in vitro に於ける脳腫脹の電子顕微鏡的研究

京都大学医学部脳神経外科学教室（指導：荒木千里教授）

菊　池　晴　彦

〔原稿受付　昭和39年12月17日〕

"Electron microscopic study on in-vitro brain swelling"

by

HARUHIKO KIKUCHI

From the 1st Surgical and Neurosurgical Division, Kyoto University Medical School
(Director : Prof. Dr. Chisato Araki)

Received for Publication Dec. 17, 1964

Electron microscopic observation was made on cortex slices of adult rat brain incubated in various media under in-vitro condition.

Findings were as follows ;

1) When brain slices were incubated in isotonc Krebs-Ringer's solution, high degree of swelling of glia cells and various degenerative changes of mitochondria were observed within 20 minutes. And these electron microscopic changes were nearly identical to those in brain swelling produced under in-vivo condition.

2) When glucose or glutamate was added to Krebs-Ringer's solution as substrates, the swelling of glia cell could not be arrested in 20 minutes incubation under the same condition. However, in case of the incubation in glucose added Krebs-Ringer's solution, there was a tendency that the degree of swelling diminished to a certain degree.

3) When ATP was added to Krebs-Ringer's solution with glucose, incubated brain slice showed almost complete arrest of swelling of glia cells in 20 minutes, and moderate swelling occurred in 40 minutes.

4) The brain slice was preincubated in glucose added Krebs-Ringer's solution for 20 minutes to produce the swelling of glia. Then it was incubated in ATP reinforced medium for next 20 minutes. In this case, the tissue swelling was not reversed.

5) Contrary to this, when the slice was incubated in ATP reinforced medium with xanthine for 20 minutes following the same 20 minutes preincubation as 4), once developed swelling of glia cell was found to be reversed.

Based on these findings, a discussion was made on the relationship between the metabolic abnormality of glia cells and the development of swelling from various angles. The enregy which is necessary to maintain the normal form of cells, is seemingly supplied by ATP produced mainly in mitochondria during the metabolic process. Thus same measures correcting impaired oxidative phosporylation of cell may possibly reverse the swelling of cells.

The action of ATP added to media was also discussed.

緒　　言

近年電子顕微鏡の導入により，脳腫脹の本態に関して数多くの知見が加えられた．しかし脳腫脹の成立に関与する複雑多彩な要因を解析する事は現在といえども必ずしも容易ではない．そこで吾々は可及的に単純化された．而も再現性のある条件下，即ち in vitro の条件で脳腫脹を作製し，之に電子顕微鏡的検索を加え，同時に之等知見を脳腫脹に関する生化学的検索の結果と対比検討することによつて，脳腫脹の成因を追求し，更に可能なれば，脳腫脹の治療に役立つ何らかの情報を得ようとしたのが本研究の目的である．

in vitro の条件下で等張溶液内に incubate された brain slice に腫脹の起ることは，Stern (1949)，Elliott (1946) 等により指摘された[7)35)]．Allen (1955)も同様の所見を報告し，incubated brain slice の重量増加は innulin 或いは ferrocyanide space によつて代表される extracellular space の増加に基因するとした[1)]．次いで Elliott (1956) は aerobic condition に於いては medium 中に glutamate を基質として添加することにより，腫脹が或る程度防止し得たことを報告している[6)]．Gerschenfeld (1959)は，Allen, Elliott 等と同じ方法を用い incubate された brain slice を電子顕微鏡的に検索し gila 細胞の胞体の腫脹及び mitochondria の退行性変化等の所見を認めている[10)]．

以上述べて来た in vitro の研究にならい，本実験に於いても incubated brain slice について，主として電子顕微鏡的検索を行なつた．

実　験　方　法

実験動物として adult rat を使用した．基本的な incubation medium として等張 Krebs-Ringer's solution を用い，必要に応じ，基質或いはその他の薬剤をこれに添加した．(Fig. 1)

incubation は magnetic stirrer を内蔵する装置を用い，30℃で充分の O_2 influx を行ないながらincubateした．(Fig. 2)

正常 rat を断頭後，可及的迅速に (約1分間) 脳をとり出し，0.1～1mmの厚さの brain cortex を sharp razor blade にて切除し，直ちに既に oxygenate された，medium 中に入れ，20分間乃至40分間の incubation を行なつた[3)]．

次いで標本を1％ Osmium tetraoxide にて2時間固定，graded alcohol solution (50～100％) により脱水，methacrylate (butyl methacrylate : methyl methacrylate = 7 : 3)，又は epoxy resin (epon 815 : epon 812 = 6 : 4) にて包埋した[2)22)30)]．

超薄切片の作製には Leitz wetzler の ultramicrotome と glass knife を用い，電子顕微鏡は Hitachi HS-6型を用いた．

実　験　結　果

1) Incubation in the Krebs-Ringer's solution.

Krebs-Ringer's solution に20分間 incubate された brain cortex の電子顕微鏡像で特に目立つ所見は次の通りである．

即ち astrocyte の胞体は殆んど最大限に腫脹し，waterly appearance を示す．neuropil も又，著明に腫脹している．次いで mitochondria では mitochondrial matrix の膨化，cristae の断裂，空胞化，external membrane の断裂等種々の退行性変化を示した (Fig. 3)．

Tris buffer の代りに phosphate buffer を使用した等張 Krebs-Ringer's solution に incubate した場合も全く同じような所見が得られた (Fig. 4)．

2) Incubation in the Krebs-Ringer's solution with substrate.

等張 Krebs-Ringer's solution に glucose (11mM)，glutamate(20mM)，或いはglucose (11mM) + glutamate (20mM) 等の substrate の添加した medium 中に前回と同じ方法で brain cortex slice を incubate したが，この方法をもつてしても，脳組織の spontaneous swelling は防止し得なかつた (Fig. 5 & 6)．

即ち実験1に見られたと同様 astrocyte 胞体の著明な腫脹，mitochondria の退行性変化が証明された．ただ glucose 添加の medium 中に incubate された slice の astrocyte の膨化の程度は，何等 substrate を加えなかつた場合に比し，ごく僅かに，軽度にとどまつた程度である．

3) Incubation in the Krebs-Ringer's solution with glucose and ATP.

次いで glucose を添加した medium に adenosine triphosphate (ATP) を2 mMの割合で加えて見た．即ち Krebs-Ringer's solution buffered with Tris に glucose (11mM)，ATP (2 mM) を添加し，このmedium 内で brain cortex を incubate した．20分間の incubation では少なくとも形態学的には glia 細胞の腫脹はよく防止され，astroglia はほぼ正常の形状を示し，而も mitochondria も殆んど正常の形態を保つている (Fig. 7)．

4) Incubation in the ATP reinforced medium with uncoupler.

