

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19592090  
 研究課題名（和文）  
 ニューロプロテオミクスによる重症脳障害の病態解析と脳蘇生法の開発に関する研究  
 研究課題名（英文）  
 A study of pathophysiology and therapeutic strategy of severe brain injury with neuroproteomics  
 研究代表者  
 黒田 泰弘（KURODA YASUHIRO）  
 香川大学・医学部附属病院・准教授  
 研究者番号：80234615

## 研究成果の概要：

重症頭部外傷例においては、脳マイクロダイアリスパラメータと神経学的転帰に一定の関係はなかった。lactate/pyruvate比は、高値またはその変動が大きい症例では転帰不良の傾向がある。脳挫傷近傍でlactate/pyruvate比が高値を示す部位は、後に梗塞域となる可能性がある。重症頭部外傷では病変が局在するので複数部位モニタリングによる検討が必要である。

心停止後症候群でglycerol高値（200 $\mu$ M以上）の持続は神経学的転帰不良と関係する。これは蘇生後昏睡状態でもglycerol初期値が低値であれば予後良好である可能性を示唆し、心停止後集中治療におけるMDモニタリングの有用性を示した。一方glutamate, lactate/pyruvate比, glucose, 8-OHdG（酸化ストレスマーカー）は、神経学的転帰による相違は明らかではなかった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：脳循環代謝、脳蘇生

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：重症頭部外傷、心停止後症候群、マイクロダイアリス、glycerol、glutamate、lactate/pyruvate比、8-OHdG

## 1. 研究開始当初の背景

脳マイクロダイアリス（microdialysis: MD）法は、脳内局代謝動態の real time モニタリングである。

われわれは重症脳障害患者において脳 MD 法を用いて脳細胞外液の glycerol および glutamate 濃度のモニタリングを行い、これ

らが重症例において増加し、この増加の程度が治療内容（脳低温療法の継続期間など）の参考となることを報告している。

## 2. 研究の目的

重症脳障害患者を対象に、MD法による各種パラメータの意義をさらに追求する。さらに、

MDによって得られた脳細胞外液のプロテオミクスにより、神経学的転帰を予測でき、治療判断を行えるタンパク質を探索する。

MD法では通常カットオフ値20,000 Daltonのプロープを使用する。カットオフ値20,000 DaltonのMDプロープでも、回収率は低下するが分子量180,000 Dalton程度の蛋白は通過できる可能性がある。大孔径プロープ（カットオフ値300,000 Dalton）を使用して、タンパク質濃度をモニタリングし採取した脳細胞外液のプロテオミクスを行うことも考慮する。

本研究では、重症脳障害の病態に関連しているタンパク質の検討から、脳障害時の細胞障害の機序と治療に伴う細胞代謝障害の評価を行う。

### 3. 研究の方法

患者家族よりインフォームドコンセントを得ており、処置についても病院倫理委員会の承認を受けている。平成19年度及び20年度は同じプロトコールで実施した。

重症脳障害（頭部外傷、心停止後脳症）により、救命救急センターで集中治療を行っている患者を対象とする。

MDによる脳細胞外液のサンプリングは、プロープ挿入自体による脳障害、およびそれに起因する発現タンパクの混入の影響を避けるため、挿入後18時間以後から4時間毎に行う。ただし、glutamate, glycerol, lactate, pyruvate, lactate/pyruvate (L/P) 比、glucoseのモニタリングは、プロープ挿入1時間後より行う。さらにMDサンプル中の8-OHdG（酸化ストレスマーカー）濃度をELISA法で測定する。

### プロテオミクス

サンプルはcell debrisなどの障害物を除くために遠心後、2 Dタンパク分離、MS/MSタンパク同定法によりバイオマーカーを同定定量する。

### 4. 研究成果

重症頭部外傷（traumatic brain injury: TBI）15例（19～75歳、男14例、女1例、Glasgow Coma Scale: GCSスコア3～8）、および心停止（cardiopulmonary arrest: CPA）蘇生後循環動態が安定したにも係わらず昏睡状態が継続した10例（10～76歳、男6例、女4例、GCSスコア3～5）を対象とした。1か月後のGlasgow Outcome Scale: GOSはTBIでは転帰良好（Good Recovery + Moderate Disabled）8例、転帰不良（Severely Disabled

