

Title	実験的脳浮腫のエネルギー代謝異常と薬効評価に関する研究
Author(s)	桑島, 淳二
Citation	大阪大学, 1979, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/32538">https://hdl.handle.net/11094/32538</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【4】

氏名・(本籍)	桑 島 淳 二
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	第 4 6 5 6 号
学位授与の日付	昭和 54 年 5 月 18 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	実験的脳浮腫のエネルギー代謝異常と薬効評価に関する 研究
論文審査委員	(主査) 教授 上原喜八郎 (副査) 教授 鎌田 皎 教授 岩田平太郎 教授 青沼 繁

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 緒 論

脳浮腫は頭部外傷、脳循環障害、開頭術後など、脳に加わった種々の非生理的条件に随伴して起る脳容積の増大した状態を言い、主として脳に水分が蓄積する脳疾患の一形態である。脳浮腫の病理についてはこれまでにかなりの報告がみられるが、脳浮腫に関する生化学的な研究はほとんどなされていない。著者は脳虚血によって発症させた脳浮腫ラットを用い、主として脳のエネルギー代謝の面より脳浮腫の代謝異常について検索し、脳浮腫の発症機序の一端を明らかにしようとした。また、この実験的脳浮腫に対する薬物の発症阻止効果についても検討し、どのような薬理作用を有する薬物が脳浮腫に対し有効であるかを検索した。

### 本 論

#### 1. 一側性脳浮腫ラットの作製

左右の頸動脈のうち一方の頸動脈を結紮したラットを窒素ガス中に放置すると、同側の脳半球に脳浮腫が発症することが知られている。しかし、この一側性脳浮腫ラットの作製法はラットの死亡率が高く、また脳浮腫の発症率が低いという難点が指摘されていた。そこで著者はその改良法について検討した結果、左頸動脈を結紮したラット(脳虚血ラット)に低酸素ガスを1時間負荷することにより、ラットを死亡させることなく高頻度に脳浮腫が発症することを見出した。

低酸素ガスを負荷したラットはその2時間後より右の前後肢に麻痺が現われ、その後歩行異常、右旋回歩行、歩行不能、回転性痙攣など、片麻痺を主とした種々の症状が現われた(表1)。このラットの左脳半球は写真1に示す如く著しく腫張し、また脳組織切片を光学顕微鏡で観察すると、左脳半

球の皮質において神経細胞周囲の空胞形成や血管外腔の形成などがみられた。これらの病理所見は脳浮腫の特徴を示すものであり、その病変の出現は左脳半球に限定していた。

表1 一側性脳浮腫ラットの症状

症 状	低酸素負荷後の時間(hr)					
	0	2	5	12	24	72
異常なし	0	1	0	0	0	0
昏睡、体温下降	8	0	0	0	0	0
片麻痺	0	5	8	6	6	6
歩行異常	0	4	4	4	1	4
歩行能力の喪失	0	0	3	0	0	0
回転性痙攣	0	1	0	0	4	0
生存数	8	7	8	6	6	6
死亡数	0	1	2	4	4	4

脳浮腫ラットの症状を低酸素負荷終了直後より72時間後まで観察した。数値は該当する症状を示したラットの匹数で表わした。



写真1 一側性脳浮腫ラットの左脳半球は腫張し、脳容積が増大している。(左：正常ラット，右：脳浮腫ラット，低酸素負荷後24時間)

## 2. 脳の含水量および電解質の変化

一側性脳浮腫ラットの左脳半球では低酸素負荷後その含水量が経時的に増加し、72時間後で最大に達した(表2)。これに対し、右脳半球の含水量はほとんど変化せず、ほぼ正常値を維持していた。一方、左脳半球の電解質を測定した結果、表3に示す如く、低酸素負荷後Naイオンが著明に増加し、Kイオンは逆に減少していた。

表2 脳内含水量の変動

群	低酸素負荷 後の時間	匹数	含水量 (g/100 g 組織湿重量)	
			左脳半球	右脳半球
正常ラット	—	4	79.0 ± 0	79.0 ± 0.1
脳虚血ラット	—	5	78.8 ± 0	78.8 ± 0.1
脳浮腫ラット	0 hr	8	80.2 ± 0.2*	79.2 ± 0.1
	2 hr	7	80.4 ± 0.4*	79.0 ± 0.2
	5 hr	8	83.1 ± 0.3**	79.8 ± 0.1*
	12 hr	6	81.7 ± 0.8*	79.1 ± 0.2
	24 hr	6	82.8 ± 1.1*	79.2 ± 0.1
	72 hr	6	84.0 ± 1.0**	79.5 ± 0.1

