

厚生労働科学研究費補助金  
効果的医療技術の確立推進臨床研究事業  
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—

総合研究報告書

(平成14—16年度)

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

効果的医療技術の確立推進臨床研究事業

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—

総合研究報告書

(平成14—16年度)

主任研究者 前川剛志

平成17(2005)年 3月

## 目 次

I. 総合研究報告	3～6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	7～41頁
荻野景規（金沢大学大学院医学系研究科）	
1) 重症脳障害患者生体試料からのニトロチロシン分析	
2) 脳挫傷患者の血清及び髄液ニトロチロシン測定	
林 成之（日本大学救急医学）	
3) 重症脳障害患者に対する軽度低体温療法装置の評価とコンピュータソフトの開発、および軽度低体温の効果について	
4) 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	
長尾省吾（香川大学医学部脳神経外科学）	
5) 低体温療法の脳保護メカニズム	
武澤 純、福岡敏雄（名古屋大学大学院医学系研究科）	
6) 頭部外傷患者に対する軽度低体温療法に関する経済分析－新知見をふまえた再検討－	
7) 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－	
III. 資料	43～267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）	
・重症頭部外傷患者に対する軽度低体温療法に関するアンケート調査結果	
・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	269～300頁



## 厚生労働科学研究費補助金

### (効果的医療技術の確立推進臨床研究事業 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—

#### I. 総合研究報告書

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  
荻野景規・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。割付は対照軽微低体温群1に対し、軽度低体温群を2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。

平成14年度にはプロトコルを確立し、各施設で臨床治験委員会等（IRB）の承認を得ることができた施設から本治験の登録を開始した。平成15年度は症例登録を増やすとともに、平成12年度から平成14年度（本RCT開始前）までの重症頭部外傷（GCS：3

～8) 症例に対する軽度低体温療法に関するアンケート調査を行った。平成16年度は引き続き症例登録の推進に努めた。良質のデータを得るために、36施設をサイトビジットし、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。平成17年3月末日までに109症例が登録されている。

今後は目標の300症例に到達するまで研究を継続し、キーオープンして効果の判定を行う予定である。

## 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している。

## 2. 研究方法

詳細はプロトコール(資料:研究計画書)に示す。重症頭部外傷患者(グラスゴー・コーマ・スケール、 $4 \leq GCS \leq 8$ )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)とし実施している。割付は対照軽微低体温群1に対し、軽度低体温群を2とした。

- ・ 対照軽微低体温M群:

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:

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:

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:

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、疫学の専門家が先行し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している。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

各年度、班会議を2～3回、全体会議を1～2回開催して、対象患者の安全確保、プロトコールの遵守、詳細説明、症例登録増加に努めた。しかし、道路交通法(飲酒運転罰則規定の改正による交通事故の減少(資料;交

通事故死亡数の推移)により、予定数には達していない。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こり、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（資料；中間解析報告）。

#### 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）に早急に変更することとし、

症例登録増加対策が必要である。

#### 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（ $\text{NOx}$ ）、サイトカイン（ $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-6}$ 、 $\text{IL-10}$ 、 $\text{IL-8}$ 、 $\text{GM-CSF}$ 、 $\text{IFN-}\gamma$ ）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、 $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ 、ヒートショック蛋白、ニトロク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  
(効果的医療技術の確立推進臨床研究事業  
循環器疾患等総合研究事業)

Ⅱ. 分担研究報告

1) 重症脳障害患者生体試料からのニトロチロシン分析

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) 脳はその化学的構成の面からみると、細胞膜成分の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やす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、脳虚血、アルツハイマー病やパーキンソン病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。重症頭部外傷患者においても活性酸素種の異常産生が起こり、髄液中のニトロチロシン発生の増加が十分に考えられる。

生体試料を用いたニトロチロシンの測定は抗ニトロチロシン抗体を用いた免疫(組織)化学的手法や Western blot で、そして遊離ニトロチロシンやタンパク質内のニトロチロシンはアミノ酸への分解により高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で測定されてきた。しかしながら、免疫化学的手法による測定結果と HPLC による測定結果が必ずしも一致しないことや、試料を酸性条件下で処理することによる人工的ニトロ化が発生するなどの問題点が多い。そこで、人工的ニトロ化が発生しない生体試料分析方法の改善と、より高い特異性と感度を有する検出方法が必要である。本研究では HPLC と多電極よりなる電気化学検出器を用いることにより、生体資料を測定する方法を確立することを目的とした。また生体試料のタンパク質の回収率や分析条件のさらなる改善を行うことにより、頭部外傷患者の髄液や血清中ニトロチロシンを測定し、測定法の確立だけでなく脳挫傷におけるニトロチロシン発生機序を解明し、活性酸素及び活性窒素種の発生意義を検討し、軽度低体温療法の効果を検討する。

