

虚血性神経細胞障害における脳局所 カルシウムとエネルギー代謝の変化

京都大学医学部脳神経外科学教室（指導：菊池晴彦教授）

小 林 修 一

〔原稿受付：昭和63年10月28日〕

Alteration of Regional Calcium and Energy Metabolism in Ischemic Neuronal Injury

SHUICHI KOBAYASHI

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

Abstract

To elucidate mechanisms of intra-and postischemic brain damage, regional alterations of calcium and energy metabolism were investigated by histochemical methods. Permanent ischemia of 1 and 3 hours, and temporary ischemia of 15 min, 1 and 3 hours with subsequent recirculation were made in gerbils.

In the first of present study, calcium leakage was studied in the permanent ischemia. Abnormal calcium stains were observed in the area where ATP content markedly decreased, and they were already noted in the 15 min ischemia. These calcium stains were mainly seen around the blood vessels, and also seen in the tissue at the border of the ischemic area. Distribution of the calcium stains were more intense in the proximity of the large arteries than their distal portion. Thus the results show calcium leakage from the blood vessels developed in the early stage of ischemia, and such vessels were localized in the area where decrease of perfusion pressure was persisted above the level sufficient for calcium leakage.

In the second of present study, regional changes of calcium and energy metabolism were studied in reperfusion of 1 and 3 hours hemispheric ischemia. Although postischemic retraction of brain ATP content varied greatly in different regions, the ATP retraction after the 1 hour ischemia was better than that after the 3 hours ischemia. Abnormal calcium stains were seen in the cortex, the hippocampal Ammon's horn, the ventral postero-lateral thalamic nucleus and

key words: Cerebral ischemia, Recirculation, Calcium, Energy metabolism, Gerbil.

索引語：脳虚血，血流再開，カルシウム，エネルギー代謝，砂ネズミ。

Present address: Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Kyoto University, 54-Shogoin Kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto-606, Japan.

the habenula. These calcium stains mainly localized in the neurons, which were different from intranschemic ones.

In the third of present study, regional changes of calcium and energy metabolism were studied in the later stage of recirculation after 15 min forebrain ischemia. Although tissue ATP content recovered to normal at 6 hours after the recirculation, it gradually decreased in the hippocampal subiculum-CA1 regions as the recirculation time increased. In the regions of reduced ATP content, an alkaline pH shift and loss of Nissl's staining were noted. Abnormal calcium stains were seen in the cortical neurons in layers 3 and 5-6, the hippocampal Ammon's horn and the ventral postero-lateral thalamic nucleus. The distribution of these calcium stains was almost consistent with that in the second study. In the hippocampal subiculum-CA1 regions, the abnormal calcium stains preceded the alteration of ATP and tissue pH. Abnormality in the calcium staining was also noted in the hippocampal CA3-CA4 regions and the ventral postero-lateral thalamic nucleus, where the decrease of ATP or the histopathological change did not develop. Furthermore, abnormality in the calcium staining in these regions was gradually disappeared after 120-144 hours of recirculation.

Thus, present results indicate that postischemic disturbance of intracellular calcium homeostasis does not always lead to the postischemic neuronal cell death, although it is important for cell injury.

はじめに

脳虚血は神経組織への血液供給が減少することによって起こるが、臨床的な治療という見地からは残存血流の豊富な虚血巣辺縁部や虚血後血行が再開された場合の病態に注目する必要がある。しかし単に血行を再開すれば良いという訳ではなく、血行再開後も何らかの機序によりエネルギー代謝障害が改善せず神経組織全体が壊死に陥る脳梗塞²¹⁾、エネルギー代謝障害の改善にもかかわらず発生する選択的な神経細胞壊死 (選択的脆弱性)^{23,27,32)}、さらに非常に短時間の虚血の後、回復していた海馬 CA1 錐体細胞がおよそ48時間後から急速に壊死に陥る遅発性神経細胞壊死¹¹⁾ などいくつかの種類の虚血性神経細胞障害が報告され、その病態に関して研究が進められてきた。しかし虚血巣辺縁部をはじめ選択的脆弱性や遅発性神経細胞壊死を示す部位は空間的に非常に限られた領域であり、ラットなどの小動物を用いた実験では従来の sampling による生化学定量では方法論的に限界があった。それに対し近年 autoradiography をはじめ NADH, ATP, 組織 pH, 各種電解質などを in situ で画像化する組織化学的手法が脳虚血研究にも導入され成果を上げつつあ

る^{8,10,31)}。これらの組織化学的手法では脳の中の空間的解剖学的分布を保ったまま、多種類のパラメータに関して同時に解析することが可能であり、虚血巣辺縁部の変化や一過性脳虚血後の選択的脆弱性や遅発性神経細胞壊死を論ずる時には極めて有力な手法であると考えられる。本研究では砂ネズミの虚血モデルを用いて、虚血性神経細胞障害への関与が注目されるカルシウム^{3,4,5,15,26,29)}とエネルギー代謝の変化との関連を中心にこれらの組織化学的手法により検討を加えた。

方 法

1 実験動物

砂ネズミ成獣ではウィリス動脈輪の発達が不完全で後交通動脈が欠損している¹⁴⁾。そのため一側総頸動脈を結紮することにより、前交通動脈の発達程度に応じて同側大脳半球に不完全脳虚血を作成することが可能で、両側総頸動脈を結紮した場合には全例で高度の前脳虚血を作成することが出来る。本研究では体重 60-80g の雌雄の砂ネズミを用い、大脳半球虚血および前脳虚血を作成して虚血中のエネルギー代謝とカルシウムの変化について検討を行なった。なお実験開始時まで餌と水は自由に摂取させた。

2. NADH 蛍光写真³⁰⁾

液化室素内で凍結脳ブロックに 366 nm の紫外線を励起照射し、発生した 450 nm の NADH 蛍光の局所分布を写真撮影することにより記録した。

3. 組織 pH²⁾

-20°C のクリオスタット内で 16 μ m の冠状凍結切片を作成し、あらかじめ umbelliferone で飽和させたセルロースアセテート膜の上にのせた。370 nm の紫外線を照射することにより組織 pH の局所変化を撮影記録した。

4. ATP 組織化学¹³⁾

ATP の局所変化を観察するために Kogure らの ATP 組織化学法に改良を加えて使用した¹²⁾。まず透明支持体の上に反応に必要な luciferin-luciferase などのすべての試薬を含む試薬層をおき、その上に aniline black の微粉末よりなる着色層を重ねた試薬

フィルムを作成した。あらかじめ -20°C に冷却した試薬フィルムの着色層の上に、同じ温度で 16 μ m に薄切した新鮮凍結脳切片を貼付し室温に取り出した。溶け出した組織液が着色層を通過して試薬層に入ることにより発生した ATP 生物発光を、透明支持体ごと Kodak Tri X pan film (ISO 400) に直接密着させることにより定性的に記録した。なお露出はクリオスタットから試薬フィルムを取り出して30秒後から45秒後までの15秒間とした。

5. カルシウム組織化学^{1,26)}

カルシウムの局所分布は alizarin red S 法により定性的に観察した。染色液は 1.0g の alizarin red S (Kodak) を 90g の蒸留水に溶解し、これに2.8%のアンモニア溶液 10 ml を加えて作成し²⁶⁾、使用前に液の pH が5.3から5.4の間にあることを確認した。染色は 16 μ m の新鮮凍結脳切片を使用し、3 $\pm$ 2°C で5分間

