

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月27日現在

機関番号： 15501

研究種目： 基盤研究(B)

研究期間： 2010~2012

課題番号： 22390276

研究課題名（和文） 難治性てんかんの局所脳温制御による治療とその応用

研究課題名（英文） Application of focal brain cooling for intractable epilepsy

研究代表者

鈴木 倫保 (SUZUKI MICHIIYASU)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号： 80196873

研究成果の概要（和文）：

難治性てんかんに対する局所脳冷却療法の安全性を検証した。ラットのてんかんモデルに脳冷却を行った。発作が抑制され、神経機能が維持された温度は15℃であった。てんかん患者の術中に脳冷却を行った。冷却前には高値だったグルタミン酸と乳酸が、15℃冷却によって低下した。神経細胞の興奮が抑制され、嫌気性代謝が軽減されたことが示された。新規に作成した冷却デバイスはネコ、サルに使用可能になった。

研究成果の概要（英文）：

Safeness of focal brain cooling (FBC) for intractable epilepsy was verified. A rat epilepsy model was treated by the FBC. The optimal temperature to interrupt seizure without deteriorating neuronal function was 15 °C. The FBC was applied at epilepsy surgery in human. Increased levels of glutamate and lactate reduced at 15 °C. The FBC effectively inhibit neuronal excitotoxicity and anaerobic metabolism. Newly developed cooling device was successfully applied to cats and monkeys.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2011年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2012年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学、脳神経外科学

キーワード： epilepsy, focal brain cooling

1. 研究開始当初の背景

てんかんは、脳細胞のネットワークにおきる異常な神経活動が原因で、意識障害や異常行動の発作が繰り返して起こる疾患である。てんかん患者は人口のおよそ1%存在し、うち30%は薬物治療で効果のない「難治性てん

かん」である。現在行われている外科治療は脳の一部を切除するもので、重要な脳機能を持つ部位では切除できない。このような背景から、我々は脳皮質局所冷却による新規低侵襲てんかん治療機器開発を目指してきた。

本研究課題開始前までに、てんかん性放電

およびてんかん発作が脳冷却によって抑制されることを示していた。次の課題として、冷却療法が脳に与える影響を測定すること、安全性を検証することが挙げられた。脳冷却はてんかん放電を抑制するが、同時にシナプス伝達も抑制する。動物を用いた過去の研究ではネコの視機能あるいは聴覚機能が抑制された、サルの運動機能が抑制された、等の報告がある。一方肯定的な研究結果としては、大脳皮質を4℃の生理食塩水で冷却しても運動誘発電位が低下しなかった報告や、海馬スライスを用いた冷却で、てんかん性放電が抑制されたが正常のシナプス伝達は抑制されなかったという報告がある。

冷却が分子レベルで神経に与える影響の詳細は分かっていない。てんかん発作と異常脳波を止めるためには、冷却と復温は繰り返し行わなければならない。冷却が脳の活動と恒常性維持に与える影響を与えているのか、不利な状況である影響が表面化しない程に存在するのか、の差は、長期的治療が可能か否かに関係する。これの鍵となる因子の一つは興奮性神経伝達物質の Glutamate (Glu) である。Glu はてんかんの起始、伝播、持続に深く関係しており、発作時の細胞外 Glu 濃度上昇が確認されている。神経外傷や脳虚血でも Glu は上昇しており、これが33℃の全身低体温療法中には減少することも知られている。したがって、てんかんの局所冷却でも上昇した Glu の低下は予想される。

てんかん発作時は、相対的脳虚血であると言われている。すなわち脳代謝が亢進し、脳血流はそれに対応できるほどには増加しないというものである。脳のエネルギー源は Glucose (Glc) であるから、Glc とその代謝物である pyruvate (Pyr) および lactate (Lac) の濃度比から、てんかん患者の循環・代謝、および冷却時のその変動を見ることができ

る。器材の開発に関しては、主に冷却デバイスの改良に重点を置き、効率的な冷却方法と、頭蓋内に埋め込む器材の形状・手法を決めることが課題であった。

2. 研究の目的

局所冷却治療を安全かつ有効に行うために、(1)冷却が神経機能に及ぼす影響を行動解析によって測定する、(2)冷却が神経細胞に及ぼす影響を分子生物学的に検証する、(3)冷却デバイスを改良する、ことを目的とする。

