

低酸素・無グルコース負荷中のラット海馬切片細胞内 Ca イオン濃度上昇に対する温度と pH の影響

新潟大学医学部麻酔学教室（主任：下地恒毅教授）

海老根 美子

Effects of Temperature and pH on Changes in Intracellular Ca Ion
Concentration of Rat Hippocampal Slices during Oxygen-
Glucose Deprivation

Yoshiko EBINE

*Department of Anesthesiology, Niigata
University School of Medicine
(Director: Prof. Koki Shimoji)*

Low temperature is commonly known to protect neurons against ischemia, and neuroprotective effect of mild acidosis has also been suggested in our recent reports. In this study, the effects of temperature and pH on ischemic cell damage were studied in terms of intracellular Ca^{2+} , as an indicator of ischemic cell damage, using rat hippocampal slice preparations. Intracellular Ca^{2+} concentration was measured by fluorometry using fura-2. Slices were exposed to ischemia by perfusion with glucose-free artificial CSF (ACSF) bubbled with 95% N_2 -5% CO_2 . Intracellular Ca^{2+} showed a characteristic rapid increase at 334 ± 83 sec ($n=24$) following the start of ischemia at normal temperature (37°C). The latency of the characteristic rapid increase in intracellular Ca^{2+} was prolonged to 535 ± 49 sec ($n=9$) at low temperature (33°C), while it was shortened to 189 ± 39 sec ($n=12$) at high temperature (42°C). The latency of the rapid intracellular Ca^{2+} increase was shortened at each temperature in alkalinized ACSF (pH 7.8). The characteristic rapid increase in intracellular Ca^{2+} was not observed at each temperature in acidified ACSF (pH 6.8). The results indicate that both temperature and pH affect the time to the rapid increase in intracellular Ca^{2+} in ischemic tissue, and suggest the neuroprotective effect of hypothermia as well as mild acidosis and also hypothermia plus mild acidosis.

Key words: pH, temperature, intracellular Ca ion concentration, ischemia, oxygen-glucose deprivation

pH, 温度, 細胞内 Ca イオン濃度, 虚血, 低酸素・無グルコース

Reprint requests to: Yoshiko EBINE,
Department of Anesthesiology,
Niigata University School of Medicine,
Niigata City, 951-8510, JAPAN.

別刷請求先: 〒951-8510 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部麻酔学教室 海老根 美子

背景と目的

近年、脳虚血における低体温の脳保護作用が注目され、脳温と神経細胞障害の関連が議論されている。これまで虚血性神経細胞障害に対する温度の影響については、ATP 含量¹⁾²⁾、遊離脂肪酸濃度³⁾⁴⁾⁵⁾、シナプス機能⁶⁾、形態⁷⁾、脳代謝率⁸⁾等を指標とした検討がなされているが、虚血による神経細胞障害に関与するとされる⁹⁾細胞内 Ca イオン濃度を指標とした研究は少ない。一方、著者らはこれまでに、ラット海馬切片を用いた神経生理学的方法¹⁰⁾や蛍光色素法による細胞内 Ca イオン濃度変化測定¹¹⁾により、軽度酸性状態が虚血に対し神経細胞保護効果を持つ可能性を報告した。

神経細胞内 Ca イオンは、神経伝達物質の放出や細胞代謝の制御に重要な役割を担っている⁹⁾。正常な状態では、ミトコンドリアや小胞体等の細胞内 Ca ストア内への取り込み、エネルギー依存性の細胞外への放出や細胞内の Ca 結合蛋白¹²⁾等の Ca イオン緩衝系の作用によりその細胞内濃度は、 10^{-7} M に制御されている¹³⁾。しかし、虚血時には、神経伝達物質の放出や細胞膜の脱分極に続いて Na イオン流入、Ca イオン流入、K イオン流出が起こり、細胞内 Ca イオン濃度の過剰な上昇を招く。それに対し、細胞膜機能を回復すべく ATP が消費されエネルギーレベルが低下する¹⁴⁾。細胞内 Ca イオン濃度の過剰な上昇は、蛋白分解酵素の活性化¹⁵⁾や、脂質分解を起こし³⁾⁴⁾、虚血性障害の進行に関与しているとされる。したがって、細胞内 Ca イオン濃度は虚血による神経細胞障害の指標の1つとなると考えられる。