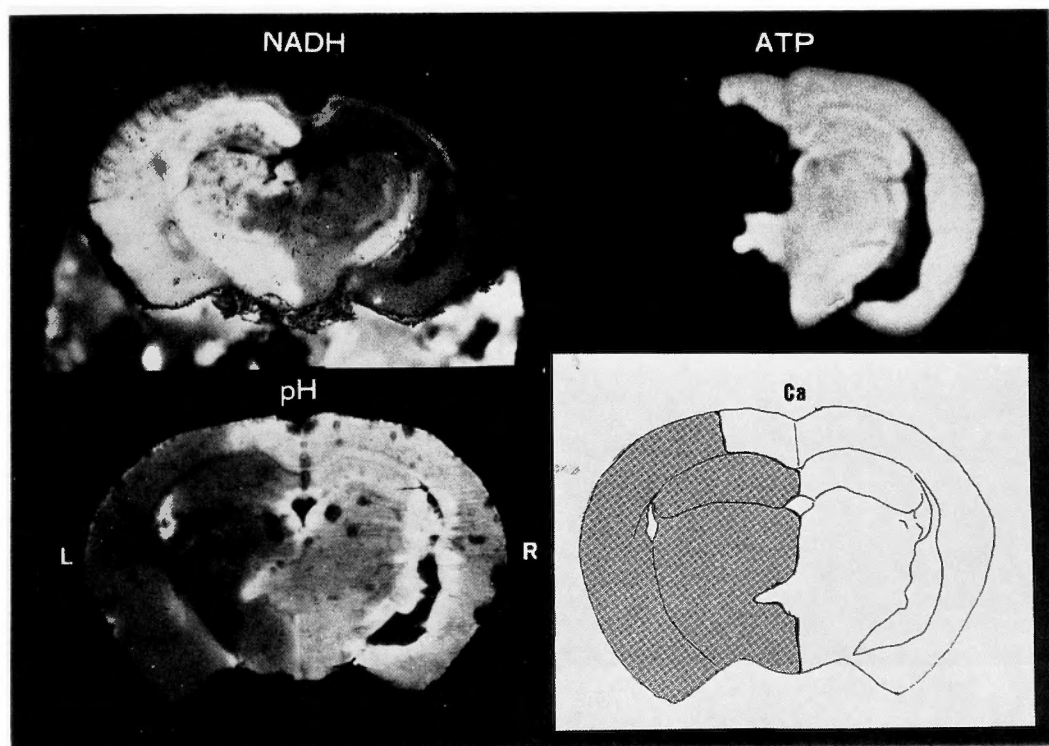


Fig. 1 Regional alterations of NADH fluorescence (NADH), ATP content (ATP), tissue pH (pH) and calcium stains (Ca) in an animal of 3 hours permanent ischemia. NADH fluorescence increased markedly in the ischemic region on the left (L). ATP content also depleted in the corresponding regions. Tissue pH showed acidosis which was represented as dark area. The distribution of abnormal calcium stains was shown in an illustration (shaded area).

反応させた後、グリセリンを用いて余分の染色液を洗い流した。グリセリンで封入後ただちに観察記録を行った。

6. 組織学的検索 (Nissl 染色)

16 μ m の凍結脳切片で cresyl violet 染色を行なった。

実験 I. 永久虚血における検討

これまでの報告では主に虚血後再灌流時におけるカルシウムの変化が問題にされており、虚血中のカルシウムの変化、特に局所的な変化と虚血性神経細胞障害の関連については、外因性のトレーサーを投与する autoradiography では方法論的な限界もあって問題にされることが少なかった。そこで実験 I では永久虚血における脳局所のカルシウムの変化とエネルギー代謝

の関連について検討を加えた。

方 法

A. 半球虚血

エーテル麻酔にて左総頸動脈を 7-0 ナイロン糸にて結紮した。閉創麻酔覚醒後 30 分間神経症状を観察し、虚血による神経症状の内、rolling fit と convulsion を持続的に示したものををもって症状陽性とし¹⁶⁾、単なる意識障害や活動性の低下のみのものは除外した。

B. 前脳虚血

エーテル麻酔下にて気管切開後、両側総頸動脈をポリエチレンチューブ (PE-50) に通した 4-0 ナイロン糸を介して閉塞した。血行の遮断は手術用顕微鏡で直接観察して確認した。

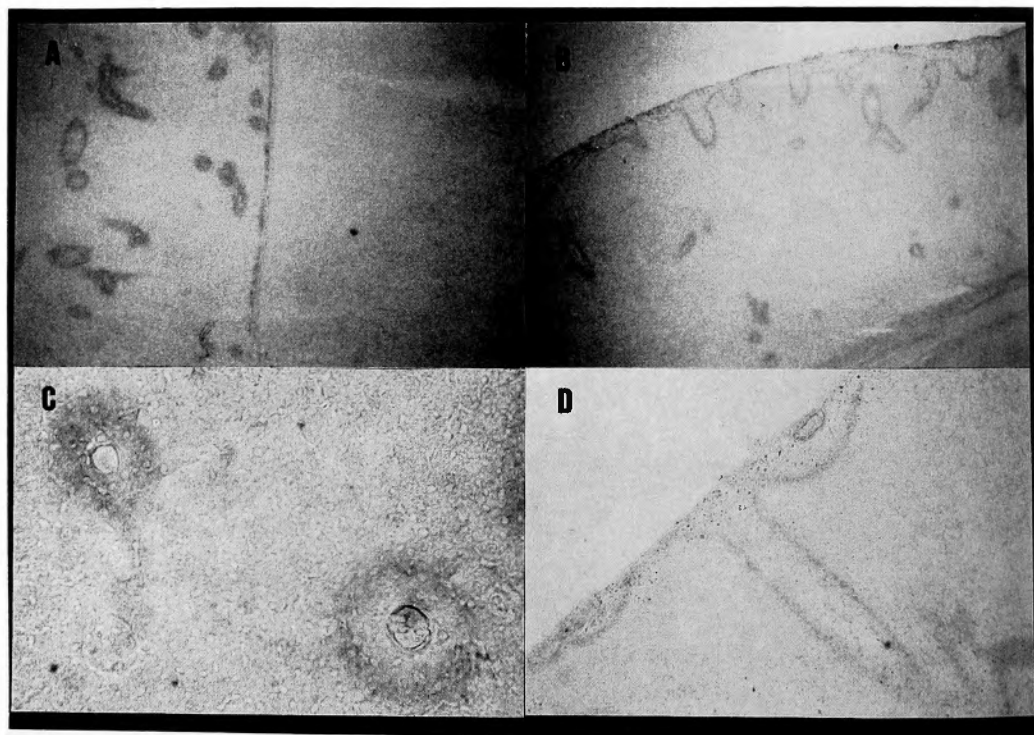


Fig. 2 Calcium histochemistry of the same animal demonstrated in Figure 1. A: midline portion of the hypothalamus. Narrow bundle-like stain was seen in the border zone between ischemic and non-ischemic areas. Many irregular stains around the vessels were seen in the ischemic hemisphere. In contrast, there were no stains in the non-ischemic hemisphere ($\times 16$). B: the cortex. Many irregular calcium stains were seen around the perforating vessels ($\times 16$). C: the hippocampus. Calcium stains were seen around the vessels, which were various in size ($\times 100$). D: the cortex. Calcium stains were seen around the pial vessels and the perforating vessels ($\times 16$).

半球虚血の場合1時間または3時間の虚血後、前脳虚血の場合は15分間の虚血後、エーテル麻酔下で液化窒素による *in situ* brain freezing を行なって脳を取り出し²²⁾、 -85°C にて保存した。対照として無処置の動物(7匹)、総頸動脈の剥離のみを行なった動物(3匹)を用いた。脳は冠状断切片を作成して組織化学的に検討した。

結 果

A. 半球虚血 (Fig. 1, Fig. 2)

1時間虚血例(4例)、3時間虚血例(4例)とも結紮側である左大脳半球で NADH 蛍光の増強と acidosis を認めた。ATP は NADH 蛍光の増強した範囲にほぼ一致して検出限界以下にまで減少しているのが認められた。非虚血側から虚血側への移行部での ATP の変化は急激であり、中間的な変化や不均一な移行帯は認められなかった (Fig. 1)。カルシウムの組織化学も1時間虚血例、3時間虚血例ともほぼ同様の所見が見られ、ATP の減少を認めた左大脳半球(特に皮質)で細動脈と思われる外径 $20-50\ \mu\text{m}$ の血管をとりまいてカルシウムの反応が認められた (Fig. 2-B, Fig. 2-D)。カルシウムの反応が見られる位置は血管外壁に接している場合といくぶん離れている場合が見られた (Fig. 2-C)。また非虚血側と虚血側との境界部には細い帯状にカルシウムの濃染が見られ (Fig. 2-A)、この位置は ATP の変化が急激に起こる位置と一致しており、外径 $20-50\ \mu\text{m}$ の血管とは直接の関係を認めなかった。なお非虚血側である右大脳半球ではカルシウムの反応はまったく認められなかった (Fig. 2-A)。

B. 前脳虚血 (4匹) (Fig. 3, Fig. 4)

椎骨脳底動脈系によって灌流される内側視床の一部や中大脳動脈近位部に近い脳表部を除いて acidosis, NADH 蛍光の著明な増強が見られ、ATP は検出限界以下に減少していた (Fig. 3)。カルシウムの組織化学では中大脳動脈の近位部にあたる脳底部皮質や皮質穿通枝周囲、中大脳動脈や前大脳動脈の近位部本幹に近い脳表血管に接した皮質表層部 (Fig. 4-A)、椎骨脳底動脈系によって灌流される内側視床部分を取りまく視床の血管周囲や内側視床部分との境界部 (Fig. 4-B) に反応が認められた。

