実験的脳虚血に対する Ca^{++} 拮抗剤と barbiturate の脳保護作用について

村上 登

Comparison of Protective Effects of Calcium-antagonist and Barbiturate upon the Cerebral Energy Metabolites and Cyclic-AMP during and after Forebrain Ischemia in Gerbils

Noboru MURAKAMI

Department of Neurosurgery, Juntendo University, Tokyo

Abstract

Calcium-antagonist (nicardipine, 0.1 mg/kg), barbiturate (thiamylal, 100 mg/kg), and saline as control were intraperitoneally administered to mongolian gerbils prior to the 20 minutes of ischemia, produced by bilateral clipping of the common carotid arteries of the animals. (1) The survival rates at either 24 hours or 14 days of recirculation of the animals, pretreated with nicardipine ($n=30$) and thiamylal ($n=44$), respectively, were significantly higher than that of control ($n=64$) ($p<0.05$). (2) The changes in cerebral concentrations of adenosine triphosphate (ATP), phosphocreatine (P-Cr), glucose, lactate, and cyclic-adenosine 3'5'-monophosphate (C-AMP) were assayed during ischemia, and at various periods of recirculation after ischemia. During ischemia, accumulation of lactate and decreased concentration of the energy metabolites were similarly found in control and experimental animals with premedication. As early as 5 minutes after beginning recirculation, however, ATP and P-Cr increased up to 75% and 98% of control values, respectively, in the animals treated by nicardipine, whereas recovery of the controls and thiamylal-treated animals was not significant. At 30 minutes of recirculation in the control animals, the energy metabolites were restored as high as the control level, but two fold or more reaccumulation of lactate and significant decrease in ATP concentration occurred at 360 minutes of recirculation. In both groups of experimental animals with premedication, however, there were neither accumulation of lactate nor decrease of ATP concentration at 360 minutes. At the same time, the high energy phosphate utilization rate in both experimental groups measured in various periods of recirculation was found to be decreased compared to that of control groups. (3) Overshoot of C-AMP at 5 minutes of recirculation was found in all animals treated with or without premedication but the rate of the overshoot in thiamylal-treated animals was significantly lower than those of others. It seems that both calcium-antagonist and barbiturate similarly demonstrate protective effects possibly by decreasing the energy demand of the brain during ischemia-recirculation periods. When compared with the effects of barbiturate during early periods of recirculation, calcium-antagonist appears to facilitate the rapid recovery of ATP and P-Cr regeneration, which are the indicators of mitochondrial activities. The physiological significance of relevant changes in C-AMP overshoot during early periods of recirculation, however, is not clearly understood.

Key words: cerebral ischemia, energy metabolites, cyclic-adenosine 3'5'-monophosphate, calcium-antagonist, barbiturate

順天堂大学脳神経外科

Address reprint requests to: N. Murakami, M.D., Department of Neurosurgery, Fujisawa City Hospital, 2-6-1 Fujisawa, Fujisawa, Kanagawa 251.

受稿 1985年5月20日 受理 1985年9月9日

I はじめに

一定時間以上の脳虚血は例外なく脳細胞機能障害、ついで脳細胞死を惹起するが、そのメカニズムはいまだ十分に解明されていない。脳虚血に伴って起こる生化学的変化は一連の cascade として起こることが知られ、脳虚血に対する脳の保護的手段は、この生化学的 cascade の十分な理解の下に行われるべきである³⁶⁾。

脳虚血に対し保護作用を示すと考えられる薬剤について多くの研究が重ねられ、そのなかで理論的に正当化されているものに barbiturate^{23,26,27,31,40)}, Ca^{2+} 拮抗剤, phospholipase および lipooxygenase blocker, free radical scavenger など^{11,22,36,38)}がある。Barbiturate は一般には麻酔薬および抗痙攣剤として使用されているが、脳虚血に対しては、脳細胞の酸素消費率(CMRO₂)を著明に低下させたり、free radical scavenger としての作用を有することなど^{9,23,27,31)}により保護作用を発揮すると報告されている。しかし、臨床的には大量投与による呼吸器系、心臓血管系への抑制効果も強く、臨床応用に際し種々の制約があり、適応範囲にも限度がある。一方、 Ca^{2+} 拮抗剤は血管拡張作用および血流増加作用を有することが知られ、临床上、脳虚血症状の改善に有効であることが報告されている²⁾。一方、ラット肝細胞虚血モデルを用いた実験では、虚血により肝細胞膜の depolarization が起こり、細胞外から大量の Ca^{2+} イオンが細胞内に流入するのが観察されるが、 Ca^{2+} 拮抗剤を投与すると Ca^{2+} イオンの細胞内過剰流入は抑制され、 Ca^{2+} イオンの細胞内 homeostasis を維持することにより Ca^{2+} 依存性異化作用を進行、ひいては細胞死が防止できることが報告されている^{5,7,35)}。今回我々は、動物の両側総頸動脈閉塞による脳虚血モデルを作製し、虚血期間中ならびに血流再開後において Ca^{2+} 拮抗剤および barbiturate の投与が脳の生化学的変化にいかなる影響を及ぼすかを脳代謝の変動を中心に検討した。とりわけ動物の生存率、エネルギー代謝産物、高エネルギー磷酸消費率ならびに cyclic-AMP の消長の面から両薬剤の虚血脳に対する保護作用を比較検討した。

