

199800253A

慢性期の中樞神経系外傷に関する研究

平成10年度厚生科学研究費補助金

脳科学研究事業(H10-脳-011)

総括研究報告書

分担研究報告書

平成11年3月

主任研究者

名古屋市立大学医学部脳神経外科学

山田和雄

分担研究者

名古屋市立大学医学部分子医学研究所生体制御部門

加藤泰治

名古屋市立大学医学部第二解剖学

島田昌一

大阪大学医学部脳神経外科学

甲村英二

慢性期の中樞神経系外傷に関する研究

平成10年度厚生科学研究費補助金

脳科学研究事業(H10-脳-011)

総括研究報告書

分担研究報告書

平成11年3月

主任研究者

名古屋市立大学医学部脳神経外科学

山田和雄

分担研究者

名古屋市立大学医学部分子医学研究所生体制御部門

加藤泰治

名古屋市立大学医学部第二解剖学

島田昌一

大阪大学医学部脳神経外科学

甲村英二

厚生大臣 宮下創平 殿

住所

フリガナ ヤマダ カズオ

研究者 氏名 山田 和雄

(所属施設 名古屋市立大学医学部脳神経外科)

平成10年度厚生科学研究費補助金(脳科学研究事業)に係る研究事業を完了したので次のとおり報告する。

研究課題名(課題番号) : 慢性期の中枢神経系外傷に関する研究(H10-脳-011)国庫補助金精算所要額 : 金 40,000,000 円也

1. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版及びこれを入力したフロッピーディスク (別添1のとうり)
2. 厚生科学研究費総括研究報告書 (別添2のとうり)
3. 厚生科学研究費分担研究報告書 (別添3のとうり)
4. 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名(雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Brain Res 800:69-77: Differential induction of immediate early gene mRNAs following cryogenic and impact trauma with/without craniotomy in rats.	1998		Katano H, Masago A, Harada S, Iwata A, Yamada K
Acta Neurochir71:195-199: Expression of immediate early gene c-fos in rat brain following increased intracranial pressure	1998		Matsumoto T, Masago A, Yamada K, Iwata A, Harada S, Mase M
臨床科学34: 1192-1199: 脳損傷における修復の分子機構と治療への応用—特に虚血性脳損傷に対するFGFの効果について	1998		山田和雄
神経外傷21:67-69: Astroglial cellのin vitro injury modelとIEG発現	1998		片野広之、藤田佳織、加藤泰治、浅井清文、真砂敦夫、山田和雄
Nature 395: 555-556: Receptor that leaves a sour taste in the mouth	1998		Ugawa S., Minami Y, Guo W, Saishin Y, Takatsuji K, Yamamoto T, Tohyama M, Shimada S
FEBS Lett :443, 267-270:Cloning of a bovine orphan transporter and its short splicing variant	1999		Sakata K, Shimada S, Yamashita T, Inoue K, Tohyama M.

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Biochim Biophys Acta 1396:242-244. Isolation of novel human cDNA (hGMF-gamma) homologous to glia maturation factor gene	1998		Asai, K., Fujita, K., Yamamoto, M., Hotta, T., Morikawa, M., Kokubo, M., Moriyama, A., Kato, T.
Mol. Brain Res. 60:28-39. Neurotrophic action of lipocortin 1 derived from astrocytes on cultured rat cortical neurons.	1998		Mizuno, H., Asai, K., Fujita, K., Uemura, K., Wada, Y., Moriyama, A., Ogawa, H., Kimura, S., Kato, T.
J. Biol. Chem. 273(1998)16544-16550. Critical role for the 3-10 Herix region of p57 in Cdk2 inhibition and growth suppression.	1998		Hashimoto, Y., Kohri, K., Kaneko, Y., Morisaki, H., Kato, T., Ikeda, K., Nakanishi, M.
Mol Brain Res 55: 54-60: Increased transcription of glutamate-aspartate transporter (GLAST/GluT-1) mRNA following kainic acid-induced limbic seizure	1998		Nonaka M, Kohmura E, Yamashita T, Shimada S, Tanaka K, Yoshimine T, Tohyama M, Hayakawa T
J Neurol Sci 157:25-30: Changes in brain organic osmolytes in experimental cerebral ischemia.	1998		Nonaka M, Yoshimine T, Kohmura E, Wakayama A, Yamashita T, Hayakawa T
J Biol Chem 273:18522-18527: Potent prostaglandin A1 analogs that suppress tumor cell growth through induction of p21 and reduction of cyclin E.	1998		Tanikawa M, Yamada K, Tominaga K, Morisaki H, Kaneko Y, Ikeda K, Suzuki M, Kiho T, Tomokiyo K, Furuta K, Noyori R, Nakanishi M

5. 研究成果による特許権等の知的財産権の取得状況

特になし

厚生科学研究費補助金総括研究報告書

名古屋市立大学医学部脳神経外科

山田和雄

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

総括研究報告書

慢性期中枢神経系外傷に関する研究（H10-脳-011）

主任研究者	山田和雄	名古屋市立大学医学部脳神経外科教授
研究協力者	松本 隆	名古屋市立大学医学部脳神経外科講師
	上田行彦	名古屋市立大学医学部脳神経外科講師
	間瀬光人	名古屋市立大学医学部脳神経外科講師
	相原徳孝	名古屋市立大学医学部脳神経外科助手
	岩田 明	名古屋市立大学医学部脳神経外科助手
	小松裕明	名古屋市立大学医学部脳神経外科助手
	谷川元紀	名古屋市立大学医学部脳神経外科大学院生
	藤田政孝	名古屋市立大学医学部脳神経外科大学院生
	木村知寛	名古屋市立大学医学部脳神経外科大学院生
	今村暢希	名古屋市立大学医学部脳神経外科大学院生
	飯田昭彦	名古屋市総合リハビリテーションセンター部長
	蒲澤秀洋	名古屋市総合リハビリテーションセンター部長
	小川鉄男	名古屋市総合リハビリテーションセンター副部長
	阿部順子	名古屋市総合リハビリテーションセンター臨床心理士

