

**厚生労働科学研究費補助金
循環器疾患等総合研究事業**

超急性期軽度低体温療法による重症脳障害患者の予後改善戦略と医療費評価
—多施設無作為対照臨床研究—

平成16年度 総括研究報告書

主任研究者 前川剛志

平成17(2005)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

循環器疾患等総合研究事業

超急性期軽度低体温療法による重症脳障害患者の予後改善戦略と医療費評価
—多施設無作為対照臨床研究—

平成16年度 総括研究報告書

主任研究者 前川剛志

平成17(2005)年 3月

目 次

- I. 総括研究報告 2～4頁
超急性期軽度低体温療法による重症脳障害患者の予後改善戦略と
医療費評価—多施設無作為対照臨床研究
前川剛志、林 成之、荻野景規、武澤 純、長尾省吾、大橋靖雄
- II. 分担研究報告 5～24頁
1) 脳挫傷患者の血清及び髄液ニトロチロシン測定 (荻野景規)
2) 重症脳障害患者に対する軽度低体温療法の問題点とその改善法 (林 成之)
3) 低体温療法の脳保護メカニズム (長尾省吾)
4) 脳低体温療法に関する経済分析
—軽度低体温療法は軽微低体温療法に比してどれほど急性期医療費が増えるか—
(武澤 純、福岡敏雄)
- III. 資料 25～243頁
・研究計画書
「超急性期軽度低体温療法による重症脳障害患者の予後改善戦略と医療費
評価—多施設無作為対照臨床研究—」(高次脳機能評価項目追加)
・中間報告
体温管理、全身管理把握システムの処理データ
平成16年度厚生労働科学研究報告資料
BHYPO医療費評価
独立モニタリング委員会報告
・平成17年度以後の変更点・留意点について
NLA: Neurolept Anesthesia (神経遮断麻酔) マニュアル
・改訂版研究計画書、入力マニュアル
- IV. 研究成果に関連する刊行一覧 245～251頁

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等総合研究事業）

I. 総括研究報告書

超急性期軽度低体温療法による重症脳障害患者の予後改善戦略と医療費評価
—多施設無作為対照臨床研究—

主任研究者 前川剛志・山口大学医学部附属病院先進救急医療センター・教授
分担研究者 林 成之・日本大学医学部附属病院救命救急センター・教授
萩野景規・金沢大学大学院医学系研究科環境生態医学講座・教授
武澤 純・名古屋大学医学部附属病院救急部集中治療部・教授
長尾省吾・香川医科大学医学部附属病院脳神経外科・教授
大橋靖雄・東京大学大学院医学系研究科生物統計学講座・教授

（研究要旨）脳卒中、心肺停止（完全脳虚血）、頭部外傷など急性重症脳障害の予後は非常に悪い。最近、基礎研究でこれらの病態に対して32～34℃の軽度低体温法につき、多施設無作為臨床比較研究試験（RCT）が実施され、その有効性が2002年に報告された。我々も多くの院外心肺停止（最長12分）・蘇生患者で軽度低体温療法を実施し、完全社会復帰させている。急性重症脳障害、特に頭部外傷患者で受傷後超急性期（3～6時間以内）に軽度低体温（32～34℃）療法を開始すれば、患者の予後が著明に改善される可能性が高い。これを多施設・無作為・対照・臨床対照比較研究試験（RCT）で実施し、新しい医療技術を開発して国民の保健に資するとともに、その成果を世界に向けて発信することを目的とした。

本RCTでは重症頭部外傷患者（Glasgow Coma Scale；GCS 4～8点）で300症例を目標に受傷後超急性期（6時間以内）に軽度低体温療法（32.0～34.0℃）を開始して最短72時間以上維持した群（軽度低体温群）と体温上昇を抑制して35.5～37.0℃に最短72時間以上維持した群（軽微低体温群）を比較した。本臨床研究には全国40協力施設が参加して、Good Clinical Practiceに準拠した医師主導型大規模RCTとした。大学病院医療情報ネットワークを利用し、個人情報保護法を遵守できる電子化された症例登録・割付システムを採用した。良質のデータを得るために、36施設にサイトビジットを行い、脳温、心係数など8項目で1分毎の生データを極力早期より、最低72時間後までコンピュータで記録解析した。本研究における一次評価は割付後3ヶ月および6ヶ月のGlasgow outcome scale（GOS）評価、および6ヶ月の高次脳機能評価を行い、適切な症例による医療経済評価も行うこととした。二次評価は各種機能検査結果、各種生化学検査結果、割付後3ヶ月以内の死亡、1週間と30日のGlasgow coma scale, treatment failure、その他の有害事象とした。平成16年10月までに登録された95症例について中間解析を行い、両群間に有害事象で有意さはなく、そして軽度低体温群で予後（3ヶ月後のGOSで評価、中間解析では $P<0.0125$ を有意として解析）が良好となる可能性が示唆されたが有意差が出るまでには至っていない。

今後も研究を継続し、300症例に達した時点で、キーオープンし効果を判定する予定である。

1. 研究目的

急性重症脳障害、特に頭部外傷患者で受傷後超急性期（3～6時間以内）に軽度低体温（32～34℃）療法を開始すれば、患者の予後が著明に改善される可能性が高い。これを多施設・無作為・対照・臨床研究（RCT）で実施し、新しい医療技術を開発して国民の保健に資するとともに、その成果を世界に向けて発信することを目的とする。

2. 研究方法

重症頭部外傷患者（グラスゴー・コーマ・スケール、 $4 \leq \text{GCS} \leq 8$ ）300例を対象に、多施設（協力病院を含む）、無作為、対照比較、臨床試験研究（RCT）とし実施する。

・ 対照軽微低体温M群（50例）：

背景麻酔をミダゾラム非麻薬性鎮痛薬または麻薬とし、最低72時間は軽微低体温～常温（血液温35.5～37.0℃）とし、以後も極力常温を維持する。

・ 軽度低体温M群（100例）：

背景麻酔をミダゾラム非麻薬性鎮痛薬または麻薬とし、最低72時間は体温を軽度低体温（血液温32.0～34.0℃）とし、その後極力常温を維持する。

・ 対照軽微低体温NLA群（50例）：

背景麻酔をドロペリドール・フェンタニールとし、最低72時間は軽微低体温～常温（血液温35.5～37.0℃）とし、以後も極力常温を維持する。

・ 軽度低体温NLA群（100例）：

背景麻酔をドロペリドール・フェンタニールとし、最低72時間は軽度低体温（血液温32.0～34.0℃）とし、その後極力常温を維持する。

患者の登録は大学病院医療情報ネットワーク（UMIN）にアクセスする。また振り分けは、疫学の専門家が行い各群を均等割り振りできる方法をとった。被験者の血液（動脈血、内頸静脈血）と脳脊髄液をワーキンググループで採取し、ラジカル関連物質およびサイトカイン等を測定する。予後評価は3ヶ月後および6ヶ月後に、無作

為化のために治療内容を知らない医師がグラスゴー・アウトカム・スケール（GOS）で評価する。当該年度終了後、目標症例数終了後、または統計学的に有意差が出た時点で本法の医療経済評価を行う。

3. 結果と考察

1) 無作為対照比較臨床試験研究（RCT）の実施体制

本RCTでは企画委員会、プロトコール遵守監視委員会、独立モニタリング委員会等7つの委員会と2つのセンター、および事務局を置き、40施設が低体温実施施設で参加した。症例の確保、プロトコール遵守監視、有害事象発生の回避のためにサイトビジットを積極的に行い、40施設中36施設に実施した。

2) 本RCTの実施状況

平成17年3月末日までに134症例のアクセスがあり、109症例が登録された。平成16年10月26日の班会議と全体会議で中間解析の実施を決めた。平成16年10月17日までに登録された95症例につき、3ヶ月後の予後（GOS）をprimary end pointとしてデータ解析委員会で解析し、独立モニタリング委員会にその結果を報告した。

