

脳腫脹発生に対するエネルギー代謝障害の役割について

京都大学医学部脳神経外科学教室 (指導: 半田 肇教授)

瀬 田 喜 一 郎

〔原稿受付: 昭和42年3月4日〕

Biochemical Changes in Brain Mitochondria Following Ischemia and Brain Swelling

by

KIICHIRO SETA

From Department of Neurosurgery, Kyoto University Medical School

(Director : Prof. Dr. HAJIME HANDA)

The present study was undertaken to clarify the energy metabolism of rat brain mitochondria in the ischemic state with regard to some basic properties relevant to their functional state, such as oxidative phosphorylation and active cation transport.

(1) After 3 minutes' ischemia, the maximal phosphorylation rate in brain mitochondria fell to one third of the initial rate, whereas in mitochondria from other tissues such as liver, kidney and heart, the initial rates of phosphorylation remained almost constant for ten minutes. In brain mitochondria, the state 3 respiration, respiratory control, the phosphorylation rate and 2,4-dinitrophenol-activated ATPase activity decreased simultaneously as a function of the period for which the brain remained in the ischemic state. These four activities fell to one third of the normal values after 3 minutes' ischemia, but the ADP/O ratio and Mg^{++} -activated ATPase activity were retained at essentially the initial level. In addition, the progressive decrease in oxidative phosphorylation was accompanied with an increase in fatty acid-like substances, which were suspected to act as a "physiological" uncoupler and which appeared to be formed enzymatically from mitochondrial lipoprotein.

(2) Brain swelling was produced by exposing the cerebral cortex to air. The biochemical findings of the isolated mitochondria from swollen brains correlated with clinical findings. In the moderate cases, the isolated mitochondria revealed a loosely coupled state of the oxidative phosphorylation, and was characterized by a decrease of respiration in the presence of a phosphate acceptor, with an essentially normal phosphorylative efficiency. The ATPase activity of the mitochondria was slightly stimulated by 2,4-dinitrophenol. On the other hand, the mitochondria of severe cases showed loss of phosphorylation and a decrease of DNP-activated ATPase activity.

(3) Mitochondrial electrolytes are normally retained constant by the metabolically-linked transport against their concentration gradients, and the mitochondrial original content of K^+ and Na^+ was 290 and 80 $m\mu$ moles/mg protein respectively. Ischemia revealed

an increase of mitochondrial Na^+ and a decrease of K^+ . During the first two minutes of ischemia the K^+ content markedly decreased and over a much longer period reached to a constant value, 230 $\text{m}\mu$ moles/mg protein. On the other hand, Na^+ increased linearly under the same conditions and after 3 minutes became 95 $\text{m}\mu$ moles/mg protein. The decrease of K^+/Na^+ ratio was accompanied by the same fall in the phosphorylation rate. The parallelism of these results suggests that the maintenance of concentration gradients of K^+ and Na^+ in the mitochondria is strongly dependent upon the phosphorylative capacity.

(4) The possible therapeutic effect of some drugs for the ischemic brain and the swollen brain was investigated. The brain mitochondria prepared from the rats that were pretreated by steroid hormone and then incubated in the ischemic state for a few minutes showed a decrease of respiratory activity. On the other hand, the mitochondria prepared from the rats suffered from brain swelling and treated by steroid hormone, showed relatively marked recovery of respiratory activity. Marked recovery was obtained in the rats treated by the hypertonic solution of urea, and by CDP-choline moderate recovery was obtained.

Further, the possible mechanism of the development of the brain swelling was discussed from the viewpoint of the endogenous inhibitor and electrolytes.

結 言

脳内の高エネルギー物質のレベルは恒常的であり、常にブドウ糖・酸素を高率に利用して非常に活発な代謝がいとまれ、その酸素消費量は他の組織に比していちじるしく高く、成人では全組織の消費する酸素量の20~25%、4才未満の小児では50%が消費されている⁴⁾。しかも、これらの酸素の利用、すなわち呼吸は常に細胞内においていとまれている数々の磷酸化とのつながりにおいて行なわれている。すなわち、細胞が活動する時には、エネルギー要求反応が高まり、ATPが分解され、そのエネルギーが利用される。ここで生じたADPが呼吸を促進してATPが再合成される。したがってATPが利用されている間はADPが再生されるので活発な呼吸が続き、いわゆる定常状態(kinetic steady state)となるわけである。

このような定常状態をいとなむ場所は、細胞内ミトコンドリアであり、ここでは生体が利用するのに最も便利な型のエネルギー、すなわちATPを酸素の存在下で酸化的磷酸化により生成する。このことからミトコンドリアは、蛋白合成・能動輸送など細胞内のエネルギー要求のあるすべての酵素反応に密接に関与していることになる³⁴⁾。したがって、脳組織がこのように十分な酸素の供給を受けなければ機能を果しえないことは、脳組織の代謝活性それ自体が酸素を利用して生成される高エネルギー物質に強く依存していることに

ほかならない。すなわち、ミトコンドリアの生化学的活性が低下すれば、その組織の生物学的活性が低下することになる。

低酸素状態においては、脳内の嫌氣的解糖が盛んとなり、creatine phosphate・ATPなどの高エネルギーを有する物質の利用が高まり、その結果、乳酸・無機磷の蓄積がおこる⁴¹⁾。一方、組織学的には、毛細血管・静脈の拡張にはじまり、次いでこれらの血管壁の破綻、組織の膨化がおこる¹⁵⁾。また、電子顕微鏡的にはanoxiaの早期には核および核膜は、比較的傷害を受けないのに対し、細胞質の変化がみられ、ミトコンドリアの変化も著明で、膨化を示すとともに内膜の乱れを生じ、き裂を生じ、最後には内膜は消失する²⁰⁾。

脳腫脹脳浮腫についても、色々の方法によつて作成され、種々の角度より研究が行なわれ、多くの成績が得られているが、一般に血液-脳関門の破綻とか、血管容積の増大・血管壁の透過性異常、細胞膨化とか、その微細構造の変化の観察にのみ重点がおかれているのが現状であり、ダイナミックな立場、すなわちその細胞自体の生化学的立場から分析を試みた研究は殆どなく、従つてその発生機序については何ら知るところがないといつても過言ではあるまい。

以上の観点より、本研究においてischemiaの脳組織に及ぼす影響を他の組織と比較した結果、脳組織のエネルギー代謝が最も鋭敏かつ著明に抑制されることが明らかになり、さらに脳腫脹時に見出されるイオン能

すなわち脂質成分を含まない牛血清アルブミンをミトコンドリア浮遊液に加え、熱処理後 ethyl alcohol にて抽出した。

4) 呼吸調節能, ADP/0 比および最大磷酸化率の測定

密閉型の回転白金電極による酸素電極法²¹⁾により測定を行なった。反応液は0.3M mannitol, 0.01M KCl, 0.01M Tris-HCl buffer, 0.005M phosphate buffer, 0.2 mM EDTA pH7.4を用いた。肝ミトコンドリアには Mg^{++} 4 mM を加えた。基質は指示しない限り 4 mM glutamic acid を用い、心、腎ミトコンドリアには更に malic acid 1 mM の添加を行なった。測定は22°Cで行なった。

呼吸調節能 (respiratory control ratio, RC)¹⁰⁾は、基質・酸素・無機燐・ADPなどの呼吸に必要なすべての要素の満たされた状態における呼吸 (state 3 呼吸) と、この状態からADPが消費された状態における呼吸 (state 4 呼吸) の比で表わされる。

ADP/0 比は添加したADPのモル濃度と、それに伴う酸素消費量 (state 3) との比で表わされる。

最大磷酸化率 (maximal phosphorylation rate) は、最大ATP生成率を表し、酸素消費量 $\times$ ADP/0 比で求められる。その単位は $m\mu$ moles ATP synthesis/mg protein/min となる。

なお、これらはすべてミトコンドリアの機能を種々の角度より、表示する指標であるが、呼吸調節能は最も鋭敏であり、ごくわずかのミトコンドリアの損傷によつて、その呼吸調節能は著明に低下する。次いで、最大磷酸化率、最後にADP/0 比が低下してくる。

5) ATPase 活性の測定

反応液として、0.25M mannitol, 0.01M KCl, 0.2mM EDTA, 3 mM ATP, 0.01M Tris-HCl buffer pH7.4を用いた。反応液1.3ccを先ず22°Cにて3分間孵置した後、蛋白量にて約0.5mgのミトコンドリアを加えて反応を開始し、15分間孵置した。15% trichloroacetic acid 1.3ccを加えて反応をとめ、4°C 5,000 $\times$ g 5分間にて除蛋白後、上清液について遊離せる無機燐を Fiske and Subbarow の方法¹⁶⁾によつて測定した。

6) ミトコンドリアに結合せる K^+ , Na^+ の測定

分離調整液として、0.3M mannitol, 0.01mM EDTA pH7.4を用いたが、pHは Tris にて調整を行なった。分離せるミトコンドリアを適当量の脱イオン水にて稀釈した後、炎光分光器にて測定した。