## 背景と目的

活性酸素種及び活性窒素種のスーパーオキシド ( $O_2^-$ ) と一酸化窒素 (NO) の反応物としてのペルオキシナイトライト ( $ONOO^-$ ) はその反応性の強さから、核酸、タンパク質、脂質といった生体分子を修飾することが知られており、特に、タンパク質の構成成分であるアミノ酸のチロシンを容易にニトロ化し、情報伝達を攪乱させ、種々の病態に関与している。ニトロチロシンの検出は、ペルオキシナイトライトの発生を推測するバイオマーカーとして認識され、血中濃度の上昇は、虚血性疾患の危険因子ともなりうる。しかしながら、好中球や好酸球などのペルオキシダーゼが過酸化水素存在下で亜硝酸イオン ( $NO_2^-$ ) を二酸化窒素 ( $NO_2$ ) に酸化し、二酸化窒素がチロシンをニトロ化することが指摘され、ニトロチロシン発生の病態は混沌としている。

脳の酸素消費量は他の臓器に比べて極めて高いが、脳はその化学的構成の面からみると、細胞膜成分の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やす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、脳虚血、アルツハイマー病やパーキンソン病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。頭部外傷においても活性酸素種の異常産生が起こり、髄液中のニトロチロシン発生の増加が十分に考えられる。

生体試料を用いたニトロチロシンの測定は抗ニトロチロシン抗体を用いた免疫（組織）化学的手法や Western blot で、そして遊離ニトロチロシンやタンパク質内のニトロチロシンはアミノ酸への分解により高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で測定されてきた。しかしながら、免疫化学的手法による測定結果と HPLC による測定結果が必ずしも一致しないことや、試料を酸性条件下で処理することによる人工的ニトロ化が発生するなどの問題点が多い。そこで、人工的ニトロ化が発生しない生体試料分析方法の改善と、より高い特異性と感度を有する検出方法が必要である。本研究では HPLC と多電極よりなる電気化学検出器を用いることにより、生体資料を測定する方法を確立することを目的とした。また生体試料のタンパク質の回収率や分析条件のさらなる改善を行うことにより、頭部外傷患者の髄液や血清中ニトロチロシンを測定し、測定法の確立だけでなく脳挫傷におけるニトロチロシン発生機序を解明し、活性酸素及び活性窒素種の発生意義を検討し、軽度低体温療法の効果を検討する。

## 血清蛋白質中ニトロチロシン分析の検討

多方面で分析方法の検討を行った結果、血清のニトロチロシン分析系を以下のように決めた。血清のタンパク質量を測定し、5 mg 分の血清を使用する。これに 0.1 M 酢酸緩衝液とアセトニトリルを加え、ボルテックスで 30 秒攪拌後 4℃において 700 G で 10 分間遠心する。上清を除去後、0.1 M 酢酸緩衝液

(pH 7.2) を加え、超音波処理を行う。タンパク質量の 20% となる量の透析したプロナーゼ (Roche) を加えた後、50°C の恒温槽に入れ一晩 (12-16 時間) 置く。一晩置いたサンプルを 4°C において 2000 G で 10 分間遠心する。上清をフィルター (Milipore ; 10,000 NMWL ULTRA FREE-MC polysulfone membrane) を用いて、4°C において 2000 G で 10 分間遠心し、限外濾過する。濾過されたサンプルを HPLC (ニトロチロシン : HPLC-ECD, チロシン : HPLC-UV) を用いて分析する。HPLC-ECD の分析カラム SC-500DS カラム (3.0 mm, 5  $\mu$ m, Eicom) を使用し、移動相はリン酸二水素ナトリウム, EDTA (, アセトニトリル (2 %) を含む水溶液を使用し、流速は 500  $\mu$ L とする。HPLC-UV の分析カラムは ODS2 カラム (4.0 mm, 5  $\mu$ m, Waters) を使用し、移動相はリン酸二水素カリウムとメタノールを含む水溶液を使用し、流速は 1 mL とする。

