

慢性期の中樞神経系外傷に関する研究

平成11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

総合研究報告書

平成12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

大阪大学大学院医学系研究科神経機能制御外科学

甲村英二

名古屋市立大学医学部第二生理学

西野仁雄

慢性期の中樞神経系外傷に関する研究

平成11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

総合研究報告書

平成12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

大阪大学大学院医学系研究科神経機能制御外科学

甲村英二

名古屋市立大学医学部第二生理学

西野仁雄

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学教授

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 大阪大学大学院医学系研究科神経機能制御外科学講師
西野仁雄 名古屋市立大学医学部第二生理学教授

研究要旨：

本研究は慢性期頭部外傷後遺症の病態解明、患者の現状調査、診断法の確立、治療法の開発を目的として計画した。本年度は2年計画の2年目であり、研究計画の完了に努めた。まず現状把握では頭部外傷後遺症友の会の協力を得て、378人の患者の現状を調査した。その結果87%が交通事故後遺症で、受傷時と調査時の平均年齢が26.9歳と33才と若く、3分の2の人が日常生活では自立しているものの、就労は福祉的なものも含めて27%であった。このことから外傷後の高次脳機能障害が患者の社会復帰を著しく妨げていることが明らかになった。本病態の補助診断としてPETを用いた解析を行った。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循環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、体幹運動失調とそのためQOLの低下は小脳・後頭葉の血流低下と関連することが示された。慢性期頭部外傷後遺症のうち重要な位置をしめる慢性軸索損傷の病態について、動物モデルを用いて研究を進めた。まず損傷直後の細胞応答を解析したところ、immediate early gene が損傷直後から大脳皮質で発現亢進するのに対し、熱ショック蛋白遺伝子は発現しないことを明らかにした。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。一方グリوترansポータ mRNA 発現を検討したところ、ミオイノシトール・トランスポーターが橋・延髄腹側部の錐体外側部に発現誘導され、水チャンネル・トランスポーターであるアクアポリンも軸索損傷や脳浮腫の周囲に発現がみられた。慢性軸索損傷ラットを用いた行動異常解析では、受傷後1ヶ月の受動回避学習は障害されず、rotarodによる平衡運動能力が有意に低下した。またミニポンプによる脳室内BDNF投与実験では活動性の改善を示し、新しい治療法としての可能性が示された。

研究協力者 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
梅村 淳 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
真砂敦夫 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
加藤康二郎 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
永井 肇 名古屋市総合リハビリテーションセンター・センター長
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
長野友里 名古屋市総合リハビリテーションセンター臨床心理士

A. 研究目的

重症頭部外傷患者の救命率は最近著しく向上しつつある。しかしこのようにして救命された患者の中に、運動機能障害がほとんど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が残存し、社会に復帰できない患者が存在する。これら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年目にはこれら患者の実態調査を行い、378人から回答を得た。本年度はこれらの解析を行い、「頭部外傷後の高次脳機能障害者の実態調査報告書」としてまとめ、本報告書巻末に添付した。

若年者の外傷後慢性期高次脳機能障害の中心を占めるのは彌慢性軸索損傷であるが、本病態初期には画像変化に乏しく、そのため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、本疾患病態の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る。したがって新しい治療法を開発する場合、神経回路網の修復と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た。また本年度はBDNFの脳室内投与による実験的治療を試みた。この結果は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、初年度には、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。本年度は神経回路網障害をArgyrophil III 鍍銀染色法で解析し、詳細は分担研究者西野仁雄の報告書に記載した。また軸索流の障害をArzheimer 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、定量的把握を

試みた。

び慢性脳損傷に伴う脳組織の浸透圧変化、体積・形態変化を解析するため、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、その詳細を分担研究者島田昌一の研究報告書に記載した。また浸透圧変化についてはアクアポリン4型の mRNA と蛋白発現からも解析した。