3) 症例の登録およびデータの入力

大学病院医療情報ネットワーク（UMIN）を利用した登録は頭部外傷発症6時間以内と言う厳しい条件にも順調に対応できており、特別なトラブルは発生していない。各症例におけるデータ入力の不足に関しては、班員によるサイトビジットや厚生労働科学研究（臨床研究実施チーム）で雇用されている研究支援者が対応した。

4) 全身管理レベルの把握と良質なデータの確保

重症頭部外傷患者では十分な脳血流量が得られなければ脳温貯留現象が起り、脳障害を助長する。

本RCTでは徹底した全身管理（人工呼吸、ス

ワン・ガンツカテーテルによる循環管理、内頸静脈カテーテルによる脳温と脳循環・酸素消費量バランスのモニターなど)を行い、肺動脈血液温、内頸(脳)静脈血液温、心機能、心拍出量と全身酸素消費量のバランス、脳血流量と脳酸素消費量のバランスなどを1分毎に測定した。平成16年度はこれらの生データを特殊なコンピュータプログラムを利用して処理し、中間解析症例分(95症例)を解析した。

5) 中間解析結果

本研究における解析対象例数は、対照軽微低体温群で30例、軽度低体温群で34例であった。データ収集状況は対照軽微低体温群32例、軽度低体温群63例であり、解析除外例は対照軽微低体温群で2例、軽度低体温群で29例であった。両群の全身管理につき day 0、day 1、day 3、復温後のデータを心係数、平均動脈圧、脳灌流圧、末梢血管抵抗係数をはじめ、生理、生化学的項目につき統計学的(中間解析では $P < 0.0125$ を採用)に検討し、独立モニタリング委員会に報告した。その結果、同委員会より現時点で軽度低体温群と対照軽微低体温群間に Glasgow Outcome Scale(3ヶ月後)で評価される神経学的予後改善に有意さは認められず、死亡率を含めて各種合併症の発生率も有意差を認めないとの報告を受けている。そして、本臨床研究は安全にかつ適切に実行されており、現行のプロトコールに変更を加えることなく、本RCTを継続することに関して承認を受けている。中間解析で判明したことは軽度低体温群で解析除外例が29例と非常に多く、その大半が6時間以内に規定の $32.0 \sim 34.0^{\circ}\text{C}$ に達していなかった。このことから末梢血管抵抗を下げ皮膚血流を上げて熱交換を良くすることにより、予定時間内に急速に体温を下げ得る neurolept 麻酔(NLA麻酔、プロトコールで当初より予定)に早急に変更する等の対策が必要である。

6) ワーキンググループによるラジカル関連

物質およびサイトカイン等の測定結果

神経細胞死と関連する興奮毒性を示すアスパラギン酸、グルタミン酸、ヒートショック蛋白、ラジカル関連物質(NO_x)、サイトカイン($\text{TNF-}\alpha$ 、 IL-6 、 IL-10 、 IL-8 、 GM-CSF 、 $\text{IFN-}\gamma$)などの測定系を確立し、動脈血、内頸静脈血、脳脊髄液で測定した。中間解析の段階であるので、軽度低体温療法の有無ではなく、予後の良否で評価すると受傷日には動脈血と内頸静脈血ではあまり差がなかったが、脳脊髄液では予後不良群でグルタミン酸、 NO_2 + NO_3 -、ヒートショック蛋白、ニトロチロシンの上昇傾向があった。サイトカインはあまり変化がなかったものと異常高値を示すもの(予後不良症例に多い)とがあり、サイトカインの種類によりその変化に差異がみられた。

7) 医療費評価

医療費評価を実施症例数の多い3施設で行った。直接経費は対照軽微低体温群でもほとんどの患者で体表冷却を要するため、ICU入室期間に大きな差はなく、DPC(包括医療)では費用に差額はないので、軽度低体温療法は選択しやすくなるものと思われる。

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等総合研究事業）

Ⅱ．分担研究報告書

1) 脳挫傷患者の血清及び髄液ニトロチロシン測定

分担研究者：荻野景規、金沢大学大学院医学系研究科 教授

（研究要旨）生活習慣病、変性性脳疾患、炎症性急性疾病等の発症に活性窒素種が関与している。生体中におけるこの活性窒素種発生の指標のひとつとしてニトロチロシンが考えられている。ニトロチロシンの生成には次の2つの経路が知られている。スーパーオキシドと一酸化窒素の反応により生成するペルオキシナイトライトによるチロシンのニトロ化 [1] と、好酸球 [2] や好中球 [3] の持つペルオキシダーゼが過酸化水素を利用して亜硝酸イオンやチロシンを酸化することにより起こるニトロチロシンの生成である。亜硝酸イオンは一酸化窒素の代謝により生成し、過酸化水素はスーパーオキシドの不均化により生成するので、いずれの経路にも活性窒素種と活性酸素種が関与している。特にタンパク質中のチロシンがニトロ化されることにより、情報伝達の攪乱や、酵素が影響を受け、種々の病態に関与することも考えられる。また、昨年度、ニトロチロシンは冠動脈疾患のリスクファクター [4] として報告され、動脈硬化のバイオマーカーとしてその測定の重要性は高まりつつある。

一方、脳の酸素消費量は他臓器に比べて極めて高いが、脳はその組織成分からみると、細胞膜成分である不飽和脂肪酸や神経伝達物質であるカテコールアミンなどの容易に酸化され易い物質を豊富に含んでおり、活性酸素種の異常発生が起こるような場合には、それによる障害を受けやすい環境下にある。実際、アルツハイマー病、多発性硬化症、脳虚血などの中枢神経疾患においてはその髄液中に高レベルのニトロチロシンが存在するという報告がある [5-7]。脳挫傷においても活性酸素種や活性窒素種の異常産生に起因する髄液中ニトロチロシンの増加は十分に考えられる。

生体中のニトロチロシンを測定するために様々な手法が使用されてきた [8]。抗ニトロチロシン抗体を用いた免疫組織化学的手法、ELISA、Western blot、さらに、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、ガスクロマトグラフィー質量分析法、液体クロマトグラフィー質量分析法を用いた方法などである。しかしながら、それぞれの方法で測定したニトロチロシンの正常値の範囲が広範である [9-12] ことや、タンパク質の沈降や加水分解を酸性条件下で行うことによる人工的なニトロ化が起こる [13] など問題点が多い。そこで、人工的なニトロ化が起こらない方法やより高い特異性と感度を有するニトロチロシンの分析方法について検討した。タンパク質中のニトロチロシンをタンパク質分解酵素により中性領域で加水分解した後、電気化学検出器付き HPLC（HPLC-ECD）を用いて検出することにより、生体試料中のニトロチロシンを比較的簡便に定量出来ると考えられる。この測定法を用い、脳挫傷患者の髄液や血清中タンパク質ニトロチロシンの分析条件を検討し、その測定結果を報告する。

1. 方法

1-1. 試薬.

プロナーゼは Roche 社製のものを使用した.

1-2. タンパク質沈降法の検討.

ラット血漿 160 μ l (蛋白質量 10 mg) に 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 7.2) を 340 μ l 加えた. これに種々の溶媒を加え, タンパク質を沈降させる条件の検討を行った. 検討した条件は次の通りである.

- a) 60%過塩素酸 23 μ l (最終濃度 0.2 M).
- b) アセトン/メタノール (1/1, 容量比) 3 ml.
- c) クロロホルム/メタノール (1/2, 容量比) 1 ml.
- d) アセトニトリル 800 μ l.

それぞれの溶媒を添加し遠心分離後, 上清を取り除いた. これに 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 7.2) を加え, 超音波処理後, タンパク質量に対して 80%のプロナーゼを加え, 50°C で 14 時間反応させた. フィルター (Milipore; 10000 NMWL ULTRA FREE-MC polysulfone membrane) を用いて限外濾過後, ニトロチロシンとチロシンの分析を行った.

1-3. 使用するプロナーゼ量の検討.