C. 対照動物

すべてのパラメータで変化を認めなかった。

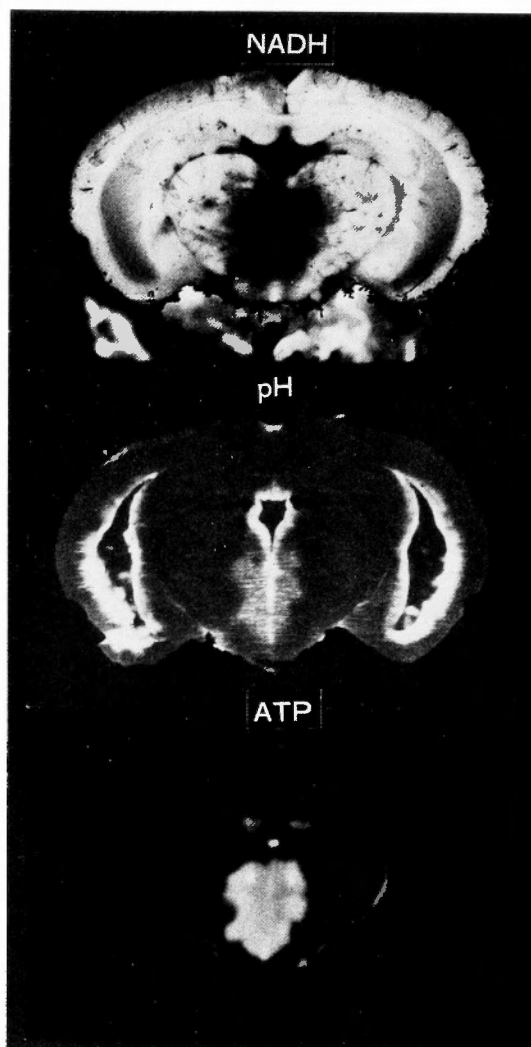


Fig. 3 Histochemical representation of 15 min fore-brain ischemia. Note marked bilateral increase of NADH fluorescence, acidosis and ATP depletion. The medial thalamic region perfused by posterior circulation was spared.

小 括

脳の血管にはカルシウムに対する血液脳関門が存在し^{17,18)}、およそ $2.7\ \text{mM}$ といわれる血液中のカルシウム濃度¹⁸⁾ に対して、細胞外カルシウム濃度は $1.3\ \text{mM}$ といわれている⁷⁾。しかし今回の実験では ATP が急激に変化する虚血巣の辺縁部で帯状に高度のカルシウムの反応が見られ、また皮質穿通血管を始めとして外径 $20-50\ \mu\text{m}$ の血管の周囲にもカルシウムの反応が著

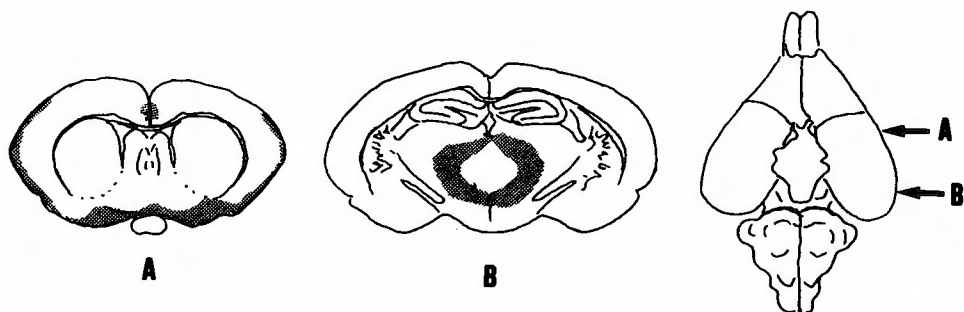


Fig. 4 Illustration of calcium change in the 15 min forebrain ischemia (shaded area). A: caudate level. Calcium stains were mainly seen in the proximal region of the anterior cerebral artery and middle cerebral artery. B: hippocampal level. No calcium stains were seen in the cortical surface. Calcium stains were only seen in the region just lateral to the medial thalamus which was perfused by posterior circulation.

明であった。これは虚血中に血液中のカルシウムが毛細血管壁から直接細胞外腔に漏出したためと思われる、このような漏出は15分間前脳虚血においてもすでに認められた。これらの変化はその分布から判断して虚血辺縁部や細動脈の周囲など、ある程度灌流圧が保たれている部分に起こる変化と考えられた。従ってエネルギー代謝障害により透過性亢進をきたした血管のうち、ある程度以上の灌流圧が保たれている部分でのみ細胞外腔にカルシウムが漏出したものと思われる。

実験II. 半球虚血後再灌流急性期における検討

方 法

エーテル麻酔下に左総頸動脈を小クリップにて閉塞した。実験Iと同じ基準で症状陽性の動物を選び実験に使用した。1時間または3時間の虚血後小クリップをはずして手術用顕微鏡下に総頸動脈の血行再開を確認し、1時間虚血群（1時間再灌流2例、3時間再灌流6例、6時間再灌流2例）および3時間虚血群（1時間再灌流2例、3時間再灌流5例、6時間再灌流2例）について検討した。なお血行の遮断と再開は手術用顕微鏡で直接観察して確認した。また動物の屠殺は実験Iと同じとしATP、カルシウム染色、Nissl染色を行なった。

結 果

A. 1時間虚血群 (Fig. 5, Fig. 6)

1時間再灌流の場合 ATP の回復は良好であった (Fig. 5-A)。カルシウムの組織化学では海馬において

永久虚血例と同様に血管の周囲に反応が見られたが、(Fig. 5-D) 海馬以外の部位ではこのような反応は見られなかった。3時間以上の再灌流を行なった例の ATP 変化はほぼ同じであった。代表例として3時間再灌流例を Fig. 5-B, 5-C に示す。ATP は海馬 subiculum から CA1 および CA3a 領域と視床後外側腹側核での回復が不良であった。海馬 CA3a 領域はとりわけ ATP の回復が不良な部位であったが、Fig. 5-B のように CA3a 領域の ATP 減少が軽度な場合には、カルシウム染色で CA3a に強いカルシウムの反応が見られ (Fig. 5-F)、Nissl 染色における染色性も低下していなかった (Fig. 6-A)。一方 Fig. 5-C のように CA3a 領域の ATP が検出限界以下にまで減少している場合には病巣の中心ではカルシウムの反応が見られず (Fig. 5-F)、Nissl 染色でも病巣部で染色性の低下が見られた (Fig. 6-B)。同様の所見は ATP が検出限界以下にまで減少した視床後外側腹側核でも見られ、カルシウムの反応は病巣部の周辺でのみ認められ、中心部では反応が低下していた (Fig. 5-G)。また1時間再灌流例で見られた血管周囲のカルシウムの反応は3時間再灌流例までは見られたが (Fig. 5-F)、6時間再灌流例では見られなかった。

B. 3時間虚血群 (Fig. 7)

ATP の回復は1時間虚血群とくらべて3時間虚血群の場合は全般的に不良であり、その中でも海馬は特に回復が悪い部位であった。しかし海馬の内部でも部位により ATP 回復に差が見られ、歯状回 (Fig. 7-A, Fig. 7-B, Fig. 7-C) とアンモン角の stratum pyramidale

