—特集(虚血性脳血管障害 一病態)—
—よりみた治療への展望—

脳代謝よりみた虚血耐性現象

片山 泰朗

日本医科大学内科学第2教室

Studies on ischemic tolerance

An approach from energy metabolism

Yasuo Katayama

The Second Department of Internal Medicine, Nippon Medical School

はじめに

近年、虚血耐性現象^{1,2)}という現象が脳虚血の分野において注目を浴びている。これは非致死的な脳虚血が次に加えられる致死的な脳虚血の侵襲に対して抵抗性を与える現象である。この現象は、虚血により細胞内への Ca^{2+} の流入が引き金となり、細胞内で Ca^{2+} 依存性蛋白が活性化され、特定遺伝子を発現させ³⁾、heat shock protein (HSP)⁴⁾ などのストレス蛋白を発現することによりもたらされ则认为られている。脳虚血による遺伝子発現やストレス蛋白誘導に関しては、多く報告がなされ、研究が進展している。

ここで本研究の背景となったいくつかの報告や研究者らの追試の成績について触れる。

砂ネズミに2分虚血の侵襲を加えても海馬 CA_1 錐体細胞は大部分生存する(図1)。5分虚血を加えると海馬 CA_1 錐体細胞は大部分死滅する(図2)。2分虚血を加えて1日以上経過して5分虚血を加えると、海馬 CA_1 錐体細胞の細胞死は著しく減少する(図3)。この海馬 CA_1 錐体細胞のみられた虚血耐性現象は海馬のみに特異な現象ではなく、他の部位にも一般的な現象として存在することが明らかとされている⁵⁾。

本シンポジウムでは、このような研究背景の下に虚血耐性現象を脳エネルギー代謝より、そのメカニズムにアプローチしたので報告する。

24時間前に2分虚血を負荷した砂ネズミ(虚血

耐性獲得動物)と2分虚血を負荷しなかった砂ネズミ(虚血耐性非獲得動物)において、虚血負荷

図1 脳虚血2分+7日間再灌流の海馬 CA_1 錐体細胞。大部分の CA_1 細胞は生存していることが観察される。

図2 脳虚血5分+7日間再灌流の海馬 CA_1 錐体細胞。大部分の CA_1 細胞は死滅していることが観察される。

図3 脳虚血2分後1日経過+5分虚血+7日間再灌流の海馬CA₁錐体細胞。かなりのCA₁細胞が死滅せずに生存していることが観察される。

(5分虚血)の応答の差異をエネルギー代謝およびエネルギー代謝を律速するミトコンドリア酵素である pyruvate dehydrogenase (PDH) 活性を測定することによって検討した。

方 法

約60gの雄性の mongolian gerbil を使用して、2%フローセン麻酔の後に、動脈瘤クリップを用いて両側総頸動脈を閉塞することにより脳虚血を作成し、閉塞を解除することにより再開通を行った。虚血耐性獲得動物は2分虚血を加えた後24時間経過した動物に5分虚血を加えた。虚血耐性非獲得動物は5分虚血のみを施した。なお、虚血中および再開通30分までの期間は、頭蓋表面および直腸温を $37.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ に維持した。5分虚血後、再開通0, 10分, 1時間, 1, 3および7日後に液体窒素で凍結後、海馬が描出される冠状断面を作成し、海馬CA₁およびCA₃を含む海馬および皮質より脳組織を採取して、脳代謝諸量(ATP, PCr, lactate) およびPDH活性を測定した。脳代謝諸量はLowryの方法、PDH活性(active form)はHinmanの方法で測定した。

結 果

2分虚血をあらかじめ負荷した群および負荷しなかった群ともに5分虚血によりATPは海馬および皮質においてほぼ0となった。10分再開通では両群とも両部位においてコントロールの約70%

