

## 幼若動物における脳の低酸素、虚血に対する抵抗性に関する実験的研究

籠田 仁樹

乳幼児の脳は低酸素や虚血に対し抵抗性を有すると言われるが、その原因は明らかではない。そこで幼若動物を用い、低酸素および虚血に対する脳の抵抗性とその要因について検討した。方法：マウスを用い低酸素における生存時間、断頭による下顎呼吸の持続時間 (gaspig movement time : GMT) の測定を行った。また砂ネズミを用い遅発性神経細胞壊死 (delayed neuronal death : DND) による海馬 CA1 細胞の残存率を検討した。更に低酸素下の乳酸、ピルビン酸、LDH, superoxide dismutase (SOD) の測定、GMT, DND に対する低体温の影響を検討した。結果：1) 幼若なほど低酸素や虚血に抵抗性を示した。2) 幼若マウスの低酸素負荷、完全脳虚血において抵抗性の消失する時期は、各々 3, 5 週齢で、砂ネズミの一過性脳虚血による DND に関しては、6 週齢であった。3) 低酸素下の乳酸、ピルビン酸、LDH の代謝、SOD の反応が成熟、幼若マウスでは、異なっていた。4) 低体温により GMT は、成熟、幼若マウスとも延長した。5) DND モデルにおいて低体温により海馬 CA1 細胞は保護されたが、幼若砂ネズミに特異的ではなかった。考察：幼若動物は、低酸素や虚血に対し抵抗性を有し、要因として低酸素下の脳代謝、SOD の反応の違いが関与していると考えられた。低体温は、脳保護効果を示すが、幼若動物に特異的ではなかった。

(平成 6 年 2 月 28 日採用)

### Brain Tolerance against Hypoxia and Ischemia in Young Animals and its Reasons

Yoshiki Komorita

It is well known that young animals have tolerance against hypoxia and ischemia, but the reasons for this tolerance are not clearly understood. Therefore we carried out a study to demonstrate the tolerance of young animals against hypoxia and ischemia and to determine the reasons for this tolerance.

Method : We measured the survival time following hypoxia and the gasping movement time (GMT) in young mice, and counted the hippocampus CA1 cells following delayed neuronal death (DND) in young gerbils. Brain metabolism was determined by measuring pyruvic acid, lactic acid and lactic dehydrogenase changes after hypoxia and by measuring superoxide dismutase (SOD) after anoxia in mice. The effect of hypothermia was determined by measuring GMT in young and adult mice and DND in young and adult gerbils.

Results: In young mice, survival times following hypoxia and ischemia were longer than those for adult mice, and GMT was also longer than in adult mice. In DND, hippocampus CA1 cells still remained in young gerbils. With regard to brain metabolism, lactic acid did not increase but LDH did in young mice. In adult mice, lactic acid increased but LDH did not increase. The SOD level of adult mice decreased with anoxia. As for the effect of hypothermia, young mice tended to show a decrease in body temperature faster than adult mice. Changes in GMT and DND, however, were similar to those in adults.

Conclusion: The results of the present study demonstrated that young animals have tolerance against hypoxia and ischemia. The differences in brain metabolism and in the SOD reaction to anoxia in young and adult mice suggest one reason for the young animals' tolerance; hypothermia has a protective effect against brain hypoxia and ischemia. However, there are also some other reasons for this tolerance in young animals. (Accepted on February 28, 1994) *Kawasaki Igakkaishi* 20(2): 101-108, 1994

**Key Words** ① Tolerance against hypoxia and ischemia  
 ② Young animal ③ Delayed neuronal death  
 ④ Hypothermia ⑤ Brain metabolism

