虚血性細胞機能障害における軽度低温の抑制作用

遠 山 啓 介

九州歯科大学歯科麻酔学講座

平成 16 年 2 月 20 日受付

平成 16 年 4 月 12 日受理

Hypothermia Prevents Neuronal Degeneration in Rat Progressive Brain Ischemia

Keisuke Tohyama

Department of Dental Anesthesiology,
Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

It has been well known that intracellular increase in Ca^{++} induced by massive release of excitatory amino acid and by increased phospholipid metabolism during and after ischemia that plays an important role in brain damage. Furthermore, recent studies revealed that mild hypothermia (only 2–5 °C reduction of brain temperature below normothermia) provided protective effect, though the mechanism of this effect is still unclear. The present study was designed to gain further insight into the mechanism for neuroprotective effect of mild hypothermia especially focussing on the changes of intracellular signal transduction system in a model of progressive forebrain ischemia in the rats.

Two series of study were performed in male Wistar rats in which the brain temperature was kept either at normothermia (37 °C) or at a mild hypothermia (33 °C) during the ischemic period. Forebrain ischemia (10 and 30 min duration) was produced by bilateral occlusion of the carotid artery combined with hemorrhagic hypotension (mean BP = 50 mmHg). In the first series of experiment, neuropathological damages were assessed by the immunohisto-chemical reactivity for microtubule-associated protein (MAP2) in the cerebral cortex, striatum, hippocampus, and thalamus. In the second series, the changes in binding for 3H -PDBu were measured to evaluate the functional changes of protein kinase C.

The progressive decrease in MAP2 immunoreactivity was observed, the order of severity being striatum > hippocampus > cerebral cortex > thalamus. The binding for 3H -PDBu decreased by 33 %, 25 % in the hippocampus, cerebral cortex after 30 min of ischemia, respectively. In the mild hypothermia group, the decrease in MAP2 immunoreactivity was attenuated in the striatum and hippocampus after 30 min of ischemia. This decrease in 3H -PDBu binding was significantly less in hippocampus.

These results suggest that, in progressive ischemia, mild hypothermia may ameliorate the cytoskeletal damages possibly by inhibiting the perturbation of intracellular signal transduction system.

Key words: Brain ischemia/Protein kinase C/Mild hypothermia

はじめに

脳は、高次機能を有するがために高いエネルギーを消費し、又そのエネルギーは他からの供給を受ける臓器である。この特徴が酸素・グルコースの供給が途絶えるさまざまな病態に、脳細胞は機能障害を来すため、脆弱な臓器とされる。すなわち、一過性心停止、低酸素、頭蓋内圧亢進、低血圧などにより、脳血流が自己調節閾値以下になると、その後の学習・記憶機能障害など、高次神経の機能障害がしばしば現れる。最近の研究から、虚血性脳障害の発生機序として、N-methyl D-aspartate (NMDA)、非NMDA受容体の活性化やGlutamateなどの興奮性アミノ酸の過剰放出などで起きる細胞内Ca増加と、蛋白キナーゼ、プロテアーゼ、リパーゼなどのさまざまな酵素の活性化による蛋白代謝や細胞膜の障害が考えられている¹⁾。虚血後の細胞内Ca⁺⁺増加に起因したCa依存性情報伝達系、なかでもCキナーゼ(PKC)などの活性化はさまざまな蛋白リン酸化を促進する。とくに、PKCの活性化はカルパインの活性化と同様、微小管関連蛋白質(MAP2)の障害をもたらす^{2,3)}。しかも、この変化は虚血性細胞障害の早期に起りやすく^{4,5)}、虚血性障害の進行を知る上での有用なマーカーになるものと考えられている。

また、最近の動物実験から、軽度脳低温(2~5℃の低下)が虚血性細胞障害を軽減する可能性が分かり、その成果は臨床での頭部外傷後、脳外科手術後等で応用され、大きな注目を集めている^{6,7)}。しかし、その機序は十分には明らかではなく、代謝抑制や^{8,9)}、神経伝達物質過剰放出の抑制¹⁰⁾などの面から検討されているが、少なくとも細胞機能を示すMAP2と細胞内情報伝達系の変化の面から調べたものはない。