(1) 神経機能への影響の解析

冷却による神経機能の変化を覚醒状態の動物で確認する。冷却デバイスを設置した動物にてんかんを発生させる。大脳感覚運動皮質 (sensorimotor area, SI-MI) を冷却する。冷却前、中、後とも個体は自由行動下に管理

し、各種の行動学的解析による神経機能の評価を行う。これによっててんかん発作が止まる温度と、神経機能が低下しない温度を知ることができる。

(2) 分子への影響の解析

開頭手術 (てんかん症例の焦点切除術) 中に脳局所冷却を行い脳温の違いによる脳液、脳血流、糖代謝、興奮性アミノ酸を測定する。これは同時に、てんかん病態と正常との差もみることになる。

(3) デバイス改良

臨床応用を目指すため、ネコ・サルへの埋め込みデバイスを作成することで、冷却効果と埋め込み手術、術後管理の安全性と利便性を検証する。

3. 研究の方法

(1) 神経機能への影響の解析

雄 wistar rat を用い、皮質にペニシリン G を注入して痙攣発作を発生させた。3 分間に前肢を不随意拳上させる動作の数を痙攣の回数として測定した。

当科で作成したペルチェ冷却デバイス (PID-controlled thermoelectric chip (6.0 x 6.0 mm, maximum current: 1.8 A, maximum voltage: 2.5 V, maximum power: 2.4 W; Ferrotec Corp., Japan) を使用した。これを SI-MI 皮質上に留置し、温度計、脳波電極とともに頭蓋に固定した。20℃、15℃、10℃に冷却した。冷却は痙攣発作を誘発したラットと非けいれんラットの両方で行った。

21 ポイント神経スケールを神経症状の指標として測定した。これは 10 の項目からなる運動機能測定法で、げっ歯類で標準的に用いられる方法である。前肢の運動機能測定には foot-fault test を、感覚機能は receptive field (RF) size の測定で評価した。

本実験は山口大学倫理委員会の承認を得て行った。

(2) 分子への影響の解析

難治性てんかん患者 9 名を対象とした。全例に頭蓋内電極留置を行い、焦点を同定した。側頭葉外てんかんには焦点切除を、側頭葉てんかんには側頭葉および海馬切除を行った。

焦点切除、海馬切除に先立ち、同部位に当科で作成したペルチェ冷却デバイス (PID-controlled thermoelectric chip (皮質用には 29.8 x 29.8 mm, maximum current: 4.0 A, maximum voltage: 9.8 V, maximum power: 21 W, 海馬用には 10 x 10 mm, maximum current: 0.8 A, maximum voltage: 8.8 V, maximum power: 4.2 W, いずれも Ferrotec Corp., Japan) を置いて 15℃、30 分の冷却を行った。

冷却の 30 分前から冷却終了の 30 分後まで、冷却直下の皮質脳波と脳血流測定を行った。

脳波は Spectrum analysis を行い、power で表現した。同部位にマイクロダイアリスプローブを挿入し、リンゲル液を 0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$ で灌流した。冷却前、中、後にサンプリングした。神経細胞興奮の指標として Glu を、糖代謝の指標として Glc, Pyr, Lac を、細胞組織崩壊の指標として Glycerol 濃度を測定した。

本研究は山口大学倫理委員会の承認と患者および家族の承諾を得て行った。

(3) デバイス改良

冷却デバイスとして冷却水還流型のチタン製パッドを動物の脳表に併せた形状で試作し、ネコ・サルに対して脳表冷却デバイスを慢性的に留置し、冷却効果の確認と、長期に渡る効果を調べた。

本研究は山口大学動物使用委員会の承認を得て、同施設の実験手引きを遵守して行った。

4. 研究成果

(1) 神経機能への影響の解析

ペニシリンGによって痙攣発作が誘発された。発作は 20°C の冷却で有意に抑制された。各温度における発作回数(非冷却を 100% として)と非冷却群との有意差は 20°C (48.7%, $p < 0.0001$), 15°C (11.8%, $p < 0.0001$), 10°C (0%, $p < 0.0001$) であった (図 1A)。

発作が抑制されるとともに 21 ポイント神経スケールで測定した神経機能は改善した。非冷却時には 15.6 ± 0.43 ポイントであったスコアが 20°C では 18.33 ± 0.21