#### 髄液蛋白質中ニトロチロシン分析法の検討

髄液中の遊離ニトロチロシンを除くため、蛋白質を沈殿させ、また上清を取り除く条件を検討した。

髄液のタンパク質量は血清に比べてかなり低く、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 5 mg 分使用することができなかった。中には、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が測定可能な最低量として必要な髄液の質量を検討した結果、500  $\mu$ L と分かった。

これに様々な量のアセトニトリルを加え、蛋白質沈殿効果を検討し、アセトニトリルの場合が一番タンパク質を沈殿させることが出来た。以上のことから髄液のニトロチロシン分析系は以下のように決めた。

髄液 500  $\mu$ L にアセトニトリルを加える。ボルテックスで 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 酢酸緩衝液を加え、超音波処理 (output 2  $\cdot$  6 秒) を行う。タンパク質量を測定し、タンパク質量の 20% となる量の透析したプロナーゼ (Roche) を加えた後、50°C の恒温槽に入れ一晩 (12-16 時間) 置く。一晩置いたサンプルを 4°C において 2000 G で 10 分間遠心する。上清をフィルター (Milipore ; 10,000 NMWL ULTRA FREE-MC polysulfone membrane) を用いて、4°C において 2000 G で 10 分間遠心し、限外濾過する。濾過されたサンプルを HPLC (ニトロチロシン : HPLC-ECD, チロシン : HPLC-UV) を用いて分析する。HPLC-ECD の分析カラムは SC-500DS カラム (3.0 mm, 5  $\mu$ m, Eicom) を使用し、移動相はリン酸二水素ナトリウム, EDTA, アセトニトリル in H<sub>2</sub>O とし、500  $\mu$ L の流速とする。HPLC-UV の分析カラムは ODS2 (4.6 mm, 5  $\mu$ m; Waters) を使用し、移動相はリン酸二水素カリウムとメタノールを含む水溶液を用い、流速は 1 mL とする。

## 2) 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：萩野景規、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  $\mu$ l (蛋白質量 10 mg) に 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 7.2) を 340  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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-500DS カラム (3  $\times$  150 mm, 5  $\mu$ 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  $\mu$ l

#### b) チロシンの測定

カラム: ODS2 カラム (4  $\times$  150 mm, 5  $\mu$ 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  $\mu$ 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いふ報告がある [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、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  $\mu$ l とした後、アセトニトリルを 800  $\mu$ 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  $\mu$ l 加える。超音波処理 (output 2  $\times$  6 秒) 後、プロナーゼ溶液を 100  $\mu$ 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  $\mu$ M ニトロチロシンを 50  $\mu$ 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  $49 \pm 6$  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ないと考えられるため、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  $\mu$ 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  $\mu$ l にアセトニトリル 800  $\mu$ 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  $\mu$ l 加え、超音波処理 (output  $2 \times 6$  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  $\mu$ 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 ;  $0.72 \pm 0.33$  pmol/mg protein, 静脈 ;  $0.78 \pm 0.36$  pmol/mg protein (正常値 ;  $0.39 \pm 0.06$ ,  $n=8$ ) 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.



