— 原 著 —

実験的脳出血による脳浮腫の成因に関する研究

脳組織のエネルギー代謝の面よりの検討

片山 泰朗

日本医科大学第2内科学教室 (主任: 赫 彰 郎 教授)
指導: 新城之介特任教授

Studies on pathogenesis of cerebral edema due to
experimental cerebral hemorrhage
An approach through energy metabolism

Yasuo Katayama

The Second Department of Internal Medicine, Nippon Medical School

The occurrence of cerebral edema is considered as one of the most important factors, influencing the prognosis of patients with cerebrovascular disorders. To clarify the edema mechanism due to hypertensive cerebral hemorrhage from the aspects of energy metabolism, experimental hemorrhagic models were prepared with spontaneously hypertensive rats (SHR). The specific hemorrhage was created in the cortex of left parietal region by Klatzo's cold injury method, where hematoma was recognized. After inducing the cold injury, the periodically measured changes of brain-water content were compared with those of c-AMP, ATP and lactate in the brain tissue.

1) The brain-water content began to increase at 3~6 hours after the injury on the undamaged hemisphere as well as the damaged one, reaching its peak at 24~48 hours. The increase of brain-water content was more remarkable on the damaged hemisphere.

2) The disturbance of aerobic brain metabolism was more significant in the cerebral cortex proximal to the damaged region. Although it was less severe on the undamaged than it was on the damaged, the metabolic disturbance was recognized. This suggests that experimental hemorrhage influences the cerebral metabolism simultaneously not only on the damaged but also on the undamaged hemisphere.

3) Within the period between the time immediately after the injury and six hours, c-AMP was rapidly increased once and decreased within half an hour and the decrease of ATP and the increase of lactate were recognized in the cortices of parietal and occipital regions and the white matter. The aerobic disturbance of cerebral metabolism may be considered as playing a part in creating cerebral edema within 3~6 hours after the injury.

4) The above-mentioned disturbance of aerobic cerebral metabolism was improved 18 hours later, but the brain-water content reached its peak within 24~48 hours. During this period of 24~48 hours after the injury, it was suggested that the enlargement of cerebral edema was due to the factors other than metabolic ones.

5) These results suggest that immediately following the cold injury, the metabolic disturbance plays a leading role in producing the cerebral edema (cytotoxic edema), whereas the disturbance of the vascular permeability later plays a leading role (vasogenic edema).

Key words : experimental cerebral hemorrhage, brain-water content, c-AMP, ATP, lactate

結 言

脳血管障害はわが国の国民死因別統計の第1位の座にあるが、脳卒中急性期の死因の大半は、生じた脳浮腫による脳ヘルニアに基づく二次的脳幹の機能的または直接的破壊の結果によることが知られている¹⁾。したがって脳卒中の予後は脳浮腫の防止、あるいは軽減の成否により大きく左右されることが考えられる。脳浮腫の成因に関しては多くの報告²⁻⁹⁾があるが、いまだ不明な点が多く、したがってその治療法^{3, 6-9)}も確立されているとは言い難い。

従来、脳卒中急性期の脳浮腫の成因に関する研究は、実験動物に凍結損傷法²⁾、硬膜外バルーン圧迫法¹⁰⁾、中大脳動脈結紮法⁹⁾、片側頸動脈結紮法¹¹⁾などを用いて、実験的脳卒中⁸⁾を作成して行われてきた。

他方、1958年にSutherlandとRall^{12, 13)}により発見されたc-AMPは、脳のエネルギー代謝に密接な関係があり、グリコーゲンからブドウ糖にいたる一連の生化学的反応の中でphosphorylaseを活性化する物質であるとされ、さらにphosphorylase系のみばかりでなく、細胞内の化学的伝達物質として働き、細胞の機能をコントロールするとされている(2nd Messenger Theory¹⁴⁾)。このc-AMPはそれ自体、高エネルギー磷酸化合物であり、adenylate cyclaseによりATPより作られるものであって、c-AMPおよびその代謝に関与する酵素活性は脳組織に著しく高く^{15, 16)}、化学的神経伝達物質^{17, 18)}や電気刺激¹⁹⁾によって脳組織のc-AMPの値が著しく上昇することは、脳におけるc-AMPの重要性を示唆するものである。

またATPは細胞活動のエネルギー源として使用され、その測定値は細胞内のエネルギー状態を把握するための指標になると考えられているものである。これに対して脳の血流障害により酸素の供給が減少すると脳のエネルギー代謝が障害され、嫌氣的解糖により生ずる代謝産物としてlactateが増加するが、このlactateの細胞内の蓄積は脳浮腫の発生に関与している^{3, 20, 21)}と考えられている。

そこで著者は、高血圧性脳出血によって生ずる脳浮腫の成因をエネルギー代謝の面より明らかにするため、高血圧自然発症ラット(spontaneously hypertensive rat, 以下SHRと略す)を用いて、凍結損傷法^{2, 4)}により実験的脳出血を作成し、脳含水量とc-AMP, ATP, lactateの実験的脳出血後の

経時的变化を比較検討することにより、代謝の面からみた脳浮腫発生機序を検索したので報告する。

研究対象および方法

(1) 研究対象および実験モデルの作成

実験動物として体重300g前後のSHRを計130匹用いた。実験的脳出血の作成はKlatzoら²⁾の方法に準じて凍結損傷法を用いて行った。すなわち動物の体動を防ぎ、固定を容易にするための前処置として、エーテル麻酔後に直ちに0.20mg/100gのペントバルビタールをSHRの腹腔内に注射して後、実験台上に固定し、その頭頂部の矢状方向に皮膚切開を加え、頭蓋骨を露出し歯科用のドリルを用いて矢状縫合の左側、冠状縫合のすぐ後方に、直径約4mmの骨窓を作成し、後に述べる理由から24時間後に無麻酔のもとで、先端直径約2mmの円錐容器にドライアイスとアセトンを入れて約-40°Cに冷却し、その先端を骨窓部より硬膜上に約40秒間あてて脳に凍結損傷を加え、直ちに骨窓、皮膚を閉じて実験的脳出血を作成した(Fig. 1)。

(2) 脳含水量の経時的測定

Fig. 1 Experimental cerebral hemorrhage at 24 hrs. after cold injury. A hematoma observed in the left parietal cortex.