脳の含水量は乾燥前後の組織重量の差より求めた。数値は平均値±標準誤差で示した。

\*正常群との差がP < 0.05 で有意である。 \*\*正常群との差がP < 0.01 で有意である。

表3 脳内電解質の変動

群	低酸素負荷 後の時間	匹数	Naイオン値		Kイオン値	
			左脳半球	右脳半球	左脳半球	右脳半球
正常ラット	—	4	243 ± 2	253 ± 3	500 ± 0	500 ± 4
脳虚血ラット	—	5	246 ± 3	254 ± 3	521 ± 4	525 ± 4
脳浮腫ラット	0 hr	8	266 ± 8	251 ± 3	481 ± 7	498 ± 4
	2 hr	7	310 ± 21*	246 ± 8	456 ± 17*	496 ± 4
	5 hr	8	466 ± 22**	258 ± 4	381 ± 18**	513 ± 3
	12 hr	6	403 ± 55*	257 ± 4	432 ± 34*	503 ± 4
	24 hr	6	510 ± 88**	258 ± 3	373 ± 49*	500 ± 4
	72 hr	6	609 ± 87**	258 ± 5	330 ± 45**	501 ± 3

乾燥脳組織に6%過塩素酸を加えてホモジナイズし、その抽出液中のNaイオンとKイオンを蛍光光度計で測定した。電解質の値は $\mu\text{equiv./g}$  組織乾燥重量で表示し、各群の値は平均値±標準誤差で表わした。

\*正常群との差がP < 0.05 で有意である。 \*\*正常群との差がP < 0.01 で有意である。

### 3. エネルギー代謝異常とミトコンドリアの酸化的リン酸化障害

一側性脳浮腫ラットの左脳半球におけるATP、ADP、AMPおよびPhospho-creatine(PCr)レベルの変動を経時的に測定した結果、表4に示す如く、低酸素負荷後5時間目でATPとPCrレベルが著しく低下し、AMPレベルは著明に上昇していることがわかった。ATPとPCrレベルはその後さらに減少し、24、72時間後では正常値の約25%にまで低下した。

各脳浮腫ラットの左脳半球におけるATPレベルとNaイオン値およびKイオン値を対比させ、それらの間の相関性をしらべてみると、ATPレベルとNaイオン値は負の相関性を、またATPレベル

とKイオン値は正の相関性を示し、それらの間の相関係数はいずれも高い値であった(図1, 2)。これらの結果は細胞膜でのイオンの輸送機構が脳内のATPレベルに強く依存していることを示すものであり、同時に脳浮腫における電解質異常が脳内のATPレベルの低下によって引き起こされたことを推測させるものである。

表4 左脳半球におけるエネルギー代謝物の変動

群	低酸素負荷 後の時間	匹数	ATP ( $\mu$ moles/g 組織重量)	ADP	AMP	PCr	ECP
正常ラット	—	6	3.10 $\pm$ 0.04	0.362 $\pm$ 0.006	0.058 $\pm$ 0.004	3.07 $\pm$ 0.09	0.934 $\pm$ 0.001
脳虚血ラット	—	5	2.90 $\pm$ 0.02	0.349 $\pm$ 0.005	0.065 $\pm$ 0.002	3.03 $\pm$ 0.11	0.926 $\pm$ 0.003
脳浮腫ラット	5 hr	5	1.22** $\pm$ 0.27	0.367 $\pm$ 0.011	0.195** $\pm$ 0.026	1.27** $\pm$ 0.42	0.770** $\pm$ 0.034
	24 hr	5	0.85** $\pm$ 0.16	0.293 $\pm$ 0.044	0.149** $\pm$ 0.017	0.69** $\pm$ 0.11	0.763** $\pm$ 0.019
	72 hr	5	0.80** $\pm$ 0.10	0.131** $\pm$ 0.017	0.053 $\pm$ 0.002	0.81** $\pm$ 0.15	0.880** $\pm$ 0.006

ラットをドライアイス・アセトン ( $-82^{\circ}\text{C}$ ) 中で凍結し、脳を低温 ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) で粉碎した。各代謝物は組織を6%過塩素酸で抽出したのち酵素法で定量した。数値は平均値 $\pm$ 標準誤差で表示した。ECP; Energy charge potential \*\*正常群との差が $P < 0.01$  で有意である。