## はじめに

来院時心肺機能停止症例において、乳幼児は、成人に比べ心停止時間が長くても脳機能の回復がよいと言われている<sup>1)~4)</sup>。川崎医科大学救命救急センターにおいても、来院時心肺機能停止症例のうち完全社会復帰症例では、乳幼児の平均推定心停止時間は $32.5 \pm 7.4$ 分、成人では $12.4 \pm 3.2$ 分と成人例に比べて乳幼児の平均推定心停止時間が長いことを認めている。しかしその機序については、未だ明らかにされていない。また幼若動物の脳が低酸素や虚血に対して抵抗性があることは認められているが、その抵抗性が成熟することによって消失する時期については、明らかにされていない。そこで今回、マウス、砂ネズミを用いて幼若動物の脳の低酸素および虚血に対する抵抗性と抵抗性が消失する時期について、更にその機序を知るため抵抗性の要因と考えられる2,3の因子について検討を行った。

## 実験1 幼若動物の低酸素および虚血に対する抵抗性について

### 目 的

幼若動物における低酸素や虚血に対する脳の抵抗性は、Himwichら<sup>5)</sup>のラットの断頭実験、吉岡<sup>6)</sup>の無酸素下におけるマウスの生存時間の実験でも報告されている。しかし抵抗性が消失し、成熟動物へ移行する時期を明らかにしたものはない。そこでマウス、砂ネズミを用い、低酸素、完全脳虚血、一過性脳虚血に対する抵抗性とその抵抗性が消失する時期について検討を行った。

各々の抵抗性の判定は、低酸素は生存時間、完全脳虚血は断頭による下顎呼吸の持続時間(gasping movement time: GMT)、一過性脳虚血は遅発性神経細胞壊死(delayed neuronal death: DND)モデルでの海馬CA1細胞の残存数で行った。

### 方 法

#### 1) 低酸素に対する抵抗性

生後1日齢、1週齢、2週齢、3週齢、4週齢、5週齢、6週齢のマウス(Slc, ddy) 8匹

を各々一群とし、低酸素 (O<sub>2</sub>:N<sub>2</sub> = 4:96) を 4l/min で 2.5l のチャンバーに流し、マウスの生存時間を測定した。また無酸素 (N<sub>2</sub> 100%) にして同様の実験を行った。生存時間は、チャンバーにマウスを入れてから強直性痙攣後の呼吸停止までとした。

2) 完全脳虚血に対する抵抗性

生後1日齢、1週齢、2週齢、3週齢、4週齢、5週齢、6週齢のマウス8匹を各々一群とし、断頭を行った。抵抗性の判定は、断頭から下顎呼吸の停止までの時間(GMT)をもって判定した。

3) 一過性脳虚血に対する抵抗性

4, 5, 6, 週齢の砂ネズミ5匹を各々一群とし、前脳虚血後の遅発性神経細胞壊死(DND)の出現を観察した。DNDは、エーテル麻酔下に頸部を正中切開し、両側総頸動脈を剥離した後、ZENのクリップで20分間の血流遮断を行うことにより作成した(室温22°C)。血流再開確認後、創を閉鎖し、福田ら<sup>7)</sup>の方法にしたがい4日後に脳の灌流固定を行った。その後脳標本を海馬を含む4μmの切片とし、Hematoxiline and eosine (HE)染色を行った。抵抗性の判定は、1000倍(10×100)の光顕下一視野中の海馬CA1の細胞数を測定し、同週齢の手術を行っていない対照群の細胞数を100%とし、残存細胞数を比較することにより行った。

結 果

1) 低酸素に対する抵抗性

低酸素 (O<sub>2</sub>:N<sub>2</sub> = 4:96) においては、1日齢、1週齢、2週齢では、負荷1時間後においても死亡する事はなかったが、3週齢以降のマウスでは生存時間(154.8±23.0秒)に有意な差を認めなかった。無酸素下(N<sub>2</sub> 100%)における生存時間は、1日齢では2100.0±358.6秒、1週齢では200.1±31.5秒、2週齢では83.0±25.0秒で、生後日数が短いほど抵抗性を示した。3週齢では、41.6±2.5秒であり、それ以降は生存時間に著変を認めなかった (Fig. 1)。

