

脳内遊離脂肪酸及び膜リン脂質分子種の虚血中, 血流再開時の変化に関する実験的研究

京都大学医学部脳神経外科学教室 (指導: 菊池晴彦教授)

後 藤 泰 伸

〔原稿受付: 昭和62年10月30日〕

Experimental Studies on the Effects of Cerebral Ischemia and Recirculation with Respect to Free Fatty Acids and Membrane Phospholipid Molecular Species

YASUNOBU GOTO

Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Kyoto University
(Director: Prof. Dr. HARUHIKO KIKUCHI)

Previous investigators have shown that free fatty acids which accumulated during ischemia are one of indicators of the evolution in ischemic brain damage. This study has sought to delineate the temporal relation after cerebral ischemia and postischemic recirculation between free fatty acid accumulation and degradation of phospholipid molecular species.

During ischemia, the cerebral phospholipid molecular species in diacyl phosphatidylcholine (PC) decreased gradually. By contrast, diacyl phosphatidylethanolamine (PE) decreased abruptly after 5 minutes of ischemia. Both diacyl PC and PE showed greater decrease in polyenoic molecular species (especially 16:0-22:6 and 18:0-22:6) than saturated, monoenoic molecular species.

Total free fatty acid accumulation was observed according to the time elapsed. Free arachidonic acid and docosahexaenoic acid showed more rapid accumulation than the other fatty acids. At 60 minutes of ischemia, every kind of fatty acid accumulated nonspecifically.

In recirculation period, the decrease in phospholipid molecular species content and the increase in free fatty acid have continued as long as 30 minutes. Thereafter, free fatty acid decreased to control values. Reacylation of PC and PE molecular species has not been observed during 120 minutes recirculation period.

We have drawn conclusion from this experiment that 1) cerebral ischemia caused differential degradation in each phospholipid classes and preferential hydrolysis in polyenoic molecular

Key words: Cerebral ischemia, Recirculation, Free fatty acid, Phospholipid molecular species.

索引語: 脳虚血, 血流再開, 遊離脂肪酸, リン脂質分子種.

Present address: Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan.

species in individual phospholipid class; 2) cerebral recirculation failed to attain reacylation of fatty acid into phospholipid, although the accumulated fatty acid nonpreferentially decreased to control values.

緒 言

脳動脈の閉塞によってひきおこされる脳梗塞は成人病の中でも大きな死因を占めているがその病態生理については明らかではない。脳組織は虚血にはある程度の耐性を示すが³⁾、その活発な代謝の故に、他の組織に比べて循環血液に対する依存度は高く、比較的短時間の虚血により非可逆的な細胞損傷を起こし、これは更に脳組織レベルでの acidosis、脳浮腫の発生をきたして、全体としての機能障害が進展してゆくと言われている⁴⁾。脳組織が虚血によって非可逆的損傷を生じるのは実験的には虚血発生後6-8時間とされており⁵⁾、この間に細胞レベルでは膜イオンポンプの破綻やATP等の高エネルギーリン酸化合物の枯渇が進行する。しかし、これらの現象自体は、必ずしも細胞レベルでの非可逆的損傷を表わすものとは言えず、どのような現象を以て非可逆的損傷と言えるかという点は未だ明らかではない。細胞の恒常性と言う観点からは、細胞膜をはじめとする生体膜構造の維持が最も基本的な役割を担っている事は明らかで、これは、細胞内環境の境界をなし多くの代謝の場ともなっている。又、膜の構成成分自体も動的な代謝を行いつつ、一定の恒常性を保っている。従って、細胞レベルでの非可逆的变化を考える上で、膜の構成成分の変化を検討する事は非常に重要であると考えられる。

臨床的には虚血発症後ごく早期に血流再開を行っても重篤な浮腫や出血性梗塞を起こし、かえって逆効果になる症例も見られる事から^{50,51)}、脳梗塞急性期にこのような治療法は確立されていないのが現状である。

脳組織には他の臓器に比して多量のリン脂質が生体膜を構成する脂質として含まれ、これらの代謝回転は上述の如く、膜の恒常性や可塑性を保つうえで必要不可欠である。脳虚血^{5,6,7,12,16,19,20,37,49,52)} 低酸素負荷¹⁷⁾、低血糖⁴⁷⁾ 及び痙攣⁵⁾ などにより膜リン脂質から脂肪酸が遊離蓄積し、これらは脳細胞障害の指標として重要であることが言われている⁴¹⁾。遊離脂肪酸はミトコンドリアの酸化的リン酸化を阻害し機能低下を引き起こす^{29,48)} 他にシナプスにおける伝達を妨げる³⁸⁾ 事も報告されている。アラキドン酸は脳に多く存在し⁴⁰⁾ 膜

より切り出された後、それ自体が脳浮腫を発生させる⁹⁾ と共に酵素的に代謝を受けて種々の Prostaglandins (PGs) や、Leukotrienes (LTs) の前駆体となり²⁷⁾、これらアラキドン酸代謝産物は、それぞれの生理活性によって更に虚血による変化を修飾してゆくと考えられている。

膜リン脂質からの脂肪酸の切り出し機構については幾つかの経路が想定されている³¹⁾。その主なものは phospholipase A₂ を介するものとイノシトールリン脂質から phospholipase C を介する経路であるがこれらが脳虚血のいかなる時期にどの程度関与しているのかについても明らかとは言えない。

そこで本研究では脳虚血時の各種の膜構成成分の変化を知る目的で、実験的脳虚血及び血流再開モデルを用いて遊離脂肪酸及び、その供与体である主な膜リン脂質 (diacyl 型 phosphatidylcholine [PC], phosphatidylethanolamine [PE]) の変化を分子種組成別に定量し、脳虚血後の膜崩壊過程の一端を明らかにする事を試みた。

方 法

(A) 実験動物

体重 350-450 g の Wistar 系雄性ラット (月齢 8-12ヶ月) に pentobarbital (60 mg/Kg) を腹腔内麻酔してまず仰臥位で実験用手術台に固定した。大腿動静脈に各々 cannulation を行い、実験中の血圧や血中酸素分圧、二酸化炭素分圧、pH の monitor が出来るようにした。

つぎに気管切開を行い d-tubocurarine (0.5 mg/Kg) を静注したのち、小動物用人工呼吸器で調節呼吸とした。

頸部正中線に小皮切を行い両側総頸動脈を迷走神経、頸静脈より剥離露出し、血行遮断装置を装着した後、動物を腹臥位にかえた。後頸部皮膚を正中で切開し第一頸椎の alar foramina を露出した。

対照動物は同様の操作を加えたが血行遮断をしないものを用いた。

(B) 虚血の作成

Pulsinelli らのモデル³⁶⁾ に準じて両側の椎骨動脈を

alar foramina に刺入した針電極によって電氣的に凝固遮断したのち、1分以内に両総頸動脈の血流遮断装置を閉鎖して虚血を作成した。血流再開を行った群では一定の時間を経過した後血流遮断装置を開放した。

(C) 脳血流の測定

脳血流を測定した群では2本の水素クリアランス用電極を両側頭頂葉皮質に、1本を小脳皮質に顕微鏡下に刺入して、デンタルセメントとアロンアルファで頭蓋骨に固定した。約10%濃度の水素ガス混合気を3-5分、人工呼吸器から吸わせ、皮質の rCBF を initial slope index で算出した^{14,34}。

(D) 脳材料の採取

頭頂部頭蓋骨に紙製の漏斗をアロンアルファで固定して一定時間後に人工呼吸を行いなから液化窒素を滴下して脳を in situ freezing³⁵ により凍結した。その後、頭部を2-3スライスにバンドソーで切断し -30°C

のクライオスタット内で脳のみを取り出し重さを測った後、分析まで -80°C で保存した。

(E) 遊離脂肪酸の分析

一定量の pentadecanoic acid (15:0) を内部標準として加えた後、脳を氷冷した5%トリクロル酢酸 (TCA) 7 ml 中で polytron homogenizer により30秒間磨砕し、chloroform/methanol (1:2, v/v) 30 ml, 37°C, 3回 Kates らの方法²⁴ に準じて抽出した。これらに各 30 ml の chloroform, 0.01N HCl を加えて遠沈し chloroform 層を分取した。Sep-pak (silica cartridge) を用い中性脂質は chloroform 層と 20 ml, chloroform でリン脂質は 20 ml, methanol で各々分離した。中性脂質は thin layer chromatography (hexane/ethyl ether/acetic acid, 50:50:1, v/v/v) に spot して展開し、脂肪酸を同定したのち掻きとった。Morrison and Smith の方法³² に準じて BF₃/MeOH