細胞内 Ca イオン濃度測定や脳温のコントロールを精度よく行うことは *in vivo* では難しく、しかも細胞外環境を任意に変化させることはできない。そこで本研究では、虚血に弱いとされる海馬切片標本を用いて灌流液の温度と pH を変化させ、虚血モデルとして低酸素・無グルコース負荷を行い、細胞内 Ca イオン濃度の上昇に対する温度と pH の影響を検討した。

方 法

体重 110~140 g の雄性 Wistar ラットをエーテル麻酔下で断頭し、脳をすばやく取り出して、氷冷クレブス液中で厚さ 350 μ m の海馬切片を作製した。それらを蛍光性 Ca イオン指示薬 1-(2-5'-carboxyoxazol-2'-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy)-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)-ethane-N, N, N', N'-tetraacetic acid (fura-2) のアセトキシメチルエステル化合物 (fura-2AM) 10

μ M を含む酸素化クレブス溶液中に室温で90分間浸して染色した。

切片を倒立顕微鏡上の容積約 0.6 ml の測定用灌流チャンバーに置き、95%酸素-5%二酸化炭素混合ガスで飽和したクレブス液で灌流した。キセノンランプから波長 340 nm と 380 nm の励起光を 0.01 秒毎に切片に照射し、CA1 錐体細胞層からの蛍光をバンドパスフィルター (490 nm~510 nm) を通して photomultiplier にて検出し、340 nm 及び 380 nm 励起によるそれぞれの蛍光強度とその比を連続記録した。標準灌流液の組成 (mM) は、NaCl 117, KCl 3.6, NaHPO₄ 1.2, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 1.2, NaHCO₃ 25, グルコース 11 とした。酸性溶液 (pH 6.8) は NaHCO₃ を 5 mM, アルカリ性溶液 (pH 7.8) は 55 mM として調製し、浸透圧は NaCl で調整した。チャンバー内灌流液の酸素分圧は、ABL 500 (Radiometer 社) で測定し、その値は、 484 ± 20 mmHg (Mean \pm SD, n=9, 37°C) であった。低酸素・無グルコース灌流液は、グルコース除去クレブス液を95%酸素-5%二酸化炭素混合ガスで飽和して調製した。その酸素分圧は、 91 ± 13 mmHg (Mean \pm SD, n=9, 37°C) であった。酸性溶液 (pH 6.8) 又はアルカリ性溶液 (pH 7.8) を低酸素・無グルコース負荷10分前から負荷終了まで灌流した。低灌流温 (33°C)・正常灌流温 (37°C)・高灌流温 (42°C) は、加温器を用いて灌流液の温度を実験開始から終了まで一定に保った。灌流速度は、ペリスタポンプを用いて、5 ml/min とした。

細胞内の Ca イオン濃度の変化は、蛍光強度比 (以下 R_{340/380} と略す) の変化で表した。細胞質の fura-2 の解離定数が決定されていないことや自家蛍光の存在により、脳切片標本では正確な値を決定することは困難であることから、本研究では細胞内 Ca イオン濃度の変化については、低酸素・無グルコース負荷開始時の R_{340/380} の値を基準としてその変化率で表した。低酸素・無グルコース負荷中に出現する細胞内 Ca イオン濃度の急峻な上昇の出現頻度・時間、負荷10分・15分における R_{340/380} の変化率を pH 7.4、温度 37°C の値と比較した。R_{340/380} の変化率とその急峻な上昇までの時間は、unpaired T-test で検定し、急峻な上昇の出現頻度は χ^2 test を用い比較した。P<0.05 で有意差ありと判定した。

