

分担研究報告書（脳科学研究事業「中枢神経系外傷に関する研究」）

「重症頭部外傷患者における多核白血球（PMNL）機能の変化に関する研究
—感染によるセカンドヒット、脳死の影響について—」

分担研究者	田中 裕	大阪大学医学部救急医学	助教授
協力研究者	小倉 裕司	大阪大学医学部救急医学	助手
	上尾 光弘	大阪大学医学部救急医学	医員
	中森 靖	大阪大学医学部救急医学	医員

研究要旨：脳低温・バルビタール療法を要する重症頭部外傷患者における多核白血球（PMNL）の機能変化を経日的に検討した。また、経過中に生じた感染によるセカンドヒットおよび脳死に伴うPMNL機能の変化を検討した。対象は、来院時GCSが8点以下、中等度脳低温を要した重症単独頭部外傷患者12例（生存8例、死亡4例）である。フローサイトメトリーを使用して、末梢血中PMNLの活性酸素産生能、貪食能、およびアポトーシスを経日的に測定した。この際、無刺激状態での活性酸素産生能をプライミング指数、FMLP刺激による活性酸素産生能をFMLP反応性として、さらにFMLP過剰反応を示すPMNL数比をFMLP過剰反応比として評価した。また、多発外傷患者10例におけるPMNL機能の経日的変化と比較検討した。この結果、頭部外傷生存例において、PMNLのプライミング指数は受傷後2日から14日まで著しく上昇した。これは、多発外傷患者でみられたプライミング指数の亢進期間（第2-5病日）に比べ、有意に長期であった。生存例のFMLP反応性は受傷後2日から14日まで上昇し、この間FMLP過剰反応比も上昇した。生存例において、PMNLのアポトーシスは受傷後2週間にわたり有意に抑制された。また、生存8例中5例（63%）において感染によるセカンドヒットが第3-6病日でみられ、セカンドヒットに伴いPMNLのプライミング指数、FMLP反応性共に一層上昇した。一方、死亡4例においてはいずれも受傷後2-3病日に脳死に陥った。脳死を契機としてPMNLのプライミング指数、FMLP反応性、およびFMLP過剰反応比の著しい上昇を認めた。以上より、重症頭部外傷患者において、PMNLのプライミング状態は他の外傷患者に比べ長期間持続し、アポトーシスは抑制されることが明らかとなった。また、感染のセカンドヒットに伴い、PMNLのプライミング状態は一層亢進すること、さらに脳死に陥るとPMNLは急激に著しいプライミング状態をきたすことが明らかとなった。

A 研究目的

外傷後の全身性炎症反応においてPMNLの役割は生体防御、組織障害の両面において重要と考えられる。しかしながら、重症頭部外傷患者のPMNL機能は十分に検討されていない。本研究の目的は、脳低温・バルビタール療法を要する重症頭部外傷患者における

PMNLの機能変化をフローサイトメトリーを使用して経日的に明らかにすることである。

B 研究方法

対象は、来院時GCSが8点以下であり、従来の治療法（脱水療法、過換気療法、バルビツレート大量投与、血腫除去術、等）では頭

蓋内圧を20mmHg以下にコントロールできず中等度脳低温（34℃）・バルビタール療法を要した重症単独頭部外傷患者12例である。うちわけは、生存8例、死亡4例であった。各症例においてフローサイトメトリーを使用して、血中PMNLの活性酸素産生能、貪食能、およびアポトーシスを経日的に測定した。このうち無刺激状態での活性酸素産生能をプライミング指数、FMLP刺激による活性酸素産生能をFMLP反応性として、さらにFMLP過剰反応を示すPMNL数比をFMLP過剰反応比として評価した。各症例において以上の測定を受傷後0-1病日、2-5病日、6-13病日、および14-21病日の計4ポイントで行った。また、頭部外傷患者におけるPMNL機能の経日的変化を、頭部外傷を伴わない多発外傷患者10例（ISS 30.6±13.0）のPMNL機能の経日的変化と比較検討した。さらに、経過中に生じた感染によるセカンドヒットおよび脳死の前後において血中PMNL機能、血中サイトカイン濃度（IL-6、IL-10）、および血中thrombomodulin値を測定した。結果はmean±SDで示す。

C 研究結果

頭部外傷生存例において、PMNLのプライミング指数は受傷後2日から14日まで著しく上昇した（図1）。これは、多発外傷患者でみられたプライミング指数の亢進期間（第2-5病日）に比べ、有意に長期であった（図2）。生存例のFMLP反応性は受傷後2日から14日まで上昇し（図3）、この間FMLP過剰反応比も上昇した（図4）。生存例において、PMNLのアポトーシスは受傷後2週間にわたり有意に抑制された（図5）。また、生存8例中5例（63%）に

おいて感染によるセカンドヒットが第3-6病日でみられた。感染症のうちわけは、肺炎2例、髄膜炎2例、腸炎1例であった。セカンドヒットに伴いPMNLのプライミング指数、FMLP反応性共に一層上昇した（セカンドヒットプライミング；図6、7）。また、セカンドヒットに伴い、血中IL-6値は有意に上昇したが、血中IL-10値および血管内皮細胞障害の指標である血中thrombomodulin値の上昇は認めなかった（図8、9）。一方、死亡4例はいずれも受傷後2-3病日に臨床上脳死に陥り、脳死を契機としてPMNLのプライミング指数およびFMLP反応性の著しい上昇を認めた（図10、11）。また、脳死に伴い血中IL-6値の上昇とIL-10値の低下を認めた（図12、13）。

D 考察

頭部外傷に伴い引き起こされる生体反応においてPMNLの役割は重要と考えられるが、経日的なPMNL機能の変化は未だ十分に評価されていない。本研究では、脳低温・バルビタール療法を要した重症単独頭部外傷患者のPMNL機能を検討し、単独頭部外傷では多発外傷に比べPMNLは長期にわたりプライミングを受けることを明らかとした。経過中に起きた感染に伴い、プライミング状態のPMNLは、一層プライミングを受けることから、重症頭部外傷患者における易感染性が長期プライミングの原因の一つと考えられる。また、セカンドヒットによるプライミングは、炎症性サイトカインのひとつであるIL-6の血中レベルでの上昇を伴う一方で、抗炎症性サイトカインのひとつであるIL-10の血中レベルは変化がみられておらず、サイトカインバランスの変化によっ

て制御される可能性がある。脳死後も同様にサイトカインバランスは炎症性方向に崩れており、脳死を契機としたPMNLのプライミングと関連していると考えられる。

本研究では、重症頭部外傷患者においてプライミング状態のPMNLのアポトーシスが受傷後2週間にわたり有意に抑制されることが明らかとなった。IL-6を含め、PMNLのプライミング因子とアポトーシス抑制因子には共通因子がいくつか報告されており、細胞寿命がこれらの因子によってコントロールされる可能性がある。本研究でみられたPMNLのプライミングやアポトーシスの抑制が組織障害を引き起こすのか、それとも生体防御的意味合いをもつのかは依然不明である。しかしながら、感染のセカンドヒットに伴いPMNLはさらにプライミングを受けるにもかかわらず、血中thrombomodulin値は変化しないことから、PMNLのプライミングが必ずしも血管内皮細胞障害、さらには組織障害の原因とはならないと考えられる。

脳低温もしくはバルビタールの使用がPMNL機能を抑制するとの報告が散見されるが、本研究においても34℃の中等度脳低温、バルビタール療法を施行した受傷後0-1病日ではPMNLのプライミングはみられなかった。しかしながら、多発外傷患者においても受傷後0-1病日ではPMNLのプライミングは認めておらず、脳低温、バルビタール療法施行中のPMNL機能変化は外傷そのものの影響を受けた可能性も否定できない。今後、重症頭部外傷患者の易感染性のメカニズムを解明するためにも、脳低温療法、バルビタール療法によるPMNL機能の変化は

さらに検討すべきと思われる。

E 結論

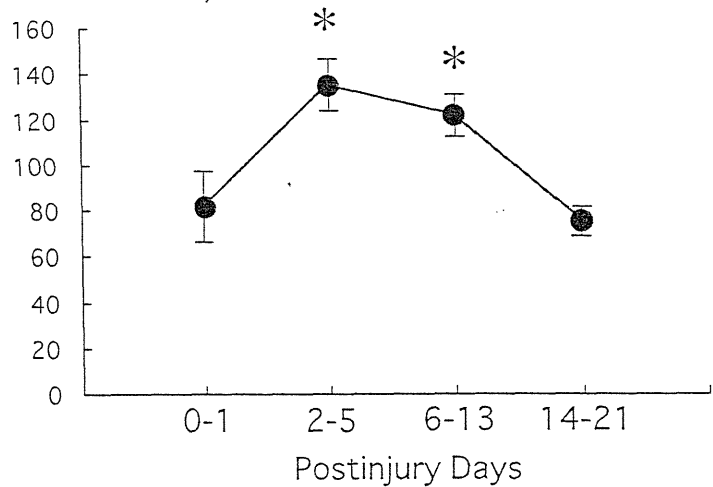
重症頭部外傷患者において、PMNLのプライミング状態は他の外傷患者に比べ長期間持続し、アポトーシスは有意に抑制された。脳低温、バルビタール療法中に起きる感染のセカンドヒットに伴い、PMNLのプライミング状態は一層亢進した。一旦脳死に陥るとPMNLは急激に著しいプライミング状態をきたした。

