

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791483

研究課題名(和文) 脊髄神経膠腫に対するCEDをもちいた新しい治療法の開発

研究課題名(英文) New Drug Delivery using CED for Spinal cord Astrocytoma

研究代表者

遠藤 俊毅 (ENDO, TOSHIKI)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：00535370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：治療困難な脊髄悪性神経膠腫に対する新規治療開発を行った。まず、脊髄に直接薬剤を送達した際の動態を観察すべく、正常ラット脊髄に蛍光色素を注入した。この方法で運動障害を引き起こすことなく安全に薬剤送達が可能、薬剤送達範囲が注入量の3.5倍に達するとの結果を得た。さらに、抗悪性腫瘍薬ACNUの脊髄組織毒性を検証し、ACNU1.0mg/mLが脊髄での適正かつ最大の耐用濃度であることが判明。その後脊髄腫瘍モデルへのACNU薬剤送達治療を実施し、16匹中4匹において下肢運動機能の保全ならびに脊髄腫瘍の増大抑制が確認された。脊髄悪性神経膠腫に対してACNUの脊髄直接注入法が新規治療になりうる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：This research was conducted to develop new treatments for spinal cord malignant glioma. First, to observe the dynamics of delivered drugs in the spinal cord, we injected fluorescent dye in normal rat spinal cord. Having confirmed that the drugs were delivered in the spinal cord without causing motor deficits in the lower extremities and drugs were distributed 3.5 times in larger volumes when compared to the true amount of the drug, we assured it safe and effective strategy. Next, we validated toxicity of antineoplastic agents ACNU to the spinal cord parenchyma. As result, ACNU 1.0 mg/mL was useful as well as tolerable maximum concentration for spinal cord. We then performed ACNU drug delivery treatments to the spinal cord glioma model. Spinal cord tumor suppression and preservation of lower limb motor function were confirmed in 4 out of 16 animals in experiments. Direct spinal cord injection of ACNU can be a new treatment for spinal cord malignant glioma.

研究分野：脳神経外科学

科研費の分科・細目：脊髄 脊椎疾患学

キーワード：脊髄腫瘍 薬剤送達 抗がん剤

1. 研究開始当初の背景

脊髄神経膠腫は脊髄髄内腫瘍の約 30%をしめる。手術による可及的腫瘍摘出療法ならびに残存腫瘍に対する放射線療法が標準治療とされているものの、治療効果は確立されておらず、予後不良の疾患である (Garces-Ambrossi GL et al, J Neurosurg Spine 11:591-599, 2009)。その理由のひとつに、腫瘍が瀰漫性に脊髄実質内へ浸潤しているため、脊髄における機能温存の観点から、十分な腫瘍摘出が行えないことがあげられる。

これを補うべく、脳腫瘍による治療薬としてその効果が確立されているテモゾロミドが脊髄腫瘍症例にも使用され、放射線治療との併用療法について報告されている (Kim WH et al., J Neurooncol 101:247-254, 2011)。しかし、その効果は限定的である。なぜなら、一般に、中枢神経系疾患に対する薬剤投与と治療は、その薬剤到達に血液-脳 (脊髄) 関門を介するため困難であるとされているためである。

抗腫瘍薬投与の制限を克服し、中枢神経系への薬剤投与を効率的かつ安全に行うために考案されたのが Convection Enhanced Delivery (以下 CED)法である。これは薬剤を陽圧下に脳あるいは脊髄組織間隙に局所注入することで、高濃度かつ広範囲の薬剤分布が得られる新規薬剤投与方法である

2. 研究の目的

本研究では、ラット脊髄神経膠腫モデルを用いて、抗腫瘍薬 ACNU を脊髄内に送達する CED 法の安全性と有効性について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)安全性に関する基礎的データを得るために、正常脊髄をもちいて、CED 法の薬剤送達における薬剤動態評価と脊髄における ACNU の毒性試験 (濃度耐性試験) を行った。これにより、脊髄における至適薬剤濃度ならびに安全かつ有効な薬剤量と注入速度を把握することが可能となる。なお、脊髄 CED には自作の針 (図) を使用した。



