

200500764B

厚生労働科学研究研究費補助金

こころの健康科学研究事業

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

平成 15 年度～17 年度 総合研究報告書

主任研究者 杉本 壽

平成 18 (2006) 年 3 月

## 目次

I.	総合研究報告書	
	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	1
	杉本 壽	
	図 1～11:	29
II.	研究成果の刊行に関する一覧表	40
III.	研究成果の刊行物・別冊	41

厚生労働科学研究費補助金(こころの健康科学研究事業)  
(総合)研究報告書

「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」

主任研究者 杉本 壽

大阪大学大学院 医学系研究科  
生体機能調節医学講座 教授

研究要旨:本研究は、厚生労働科学研究費補助金による重症頭部外傷の「急性期治療」ならびに「急性期以降の回復過程」について、我々が行った6年間の研究成果をさらに発展させ、超急性期治療終了直後(受傷後1週間)から中枢神経系の賦活と下肢運動機能の温存に主眼を置いた早期リハビリテーションを積極的に開始し、急性期治療終了後(受傷1ヵ月)の後期リハビリテーションに繋ぐことによって、重症頭部外傷患者の中枢神経系機能予後の飛躍的な改善を図ることを目指している。本研究は、『重症頭部外傷急性期から慢性期への移行期に生じている病態を解明すること』、『病態に即して意識回復を積極的に促進する移行期での治療法を開発すること』、『長期的な脳機能回復を積極的に促進するために早期から慢性期にかけて一貫した治療法(リハビリテーションを含む)を開発すること』を目標にして、以下の研究を行った。

臨床研究では、

1. 長期植物状態からの回復過程の解明
2. 損傷した中枢神経の年単位での長期的な回復過程の解明
3. 長期植物状態からの意識回復・非回復を決定する因子の解明
4. 長期植物状態からの回復予知法・回復促進法の開発
5. 意識障害患者での下肢に対する早期リハビリテーションの効果の検討
6. 意識回復例での高次脳機能障害の回復機構の解明と回復促進法の開発

基礎研究では

7. 動物ならびに培養細胞を用いた脳損傷モデルにおける中枢神経損傷後の機能回復機構の解明

(1) 長期植物状態からの回復過程の解明

当施設では、受傷1ヶ月後に植物状態を呈していた重症頭部外傷患者に関しての長期予後追跡調査を prospective に施行しており、平成18年3月現在、37症例(平均年齢 $45 \pm 19$ 、男/女=29/8)で1年以上の予後追跡調査(最長9年5ヶ月)がなされている。意識回復の経過は(i)受傷から3ヶ月以内に急激な意識レベル改善を認める症例(13例)、(ii)受傷5~12ヶ月後にかけて緩徐に意識レベルが改善する症例(8例)、(iii)植物状態が遷延する症例(16例)の3通りに分かれ、37例中21例(57%)が受傷から1年以内に意識を回復し、1例が受傷から2年後に意識を回復した。意識回復までに要した期間は平均 $5.0 \pm 5.2$ ヶ月であった。11例(29.7%)が感染症で死亡したが、受傷から1年以内の死亡は2例(5.4%)のみであった。意識が回復した22例のうち、Glasgow Outcome ScaleでModerate Disability以上のレベルにまで回復したのは4例(18%)だが、うち3例が社会復帰した。しかし、他の18例は意識回復後も日常生活動作は障害されており、特に下肢の運動機能が上肢に比べて著しく障害されていた。これらの結果は、急性期治療が終了した時点で植物状態を呈していても、諦めずに治療を継続すれば中枢神経機能が回復する可能性が十分にあることを明確に示している。

## (2) 損傷した中枢神経の年単位での長期的な回復過程の解明

上記 37 症例のうち、3 年以上生存、かつ意識が回復している 16 症例について認知能力(摂食、排泄、整容)の推移を詳細に検討した結果、意識が回復した後も摂食 ≧ 排泄 ≧ 整容の順番で、年単位で徐々に改善していくことが判明した。さらに、受傷から 3 年経過しても発語の認められなかった 7 例のうち 6 例が受傷から 3 年～5 年の間に発語が可能になった事実を明らかにした。

## (3) 長期植物状態からの意識回復・非回復を決定する因子の解明

当施設での上記 24 症例を解析して、受傷後 3 年間の意識回復度合いに影響を及ぼす因子について検討した。来院時意識レベルと意識回復度合いとの関係を調べると、来院時 GCS score が 3 点 4 点の最重症例と 5 点以上の症例とでは、受傷後 2 年間の意識回復の度合いに明らかな違いが認められ、来院時 GCS score 5 点以上の症例の方が意識回復の度合いが良いことが判明した( $p < 0.05$ )。受傷時の年齢と意識回復度合いとの関係を調べると、受傷後 1 年を経過した頃から 50 歳未満のグループの方が 50 歳以上のグループに比べて意識回復の度合いが良くなる傾向を認めた( $p = 0.13$ )。しかし、急性期の頭蓋内圧の高低、CT 上の脳損傷形態と意識回復度合いとの間に明らかな関係は認められなかった。

平成 14 年 2 月から開始した多施設研究では CT・MRI による脳損傷の評価、脳波や聴性脳幹反応などの生理学的検査、髄液の生化学的検査(興奮性アミノ酸濃度・各種インターロイキン濃度・神経栄養因子濃度)を施行し、意識回復に影響を及ぼす因子について詳細に検討している。平成 18 年 3 月の時点で 18 例での測定が終了し、1 年以内に意識の回復した患者では、受傷 1 ヶ月後の髄液中 IL-1 $\beta$  濃度が意識回復の遷延している患者に対して有意に低い( $0.38 \pm 0.19$  v.s.  $0.88 \pm 0.28$  pg/ml, M $\pm$  SD,  $p < 0.05$ )ことが判明した。他のインターロイキン濃度や興奮性アミノ酸濃度には両群で有意差を認めなかった。

## (4) 長期植物状態からの回復予知法・回復促進法の開発

平成 15 年度の研究で、PET (positron emission tomography) よりも汎用性の高い画像システム (SPECT (single photon emission computed tomography) を改良した Hybrid PET) を用いて脳グルコース消費量を画像化することに成功した。この測定法では文献値と比較して 50% 高い脳ブドウ糖消費量であったが、平成 16 年度の研究で散乱同時計数補正、偶発同時計数補正、相互補正、動脈血放射能濃度測定精度改善(入力関数の精度改善)を行った結果、文献値と一致する脳ブドウ糖消費量が得られた。重症頭部外傷患者 2 例に対して施行した Hybrid PET では、意識が回復した後もグルコース消費量は健常者の 6 割以下に抑制されていた。さらに、Hybrid PET によって得られる機能画像を MRI や CT などの形態画像と重ね合わせるソフトウェアも開発した。

## (5) 意識障害患者での下肢に対する早期リハビリテーションの効果の検討

意識障害患者に対して通常他動的関節可動域運動を施行した場合の下肢筋肉の萎縮経過を、6 例(11 肢)で筋肉の断面積を CT 画像上で計測して客観的に評価を行った。驚くべきことに、6 週間の経過で大腿四頭筋、大腿二頭筋、下腿前頸骨筋群、下腿三頭筋の総てが来院時の 60~70% にまで断面積が減少していた。意識障害患者の下肢筋肉(6 例 10 肢)に 1 週間の電気刺激(発症後 1 週~2 週の間)を加えることにより、下肢総ての部位で、この期間の筋萎縮を平均 1% に留めることに成功した(コントロール群では 11~13% 萎縮)。さらに、長期(第 1 週~第 6 週)にわたり電気刺激を加えた場合(2 例 4 肢)も、下肢総ての部位で 4% 以内の萎縮に留めることに成功した。