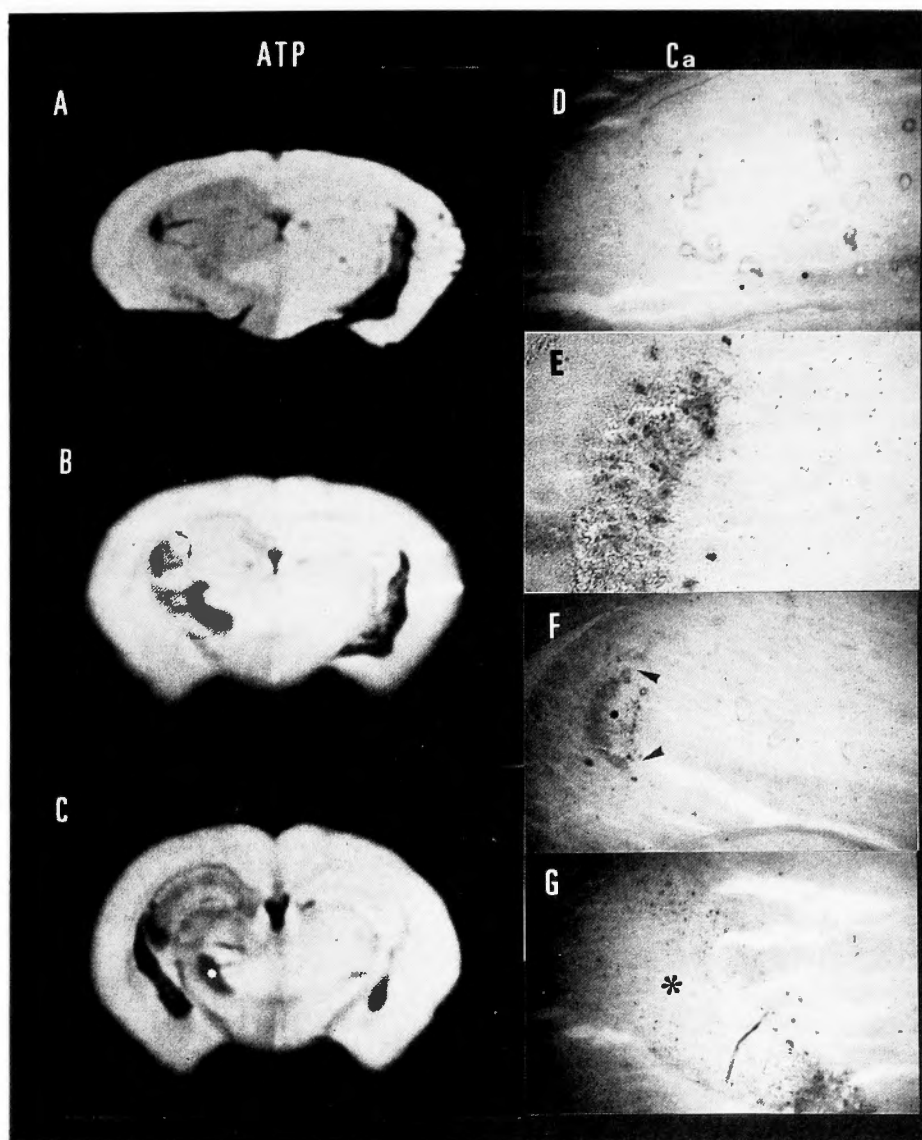


Fig. 5 Regional changes of ATP and calcium stains (Ca) in the recirculation of the 1 hour ischemia. A: 1 hour recirculation. Restoration of ATP in the hippocampus was slightly poorer than the other regions. B: 3 hours recirculation. Restoration of ATP was less in the hippocampal subiculum and CA3a (arrows) regions. In particular, ATP content became undetectable level in the ventral posterolateral thalamic nucleus. C: 3 hours recirculation. ATP restoration was much less in the hippocampal CA1, CA3a regions and the ventral postero-lateral thalamic nucleus (*). In particular, marked depletion of ATP was noted in the hippocampal CA3a region and the ventral postero-lateral thalamic nucleus. D: calcium staining of the CA3 region ($\times 16$). The same animal represented in A. Calcium stains were seen around the blood vessels. E: calcium staining of the CA3 region ($\times 25$). The same animal represented in B. Calcium stains were seen in the pyramidal neurons of the CA3a region. F: calcium staining of the CA3 region ($\times 16$). The same animal represented in C. Calcium stains were seen both around the blood vessels and in the pyramidal neurons of the CA3a region (arrowheads). In the CA3a region, the stains, however, were less intense in the stratum pyramidale (*) than the other strata. G: calcium staining of the ventral postero-lateral thalamic nucleus ($\times 16$). The animal represented in C. Calcium stains were mainly seen in the marginal region of the nucleus, and not seen in the center (*).

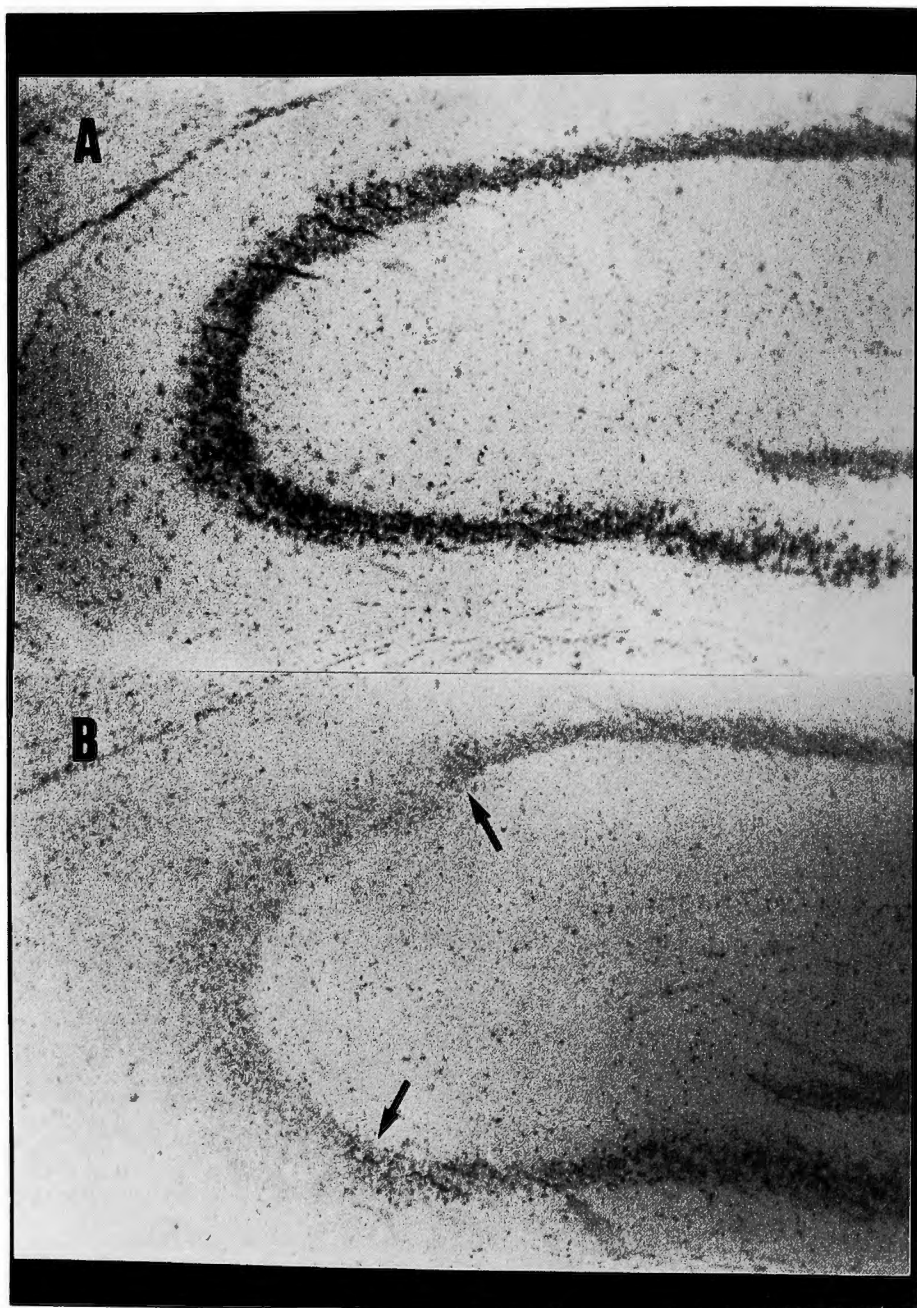


Fig. 6 Nissl's staining in the CA3 region ($\times 16$). A: the same animal in Figure 5-B. Nissl's staining was preserved in the CA3a region. B: the same animal in Figure 5-C. Loss of the staining (arrows) in the CA3a region was noted.