脳含水量の測定は実験的脳出血作成後 1, 3, 6, 12, 24 の各時間後および 2, 3, 4, 5, 6, 7 日後までの各時期に断頭し、直ちに脳を取り出し、その湿潤重量を測定した。さらに、その脳を真空凍結乾燥器（大亜真空技研社製）により 48 時間凍結乾燥し、脳乾燥重量を測定し脳含水量は次式により算出した。

$$\text{脳含水量 (\%)} = \frac{\text{脳湿潤重量} - \text{脳凍結乾燥重量}}{\text{脳湿潤重量}} \times 100$$

実験動物は各時間ごとに、また対照群としても各 4 匹、計 48 匹を使用した。

(3) c-AMP, ATP および lactate の測定

SHR の頭部に東芝製のマイクロウェーブアプリケーションターを用いて、5 kW, 2 秒間の照射条件でマイクロウェーブを照射して瞬間加熱処理し、脳組織中の酵素活性、代謝産物の変動および分解を停止させた^{22, 23)}。直ちに脳を取り出して、両半球の頭頂部皮質、後頭部皮質、中脳および白質の各部位より約 20~30 mg の脳組織を採取し、6% トリクロル酢酸 3 ml を添加してホモジナイズし、3,000 rpm で 15 分間遠心分離した。上清は二分し、その一方に水飽和エーテル 3 ml を加え、攪拌後にエーテル層を除去した。このエーテル処理は 3 度繰り返して行った。この抽出液の資料について c-AMP, ATP を測定した。lactate の測定用資料として、もう一方のエーテル未処理の上清を使用し、沈殿物は 48 時間の凍結乾燥後に重量測定し、採取した脳組織の乾燥重量とした。

c-AMP は YAMASA cyclic AMP assay kit (ヤマサ醤油社製) を用いてラジオイムノアッセイ法にて測定し、その値は p moles/mg dry weight tissue で表した。

ATP は ATP Photometer Model 2000 (SAI Technology Co. 製) を用いて酵素法 (luciferase) にて測定し、測定値は n moles/mg dry weight tissue で表した。

lactate は Lactate-UV-Test (Boehringer Mannheim Co. 製) を用いて酵素法 (lactate dehydrogenase) にて測定し、その値は n moles/mg dry weight tissue で表した。

コントロール群として合計 12 匹を使用した。

1) 麻酔（エーテル+ペントバルビタール）による測定値への影響の検討

SHR の頭部に骨窓を作製する際に、動物を固定するため、エーテル麻酔後 0.20 mg/100 g のペントバルビタールを腹腔内に注射した。その麻酔が脳組織の代

謝に及ぼす影響を無処置の SHR と比較検討した。すなわち、エーテル麻酔後、等量のペントバルビタールを腹腔内に投与し、1, 6, 12, 24 時間を経過した各群ごとにマイクロウェーブを照射し瞬間加熱処理を行い、直ちに脳組織を採取して前述の無処置のコントロールの場合と同様に、c-AMP, ATP および lactate を測定した。この検討に使用した SHR は合計 21 匹である。

2) 実験的脳出血作成 SHR の脳組織の c-AMP, ATP および lactate の経時的変動

骨窓の作成後 24 時間を経過した SHR に無麻酔で凍結損傷を加えて実験的脳出血を作成した。その後 5, 30 分, 1, 6, 12, 18, 24 時間および 48 時間を経過した各群の凍結損傷加 SHR の頭部にコントロールと同様の条件にて、マイクロウェーブを照射した後に脳を取り出した。その脳より損傷側（左半球）では損傷部周辺の頭頂部皮質、損傷部位から隔たった後頭部皮質、中脳および白質の各部位より、さらに対側（右半球）も損傷側に対応する部位よりそれぞれ脳組織を採取した。各脳組織は直ちにトリクロル酢酸で処理し、コントロールと同様の方法にて資料を作成して c-AMP, ATP および lactate を測定した。本測定に使用した SHR は合計 49 匹である。

成 績

1. 凍結損傷後の脳含水量の経時的変動

Table 1 Changes of cerebral water content after cold injury

time (hr)	cerebral water content (%)	
	the damaged site	the undamaged site
control	77.0±0.4 (4)	77.0±0.4 (4)
1	77.0±0.5 (4)	77.0±0.4 (4)
3	76.9±0.5 (4)	76.9±0.5 (4)
6	77.4±0.6 (4)	77.1±0.6 (4)
12	78.2±0.5 (4)*	77.7±0.5 (4)
24	79.2±0.7 (4)*	78.1±0.6 (4)*
48	79.2±0.5 (4)*	78.2±0.7 (4)*
72	79.1±0.6 (4)*	77.9±0.6 (4)*
96	78.7±0.5 (4)*	77.7±0.5 (4)
120	78.5±0.6 (4)*	77.4±0.5 (4)
144	78.0±0.4 (4)*	77.4±0.6 (4)
168	77.8±0.6 (4)	77.2±0.5 (4)

The results are the mean ± standard deviation. The number of hemispheres shown in parentheses. The values significantly different from the corresponding control are indicated: *P < 0.05.

Table 1 に示したごとく、凍結損傷後の脳含水量は損傷側、対側ともに 3~6 時間後より増加し始め、24~48 時間で最高に達したが、この脳含水量の増加は損傷側でより著明であった。その後脳含水量は徐々に減少し、約 7 日後には損傷側ではなお高値を持続したが、対側ではほぼ前値に回復した。

2. SHR の脳組織における c-AMP, ATP および lactate

(1) 無処置の SHR (コントロール) についての測定

c-AMP 値: 頭頂部皮質, 後頭部皮質, 中脳および白質の c-AMP 値はそれぞれ 4.93 ± 0.72 ($n=15$), 3.18 ± 0.80 ($n=20$), 4.53 ± 1.24 ($n=21$) および 2.50 ± 0.87 ($n=24$) であった (数字は平均±標準偏差で示す。() の n は半球数を示す.)。

ATP 値: 頭頂部皮質, 後頭部皮質, 中脳および白質の ATP 値はそれぞれ 8.39 ± 1.04 ($n=8$), 6.06 ± 1.58 ($n=9$), 7.00 ± 1.41 ($n=9$) および 5.81 ± 0.93 ($n=8$) であった。

lactate 値: 頭頂部皮質, 後頭部皮質, 中脳および白質の lactate 値はそれぞれ 21.2 ± 8.2 ($n=8$), 21.1 ± 10.1 ($n=8$), 19.1 ± 6.4 ($n=8$) および 18.8 ± 9.1 ($n=7$) であった。

