類浸透圧を変化せしめて、それによる筋収縮の変化を調べたところ、浸透圧上昇につれ、筋収縮も軽度上昇気味であるが、大した差はなく、誤差範囲に入る程度である。然るに髄液を高濃度で使用了場合には、膠質浸透圧その他種々の質的因子の影響によると思われるが、筋標本の緊張が増加する。従て含有される Ach が低濃度の時にはこの点に注意すべきものとする。

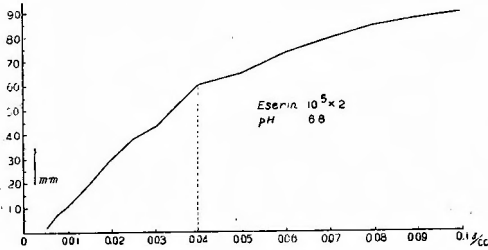
最高感度—蛙腹直筋の Ach. に対する最高感度は種々個体差があるが、通常 $0.01\gamma/cc$ であつて、特に鋭敏なものでは $0.0025\gamma/cc$ 迄検出している。

Aceton 増感法—1949 年 Hsi-Chun (Chang) 等は蛙の腹直筋を用い、Aceton を加えることにより Ach 感

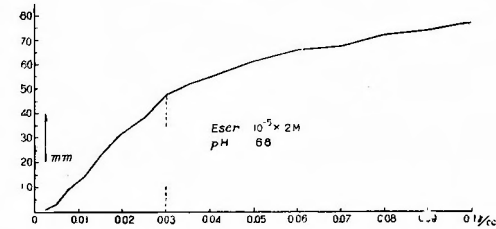
度を数倍に増強する方法を発表している。この際ChE及び Eserine の作用は無影響と云われ、通常の方法で Ach が検出されない場合に行えば、非常に好都合であると思う。この方法で我々は第15図の如く最高感度0.004 γ /ccを検出した。第15図



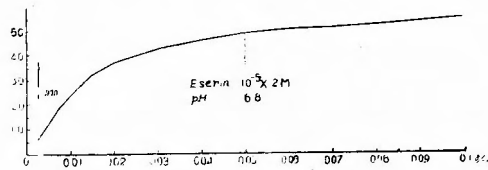
第 15 図



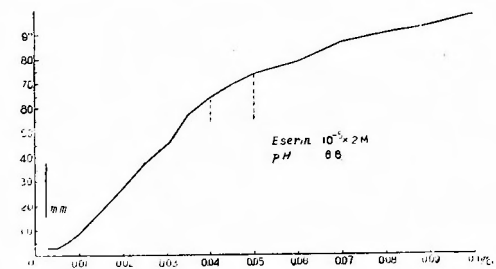
第16図



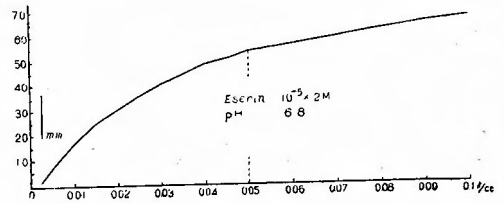
第17図



第18図

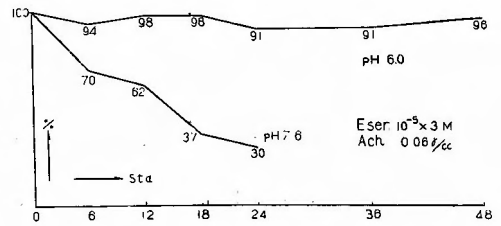


第19図



第20図

Standard 作製—第16図に示す如く、0.01 γ /cc より0.1 γ /cc迄の Ach 液を筋標本に作用せしめ、この収縮高を以てグラフを描き、被検液の収縮高との比例的関係から、稀釈倍数計算の上、被検液中の Ach 濃度を出すわけである。筋標本の長さや収縮率は各標本毎に異なるから、この Standard は各標本毎に作らねばならない。この Standard の数例を示すと第16～第20図の如くであるが、各図を通覧すると 0.03 γ /cc～0.05 γ /cc