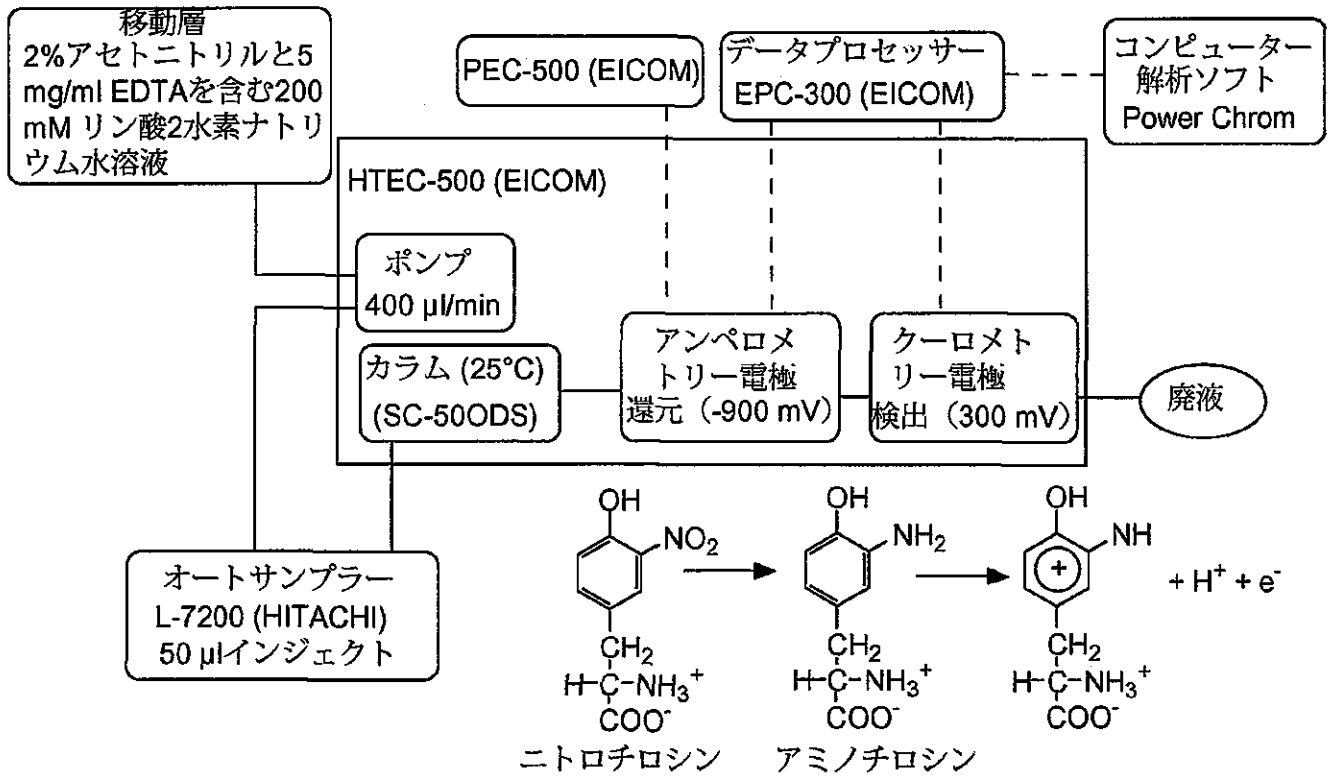


図1 ニトロチロシン測定に用いたHPLC-ECDの構成.

