

ラット一過性局所脳虚血モデルにおける
Secondary deterioration の病態：
7 テスラ プロトン磁気共鳴スペクトロスコピーによる解析

菊池文平

新潟大学大学院医歯学総合研究科脳神経外科学分野

(主任：藤井幸彦教授)

**Mechanism of Secondary Deterioration after Transient Focal Brain Ischemia:
¹H-Magnetic Resonance Spectroscopy Study**

Bumpei KIKUCHI

Division of Neurosurgery, Niigata University

Graduate School of Medical and Dental Science

(Director: Prof. Yukihiko Fujii)

要 旨

【背景】脳梗塞急性期における MRI 拡散強調画像 (DWI) の高信号域, すなわち拡散係数 (ADC) 低下領域は細胞内 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATP pump の停止を示唆し, 組織の不可逆性を示すと考えられてきた. 一方, 超急性期に再灌流が成功した症例において, 病巣の DWI 高信号領域が一旦消失し ADC が正常化するものの, その後再び出現し最終的に梗塞に陥ることが secondary deterioration として近年報告されており, この現象は rat を用いた局所脳虚血モデルにおいても再現性高く認められる. しかし, 一過性 ADC 正常化時において脳組織の代謝状態が同様に一過性の改善を伴うのかは不明である.

【目的】脳虚血後再灌流時に見られる一過性の ADC 正常化時における組織代謝状態をプロトン磁気共鳴スペクトロスコピー (¹H-MRS) により検討する.

【方法】12 匹のラットに 90 分の一過性中大脳動脈閉塞を負荷し, 虚血中および再灌流後 1, 4, 6, 24 時間に動物用 7T MR 装置にて MR 測定を行った. DWI 測定を行うことにより ADC map, Continuous Spin-Labeling (CASL) 法を行うことにより局所脳血流量 (rCBF) の各 parametric map を作成した. 更に ADC 値の一過性正常化を示した lateral caudoputamen について, 組織の代謝状態を検討するために, 同時に ¹H-MRS を測定し, N-acetyl aspartate (NAA) および Lactate の経時的変化を観察した.

【結果】lateral caudoputamen において虚血時に低下した rCBF は再開通後 24 時間後まで上昇を続け虚血前値に復した. 一方, ADC は secondary deterioration を呈し, 一旦正常値に復するも再開通 4 時間目より再度低下し, 同部は 24 時間後には最終的に梗塞に陥った. 同部位にお

Reprint requests to: Bumpei KIKUCHI
Division of Neurosurgery Niigata University
Graduate School of Medical and Dental Sciences
1-757 Asahimachi-dori Chuo-ku,
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先: 〒951-8510 新潟市中央区旭町通 1-757
新潟大学医歯学総合研究科脳神経外科学分野
菊池文平

る NAA は虚血中に低下しはじめ、一過性の ADC 正常化時にも漸減を続けた。一方、Lactate は虚血中に著明に増加した後、ADC 正常化時にも漸増した。

【考察】脳梗塞超急性期血行再建例に見られる、再開通直後の ADC の一過性正常化時においても、NAA は漸減および Lactate の増加が見られることより組織代謝障害は進んでおり、脳組織が細胞死へ向かっていることが示唆された。

Key words: secondary deterioration, apparent diffusion coefficient, magnetic resonance spectroscopy, ischemia, rat

緒 言

脳梗塞は、現在日本での疾病人口は130万人と言われ、65才以上の寝たきり老人の原因疾患の1位を占める脳卒中の中で約65%を占める疾患である。1996年に脳梗塞に対する初めての予後改善をもたらす治療法として米国食品医薬局は tissue plasminogen activator (t-PA) を認可し、遅ればせながら2005年10月同薬剤は日本においても認可された。これにより、一部の症例では予後の劇的な改善を見ることが可能となったが、すべての t-PA 投与患者が予後の改善を見るわけではない。予後改善が得られない場合の最大の原因は t-PA による再開通の不成功や再閉塞、出血性梗塞の合併といった、血管系に帰するものだが、それについて近年問題になっているのが、t-PA 治療が特に効果の高い発症3時間以内に再開通を得たにもかかわらず、徴候の改善を見ない症例の存在である。一方、近年の MRI 撮像技術の進歩により、このような症例において拡散強調画像 diffusion weighted image (DWI) 上、一旦病巣が消失するにもかかわらず、数日以内に DWI 陽性病巣が同部位に再度出現することが報告されるようになった¹⁾。この現象は secondary deterioration と名付けられ、この画像上の回復と再悪化のメカニズムを研究することにより secondary deterioration を防ぐ対策が明らかとなれば、今後臨床で問題となるであろう t-PA 投与後の脳保護療法の標的を絞り込める可能性がある。しかし、secondary deterioration に関しては未だその現象に対する報告が散見されるようになったのみで、メカニズムを追求した報告はみられていない。今回、われわれは secondary deterioration のメカニズムを追求する