第 21 図

を境として、一側又は両側に、略々直線をなすと思われる部分が出現するが、かゝる標本では被検液の収縮高がこの直線部分に来るように稀釈すれば、Ach量は比例的関係から容易に計算されるわけである。

蛭

1933年 Chang 及び Gaddum は最も満足すべき test object として蛙腹直筋と蛭背筋を挙げているのは前述の通りであるが、我々も蛭（ちすいびる *Hirido nipponica* Whitman, 又はしまいしびる *Herpobdella lineata* O. F. Müller）を数十匹使用した。

蛭の体の中央部を 1～1.5cm 長に剪刀にて切断し、次いで両側面より切開し、背部と腹部とに分け、この背側部に附着せる白色の内臓神経組織等を除去すれば純粋な滑平筋標本を得るといわれる。之を eserinize して増感して使用するが、この筋標本の長さは荷重により或る程度伸縮自在で、且僅かな刺激で鋭敏に反応して長さが変わるため、蛙腹直筋に比し遙かに扱い難く定量的検査には稍不適當のように思われる。但し、感度が比較的鋭敏で、又冬期も池、沼等で容易に採取

し得る利点がある。然し乍ら蛙腹直筋にては Aceton による増感可能であるのに反して、蛙に於ては Aceton で筋の緊張度低下し、増感不能である。

人間の髄液使用の場合の予備実験

今仮りに Ach を含んだ髄液が採取されたとして Eserine を加えずに室温に之を放置した場合に、時間の経過と共に果してどの程度 Ach が破壊されないで残るものかを検討してみたのである。

室温25°C pH.7.6 の髄液に、仮りに Ach を 0.06γ/cc の割合に加えてみると Ach は急速に分解され、蛙腹直筋標本では 8分30秒乃至13分後には反応全く消失して Ach は検出されない。尤も、この髄液は normal のものであり、従つて ChE 量も normal と推定され、実際の頭部外傷等の場合には ChE 作用の変化があり、又 Ach も相当多量に出現するといわれているので、全部このように速に消失するわけではあるまいが、髄液中に拡散して来る Ach は ChE により、少くとも頭部外傷後の初期には、かなり速に分解されるであろうと考えられる。

髄液中の ChE は血清中の ChE の 1/90~1/150 といわれており、従つて血液が混入する場合には、更に速に Ach は分解されるものと思われる。この点血液混入多量な髄液での測定は無駄であり、従て髄液採取時に於ても血液が混入しないように注意すべきは勿論である。

更に前述の Ach 加髄液に Eserine を添加し、ChE の酵素作用を抑制して、同一実験を行つてみると、24 時間後には Ach 含有量は 30~65% に低下するが、尚よく証明出来る。更に又、之を pH. 6.0 に下げて冷蔵すると、第21図に示すように48時間後、pH. 7.6 のものでは反応消失するのに反し、pH. 6.0 のものでは殆んど破壊されずに Ach が存在する。以上の実験により、採取された髄液は、直ちに Eserine を添加し且 pH. を 6.0 に下げて氷中に貯えれば、かなり長時間定量実験に使用可能と推定される。

Ach 定量測定

脳振盪—人間の重症頭部外傷及び動物（犬、猫）の実験的頭部外傷の際に髄液中 Ach 出現の報告があるが脳振盪の際に果して Ach が髄液中に出現するものかどうかを検討してみた。

症例 第1例武○滝○郎、51才、男子。

昭和29年8月5日午後4時20分頃自転車にて道路進行中トラックと衝突して、頭部を強打し、約25分間意識不明であつた。受診の結果、後頭部挫創の他は何処

にも外傷はなく、受傷後約40分で水様透明の髄液を採取しているが、蛙腹直筋による検査の結果、Ach は陰性であつた。

第2例 斎○好○、15才、女子。

昭和29年8月13日午後10時20分頃スクーターの後に乗つていて転倒、左側頭部を強打し、十数分間意識不明であつた。直ちに入院し、その後一時稍々興奮状態となつたが、側頭部に鶏卵大の血腫がある他、著変を認めなかつた。受傷後僅に約20分を経た午後10時40分に、水様透明の髄液を採取しているが、検査の結果陰性であつた。