更に上記 ATP reinforced medium に oxidative phosphorylation の uncoupler である 2, 4-dinitrophenol (0.2mM) を添加した medium 内で brain slice を20分間 incubate したところ再び astrogha のかなりの腫脹が証明された (Fig. 8). しかし腫脹の程度は基質を全く添加しない Krebs-Ringer's solution に incubate された場合の様に最大限の腫脹ではなく，若干軽度にとどまつた.

5) Incubation in the Krebs-Ringer's solution with glucose(20′), transfered later to the ATP reinforced medium (20′)

brain slice をはじめ glucose (11mM) のみを添加した Krebs-Ringer's solution に20分間 incubate し，更にその slice を次の20分間，上述の ATP reinforced medium 移して incubate すると，最初の Kreds-Ringer's solution with glucose 内の incubation で一度起こつた腫脹は reverse されず，やはり astroglia の著明な腫脹，及び mitochondria 種々の退行性変化が電顕像で認められた (Fig. 9). 之に比し，ATP reinforced medium にはじめから40分間 incubate した brain slice は毛細血管周囲の astroglia に若干の腫脹が認められるが，全体としてそう著明な腫脹を示して居ない (Fig. 10).

6) Incubation in the Krebs-Ringer's solution with glucose (20′), transfered later to the ATP reinforced medium with xanthine (20′).

今度は，はじめの 20分間はやはり glucose (11mM) のみを添加した Krebs-Ringer's solution での incubation で脳組織の腫脹を起こさせ，次いでその slice を ATP reinforced medium に xanthine 0.45mM を添加した medium に20分間 incubate したところ，今度は一度発生した腫脹が，かなりの程度に reverse されて居る所見を得た. 尤もこの際 glia 細胞内の Palade's granule は集合して粗大な顆粒を形成し，而も全体として胞体の osmiodensity は増加している. 又細胞間隙もかなり拡大して居る所見が認められ，厳密に云えば正常所見とは云い難いがとも角 glia 細胞はほぼ正常に近い容積を示した. (Fig. 11) その場合の control として glucose (11mM) のみを添加した medium に40分間 incubate した brain slice には著明な腫脹像が証明されている (Fig. 12).

考　　察

先にも述べた様に，従来如何なる medium を使用するにせよ，in vitro の条件下で incubate された brain slice に swelling の起こることは避け難い現象とされた.

この現象の成立機転として，断頭による乾燥，脳切片作製に伴なう組織への傷害，更に slice を作る事によつて不可避的に多数の glia 細胞，神経細胞の突起が切断され，細胞膜が一部その連続性を失なう事等々，種々の要因が挙げられるであろうが，最も大きな原因は恐らく，isolated brain tissue の代謝が in vivo の状態に於ける脳代謝と大いに異なり強く障害された事にあると思われる.

in vitro にとり出された脳組織はたとえそれが等張溶液に incubate され，又充分な O_2 influx が与えられたとしても決して生理的代謝は営み得ず，例えば，その O_2 consumption は in vivo の条件下に於けるそれの約1/2にすぎぬことが知られている[27].

脳の代謝に関する考察は後で行なう積りであるが，ここで最も興味をひくのは脳腫脹に関する電子顕微鏡的所見である.

in vivo の実験でいろいろな条件を与える事によつて動物に脳腫脹を起こす事が出来る. 例えば cerebral compression によつて起こした脳腫脹(Fig. 13)，或いは cerebral infarction (Fig. 14)，又は venous congestion (Fig. 15) によつて起こした脳腫脹等の電子顕微鏡像をそれぞれ比較してみると，少なくとも脳腫脹発生の初期に於いては，何れも非常に似通つた所見を示して居り，相互間に有為の差異を見出すことは非常に困難である[14][15]. 更に大切なことは in vivo で認められた脳腫脹に共通な形態学的変化が isotonic solution に incubate された brain slice にも同様に認められた事である.

何れの場合にも程度の差こそあれ astrocyte の胞体の著明な容積の増大，及び mitochondria の腫化，cristae fragmentation の空胞化，external membrane の断裂という様な共通の諸変化が証明されるのである[10][14][23].

即ち脳腫脹を起こす手段が何であろうとも，よしそれが in vitro に於ける incubation という様な特殊な条件下に起こつたものであつても，その結果として起こる形態学的変化はほぼ identical であり，非特異的であると云う事である.

電子顕微鏡像に示されたこの様な形態学的変化を脳の代謝面に於ける知見と対比せしめながら考察してみたい。

周知の様に脳代謝に必要な基質の95%余は glucose である。glucose はFig. 16に示す如く一連の解糖過程を経て pyruvate にまで分解され，acetyl CoA を経て citric acid cycle に入り酸化をうける。この代謝過程のいろいろな段階に於いて release された水素イオンは，いわゆる electron transport chain に移される。かくして carbon compounds は CO_2 にまで分解され，又 electron transport chain に移された水素イオンは一連の蛋白酵素を通過した後に，O_2分子にまで運ばれ，H_2Oを生成し，酸化過程を終る。而もこの全代謝過程を通じ1 mol の glucose は合計38mol の ATP を形成することになる。このうち2 mol の ATP は解糖系即ち glucose が pyruvate にまで分解される過程で生成され，これには必ずしも酸素の存在を必要としない。而も解糖系の諸反応は cytoplasm で行なわれる事からここで生成された ATP は cytoplasmic ATP と呼ばれる。残りの36mol の ATP は citric acid cycle 更に electron transport chain を通じての一連の代謝過程に於いて生成され，而もこれらの反応は mitochondria で酸素の存在下に於いて行なわれる[8)19)33)36)40)]。mitochondria は Fig.17 に示す様に1層の protein molecule と2層の lipid molecule よりなる double membrane の構造を有し，而もその inner wall が infold して cristae を形成する。正常の mitochondria にはすでに知られているように matrix に於いて citric acid cycle の酸化を catalyze する酵素が，又 cristae 及び external membrane には electron transport chain に関与する呼吸系酵素が存在するとされて居る。細胞の respiratory system 即ち electron transport chain を通じての酸化の過程と共軛して ATP が生成されるが，かかる共軛反応は oxidative phosphorylation と呼ばれる[18)20)21)37)]。この様な oxidative phosphorylation の system に例えば 2,4-dinitrophenol (D. N. P.) の様な化合物が加えられると respiration は侵されず ATP formation のみが選択的に侵されるという現象が起きる。この様な現象は uncoupling と名付けられ，D. N. P. の如き物質を uncoupler と呼ぶ[39)]。

さて細胞の代謝を通じて生成された ATP 或いはその他の形の high energy bond-P はそれぞれの細胞の specific functional activity を遂行するための energy として消費されると同時に，細胞の正常な形態保持，即ち細胞膜の透過性を規定し，細胞の state of hydration を constant に保つ目的にも使用される事が知られている。

