

## 分担研究報告書

(脳科学研究事業「外傷性中枢神経障害のリハビリテーションにおける科学的解析法と治療法の確立に関する研究」)

### 「Hybrid PET による脳ブドウ糖代謝の定量的測定」

分担研究者	畑澤順	大阪大学大学院医学系研究科生体統合医学講座	教授
研究協力者	長谷川新治	大阪大学大学院医学系研究科生体統合医学講座	助手
	奥直彦	大阪大学医学部附属病院放射線部	講師
	茨木正信	秋田県立脳血管研究センター	研究員

研究要旨: Hybrid PET は、単光子放出核種の  $\gamma$  線と陽電子放出核種の消滅  $\gamma$  線の両者を検出するユニークな測定システムである。PET 専用機と比較して汎用性が高く、2-deoxy- $^{18}\text{F}$  fluoro-D-glucose ( $^{18}\text{FDG}$ ) による悪性腫瘍イメージングに用いられている。前年度、健常被験者 4 例 (男性 4 例、平均年齢  $22.8 \pm 1.9$  才) で脳ブドウ糖消費量を定量測定し正常値を得た。本年度は、頭部外傷例の脳ブドウ糖代謝を定量評価し正常値と比較した。頭部外傷に伴う局所的脳ブドウ糖代謝の低下を検出することが可能であった。

本研究は、Hybrid PET を用いて定量的局所脳ブドウ糖消費量測定が可能であり、脳ブドウ糖代謝を指標として頭部外傷後の脳機能障害を解析することが可能であることを示した。

#### A. 研究目的

Hybrid Positron emission tomography (PET) は、単光子放出核種の  $\gamma$  線と陽電子放出核種の消滅  $\gamma$  線の両者を検出するユニークな測定システムである。PET 専用機と比較して汎用性が高く、2-deoxy- $^{18}\text{F}$  fluoro-D-glucose ( $^{18}\text{FDG}$ ) による脳ブドウ糖代謝の定量測定が可能であることを前年度までの研究で明らかにした。今年度は、頭部外傷例における脳ブドウ糖代謝を測定し、健常成人と

比較した。

#### B. 研究方法

健常被験者 4 例 (男性 4 例、平均年齢  $22.8 \pm 1.9$  才) に対して 5 時間以上の絶食後に  $^{18}\text{FDG}$  111MBq を静注した。Arterial input curve を求めるために静注と同時に橈骨動脈より動脈血サンプリングを開始した。静注後 50 分から 10 分間 PET 装置 Headtome V/SET 2400 system (Shimadzu Co, Ltd) にて、静注後 70~110 分後から

30 分間 Hybrid PET 装置 VERTEX Plus MCD (ADAC Laboratories, Milpitas, CA) にて撮像を行った。仮想的線源計数による Chang の吸収補正法を適用した。脳ブドウ糖消費量は、Sokoloff の原法 (Brooks による改変) と Phelps らの手技に従い、モデル速度定数 ( $K_1=0.102$ ,  $k_2=0.130$ ,  $k_3=0.062$ )、lumped constant (0.42) を用いて計算した。

右側頭部外傷例 (16 才男、右側頭骨骨折、右硬膜外血腫、発症後 6 週) の PET 検査を施行、健常者と同様の方法により脳ブドウ糖代謝画像を作製した。

### C. 研究結果

図1に健常者および頭部外傷例の脳ブドウ糖代謝定量画像を示す。右側頭葉・頭頂葉の広範な領域のブドウ糖代謝の低下を認める。局所脳ブドウ糖消費量は、右側頭葉 3.93mg/100g/min、右頭頂葉 3.94mg/100g/min であった。また、遠隔部の脳ブドウ糖消費量は右前頭葉 5.53mg/100g/min、右視床 4.01mg/100g/min と軽度低下していた。

### D. 考察

Hybrid PET での脳ブドウ糖消費量定量値は PET と比較すると、約 10~23% 低値であったが (前年度報告)、これはふたつの検出器間での感度や散乱線の影響の違いなどに起因するものと考えられる。Hybrid PET での健常人の脳ブドウ糖消費量を基準として各症例を評価することにより、頭

部外傷における脳機能障害を比較することが可能と考えられる。

Hybrid PET の検出器の時間分解能を考慮し、放射性薬剤の投与量を PET 測定 の 30% とした。測定時間は PET と比較して延長するが被験者の被曝を軽減することが可能であった。

局所での検討においては、Hybrid PET では視床や橋といった脳の深部での脳ブドウ糖消費量が PET と比較して有意に低値であった (前年度報告)。脳の深部における Hybrid PET と PET の測定値の違いは、吸収補正法の違いに依存しているものと思われる。頭部外傷例では、遠隔部の代謝の変化がみられる。したがって、局所のブドウ糖代謝の変化を評価するためには、健常者の Hybrid PET 画像と比較して評価することが重要と考えられた。

### E. 結論

Hybrid PET による定量的脳ブドウ糖代謝測定は、感度、空間分解能、吸収補正の精度で PET 測定には及ばないものの、頭部外傷における脳機能障害を客観的に評価する手法として有用である。特に、Hybrid PET による健常人の画像を基準とした評価が重要と考えられた。

### F. 研究発表

1. Oku N, Kitagawa K, Imaizumi M, Takasawa M, Piao R, Kimura Y, Kajimoto K, Matsumoto M, Hori M, Hatazawa J.. Hemodynamic influences of losartan on the brain in hypertensive

- patients. *Hypertens Res.* 2005 28:43-9.
2. Shimosegawa E, Hatazawa J, Ibaraki M, Toyoshima H, Suzuki A. Metabolic penumbra of acute brain infarction: a correlation with infarct growth. *Ann Neurol.* 2005 57:495-504.
  3. Yata K, Suzuki A, Hatazawa J, Shimosegawa E, Nagata K, Sato M, Moroi J. Relationship between cerebral circulatory reserve and oxygen extraction fraction in patients with

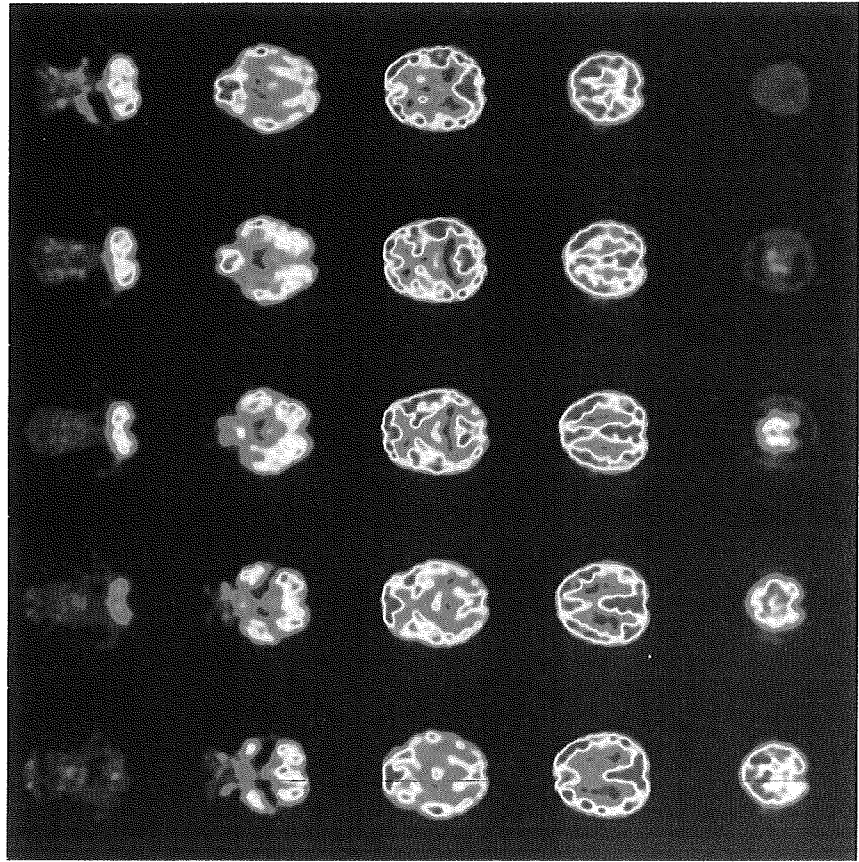
major cerebral artery occlusive disease: a positron emission tomography study. *Stroke.* 2006 37:534-6.

