

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 24 年 5 月 2 日現在

機関番号：15501
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2010～2011
課題番号：22659261
研究課題名（和文） 温度制御デバイスによる中枢神経系疾患に対するドラッグデリバリーシステムの開発
研究課題名（英文） Development of drug delivery system for central nervous system disease using with temperature control devise
研究代表者
鈴木 倫保（SUZUKI MICHİYASU）
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）：

脳疾患へのドラッグデリバリーシステム構築のため、冷却による血液脳関門 (BBB) の制御を試みた。マウス内皮細胞による人工 BBB は、低温時にタイト結合が一過性に開き、その構成タンパクである claudin5 は 15℃で発現量が減少した。ラットに静注したエバンスブルーは脳冷却部位に漏出し、これは可逆的だった。てんかん患者では術中に静注したインドシアニングリーンが脳冷却部位に漏出した。以上より脳局所冷却が BBB を可逆的に開放することが分かった。

研究成果の概要（英文）：

Drug delivery system (DDS) through blood brain barrier (BBB) promises to enhance the effectiveness of medicine for nervous system diseases such as epilepsy and malignant brain tumors. In order to develop the DDS system, control of BBB permeability of molecules by alteration of temperature was analyzed. Tight junction of artificial BBB made from mouse endothelial cell was temporary opened at 15 degrees centigrade. And claudin5, one of the major structural proteins of the tight junction decreased the amount of expression at 15 degrees. Evans blue administered to a rat vein leaked to the brain surface when it was cooled. The increased permeability was reversible by the temperature control. Indocyanine green administered intravenously to an epilepsy patient appeared to the cooled area of brain surface at the surgery of temporal lobectomy. These results lead that the temperature control may modulate BBB permeability in a reversible fashion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：脳神経外科学

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：血液脳関門、ニューロモデュレーションデバイス、脳温

1. 研究開始当初の背景

中枢神経と血管の間には物質の透過を限定する機構が存在し、これを血液脳関門 (blood brain barrier、BBB) という。BBB は毒性物質から脳脊髄を保護する働きを持つ。一方、脳腫瘍や中枢神経感染など疾患の治療を行う場合は、この関門を越えて薬剤が標的とする組織に到達しないという不利がある。現在この問題を克服するために行われている方法は、浸透圧差を利用したものである。高浸透圧液を静脈あるいは動脈から負荷し、その直後に化学療法剤などの治療薬を投与するものである。残念ながらその成果は十分高くはない。疾患部位の BBB 透過性を一定時間のみ局所的に制御するような時空間的制御を可能とする手段は現存しない。我々は自由行動下ラットの脳内に冷却装置を埋め込むことで、脳の冷却による BBB の可逆的な透過性亢進を発見した。この透過性の亢進は 20°C 以下の冷却で生じ、さらに 15°C 前後で冷却しても 3~4 日で正常の透過性に戻るといった性質を備えていた。この現象は脳内に薬物の取り込みが行われ易くなっていることを意味しており、薬物治療耐性の中枢神経系疾患の潜在的な治療法として極めて興味深い現象であった。

2. 研究の目的

本研究は温度によって脳局所の BBB を可逆的に制御し、中枢神経系疾患のドラッグデリバリーシステム (DDS) の構築を行うことを目的とする。BBB の時空間的制御により、薬物に治療抵抗性を示すてんかんや脳腫瘍に対し、従来の抗てんかん薬、抗癌剤の効果を増強する可能性を探る。一方で、BBB の破綻が神経疾患に悪影響を与える可能性が示唆されている。本研究はこれらの知見に基づき、脳の冷却・加温によって脳局所の BBB を可逆

的に制御する装置を開発し、中枢神経系疾患への DDS の構築を行うものである。

中枢性疾患としててんかんをターゲットとし、温度変化を変数とした BBB の透過性変化を *in vitro* の系で詳細に調べるとともに、温度変化による薬物漏出の相違を *in vivo* の系で調べるというアプローチをとる。*In vitro* の系では血管内皮細胞から人工 BBB を作成し、その電気抵抗、およびタンパク発現を指標として、温度変化の影響を検出する。*in vivo* の系では脳内に冷却装置を設置し、冷却により薬物の透過性がどのように変化するかをラットにて調べる。難治性てんかん患者の手術中に、開頭術中の脳血流検査として認められている薬剤であるインドシアニングリーン[®]の脳表への漏出を観察する。

3. 研究の方法

(1) 人工 BBB 透過性の温度による変化

生後 1 日齢 (P1) の C57BL/6 マウス由来の初代培養血管内皮細胞、およびマウス脳血管内皮株である bEND3 細胞を使用した。これらの細胞を 5%CO₂・37°C の条件下でダブルチャンバーにて単層培養を行い、コンフルエントになった後に、培養温度を 15°C に下げ、BBB の生理学的指標である経内皮電気抵抗 TEER を計測した。