II 実験動物および実験方法

動物は mongolian gerbil (砂ネズミ) (体重60~90 g)を用い、Nembutal (15 mg/kg, 腹腔内注)による浅麻酔下で動物固定器(CFK, ISPS マウス固定器)にて固定したのち、動物の頸部皮膚を正中切開し、両側総頸動脈を露出、血流遮断の準備をしておいた。ついで、動物の脳皮質のより迅速な凍結を図るために、天蓋部頭皮を除去し、頭蓋骨を広汎に露出した。以上の手術操作が終了したのち、すべて

の動物を6時間以上放置し、麻酔からの覚醒を待った。脳虚血—血流再開実験は、麻酔覚醒後、動物の両側総頸動脈に Heifetz の aneurysm clip をかけ、20分間閉塞せしめ、ついで clip を除去し、血流を再開せしめる方法²⁸⁾によった。脳虚血—血流再開実験群を① nicardipine 投与群：脳虚血開始5分前に Ca^{2+} 拮抗剤として nicardipine 0.1 mg/kg を腹腔内投与した群および② barbiturate 投与群：虚血開始30分前に barbiturate として thiamylal 100 mg/kg を腹腔内投与した群に分け、また同じ手術を行い、薬剤を投与しない動物を③ control 群とした。

初めに、血流再開後14日目までの動物の生存率を比較した。続いて、虚血終了時および血流再開後5, 30, 60, 180, 360分の各時点で動物をただちに液体窒素に投入、凍結固定し、生化学的検索に供した。高エネルギー磷酸消費率 (high energy phosphate utilization rate, 以下 $\sim P$)の測定は、虚血後血流再開30, 360分の各時点で動物を断頭し、断頭直後(0秒)、および断頭後一定時間(15秒間)室温下に放置したのち、ただちに液体窒素で凍結固定した頭部から取り出した脳を用いて行った。いずれの場合も凍結固定後 -60°C 以下の冷凍庫内で保存し、ついで、すでに露出された頭蓋骨の直下の脳皮質を $-20^{\circ}\text{C}\sim-30^{\circ}\text{C}$ の温度に維持した cryostat (RFS, Co)内で1~2 mmの薄層に削除し、0.1 N HCl-methanol 液中にて -50°C 以下で約90分間放置した。さらに、0.02 N HCl を添加したのち、homogenize した。次に、EGTA を含む過塩素酸で除蛋白し、超遠心分離を行い、その上清は重炭酸カリウムで中和したのち、種々の代謝産物の測定に供した。エネルギー代謝産物 ATP, P-Cr, glucose および lactate は Lowry and Passonneau による fluorometric enzymatic procedure²²⁾により微量測定した。この際、上清分離後の沈渣は1 N NaOH の添加で溶解し、Lowry らの方法²⁴⁾により蛋白濃度の測定を行った。 $\sim P$ は、断頭後0秒時の ATP, P-Cr, lactate の値から15秒間に組織内で消費されるおのおのの値を計測し、次の計算式により算出した。すなわち、 $\sim P = 2 \Delta \text{ATP} + \Delta \text{P-Cr} + \Delta \text{lactate}$ ^{9,23)}。Cyclic-AMP は radioimmunoassay 法³⁹⁾(Yamasa, Co)により測定した。なお、各群間の生存率は χ^2 検定法、エネルギー代謝産物の変化は student's t-test により検定した。

III 結 果

1. 動物の行動学的観察と生存率の比較

20分間の両側総頸動脈閉塞中および血流再開後にみられる behavioral pattern は、control および nicardipine 投与群では全例で opisthotonic posture、すなわち頸部および躯幹の過伸展位をとり、同時に vertical jump, rotatory move-

Fig. 1 Survival rate of the animals pretreated with nicardipine (0.1 mg/kg, intraperitoneally) (●) (n=30) and thiamylal (100 mg/kg, intraperitoneally) (▲) (n=44), and of control animals (○) (n=64). The values are expressed as percent of survival rate at each period of recirculation after ischemia. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

ment, running および tonic-clonic convulsionなどを示した。一方, barbiturate 投与群では上記の症状は比較的少ないか消失していた。