G. 知的所有権の取得状況

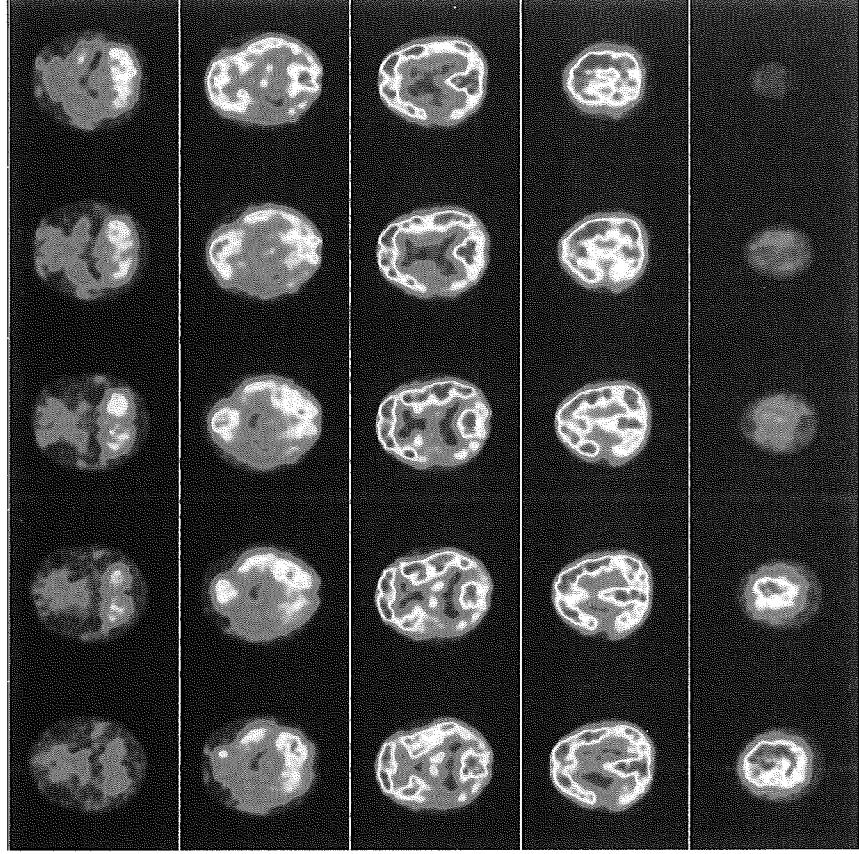
1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

図.1

Hybrid PET  
(健常者)



Hybrid PET  
(頭部外傷患者)



R

L

## 分担研究報告書

(脳科学研究事業「外傷性中枢神経障害のリハビリテーションにおける科学的解析法と治療法の確立に関する研究」)

「外傷性脳損傷後の高次神経機能の変化について」

分担研究者 池尻 義隆 大阪大学大学院医学系研究科精神医学 講師  
協力研究者 数井 裕光 大阪大学大学院医学系研究科精神医学 助手  
久保 嘉彦 大阪大学大学院医学系研究科精神医学

研究要旨： 頭部外傷患者の高次脳機能障害について、障害の実態と回復過程を検討するため、大阪大学医学部附属病院救命救急センターへ搬送され入院した患者のうち、高次脳機能障害が疑われた患者に対して神経心理学的評価を行った。

急性期を脱して検査可能となった時点(受傷後約 1 週間～1 ヶ月)で 2004 年 12 月までは MMSE, SLTA, WMS-R, WCST, go-no go test, 信号動作, パントマイム, 手指呼称について初期の評価を行い、2005 年 1 月以降は MMSE, RBANS, FAB, TMT を実施し、また可能な限り受傷後半年毎に追跡検査を行なった。さらに 2005 年 1 月以降は精神症状の推移を検討するため BADS 質問票を評価項目に加えた。評価項目は、外傷性脳損傷後のいわゆる高次脳機能障害をより効率的に検知し追跡するために変更した。

今年度までに検討した患者は、頭部外傷 51 例、蘇生後脳症 3 例であった。最も多い受傷原因は交通外傷であり、最も多い脳損傷部位は左側頭葉であった。また最も多い脳機能障害は言語性記憶障害であった。RBANS は、外傷性脳損傷後の言語生記憶障害や注意障害をより簡便に検知することが可能であった。また BADS 質問票は精神症状を評価するにあたり有用であった。

頭部外傷 51 例のうち、15 例の患者について追跡調査が可能であった。回復過程に関して現時点では、左半球前半部の損傷が、回復しがたい言語性記憶障害と関連している可能性が示唆された。

### A. 研究目的

頭部外傷については、低体温療法等種々の治療法の発達により生命予後が著しく改善した。しかし、それに伴って頭

部外傷患者の生活的・社会的予後が新たな問題となり、なかでも、麻痺などの運動障害の程度に比して生活場面での認知や行動の障害が目立つ、いわゆる高

次脳機能障害の影響が注目されている。本研究では、外傷後の高次脳機能の評価を通して、その障害の実態と回復過程に関する調査を行った。

## B. 対象と方法

対象は、平成 13 年度以降の当院救命救急センター入院患者のうち、高次脳機能の変化が疑われた患者で、神経心理学的検査が可能であった 51 例(うち外傷例 48 例、蘇生後脳症例 3 例)。

方法は、各患者に、全般的認知機能評価として MMSE、言語機能評価として

SLTA、記憶評価として WMS-R、前頭葉機能評価として RCPM、WCST、go-no go test、行為の評価として信号動作、パントマイム、手指呼称を施行した。2005 年 1 月以降は MMSE, RBANS, FAB, TMT および精神症状の推移を検討するため BADS 質問票を実施した。評価項目は、外傷性脳損傷後のいわゆる高次脳機能障害をより効率的に検知し追跡するために変更した。

うち 15 例の患者で、受傷後半年毎に追跡検査を行うことができた。

## C. 研究結果

今回の調査において、最も多かった脳外傷の受傷原因は交通外傷であり、51 例中 47 例であった。また、最も多い脳損傷部位は左側頭葉であり、47 例中 21 例であった。

これらの対象脳外傷患者に対して、受傷後約一週間から約一ヶ月の時点で上記の神経心理学的諸検査による初期評価を行なった。その結果、47 例の患者のうち 31 例の患者で言語性記憶力障害を認め、うち 17 例の患者で左側頭葉の損傷を認めた。13 例の患者で視覚性記憶力障害を認め、うち 7 例で右前頭葉ないし側頭葉の損傷を認めた。18 例の患者で語想起障害を認め、うち 8 例の患者で前頭葉の損傷を認めた。14 例の患者で注意障害を認め、うち 7 例の患者で前頭葉の損傷を認めた。この結果は、現在広く知られている脳機能の局在と一致している。

結果の詳細を以下に述べる。

### 1. 初期評価の結果

(1)まず、MRI によって判定した大脳半球損傷は、20 例が両側損傷であり、一側損傷では左半球損傷が 12 例、右半球損傷が 8 例であった。

(2)記憶障害に関しては、言語性記憶障害が 31 例、視覚性記憶障害が 4 例であった。

(3)左半球損傷患者(両側半球損傷患者を含む)の記憶障害に注目すると言語性記憶障害を呈する例が 14 例と多かった

(4)右半球損傷患者(両側半球損傷患者を含む)の記憶障害に注目すると記憶障害を認め

ない例も 8 例認められた。

(5) 左半球に限局した損傷例、11 例では、9 例で言語性記憶障害を認め、5 例で言語障害を認めた。

(6) 右半球に限局した損傷例、6 例では、3 例で高次脳機能障害を認めなかったが、1 例で視覚性記憶障害、言語機能障害を認め、2 例で注意集中障害、そのうち 1 例では全般性記憶障害を認めた。

(7) 次に、記憶障害を呈した症例の脳損傷部位の傾向を検討してみると、全般性記憶障害を呈する例では、左側頭葉や両側前頭葉損傷が多く、言語性記憶障害のみを呈する例では、両側側頭葉損傷が多く、また視覚性記憶障害を呈する例では前例で右前頭葉損傷を認めた。