結 果

正常 pH (pH 7.4) では、低酸素・無グルコース負荷中、CA1 錐体細胞層の細胞内 Ca イオン濃度は、緩徐

な上昇を示した後、急峻な上昇に転じた（図 1 中央）。この特徴的で急峻な細胞内 Ca イオン濃度の上昇は、正常灌流温（37℃）では26切片中24切片で、低灌流温（33℃）では11切片中9切片に、高灌流温（42℃）では13切片中12切片で観察され、その出現頻度に有意差は認められなかった（図 1 中段、表 1）。この急峻な細胞内 Ca イオン濃度の上昇は、正常灌流温（37℃）では低酸素・無グルコース負荷開始後 334±83秒（n=24）で観察されたが、高灌流温（42℃）では 189±39秒後（n=12）と有意に早まり、低灌流温（33℃）では 535±49秒後（n=9）と有意に遅延した（図 1 中段、表 1）。また低酸素・無グルコース負荷10分及び15分での $R_{340/380}$ の変化率は、正常灌流温と高灌流温では有意差は認められなかったが、低灌流温で、正常・高灌流温の値に比し有意に抑制された（表 2）。

高 pH（pH 7.8）状態では、低酸素・無グルコース負荷時の細胞内 Ca イオン濃度の急峻な上昇は正常灌流温と高灌流温では全ての切片で観察された。低灌流温時でも12切片中10切片で観察された。その出現時間は、正常灌流温時に 233±77秒（n=26）であったが、高灌流温時に 116±43秒（n=12）と有意に短縮し、低灌流温時には 417±55秒（n=10）と有意に延長した（図 1 下段、表 1）。低酸素・無グルコース負荷10分及び15分の $R_{340/380}$ の変化率には、灌流温度間で有意差は認められなかった（表 2）。

低 pH（pH 6.8）状態では、低酸素・無グルコース負荷時の細胞内 Ca イオン濃度の急峻な上昇は、高灌流温で11切片中1切片においてのみ観察され、その出現までの時間は 300秒であったが、正常灌流温では24切片中5切片（出現時間 564±102秒）において観察され、低