(2) 麻酔 (エーテル+ペントバルビタール) による測定値への影響の検討

Table 2-1~4 に示したごとく、c-AMP 値は各部位とも 1 時間で低値をとり、6 時間でほぼ前値に回復した。24 時間後でも前値との間に有意差を認めなかった ($P > 0.05$)。

ATP 値は各部位ともほぼ前値の範囲内の変動を示し、24 時間後も前値との間に有意差を認めなかった ($P > 0.05$)。

lactate は各部位とも 6~12 時間で蓄積傾向を認めたが、24 時間後では前値との間に有意差を認めなかった ($P > 0.05$)。

(3) 実験的脳出血作成 SHR の脳組織の c-AMP, ATP および lactate の経時的変動 (**Table 3~6**)

1) 実験的脳出血 SHR の c-AMP の経時的変動 (**Fig. 2**)

頭頂部皮質の c-AMP の変動: c-AMP 値は損傷側の損傷部位の近位にある頭頂部皮質では、損傷後 5 分

で約 2 倍の増加を示し、30 分後には急激に減少して前値よりも低値を示した。その後 1 時間ではほぼ前値に

Table 2-1 Effect of anesthesia on the levels of c-AMP, ATP and lactate in parietal cortex

time (hr)	c-AMP	ATP	lactate
control	$4.93 \pm 0.72(15)$	$8.39 \pm 1.04(8)$	$21.2 \pm 8.2(8)$
1	$4.46 \pm 1.09(8)$	$8.56 \pm 1.68(4)$	$17.7 \pm 2.3(6)$
6	$5.16 \pm 2.10(6)$	$7.87 \pm 1.86(10)$	$24.1 \pm 6.6(9)$
12	$6.02 \pm 0.92(6)^*$	$9.01 \pm 1.35(10)$	$29.3 \pm 5.6(10)^*$
24	$4.77 \pm 1.23(10)$	$8.56 \pm 2.92(6)$	$24.4 \pm 7.7(6)$

The results are the mean $\pm$ standard deviation.

The number of hemispheres shown in parentheses.

The concentrations of c-AMP, ATP and lactate are indicated in μ moles/mg dry weight tissue, n moles/mg dry wt. tissue and n moles/mg dry wt. tissue.

The values significantly different from the corresponding control are indicated: * $P < 0.05$.

Table 2-2 Effect of anesthesia on the levels of c-AMP, ATP and lactate in occipital cortex

time (hr)	c-AMP	ATP	lactate
control	$3.18 \pm 0.80(20)$	$6.06 \pm 1.58(9)$	$21.1 \pm 10.1(8)$
1	$2.95 \pm 0.61(7)$	$7.69 \pm 2.87(4)$	$18.9 \pm 3.5(6)$
6	$3.50 \pm 1.01(5)$	$6.29 \pm 2.51(7)$	$21.9 \pm 4.2(4)$
12	$3.80 \pm 1.10(7)$	$7.31 \pm 1.46(9)$	$30.2 \pm 4.7(8)^*$
24	$3.80 \pm 0.60(6)$	$7.07 \pm 2.05(6)$	$20.8 \pm 2.8(6)$

* $P < 0.05$

Table 2-3 Effect of anesthesia on the levels of c-AMP, ATP and lactate in midbrain

time (hr)	c-AMP	ATP	lactate
control	$4.53 \pm 1.24(21)$	$7.00 \pm 1.41(9)$	$19.1 \pm 6.4(8)$
1	$2.33 \pm 0.79(8)^*$	$7.69 \pm 2.87(4)$	$16.9 \pm 1.5(5)$
6	$4.09 \pm 1.04(4)$	$6.29 \pm 2.51(7)$	$29.0 \pm 4.7(7)^*$
12	$4.42 \pm 1.88(6)$	$7.31 \pm 1.46(9)$	$22.6 \pm 7.9(5)$
24	$4.48 \pm 0.65(6)$	$6.67 \pm 1.29(7)$	$20.1 \pm 1.2(4)$

* $P < 0.05$

Table 2-4 Effect of anesthesia on the levels of c-AMP, ATP and lactate in white matter

time (hr)	c-AMP	ATP	lactate
control	$2.50 \pm 0.87(24)$	$5.81 \pm 0.93(8)$	$18.8 \pm 9.1(7)$
1	$1.72 \pm 0.93(7)$	$4.82 \pm 1.78(4)$	$20.0 \pm 5.0(5)$
6	$1.94 \pm 0.45(4)$	$5.02 \pm 1.24(12)$	$25.9 \pm 8.3(12)$
12	$1.82 \pm 0.57(4)$	$5.42 \pm 1.21(9)$	$23.8 \pm 4.2(6)$
24	$2.22 \pm 0.49(6)$	$4.87 \pm 1.63(8)$	$20.7 \pm 4.3(6)$

Fig. 2 Effect of cold injury on brain c-AMP in SHR

Fig. 3 Effect of cold injury on brain ATP in SHR

復したが、18 時間までは前値よりもやや低値をとり、18~24 時間でほぼ前値となった。対側(非損傷側)においては、ほぼ同様の動きを示したが、変動幅は軽度であった。

後頭部皮質の c-AMP の変動：損傷側の損傷部位より隔たった後頭部皮質では、損傷後 5 分で約 2 倍の増加を示し、30 分後に急激に減少し、前値よりも低下した。その後漸増して 18 時間で前値に復した。対側においてもほぼ同様の変動を示したが、変動幅は小であった。

中脳の c-AMP の変動：損傷後 5 分でやや増加傾向を示したが、その増加は頭頂部皮質や後頭部皮質のそれに比べて少なかった。その後は前値の範囲で変動を示し、著明な動きは認められなかった。また損傷側と対側の差異は認められなかった。

白質の c-AMP の変動：損傷後 5 分で約 1.5 倍に増加し、30 分で前値よりも低値を示し、そして 1 時間で前値に回復し、その後はほぼ前値の範囲内で変動を示した。対側の動きも損傷側のそれとほぼ同様であった。