## (6) 意識回復例での高次脳機能障害の回復機構の解明と回復促進法の開発

当施設に搬送された重症頭部外傷患者のうち、神経心理学的検査施行が可能なレベルにまで回復した症例では、高次脳機能の障害程度を prospective に追跡調査(受傷 1 ヶ月後、半年毎)し、平成 18 年 3 月現在、48 例で受傷 1 ヶ月以内の初期評価を終了している。48 例中 41 例(85%)で何らかの高次脳機能障害(特に記憶力障害)が生じていることから、少なくとも受傷 1 ヶ月後の時点では、重症頭部外傷患者の大多数で高次脳機能障害の生じていることが判明した。上記 48 症例のうち、26 例で施行できた追跡調査(6 ヶ月~2 年)の結果、11 例(42%)が完全に回復、9 例(35%)が一部回復、6 例

(23%)は経過中全く改善を認めなかった。また、BADs(遂行機能障害症候群の行動評価法)の結果が、患者自身の病識欠除の程度の指標になることが判明した。

#### (7) 動物ならびに培養細胞を用いた脳損傷モデルにおける中枢神経損傷後の機能回復機構の解明

##### ① 中枢神経損傷時のストレス応答防御メカニズムの研究

小胞体ストレスセンサー蛋白である Ire1 に相互作用を示す分子を yeast two hybrid 法を用いてスクリーニングし、シグナル分子 JAB1 を同定した。機能解析の結果、JAB1 はストレス応答遺伝子群の活性制御を行っていることが明らかになった。さらに、Ire1 に結合するがストレス刺激によっても解離することができない JAB1 変異体を作成することに成功した。また、正常状態のミトコンドリアが営んでいる蛋白代謝を、ミトコンドリア特異的に攪乱することにより誘導されてくる分子を検索し、『ミトコンドリア特異的シャペロン』を新しく発見した。

##### ② 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

樹状突起再生時に軸索末端部分で蛋白質合成が起きるのか、また起きるとすれば末梢部での翻訳が軸索再生にどの程度寄与しているのかは全く解明されていない。我々は、翻訳開始時に起きる翻訳開始因子どうしの分子間相互作用の変化を FRET(Fluorescent Resonance Energy Transfer)を用いて可視化することにより、翻訳の過程そのものを指標とする手法を開発した。

##### ③ 慢性脳損傷モデルにおけるノルアドレナリン系神経細胞の形態学的変化に関する研究

慢性脳損傷モデル(ラット)において、青斑核ノルアドレナリンニューロン細胞体のサイズは、受傷1日後に腫大するが7日後には著明に減少し、14日後には少し回復して28日後には対照群とほぼ同じサイズに回復した。この一連の形態変化は、軸索輸送の障害とその後の反応によって引き起こされるものと考えられた。

##### ④ 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

培養アストロサイト細胞に高浸透圧刺激を与えると AQP4,8 の mRNA 発現量が増加し、低浸透圧刺激を与えると AQP family 全ての mRNA 発現量が減少した。副腎皮質ホルモン投与により AQP3 の mRNA 発現量が減少した。脳腫瘍周囲に高頻度で発現する AQP4 の mRNA 発現には、脳浮腫形成の一因とされる VEGF は直接的には関与しないことが明らかとなった。マウス stab wound モデルを用いた研究では、脳損傷後24時間では脳水分含有量の増加は認めず、AQP4 mRNA 発現量も変化を認めなかった。しかし、脳損傷後48時間後より脳水分含有量の増加、すなわち外傷性脳浮腫の発生と AQP4 mRNA 発現上昇を認めた。今回の研究により、脳梗塞部位あるいは脳挫傷部位における組織浸透圧上昇→脳浮腫発生→水チャンネル AQP4 発現増加→脳浮腫悪化という脳浮腫が増悪する悪循環の一端を、初めて分子レベルで解明することに成功した。

#### 分担研究者

嶋津 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  
鋤方 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  
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  
田崎 修 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 大阪大学大学院医学系  
研究科神経機能制御外科 教授  
池尻 義隆 大阪大学大学院医学系  
研究科神経機能医学 講師  
森 泰丈 大阪大学大学院医学系  
研究科機能形態学 助手

## A. 研究目的

本研究の目的は、損傷した中枢神経が長期的には回復する可能性が高いことを前提として、急性期早期から慢性期にかけて一貫して積極的に治療・介護し、より完全な社会復帰を実現することにある。

平成 15～17 年度こころの健康科学研究事業では、我々は特に『下肢運動機能の温存に主眼を置いた早期リハビリテーションの開発』に重点を置いて臨床研究を行った。我々は平成 12～14 年度のこころの健康科学研究事業で、『意識の回復した重症頭部外傷患者 16 例のうち、受傷後 1 年の時点で上肢をある程度使用することが可能な症例が 15 例(94%)にも達するのに対して、受傷後 1 年の時点で歩行器あるいは杖を使用して歩行可能な症例(自力歩行も含む)はわずか 5 例(31%)しかないこと』を明らかにした。この事実は、『植物状態を呈していた患者が意識を回復しても、筋の廃用性萎縮による下肢の運動機能障害が著しくて車椅子生活を余儀なくされ、ADL が非常に障害されている』ことを如実に物語っている。これに対する根本的な治療法を開発して解決策を講じなければ、長期植物状態からの意識回復予知法あるいは意識回復促進法をいくら開発しても、宝の持ち腐れになることは言を待たない。

この研究を開始するにあたり、最初に我々の脳裏に浮かんだ疑問は、『意識障害患者に対して通常の他動的関節可動域運動を施行した場合に、実際に、どれぐらいの期間で、どの程度、下肢筋肉が萎縮するのだろうか?』という簡単な疑問であった。しかし、文献を調べてみると、我々が渉猟した限りでは、発症後(受傷後)何週間で

何%どこの筋肉が萎縮すると具体的に記載している文献は、英語論文も含めて皆無であった。発症(受傷)から数週間経過した後の萎縮した下肢筋肉の断面積を測定した報告や下肢筋肉が萎縮するという報告は散見できるが、発症(受傷)直後から継続して萎縮経過を計測した報告は見当たらなかった。意識障害を呈している患者は、通常、発症(受傷)後 2～3 週間の急性期は救命救急センターで治療を受け、其の後の亜急性期から慢性期にかけては後送病院で治療を受けることが多い。しかも、慢性期治療のことなどほとんど考慮することなく、救命救急センターは急性期の治療だけに専念してきた。したがって、このような医療事情の下では、意識障害患者で発症(受傷)から経時的に下肢筋肉萎縮の経過を計測することは非常に困難であった。

これでは、下肢の廃用性萎縮を予防する目的で早期リハビリテーションを開始しようと考えても、『どの部位に対して』、『どのようなリハビリを』、『いつ頃までに』開始すればよいのか、を科学的根拠に基づいて判断することができない。そこで我々は、まず基本データとして『治療期間中に実際にどの程度下肢筋肉が萎縮するのか』を数値的に明らかにしなければいけないと考え、今回の研究を開始した。

## B. 研究方法

臨床研究:

### 1. 長期植物状態からの回復過程の解明:

(a)大阪大学医学部附属病院高度救命救急センターでの研究

【対象】対象は、1996 年 10 月以降に大阪大学医学部附属病院救命救急センターで急

性期治療を受けた重症頭部外傷患者のうち、受傷後1ヶ月の時点で植物状態(もしくは植物状態以下の昏睡状態)を呈していた37症例(平均年齢45±19、男/女=29/8)である。32例は来院時Glasgow Coma Scale score (GCS)が8点以下の重症頭部外傷患者で、残りの5例は来院時GCSが9点以上であったが急激に意識レベルが低下してきた『Talk and Deteriorate』患者である。