Quantitative Analysis of Phospholipid Molecular Species and Free Fatty Acids

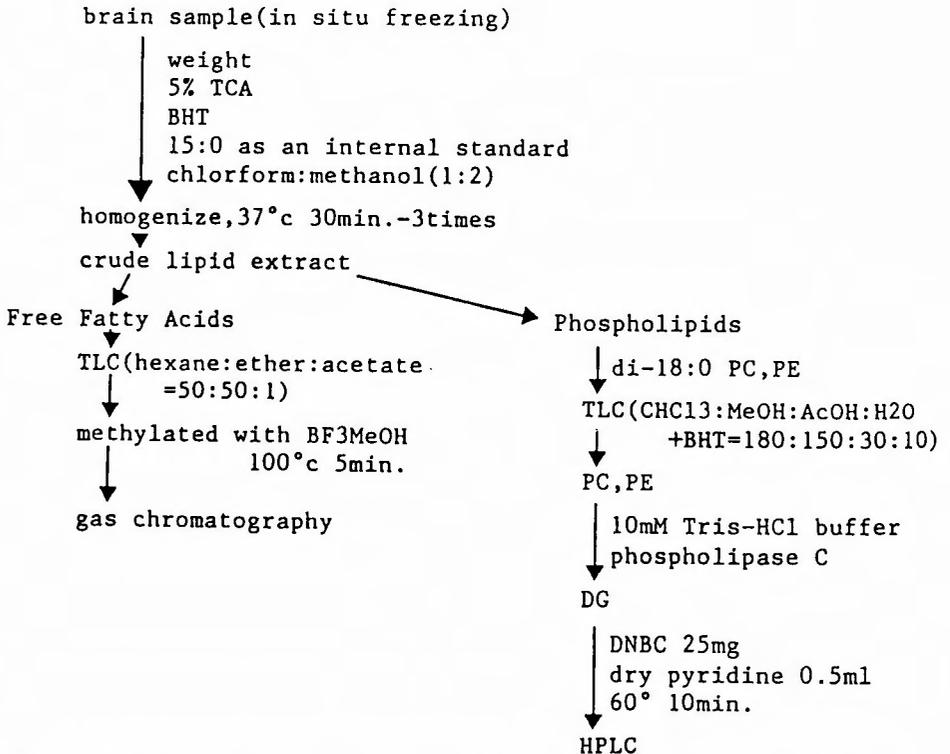


Figure 1. Schematic representation of the procedures to analyse the FFA and phospholipid molecular species (diacyl PC and PE).

Table 1. physiological variables before and after ischemia

	Controls	Ischemia				
		5 min.	10 min.	15 min.	30 min.	60 min.
Systemic arterial pressure (mmHg)	100.0±5.0	106.0±9.5	102.0±10.5	98.0±8.5	90.8±8.2	95.0±9.5
Blood gas analysis						
pH	7.4±0.1	7.2±0.2	7.2±0.3	7.3±0.2	7.3±0.2	7.3±0.2
PaCO ₂ (mmHg)	30.6±6.7	35.8±10.1	37.9±9.9	41.1±10.6	42.8±9.0	43.1±10.5
PaO ₂ (mmHg)	138.9±17.3	136.5±15.4	139.4±19.1	140.6±17.0	142.4±19.9	145.6±18.6

Values are mean±SEM. n=5

を加えて methyl 化し gas chromatography で定量した。Gas chromatography は Shimadzu GC-9A, 10% Silar 10C, 100-120 mesh chromosorb W, N₂ 流量は 40 ml min, 160-240°C の条件を用いた。

各脂肪酸は同一条件で測定した標準物質の相対保持時間から同定し、内部標準物質 (15:0) との面積比によって定量した。

(F) リン脂質分子種分析

分離したリン脂質は少量し再度 chloroform に溶解した。2 mg のリン脂質に対して抗酸化剤として 10 µg の butylated hydroxytoluene (BHT) を加えた後、内部標準として distearoylphosphatidylcholine (18:0-18:0 PC), distearoylphosphatidylethanolamine (18:0-18:0 PE) を加えた。これを TLC (chloroform/methanol/acetic acid/water, 180:150:30:10, v/v/v) に spot して展開し、PC, PE を同定して掻きとった。chloroform/methanol (2:1, v/v) で 3 回抽出した後、濃縮乾固し、鬼頭らの方法^{23,45)} に準じて diacyl 型 PC, PE の分子種を定量した。1.25 ml 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5 30 mM H₃BO₃ を含む) に溶解し約 1 分間 sonication, phospholipase C と水飽和 ethyl ether 2.0 ml を加え Diacylglycerol 化したもの

を 3 回抽出し乾固, Dinitrobenzoylchloride (DNBC) 25 mg と共に 30 分間, desiccator で乾燥させた。これらに dry pyridine 0.5 ml を加え, 60°C, 10 分間反応させて DNBC-DG 複合体を得た。これらを n-hexane で 3 回抽出し pyridine を除いた後 acetonitrile に溶解して HPLC にて定量した。

HPLC (high performance liquid chromatography) は Hitachi model 655-15 を用い、分離された分子種は 254 nm で測定した。column は An ultrasphere ODS column, acetonitrile/2-propanol (80:20, v/v) を溶媒として用い、flow rate は 1.0 ml min, 温度は 25°C とした。内部標準との面積比から各分子種の定量を行った。分析法の概略は Figure 1 に示す

(G) 統計検定

得られた結果は分散分析 (ANOVA) により検定し、p < 0.05 を示したものを統計的に有意とした。

実験 1 虚血に伴う脳遊離脂肪酸とリン脂質分子種の変化

方法 脳虚血後 5, 10, 15, 30, 60 分の時間経過で試量を得、sham operation (0 分) との比較を行った。

Table 2. rCBF before and after ischemia (one-staged 4 vessel occlusion)

	Controls	Ischemia		
		5 min.	30 min.	60 min.
left parietal cortex	48.6±5.3	—	—	—
right	43.2±3.9	—	—	—
cerebellum	28.3±1.7	—	—	—

Values are mean±SEM (ml/100 g.min)

rCBF is measured by hydrogen clearance method

: rCBF cannot be calculated by hydrogen clearance method

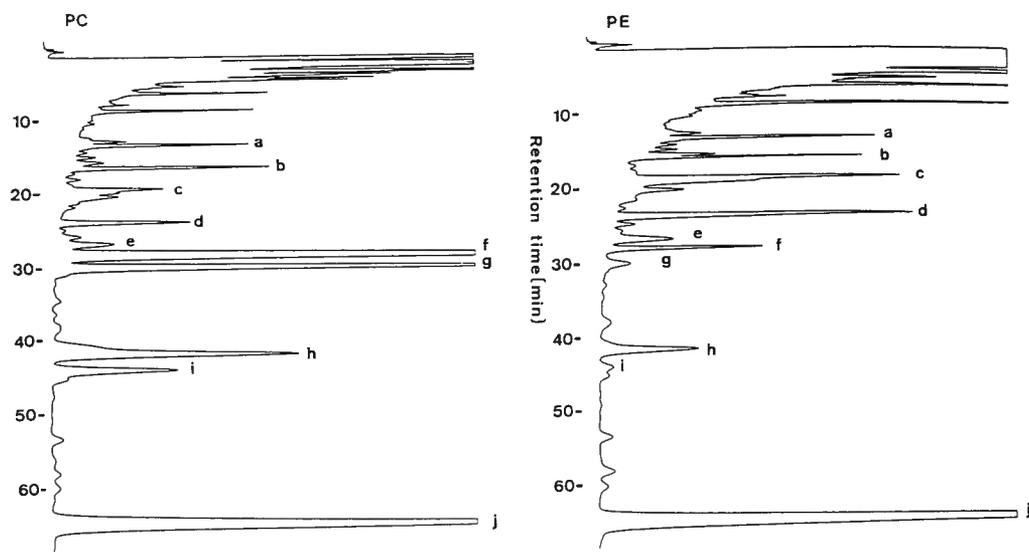


Figure 2. Separation of major molecular species of diacyl PC and PE by HPLC.
 a, 16:0-22:6; b, 16:0-20:4; c, 18:0-22:6; d, 18:0-20:4; e, 18:1-18:1;
 f, 16:0-18:1; g, 16:0-16:0; h, 18:0-18:1; i, 18:0-16:0; j, 18:0-18:0
 (as an internal standard)

結果

(A) 生理的変動

虚血前後の各パラメーターを Table 1 に示す。虚血によって体血圧、血中 pH は変化を認めなかったが、 PaCO_2 , PaO_2 は虚血時間を追って、若干の蓄積傾向を

示した、しかし統計的には有意差を認めなかった。

(B) 脳血流

虚血に伴って脳血流は著明に減少し水素クリアランス法によって測定することが不能となった。すなわち CBF は $10 \text{ ml}/100 \text{ g}\cdot\text{min}$ 以下に低下したものと考え

Table 3. Relative composition of diacyl molecular species of PC and PE in control rat brain

	Phosphatidylcholine (PC)	Phosphatidylethanolamine (PE)
16:0-22:6	$4.38 \pm 0.67\%$	$9.94 \pm 0.58\%$
16:0-20:4	5.68 ± 1.01	3.53 ± 0.19
18:0-22:6	3.82 ± 0.48	31.32 ± 2.74
18:0-20:4	4.81 ± 0.46	22.17 ± 1.04
18:1-18:1	3.01 ± 0.22	6.70 ± 1.01
16:0-18:1	39.35 ± 1.20	6.54 ± 1.31
16:0-16:0	16.59 ± 1.84	4.55 ± 0.30
18:0-18:1	16.44 ± 0.57	12.95 ± 1.31
18:0-16:0	5.92 ± 0.68	2.31 ± 1.12
polyenoic MS	18.78 ± 1.97	66.96 ± 2.78
saturated and monoenoic MS	81.31 ± 1.92	33.03 ± 2.78

polyenoic MS = (16:0-22:6) + (16:0-20:4) + (18:0-22:6) + (18:0-20:4)

saturated and monoenoic MS = (18:1-18:1) + (16:0-18:1) + (16:0-16:0) + (18:0-18:1) + (18:0-16:0)

Values are mean \pm S.D. n=5 in each group

られた (Table 2).