+ Vegetable State + Dead）7例、CPAでは転帰良好7例、不良3例、であった。

TBIのうち頭蓋内出血の7例（急性硬膜外血腫2例、急性硬膜下血腫1例、外傷性脳内血腫4例）では、緊急開頭血腫除去術を施行し、術中にpenumbra領域にMDカテーテルを留置した。TBIのうち広範性損傷の8例（脳挫傷7例、びまん性脳腫脹1例）では穿頭術により右前頭葉にMDプロープを留置した。脳室ドレナージを行った症例はなかった。CPA 10例は広範性の損傷と考えMDプロープを右前頭葉に留置した。

頭蓋内圧（intracranial pressure: ICP）測定プロープはMDプロープの近傍に同時に留置した。MDプロープの先端は脳挫傷部位や血腫内に入っていないことをCTで確認した。MDプロープには酢酸リンゲル液を0.3 μl/minの速度で灌流して、プロープ挿入1時間後から原則として1時間毎に脳細胞外液をサンプリングした。MDパラメータ濃度はenzymatic fluorometric assayで測定した。われわれが使用したプロープの回収率は70%とされ、回収率は経時的に変化するとされている。本研究では回収率を評価していないため、サンプリング液中のパラメータ濃度を脳細胞外液のパラメータ濃度として検討した。MDプロープ挿入およびMDモニタリングに起因すると思われる合併症はみられなかった。

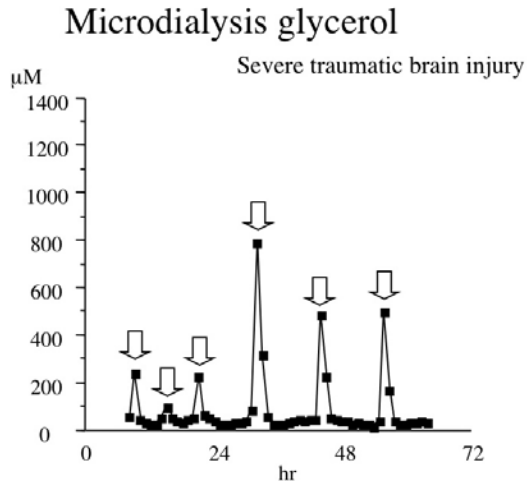
二次性脳障害の予防と治療のために集中治療管理をガイドラインに沿って行った。全例、気管挿管後は鎮静不動化し、Paco<sub>2</sub> 40 mmHg、Pao<sub>2</sub>>100 mmHgを目標に呼吸管理を症例に応じて1～12日行った。ICPを20 mmHg以下にコントロールするために、頭部挙上、薬物（鎮静薬・鎮痛薬・筋弛緩薬）量の調節、浸透圧利尿薬glycerol投与、常温もしくは低体温療法、を組み合わせで行った。血圧は、必要に応じて輸液、輸血、陽性変力薬、血管収縮薬を使用して、脳灌流圧（Cerebral perfusion pressure: CPP）が60 mmHg以上を目標に調節した。低体温療法は、TBIの6例（32～35.5℃、1～11日間持続）、CPAの9例（3日間持続）で行った。

受傷から1ヶ月後の神経学的転帰良好例と不良例それぞれにおいてMDパラメータ値を、受傷（発症）から24時間以内と48～72時間後に分けて比較検討した。値は平均±標準偏差で示した。統計は対応のないt検定を用い、P<0.05を有意とした。

### 結果

glycerolは一過性の著明な増加を繰り返す症例がみられ、これは浸透圧利尿薬

glycerol の投与時期 (↓) と関係した。



以下の検討においてはこの一過性的変動に関係なくすべてを含めて解析した。

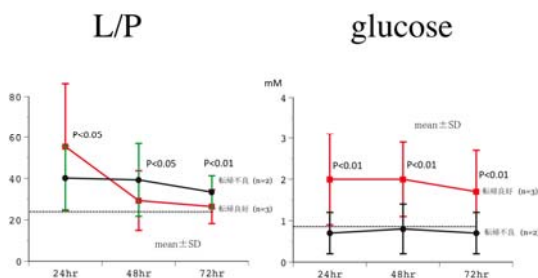
### TBI

15 例のうち 1 例 (びまん性脳腫脹例) は CPP が持続的に維持できず脳ヘルニアとなり、glycerol は著明な高値 (>700 μM) が持続して受傷 17 時間後に死亡した。CPP が維持できた残りの 7 例では、glycerol は受傷後 20~900 μM にわたって幅広く変動した。

