

## マウス脳内コリン代謝に及ぼす虚血の影響

根本 光, 村井 繁夫\*

岩手医科大学歯学部歯科麻酔学講座

(主任: 城 茂治 教授)

岩手医科大学歯学部歯科薬理学講座\*

(主任: 加藤 裕久 教授)

(受付: 2004年10月25日)

(受理: 2004年11月12日)

**Abstract** The present study clearly demonstrated the effects of complete cerebral ischemia and selective ischemia on brain choline metabolism in ddY mice. The complete cerebral ischemia mouse was produced by cervical dislocation, and the selective ischemia mouse was produced by bilateral occlusion of the common carotid arteries.

The following results were obtained

1 Complete cerebral ischemia increased brain choline contents rapidly and remarkably for 10 minutes. After 10 minutes, the rate of increase of brain choline contents suddenly fell.

2 The increased level of choline contents by complete cerebral ischemia differed among the brain regions (cerebral cortex, hippocampus, medulla oblongata, cerebellum) tested.

3 Selective ischemia increased choline contents in the cerebral cortex and hippocampus but not in the medulla oblongata or cerebella.

4. As with complete ischemia, hypoxia induced by N<sub>2</sub> gas inhalation increased choline contents in all brain regions.

5. Hypoglycemia induced by insulin administration did not increase brain choline contents. However, the ischemia under a hypoglycemia state produced a greater choline increase than ischemia alone.

6 Complete cerebral ischemia decreased the contents of both phosphatidylcholine (PtdCh) and glycerophosphocholine (GlyCh) in the mouse brain.

The present results suggest that a main cause for the ischemic increase of brain choline contents is hypoxia by cessation of blood flow, and a low energy state caused by hypoglycemia partly contributes to this increase. Furthermore, it is suggested that the ischemic increase of brain choline depends on the choline accumulation that results from decomposition of both PtdCh and GlyCh.

**Key words** : cerebral ischemia, hypoxia, hypoglycemia, choline metabolism, mouse

---

Effect of cerebral ischemia on choline metabolism in the mouse brain

Akira NEMOTO, Shigeo MURAI\*

Department of Dental Anesthesiology, School of Dentistry, Iwate Medical University

Department of Dental Pharmacology, School of Dentistry, Iwate Medical University

1-3-27 Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

## 緒 言

コリン (Ch) は、神経伝達物質であるアセチルコリン (ACh) や細胞膜構成成分であるフォスファチジルコリン (PtdCh) 合成時の前駆物質であると同時に、両者の主要な代謝物質でもある<sup>1-3)</sup>。そのため、Ch の生理的意義に関する研究は、永らく栄養学的な観点から行われてきた。しかし、最近 Ch は上記の生理的役割に留まらず、細胞内顆粒輸送<sup>4)</sup>、有糸分裂<sup>5)</sup>、細胞融合<sup>6)</sup>、肝細胞のアポトーシス<sup>7)</sup>、neuronal NO 産生<sup>8)</sup>等にも関与しており、また心筋細胞膜の M<sub>3</sub> ムスカリン性 ACh 受容体に対して、フルアゴニストとしても機能している<sup>8)</sup>など、多彩な生理作用を有する物質であることが明らかにされつつある。

脳内 Ch 量は、通常の場合、低親和性 Ch 取り込み機構を介した homeostatic mechanism により、比較的一定に保たれている<sup>10,11)</sup>。しかしながら、脳内 Ch 量は死亡のような特殊な状態下では、急速かつ著しく増加することが報告されている<sup>12-15)</sup>。例えば、Dross & Kewitz<sup>12)</sup> は、屠殺後におけるラット脳内 Ch 量が 20.5 nmol/g/min の速度で増加し、屠殺後 1 分間で約 2 倍に増加したことを報告しており、また、Kosh<sup>13)</sup> も、マウス全脳における Ch 量が、死後 15 分で約 7 倍にまで増加したことを報告している。このような屠殺直後から急速に開始される Ch 量増加の意義に関して、Jenden<sup>14)</sup> は、血流および呼吸停止により生じる為害作用から、脳機能を保護するためではないかと示唆しているが、その生理的意義についてはいまだ不明である。

最近、Ch の生理的機能に関して、興味深い新しい知見が報告されてきた。例えば、Strahlendorf<sup>17)</sup> は、Ch がニコチンと同様に、アミノメチルリン酸による細胞毒性から神経細胞を保護することを報告しており、Jonnala<sup>18)</sup> は、Ch が中枢神経系に存在する  $\alpha 7$  ニコチン性 ACh 受容体 ( $\alpha 7$  nAChR) のフルアゴニストとして作用することを報告している。 $\alpha 7$

nAChR は、様々な物質の神経毒性に対し、細胞保護的に作用することが知られている受容体である<sup>19)</sup>。また、Gurun<sup>ら</sup><sup>20)</sup> は、Ch の脳室内投与が交感神経-副腎系の活性化により、血糖値の上昇を引き起こすことを報告している。脳内血糖値の低下は、重大な脳機能損傷の発現要因であることから、脳血流停止後に増加する Ch は低血糖を改善し、脳機能損傷開始の遅延に働く可能性がある。これらの知見はいずれも、脳内において Ch が何らかの神経細胞保護的作用を有している可能性を示唆するものであることから、脳機能維持に関して極めて危機的な状況である脳血流停止後の Ch 量増加は、麻酔および蘇生の臨床において興味深い現象だと思われる。

しかしながら、脳血流停止後に発現する脳内 Ch 量増加現象に関しては、まだ不明な点が多く残されている。そこで本研究において、完全な脳虚血 (低酸素+低血糖) モデル<sup>15)</sup>とされる頸椎脱臼死マウスと選択的脳虚血モデル<sup>21)</sup>である 2-VO (両側総頸動脈閉塞) マウスの脳を用い、(1)Ch の増加は脳部位により相違するのか、(2)Ch 代謝系にも変化が発現するのか、(3)増加した Ch はどこから供給されるのか、虚血時における脳内 Ch 代謝に関する検討を行った。

## 材料および方法

### 1. 実験動物

実験には、5 週齢の ddY 系雄性マウス (日本 SLC, 静岡) および 5 週齢の Wistar 系雄性ラット (日本 SLC, 静岡) を用いた。マウスおよびラットの飼育は、実験日まで室温 23 ± 1°C、湿度 50 ± 5% に維持された 12 時間照明 (サイクル: 明期 7:00-19:00, 暗期 19:00-7:00) の環境で飼育し、実験動物用固形飼料 (MF, オリエンタル酵母工業, 東京) と水道水を自由に摂取させた。なお本研究は、岩手医科大学実験動物センターの承認のもとで実施された。

### 2. 実験方法

#### 1) 完全脳虚血標本の作製

完全脳虚血モデルとしては、頸椎脱臼により屠殺したマウスを使用した。屠殺後、体温低下を抑えるために、37°Cの恒温槽の中にて保温し、所定の時間にマイクロウェーブ照射（1.4 kW, 6秒）を行い、Chのその後の死後変化を防いだ。大脳皮質、海馬、小脳、延髄の摘出は、Glowinski & Iversen 法<sup>22)</sup>の変法により行った。摘出した脳組織は、秤量後サンプル作製時まで-80°Cで凍結保存した。

## 2) 選択的脳虚血標本の作製

Ch量に及ぼす脳虚血と血流再開の影響を測定するため、Himoriら<sup>21)</sup>の方法に従い、両側総頸動脈を同時閉塞する2-VOモデルマウスを作製した。この2-VOモデルは、大脳皮質、海馬、小脳、延髄のうち、大脳皮質と海馬領域の虚血を発現させる選択的脳虚血モデルである。2-VOモデルの作製法は以下の通りである。ペントバルビタール（50mg/kg）の腹腔内投与（i.p.）で全身麻酔後、両側総頸動脈を周囲組織より剥離した後、一時的な動脈閉塞を行うための糸とその閉塞を解除するための糸を両側総頸動脈に廻した。その後、どちらの糸も皮下を經由させて、後頭部の位置で体外に露出させた。その後、頸部皮膚の切開部を縫合し、一匹ずつ飼育ケージで飼育した。本実験では、このようにして作製した2-VOモデルマウスを、術後3日目において、総頸動脈閉塞後2.5分、5分、総頸動脈開放後5分、10分の時点で、マイクロウェーブ照射により屠殺し、大脳皮質、海馬、延髄、小脳を摘出した。