研究要旨：

本研究では慢性期頭部外傷後遺症のうち、広範な脳内神経線維連絡の損傷による高次脳機能障害を持つ患者の現状把握、病態解明、治療法の開発を目的として計画した。まず現状把握では私どもが把握している患者10名のCT, MRI, PET 画像の解析と運動機能、高次脳機能障害との関連を調べた。その結果、本患者では大脳皮質、大脳脚、小脳の萎縮が進むこと、これに応じて該当部位の脳血流代謝が低下すること、また高次脳機能障害は大脳血流低下と関連し、体幹運動失調は脳幹・小脳血流低下と関連することを明らかにした。さらに「頭部外傷後の高次脳機能障害者の実態調査」を、名古屋市リハビリテーションセンターを中心に進め366人から回答を得た。現在、その結果を解析中である。

病態解明のため動物モデルを開発し、「びまん性脳損傷」後に生じる細胞応答を解析した。その結果、即時早期遺伝子 *c-fos* と *c-jun* の mRNA は損傷後30分から1時間で大脳皮質に発現が亢進することを確認した。一方、ストレス遺伝子である *hsp-70* は殆ど発現が見られなかった。次にび慢性軸索損傷の範囲を鍍銀染色と APP 蛋白の免疫染色で調べたが、内包、橋腹側部、脳梁などに鍍銀染色で陽性の線維を認め、軸索の損傷と軸索流の障害を示す所見が得られた。さらに損傷後青斑核ニューロンの萎縮が明らかとなり、これと行動機能障害との関連が示唆された。グリアのストレス応答としてミオイノシトールトランスポーターの mRNA 発現を検討したところ、橋・延髄腹側部の錐体外側部に発現誘導がみられ、この部位に何らかのストレスがかかっていることが示された。また水チャンネル（アクアポリン）の発現、グリア成熟因子の遺伝子発現についても検討中である。

分担研究者

加藤泰治 名古屋市立大学医学部分子医学
研究所生体制御部門・教授
島田昌一 名古屋市立大学医学部第二
解剖学・教授
甲村英二 大阪大学医学部脳神経外科・
講師

A. 研究目的

近年の予防医学や交通環境の整備、低体温療法の実施などにより重症頭部外傷患者の救命率は向上しつつあるが、患者の社会復帰にはいまだ困難な点が多い。リハビリテーションにより運動機能障害がある程度回復したにもかかわらず、知能、記憶などの高次精神機能障害のために社会に復帰できない患者が多数存在する。重症頭部外傷患者の多くは青壮年であり、受傷者に対する福祉厚生行政を考える上で今後解決すべき大問題である。

本研究1年目の実態調査では、これら患者と家族の実態がかなり詳しく把握でき、第2年度に向けて、アンケート結果を解析中である。また本疾患初期には画像変化に乏しく、び慢性脳損傷の病態が、特に自賠責査定などで、正しく世の中に伝わっていないことが危惧される。本研究ではこのような面に留意しつつ、び慢性脳損傷患者の画像診断上の特徴をMRIとPETで明らかにし、社会的認知を得ることを目的とした。

頭部外傷慢性期の脳高次機能低下は、局所脳損傷よりはむしろ「び慢性脳損傷」に基づく広範な神経回路網の断裂に起因するところが大きいと考えられ、神経細胞脱落の抑制、神経回路網修復の促進、再形成を目指した新たな治療戦略が必要である。

そこで、ヒトび慢性脳損傷に類似の動物モデルを作成し、発症病態を分子レベルで解析し、また実験的治療を行うことにより、本病態治療の糸口を見つけることは大きな社会的意義を持つものである。本年度は第1年目なので、各研究者に供給するラットび慢性脳損傷モデルの確立に務め、死亡率が少なく、かつ確実なび慢性脳損傷をきたす実験系を確立した（分担研究者甲村英二の報告書に詳細を記載した）。

このラットび慢性軸索損傷モデルを用いて、受傷直後の脳内細胞応答、ストレス応答を immediate early gene である c-fos と c-jun の mRNA 発現およびストレス遺伝子である hsp-70 の mRNA 発現から検討した。つぎにこのモデルでの神経回路網障害を Argyrophil III 鍍銀染色法で解析した。また軸索流の障害を Alzheimer precursor protein (app) 蛋白とニューロフィラメントの免疫染色法により検討した。

び慢性脳損傷に対する脳のストレス応答の中でも神経損傷に伴う浸透圧変化、体積・形態変化に着目し、浸透圧調節関連遺伝子ミオイノシトールトランスポーターについて mRNA 発現を解析した（詳細は分担研究者島田昌一の研究報告書に記載）。浸透圧変化についてはアクアポリン4型の mRNA 発現からも検討した。

び慢性脳損傷時のグリア細胞の機能障害を解析する目的でその第1段階としてラットの glia maturation factor (GMF)- γ の cDNA をクローニングし、GMF- γ に対する抗体の作成を行った（詳細は分担研究者加藤泰治の研究報告書に記載）。

臨床例の解析から注意力低下、自発性低下が特徴的に見られていたが、これに関与するノルアドレナリン神経中枢である青斑核に、受傷後2日▽14日後に神経細胞体

の萎縮を認め、投射径路の軸索損傷によることが推定された（詳細は分担研究者甲村英二の研究報告書に記載）。

これら本研究の成果により、交通事故などの突然の災害により頭部外傷を受け、慢性期に至っても社会復帰できずにいる多数の青壮年患者にとって、社会復帰の道が開かれることが期待され、社会経済、国民医療福祉に大きく貢献しうるものである。

B. 研究方法

1. び慢性軸索損傷患者の脳循環代謝

病歴、画像所見などからび慢性軸索損傷が明らかな患者10人について、局所脳血流量(rCBF)と局所酸素消費率(CMR2)をポジトロンCT(PET)で測定した。このうち8人では高次脳機能検査(WAIS-R, paced auditory serial addition task, 仮名拾いテスト, fire story, Rey-Osterrieth complex figure test, Miyake's auditory memory scale)も行っており、PET所見と高次脳機能検査の結果を対比検討した。

詳細検討の対象とした8人の患者は、17歳～51歳（平均29歳）、男性4名女性4名であった。全例交通事故が原因で、受傷時診断は、外傷性クモ膜下出血3例、び慢性軸索損傷4例、急性硬膜外血腫1例（摘出術を受けた）であった。来院時のGlasgow Coma Scale (GCS) は3-8点（平均5.5点）、意識障害の持続期間は3—60日（平均18日）であった。PET検査は受傷後2カ月～3年（平均9カ月）の間に行われた。検査時にはいずれの患者も運動・知覚障害、明らかな失語や失認などは認めなかった。またMRIでも明らかな局所脳損傷を認めなかった。