目的の一貫として、ラット中大脳動脈の一過性虚血モデルを用い、DWI の経時的撮像を行うと共に、プロトン磁気共鳴スペクトロスコピー (Proton-magnetic resonance spectroscopy, ¹H-MRS) を同時に施行し、組織代謝状態の評価を行った。

材料と方法

1. 動物モデル

雄性 Sprague-Dawley rat (体重 250 ~ 300g) を12時間絶食で飲水のみ可能としたのち、1.5% ハロセン、空気/笑気/酸素を各々 40/30/30% 2L/min で麻酔導入。直腸温をモニターし、これを feedback controlled heating lamp につなぐことで 37.0 ± 0.5 °C に保った。尾動脈に PE-50 ポリエチレンチューブを挿入し、観血的血圧モニターと血糖測定・動脈血ガス分析を反復して行った。麻酔導入後ハロセンは 1.0% とした。

一過性局所脳虚血は Koizumi²⁾ の suture model を用い、左中大脳動脈閉塞 (MCAO) により90分間の局所脳虚血を負荷した。手術用顕微鏡直視下に前頸部正中切開後、左総頸動脈・外頸動脈・内頸動脈を露出し、総頸動脈近位部と外頸動脈を 3-0 絹糸で結紮したのち左総頸動脈の動脈壁を切開し、ここよりナイロン糸の先端にシリコンコーティングを施して直径 0.35mm とした塞栓子を分岐部より左内頸動脈へ挿入した。軽い抵抗が得られることをもって塞栓子が前大脳動脈近位部に挿入された事を確認し、左中大脳動脈への血流が遮断されたものとして固定した。塞栓開始より90分後に塞栓子の断端を 15mm 引き抜き、中大脳動脈の閉塞を解除した。

2. MRI 撮影

上門歯と両耳孔を固定する非磁性の自作 3 点頭部固定器にラットを置き、マグネット内に supine position にて留置した。マグネット内では 1.0 % ハロセン、笑気/酸素を 70/30 % 1L/min で麻酔を維持した。測定中は直腸温をモニターし、自作の温水循環回路でこれを 37.0 ± 0.5 °C に維持した。MR の撮影に用いたのは静磁場強度 7T で、Gradient Coil に Actively shielded Gradient (最大傾斜磁場 20G/cm) を有する直径 12cm の横 bore Magnet (Magnex Scientific, Abington, U.K.) に Varian Unity - INOVA - 300 console (Varian Inc, Palo Alto, CA, USA) を接続した動物実験用 MR system を用いた。RF の送受信には内径 6cm の Quadrature Coil を用いた。

Gradient - echo 3 plane scout scan ののち、Spin - echo multislice sequence (TE 500 msec, TR 14 msec) で詳細な Sagittal scout scan を得た。これによって異なる撮影時間及び個体でラット脳の撮像位置が一致するようにし、2 mm 厚、non-gap, 8 スライス of 冠状断画像を嗅脳と前脳の境界から 1 スライス目が始まるように撮影した。1 回の測定につき、拡散強調画像、脳血流画像、¹H - MRS を得るために、以下の protocol で撮像を行った。各シーケンスのパラメータは以下の如くである。

- ① T1 強調画像：conventional Spin - echo, FOV 40 × 40 mm, Matrix 128x128, TR 500 msec, TE 14 msec, NEX 2.
- ② DWI：Spin - echo Echo - Planar Imaging with Stajkal-Tanner diffusion gradients³⁾, FOV 40 × 40 mm, Matrix 128x128, TR 2000 msec, TE 40 msec, NEX 2, b 値 0, 750, 1500 sec/mm² (X, Y, Z 軸に対し各々の b 値で撮像)
- ③ CBF map：Continued Arterial Spin Labeling (CASL) using centric ordered snapshot FLASH (TR/TE = 4/2.3 msec), Labeled slab imaging plane ± 20 mm
- ④ Single voxel MR Spectroscopy (SV - MRS)：point - resolved spectroscopy (PRESS), 3 × 3 × 3 mm Voxel of Interest (VOI) を Lateral

caudo - putamen の secondary deterioration を呈する部位に設置。TR：2000 msec, TE：30 msec, Spectral Width 4000 Hz, Spectral Resolution 4096 point, NEX 256 (虚血中), 512 (再灌流後), water reference scan NEX 16.