そこで、本研究ではラットを用い脳低温が脳虚血モデルにおいて、MAP2とPKC活性の変化をどのように修飾するか検討し、軽度脳低温の脳保護作用の機序について、これら細胞機能の面から明らかにすることを目的とした。

実験材料および方法

1. 動物および外科的手術

ラット(250-350 g)を用い、明(7:00~19:00)暗調節および温度23±2℃の環境で飼育し実験前8時間は絶食とし、水のみ与えた。ラットをisoflurane(4%) + 笑気(50%) + 酸素で麻酔し、気管内挿管後人工呼吸を行った。その後、直接動脈圧、採血、および薬物投与

のために大腿動脈、静脈にカテーテルを挿入し、留置した。筋弛緩を得るためd-Tubocurarine(3 mg/kg)を適宜静注した。頸部の皮膚を正中切開し、両側頸動脈を剥離し手術用絹糸をかけた後、外頸静脈に脱血および復血のためのカテーテル(PE-50)を留置した。なお、切開部位にはbupivacaine(0.5%)を0.3 mlを適宜注入し、侵害刺激受容を緩和した。針型白金電極を頭頂骨膜に刺入し、双極誘導により脳波を誘導記録した。直腸温および側頭筋温(予め側頭筋温は、虚血時において脳実質温度とほぼ一致することを確認した)をサーミスタで測定した。実験中の直腸温は37℃となるようブランケットを用いて調節した。虚血時の脳温は、正常温実験群では37℃となるようランプを照射し、また軽度低温(低温群)では33℃になるよう氷袋を頭部に当て、風を吹き付け調節した。手術終了後isoflurane吸入を中止し、笑気(70%) + 酸素吸入下に約30分間安静状態にした。この間、平均動脈圧(mBP)は140~150 mmHgに、またPo₂は約150 mmHg、Pco₂は40 mmHg、pHは7.37~7.43となるよう、それぞれ換気条件やbicarbonateの投与により調節した。なお動物の飼育ならびに実験は、九州歯科大学および山口大学動物実験委員会の倫理基準および実験指針に準じて行った。

2. 虚血モデルの作成

生理学的諸量の測定終了後、まずtrimethaphan 25 mgを静注し、直ちに脱血を開始すると同時に両側総頸動脈を結紮し、すばやくmBPが50 mmHgになるよう脱血を開始した¹¹⁾。脳波の平坦化より虚血開始とみなし、虚血中は脱血と送血を繰り返し、mBPを50 mmHgに維持した。虚血時の脱血量(平均0.9~2.0 ml/100 g体重)は各実験群間で差はなかった。

3. 実験群

ラットを以下の実験群に分けた。

1) 病理学的検討では、偽手術のみを行い30分間の安静状態後に断頭する群を対照とし、正常温あるいは低温下で虚血10分および30分後に断頭する群に分けた(各群5~6匹)。

2) 細胞内情報伝達系の検討では、正常温下では前述と同様な実験群としたが、低温下では酵素活性の温度による影響を考慮するため低温下偽手術対照群を加えた。また虚血10分後では病理学的所見—細胞内情報伝達系の変化が軽微と予想されたことから、虚血30分後に断頭する群について実験を行った(各群5~6匹)。