さらにマウス embryonal carcinoma 細胞を用いてアストロサイトの分化過程にアクアポリン4型の発現機構を解析した。この詳細は分担研究者加藤泰治の研究報告書に記載した。

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、初年度の研究では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。そこで本年度は青斑核ニューロンの保護効果をもつ BDNF をミニポンプで脳室内に投与する実験治療を行った。この詳細は分担研究者甲村英二の研究報告書に記載してあるが、BDNF 投与群では明らかな行動量の増加が見られた。

2年間の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、医療と福祉の光が当てられ、社会復帰の道が開かれることが期待される。

B. 研究方法

1. 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、540人のうち378人(回収率70%)から回答を得た。現在その詳細について本年度も解析を続け、7月に実態調査報告書を作成した。

2. び慢性軸索損傷患者の脳循環代謝

病歴、画像所見などからみて、び慢性軸索損傷が疑われる患者について、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。これらの患者については、昨年度に検査を行い関連を検討したが、本年度はその後の追跡調査を行った。

3. 彌慢性脳損傷モデルにおけるニュー

ロンやグリアのストレス応答

ラットに Marmarou のモデルに準じたび慢性軸索損傷を加え、経時的に脳切片を作成し、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。

4. Aquaporin 4 mRNA と蛋白の発現

脳に特異的に発現する水チャンネルトランスポータ 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。また坑アクアポリン 4 抗体を用いて、蛋白の発現を検討した。

5. 組織学的解析

1) 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否かを、損傷 4 8 時間後に TUNEL 法で検出した。

2) 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。

3) 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。

6. 局所脳損傷モデルと慢性軸索損傷との対比

上記の検討項目について、慢性脳損傷と局所性脳損傷、凍結性脳損傷とを対比検討し、慢性脳損傷モデルの特徴を明らかにした。

C. 研究結果

1. 頭部外傷後高次脳機能障害者の実態調査

本アンケート結果の詳細は報告書巻末の冊子にまとめた。その要点を以下にまとめる。540 人に対し調査票を送付したが、そのうち回答は総数 378 人 (70%) 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。

2. び慢性脳損傷患者の脳循環代謝

び慢性脳損傷患者の受傷後早期には、MRI で脳梁や脳幹に局所性損傷がみられることがある以外には、比較的所見に乏しい。本調査でも大脳の損傷は軽微であり、このことが診断を困難にしている原因の 1 つと思われた。これらの患者もその後の経過を MRI で追跡すると、徐々に大脳皮質の萎縮がみられるようになるが、これらの所見が

顕著になるのは受傷後数年を経た後であり、早期の診断には結びつかない。そこでより早期にび慢性軸索損傷を診断するために PET による脳血流代謝の検査を導入した。

その結果 PET での脳血流障害パターンは前頭葉障害型と小脳・脳幹障害型の 2 つに大別できた。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(図 1)。

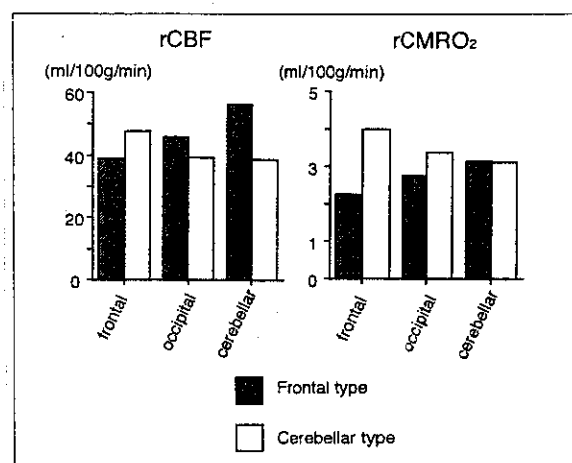


図 1 び慢性脳損傷患者の脳循環代謝

この脳循環代謝障害と高次脳機能障害を対比検討してみると、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。