F 研究発表

- 1、論文発表 Ogura H, Tanaka H, Sugimoto H, et al. Priming, Second-Hit Priming, and Apoptosis in Leukocytes from Trauma Patients. J. Trauma (in press)
- 2、学会発表 小倉裕司、田中裕、杉本壽、他. 重症頭部外傷患者における白血球機能の変化—セカンドヒット、脳死の影響—. 第26回日本救急医学会総会1998年

☒ 1 Priming Index

(mean fluorescence/cell)

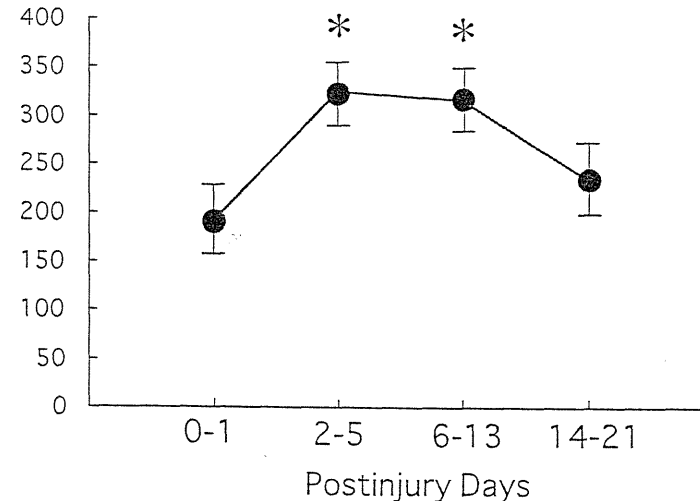


* p<0.05
vs normal

normal

☒ 3 FMLP Response

(mean fluorescence/cell)

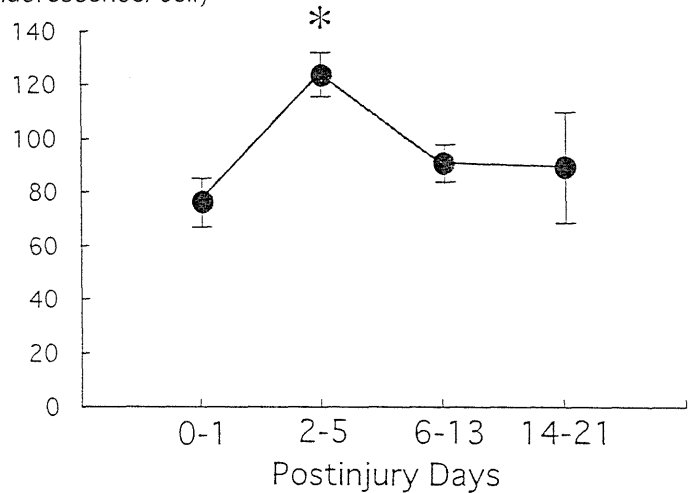


* p<0.05
vs normal

normal

☒ 2 Priming Index
- Multiple Trauma -

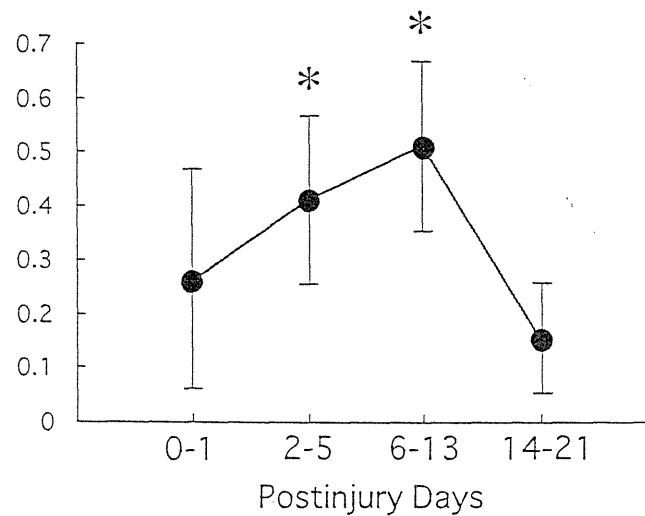
(mean fluorescence/cell)