3. 撮影プロトコール

虚血中と再灌流後 1, 4, 6, 24 時間の計 5 回にわたって ADC map, CBF map, SV - MRS を撮影した。T1 強調画像は初回と再灌流直後、24 時間後に撮影し、スライスの位置を確認した。

4. 画像解析

ADC 値, CBF 値, 梗塞体積の計測には画像解析ソフトウェア MR Vision ver. 1.6 (MR Vision Co.) を用いた。実験に用いた 90 分一過性中大脳動脈閉塞モデルにおいて拡散強調画像上, Secondary deterioration を呈する部位である Lateral caudoputamen^{20) 21)} に 3 × 3mm の Region of Interest (ROI) を設定し, 対側 (非虚血側) mirror region の値で normalize することにより relative ADC value (rADC) および relative CBF value (rCBF) を算出した。梗塞体積の計測には第 2 スライスから第 6 スライスまでの 5 スライスを採用し, 対側半球 ADC の 80 % 以下の領域を梗塞巣と定義し^{4) 21)}, これを同側半球体積で除したものを percentile Hemispheric Lesion Volume (% HLV) として計測した。これにより 24 時間の時点での脳浮腫による影響を除外した^{21) 22)}。

5. ¹H - MRS スペクトル定量解析

¹H - MRS data の定量は恣意性を排除するために, curve fitting program である LCmodel⁵⁾ を用いた。LCmodel は ¹H - MRS 上の各ピークの既知のケミカルシフトおよび緩和時間より, 水ピークを基準として各代謝物の定量値を求めるプログラムである。既知ケミカルシフトおよび緩和時間の基本データは, LCmodel の作者である Dr. Steven Provencher より入手した。さらに定量精度を上げるために, 今回の対象測定代謝物である N - acetyl aspartate (NAA) および Lactate の希釈溶

液系列を作成し、測定に使用したMR装置において calibration を行った。

6. 統計学的処理

すべてのデータは平均±S.Dで表記した。

結 果

1. relative CBF

左MCA閉塞後、同側Lateral caudoputamenのrCBFは著減した(32.9±22.3%)。再灌流後rCBFは回復傾向を示し(48.9±11.4%)、その後、経時的に漸増して24時間の時点で虚血前値に復した(100.6±39.6%)。

2. relative ADC

同側Lateral caudoputamenのADC値は虚血中に著明に低下し(rADC 79.5±10.6%)、再灌流にてすみやかに回復した(93.2±10.8%)。その後再び経時的に低下し、24時間の時点のrADCは75.9±18.9%と虚血中のrADCに比して4.7%低下していた。

3. percentile Hemispheric Lesion Volume

%HLVは虚血中に16.3±8.4%となったのち、再灌流によって一旦縮小した(7.7±3.9%)が再灌流後4時間以降に再度増大し、24時間の時点で20.5±14.4%となり、虚血中に比して25.2%拡大していた。

4. SV-MRS

同側Lateral caudoputamenのVOIにおけるNAAはControlでは8.54±1.47μmol/mgであったが、虚血中には7.01±1.16μmol/mgと低下し、その後も血流の再開に関係なく、24時間まで漸減した(3.12±1.90μmol/mg)。同VOIのLactateはControlでは0.87±0.92μmol/mgであったが、虚血中に著明に上昇し(7.01±3.80μmol/mg)、再灌流後1時間でピークに達し(4.80±3.46μmol/mg)、その後減少し、再灌流後6時間の時点で2.68±2.16μmol/mgとなった。しかし再び増