3. び慢性脳損傷モデルにおけるニューロンやグリアのストレス応答

c-fos は immediate early gene の代表的なものであるが、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。このことから、軸索損傷が主体である本病態においても、神経細胞体はストレス応答をしていることが明らかとなった。

もう 1 つの immediate early gene である *c-jun* mRNA の発現は *c-fos* ほど強くはなく、海馬歯状回、脳幹の一部で軽度に発現の亢進がみられるのみであった。

マイクロオートラジオグラムで *c-jun* や *c-fos* の発現細胞をみると、*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。

このように *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、本モデルとは明らかに発症機構が異なることを示している軸索損傷による細胞体のストレス応答が二次的なものであるのに対し、虚血に対する細胞応答は細胞体自体の一次的損傷によることが示された。

4. Aquaporin 4 mRNA と蛋白の発現

aquaporin 4 は脳内水チャンネルの主要構成成分であるが、正常ラットでも大脳皮質、海馬などのアストロサイトに定常的に出現している。慢性軸索損傷ラットでは新たな発現亢進はほとんどみられなかった。これは後述する凍結脳損傷モデルとは好対

照をなしていた。

5. 組織学的解析

1) TUNEL 染色によるアポトーシスの検出

慢性軸索損傷において、神経細胞やグリアにアポトーシスが起きているかを検討するため、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。このことは軽度脳虚血後 48 時間で海馬に TUNEL 陽性細胞が出現することとは好対照をなしており、慢性軸索損傷において一次的に損傷を受けるのは軸索であり、細胞体ではないことを示す証拠の 1 つと思われる。

2) β -APP 前駆体蛋白の免疫染色

β -APP 前駆体蛋白は細胞体から軸索へ輸送される。したがって軸索損傷によりその輸送が障害されると、細胞体にも β -APP 免疫染色性が増加することが予想される。事実、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、肥大した神経細胞体と軸索が染色された。この染色性を顕微鏡 1 視野あたりの陽性細胞数として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 前駆体蛋白の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。

3) 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。これらの鍍銀陽性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** 状の形態を示しており、またこの形態が損傷 30 日後にも持続することから、軸索損傷が長期に及ぶことが示された。

6. 局所脳損傷モデルと慢性軸索損傷モデルとの対比

局所脳損傷モデルとして力学的外傷と凍結脳損傷モデル用い、慢性脳損傷モデルを対比検討した。その結果、ストレス遺伝子の発現、熱ショック蛋白遺伝子の発現、p21 遺伝子の発現、アクアポリン 4 型遺伝子の発現などいずれの項目においても、慢性脳損傷モデルでの発現は軽微であり、局所脳損傷モデルの方が強い遺伝子発現を示した。

D. 考察

本研究では慢性脳損傷を中心とする慢性期脳損傷後遺症の臨床的病態把握、患者の置かれている現状把握、さらにポジトロン CT を用いた病態診断を臨床的研究の目標とした。さらに病態発症機構を分子レベルで解明し、新しい治療法を開発するため、モデル動物を用いた研究を進めた。研究は 2 年計画で行われ、臨床研究班、基礎研究班とも当初の研究目的を遂行することができたものと思われる。それぞれの分担研究者の研究報告は分担研究報告書に記載したが、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、2 年間の研究期間で PET と高次脳機能検査を用いて病態把握と診断法の確立に迫ることができた。従来、本病

態では社会生活に適応できないほど高次脳機能が障害されているが、その客観的検査所見には乏しかった。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。

動物実験では軸索損傷は主に中脳腹側部に集中しており、前頭葉には鍍銀陽性線維はほとんど見られなかった。したがって本研究に用いた動物モデルは、慢性脳損傷の中でも、脳幹—小脳損傷型に近いモデルということができる。本年度の分担研究報告で、**passive avoidance test** は障害されないこと、一方 **rotarod test** は障害されることが明らかになった。このことは、**passive avoidance test** で代表される大脳機能は障害されず、**rotarod test** で代表される脳幹—小脳機能は障害されることを示すものである。また BDNF の脳室内持続投与による治療実験でも、自発行動が著しく低下していた動物が BDNF 投与により、活動性が有意に増加することが示されており、本モデルが慢性軸索損傷による行動量の低下を研究するのに良いモデルであることが示された。

