

脳ミトコンドリア膜リン脂質の虚血中、血流再開時の変化 に関する実験的研究

京都大学脳神経外科学教室

(指導：菊池 晴彦教授)

中原 一郎

Experimental Studies on the Changes of Mitochondrial Membrane Phospholipids during Cerebral Ischemia and Recirculation

ICHIRO NAKAHARA

Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Kyoto University

(Director: Prof. Dr. Haruhiko Kikuchi)

Changes of brain mitochondrial phospholipids during cerebral ischemia and recirculation were experimentally studied in a rat 4-vessel occlusion model, to explore the relation between changes of mitochondrial phospholipids and dysfunction of mitochondria. Respiratory functions, activities of respiratory enzymes (cytochrome c oxidase, F_0F_1 -ATPase) were analyzed after 30 and 60 minutes of ischemia, and after 30 minutes of recirculation following each ischemic period. Activities of respiratory functions and respiratory enzymes decreased progressively during ischemia, which recovered completely after recirculation following 30 minutes of ischemia, while only partial recovery was observed after recirculation following 60 minutes of ischemia. In phospholipid analyses, contents of phospholipid classes tended to decrease time-dependently during ischemia, and compositions of polyunsaturated fatty acids (PUFA) such as arachidonic acid (20 : 4) and docosahexaenoic acid (22 : 6) were decreased preferentially. In recirculation, phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), and cardiolipin (CL) showed recovery of contents of phospholipids and compositions of PUFA after recirculation following 30 minutes of ischemia, while further decrease of contents of phospholipids and compositions of PUFA were observed after recirculation following 60 minutes of ischemia, especially in CL. On the other hand, progressive degradation of phospholipids occurred after recirculation following both 30 and 60 minutes of ischemia in phosphatidylserine and phosphatidylinositol. Changes of major phospholipid classes such as PC, PE, and CL correlated with the changes of mitochondrial respiratory functions and activities of respiratory enzymes. In conclusion, changes of mitochondrial membrane phospholipids appear to affect the integrity of cellular energy metabolism via mitochondrial dysfunction during cerebral ischemia and recirculation.

Key words: Cerebral ischemia, Recirculation, Mitochondria, Phospholipids.

索引語：脳虚血，血流再開，ミトコンドリア，リン脂質。

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

結 言

ミトコンドリアは細胞のエネルギー代謝の中核となる細胞内小器官であり、その膜内及び matrix 内には、TCA 回路、電子伝達系、酸化的リン酸化等の ATP 産生に関与する系が存在する。脳では循環血液により供給される glucose を唯一の呼吸基質として利用しており、虚血による血行の停止により、まもなく、ミトコンドリアにおける ATP 産生は低下し、エネルギー依存性の膜イオン輸送や生体膜の恒常性の維持が障害され、様々な虚血性細胞障害を来す。このようなエネルギー代謝の障害が持続すると様々な生化学的な系路により細胞の機能障害が進行し、非可逆的損傷を来すに至る^{37,38)}。このような変化はミトコンドリアにも起こる事が報告されており、虚血によるミトコンドリア機能障害は細胞のエネルギー代謝を増悪させ、虚血性細胞障害の進行をもたらす事が知られている^{9,10,13,16-20,34)}。

脳には多量の脂質成分が含まれ、その多くはリン脂質から成る。生体膜はこれらリン脂質の二重層により構成されており、その恒常性は、膜の構造や機能の維持に不可欠である。脳虚血によるエネルギー代謝障害は、膜リン脂質の崩壊、細胞内遊離脂肪酸の増加を来す事が知られており^{3,7,14,15,35,42)}、これらの変化は様々な系を介して虚血性細胞障害に関与する^{37,38)}。ミトコンドリアにおいてもこのような虚血に伴う膜リン脂質分解が示唆されており^{27,28)}、虚血時、血流再開時のミトコンドリアの膜リン脂質を検討する事は、虚血性細胞障害の機構の解明の上で非常に重要であると思われる^{10,34)}。しかし、これまで、虚血時、血流再開時の脳ミトコンドリア膜リン脂質の変化についてはほとんど検討されておらず、ミトコンドリア膜リン脂質代謝のエネルギー代謝における意義も十分明らかにされていない。そこで本研究ではラット脳虚血及び血流再開モデルを用いてミトコンドリア膜のリン脂質量及び各リン脂質の脂肪酸組成分析を行い、ミトコンドリアの呼吸機能、呼吸酵素活性との関連性について検討し、ミトコンドリア膜リン脂質代謝の虚血性細胞障害における重要性の一端を明らかにする事を試みた。

方 法

(A) 虚血及び血流再開モデルの作製

体重 350-400 g の Wistar 系雄性ラットに、pentobarbital 40 mg/kg にて腹腔内麻酔を行い、気管内挿管下

に、小動物用人工呼吸器で調節呼吸とした。Pulsinelliらのモデルに準じて³³⁾ 仰臥位で頸部正中小切開を行い、両側総頸動脈を頸静脈、迷走神経より剝離露出した。ついで動物を腹臥位にして後頸部正中小切開を行い、両側第一頸椎の alar foramen を露出し、針電極を刺入して両側椎骨動脈を電氣的に凝固遮断した後ただちに仰臥位に戻し、両側総頸動脈を血管吻合用マイクロクリップで30分或は60分間血流遮断した。血流再開群では各々の虚血時間の経過後クリップを開放し30分間の血流再開を行った。対照動物は同様の操作を加えたが血行遮断を行わないものを用いた。

(B) 脳ミトコンドリアの単離

脳ミトコンドリアの単離は、Clark らの方法に準じて行った⁹⁾。すなわち、虚血ないし血流再開終了後ただちに断頭して30秒以内に前脳を摘出し、氷冷した isolation medium (0.225 M mannitol, 0.075 M sucrose, 1 mM EGTA; pH 7.4) 中で細かく切断した後、同様の isolation medium で3回洗浄し血液等を可及的に除去した。ついで alkaline proteinase 0.5 mg/ml (Toyobo), bovine serum albumin 2.5 mg/ml (BSA; Sigma, St. Louis, MO) を含む isolation medium 10 ml を加え、Dounce homogenizer にて用手的に4回 homogenize した。1分間 incubate した後さらに BSA 5.0 mg/ml を含む isolation medium 10 ml を加え8回 homogenize した。

homogenate は 2,200 × g, 4°C にて3分間遠沈して上清を分取し、沈澱を isolation medium 20 ml で懸濁しさらに同様に遠沈して上清を回収した。これらの上清を 12,100 × g, 4°C にて8分間遠沈し沈澱を分取した。沈澱を 3% Ficoll solution 10 ml (3% Ficoll, 0.12 M mannitol, 0.03 M sucrose, 25 μM EDTA; pH 7.4) で懸濁し、6% Ficoll solution 20 ml (6% Ficoll, 0.24 M mannitol, 0.06 M sucrose, 50 μM EDTA; pH 7.4) 上に層状に静置し不連続密度勾配を作製した。10,400 × g, 4°C にて30分間遠沈した後、沈澱を isolation medium 10 ml で懸濁し 12,000 × g, 4°C にて10分間遠沈して Ficoll を洗浄除去した後、沈澱を isolation medium 500 μl にて懸濁しミトコンドリア懸濁液 (約 20 mg/ml protein) を得た。操作は 4°C の氷冷下に行いすべての溶液は氷冷に保った。ミトコンドリア懸濁液 80 μl を呼吸活性の測定に供し、残りは分析まで -80°C にて保存した。