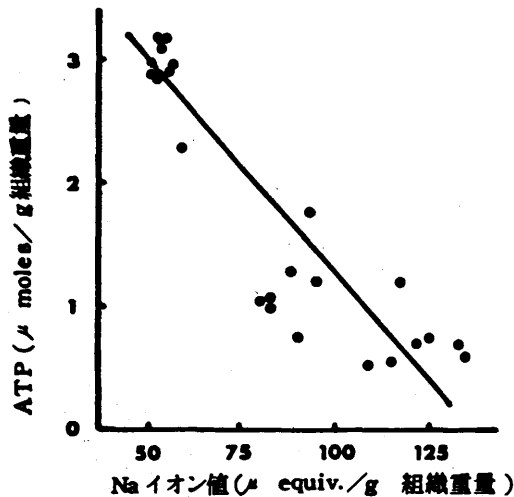


図1 脳内ATPとNaイオンの相関性  
正常ラット(5匹), 脳虚血ラット(5匹)および脳浮腫ラット(15匹)の左脳半球におけるATPレベルとNaイオン値をグラフ上にプロットした。  
ATPレベルとNaイオン値との間の相関係数は $-0.91$ である。

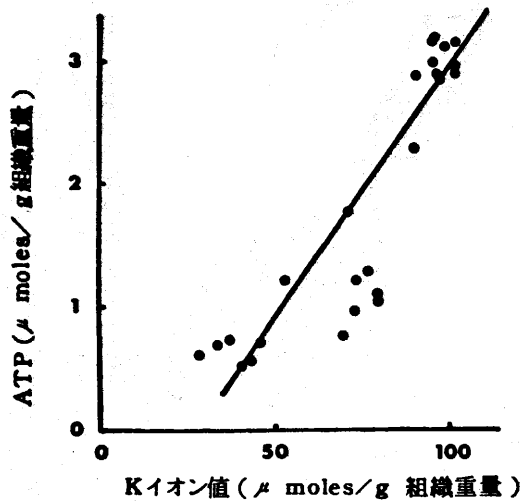


図2 脳内ATPとKイオンの相関性  
 正常ラット(5匹),脳虚血ラット(5匹)および脳浮腫ラット  
 (15匹)の左脳半球におけるATPレベルとKイオン値をグラ  
 フ上にプロットした。  
 ATPレベルとKイオン値との間の相関係数は0.88である。

一方、この脳浮腫ラットの左脳半球より調製したミトコンドリアの酸化的リン酸化能を測定したところ、低酸素負荷後5、24時間目でミトコンドリアのATP生成量と酸素消費量が著しく低下していることがわかった(表5)。この際のATP生成量の低下は酸素消費量のそれに比べて著しく、そのためATP/O値は低値を示した。

以上の結果は脳浮腫の発症過程に脳ミトコンドリアのATP産生障害が関与していることを示唆しており、脳内のATPの著しい低下によって細胞の膜機能の維持と形態保持に変化が生じたものと推定される。

表5 脳ミトコンドリアの酸化的リン酸化障害

群	低酸素 負荷後 の時間	匹数	左 脳 半 球			右 脳 半 球		
			ATP 生成量	酸素消費量	ATP/O	ATP 生成量	酸素消費量	ATP/O
正常ラット	—	6	1941 ±70	1234 ±67	1.58 ± 0.03	—	—	—
脳虚血ラット	—	5	2133 ± 52	1351 ± 21	1.58 ±0.04	2294 ± 43	1514 ± 26	1.52 ± 0.03
脳浮腫ラット	5 hr	6	968** ±156	*709** ± 83	1.33* ±0.08	1786 ± 90	1118 ± 46	1.60 ±0.03
	24 hr	6	801** ±126	584** ± 70	1.34 ±0.06	2123 ± 87	1246 ± 52	1.71 ±0.05
	72 hr	5	230** ± 28	249** ± 32	0.93** ±0.05	1645 ±130	1167 ± 84	1.41 ±0.08

ミトコンドリアの酸化的リン酸化の測定は基質としてコハク酸を用いておこなった。酸素消費量はワールブルグ検圧計で測定し、ATP生成量は酵素法で定量した。ATP生成量と酸素消費量はそれぞれ n moles/min/窒素 mg, n atoms/min/窒素 mg で表わした。数値は平均値±標準誤差で表示した。