## 3) 低酸素の影響

脳内Ch量に及ぼす低酸素の影響を測定するため、100%窒素を持続的に吸入させたマウスの脳内Ch量を測定した。実験条件は、以下の通りである。窒素（流速3ℓ/min）を充滿させた箱の中にマウスを入れ、正向反射の消失20秒後に箱から取り出し、直ちにマイクロウェーブ照射により脳を固定・摘出した。

## 4) 動脈血酸素分圧 (PaO<sub>2</sub>) に及ぼす完全虚血および低酸素の影響

完全虚血（脱臼屠殺）後および窒素吸入によ

る低酸素時におけるPaO<sub>2</sub>と脳内Ch量の関係を測定するため、以下の実験を行った。

4-1) 完全虚血後における動脈血の採血には、十分な採血量を得るためラットを用いた。ペントバルビタール（60mg/kg, i.p.）で全身麻酔後、頸椎脱臼により屠殺し、2.5分後に左心室穿刺により動脈血を採血した。

4-2) 100%窒素吸入時における動脈血の採血には、マウスを用いた。ペントバルビタール（50mg/kg, i.p.）で全身麻酔後、両側総頸動脈を周囲組織より剥離・露出した。その後、その状態のまま100%窒素を充滿した箱の中に入れ、3分後に総頸動脈切断をおこない、流出してくる動脈血を採取した。採取した動脈血は、血液分析器（i-STAT：扶桑薬品工業）を用いて、血液ガス分析を行った。

## 5) 低血糖の影響

脳内Ch量に及ぼす低血糖の影響を測定するため、インスリン処理による低血糖マウスを作製した。インスリン（2.0unit/kg, i.p.）処理55分後に、尾静脈の血糖値を測定し、60分後に頸椎脱臼により屠殺した。血糖値の測定には、血糖値測定器（グルコカート、京都第一科学）を使用した。

## 6) 脳内Ch量の測定

脳内Ch量の測定は、電気化学的検出器付き高速液体クロマトグラフィー（HPLC-ECD：柳本）と固定化酵素カラム（AC-Enzaympak, エイコム）を用いるMuraiら<sup>23)</sup>の方法により行った。測定試料は以下の手順で作製した。全脳および分割脳組織を0.2mM エチレンジアミン四酢酸（EDTA）および100μM エチルホモコリン（EHC：内部標準物質）を含む0.1N 過塩素酸溶液中で超音波粉碎し、遠心分離（12,000×g, 15分, 4°C）を行った。その後、採取した上清を0.45μmフィルターで濾過し、高速液体クロマトグラフィーで測定した。

Ch量は、それぞれの対照群実測値の相対値として示した。Fig. 2に示した対照群の実測値は、大脳皮質では32.9nmol/g、海馬では31.3nmol/g、延髄では39.8nmol/g、小脳では29.8

nmol/gであった。

## 7) Ch代謝

### 7-1) グリセロフォスホコリン (glycerophosphocholine : GlyCh) 量の測定

GlyCh量の測定は、HPLC-ECDを用いる Murai ら<sup>24)</sup>の方法により行った。測定試料は以下の手順で作製した。摘出した脳組織を0.1mM EDTA および100 $\mu$ M EHCを含む0.4M 過塩素酸溶液中で超音波粉碎後、クロロホルムを添加し、遠心分離(12,000 $\times$ g, 10分, 4 $^{\circ}$ C)により得られた上清の酸性分解(80 $^{\circ}$ C, 1時間)を行った。反応終了後、0.45 $\mu$ mフィルターで濾過した上清を高速液体クロマトグラフィーで測定した。

GlyCh量は、それぞれの対照群実測値の相対値として示した。Fig. 6に示したGlyCh量の対照群実測値は、大脳皮質では1054.4nmol/g, 海馬では1165.9nmol/g, 延髄では1239.5nmol/g, 小脳では1111.5nmol/gであった。

### 7-2) フォスファチジルコリン (phosphatidylcholine : PtdCh) 量の測定

PtdCh量の測定は、HPLC-ECDを用いる Murai ら<sup>25)</sup>の方法により行った。測定試料は以下の手順で作製した。摘出した脳組織を0.1mM EDTAを含む0.4M 過塩素酸溶液中で超音波粉碎後、クロロホルムを添加し、遠心分離(12,000 $\times$ g, 10分, 4 $^{\circ}$ C)により、水層とクロロホルム層とに分離した。水層を除去後、クロロホルム層を乾かし、100 $\mu$ M EHCを含む1M 過塩素酸溶液の添加による酸性分解(90 $^{\circ}$ C, 1時間)を行った。反応終了後、0.45 $\mu$ mフィルターで濾過した上清を高速液体クロマトグラフィーで測定した。

PtdCh量は、それぞれの対照群実測値の相対値として示した。Fig. 7に示したPtdCh量対照群の実測値は、大脳皮質では23822.7nmol/g, 海馬では18220.1nmol/g, 延髄では23859.5nmol/g, 小脳では21416.9nmol/gであった。

### 7-3) フォスホコリン (phosphocholine : PCh) 量の測定

PCh量の測定は、HPLC-ECDを用いる

Murai ら<sup>24)</sup>の方法により行った。測定試料は以下の手順で作製した。脳組織を1mM 塩化マグネシウム, 0.1mM 硫酸亜鉛, 0.1mM EDTA および100 $\mu$ M EHCを含む60mM グリシンバッファー中で超音波粉碎し、遠心分離(12,000 $\times$ g, 15分, 4 $^{\circ}$ C)後得られた上清にアルカリフォスファターゼ(10unit)を添加して、PChの酵素分解(37 $^{\circ}$ C, 1時間)を行った。反応終了後、0.45 $\mu$ mフィルターで濾過した上清を高速液体クロマトグラフィーにて測定した。

PCh量は、それぞれの対照群実測値の相対値として示した。Fig. 8に示したPCh量対照群の実測値は、大脳皮質では351.4nmol/g, 海馬では365.6nmol/g, 延髄では307.9nmol/g, 小脳では540.4nmol/gであった。

## 8) 測定条件と試薬

使用機器：HPLCポンプ(L-5000, 柳本), 分析カラム(AC-GEL, エイコム), 固定化酵素カラム(AC-Enzaympak, エイコム), カテコールアミントラップカラム(CA-Trap, エイコム), ECD(VMD-501, 柳本), 白金電極(WE-PT, エイコム, +0.5V), カラム温度調節用ヒーター(CTR-200, イワキ), インテグレーター(C-R 3 A, 島津)。クロマトグラフィー条件：0.06%EDTA, 0.065%塩化テトラメチルアンモニウム, 0.3%オクタン sulfon 酸ソーダを含む0.07M リン酸バッファー(pH8.3-8.5,)を流速2.0ml/min, バス温度33 $^{\circ}$ C。

## 9) 使用薬物

塩化テトラメチルアンモニウム, 塩化コリンは和光純薬より, オクタン sulfon 酸ソーダはAldrich社より購入した。EHCは, Potterら<sup>26)</sup>の方法により合成したものを使用した。その他の試薬および溶媒は, HPLC gradeのものを使用した。

## 10) 統計処理

2群間の比較には Student's t-test を用い, 3群以上の比較には一元配置分散分析を用いた後, Tukey-Kramer multiple comparisons test を用いた。いずれも危険率5%以下の水準で有意差を判定した。

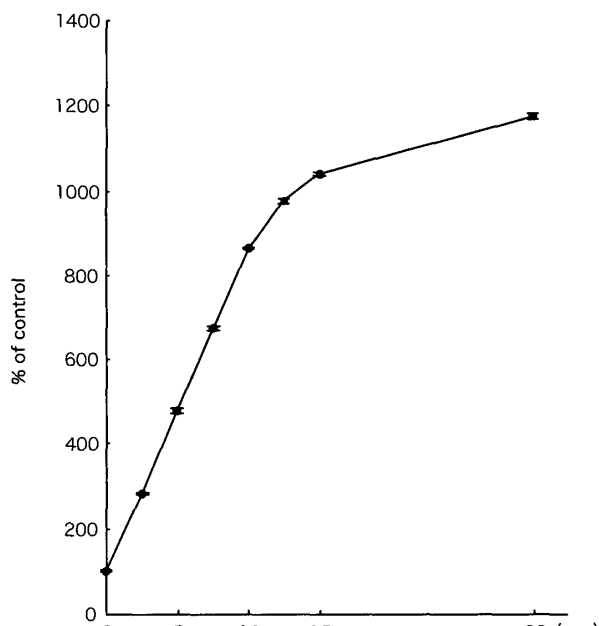


Fig 1 Effects of complete cerebral ischemia on choline contents in the mouse whole brain. Complete cerebral ischemia was produced by cervical dislocation. The choline contents are expressed as percentages of the control values. Each value is the mean  $\pm$  SEM of 8 mice.

