

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870405

研究課題名(和文) 反復性軽度頭部外傷の悪化メカニズムの解明と治療法の検討

研究課題名(英文) Research on the development and treatment after repetitive mild traumatic brain injury

研究代表者

宮内 崇 (MIYAUCHI, Takashi)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40380000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：脳振とうに代表される軽症頭部外傷は、単独では自然に改善するが、繰り返し受傷すると長期的に悪い影響が出る可能性がある。このメカニズムの詳細は分かっていない。この研究では、動物実験によりそのメカニズムを解明することを目的とした。

ラットに、2回の軽症頭部外傷を3時間空けて与え、そのあとに血液、髄液、脳組織を採取してそれぞれを用いて炎症性サイトカインであるIL6を測定した。血液中では1回目のあとに上昇し、その後はあまり上昇がみられなかった。髄液では1回目の外傷ではあまり上昇せず、2回目の外傷で著明に上昇した。脳組織のIL6の発現はIL6のmRNAで評価し、髄液と同様の変化を示していた。

研究成果の概要(英文)：Mild traumatic brain injury (mTBI), known such as concussion, is usually harmless injury. However, repetitive mTBI could cause worse outcome in the long-term clinical course, which mechanism is unknown. The purpose of this study is to assess the mechanism of development after repetitive mTBI by animal experiment. Rats underwent two repetitive mTBIs in 3h interval and blood, cerebrospinal fluid (CSF), and brain tissue was taken in pre-determined time points. Interleukin 6 (IL6), known as an inflammatory cytokine, was measured in each sample. Serum IL6 was increased after the first impact, but was not after the second one. Although IL6 level in CSF was not increased after the first impact, it was remarkably increased after the second one. Interestingly, IL6 presentation in the brain tissue, which was assessed by relative increase of IL6 mRNA, showed similar change to that of CSF.

研究分野：救急、集中治療

キーワード：軽症頭部外傷 脳振とう IL6

1. 研究開始当初の背景

病院の外来を受診する頭部外傷の80%は、軽症のいわゆる脳振とうとよばれるものである。脳振とうは、受傷直後には意識消失、めまい、ふらつきなどの神経症状が出現するが、数分～数時間で消失することを特徴とする。しかし近年、繰り返し軽度頭部外傷を受けた場合に、遅発性に現れる神経症状が注目されている。アメリカではアメリカンフットボールやアイスホッケーなどのコンタクトスポーツで繰り返し軽度頭部外傷を受けていたアスリートに遅発性に起きる精神障害、記憶障害など (chronic traumatic encephalopathy, CTE) が問題になっている。また軍事活動でも反復性軽度頭部外傷は頻繁に発生し、軍事活動から帰還したアメリカ兵が PTSD などの精神、神経症状を呈して、自殺する報告が相次いでいる。特筆すべきは、これらの患者が若い世代に集中していることである。実際にアメリカにおける軽度頭部外傷の救急受診例の70%以上は44歳以下である。だがこれはおそらく氷山の一角である。反復性軽度頭部外傷の後遺症としてのCTEは、その時点では目立った症状を呈さないが、数年から数10年経過して徐々に進行していくため、因果関係がはっきりしないまま処理されていることがある。また、まれではあるが反復性軽度頭部外傷症例の中に、急速に進展して致死的な経過をたどる "second impact syndrome" も報告されている。

アメリカではCDCによって軽度頭部外傷に対する啓蒙と予防を促進するキャンペーン ("Heads Up" campaign) が開始され、それにつれて動物実験などの基礎研究や臨床調査が盛んに行われるようになってきている。しかし現在もなお、反復性軽度頭部外傷と遅発性神経症状との因果関係は不明であり、その予防法や治療法は確立していない。American Academy of Neurology は脳振とうに対する評価と治療に関するガイドラインを提唱しているが、推奨される処置は、安静 (スポーツにおいてはスポーツを中断して休ませる) である。しかしこれも、どの程度休ませるべきか、いつプレーに復帰してよいか、ということの明確な基準はない。

われわれはこれまで、反復性軽度頭部外傷の数時間後にはすでに血管機能傷害と軸索傷害が認められることを報告した。この結果は急性期の変化を示しているが、頭部外傷による炎症反応は長期間にわたって継続しているとも報告されており、急性期に発生した変化が遅発性の神経症状の原因になっている可能性がある。