血流再開後の各群の動物の生存率を比較すると (Fig. 1), control 群では血流再開後5時間を経過すると40%以下となり, 24時間で15%, 14日目では3%以下と, ほとんどの動物が死亡してしまうが, barbiturate および nicardipine 投与群では血流再開4時間以降, どの時点においても生存率は統計学的に有意に高く, 24時間以降でも40%以上, 14日目でも30%以上の生存率を示した。

2. 脳虚血—血流再開実験におけるエネルギー代謝の変動 (Table 1)

(1) Glucose および lactate 濃度の変動 (Fig. 2)

20分間の脳虚血により, いずれの動物群においても lactate は正常値の450%以上の蓄積を示し, glucose は正常値の40%以下の減少を認めた。血流再開後5分では, すべての群で lactate の蓄積と glucose の枯渇状態が持続していたが, 血流再開後30分になると, いずれの群においても glucose の著明な overshoot と lactate の急激な減少がみられ, さらにその後 lactate 濃度は subnormal level に移行した。Barbiturate 投与群では, 血流再開後30分での glucose の overshoot が正常値の200%と, 他の2群と比較して有意($p < 0.01$)に抑制され, また60分における lactate 値も正

Fig. 2 Effects of nicardipine and thiamylal on glucose (○) and lactate (△) concentrations in the cerebral cortex of gerbils following 20 minutes of ischemia and 5, 30, 60, 180, or 360 minutes of recirculation. The values are averaged and expressed as percent of normal value calculated from untreated sham-operated animals. Closed symbols indicate statistically significant differences from the normal value ($p < 0.05$). Asterisks indicate statistically significant differences from the corresponding value in the control group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Table 1 Comparison of the effects of nicardipine and thiamylal upon energy metabolites of cerebral cortex during ischemia-recirculation periods

		ATP	P-Cr	Glucose	Lactate
Sham-operated	control (n=11)	21.9±1.01	37.1±1.67	15.4±0.67	17.7±2.11
	nicardipine (n=8)	22.3±1.00	38.1±2.73	13.1±0.88	13.2±1.05
	thiamylal (n=11)	21.3±1.24	47.3±2.81**	22.1±1.22**	11.2±1.60*
0 min recovery	control (n=9)	2.6±0.38	12.1±1.23	4.2±0.53	93.7±5.98
	nicardipine (n=7)	5.3±1.17*	12.0±2.64	6.2±1.77	82.6±3.82
	thiamylal (n=10)	2.8±0.47	2.3±0.52*	3.5±0.55	84.0±4.10
5 min recovery	control (n=15)	8.0±0.75	16.5±1.72	4.7±0.71	74.0±3.50
	nicardipine (n=12)	16.4±0.46***	36.5±1.70***	7.9±1.27*	76.3±5.43
	thiamylal (n=9)	7.3±1.15	11.8±2.96	6.3±0.80	94.3±5.81*
30 min recovery	control (n=8)	19.6±1.07	49.0±2.53	41.2±4.72	21.9±4.71
	nicardipine (n=8)	19.0±1.18	49.0±2.09	48.5±5.13	15.3±1.94
	thiamylal (n=11)	16.7±1.14	54.9±2.49	32.3±2.36**	7.1±0.84**
60 min recovery	control (n=8)	16.8±1.66	46.1±2.95	20.7±2.97	14.9±1.57
	nicardipine (n=8)	17.3±0.77	45.0±2.81	24.5±3.67	9.6±0.72**
	thiamylal (n=4)	17.7±0.80	51.0±4.07	23.8±3.65	7.4±2.42**
180 min recovery	control (n=7)	18.9±1.12	45.6±2.59	27.0±2.65	15.1±2.05
	nicardipine (n=7)	19.2±0.59	45.3±2.11	28.0±3.97	12.4±1.77
360 min recovery	control (n=7)	15.6±1.50	35.5±3.59	24.1±3.54	36.5±9.80
	nicardipine (n=7)	19.3±0.50*	38.2±2.15	20.5±3.14	16.6±2.6*
	thiamylal (n=11)	19.4±1.39	39.0±0.82	17.9±1.48	12.7±0.96**

The values are means±SEM, expressed as nmol/mg protein. Asterisks indicate values of nicardipine- and thiamylal-treated groups which are significantly different from those of the control group (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001). ATP indicates adenosine triphosphate; P-Cr, phosphocreatine.