脳外傷後慢性期の患者が置かれている状況については、今回のアンケート調査報告書でかなり把握することができた。とくに社会復帰率が 2 割程度と著しく低いこと、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 つである。このことは、本研究成果の 1 つであり、これら患者の社

会復帰を支援するための医療サイド、行政サイドでの支援がとりわけ重要であろう。

E. 結論

2年間の研究期間で慢性脳損傷、とくに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。ま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。本研究結果が患者の社会復帰につながる事が念じられる。

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

山田 和雄、間瀬光人、真砂敦夫：脳浮腫とグリア（総説）。 *Clin Neurosci* 17:1043-1045, 1999

松本 隆、山田 和雄、真砂敦夫、原田重徳、間瀬光人：頭蓋内圧亢進と脳内遺伝子発現（総説）。 *脳循環代謝* 11 : 77-93, 1999

Katano H, Fujita K, Kato T, Asai K, Kawamura Y, Masago A, Yamada K: Traumatic injury in vitro induces IEG mRNA in cultured glial cells, suppressed by co-culture with neurons. *Neuroreport* 10:2439-2448, 1999

Mase M, Yamada K, Aihara N, Iida A, Kabasawa H, Ogawa T, Abe J, Nagano Y: Cerebral Blood flow and metabolism in patients with neuropsychological impairments after diffuse brain injury. in Chiu W-T (ed) *International Conference on Recent Advances in Neurotraumatology*, p351-355, 1999, Monduzzi Editore, Bologna, Italy

M. Mase, K. Yamada, T. Matsumoto, A. Iida, H. Kabasawa, T. Ogawa, Z. Abe, Y. Nagano : PET study in patients with neuropsychological impairments in the chronic stage after diffuse brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 19 (Suppl.1): S818, 1999

Aihara N, Yamada K, Komatsu H, Iwata A, Matsumoto T, Nishino H: Temporal pattern of argyrophilic neurons after diffuse axonal injury in rats. *J Neurotrauma* (in press)

Katano H, Yamada K, et al: p53-independent transient p21 WAF1/CIP1 mRNA induction in the rat brain following experimental traumatic injury. *Neuroreport* (in press)

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

間瀬光人、山田 和雄、蒲澤秀洋、小川鉄夫、
阿部順子、長野友里、太田成誓、加藤 朗、
松田妙子、永井 肇:頭部外傷後の高次脳
機能障害者の実態調査.第 2 3 回日本神経外
傷学会、2000 年 4 月 1 5 日、福島

間瀬光人、山田 和雄、飯田昭彦、蒲澤秀洋、
小川鉄夫、阿部順子、長野友里:脳外傷後
慢性期の高次脳機能障害と脳循環代謝(PET
study). 第 2 3 回日本神経外傷学会、2000 年
4 月 1 5 日、福島

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、グリア細胞に多く発現している水チャネルAquaporin-4 (AQP4)の発現調節機構を解析した。マウスembryonal carcinoma P19を使った神経系分化モデルにおいて、細胞がグリア細胞に分化し細胞周期を止めた時点で、AQP4の発現量が増加することが判明した。アストロサイトのAQP4は、脳浮腫の発生に深く関与していると考えられ、その発現調節機構を解明することは、脳浮腫の治療に役立つものと考えられた。