4. 神経病理学的所見

対照および各虚血時間後に、ラットを開胸し、灌流用

のカニューレを左心室から先端が上行大動脈に位置するように留置した。まず、生理食塩水 (37℃) を 250 ml 灌流し、その後中性 formalin (4% formalin, リン酸緩衝液, pH 7.4) 300 ml を灌流した。断頭後 5℃ で 24 時間乾燥後、脳を摘出しさらに 2 週間 10% formalin 液中に浸透し固定させた (4℃)。ついで、約 3 mm の冠状断脳ブロックをパラフィン包埋し、8 μ m 厚さの冠状断組織切片をマイクロームで作成した。組織切片は抗マウス MAP2 抗体 (Sigma) を用い ABC 法で免疫染色し (Vectastain, ABC キット)、発色は 0.02% diaminobenzidine tetrahydro-chloride, 0.005% H_2O_2 を含む 50 mM Tris 緩衝液で 10 分間行った。光顕的に免疫陽性反応が消失した部位を障害とし、一定視野における障害の範囲により、4 段階スコア (0: 正常, 1: ~25% 障害, 2: 25~75%, 3: 75%~) で評価した¹²⁾。これらの組織学的所見では、大脳皮質 (前頭皮質, 頭頂皮質の 1~3 層), 線条体 (背外側部), 海馬 (CA1) および視床について二重盲検で評価した。

5. 細胞内情報伝達系

各群断頭後、脳を取り出し凍結した。その後クライオスタット (-20℃) で 20 μ m 厚さの凍結組織切片を作成し、*in vitro* autoradiography を用いて以下のように結合活性を測定した。Worley ら¹³⁾ の方法に準じ、 3H -phorbol-12, 13-dibutyrate (PDBu) 結合を測定した。全結合については、組織切片を 2.5 nM 3H -PDBu (specific activity 20 Bq/mmol, NEN) を含む、50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.7, 1mM $CaCl_2$) の中で 60 分間インキュベーションした (20℃) ものをを用い、非特異的結合については、隣接する組織切片を 1 μ M PDBu を含む前述の全結合の buffer の中でインキュベーションした (20℃) ものをを用いた。これらの組織切片を洗浄・乾燥し、 3H 標準線源 (3H -Micro-scale, Amersham) と

ともに 3H -hyper-film (Amersham) に 7~10 日間感光させた (4℃)。得られたオートラジオグラムは画像解析装置 (ユニークメディカル) を用い、フィルム上の病理学的所見と同じ脳局所部位における特異的結合 (全結合 - 非特異的結合) を定量的に解析した。

6. 統計方法

生理学的諸量および細胞内情報伝達系の測定値は、一元配置分散分析法 (多重比較は最小有意較差法) を行い、また病理学的所見の評価 (スコア) については Kruskal-Wallis テストの後、Wilcoxon signed rank テストを用いて各群間の比較を行った。すべて 5% 未満の危険率で有意とみなした。

結 果

1. 生理学的諸量

生理学的諸量を表 1 に示す。虚血前および中の mBP 値は各群間で差がなかった。正常温下の虚血 10 分群の P_{CO_2} , 30 分群の pH が対照群に比べ軽度低下したが、有意ではなかった。虚血中の脳温は、正常温ラットの平均が 36.8~36.9℃ に対し、低温ラットでは 32.6~32.9℃ にそれぞれ極めて一定になるようにした。この時の直腸温は脳常温群では 37.1~37.2 であったが、脳低温群では 36.4~37.1 とやや低下傾向ではあったが、有意な低下ではなかった。

2. 神経病理学的所見

図 1 に海馬における代表的 MAP2 免疫染色の写真 ($\times 400$) を示す。対照は障害: 0, 虚血 10 分, 30 分では、それぞれ障害: 1, 3 を示す。低温下 30 分では障害: 1 を示す。虚血により、免疫陽性反応は、樹状突起が主に障害され、細胞体での変化は軽微であった。MAP2 の免疫陽性反応は虚血時間依存性に低下がみられた。虚血 10 分で、大脳皮質、線条体、海馬で免疫陽

