—原 著—

虚血性脳浮腫における free radical の影響

稲村 憲治

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)

The influence of free radicals on ischemic brain edema

Kenji Inamura

The Second Department of Internal Medicine, Nippon Medical School

The hypothesis that "Free radical reaction" plays a role in production of ischemic brain edema was checked in the ischemic model produced in the Mongolian gerbil through unilateral carotid ligation (ULCL). Free radical is a highly reactive state of molecule with a single electron at the most outer orbit. By its highly reactive nature, free radical affects the lipid bilayer membrane to produce lipid peroxides; it also affects enzyme activities. As an index of free radical activity, the author periodically measured cerebral tissue lipid peroxide level. As an index of cytologic membrane damage, the author measured cerebral tissue acid phosphatase activity. Water content and passage of ^{131}I -RISA were also periodically measured.

In the animals which showed neurological symptoms following ULCL, water content began to rise after 2 to 3 hours after ULCL, reaching its peak at 18 to 48 hours. There was no rise of water content on the contralateral hemisphere.

The ^{131}I -RISA uptake rose only after 12 hours following ULCL only on the ipsilateral hemisphere. This may indicate that the blood brain barrier was still intact till 12 hours after ULCL. The tissue lipid peroxide level rose after ULCL and reached its peak 6 hours after ULCL on the damaged hemisphere. This fact may indicate that free radical reaction was active during this period while the blood brain barrier was still intact.

The total phosphatase activity showed little alteration, but the free acid phosphatase activity of the damaged hemisphere showed elevation at 6 to 24 hours after ULCL. This fact may indicate that the membrane damage had occurred during this period. Since acid phosphatase is usually confined to lysosomes and other membrane particles, the release of the enzyme may be due to the membrane damage.

These results suggest that during the early phase of ischemic brain edema, lipid peroxidation of the membrane occurs as a result of free radical activity. This membrane damage involves plasma membranes as well as membranes of blood brain barrier, thereby enhancing brain edema.

Key words: experimental brain edema, free radical, lipid peroxide, acid phosphatase, blood brain barrier

緒 言

脳卒中急性期において病状を悪化させるものに脳浮腫がある。脳実質は他臓器と異なり、固い頭蓋により保護されているが、脳浮腫の発生により、脳実質の圧

迫、さらには脳ヘルニアの発生へと連なる。したがって、脳浮腫の発生は患者の生命予後に大きく影響するものであり¹⁾、その対策の上からも、その発生機序の解明は重要な課題であるが、その機序はいまだ十分に解明されたとはいえない。

脳浮腫は、脳の液体成分の増加による脳組織容積の増加と定義されるが^{2,3)}、Klatzo らは脳浮腫は液体成分の貯留部位によって、また血液脳関門の透過性亢進

Present address: Department of Internal Medicine, Nippon Medical School First Hospital, 3-5-5, Iidabashi, Chiyoda-ku, Tokyo, 102 Japan

の有無によって cytotoxic edema と vasogenic edema に分類されている²⁾。

vasogenic edema は、血液脳関門が障害されて脳血管内皮細胞の透過性が亢進している状態であり、液体成分は主に細胞外腔に貯留するのに対して、cytotoxic edema は脳の細胞 (glia 細胞, その他 neuron 内皮細胞) 内に液体成分が増加することによって起こる脳浮腫であるが、cytotoxic edema では虚血により脳のエネルギー源であるグルコースが枯渇し、ATP が減少すると Na pump の破綻をきたし、水を伴う Na イオンの細胞内流入により、細胞腫張をきたすと考えられている⁴⁾。

このように脳浮腫は、脳のエネルギー代謝障害によって発生するが、近年 Butterfield⁵⁾, Demopoulos ら^{6,7)}によって free radical 反応により惹起される膜の障害が、脳浮腫の発生に関与する可能性も指摘されている。

free radical とは最外殻電子が対をなしていない分子の状態をいい、この状態では分子は励起された状態にあり非常に反応性が高い。生体の生命維持に酸素は不可欠なものであるが、この酸素が励起されると酸素 free radical となり、生体膜を構成する多価不飽和脂肪酸と反応し過酸化脂質を作り、生体膜に障害を与えると考えられている。生体膜が障害されると酸性フォスファターゼが遊離されるため、遊離酸性フォスファターゼの組織内濃度は生体膜障害の指標とすることができると考えた。

