

砂ネズミ中大脳動脈閉塞モデルにおける遠隔病変

新潟大学脳研究所脳神経外科学教室 (主任: 田中隆一教授)

阿部博史

Remote Neuronal Damage After Middle Cerebral
Artery Occlusion in Gerbils

Hiroshi ABE

*Department of Neurosurgery, Brain Research Institute, Niigata University**(Director: Prof. Ryuichi TANAKA)*

Using the model of middle cerebral artery (MCA) occlusion in gerbils, in which infarction was produced in the ipsilateral cortex and striatum, the author investigated neuronal damage and sequential changes of local cerebral glucose utilization ipsilaterally in the hippocampus, thalamus, lateral geniculate body (LGB), medial geniculate body (MGB), globus pallidus (GP), and substantia nigra pars reticulata (SNR), all of which are outside the ischemic area, and protein synthesis in the hippocampus. Neuronal damage was determined by histopathological change and the regional distribution of ^{45}Ca on ^{45}Ca autoradiograms. Local cerebral glucose utilization (LCGU) was evaluated by ^{14}C -deoxyglucose autoradiography, and protein synthesis by ^{14}C -valine autoradiography.

In the ipsilateral hippocampus, a marked increase in LCGU was present and ^{45}Ca accumulation was observed in the dendritic region of the pyramidal cells during the 2 hours after MCA occlusion. Reduced protein synthesis in the CA1 neurons was evident 2 to 12 hours after MCA occlusion and reversible dendritic damage of the CA1 neurons was demonstrated using the antibody against microtubule-associated protein 2.

However, in the ipsilateral thalamus, LGB, MGB, GP and SNR, degenerated neurons were found 1 week after MCA occlusion, and a marked atrophy was observed during and after the second week following MCA occlusion. The ventral posterior nucleus of the ipsilateral thalamus suffered the greatest neuronal loss. In the thalamus, LGB and MGB, which all send efferent fibers to the cortex in the territory of the MCA, a decrease in LCGU was observed during the first week after the occlusion, and ^{45}Ca accumulation occurred during and after the second day following MCA occlusion. In

Reprint requests to: Hiroshi ABE,
Department of Neurosurgery, Brain Research
Institute, Niigata University, Asahimachi-dori
1, Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町757
新潟大学脳研究所脳神経外科学教室
阿部博史

contrast, in the GP and SNR, which receive striatal input, LCGU increased during the first 12 hours, and ^{45}Ca started to accumulate from the 4th day after the onset of ischemia.

These results demonstrate there are two types of neuronal damage in areas remote to the infarction following focal cerebral ischemia. One is a reversible change in the acute stage of ischemia and the other is a progressive degeneration in the areas having direct connections with the ischemic focus. The latter could be caused by some different mechanisms such as retrograde degeneration, antegrade transsynaptic degeneration, and neuronal disinhibition consequent to loss of inhibitory inputs, in which the type of neurotransmitter and the direction of transmission are important factors.

Key words: focal cerebral ischemia, remote area, neuronal damage, glucose metabolism, calcium accumulation, gerbil

局所脳虚血, 遠隔領域, 神経細胞傷害, グルコース代謝, カルシウム, 砂ネズミ

I. はじめに

脳虚血における神経細胞傷害の研究は, 今までは主に, 虚血に陥った領域の神経細胞に関してなされてきた. 脳血流低下のためのエネルギー死である古典的な虚血性細胞壊死¹⁾と, 一過性虚血後エネルギー代謝が回復したにもかかわらず数日後脆弱性を持つ細胞群が崩壊していく遅発性神経細胞壊死²⁾³⁾が知られている.

一方, 局所に脳梗塞などの病変が生じた場合, 病変以外の部位にも脳血流量や脳グルコース代謝の変化が生じる現象は, diaschisis⁴⁾として知られている. 最近さらに, そうした虚血にさらされることのない虚血領域以外の部位にも神経細胞傷害の生じることが局所脳虚血モデルを用いた実験で報告されている⁵⁾⁶⁾. しかし, 局所虚血巣に伴ってみられる遠隔病変の病態やメカニズムに関してはまだ不明の点も多い. また, 実験の場合は, 用いる局所脳虚血モデルによって, 遠隔病変の部位や経時的变化が異なる可能性が考えられる.

本研究では, 局所脳虚血に伴ってみられる遠隔病変の病態をできるだけ明らかにすることを目的に, 線条体と中大脳動脈領域の脳皮質に重度の均一した広がり虚血を生じる砂ネズミ中大脳動脈閉塞モデル⁷⁾を用いて, 閉塞1時間後の覚醒時脳グルコース代謝で低下のみられた虚血側視床, 外側膝状体, 内側膝状体および, 逆に亢進のみられた虚血側海馬, 黒質, 淡蒼球の各領域において, グルコース代謝と組織学的変化を経時的に観察し, その関連について検討を行った. 組織学的変化は ^{45}Ca オートラジオグラムによる ^{45}Ca 集積・分布と病理学的検索から検討した. 海馬においてはさらに, 蛋白合成能

の経時的变化についても検討した.

II. 実験方法

1. 実験モデル

実験には50~70gの成熟雄砂ネズミ(Mongolian gerbil)を用いた. 1.5%ハロセンと70%笑気, 30%酸素の混合ガス麻酔下に, trans-retroorbital approachで中大脳動脈を露出し, 嗅索の内側部にて本動脈を電気凝固, 永久閉塞してモデルを作製した. 一部では, 線条体をできるだけ虚血領域に含まないモデルを作製する目的で, 中大脳動脈の閉塞を嗅索横断部より約2mm遠位部で行った. 咬筋を焼却, 頬骨弓後半部を切除して側頭骨底部に到達する従来の方法⁷⁾では, 十分な摂食ができなくなり, 長期の生存は困難であったが, trans-retroorbital approachでは咬筋, 側頭筋が温存でき長期生存が可能であった. 平均手術時間は約15分で, 手術終了後直ちに麻酔から覚醒させた.

2. 局所脳血流量の測定

虚血に陥る中大脳動脈領域の広がりとその程度及び虚血領域以外で今回検討する領域の脳血流量を知ることが目的に, Sakuradaら⁸⁾の方法に基づいて, ^{14}C -idoantipyrine (IAP)を用いたオートラジオグラフィ法で中大脳動脈閉塞1時間後の局所脳血流量を測定した(n=7). ハロセン麻酔下に大腿動脈及び大腿静脈のカニューレーションとplaster castによる下半身の固定を行い, 約2時間後, 十分に覚醒したところで再びハロセン麻酔下に中大脳動脈を閉塞した. 59分30秒後に ^{14}C -IAP $10\mu\text{Ci}/100\text{g}$ を30秒間で注入し, その間動脈血を5秒ごとに採血した. 体温は直腸温で37℃前後になるようにヒー

ティングランプで調節した。注入終了と同時に断頭し、脳を素早く取り出し、粉状のドライアイスにて凍結した。次にクライオスタットで 20μ の冠状断切片を作製し、乾燥固定した後、標準線量板とともにX線フィルム (Fuji Type 150) に10日間感光させオートラジオグラムを得た。血中の RI 濃度をシンチレーションカウンター (Becman 社製 LS9000) で測定し、画像の定量化には、自動画像解析装置 (Unique Medical 社製 Unigraphy) を使用した。