2) 実験的脳出血 SHR の ATP の経時的変動 (Fig. 3)

頭頂部皮質の ATP の変動：ATP 値は、損傷側では損傷後 5 分で前値の約 50% に、30 分では約 40% にと著しく減少し、その後 18 時間まで徐々に増加し、18 時間で前値に回復した。対側においてもほぼ同様の変動を示したが、変動幅はやや小であった。

後頭部皮質の ATP の変動：損傷側では 5、30 分と減少し、30 分では前値の約 60% に著しく減少した。その後漸増して 12 時間ではほぼ前値に回復し、18~24 時間では一時的に前値よりも高値を示したが、48 時間では前値に復した。対側においてもほぼ同様の変動を示した。

中脳の ATP の変動：頭頂部皮質および後頭部皮質では 30 分で大幅な減少を

認めたが、中脳では損傷側、対側とも増加を示し、その後多少の変動はあったが前値よりも高値を持続していた。

白質の ATP の変動：損傷側では 30 分まで漸減し、30 分では前値の約 70% に減少した。その後は徐々に増加し、6~12 時間で前値に回復し、その後はやや高値を持続した。対側においてもほぼ同様の変動を示し

た。
3) 実験的脳出血 SHR の lactate の経時的変動 (Fig. 4)

頭頂部皮質の lactate の変動：損傷側では 5 分後に約 2.5 倍に著増し、その後漸減して 6 時間でほぼ前値に復し、その後は前値とほぼ同じレベルであった。対側でも同様の変動を示したが、lactate の増加は損傷側に比して軽度であった。

後頭部皮質の lactate の変動：損傷側および対側の変動は前述の頭頂部皮質のそれとほぼ同様であった。

中脳の lactate の変動：この部での lactate は損傷側では 5 分で軽度増加し、その後漸減して 1 時間で前値に復し、その後はほぼ同じレベルであった。対側でも損傷側と同様の変動を示した。

白質の lactate の変動：損傷側および対側において lactate の変化は認められなかった。

考 案

高血圧性脳出血によって生ずる脳浮腫の成因を脳のエネルギー代謝面より明らかにするため、SHR を用い凍結損傷法により実験的脳出血モデルを作成し検討した。

SHR の脳の左半球頭頂部に凍結損傷を加えると損傷部皮質下に半球状の血腫が形成される。この実験的脳出血モデルを使用して脳含水量および脳代謝を知る

Fig. 4 Effect of cold injury on brain lactate in SHR

Table 3 Effect of cold injury on the levels of c-AMP, ATP and lactate in parietal cortex

time	c-AMP		ATP		lactate	
	the damaged site	the undamaged site	the damaged site	the undamaged site	the damaged site	the undamaged site
control	4.93±0.72(15)		8.39±1.04(8)		21.2±8.16(8)	
5 min	8.40±1.72(5)*	5.12±2.11(6)	4.73±0.95(5)*	5.07±1.28(7)*	51.4±13.2(5)*	37.3±12.4(5)*
30 min	3.31±1.03(5)*	3.49±0.69(4)*	3.56±1.99(4)*	6.49±1.37(6)*	53.7±12.2(4)*	22.6± 5.5(4)
1 hr	4.91±1.11(4)	6.06±0.64(4)*	6.39±1.17(4)*	8.46±0.81(5)	39.0±11.5(5)*	22.0± 5.3(5)
6 hr	4.48±1.90(4)	4.61±2.12(4)	4.78±2.35(3)*	6.36±2.90(3)	22.4± 9.8(5)	19.4± 9.2(5)
12 hr	4.11±1.09(4)	5.71±0.82(5)	7.40±1.45(4)	8.53±2.32(5)	17.2± 5.7(4)	20.0± 7.8(5)
18 hr	4.32±1.41(5)	4.77±1.34(4)	7.72±1.18(5)	8.91±0.88(4)	18.2± 6.4(4)	18.8± 6.1(4)
24 hr	4.85±0.89(5)	4.97±1.16(6)	9.47±2.60(4)	8.30±1.59(5)	20.0± 8.7(5)	18.7± 6.0(5)
48 hr	3.72±1.28(6)*	4.24±1.45(7)	7.79±0.94(6)	7.84±2.03(6)	20.2± 5.0(5)	20.7± 8.6(5)

The results are the mean ± standard deviation. The number of hemispheres shown in parentheses. The values significantly different from the corresponding control are indicated: *P<0.05. The concentrations of c-AMP, ATP and lactate are expressed in p moles/mg dry weight tissue, n moles/mg dry wt. tissue and n moles/mg dry wt. tissue.

Table 4 Effect of cold injury on the levels of c-AMP, ATP and lactate in occipital cortex

time	c-AMP		ATP		lactate	
	the damaged site	the undamaged site	the damaged site	the undamaged site	the damaged site	the undamaged site
control	3.18±0.80(20)		6.06±1.58(9)		21.1±10.1(8)	
5 min	5.61±1.28(4)*	4.04±2.07(4)	5.13±1.64(6)	5.54±2.01(6)	50.1±29.4(5)*	36.8±15.2(5)*
30 min	2.39±0.97(4)	1.63±0.64(4)*	3.51±1.51(6)*	2.62±1.96(5)*	36.3±12.2(4)*	22.4± 9.6(4)
1 hr	2.50±1.25(4)	3.01±0.64(4)	3.71±0.40(5)*	4.82±0.84(4)	36.7±11.3(5)*	19.9± 7.1(5)
6 hr	2.52±1.03(4)	1.83±1.36(6)*	5.69±3.00(3)	3.72±1.93(3)	25.4± 7.3(5)	19.7± 8.1(5)
12 hr	2.97±0.41(4)	2.44±0.69(4)	6.19±1.27(4)	5.16±1.16(5)	17.6± 6.9(5)	19.8± 4.5(5)
18 hr	3.07±0.92(4)	2.84±1.61(4)	8.11±1.77(5)*	6.74±1.35(5)	17.0± 6.4(5)	18.5± 6.2(5)
24 hr	3.20±1.21(5)	3.07±0.68(4)	8.40±1.73(3)*	7.48±0.75(4)*	18.4± 6.9(5)	19.5± 5.7(5)
48 hr	3.06±1.34(6)	3.14±1.39(7)	6.19±1.28(4)	6.51±1.98(6)	21.0± 6.4(5)	19.9± 4.7(5)

The values significantly different from the corresponding control are indicated : * $P < 0.05$.

