

## 一過性脳虚血後の慢性期ラット脳における 生化学的変化に関する研究

岡山大学医学部脳代謝研究施設機能生化学部門 (指導: 森 昭胤教授)

吉 川 寛

(平成元年12月5日受稿)

**Key words :** ischemia, acetylcholine, muscarinic acetylcholine receptor,  
N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor, delayed neuronal death

### 緒 言

脳血管障害による死亡率は減少してきたが、その一方で、脳虚血発作の後に多くの神経細胞が死滅し、脳血管性痴呆をはじめとするさまざまな脳血管障害後遺症症状を発症してくる症例が近年増加してきている。従って、これらの症状を呈する脳機能障害の基礎となる脳虚血後の慢性期の脳内の生化学的変化を明らかにすることは、病態生理の解明や治療法の開発のために重要である。

神経細胞の生存維持は呼吸の結果産生されるATPのエネルギーを用いてなされているので、虚血等によって呼吸が障害された神経細胞は、エネルギー欠乏のために壊死すると考えられてきた。しかし、1982年にKirinoら<sup>1)</sup>が遅発性神経細胞壊死 (delayed neuronal death) の現象を発見してから、虚血性脳細胞壊死をもたらす機序は単にエネルギーが欠乏しただけではないことが明らかとなった。遅発性神経細胞壊死は、短時間の一過性の虚血侵襲のあと、血流、細胞のエネルギー水準、内部環境のいずれもが正常に回復したあとで起こることが知られるようになったからである。しかも、この遅発性神経細胞壊死現象は、Kirinoら<sup>2)</sup>がスナネズミを、またPulsinelliら<sup>3)</sup>が四血管閉塞モデル (four vessel occlusion model)<sup>3)</sup>を用いて、一過性前脳虚血の後、海馬に特異的に、しかもきわめて緩慢な病変として現われることを示したことから、昔から知られていた脳虚血における海馬の脆弱

性が重要であることが改めて再確認されるようになった。

従来の遅発性神経細胞壊死に関する研究は主として形態学的変化やエネルギー代謝の変化を、しかも急性期から亜急性期まで検討したものが大部分であり、慢性期までの検討はほとんどみられない。そこで今回の研究では、脳血管障害後遺症の生化学的背景を明らかにする目的で、脳虚血後の神経細胞の変化を、組織学的検索をはじめとしてさらには脳機能と関係が深いと考えられているacetylcholine (ACh) 含量, muscarinic acetylcholine (mACh) 受容体結合, N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体結合の測定を行なうことにより、多角的にしかも慢性期に到るまで明らかにしようとするものである。

### 材 料 と 方 法

実験には9-10週齢雄性Wistar系ラット(体重280-340g)を用いたが、実験前日まで食餌および水分を自由に摂取させた。

#### 1. 脳虚血モデル作製

椎骨動脈焼灼手術は、Pulsinelli & Brierleyの方法<sup>3)</sup>にはば準じた。すなわち、ketamine 100 mg/kg筋肉内注射による麻酔下で、脳定位固定装置にラットを腹臥位に固定し、背側頸部の皮膚および筋肉層を切開して、第一頸椎を露出した。第一頸椎の両端にあるalar foraminaに、歯科用電気メス (Odontosurge<sup>®</sup>, A/S L. Goof, Denmark) を刺入して脳底部へ上行している椎骨動脈を両側とも電気焼灼で切断し、その後皮

膚を縫合した。続いて、ラットを実験用手術台に背臥位に固定し直し腹側頸部の皮膚を切開して、両側総頸動脈を周囲の組織から分離し絹糸を輪状にかけた後、皮膚を縫合した。手術終了後、ラットはケージへ戻して観察し、行動上異常が認められないことを確認した。

上記方法によって椎骨動脈を焼灼したラットを翌日エーテル麻酔下にて実験用手術台に背臥位に固定し、腹側頸部の皮膚を再び開き、両側頸動脈を露出した。まず右側の総頸動脈を脳動脈瘤クリップで閉塞し、ついですぐに左側を同様に閉塞した。両側総頸動脈を閉塞しても、立ち直り反射が消失しなかったものは、実験から除外した。20分間の脳虚血後、脳動脈瘤クリップを除去した。血流再開を直視下で確認した後、速やかに切開部を縫合し、プラスチックケージに静置した。回復後はホームケージ内で通常の食餌および水分を自由に摂取させた。

上記と同様に麻酔し、固定し、背側および腹側頸部の皮膚を切開しただけで縫合したラットを偽手術群とした。

## 2. 組織学的検討

脳虚血後の生化学的変化の背景となる組織学的変化をみるために、脳虚血終了時、脳血流再開通3日後、10日後、21日後に組織学的検索を行なった。ラットを pentobarbital 100mg/kg腹腔内注射にて麻酔し、断頭した後、脳をすばやく取りだし、10%フォルマリン固定液に入れ、7日間固定した。アルコールにて脱水した後、パラフィンにて包埋して、海馬領域を含む前額断切片(厚さ5-8 $\mu$ m)を作製した。それをスライドガラスの上に載せ伸展させた。キシレンにて脱パラフィンを行い、hematoxylin-eosine (HE) 染色をして光学顕微鏡的に観察した。

## 3. ACh の定量

脳虚血終了時と脳血流再開通21日後に、ラットをマイクロウエーブ(5 kw, 1.5 sec., Metabostat NJE 2601)で脳を固定して屠殺後断頭し、直ちに頭部を氷冷後、氷上に載せたステンレス板の上に全脳を摘出し、Glowinskiらの方法<sup>9)</sup>に従って、橋+延髄、線条体、大脳皮質前頭葉、大脳皮質側頭葉、間脳+中脳および海馬を取り出し、分析開始まで-80°Cで保存した。

摘出した脳各部位を0.2 N HClO<sub>4</sub>(0.1% EDTAと内部標準として1 $\mu$ Mのethylhomocholineを含む)でホモゲナイズし、12000 g 20分間遠心分離した。その上清をメンブランフィルター(Millipore; pore size: 0.45 $\mu$ m)で濾過し、濾液中のAChを電気化学的分析器付き高速液体クロマトグラフィー(LC-304, Bioanalytical Systems, Lafayette, IN, U. S. A.)を用いて分析した<sup>7)</sup>。

