

平成 21 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390388
 研究課題名（和文） 頭蓋内埋め込み式衝撃波治療装置を用いた脳内ドラッグデリバリーシステムの開発
 研究課題名（英文） Enhancement of drug induction into brain parenchyma using shock wave delivery system
 研究代表者
 富永 悌二 (TOMINAGA TEIJI)
 東北大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：00217548

研究成果の概要：

衝撃波損傷ラットモデルでは 10-15 MPa 以上で照射側に脳内出血・壊死が認められた。その周囲では脳梁を介して反対側におよぶ広範囲で色素漏出と matrix metalloproteinase 発現増加が認められ、血管透過性亢進を示唆する所見と考えられた。対側には神経細胞の紡錘化を認め、頭蓋模擬モデル実験から頭蓋骨に反射した反射波とキャビテーションの発生が部位特有の損傷に関与するものと考えられた。グリオーマ細胞株への照射により種々の薬剤のうち、ブレオマイシンのみが照射回数依存的に細胞増殖能抑制効果を示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
2007 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：医療工学 高エネルギー外傷 対側損傷 低侵襲外科 頭部外傷モデル

1. 研究開始当初の背景

1990 年代より衝撃波を臓器損傷閾値以下で照射し、一過性に血管透過性を変化させ、局所的に化学療法剤の組織移行性を高める試みが多数報告されてきた。特に体表近傍の腫瘍内に対する薬剤導入に関しては動物実験レベルにおいては方法論が確立されつつあり、有用性も報告され、非侵襲的なドラッグデリバリー法として期待されている。われわれもその効果にいち早く注目し、1996 年には胃がん細胞に対して市販の体外衝撃波発生装置を使用し、in vitro・in vivo とともにブレオマイシンの薬剤導入効率の増加を報告した。この試みを脳神経外科領域に発展さ

せる構想は頭蓋近傍において適切、かつ安全に使用できる衝撃波装置が開発できなかった点、周囲組織に対する衝撃波の伝播動態が解明できなかった点、周囲脳神経組織の保護方法が開発できなかった点が障壁となっていた。先行研究において上記問題点に関する基礎的知見が得られたこと、現在脳神経外科領域では血液脳関門が障壁となり化学療法剤の選択、効果に限界があることから新たなアプローチとして衝撃波による血液脳関門の modulation を介したドラッグデリバリーシステムの開発を提案した。

2. 研究の目的

本研究の目的は脳腫瘍摘出術中および脳腫瘍摘出後の照射腔周囲に衝撃波を用いた薬剤導入システムを開発し、脳腫瘍治療において低侵襲、効率的かつ効果的な局所制御方法に関する基礎知見を得ることである。その目的の実現にあたり、本研究期間内において、1). 脳腫瘍細胞に対する衝撃波照射後の薬剤導入増強効果を検証、2). 脳表近傍において衝撃波を照射した際の衝撃波動態を検証、3). 脳表近傍で使用可能なマイクロサイズの衝撃波治療装置の開発を医学的、工学的アプローチをあわせて行う。

3. 研究の方法

上記目的を実現するために、当初目標の応用形も含めて以下5項目の研究を設定した。

(1) 衝撃波照射が脳神経組織に与える影響に関する検討

① 工学的検討

- ・ 頭蓋模擬モデルにおける検討: 音響インピーダンスの観点から頭蓋骨はアクリル円筒、硬膜はセロファン、髄液は生理食塩水、脳は10%ゼラチン使用
- ・ 解析簡略化のため開頭モデルを使用。
- ・ 可視化/圧測定

② 医学的検討

- ・ 衝撃波による圧損傷閾値の同定と衝撃波特有の損傷所見の解明
- ・ 8週令雄性SDラットに骨窓を作成
- ・ アジ化銀ペレットをNd: YAGレーザーにて発火。検証可能な衝撃波(過剰圧 1 / 10/15/20 MPa)を単発照射。
- ・ 照射後4、24、72時間で灌流固定して摘出した脳標本をHE染色で評価