(C) リン脂質分子種の分離

コントロールラットにおいて、diacyl 型 PC は41.9 ±3.5%, diacyl 型 PE は30.2 ±3.1%を占め、各々は Figure 2 に示した如く良好に分離された。

主に9分子種が検出されたが、高度不飽和分子種はこれらのうち palmitoyl-docosahexaenoyl (16:0-22:6), palmitoyl-arachidonoyl (16:0-20:4), stearoyl-docosahexaenoyl (18:0-22:6), stearoyl-arachidonoyl (18:0-20:4) の4分子種であり、飽和、モノ不飽和分子種は oleoyl-oleoyl (18:1-18:1), palmitoyl-oleoyl (16:0-18:1), palmitoyl-palmitoyl (16:0-16:0), stearoyl-oleoyl (18:0-18:1), stearoyl-palmitoyl (18:0-16:0) の5種であった。

Diacyl 型 PC では飽和、モノ不飽和分子種が81.3%を占めていたのに対して、diacyl 型 PE では高度不飽和分子種が67.0%と分子種組成に大きな差が見られた (Table 3).

(D) 虚血に伴うリン脂質分子種の変化

Figure 3 に diacyl 型 PC, PE (主要9分子種の総和) の変化を示す。PC は60分迄の時間経過で徐々に減少を示すが総量の上では有意差を認めない、しかし、高度不飽和分子種、特に16:0-22:6は5分以後、18:0-22:6は虚血10分以後で有意の減少を認めた。60分で diacyl 型の高度不飽和分子種は42%の減少を示し、一方飽和、モノ不飽和分子種は32%の減少を認めた (Table 4, 5).

PE は虚血5分で有意に急激な減少を示し、その後

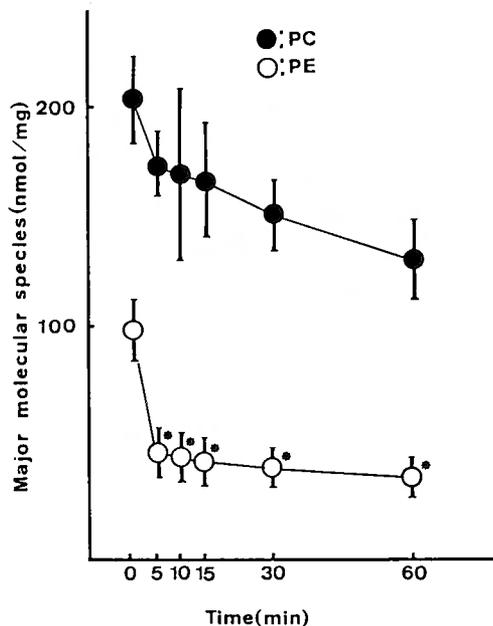


Figure 3. Changes in sum of major molecular species of diacyl PC and PE during various periods of ischemia. Values are mean ± SEM. n=5 in each group. *: p<0.05 as compared with corresponding control.

は緩やかに減り続けた。60分で高度不飽和分子種は66%, 飽和、モノ不飽和分子種は54%の減少を認めた (Table 6, 7).

PC, PE 間では減少する割合、及び時間経過は異な

Table 4. Diacyl molecular species of PC in rat brain during various periods of ischemia

Molecular species	Controls#	Ischemia#				
		5 min.	10 min.	15 min.	30 min.	60 min.
16:0-22:6	8.46 ± 0.70	6.06 ± 0.61*	5.72 ± 1.15*	5.44 ± 1.12*	4.88 ± 0.25*	4.67 ± 1.02*
16:0-20:4	10.99 ± 1.06	9.03 ± 0.91	7.82 ± 1.94	7.57 ± 1.05	7.57 ± 1.22	6.83 ± 1.06
18:0-22:6	7.44 ± 0.65	5.86 ± 0.57	4.75 ± 0.86*	4.57 ± 0.72*	4.51 ± 0.84*	3.84 ± 0.82*
18:0-20:4	9.37 ± 0.80	7.02 ± 0.42	7.00 ± 1.68	6.80 ± 0.85*	5.97 ± 0.33*	5.77 ± 0.91*
18:1-18:1	5.99 ± 0.71	4.64 ± 0.53	4.59 ± 1.00	4.58 ± 1.00	4.43 ± 0.41	4.42 ± 0.52
16:0-18:1	77.89 ± 8.60	68.36 ± 4.72	68.10 ± 13.78	66.07 ± 8.46	57.83 ± 3.48	52.41 ± 6.54
16:0-16:0	33.03 ± 4.31	32.81 ± 2.28	32.61 ± 6.02	32.41 ± 3.79	31.71 ± 7.30	24.97 ± 2.89
18:0-18:1	32.53 ± 3.50	28.25 ± 2.45	27.75 ± 5.15	27.36 ± 4.25	24.44 ± 1.81	22.09 ± 2.60
18:0-16:0	14.77 ± 1.50	13.59 ± 2.15	13.00 ± 2.51	12.67 ± 2.38	10.62 ± 1.65	8.22 ± 0.79
total	200.47 ± 20.53	175.62 ± 12.98	172.34 ± 32.54	167.47 ± 22.91	151.96 ± 12.32	133.22 ± 16.40

Values represent the mean ± SEM nmol/mg phospholipid #: n=5 in each group

*: p<0.05, compared with the control values

Table 5. Polyenoic and saturated, monoenoic molecular species of diacyl PC in rat brain during various periods of ischemia

	Controls‡	Ischemia‡				
		5 min.	10 min.	15 min.	30 min.	60 min.
polyenoic MS	36.26±2.77 (100)	27.97±1.54 (77.1)	25.29±5.49* (69.7)	24.38±3.70* (67.2)	22.93±0.96* (63.1)	21.11±3.57* (58.1)
saturated, and monoenoic MS	164.21±18.05 (100)	147.65±11.75 (90.0)	146.05±28.27 (89.0)	143.09±19.37 (87.1)	129.03±11.65 (78.6)	112.11±13.06 (68.3)
total	200.47±20.53	175.62±12.98	171.34±32.54	167.47±22.91	151.96±12.32	133.22±16.40

Values represent the mean±SEM nmol/mg phospholipid. ‡: n=5 in each group

*: p<0.05, compared with the control values

numerals in parenthesis are percentage to control.

polyenoic MS=(16:0-22:6)+(16:0-20:4)+(18:0-22:6)+(18:0-20:4)

saturated and monoenoic MS=(18:1-18:1)+(16:0-18:1)+(16:0-16:0)+(18:0-18:1)+(18:0-16:0)

Table 6. Diacyl molecular species of PE in rat brain during various periods of ischemia

Molecular species	Controls‡	Ischemia‡				
		5 min.	10 min.	15 min.	30 min.	60 min.
16:0-22:6	10.41±1.04	4.56±1.04*	4.51±1.38*	4.13±0.71*	3.98±0.39*	3.54±0.41*
16:0-20:4	3.70±0.35	1.58±0.18*	1.50±0.17*	1.49±0.18*	1.40±0.11*	1.38±0.38*
18:0-22:6	32.77±3.36	13.02±1.78*	12.88±2.54*	12.88±1.31*	12.01±0.67*	10.51±1.97*
18:0-20:4	23.26±2.40	10.11±1.59*	9.59±1.64*	9.59±1.44*	9.49±0.84*	8.44±1.01*
18:1-18:1	6.99±0.79	3.63±0.70*	3.56±0.59*	3.56±0.41*	3.52±0.76*	3.46±1.04*
16:0-18:1	6.73±0.72	4.29±0.76*	4.27±0.89*	4.13±0.29*	3.86±0.35*	3.50±1.00*
16:0-16:0	4.76±0.47	2.55±0.38*	2.55±0.53*	1.89±0.21*	1.87±0.26*	1.67±0.24*
18:0-18:1	13.48±1.23	6.97±1.30*	6.72±0.95*	6.64±0.79*	6.30±0.58*	6.19±1.82*
18:0-16:0	2.38±0.59	2.32±0.85	2.20±0.59	1.76±0.30	1.66±0.36	0.78±0.13
total	104.48±9.18	49.03±8.42*	47.78±7.24*	46.07±5.07*	44.09±3.09*	39.47±6.14*