A. 研究目的

脳損傷における脳浮腫の発生には、血液脳関門の破綻や、アストロサイトのdysfunctionが関わっていると考えられている。水を選択的に通すaquaporinのうち、AQP4はアストロサイトに多く発現していることが分かっており、脳浮腫の発生に関与すると考えられている。しかし、AQP4の発現調節機構については、未だ不明な点が多い。そこで、今回、embryonal carcinoma細胞を用いてアストロサイトの分化過程におけるAQP4の発現機構を検討した。

B. 研究方法

1, マウスembryonal carcinoma P19の神経系細胞への分化誘導：マウスP19 embryonal carcinomaをaggregate cultureした後、レチノイン酸 1×10^{-7} Mで4日間処理した。その後、トリプシンで分散した後、新しいdishへ継代し接着した状態で培養を続けた。

2, RT-PCRによる、AQP4、グリア線維性酸性蛋白 (GFAP) mRNAの発現量の検討：P19を継代後、3日、6日、21日でharvestし、TRIZOLを用いてtotal RNAを抽出、逆転写後、AQP4、GFAP、 β -actinに対するprimerを用いてPCRを行った。

C. 研究結果

1, P19は、継代後3日で突起を伸展し神経細胞様の形態を示した。その後、この神経細胞様の細胞は少なくなり、アストロサイト様の細胞が増加、21日後には、ほぼすべての細胞がアストロサイト様の形態を示した。21日後では、抗GFAP抗体による免疫染色では95%以上が陽性であった。

2, RT-PCRでAQP4、GFAP、 β -actinのmRNAを検出したところ、レチノイン酸刺激前では、AQP4、GFAPとも発現がなかった。GFAPは継代培

養後3日で出現を始め6日後にはほぼplateauに達した。一方、AQP4は、継代培養後6日で出現を始め21日後には、発現量が増加した（図1）。

D. 考察

アストロサイトは、神経組織内で水やイオンを調節し、その恒常性の保持に働いていると考えられており、アストロサイトに発現しているAQP4が水の恒常性に関与していると思われる。今回、マウスembryonal carcinomaの神経分化モデルを利用し、AQP4の発現を検討したところ、GFAPの発現より数日遅れてAQP4が発現してくることが判明した。また、結果には述べていないがラットグリオーマ細胞C6を用いた実験で、人為的に細胞周期を止めるとAQP4の発現が上昇することが判明している。このような結果から神経幹細胞がグリア細胞に分化し細胞周期を止めた時点で、AQP4の発現量が増加するものと考えられた。今後は、このような結果をもとにびまん性脳損傷モデルにおいてAQP4の発現がその病態とどのような関係にあるか解析していきたいと考えている。

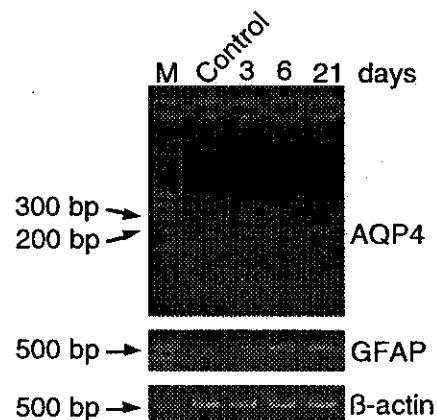


図1 P19におけるAQP4、GFAPの発現

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二解剖学

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

慢性期中枢神経系の外傷時に生じる脳組織における浸透圧、電解質バランス、体積等の変化に着目し、浸透圧調節関連遺伝子について、ミオイノシトールトランスポーター (SMIT)、TRP6、V-ATPase N-M9.2、RAMP1等の遺伝子発現について、ラット Diffuse axonal injuryモデルを用いて山田らと共同で解析した。また、これらの遺伝子の上流で機能していると考えられるMAPキナーゼ、p38、SAPK/JNKに着いても同様に解析した。び慢性脳損傷モデル動物におけるストレス応答は、限局した遺伝子 (SMITとMAPキナーゼ) に限られていた。これらの遺伝子の発現パターンやリン酸化パターンが一致していることから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、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。これらの結果は、慢性期中枢神経系の外傷時の細胞保護機構の解明への一助となるばかりでなく、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にもなりうる。

