

実験的脳虚血急性期における脳局所病態変化
—多重指標組織化学的検索—

京都大学医学部脳神経外科学教室 (指導: 半田 肇教授)

金 秀 浩

〔原稿受付: 昭和60年7月30日〕

Regional Assessment of Pathophysiological Changes
in Acute Cerebral Ischemia:
Multiparametric Histochemical Study

SOO-HO KIM

Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Kyoto University
(Director: Prof. Dr. HAJIME HANDA)

Regional changes of histochemical multiparameters including brain mitochondrial redox state (NADH), ATP content, tissue pH (pH), tissue potassium (K^+) and brain dopamine nerve terminals (DA) in the caudate nucleus were assessed in a various degree of experimental acute cerebral ischemia. Ischemia was produced by permanent or transient occlusion of the left common carotid artery for various duration in normally fed mongolian gerbils. The degree of ischemia was evaluated by the severity of neurological symptoms, and animals were classified into three groups; symptomatic, borderline and asymptomatic.

The changes of each parameters on the ligated side were well corresponded to the degree of ischemia. However, regional differences were observed among these parameters. In 5 minutes and 60 minutes of occlusion, there were three different types of ischemic changes; (1) acidosis with marked increase of NADH and depletion of ATP, (2) acidosis with mild increase of NADH and no depletion of ATP, (3) acidosis without changes of NADH and ATP. Acidosis extended wider than areas of NADH and ATP changes. These differences might be caused by facilitated anaerobic glycolysis in acute stage of ischemia. In 180 minutes occlusion of symptomatic gerbils on the other hand, the acidotic area was almost consistent with the areas of NADH and ATP changes with marked depletion of tissue K^+ . The results might indicate that mild ischemic changes of energy metabolism were exacerbated by brain edema in symptomatic group in spite

Key words: Heterogeneity, Histochemical study, Incomplete ischemia, Gerbil brain, Multiparameter.

索引語: 不均一性, 組織化学的検索, 不完全脳虚血, 砂ネズミ脳, 多重指標.

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

of recovery in borderline group.

In transient ischemia, symptoms and changes of parameters recovered with residual acidosis in 60 minutes reperfusion after 60 minutes of ischemic insult. On the other hand the black area on NADH fluorescence was noted with depletion of ATP and tissue K^+ and persistent acidosis in the hippocampus, thalamus and caudate nucleus in 60 minutes of reperfusion after 180 minutes of ischemic insult. These tissue damage and disturbance of energy metabolism might be related to the postischemic hyperoxidation.

DA fluorescence in the caudate nucleus on the ligated side decreased heterogeneously in acute stage of ischemia. Preservation of DA fluorescence was noted around the small vessels with thick walls, probably arterioles. The heterogeneity was more apparent in borderline group of 60 minutes occlusion and in 5 minutes occlusion of the symptomatic group. This heterogeneity of DA might be due to the difference of perfusion pressure at the microcirculation in the acute stage of incomplete cerebral ischemia.

The present study indicates the importance of multiparametric regional study to elucidate the pathophysiology of acute cerebral ischemia.

I. はじめに

脳組織の単位重量あたりの血流量と酸素消費量は他の諸臓器よりも多く、血流量は心拍出量の15%、酸素消費量は全身の20%にも達する⁵²⁾。脳はこのような豊富な血流により供給されたグルコースと酸素を消費し、解糖系-TCA サイクル-電子伝達系という一連の経路を介して酸化的リン酸化を行ない、エネルギー源としてのATPを生成している。このエネルギー源は、主に生体膜内外における Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{++} などの電解質輸送に利用され、膜内外の恒常性が維持されている。その他には、神経情報伝達機構や組織構造物質の合成、軸索輸送を行なうために消費されている⁵⁴⁾。エネルギーを多量に必要とする反面、脳組織はエネルギーの予備が少なく、また栄養血管である毛細血管の分布に乏しい⁴⁵⁾という臓器特異性を有する。従って、脳は恒常的な血流の供給に対する依存性が高く、虚血に対して極めて脆弱な組織である。

脳虚血がおこると、グルコースと酸素の供給が途絶あるいは減少し、ATPが急速に減少する⁴⁰⁾ために、エネルギー依存性の各種機能は障害される。すなわち、神経細胞内外の電解質異常^{19,55)}、生体膜をはじめとする組織構造物の分解や合成障害、神経情報伝達及び情報伝達物質の障害^{4,50)}、乳酸蓄積による組織acidosis^{3,47,51)}、あるいは遊離脂肪酸の蓄積⁴⁴⁾、といったさまざまな現象の生じることがこれまでの病態生理、生化学的検索

により知られている。また虚血からの回復には血流の再開が不可欠であるが、この場合には postischemic hypoperfusion⁴⁶⁾、postischemic edema²²⁾ 過酸化による

free radicalの生成¹³⁾、などの変化が報告されている。虚血中及び血流再開後に生じる以上のような変化が非可逆性組織障害の要因となることが推測されており、脳虚血の病態を理解する上で重要な指標となる。しかし、これらの病態生理・生化学的变化は血流減少の程度、虚血巣の部位や広がり、側副血行の程度や虚血時間により異なり、互いに複雑に絡み合っていると考えられる。さらに脳は解剖学的に、また血流やエネルギー代謝の面でも不均一な組織であり^{14,27,38)}、臨床で大部分を占める不完全脳虚血の場合は特に病態の局所による不均一性が顕著になると考えられる。このことは脳虚血の病態を理解する上で障害となり、従来の生化学定量的方法が重要であるにもかかわらず、これのみでは不十分であるといわざるをえない。また最近、ischemic penumbra¹¹⁾ や selective vulnerability⁵⁵⁾ などの脳虚血時の局所による特異的病態が注目されるようになり、脳虚血の局所病態変化を検索することは極めて重要且つ不可欠と考えられる。

以上の観点から、種々の程度の不完全脳虚血の急性期と血流再開早期での、脳局所におけるミトコンドリア酸化還元状態、エネルギー代謝、組織pH、組織カリウムイオン、脳内カテコールアミンの変化と相関を調べる目的で、一連の各種組織化学的多重指標による

実験的検索をおこなった。

II. 実験方法 (Fig. 1)

1. 実験的脳虚血の作成

動物は体重 50—80 g, 雌雄の Mongolian gerbil (Meriones unguiculatus) を用い, 実験直前まで食餌と水を自由に摂取させた。エーテルによる浅麻酔後, 手術用顕微鏡下に左総頸動脈を剥離し 8—0 ナイロン糸で二重結紮した。

総頸動脈の閉塞時間は 5 分, 60分, 180分とし, 各々に 13匹, 42匹, 21匹の gerbil を用いた。

閉塞60分例と180分例では, 麻酔覚醒後の神経症状²⁵⁾を観察しその程度から以下に記載する如く 3 群に分類した^{1, 28, 30)}

1) Symptomatic group: 片麻痺・回転性歩行・体

軸の回旋屈曲・rolling fits・hopping などの明らかな神経症状が出現し, 持続した群。

2) Borderline group: 回転性歩行や体軸の回旋屈曲が一過性に出現し30分以内に消失したか, あるいは活動性がわずかに低下したが明らかな神経症状を示さなかった群。

3) Asymptomatic group: 神経症状を全く示さなかった群。

神経症状観察後再びエーテル浅麻酔を施し, 総頸動脈結紮60分後と180分後の各時点で頭頂部に固定した funnel cup から液化窒素を注ぎ in situ brain freezing を行なった⁴⁸⁾

閉塞5分例では, 神経症状の観察は行わず, 結紮5分後に in situ freezing を開始した。

次に, 凍結脳を液化窒素で冷却しながら電動鋸で冠

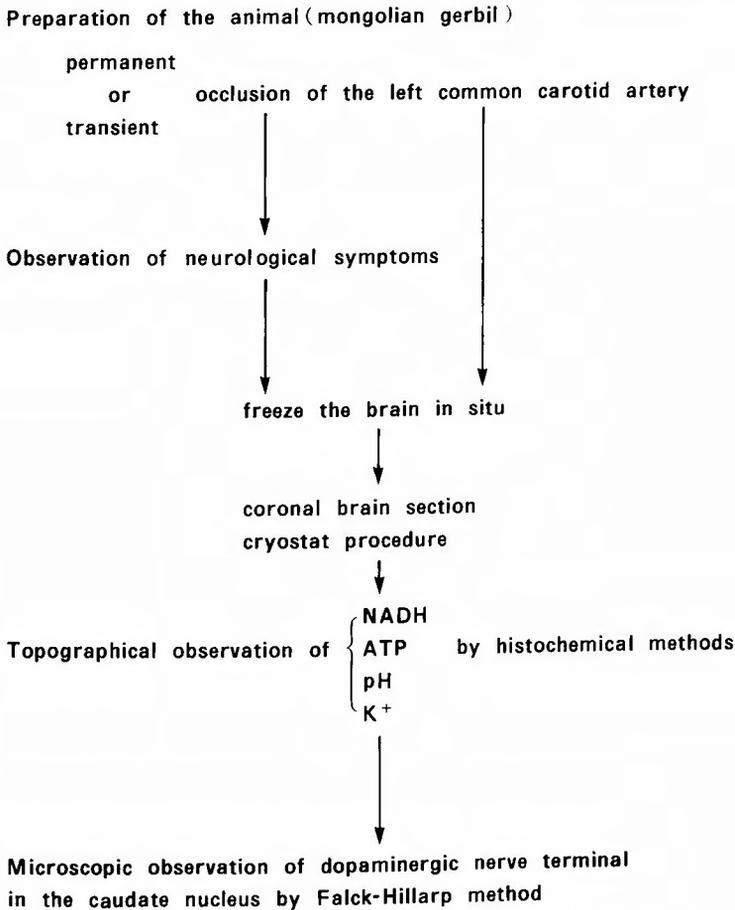


Fig. 1. Flow chart of the experimental procedure

状断し、一連の各種組織化学的方法による観察を行なった。

尚、各々の閉塞時間例につき3匹ずつの gerbil を用い、総頸動脈の剝離のみを行ない5分、60分、180分後に in situ brain freezing し、これを対照群とした。

2. NADH 蛍光局所分布²⁹⁾

液化窒素内で凍結脳ブロック冠状断面に紫外線(366 nm)を励起照射し、NADH 蛍光(460 nm)の局所分布を写真撮影で記録し観察した。紫外線用の光源は水銀ランプ(HBO 100 W/2, Carl Zeiss)、一次フィルターは Corning 5840 を使用し、NADH 蛍光用の2次フィルターは Corniong 3387, 5562 を使用した。また紫外線(366 nm)の吸収像も同時に記録し、NADH 蛍光に対するヘモグロビンの干渉を観察した。写真撮影はニコン FE, Mediar Nikkor, Kodak technical pan film 2415 を使用し、一定条件下³⁰⁾で行なった。

3. ATP の局所分布

NADH 蛍光を観察した後、luciferine-luciferase 法³²⁾により ATP の分布を定性的に観察した。Cryostat (American Optical Co.)にて凍結脳切片を薄切し(16 μ m)、固定液(80% absolute ethanol, 10% formaldehyde solution, 10% dioxane)に浸透し乾燥させた後、60 μ m の luciferine-luciferase (Firefly Lantern Extract, Sigma Chemical)凍結切片を載せ反応させた。ATP の存在により発生した蛍光を Kodak Tri-X pan film に直接感光させることにより記録した³⁰⁾。

4. 組織 pH

脳局所の組織 pH は umbelliferone 法^{8), 11), 57), 60)}により半定量的に判定した³⁰⁾。あらかじめ umbelliferone (7-hydroxycoumarin 東京化成工業)で飽和させたセルロースアセテート膜 (Macherey Nagel GmbH Co.)に凍結脳切片(16 μ m)を載せ、紫外線(366 nm)で励起し umbelliferone 蛍光(460 nm)を写真撮影により記録し観察した。光源、1次及び2次フィルター、カメラ、レンズ、フィルムは、NADH 蛍光と同じものを用いた。pH 値の標準は既知 pH のリン酸緩衝液(98% 0.1M phosphate buffer, 2% gelatin, pH 6.0-7.4)の凍結切片により作成した³⁰⁾。