表 1 生理学的諸量

	群	平均血圧	酸素分圧 (P_{O_2})	炭酸ガス分圧 (P_{CO_2})	pH	Temperature °C	
		mmHg	mmHg	mmHg		脳	直腸
対 照	虚血時間						
		162 $\pm$ 4	148 $\pm$ 13	42 $\pm$ 1	7.39 $\pm$ 0.03	37.2 $\pm$ 0.1	37.4 $\pm$ 0.3
37℃	10 分	49 $\pm$ 0.3*	132 $\pm$ 9	34 $\pm$ 4	7.32 $\pm$ 0.04	36.9 $\pm$ 0.1	37.2 $\pm$ 0.4
	30 分	50 $\pm$ 0.2*	163 $\pm$ 21	36 $\pm$ 3	7.30 $\pm$ 0.06	36.8 $\pm$ 0.1	37.1 $\pm$ 0.3
33℃	10 分	50 $\pm$ 0.5*	148 $\pm$ 11	33 $\pm$ 3	7.31 $\pm$ 0.05	32.6 $\pm$ 0.4#	36.4 $\pm$ 0.3
	30 分	51 $\pm$ 0.4*	149 $\pm$ 16	39 $\pm$ 3	7.32 $\pm$ 0.02	32.9 $\pm$ 0.2#	37.1 $\pm$ 0.4

値は平均 $\pm$ 標準誤差、脳温は側頭筋部における温度を示す。

* 対照値と有意 ($p < 0.05$)

脳常温群と有意 ($p < 0.05$)

障害度: 0 (対照群)

障害度: 1 (脳虚血, 10 分)

障害度: 3 (脳虚血, 30 分)

障害度: 1 (脳虚血, 脳低温 30 分)

図 1 海馬における MAP2 免疫染色 (×400).

図 2 大脳皮質における虚血後 MAP2 免疫陽性反応の変化。脳常温, 脳低温は虚血 10 分, 30 分で対照群に対し有意差を示した ($p < 0.05$).

性反応が有意に低下し, 30 分では免疫陽性反応の低下が強くなり, その程度は線条体, 海馬, 大脳皮質の順であった (図 2 ~ 4)。視床では, 虚血 10 分では免疫陽性反応の変化は軽微で, 虚血 30 分で初めて有意な低下を

図 3 線条体における虚血後 MAP2 免疫陽性反応の変化。脳常温, 脳低温は虚血 10 分, 30 分で対照群に対し有意差を示した ($p < 0.05$)。また, 30 分では脳低温は脳常温に対し有意差を示した ($p < 0.05$)。

図4 海馬における虚血後 MAP2 免疫陽性反応の変化。脳常温、脳低温は虚血 10 分、30 分で対照群に対し有意差を示した ($p < 0.05$)。また、30 分では脳低温は脳常温に対し有意差を示した ($p < 0.05$)。

図5 視床における虚血後 MAP2 免疫陽性反応の変化。脳常温、脳低温は虚血 10 分、30 分で対照群に対し有意差を示した ($p < 0.05$)。

示した (図5)。一方、低温下でも虚血後 MAP2 免疫陽性反応は低下したが、その低下は正常温群に比べ軽微で、虚血 30 分の線条体および海馬の免疫陽性反応低下は有意に軽度であった。

3. 細胞内情報伝達系

$^3\text{H-PDBu}$ 結合の結果を図6～9に示す。対照時の $^3\text{H-PDBu}$ 結合は海馬および大脳皮質で高かった。正常脳温下での虚血変化は海馬、大脳皮質の30分で $^3\text{H-PDBu}$ 結合がそれぞれ32%、25%低下し、有意なものであった。また、脳低温での影響は、海馬の虚血30分の低下が19%となり、これは脳常温の低下に比して有意な軽減で

図6 大脳皮質における虚血後 $^3\text{H-PDBu}$ 結合。脳常温は虚血30分で対照群に対し有意差を示した ($p < 0.05$)。

図7 線条体における虚血後 $^3\text{H-PDBu}$ 結合。脳常温、脳低温ともに虚血における変化は認めなかった。

図8 海馬における虚血後 $^3\text{H-PDBu}$ 結合。脳常温は虚血30分で対照群に対し有意差を示した ($p < 0.05$)。脳低温は虚血30分で脳常温に対し有意差を示した ($p < 0.05$)。

