

虚血ラットにおける尾状核内モノアミンの変動

*In vivo dialysis*による経時的観察

河野 輝昭・三宅 仁志・堤 圭介・森 和夫

Sequential Changes in Dopamine and Monoamine Metabolites in Ischemic Rat Caudate Nucleus

In Vivo Dialysis coupled with High-performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection

Teruaki KAWANO, Hitoshi MIYAKE, Keisuke TSUTSUMI and Kazuo MORI

Department of Neurosurgery, Nagasaki University, Nagasaki

Abstract

Dialysis tubing with a 0.2-mm diameter was implanted into the caudate nucleus of spontaneously hypertensive rats. Continuous perfusion with Ringer's solution at a flow rate of 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ was then initiated. During incomplete cerebral ischemia induced by bilateral common carotid artery occlusion, the perfusate was collected every 20 minutes and analyzed for the content of monoamines and their metabolites. The extracellular content of dopamine was abruptly increased about 4 to 6 minutes after ischemic insult, reached a maximum after about 20 to 40 minutes, and then decreased over 120 minutes. During the same period, 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid and 5-hydroxyindole acetic acid were significantly decreased, and 5-hydroxytryptamine was not detected during the ischemic period. The results suggest that the ischemia induced a large increase in extracellular dopamine within the caudate nucleus and that leakage occurred due to the energy failure of cell membranes. This process may be one causal factor in the neuronal damage observed after ischemia.

Key words: ischemia, monoamine, caudate nucleus, liquid chromatography

I はじめに

脳虚血に伴う脳内モノアミンの変動については、すでに①虚血後の脳内のモノアミンならびにそれらの代謝産物の測定^{4,7,9,12,14,15,17,18,21)}、②あらかじめ取り込ませておいた放射性物質の虚血脳からの放出の有無を調べる方法^{19,22)}、③*in vivo voltammetry*により代謝産物を経時的に測定する方法^{5,8)}、④組織化学的に虚血後の脳内に漏れ出たアミンを染めてみる方法^{1,13,16)}などにより、少なくとも虚血早期にはモノアミンが放出されるものと推定されてきた。しかし、

*in vivo voltammetry*法を除いては直接的証明にはなりえず、またこの方法においてもモノアミンや代謝産物の経時的測定が不可能であり、さらに検知される電気的信号に特異性を欠くという欠点があった^{8,24)}。

近年、透析チューブを用いてアミノ酸やモノアミンなどの脳内物質の経時的なモニタリングが可能になり、特にモノアミンやその代謝産物に関しては、この方法に電気化学的検出器(ECD)付き高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を組み合せることにより高感度測定が可能で、虚血後に起こる変化の minutes to minutes な分析もできるよ

長崎大学脳神経外科

Address reprint requests to: T. Kawano, M.D., Department of Neurosurgery, National Cardiovascular Center, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565.

受稿 1986年12月15日 受理 1987年9月7日

うになった^{2,11,20,26,29)}。著者らはラット脳虚血モデルにおいて本法を用い、虚血後急性期における脳内でのモノアミンならびにそれらの代謝産物の変動を検討した。

II 方 法

実験動物には、すべて自然発症高血圧ラット(週齢25~35)を用いた。虚血作製は Fujishima ら⁶⁾の原法に基づき、amobarbital (100 mg/kg, i.p.) 麻酔下に両側総頸動脈を結紮する方法を用いた。