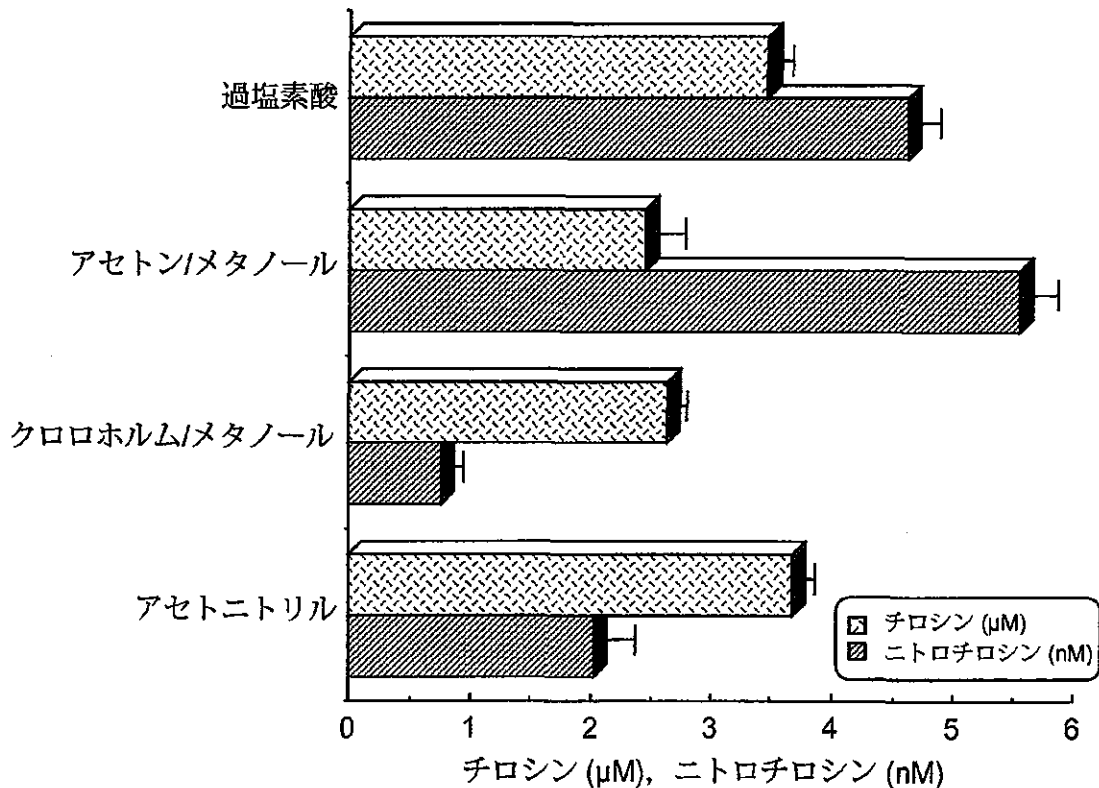


図2 タンパク質沈降法の検討.

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。

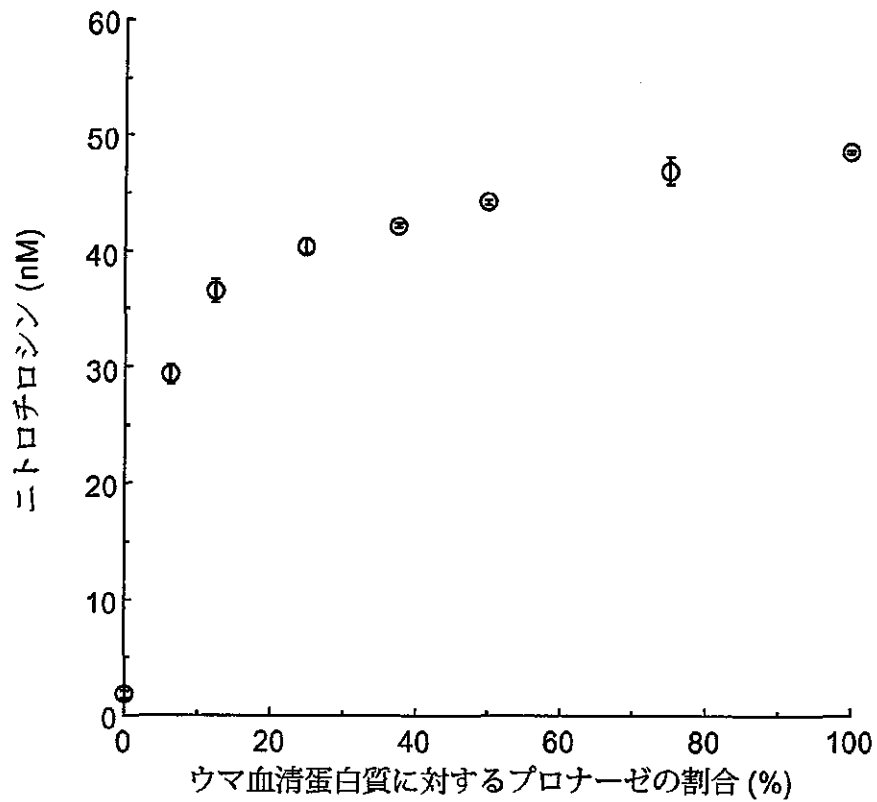


図3 タンパク質分解に用いるプロナーゼ量の検討.

ニトロ化したウマ血清タンパク質200  $\mu$ g 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.