5. 組織 K⁺ イオンの分布

脳組織 K⁺ イオンの局所分布は亜硝酸コバルトナトリウム法⁴¹⁾に準じた方法により、定性的に観察した。薄切凍結脳切片(16 μ m)を亜硝酸コバルトナトリウム

溶液中で20分間反応させ、水洗後多硫化アンモニウム希釈液に1分間浸漬し硫化させた。バルサム封入を行ない、黒褐色沈殿物として検出された K⁺ イオンの分布を白色透過光で撮影記録し、定性的に観察した。尚、組織 K⁺ イオン局所分布の観察は総頸動脈閉塞60分例と180分例について行なった。

6. 脳内カテコールアミン (CA) の蛍光組織化学

以上の組織化学的検索を行なった後、凍結脳ブロックを真空凍結乾燥し、Falck-Hillarp 法⁴⁰⁾に準じて脳内カテコールアミン神経終末の蛍光を観察した。本研究では、特に CA 神経終末の局所の変化を調べる目的に適した部位すなわち caudate nucleus のドパミン (DA) 神経終末の変化について検索した。

7. 組織学的検索

ATP 組織化学で固定した脳切片と、CA 蛍光組織化学でパラフィン包埋した切片の一部に toluidine blue 染色を施し、組織学的変化を観察した。

8. 局所脳血流量 (rCBF)

以上の実験とは別に60分閉塞例の Symptomatic group 2匹、Borderline group 2匹、Asymptomatic group 1匹において autoradiography による rCBF の測定を行なった。左総頸動脈結紮後の神経症状を観察し、屠殺1分前に ¹⁴C-antipyrine 7.5 μ Ci/0.1 ml、あるいは5分前に ¹²⁵I-iodoamphetamine 10 μ Ci/0.1 ml を大腿静脈より一定速度で注入した。ギロチン断頭後取り出した脳を dryice で凍結し、20 μ m の凍結切片をレントゲンフィルムに密着させ autoradiogram を作成した。rCBF は autoradiogram 上の濃度分布により定性的に観察した。

9. 一過性脳虚血モデルによる血流再開後早期に関する検索

脳虚血後の血流再開早期において、特に虚血時間の差が脳局所病態変化にどのような相違をもたらすかについて、永久虚血モデルと同じ組織化学的検索を行なった。Gerbil の一側総頸動脈の一過性閉塞モデルでは、虚血1時間例と3時間例で予後に大きな差があることが知られている²²⁾。従って本研究では両群について血流再開1時間後の変化を調べた。

エーテル浅麻酔下で Gerbil の左総頸動脈にクリップをかけ、Symptomatic group のみを閉塞60分後と180分後にクリップを外し、再び神経症状を観察した。血流再開1時間後に in situ brain freezing し、NADH、

ATP, pH, K^+ の変化を観察し比較検討した。尚、虚血60分例と180分例の両群について、それぞれ5匹の Symptomatic gerbil を用いた。

III. 結 果

1. 60分閉塞例

60分閉塞例42匹のうち, Symptomatic group 18匹, Borderline group 10匹, Asymptomatic group 14匹に分類された。

1) Symptomatic group (Fig. 2-A, B, C)

全例において、結紮側大脳半球に広汎で高度の NADH 蛍光増強を認めた。増強部位は、結紮側の temporal cortex, lateral parietal cortex, occipital cortex, hippocampus, thalamus, hypothalamus, caudate nucleus, や dorsolateral midbrain であった。また4匹の gerbil では、結紮側と非結紮側の medial parietal cortex にも NADH 蛍光増強が及んでいた。増強範囲は冠状断面のレベルや個体による差があり、manual planimetry による測定では大脳半球冠状断面の55%-103%の割合を占めていた (Fig. 2-A, 76%, Fig. 2-B 92%)。増強の程度は高度且つ均一な部位が大部分を占

めていたか、medial parietal cortex の非増強部との移行部に軽度で不均一な増強を認めた。この部分では増強部と非増強部が皮質穿通血管に対し並行な、いわゆる columnar pattern²⁸⁾ を示した。

ATP は NADH 蛍光の高度増強部にほぼ一致して激減していたが、組織 pH は NADH と ATP の変化した全域で高度且つ均一な umbelliferone 蛍光の減弱を認め、この部分が pH 値6.4以下の acidosis となっていることを示唆した。さらに NADH の変化がない部分でも acidosis を認めた。NADH 蛍光の増強範囲に対する acidosis の割合は、manual planimetry による測定の結果103-114%(Fig. 2-A 113%, Fig. 2-B 105%) であり、全例で NADH 蛍光増強範囲よりも acidosis のほうが広範囲であった。一方、非結紮側半球の cortex での pH 値は、7.0-7.2であり脳室の髄液はさらに高値を示し約7.4であった。これらの値は諸家の報告と一致していた^{6,10)}。

組織 K^+ は、NADH 蛍光が高度に増強し ATP が減少した部分において、非結紮側よりもわずかに減少していたが変化は軽微であり境界も不明瞭であった。ただ hippocampus や thalamus の内側では明らかな

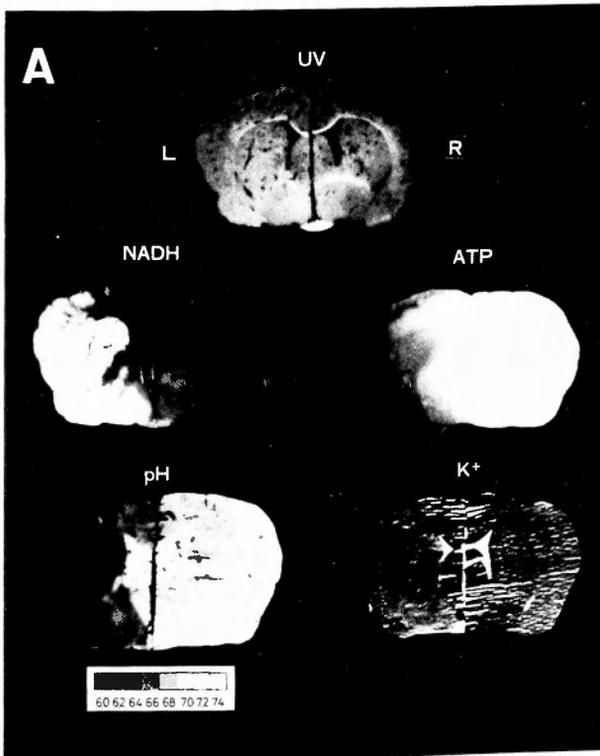


Fig. 2A.

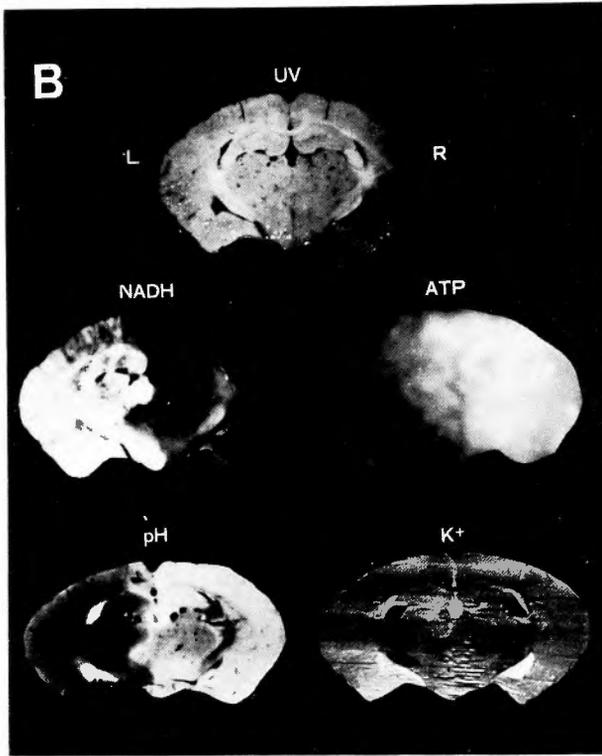


Fig. 2B.

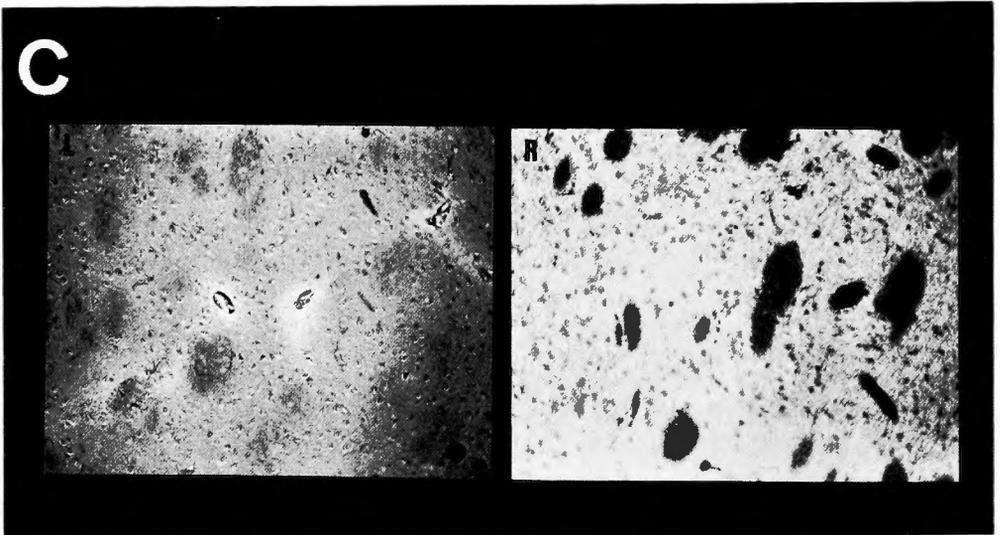


Fig. 2C.

Fig. 2. Symptomatic gerbil 60 min after left carotid occlusion. Multiparametric study of ultraviolet reflectance (UV) NADH fluorescence (NADH), content of ATP (ATP), tissue pH (pH), tissue potassium (K^+) on different levels (A, B) and dopamine (DA) nerve terminals in the caudate nucleus (C, $\times 40$).

L: left, R: right.

減少を認めた (Fig. 2-B)

Caudate nucleus の DA 神経終末蛍光 (Fig. 2-C) は結紮側においてびまん性に減弱し、グリア細胞、有髄線維束や皮質下白質には軽度の緑色蛍光を認めた。また caudate nucleus の細動脈周囲では、遠隔部よりもわずかに強い DA 蛍光の残存が見られた。

2) Borderline group (Fig. 3-A, B, C)

NADH 蛍光は、結紮側半球にて軽度で不均一な増強を示した。増強部位は10匹中8匹において Symptomatic group と同様の範囲に見られたが、他の2例ではやや狭く cortex, や caudate nucleus, hippocampus に限局していた。いずれにしても増強の程度は Symptomatic group よりも軽度で不均一であり、cortex では columnar pattern を、caudate nucleus では patchy pattern を示した。

ATP は NADH の変化した部位よりも狭い範囲で、特に cortex に減少が見られた。

これに対して、組織 pH では NADH の変化部位と同様か (Fig. 3-B), あるいはさらに広範囲において (Fig. 3-A) 高度且つ均一な acidosis を示した。従って、Borderline group の全例において acidosis は NADH や ATP の変化よりも広い範囲に及んでいた。組織 K⁺ の分布に著変は認めなかった。

Caudate nucleus の DA 蛍光は極めて不均一な減弱を示し、細動脈周囲では非結紮側と同程度の蛍光が残存し遠隔部では減弱していた (Fig. 3-C)。また、毛細血管周囲では蛍光が残存する場合と減弱する場合に分かれた。

3) Asymptomatic group (Fig. 4)

この group では対照群と同様に、NADH, ATP, pH, K⁺, DA の変化は認めなかった。

2. 5分閉塞例

5分閉塞例では神経症状の観察を行なわなかったが、NADH 蛍光の分布から60分閉塞例と同様3群に分類

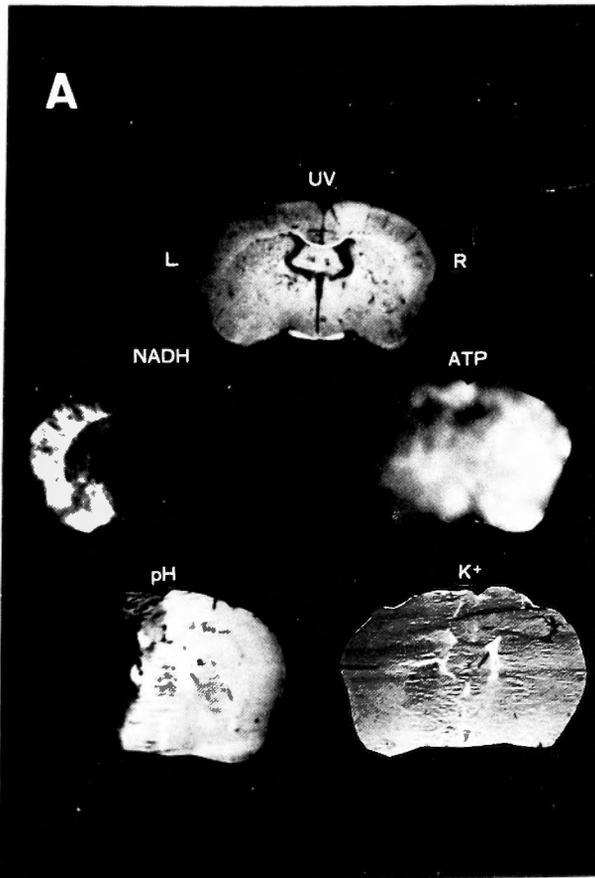


Fig. 3A.

