

# 砂ねずみ海馬スライスにおける低酸素負荷に対する アシドーシスの影響

奈良県立医科大学第2外科学教室

鎌田 喜敬

## EFFECTS OF ACIDOSIS ON THE POSTHYPOXIC RECOVERY OF SYNAPTIC TRANSMISSION IN GERBIL HIPPOCAMPAL SLICES

YOSHITAKA KAMADA

Department of Neurosurgery, Nara Medical University

Received October 13, 1999

*Abstract*: We investigated the effect of acidosis on hypoxic neuronal damage using gerbil hippocampal slices. Acidosis could delay the onset of harmful hypoxic depolarization, but the synaptic recovery after reoxygenation was attenuated when acidosis was sustained. Conversely, synaptic recovery was potentiated when acidosis was restored to the physiological milieu during the period of reoxygenation. These results suggest that acidosis exerts a protective effect on hypoxic neuronal damage only when rapid appreciable pH recovery is achieved during reoxygenation.

(奈医誌. J. Nara Med. Ass. 50, 509~514, 1999)

**Key words**: acidosis, hypoxia, gerbil, neuroprotection, hippocampal slice

### 緒 言

従来より、虚血性あるいは低酸素性神経組織障害において、acidosisは組織障害性に作用すると考えられてきた。無酸素下では、乳酸の産生により細胞および組織の脆弱性が増すと報告されており<sup>25)</sup>、いくつかのin vivoの虚血障害動物モデルにおいては、acidosisの程度に比例して障害の程度が増すと報告されている<sup>14,17,31)</sup>。

しかし一方では、pH 6.8程度のacidosis下で梗塞巣が減少し、細胞の虚血性障害が軽減したとの報告もあり、同程度のpH 6.9程度のmild acidosis下では、hypoxic depolarization(HD)が遅延し、低酸素性神経組織障害からの回復が改善されたとも報告されている<sup>28)</sup>。In vitroの低酸素性神経細胞障害モデルにおいては、acidosisが神経保護の方向に作用すると報告されており、pHの低下が、NMDAチャンネルを介するion transportationを低下させ、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度を低下させることにより低酸素性神経細胞障害が抑制されると報告されている。

したがって、acidosisの低酸素および虚血神経細胞障害に対する効果に関しては、いまだ不明な点が多い。

生体内においては、虚血条件下で、脳内のpH環境はacidosisに傾くが、その程度および時間的変化に関しては、様々である。例えばそれが、完全虚血であるか不完全虚血であるか、または、focal ischemiaかglobal ischemiaか、さらには、再灌流の有無等、虚血の種類によっても様々に変化する。

今回我々は、効果の不明瞭となる要因として、それぞれの実験において、低酸素あるいは虚血負荷の違い、pH環境の違いによりacidosisの効果の様々に報告されていると考えた。本実験系においては、in vitroで砂ねずみ海馬スライスモデルを用いて、組織酸素分圧、温度、糖濃度、イオン環境を一定とし、低酸素負荷後のpH環境のみを変化させることにより、acidosisの効果を電気生理学的に検討した。

## 対象と方法

60~80 g の成熟砂ねずみ (*Meriones unguiculatus*) をエーテル麻酔下に断頭し、以前より報告されている方法と同様に海馬スライスを採取した<sup>27)</sup>。今回我々は、124 mmol NaCl, 3.3 mmol KCl, 1.25 mmol  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.4 mmol  $\text{MgSO}_4$ , 2.0 mmol  $\text{CaCl}_2$ , 25.7 mmol  $\text{NaHCO}_3$ , 10 mmol glucose の人口髄液 (ACSF) を作成し、95%  $\text{O}_2$  : 5%  $\text{CO}_2$  で酸素化を十分に行い、pH 7.4 としている (control ACSF)。採取した大脳は、速やかに酸素化された 0°C の ACSF に浸し、両側海馬を摘出した。さらに、摘出した両側海馬は、カミソリを用いて 500  $\mu\text{m}$  の厚さに冠状断に cut して海馬スライスを作製した。作製したスライスを interface 式 chamber に移動、温度は 36°C に設定した。ACSF の pH に関しては、Chamber 内に microprobe (SHOTT pH electrode, Orion Research, Boston) を挿入し、持続的に計測した。気相は、95%  $\text{O}_2$  : 5%  $\text{CO}_2$  とし、液相を control ACSF で 10 ml/h で 60 分間灌流した。片側海馬よりスライス 2~3 枚を用い synaptic response を記録した。刺激電極に関

