

# Differential Hypothermia 処置の安全限界に 関する実験的研究

## 第 2 編

### 家兎正常脳代謝への影響

岡山大学脳神経外科学教室 (指導: 西本詮教授)

池 田 幸 明

(昭和54年8月29日受稿)

**Key words:** differential hypothermia  
normal brain  
glucose  
adenine nucleotides  
metabolic changes

#### 緒 言

著者は全身低体温下に腫瘍局所のみを正常温に保つ differential hypothermia (以下 D.H. と略す) 処置<sup>1)</sup> を、ヒト脳腫瘍の治療に応用するべく、加温方法に関する基礎的な検討を行ない、microwave(2.45 GHz) 照射で十分な加温が得られること、また家兎正常脳における加温の安全限界は、23℃の全身低体温下で5時間の加温に際しては、正常温までであることを第1編で述べた。従来より生体は低体温下であれば、低酸素状態にさらされても、正常温時よりも比較的長時間その状態に耐えられること<sup>2),3)</sup> (protective effect) が知られており、D.H. 処置はこの低体温による protective effect を腫瘍局所を正常温にすることによって、腫瘍部のみで取り除くことでもある<sup>3)</sup>。ヒト脳腫瘍の治療に D.H. 処置を行なう場合、正常脳には損傷を及ぼさない必要があるが、正常脳の加温は避けられないところでもあり、この protective effect を取り除かれた正常脳では、どのような変化が生ずるのか全く知られていない。そこで本編では、脳がその代謝上、最も依存している糖とその中間代謝物質、エネルギーとして必要な adenine nucleotides を家兎脳を用いて、D.H. 処置中及び処置後にわたって経時的に測定し、D.H. 処置により正常脳が受ける影響を代謝面より検討し、D.H. 処置の時間的な安全性とその抗腫瘍効果を得るに必要な時間とを探るべく研究を行なった。

#### 実験材料と方法

##### 1. Differential hypothermia 処置法及び試料採取時期

実験動物として、岡山県内の動物商から購入した日本在来種白色家兎を、体重  $2.0 \pm 0.2$  kg まで当教室で飼育し、外見上何ら疾患を有さないものを使用した。まず前処置として硫酸アトロピン 0.1 mg/kg を投与し、続いて塩酸ケタミン 25 mg/kg、ペントバルビタール 25 mg/kg で麻酔し、氷水中に浸して、自発呼吸下に直腸温を示標として低体温とし、直腸温 23℃ に維持した。温度測定には針型サーミスター (type NPT, SHIBAURA ELECTRONICS Co. 製) を使用した。D.H. 処置は右頭頂側頭部に骨窓を開け、この部以外はアルミ箔で覆い、microwave 照射装置、ME-20 (O.G. GIKEN Co. 製) を使って、骨窓部の大脳を撰択的に加温し、第1編で述べた如く脳温を測定しつつ、正常温  $37 \pm 1$ ℃ に維持することによって行なった。骨窓は前後径約 1.5 cm、側方径約 1.0 cm の大きさで、その内側縁は正中より約 0.3 cm 離すように作製し、microwave 照射アンテナを約 5 cm 照射野から離し、矢状面に平行の方向から照射した。D.H. 処置後の復温は家兎を濡らさないように温水にて正常温に戻し、室温の低い時には暖を与えて復温後の体温下降を避けた。

D.H. 処置正常脳よりの試料採取は、(1) 正常温時、(2) D.H. 処置 0 時間目、すなわち直腸温 23℃ の低体

温となった時点, (3) D.H. 処置 3 時間目, (4) 同 6 時間目, (5) 同 10 時間目, (6) D.H. 処置終了後 12 時間目 (復温時間を含める), (7) D.H. 処置後 36 時間目, の 7 群で行ない各群 5 羽, 計 35 羽の家兎を用いた。

試料採取は次の如く行なった。(1)(6)(7)群では麻酔後に, 麻酔下にある(2)(3)(4)(5)群ではそれぞれの時間で, また(1)(2)群では右頭頂側頭部で, 他の群では D.H. 処置部及びその対称部を中心に, まず頭蓋骨を十分広く除去した。この時, 脳に圧迫の加わらないよう十分に注意し, また上矢状洞からの出血を避けて, 正中部の骨除去は行なわなかった。次いで硬膜を切開し, 出血部は湿綿で覆い, 鋭利なメスで一気に入切開を加え, 左右それぞれ 1g を目安として脳組織を切除した。採取した脳組織に付着した血液を手ばやくふきとり, 直ちにこれを液体窒素を入れた乳鉢に投入し, 脳切除後数秒以内に, 採取組織全体を急速凍結し, 粉碎した。これら試料採取に際して家兎は自発呼吸下に置いた。

左側の頭頂側頭部, すなわち D.H. 処置対称側から得た試料は, 採取時点での全身代謝の低体温による変化を反映するものとして, D.H. 処置側に対する対照とした。

## 2. 測定代謝物質と測定方法

上記各群で採取した脳組織を用いて, 解糖系では, glucose (Glu.), glucose-6-phosphate (G6P), fructose-1, 6-diphosphate (FDP), dihydroxyacetone phosphate (DAP), pyruvate (Pyr.), lactate (Lact.) の 6 種, エネルギー系では adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), adenosine monophosphate (AMP) の 3 種, 計 9 種の代謝物質について, 脳組織内濃度を定量した。

試料作製は, 前述の如くして採取し液体窒素中で粉碎した脳組織を, まず既知量の 6% perchloric acid を入れて冷却してあるテフロン製ホモジナイザー (10ml, 高島商店製) に移して秤量し, 続いて氷水中でホモジナイズした。次いで, 2,000G, 10 分間の遠沈 (久保田製作所, K-80 型) を行ない, その上清をメチルオレンジを指示薬として, 5M potassium carbonate で中和し, 炭酸ガスの発生がなくなるまでこれを氷水中に静置し, その上清を最終試料とした。定量方法は酵素法<sup>4)</sup>により, 分光計 (日立 101 型) を用いて行なった。なお測定に用いた酵素は lactate dehydrogenase, pyruvate kinase, glycerol-1-phosphate dehydrogenase, aldolase, triose phosphate isomerase, phosphoglucose isomerase

(Sigma Co.), myokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, hexokinase (Boeringer Co.) である。測定した定量値から下記のものを算出した。

(1) lactate, pyruvate ratio = L/P

(2) energy charge potential (ECP) =  $(ATP + 0.5 ADP) / (ATP + ADP + AMP)^5$

## 実験結果

各群における各個体別の代謝物質濃度は表 1 の如くである。又, 表 2 は L/P 比, ECP を算出したものであり, 表 1 から平均値及び標準偏差を一覧にしてまとめたものが表 3 である。

(1) 正常温時

Glu.,  $2.976 \pm 0.477$  micromole/gram wet tissue (以下単位は  $\mu M/g$  と略す), ATP,  $1.789 \pm 0.278 \mu M/g$  と諸家の報告<sup>6)-11)</sup> に比し低値であり, Lact. は  $6.954 \pm 0.259 \mu M/g$  と高値であった。

(2) D.H. 処置 0 時間目 (低体温時)

正常温時に比して, G6P, ATP, AMP は増加傾向を示し, その他の代謝物質は全て低下傾向を示しているが, G6P は  $0.021 \pm 0.004 \mu M/g$  から  $0.045 \pm 0.012$  へ ( $P < 0.01$ ), DAP は  $0.140 \pm 0.032 \mu M/g$  から  $0.099 \pm 0.011$  へ ( $P < 0.05$ ), ADP は  $0.251 \pm 0.021 \mu M/g$  から  $0.173 \pm 0.053$  へ ( $P < 0.05$ ), とそれぞれ正常温時から低体温時へと有意に変化していた。なお 23°C の全身低体温になるまでに要した時間は 2 時間から 2 時間 30 分であった。

(3) D.H. 処置 3 時間目

D.H. 処置側と対照側で有意差をみるものは Glu. のみで D.H. 側では  $3.259 \pm 0.189 \mu M/g$  と高値であるのに対して, 対照側では  $1.552 \pm 0.394 \mu M/g$  と低値 ( $P < 0.001$ ) であった。低体温時と比較すれば処置側, 対照側ともに FDP, DAP, ATP は増加傾向を示し, G6P, Lact, AMP では減少傾向をみている。