Table 5 Effect of cold injury on the levels of c-AMP, ATP and lactate in midbrain

time	c-AMP		ATP		lactate	
	the damaged site	the undamaged site	the damaged site	the undamaged site	the damaged site	the undamaged site
control	4.53±1.24(21)		7.00±1.41(9)		19.1± 6.4(8)	
5 min	5.43±1.35(5)	5.23±1.54(5)	6.77±0.63(7)	8.12±0.44(7)*	34.2±13.2(4)*	27.6±11.0(5)
30 min	4.21±1.17(4)	4.57±1.28(5)	9.78±1.71(5)*	9.83±1.18(5)*	37.9± 4.9(4)*	19.7±11.0(4)
1 hr	4.42±1.67(4)	4.64±0.97(4)	8.27±0.69(4)*	9.18±0.71(5)*	23.0± 6.6(5)	20.0± 9.2(5)
6 hr	4.60±1.91(4)	4.23±2.00(4)	8.44±0.72(3)*	7.58±0.95(3)	20.2± 6.5(5)	20.9± 9.1(5)
12 hr	5.22±0.60(6)	4.66±1.12(6)	11.67±2.20(4)*	10.05±2.13(5)*	21.0± 7.7(5)	20.2± 4.8(5)
18 hr	5.10±0.90(4)	4.81±1.11(4)	9.81±1.11(6)*	10.19±1.31(4)*	22.0± 7.4(5)	22.2± 6.4(5)
24 hr	5.54±1.02(4)	5.48±0.68(4)	10.65±2.24(3)*	10.92±2.41(3)*	18.0± 6.3(5)	18.4± 6.7(5)
48 hr	4.47±0.99(4)	4.25±1.37(5)	9.58±2.49(5)*	8.40±0.97(6)*	20.9± 6.6(5)	21.2± 7.9(5)

The values significantly different from the corresponding control are indicated : * $P < 0.05$.

Table 6 Effect of cold injury on the levels of c-AMP, ATP and lactate in white matter

time	c-AMP		ATP		lactate	
	the damaged site	the undamaged site	the damaged site	the undamaged site	the damaged site	the undamaged site
control	2.50±0.87(24)		5.81±0.93(8)		18.8± 9.1(7)	
5 min	3.80±0.65(4)*	3.61±1.27(4)*	4.76±0.83(6)*	4.84±0.73(7)*	20.2±9.3(5)	20.9±7.6(5)
30 min	1.73±0.32(4)*	1.86±0.35(5)*	3.88±0.80(4)*	5.35±1.09(3)	19.6±6.2(4)	18.3±5.4(4)
1 hr	2.72±1.38(4)	2.78±1.26(4)	4.76±0.87(5)*	5.60±1.14(5)	21.6±6.4(5)	20.5±7.1(5)
6 hr	2.25±1.20(4)	2.62±1.80(4)	5.43±0.97(4)	5.95±1.40(4)	19.4±8.5(5)	19.7±9.7(5)
12 hr	3.34±0.47(6)*	2.80±0.77(6)	7.30±1.48(6)*	6.02±1.17(6)	19.9±4.2(5)	18.9±6.1(5)
18 hr	2.78±1.64(4)	2.40±1.04(4)	6.94±1.60(4)	6.23±1.94(6)	20.0±5.6(5)	19.6±5.9(5)
24 hr	3.27±0.23(4)*	2.89±0.44(6)	7.20±1.20(4)*	7.16±1.93(4)	18.7±5.2(5)	19.7±5.3(5)
48 hr	2.12±1.51(4)	2.01±0.90(5)	6.07±1.38(6)	6.36±1.15(6)	18.2±5.9(5)	19.0±6.3(5)

The values significantly different from the corresponding control are indicated : * $P < 0.05$.

指標として、脳組織のエネルギー供給源である ATP、また受容細胞において多くのホルモンの作用を伝達する仲介物質として作用している c-AMP と嫌氣的解糖の増強の有無の判定のために lactate を測定した。

実験動物を固定したりなんらかの操作を加える際には麻酔下で行われることが多いが、麻酔剤のごとき神

経系に作用する薬剤は動物の脳内の c-AMP を変動させることが知られている²⁴⁻²⁶⁾。ペントバルビタールの腹腔内投与はラットやマウスの脳内の c-AMP を減少させる^{24,25)}。また、あらかじめペントバルビタールやテオフィリンを投与された動物は、断頭後の脳組織 c-AMP の増加が抑制されると報告²⁴⁾されている。そこ

で、実験に先だち麻酔（エーテル＋ペントバルビタール 0.20 mg/100 g）が SHR の脳組織中の c-AMP, ATP および lactate にいかなる影響を及ぼすかを検索した。c-AMP は 1 時間で各部位の脳で低下し、6 時間でほぼ前値に復し、ATP は各時間で各部位とも前値内の変動であったが、lactate は 6～12 時間で脳の各部位において増加傾向を示した。しかし 24 時間では c-AMP, ATP, lactate のいずれも前値に復することを認めた。

したがって脳代謝を検索する目的の実験では、実験の前処置などの際に麻酔剤を用いた場合、麻酔の影響を避けるために麻酔後 24 時間以上経過した動物を使用する必要があると考えた。本実験では、前処置として麻酔下で凍結損傷を与えるための頭蓋骨窓の作成を行い、凍結損傷は前処置後 24 時間経過した後に行った。

凍結損傷後、前述した各時間を経過した SHR の頭部にあらかじめマイクロウェーブを照射し、断頭した後に採取した脳組織について c-AMP, ATP および lactate を測定した。これらの細胞内の活性物質および代謝産物は、不安定で変化を起こしやすい状態にあり、死後変化が急速に起こる²⁷⁾。そこで死後変化を抑制し、断頭時点において、生体により近い状態で活性物質および代謝産物を測定するため、従来より急速凍結法として液体窒素や冷却フロンが用いられている。しかし、これらの方法では脳の表層と深部とに凍結時間の差異を生じ²⁸⁻³⁰⁾、脳組織の深部は glucose の減少や lactate の蓄積などが起こり、anoxic changes を生ずることがある。また、凍結法では凍結した組織から活性物質や代謝産物を抽出するまでの過程を凍結状態で操作しなければならない。そこで著者は、瞬間的に加熱処理ができ、しかも常温で資料の抽出操作ができるマイクロウェーブ照射法を用い^{22, 23)}、凍結法による諸問題の解決を図ったのである。