受傷後約20分というのは髄液を採取し得る最短時間と考えられる。

以上の他に合計10例の脳振盪の患者について、何れも水様透明の髄液を受傷後種々な時間に採取して検査しているが、Ach は全く検出されなかつた。

その他重症頭部外傷（脳挫傷型）3例（1例は入院後4時間にて死亡）について、受傷後40分より3日迄の間に何れも軽度血性髄液を採取して検査したが、Ach は陰性であつた。

動物実験—頭部外傷の方法としては、頭頂部打撲と手術的直接損傷とを行つた。

1) 頭頂部打撲

犬16例、猫4例を用い、イソミタールを静脈内、又は皮下に与え、軽度麻酔下に、重量1kg の木槌を片手にもつて頭頂部を数回強打し、軽度外傷のものより致死的なもの迄、各段階の外傷を与え、打撲直後より数時間後迄、経時的に後頭下穿刺にて髄液を採取し、蛙腹直筋にて Ach 検出を試みた。採取髄液は水様透明のもの（13例）より軽度血液を混入し稍々淡紅色程度のもの（7例）迄は使用したが、肉眼的血液混入強度のものは Ach 検出の意味なしと認め、使用しなかつた。このうち犬1例、猫1例では、0.5mg/kg の Eserine を皮下に与え、又猫2例では 1.2mg/kg の Eserine を同様皮下に与えて検出を試みているが、eserinize しない猫1例に於て髄液中 0.034γ/cc の Ach を検出したのみで、他は全て Ach 陰性であつた。

2) 手術的直接損傷

上述のように頭頂部を木槌にて強打して頭部外傷を与える方法では、脳への損傷の程度が不定で、屢々蜘蛛網膜下出血の爲髄液に血液を混入し、時には多量の血液を混ざる為、Ach 測定不能となる。そこで以下述べる如く手術的に頭蓋を開き、可及的出血を避けつゝ皮質へ確実に外傷を与える方法を行つてみた。動物はす

べて犬である。

i) 頭蓋を開き、硬膜上より針にて皮質破壊。第1例、頭頂部皮質破壊15分後、後頭下穿刺にて3.5cc 髄液採取、蛙腹直筋使用。第2例、頭頂部皮質破壊直後2分30秒後、5分後、後頭下穿刺にて髄液採取、蛙背筋使用。以上何れも Ach 陰性。