2. 頭部外傷後高次脳機能障害者の実

態調査

び慢性脳損傷患者の高次脳機能障害について、その実態を知るため2月15日を回答期限としてアンケート調査を行った。調査は名古屋市総合リハビリテーションセンターに業務委託し、名古屋、神奈川、札幌、大阪などの患者友の会を中心に、患者あるいは家族に高次脳機能に関する患者の現状をかいとうしてもらった。その結果、366人（回収率60%）から回答を得た。現在その詳細について解析中である。

3. び慢性脳損傷モデルの作成

本モデルはMarmarouのモデルに準じて作成した。（詳細は甲村英二分担研究報告書に記載してある。）この際、研究グループ間で一定のモデルが作成できるように、装置、作成手法の共通化を図った。

4. ラットび慢性脳損傷モデルにおける急性期ストレス応答について

ラットに前述のび慢性軸索損傷を加えた。その後、1、3、6、12、24時間後に脳をすばやく取りだし、凍結保存した。これら標本から10 μmの冠状断凍結切片を作成し、in situ hybridizationに供した。用いたプローブはc-fos, c-jun, hsp70に相補的なオリゴヌクレオチドで³⁵Sでラベルし、フィルムオートラジオグラムとマイクロオートラジオグラムに供した。

5. TUNEL染色によるアポトーシスの検出

本モデルで神経細胞やグリアにアポトーシスをもたらすような細胞死が出現するかどうかを、損傷48時間後にTUNEL法で検出した。

5. β -APP 前駆体蛋白の免疫染色

β -APP 前駆体蛋白は細胞体で作られ、軸索輸送される。この軸索流に障害があると、軸索内で β -APP 前駆体蛋白の貯溜が起こり、免疫染色で観察可能となる。そこでび慢性脳損傷時にみられる軸索流の障害を本法で解析した。すなわちラットに前述のび慢性軸索損傷を加え、その後1、3、6、12、24時間後に脳を取りだして凍結保存し、10 μ m の冠状断凍結切片を作成した。これらを β -APP 前駆体蛋白に特異的な抗体で染色し、軸索流障害の程度を評価した。

5. Argyrophil III 鍍銀染色法による損傷ニューロンの解析

Argyrophil III 法は Gallyas ら (Acta Neuropathol 1990, 1992) された鍍銀法で、軸索や樹状突起が障害されたニューロンを鋭敏に捉える方法として注目されている。そこで本モデルにおいて軸索や樹状突起の障害がどの程度の範囲に及んでいるかを検討した。動物は深麻酔下に 2.5% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde で灌流固定し、50 μ m 冠状断切片を作成後、浮游法で鍍銀染色した。

8. Aquaporin 4 mRNA と N-cadherin mRNA の発現の発現

脳に特異的に発現する水チャンネル aquaporin 4 が本モデルで発現するか否かを aquaporin 4 cRNA を用いた in situ hybridization 法で検討した。また神経特異的接着因子である N-cadherin についても同様に検討した(分担研究者加藤泰治との共同研究による。)

C. 研究結果

1. び慢性軸索損傷患者の脳循環代謝

PET の rCBF スタディの結果、脳血流障害のパターンは、前頭葉障害型と小脳・脳幹障害型の2つに分かれた。前頭葉障害型では rCBF は後頭葉と比べて15%、小脳と比べて30%の血流低下がみられた。また CMRO₂ も同程度に低下しており、血流と代謝はカップリングして低下していたといえる。

一方小脳・脳幹障害型では小脳血流は前頭葉血流と比べて約20%低下しており、CMRO₂ も同程度に低下していた。

Summary of neuropsychological tests

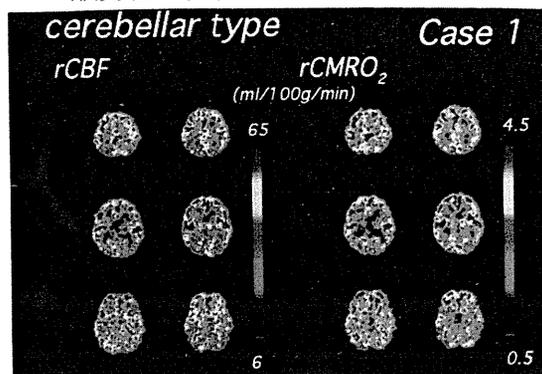
Type	No. cases	WAIS-R FIQ	PASAT	fire story	immed 30m
(normal)		(90-110)	(48<)	(15)	(15)
Frontal	4	72.6	22	7.3	3.0
Cerebellar	4	63.5	41	6.8	2.5

次に2つの血流パターンと高次脳機能検査の結果のまとめを下図に示す。

WAIS-R は前頭葉型よりも小脳・脳幹型の方がむしろ悪く、これは小脳・脳幹型に特有の運動失調によるものと思われた。一方注意力に関する PASAT は前頭葉型の方が低値を示した。短時記憶は前頭葉型、小脳・脳幹型ともに低値を示した。前頭葉型と小脳・脳幹型の典型的な PET 画像を下記に示す。

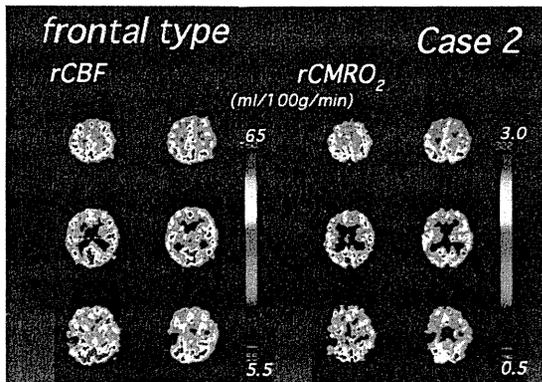
症例1 小脳・脳幹型

20歳男性、受傷4カ月後、WAIS-R 47



症例 2 前頭葉型

26歳女性、受傷2カ月後、WAIS-R 83



2. 頭部外傷後高次脳機能障害者の実態調査

本アンケート結果については、平成11年度に名古屋市総合リハビリテーションセンター臨床心理士阿部順子を中心とした研究グループが詳細を報告する予定である。ここでは速報として一部を紹介する。