In vivo dialysis: 脳内透析には透析チューブとして旭メディカル社製 AM-80 (外径0.2 mm, 分子量カット5万)を使用し、チューブの内腔にステンレスワイヤーを挿入し、U字形に屈曲させて7 mm長とし、両端はPE-20のポリエチレンチューブに接続した。これを定位的に垂直に、原則として右側の尾状核に埋没留置し²³⁾、Ringer液(147 mM Na⁺, 4.0 mM K⁺, 4.5 mM Ca²⁺, 155.5 mM Cl⁻, pH 6.5)を用いて毎分10 μlの速度で灌流を開始した。下記の方法でモノアミン(特にドーパミン:DA)ならびに代謝産物(3,4-dihydroxyphenyl acetic acid: DOPAC, 5-hydroxyindole acetic acid: 5-HIAA)の分析ピーカ高より透析チューブが尾状核内に埋没されていることを確認したのち、ピークの高さの安定する60~90分後に虚血を作製し、0.4 N HClO₄ 20 μlをあらかじめ分注しておいたsample容器に虚血後20分間隔で灌流液を採取し、120分後まで分析した。また、虚血の始めの20分間については、さらに1分間隔での分析を行った。透析チューブの位置は最終的には脳を摘出し、10%ホルマリン固定後に尾状核内に挿入されていたことを確認した。

モノアミンならびに代謝産物の測定: ECD付きHPLCにより、流出灌流液の20 μlを注入して分析した。HPLCの分析条件として、カラムは Whatman Partisphere 5 C18 (4.7 × 110 mm)を用い、mobile phaseとしては0.05 M, monochloroacetate-NaOH buffer, EDTA-2 Na 2 mM, Na-octylsulfate 0.25 mM, pH 3.5を用いた。ECDはAg/AgCl電極に対して0.7 Vのpotentialを設定した。ピークの計測には個体差があるため、ピークそのものの高さを虚血前、虚血中、虚血後ともにおのおののラットについて記録した。

脳表血流量の測定: 自然発症高血圧ラットを用いた場合の両側総頸動脈結紮による脳虚血においては、大脳皮質ならびに尾状核での血流量は比例して減少するとされている⁶⁾ので、レーザードップラー法により Perimed 社製 Periflux を用いて脳表血流量を測定し、測定値は虚血前の値を100とした変化率(%)で表し、尾状核内での相対的な血流量変化として示した。

III 結 果

1. 透析チューブによる *in vitro study*

*In vivo study*に先立って、脳内モノアミンならびに代謝産物の透析チューブによる回収率を求めるために、あらかじめ Ringer 液に DA, DOPAC, homovanillic acid (HVA), norepinephrine (NE), 5-methoxy-4-hydroxyphenylethylene glycol (MHPG), 5-hydroxytryptamine (5-HT), 5-HIAA を各 1 ng/ml の濃度になるように溶解し、透析チューブを用いて 10 μl/min で透析し、その 20 μl を HPLC に注入した。ピーク高より求めた回収率はそれぞれのアミンならびに代謝産物で大きな違いではなく、約 10~15% であった。これより尾状核内 extracellular metabolites の濃度を算出すると、DA 2.26×10^{-8} M, DOPAC 2.26×10^{-6} M, 5-HIAA 3.60×10^{-7} M, HVA 2.20×10^{-6} M, MHPG 2.48×10^{-8} M となり、Zetterstrom ら²⁹⁾の報告とほぼ一致していた。

2. 尾状核内に挿入された透析チューブより得られたクロマトグラム

透析チューブ挿入直後にはチューブ挿入に伴う組織の破壊によるとと思われる一過性の DA のピークが認められるが、すぐに消失し、5-HT のピークは減少し、DOPAC のピークは徐々に増大し、約 60~90 分後には一定のピーク高

