

# 外傷脳の生化学的研究

—特に切載脳グリア組織の代謝的特徴について—

東邦大学医学部第2外科学教室（指導：栗津三郎教授）

中 野 重 徳

〔原稿受付 昭和42年11月1日〕

## Biochemical Studies on Injured Brain Tissue

by

SHIGENORI NAKANO

2nd Department of Surgery, School of Medicine, Toho University  
(Director : Prof. Dr. SABURO AWAZU)

It is well known that a focal injury to cerebral cortex produces degeneration of neurons and reactive proliferation of glial cells. Therefore, one can study some of characteristics of glial and neuronal cells by comparing degenerated brain tissue with intact tissue.

The present paper was based on morphological and biochemical changes after operation which was surgical section onto one side of frontal lobe of rat brain, and metabolic characteristics of proliferative glial cells one month after operation.

These results were demonstrated as following :

1) Surgical section of the frontal lobe of the rat brain has been found to cause degeneration and disappearance of neurons, and proliferation of glial cells in injured lesion, one month after the operation.

2) Water and Na contents in injured brain tissue increased by the 5th days after the operation and were to be the same level as the intact control tissue in one week. One month after the operation, K contents in operated tissue slightly decreased compared with the unoperated control tissue.

3) Two months after operation, lipid-phosphorus contents in injured tissue apparently decreased.

4) In operated brain tissue, DNA contents were higher and RNA/DNA ratio was less than the control.

5) Contents of free amino acids, especially aspartic acid, glycine and alanin in the operated brain tissues decreased compared with control tissues in two months after operation.

6) Incorporation of  $^{32}\text{P}$ , which was injected intraperitoneally, into brain tissues one week after operation was four times higher than the intact control tissues. One month after operation, however,  $^{32}\text{P}$  incorporation values into glial tissues were not changeable comparing with the control.

7) Oxygen consumption and glycolytic activity in reactive glial slices were almost

same as the control. K-effect was also observed in slices of the glial tissues.

8) When amino acids such as L-glutamate, L-aspartate and these D-isomers were added to the incubation medium, these amino acids were actively accumulated into glial tissues obtained two months after operation.

Contents of D-glutamate accumulation in glial tissues increased linearly for 60 minutes and no appreciable difference was found on D-glutamate accumulation between control and glial tissues. Active accumulation of D-glutamate was corresponding to increasing of potassium ions into glial cells.

## 結 論

近来脳神経外科の進歩は脳外傷のみならず脳腫瘍或いは脳血管疾患に対してもその治療範囲を拡大しつつある。然しなから此れ等の脳障害のみならず、脳手術においてさえも、脳組織は脳浮腫にはじまる病的現象を惹起し、ひいては神経細胞の変性消失、更にはグリア細胞の反応性増殖を来す経過をとることが知られているのであつて<sup>1)~4)</sup>。他組織においてみられる様な治療経過とは異つている。

一方、脳組織においては、少くとも毛細血管レベルでは光学顕微鏡の検査によつて記載された血管周囲腔、乃至は Virchow-Robin 氏腔等の他組織に認められる様な組織間隙は存在せず<sup>5)</sup>、代つてグリア細胞の密接した像が認められているのである。そして神経細胞が脳組織の機能を担つていることについては異論がないにしても、他方数の上で神経細胞に数倍するグリア細胞については、その機能は憶測の域を出ていない。

そこで著者は外傷脳の治療機転に關与する物質的背景を明らかにし、併せて反応性に増殖するグリア組織の機能的並びに物質的特質をも明確にしようと考え、白鼠を用い脳半球前頭部に切載手術を加え非手術側を対照としながらその経時的变化について組織学的、生化学的検索を試みたのである。

外傷脳の初期においては既に知られる様<sup>6)~9)</sup>に脳浮腫の経過を示すのであり、荏原<sup>10)</sup>らによつても報告されている様に自由水の増加に伴う腫張と理解されたのである。然るにその後の変化は形態学的にグリア細胞の増殖が惹き起こされることは知られているが、生化学的な検索は殆んど為されていない。そこで著者は更に此の組織を用いて *in vitro* での研究を進めたのである。此のことは反応性に得られたグリア組織が仮に正常脳組織中に存在するグリア細胞そのものでないとしても、今迄不明であつたグリア細胞の代謝的特徴の一端を明らかにし、ひいては脳の機能を支えるグリア細

胞の物質的背景をも明確にし得るものと考えられるのであつて、ひいては脳外傷急性期経過後、自覚的症狀の消退をみない、いわゆる脳外傷後遺症等の原因を明らかにし得る問題を提起する根拠とも考え検索を進めた。

## 実 験 方 法

### 1) 実験動物作成法

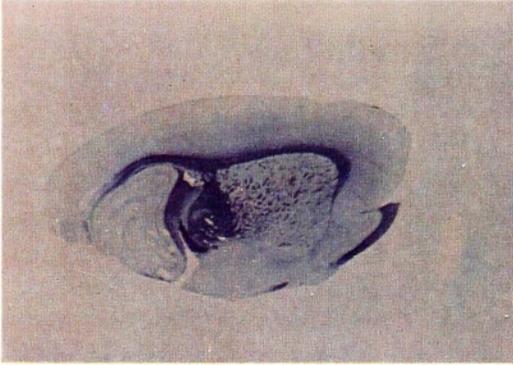
実験材料には体重180~250 g の Wistar 系白鼠を用い、雌雄については特に区別はしなかつた。手術に當つてラボナルを 50mg/kg 当り腹腔内に注射し全身麻酔を行なつた後、頭毛を剃毛し Preshot にて消毒、頭皮に正中切開を加え左半球前頭骨に直径 3.5mm のドリルにて穿孔し、この部より尖刃を挿入して左球前頭葉のみの切載手術を行なつた。唯しこの際、出来得る限り脳軟膜を切断しない様に注意し、血管損傷を可及的に避けた。次いで頭皮を縫合し Nobectan を噴霧し手術を終る。

