

平成11年度厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

研究報告書

「中枢神経系外傷に関する研究」

主任研究者 杉本 壽

## 総括研究報告書（脳科学研究事業）

### 「中枢神経系外傷に関する研究」

主任研究者 杉本 壽 大阪大学医学部救急医学教授

研究要旨：本研究は、重症頭部外傷患者を対象にした臨床研究と、動物実験ならびに分子生物学的方法を用いた基礎研究に分けられる。

前年度までの臨床研究では重症頭部外傷 129 症例を retrospective に検討し、従来の治療法では頭蓋内圧の上昇を制御できない症例に対する中等度脳低温療法の効果と限界、頭蓋内圧の低い症例では中等度脳低温療法を用いなくても治療成績が比較的良好（80%が GR/MD）であること、中等度脳低温療法に伴う易感染性の機序、低体温時の心機能等を明らかにした。そして、従来の治療法で頭蓋内圧の上昇を制御できる症例に対する中等度脳低温療法の prospective randomized clinical trial を開始した。これらを基に本年度の臨床研究では 1) 従来の治療法で頭蓋内圧の上昇を制御できる重症頭部外傷に対する中等度脳低温療法の治療成績改善効果 (prospective randomized clinical trial)、2) 重症頭部外傷急性期の細胞応答、3) 重症頭部外傷時の神経・内分泌・免疫系のネットワークの変化に焦点を当てた。

1) 周到な準備の後、11 施設による prospective randomized controlled trial は順調に推移し、平成 10 年 2 月から平成 11 年 11 月までにエントリーし、受傷 3 ヶ月後の生命・機能予後が判明している 85 症例を検討した結果、①経過中の頭蓋内圧の推移、②受傷 3 ヶ月後の生命・機能予後には両群間（34 度群と 37 度群）では有意差は認められず、③各種合併症の発生頻度が 34 度群で有意に高かった。以上の結果から、「従来の治療法（脱水療法、過換気療法、高浸透圧利尿剤、バルビツレート大量投与、血腫除去術、減圧開頭術、等）で頭蓋内圧を 25 mmHg 未満に制御できる重症頭部外傷患者に対しては、中等度脳低温療法を併用すべきではない」と結論した。

2) 種々の中枢神経系の損傷で増加すると報告されている S-100B 蛋白とサイトカインが頭部外傷の急性期病態にどのように関与するかを検討した。その結果、髄液中 S-100B 蛋白の増加をもたらす損傷が、引き続いて髄液中サイトカインの産生を誘導することが明らかとなった。一方、本蛋白の増加に関与しない他の機序でサイトカインが産生されている可能性も示唆された。また、髄液中 S-100B 蛋白濃度は生命予後を予測する因子になりうることを示された。

3) 中枢神経系の制御が無くなった脳死状態における白血球機能と血中サイトカインバランスならびにコルチゾールの変動について検討した。その結果、脳死に伴い、サイトカインバランスは炎症性方向に崩れ、白血球機能は急激に著しいプライミング状態をきたした。脳死によるサイトカインバランスの崩壊には、血中コルチゾール値の低下が一因として考えられた。

他方、基礎研究では、1) 中枢神経損傷（脳虚血再灌流障害モデル）における脳低温療法時の glucose regulating protein 78 (GRP78) 遺伝子の機能解析、2) 脳損傷病態の解明、3) 脳保護法の開発、4) 虚血性神経細胞死とその制御機構に関する研究を行い、以下の結果を得た。

1) GRP78 遺伝子を組み込んだアデノウイルスをマウスの初代培養神経細胞に感染させて得られた強制発現モデルにおいて、過酸化水素による細胞障害抑制効果を認めた。この結果より、脳低温療法による GRP78 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、脳神経細胞の保護作用の一端を担っている可能性が示唆された。

2) 組織型プラスミンogen activator (tPA) mRNA の変化が、中枢神経損傷時と末梢神経損傷時で発現機序、時期に違いがあり、機能的にも異なる可能性があること。tPA ノックアウトマウスの神経損傷時の transneuronal degeneration には tPA は関与しないこと、さらにロキセチン型プラスミンogen activator (uPA) が外傷急性期の脳浮腫の発生に関与することを明らかにした。

3) HVJ-AVE リポソームにアポトーシス抑制作用を有する Bcl-2 遺伝子を組み込み、実験的脳梗塞の領域を軽減する効果が得られ、将来的な脳保護治療の第一歩を確立した。

4) 低酸素刺激による神経細胞死の機序に関し、主にミトコンドリアに存在するアポトーシス関連蛋白の

Bcl-2ファミリーおよび小胞体に局在するストレス蛋白（ORP150）の機能解析を行った。その結果、低酸素により Bcl-2 蛋白量の低下、ミトコンドリアからのシトクロムcの放出、caspase-3の活性化が起こり、神経細胞死に至る経路が明らかとなった。また、アポトーシス阻害剤を用いて、ORP150を過剰発現させると、低酸素による細胞死が抑制された。以上より、虚血性神経細胞死にミトコンドリアのみならず、小胞体の機能変化が関与することが示唆された。

#### 分担研究者

島津 岳士 大阪大学大学院医学系研究科生体機能調節医学助教授  
田中 裕 大阪大学大学院医学系研究科生体機能調節医学助教授  
平出 敦 大阪大学医学部総合診療部講師  
塩崎 忠彦 大阪大学大学院医学系研究科生体機能調節医学助手  
鎌方 安行 大阪大学大学院医学系研究科生体機能調節医学助手  
種子田 護 近畿大学医学部脳神経外科教授  
吉峰 俊樹 大阪大学医学部脳神経外科教授  
長田 重一 大阪大学医学部遺伝学教授  
玉谷 実智夫 大阪大学大学院医学系研究科機能形態学助教授

#### A. 研究目的

頭部外傷はたとえ救命は出来ても重篤な脳機能の障害が遺ると、患者本人・家族周囲に深刻な問題を提起する。その意味で頭部外傷の治療のゴールは、単なる救命では済まず、より優れた脳機能を保全することにある。本研究は、科学的裏付けに基づく、より安全な頭部外傷の治療法を開発・確立することを目的とした。

我々が重症頭部外傷患者に対する中等度脳低温療法を開発してからすでに9年が経過し、本邦のみならず世界中で現在盛んに臨床応用されている。しかし、その作用機序については、我々が最初の報告で指摘した脳酸素消費量の減少に伴う脳血流量の減少ならびに頭蓋内圧（ICP）の低下以外には臨床例でほとんど解明されていない。さら

に、中等度脳低温療法は、易感染性による肺炎や髄膜炎などの感染症の頻発・循環不全や不整脈・電解質異常など深刻な合併症をもたらすことがあり、安全な確立した治療法とは決して言えない。この療法を用いるためには呼吸・循環管理を含む重症患者管理に精通していることが求められ、現状では一般の医療施設では施行が困難な点が多い。このように作用機序はおろか適応や最適な冷却温度・期間などについても不明な点が多い。にもかかわらず、本邦においても近年中等度脳低温療法が急速に広まりつつある。しかし、適応基準を明確に定めて実施している施設は皆無に近く、各施設ごとに試行錯誤しているのが現状である。そしてそれらの施設の多くは、科学的実証を欠いたまま喧噪されている“いわゆる中等度脳低温療法の作用機序と効果”に基づき、中等度脳低温療法を施行しなくても良好な転帰が期待できる症例にまで適応を拡大しているのが実状である。これは、中等度脳低温療法に伴う易感染性などの合併症を考慮すると極めて憂慮すべき風潮であると言わざるを得ない。また、医療経済の面からも深刻な問題を提起している。

この様な実状から、本研究では中等度脳低温療法の作用機序と適応、限界、危険性を臨床ならびに動物実験で明らかにし、最終的には中等度脳低温療法に取って代わるより簡便かつ安全な新しい治療法を開発することを目的とした。