(8) 蘇生後脳症の 3 例では、全例とも MRI によって局在性脳損傷が検出できなかったが、1 例で言語性記憶障害、1 例で語想起障害、1 例で全般性記憶障害と注意障害を主とする広範な脳機能障害を認めた。

## 2. 追跡調査の結果

47 例の頭部外傷患者のうち、26 例で半年後から 2 年後までの追跡調査を行った。

(1)

初期評価時に高次脳機能障害を認めなかった 3 例は半年後にも障害を認めなかった(A 群)。

高次脳機能障害なし 3 例      全例障害なし(A)

(2) 残り 23 例のうち 18 例で記憶障害を認めた。この中で初期評価時に全般性記憶障害を認めた 6 例のうち、受傷半年後に 1 例では言語性記憶の改善はみられなかったが、視覚性記憶が正常域に回復した(B群)。1 例は記憶障害の改善はみられず(C 群)、3 例で全般性記憶の改善が見られた。

全般性記憶障害 6 例      1 例は視覚性記憶の改善      言語性記憶は改善せず(B)  
1 例は記憶障害改善せず(C)  
4 例は全般性記憶の改善(D)

(3) 初期評価時に言語性記憶障害のみを認めた 6 例のうち、3 例は受傷半年後に正常域に回復し(E 群)、3 例は改善がみられなかった(F 群)。

言語性記憶障害 6 例      3 例は正常域に改善(E)  
3 例は改善みられず(F)

(4) 初期評価時に視覚性記憶障害のみを認めた 2 例は、受傷半年後に正常息に回復した。(G 群)

以上の患者群 A~G の局所脳損傷を比べてみると、

A 群 3 例とも局所脳損傷を認めず。

B 群 1 例は、脳梁膨大部の瀰慢性軸索損傷を認めた。

C 群 1 例では、左前頭葉硬膜外血腫と頭頂葉挫傷巣を認めた。

D 群4例は、2 例は両側前頭葉の損傷を認め、1 例では右側頭葉から島にかけての損傷があり、右前頭葉～側頭葉で糖代謝の低下を認めた。1 例は瀰漫性軸索損傷を認めた。E 群3 例では、それぞれ左側頭葉挫傷巣のみの1 例と、左側頭葉脳内血腫を認めた1 例、左後頭葉脳挫傷を認めた1 例であった。F 群3 例では、1 例で左前頭葉から側頭葉に及ぶ損傷と、右前頭葉の損傷を認め、1 例では両側側頭葉と左前頭葉の挫傷巣、また 1 例では左前頭葉から側頭葉にかけての挫傷巣を認めた。

組成後脳症例の追跡調査 1 例では、高次脳機能の改善は認められなかった。

#### D. 考察

頭部外傷は、本邦では交通事故によるものが多く、また若年男性が受傷することが多いことも知られている。救急医療がより早く効果的に行われることになったこと、専門病院、脳神経外科治療の進歩に伴い、生命予後は改善している。しかし、頭部外傷後に身体的には問題がなく、日常生活上のトラブルも少ない軽症例で、本人だけでなく、周囲のものも障害の存在に気づかず、比較的容易に社会復帰するものの、仕事上のミスが多かったり、対人関係のトラブルにより、社会生活への適応が困難である症例や、また、人柄が変わったり、知的能力の低下という障害が残り、社会的予後が必ずしも良好でないという症例があり、いわゆる高次脳機能障害が問題になりつつある。

過去の研究から、頭部外傷による高次脳機能障害の病態においては注意障害・記憶力障害が重要な意義を有することが示唆されている。とりわけ言語性記憶障害は社会生活に及ぼす影響が大きく、社会復帰を目指す上で大きな問題となることが指摘されている。

我々の調査結果においても昨年までと同様の所見が得られた。今回の調査では、今までに引き続き両側半球損傷を含め、左半球損傷例が多かったが、これを反映して高次脳機能の障害領域に関して言語性記憶障害を有する例が多かった。また、左半球に限局した脳損傷例ではほぼ全例で言語性記憶障害を認め、右半球に限局した脳損傷例では左半球脳損傷に比較すると高次脳機能障害を認めない症例を多く認めた。症例数が多くないため明確な結論は出せないが、これらの結果は、高次脳機能障害の病態においては言語性記憶障害の関与が大きいために、左半球損傷例では頭部外傷後に高次脳機能障害が顕在化することが多く、もとより右半球に限局した損傷例が我々の調査の対象に挙がるのが少ないことを反映しているのかもしれない。

追跡調査についての過去の報告からは、頭部外傷における言語性記憶障害回復の困難な要因として、左半球前半部の挫傷や、側頭葉内側面の損傷、びまん性軸索損傷が挙げられている。今回我々の調査でも半年後に記憶障害の改善しなかった C, F 群ではいずれも左前頭葉の損傷が認められ、同部位が回復しがたい記憶障害に関連していることが示唆された。しかし、記憶障害の回復が認められた、D, E, G 群では明らかな受傷部位との関連は認められなかった。



脳外傷における認知機能障害に対する治療的アプローチは、患者に自らの障害の認識を促し、その障害に対する代償方法を見つけ、代償的行動を獲得させることであるとされているが、実際にはかなり困難といえる。これは、脳外傷において、患者本人の認知障害に関する自覚が低下している場合、いわゆる病識が低下するケースが多い為である。過去の研究からも、同様の知見が得られており、今回の我々の印象とも一致する。

今回修正した評価項目である RBANS では、リスト学習およびリスト再生や符号課題での減点が多くみられ、言語性記憶障害および前頭葉機能の障害が検査結果に反映された。また BADS 質問票では各項目の重症度判断とともに、患者自身と患者家族の評価の解離が患者の病識欠如の程度の指標となり、診断の参考となることが示唆された。

## E. 結論

今回の我々の調査では、頭部外傷例では左半球損傷が多いこと、初期評価時に言語性記憶障害が多いことが示された。また、前頭葉を含む左半球前半部の損傷が、回復しがたい言語性記憶障害と関連している可能性があることが示唆された。今回修正した評価項目である RBANS および BADS 質問票は外傷性脳損傷後のいわゆる高次脳機能障害を評価、追跡するにあたり、簡便で有用な評価尺度であると思われた。

## F. 研究発表

1. 論文発表      なし

2. 学会発表      なし

## G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得      なし

2. 実用新案登録      なし

3. その他      なし

## 分担研究報告書

(脳科学研究事業「外傷性中枢神経障害のリハビリテーションにおける科学的解析法と治療法の確立に関する研究」)

「神経細胞の樹状突起における蛋白質合成をリアルタイムに可視化する手法の確立」

分担研究者 森 泰丈

大阪大学大学院医学系研究科未来医療開発専攻ポストゲノム疾患解析学講座  
プロセッシング機能形態分野 助教授

研究要旨:我々は切断された神経細胞の軸索再生時において、再生過程に形成される成長円錐での蛋白質合成を可視化する目的で、翻訳開始時に起きる翻訳開始因子間の相互作用の変化を FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer) を用いて可視化する系の確立をおこなった。これまで mRNA から蛋白質への翻訳をリアルタイムに解析するための手段は翻訳の最終産物である蛋白質量に依拠していた。しかし蛋白質の量は翻訳以外の様々な不確定要因による影響を受けるため、翻訳動態の指標としては不適切である。そこで翻訳の過程でおきる現象を指標とする手法を考案し、翻訳開始時に相互作用を起こす eIF2 $\beta$  サブユニットと eIF5 のそれぞれを CFP および YFP で標識した蛍光プローブを作製し、その結合・解離の動態を FRET でモニタリングすることにより翻訳を生細胞内で可視化することに成功した。我々はこの手法を神経細胞の再生軸索に応用することにより、神経突起の再形成における局所タンパク質合成の制御機構を明らかにできるのではないかと考えた。

### A. 研究の目的

これまで神経細胞におけるタンパク質合成は細胞体に限られていると考えられてきた。しかし近年、神経細胞のシナプスや軸索先端部において細胞体とは独立した蛋白合成が行われる可能性が示唆されている (local protein synthesis)。その理由として、1) 樹状