特に手術後感染予防並びに補液の目的で、体重kg当りテラマイシン100mg並びに20%ブドウ糖 4 ml を手術後1回だけ皮下に与えた。飼育に當つては鼠用固形飼料(増殖用一NM型、オリエンタル酵母社製)を用いた。

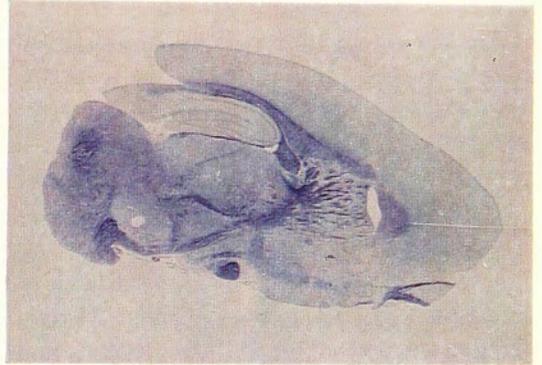
尚切載手術に際し特に切載部位を前頭部にした意義は脳障害の為に惹起される片麻痺、運動障害が飼料の経口摂取を困難にし、機能或いは脳代謝に及ぼす栄養障害の影響を除く為である。

### 2) 組織学的検索

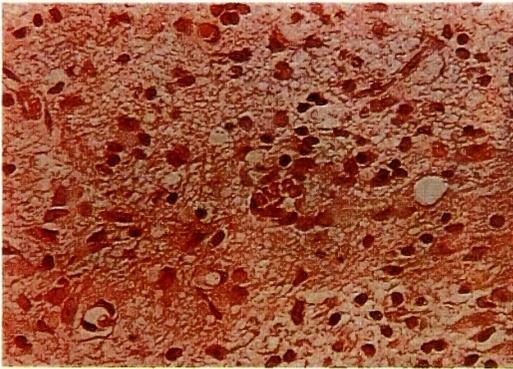
組織学的検索に當つては、左半球前頭部切載白鼠を手術直後より3ヵ月迄の各時期に於いて断頭後、大脳を損傷しない様に摘出し、左右両半球を分けてそれぞれ手術側、正常側とし各染色法の必要に応じて、10%ホルマリン並びにブロムホルマリン液で、あるいは凍結固定し、パラフィン切片又は凍結切片として H.E. 染色、Penfield 染色、L.F.B. 染色を行ない組織学的検



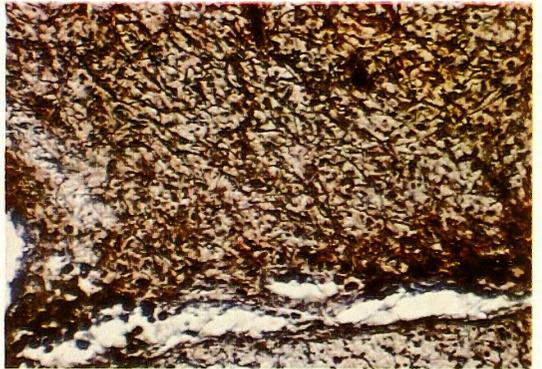
**Fig. 1** : intact brain tissue  
(LFB)



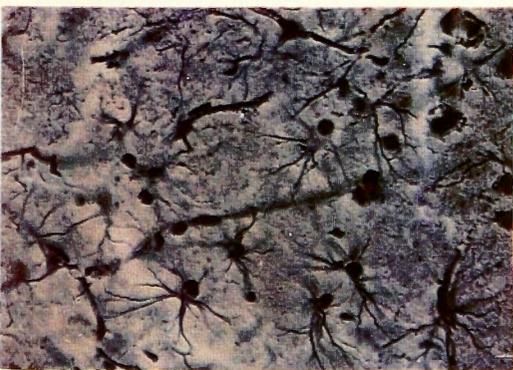
**Fig. 2** : one month after operation  
(LFB)



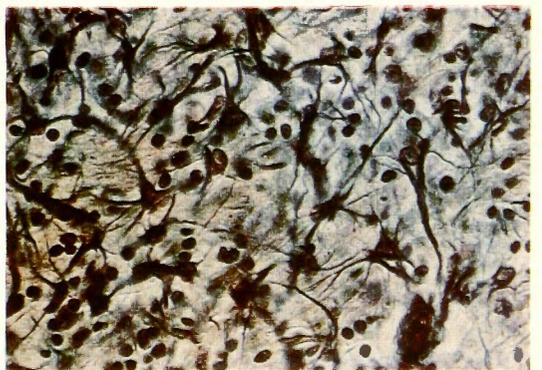
**Fig. 3** : one month after operation  
(HE)



**Fig. 4** : one month after operation  
(Penfield)



**Fig. 5** : ten days after operation  
(Penfield)



**Fig. 6** : one month after operation  
(Penfield)

索に供した。尚切片作成は脳の矢状方向への切り出しで行なつた。

### 3) 試料の調整

組織の取り出しは断頭瀉血後大脳を摘出し左右脳半球に切離後、水分の蒸発等を考慮して可及的速やかに組織を取つた。手術側では脳半球の切断創より前後各々約1.0mm範囲の灰白質を、又対照側では切載創の対照部位に相当する灰白質を試料とした。

尚 *In vitro* の実験に使用する時は、大脳摘出後直ちに氷冷中の Krebs-Ringer phosphate 緩衝液中に入れ組織に附着した血液を洗つた後、上記の部位から free hand で厚さ0.2~0.3mmの薄切片を作製し試料とした。

basic medium の組成は Krebs-Ringer phosphate (pH-7.2)-Na : 140mEq/L, K : 7.26mEq/L, Ca : 2.75mEq/L, Mg : 2.62mEq/L, Cl : 139mEq/L, P : 10.8mol/L, total osmolarity = 302mOsm/L-である。