そこで、著者は脳浮腫の発生に free radical がいかなる役割を果たしているかを明らかにする目的で Mongolian gerbil を用いて片側総頸動脈結紮法で作成した脳虚血モデルにおける脳浮腫について、脳含水量、¹³¹I-RISA 移行率、脳組織過酸化脂質と脳組織酸性フォスファターゼを測定することにより、脳浮腫と free radical との関係を検討したので報告する。

研究対象および方法

(1) 研究対象

1) 研究対象と脳浮腫の作成

研究材料としては、24 週齢以上の体重 70~90 g の雄の Mongolian gerbil 190 匹を用いた。Mongolian gerbil は、脳底動脈の発達が十分でなく、左右の動脈の交通が少ないことから、片側総頸動脈結紮法により脳に虚血巣の得られる確率が高く、40~50% 前後といわれる⁸⁾。

結紮後の神経学的症状としては片麻痺、施回運動、眼瞼下垂、刺激に対する反応性の低下、強直性痙攣などが見られ、これら神経学的症状を示すものには虚血病巣が見られると報告されている^{10,11)}。

総頸動脈結紮は、pentobarbital 30 mg/kg を gerbil の腹腔内に投与して麻酔した後、仰臥位に固定し、顕微鏡下で迷走神経を損傷することなく、左総頸動脈を露出し、絹糸を用いて行った。結紮後経時的に各種の検索を行ったが、結紮はあらかじめ左総頸動脈下に糸を通し、麻酔から十分に覚醒するのを待って行った。

(2) 研究方法

1) 脳含水量の測定

片側総頸動脈結紮による脳虚血巣発生後の脳浮腫の進展を見るため、結紮前と結紮後の 1, 2, 3, 6, 12, 24 時間、および 48 時間後のそれぞれの脳につき脳含水量を測定した。

脳含水量の測定は乾燥重量法を用い、湿潤重量を化学天秤にて測定した後、麻酔し、真空凍結乾燥機 (LAB. CON 社製 Freeze dryer-3 型) を用いて 72 時間乾燥し、乾燥重量を測定した。脳含水量は次式 (1) により算出した。

$$\text{含水量 (\%)} = \frac{\text{湿潤重量} - \text{乾燥重量}}{\text{湿潤重量}} \times 100 \cdots (1)$$

2) 血液脳関門の検索

血液脳関門が障害されると、血管内皮細胞の透過性の異常亢進が起こり、血管中から脳組織へ水分が血漿成分を伴って漏出する。このような血液脳関門の障害を検索する目的で、ヒト血清アルブミンを放射性ヨウ素で標識した ¹³¹I-RISA を血管内に注入して、脳組織への移行を測定した。

¹³¹I-RISA の移行率の測定は、片側総頸動脈結紮後 5 μ Ci/kg の ¹³¹I-RISA を大腿静脈より注入し、含水量測定の場合と同様に経時的に脳を採取し、well type のシンチレーション計数管を用いて測定した。

脳採取の前処置として、両側の頸静脈を切断し、あらかじめ腹部大動脈から挿入したカニューレから生理食塩水 500 ml で灌流し、脳内の血液を排除し ¹³¹I-RISA の脳組織への移行率は次式 (2) で算出した。

$$\text{RISA 移行率 (\%)} = \frac{\text{脳組織 1 g 当たりの RISA 量}}{\text{血液 1 ml 当たりの RISA 量}} \times 100 \cdots (2)$$

3) 脳組織過酸化脂質測定

脳虚血後に発生した free radical は、生体膜を構成する不飽和脂肪酸に作用し、過酸化脂質を作る⁹⁾。

そこで脳組織過酸化脂質を free radical 活動の指標と考え、脳浮腫の進展との関連を見るため、結紮前と結紮後 1, 3, 6, 12, 24 時間、および 48 時間後の脳について過酸化脂質を測定した。

脳は断頭後速やかにアセトン加ドライアイスにて凍結し、左右に分割、また前頭部、頭頂部、側頭部、および後頭部の 4 部に分割し、化学天秤にて秤量した。次いでそれらの脳を生食水にて homogenize した。生食水および試薬は、あらかじめ溶存する酸素を排除するため窒素にて通気して使用した。homogenater は Potter-Elvehjem 型 teflon homogenater を使用し、操作中酸素との暴露を避けるため、内容積 50 l のアクリル製箱に窒素を充填し、その箱内で操作した。