A. 研究目的

中枢神経外傷による浸透圧、電解質バランス、体積等の変化に着目し、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

慢性期中枢神経系の外傷時の浸透圧、電解質バランス、体積等の変化に関連する因子としてミオイノシトールトランスポーター、TRP6 (カルシウムチャネル)、V-ATPase N-M9.2 (我々が最近単離した神経系にのみ発現するV-ATPの新規サブユニット)、RAMP1 (神経系に発現する受容体補助蛋白)等の遺伝子発現について、ラット Diffuse axonal injuryモデル (山田らが作製) と他の脳損傷モデルとを比較して解析した。これらの遺伝子の上流で機能していると考えられるMAPキナーゼ、p38、SAPK/JNKに着いても同様に解析した。

C. 研究結果

検索した遺伝子の中で脳虚血モデル等の他の脳障害モデルでは発現の変化する遺伝子が幾つか認められたが、び慢性脳損傷モデルにおいては、ミオイノシトールトランスポーター (SMIT) のみが特異的に強く発現が誘導されていた。また、リン酸化酵素の検索でも、他の脳障害モデルではMAPキナーゼ、p38、SAPK/JNKの変化が認められたが、び慢性脳損傷モデルにおいては、MAPキナーゼのリン酸化のみが生じていた。SMITもMAPキナーゼも橋から延髄に及ぶ下位脳幹腹側部の錐体外側領域の同一と考えられる小型の細胞で強く発現が誘導されていた。

D. 考察

他の脳障害モデルのストレス応答では、比較多くの種類の遺伝子の変化が関与しているが、び慢性脳損傷モデル動物におけるストレス応答は、限局した遺伝子 (SMITとMAPキナーゼ) に限られていた。これらの遺伝子の発現パターンやリン酸化パターンが一致していることから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、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

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.

Mizuno N, Kitayama S, Saishin Y, Shimada S, Morita K, Mitsuhashi C, Kurihara H, Dohi T. Molecular cloning and characterization of rat trp homologues from brain. Mol Brain Res. 1999, 64: 41-51.

2. 学会発表

植田高史、神経系特異的な新規液胞型プロトン輸送性ATPase (V-ATPase) サブユニットcDNAの単離と解析、第22回日本神経科学大会 (平成11年7月)

厚生科学研究費補助金分担研究報告書

大阪大学大学院医学系研究科

神経機能制御外科学

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における行動異常と 脳由来神経栄養因子(BDNF)投与による改善について」

分担研究者	甲村英二	大阪大学大学院医学系研究科神経機能制御外科学講師
研究協力者	湯口貴導	大阪大学大学院医学系研究科神経機能制御外科学助手
	藤中俊之	大阪大学大学院医学系研究科神経機能制御外科学
	埜中正博	大阪大学大学院医学系研究科神経機能制御外科学
	西尾雅実	大阪大学大学院医学系研究科神経機能制御外科学

研究要旨：

本研究では、前年度の研究により確立されたび慢性脳損傷病態動物モデルを用いて行動異常の定量的検討と脳由来神経栄養因子(BDNF)投与による治療実験を中心として行った。

直径1mの円形フィールド中央にラットを放置した後の90秒間の自発行動、探索行動をモノクロ CCD カメラで記録コンピュータ解析した。外傷を加えられた動物では、行動開始が遅延するとともに行動量が著しく減少し緩慢な動きを示した。受傷2日ではpathは $42.9 \pm 4.0\%$ 、1週後 $53.5 \pm 4.9\%$ 、2週後 $55.2 \pm 6.3\%$ と移動距離は約半減していた。