### 4) 組織内水分量及び電解質

組織内水分量の測定は、取り出した試料をアルミ箔上におき、可及的速やかに湿重量を測定した後、更にそれを110°C 5時間以上乾燥後、乾燥重量を秤量して湿重量と乾燥重量の差より算出した。

電解質はこの乾燥組織を一定量の0.01N HNO<sub>3</sub>で3時間抽出し、その抽出液中のNa<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>をベックマン焰光分光光度計を用いて測定し電解質量を求めた。

Inulin Assumption により細胞内外の電解質分を布求める<sup>11)</sup>際には0.2% Inulin を medium 中に加え組織切片を incubate した。incubation 終了後組織を取り出し、脱イオン水で Inulin を抽出し Higashi の方法で測定<sup>12)</sup>した後、乾燥重量を求め組織水分量を求めた。更に0.01N HNO<sub>3</sub> 中で乾燥組織から電解質を抽出してNa<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>は焰光分光光度計により、ClはLowryの方法<sup>13)</sup>により求め、medium 中に添加したInulinは細胞内に組込まれないと仮定し、細胞内電解質分布を算出した。尚実験器具はすべて2N HNO<sub>3</sub>で洗滌したポリエチレン、又は石英製を使用した。

### 5) アミノ酸の分離定量

遊離アミノ酸の定量は検体をトーション・バランスで秤量後、75%エタノール或いは1% P.C.A. で除蛋白し、その上清を用いた。アミノ酸の定量はペーパークロマトグラフィ<sup>14)</sup>を用い行なつたが、特に組織内アミノ酸含量の測定にはアミノ酸自動分析装置を用いて測定し、ペーパーによる値と比較しながら検討を進めた。又ペーパークロマトグラフィによる分離定量の場合、濾紙(東洋濾紙No. 51, 40×40cm)の展開溶媒と

してはフェノール:水(4:1)、ときにn-ブタノール:酢酸:水(4:1:5)を用いた。尚アミノ酸の能動的取り込みは、用いるアミノ酸をあらかじめリンゲル液に溶解し中和したものを medium に加え、終末濃度を5mMとなる様にし、これに脳切片を入れ37°Cで incubate し、切片を引きあげ経時的にその取り込みを追跡した。medium についても incubate 前後についてそのつどアミノ酸の値を求めた。

### 6) 脂質、核酸の定量

試料を4% P.C.A. で除蛋白し Schmidt-Thannhauser の変法<sup>15)</sup>に従つて脂質、核酸を抽出し、脂質は Lowry の方法<sup>16)</sup>、RNA は Orcinol による方法<sup>17)</sup>、DNA は Burton の方法<sup>18)</sup>によつた。又蛋白は Lowry の変法<sup>19)</sup>に準じた。

### 7) 酸素消費、ブドウ糖、乳酸の測定

4mMのグルコースを含む Krebs-Ringer Phosphate 緩衝液中に組織切片を浮遊し、気相は純酸素に置換し37°C 60分 incubate した。酸素消費は Warburg 法によつて求めると同時に medium 中のブドウ糖消費量及び乳酸の生成について検討した。ブドウ糖は Koehler の方法<sup>20)</sup>、乳酸は Barker & Summerson の方法<sup>21)</sup>を用い定量した。

尚K<sup>+</sup>添加の際は滲透圧を考慮することなく Ringer 中に100mM KCl を添加した。

### 8) 脳組織中の<sup>32</sup>Pの測定

脂腔内に<sup>32</sup>P(英国 The Radiochemical Centre製)を10μc/g-Body-wt. の割合で投与し、3時間後に瀉血断頭し脳組織を摘出後、直ちに氷冷10% T.C.A. 中でホモジエナイズし、その一部を取つて Geiger-Müller 計数器でその放射能を測定し、cpm/g-wet. wt. の値をもつて腹腔内より単位質量当りの脳組織中へ組み込まれた放射能の値とした。

## 実験成績

組織学的には脳障害部に一致して神経細胞の消失が起り、これに代つて反応性にグリア細胞の増殖が認められることは種々報告がある。著者は白鼠の脳半球前頭部を切載し、その傷害に伴なつた変化を組織学的に、又生化学的に検索し、脳障害並びにその回復過程に於ける生化学的变化を追究し、併わせて外傷脳組織中に存在するグリア細胞の代謝的特徴をも明らかにしようとして試みた。

### 1) 組織学的検索

切載部位は1ヵ月後の L.F.B. 髄鞘染色像(図2)

にみられる如く前頭部に於ける髄鞘の断裂, 消失像として明らかに認められている。図1は L.F.B. 染色の対照側像である。図3は切載部位に沿った術後1ヵ月のHE像であるが, グリア細胞の著しい増加と神経細胞の萎縮変性像がみられる。尚術後1ヵ月以後の組織も検索したが, その像は1ヵ月のものと変らなかつた。この時期のものを Penfield のグリア染色で更に追求すると, 図4に示す様に切載部に一致してグリア細胞の増殖像を認め得る。図5はこの切載部附近の術後10日目の強拡大で, この時期で既に脳傷害に反応したグリア細胞の増殖像が認め始められており, 1ヵ月以後になると手術部附近では図6に示す様にグリア細胞の密集像が得られた。

2) In vivo に於ける物質変化

電解質及び蛋白質の手術後の継時的変化を追求したものが図7に示してある。

手術後5日迄の急性期で水分量,  $K^+$ ,  $Na^+$  の増加を認めた。荏原ら<sup>10)</sup>は脳振盪等により実験的に脳損傷を起しその電解質変化を観察し, 急性期に於いては水分量等の増加を認めて, これが脳浮腫であることを報告