脳組織過酸化脂質の測定は大川、八木法¹²⁾による TBA 法を用い、測定手順は Table 1 のごとくである。

測定中 95°C 温浴時は特に遮光に留意し、波長 515 nm で励起し波長 553 nm の蛍光を八木式微量蛍光光度計 TBA 型(コタキ製作所)を用いて測定した。標準液は 1, 1, 3, 3, テトラエトキシプロパン 5 nmol/ml を用いた。

4) 脳組織酸性フォスファターゼ活性の測定

酸性フォスファターゼ (ACP) は、酸性ハイドロラーゼの一つとしてライソゾームなどに存在するが¹³⁾、生体膜の障害により遊離し放出されるので、膜障害のよき指標と考えられるものである。脳浮腫の進展との

Table 1 Procedure for the assay of tissue lipid peroxides

Assay of Tissue Lipid Peroxides

Sampling of brain tissue
freezing immediately
+ 1.5mg Tocopherol acetate
+ 2.0ml 0.9% NaCl
Homogenize by Potter homogenizer
Tissue Homogenate 100μl
+ 8.1% SDS 0.4ml
+ 20% Acetate buffer (pH 3.5) 1.5ml.
+ 0.8% TBA 1.5ml
+ distilled water (made up to 4.0ml)
Mixture
heating (95°C 60min) by oil bath
cooling with tap water
+ 1.0ml of distilled water
+ n-Butanol-Pyridine mixture (15:1 V/V)
shake vigorously
centrifugation at 3,000rpm 20min
Organic layer
absorbance at 532nm
TMP was used as external standard

関連を見るため、結紮前と結紮後 1, 3, 6, 12, 24, 48 時間の脳について測定した。

被検脳は断頭後速やかに取り出し秤量し、4°C に氷で冷却した 0.32 M ショ糖 0.01 M シュウ酸ナトリウム pH 5.6 の緩衝液を加え、4°C の状態で Potter 型 homogenater を用いて 10% homogenate を作った。これを二分し、それぞれについて総酸性フォスファターゼ活性、および遊離酸性フォスファターゼの測定を行った。

総酸性フォスファターゼ活性は homogenate に界面活性物質 Triton X-100 (Eastman) をその濃度が 0.1% (v/v) となるように加え、paranitrophenylphosphate を基質とし、次に示す化学反応により産生される phosphate (Pi) を吸光度 405 nm にて 200-10 形、日立ダブルビーム分光光度計を用い測定した。

反応は正確に 10 分間、37°C の恒温槽中に行い、10% トリクロル酢酸を加え反応を終結させ、遠心後上清を発色させ、その吸光度を測定した。

次に遊離酸性フォスファターゼ活性は、homogenate を日立製 65 P 型の分離用超遠心機にて RP 55 T 型ローターを使用し、105,000 G にて遠心し、脳組織、ライソゾームなどの不溶物質を沈殿させ、その上清に

Table 2 Procedure for the assay of tissue acid phosphatase activity

Assay of Brain Tissue ACPase

Sampling of brain tissue
Homogenize by Potter homogenater
10% Homogenate (0.33M Sucrose 0.01M Na-Citrate pH5.6)
Total
+ 10% Triton X-100 to make 0.1% Solution
Mixture 50μl
+ Na-Citrate buffer 0.1M pH5.6 0.92ml
+ PNPP (p-Nitrophenylphosphate) 30μl
Incubation for 10min at 37°C
+ 10% TCA 1.0ml
Centrifuge 3000rpm x 15min
Supernatant 1.0ml
+ NaOH 2N 2ml
Measure absorbance ABS 405nm
Free
Ultracentrifuge 105000g
Use supernatant
Same as above.

ついて測定した。測定法は、総酸性フォスファターゼの測定と同様の手順にて行った。以上の測定手順は **Table 2** のごとくである。

成 績

1. 脳含水量

Mongolian gerbil の片側総頸動脈結紮後、運動麻痺を呈したもののみにつき脳含水量を測定した。前述したごとく、運動麻痺を呈したものは脳虚血巣が生じており、脳浮腫の発生がみられるからである。

脳の含水量は **Fig. 1** のごとく、結紮側では結紮後 2~3 時間後から増加し始め、18~48 時間後に最高値を示した。対側では明らかな変化を示さなかった。

このように虚血性脳浮腫においては、浮腫は比較的早期より出現し、18~48 時間で最も強くなる傾向を認めた。

Fig. 1 Water content of Mongolian gerbil brain after unilateral carotid artery ligation
Only those which showed neurological symptoms.