回答は総数366人で、内訳は名古屋市総合リハビリテーションセンター関連183人(49.9%)、神奈川リハビリテーションセンター関連95人(26%)、埼玉リハビリテーションセンター関連38人(10.4%)、大阪患者友の会関連20人(5.5%)、札幌患者友の会関連19人(5.2%)、横浜リハビリテーションセンター関連10人(2.7%)などであった。回答者は親が245人(66.9%)と最も多く、次いで配偶者63人(17.2%)となり、親ならびに夫婦のどちらか一方が問題を実感していることを伺わせた。

性別では男73.2%、女26.8%で、受傷原因は交通事故が73.2%と圧倒的多数を占めた。意識障害の期間が1カ月以上の人全体の43.2%を占め、本疾患の特徴である遷延性の意識障害を示していた。

現在、障害者手帳を持つ者が66.4%を占

め、身障者手帳1級保持者が33.6%、2級保持者が23.5%であった。しかし現在障害基礎年金、障害共済年金を保持する者は41.5%、労災年金保持者が7.1%、損害保険保持者が8.5%であった。しかし一方ではこれらの保障を全く受給していない人が45.4%の存在し、今後問題となろうと思われた。現在就労・修学している者は28.2%であり、この面からも社会復帰が容易でないことが示唆された。

本病態の特徴である高次機能障害については、記憶は判断などで困っていると答えた人が80%にのぼり、一旦復職したが止めた人が18.3%、元の仕事に戻れなかった人が52.2%を占めた。その他、法的認定の問題、社会復帰の妨げとなる種々の問題などもあげられているが、詳細は次年度の報告書に記載したい。最後に患者が現座最も望んでいることは高次機能障害の認定50.5%、リハビリ施設等の充実33.6%、研究の充実32.2%などであり、今後の厚生行政を考える上で参考となり得るものと思われる。

3. び慢性脳損傷モデルの作成

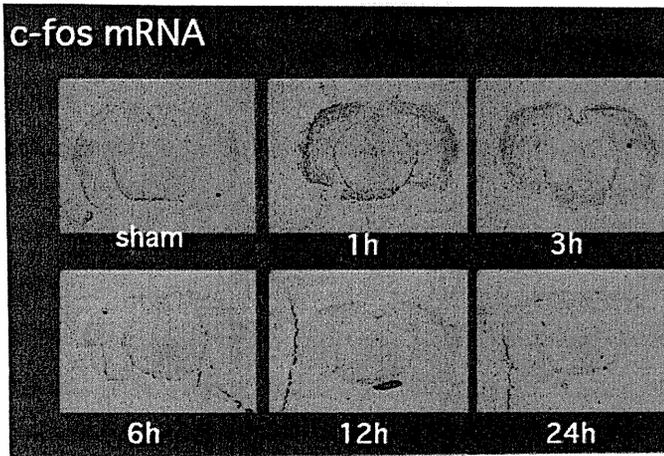
名古屋市立大学研究グループでも、大阪大学研究グループと同様の手法でモデルの作成を行い、1.5mの高さより落下させることにより、脳幹部を中心に慢性脳損傷に特徴的なretraction ballなどの組織学的変化を安定した形で得ることができた。

また、麻酔はハロセン浅麻酔として外傷を加えることにより受傷直後の死亡率を9%程度に低下させることができた。

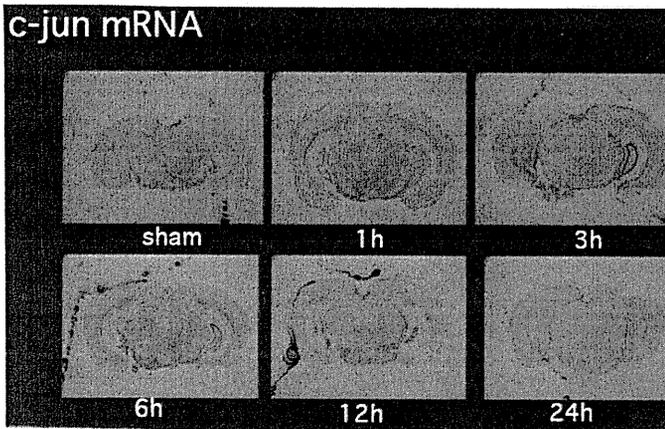
このようにして作成した動物モデルは、すべて受傷直後に一時的に無呼吸を呈し、痙攣発作も大部分の動物で認められた。剖検では大部分の例にクモ膜下出血が延髄周囲に存在し、呼吸抑制の原因と思われた。

4. ラットび慢性脳損傷モデルにおける急性期ストレス応答について

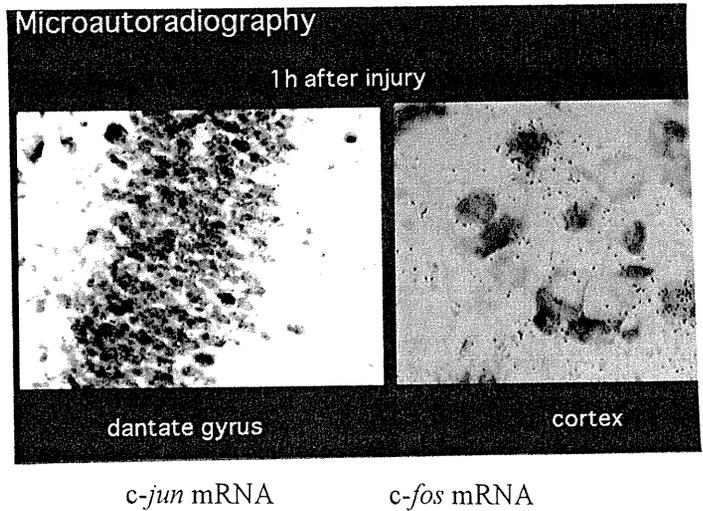
immediate early gene である *c-fos* は受傷後 1 時間で両側大脳皮質に広範な mRNA の発現亢進を認めた。この発現は 3 時間後までみられたが、6 時間後以降は発現亢進を認めなかった。実際の画像を示す。