## 結 果

### 1) 完全脳虚血の影響

#### 1-1) 全脳における Ch 量の経時的变化

屠殺10分後まで Ch 量は直線的に増加し、対照群に対して約9倍(10分後)に増加した。屠殺12.5分後以降においても Ch 量は増加を続け、屠殺30分後には対照群に対して約12倍まで増加した (Fig. 1)。

#### 1-2) 分割脳における Ch 量変化

屠殺後、大脳皮質・海馬・延髄・小脳のすべての部位において、Ch 量は経時的に増加した。大脳と海馬、延髄と小脳における Ch 量の増加程度は、類似していた。すなわち、大脳皮質と海馬では虚血10分後、対照群に対して5.5倍、延髄と小脳では、約7倍の Ch 増加を示した (Fig. 2)。

### 2) 選択的脳虚血の影響

2-1) 両側総頸動脈閉塞 (2-VO) による脳虚血マウスの脳内 Ch 量

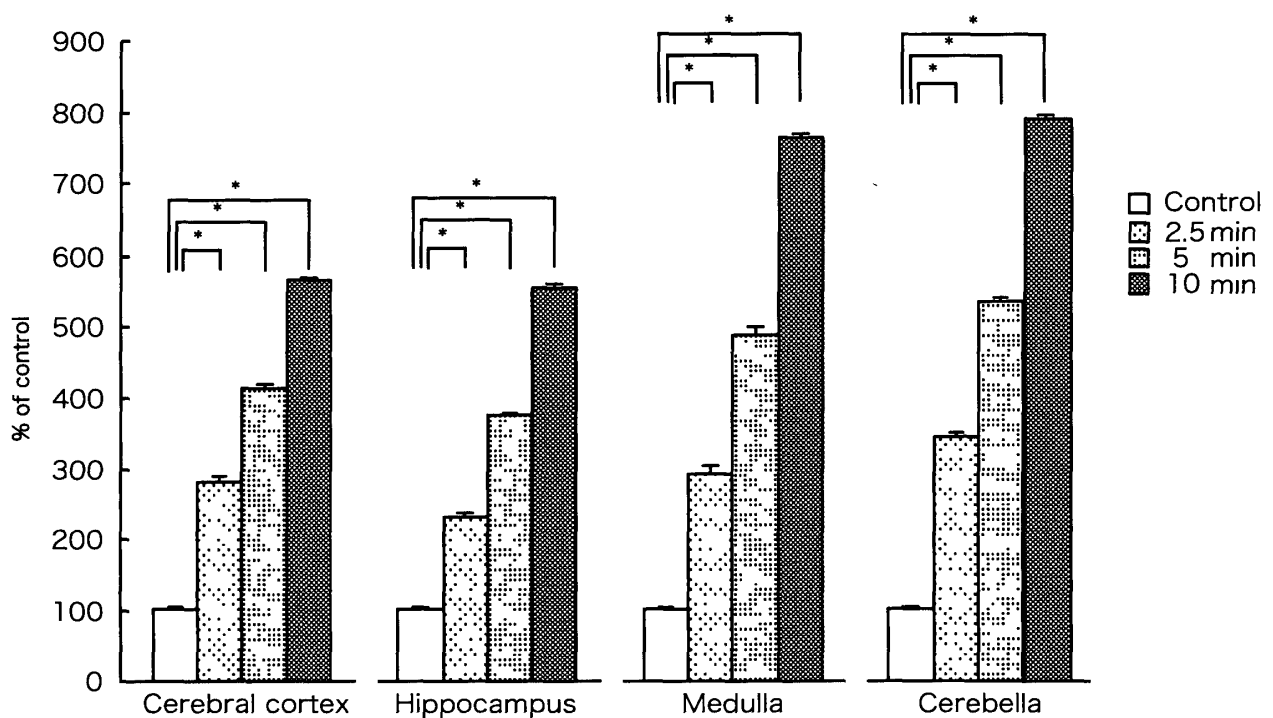


Fig 2 Effects of complete cerebral ischemia on choline contents in the mouse discrete brain regions. The choline contents are expressed as percentages of the control values. Each value is the mean  $\pm$  SEM of 8 mice. \*  $p < 0.05$  vs control by Student's *t*-test (two-tailed)

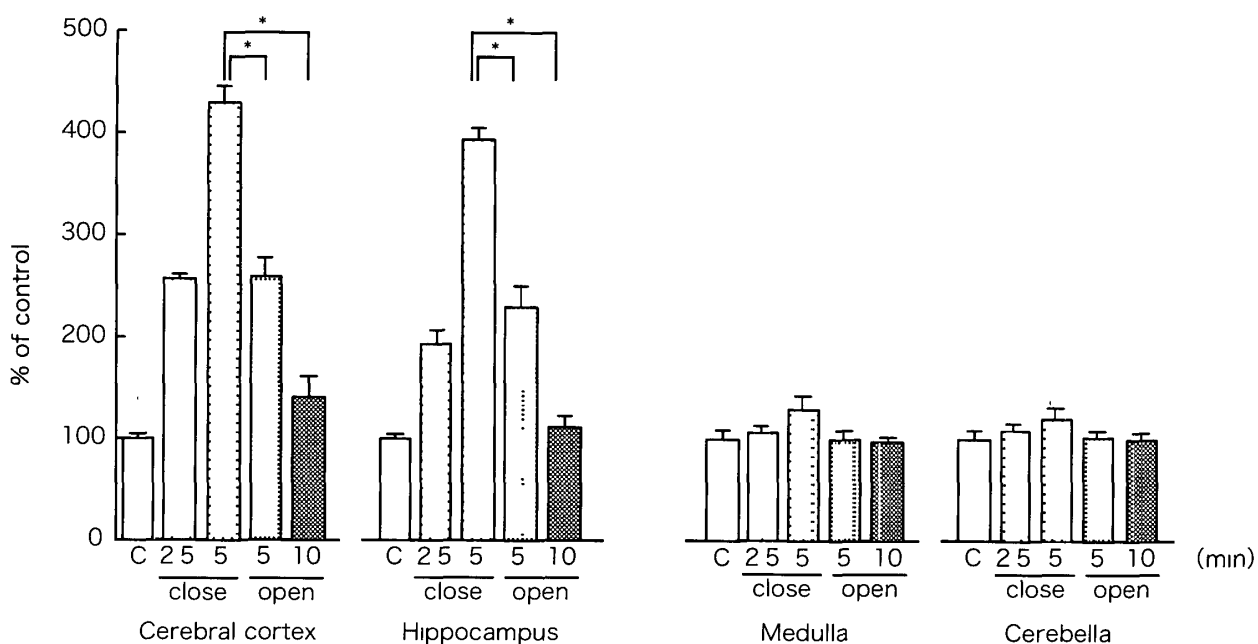


Fig 3 Effects of selective cerebral ischemia on choline contents in the mouse discrete brain regions. Selective cerebral ischemia was performed by occlusion and open of common carotid artery. The choline contents are expressed as percentages of the control values. Each value is the mean  $\pm$  SEM of 7 mice. \*  $p < 0.05$  was calculated Tukey-Kramer multiple comparisons test.