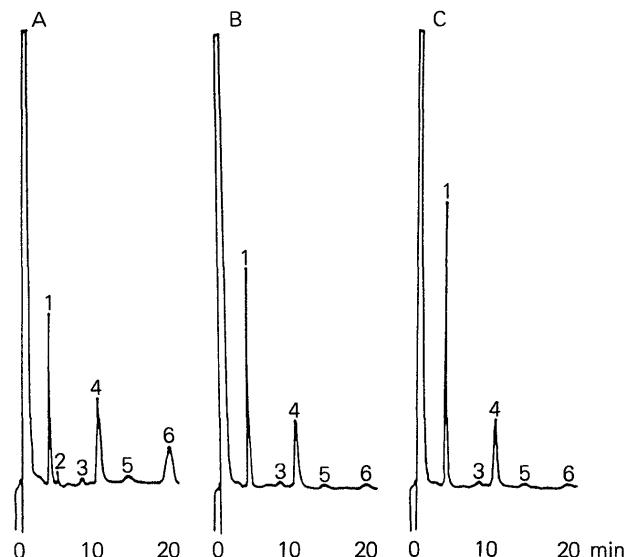


Fig. 1 Changes in chromatographic pattern after insertion of the dialysis tubing into the caudate nucleus. A, B, and C represent chromatograms obtained in the first, second, and final 20 minutes, respectively, after insertion of the dialysis tubing. 1: 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid (DOPAC), 2: dopamine, 3: 5-methoxy-4-hydroxyphenylethylene glycol (MHPG), 4: 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA), 5: homovanillic acid (HVA), 6: 5-hydroxytryptamine (5-HT).

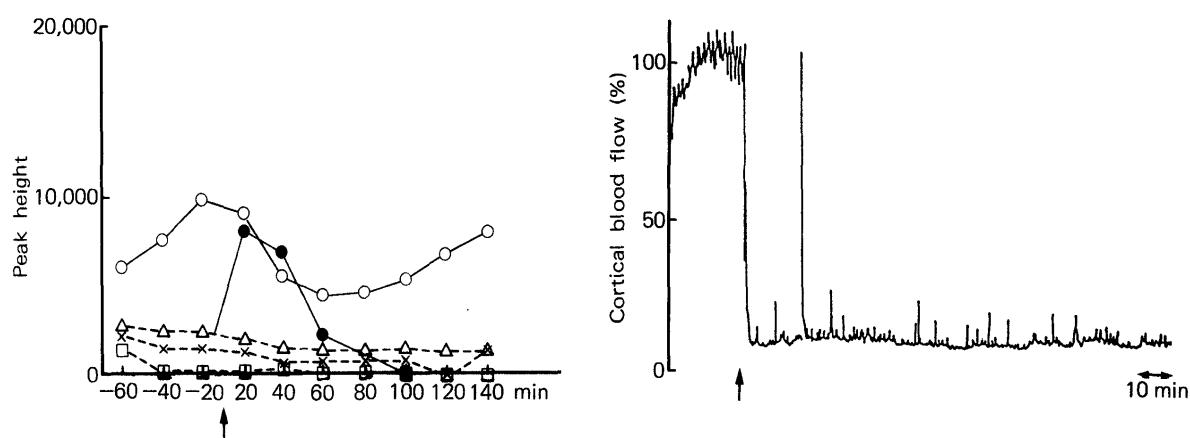


Fig. 2 left: Changes in monoamines and their metabolites before and after bilateral common carotid artery occlusion (arrow) under amobarbital anesthesia. Peak height shows the values calculated by automatic data processor. ●: dopamine, ○: DOPAC, □: 5-HT, ×: HVA, △: 5-HIAA. right: Changes in cortical blood flow measured by laser Doppler flowmeter.

をとるようになった(Fig. 1).

3. 脳表血流量の変化と DA, DOPAC, 5-HIAA の変動

尾状核内で虚血に伴う DA の放出は虚血の程度に依存しており、20%までの虚血では DA の放出はまったく認められなかった。Fig. 2 に代表的な 1 例を示しているが、Fujishima ら⁶⁾の原法による amobarbital (100 mg/kg, i.p.) 麻酔下で両側総頸動脈結紮により血流量が10%程度まで急激に減少し、このときに初めて DA の放出が認められた。この放出は脳表血流量が低下したままであるにもかかわらず、約 1 時間続くのみで、120分後には再び測定限界以下となった。DA の代謝産物である DOPAC は DA の急激な放出と一致して減少はじめ、DA と対照的な経過を辿った。5-HIAA は DOPAC とほぼ同様な経過を辿り、虚血後60分で最低値を示し、120分まで続いている。また、Fig. 3 には 5 例での平均を示しているが、細胞外液中の DA の濃度は20~40分でピークをとり、その後120分までは減少しつづけた。