健常ラットを用いた、脊髄への CED 法における薬剤分布の検討

吸入麻酔下でラットの鎮痛、鎮静をはかりラットを腹臥位とする。腹部には保温パッドを使用。背部の剃毛ならびに約 2cm の皮膚切開を行ったのち、傍脊柱筋群を目的の椎弓より愛護的に剥離する。過去に我々の報告した方

法 (Rooney GE, Endo T, et al., J Neurosurg Spine 2009) に準じて脊髄を露出し、前述の薬剤注入用カニューラ (直径 0.1mm) を定位的に留置する。(図)



微量注入ポンプを用い、毎分 0.2 マイクロリットル×10 分の薬剤注入を行う。薬剤分布試験における注入薬剤は蛍光色素 (Evansblue) を使用する。薬剤注入直後、ラットの下肢運動機能を評価し、運動障害のないことを確認後、ラットを安楽死させ、標本を摘出する。連続凍結切片を作成し、蛍光顕微鏡で画像を取り込み、各切片での薬剤分布面積を計測する。なお、以下 CED 法は、我々の過去の頭蓋内局所注入の実験系に準じておこなうこととする (Sugiyama S, Saito R, et al., J Neurooncol 2007) (Kikuchi T, Saito R, et al., J Neurosurg, 2008) 薬剤動態評価は白質注入と灰白質注入を別々に行い、それぞれの箇所での脊髄薬剤送達における特徴を考察した。

健常ラットを用いた、ACNU-CED 法の安全性試験

薬剤分布試験と同様の投与量で、5 段階 (0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、mg/mL) の濃度の塩酸ニムスチンを CED 法を用いて脊髄実質へ投与し、その局所神経毒性を評価する。薬剤の投与部位は脊髄後索である。ラットにおいては、同部位を皮質脊髄路が走行する。すなわち、局所毒性の出現は、ラットの下肢運動障害あるいは組織毒性によって判定する。病理学的検討は 30 日目に摘出標本を用いて行う。本試験では観察期間中に実験動物へ苦痛を与えないように工夫する。つまり、重度の下肢麻痺が出現した場合には、そこで観察を終了し、すみやかに安楽死させて標本を摘出することとする。なお、投与濃度について、病理学的に異常を認めるが神経症状を呈さないレベルを最も高い濃度と決定する。

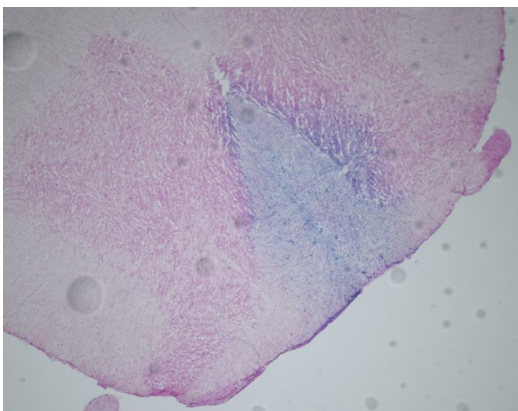
(2) ACNU-CED 法の有効性を確認するために、脊髄腫瘍モデルを作成する。これは、既に当科で実験系の確立している脳腫瘍モデル作成手法にならい、ラットグリオーマ細胞 9L と F98 を脊髄腰部膨大部に接種することによりラット脊髄腫瘍モデルを作成する。

これら脊髄神経膠腫モデルラットにたいし、(1) で使用したのと同様の量；毎分 0.2 マイクロリットル×10 分を、(1) で決定された至適濃度の ACNU をもちいて、微量注入ポンプを用い、CED 法により脊髄への注入、すなわち脊髄腫瘍局所抗がん剤注入治療を行う。この場合、下肢運動機能ならびに腫瘍体積を評価項目として、治療効果判定を行う。下肢運動機能については、その評価方法が確立されている BBB スコアを用いて行う。動物は 30 日間連日あるいは 2 日に 1 度の頻度で観察し 30 日が経過した時点で、動物を sacrifice。腫瘍体積の各治療群間での比較ならびに組織学的検討による脊髄損傷の有無あるいはその程度評価、治療効果判定を行う。

4. 研究成果

(1) 正常脊髄における CED による薬物動態の解析

脊髄において白質に注入した場合と灰白質に注入した場合でその挙動に違いが見られた。灰白質に注入した場合 Evans blue が容易に白質に漏出するのに対し、白質に注入した場合、決して灰白質へ漏出しなかった。(図)