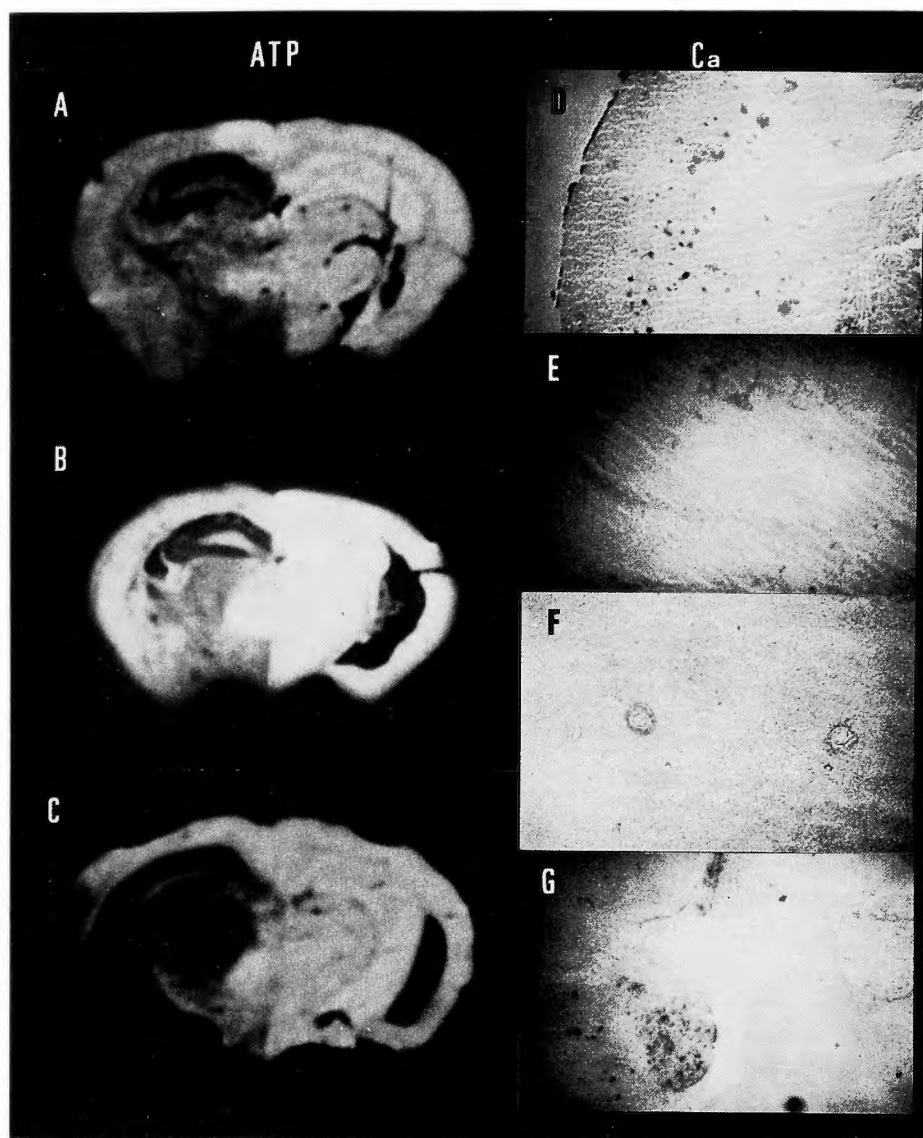


Fig. 7 Regional changes of ATP and calcium staining in the recirculation of the 3 hours ischemia. A: 1 hour recirculation. ATP restration was much less in the hippocampus and the hypothalamus. B: 3 hours recirculation. Although ATP depletion was marked in the hippocampus, the mild restration was seen in the dentate gyrus and the stratum pyramidale. C: 6 hours recirculation. ATP depletion was extensive in the left hemisphere. D: calcium staining of the cortex ($\times 16$). The same animal represented in B. Calcium stains were scattered in the cortical neurons. E: calcium staining in the CA3 region ($\times 16$). The same animal represented in B. Calcium stains were seen in the pyramidal cell layer. F: calcium staining of the hippocampus ($\times 60$). The same animal represented in B. Calcium stains were seen around the blood vessels. G: calcium staining of the habenula ($\times 16$). The same animal represented in B. Calcium stains were also noted in the habenula.

(Fig. 7-A, Fig. 7-B) では回復傾向を認めた。しかし1時間虚血後3時間以上の再灌流を行なった場合に見られた海馬 CA3a 領域に選択的な ATP の減少は認められなかった。カルシウム染色では皮質 (Fig. 7-D)、手綱核 (Fig. 7-G) に反応を認めたが、これらの変化は1時間虚血群でも同様に見られた。海馬では ATP の回復の比較的良かった stratum pyramidale を中心にカルシウムの反応を認め (Fig. 7-E)、再灌流3時間までの例では1時間虚血群と同様に血管周囲にカルシウムの反応が見られた (Fig. 7-F)。しかし1時間虚血群によく見られた海馬 CA3a 領域に選択的なカルシウムの反応は3時間虚血群では見られなかった。

小 括

虚血後再灌流時の ATP の回復は、1時間虚血群にくらべ3時間虚血群では全般的に不良であり虚血時間が長くなると ATP の回復は不良になると考えられる。しかしいずれにしても海馬や視床などでは解剖学的構造に沿った選択的な変化が認められ特徴的であった。一方カルシウムの反応は皮質、海馬、手綱核、後外側腹側核などに選択的に見られたが、これらの部位で ATP の回復が良い場合にむしろ強い反応が見られ、ATP が著明に減少した場合には病巣の中心部は反応が見られなかった。また再灌流3時間までの海馬では虚血中 (実験 I) と同様に血管周囲にカルシウムの反

応が見られた。

実験III. 前脳虚血後再灌流慢性期における検討

方 法

実験 I と同じ方法で両側総頸動脈を閉塞し、15分間の虚血後6時間、24時間、48時間、72時間、96時間、120時間、144時間の再灌流を行なった。なお血行の遮断と再開は手術用顕微鏡で直接観察して確認した。また動物の屠殺は実験 I と同じとし組織 pH, ATP, カルシウム染色, Nissl 染色を行なった。

結 果

1. 再灌流6時間 (4匹) (Fig. 8)

カルシウムの組織化学で永久虚血例 (実験 I) の血管周囲や非虚血部との境界部に見られた反応はすでに認められず、脈絡叢 (Fig. 8-C)、頭頂葉皮質の3層および5—6層の神経細胞が散在性に染色され (Fig. 8-A, Fig. 8-B)、海馬では subiculum (Fig. 8-C) および CA4 (Fig. 8-D) に反応が見られた。この時点では ATP は既に回復していた。

2. 再灌流24時間 (4匹) (Fig. 9)

カルシウムの組織化学では6時間再灌流例とほぼ同じであったが、新たに海馬 CA1 領域 (Fig. 9-A)、視床 (Fig. 9-B) で反応が見られた。エネルギー代謝では海馬の subiculum でのみ ATP の減少と alkalosis が

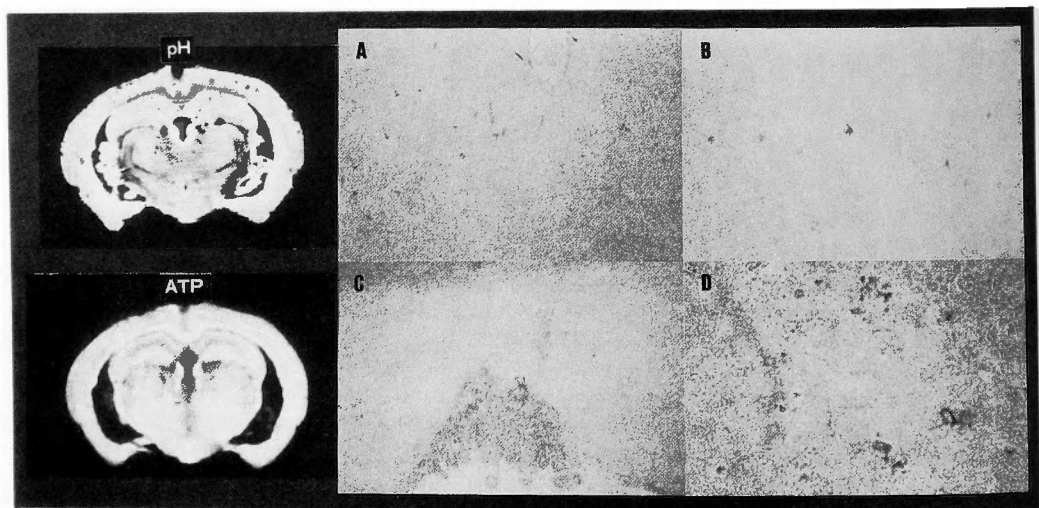


Fig. 8 Tissue pH, ATP content and calcium staining in an animal of 6 hours recirculation after the 15 min forebrain ischemia. Scattered calcium stains were seen (A-D). A: the cortical layer 3 ($\times 40$), B: the cortical layers 5-6 ($\times 40$), C: the hippocampal subiculum ($\times 25$), D: the hippocampal CA4 region ($\times 100$).