## 4. mACh 受容体結合

脳虚血終了時、脳血流再開通3日後、10日後、21日後に、ラットを断頭し、直ちに全脳を摘出し、AChの定量の時と同様に脳の部位分けを行い50 mM Tris/HCl緩衝液(pH7.6)でホモゲナイズした。12000 g 20分間遠心分離を2回行った後、沈渣を約1 mg protein/mlとなるように50 mM Tris/HCl緩衝液(pH7.6)に再懸濁し、膜標品とした。各脳部位の膜標品のmACh受容体結合能は [<sup>3</sup>H]-QNB (quinuclidinyl benzylate)を放射性リガンドとして受容体結合実験法<sup>8)</sup>で測定した。すなわち、膜標品(約250 $\mu$ g protein)と0.08-1.5 nMの [<sup>3</sup>H]-QNBとを総量500 $\mu$ lの50 mM Tris/HCl緩衝液(pH7.6)中で25°C、120分間インキュベートし、結合型(B)と遊離型(F)の放射性リガンドを吸引濾過で分離し、Bの放射エネルギーを $\beta$ -カウンターで測定した。非特異的結合は1 $\mu$ Mのatropine存在下の放射エネルギーとした。

## 5. NMDA 受容体結合

mACh受容体結合の測定の場合と同様に、脳虚血終了時、脳血流再開通3日後、10日後、21日後にラットを断頭屠殺し、脳を部位分けした。各脳組織に10倍容量の0.04% Triton X-100を含む50 mM Tris/acetate緩衝液(pH7.5)を加えてホモゲナイズし、37°Cの温浴中で振盪しながら15分間インキュベートした。ついで12000 g 20分間遠心分離を3回行った後、沈渣を50 mM Tris/acetate緩衝液(pH7.5)を用いて約200 $\mu$ g protein/mlに調製し、膜標品とした。放射性リガンドとしては、NMDA受容体に最も特異性と親和性の高い<sup>9)10)</sup> [<sup>3</sup>H]-CPP (3-(2-carboxypiperazin-4-yl) propyl-1-phosphonic acid)を用いた。結合実験の方法はMurphyらの方法<sup>10)</sup>に準じて測定した。すなわち、膜標品(約50 $\mu$ g

protein)と15 nMの $[^3\text{H}]\text{-CPP}$ とを総量500 $\mu\text{l}$ の50 mM Tris/acetate 緩衝液 (pH7.5) 中で、37°C、15分間インキュベートし、B-Fの分離のためにマイクロ超遠沈器(Kubota, KM-15000型)で4°C、12000 g、3分間遠沈した。上清を吸引排除した後、再び冷緩衝液1 mlを加えて、同一条件で遠沈、沈渣を1 N NaOHで溶解してシンチレーターと共に $\beta$ -カウンターで放射エネルギーを測定した。1 mMのL-グルタミン酸存在下の放射エネルギーを非特異的結合として、総結合型放射エネルギーから差し引いたものを特異的結合とした。Scatchard分析のためには $[^3\text{H}]\text{-CPP}$ の量を1-900 nMまで変化させた。

#### 6. 蛋白質定量

膜標品の蛋白質定量は、牛血清アルブミン標準としてBio-Rad protein assay kitを用いて測定した。

#### 7. 推計学的検討

得られた実験成績の有意差検定にはone-way analysis of variance (ANOVA)を用いた。

## 結 果

### 1. 組織学的検討

海馬における神経細胞の脱落壊死の発生の経時的変化を組織学的に検討した結果をFig. 1およびFig. 2に示す。Fig. 1-aは偽手術群の海馬を、Fig. 1-bは脳虚血・脳血流再開10日後の海馬の弱拡大の光顕所見を示したもので、後者では海馬のCA1領域のみの錐体細胞の脱落壊死およびアストログリアの増殖を認める。Fig. 2はCA1領域の強拡大の光顕像で虚血後の経時的変化を示した。Fig. 2-aは偽手術群のCA1領域の正常錐体細胞層の光顕像で円形の明るい錐体細胞が整然と配列している。脳虚血・脳血流再開3日後には細胞の境界が不鮮明となり、細胞配列が乱れ核が凝縮しはじめている(Fig. 2-b)。Fig. 2-cのように10日後では、核が濃縮して小さくなり、錐体細胞おししの細胞間隙が拡大して見えるようになり、その間に小型のアストログリアの増殖がみられる。21日後でもほぼ同様の細胞脱落がみられている(Fig. 2-d)。このように、脳虚血・脳血流再開10日目で神経細胞の脱落およびアストログリアの増殖は完

成しており、それ以降、光学顕微鏡的には進行はみられなかった。

### 2. 脳虚血・脳血流再開によるACh含量の変化

Fig. 3に示したように、偽手術群の海馬のACh含量が $8.01 \pm 0.2$  nmol/mg protein (mean  $\pm$  SEM)であるのに対して脳虚血群の脳虚血終了時には、 $4.83 \pm 1.00$  nmol/mg protein (mean  $\pm$  SEM)と半減しており、有意な減少がみられた( $p < 0.05$ )。同様に線条体や大脳皮質前頭葉でも、ACh含量は偽手術群に対して虚血群では有意な減少がみられた。一方、その他の脳部位では、脳虚血によるACh含量には有意な変化は認められなかった。

脳血流再開21日後では、偽手術群と脳虚血群との間で全ての脳部位において、ACh含量には有意な変化は認められず、脳虚血終了時には低下していたACh含量は正常値に回復していた(Fig. 3)。

### 3. 脳虚血・脳血流再開によるmACh受容体結合の変化

Table 1に、脳虚血終了時、脳血流再開3日後、10日後、21日後のmACh受容体結合の解離定数(Kd)と受容体数(Bmax)の経時的変化をまとめた。脳血流再開21日後の海馬において、Bmaxが、偽手術群では、 $1.00 \pm 0.11$  pmol/mg protein (mean  $\pm$  SEM)、脳虚血群では、 $1.44 \pm 0.10$  pmol/mg protein (mean  $\pm$  SEM)と、蛋白当りのmACh受容体結合は有意な増加がみられた( $p < 0.005$ )。しかし、単位をpmol/mg proteinからpmol/regionに換算し、脳部位当りの総受容体量として表示してみると、有意差は認められなくなった(Table 1)。従って、脳血流再開21日後の海馬における $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ 結合のBmaxの増加は見かけ上のもので、総 $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ 結合部位数に変化がないことが判明した。