実験的脳出血作成により、病巣部位はもちろん病巣近位部および遠位部、さらには対側の脳組織の代謝がいかなる影響を受けるかを知ることが、脳浮腫発生の機序解明にとり重要であると考え、著者は c-AMP, ATP および lactate を、損傷側では損傷部位の周辺である頭頂部皮質、損傷部位より隔たった後頭部皮質、中脳および白質について、また対側でも損傷側と同様の部位で測定した。

c-AMP は凍結損傷後、中脳を除く各部位で一過性の著明な増加と、その後の減少を認めた。凍結損傷直

後にみられた脳皮質の c-AMP の一過性の増加というこの著者の成績は Steiner ら³¹⁾がマウスを用いての実験で、断頭後 1 分で c-AMP は約 4 倍に増加したと報告したこと、また Ditzion ら³²⁾がラットの断頭でほぼ同様の成績を報告し、この現象は断頭により惹き起こされた強度の虚血により生じたと述べているのと撓を一つにするものと考えられる。また Kogure³³⁾は 35 μ のカーボンの小粒子をラットの内頸動脈に注入し、脳塞栓を起こさせ、脳虚血時における脳皮質の c-AMP, norepinephrine, dopamine を患側と健側において経時的に測定し、塞栓直後の患側脳の c-AMP は約 3 倍に増加したことを認めた。Watanabe ら³⁴⁾は mongolian gerbil を用いて総頸動脈の片側結紮法により脳虚血を作成し、虚血後 15 分で c-AMP は約 8 倍に増加し、その後急速に減少し 6 時間でほぼ前値に復し、他方 glycogen は 15 分で約 1/2 に減少したと報告しており、また Watanabe と Passonneau³⁵⁾は脳に刺創を作成し、その直後に c-AMP の増加を認めた。このような脳組織 c-AMP の増加は脳室内への catecholamine の注射³⁶⁾または脳の電気刺激¹⁹⁾によってもみられることが報告されている。

他方、本実験において c-AMP は、凍結損傷後増加したものが 30 分では急速に大幅な減少をきたし、その後も頭頂部皮質および後頭部皮質では凍結損傷後 18 時間まで低値を示すことを認めた。これは Flamm ら³⁷⁾が猫の中大脳動脈の結紮により脳虚血を作成して、虚血後 3 時間以後に患側において c-AMP の大幅な減少を認めたことを報告しているのと一致する。

c-AMP の一時的な増加は断頭、総頸動脈の結紮、カーボン粒子による塞栓、また本実験の脳凍結損傷などで観察されるが、これらはいずれも脳血流障害による脳虚血が共通の要因となり一時的な c-AMP の増加をきたしたと考えられる。

Lowry²⁷⁾は断頭による虚血は脳組織の解糖作用を 4～7 倍に増加させると述べており、虚血脳において c-AMP の増加と解糖作用の増大とは密接な関連があることが示唆される。

凍結損傷直後の c-AMP の増加は、虚血により解糖作用の増大による直接的現象のほか、ATP より c-AMP に変換する酵素である adenylate cyclase の活性を高める catecholamine などの物質が多量に放出される結果であるか、あるいは c-AMP の分解酵素である phosphodiesterase 活性の低下のためとも考えられる。

Kogure は管理された hypoxemia のラットにおいて、脳組織の c-AMP の増加は dopamine, norepinephrine などのいかなる変化よりも先立って起こり、catecholamine の放出が c-AMP の増加を起こす原因ではないとしている⁸⁸⁾。

また Stefanovich は anoxia の状態におかれたラットの脳において phosphodiesterase の活性の変化は認められなかったと述べている⁸⁹⁾。したがって凍結損傷直後の c-AMP の増加は虚血により解糖作用の増大による直接的現象と考える。

凍結損傷後の SHR の脳組織中の ATP については、著者は中脳を除く各部位で 5 分で減少し始め、30 分で大幅な減少を示し最低値をとり、以後漸次増加し 12~18 時間で前値に回復し、この ATP の減少は損傷近位部である損傷側頭頂部において最も著明であることを認めた。これは損傷後急激に脳組織内の ATP をはじめとするエネルギー源が消費されたことを示している。

他方、lactate は ATP の鏡像を示すごとく、損傷直後 5 分で著増し、以後漸減して 6 時間ではほぼ前値となったが、lactate の増加は損傷部近位の頭頂部皮質で最も著明であった。

凍結損傷後の急激な c-AMP の増加、それに引き続いて起こる c-AMP の減少、ATP の枯渇および lactate の蓄積は凍結損傷直後より 6 時間の期間において脳は嫌氣的代謝の状態にあることを示したものである。伊与田⁴⁰⁾は凍結損傷法による実験的脳出血 SHR で水素クリアランス法により脳血流量を測定し、損傷側の脳血流量は明らかな減少を示し、6 時間ころより次第に回復してくると述べており、著者の代謝面における成績は、この脳血流動態の変動と密接に関連していることが示されている。

また著者の成績で、嫌氣的代謝は損傷近位部である頭頂部皮質において最も著しく、次いで損傷部位よりやや隔たった後頭部皮質においても認められたが、白質では著明でなく中脳の代謝は皮質と異なり、c-AMP, ATP とともに増加し、lactate の蓄積もわずかであった。これは病巣から、より遠位にある脳血流動態は皮質のそれと異なることによるものと考ええる。

対側半球の c-AMP, ATP および lactate は変動は少ないが、損傷側と同様の変動を示した。また凍結損傷加 SHR の対側半球の脳血流量は、損傷側に比べて軽度であるが損傷側と同様の血流減少をきたしており⁴⁰⁾、凍結損傷は損傷半球の脳血流量および脳代謝のみ