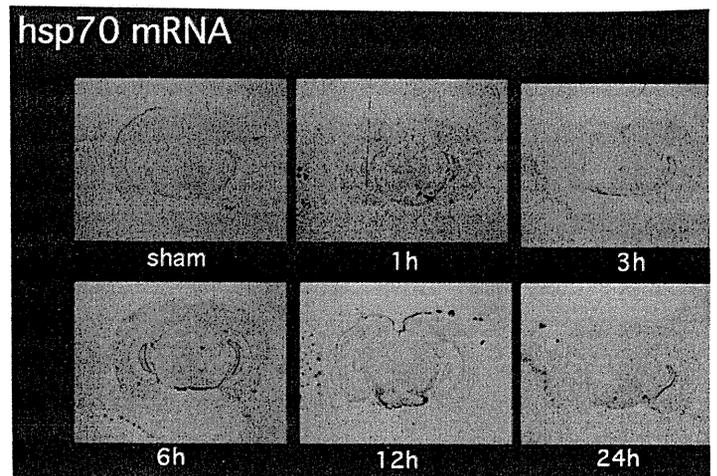
c-jun mRNA の発現は *c-fos* ほどには強くはないが、海馬歯状回、脳幹の一部で軽度の発現亢進がみられた。*c-jun* mRNA 発現のマクロオートラジオグラムを下に示す。



マイクロオートラジオグラムで発現細胞を同定すると、*c-jun* の歯状回における発現は錐体細胞層にみられ、*c-fos* の大脳皮質における発現は主にニューロンに、一部グリアに認められた。



c-fos や *c-jun* の mRNA が大脳皮質、海馬、脳幹などである程度発現上昇するのに対し、*hsp70* mRNA は損傷後 1 時間から 24 時間までのいずれの時間においても、明らかな発現亢進を認めなかった。



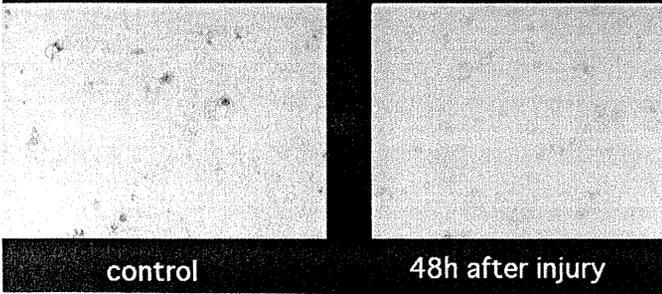
このことは虚血など *hsp70* mRNA が著しく亢進する病態と、本モデルとは発症機構が異なることを示唆するものである。

5. TUNEL 染色によるアポトーシスの検出

本病態で神経細胞にアポトーシスが起っていないかを検討するため、受傷 48 時間後に TUNEL 染色を行った。しかし TUNEL 陽性細胞は全く出現せず、同時に行った陽性対照(乳腺細胞)とは好対照を示した。実

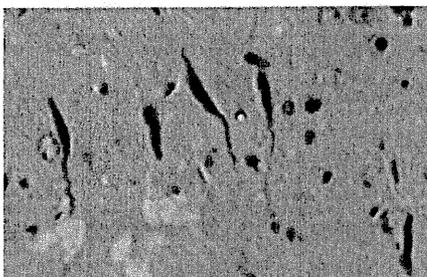
際の図を下記に示す。

TUNEL 法



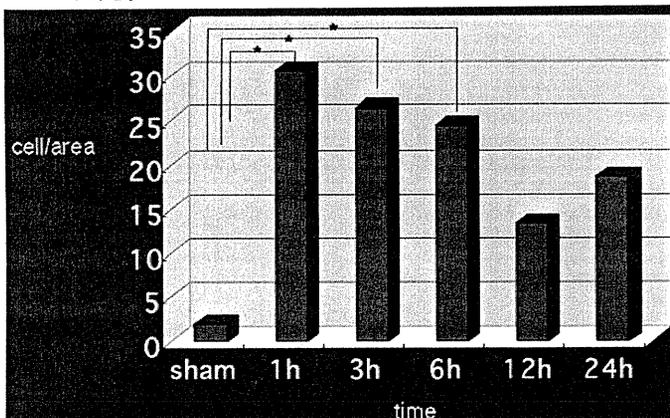
6. β -APP 前駆体蛋白の免疫染色

β -APP 前駆体蛋白は受傷後 1 時間後から脳幹腹側部の神経細胞で陽性所見がみられるようになった。この所見は中脳の前交連で最も良く観察され、下図のように肥大した神経細胞体と軸索が染色された。



中脳前交連での β -APP 前駆体蛋白陽性細胞

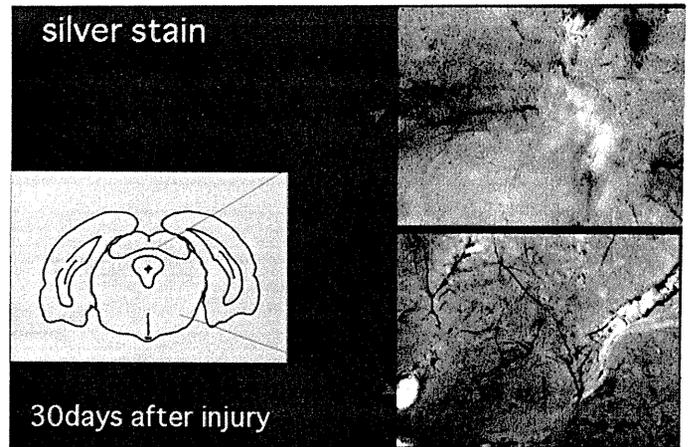
顕微鏡 1 視野あたりの陽性細胞数を損傷直後から経時的に計測すると、受傷 1 時間後が最も強く、6 時間後まで有意差がみられた。



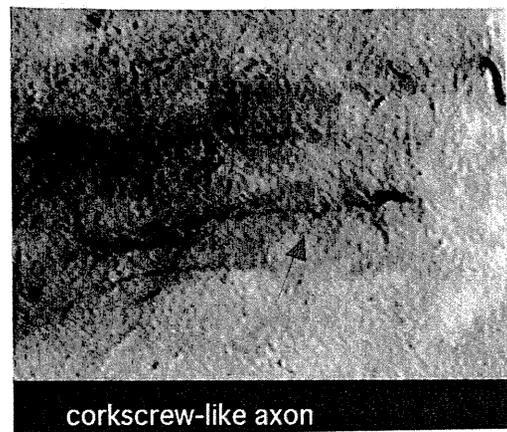
このことから β -APP 前駆体蛋白に関する軸索流障害は受傷後早期に出現し、その後 12—24 時間で消失することが示された。