2) 完全脳虚血に対する抵抗性

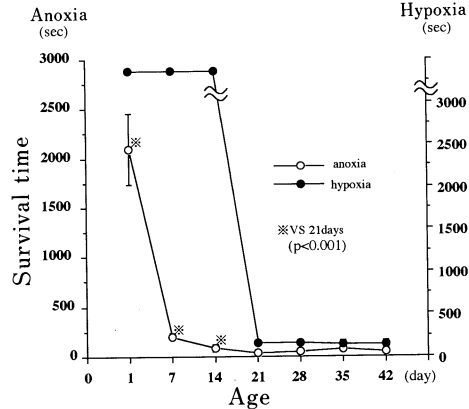


Fig. 1. Survival time following hypoxia (O<sub>2</sub>:N<sub>2</sub> = 4:96) and anoxia (N<sub>2</sub> 100%) in mice. There was a significant difference between mice that survived for 1-14 days and those that survived for 21 days. (t-test: p<0.001) Each group consists of 8 mice.

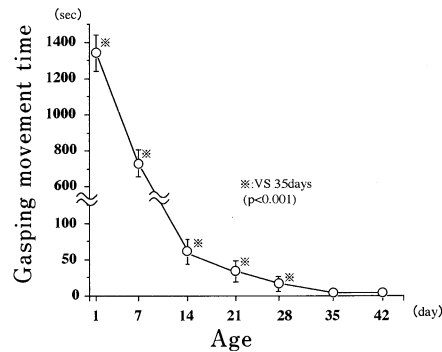


Fig. 2. Gasping movement time in mice. There was a significant difference between mice that survived for 1-28 days and those that survived for 35 days. (t-test: p<0.001) Each group consists of 8 mice.

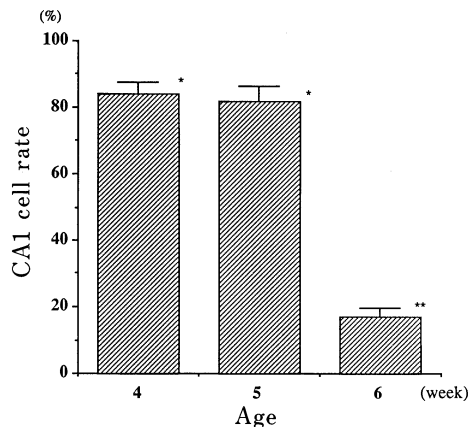


Fig. 3. Delayed neuronal death as indicated by the number of hippocampus CA1 cells in gerbils. There was a significant difference between gerbils that 4, 5 weeks and those that 6 weeks. (t-test: P<0.001) Each group consists of 5 gerbils.

断頭による完全脳虚血における GMT は、1日齢では $1341.0 \pm 101.0$ 秒、1週齢では $732.0 \pm 77.0$ 秒、2週齢では $27.0 \pm 3.0$ 秒と生後日数が短いほど長かった。5週齢 ( $15.6 \pm 0.5$ 秒)以降は、GMT に有意な差を認めなかった (Fig. 2)。

### 3) 一過性脳虚血に対する抵抗性

4, 5, 6週齢の砂ネズミの海馬 CA1 細胞の DND は、対照群を100%として各々  $84.2 \pm 3.4\%$  (細胞数は  $72.0 \pm 2.9$ 個),  $81.8 \pm 4.5\%$  ( $63.0 \pm 3.5$ 個),  $19.2 \pm 2.1\%$  ( $16.3 \pm 1.2$ 個)と6週齢で急速に減少した (Fig. 3)。

### 実験1におけるまとめ

実験1において幼若動物では、低酸素 (無酸素)、完全脳虚血、一過性脳虚血に対して各々抵抗性を有した。またマウスの低酸素 (無酸素)、完全脳虚血、砂ネズミの一過性脳虚血における抵抗性消失時期は、3週齢、5週齢、6週齢であった。