従来，脳腫脹の発生機序として何等かの原因により，所謂 Blood Brain Barrier (B. B. B.) の破綻が生じ，その結果異常な metabolite, 或いは正常範囲を越えた多量の electrolyte 或いは水が血液から脳実質へ侵入し，かくして脳腫脹が成立すると云う素朴な考えが支配的であつた。しかしながら最近の研究，殊に電子顕微鏡的研究を通じての知見からB. B. B. は決して物理的な障壁として存在するものではなく，又その所在を単一の anatomical entity に求むべき性質のものではない事が明らかにされた[14)23)38)]。更にB. B. B. の成立の脳の代謝と深い関係を持つ事も示された[14)17)]。

本研究においても脳腫脹なる現象を脳の代謝との関連において把握せんと企てた。特に細胞の膜機能の破綻が脳腫脹の発生に通ずるものではないかとの見地から，これを証明せんとしたのが本研究の目的である。

Burck によれば in vitro の状態で細胞が障害なく代謝を続けるためには，

1) 生理的な osmoregulation 保持のために，溶液中に質量ともに充分な electrolyte を含むこと。
2) energy 産生のための基質の供給。
3) 基質の需要のための酸素。
4) 組織呼吸に要する種々のイオンの存在。
5) 一定のpHを維持するための buffer system.
6) 酵素の正常な機能に必要な適当な温度。
7) slice への基質の一定の transport のための攪拌機構。

等の条件がみたされる必要があると述べている[3)]。

実際に脳以外の組織，例えば diaphragm muscle 等の incubation study では上述の条件がみたされれば組織は数時間にわたり，ほぼ in vivo の状態に近い呼吸，代謝を営み，形態も殆ど正常に保たれる事が知られている[5)]。

ところが incubated brain slice は好適な条件が与えられた時でさえ，その代謝は異常に低下し，組織の swelling は避けがたいとされている。in vitro におかれた brain slice の呼吸は，先に Burck の述べた様な条件が与えられた時でさえ，in vivo の状態の半分にまで低下しており[26)27)]，もし in vivo でこれと同程度に呼吸機能が低下すれば，動物（人間）は深い意識障害を来すとされている[9)16)]。incubated slice のこの様な呼吸低下は必然的に energy 産生機構の破綻を結果

し，従つて細胞の形態保持の機構にも重大な障害が起こるであろうことは想像に難くない．この問題に関連し，協同研究者小沢の行なつた研究結果は非常に興味深い．彼は rubber balloon による cerebral compression で猫に cerebral swelling を作製し，腫脹脳の mitochondrial fraction を超遠心分離法により分画し，その oxidative phosphorylation の状態を検討した．その結果，腫脹脳の mitochondria の ATP formation は control の半分以下に減少し，O_2 consumption の低下は更に一層顕著であつた事を発見した．即ち腫脹脳における mitochondria の biological function の低下がはつきり認められた訳である[15)28)29)]．(Fig. 18)

Medium に何等 substrate を添加しない等張 Krebs-Ringer's solution に brain slice を incubate した場合に起つた glia の腫脹は組織にその energy source が供給されていないという点から容易に理解される．Elliott も同様の medium に brain slice を incubate し，aerobic の状態でも anaerobic の条件下でも，腫脹の起こることを報告している[6)]．Gerschenfeld も本実験で得られたものと同様の電子顕微鏡所見を得ている[10)]．

Substrate 添加の medium への incubation では，Elliott はaerobic condition に限り，glutamate 添加 Krebs-Ringer's solution が incubated slice の swelling をある程度防止し得ることを報告している[6)]．本実験では勿論，定量的測定が行なわれた訳ではなく，はつきりしたことはいえないが glutamate の添加は余り効果がなく，glucose 11 mM を添加した Krebs-Ringer's solution に brain slice を incubate した場合に glia 細胞の腫脹が若干防止され得るかの様な所見を得た．即ちこの場合でもかなりの腫脹は証明されるが，substrate を含まぬ medium への incubation で認められた glia 細胞の最大限の腫脹はここでは見られず，細胞膜の連続性もよく保たれていた．(Fig. 5)

これ等の所見は恐らく incubated slice が medium に添加された glucose, glutamate の様な基質をある程度酸化し，不十分ながら energy も産生され，正常な形態保持の目的に利用されている事を示唆する．

次いで glucose 添加 Krebs-Ringer's solution に ATP 2 mM を添加した所謂 ATP reinforced medium において incubate された brain slice は少なくとも20分間程度の期間では大した腫脹を起さない．(Fig. 6) この所見は非常に興味深い．特に incubated brain slice はもはや従来の意味における B.B.B. を持たず，脳組織の物質交換は直接組織周囲の medium との間に行なわれている事，しかも glia 細胞が正常な形態を保ち得るという点で非常に重要な所見であろう．添加された ATP が果して細胞膜を通過するか，通過するとすれば果して細胞のどの部分にどの様に働くかを分析することは非常に難かしい問題で，後でも一寸触れるが，とに角これが，直接にせよ，間接にせよ，glia 細胞の形態保持の方向に働き，腫脹を防止した事は事実である．

細胞が concentration gradient に抗してイオンその他の物質を細胞膜を介して細胞内にとり込み，又は細胞外に排出する現象を active transport と呼ぶ．例えば細胞は数倍，或は十数倍の濃度勾配に逆らつて細胞内に K をとり入れ，Na を細胞外に出すが，この現象には energy の消費を伴なつた "pump" の存在が要求される．Gordos は人間の erythrocyte 内への K-accumulation には ATP の要求されることを主張し[11)]，また Caldwell は冷血動物の神経線維を使つた実験から，細胞内から外に向つての Na の transport，即ち "sodium pump" の機構には energy rich phosphate ester，恐らく ATP 及び arginine phosphate の関与するであろう事を示唆した[4)]．Post 等は cell membrane に ATP splitting enzyme，即ち ATPase が存在し，この酵素による ATP の break down が Na 及び K の transport と直接 couple するとした[32)]．また Hokin 等は goose salt gland 及び erythrocyte membrane を使用した incubation study で ATP^{32} が medium に加えられると，membrane の phosphatidic acid に radioactive P^{32} がとり出されることを発見し，しかも posphatidic acid cycle が Na transport と密接な関係を持つと主張した[13)]．

以上の報告はいずれも ATP が細胞膜の active transport に energy 源として関与しているとした点で一致している．また medium に加えられた ATP が細胞膜にその作用点を持つであろうことも想像される．