\* 正常群との差が P < 0.05 で有意である。 \*\* 正常群との差が P < 0.01 で有意である。

#### 4. 遊離脂肪酸の蓄積と脂肪酸による脳ミトコンドリアの酸化的リン酸化阻害

この脳浮腫ラットの左脳半球における遊離脂肪酸レベルは脳浮腫の発現と共に著しく増加した(表6)。著明に増加した遊離脂肪酸はパルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸で、低酸素負荷後24時間目のそれらのレベルはそれぞれ正常レベルの6倍、25倍、18倍にも達した。また、正常ラットの脳では検出されなかったアラキドン酸がパルミチン酸やオレイン酸とほぼ同程度のレベルまで増加した。

次に正常ラットの脳ミトコンドリアの酸化的リン酸化に対する各種脂肪酸の影響を *in vitro* の実験で検討した。その結果、図3に示す如く、オレイン酸やアラキドン酸などの不飽和脂肪酸が  $10^{-5}$  ~  $10^{-4}$  M の濃度でミトコンドリアのATP生成と酸素消費を阻害することが明らかとなった。この阻害作用は酸素消費よりもATP生成に対してより強く現われ、その阻害様式は脳浮腫ラットの脳ミトコンドリアの場合と類似していた。

一方、脳浮腫ラットの左脳半球におけるオレイン酸とアラキドン酸の濃度は低酸素負荷後24時間目でそれぞれ組織重量当り 0.55, 0.60  $\mu$  moles/g に相当しており、これらの組織内濃度は脳ミトコンドリアのATP生成を阻害するに十分な濃度であった。

以上の成績より、脳浮腫では遊離脂肪酸の蓄積が起り、それがミトコンドリアのATP生成を阻害する結果、脳内のATPレベルが低下したものと考えられる。

表6 左脳半球における遊離脂肪酸の変動

群	低酸素 負荷後 の時間	匹数	遊離脂肪酸 ( $\mu\text{g/g}$ 組織重量)					
			C <sub>16:0</sub>	C <sub>16:1</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:2</sub>	C <sub>20:4</sub>
正常ラット	—	4	31.1 $\pm 0.8$	9.8 $\pm 0.5$	9.2 $\pm 0.2$	9.0 $\pm 0.2$	5.1 $\pm 0.1$	trace
脳虚血ラット	—	4	29.4 $\pm 1.7$	6.8 $\pm 1.3$	9.6 $\pm 0.8$	8.8 $\pm 0.6$	5.1 $\pm 0.1$	trace
脳浮腫ラット	5 hr	4	88.6 $\pm 11.9$	16.9 $\pm 2.2$	107.6 $\pm 16.5$	66.2 $\pm 11.2$	10.2 $\pm 1.6$	44.0 $\pm 14.9$
	24 hr	4	195.5 $\pm 57.5$	—	231.5 $\pm 59.0$	156.4 $\pm 59.3$	19.6 $\pm 4.9$	172.4 $\pm 82.3$

脳の脂質をクロロホルム・メタノール (2:1, v/v) で抽出し、遊離脂肪酸を薄層クロマトグラフィで分離した。遊離脂肪酸をメチルエステル化したのち、気相-液相クロマトグラフィで定量した。数値は平均値 $\pm$ 標準誤差で表示した。

C<sub>16:0</sub> パルミチン酸, C<sub>16:1</sub> パルミトオレイン酸, C<sub>18:0</sub> ステアリン酸, C<sub>18:1</sub> オレイン酸, C<sub>18:2</sub> リノール酸, C<sub>20:4</sub> アラキドン酸