(4) D.H. 処置 6 時間目

この群では D.H. 処置側で Pyr. と ADP 以外の全ての測定物質が増加傾向を示しており, 特に AMP は対照側  $0.032 \pm 0.004 \mu M/g$  に対し, D.H. 処置側  $0.060 \pm 0.006 \mu M/g$  と約 2 倍の高値である。反対に Pyr. は対照側  $0.261 \pm 0.018 \mu M/g$  に対し, D.H. 側で  $0.222 \pm 0.015 \mu M/g$  と低値 ( $P < 0.05$ ) であった。Lact. 値は D.H. 処置 3 時間目と比して両側上昇しているが D.H. 側での  $6.100 \pm 0.607 \mu M/g$  と対側の  $5.828 \pm 0.568 \mu M/g$  との間に有意の差はない。

表1. D.H. 処置による家兎正常脳の代謝物質濃度の変化

	No.	1	2	3	4	5	Mean	±SD	
正 常 温 時	Glu	2.642	3.693	2.816	2.386	3.345	2.976	.477	
	G6P	.014	.022	.018	.026	.024	.021	.004	
	FDP	.200	.182	.202	.141	.131	.171	.030	
	DAP	.187	.167	.101	.116	.131	.140	.032	
	Pyr	.250	.230	.266	.282	.299	.265	.024	
	Lact	6.644	7.296	6.731	7.216	6.885	6.954	.259	
	ATP	1.693	2.078	1.294	1.984	1.894	1.789	.278	
	ADP	.213	.270	.258	.269	.246	.251	.021	
	AMP	.028	.039	.043	.032	.037	.036	.005	
D. H. 処 置 0 時 間	GLU	2.494	2.161	2.777	2.189	3.277	2.580	.415	
	G6P	.048	.060	.055	.030	.033	.045	.012	
	FDP	.154	.187	.096	.114	.195	.149	.039	
	DAP	.077	.101	.108	.108	.101	.099	.011	
	PYR	.187	.248	.293	.221	.222	.234	.035	
	Lact	6.917	6.600	7.245	5.519	7.460	6.748	.680	
	ATP	2.527	1.851	1.780	1.896	1.447	1.900	.351	
	ADP	.175	.175	.156	.263	.096	.173	.053	
	AMP	.043	.087	.093	.052	.064	.068	.019	
D. H. 処 置 3 時 間 目	Glu	D.H.side	3.323	2.993	3.107	3.339	3.531	3.259	.189
		control	1.592	1.534	1.130	1.246	2.260	1.552	.394
	G6P	D.H.side	.027	.043	.030	.026	.024	.030	.007
		control	.017	.028	.020	.022	.023	.022	.004
	FDP	D.H.side	.170	.131	.222	.201	.182	.181	.031
		control	.192	.222	.241	.163	.182	.200	.028
	DAP	D.H.side	.125	.183	.117	.134	.184	.149	.029
		control	.220	.140	.151	.200	.213	.185	.033
	Pyr	D.H.side	.238	.195	.249	.135	.106	.185	.056
		control	.208	.168	.195	.189	.236	.199	.022
	Lact	D.H.side	4.414	4.422	5.355	4.368	4.175	4.547	.414
		control	5.075	5.050	4.038	4.047	6.250	4.892	.818
	ATP	D.H.side	1.755	2.574	3.079	2.821	2.106	2.467	.479
		control	2.439	1.569	2.189	2.304	1.510	2.002	.386
	ADP	D.H.side	.143	.207	.237	.191	.142	.184	.037
		control	.100	.195	.147	.137	.156	.147	.031
	AMP	D.H.side	.029	.043	.033	.038	.048	.038	.007
		control	.051	.055	.063	.043	.039	.050	.009
D. H. 処 置 6 時 間 目	Glu	D.H.side	2.633	4.504	3.850	3.581	2.924	3.498	.666
		control	2.184	3.609	3.590	2.373	1.708	2.693	.771
	G6P	D.H.side	.012	.014	.022	.032	.020	.020	.007
		control	.011	.009	.016	.015	.013	.013	.003
	FDP	D.H.side	.208	.127	.113	.178	.177	.161	.035
		control	.094	.096	.100	.144	.145	.116	.024
	DAP	D.H.side	.125	.208	.194	.163	.122	.162	.035
		control	.162	.173	.137	.196	.124	.158	.027
	Pyr	D.H.side	.247	.223	.215	.201	.224	.222	.015
		control	.277	.241	.285	.263	.241	.261	.018
	Lact	D.H.side	6.159	6.258	4.937	6.478	6.666	6.100	.607
		control	6.568	4.897	5.646	6.231	5.800	5.828	.568
	ATP	D.H.side	2.004	2.456	2.109	1.604	1.781	1.991	.291
		control	1.720	2.221	1.874	1.525	1.671	1.802	.237
	ADP	D.H.side	.089	.058	.092	.067	.069	.075	.013
		control	.083	.084	.105	.094	.065	.086	.013
	AMP	D.H.side	.066	.069	.055	.054	.058	.060	.006
		control	.037	.029	.025	.032	.035	.032	.004
D. 10 H. 処 置 目	Glu	D.H.side	2.337	2.696	1.654	1.361	2.426	2.095	.503
		control	3.058	3.508	3.459	2.852	3.004	3.176	.260
	G6P	D.H.side	.052	.058	.068	.081	.077	.067	.011
		control	.014	.016	.012	.021	.015	.016	.003
FDP	D.H.side	.217	.204	.208	.127	.125	.176	.041	
	control	.239	.196	.208	.197	.173	.203	.022	

D. H. 処 置 10 時 間 目	DAP	D.H.side	.084	.095	.092	.082	.074	.085	.007
		control	.144	.116	.126	.113	.123	.124	.011
	Pyr	D.H.side	.189	.150	.153	.175	.170	.167	.014
		control	.204	.192	.182	.209	.207	.199	.010
	Lact	D.H.side	8.068	8.478	7.200	8.444	7.310	7.900	.547
		control	5.516	5.933	6.900	6.425	6.567	6.268	.488
	ATP	D.H.side	1.144	1.320	1.209	.945	1.077	1.139	.126
		control	1.966	2.581	2.309	2.410	2.149	2.283	.212
	ADP	D.H.side	.234	.296	.236	.243	.220	.246	.026
		control	.220	.209	.170	.210	.158	.193	.025
	AMP	D.H.side	.053	.064	.056	.062	.063	.060	.004
		control	.054	.060	.054	.038	.043	.050	.008
D. H. 処 置 後 12 時 間 目	Glu	D.H.side	1.512	2.044	1.690	1.436	2.247	1.786	.312
		control	.980	1.150	1.080	1.238	1.081	1.106	.085
	G6P	D.H.side	.027	.031	.039	.038	.040	.035	.005
		control	.038	.022	.030	.037	.027	.031	.006
	FDP	D.H.side	.109	.099	.105	.117	.098	.106	.007
		control	.145	.127	.145	.207	.142	.153	.028
	DAP	D.H.side	.137	.105	.164	.110	.108	.125	.023
		control	.142	.103	.106	.110	.117	.116	.014
	Pyr	D.H.side	.141	.165	.206	.197	.178	.177	.023
		control	.301	.268	.273	.309	.297	.289	.016
	Lact	D.H.side	5.057	5.576	6.548	6.148	6.011	5.868	.511
		control	7.043	5.832	5.793	8.073	7.434	6.835	.897
	ATP	D.H.side	1.132	1.405	1.083	1.090	1.336	1.209	.135
		control	1.353	1.713	1.100	1.108	1.489	1.353	.233
	ADP	D.H.side	.153	.177	.145	.176	.168	.164	.013
		control	.148	.125	.111	.144	.169	.139	.020
	AMP	D.H.side	.057	.064	.048	.058	.050	.055	.006
		control	.066	.068	.023	.040	.048	.049	.017
D. H. 処 置 後 36 時 間 目	Glu	D.H.side	1.194	1.246	1.406	1.121	1.262	1.246	.094
		control	1.652	1.215	1.666	1.355	1.482	1.474	.173
	G6P	D.H.side	.014	.016	.022	.016	.015	.017	.003
		control	.008	.010	.009	.005	.007	.008	.001
	FDP	D.H.side	.174	.156	.156	.172	.165	.165	.008
		control	.162	.148	.169	.197	.170	.169	.016
	DAP	D.H.side	.032	.040	.033	.034	.035	.035	.003
		control	.050	.050	.046	.046	.048	.048	.002
	Pyr	D.H.side	.321	.289	.255	.296	.292	.290	.021
		control	.264	.278	.272	.304	.281	.280	.013
	Lact	D.H.side	6.107	4.720	4.108	6.882	5.474	5.458	.981
		control	5.959	4.822	5.694	6.772	5.822	5.814	.622
	ATP	D.H.side	1.185	.974	1.154	1.084	1.090	1.097	.073
		control	.942	1.016	1.092	.918	.995	.993	.061
	ADP	D.H.side	.140	.169	.157	.143	.156	.153	.010
		control	.076	.081	.090	.091	.087	.085	.006
	AMP	D.H.side	.045	.050	.069	.046	.051	.052	.009
		control	.040	.055	.047	.066	.050	.052	.009