さらに、虚血開始後20分までの変動を 1 分間隔で分析してみると、Fig. 4 に代表的な 1 例を、Fig. 5 に 5 例での平均を示しているが、DA の放出は虚血開始後 4~5 分遅れて起りはじめることが判った。同時に DOPAC, 5-HIAA も減少はじめ、この後の経過は前述した通りであった。

N 考 察

虚血脳内でのモノアミンの変動に関しては、今までに gerbil, ラット, ネコ, イヌなどの多くの種類の実験動物が用いられ、また虚血作製の方法においても、一側頸動脈結紮、両側総頸動脈結紮、中大脳動脈結紮、microemboli

の注入、さらにはこれらの方に脱血や降圧剤投与による低血圧負荷など色々な方法が取られ、モノアミンの測定法も一様でなく、虚血後に脳内でモノアミンが増加するという報告から減少するというものまで両極端であった。その

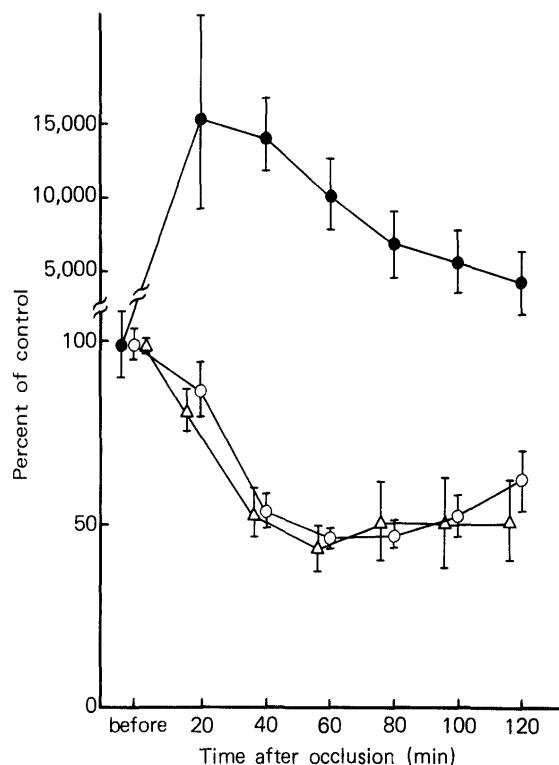


Fig. 3 Sequential changes in dopamine (●), DOPAC (○), and 5-HIAA (△) in samples collected every 20 minutes before and after bilateral common carotid artery occlusion under amobarbital anesthesia. Values are means \pm SEM ($n=5$).