20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) 30 ml 中でペルオキシナイトライト (最終濃度で 100 μ M) を用いて, ウマ血清 (50 mg/ml) をニトロ化した. これを透析後, 実験に用いた. タンパク質量が 200 μ g となるようにウマ血清を使用し, これを分解するためのプロナーゼ量の検討を行った. 様々な量のプロナーゼをニトロ化したウマ血清に加え, 50°C で 14 時間反応させた. 限外濾過後, ニトロチロシンとチロシンを分析した.

1-4. HPLC を用いたニトロチロシン及びチロシンの分析条件.

a) ニトロチロシンの測定

カラム: SC-50ODS カラム (3 \times 150 mm, 5 μ m, EICOM)

移動層: 2% アセトニトリルと 5 mg/ml EDTA 含む 200 mM リン酸 2 水素ナトリウム水溶液

流速: 0.4 ml/min、カラム温度: 25°C

還元電圧: -900 mV、測定電圧: 300 mV

インジェクト量: 50 μ l

b) チロシンの測定

カラム: ODS2 カラム (4 \times 150 mm, 5 μ m, Waters)

移動層: 7% メタノールを含む 50 mM リン酸 2 水素カリウム水溶液 (pH 3)

流速: 1.0 ml/min、測定波長: 274 nm

インジェクト量: 50 μ l

2. 結果と考察

2-1. 測定方法の決定.

タンパク質中のニトロチロシン測定法の検討を行った. コストの点や比較的簡便に測定を行えることから, HPLC を用いることにした. EICOM 社製の HPLC-ECD は, ポストカラムにおいて 900 mV の電圧をかけてニトロチロシンを電気化学的にアミノチロシンへ還元した後に, 300 mV の電圧をかけて検出する [14, 15]. ニトロチロシンを電気化学的に還元した後に測定することで, ニトロチロシンであることの確認が出来る. また, ニトロチロシンの電気化学的検出には高い電圧 (750 mV) が必要である [16] が, 本装置ではニトロチロシンを還元後に測定するため低い電圧で検出することが出来, 検出されるピークが少なくなり, ニトロチロシンのピークの判別が行い易くなる. このような利点のため, この装置を用いることにした.

当教室では図 1 のようなシステムを組んでいる。多検体の測定を行うため、オートサンプラーを使用している。

2.2. タンパク質中ニトロチロシン測定条件の検討。

タンパク質中のニトロチロシンを測定するには、タンパク質を沈降させ、その後に加水分解を行う必要がある。そこで、まず、タンパク質沈降条件の検討を行った。生体試料中のタンパク質ニトロチロシン分析時のタンパク質沈降に使用したと報告されているものの中から、過塩素酸 [5] とアセトン/メタノール [17] とアセトニトリルの検討を行った [13]。また、プロナーゼによるタンパク質分解を妨害している可能性のある脂質を取り除くためにクロロホルム/メタノールも検討した。結果を図 2 に示す。我々も確認したが、酸性領域では亜硝酸イオン存在下において化学的なチロシンのニトロ化反応が起こると報告がある [13]。ラット血漿に過塩素酸を加えると、pH は酸性になった。この場合、加水分解後に回収されるニトロチロシン濃度が高めであり、人工的なチロシンのニトロ化が起こっていると考えられた。アセトン/メタノールを用いた時のニトロチロシン濃度はさらに高く、詳細は分からないが人工的なチロシンニトロ化反応が起こっていることが示唆された。そのため、これらの溶媒を用いないことにした。一方、クロロホルム/メタノールの場合は、回収されたチロシン濃度もニトロチロシン濃度も低く、タンパク質の変性が起こり、プロナーゼが働きにくくなったと考えられた。したがって、タンパク質の沈降にはチロシンの回収量も多く、ニトロチロシンの分析に影響を与えにくいと考えられたアセトニトリルを使用することにした。次に、タンパク質の加水分

解に使用するプロナーゼ濃度の検討をニトロ化したウシ血清アルブミンを用いて行った。図 3 に示すように、アルブミンに対するプロナーゼの割合が 25% のところで、ニトロチロシン回収量はほぼ最大に達していた。一定量以上のプロナーゼを加えても、回収されるニトロチロシン量に違いが無いため、プロナーゼの自己分解は起こっていない。実際の測定で用いる検体は生体試料なので、いろいろな種類の蛋白質が含まれる。そこで、この割合よりも高いプロナーゼ量 (蛋白質に対して 80%) を使用することにした。以上のことから、蛋白質中ニトロチロシン分析法を図 4 のように確立した。タンパク質量が 5 mg となるようにサンプル (血清, 血漿など) を取り、0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 7.2) を加え容量を 500 μ l とした後、アセトニトリルを 800 μ l 加える。これを遠心分離後、上清を取り除き、0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 7.2) を 400 μ l 加える。超音波処理 (output 2 \times 6 秒) 後、プロナーゼ溶液を 100 μ l 添加 (サンプル中タンパク質量の 80% 相当) し、50°C で 14 時間反応させる。これを限外濾過し、加水分解されていないタンパク質を取り除く。この一部をオートサンプラー用容器に移し、HPLC を用いてニトロチロシンとチロシンを分析する。結果は、ニトロチロシン濃度や、ニトロチロシンとチロシンのモル比で示すことにする。

2.3. 健常者血清のタンパク質中ニトロチロシン濃度。

本方法を用いたニトロチロシン標準物質の分析クロマトグラムを図 5 に示す。10 μ M ニトロチロシンを 50 μ l インジェクトした (500 fmol) 時でもきれいなピークとして得られた。次に、本方法を用いて、健常者の血清中タンパク質ニトロチロシン濃度の検討

を行った。図 6 に、ヒト血清タンパク質中ニトロチロシン分析の代表的なクロマトグラムをそれぞれ示す。本法で測定した健常者血清中タンパク質ニトロチロシン濃度は 49 ± 6 nM ($n = 5$) であった。これは報告されている値 (健常者血清: not detected ~831 nM [9-12]) の中でも低い値であった。正常な状態では酸化ストレスはかかっていると考えられるため、ニトロチロシンレベルが低かったという結果はリーズナブルである。さらに、本測定の正確性を確認するために、本法で測定した同サンプルをより確実にニトロチロシンのみを検出できる液体クロマトグラフィー質量分析法で測定したところ、ほぼ近い値が得られた。したがって、本法を用いた測定で生体試料中ニトロチロシンの正しい値が得られることが確認された。

2.4. 髄液のタンパク質中ニトロチロシン分析方法の検討。

最後に、髄液中のニトロチロシンの測定法を検討した。髄液のタンパク質量は血清に比べてかなり低く、また、採取可能な容量が少ないため、全ての髄液のタンパク質量を図 4 で決めた 5 mg 分使用することが出来なかった。髄液の容量やタンパク質量がニトロチロシンを検出するには満たない検体もあった。そこで、ニトロチロシン測定に必要な髄液の量を検討した結果、500 μ l あれば髄液中のタンパク質ニトロチロシンの測定が出来ることが分かった。このことから、髄液のタンパク質ニトロチロシンの分析を以下のように行うことにした (図 8)。髄液 500 μ l にアセトニトリル 800 μ l を加える。ボルテックスを用いて 30 秒攪拌後、4°C において 700 g で 10 分間遠心する。上清除去後、0.1 M 酢

酸緩衝液 (pH 7.2) を 100 μ l 加え、超音波処理 (output 2×6 秒) を行う。タンパク質量を測定し、タンパク質量の 20% となる量のプロナーゼを 100 μ l 加えた後、50°C で 14 時間反応させる。その後、4°C において 700 g で 10 分間遠心する。上清をフィルターに移し、4°C において 2200 g で遠心することにより、限外濾過する。サンプル中のニトロチロシンとチロシンを HPLC を用いて分析する。この方法を用いると、脳挫傷患者髄液タンパク質中ニトロチロシンは図 8 のように測定できる。