大脳皮質と海馬において、Ch量は両側総頸動脈閉塞後2.5分、5分と経時的に増加し、総頸動脈開通後、減少した。海馬におけるCh量の減少は顕著で、開通後10分で対照群に近いレベルまで減少した。一方、延髄と小脳では、両側総頸動脈閉塞によるCh量の増加はみられなかった (Fig. 3)。

3) 低酸素の影響

窒素吸入時、大脳皮質、海馬、延髄、小脳のすべての部位において、Ch量の有意な増加がみられた。ただし、延髄でのCh量増加の程度は、大脳皮質、海馬、小脳に比べて小さかった (Fig. 4)。

4) 完全虚血および低酸素時の動脈血酸素分圧 (PaO<sub>2</sub>)

完全虚血および窒素吸入時のPaO<sub>2</sub>は、対照群と比較して著しく低下した。完全虚血群と窒素吸入群では、完全虚血群の方が、より顕著なPaO<sub>2</sub>低下を示した。(Table. 1)

5) 低血糖時の脳内Ch量変化

インスリン (20unit/kg, i.p.) 処理後、55分後の血糖値は、正常時より約60%低下した。こ

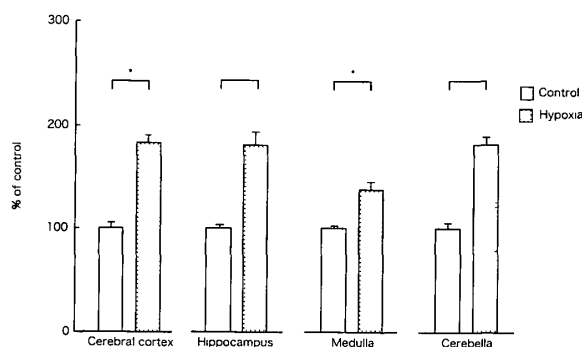


Fig 4 Effects of hypoxia on choline contents in the mouse discrete brain regions. Hypoxia was produced by continuous inhalation of 100% N<sub>2</sub> gas. The choline contents are expressed as percentages of the control values. Each value is the mean  $\pm$  SEM of 7 mice. \*  $p < 0.05$  was calculated Tukey-Kramer multiple comparisons test.

の時の全脳内Ch量は、対照群と変わらなかった。しかし、低血糖状態下で屠殺した場合には、正常群の屠殺時より有意に高いCh量の増加がみられた (Fig. 5)。

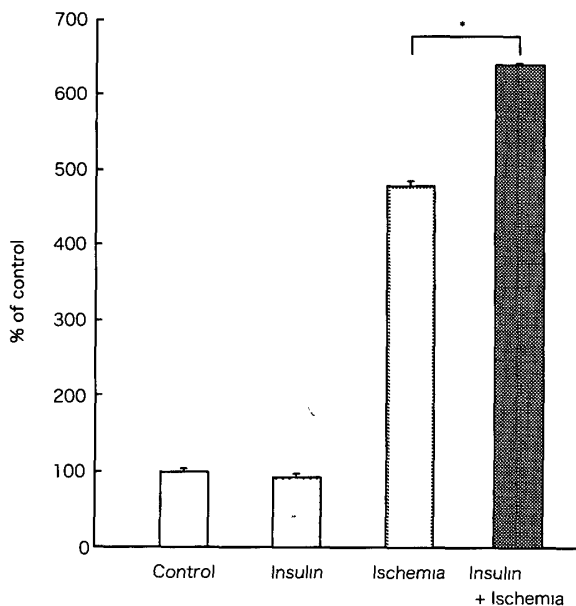
6) 完全脳虚血時のCh代謝

6-1) GlyCh量の経時的変化

屠殺後、測定を行った全ての脳部位でGlyCh

**Table 1** Effects of complete cerebral ischemia and hypoxia on PaO<sub>2</sub> and PaCO<sub>2</sub> in mouse and rat<sup>a</sup>: Hypoxia was produced 100% N<sub>2</sub> gas in mice<sup>b</sup>. Complete cerebral ischemia was produced by cervical dislocation in rats. Each value is the mean ± SEM of 5 mice and rats \* p<0.05 vs control by Student's *t*-test (two-tailed).

	Control <sup>a</sup>	Hypoxia <sup>a</sup>	Control <sup>b</sup>	Ischemia <sup>b</sup>
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	103.2 ± 4.1	65.7 ± 3.2 *	81.3 ± 3.4	10.5 ± 3.4 *
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	31.4 ± 3.0	32.9 ± 3.0	40.4 ± 3.3	84.3 ± 5.7 *



**Fig 5** Effects of hypoglycemia on choline contents in the mouse whole brain. Hypoglycemia was produced by administration of insulin (2.0 unit/kg). The choline contents are expressed as percentages of the control values. Each value is the mean ± SEM of 8 mice \* p<0.05 was calculated Tukey-Kramer multiple comparisons test.

量は経時的に減少し、屠殺10分後には、約30%のGlyCh量の減少が認められた (Fig. 6)。

#### 6-2) PtdCh量の経時的变化

大脳皮質と延髄において、屠殺後10分で対照群に対して有意なPtdCh量の減少がみられた。海馬と小脳におけるPtdCh量は、有意差はないものの、いずれも減少傾向を示した (Fig. 7)。

#### 6-3) PCh量の経時的变化

大脳皮質、海馬、延髄、小脳におけるPCh量の有意な変化は認められなかった (Fig. 8)。

## 考 察

正常の場合、脳内Ch量は比較的一定レベルに保たれているが、死後、急激に増加することが、動物実験において報告されている。このCh量増加反応の発現は極めて早く、例えば頸椎脱臼死後30秒で、脳内Ch量は1.5倍にも増加する。死後急速に変化する脳内物質としては、これまでにアデノシン<sup>27)</sup>、cAMP<sup>28)</sup>、イノシン<sup>27)</sup>、遊離脂肪酸<sup>29)</sup>などが報告されている。死後30秒におけるそれらの増加率は、アデノシンが2.9倍、cAMPが2.3倍で、イノシンと遊離脂肪酸はCh (1.5倍)と同程度の1.4倍である。これらの知見は、本実験で測定したChもまた急速な死後増加を示す特異な脳内代謝をもつ物質群に含まれることを示している。これらの物質の増加意義に関して、何らかの指摘が行われているのはアデノシンとChのみで、他の物質についてはまだ指摘が無い。アデノシン量増加に関しては、脳組織の低酸素状態を改善するために、脳血管を拡張させ脳血流量を確保するためだと示唆されている<sup>27,30)</sup>。一方、Ch量増加に関しては、虚血によって生じた異常状態 (低酸素) に対する脳機能保護のためではないかと示唆されている<sup>18)</sup>。

Chの生理的意義に関しては、最近、脳機能保護説との関連性を示唆する知見<sup>17,18,20)</sup>が集まりつつある。しかしながら、その詳細については未だ検討が少なく、また、その時のCh代謝に関しても検討は少ない。そこで本研究において、完全な脳虚血モデルとされる頸椎脱臼死マウスと選択的脳虚血モデルである2-VO (両側総頸動脈閉塞) マウスの脳を用い、(1)Ch量増加は脳部位により相違するのか、(2)Ch代謝系