加を示し、24時間後には5.56±3.13μmol/mgとなった(図1, 2)。

考 察

急性期脳卒中の臨床において近年普及したMRI測定法であるDWIは、虚血によるエネルギー枯渇に陥った脳組織を可及的に描出することにより、虚血直後より脳虚血巣の描出が可能であり、「脳梗塞の心電図」として広く普及した。脳虚血により、脳代謝の2つの重要な基質である酸素およびグルコースの供給が途絶し、それによる高エネルギー燐化合物の急速な枯渇が生じた結果、細胞のイオンホメオスタシスをつかさどる $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATP pumpが停止し、細胞質への Na^+ 流入とそれに伴う、細胞の腫脹(cytotoxic edema)と細胞間腔の狭小化が生じる。その結果、組織内では細胞間腔の水分子のブラウン運動による拡散が停止し、相対的に水分子の動きが遅くなる細胞質内の水分子の比率が上昇するため、水分子の微視的な動きを数値化した指標であるみかけの拡散係数(apparent diffusion coefficient, ADC)の低下をもたらす。DWIはこのADCに依存して画像コントラストをつけることにより虚血直後よりcytotoxic edema⁶⁾が生じた部位を高信号として描出することが可能である。1990年代後半にこの撮像法が普及した当初、DWIにて描出された病巣は不可逆的な変化を来していると考えられていた。しかし、臨床では脳虚血の治療法としてt-PAや脳血管内治療による超急性期の血行再建が普及した結果、虚血後早期に血行再建をなした症例では、血行再建直後に一部ないしはすべてのDWI陽性病巣が消失、すなわち虚血中に低下したADCが回復することが報告され始めた。さらにこれらの病変において一旦ADCが回復したにもかかわらず、数日後には再度ADCの低下を来し最終的に梗塞に陥ることが明らかになった。この一過性脳虚血後ADCの再度の低下はsecondary deteriorationと呼ばれKidwell¹⁾によって初めて臨床例で報告され、van Lookeren⁷⁾、Li F²⁰⁾らによって動物実験系でも示された。この現象はラットを用

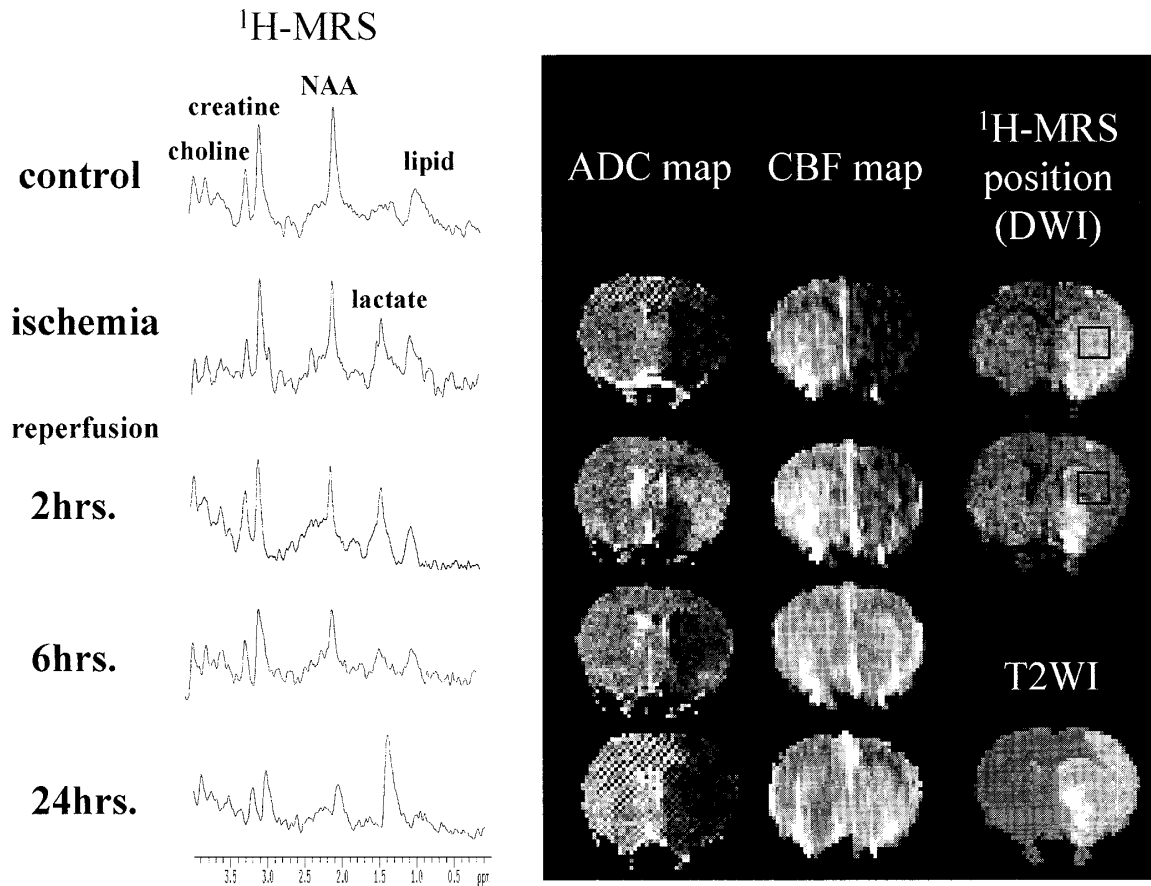


図 1

代表例の ADC map, CBF map, DWI, 再灌流 24 時間後の T2 強調画像と ^1H -MRS の経時的变化を示す. 虚血負荷により ADC が低下した部位は再灌流によって著減し, その後漸増してくる. NAA は再灌流にかかわらず漸減している. 図中 DWI 上の四角は ^1H -MRS における Lateral caudoputamen の VOI を示す.