10. Argyrophil III 鍍銀染色法による損傷ニューロンの解析

鍍銀法による観察では損傷 30 日後にも中脳腹側の前交連に鍍銀陽性細胞が認められた。下図にその実際を示す。



高倍率でこれらの鍍銀陽性線維を観察すると線維はコルクの栓抜き状にらせん型のうねりを示し、軸索流の障害あるいは retraction ball 状の形態が損傷 30 日後にも持続していることが示された。

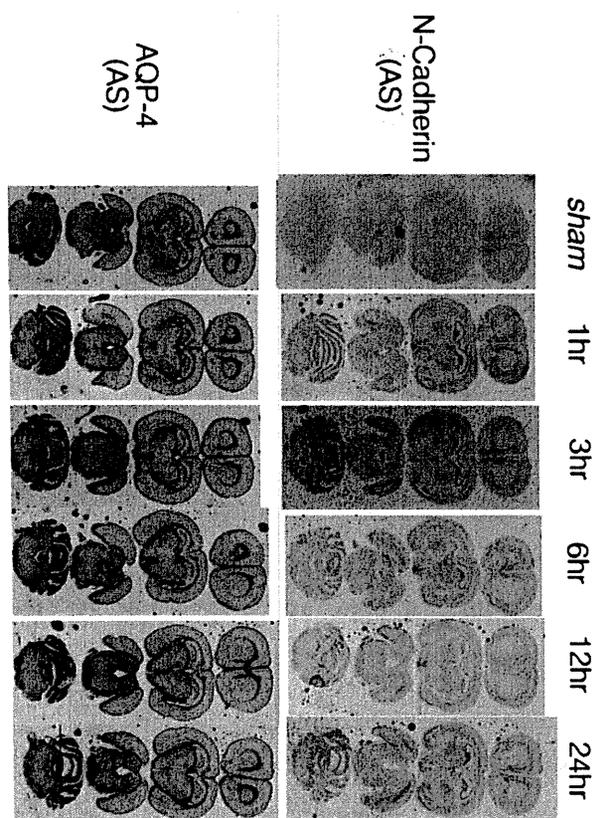


8. N-cadherin mRNA と Aquaporin 4 mRNA の発現の発現

N-cadherin は sham control では mRNA

発現のレベルは低いですが、損傷 1—3 時間後に慢性に発現亢進がみられる。特に海馬歯状回、大脳皮質、小脳顆粒細胞層で発現が強い。これらの部位で何らかのストレス反応がおこり、細胞間情報伝達あるいは細胞間接着に影響が及んだことが示唆される。

一方 aquaporin 4 が constitutive に発現があり、外傷によってもそれほど強い発現亢進は認めていない。これらのいずれも最近解析を始めたところであり、結論を出すには今しばらく研究を続ける必要がある。



D. 考察

本研究では臨床的病態把握、現状把握と、モデル動物を用いた病態発症機構の解析と治療法の開発をめざした。研究が本年度にスタートしたこともあり、いずれも未だ十分な完成の域に達しているとは言い難い面があるが、研究初年度終了近くになっていくつかの重要なデータが出るようになった。

このうち分担研究者の項目についてはそれぞれのところ述べているので、総括研究者として、その他の部分について考察したい。

本研究でめざした臨床病態把握については、名古屋市総合リハビリテーションセンターの協力もあり、PET と高次脳機能検査を用いて病態把握に迫ることができた。従来、本病態では社会生活に適應できないほどに高次脳機能が障害されているが、その客観的指標には乏しかった。本研究ではPET スキャンで前頭葉の血流代謝が低下するタイプ、小脳と後頭葉の血流代謝が低下するタイプの 2 つがあることを明らかにした。このうち前頭葉血流低下タイプは注意力の低下や近時記憶障害などの面で障害が強く、小脳と後頭葉の血流低下タイプは臨床的には小脳・脳幹の機能障害が強いことが示された。両者は軸索損傷の部位が違うものと思われるが、現時点ではその詳細は不明である。この点は動物実験で解明すべきと思われる。また治療法、機能回復のためのアプローチも両群では異なるものと思われ、それぞれに適した治療法、リハビリテーション法が開発されなければならない。

これらの患者が社会で置かれている状況は、今回のアンケート調査でかなり把握することができた。とくにもとの職業に復帰することが出来ない率が高いこと、その理由が麻痺などの運動機能障害ではなく、高次機能障害が多いことは、本疾患を特徴づけるものの 1 つであろう。今後アンケートの詳細が解析されるにつれ、多くの問題点が浮かび上がってくるものと思われ、今後の厚生行政に役立つものと思われる。

病態解明のためのモデルの確立はできたものと思われる。私どものモデルは Marmarou のオリジナルの記載よりもやや軽

い外傷で、そのため呼吸停止で死亡する率が少ない。これはより軽度の臨床上問題となるび慢性脳損傷モデルを扱う上では重要であろう。本年度は受傷直後に脳がどのようなストレス応答を行い、軸索障害がどのような時間経過でおこってくるかは明らかにできた。次年度はこれらを指標とした治療実験を行い、有効な治療法の確立に努める予定である。

E. 結論

び慢性脳損傷、とくにび慢性軸索損傷の臨床病態、高次脳機能障害、患者の置かれている現状把握を行った。治療法開発のため、動物実験モデルを開発し、多方面から病態研究を行った。次年度はこれら項目をより詳細に解析するとともに、新しい治療法、リハビリテーション法開発をめざした他方方からの研究アプローチを行いたい。

F. 研究発表

1) 論文発表

Katano H, Masago A, Harada S, Iwata A, Yamada K: Differential induction of immediate early gene mRNAs following cryogenic and impact trauma with/without craniotomy in rats. *Brain Res* 800:69-77, 1998

Matsumoto T, Masago A, Yamada K, Iwata A, Harada S, Mase M: Expression of immediate early gene c-fos in rat brain following increased intracranial pressure. *Acta Neurochir [Suppl]* 71:195-199, 1998