7) Mg^{++} の測定

Mg^{++} の測定は Brierley の方法⁹⁾ に準じ次のように行なつた。ミトコンドリア浮遊液 1 ccに 2 ccの 1 N perchloric acid を加えることによつて3回抽出を行なつた。その上清の抽出液を水酸化アンモニアによつて中性にした後、2 ccのメタノール、2.5ccの水酸化アンモニア塩化アンモニア緩衝液 (pH9.5), 3.2ccの12.5% シアンソーダおよび0.4ccの0.1%のErichrome black T (メタノールに溶かせるもの)を加えた。全量10ccにし、pHが9.5であることを確認した後、520m μ におけるその optical density を測定して、その Mg^{++} 量を測定した。

8) 蛋白量の測定

Lowry の方法⁴⁰⁾によつた。標準液として結晶牛血清アルブミンを用いた。

実験結果

I. 本実験に用いられた正常脳ミトコンドリアの23の特性

この研究において行なわれた分離調整法によつて分離された正常脳ミトコンドリアのオキシグラフを示したのが図2である。即ち、基質として glutamic acid を用い、無機燐の存在下でADPを添加すると、直ちに酸素消費が高まり、いわゆるstate 3呼吸となり、添加せるADPが全て磷酸化されてATPになると、呼吸はなくなりstate 4呼吸となる。この図におけるごとく一般に2回目のADP添加によつて、state 3/state 4 比、すなわち呼吸調節能が著明に上昇する現象が認められた。これらの事実より、これらのミトコンドリアは tightly coupled の状態にあり、極めて良質のものであり、in vivo の状態に近いものと考えられる。以下、このようなすぐれた脳ミトコンドリアを用いて実験を行なつた。

基質による酸素消費は表1に示すごとくであり、Chance により報告されているごとく¹⁰⁾、一般にNAD-linked のものの呼吸調節能は高く glutamic acid では9以上、succinic acid の場合は3以上であつた。

II. 各種臓器ミトコンドリアに対する ischemia の効果

断頭後脱血せる状態で22°Cに孵置し、一定時間後各組織を剔出し、ミトコンドリアを分離調整し、最大のATP生成率を比較すると、図3に示すごとくになる。すなわち脳においては、断頭後2分間直線的に著明な低下を示し、3分ではすでに1/3に低下したのに比べて、心・腎・肝では、10分を経過してもATP生成率

Table 1 Oxidation of various substrates by brain mitochondria.

Substrate	O ₂ -uptake (mμ atoms/mg/min)		R C	ADP / O
	state 3	state 4		
Glutamate	55.8	5.0	11.2	2.62
Glutamate + malate	50.7	5.0	10.2	2.99
Pyruvate + malate	60.0	8.2	7.3	3.00
α-Ketoglutarate	62.7	8.4	7.4	2.70
α-Ketoglutarate + malate	59.2	10.2	5.8	2.48
Succinate	82.3	21.5	3.8	1.97
Succinate + malate	61.5	17.9	3.4	2.15
Isocitrate + malate	30.5	14.8	2.1	2.78
Glutamine	16.6	6.2	2.7	1.94
Glutamine + malate	21.0	6.8	3.1	2.48

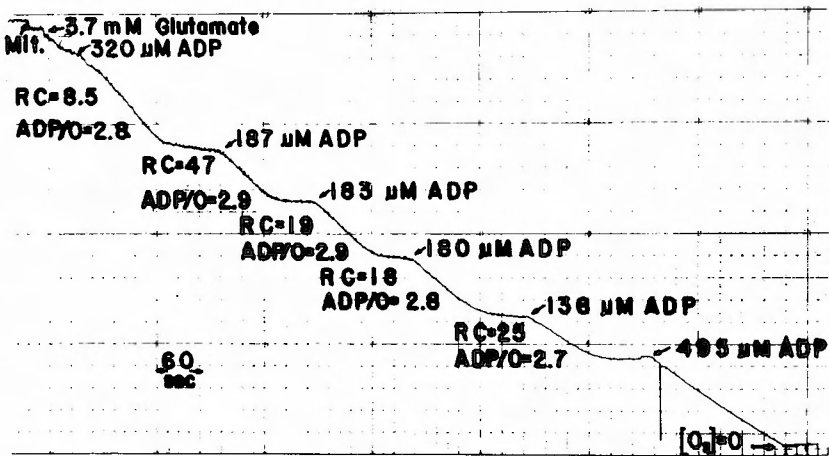


Fig. 2 Polarographic assay of respiration and oxidative phosphorylation of brain mitochondria.

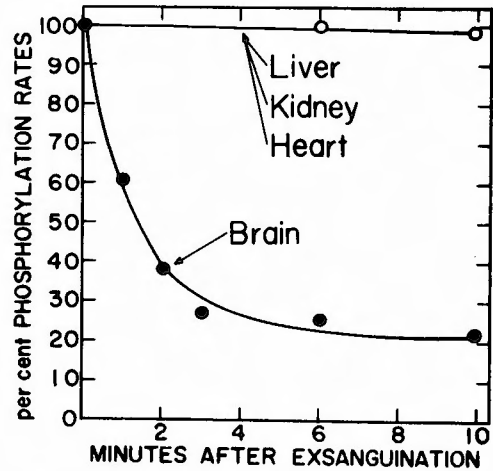


Fig. 3 Effect of ischemia on phosphorylation rates of mitochondria from various tissues.

の低下は認められなかつた。このことより、脳ミトコンドリアは短時間の ischemia によつて特異的に影響を受けることは明らかである。

分離調整せる ミトコンドリアを 22°C にて孵置し、aging の効果をみると図 4 に示すごとく、肝では 1 時間の aging でなお 60% の ATP 生成率を有するのに対し、脳では数分で 60% となり、20 分では殆ど 1/10 の ATP 生成率しか示さなかつた。心・腎では、脳と肝の中間の態度を示したが、いずれにせよ aging に対して ATP の生成能はかなり保存されていた。

以上の実験より、in vivo における ischemia においても、in vitro における aging においても、脳細胞内エネルギー代謝が著明にしかも特異的に影響を受けることは明瞭である。

ここで脳ミトコンドリアの機能変化を種々の角度よ

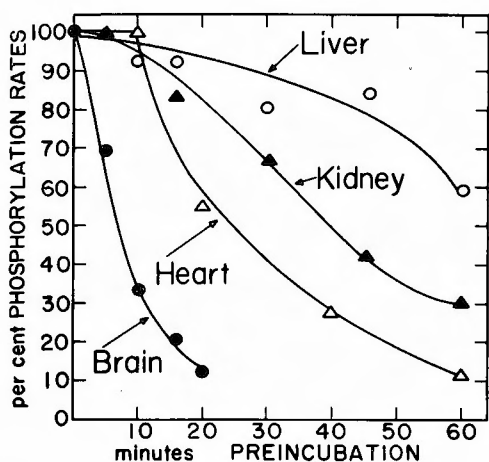


Fig. 4 Effect of aging on phosphorylation rates of mitochondria from various tissues.

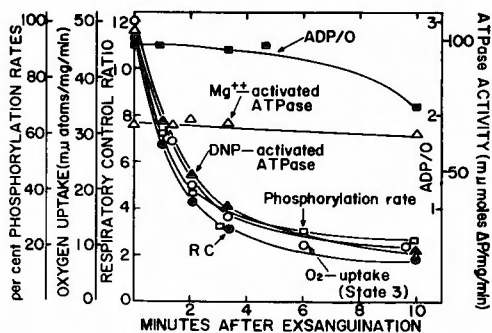


Fig. 5 Effect of ischemia on mitochondrial activity.

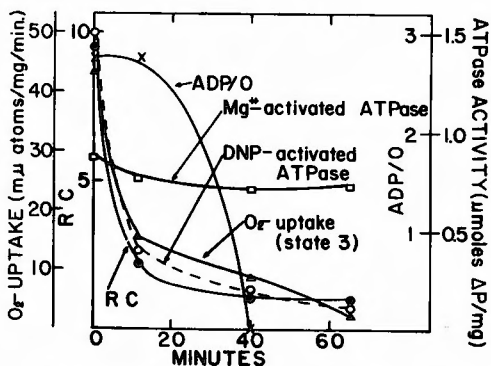


Fig. 6 Effect of aging on mitochondrial activity.