2.5. 測定結果の分析

脳挫傷患者の血清ニトロチロシンの測定結果は、患者情報が開示されていないので分析内容には非常に限りがあるが、以下の如くである。

患者数; 29 名。検体数; 動脈 103 本、静脈 93 本。ニトロチロシン平均濃度は、動脈; 0.72 ± 0.33 pmol/mg protein, 静脈; 0.78 ± 0.36 pmol/mg protein (正常値; 0.39 ± 0.06 , $n=8$) で高値を示し、動静脈間で有意に相関していた ($r=0.37$, $p < 0.01$)。入院時からの経時的推移をみると、24 名中、6 名の検体に動静脈に逆の推移が認められた。動脈では、経時的に上昇傾向が 5 名、下降傾向が 8 名、上昇して下降するものが 5 名、変化のない者が 6 名に認められた。静脈では、上昇傾向が 2 名、下降傾向が 2 名、上昇して下降するものが 8 名、下降してまた上昇するものが 5 名、変化のない者が 4 名にみとめられた。髄液に関しては、次の如くである。

患者数; 11 名。検体数; 32 本。検出不可能な患者数は 1 名であり、検出されたニトロチロシン濃度の範囲は、0 ~ 3.41 pmol/mg protein であった。

動静脈血清中のニトロチロシン濃度と、髄液

中のニトロチロシン濃度には、統計学的関連性はなく、また推移のパターンにも関連性は認められなかった。

これらの推移がどのような治療及び病態と関連しているかは、患者情報開示の後、解明されるであろう

2-6. まとめ

血清中および髄液中タンパク質ニトロチロシンの測定法を確立し、本方法を用いて脳挫傷患者の髄液や血清中タンパク質ニトロチロシンを測定した。二重盲検低体温療法の治療効果と血清ニトロチロシンとの関係を今後、情報開示とともに検討する。

3. 引用文献

- [1] Ischiropoulos, H., Zhu, H., Chen, J. *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* **298** (1992) 431-437.
- [2] Sampson, J.B., Ye, Y., Rosen, H., and Beckman, J.S., *Arch. Biochem. Biophys.* **356** (1998) 207-213.
- [3] Wu, W., Chen, Y., and Hazen, S., *J. Biol. Chem.* **274** (1999) 25933-25944.
- [4] Shishebor, M.H., Aviles, R.J., Brennan, M.L. *et al.*, *JAMA* **289** (2003), 1675-1680.
- [5] Tohgi, H., Abe, T., Yamazaki, K. *et al.*, *Neurosci. Lett.* **269** (1999) 52-54.
- [6] Calabrese, V., Scapagnini, G., Ravagna, A. *et al.*, *J. Neurosci. Res.* **70** (2002) 580-587.
- [7] Gucuyener, K., Ergenekon, E., Demiryurek, T. *et al.*, *J. Child Neurol.* **17** (2002) 815-818.
- [8] Duncan, M.W., *Amino Acid* **25** (2003) 351-361.
- [9] Ceriello, A., Mercuri, F., Quagliaro, L. *et al.*, *Diabetologia* **44** (2001) 834-838.
- [10] Frost, M.T., Halliwell, B., and Moore, K.P., *Biochem. J.* **345** (2000) 453-458.
- [11] Khan, J., Brennan, D.M., Bradley, N. *et al.*, *Biochem. J.* **330** (1998) 795-801.
- [12] Petruzzelli, S., Puntoni, R., Mimotti, P. *et al.*, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **156** (1997) 1902-1907.
- [13] Shigenaga, M.K., Lee, H.H., Blount, B.C. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** (1997) 3211-3216.
- [14] Ishida, N., Hasegawa, T., Mukai, K., Watanabe, M., and Nishino, H., *J. Vet. Med. Sci.* **64** (2002) 401-404.
- [15] Sugiura, H., Ichinose, M., Tomaki, M. *et al.*, *Free Radic. Res.* **38** (2004) 49-57.
- [16] Hensley, K., Williamson, K.S., and Floyd, R.A., *Free Radic. Biol. Med.* **28** (2000) 520-528.
- [17] Marvin, L.F., Delatour, T., Tavazzi, I. *et al.*, *Anal. Chem.* **75** (2003) 261-267.

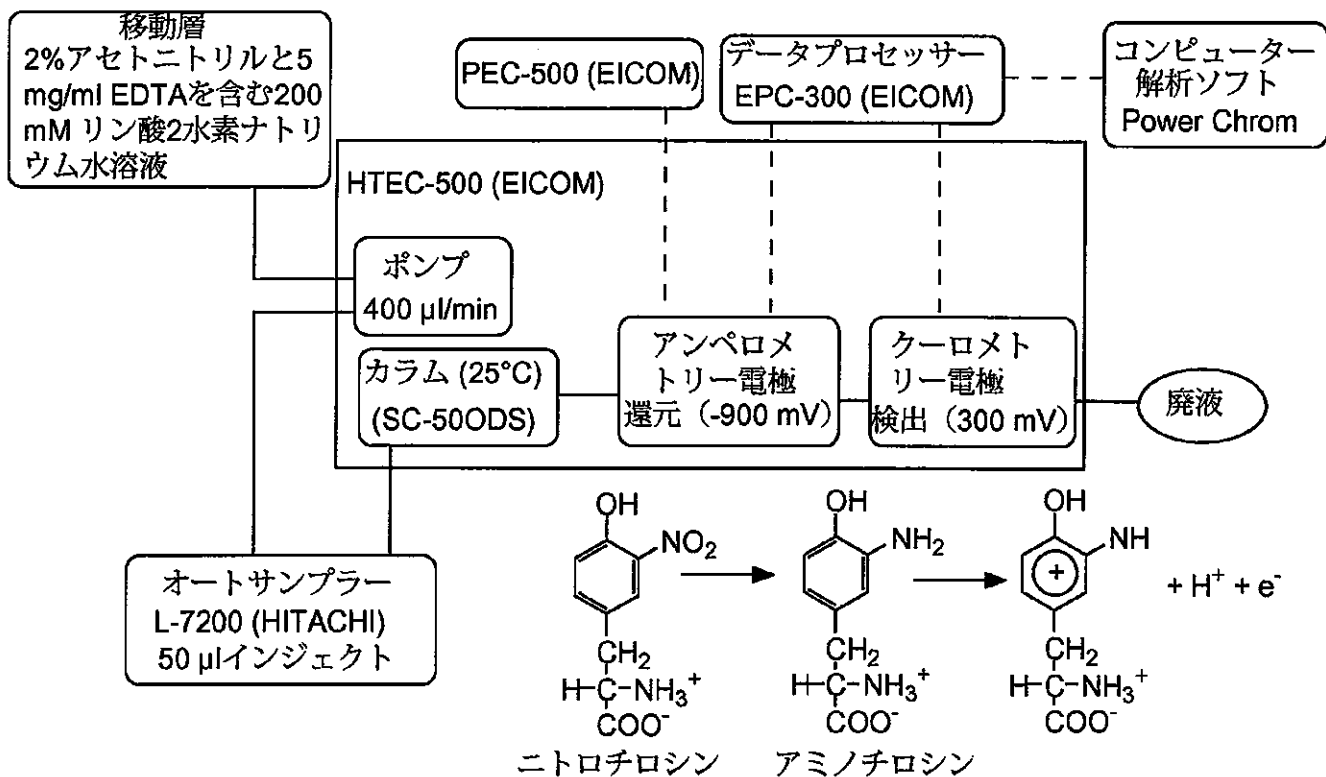


図1 ニトロチロシン測定に用いたHPLC-ECDの構成.