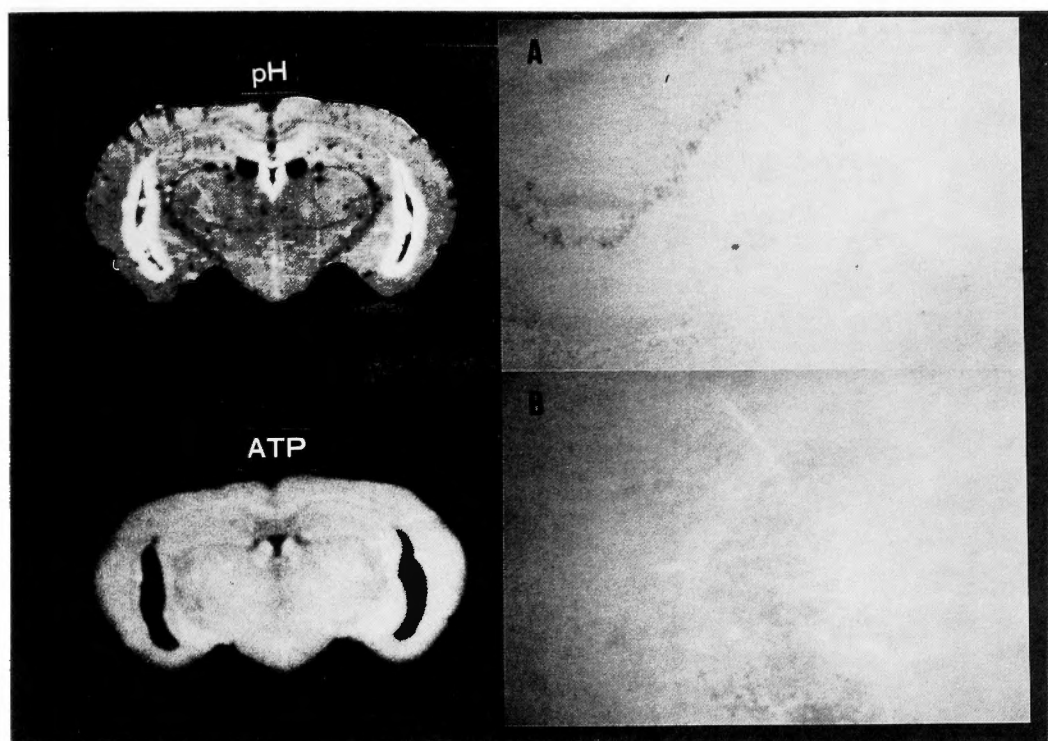


Fig. 9 Tissue pH, ATP content and calcium staining in an animal of 24 hours recirculation after the 15 min forebrain ischemia. Alkalosis and decreased ATP content were seen in the bilateral subicula. A: Calcium stains were noted in the hippocampal subiculum-CA1 regions ($\times 16$). B: calcium stains in the ventral posterolateral thalamic nucleus ($\times 16$).

見られた。従ってカルシウムの組織化学の変化は ATP の減少した領域よりも広範囲であった。

3. 再灌流48時間（5匹）(Fig. 10)

カルシウムの組織化学では24時間再灌流例での変化に加え、海馬 CA3 領域で反応が認められた (Fig. 10-B)。エネルギー代謝では海馬の subiculum から CA1 領域で ATP の減少と alkalosis が見られた。やはりカルシウム組織化学の変化は ATP の変化より広範囲であった。

4. 再灌流72時間（5匹）、96時間（4匹）(Fig. 11)

カルシウム組織化学では48時間再灌流例と同じ皮質3層および5—6層、海馬 CA1、CA3 領域、視床に反応を認めたが、最も強い反応を示した例がこの時間帯に集中して見られ特徴的であった (Fig. 11-A, Fig. 11-B)。しかしエネルギー代謝では海馬の subiculum から CA1 領域でのみ ATP の減少と alkalosis が見られた。

5. 再灌流120時間（6匹）、144時間（2匹）(Fig. 12)

カルシウムの組織化学では反応は非常に軽微となっていた (Fig. 12-A, Fig. 12-B)。一方エネルギー代謝では海馬 subiculum から CA1 領域のみに ATP の減少と alkalosis が見られた。

6. 組織学的変化

海馬 subiculum から CA1 領域で、ATP の減少と alkalosis が見られた部分では細胞壊死による錐体細胞の染色性低下と reactive microglia の浸潤が見られた。

小 括

この実験では細胞障害の判断の基準として脳局所での ATP の変化に着目した。ATP は代謝回転の速い物質であり、ミトコンドリアでの生合成が停止すると数分で細胞内の ATP は枯渇する²⁰⁾。従って ATP の枯渇は必ずしも細胞死や不可逆的細胞障害を意味しな

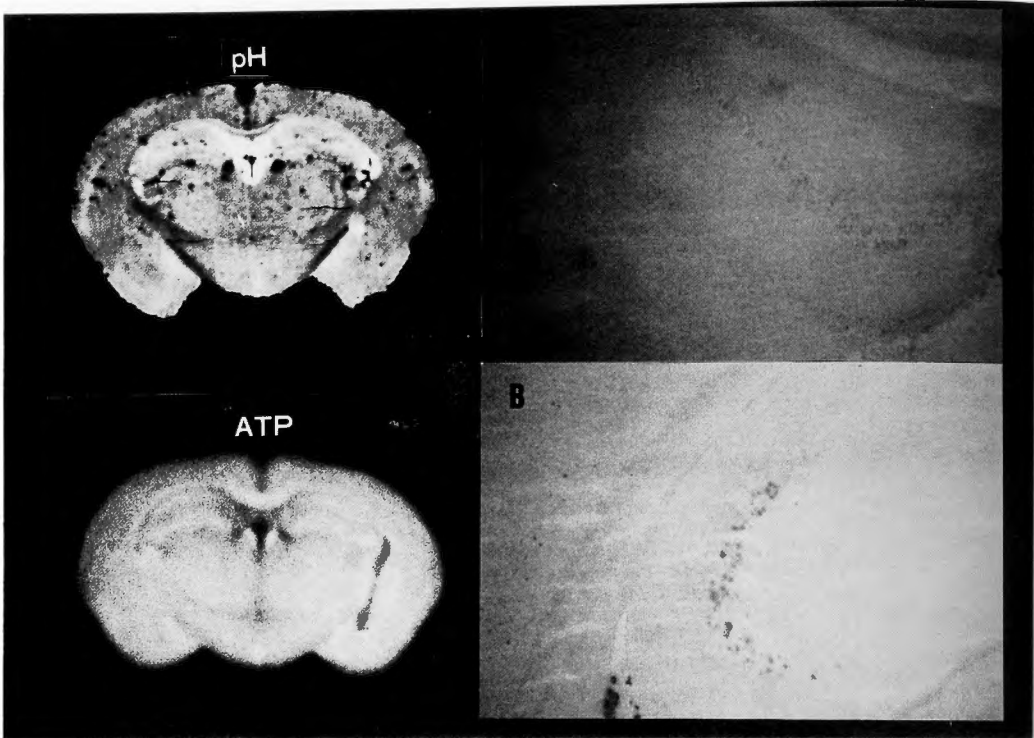


Fig. 10.

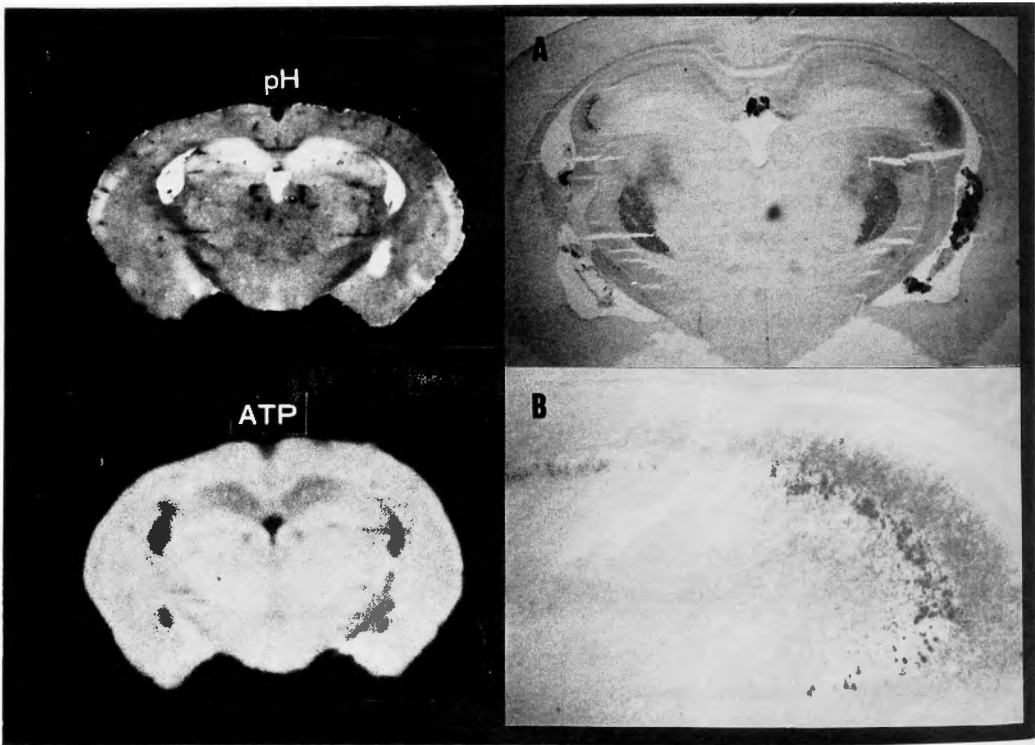


Fig. 11.