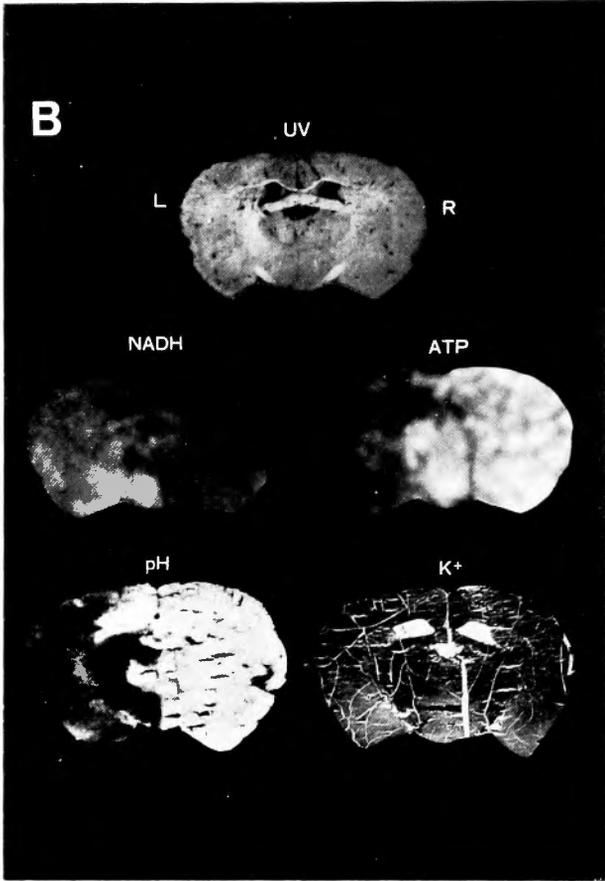


Fig. 3B.

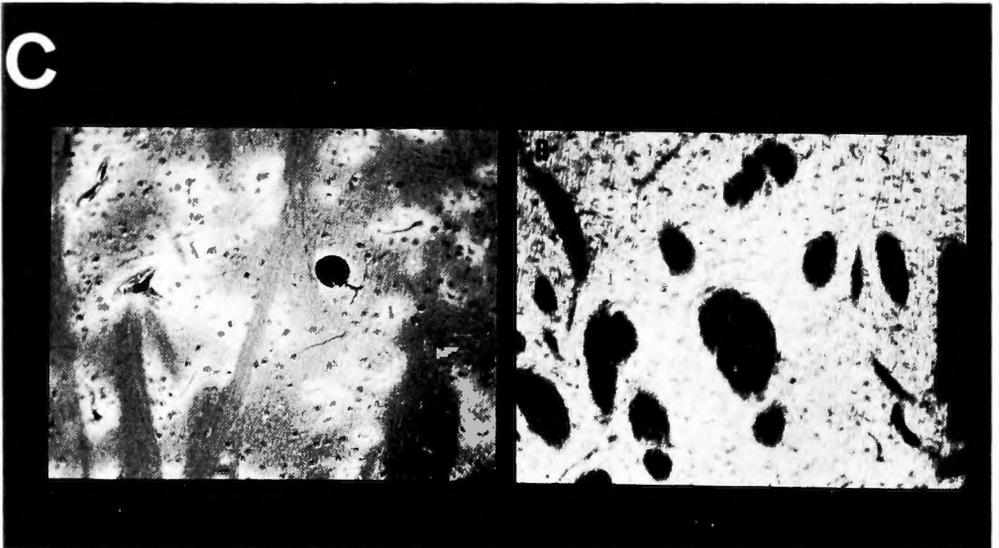


Fig. 3C.

Fig. 3. Borderline gerbil 60 min after left carotid occlusion. A, B, C; same as in Fig. 2.

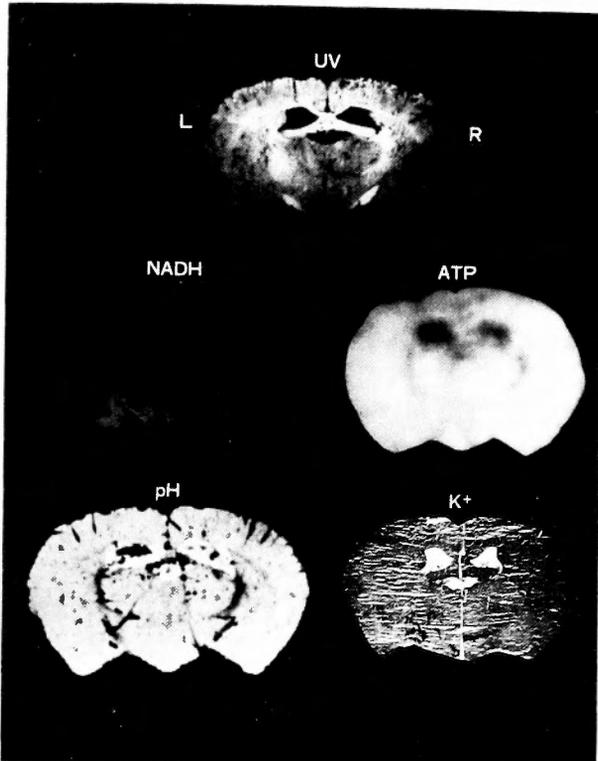


Fig. 4. Asymptomatic gerbil 60 min. after left carotid occlusion, multiparametric study

された。すなわち Symptomatic group に相当する例 6 匹, Borderline group に相当する例 3 匹, Asymptomatic group に相当する例 4 匹であった。

1) Symptomatic group (Fig. 5-A, B, C)

NADH 蛍光は結紮側半球で高度に増強していたが, ATP 減少はこれよりもやや狭く parietal cortex や septal area では減少していなかった。一方組織 pH は 60 分間閉塞例と同じように, NADH や ATP の変化した部位よりも広い範囲に高度且つ均一な acidosis を示した。NADH 蛍光増強部に対する acidosis の割合は, manual planimetry で測定した結果 117-148% であった (Fig. 5-A: 147%)。

caudate nucleus の DA 神経終末蛍光は結紮側において減弱していたが, 60 分閉塞例に比べると減弱の程度は軽度でより不均一であった (Fig. 5-B)。すなわち, 細動脈周囲の DA 蛍光残存が 60 分例よりも良好であった。 (Fig. 5-C)

2) Borderline group (Fig. 6-A, B)

NADH 蛍光の増強は 60 分間閉塞例と同様であったが, ATP 減少は 60 分例よりもさらに狭い範囲において

認められた (Fig. 6-A)。一方, 組織 pH は高度且つ均一な acidosis の広がりを示していた。従って, NADH や ATP の変化した範囲に対する acidosis の範囲の割合は 60 分例 Borderline group よりも一層大きかった。

caudate nucleus の DA 神経終末蛍光はやはり不均一な減弱が認められたが, 60 分例よりも変化は軽度であった (Fig. 6-B)。

3) Asymptomatic group

NADH, ATP, pH, DA の変化は認めなかった。

3. 180分閉塞例

21匹中 Symptomatic 9 匹, Borderline 5 匹, Asymptomatic 7 匹に分類された。

1) Symptomatic group (Fig. 7-A, B, C)

NADH 蛍光は 60 分間閉塞例と同じように, 結紮側半球で増強していた。しかし増強の程度は 60 分閉塞例よりも軽度となっており, 一旦増加した NADH が虚血時間延長により減少することを示唆した。この減少は全範囲に見られ, 不均一な変化を示した。

ATP 量は NADH 蛍光増強部位に一致して, 高度且つ均一な減少がみられた。すなわち, 5 分例や 60 分

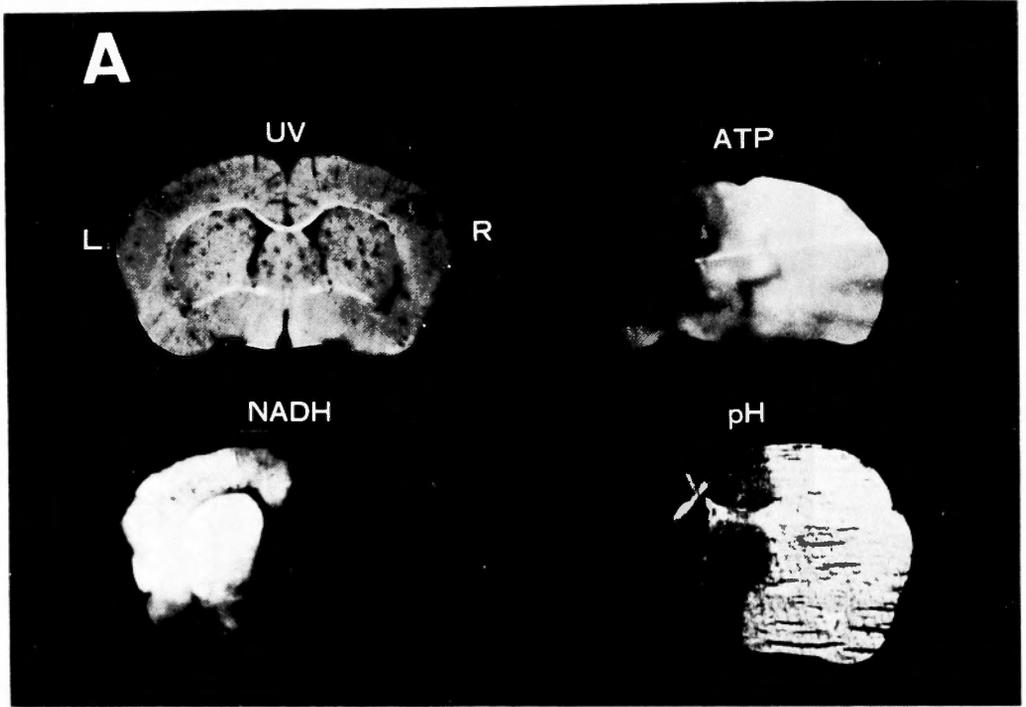


Fig. 5A.