ならず、対側半球のそれらに同時に影響を及ぼすことを示すものである。

c-AMP の変動、ATP の減少および lactate の蓄積は、細胞膜の透過性と細胞内浸透圧に密接に関与し⁴¹⁾、cytotoxic edema⁴²⁾ の発生に重要な要因であるとされている。本研究で認めたごとく、実験的脳出血の初期（損傷直後より 6 時間）の両半球にわたる好氣的エネルギー代謝障害は、損傷後 3~6 時間後より発生する脳浮腫の成因の一端を担っていると考ええる。この c-AMP, ATP, lactate は 6 時間以後次第に前値に近づき、12~18 時間では脳の各部位で前値となったが、脳含水量はさらに増加し、24~48 時間で最高値となった。すなわち 24~48 時間ころでは脳の好氣的エネルギー代謝障害は改善されているにもかかわらず、脳浮腫は増大していることが認められているが、この 24~48 時間ころに増大する脳含水量は、主として脳血管の透過性亢進に基づく vasogenic edema^{42, 43)} によって生ずることが考えられる。

以上、凍結損傷による実験的脳出血の脳浮腫は、脳のエネルギー代謝面より検索した著者の成績のごとく、単一の成因によって生ずるのではなく、損傷直後にみられる細胞レベルでの代謝異常が、脳浮腫発生の誘因となり cytotoxic edema が生じ、さらにこれに脳血管の破綻や血管透過性の亢進による vasogenic edema が進展して脳浮腫が次第に増大してくるものと考ええる。

結 論

高血圧性脳出血の脳浮腫の成因を、エネルギー代謝面より明らかにするため高血圧自然発症ラット (SHR) を用いて実験的脳出血モデルを作成し、脳含水量および脳組織中の c-AMP, ATP および lactate の変動を検索して次の結果を得た。

1) 脳含水量は損傷後 3~6 時間で、損傷側のみならず対側においてもともに増加し始め、24~48 時間で最高に達したが、その程度は損傷側においてより著明であった。

2) 好氣的脳代謝障害は損傷近位部の皮質でより著明であった。また対側においても損傷側に比べて軽度であったが、脳代謝障害が認められた。これは実験的脳出血が損傷側のみならず対側においても同時に代謝に影響を及ぼすことを示すものである。

3) 損傷直後より 6 時間の期間に頭頂部皮質、後頭部皮質、白質において c-AMP は初め急激に増加した

後に減少し、ATP は減少し lactate は増加することが観察された。中脳においては c-AMP, ATP は増加し、lactate の増加はほとんど認められなかった。この損傷部を主とした好氣的脳代謝障害が、損傷後 3～6 時間後より発生する脳浮腫の成因の一端を担っているものと考えた。

4) 好氣的脳代謝障害は 18 時間以後に改善されたが、脳含水量は 24～48 時間で最高値となった。この 24～48 時間の時期での脳浮腫の増大は代謝性の因子以外の要因が働いていることが示唆された。

5) 以上の結果より、実験的脳出血に伴う脳浮腫は、損傷初期には代謝障害に基づく cytotoxic edema, および従来いわれている vasogenic edema よりなり、その後は vasogenic edema が主体となって進展するものと考えた。

稿を終わるに当たり、御援助下さった伊与田浩介講師、溝口正明学士をはじめとする研究班の方々に深謝するとともに、終始実験に御協力を頂いた中澤憲一医学博士に御礼申し上げます。また c-AMP, ATP の測定に御援助を頂いた第 2 生化学教室吉野芳夫教授に謝意を表します。

なお、本論文の要旨は第 4 回日本脳卒中学会総会（昭和 54 年 2 月）および IXth International Symposium on Cerebral Blood Flow and Metabolism (May, 1979, Tokyo) において発表した。

文 献

- 1) Bounds, J.V., Okazaki, H., Reagan, T.J., and Whisnant, J.P.: Recent cerebral infarction in the distribution of the internal carotid artery. *Stroke*, **8**, 5, 1977.
- 2) Klatzo, I., Piroux, A., and Laskowski, E.J.: The relationship between edema, blood-brain-barrier and tissue elements in a local brain injury. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **17**, 548～564, 1958.
- 3) Katzman, R., Clasen, R., Klatzo, I., Meyer, J.S., Pappius, H.M., and Waltz, A.G.: Report of joint committee for stroke resources. IV. Brain edema in stroke. *Stroke*, **8**, 512～540, 1977.
- 4) 植木幸明: 脳浮腫の研究。神研の進歩, **12**, 476～494, 1968.
- 5) Reulen, H.J., Medzihradsky, F., Enzenbach, R., Marguth, F., and Brendel, W.: Electrolytes, fluids, and energy metabolism in human cerebral edema. *Arch. Neurol.*, **21**, 517～525, 1969.
- 6) 新城之介, 伊与田浩介: 脳出血の診断と治療。第 4 巻 脳出血。“脳卒中”(大根田玄寿, 亀山正邦, 佐野圭司, 鈴木二郎, 田崎義昭編), p. 93～105. にゅーろん社, 東京, 1975.
- 7) 柿彰郎, 宮崎徳蔵, 正田哲一, 新城之介: 脳卒中治療の問題点; 高血圧と関連して。現代医療, **7**, 1153～1162, 1975.
- 8) Harrison, M.J.G., and Russell, R.W.: Effect of dexamethasone on experimental cerebral infarction in the gerbil. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **35**, 520～521, 1972.
- 9) Bartko, D., Reulen, H.J., Koch, H., and Schurmann, K.: Effect of dexamethasone on the early edema following occlusion of the middle cerebral artery in cats. “Steroid and Brain Edema” (Reulen, H.J., and Schurman, K. eds.), p. 127～137, Springer-Verlag, Berlin, 1972.
- 10) Ishii, S., Hayner, R., Kelly, W.A., and Evans, J.P.: Studies of cerebral swelling. II. Experimental cerebral swelling produced by supratentorial extradural compression. *J. Neurosurg.*, **16**, 152～166, 1959.
- 11) Ito, U., Spatz, M., Walker, J.T., and Klatzo, I.: Experimental cerebral ischemia in Mongolian gerbils. I. Light microscopic observations. *Acta Neuropathol. (Berl)*, **32**, 209～223, 1975.
- 12) Rall, T.W., and Sutherland, E.W.: Formation of cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. *J. Biol. Chem.*, **232**, 1065～1076, 1958.
- 13) Sutherland, E.W., and Rall, T.W.: Fractionation and characterization of cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J. Biol. Chem.*, **232**, 1077～1091, 1958.
- 14) Sutherland, E.W., Øye, I., and Butcher, R.W.: The action of epinephrine and the role of the adenylyl cyclase system in hormone action. *Recent Prog. Horm. Res.*, **21**, 623～647, 1965.
- 15) Sutherland, E.W., Rall, T.W., and Menon, T.: Adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.*, **237**, 1220～1227, 1962.
- 16) Butcher, R.W., and Sutherland, E.W.: Adenosine 3', 5'-phosphate in biological materials. *J. Biol. Chem.*, **237**, 1244～1250, 1962.
- 17) Kakiuchi, S., and Rall, T.W.: The influence of chemical agents on the accumulation of adenosine 3', 5'-phosphate in slices of rabbit cerebellum. *Mol. Pharmacol.*, **4**, 367～378, 1968.
- 18) Kakiuchi, S., and Rall, T.W.: Studies on adenosine 3', 5'-phosphate in rabbit cortex. *Mol. Pharmacol.*, **4**, 379～388, 1968.
- 19) Sattin, A.: Increase in content of adenosine 3', 5'-monophosphate in mouse forebrain during seizures and prevention of the increase by methylxanthines. *J. Neurochem.*, **18**, 1087～1096, 1971.
- 20) Myers, R.E., and Yamaguchi, M.: Effect of serum glucose concentration on brain response to circulatory arrest. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **35**, 301, 1976.
- 21) Yamaguchi, M., and Myers, R.E.: Comparison of brain biochemical changes produced by anoxia and hypoxia. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **35**, 302, 1976.
- 22) Medina, M.A., Jones, D.J., Stavinocha, W.B., and Ross, D.H.: The levels of labile intermediary metabolites in mouse brain following rapid tissue fixation with microwave irradiation. *J. Neurochem.*, **24**, 223～227, 1975.
- 23) Moroji, T., Takahashi, K., Ogura, K., Toishi, T.,