* p<0.05
vs normal

normal

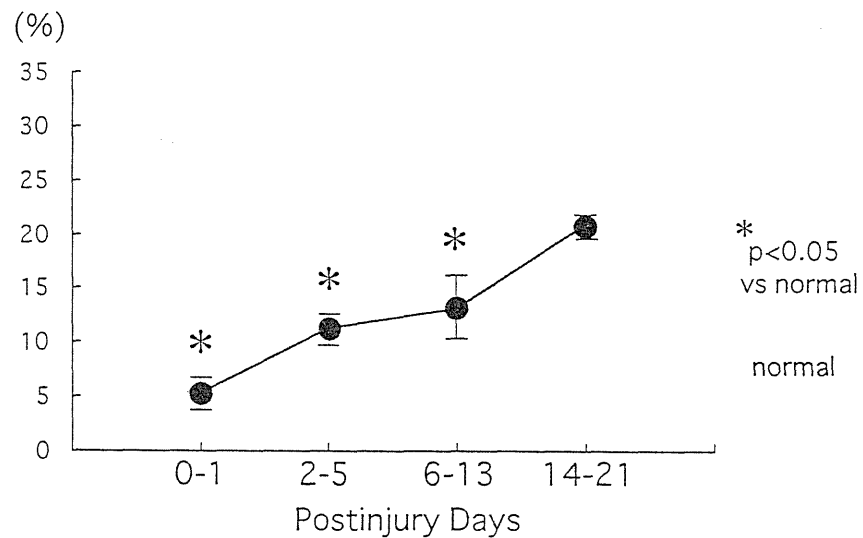
☒ 4 FMLP過剩反応比



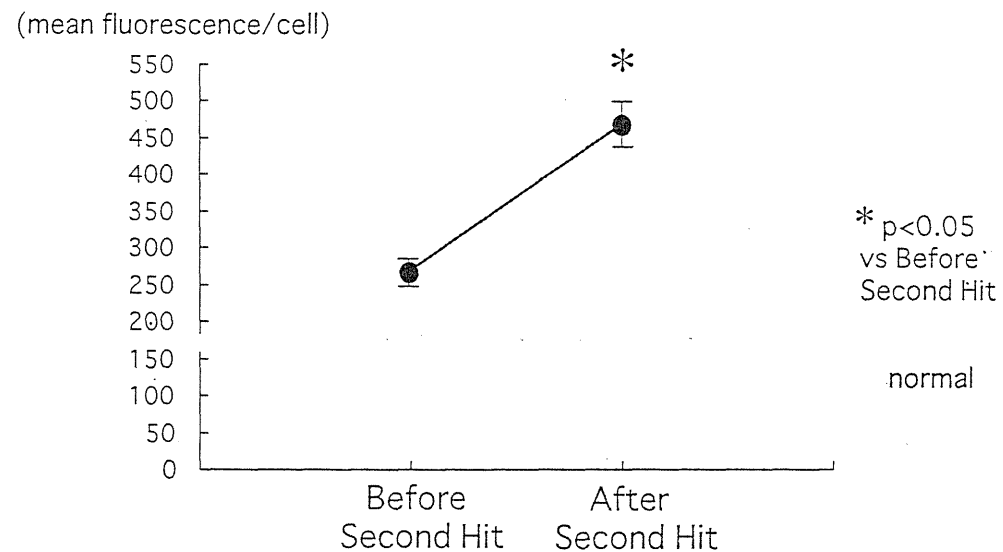
* p<0.05
vs normal

normal

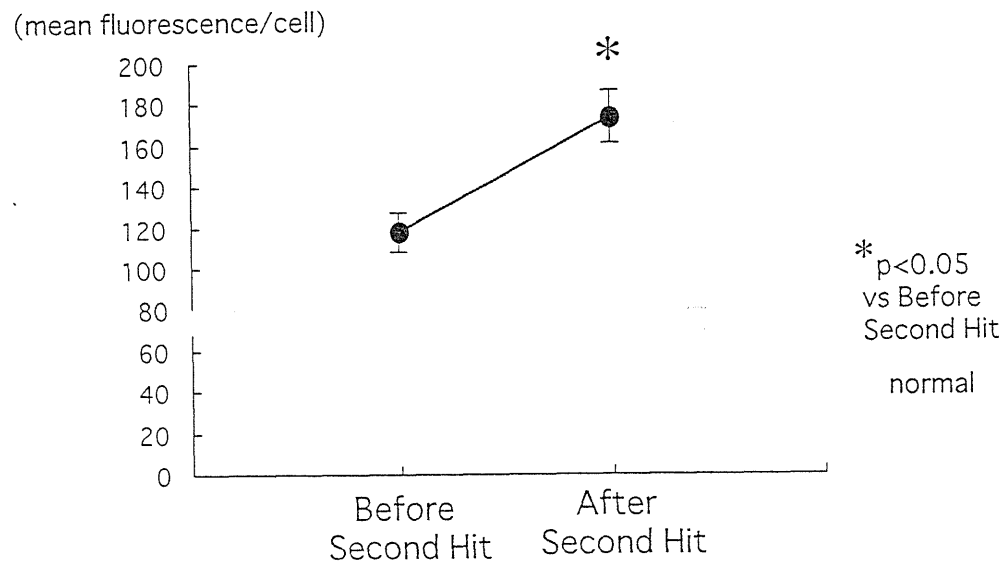
☒ 5 Apoptosis



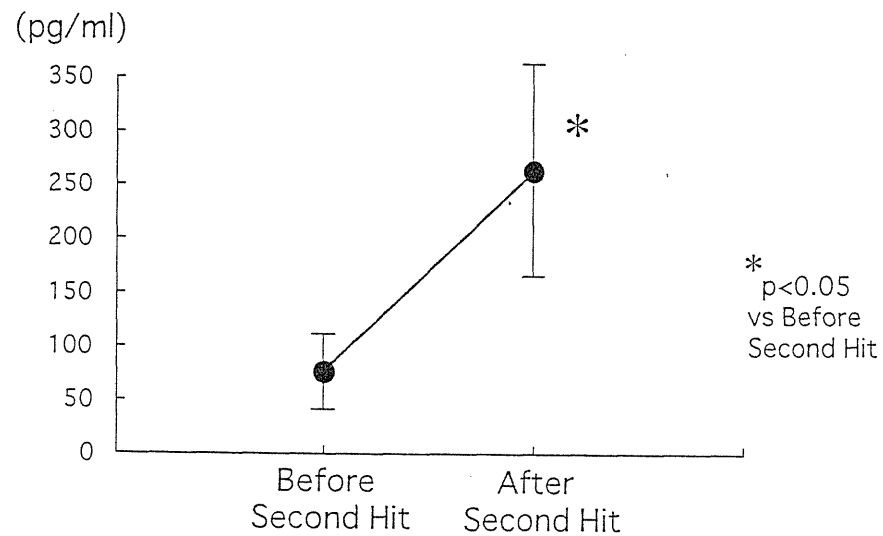
☒ 7 FMLP Response



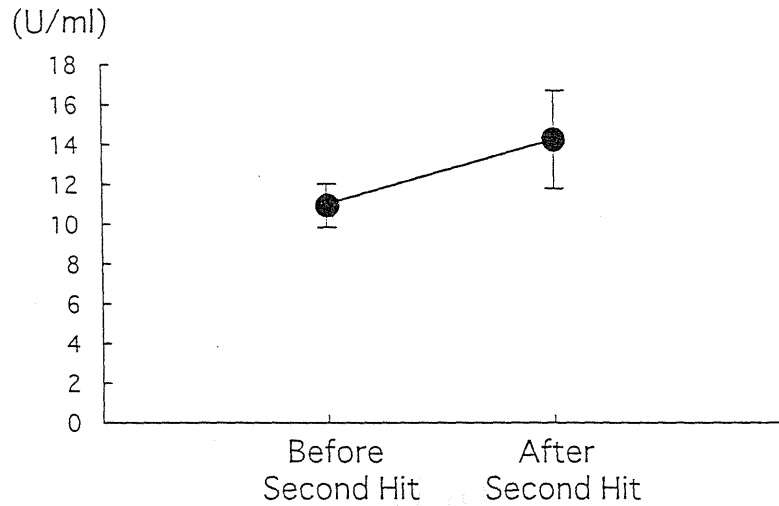
☒ 6 Priming Index



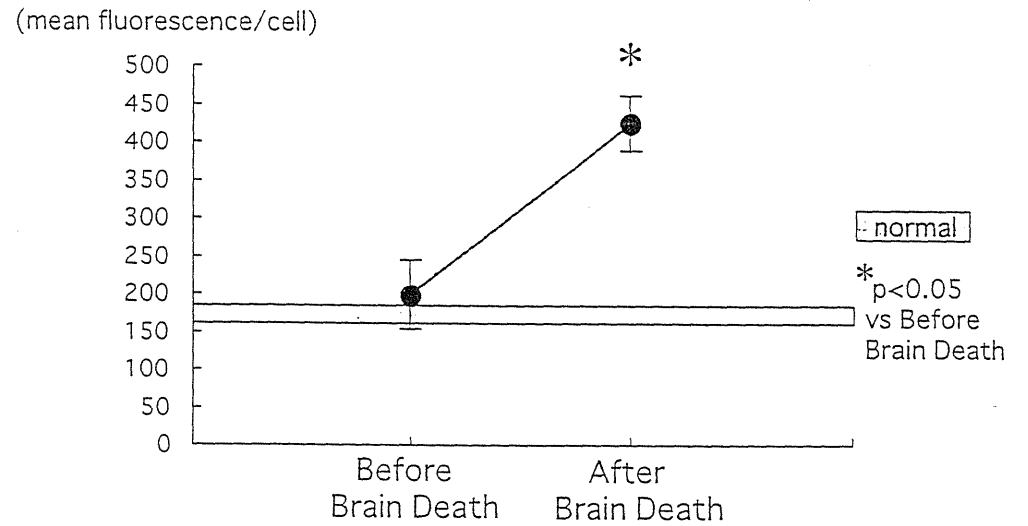
☒ 8 IL-6



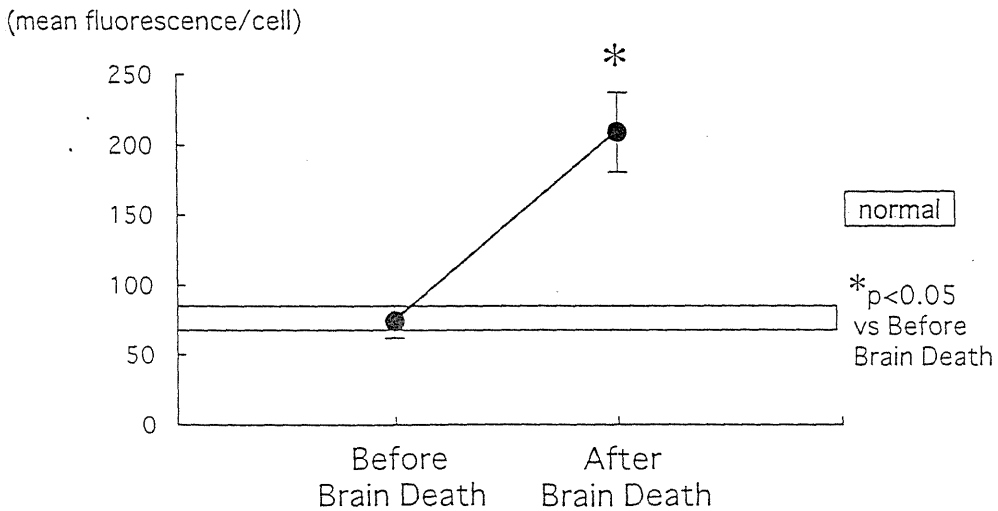
☒ 9 Thrombomodulin



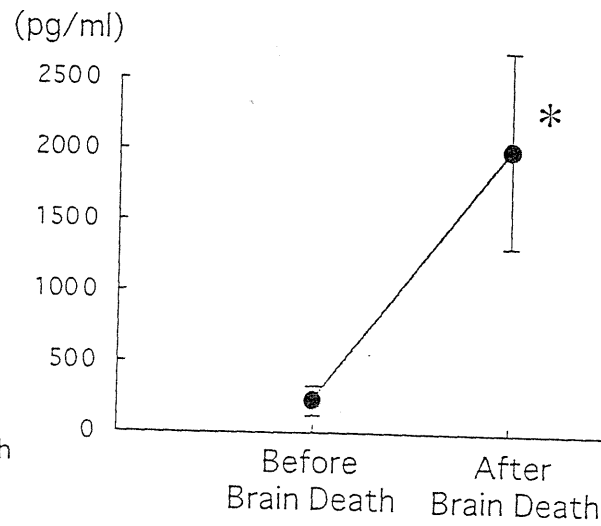
☒ 1 1 FMLP Response



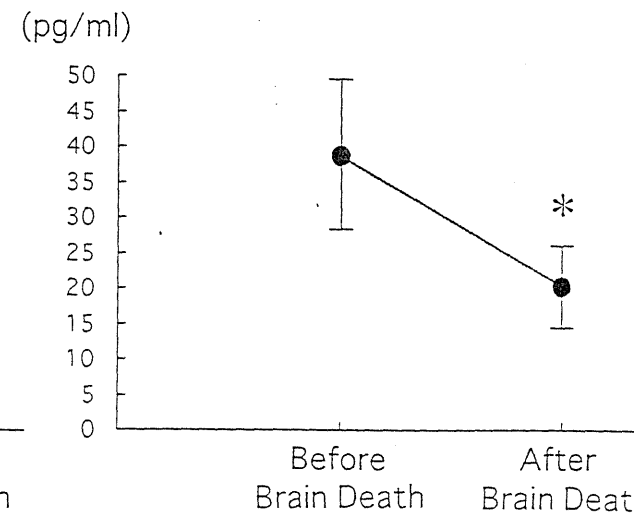
☒ 1 0 Priming Index



☒ 1 2 IL-6



☒ 1 3 IL-10



分担研究報告書（脳科学研究事業）

「中等度低体温が脳および全身の循環調節・酸素代謝におよぼす影響に関する研究」

分担研究者	嶋津 岳士	大阪大学医学部救急医学助教授
協力研究者	鎌方 安行	大阪大学医学部救急医学助手
	織田 順	大阪大学医学部救急医学

研究要旨：中等度脳低温療法が心循環機能に及ぼす影響を明らかにするために、最新の tissue Doppler imaging の機能を備えた digital echocardiography を用いて、本療法中の臨床例 7 例（特殊救急部収容例）の心機能を検討した。その結果、33.5℃までの低体温では、前負荷である左室拡張末期径は有意に変化せず、心拍出量は主として心拍数依存性に、体温低下とともに減少した。一心周期の解析から、体温が低下するとともに左室の弛緩速度が抑制され、かつ拡張にかかわる時間が短縮した。これは、低体温時の左室充満不全発生の機構を示唆するものである。しかし、今回検討した 33.5℃までの低体温では、左室拡張末期径が変化しなかったことから、左室充満不全はなく安全であると考えられた。また、低温時の脳循環・代謝を生理学的に検討するため、家兎を用いた実験系の開発を行った。本法では、心タンポナーデにより心拍出量、酸素運搬量を可変とした家兎を、常温群と低体温群（34℃）に群分けし、それぞれの酸素運搬量と酸素消費量の検討から酸素運搬量の臨界値（DO₂crit）と酸素摂取率限界（O₂ERcrit）を dual line method により算出した。常温では DO₂crit 11.7±0.7 ml/kg・min、O₂ERcrit 78.9±4.6 % であるのに対し、34℃の低体温では DO₂crit 7.7±2.0 ml/kg・min、O₂ERcrit 67.0±1.9 % とそれぞれ有意に低下した。この結果は、低体温により酸素消費量が抑制される一方で、血液からの酸素摂取量も低下することを意味し、本療法中に酸素運搬量の減少を生じる病態を避ける必要性が示された。

A 研究目的

従来、深部温 34℃程度の中等度低体温は、重篤な不整脈や意識障害、心停止の原因となる accidental hypothermia（深部温 28℃以下）からの正常な回復過程としてとらえられるか、あるいはさほど危険でない低体温として認識される程度で、その病態生理が注目されることはあまりなかった。しかし、近年中等度低体温が非常にすぐれた頭蓋内圧亢進抑制効果をもつことが判明し、急速に臨床応用がひろまっている。前述のように、元々関心が低かった分、この温度域で生じる循環系・代謝系の生理学的変化については未知の部分が多い。本研究は、34℃の低体温が心循環系・酸素代謝系にあたる影響を、臨床的・実験的に明らかに

することである。

B 研究方法

1 頭蓋内圧亢進をともなう頭部外傷急性期の症例に対し、中等度低体温療法を施行中の期間と、常温への復温期間中に、心臓超音波検査を経時的に実施し、体温変化にともなう心機能変化を観察する。なお、検査には Tissue Doppler Imaging（以下 TDI）機能を備えた最新のデジタル機（東芝、SSA-380A）を用い、微妙な機能変化を検出できるようにした。経前胸壁心エコー検査は、機械的人工呼吸で陽圧換気を施行中には、肺によるウインドウの制限が生じる。このため、対象症例はかなり限定されたが、本研究期間中には、7 例の経時的検査が可能であった。