我々は前年度までの臨床研究では重症頭

部外傷129症例をretrospectiveに検討し、従来の治療法では頭蓋内圧の上昇を制御できない症例に対する中等度脳低温療法の効果と限界、中等度脳低温療法に伴う易感染性や電解質異常、循環不全等の問題点を明らかにした。また、従来の治療法で頭蓋内圧の上昇を制御できる症例には中等度脳低温療法を用いなくても治療成績が比較的良好（80%がGR/MD）であることを明らかにした（平成9年度）。さらに、平成10年度より従来の治療法で頭蓋内圧の上昇を制御できる重症頭部外傷に対する中等度脳低温療法の治療成績改善効果について、11施設によるprospective randomized controlled trialを開始し、「従来の治療法（脱水療法、過換気療法、高浸透圧利尿剤、バルビツレート大量投与、血腫除去術、減圧開頭術、等）で頭蓋内圧を25 mmHg未満に制御できる重症頭部外傷患者に対しては、中等度脳低温療法は治療成績の明らかな改善をもたらさず、むしろ合併症の頻度を上昇させる危険性がある」との中間報告をおこなった。これらを基に本年度の臨床研究では、1)多施設研究の継続、2)重症頭部外傷急性期の細胞応答についてS-100B蛋白とサイトカインの意義、3)重症頭部外傷時の神経・内分泌・免疫系のネットワークに焦点を当てた。

基礎研究では、1)中枢神経損傷（脳虚血再灌流障害モデル）における中等度脳低温療法時のglucose regulating protein 78 (GRP78)遺伝子の機能解析、2)脳損傷病態における細胞応答、3)HVJ-AVEリボソームにアポトーシ抑制遺伝子を組み込んだ脳保護法の開発、4)虚血性神経細胞死とその制御機構について研究した。

## B. 研究方法

### 臨床研究

#### 1) multicenter prospective randomized controlled trial

以下の救命救急センターならびに三次救急医療機関11施設が今回の研究に参加した。

大阪大学医学部救急医学、近畿大学救命救急センター、大阪府立泉州救命救急センター、大阪府立中河内救命救急センター、大阪府三島救命救急センター、大阪府立病院救急診療科、県立西宮病院救命センター、杏林大学医学部救急医学、獨協医科大学越谷病院救急医療科、防衛大学医学部救急医学、松戸市民病院救急部

対象は、来院時GCSが8点以下の重症頭部外傷患者である。頭部以外にAIS $\geq$ 4の外傷を合併する症例や、呼吸・循環を適正レベルに維持できない症例は除外した。年齢制限は設けなかった。

研究方法は以下の通りである。

#### [1]患者管理共通事項

来院時、まず次に示す従来の治療法で頭蓋内圧を25mmHg未満に保つように努める：

- ・輸液療法：乳酸加リンゲル（1.5 $\pm$ 0.5ml/kg/時）を使用し、それ以上の輸液が必要な時は原則として輸血・FFP・アルブミンを使用する。

- ・過換気療法：動脈血液中二酸化炭素濃度を35 $\pm$ 5 mmHgに維持する。

- ・高浸透圧利尿剤（マンニトール、グリセロール、等）の使用は各施設の治療方針に委ねる。

- ・来院時の臨床症状や頭部CTで頭蓋内圧が高いことが明らかな症例にはバルビツレートを初回bolus投与し、その後は頭蓋内圧

のモニター下に持続大量投与（脳波が suppression and burst を示すまで）に移行する。

・血腫除去などの外科的治療は各施設の判断で必要に応じて行う。

・頭蓋内圧持続モニターを行う（側脳室穿刺、硬膜下留置、脳実質内留置、等の方法は各施設の方法に委ねる）。

上記の従来の治療法で頭蓋内圧を 25mmHg 未満に維持できない場合は、直ちに中等度脳低温療法（34℃）を併用する。中等度脳低温療法を併用してもなお頭蓋内圧を 25mmHg 未満に制御できない場合には、後の治療法に一切制限を加えず、治療法の選択は各施設の判断に委ねる。

他方、上記の従来の治療法で頭蓋内圧を 25mmHg 未満に維持できた場合、患者を無作為に 2 群に分け、次に示す体温コントロールを行う。

奇数日入院：低温群（34℃）、偶数日入院：常温群（37℃）

なお、この多施設研究は大阪大学倫理委員会の厳格な審査を予め受け承認されたものである。実施に当たっては患者家族に予め低温療法・常温療法について文書と口頭で十分な説明を行い、同意を得た症例のみを対象とした。同意は家族の申し出によって随時撤回でき、その場合も患者は不利益を受けないことを保証した。

## [2] 体温コントロールの方法

体表冷却法によって可及的速やかに目標温度まで冷却する。

低温群では、頭蓋内温度（膀胱温を代用しても良い）を  $34 \pm 0.5^\circ\text{C}$  に 48 時間維持した後、 $1.0^\circ\text{C}/\text{日}$  以下の速度で 3 日間かけて復温し、第 5 病日に  $37^\circ\text{C}$  に復温させる。復温中に頭

蓋内圧が 25mmHg を越えた場合は、再度  $34^\circ\text{C}$  まで冷却する。常温群では、頭蓋内温度を  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  に 5 日間維持する。経過中に頭蓋内圧が 25mmHg を越えた場合、直ちに中等度脳低温療法（ $34^\circ\text{C}$ ）に変更するが、生命予後の記載は常温群とする。両群とも、5 日後から 14 病日までは体温を  $38.5^\circ\text{C}$  以内に保つ（解熱剤あるいは物理的冷却等の手段は制約しない）。

## [3] 研究内容

上記の 2 群間で、(1) 頭蓋内圧の推移、(2) 生命予後及び機能予後、(3) 使用薬剤の種類と頻度、(4) 合併症の種類と頻度を比較検討する。

### 2) 重症頭部外傷急性期の S-100B 蛋白と sTBI の意義に関する研究

平成 9 年から平成 11 年の間に大阪大学医学部附属病院特殊救急部に収容された重症頭部外傷患者 23 例（男性 17 名、女性 6 名、平均年齢は  $40 \pm 19$ ）を対象とした。23 例の損傷形態は Traumatic Coma Data Bank (TCDB) の CT 分類に従って分類し、Diffuse injury I が 2 例、Diffuse injury II が 8 例、Diffuse injury III が 2 例、Evacuated mass lesion が 11 例であった。全例、バルブ・ドリット療法、軽度の過換気療法、 $1 \sim 2\text{ml}/\text{kg}/\text{hr}$  の輸液管理を行った。また必要に応じて血腫除去等の手術を施行した。これら各種の治療を施行しても頭蓋内圧が 20mmHg 未満に制御できなかった症例 6 例に対しては、全例  $34^\circ\text{C}$  中等度脳低温療法を施行した。頭蓋内圧が 20mmHg 未満に制御できた 17 症例は、無差別（来院奇数日・偶数日方式）に 2 群に分け 11 例には中等度脳低温療法（ $34^\circ\text{C}$  群）を、6 例には常温療法（ $37^\circ\text{C}$  群）を行った。23 症例の 3 ヶ月後の予後

(Glasgow Outcome Scale) は、GR11 人、MD 4 人、SD 3 人、V 2 人、D 3 人であった。検体の採取は、脳室ドレナージまたはスパイクドレナージ挿入時を初回採取時間 (2.0±0.5 時間) とし、受傷後 6、12、24、48、72、96 時間に髄液及び血漿を採取し、髄液中の S-100B 蛋白、髄液及び血漿中のサイトカイン (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10) を測定した。これらの測定値を解析し、重症頭部外傷患者の髄液中 S-100B 蛋白・サイトカイン濃度の時間経過、髄液と血液との濃度比較、脳低温療法法の S-100B 蛋白・サイトカインへの影響、頭部外傷の損傷形態・頭蓋内圧・予後と髄液 S-100B 蛋白・サイトカインとの関係を検討した。

### 3) 脳死状態における白血球機能と血中サイトカインバランスならびにコルチゾールの変動に関する研究

脳死患者 15 例 (頭部外傷 8 例と非頭部外傷 7 例) の血中 CRP 値、白血球数、血中 PMNL の活性酸素産生能および食食能を脳死前後で測定した。頭部外傷 8 例では、PMNL 機能測定と同時に血中サイトカインバランスとコルチゾール値を測定した。さらに血管内皮細胞障害の指標である soluble E-selectin 値、組織障害の指標である顆粒球 elastase 値、呼吸障害の指標である respiratory index (RI)、および臓器障害の指標である MOF score を評価した