また上記条件の bEND3 細胞から細胞質および細胞膜分画のタンパク質をキットを用いて抽出し、BBB の機能的構成単位であるタイト結合構成タンパク質 (claudin5、occludin など) に対するウェスタンブロットを行った。さらに、claudin5 の免疫細胞化学染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析を施行した。

(2) ラット BBB 機能の温度による変化

ラット (350g-460g) を冷却群、冷却後群、非冷却群に分けた。麻酔下に右半球を開頭し、

冷却群と冷却後群には5x5mmのペルチエ素子からなる冷却プレートを置いて5°Cで1.5時間冷却した。冷却群には冷却開始から1時間後、冷却後群には冷却終了の72時間後、大腿静脈からエバンスブルー(EB)を3ml注入した。冷却群は冷却終了から1時間後、冷却後群はEB注入から1時間後、深麻酔によってラットを心停止させ、灌流固定を行った。脳を摘出し肉眼でEB漏出を観察した。冠状切片作成後、フルオレセン染色によって脳表に漏出したEBを測定した。

(3) 術中冷却脳のBBB透過性変化

側頭葉てんかんで、右側頭葉切除を行う患者1名で臨床研究を行った。全身麻酔下に右側頭開頭を行い、硬膜を開いて脳表を露出させた。側頭葉先端から4.5cmで中側頭回以下を本手術の切除範囲とした。この切除範囲内において、1x1cmのペルチエ素子からなる冷却装置を用いて脳表を15°Cで15分間冷却した。冷却装置を除去した直後にインドシアニングリーンを5ml静脈投与した。手術用顕微鏡にはインドシアニングリーンを発行させる照射装置と検出する赤外線カメラを搭載しており、これで脳表に現れるインドシアニンググリーンを経時的に測定した。この方法はビデオアンギオグラフィーと呼ばれ、開頭術で一般的に行われる方法である。予定の切除部位を切除し、手術を終了させた。冷却部位と非冷却部位の組織切片を作成し、フルオレセン染色でインドシアニンググリーンの漏出の有無を測定した。本臨床研究に際しては、手術前に説明を行い、文書による同意を得た。

4. 研究成果

(1) 人工BBB透過性の温度による変化

マウス初代培養脳血管内皮細胞およびbEND3細胞を37°Cで培養し、TEERを測定後に温度を15°Cに低下させると、著明なTEERの

減少が認められた。15°C培養1時間後にはTEERは37°C培養値に比べて約30%の低下を示し、以後培養を継続すると、24時間後には、ほぼ前値にまで回復した。この結果は低温暴露によって血管内皮細胞のタイト結合が一過性にオープンする可能性を示唆している。そこで、タイト結合構成タンパク質であるclaudin5およびoccludinの発現をウェスタンブロットにて解析すると、15°C低温暴露によって内皮細胞膜上のclaudin5の発現量が、37°Cに比べて減少していることが判明した。Claudin5の免疫細胞染色においても、低温暴露時に細胞膜上の免疫陽性の低下が観察された。

(2) ラットBBB機能の温度による変化

麻酔から覚醒したラットの行動には特に異常を認めなかった。ただし本研究では詳細な神経学的検査は行わなかった。摘出脳には肉眼的観察、フルオレセン染色像とも、冷却群の右脳表(冷却側)にはEBが検出された。対側および同側の非冷却部位には明らかな変化を認めなかった。冷却後群と非冷却群にはEBの漏出は認められなかった。吸光度計で脳表の色調を定量すると、冷却群の冷却側の脳には非冷却側に比べ20%の吸光度上昇を観察した。EBは大分子であり、本来はBBBを通過することはない。以上より、大脳の冷却を5°Cで1時間行うことによって、BBBの分子透過性が高くなることが示された。冷却群で観察されたEBの漏出が、冷却後72時間にEBの注入を行った群には認められなかったことから、このBBB透過性亢進は一時的な現象であることが証明された。

(3) 術中冷却脳のBBB透過性変化

術中ビデオアンギオグラフィーでは冷却部位の造影所見は、周囲脳と変わりがなく、インドシアニンググリーンの血管外漏出は観察されなかった。摘出標本のフルオレセン染

色では、冷却部位の脳表にインドシアニンググリーン[®]の漏出を観察した。深部白質および灰白質には変化が見られなかった。非冷却部位の脳表及び深部には同様の変化はなかった。手術を行った患者の術後経過は良好であった。インドシアニンググリーンは大分子であり、正常ではBBBを通過しない。本研究によって、ヒトにおいてもBBBの分子透過性が冷却によって亢進することが確認された。ラットで行った脳冷却法に比べると、温度が高く、短時間の冷却を行った。両者の差を比べると、BBB透過性の上昇の程度は、より低い温度で高く、より長い時間で高いことが考えられる。