例では特に parietal cortex の NADH 蛍光軽度増強部位において ATP は減少していなかったが、180分例では NADH 増加部位の全域に ATP 減少を認めた。

組織 pH も 5 分例や 60 分例と異なり、NADH と ATP の変化した範囲に一致して umbelliferone 蛍光の減少を認めた。また蛍光減少の程度は 5 分及び 60 分閉塞例よりも軽度であり、結紮側半球で acidosis となっているものの一旦減弱した umbelliferone 蛍光が時間と共に増強することが示唆された。この増強は不均一に生じており、半球の内側に強い傾向を認めた。特に parietal cortex で NADH と ATP の変化した部位と非変化部位の境界部において非結紮側 cortex よりもむしろ高度の umbelliferone 蛍光が帯状に見られた。

組織 K^+ も NADH と ATP が変化した部位に一致して、60 分閉塞例よりも高度な減少を認めた。部位的には特に caudate nucleus の内側や、hippocampus, thalamus 内側などの、半球内側においてより顕著な減少を認めた。

caudate nucleus の DA 神経終末蛍光は 60 分閉塞例よりもさらに高度で均一な減弱が見られ、細動脈周囲の蛍光残存はほとんど認められなかった。また、有髄

線維束やグリア細胞と他の部位の識別は困難であった。

2) Borderline group (Fig. 8-A, B)

NADH 蛍光は主に結紮側半球の caudate nucleus に不均一な増強 (patchy pattern) を認めたが、60 分間閉塞と比較するとより軽度であった。また、ATP と組織 K^+ の減少はほとんど認めなかった。

一方組織 pH は NADH 蛍光の変化した範囲よりも広く、比較的均一な軽度の acidosis を示した。

caudate nucleus の DA 神経終末蛍光は、60 分閉塞例と同様の不均一減弱像を示したが、減弱範囲が狭くより軽度な変化が見られた (Fig. 8-B)。

3) Asymptomatic group

NADH, ATP, K^+ , DA の変化は認めなかった。

4. 一過性脳虚血について

1) 60 分虚血後血流再開 60 分例 (Fig. 9)

左総頸動脈のクリップを解除した後、神経症状は徐々に消失し、血流再開後 30 分の時点では明らかな症状を認めなかった。ただ、刺激に対する易興奮性を示した。

NADH 蛍光は結紮側半球で非結紮側よりもやや暗いか (Fig. 9) あるいは同程度であり、ATP 量の減少は

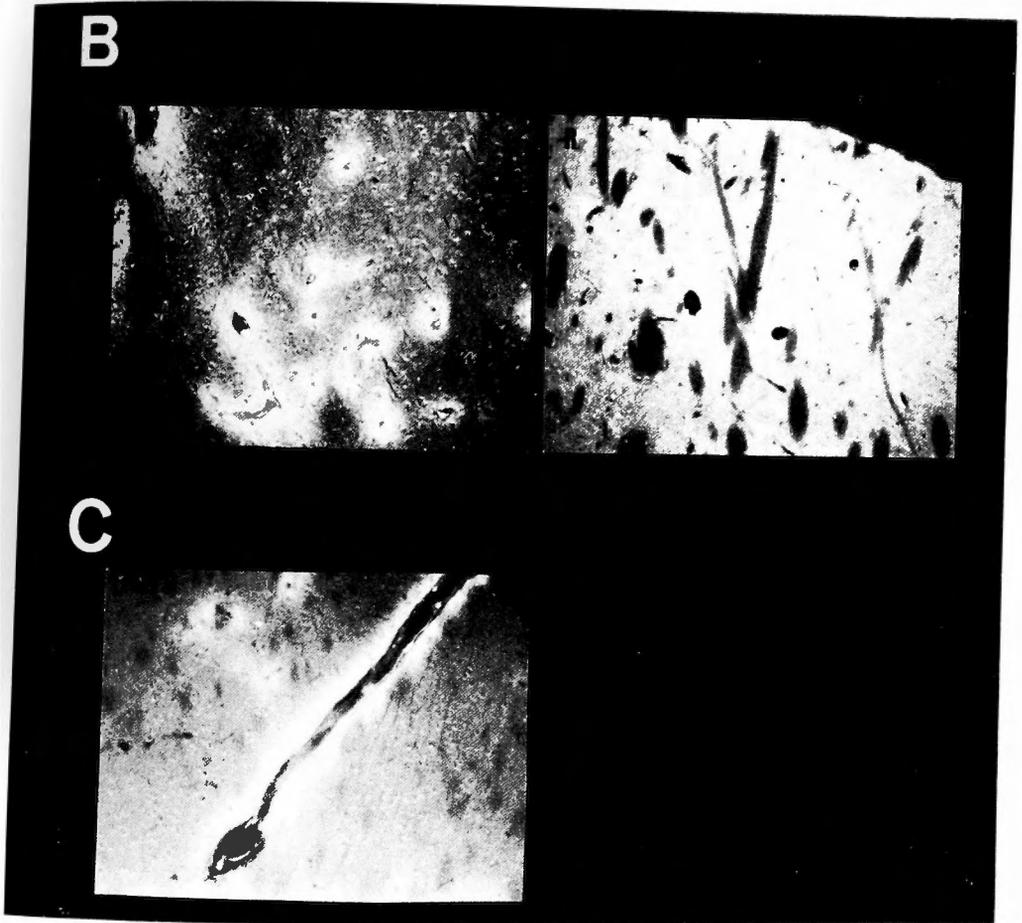


Fig. 5B, C.

Fig. 5. Gerbil 5 min. after left carotid occlusion, corresponding to symptomatic group A; multiparametric study B; DA terminals ($\times 40$) C; DA terminals ($\times 100$)

認めなかった。また組織 pH では caudate nucleus や thalamus 等に軽度の umbelliferone 螢光の低下が見られ、acidosis の残存が示唆された。

2) 180分虚血後血流再開60分例 (Fig. 10-A, B)

全例において血流再開後も神経症状は回復せず、むしろ増悪傾向が見られた。

紫外線吸収像 (UV) は、結紮側半球の cortex の一部や caudate nucleus (Fig. 10-A) あるいは hippocampus (Fig. 10-B) に暗い部分が認められた。NADH 螢光でも結紮側の caudate nucleus, hippocampus や thalamus に暗い部分 (black area) を認めたが、UV での暗い部分とは一致せず、NADH 螢光の black area のほうがより広範囲であった。ATP は NADH 螢光が低下した部分、すなわち black area で減少していたが、

永久虚血群よりは軽度であった。組織 pH も black area で高度の acidosis を示したが、結紮側 cortex の umbelliferone 螢光はむしろ非結紮側よりも強い例があり (Fig. 10-B) 見かけ上の alkalosis を示した。また組織 K^+ も結紮側半球で減少し、特に black area で顕著であった。

5. 組織学的変化

凍結乾燥標本から得られたパラフィン切片による toluidine blue 染色では、in situ brain freezing による artifact が特に冠状断面腹側に強く、さらに cryostat による凍結切片の固定標本 (ATP 用固定液) はより強い artifact を認めた。従って軽微な虚血性変化を検索することは困難であり、neuronal shrinkage や neuropil vacuolization などの著しい変化のみの観察に限ら

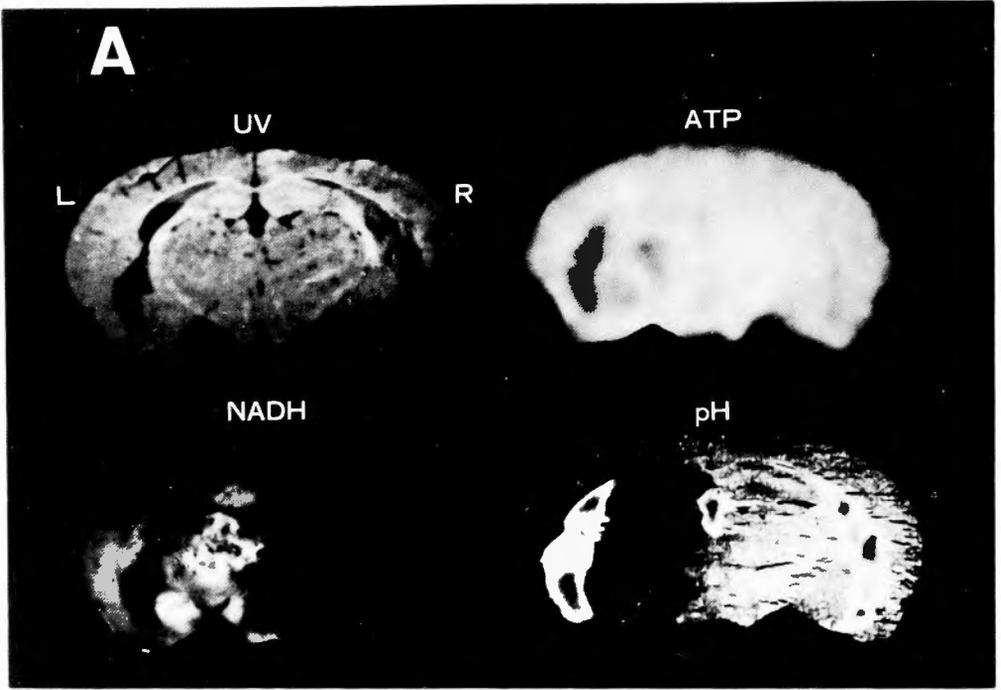


Fig. 6A.

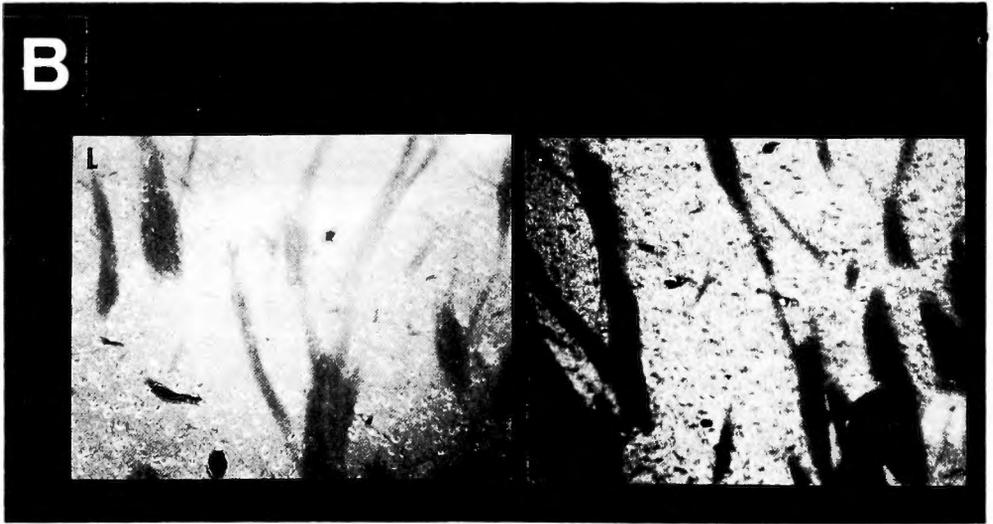


Fig. 6B.

Fig. 6. Gerbil 5 min. after left carotid occlusion, corresponding to borderline group
 A; multiparametric study B; DA terminals ($\times 40$)

れた。

Symptomatic group では、180分閉塞例で結紮側大脳半球の内側で非虚血部との境界領域に帯状の神経網空胞化を認めた。この空胞帯の外側虚血巣で、特に

hippocampus, thalamus, caudate nucleus に顕著な neuronal shrinkage などの組織障害が見られ、これは組織 K^+ の高度減少部とほぼ一致していた。60分閉塞例ではこのような変化は軽度であり、5分閉塞例では

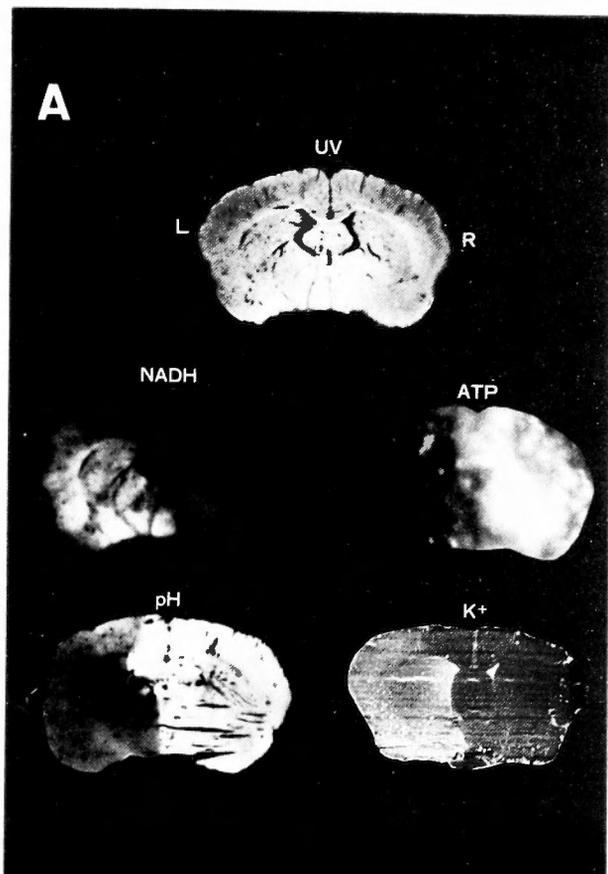


Fig. 7A.