2 低温時の脳循環・代謝の生理学的検討は、歴史的にみても十分ではない。そこで、*in vivo* で臨床状況を再現できる簡便な動物モデルを構築する必要がある。特に酸素代謝に重点をおき、家兎を用いた実験系の開発に着手した。2.5 kg 前後の New Zealand White rabbit を、臨床同様バルビタール麻酔下に気管切開ののち筋弛緩し、調節呼吸とした。心嚢を露出、小開窓して自家製のバルーンカテーテルを留置し、これを逐次充満、解除することにより心拍出量、酸素運搬量を可変にした。家兎を常温群と低温群(34°C)に群分けし、それぞれの酸素運搬量と酸素消費量の検討から酸素運搬量の臨界値(DO₂crit)と酸素摂取率限界(O₂ERcrit)を dual line method により算出した。また、内頸静脈血酸素分圧・酸素飽和度と酸素運搬量の関係から、脳における酸素摂取状態を評価した。

C 研究結果

1 33.5°Cまでの低温では、前負荷である左室拡張末期径は有意に変化せず、心拍出量は主として心拍数依存性に、体温低下とともに減少した。左室収縮の指標では、空間的变化をもとにした fractional shortening は体温変化に影響を受けないのに対し、時間的变化(収縮速度)にもとづく ejection time や S_{max}(tissue Doppler imaging による収縮指標)は、体温低下と有意に相関して抑制されることが明らかとなった。左室拡張の指標では、D_{max}(tissue Doppler imaging による拡張指標)が低温により有意に低下した。また、一心周期の解析から、体温が低下するとともに一心周期中収縮に費やす時間が次第に延長し、逆に拡張に費やす時間が短縮することが明

らかとなり、左室の収縮速度が低温によって抑制されても駆出にかかわる時間が延長するため一回拍出量が維持される機構が解明された。一方、左室の弛緩速度も低温により抑制され、かつ拡張にかかわる時間が短縮することは、低温時の左室充満不全発生の機構を示唆するものである。ただし、今回検討した 33.5°Cまでの低温では、左室拡張末期径は、温度変化に関わらず症例ごとにはほぼ一定で、影響をうけていなかった。(表1参照)

2 常温では DO₂crit 11.7 ± 0.7 ml/kg/min、O₂ERcrit 78.9 ± 4.6 %であるのに対し、34°Cの低温では DO₂crit 7.7 ± 2.0 ml/kg/min、O₂ERcrit 67.0 ± 1.9 %とそれぞれ有意に低下した。同等の酸素運搬量にたいして、常温に比し低温では内頸静脈血酸素分圧は低値を、酸素飽和度は高値をとった。この結果は、低温により酸素消費量が抑制される一方で、血液からの酸素摂取能も低下することを意味し、この現象が全身でも脳でも等しくおこっていることが示された。(図1参照)

D 考察

臨床例における心機能の検討から見いだされた最大の発見は、左室の拡張能が低温に対してもっとも敏感に反応する、という事実である。従来、深部温 28°C以下の高度低温では、心調律の異常から危険な不整脈を頻発し、心室細動から心停止にいたることはよく知られている。しかし、この領域にいたるまでの中等度低温では、徐脈がおこるものの、体温低下にともなう酸素消費量の減少にともなう生体はよく耐えらるると考えられてきた。また、低温にともなう心拍の低下、すなわち一心周期の延長

は、収縮期・拡張期のいずれにも生じるものとされてきた。今回の研究結果は、体温低下にともない、拡張時間・拡張速度の両者が進行性に抑制されることを明らかにした点で、全くの新知見をもたらしたことになる。これは、低温になると、ただ心臓の動きがゆっくりになるというだけでなく、縮むことはできるが、拡がりにくくなることによって、左室充満不全をまねく危険を意味する。ただし、現在臨床応用している34℃までの低体温では、左室充満の直接指標である左室拡張末期径に影響がない。従って、潜在的左室拡張不全は存在するものの、現行の中等度低体温療法は、心機能に関して臨床的に安全であると考えられる。なお、この知見は、高度の偶発性低体温などでみられる心機能異常に新しい解釈を与えるものである。