± SD: Standard Deviation 単位: micromole/gram wet tissue

(5) D. H. 処置10時間目

この群では D. H. 処置側と対照側で FDP, AMP 以外の全測定物質に有意差がみられ, Glu. は 6 時間目までの変化が逆転し, 対照側の  $3.176 \pm 0.260 \mu\text{M/g}$  に比し D. H. 側で  $2.095 \pm 0.503 \mu\text{M/g}$  と低値 ( $P < 0.01$ ) を示していた. G6P は対照側  $0.016 \pm 0.003 \mu\text{M/g}$  に比し D. H. 側  $0.067 \pm 0.011 \mu\text{M/g}$  と高値 ( $P < 0.001$ ) であり, Pyr. は D. H. 側で低値 ( $0.167 \pm 0.014 \mu\text{M/g}$ ,  $P < 0.01$ ) を示し, Lact. は D. H. 側で  $7.900 \pm 0.547$

$\mu\text{M/g}$  と高値 ( $P < 0.01$ ) になっていた. エネルギー系では ATP が対照側の  $2.283 \pm 0.212 \mu\text{M/g}$  に比し D. H. 側で  $1.139 \pm 0.126 \mu\text{M/g}$  と低下 ( $P < 0.001$ ) しており, ADP は対照側の  $0.193 \pm 0.025 \mu\text{M/g}$  に対し, D. H. 側で  $0.246 \pm 0.026 \mu\text{M/g}$  と増加 ( $P < 0.05$ ) していた.

(6) D. H. 処置後12時間目

D. H. 処置側では対照側に比し Glu.,  $1.786 \pm 0.312 \mu\text{M/g}$  と高値 ( $P < 0.01$ ) を示し, FDP は対照側  $0.153$

±0.028 μM/g (P<0.05), Pyr. は対照側 0.289±0.016 μM/g, D.H. 側 0.177±0.023 μM/g (P<0.001) とそれぞれ D.H. 側で低下していた。又, Glu., ATP, ADP は両側共に正常温時よりも低値であった。

(7) D.H. 処置後36時間目

Glu. 量は, D.H. 側, 対照側共に低値で, 特に D.H. 側で 1.246±0.094 μM/g と低く, 対照側の 1.474±0.173 μM/g と有意差 (P<0.05) がある。G6P は対照側で 0.008±0.001 μM/g, D.H. 側 0.017±0.003 μM/g と高値 (P<0.001) であるが, 正常温時に比し, 対照側の方がむしろ低値にあるための差である。FDP はほぼ両側で正常温時に復している。DAP は正常温時に比して両側とも極端に低下しており, 特に D.H. 側では低値 (P<0.001) である。Pyr. は正常温時より高値であるが有意差はみられない。Lact.

があり, 対照側 0.085±0.006 μM/g に対して D.H. 側 0.153±0.010 μM/g であった。AMP は両側で正常温時よりも高値 (P<0.05) であった。

(8) L/P 比の変化 (表 2)

正常温時 26.4±2.9 から低体温時 29.4±5.0 とやや増加傾向を示し, D.H. 処置側では 3 時間目では 26.9±7.7 と正常温時と同じで, 以後 6 時間目, 10 時間目ではそれぞれ, 27.6±3.3, 47.5±5.0 と経時的に上昇し, 処置後は 12 時間目 33.3±1.7, 36 時間目 18.7±2.6 と下降する。対照側では D.H. 処置 6 時間目までは経時的に下降するが, 10 時間目では 30.8±4.7 と上昇を示していた。D.H. 処置後は 12 時間目 23.5±1.9, 36 時間目 20.8±1.9 と下降を示し, D.H. 側とは 6 時間目 (P<0.05), 10 時間目 (P<0.01), D.H. 後 12 時間目 (P<0.001) で有意の差があった。

表 2. Lactate/pyruvate ratio(L/P) と Energy Charge Potential(ECP) の経時的变化

		No.	1	2	3	4	5	Mean	SD
正常温	L/P		26.6	31.7	25.3	25.6	23.0	26.4	2.9
	ECP		.930	.927	.892	.927	.927	.921	.014
D.H. 処置 (時間)	0	L/P	37.0	26.6	24.7	25.0	33.6	29.4	5.0
		ECP	.952	.917	.916	.917	.930	.926	.014
	3	L/P	D.H. side 18.5	22.7	21.5	32.3	39.3	26.9	7.7
		control	24.4	30.1	20.7	21.4	26.5	24.6	3.4
	ECP	D.H. side	.948	.948	.955	.956	.948	.951	.004
		control	.961	.916	.943	.955	.931	.941	.016
	6	L/P	D.H. side 24.9	28.1	23.0	32.2	29.8	27.6	3.3 *
		control	23.7	20.3	19.8	23.7	24.1	22.3	1.9
	ECP	D.H. side	.949	.962	.955	.949	.952	.953	.005
		control	.957	.970	.961	.952	.962	.960	.006
	10	L/P	D.H. side 42.7	56.5	47.1	48.3	43.0	47.5	5.0 **
		control	23.0	30.9	37.9	30.7	31.7	30.8	4.7
ECP	D.H. side	.881	.874	.884	.853	.873	.873	.011***	
	control	.927	.942	.945	.946	.948	.942	.008	
処置後 (時間)	12	L/P	D.H. side 35.9	33.8	31.8	31.2	33.8	33.3	1.7 ***
		control	23.4	21.8	21.2	26.1	25.0	23.5	1.9
	ECP	D.H. side	.901	.907	.906	.890	.914	.904	.008*
		control	.911	.932	.936	.913	.922	.923	.010
	36	L/P	D.H. side 19.0	16.3	16.1	23.3	18.7	18.7	2.6
		control	22.6	17.3	20.9	22.3	20.7	20.8	1.9
ECP	D.H. side	.916	.887	.893	.908	.901	.901	.010	
	control	.926	.917	.925	.896	.917	.916	.011	

SD: Standard Deviation 対照側に対し, \*: p<.05, \*\*: p<.01, \*\*\*: p<.001,

$$ECP = \frac{ATP + .5ADP}{ATP + ADP + AMP}$$

は D.H. 側, 対照側間に差はみられないが, 正常温時よりむしろ低値 (P<0.05) である。ATP も D.H. 側, 対照側共に低値で, 正常温時と差 (P<0.01) があり, ADP も正常温時より減少 (P<0.001) している。さらに ADP は D.H. 側と対照側間にも差 (P<0.001)

(9) ECP の変化 (表 2)

正常温時 0.921±0.014 から低体温時 (D.H. 処置 0 時間) 0.926±0.014, D.H. 処置 3 時間目で D.H. 側 0.951±0.004, 対照側 0.941±0.016, 同じく 6 時間目で処置側 0.953±0.005, 対照側 0.960±0.006 と経時的に上昇しているが, D.H. 処置 10 時間目では対照側 0.942