## 実験2 低酸素抵抗性の要因について

### 目的

実験1において幼若動物の脳は、低酸素、虚血に対して抵抗性を有することが明らかとなった。実験2では、その要因について検討した。

幼若動物の低酸素抵抗性について久永ら<sup>8)</sup>は、エネルギー代謝が低いことをラット胎児を用いた実験で述べている。また Joan ら<sup>9)</sup>は、羊と猿を用いた実験で体温の低下が幼若動物の抵抗性の要因であると述べている。そこで今回は、低酸素下における脳代謝、虚血に対する低体温の影響を検討した。脳代謝に関しては、低酸素による脳組織内の乳酸、ピルビン酸、lactic dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD) の変化を、低体温に関しては、低体温による GMT 及び DND の変化を検討した。

### 方法

#### 1) 低酸素下における脳代謝

生後1日齢、6週齢のマウス (Slc, ddy) 8匹ずつを1群とし、低酸素 ( $O_2 : N_2 = 4 : 96$ ) 負荷を 30, 60, 90, 120秒間行った。各々の負

荷直後に脳を摘出し、脳組織内の乳酸、ピルビン酸、LDH を酵素法、比色法にて測定した。

#### 2) 低酸素に対する SOD の反応

1)と同様のマウス8匹を1群とし、無酸素 ( $N_2$ , 100%) を30秒間負荷した後、脳を摘出し、脳組織内の SOD を亜硝酸法にて測定した。

#### 3) 虚血に対する低体温の影響

##### ① 0°Cにおける体温の変化

4週齢と10週齢のマウス (Slc, ddy) を一群8匹とし、室温0°Cの部屋で1, 1.5, 2時間放置し、体温の変化を直腸温にて測定した。

##### ② GMT に対する低体温の影響

①と同様のマウスを用い、常温 (37.5°C), 34, 30°Cで断頭を行い各々における GMT を測定した。

##### ③ DND に対する低体温の影響

4週齢と12週齢の砂ネズミを一群5匹とし、常温 (37.5°C), 36.5, 35.5°CにてDNDモデルを作成し、海馬 CA1 の残存細胞数を比較した。残存細胞数は、実験1の3)と同様の方法で測定した。体温は、側頭筋温、直腸温にて測定し、手術開始時から血流再開まで一定温度とした。

## 結果

#### 1) 低酸素における脳代謝

幼若マウス (1日齢) では、乳酸、ピルビン酸は増加せず LDH が低酸素負荷の増大により増加した。成熟マウス (6週齢) では、低酸素負荷により乳酸、ピルビン酸は増加したが、LDH は、低酸素負荷120秒のみ増加した (Fig. 4)。

#### 2) 低酸素に対する SOD の反応

無酸素負荷により幼若マウスは  $4.8 \pm 0.1$  U/mg protein ( $100 \pm 2.9\%$ ) から  $5.4 \pm 0.3$  ( $114 \pm 7.3$ )へ変化したが、成熟マウスは、 $8.7 \pm 0.2$  ( $100 \pm 1.8$ ) から  $8.0 \pm 0.01$  ( $92.4 \pm 0.2$ )へと低下した (Fig. 5)。

#### 3) 虚血に対する低体温の影響

① 4週齢、10週齢のマウスの常温は、各々 37.5°Cであった。0°Cの室温に放置すると体温は、4週齢では1時間で34°C、1.5時間で30°C、2時間で25°Cに変化したが、10週齢では、35°C、