### 基礎研究

#### 1) 中等度脳低温療法時の脳細胞の遺伝子発現についての研究

中等度脳低温時に発現が回復する遺伝子として GRP78 の機能解析を行うために、GRP78 を過剰発現させた初代培養神経細胞のストレス耐性について検討した。初代培養神

経細胞は胎生 18 日のラット胎児より海馬部分を採取し、グリア細胞の増殖を抑制して 10 日ほど継代した。GRP78 遺伝子を組み込んだアデノウイルスの作成には、GRP78 遺伝子の全長を組み込んだシャットコスミットを作成し、アデノウイルスとともにラットの神経細胞に感染させて組み替えをおこさせた。ストレス耐性の確認には、アデノウイルスをラットの神経細胞に感染させて 24 時間培養した後、ウェスタンブロット法で蛋白量を比較検討した。さらに過酸化水素による細胞傷害モデルを用い、アデノウイルス感染量の濃度を変えて比較した。細胞活性は、培養液中の乳酸脱水素酵素 (LDH) 量の測定で評価した。

#### 2) 脳損傷病態における細胞応答の研究

##### 1. 実験的脳梗塞における N-acetylaspartate の変動について

N-acetylaspartate (NAA) は成熟神経細胞内に豊富に存在し、NAA の組織濃度が生存神経細胞と密接に関係することが示唆されている。MRI スペクトロスコピー法を用いて、実験動物の全脳完全虚血モデルならびに局所脳虚血モデルを用いて、神経細胞生存の一つの指標として脳内の NAA ならびに代謝産物の変動を測定解析した。完全全脳虚血モデルは全身麻酔下にラットを断頭シラップフィルムで密に覆った後に 37°C で一定時間反応した後に脳を摘出することで作成した。局所脳虚血は全身麻酔下にラット頸動脈より 4-0 ナylon 糸を頭蓋内に挿入することにより中大脳動脈閉塞モデルを作成した。摘出脳は線条体淡蒼球のバルで 3mm 厚に薄切、急速凍結し、perchloric acid にて抽出した後に重水に溶解した。Bruker AMX-400 を用いて  $^3\text{H}$  核磁気共鳴スペクトルを得た。

##### 2. 実験脳損傷モデルにおける組織型グラスシ

ーゲンアチベータ(tPA) mRNA 発現について

tPA は血栓溶解などの用途に臨床的に用いられている薬剤であるが、元来は脳組織内にも存在するセリンプロテアーゼであり、線溶系に関与するのみならず、成長円錐での突起伸展、シナプスの可塑性との関連で注目されている。また、痙攣モデルにおいては immediate early gene の一つとして意義付けられている。本研究では中枢神経脳損傷ことに外傷脳における tPA mRNA の変動を検討した。雌性ウイスタット(100g)を用いて包水クロラル麻酔下に左側一次感覚運動野皮質を鋭的に切除した。2、6時間、1、4、5日後に屠殺して凍結切片を作成した。ヒト及びマウス tPA に対する cDNA をもとに cRNA プロローブを作成し、in situ hybridization を行い tPA mRNA の発現について検討した。また、tPA ならびにウチナーゼ型プラスミノゲンアチベータ (uPA)、uPA 受容体、PAI-1 遺伝子のノックアウトマウスを用いて、頭部外傷モデルの transneuronal degeneration の変化、脳浮腫に及ぼす影響について検討した。

3) 脳内への bcl-2 遺伝子導入 (HVJ-AVE リポソームを用いた) による脳保護療法の研究  
本研究では外部より脳保護的に作用する遺伝子を導入し発現させることによる脳損傷の軽減を試みた。前年度までの研究により、HVJ-AVE liposome をベクターとして用いると、中枢神経へ広範囲に遺伝子導入を行えることを、ラットならびに霊長類 (サル) において実証した。本年度は、脳保護的に作用すると考えられる遺伝子の導入により脳保護効果が実際に得られるかどうかを検討した。用いた遺伝子はアポトシス抑制因子である bcl-2 遺伝子で、ラット脳に導入し局所脳虚血

モデルにおける脳保護効果の有無について検討を行った。human bcl-2 遺伝子 10 µg を抱合した HVJ-AVE liposome (HVJ-AVE-bcl2) を 10 週齢マウス SD ラット大槽内へ注入し、48 時間後に左中大脳動脈をクリップにより閉塞した。閉塞 48 時間後に、37℃の 2%TTC - PBS 溶液 120ml で経動的に灌流し、脳を摘出し冠状断切片を作成して脳梗塞の範囲を計測した。遺伝子を導入せずに中大脳動脈閉塞を行った動物を対照群とした。

4) 虚血性神経細胞死とその制御機構についての研究

虚血性神経細胞死の機序を解析するため、ラット新生児の海馬より神経細胞を分離し低酸素負荷を加え、caspase-3 活性、ミトコンドリアからの cytochrome c の放出、Bcl-2 ファミリー及び ORP150 蛋白質の定量を行った。次に Bcl-2 及び ORP150 の培養系での機能を解析するため、各々の蛋白質を発現する組み替えアジュビラベクターを作製し、低酸素負荷による神経細胞死の抑制効果を検討した。一方、生体内における ORP150 の機能を解析するため、ORP150 を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製し、中大脳動脈閉塞モデルによる梗塞範囲と神経機能について検討した。

基礎研究における動物実験の倫理面への配慮: 全ての作業は深麻酔下で行われるため、動物に与える苦痛が最小限にとどめるよう配慮している。また、本実験から得られる成果は臨床治療に結びつくものであり、動物が受ける侵襲と比べた場合、本実験の社会的意義は大きいと考えられる。

C. 研究結果

## 臨床研究

### 1) multicenter prospective randomized controlled trial

11施設での multicenter prospective randomized controlled trial は、実施可能なプロトコル作成のため平成9年度より数回の会合を行い、大阪大学特殊救急部で preliminary study を、次いで4施設で pilot study を実施し、安全性・実施可能性を確認した上で、平成10年2月から11施設による本研究に着手した。周到的準備を行った結果、プロトコルの遂行にも大きな問題点は報告されなかった。平成11年11月末までに154例がエントリーした。その内、2例は患者家族の同意が得られなかったために除外、7例は頭蓋内圧が測定されていないために除外、60例は従来の治療法で頭蓋内圧を25mmHg未満に維持することができなかったので除外した。頭蓋内圧の高かった60例の内、45例では治療にほとんど反応せずに頭蓋内圧が進行性に亢進して脳死に陥った。残りの15例では、頭蓋内圧の亢進をみとめるものの中等度脳低温療法の併用により脳死には至らず、受傷3ヶ月後の Glasgow Outcome Scale は GR 3人、MD 3人、SD 3人、V 4人、D(合併症死) 2人であった。結局、従来の治療法によって頭蓋内圧を25mmHg未満に維持することができたのは154例中85例で、これらが無作為に常温群(37°C)44例と低温群(34°C)41例に分けた。

男女比、平均年齢、来院時 GCS、来院時瞳孔異常の頻度、来院時低血圧の頻度、来院時低酸素血症の頻度、等の両群の背景因子には全く有意差を認めなかった。また、来院時から群分けまでに要した時間、従来の治療法施行後の頭蓋内圧と脳灌流圧にも

全く有意差を認めなかった。合併損傷の種類と頻度及びその重症度にも全く有意差を認めず、両群ともに胸部外傷の合併頻度が最も高かった(常温群 34%、低温群 29%、NS)。頭部CT画像上の損傷形態は、両群ともに大多数の症例が diffuse injury II type(常温群 43%、低温群 34%、NS)か evacuated mass lesion type(常温群 50%、低温群 61%、NS)に属し、両群間に有意差を認めなかった。

#### (1)頭蓋内圧の推移

常温群では、44例中7例で経過中に頭蓋内圧が上昇(うち5日以内の上昇は6例)し、25mmHg未満に維持することができなかった。この7例中2例は引き続き施行した中等度脳低温療法(34°C)にも全く反応せず、頭蓋内圧亢進のため脳死に陥った。しかし、残りの5例では中等度脳低温療法の併用により致命的な頭蓋内圧上昇を制御することができた。低温群では、41例中5例で頭蓋内圧を25mmHg未満に維持することができなかった(うち5日以内の上昇は2例)。この5例はあらゆる治療に反応せず、頭蓋内圧亢進のため脳死に陥った。これらの12症例(常温群7例と低温群5例)以外では、両群間で頭蓋内圧の推移に有意差を認めなかった。