図9 視床における虚血後 ^3H -PDBu結合。
脳常温、脳低温ともに虚血における変化は認められなかった。

あった(図8)。他の部位では、脳低温での虚血時の ^3H -PDBu結合はいずれにおいても脳常温に比して変化はなかった。

考 察

本研究では、脳虚血の局所脳の細胞機能変化に及ぼす影響を細胞骨格蛋白質の一つであるMAP2により観察し、また虚血に密接に関与するPKC活性の変化との関連を検討した結果、虚血時間に依存して線条体、大脳皮質、海馬でMAP2免疫陽性反応が低下し、PKC結合活性の低下もみられることが明らかとなった。また、脳低温が虚血後のPKC活性の機能的低下を抑制し、細胞骨格の破綻を軽減することが明らかとなった。

神経病理学的変化

脳虚血により、細胞膜の電位依存性、および、興奮性アミノ酸過剰放出によるアゴニスト依存性 Ca^{++} チャネルが開閉し、細胞内 Ca^{++} 濃度が上昇することが知られている¹⁴⁾。この細胞内 Ca^{++} 濃度の上昇は、G蛋白を介してフォスホリパーゼCの活性化、イノシトールリン脂質代謝回転の亢進をもたらす、イノシトール3リン酸などが産生され、細胞内Ca貯蔵部位の小胞体から Ca^{++} 放出が起こり、細胞内 Ca^{++} 濃度がさらに増加する¹⁾。さらに、この細胞内 Ca^{++} 濃度の上昇はPKCあるいは中性プロテアーゼを活性化することで、細胞構築を障害する大きな要因と考えられている^{2,14)}。

神経系は虚血性侵襲に対する感受性が局所部位により違うことに加え、免疫組織化学的手法の進歩により、細胞骨格蛋白MAP2の免疫陽性反応の低下を指標にすると、細胞質よりも樹状突起が最も脆弱であることが判明した^{4,15)}。本研究でも、虚血直後の神経細胞障害は明らかではないが、樹状突起のMAP2免疫陽性反応は、すぐに

低下することが確認された。また、このような易障害性は線条体、海馬、大脳皮質、視床の順であり、虚血による血流減少の程度に依存する傾向がみられた。Kitagawaら(1997)⁶⁾の砂ネズミでの片側頸動脈結紮の検討では、海馬CA1では5分で既にMAP2免疫陽性反応が低下し、その後、細胞は不可逆的障害に陥るとされている。さらに、大脳皮質でもほぼ類似の変化がみられたが、線条体では30分後に初めてMAP2が低下するとしている。本研究結果とはやや局所部位の脆弱性に違いがあるが、これは虚血モデルの違いによるものと考えられる。

MAP2は樹状突起の微小管相互間および微小管とニューロフィラメントの間の架橋構造における重要な要素で、チューブリンの重合を促進し神経突起の成長やその安定に密接に影響する事から、その変化を虚血で指標とすることには意義がある。虚血後細胞内 Ca^{++} 濃度の上昇により活性化される中性プロテアーゼ、カルパインやPKCがMAP2の分解や活性化によりリン酸化の促進をもたらす形態変化をきたすことが知られている^{2,14)}。本研究では、後述するように海馬でPKC活性の異常がみられたことは、虚血性障害の発現に一つのカギを握っているものと考えられる。従来より、軽度低温が一過性脳虚血後の遅発性細胞障害の発生を抑制することがよく知られているが^{6,7)}、虚血急性期のMAP2に及ぼす影響についてはほとんど知られていない。Eguchi¹⁶⁾は、ラット頭部外傷モデルで、細胞質および膜画分のMAP2免疫陽性反応の低下を脳低温(30℃)が抑制することを示した。本研究の結果もこれに良く一致している。すなわち、わずか4℃の脳温低下が進行性脳虚血におけるMAP2免疫陽性反応の低下を軽減したことから、脳温低下による細胞内情報伝達系変化の修飾を一機序とする脳保護作用の存在が示唆される。