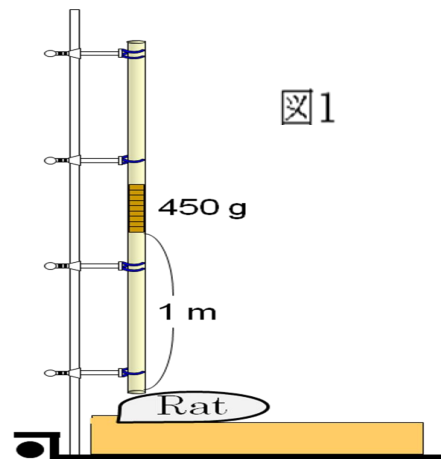
2. 研究の目的

本研究では、ラットの軽症頭部外傷モデル

を用いて臨床に近い状態の軽症頭部外傷を再現し、急性期に起きる全身および脳組織内の変化を調査し、メカニズムを解明することによって治療方針を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 材料と方法：成人の雄ラットを用いる。ラットはあらかじめ pentobarbital によって麻酔した状態にし、各種モニターを装着する。続いて単径部から静脈、動脈ルートを確認する。同時に気管切開を行って人工呼吸管理する。実験期間中は血圧、体温が連続してモニターされ、人工呼吸の設定は間欠的な血液ガス分析の結果によって調整する。経過中の麻酔は経静脈的に投与され、pinch test により麻酔深度を確認しながら行う。頭部外傷は以前の報告と同様に、impact acceleration injury device (図1) を用いる。麻酔した状態で頭部を切開し頭頂骨を露出させた後、金属ディスクを頭部の矢状縫合線上にデンタルアクリルを使って固定する。その後麻酔したラットをスポンジのベッドに腹臥位にさせた状態にして450gの重りを高さ1mからラットの頭上へ落下させる。受傷後はモニターと人工呼吸管理を再開する。反復外傷は同じ手順によって3時間後に行う。以後、あらかじめ決めた時間までモニター管理を行い、最終的にラットを安楽死させる。その後、脳や髄液サンプルを取り出して保存する。



(2) 研究デザイン：sham群、single (単回外傷) 群、double (2回反復外傷) 群に分けて比較検討する。バイタルサイン、血液、髄液中の各種メディエーター、組織中での発現などを調べる。

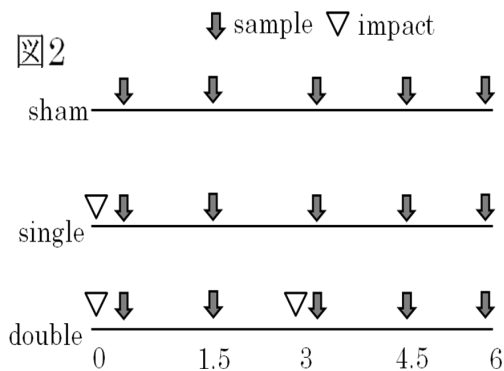
(3) サンプル採取：単回あるいは複数回の頭部外傷の前後で血液サンプルの採取を行う。髄液、脳組織の採取はラットを安楽死させた直後に直ちに行う。脳の組織学的な検討のために一部のラットでは、安楽死させた後に生理食塩水およびホルマリンで灌流し、固定した脳組織を採取した。

(4) 評価項目：増悪に関与すると予想される炎症性メディエーターの測定を行い、候補を

絞る。病態を適切に反映していると考えられるメディエーターについて、脳組織内での mRNA の発現を調べ、血液、髄液中と組織内の発現についてその関連性を検討する。血清、脳脊髄液 (CSF, cerebrospinal fluid) 中のメディエーターの測定は ELISA 法を利用したキットを用いた。mRNA の測定は脳組織全体を用いて RNA の抽出 cDNA の合成、mRNA の合成を市販のキットを用いて行った。

4. 研究成果

軽症頭部外傷後の変化を検討するため、動物を sham、single、double 群に分けた。1 回目の軽症頭部外傷の時間を 0 とし、以後の時間経過に従ってサンプル採取の時間を合わせた (図 2)。



また、髄液、脳組織のサンプルを採取するためには対象動物を安楽死させる必要があるため、それぞれの群で 3 時間後、4.5 時間後および 6 時間後で安楽死させる実験を行った。実験で使用したラットは sham、single、double 群でそれぞれ 11、16、10 頭であった。