(C) ミトコンドリア呼吸機能の測定

ミトコンドリアの呼吸機能は、Estabrook らの方法に準じて行った⁹⁾。すなわち、Clark 型酸素電極 (Han-

satec, Norfolk, England) を用い、呼吸基質として 10 mM glutamate+10 mM malate 或は 10 mM succinate を含む reaction medium (160 mM KCl, 10 mM K_2SO_4 , 0.15 mM EGTA; pH 7.4) 980 μ l を 25°C の恒温に保ち、ミトコンドリア懸濁液 20 μ l を加え State 4 呼吸⁴⁾ の酸素消費速度を測定した。ついで ADP 200 nmol を添加し State 3 呼吸⁴⁾ を開始させ、その酸素消費速度を測定した。ミトコンドリアのタンパク濃度は Lowry らの方法²⁶⁾ により定量した。

(D) ミトコンドリア呼吸酵素活性の測定

cytochrome c oxidase (EC 1.9.3.1) の活性は Orii らの方法³¹⁾ により cytochrome c の酸化に伴う 550 nm の吸光度の変化として測定した。また、 F_0F_1 -ATPase (EC 3.6.7.3) 活性の測定は Kagawa の方法²³⁾ に従って無機リンの定量により行った。cytochrome c (Type III from horse heart) 及び ATP は Sigma Chemical より購入した。

(E) リン脂質の抽出、分画及び定量

保存したサンプルは Kates らの方法²⁵⁾ により chloroform : methanol (1 : 2, vol/vol) 25 ml を用いて 37°C で 40 分間抽出した。抽出された脂質を含む chloroform : methanol は 2 M KCl+0.5 M EDTA 10 ml にて除タンパク後 0.5 M EDTA 20 ml にて洗浄し、Sep-pak (silica cartridge) を用い chloroform, methanol 各 20 ml で中性脂質層、リン脂質層を分取した後、リン脂質層を減圧乾固し抗酸化剤として 0.001% butylated hydroxytoluene (BHT) を含む chloroform 5 ml に溶解し -80°C で保存した。

リン脂質は Takamura らの方法⁴⁰⁾ two-step single-dimensional thin-layer chromatography (TLC) にて各リン脂質種に分画した。すなわち、リン脂質の chloroform 溶液を TLC plate (Merck, Darmstadt, FRG; No. 11845) に spot し, chloroform : methanol : acetone : acetic acid : water (100 : 50 : 100 : 4 : 10, vol/vol; 0.001% BHT) にて展開して 40 分間減圧乾燥後, chloroform : methanol : acetic acid : water (180 : 150 : 30 : 10, vol/vol; 0.001% BHT) にて同一方向に再び展開した。phosphatidylcholine (PC), phosphatidylserine (PS), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylethanolamine (PE), cardiolipin (CL) の各リン脂質をヨウ素蒸気中で標準リン脂質の plate と比較し同定した。各リン脂質分画を掻き取り Bartlett の方法²⁾ にてリンの定量を行った。

(F) 脂肪酸組成の分析

脂肪酸組成の分析は gas-liquid chromatography を用いて PC, PS, PI, PE, CL の各リン脂質について行った。TLC plate より掻き取った各リン脂質分画を Morrison らの方法²⁹⁾ により 14% boron trifluoride-methanol (Applied Science Laboratory, Deerfield, IL) を用いて 100°C, 40 分間メチル化した後 gas-liquid chromatography に供した。gas-liquid chromatography は Shimadzu GC-9A (Kyoto, Japan) にて行い、10% Silar 10C, 60-80 mesh Chromosorb W, N_2 flow 60 ml/min, 160-240°C の条件を用いた^{14,15)}。各脂肪酸は同一条件下で測定した標準物質の相対保持時間と比較し同定した。

(G) 統計検定

得られた結果は mean \pm SEM で表し、一次元分散分析により検定し $p < 0.05$ を示したものを統計学的に有意とした。

結 果

虚血時の変化

(A) ミトコンドリア呼吸機能の変化

State 3 呼吸の respiratory rate (RR), respiratory control ratio (RCR) は呼吸基質が 10 mM glutamate+10 mM malate, 或は 10 mM succinate のいずれにおいても、虚血の進行に伴い、control に比し有意に低下した。State 4 呼吸の RR は 10 mM succinate で虚血 60 分後に有意に低下したが、10 mM glutamate+10 mM malate では変化を認めなかった。また、ADP/O はいずれの呼吸基質においても有意の変化は認められなかった (Table 1)。

(B) ミトコンドリア呼吸酵素活性の変化

cytochrome c oxidase の活性は、虚血の進行に伴い、control に比し虚血 30 分後で 81%, 虚血 60 分後で 61% に低下し有意の変化を認めた。また、 F_0F_1 -ATPase においても、control に比し虚血 30 分後、虚血 60 分後で各々 75%, 49% と有意に低下した (Table 2)。

(C) リン脂質量の変化

各リン脂質共、虚血の進行に伴い、control に比しリン脂質量が減少する傾向を示した。ただし統計学的には有意の変化に至らなかった (Table 3, Figure 1)。

(D) 脂肪酸組成の変化

各リン脂質共、虚血の進行に伴い、アラキドン酸 (20:4), ドコサヘキサエン酸 (22:6) 等の多価不飽和脂肪酸の減少の傾向を認めた。なかでも PI, PE, CL 等の本来これらの多価不飽和脂肪酸の組成比の高

いリン脂質においてこの傾向が明らかであった。また、飽和及び一価不飽和脂肪酸と多価不飽和脂肪酸の各々の総和の組成比でも同様の傾向が見られ、PI, PE, CLでは、多価不飽和脂肪酸組成比の有意の減少及び相対的な飽和及び一価不飽和脂肪酸組成比の増加(虚血30分後: PE, CL, 虚血60分後: PI, PE, CL)を認めた(Table 4, Figure 2).

血流再開時の変化

(A) ミトコンドリア呼吸機能の変化

虚血30分後血流再開では 10 mM glutamate+10 mM malate, 10 mM succinate のいずれの呼吸基質においても虚血により低下した RR 及び RCR は十分に回復していた。特に、10 mM glutamate+10 mM malate では、control に比し126%と有意の活性の亢進を示していた。これに対し虚血60分後血流再開ではいずれの基質

でも回復が不十分で、10 mM glutamate+10 mM malate では、control は比し60.4%に留まった。また、10 mM succinate では虚血60分後血流再開で State 4 呼吸の有意の上昇が認められた(Table 1).