### 4. 脳虚血・脳血流再開によるNMDA受容体の変化

脳虚血終了時、脳血流再開3日後、10日後、21日後の特異的 $[^3\text{H}]\text{-CPP}$ 結合を経時的に検討してみると(Fig. 4)、脳虚血10日後までは偽手術群と有意差がみられなかった。しかし、脳

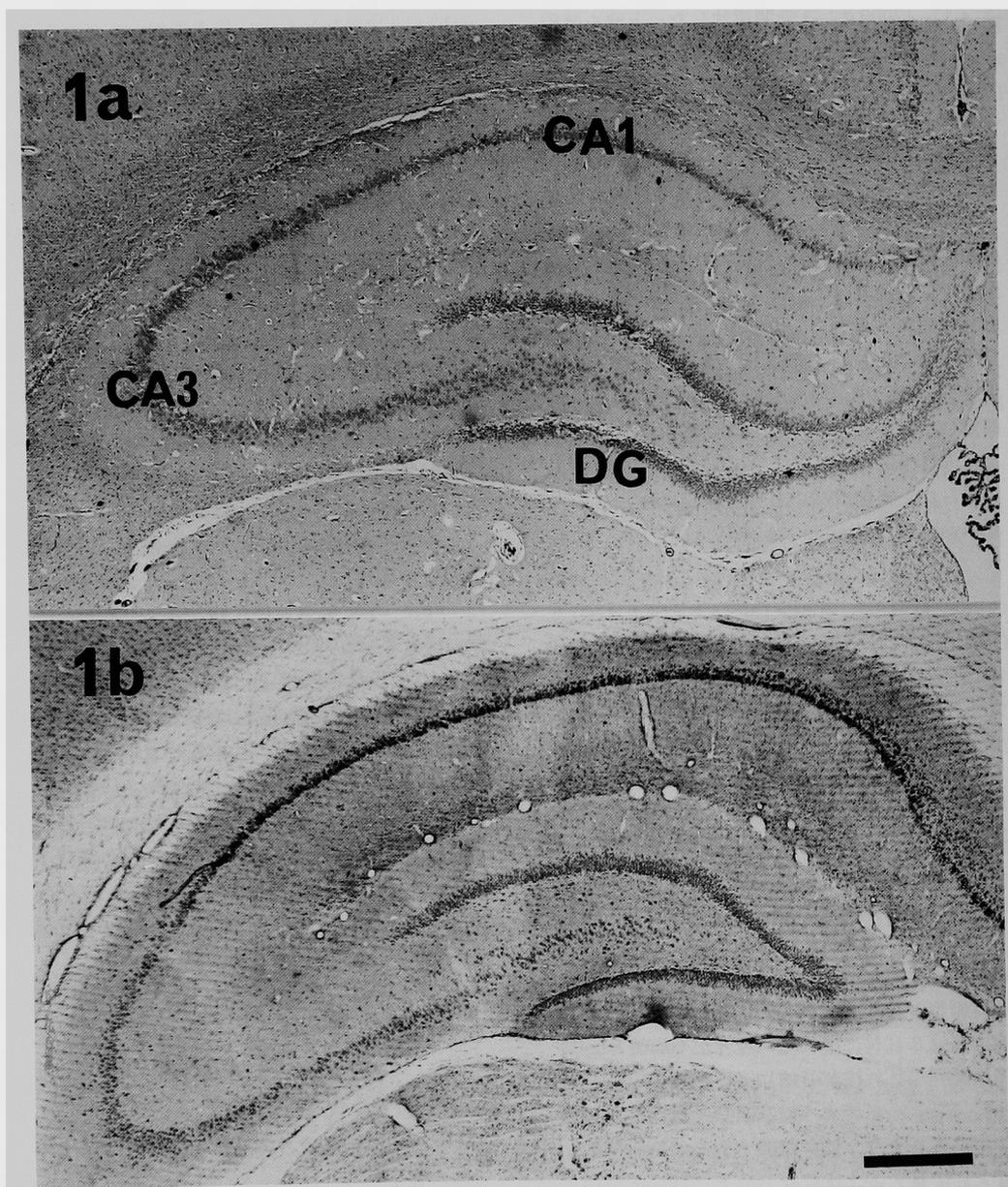


Fig. 1 Histological feature of pyramidal cell layers in the hippocampus.  
(a) sham-operated control.  
(b) 10 days after transient forebrain ischemia.  
Bar represents 0.5mm.