山田和雄：脳損傷における修復の分子機構と治療への応用—特に虚血性脳損傷に対する FGF の効果について。 *臨床科学* 34 : 1192-1199, 1998

片野広之、藤田佳織、加藤泰治、浅井清文、真砂敦夫、山田和雄：Astroglial cell の in vitro injury model と IEG 発現： *神経外傷* 21:67-69, 1998

2) 学会発表

小松裕明、岩田 明、相原徳孝、松本 隆、山田和雄、間瀬光人：び慢性脳損傷モデルにおけるストレス応答。第 22 回日本神経外傷学会シンポジウム、1999 年 3 月 26 日、福岡

間瀬光人、山田和雄、飯田昭彦、蒲澤秀洋、小川鉄男、阿部順子、長野友里：び慢性脳損傷患者の脳循環代謝・PET による検討。第 22 回日本神経外傷学会、1999 年 3 月 26 日、福岡

厚生科学研究費補助金分担研究報告書

名古屋市立大学医学部分子医学研究所生体制御部門

加藤泰治

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
（分担）研究報告書

神経栄養因子レセプター、グリア細胞機能の変動解析
（分担）研究者 加藤 泰治 名古屋市立大学医学部教授

研究要旨

ラットびまん性脳損傷モデルにおけるグリア細胞の機能の変化を解析するために、ラット glia maturation factor (GMF)- γ cDNA のクローニング及び GMF- β 、GMF- γ に対する抗体の作製を行った。GMF- γ は、アストロサイト増殖期に発現しており、グリオーシスの形成過程の検出に役立つものと考えられた。

A. 研究目的

ラットびまん性脳損傷モデルを利用し、グリア細胞の機能が損傷後急性期から慢性期にかけてどのように変化するか解析する。特に、グリア細胞で発現することが知られている神経栄養因子類のうち、glia maturation factor、gliostatin、lipocortin 1 について損傷後の発現変化を検討し、びまん性脳損傷モデルにおけるこれら因子の変動を明らかにする。本年度は、ラットでは、glia maturation factor- γ (GMF- γ) の cDNA がクローニングされていないので、その cDNA のクローニングを行った。また、glia maturation factor- β (GMF- β)、GMF- γ に対する抗体の作製を行った。

B. 研究方法

Rat pulmonary artery cDNA library (Stratagene) に対し、human GMF- γ cDNA をプローブとしてスクリーニングを行った。Rat pulmonary artery cDNA library を使用したのは、本研究室で利用可能な rat library が 1 つしかなかったこと、PCR でチェックしたところ、この library にも GMF- γ のシグナルが検出できたことによる。定法に従いスクリーニングし、in vivo excision 法により plasmid に変換後、シークエンスを行い塩基配列を決定した。この cDNA を用いてノーザンブロットを行った。

抗体の作製は、以下のように行った。すでに本研究室でクローニングした human GMF- β cDNA、human GMF- γ cDNA を大腸菌発現ベクター pAED4 に組み込み、大腸菌 BL21(DE3) で発現させた。リコンビナント蛋白をイオン交換クロマトグラフィーで精製し、アミノ酸配列を確認後、ウサギに免疫した。

C. 研究結果

Library screening の結果得られた陽性クローンの塩基配列を決定したところ、558 塩基の cDNA を含んでいた。予想されるアミノ酸配列は 142 アミノ酸で、human GMF- γ と同じ長さであった（図 1）。ホモロジー検索したところ、human GMF- γ とアミノ酸レベルで 79% のホモロジーであった。ノーザンブロットで脳における発現を調べたところ、成体大脳では発

現量が微量であることが判明した。一方、培養アストロサイトでは、発現量が多いことが判明した。

発現させたリコンビナント GMF- β 、GMF- γ を、ウサギに免疫しポリクローナル抗体を得た。GMF- β 、GMF- γ は相同性が高いため、これらのポリクローナル抗体は互いに交差反応することが判明した。そこで、GMF- β 、GMF- γ を固定化したアフィニティーカラムを作成し、抗 GMF- β 抗体は GMF- γ 固定化カラムで処理し、抗 GMF- γ 抗体は GMF- β 固定化カラムで処理し、互いに交差反応する抗体を除去し特異的に反応する抗体だけを精製した。Western blot で検討したところ、100 倍以上に抗体液を希釈すれば、交差反応は全く観察されなかった。今後、この抗体を免疫組織に利用していく予定である。

D. 考察

ノーザンブロットの結果、GMF- β は、成体大脳および培養アストロサイトで多く発現されていたのに対し、GMF- γ は成体大脳では発現が少なく培養アストロサイトでは発現が多かった。このようなことから、脳損傷後のグリオーシスのようなアストロサイトの増殖が生じている時に GMF- γ の発現が高まる可能性があると考えられた。従って、グリオーシス検出等に役立つものと考えられた。今後、今年度得られた cDNA 及び抗体を用いて、ラットびまん性脳損傷モデルにおけるグリア細胞の動態を解析していきたいと考えている。

図1 ラット GMF- γ アミノ酸配列

MSDSLVCV DPELKETLRK FRFRKETNNA	30
AIIMKVDKDR QMVLEDEFQ NVSPEELKLE	60
LPERQPRFVV YSYKYVHDDG RVSYPCLCFIF	90
SSPVGCKPEQ QMMYAGSKNR LVQIAELTKV	120
FEIRTTDDL N ETWLKEKLA F FR	142

厚生科学研究費補助金分担研究報告書

名古屋市立大学医学部第2解剖学

島田昌一

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
分担研究報告書

慢性期中枢神経系外傷に関する研究

分担研究者 島田 昌一 名古屋市立大学医学部教授

研究要旨

び慢性脳損傷に対する脳のストレス応答の中でも神経損傷に伴う浸透圧変化、体積・形態変化に着目し、種々の浸透圧調節関連遺伝子について、ラットDiffuse axonal injuryモデルを用いて山田らと共同で解析した。その結果、組織の浸透圧勾配を是正して神経細胞を保護するミオイノシトールトランスポーターがラットび慢性脳損傷モデルにおいて、橋から延髄に及ぶ下位脳幹腹側部の錐体外側領域で強く発現が誘導されていることを明らかにした。またミオイノシトールトランスポーターなどの浸透圧関連遺伝子の発現調節に関係していると考えられているMAPキナーゼの活性型（リン酸化）が先ほどと同じ錐体外側領域で生じていることを明らかにした。これらの結果は、び慢性脳損傷に対するストレス応答による細胞保護機構の解明への一助となるばかりでなく、Diffuse axonal injuryにおいてミオイノシトールトランスポーターやリン酸化MAPキナーゼは細胞の障害の重傷度や治療効果の評価等の鋭敏なマーカーになる可能性が考えられた。