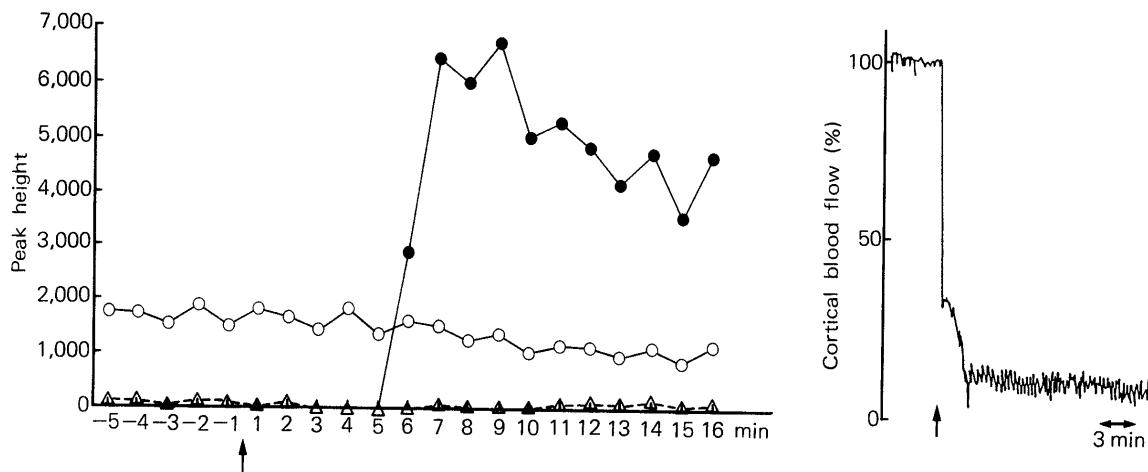


Fig. 4 left: Sequential changes in dopamine (●), DOPAC (○), and 5-HIAA (△) in samples collected every 60 seconds before and after bilateral common carotid artery occlusion (arrow) under amobarbital anesthesia. right: Changes in cortical blood flow measured by laser Doppler flowmeter.

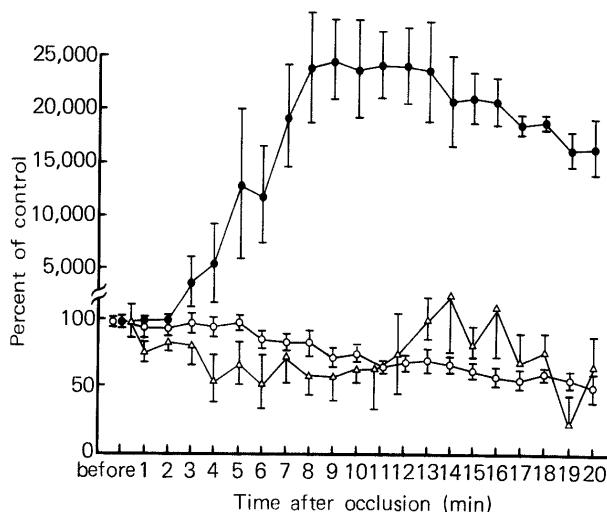


Fig. 5 Sequential changes in dopamine (●), DOPAC (○), and 5-HIAA (△) in samples collected every 60 seconds before and after bilateral common carotid artery occlusion under amobarbital anesthesia. Values are means \pm SEM ($n=5$).

ため、虚血前にあらかじめ NE や 5-HT を減少させておいた動物では虚血による組織障害が軽減するという報告^{3,10,25,27,28,30)}はあるものの、虚血脳に対しモノアミンがどのような意義を持つものか、依然として未解決のままになっている。

虚血早期における脳内モノアミンの変動に関し、組織化学的な手法を用いた Ishikawa ら¹³⁾の報告では、特に DA 由来の蛍光が増加することから DA の放出ないしは漏出が認められるとされ、また radioisotope を用いた Mrsulja ら²²⁾は NE が放出されることを報告している。さらに、

microemboli 注入による虚血において大脳皮質で虚血後 2 分、5 分と早期における測定をした Kogure ら¹⁸⁾は、NE は減少し、DA は一過性に増加したとし、前者は放出されたため、後者は虚血によるエネルギー代謝障害によるものであろうと報告している。このように、今までのすべての報告は、虚血後の脳内でのモノアミンやその代謝産物を測定することによりモノアミンの放出やその代謝障害などを推論したものであり、実際に細胞外腔へのモノアミンの放出を捉えた上でのものではなかった。

近年、*in vivo* dialysis による脳内透析法が確立され、細胞外液中でのアミノ酸、purin metabolites、モノアミンなどの測定が可能になっており、特にモノアミンに関しては、本法と ECD 装着 HPLC との組み合せにより高感度の測定ができる、かつ物質の同定が容易に行えるようになった。著者らは虚血に伴う尾状核内でのモノアミンならびに代謝産物の変動を検討したが、尾状核内では虚血後 4~5 分で急激な DA の上昇が起こり、これは虚血の程度に依存していた。すなわち、虚血後の脳血流量が前値の 10~15% のときに初めて起こることが示された。このことは従来、虚血時の脳内エネルギー代謝が 4~5 分後を境にほぼ 0 近くになると一致しており、強度の虚血時に起こる DA の著明な細胞外液中での増加は放出というよりむしろ漏出に近いものであることが示唆され、Ishikawa ら¹³⁾が組織化学的に調べた結果とほぼ一致しており、かつ虚血後 60~120 分には DA 由来と思われる蛍光が消失することも我々の細胞外液中での DA の定量結果と一致していた。