いた中大脳動脈一過性虚血モデルでは虚血時間が 2 時間以内の場合に生じ⁸⁾⁹⁾, 特に 30 分虚血の場合には ADC 低下領域は一旦完全に消失し¹⁰⁾¹¹⁾²¹⁾, 30 分以上の虚血時間の場合, 部分的に消失することが示されている¹²⁾. また, 超短時間虚血 (10 分) の場合には再灌流後にも secondary deterioration が生じないことが示されており²⁰⁾, この現象は虚血時間に依存して生じるものであることが明らかにされている. しかしながら 30 分以内の短時間一過性脳虚血の場合でさえも, ADC 正常化時において, 組織学的にはアストログリアの腫脹の漸次的な進行などの細胞障害の悪化が示され

ており¹³⁾²⁰⁾, 再灌流直後の ADC の正常化が必ずしもエネルギー代謝の完全な回復を意味しているわけではないことが示唆されている.

今回の実験においては, 脳組織内のエネルギー代謝を DWI と別の角度で検討するために, 動物実験用 MR 装置で DWI と交互に脳血流および ^1H -MRS を測定した. ^1H -MRS では脳組織内に含まれるアミノ酸や Lactate などの種々の代謝物が測定可能であり, その中でも神経細胞内に特異的に含まれる代謝物である NAA は神経細胞のミトコンドリアで Acetyl-CoA と aspartate から L-aspartate-N-transferase (asp-NAT) により合