脳由来神経栄養因子(BDNF)は、発生期における神経細胞の生存維持、分化に作用しているが、成熟脳でも広く豊富に存在している。神経細胞の生存を維持するとともに、近年の知見によれば順行性に軸索を輸送されシナプス伝達の増強に重要な作用を行っていると考えられている。後者の重要な系として青班核よりの中枢ノルアドレナリン投射系が注目されている。そこで、免疫染色により青班核神経細胞における損傷後のBDNF染色性を検討した。脳損傷を加えていない対照群では、青班核神経細胞はBDNF免疫染色において軽度陽性を示した。受傷後1日では同部神経細胞のBDNF染色性が増強され、さらには青班核よりの投射繊維においてもBDNF染色が強く陽性に認められた。1週、2週、4週後の標本においてはBDNF染色性は低下しほとんど認められなかった。8週後の動物ではBDNF染色性は対照群のレベルに戻っていた。外傷後のBDNF輸送の停滞、産生低下が示唆された。

外傷群に対して受傷直後よりミニポンプを埋め込みBDNF $20\mu\text{g}/\text{day}$ を2週間連続脳室内投与したところ受傷2日では行動性が非外傷群に対して軽度低下していたが、1週、2週の時点ではBDNF非投与群に比して著しい活動性の増加を示し(1週後path $120 \pm 35.9\%$ 、2週後path $139 \pm 23.9\%$)非外傷群と比べてもむしろ行動量が増加していた。動物の行動はfieldの周囲を回る動きが中心であり、正常動物に認められるパターンであった。

新たな治療法として、BDNFの投与が有望である可能性が示唆された。

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。慢性期頭部外傷患者高次機能に及ぼす影響としては、び慢性脳損傷は多大な要素を有していると考えられる。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る。実験動物においても活動性の低下、異常行動が観察されるが、治療実験をすすめるためには単なる定性的観察のみでは不十分であり定量的な解析を行う必要がある。本研究では、前年度の研究により確立されたび慢性脳損傷モデルについて、Open Fieldにおける自発運動、移所行動をビデオ解析装置を用いて定量的に解析することを第一義とした。

脳由来神経栄養因子(BDNF)は、発生期における神経細胞の生存維持、分化に作用しているが、成熟脳でも広く豊富に存在している。神経細胞の生存を維持するとともに、近年の知見によれば順行性に軸索を輸送されシナプス伝達の増強に重要な作用を行っていると考えられている。後者の重要な系として青斑核よりの中枢ノルアドレナリン投射系が注目されている。本研究では損傷後の青斑核神経細胞における BDNF 蛋白の変化を免疫染色により検討した。

さらに、本モデルにおいて少なくとも青斑核からの BDNF 供給が減少していることが推測されたことより、治療実験として BDNF の脳室内投与実験を行い、行動変化を定量的に解析し効果を検証した。

B. 研究方法

1. び慢性脳損傷モデルの作成

前年度報告書記載の方法を用いて全身麻酔下(包水クロラール 350mg/kg 腹腔内投与)に 500g 雄 SD ラットを全身麻酔下に頭蓋骨(coronal suture から lambda suture)を露出して金属プレート(直径 2cm、厚さ 1.5mm)を頭蓋骨正中上に固定した。ラットをウレタンフォーム上にのせ、内径 1cm のパイプをプレート上に垂直に保持して、450g の重りをプレートめがけてパイプ内を 1.5m の高さより自然落下させ脳損傷を加えた(Fig. 1)。

2. Open Field における自発行動の解析

直径 1 m の円形のフィールド中央にラットを放置した後の 90 秒間の自発行動、探索行動をモノクロ CCD カメラで記録解析した。CCD カメラよりの映像信号は AXIS 60(Neuroscience Inc.)に送られて二値化処理を受け、動物の移動はリアルタイムに座標系内での指定物体の移動として自動追跡される。得られたデータを解析ソフトを用いて処理し、測定時間内の移動パターン、距離(path)、行動開始までの時間(latency)について定量解析を行った(Fig. 2)。