酸素運搬量-消費量関係の解析は、酸素代謝を検討する上でもっとも優れた方法の一つである。体温低下とともに安静時酸素消費量が減少することは、以前からよく知られた事実であり、そもそも低体温療法自体がこの現象を臨床で利用した方法である。一方、補助循環を用いない限り、体温低下は心拍出量減少にともなう酸素運搬量の低下も生じる。生体は、酸素運搬量が減少しても、酸素摂取率を増大させることにより酸素消費量をほぼ一定に保とうとするが、酸素運搬量の限界値(DO₂crit)を下回ると、酸素消費量は運搬量依存性に減少してしまう。また、この点での最大酸素摂取率(O₂ERcrit)を知ることは、各種病態の循環管理上きわめて重要な知見である。従来報告では、低体温によってDO₂critは等しく左方移動(減少)するが、O₂ERcrit

に関しては不変とするもの、減少とするもの様々であった。今回の結果は、DO₂critの減少と、O₂ERcritの減少を少ないばらつきで明らかにした。これは、ヘモグロビン解離曲線の低温による左方移動に基づく理論的な解釈と見事に符合している。また、同様の現象が、脳循環でも生じていることは、内頸静脈酸素分圧、酸素飽和度の観察からも明らかである。O₂ERcritの減少は、循環不安定などの要因で酸素運搬量が減少した際に、生体が代償できる範囲の狭小化を意味する。34℃の中等度低体温を加えるのみであれば、酸素消費量は運搬量非依存性の領域に十分入っているので何ら障害はないと推測されるが、出血、低酸素血症、感染など、酸素需給バランスに異常をきたす病態には、より敏感になると想定される。これらの病的状態が低体温に加味された場合の解析は今後の課題である。

E 結論

中等度低体温は、主として心拍数減少依存性(陰性変時性)に心拍出量を減少させる。体温低下は、特に心拡張能に影響を与え、潜在的充満不全を引き起こす。しかし、34℃までの中等度低体温では前負荷の減少にはつながらず、安全と考えられる。中等度低体温は、酸素消費量を減少させると同時に最大酸素摂取率も減少させる。従って、酸素運搬量が減少するような病態の合併を避ける努力が必要である。

F 研究発表

論文発表

Y. Kuwagata, J. Oda, N. Ninomiya, et al.: Changes in left ventricular performance in patients with severe head injury during and after mild hypothermia. J

Trauma (in press)

学会発表

1 Y. Kuwagata, J. Oda, N. Ninomiya, et al.: Left ventricular wall velocity assessment by Tissue Doppler Imaging in patients with severe head injury during and after mild hypothermia. American Association for the Surgery of Trauma 58th annual meeting in Baltimore, Sep 24 - 26, 1998.

2 鎌方安行、織田順、二宮典久、他：ウサギ可変心拍出量モデルを用いた個体酸素摂取限界測定系の開発 第 26 回日本救急医学会総会 高松 1998 年 11 月 12 日 - 14 日

表1 体温変化と各種心循環指標の関係と相関

	33.5 to 34.4°C	34.5 to 35.4°C	35.5 to 36.4°C	体温調節なし	体温との直線回帰	
					r	p Value
MAP (mmHg)	90 ± 14	101 ± 18	102 ± 18	100 ± 8	0.23	0.252
HR (beats/min)	69 ± 8	76 ± 9	78 ± 10	83 ± 13	0.45	0.147
EDD (mm)	43 ± 3	44 ± 3	43 ± 2	43 ± 5	0.12	0.562
SVI (mL/m ²)	32 ± 3	34 ± 4	33 ± 4	37 ± 10	0.33	0.082
CI (L/min.m ²)	2.2 ± 0.4*	2.6 ± 0.3	2.6 ± 0.5	3.1 ± 0.7	0.56	0.002
FS	0.36 ± 0.05	0.34 ± 0.04	0.35 ± 0.06	0.41 ± 0.06	0.29	0.134
Smax (mm/sec)	53 ± 22*	53 ± 17*	57 ± 21*	86 ± 14	0.55	0.002
Dmax (mm/sec)	-87 ± 23*	-108 ± 23	-110 ± 20	-149 ± 51	-0.61	<0.001
E (M/sec)	0.48 ± 0.18	0.51 ± 0.16	0.54 ± 0.13	0.58 ± 0.18	0.27	0.200
ET (msec)	346 ± 39*	301 ± 36*	280 ± 33	246 ± 28	-0.77	<0.001
D-F (msec)	191 ± 28	198 ± 33	201 ± 32	223 ± 26	0.42	0.039
IT (msec)	365 ± 53	366 ± 69	363 ± 62	430 ± 84	0.38	0.063
ETcor (%)	39 ± 3	38 ± 5	36 ± 4	34 ± 4	-0.56	0.002
D-Fcor (%)	21 ± 5	25 ± 5	26 ± 6	29 ± 3	0.56	0.003
ITcor (%)	40 ± 3*	44 ± 5*	46 ± 6*	56 ± 8	0.78	<0.001

* : Neuman-Keuls法による多重比較で体温調節なし群との間に有意差あり (p < 0.05)

MAP = 平均動脈圧 ; HR = 心拍数 ; EDD = 左室拡張末期内径 ; SVI = 一回拍出量係数 ; CI = 心係数 ;

FS = fractional shortening ; Smax = 収縮期左室後壁前方運動速度の最大値 (Tissue Doppler Imaging) ;

Dmax = 拡張期左室後壁後退速度の最大値 (Tissue Doppler Imaging) ;

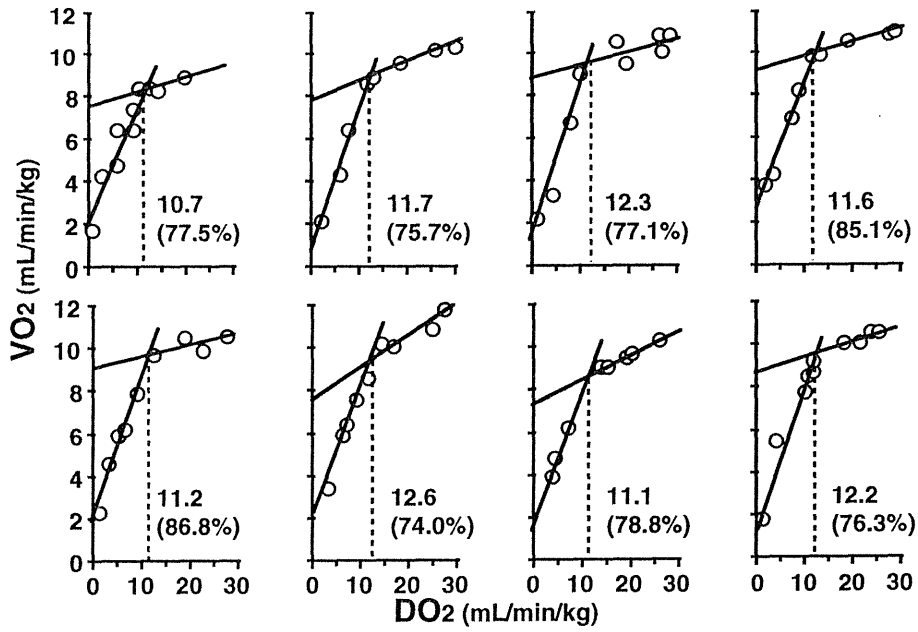
E = 経僧帽弁拡張早期左室流入流速の最大値 (経僧帽弁的pulsed Doppler echocardiography) ;

ET = 駆出時間 (大動脈弁開放時間) ; D-F = 拡張早期流入時間 (pulsed Doppler echocardiography) ;