Values represent the mean±SEM nmol/mg phospholipid ‡: n=5 in each group

*: p<0.05, compared with the control values

Table 7. Polyenoic and saturated, monoenoic molecular species of diacyl PE in rat brain during various periods of ischemia

	Controls‡	Ischemia‡				
		5 min.	10 min.	15 min.	30 min.	60 min.
polyenoic MS	70.14±6.86 (100)	29.27±4.75* (41.8)	28.48±5.60* (40.5)	28.09±3.40* (40.1)	26.98±1.64* (38.5)	23.87±2.99* (34.1)
saturated, and monoenoic MS	34.34±2.86 (100)	19.76±3.68* (57.7)	19.30±2.51* (56.3)	17.98±1.81* (52.5)	17.21±1.83* (50.1)	15.60±4.10* (45.5)
total	104.48±9.18	49.03±8.42*	47.78±7.24*	46.07±5.07*	44.09±3.09*	39.47±6.14*

Values represent the mean±SEM nmol/mg phospholipid. ‡: n=5 in each group

*: p<0.05, compared with the control values

numerals in parenthesis are percentage to control

polyenoic MS=(16:0-22:6)+(16:0-20:4)+(18:0-22:6)+(18:0-20:4)

saturated and monoenoic MS=(18:1-18:1)+(16:0-18:1)+(16:0-16:0)+(18:0-18:1)+(18:0-16:0)

るが高度不飽和分子種は他の飽和，モノ不飽和分子種よりも，より虚血早期に崩壊を受け易く，又経過中を通して高い崩壊率を示した。

(E) 遊離脂肪酸の変化

ラット脳より得られる遊離脂肪酸は palmitic acid (16:0), stearic acid (18:0), oleic acid (18:1), arachidonic acid (20:4), docosahexaenoic acid (22:6) の5脂肪酸が大半を占めており，これらの和を総量として計算した (Figure 4)。

Figure 5 に遊離脂肪酸総量の虚血による変化を示す。虚血10分以後で有意の増加を示し，その後も時間が経過するに従って増加蓄積が見られた。虚血60分では虚血前値の約2.4倍にまで達した。個々の脂肪酸の増加の経過を Figure 6, Table 8 に示す。コントロールラットにおいては18:1, 18:0, 16:0が高度不飽和脂肪酸 (20:4, 22:6) に対して多く見られたが，虚血によって早期 (10分) から有意の変化を認めたのは20:4, 22:6であった。虚血後の真の増加量は，5分では20:4, 18:0が多く，30分を過ぎると，16:0, 18:0, 18:1が20:4, 22:6の増加量を上回った。蓄積の時間経過は20:4, 22:6と16:0, 18:0, 18:1で異なり，後者は30分以後で，急激な増加を認めた。

小 括

脳虚血に伴って生じる膜リン脂質を供与体とした脂肪酸の蓄積は本モデルにおいては虚血時間と共に進行

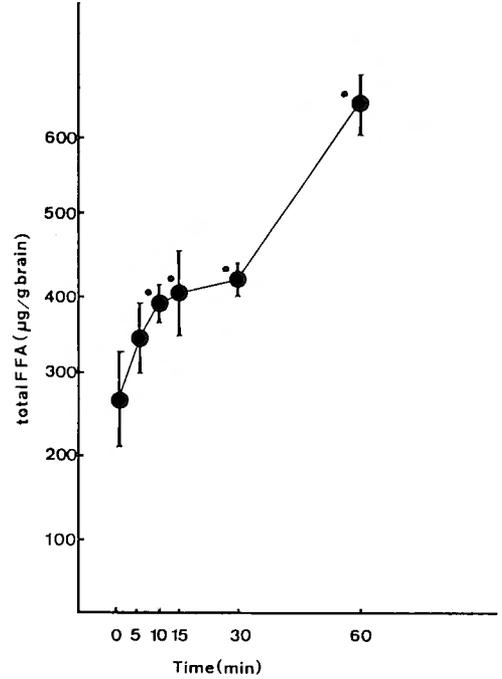


Figure 5. Total free fatty acid levels during various periods of ischemia. Values are mean \pm SEM. $n=5$ in each group. *: $p < 0.05$ as compared with corresponding control.

し10分以後から有意の増加を認めた。

早期に蓄積する脂肪酸は高度不飽和脂肪酸が多くを

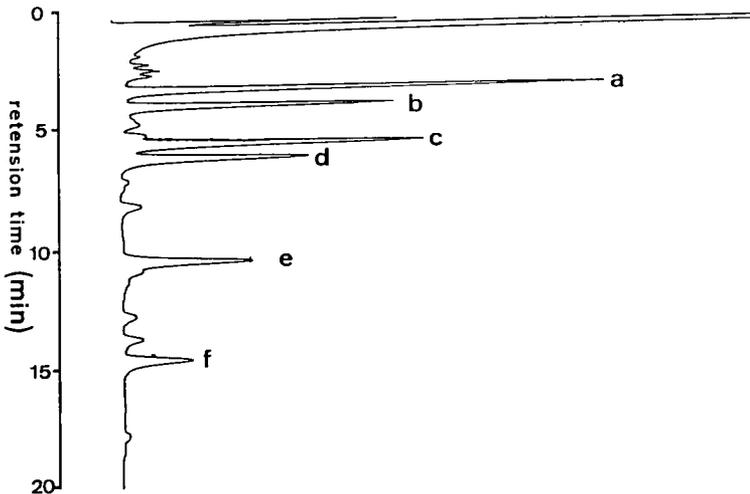


Figure 4. Separation of free fatty acid by gas chromatography (GC). a, 15:0 (as an internal standard); b, 16:0; c, 18:0; d, 18:1; e, 20:4; f, 22:6.

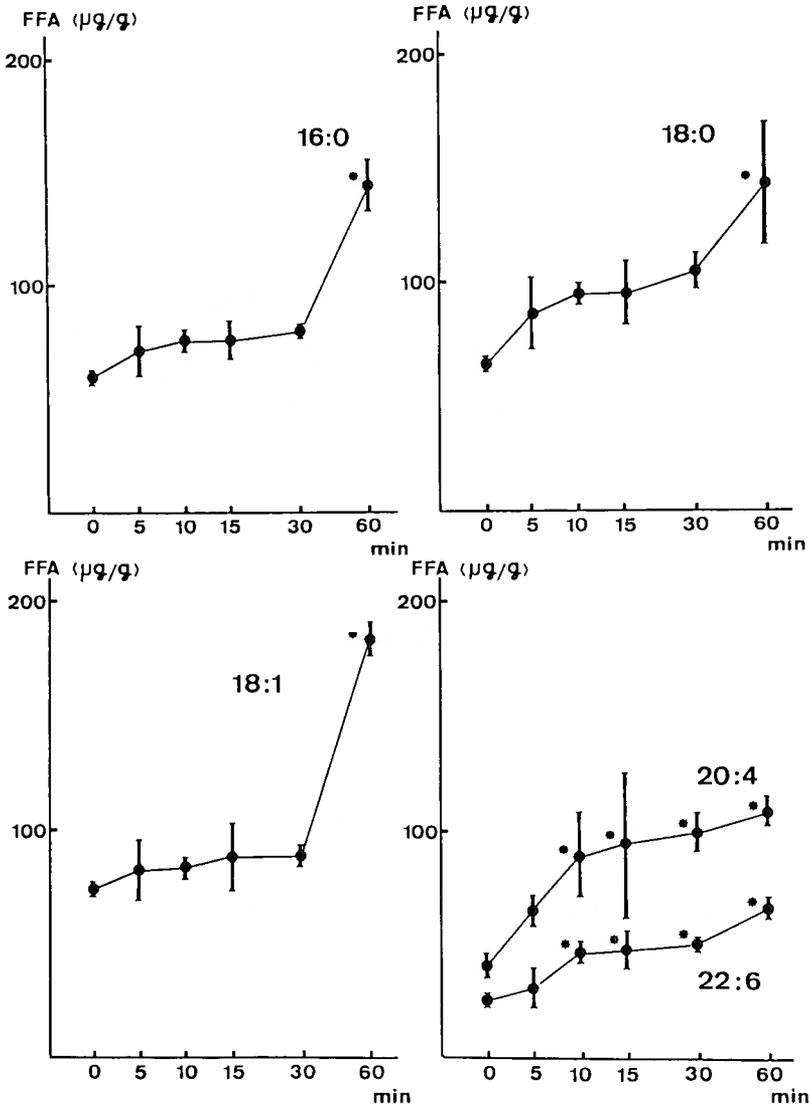


Figure 6. Individual fatty acid levels after ischemia. Values are mean \pm SEM. $n=5$ in each group. *: $p < 0.05$ as compared with corresponding control.