表3. D.H. 処置による家兔正常脳の代謝物質濃度の変化

	normothermia	D.H. treatment (hour)					after D.H. treat. (hour)		
		0 (hypotherm)	3	6	10	12	36		
Glu		2.580 ± .415	3.259 ± .189 <sup>***</sup>	3.498 ± .666	2.095 ± .503 <sup>**</sup>	1.786 ± .312 <sup>**</sup>	1.246 ± .094*		
control	2.976 ± .477	1.552 ± .394	2.693 ± .771	3.176 ± .260	1.106 ± .085	1.474 ± .173			
G6P		.045 ± .012 <sup>**</sup>	.030 ± .007	.020 ± .007	.067 ± .011 <sup>**</sup>	.035 ± .005	.017 ± .003 <sup>***</sup>		
control	.021 ± .004	.022 ± .004	.013 ± .003	.016 ± .003	.031 ± .006	.008 ± .001			
FDP		.149 ± .039	.181 ± .031	.161 ± .035	.176 ± .041	.106 ± .007*	.165 ± .008		
control	.171 ± .030	.200 ± .028	.116 ± .024	.203 ± .022	.153 ± .028	.169 ± .016			
DAP		.099 ± .011*	.149 ± .029	.162 ± .035	.085 ± .007 <sup>**</sup>	.125 ± .023	.035 ± .003 <sup>***</sup>		
control	.140 ± .032	.185 ± .033	.158 ± .027	.124 ± .011	.116 ± .014	.048 ± .002			
Pyr		.234 ± .035	.185 ± .056	.222 ± .015*	.167 ± .014 <sup>**</sup>	.177 ± .023 <sup>**</sup>	.290 ± .021		
control	.265 ± .024	.199 ± .022	.261 ± .018	.199 ± .010	.289 ± .016	.280 ± .013			
Lact		6.748 ± .680	4.547 ± .414	6.100 ± .607	7.900 ± .547 <sup>**</sup>	5.868 ± .511	5.458 ± .981		
control	6.954 ± .259	4.892 ± .818	5.828 ± .568	6.268 ± .488	6.835 ± .897	5.814 ± .622			
ATP		1.900 ± .351	2.467 ± .479	1.991 ± .291	1.139 ± .126 <sup>**</sup>	1.209 ± .135	1.097 ± .073		
control	1.789 ± .278	2.002 ± .386	1.802 ± .237	2.283 ± .212	1.353 ± .233	.993 ± .061			
ADP		.173 ± .053*	.184 ± .037	.075 ± .013	.246 ± .026*	.164 ± .013	.153 ± .010 <sup>***</sup>		
control	.251 ± .021	.147 ± .031	.086 ± .013	.193 ± .025	.139 ± .020	.085 ± .006			
D.H. side		.068 ± .019*	.038 ± .007	.060 ± .006 <sup>**</sup>	.060 ± .004	.055 ± .006	.052 ± .009		
control	.036 ± .005	.050 ± .009	.032 ± .004	.050 ± .008	.049 ± .017	.052 ± .009			

\*: p&lt;.05, \*\*: p&lt;.01, \*\*\*: p&lt;.001

単位: micromole/gram wet tissue

(D.H. 0時間のみ正常温に対して, 他は対照側に対して)

$\pm 0.008$  に比し D.H. 処置側  $0.873 \pm 0.011$  と急激に低下 ( $P < 0.001$ ) している。D.H. 処置後 12 時間目では対照側  $0.923 \pm 0.010$ , D.H. 側  $0.904 \pm 0.008$  と D.H. 側で低値 ( $P < 0.05$ ) であり, 36 時間後では D.H. 側  $0.901 \pm 0.010$ , 対照側  $0.916 \pm 0.011$  となり, 両者間に差はないが, 正常温時よりも低値 ( $P < 0.05$ ) にある。

以上の結果を図示したものが図 1, 図 2 であり, 図 1 は各実験群での代謝物質濃度を同心円上に示したもので, (1)のみ正九角形に正常温時の濃度をとり, (2)~(6)はそれぞれの対照側を正九角形にとってある。(1)では正常温時の代謝物質濃度に対する D.H. 処置 0 時間 (低体温時) の各物質濃度の増減比を表わし

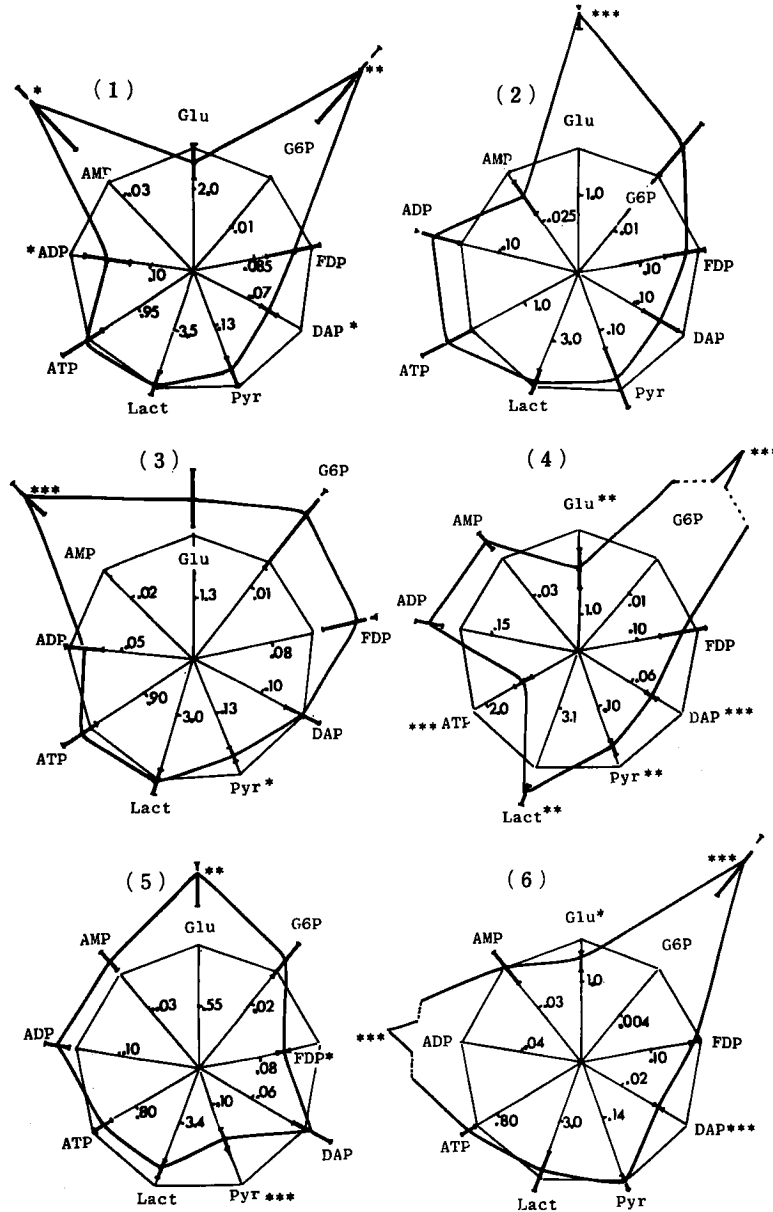


図 1. 経時的な対照側に対する代謝物質濃度比(本文参照) (1)のみ対正常温時 (1) D.H. 0 hour(hypothermia) (2) D.H. 3 hours (3) D.H. 6 hours (4) D.H. 10 hours (5) 12 hours after D.H. (6) 36 hours after D.H.

\*:  $P < .5$  \*\*:  $P < .01$  \*\*\*:  $P < .001$

ており、またそれぞれに標準偏差をつけてあるが、対照とした正三角形では繁雑を避けて標準偏差は入れていない。(2)~(6)も同様に各々 D.H. 処置 3 時間目、6 時間目、10 時間目、処置後 12 時間目、36 時間目の対照側に対する D.H. 側の物質濃度比を示している。図 2 は L/P 比、ECP の変化をグラフにしたものであり、黒丸、太い実線が D.H. 側の変化を、四角、細い実線が対照側の変化を示したもので、標準偏差を上下の線で示してある。

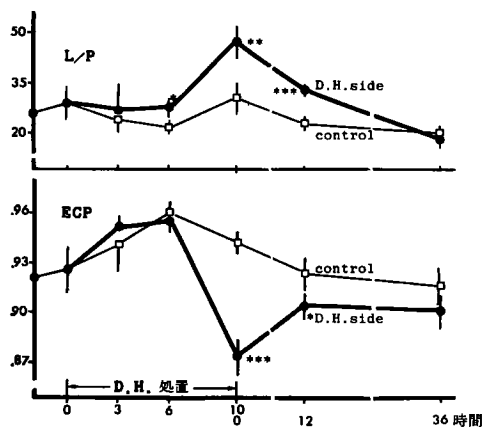


図 2. Lactate/Pyruvate ratio (L/P) と Energy Charge Potential (ECP) の経時変化

\*:  $P < .05$  \*\*:  $P < .01$  \*\*\*:  $P < .001$

## 考 按

D.H. 処置では全身が低体温下にあるので、腫瘍局所のみを正常温に維持するためには、腫瘍を加温しなければならないが、第 1 編で検討した如く、加温手段として、現時点では microwave 照射が最も実用的であると考えられ、又、浸潤性に発育した脳腫瘍にあっては、腫瘍の浸潤した正常脳の加温は避けられないところであるが、これも D.H. 処置 5 時間では組織学的には無視し得る程度の変化にすぎず、正常温に維持する限り、実験動物の正常脳組織に恒久的な変化は残さないと結論を得ている。ただこれらは、D.H. 処置 5 時間と現実と比較的容易に施行しうる条件を考慮して行なわれた実験結果であり、それ以上の長時間での変化や、またどの程度迄の処置時間が安全域かも不明のままであった。今回の実験はこれらの点を明らかにすべく行なわれたものである。