(2) 衝撃波による脳損傷の特徴と損傷機序に関する検討

① ラット衝撃波損傷モデルを用いた検討

- ・ アポトーシスの関与: 上記と同様のプロトコルで採取した標本に対してTUNEL染色。損傷細胞を同定するためにNeuN(神経細胞マーカー)、GFAP(グリア細胞マーカー)、CNPase(稀突起細胞マーカー)によるTUNEL染色との二重染色。
- ・ 衝撃波/キャビテーションの関与: 衝撃波による損傷は通常の外傷モデルと異なり、波の伝播動態に起因する特有な損傷の存在が予想される(入射側と反対側の脳-頭蓋骨界面の損傷など)。脳全体を組織学的に検索。

② 模擬頭蓋モデルによる損傷機序の検討

① 可視化 / 圧測定

- ・ 上記 II A) ②を模擬モデルで検討。

(3) 頭蓋内照射用衝撃波発生装置の試作

① 試作

- ・ アジ化銀起爆を用いた微小衝撃波発生装置を試作

② 特性評価

- ・ 可視化、圧測定

(4) 衝撃波が血液脳関門に与える影響

① ラット衝撃波損傷モデルを用いた検討

- ・ 血管外漏出の評価: 衝撃波照射後 1/4/24/72 時間後にエバンスブルーを注入。組織学的に漏出評価。
- ・ 血管外マトリックスの関与: 衝撃波照射後 4/24/72時間後に脳標本を摘出。MMP 2/9発現量を評価

(5) 衝撃波照射によるグリオーマ細胞株の薬剤感受性変化の評価

① In vitroでの検討

- ・ BLM溶液 (0.001、0.01、0.1、1、10、100 μ g/ml) 内に脳腫瘍細胞株 (CCF-STTG1、A172) を注入後、衝撃波照射 (推定過剰圧: 5 MPa) 3000発照射を行い、細胞増殖抑制効果を評価。
- ・ ACNU、MTX、5 FUにおいても同様に検討。

② In vivoでの検討

- ・ グリオーマ細胞株を移植したラットモデルを作成。薬剤投与後一定時間後に衝撃波を開頭後の状態で照射。1、4、7、14 日後の生存率、腫瘍体積を評価。

4. 研究成果

(1) 衝撃波照射が脳神経組織に与える影響に関する検討

② 工学的検討 (Okuyama H, et al. J Neurotrauma under submission)

- ・ 頭蓋模擬モデルにおける検討: 可視化 (高速度撮影): 衝撃波入射側では髄液相から脳での界面移行部で明らかな変化は認められず。入射反対側では頭蓋骨との境界面から反射衝撃波、膨張波とそれに引き続いてキャビテーションの発生が認められた (図1)。

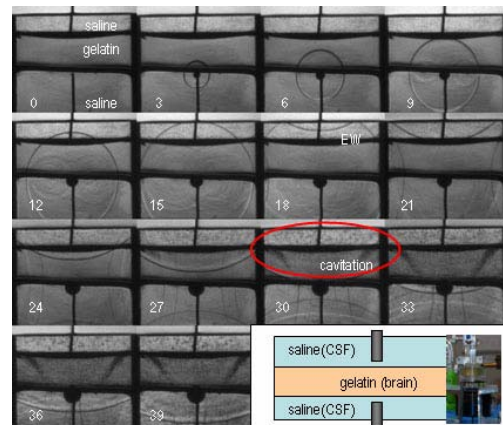


図 1. 頭蓋模擬モデル 頭蓋骨-脳界面で反射波、膨張波の干渉、キャビテーションの発生が認められた。

- ・ 圧測定: 複数点で圧測定を行ったところ、頭蓋骨-脳・髄液界面よりも脳側に反射

波と膨張波の干渉による考えられる圧のピークが認められた(図2)。

- 本モデルのlimitationとしては入射側に衝撃波の伝播動態を複雑化すると思われる頭蓋骨を消去している点である。今後は頭蓋骨のある状態での伝播動態解析を行っている。