【方法】植物状態を呈している患者の意識レベルを受傷1年以内は毎月、受傷1年以上は2ヶ月に1度、Glasgow Outcome Scale score (GOS)及びDisability Rating Scale score (DRS)を用いて評価した。患者が入院している場合は、病院を直接訪問するか主治医に電話で確認した。自宅で介護している場合は、移動が容易であれば再来院してもらい、困難な場合は介護している中心人物に電話で確認した。

#### (b)多施設間での前向き研究

平成14年2月に、長期間植物状態を呈している重症頭部外傷患者の自然回復過程を明らかにする目的で、10都府県にわたる26の3次救急医療施設(12の大学附属病院と14の救命救急センター)が参加して多施設臨床研究が開始された。下記の26施設が参加している。

- ・大阪大学医学部救急医学
- ・大阪市立大学医学部附属病院救急部
- ・関西医大高度救命救急センター
- ・杏林大学医学部救急医学
- ・近畿大学医学部附属病院救命救急センター
- ・近畿大学医学部奈良病院救命救急部
- ・熊本大学医学部救急医学
- ・島根医大救急部
- ・東京医大救命救急センター

- ・獨協医科大学越谷病院救急医療科
- ・防衛医科大学救急部
- ・宮崎医科大学救急医学
- ・青梅市民病院救急部
- ・大阪警察病院救命救急科
- ・大阪市立総合医療センター救命救急センター
- ・大阪府立泉州救命救急センター
- ・大阪府立千里救命救急センター
- ・大阪府立中河内救命救急センター
- ・大阪府立病院救急診療科
- ・大阪三島救命救急センター
- ・国立大阪病院救急部
- ・社会保険中京病院救急科
- ・鳥取県立中央病院救急部
- ・阪和記念病院
- ・兵庫県立西宮病院救急医療センター
- ・松戸市立病院救急部

#### 【対象】

- ・ 頭部外傷受傷後1ヶ月の時点で植物状態(もしくは植物状態以下の昏睡状態)を呈している症例。
- ・ 急性期の治療方法は各施設の治療方針に任せる。
- ・ 他部位に重度の損傷があってもかまわない。
- ・ 年齢制限は設けない。
- ・ 植物状態の定義としては、1994年にThe Multi-Society Task Force on PVSが発表したクライテリア(New Engl J Med 1994; 330: 1499-1508)を用いた(下記)。
  - ① no evidence of awareness of self or environmental and an inability to interact with others
  - ② no evidence of sustained, re- producible,

purposeful, or voluntary behavioral responses to visual, auditory, or noxious stimuli

- ③ no evidence of language comprehension or expression
- ④ intermittent wakefulness manifested by the presence of sleep-wake cycles
- ⑤ sufficiently preserved hypothalamic and brain stem autonomic functions to permit survival with medical and nursing care
- ⑥ bowel and bladder incontinence
- ⑦ variably preserved cranial-nerve reflexes (papillary, oculocephalic, corneal, vestibulo-ocular, and gag) and spinal reflexes

【方法】この多施設研究を施行するにあたり大阪大学倫理委員会の厳格な審査を受け、承認を得た。患者家族に対しては予め研究についての十分な説明を行い、同意を得た上で研究に参加していただいた。同意は家族の申し出によって随時撤回できることも説明した。

具体的には次の①②③を施行した。

- ① 植物状態を呈している患者の意識レベルを受傷1年以内は毎月、受傷1年以降は2ヶ月に1度、Glasgow Outcome Scale score (GOS)及び Disability Rating Scale score (DRS)を用いて評価する。
- ② 受傷後1ヶ月の時点で、画像(CTとMRI)による脳損傷の評価、脳波や聴性脳幹反応などの生理学的検査、髄液の生化学的検査(興奮性アミノ酸濃度、各種インターロイキン濃度、神経栄養因子濃度)、可能な施設では脳血流量測定(XeCTやSPECT)を施行する。
- ③ 患者基本データの記入

## 2. 損傷した中枢神経の年単位での長期的な回復過程の解明:

当施設で9年前からprospectiveに施行している上記37症例(平成18年3月現在)の予後追跡調査をさらに継続し、発語、摂食、排泄、整容動作、等の認知能力の年単位での回復過程をDisability Rating Scale scoreを用いて客観的に評価した。

## 3. 長期植物状態からの意識回復・非回復を決定する因子の解明:

### (a)大阪大学医学部附属病院高度救命救急センターでの研究

当施設での上述37症例を詳細に解析して、来院時意識レベル、受傷時の年齢、急性期の頭蓋内圧の高低、CT上の脳損傷形態と、受傷後2年間の意識回復度合い(受傷後1年間のDRSの推移)との関係を検討した。

### (b)多施設間での前向き研究

【対象】上記の多施設研究患者を対象とした。

【方法】重症頭部外傷受傷1ヶ月の時点でCT・MRIによる脳損傷の評価、脳波や聴性脳幹反応などの生理学的検査、髄液の生化学的検査(興奮性アミノ酸濃度、各種インターロイキン濃度、等)を施行して、意識回復・非回復に影響を及ぼす因子を検討した。

## 4. 長期植物状態からの回復予知法・回復促進法の開発:

### 【対象及び方法】

#### (i)誤差要因の検討

Hybrid PETは、単光子放出核種の $\gamma$ 線と陽電子放出核種の消滅 $\gamma$ 線の両者を検出しう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。一方、脳ブドウ糖代謝の定量的測定は行われておらず、機能解析の手法としての精度は確立されていない。本装置を用いて、脳ブドウ糖代謝の定量測定を試み、頭部外傷患者の画像解析による脳機能評価法としての可能性を検討した。

内径20cmのプールファントムに1.74mCiの陽電子放出核種添加水溶液を満らし、線減弱計数0, 0.095, 0.090, 0.085, 0.080, 0.075, 0.070, 0.065 $\text{cm}^{-1}$ と仮定してChang法で画像再構成し、最適線減弱計数を求めた。

#### (ii) 正常者の脳ブドウ糖代謝の計測

Sokolof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、lumped constantを用いて計算した。正常者として健康成人男性6名を用いた。計算には、Chang法における最適線減弱計数を用いて画像再構成を行った場合の脳ブドウ糖消費量の定量値と、X線CTを吸収補正に用いた場合の定量値を求め、比較した。

さらに、別の健常被験者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、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。PETでは外部線源による測定に基づく吸収補正を行い、Hybrid PETでは仮想的線源計数によるChangの吸収補正法を用いた。脳ブドウ糖

消費量は、Sokolof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。

#### (iii) 重症頭部外傷患者の脳ブドウ糖代謝の計測

**【対象】**大阪大学医学部附属病院高度救命救急センターに搬送される来院時GCS (Glasgow Coma Scale)  $< 8$  及び talk & deteriorate を認めた重症頭部外傷患者のうち、10歳未満65歳以上の症例、及び他部位にAIS (Abbreviated Injury Score)  $\geq 3$ の損傷を合併する症例、また経過中頭蓋内圧 (Intra cerebral pressure, ICP) が著しく高くてコントロールができず、脳死状態に陥った症例を除外した症例を本研究の対象とした。