(B) ミトコンドリア呼吸酵素活性の変化

cytochrome c oxidase 活性は虚血30分後血流再開では control と同程度まで回復していた。しかし、虚血60分後血流再開では control の78%と回復が十分でなかった。F₀F₁-ATPase も虚血30分後血流再開、虚血60分後血流再開で各々 control の115%, 51%と同様の傾向を示し、虚血30分後血流再開では control よりもやや亢進の傾向を示したのに対し虚血60分後血流再開ではほとんど回復しなかった(Table 2).

(C) リン脂質量の変化

PC, PE, CL では虚血30分後血流再開で虚血のみの

Table 1 Mitochondrial respiration in Rat Brain during Ischemia and Recirculation

		Control	Ischemia		Recirculation for 30 min	
			30 min	60 min	After 30 min	After 60 min
(Substrate: 10 mM glutamate+10 mM malate)						
RR	State 3*	278±17	188±13 ^a	114±6 ^a	350±50 ^{a,b}	168±11 ^a
	State 4*	36±3	38±3	37±3	45±5	45±2
RCR		7.7±0.2	4.9±0.1 ^a	3.2±0.3 ^a	7.6±0.3 ^b	3.8±0.4 ^a
ADP/O		3.3±0.2	3.0±0.1	3.2±0.2	3.4±0.1	2.9±0.1
(Substrate: 10 mM succinate)						
RR	State 3*	230±9	229±11	112±7 ^a	238±23	222±10 ^b
	State 4*	74±3	76±2	51±2 ^a	80±3	83±3 ^{a,b}
RCR		3.1±0.1	2.8±0.1	2.2±0.1 ^a	2.9±0.2	2.7±0.1 ^{a,b}
ADP/O		2.3±0.1	2.1±0.1	2.1±0.1	2.5±0.2	2.2±0.1

Values are mean±SEM, n=4-5.

RR: respiratory rate, RCR: respiratory control ratio

* natom O·min⁻¹·mg protein⁻¹

^a p<0.05 different from control, ^b p<0.05 different from ischemia only

Table 2 Changes in Activities of Mitochondrial Respiratory Enzymes in Rat Brain during Ischemia and Recirculation

	Control	Ischemia		Recirculation for 30 min	
		30 min	60 min	After 30 min	After 60 min
Cytochrome c oxidase*	6.7±0.4	5.4±0.2 ^a	4.1±0.6 ^a	6.6±0.5 ^b	5.2±0.2 ^{a,b}
F ₀ F ₁ -ATPase**	326.3±17.9	243.2±25.9 ^a	160.9±7.4 ^a	374.8±1.4	165.0±13.8 ^{a,b}

Values are mean±SEM; n=4-5.

* 10⁻²·sec⁻¹·mg protein⁻¹, ** Pi nmol·min⁻¹·mg protein⁻¹

^a p<0.05 different from control, ^b p<0.05 different from ischemia only

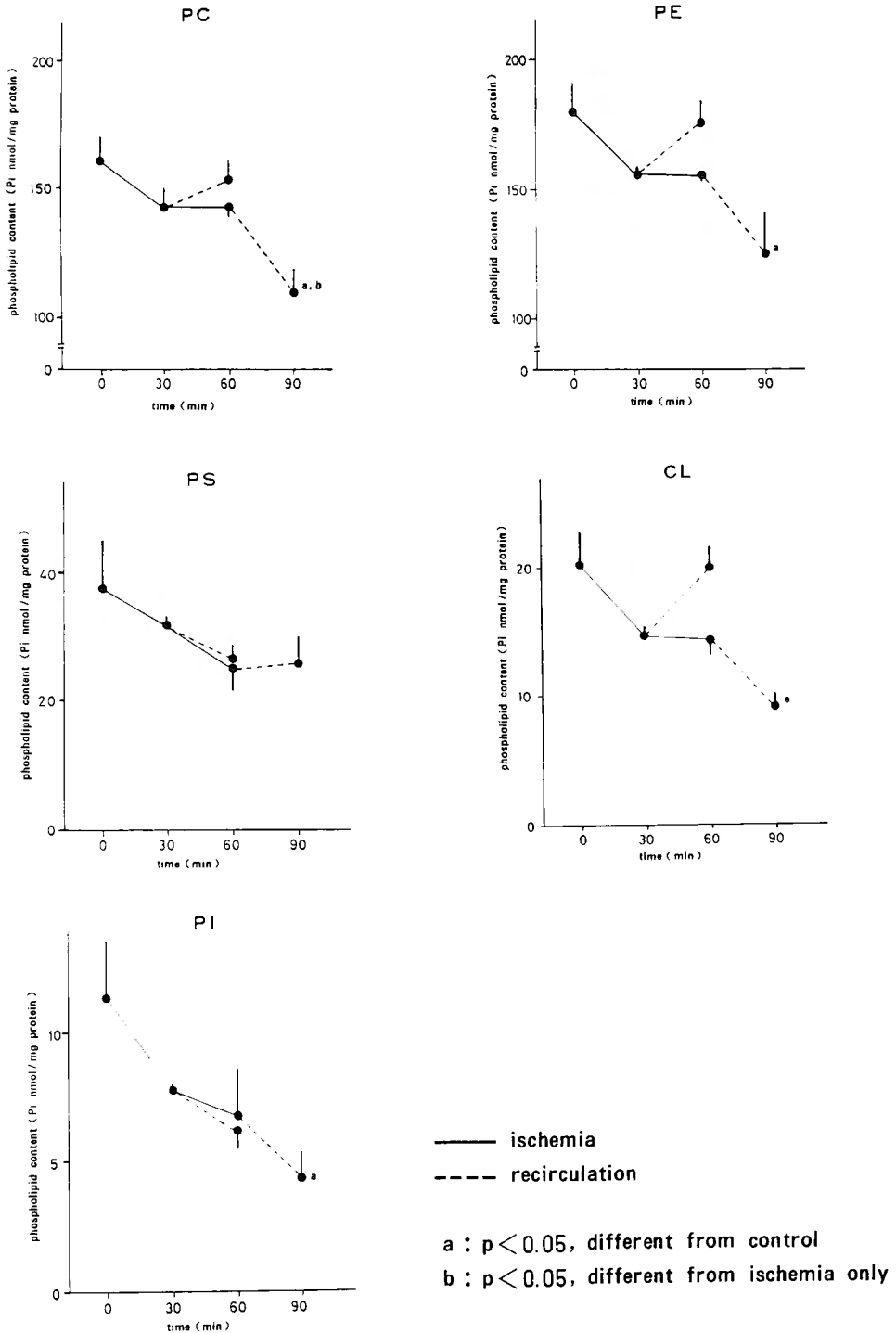


Fig. 1 Contents of mitochondrial phospholipids in rat brain during ischemia and recirculation. Values are mean \pm SEM, $n=4-5$ in each group. ^a $p < 0.05$ different from control, ^b $p < 0.05$ different from ischemia only.