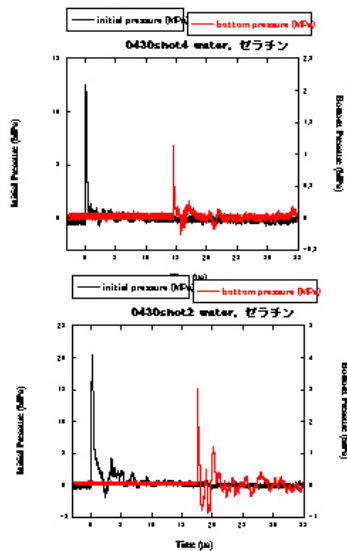


図 2. 頭蓋骨-脳界面からの距離による伝播動態の相違

② 医学的検討

- 衝撃波による圧損傷閾値の同定: 組織学的検討では10 MPa以上の過剰圧では衝撃波入射側に照射部を中心に脳内出血・壊死を認めた(図3)。

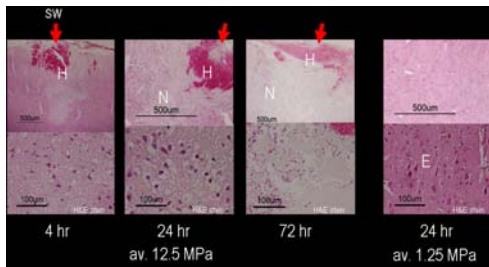


図 3. 衝撃波による脳損傷の経時的变化 HE 標本 上段: 弱拡大 下段: 強拡大像

- 衝撃波特有の損傷所見の同定: 平均過剰圧1 MPaにおいても衝撃波入射側に神経細胞核紡錘化を認めた。また、10 MPa以上では衝撃波入射側と反対側に神経細胞の紡錘形変形を認めた(図4)。可能性としては、衝撃波損傷でも報告があるが、虚血モデル、外傷性モデルにおいても認められる所見であるが、衝撃波照射後肝臓などでも同様の所見が報告されている点、血管支配領域とはまったく異なる分布をしていることから衝撃波通過に伴うものである可能性が示された。

- 照射側を中心として照射後 24 時間をピークに浮腫を認めた(定量解析継続中)。72 時間以降の亜急性期変化に関しては照射 7 日目、4 日目の検討を計画している。

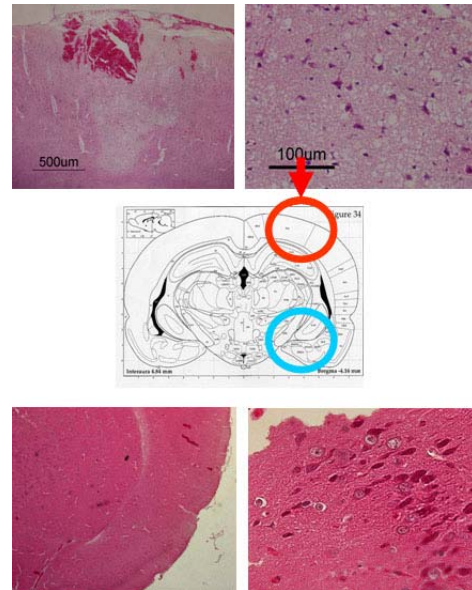


図 4. 衝撃波照射時の損傷部位 上段: 入射側 下段: 入射側と反対側

(2) 衝撃波による脳損傷の特徴と損傷機序に関する検討

① ラット衝撃波損傷モデルを用いた検討

- アポトーシスの関与: 平均過剰圧10 MPa以上では皮質下出血と周囲壊死を認めた。TUNEL染色では出血部周囲にアポトーシスの出現を示唆するTUNEL陽性細胞を24時間をピークに認められた(図5)。
- 免疫染色の検討の結果、TUNEL陽性細胞は神経細胞と一致した。
- アポトーシスの経路を検討するためにカスパーゼ阻害剤であるz-vad-fmk脳室内投与を行ったところ、アポトーシスの発現が有意に抑制されたことからカスパーゼを介した経路であることが示唆された。