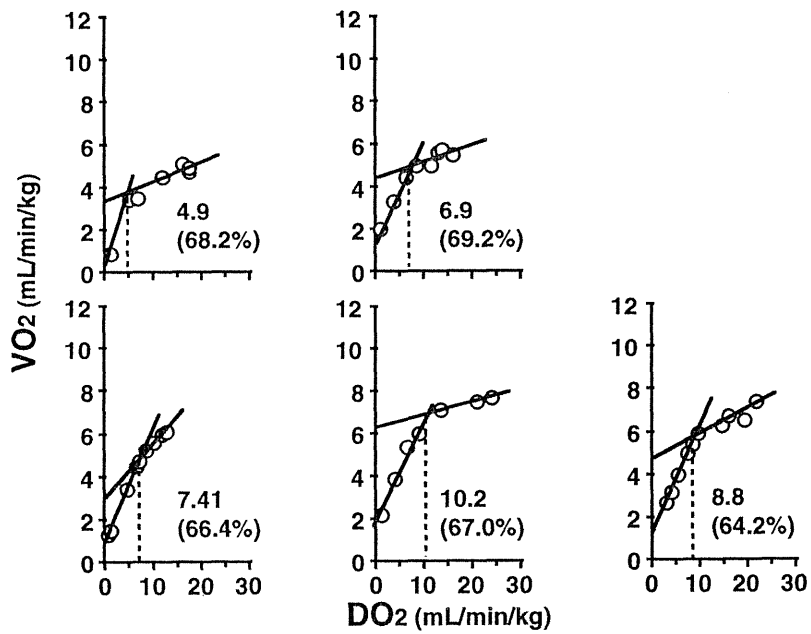
IT = 拡張期総流入時間 (pulsed Doppler echocardiography) ;

ETcor, D-Fcor, ITcor = それぞれの値をR-R間隔で除した%値 (一心周期あたりの占拠率を示す)

図1 ; 常温コントロール (n = 8) のDO₂crit、O₂ERcrit



低体温 (33.5 - 34.5°C) (n = 5) のDO₂crit、O₂ERcrit



分担研究報告書（脳科学研究事業）

「脳虚血再灌流障害モデルにおける遺伝子発現－中等度脳低温療法の効果について－」

分担研究者 三好 康雄 大阪大学医学部附属バイオメディカル教育研究センター
臨床遺伝学研究部助手

協力研究者 青木 正之 大阪大学大学院医学研究科博士課程救急医学講座
中村 祐輔 大阪大学医学部附属バイオメディカル教育研究センター
臨床遺伝学研究部教授

研究要旨： 頭部外傷や虚血性脳疾患に対する中等度脳低温療法の効果は、臨床のみならず、実験モデルにおいても数々の報告がなされているが、その作用機序に関してはほとんど解明されていない。我々は、砂ネズミ虚血モデルにおいて、虚血再灌流後に 34 度の中等度脳低温療法を施行することによってより臨床像に近づけたモデルを作り、神経細胞保護作用を分子レベルで解析した。再灌流後に 3 時間、34 度の中等度脳低温療法を施行する脳低温群、脳低温療法を施行しない常温群、虚血操作を行わない Sham 群に砂ネズミを分け、小脳部分を除いた全脳組織の遺伝子の発現量の変化を Differential display 法で検索した。その結果、常温群では、海馬 CA1 領域の細胞に変性脱落を認めた。低温群においても CA1 領域に変性脱落している細胞を認めるが、常温群と比較すると、その変性脱落は有意に抑制されている。遺伝子解析の結果、常温群において低下した発現量が低温群で回復している遺伝子として、Glucose regulated protein78 (GRP78)、Calmodulin、Cytochrome C oxidase subunit I を同定した。免疫染色では、大脳皮質の神経細胞に局在する GRP78 の量は、常温群でも低温群でも余り変化しないのに対し、海馬錐体細胞層に局在する GRP78 の量は、常温群で低下し、低温群で回復しているのを確認した。In situ hybridization では、GRP78、calmodulin 遺伝子共に、Sham 群で大脳皮質や海馬錐体細胞層に発現しているが、常温群では海馬を中心に遺伝子発現量が低下し、低温群では回復する傾向にあることを確認した。以上の結果から、脳低温療法による GRP78 や calmodulin の局在の維持が同部位における細胞の変性脱落を抑制し、脳神経細胞保護作用の一端を担っている可能性が示唆された。

A. 研究目的

重症頭部外傷や虚血性脳疾患の患者に対する治療としては、脳浮腫とそれに伴う頭蓋内圧亢進を抑える目的で、脱水療法や過換気療法、バルビタール大量投与が行われてきた。近年、全身を冷却することで脳温を 34 度以下に維持する脳低温療法が確立し、従来の治療では脳圧の亢進を抑えるこ

とが難しかった患者の生命予後の改善のみならず、機能予後の改善にも効果をあげてきた。しかしながら、脳低温療法の神経細胞保護作用のメカニズムには未知の部分が多く、また実際の運用に際しても、多くの医療モニターと技術に習熟した医療スタッフが必要であるために、限られた施設での運用実績しかないのが現実である。したが

って、より簡便で有効な治療法を開発するためにも、脳低温療法の持つ神経細胞保護作用の解明が必要になっている。

砂ネズミの両側頸動脈遮断による虚血再灌流実験モデルは、海馬のCA1細胞に遅延型の細胞障害を引き起こすことから、様々な脳神経保護作用因子の効果判定に用いられてきた。我々は、虚血再灌流後に34度の脳低温療法を施行するモデルを作成し、脳低温療法で海馬CA1細胞の脱落変性が抑制されることを確認した。さらにこのモデルで得られた脳組織の遺伝子発現量の変化をDifferential display法を用いて検討した結果、常温群では発現量が低下しているが、低温群で発現量が回復している遺伝子があることを確認した（平成9年度脳科学研究事業）。

本研究の目的はこれらの遺伝子の局所における発現部位を検索し、その作用機序の解析を行うことで、脳低温療法の神経細胞保護作用のメカニズムの解明と、将来的には脳低温療法に代わる、簡便でより有効な治療法への糸口を模索することである。

B. 研究方法

1) 組織染色

12-14週令のオスの砂ネズミを用い、麻酔下に両側頸動脈を15分間遮断した。再灌流後は、34度の脳低温療法を施行する低温群と、施行しない常温群に分けた。またコントロールとして、頸動脈の遮断を行わないSham群を作成した。3時間の再灌流後に、いずれの群も5%グルタルアルデヒドを含んだリン酸緩衝液で還流固定し、クリューバーバレーラ染色を行った。

2) 免疫染色

組織染色と同様のモデルを作成し、3時間の再灌流後に断頭の上、脳組織をドライアイスにて凍結してクリオスタットで20マイクロメートルの厚さにスライスした。GRP78の抗体はマウスのモノクローナル抗体を用い、ペルオキシダーゼ染色法にて呈色させた。

3) In situ hybridization

免疫染色と同様に、ドライアイスで凍結させた脳組織を20マイクロメートルの厚さにスライスした。GRP78とcalmodulin遺伝子のcDNAを鋳型に、35Pを用いてセンス、アンチセンスのリボプローブを作成してhybridizationを行った。

C. 研究結果

1) 組織染色

15分間の虚血後に脳低温療法を施行した低温群と、施行しなかった常温群、虚血処置を行わなかったSham群の脳組織を、クリューバーバレーラ染色で比較した。Sham群では、大脳皮質の神経細胞や海馬錐体細胞層の細胞が染まるのに対し、常温群では、海馬CA1領域の細胞に変性脱落を認めた。低温群においては、CA1領域に変性脱落している細胞を認めるが、常温群と比較すると、有意に変性脱落は抑制されている。

2) 免疫染色

マウスのGRP78モノクローナル抗体の抗原認識部位の配列が砂ネズミにも存在していることから、マウスのGRP78抗体を用いて免疫染色を行った。Sham群では、大脳皮質の神経細胞や海馬錐体細胞層にGRP78の局在を認めた。大脳皮質の神経細胞に局在するGRP78は常温群や低温群でもほとんど変化を認めなかったが、海馬錐体細胞

層の GRP78 は、常温群で局在が低下し、低温群で回復しているのが確認された。

3) In situ hybridization

GRP78、calmodulin 遺伝子の発現量と局在を確認するために、センス、アンチセンスのプロブを用いて In situ hybridization を行った。Sham 群においては、GRP78 遺伝子は大脳皮質の神経細胞や海馬錐体細胞層の細胞内に発現を認めた。常温群では、海馬錐体細胞層における発現はほとんど認められず、大脳皮質における発現量も低下していた。低温群では、海馬錐体細胞層や大脳皮質における発現量の低下は回復しているのを認めた。calmodulin 遺伝子についても同様に in situ hybridization を行ったところ、Sham 群では大脳皮質の神経細胞や海馬錐体細胞層で発現しているが、常温群では海馬錐体細胞層での発現が低下し、低温群で回復しているのを確認した。

D. 考察

頭部外傷や虚血性脳疾患の患者に対する脳低温療法は、臨床においてその有効性が報告されている。実験モデルにおいても、脳低温療法による神経細胞保護作用の報告はあるが、ほとんどが虚血中の低温施行実験である。本モデルにおいて、虚血再灌流後に脳低温療法を施行したのは、より臨床例に近いモデルを作成するという点を考慮したものである。この実験モデルを用いて、3時間の脳低温療法施行後の大脳部分での遺伝子発現量の差を Differential Display 法で検索した。その結果、これまでに、Sham 群で発現しているが常温群では発現量が低下し低温群で回復している遺伝子として、Glucose regulated protein78 (GRP78)、Calmodulin、Cytochrome C oxidase subunit