Table 3 Contents of Mitochondrial Phospholipids in Rat Brain during Ischemia and Recirculation

	Control	Ischemia		Recirculation for 30 min	
		30 min	60 min	After 30 min	After 60 min
PC	160.3 ± 9.5	142.3 ± 7.8	142.0 ± 3.4	153.1 ± 7.7	109.9 ± 8.7 ^{a,b}
PS	37.2 ± 7.5	31.8 ± 1.2	25.4 ± 4.0	25.8 ± 2.8	25.6 ± 4.2
PI	11.2 ± 2.3	7.8 ± 0.1	6.7 ± 1.9	6.2 ± 0.7	4.3 ± 1.0 ^a
PE	179.7 ± 11.1	155.7 ± 2.2	155.4 ± 1.1	175.5 ± 9.2	124.8 ± 16.3 ^a
CL	20.2 ± 2.6	14.7 ± 0.7	14.4 ± 1.2	20.0 ± 2.6	9.1 ± 1.0 ^a

Values are mean ± SEM, expressed as nmol · mg protein⁻¹, n=4-5.

PC: phosphatidylcholine, PS: phosphatidylserine, PI: phosphatidylinositol, PE: phosphatidylethanolamine, CL: cardiolipin

^a p<0.05 different from control, ^b p<0.05 different from ischemia only

群に比しリン脂質量の回復の傾向が見られたのに対し、虚血60分後血流再開では回復が見られずリン脂質量の減少が虚血のみの群よりさらに進行していた。PS, PI では虚血30分後血流再開でも虚血のみの群より

リン脂質量が減少しており回復の傾向は認められず、虚血60分後血流再開ではリン脂質量の減少がより進行していた (Table 3, Figure 1).

(D) 脂肪酸組成の変化

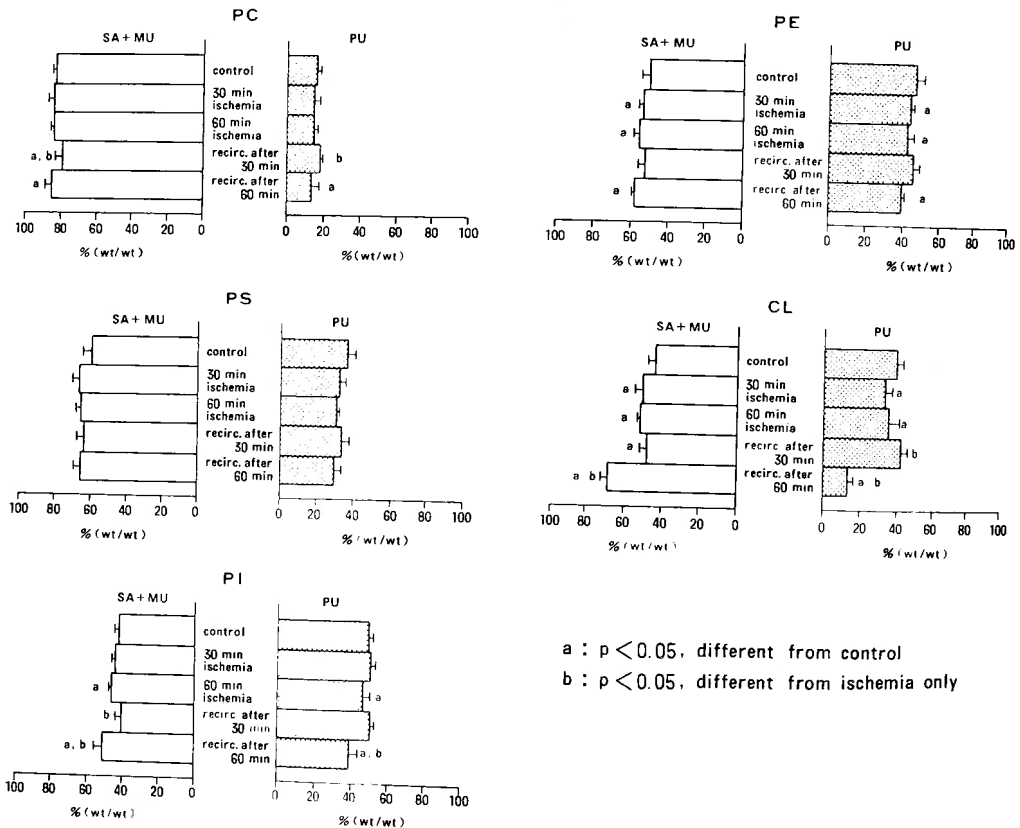


Fig. 2 Compositions of saturated and monounsaturated (SA+MU) fatty acids versus polyunsaturated (PU) fatty acid chains of phospholipid classes in rat brain during ischemia and recirculation. Values are mean ± SEM, n=4-5 in each group. ^ap<0.05 different from control, ^bp<0.05 different from ischemia only.

Table 4 Fatty Acid Compositions of Mitochondrial Phospholipids during Ischemia and Recirculation