まず正常温時の結果からみると、諸家の報告<sup>6)~11)</sup>に比し、Glu. の低下と Lact. の増加、ATP の低下

がみられるが、著者の実験はいずれも自発呼吸下のものであり、諸家の如く調節呼吸を行なっていないために生ずる麻酔の影響とも思われ、事実同じ条件下の実験で、当教室の片木<sup>12)</sup>は、実験初期には  $\text{PaO}_2$ 、 $\text{PaCO}_2$  の変動が強く、後半 6 時間目以後にはこれらが安定してきており、この時点では麻酔による何らかの影響を、特に呼吸抑制による hypoxia の影響をうけているものであろうと報告している。勿論、一般に麻酔剤は代謝抑制を来し<sup>13),14)</sup>、今回の実験結果とは逆の効果をもたらすと考えられるが、本実験とは呼吸管理法が異なるため、どの程度今回得られた結果に、麻酔剤が影響を及ぼしているかは不明である。さらに Glu.、ATP の低下、Lact. の上昇を来す可能性のあるものとしては、試料採取時の autolysis<sup>8)</sup> が考えられるが、試料採取から液体窒素中に投入するまでの時間は、本実験では数秒以内であり、autolysis のみの変化<sup>6),15),16)</sup> とは考え難いと思われる。

D.H. 処置 0 時間目 (低体温時) では G6P と AMP の上昇が著明で、DAP、ADP の低下がみられる。この傾向は AMP の結果を除外すれば、ほぼ諸家の報告<sup>7),9)~11)</sup> と一致しており、FDP 以下の解糖系代謝物質の濃度の低下傾向は、fructose-6-phosphate (F6P) と FDP の間に働く phosphofructokinase (PFK) の段階での律速作用<sup>17),18)</sup> が抑制的に作用しているものと考えれば理解できる。AMP の増加がいかなる機転によって生じたものかは、はっきりしないが、AMP が hypoxia を最も敏感に反映するという報告<sup>19)</sup> もあり、この時点でもなお麻酔剤の影響による呼吸抑制や低体温への過程での脳血流量の減少 (後述) があり、hypoxia ないし、ischemia が存在している可能性はある。さらに低体温時には TCA cycle での citrate の貯溜、 $\alpha$ -ketoglutarate の著明な減少がみられており<sup>9)</sup>、TCA cycle での円滑な回転がないため、低体温下でしかも hypoxia が存在すれば、ATP 産生のために、cytoplasm 内で adenylate kinase による  $2 \text{ADP} \rightarrow \text{ATP} + \text{AMP}$  の反応が亢進し、元来少量の AMP が、見かけ上著明に増加してくるのかも知れない。ATP 量に比して ADP の濃度が低下していることは、上記推理をある程度裏付けているものと思われる。一方 ATP 量の低下がみられないことは、ATP の利用そのものは低いことを窺わせている。L/P 比は 29.4 と高くなっているが、ECP は 0.926 と比較的高値に保たれており、AMP の増加があるにせよ、エネルギー代



謝の面では、細胞にそれ程不利な状況が生じているとは思えない代謝の pattern である。

D.H. 処置 3 時間目では D.H. 処置部の脳は正常温 ( $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ) に維持されている訳であるが、全身低体温にあるため相対的には高温にあるとも言えよう。そこでまず体温上昇時の代謝に関する報告と本実験結果を比較してみる。現在までの体温上昇時の脳内代謝物質の測定結果に関しては、3 編の報告<sup>10),20),21)</sup>があるにすぎず、それらでは体温  $42^\circ\text{C}$  前後で、Glu., G6P, Lact. の上昇が一致してみられているが、Pyr. は不変或は軽度減少とするもの<sup>21)</sup>と、むしろ上昇している<sup>10)</sup>と報告しているもの<sup>21)</sup>とがあり、ATP でも不変とするもの<sup>21)</sup>と減少とするもの<sup>20)</sup>とがあり、AMP でもやはり不変とするもの<sup>21)</sup>と増加とするもの<sup>21)</sup>とがみられ、体温上昇時の脳代謝に関してはまだ一定した結果が得られていない現状である。著者の実験では D.H. 処置側の変化としては Glu. の上昇を認めるのみであったが、G6P, ATP, ADP は増加傾向にあり、FDP, DAP, Pyr., Lact., AMP は下降傾向にある。これを正常温時と比較すると Pyr., Lact. の減少と ADP の減少があり、その他には有意の差がみられない。この結果は麻酔剤による呼吸抑制や、低体温による全身代謝の変動がこの時期になるとほぼ安定した状態になっていると考えれば、Pyr., Lact., ADP の減少は理解でき、また体温上昇時の Glu., G6P, Lact. の増加といった代謝 pattern とは異なっていることから、D.H. 処置側の代謝は通常の正常温時の代謝回転に近い状態で流れていると思われる。すなわち D.H. 側が相対的に高温であっても、その代謝回転は  $37^\circ\text{C}$  での代謝回転にあることを示しているものと考えられる。

次に対照側と比較すると Glu. の上昇が目立っているが、これは相対的な高温のために脳血流量が対照側よりも増加し、Glu. の脳内取込みが相対的に増強したもの<sup>21)-23)</sup>と思われ、ATP, ADP の増加傾向からみて、代謝回転は速くなっており、対照側よりも代謝亢進の状態にあることを推測させるが、他の中間代謝物質に著しい増加や減少はみられず、代謝回転を補うに十分な供給がなされていると思われる。

D.H. 処置 6 時間目になると、Pyr. はやや低下し、Lact. 量には差はなく Glu. の消費は円滑に行なわれていると考えられる。もし代謝の低下があるなら低体温時にみられる如く、Glu. の低下、G6P の貯溜、FDP 以下の中間代謝物質の減少があつてしかるべ

きであるが、その傾向はみられず、3 時間目に引き続き代謝はやはり相対的には亢進を続けていると思われ、又 ECP 値も高く、L/P 比にも上昇はみられず、好氣的磷酸化が十分に行なわれている状態にあると考えられる。

D.H. 処置 10 時間目になると Glu. の減少、G6P の増量、DAP, Pyr. の減少、Lact. の蓄積がみられ、解糖系での代謝に歪みが生じている。Hypoxia や ischemia の実験<sup>24)-31)</sup>では Glu. の低下、G6P の上昇、F6P の減少、FDP の上昇、Pyr., Lact. の蓄積がみられているが、今回の実験では F6P を測定しておらずこの点は不明だが、一般には G6P と F6P は平衡関係にあり、この間での律速作用はないと考えられている。そこで F6P を除いて著者の実験結果をみても D.H. 処置 10 時間目の解糖系の代謝形態は Pyr. の減少を除けば、hypoxia, ischemia の pattern になっていることが解る。又、この代謝 pattern は edema の代謝 pattern<sup>32)-35)</sup>でもあり、cell damage に共通した代謝形態で、進行すればやがては壊死へと進む形である。こうした解糖系の一連の変化に対して、Lowry ら<sup>6),17)</sup>は hexokinase, PFK, pyruvate kinase の律速作用を強調し、これらの作用は逆流防止としての valve 作用ではなくて、これら酵素の作用する前後の物質濃度や adenine nucleotides 等の濃度によって、その活性が律せられ、これは上流と下流の水量で貯溜、放流を行なうダムのように近いことから、ダム作用による律速だと述べている。さらに彼等は glyceraldehyde phosphate dehydrogenase の部でも律速作用のある可能性を示唆している。著者の今回の実験結果でも G6P の貯溜がみられており、これは hexokinase の活性亢進があることを示すものと思われ、又 DAP の絶対量の低下からみて FDP から DAP への流れは aldolase の平衡反応からすれば相当速くなっていると思われるにもかかわらず FDP の量そのものは低くないことからして、hexokinase の活性亢進と同時に、これと共役する PFK の活性亢進もあると思われる。しかし、それでもなお G6P の貯溜がみられることは、PFK の処理能力以上の代謝の流れにあることを窺わせ、その処理能力を超えた分は G6P (F6P) としてプールされるといった形で律速作用が働いていると想像される。また、DAP 量の低下からみれば glyceraldehyde phosphate dehydrogenase での律速作用は働いていないと思われる。Pyr. の減少からみれば TCA cycle の回転は残存していると