り、すなわち呼吸調節能、state 3呼吸、最大磷酸化率、ADP/O比およびDNP-activated ATPase活性、 Mg^{++} -activated ATPase活性らにより追求してみると図5, 6に示すごとくなる。図5は図3と同じ条件で行なつた実験であるが、短時間のischemiaで呼吸調節能、state 3の酸素消費、DNP-activated ATPase活性は、いずれも平行して直線的に低下を示し、その後もほぼ一定の低い値をとるのに対し、ADP/O比はかなりおくて低下した。図6は図4と同じ条件で行なつた実験、すなわち分離調整したミトコンドリアを22°Cにagingした実験であるが、この場合も呼吸調節能、state 3の酸素消費、DNP-activated ATPase活性は短時間の内に著明に低下し、ADP/O比がこれにおくて低下した。ischemiaにおかれた脳ミトコンドリアの機能低下と、正常の脳より分離されたミトコンドリアのagingによる機能低下の型が、上記のごとく全く同様であり、このことからin vivoにおけるミトコンドリアのischemiaによる変化は、in vitroにおけるミトコンドリアのagingによる変化と同様の变化であると推察される。

Ⅲ. Histotoxic anoxia の脳エネルギー代謝に及ぼす影響

1/2 LD₅₀のmalonic acidの腹腔内注射を行なうと、2~3分で動物は不穏状態となり、次第に意識のレベルが低下し、角膜反射、痛覚反射は鈍く、Cheyne-Stoke呼吸となり、次第に心搏動微弱となる。ここで痛覚反応は消失しかかっているが、比較的呼吸障害の少ない時期の脳ミトコンドリアを精査してみると、表2のごとくである。すなわち呼吸調節能が全例において著明に低下し、state 3の酸素消費量も軽度の低下が認められたが、ADP/O比の低下はあまり著明ではなかつた。

Ⅳ. 脳腫脹時における脳ミトコンドリアの機能変化

以上のように、ischemiaあるいはanoxiaにより発生するミトコンドリアの機能低下は、脳ミトコンドリアに特徴的であり、病態発生後の極めて短時間内に発生することが明らかとなつたが、ここで脳腫脹発生時にいかなるミトコンドリアの変化が生じるかを検索した。開頭術と大量のepinephrine投与によるMannの方法⁴³⁾を用いて脳腫脹を作製し、各時期の脳ミトコンドリアを精査した(図7)。

対照群 30匹、pentobarbital腹腔内投与により麻酔を行なつた白鼠よりミトコンドリアを分離した。

A群 16匹、呼吸抑制は認められず、腫脹の程度も軽度であり、脳を剔出し氷冷せる分離調整液中に置く

Table 2 Inhibitory effect of malonate on mitochondrial activity (in vivo).

Exp. No.	O ₂ -uptake (mμ atoms/mg/min)		R C	ADP / O
	state 3	state 4		
1	43.6	9.4	4.63	2.42
2	36.6	7.8	4.66	2.90
3	20.8	3.5	5.33	2.70
4	32.3	7.7	4.17	2.45
5	48.6	10.1	4.80	2.68
6	37.5	7.5	5.00	2.42
7	33.5	9.3	3.60	2.57
8	40.0	8.7	4.60	2.62
Mean	36.6	8.0	4.60	2.60
SD.	2.62	2.04	0.52	0.17

と、腫脹せる部分は消失した。ミトコンドリアの呼吸活性はやや抑制され、呼吸調節能はわずかに低下の傾向を示したが、DNP-activated ATPase 活性およびMg⁺⁺-activated ATPase 活性は、いずれも変化しなかつた。

B群 16匹、臨床的には呼吸抑制が軽度認められ、脳の腫脹もA群に比し著明であつた。剔出脳も分

離調整液中にて腫脹は消失しなかつた。ミトコンドリアでは、呼吸活性および呼吸調節能は低下を示した。DNP-activated ATPase活性の低下を認めたが、Mg⁺⁺-activated ATPase 活性は変化しなかつた。

C群 10匹、著明な呼吸抑制が認められ腫脹も著明であつた。ミトコンドリアは state 3 呼吸は著明に抑制され、state 4 呼吸は増加し、この為に呼吸調節能は非常な低下を示した。DNP-activated ATPase 活性の著明な低下が認められたのに比し、Mg⁺⁺-activated ATPase 活性は変化が認められなかつた。

以上の事実より脳腫脹発生時には、その程度に比例してミトコンドリアの機能低下がおこっていることが明らかである。

V. ischemia によるイオン変動

脳腫脹の際、脳組織においてNa⁺、K⁺を主体とする電解質の変動が起こることは、よく知られている事実である(2)(13)(28)(29)(42)(50)(51)(56)(61)(62)。細胞内ではイオン濃度および種類は均一と考えられ、特にミトコンドリアのイオン分布は、細胞のものと等しく¹⁸⁾、したがってミトコンドリア内のイオン変動を測定することによつて、細胞内のイオンの変化を推定することが可能である。

ここで、各時間毎5匹でischemiaにおけるイオン変化を精査したのが図8である。

正常脳ミトコンドリアでは、K⁺ 290 mμ moles/mg, Na⁺ 80 mμ moles/mg, Mg⁺⁺ 55 mμ moles/mg, Pi 82 mμ moles/mgを含み、K⁺/Na⁺ 比は平均3.7を示した。

ischemiaによつて、1分以内に著明なK⁺の低下がみとこり、3分後には220 mμ molesに低下したのに反し、

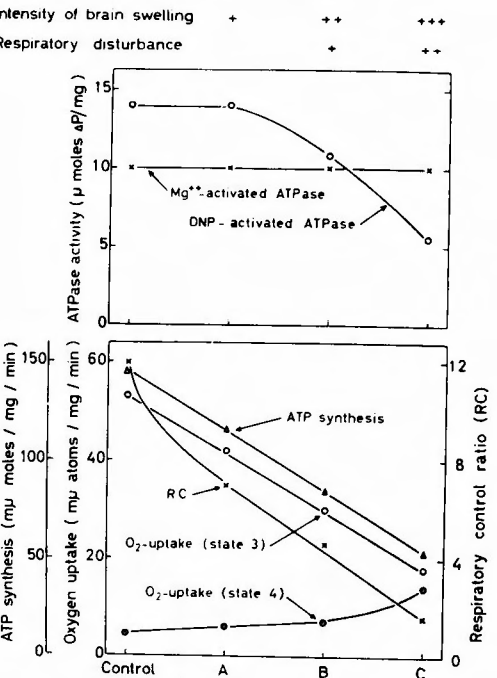


Fig. 7 Influence of brain swelling on mitochondrial activity.

Na^+ は直線的に増加した。しかし、 Mg^{++} 、 Pi には殆ど変化がなかつた。従来より aging など非生理的な状態におかれると、肝ミトコンドリアでは K^+ が減少するが、その際アニオンとして同量の無機磷が減少する事実から、 K^+ と Pi は同じ compartment 内に存在すると推定されていたが、ischemia の状態においては、このような平行現象は認められなかつた。

ここで、ミトコンドリア自体の ATP 生成能（磷酸化率）と、 K^+/Na^+ 比を比較検討してみると、図 9 のごとく磷酸化率の減少に平行して、 K^+/Na^+ が減少することが認められた。

したがって、細胞内エネルギー生成能が、細胞内イオン分布の維持に重要な役割を演じていることがうかがわれる。

VI. ischemia におけるエネルギー形成阻害物質

ischemia により起こる脳ミトコンドリアの機能低下は種々検索した結果、ある種の脂質成分（endogenous inhibitor）の増加と密接なる関係があることを見出した。すなわち 2 分および 5 分間 ischemia の状態におか

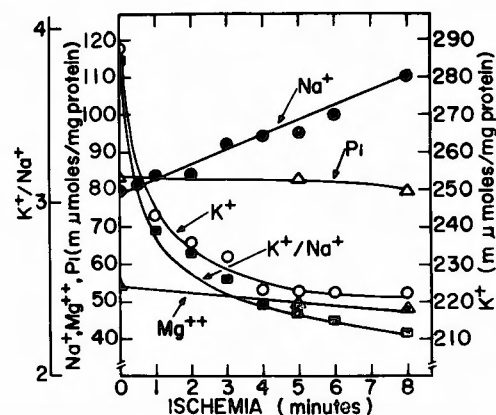


Fig. 8 Effect of ischemia on mitochondrial electrolytes.