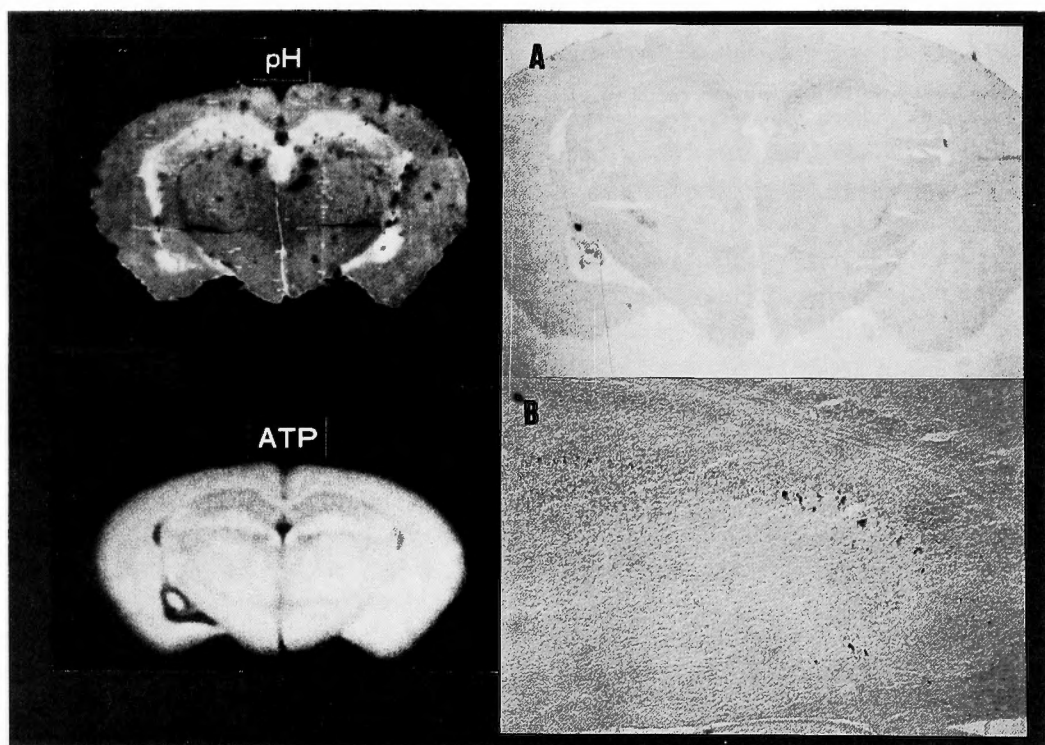


Fig. 12 Tissue pH, ATP content and calcium staining in an animal of 144 hours recirculation after the 15 min forebrain ischemia. Alkalosis and decreased ATP content were seen in the bilateral subiculum-CA1 regions. A: Minimal calcium stains were seen in the hippocampal subiculum-CA1 regions, the CA3 regions and the thalamic regions ($\times 2.5$). B: Calcium stains in the hippocampal CA3 region became less intense ($\times 16$).

いが、逆に脳局所の ATP に変化が見られないという
ことはその部分で ATP の産生が続いていること、す
なわち細胞が生きていることを意味している。今回の
実験では虚血中に減少した ATP は再灌流 6 時間の時
点ですでに回復しており、再灌流 24 時間以降に認めら
れた ATP の減少は組織学的変化や alkalosis を伴っ

ていた。

実験Ⅲでカルシウムの変化を認めた部位は皮質 3 層、
5—6 層、海馬 subiculum-CA1, CA3 領域、視床核
などであり、実験Ⅱにおいてカルシウムの変化を認め
た部位と共通点が多かった。しかしこれらの部位のう
ち実験Ⅲで検討した時間経過の範囲で、実際に ATP

Fig. 10 Tissue pH, ATP content and calcium staining in an animal of 48 hours recirculation after the 15 min forebrain ischemia. Alkalosis and decreased ATP content were seen in the bilateral subicula. A: Calcium stains were noted in the hippocampal subiculum-CA1 regions ($\times 16$). B: calcium stains in the hippocampal CA3 region ($\times 16$).

Fig. 11 Tissue pH, ATP content and calcium staining in an animal of 72 hours recirculation after the 15 min forebrain ischemia. Alkalosis and decreased ATP content were seen in the bilateral subiculum-CA1 regions. A: Calcium stains were noted in the hippocampal subiculum-CA1 regions, the CA3 regions and the thalamic regions ($\times 2.5$). B: Massive stains of calcium were seen in the hippocampal CA3 region ($\times 16$).

の減少が見られたのは海馬 subiculum-CA1 領域のみであり、実験Ⅱの1時間虚血群で選択的な ATP の減少が見られた海馬 CA3a 領域や視床では、カルシウム染色で異常が見られたにもかかわらず ATP の減少は認められなかった。また ATP が減少しなかったこれら海馬 CA3a 領域や視床は再灌流120-144時間後にはカルシウムホメオスタシスの異常から次第に回復しつつあると考えられた。従って再灌流時にはまずカルシウムホメオスタシスの異常が起こり、その後海馬 subiculum-CA1 領域ではいわゆる遅発性神経細胞壊死に陥るのに対し、それ以外の部位では ATP が減少せずむしろカルシウムホメオスタシスの異常から次第に回復していくと考えられた。

考 察

1. 組織化学的手法に関して

今回用いた組織化学的手法のうち脳切片に含まれる ATP を in situ で画像化する方法は最初 Kogure らにより発表された¹³⁾。しかし原法の解像力や再現性では微妙な変化を捉えることは困難であったため、本研究では固定化酵素膜を用いた変法を工夫した。変法により高い解像力と再現性が達成された¹²⁾。

カルシウムの組織化学は alizarin red S 法により行なったが、alizarin red S は pH 5.4 の条件でカルシウム、バリウム、ストロンチウムとのみ反応する¹⁾。しかしカルシウム以外は脳組織においてその絶対量が少なく、その反応物の色調もカルシウムによるものと異なることから、本研究で認められた alizarin red S の反応はカルシウムに特異的と考えられる。

2. カルシウム仮説

近年カルシウムイオンの細胞内流入が細胞死に至る最終共通経路 (final common pathway) として取り上げられ⁶⁾、虚血性神経細胞障害においてもカルシウムイオンの細胞内流入が起こってミトコンドリアの機能が障害されたり、細胞融解に関与するカルシウム依存性フォスホリパーゼやプロテアーゼが活性化される可能性(カルシウム仮説)が指摘されている^{24,27,28,32)}。このカルシウム仮説はこれまで主に一過性脳虚血後の神経細胞障害の機序として検討されてきた事柄であるが、実験Ⅰの結果からすでに虚血中にカルシウムの血管からの漏出が起こっていることが明らかであり、実験Ⅱでは再灌流早期の海馬で同様の所見が残存しているのが観察された。Ito らは1時間以上の砂ネズミ半球虚血で、細動脈周囲および虚血領域と非虚血領域と

の境界部の限局した領域で neuropil の vacuolization が見られたと報告しており⁹⁾、これは実験Ⅰでカルシウムの漏出が見られた部位と一致している。従って血管から漏出したカルシウムがその局所においてまず細胞外次いで細胞内のカルシウム濃度を異常に上昇させ、細胞融解に関与するカルシウム依存性酵素を活性化させることにより組織障害を引き起こした可能性や、血管壁からのカルシウム漏出に伴って溶質である水の移行が起こり、血管周囲や虚血巣辺縁部の限局した領域で局所的な浮腫を引き起こした可能性が示唆される。

一方再灌流にともなう虚血性神経細胞障害においては、カルシウムの細胞内流入が少なくとも細胞死に先行することがカルシウム仮説成立の前提条件として必要であり、それを証明する努力が続けられてきた。しかしこれまでの報告ではカルシウムの細胞内蓄積は細胞壊死と同時にそれに引き続いて起こったとする報告が多く^{4,15,26,29)}、カルシウムの蓄積が細胞壊死に先行するというのは1987年の Deshpande らの報告のみであった⁹⁾。この細胞死に先行するカルシウムの細胞内流入を証明することは本研究の目標の一つであったが、実験Ⅱ、実験Ⅲではいまだ ATP の減少や組織障害が発生していない部位でもカルシウムホメオスタシスの異常が広範に起こっていることが示され、カルシウムの細胞内流入が細胞死に先行する可能性を強く示唆する所見と考えられる。

3. カルシウムホメオスタシスの異常と選択的脆弱性

本研究で示された変化のうち、再灌流時のカルシウムの変化は虚血再灌流の時間経過が全く異なる実験Ⅱと実験Ⅲにおいてもほぼ共通した部位に見られた。このことからこれらの部位は虚血再灌流時に特にカルシウムホメオスタシスの異常をきたしやすい性質を持った部位であると考えられる。またこれらの部位は Pulsinelli らの報告にある選択的脆弱性を示す領域²³⁾とも良く一致していることから、虚血性神経細胞障害における選択的脆弱性は、再灌流中に起こるカルシウムホメオスタシスの異常と密接な関係があることが示唆される。その際、同じようにカルシウムホメオスタシスの異常をきたした部位でも何らかの条件により細胞死に至る場合と回復する場合のあることが実験Ⅲの結果から認められた。すなわちこれらの部位では虚血性侵襲のために細胞膜が障害され、再灌流時には細胞内へのカルシウム流入が亢進し、それを細胞外へ排出する¹⁹⁾と同時にミトコンドリア内へ貯蔵する^{5,29)}