2. 脳組織への ^{131}I -RISA 移行率

総頸動脈結紮後の血液脳関門の障害の有無を知る目的で、脳組織への ^{131}I -RISA の移行率を測定した。**Fig. 2** に示したごとく、結紮後運動麻痺を呈した群、すなわち脳虚血巣を生じたものでも結紮早期では ^{131}I -RISA の移行がみられないが、結紮の 12 時間後

Fig. 2 ^{131}I -RISA uptake of Mongolian gerbil brain after unilateral carotid artery ligation
Only those which showed neurological symptoms.

ころより移行が起こることが認められた。

これは脳血管の透過性亢進が虚血の 12 時間後ころより起こることを示し、血液脳関門が虚血後早期にはなお障害されていないが、虚血の 12 時間後ころより破綻が始まることを示すものと考えられる。

この血液脳関門の破綻により循環血液中の血漿成分が脳組織に漏出し始め、虚血早期に発生する脳浮腫をさらに増大させるものと考えられる。

3. 脳組織の過酸化脂質

虚血性脳浮腫と free radical の関係を検索するために測定した脳組織過酸化脂質は **Fig. 3** に示したごとく、Mongolian gerbil の片側総頸動脈結紮では、結紮側において虚血早期より脳組織過酸化脂質の上昇が見られた。

すなわち、両側脳をそれぞれ前頭部、頭頂部、側頭部、後頭部の 4 部分に分けて測定したが、結紮側の脳では各部分ともに脳組織過酸化脂質は同様に虚血早期より上昇し、結紮後 6~12 時間にて最高値を示し、以後漸減して 72 時間でほぼ前値に復した。

Fig. 4 のごとく対側においてもわずかであるが虚血早期より上昇を示し、結紮側と同様の経過を示した。

これらの成績は虚血早期の血液脳関門が障害される

Fig. 3 Changes in brain lipid peroxide levels at different times after unilateral carotid artery ligation in Mongolian gerbil. Damaged hemisphere.

Fig. 4 Changes in brain lipid peroxide levels at different times after unilateral carotid artery ligation in Mongolian gerbil. Undamaged hemisphere.

Fig. 5 Changes of brain total acid phosphatase activity after unilateral carotid artery ligation in Mongolian gerbil

以前から free radical の活動が活発であることを示すものとする。

4. 脳組織酸性フォスファターゼ

総酸性フォスファターゼ活性は組織中の全活性を表

すもので、その測定値は Fig. 5 に示したごとく、結紮側でわずかの減少を認めたのみであり、対側では変化はほとんど認められなかった。

遊離酸性フォスファターゼは Fig. 6 のごとく、結紮側において結紮後の 6～12 時間後にかけて上昇が

Fig. 6 Changes of brain free acid phosphatase activity after unilateral carotid artery ligation in Mongolian gerbil

見られたが、対側における変化はわずかであった。

このことは膜障害により、酸性フォスファターゼが虚血後 6~12 時間後に遊出してくることを示すものと考えられる。

考 察

著者は虚血性脳浮腫における free radical の影響を検討する目的で、虚血後の脳含水量の推移を測定するとともに、脳の細胞膜障害に重要な影響を及ぼすと考えられる free radical 反応につき検索し、併せて虚血性脳浮腫の発生機序について考察を加える。

脳浮腫に伴う細胞内外の水分の分布異常は、膜の異常なしには考えられない。また、血液脳関門の障害も循環血液と組織を境する膜の異常と考えられる。

虚血性脳浮腫に及ぼす free radical の影響と膜障害について著者の成績について考案するに当たり、生体膜の構造と機能、free radical による膜障害、膜障害と血液脳関門の障害、虚血性脳浮腫と free radical 反応の順序で述べることにする。

著者の実験では結紮による虚血を発生させてから、虚血後早期の 2~3 時間後に含水量の増加が見られ、虚血早期から脳浮腫の発生が認められた。この時期の脳浮腫は ATP 欠乏から起こる Na pump 障害による代謝性の細胞腫脹が主因で起こるとされており、近年この過程に free radical の関与が注目されている⁵⁻⁸⁾。

膜の構造は、Singer and Nicolson¹⁴⁾ の提唱する流動モザイクモデルが、種々の実験研究によって現在ほぼ認められている。

free radical が膜に反応すると、膜脂質不飽和脂肪酸は過酸化脂質となり、膜流動性の低下^{15,16)}、イオン透過性の亢進¹⁷⁾、膜酵素活性変化膜構成物質の変性が