しては、双極刺激電極を CA 1/CA 3 の境界部に設置し、記録電極は、人口髄液で満たしたガラスピペットを CA 1 の radiatum の層に設置した。15 秒毎に単発刺激を加え Schaffer collateral と commissural afferent の順行性の興奮性シナプス後電位 (f EPSP) を記録した。また、DC potential の記録電極を前述の記録電極近傍に設置し、HD を記録した。刺激強度に関しては、最大の f EPSP を呈する 60% の強度としている。

ACSF の pH 調整に関しては 1 N HCl を用い ACSF の acidosis レベルを pH 6.2, 6.9 の 2 段階と control の pH 7.4 の 3 段階に設定した。それぞれの pH 下に通常酸化の下 f EPSP を記録し、電位の安定した後 95%  $\text{N}_2$  : 5%  $\text{CO}_2$  により低酸素負荷を加えた。低酸素負荷は、実験 1 では、HD のみられたのち更に 5 分間の低酸素負荷を加えた (計 6~11 分)。また、実験 2 では実験 1 と同程度の低酸素負荷時間で、constant に 8 分間の低酸素負荷を加えた。両群ともに、それぞれのスライスで低酸素負荷中に HD が生じるまでの時間を計測し、低酸素負荷後 95%  $\text{O}_2$  : 5%  $\text{CO}_2$  で再酸素供給を行うとともに f EPSP を 60 分間記録した。

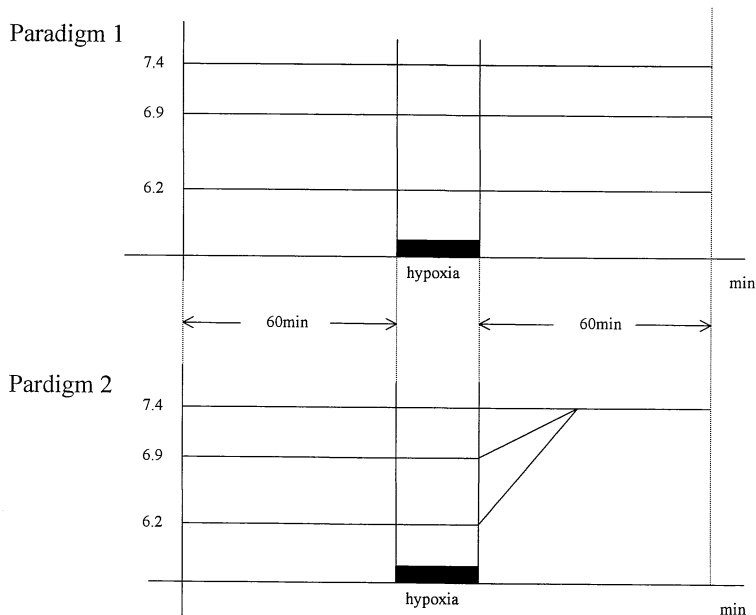


Fig. 1. This figure shows the time course and the sequential change of the pH of ACSF. In both paradigms, slices were incubated at adjusted pH for 60 min. After hypoxic period, in paradigm 1, slices were exposed at adjusted pH, but in paradigm 2 pH circumstances were recovered to pH 7.4.

再酸素供給中の pH は、実験 1 ではそれぞれのレベルで acidosis を保続したのに対し、実験 2 では、全てのスライスで pH を normal の 7.4 に復した (Fig. 1)。低酸素性神経組織障害からの回復に関しては、再酸素供給後 45~60 分の間の f EPSP の平均値を算出した後、低酸素負荷前の f EPSP に対する割合で検討した。それぞれの回復率を a) control ACSF (pH=7.4, n=14) b) mild acidic ACSF (pH=6.9, n=14) c) severe acidic ACSF (pH=6.2, n=14) 間及び実験 1 と実験 2 で比較検討した。本論文中の全ての data および table は、mean±SD で表示している。

### 結 果

従来の報告と同様、記録される活動電位の波形は、Fig. 2 のごとくであった<sup>27)</sup>。低酸素負荷により、これらの波形は、最初に synapse 後電位の f EPSP の低下がみられ、次に non synaptic な factor である fiber volley が消失するという特徴的な変化を呈した (Fig. 2)。さらに低酸素負荷を続けると、non synaptic な活動電位が消失し、