($p = 0.027$) に、15°C では 19.5 ± 0.22 ($p = 0.029$) にまで改善した。ところが 10°C に冷却したときは 15.93 ± 0.21 にとどまり、有意な改善はなかった ($p = 0.979$) (図 1B)。

非けいれんラットを用いた冷却の影響を 21 ポイントスコアで見ると、15°C 冷却までは機能が保持され、10°C で有意に低下した (図 2A)。foot-fault test でのエラー率は 15°C から悪化が見られ、10°C では大きく悪化した (図 2B)。RF size 測定では 15°C から低下し、10°C で大きく低下した (図 2C)。

以上より、痙攣発作をほぼ停止させるに有効な局所脳冷却温度は 15°C であり、それによる神経機能の低下はわずかである、と判明した。

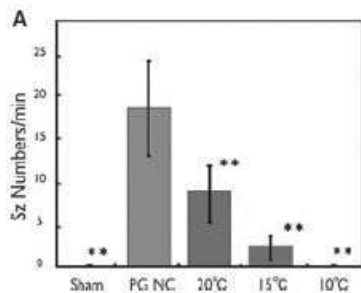


図 1A

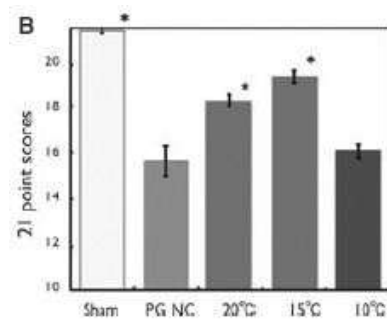


図 1B

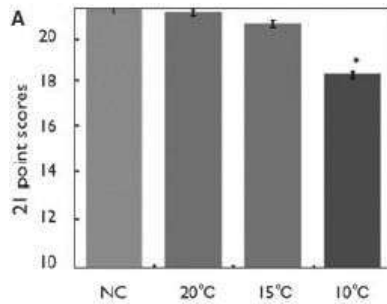


図 2A

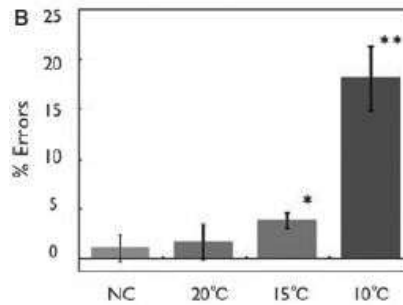


図 2B. foot-fault test

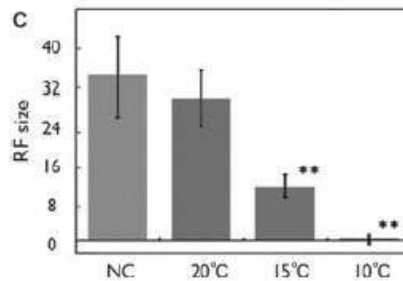


図 2C

(2) 分子への影響の解析

全身麻酔中でもてんかん焦点には頻回のスパイクが検出された。これは 15°C に冷却することで有意に抑制され、冷却終了後には再度増加した (図 3A)。

冷却によって脳血流は低下し、冷却終了後再度増加した (図 3B)。

冷却前の細胞外 Glu 濃度は高く、 $45.5 \pm 25.9 \mu\text{mol}/\text{L}$ であった。冷却中は $23.3 \pm 18.3 \mu\text{mol}/\text{L}$ に低下し ($p = 0.025$)、冷却後もこの低下は維持された ($19.3 \pm 19.3 \mu\text{mol}/\text{L}$) (図 4A)。

Glc 濃度と Pyr 濃度は冷却前、中、後を通じて一定していた。Lac 濃度は冷却前には高く ($4.88 \pm 2.37 \text{mmol}/\text{L}$)、冷却中に有意に

低下し (3.84 ± 2.39 mmol/L, $p = 0.005$)、冷却後も維持された (3.73 ± 2.07 mmol/L; $p = 0.003$) (図 4B)。