- and Arai, S.: Rapid microwave fixation of rat brain. *J. Microwave Power*, **12**, 273~286, 1977.
- 24) Paul, M.I., Pauk, G.L., and Ditzion, B.R.: The effect of centrally acting drugs on the concentration of brain adenosine 3', 5'-monophosphate. *Pharmacology*, **3**, 148~154, 1970.
- 25) Schmidt, M.J., Hopkins, J.T., Schmidt, D.E., and Robison, G.A.: Cyclic AMP in brain areas; Effects of amphetamine and norepinephrine assessed through the use of microwave radiation as a means of tissue fixation. *Brain Res.*, **42**, 465~477, 1972.
- 26) 清水宏俊: 神経と Cyclic AMP. *日医師会誌*, **79**, 1156~1160, 1978.
- 27) Lowry, O.H., Passonneau, J.V., Hasselberger, F., and Schulz, D.W.: Effect of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain. *J. Biol. Chem.*, **239**, 18~30, 1964.
- 28) Swaab, D.F.: Pitfalls in the use of rapid freezing for stopping brain and spinal cord metabolism in rat and mouse. *J. Neurochem.*, **18**, 2085~2092, 1971.
- 29) Ferrendelli, J.A., Gay, M.H., Sedgwick, W.G., and Chang, M.M.: Quick freezing of the murine CNS; Comparison of regional cooling rates and metabolite levels when using liquid nitrogen or freon-12. *J. Neurochem.*, **19**, 979~987, 1972.
- 30) Takahashi, R., and Aprison, M.H.: Acetylcholine content of discrete areas of the brain obtained by a near-freezing method. *J. Neurochem.*, **11**, 887~898, 1964.
- 31) Steiner, A.L., Ferrendelli, J.A., and Kipnis, D.M.: Radioimmunoassay for cyclic nucleotides. III. Effect of ischemia, changes during development and regional distribution of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate in mouse brain. *J. Biol. Chem.*, **247**, 1121~1124, 1972.
- 32) Ditzion, B.R., Paul, M.I., and Pauk, G.L.: Measurement of adenosine 3', 5'-monophosphate (Cyclic AMP) in brain. *Pharmacology*, **3**, 25~31, 1970.
- 33) Kogure, K., Scheinberg, P., Matsumoto, A., Busto, R., and Reinmuth, O.M.: Catecholamines in experimental brain ischemia. *Arch. Neurol.*, **32**, 21~24, 1975.
- 34) Watanabe, H., and Ishii, S.: The effect of brain ischemia on the levels of cyclic AMP and glycogen metabolism in gerbil brain in vivo. *Brain Res.*, **102**, 385~389, 1976.
- 35) Watanabe, H., and Passonneau, J.V.: The effect of trauma on cerebral glycogen and related metabolites and enzymes. *Brain Res.*, **66**, 147~159, 1974.
- 36) Burkard, W.P.: Catecholamine induced increase of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate in rat brain in vivo. *J. Neurochem.*, **19**, 2615~2619, 1972.
- 37) Flamm, E.S., Schiffer, J., Viau, A.T., and Naftchi, E.: Alterations of cyclic AMP in cerebral ischemia. *Stroke*, **9**, 400~402, 1978.
- 38) Kogure, K., Scheinberg, P., Utsunomiya, Y., Kishikawa, H., and Busto, R.: Sequential cerebral biochemical and physiological events in controlled hypoxemia. *Ann. Neurol.*, **2**, 304~310, 1977.
- 39) Stefanovich, V., and John, J.P.: The increase of cyclic AMP in rat's brain during anoxia. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **9**, 591~593, 1974.
- 40) 伊与田浩介, 新城之介, 赫彰郎, 永積惇, 比企秀男, 中沢憲一, 添田敏幸, 溝口正明, 布施喜八, 瀬田健一: 脳血管障害の脳浮腫に関する研究. 第8報 実験的脳出血における脳循環と血圧との関係. *脳卒中*, **1**, 181, 1979.
- 41) 渡辺博, 石井昌三: 脳浮腫; その成因の生化学的検討. *血と脈管*, **5**, 455~463, 1974.
- 42) Klatzo, I.: Neuropathological aspects of brain edema. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **26**, 1~14, 1967.
- 43) 伊与田浩介, 赫彰郎: シンポジウム III 脳血管障害における脳浮腫. (1) 脳浮腫の成因. *臨神経*, **19**, 848~851, 1979.

(受付: 1981 年 11 月 4 日)