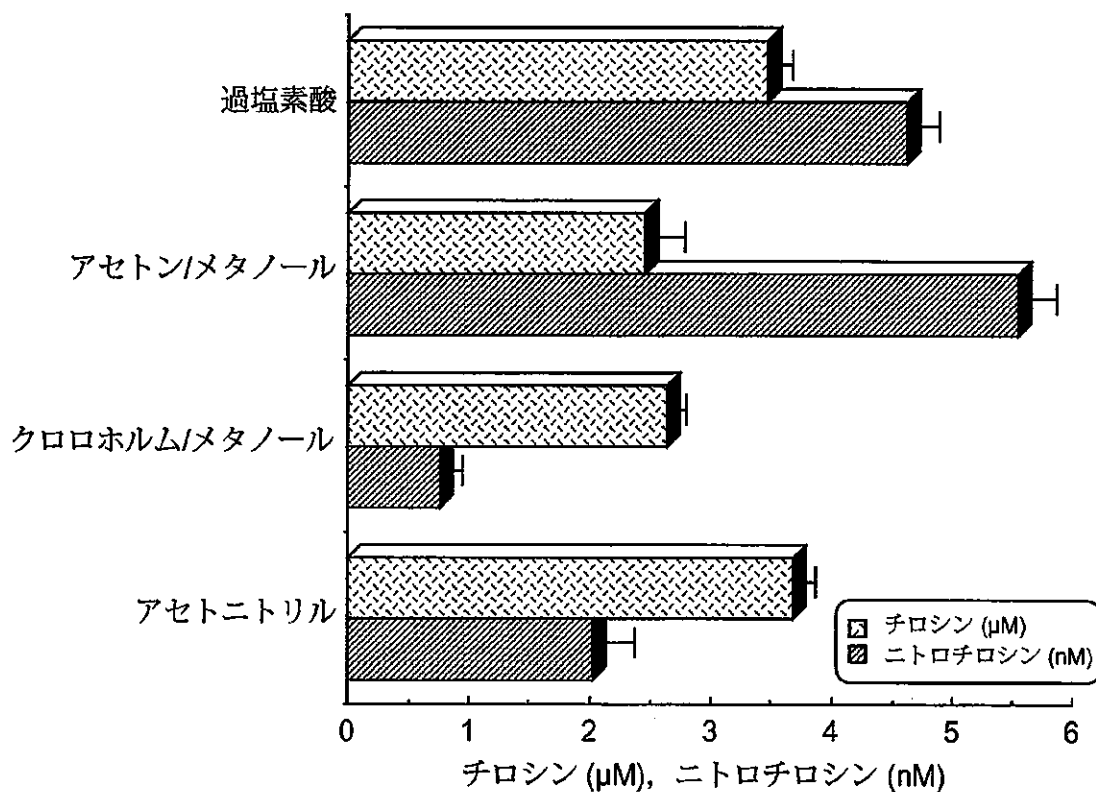


図2 タンパク質沈降法の検討.

ラット血漿160 µl (タンパク質量10 mg) に0.1 M酢酸緩衝液 (pH 7.2) を340 µl加えた。これに、60%過塩素酸23 µl (最終濃度: 0.2 M)、アセトン/メタノール (1/1, 容量比) 3 ml, クロロホルム/メタノール (1/2, 容量比) 1 ml, アセトニトリル800 µlをそれぞれ加え、検討した。

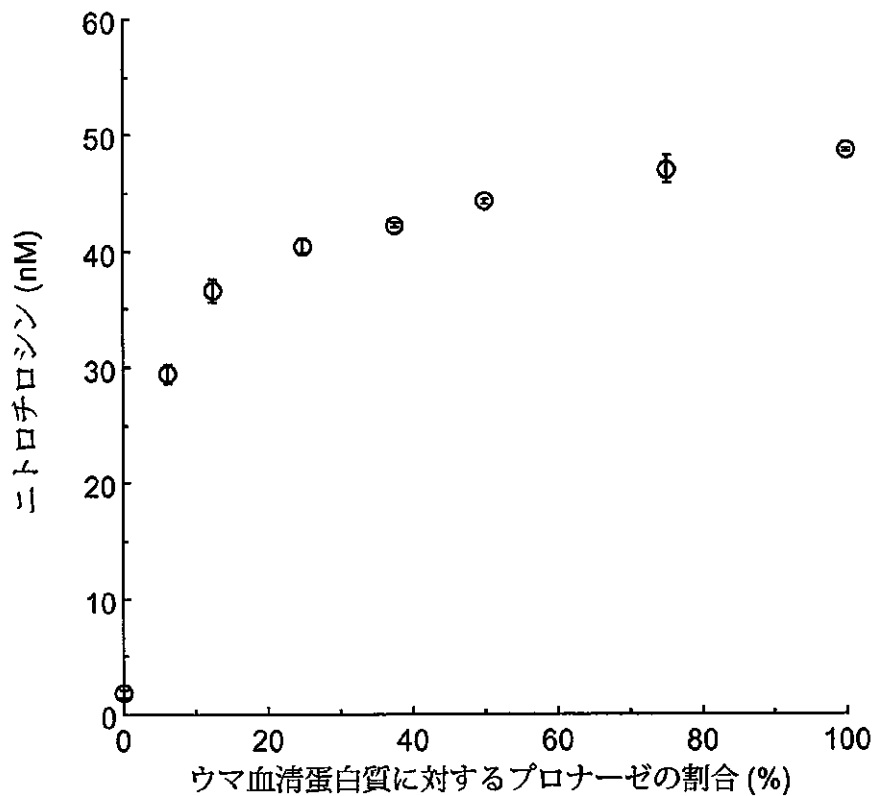


図3 タンパク質分解に用いるプロナーゼ量の検討.

ニトロ化したウマ血清タンパク質200 µg に対する様々な割合のプロナーゼを用いてニトロチロシンの回収量を検討した.

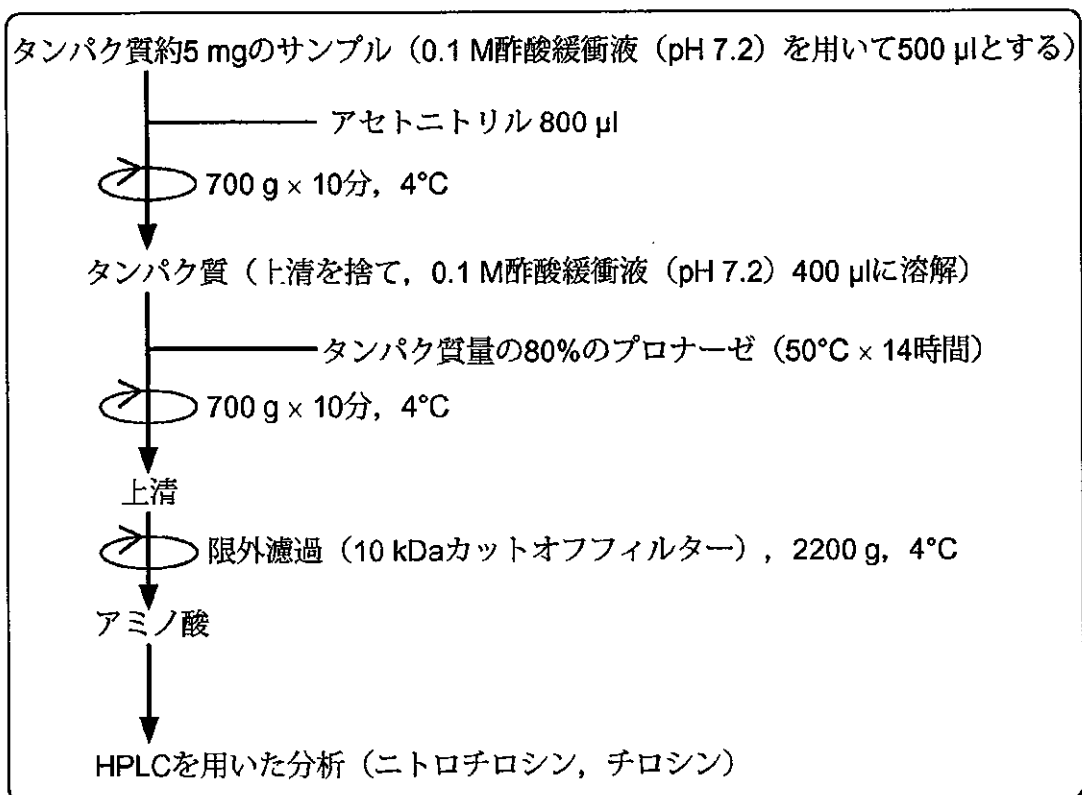


図4 生体試料のタンパク質中ニトロチロシン測定法のフローチャート.