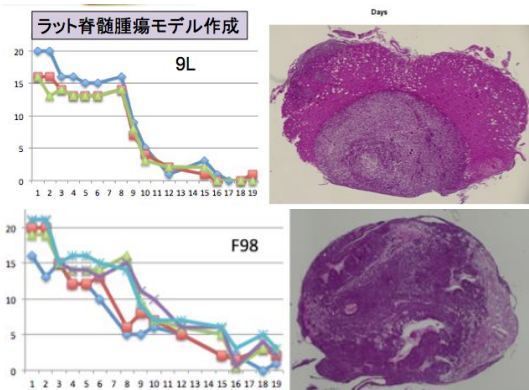


むしろ白質に注入した Evans blue は白質繊維にそって頭尾側方向に伸展する所見であった。脊髄悪性神経膠腫は白質を発生母地とすると考えられており、脊髄 CED により頭尾側に伸展する腫瘍性病変を覆うような薬剤送達が可能になると考察された。なお、白質 CED、灰白質 CED のいずれの方法でも注入薬剤は投与量体積の 3.5 倍の体積の脊髄を覆うようにひろく送達される事が確認された。

(1) 健常ラットを用いた、ACNU-CED 法の安全性試験

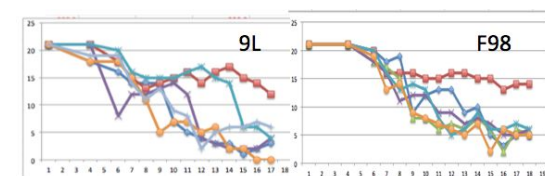
最大 2.0mg/mL の ACNU を 5 段階の濃度(0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、mg/mL)にて脊髄へ注入し、脊髄における安全性を検討した。2.0mg/mL の濃度において脊髄実質に空胞変性をきたし、組織毒性ありと判定した。結果、1.0mg/mL を至適最高濃度として後の ACNU CED 試験を行った。

(2) 9L F98 細胞を用いて脊髄腫瘍モデルを作成した。9L 細胞によるモデルでは腫瘍が exophytic に伸展。BBB スコアにより判定する下肢運動麻痺の進行が急峻であった(上図) F98 はむしろび慢性に脊髄実質内へ入り込み、下肢麻痺の進行がより緩徐に進行した。(下図)なお、当初 30 日の観察を計画していたが 3 週間で下肢完全麻痺を呈する事が確認されたため、その後の実験は 21 日間の



経過観察にて継続した。

脊髄腫瘍モデルに対する ACNU CED 治療を行った。1.0 mg/mL にて 0.2 マイクロリットル×10 分の ACNU を脊髄腫瘍移植後 5 日間の時点で行った。下肢運動機能評価を行い、9L F98 のラットいずれの群も下肢運動機能が保たれるラットが複数観察された。(図)これらラットにおいて、脊髄腫瘍の増殖抑制効果が腫瘍体積の計測により確認された。



ただし、腫瘍制御効果については、各脊髄腫瘍モデル群で一律に認められたわけではない。今後、ACNU-CED 法の薬剤量、脊髄における ACNU 注入箇所、さらに腫瘍移植後の治療までのタイミングを工夫する事でより効果的な抗腫瘍制御効果が得られると考察される。今後の検討課題である。

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 7件)

Haryu S, Endo T, Sato K, Inoue T, Takahashi A, Tominaga T. Cognard type V intracranial dural arteriovenous shunt: case reports and literature review with special consideration of the pattern of spinal venous drainage. *Neurosurgery*. 2014 Jan;74(1):E135-42; doi:10.1227/NEU.000000000000069. PubMed PMID: 23839515. 査読有

Niizuma K, Endo T, Sato K, Takada S, Sugawara T, Mikawa S, Tominaga T. Surgical treatment of spinal extradural arteriovenous fistula with parenchymal drainage: report on 5 cases. *Neurosurgery*. 2013 Dec;73(2 Suppl Operative):E287-294. doi: 10.1227/NEU.0000000000000189. PubMed PMID: 24077580. 査読有