3. 局所脳グルコース代謝の測定

各領域における局所脳グルコース代謝の経時的変化は、中大脳動脈閉塞後1時間、2時間、6時間、12時間、1日、2日、1週間の各群 (n=6) と無処置の正常砂ネズミ (n=4) において、 ^{14}C -deoxyglucose (DG) を用いたオートラジオグラフィ法で観察した。 ^{14}C -DG $10\mu\text{Ci}/100\text{g}$ を大腿静脈から注入し、その後は自由に放置し、45分後に断頭した。断頭後は前述した方法でオートラジオグラムを作製した。定量化には、断頭までの45分間、血中 RI 濃度と血糖値の測定のための定期的な採血が必要であり、体重の少ない砂ネズミにとってはその採血量による影響の方が大きいと考えられ、あえて定量化は行わず、非虚血側線条件の optical density の平均値に対する各領域の optical density の比で検討した。Optical density の測定には同じく自動画像解析装置を用いた。

4. ^{45}Ca の集積の観察

^{45}Ca オートラジオグラフィは、細胞が傷害され膜機能が低下していると静注した ^{45}Ca は細胞内に流入蓄積するため傷害部位の同定に有用である。中大脳動脈閉塞後1時間、2時間、6時間、12時間、1日、2日、4日、1週間、2週間、1カ月の各群 (n=6) における ^{45}Ca の集積及び分布を、Dienel ら⁹⁾ の方法に基づいて作製した ^{45}Ca によるオートラジオグラムより検討した。静注後 ^{45}Ca が脳内に均一に分布するのに約5時間かかるとされるため、 $^{45}\text{CaCl}_2$ $50\mu\text{Ci}$ を、閉塞1、2時間群は MCA を閉塞する5時間前に、残りの群は断頭の5時間前に静注した。

5. 局所蛋白質合成能の観察

中大脳動脈閉塞後1時間、2時間、6時間、12時間、1日、2日、1週間の各群 (n=4) において、海馬における蛋白質合成能を、 ^{14}C -valine を用いたオートラジオグラフィ法で観察した。 ^{14}C -valine を $10\mu\text{Ci}/100\text{g}$ 静注し、45分後に断頭して 20μ の凍結冠状断切片を作製した。乾燥固定後、切片を5% TCA で1時間処理

し、X線フィルムに3週間感光させてオートラジオグラムを得た。

6. 組織学的検索

中大脳動脈閉塞後1日、2日、4日、1週間、2週間、1カ月、3カ月の各群 (n=7) における海馬、視床、外側膝状体、内側膝状体、黒質、淡蒼球の組織学的所見を検討した。但し、淡蒼球は外側部が虚血領域である線条体と接するため、内側部を検索した。3.5% paraformaldehyde, 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) により経心的に灌流し、その後断頭して脳を摘出した。同液でさらに数日固定後パラフィン包埋し、厚さ 6μ の冠状断切片を作製した。Hematoxylin-eosin (HE) 染色、Klüver-Barrera (KB) 染色と反応性 astrocyte の出現や増加をみるために glial fibrillary acidic protein に対する免疫組織学的染色 (GFAP 染色) を行った。GFAP 染色は、抗 GFAP 抗体 (DAKO 社製) を80倍希釈で1時間反応させ、次に biotin 化した抗ラビット IgG 血清、avidin-biotin-peroxidase complex とそれぞれ30分反応させた後、diaminobenzidine にて発色させた。海馬においてはさらに、神経細胞傷害をより鋭敏にとらえるため、樹状突起に主に存在する微小管結合蛋白である microtubule-associated protein 2¹⁰⁾ に対する免疫組織学的染色 (MAP2 染色) を、中大脳動脈閉塞後1日、2日、1週間の各群 (n=7) において行った。摘出脳をエタノール固定して、同様に厚さ 6μ の冠状断切片を作製し、抗 MAP2 抗体 (Southern Biotechnology 社製) を100倍希釈で1時間反応させ、次に biotin 化した抗マウス IgG 血清、avidin-biotin-peroxidase complex とそれぞれ30分反応させた後、diaminobenzidine にて発色させ観察した。

III. 結 果

1. 局所脳血流量

中大脳動脈閉塞後1時間の ^{14}C -IAP オートラジオグラムを **図 1** に示し、それに基づく局所脳血流値は対側対照部位と比較し **表 1** に表示した。中大脳動脈領域の大脳皮質である frontal, sensorimotor, auditory 及び visual cortex と線条体に一定した広がり虚血領域が認められた。大脳皮質の虚血の程度は著しく、平均脳血流値は $0.05\sim 0.08\text{ml}/\text{g}/\text{min}$ (4~8%対側) であった。線条体外側部も大脳皮質同様に重度の虚血に陥ったが、線条体内側部は中等度の虚血にとどまることもあり平均脳血流値は $0.34\text{ml}/\text{g}/\text{min}$ (37%対側) であった。今回虚血領域以外の部位として検討した虚血側の海馬、

視床, 外側膝状体, 内側膝状体, 黒質, 淡蒼球において, 海馬, 黒質, 淡蒼球では対側と差を認めなかったが, 視床腹側部(視床後腹側核), 視床内側部, 外側膝状体,

内側膝状体は対側の同一部位と比べ, 各々82%, 85%, 84%, 67%の低値を示した。

2. 局所脳グルコース代謝

中大脳動脈閉塞後1時間の ¹⁴C-DG オートラジオグラムを図2に示した。いずれも虚血側で, 程度に差はあるが, 淡蒼球(A), 海馬(B), 黒質(F)はグルコース代謝の亢進を, 視床(C), 外側膝状体(D), 内側膝状体(E)は低下を示した。

図3に, 各部位の optical density の経時的変動を, 対側線条体の平均 optical density に対する比で, 正常群を100%として対側と共にグラフで表した。海馬において, 虚血側は閉塞1時間後で control 値の261%, 2時間後で233%と高値を示した。対側は閉塞1時間後では虚血側とは異なりほぼ control 値と同じであったが, 2時間後で control 値の203%の高値をとった。両側とも6時間後ではほぼ control 値に復し, 以後大き

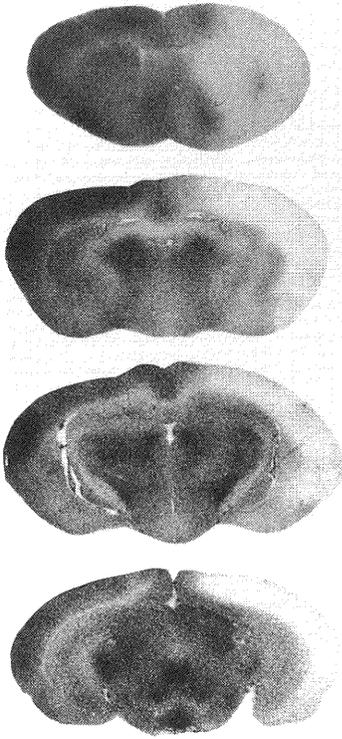


図1 中大脳動脈閉塞1時間後の ¹⁴C-iodoantipyrine オートラジオグラム

表1 中大脳動脈閉塞1時間後の局所脳血流量

Region	Ipsilateral	Contralateral
Frontal cortex	0.05 ± 0.03	1.20 ± 0.08**
Sensorimotor cortex	0.05 ± 0.02	1.15 ± 0.04**
Auditory cortex	0.08 ± 0.02	1.70 ± 0.13**
Visual cortex	0.08 ± 0.02	0.98 ± 0.08**
Lateral caudate-putamen	0.12 ± 0.09	0.96 ± 0.10**
Medial caudate-putamen	0.34 ± 0.18	0.93 ± 0.12**
Globus pallidus	0.64 ± 0.11	0.68 ± 0.09
Hippocampus	0.54 ± 0.11	0.61 ± 0.10
Ventral thalamus	0.95 ± 0.10	1.16 ± 0.09*
Medial thalamus	0.98 ± 0.12	1.15 ± 0.12*
Lateral geniculate body	0.81 ± 0.15	0.96 ± 0.06*
Medial geniculate body	0.90 ± 0.11	1.35 ± 0.18**
Substantia nigra	0.84 ± 0.13	0.83 ± 0.09

mean ± SD (ml/g/min)