起こり、障害が進行すると、膜蛋白が非可逆的变化を起こし¹⁸⁾、最終的には膜の破壊が起こると考えられる。

膜には Na-K ATPase が存在し、ATP 存在下において Na pump として働いている。虚血が起こると、ATP 欠乏から Na pump の機能が失われ、細胞内外の Na⁺, K⁺ の濃度差から、Na⁺ は細胞内へ移動するが、この時に水分子を伴い細胞内へ移動する。このことが虚血初期の細胞腫脹の主因と推定されている^{2,4)}。

しかしながら、Na pump の本態である Na-K ATPase もまた酵素であることから、free radical による活性変化も考えられるところである。

虚血部において、いかに free radical が発生し、脂質過酸化が起こるかはいまだ不明な点が多い。

著者の実験成績では、結紮後の 2~3 時間の虚血早期の脳において、すでに過酸化脂質の上昇が見られることから、虚血早期より free radical の発生が促され、過酸化反応が進展し、膜脂質が過酸化脂質となることが示された。また、過酸化脂質は free radical 反応の結果と考えられること、虚血発生 6 時間後に過酸化脂質が高値を示したことから、この時期に free radical 反応が活発であることが推察された。

Flamm ら⁹⁾は、虚血時にミトコンドリアの電子伝達系の末端に電子が集り、酸素を加水分解できずに free radical が産生され、ミトコンドリアの膜構造に過酸化反応⁸⁵⁻⁸⁸⁾を惹起すると考えた。Butterfield ら⁵⁾は、酸素が疎水部に溶存しやすい性質から、膜の脂質二重層の疎水部に酸素 free radical が反応すると、膜脂質過酸化反応を起こし、膜脂質の疎水結合を障害し、ひいては生体膜を機能的、器質的に障害するとした。

しかし小暮ら^{22,28)}は、閉塞血管の再開通により多量の酸素が供給された場合は別として、虚血のみではミトコンドリア周囲の酸素濃度が低く、過酸化を起こすまでにはなりにくとした。膜脂質が過酸化されると、膜は器質的障害を受け⁴⁰⁾、ついには構造的な不可逆的障害を被ることが考えられる。

著者は、このような膜構造の崩壊を見る指標として、脳組織酸性フォスファターゼ活性を測定した。というのは、膜障害により酸性フォスファターゼが遊出する²⁶⁻²⁸⁾ものと考えられるからである。

著者の成績では、総酸性フォスファターゼ活性に大きな変化が認められないにもかかわらず、虚血後 6~24 時間後に遊離酸性フォスファターゼ活性の上昇がみられた。

酸性フォスファターゼは、酸性水解酵素の一つとしてライソゾームなどに存在するが、DeDuve ら¹⁹⁾は、細胞の自己融解の過程として、ライソゾーム膜が破れ、中の酸性水解酵素の細胞質内への遊出が起これるとした。また無酸素状態、過剰の酸素でライソゾーム酵素の遊出が起これることなどから^{24,25)}、酸素 free radical はライソゾーム膜障害に深くかかわっていることが考えられる²⁶⁻²⁸⁾。また Clendenon は、脳において酸性水解酵素の結合状態が他臓器と異なることを示した²⁹⁻³¹⁾。

著者の成績で認められた遊離酸性フォスファターゼ活性の上昇は、free radical によるライソゾーム膜の障害²⁶⁻²⁸⁾、または酸性フォスファターゼ結合顆粒³¹⁾の膜障害によって酵素が遊出したものと考ええる。

このような虚血早期の free radical による生体膜障害は、ミトコンドリア、ライソゾーム膜をはじめ、すべての膜に及び、細胞膜の障害へと進展することが考えられる。またこの障害は、血液脳関門を構成する種々の膜にも同様に起これ、血液脳関門の障害へと進展するものと思われる。

血液脳関門の障害を検索するに当たり、著者は¹⁸¹I-RISA の静脈内投与を行った。¹⁸¹I-RISA は正常な動物へ注射しても脳組織へは移行しない。しかし血液脳関門の器質的障害があれば、血液中から脳組織中へ漏出し、血液脳関門の障害を知るよい指標となる。

著者の成績では、脳虚血の作成後約 12 時間後に初めて¹⁸¹I-RISA の脳組織への移行が認められ、この時以降に血液脳関門の障害が認められたことになる。このことは、機能的血液脳関門の障害が虚血後 12 時間を経てから器質的、不可逆的な障害に陥ったものと