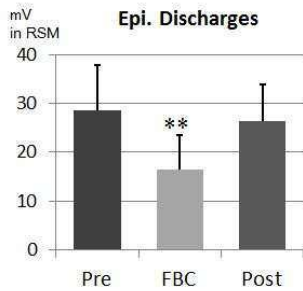


図 3A

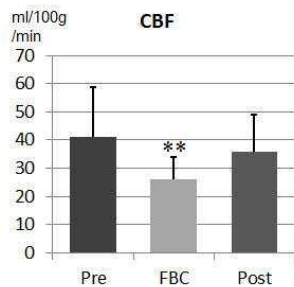


図 3B

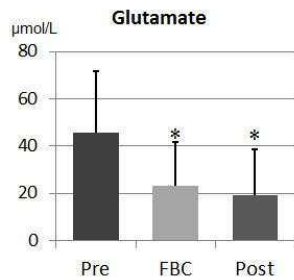


図 4A

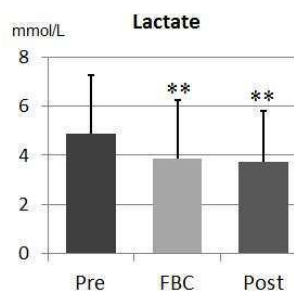


図 4B

Glycerol 濃度は冷却によって有意に低下した (134.5 から $95.7 \mu\text{mol/L}$, $p = 0.028$)。手術後は 9 名中 7 名で発作が消失、1 名は有意な発作減少があり、1 名は不変であった。てんかん焦点では神経細胞の興奮が持続的に起こっており、この結果 Glu が放出され、高い Glu が発作波の原因にもなっていると推測された。持続的神経興奮は局所のエネルギー不足を招き、脳血流が維持されていても嫌

気性代謝に依存した状態であることも判明した。15°Cの局所脳冷却は Glu を低下させ、嫌気性代謝も低下させた。脳保護性は Glycerol の値の変化からも証明された。脳血流が低下したのはエネルギー需要が小さくなったためであり、虚血状態になったものではないと考えられた。以上より、15°Cの局所脳冷却は発作を抑制するだけでなく、脳組織に良い影響を及ぼす治療であることが分かった。

(3) デバイス改良

チタン製の冷却パッドを頭蓋骨と置換できる形状とすることで、脳に対する損傷を起こさず、かつ脳表に対する良好な埋め込みを可能にするデバイスを試作した。また、ネコ・サルに対する慢性留置に成功し 3 ヶ月以上安定した冷却効果を確認した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Imoto H, Fujii M (2 番目), Nomura S (7 番目), Suzuki M (8 番目), 他 4 名. Insular psammomatous meningioma presenting intractable complex partial seizures. No Shinkei Geka. 2012, 40(9):799-804. 査読有
- ② Kida H, Fujii M (2 番目), Nomura S (6 番目), Suzuki M (11 番目), 他 7 名. Focal brain cooling terminates the faster frequency components of epileptic discharges induced by penicillin G in anesthetized rats. Clin Neurophysiol. 2012, 123(9):1708-13. 査読有
- ③ Fujii M (1 番目), Nomura S (3 番目), Owada Y (8 番目), Suzuki M (14 番目), 他 10 名. Cooling of the epileptic focus suppresses seizures with minimal influence on neurologic functions. Epilepsia. 2012, 53(3):485-93. 査読有
- ④ Maruta Y, Fujii M (2 番目), Nomura S (4 番目), Suzuki M (16 番目), 他 12 名. Intra-operative monitoring of lower extremity motor-evoked potentials by direct cortical stimulation. Clin Neurophysiol. 2012, 123(6):1248-54. 査読有
- ⑤ Suehiro E, Nomura S (4 番目), Fujii M (6 番目), Suzuki M (7 番目), 他 3 名. Significance of differences between brain temperature and core temperature (ΔT) during mild hypothermia in patients with diffuse axonal injury. Neurol Med Chir (Tokyo). 2011, 51(8):551-5. 査読有

- ⑥ Fujii M (1 番目), Nomura S (7 番目), Suzuki M (12 番目), 他 9 名.
Application of focal cerebral cooling for the treatment of intractable epilepsy. Neurol Med Chir (Tokyo). 2010, 50(9):839-44. 査読有
- ⑦ Fujioka H, Fujii M (2 番目), Nomura S (5 番目), Suzuki M (8 番目), 他 4 名.
An implantable, focal brain cooling device suppresses nociceptive pain in rats. Neurosci Res. 2010, 66(4):402-5. 査読有
- ⑧ Fujioka H, Fujii M (3 番目), Nomura S (6 番目), Suzuki M (9 番目), 他 5 名.
Epileptiform discharges and neuronal plasticity in the acute peri-infarct cortex of rats. Neurol Res. 2010, 32(6):666-9. 査読有