変化を認めなかった。また Borderline group や Asymptomatic group では、著変を認めなかった。

虚血後血流再開例では cryostat による凍結固定切片のみを染色したが、180分虚血後60分血流再開例において永久虚血群180分閉塞例と同じ結紮側の hippocampus, thalamus や caudate nucleus に高度な組織障害を認めた。

6. 局所脳血流量

Symptomatic group では結紮側半球に高度且つ均一な血流低下を認めたが、虚血巣と非虚血巣の境界領域に血流増大部を認めた (Fig. 11-A)。

一方, borderline group でも symptomatic group と同様の範囲に血流低下を認めたが、軽度の血流残存が見られた (Fig. 11-B)。しかし, NADH 蛍光のような不均一性は見られなかった。

Asymptomatic group でもほぼ同様の範囲に血流低下を認めたが、その程度は borderline group よりも

さらに軽度であった。

IV. 考 察

1. 永久脳虚血について

Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) は、一側の総頸動脈を閉塞することにより同側大脳半球に種々の程度の不完全脳虚血を起こすが^{1,28)} この不完全虚血の程度は、脳底 Willis 動脈輪発達程度により規定されることが知られている^{37,56)}。本研究では虚血の程度を総頸動脈結紮後の神経症状の程度により判別し, symptomatic, borderline, asymptomatic の3段階に分類したが、これらは NADH, ATP の変化の程度とよく対応していた^{26,30)}。すなわち60分閉塞例の symptomatic group では、結紮側半球の広範囲に高度な NADH 蛍光増強と ATP 減少を認めたが、borderline group では NADH 蛍光の増強は軽度且つ不均一で、ATP 減少もより狭い範囲に限られた。一方, asy-

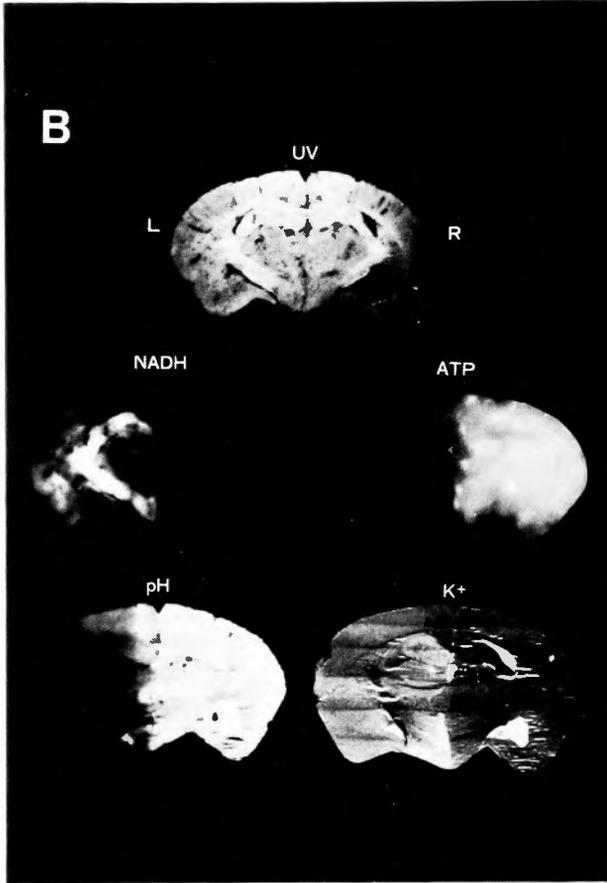


Fig. 7B.

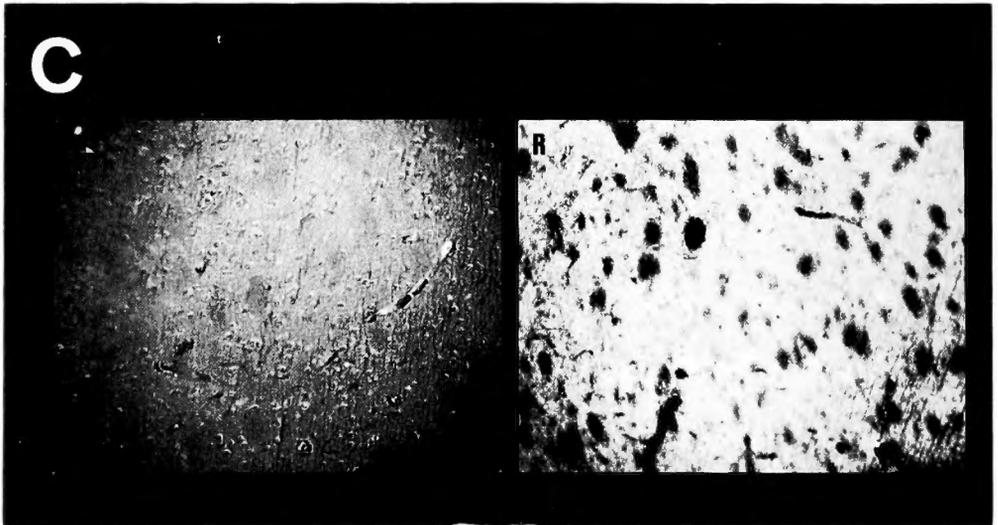


Fig. 7C.

Fig. 7. Symptomatic gerbil 180 min. after left carotid occlusion A, B, C; same as in Fig. 2.

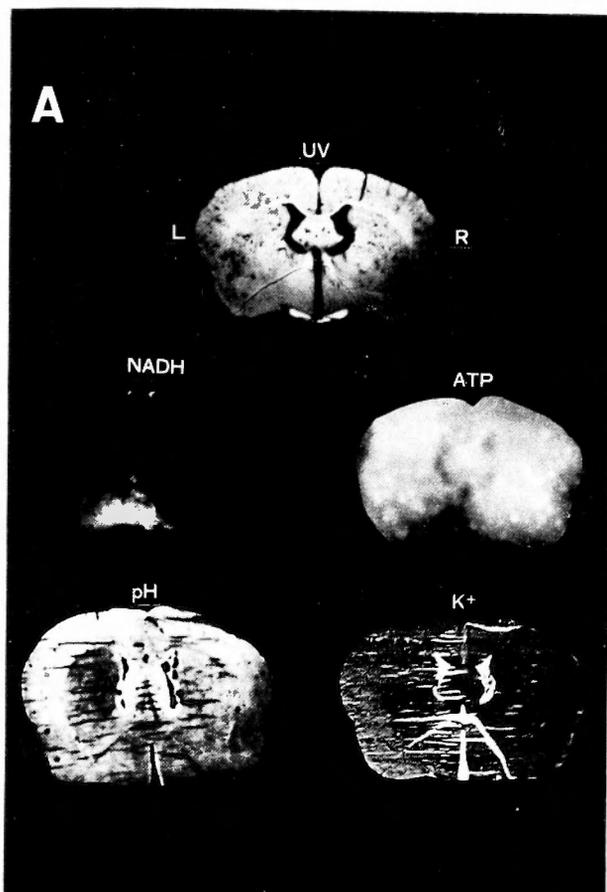


Fig. 8A.

asymptomatic group ではこれらの変化を認めなかった。NAD⁺-NADH は電子伝達系の重要な補酵素であり、脳虚血により酸素供給が減少した場合はミトコンドリアの還元型 NADH が増加してくる²⁹⁾。また ATP は、酸化的リン酸化により最終的に生成されるエネルギー源であり、NADH 蛍光と ATP の局所分布は脳局所の酸素供給状態、ミトコンドリアの酸化還元状態や酸化的リン酸化の機能状態を脳血流量よりも直接的に反映すると考えられる。autoradiography による血流変化が比較的均一であったことは、分解能の限界によるものであろう²⁸⁾。5分閉塞例では神経症状の観察は出来ないが、NADH 蛍光の分布状態から3段階に分類され、60分閉塞例の symptomatic, borderline, asymptomatic の各グループに相当していた。

さて、以上のように NADH や ATP の変化は5分及び60分閉塞例において、各グループ毎に虚血の程度に応じた変化を示したが、比較的均一な変化を示した

symptomatic group においても NADH と ATP の変化には局所的な差が見られた。すなわち NADH 蛍光が軽度増強し columnar pattern を示した結紮側 parietal cortex では、ATP 減少を認めなかった。このように ATP 減少が NADH 増加部位よりも狭いという傾向は Borderline group でより顕著であり、特に虚血時間が短い程著しかった。さらに組織 pH の変化と NADH 蛍光の局所分布を比較すると、symptomatic group や asymptomatic group の NADH が軽度に増加した部位やほとんど増加していない部分においても均一且つ高度の acidosis が生じており、より大きな相違が認められた。この結果は、不完全脳虚血の場合、局所により異なる程度の虚血が生じることを示しており、また acidosis を引き起こす血流低下の閾値が NADH や ATP の変化に対する閾値よりも低いことを示唆すると考えられた。さらに acidosis が均一に生じ境界明瞭であったことは、脳主幹栄養血管の境界明

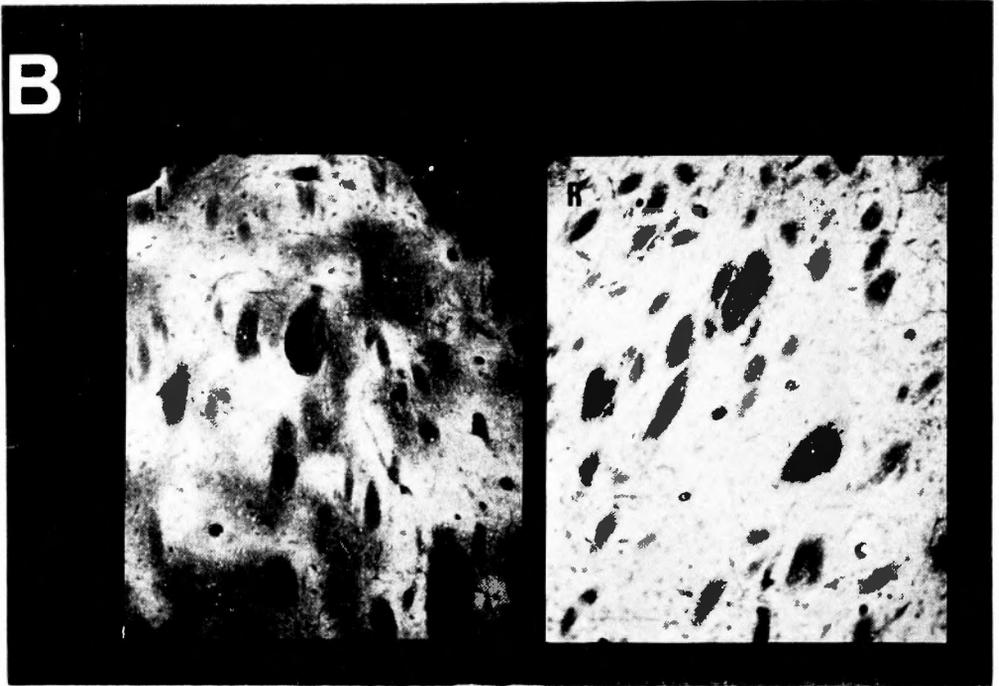


Fig. 8B.

Fig. 8. Borderline gerbil 180 min. after left carotid occlusion A; multiparametric study B; DA terminals ($\times 40$)

瞭な支配領域を示していると考えられた³⁰⁾.