突起や軸索末端に局在する mRNA が存在すること、2) 蛋白質翻訳に関わる諸因子が樹状突起や軸索末端に存在すること、3) 細胞体から物理的に切り離された突起においてもアミノ酸の取り込みが行われること、が挙げられる。したがって再生軸索末端においても局在化した mRNA からのタンパク質合成がおこなわれる可能性が考えられた。しかし

細胞内の特定の領域に局在する mRNA が蛋白質合成に関与していることを示す直接の証拠が示されているとは言い難い。なぜなら mRNA から蛋白質への変換、すなわち翻訳が行われたということを経験的に解析するための手段が存在しなかったからである。これまで翻訳という現象は最終産物である蛋白質の増減を指標として評価されてきた。例えば蛍光蛋白質を細胞に発現させておいて、細胞内における蛍光強度の増加が全て翻訳の促進によるものとして解析されてきた。しかし細胞内のある特定の時間および位置における蛋白質量を決定づける要因は翻訳の増減だけではない。蛋白質の移動、また分解速度の変化などの多様な要因が絡みあって蛋白質量を規定している。したがって純粋に翻訳という現象を評価したいのであれば、最終産物である蛋白質によらない方法論の確立が必要不可欠であるというのが我々の結論である。

そこで我々はこの問題を解決する目的で、蛋白質が翻訳される過程に着目した実験系の構築を行うことにし、翻訳開始因子の相互作用をリアルタイムで可視化することを考えた。この新たな方法論を物理的に切断した培養後根神経節細胞から生じる再生軸索末端に導入し、末端部におけるタンパク質合成がどのように調節されているのかを細胞の構造に影響を与えることなくリアルタイムに可視化することを試みた。

## B. 研究方法

### 1) FRET プローブの調整

異なる吸収波長を有する蛋白質である YFP-eIF2 $\beta$  と eIF5-CFP をスパーサーで連結した蛋白質 (YFP-eIF2 $\beta$  /eIF5-CFP) カセットをアデノウイルスベクターに組み込んだプラスミドを作製し、293A 細胞に導入しウイルス粒子を得た。

また同時に sindbis virus ベクター (pSinRep) により YFP-eIF2 $\beta$  /eIF5-CFP タンパク質を発現するプラスミドを作製した。この sindbis virus プラスミドを poly (A) の直後でワンカットし、SP6 プロモーターより RNA ポリメラーゼを用いてウイルス RNA の合成をおこなった。またヘルパー RNA も同様の手法で合成し、2つの RNA を同時に BHK 細胞にトランスフェクトした。培養上清よりウイルス粒子を回収し実験に使用した。

### 2) 後根神経節細胞の培養

後根神経節細胞は生後 1 週齢のラットより取得した。培養開始 1 2 時間後、ウイルス粒子を感染させた。後根神経節細胞より伸展してきた軸索を顕微鏡観察下でマイクロピペットを用いて切断した。

FRET の観察は 100W 水銀ランプでプローブを励起させなら Leica 社製 DM IRE2 microscope で細胞の観察をおこない、画像の解析処理は MetaMorph software でおこなった。

## C. 研究結果

培養後根神経節細胞に各ウイルスベクターより産生されたウイルス粒子を感染させたと

ころ、YFP-eIF2 $\beta$ /eIF5-CFP タンパク質の蛍光がアデノウイルスベクターでは10～15%、sindbis virus ベクターでは8～20%の細胞で認められた。アデノウイルスベクターでは感染2日目以降より細胞がタンパク質の過剰発現による影響で細胞死を起し始め、さらに軸索を物理的に切断すると FRET を観察するまでに細胞が完全に萎縮し、解析に至らないことが判明した。sindbis virus を用いた場合でも、感染数日後より細胞死を起し大部分が死滅することが分かった。一部の生存した細胞を用いて、その軸索をマイクロピペットにより切断したが、切断後直ちに細胞が萎縮し細胞死に至るのが確認された。切断せずに突起が伸展していく過程を撮影したところ、突起の先端部の成長円錐において FRET が確認することができた。

#### D. 考察

本年度の研究においては培養神経細胞の再生軸索内におけるタンパク質合成を翻訳開始因子間の相互作用を利用した FRET プローブにより観察することを試みたが、ウイルスによるプローブ発現が予想以

上に困難であり、方法論の変更を迫られることになった。ウイルスを用いた方法では観察可能な状態になる前に細胞死を起してしまい、FRET を検出する以前の問題が存在する。現在ウイルス以外の発現手法、Amaza (electroporation) などの発現方法の改善をおこなっている。

#### F. 研究発表

(英文誌)

なし

(学会発表)

ラット海馬神経細胞の樹状突起における局所的翻訳のリアルタイムな可視化システムの構築 宮田信吾、森泰丈、藤原達司、遠山正彌 第27回日本神経科学・第47回日本神経化学会合同大会(於大阪)

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

## 分担研究報告書

(脳科学研究事業「外傷性中枢神経障害のリハビリテーションにおける科学的解析法と治療法の確立に関する研究」)

「脳浮腫における水選択性チャンネル蛋白(AQP)の役割に関する研究」

分担研究者 種子田 護 近畿大学医学部脳神経外科学 教授  
研究協力者 片岡 和夫 近畿大学医学部脳神経外科学 助教授

研究要旨:外傷性脳損傷では損傷組織の浸透圧が上昇する。水は浸透圧勾配により移動し外傷性浮腫を生じる。アストサイト細胞由来の aquaporin4 (AQP4)は、脳損傷における高浸透圧刺激により発現上昇し、脳浮腫の発生・消退に関与すると考えられる。

### A. 研究目的

外傷性脳浮腫は脳外傷での病態悪化のもっとも重要な因子である。その制御は脳損傷治療の中心を占めている。本研究では外傷性脳浮腫の発生・進展のメカニズムをモレキュラーレベルにて検討した。すなわち水チャンネル蛋白 aquaporin (AQP)の外傷性脳損傷病態下での役割について検討した。

### B. 研究方法

マウス脳に stab wounds を加えた。経時的に損傷脳の脳水分含有量を乾燥重量法にて検討した。損傷脳より RNA を抽出し AQP4 mRNA 発現について高感度定量的 PCR 装置を用いた quantitative RT PCR 法にて検討した。

### C. 研究結果

マウス脳損傷モデルでは脳損傷後 3 日目に脳水分含有量は外傷側 80.4%, 反対側 78.9%と有意に増加した。有意な増加は脳損傷後 8 日まで認められた。AQP4 mRNA 発現量は脳損傷後 2 日目より上昇し 5 日目に 204% (反対側に対する%) まで上昇した。その上昇は脳損傷後 8 日目まで続いた。

### D. 考察

水チャンネル・aquaporin (AQP)はモレキュラーレベルで水代謝に関与している。脳での水代謝はアストロサイト細胞・微小血管・脳血液関門が重要な役割を担っている。アストロサイト細胞にはAQP4が恒常的に発現し、脳における主たる水チャンネルの役割を担っている。外傷性脳損傷では外傷性脳浮腫が発生し、頭蓋内圧を亢進させ脳病態を悪化させる。脳損傷部位では組織損傷

に伴い電解質などが貯留し組織浸透圧が急速に上昇する。水は浸透圧勾配により高浸透圧の脳損傷部位へ移動し脳浮腫が発生する。しかも脳損傷部位での高浸透圧はアストロサイト細胞・AQP4 発現を増加させる可能性が明らかとなった。AQP4 の発現が増加すれば水移動を促進される。脳損傷急性期では AQP4 の発現上昇は脳浮腫病態の悪化を促進すると考えられる。一方、急性期を離脱し回復期にはいると AQP4 発現上昇は脳浮腫消退を促すと考えられる。

## E. 結論

外傷性脳損傷時、損傷部位では組織浸透圧が上昇する。水は浸透圧勾配により移動し、脳浮腫の発生を生じる。マウス外傷性脳損傷モデルにおいても AQP4 mRNA 発現上昇と脳水分量増加すなわち外傷性脳浮腫の発生を同時に認めた。また AQP4 の発現増加は脳浮腫消退期まで持続した。本研究により脳損傷時の外傷性脳浮腫の発生・消退に水チャンネル AQP4 が関与している可能性が明らかとなった。

## F. 研究発表

### 論文発表

1. Okuda T, Kataoka K, Kitano M, Watanabe A, Taneda M. Successful treatment of a patient with a 13-year

history of post-traumatic rhinorrhea due to malabsorption of cerebrospinal fluid. *Minim Invasive Neurosurg* 48:247-249,2005