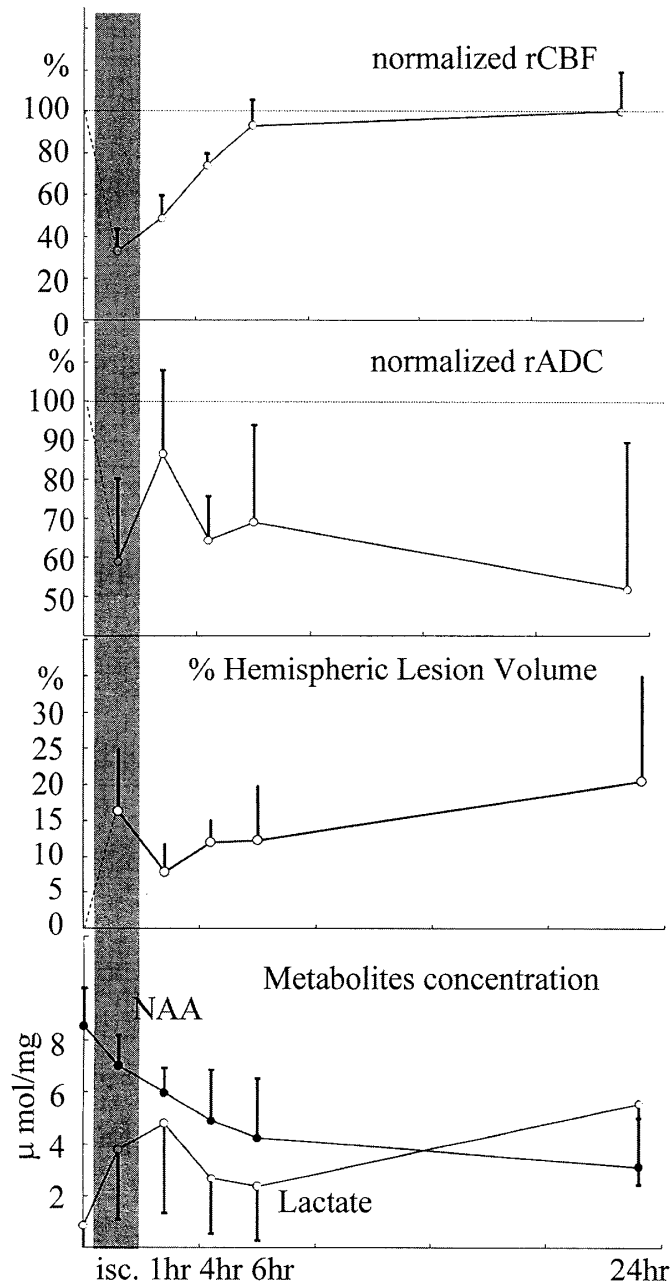


図2

normalized relative CBF (rCBF), normalized relative ADC (rADC), percentile hemispheric lesion volume (% HLV) 及び ^1H -MRSpectroscopy による N-acetyl aspartate (NAA) と Lactate の metabolic concentration の時系列グラフ。左 MCAO により同側 Lateral caudoputamen の rCBF は著減し、再灌流後に漸増した。rADC は虚血中に著減し、再灌流によりすみやかに回復したが、その後漸減し、secondary deterioration を呈した。これを反映して % HLV も虚血中に増加したものが再灌流によって一旦減少した後、漸増した。NAA は虚血中より再灌流後 24 時間まで漸減した。Lactate は虚血中に増加した後、再灌流後 1 時間で一旦低下したのち、再び漸増した。

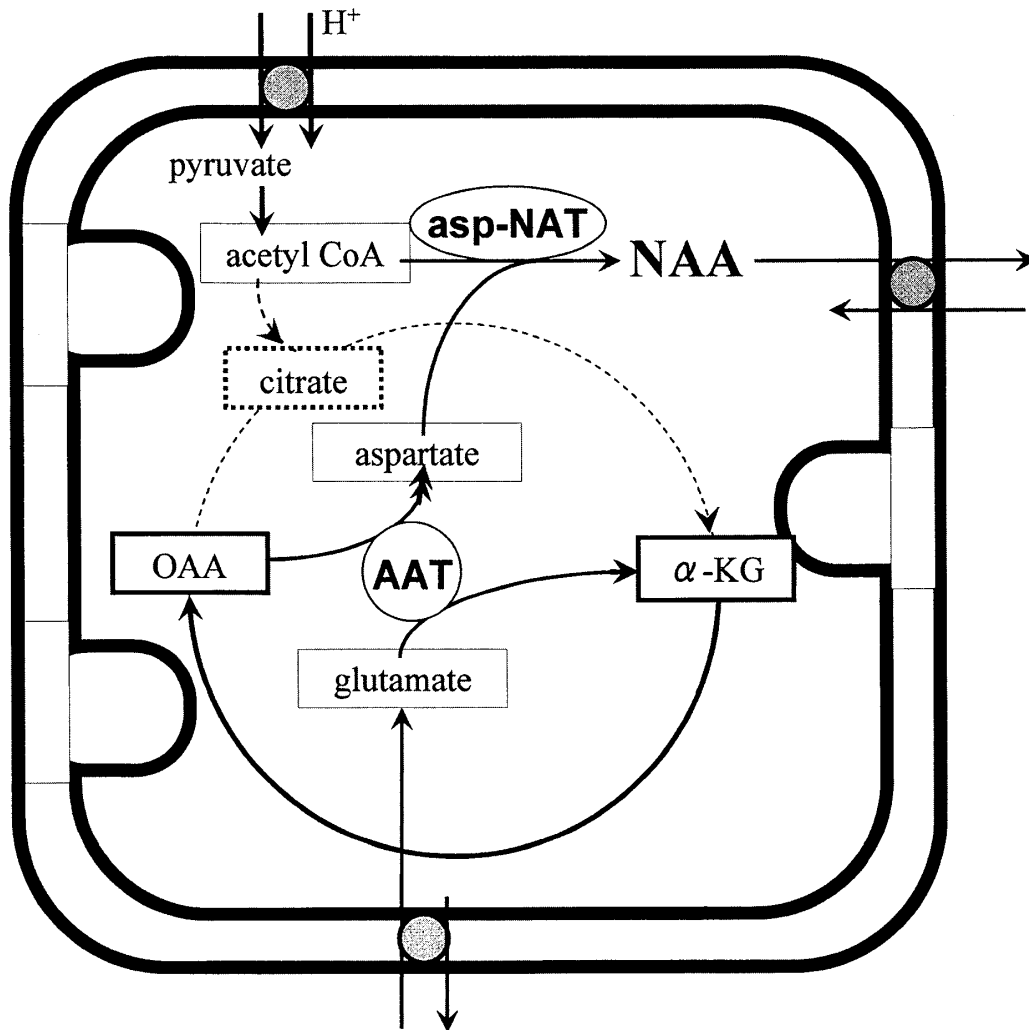


図 3

NAA の合成経路. NAA はミトコンドリア内で acetyl CoA および aspartate より合成される. その合成経路は energy - dependent であり, TCA cycle の側副路を形成している為に mini - TCA cycle と呼ばれる. asp - NAT: L - aspartate - N - transferase, AAT: aspartate aminotransferase, OAA: oxaloacetate, α - KG: alpha - ketoglutarate)