Fig. 3 The effects of nicardipine and thiamylal on adenosine triphosphate (ATP) (□) and phosphocreatine (P-Cr) (○) in the cerebral cortex during ischemia-recirculation experiments. The values are averaged and expressed as percent of normal value calculated from untreated sham-operated animals. Closed symbols indicate statistically significant differences from the normal value (p<0.05). Asterisks indicate statistically significant differences from the corresponding value in the control group (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

常値の40%と、他の2群と比べ有意($p < 0.01$)に減少していた。次に、血流再開後360分の所見をみると、control群においてはlactate値は再び増加し、正常の2倍に達した。一方、このようなlactateの再貯留はnicardipineあるいはbarbiturate投与群においては明らかに抑制されており、lactateは正常範囲に留まるか、正常下限の値を示した。

(2) ATP および P-Cr 濃度の変動 (Fig. 3)

Fig. 3 に示したように、20分間の脳虚血時にはいずれの群においてもATP含量は著明に減少するが、nicardipine投与群では、その減少の程度は若干抑えられていた。また、脳虚血においてもっとも敏感に反応すると言われる^{23,25,28)} P-Cr含量は、各群とも著明な減少を示した。血流再開後5分では、control群ならびにbarbiturate投与群においてはATPおよびP-Crの回復は遅延し、おのこの正常値の45%以下の低値に留まり、特にbarbiturate投与群でその傾向が顕著であった。一方、nicardipine投与群においてはATPならびにP-Cr濃度が血流再開後急速に回復し、5分の時点でこの正常値の75%、98%のレベルにまで達した。血流再開30分では、いずれの群においてもATP濃度は漸次回復し、P-Crは逆にovershootの傾向を示した。しかしながら、血流再開30分以降のATP濃度は、control群でみると再び漸次減少傾向を示し、360分後では正常値の70%と有意な減少を示すが、この再減少の傾向はnicardipineおよびbarbiturate投与によって抑制され、両群とも血流再開後360分ではほぼ正常に回復していた。ただし、nicardipineおよびbarbiturate投与群の血流再開後のATPの回復過程を比較すると、後者ではその回復が比較的緩徐であった。

(3) $\sim P$ の変動 (Fig. 4)

Fig. 4 に示すように、 $\sim P$ を3群で比較すると、control群では虚血後血流再開30分以降360分までに、漸次、 $\sim P$ は正常値の116%と増加する傾向を示したが、nicardipineおよびbarbiturate投与群のそれは常に正常値の70%あるいはそれ以下に減少していた。

3. 脳虚血—血流再開実験におけるcyclic-AMPの変動 (Fig. 5)

Fig. 5 に示すように、20分間の脳虚血時には、いずれの群においてもcyclic-AMPは正常値の4～6倍に上昇するに留まったが、血流再開5分後には、いずれの群においても正常値の数10倍にも達する爆発的なovershootを示した。しかし、このovershootの程度を3群で比較すると、nicardipine投与群ではcontrol群よりさらに有意に上昇し、一方barbiturate投与群では逆に有意に抑制されていた($p < 0.05$)。その後血流再開360分までの経過をみると、各群ともcyclic-AMP濃度はしだいに正常に復していた。

Fig. 4 Effects of nicardipine or thiamylal on high energy phosphate utilization rate ($\sim P = 2 \Delta ATP + \Delta P-Cr + \Delta lactate$, mmol/kg/min) at 30 and 360 minutes of recirculation after 20 minutes of ischemia. ○: control animals, ●: animals pretreated with nicardipine, ▲: animals pretreated with thiamylal. The values are averaged and expressed as percent of normal value calculated from untreated sham-operated animals (21.44 mmol/kg/min).

Fig. 5 Effects of nicardipine and thiamylal upon cyclic-adenosine 3'5'-monophosphate level in the cerebral cortex during and after 20 minutes of ischemia. ○: control animals, ●: animals pretreated with nicardipine, ▲: animals pretreated with thiamylal. The values are averaged and expressed as ratios of normal value calculated from untreated sham-operated animals (5.0 ± 0.3 Pmol/mg protein). Asterisks indicate statistically significant differences from the corresponding value in the control group (* $p < 0.05$).