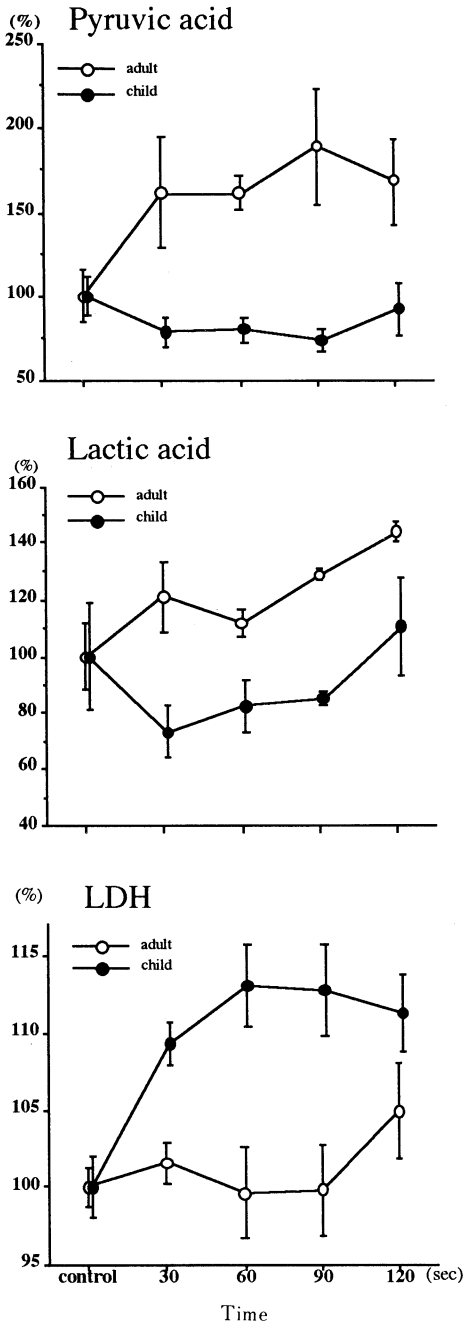


Fig. 4. Changes in brain lactic acid, pyruvic acid and lactic dehydrogenase after 4% hypoxia in mice. Each group consists of 8 mice.

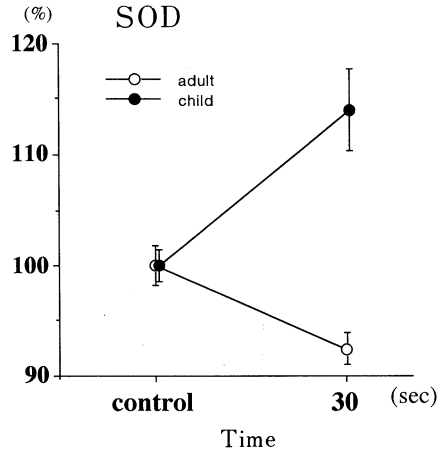


Fig. 5. Change in brain superoxide dismutase in mice after anoxia ( $N_2$  100%  $\times$  30 sec). Each group consists of 8 mice.

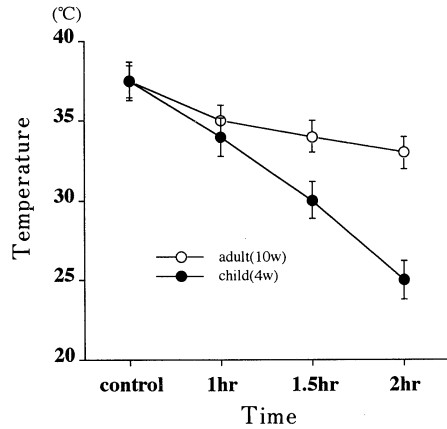


Fig. 6. Changes in body temperature in 4-week and 10-week-old mice in a 0°C room. Each group consists of 8 mice.

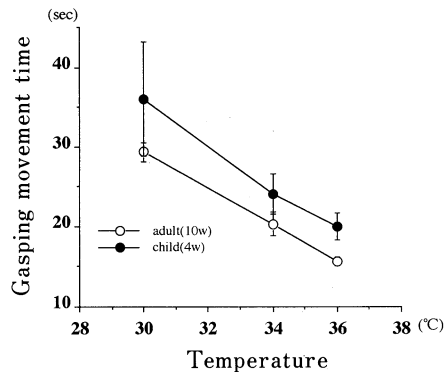


Fig. 7. Effect of hypothermia on GMT in 4-week and 10-week-old mice. Each group consists of 8 mice.