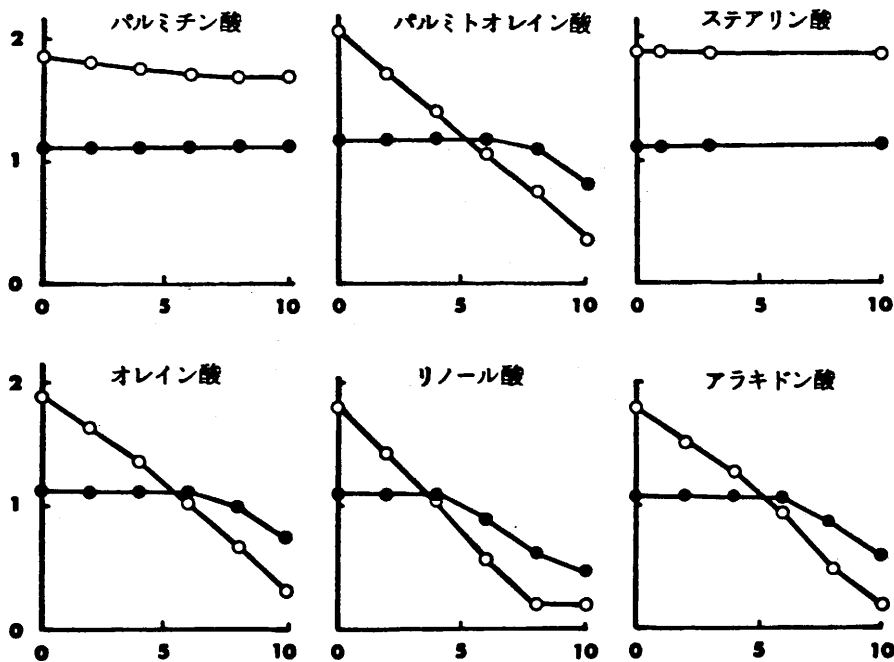


図3 脳ミトコンドリアの酸化的リン酸化能に対する脂肪酸の阻害作用

各図の縦軸はATP生産量(n moles/min/窒素mg)と酸素消費量(n atoms/min/窒素mg)で表示し、横軸は脂肪酸濃度 ( $\times 10^{-5}$  M) で表わした。

○ ATP生成量 ● 酸素消費量



### 5. 両側性脳浮腫ラットのエネルギー代謝異常

一側性脳浮腫ラットでみられた一連のエネルギー代謝異常が他の type の脳浮腫でも共通して起る現象であるかを知る目的で、左右の頸動脈を結紮することにより発症させた両側性脳浮腫ラットを用いて同様な実験をおこなった。その結果、両側性脳浮腫ラットの場合も一側性脳浮腫ラットの場合と同様に、脳の含水量増加、電解質異常、ATP レベルの低下、ミトコンドリアの酸化的リン酸化能の低下、遊離脂肪酸の蓄積など、一連の代謝異常が起きていることを確認することができた。両側性脳浮腫ラットの脳のミエリンとミトコンドリアに含まれる総脂肪酸量（エステル型+遊離型の量）を測定したところ、ミエリン脂質の構成脂肪酸のうち大部分の脂肪酸が減少し、またミトコンドリアの脂質ではオレイン酸とアラキドン酸のみが選択的に減少していることが明らかとなった（表7, 8）

これらの結果は脳浮腫の発症過程で蓄積した遊離脂肪酸が内因性脂質に由来することを示唆するものである。

表7 ミエリン脂質中の総脂肪酸の変動

群 匹数	窒素量 (mg/g 組織重量)	脂 肪 酸 (μg/窒素mg)										総 計
		C <sub>16:0</sub>	+C <sub>16:1</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:2</sub>	C <sub>18:3</sub>	C <sub>20:1</sub>	C <sub>20:4</sub>	C <sub>22:4</sub>	C <sub>22:6</sub>	
正 常 ラット 3	0.539 ± 0.016	362 ±21		298 ±15	434 ±27	27 ± 5	9 ± 1	39 ± 3	113 ± 7	55 ±12	85 ±16	1421 ±73
脳浮腫 ラット 3	0.426* ± 0.051	240* ±28		176* ±29	248* ±43	26 ± 1	7 ± 1	27* ± 1	81 ±11	32 ± 4	54* ± 3	890* ±111

頸動脈結紮後6時間目の脳浮腫ラットを使用した。脳のミエリンはショ糖密度勾配による超超心分離法で分画した。ミエリン脂質中の総脂肪酸は脂質をアルカリで加水分解したのち、気相-液相クロマトグラフィで定量した。数値は平均値±標準誤差で表示した。

\*正常群との差がP<0.05 で有意である。

表8 脳ミトコンドリア脂質中の総脂肪酸の変動

群 匹数	窒素量 (mg/g 組織重量)	脂 肪 酸 (μg/窒素mg)										総 計
		C <sub>16:0</sub>	+C <sub>16:1</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:2</sub>	C <sub>18:3</sub>	C <sub>20:1</sub>	C <sub>20:4</sub>	C <sub>22:4</sub>	C <sub>22:6</sub>	
正 常 ラット 3	0.832 ± 0.024	231 ±13		158 ± 9	214 ±11	29 ± 2	3 ± 0	10 ± 1	139 ± 6	18 ± 4	89 ± 3	891 ±41
脳浮腫 ラット 3	0.773 ± 0.076	207 ±11		139 ± 7	153* ±11	20 ± 2	3 ± 0	10 ± 1	95** ± 6	24 ± 2	83 ± 2	734 ±39