Table 2 Summary of effects of calcium-antagonist and barbiturates upon energy metabolites, high energy phosphate utilization rate ($\sim P$), and cyclic-adenosine 3' 5'-monophosphate (C-AMP) during various periods of recirculation after 20 minutes of forebrain ischemia

A: At early period of recirculation (reactive hyperemia)			
	Control	Calcium-antagonist	Barbiturate
Recovery of ATP and P-Cr	slow	rapid	slow
Overshoot of C-AMP	marked	marked	suppressed
Overshoot of glucose	marked	marked	suppressed

B: At 360 minutes of recirculation (delayed hypoperfusion)			
	Control	Calcium-antagonist	Barbiturate
Level of ATP and P-Cr	decreased	normalized	normalized
Level of lactate	reaccumulated	normalized	normalized or decreased
$\sim P$	increased	decreased	decreased

以上, Ca^{++} 拮抗剤と barbiturate の脳代謝に及ぼす効果の比較をまとめて Table 2 に示した。

IV 考 察

本研究で用いた砂ネズミ 20 分間前脳虚血モデルにおける血流再開後の早期は、いわゆる reactive hyperemia の時期^{15,19,20}に相当すると考えられる。この時期には脳血管は拡張し、組織内酸素分圧は増加し、“red venous blood” がみられると報告されている¹⁷。この状況下では酸素の供給により原形質内に蓄積されていた NADH が NAD^{+} に酸化され、嫌気性解糖より好気性解糖へ移行することになる^{17,18}。しかし、脳内 lactate 濃度は依然として高く、基質である glucose 濃度もまだ低値のままであり、mitochondria 内の酸化の磷酸化反応は十分行われず、脳内 ATP 濃度は枯渇した状態であるとされる^{17,33}。

本実験の血流再開早期においては、 Ca^{++} 拮抗剤を前投与した動物群においてのみ、ATP ならびに P-Cr 濃度の急速な回復が観察された。これは、 Ca^{++} 拮抗剤の投与が脳虚血—血流再開に引き続き、細胞死に陥るまでの一連の生化学的変化のうち、初期の段階で、主に mitochondria で起こるエネルギー代謝の変化になんらかの影響を及ぼしていることが推察された。脳虚血に伴う細胞死の機序に関しては、脳虚血および血流再開に伴って起こる細胞膜の depolarization により、まず細胞外から大量の Ca^{++} イオンの細胞内への流入が起こり、ついで余剰の Ca^{++} イオンが

mitochondria 内などにも流入し、 Ca^{++} 依存性異化作用に基づいて lipolysis, proteolysis が惹起され、これがひいては脳細胞死につながるものと考えられる^{5,7,36}。 Ca^{++} 拮抗剤の投与は、血流再開早期より起こる細胞内への Ca^{++} イオンの大量流入を阻止し、また mitochondria 内 Ca^{++} イオンの homeostasis を破綻させることなく、energy failure に陥った mitochondria の oxidative phosphorylation を円滑に再開し、ATP ならびに P-Cr など、エネルギー代謝産物の生成機能を迅速に促進するものと考えられる。 Ca^{++} 拮抗剤が脳血管拡張作用および脳血流増加作用を有することは周知である^{4,34,38}が、本実験で明らかにされたような脳エネルギー代謝を介する脳保護作用も本剤の有する重要な薬理作用であることが示唆された。

一方、barbiturate にはこのような作用は認められなかったが、血流再開早期に発来する cyclic-AMP の overshoot を抑制する作用は認められた。この血流再開早期に起こる cyclic-AMP の overshoot の生物学的意義は十分に解明されているとは言えないが、すでに報告されているように、脳の電気的興奮性の低下と関連があり、また動物の死亡率に影響を及ぼす痙攣発作の発現にも関与しているものと考えられる^{16,25,28}。

血流再開直後に起こる cyclic AMP の著明な増加は、血流再開後、基質である ATP が再合成されはじめるところに adenosine, potassium, norepinephrine などの adenylate cyclase の agonist が放出されるために起こってくるものと推測されている^{8,16,25}。さらに、cyclic-AMP overshoot の機序として、細胞膜の生化学的性状の変化の面からも説明されている。すなわち、細胞膜が虚血も含め、なんらかの要因で障害されると膜磷脂質のメチル化が起こり、membrane fluidity が増加する結果、一方で Ca^{++} gate が開き、細胞内に Ca^{++} が大量流入すると同時に、他方で adenylate cyclase の agonist による活性化が増強されて cyclic-AMP が増加するとの学説もある¹³。このような状況下で Ca^{++} 拮抗剤をあらかじめ投与すると、当然、 Ca^{++} の大量流入が抑制される。同時に membrane fluidity も改善され、cyclic-AMP も減少することが予想されたが、結果は逆で、著しい増加を示した。この過剰な増加は、 Ca^{++} 拮抗剤投与により mitochondria の機能が迅速に回復し、基質である ATP の供給が十分であるためか、他の可能性としては phosphodiesterase 活性が抑制されたため³⁴、分解されることなく、cyclic-AMP が蓄積したためであると考えられた。前述のごとく、barbiturate 投与群では ATP の再貯留が遅延し、基質不足に陥るためか、あるいは膜磷脂質のメチル化の stabilizer としての作用によるものか^{8,13,25}、その機序は不明であるが、血流再開直後の cyclic-AMP