細胞内情報伝達系変化

虚血直後にPKC(^3H -PDBu)の結合が低下し、軽度脳低温がこれらの変化を軽減することが分かった。本研究で用いたautoradiographyでは ^3H -PDBu結合は、膜上の活性型PKCの変化や神経伝達物質であるglutamateのNMDA受容体などのイノシトールリン脂質系の受容体—細胞内情報伝達系の変化を反映する^{14,17)}。虚血中あるいは虚血後再灌流早期にCa依存性反応のひとつとして、PKCが細胞質から膜へ移行することが知られている¹⁸⁻²¹⁾。Haraら¹⁸⁾は海馬CA1におけるautoradiographyにおいて膜での ^3H -PDBu結合が増加し、その後、細胞障害の進展と共に有意に低下することを報告した。さらに、幼若期ラットの進行性脳虚血モデルにお

いて、脳虚血 5 分で細胞質 PKC 活性すなわち³H-PDBu 結合が 30 % に低下したのに対し膜画分ではこれらは 4 ~ 5 倍に増加すること (“trans-location”), また虚血 15 分ではこれら画分間の差が減少し、虚血 30 分では膜画分³H-PDBu 結合は約 2 倍にまで低下することを示した¹⁹⁾. これらのことから、虚血中あるいは再灌流早期には PKC の活性化/膜への移送がみられたのち、“down-regulation” (自己リン酸化²²⁾) が起きることがうかがえる. 一般に、PKC の活性化は可逆的反応ではあるが、神経伝達物質の過剰放出、電位依存性 Ca チャネルの活性化をもたらすとともに、細胞骨格蛋白質のリン酸化を亢進させ、膜の構造を破綻させうることから、その活性変化と細胞障害との関連が注目される.

本研究では、海馬 CA1 の³H-PDBu 結合が虚血 10 分後では変化せず、30 分で低下し、この時期に MAP2 免疫陽性反応の低下がみられた. PKC の活性化は 30 分より前のある時期に起き、その活性化の持続時間が短く、測定時期が限られているため PDBu 結合増加がみられなかった可能性がある. 海馬 CA1 で PDBu 結合が変化したのに対し、線条体では明らかな変化はみられなかった. 海馬 CA1 には、PKC が大量に局在し²³⁾, Ca⁺⁺濃度の上昇し易い樹状突起にはとくに多い. この PKC の分布は PKC の基質蛋白質 MAP2 の分布と一致する²⁴⁾. Cardell (1991)²⁰⁾ らは、ラット前脳虚血 20 分で、正常温では線条体細胞膜の PKC レベルが 3.9 倍に増加し、PKC が膜へ移行することも明らかにし、脳低温 (27 °C) がこれらの変化を抑え、細胞膜での温度依存性の修飾機構が働くことを示唆した. 本研究結果からは虚血時に線状体の著しい MAP2 低下を来す機序を説明できないが、Cardell ら²⁰⁾ の実験結果と脳低温により虚血性の PKC 活性の異常が抑制されることは一致する. PKC の選択的阻害薬 staurosporine が虚血性細胞障害を軽減すること²⁵⁾ を考え合わせると、虚血後の障害過程における PKC の関与が示唆される. 本研究では軽度脳低温が海馬の³H-PDBu 結合の低下を抑制することが明らかとなった. 海馬と線条体の違いがあるものの、本研究結果と Cardell ら²⁰⁾ の結果とは符合し PKC 活性の如何が細胞障害の過程に関与していることが明らかとなった.

本研究において、脳低温が虚血直後における細胞機能、つまり細胞内情報伝達系の異常を軽減し、MAP2 免疫陽性反応低下を抑制することが明らかとなった. すなわち、虚血の進行に伴い細胞障害に先行して PKC 活性の機能低下がみられ、同じ時期に MAP2 免疫陽性反応

の低下が起き、細胞機能を不可逆的障害へと導くものと考えられる. 脳低温は、虚血後のこれらの細胞内情報伝達系異常を軽減し、その結果 MAP2 の障害過程を軽減することが示唆された. これまで、軽度脳低温の脳保護作用には、脳代謝の抑制が考えられてきたが^{8,9)}, 脳保護作用を発揮する用量のバルビツレート代謝抑制は約 40 % であるのに対して、軽度低脳温 (4 °C 低下) では約 15 % の抑制に過ぎず⁹⁾, 代謝抑制からのみで脳保護作用を説明することはできない. 軽度脳低温の作用機序には、少なくとも一部には、興奮性アミノ酸の過剰放出の抑制¹⁰⁾, および NMDA 受容体活性に関連すると思われる細胞内情報伝達系の異常を抑制する作用^{20,26)} の関与がうかがえる.