思われるが、ATP量は減少し、ADP、AMP量は増加しており、エネルギー消費に対して、その産生が十分でない状況にあり、これも hypoxia, edema, ischemia 等でみられる cell damage の代謝 pattern である。片木の報告<sup>12)</sup>ではこの時の PaO<sub>2</sub> は 119.5 mmHg であり全身的な hypoxia はみられていない。結局、D.H. 処置10時間目になると、D.H. 処置局所では好氣的磷酸化が抑制され、tissue hypoxia の代謝 pattern となり、解糖系の流れが速くなるが、PFK での律速作用が強く充分なエネルギー産生ができない状態にあり、エネルギー代謝に破綻が生じていると思われる。一般に全身低体温にある場合、脳血流量は低下<sup>36)~42)</sup>を示し、Hägerdal らによれば、22°C の低体温時のそれは正常温時の約25%にまで低下しているが、この時の酸素消費率も同様の低下を来しており、むしろ脳に対しては protective effect となり得るとされている。しかし D.H. 処置では全身低体温による血流量の絶対的な減少に加え、血管透過性の亢進による脳浮腫の存在<sup>43),44)</sup> もからみ、D.H. 処置局所にこうしたエネルギー代謝の破綻が生じてきたものであろう。

D.H. 処置後12時間目では AMP 以外の全測定物質が正常温時より低下しており、これは①代謝回転が落ちているのか、②エネルギー消費が亢進しているのかが考えられる結果である。この場合 FDP の低下がみられることからすれば、Pyr. への流れは速いものと想像され、しかも Pyr., Lact. の蓄積がないことから、好氣的なエネルギー産生がなされていると思われ、エネルギー消費の亢進があることを示すものと考えられる。問題はなぜエネルギー消費が亢進しているかという点にあるが、少なくとも代謝面では脳損傷があり、その修復のために、例えば脳浮腫の回復のために Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase として消費されている<sup>33)</sup>、とみなすこともできる。

D.H. 処置後36時間目においても12時間後と似た代謝 pattern であるが、ATP の減少が目立っている。そして処置後12時間目の代謝形態は、処置側、対照側ともよく似ており、少なくとも対照側でも代謝面では損傷を受けていることを示している。これは低体温10時間という長時間の負荷が脳損傷を生じた、すなわち Mendler<sup>45)</sup> も述べている如く、Na<sup>+</sup> の transport に温度依存性があり、低体温では組織内の Na が水と共に増加し、cold swelling を来し、低体温に経過してきた対側脳に浮腫を生じてきた可能性も考えられる。いずれにしても D.H. 処置後36

時間目では、まだその代謝は正常状態にまでは復しておらず、エネルギー消費量が産生量を上回っている状態である。しかし L/P 比は完全に回復しており、また代謝機能の回復の示標として、Lact. 量の低下、Pyr. 量の増加、ECP の増加がみられること、一方回復のないものは Lact. の上昇、ECP の低下が続くとされており<sup>28)</sup>、今回の結果は、回復への代謝 pattern であり、やがては正常化すると予想される。

図2にみる如く、L/P 比、ECP の変化でも D.H. 処置10時間目では、L/P 比は上昇し解糖系の亢進を示し、しかも ECP は急に低下しエネルギー消費が産生を凌いでいることを表している。この変化が D.H. 処置後は旧に復しつつあり、回復可能な変化であることを窺わせている。

低体温により代謝が低下すれば、低酸素下にあっても生体は保護される (protective effect) との推測は以前からあったが、特に酸素に鋭敏な脳組織での低体温時の代謝には、比較的多くの報告がある<sup>46)~54)</sup>。もともと differential hypothermia という言葉自体が、Jensen<sup>55)</sup> らが全身体温に比して脳温のみを下降させて、脳への血流を遮断した場合、脳は通常温時に比して長時間損傷から守られると報告したことに始まる。Popovic の使用した differential hypothermia では全身低体温、局所正常温であり、Jensen らの脳低温とは反対の状況をさしているが、当教室では腫瘍治療の立場から、Popovic の使用した意味で D.H. という言葉を使用してきた。言葉の意味はともかくとして、D.H. 処置とは結局低体温による protective effect を生体の一部 (腫瘍部) にとり除くことと理解できる。ここで protective effect とはどのような機序によって生ずるものであるかが問題となる。この問題への最初の解答を試みたのは、Field ら<sup>56)</sup> で、彼等はラットの脳切片を用いて、種々の温度下で酸素消費量を測定し、温度低下につれて、酸素消費量も低下することを報告している。その後、Rosomoff ら<sup>36)</sup>、Stone ら<sup>57)</sup>、Bering<sup>40)</sup>、Cohen ら<sup>38)</sup>、Michenfelder ら<sup>39)</sup>、Hägerdal ら<sup>41),42)</sup> の報告が続き、その結果 22—37°C の温度域では温度と酸素消費量にはほぼ直線関係があり、温度 1°C の低下につき、約 5% の酸素消費量の低下があるとされている。さらに Michenfelder らの結果では Glu. の消費もこれに見合った減少を示している。脳血流量に関しても低体温で減少するが<sup>39),55)</sup>、減少率は動脈血中の炭酸ガス濃度が関与して大きく変化する<sup>42)</sup> とされている。低体温中の脳代謝物質の測定では

ATP, ADP, AMP量は変化しないとされ, phosphocreatineの著明な上昇をみた報告<sup>20),58)</sup>と10%以内の上昇をみた報告<sup>9)</sup>があるが, いずれにしても低体温によりエネルギー系での蓄積が生じており, これが protective effect につながるという結果ではない. 低体温時の組織内 Glu. 量は全ての報告で低下しており<sup>7),9)-11)</sup>, もし Glu. 消費が低下していれば組織内 Glu. は貯溜して増加傾向を示してもよいのだが, 低下を示すことは, Glu. の組織内取り込みに, 低体温が抑制的に働くのではないかと推測がなされている<sup>9)</sup>. 他の解糖系中間代謝物質では G6P の上昇<sup>20)</sup>, 或は不変<sup>9)</sup>と FDP, Pyr., Lact. の低下がみられている. こうした一連の低体温時の代謝の研究から, その protective effect は, ①低体温が酸素—ヘモグロビン解離曲線を左方に移動させ, 比較的低い酸素濃度でも酸素供給がなされる, ②脳酸素消費量の低下(細胞のエネルギー必要量の低下)によって細胞レベルでの低酸素に対する防禦をなし得ることによると, Carlssonら<sup>11)</sup>は結論している. 今回の実験では, D.H. 処置10時間目ではエネルギー代謝に歪みを生じ, その破綻を窺わせ, しかも処置後36時間目でもなお正常に復していないのであるが, これが加温に基く血管の透過性亢進に伴う脳浮腫から生ずるにしても, 或は純粹に全身の低代謝下における局所の相対的代謝亢進からくる破綻であるにしても, protective effect からはずされた正常脳は, tissue hypoxia の代謝 pattern にあるといえる. また, 家兎 Vx2 移植腫瘍に対して, D.H. 処置を施した教室の片木の実験<sup>12)</sup>でも, D.H. 処置10時間目, やはり tissue hypoxia を示しており, D.H. 処置の抗腫瘍効果に tissue hypoxia が何らかの役割を演じている可能性を示唆している. D.H. 処置の抗腫瘍効果に tissue hypoxia が必要ならば, D.H. 処置に必要とする時間は, 代謝に変動を来す6時間目から10時間目までの間の時間となる. また, 家兎正常脳に D.H. 処置を行ない, 解糖系及びエネルギー系の代謝物質の変動からみた今回の実験結果でみる限り, D.H. 処置10時間目でみられた代謝の破綻も可逆的なものであり, 10時間の D.H. 処置でも安全に行なうというと思われた. ただしこれは, 全てに正常と思われる家兎脳での実験結果であり, 現実のヒト脳腫瘍にあっては, 腫瘍浸潤部脳組織には浮腫が存在する等, 既に病的脳に陥っているため, この実験結果をそのまま当てはめるわけには行かないであろう.