Student's paired t-test (*p<0.05, **p<0.001)

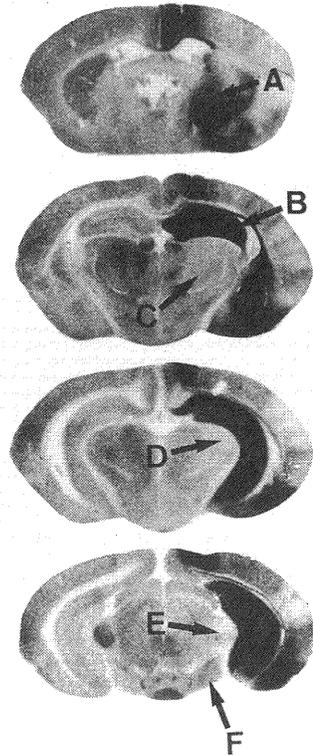


図2 中大脳動脈閉塞1時間後の ¹⁴C-deoxyglucose オートラジオグラム

A: 淡蒼球, B: 海馬, C: 視床, D: 外側膝状体, E: 内側膝状体, F: 黒質

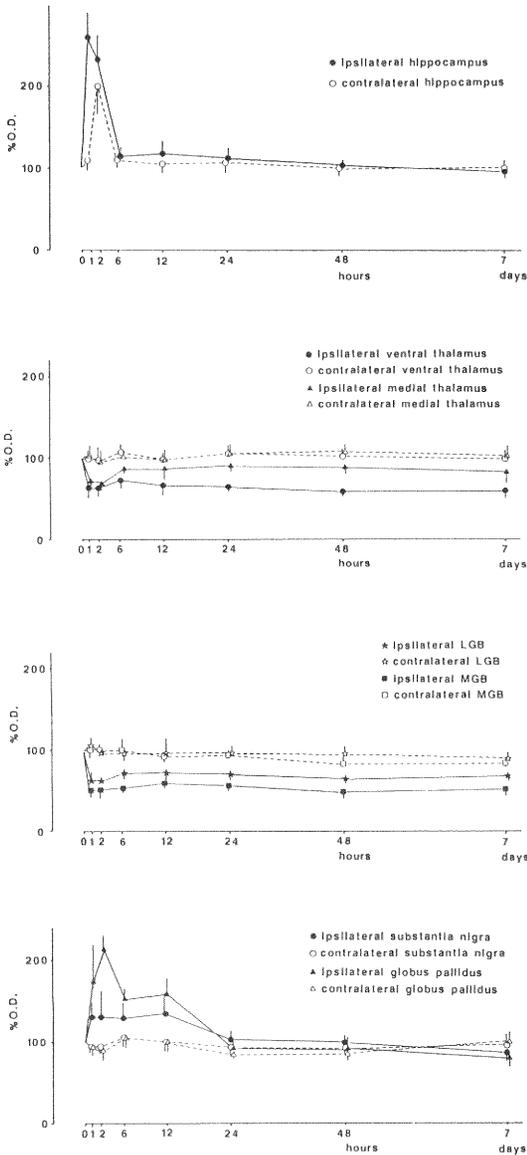


図3 各領域における脳グルコース代謝の経時的変動

な変動は呈さなかった。視床腹側部（視床後腹側核）、外側膝状体、内側膝状体の虚血側は、共に閉塞1時間後から1週間後まで終始 control 値の48~75%の低値を示した。視床内側部は閉塞後1、2時間では各々 control 値の75%、70%と低値を示したが、6時間後には control 値90%近くまで回復し、1週間後まではほぼ同様の値を示した。対側は各部位とも control 値から大きくはずれ

ることはなかった。黒質、淡蒼球では、閉塞12時間後まで虚血側は対側に比べ高値を示し、1日後、2日後でも虚血側が僅かに高値をとったが、1週間後では逆に虚血側は対側に比べ低値を示した。黒質が閉塞後12時間まではほぼ持続して、control 値の約135%の高値をとったのに対して、淡蒼球は、閉塞後2時間までは約2倍もの著明な高値を示した。

3. ⁴⁵Ca の集積と分布

海馬では、虚血側において、閉塞1時間後で CA1 の str. radiatum に ⁴⁵Ca の集積がみられ、2時間後にはその集積が著明になり、CA1 から CA3 の str. radiatum とさらに str. oriens にも ⁴⁵Ca の集積が認められた。しかし、6時間以降は全く ⁴⁵Ca の集積観察されなかった（図4）。対側においては閉塞後いずれの時期にも ⁴⁵Ca の異常集積は認められなかった。

閉塞後1日、2日、4日、2週間の ⁴⁵Ca オートラジオグラムを図5に示した。視床の虚血側では、閉塞1日後までは ⁴⁵Ca の集積はみられなかったが、2日後に視床のほぼ全体に認められた。以後 ⁴⁵Ca の集積は経時的に増強し1カ月後まで認められたが、後述するように神経細胞の脱落消失の強い後腹側核においては、2週間

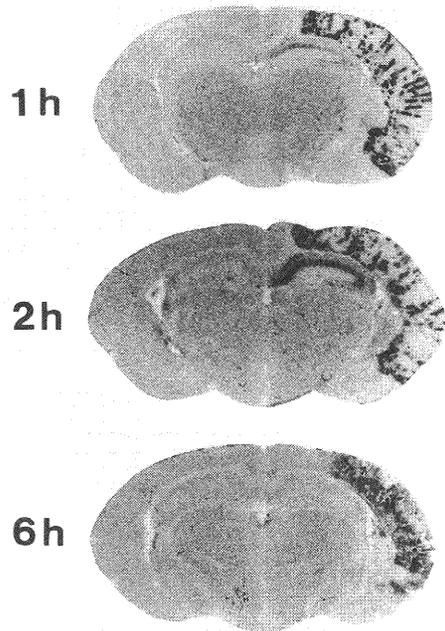


図4 海馬における ⁴⁵Ca オートラジオグラム

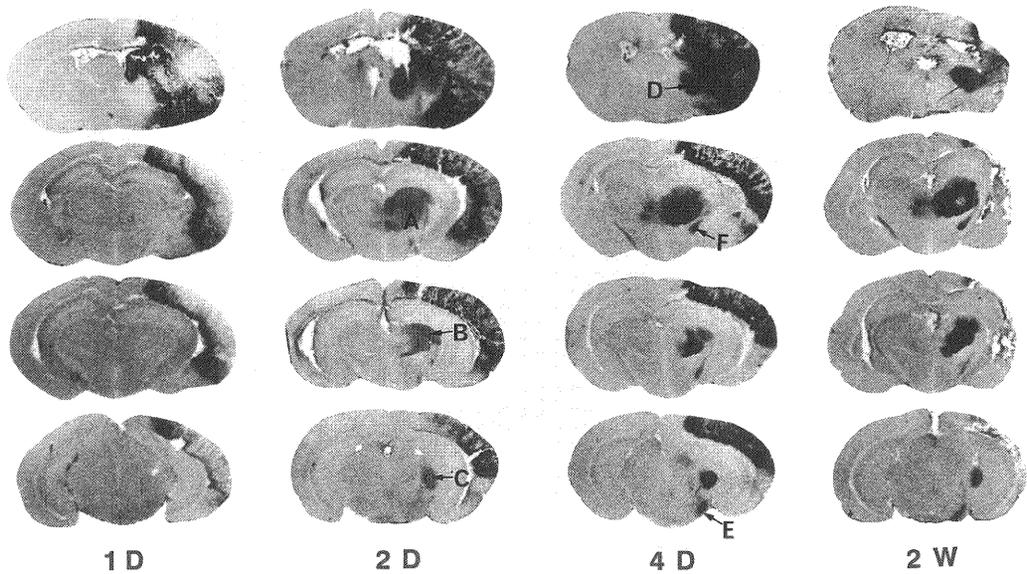


図5 中大脳動脈閉塞後1日, 2日, 4日, 2週間の ^{45}Ca オートラジオグラム
A: 視床, B: 外側膝状体, C: 内側膝状体, D: 淡蒼球,
E: 黒質網様部, F: 脚内核