以上のことから、軽度脳低温は代謝抑制、神経伝達物質過剰放出の抑制に加え、細胞膜の構造と機能維持に関係する PKC の機能障害を軽減し、脳保護作用を発揮するものと考えられる.

ま と め

本研究では、ラット前脳虚血モデルで、線条体、大脳皮質、海馬で虚血時間に依存した MAP2 免疫陽性反応低下と、細胞内情報伝達系の機能障害が起きることが明らかとなった. また、軽度脳低温が脆弱細胞群における虚血早期の細胞内情報伝達系、PKC 活性の機能低下の発現を軽減し、樹状突起の MAP2 の破綻を抑制し、脳保護作用を示すことが示唆された.

稿を終えるにあたり、終始ご懇篤なご指導を賜りました、九州歯科大学歯科麻酔学講座仲西 修教授に深甚なる謝意をあらわします. そして、本研究の遂行に多大なご協力を賜った、同講座の諸兄姉に厚くお礼を申し上げます.

参考文献

- 1) Rossi, D. J., Oshima, T. and Attwell, D.: Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403: 316-321, 2000.
- 2) Ainsztein, A. M. and Purich, D. L.: Stimulation of tubulin polymerization by MAP-2. Control by protein kinase C-mediated phosphorylation at specific sites in the microtubule-binding region. *J. Biol. Chem.* 269: 28465-28471, 1994.
- 3) Phillis, J. W. and O'Regan, M. H.: Mechanisms of glutamate and aspartate release in the ischemic rat cerebral cortex. *Brain Res.* 730: 150-164, 1996.
- 4) Hara, H.: Involvement of lipid peroxidation and in-