ことにより処理しているものと思われるが、ミトコンドリアによるカルシウムの貯蔵能には上限がある^{19,25)}。従って細胞膜の障害が修復されず細胞内へのカルシウム流入の増大が持続している細胞では、最終的にはミトコンドリアの処理能力を越えてしまうため細胞死に陥り¹⁹⁾、その一方でこのカルシウムの細胞内流入の増大をなんとか処理しつつ細胞膜の修復に成功した細胞は、生き延びることが出来るのではないかと考えられる。

本研究では虚血に伴って起こるカルシウムホメオスタシスの異常が虚血性神経細胞障害と密接に関係していることが強く示唆された。しかもこの様なカルシウムホメオスタシスの異常をきたした部位の中でも将来細胞死に至る部位と、回復する部位のあることが明らかとなった。そしてこの回復する部位の存在こそ虚血性脳血管障害治療への可能性を示唆するものと考えられる。

結 語

1. 砂ネズミの不完全虚血モデルを用いて、虚血中を含め一過性脳虚血後急性期および慢性期のカルシウムの変化とエネルギー代謝の変化に関して検討した。
2. 虚血中の検討では、15分間の虚血ですでにカルシウムが血管から漏出しているのが認められた。カルシウムの漏出は ATP の減少した領域の中でもある程度の灌流圧が保たれていると推定される部位を中心に見られた。
3. 1時間または3時間の半球虚血後血流を再開し、再灌流6時間までの急性期の変化について検討した。ATP の回復は局所により差が見られたが、全般的に1時間虚血群にくらべると3時間虚血群では不良であった。カルシウムの変化は再灌流3時間までの海馬では虚血中と同様に血管周囲に反応が見られたが、再灌流時間の延長にともない次第に皮質、海馬、視床における特定の部位で反応が見られるようになった。
4. 15分間の前脳虚血後血流を再開し、再灌流6時間以降144時間までの慢性期の変化について検討した。再灌流後いったん回復した ATP はカルシウムの変化に引き続いて海馬 subiculum から CA1 領域で次第に減少し、組織障害の発生と alkalosis が観察された。カルシウムの変化は海馬 subiculum から CA1 領域だけでなく、海馬 CA3 領域や視床でも認められたが、これらの部位では ATP の減少や組織障害は発生せず、最終的にはカルシウムホメオスタシスの異常からも

回復すると考えられた。

5. 虚血再灌流時間が異なっても一過性脳虚血後はほぼ共通した部位でカルシウムホメオスタシスの異常が起こることが示された。従ってこれらの部位では虚血に際しカルシウムホメオスタシスの異常をきたしやすい共通の性質を持つ可能性が推測され、このことがこれらの部位が虚血に対し選択的に脆弱であることと密接な関係があると思われる。

6. 以上より一過性脳虚血後神経細胞障害に先行してカルシウムホメオスタシスの異常が起こる可能性が示唆された。しかしカルシウムホメオスタシスの異常は、部位によっては回復する可能性もあり、すべて細胞死へつながる現象とは考えられなかった。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました京都大学脳神経外科学教授、菊池晴彦先生に深甚の謝意を表すると共に、終始、御指導、御教示頂いた京都大学脳神経外科学講師、石川正恒先生に深謝の意を捧げます。

文 献

- 1) Bodensteiner JB, Engel AG: Intracellular calcium accumulation in Duchenne dystrophy and other myopathies: A study of 567,000 muscle fibers in 114 biopsies. *Neurology* 28: 439-446, 1978.
- 2) Csiba L, Paschen W, Hossmann KA: A topographic quantitative method for measuring brain tissue pH under physiological and pathophysiological conditions. *Brain Res* 289: 334-337, 1983.
- 3) Deshpande JK, Siesjö BK, Wieloch T: Calcium accumulation and neuronal damage in the rat hippocampus following cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 7: 89-95, 1987.
- 4) Dienel GA: Regional accumulation of calcium in postischemic rat brain. *J Neurochem* 43: 913-925, 1984.
- 5) Dux E, Mies G, Hossmann KA, et al: Calcium in the mitochondria following brief ischemia of gerbil brain. *Neurosci Lett* 78: 295-300, 1987.
- 6) Farber JL: The role of calcium in cell death. *Life Sci* 29: 1289-1295, 1981.
- 7) Hansen AJ, Zeuthen T: Extracellular ion concentrations during spreading depression and ischemia in the rat brain cortex. *Acta Physiol Scand* 113: 437-445, 1981.
- 8) Hossmann KA, Mies G, Paschen W, et al: Multiparametric imaging of blood flow and metabolism after middle cerebral artery occlusion in cats. *J Cereb Blood Flow Metab* 5: 97-107, 1985.

- 9) Ito U, Spatz M, Walker JT, et al: Experimental cerebral ischemia in Mongolian gerbils. I. Light microscopic observations. *Acta Neuropath(Berl)* 32: 209-223, 1975.
- 10) Kim SH, Handa H, Ishikawa M, et al: Brain tissue acidosis and changes of energy metabolism in mild incomplete ischemia-Topographical study. *J Cereb Blood Flow Metab* 5: 432-438, 1985.
- 11) Kirino T: Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* 239: 57-69, 1982.
- 12) Kobayashi S, Kikuchi H, Ishikawa M, et al: Histochemical representation of regional ATP in the brain using a multilayer film format firefly luciferase immobilized membrane. *J Cereb Blood Flow Metab*: *in press*.
- 13) Kogure K, Alonso OF: A pictorial representation of endogenous brain ATP by a bioluminescent method. *Brain Res* 154: 273-284, 1978.
- 14) Levine S, Sohn D: Cerebral ischemia in infant and adult gerbils. Relation to incomplete circle of Willis. *Arch Path* 87: 315-317, 1969.
- 15) Martins E, Inamura K, Themner K, et al: Accumulation of calcium and loss of potassium in the hippocampus following transient cerebral ischemia: A proton microprobe study. *J Cereb Blood Flow Metab* 8: 531-538, 1988.
- 16) Matsumoto M, Hatakeyama T, Akai F, et al: Prediction of stroke before and after unilateral occlusion of the common carotid artery in gerbils. *Stroke* 19: 490-497, 1988.
- 17) Mulryan BJ, Neuman MW, Neuman WF, et al: Equilibration between tissue calcium and injected radiocalcium in the rat. *Am J Physiol* 207: 947-952, 1964.
- 18) Murphy VA, Smith QR, Rapoport SI: Homeostasis of brain and cerebrospinal fluid calcium concentration during chronic hypo- and hypercalcemia. *J Neurochem* 47: 1735-1741, 1986.
- 19) Nicholls DG: A role for the mitochondrion in the protection of cells against calcium overload? *Prog Brain Res* 63: 97-106, 1985.
- 20) Nowak TS, Fried RL, Lust WD, et al: Changes in brain energy metabolism and protein synthesis following transient bilateral ischemia in the gerbil. *J Neurochem* 44: 487-494, 1985.
- 21) Plum F: What causes infarction in ischemic brain?: The Robert Wartenberg lecture. *Neurology* 33: 222-233, 1983.
- 22) Pontén U, Ratcheson RA, Salford LG, et al: Optimal freezing conditions for cerebral metabolites in rats. *J Neurochem* 21: 1127-1138, 1973.
- 23) Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F: Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* 11: 491-498, 1982.
- 24) Raichle ME: The pathophysiology of brain ischemia. *Ann Neurol* 13: 2-10, 1983.
- 25) 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.
- 26) Sakamoto N, Kogure K, Kato H, et al: Disturbed Ca^{2+} homeostasis in the gerbil hippocampus following brief transient ischemia. *Brain Res* 364: 372-376, 1986.
- 27) Siesjö BK: Cell damage in the brain: A speculative synthesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 1: 155-185, 1981.
- 28) Siesjö BK: Cerebral circulation and metabolism. *J Neurosurg* 60: 883-908, 1984.
- 29) Simon RP, Griffiths T, Evans MC, et al: Calcium overload in selectively vulnerable neurons of the hippocampus during and after ischemia: An electron microscopy study in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 4: 350-361, 1984.
- 30) Welsh FA, Reider W: Evaluation of in situ freezing of cat brain by NADH fluorescence. *J Neurochem* 31: 299-309, 1978.
- 31) Welsh FA: Regional evaluation of ischemic metabolic alterations. *J Cereb Blood Flow Metab* 4: 309-316, 1984.
- 32) Wieloch T: Neurochemical correlates to selective neuronal vulnerability. *Prog Brain Res* 63: 69-85, 1985.