この点に関連して ATP reinforced medium に uncoupler である 2,4-dinitrophenol (0.2 mM) を加え，20分間 incubate した brain slice の電子顕微鏡所見 (Fig. 8) は興味深い．ここでは正常の metabolic route を経ての ATP synthesis は殆ど DNP の uncoupling effect によつて block されており，membrane の active transport に使用されるべき energy はごく少量の cytoplasmic ATP と medium に添加された exogeneous ATP のみである．Fig. 8 に見られるようにglia 細胞の腫脹をよく防止し得るはずの ATP rein-

forced medium も DNP の添加により再びかなりの程度の腫脹を示すことがわかる。もつともこの際にも最大限の腫脹は認められない。

以上の所見から明らかなことは，in vitro の条件下で incubate された brain slice は細胞の代謝過程を通じて生成される endogeneous ATP だけでも，また外から medium へ与えられた exogeneous ATP のみでも，glia 細胞の腫脹を防ぐにたる充分な energy を供給し得ないという事，更にその両者が相加わつて始めて正常の形態が保持し得るという事がわかる。

Incubated brain slice に投与された uncoupler が glia 胞体の腫脹を助長する事実はかくして証明された訳であるが，一体 in vivo の状態である条件下において細胞内に uncoupling effect を持つ物質が生成され，これが mitochondria の ATP formation を阻害し，その結果，脳腫脹を起こすという可能性は考えられないであろうか。

Lehninger 等は rat の liver mitochondria について行なつた研究から，mitochondria の腫脹を起こす様な種々の操作を加えると，intramitochondrial に代謝過程を通じて共通の物質，即ち U-facter の生成される事を発見し，その抽出に成功した。彼等は U-facter は恐らく不飽和脂肪酸の一種であろうと考えており，またこの物質が oxidative phosphorylation に対し，著明な uncoupling effect を示す事も発見した[18)21)]。

小沢もまた脳において同様な実験を行ない，脳腫脹時，脳の mitochondria に U-facter 類似の作用を持つ物質の生成される事を見出し検索を続けている[28)29)]。しかしながら先にも述べた様に，(Fig. 18)，in vitro の実験で得られた腫脹脳の mitochondria は単にその ATP formation が障害されているだけでなく，O_2 consumption も同程度，或はむしろそれ以上に著明に低下しており，oxidative phosphorylation の uncoupling だけが起つているとは考えられない。即ちこの所見に関する限り脳腫脹の成立を単に uncoupling agent の作用に帰することは困難な様である。

Medium に加えられた exogeneous ATP のみでは glia 細胞の腫脹を防止するに充分でないという事実は次の二つの所見においても示されている。即ち brain slice を40分間 ATP reinforced medium に incubate した場合，或はまた glucose 添加 Krebs-Ringer's solution に先ず20分間 incubate し，次いで ATP reinforced medium に移し，ここで更に20分間 incubate した場合の brain slice の電顕像（Fig. 9 & 10）は何れも glia 胞体の中等度の腫脹を示している。しかもその程度は ATP reinforced medium に DNP を加えた medium に incubate された brain slice のそれに匹敵する。即ち長時間の incubation によつて endogeneous ATP が exhaust され，更に mitochondria の機能低下のため，新たな ATP formation が期待できなくなつた状態において exogeneous ATP が与えられても，それだけでは正常な形態保持に必要且つ充分な energy を供給し得ないという事を示している。何れにせよすでに一度 glia の腫脹が発生した後からでは ATP を外から投与しても，腫脹を reverse し得ないという事実は，脳腫脹治療の面から考えれば，甚だ不都合な事であり，何か他の補助手段が求められなければならない。

Polis は caffeine 及びその related compounds 即ち，xanthine, hypoxanthine の様な purine 基をもつ物質が pentothal や DNP によつて障害された mitochondria の oxidative phosphorylation を著明に恢復せしむること，しかも phosphorylation の reactivation は system 内の ATP 含量が少ない時に一層著明であることを報告した[31)]。

その作用機序は充分明らかでないが，元来細胞内の phosphate transfer は主に ADP, ATP の様な adenylate system を通じて行なわれるとされているが，何らかの原因でこの adenylate mechanism が阻害されると purine base を持つ物質，即ち caffeine, xanthine, hypoxanthine の様な物質がかわりに -P acceptor として働き，丁度 creatine phosphate の様に adenylate system の reservoir として，或は substitute として働くのではないかと彼は仮定した。

そこで先ず Krebs-Ringer's solution with glucose 11 mM の中で brain slice を20分間 incubate する。この条件では glia の腫脹が起こることは知られており，またこの時点において ATP を添加してもその腫脹は reverse し得ないことも判明している。さて今度はこの preincubated brain slice を ATP reinforced medium に xanthine 0.45 mM を添加した medium に移し，ここで更に20分間 incubate した後，組織を電子顕微鏡で見ると Fig. 11 に示された様に，一度発生した組織の腫脹が再び reverse される事を知つた。この所見は Polis の生化学的知見とかなりよく一致し，また glia 細胞の腫脹の発生の機序に関し，或る解答を与えたものと思われる。

また本実験で得られた知見は in vivo の状態におけ

る脳腫脹の治療にかなりの指針を与えるもので，この線に沿つた動物実験の結果は，一部既本によつてすでに報告されている[34]．

総括及び結語

adult rat brain の cortex slice を用い，in vitro の条件下で種々の medihm に incubate し，これを電子顕微鏡的に観察した結果，次の様な所見を得た．

1) 等張 Krebs-Ringer's solution に brain slice を incubate すると20分間で非常に高度の glia 細胞の腫脹と mitochondria の種々の退行性変化が証明された．しかもこの変化は in vivo の条件下で起こした brain swelling の電子顕微鏡所見と殆ど identical であつた．

2) Krebs-Ringer's solution に基質として glucose, glutamate を加え，同じ条件で20分間 incubate しても glia 細胞の腫脹は防ぎ得なかつた．ただ glucose を加えた Krebs-Ringer's solution での incubation において腫脹の程度が若干軽減される傾向が見られた．

3) glucose 添加 Krebs-Ringer's solution にさらに ATP を添加し，brain slice を incubate すると20分間では殆ど glia 細胞の腫脹が防止され，40分間では中等度の腫脹を見た．

4) glucose 添加 Krebs-Ringer's solution に20分間，brain slice を preincubate して glia の腫脹を発生させ，更に ATP reinforced medium に次の20分間 incubate した場合は組織の腫脹は reverse されない．

これに対し，同じく先ず20分間の preincubation の後，slice が ATP reinforced medium with xanthine の溶液内で20分間 incubate された場合には，一度発生した glia 細胞の腫脹が reverse される所見が得られた．

以上の所見を基に，glia 細胞の代謝異常と腫脹の発生との関連を種々の角度から検討したが，細胞の正常な形態保持に必要な energy は主に mitochondria において代謝過程を通じて生成される ATP によつて補給される様で，障害された細胞の oxidative phosphorylation を是正する手段を用いる事により，細胞の腫脹もある程度 reverse される事を知つた．

Medium に与えられた ATP の作用についても論じた．

稿を終るに臨み，終始御懇篤な御指導を賜りました，石井昌三講師に深甚なる感謝の意を表します．

文　献

1) Allen, J. N.: Extracellular space in central nervous system. Arch. Neurol. & Psychiat. **73**: 241, 1955.