成され, ミトコンドリアより細胞質, さらには細胞外へ放出され oligodendroglia に取り込まれた後に asparto - acilase で分解される. その合成経路はミトコンドリア内において TCA cycle と共役して側副路 (mini TCA cycle¹⁴⁾) を形成していると考えられており (図 3), NAA の合成は energy dependent¹⁵⁾ である. これらの報告を元に, 虚血急性期における低下はミトコンドリア障害を間接的に表していると考えられている¹⁶⁾¹⁷⁾. 一方,

Lactate は虚血時における嫌気性解糖の亢進, いわゆるパストール効果により上昇し, 本来の TCA cycle の障害を反映すると考えられている. 今回, 90 分虚血後再灌流 1 時間目の lateral caudo - putamen において, DWI 上は ADC の回復を見, 血流も上昇しているものの, NAA は漸減し続けた. また, Lactate は再灌流後, 一旦低下するものの再度上昇した. このことは, 虚血早期再灌流後に ADC は見掛け上正常化するものの, 虚血によ

るエネルギー代謝障害が続いていることを示唆していると考えられた。

今回の虚血モデルにおける secondary deterioration のメカニズムを本研究の結果より考察すると、以下のごとく解釈できる。虚血脳組織において再灌流により通常の TCA cycle は可及的に再開し、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATP pump の駆動に必要な ATP 産生が再開されるものの、この時ミトコンドリアは完全に回復しておらず、mini-TCA cycle が NAA を産生できない状態、即ち潜在的な機能不全の状態に陥っていると考えられる。その後ミトコンドリア機能不全は何らかの原因で徐々に進行し、TCA cycle まで障害が及び、再度 ATP 産生が低下した結果、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATP pump が停止する部位が徐々に拡大し、ADC が再度漸減し、ついには細胞死に至ると考えられる。生化学的にもこのミトコンドリア障害の進行のメカニズムを支持する結果は多く報告されているが、その原因としては、ミトコンドリア遺伝子の発現障害¹⁸⁾、2 次的なカルシウムイオンの増加¹⁹⁾、フリーラジカルによる膜障害²³⁾、ミトコンドリア膜の透過性亢進²⁴⁾ など多岐にわたっており、未だ一定の見解は得られておらず、今後このモデルを用いて検討すべき問題である。

以上、 ^1H -MRS を用いることによって脳組織のエネルギー代謝を経時的に追跡することにより、脳虚血後早期再灌流後の ADC の一過性の正常化はミトコンドリアの潜在的な機能障害を伴っており、漸次的な機能障害の悪化により自然経過においては脳組織は細胞死に向かっていることが解明された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、研究の機会を与えてくださいました新潟大学大学院医歯学総合研究科脳神経外科学分野 藤井幸彦教授、新潟大学統合脳機能研究センター 中田力教授、御指導いただきました新潟大学統合脳機能研究センター 五十嵐博中准教授に深謝申し上げます。また、研究を支えていただきました脳研究所脳神経外科ならびに統合脳機能研究センターの皆様にも併せて感謝いたします。

文 献

- 1) Kidwell CS, Saver JL and Mattiello J: Thrombolytic reversal of acute human cerebral injury shown by diffusion/perfusion Magnetic Resonance Imaging. *Ann Neurol* 47: 462 - 469, 2000.
- 2) Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T and Ooneda G: Experimental studies of ischemic brain edema, I: A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke* 8: 1 - 8, 1986.
- 3) Stejskal EO and Tanner JE: Spin diffusion measurements: spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient. *Journal of Chemical Physics* 42: 288 - 292, 1965.
- 4) Olah L, Wecker S and Hoehn M: Secondary deterioration of apparent diffusion coefficient after 1-hour transient focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 20: 1474 - 1482, 2000.
- 5) Provencher SW: Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magn Reson Med* 30: 672 - 679, 1993.
- 6) Klazo I: Evolution of brain edema concepts. *Acta Neurochir. Suppl* 60: 3 - 6, 1994.
- 7) van Lookeren Campagne M, Thomas GR, Thibodeaux H, Palmer JT, Williams SP, Lowe DG and van Bruggen N: Secondary reduction in the apparent diffusion coefficient of water, increase in cerebral blood volume and delayed neuronal death after middle cerebral artery occlusion and early reperfusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 19: 1354 - 1364, 1999.
- 8) Minematsu K, Li L, Sotak CH, Davis MA and Fisher M: Reversible focal ischemic injury demonstrated by diffusion-weighted magnetic resonance imaging in rats. *Stroke* 23: 1304 - 1311, 1992.
- 9) Muller TB, Haraldseth O, Jones RA, Sebastiani G, Godtliebsen F, Lindboe CF and Unsgard G: Combined perfusion and diffusion-weighted magnetic resonance imaging in a rat model of reversible middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 26: 451 - 458, 1995.