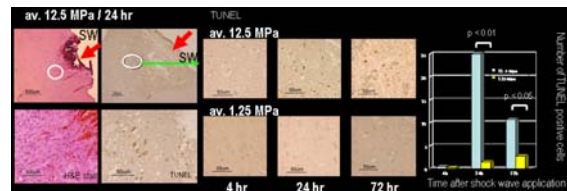


図 5. TUNEL 染色によるアポトーシス陽性細胞数の減時的変化

① 衝撃波/ キャビテーションの関与: 頭蓋模擬モデルを用いた検討

- I A)参照。

(3) 頭蓋内照射用衝撃波発生装置の試作

- ・ アジ化銀起爆を用いた微小衝撃波発生装置を試作した (図6)。
- ・ 圧測定では最大30 MPaまでの過剰圧が得られた。
- ・ 数値解析により過剰圧、分布をコントロールした定量性の高い衝撃波の照射が可能であった (図7)

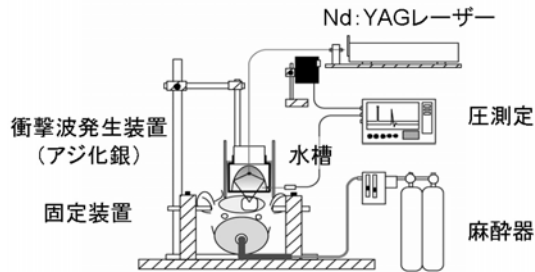


図6. 微小衝撃波発生装置

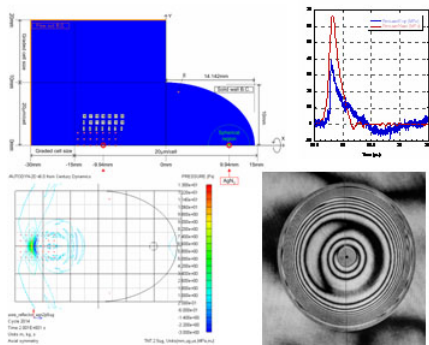


図7. 衝撃波発生装置から発生する衝撃波
右段: 数値解析によるシミュレーション 左上: 実測値との比較 右下: 二重露光は炉グラフィーによる可視化像

(4) 衝撃波が血液脳関門に与える影響

- ① ラット衝撃波損傷モデルを用いた検討
 - ・ 血管外漏出の評価: 衝撃波照射後1~4時間後にかけてエバンスブルーの顕著な漏出を認めた。組織学的には、挫傷性出血、壊死を呈する領域外にも色素の漏出を認めることから組織学的な損傷を伴わない、血液脳関門の透過性のみが変化する領域の存在を示唆する所見であると考えられた (図8)。

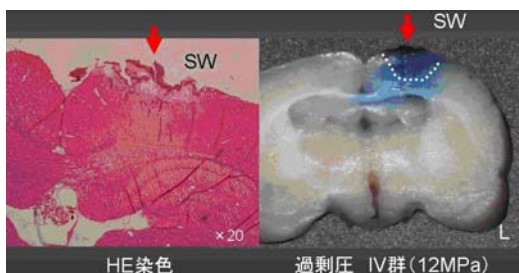


図8. エバンスブルー注入後の色素漏出像

- ・ 血管外マトリックスの関与: MMP-9は衝撃波照射後4、24、72時間後にいずれも発現増加を認めた。MMP-2は衝撃波照射後72時間後に発現増加を認めた。これは虚血、外傷などの時間経過と類似しており、衝撃波特有と思われる所見は認められなかった (図9)。

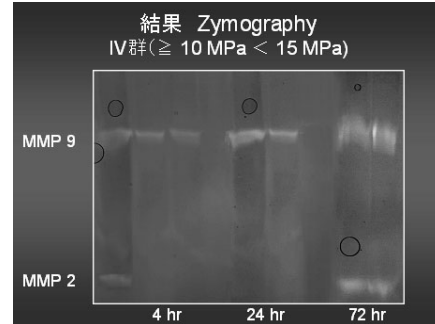


図9. ゼイモグラフィーによる MMP 発現の経時的変化

- ・ 追加実験として、血管新生因子である VEGF を免疫組織学的に検討したところ、衝撃波照射による損傷部位周囲に VEGF 陽性細胞が顕著に増加していた。心臓では VEGF 発現を介した血管新生を利用した血行再建療法が試みられているが、脳神経組織においても同様のことが期待できる可能性を示唆する所見と思われた。