	Control	Ischemia		Recirculation for 30 min	
		30 min	60 min	After 30 min	After 60 min
Phosphatidylcholine					
16:0	41.3±0.6	40.5±1.0	41.6±0.5	38.4±0.7 ^a	43.3±0.9
18:0	13.9±0.1	14.7±0.2 ^a	14.1±0.1	13.6±0.4 ^b	14.8±0.2 ^{a,b}
18:1	27.8±0.1	29.3±0.4	28.7±0.4	27.7±0.6	27.8±0.3
18:2	1.1±0.1	0.6±0.2	1.0±0.1	1.3±0.2	0.5±0.2
18:3	0.8±0.0	1.0±0.0	1.0±0.1	1.1±0.3	0.9±0.1
20:4	8.6±0.3	8.1±0.6	7.6±0.4	9.6±0.1 ^b	7.0±0.6 ^a
22:4	0.8±0.0	0.6±0.1	0.6±0.0	0.7±0.1	0.5±0.3
22:6	5.4±0.2	4.8±0.5	4.4±0.2	5.9±0.2	4.4±0.4
others	0.4±0.1	0.4±0.2	1.0±0.4	1.1±1.2	0.6±0.2
SA+MU	83.0±0.5	84.5±0.9	84.4±0.5	79.8±1.4 ^{a,b}	85.9±1.3 ^a
PU	16.7±0.5	15.1±1.0	14.6±0.7	18.6±0.2 ^b	13.5±1.1 ^a
Phosphatidylserine					
16:0	2.7±0.4	2.0±0.1	2.9±0.2	3.8±0.4 ^{a,b}	2.7±0.2
18:0	41.6±1.4	47.1±0.7 ^a	43.3±0.5	43.9±1.3	47.9±1.7 ^{a,b}
18:1	15.8±1.1	17.8±1.0	19.9±0.7	17.0±0.8	16.1±0.8
18:2	0.1±0.1	0.0±0.0	0.1±0.0	0.2±0.1	0.0±0.0
18:3	0.5±0.1	0.3±0.2	0.8±0.0	0.3±0.3	0.1±0.1
20:4	4.7±0.3	3.7±0.1	4.8±0.5	4.0±0.2	3.7±0.2
22:4	3.2±0.3	2.6±0.1	2.5±0.1	2.8±0.2	3.6±0.4
22:6	28.3±1.8	26.3±1.2	23.1±0.4	27.0±2.3	22.4±1.2
others	3.1±0.3	0.2±0.1	2.6±0.7	1.0±0.6	3.5±0.9
SA+MU	60.1±2.4	67.0±1.7	66.2±0.8	64.7±1.7	66.7±1.9
PU	36.8±2.3	32.9±1.6	31.2±0.5	34.3±1.8	29.8±1.6
Phosphatidylinositol					
16:0	8.8±0.7	7.0±0.1	9.1±0.8	9.5±1.0	11.7±1.9
18:0	29.1±1.1	32.7±0.5	32.4±0.9	26.6±2.1 ^b	34.0±1.4 ^a
18:1	5.0±0.3	5.0±0.1	5.1±0.1	4.9±0.2	6.0±0.4 ^{a,b}
18:2	1.2±0.2	0.5±0.1	0.6±0.3	0.8±0.2	0.3±0.1
18:3	0.1±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1	0.1±0.0	0.2±0.1
20:4	41.7±1.2	43.5±0.7	35.8±1.6 ^a	41.0±1.1	32.0±1.8 ^a
22:4	1.7±0.1	1.8±0.2	2.7±0.5	2.3±0.4	1.7±0.4
22:6	5.3±0.6	5.6±0.1	7.5±0.9	6.9±0.6	5.1±0.5
others	7.1±1.1	4.1±0.2	6.6±1.0	8.0±1.2	9.0±1.0
SA+MU	42.9±0.8	44.6±0.6	46.7±0.3 ^a	41.0±1.5 ^b	51.7±2.0 ^{a,b}
PU	50.0±0.6	51.3±0.7	46.8±0.9 ^a	51.0±0.6	39.3±2.1 ^{a,b}

(continued)

	Control	Ischemia		Recirculation for 30 min	
		30 min	60 min	After 30 min	After 60 min
Phosphatidylethanolamine					
16:0	10.2±1.3	11.5±1.1	10.4±0.8	7.1±0.5	11.5±1.3
18:0	28.2±0.8	28.8±0.1	29.1±0.5	30.4±0.6 ^a	32.1±0.9 ^{a,b}
18:1	12.6±0.2	14.2±1.4	16.6±0.7	15.7±0.6	14.6±1.1
18:2	0.1±0.0	0.1±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	1.4±1.0
18:3	1.1±0.1	1.1±0.1	1.4±0.1	1.0±0.1	1.1±0.0
20:4	16.3±0.6	14.7±0.2 ^a	13.9±0.3 ^a	16.6±0.4 ^b	12.8±0.2 ^a
22:4	5.9±0.1	5.4±0.2	5.3±0.1	5.4±0.3	5.1±0.1
22:6	24.3±0.9	22.9±0.1	22.4±0.7 ^a	23.4±0.7	19.8±0.7 ^{a,b}
others	1.4±0.5	1.3±0.6	0.9±0.2	0.3±0.2	1.4±0.2
SA+MU	51.0±1.6	54.5±0.7 ^a	56.1±0.9 ^a	53.2±1.2	58.3±0.4 ^a
PU	47.6±1.5	44.2±0.4 ^a	43.0±1.0 ^a	46.5±1.1	40.3±0.5 ^a
Cardiolipin					
16:0	8.0±0.1	10.0±1.6	7.8±0.1	6.4±0.2 ^b	14.7±0.8 ^{a,b}
18:0	7.9±0.4	8.5±1.0	8.9±0.1	11.1±1.0 ^{a,b}	13.3±0.5 ^{a,b}
18:1	28.1±0.8	32.2±1.9 ^a	34.9±0.1 ^a	30.8±0.1	40.8±1.2 ^{a,b}
18:2	6.5±0.6	4.7±0.1 ^a	5.2±0.6	5.4±0.5	1.4±0.4 ^{a,b}
18:3	0.6±0.1	0.5±0.2	0.7±0.0	0.6±0.0	1.5±0.8
20:4	15.0±0.6	13.1±0.5 ^a	11.6±0.7 ^a	16.6±0.7 ^b	2.8±0.4 ^{a,b}
22:4	2.3±0.2	2.9±0.2	2.2±0.3	2.7±0.2	2.3±0.2
22:6	15.2±0.8	13.5±0.5	14.7±1.2	17.0±0.1 ^b	5.4±0.5 ^{a,b}
others	16.4±1.0	14.6±1.4	14.0±1.8	9.5±0.3	17.8±2.5
SA+MU	44.0±1.1	50.7±1.2 ^a	51.7±0.2 ^a	48.2±1.1 ^a	68.8±1.3 ^{a,b}
PU	39.6±1.0	33.5±1.1 ^a	35.6±1.7 ^a	42.3±1.0 ^b	13.4±1.2 ^{a,b}

Values are mean±SEM, expressed as % (wt/wt), n=4-5.

SA+MU: saturated and monounsaturated fatty acids, PU: polyunsaturated fatty acids

^a p<0.05 different from control, ^b p<0.05 different from ischemia only

虚血30分後血流再開では虚血のみの群に比し多価不飽和脂肪酸組成比は上昇し, control 近くまで回復(PS, PI, PE)ないしややこれを上回る(PC, CL)傾向を示した。これに対し虚血60分後血流再開では20:4(PC, PI, PE, CL)及び22:6(PE, CL)の組成比がcontrolに比し或は虚血のみの群に比し有意に低下しており, 各リン脂質で多価不飽和脂肪酸組成比の低下が見られた。特に, CLでは多価不飽和脂肪酸組成比がcontrol 39.6%, 虚血60分35.6%に対し虚血60分後血流再開では13.4%と著しい低下を示した(Table 4, Figure 2).