I を同定している。

GRP78 は、ストレスタンパクである Heat shock protein 70 (HSP70) のサブファミリーであり、通常は細胞質の小胞体 (Endoplasmic reticulum) に存在している。その機能については、HSP70 同様に変成タンパクの代謝に関係している他に、Interleukin-6 (IL-6) の細胞外分泌への関与が最近報告されている。我々の実験でも、半定量的 RT-PCR 法による検討で、低温群における IL-6 遺伝子の発現量の増加を確認している。IL-6 のサイトカインとしての作用は、B リンパ球の分化の他にも神経細胞の分化再生に関与しているとの報告や、in vitro での神経細胞保護作用も確認されている。今回の実験で我々は、虚血再灌流後の常温群で、海馬錐体細胞層における GRP78 局在の低下を確認している。この低下は、低温群で回復しており、in situ hybridization において、海馬錐体細胞層での遺伝子発現が、常温群で低下し低温群で回復していること考え合わせると、脳低温療法においては、海馬顆粒細胞層における GRP78 タンパク局在の維持と、IL-6 分泌の増加を通じて神経細胞保護作用に関連していると考えられた。

一方、calmodulin は、カルシウム結合タンパクとして、細胞内の様々なタンパク質の活性化を行っており、その一つに calpastatin がある。虚血再灌流脳において再灌流後早期に活性化されて細胞障害をもたらすタンパクの中にプロテアーゼ活性を持つ calpain があるが、calpastatin は calpain の活性を阻害することが確認されており、今回我々の実験で、常温群の海馬錐体細胞層で低下した calmodulin 遺伝子の発現が低温群で回復

していることは、calpastatin を介した calpain 活性阻害による神経細胞保護作用の可能性が考えられた。

また、Cytochrome C oxidase subunit I はミトコンドリア由来のタンパクで、ミトコンドリア内膜における酸化リン酸化の系に参与している。このタンパクは、フリーラジカルである O⁻ を H⁺ と反応させて水を合成することで代謝しており、低温群でこの遺伝子発現が増加することは、虚血再灌流後の細胞障害の原因の一つとされているフリーラジカルの代謝を介して神経細胞保護作用を持つのではないかと考えられた。

今後、上記の脳保護作用を有すると考えられる遺伝子を、遺伝子導入法により損傷脳に強制発現させ、脳低温療法に代わる新しい中枢神経保護法としての効果を検討する予定である。

E. 結語

我々が作成したスナネズミ虚血再灌流モデルを用いた遺伝子検索において得られた遺伝子について様々な検討を加えた結果、脳低温療法による GRP78 や calmodulin の局在の維持が同部位における細胞の変性脱落を抑制し、脳神経細胞保護作用の一端を担っている可能性が示唆された。さらにその作用機序としては、GRP78 は IL-6 の分泌を促進することで、calmodulin は calpastatin を活性化することによって calpain を不活化することで、また Cytochrome C oxidase subunit I はミトコンドリアにおけるフリーラジカルの代謝を促進することで神経細胞保護作用をもたらしていると考えられた。

F. 研究発表

学会発表

青木 正之、三好 康雄、田中 裕、他：

脳虚血に対する低温療法の神経保護作用に関する遺伝子の単離、第 43 回日本人類遺伝学会総会、1998

青木 正之、三好 康雄、田中 裕、他：
砂ネズミ前脳虚血モデルにおける遺伝子発現の変化（中等度脳低温療法の効果について）、第 26 回救急医学会総会、1998

中枢神経外傷に関する研究

分担研究報告書

脳損傷病態の解明と脳保護法の開発

分担研究者	吉峰俊樹	大阪大学医学部脳神経外科教授
研究協力者	甲村英二	大阪大学医学部脳神経外科講師
	斎藤洋一	大阪大学医学部脳神経外科助手
	久村英嗣	大阪大学医学部バイオメディカル教育センター神経生理学
	埜中正博	大阪大学医学部脳神経外科
	萩原 靖	大阪大学医学部脳神経外科
	藤中俊之	大阪大学医学部脳神経外科
	藤田敏晃	大阪労災病院脳神経外科
	湯口貴導	関西労災病院脳神経外科
	岩月幸一	茨木医誠会病院脳神経外科
	山中一功	市立泉佐野病院脳神経外科

研究要旨：

脳損傷病態には単に細胞や組織の形態学的ないし機能的損傷のみでなく、ある種の細胞の活性化、生理活性物質の関与、蛋白、遺伝子発現など活発な細胞反応が関与するものと考えられる。本研究では脳損傷病態をとくに損傷後惹起される各種の細胞応答の面から解明するため、いくつかの基礎的研究を行った。その第一は大脳皮質切傷後活発化する一酸化窒素（NO）産生細胞の検討、損傷後の脳浮腫に関連して、組織内のオスモライトの変動、水チャンネル蛋白のmRNA変動、細胞傷害に強く関与する興奮性アミノ酸トランスポーター遺伝子発現の変化の検討などの病態解析である。第二は今後の治療法開発のための神経栄養因子含有ミニペレットや遺伝子封入リポソームを用いての基礎実験である。第三は、臨床患者における脳虚血急性期の血中エラスターゼの測定やDSAによる脳血行動態定量法の開発である。

これらの研究により、脳損傷急性期の病態にはマクロファージやマイクログリアなどの活発な活動やそれにともなう一酸化窒素（NO）の産生、オスモライトの変化、水チャンネル蛋白アクアポリンmRNA、グルタミン酸トランスポーターGLAST mRNA 発現など、分子レベルの細胞内応答が多数関与していることが明らかとなった。そしてdrug delivery system (DDS)としてミニペレットを用いてのNGF投与が大型動物に対しても有効であることが明らかとなった。また、脳保護遺伝子などの遺伝子導入法として新型のHvj-AVE liposomeが有用であることが明らかとなった。さらには臨床患者での血行動態把握のために血行動態解析用 DSA システムの開発に成功し、脳虚血急性期患者における血中エラスターゼの測定意義も明らかとなった。

A. 研究目的

脳は種々の形で損傷をうけるが、これに引き続く病態は複雑である。これまでの知見で

は、その病態は単に細胞や組織の形態学的ないし機能的損傷のみでなく、多種類の細胞の活性化、多くの生理活性物質の関与や、細胞

内外での物質移動、各種の蛋白、遺伝子の発現など、むしろ活発な細胞応答が関与することが示されている。前年度に引き続き本研究では脳損傷病態をとくに損傷後に惹起されるさまざまな細胞応答の面から基礎的研究を行うとともに、脳保護法開発のための基礎実験を行った。

1. 実験的大脳皮質損傷後の誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の発現とラジカルスカベンジャーによる発現抑制

局所脳損傷は急性の神経細胞死を惹起するとともに単球系貪食細胞(マイクログリア及びマクローファージ)やアストロサイトなどの集族、増殖が認められる (Masana et al., Neurosci Res 23: 217, 1995)。これらの反応性細胞は一酸化窒素(NO)産生などを通じて組織損傷に関与していることが示唆されている。そこでラット大脳皮質切創モデルを用いて誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の発現を免疫組織化学的に検討した

2. 脳虚血病態におけるオスモライトの変動

外傷、虚血などにより生じた脳損傷は、細胞内外でのイオン分布の急速な変化により脳浮腫病態を惹起する。細胞の膨化は、このような無機イオンの変動のみならず、アミノ酸、メチルアミンやミオイノシトールなどのオルガニックオスモライトにより制御されている。人為的に低張液を全身性に投与して脳腫張を誘導した場合には、脳内浸透圧物質であるオルガニックオスモライトは減少することが報告され、脳浮腫を軽減させる方向に働くと考えられている。局所脳虚血病態において脳内オルガニックオスモライトの代表であるミオイノシトールの細胞内外の輸送に関係するトランスポーター遺伝子発現の変化をこれまでに報告してきたが、本年度の研究においては、局所脳虚血病態モデル動物でのオスモライトの変動をNMRスペクトロスコピー