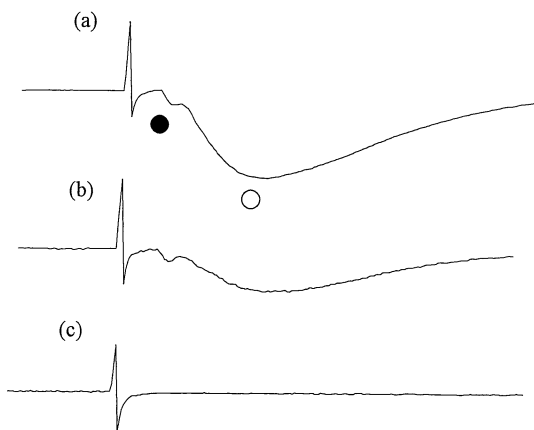


Fig. 2. The sequence of waveform of evoked potentials during hypoxia. (a) pre-hypoxic base line waveform consisted of early fiber volley (●) and late f EPSP (○). (b) Same response elicited 1 minute after starting hypoxia. The late f EPSP is drastically reduced. (c) Responses taken a few minutes after beginning hypoxia. Both fEPSP and fiber volley completely eliminated; hypoxic depolarization was observed at this time.

10~15 mV の DC potential の negative shift, いわゆる HD を認めた。

#### 1) 実験 1 (paradigm 1)

低酸素負荷前の f EPSP voltage は、acidosis の程度に比例して低値を示した (Table 1)。HD に関しては、pH 6.9, 7.4 の下では、全てのスライスが 8 分以内に HD を呈し、更に pH 6.9 の下で HD までの時間が有意に延長していた (Table 2)。また、pH 6.2 の severe acidosis 群では 14 スライス中 10 スライスで HD がみられず、HD の認められた 4 例においても control 群に比し、有意に HD までの時間が延長された (Table 2)。以上のように低酸素負荷中に acidosis の環境下にあった群においては、その程度に比例して HD が遅延した。

しかし、その回復率に関してみると、低酸素負荷後も pH 環境を acidosis のまま継続した本実験においては、pH 7.4 の control 群において 28.1±15.1% であったのに対し pH 6.2, 6.9 の acidosis 群で 8.0±11.3, 15.9±4.1% と有意に低下した (Table 3)。

#### 2) 実験 2 (paradigm 2)

低酸素負荷前の f EPSP voltage は、実験 1 同様 acidosis のレベルに比例して低値を示した (Table 1)。HD に関しては、pH 7.4 の control 群では、全例 8 分以内に脱分極を認めたが、pH 6.9 では 14 例中 8 例、pH 6.2 の severe acidosis 群では 14 例中 5 例のみが HD を呈した。これら acidosis 群での HD の出現頻度は、control 群に比し統計学的にも有意に低いものであった (chi-square test)。また、HD までの時間に関しても Table 2 のごとく、実験 1 同様 acidosis 群は、control 群に比し有意に延長した。

しかし、低酸素負荷後の pH 環境を 7.4 に復した本実験においては、実験 1 と異なり pH 6.2 の severe

Table 1. Pre-hypoxic f EPSP voltages in hippocampal slices is shown (in mV). Values are means±SD. Incubation with severe acidic ACSF (pH 6.2) significantly attenuates f EPSP voltages. \* p<0.05 vs control ACSF (Kruskal-Wallis test followed by Dunnett's method)

	pH 6.2	pH 6.9	pH 7.4
paradigm 1	1.3±0.3*	2.2±0.3	2.4±0.4
paradigm 2	1.9±0.3*	2.3±0.3	2.3±0.4

Table 2. Delay to HD in both paradigms is shown (in min). In both paradigms, acidic slices lead to delay the onset of HD. \*  $p < 0.05$  vs control ACSF (Kruskal-Wallis test followed by Dunnett's method)

	pH 6.2	pH 6.9	pH 7.4
paradigm 1	6.2±1.6*	2.4±0.8*	1.6±0.9
paradigm 2	4.4±1.9*	3.9±1.6*	1.9±1.0

Table 3. The percentage recovery of the fEPSP is shown (in %). In paradigm 1, for slices subjected acidosis after hypoxic period, the recovery ratio was substantially attenuated by a reduced pH. However, subjected to the normal pH, acidosis enhances the post-hypoxic recovery of fEPSP in paradigm 2. Values are means±SD. \*  $p < 0.05$  vs control ACSF (Kruskal-Wallis test followed by Dunnett's method)

	pH 6.2	pH 6.9	pH 7.4
paradigm 1	8.0±11.3*	15.9± 4.1*	28.1±15.1
paradigm 2	68.0±28.6*	50.1±24.5*	17.8±14.6

acidosis 群で 68.0±28.6%, mild acidosis 群で 50.1±24.5%, control 群で 17.8±14.6% と acidosis 群で程度に比例して回復率の改善を認めた (Table 3).