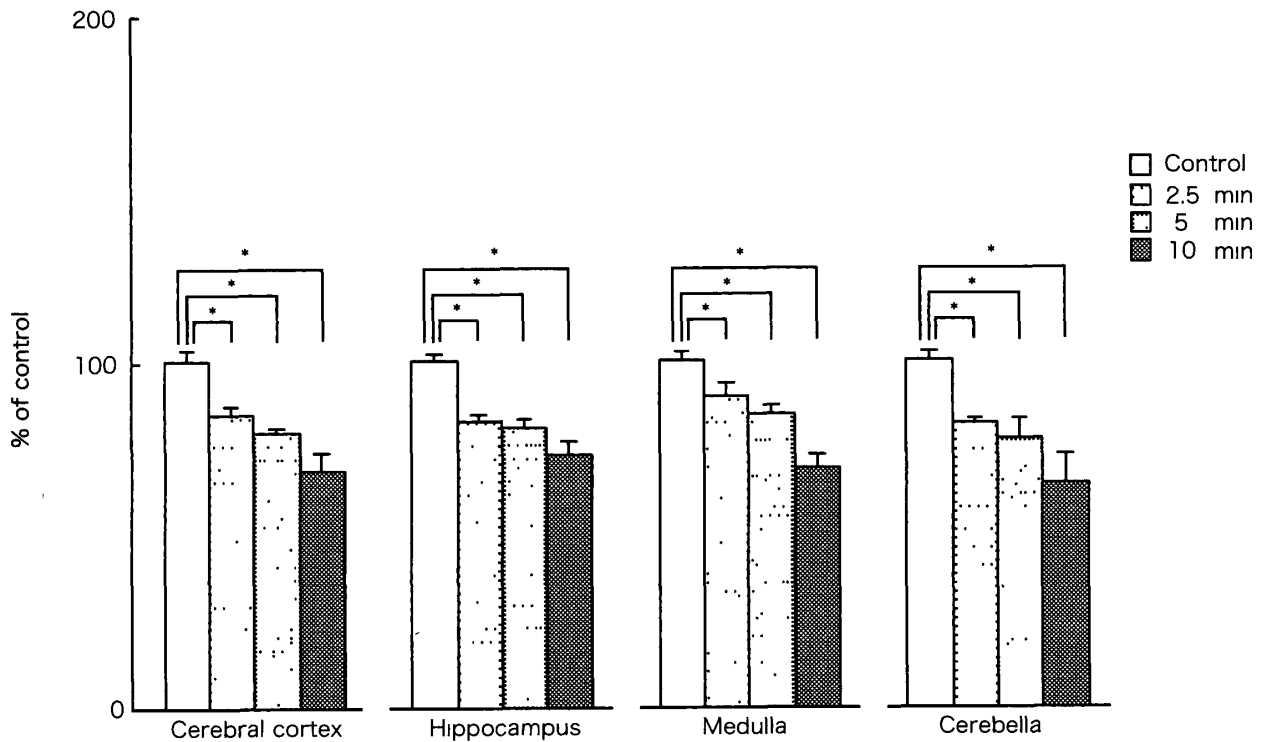


Fig 6 Effects of complete cerebral ischemia on glycerophosphocholine contents in the mouse discrete brain regions. Glycerophosphocholine contents are expressed as percentages of the control values. Each value is the mean  $\pm$  SEM of 8 mice. \*  $p < 0.05$  was calculated Tukey-Kramer multiple comparisons test.

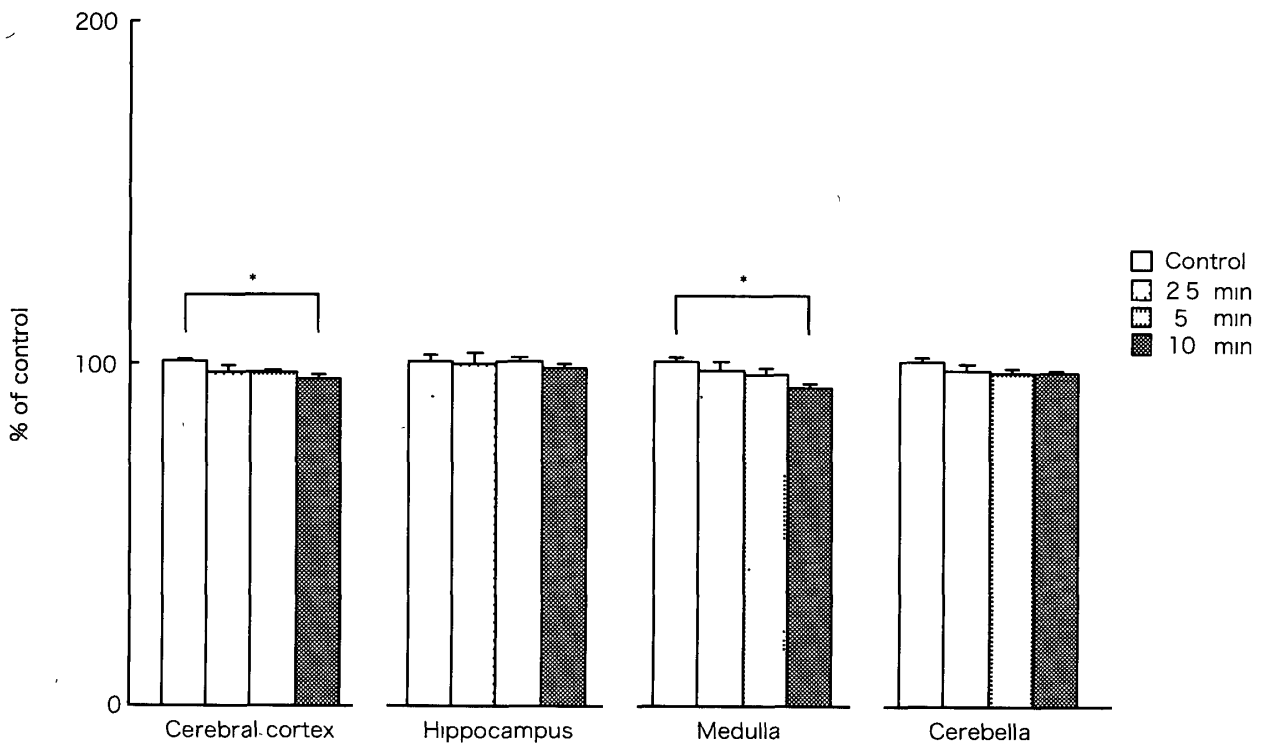


Fig 7 Effects of complete cerebral ischemia on phosphatidylcholine contents in the mouse discrete brain regions. Phosphatidylcholine contents are expressed as percentages of the control values. Each value is the mean  $\pm$  SEM of 8 mice. \*  $p < 0.05$  was calculated Tukey-Kramer multiple comparisons test.