*2) Azuma, N.: Modern applied electron microscopy. Nagai, Osaka 1957.

3) Burck, H.: Tissue slices, incubation fluid, electrolyte content and water balance.: Measurement tranceport and metabolism. ed. by Kleinzellen & Kotyk. Academic Press. 579, 1960.

4) Caldwell, P. C. and Keynes, R. D.: The utilization of phosphate bond energy for sodium extrusion from giant axons.; J. Physiol. **156**: 271, 1957.

5) Del Monte, U.: Active transport and metabolism in rat diaphragm in vitro.: Biochm. et Biophys Acta. **49**: 431, 1961.

6) Elliott, K. A C.: Swelling of brain slices and permeability of brain cell to glucose.. Proc. Soc. Exp. & Med. **41**: 231, 1962.

7) Elliott, K. A. C.: Measurement of experimentally induced brain swelling and shrinkage.: Can. J. Biochem. & Physiol. **33**: 966, 1956.

8) Ellott, K. A. C. et al.: Brain tissue respiration and glycolysis. Neurochemistry: ed. by Elliott & Quastel. Thomas springfield, Illinois, 177, 1963.

9) Geiger, A.. Correlation of brain metabolism and function by the use of a brain perfusion in situ.: Physiol. Rev. **38**: 1, 1958.

10) Gerschenfeld, H. M. et al.. Function of astroglia in the water ion metabolism of the central nervous system. Neurology. **9**: 129, 1959.

11) Gordos, G.: Infusion of Ca. in the regulation of ion transport. Membrane transport & Metabolism. Academic Press. 553, 1960.

12) Green, D. E.. The mitochondrion.: Scient. Amer. **210**: 63, 1964.

13) Hokin, M. R. and Hokin, L. E.. Further evidence for phosphatidic acid as tha Na carrier.: Nature. **190**: 1016, 1961.

14) Ishii, S. and Tani, E: Electron microscopic studies on blood brain barrier in cerebral swell-

ings.: Acta Neuropathol. **1**: 471, 1962.

15) Ishi, S. et al.: Studies of cerebral swelling II. Experimental cerebral swelling produced by supratentorial extradural compression. J. Neurosurg. **16**: 152, 1959.

16) Kety, S. S. et al.: Recent studies of cerebral blood flow and cerebral metabolism in man.: Federation Proc. 1948.

17) Lajtha, A. The brain barrier syrtem.. Neurochemistry. ed. by Eliott & Quastel. Thomas. Springfield, Illinois. 899, 1962.

18) Lehninger, A. L. and Wadkins, C. L.: Oxidative phosphorylation. Ann Rev. Biochem. **31**: 47, 1962.

19) Lehninger, A. L.: How cell transform energy.: Scient. Amer. **205**: 50, 1961.

20) Lehninger, A. L.: Respiratory chain phosphorylation, experimental observation.. Mitochondrion. Benjamin, New York 87, 1964.

21) Lehninger, A. L.: Energy coupled chanjes of volume and structuer. Mitochondrion. Bengamin, New York **180**, 1964.

22) Luft, J. H.: Improvement in epoxy resin embedding methods. J. B. B. C. **9**: 409, 1961.

23) Luse, S. A and Harris, B.: Electron microscopy of the brain experimental edema.: J. Neurosurg, **17**: 439, 1960.

24) Luse, S. A. and Harris, B.: Brain ultrastructure in hydration and dehydration.: Arch. of Neurol. **4**: 139, 1961.

25) Luse, S. A: Ultrastructure of the brain and it's relation to transport of metabolites.. Ultrastructure and metabolism of the nervous system.: Williams & Wilkins. 1, 1962.

26) McIlwain, H.: Maintainance of resting membrane potentials in slices of mammalian cerebral cortex and other tissue in vitro. J. Physiol. **139**: 178, 1958.

27) McIlwain, H.: Glucose level, metabolism and response to electrical impulses in cerebral tissues from man and laboratory animals. Biochem. J. **55**: 618, 1953.

*28) Ozawa, K. et al.: Biochemical studies on brain injuly.: Proc. Symp. on Chem. Physiol. & Pathol. **3**: 173, 1963.

*29) Ozawa, K. et al.: Biochemistey of brain injury.: Rec. Adv. in Research of the Nervous System. **7**: 128, 1963.

30) Pease, D. C.: Electron microscopical techniques. 1955.

31) Polis, B. D.: Studies on rate controlling factors in oxidative phosphorylation.: Regional Neurochemistry. ed. by Kety & Elkes. Pergamon Press. **37**: 1961.

32) Post, R. L. et al.: Membrane adenosine triphosohate as participant in the active transport of potassium in the human erythrocyte. J. Biol. Chem. **235**: 1796, 1960.

33) Quastel, J. H.: Carbohydrate metabolism in rat cerebral cortex in vitro and effects of neurotropic agents.. Ultrastructure and metabolism of the nervous system. Williams & Wilkins. **57**: 1960.

*34) Sakamoto, K.: Studies on the cerebral hemodynamics after an experimental head injury and it's treatment, with reference to the role of a therapeutic hypothermia and an attempt at using the new medical mixture which contains the nucleotides-delivatives. Arch. für Japan. Chirurg. **32**: 770, 1963.

35) Stern, S. R.: Accumulation of glutamic acid in isolated brain tissue.: Biochem. J. **44**: 410, 1949.

*36) Takagaki, G. et al.: Carbohydrate metabolism of brain. Protein, Nucleic acid, Enzyme. **7**: 61, 1962.

37) Tanaka, R. and Abood, G.: Relationship of structure to phosphorylative activity in rat brain mitochondria.: J. Neurochem. **10**: 7, 1963.

38) Tani, E.: Electron microscopic study on pathogenesis of cerebral edema in the white matter.: Arch. für Japan. Chirurg. **33**: 469, 1964.

39) Tuena, M. et al. Studies on adenosine triphosphatase and adenosioe triphosphate exchange reaction in brain mitochondria and efffect on 2, 4,-dinitrophenol.: J. Neurochem. **11**: 521, 1964.

40) White, A. et al.: Biological oxidation. Priniople of Neurochemistry ed. by White et al. McGraw Hill.: 358, 1959.