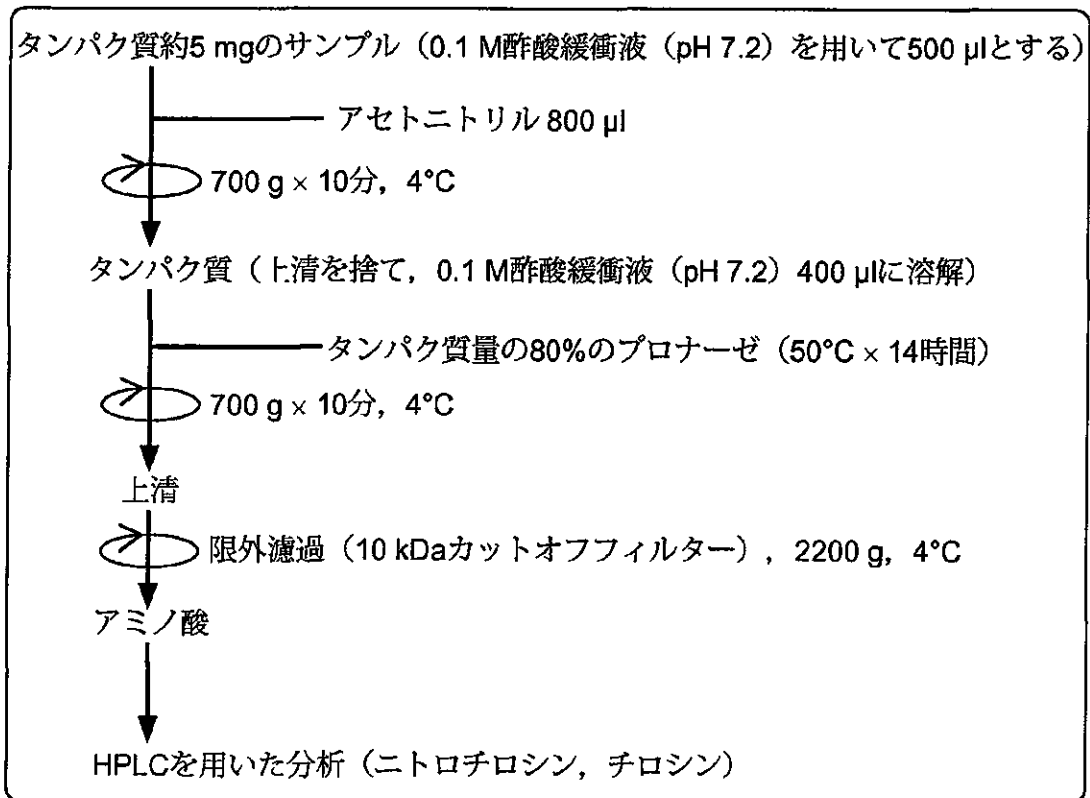


図4 生体試料のタンパク質中ニトロチロシン測定法のフローチャート.

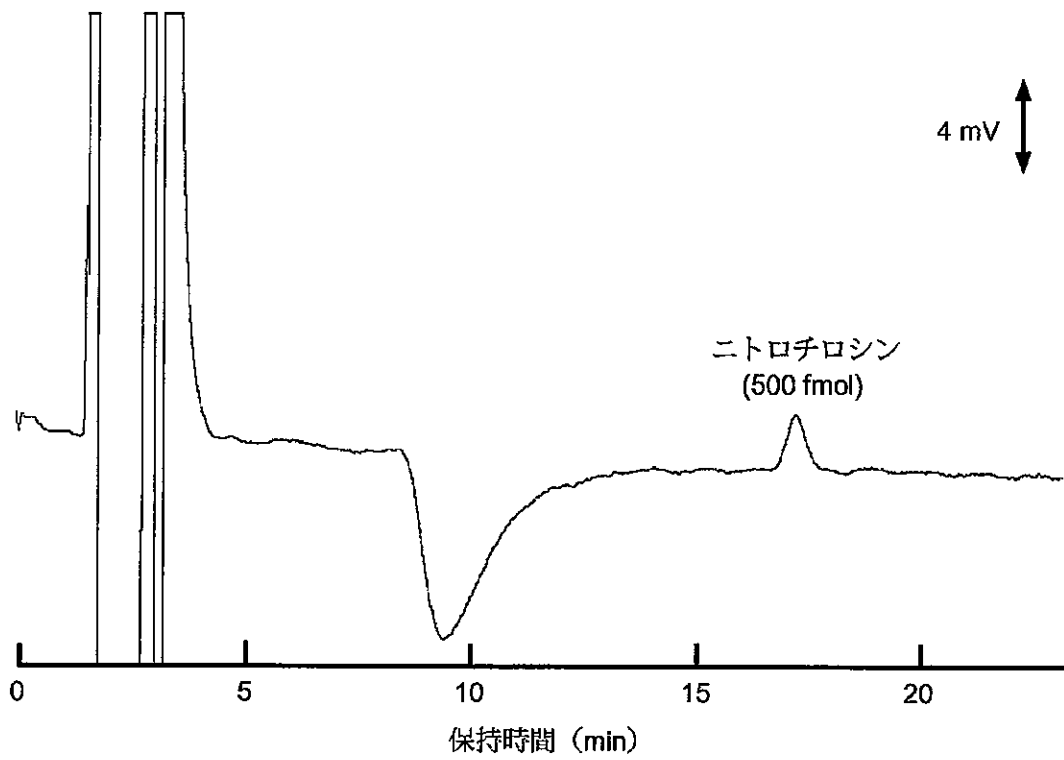


図5 ニトロチロシン標準物質の分析クロマトグラム.