(5) 衝撃波照射によるグリオーマ細胞株の薬剤感受性変化の評価

- ① In vitroでの検討
 - ・ BLM溶液 (0.001、0.01、0.1、1、10、100 $\mu\text{g/ml}$) 内に脳腫瘍細胞株 (CCF-STTG1、A172) を注入後、衝撃波照射 (推定過剰圧: 5 MPa) 3000発照射により細胞増殖抑制効果が有意dose dependentに得られた。しかし、ACNU、MTX、5 FUでは明らかな効果は得られなかった (図10)。

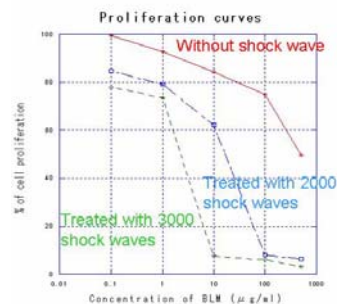


図10 衝撃波照射によるグリオーマ細胞株の増殖能の変化 回数依存的に効果は増大する

- ② In vivoでの検討
 - ・ 脳の脆弱性もあり、より低過剰圧で影響を与えることができるかに関する検討が必

要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 17 件) (査読の有無)

- ① Nakagawa A, Manley GT, Gean AD, Armonda R, Takayama K, Tominaga T: Traumatic brain injury by blast waves. Insight from perspectives from shock wave physics. *Shock Waves* (2009, in press) (有)
- ② 中川敦寛, 隈部俊宏, 小川欣一, 平野孝幸, 橋本時忠, 中野徹, 亀井尚, 上之原広司, 高山和喜, 富永悌二: パルス Ho: YAG レーザーを用いた微小ジェット of 臨床応用: 東北大学における医工学連携の取り組み. *日本レーザー医学会誌* (2009, in press) (有)
- ③ Nakagawa A, Kumabe T, Ogawa Y, Hirano T, Nakano T, Takayama K, Tominaga T: Pulsed laser-induced liquid jet: evolution from shock / bubble interaction to neurosurgical application. *Shock Waves* (2009, in press) (有)
- ④ Nakagawa A, Fujimura M, Arafune T, Sakuma I, Tominaga T: Clinical implications of intraoperative infrared brain surface monitoring during superficial temporal artery-middle cerebral artery anastomosis in patients with moyamoya disease. *J Neurosurg* 2009 May 8 [Epub ahead of print] (有)
- ⑤ Saito R, Kumabe T, Inoue T, Takada S, Yamashita Y, Kanamori M, Sonoda Y, Tominaga T: Magnetic resonance imaging for preoperative identification of the lenticulostriate arteries in insular glioma surgery. *J Neurosurg* 2009 [Epub ahead of print] (有)
- ⑥ Inoue T, Yamashita Y, Nishihara M, Sugiyama S, Sonoda Y, Kumabe T, Yokoyama M, Tominaga T: Therapeutic efficacy of a polymeric micellar doxorubicin infused by convection-enhanced delivery against intracranial 9L brain tumor models. *Neurol Oncol* 11:151-157, 2009 (有)
- ⑦ 中川敦寛, 隈部俊宏, 金森政之, 斎藤竜太, 平野孝幸, 高山和喜, 富永悌二: パルスレーザージェットメス: 神経膠腫手術への臨床応用. *No Shinkei Geka* 36: 1005-1010, 2008 (有)
- ⑧ Nakagawa A, Fujimura M, Kato K, Okuyama H, Hashimoto T, Takayama K, Tominaga T: Shock wave-induced brain injury in rat: Novel traumatic brain injury animal model. *Acta Neurochir (Suppl)* 102: 421-424, 2008 (有)
- ⑨ Nakagawa A, Fujimura M, Arafune T, Sakuma I, Tominaga T: Intraoperative dynamic infrared brain surface blood flow monitoring during superficial temporal artery-middle cerebral artery anastomosis in patients with childhood moyamoya disease. *Child's Nerv Syst* 24: 1299-1305, 2008 (有)