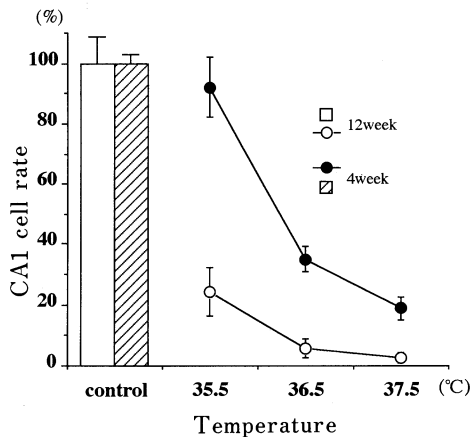


Fig. 8. Effect of hypothermia on delayed neuronal death in 4-week and 12-week-old gerbils. Each group consists of 5 gerbils.

34°C, 33°Cであった (Fig. 6).

② GMT に対する低体温の影響は、4週齢マウスの常温 (37.5°C), 34°C, 30°Cでは、各々  $20.0 \pm 1.3$  秒,  $24.0 \pm 2.5$  秒,  $36.0 \pm 7.2$  秒, 10週齢では、 $15.6 \pm 0.5$  秒,  $20.3 \pm 1.5$  秒,  $29.3 \pm 1.2$  秒であった (Fig. 7).

③ 低体温による DND への影響は、4週齢の砂ネズミの常温 (37.5°C), 36.5°C, 35.5°C において海馬 CA1 の残存率は各々  $18.8 \pm 3.7\%$  (細胞数は  $19.0 \pm 3.7$  個),  $35.0 \pm 4.1\%$  ( $35.4 \pm 4.2$  個),  $92.1 \pm 9.8\%$  ( $93.0 \pm 9.9$  個) で、12週齢の砂ネズミでは、 $2.6 \pm 1.8\%$  ( $2.4 \pm 1.2$  個),  $5.8 \pm 3.3\%$  ( $3.8 \pm 2.2$  個),  $24.2 \pm 7.9\%$  ( $16.0 \pm 5.2$  個) であった (Fig. 8).

## 考 察

幼若動物が種々の負荷に対して抵抗性を有するという事は以前から言われている<sup>5),6),10)</sup>. 今回の実験においても Figures 1~3 に示すように幼若動物では、低酸素、無酸素に対する生存時間の延長、完全脳虚血に対する GMT の延長、さらに一過性脳虚血に対する海馬 CA1 細胞の残存細胞数が多いことを認めた. すなわち、幼若動物では、種々の要因により低酸素、虚血に

対して脳が抵抗性を有していることが確認された.

またマウスの低酸素、無酸素に対して抵抗性が消失する時期は、3週齢 (21日齢) であった ( $p < 0.001$ ) が、断頭による完全脳虚血では、5週齢 (35日齢) であった ( $p < 0.001$ ). 砂ネズミの一過性脳虚血においては、6週齢であり、各々の負荷に対する抵抗性が消失する時期が異なった. 幼若動物の抵抗性が消失する時期の違いは、負荷の違いによっても異なることを示している.

幼若動物の低酸素に対する脳内のエネルギー代謝について Vannucci ら<sup>11)</sup> や武田<sup>12)</sup> は、嫌気性代謝で産生される乳酸を脂質に変換し、エネルギー源としていることを報告している. 今回の実験においても幼若マウスでは、低酸素負荷において成熟マウスと異なり、脳組織内において乳酸の蓄積を認めなかった. このことは、植田の報告<sup>13)</sup> にあるように、乳酸が蓄積しないことにより脳内のアシドーシスを抑制し、脳の機能維持に対しても有益に作用しているものと考えられた.