**【方法】(1)患者管理:** すべての患者に対して、急性期1週間の間は人工呼吸管理を初めとする各種集中治療によって呼吸・循環動態を安定させた。脳室内留置カテーテルあるいは脳実質内留置センサーによって頭蓋内圧をモニタリングし、正常体温範囲内に体温コントロールを行い、ICP  $< 25\text{mmHg}$  となるように barbiturate あるいは propofol 持続投与にて鎮静した。ICP  $\geq 25\text{mmHg}$  を示す症例に対しては開頭手術や低体温療法を施行した。対象患者はほぼ全例が初期1週間以内にこれら鎮静剤及び体温コントロールを離脱することができた。

**(2)脳血流量の測定と脳酸素代謝率の算出:** 対象患者に対して、Xe-CTを受傷後第1・2・3・4・6週目に各々Xe-CTを施行して脳血流量を測定した。Xe-CTはCT装置(Asteion-multi TSX-021A, Toshiba, Tokyo, Japan)に連動するXeガス吸入装置

(AZ-725; Anzai medical, Japan)を用いて人工呼吸器あるいはマスク吸入によって行った。30%  $^{133}\text{Xe}$  ガス (Xenon Cold<sup>®</sup>; Anzai medical, Japan)と純酸素の混合ガスを3分間吸入させた後、5分間室内ガス吸入によって洗い流し、スキャンプロトコールはベースラインスキャン1回、脳血流量解析ソフト (AZ-7000W; Anzai medical, Japan)を用いて脳血流量を算出した。脳血流量は基底核を含めた左右両大脳半球に関心領域を取り、その半球の平均値を持って脳血流量とした。

Xe-CT測定時に一致して、右内頸静脈より右S状静脈洞に18G中枢静脈カテーテルを挿入し、内頸静脈血液ガスを採取して、内頸静脈酸素飽和度を測定した。Xe-CTにて求めた脳血流量と合わせて脳酸素代謝率を算出した。

(3)脳グルコース代謝の測定: これまでの我々の研究結果より、重症頭部外傷患者では受傷後第3週目に頭部外傷受傷後それまで低下していた脳血流量が回復傾向となり、第6週目までにプラトーに達することが明らかであり(J neurotrauma 2005)、測定時期として受傷後第3・6週目にFDG-PETを用いて脳グルコース代謝を行った。脳グルコース代謝の測定は、放射性同位元素 $^{18}\text{F}$ -fluorodeoxyglucoseを静脈投与し、投与前及び投与後15、30、45、60、90、120、150、180、300秒後及び、以降経時的に10、15、20、30、40、45分後に動脈血液ガスを測定し、放射性同位元素の分布により脳グルコース代謝を定量的評価した。

(4)患者管理: すべての患者は少なくとも受傷後6週目まで当センターにて加療を行い、退院後も全例神経学的予後の追跡調査を行った。3ヶ月目の Glasgow Outcome

Scale (GOS)により good recovery (GR) 及び mild disability (MD)を予後良好群、severe disability (SD)及び persistent vegetative state (PVS)を予後不良群とした。正常健康男子14名(25-45歳、平均年齢32歳)の脳血流量を上記方法で測定し、正常値とした( $41 \pm 7$  ml/100g/min)。また正常健康男子5名(25-41歳、平均年齢32歳)の脳グルコース代謝を上記方法で測定し、正常値とした( $15.3 \pm 4.1$  ml/100g/min)。測定統計学的検討はMann Whitney検定、 $\chi^2$ 検定、及び反復測定分散分析法を用いて、 $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

### 5. 意識障害患者での下肢に対する早期リハビリテーションの効果の検討:

(i) 意識障害患者での下肢筋肉の廃用性萎縮の実態

**【対象】**2003年9月以降に大阪大学医学部附属病院救命救急センターに搬送され、急性期に意識障害を呈していた重症頭部外傷患者3例(23歳女性、72歳男性、72歳女性)と脳出血患者3例(56歳男性、63歳男性、68歳女性)の計6例を対象とした。

**【方法】**意識障害患者に対して通常他動的関節可動域運動を施行した場合の下肢筋肉(大腿四頭筋、大腿二頭筋、下腿前頸骨筋群、下腿三頭筋)の6週間にわたる萎縮経過を、CT画像上で筋肉の断面積を計測することにより数値を用いて客観的に評価した。

(ii) 『自転車こぎ運動』の効果

**【対象】**重症頭部外傷患者1例(68歳女性)と脳出血患者3例(45歳男性 左被殻出血、67歳男性 脳幹出血、58歳男性 脳動静脈奇形による右後頭葉・側頭葉出血)を対象とした。

【方法】病態の安定した第 7 病日から第 13 病日までの 1 週間、意識障害患者に対して他動的に『自転車こぎ運動』(図1)を施行し、施行前(第 7 病日)と施行後(第 14 病日)に CT 画像上で筋肉の断面積を計算して、上記通常経過群と比較した。スケジュールとしては、右下肢 15 分間、左下肢 15 分間、それぞれ用手的に他動的関節可動域運動を施した後に、図1に示すような他動的『自転車こぎ運動』を 30 分間施行した。この装置は、足をペダルに固定すれば、モーターによって自動的に『自転車こぎ運動』をしてくれる。回転数(回/分)や継続時間をさまざまに設定できるが、今回の pilot study では 30 分間で約 20Cal のエネルギー消費となるように設定した。これを 1 セットとして、日勤帯(午後 3 時～4 時)と準夜帯(午後 8 時～9 時)に 1 セットずつ、計 1 日 2 セット行い、7 日間継続した。

### (iii) 『電気的筋肉刺激』の効果

【対象】重症頭部外傷患者 2 例(63 歳男性、17 歳男性)と脳出血患者 4 例(56 歳女性、57 歳男性、65 歳男性、67 歳男性)の計 6 例を対象とした。

【方法】病態の安定した第 7 病日から第 13 病日までの 1 週間、下肢伸側(大腿四頭筋・下腿前頸骨筋群)と下肢屈側(大腿二頭筋・下腿三頭筋群)に一日 30 分ずつ電気的筋肉刺激を与えた。第 7 病日と第 14 病日に、同様に CT 画面上で筋肉の断面積を計測し、他動的関節可動域運動のみを施行した患者の経過と比較した。電気的筋肉刺激には市販されている東レアイリーブ社製トレリートを使用了(図2)。これは各種スポーツ選手の筋肉増強に広く使われている機器で、体の部位によってそれぞれの筋肉特性に基づいたプログラム設定

がされており、刺激したい部位に電極を貼付するだけで簡単に使用できるようにできている。スケジュールとしては、トレリートのプログラムに従って部位別モードで一部位につき、ウォームアップ 3 分・トレーニング 25 分・クールダウン 2 分の計 30 分ずつ電気的筋肉刺激を施行した。トレーニング中は約 10 秒ごとに筋肉の収縮と弛緩が繰り返され、出力は外観的に筋収縮が確認できる 30～40mA とした。実際には図8のように 2 台のトレリートを接続して 1 台で両下肢の同じ部位を同時に刺激したため、一日の刺激時間は 60 分となった。

## 6. 意識回復例での高次脳機能障害の回復機構の解明と回復促進法の開発:

【対象】平成 13 年 4 月 1 日以降に当院救命救急センターに入院した頭部外傷患者のうち、いわゆる高次脳機能障害が疑われた患者で、かつ神経心理学的検査が可能であった 48 例である。