(* : written in Japanese)

Krebs-Ringer's Solution
buffered with Tris

0.90%	NaCl	(0.154 M)	100 ml
1.15%	KCl	(0.154 M)	4 ml
1.22%	$CaCl_2$	(0.110 M)	3 ml
2.11%	KH_2PO_4	(0.154 M)	1 ml
3.82%	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	(0.154 M)	1 ml
add	Tris	0.05M PH(7.4)	12 ml

Fig. 1 Incubation medium

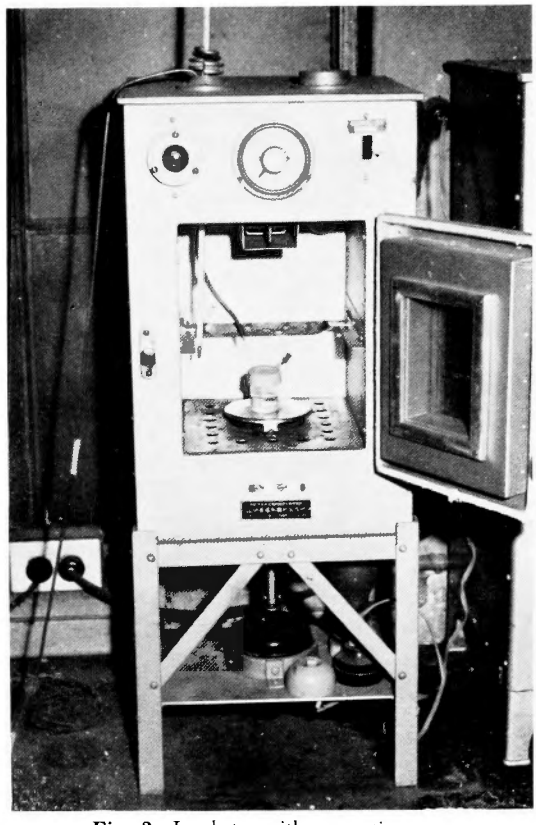

Fig. 2 Incubater with magnetic stirrer

Fig. 3 Incubation in the Krebs-Ringer's solution buffered with Tris for 20 min.
Mag. ×6,000

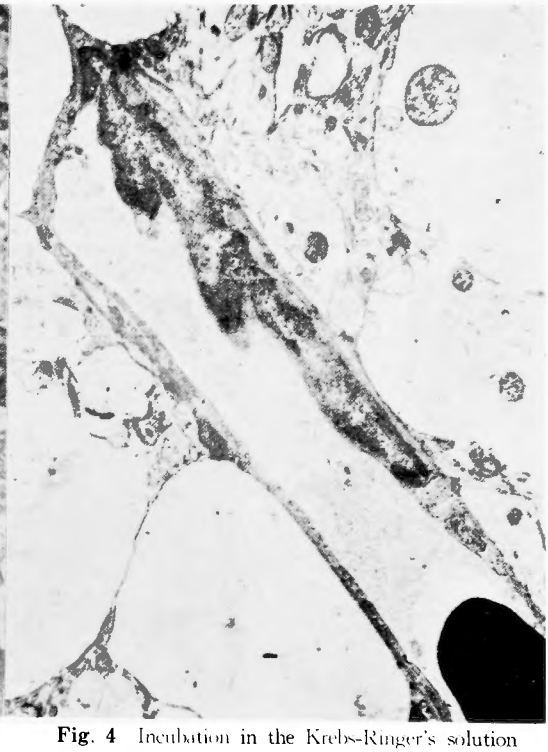

Fig. 4 Incubation in the Krebs-Ringer's solution buffered with phosphate for 20 min.
Mag. ×6,000

Fig. 5 Incubation in the Krebs-Ringer's solution with glucose 11 mM for 20 min.

Mag. ×6,000

Fig. 6 Incubation in the Krebs-Ringer's solution with glutamate 20 mM for 20 min.

Mag. ×6,000

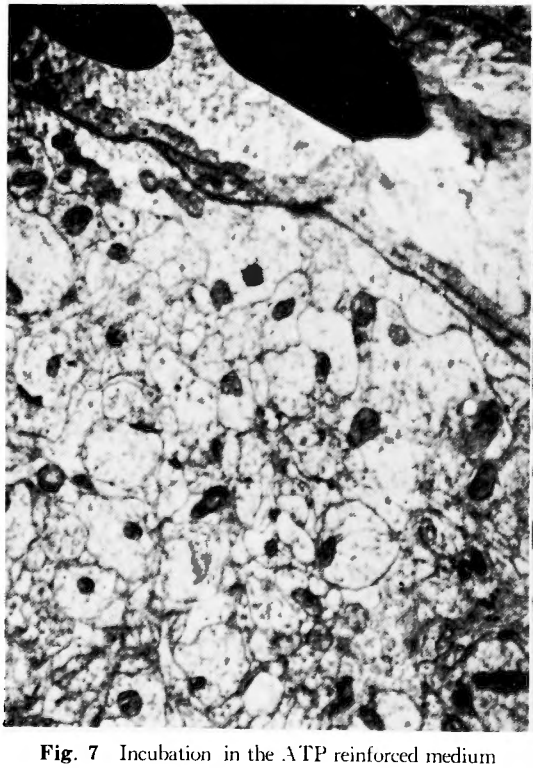

Fig. 7 Incubation in the ATP reinforced medium for 20 min.

Mag. ×6,000

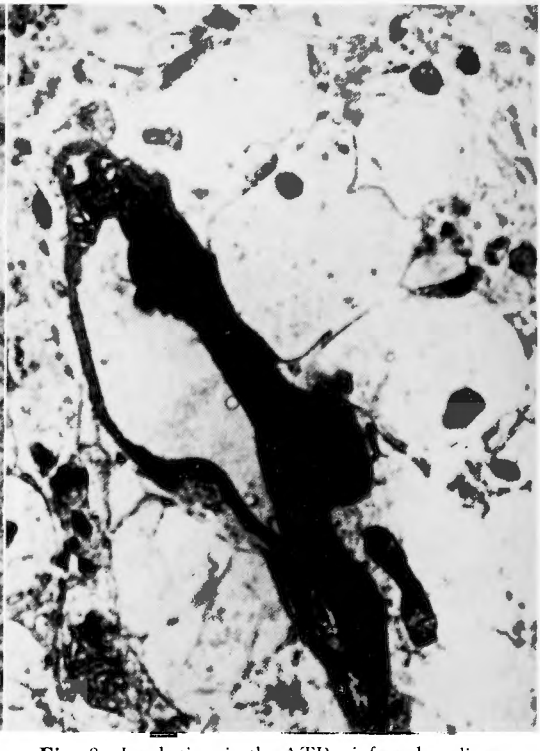

Fig. 8 Incubation in the ATP reinforced medium with 2, 4-DNP for 20 min.