一般に脳虚血が生じると、まず炭酸ガスの血流による除去が障害され虚血巣は急速に acidosis となる¹⁷⁾. 次に生理的状态における血流からの酸素抽出率は約50%、グルコースは約10%であり、利用率は酸素の方が高いことから酸素供給の減少が先に生じることになる²⁰⁾. この結果ミトコンドリア電子伝達系の酸化のリン酸化が障害され、ATP 濃度は減少する. 原形質内では嫌氣的解糖が亢進し⁹⁾ pyruvate を lactate に還元することにより原形質内 NADH を NAD^+ に酸化しようとするため、lactate が急速に蓄積してくる. 脳虚血における acidosis は、この lactate の蓄積が主な原因であると考えられている⁵⁴⁾が、不完全脳虚血の場合、残存した血流によりグルコースの供給が残っており完全虚血時よりも lactate の蓄積が多く、従ってより高度の acidosis が生じると考えられている⁵⁰⁾.

本研究における NADH が高度に増加した部位では、血流減少の程度が著しい為に炭酸ガスや H^+ が蓄積していると考えられ、これらも acidosis に関与しているという可能性は否定出来ない. しかし、NADH が

軽度増加した部位では血流が比較的残存しており、軽度不完全脳虚血の場合には lactate の蓄積が acidosis の主要因になると考えられる. 以上のことから、本研究で観察された NADH, ATP, pH の変化の相違は、虚血の程度により少なくとも3段階の異なるエネルギー代謝の状態が存在することを示唆すると考えられた. すなわち、第Iの状態は虚血の程度が高度で、酸素及びグルコースの供給が絶対的に不足し酸化のリン酸化が障害されるために、NADH は高度に増加し ATP が激減した状態である. この場合嫌氣的解糖による ATP 産生は不足している. symptomatic group の虚血巣中心部がこの状態に相当すると考えられた. 第IIの状態は、軽度の不完全脳虚血が生じ酸素の供給量が相対的に不足するためミトコンドリアの NADH は軽度増加しているが、嫌氣的解糖により ATP 産生を部分的に代償している状態である. この状態は borderline group の結紮側半球や symptomatic group の虚血巣辺縁部、たとえば parietal cortex に相当すると考えられた. Borderline group の60分閉塞例は5分例よりも広範囲に ATP 減少を認めたが、これは虚血

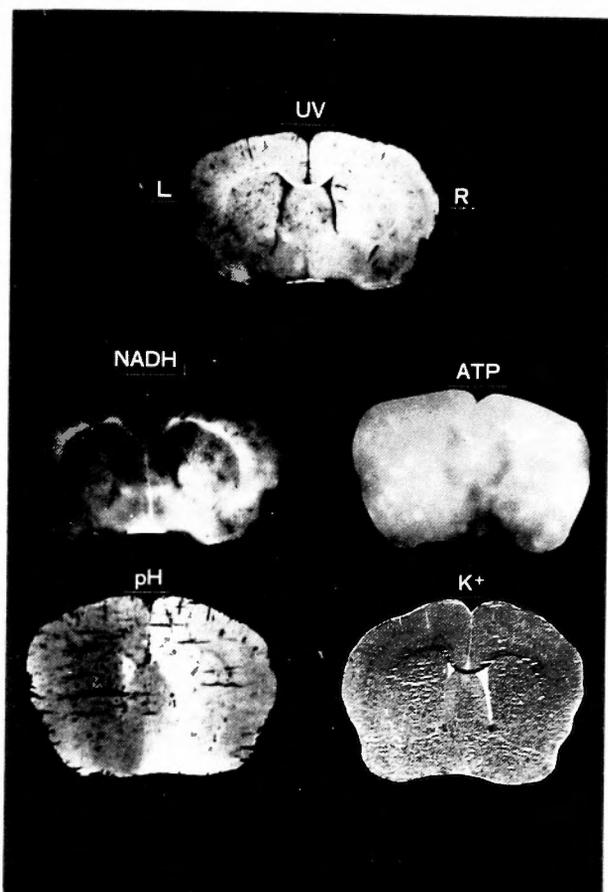


Fig. 9. Gerbil of 60 min. ischemia and 60 min. reperfusion, multiparametric study

時間の延長により嫌氣的解糖による ATP 生成が不足する部位のあることを示唆するものと考えられた。すなわち、嫌氣的代謝のみで ATP を産生したと仮定すると好氣的条件下の2/38の量にしか達せず²¹⁾、血流低下が ATP 産生代償の閾値付近にある部位では、時間経過と共に速やかに ATP が減少するものと推測された。第Ⅲの状態は、血流低下がより軽度で、嫌氣的解糖が ATP 産生を完全に代償し、さらに hydrogen transport shuttle system を介してミトコンドリアの NADH の酸化も代償された場合である。この状態は NADH や ATP の変化が無く、acidosis のみを認めた部位に相当する。Ginsberg ら¹⁶⁾も、軽度の不完全脳虚血において NADH 蛍光が増強していない部位で lactate の蓄積があることを報告しており、第Ⅲの状態も lactate 蓄積により acidosis が生じたと考えられた。また小暮ら³¹⁾は、軽度の低酸素状態で pyruva-

te/lactate 比や NAD^+/NADH 比の変化が生じる以前の段階において、非嫌氣的な解糖亢進と H^+ イオンの増加が起こるとい現象を報告している。この現象の機序については明らかにされておらず、また本研究では生化学的定量を行っていないが、第Ⅲの状態においてこのような現象が起こっている可能性は考えられる。

以上のように、脳虚血時に acidosis が NADH や ATP の変化よりも広い範囲で起こるとい現象と共に、総頸動脈閉塞5分という虚血超早期に既に高度の acidosis が生じたことは重要である。最近、軽度の脳虚血早期における acidosis について、cortex の細胞外腔 pH 値を微小電極により測定した報告がなされている^{3,18)}。Harris ら¹⁸⁾は細胞内外の電解質に変化が生じない程度の軽度な脳虚血において、早期から細胞外 pH が低下することを報告しているが、一方細胞内腔

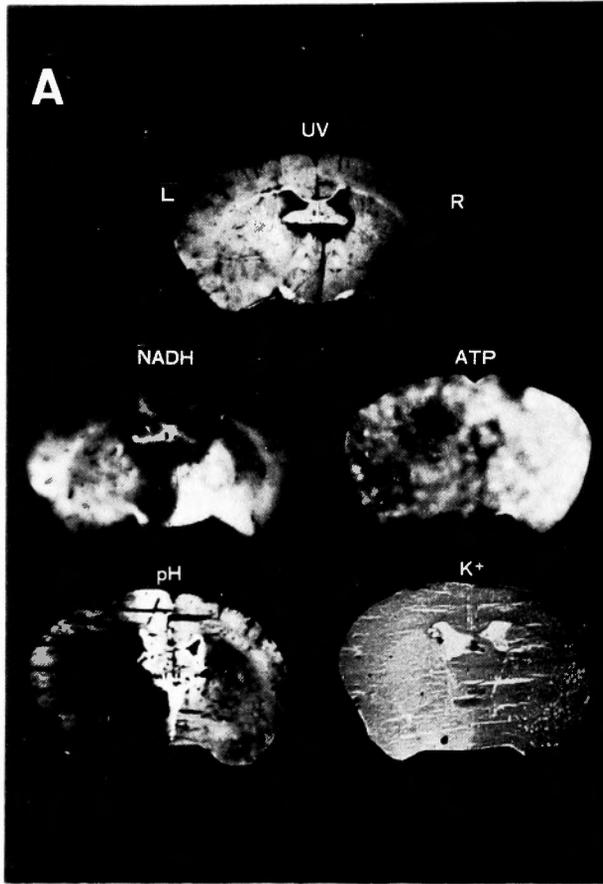


Fig. 10A.

では生理, 生化学的緩衝作用により acidosis から防御されていると述べている. 本研究で示された pH 値は細胞内外の総和としての組織 pH であり, 両者を区別することはできない. しかし, 第Ⅱ, 第Ⅲの状態のような軽度の虚血において仮に細胞内 pH が7.0と正常値であったとすると, 細胞外容積が15%, 血液の容積が3%, 血液の pH が7.4, 組織 pH が6.6という仮定のもとに算出される細胞外 pH 値は5.95となる. 実際の組織 pH 値は6.6以下であり, また虚血時には細胞外容積が減少することが知られており⁵³⁾細胞外 pH 値はさらに低値となる必要があるが, これまでの報告⁵¹⁾と比べて過度な acidosis と考えられる. 従って, 虚血早期においても細胞内腔に acidosis が生じている可能性が強く示唆された.

次に組織 K^+ の変化を見ると, 60分閉塞例の symptomatic group でわずかな減少を認めたにすぎない.

細胞膜内外の Na^+ , K^+ 分布は ATP 依存性の $(Na^++K^+)-ATPase$ を介して恒常性が維持されており, 虚血により ATP が減少すると K^+ は細胞外へ漏出し脱分極が生じる. しかし今回の結果は, 細胞内外の K^+ イオン総量の減少は虚血60分の時点ではわずかであったが, 180分虚血ではより高度となっており, 時間と共に K^+ が減少することを示していた. Schuier ら⁵²⁾も, 脳虚血時の組織電解質を定量し, 虚血時間の延長により次第に K^+ イオンが減少することを報告している. このように K^+ をはじめとして, 5分及び60分閉塞例と180分閉塞例の NADH, ATP, pH の変化を比較すると, 時間経過により変化の部位や程度に相違が生じてくるのがわかる. まず180分閉塞例の symptomatic group では, 結紮側虚血巣の ATP は減少しているが, NADH 蛍光は増強したものの5分, 60分閉塞例よりも軽度となっていた. 虚血巣での NADH 蛍光

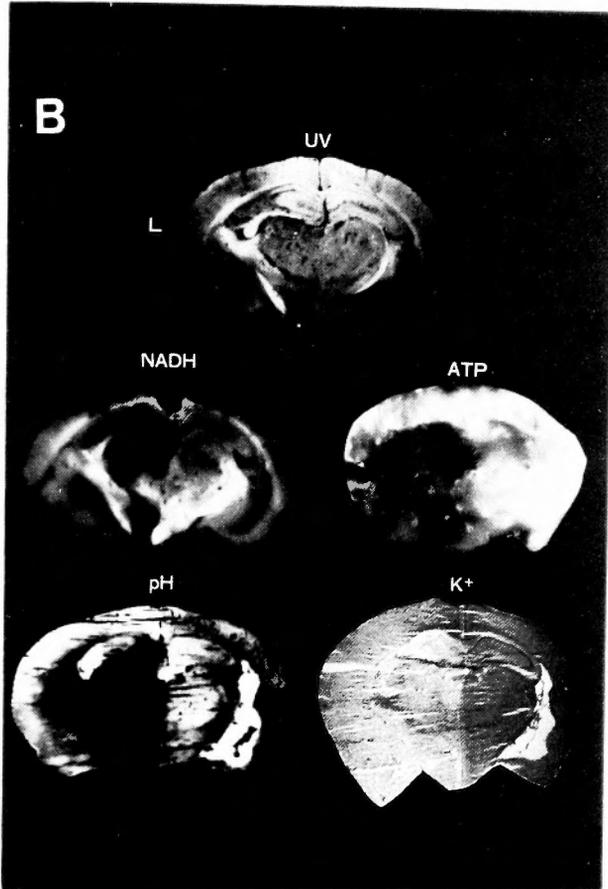


Fig. 10B.