血清サンプルの測定はまず、測定項目を決めるため数種類のメディエーターを測定した。時系列で検討し、病勢を反映するものとして IL-6 を検討対象とすることとした。

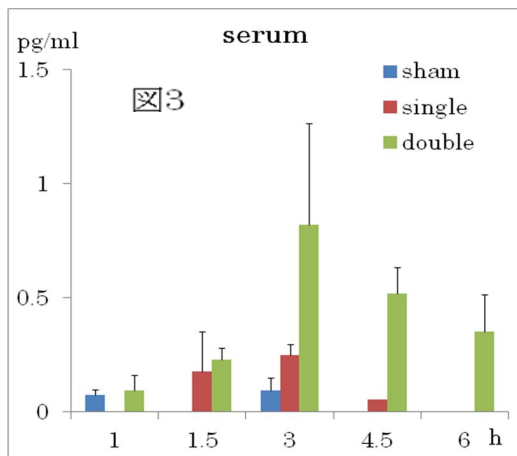


図 3 は各群の IL-6 の測定結果を示している。Sham 群ではほとんど増加せず、single 群では 3 時間後がピークであったがその後は低下し、経過を通じて増加しなかった。一方、double 群では、3 時間後で著明な増加がみら

れ (この時間では 2 回目の impact 後 1h 以内にサンプル採取している) 以後漸減していることが分かった。

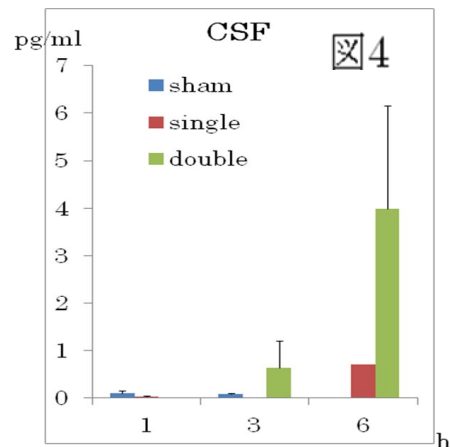
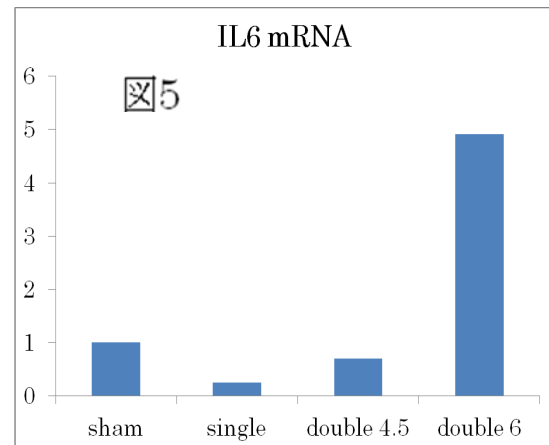


図 4 は CSF 中の IL-6 の測定結果を示す。Sham 群では IL-6 の増加はほとんど認められず、single 群では初回の impact から 6 時間後にわずかに上昇が認められた。double 群では 3 時間目にわずかに上昇し、6 時間後に著明に上昇していた。



次に、脳組織内での IL-6 の発現を調べた。図 5 は sham 群、single 群の実験終了後、double 群で最初の impact から 4.5 時間後 (double 4.5) double 群で最初の impact から 6 時間後 (double 6) に摘出した脳組織で測定した mRNA の発現量を示している。各群の値は、Sham 群を 1 とした場合の相対的な発現量である。Single 群や double 4.5 群では増加は認めないが、double 6 群で約 5 倍の発現量の増加が認められた。

血清における IL-6 の推移は、全身における炎症反応の惹起を示している。単回の軽症頭部外傷では IL-6 は軽度の上昇にとどまっているが、2 回目を加えた後に著明に上昇している。われわれは先行研究において、軽症頭部外傷を繰り返すことで局所の相乗的な増悪を示すことを示したが、今回の結果は全身でも同様の影響が出ることを示している。一方で CSF の結果は 6 時間後がピークとなり、

血清の結果との相違がみられた。この結果は外傷部位である脳からの情報によって全身の IL-6 が増加しているという機序に否定的である。それぞれは別の調節系がかかわっている可能性がある。mRNA の測定でも発現量が増加するのは 6 時間後の検体であり、CSF の結果と一致する。今回の研究では、IL-6 を産生する部位や治療介入についての検討ができなかったが、メディエーターのうち HMGB-1 は IL-6 と同様の変動を示していた。HMGB-1 はマイクログリアでの受動的あるいは能動的な放出が考えられており、マイクログリア、HMGB-1、IL-6 の関連性に関する研究を継続していく価値はある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

なし

〔学会発表〕(計 1 件)

宮内 崇, 軽傷頭部外傷の対応, 管理と病態生理, 第 44 回日本集中治療医学会学術集会, 2017 年 3 月 9-11 日, ロイトン札幌 (北海道・札幌市)

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

なし

取得状況 (計 0 件)

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮内 崇 (MIYAUCHI, Takashi)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 40380000