占めるのに対して、30分を過ぎると全ての脂肪酸の非特異的な蓄積が見られた。

膜リン脂質においては diacyl 型の PC, PE 間で崩壊の経過は異なると共に、高度不飽和分子種は早期から又時間経過を通じて分解を受けやすい事が示された。

実験 2 虚血急性期血流再開の遊離脂肪酸，リン脂質分子種に及ぼす効果

方法 虚血30分後に血流再開を行いその後30, 60,

120分後に試量を得た。

結果

(A) 生理的変動

Table 9 に血流再開後の各種パラメーターを示す。虚血中にやや低下傾向を示した体血圧は血流再開によって、コントロール値を上回り上昇傾向を示した。血液ガスも変動が見られたが有意差を示す程ではなかった。

Table 8. Free fatty acid levels in rat brain during various periods of ischemia

FFA	Controls [#]	Ischemia [#]				
		5 min.	10 min.	15 min.	30 min.	60 min.
16:0	59.66±3.18	70.94±10.24	74.53±5.63	74.52±8.18	78.15±0.46	143.29±12.24*
18:0	65.02±2.74	86.08±15.72	94.63±3.19	94.53±14.58	104.10±9.19	142.62±27.49*
18:1	73.91±3.51	81.92±13.76	83.48±5.71	87.91±14.84	88.38±4.56	183.55±7.47*
20:4	40.72±6.19	64.40±7.53	89.08±18.98*	95.17±32.61*	99.76±9.68*	108.61±8.37*
22:6	26.46±0.91	31.00±9.82	47.69±3.83*	48.35±10.42*	50.10±0.73*	66.05±4.74*
total	265.77±15.22	334.34±42.44	389.41±24.99*	400.48±62.46*	420.49±21.88*	644.12±37.65*

Values represent the mean±SEM $\mu\text{g/g}$ brain. [#]: n=5 in each group

*: p<0.05, compared with the control values

Table 9. Physiological variables during ischemia and postischemic reperfusion

	Controls	Ischemia 30 min.	Reperfusion		
			30 min.	60 min.	120 min.
systemic arterial pressure (mmHg)	100±5	90±8.2	110.4±10.5	116.2±20.6	120±21.8
blood gas analysis					
pH	7.4±0.1	7.3±0.2	7.3±0.4	7.2±0.6	7.2±0.6
PaCO ₂ (mmHg)	30.6±0.7	42.8±9.0	42.5±10.8	43.3±11.1	43.0±9.2
PaO ₂ (mmHg)	138.9±17.3	142.4±19.9	136.5±23.0	133.3±20.1	130.5±25.4

Values represent the mean±SEM,

Table 10. Regional CBF values during ischemia and postischemic reperfusion

	Controls	Ischemia	Reperfusion			
			5 min.	30 min.	60 min.	120 min.
left parietal cortex	34.8±4.5	—	75.2±9.9*	34.0±12.2	28.6±18.0	15.9±10.1*
right	48.1±9.0	—	60.8±13.2	34.5±15.1	22.9±7.8	29.6±11.3
cerebellum	31.0±2.8	—	55.7±5.6*	30.2±5.4	12.9±1.6*	12.6±3.5*

Values represent the mean±SEM (ml/100g.min) n=8 in each group

(—): unmeasurably low clearance

*: p<0.05, compared with the control values

(B) 脳血流量

Table 10 に血流再開後の脳血流量を示す。血流再開後5分で rCBF は全ての測定部位において虚血前の値を上回り126%から217%の増加を示した。その後は次第に減少をし、30分以後では虚血前値を下回り、それ以後も低下傾向を示した。これらは血流再開による initial (reactive) hyperemia とそれに引き続く post-ischemic delayed hypoperfusion に相応する変化と考えられた。

(C) 血流再開に伴うリン脂質分子種の変化

リン脂質分子種総量の変化を Figure 7 にまとめて示した。Diacyl 型 PC では血流再開後も引き続いて

分子種総量は減少を続け60分後に最も低い値を示した (p<0.05)。その後はやや増量を示したが統計的な有意差は認められなかった (Table 11)。Diacyl 型 PE でも血流再開後30分、60分と更に減少を続け、その後は変化を認めなかった (Table 12)。

(D) 遊離脂肪酸の血流再開による変化

血流再開によっても遊離脂肪酸は30分間更に蓄積を続け、その後の30分 (血流再開60分) で急に減少し、虚血前値近くに戻り、その後は平衡状態を保った (Figure 8, Table 13)。個々の脂肪酸は、総量の変化とほぼ同様に増減を示したが (Figure 9)、20:4、22:6はいち早く減少し対照値とほぼ同じレベルに戻ったのに

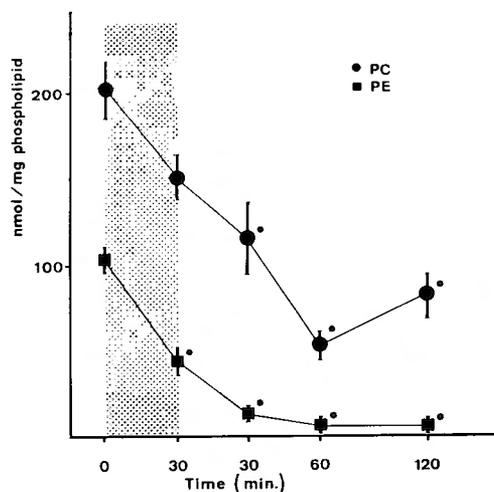


Figure 7. Changes in sum of major molecular species of diacyl PC and PE during postischemic recirculation periods after 30 minutes of ischemia. Values are mean \pm SEM. n=5 in each group. *: p<0.05 as compared with corresponding control. Hatched area shows period of ischemia (30 minutes).

対し、その他の脂肪酸は60-120分迄の間でも完全には対照値に戻らず、むしろ、若干の増加傾向を示した。

小 括

虚血30分での血流再開によって、30分間は遊離脂肪

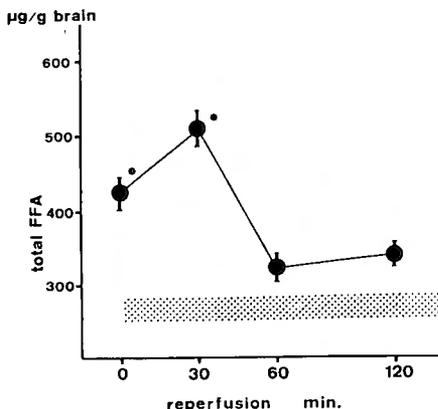


Figure 8. Total free fatty acid levels during post-ischemic recirculation periods after 30 minutes of ischemia. Values are mean \pm SEM. n=5 in each group. *: p<0.05 as compared with corresponding control. Hatched area shows preischemic control values (mean \pm SEM).

酸の蓄積は虚血中に引き続いて持続し脳血流の上での変化とは対応が見られなかった。その後の脂肪酸の減少は急激で、対照値近くに戻ったが、diacyl型分子種は有意な増加を認めず、これらの変化の時間経過には隔たりが見られた。

考 察

(A) 実験に用いた脳虚血モデル

Table 11. Diacyl molecular species of PC in rat brain during reperfusion

MS	reperfusion		
	30 min.	60 min.	120 min.
16:0-22:6	5.54+1.25 ^a	1.53+0.19 ^a	2.37+0.51 ^a
16:0-20:4	5.10+0.88 ^a	2.03+0.28 ^a	3.24+0.69 ^a
18:0-22:6	4.24+0.92 ^a	1.12+0.18 ^a	2.11+0.51 ^a
18:0-20:4	4.26+0.96 ^a	1.69+0.20 ^a	2.60+0.54 ^a
polyenoic	19.13+3.34 ^a	6.38+0.84 ^a	10.32+2.18 ^a
18:1-18:1	6.50+1.74	1.78+0.16 ^a	2.15+0.33 ^a
16:0-18:1	42.54+9.06 ^a	21.03+1.55 ^a	32.09+5.35 ^a
16:0-16:0	21.82+4.53 ^a	11.20+0.70 ^a	18.58+3.16 ^a
18:0-18:1	17.86+3.71 ^a	8.64+0.53 ^a	12.60+1.96 ^a
18:0-16:0	8.20+1.21 ^a	4.03+0.16 ^a	5.94+0.94 ^a
saturated, monoenoic	96.92+18.23 ^a	46.69+2.99 ^a	71.37+11.66 ^a
total	116.05+21.18 ^a	53.06+8.55 ^a	81.68+13.81 ^a