動物は昼夜 12 時間のリズムで自由に飲食飲水可能な条件下で飼育し、行動測定は活動が活発となる夜間の実験を行った。照明を低下させた条件で 2 回反復して測定を行った。受傷前、受傷後 1 日、2 日、1 週間、2 週間の時点で測定を行った。

3. 青斑核神経細胞における BDNF 蛋白発現について

外傷後一定期間生存させた後、4%パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定した。脳を取り出し青斑核を含む bregma より 8 mm 後

方から 11mm までの範囲で厚さ 12 μ m の冠状断凍結連続切片を作成した。本検討では、5 枚ごと (60 μ m 間隔) の連続切片を対象とした。anti-BDNF (Wako Pure Chemical) を一次抗体とし、ABC-Elite キットを用いて免疫染色を行った。対照群は sham 手術を行った動物とし同様の切片を作成した。

4. BDNF 脳室内投与実験について

全身麻酔下に Alzet osmotic minipump (Alza model 2002) に 200 μ l の薬液を封入し背部皮下に埋め込み、Bregma 前方 1mm、正中より外側 1.5mm の位置より頭蓋骨に小孔をあけ脳室側のカニューレを 4mm 挿入した (Fig. 3)。本システムにより 2 週間にわたり薬液の注入が脳室内に持続的に行われる。BDNF 群には BDNF 20 μ g/day が投与されるように濃度を調整し、対照動物には生食を投与した。

C. 研究結果

1. び慢性脳損傷モデルについて (Table 1)

動物モデルのすべては、受傷直後に一時的に無呼吸を呈し、本研究での死亡率は 20.5% (20/98) であり、前年度結果に準ずるもので、中等度から高度の損傷モデルといえる。

痙攣発作は受傷直後生存動物の 62.8% (49/78) に認められた。

2. Open Field における自発行動の解析

反復測定を行った予備実験により動物個体間において行動量の差異は存在するが、同一個体においては、ほぼ一定した値が得られることを確認した。各個体で受傷前の測定値を 100% とした相対値で結果を示すこととした。

動物は field の中心から出発し周囲の壁に

沿って回る動きが中心であった。Sham 群では麻酔、sham 手術により 2 日後ではラットの活動性が低下していたが、1 週以後では対照群との差は認めなかった (2 日後 path 81.6 \pm 2.1%、1 週後 100 \pm 21%、2 週後 90.4 \pm 5.0%)。外傷を加えられた動物では、行動開始が遅延するとともに行動量が著しく減少し緩慢な動きを示した。受傷 2 日では path は 42.9 \pm 4.0%、1 週後 53.5 \pm 4.9%、2 週後 55.2 \pm 6.3% と移動距離は約半減したままであった (Fig. 4)。Latency は 2 日後 394 \pm 126%、1 週後 485 \pm 185% と延長し、2 週後には 204 \pm 91% とやや改善を示すが依然として行動開始の遅延があきらかであった (Fig. 5)。行動パターンも正常とは異なり、field の中央部を横切る動きが認められた (Fig. 6)。

3. 青班核神経細胞における BDNF 蛋白発現について

脳損傷を加えていない対照群では、青班核神経細胞は BDNF 免疫染色において軽度に陽性を示した。受傷後 1 日では同部神経細胞の BDNF 染色性が増強され、さらに青班核よりの投射繊維においても BDNF 染色が強く陽性に認められた。1 週、2 週、4 週後の標本においては BDNF 染色性は低下しほとんど認められなかったが、8 週後の動物では BDNF 染色性は対照群のレベルに戻っていた。

4. BDNF 脳室内投与実験について

非外傷群での麻酔、ポンプ埋め込み手術により 2 日後ではラットの活動性が低下していたが、1 週以後では対照群との差は認めなかった。予備実験で非外傷群に対して BDNF 含有ポンプを埋め込んだところ 5 μ g/day 投与では動物の自発行動が低下することが判