幼若マウスでは、Figure 4 に示されるように、わずかであるが LDH の増加を認めた. これは、血流増加によって運ばれて来た場合と、比色方で測定しているため測定物質である  $\text{NADH}_2$  が増加している場合が考えられる. Laptook ら<sup>14)</sup> は、幼若動物の低酸素状態では脳血流量が低下することを報告しており、血液量の増加による上昇は考えにくい. LDH は、比色法にて測定を行っており、これは、乳酸からピルビン酸への移行時に産生される  $\text{NADH}_2$  を測定したものである. Vannucci らの報告<sup>11)</sup> では、新生児は、低酸素下においても乳酸からピルビン酸へ移行する可能性を述べており、今回の結果は、産生された乳酸の一部がピルビン酸へと変換され LDH の増加として現われたのではないかと考えられた.

近年フリーラジカルによる脳障害が言われているが、低酸素下でのフリーラジカルの発生が新生仔マウスにおいて報告されている<sup>15)</sup>. SOD

は、フリーラジカルの抗酸化物として体内に存在し、低酸素負荷直後に発生するフリーラジカルに反応すると言われているが<sup>16)</sup>、虚血再灌流では、虚血後1時間以上たってから上昇することが報告<sup>17)</sup>されている。そのため無酸素負荷直後では、組織内に蓄えられているSODが使われ成熟マウスでは、SODの低下を認めたと考えられた。また、SODをもたない変異種の動物では、寿命が明らかに短縮することや加齢によりSOD活性の低下等が報告されている<sup>18),19)</sup>。幼若動物におけるSODの低酸素負荷による変化については、まだ報告を見ないが、今回の実験では幼若マウスでSODの低下を認めなかった。このことは、低酸素状態に抵抗性を示す要因の一つと考えられた。

低体温による脳の保護作用は、以前より言われているが近年Choppら<sup>20)</sup>が猫を用いた一過性脳虚血の実験において軽度の低体温による脳保護作用を報告している。今回の実験では、幼若動物の方が成熟動物と同じ0°Cの室温において低体温に陥りやすく、外部環境の影響を受けやすいことが示唆された。しかし同じ体温におけるGMTの変化は、Figure 7で示されるように成熟動物、幼若動物で差は、認められなかった。一方、低体温のDNDに対する影響は、常温より1~2°Cという軽度低体温によって海馬CA1細胞の保護効果が得られており、幼若動物において、軽度の低体温で脳保護が得られるこ

とがわかった。

今回の実験からは、幼若動物が低酸素や虚血に対して抵抗性を示すことを確認し、その要因として幼若動物の低酸素下における脳代謝、すなわち乳酸を脂質等に合成し、エネルギー源として利用すること、乳酸が他の物質に変換され脳内の乳酸性アシドーシスを抑制していること、低酸素下における脳内SODの反応が成熟マウスと異なることなどが考えられた。また低体温は、幼若動物の低酸素、虚血に対する抵抗性において特異的な要因ではないが、成熟動物より低酸素状態による脳障害が抑ええられることがわかった。

幼若動物が低酸素や虚血に対して抵抗性を有する要因として今回は、代謝、SOD、環境因子である温度について検討した。これらの項目以外に頭蓋骨の形成、神経細胞・グリア細胞の成熟度・密度などの解剖学的因子<sup>21),22)</sup>に加え、種々の生化学的因子、すなわち成長ホルモンや神経栄養因子が多いこと<sup>23),24)</sup>等が考えられている。今後もさらにこれらの要因に対して検討を続けていく必要があると思われた。

稿を終えるにあたり、直接ご指導、ご校閲いただきました川崎医科大学救急医学教室 小濱啓次教授、福田充宏講師に深甚な謝意を捧げるとともに、種々のご助言を承りました救急医学教室の諸先生方に感謝いたします。