Values represent the mean+SEM nmol/mg phospholipid. #:n=5 in each group
^a: p<0.05, compared with the control values

Table 12. Diacyl molecular species of PE in rat brain during reperfusion

MS	reperfusion		
	30 min.	60 min.	120 min.
16:0-22:6	1.55+0.38 ^a	0.61+0.14 ^a	0.56+0.10 ^a
16:0-20:4	0.95+0.11 ^a	0.41+0.09 ^a	0.50+0.17 ^a
18:0-22:6	3.56+0.99 ^a	1.83+0.55 ^a	1.82+0.18 ^a
18:0-20:4	2.90+0.74 ^a	1.64+0.48 ^a	1.45+0.17 ^a
polyenoic	8.95+2.10 ^a	4.49+1.18 ^a	4.33+0.49 ^a
18:1-18:1	1.39+0.26 ^a	0.69+0.14 ^a	0.58+0.09 ^a
16:0-18:1	3.17+1.07 ^a	0.64+0.08 ^a	0.88+0.20 ^a
16:0-16:0	0.41+0.17 ^a	0.12+0.04 ^a	0.10+0.03 ^a
18:0-18:1	1.97+0.28 ^a	0.98+0.19 ^a	0.90+0.08 ^a
18:0-16:0	0.45+0.06 ^a	0.21+0.04 ^a	0.24+0.06 ^a
saturated, monoenoic	6.04+0.79 ^a	2.65+0.39 ^a	2.70+0.37 ^a
total	14.99+2.79 ^a	7.14+1.54 ^a	7.03+0.77 ^a

Values represent the mean+SEM nmol/mg phospholipid. #: n=5 in each group
^a: p<0.05, compared with the control values

Table 13. Free fatty acid in rat brain during reperfusion

FFA	reperfusion		
	30 min.	60 min.	120 min.
16:0	93.30+6.85 ^{a,b}	68.79+5.69	77.82+4.95
18:0	122.82+9.47 ^{a,b}	78.61+6.77	91.50+7.48
18:1	112.86+12.74 ^{a,b}	92.07+10.59	93.59+12.32
20:4	106.33+16.50 ^a	47.56+5.42 ^b	42.42+6.27
22:6	72.45+23.04 ^a	34.04+3.34 ^b	30.01+4.00
total	507.76+24.52 ^{a,b}	321.07+18.31	335.34+16.33

Values represent the mean+SEM $\mu\text{g/g}$ brain. n=5 in each group

^a: p<0.05, compared with the control

^b: p<0.05, compared with the values of 30 min. of ischemia.

小動物を用いた脳虚血モデルとしては mongolian gerbil の両側あるいは、一側総頸動脈閉塞によるものが多く用いられてきたが³⁰⁾, gerbil においては、水素クリアランスによる脳血流の測定が困難であることや、得られる脳組織の重量が少ない事などが実験上の制約となる。ラットを用いた脳虚血モデルとしては中大脳動脈閉塞による局所脳虚血モデル⁴⁶⁾ があるが本モデルでは虚血に陥る部位が狭く、ここを同定し試量とする事が困難である事から、全脳が虚血になるような実験モデルを選定する事が必要であった。

そこで Pulsinelli らの考案した4本の頭蓋外主幹動脈の遮断モデル³⁶⁾ を用いて実験を開始したが原法(両椎骨動脈遮断24時間後に両総頸動脈の遮断を無麻酔で

行うもの)を用いた場合、神経症状の発現頻度に著しい個体差があり、遊離脂肪酸の量も変異が大きく統計処理が困難であった。そこで人工呼吸下に4主幹動脈をほぼ同時に閉塞するモデルに変えて実験を行った。

臨床的に脳梗塞の発生は40才台以降に多く見られる事と、幼若ラットは脳虚血に対して抵抗性を有する事¹⁰⁾ を考慮して生後8ヶ月以上飼育した体重350-450gのretired breedersを用いた。

(B) 脳血流量

一般に脳梗塞に陥るrCBFの閾値は約10ml/100g.minとされており、それ以上のrCBFでは電気生理学的な活動は停止するが細胞を取り巻くイオン環境やエネルギー代謝の決定的な破綻は引き起こされないと

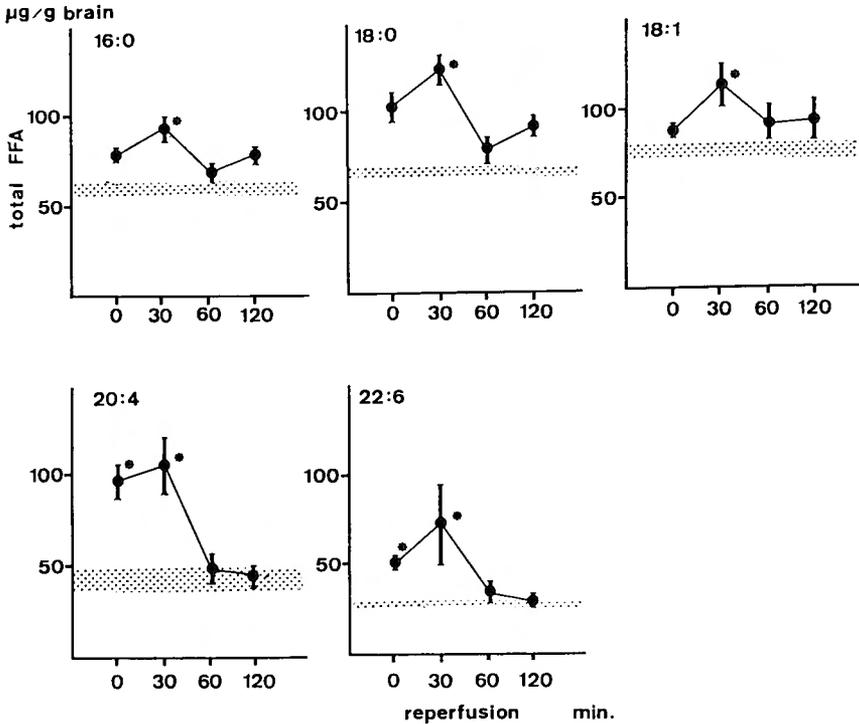


Figure 9. Individual free fatty acid levels during postischemic recirculation periods after 30 minutes of ischemia. Values are mean \pm SEM. $n=5$ in each group. *: $p < 0.05$ as compared with corresponding control. Hatched area shows preischemic control values (mean \pm SEM).

される²¹。本モデルでは虚血によって rCBF は水素クリアランス上、測定が出来なくなった事より 10 ml/100 g.min 以下に低下したものと推測される。虚血の持続時間がその後の脳浮腫の生成や細胞の可逆性を支配する要素として重要であるが30分後に血流再開を行った所、rCBFの上では一時的に reactive hyperemia を示し、その後は次第に低下傾向を示した。これが組織に対して、2次的な障害を引き起こすという考えかたもある²²。これらの現象が虚血による血管麻痺 (vasoparalysis) による一時的な反応であるのか、血流再開後に産生される prostacyclin と thromboxanes との imbalance によっておこっているのか、又組織の可逆性、脳浮腫の進展とどの様に関連するのかは今後、検討すべき問題である。

(C) in situ freezing

脳組織膜エネルギー代謝を検討する上では断頭後、脳を取り出して液化窒素で凍結するまでの時間 (約1分) に様々な変化が追加して生じる為真の値を得る

ために色々な工夫がなされてきた³⁵。microwave による方法と共に本法は最も優れた方法の一つであり、容易に行える事も大きな利点である。実験に使用したラットは retired で calvarium が厚く、頭蓋底部までの組織が液化窒素によって凍結されるのにはより永い時間を要したものと考えられる。その為にいわゆる stress induced condition が生じた可能性は否定出来ない。

(D) 虚血による分子種の変化

虚血によるリン脂質の変化に関しては多くの報告があるが未だ一致を見ていないのが現状である。Rehncrona ら³⁷ はラット完全、及び不完全虚血モデルを用いてリン脂質 pool の大きさ、その組成に変化が見られなかったとし、服部らもラット断頭モデルで変化が見られなかったと報告している^{19,20}。一方、吉田ら⁵² は gerbil の30分虚血で PC は4%, PE は16%の減少が見られたとし、Enseleit ら¹⁸ はリン脂質総量、PC, PS, PE に変化が見られた事を報告している。これらの結果の相違は抽出法、分析法の差、又、

虚血モデルや虚血時間の差などに起因するものと考えられる。今まで行われて来た報告はリンの定量 (Pi) や脂肪酸組成の分析から行われたものが大半で、現在の所、リン脂質分子種の虚血中の変化を見た報告はほとんど無い。