(4) 結語

ラットおよびヒトで、脳冷却によってBBB透過性が亢進することが判明した。透過性亢進の程度は、温度がより低く、長時間の時に高い可能性がある。またラットの実験によってBBB透過性亢進は冷却による一時的な効果であり、その変化は可逆的な変化である可能性が高いことが示唆された。分子生物学的側面からこの変化を観察すると、BBB透過性変化とは血管内皮細胞のタイト結合が一過性に開くものであり、さらにその原因はタイト結合構成タンパク質である claudin5 の一時的な発現低下によるものではないかと考えられた。

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6件)

1. Fujii M, Inoue T, Nomura S, Maruta Y, He Y, Yamakawa T, Suzuki M, Cooling of the Epileptic Focus Suppresses Seizures with Minimal Influence on Neurological Functions. *Epilepsia* 53: 485-493, 2012. 査読有
2. Maruta Y, Fujii M, Imoto H, Nomura S, Oka F, Goto H, Shirao S, Yoshikawa K, Yoneda H, Ideguchi M, Suehiro E, Koizumi H, Ishihara H, Kato S, Kajiwara K, Suzuki M. Intra-operative

monitoring of lower extremity motor-evoked potentials by direct cortical stimulation. *Clin Neurophysiol.* 2012 [Epub ahead of print]. 査読有

3. Suehiro E, Fujisawa H, Koizumi H, Nomura S, Kajiwara K, Fujii M, Suzuki M. Significance of differences between brain temperature and core temperature (ΔT) during mild hypothermia. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 51: 551-555, 2011. 査読有
4. Fujii M, Fujioka H, Oku T, Tanaka N, Imoto H, Maruta Y, Nomura S, Kajiwara K, Saito T, Yamakawa T, Yamakawa T, Suzuki M. Application of focal cerebral cooling for the treatment of intractable epilepsy. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 50: 839-844, 2010. 査読有
5. Fujioka H, Fujii M, Koizumi H, Imoto H, Nomura S, Saito T, Yamakawa T, Suzuki M. An implantable, focal brain cooling device suppresses nociceptive pain in rats. *Neurosci Res* 66: 402-405, 2010. 査読有
6. Fujioka H, Kaneko H, Fujii M, Suzuki SS, Imoto H, Nomura S, Fujisawa H, Yamakawa T, Suzuki M. Epileptiform discharges and neuronal plasticity in the acute peri-infarct cortex of rats. *Neurol Res* 32: 666-669, 2010. 査読有

[学会発表] (計7件)

1. Fujii M, Inoue T, Suzuki M. Cooling of the Epileptic Focus Suppresses Seizures with Minimal Influence on Neurological Functions. American Epilepsy Society, Annual Meeting, 2011, 2011, 12, 1-5, Baltimore, USA
2. Fujii M, Inoue T, Suzuki M, Tokiwa T, Yamakawa T. Alternative treatment of intractable epilepsy with focal brain cooling -A review of our past studies-. IEEE SMC, 2011, 2011, 10, 9-12, Anchorage (Alaska), USA
3. Takao Inoue, Masami Fujii, Michiyasu Suzuki. Development of a Focal Cerebral Cooling System for the Treatment of Intractable Epilepsy. IEEE SMC, 2011, 2011, 10, 9-12, Anchorage (Alaska), USA
4. Hiroyuki Kida, Masami Fujii, Takao Inoue, Yeting He, Yuichi Maruta, Sadahiro Nomura, Kazuhiro Taniguchi, Takuya Ichikawa, Takashi Saito, Michiyasu Suzuki. The effect of focal brain cooling on epileptic discharges

- in rats -Frequency analysis of electroencephalography-. IEEE SMC, 2011, 2011, 10, 9-12, Anchorage (Alaska), USA
5. Inoue T, He Y, Fujii M, Fujioka H, Tokiwa T, Kida H, Imoto H, Maruta Y, Nomura S, Yamakawa T, Suzuki M. Inhibitory effects of focal brain cooling for motor cortical seizures in cats and nonhuman primates. 29th International Epilepsy Congress. 2011, 8, 28-9, 1, Rome, Italy
 6. Fujii M, Inoue T, Imoto H, Tanaka N, Oku T, Maruta Y, Koizumi H, Nomura S, Owada Y, Saito T, Yamakawa T, Tokiwa T, Yamakawa T, Suzuki M. Alternative treatment of intractable epilepsy with focal brain cooling. 29th International Epilepsy Congress. 2011, 8, 28-9, 1, Rome, Italy
 7. Maruta Y, Fujii M, Imoto H, Nomura S, Matsushige T, Ichiyama T, Yamakawa T, Suzuki M. Identification of epileptic focus with multi-channel near-infrared spectroscopic topography (optic topography). 29th International Epilepsy Congress, 2011, 8, 28-9, 1, Rome, Italy

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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