## 考 察

今回我々は、2種類の実験を用いて、acidosis の時期及び程度を変更させることにより、神経細胞の低酸素性組織障害に対する acidosis の効果を検討した。実験 1, 2 共に acidosis 下では、低酸素負荷に対し HD が遅延し、低酸素性神経細胞障害に対し、神経保護効果が認められた。しかし、実験 1 で再酸素供給期の pH 環境を acidosis のまま継続した群においては、低酸素負荷後の f EPSP の回復率が pH 7.4 の control 群に比べ低下したのに対し、pH 環境を normal に復した実験 2 においては、acidosis 群の f EPSP の回復率は、control 群よりも改善した。この差は、pH 6.2 の severe acidosis 群で最も著明となり、実験 1 でその回復率は 8% であったのに対し、実験 2 では 68% であった。

従来より、神経細胞において、組織 pH の低下、acidosis は低酸素性あるいは虚血神経細胞障害に対して、

細胞障害性に作用するとされてきたが、in vitro モデルだけでなく in vivo モデルにおいても、acidosis が neuroprotective に作用するとの報告が少なからず認められている。保護効果を発現する作用機序としては、NMDA channel の活性を低下させることによる細胞内への  $Ca^{2+}$  の流入の抑制あるいは glutamate receptor に対する抑制効果の減弱等の様々な要因が考えられている。例えば、大脳皮質スライスモデルにおいて、低酸素の負荷により pH は低下し、 $Ca^{2+}$  の流入が増加する<sup>15)</sup> と報告されているが、Trafton らによれば中枢神経細胞の培養モデルにおいてはその効果は両面性をもち、脳神経細胞に対しては複雑で両面性の効果をもつと結論している。また近年、acidosis は、それ自体電解質の catalysis を促進し、free radical を産生することにより、神経細胞を障害しうるとの報告も認められる<sup>12,21)</sup>。いずれにせよ、神経細胞の低酸素性組織障害における acidosis の影響に関しては、様々に報告されており、いまだ明らかではないのが現状である。

実際に、虚血あるいは低酸素性神経組織障害による脳内の酸塩基平衡に関しては、部位や時期などを含め常に一定ではない。例えば、ウサギの中大脳動脈完全閉塞モデルにおいて、大部分の penumbra 領域における細胞内 pH は正常範囲に復するが、再灌流障害や虚血性の神経細胞障害により pH が正常化しない部位が認められる<sup>29)</sup>。この結果は、低酸素性神経細胞障害における acidosis の様々な作用機序を示唆するものであり、検討を要すると考えられる。

In vitro のスライス実験モデルにおいては、様々な生理学的要素を厳密に control することが可能であり、in vivo では操作困難な組織環境を設定することが可能となる。本実験系においては、低酸素負荷中に大量の  $Ca^{2+}$  の神経細胞内への流入による急激な脱分極いわゆる HD が認められた。これは、低酸素性あるいは虚血性神経細胞死を生じさせる過程における重要な trigger となると考えられている。スライス実験モデルにおいて、HD 後低酸素状態が数分以上継続した場合、synaptic transmission の回復が認められなかった<sup>1,2)</sup> との報告もあるため、低酸素性神経細胞障害の治療において HD を遅延させることは、神経病理学的にも有効であると考えられた<sup>3,8,11,19,25)</sup>。以前からの報告例にも見られるように、本実験系においても acidosis 環境下では HD の発現が遅延し、実験 2 においては、acidosis の程度に比例して脱分極を呈する期間が短縮した。これは、低酸素供給後の synaptic recovery を改善する可能性を有すると考えられる。また、Maruki らによれば、再灌流後の細胞内 pH

の回復遅延が、電氣的活性の回復を遅延させると報告されており、本実験2において、一過性虚血後の低酸素供給下におけるpH環境の速やかな正常化が、神経障害の回復に有効であると考えられた。