しているが, 此の際の脳切載後の初期に惹き起こされた電解質の増加はやはり手術侵襲に伴う脳浮腫の状態と考えられた。

組織中の蛋白についても此の時期では対照に比しやはり高いことが示されたが, 此の時期の組織像でも白血球の滲潤像がみられることから血清由来の蛋白が多量に含まれることも考えられ, 必ずしも組織由来の蛋白のみが増加したものとは考え難い。

術後1ヵ月を経過すると電解質, 蛋白共に一定値を示す様になり, 2ヵ月に至るまでその値は変化しない。既に述べた如く1ヵ月では組織でグリア細胞の密集像が明らかに認められることと考え合わせると, 1ヵ月で既に Gliosis が完成し, 以後その状態を継続するものと考えられる。

表1は乾燥重量当りの電解質分布を示したものである。術後1週間経過したものでは, 対照側と電解質分布の上で殆んど変化がみられなかつた。然し2ヵ月経過したものでは手術側で  $K^+$  量が低下しているのが認められた。

Table 1 Electrolytes content in rat brain cortex

Condition	H <sub>2</sub> O (ml/g-dry wt.)	K <sup>+</sup> (μEq/g-dry wt.)	Na <sup>+</sup> (μEq/g-dry wt.)
1 Week control	3.66	444.0	190.0
1 Week operated	3.72	449.0	235.0
2 Months control	3.88	495.9	250.0
2 Months operated	3.93	403.5	241.5

又第2表に示す如く, 磷脂質量は2ヵ月の手術側で対照側と比べ低値を示しており, グリア細胞の脂質代謝の特徴として興味を持たれる。核酸についてみる

Table 2 Lipid-P and nucleic acid contents in rat brain cortex

Condition	Lipid-P (mg-P/g w.w.)	RNA (mg/g w.w.)	DNA (mg/g w.w.)	RNA/ DNA Ratio
1 Week control	2.05	1.65	0.52	3.18
1 Week operated	1.95	1.97	0.59	2.93
2 Months control	1.95	2.16	0.60	3.51
2 Months operated	1.10	2.34	0.83	2.82

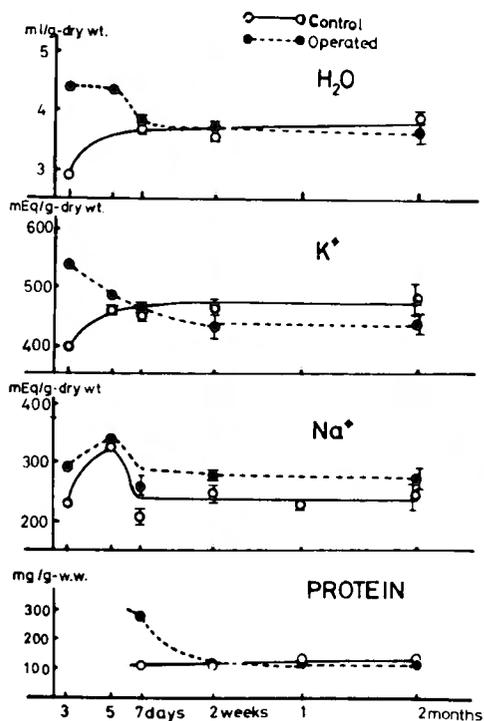


Fig. 7 Distribution of Electrolytes and Protein in Rat Brain Cortex

と、DNA は手術後2ヵ月のもので手術側が対照側に比し40%増加し、又 RNA/DNA 比は2ヵ月経過した手術側が対照側に比し低値を示しており、このことは細胞の増殖が起つていることを示唆している。

組織内遊離アミノ酸量についてみると表3の如く、脳組織内に多量に存在するグルタミン酸、グルタミン、GABA は手術後1週目では大きな変化がみられなかつたが、2ヵ月経過のものでは低下の傾向を示して来ており、特にアスパラギン酸、グリシン、アラニン等は低下が著明であり、これはグリア細胞に特徴的なアミノ酸代謝パターンを示しているものと考えられた。

**Table 3** Amino acids contents in rat brain cortex

Condition	Amino acids ( $\mu$ moles/g-wet weight)					
	A.s.p.	Glu-NH <sub>2</sub>	Glu.	Gly.	Ala.	GABA
1 Week						
control	4.22	3.06	11.95	1.63	1.39	3.28
operated	3.87	3.75	12.6	1.84	1.46	2.84
2 Months						
control	4.76	3.62	11.10	2.04	1.30	3.40
operated	2.73	2.81	8.70	1.25	0.78	2.93

Amino acids contents were determined by amino acid autoanalyser

3) 血液—脳関門に対する検討

血液—脳関門に対する脳切載時の影響を調べるために、腹腔内に <sup>32</sup>P を10 $\mu$ c/g-Body wt. の割合で投与し、3時間後に断頭瀉血し、脳組織1g中の放射能を手術側並びに非手術側の組織について比較検討したのが表4である。同時にここに示した Ratio とは単位組織質量中の手術側の <sup>32</sup>P 取り込み量と対照値の比を表したもので、術後1週間目では対照の組織に比し3.7倍も多く <sup>32</sup>P が手術側脳組織内に組み込まれていることを

**Table 4** <sup>32</sup>P incorporation in rat brain tissue after intra-peritoneal injection

Condition	Total counts	
	C.P.M./g-w.w.	Ratio
Control	3.84 $\times$ 10 <sup>5</sup>	1.00
1 week after operation	14.1 $\times$ 10 <sup>5</sup>	3.67
Control	1.38 $\times$ 10 <sup>5</sup>	1.00
1 month after operation	1.83 $\times$ 10 <sup>5</sup>	1.33