に回復した。その後再開通1日ではコントロール値となった。両群間にその変動の差を認めなかった。再開通3日において海馬では2分虚血+5分虚血群および5分虚血群の一匹ずつが低値をとった。7日では5分虚血群は4匹中4匹とも有意の低値を示したのに対して、2分虚血+5分虚血群は3匹中の1匹が明らかな減少を示したのみであり、虚血耐性群ではATPは減少せず高値に維持された。他方、皮質ではATPは再開通1日以後7日まで2分虚血+5分虚血群および5分虚血群ともコントロールレベルにあった(図4)。

PCrは海馬では両群とも虚血により0となり、再開通10分ではコントロール値となった。その後3日までほぼコントロールレベルであった。7日後では5分虚血群は4匹中3匹がPCrの低下をみた。一方、2分虚血+5分虚血群は3匹中1匹に軽度低下をみた。皮質では3日目まで両群とも海馬と同様の変動を示した。7日においてもコントロールレベル内にあった(図5)。

嫌気的解産物である lactate は、海馬では両群とも虚血により7~8倍に増加し、再開通により速やかに減少し、60分以後7日までコントロールレベルにあった。両群間において差を認めなかった。皮質でも海馬と同様の変動を示し、虚血により著増し、再開通により速やかに減少し、60分以後はコントロールレベルであった。両群間において差を認めなかった(図6)。

PDH活性は、海馬では両群とも約2倍に増加した。両群間においては差をみなかった。再開通10分では両群ともコントロールレベルより低値を示した。60分ではコントロールレベルとなり、その後はほぼ同レベルで推移した。再開通3日では5分虚血群では4匹中2匹が低値をとった。一方、2分虚血+5分虚血群はコントロールレベルにあった。7日後では5分虚血群では3匹中2匹は低値を示した。2分虚血+5分虚血群は活性の高いものから低いものまでであった。皮質では両群とも虚血によるPDH活性上昇は明らかでなかった。再開通10分では両群とも低値をとった。両者間で差は認められなかった。その後PDH活性は徐々に増加し再開通1日ではコントロール値と

図4 海馬（上段）および皮質（下段）の脳虚血および再灌流後のATP値の変化。海馬において5分虚血群は7 daysにATPの低下を認めるが、2分虚血+5分虚血群ではその減少が軽度である。

なった。以後7日までほぼ同レベルで推移し、両群間に差異はなかった（図7）。

考 察

本研究に先立って行った preliminary study の

2分虚血と5分虚血の脳代謝に及ぼす検討では、両群間にその代謝障害の程度および回復経過に差異を認めなかった。再開通24時間では両群ともエネルギー代謝は虚血前の状態に回復していた。

2分虚血をあらかじめ負荷した動物と負荷しな

図5 海馬（上段）および皮質（下段）のPCr値の変化。海馬において5分虚血群は7daysにPCrの低下を認めるが、2分虚血+5分虚血群ではその減少をほとんど認めない。

かった動物における5分虚血負荷の脳エネルギー代謝に及ぼす差異の検討では、ATPおよびPCrの高エネルギー燐化合物は、5分虚血により海馬および皮質の両部位において、両群ともほぼ0となりlactateは7～8倍に増加した。それらの減少または増加程度に差を認めなかった。これは、

あらかじめ2分虚血を加えても、加えなくとも5分虚血は同じ程度の虚血侵襲が加わっていることを示している。ミトコンドリア酵素であるPDH活性は皮質では増加がみられなかったが、海馬では虚血により約2倍に増加した。これは虚血による酸素およびブドウ糖の供給不足に対応した代償

Lactate in Hippocampus

Lactate in Cortex

図6 海馬(上段)および皮質(下段)の lactate 値の変化。5分虚血群と2分虚血+5分虚血群との間にその変動の差を認めない。

反応と考えられる。ミトコンドリア酵素の一つである PDH 活性においても、2分虚血を加えた群と加えなかった群において差をみなかった。

再灌流後1時間までに ATP, PCr, lactate の脳代謝諸量は、海馬および皮質において、両群とも差異なく速やかにほぼコントロールレベルに復した。PDH 活性は再灌流10分で低値をみた。この現象はすでに以前の研究において観察して報告した⁹⁾。その後海馬では60分で、皮質では1日でコントロール値に復した。両群間に差はなかった。3