## 結 論

家兎を直腸温23℃の全身低体温とし, 正常脳の一部に加温のため, 2.45 GHz の microwave を照射して正常温(37±1℃)に維持する differential hypothermia (D.H.) 処置を行ない, 経時的に脳内代謝物質を測定し, その変化を検討した. 試料は正常温時, D.H. 処置0, 3, 6, 10時間目, 及び10時間の D.H. 処置後12, 36時間目で採取し, 酵素法にて解糖系の6種(d-glucose, glucose-6-phosphate, fructose-1, 6-diphosphate, dihydroxyacetone phosphate, pyruvate, lactate)と adenine nucleotide の3種(ATP, ADP, AMP), 計9種の代謝物質を定量した. また測定結果から lactate/pyruvate比(L/P比)と energy charge potential (ECP)を算出した. その結果, ①正常温時の L/P比は26.4, ECPは0.921であった. ②D.H. 処置6時間目までは, D.H. 処置側脳では低体温下にある対照脳に比し, 相対的な代謝亢進を示し, 6時間目の処置側でのL/P比は, 27.6, ECPは0.953であった. ③D.H. 処置10時間目では, glucoseは低下し, G6Pは著明に増加しており, L/P比も上昇していた. ④同じく10時間目では ATPの減少, ADP, AMPの増加がみられ, このため ECPは0.873に下降していた. ⑤D.H. 処置後36時間では L/P比は18.7と正常温時よりも低くなるまでに回復しており, ECPは0.901と完全ではないが正常温時に近い値にまで復していた. この結果は, D.H. 処置6時間目までの正常脳での代謝は, 対照側より亢進してはいるものの, 円滑に行なわれており, これが10時間目になると, tissue hypoxia の代謝 pattern となり, 解糖系の亢進と, エネルギー代謝面での破綻を来してくることを示している. しかし, D.H. 処置10時間目のこの変化は, 処置後の代謝状態からみて, 可逆的なものであると考えられた. 結局, 家兎脳での解糖系及びエネルギー系代謝物質の変動からみる限りでは, 正常脳に対する10時間の D.H. 処置は, 実験動物では安全に行ない得ることが示唆された.

稿を終るに臨み, 終始御懇篤なる御指導, 御校閲を賜りました恩師西本詮教授に深甚なる謝意を捧げます. また, 本研究に御指導, 御助言を頂きました当教室の田淵和雄博士はじめ, 諸先生, 諸氏諸嬢に感謝致します. なお本論文の要旨は第32回日本脳神経外科学会(昭和48年, 福岡)にて発表した.

また本研究は厚生省がん研究助成金の援助を受けた

## 文 献

1. Popovic, V.P., and Masironi, R.: Disappearance of euthermic tumors after 10-hour generalized hypothermia. *Life Sci.* **4**, 533-543, 1965.
2. Gellhorn, E.: Oxygen deficiency, carbon dioxide and temperature regulation. *Am. J. Physiol.*, **120**, 190-194, 1937.
3. Popovic, P. and Popovic, V.P.: Protective effects of differential hypothermia, In *Depressed Metabolism*, ed. X.J. Musacchia, and J.F. Sanders, American Elsevier Publishing Co., New York, pp. 499-524, 1969.
4. Slein, M.W.: D-glucose. Determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. 117-123, Hohorst, H.J.: D-glucose-6-phosphate and d-fructose-6-phosphate. Determination with glucose-6-phosphate dehydrogenase and phosphoglucose isomerase. 134-138, Bücher, T., Hohost, H.J.: Dihydroxyacetone phosphate, fructose-1, 6-diphosphate and d-glyceraldehyde-3-phosphate. Determination with glycerol-1-phosphate dehydrogenase, aldolase and triosephosphate isomerase. 246-252, Bücher, T., Czok, R., Lamprecht, W., Latzko, E.: Pyruvate. 253-259, Hohorst, H.J.: L-(+)-lactate. Determination with lactic dehydrogenase and DPN. 266-270, Lamprecht, W., Trautschold, I.: Adenosine-5'-triphosphate. Determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. 543-551, Adam, H.: Adenosine-5'-diphosphate and adenosine-5'-monophosphate. 573-577, In *Methods of Enzymatic Analysis*, ed. H.U. Bergmeyer, Academic Press, New York, 1963.
5. Atkinson, D.E.: The energy Charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry* **7**, 4030-4034, 1968.
6. Lowry, O.H., Passonneau, J.V., Hasselberger, F.X. and Schulz, D.W.: Effect of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain. *J. Biol. Chem.* **239**, 18-30, 1964.
7. Sarajas, H.S.S., Oja, H. and Oja, S.S.: Variables influencing the energy metabolism of the brain in normo-and hypothermia. *Ann. Med. Exp. Fenn.* **46**, 547-551, 1968.
8. Pontén, U., Ratcheson, R.A. and Siesjö, B.K.: Metabolic changes in the brains of mice frozen in liquid nitrogen. *J. Neurochem.* **21**, 1121-1126, 1973.
9. Hägerdal, M., Harr, J. and Siesjö, B.K.: Effect of hypothermia upon organic phosphates, glycolytic metabolites, citric acid cycle intermediates and associated amino acid in rat cerebral cortex. *J. Neurochem.* **24**, 743-748, 1975.
10. Nilsson, L., Kogure, K. and Busto, R.: Effects of hypothermia and hyperthermia on brain energy metabolism. *Acta Anaesth. Scand.* **19**, 199-205, 1975.
11. Carlsson, C., Hägerdal, M. and Siesjö, B.K.: Protective effect of hypothermia in cerebral oxygen deficiency caused by arterial hypoxia. *Anesthesiology* **44**, 27-35, 1976.
12. 片木良典：家兔 Vx2 移植腫瘍の代謝におよぼす differential hypothermia 処置の影響。岡山医学会雑誌, **90**, 765-783, 1978.
13. Folbergrová, J., Lowry, O.H. and Passonneau, J.V.: Changes in metabolites of energy reserves in individual layers of mouse cerebral cortex and subjacent white matter during ischemia and anaesthesia. *J. Neurochem.* **17**, 1155-1162, 1970.
14. MacMillan, V. and Siesjö, B.K.: The effect of phenobarbitone anaesthesia upon some organic phosphates, glycolytic metabolites and citric acid cycle-associated intermediates of the rat brain. *J. Neurochem.* **20**, 1669-1681, 1973.
15. Kirsch, W.M. and Leitner, J.W.: Glycolytic metabolites and co-factors in human cerebral cortex and white matter during complete ischemia. *Brain Res.* **4**, 358-368, 1967.

16. Kirsch, W.M. and Schulz, D.: Anaerobic energy metabolism of brain and neoplasm. In *The Experimental Biology of Brain Tumors*, ed. W.M. Kirsch, E.C. Paoletti and P. Paoletti, Charles C. Thomas, Publisher, Springfield, Illinois, pp. 275-298, 1972.
17. Lowry, O.H. and Passonneau, J.V.: The relationships between substrates and enzymes of glycolysis in brain. *J. Biol. Chem.* **239**, 31-42, 1964.
18. Schwark, W.S., Singhal, R.L. and Ling, G.M.: Metabolic control mechanisms in mammalian systems. Regulation of key glycolytic enzymes in developing brain during experimental cretinism. *J. Neurochem.* **19**, 1171-1182, 1972.
19. Minard, F.N. and Davis, R.V.: The effects of electroshock on the acidsoluble phosphates of rat brain. *J. Biol. Chem.* **273**, 1283-1289, 1962.
20. Goldberg, N.D., Passonneau, J.V. and Lowry, O.H.: Effects of changes in brain metabolism on the levels of citric acid cycle intermediates. *J. Biol. Chem.* **241**, 3997-4003, 1966.
21. Carlsson, C., Hägerdal, M. and Siesjö, B.K.: The effect of hyperthermia upon oxygen consumption and upon organic phosphates, glycolytic metabolites, citric acid cycle intermediates and associated amino acids in rat cerebral cortex. *J. Neurochem.* **26**, 1001-1006, 1976.
22. Nemoto, E.M. and Frankel, H.M.: Cerebral oxygenation and metabolism during progressive hyperthermia. *Am. J. Physiol.* **219**, 1784-1788, 1970.
23. Hales, J.R.S.: Effects of exposure to hot environments on total and regional blood flow in the brain and spinal cord of the sheep. *Pflügers Arch.* **344**, 327-337, 1973.
24. Ljunggren, B., Schutz, H. and Siesjö, B.K.: Changes in energy state and acid-base parameters of the rat brain during complete compression ischemia. *Brain Res.* **73**, 277-289, 1974.
25. Ljunggren, B., Ratcheson, R.A. and Siesjö, B.K.: Cerebral metabolic state following complete compression ischemia. *Brain Res.* **73**, 291-307, 1974.
26. Folbergrová, J., Ljunggren, B., Norberg, K. and Siesjö, B.K.: Influence of complete ischemia on glycolytic metabolites, citric acid cycle intermediates, and associated amino acids in the rat cerebral cortex. *Brain Res.* **80**, 265-279, 1974.
27. Levy, D.E. and Duffy, T.E.: Effect of ischemia on energy metabolism in the gerbil cerebral cortex. *J. Neurochem.* **24**, 1287-1289, 1975.
28. Kleihues, P., Hossmann, K.A., Pegg, A.E., Kobayashi, K. and Zimmermann, V.: Resuscitation of the monkey brain after one hour complete ischemia. III. Indications of metabolic recovery. *Brain Res.* **95**, 61-73, 1975.
29. Mršulja, B.B., Mršulja, B.J., Ito, U., Walker, J.T.Jr., Spatz, M. and Klatzo, I.: Experimental cerebral ischemia in mongolian gerbils. II. Changes in carbohydrates. *Acta Neuropathol, Suppl.* **33**, 91-103, 1975.
30. Hakim, A.M., Moss, G. and Gollomp, S.M.: The effect of hypoxia on the pentose phosphate pathway in brain. *J. Neurochem.* **26**, 683-688, 1976.
31. Siesjö, B.K.: Metabolism and flow in the hypoxic brain. *Eur. Neurol.* **6**, 43-48, (1971/72).
32. 遠藤辰一郎, 大野安春: 実験的外傷脳のアミン酸量に及ぼす ATP 並びに AMP の影響. *脳と神経*, **12**, 673-677, 1960.
33. 瀬田喜一郎: 脳腫脹発生に対するエネルギー代謝障害の役割について, *日本外科宝函*, **36**, 224-241, 1967.
34. Reulen, H.J., Medzihradsky, F., Enzenback, R., Marguth, F. and Brendel, W.: Electrolytes, fluids, and energy metabolism in human cerebral edema. *Arch. Neurol.* **21**, 517-525, 1969.
35. Schmiedek, P., Baethmann, A., Sippel, G., Oettinger, W., Enzenback, R., Marguth, F. and Brendel, W.: Energy state and glycolysis in human cerebral edema. The application of a new freeze-stop