れた脳より分離したほぼ同量のミトコンドリア分画より endogenous inhibitor を抽出し、新たに分離した正常の脳ミトコンドリアに加えて酸素消費および呼吸調節能に対する影響を調べると表 3 に示すようになる。5 分間のものは、2 分間の例に比して呼吸抑制作用が強い。したがって endogenous inhibitor の活性は、前者の方が強いことになる。また、この endogenous inhibitor の作用は、血清アルブミンの添加により、state 4 の酸素消費を抑制することによって呼吸調節能を回復したが、endogenous inhibitor の作用が強すぎた時は、アルブミンの効果は不完全であつた。同様に 2 分および 5 分間 ischemia におかれた脳より分離したミトコンドリアから抽出した endogenous inhibitor の ATPase 活性に対する抑制効果は、表 4 に示すごとく後者で強度であつた。これを図示すると図 10 のごとくなり、呼吸調節能・DNP-activated ATPase 活性に対する抑制作用が著明に認められた。

いま ischemia 2 分の脳より分離したミトコンドリアから抽出した endogenous inhibitor を、正常の脳より分離したミトコンドリアに加えて、酸素電極法により

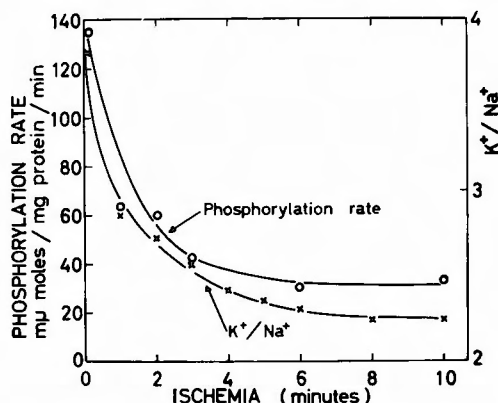


Fig. 9 Effect of ischemia on phosphorylation rate and K^+/Na^+ ratio.

Table 3 Effect of endogenous inhibitors on mitochondrial respiration.

Addition	SA	O_2 -uptake (μ atoms/mg/min)		RC
		state 3	state 4	
Control	—	41.3	3.3	12.5
Extracts from mitochondria (0.56 mg protein) prepared after 2 min incubation	—	29.0	6.5	4.5
	+	27.0	2.2	12.3
Extracts from mitochondria (0.58 mg protein) prepared after 5 min incubation	—	23.8	11.9	2.0
	+	26.8	4.5	5.9

Table 4 Effect of endogenous inhibitors on mitochondrial ATPase.

Exp.No.	Additions	ATPase Activity μ moles Δ P/mg
1	Control	0.07
	DNP	1.22
	DNP+Extracts from mitochondria (1.12mg) after 2 min incubation	1.12
2	Control	0.14
	DNP	1.25
	DNP+Extracts from mitochondria (1.17 mg) after 5 min incubation	0.66

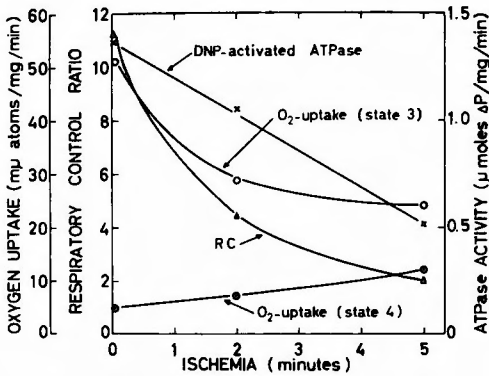


Fig. 10 Effect of endogenous inhibitors on mitochondrial activity.

測定を行なうと、endogenous inhibitor の量が増加するに従い、先ず呼吸調節能の低下が著明におこり、次いで state 3 の酸素消費、更におくれて DNP-activated ATPase 活性の低下がみられた。この間 state 4 の酸素消費は、漸次増加の傾向を示した (図11)。

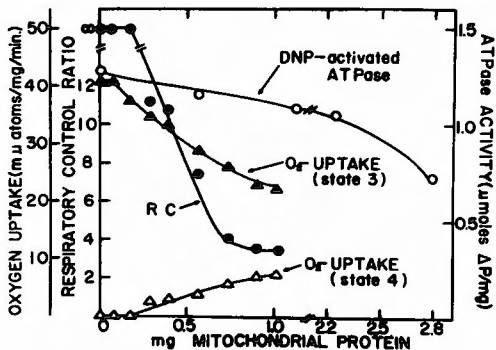


Fig. 11 Effect of varying concentrations of endogenous inhibitors on mitochondrial activity.

VII. 脳腫脹抑制剤の効果

a) predonin 前投与群 (表5, 図12)

全例48匹について、対照群16匹、1回投与群16匹、3回投与群16匹を各々0, 1, 3, 5分の4群に分けた。predonin 1回投与群においては、投与による死亡例はなかったが、3回投与群においては3匹の死亡例があった。いずれも第3回目の注射直後より興奮状態となり、次いで全身の痙攣発作を起こして、注射後5分以内に死亡した。predonin 前投与により症状に異常の認められなかった白鼠 (32匹) について、脳ミトコンドリアを分離し、呼吸活性を測定した結果を表5に示した。各々4匹の平均を示した。対照群において ischemia の時間が長くなるに従い、state 3呼吸は低下し呼吸調節能も著明な低下が認められた。ADP/0 比の低下は軽度であった。これに対して predonin 1回および3回投与群いずれにおいても対照群と同様 ischemia の時間が長くなるに従い、state 3呼吸、呼吸調節能は低下した。Mg⁺⁺の添加により呼吸は促進されるが⁴⁹⁾、predonin 投与例においてもこの傾向に変化はみられなかった。呼吸調節能のみについてみると、図12に示すごとく predonin投与群ではかえって対照群より低下していた。

b) 開頭および大量の epinephrine 投与により作製した脳腫脹に対する効果 (表6, 図13)

対照群 30匹、pentobarbital により麻酔した白鼠を対照とした。

腫脹を起こした対照群 16匹、中等度の腫脹、すなわち呼吸抑制は軽度であるが、腫脹は著明に認められる程度、すなわち先述のB群を用いた。また、薬剤の効果を検討する場合においても、上記の症状の認められたものについてのみ行なった。

治療群

i) 尿素による治療群 12匹、高張尿素液を腹腔内に注射した。腫脹脳は収縮し、頭蓋骨よりむしる陥没せる程度にまで収縮した。一方、多量の排尿が認められ、臨床症状では呼吸がやや正常に近づいた以外は特記すべき変化が認められなかった。分離したミトコンドリアについて、state 4呼吸の酸素消費抑制が認められ、呼吸調節能は著明に回復したが、ADP/0 比は変化しなかった。

ii) predonin による治療群 12匹、predonin 1mgの筋注を行なったが、臨床的には著しい変化は認められなかった。膨隆せる脳にも外見上変化は認められなかった。分離したミトコンドリアにおいても、state 3呼

Table 5 Effect of treatment with predonin.

		Mg ⁺⁺ (-)				Mg ⁺⁺ (+)			
		O ₂ -uptake (mμ atoms/mg/min)		RC	ADP/O	O ₂ -uptake (mμ atoms/mg/min)		RC	ADP/O
		state 3	state 4			state 3	state 4		
Control	0'	61.2	7.20	8.50	2.78	89.5	32.8	2.72	2.32
	1'	40.0	6.35	6.39	2.76	75.8	36.4	2.08	1.77
	3'	27.5	6.33	4.31	2.68	70.8	34.2	2.07	1.86
	5'	21.4	5.83	3.67	2.37	52.0	19.6	2.65	1.81
Predonin (1 mg)	0'	54.9	8.67	6.46	2.92	82.7	24.8	3.32	2.79
	1'	42.5	9.36	5.22	2.49	77.3	22.0	3.86	2.12
	3'	25.8	7.42	3.96	2.53	53.6	20.2	2.49	2.44
	5'	34.4	10.6	3.28	1.94	66.2	27.1	2.70	1.61
Predonin (3 mg)	0'	44.6	7.19	6.41	2.72	67.7	27.2	2.50	2.37
	1'	38.1	10.1	3.79	2.48	68.5	34.3	2.01	1.89
	3'	30.1	10.55	2.87	2.34	63.9	31.5	1.88	1.90
	5'	24.0	9.75	2.50	1.87	56.2	20.7	2.72	1.79

Table 6 Effect of some drugs on brain swelling.

	O ₂ -uptake (mμ atoms/mg/min)		RC	ADP/O
	state 3	state 4		
Control	53.5	4.57	11.7	2.81
Swelling	30.4	6.44	4.71	2.66
Urea-treated	42.6	3.80	12.4	2.66
Predonin-treated	38.6	6.02	6.43	2.64
CDP-choline(5')	47.8	6.93	6.96	2.56
CDP-choline(10')	27.9	4.84	5.72	2.82

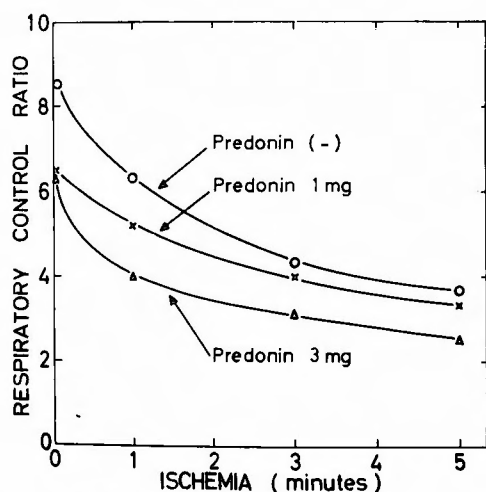


Fig. 12 Pretreatment with predonin

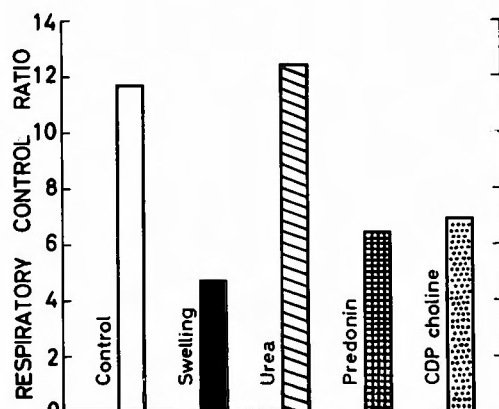


Fig. 13 Effect of some drugs on respiratory control of mitochondria of swollen brain.