- ⑩ Nakagawa A, Fujimura M, Arafune T, Suzuki H, Sakuma I, Tominaga T: Intraoperative infrared brain surface blood flow monitoring during superficial temporal artery-middle cerebral artery anastomosis in a patient with moyamoya disease: Clinical implication of the gradation value in postoperative clinical course. *Acta Neurochir (Suppl)* 102:159-163, 2008 (有)
- ⑪ Kikuchi T, Saito R, Sugiyama S, Yamashita Y, Kumabe T, Krauze M, Bankiewicz K, Tominaga T: Convection-enhanced delivery of polyethylene glycol-coated liposomal doxorubicin: characterization and efficacy in rat intracranial glioma models. *J Neurosurg* 109:867-873, 2008 (有)
- ⑫ Nagamatsu K, Kumabe T, Suzuki K, Nakasato N, Sato K, Iizuka O, Kanamori M, Sonoda Y, Tominaga T: [Clinical features and significance of negative motor response in intraoperative language mapping during awake craniotomy] *No Shinkei Geka* 36:693-700, 2008 (Jpn) (有)
- ⑬ Hirano T, Nakagawa A, Sato Y, Uenohara H, Takahashi A, Takayama K, Tominaga T: Pulsed laser-induced liquid jet microcatheter system for rapid and reliable fibrinolysis in acute cerebral embolisms. *Minim Invas Neurosurg* 51: 324-328, 2008 (有)
- ⑭ Kanamori M, Kumabe T, Sonoda Y, Nishino Y, Watanabe M, Tominaga T: Predictive factors for overall and progression-free survival, and dissemination in oligodendrial tumors. *J Neurooncol* 2008 [Epub ahead of print] (有)
- ⑮ Sugiyama S, Yamashita Y, Kikuchi T, Sonoda Y, Kumabe T, Tominaga T: Enhanced antitumor effect of combined-modality treatment using convection-enhanced delivery of hydrophilic nitrosourea with irradiation or systemic administration of temozolomide in intracranial brain tumor xenografts. *Neurol Res* 30:960-967, 2008 (有)
- ⑯ Kato K, Fujimura M, Nakagawa A, Saito T, Ohki T, Takayama K, Tominaga T: Pressure-dependent effect of shock waves on rat brain: induction of neuronal apoptosis mediated by a caspase-dependent pathway. *J Neurosurg* 106: 667-676, 2007 (有)

- ⑰ Sato Y, Nakagawa A, Hirano T, Ohki H, Uenohara H, Takayama K, Tominaga T: Pulsed Laser-Induced Liquid Jet Microcatheter System for Rapid and Reliable Fibrinolysis in Acute Cerebral Embolisms: Experiments on Safety and Preliminary Application in Porcine Cranial Vessels. *Minim Invas Neurosurg* 50: 212-218, 2007 (有)

[学会発表] (計 9 件)