#### (2)受傷3ヶ月後の生命・機能予後

両群の受傷3ヶ月後の Glasgow Outcome Scale score (GOS)は、常温群: GR17人、MD9人、SD6人、V7人、D5人に対し、低温群: GR14人、MD7人、SD8人、V5人、D7人であった。3ヶ月後の生命・機能予後を比較すると、常温群では機能的予後良好(GRもしくはMD)が26例(59%)で機能的予後不良(SD、V、あるいはD)が18例(41%)であ



った。これに対して低温群では、機能的予後良好が 21 例(51%)で機能的予後不良が 20 例(49%)であった。両群間の生命・機能予後には統計学的有意差は認められなかった( $P=0.466$ )。

### (3) 使用薬剤の種類と頻度

頭蓋内圧を 25mmHg 未満に維持するために必要とした薬剤の種類とその使用頻度は、バルビツレート、高浸透圧利尿剤(マンニトールもしくはグリセロール)、及びミダゾラムには両群間で有意差は認められなかった。しかし、筋弛緩剤の使用頻度は常温群(37%)に比較して低温群(62%)で有意に高かった( $p=0.030$ )。頭蓋内圧を 25mmHg 未満に維持するために施行した脳脊髄液ドレナージの頻度にも両群間で有意差は認められなかった。

### (4) 合併症の種類と頻度

受傷後 2 週間以内に認められた主な合併症の種類とその頻度の結果を以下に示す。なお、群分け後 5 日以内に頭蓋内圧が上昇した症例(常温群 6 例と低温群 2 例)はこの対象から除外している。

感染症の合併頻度は常温群が 38 例中 11 例(29%)に対して低温群では 39 例中 26 例(67%)と、低温群で明らかに高頻度であった( $P<0.001$ )。その内訳は、常温群で肺炎 6 例、髄膜炎 4 例、腸炎 1 例、尿路感染症 1 例(重複を含む)であり、低温群で菌血症 2 例、肺炎 18 例、髄膜炎 9 例、創部感染 2 例、尿路感染症 1 例、副鼻腔炎 1 例(重複を含む)であった。特に低温群での肺炎発生頻度は常温群の約 3 倍であった。白血球数減少及び血小板数減少は常温群(38 例)でそれぞれ 1 例(3%)及び 2 例(5%)にしか認められなかったが、低温群(39 例)ではそれぞれ 8 例(21%)及び 9 例(23%)に認められ、明

らかに低温群での合併頻度が高かった。血清電解質異常の頻度は、常温群では 38 例中 17 例(45%)であったのに対して低温群では 39 例中 30 例(77%)と、明らかに低温群で高頻度であった( $P=0.004$ )。特に、低温群での高 Na 血症(64%)と低 K 血症(67%)の合併は高頻度であった。血清電解質異常の原因の一つである尿崩症の合併頻度は、常温群では 38 例中 7 例(18%)に対して低温群では 39 例中 14 例(36%)と、統計学的有意差が得られるまでには至らなかったが、やはり低温群で高い傾向を認めた( $P=0.085$ )。高アミラーゼ血症の合併頻度は常温群では 38 例中 2 例(5%)に対して低温群では 39 例中 9 例(23%)と、明らかに低温群での合併頻度が高かった( $P=0.026$ )。不整脈の発生頻度は両群間に有意差を認めず( $P=0.352$ )、常温群で 38 例中 4 例(11%)、低温群でも 39 例中 7 例(18%)であった。

### 2) 重症頭部外傷急性期の S-100B 蛋白とサイトカインの意義に関する研究

髄液中 S-100B 蛋白濃度は、受傷 6 時間以内に増加しその後経時的に減少した。髄液中 IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$  濃度は初回採取時から受傷後 12 時間の間で最高値となり、その後経時的に減少した。また髄液中 IL-6、IL-8 濃度は受傷後 6 時間をピークにその後経時的に減少した。一方髄液中 IL-10 濃度は、受傷 6 時間以内に増加し、その後経時的に減少した。受傷後 24 時間以内では、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 の髄液中濃度は血液中濃度の数倍~100 倍もの高値を示したが、IL-10 では逆に血液中濃度の方が髄液中濃度より数倍高値であった。両者ともに受傷後 3~4 日経過すると髄液中濃度と血液中濃度と

がほぼ等しくなった。

Diffuse Injury (DI) 群 10 例 (全例、各種治療により頭蓋内圧は 20mmHg 未満にコントロールされた) と、Evacuated mass lesion 11 例中、血腫除去と各種治療により頭蓋内圧が 20mmHg 未満にコントロールされた 6 例 (EM 群) との間で、各髄液中 S-100B 蛋白、サイトカイン濃度の最高値を比較した。その結果、髄液中 S-100B 蛋白濃度は、EM 群で有意に高値であった ( $p < 0.05$ ) が、髄液中サイトカイン濃度は両群間で有意差を認めなかった。

各種治療によっても頭蓋内圧を 20mmHg 未満にコントロールできなかつた 6 例 (頭蓋内圧高値群) と頭蓋内圧を 20mmHg 未満にコントロールできた 17 例 (頭蓋内圧制御可能群) との間で、髄液中 S-100B 蛋白、サイトカイン濃度の最高値を比較した。その結果、髄液中 S-100B 蛋白濃度は、頭蓋内圧制御可能群に比べて頭蓋内圧高値群で有意に高値であった ( $p < 0.05$ )。また、髄液中 IL-1 $\beta$  濃度は、頭蓋内圧制御可能群に比べて頭蓋内圧高値群で有意に高値であった ( $p < 0.05$ )。他のサイトカイン (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10) の髄液中濃度は両群間で有意差を認めなかった。さらに、脳低温療法以外の各種治療により頭蓋内圧を 20mmHg 未満に制御できた 17 症例を、34 $^{\circ}$ C 群 (11 例) と 37 $^{\circ}$ C 群 (6 例) に分け、両群間で髄液中 S-100B 蛋白濃度及びサイトカイン濃度の経時的変化を比較したが、両群間で、髄液中 S-100B 蛋白濃度及び髄液中サイトカイン濃度に有意差を認めなかった。また髄液中 S-100B 蛋白濃度は予後不良群で有意に高値であった。しかし、髄液中サイトカイン濃度は両群間で有意差を認めなかった。

### 3) 脳死状態における白血球機能と血中サイ

トキンバランスならびにコルチゾールの変動に関する研究

頭部外傷群および非頭部外傷群における脳死前後の血中 CRP 値、末梢血白血球数、および PMNL 機能について検討した。その結果、血中 CRP 値は、両群共に脳死を契機として有意に上昇し、頭部外傷群においてより顕著に上昇がみられた。同様に、末梢血白血球数も脳死を契機として両群において増加がみられ、頭部外傷群において有意な上昇が認められた。また、脳死前正常であった PMNL のプライミング指数および FMLP 反応性は、頭部外傷、非頭部外傷にかかわらず、脳死後有意に上昇した。一方 PMNL の食食能は、頭部外傷群において脳死前有意に抑制されていたが、脳死を契機として著明な改善を認めた。

頭部外傷群 8 例において PMNL 機能の活性化を引き起こす機序を血清因子の変化から検討した結果、monocyte の活性化の指標である血中 neopterin 値は、脳死を契機として著明に増加した。炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 の血中濃度は、いずれも脳死に伴い有意に上昇した。一方、抗炎症性サイトカインである IL-10 の血中濃度は、炎症性サイトカインの動きとは逆に、脳死に伴い有意に低下した。また、血中コルチゾール値は、脳死後明らかに減少した。さらに脳死に伴う PMNL 機能の著しい活性化が組織障害性を発揮するか否かを検討した結果、血中 elastase 値、soluble E-selectin 値、respiratory index、MOF score 共に脳死を契機として著しい上昇を示した。