吸の軽度亢進, state 4 呼吸の抑制が認められ, 呼吸調節能の軽度回復が認められた。

iii) CDP-choline による治療群 12匹, CDP-choline 注射後5分および10分にて断頭した。脳腫脹作製後認められた呼吸抑制は, 投与後浅薄頻となり, この呼吸状態は5~8分間持続し, のち次第に投与前の呼吸にもどつた。腫脹せる脳には変化が認められなかつた。分離したミトコンドリアにおいて, 呼吸調節能の回復が認められたが, 投与後5分にて断頭せる場合において回復が著明で, 10分を経過した場合においてはミトコンドリアの活性はやや低下の傾向が認められた。

呼吸調節能のみを比較すると図13のごとくであり, 呼吸調節能のみで薬剤の効果を論じることは勿論できないが, 尿素 predonin CDP-cholin いずれにおいてもミトコンドリアの機能回復を認めた。

考 察

脳外傷の際, 脳ミトコンドリアの機能低下は受傷後非常に早期に発生し, エネルギー生成が障害され, このために細胞内の種々の代謝活性の低下がおこる。これは組織内さらに細胞, ミトコンドリア内のある種の脂質成分の増加とあいまって, 脳腫脹の重要な発生機転と考えられている。すなわち荒木らによれば, 猫を用いた硬膜外バルーン圧迫法により作製した脳腫脹において, 臨床症状と平行してミトコンドリアの機能低下が認められた。そしてこのミトコンドリアの機能低下は Brain Mitochondria Isooctane Extractable Substance (BMIES) が, 細胞内あるいはミトコンドリア内に爆発的に増加することと, 重要な関係があると報告している³⁾⁻⁵⁾⁴⁶⁾。しかしながら, これらにおいて用いられたミトコンドリアの分離方法は完全なものではなく, その呼吸調節能も3~4前後でしかなかった。従来, 脳ミトコンドリアの分離調整法に関しては, 非常に多くの困難な問題をふくみ, そのために目的に応じて色々な方法が考えられてきた。しかし, Chanceにより酸素電極法による測定が導入されて以来, ミトコンドリアの状態を最も鋭敏に示す概念として, 呼吸調節能が用いられるようになった¹⁰⁾。従来の方法により分離された脳ミトコンドリアにおいては, 呼吸調節能は低く, いわゆる tightly coupled の脳ミトコンドリアの分離調整は非常に困難であつた。小沢らは白鼠の脳を用いて, 呼吸調節能の高い tightly coupled の脳ミトコンドリアの分離調整法を確立したが⁴⁸⁾, 特に断頭に

より ischemia あるいは anoxia の状態におかれることにより, 非常に短時間の内にミトコンドリアの呼吸調節能は著明に低下すると報告している。脳ミトコンドリアの分離に関しては, 電子顕微鏡的に殆ど他の細胞成分の混入が認められない分離方法⁶⁰⁾もあるが, これは断頭後の操作に時間を要し, アルブミンを添加しなければ呼吸活性は認められず, 呼吸調節能を指標とする場合には, 用いることはできないと考えられる。荒木ら⁵⁾によると, 猫の脳ミトコンドリアに関する研究においても, 脳剔出の操作が困難なることより, 分離せる脳ミトコンドリアの呼吸調節能は, Voss らの方法⁶³⁾によるものを凌駕するも, 未だ十分な方法とはいえなかつたが, 白鼠において呼吸調節能の高い脳ミトコンドリアを分離したことにより, 初めて断頭後の短時間の脳ミトコンドリアの機能変化をより正確に追及することが可能となつた。

脱血により生じた ischemia にみられる種々の組織ミトコンドリアの機能低下は, 脳において著明に認められたが, 心・腎・肝ミトコンドリアでは認められなかつた。脳は前述せるごとく酸素に対する依存性が非常に大きい組織であり, ミトコンドリアの段階においても同じ傾向が認められたが, この結果より脳が anoxia により, より影響を受け易い原因をミトコンドリアの anoxia に対して示す高い感受性からミトコンドリアの段階で説明しうるか否かは簡単に結論を下しえないが, 脳が代謝の活性水準を一定に保つために必要かくべからざるエネルギーを供給する場であり, anoxia による脳の機能障害が anoxia によるミトコンドリアの機能低下と全く平行していることから, 脳の anoxia に対する特異性もミトコンドリアに求めうと思われる。

anoxia による脳ミトコンドリアの機能低下の機序については, 不明の点が多いが, 脳腫脹の際にみられると同じく, 脂質成分の増加が重要な役割りを果していると考えられる⁵⁹⁾。肝ミトコンドリアにおいては, 古くよりエネルギー産生障害作用を持つ脂質成分が, いろいろと報告されてきた。すなわち低調液で aging した肝ミトコンドリア浮遊液よりの抽出物⁵⁵⁾, aging あるいは変性を受けたミトコンドリアから抽出されたミトクローム⁵⁵⁾⁵²⁾, ミトコンドリアの aging および音波破碎により得られた U-factor³³⁾など, 正常のミトコンドリアより分離されたものではなく, 何らかの処理を受けたミトコンドリアより分離されたものである。このことは肝ミトコンドリアにおいては, 何らかの操作を加えない正常のミトコンドリアには, このような阻

害作用を持つ脂質成分が認められないことを示すと共に、脂質成分がミトコンドリア自体に由来していることを示している。このことはミトクロームが精製されたチトクロームの解置により生じる²⁵⁾ことによつても明らかである。脳ミトコンドリアの脂質成分の場合も、ミトコンドリア自体に由来するものであると考えられる。

分離調整された脳ミトコンドリアを22°Cに解置すると、数分間で呼吸活性の著明な低下が起こる。Christieら¹²⁾はこの不安定な脳ミトコンドリアの活性を保つために、ATP, glutathion, coenzyme I, CoAの添加を行ない効果を得たのに反し、Aldrige¹¹⁾は pyruvic acid の酸化を指標にして、この酸化は50~60分で低下し、この低下を防ぐ方法はなかつたと報告している。また、35°Cの解置によると、1時間30分で酸素消費は完全になくなるとの報告もある⁶⁾。

aging によるミトコンドリアの活性の低下は脳に限らず、他の組織のミトコンドリアにも見られるものであるが、脳では特に短時間で著明に低下する。Lesterら³⁵⁾によると aging によつて結合型の NAD が、ミトコンドリアから失なわれるために活性が低下するとされている。しかし、ischemia の状態においては、脳ミトコンドリア内結合 NAD 量には変化は見い出せなかつた*。

脂質成分の作用については、肝ミトコンドリアより抽出されたもの²⁵⁾³³⁾⁵²⁾⁵⁴⁾では、ミトコンドリアの呼吸活性を低下せしめるのみならず、潜在性の ATPase 活性を高め、DNP などの非共軛因子の作用を促進し、ATP-Pi 交換反応を阻害し、in vitro でミトコンドリアの膨化を起こす。同様の脂質成分は昆虫の飛翔筋などからも抽出されている³⁶⁾⁶⁴⁾が、作用は肝ミトコンドリアから抽出されたものと同様である。しかし、脳ミトコンドリアから得られた脂質成分は、state 4 呼吸を開放するが、state 3 呼吸を抑制し、DNP-activated ATPase 活性を低下せしめた。したがつて脳ミトコンドリアにおいて生成される有効脂質成分が、肝ミトコンドリアよりのものと同一成分とも考えられず、現在その成分を決定中である。

種々の原因による脳浮腫において、細胞内 Na⁺, Cl⁻, H₂O は増加、K⁺ は不変ないし減少することはすでによく知られた事実であるが、anoxia において極めて短時間内に同様の変化が認められ、すなわちミトコンド