考える。

著者の成績から、過酸化脂質は虚血後 6 時間で最高値に達したが、これは虚血後活発となった free radical 反応が、その後に発生する血液脳関門の器質的障害にもなんらかの影響を及ぼしたものと考える。すなわち、血液脳関門は毛細管内皮細胞の膜、血管周囲腔、基底膜、星状細胞よりなると考えられており³⁸⁾、したがってその機能³²⁾は、これら膜の機能が複合したものであると思われるからである³⁴⁾。

このように循環血液中の血漿成分が、脳組織中に浸出することは、脳浮腫をさらに増悪、助長させるものと考ええる。

著者の成績をもとに、虚血性脳浮腫の発生に free radical 反応がいかに関与するか考察を加える。

著者の脳含水量の成績から、虚血性脳浮腫は虚血発生後、早期の 2~3 時間後から現れる。この時期の脳浮腫は、ATP 欠乏から起こる Na pump の機能障害による代謝性の細胞腫張が主因であるとされている^{2,4)}。

しかし著者の成績では、脳組織過酸化脂質も虚血後より増加を示し、虚血後 6 時間で最高値を示すことから、この時期に free radical 反応が活発であることを示している。

通常、free radical 反応に対し生体では防御機構が存在する^{19,20)}。すなわち radical scavenger によって生体は防御されている。

しかしながら、free radical 反応が活発であるということは、虚血によって scavenger は枯渇し、free radical 反応を阻止しえない状態になったものと推察する。

一方、free radical の作用として膜の酵素および蛋白の SH 基³⁹⁻⁴⁰⁾を障害することが知られている。その SH 基は多くの膜機能に関与し⁴⁰⁾、中でも Na-K ATPase の機能との関係は深い¹⁸⁾。

したがって free radical は、このように SH 基障害を介して ATPase の活性を低下させ⁴²⁻⁴⁶⁾、ひいては Na pump の機能を障害する。このような free radical による影響は、膜の複合体である血液脳関門にもみられるものと考ええる。

すなわち、虚血早期には虚血によって活発化した free radical によって Na pump は障害を受け、脳のエネルギー代謝障害と相まって血液脳関門の代謝的、また機能的、器質的障害によって脳浮腫の発生が促されたと推察した。

Fig. 7 Schematic diagram of free radical hypothesis on production of ischemic brain edema

以上、虚血性脳浮腫の成因を free radical 障害の面からまとめると、Fig. 7 のような模式図になると考える。

結 論

Mongolian gerbil の片側総頸動脈結紮法により脳虚血モデル作成をし、脳含水量、脳組織への ^{131}I -RISA 移行率、脳組織過酸化脂質および酸性フォスファターゼ活性の測定をそれぞれ経時的に行い、free radical 反応による膜障害が脳浮腫にいかに関与するか検討し、次の結果を得た。

1) 脳浮腫は結紮側においては結紮後 2~3 時間の早期より虚血側に出現し始め、18~24 時間後に最高に達する。

2) ^{131}I -RISA の脳組織への移行は、結紮後 12 時間後に初めて認められた。これは血液脳関門の透過性亢進がこの時期に起こることを示すものと推定され、循環血液中の物質が水分を含め、脳組織中へ漏出し、脳浮腫はさらに助長されるものと考えられる。

3) 脳組織過酸化脂質は虚血早期より上昇が認められた。これは生体膜の過酸化反応が free radical により早期から惹起されていることを示唆するものと考えた。

4) 総酸性フォスファターゼは虚血後大きな変化は認められないが、遊離酸性フォスファターゼは虚血後

6 時間より上昇を示した。これは生体膜がこの時期に障害されたことを示すと考えた。

5) 以上の成績から虚血早期の脳浮腫は、虚血により発生した free radical が生体膜に作用し、膜を構成するリン脂質を過酸化し、この膜障害により、細胞膜はもとより血液脳関門の障害を促し、一方では血液脳関門エネルギー不足による代謝的障害を助長し、さらに器質的障害を促し、脳浮腫の一層の発生および進展が起こるものと結論した。

稿を終るに当たり、本研究について御指導と御援助下さった伊與田浩介講師ならびに本研究に御協力下さった添田敏幸博士、杉本繁博士、片山泰朗博士、溝口正明博士に厚く御礼申し上げます。

なお、本論文の要旨は第 6 回日本脳卒中学会総会（昭和 56 年 2 月）、および 12th World Congress of Neurology (Sept., 1981, Kyoto) において発表した。