いずれにせよ、虚血により生じたacidosisが、神経細胞の低酸素性組織障害においてその機能的回復にどのように作用するかは、いまだ不明瞭な点を残すが、本実験系においては、虚血中にpH環境を低く保つことによりHDが遅延し、Ca<sup>2+</sup>の細胞内への流入が抑制されると考えられた。しかし、再酸素供給後もacidosisを保持した場合においては、その機能回復が障害された。この阻害作用としては、acidosis自体の神経細胞や神経膠細胞への直接的障害作用が最も考えられる。また、acidosisのglutamate transporterに対する障害作用もあり、グルタミン酸輸送が障害され、機能回復が障害されたと考えられる。

一般に、脳血流量の低下が、不可逆的虚血性あるいは低酸素性脳神経障害を呈する原因となるのではなく、灌流血流量とそれに対する代謝とのバランスが大きな要因となる。また、Ca<sup>2+</sup>濃度の調節やfree radical, pH, neurotransmitterなど様々な要因が低酸素性神経障害に関与しているといった報告も認められている。

我々は、本実験系において、適切な酸素供給下で速やかに組織pHを正常化することにより、acidosisは低酸素性障害に対し神経保護効果を有することが示唆された。

## 結 論

- 1 砂ねずみ海馬スライスを用い、低酸素負荷による神経組織障害におけるacidosisの効果に関し電気生理学的に検討した。
- 2 スライス実験系を用い、低酸素負荷後のpH環境のみを変化させることにより低酸素性神経組織障害に対するacidosisの効果をも3段階に分類し検討した。
- 3 低酸素負荷中のacidosisは、HDを遅延させることにより低酸素性神経組織障害に対し、神経保護作用を有する。しかし、低酸素負荷後のacidosisは、低酸素性組織障害からの回復をその程度に比例して障害した。
- 4 適切な酸素供給下で、速やかに組織pHを正常化することにより、acidosisは低酸素性障害に対し、神経保護効果を有すると考えられた。

## 文 献

- 1) Arai, A., Kessler, M., Lee, K. and Lynch, G. : Halpain inhibitors improve the recovery of

synaptic transmission from hypoxia in hippocampal slices. *Brain Res.* **532** : 63-68, 1990.

- 2) Arlinghaus, L., Mehdi, S. and Lee, K. S. : Improved posthypoxic recovery with a membrane-permeable calpain inhibitor. *Eur. J. Pharmacol.* **209** : 123-125, 1991.
- 3) Balestrino, M., Aitken, P. G. and Somjen, G. G. : Spreading depression like depolarization in CA 1 and fascia dentata : relationship to selective vulnerability. *Brain Res.* **497** : 102-107, 1989.
- 4) Ebine, Y., Fujiwara, N. and Shimoji, K. : Mild acidosis inhibits the rise in intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in response to oxygen-glucose deprivation in rat hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* **168** : 155-158, 1994.
- 5) Giffard, R. G., Monyer, H., Christine, C. W. and Choi, D. W. : Acidosis reduced NMDA receptor activation, glutamate neurotoxicity, and oxygen-glucose deprivation neuronal injury in cortical cultures. *Brain Res.* **506** : 339-342, 1990.
- 6) Giffard, R. G., Monyer, H. and Choi, D. W. : Selective vulnerability of cultured cortical glia to injury by extracellular acidosis. *Brain Res.* **530** : 138-141, 1990.
- 7) Hansen, A. J. : Effect of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiol. Rev.* **65** : 101-148, 1985.
- 8) Hiramatsu, K., Kassell, N. F. and Lee, K. S. : Thermal sensitivity of hypoxic responses in neocortical brain slice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **13** : 395-401, 1993.
- 9) Kaku, D. A., Giffard, R. D. G. and Choi, D. W. : Neuroprotective effects of glutamate antagonists and extracellular acidity. *Science* **260** : 1516-1518, 1993.
- 10) Kaplan, J., Dimlich, R. V., Biros, M. H. and Hedges, J. : Mechanisms of ischemic cerebral injury. *Resuscitation* **15** : 149-169, 1987.
- 11) Lee, K. S. and Lowenkopf, T. : Endogenous adenosine delays the onset of hypoxic depolarization in the rat hippocampus in vitro via an action at A1 receptors. *Brain Res.* **609** : 313-315, 1993.
- 12) Li, P. A. and Siesjö, B. K. : Role of hyperglycaemia-related acidosis in ischaemic brain damage. *Acta. Physiol. Scand.* **161** : 567-580, 1997.
- 13) Maruki, Y., Koehler, R. C., Eleff, S. M. and