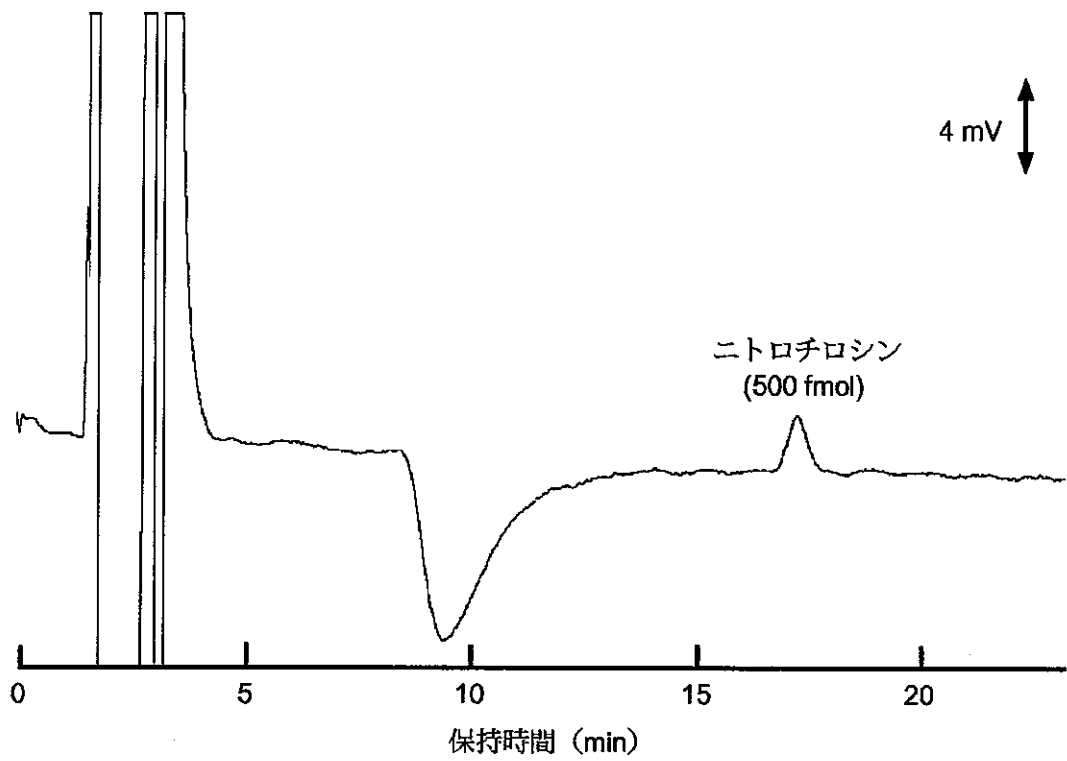


図5 ニトロチロシン標準物質の分析クロマトグラム.

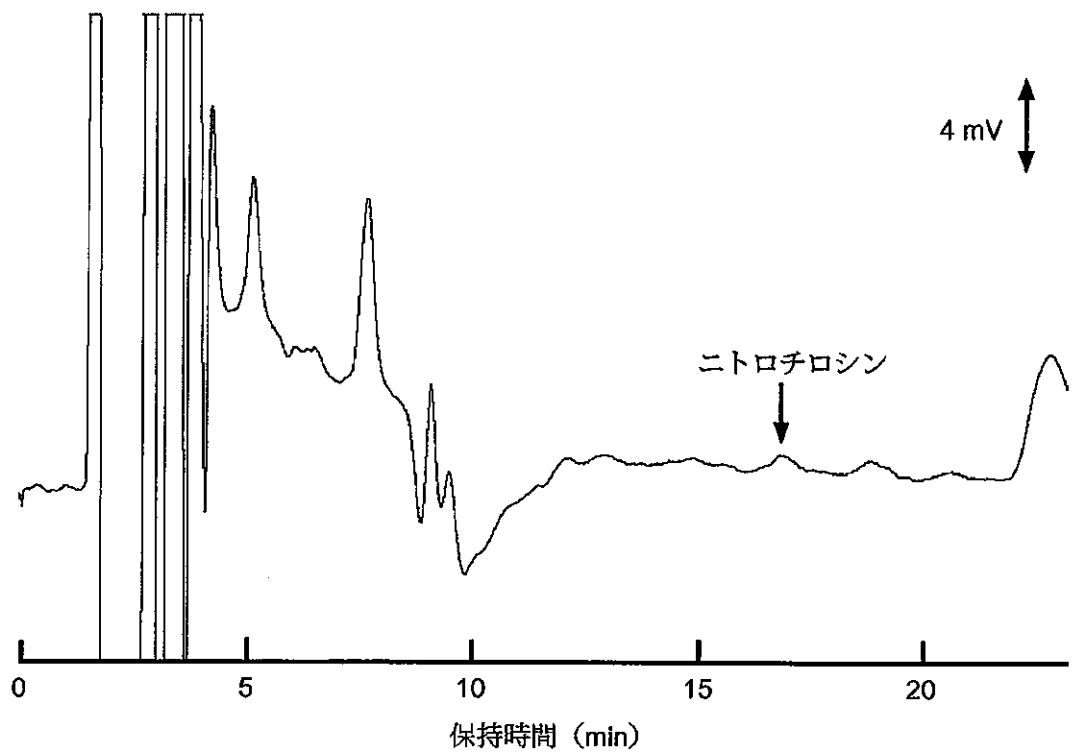


図6 ヒト血清のタンパク質中ニトロチロシン分析の代表的なクロマトグラム.

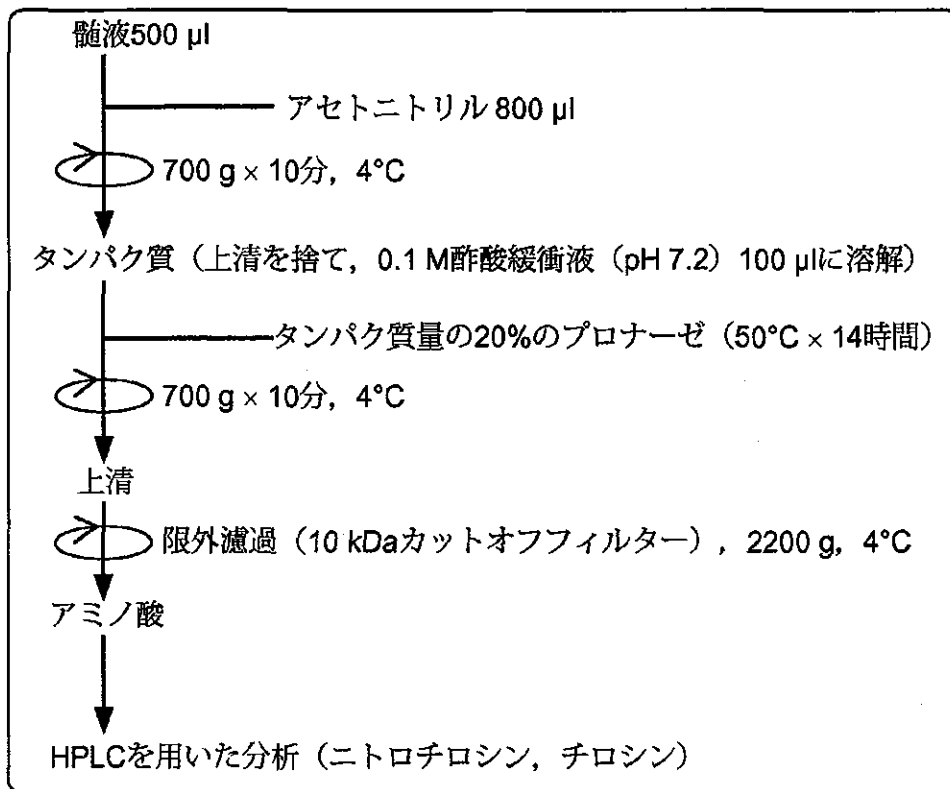


図7 髄液のタンパク質中ニトロチロシン測定法のフローチャート.