更に頭蓋を大きく開き、更に広範囲に脳を破壊したもの。

第3例、頭頂部皮質破壊後5分、15分、30分、45分60分、2時間30分、後頭下穿刺にて髄液採取、蛙背筋使用。

5分後のものに Ach 0.052 γ /cc出現。15分以下陰性

ii) 硬膜を開き、蜘蛛膜上よりピンセットにて皮質を挫滅。

第1例、頭頂部皮質挫滅後5分、10分、15分、20分3時間30分を経て、後頭下穿刺、髄液採取、初め水様透明、次第に血液を混入す。蛙背筋使用。

5分後のものに Ach. 0.012 γ /cc 出現。他はすべて陰性。

第2例、頭頂部皮質挫滅直後、15分、30分、45分、1時間、1時間30分、2時間を経て後頭下穿刺にて髄液採取、蛙背筋使用。

45分後のものに Ach. 0.0063 γ /cc 出現。他は何れも陰性。

第3例、頭頂部皮質挫滅後20分、40分、1時間、1時間40分を経て、後頭下穿刺にて髄液採取、蛙背筋使用。何れも Ach 陰性。

iii) 硬膜を開き脳室に向い硝子棒刺入。

第1例、硝子棒刺入後20分、40分、1時間、2時間3時間、5時間を経て後頭下穿刺にて髄液採取、蛙背筋使用。

第2例、硝子棒刺入後30分、1時間、11時間30分を経て後頭下穿刺、髄液採取。何れも髄液は血性で、時間とともに血液混入度を増し Ach 検出は全部陰性に終った。

Esetine 静注による髄液中 Ach 出現

W.Feldberg, H. Schriever⁴⁾によれば、犬 (13~30kg) に Chlorase 麻酔下に 1.5~4.5mg/kg の Eserine を長時間20~30分かけて静注すると、10分後の髄液中に Ach. (最高0.015 γ /cc) 出現すると述べている。我々は僅か1例の追試ではあるが、この方法にて髄液中にAchの出現することを認めた。即ち体重7kgの犬にイソミタール静注麻酔のもとに Eserine 3mg/kg を約20分間にて静注し、10分後及び18分後に後頭

下穿刺にて髄液夫々2cc宛を採取し、蛙背筋にて Ach を測定し、夫々0.0044 γ /cc, 0.0068 γ /cc を検出した。

癲癇患者の髄液

Tower 及び Mc Eachern は髄液中のAch及びChEの研究に於て、癲癇患者ではChE正常、Ach陽性⁷⁾を報じている。実験の詳細は不明であるが、髄液中のChEが正常とすれば、果して髄液中に拡散して来たAchがChEによる破壊を免がれ、検出され得るものか否か興味があるので、我々は癲癇患者の発作状態にないもの14例、発作中のもの、又は発作直後のもの3例の髄液を後頭下穿刺にて採取し、(1例腰椎穿刺による) Achの検出を行つたが、発作中のものゝ1症例を述べると、

症例 千〇恵〇、7才、女子

約2年前、別に誘因と思われるものなく、突然全身痙攣と意識喪失を来し、1日数十回の発作が40~50日続いた。その後次第に発作の回数を減じ、1日に1回位となつたが、昭和29年3月頃から再び回数増加し8月末より殊に著しく、現在30分に1回位の発作が連続している。

本患者の髄液採取は空気脳撮影の際に行つたが、空気注入中に発作が2回起つている。空気注入開始時と2回の発作直後と終了時との計4回の髄液について、蛙腹直筋を使用して Ach を測定したが全部陰性であつた。其他の癲癇患者の髄液でも、1例も Ach 出現を見ていない。

更に癲癇患者に Pentazol を350mg~800mg 静注して、発作を誘発せしめ、発作直後乃至10分後に後頭下穿刺にて髄液を採取し、Achの検出を行つたのが3例あるが、何れの例でも陰性であつた。

電撃ショックに於ける髄液

頭部外傷の一種であり短時間の意識喪失と全身痙攣を来す電撃ショックでは、髄液中に Ach が出現しないかとの疑問を持ち、犬について直流抵抗600~1900 Ω 、交流100~130Volt、通電1~5秒間の電撃を行い、通電後1~5分で、後頭下穿刺により髄液を採取し、蛙背筋を使用し計5例の Ach 検出を試みたが、全部陰性であつた。

考 察

髄液中に Ach の出現を見たのは僅かに実験的頭部外傷例中の4例、及び Eserine を静注した犬1例のみで、脳振盪、癲癇患者、電撃ショック等総て陰性であつた。この為遺憾乍ら抗ヒヨリン剤等の頭部外傷に

対する治療効果について研究することは不能であつたが、Achの出現を見た例に於ても、その出現量は今迄報告されたものより1例を除いては比較的少量であり又外傷後比較的短時間に出現している。我々は人間の髄液中のAchの検出には既述のEserine添加、pH 6.0に訂正、冷蔵保存の方法を厳密に行つてゐるのに拘らず、結果は上述の如く陰性の場合が多い。然るにBornsteinはeserinizeされざる動物に於ても頭部外傷後初期に5.0~5.4%のAchを髄液中に検出し、48時間後も尚3.0~3.1%¹⁾のAchの存在を認めている。我々の実験にて頭部外傷後Achの出現した4例は外傷5分後2例、10~18分後1例、45分後1例であつて、外傷後比較的短時間のもののみ出現している。この点理由不明であるが何れにしても、髄液中Achの出現は、結局神経組織のAch生産量と髄液中のChE活性度との関係によつてきまるものであり、癲癇に於てはChE. normalと云われ、又頭部外傷でも外傷を受ける迄はChE. normalである筈であるから、結局髄液中Achの出現は頭蓋内神経組織への傷害が大で、Ach生産が大なる程Ach出現の機会大なるものと考えられる。AchはChEによつて、醋酸と生物学的活性度の低いCholinとに分解されるが、引続き多量のAchが放出されて髄液中に拡散してくる場合、即ち脳損傷の大なる場合には、pH. 変化等のChEの活性低下の要因を生じてAchが出現するものと推察される。