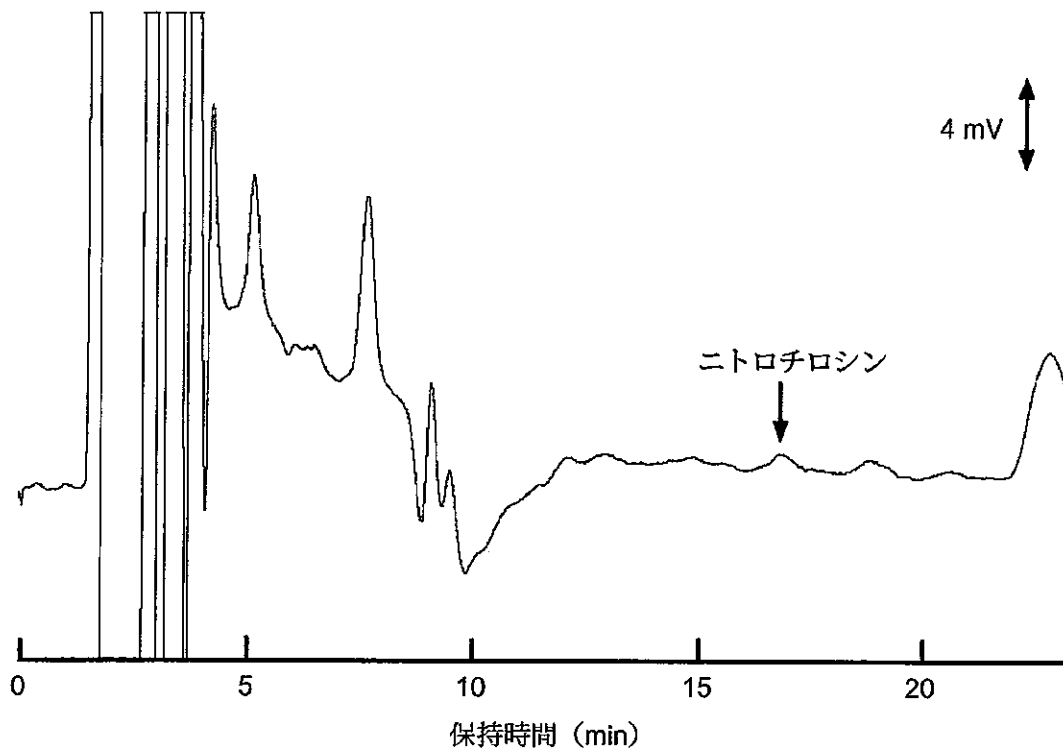


図6 ヒト血清のタンパク質中ニトロチロシン分析の代表的なクロマトグラム.