- hibitory mechanisms on ischemic neuronal damage in gerbil hippocampus. *Neuroscience* 42: 159, 1991.
- 5) Blomgren, K., McRae, A., Bona, E., Saido, T. C., Karlsson, J. O. and Hagberg, H.: Degradation of fodrin and MAP 2 after neonatal cerebral hypoxic-ischemia. *Brain Res.* 684: 136-142, 1995.
 - 6) Kitagawa, K., Matsumoto, M., Mabuchi, T., Yagita, Y., Mandai, K., Matsushita, K., Hori, M. and Yanagihara, T.: Ischemic tolerance in hippocampal CA1 neurons studied using contralateral controls. *Neuroscience* 81: 989-998, 1997.
 - 7) Hagioka, S., Takeda, Y., Takata, K. and Morita, K.: Nasopharyngeal cooling selectively and rapidly decreases brain temperature and attenuates neuronal damage, even if initiated at the onset of cardiopulmonary resuscitation in rats. *Crit. Care Med.* 31: 2502-2508, 2003.
 - 8) Bacher, A., Kwon, J. Y. and Zornow, M. H.: Effects of temperature on cerebral tissue oxygen tension, carbon dioxide tension, and pH during transient global ischemia in rabbits. *Anesthesiology* 88: 403-409, 1998.
 - 9) Ibayashi, S., Takano, K., Ooboshi, H., Kitazono, T., Sadoshima, S. and Fujishima, M.: Effect of selective brain hypothermia on regional cerebral blood flow and tissue metabolism using brain thermo-regulator in spontaneously hypertensive rats. *Neurochem. Res.* 25, 369-375, 2000.
 - 10) Mori, K., Maeda, M., Miyazaki, M. and Iwase, H.: Effects of mild (33 degrees C) and moderate (29 degrees C) hypothermia on cerebral blood flow and metabolism, lactate, and extracellular glutamate in experimental head injury. *Neurol. Res.* 20: 719-726, 1998.
 - 11) Smith, M. L., Bendek, G., Dahlgren, N., Rosen, I., Wieloch, T. and Siesjo, B. K.: Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2-vessel occlusion model. *Acta Neurol. Scand.* 69: 385-401, 1984.
 - 12) Yanagihara, T., Yoshimine, T., Morimoto, K., Yamamoto, K. and Homburger, H. A.: Immunohistochemical investigation of cerebral ischemia in gerbils. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 44: 204-215, 1985.
 - 13) Worley, P. F., Baraban, J. M., De Souza, E. B. and Snyder, S. H.: Mapping second messenger systems in the brain: differential localizations of adenylate cyclase and protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 4053-4057, 1986.
 - 14) Mayer, M. L. and Miller, R. J.: Excitatory amino acid receptors, second messengers and regulation of intracellular Ca^{2+} in mammalian neurons. *Trends Pharmacol. Sci.* 11: 254-260, 1990.
 - 15) Matesic, D. F. and Lin, R. C.: Microtubule-associated protein 2 as an early indicator of ischemia-induced neurodegeneration in the gerbil forebrain. *J. Neurochem.* 63: 1012-1020, 1994.
 - 16) Eguchi, Y., Yamashita, K., Iwamoto, T. and Ito, H.: Effects of brain temperature on calmodulin and microtubule-associated protein 2 immunoreactivity in the gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia. *J. Neurotrauma.* 14: 109-118, 1997.
 - 17) Barrios, M. and Liljequist, S.: Developmental changes in the inhibitory actions of ethanol on glutamate-induced translocation of protein kinase C in cerebellar granule neurons. *Alcohol* 14: 575-580, 1997.
 - 18) Hara, H., Onodera, H. and Kogure, K.: Protein kinase C activity in the gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia: morphological and autoradiographic analysis using [3H]phorbol 12,13-dibutyrate. *Neurosci. Lett.* 120: 120-123, 1990.
 - 19) Louis, J. C., Magal, E. and Yavin, E.: Protein kinase C alterations in the fetal rat brain after global ischemia. *J. Biol. Chem.* 263: 19282-19285, 1988.
 - 20) Cardell, M., Boris-Moller, F. and Wieloch, T.: Hypothermia prevents the ischemia-induced translocation and inhibition of protein kinase C in the rat striatum. *J. Neurochem.* 57: 1814-1817, 1991.
 - 21) Worley, P. F.: Heterogeneous localization of protein kinase C in rat brain: autoradiographic analysis of phorbol eaten binding. *J. Neurosci.* 6: 199-207, 1986.
 - 22) Harada, K., Maekawa, T., Abu-Shama, K. M., Yamashita, T. and Yoshida, K.: Translocation and down-regulation of protein kinase C- α , - β , and - γ isoforms during ischemia-reperfusion in rat brain. *J. Neurochem.* 72: 2556-2564, 1999.
 - 23) Shimohama, S., Saitoh, T. and Gage, F. H.: Changes in protein kinase C isozymes in the rat hippocampal formation following hippocampal lesion. *Hippocampus* 3: 43-55, 1993.
 - 24) Matsumoto, M.: A combined method for measurement of cerebral blood flow and immunohistochemistry for investigation of cerebral ischemia. *Brain Res.* 424: 231-238, 1987.
 - 25) Hara, H., Onodera, H., Yoshidomi, M., Matsuda, Y. and Kogure, K.: Staurosporine, a novel protein kinase C inhibitor, prevents postischemic neuronal damage in the gerbil and rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 10: 646-653, 1990.
 - 26) Frazzini, V. I., Winfree, C. J., Choudhri, H. F., Prestigiacomo, C. J. and Solomon, R. A.: Mild hypothermia and MK-801 have similar but not additive degrees of cerebroprotection in the rat permanent focal ischemia model. *Neurosurgery* 34: 1040-1046, 1994.