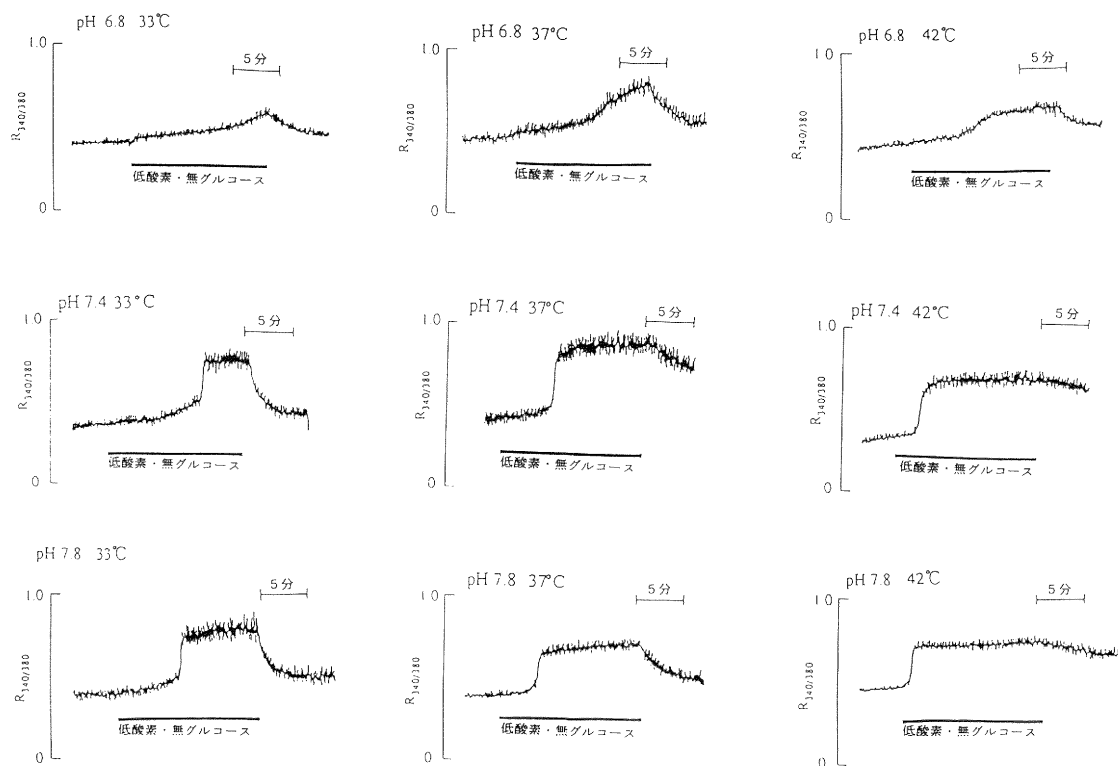


図 1 低酸素・無グルコース負荷中の $R_{340/380}$ の変化

低酸素・無グルコース負荷15分間の $R_{340/380}$ の各条件下での典型的なトレースを示す。pH 7.4、37℃におけるトレース（中央）を基準として比較すると、低酸素・無グルコース負荷中の $R_{340/380}$ の急峻な上昇の出現時間は、低灌流温（33℃、左列）で延長し、高灌流温（42℃、右列）では短縮した。また、低 pH では温度に関係なく、 $R_{340/380}$ の急峻な上昇は抑制された（上段）。

表 1 低酸素・無グルコース負荷中の R_{340/380} の急峻な上昇の頻度とその出現までの時間

溶液 pH	R _{340/380} の急峻な上昇の頻度とその出現までの時間					
	頻 度			出現時間 (秒)		
	33℃	37℃	42℃	33℃	37℃	42℃
pH 6.8	3/14 ^a	5/24 ^a	1/11 ^b	690±60 ^b	564±102 ^b	300
pH 7.4	9/11	24/26	12/13	535±49 ^d	334±83	189±39 ^d
pH 7.8	10/12	26/26	12/12	417±55 ^{b,d}	233±77	116±43 ^d

(Mean±SD) a: pH 7.4 で同灌流温の値に対し p<0.05
b: pH 7.4 で同灌流温の値に対し p<0.01
c: 同 pH で灌流温37℃の値に対し p<0.05
d: 同 pH で灌流温37℃の値に対し p<0.01

表 2 低酸素・無グルコース負荷中の R_{340/380} の変化

溶液の pH	低酸素・無グルコース負荷による R _{340/380} の変化率					
	10分			15分		
	33℃	37℃	42℃	33℃	37℃	42℃
pH 6.8	1.17±0.05 ^{b,d}	1.32±0.16 ^b	1.43±0.26 ^b	1.38±0.17 ^{b,c}	1.52±0.17	1.49±0.26 ^b
pH 7.4	1.55±0.26 ^d	1.88±0.21	1.94±0.29	1.74±0.29 ^c	1.96±0.27	1.98±0.27
pH 7.8	1.67±0.33	1.82±0.22	1.76±0.17	1.75±0.33	1.87±0.23	1.80±0.17

(Mean±SD) a: pH 7.4 で同灌流温の値に対し p<0.05
b: pH 7.4 で同灌流温の値に対し p<0.01
c: 同 pH で灌流温37℃の値に対し p<0.05
d: 同 pH で灌流温37℃の値に対し p<0.01

灌流温では14切片中3切片（出現時間 690±60秒）にのみ観察された（図 1 上段, 表 1）。これら低 pH における細胞内 Ca イオン濃度の急峻な上昇の出現頻度は、対応する温度の正常 pH および高 pH に比較して有意に低かった（表 1）。低 pH では、低酸素・無グルコース負荷10分及び15分の細胞内 Ca イオン濃度の上昇については、正常灌流温と高灌流温の間には有意差は認められなかったが、低灌流温では、正常灌流温時に比べ、有意に抑制された（表 2）。

まとめると、正常 pH 及び高 pH では、低酸素・無グルコース負荷中の細胞内 Ca イオン濃度の急峻な上昇は、いずれの灌流温度でもほとんどの切片で認められ、その出現までの時間は、高灌流温時は短縮され低灌流温時には遅延した。それに対し、低 pH では、いずれの灌流温度でも急峻な上昇の出現が抑制された。また、低 pH に低灌流温を同時に加えると、細胞内 Ca イオン濃度の緩徐な上昇も抑制された。

考 察

Fura-2 の Ca イオンとの解離平衡は、温度や pH に

よって影響を受ける。しかし、灌流液の温度や pH を変えても、切片標本の R_{340/380} に変化が見られないことから、細胞内 Ca 濃度に対する pH の影響は、R_{340/380} の低酸素・無グルコース負荷による上昇に比べると、小さいと考えられる。