2. Nakano N, Uchiyama T, Okuda T, Kitano M, Taneda M. Successful long-term deep brain stimulation for hemichorea-hemiballism in a patient with diabetes. *J Neurosurg* 102:1137-41,2005

### 学会発表

1. Watanabe A, Kataoka K, Tsuji K, Sumii T, Teramoto Y, Taneda M. A role of astrocytic aquaporin4 on the traumatic brain edema and a hypothermic effect upon the aquaporin4 expression. *Brain '05 Amsterdam*, 2005 June

## G. 知的所有権の取得状況

- |           |    |
|-----------|----|
| 1. 特許取得   | なし |
| 2. 実用新案特許 | なし |
| 3. その他    | なし |

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Shiozaki T, et al.	Cerebrospinal fluid concentrations of anti-inflammatory mediators in early-phase severe traumatic brain injury.	Shock	23	406 - 410	2005
Inoue Y, et al.	Changes in cerebral blood flow from the acute to the chronic phase of severe head injury.	J Neurotrauma	22	1411 - 1418	2005
Yata K, et al.	Relationship between cerebral circulatory reserve and oxygen extraction fraction in patients with major cerebral artery occlusive disease: a positron emission tomography study.	Stroke	37	534 - 536	2006
Oku N, et al.	Hemodynamic influences of losartan on the brain in hypertensive patients.	Hypertens Res	28	43 - 49	2005
Shimosegawa E, et al.	Metabolic penumbra of acute brain infarction: a correlation with infarct growth.	Ann Neurol.	57	495 - 504	2005

## CEREBROSPINAL FLUID CONCENTRATIONS OF ANTI-INFLAMMATORY MEDIATORS IN EARLY-PHASE SEVERE TRAUMATIC BRAIN INJURY

Tadahiko Shiozaki, Toshiaki Hayakata, Osamu Tasaki, Hideo Hosotubo, Kieko Fujita, Tomoyoshi Mouri, Goro Tajima, Kentaro Kajino, Haruhiko Nakae, Hiroshi Tanaka, Takeshi Shimazu, and Hisashi Sugimoto

Department of Traumatology, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka 565-0871, Japan

Received 10 Jan 2005; first review completed 26 Jan 2005; accepted in final form 18 Feb 2005

**ABSTRACT**—In our previous study of patients with early-phase severe traumatic brain injury (TBI), the anti-inflammatory interleukin (IL)-10 concentration was lower in cerebrospinal fluid (CSF) than in serum, whereas proinflammatory IL-1 $\beta$  and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  concentrations were higher in CSF than in serum. To clarify the influence of additional injury on this disproportion between proinflammatory and anti-inflammatory mediators, we compared their CSF and serum concentrations in patients with severe TBI with and without additional injury. All 35 study patients (18 with and 17 without additional injury) had a Glasgow Coma Scale score of 8 or less upon admission. With the exception of additional injury, clinical characteristics did not differ significantly between groups. CSF and serum concentrations of two proinflammatory mediators (IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ ) and three anti-inflammatory mediators (IL-1 receptor antagonist [IL-1ra], soluble TNF receptor-I [sTNFr-I], and IL-10) were measured and compared at 6 h after injury. CSF concentrations of proinflammatory mediators were much higher than the corresponding serum concentrations in both patient groups ( $P < 0.001$ ). In contrast, serum concentrations of anti-inflammatory mediators were much higher than the paired CSF concentrations in patients with additional injury ( $P < 0.001$ ), but serum concentrations were lower than or equal to the corresponding CSF concentrations in patients without additional injury. CSF concentrations of IL-1 $\beta$ , IL-1ra, sTNFr-I, and IL-10 were significantly higher ( $P < 0.01$  for all) in patients with high intracranial pressure (ICP;  $n = 11$ ) than in patients with low ICP ( $n = 24$ ), and were also significantly higher ( $P < 0.05$  for all) in patients with an unfavorable outcome ( $n = 14$ ) than in patients with a favorable outcome ( $n = 21$ ). These findings indicate that increased serum concentrations of anti-inflammatory mediators after severe TBI are mainly due to additional extracranial injury. We conclude that anti-inflammatory mediators in CSF may be useful indicators of the severity of brain damage in terms of ICP as well as overall prognosis of patients with severe TBI.

**KEYWORDS**—IL-1ra, sTNFr-I, IL-10, cerebrospinal fluid, head injury

### INTRODUCTION

We have reported that concentrations of proinflammatory interleukin (IL)-1 $\beta$  and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  were higher in cerebrospinal fluid (CSF) than in serum of patients with early-phase severe traumatic brain injury (TBI), whereas concentrations of anti-inflammatory IL-10 were lower in CSF than in serum (1). This notable disproportion between proinflammatory mediators and anti-inflammatory mediators after severe TBI is consistent with the observations of Maier et al. (2). Partrick et al. (3) reported that serum concentrations of anti-inflammatory mediators (IL-1 receptor antagonist [IL-1ra] and soluble TNF receptor-I [sTNFr-I]) were dramatically increased in trauma patients within 12 h after the event (3). Shimonkevitz et al. (4) also reported that IL-10 was found in peripheral blood immediately after TBI. Therefore, we hypothesized that additional extracranial injury may be involved in the disproportion in mediator concentrations. To test our hypothesis, we examined CSF and serum concentrations of

anti-inflammatory mediators and proinflammatory mediators in patients with severe TBI with or without additional injury. For the purpose of this study, we selected two proinflammatory mediators (IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ ) and three anti-inflammatory mediators (IL-1ra, sTNFr-I, and IL-10) that have been analyzed in the clinical setting (5–9). In this study, we also assessed the relation of CSF anti-inflammatory mediators to intracranial pressure (ICP) and prognosis of patients with severe TBI.

### MATERIALS AND METHODS

#### Patient population

During the period of 1998 to 2002, a total of 73 patients with a Glasgow Coma Scale (GCS) (10) score of 8 or less were admitted to the Department of Traumatology, Osaka University Graduate School of Medicine. Patients less than 10 years of age were excluded from this study. Eight patients who suffered severe life-threatening injury to organs other than the brain were also excluded from this study. CSF or serum samples could not be obtained from 30 of the remaining 65 patients, therefore, these 30 were excluded. Thus, 35 patients were included in this study: 17 without additional extracranial injury and 18 with additional extracranial injury. Of the 35 patients, 26 were men and 9 were women. Their age averaged 39 years and ranged from 14 to 77 years. No patient had pre-existing neurological disease. Informed consent for participation in the study was obtained from an appropriate member of each patient's family.

Eight patients with additional extracranial injury and eight patients without additional extracranial injury were overlapped in our previous study (1).

#### Patient management

After intubation, all patients were subjected to continuous mild hyperventilation, which was induced with PaCO<sub>2</sub> between 30 and 35 mmHg, and all received high-dose barbiturates with mild fluid restriction (1–2 mL/kg/h). When cerebral perfusion pressure (mean arterial blood pressure minus ICP) dropped to less than 60 mmHg, patients were given adequate amounts of albumin. Colloidal fluids or dopamine

Address reprint requests to Tadahiko Shiozaki, MD, PhD, Department of Traumatology, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2, Yamada-oka, Suita-shi, Osaka 565-0871, Japan. E-mail: shiozaki@hp-emerg.med.osaka-u.ac.jp

This study was supported by a grant from the Marine and Fire Insurance Association of Japan, Inc.; by a Research on Brain Science grant from the Ministry of Health and Welfare in Japan (no. 15131001); and by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology in Japan (no. 15390545).