リアの K⁺, Na⁺ を測定すると K⁺ の低下、Na⁺ の増加が認められ、K⁺/Na⁺ は ATP 生成率とほぼ平行して低下した。Gamble¹⁸⁾によれば細胞内およびミトコンドリア内の電解質の分布状態は同じと考えられることより、脳全体においても同様の変化が起こつていと考えられる。そしてこの現象はイオンの能動輸送の障害によつて発生するものであると考えられる。すなわち前述のごとく anoxia によりミトコンドリアの機能低下、すなわち ATP 生成率の低下がおこり、イオンの能動輸送に利用されるべきエネルギー (ATP あるいはミトコンドリアにおいては高エネルギー中間体) の供給が減少し、Na⁺ ポンプは麻痺し、その結果イオンは濃度勾配により移動する受動輸送の状態となり、細胞外液中の Na⁺ は細胞内に流入し、細胞内 K⁺ は細胞外液に流出することになる。これらの事実から Na⁺ ポンプに対するエネルギー供給は、脳組織においては嫌氣的解糖に依存するものではなく、呼吸すなわち酸化的磷酸化能に強く依存していると推定される。

イオンの能動輸送の障害と脂質成分の遊離のいずれが anoxia の際に先行するかという問題は非常にむづかしく、未だ確定するに至っていない。

malonic acid による histotoxic anoxia においてもミトコンドリアの機能低下がみられ、同様の機序にて脳腫脹が発生すると考えられる。また、硬膜外バルーン圧迫法^{3)~5)6)}、開頭術と大量の epinephrine 投与による脳腫脹においてもミトコンドリアの機能低下が認められ、同様の機序により脳腫脹が発生すると考えられる。

次に、実験的脳腫脹に対する治療効果の問題であるが、脳外科領域においては脳浮腫・脳腫脹に対して低体温法・薬物療法が行なわれてきたが、特に有効かつ積極的な治療法は未だ確立されていない。一般に脳腫脹に対する薬物療法としては、i) 脳組織の脱水をおこして脳腫脹を軽減せしめるブドウ糖・尿素・マニトールなどの高張溶液、ii) 障害を受けた脳細胞を賦活し、あるいは脳内代謝の正常化を促進することにより腫脹を軽減せしめる CDP-choline, cytochrom C, ATP などのいわゆる細胞賦活剤および iii) 作用機序についてはなお議論が存するが、一般に血液脳関門あるいは破壊された膜の修復をはかるとされているステロイドホルモンなどに大別される。

近年、電子顕微鏡の導入によつて、脳腫脹の病態像

* K. Ozawa personal communication

の微細構造を把握し、さらに高張溶液やステロイドホルモンを投与して惹起される微細構造に注目して、その治療効果を解明しようと色々と試みられてきている。ことにステロイド療法は脳腫脹の発生防止および進展阻止効果がある²²⁾⁵⁵⁾として、その治療効果を認めるものと、一方批判的な報告もまた少なくない。これらは実験動物の種属による特異性、脳腫脹の作製方法ならびに投与方法などの実験条件が異なることから生じると思われるが、以上のことから考慮を払いつつ、現在広く使用されている代表的な脳腫脹抑制剤を用いて、脳ミトコンドリアに対する効果を検索した。

Blinderman⁶⁾は断頭により生じた ischemia において、ミトコンドリアの酸化的燐酸化に関連した DPN および TPN diaphorase 活性を tetrazolium を電子受容体として組織化学的に測定し、ミトコンドリアの機能低下を示した。ミトコンドリアの活性を検討する場合、指標とすべき要素は数多く存在するが、Chance により導入された酸素電極法¹⁰⁾による呼吸活性なかんづ呼吸調節能が、最も鋭敏にミトコンドリアの状態を示しており、この点から脳腫脹に用いた薬剤の効果についても、呼吸調節能の回復という点に重点をおいて検討した。

ステロイドホルモンの脳腫脹に対する効果に関しては、未だ賛否両論で結論が得られていない。Plum^ら⁵¹⁾によれば鼠の一侧頸動脈を結紮した後開頭を行ない、脳表面を空気にさらすことにより生じた脳腫脹に dexamethasone を投与したが、組織の電解質の変化は認められず、また前投与せる trypan blue による染色状態にも変化は認められなかった。Pappius^ら⁵¹⁾は猫を用い、冷却により生じた傷害部位を用い、cortisone の効果を水および電解質の分析により検討したが、対照群、治療群において有意の差を認めることはできなかった。Lippert^ら³⁷⁾は犬において psyllium seed を皮質下に移植し、cortisone の効果を検討したが、統計的に有意の差は認められなかったと報告している。サルに冷却による脳腫脹を作製した Clasen^ら¹⁴⁾も predonisolone と抗ヒスタミン剤の併用によっても効果が認められなかったと報告している。

これに対して有効であつたとの報告も多く存し、Prados^ら⁵³⁾およびこの結果を追試した Grenell^ら¹⁹⁾によれば、猫に副腎皮質の抽出物および下垂体前葉の抽出物の注射により、開頭により得られた脳腫脹が防止できた。Taylor^ら⁶²⁾は triethyl tin により兔に脳腫脹をおこし、dexamethasone の効果を臨床的ならびに生

化学的变化として、水分、Na、K について検討したが、投与群で臨床的にも生化学的にも改善を認めた。Long^ら³⁸⁾は兎、犬を用い psyllium seed またはバルーンを用いて脳腫脹を作製し、dexamethasone が有効に作用したことを報告している。

実験結果に示したごとく ischemia に対して predonin の前投与によつてミトコンドリアの機能回復は認められず、大量の predonin を投与した短時間の ischemia 例においては、むしろ呼吸活性の低下が認められた。しかるに開頭および epinephrine 投与により作製した脳腫脹においては、predonin の効果が認められたが predonin 投与後、比較的短時間のうちにミトコンドリアを分離しており、効果を検討するに際しても投与後の時間の経過を考慮しなければならないのかもしれない。

Prados^ら⁵³⁾によれば、ステロイドホルモンの作用機転は、脳腫脹時にみられる血管の透過性の増加が防止される点にあるとし、Blinderman⁷⁾も脳組織の滲透圧の変化が防止されることから、また畠中^ら²²⁾は血管内膜に作用するとの考えなど、いずれも血液脳関門に作用機転を求めようとしている。しかし Plum^ら⁵¹⁾は血液脳関門に対する効果に否定的である。またステロイドホルモン特に糖質コルチコイドはミトコンドリアの酸化代謝を抑制し、これは糖質コルチコイドがミトコンドリアの膜の透過性を高めた結果、この代謝に必要な溶解性の補助因子が失なわれるためであるとの説もある¹⁷⁾。このように膜の透過性あるいは血液脳関門とステロイドホルモンとの関係について、なお多くの問題をふくみ今後一層研究されなければならない問題であると考えられる。

Blinderman⁸⁾はミトコンドリアが、イオンの能動輸送あるいはエネルギーに依存した形態変化との関連において、脳腫脹を起こす原因となつており、ステロイドホルモンの作用部位もミトコンドリアの diaphorase enzyme への直接作用によると主張しているが、実験的根拠がうすく、ステロイドホルモンの投与により肝臓においてであるがミトコンドリアの数が減少したとの報告もあり³⁹⁾、ステロイドホルモンとミトコンドリアとの関係においても、今後の問題が多くふくまれている。

高張尿素液による脳腫脹の軽減は、すでに多く報告されており、改めて議論すべき余地はない。実験的脳腫脹においても高張尿素液は、肉眼的に著明な容積減少の効果を示したが、この脳より分離したミトコンド

リアにおいて、呼吸調節能の著明な回復が認められた。従来、高張尿素液は血液滲透圧の上昇をおこし、これによつて組織の脱水を行ない、その結果脳腫脹が軽減されるとされていたが、ミトコンドリアの機能回復はこれだけでは説明しえない。脳腫脹の際、血清アルブミンが組織に増加していることはよく知られているところである²³⁾²⁷⁾³⁰⁾³¹⁾。血清アルブミンは機能低下を示すミトコンドリアの回復に有効であるから、脳腫脹時にアルブミンが増加する事実は、脳腫脹の発生に対して起こる生体の防御反応の一つであると考えられ、このことと関連して高張尿素液により組織の脱水が起こると共に、組織のアルブミンの濃度の上昇がおこると考えられる。ゆえに尿素の作用機転として従来いわれてきた物理的作用以外に、組織のアルブミンの増加によりミトコンドリアの機能回復をはかるという生化学的意義が存在すると考えられる。

最後にCDP-cholineの効果であるが、すでに早石ら²⁴⁾、石井ら²⁶⁾、近藤³²⁾、三宅ら⁴⁵⁾により発表されているが、白鼠の実験的脳腫脹に対しても有効であった。この場合、脳実質の腫脹は軽減されなかつたが、ミトコンドリアの機能が回復されていることより考えて、非共軛物質として作用する endogenous inhibitor の lecithine への合成を促進しているものと思われる。