我々の得た結果では diacyl 型の PC は虚血によって漸減し、一方 diacyl 型の PE は早期に急減、その後は緩やかに減り続けるという事が示された。虚血時間が長引くにつれて全ての分子種に影響が生じてくるが、早期には PC, PE では高度不飽和分子種に、より著明な減少が起こっているという事が示された。Diacyl 型 PE が PC よりいち早く崩壊する原因は明らかではないが一つは、PE の分子種がその多くを高度不飽和分子種によって占められることから、PE に対して脱アシル化酵素が作用しやすい事が考えられる。又、膜の外葉と内葉で PC, PE の分布が異なり¹¹⁾、PE に対して細胞内水解酵素がより働きやすいことも原因の一つとして考えられる。

(E) 虚血中の遊離脂肪酸の変化

脳虚血によって1分以内に遊離脂肪酸は蓄積を始め^{5,6,7,12,16,19,20,37,49,52)} 又, diacylglycerol (DG) も同時に増加する事が言われている^{1,4,19,20)} これらが生じる原因としては 1) 脱アシル化酵素の活性亢進^{15,21)} 2) 高エネルギーリン酸化合物の枯渇による再アシル化の障害等が重要である^{19,20,39)}、脱アシル化に関与する酵素としては大きく phospholipase C を介した系と phospholipase A₂ を介した系を考えることが出来る。虚血後ごく早期には18:0と20:4が多く遊離蓄積し、DG も18:0, 20:4を含むものが増加してくることよりこれらは inositol phospholipid から C 系により由来したものと考えられている^{1,23)}。本実験では inositol, DG の測定を行っていないのでこれらの関与については明らかではない。しかし、18:0の虚血早期の蓄積量が20:4と共に多い事を考えると inositol リン脂質系からの遊離も十分に考えておかねばならない。

虚血早期 (10分) に20:4, 22:6が有意に増加した事は C-2 位に結合する脂肪酸が選択的に切り出しを受け蓄積した事を示しており、分子種分析の結果から diacyl 型 PC, PE の高度不飽和分子種に減少が多く生じた事によって裏づけられている。これらには phospholipase A₂ 系が関与していると考えられる³¹⁾。

虚血30分以後に16:0, 18:0, 18:1などの脂肪酸も増加してくるのは C-1 位の脂肪酸も切り出されたためと考えられる。

この様に、虚血早期と、30分以後においては、脂肪酸蓄積の経過に差異が見られる事から、供与体となるリン脂質において、又、作用酵素において別個のものが関与している可能性がある。

分子種の減少が全て遊離脂肪酸の増加として測定出来るものではなく lyso 体としてとどまっているもの⁴⁴⁾ TG, DG, MG など今回測定出来ていないもの、他の物質に代謝される、あるいは血液脳脊髄液中に、運び去られるという要素がある⁵²⁾。更に今回の検討は diacyl 型の PC, PE のみであることから alkenylacyl 型の動向⁴²⁾、他の PA, PI, PS, SPM の変化についても検討が必要である^{2,23)}。

(F) 脳血流再開時の変化について

血流再開後の rCBF が5分で増加した後に次第に低下を示したのは虚血によって血管反応性が障害され、血流再開によって脳浮腫が進行し有効な組織還流圧が回復していない可能性がある。脂肪酸レベルでも、リン脂質レベルでも30分間は虚血中の変化が持続している事は微小循環が十分に回復していない事を物語っており酵素反応の場合においても同様の状況が推測される。

脳血流再開時には遊離脂肪酸は再び減少する事が言われており、これらには、1) リン脂質への再アシル化、2) エネルギー産生の為の β -酸化、3) 生理活性物質への代謝 (特に20:4)、4) 他の脂質分画への代謝取り込み、5) 血流や脳脊髄液中への拡散、流出、等の幾つかの経路が考えられる^{2,52)}。

今回の実験でリン脂質 (diacyl 型 PC, PE) に関しては虚血によって減少したものは血流再開120分迄の時間で更に減少を続け、有意の再アシル化は見られなかった。PC では60-120分の間で増加が見られたものの有意とならなかったが、更に時間経過を追跡することによって有意差が生じる可能性は残っている。血流の障害された状況下ではエネルギー状態の回復も遅れ³³⁾ ATP 等に依存する acyl-CoA の生成は血流再開早期には低下しているものと考えられるため β -酸化、再アシル化は生じるとしてもごくわずかな要素でしかないと推測され、今回の結果はこの推測を支持するものと言える。

アラキドン酸 (20:4) を基質とした eicosanoid の産生はその実験モデルや虚血時間によって結果は様々であるが血流再開によって産生が増加するという報告が多い^{8,18,42)}。この理由としては Cyclooxygenase は酸素を必要とする反応であり虚血中には十分な酸素が供給されにくく、この反応は抑制されると言う考え方

が強い²⁸⁾、また、今回の結果にも示された如く、血流再開後の各遊離脂肪酸の減少のうち、特にアラキドン酸の減少が著明である事も、アラキドン酸が迅速に代謝を受けると言う事を示唆している。しかし eicosanoid が虚血後の血流再開によって発生するとしてもその変化は pg/mg の変化であり遊離脂肪酸の変化量の大きさと比較した場合、これらで全てを説明する事は出来ず、又本実験で示されたごとくに20:4以外の脂肪酸の動態を同時に説明する事は出来ない。

血流再開によるリン脂質代謝の変動については十分な検討がなされていないが、吉田らは血流再開によって減少していた PIP, PIP₂ の回復と TG の脂肪酸組成の変化が見られたとしている⁵³⁾。このように虚血後の脂肪酸の変化、代謝経路については未だ十分に解明されているわけではなく、今回の実験系からは、この面での変化も除外する事は出来ない。

脂質過酸化や free radical の生成が、中枢神経系の障害に関与している事はよく知られている。これらが虚血中におこる (intraischemic peroxidation) という説¹³⁾ と虚血後血流再開によっておこる (postischemic peroxidation) という説²⁶⁾ が対立している。Bhakoo ら⁷⁾ は、血流再開後の遊離脂肪酸の変化を観察して、血流再開後5分で FFA (特に20:4, 22:6) が著明な増加を見せるが、その後は一様に減少する事より、虚血性脳浮腫の発生には free radical の関与は少ないとしている。Rehncrona も20:4+22:6/16:0+18:0の比の変化からみて虚血中、虚血後血流再開のいずれの時期においても free radical による細胞障害は重要な役割を担っていないとしている³⁷⁾。我々の結果からも高度不飽和脂肪酸のみの特異的減少は見られず飽和脂肪酸においても減少が観察された事より脂質過酸化による細胞障害は酸素に依存しない酵素的な膜リン脂質の加水作用に比較して少ないものと推測された。

結 論

脳虚血に伴って生じる遊離脂肪酸の蓄積には時間経過によって異なる機構が作用しているものと考えられた。

脳虚血時には、膜リン脂質は減少するが、その過程は極性基によって異なり、また同一極性基の中であっても分子種によって異なる。何れの場合にも高度不飽和分子種がより早く減少する。

虚血30分後の血流再開では虚血による影響は持続し120分迄の経過では diacyl 型 PC, PE に再アシル化

は見られず、エネルギー状態の回復が充分には起こっていないものと推測された。

<謝辞> 本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました京都大学脳神経外科学教授、菊池晴彦先生、並びに名誉教授半田肇先生(現浜松労災病院長)に深甚の謝意を表すると共に、終始、御指導御協力を賜った京都大学食糧科学研究所教授、鬼頭誠先生、研究室諸兄、京都大学医学部脳神経外科、前助教授、米川泰弘先生(現国立循環器病センター脳神経外科部長)、同助手、岡本新一郎先生、滝和郎先生(現国立循環器病センター脳血管障害研究室長)に深く感謝致します。

文 献

- 1) Abe K, Kogure K: Accurate evaluation of 1,2-diacylglycerol in gerbil forebrain using HPLC and in situ freezing technique. *J Neurochem* 47: 577-582, 1986.
- 2) Abe K, Kogure K, Yamamoto H, et al: Mechanism of arachidonic acid liberation during ischemia in gerbil cerebral cortex. *J Neurochem* 48: 503-509, 1987.
- 3) Astrup J, Siesjo BK, Symon L: Thresholds in cerebral ischemia-The ischemic penumbra. *Stroke* 12: 723-725, 1981.
- 4) Avelango MI, Bazan NG: Rapid production of diacylglycerols enriched in arachidonate and stearate during early brain ischemia. *J Neurochem* 25: 919-920, 1975.
- 5) Bazan NG Jr: Effects of ischemia and electroconvulsive shock on free fatty acid pool in the brain. *Biochim Biophys Acta* 218: 1-10, 1970.
- 6) Bazan NG Jr, Bazan HEP, Kennedy WG, et al: Regional distribution and rate of production of free fatty acids in rat brain. *J Neurochem* 18: 1387-1393, 1971.
- 7) Bhakoo KK, Crockard HA, Lascelles PT: Regional studies of changes in brain fatty acids following experimental ischemia and reperfusion in the gerbil. *J Neurochem* 43: 1025-1031, 1984.
- 8) Bhakoo KK, Crockard HA, Lascelles PT, et al: Prostaglandin synthesis and edema formation during reperfusion following experimental brain ischemia in the gerbil. *Stroke* 15: 891-895, 1984.
- 9) Chan PH, Fishman RA: Brain edema; Induction in cortical slices by polyunsaturated fatty acids. *Science* 201: 358-360, 1978.
- 10) Coyle P: Middle cerebral artery occlusion in the young rat. *Stroke* 13: 855-858, 1982.
- 11) Crews FT, Camacho A, Philips I, et al: Effects of membrane fluidity on mast cell and nerve cell function. *Phospholipids in the Nervous System*, vol 1, (Horrocks L, et al ed.), pp 21-35. Raven Press, New York, 1982.