【方法】各患者に、意識障害から回復し検査可能となった時点(受傷後約 1 週間～1 ヶ月)(初期評価)と、その後 6 ヶ月毎に以下の認知機能検査をおこない(追跡評価)、MRI で同定された損傷脳部位との関連を検討した。2004 年 12 月までは、認知機能検査は、全般性認知機能評価として Mini Mental State Examination(MMSE)、言語機能評価として標準失語症検査(SLTA)、記憶機能評価として Wechsler Memory Scale-Revised(WMS-R)、前頭葉機能評価として Raven's colored progressive matrices(RCPM)、Trail making test(TMT)、語想起課題を用いた。2005 年 1 月以降は MMSE、RBANS、FAB、TMT を実施し、さらに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。なお、追跡調査を実施した症例の一部では前頭葉機能検査を実施していないので、結果の解析からは除外した。

基礎研究:

### 7. 動物ならびに培養細胞を用いた脳損傷モデルにおける中枢神経損傷後の機能回復機構の解明:

#### ① 中枢神経損傷時のストレス応答防御メカニズムの研究:

##### (a) 小胞体ストレス応答関連分子の同定

小胞体でのストレス応答 (unfolded protein response) 防御システムを解明する目的で、小胞体ストレスセンサー蛋白である Ire1 に相互作用を示す分子を yeast two hybrid 法を用いてスクリーニングし、シグナル分子 JAB1 を同定した。

さらに、5種類の JAB1 活性変異体を作成して JAB1 の各ドメインごとの小胞体ストレス応答における機能解析を試みた。

##### (b) ミトコンドリアのストレス応答に関する研究

正常状態のミトコンドリアが営んでいる蛋白代謝を、ミトコンドリア特異的に攪乱することにより誘導されてくる分子を検索した。

#### ② 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

##### (a) FRET プローブの検討

異なる吸収波長を有する蛋白質である YFP と CFP を eIF2  $\beta$  と eIF5 にそれぞれ融合させた蛋白質を発現するプラスミドを作製した。YFP-eIF2  $\beta$ 、CFP-eIF5 を CMV プロモーターの下流から発現させるコンストラ

クトを作製し、NIH-3T3 細胞に強制発現させたが、十分な発現を得られず、また相互作用を確認することができなかったため、この2種類のプローブを、スパーサーを介して1分子に再構成し (YFP-eIF2  $\beta$  /eIF5-CFP)、一過性に強制発現させた。NIH-3T3 細胞は 10%ウシ血清存在下で培養し、70%コンフルエントに達したところでリポフェクション法を用いてトランスフェクトをおこなった。発現を確認した後、無血清培地で 24 時間培養し、20%v/v になるようにウシ血清を添加し 100W 水銀ランプでプローブを励起させながら Leica 社製 DM IRE2 microscope で細胞の観察をおこなった。画像の解析処理は MetaMorph software で行った。

##### (b) ラット海馬初代神経細胞を用いての観察

胎生 18 日目のラット胎児脳から海馬を摘出し、ポリエチレンイミンでコートしたガラスボトムディッシュ上にニューロンの初代培養系を確立した。B27 サプリメント (Invitrogen 社) を添加した DMEM で 21 日間培養すると、樹状突起上のシナプスはスパインとして観察された。

海馬培養神経細胞にはアデノウイルスを用いることにした。YFP-eIF2  $\beta$  /eIF5-CFP をアデノウイルス発現ベクターにクローニングし、HEK293A にトランスフェクトすることによりウイルス粒子を得た。ウイルス粒子は実験 2 日前に神経細胞へ感染させた。

#### ③ 慢性脳損傷モデルにおけるノルアドレナリン系神経細胞の形態学的変化に関する研究:

雄性 SD ラットに weight-drop device を用いて慢性脳損傷を作成した。受傷後 1, 2, 7, 14, 28, 56 日の時点で青斑核の NA ニューロンの形態学的変化を画像解析ソフトを用

いて解析した。また、HPLC-EDを用いて脳組織中の norepinephrine (NE)と代謝物質である 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG)を測定し、NE 代謝について解析した。

#### ④ 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

##### (a) *in vitro* 実験

マウス由来のアストロサイト細胞を分離し培養系を確立した。アストロサイト培養系を低浸透圧(225mOsm)及び高浸透圧刺激(375mOsm), 腫瘍性脳浮腫への関与が疑われる mouse vascular endothelial cell growth factor (VEGF) 刺激、そして脳浮腫の治療に用いる副腎皮質ホルモン(ベタメサゾン)刺激を行った。培養細胞より RNA を抽出しアクアポリン 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。

##### (b) *in vivo* 実験

マウス脳に stab wounds を加え、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。

#### 【倫理面への配慮】

本研究の臨床面における計画を遂行するに当たっては、まず大阪大学倫理委員会の承認を得る。その上で、患者の安全性を最優先し、患者に少しでも不利益(あるいは危険)が生じると考えられる時は直ちに中止する。インフォームドコンセントに関しては、治療内容ならびに考えられる危険性について主治医が口頭で説明すると同時に書面を手渡し、患者家族が十分に理解した上

で同意が得られた症例にのみ実施する。

動物実験では、あらかじめ実験計画書を動物実験委員会に提出して実験方法・麻酔方法・安楽死方法・使用薬剤等について十分検討し、同委員会の承認を得た後に実験を開始した。

#### C. 研究結果

##### 臨床研究:

##### 1. 長期植物状態からの回復過程の解明:

##### (a)大阪大学医学部附属病院高度救命救急センターでの研究

平成 18 年 3 月現在、37 症例で 1 年以上(最長 9 年 5 ヶ月)の予後追跡調査がなされており、意識回復の経過は①Group I :受傷から 3 ヶ月以内に植物状態から脱却して急激な意識レベル改善を認める症例(13 例)、②Group II :受傷 4~12 ヶ月後にかけて徐々に意識レベルが改善して植物状態から脱却する症例(8 例)、③Group III :植物状態がずっと遷延する症例(16 例)の 3 通りに分かれることが判明した(図 3)。観察期間内に死亡した症例は 11 例(30%)で、それぞれ受傷 4 ヶ月目、10 ヶ月目、12 ヶ月目、14 ヶ月目、16 ヶ月目、22 ヶ月目、31 ヶ月目、36 ヶ月目、37 ヶ月目(2 例)、40 ヶ月目、に感染症で死亡した。しかし 1 年以内の死亡は 3 例(8%)と我々の予想よりもはるかに少なかった。37 例中 21 例(60%)が受傷から 1 年以内に意識を回復し、1 例は受傷から 2 年後に意識が回復した(図 3 ピンク線)。意識回復までに要した期間は平均 5.0 ± 5.2 ヶ月であった。2 年後に意識の回復した 1 例は、ストローを使ってコーヒーを飲んだり、アイスクリームを舐めることができるレベルにまで回復した。意識が回復した 22

例の中で、受傷後 1 年以内に GOS で Moderate Disability (MD)以上のレベルに改善したのは4例(11%)であり、大多数の患者は意識回復後も ADL(日常生活動作)が障害されていることが判明した。しかし、この4例中3例(図3水色線)が社会復帰を成し遂げることができた。これは全く我々が予想のできなかったことで、大変意外な驚くべき事実である。1 例目は 29 歳男性で、受傷後 2 ヶ月目から徐々に意識が回復し、受傷から 1 年 3 ヶ月後に元の職場に computer engineer として完全復帰した。2 例目は 15 歳男性で受傷後 2 ヶ月半は全くの植物状態であったが、受傷から 3 ヶ月目に突然意識が回復し始め、受傷から 1 年 10 ヶ月後に塗装工として働くまでに回復した。3 例目は 33 歳男性で、受傷後 2 ヶ月目から徐々に意識が回復し、受傷から 1 年後には乗用車の運転も可能となった。