受傷から 72 時間後までモニタリングが継続できた転帰良好 3 例、転帰不良 2 例において転帰別にパラメータを検討した。

L/P 比：転帰良好群では、受傷 24 時間後まで 55±31、24~48 時間後まで 29±14 (平均±標準偏差)、48~72 時間後まで 26±8 であり、これらは転帰不良群の値 (それぞれ 40±15、39±18、33±8) に比して受傷 24 時間後までは有意に高値、24 時間以後では有意に低値を示した。

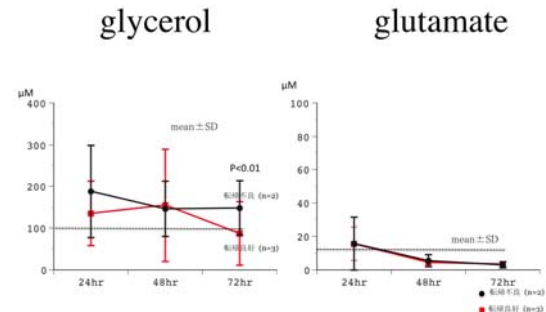
glucose：転帰良好群では、受傷 24 時間後まで 2.0±1.1 mM、24~48 時間後まで 2.0±0.9 mM、48~72 時間後まで 1.7±1.0 mM であり、これらは転帰不良群の値 (それぞれ 0.7±0.5 mM、0.8±0.6 mM、0.7±0.5 mM) に比して有意に高値を示した。



glycerol：転帰良好群では、プローブ挿入から受傷 24 時間後まで 135±77 μM、受傷 48 時間後から 72 時間後まで 87±76 μM であ

り、これらは転帰不良群の値 (それぞれ 188±111 μM、148±66 μM) に比して受傷から 24 時間後までは有意差なかったが、受傷 48~72 時間後では有意に (P<0.01) 低値を示した。

glutamate：転帰による群間差はなかった。



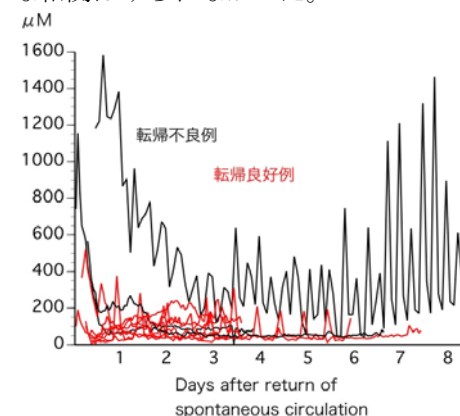
### CPA

CPA 10 例では CPP が原則として維持できた。

Glycerol：心拍再開後の最初の測定値 (心拍再開 4~10 時間後の値) は、転帰不良例では高値となり、とくにうち 2 例においては 1000 μM 以上となった。一方、転帰良好例の glycerol は 400 μM 未満であった。転帰に関わらず glycerol は以後漸減し 72 時間後までに正常値まで戻った。転帰良好例の glycerol は、プローブ挿入から受傷 24 時間後まで 198±144 μM、受傷 48 時間後から 72 時間後まで 49±28 μM であり、これらは転帰不良例の値 (それぞれ 1251±201 μM、328±128 μM) に比して有意に (P<0.01) 低値を示した。

他のパラメータには転帰による明らかな相違はなかった。

MD サンプルはゲル電気泳動で分離し、銀染色でタンパク質あるいはペプチドの検出を繰り返し行ったが特定のバンドは検出できなかった。MD プローブ膜孔が 20,000 Dalton のためペプチド断片も回収できなかったためと思われる。MD サンプルの 8-OHdG (酸化ストレスマーカー) は、転帰との間に明らかな相関はみられなかった。



## 結語

glycerol は脳ヘルニア例では持続的異常高値を示し、これは細胞膜傷害と局所の灌流がないことを間接的に反映すると思われる。glycerol は浸透圧利尿薬 glycerol 投与により変動し、これは glycerol がすみやかに血液脳関門を通過していることを間接的に示す。

TBI では L/P 比および glucose 測定による嫌気性代謝の指標が脳障害の程度を推定できる可能性があるが、さらに検討が必要である。

CPA では転帰不良例において心拍再開 4～10 時間後の glycerol が高値を示す傾向があり、glycerol は転帰を推測できる良い指標である可能性がある。