Fig. 10. Gerbil of 180 min. ischemia and 60 min. reperfusion A, B; multiparametric study

減少は、ATPが減少したままであることからエネルギー代謝の改善によるものでなく、脳内において高度の活性を持つ NAD^+ ase による NAD^+ の分解⁴²⁾か、あるいは acidosis による NADH 崩壊³⁹⁾が生じたことによると推測された。さらに、組織 K^+ と共に ATP は NADH 蛍光が軽度で増強した部分でも減少し、 NADH , ATP , K^+ , pH の変化した範囲がほぼ一致していた点で、5分及び60分閉塞例と異なっていた。これは5分、60分閉塞例で見られた軽度虚血部位（第Ⅱの状態）において、エネルギー代謝の障害が時間経過とともに増悪したことによると考えられた。一方、第Ⅲの状態も180分例ではみられなかったが、この部分は側副血行により血流低下が改善されたものと考えられた。同じように、Borderline group でも180分閉塞例は NADH , ATP , pH の変化が軽減しており、やはり側

副血行による血流改善があったと推測された。このように、エネルギー代謝障害が軽度な場合でも、高度な虚血部位に隣接する場合とそうでない場合に、時間経過による予後に差が生じることは興味深い。Astrup らは、脳虚血において細胞内 K^+ イオンが細胞外へ漏出する membrane failure は、電気活動が低下する synaptic transmission failure よりも血流低下に対する閾値が高いことを示し、“ischemic penumbra” の概念を提唱している³⁾。“ischemic penumbra” は虚血巣の周辺部に存在し、機能的には停止した状態であるが、血流改善あるいは薬物による脳代謝抑制により回復しうる組織であるとされ、臨床的にも重要であると考えられている。本研究では、脳波、誘発電位、脳血流量の絶対値等の測定を行なっておらず、実験モデルも異なるため、軽度な虚血部位（第Ⅱ、第Ⅲの状態）が厳密

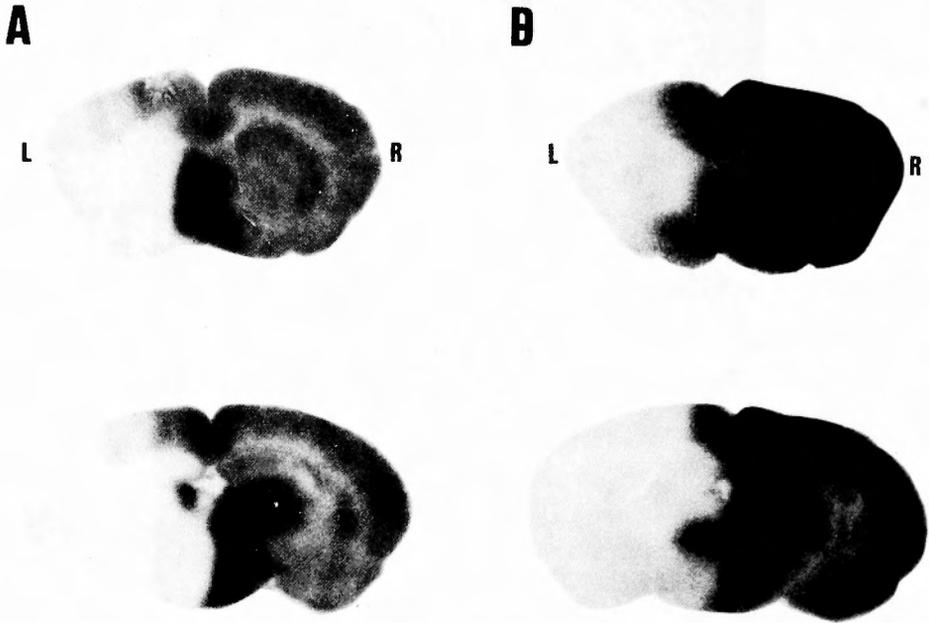


Fig. 11. Autoradiograms of regional cerebral blood flow (rCBF) with ^{125}I -isopropylidoamphetamine in symptomatic gerbil (A) and borderline gerbil (B) 60 minutes after left carotid occlusion

な意味でいわゆる“ischemic penumbra”に一致するものではないが、少なくとも“ischemic penumbra”を部分的に含むものと推定される。また Borderline group のように、エネルギー代謝が虚血巣の広範囲において時間と共に回復する場合があります、“ischemic penumbra”でみられるような高度虚血部位の周辺部のみでなく、虚血巣全般で可逆性変化を示す場合があると考えられた。さて、以上のような虚血時間の延長による相異は組織 pH の変化でもみとめられており、symptomatic group の 5 分及び 60 分例で高度に低下した umbelliferone の蛍光が、180 分例では部分的にやや増強していた。虚血中に生じた acidosis が時間とともに alkalosis へと shift する現象は、neutral red による組織化学的方法を用いた小暮ら³³⁾と溝井ら⁴³⁾の報告があるが、その機序については明らかにされていない。今回の実験で示された umbelliferone 蛍光強度の上昇を考える場合、二つの現象を考慮に入れる必要がある。すなわち、実際の pH 値が上昇した場合と、background の umbelliferone 蛍光が上昇した場合である。実際 umbelliferone の蛍光が pH 値による影響

を受けない 340 nm 紫外線励起でも⁵⁷⁾、370 nm による励起と同じ部位に蛍光増強を認めたことから(未発表データ)、pH 値変化以外の要因も関与していることが示唆された。この background 上昇の原因は現在の段階では不明であるが、少なくとも水分量が増加した場合に上昇する³⁰⁾ことは判明しており、また蛍光が増強した部位は脳浮腫の生じやすい虚血巣辺縁部²⁶⁾であったことから、脳局所水分量の増加が反映された可能性が強い。いわゆる浮腫水は血液に由来するものであり、pH 値はほぼ 7.4 であると考えられ、従って水分の増加した場合でも局所的に pH 値は上昇すると推測される。また、高度虚血巣隣接部の軽度虚血部で見られた虚血時間延長によるエネルギー代謝障害や組織障害の増悪は、この部分に生じた脳浮腫が関与したと推測できる。しかし、この点に関しては今後さらに検索されるべき問題であると考えられる。

2. 一過性脳虚血について

永久虚血時においても、側副血行により血流が増加し血流再開と同様の現象が部分的に存在すると考えられた。一方、総頸動脈クリップ除去による血流再開も

デルでは、高度不完全虚血巣に対する血流の再開であり、臨床的には脳主幹動脈の血栓溶解、血栓除去あるいは頭蓋内外血行再建術に相当すると考えられる。この場合、虚血時間の差が血流再開後の病態変化の差異に大きく影響してくる。

虚血60分後の血流再開例では、虚血巣の NADH 螢光増強はみられずむしろ対側半球よりもやや暗い例があった。また ATP や組織 K^+ は減少しておらず、従ってこの時点ではエネルギー代謝の障害が血流再開により回復したと考えられた。しかし、程度の差はあれ acidosis が虚血巣に見られたことは、虚血中に蓄積した lactate がまだ残存していることを示唆している。

伊藤らは²³⁾同じ gerbil の1時間虚血例において、血流再開後3時間から20時間後の間に強い組織障害が出現すると報告している。血流再開後1時間の時点でエネルギー代謝(ATP生成)は回復していたことから、その後生じる Blood Brain Barrier の障害と組織障害が密接に関連しているのであろう。一方180分虚血例では結紮側半球で特に hippocampus や caudate nucleus, thalamus で、ATP 減少の回復が不良であり高度の acidosis が生じていた。またこれらの部位の NADH 螢光は反対側よりも明らかに減少し暗くなっていた。このような NADH の変化は紫外線吸収像で血流量の増加が一部に限られていたことから、ヘモグロビンの干渉によるものではないと考えられた。従って、NADH 螢光の暗い部分(black area)では $NAD^+ - NADH$ プールの減少⁶⁰⁾か、あるいは過酸化現象³⁴⁾が起こっていることが推測された。今回の実験では両者のいずれかを決定することはできないが、black area で高度の acidosis が生じていたことは過酸化現象が存在することを示唆するものと考えられた。すなわち、血流再開後も嫌氣的解糖が続き電子が原形質からミトコンドリアへ流れていないことを示しており、ミトコンドリアの電子伝達系がまだ障害されていない状態で血流が再開されると血流により供給された酸素が還元されなくなる。この様な場合に過酸化の状態が生じると考えられている³⁴⁾。過酸化により free radical が生成され、生体膜の構成要素である脂質が酸化を受け膜構造が変化し、これが血流再開時の組織障害の一要因と考えられている¹³⁾。さらに組織 K^+ の減少は細胞障害の指標と考えられ、180分虚血後の血流再開例の black area において K^+ 減少が顕著であったことから、この部位に過酸化が生じている可能性は強いと考えられた。過酸化—free radical はまた、脳浮腫の

発生に深く関与すると考えられており¹²⁾血流再開後の病態を知る上で極めて重要と思われるが、今後さらに検討を要する。また今回の180分虚血後血流再開例は、再現性に富む有用なモデルであると考ええる。

近年、positron emission CT や NMR CT が開発され、脳虚血時の水分量、酸素消費量、ATP、pH、 K^+ などを測定することが試みられており、特に水分量⁴⁹⁾や、酸素消費量¹⁵⁾、pH⁵⁾については実際に臨床の場で応用されるようになった。脳虚血における局所病態変化や組織回復性に関するこれらの診断方法の臨床的応用を目的として、今後組織化学的方法による実験的検索はさらに重要不可欠になると考えられる。

3. ドパミン(DA)神経終末の変化について

今まで述べた NADH、ATP、 K^+ 、pH の局所変化は方法的制限により macroscopic level での観察にとどまった。一方 caudate nucleus の DA 神経終末螢光の変化は、microscopic level での局所酸素供給状態や、ATP の変化を反映するものと考えられる。すなわち、DA を含む CA は神経終末での合成、貯蔵、放出、再摂取、分解のすべての過程で分子状酸素と ATP を必要とするため、脳虚血による酸素や ATP の減少に応じて変化を示すと考えられた²⁸⁾。

実際に、60分閉塞例 symptomatic group では結紮側 caudate nucleus の DA 螢光は高度に減弱しており、DA が神経終末から漏出し周囲のグリアや有髄神経束へ取り込まれていた。時間を追ってこの変化を見ると、虚血5分という早期ではまだ不均一且つ軽度であり、時間経過と共に高度化、均一化することがわかる。この不均一性は borderline group において特に顕著であり、細動脈周囲での DA 螢光は保存されており遠隔部において DA 漏出が生じ易いことを示す。この結果から、軽度の不完全虚血では部位により血流の灌流圧に差が生じ、細動脈近傍では DA 漏出(エネルギー代謝障害)の閾値以上の血流が保たれ、遠隔部のいわゆる“microwatershed zone”というべき部位では、閾値以下に減少したと推測される。また高度不完全脳虚血でも、まず“microwatershed zone”からエネルギー代謝障害が始まり、時間と共に広がっていくと考えられた。gerbil の断頭による完全虚血モデルでは、DA 螢光の不均一な変化は認めておらず²⁹⁾、この結果からも不完全脳虚血における microscopic level での脳エネルギー代謝の不均一な変化は、もっぱら細動脈—毛細血管レベルでの灌流圧の差に起因する可能性が

強い^{24,28)}。

小暮は²⁵⁾, Opitz や Thew の脳組織毛細血管の酸素分圧モデルの毛細血管を皮質穿通動脈に置き換えることにより脳虚血時エネルギー代謝の不均一性を論じている。しかしこれまで microscopic level での不均一性を実際に証明した報告は見当たらず、本研究での所見は重要であると考えられる。また Cervós-Navaro ら⁶⁾ は、従来より毛細血管にあると考えられてきた栄養血管としての機能が細動脈にも存在する可能性を示唆しているが、今回の結果はこれを支持するものである。

V. 結 語

1. Mongolian gerbil の一側頸動脈閉塞により、急性期の局所不完全脳虚血及び虚血後血流再開モデルを作成し、脳局所のミトコンドリア酸化還元状態 (NADH), ATP, 組織 pH, 組織カリウムイオンと caudate nucleus のドパミン神経終末の変化を指標として、組織化学的方法による脳虚血の局所病態変化を検索した。

2. 総頸動脈閉塞後の神経症状の程度と、各指標の変化の程度はよく対応していたが、部分的に、また閉塞時間により各指標の変化に相違を認めた。特に脳虚血早期では、境界明瞭な acidosis が最も広い範囲に生じ、I) acidosis と高度の NADH 増加及び ATP 減少を生じた部分、II) acidosis に軽度の NADH 増加はあるが、ATP は減少していない部分、III) acidosis のみ生じた部分、という三種類の異なる状態に大別された。この状態の相異には、血流低下時の嫌氣的解糖が関与すると考えられた。また II) や III) の軽度脳虚血でも、虚血時間延長によりエネルギー代謝障害が回復する場合と増悪する場合にわかれた。

3. 組織カリウムの変化から、hippocampus や caudate nucleus, thalamus などの内側に虚血早期から高度の組織障害が生じることが示唆された。これには側副血行による脳浮腫が関与すると推測された。