を用いて検索しその意義を検討した。

3. 虚血性脳浮腫における水チャンネル蛋白アクアポリンの発現

細胞膜を介した水の移動は、浸透圧格差に応じた自由拡散によると考えられるが、腎尿細管など多量の水を輸送する組織では、速やかな移動を説明することは困難であった。近年になり諸臓器において水を選択的に通過させる膜蛋白アクアポリン(AQP)が同定され、水移動のメカニズムが分子レベルで解明されつつある。現在アクアポリンはタイプ1~5までが同定されているが、中枢神経系ではタイプ1と4の発現がみられる。とくに後者(AQP4)は中枢神経で最も多く発現しており、脳室上衣、脳表の星細胞、視索上核や傍室野などで脳内水分ホメオスタシスに関与していると推測されている。今回、虚血性脳浮腫の発生におけるAQP4の関与を検討するため、局所脳虚血モデルを用いてAQP4 mRNAの発現を調べた。

4. カイニン酸誘発痙攣モデルでのグルタミン酸トランスポーター遺伝子発現の変動

外傷、虚血とならんで脳神経細胞障害を生じさせる重要な病態に痙攣があげられる。グルタミン酸は神経伝達物質として生理的に重要な興奮性アミノ酸である反面、虚血、外傷、てんかんなどの病態下で神経毒として作用している。グルタミン酸トランスポーターは、細胞外のグルタミン酸濃度の調節維持に重要な役割を果たしている。現在までに少なくとも5種類のトランスポーターが同定されている。本研究では、カイニン酸誘発痙攣発作モデルにおけるグルタミン酸トランスポーターの変動について検討した。中でもグリア細胞に主として発現されグルタミン酸濃度調節に最も重要と考えられるGLAST(glutamate-aspartate transporter)の発現変化について検討を加えた。

5. 脳虚血急性期における血中エラスターゼの測定

組織損傷にともない種々の細胞反応がみられるが、実験的脳虚血病変では多核白血球の病変部への集族も顕著であり、脳組織損傷との関連が示唆されている。しかし、このような細胞の臨床病態での関与はほとんど検討されていない。実験的脳損傷病態と臨床的脳損傷病態の整合性は、治療法を検討する際には避けて通れないものである。臨床病態検討の困難性のひとつは倫理的問題のため、実際の病変組織を採取し難いことである。そこで、とくに多核白血球活性化の指標として多核白血球より産生されるエラスターゼ (PMN elastase) に注目した。エラスターゼは蛋白分解酵素の一つであり、その組織障害性が病態悪化の面で少なからぬ関与をしていると考えられる。脳梗塞および脳内出血患者の血中エラスターゼ値を測定した。

6. コラーゲンペレットによる NGF 脳内投与法の検討

これまでに神経栄養因子の一つである nerve growth factor (NGF) をコラーゲンペレットに封入して投与することにより、砂ネズミ一過性前脳虚血による海馬 CA1 領域の遅発性神経細胞死を抑制する効果を有することを示したが (Yamamoto et al., *Neurosci Lett* 141: 161, 1992)、このような小動物脳における NGF の分布とヒトなどの大型脳における分布が大きく異なる可能性があった。すなわち、この生理活性物質の臨床応用を考えるに当たっては本投与方法による NGF の脳内分布を検討する必要がある。そこで、より大型脳であるネコ脳を用いてコラーゲンペレットを用いた NGF 脳内投与の有用性を検討した。

7. bcl-2遺伝子の広範囲脳内導入による脳保護療法への基礎実験

近年、各種病態下での神経細胞死へのアポトーシスの関与が示唆されている。bcl-2はアポトーシスを抑制する代表的な遺伝子であるが、脳内に遺伝子導入を試みる場合はその方法について検討を加えねばならない。そこで、bcl-2遺伝子の広範囲脳内導入による脳保護療法を確立するための基礎実験として、Hvj-AVE liposomeにレポーター遺伝子としてlacZ遺伝子を封入することにより遺伝子導入状況をラットとサルで検討した。

8. 血行動態解析用 DSA システムの開発

Digital subtraction angiography (DSA) は脳血管走行を鮮明に描出することができ、また造影剤の流速により血管内血流をある程度評価することができる。しかしその定量性、客観的評価は不十分であり、脳環流障害の把握目的にはあまり用いられていない。DSAの形態的解像力に優れている点を考慮すれば、血流速度の定量的表示の重層表示を可能とすることにより、脳血流動態把握に極めて有用な画期的技術となると考えられる。そこで、本研究では造影剤の通過速度をピクセル単位で捉えることにより血管内血流速度を算出し、擬似カラー化した血管像を表示する新たなDSAシステムを開発した。

B. 研究方法

1. 実験的大脳皮質損傷後の誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の発現とラジカルスカベンジャーによる発現抑制

すでに報告した方法で (Masana et al., *Neurosci Res* 23: 217, 1995)ラット大脳に皮質切創を加え、1、3、7日後に屠殺し、ホルマリン固定、パラフィン包埋切片を抗 iNOS抗体を一次抗体とするABC法で処理した (対照群)。

治療群では、損傷時よりhydroxyl radical scavengerである 1, 2-bis (nicotinamido) propane を投与した。

2. 脳虚血病態におけるオスモライトの変動

実験には雄性SDラット(300-400g)を用いた。包水クロラル腹腔内投与(300mg/kg)による全身麻酔下に左内頸動脈より4-0ナイロン糸を挿入し中大脳動脈を閉塞させることにより局所脳虚血モデルを作成した。実験中直腸温は $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ に維持し、大腿動脈に挿入したカテテルより随時血液ガス測定を行った。

中大脳動脈閉塞2、6、24時間後(各群 $n=6$)に断頭し、bregmaの前後で3mm厚の切片を作成し、前方の大脳皮質は水分含量の測定に供し、後方の切片よりは左右の大脳皮質をNMRスペクトロスコピー測定用に凍結保存した。測定対象物質の変性を避けるため、上記の操作は断頭後速やかに行い45秒以内に完了するように努めた。なお、対象群としては、左内頸動脈を露出、結紮のみを行った($n=8$)。また、別個に完全全脳虚血モデルとして、断頭後 37°C に保持した脳を用いて同様の処理を行った(各群 $n=4$)。

凍結標本は、過塩素酸にて溶解、遠沈処理し上清を凍結乾燥してNMRスペクトロスコピー標本とした。NMRスペクトラム測定はBruker AMX-400 NMRを用いて行った。

3. 虚血性脳浮腫における水チャンネル蛋白アクアポリンの発現

雄性ウイスターラットを用いて中大脳動脈閉塞モデルを作成し、1、3、7日後に屠殺して凍結切片を作成し、AQP4-アンチセンスプローブを用いて in situ hybridizationを行った。また、同じく1、3、7日後にT2強調MRIを撮像し、信号強度変化領域をAQP4 mRNA発現部位と比較検討した。

4. カイニン酸誘発痙攣モデルでのグルタミン酸トランスポーター遺伝子発現の変動

200-250gの雄性SDラットを実験に用いた。カイニン酸は生理食塩水に溶解しpHを調整後10mg/kgを腹腔内投与した。対象群には同量の

生理食塩水のみを腹腔内投与した。各動物について薬剤投与後4-6時間行動を観察した後、6、12、24、48時間、7日後に全身麻酔下に断頭屠殺し、冠状断あるいは矢状断凍結切片を作成し ^{35}S 標識RNAプローブを用いてGLAST mRNAに対する in situ hybridizationを行った。各時点について痙攣を生じた5-6匹の動物を用い、対象群は各3匹とした。

ノーザンブロット用には痙攣後12時間、48時間、7日後に断頭屠殺し、両側海馬より全RNAを抽出しアガロースゲルにて電気泳動後ナイロンメンブレンに転写しGLAST mRNA及びGAPDH mRNAに対する ^{32}P 標識cDNAプローブを用いてハイブリダイゼーションさせ発現量を定量化した。

5. 脳虚血急性期における血中エラスターゼの測定

発症6時間以内に搬送されてきた脳梗塞あるいは脳内出血患者計6名を対象とした。これらの患者において発症当日、1、2、3、4および7日後に頸静脈血および大腿動脈血を採取し、血中PMN数、血中PMN elastase値、およびPMN elastaseの選択的阻害物質としての α_1 -antitrypsin (α_1 -AT) 値を測定した。

6. コラーゲンペレットによる NGF 脳内投与法の検討

成猫52匹を用いて、NGF 溶液(200 μg /200 μl , NGF 溶液群)あるいはNGF ミニペレット(200 μg /pellet, NGF ミニペレット群)を右尾状核内に投与した。投与後6時間から2週間後に動物を屠殺し、大脳、小脳など多部位の組織中NGF濃度をenzyme-linked immuno-solvent assay法により測定した。

7. bcl-2遺伝子の広範囲脳内導入による脳保護療法への基礎実験

Hvj-lacZ 10 μg をSDラット大槽に注入し、7日後に灌流固定した。脳を取り出し、40 μm 厚の切片を作成し、脳内に導入されたlacZ遺伝子