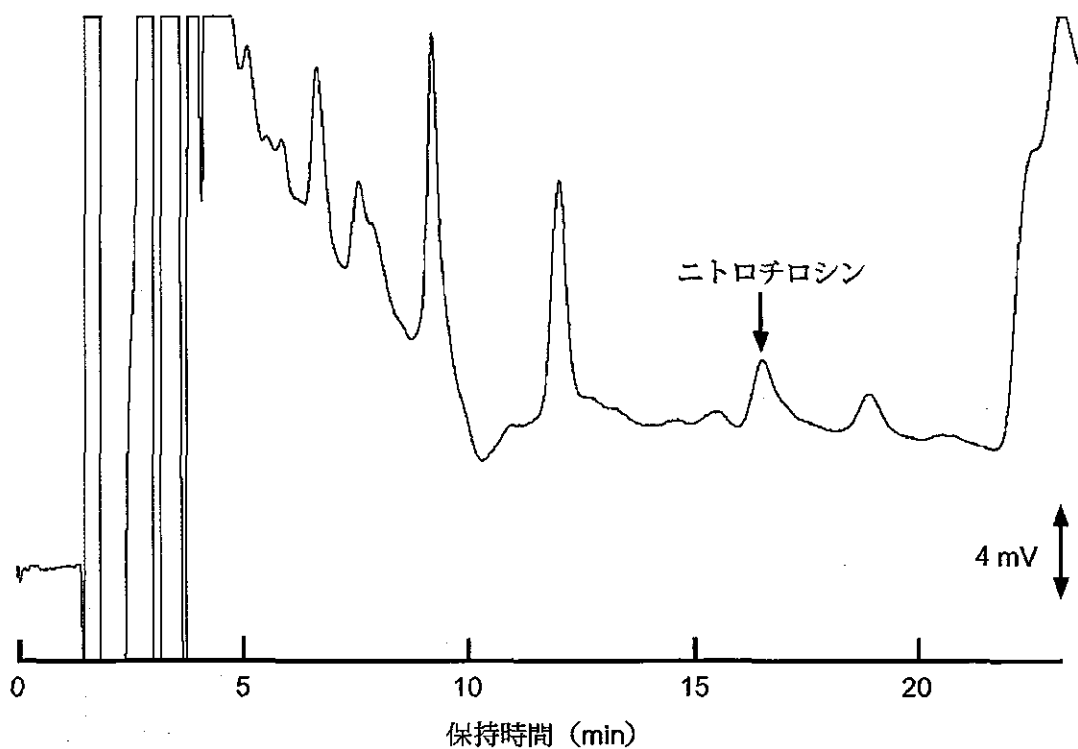


図8 ヒト髄液のタンパク質中ニトロチロシン分析の代表的なクロマトグラム.

2) 重症脳障害患者に対する軽度低体温療法の問題点とその改善法

分担研究者：林 成之、日本大学救急医学 教授

(研究要旨) 脳障害患者の予後改善戦略において、下記のような問題点とその改善法について検討した。

1. 動物実験で有効な低体温管理が臨床に導入すると何故動物実験ほど有効な成果が挙げられなくなるかの理由を明らかにする。
2. 脳低温療法の予後改善戦略を高める集中管理における問題点を明らかにする。
3. 重症脳障害患者に知能・感情障害を残さない為の具体的な治療戦略を確立する。
重症脳障害に伴う植物症からの脱却を達成するための予後改善戦略として、予後判定や治療法の有効性を客観的に評価する「植物症患者の重傷度分類」を完成させる。

1. 研究の実施と成果

動物実験で有効な低体温管理が臨床に導入すると何故動物実験ほど有効な成果が挙げられなくなるかの理由を明らかにする。

重症脳損傷患者の脳障害機構は、実験動物モデルの脳障害病態と異なってより複雑で、脳内貯溜による脳温上昇、ヘモグロビン内の2,3DPG 減少に伴う脳内でのヘモグロビンと酸素を切り離す障害による神経細胞低酸素状態、インスリン抵抗性高血糖による脳内乳酸の増加、ドーパミン放出にともなう海馬回・扁桃核の選択的ラジカル障害で発生する知能・感情障害などが発生する。その理由は、麻酔のかかった侵襲反応が少ない動物モデルと異なって患者では視床下部-下垂体-副腎系の神経防御過剰反応が数分で発生するために起きる病態であることをとらえた¹⁾。これらの病態は、いずれも、患者の予後を決定的なものにする重要な病態である。この新たに発見された患者特有の脳障害機構に対する治療法が、これまでの低体温療法に組み込まれていなかったことが、動物実験と臨床成果に同じ結果が得られなかった最も大きな理由といえる¹⁾。

1) 脳低温療法の予後改善戦略を高める集中管理の問題点を明らかにする。

低体温環境は、恒温動物である人間にとって、脳細胞の保護効果は得られても生体にとって大きな侵襲となる。脳低温療法にはその危険性をさけるための集中管理が重要である。

体温が34℃を境にグルコースから脂質代謝に変換するため特別の代謝管理の工夫が必要になるが¹⁾、このうち、特に、低体温による下垂体不全から発生する免疫不全とそれに伴う感染症の管理法が大切で、脳低温療法の成否を決める重要な管理法となる。免疫不全性の重症感染症に対する集中管理法がこれまでの医療において確立されていなかった事がこの管理法を難しいものにしてしている。この問題をクリアするための低体温環境における感染症対策(表1)、呼吸管理におけるチェックリスト(表2)と管理法(表3)を明らかにした。

2) 脳障害患者に知能・感情障害を残さない為の具体的な治療戦略を確立する。

これまで、知能・感情の高次機能障害は、脳が広範囲に障害されて発生すると理解されてきた。今回の研究によって、短期記憶に関連する海馬回と喜怒哀楽の機能をもつ扁桃核が同時に障害されても植物症に移行することがとらえられた(図1)。その発生原因はドーパミン放出に伴う酸素との反応で産生されたOHラジカルによる選択的ラジカル障害が原因と推定され、その早期治療法から慢性期治療法の一連の治療戦略を明らかにした²⁾。

3) 重症脳障害に伴う植物症からの脱却を達成するための予後改善戦略として、予後判定や治療法の有効性を客観的に評価する「植物症患者の重傷度分類」を完成させる。

人間の知能と感情にはドーパミン A10 神経

群が大きくかかわっている。植物症発生には、ドーパミンA10神経群、リンピックシステム、大脳半球全体の混合障害が深く関与していることをとらえた。これらの部位における神経細胞の機能が保たれているか否かを、音楽刺激、電気刺激、言葉の刺激、運動刺激など行いなら、その機能を評価する指標を検索した、その結果、顔の口や目の周囲の表情筋反応、髄液中のドーパミン/プロラクチン比、髄液中の神経伝達物質の濃度、somato-sensory evoked potential (SEP) N-20の反応性、それに、CT画像における海馬回と扁桃核の変化という5つの因子で評価出来ることをとらえた。その結果は、表4に植物症評価法として示す。

2. 研究により得られた成果の今後の活用と展開

重症脳障害患者の治療戦略は、これまで、実験動物から得られた科学的な情報をもとに、壊れた脳は治せないのだからそこから二次的に発生する脳浮腫、脳圧亢進、脳循環障害、活性酸素による脳細胞障害から守るという脳保護治療の概念で患者の治療が行われてきた。しかし、今回の研究によって、37°Cの一定温度で麻酔のかかった生体侵襲の少ない実験動物モデルと異なって、患者では生体侵襲反応に伴う視床下部-下垂体-副腎系のホルモン異常によってこれまでの治療戦略に無い、40~44°Cの脳温上昇やヘモクロビンの機能障害、インスリン無効の高血糖によって、脳蘇生治療の基本とされている酸素吸入、脳圧管理、脳循環障害の管理も無効となる患者特有の複雑な脳の病態が発生していることが明らかにされた。この病態は、重症頭部外傷のみならず、脳卒中、心停止蘇生後脳症においても共通の病態であり、これからの脳蘇生治療の発展に革命的な成果を生み出す科学的なエビデンスが明らかになったと言える。脳低温療法においても、動物実験による低体温の脳保護効果を期待する治療ではなくて、この新たに発見された脳損傷機構に対応する治療内容が組み込まれていることが大切で、この見落としが、これまで脳低温療法の実験動物と患者の治療成果に一致しない理由になっていたと言える。