### 基礎研究

#### 1) 中等度脳低温療法時の脳細胞の遺伝子

## 変化 (GRP78 の機能解析) の研究

GRP78 遺伝子をアデノウイルスベクターを用い培養神経細胞に強制発現させ、過酸化水素によるストレス耐性を検討した。その結果、24 時間後の生存率は GRP78 を過剰発現しない場合には 46%であったのに対して、GRP78 を過剰発現した場合は、感染量 10 m. o. i. では 66%と有意に上昇した。さらに GRP78 の発現量を増加させた場合 (感染量 30 m. o. i.) 生存率は 72%と発現量に依存して増加した。

## 2) 脳損傷病態における細胞応答の研究

### 1. 実験的脳梗塞における N-acetylaspartate の変動について

$^3\text{H}$  核磁気共鳴スペクトルの解析により N-acetyl aspartate (NAA) は、断頭虚血モデル、局所脳虚血モデルともに 24 時間まで直線的に減少した。NAA の分解産物である acetate は、断頭脳モデルでは 24 時間まで持続的に増加したのに反し、局所脳虚血モデルでは 6 時間後に一時的に増加を示したのみであった。NAA の合成基質でありかつ分解産物でもある aspartate は、断頭モデルでは 6 時間後に軽度上昇した以後の変動は認められず、局所脳虚血モデルでは逆に減少を示した。

### 2. 実験脳損傷モデルにおける組織型プラスミンゲンアクチベータ (tPA) mRNA 発現について

大脳皮質損傷モデルでは損傷後 6 時間の時点において、損傷側大脳皮質全体で tPA mRNA の発現増加を認めた。この発現増多は 24 時間後においても強く認められるが、5 日後では、損傷周囲に限局したもの以外は対照群と変化はなかった。さらに MK-801 の外傷前投与により同側皮質全体での tPA mRNA 発現亢進が抑制されることが確認された。

PAI-1 knock out mouse では脳浮腫の拡大を認める一方、血管新生の有意な増加を認めた。uPA knock out mouse では脳浮腫の発生は抑制されたが、uPA receptor knock out mouse では脳浮腫は control と差は認めなかった。損傷脳では uPA の mRNA の増加を認めた。Striatopallidum 損傷により黒質では transneuronal degeneration を生じる。tPA knock out mouse に実験的 striatopallidum 損傷を加えても control と同様の黒質変性を認めた。

### 3) 脳内への bcl-2 遺伝子導入 (HVF-AVE リボソームを用いた) による脳保護療法の研究

Hvj-bcl-2 10 $\mu\text{g}$  を大槽に注入して抗 bcl-2 抗体による免疫染色を行うと、分布は脳幹、小脳、上位頸髄に強く、多数の細胞に観察され、脳幹深部の細胞にまで認められた。注入部位よりも吻側の海馬の神経細胞においても発現が観察された。中大脳動脈閉塞モデルにおける脳梗塞面積の検討を行うと、bcl-2 導入群では対照群に対して皮質では、脳梗塞の体積が約 49.2%に減少していた。基底核でも遺伝子導入群では非導入群に対して梗塞巣が小さい傾向があったが、個体数が少ないため、統計学的な有意差を検討するまでには至らなかった。

### 3) 虚血性神経細胞死とその制御機構についての研究

ラット胎生 18 日の大脳皮質より単離した培養神経細胞に低酸素負荷を加えると形態学的には TUNEL positive であり、Hochst33258 により核の condensation 或いは fragmentation が見られた。また、この細胞死では caspase の活性化が観察され、これらの阻害剤が低酸素による細胞死を抑制した。さらに、低酸素暴露した細胞よりミト

ミトコンドリア分画と細胞質分画を採取し、各分画の cytochrome c の量を Western Blot にて検討するとミトコンドリアの cytochrome c 量が減少し、また細胞質の cytochrome c 量が増加しており、ミトコンドリアから細胞質への遊離がおこっていることがわかった。

低酸素暴露による cytochrome c の遊離及び caspase の活性化以前に Bcl-2 の蛋白レベルは低下するが Bax の蛋白レベルは変化しなかった。また、アポトシスベクターを用いた Bcl-2 の過剰発現は低酸素負荷による cytochrome c の遊離、caspase-3 の活性化及び細胞死を有意に抑制した。これらの事実より低酸素により Bcl-2 の蛋白レベルが低下し、この低下によりミトコンドリアより cytochrome c が遊離、その後 caspase-3 が活性化し、アポトシスに至る伝達経路が考えられた。

ORP150 は小胞体に存在するシヤペロンである。培養アストロサイトは低酸素負荷に対し耐性を示すが、一方培養神経細胞は低酸素により細胞死をきたす。この際、アストロサイトにおいては ORP150 が強く誘導されるが、神経細胞においては誘導が弱い。したがって、低酸素下で誘導される ORP150 が細胞の生存に重要な役割を果たしていると推測される。この可能性を立証する為に、初代培養神経細胞に強制的に ORP150 を発現させて、低酸素下での生存率について検討したところ、ORP150 の発現は低酸素によるアポトシスを抑制した。さらに生体内における ORP150 の役割を検討するため、ORP150 を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製した。中大脳動脈閉塞モデルによる梗塞サイズを TTC 染色にて検討したところ、トランスジェニックマウスにおいて梗塞サイズの減少が認められ、また虚血後の神経学的

アも改善した。

#### D. 考察

我々は、本年度も重症頭部外傷患者を対象にした臨床研究と、動物実験ならびに分子生物学的方法を用いた基礎研究とを並行して行った。

臨床研究は、重度頭部外傷患者における致命的頭蓋内圧上昇に対するバルブツレット大量投与と中等度脳低温療法 (34°C) との併用療法の効果とその適応を決定することに力点をおいた。この併用療法は、脳酸素需給バランスの視点から、我々が世界で初めて開発・報告 (J. Neurosurg 79:363-368, 1993) したものである。その最大の利点は、従来の治療法 (脱水療法・過換気療法・バルブツレット大量療法・血腫除去術・減圧開頭術など) では制御できない頭蓋内圧亢進 (ICP > 20mmHg) を伴う重症頭部外傷 (GCS ≤ 8) に対し、中等度脳低温療法が生命ならびに脳機能を改善する効果にある。前年度までに我々は過去 7 年間の重症頭部外傷 129 例を対象に retrospective な分析を行い以下の結果を得た (J Neurosurg. 89:206-211, 1998)。

- 1) 従来の治療法では頭蓋内圧を ≤ 20 mmHg に維持できない重症頭部外傷症例の内、①来院時 GCS が 5~8、②従来の治療法施行後の頭蓋内圧が ≤ 40mmHg、③受傷初期の CT 画像所見が focal cerebral lesion type である症例では、中等度脳低温療法を併用することによって生命予後・機能予後の改善が十分期待できる
- 2) 従来の治療法で頭蓋内圧を制御できない重症頭部外傷患者に対する中等度脳低温療法には一定の限界があり、①GCS < 5、②

ICP > 60 mmHg、③ 慢性脳腫脹あるいは midline shift > 12 mm のいずれかを呈する症例には中等度脳低温療法は無効である。

3) 従来の方法で頭蓋内圧上昇を  $\leq 20$  mmHg に制御できる重症頭部外傷症例は中等度脳低温療法を施行しなくても予後は比較的良好である (約 80% が GR/MD)。

4) 中等度脳低温療法によって機能が回復しても、年次をわたって CT 画像上脳が緩徐に萎縮していく症例がある (我々はこれを delayed neuronal loss と名付けた)。

現在本邦のみならず世界中で中等度脳低温療法は盛んに臨床応用されている。しかし、適応基準を明確に定めて実施している施設は皆無に近く、各施設ごとに試行錯誤しているのが現状である。特に本邦では科学的実証を欠いたまま喧噪されている“いわゆる中等度脳低温療法の作用機序と効果”を根拠に中等度脳低温療法を施行しなくても良好な転帰が期待できる症例にまで適応を拡大しているのが実状である。これは、中等度脳低温療法に伴う易感染性や循環不全、電解質異常などの多くの危険な合併症を考慮すると極めて憂慮すべき傾向である。また、医療経済の面からも深刻な問題を提起している。以上の点を鑑み、また前年度から継続して行ってきた多施設研究の中間結果を踏まえて、本年度も引き続き従来の治療法で頭蓋内圧を制御できる重症頭部外傷症例に対して、中等度脳低温療法がその生命・機能予後をさらに改善する可否かを決定することに力点を置いた。我々は preliminary study の結果をもとに、平成 9 年度より multicenter prospective randomized controlled trial の準備を始め、平成 11 年 1 月末現在で中間集計を行っ