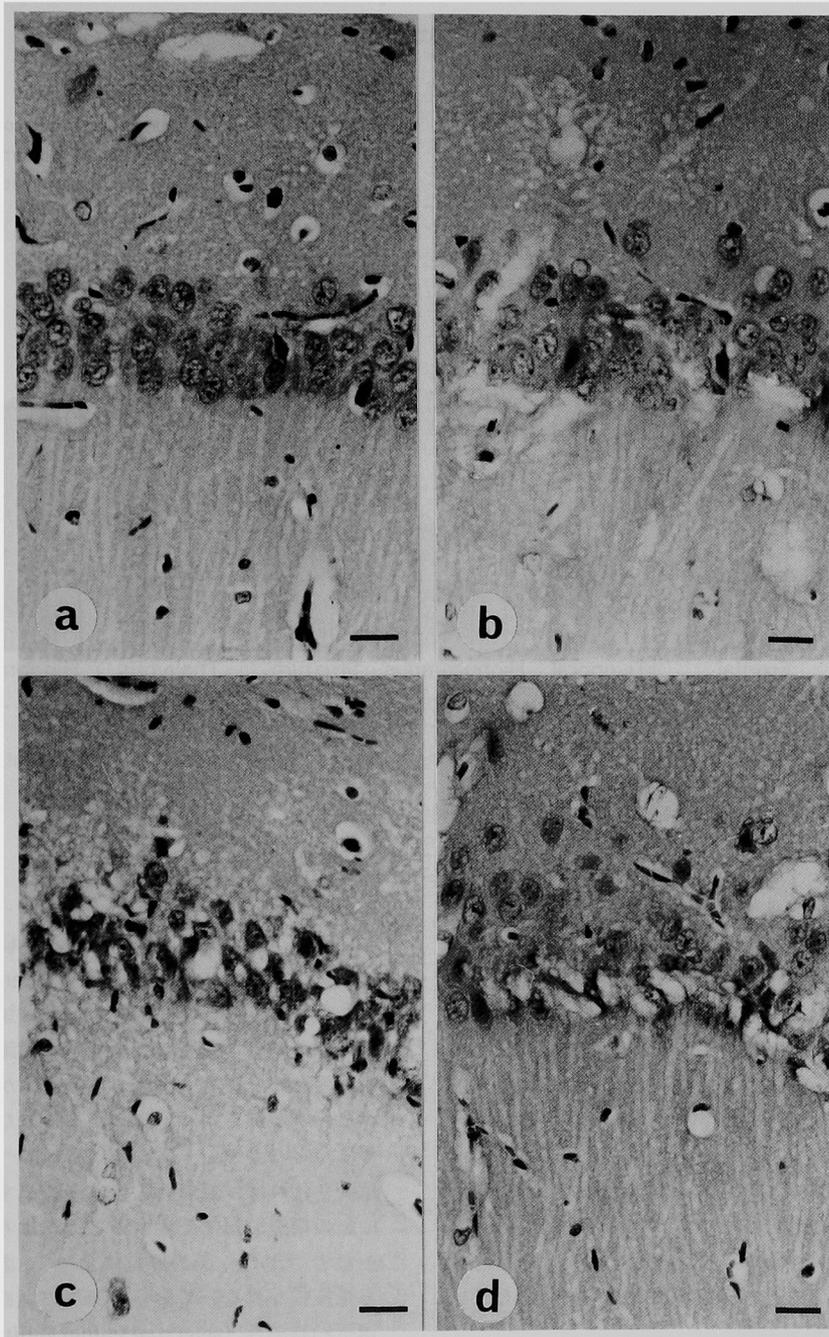


Fig. 2 Histological changes in pyramidal cells in the CA1 area of the hippocampus after transient forebrain ischemia.

(a) sham-operated control.

(b) 3 days after transient forebrain ischemia.

(c) 10 days after transient forebrain ischemia.

(d) 21 days after transient forebrain ischemia.

Bar in each part of the figure represents 25 μm.

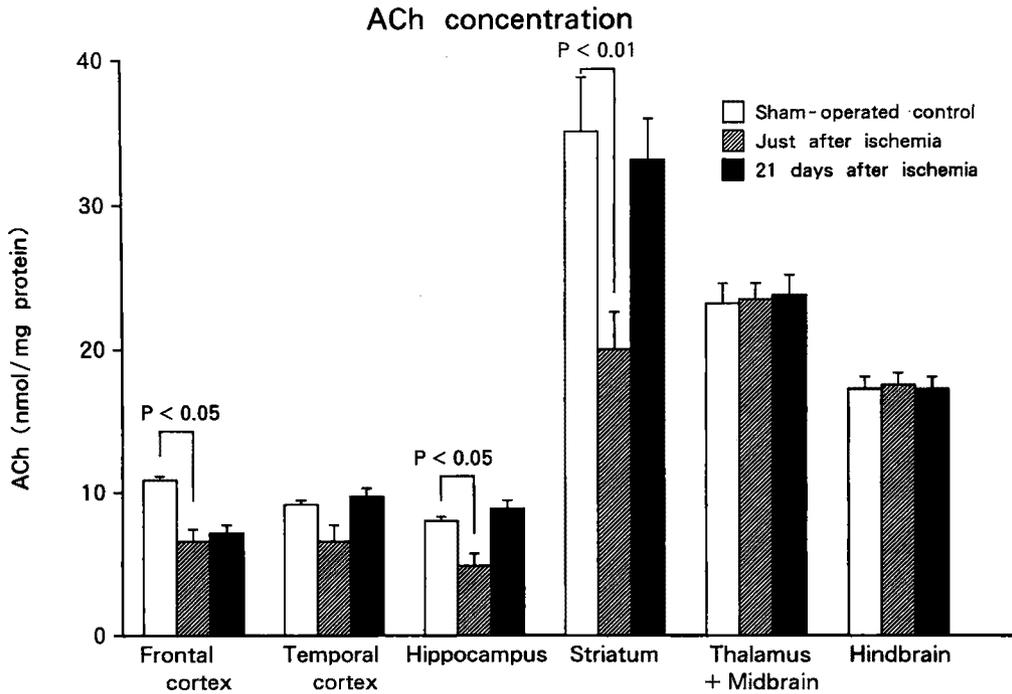


Fig. 3 ACh concentrations in the rat brain regions just after and 21 days after transient forebrain ischemia. Data are presented as mean  $\pm$  SEM (n=8).

血流再開通21日後の海馬の特異的 $^3\text{H}$ -CPP結合は、偽手術群では、 $265.87 \pm 18.87$  fmol/mg protein (mean  $\pm$  SEM)であるのに対して、脳虚血群では、 $118.23 \pm 9.10$  fmol/mg protein (mean  $\pm$  SEM)と半減しており、さらに、Scatchard分析によって海馬における脳血流再開通21日後のNMDA受容体のKdおよびBmaxを求めてみたところ(Fig. 5),脳虚血群ではBmaxが有意に減少しており( $p < 0.005$ ),Kdは有意な変化は認められなかった。このことはNMDA受容体を持つ海馬の神経細胞の障害がきわめて遅発性におこり、脳虚血21日後には半減していることを意味する。

#### 考 察

脳虚血によってもたらされる神経細胞の壊死に関しては、その引金となる現象と遅発性に起こってくる神経細胞壊死の機序とを分けて考え

る必要がある。

中枢神経系の機能を担っている神経細胞が、無酸素症(anoxia)や脳虚血(ischemia)によって容易に障害を受けることはよく知られている。神経細胞は活発なエネルギー代謝を行なっているため、酸素や血流への依存度が極めて高いにもかかわらず、それらが不足した場合の備蓄はほとんど無い。従って、もし脳への血流が遮断されれば、直ちに脳波は平坦化するとともに脳の構造的損傷が生ずると従来は考えられていた<sup>11)</sup>。しかし、脳の部位によって、虚血に対する抵抗性が異なっており、海馬の虚血に対する選択的脆弱性(selective vulnerability)は昔からよく知られていた現象である<sup>12)</sup>。さらに、1982年にKirinoら<sup>11)</sup>が遅発性神経細胞壊死の現象を発見してから、脳虚血後の海馬における変化が、単なるエネルギー代謝障害では説明できないことが明白となった。なぜなら、神経細胞が壊死

Table 1 Muscarinic cholinergic receptor (mACh-R) bindings in the rat brain regions after transient forebrain ischemia.