後, 1カ月後は逆に ^{45}Ca の集積は減少した. 対側では, 4日以降, 内側部 (主に内側腹側核と中心傍核) に軽度の ^{45}Ca の集積が持続して認められた. 虚血側の外側膝状体, 内側膝状体では視床と同じく閉塞2日後より ^{45}Ca の集積がみられ, 以後1カ月後まで観察された. 一方, 黒質では網様部を中心に閉塞4日後より ^{45}Ca の集積が認められた. 淡蒼球も, 閉塞4日以降で ^{45}Ca の集積を認めたが, 閉塞後2日の半数例においても ^{45}Ca の集積がみられた. また, ヒトで淡蒼球内節にあたる脚内核にも, 閉塞4日以降で ^{45}Ca の集積が認められた.

4. 海馬における蛋白合成能

閉塞1時間後では虚血側と対側とほとんど差がみられなかったが, 2時間後には ^{45}Ca の集積に一致するように虚血側の錐体細胞の CA1 から CA3 にかけて合成能の低下が認められた. 但し, CA2 と CA3 の低下は軽度であった. CA2 と CA3 は6時間後には回復したが, CA1 は12時間後まで合成能の低下がみられた. 閉塞1日後には CA1 における合成能の低下も回復し, 以後1週間後まで対側と差を認めなかった (図6).

5. 組織学的所見

虚血側の海馬において, HE 染色, KB 染色では閉塞1週間群の2例で CA1 内側の錐体細胞の一部に細胞壊

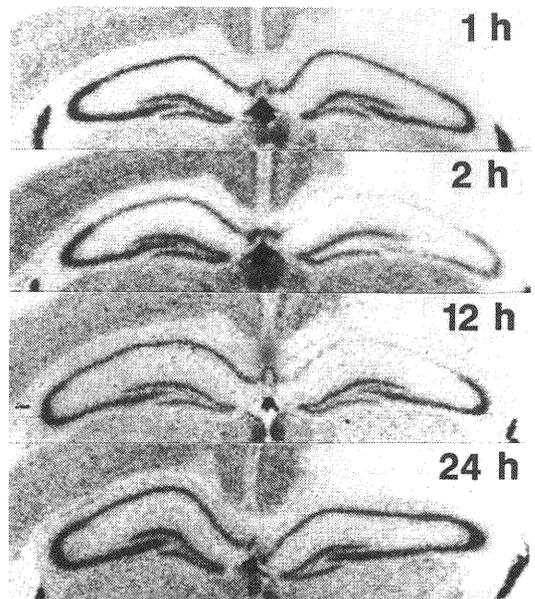


図6 海馬における ^{14}C -valine オートラジオグラム

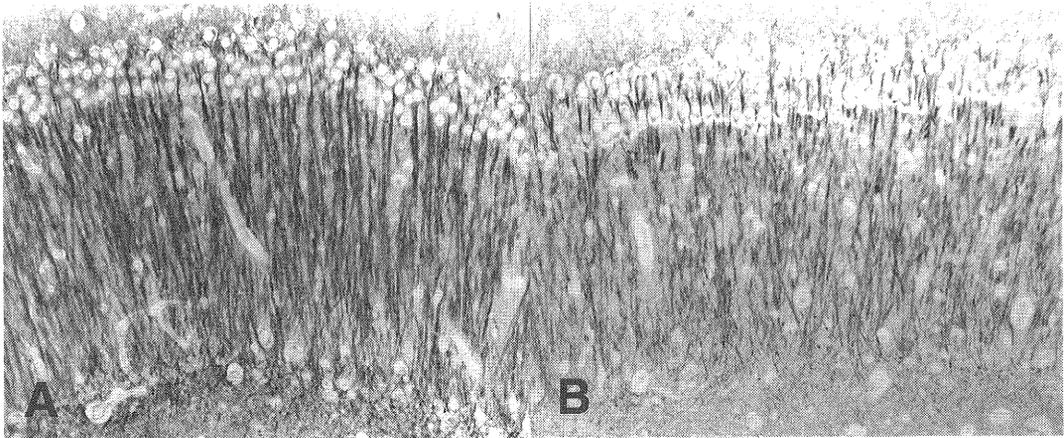


図 7 中大脳動脈閉塞 2 日後の海馬 CA1 錐体細胞
A：非虚血側，B：虚血側

死が観察された以外には、3カ月後までの各群において明らかな神経細胞の変化は認められなかった。GFAP染色では、閉塞1日後では反応性 astrocyte はみられなかったが、2日群と1週間群において、CA1 から一部 CA3 にかけて str. lacunosum moleculare と str. radiatum を中心に反応性 astrocyte の増加が観察された。2週間後には反応性 astrocyte は僅かとなり、1カ月後ではほとんど認められなくなった。MAP2 染色では、2日群において CA1 錐体細胞の apical dendrite が不規則にとぎれとぎれに染色され(図7)、dendrite の損傷が示されたが、1週間後にはその染色性は回復し、その後も dendrite に何ら変化を認めなかった。

虚血側視床において、閉塞2日後まで変化はみられなかった。4日後になると後腹側核の反応性 astrocyte の出現と神経細胞に変化がみられ、1週間後には壊死する神経細胞も認められるようになった。また、1週間後には ^{45}Ca の集積部位と一致して視床のほぼ全体に反応性 astrocyte の増加がみられた。その後、 ^{45}Ca の集積がみられた後腹側核以外の領域においても、神経細胞の変性が認められ、視床は全体として萎縮していった。神経細胞の脱落とそれに伴うグリオーシスは後腹側核において最も著明であった。対側視床においては、 ^{45}Ca の集積がみられた内側腹側核、中心傍核に閉塞2週間後、1カ月後で反応性 astrocyte がみられたが、神経細胞の明らかな形態学的変化は認められなかった。図8は反応性 astrocyte がみられる閉塞2週間後の対側内側腹側核を示す。虚血側の外側膝状体と内側膝状体閉塞4日後までは神経細胞に変化はみられず、1週間後に神経

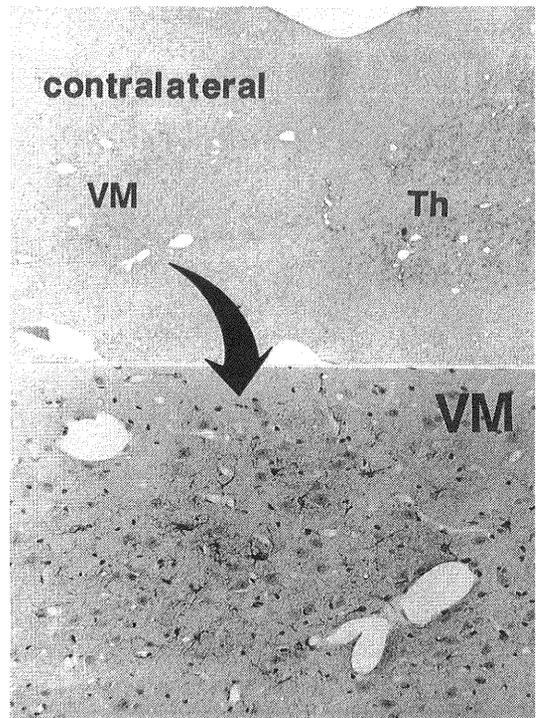


図 8 中大脳動脈閉塞 2 週間後の対側視床
(GFAP 染色+HE 染色)
VM：内側腹側核，Th：視床

細胞の変性と反応性 astrocyte の出現が認められた。黒質網様部と淡蒼球においても同じく1週間後に神経細胞の変性がみられた。反応性 astrocyte は外側膝状体