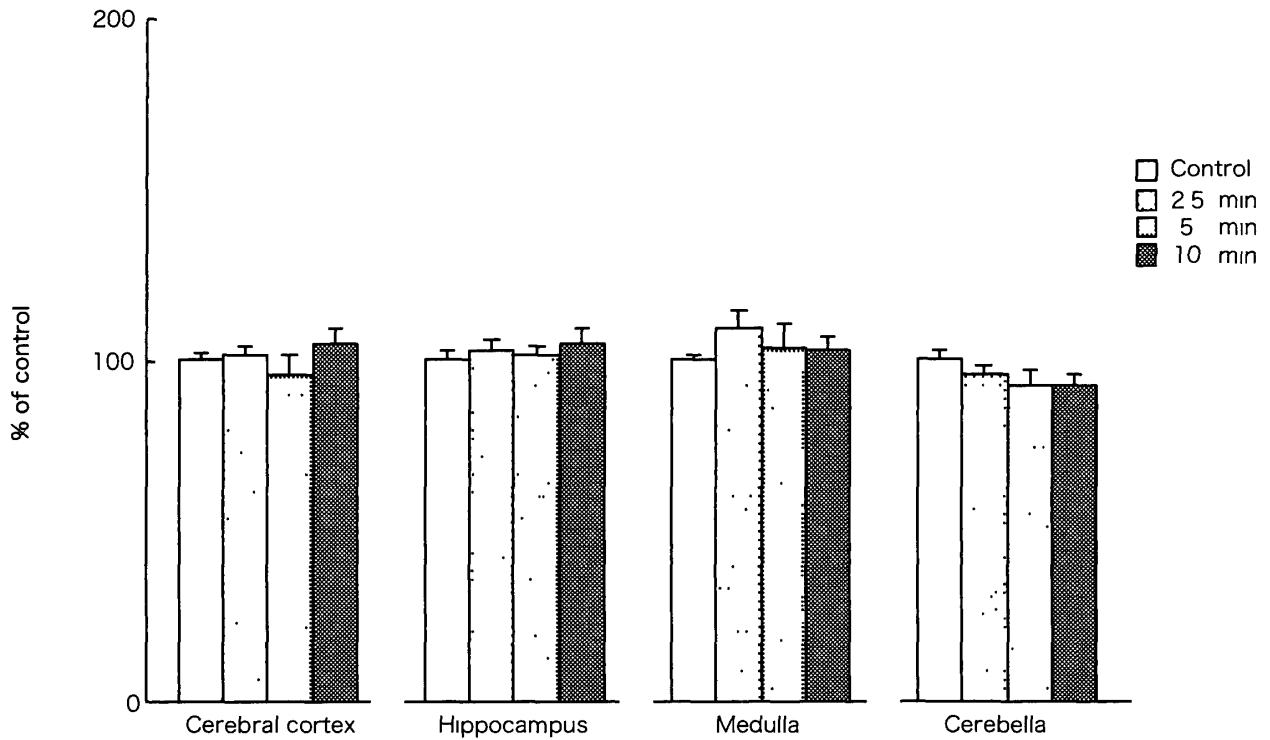


Fig 8 Effects of complete cerebral ischemia on phosphocholine contents in the mouse discrete brain regions. Phosphocholine contents are expressed as percentages of the control values. Each value is the mean  $\pm$  SEM of 8 mice.

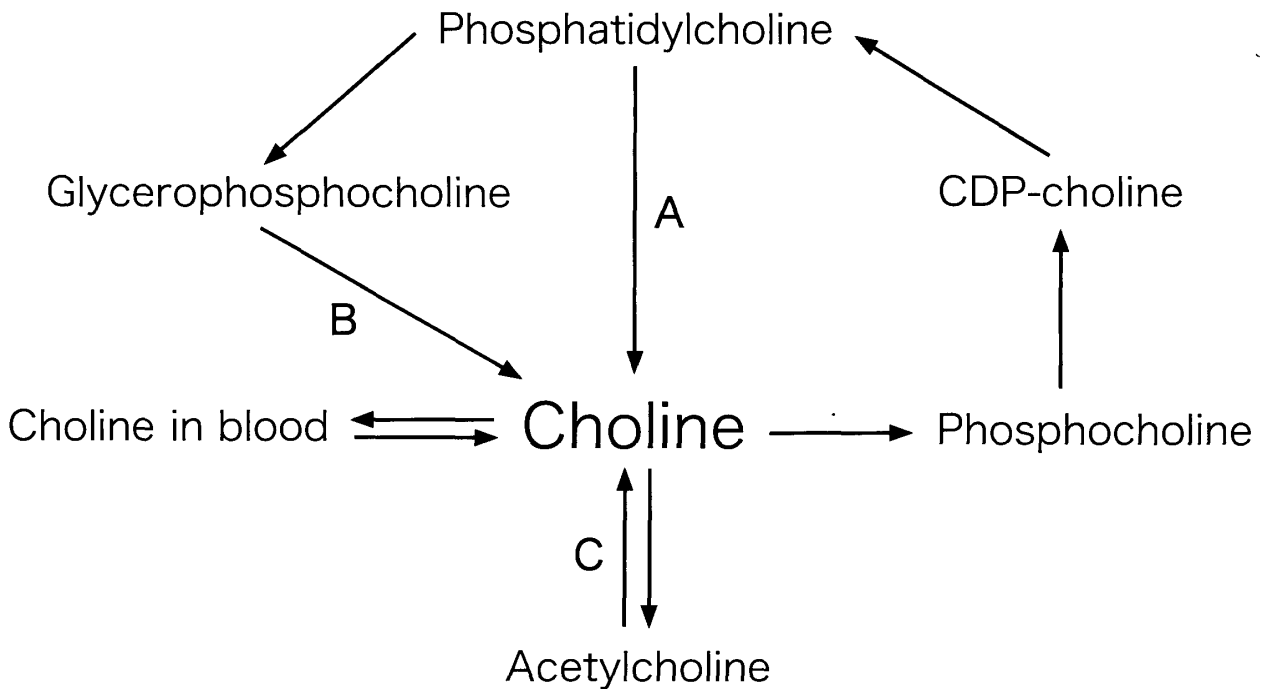


Fig 9 Choline metabolism major pathway

にも変化が発現するのか、(3)増加したChはどこから供給されるのか、虚血下における脳内Ch代謝に関する検討を行った。以下、項目毎に考察する。

### 1) 完全脳虚血

最初に脳内Ch量が、死後どのような経時的变化を示すかを、全脳を用いて検討した。Fig. 1に示したように、脳内Ch量は、死後、経時的に増加していくが、その増加曲線の傾斜には、死後10分を境に明らかな相違が認められた。すなわち、脳内Ch量は死後10分までは急激に増加し、10分以降ではゆるやかな増加曲線を示した。この結果は、死後10分までとそれ以降では、完全虚血（低酸素+低血糖）により誘導されるCh代謝に相違がある可能性を示唆している。脳機能は3～4分間以上の完全虚血により不可逆的な損傷を受けることか知られている。この事実は完全虚血に対する正常な脳機能の維持力が、3～4分間を境にして低下することを示している。もしCh量増加が脳機能保護に関与する反応ならば、完全虚血の発生とはほぼ同時に発現し、その後10分程度で急速に弱まってしまうCh量増加現象は、やや時間的なずれはあるものの、脳機能の維持力低下の原因と関係する可能性が考えられる。

死後における脳内Ch量変化について、Koshら<sup>13)</sup>は、死後15分で約7倍に増加したことを報告している。一方、本実験における全脳内Ch量増加は、死後10分で約8倍、15分後で約11倍と、Koshら<sup>13)</sup>の報告を大きく上回る数値であった。Ch増加量に関するこのような差は、おそらく動物の屠殺法に著者との違いがあるためと考えられる。死後極めて急速に増加するCh量の測定には、死後増加を停止するために、著者と同様なマイクロ照射による屠殺手技が必須である。しかし、Koshら<sup>13)</sup>の研究ではマイクロ照射屠殺法を使用していないため、増加率計算の基礎となる対照群の値が大きめに算出され、その結果、増加率は小さく計算されたと考えられる。

次に、Chの死後増加率が脳部位により相違

するかどうかを明らかにするために、Ch量の測定を脳部位別に行った。検討部位としては、総頸動脈に支配されている大脳皮質、海馬と椎骨動脈の支配領域である延髄、小脳を用いた。その結果、Fig. 2に示したように、死後のCh量の増加率は、明らかに脳部位によって異なっていた。Ch増加量を部位別に比較してみると、大脳皮質・海馬群と延髄・小脳群とに分けられ、椎骨動脈の支配領域の延髄、小脳は、いずれも総頸動脈の支配領域の大脳皮質、海馬群よりも明らかに高い増加率（1.3倍）を示した。マウスの場合、脳組織への血液の供給量は、総頸動脈よりも椎骨動脈の方が多いたことが知られている。したがって、本実験の結果から、供給血流量の大きい脳部位は、供給血流量の少ない脳部位よりも完全虚血の影響をより強く受ける可能性が示唆される。

### 2) 選択的脳虚血

頸椎脱臼による死亡の場合、脳機能に対する主な有害要因は、低酸素と低血糖であるが、その他にも、中枢神経系と末梢臓器との離断などの影響が考えられる。そこで、頸椎脱臼死後に発現するCh量増加が、完全虚血によるものかどうかを検討するため、選択的な脳虚血実験を行った。本実験には、Himoriら<sup>21)</sup>が開発した2-VOマウスモデルを用いた。このモデルは、非麻酔下で両側総頸動脈の閉塞・開放を簡単に実施出来る特長を持っている。本実験に用いたddY系マウスでは、脳底部のWillis動脈輪が未発達のため、両側総頸動脈閉塞を行った場合、椎骨動脈から総頸動脈支配領域である大脳皮質・海馬への血液の流入がほとんど起こらない。そのため、本法では大脳皮質および海馬だけの虚血を選択的に発現することができる。この時、椎骨動脈の血流には影響がでないので、延髄および小脳には虚血状態は発現しない。