Region	just after ischemia (n=8)				3 days after ischemia (n=6)				10 days after ischemia (n=6)				21 days after ischemia (n=6)			
	Bmax		Kd		Bmax		Kd		Bmax		Kd		Bmax		Kd	
	pmol/mg protein	pmol /region	nM	nM	pmol/mg protein	pmol /region	nM	nM	pmol/mg protein	pmol /region	nM	nM	pmol/mg protein	pmol /region	nM	nM
Frontal cortex	(S)	0.28±0.02	1.13±0.10	6.39±0.10	0.29±0.01	1.16±0.11	6.39±0.74	0.28±0.03	1.14±0.10	6.38±0.74	0.24±0.01	1.06±0.02	6.39±0.20			
	(I)	0.30±0.01	1.15±0.05	6.42±0.21	0.30±0.01	1.18±0.09	6.39±0.21	0.28±0.02	1.13±0.08	6.45±0.43	0.27±0.02	1.05±0.05	6.47±0.69			
Temporal cortex	(S)	0.28±0.08	1.02±0.23	1.54±0.38	0.27±0.01	1.02±0.14	1.54±0.25	0.29±0.01	1.00±0.18	1.54±0.19	0.29±0.02	1.03±0.03	1.54±0.15			
	(I)	0.29±0.04	1.03±0.12	1.54±0.18	0.29±0.03	1.06±0.10	1.54±0.21	0.31±0.04	1.05±0.14	1.54±0.15	0.27±0.02	1.03±0.06	1.53±0.22			
Hippocampus	(S)	0.28±0.02	1.00±0.07	4.23±0.31	0.28±0.02	1.04±0.06	4.23±0.36	0.28±0.02	1.01±0.09	4.24±0.42	0.26±0.02	1.00±0.11	4.22±0.18			
	(I)	0.26±0.02	1.06±0.04	4.24±0.27	0.27±0.01	1.05±0.03	4.24±0.26	0.26±0.02	1.03±0.04	4.22±0.38	0.27±0.02	1.44±0.10*	4.24±0.27			
Striatum	(S)	0.25±0.01	1.40±0.13	5.68±0.79	0.24±0.02	1.41±0.14	5.68±0.79	0.24±0.01	1.41±0.25	5.68±0.84	0.23±0.02	1.44±0.15	5.70±0.31			
	(I)	0.22±0.01	1.44±0.07	5.99±0.31	0.23±0.01	1.45±0.05	5.98±0.59	0.21±0.02	1.47±0.13	6.00±0.57	0.21±0.03	1.40±0.15	6.04±0.45			
Thalamus + Midbrain	(S)	0.10±0.01	0.86±0.03	5.23±0.26	0.10±0.01	0.86±0.05	5.26±0.23	0.12±0.01	0.83±0.02	5.26±0.26	0.13±0.01	0.83±0.02	5.25±0.26			
	(I)	0.10±0.01	0.86±0.02	5.23±0.18	0.10±0.01	0.86±0.04	5.26±0.21	0.11±0.01	0.85±0.02	5.24±0.27	0.14±0.01	0.79±0.03	5.24±0.23			
Hindbrain	(S)	0.27±0.06	0.39±0.03	1.50±0.09	0.26±0.01	0.38±0.02	1.49±0.11	0.27±0.01	0.39±0.02	1.50±0.12	0.26±0.04	0.35±0.01	1.48±0.03			
	(I)	0.26±0.05	0.36±0.02	1.51±0.09	0.27±0.08	0.36±0.02	1.51±0.12	0.27±0.02	0.36±0.02	1.51±0.18	0.26±0.02	0.37±0.02	1.49±0.09			

(S) : sham-operated control, (I) : ischemic group.

Samples of each receptor preparation were incubated with 0.08-1.5 nM [<sup>3</sup>H]-QNB.

Date are presented as mean±SEM.

\*P<0.005 vs. sham-operated control (one-way ANOVA).

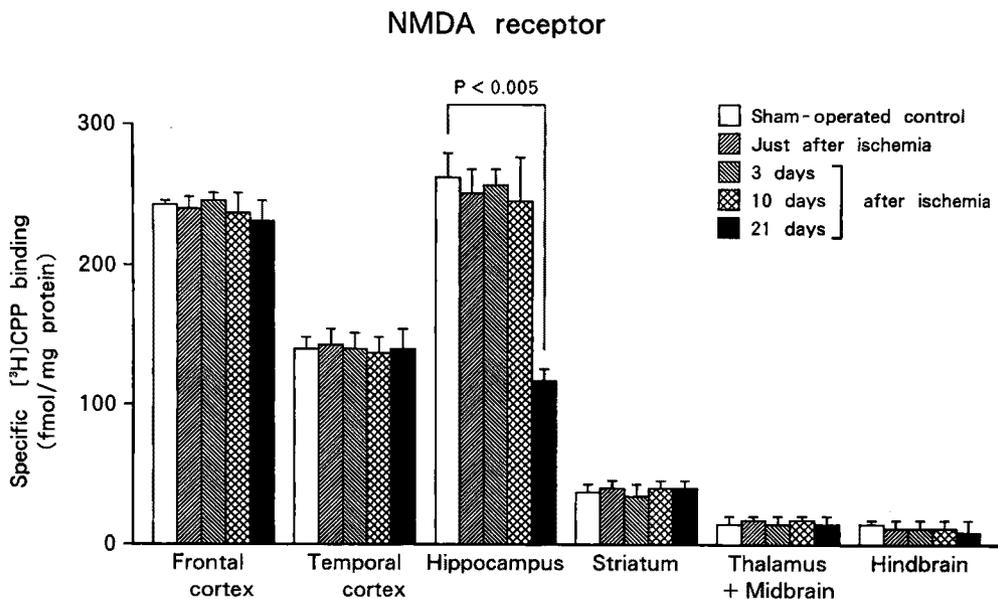


Fig. 4 Specific [<sup>3</sup>H]-CPP receptor bindings in the rat brain regions after transient forebrain ischemia. (S) : sham-operated control, (I) : ischemic group. Samples of each receptor preparation were incubated with 15 nM [<sup>3</sup>H]-CPP. Data are presented as mean ± SEM (n=4).