DOI: 10.1097/01.shk.0000161385.62758.24



(3–5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  continuous infusion) was administered as needed to maintain urine output greater than 0.5 mL/kg/h. No corticosteroid or mannitol was administered during the study. Immediately after initial resuscitation, all patients underwent computed tomography (CT) scanning of the head. Subsequently, an intraventricular catheter was placed in each patient. The catheter allowed continuous monitoring of ICP and intracranial temperature. There was no evidence of complications, such as intracranial hemorrhage or infection, due to insertion of the intraventricular catheter. Intracranial mass lesions associated with midline displacement greater than 5 mm were surgically removed when necessary. Intracranial hypertension was managed initially in all patients by conventional ICP reduction therapy, such as mild hyperventilation, mild fluid restriction, high-dose barbiturates, and/or CSF drainage. In patients with ICP at or above 20 mmHg and those who were unresponsive to conventional therapy, mild hypothermia (34°C) was induced by surface cooling with a circulating water blanket placed above and below the patient. Intracranial temperature was controlled according to our previously published protocol (11). Control of ICP was achieved in 24 of the 35 patients, but not in the remaining 11. Patients with low ICP were assigned randomly to mild hypothermia (12 patients) or normothermia (12 patients). After randomization, patients assigned to mild hypothermia were subjected to mild hypothermia (intracranial temperature of 34°C) as quickly as possible, and patients assigned to normothermia were maintained under normothermic conditions (intracranial temperature of 37°C). Mild hypothermia was started 1.9  $\pm$  0.5 h after injury, and body temperature reached 34°C 6.0  $\pm$  0.5 h after injury. Mild hypothermia was continued for 48 h, and patients were rewarmed at 1°C/day for 3 days. Normothermia (37°C) was maintained for 5 days.

### CSF and serum analysis

CSF samples were drawn from the intraventricular catheter, and blood samples were drawn from an arterial line simultaneously 6 h after injury. The CSF samples were centrifuged to remove cellular debris, and the supernatant was immediately frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  and stored until analysis. Serum samples were prepared from the blood samples and were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-1ra, sTNFr-I, and IL-10 concentrations in CSF and serum were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay with commercially available kits (R&D Systems, Minneapolis, MN). The minimum detectable mediator concentrations were IL-1 $\beta$ , 1 pg/mL; TNF- $\alpha$ , 4.4 pg/mL; IL-1ra, 14 pg/mL; sTNFr-I, 3.0 pg/mL; and IL-10, 3.9 pg/mL. For statistical analysis, minimum detection-level values were used for mediator concentrations below the minimum detectable levels.

### Injury severity score

Injury severity score (ISS) is calculated using the standard method of squaring the three 1990 Abbreviated Injury Scale score values for the three body regions most severely injured (12, 13).

### Patient outcomes

Patient outcome was assessed 6 months after injury on the basis of the Glasgow Outcome Scale (GOS) (14) in which death is scored as 1, vegetative state as 2, severe disability as 3, moderate disability as 4, and good recovery as 5. For statistical comparison, the outcome of patients with a score of 4 or 5 was considered favorable and the outcome of patients with a score of 1, 2, or 3 was considered unfavorable. Surviving patients participated in follow-up interviews by telephone or in person at the clinic.

### Statistical analysis

All values are expressed as mean  $\pm$  SEM unless otherwise specified. Statistical analyses were performed with Stat-View computer software (version 5.0) and included Mann-Whitney *U* test, chi-square test, or Fisher exact test. Relations between variables were assessed by Pearson's correlation coefficient. Differences were considered statistically significant at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Patient characteristics

Clinical characteristics of patients in the two groups are summarized in Table 1. The groups did not differ significantly with respect to prognostic factors on admission such as patient age, GCS score, pupil abnormalities, or CT classification. ISS in patients with additional extracranial injury was significantly higher than that in patients without additional extracranial injury ( $P < 0.001$ ).

Of the 35 patients, 12 made up the "patients with low ICP treated under normothermia," 12 made up the "patients with

low ICP treated under mild hypothermia," and 11 made up the "patients with high ICP." All patients with high ICP were treated under mild hypothermia; none were treated under normothermia. The number of patients treated under each condition did not differ significantly between patients with and without additional injury (Table 1).

### Mediator concentrations in patients without additional extracranial injury

CSF and serum concentrations of all substances measured in patients without additional extracranial injury ( $n = 17$ ) are shown in Figure 1. CSF concentrations of the two proinflammatory mediators (IL-1 $\beta$ , 10.9  $\pm$  2.3 pg/mL; TNF- $\alpha$ , 18.4  $\pm$  4.9 pg/mL) were significantly higher than the corresponding serum concentrations (IL-1 $\beta$ , 1.6  $\pm$  0.2 pg/mL; TNF- $\alpha$ , 5.0  $\pm$  0.4 pg/mL;  $P < 0.001$ ). As to the three anti-inflammatory mediators, CSF concentrations of sTNFr-I (984  $\pm$  137 pg/mL) and IL-10 (13.5  $\pm$  4.3 pg/mL) were almost equal to the corresponding serum concentrations (sTNFr-I, 878  $\pm$  107 pg/mL; IL-10, 13.6  $\pm$  3.1 pg/mL). CSF concentrations of IL-1ra (1670  $\pm$  377 pg/mL) was significantly higher than the corresponding serum concentrations (621  $\pm$  114 pg/mL;  $P = 0.034$ ).

### Mediator concentrations in patients without additional extracranial injury

CSF and serum concentrations of all substances measured in patients with additional extracranial injury ( $n = 18$ ) are shown in Figure 2. CSF concentrations of the two proinflammatory mediators (IL-1 $\beta$ , 9.9  $\pm$  1.9 pg/mL; TNF- $\alpha$ , 16.6  $\pm$  3.5 pg/mL) were significantly higher than the corresponding serum concentrations (IL-1 $\beta$ , 1.5  $\pm$  0.2 pg/mL; TNF- $\alpha$ , 5.1  $\pm$  0.4 pg/mL;  $P < 0.001$ ). Unlike patients without additional extracranial injury, serum concentrations of the three anti-inflammatory mediators (IL-1ra, 26,861  $\pm$  10,354 pg/mL; sTNFr-I, 2590  $\pm$  356 pg/mL; and IL-10, 69.3  $\pm$  20.2 pg/mL) were markedly higher than the corresponding CSF concentrations (IL-1ra, 1920  $\pm$  381 pg/mL; sTNFr-I, 831  $\pm$  144 pg/mL; and IL-10, 12.9  $\pm$  2.5 pg/mL) in patients with additional injury ( $P < 0.001$ ).

### Mediator concentrations in relation to extracranial additional injury

Serum concentrations of the three anti-inflammatory mediators (IL-1ra, 26,861  $\pm$  10,354 pg/mL; sTNFr-I, 2590  $\pm$  356 pg/mL; and IL-10, 69.3  $\pm$  20.2 pg/mL) in patients with additional extracranial injury were several times higher than those in patients without additional extracranial injury (IL-1ra, 621  $\pm$  114 pg/mL; sTNFr-I, 878  $\pm$  107 pg/mL; and IL-10, 13.6  $\pm$  3.1 pg/mL;  $P < 0.001$ ). There were no significant differences in CSF concentrations of the two proinflammatory mediators, serum concentrations of the two proinflammatory mediators, or CSF concentrations of the three anti-inflammatory mediators between the two groups.

### Serum concentrations of anti-inflammatory mediators in relation to ISS

Significant positive correlation was found between ISS and serum sTNFr-I concentrations ( $r^2 = 0.365$ ,  $P < 0.001$ ). No significant correlation was found between ISS and serum IL-1ra

TABLE 1. Clinical characteristics of the two study groups

	Patients without extracranial additional injuries	Patients with extracranial additional injuries	P value*
No. of patients	17	18	
Age (yrs)	41 ± 5	37 ± 4	0.531
Sex ratio (M/F)	12/5	14/4	0.711
GCS on admission	5.4 ± 0.4	5.9 ± 0.4	0.409
Pupil abnormalities on admission <sup>†</sup>	10	13	0.489
Hypoxia on admission <sup>‡</sup>	7	9	0.738
Hypotension on admission <sup>§</sup>	3	6	0.443
CT classification <sup>  </sup>			0.700
diffuse injury 1	1	1	
diffuse injury 2	5	8	
diffuse injury 3	0	1	
diffuse injury 4	1	1	
evacuated mass lesion	10	7	
nonevacuated mass lesion	0	0	
Treatment assignment			0.694
patients with low ICP treated under normothermia <sup>¶</sup>	5	7	
patients with low ICP treated under mild hypothermia <sup>¶</sup>	7	5	
patients with high ICP <sup>¶</sup>	5	6	
Additional injury**			
chest injury	0	9	
abdominal injury	0	4	
pelvic or leg fracture	0	8	
arm fracture	0	4	
Injury severity score <sup>††</sup>	22.5 ± 0.2	41.7 ± 0.6	<0.001
Outcome			
favorable/unfavorable	11/6	10/8	0.733

Numbers represent number of patients unless otherwise indicated.