overshootは抑制されていた。今回の実験では、 Ca^{2+} 拮抗剤およびbarbiturateはcyclic-AMPのovershootに対してはおおの増強と抑制という相反する反応態度をとるが、一方ではともに動物の生存率を有意に高める作用を有するという結果が得られ、cyclic-AMPの急激な増加が動物の生存率に密接に関連する脳エネルギー代謝の変化に直接影響を及ぼしているという結果は得られなかった。他のneuropeptideの消長とも合せて、今後の検討が必要と思われる。

血流再開30分以後では、蓄積したlactateは利用される^{17,18)}ので、しだいにsubnormal levelに達する。また、glucose濃度が回復する際にglucoseのovershootという現象を呈するが、その成因に関して、次の二通りの考え方がある。一つは脳虚血後に起こる一過性高血糖¹⁶⁾によるエネルギー依存性の糖のactive transportの増加にその原因を求めるもの¹⁰⁾で、もう一つはcyclic-AMPの増加に基づくglycogenの分解促進による増加に原因を求めるもの^{10,25)}である。このような組織内glucoseの異常な増加は一般に細胞代謝に対し不利に作用すると考えられており^{12,29,32,36)}、事実、我々の実験でもbarbiturate投与群ではこのglucoseのovershootは著しく抑制されている。さらに、barbiturate投与群ではlactate濃度は正常値以下にまで著明に抑制されており、またATPの回復過程が非常に緩徐であることなどから、barbiturateは Ca^{2+} 拮抗剤とは異なり、主として細胞質内の一連の生化学的cascadeに関与し、エネルギー生成機能を抑制しているように思われる。

次に、血流再開30分以降360分までの脳代謝の変動を検討してみると、まずcontrol群においては血流再開360分後にはATP濃度の二次的減少ならびにlactateの再蓄積を認め、同時に $\sim\text{P}$ が増加傾向にあることが判明した。すなわち、control群におけるcerebral energy demandは血流再開後、終始増加しているにもかかわらず、ATPの回復過程は遅延し、さらにこのようなhypermetabolismが血流再開後しばらくして起こる“delayed hypoperfusion”^{14,15,21,30,37)}の時期まで続くと二次的代謝障害が発生するものと思われる。一方、 Ca^{2+} 拮抗剤およびbarbiturate投与群ではエネルギー代謝産物はすべて血流再開360分までにはほぼ正常化しており、脳内energy demandは終始減少していた。Barbiturateがenergy demandを減少させる作用を有するという報告はみられる^{6,9,23,27,31)}が、 Ca^{2+} 拮抗剤にこのような作用があるという報告は、いまだこれをみない。その作用機序は不明であるが、生理的条件下ではmitochondriaの酸化的磷酸化と酸素消費量との間にある種のcouplingが存在し、効率良い酸化的磷酸化が行われれば、酸素消費量は相対的に減少すると言われる³⁶⁾。また、虚血という条件下

で細胞内に余剰の Ca^{2+} イオンが取り込まれると、酸素消費量が増加し、効率的には酸化的磷酸化反応が起こりにくくなるという報告もある^{12,36)}。 Ca^{2+} 拮抗剤による前処理は神経細胞内、そしておそらくmitochondria内への Ca^{2+} イオンの取り込みを著明に抑制するとされている¹¹⁾ので、その結果、mitochondriaにおける酸素消費率の増加は抑制され、酸化的磷酸化反応が円滑に行われるようになるものと推察される。

本実験結果からも推察されるように、 Ca^{2+} 拮抗剤は酸素消費率を増加させることなく、円滑な酸化的磷酸化反応を通じて、エネルギー生成機能を高めるものと考えられる。一方、barbiturateにも*in vitro*の実験ではあるが、ある程度 Ca^{2+} 拮抗作用を有することが証明されている³¹⁾。いずれにせよ、今回の脳虚血一血流再開実験において示されたbarbiturateと Ca^{2+} 拮抗剤による脳保護作用の機序は必ずしも同一ではないが、両者に共通点があるとすれば、いずれも脳のenergy demandを抑制し、血流再開後に起こる二次的脳損傷を防止することにあるように思われる。