Ratio : Operation counts/control counts

示している。然し術後1ヵ月では、その比は対照側と殆んど変化が認められなくなる。このことは、脳傷害によつて惹き起こされた血液—脳関門の障害がグリア細胞の増殖によつて修復されたことを示している。

4) 脳切片を用いての実験

脳切片を用いる in vitro の実験には、全て手術後2ヵ月の組織を用いた。

表5に示す Normal Ringer とはグルコースを含む Krebs-Ringer 中で脳切片を保温振盪した結果を示している。ブドウ糖消費、乳酸形成共に対照側とほぼ同様の値を示しており、酸素消費についても又対照側と同様であつた。このことはグリア組織が組織呼吸並びに解糖系の面で正常脳切片と同様に高い代謝活性があることを示している。

**Table 5** Oxygen consumption and glucose utilization in rat brain cortex slices

Condition	Oxygen consumption $\mu$ moles/g-hr.	Glucose utilization $\mu$ moles/g-hr.	Lactate formation $\mu$ moles/g-hr.
Normal ringer			
control	59.6	30.3	31.1
operated	57.0	34.9	39.9
K <sup>+</sup> rich Ringer (100 mM-KCl)			
Control	85.4	63.3	78.0
Operated	78.4	55.9	71.9

又100mMKCl を浸透圧を調節することなく medium 中に添加すると、対照側及び手術側共に酸素消費の増大、ブドウ糖消費並びに乳酸形成の増加を引き起こしてくる。既に知られている様に K-効果は脳切片においてのみ特異的にみられる現象であるが、グリア組織においても亦明らかに認めることが出来た。

一方、medium 中に添加されたアミノ酸は脳切片中にグルコース存在下で能動的に取り込まれることが報告されている<sup>22)</sup>。表6、7に示す In Slice とは1時間保温振盪後切片中に取り込まれたアミノ酸の組織湿重量当りの総量を示したものであり、Slice/Medium Ratio とは切片内のアミノ酸量を保温振盪後 medium 中に含まれるアミノ酸濃度で除したものであり、Ratio 1.0 以上は能動的に medium 中のアミノ酸が組織内に蓄積されたことを表している。

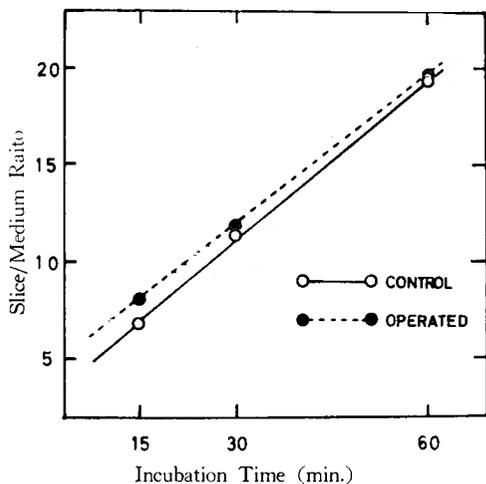
非代謝性アミノ酸の一つであり、脳切片に能動的に取り込まれることが知られている D-グルタミン酸を用い、切片内えの取り込みの経時的変化を示したもの

**Table 6** D-Glutamic acid accumulation and electrolytes distribution in rat brain cortex slices

Cotions	D-Glutamate in slice ( $\mu$ moles/g-w.w.)	Slice/ Medium Ratio	Tot. H <sub>2</sub> O ml/g- dry wt.	Intracellular phase (Inulin assumption)			
				H <sub>2</sub> O ml/dry wt.	K <sup>+</sup> $\mu$ Eq/dry wt.	Na <sup>+</sup> $\mu$ Eq/dry wt.	Cl <sup>-</sup> $\mu$ Eq/dry wt.
Control							
normal ringer	—	—	8.59	4.28	355	300.5	390.7
+ D-Glu. (5mM)	62.0	19.4	9.85	6.67	433	490.2	430.3
Operated							
normal ringer	—	—	8.96	4.58	377	266.4	358.5
+ D-Glu. (5mM)	60.3	19.5	10.1	6.54	446	468.5	426.2

**Table 7** Amino acids accumulation into rat brain cortex slices

Conditions	L-Glu. (5mM)	L-Asp. (5mM)	D-Asp. (5mM)	GABA (5mM)	D-Glu. + ouabain (5mM) ( $5 \times 10^{-8}$ M)
In slices ( $\mu$ moles/g-w. w. /hr.)	48.8	22.7	27.7	22.2	6.04
Control					
Slice/Med. Ratio	18.8	5.72	6.96	5.21	0.97
Operated					
In slices ( $\mu$ moles/g-w. w. /hr.)	41.5	25.4	29.7	26.5	5.97
Slice/Med. Ratio	13.0	6.41	7.56	5.84	1.08



**Fig. 8** Time Course of D-Glutamate Accumulation in Rat Brain Cortex Slices

が図8である。手術側の切片内への取り込み量は時間と共に1時間に亘って直線的に増大し、その経過及び取り込み量は全く対照と変ることがなかつた。

又 Inulin Assumptionを用いてD-グルタミン酸の取り込みに伴った細胞内外電解質分布の変化をみると(表6), 手術側切片即ちグリア細胞内にも正常脳切片

と同様D-グルタミン酸の能動的取り込みに伴った K<sup>+</sup>の増加が認められ、K-Glutamate の中性塩として細胞内に取り込まれ、蓄積されることを認めることが出来た。

而も乾燥重量当りの細胞内電解質分布はアミノ酸を添加しない場合、或いは添加した場合、共に対照側とはほぼ同様であつた。

更に、他のアミノ酸について同様な取り込みに対する態度を検討したが(表7), 対照側に対すると同様、手術側切片でも能動的な取り込みはみられ、能動輸送の阻害剤である Ouabain 添加では抑制された。