生体の調節機構において、ホルモン、神経機能が重要な役割をはたしているのは勿論であるが、細胞にはホルモン、神経以外により本質的な調節機構、例えば今迄述べてきたときエネルギー産生機構が存在しており、これにより各細胞の活性水準が維持されている。実際にはこのような原始的な調節機構が正常にいたなまれ、その上にホルモン、神経機構が作用していると考えられる。このような観点に立ち脳腫脹の発生機序を考え、あわせて脳腫脹抑制剤の作用機序を考えると、図14に示すごとくなる。すなわち脳外傷あるいはその他の原因により、脳組織の ischemia あるいは anoxia が発生すると、脂質有効成分がミトコンドリア分面に増加してくるが、脳が磷脂質に富む組織であることをあわせて考えると、脂質分解酵素がこのような条件下では何らかの機序により活性化され、そのためにミトコンドリアの膜あるいはその他の磷脂質の分解がおこり、脂肪酸様物質が爆発的に増加する。その結果、呼吸調節能、呼吸、DNP-activated ATPase 活性、ADP/O 比の順にミトコンドリアの機能が低下し、エネルギー産生能の低下は当然Na⁺ポンプの麻痺をきたし、ミトコンドリア内へのNa⁺およびH₂Oの流入をきたす。このようなミトコンドリアの電解質の変化は、細胞においても発生しているものと考えられ、

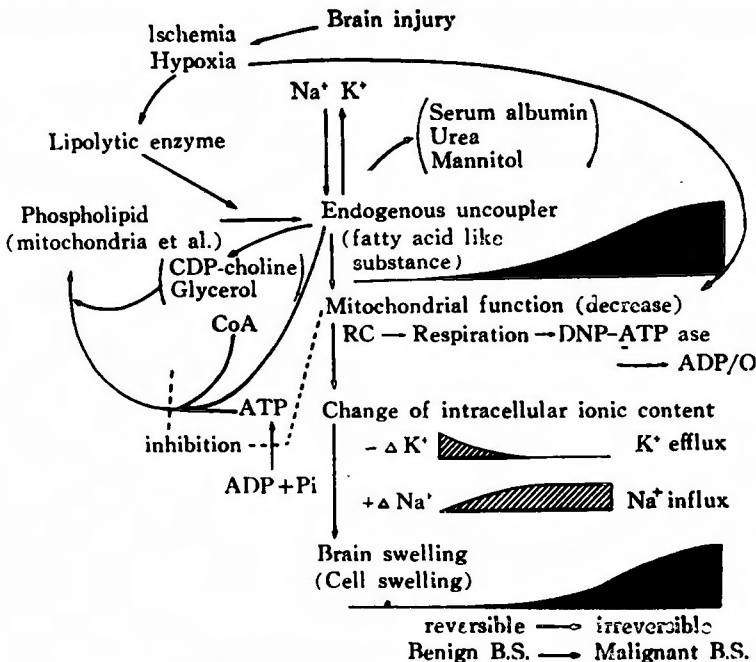


Fig. 14 Schematic representation of relationship between brain swelling and mitochondrial dysfunction.

結局、細胞の腫脹ひいては脳腫脹の発生を生じると考えられる。この場合、ミトコンドリアの機能低下が可逆的な段階でとどまりえると、腫脹も可逆的であるが、多くのミトコンドリアがもはや不可逆的にまで障害されてくると、腫脹も不可逆的な状態になると考えられる。その結果、良性の腫脹も不可逆的な悪性の腫脹に移行すると考えられる。

結 論

1. 白鼠脳より呼吸調節能の高いいわゆる tightly coupled の脳ミトコンドリアの分離調整をおこなった。

2. ischemia におかれた脳より分離したミトコンドリアは ischemia の経過時間に従って著明な機能低下を示した。しかもこれは肝、腎、心ミトコンドリアと比較すると、脳にのみ特異的な変化であつた。

3. malonic acid 阻害による histotoxic anoxia, 開頭と epinephrine 投与の併用により作製した脳腫脹いずれの場合においても症状に対応したミトコンドリアの機能変化が認められた。

4. ischemia によりミトコンドリアのATP生成率は低下したが、ミトコンドリア内 K^+ は低下、 Na^+ は増加、 Mg^{++} , P_i は殆ど変化は認められなかつた。そして K^+/Na^+ 比はATP生成率の低下と全く平行して低下した。

5. 更に ischemia において、脂質有効成分の短時間内の爆発的増加が認められた。この脂質有効成分はミトコンドリア自体、すなわち lipoprotein membrane より生成されるものと考えられ、この物質の意義について考察を加えた。

6. 脳腫脹抑制剤として、現在広く使用されているステロイドホルモン、高張尿素液、CDP-choline について、実験的脳腫脹に対する効果をミトコンドリアの機能回復の面より検討した結果、これらはいずれも開頭および epinephrine 投与により作製せる脳腫脹に対しては有効であつたが、ステロイドホルモンの断頭による ischemia に対する予防的効果は認められなかつた。

稿を終わるに当たり、始終御指導を戴いた半田 肇教授、安藤協三講師、小沢和恵博士に深甚の謝意を表します。また、御協力いただいた荒木 裕先生に深く感謝いたします。なお、この研究に際し、文部省科学研究費（ミトコンドリアのエネルギー代謝）の補助を受けたことに謝意を表します。

本論文の要旨は、

- 第8回 神経化学懇話会（1965年9月 東京）
- 第5回 医化学シンポジウム（1965年12月 福岡）
- 第9回 神経化学懇話会（1966年10月 大阪）
- 第25回 日本脳神経外科学会総会（1966年10月 東京）

において発表した。

REFERENCES

- 1) Aldrige, W. N. : Liver and brain mitochondria. *Biochem. J.*, **67** : 423-431, 1957.
- 2) Aleu, F. P., Katzman, R., and Terry, R. D. : Fine structure and electrolyte analyses of cerebral edema induced by alkyltin intoxication. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, **22** : 403-413, 1963.
- 3) 荒木千里, 石井昌三, 早石 修, 久野 滋, 小沢和恵, 辻 宏 : 頭部外傷の生化学。神経研究の進歩, **7** : 820-825, 1963.
- 4) 荒木千里, 小沢和恵, 井唯信友, 久野 滋, 早石 修 : 脳外傷の生化学。Proceeding of Symposium on Chemical Physiology and Pathology, **3** : 183-178, 1963.
- 5) 荒木千里, 小沢和恵 : 脳外傷および脳腫脹の生化学的研究。神経研究の進歩, **4** : 611-622, 1965.
- 6) Bellamy, D. : The endogenous citric acid-cycle intermediates and amino acids of mitochondria. *Biochem. J.*, **82** : 218-224, 1961.
- 7) Blinderman, E. E., Graf, C. J., and Fitzpatrick, T. : Basic studies in cerebral edema : Its control by a corticosteroid. *J. Neurosurg.*, **19** : 319-324, 1962.
- 8) Blinderman, E. E. : Effect of Dexamethasone on mitochondria in anoxic brain. *Arch. Neurol.*, **12** : 278-283, 1965.
- 9) Brierley, G., Murer, E., Bachmann, E., and Green, D. E. : Studies on ion transport. *J. Biol. Chem.*, **238** : 3482-3489, 1963.
- 10) Chance, B., and Williams, G. R. : Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. *J. Biol. Chem.*, **217** : 383-393, 1955.
- 11) Chance, B., and Hagihara, B. : Direct spectre-