次に、DA の代謝産物である DOPAC は DA の増加とともに減少はじめ、DA の増加が消失する 60~120 分後に虚血前値に復することが判明し、DA の代謝障害が早期

に起こり、かつ一過性であることを示していた。細胞外液中に漏出したDAが早い時期にclearされることはEwingら⁵⁾の報告においても認められるが、その詳細な機序は不明である。しかし、本実験でDAならびにDOPACが同時定量でき、DAの増加が認められる間、さらにはその後もDAの代謝産物であるDOPACの増加が認められなかつことは、DAが代謝されることなく、拡散によりclearされることを示しているものと思われた。また、細胞外液中に虚血後120分以上にわたり、代謝されることなく、高濃度のDAが留まっていることより、虚血脳組織障害に対するDAの関与も無視できないものと思われる。最後に、セロトニン系に関しては、代謝産物である5-HIAAのみが測定できたが、虚血前・中・後を通じて大きな変化は認められず、少なくとも尾状核でのセロトニン系は虚血脳に対し大きな意義は持たないものと思われる。

なお、今回は尾状核内のモノアミンの変化について報告したが、脳の各部位についての検討²¹⁾が必要と思われた。

本論文の要旨は、第45回日本脳神経外科学会総会(1986年10月、東京)において発表した。

文 献

- 1) Akiguchi I, Horie R, Yamori Y: Role of central aminergic fibers in experimental cerebral ischemia in stroke-prone SHR. Relation to anesthetic effect. *Stroke* 11: 383-389, 1980
- 2) Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer NH: Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 43: 1369-1374, 1984
- 3) Busto R, Harik SI, Yoshida S, Scheinberg P, Ginsberg MD: Cerebral norepinephrine depletion enhances recovery after brain ischemia. *Ann Neurol* 18: 329-336, 1985
- 4) Cvejic V, Micic DV, Djuricic BM, Mrsulja BJ, Mrsulja BB: Monoamines and related enzymes in cerebral cortex and basal ganglia following transient ischemia in gerbils. *Acta Neuropathol (Berl)* 51: 71-77, 1980
- 5) Ewing AG, Wightman RM: Monitoring the stimulated release of dopamine with in vivo voltammetry. II: Clearance of related dopamine from extracellular fluid. *J Neurochem* 43: 570-577, 1984
- 6) Fujishima M, Ishitsuka T, Nakatomi Y, Tamaki K, Omae T: Changes in local cerebral blood flow following bilateral carotid occlusion in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Stroke* 12: 874-876, 1981
- 7) Gaudet R, Welch KMA, Chabi E, Wang T-P: Effect of transient ischemia on monoamine levels in the cerebral cortex of gerbils. *J Neurochem* 30: 751-757, 1978
- 8) Gonon F, Buda M, Cesuglio R, Jouvet M, Pujol J-F: In vivo electrochemical detection of catechols in the neostriatum of anaesthetized rats: Dopamine or DOPAC? *Nature* 286: 902-904, 1980
- 9) Harrison MJG, Marsden CD, Jenner P: Effect of experimental ischemia on neurotransmitter amines in the gerbil brain. *Stroke* 10: 165-168, 1979
- 10) 堀 汎: 実験的中大脳動脈閉塞症に対するalphamethyl-tyrosineの効果. *脳神外科* 3: 859-865, 1975
- 11) Imperato A, Chiarqa GD: Trans-striatal dialysis coupled to reverse phase high performance liquid chromatography with electrochemical detection: A new method for the study of the in vivo release of endogenous dopamine and metabolites. *J Neurosci* 4: 966-977, 1984
- 12) Ishihara N, Welch KMA, Meyer JS, Chabi E, Naritomi H, Wang T-PF, Nell JH, Hsu M-C, Miyakawa Y: Influence of cerebral embolism on brain monoamines. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 42: 847-853, 1979
- 13) Ishikawa M, Handa H, Kim S-O, Hirai O, Yoshida S: Microheterogeneity of brain dopamine in the experimental acute cerebral ischemia. *Neurol Res* 6: 155-158, 1984
- 14) 金子大成, 中村紀夫, 田村 晃: ラット局所脳虚血における脳内カテコールアミンの変動—HPLC-ECD法による測定—. *脳と神* 37: 1079-1085, 1985
- 15) 片山泰朗, 赫 彰郎, 杉本 繁, 稲村憲治, 鈴木 悟, 関口富士男, 明石 彰: SHRSP, SHRSR およびWistar ratsを用いた両側総頸動脈結紮による脳虚血の比較. *脳と神* 36: 1069-1075, 1984
- 16) 金 秀浩, 半田 肇, 石川正恒, 平井 収, 吉田真三: 脳虚血急性期における局所脳エネルギー代謝とカテコールアミンの変動—組織化学法による実験的検索—. *脳と神* 36: 167-174, 1984
- 17) 小暮久也: 虚血脳と脳内モノアミンの変動. *脳と神* 35: 33-39, 1983
- 18) Kogure K, Scheinberg P, Matsumoto A, Busto R, Reinmuth OM: Catecholamines in experimental brain ischemia. *Arch Neurol* 32: 21-24, 1975
- 19) Lavyne MH, Moskowitz MA, Larin F, Zervas NT, Wurtman RJ: Brain H³-catecholamine metabolism in experimental cerebral ischemia. *Neurology (Minneapolis)* 25: 483-485, 1975
- 20) L'Heureux R, Dennis T, Curet O, Scatton B: Measurement of endogenous noradrenaline release in the rat cerebral cortex in vivo by transcortical dialysis: Effects of drugs affecting noradrenergic transmission. *J Neurochem* 46: 1794-1801, 1986
- 21) Matsumoto M, Kimura K, Fujisawa A, Matsuyama T, Fukunaga R, Yoneda S, Wada H, Abe H: Differential effect of cerebral ischemia on monoamine content of discrete brain regions of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *J Neurochem* 42: 647-651, 1984
- 22) Mrsulja BB, Mrsulja BJ, Cvejic V, Djuricic BM, Rogac L: Alterations of putative neurotransmitters and enzymes during ischemia in gerbil cerebral cortex. *J Neural Transm [Suppl]* 14: 23-30, 1978