本研究において、正常および高 pH では、虚血負荷中の細胞内 Ca イオン濃度の急峻な上昇自体は抑制されないが、その出現までの時間は、正常温に比べ低温では有意に遅延し、高温では有意に短縮した。

低温時に虚血性神経細胞障害が抑制されることに関しては、臨床的にも実験的にも多くの報告があり、代謝面から検討したもの¹⁾²⁾⁵⁾や電気生理学的⁶⁾⁷⁾、形態学的方法¹⁾¹⁷⁾による検討がなされている。脳内では温度の低下により、生物学的合成の低下、神経伝達物質の再吸収の低下、さらに細胞外グルタミン酸濃度の低下が認められており⁵⁾⁸⁾、また、シナプス機能にも可逆的な低下が認められる⁶⁾。Welsh ら¹⁾によると、Mongolian gerbil の5分間の内頸動脈閉塞時に低体温を保った例では、ATP 消費が抑制され adenylate kinase 活性が保たれるが、Nicardipine 1 mg/kg 閉塞前投与では、ATP 消費

は抑制されず、虚血に対する脳保護作用は Ca 拮抗薬よりも低体温の方が強いとされる。Busto らは、虚血によるグルタミン酸の細胞外放出と遊離脂肪酸の濃度上昇が低温で抑制されたと報告した⁵⁾。Buchan らは、Mongolian gerbil の両側内頸動脈閉塞負荷 5 日後の神経細胞死に対する NMDA channel blocker MK-801 の効果は、体温低下作用によると報告した¹⁶⁾。McLarnon らは、低温では NMDA 受容体の single channel current が減少すると報告している¹⁷⁾。一方で Arai らは、30℃の低温中でも 10 μ M~1 mM グルタミン酸を投与した脳切片において細胞内 Ca イオン濃度の急峻な上昇が認められたことより、低体温の脳保護作用は、グルタミン酸の細胞外遊離を抑制するためではないかと指摘した¹⁸⁾。本研究において、低灌流温では、虚血負荷時の細胞内 Ca イオン濃度の特徴的な急峻な上昇の出現頻度は低下しないものの、その出現時間が有意に遅延した。これは、低温による脳代謝の低下や ATP 消費の減少、細胞外へのグルタミン酸の過剰放出の抑制、Ca channels の活性低下、細胞内 Ca 貯蔵部位からの放出の低下など、細胞内 Ca 濃度の過剰な上昇に至るまでのプロセスが遅延したためと考えられる。すなわち、低温は虚血による細胞内 Ca イオン濃度上昇による神経細胞障害を抑制することが示唆された。

高灌流温では、正常灌流温に比し、低酸素・無グルコース負荷中の細胞内 Ca 濃度の急峻な上昇までの時間が有意に短縮した。高温の神経細胞に対する作用について、Chung らは、NMDA receptor-gated Ca channel の活性が高温で増大すると報告し¹⁹⁾、Nilsson らは、高温 (42℃) での脳代謝亢進、乳酸の蓄積やエネルギー消費と産生のバランスの崩れを報告した²⁾。また、Amorim らも、ラット海馬切片を用いた実験系で、灌流温 39℃では 37℃に比べ無酸素負荷による細胞内 ATP の消費が大きく、細胞内 Ca イオン濃度はより増大したと報告している²⁰⁾。高温では、低温とは逆に細胞内 Ca イオン濃度の上昇のプロセスが促進され、急峻な細胞内 Ca イオン濃度の上昇が短時間で起こったものと考えられ、虚血による神経細胞障害を促進するものと考えられる。

虚血負荷時の神経細胞内 Ca イオン濃度上昇の要素には、Ca イオン流入、細胞内貯蔵部位からの Ca イオン放出、Ca イオンの細胞外へ汲み出し障害 (ATP を必要とする Na イオン-Ca イオン交換系の障害)、Ca 結合蛋白の結合能力の低下が考えられる¹⁴⁾。このうち Ca イオンの過剰な細胞内流入は、voltage-dependent Ca channel²¹⁾ や NMDA receptor-gated Ca channel を