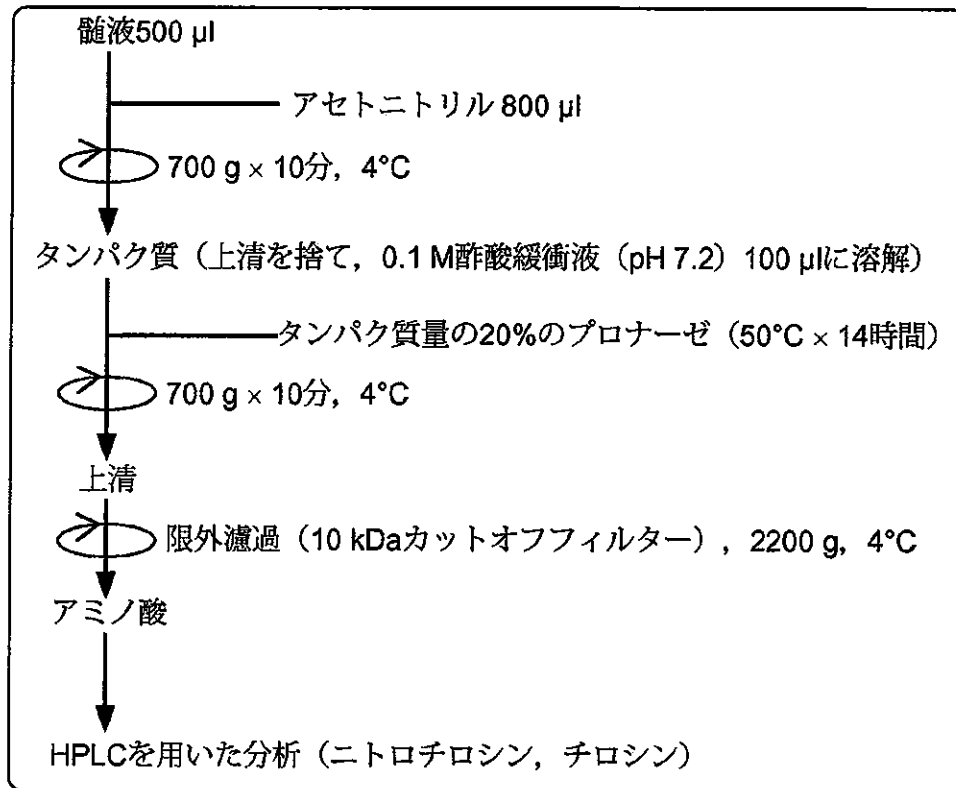


図7 髄液のタンパク質中ニトロチロシン測定法のフローチャート.

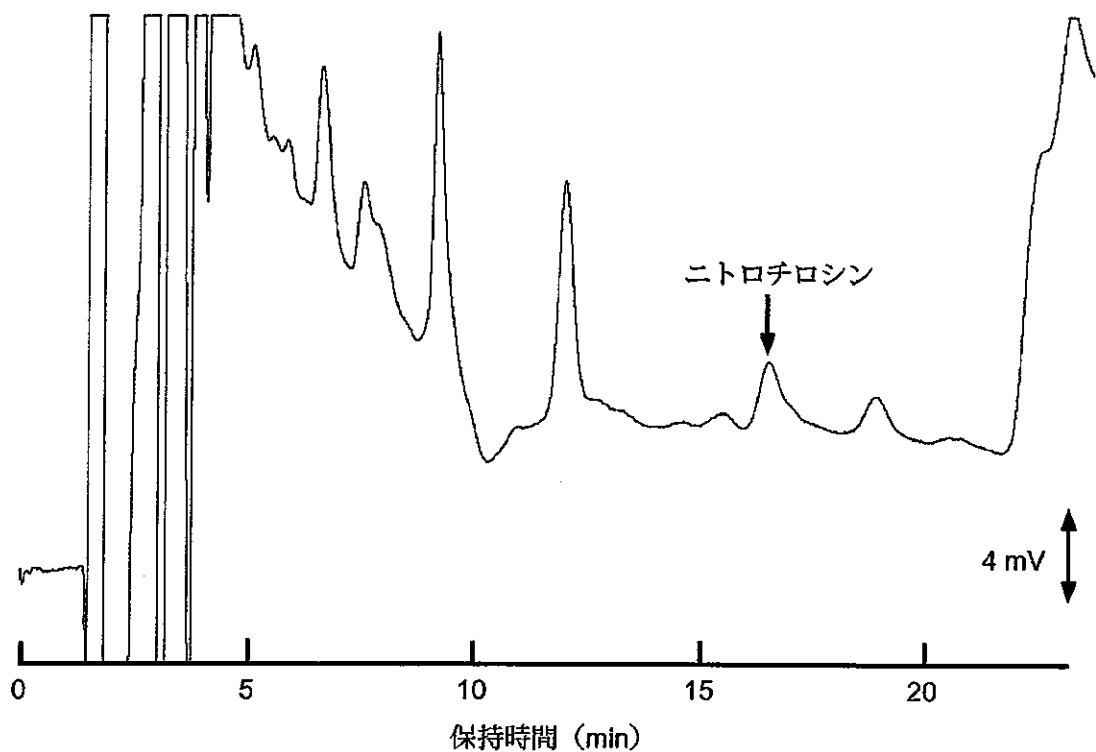


図8 ヒト髄液のタンパク質中ニトロチロシン分析の代表的なクロマトグラム.