V ま と め

脳虚血における Ca^{2+} 拮抗剤とbarbiturateの脳保護作用を比較した結果、両薬剤共通の作用は、脳のエネルギー消費機能を抑制することにより脳組織のenergy reserveを高め、脳保護作用を発揮することであることが判明した。一方、両者の相違点は、 Ca^{2+} 拮抗剤が血流再開早期に脳mitochondriaの機能に関連のあるエネルギー生成機能を急速に回復せしむるに対し、barbiturateは緩徐なATPの回復、glucoseのovershootの抑制などによりエネルギー産生機能を抑制しており、また血流再開早期におけるcyclic-AMPのovershootを抑制している点にあると思われた。

稿を終えるに当たり、長期にわたり、研究の御指導・御校閲を賜りました順天堂大学脳神経外科 石井昌三 教授、終始御教示・御協力を頂きました同 小林智志 講師、Lab. of Cellular Neurochemistry, N.I.H. のDr. Passonneau, Dr. Lustに深く感謝致します。

本研究は、文部省特定研究「神経難病の発症機構」研究費の援助を得て行われた。また、本研究の要旨は、第43回日本脳神経外科学会総会(1984年10月、千葉)、第27回脳循環代謝研究会(1984年10月、東京)、ならびに第8回国際脳神経外科学会議(1985年7月、Toronto)において発表した。

文 献

- 1) 阿部耕三、石井昌三： Ca^{2+} 拮抗剤：塩酸 nicardipine (Perdipine)の虚血性脳浮腫に対する効果。第43回日本脳神経外科

学会総会プログラム, 1984, p 142

- 2) Allen GS, Banghart SB: Cerebral arterial spasm: Part 9. In vitro effects of nifedipine on serotonin-, phenylephrine-, and potassium-induced contractions of canine basilar and femoral arteries. *Neurosurgery* 4: 37-42, 1979
- 3) Blaustein M, Ector A: Barbiturate inhibition of calcium uptake by depolarized nerve terminals in vitro. *Mol Pharmacol* 11: 369-378, 1975
- 4) Brandt L, Ljunggren B, Andersson KE, Edvinsson L, Mackenzie E, Tamura A, Teasdale G: Effects of topical application of a calcium antagonist (nifedipine) on feline cortical pial microvasculature under normal conditions and in focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metabol* 3: 44-50, 1983
- 5) Chien KR, Abrams J, Pfau RG, Farber JL: Prevention by chlorpromazine of ischemic liver cell death. *Amer J Path* 88: 539-551, 1977
- 6) Crane PD, Braun LD, Cornford EM, Cremer JE, Glass JM, Oldendorf WH: Dose dependent reduction of glucose utilization by pentobarbital in rat brain. *Stroke* 9: 12-18, 1978
- 7) Farber JL, Chien KR, Mittnacht S: The pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia. *Am J Pathol* 102: 271-281, 1981
- 8) Ferrendelli JA, Gross RA, Kinscherf DA, Rubin EH: Effects of seizures and anticonvulsant drugs on cyclic nucleotide regulation in the CNS, in: *Neuropharmacology of Cyclic Nucleotides U & S*. 1979, pp 211-227
- 9) Folbergrova J, Lowry OH, Passonneau JV: Changes in metabolites of the energy reserves in individual layers of mouse cerebral cortex and subjacent white matter during ischemia and anesthesia. *J Neurochem* 17: 1155-1162, 1970
- 10) Goldberg ND, O'toole AG: The properties of glycogen synthetase and regulation of glycogen biosynthesis in rat brain. *J Biol Chem* 244: 3053-3061, 1969
- 11) Hass WK: Beyond cerebral blood flow, metabolism and ischemia thresholds: An examination of the role of calcium in the initiation of cerebral infarction, in: *Cerebral Vascular Disease vol 3; Proceeding of the 10th Salzburg Conference on Cerebral Vascular Disease*. 1981, pp 3-17
- 12) Hillered L, Siesjö BK, Arfors KE: Mitochondrial response to transient forebrain ischemia and recirculation in the rat. *J Cereb Blood Flow Metabol* 4: 438-446, 1984
- 13) Hirata F, Axelrod J: Phospholipid methylation and biological signal transmission. *Science* 209: 1082-1090, 1980
- 14) Hossmann KA: Cerebral dysfunction related to local and global ischemia of the brain, in: *Brain Function in Old Age*. Berlin, Springer, 1979, pp 385-393
- 15) Hossmann K-A, Lechtepe-Grüter H, Hossmann V: The role of cerebral blood flow for the recovery of the brain after prolonged ischemia. *Zbl Neurol* 204: 281-299, 1973
- 16) 小林啓志: Ischemiaの脳皮質energy metabolitesおよびcyclic nucleotidesに及ぼす影響. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 18 [Part II]: 21-28, 1978
- 17) 小暮久也: 血行再建と脳のエネルギー代謝 一脳虚血と生化学一. *脳神経外科* 8: 313-329, 1980
- 18) Kogure K, Busto R, Scheinberg P, Reinmuth OM: Energy metabolites and water content in rat brain during the early stage of development of cerebral infarction. *Brain* 97: 103-114, 1974
- 19) Kogure K, Scheinberg P, Fujishima M, Busto R, Reinmuth OM: Effects of hypoxia on cerebral autoregulation. *Am J Physiol* 219: 1393-1396, 1970
- 20) Lang R, Zimmer R, Oberdorster G: Post ischemic O₂ availability and O₂ consumption of the isolated perfused brain of the dog. *Pfluegers Arch* 334: 103-113, 1972
- 21) Levy DE, Duffy TE: Cerebral energy metabolism during transient ischemia and recovery in the gerbil. *J Neurochem* 28: 63-70, 1977
- 22) Lowry OH, Passonneau JV: *A Flexible System of Enzymatic Analysis*. New York, Academic, 1972, pp 109-217
- 23) Lowry OH, Passonneau JV, Hasselberger FX, Schulz DW: Effect of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain. *J Biol Chem* 239: 18-30, 1964
- 24) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951
- 25) Lust WD, Passonneau JV: Cyclic nucleotide in murine brain: Effect of hypothermia on adenosine 3',5' monophosphate, glycogen phosphorylase, glycogen synthase and metabolites following maximal electroshock or decapitation. *J Neurochem* 26: 11-16, 1976
- 26) Michenfelder JD, Milde JH, Sundt TM Jr: Cerebral protection by barbiturate anaesthesia. *Arch Neurol* 33: 345-350, 1976
- 27) Michenfelder JD, Theye RA: Cerebral protection by thiopental during hypoxia. *Anesthesiology* 39: 510-517, 1973
- 28) Murakami N, Lust WD, deAzeredo FAM, Passonneau JV: Ischemia related changes in adenine nucleotide metabolism, in: *Circulatory and Developmental Aspect of Brain Metabolism*. New York, Plenum, 1980, pp 5-22
- 29) Myer RE: Anoxic brain pathology and blood glucose. *Neurology (Minneapolis)* 26: 345, 1976
- 30) Nemoto EM, Hossmann KA, Cooper HK: Post-ischemic hypermetabolism in cat brain. *Stroke* 12: 666-676, 1981
- 31) Nilsson L, Siesjö BK: The effect of phenobarbiturate anesthesia on blood flow and oxygen consumption in the rat brain. *Acta Anaesthesiol Scand* 57: 18-24, 1975
- 32) Plum F: What causes infarction in ischemic brain? The Robert Wartenberg Lecture. *Neurology (Minneapolis)* 33: 222-233, 1983
- 33) Rehncrona S, Mela L, Siesjö BK: Recovery of brain mitochondrial function in the rat after complete and incomplete cerebral ischemia. *Stroke* 10: 437-446, 1979
- 34) Sakamoto N, Tera M, Takenaka T, Maeno H: Inhibition of cyclic-AMP phosphodiesterase by 2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylic acid 3-(2-(N-benzyl-N-methylamino)ethyl ester 5-methyl ester hydrochloride (YC-93), a potent vasodilator. *Biochem Pharmacol* 27: 1269-1274, 1978
- 35) Schanne FAX, Kane AB, Young EE, Farber JL: Calcium dependence of toxic cell death: A final common pathway. *Science*