また、虚血後血流再開モデルにおいても永久虚血モデル群と同様の部位に高度な脳エネルギー代謝障害、組織障害を認め、過酸化現象の関与が推測された。

4. Caudate nucleus の DA 神経終末の変化は microscopic level で不均一であり、特に虚血の程度が軽い程不均一性は顕著であった。この不均一性から、細動脈一毛細血管といった微小血管レベルでの perfusion pressure の隔差によるエネルギー代謝の不均一性が存在すると考えられた。また細動脈が、栄養血管

として機能する可能性が示唆された。

5. 脳虚血の局所病態変化を各種指標による組織化学的方法で検索することは、PET や NMR CT の臨床的応用の上からもさらに重要であると考えられた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導御校閲を賜りました恩師半田肇教授に深甚なる謝意を表わすとともに、終始御指導御討論をいただきました京都大学脳神経外科学講師石川正恒博士に深謝いたします。また本研究の場を提供していただきました京都大学医学部薬理学教室、皮膚科学教室及び核医学教室に深謝いたします。さらに実験に御協力御討論いただきました京都大学脳神経外科学教室の諸先生方に感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) 阿波根朝光: 実験的脳虚血における脳内カテコラミンの変動—組織化学的検索—. 日外宝 **49**: 754-773, 1980.
- 2) Astrup J, Symon L, et al: Cortical evoked potential and extracellular K⁺ and H⁺ at critical levels of brain ischemia. *Stroke* **8**: 51-57, 1977.
- 3) Astrup J: Energy requiring cell functions in the ischemic brain. *J Neurosurg* **56**: 482-497, 1982.
- 4) Bazan NG: Effect of isohemia and electroconvulsive shock on free fatty acid pool in the brain. *Biochim Biophys Acta* **218**: 1-10, 1970.
- 5) Castaing M, Syrota A, et al: (¹⁴C) DMO for evaluation of regional tissue pH in patients with hemispheric infarction using positron emission tomography. *J Cereb Blood Flow Metabol* **3** (Suppl 1): S148-S149, 1983.
- 6) Cervós-Navaro J and Iglesias Rozas J: The arteriole as a site of metabolic exchange. *Adv Neurol* **20**: 17-24, 1978.
- 7) Chance B, Cohen P, et al: Intracellular oxidation-reduction states in vivo. *Science* **137**: 499-508, 1962.
- 8) Csiba L, Paschen W, et al: A topographic quantitative method for measuring brain tissue pH under physiological and pathophysiological conditions. *Brain Res* **289**: 334-337, 1983.
- 9) Duffy TE, Nelson SR, et al: Cerebral carbohydrate metabolism during acute hypoxia and recovery. *J Neurochem* **19**: 959-977, 1972.
- 10) Falck B, Hillarp NA, et al: Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. *J Histochem Cytochem* **10**: 349-354, 1962.
- 11) Fink DW and Koehler W: pH effects on fluorescence umbelliferone. *Anal Chem* **42**: 990-993, 1970.
- 12) Fishmann RA and Chan PH: Metabolic basis of brain edema. *Adv. Neurol* **28**: 207-215, 1980.

- 13) Flamm ES, Demopoulos HB, et al: Free radicals in cerebral ischemia. *Stroke* **9**: 445-447, 1978.
- 14) Flohr HW, Brock M, et al: Arterial P_{CO_2} and blood flow in different parts of the central nervous system of the anesthetized cat. In *Cerebral Blood Flow* edited by Brock M, Fieschic, et al, Berlin, Springer-Verlag 1969, p 80-88.
- 15) Frackowiak SJ, Lenzi GL, et al: Quantitative measurement of regional cerebral blood flow and oxygen metabolism in man using ^{15}O and positron emission tomography: Theory, procedure and normal values. *J Comput Tomogr* **4**: 727-736, 1980.
- 16) Ginsberg MD, Watson BD, et al: Aspects of tissue injury in cerebral ischemia. In *Princeton Conferences on Cerebrovascular Diseases, Vol. 13: Cerebrovascular diseases* edited by Reivich M, Hurtig HI, New York, Raven Press 1983, p 337-350.
- 17) Gotoh F, Tazaki Y, et al: Transport of gases through brain and their extravascular vasomotor action. *Exp Neurol* **4**: 48-58, 1961.
- 18) Harris RJ and Symon L. Extracellular pH, potassium and calcium activities in progressive ischemia of rat cortex. *J Cereb Blood Flow Metabol* **4**: 178-186, 1984.
- 19) Hossmann K-A, Sakai S, et al: Cation activities in reversible ischemia of the rat brain. *Stroke* **8**: 77-81, 1977.
- 20) Hossmann KA: Cerebral dysfunction related to local and global ischemia of the brain. In *Brain Function in Old Age. Evaluation of Changes and Disorders* edited by Hoffmeister F, Muller C, Berlin/Heidelberg/New York, Springer Verlag 1979, p 385-393.
- 21) Hossmann KA: Experimental aspect of stroke, In *Vascular Disease of the Central Nervous System*, ed 2 edited by Ross Russell RW, Edinburgh, Churchill Livingstone 1983, p 73-100.
- 22) 伊藤梅男, 大野喜久郎, 他: Mongolian Gerbilにおける一時的脳虚血後の脳障害に関する研究. *神経外科* **16**: part II: 313-322, 1976.
- 23) Ito U, Spatz M, et al: Experimental cerebral ischemia in mongolian gerbils. I. Light microscopic observations. *Acta Neuropath* **32**: 209-223, 1975.
- 24) Ishikawa M, Handa H, et al: Microheterogeneity of brain dopamine in the experimental acute cerebral ischemia, *Neurol Res* **6**: 155-158, 1984.
- 25) Kahn K: The natural course of experimental cerebral infarction in gerbils. *Neurol* **22**: 510-515, 1972.
- 26) 加藤宏之, 坂本信夫, 他: 局所性脳虚血病巣周辺部に始まる脳浮腫および組織障害について. 第10回日本脳卒中学会総会, 1985.
- 27) Kety SS: Regional circulation of the brain under physiological conditions -possible relationship to selective vulnerability. In *Selective Vulnerability of the Brain in Hypoxaemia* edited by Schade JP, McMenemey WH, Philadelphia FA Davis Company 1963, p 21-26.
- 28) 金 秀浩, 半田 肇, 他: 脳虚血急性期における局所脳エネルギー代謝とカテコールアミンの変動—組織化学法による実験的検索—. *脳神経* **36**: 167-174, 1984.
- 29) 金 秀浩, 石川正恒, 他: 脳虚血におけるエネルギー代謝及びドパミンの不均一性. 第25回日本神経学会総会, 1984.
- 30) Kim S-H, Handa H, et al: Brain tissue acidosis and changes of energy metabolism in mild incomplete ischemia-Topographical study, *J Cerebral Blood Flow Metabol* **5**: 432-438, 1985.
- 31) Kogure K, Scheinberg P, et al: Sequential cerebral biochemical and physiological events in controlled hypoxemia. *Ann Neurol* **2**: 304-310, 1977.
- 32) Kogure K and Alonso OF: A pictorial presentation of endogenous brain ATP by a bioluminescent method. *Brain Res* **154**: 273-284, 1978.
- 33) Kogure K, Busto R, et al: The dissociation of cerebral blood flow, metabolism and function in the early stage of developing cerebral infarction. *Ann Neurol* **8**: 278-290, 1980.
- 34) 小暮久也: 虚血と脳代謝—フリーラジカル反応にふれて. 虚血と細胞障害—活性酸素, フリーラジカル, 医歯薬出版, 1980, p 51-70.
- 35) 小暮久也: 虚血, 脳浮腫とニューロン障害. 蛋白質・核酸・酵素 **29**: 1695-1709, 1984.
- 36) Krebs HA: The Pasteur effect and the regulation between respiration and fermentation. *Essays Biochem* **8**: 2-34, 1972.
- 37) Levyne S and Payan H: Effect of ischemia and other procedures on the brain and retina of the gerbil. *Exp Neurol* **16**: 255-262, 1966.
- 38) Lierse W and Horstmann E: Quantitative anatomy of the cerebral vascular bed with especial emphasis on homogeneity and inhomogeneity in small parts of the gray and white matter. In *Regional Cerebral Blood Flow*. University of Lund, March 5, 1965. edited by Ingvar DH, Lassen XH, Copenhagen, Munksgaard 1965, p 15-17.
- 39) Lowry OH, Passoneau JV, et al: The stability of pyridine nucleotides. *J Biol Chem* **236**: 2756-2759, 1961.
- 40) Lowry OH, Passoneau JV, et al: Effect of ischemia on known substrate and cofactors of the glycolytic pathway in brain. *J Biol Chem* **239**: 18-30, 1964.
- 41) Macallum AB: On the distribution of potassium

- in animal and vegetable cells. *J Physiol* **32**: 95, 1905.
- 42) Mann DJG and Quastel JH: Nicotinamide, coenzymes and tissue metabolism. *Biochem J* **35**: 502-517, 1941.
- 43) 溝井和夫, 小川 彰, 他: 脳虚血巣, 組織 pH の経時の変化—alkaline shift. *脳神経* **32**: 265-268, 1980.
- 44) Mrsulja BB, Mrsulja BJ, et al: Catecholamine in brain ischemia—alpha-methylparatyrosine. *Brain Res* **104**: 373-378, 1976.
- 45) Nair V, Dann D, et al: Relative vascularity of certain anatomical areas of the brain and other organs of the rat. *Nature (Lond.)* **155**: 497-198, 1960.
- 46) Paschen W, Hossmann K-A, et al: Regional assessment of energy producing metabolism following prolonged complete ischemia of cat brain. *J Cereb Blood Flow Metabol* **3**: 321-329, 1983.
- 47) Plum F, Pulsinelli WA, et al: Brain glucose levels as a factor influencing the outcome of ischemic damage. In *Princeton Conference on Cerebrovascular Diseases*, Vol. 13: *Cerebrovascular Diseases* edited by Reivich M, Hurtig HI, New York, Raven Press, 1983, pp. 195-212.
- 48) Ponten U, Ratcheson R.A. et al: Optimal freezing conditions for cerebral metabolism in rat. *J Neurochem* **21**: 1127-1138, 1973.
- 49) Pykett IL, Newhouse JH, et al: Principles of nuclear magnetic resonance imaging. *Radiology* **143**: 157-168, 1980.
- 50) Rhencrona S, Rosén I, et al: Excessive cellular acidosis: an important mechanism of neuronal damage in the brain? *Acta Physiol Scand* **110**: 435-437, 1980.
- 51) Rhencrona S, Rosén I, et al: Brain lactic acidosis and ischemic cell damage. 1: Biochemistry and neuropathophysiology. *J Cereb Blood Flow Metabol* **1**: 297-311, 1981.
- 52) Schmidt CF: The measurement of P_{O_2} in tissues. In *Oxygen in the Animal Organism* edited by Dickens F, Neil E, London Pergamon Press 1964, p 239-246.
- 53) Schuier FJ, Hossmann K-A, et al: Experimental brain infarcts in cats. II Ischemic brain edema. *Stroke* **11**: 593-601, 1980.
- 54) Siesjö BK: *Brain Energy Metabolism*, New York, Johan Wiley & Sons, 1978.
- 55) Siesjö BK: Cell damage in the brain: A speculative synthesis. *J Cereb Blood Flow Metabol* **1**: 155-185, 1980.
- 56) Tamura A, Horizoe H, et al: Relationship of cerebral vasculature to infarcted areas following unilateral common carotid artery ligation in the Mongolian gerbils. *J Cereb Blood Flow Metabol* **1** (Suppl. 1): S194-195, 1981.
- 57) Sundt TM, Anderson RE, et al: Brain pH measurement using a diffusible lipid soluble pH sensitive fluorescent indicator. *J Neurochem* **31**: 629-636, 1978.
- 59) Welsh FA and Rieder W: Evaluation of in situ freezing of cat brain by NADH fluorescence. *J Neurochem* **31**: 299-309, 1978.
- 60) Welsh FA, O'Corner J, et al: Factors limiting regeneration of ATP following temporary ischemia in cat brain. *Stroke* **13**: 234-242, 1982.