日後では海馬において一部の動物で、ATP, PCr レベルの低下がみられ、7日後では5分虚血のみを加えた動物の海馬において、これらの高エネルギー磷酸化合物が著しく減少した。lactate 値は再灌流時では両部位においてコントロール値範囲内であった。PDH 活性は5分虚血のみを加えた動物で海馬において、3日以後より低下する傾向をみたが、動物数を増してさらに検討する必要があると思われた。

このように虚血を pretreatment しなかった動

PDH Activity in Hippocampus

PDH Activity in Cortex

図7 海馬(上段)および皮質(下段)のPDH活性の変化。海馬では5分虚血群は7 daysにPDH活性が低下する傾向をみた。

物では海馬において再灌流3日後頃よりPDH活性の低下、高エネルギー磷酸化合物の減少がみられ、すなわちミトコンドリアの機能低下によるエネルギー代謝障害が発生してきており、再灌流7日で観察された海馬CA₁細胞の遅発性神経壊死が起こり始めていることが示唆された。海馬CA₁錐体細胞の死は、高エネルギー磷酸化合物が枯渇していないことやlactateの増加がみられないことより、すでに報告されているように脳虚血時におけるグルタミン酸の放出⁷⁾や海馬CA₁錐体細胞

にグルタミン酸受容体が高密度に分布していること⁸⁾などが関与していると考えられた。

以上、本研究の結果、2分虚血をあらかじめ加えることにより次に加えられる致死的な虚血に対して虚血耐性現象が発現されるのは、虚血侵襲によるエネルギー代謝障害が軽減されるのではなく、蛋白合成能⁹⁾やストレス蛋白のgeneの誘導・転写³⁾に影響してもたらされたものと考えられた。

本研究に御協力下さった日本医科大学第一病院生理研究

室, 松村浩美技術員, Mrs. Ann McKee ならびに第2内科, 神谷達司博士, 李秀玲研究生に謝意を表します。

文 献

- 1) Kitagawa, K., Matsumoto, M., Tagaya, M., et al.: 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain. *Brain. Res.*, **528**, 21~24, 1990.
- 2) Kirino, T., Tsujita, Y., and Tamura, T.: Induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons. *J. CBF and Metabol.*, **11**, 299~307, 1991.
- 3) Abe, K., Tanzi, R.E., and Kogure, K.: Induction of HSP 70 mRNA after transient ischemia in gerbil brain. *Neurosci Lett.*, **125**, 166~168, 1991.
- 4) Vass, K., Welch, W.J., and Nowak, T.S.: Localization of 70-kDa stress protein induction in gerbil brain after ischemia. *Acta Neuropathol.*, **77**, 128~135, 1988.
- 5) Kitagawa, K., Matsumoto, M., Kuwabara, K., et al.: 'Ischemic tolerance' phenomenon detected in various brain regions. *Brain Res.*, **561**, 203~211, 1991.
- 6) Katayama, Y., and Welsh, F.A.: Effect of dichloroacetate on regional energy metabolites and pyruvate dehydrogenase activity during ischemia and reperfusion in gerbil brain. *J. Neurochem.*, **52**, 1817~1822, 1989.
- 7) Benveniste, H., Drejer, J., Schousboe, A., et al.: 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.
- 8) Monaghan, D.T., Holets, V.R., Toy, D.W., et al.: Anatomical distributions of four pharmacologically distinct 3H-L-glutamate binding sites. *Nature*, **306**, 176~179, 1983.
- 9) Nowak, T.S., Fried, R.L., Lust, W.D., et al.: Changes in brain energy metabolism and protein synthesis following transient bilateral ischemia in the gerbil. *J. Neurochem.*, **44**, 487~494, 1985.

(受付: 1994年 8月11日)