- 206: 700-702, 1979
- 36) Siesjö BK: Cell damage in the brain: A speculative synthesis. *J Cereb Blood Flow Metabol* 1: 155-185, 1981
- 37) Snyder JV, Nemoto EM, Carroll RG, Safar P: Global ischemia in dogs: Intracranial pressures, brain blood flow and metabolism. *Stroke* 6: 21-27, 1975
- 38) Steen P, Newberg LA, Milde JH, Michenfelder JD: Nimodipine improves cerebral blood flow and neurologic recovery after complete cerebral ischemia in the dog. *J Cereb Blood Flow Metabol* 3: 38-43, 1983
- 39) Steiner AL, Wehmann RE, Parker CW, Kipnis DM: Radio-immuno-assay for the measurement of cyclic nucleotides, in Greengard P, Robinson GA (eds): *Advances in Cyclic Nucleotide Research*, vol 2. New York, Raven, 1972, pp 51-61
- 40) Yatsu FM, Diamond I, Graziano C, Lindquist P: Experimental brain ischemia: Protection from irreversible damage with a rapid-acting barbiturate (methohexital). *Stroke* 3: 726-732, 1972
- [別刷請求先：〒251 神奈川県藤沢市藤沢 2-6-1, 藤沢市民病院 脳神経外科, 村上 登]