- 10) Mintorovitch J, Moseley ME, Chileuitt L, Shimizu H, Cohen Y and Weinstein PR: Comparison of diffusion - and T2 - weighted MRI for the early detection of cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Magn Reson Med* 18: 39 - 50, 1991.
- 11) Wendland MF, White DL Aicher KP, Tzika AA and Moseley ME: Detection with echo - planar MR imaging of transit of susceptibility contrast medium in a rat model of regional brain ischemia. *J Magn reson Imaging* 1: 285 - 292, 1991.
- 12) Hasegawa Y, Fisher M, Latour LL, Dardzinski BJ and Sotak CH: MRI diffusion mapping of reversible and irreversible ischemic injury in focal brain ischemia. *Neurology* 44: 1484 - 1490, 1994.
- 13) Ringer TM, Neumann - Haefelin T, Sobel RA, Moseley ME and Yenari MA: Reversal of early diffusion - weighted magnetic resonance imaging abnormalities does not necessarily reflect tissue salvage in experimental cerebral ischemia. *Stroke* 32: 2362 - 2379, 2001.
- 14) Yudkoff M, Nelson D, Daikhin Y and Erecinska M: Tricarboxylic acid cycle in rat brain synaptosomes: Fluxes and interactions with aspartate aminotransferase and malate/aspartate shuttle. *J Biol Chem* 269: 27414 - 27420, 1994.
- 15) Patel TB and Clark JB: Synthesis of N - acetyl - L - aspartate by rat brain mitochondria and its involvement in mitochondrial/cytosolic carbon transport. *Biochem J* 184:539 - 546, 1979.
- 16) Bates TE, Strangward M, Keelan J, Davey GP, Munro PM and Clark JB: Inhibition of N - acetyl - aspartate production: implications for ¹H MRS studies in vivo. *Neuroreport* 7: 1397 - 1400, 1996.
- 17) Clark JB: N - Acetyl aspartate: a marker for neuronal loss or mitochondrial dysfunction. *Dev Neurosci* 20: 271 - 276, 1998.
- 18) Abe K, Aoki M, Kawagoe J, Yoshida T, Hattori A, Kogure K and Itoyama Y: Ischemic delayed neuronal death. A mitochondrial hypothesis. *Stroke* 9: 1478 - 1489, 1995.
- 19) Kristian T and Siesjo BK: Calcium in ischemic cell death. *Stroke* 29: 705 - 718, 1998.
- 20) Li F, Liu K - F, Silva MD, Omae T, Sotak CH, Fenstermacher JD, Fisher M and Hsu CY Lin W: Transient and permanent resolution of ischemic lesions on diffusion - weighted imaging after brief periods of focal ischemia in rats: Correlation with histopathology. *Stroke* 31: 946 - 954, 2000.
- 21) Li F, Silva MD, Sotak CH and Fisher M: Temporal evolution of ischemic injury evaluated with diffusion - , perfusion - and T2 - weighted MRI. *Neurology* 54: 689 - 696, 2000.
- 22) Li F, Silva MD, Liu KF, Helmer KG, Omae T, Fenstermacher JD, Sotak CH and Fisher M: Secondary decline in apparent diffusion coefficient and neurological outcomes after a short period of focal brain ischemia in rats. *Ann Neurol* 48: 236 - 244, 2000.
- 23) Siesjo BK, Agardh CD and Bengtsson F: Free radicals and brain damage. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1: 165 - 211, 1989.
- 24) Siesjo BK, Hu B and Kristian T: Is the cell death pathway triggered by the mitochondrion or the endoplasmic reticulum? *J Cereb Blood Flow Metab* 19: 19 - 26, 1999.

(平成 19 年 12 月 26 日受付)