脳低温療法が充分成果を挙げられない第二の理由として、低体温環境は脳神経細胞にとって保護的効果があっても、恒温動物の人間にとって生体侵襲となり、そのデメリットを避けるための集中管理法が明らかにされ、本治療法をより正確に行う事が可能となった。

脳低温療法が充分成果を挙げられない第三の理由として、これまでに知能や感情障害を防止する具体的な治療法が見つかっていなかったために脳低温療法においてもその治療法が配慮されていなかった。本研究によって、知能・感情障害や植物症の高次機能を少なくする具体的な治療戦略が解明されたばかりか、植物症患者の治療成果や回復の見込みを客観的に判定できるスコア表が完成したことは、これからの重症脳障害患者の回復に福音をもたらすと同時に、医療費削減に大きな貢献が期待される。

最近、重症頭部外傷患者が社会システムの改善によって激減し、脳低温療法を導入する機会は減ったが、心停止蘇生後脳症の患者に後遺症を残さない治療法として新たな展開が世界的レベルで進められており、それに対する指導的な立場での貢献が期待されている。

3. 参考文献

- 1) Hayashi N: A new concept of brain hypothermia treatment and pitt falls in intensive care unit hypothermia management. In "Hypothermia for Acute Brain Damage" ed Hayashi N, R Bullock, Dietrich DW, et al. Springer-Verlag, Tokyo, pp 49-75, 2004
- 2) Hayashi N, Moriya T, Kinoshita K et al: Persistent vegetation means unconsciousness? How to manage vegetation and memory disturbances following severe brain damage. In "Hypothermia for Acute Brain Damage" ed Hayashi N, R Bullock, Dietrich DW, et al. Springer-Verlag, Tokyo, pp327-342, 2004

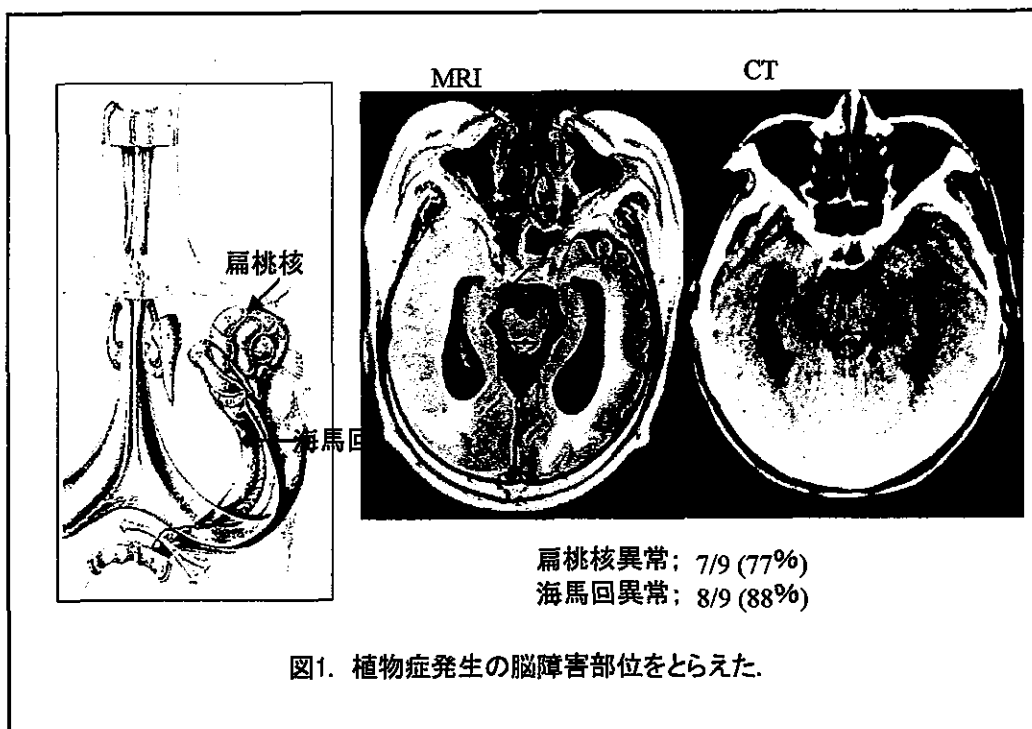


表1. 免疫不全を伴う感染症管理の工夫

1. 間欠的脳低温管理

34℃
32℃



2. 免疫不全対策

プロラクチンとアルギニンの投与
骨格筋の代謝管理とマッサージ

3. 高血糖管理

血糖値: 120-140mg/dl

4. 腸内細菌の管理

胃洗浄・腸内ガス排除
非吸収性抗生物質腸内投与
胃液のpH<3.5
AT-III>100%、血清磷>3mg/dl
血清アルブミン>3.0mg/dl
免疫・非高血糖性経腸栄養の早期投与
経腸栄養の工夫

5. 脳血液関門の補強

髄液/血清アルブミン比<0.01

表2. 低体温時の呼吸管理チェックリスト

項目内容	項目数	チェック項目
1. 人工呼吸器の設定条件		TV; 6 ml/kg、PEEP; 7cmH ₂ O、Plateau 圧 ≤30 cmH ₂ O
2. 低体温と気道抵抗		体温>34°C、PaCO ₂ >25mmHg、気道抵抗<10dyn/mm ³
3. 換気障害		呼吸音左右差と上下差、異常胸郭運動、頸静脈怒張
4. 肺循環と心機能		血圧、心電図、SaO ₂ >90mmHg、下肢・顔面の浮腫
5. 肺間質障害		S.albumin>2.5g/dl、ETCO ₂ /CO ₂ ・PaCO ₂ ; 0.2~0.1
6. 自律神経障害		血圧変動、呼気/吸気時の脈拍変動
7. 免疫力低下		骨格筋の脆弱、リンパ球の減少、成長ホルモンの減少
8. 腸内細菌活性と移動		胃液pH<3.5
9. 消化器機能		腹圧<10cmH ₂ O、AT-III>100%、S.albumin>2.5g/dl
10. 肺感染野合併		ラ音聴取、呼吸音左右差、喀痰、眼瞼結膜充血
11. 肺静脈血栓		呼吸音減弱、左右・上下差、四肢末梢の浮腫
12. ヘモクロビン機能		Serum pH>7.3、血糖値:120-140mg/dl

表3. 脳低温療法時の呼吸管理ポイント

1. レスピレータ肺損傷を起こさない。
2. 四肢末端の浮腫防止。
3. 肺の血流-リンパ流を維持する。
4. 肺間質のメデイエーターを過剰刺激しない。
5. 低アルブミン血症でラジカル損傷・肺血管透過性亢進をさせない。
6. 非吸収性抗生物質投与で腸内細菌活動を押さえる。
7. 胃液のpH<3.5で腸内細菌の気管内移動を防ぐ。
8. 腸の微小循環維持・粘膜浮腫防止対策をたてる。
9. リンパ球のエネルギー源確保と骨格筋リハビリ。
10. 血糖値の管理
11. 成長ホルモン欠乏をおこさせない。
12. 抗生物質は蛋白非結合形タイプから感受性をみる。

表4. 植物症の評価スコア

	加 点			計
	0	1	2	
顔の表情筋反応	O & J mouth	口の周囲筋	目の周囲筋	F 0-2
CT画像	海馬回・扁桃核共に low	海馬回 or 扁桃核 low	海馬回・扁桃核 lowなし	C 0-2
SEP N20	無し	一側反応	両側反応	S 0-2
髄液 ドーパミン/プロラクチン 比	0.5<	0.5-1.5	>1.5	D 0-2
髄液中エピネフリン	5ng/ml<	5-10 ng/ml	>10ng/ml	E 0-2

Score (Example) Recording → F2,C1,S1, D1, E2 Total score:7