考 察

(A) 実験モデル

本実験では虚血及び血流再開モデルとしてPulsinelliらの考案した頭蓋外主幹動脈遮断モデルに準じた方法を用いた³³⁾。後藤¹⁵⁾、Toddら⁴⁾によると本法により主幹動脈閉塞時の前脳の脳血流量は10 ml/100 g/min以下となる事が知られている。このような著しい脳血流の低下により脳ではエネルギー代謝の破綻により電気生理学的活動の停止はもとより細胞を取り巻くイオン環境の変化をはじめ様々な系路による虚血性変化を来す¹⁾。また, 虚血後血流再開では脳血流量は一過性の増加(postischemic hyperemia)の後次

第に低下傾向 (delayed hypoperfusion) を来す事が知られているが、本実験で行った虚血30分後血流再開及び虚血60分後血流再開では血流再開中いずれも control と同程度ないしこれ以上の脳血流量が保たれている事が実験的に確かめられている。また、この際血圧、血液ガス分析等の生理的変動は有意差を示さない事が知られており、本法は虚血及び血流再開モデルとして妥当かつ有用な方法と考えられる^{15,41)}。

(B) ミトコンドリア呼吸機能の変化

虚血及び血流再開時の脳ミトコンドリア機能の変化に関しては多くの報告がある。Ozawa ら³²⁾ はラット脳虚血早期のミトコンドリア呼吸機能の変化を検討し、ミトコンドリア機能障害の虚血性細胞障害ないし虚血性脳浮腫の招来における重要性を示した。その後 Clark ら⁹⁾ は Ficoll による不連続密度勾配を用いて呼吸活性の高度に維持されたミトコンドリアの単離法を報告した。Ginsberg ら¹³⁾ はこの方法を用いて gerbil の30分から120分の脳虚血におけるミトコンドリア呼吸の経時的な機能低下を報告している。また、Hillered ら¹⁶⁻²⁰⁾ は oxygen radical, 細胞内 pH, Ca^{2+} homeostasis, 細胞内遊離脂肪酸等が脳虚血時のミトコンドリア機能障害と関連している事を明らかにした。本実験でも、虚血の進行に伴い、ミトコンドリアの呼吸機能の経時的な低下を認め、その程度はこれまでの諸家の報告とはほぼ一致した。

血流再開時のミトコンドリア呼吸機能の可逆性について、Renchirona ら³⁴⁾ はラットで30分間の完全及び不完全脳虚血後30分間の血流再開を行い、完全虚血後の血流再開ではミトコンドリア機能の回復を認めたのに対し、不完全虚血後の血流再開ではミトコンドリア機能低下の増悪する事を観察した。不完全虚血時には残存する血行により進行する嫌気代謝に伴う lactic acidosis や oxygen radical の産生等により、虚血後血流再開時のエネルギー代謝の回復の様相が完全虚血と異なる事が知られているが、本実験のように完全虚血の場合、ラット脳ミトコンドリア機能の可逆性の境界となる虚血時間は30分前後である事が知られている^{18,19,34,37)}、本実験でも虚血30分後血流再開ではミトコンドリア機能は虚血前と同レベルに回復したのに対し虚血60分後血流再開では回復が不十分であり、従来の報告と同様の傾向を示した。ただし、10 mM glutamate+10 mM malate を基質とした場合、虚血30分後血流再開では control よりむしろ呼吸活性の亢進を認めており、虚血後血流再開における代償的な呼吸

機能の亢進を示している可能性がある。この点については従来報告されておらず今後の検討を要すると思われる。また、10 mM succinate を基質とした場合、虚血60分後血流再開で State 4 呼吸の酸素消費速度の若干の上昇傾向が見られたが、State 4 呼吸の亢進は従来より高度のミトコンドリア内膜の障害による permeability の亢進に伴う電解質の逸脱を示すものとされており⁹⁾、この点からも虚血60分後血流再開時にミトコンドリア膜の崩壊が進行している事が示唆される。これらの点を含め呼吸基質の違いにより虚血ないし血流再開時の呼吸活性に若干の相違を認めるが、この理由として glutamate+malate 及び succinate がそれぞれ NAD-linked ないし FAD-linked の基質であり電子伝達系への entry point が異なる事、虚血ないし血流再開時の作用が電子伝達系の部位により異なる事等の影響が考慮されている¹⁷⁾。

(C) ミトコンドリア呼吸酵素活性の変化

cytochrome c oxidase, F_0F_1 -ATPase は各々ミトコンドリア内膜に存在する電子伝達系、酸化的リン酸化の呼吸酵素である。各酵素とも虚血の進行と共に活性が低下し、虚血30分後血流再開では十分な活性の回復が認められたのに対し虚血60分後血流再開では回復が十分でなく、これらの酵素活性の変化が呼吸機能の変化に反映されたものと考えられる。酵素活性の変化は後述のように膜リン脂質組成の変化との相関が示唆されているが、虚血に伴う protease 反応の活性化による酵素量自体の減少も否定する事はできず今後の検討を要する。

(D) ミトコンドリア膜リン脂質—虚血時の変化について

虚血時の脳内の膜リン脂質の変化については Bazan³⁾ による細胞内遊離脂肪酸増加の報告以来、脳 homogenate のレベルでは多くの報告がある。Renchirona ら³⁵⁾ はラット完全及び不完全脳虚血において虚血30分ではリン脂質量及び組成に有意の変化が見られなかったとしている。一方、Yoshida ら⁴²⁾ は gerbil の30分虚血で PC に4%、PE に16%の減少を認め、Enseleit ら⁷⁾ も gerbil の15から240分の虚血で PC, PS, PI, 及び PE に減少が見られたと報告している。また、Goto ら¹⁴⁾ も、ラットの5から60分虚血における PC の漸減、及び PE の虚血早期からの急減を報告している。これらの報告を含めて、脳虚血中、脳内膜リン脂質の分解が起こる事が認められており、遊離脂肪酸やリン脂質組成の検討により phospholipase A₂ の関与す

る事が知られている^{6,14,15,37,38)}。しかし、脳ミトコンドリア膜のリン脂質の変化についてはこれまで報告が散見されるに過ぎず^{27,28)} 余り検討されていなかった。

他臓器ではミトコンドリア膜リン脂質の変化についていくつかの報告があり、Smithら³⁹⁾はラット腎虚血において虚血早期よりCLの減少が見られ、虚血の進行と共にPC, PEも引き続いて減少する事を報告している。また、総リン脂質の脂肪酸組成でリノール酸(18:2)及びアラキドン酸(20:4)が選択的に減少している事を示し、CLの選択的な減少と併せてミトコンドリア膜リン脂質の分解に虚血による細胞内Ca²⁺の上昇によるミトコンドリア内 phospholipase A₂の活性化が関与しているとした。Okayasuら³⁰⁾もラット肝虚血でCLの選択的な減少を認め、脂肪酸組成の変化より、同様にミトコンドリア内 phospholipase A₂の関与を示唆している。また、Kajiyamaら²⁴⁾は犬心筋の60分虚血においてCL及びPCの減少を認め、その原因として脂肪酸組成、glutathioneのredox state等の分析をもとに、phospholipase A₂の活性化及びlipid peroxidationの関与を報告している。