文 献

- 1) Bounds, J.D., Wiebers, D.O., Whisnant, J.P., and Okazaki, H.: Mechanisms and timings of deaths from cerebral infarction. *Stroke*, **12**, 474~477, 1981.
- 2) Klatzo, I.: Neuropathological aspects of brain edema. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **26**, 1~14, 1967.
- 3) Katzman, R., Clasen, C.R., Klatzo, I., Meyer, J.S., Pappius, H.M., and Waltz, A.G.: Brain edema in stroke. *Stroke*, **8**, 512~540, 1977.
- 4) 渡辺博, 石井昌三: 脳浮腫; その成因の生化学的検討。血液と脈管, **9**, 455~463, 1974.
- 5) Butterfield, J.D., Jr., and McGraw, C.P.: Free radical pathology. *Stroke*, **9**, 443~445, 1978.
- 6) Flamm, E.S., Demopoulos, H.B., and Seligman, M.L.: Free radicals in cerebral ischemia. *Stroke*, **9**, 445~447, 1978.
- 7) Demopoulos, H.B., Miluy, P., Kakari, S., and Ransohoff, J.: Molecular aspects of membrane structure in cerebral edema. "Steroids and brain edema" (Reulen, H.V., and Schürmann, K. eds.), p. 29~55, Springer, New York, 1972.
- 8) Demopoulos, H.: The basis of free radical pathology. *Fed. Proc.*, **32**, 1859~1861, 1973.
- 9) Kahn, K.: The natural course of experimental infarction in gerbil. *Neurology (Minneapolis)*, **22**, 510~515, 1972.
- 10) Levy, D.E., Brierly, J.B., and Plum, F.: Ischemic brain damage in the gerbil in the absence of "no reflow". *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **38**, 1197~1205, 1975.
- 11) Berry, K., Wisniewski, H.M., Svarzbein, L., and Baez, S.: On the relationship of brain vasculature to production of neurological deficit and morphological changes following acute unilateral common carotid artery ligation in gerbils. *J. Neurol. Sci.*, **25**,