による時期にはすでにエネルギー代謝は正常化しているからである<sup>13)</sup>。

今回のラットにおける20分間の前脳虚血・脳血流再開通実験で、光学顕微鏡的組織学的検討では従来の検討と同様に、10日後には海馬 CA 1 領域の錐体細胞の壊死は完成しており、それ以降は進行がみられなかった。

脳血管障害後遺症のうち、痴呆症状には ACh 系神経機構の関与が示唆されているので、まず、ACh 系についての検討を行った。

今回の実験において、明らかにした脳虚血終了時(急性期)の、海馬、線条体、大脳皮質前頭葉における ACh 含量の低下は、脳切片を用いた *in vitro* の実験において ACh の合成が低酸素により低下することが示されている<sup>14)</sup>事を考え合わせると、*in vivo* においても虚血中は ACh 合成が低下している可能性が考えられる。しかし慢性期の ACh 含量は正常化しているので、この急性期の ACh 含量の低下という成績は遅発性に神経細胞が死亡することの説明とはなり

得ない。

また、脳虚血・脳血流再開通による mACh 受容体結合の変化が脳血流再開通21日後の蛋白量当りの Bmax が偽手術群に比べ脳虚血群で有意な増加がみられたが、総結合量には変化がみられず、mACh 受容体を有する神経細胞は正常に保たれている。このように、今回の実験の全経過を通じて、mACh 受容体には変化がみられなかった。

以上のように脳虚血後の慢性期においては ACh 神経機構に関してはシナプス前ならびに後の機構とも正常に保持されることが判明し、本研究で行ったような一過性脳虚血では ACh 系神経機構は障害されない。従って、海馬における神経細胞の変性・壊死は ACh 系以外の系に求めなければならない。

最近、神経細胞死にはシナプス結合が必要だと考えられるようになってきている。その根拠となった成績は以下の通りである。通常、培養神経細胞は無酸素状態に15分以上さらされると死滅

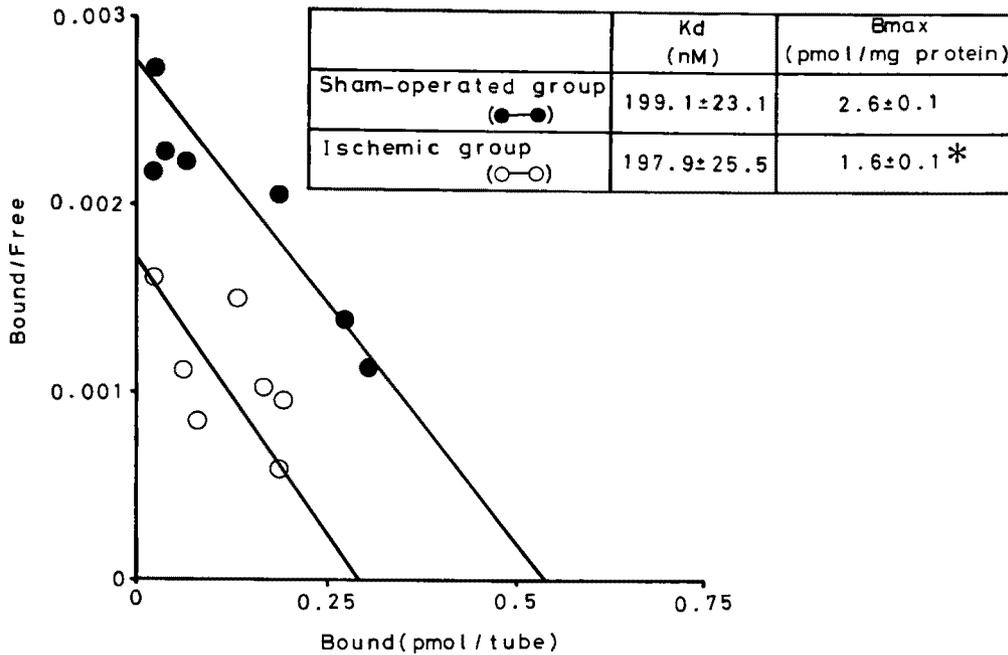


Fig. 5 Scatchard plots of [ $^3\text{H}$ ] -CPP receptor bindings in the hippocampus of the sham-operated control and the 21 days after transient forebrain ischemia. The inserted Kd and Bmax values are calculated from 4 rats (mean  $\pm$  SEM).

\* $p < 0.005$  vs. sham-operated control (one-way ANOVA).

する<sup>15)</sup>。しかし、まだ互いにシナプス結合が完成していない培養2日以内の神経細胞は無酸素状態に対してよく耐えるのに対して、培養2週以上でシナプス結合が完成している神経細胞は、短期間のうちに崩壊する<sup>16)</sup>。さらに、シナプス伝達を阻害することが知られている  $\text{Mg}^{2+}$  を培養2週間目の神経細胞の培養液に加えると、無酸素によって神経細胞が破壊されない<sup>16)</sup>。この実験成績から Rothman<sup>16)</sup>は、神経細胞が無酸素状態に耐えなくしているのは、興奮性アミノ酸 (excitatory amino acid) 伝達物質、特にグルタミン酸であると想定した。さらに彼は培養神経細胞に  $10^{-4}\text{M}$  以上のグルタミン酸を加えると神経細胞が崩壊し、さらにグルタミン酸の拮抗剤を併用することによりグルタミン酸の毒性は消失することを発見し、グルタミン酸のシナプス伝達の阻害剤が培養細胞を無酸素状態から護ることをも示した<sup>17)</sup>。以上の報告は、グルタミン酸が無酸素・脳虚血による神経細胞の障害に関して重要な役割

を果たしていることを示唆したものである。しかし、実験は *in vitro* の培養系を用いて行われたため、実際の *in vivo* の系での証明を要すると思われる。

興奮性アミノ酸の中枢での役割は均一ではなく、部位によって著しく異なる。現在では興奮性アミノ酸の受容体は3つのグループに分類し得ると考えられている<sup>18)</sup>。それぞれのグループは選択的な作働薬 (agonist) による名前がつけられており、NMDA の結合する NMDA 受容体、カイニン酸の結合する kainate 受容体、そしてキスカル酸の結合する quisqualate 受容体の3種である。