これらの事実は、『諦めないで治療を継続すれば社会復帰できる可能性がある』ということをはっきりと示しており、患者家族及び慢性期診療施設の医療従事者にとって極めて貴重な朗報となっている。

#### **(b)多施設間での前向き研究**

平成 14 年 2 月に、長期間植物状態を呈している重症頭部外傷患者の自然回復過程を明らかにする目的で、10 都府県にわたる 26 の 3 次救急医療施設(12 の大学附属病院と 14 の救命救急センター)が参加して多施設臨床研究が開始された。しかし、エントリー開始から 4 年経過した平成 18 年 3 月の時点で未だ 28 例しかエントリーできていない。これは①2002 年 6 月 1 日から飲酒運転に伴う罰則が強化されたことにより重症頭部外傷患者が激減したこと、②各施設

での倫理委員会の許諾を得るのに時間がかかっていること、③2002 年 4 月の法律改正に伴い、慢性期治療施設が受傷後早期のリハビリ開始を希望するようになり、エントリーする時点(受傷後 1 ヶ月)までに転院してしまうケースが増えたこと、が大きな要因であると考えられる。

#### **2. 損傷した中枢神経の年単位での長期的な回復過程の解明:**

認知能力に関しては、意識が回復し、かつ 3 年以上追跡調査が可能であった 16 例で経時的な改善を調べた(図4)。受傷 1 年後の時点で経口摂取が全く不可能な患者が 6 例いたが徐々に改善を示し、受傷 4 年後には経口摂取が全く不可能な患者は皆無であった。一方、受傷 1 年後の時点で排泄が全くコントロールできない患者は 8 例であったが、その後の 1 年間で改善を示した患者はおらず、8 例中 5 例は受傷 4 年後の時点でも排泄が全くコントロールできなかった。また、受傷 1 年後の時点で整容動作が全くできない患者は 9 例だったが、その後の 1 年間で改善を示した患者はおらず、受傷後 4 年が経過した時点でも 6 例は整容動作が全くできなかった。この結果から、摂食に関する能力は意識回復と共に徐々に回復し、受傷後 4 年の時点で全患者が『介助すれば何とか経口摂取が可能なレベル』にまで達していることが判明した。しかし、排泄及び整容動作に関する能力は回復が非常に遅れ、受傷後 4 年経過した時点でも約半数の患者が排泄及び整容に関する動作を全く行うことができないことが判明した。

3 年以上追跡が可能であった 35 例のうち、現時点で生存しているのが 23 例で、植物状態を呈している 7 例を除いた 16 例が意

識を回復している。その 16 例から受傷後1年半の時点で意味のある発語が可能であった 9 例を除き、残りの7例が受傷後1年半の時点で全く発語が認められなかった(図5)。この7例は、受傷後3年経過しても意味のある発語は全く不可能で、家族も発語に関しては全く諦めていた。しかし、そのうちの1例(受傷時 26 歳、女性)が、受傷 3 年 4 ヶ月後に突然『痛い』や『私の(もの)』等の言葉を発するようになった。2 例目(受傷時 20 歳、男性)は、受傷 3 年 8 ヶ月後頃から『アーアー』や『ウーウー』という声のトーンが急に高く大きくなってきたなど思っていると、その 2 ヶ月後(受傷 3 年 10 ヶ月後)に突然『お母さん』、『婦長さん』、『ありがとう』等の言葉を発するようになった。3 例目(受傷時 27 歳、男性)は受傷 4 年 6 ヶ月後に突然『おはよう』と発し、「イチゴとみかんのどちらがほしい?」と尋ねられて『イチゴ』と答えることができるようになった。4 例目(受傷時 52 歳、女性)は受傷 4 年 10 ヶ月後に突然『おはようございます』、等の言葉を発するようになった。5 例目(受傷時 18 歳、男性)は、受傷から 3 年半が経過した時に、見舞いに来た姉が帰るときに『がんばりなよ!』と言ったのに対して、『おまえもな!』と答えたのが始まりだった。その後、簡単な書字ができるにまで急速に回復した。6 例目(受傷時 46 歳、男性)は、受傷から 3 年 4 ヶ月が経過した時に、病院のバスで遠足に連れていってもらった帰りに、『うれしかった!』と突然話をしだした。これらの事実は、『諦めないで治療を継続すれば会話ができるようになる可能性がある』ということをはっきりと示しており、患者家族及び慢性期診療施設の医療従事者にとって極めて貴重な朗報となる。しかも、この6例は専門的な言語リハ

ビリテーションを受けていないので、受傷後 1 年以上経過していても諦めずに専門的な言語リハビリテーションを施行すれば、会話が可能になる症例がさらに増えるのではないかと考えられる。

### 3. 長期植物状態からの意識回復・非回復を決定する因子の解明:

#### (a)大阪大学医学部附属病院高度救命救急センターでの研究

来院時意識レベルと意識回復度合いとの関係を調べると、来院時 GCS score が 3 点 4 点の最重症例と 5 点以上の症例とでは、受傷後1年間の DRS の推移に明らかな違いが認められ、来院時 GCS score 5 点以上の症例の方が意識回復の度合いが良いことが判明した( $p < 0.05$ ) (図6)。しかし、受傷時年齢(図6右)、急性期の頭蓋内圧、および CT 画像上の脳損傷形態と受傷後1年間の DRS の推移との間に有意差は認められなかった。

#### (b)多施設間での前向き研究

平成 18 年 3 月の時点で 18 例での測定が終了し、1 年以内に意識の回復した患者では、受傷 1 ヶ月後の髄液中 IL-1 $\beta$  濃度が意識回復の遷延している患者に対して有意に低い ( $0.38 \pm 0.19$  v.s.  $0.88 \pm 0.28$  pg/ml,  $M \pm SD$ ,  $p < 0.05$ ) ことが判明した。他のインターロイキン濃度や興奮性アミノ酸濃度には両群で有意差を認めなかった。

### 4. 長期植物状態からの回復予知法・回復促進法の開発:

#### (i) 誤差要因の検討

Chang 法による画像再構成では、線減弱計数を仮定する必要がある。ファントム実験からは線減弱計数 0.085 の時が最適である。

水の物理的減弱計数 0.095 を用いると約 20%の過大評価になった(図9)。

#### (ii) 正常者の脳ブドウ糖代謝の計測

正常者6例の全脳平均脳ブドウ糖消費量は、Chang 法と最適線減弱計数を用いた場合、 $11.5 \pm 2.5 \text{mg}/100\text{g}/\text{min}$  であった。局所的には、大脳被殻、尾状核、視床、小脳、大脳皮質の順にブドウ糖消費量は高値であった。CT を用いて吸収補正を行った場合は、全脳平均  $8.2 \pm 2.5 \text{mg}/100\text{g}/\text{min}$  であった(表1)。

#### (iii) 重症頭部外傷患者の脳ブドウ糖代謝の計測

平成 18 年 3 月までに 3 例がエントリーしたが、うち 2 例は検査中の安静を保てず、検査時に沈静剤を要するなど検査の協力が得られなかったため、プロトコルを完全に実施できた症例は、該当症例のうち 1 例のみであった。3 例の測定結果を表2に示す。

Case1 について図9に脳血流量及び脳グルコース代謝の経時的変化を示した。脳血流量は第3週の段階では正常下限にあったが、第6週では正常範囲内に改善している。一方脳グルコース代謝量は、第3週の段階ではまだかなり低値であり、意識が回復し、communication が取れるようになった第6週の段階でも未だ低値であった。