- 12) DeMedio GE, Goracci G, Horrocks LA, et al: The effects of transient ischemia on fatty acid and lipid metabolism in the gerbil brain. *Ital. J Biochem* 29: 412-432, 1980.
- 13) Demopoulos H, Flamm E, Seligman M, et al: Molecular pathology of lipids in CNS membranes. In Joebnis FF (ed), *Oxygen and Physiological Function*, Professional Information Library, Dallas, pp 491-508, 1977.
- 14) Doyle TF, Martin AN: Estimating total cerebral blood flow from the initial slope of hydrogen washout curves. *Stroke* 6: 149-152, 1975.
- 15) Edgar AD, Strosznajder J, Horrocks LA: Activation of ethanolamine phospholipase A₂ in brain during ischemia. *J Neurochem* 39: 1111-1116, 1982.
- 16) Enseleit WH, Domer FR, Jarrot DM, et al: Cerebral phospholipid content and Na⁺, K⁺-ATPase activity during ischemia and post-ischemic reperfusion in the Mongolian Gerbil. *J Neurochem* 43: 320-327, 1984.
- 17) Gardiner M, Nilsson B, Rehnrona S, et al: Free fatty acids in the rat brain in moderate and severe hypoxia. *J Neurochem* 36: 1500-1505, 1981.
- 18) Gaudet RJ, Alam I, Levine L: Accumulation of cyclooxygenase products of arachidonic acid metabolism in gerbil brain during reperfusion after bilateral common carotid artery occlusion. *J Neurochem* 35: 653-658, 1980.
- 19) 服部達明, 坂井 昇, 山田 弘, 他: 脳虚血早期における脳組織脂質動態—膜リン脂質代謝関連酵素の関与について—。 *脳神経* 37: 377-383, 1985.
- 20) 服部達明, 西村康明, 坂井 昇, 他: 脳虚血時の脂質動態に及ぼすベントバルビタールの影響。 *脳神経* 38: 585-591, 1986.
- 21) 平島 豊, 本 敦文, 遠藤俊郎, 他: 虚血脳microsome 分画におけるリン脂質代謝関連酵素の変化。 *脳神経* 37: 385-391, 1985.
- 22) Hossmann KA, Kleihnes P: Reversibility of ischemic brain damage. *Arch Neurol* 29: 375-382, 1973.
- 23) Ikeda M, Yoshida S, Busto R, et al: Polyphosphoinositides as a probable source of brain free fatty acids accumulated at the onset of ischemia. *J Neurochem* 47: 123-132, 1986.
- 24) Kates M: *Technique of lipidology*. (Work TS, Work E, et al ed.) pp 347-350, Amsterdam, North-Holland, 1972.
- 25) Kito M, Takamura H, Narita H, et al: A sensitive method for quantitative analysis of phospholipid molecular species by high performance liquid chromatography. *J Biochem* 98: 327-331, 1985.
- 26) Kogure K, Morooka H, Busto R, et al: Involvement of lipid peroxidation in postischemic brain damage. *Neurology* 29: 546, 1979.
- 27) Lands WE, Samuelsson B: Phospholipid precursor of prostaglandins. *Biochem Biophys Acta* 164: 426-429, 1968.
- 28) Lands WE: The biosynthesis and metabolism of prostaglandins. *Ann Rev Physiol* 41: 633-652, 1979.
- 29) Lazarewicz JW, Strosznajder J, Gromek A: Effects of ischemia and exogenous fatty acids on the energy metabolism in brain mitochondria. *Bull Acad Pol Sci* 20: 599-606, 1972.
- 30) Levine S, Sohn D: Cerebral ischemia in infant and adult gerbils. *Arch Pathol* 87: 315-317, 1969.
- 31) Marion J, Wolfe LS: Origin of the arachidonic acid released postmortem in rat forebrain. *Biochem Biophys Acta* 574: 25-32, 1979.
- 32) Morrison WR, Smith LM: Preparation of fatty acid methyl esters and dimethyl acetals from lipids with boron fluoridemethanol. *J Lipid Res* 5: 600-608, 1964.
- 33) Nordstrom C-M, Rehnrona S, Siesjö BK: Effects of phenobarbital in cerebral ischemia. part 2; Restitution of cerebral energy state, as well as of glycolytic metabolites, citric acid cycle intermediates and associated amino acids after pronounced incomplete ischemia. *Stroke* 9: 335-343, 1978.
- 34) Pasztor E, Symon I, Dorsch NWC, et al: The hydrogen clearance method in assessment of blood flow in cortex, white matter and deep nuclei of baboons. *Stroke* 4: 556-567, 1973.
- 35) Ponten U, Ratcheson RA, Salford LG, et al: Optimal freezing conditions for cerebral metabolites in rats. *J Neurochem* 21: 1127-1138, 1973.
- 36) Pulsinelli WA, Briery JB: A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* 10: 267-272, 1979.
- 37) Rehnrona S, Westerberg E, Akesson B, et al: Brain cortical fatty acids and phospholipids during following complete and severe incomplete ischemia. *J Neurochem* 38: 84-93, 1982.
- 38) Rhoads DE, Kaplan MA, Peterson NA, et al: Effects of free fatty acids on synaptosomal amino acid uptake systems. *J Neurochem* 38: 1255-1260, 1982.
- 39) Rodriguez de Turco EB, Cascone GD, Pediconi MF, et al: Phosphatidate, phosphatidylinositol, diacylglycerols and free fatty acids in the brain following electroshock, anoxia or ischemia. *Function and Biosynthesis of Lipids* (Bazan NG,

- et al eds), pp 389-396. Plenum Press, New York, 1977.
- 40) 清水孝雄: 神経細胞とプロスタグランジン. 臨床科学 17: 1014-1021, 1981.
- 41) Shiu GK, Nemoto EM: Barbiturate attenuation of brain free fatty acid liberation during global ischemia. *J Neurochem* 37: 1448-1456, 1981.
- 42) Shohami E, Rosenthal J, Levy S: The effect of incomplete cerebral ischemia on prostaglandin levels in rat brain. *Stroke* 13: 494-499, 1982.
- 43) Siesjö BK: Brain energy metabolism. New York, John Wiley. 1978.
- 44) Sun GY, Foudin L: On the status of lysolecithin in rat cerebral cortex during ischemia. *J Neurochem* 43: 1081-1086, 1984.
- 45) Takamura H, Narita H, Urade R, et al: Quantitative analysis of polyenoic phospholipid molecular species by high performance liquid chromatography. *Lipids* 21: 356-361, 1986.
- 46) Tamura A, Graham DI, McCulloch J, et al: Focal cerebral ischaemia in the rat; 1. description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Metabol* 1: 53-60, 1981.
- 47) Wieloch T, Harris RJ, Symon L, et al: Influence of severe hypoglycemia on brain extracellular calcium and potassium activities, energy, and phospholipid metabolism. *J Neurochem* 43: 160-168, 1984.
- 48) Wojtczak L: Effect of long chain fatty acids and acyl-CoA on mitochondrial permeability, transport, and energy-coupling processes. *J Bioenerg Biomembr* 8: 293-311, 1976.
- 49) Yasuda H, Kishiro K, Izumi N, et al: Biphasic liberation of arachidonic and stearic acids during cerebral ischemia. *J Neurochem* 42: 168-172, 1985.
- 50) 米川泰弘: 急性期脳梗塞の外科的治療. 日本外科学会雑誌 80: 1602-1606, 1979.
- 51) 米川泰弘, 半田 肇: 閉塞性脳血管障害の外科的治療. 脳神経 32: 239-255, 1980.
- 52) Yoshida S, Inoh S, Asano T, et al: Effects of transient ischemia on free fatty acids and phospholipids in the gerbil brain. *J Neurosurg* 53: 323-331, 1980.
- 53) Yoshida S, Ikeda M, Busto R, et al: Cerebral phosphoinositide, triacylglycerol, and energy metabolism in reversible ischemia; origin and fate of free fatty acids *J Neurochem* 47: 744-757, 1986.