- 23) Paxinos G, Watson C: *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York, Academic, 1982, p 25
- 24) Stamford JA: In vivo voltammetry: Promise and perspective. *Brain Research Reviews* 10: 119-135, 1985
- 25) Stein SC, Cracco RQ: Cortical injury without ischemia produced by topical monoamines. *Stroke* 13: 74-83, 1982
- 26) Van Wylen DGL, Park TS, Rubio R, Berne RM: Increases in cerebral interstitial fluid adenosine concentration during hypoxia, local potassium infusion, and ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 6: 522-528, 1986
- 27) Weinberger J, Cohen G, Nieves-Rosa J: Nerve terminal damage in cerebral ischemia: Greater susceptibility of catecholamine nerve terminals relative to serotonin nerve terminals. *Stroke* 14: 986-989, 1983
- 28) Welch KMA, Chabi E, Bucjingham J, Bergin B, Achar VS, Meyer JS: Catecholamine and 5-hydroxytryptamine levels in ischemic brain. Influence of p-chlorophenylalanine. *Stroke* 8: 341-346, 1977
- 29) Zetterstrom T, Ungerstedt U: Effects of apomorphine on the in vivo release of dopamine and its metabolites, studied by brain dialysis. *Eur J Pharmacol* 97: 29-36, 1984
- 30) Zivin JA, Venditto JA: Experimental CNS ischemia: Serotonin antagonists reduce or prevent damage. *Neurology (Minneapolis)* 34: 469-474, 1984

[別刷請求先: 〒565 大阪府吹田市藤白台5-7-1, 国立循環器病センター-脳神経外科, 河野輝昭]