- Traystman, R. J.** : Intracellular pH during reperfusion influences evoked potential recovery after complete cerebral ischemia. *Stroke* **24** : 697-703, 1993.
- 14) **Myers, R. E.** and **Yamaguchi, S.** : Nervous system effects cardiac arrest in monkeys. *Arch. Neurol* **34** : 65-74, 1977.
- 15) **O'Donnell, B. R.** and **Bickler, P. E.** : Influence of pH on calcium influx during hypoxia in rat cortical brain slices. *Stroke* **25** : 171-177, 1994.
- 16) **Plum, F.** : What causes infarction in ischemic brain? *Neurology* **33** : 222-233, 1983.
- 17) **Pulsinelli, W. A., Waldman, S., Rawlinson, D.** and **Plum, F.** : Moderate hyperglycemia augments ischemic brain damage : a neuropathologic study in the rat. *Neurology* **32** : 1239-1246, 1982.
- 18) **Raley-Susman, K. M.** and **Barnes, J. R.** : The effects of extracellular pH and calcium manipulation on protein synthesis and response to anoxia/aglycemia in the rat hippocampal slice. *Brain Res.* **782** : 281-289, 1998.
- 19) **Roberts Jr. E. L.** and **Chih, C-P.** : The influence of age on pH regulation in hippocampal slices before, during, and after anoxia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **17** : 560-566, 1997.
- 20) **Saybasili, H.** : The protective role of mild acidic pH shifts on synaptic NMDA current in hippocampal slice. *Brain Res.* **786** : 128-132, 1998.
- 21) **Shen, H., Chan, J. Kass, I. S.** and **Berold, P. J.** : Transient acidosis induces delayed neurotoxicity in cultured hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* **185** : 115-118, 1995.
- 22) **Siemkowitz, E.** and **Hansen, A. J.** : Brain extracellular ion composition and EEG activity following 10 minutes ischemia in normo- and hyperglycemic rats. *Stroke* **12** : 236-240, 1981.
- 23) **Siesjö, B. K.** and **Li, P. A.** : Role of hyperglycaemia-related acidosis in ischaemic brain damage. *Acta. Physiol. Scand.* **161** : 567-580, 1997.
- 24) **Simon, R., Niiro, M.** and **Gwinn, R.** : Brain acidosis induced by hypercarbic ventilation attenuates focal ischemic injury. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **267** : 1428-1431, 1993.
- 25) **Smith, M-L.** and **Siesjö, B. K.** : Acidosis-related brain damage : immediate and delayed events, in : G. G. Somjen (Ed.), *advances in Behavioral Biology, Vol. 35, Mechanism and cerebral hypoxia and stroke.* Plenum Press, New York : 57-71, 1988.
- 26) **Swanson, R., Farrell, K.** and **Simon, R. P.** : Acidosis causes failure of astrocyte glutamate uptake during hypoxia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **15** : 417-424, 1995.
- 27) **Tokunaga, H., Hiramatsu, K.** and **Sakaki, S.** : Effect of preceding in vivo sublethal ischemia on the evoked potentials during secondary in vitro hypoxia evaluated with gerbil hippocampal slices. *Brain Res.* **784** : 316-320, 1998.
- 28) **Tombaugh, G. C.** : Mild acidosis delays hypoxic spreading depression and improves neuronal recovery in hippocampal slices. *J. Neurosci.* **14** : 5635-5643, 1994.
- 29) **Tomlinson, F. H., Anderson, R. E.** and **Meyer, F. B.** : Acidic foci within the ischemic penumbra of the New Zealand white rabbit. *Stroke* **24** : 1030-1039, 1993.
- 30) **Trafton, J., Tombaugh, G., Yang, S.** and **Sapolsky, R.** : Salutary and deleterious effects of acidity on an indirect measure of metabolic rate and ATP concentrations in CNS cultures. *Brain Res.* **731** : 122-131, 1996.
- 31) **Welsh, F. A., Ginsberg, M. D., Rieder, W.** and **Budd, W. W.** : Deleterious effects glucose pretreatment on recovery from diffuse cerebral ischemia in the cat, II. Regional metabolite levels, *Stroke* **11** : 355-363, 1980.