- 75~92, 1975.
- 12) Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K. : Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, **95**, 351~358, 1979.
- 13) DeDuve, C., and Wattiaux, R. : The classic general review. *Annu. Rev. Physiol.*, **28**, 435~492, 1966.
- 14) Singer, S.J., and Nicolson, G.L. : The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175**, 720~731, 1972.
- 15) Dobretsov, G.E., Borschevskaya, T.A., Petrov, V.A., and Aladiminov, Y.A. : The increase of phospholipid bilayer rigidity after lipid peroxidation. *FEBS Lett.*, **84**, 125~128, 1977.
- 16) Shiraiishi, N., Arima, T., Aono, K., Inoue, B., Morimoto, Y., and Utsumi, K. : Inhibition of lipid peroxidation in biological membranes by biscoclaurine alkaloid. *Physiol. Chem. Phys.*, **12**, 299~305, 1980.
- 17) 内海耕造, 白石則之 : 生体膜と過酸化脂質について. “未熟児, 新生児の酸素障害; 活性酸素, フリーラジカル” (馬場一雄, 坂元正一, 美濃真編), p. 127~139, 医歯薬出版, 東京, 1981.
- 18) 松本順二 : 赤血球膜に及ぼす高分子 SH 阻害剤の影響. お茶の水医誌, **18**, 87~102, 1970.
- 19) 錦見盛光 : 生体内における活性酸素. “脳虚血と細胞障害; 活性酸素とフリーラジカルの関与” (浅野孝雄編), p. 3~8, にゅーろん社, 川崎, 1980.
- 20) 八木国夫 : 酸素の特性と生体における酸化機構. 代謝, **17**, 1695~1702, 1980.
- 21) 松浦輝男 : 酸素酸化反応. p. 17~51, 丸善, 東京, 1977.
- 22) 小暮久也 : 虚血と脳代謝. “虚血と細胞障害” (早石修, 八木国夫, 五島雄一郎監), p. 51~64, 医歯薬出版, 東京, 1980.
- 23) 小暮久也 : 脳虚血と活性酸素. “脳虚血と細胞障害” (浅野孝雄編), p. 17~30, にゅーろん社, 川崎, 1980.
- 24) Leighty, E.G., Stoner, C.D., Ressallat, M.M., Pasananti, T., and Sirak, H.D. : Effects of acute asphyxia and deep hypothermia on the state of binding of lysosomal acid hydrolases in canine cardiac muscle. *Circ. Res.*, **21**, 59~64, 1967.
- 25) Abraham, R., Dawson, W., Grasso, P., and Goldberg, L. : Lysosomal changes associated with hyperoxia in the isolated perfused rat liver. *Exp. Mol. Pathol.*, **8**, 370~387, 1968.
- 26) Desai, I.D., Sawant, P.L., and Tappel, A.L. : Peroxidative and radiation damage to isolated lysosomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **86**, 277~285, 1964.
- 27) Wills, E.D., and Wilkinson, A.E. : Release of enzymes from lysosomes by irradiation and relation of lipid peroxide formation to enzyme release. *Biochem. J.*, **99**, 657~666, 1966.
- 28) Fong, K.L., McCay, P.B., and Poyer, J.L. : Evidence that peroxidation of lysosomal membranes is initiated by hydroxyl free radicals produced during flavin enzyme activity. *J. Biol. Chem.*, **248**, 7792~7797, 1973.
- 29) Clendenon, N.R., Komatsu, T., Allen, N., and Gordon, W. : Experimental alterations of the bound state of cerebral lysosomal enzymes. *Neurology* (Minneapolis), **21**, 103~110, 1971.
- 30) Clendenon, N.R., Allen, N., Komatsu, T., Liss, L., Gordon, W.A., and Heimberger, K. : Biochemical alterations in the anoxic-ischemic lesion of rat brain. *Arch. Neurol.*, **25**, 432~448, 1971.
- 31) DeAraujo, P.S., Mies, V., and Miranda, O. : Subcellular distribution of low and high molecular weight acid phosphatases. *Biochim. Biophys. Acta*, **452**, 121~130, 1976.
- 32) Dobbins, J. : The blood-brain barrier. *Physiol. Rev.*, **41**, 130~188, 1961.
- 33) 平野朝雄, 松井孝嘉 : 脳浮腫; 脳の微細病理形態からみた解説. 脳神経外科, **6**, 211~219, 1978.
- 34) 伊與田浩介 : 虚血性脳浮腫の発生機序. 日医大誌, **48**, 505~516, 1981.
- 35) Hohl, H., and Hegner, H. : Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo? *Eur. J. Biochem.*, **82**, 563~567, 1978.
- 36) Boveris, A., and Cadenas, E. : Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett.*, **54**, 311~315, 1975.
- 37) Majewska, M.D., Strosznajder, J., and Tazarewicz, J. : Effects of ischemic anoxia and barbiturate anesthesia on free radical oxidation of mitochondrial phospholipids. *Brain Res.*, **150**, 423~434, 1978.
- 38) Tappel, A.L., and Zalkin, H. : Lipid peroxidation in isolated mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, **80**, 326~332, 1959.
- 39) Tappel, A.L. : Vitamin E as the biological lipid antioxidant. *Vitam. Horm.*, **20**, 493~510, 1962.
- 40) Tappel, A.L. : Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed. Proc.*, **32**, 1870~1874, 1973.
- 41) Weed, R.I., and Berg, G.G. : Membrane sulfhydryl groups and ATPase. *Fed. Proc.*, **22**, 213, 1963.
- 42) Lewis, S.E., and Wills, E.D. : The destruction of SH groups of proteins and amino acids by peroxides of unsaturated fatty acids. *Biochem. Pharmacol.*, **11**, 901~912, 1962.
- 43) Schaefer, A., Komlos, M., and Seregi, A. : Lipid peroxidation as the cause of ascorbic acid induced decrease of adenosine triphosphatase activities of rat brain microsomes and its inhibition by biogenic amines and psychotropic drugs. *Biochem. Pharmacol.*, **24**, 1781~1786, 1975.
- 44) Bartosz, G., Fried, R., Grzelinska, E., and Leyhs, W. : Effects of hydroperoxide radicals on bovine-erythrocyte membrane. *Eur. J. Biochem.*, **73**, 261~264, 1977.
- 45) Chan, P.C., and Rosenblum, M.S. : Effect of sulfhydryl group modification on erythrocyte membrane adenosine triphosphatase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **130**, 143~145, 1969.
- 46) Rothstein, A. : Sulfhydryl groups in membrane structure and function. “Current topics in membrane and transport Vol. 1” (Bronner, F., and Kleinzeller, A. eds.), p. 15~176, Academic Press, New York, 1970.

(受付 1982 年 1 月 12 日)