Fig. 3に示したように、両側総頸動脈閉塞後のCh量は、大脳皮質、海馬のみで著しく増加し、延髄、小脳ではほとんど変化を示さなかった。大脳皮質および海馬における閉塞後のCh量は、時間とともに増加し、閉塞5分後の増加

量は、頸椎脱臼による完全虚血時とほぼ同程度であった。これらの結果から、頸椎脱臼死後に発現するCh量増加反応は、完全虚血（低酸素+低血糖）により誘発されたと結論される。また、総頸動脈閉塞により大脳皮質、海馬に大量に蓄積したCh量は、解放後急速に減少し、解放10分後ではほぼ正常レベルまでに戻った。脳からのChクリアランス速度は、約12nmol/g/min（ラット）と報告されている<sup>31)</sup>。この速度は本実験における5分間の虚血により蓄積したCh量を10分程度で排除出来る速度であることから、本実験で認められたCh量減少は、血流再開により通常のChクリアランスが再開したためと考えられる。

### 3) 低酸素

Pearigenら<sup>32)</sup>は、循環が維持されている場合、低酸素のみでは脳に不可逆的な病理変化が起こらないことを報告している。この知見は、虚血による脳障害の誘発要因としては、低酸素よりも血流停止がより強い影響を及ぼすことを示唆している。そこで、脳内Ch量に及ぼす低酸素（100%窒素ガスの吸入）の効果と、完全虚血（低酸素+低血糖）時の変化とを比較した。その結果、Fig. 4に示したように100%窒素ガスの持続吸入により、測定した全ての脳部位で、Ch量の有意な増加が発現した。また、低酸素状態と完全虚血時のCh量変化を比較した場合、完全虚血時の方が、大脳皮質、海馬で約1.5倍、延髄、小脳で約2倍、増加程度が大きかった。この時のPaO<sub>2</sub>は、Table. 1に示したように100%窒素ガス持続吸入群で正常値の約60%に、完全虚血群で約15%に低下していた。PaO<sub>2</sub>低下状態が両群で相違していたことから、完全虚血と低酸素のどちらがCh量増加現象に対してより重要な要因であるかの結論は困難である。しかしながら、これらの結果から、完全虚血によるCh量増加には、低酸素と低血糖の両要因が関係していると結論される。また、血液供給量の多い部位（延髄、小脳）では、少ない部位（大脳皮質、海馬）よりも、より強く完全虚血の影響を受ける可能性が示唆される。

### 4) 低血糖

グルコースは、脳機能維持に必須の重要なエネルギー源であり、広く知られているように低血糖状態は重大な脳機能の損傷を招く要因である。完全虚血時では血流が停止するため、脳組織周囲の血液中の酸素およびグルコース量の低下が急速に進む。また、Hinzenら<sup>33)</sup>はウサギを用いた実験において、血糖値が60mg/dlに低下すると脳内リン脂質は緩やかに減少し始め、30mg/dl以下では急激な脳内リン脂質の減少が起こることを報告している。多量のPtdChやGlyChを含有する脳内リン脂質の分解促進は、Ch量の増加を招くので、本実験で認められたCh量増加の発現要因として、虚血による低血糖が関与する可能性がある。そこで、脳内Ch量に及ぼす低血糖の影響を検討した。その結果、Fig. 5に示したように、インスリン投与による低血糖状態は、脳内Ch量に有意な変化を及ぼさなかった。しかしながら、正常血糖値虚血群と低血糖値虚血群を比較した場合には、明らかに低血糖値群の方が、より強く脳内Ch量増加を起こした。虚血+インスリン投与は、虚血のみの状態よりもより強い低血糖状態を発現すると考えられることから、極度の低血糖もCh量増加の誘発要因となる可能性がある。ただし、低血糖条件の負荷だけではCh量増加が起こらなかった結果から、低血糖は虚血による為害作用の強化要因として、Ch量増加に関与する可能性も排除できない。

### 5) Ch代謝

脳内Ch量を増加する要因として知られている主な経路としては、Fig. 9に示したように(1)細胞膜構成成分PtdChの分解（経路A）、(2)GlyChの分解（経路B）、(3)AChの分解（経路C）などが知られている。これらの経路のうち、PtdCh分解経路については、死後のCh量増加に関係することが、すでに報告されている<sup>1,11)</sup>。Jendenら<sup>34)</sup>は、このPtdCh分解経路はエネルギーを必要としない為、虚血後のエネルギーおよび酸素の欠乏した状態でも反応が亢進するこ

とを報告している。したがって、本実験における Ch の死後増加機序にも PtdCh 分解が関与している可能性は高い。しかしながら、第 2 の経路である GlyCh 分解経路が関与する可能性については不明である。そこで死亡後の増加した Ch がどこから供給されるのかを更に明らかにするため、死後の脳内 Ch 代謝を分析した。その結果、Fig. 7 に示したように、完全虚血後、PtdCh 量（大脳皮質と延髄）と GlyCh 量（全ての脳部位）の有意な減少が認められた。

脳組織内での PtdCh 量は、Ch 量と比べて絶対量（大脳皮質で 850 倍、延髄で 600 倍）がきわめて大きいため、わずかな割合の PtdCh 分解でも Ch 量の顕著な増加につながる。本実験で認められた Ch の増加量は、PtdCh の減少量から見積もられる Ch 量の増加で十分にカバーされる。したがって、本実験における Ch 量の死後増加には、これまでの報告と同様に PtdCh 分解促進が関与していると考えられる。しかしながら、GlyCh 量に関しても、死後 10 分で 30% 程度の減少が認められた。この減少量だけでも本実験で認められた Ch の増加量を十分にカバーすることから、GlyCh 分解促進の寄与も大きいと考えられる。一方、第 3 の経路である ACh 分解経路は、存在する ACh の全量が分解した場合でも、Ch 増加量のわずか 5% 程度の寄与に留まることから、この経路の関与の度合いは、極めて低いと考えられる。これまで、虚血時の Ch 量の急速増加は、PtdCh の分解促進によるものとされてきたが、本実験の結果は、虚血後 5 分までの Ch 量増加の主な要因として GlyCh の分解促進が、10 分以降は GlyCh および PtdCh の両者の分解促進が関与する可能性を示唆するものである。

## 結 語

頸椎脱臼による完全脳虚血マウスおよび総頸動脈閉塞による選択的脳虚血マウスを使用して、死後急速に増加する脳内 Ch 量の代謝を比較解析し、以下の結果を得た。

1. 死後の Ch 量は、死後 10 分まで直線的かつ

急激に増加したが、10 分以降の増加速度は急激に低下した。

2. 死後の Ch 量増加は、測定した全ての脳部位（大脳皮質、海馬、延髄、小脳）で極めて急速に発現した。

3. 死後の Ch 量増加の程度は、脳部位により異なった。

4. 選択的脳虚血は、大脳皮質と海馬の Ch 量を増加させた。

5. 窒素ガス吸入による低酸素状態は、脳内 Ch 量を著しく増加させた。

6. インスリン投与による低血糖状態は、脳内 Ch 量に影響を及ぼさなかったが、低血糖状態下での虚血は、虚血だけよりも更に強く Ch 量を増加させた。

7. 完全虚血により、脳内 PtdCh と GlyCh 量は、有意に低下した。

以上の結果より、死後直後より開始される急速かつ急激な脳内 Ch 量増加には、脳部位依存性があり、これは血流量の違いによると考えられる。その発現の主な要因は虚血による低酸素で、一部、低血糖による低エネルギー状態も関与していることが示唆される。また、これらの Ch 量増加は、PtdCh と GlyCh の両者の分解促進により生じた Ch の蓄積によることが示唆される。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、終始ご懇篤なる指導と校閲を賜りました歯科麻酔学講座城茂治教授に深甚なる謝意を表します。本研究に際し、ご懇篤な校閲を賜りました歯科薬理学講座加藤裕久教授ならびに口腔外科学第一講座水城春美教授に心から感謝の意を表します。さらに、本研究の遂行にあたり数多くのご教示をいただきました歯科薬理学講座村井繁夫助教授、斉藤弘子博士に衷心より謝意を捧げます。