- scopic measurements of interaction of components of the respiratory chain with ATP, ADP, phosphate, and uncoupling agents. Proceedings of the Fifth International Congress of Biochemistry (Moscow), Volume 5 : 3-33, 1963.
- 12) Christie, G. S., Judah, J. D., and Ress, K. R. : Cofactor and metal requirements of brain mitochondria. Proc. Roy. Soc. B., **141** : 523-541, 1953.
- 13) Clasen, R. A., Cooke, P., Tyler, S., and Pandolfi, S. : Changes in intracerebral sodium chloride and water associated with experimental cerebral edema. J. Neuropath. exp. Neurol., **19** : 164-165, 1960.
- 14) Clasen, R. A., Cooke, P. M., Pandolfi, S., Carnecki, G., and Hass, G. M. : Steroid-antihistaminic therapy in experimental cerebral edema. Arch. Neurol., **13** : 584-592, 1965.
- 15) Denny-Brown, D., and Meyer, J. S. : The cerebral collateral circulation. Neurol., **7** : 567-579, 1957.
- 16) Fiske, C. H., and Subbarow, Y. : Methods in enzymology. vol. 3, New York, Academic Press, Inc., 1957, p. 843.
- 17) Gallagher, C. H. : The mechanism of action of hydrocortisone on mitochondrial metabolism. Biochem. J., **74** : 38-43, 1960.
- 18) Gamble, J. L., and Hess, R. C. : Mitochondrial electrolytes. Am. J. Physiol., **210** : 765-770, 1966.
- 19) Grenell, R. G., and McCawley, E. L. : Central nervous system resistance : III. Effect of adrenal cortical substances on central nervous system. J. Neurosurg., **4** : 508-518, 1947.
- 20) Hager, H. : Electron microscopy on early changes in neurons by hypoxidoses and on ultrastructural aspects of neural necroses in cerebral cortex of monkeys. Selective vulnerability of brain in hypoxaemia. Schade, J. P., and McMenemy, W. H., eds., Philadelphia. F. A. Davis, 125-136, 1963.
- 21) Hagihara, B. : Techniques for the application of polarography to mitochondrial respiration. Biochim. Biophys. Acta, **46** : 134-143, 1961.
- 22) 畠中 坦, 佐野圭司, 喜多村孝一, 鎌野考嗣, 益沢秀明 : ステロイドと脳浮腫. 脳と神経, **15** : 624-633, 1963.
- 23) Hauser, H. M., Svien, H. J., McKenzie, B. F., McGuckin, W. F., and Goldstein, N. P. : A Study of cerebral protein and polysaccharide in the dog. Neurology, **13** : 945-952, 1963.
- 24) 早石 修, 小沢和恵, 荒木千里, 石井昌三, 近藤祐之 : 脳外傷及脳浮腫の生化学. 日新医学, **48** : 519, 1961.
- 25) Hülsmann, W. C., Elliott, W. B., and Slater, E. C. : The nature and mechanism of action of uncoupling agents present in mitochondria preparations. Biochim. Biophys. Acta, **39** : 267-276, 1960.
- 26) 石井昌三, 小沢和恵, 近藤祐之, 坂本 宏, 辻宏 : 脳外傷昏睡に対する核酸誘導物質の応用. 日外会誌, **63** : 1013-1014, 1962.
- 27) Kaps, G. : Über elektrophoretische Untersuchungen am Hirngewebe, insbesondere aus der Umgebung von Tumoren-zugleich ein Beitrag zur Pathogenese von Hirnschwellung und Hirn-ödem. Arch. Psychiat., **192** : 115-129, 1954.
- 28) Katzman, R., Aleu, F., and Wilson, C. : Further observations on triethyl tin edema. Arch. Neurol. (Chic.), **9** : 178-187, 1963.
- 29) Katzman, R., Gonatas, N., and Levine, S. : Electrolytes and fluids in experimental focal leukoencephalopathy. Arch. Neurol., **10** : 58-65, 1964.
- 30) Kiyota, K. : The protein of the brain in patients with lowered convulsion threshold, J. Neurochem., **1** : 301-302, 1957.
- 31) Kiyota, K. : Electrophoretic protein fractions and the hydrophilic property of brain tissue. II. The proteins of brain with edema. J. Neurochem., **4** : 209-214, 1959.
- 32) 近藤祐之 : 脳外傷に対する核酸誘導物質の応用. 日本外科宝函, **32** : 489-505, 1963.
- 33) Lehninger, A. L., and Remmert, L. F. : An endogenous uncoupling and swelling agent in liver mitochondria and its enzymic formation. J. Biol. Chem., **234** : 2459-2464, 1959.
- 34) Lehninger, A. L. : The Mitochondrion. New

- York, W. A. Benjamin, Inc., 1964, p. 16.
- 35) Lester, R. L., and Hatefi, Y. : Studies on the mechanism of oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta*, **29** : 103-112, 1958.
 - 36) Lewis, S. E., and Fowler, K. S. : Nature and origin of an inhibitor of oxidative phosphorylation present in freshly isolated sarcosomes from blowfly thoraces. *Biochim. Biophys. Acta*, **38** : 564-565, 1960.
 - 37) Lippert, R. G., Svien, H. J., Grindlay, J. H., Goldstein, N. P., and Gastineau, C. F. : The effect of cortisone on experimental edema. *J. Neurosurg.*, **17** : 583-589, 1960.
 - 38) Long, D. M., Hartmann, J. F., and French, L. A. : The response of experimental cerebral edema to glucocorticoid administration. *J. Neurosurg.*, **24** : 843-854, 1966.
 - 39) Lowe, C. U., and Williams, W. L. : Effect of cortisone administration on intracellular composition of rat liver. *Proc. Soc. Expl. & Med.*, **84** : 70-74, 1953.
 - 40) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. : Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193** : 265-275, 1951.
 - 41) Lowry, O. H., Passonneau, J. V., Hasselberger, F. X., and Schulz, D. W. : Effect of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain. *J. Biol. Chem.*, **239** : 18-30, 1964.
 - 42) Magee, P. N., Stoner, H. B., and Barnes, J. M. : The experimental production of oedema in the central nervous system of the rat by triethyltin compounds. *J. Path. Bact.*, **73** : 107-124, 1957.
 - 43) Mann, F. D., and Travaini, D. D. : Experimental postoperative cerebral edema. *J. Neurosurg.*, **20** : 687-691, 1963.
 - 44) McIlweine, H. : *Biochemistry and the central nervous system*. J. & A. Churchill, London, 1955.
 - 45) 三宅浩之, 早川 勲, 高倉公明 : 脳代謝サイクルの中間代謝物質による頭部外傷の治療. 脳と神経, **16** : 873-878, 1964.
 - 46) Ozawa, K., Itada, N., Kuno, S., Seta, K., Handa, H., and Araki, C. : Biochemical studies on brain swelling. I. *Folia Psychiat. Neurol. Japonica*, **20** : 57-72, 1966.
 - 47) Ozawa, K., Seta, K., and Handa, H. : Biochemical studies on brain swelling. II. *Folia Psychiat. Neurol. Japonica*, **20** : 73-84, 1966.
 - 48) Ozawa, K., Seta, K., Takeda, H., Ando, K., Handa, H., and Araki, C. : On the isolation of mitochondria with high respiratory control from rat brain. *J. Biochem.*, **59** : 501-510, 1966.
 - 49) Ozawa, K., Seta, K., and Handa, H. : The effect of magnesium on brain mitochondrial metabolism. *J. Biochem.*, **60** : 268-273, 1966.
 - 50) Pappius, H. M., and Gulati, D. R. : Water and electrolyte content of cerebral tissues in experimentally induced edema. *Acta Neuropath. (Berl.)*, **2** : 451-460, 1963.
 - 51) Plum, F., Posner, J. B., and Alvord, E. C., JR : Edema and necrosis in experimental cerebral infarction. *Arch. Neurol. (Chic.)*, **9** : 563-570, 1963.
 - 52) Polis, B. D., and Shmukler, H. W. : Mitochrome I. Isolation and physicochemical properties. II. Enzymatic effects. *J. Biol. Chem.*, **227** : 419-440, 1957.
 - 53) Prados, M., Strowger, B., and Feindel, W. : Studies on cerebral edema : II. Reaction of the brain to exposure to air ; Physiologic changes. *Arch. Neurol. Psychiat.*, **54** : 290-300, 1945.
 - 54) Pullman, M. E., and Racker, E. : Spectrophotometric studies of oxidative phosphorylation. *Science*, **123** : 1105-1107, 1956.
 - 55) Rasmussen, T., and Gielati, D. R. : Cortisone in treatment of postoperative cerebral edema. *J. Neurosurg.*, **19** : 535-544, 1962.
 - 56) Reed, D. J., Woodbury, D. M., and Holtzer, R. L. : Brain edema, electrolytes, and extracellular space. *Arch. Neurol. (Chic.)*, **10** : 604-616, 1964.
 - 57) Schneider, W. C., and Hogeboom, G. H. : Intracellular distribution of enzymes. V. Further studies on the distribution of cytochrome C in

- rat liver homogenates. *J. Biol. Chem.*, **183** : 123-128, 1950.
- 58) 瀬田喜一郎, 小沢和恵, 安藤協三, 半田 肇 : 脳ミトコンドリアの分離調整法について。神経研究の進歩, **10** : 64-68, 1966.
- 59) 瀬田喜一郎, 小沢和恵, 安藤協三, 半田 肇 : 脳腫脹の生化学的研究。Proceeding of Symposium on Chemical Physiology and Pathology, **5** : 163-166, 1966.
- 60) Stahl, W. L., Smith, J. C., Napolitano, L. M., and Basford, R. E. : Brain mitochondria. *J. Cell, Biol.*, **19** : 293-307, 1963.
- 61) Streicher, E., Ferris, P. J., Prokop, J. D., and Klatzo, I. : Brain volume and thiocyanate space in local cold injury. *Arch. Neurol. (Chic.)*, **11** : 444-448, 1964.
- 62) Taylor, J. M., Levy, W. A., Herzog, I., and Scheinberg, L. C. : Prevention of experimental cerebral edema by corticosteroids. *Neurology (Minneapolis)*, **15** : 667-674, 1965.
- 63) Voss, D. O., Campello, A. P., and Bacila, M. : The respiratory chain and oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. *Biochem. Biophys. Research Commun.*, **4** : 48-51, 1961.
- 64) Wojtczak, L., and Wojtczak, A. B. : Uncoupling of oxidative phosphorylation and inhibition of ATP-Pi exchange by a substance from insect mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, **39** : 277-286, 1960.
- 65) Wojtczak, L., and Lehninger, A. L. : Formation and disappearance of an endogenous uncoupling factor during swelling and contraction of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, **51** : 442-456, 1961.