考 按

Cajal<sup>21)</sup> は1928年脳の傷害或いは疾病により侵された脳の障害部位では Neuron の消失が起り、それに代つてグリア細胞が置き代ると報告して以来、脳障害とグリア細胞の関係は種々形能学的に検討されて来た。一方、脳組織におけるグリア細胞の役割についても研究が行なわれており、グリア細胞が脳組織における栄養物の貯蔵場所であり<sup>23)</sup>、血液からの脳組織への物質輸送の主役を演じていることも示唆されて来た<sup>24)</sup>。この様なことから著者は脳に対する侵襲後の経過特に一応治癒の経過を辿つた慢性の状態に於ける脳障害部位

の生化学的变化を追求し、併せてグリア細胞の特徴をも生化学的に追求しようと考え、白鼠を用い前頭葉切載によつて脳に傷害を与え、反応性に得られたグリア組織を用いてその傷害部位の生化学的特徴を追求したのである。

前頭葉切載部位では組織学的検索においても示された様に、術後10日目で既に反応性にグリアの増殖を認めており、1ヵ月以降では神経細胞の消失に代り、グリアの密集像が得られた。

表1に示した通り電解質分布は組織中の電解質を示したものであるが、 $K^+$ 量においては手術側2ヵ月のものが対照側に比しやや低値を示した。グリア細胞における静止電位は神経細胞に比し低いことが報告されており<sup>25)</sup>、このことが $K^+$ 量の低下と関連すると考えられる。Koch等<sup>26)</sup>によつてグリア細胞では $Na^+$ が組織電解質の50%を占めていることも報告されているが、著者の成績では殆んど正常側と変化を認めることは出来なかつた。Kochらの用いた組織は皮質下核であつて、細胞間隙、Microgliaの混在等も考慮しなくてはならず、著者の行なつた皮質組織の場合と異なつていゝと考えなくてはならない。本組織の組織像でグリアの密集像が得られていること、或いは静止電位が神経細胞に比し少々低値を示すに過ぎないとの報告からも考え $Na^+$ が電解質の50%以上を占めることは考え難い。

第7図に示す様に手術後1ヵ月以後では電解質の変動がみられず、一定の値を維持しており、且つDNA量及びRNA/DNA比も同様に1ヵ月以後で表2に示す如く増加或いは低値を各々維持しているのであつて、このことは組織学的変化と考えあわせると、神経細胞の変性消失に代つてグリア細胞の反応性増殖が終り、1ヵ月以後ではグリア組織としての完成像が得られたものと考えられる。

さて、脳組織中のアミノ酸は高い含有量を有し、且つブドウ糖酸化によつてこれらアミノ酸が新生されることが知られている<sup>27)28)</sup>。この組織のアミノ酸含有量は対照側に比し低い傾向を示しており且つアスパラギン酸、グリシン、アラニン等の低下が著しい。このことはグリア細胞のアミノ酸代謝パターンの特徴を示したものと考えられる。Korey, S.R.<sup>29)</sup>らによれば脳全体の酵素消費量の65%が軸索原形質を含むNeuronによるものとしているが、Hydén<sup>30)</sup>らの報告で単離細胞を用い単位体積当りの呼吸活性はOligodendrogliaがNeuronよりも高く、むしろグリア細胞で嫌氣的解糖

系の活性が強いことを報告している。表5に示される結果もその傾向を伺わせる。このことはグリア組織中のアミノ酸含有量が正常組織に比し全般的に低いことと関連するかも知れないがアスパラギン酸等が特に低値を示していることは、やはりグリア組織のアミノ酸代謝パターンの特質として考慮されなくてはならない。

いずれにしても本グリア組織が高い代謝活性を持つことは明らかであり、少くとも脳切片における代謝活性の主役はグリア細胞によるものと考えられる。

一方、グリア細胞は血管からの脳組織への物質輸送を調節するいわゆる血液-脳関門の機能を有するものとの報告がある<sup>31)</sup>。

静脈内に注入された<sup>32</sup>Pは脳組織内へ移入し難いことは既に知られており<sup>32)</sup>、血液-脳関門の存在を物語つている。脳切載手術後1週間目の手術側では、腹腔内に投与された<sup>32</sup>Pは対照側のほぼ4倍量も高く組み込まれている。図7に示す電解質分布の結果からみると、既に急性期の脳浮腫の状態は消退し、一応血管損傷も修復されたと考えられるのであるが、脳損傷部位の血液-脳関門の障害を惹き起していることを示している。Glial endfootが毛細血管からの物質輸送を調節するBarrierの機能を持つことも形態学的<sup>33)34)</sup>に考えられているが、1週間後既にグリア細胞の増殖が始まつたとしても尚グリアによつて覆われる毛細血管部が少ないことが1週間後での<sup>32</sup>Pの移入増加と関連すると考えられる。然し術後2ヵ月の動物では手術側においても、<sup>32</sup>Pの腹腔内よりの組み込みは対照側と全く変化がなく、障害によつて反応性に引き起こされたグリア細胞が血液-脳関門の機能を十分に果していることを示したものと云える。

以上の結果はグリア細胞が血液-脳関門の役割を果していることを示したものと云えるが、更に又グリア細胞は神経細胞に供給する物質の貯蔵庫の機能<sup>23)</sup>を持つとか、或いはPinocytosis<sup>35)</sup>乃至はPhagocytosisの機能<sup>36)</sup>をも持つであろうことも報告されており、グリア細胞そのものに物質輸送機構が存在していることを示唆している。

摘出組織切片を用いた著者の成績によつてもそのことを十分に示している。即ち細胞構造を有する脳切片においてのみ、特異的にみられる $K^+$ 効果はグリア組織においても明らかに認め得た。又ブドウ糖存在下でmedium中に加えられたアミノ酸が脳切片内に能動的に蓄積されることは、やはり脳切片特有の現象として