Endo T, Aizawa-Kohama M, Nagamatsu K, Murakami K, Takahashi A, Tominaga T. Use of microscope-integrated near-infrared indocyanine green videoangiography in the surgical treatment of intramedullary cavernous malformations: report of 8 cases. *J Neurosurg Spine*. 2013 May;18(5):443-9. doi: 10.3171/2013.1.SPINE12482. 査読有

Sato K, Endo T, Niizuma K, Fujimura M, Inoue T, Shimizu H, Tominaga T. Concurrent dural and perimedullary arteriovenous fistulas at the craniocervical junction: case series with special reference to angioarchitecture. *J Neurosurg*. 2013 Feb;118(2):451-9. doi: 10.3171/2012.10.JNS121028. PubMed PMID: 23176338. 査読有

Inoue T, Endo T, Nagamatsu K, Watanabe M, Tominaga T. 5-aminolevulinic acid fluorescence-guided resection of intramedullary ependymoma: report of 9 cases. *Neurosurgery*. 2013 Jun;72(2 Suppl Operative):ons159-68 doi: 10.1227/NEU.0b013e31827bc7a3. PubMed PMID: 23149963. 査読有

Aizawa-Kohama M, Endo T, Kitada M, Wakao S, Sumiyoshi A, Matsuse D, Kuroda Y, Morita T, Riera JJ, Kawashima R, Tominaga T, Dezawa M. Transplantation of bone marrow stromal cell-derived

neural precursor cells ameliorates deficits in a rat model of complete spinal cord transection. *Cell Transplant*. 2013;22(9):1613-25. doi: 10.3727/096368912X658791. PubMed PMID: 23127893. 査読有

Kanno H, Endo T, Ozawa H, Koizumi Y, Morozumi N, Itoi E, Ishii Y. Axial loading during magnetic resonance imaging in patients with lumbar spinal canal stenosis: does it reproduce the positional change of the dural sac detected by upright myelography? *Spine (Phila Pa 1976)*. 2012 Jul 15;37(16):E985-92. doi: 10.1097/BRS.0b013e31821038f2. PubMed PMID: 21258271. 査読有

[学会発表](計 10件)

遠藤俊毅、頸髄症にて発症した頭蓋内硬膜動静脈瘻：早期診断につながる臨床学的特徴、第45回 脊髄障害医学会、2013年11月15日、福岡

遠藤俊毅、脊髄腹側 Perimedullary Arteriovenous Shunts: 内視鏡併用手術の有用性 第20回日本神経内視鏡学会、2013年11月8日、山梨

遠藤俊毅、Cervical Perimedullary Arteriovenous Shunts: 連続22症例におけるシャント部位と血管構築に基づいた治療ストラテジー、第72回日本脳神経外科学会総会、2013年10月18日、横浜

Toshiki Endo、Peculiar Characteristics of Arteriovenous malformations at the Craniocervical Junction: Concurrent dural and perimedullary arteriovenous fistulas at the craniocervical junction. 7th annual meeting of Asia-Pacific Cervical Spine Society 2013, 2013年8月22日、札幌

遠藤俊毅、ラット脳/脊髄 fMRI: 脊髄損傷後の脳の変化と回復に果たす脳の役割とは、第28回日本脊髄外科学会、2013年6月6日、名古屋

Toshiki Endo, 5ALA Fluorescence guided resection of intramedullary Ependymoma, 81st AANS Annual Scientific Meeting, 2013 年 4 月 29 日、New Orleans アメリカ

遠藤俊毅, 脊髄局所薬剤送達にて治療した脊髄神経膠腫の一例、第 49 回東北地方会、2013 年 3 月 30 日、新潟

遠藤俊毅, 5ALA を用いた脊髄上衣腫手術; 10 例報告、第 71 回日本脳神経外科学会学術総会、2012 年 10 月 18 日、大阪

遠藤俊毅, 定位放射線治療を行った胸髄動静脈奇形症例、第 48 回東北地方会、2012 年 9 月 1 日、盛岡

遠藤俊毅, 脊髄神経膠腫の頭蓋内播種: 4 症例報告、第 27 回日本脊髄外科学会、2012 年 6 月 22 日、東京

6 . 研究組織

(1)研究代表者

遠藤 俊毅 (ENDO, TOSHIKI)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号 : 00535370