なお、本論文の一部は、第 31 回日本歯科麻酔学会総会（2003 年 9 月、岡山）および第 32 回日本歯科麻酔学会総会（2004 年 10 月、東京）において発表した。

## 文 献

- 1) Jenden, D J · The metabolism of choline *Bull Clin Neurosci* 55 · 99-106, 1991
- 2) Zeisel, S H. and Blusztajn, J. K. : Choline and human nutrition *Annu Rev Nutr.* 14 . 269-296, 1994
- 3) Zeisel, S. H Choline . An essential nutrient for humans. *Nutrition* 16 669-671, 2000.
- 4) Kahn, R A, Yucel, J. K and Malhotra, V. ARF signaling a potential role for phospholipase D in membrane traffic. *Cell* 75 1045-1048, 1993
- 5) Tronchre, H., Plant, V, Record, M, Terce, F., Ribbes, G and Chap, H · Phosphatidylcholine turnover in activated human neutrophils. *J Biol. chem.* 270 13138-13146, 1995.
- 6) Krause, R M, Hamann, M., Bader, C. R, Liu, J H, Baroffio, A and Bernheim, L : Activation of nicotinic acetylcholine receptors increases the rate of fusion of cultured human myoblasts. *J Physiol.* 489 779-790, 1995
- 7) Shin, O. H., Mar, M. H, Albright, C D., Citarrella, M. T, da Costa, K A. and Zeisel, S. H · Methylgroup donors cannot prevent apoptotic death of rat hepatocytes induced by choline-deficiency *J Cell Biochem.* 64 · 196-208, 1997
- 8) Carriere, J L. and El-Fakahany, E E. . Choline is a full agonist in inducing activation of neuronal nitric oxide synthase via the muscarinic M<sub>1</sub> receptor *Pharmacology* 60( 2 ) · 82-89, 2000
- 9) Shi, H., Wang, H, Lu, Y, Yang, B and Wang, Z : Choline modulates cardiac membrane repolarization by activating an M<sub>3</sub> muscarinic receptor and its coupled K<sup>+</sup> channel *J Membr Biol.* 169 : 55-64, 1999.
- 10) Loffelholz, K., Klein, J. and Koppen, A · Choline, a precursor of acetylcholine and phospholipids in the brain. *Prog Brain Res.* 98 . 197-200, 1993
- 11) Klein, J, Holler, T., Cappel, E, Koppen, A. and Loffelholz, K Release of choline from rat brain under hypoxia · contribution from phospholipase A<sub>2</sub> but not from phospholipase D *Brain Res.* 630 337-340, 1993
- 12) Dross, K. and Kewitz, H · Concentration and origin of choline in the rat brain. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 274( 1 ) 91-106, 1972
- 13) Kosh, J W., Dick, R M. and Freeman, J J Choline postmortem increase Effect of tissue, agitation, pH and temperature. *Life Sci* 27(21) 1953-1959, 1980
- 14) Ceder, G and Schuberth, J In vivo formation and postmortem changes of choline and acetylcholine in the brain of mice *Brain Res* 128 ( 3 ) . 580-584, 1977
- 15) Beley, A , Bertrand, N. and Beley, P. : Cerebral ischemia changes in brain choline, acetylcholine, and other monoamines as related to energy metabolism *Neurochem Res.* 16(5) : 555-561, 1991.
- 16) Jenden, D J., Scremin, O U., Roch, M and Li, G. The influence of aging on whole body choline release and clearance *Life Sci* 58(22) · 2003-2009, 1996
- 17) Strahlendorf, J. C., Acosta, S., Miles, R and Strahlendorf, H K. Choline blocks AMPA-induced dark cell degeneration of Purkinje neurons · potential role of the alpha 7 -nicotinic receptor. *Brain Res* 901( 1 - 2 ) : 71-78, 2001
- 18) Jonnala, R. R, Graham, J. H. 3 rd., Terry, A. V Jr., Beach, J W, Young, J A and Buccafusco, J J. Relative levels of cytoprotection produced by analogs of choline and the role of alpha 7 -nicotinic acetylcholine receptors. *Synapse* 47 ( 4 ) · 262-269, 2003.
- 19) Tohgi, H, Utsugisawa, K. and Nagane, Y · Protective effect of nicotine through nicotinic acetylcholine receptor alpha 7 on hypoxia-induced membrane disintegration and DNA fragmentation of cultured PC12 cell. *Neurosci Lett* 285( 2 ) 91-94, 2000.
- 20) Gurun, M. S, Icol, Y. O, Taga, Y. and Ulus, I H. · Hyperglycemia induced by intracerebroventricular choline involvement of the sympatho-adrenal system. *Eur J Pharmacol.* 438( 3 ) : 197-205, 2002
- 21) Himori, N, Watanabe, H, Akaike, N., Kurasawa, M., Itoh, J and Tanaka, Y · Cerebral ischemia model with conscious mice Involvement of NMDA receptor activation and derangement of learning and memory ability. *J Pharmacol Methods* 23( 4 ) . 311-327, 1990.
- 22) Glowinski, J. and Iversen, L. L · Regional studies of catecholamines in the rat brain *J. Neurochem.* 13 . 655-669, 1966.
- 23) Murai, S., Miyate, H., Saito, H., Nagahama, H, Masuda, Y and Itoh, T. . Simple determination of acetylcholine and choline within 4 min by HPLC-ECD and immobilized enzyme column in mice brain areas. *J. Pharmacol Methods* 21( 4 ) 255-262, 1989
- 24) Murai, S., Saito, H, Shirato, R and Kawaguchi, T . An improved method for assaying phosphocholine and glycerophosphocholine in mouse tissue *J Pharmacol Toxicol Methods.* 46( 2 ) 103-109, 2001.
- 25) Murai, S., Saito, H., Shirato, R., Tamura, H, Yamada, A , and Kato, H An improved method for assaying phosphatidylcholine in mouse tissue *J. Pharmacol Toxicol. Methods* 50 223-229, 2004.

- 26) Potter, P E, Meek, J L, and Neff, N H.  
Acetylcholine and choline in neuronal tissue measured by HPLC with electrochemical detection *J Neurochem* 41(1) . 188-194, 1983.
- 27) Richard, W H, Rubio, R. and Berne, R · Brain adenosine production in the rat during 60 seconds of ischemia. *Circulation Res* 45 · 486-492, 1979.
- 28) Steiner, A. L., Ferrendelli, J. A and Kipnis, D M Radioimmunoassay for cyclic nucleotides *J Biol Chem* 247 . 1121- 1124, 1972
- 29) Olsen, U. B and Kofod, A R . Pharmacological manipulations of anoxia-induced free fatty acid accumulation in the mouse brain *Mol Chem. Neuropathology* 15 · 261-270, 1991
- 30) Winn, H. R., Rubio, R and Berne, R M · Brain adenosine concentration during hypoxia in rats *Am. J Physiol.* 241(2) H235-H242, 1981
- 31) Choi, R L, Freeman, J J and Jenden, D J. . Kinetics of plasma choline in relation to turnover of brain choline and formation of acetylcholine *J Neurochemistry* 24 735-741, 1975
- 32) Pearigen, P., Gwinn, R and Simon, R. P The effects in in vivo of hypoxia on brain injury. *Brain Res* 725(2) : 184-191, 1996
- 33) Hinzen, D H, Becker, P. and Muller, U Einfluss von insulin auf den regionalen phospholipidstoffwechsel des kaninchengehirns in vivo *Pflugers Arch* 321 1-14, 1970
- 34) Jenden, D J and Scremin, O U · Effect of hypoxia and hypercapnia on whole body release and clearance of choline. *Am. J Physiol.* 268 R1520-1525, 1995