脳では、Majewskaら^{27,28)}が guinea pigの5分虚血後にPC及びPEが減少し同時にミトコンドリア分画で遊離脂肪酸及び脂質過酸化の代謝産物であるmalonyldialdehydeが増加したと報告し、他臓器での検討と同様にミトコンドリア膜リン脂質分解の要因としてphospholipase A₂の活性化或はlipid peroxidationの関与を挙げている。しかし、虚血時間が短く脂肪酸組成の検討もされておらず、リン脂質分解の機構は十分明らかにされていない。

本実験では虚血の進行に伴い、統計学的には有意に至らなかったものの各リン脂質種共減少の傾向を示している。また、虚血の進行に伴い各リン脂質で20:4, 22:6等の多価不飽和脂肪酸組成比が低下し相対的に飽和及び一価不飽和脂肪酸組成比の上昇を認めた事は、リン脂質分解の過程でC-2位の脂肪酸側鎖がより切り出された事を示しており、虚血時の脳ミトコンドリア膜リン脂質の分解にphospholipase A₂の関与している可能性を強く示唆している。この傾向は本来多価不飽和脂肪酸組成比の高いPI, PE, CLで有意に認められ、これらのリン脂質が不飽和度の低いPC, PSに比しよりphospholipase A₂の脱アシル作用を受けやすいものと思われる。

(E) ミトコンドリア膜リン脂質—血流再開時の変化について

血流再開時の膜リン脂質の変化については虚血中の変化に比し脳 homogenate のレベルでも未だ諸家の一致を見ていない。Renchroneら³⁵⁾はラット不完全虚血30分後30分間の血流再開で、PI+PSのfractionでわずかに減少を認め、Yoshidaら⁴²⁾はgerbilの30分虚血で血流再開後30分以降PEが漸減していくのに対しPCは変化しなかったと報告している。一方、Enseleitら⁷⁾はgerbilの60分虚血後の血流再開で、PC, PI, PE等において再開後60分でcontrol或はそれ以上のレベルに増加し120分後に再度controlないしそれ以下に減少したのに対し、PSでは再開後60分で減少し120分後で回復傾向を示したと報告した。また、後藤¹⁵⁾はラットにおいて30分虚血後30分から120分の血流再開で、再開後PC, PEとも虚血直後よりさらに減少を続け、120分後にPCにおいてわずかな回復傾向を認めている。このように血流再開時の膜リン脂質の変化は虚血直後に比し回復するとする報告や減少するとする報告が混在し、未だこれらの変化の機構も含め不明な点が多い。さらに、血流再開時の脳ミトコンドリア膜リン脂質の変化に関しては未だ検討されていない。他臓器では、Kajiyamaら²⁴⁾が犬心筋60分虚血後20分間の血流再開でPC及びPEが虚血直後に比し低下を続け、Ca²⁺ antagonistの投与でこの変化が緩和された事を報告している。

本実験ではPC, PE, CLにおいて、虚血30分後血流再開により、虚血後低下していたリン脂質量及び多価不飽和脂肪酸組成比の回復を認めている。一方、虚血60分後血流再開ではこれらのリン脂質は虚血直後に比しさらに減少し多価不飽和脂肪酸組成比の低下を認め、phospholipase A₂によるリン脂質分解の進行が示唆される。これらの変化は特にCLにおいて著明に認められているが、CLはミトコンドリア内膜の内層に多く存在し細胞質内のphospholipase A₂は作用されにくい事が知られている¹²⁾。ミトコンドリアは小胞体と共に細胞内のCa²⁺ sequestrationを行う機能を有しており、血流再開により虚血中に細胞内に増加したCa²⁺が流入しリン酸塩としてmatrix内に蓄積される。虚血60分後血流再開時の膜リン脂質分解の要因として、虚血中に増加した細胞内Ca²⁺の過大な流入、或は虚血の進行に伴いミトコンドリアのCa²⁺代謝障害が起り“Ca²⁺ overload”の状態となって^{9,10,36)}ミトコンドリア内のphospholipase A₂が活性化され、CLがより選択的に分解された事が推測される³⁹⁾。この点については今後虚血及び血流再開時の細胞内或はミトコンドリア

内の Ca^{2+} 代謝, phospholipase A_2 活性等の検討が必要と考えられる。

一方, PS, PI では虚血30分後, 60分後血流再開共, リン脂質量, 多価不飽和脂肪酸組成比の低下を示している。リン脂質種により変化の態様, 程度に差異を生じた理由は不明であるが, phospholipase A_2 に対する各リン脂質の基質特異性の違い, ミトコンドリア膜の内層, 外層間, 或は膜の内層, 外層間での各リン脂質の分布の違い等による phospholipase A_2 の accessibility の相違等が関与している可能性がある^{12,39)}。また, lipid peroxidation については本実験の結果からその関与を否定できないが, むしろ虚血後数時間ないし数日後の delayed ischemic phase で作用するとの報告もあり¹⁰⁾ 今後検討を要する。

(F) ミトコンドリア膜リン脂質の変化と呼吸機能, 呼吸酵素活性の関連について

ミトコンドリアでは他の生体膜と同様, 膜脂質と膜酵素との関連が知られており, 膜脂質組成の変化は膜の構造や機能と密接に関連している¹²⁾。cytochrome c oxidase はその活性の発現に CL を必須としており, CL 量と酵素活性の相関が知られている^{11,12)}。また, F_0F_1 -ATPase も同様に CL を要求する酵素であり, さらに膜リン脂質の不飽和度がその活性と関連する事が実験的に確かめられている^{12,22,23)}。これらの点より膜リン脂質の変化, とりわけ CL の変化がミトコンドリアの呼吸酵素活性を介して虚血中, 虚血後血流再開時のミトコンドリア機能に影響を与えたと考えられる。虚血30分後血流再開では呼吸機能, 呼吸酵素活性及び膜リン脂質の回復が見られ虚血によるエネルギー代謝障害は可逆的であった。これに対し虚血60分後血流再開では呼吸機能や呼吸酵素活性の回復は十分でなく膜リン脂質の分解が進行していた。虚血の進行によりミトコンドリアはその機能障害と膜リン脂質崩壊の悪循環を繰り返しながら次第に不可逆的な変化を来すに至るものと思われる。このように虚血後血流再開時のエネルギー代謝の可逆性はミトコンドリア機能とミトコンドリア膜リン脂質代謝の密接な相関の影響を受けており, ミトコンドリア膜リン脂質代謝の虚血時, 血流再開時のエネルギー代謝における重要性が示唆された。

結 論

脳虚血, 及び虚血後血流再開におけるミトコンドリア膜リン脂質の変化を明らかにした。ミトコンドリア

膜リン脂質の変化はミトコンドリア機能を介して細胞のエネルギー代謝と関連し, 虚血性細胞障害の可逆性に強く関与する事が示唆された。

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教授, 菊池晴彦先生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科教授, 鬼頭 誠先生, 並びに研究室諸兄, 国立循環器病センター脳神経外科部長, 米川泰弘先生 (京都大学脳神経外科元助教授), 京都大学脳神経外科講師, 滝 和郎先生に深く感謝致します。