通して起こる²²⁾とされるが、voltage-dependent Ca channels は細胞膜の脱分極が持続すればただちに不活性化すると報告されている²³⁾。Morad ら²⁴⁾は、キスカル酸やカイニン酸によって活性化された Ca 電流は、細胞外 pH の低下に影響されないのに対し、NMDA により活性化された Ca 電流は、pH 6.6 では著明に抑制されたと報告するなど、酸性環境下での NMDA 受容体の活性低下が報告されている^{25)~29)}。今回の実験で低 pH (pH 6.8) では虚血による細胞内 Ca イオン濃度の急峻な上昇が抑制されたが、酸性化による NMDA 受容体の活性低下がその一因となっていると考えられる。

虚血中の嫌気性代謝促進による乳酸アシドーシスの発生は、神経細胞障害の助長^{13) 30)}、グリア細胞の浮腫³¹⁾、さらに細胞内蛋白質の陽イオン結合能力低下によるフリーラジカルの増加を引き起こす¹⁵⁾とされている。しかし、最近、pH 6.8 程度の軽度アシドーシスは、神経細胞の虚血性障害を軽減することも培養細胞²⁷⁾および切片標本^{10) 11)}において見出されており、乳酸アシドーシスは、神経細胞障害に対して二相性の効果があると考えられる³¹⁾。もちろん、酸性状態が十分に強ければ、酸性状態それ自体による細胞障害が起こりうる。細胞外 pH 6.0 以下では、エネルギー状態に関係なく細胞障害が起こると報告されている³²⁾。Kraig らは、細胞外 pH 5.3 以下では虚血がなくても脳の壊死が起こると報告した³⁰⁾。また、Walz らは、乳酸 30 mM (pH 4.87) 溶液の灌流により、海馬切片で不可逆的な EPSP の消失が起こることを示した³³⁾。Staub らは、pH 6.8 以下では細胞浮腫が増強し、pH 5.6 以下では細胞死が増加することを報告した³¹⁾。一方、Tombaugh らは、培養神経細胞において 6 時間の無グルコース・無酸素状態に対し、細胞外液が pH 6.5 で完全な神経細胞保護効果が認められたと報告している³²⁾。同じ乳酸アシドーシスでも pH 7.18 (乳酸 10 mM) 又は pH 6.84 (乳酸 20 mM) ではシナプス伝達の抑制は可逆的であるとされる³³⁾。Schurr らは、低酸素負荷ラット海馬切片について再酸素化後の synaptic function の回復を検討したが、10 mM 乳酸溶液中で最も回復率が高かったと報告した³⁴⁾。Kaku らは、アノキシアによる培養神経細胞からの LDH 流出の抑制について、酸性状態はグルタミン酸拮抗薬や AMPA-kinate 拮抗薬よりも有効であるとした²⁵⁾。本研究における低酸素・無グルコース負荷中の細胞内 Ca イオン濃度の急峻な上昇が、正常~アルカリ性環境に比し、軽度酸性環境 (pH 6.8) で有意に抑制されたという結果は、これらの報告と矛盾しない。

以上、酸性化や低温化に伴い、グルタミン酸遊離や Ca channel 活性が低下し細胞内への Ca イオン流入や細胞内 Ca 貯蔵部位からの Ca イオン流出が減少し、その結果、虚血中の細胞内 Ca イオン濃度の急峻な上昇が抑制され、神経細胞障害の発生が抑制されることが考えられる。特に、低温では虚血による細胞内 Ca イオン濃度の急峻な上昇が遅延するのに対し、酸性状態ではいずれの温度でも細胞内 Ca イオン濃度の急峻な上昇そのものを抑制しており、また低 pH に低温を同時に加えると虚血による細胞内 Ca イオン濃度の緩徐な上昇も抑制されることがより、低 pH と低温では、虚血中の細胞内 Ca 濃度の上昇に対する抑制の作用機序が異なっていることが示唆された。