Values are expressed as mean ± SE.

<sup>†</sup>Pupil abnormalities were defined as abnormalities in size and/or reaction to light in one or both pupils.

<sup>‡</sup>Hypoxia was defined as PaO<sub>2</sub> less than 60 mmHg.

<sup>§</sup>Hypotension was defined as a sustained fall in systolic blood pressure to 100 mmHg.

<sup>||</sup>Categorized according to the classification of Marshall, et al. (J Neurosurg 75:S14-S20, 1991).

<sup>¶</sup>low ICP: patient's ICP was maintained below 20 mmHg by conventional treatments.

<sup>¶</sup>High ICP: patient's ICP could not be lowered to below 20 mmHg despite conventional treatments. All patients with high ICP were treated under mild hypothermia.

\*\*Overlapped in some patients.

<sup>††</sup>Injury Severity Score is calculated using the standard method of squaring the three 1990 Abbreviated Injury Scale score values for the three body regions most severely injured (12, 13).

\*Mann-Whitney *U*-test was used for the comparison of age, GCS on admission, and Injury Severity Score. Fisher exact test was used for the comparison of sex ratio, the incidence of pupil abnormalities on admission, hypoxia on admission, and hypotension on admission, and outcome. Chi-square test was used for the comparison of CT classification and treatment assignment.

concentrations ( $r^2 = 0.001$ ) or between ISS and serum IL-10 concentrations ( $r^2 = 0.050$ ).

#### Correlation of GCS score with CSF concentrations of mediators

Because CSF concentrations of both proinflammatory mediators and anti-inflammatory mediators did not differ between the two groups, we examined correlation of GCS score on admission with CSF concentrations of mediators in all 35 patients regardless of the existence of additional extracranial injury. No significant correlation was found between CSF concentrations of any mediator and a patient's GCS score on admission.

#### Correlation of ICP with CSF concentrations of mediators

The CSF concentrations of all substances in patients with high ICP ( $n = 11$ ) and those with low ICP ( $n = 24$ ) are shown in Table 2. The CSF concentrations of IL-1 $\beta$ , IL-1ra, sTNF $\alpha$ -I,

and IL-10 were significantly higher in patients with high ICP than those with low ICP ( $P = 0.002$ ,  $P = 0.006$ ,  $P = 0.009$ , and  $P = 0.009$ , respectively). However, the CSF concentrations of TNF- $\alpha$  did not differ between patients with high ICP and those with low ICP.

#### Correlation between CSF concentrations of mediators and outcome

At 6 months after TBI, outcome was favorable for 21 patients, but were unfavorable for 14 patients (Table 3). The CSF concentrations of IL-1 $\beta$ , IL-1ra, sTNF $\alpha$ -I, and IL-10 were significantly higher in patients with an unfavorable outcome than in patients with a favorable outcome ( $P = 0.006$ ,  $P = 0.009$ ,  $P = 0.003$ , and  $P = 0.012$ , respectively). However, the CSF concentrations of TNF- $\alpha$  did not differ between patients with an unfavorable outcome and those with a favorable outcome.

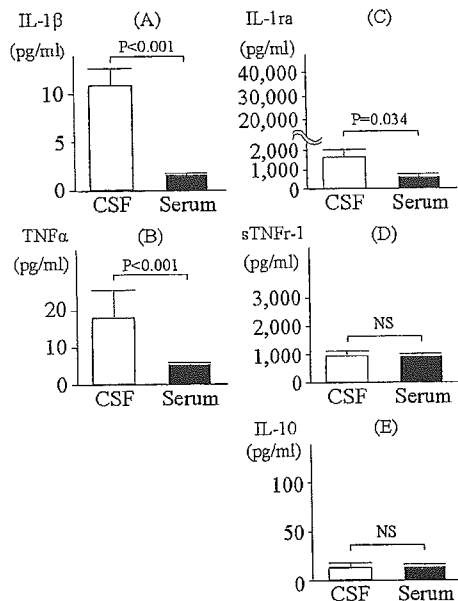


FIG. 1. Graphs showing CSF and serum concentrations for all substances measured in patients without extracranial additional injury (n = 17). Open bar, CSF samples. Closed bar, serum samples. Data are expressed as mean ± SEM.

DISCUSSION

This study was designed to answer the following two questions: Is the increase of serum concentrations of anti-inflammatory mediators related to the existence of additional extracranial injury? Is the CSF concentrations of anti-inflammatory mediators related to ICP and prognosis of patients with severe TBI?

In the present study, serum concentrations of anti-inflammatory mediators were lower than or equal to the corresponding CSF concentrations in patients without additional injury, whereas

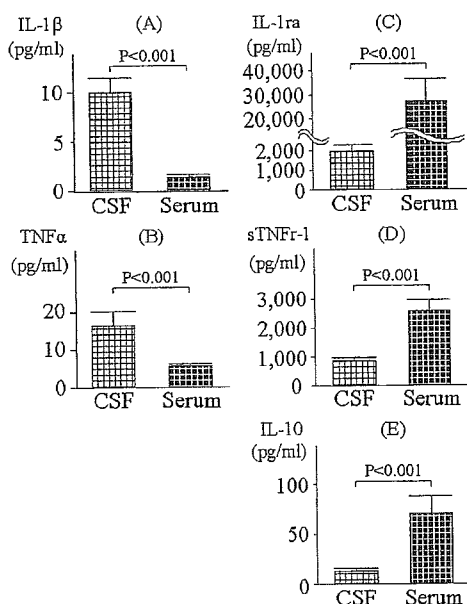


FIG. 2. Graphs showing CSF and serum concentrations for all substances measured in patients with extracranial additional injury (n = 18). Open hatched bar, CSF samples. Closed hatched bar, serum samples. Data are expressed as mean ± SEM.

TABLE 2. CSF mediators in TBI patients based on intracranial pressure (ICP)

	IL-1β (pg/ml)	TNF-α (pg/ml)	IL-1ra (pg/ml)	sTNFr-I (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
Patients with high ICP* (n = 11)	17.4 ± 2.7	21.8 ± 6.4	2968 ± 597	1351 ± 229	17.4 ± 2.7
Patients with low ICP† (n = 24)	7.2 ± 1.3	15.5 ± 3.1	1263 ± 202	701 ± 69	8.9 ± 1.3
P value	P = 0.002	P = 0.546	P = 0.006	P = 0.009	P = 0.009

Values are expressed as mean ± SE.

\*High ICP: patient's ICP could not be lowered to below 20 mmHg despite conventional treatments.

†Low ICP: patient's ICP was maintained below 20 mmHg by conventional treatments.

P value obtained by Mann-Whitney U-test for the difference between the 2 groups.

serum concentrations were markedly higher than the corresponding CSF concentrations in patients with additional injury. Serum concentrations of anti-inflammatory mediators in patients with additional injury were several times higher than those in patients without additional injury. If we put the two patient groups together, concentrations of anti-inflammatory mediators appeared to be higher in serum than in CSF, as was the case for concentrations of IL-10 in our previous study (1). However, it is natural to think that the influence of brain damage on other organ systems is reflected more precisely in the serum samples of patients without additional injury than in those of patients with additional injury. Therefore, we conclude that the excessive increase in serum concentrations of anti-inflammatory mediators after severe TBI is mainly due to additional extracranial injury, not to TBI itself. Our hypothesis is supported by Hensler et al.'s (15) report that plasma levels of IL-10 did not differ between trauma patients with severe TBI and those without severe TBI.