- technique. *J. Neurosurg.* **40**, 351-364, 1974.
36. Rosomoff, H.L. and Holaday, D.A.: Cerebral blood flow and cerebral oxygen consumption during hypothermia. *Am. J. Physiol.* **179**, 85-88, 1954.
  37. Bering, E.A., Jr.: Effect of body temperature change on cerebral oxygen consumption of the intact monkey. *Am. J. Physiol.* **200**, 417-419, 1961.
  38. Cohen, P.J., Wollman, H., Alexander, S.C., Chase, P.E. and Behar, M.G.: Cerebral carbohydrate metabolism in man during halothane anesthesia. *Anesthesiology* **25**, 185-191, 1964.
  39. Michenfelder, J.D. and Theye, R.A.: Hypothermia: Effect on canine brain and whole-body metabolism. *Anesthesiology* **29**, 1107-1112, 1968.
  40. Bering, E.A., Jr.: Effects of profound hypothermia and circulatory arrest on cerebral oxygen metabolism and cerebrospinal fluid electrolyte composition in dogs. *J. Neurosurg.* **39**, 199-205, 1974.
  41. Hägerdal, M., Harp, J., Nilsson, L. and Siesjö, B.K.: The effect of induced hypothermia upon oxygen consumption in the rat brain. *J. Neurochem.* **24**, 311-316, 1975.
  42. Hägerdal, M., Harp, J.R. and Siesjö, B.K.: Influence of changes in arterial Pco<sub>2</sub> on cerebral blood flow and cerebral energy state during hypothermia in the rat. *Acta Anaesth. Scand. Suppl.* **57**, 25-33, 1975.
  43. 近藤裕之, Baldwin, M.: 脳の profound differential cooling 下における透過性亢進に関する研究—特に脳温及び流入血温間の difference と臨床的应用に関して, 第30回日本脳神経外科学会抄録 **30**, 102, 1971.
  44. 菅健: Differential hypothermia 下における脳血管透過性亢進に関する研究. 岡山医学会雑誌 **85**, 103-113, 1973.
  45. Mandler, N.: Elektrolyt- und Metabolitveränderungen im Gehirn der Ratte nach Kühlung auf 4-2°C mit einer Herzlungenmaschine. *Z. ges. Exp. Med.* **146**, 206-225, 1954.
  46. Wynn, V.: Electrolyte disturbances associated with failure to metabolise glucose during hypothermia. *Lancet* **18**, 575-578, 1954.
  47. Woodhall, B., Reynolds, D.H., Mahaley, S., Jr. and Sanders, A.P.: The physiologic and pathologic effects of localized cerebral hypothermia. *Ann. Surg.* **147**, 673-689, 1958.
  48. Severinghaus, J.W.: Respiration and hypothermia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **80**, 384-394, 1959.
  49. Kramer, R.S., Sanders, A.P., Lesage, A.M., Woodhall, B., Sealy, W.C. and Durham, N.C.: The effect of profound hypothermia on preservation of cerebral ATP content during circulatory arrest. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **56**, 699-709, 1968.
  50. Hurwitz, B.S. and Walfson, S.K., Jr.: Brain lactate in anoxia and hypothermia: Relationship to brain viability. *Exp. Neurol.* **23**, 426-434, 1969.
  51. Reeves, R.B.: Role of body temperature in determining the acid-base state in vertebrates. *Fed. Proc.* **28**, 1204-1208, 1969.
  52. 村瀬活郎: 極低温法: 頭部遊離による脳血流遮断許容時間の限界, 脳糖代謝の検討. 慶応医学 **46**, 281-294, 1969.
  53. Volkert, W.A. and Musacchia, X.J.: Blood gases in hamsters during hypothermia by exposure to He-O<sub>2</sub> mixture and cold. *Am. J. Physiol.* **219**, 919-922, 1970.
  54. Turinsky, J., Mukherji, B. and Sloviter, H.A.: Effects of induced hypothermia on amino acids and glycogen in rat brain. *J. Neurochem.* **18**, 233-235, 1971.
  55. Jensen, J.M. and Parkins, W.M.: Brain tolerance to differential hypothermia and circulatory occlusion. *Fed. Proc.* **13**, 75, 1954.
  56. Field, J., 2nd., Fuhrman, F.A. and Martin, A.W.: Effect of temperature on the oxygen consumption of brain tissue. *J. Neurophysiol.* **7**, 117-126, 1944.

57. Stone, H.H., Donnelly, C. and Frobese, A.S.: The effect of lowered body temperature on the hemodynamics and metabolism of man. *Surg. Gynecol. Obst.* **103**, 313-317, 1956.
58. Brunner, E.A., Passonneau, J.V. and Molstad, C.: The effect of volatile anaesthetics on levels of metabolites and on metabolic rate in brain. *J. Neurochem.* **18**, 2301-2316, 1971.

## Experimental study of safety limits in differential hypothermia Part 2. Metabolic effects on normal rabbit brains

Komei IKEDA

Department of Neurological Surgery, Okayama University Medical School

(Director : Prof. A. Nishimoto)

Differential hypothermia (D.H.) treatment was performed on normal rabbit brains and the associated changes in cerebral metabolism were observed in series. Under generalized body hypothermia (rectal temperature; 23 °C), a portion of normal brain was maintained at normothermia ( $37 \pm 1$  °C) by heating with microwave irradiation (2.45GHz). Brain tissues were sampled as follows; before treatment, at the beginning, 3, 6 and 10 hours later, and finally 12 and 36 hours after completion of the 10 hour-treatment. Five rabbits were studied in each group to be 35 as a total sum. In each rabbit, two samples; one from the normothermic portion and one from the hypothermic portion, were obtained. By using enzymatic analysis, six glycolytic metabolites (glucose, glucose-6-phosphate, fructose-1,6-diphosphate, dihydroxyacetone phosphate, pyruvate, lactate) and three adenine nucleotides (ATP, ADP, AMP) were investigated quantitatively. From these results, the ratio of lactate and pyruvate (L/P ratio) and energy charge potential (ECP) were calculated.

Before the treatment, the L/P ratio was 26.4 and ECP was 0.921. Up to 6 hours after the beginning, the metabolic status in the normothermic portion was relatively higher than the hypothermic portion. Namely, L/P ratio and ECP in the normothermic portion reached 27.6 and 0.953 respectively. On the completion of the 10 hour-treatment, however, glucose decreased considerably. While G6P increased markedly associated with a L/P ratio of 47.5. Similarly ATP was decreased, while ADP and AMP were increased, therefore ECP decreased to 0.873. These data indicated tissue hypoxia. On the other hand, 36 hours after the treatment, the L/P ratio recovered completely to 18.7, ECP also recovered to 0.901.

These results indicated that metabolism in the normothermic portion was smooth up to 6 hours duration of treatment, although it was constantly higher than the hypothermic portion. On the completion of the 10 hour-treatment, increase of glycolysis by tissue hypoxia and failure of energy metabolism were observed. However, these changes were considered still reversible because the results obtained after the treatment indicated reasonable recovery. Therefore it was suggested that 10 hour-differential hypothermia treatment on the normal rabbit brains was safe from a viewpoint of glycolytic and energy metabolism.