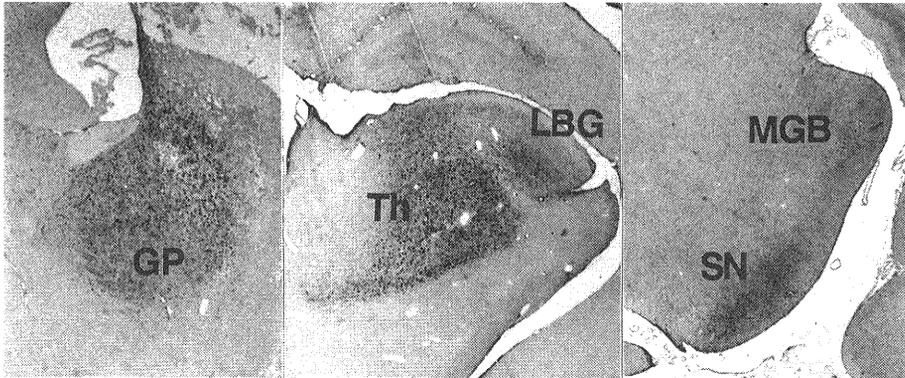


図 9 中大脳動脈閉塞 1 週間後の虚血側の各領域 (GFAP 染色)
 GP: 淡蒼球, Th: 視床, LBG: 外側膝状体,
 MGB: 内側膝状体, SN: 黒質網様部

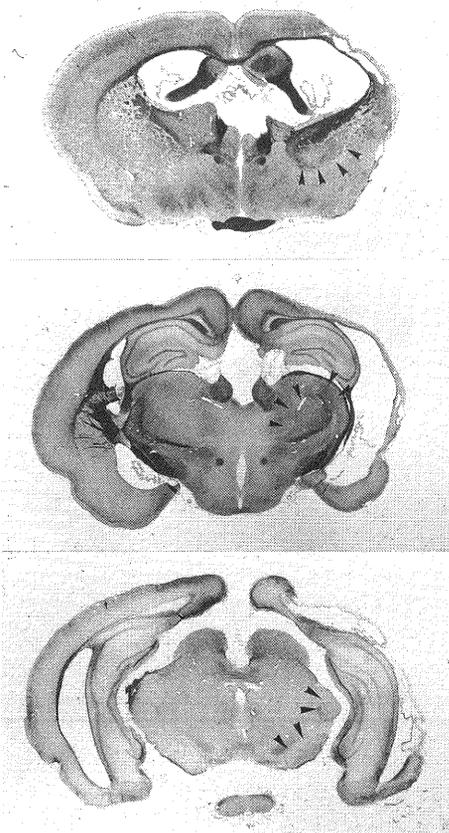


図10 中大脳動脈閉塞 1 カ月後の各領域を含む冠状断 (KB 染色)

虚血側淡蒼球, 視床, 外側膝状体, 内側膝状体, 黒質ともに萎縮を認める (矢頭).

や内側膝状体におけるより多くみられる傾向にあった。その後は4領域とも神経細胞が徐々に崩壊脱落し、1カ月後には明らかな萎縮として観察され、3月後には更に萎縮は進行した。図9には閉塞1週間後のGFAP染色示す。各領域とも反応性 astrocyte の増加がみられる。図10は閉塞1カ月後の各領域を含む冠状断のKB染色で、各領域とも萎縮が明らかである。

IV. 考 察

局所脳虚血に伴う虚血巣以外の病変に関する実験を行う場合、できるだけ一定した部位に均一した広がり虚血巣が得られる局所脳虚血モデルを用いる必要がある。その点、ラット中大脳動脈閉塞モデルは比較的個体間の差が少なく、虚血巣以外の病変に関する実験のモデルとして用いられることが多い。今回は、さらに均一した範囲に虚血巣が得られる砂ネズミ中大脳動脈閉塞モデルを用いた。本モデルは、再現性よく、表1で示した如く、線条体と中大脳動脈領域の大脳皮質にラットと比べ重度かつ一定した広がり虚血を生じ、しかも手術の approach を工夫したことで長期生存が可能となり、本研究の目的に適したモデルと考えられた。尚、砂ネズミ中大脳動脈閉塞モデルを用いていわゆる遠隔部の病変について検討した報告は本研究が初めてである。

ラット中大脳動脈閉塞モデルにおいては、虚血巣以外の領域で組織学的変化のくる部位として、虚血側の視床と黒質網様部が報告されている⁵⁾⁶⁾。それと比べ、今回用いた砂ネズミ中大脳動脈閉塞モデルでは、可逆性の神経細胞傷害が虚血側の①海馬に、進行性の萎縮が虚血側の②視床, 外側膝状体, 内側膝状体, ③黒質網様部, 淡蒼球において認められた。また、一次的に血液の

供給に制限を受けないこうした虚血領域以外の部位では、覚醒状態における脳グルコース代謝は神経細胞の活動状態を主に反映すると考えられるが、虚血急性期から経時的に覚醒状態の脳グルコース代謝を観察した結果、②と③は明らかに異なる経時変化が認められた。すなわち、①、②、③では異なる病態を持つ遠隔病変が観察された。

以下①、②、③のそれぞれにおいて、今回の実験結果を論じる。

1. 海馬

今回、虚血側の海馬において認められた所見をまとめると以下ようになる。閉塞1時間後の脳血流量は対側とほとんど差を認めなかったが、グルコース代謝は閉塞2時間後まで著明な亢進を呈し、それと時間を同じくして、CA1からCA3にかけて dendritic area である str. radiatum と str. oriens に ^{45}Ca の異常集積が観察された。6時間後にはグルコース代謝の亢進も ^{45}Ca の集積も認められず、ほぼ閉塞前のコントロールの状態に復した。しかし、CA1においては蛋白合成能の低下が12時間後までみられ、閉塞2日後にCA1の apical dendrite の軽度損傷が抗 MAP2 抗体を用いた酵素抗体法で観察された。その変化は可逆的で錐体細胞自身の破壊には結びつかなかったが、その後、主に傷害部位に対応して反応性 astrocyte の増加がみられた。

閉塞2時間後までみられた ^{45}Ca の異常集積は、6時間後には認められなくなっていることより不可逆的な組織損傷を示すものではないと考えられる。海馬における主な神経伝達物質は興奮性アミノ酸であるグルタミン酸であることが確かめられており、 ^{45}Ca の集積がちょうど synapse の多く存在する dendritic area にみられていること、その時に一致してグルコース代謝が著明に亢進していることより、シナプス前部終末からのグルタミン酸の放出し、その後起こる Ca チャネルを介する Ca イオンのシナプス後細胞内への流入を示している可能性を考えた。すなわち、砂ネズミ中大脳動脈閉塞モデルの虚血側海馬において虚血後2時間までは何らかの理由でグルタミン酸の放出が起きていることが予想された。