Mag. ×5,000

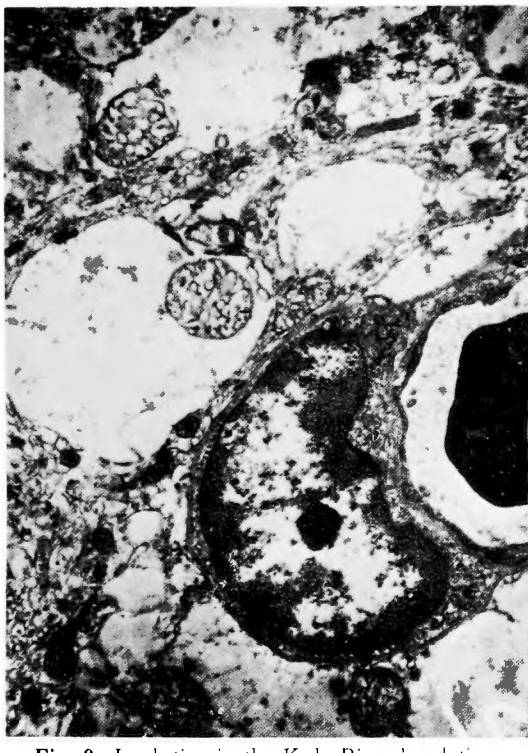

Fig. 9 Incubation in the Krebs-Ringer's solution with glucose (20′), transfered later to the ATP reinforced medium (20′) Mag. ×8,000

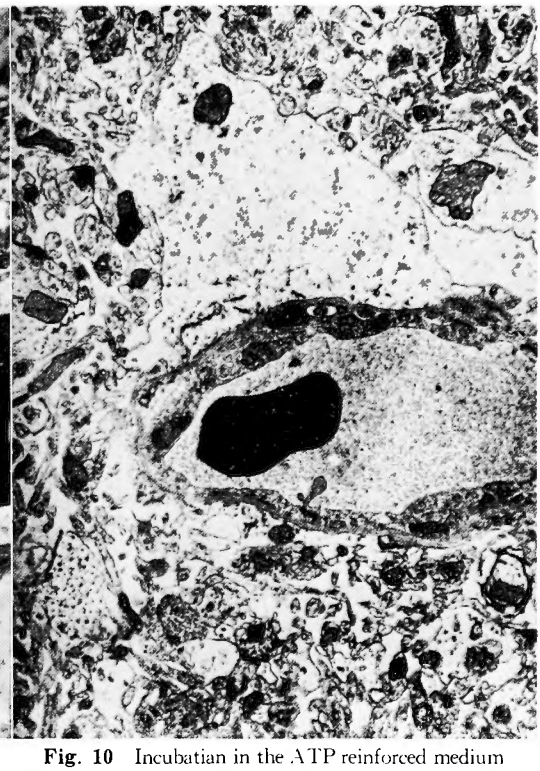

Fig. 10 Incubatian in the ATP reinforced medium for 40 min.

Mag. ×8,000

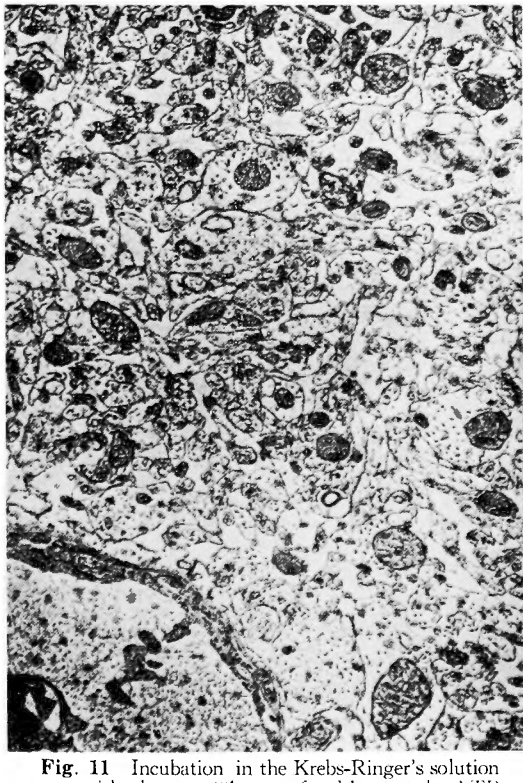

Fig. 11 Incubation in the Krebs-Ringer's solution with glucose (20′), transfered later to the ATP reinforced medium with xanthine (20′)

Mag. ×9,000

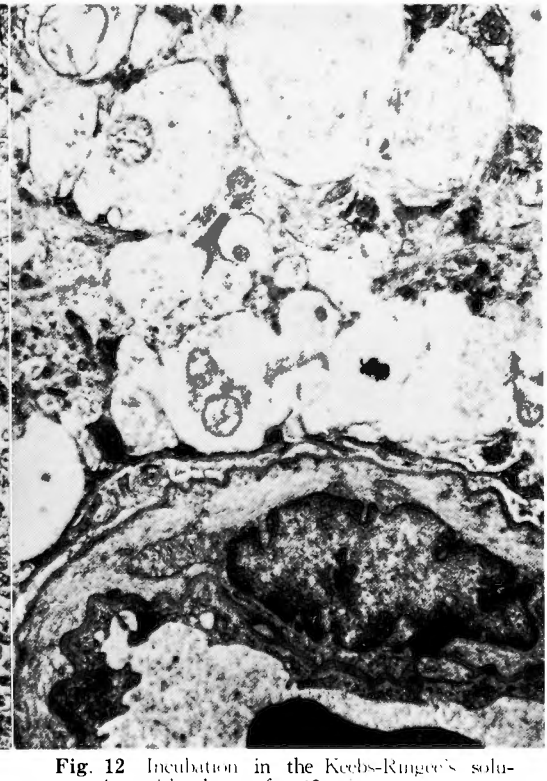

Fig. 12 Incubation in the Krebs-Ringer's solution with glucose for 40 min.