グルタミン酸をはじめとする興奮性アミノ酸神経伝達物質の細胞外濃度が上昇すれば神経細胞は損傷を受けることは古くから知られていたこともあって<sup>19)</sup>、興奮性アミノ酸が虚血性神経細胞障害の原因であると最近では想定されるようになってきている。興奮性アミノ酸はシナプス後部

膜の受容体に結合すると細胞内にCa<sup>2+</sup>が大量に流入し、蛋白分解酵素が活性化されて蛋白の破壊が起こり、神経細胞は崩壊すると考えられている<sup>20)</sup>。さらに、脳虚血状態では、Ca<sup>2+</sup>の流入ばかりでなく、イオン環境の変化、ことにCl<sup>-</sup>イオンの流入によっても神経細胞が障害されると考えられている<sup>21)</sup>。さらにCa<sup>2+</sup>の細胞内への流入に関与するのは興奮性アミノ酸に対する受容体の中でも特にNMDA受容体であるとされている<sup>22)</sup>ことから、虚血性神経細胞病変のメカニズムにおいてNMDA受容体の役割が重要視されるようになった。虚血に対して最も脆弱な海馬CA1領域はNMDA受容体の密度の最も高い部位であり<sup>18)23)24)</sup>、NMDA受容体の非競合的拮抗剤であるMg<sup>2+</sup>が*in vitro*で<sup>15)</sup>、また競合的拮抗剤であるAP7が*in vivo*で<sup>25)</sup>脳虚血から神経細胞を保護することなどが相次いで報告されている。今回の実験で、21日という慢性期脳虚血において、海馬で、NMDA受容体が有意に低下したことは、NMDA受容体を有する神経細胞が変性脱落したものと理解され、遅発性神経細胞壊死に陥る細胞はNMDA受容体を持っていることを示した。すなわち、mACh受容体を持った細胞は死なずに、NMDA受容体を持った細胞だけが死亡することを明確にした。

このように、NMDA受容体を有する神経細胞のみが、遅発性に壊死に陥ることを明確にしたのが、一過性脳虚血の際には海馬でグルタミン酸が放出されるが、その上昇している時間はわずか10分間程度で、虚血後の血流再開直後20—25分で正常値に復してしまう<sup>26)</sup>。従って、グルタミン酸がNMDA受容体に作用し、Ca<sup>2+</sup>やCl<sup>-</sup>が神経細胞内に流入し、その後はこれらのイオンによってひきおこされる一連の反応によって神経細胞が壊死に陥ると考えられる。しかし、脳虚血後のCa<sup>2+</sup>の流入はグルタミン酸濃度の上昇よりはるかに遅く、24—72時間後に生ずるので<sup>27)28)</sup>、受容体活性化とCa<sup>2+</sup>流入とを直ちに結びつけて考えることは難しいし、21日後にNMDA受容体を保有した神経細胞に壊死が生ずることの説明ともなり得ない。したがって、ひとたび高濃度のグルタミン酸にさらされたNMDA受容体を有する神経細胞の性質が変調し、その後

正常量のグルタミン酸が作用し続けることが著しく高くはないが持続的なCa<sup>2+</sup>の流入をひきおこし、ひいては神経細胞の壊死をもたらす可能性も否定できない。

従来の遅発性神経細胞壊死の研究は、海馬の錐体細胞の数の減少のみで論じられる傾向があったが<sup>1)2)3)</sup>、今回の研究では、組織学的にはすでに完成してしまったあとでも生化学的に、特定の変化が特異的に生ずることを明確にした。このことは従来の方法論だけでの研究では不十分で、機能と直結した受容体の検索の重要性を示している。このように受容体を主体とする生化学的研究の進歩がさらに遅発性神経細胞壊死の病態生理を明確にし、ひいては治療薬の開発に役立つ情報をもたらしてくれるものと考えられる。

## 結 論

ラットに四動脈閉塞による一過性脳虚血を起こさせた後に経時的に慢性期にいたるまで脳内ACh系神経機構(ACh含量、mACh受容体)ならびにNMDA受容体の変化を検討した。

1. 海馬CA1領域の錐体細胞の崩壊は脳血流再開10日後には完成しており、光学顕微鏡的にはそれ以降の進行はみられなかった。
2. ACh含量は、虚血終了時に、海馬、線条体、大脳皮質前頭葉で有意な減少が認められたが、脳血流再開21日後には正常に回復していた。
3. mACh受容体結合は、脳血流再開21日後で、海馬において、見かけ上蛋白量当りのBmaxが増加していたが、海馬全体の総受容体数には変化はみられなかった。
4. 従って、慢性期にはACh系神経機構には全く変化がなく、この系は遅発性神経細胞壊死とは直接的な関係はないものと考えられた。
5. グルタミン酸受容体のサブタイプの1つであるNMDA受容体は、海馬において、10日まで変化なく、組織学的には壊死の進行がないにもかかわらず21日後にBmaxが半減した。
6. 以上の結果から、脳虚血発作後の遅発性神経細胞壊死が、興奮性アミノ酸であるグルタミン酸が放出されたために生ずるだろうとの説に対して、グルタミン酸と対応するNMDA受容

体を有する神経細胞のみが遅発性に死滅することを明確にした。

稿を終わるに臨み、終始御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜った森昭胤教授ならびに直接御指導御協力頂きました小川紀雄助教授に深く感謝の意を捧

げます。さらに、実験遂行にあたり終始快く御協力下さった研究室の皆様から御礼申し上げます。また、組織学的検討に御協力下さいました岡山大学第一解剖学教室水川公直講師に感謝致します。本研究の要旨は第41回日本自律神経学会総会（昭和63年11月12日、大分）において発表した。