[学会発表] (計 54 件)

- ① He Y, Suzuki M, et al. Local Brain Hypothermia Suppresses Perifocal Epileptiform Discharges Induced By Focal Cerebral Ischemia In Rats. 66th Annual Meeting and 4th Biennial North American Epilepsy Congress. 2012. 11. 30-12. 4, San Diego, USA
- ② Inoue T, Suzuki M, et al. Challenges and Opportunities for Development of a Focal Cooling Device for Intractable Epilepsy. KEC 2012. 2012. 6. 7-9, Seoul, Korea
- ③ Fujii M, et al. Cooling of the epileptic focus suppresses seizures with minimal influence on neurological functions. 65th AES. 2011. 12. 2-6, Baltimore, USA
- ④ Inoue T, Suzuki M, et al. Development of a Focal Cerebral Cooling System for the Treatment of Intractable Epilepsy. IEEE SMC. 2011. 10. 9-12, Alaska Anchorage, USA
- ⑤ Fujii M, et al. Alternative treatment of intractable epilepsy with focal brain cooling -A review of our past studies. IEEE SMC. 2011. 10. 9-12, Alaska Anchorage, USA
- ⑥ Kida H, Suzuki M, et al. The effect of focal brain cooling on epileptic discharges in rats Frequency analysis electroencephalogram. IEEE SMC. 2011. 10. 9-12, Alaska Anchorage, USA
- ⑦ Yamakawa T, Suzuki M, et al. Minimally-invasive ECoG recording using the novel subdural electrodes manipulated by a shape memory alloy guidewire. 29th IEC. 2011. 8. 28-9. 1,

- Rome, Italy
 - ⑧ Inoue T, Suzuki M, et al. Inhibitory effects of focal brain cooling for motor cortical seizures in cats and nonhuman primates. 29th IEC, 2011. 8. 28-9. 1, Rome, Italy
 - ⑨ Fujii M, et al. Alternative treatment of intractable epilepsy with focal brain cooling. 29th IEC. 2011. 8. 28-9. 1, Rome, Italy
 - ⑩ Fujii M, et al. Alternative treatment of intractable epilepsy with focal brain cooling -A review of our past studies-. The 8th AASSFN. 2011. 6. 16-18, Jeju, Korea
 - ⑪ Fujii M, et al. Application of focal brain cooling for the treatment of intractable epilepsy. 2nd Annual Congress of Neuro Talk. 2011. 5. 22-25, Dalian, China
 - ⑫ Fujii M, Application of focal cerebral cooling for the treatment of intractable epilepsy: An overview of past studies. 64th AES. 2010. 12. 3-7, San Antonio, USA
 - ⑬ Fujioka H, Suzuki M, et al. An implantable, focal brain cooling device for epilepsy therapy: An animal and clinical investigation. 29th ICCN. 2010. 10. 28-11. 1, Kobe Convention Center, Kobe
 - ⑭ Fujioka H, Suzuki M, et al. Coupling of cerebral blood flow and metabolism during focal hypothermia. 8th Asian & Oceanian Epilepsy Congress. 2010. 10. 21-24, Melbourne, Australia
 - ⑮ Fujii M, et al. Effect of Focal Brain Cooling On Epileptiform Discharges in Rat. WAC. 2010. 9. 19-22, Kobe Convention Center, Kobe
 - ⑯ Fujioka H, Suzuki M, et al. Focal Brain Cooling for the Treatment of Epilepsy: Laboratory and Clinical Investigation. WAC. 2010. 9. 19-22, Kobe Convention Center, Kobe
- 他 38 件

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 大脳局所冷却プローブ及び脳機能マッピング装置

発明者: 鈴木倫保、藤井正美、野村貞宏

権利者: 山口大学

種類: 国際特許

番号: PCT/JP2011/57424

出願年月日: 平成 23 年 3 月 25 日

国内外の別：国外（USA）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 倫保 (SUZUKI MICHIIYASU)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：80196873

(2) 研究分担者

大和田 祐二 (OWADA YUJI)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20292211

藤井 正美 (FUJII MASAMI)
山口大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：90181320

野村 貞宏 (NOMURA SADAHIRO)
山口大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：20343296