知られているか<sup>22)</sup>、グリア組織切片においてもその現象は同様に認められ、能動輸送の阻害剤である Ouabain 添加で能動的蓄積は完全に抑えられたのである。

非代謝性の D-グルタミン酸を用いて輸送機構を更に詳細に検討を加えると、単に能動的に蓄積されるのみならず、時間的経過に従った取り込み量についても正常組織と全く同様で、1 時間に亘って直線的に取り込まれた。更に又 Inulin assumption による細胞内の電解質分布では対照側と同様にグルタミン酸の取り込みに伴った  $K^+$  の増加がみられ、正常組織と同様 K-Glutamate としての中性塩の形で取り込まれており、細胞内水分量、電解質量共に対照側と変らなかつた。このことはグリア細胞がアミノ酸に対する能動的輸送系を明らかに保持しているのみならず、更に神経細胞の消失に代つてグリア細胞が完全に置き代つた場合、グリア組織でもアミノ酸を取り込む細胞内容積が神経細胞を含む正常組織と全く変わらないことを示したものと云える。

以上の如く脳障害に反応し、得られたグリア組織を用い、グリア細胞の特徴をも検索したのであるが、本組織が正常脳組織中にあるグリア細胞と同一視し得るものか否かについては考慮しなければならないとしても、血液—脳関門に対する反応性から考えると、正常組織中のグリア組織と同様の機能を果しているものと考え得る。又以上の成績から考えるとグリア組織は脳組織の代謝、血液—脳関門並び物質輸送系の主役を荷うことをも示唆したものと考えられる。

然しながら刺激に対応した活動電位の変化<sup>37)</sup>、或いは機能の変化に対応した物質代謝の反応<sup>30)38)39)</sup>から考え、機能的にはグリア細胞が神経細胞を完全に代償し得るものとは考え難い。従つて脳障害の際に神経細胞の消失に代つてグリア細胞の増殖が起り、一見治癒の経過を示したとしても、神経細胞の消失に伴うその機能の欠損をグリア細胞によつて補ひ得るとは考え難いのであつて、脳障害に伴つた後遺症等の原因不明の諸問題を本組織を用い、神経細胞とグリア細胞の機能的特徴並びに相互の関連について追究することにより解明することも可能と考えられるのであり、更には脳機能の物質的基盤をも明確にし得るものとする。

## 結 語

白鼠脳半球前頭部を手術的に切載し、非手術側を対照として経時的に組織学的、生化学的变化を追究し、併せて術後 1 ヶ月以後の組織による呼吸と糖質代謝

及びアミノ酸の組織内への能動輸送について検討を加えた。

1) 組織学的検索では、切載部に一致して髄鞘の消失断裂が認められ、術後 10 日で反応性のグリア細胞増殖が始つており、1 ヶ月以後のものでは神経細胞の変性消失に代つてグリア細胞の密集像が認められた。

2) 前頭部切載後、5 日迄は脳組織内水分量、 $K^+$ 、 $Na^+$  量は増加するが、1 週間て対照側と変化がみられなくなり、術後 1 ヶ月以後は一定の値を維持した。

3) 手術後 2 ヶ月の組織で脂質磷の減少が認められた。

4) 核酸量については術後 2 ヶ月の組織で DNA 量の増加、RNA/DNA 比の減少を認めた。

5) 術後 2 ヶ月の脳組織遊離アミノ酸は稍対照に比し低く、特にアスパラギン酸、グリシン、アラニン値の低下は著しい。

6) 術後 1 週間の組織では、<sup>32</sup>P の血液—脳関門の透過性が対照側の約 4 倍に増大しているか、1 ヶ月のものでは対照側と変らなかつた。

7) 術後 2 ヶ月の脳組織切片による酸素消費、ブドウ糖消費、乳酸形成量は対照側とほぼ同様である。又  $K^+$ -効果は手術側組織においても認められた。

8) medium 中に加えられたアミノ酸は、術後 2 ヶ月の組織切片にも対照側と同様に能動的に取り込まれた。D-グルタミン酸では一時間に亘つて取り込み量は対照側と全く変化なく、Inulin space から算出すると細胞内に K-Glutamate の形として取り込まれていることが捉えられた。

稿を終るに当り、終始御懇篤なる御指導を頂き、且つ御校閲を賜つた恩師粟津三郎教授並びに第 II 生理学教室平野修助教授に深甚なる感謝の意を捧げます。また生化学的な研究について御協力を惜しまれなかつた第 II 生理学教室横井幸雄博士に深謝し、尚併せて日々御支援御鞭撻を頂いた第 II 外科教室柴田家門博士並びに第 II 外科及び第 II 生理学教室員の方々に對し厚く感謝の意を表わします。

## 文 献

- 1) Cajal, S. Ramon Y. : Degeneration and regeneration in the nervous system. 2 vols., transl. from Spanish ed. of 1913. Oxford Univ. Press. London : Humphrey Milford 1928.
- 2) Luse, S.L. : The ultrastructure of normal and reactive astrocytes. Lab. Invest., 1958, 7, 401.