## 文 献

- 1) Montes EJ, Conn WA: Near-drowning: An unusual case. *Canada Anaesth Socj* 27(2): 172-174, 1980
- 2) Rod TSH, Lind BBH: Survival after 40 minutes' submersion without cerebral sequelae. *The Lancet* 7: 1275-1277, 1975
- 3) Kvittingen DT, Naess A: Recovery from drowning in fresh water. *Brit Med J* 18: 1315-1317, 1963
- 4) Villota DE, Barat G, Peral P, Juffe A, Miguel Fernandes MJ, Avello F: Recovery from profound hypothermia with cardiac arrest after immersion. *Brit Med J* 17: 394-395, 1973
- 5) Himwich AW: *Developmental Neurobiology*. Springfield, U.S.A., CHARLES C THOMAS PUBLISHER. 1970, pp 331-369
- 6) 吉岡 博: 新生仔低酸素症が脳組織発達に及ぼす影響・第一編 オートラジオグラフィ的研究。脳と発達 15: 317-327, 1983

- 7) 福田充宏, 増田義信: 砂ネズミの海馬遅発性神経細胞壊死に及ぼす抗痙攣剤の影響. 医学と生物学 122(5): 175-178, 1991
- 8) 久永欣哉, 大友 仁, 阿部康二, 小暮久也: 胎仔ラット低酸素負荷における脳内 muscarinic receptor への影響. 厚生省・神経疾患研究委託・83-12, 低酸素症に基づく胎生期脳障害の形態学的生化学的研究. 昭和58年度研究報告書, pp 265-270
- 9) Joan C, Mott MA, Phil D: The ability of young mammals to withstand total oxygenlack. Brit Med Bull 17(2): 144-147, 1961
- 10) 新井 一, 楠本雅之, 宮嶋雅一, 安本幸正, 森健太郎, 佐藤 潔: 幼若砂ネズミの脳虚血抵抗性. Brain Hypoxia 7: 43-48, 1993
- 11) Vannucci CR, Thomas DE: Carbohydrate metabolism in fetal and neonatal ret brain during anoxia and recovery. American J Physiol 230(5): 1269-1275, 1976
- 12) 武田佳彦: 新生児とハイポキシア. 代謝 16: 2077-2086, 1979
- 13) 植田昭徳, 福田充宏, 籠田仁樹, 小濱啓次: 心停止蘇生後の脳機能回復に及ぼす重炭酸ナトリウムの効果. 医学と生物学 127: 329-334, 1993
- 14) Laptook AR, Corbett RJT, Ruley J, Olivares E: Blood Flow and Metabolism During and After Repeated Partial Brain Ischemia in Neonatal Piglets Stroke 23(3): 380-387, 1992
- 15) 長谷川攻: 新生仔マウス低酸素脳障害におけるフリーラジカルの関与. 日本小児科学会雑誌 94: 882-890, 1990
- 16) 田川邦男: 虚血によりなぜ細胞は死ぬのか. 東京, 共立出版株式会社. 1991, pp 63-76
- 17) Sutherland G, Bose R, Louw D, Pinsky C: Global elevation of brain superoxide dismutase activity following forebrain ischemia in ret. Neuroscience Letter 128: 169-172, 1991
- 18) 松尾光芳: 老化とフリーラジカル. 現代医療 25(10): 65-68, 1993
- 19) Semsei I, Rao G, Richardson A: Expression of superoxide dismutase and catalase in rat brain as a function of age. Mechanism of Ageing and Development 58: 13-19, 1991
- 20) Chopp M, Knight R, Tidwell DC, Helpert AJ, Brown E, Weich AMK: The metabolic effect of mild hypothermia on global cerebral ischemia and recirculation in the cat: Comparison to normothermia and hyperthermia. J Cerebral Blood Flow and Metabolism 9: 141-148, 1989
- 21) Rice E, Vannucci CR, Brierley BJ: The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. Ann of Neurol 9: 131-141, 1981
- 22) 生田房弘: Astrocyte と頭蓋内圧亢進. Neurosurgeons 12: 7-14, 1993
- 23) Auburger G, Heumann R: Developmental changes of nerve growth factor and its mRNA in the rat hippocampus. Dev Biol 120: 322-328, 1987
- 24) 楠本雅之, 新井 一, 佐藤 潔: 幼若砂ネズミにおける脳虚血後の Heat shock protein の発現. 脳循環代謝 5(1): 168, 1993