## 文 献

- 1) Kirino T : Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* (1982) **239**, 57—69.
- 2) Kirino T and Sano K : Fine structural nature of delayed neuronal death following ischemia in the gerbil hippocampus. *Acta Neuropath (Berl)* (1984) **62**, 209—218.
- 3) Pulsinelli WA, Brierley JB and Plum F : Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* (1982) **11**, 491—498.
- 4) Pulsinelli WA, Levy DE and Duffy TE : Regional cerebral blood flow and glucose metabolism following transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* (1982) **11**, 499—509.
- 5) Pulsinelli WA and Brierley JB : A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* (1979) **10**, 267—272.
- 6) Glowinski J and Iversen LL : Regional studies of catecholamines in the rat brain I. *J Neurochem* (1966) **13**, 655—669.
- 7) Ogawa N, Haba K, Yoshikawa H, Ono T and Mizukawa K : Comparison of the effects of bifemerane hydrochloride, idebenone and indeloxazine hydrochloride on ischemia-induced depletion of brain acetylcholine levels in gerbils. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* (1988) **61**, 285—288.
- 8) Ogawa N, Mizuno S, Nukina I, Tsukamoto S and Mori A : Chronic thyrotropin releasing hormone (TRH) administration on TRH receptors and muscarinic cholinergic receptors in CNS. *Brain Res* (1983) **263**, 348—350.
- 9) Olverman HJ, Monaghan DT, Cotman CW and Watkins JC : [<sup>3</sup>H] CPP, a new competitive ligand for NMDA receptors. *Eur J Pharmacol* (1986) **131**, 161—162.
- 10) Murphy DE, Schneider J, Boehm C, Lehmann J and Williams M : Binding of [<sup>3</sup>H] 3-(2-carboxy-piperazin-4-yl) propyl-1-phosphonic acid to rat brain membranes : A selective high affinity ligand for N-methyl-D-aspartate receptors. *J Pharmacol Exp Ther* (1987) **240**, 778—784.
- 11) Siesjo BK : Brain energy metabolism. John Wiley and Sons, Chichester, New York, Brisbane and Toronto (1978).
- 12) Brierley JB and Graham DI : Hypoxia and vascular disorders of the central nervous system ; in Greenfield's Neuropathology, Adams, Corsellis and Duchen eds, Edward Arnold, London (1984) pp125—207.
- 13) Arai H, Passonneau JV and Lust WD : Energy metabolism in delayed neuronal death of CA 1 neurones of the hippocampus following transient ischemia in the gerbil. *Metab Brain Dis* (1986) **1**, 263—278.
- 14) Ksiezak HJ and Gibson GE : Oxygen dependence of glucose and acetylcholine metabolism in slices and synaptosomes from rat brain. *J Neurochem* (1981) **40**, 305—314.
- 15) Kim SU : Brain hypoxia studied in mouse central nervous system cultures I. Sequential cellular

- changes. *Lab Invest* (1975) **33**, 658—669.
- 16) Rothman SM : Synaptic activity mediates death of hypoxic neurons. *Science* (1983) **220**, 536—537.
  - 17) Rothman S : Synaptic release of excitatory amino acid neurotransmitter mediates anoxic neuronal death. *J Neurosci* (1984) **4**, 1884—1891.
  - 18) Cotman CW and Iversen LL : Excitatory amino acids in the brain-focus on NMDA receptors. *Trends Neurosci* (1987) **10**, 263—265.
  - 19) Van Harreveld A and Fifkova E : Light- and electron-microscopic changes in central nervous tissue after electrophoretic injection of glutamate. *Exp Mol Pathol* (1971) **15**, 61—81.
  - 20) Siejo BK : Cell damage in the brain : asspeculative synthesis. *J Cereb Blood Flow Metab* (1981) **1**, 155—185.
  - 21) Rothman SM and Olney JW : Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann Neurol* (1986) **19**, 105—111.
  - 22) MacDermott AB and Dale N : Receptor, ion channels and synaptic potentials underlying the integrative actions of excitatory amino acid. *Trends Neurosci* (1987) **10**, 280—284.
  - 23) Monaghan DT, Holets VR, Toy DW and Cotman CW : Anatomical distributions of four pharmacologically distinct <sup>3</sup>H-L-glutamate binding sites. *Nature* (1983) **306**, 176—179.
  - 24) Cotman CW, Monaghan DT, Ottersen OP and Storm-Mathisen J : Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their pathways. *Trends Neurosci* (1987) **10**, 273—280.
  - 25) Simon RP, Swan JH, Griffiths T and Meldrum BS : Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science* (1984) **226**, 850—852.
  - 26) Benveniste H, Drejer J, Schousboe A and Deimer NH : Elevation of the extra-cellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* (1984) **43**, 1369—1374.
  - 27) Dienel GA : Regional accumulation of calcium in postischemic rat brain. *J Neurochem* (1984) **43**, 913—925.
  - 28) Sakamoto N, Kogure K, Kato H and Ohtomo H : Disturbed Ca<sup>2+</sup> homeostasis in the gerbil hippocampus following brief transient ischemia. *Brain Res* (1986) **364**, 372—376.

**Biochemical changes in the rat brain in the chronic stage  
after transient forebrain ischemia**

**Hiroshi YOSHIKAWA**

**Department of Neurochemistry, Institute for Neurobiology,  
Okayama University Medical School,  
Okayama 700, Japan  
(Director : Prof. A. Mori)**

In recent years, cases of sequelae of cerebrovascular disease such as vascular dementia due to death of many neurons have been increasing. Such neuronal death following brain ischemia had been considered to be due to an energy deficiency resulting from an impaired respiratory chain. However, the detection of the delayed neuronal death showed that neuronal death is not caused by mere energy deficiency. Most previous studies on delayed neuronal death focused on the changes in morphology and energy metabolism in the acute to subacute stage. There are few reports concerning biochemical changes in the chronic stage, especially in neurotransmitter receptors.

Transient ischemia for 20 minutes in a rat four-vessel occlusion model was induced, and serial histological and biochemical changes were evaluated until the chronic stage. Destruction of pyramidal cells in the CA1 area of the hippocampus was completed by 10 days after cerebral ischemia followed by recirculation of cerebral blood flow. Light microscopy showed no progression after this day. The level of acetylcholine (ACh) was significantly decreased in the hippocampus, striatum, and frontal cortex at the termination of ischemia but recovered to normal 21 days after recirculation of cerebral blood flow. The binding sites of muscarinic ACh receptors (mACh-R) per unit of protein were increased in the hippocampus 21 days after recirculation of blood flow. However, no changes were observed in the total number of mACh-R in the entire hippocampus. These findings suggest no changes in the ACh neuronal system in the chronic stage and no direct association between this system and delayed neuronal death. On the other hand, N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors, a subtype of glutamate receptors, showed no change in the hippocampus until after 10 days, but decreased to half after 21 days despite no evidence of histological progression of neuronal death. Thus, delayed neuronal death after transient forebrain ischemia appears to be due to release of glutamate, an excitatory amino acid. Our findings show the specific death of neurons with NMDA receptors for glutamate.