- ① 中川敦寛, 隈部俊宏, 金森政之, 小川欣一, 橋本時忠, 渡辺みか, 斉藤竜太, 平野孝幸, 高山和喜, 冨永悌二: パルス Ho: YAG レーザーを用いた微小噴流生成装置の臨床応用: 東北大学における医工学連携の取り組み. 第 29 回日本レーザー医学会総会 2008 年 11 月 15 日 東京 東京工科大学
- ② 中川敦寛, 芳賀洋一, 孫明宇, 藤村幹, 隈部俊宏, 金森政之, 小川欣一, 中野徹, 橋本時忠, 船本健一, 高山和喜, 冨永悌二: 細血管温存可能な内視鏡手術デバイス (パルスレーザージェットメス) の開発. 東北大学若手研究者萌芽研究育成プログラム研究成果発表会 2008 年 7 月 16 日 仙台 東北大学 さくらホール
- ③ Nakagawa A, Kumabe T, Kanamori M, Sasaki K, Saito R, Takayama K, Tominaga T: Application of pulsed laser-induced liquid jet for glioma surgery. *Society for Medical Innovation and Technology* November 21, 2007. Sendai, Tokyu Hotel
- ④ Nakagawa A, Fujimura M, Arafune T, Yamaguchi T, Kobayashi E, Sakuma I, Tominaga T: Intraoperative brain surface monitoring using IRIS-V infrared imaging in neurological procedures: Experience in moyamoya disease. *Society for Medical Innovation and Technology* November 21, 2007. Sendai, Tokyu Hotel
- ⑤ 中川敦寛, 藤村幹, 加藤薫子, 奥山洋信, 斉藤敦志, 高山和喜, 冨永悌二: 衝撃波による脳組織損傷: 圧損傷閾値の同定と損傷機序に関する検討. 第 8 回日本分子脳神経外科学会 2007 年 8 月 31 日 神戸 兵庫医科大学平成記念会館
- ⑥ 加藤薫子, 藤村幹, 中川敦寛, 斉藤敦志, 奥山洋信, 高山和喜, 冨永悌二: 衝撃波による脳神経組織損傷 - 閾値・機序の解明 -. 第 26 回日本脳神経超音波学会総会 2007 年 7 月 9 日 横浜 パシフィコ横浜
- ⑦ Nakagawa A, Fujimura M, Kato K, Okuyama H, Takayama K, Tominaga T: Shock Wave induced brain injury: Pathological evaluation using rat 13 th International Symposium on ICP and Brain Monitoring July 25, 2007 The Palace Hotel, San Francisco

- ⑧ Nakagawa A, Fujimura M, Arafune T, Yamaguchi T, Sakuma I, Tominaga T: Intraoperative brain surface monitoring using IRIS-V infrared imaging system in moyamoya disease. 13 th International Symposium on ICP and Brain Monitoring July 23, 2007. The Palace Hotel, San Francisco

- ⑨ 加藤薫子, 中川敦寛, 藤村幹, 斉藤敦志, 奥山洋信, 高山和喜, 冨永悌二: 衝撃波による脳神経組織損傷: 過剰圧依存的損傷とアポトーシス発現に関する検討. 第 46 回日本生体医工学会 2007 年 4 月 25 日 仙台 仙台国際センター

[その他]

- ① 衝撃波損傷 (blast wave injury) モデルにおける高次脳機能解析、分子生物学的解析に関しては今後、Walter Reed Army Medical Center / National Naval Medical Center (Bethesda, MD) の支援を得て、カリフォルニア大学サンフランシスコ校・脳脊髄外傷センター (San Francisco, CA) との共同研究へ発展・継続の見込み。
- ② 本研究を含む研究内容は National Navy Medical Center (2009 年 8 月 26 日: Bethesda, MD)、National Institute of Health (2010 年 4 月) に招待講演として発表決定。
- ③ 2009 年米国 Congress of Neurosurgeons (2009 年 10 月 24-29 日 New Orleans) で本研究を含む内容は Top Ten Abstract に選出された (Nakagawa A, Fujimura M, Kato K, Okuyama H, Hashimoto T, Takayama K, Tominaga T. Mechanism of Primary Blast Injury: Insight from Microexplosive Generated Shock Wave-induced Brain Injury Animal Model and Engineering Experiments)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

冨永 悌二 (TOMINAGA TEIJI) 東北大学・大学院医学系研究科・教授 研究者番号: 00217548

(2) 研究分担者

井小萩 利明 (IKOHAGI TOSHIAKI) 東北大学・流体科学研究所・教授 研究者番号: 90091652

高山 和喜 (TAKAYAMA KAZUYOSHI) 東北大学・流体科学研究所・教授 研究者番号: 40006193

牧志 渉 (MAKISHI WATARU) 東北大学・大学院工学系研究科・助教 研究者番号: 60400454

松浦 祐司 (MATSUURA YUJI) 東北大学・医学研究科・准教授 研究者番号: 10241530

(3) 連携研究者

該当なし