た。その中間集計結果では、「従来の治療法 (脱水療法、過換気療法、高浸透圧利尿剤、バルビツレート大量投与、血腫除去術、減圧開頭術、等) で頭蓋内圧を  $\leq 25$  mmHg に制御できる重症頭部外傷患者に対しては、中等度脳低温療法は治療成績の明らかな改善をもたらさず、むしろ合併症の頻度を上昇させる危険性がある」ことを報告した (平成 10 年度)。これは、我が国のみならず世界の中度脳低温療法の臨床応用の現在の風潮を省みると、極めて重要な意味を含んでいる。それだけに最終的結論を出すには慎重を要する。しかし、引き続き行った本年度の研究結果より以下の結論を得た。1998 年 2 月から 1999 年 11 月までにエントリーし、受傷 3 ヶ月後の生命・機能予後が判明している 85 症例を検討した結果、(1) 経過中の頭蓋内圧の推移、(2) 受傷 3 ヶ月後の生命・機能予後には両群間で有意差は認められず、(3) 各種合併症の発生頻度が 34°C 群で有意に高かった。以上の結果から、『従来の治療法で頭蓋内圧を 25 mmHg 未満にコントロールできる重症頭部外傷患者に対しては中等度脳低温療法を併用すべきではない』と結論した。1999 年 11 月の時点では症例数が 34°C 群 41 例、37°C 群 44 例と比較的少なかったが、『本研究を続けた場合、34°C 群では合併症が増加するだけで生命予後の改善は期待できず、これ以上患者を生命の危機にさらすことは無意味である』と判断して、2000 年 1 月 31 日をもって今回の多施設研究を中止した。しかし、この結論を決定するには今後生存症例についての高次機能を含めた中枢神経機能の推移を長期間にわたり追跡調査する必要がある。なお、米国においても NIH が中心となり 4 年間の歳月

と 700 万ドルの巨費を投入して、重症頭部外傷に対する中等度脳低温療法の多施設 prospective randomized controlled study が行われた。しかし、現時点までの単純集計では必ずしも期待された結果が得られていない。米国の study は頭蓋内圧を全く無視したものであり、我々の研究とは全く異質なものである。我々の視点からは米国の研究は戦略ならびに計画に大きな誤りがあり、意味のある結果が得られないことは十分に予測されたものである。実際、我々の retrospective study の結果ならびに prospective study もこのことを裏付けている。すなわち、中等度脳低温療法は従来の治療法では頭蓋内圧の致死的上昇を制御できない重症頭部外傷に対してこそ生命ならびに機能予後を改善する一定の効果があるが、従来の治療法で頭蓋内圧を制御できる症例に対する予後改善効果は明らかではなく、むしろ合併症の頻度を高めるからである。頭蓋内圧を無視して GCS だけをエントリ-グイテリアにした彼らの研究からは、意味のある結論が得られないのは当然と言えるだろう。

中等度脳低温療法を施行した重症頭部外傷患者に、肺炎や髄膜炎などの感染症が多い傾向はしばしば指摘されてきたが、今回の我々の prospective randomized controlled study によって、初めてこのことが確かめられた。この中等度脳低温療法に伴う易感染性の問題は、頭蓋内圧の致死的上昇を示す重症頭部外傷に対して本療法を用いる際に極めて重大な問題となり、その機序の解明が求められている。そこで我々はこの問題について重点的に研究を行ってきた。前年度には多核白血球の HSP 発

現量の検討や活性酸素産生能（プライミング）、アポトーシスについて検討し、受傷早期からの HSP60 の増加抑制が、 $\gamma\delta$  T細胞を介した感染防御機構を低下させている原因となることを明らかにした。また in vitro で、HSP の発現が多核白血球のプライミングの亢進やアポトーシスの抑制に関与していることを示した。本年度は神経・内分泌・免疫系を軸としたネットワークに焦点を絞り研究を行った。中枢神経が障害された時、内分泌系や白血球機能を中心とした免疫反応がどのような変化を示すかを、脳死状態を中心に検討した。その結果、脳死に伴いサイトカインバランスは炎症性方向に崩れ、白血球機能は急激に著しいプライミング状態をきたした。さらに脳死によるサイトカインバランスの崩壊には、血中コルチゾール値の低下が一因となることを明らかにした。なお、中枢神経障害時の内分泌・免疫系に関する研究は十分になされておらず我々が初めて研究に着手したところであり、その評価には慎重であらねばならないが今後の発展が大いに期待される場所である。

重症頭部外傷急性期の病態に関しては、興奮性アミノ酸の産生やカルシウム、活性酸素、白血球等の関与が指摘されているが、決定的な結論にはいまだ至っていない。本年度の臨床研究では、重症頭部外傷患者の脳内のサイトカイン産生と、脳由来の蛋白である S-100B に焦点を絞り、経時的な変化、頭蓋内圧との関係、損傷形態との関係について検討した。ラットの外傷モデルでは、脳内においてサイトカインは受傷早期（数時間）に増加すると報告されている。今回の我々の検討でもサイトカイン濃度は受傷後数時間から少なくとも 24 時間以内にピークをとり、その後経時的に減少することが判明した。また髄液中のサイトカイン

の濃度は、IL-10 を除き、血漿中のそれを遙かに上回り、特に IL-6、IL-8 は、数倍から数百倍という圧倒的な高値を示した。これらのことより、重症頭部外傷患者の髄液中のサイトカインは、血液由来のものではなく、脳内で産生され、しかも受傷早期に増加することが明かとなった。重症頭部外傷患者の髄液中 S-100B 蛋白濃度は、受傷早期（初回採取時から 6 時間）にそのピークをとり、髄液中サイトカイン濃度は、S-100B 蛋白濃度の増加と同時に、少し遅れてピークを迎えた。S-100B 蛋白の髄液中での増加は、astroglial cell の破壊による S-100B 蛋白の逸脱によるものと考えられている。従って、この蛋白の受傷早期の増加は、外傷による脳の primary damage によって astroglial cell が破壊されて引き起こされたものと推察される。一方、脳内のサイトカインの産生は、外傷という脳へのストレスが脳内の炎症反応を引き起こした結果、惹起されると考えられている。頭部外傷でサイトカインの増加が、S-100B 蛋白の増加と同時に少し遅れて起きることは、astroglial cell の破壊が、脳内の炎症反応を引き起こす引き金の 1 つであることを示唆している。しかもこれらの反応が、少なくとも受傷後 24 時間以内という早期に進行していることは、重症頭部外傷の病態・治療を考える上で注目すべきである。重症頭部外傷症例の損傷形態からも検討したが、髄液中 S-100B 蛋白濃度に差を認める EM 群と DI 群で、髄液中サイトカイン濃度に有意差がないということは、グリ系グリ系の細胞損傷以外に、脳内の炎症反応を引き起こす機序（例えば慢性脳損傷が主体となる DI 群では、神経軸索の腫脹や損傷が、炎症反応を引き起こしサイトカインを産生する）が存在す

ることを示唆する。頭蓋内圧高値群、予後不良群で S-100B 蛋白が有意に高値であったことは、この蛋白の増加が予後予測因子になりうることを示している。脳内のサイトカインの作用は、2 次的脳損傷に関与するものから神経保護作用を示すものまで多様である。例えば IL-6 は、神経栄養因子の産生を促したり、自らも同様の働きをし、神経保護に働くとされている。また異なるサイトカインが同じ活性を示したり、サイトカイン間で相互作用を示すことから、サイトカインの増加が一概に、神経障害作用を引き起こし、予後を悪化させるとは限らない。今回の検討でも、頭蓋内圧高値群と頭蓋内圧制御可能群で IL-1 $\beta$  が有意差をみた以外は、予後不良群と予後良好群間も含めてサイトカイン濃度に差を認めなかった。各種サイトカインが頭部外傷の病態にどのように関与するか、今後更なる検討が必要である。