蛋白合成能が ^{45}Ca の集積と一致して一旦 CA1 から CA3 まで低下するのは、エネルギーが主に細胞内に流入した Ca イオンの排出等に使われているためであろう。その後、 ^{45}Ca の集積がみられなくなったにもかかわらず、蛋白合成能の回復が CA1 で遅延し、さらに CA1 の dendrite に可逆性ではあるが軽度の損傷を生じたことは、CA1 の持つ vulnerability を示す所見と考えられる。 ^{45}Ca の集積は CA1 に限らず CA3 にお

いても認められており、細胞内の Ca イオンが同様に増加しても、それによって引き起こされる細胞内変化が CA1 と CA3 では異なる可能性が考えられた。

尚、閉塞2時間後に対側海馬で観察されたグルコース代謝の亢進は交連線維を介して、虚血側の興奮が伝達されたためと思われる。一侧の海馬に電氣的刺激を与えると対側海馬にもグルコース代謝の亢進がみられることが確認されている¹¹⁾。しかし、程度および持続時間が軽度であったため ^{45}Ca の集積も組織損傷も観察されなかったのであろう。

では、これら虚血側海馬で認められた病態がグルタミン酸の放出に基づくものとするならば、グルタミン酸の放出はいかなるメカニズムによるのであろうか。海馬と虚血領域である中大脳動脈領域の大脳皮質、線条体とは直接の線維連絡が確認されていないことより、transneuronal な変化は考えにくいと思われる。ラットの中大脳動脈閉塞モデルにおいて虚血側の海馬にグルコース代謝の亢進がみられたとする報告は Shigeno ら¹²⁾ の報告だけである。Shigeno らは、Sprague-Dawley ラットを用いて中大脳動脈を穿通枝分岐部より遠位部で閉塞させることで、大脳皮質だけが虚血に陥るモデルを作製し、そのモデルの閉塞30分後のグルコース代謝を観察したところ、虚血側の海馬にグルコース代謝の亢進がみられた例があったとしている。彼らはその原因として seizure を考え、線条体の役割を推測している。本実験系においては痙攣発作を認めた例はなかったが、砂ネズミがラットと比べ痙攣を起こしやすいことを考えると、症状には現れない electrical seizure を起こすための結果である可能性が1つ考えられる¹³⁾。

2. 視床、外側膝状体、内側膝状体

視床と大脳皮質とは密接な線維連絡があり、大脳皮質を除去すると同側視床に組織学的な変化が生じることは以前から報告されている¹⁴⁾。藤江は、線条体とその近傍の大脳皮質が梗塞になる Sprague-Dawley ラットの中大脳動脈閉塞モデルにおける虚血側の視床後腹側核の組織学的変化を経時的に観察し、閉塞後4日より神経細胞の変性、反応性 astrocyte の増加がみられ、その後時間とともに神経細胞は徐々に脱落し、視床は進行性に萎縮していくと報告している⁵⁾。田村らは、同じラットの中大脳動脈閉塞モデルの脳血流量を測定し、虚血側視床腹側では閉塞後30分に対側に比して74%の低下を認め、その低下は閉塞後1日、2日、5日もほぼ同様で、更に7日目に測定したグルコース代謝率は、視床では脳血流量と同じく低値であったとしている¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾。

今回検討した砂ネズミ中大脳動脈閉塞モデルの虚血側

視床後腹側核においても、ラットの中大脳動脈閉塞モデルでみられたと同様の所見が認められた。すなわち、閉塞後1時間の脳血流量は対側比で82%の低下を示し、閉塞後1時間から1週間まで観察した脳グルコース代謝は終始コントロール値の60~70%の低値をとった。そして、組織学的には閉塞4日後に神経細胞の変化と反応性 astrocyte の増加がみられ、その後の神経細胞の壊死・脱落が観察された。尚、本実験では組織損傷部位の同定、確認のために ^{45}Ca オートラジオグラムも用いたが、虚血側視床後腹側核においては閉塞後2日で既に ^{45}Ca の集積が認められ、顕微鏡的な組織変化に比べ、より早く、しかも容易に組織傷害の有無を捕らえることが可能であった。閉塞1時間後の脳グルコース代謝で低値を示した虚血側外側膝状体、内側膝状体も視床後腹側核と基本的に同様の経時的変化を示した。但し、神経細胞の組織学的変化は閉塞後1週間よりみられた。神経細胞の脱落は視床後腹側核の方が顕著であった。

視床後腹側核、外側膝状体、内側膝状体はともに末梢からの感覚性入力を受け、各々体性感覚野、視覚野、聴覚野へ投射する中継点にあたる。砂ネズミ中大脳動脈閉塞モデルの場合大脳皮質の梗塞巣は広く、体性感覚野に加え、視覚野、聴覚野も含まれる。したがって、虚血側の視床後腹側核、外側膝状体、内側膝状体に同様に認められた前述の経時的変化の機序として“逆行性変性”が最も考えられる。視床後腹側核に関しては、大脳皮質からも入力を受けており、外側膝状体、内側膝状体に比べ組織変化が強く認められたことを考えると、藤江の指摘の通り、“順行性変性”も関与していると考えられる。

本モデルにおいては、更に、虚血側視床の後腹側核以外の領域（前腹側核、外側腹側核、後外側核、内側腹側核、背内側核、髄板内核等）にも広く変化が観察された。閉塞後2日で視床のほぼ全体に ^{45}Ca の集積がみられ、その後集積は顕著となり、1カ月後も依然として認められた。しかし、神経細胞の変化は後腹側核に比べて軽度で、脱落していく細胞数も少なかった。グルコース代謝も、後腹側核では閉塞後終始同じような低値を示したのに対し、視床内側部では6時間以後は対側よりは低値をとるもののコントロール値90%近くまで回復しており、このグルコース代謝の経時的変化の違いが、組織学的所見の差に反映されていると思われる。また、後腹側核で、逆に2週間後、1カ月後に ^{45}Ca の集積が少なくなったのは、脱落する神経細胞が多いためと考えられる。

この砂ネズミ中大脳動脈閉塞モデルでは大脳皮質と線条体に広範な均一した虚血巣を生じる。大脳皮質と視床とは密接な神経線維連絡があるが、視床はまた線条体と

も線維連絡を持つ。したがって、今回虚血側視床に広く認められた病変の中にはむしろ線条体が深くかかわって生じた領域が含まれている可能性が考えられる。中大脳動脈をより遠位部で閉塞し、線条体をできるだけ虚血巣に含まないモデルを作製して、2週間後に ^{45}Ca オートラジオグラムで観察したところ、視床腹側部、外側膝状体、内側膝状体には ^{45}Ca の集積が同様にみられたが、視床内側部（内側腹側核、背内側核、髄板内核）には ^{45}Ca の集積は認められなかった。図11にその ^{45}Ca オートラジオグラムを示す。大脳皮質の梗塞範囲は中大脳動脈近位部閉塞モデルとほとんど変わらず、線条体は背外側部に ^{45}Ca の集積がみられるのみであるが、近位部閉塞モデルと比べ、視床内側部と黒質、淡蒼球に ^{45}Ca の集積がみられない。それから判断すると、視床の中で内側部の病変の発生には線条体が関与していると考えられた。