結 語

蛍光性 Ca イオン指示薬 fura-2 を用い、ラット海馬の CA1 錐体細胞層の細胞内 Ca イオン濃度の変化を、細胞外 pH 及び灌流温を変化させて検討した。低酸素・無グルコース負荷時の細胞内 Ca イオン濃度の急峻な上昇の出現は、低 pH で抑制され、低温で遅延したが、高温では短縮した。以上より、軽度酸性化と低温化は、虚血による神経細胞内 Ca イオン濃度の上昇を抑制し、過剰な細胞内 Ca イオンによる神経細胞障害を軽減する要因となると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲下さった下地恒毅教授に深く感謝いたします。また、研究を進めるにあたり、御助言、御協力いただきました藤原直士講師、佐藤由紀夫技官に深く感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Welsh, F.A., Sims, R.E. and Harris, V.A.: Mild hypothermia prevents ischemic injury in gerbil hippocampus. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **10**: 557~563, 1990.
- 2) Nilsson, L., Kogure, K. and Busto, R.: Effects of hypothermia and hyperthermia on brain energy metabolism. *Acta Anaeth. Scand.*, **19**: 199~205, 1975.
- 3) Yoshida, S., Ikeda, M., Busto, R., Santiso, M., Martinez, E. and Ginsberg, M.D.: Cerebral phosphoinositide, triacylglycerol, and energy metabolism in reversible ischemia: origin and fate of free fatty acids. *J. Neurochem.*, **47**: 744~757, 1986.
- 4) Ikeda, M., Yoshida, S., Busto, R., Santiso, M. and Ginsberg, M.D.: Polyphosphoinositides as a probable source of brain free fatty acids accumulated at the onset of ischemia. *J. Neurochem.*, **47**: 123~132, 1986.
- 5) Busto, R., Globus, M.T-Y., Dietrich, W.D., Martinez, E., Valdés, I. and Ginsberg, M.D.: Effect of mild hypothermia on ischemia-induced release of neurotransmitters and free fatty acids in rat brain. *Stroke*, **20**: 904~910, 1989.
- 6) Taylor, C.P. and Weber, M.L.: Effect of temperature on synaptic function after reduced oxygen and glucose in hippocampal slices. *Neurosci.*, **52**: 555~562, 1993.
- 7) Vornov, J.J. and Coyle, J.T.: Enhancement of MNDA receptor-mediated neurotoxicity in the hippocampal slices by depolarization and ischemia. *Brain Res.*, **555**: 99~106, 1991.
- 8) Illievich, U.M., Zornow, M.H., Choi, K.T., Scheller, M.S. and Strnat, M.A.P.: Effects of hypothermic metabolic suppression on hippocampal glutamate concentration after transient global cerebral ischemia. *Anesth. Analg.*, **78**: 905~911, 1994.
- 9) Siesjö, B.K.: Cell damage in the brain: A speculative synthesis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **1**: 155~185, 1981.
- 10) 藤原直士, 海老根美子, 下地恒毅: 軽度アシドーシスは低酸素・無グルコースによる海馬ニューロンの障害を抑制する. *Brain Hypoxia*, **9**: 63~69, 1995.
- 11) Ebine, Y., Fujiwara, N. and Shimoji, K.: Mild acidosis inhibits the rise in intracellular Ca^{2+} concentration in response to oxygen-glucose deprivation in rat hippocampal slices. *Neurosci. Letters*, **168**: 155~158, 1994.
- 12) Lundgren, J., Zhang, H., Agarath, C-D., Smith, M-L., Evans, P.J., Halliwell, B. and Siesjö, B.K.: Acidosis-induced ischemic brain damage: are free radicals involved? *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **11**: 578~596, 1991.
- 13) McBurney, R.N. and Neering, I.R.: Neuronal homeostasis. *TINS*, **10**: 164~169, 1987.