文 献

- 1) Astrup J, Siesjö BK, Symon L: Thresholds in cerebral ischemia-The ischemic penumbra. *Stroke* **12**: 723-725, 1981.
- 2) Bartlett GR: Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem* **234**: 466-468, 1959.
- 3) Bazan NG Jr: Effects of ischemia and electroconvulsive shock on free fatty acid pool in the brain. *Biochim Biophys Acta* **218**: 1-10, 1970.
- 4) Chance B, Williams GR: A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation. *Nature* **176**: 250-254, 1955.
- 5) Clark JB, Nicklas WJ: The metabolism of rat brain mitochondria. *J Biol Chem* **245**: 4724-4731, 1970.
- 6) Edgar AD, Strosznajder J, Horrocks LA: Activation of ethanolamine phospholipase A_2 in brain during ischemia. *J Neurochem* **39**: 1111-1116, 1982.
- 7) Enseleit WH, Domer FR, Jarrott DM, et al: Cerebral phospholipid content and Na^+ , K^+ -ATPase activity during ischemia and postischemic reperfusion in the mongolian gerbil. *J Neurochem* **43**: 320-327, 1984.
- 8) Estabrook RW: Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios. *Methods Enzymol* **10**: 41-47, 1967.
- 9) Fiskum G: Involvement of mitochondria in ischemic cell injury and in regulation of intracellular calcium. *Am J Emerg Med* **2**: 147-153, 1983.
- 10) Fiskum G: Mitochondrial damage during cerebral ischemia. *Ann Emerg Med* **14**: 810-815, 1985.
- 11) Fry M, Green DE: Cardiolipin requirement by cytochrome oxidase and the catalytic role of phospholipid; *Biochem Biophys Res Commun* **93**: 1238-1246, 1980.
- 12) Günther: Lipids of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **822**: 1-42, 1985.
- 13) Ginsberg MD, Mela L, Wrobel-Kuhl K, et al: Mitochondrial metabolism following bilateral cerebral ischemia in the gerbil. *Ann Neurol* **1**: 519-527, 1977.

- 14) Goto Y, Okamoto S, Yonekawa Y, et al: Degradation of phospholipid molecular species during experimental cerebral ischemia in rats. *Stroke* **19**: 728-235, 1988.
- 15) 後藤泰伸: 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. *日外宝* **57**: 38-54, 1988.
- 16) Hillered L, Ernster L: Respiratory activity of isolated rat brain mitochondria following in vitro exposure to oxygen radicals. *J Cereb Blood Flow Metab* **3**: 207-214, 1983.
- 17) Hillered L, Ernster L, Siesjö BK: Influence of in vitro lactic acidosis and hypercapnia on respiratory activity of isolated rat brain mitochondria. *J Cereb Blood Flow Metab* **4**: 430-437, 1984.
- 18) Hillered L, Siesjö BK, Arfors KE: Mitochondrial response to transient forebrain ischemia and recirculation in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* **4**: 438-446, 1984.
- 19) Hillered L, Smith ML, Siesjö BK: Lactic acidosis and recovery of mitochondrial function following forebrain ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* **5**: 259-266, 1985.
- 20) Hillered L, Chan PH: Effects of arachidonic acid on respiratory activities in isolated brain mitochondria. *J Neurosci Res* **19**: 94-100, 1988.
- 21) Kagawa Y, Racker E: Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. *J Biol Chem* **246**: 5477-5487, 1971.
- 22) Kagawa Y, Kandrach A, Racker E: Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. *J Biol Chem* **248**: 676-684, 1973.
- 23) Kagawa Y: Dissociation and reassembly of the inner mitochondrial membrane, in Korn ED (ed): *Methods in Membrane Biology*, Vol 1. New York, Plenum, 1974, p. 233.
- 24) Kajiyama K, Pauly DF, Hughes H, et al: Protection by verapamil of mitochondrial glutathione equilibrium and phospholipid changes during reperfusion of ischemic canine myocardium. *Circ Res* **61**: 301-310, 1987.
- 25) Kates M: Technique of lipidology, in Work TS, Work E et al (eds): *Amsterdam, North-Holland* 1972, p. 347-350.
- 26) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275, 1951.
- 27) Majewska MD, Lazarewicz J, Strosznajder J: Catabolism of mitochondrial membrane phospholipids in conditions of ischemia and barbiturate anesthesia. *Bull Acad Pol Sci* **25**: 125-131, 1977.
- 28) Majewska MD, Strosznajder J, Lazarewicz J: Effect of ischemic anoxia and barbiturate anesthesia on free radical oxidation of mitochondrial phospholipids. *Brain Res* **158**: 423-434, 1978.
- 29) Morrison WR, Smith LM: Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J Lipid Res* **5**: 600-608, 1964.
- 30) Okayasu T, Curtis MT, Farber JL: Structural alterations of the inner mitochondrial membrane in ischemic liver cell injury. *Arch Biochem Biophys* **236**: 638-645, 1985.
- 31) Oriti Y, Okunuki K: Studies on cytochrome a. *J Biochem* **58**: 561-568, 1965.
- 32) Ozawa K, Seta K, Araki H, et al: The effect of ischemia on mitochondrial metabolism. *J Biochem* **61**: 512-514, 1967.
- 33) Pulsinelli WA, Brierley JB: A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* **10**: 267-272, 1979.
- 34) 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.
- 35) Rehncrona S, Westerberg E, Akesson B, et al: Brain cortical fatty acids and phospholipids during and following complete and severe incomplete ischemia. *J Neurochem* **38**: 84-93, 1982.
- 36) Rosenthal RE, Hamud F, Fiskum G, et al: Cerebral ischemia and reperfusion: Prevention of brain mitochondrial injury by lidoflazine. *J Cereb Blood Flow Metab* **7**: 752-758, 1987.
- 37) Siesjö BK: Cell damage in the brain: A speculative synthesis. *J Cereb Blood Flow Metab* **1**: 155-185, 1981.
- 38) Siesjö BK: Cerebral circulation and metabolism. *J Neurosurg* **60**: 883-908, 1984.
- 39) Smith MW, Collan Y, Kahng MW, et al: Changes in mitochondrial lipids of rat kidney during ischemia. *Biochim Biophys Acta* **618**: 192-201, 1980.
- 40) Takamura H, Narita H, Park HJ, et al: Differential hydrolysis of phospholipid molecular species during activation of human platelets with thrombin and collagen. *J Biol Chem* **262**: 2262-2269, 1987.
- 41) Todd NV, Picozzi P, Crocckard HA, et al: Reperfusion after cerebral ischemia: Influence of duration of ischemia. *Stroke* **17**: 460-466, 1986.
- 42) Yoshida S, Inoh S, Asano T, et al: Effects of transient ischemia on free fatty acids and phospholipids in the gerbil. *J Neurosurg* **53**: 323-331, 1980.