対側視床内部（内側腹側核、中心傍核）においても、神経細胞の形態学的変化は確認されなかったが、 ^{45}Ca

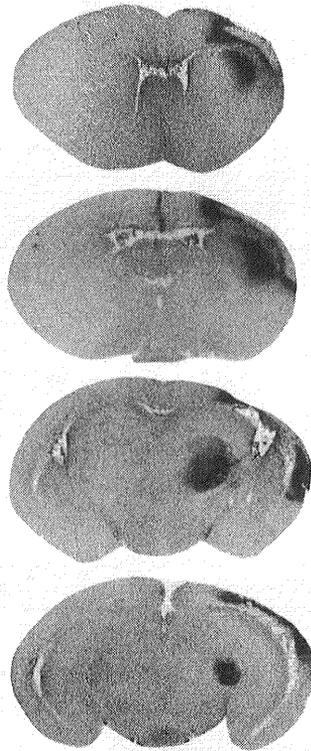


図11 中大脳動脈遠位部閉塞2週間後の ^{45}Ca オートラジオグラム

の集積がみられ、その領域に一致して反応性 astrocyte の増加を認めた。時間的に虚血側の視床に病変が生じてから変化がみられていること、虚血側視床内側部に ^{45}Ca の集積を認めなかった中大脳動脈遠位閉塞モデルでは対側視床内側部にも ^{45}Ca がみられなかったことより、梗塞巣からの直接の影響によるものではなく、左右の視床内側部同志の線維連絡による2次的変化が最も考えられた。

3. 黒質、淡蒼球

黒質網様部、淡蒼球ともに線条体から入力線維を受けており、その神経線維は GABA を伝達物質とする抑制性線維が主体であることが確認されている。線条体を興奮毒性を有するカイニン酸やイボテン酸を注入して破壊すると、同側黒質にグルコース代謝の亢進がみられること、さらには黒質網様部に神経細胞壊死を生じることが報告されている¹⁸⁾¹⁹⁾²⁰⁾²¹⁾。但し、その時間的経過は報告により異なっており、それは、線条体病変の程度や広がりによるものと思われる。メカニズムとしては、線条体の破壊によって黒質網様部における抑制性線維の入力が減少するため、脱抑制によって黒質網様部の神経細胞は過剰興奮状態となり、グルコース代謝の亢進を示すとともに、その後遅発性の神経細胞傷害を生じるのではないかと考えられている。

前述の田村らも、ラットの中大脳動脈閉塞モデルにおける虚血側黒質の組織学的所見を経時的に検討し、同じく黒質網様部に徐々に萎縮のくることを報告している⁶⁾。その経時変化は砂ネズミ中大脳動脈閉塞モデルと比べるとやや遅く、閉塞2週間後で神経細胞の壊死を認めている。彼らは虚血急性期のグルコース代謝は観察していないが、1週間後では虚血側の黒質と淡蒼球においてグルコース代謝の亢進がみられたとしている。また、田村と同じ教室の中山は、同モデルにおけるアミノ酸神経伝達物質の測定を行い、虚血側黒質と淡蒼球において、閉塞3日目から4週間目まで抑制性の伝達物質である GABA が有意に低下していることを確認している²²⁾。以上より、彼らも、虚血側の黒質に観察された組織変化のメカニズムとして、線条体の梗塞によっておきる黒質における GABA の減少に基づく脱抑制を推定している。

今回、砂ネズミ中大脳動脈閉塞モデルにおいて、虚血側の黒質網様部と淡蒼球に、視床外側膝状体、内側膝状体と同様に進行性の萎縮が観察されたが、その原因としては、やはり線条体からの抑制性線維が傷害されたための脱抑制に基づく可能性が最も考えられる。閉塞2日群の半数でみられた淡蒼球の ^{45}Ca の集積は、反応性変化が強く生じたためのものであると思われるが、黒質、淡蒼球に

おいて、閉塞4日後にみられた ^{45}Ca の集積は、線条体からの抑制性神経線維の神経終末の変性を現わしている可能性が考えられる。また、1週間後に反応性 astrocyte が外側膝状体や内側膝状体におけるより多くみられる傾向にあったのも、黒質や淡蒼球の神経細胞自体の変性に加え、入力線維の神経終末の変性に反応して増加した astrocyte を含むためであろうか。

線条体を他の方法で破壊して同側黒質の GABA を測定した報告でも、中山の結果と同様、2~3日後より減少しており、黒質における GABA の減少は MCA 閉塞後すぐには起きず、数日して起こることが予想される²³⁾²⁴⁾。今回、閉塞後3日から6日まではグルコース代謝を測定していないため、GABA を有する入力線維の減少したことによる脱抑制に基づくグルコース代謝の亢進をちょうど黒質と淡蒼球において観察できなかった可能性はある。では、閉塞後1時間から12時間まで虚血急性期に虚血側の黒質と淡蒼球で認められたグルコース代謝の亢進は何によるのであろうか。淡蒼球において閉塞後2時間まで認められた著明な高値は、梗塞に陥る線条体に淡蒼球が接していることより、急性期の虚血周辺部に認められる hypermetabolism の要素が加わっていると考えられるが、6時間以降や、虚血領域と直接接していない黒質においては、それでは説明できない。グルコース代謝ではないが、田村らも、ラット中大脳動脈閉塞モデル閉塞後30分において、同側黒質および淡蒼球に30~40%の血流増加がみられたと報告している¹⁵⁾。

虚血侵襲を受けた時、神経終末から、神経伝達物質が放出することは十分に考えられる。線条体には興奮性伝達物質と考えられる substance P を含有する神経細胞が存在し、黒質、淡蒼球に同じく神経線維を送っている²⁵⁾。虚血急性期には substance P が優位に放出され、そのためにグルコース代謝の亢進を生じた可能性は考えられないであろうか。実際、線条体を電気的に刺激すると、黒質、淡蒼球にグルコース代謝の亢進がみられたとする報告がある²⁶⁾。また、線条体が虚血に陥ると線条体において dopamine が大量に放出されることが報告されている²⁷⁾。Dopamine は線条体の神経細胞に対して抑制性に働くことが示されている。そう考えると、dopamine の放出により黒質や淡蒼球に抑制性に働く線条体の GABA 細胞が抑制され、そのため黒質と淡蒼球にグルコース代謝の亢進が生じた可能性も考えられる。いずれにせよ、黒質および淡蒼球におけるこの虚血急性期のグルコース代謝の亢進が果たしていかなる機序によるのか、その後生じる細胞傷害と何らかの関係があるか、興味深いところである。

今回の実験で、局所脳虚血に伴ってみられる遠隔病変の病態は単純でなく、種々の病態が含まれていることが明らかになった。しかし、メカニズムに関しては十分に解明されたわけではなく、さらに検討が必要と思われる。

ヒトの脳においては、神経細胞間の線維連絡は極めて複雑で、しかも多種の神経伝達物質が存在することより、脳梗塞が生じた場合に遠隔部において観察される病態の解析は容易ではないと思われる。しかし、PET や ST-ELECT を用いた脳血流、脳グルコース代謝の測定に加え、最近では PET によるレセプター mapping も可能になりつつあり、また、近年開発進歩のめざましい MRI により脳の比較的小さな領域の組織変化もとられるようになってきており、こうした方法を駆使することで、今後は臨床においても局所脳虚血が遠隔領域に与える影響について更に多くのことがわかるものと期待される。

V. ま と め

1. 局所脳虚血に伴ってみられる遠隔病変における病態を砂ネズミ中大脳動脈閉塞モデルを用いて検討した。

2. 虚血側海馬において、閉塞後2時間まで著明なグルコース代謝の亢進と錐体細胞の樹状突起領域に ^{45}Ca の異常集積が観察された。錐体細胞 GA1 の蛋白合成能は12時間後まで遷延して低下し、その後 CA1 の樹状突起に可逆性の軽度の損傷が認められた。この一連の変化には興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の放出が関与していると考えられた。