A. 研究目的

び慢性脳損傷に対する脳のストレス応答のメカニズムを解析することにより、診断、治療の一助となることを目指した。とくに、神経損傷による浸透圧変化、体積・形態変化に着目し、種々の浸透圧調節関連遺伝子について、我々が最近同定した遺伝子も含めて、ラットDiffuse axonal injuryモデルを用いてそれらの発現動態について解析した。

B. 研究方法

新規の浸透圧関連遺伝子をDifferential display法などを用いて検索した。

ラットDiffuse axonal injuryモデル（主任研究者山田らが作製）の脳や比較のため他の神経外傷モデルの脳を用いて、種々の浸透圧関連遺伝子について、in situハイブリダイゼーション法、ノーザンブロット法、免疫組織化学法等を用いてそれらの発現変化を解析した。

C. 研究結果

ミオイノシトールトランスポーターがラットび慢性脳損傷モデルにおいて、橋から延髄に及ぶ下位脳幹腹側部の錐体外側領域で強く発現が誘導されていることを明らかにした。また浸透圧関連遺伝子の発現調節に関係していると考えられているMAPキナーゼの活性型（リン酸化状態）が同じ錐体外側領域で生じていることを明らかにした。

D. 考察

Diffuse axonal injuryにおいてミオイノシトールトランスポーターやリン酸化したMAPキナーゼは、形態学的にまだ損傷による変化が認められない時期から細胞を保護するために、ダメージを受けた特定

の領域で発現誘導が生じ細胞保護のため協調して働いていると考えられた。

E. 結論

ミオイノシトールトランスポーターやリン酸化MAPキナーゼのび慢性脳損傷における機能的役割を解析することは損傷に対する細胞保護機構の解明につながる。またこれらの遺伝子の発現動態を指標にすればび慢性脳損傷の損傷部位の診断や治療効果を評価するための鋭敏なマーカーとなりうる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ugawa S., Minami Y, Guo W, Saishin Y, Takatsuji K, Yamamoto T, Tohyama M, Shimada S. Receptor that leaves a sour taste in the mouth. *Nature*, 1998, 395, 555-556.

Nonaka, M., Kohmura, E., Yamashita, T., Shimada, S., Tanaka, K., Yoshimine, T., Tohyama, M. and Hayakawa, T. Increased transcription of glutamate-aspartate transporter (GLAST/GluT-1) mRNA following kainic acid-induced limbic seizure. *Mol Brain Res*, 1998, 55: 54-60

Sakata K, Shimada S, Yamashita T, Inoue K, Tohyama M. Cloning of a bovine orphan transporter and its short splicing variant *FEBS Lett* 1999, 443, 267-270.

2. 学会発表

島田昌一、浸透圧調節機能を有するトランスポーターの役割、第21回日本神経科学、第41回日本神経化学合同大会ミニシンポジウム（平成10年9月）

厚生科学研究費補助金分担研究報告書

大阪大学医学部脳神経外科

甲村英二

頭部外傷慢性期に関する研究

分担研究報告書

「び慢性脳損傷モデルの開発と青班核ノルアドレナリン神経細胞の継時的変化について」

分担研究者 甲村英二 大阪大学医学部脳神経外科講師
研究協力者 藤中俊之 大阪大学医学部脳神経外科
湯口貴導 関西労災病院脳神経外科

研究要旨：

本研究では、び慢性脳損傷病態の解明、治療法の開発のために不可欠な安定した動物モデルの作成と本モデルにおける軸索変化を検討することを第一義とした。臨床的に慢性期のび慢性脳損傷患者を観察した経験より、これらの患者では注意力が散漫であり自発性に乏しい印象を得ていた。注意・学習・記憶などの高次神経機能と関連する中枢ノルアドレナリン系のほとんどは細胞体が青班核に存在している。そこで、本研究では、作成されたモデルを用いて青班核ノルアドレナリン産生細胞の形態的变化、ならびに再生の指標となる GAP-43 の発現についても免疫組織化学ならびに *in situ hybridization* を行いさらに検討した。

これらの研究により、文献的に報告されている方法を改変することにより、安定したラットび慢性軸索損傷モデルを作成できることが明らかとなった。青班核ノルアドレナリン産生神経細胞は、受傷後1日で腫大する傾向を示したが、2日、7日、14日で有意の細胞断面積の縮小を見た。28日、56日後では、対照群と比し有意差は認めないことが示された。損傷後早期にノルアドレナリン投射経路の軸索腫大が存在することが確認され、投射経路の軸索損傷がこれらの細胞体変化の原因と考えられた。また、神経細胞数の有意の減少は確認されなかった。GAP-43 mRNA は健常状態でも発現していることが示されたが、少なくとも7日、14日後の脳で青班核に明らかに発現亢進を認めた。

中枢ノルアドレナリン神経細胞はこれまでより神経回路の再構成能力が高いとされていたが、本研究はこれを支持するものである。中枢ノルアドレナリン系が注意・学習・記憶などの高次神経機能と密接に関連することから、臨床にて遭遇する病態と関連すると考えられ、今後の各種治療実験における一つの標的となり得ることが明らかとなった。

A. 研究目的

重症頭部外傷患者の救命率は近年向上しつつあるが、慢性期に至っても高次機能障害のために社会復帰ができない患者が依然として多数存在し、社会的に解決を要する問題である。“脳を守る”ためには損傷を防ぐことが第一義であるが、いったん損傷を受けた脳機能の回復を促

進する（“脳を治す”）手段を積極的に探求していくことは今後の福祉厚生行政にとって極めて重要な課題と考える。頭部外傷のうち局所脳損傷については従来より数多くの研究がなされてきた。他方、広範な脳内神経線維連絡の損傷をもたらす「び慢性脳損傷」については、安定した実験動物モデルに乏しくその基礎的研