- 14) **Martin, R.L., Lloyd, H.G. and Cowan, A.I.:** The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *TINS*, **17**: 251~257, 1994.
- 15) **Cardell, M., Boris-Möller, F. and Wieloch, T.:** Hypothermia prevents the ischemia-induced translocation and inhibition of protein kinase C in the rat striatum. *J. Neurochem.*, **57**: 1814~1817, 1991.
- 16) **Buchan, A. and Pulsinelli, W.A.:** Hypothermia but not N-methyl-D-aspartate antagonist, MK-801, attenuates neuronal damage in gerbils subjected to transient global ischemia. *J. Neurosci.*, **10**: 311~316, 1990.
- 17) **McLarnon, J.G. and Curry, K.:** Single channel properties of the N-methyl-D-aspartate receptor channel using NMDA and NMDA agonists: one-cell recordings. *Exp. Brain Res.*, **82**: 82~88, 1990.
- 18) **Arai, H., Uto, A., Ogawa, Y. and Sato, K.:** Effect of low temperature on glutamate-induced intracellular calcium accumulation and cell death in cultured hippocampal neurons. *Neurosci. Letters*, **163**: 132~134, 1993.
- 19) **Chung, S-H. and Kuyucak, S.:** Changes in the kinetics and conductance of N-methyl-D-aspartate (NMDA)-receptor activated single channels with temperature. *Neurosci. Letters*, **187**: 181~184, 1995.
- 20) **Amorim, P., Chambers, G., Cottrell, J. and Kass, I.S.:** Propofol reduces neuronal transmission damage and attenuates the changes in calcium, potassium, and sodium during hyperthermic anoxia in the rat hippocampal slice. *Anesthesiology*, **83**: 1254~1265, 1995.
- 21) **Hoehner, P.J., Blanck, T.J.J., Roy, R., Rosenthal, R.E. and Fiskum, G.:** Alternation of voltage-dependent calcium channels in Canine brain during global ischemia and reperfusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **12**: 418~424, 1992.
- 22) **Fagg, G.F., Foster, A.C. and Ganong, A.H.:** Excitatory amino acid synaptic mechanisms and neuronal function. *Trends Pharmacol. Sci.*, **7**: 357~363, 1989.
- 23) **Ozawa, S., Tsuzuki, K., Iino, M., Ogura, A. and Kudo, Y.:** Three types of voltage-dependent calcium current in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res.*, **495**: 329~336, 1989.
- 24) **Morad, M., Dichter, M. and Tang, C-M.:** The NMDA activated current in hippocampal neurons is highly sensitive to $[H^+]_o$. *Soc. Neurosci. Abstr.*, **14**: 791, 1988.
- 25) **Kaku, D.A., Giffard, R.G. and Choi, D.W.:** Neuroprotective effects of glutamate antagonists and extracellular acidity. *Science.*, **260**: 1516~1518, 1993.
- 26) **Tang, C-M, Dichter, M. and Morad, M.:** Modulation of the N-methyl-D-aspartate channel by extracellular H^+ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **87**: 6445~6449, 1990.
- 27) **Giffard, R.G., Monyer, H., Christine, C.W. and Choi, D.W.:** Acidosis reduces NMDA receptor activation, glutamate neurotoxicity, and oxygen-glucose deprivation neuronal injury in cortical cultures. *Brain Res.*, **506**: 339~342, 1990.
- 28) **Simon, R.P., Niuro, M. and Gwinn, R.:** Brain acidosis induced by hypercarbic ventilation attenuates focal ischemic injury. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **267**: 1428~1431, 1990.
- 29) **Kristián, T., Katsura, K., Gidö, G. and Siesjö, B.K.:** The influence of pH on cellular calcium influx during ischemia. *Brain Res.*, **641**: 295~302, 1994.
- 30) **Kraig, R.P., Petito, C.K., Plum, F. and Pulsinelli, W.A.:** Hydrogen ions kill brain at concentration reached in ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **7**: 379~386, 1987.
- 31) **Staub, A., Baethmann, A., Peters, J., Weigt, H. and Kempfski, O.:** Effects of lactic acidosis on glial cell volume and viability. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **10**: 527~535, 1990.
- 32) **Tombaugh, G.C. and Sapolsky, R.M.:** Mechanistic distinctions between excitotoxic and acidotic hippocampal damage in an in vitro model of ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **10**: 527~535, 1990.
- 33) **Walz, W. and Harold, D.E.:** Brain lactic acidosis and synaptic function. *Can. J. Physiol. Pharma-*

col., 68: 164~169, 1989.

hypoxia in vitro. Brain. Res., 438: 311~314,
1988.

- 34) Schurr, A., Dong, W-Q., Reid, K.H., West,
C.A. and Rigor, B.M.: Lactic acidosis and
recovery of neuronal function following cerebral

(平成9年2月10日受付)