現在、大孔径 MD プロブの使用による MD プロテオミクスを進行中である。MD は、重症脳障害患者の重症度の判定および低体温療法の施行期間や復温速度の決定に有用な情報を与えるモニタリング方法であることがこの検討でより明確となったので、引き続いてデータを集積していく方針である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① 黒田泰弘、河北賢哉、山下史朗、阿部祐子、山下進、鳥越奈都代、高野耕志郎、中村丈洋、河井信行、田宮隆、長尾省吾重症頭部外傷患者における脳内嫌気性代謝の評価、脳浮腫・頭蓋内圧フォーラム 10、17-19、2008 査読無
- ② Takehiro Nakamura, Yasuhiro Kuroda, N Okabe, S Shibuya, Nobuyuki Kawai, Takashi Tamiya, Guohua Xi, Richard F Keep, Toshifumi Itano, Seigo Nagao. Radial glia marker expression following experimental intracerebral hemorrhage. Acta Neurochir Suppl 105、95-97、2008 査読有
- ③ 黒田泰弘、河北賢哉、阿部祐子、熊谷和美、山下進、山下史朗、中村丈洋、河井信行、田宮隆、長尾省吾、重症頭部外傷および蘇生後脳傷害における脳細胞外液 glycerol、脳浮腫・頭蓋内圧フォーラム 9、27-32、2007 査読無

[学会発表] (計 16 件)

- ① 河井信行、河北賢哉、黒田泰弘、田宮

隆、重症頭部外傷患者における microdialysis を用いた脳代謝の評価、第 32 回日本神経外傷学会。2009 年 4 月 18 日、下関

- ② 河井信行、河北賢哉、黒田泰弘、田宮隆、悪性中大脳動脈梗塞における脳内微小透析法による神経化学モニタリング、第 34 回日本脳卒中学会。2009 年 3 月 20 日、松江
- ③ Yasuhiro Kuroda, Takehiro Nakamura, Kenya Kawakita, Susumu Yamashita, Shiro Yamashita, Yuko Abe, Koshiro Takano, Natsuyo Torigoe, Kazutaka Kirizume, Change in 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) value as a biomarker for oxidative stress in brain extracellular fluid in patients after resuscitated from cardiac arrest. The 2<sup>nd</sup> Japanese-Korean Joint Session of 36<sup>th</sup> Annual Meeting of JAAM. October 14, 2008, Sapporo
- ④ 黒田泰弘、河北賢哉、山下進、山下史朗、阿部祐子、高野耕志郎、鳥越奈都代、河井信行、田宮隆、脳マイクロダイアリシスによる脳評価、シンポジウム、「脳代謝モニタリングの進歩」、第 14 回日本脳代謝モニタリング研究会。2008 年 7 月 5 日、東京
- ⑤ 河井信行、河北賢哉、黒田泰弘、田宮隆、長尾省吾、低体温療法・積極的平温療法施行中の microdialysis を用いた脳代謝の評価、第 11 回日本脳低温療法学会。岐阜。2008 年 7 月 5 日、岐阜
- ⑥ 黒田泰弘、河北賢哉、山下史朗、阿部祐子、山下進、鳥越奈都代、高野耕志郎、中村丈洋、河井信行、田宮隆、長尾省吾、低体温療法復温時の脳局所代謝、シンポジウム、第 11 回日本脳低温療法学会、2008 年 7 月 4 日、岐阜
- ⑦ 黒田泰弘、河北賢哉、山下史朗、阿部祐子、山下進、鳥越奈都代、高野耕志郎、中村丈洋、河井信行、田宮隆、重症頭部外傷患者における脳内嫌気性代謝の評価、脳浮腫・頭蓋内圧フォーラム、2008 年 6 月 21 日、東京
- ⑧ 黒田泰弘、河北賢哉、熊谷和美、阿部祐子、山下進、山下史朗、中村丈洋、河井信行、田宮隆、長尾省吾、重症頭