3. これに対して、虚血に陥る大脳皮質、線条体と密接な線維連絡をもつ虚血側視床、外側膝状体、内側膝状体、黒質網様部、淡蒼球では、いずれにおいても進行性の萎縮が認められた。神経細胞の変性は、視床の後腹側核で閉塞後4日でみられた以外は閉塞後1週間よりみられ、その後徐々に神経細胞は壊死・脱落していった。グルコース代謝は視床、外側膝状体、内側膝状体では閉塞1時間後から1週間後まで終始低値を示したのに対して、黒質網様部、淡蒼球では、閉塞1時間後から12時間後まで高値を呈した。 ^{45}Ca の集積も視床、外側膝状体、内側膝状体では閉塞後2日で認められたが、黒質網様部、淡蒼球では4日後よりみられた。大脳皮質と相互の線維連絡を持つ視床後腹側核は逆行性変性および順行性変性が、大脳皮質に inputs 線維を送る外側膝状体、内側膝状体においては逆行性変性が、線条体から抑制性線維が受ける黒質網様部、淡蒼球においては脱抑制による過剰興奮が、それぞれの神経細胞損傷の主なメカニズムと考えられた。

4. 局所脳虚血に伴って生じる遠隔領域の神経細胞傷

害には、急性期に可逆性に見られるものや、遅発性にゆっくりと進行するものがあり、後者においては、虚血領域との線維連絡の方向や神経伝達物質の種類がその発生に重要な因子である。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました田中隆一教授に深甚なる謝意を表わすとともに、直接御指導頂きました小池哲雄講師、佐々木修先生に深謝申し上げます。さらに、本研究を進めるにあたり絶えず協力して頂きました脳神経外科教室の先生方、関川和代嬢、木山信子嬢、上杉清枝官に心から感謝致します。

参 考 文 献

- 1) Brierley, J.B. and Graham, D.I.: Hypoxia and vascular disorders of the central nervous system. In Greenfield's neuropathology (Adams, J.H., Corsellis, J.A.N. and Duchon, L.W.) Edward Arnold, London, 4th ed., 1984. pp. 125~207.
- 2) Kirino, T.: Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.*, **239**: 57~69, 1982.
- 3) Pulsinelli, W.A., Brierley, J.B. and Plum, F.: Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann. Neurol.*, **11**: 491~498, 1982.
- 4) Feeney, D.M. and Baron, J.C.: Diaschisis. *Stroke*, **17**: 817~830, 1986.
- 5) 藤江和貴: ラット局所脳虚血後にみられた虚血側視床の変性・萎縮について. *帝京医学雑誌*, **11**: 371~380, 1988.
- 6) 田村 晃, 中山比登志, 桐野高明, 佐野圭司, 松谷雅生: 中大脳動脈閉塞後の同側黒質の disinhibition hyperemia と神経細胞傷害. *Brain Hypoxia*, **3**: 43~47, 1989.
- 7) Yoshimine, T., Hayakawa, T., Yamada, K., Takemoto, O., Kato, A., Ushio, Y. and Mogami, H.: Regional cerebral ischemia in the gerbil: Measurement of regional cerebral blood flow by quantitative autoradiography. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **6**: 348~357, 1986.
- 8) Sakurada, O., Kennedy, C., Jehle, J.W., Brown, I.D., Cabin, G.L. and Sokoloff, L.: Measurement of local cerebral flow with iodo ^{14}C antipyrine. *Am. J. Physiol.*, **234**: H59~66, 1978.

- 9) **Dienel, G.A.**: Regional accumulation of calcium in postischemic rat brain. *J. Neurochem.*, **43**: 913~925, 1984.
- 10) **Bernhardt, R. and Matus, A.**: Light and electron microscopic of the distribution of microtubule-associated protein 2 in the rat brain: a difference between dendritic and axonal cytoskeletons. *J. Comp. Neurol.*, **226**: 203~221, 1984.
- 11) **Watson, R.E. Jr., Edinger, H.M. and Siegel, A.**: A [¹⁴C] 2-deoxyglucose analysis of the functional neural pathways of the limbic forebrain in the rat. III. The hippocampal formation. *Brain Res. Rev.*, **5**: 133~176, 1983.
- 12) **Shigeno, T., McCulloch, J., Graham, D.I., Mendelow, A.D. and Teasdale, G.M.**: Pure cortical ischemia versus striatal ischemia. Circulatory, metabolic, and neuropathologic consequences. *Surg. Neurol.*, **24**: 47~51, 1985.
- 13) **Schonfeld, A.R. and Glick, S.D.**: Cerebrovascular abnormalities associated with seizure susceptibility in the mongolian gerbil. *Brain Res.*, **173**: 147~151, 1979.
- 14) **Matthews, M.A.**: Death of the central neuron: an electron microscopic study of thalamic retrograde degeneration following cortical ablation. *J. Neurocytol.*, **2**: 265~288, 1973.
- 15) **Tamura, A., Graham, D.I., McCulloch, J. and Teasdale, G.M.**: Focal cerebral ischemia in the rat: 2. Regional cerebral blood flow determined by [¹⁴C] iodoantipyrine autoradiography following middle cerebral artery occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **1**: 61~69, 1981.
- 16) 田村 晃, 後藤 修, 佐野圭司, 長島 正, 松谷雅生, 折井弘武, **Graham, D.I.**: ラット脳局所虚血モデル. 2. 脳梗塞の計測と脳血流パターンの検討. *脳神経*, **38**: 859~863, 1986.
- 17) 田村 晃, 折井弘武, 長島 正, 松谷雅生: 画像診断の基礎的研究. II. 脳梗塞モデルにおけるオートラジオグラフィ法による脳代謝測定. *日本医放会誌*, **44**: 1546~1548, 1984.
- 18) **Wooten, G.F. and Collins, R.C.**: Regional brain glucose utilization following intrastriatal injection of Kainic acid. *Brain Res.*, **201**: 173~184, 1980.
- 19) **Kelly, P.A.T., Graham, D.I. and McCulloch, J.**: Specific alternations in local cerebral glucose utilization following striatal lesions. *Brain Res.*, **233**: 157~172, 1982.
- 20) **Saji, M. and Reis, D.J.**: Delayed transneuronal death of substantia nigra neurons prevented by γ -aminobutyric acid agonist. *Science*, **235**: 66~69, 1987.
- 21) **Krammer, E.B.**: Anterograde and transsynaptic degeneration 'en cascade' in the basal ganglia induced by intrastriatal injection of kainic acid: An animal analogue of huntington's disease. *Brain Res.*, **196**: 209~221, 1980.
- 22) 中山比登志: ラット中大脳動脈閉塞後の大脳基底核アミノ酸神経伝達物質の経時的変動. *脳神経*, **38**: 1043~1050, 1986.
- 23) **Kim, J.S., Bak, I.J., Hassler, R. and Okada, Y.**: Role of γ -aminobutyric acid (GABA) in the extrapyramidal, motor system. 2. Some evidence for the existence of a type of GABA-rich strio-nigral neurons. *Exp. Brain Res.*, **14**: 95~104, 1971.
- 24) **Kurihara, E., Kuriyama, K. and Yoneda, Y.**: Interconnections of GABA-ergic neurons in the rat extrapyramidal tract. Analysis using intracerebral microinjection of kainic acid. *Exp. Neurol.*, **68**: 12~26, 1980.
- 25) 金澤一郎: GABA および Substance P について. *神経進歩*, **25**: 119~129, 1981.
- 26) **Yasutake, A., Hosokawa, S., Shima, F., Kato, M. and Kitamura, K.**: Alternations in local cerebral glucose utilization during electrical stimulation of the striatum and globus pallidus in rats. *Brain Res.*, **442**: 43~52, 1988.
- 27) **Hillered, L., Hallstorm, A., Segersvard, S., Persson, L. and Ungerstedt, U.**: Dynamics of extracellular metabolites in the striatum after middle cerebral occlusion in the rat monitored by intracerebral microdialysis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **9**: 607~616, 1989.

(平成2年9月11日受付)