基礎研究では、脳虚血モデルを用い、常温では低下するが中等度脳低温療法によって GRP78, calmodulin, cytochrome C oxidase subunit I 等の遺伝子発現が回復することを発見した（平成 9 年度）。しかも、中等度脳低温療法によるこれらの遺伝子発現の回復が、虚血再灌流により変性脱落する海馬を中心とした領域でおこり、変性脱落が抑制されることを明らかにした（平成 10 年度）。本年度は GRP78 遺伝子をアデノウイルスベクターを用いて培養神経細胞に強制発現させ、過酸化水素によるストレス耐性が獲得されることを証明した。この事実は、脳低温療法的作用機序に関して分子レベルでの新たなページを開いたことになる。

線溶系 protease である uPA は脳外傷後の二次的脳損傷形成のみならず組織修復

に関係する血管新生に関与しうることが明らかとなった。急性期では receptor 非結合性の uPA が脳浮腫を増大させる一方、急性期をすぎると uPA は macrophage, microglia などの細胞上で receptor と結合し組織修復のための血管新生に関与する可能性が明らかとなった。

Striatopallidum 損傷後の黒質での transneuronal degeneration は glutamate と tPA の関与が推定されていたが、今回の研究により tPA はこの病態には関与しない可能性が高いことが明らかとなった。MK-801 が tPA mRNA 発現を抑制したことより、この発現は NMDA レプターの活性化を介するものと考えられた。これまでに本モデルにおける c-fos mRNA の発現を検討し、c-fos は 2 時間後に強く障害側皮質全体で発現し同様に MK-801 で発現抑制が得られることを報告した。この機序として損傷後に生じた spreading depression の存在がその後の c-fos、tPA mRNA 発現を誘導している可能性が示唆された。皮質損傷モデルでの tPA mRNA の発現は顔面神経損傷モデルでの発現と大きく異なっていた。顔面神経モデルでは損傷後持続的に発現し、また MK-801 は抑制効果を示さず、誘導のメカニズムが異なっているものと考えられた。機能的にも、末梢神経モデルでは、tPA の発現は神経突起進展と関係していると考えられたが、中枢神経系ではこのような機能のほかに、神経障害性に作用する可能性も示唆されている。今後は蛋白レベルの変動、抑制因子である PAI の変化などにも注目して検討していく必要がある。

HVJ-AVE liposome を用いた human bcl-2 遺伝子導入により、中枢神経の虚血に対す

る脳保護作用が発現している可能性が高いと考えられ、遺伝子導入による脳保護療法の開発は可能であると考えられる。今後の検討課題として、導入効率のさらなる向上と、ターゲティング、遺伝子発現の調節などがあげられる。

我々は、臨床研究で中等度脳低温療法によって機能が回復しても、年次にわたって CT 画像上脳が緩徐に萎縮していく症例があることを見出し、delayed neuronal loss として報告した（平成 9 年度）。この病態には神経細胞のアポトーシスが関与している可能性が高い。分化や発生、免疫細胞系にみられるアポトーシスを介した細胞死は、一般にミトコンドリアを起点とし、それに関するさまざまな因子が同定されている。本年度行った低酸素暴露によるアポトーシスの機序に関する基礎研究結果も、低酸素による Bcl-2 蛋白レベルの低下がアポトーシスのトリガーを担っていることを示しており、ミトコンドリアを起点とする従来の考えを支持する。しかしながら、それに加えて ORP150 の過剰発現が低酸素による細胞死を抑制するという事実は小胞体を起点とする細胞死の存在も示唆する。今後の研究方向として、小胞体とミトコンドリアのリンク、特に小胞体ストレスによる細胞死にミトコンドリアの機能変化が如何に関わっているかを明らかにすることが重要と思われる。また、遺伝子治療によって ORP150 の発現を上昇させておく、或いは ORP150 の発現を誘導させるような薬剤を開発することにより、虚血性神経細胞死を原因とする病態の治療となりうる可能性を期待するものである。

これら基礎研究の結果は、一部を除き直ちに臨床に応用できるものではないが、今後、我々が発見した中等度脳低温療法時に



作用する可能性のある遺伝子も含め遺伝子導入技術を駆使することにより脳損傷の抑制が可能か否かなど、重症頭部外傷の治療法の将来を展望する上で大きな意義を有すると考えられる。

#### E. 結論

従来の治療法で頭蓋内圧を 25mmHg 未満に維持できる重症頭部外傷患者に対して中等度脳低温療法を併用した場合、合併症(肺炎、白血球数減少、血小板数減少、高 Na 血症、低 K 血症等)の頻度が増加するだけで、生命機能予後の改善は全く認められなかった。以上より、従来の治療法で頭蓋内圧を 25mmHg 未満に維持できる重症頭部外傷患者に対しては、中等度脳低温療法を併用するべきではない。

中枢神経損傷時の神経・免疫・内分泌のクロストークについて検討した結果、脳死に伴い、サイトカインバランスは炎症性方向に崩れ、PMNL は著しいプライミング状態をきたす。脳死によるサイトカインバランスの崩壊には、血中コルチゾール値の低下が一因として考えられる。脳死に伴う PMNL の活性化は、血管内皮細胞障害、臓器障害を起こしうる。中枢神経系は全身性炎症反応の制御に深く関与するといえる。

重症頭部外傷時の細胞応答の変化を S-100B 蛋白とサイトカインの変化より検討した。その結果、重症頭部外傷時にはまず髄液中 S-100B 蛋白濃度が受傷 6 時間以内に上昇し、少し遅れるかたちで受傷 24 時間以内に髄液中の各種サイトカイン濃度が上昇した。このような髄液中 S-100B 蛋白、サイトカイン増加の時間経過から、外傷による primary damage が、S-100B 蛋白を増加させ、その後脳内の炎症を引き起こしてサイトカイン

の産生を誘導することが推察された。S-100B 蛋白は、予後不良例で高値となることから、予後を予測する因子になりうることが示唆された。一方サイトカインは、今回検討した S-100B 蛋白濃度に有意差のある 2 種類の損傷形態間で差はなく、予後の良悪でも差はみられなかった。脳内サイトカインの増加には、S-100B 蛋白の増加をもたらす astroglial cell の破壊以外の別の機序も関与することが示唆された。

基礎研究からは、脳虚血病態でも局所脳虚血と全脳完全虚血では N-acetylaspartate 代謝産物の変動に相違があること、tPA についても中枢神経損傷モデルと末梢神経損傷モデルで発現メカニズム、時期に相違があり、機能的にも異なる可能性があることが明らかとなった。そして遺伝子導入療法として、HVJ-AVE liposome にアポトーシス抑制作用を有する bcl-2 遺伝子を組み込み虚血前に投与することにより実験的脳梗塞の体積を減ずることが可能となることが明らかとなった。さらに、ミトコンドリアに主に局在する Bcl-2 だけではなく、小胞体に局在する ORP150 が虚血耐性にとっての key factor であることがわかった。今後の研究方向として、小胞体とミトコンドリアのクロストーク、特に小胞体ストレスによる細胞死にミトコンドリアの機能変化が如何に関わっているかを明らかにすることが重要と思われる。また、遺伝子治療によって ORP150 の発現を上昇させておく、或いは ORP150 の発現を誘導させるような薬剤を開発することにより虚血性神経細胞死を原因とする疾患の治療となりうる可能性が期待される。

脳損傷の病態には多種多様の細胞や分子

レベルの反応が関与しているものと想像される。また、このような個々の反応は互いに関連しつつ病態の全体像を構成するものと考えられる。今後ともさらに多くの細胞レベル、分子レベルの反応とともにそれらの相互関連を明らかにし、血行動態、画像診断を統合して脳損傷病態の解明に努めるとともに、得られた病態解析結果に基づいて適切な薬剤、遺伝子の導入を行うことにより新たな脳保護法の開発に努めたい。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Shiozaki T, Hayakata T, Taneda M, et al: A multicenter prospective randomized controlled trial on the efficacy of mild hypothermia for severely head-injured patients with low intracranial pressure.

(投稿中)

Shiozaki T, Akai H, Taneda M, et al: Delayed hemispheric neuronal loss in severely head-injured patient. (投稿中)

Ishikawa K, Tanaka H, Sugimoto H, et al: Characteristics of infection and leukocyte count in severely head-injury patients treated with mild hypothermia.

(投稿中)

Ishikawa K, Tanaka H, Sugimoto H, et al: Difference in the response following administration of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in septic patients with relative neutropenia. J Trauma (in press).