- 3) Friede, R.L. : The cytochemistry of normal and reactive astrocytes, *J. Neuropath. and Exp. Neurol.*, **1962**, 21, 471.
- 4) Maxwell, D.S. and Kruger, L., Electron microscopy of normal and reactive astrocytes in rat cerebral cortex, *Anat. Rec.*, **1964**, 145, 310.
- 5) Katzman, R. : Electrolyte distribution in mammalian central nervous system, *Neurology*, **11**, 27, 1961.
- 6) Obrador S. and Pi-Suner J. : Experimental Swelling of the Brain, *Arch. Neurol. & Psychiatr.* **49** : 826, 1943.
- 7) Prades, M. et al. : Studies on cerebral edema. *Arch. Neurol. Psychiatr.* **54** : 163, 1945.
- 8) Eugen Stern, W. : Studies in experimental brain swelling and brain compression. *J. Neurosurg.* **16** : 676, 1959.
- 9) Ishii, S. et al. : Studies on cerebral swelling. *J. Neurosurg.* **16** : 152, 1959.
- 10) 荏原光夫 : 脳浮腫の生化学的研究, *日本外科宝函*, **33**, 2, 314, 1964.
- 11) 塚田裕三 : 脳組織の電解質測定法, *脳と神組*, **16**, 611, 1964.
- 12) Higashi, A. & Peters, L. : A rapid calorimetric method for the determination of inulin in plasma and urine. *J. Lab. Clin. med.*, **35**, 475, 1950.
- 13) Lowry, O.H. : The quantitative histochemistry of the brain, *J. Histochem. Cytochem.* **1**, 420, 1953.
- 14) 塚田裕三・永田 豊 : ペーパークロマトグラフによる脳組織遊離アミノ酸の分離定量法について, **33** : 51, 昭和36.
- 15) Hutchinson, W.C., Munro, H.N. : The Determination of Nucleic acids in Biological Materials, *Analyst.*, **86**, 768(1961).
- 16) Lowry, O.H., Roberts, N.H., Leiner, K.Y., Wu, M., Farr, A.L. : The Quantitative Histochemistry of Brain, *J. Biochem. Chem.* **207**, 1, 1954.
- 17) Dishe, Z. : In the Nucleic Acid (ed. chrgaff, E., Davidson, J.N.), **1**, p. 300, Academic Press (1955).
- 18) Burton, K. : A study of the Conditions and Mechanism of the Diphenylamine Reaction for the Colorimetric Estimation of Deoxyribonucleic Acid, *Biochemical J.* **62**, 315, 1956.
- 19) Sutherland, E.O., Cori, C.F., Hayness, R. and Olsen, N.S. : Purification of the hyperglycemic-glycogenolytic factor from insulin and from gastric mucosa, *J. Biol. Chem.*, **180**, 825, 1949.
- 20) Kochler, L.H. (1952) : Differentiation of carbohydrates by anthron reaction rate and color intensity. *Anal. Chem.* **24**, 1576.
- 21) Barker, S.B. and Summerson, H.W. (1941) : The colorimetric determination of lactic acid in biological material. *J. Biol. Chem.* **138**, 535.
- 22) 塚田裕三, 平野修助, 永田 豊, 松谷天星丸 : 動物組織に於けるγ-アミノ酪酸 (GABA) の代謝 : 主として脳切片での GABA の能動輸送について. *神経研究の進歩*, **4**, 487~496, (1960).
- 23) Wigglesworth, V.B. : The nutrition of the central nervous system in the cockroach *Periplaneta americana* L. The role of the perinertium and glial cells in the mobilization of reserves. *J. exp. Biol.* **37**, 500-512, (1960).
- 24) Pappenheimer, J.R. : Passage of molecules through capillary walls. *Physiol. Rev.* **33**, 387-423, (1953).
- 25) Tasaki, I. and J.J. Chang : Electric response of glia cells in cat brain. *Science* **128**, 1209-1210, (1958).
- 26) Koch, A., J.B. Rank jr. and B.L. Newman : Ionic content of neurologia. *Exp. Neurol.* **6**, 186-200, (1962).
- 27) Cumming, J.T., McIlwain, H. : Electrical Pulses and the Potassium and Other Ions of Isolated Cerebral Tissues, *Biochem. J.* **79**, 330, 1961.
- 28) Davison, A.N., Morgan, R.S., Wajda, M. and Payling, W.G. : Metabolism of Myelin lipids ; Incorporation of 3-<sup>14</sup>C serine in brain lipids of the developing rabbit and their Persistence in the central nervous system, *J. Neurochem.* **4**, 360, 1959.
- 29) Korey, S.R. and M. Orchen : Relative respiration of neuronal and glial cells. *J. Neurochem.* **3**, 277-285, (1959).

- 30) Hydén, H. and P.W. Lange : Differences in the metabolism of oligodendroglia and nerve cells in the vestibula area. In *Regional neurochemistry*, edit. S.S. Kety and J. Elkes, pp. 190-199. London. Pergamon Press 1961.
- 31) Friedmann, U. : Blood-brain barrier. *Physiol. Rev.* **22**, 125-245, (1942).
- 32) Bakay, L : Studies on the blood-brain barrier with radioactive Arch Neurol. Psychiat. Chicago, **66**, 419, 1951.
- 33) Gray, E.G. : Ultrastructure of synapses of the cerebral cortex and of certain specialization of neurological membranes. In *Electron Microscopy in Anatomy* ed. J.D. Boyd, F.R. Johnson and J.D. Lever Anatom. Soc. G.B. pp. 54-66, 1961.
- 34) Peters, A. : Plasma Membrane Contacts in the central nervous system. *J. Anat. London.* **96**, 237-248, (1962).
- 35) Klalzo, I. and J. Miquel : Observation on pinocytosis in nervous tissue. *J. Neuropas. exp. Neurol.* **19**, 475-487, (1960).
- 36) Gonatas, N.K., S. Levine, and R. Shoulson : Phagocytosis and regeneration of myelin in an experimental leukoencephulopathy. An electron microscopic study. *Amer. J. Path.* **44**, 565-584, (1964).
- 37) Orkand, R.K., J.G. Nicholls and S.W. Kuffler : The effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J. Neurophysiol.* **29**, July 1966.
- 38) Hydén, H. and P.W. Lange : A differentiation in RNA response in neurons early and late during learning. *Proc. nat. Acad. Sci (Wash)*, **53**, 946-952, (1965 a).
- 39) Hydén, H. and P.W. Lange : Phytic enzyme changes in neurons and glia during sleep. *Science* **149**, 654-656, (1965 b).