今迄髄液中にAch出現を報じている文献では、生物学的定量に利用した動物名の記載はあるが、その方法の詳細は不明である。我々は蛙腹直筋に於けるAchの洗滌用Ringer液としては、Eserine加Ringer-Lock液に非ざれば、筋標本のAch感度低下甚しく、Achの定量には不適当であることを証明した。

生物学的定量法では、その標本の感度は個体により非常な差があるが、蛙腹直筋に於ては大体最低感度0.01 γ /ccとみてよい。蛙腹直筋は感度比較的安定で使いやすいのであるが、髄液は測定時稀釈して用いられるので、この程度では感度が少し不足のように思われる。この点蛭背筋に於ては、温度その他の外的刺激に敏感に反応するので、取扱いに不安定な嫌はあるが、最低0.002 γ /cc程度の感度であり、全実験を蛭背筋で行つていれば、或はAch出現率をもつと高いのかとも思われる。

又ChE活性に影響のある髄液のpH. 値を同時に測定すべきであつたかも知れないと考える。

結 語

1) Ach定量に関し種々の条件を検討し、殊に定量的実験の際には、筋標本洗滌用Ringer液はEserine加冷血動物用Ringer-Lock液を使用すべきことを明らかにした。

2) 脳振盪、脳挫創、癲癇患者、電撃ショック、Eserine静注等、人間或は動物の髄液中のAchを測定した。このうちAchの出現をみたのは頭部外傷例中の4例、Eserine静注犬1例のみで然も外傷例では外傷後、比較的短時間に出現した。

3) 髄液中のChEのAch分解作用により、かなりのAch量が放出されないと、髄液中Achの出現は検出出来ぬものと推定される。

終りに臨み本研究に種々の便宜を与えられた九間、代田、越智、占部、島田等教室員諸氏に深甚なる感謝の意を表する。

主 要 文 献

- 1) Bornstein, N. B.: Presence and action of acetylcholine in experimental brain trauma. *J. Neurophysiol.*, **9**, 349-366, 1946
- 2) Chang and Gaddum: Choline esters in tissue extracts. *J. Physiol.*, **79**, 255-284, 1933
- 3) Chang, H. C.: Increased acetylcholine sensitivity of muscle by action magnification of the rectus test. *Proceed. Societ. for Exper. Biolog. and Med.*, **70**, 129, 1949
- 4) Feldberg and Schriever: The acetylcholine content of the cerebrospinal fluid of dogs. *J. Physiol.*, **86**, 277-284, 1936
- 5) Hestrin, S.: The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine. *J. Biolog. Chemist*, **180**, 249-261, 1949
- 6) Ruge, D.: The use of cholinergic blocking agents in the treatment of cranio-cerebral injuries. *J. Neurosurgery*, **X**, 77, 1954
- 7) Tower and McEachern: Acetylcholine and neuronal activity in craniocerebral trauma. *J. Clin. Investig.*, **27**, 558-559, 1948
- 8) Tower and McEachern: Experiences with the "Venus" heart method for determining acetylcholine. *Canad. J. Research*, **26**, 183-187, 1948
- 9) Ward, J. R.: Atropine in the treatment of closed head injury. *J. Neurosurgery*, **7**, 398-402, 1950
- 10) 米沢未治: 各種筋肉のAcetylcholineに対する感受性並に其のCholinesterase量に就て。岡山医学会雑誌, **54**, 861, 昭17.