### 5. 意識障害患者での下肢に対する早期リハビリテーションの効果の検討:

#### (i) 意識障害患者での下肢筋肉の廃用性萎縮の実態

当院で予後追跡調査を継続している 37 症例のうち、3 年以上生存、かつ意識が回復している 16 症例について、上肢及び下肢が使用できるかどうかに関して調査した。

上肢は、受傷後1年の時点である程度使用可能な症例が 14 例(87.5%)で、受傷後3年が経過すると全例である程度使用可能であった。対して下肢は、受傷後1年の時点である程度使用可能(補助器具を用いても自力歩行可能)な症例はわずか 7 例(43.8%)しかおらず、受傷後3年が経過しても 9 例(56.3%)と約半数であった。この結果、『植物状態を呈していた患者が意識を回復しても、筋の廃用性萎縮による下肢の運動機能障害が著しいために車椅子生活を余儀なくされ、ADL が非常に障害されていること』が明らかになった。

そこで、意識障害患者に対して通常の他動的関節可動域運動を施行した場合の下肢筋肉の萎縮経過を、CT 画像上で筋肉の断面積を計測して客観的に評価した。6例での 6 週間にわたる下肢筋肉の萎縮経過を図 11 に示す。入院時の断面積を 100%とすると、発症から 6 週間の経過で、大腿四頭筋(膝蓋骨から 10 cm 頭側)、大腿二頭筋(膝蓋骨から 10 cm 頭側)、下腿前頸骨筋群(膝蓋骨から 10 cm 足底側)、下腿三頭筋(膝蓋骨から 10 cm 足底側)はそれぞれ  $66 \pm 5.1\%$ 、 $64 \pm 9.9\%$ 、 $60 \pm 9.8\%$ 、 $71 \pm 9.4\%$  にまで断面積が減少していた。典型的な筋萎縮経過を図 12 に示す。

#### (ii) 『自転車こぎ運動』の効果

意識障害患者に対して機器を用いて他動的に『自転車こぎ運動』を施行した場合の筋萎縮予防効果についての pilot study を行い、平成 16 年 3 月の時点で 4 例が終了した(図 13)。症例数が少ないので統計学的有意差を得るには至っていないが、大腿部に関しては 1 週間の運動(第 7 病日～第 13 病日)で大腿四頭筋が  $91.3 \pm 8.6\%$ 、大腿二頭筋が  $90.5 \pm 4.7\%$  の萎縮に留まり、



通常経過に比べて改善傾向を認めた(前述の通常経過では大腿四頭筋は  $85.9 \pm 1.0\%$ 、大腿二頭筋は  $87.0 \pm 1.8\%$ に萎縮)。しかし、下腿部に関しては1週間の運動(発症後1週~2週の間)でも下腿前頸骨筋群が  $91.6 \pm 9.3\%$ 、下腿三頭筋が  $88.8 \pm 6.2\%$ と萎縮しており、今のところ予防効果は認められていない(前述の通常経過では下腿前頸骨筋群は  $89.4 \pm 4.0\%$ 、下腿三頭筋は  $86.7 \pm 5.0\%$ に萎縮)。なお、この『自転車こぎ運動』の施行直前、施行中(15分経過時)、施行直後で患者の血圧、心拍数、体温に有意な変化は認められなかった。

### (iii) 『電氣的筋肉刺激』の効果

意識障害患者の下肢に対して電気刺激を加えた場合の筋萎縮予防効果についての研究を行い、平成18年3月の時点で6例(10肢)が終了した。1週間(第7病日~第13病日)の電気刺激により、総ての部位で平均1%の萎縮に留めることに成功した(図14)。なお、この『電氣的筋肉刺激』の施行中及び施行直後に血圧上昇、脈拍数増加、体温上昇を認めたが、どれも軽微なものであり、患者の病態には全く影響を与えなかった。また、経過中の筋逸脱酵素の上昇も認めなかった。

さらに、平成17年1月からは受傷(発症)7日後から42病日の5週間にわたって下肢筋肉に電気刺激を加えた場合の筋萎縮予防効果を明らかにする研究を開始し、平成18年3月の時点で2例での測定が終了した。うち1例での来院時から42病日に至る右大腿部断面CT画像の経日的推移を図15に示す。2例ともに電気刺激を加えている期間(第1週~第6週)は下肢総ての部位で4%以内の萎縮に留めることに成功し

た(図16)。

## 6. 意識回復例での高次脳機能障害の回復機構の解明と回復促進法の開発:

平成18年3月までの研究で、48例の初期評価(受傷1ヶ月の時点での高次脳機能検査)と20例の追跡調査(3例は初期から全く高次脳機能障害を認めず)が行われた。神経心理学的検査施行が可能なレベルにまで意識が回復した症例でも、何らかの高次脳機能障害が85%もの高頻度(受傷1ヶ月の時点で48例中41例)で生じていた。受傷1ヶ月の時点で高次脳機能障害を認め、かつ追跡調査が可能であった26例のうち、11例(42%)が追跡調査期間中に完全回復、9例(35%)が一部回復、6例(23%)は経過中全く改善を認めなかった。さらに、記憶機能障害は右半球損傷>左半球損傷>両側半球損傷の順で回復しやすいが、前頭葉機能障害はいずれの損傷においてもより回復しがたいことも追跡調査の結果から明らかになった。2005年1月からRBANSとBADs質問票を追加したが、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ること、BADs質問票は精神症状を評価するにあたり有用であること、が判明した。

### 基礎研究:

## 7. 動物ならびに培養細胞を用いた脳損傷モデルにおける中枢神経損傷後の機能回復機構の解明:

### ① 中枢神経損傷時のストレス応答防御メカニズムの研究:

#### (a)小胞体ストレス応答関連分子の同定

小胞体ストレスセンサー蛋白である Ire1

に相互作用を示す分子を yeast two hybrid 法を用いてスクリーニングし、シグナル分子 JAB1 を同定した。機能を解析した結果、JAB1 はその活性化により Ire1 との結合強度を変化させ、Ire1 の下流にある転写制御因子 XBP1 をはじめとするストレス応答遺伝子群の活性制御を行っていることが明らかになった。

さらに、5種類の JAB1 活性変異体を作成して JAB1 の各ドメインごとの小胞体ストレス応答における機能解析を試みた結果、Ire1 に結合するがストレス刺激によっても解離することができない JAB1 変異体を作成することに成功した。本変異体を強制発現させた細胞では、小胞体ストレス刺激によってもその下流が活性化されないことから、シグナル経路活性化に本遺伝子の機能ドメインが不可欠であることが明らかとなった。

### (b)ミトコンドリアのストレス応答に関する研究

正常状態のミトコンドリアが営んでいる蛋白代謝を、ミトコンドリア特異的に攪乱することにより誘導されてくる分子を検索した結果、ミトコンドリアに特異的に障害を与えたときだけに誘導を受ける『ミトコンドリア特異的シャペロン』を新しく発見した。このストレス応答は小胞体ストレスやその他の細胞内小器官ストレスでは誘導されず、ミトコンドリアに特異的なものであった。

### ② 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

われわれは翻訳開始時に起きる翻訳開始因子どうしの分子間相互作用の変化を FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer) を用いて可視化することにより、

翻訳の過程そのものを指標とする手法の開発を考案した。翻訳開始因子複合体のなかで直接相互作用を起こす 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ラット海馬神経細胞に強制発現させ、結合・解離の動態を FRET でモニタリングする方法を採った。神経細胞を BDNF や ephrinB2 で刺激すると、樹状突起において青色励起波長で得られる吸収波長が長波長側から短波長側へ、すなわち黄色から青色へ変移することがわかった。