Mag. ×6,000

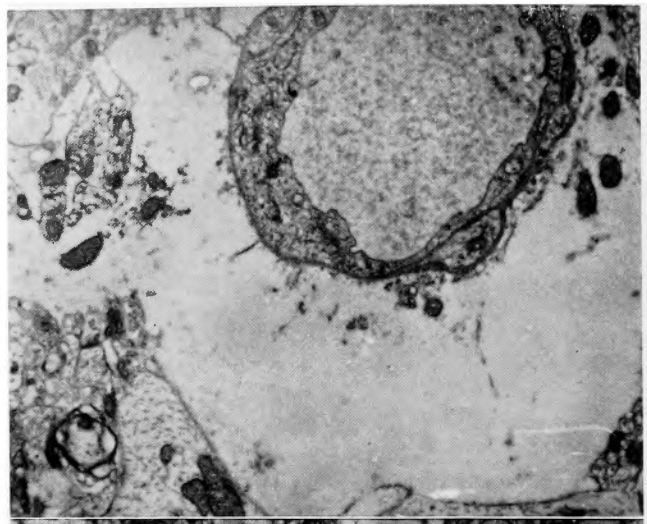

Fig. 13 Cerebral compression
Mag. ×10,000

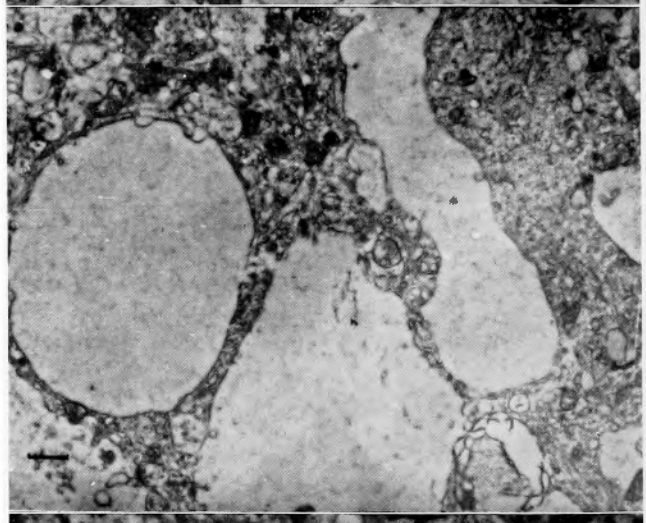

Fig. 14 Cerebral infarction
Mag. ×6,000

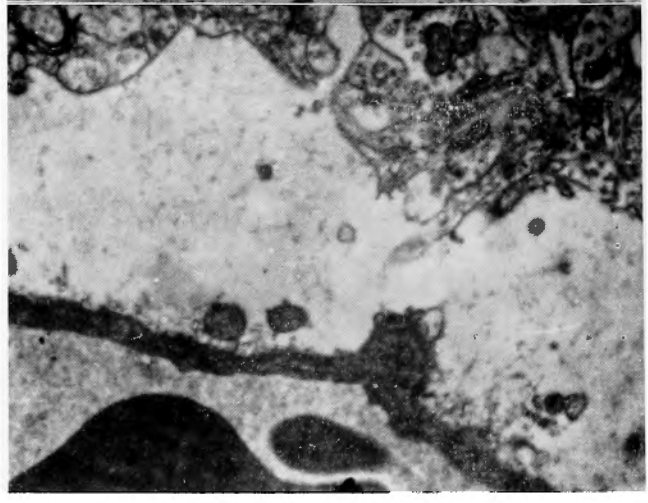

Fig. 15 Venous congestion
Mag. ×10,000

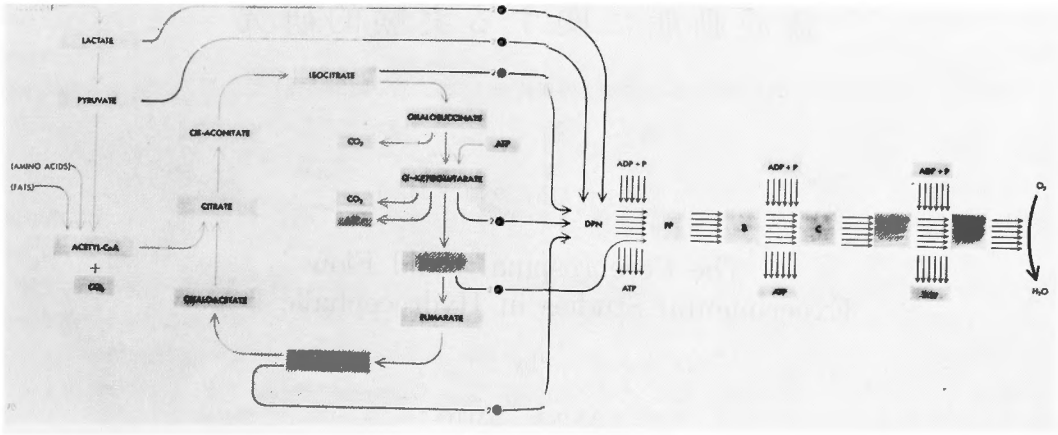

Fig. 16 Oxidative phosphorylation

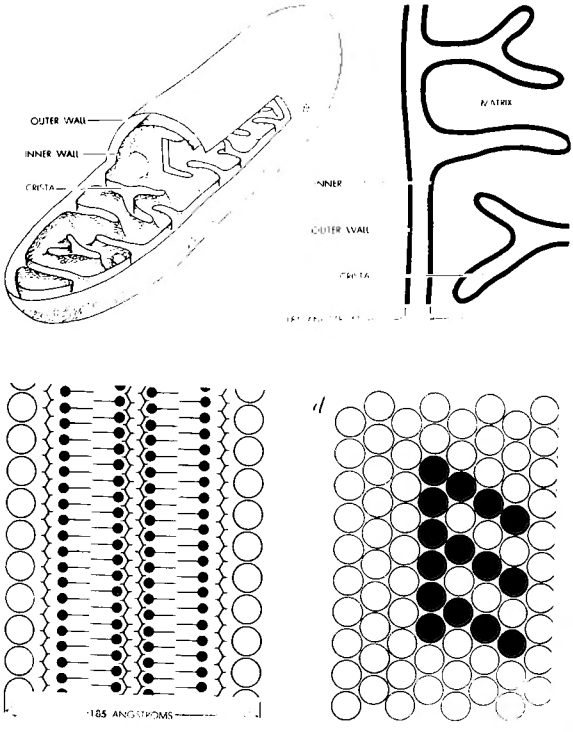

Fig. 17 Mitochondria

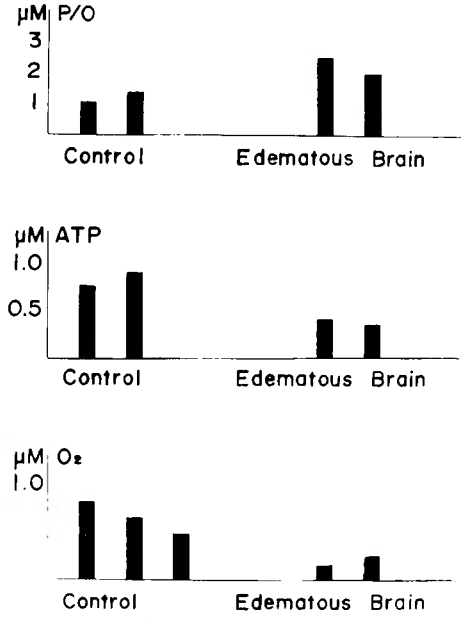

Fig. 18 Biological function of mitochondria in cerebral swelling