- 部外傷患者における脳局所 glycerol の意義、第 31 回日本神経外傷学会、2008 年 4 月 26 日、千里
- ⑨ 黒田泰弘、神経集中治療におけるマイクロダイアリスによる脳代謝評価シンポジウム、日本臨床麻酔学会第 27 回大会、2007 年 10 月 26 日、東京
- ⑩ Yasuhiro Kuroda, Susumu Yamashita, Kenya Kawakita, Shiro Yamashita, Yuko Abe, Kazumi Kumagai, Takehiro Nakamura, Nobuyuki Kawai, Takashi Tamiya, Seigo Nagao, Initial increases of brain microdialysate glycerol after resuscitation from cardiac arrest may reflect the neurological outcome. 2<sup>nd</sup> International symposium of brain hypothermia therapy. October 25, 2007, Miami, U. S. A
- ⑪ 中村丈洋、河北賢哉、山下史朗、河井信行、黒田泰弘、板野俊文、田宮隆、長尾省吾、重症頭部外傷に対する低温療法中における血清 8-OHdG モニタリング、第 66 回日本脳神経外科学会総会。2007 年 10 月 4 日。東京
- ⑫ Yasuhiro Kuroda, Kenya Kawakita, Yuko Abe, Kazumi Kumagai, Susumu Yamashita, Shiro Yamashita, Takehiro Nakamura, Nobuyuki Kawai, Takashi Tamiya Seigo Nagao, Initial increases of brain microdialysate glycerol and glutamate after resuscitation from cardiac arrest may reflect to the neurological outcome. 4<sup>th</sup> International conference on clinical microdialysis, 2007 Sep 20, Cambridge, England
- ⑬ 黒田泰弘、山下進、阿部祐子、熊谷和美、河北賢哉、山下史朗、中村丈洋、河井信行、田宮隆、長尾省吾、頭部外傷および蘇生後脳症における脳細胞外液グリセロール、第 10 回日本脳低温療法学会。2007 年 7 月 6 日、下関
- ⑭ 黒田泰弘、阿部祐子、熊谷和美、山下進、河北賢哉、山下史朗、中村丈洋、河井信行、田宮隆、長尾省吾、重症頭部外傷および蘇生後患者におけるマイクロダイアリス法による脳代謝モニタリング、第 13 回日本脳代謝モ

ニタリング研究会。2007 年 6 月 30 日、東京

- ⑮ 黒田泰弘、阿部祐子、熊谷和美、山下進、河北賢哉、山下史朗、中村丈洋、河井信行、田宮隆、長尾省吾、重症頭部外傷および蘇生後脳傷害における脳細胞外液 glycerol、脳浮腫・頭蓋内圧フォーラム、2007 年 6 月 30 日 東京
- ⑯ Yasuhiro Kuroda, Susumu Yamashita, Kazumi Kumagai, Yuko Abe, Kenya Kawakita, Takehiro Nakamura, Nobuyuki Kawai, Nobuhiro Maekawa, Seigo Nagao. CPP, blood glucose, and brain extracellular glutamate and glucose in severe traumatic brain injury. The 23<sup>th</sup> International symposium on cerebral blood flow, metabolism and function, 2007, May 21, Osaka

〔図書〕 (計 3 件)

- ① 黒田泰弘、山下進、前川信博、克誠堂出版、脳障害のバイオマーカー、脳保護・脳蘇生 for Professional Anesthesiologist 2008、99-117
- ② 黒田泰弘、山下進、河北賢哉、内野博之、小谷穰治、頭蓋内圧亢進をとまなう重症頭部外傷の呼吸管理、エキスパートの呼吸管理、中外医学社 2008、379-384
- ③ 黒田泰弘、河北賢哉、山下進、中村丈洋、小谷穰治、内野博之、神経集中治療におけるマイクロダイアリスによる脳代謝評価、日本臨床麻酔学会雑誌 2008、28:4: 552-562

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

黒田 泰弘 (KURODA YASUHIRO)  
香川大学・医学部・教授  
研究者番号：80234615

### (2) 研究分担者

中村 丈洋 (NAKAMURA TAKEHIRO)  
香川大学・医学部・講師  
研究者番号：80419506

山下 進 (YAMASHITA SUSUMU)  
香川大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：40317053

河井 信行 (KAWAI NOBUYUKI)  
香川大学・医学部・講師  
研究者番号：40294756

[2007 年度]

芝崎 太 (SHIBASAKI FUTOSHI)  
東京都医学研究機構臨床総合研究所・部長  
研究者番号：90300954

内野 博之 (UCHINO HIROYUKI)  
東京医科大学・医学部・講師  
研究者番号：60266476

前川 剛 (MAEKAWA TSUYOSHI)  
山口大学・医学部・教授  
研究者番号：60034972

(3) 連携研究者

[2008 年度]

芝崎 太 (SHIBASAKI FUTOSHI)  
東京都医学研究機構臨床総合研究所・部長  
研究者番号：90300954

内野 博之 (UCHINO HIROYUKI)  
東京医科大学・医学部・講師  
研究者番号：60266476

前川 剛 (MAEKAWA TSUYOSHI)  
山口大学・医学部・教授  
研究者番号：60034972