We also observed that serum sTNFr-I concentrations positively correlated with ISS. Our result is in concordance with other published data that sTNFr was correlated with severity of injury (16). Partrick et al. (3) reported that elevated levels of serum sTNFr-I correlated with the development of postinjury multiple organ failure early after trauma (3). There is not much doubt, therefore, that local injury in tissue beds may be likely involved in the increased serum concentrations of sTNFr-I. However, the increased release of sTNFr-I into blood does not seem to be a direct consequence of the secretion of TNF-α

TABLE 3. CSF mediators in the TBI patients per outcome

	IL-1β (pg/ml)	TNF-α (pg/ml)	IL-1ra (pg/ml)	sTNFr-I (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
Unfavorable* (n = 14)	14.7 ± 2.5	19.3 ± 5.1	2622 ± 508	1323 ± 190	20.0 ± 5.3
Favorable† (n = 21)	7.5 ± 1.6	16.3 ± 3.6	1249 ± 223	627 ± 49	8.7 ± 1.4
P value	P = 0.006	P = 0.590	P = 0.009	P = 0.003	P = 0.012

Values are expressed as mean ± SE.

\*Patients with a GOS score of 1, 2, or 3.

†Patients with a GOS score of 4 or 5.

P value obtained by Mann-Whitney U-test for the difference between the 2 groups.

because serum TNF- $\alpha$  concentration did not differ between patients with and without extracranial additional injury. The mechanisms that induce the release of sTNF-I into circulation remain to be determined.

What is the function of excessively increased anti-inflammatory mediators in serum after severe TBI? Why are proinflammatory mediators not also increased in serum? These questions cannot be answered with our present data. In 1991, Poutsiaika et al. (17) and Arend et al. (18) reported similarly that TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were not detectable in the circulation of trauma patients despite increased levels of soluble TNF receptor and IL-1ra. Although more than 10 years have passed since they reported their results, the questions just mentioned have yet to be resolved. A key to answering these questions may lie in the answer to another question. Are the excessive anti-inflammatory mediators in serum after severe TBI biologically active? We are now conducting biologic function studies to investigate the biologic activity of these anti-inflammatory mediators in serum in patients with severe TBI.

In our previous study (1), we demonstrated that CSF IL-1 $\beta$  concentration was significantly higher in patients with high ICP than in patients with low ICP ( $P < 0.05$ ) and that CSF IL-1 $\beta$  concentration tended to be higher in patients with an unfavorable outcome than in patients with a favorable outcome ( $P = 0.057$ ). In the present study, we not only confirmed that CSF IL-1 $\beta$  is useful as predictors of outcome in patients with severe TBI, but we also demonstrated that CSF anti-inflammatory mediators were related to high ICP and poor prognosis in patients with severe TBI. Although it is speculated that CSF anti-inflammatory mediators originate from intrathecal synthesis of resident glial cells in the brain or blood leukocytes recruited into the brain (19, 20), the means by which the increased CSF anti-inflammatory mediators act in counteracting the inflammatory response remain unclear. Further study is needed to clarify whether the increase in CSF proinflammatory mediators directly induces the increase in CSF anti-inflammatory mediators or leads indirectly to the increase in CSF anti-inflammatory mediators.

We examined CSF and serum concentrations of anti-inflammatory mediators and proinflammatory mediators in severe TBI patients with and without additional injury. The three primary findings of the present study were as follows: serum concentrations of anti-inflammatory mediators (IL-1ra, sTNF-I, and IL-10) were much higher than the corresponding CSF concentrations in patients with additional injury, whereas serum concentrations were lower than or equal to the corresponding CSF concentrations in patients without additional injury; CSF concentrations of anti-inflammatory mediators were significantly higher in patients with high ICP than in patients with low ICP; and CSF concentrations of anti-inflammatory mediators were also significantly higher in patients with an unfavorable outcome than in patients with a favorable outcome. On the basis of these findings, we conclude that increased serum concentrations of anti-inflammatory mediators after severe TBI are mainly due to additional extracranial injury

and that anti-inflammatory mediators in CSF may be useful indicators of the severity of brain damage in terms of ICP as well as overall prognosis of patients with severe TBI.

## REFERENCES

- Hayakata T, Shiozaki T, Tasaki O, Ikegawa H, Inoue Y, Fujinaka T, Hosotubo T, Fujita K, Yamashita T, Tanaka H, Shimazu T, Sugimoto H: Changes in CSF S100B and cytokine concentrations in early-phase severe traumatic brain injury. *Shock* 22:102-107, 2004.
- Maier B, Schwerdtfeger K, Mautes A, Holanda M, Muller M, Studel WI, Marzi I: Differential release of interleukins 6, 8, and 10 in cerebrospinal fluid and plasma after traumatic brain injury. *Shock* 15:421-426, 2001.
- Partrick DA, Moore EE, Moore FA, Biffl WL, Barnett CC Jr: Release of anti-inflammatory mediators after major torso trauma correlates with the development of postinjury multiple organ failure. *Am J Surg* 178:564-569, 1999.
- Shimonkevitz R, Bar-Or D, Harris L, Dole K, McLaughlin L, Yukl R: Transient monocyte release of interleukin 10 in response to traumatic brain injury. *Shock* 12:10-16, 1999.
- Gruber A, Rossler K, Graninger W, Donner A, Ilievich MU, Czech T: Ventricular cerebrospinal fluid and serum concentrations of sTNF-I, IL-1ra, and IL-6 after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg Anesthesiol* 12:297-306, 2000.
- Lanzrein AS, Johnston CM, Perry VH, Jobst KA, King EM, Smith AD: Longitudinal study of inflammatory factors in serum, cerebrospinal fluid, and brain tissue in Alzheimer disease: interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, interleukin-1 receptor antagonist, tumor necrosis factor- $\alpha$ , the soluble tumor necrosis factor receptors I and II, and alpha-1-antichymotrypsin. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 12:215-227, 1998.
- Tarkowski E, Liljeroth AM, Minthon L, Tarkowski A, Wallin A, Blennow K: Cerebral pattern of pro- and anti-inflammatory cytokines in dementias. *Brain Res Bull* 61:255-260, 2003.
- Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Otto VI, Stahel PF, Kossmann T: Role of cerebral inflammation after traumatic brain injury: a revisited concept. *Shock* 16:165-177, 2001.
- Christian S, Marc W, Gert M, Manfred K: Analysis of systemic interleukin 11 after major trauma. *Shock* 23:30-34, 2005.
- Teasdale G, Jennett B: Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet* 2:81-84, 1974.
- Shiozaki T, Kato A, Taneda M, Hayakata T, Hashiguchi N, Tanaka H, Shimazu T, Sugimoto H: Little benefit from mild hypothermia therapy for severely head injured patients with low intracranial pressure. *J Neurosurg* 91:185-191, 1999.
- Baker SP, O'Neill B, Haddon W Jr, Long WB: The injury severity score: a method for describing patients with multiple injuries and evaluating emergency care. *J Trauma* 14:187-196, 1974.
- Baker SP, O'Neill B: The injury severity score: an update. *J Trauma* 16:882-885, 1976.
- Jennett B, Bond M: Assessment of outcome after severe brain damage. A practical scale. *Lancet* 1:480-484, 1975.
- Hensler T, Sauerland S, Bouillon B, Raum M, Rixen D, Helling HJ, Adermahr J, Neugebauer EA: Association between injury pattern of patients with multiple injuries and circulating levels of soluble tumor necrosis factor receptors, interleukin-6 and interleukin-10, and polymorphonuclear neutrophil elastase. *J Trauma* 52:962-970, 2002.
- Ertel W, Keel M, Bonaccio M, Steckholzer U, Gallati H, Kenney JS, Trentz O: Release of anti-inflammatory mediators after mechanical trauma correlates with severity of injury and clinical outcome. *J Trauma* 39:879-885, 1995.
- Poutsiaika DD, Clark BD, Vannier E, Dinarello CA: Production of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 $\beta$  by peripheral blood mononuclear cells is differentially regulated. *Blood* 78:1275-1281, 1991.
- Arend WP, Smith MF Jr, Janson RW, Joslin FG: IL-1 receptor antagonist and IL-1 $\beta$  production in human monocytes are regulated differently. *J Immunol* 147:1530-1536, 1991.
- Csuka E, Morganti-Kossmann MC, Lenzlinger PM, Joller H, Trentz O, Kossmann T: IL-10 levels in cerebrospinal fluid and serum of patients with severe traumatic brain injury: relationship to IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  1 and blood-brain barrier function. *J Neuroimmunol* 101:211-221, 1999.
- Gutierrez EG, Banks WA, Kastin AJ: Blood-borne interleukin-1 receptor antagonist crosses the blood-brain barrier. *J Neuroimmunol* 55:153-160, 1994.