頸動脈結紮後6時間目の脳浮腫ラットを使用した。脳のミトコンドリアはショ糖密度勾配による超遠心分離法で分画した。ミトコンドリア脂質の総脂肪酸は脂質をアルカリで加水分解したのち、気相-液相クロマトグラフィで定量した。数値は平均値±標準誤差で表示した。

\*正常群との差がP<0.05 で有意である。 \*\*正常群との差がP<0.01 で有意である。

## 6. 実験的脳浮腫に対する薬物効果

今まで述べてきた一側性および両側性脳浮腫ラットは脳血流の制限によって発症させたものであり、その過程には細胞膜でのイオン輸送機構の障害や血管透過性の亢進が関与していると推定される。従って、脳血流を増加させる薬物や血管透過性を抑制する薬物はこれらの脳浮腫の発症を阻止する可能性が考えられる。そこで、血管拡張剤や抗炎症剤による脳浮腫阻止効果について検討した。

その結果、血管拡張剤であるヒドララジンやメクロフェノキサートはこれらの実験的脳浮腫に対し無効であったが、抗炎症剤であるプレドニロンやインドメサシンはその発症を有意に抑制することが判明した（表9）。

表9 一側性脳浮腫に対する薬物効果

薬物	用量 (mg/g i. p.)	匹数	含水量 (g/100g 組織湿重量)	Na イオン値 ( $\mu$ equiv./g 組織乾燥重量)	K イオン値 ( $\mu$ equiv./g 組織乾燥重量)
正 常 群	—	19	79.2 $\pm$ 0.1	259 $\pm$ 4	510 $\pm$ 3
対 照 群	—	22	82.4 $\pm$ 0.3	443 $\pm$ 25	402 $\pm$ 15
プレドニロン	10	9	81.1 $\pm$ 0.6*	365 $\pm$ 37	452 $\pm$ 22
インドメサシン	3	10	81.2 $\pm$ 0.5*	369 $\pm$ 27	439 $\pm$ 21
ヒドララジン	10	10	81.9 $\pm$ 0.3	416 $\pm$ 21	416 $\pm$ 15
メクロフェノキサート	300	5	82.1 $\pm$ 0.4	357 $\pm$ 59	452 $\pm$ 36

左頸動脈結紮ラットに1時間の低酸素負荷を与え、その直後に薬物を腹腔内投与した。低酸素負荷後5時間目にラットを屠殺し、左脳半球の含水量および電解質を測定した。数値は平均値 $\pm$ 標準誤差で表示した。

\*対照群との差がP < 0.05 で有意である。

## 結 論

一側性および両側性脳浮腫ラットの脳の代謝異常と薬物効果について検討した結果、次の成績を得た。

- 1) 脳浮腫では脳の含水量が増加し、それと並行してNa イオンの増加とK イオンの減少がみられた。
- 2) 脳のATP レベルは著明に低下し、ATP レベルの低下と電解質異常は高い相関性を示した。
- 3) 脳より調製したミトコンドリアの酸化的リン酸化能は著しく低下していた。
- 4) 脳浮腫の発現に際し遊離脂肪酸が著明に蓄積し、特にパルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、アラキドン酸の増加が顕著であった。
- 5) オレイン酸、アラキドン酸などの不飽和脂肪酸は脳ミトコンドリアの酸化的リン酸化を強く阻害し、その阻害様式は脳浮腫ラットの脳より調製したミトコンドリアの場合とよく類似していた。
- 6) 脳浮腫ではミエリン脂質とミトコンドリア脂質の総脂肪酸量が減少し、その脂肪酸は脳に蓄積した遊離脂肪酸と同じ種類のものであった。

7) 抗炎症剤が脳浮腫の発症を有意に抑制した。

以上の成績に基づいて脳浮腫の発症機序を推察すると、脳虚血によって脳の内因性脂質から脂肪酸が遊離し、それが脳ミトコンドリアのATP産生を阻害する結果細胞膜のイオン輸送機構に変化が生じ、電解質異常と共に脳の含水量が増加したものと考えられる。

### 論文の審査結果の要旨

脳浮腫ラットの作製法を確立し、それによって作製した一側性および二側性脳浮腫ラットの脳の代謝異常と薬物効果について研究した。その結果、脳浮腫では脳の含水量の増加や電解質の代謝異常を認めるなどいくつかの注目すべき生化学的知見を得、また、抗炎症剤が脳浮腫の発症を有意に抑制することを明らかにした。

現在、脳浮腫に関する生化学的研究がほとんどないことを考えれば本論文は学位論文としての内容をもつ立派な論文であると確信する。