Shiozaki T, Kato A, Taneda M, et al: Little benefit from mild hypothermia therapy for severely head-injured

patients with low intracranial pressure. J Neurosurg 91: 185-191, 1999.

Kuwagata Y, Shiozaki T, Sugimoto H, et al: Changes in left ventricular performance in patients with severe head injury during and after mild hypothermia. J Trauma, 47:666-672, 1999.

Ishikawa K, Tanaka H, Sugimoto H, et al: Granulocyte colony-stimulating factor ameliorates life-threatening infections after combined therapy with barbiturates and mild hypothermia in patients with severe head injuries. J Trauma, 46:999-1008, 1999.

Ogura H, Tanaka H, Sugimoto H, et al: Priming, second-hit priming, and apoptosis in leukocytes from trauma patients. J Trauma, 46:774-783, 1999.

Yamamura H, Hiraide A, Sugimoto H, et al: Does growth hormone augment brain edema caused by brain injury? A study with a freeze brain injury model in the rat. J Trauma, 46:292-296, 1999.

橋口 尚幸、塩崎 忠彦、杉本 壽、他：臨床的に脳死状態と判断された後、血中抗利尿ホルモン（ADH）濃度の再上昇を認めた3例。脳死・脳蘇生研究会誌、11:32-34, 1999.

塩崎 忠彦、速形 俊昭、加藤 天美、他：重症頭部外傷患者に対する中等度脳低温療法(34℃)の治療限界。脳死脳蘇生研究会誌、12:67-68, 1999.

小倉 裕司、田中 裕、杉本 壽、他：脳死に伴うサイトカインバランスと多核白血球（PMNL）機能の変化。脳死・脳蘇生研究会誌 12:84-85, 1999.

- 青木 正之：砂ネズミ前脳虚血モデルにおける calmodulin 遺伝子の発現、中等度脳低温療法の効果について（第一報）、脳死・脳蘇生研究会誌、11:20-21、1999.
- Tamatani M, Mitsuda N, Matsuzaki H, Okado H, Miyake S, Vitek MP, Yamaguchi A, Tohyama M. A pathway of neuronal apoptosis induced by hypoxia/reoxygenation: roles of NFkB and Bcl-2. *J. Neurochem.* (in press).
- Che YH, Tamatani M, Tohyama M. Changes of mRNA for postsynaptic density 95 (PSD-95) and carboxy-terminal PDZ ligand of neuronal nitric oxide synthase (CAPON) following facial nerve transection. *Brain Res. Mol. Brain Res.* (in press).
- Bando Y, Ogawa S, Yamauchi A, Kuwabara K, Ozawa K, Tamatani M, Yanagi H, Tohyama M. The 150 kDa Oxygen-regulated protein (ORP150) functions as a novel molecular chaperone in the protein transport of the MDCK cells. *Am. J. Physiol.* (in press).
- Che YH, Tamatani M, Yamashita T, Gomi F, Ogawa S, Tohyama M. Changes in protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase mRNA following facial nerve transection. *J. Chem. Neuroanat.* 2000; 17:199-206.
- Niitsu Y, Hori O, Yamaguchi A, Bando Y, Tamatani M, Ozawa K, Ogawa S, Tohyama M. Exposure of cultured primary rat astrocytes to hypoxia results in intracellular glucose depletion and induction of glycolytic enzymes. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1999; 74:26-34.
- Matsuzaki H, Tamatani M, Mitsuda N, Namikawa K, Kiyama H, Miyake S, Tohyama M. Activation of Akt kinase inhibits apoptosis and changes in Bcl-2 and Bax expression induced by nitric oxide in primary hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 1999; 73:2037-2046.
- Ozawa K, Kuwabara K, Tamatani M, Takatsuji K, Tsukamoto Y, Kobayashi T, Yanagi H, Stern DM, Ogawa S., and Tohyama M. ORP150 (150 kDa Oxygen-Regulated Proteins) suppresses hypoxia-induced apoptotic cell death. *J. Biol. Chem.* 1999; 274:6397-6404.
- Tamatani M, Che YH, Matsuzaki H, Ogawa S, Okado H., Miyake S, Mizuno T, and Tohyama M. TNF Induces Bcl-2 and Bcl-x expression through NFkB activation in primary hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* 1999; 274:8531-8538.
- Kawabata A, Kuroda R, Nishikawa H, Asai T, Kataoka K, Taneda M: Enhancement of vascular permeability by specific activation of protease-activated receptor-1 in rat hindpaw: a protective role of endogenous and exogenous nitric oxide. *Br J Pharmacol* 126:1856-1862, 1999
- Kataoka K, Asai T, Sakata I, Taneda M: Remote lesion in the substantia nigra caused by striatopallidal abscess. *Acta Neurochir (Wien)* 141:669-670, 1999
- Kinoshita A, Kataoka K, Taneda M: Multilevel vertebral body replacement with a titanium mesh spacer for aneurysmal bone cyst. *Min Inv Neurosurg* 42:156-158, 1999
- Kataoka K, Asai T, Taneda M, Ueshima S,

Matsuo O, Kuroda R, Carmeliet P, Collen D: Nigral degeneration following striato pallidal lesion in tissue type plasminogen activator deficient mice. *Neurosci Lett* 266:220-222, 1999

Kataoka K, Taneda M, Asai T, Kinoshita A, Ito M: Structural fragility and inflammatory response of ruptured cerebral aneurysms. A comparative study between ruptured and unruptured cerebral aneurysms. *Stroke* 30:1396-1401, 1999

Kataoka K, Taneda M, Asai T, Yamada Y: Difference in nature of ruptured and unruptured cerebral aneurysms. *Lancet* 355:203, 2000

Nonaka M, Yoshimine T, Kumura E, Kohmura E, Wakayama A, Hayakawa T: Decrease in N-acetylaspartate without commensurate accumulation of acetate in focal cerebral ischemia in rat. *Neurol Res* 21:771-774, 1999

Hagihara Y, Saitoh Y, Kaneda Y, Kohmura E, Yoshimine T: Widespread gene transfection into the central nervous system of primates. *Gene Ther.* (in press)

Kohmura E, Yuguchi T, Sakaki T, Nonaka M, Fujinaka T, Hayakawa T, Yoshimine T: Changes in tissue-plasminogen activator mRNA expression following cortical ablation in the rat brain. *J Mol Neurosci* (in press)

## 2. 学会発表

塩崎 忠彦、加藤 天美、種子田 護、他：『頭蓋内圧の低い重症頭部外傷患者に対す

る中等度脳低温療法の効果 (Multicenter Randomized Controlled Trial)』第 27 回日本救急医学会総会シンポジウム (1999 年 11 月) .

Shiozaki T, Hayakata T, Hashiguchi N, et al: A multicenter trial on the efficacy of mild hypothermia therapy for severely head-injured patients with low intracranial pressure - an interim report - . International Conference on Recent Advances in Neurotraumatology (ICRAN 1999) , Taipei , November 1999.

塩崎 忠彦、速形 俊昭、田中 裕、他：『頭蓋内圧の低い重症頭部外傷患者に中等度脳低温療法 (34℃) は必要か? Multicenter Prospective Randomized Controlled Trial (中間報告第 2 報)』第 14 回日本外傷学会総会 (2000 年 5 月発表予定) .

塩崎 忠彦、速形 俊昭、田中 裕、他：『頭蓋内圧の低い重症頭部外傷患者に中等度脳低温療法 (34℃) は必要か? (Multicenter Prospective Randomized Controlled Trial) 最終報告』第 59 回日本脳神経外科学会総会 (2000 年 10 月発表予定) .

塩崎 忠彦、速形 俊昭、田中 裕、他：『頭蓋内圧の低い重症頭部外傷患者に中等度脳低温療法 (34℃) は必要か? (Multicenter Prospective Randomized Controlled Trial) 最終報告』第 28 回日本救急医学会総会 (2000 年 11 月発表予定) .

速形 俊昭、塩崎 忠彦、田中 裕、杉本 壽、他

「重症頭部外傷患者における髄液中 S-100 蛋白、サイトカイン濃度の経時的変動」第 58 回日本脳神経外科学会総会 (1999 年 10 月)