本研究において翻訳開始点における蛋白質の相互作用を利用した FRET プローブが、蛋白質合成の増加時においては蛍光エネルギーの転移反応の減少をおこし、 $Em_{475} / Em_{533}$  値の増大として観察できることが分かった。これは翻訳開始前の段階ですでに翻訳開始因子は eIF2 $\beta$  や eIF5 を含む複合体を形成しており (multi-factor complex)、この複合体は mRNA に結合し開始コドンを認識すると、複合体としての分子間結合が解離するという現象と一致する。

### ③ 瀰慢性脳損傷モデルにおけるノルアドレナリン系神経細胞の形態学的変化に関する研究:

瀰慢性脳損傷モデル(ラット)において、青斑核ノルアドレナリンニューロン細胞体のサイズが、受傷 1 日後に腫大(対照と比較して 111%)、7 日後には著明に減少(73%)、14 日後には少し回復(82%)し、28 日後には対照群とほぼ同じサイズに回復した。この一連の形態変化は、軸索輸送の障害とその後の反応によって引き起こされるものと考えられた。ノルアドレナリンニューロンの形態は受傷後 28-56 日で回復したが大脳皮質でのノルアドレナリン代謝は受傷後 56

日経過しても低下しており、シナプス活動の低下やノルアドレナリンニューロン投射経路の減少がその原因として考えられた。

#### ④ 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

##### (a) *in vitro* 実験

培養アストロサイト細胞に高浸透圧刺激を与えるとAQP4,8のmRNA発現量が増加し、低浸透圧刺激を与えるとAQP family 全てのmRNA発現量が減少した。副腎皮質ホルモン投与によりAQP3のmRNA発現量が減少した。脳腫瘍周囲に高頻度で発現するAQP4のmRNA発現には、脳浮腫形成の一因とされるVEGFは直接的には関与しないことが明らかとなった。

##### (b) *in vivo* 実験

マウス stab wound モデルでは、脳損傷後 24 時間では脳水分含有量の増加は認めず、AQP4 mRNA 発現量も変化を認めなかった。しかし、脳損傷後 48 時間後より脳水分含有量の増加、すなわち外傷性脳浮腫の発生とAQP4 mRNA 発現上昇を認めた。今回の研究により、脳梗塞部位あるいは脳挫傷部位における組織浸透圧上昇→脳浮腫発生→水チャンネル AQP4 発現増加→脳浮腫悪化という脳浮腫が増悪する悪循環の一端を、初めて分子レベルで解明することに成功した。

#### D. 考察

重症頭部外傷の慢性期病態、特に植物状態を呈している患者の病態に関してはほとんど関心が寄せられず、打つ手がないとなかば諦め状態で放置され、今まで全くと言ってよいほど研究が進んでいない。そのため、重症頭部外傷慢性期では、医療従事者は暗中模索で治療を行い、患者家族

は何の目標もなく介護を行っているのが現状である。しかし、我々が行っている長期追跡調査によって中枢神経の長期的な可塑性が徐々に明らかになりつつあり、介護の目標を具体的な数字として示すことが可能となったので、暗中模索状態であった医療従事者や患者家族の眼前に明々とした希望の火を灯すことができるようになった。一般の人々の関心も非常に高く、我々の研究成果の中間報告が平成16年12月26日の読売新聞(図17)に掲載され、その記事を基にした特集『植物状態でも諦めない…社会復帰を果たした男性の場合』が平成17年3月1日夕方6時の関西テレビで放映されるや否や、やはり同日から連日現在に至るも、全国の患者家族や関係者から研究結果に対する問い合わせや個別の相談が殺到している。このことは、遷延性意識障害患者の問題がいかに重要かつ深刻であるかを端的に示している。

現時点では、交通事故による高度意識障害患者に対しては、症状固定(受傷後約1年)と判断されると障害程度に応じた保険金が一括で支払われる仕組みになっているが、一度に大金が支払われるために患者家族の間でしばしば諍いが生じている。しかし、我々の研究結果から年単位で回復が認められことが判明したので、「1年間に必要な金額だけを定期的に支払う仕組みにしたほうが良い」との意見が損害補償協会等で聞かれるようになった。

長期間意識障害を呈していた患者が幸運にも意識を回復しても、筋の廃用性萎縮による下肢の運動機能障害が著しいために車椅子生活を余儀なくされ、ADLが非常に障害されることは、昔から経験的によく知られている。しかし、教科書や成書に記載

されている事項を詳しく調べてみると、実は『経験的にはよく知られているが実はほとんど何も解明されていない未知の領域』であることが判明した。経験的には知られていても、科学的には明らかにされていない医学的常識は現在でも多々存在する。例えば、『中枢神経の長期的な可塑性』に関しても、我々が prospective な長期追跡調査を行った結果、初めて科学的に証明することができた事実である。

今回の研究結果から、まず、『意識障害患者では、随意運動が困難な下肢は 6 週間の経過で断面積で計算して受傷時(発症時)の約 65%にまで萎縮する』ことが判明した。これは非常に由々しき事態であり、病悩期間が長くなれば下肢運動機能が廃絶するのも納得がいく。何らかの予防措置をとらなければいけないことは明白である。

では、次の疑問として『どうすれば筋肉の廃用性萎縮を予防することができるか?』が浮かび上がる。筋萎縮予防に関する pilot study として、我々は、まず他動的『自転車こぎ運動』による筋萎縮予防効果を検討したが、思うほどの成果を得ることができなかった。しかし、次いで行った筋肉電気刺激の pilot study の結果から、『下肢筋肉に対する電気刺激』で十分に筋萎縮を予防できるという手ごたえを我々は得た。現時点ではまだ2例(4肢)だけであるが、1日わずか1時間の電気刺激を加えるだけで5週間(第7病日から第42病日)もの長期間にわたって下肢総ての筋肉で4%以内の萎縮に留めることに成功した研究結果は、『この方法を用いて早期から計画的にリハビリテーションを施行すれば、意識障害患者の下肢廃用性萎縮を十分に予防できる』との確信を我々に抱かせるのに十分な結

果であった。

意識障害患者の下肢廃用性萎縮に関する研究は患者のQOL向上に直結するので、行政的意義は非常に大きい。我々が用いている機器は、消費者団体によって安全性も確立されており、小型軽量(約 180g)で使いやすい上に、比較的安価(1台5~6万円)で購入できる。この研究に成功すれば、患者家族が自宅の『ベッドサイド』で、『比較的安価な装置』を用いて、『簡便な方法』で、下肢の廃用性萎縮を予防する事が可能となり、下肢の筋力維持に関しては急性期から家庭まで一貫したリハビリテーションを行うことが可能となる。我々の研究成果の一部が、2005年3月25日の朝日新聞朝刊(全国版)(図18)やアサヒ・コム(インターネット版朝日新聞)に、『電気刺激によって下肢筋肉の萎縮が予防できる』という記事で掲載されるや、同日から現在に至るも全国の患者家族や関係者から研究結果に対する問い合わせや個別の相談が殺到しており、下肢の廃用性萎縮の問題に対しても人々の関心がいかに高く、かつ深刻かを示している。

また、意識障害患者の下肢廃用性萎縮に関する研究結果には筋萎縮性側索硬化症(ALS)の患者も注目しており、2005年3月25日の朝日新聞朝刊に我々の研究結果が掲載されて依頼、個別の相談が多数寄せられている。現在継続使用している複数の患者からは、ALSに対しても電氣的筋肉刺激は有効ではないかという意見が寄せられている。

意識回復の予知に関しては、本研究によって Hybrid PET を用いた定量的局所脳ブドウ糖消費量測定が可能であることを明らかにすることができたので、頭部外傷後