

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670634

研究課題名(和文) 神経外傷急性期における局所低温療法の開発

研究課題名(英文) Brain protection by local hypothermia in the acute phase of traumatic brain injury

研究代表者

富永 悌二 (Tominaga, Teiji)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00217548

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、外傷性脳損傷に対する脳局所低温療法の開発であった。Convection-enhanced delivery法(CED法)を用いて、損傷局所に低温灌流液を注入し、脳保護効果を得ようと企図した。まず、正常ラットにおいて、冷却灌流中のMRモニタリング方法を確立した。次に、ラット外傷性脳損傷モデルを用いた概念実証を試みたが、疾患モデルにおいては脳圧亢進が速やかに起こり、冷却液灌流が困難であった。このような問題点に対して高浸透圧液注入の有用性が報告されていたが、本研究の実験系においては、その有用性を再現できなかった。灌流液を変更することでブレイクスルーを起こすべく、研究を継続している。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to develop new methodology for brain protection. We used convection-enhanced delivery (CED) to inject low-temperature fluid into damaged tissue in the acute phase of traumatic brain injury. First, we developed magnetic resonance method for real-time monitoring of fluid distribution during the continuous CFD injection. Second, we aimed the proof-of-concept study for the effect of local hypothermia on the damaged brain. In the animal models of traumatic brain injury, it was difficult to perfuse damaged brain tissue with cooling saline because of the rapid elevation of intracranial pressure just after the injury. Though hyperosmotic fluid was reported to be effective in the CFD injection into damaged brain tissue, we could not reproduce the effectiveness of hyperosmotic fluid in our experimental design. In order to make a breakthrough, we are developing the optimal fluid to perfuse the damaged brain tissue.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：脳・神経 頭部外傷 外科 脳低温療法

1. 研究開始当初の背景

現在、外傷性脳損傷に対しては、外科的減圧術および軽度低体温療法を中心とする集中治療が行われているが、その治療効果は限定的である。後遺症を最小限とするためには、受傷を免れた脳組織に対して最大限の保護療法を行う必要がある。脳保護を目的とする低体温療法（軽度低体温療法 32-34℃）について、院外心肺停止症例に対する有効性が確立されている（The Hypothermia After Cardiac Arrest Study Group, N Engl J Med 346: 557-563, 2002）。一方、重症頭部外傷患者に対する軽度低体温療法の有効性は証明されなかった（Clifton GL, et al. N Engl J Med 344: 556-563, 2001）。その理由として、全身管理上の問題と、それに伴う低体温への暴露時間の短さが挙げられている。外傷性脳損傷は心肺停止症例と異なり、脳に一次損傷を有する病態であることを考えれば、より高度の脳低体温療法が必要と考えられる。しかし、現在の全身を冷却する低体温療法においては、免疫力低下、心拍出量低下、不整脈、血液凝固能異常、けいれん発作といった低体温の全身に対する副作用が障害となり、著しい脳低温、あるいは長時間の低温暴露を達成できない。このような現状をふまえ、我々は、脳保護因子を含む薬剤を低温冷却し、脳組織を直接、灌流することで高度の局所脳低温を達成できるのではないかと考えた。それを可能にする手段こそが、Convection-enhanced delivery (CED) 法であり、薬剤（液体）を陽圧下に持続注入することで、広範囲の薬剤分布を得る局所薬剤送達法である（図1, 2）。

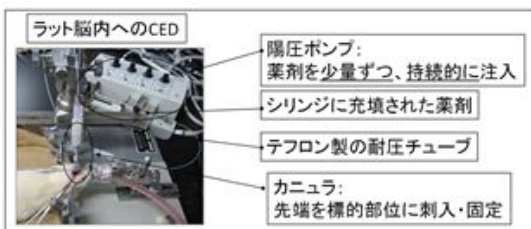


図1

CED 法を用いれば、局所脳低体温療法 + 薬剤

による神経保護療法を同時に実施することが可能と考えられる。

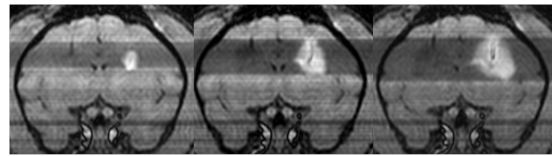


図2 カニクイザル脳内へのCED (微量ガドリニウムを薬剤に添加)

現在の低体温療法の大きな問題点のひとつが、低温による全身性の合併症である。これを避けるためには、血液の温度低下をきたすことなく、治療標的である脳に局限した低温を実現する必要がある。本研究は、脳組織を低温の薬液で灌流するという、かつてないアイデアにより、全身性の低温合併症をきたすことなく、脳局所の低温を実現することを目標としている。脳実質における広範囲の液体灌流を可能とするのが convection-enhanced delivery 法 (CED 法) であるが、国内で臨床経験の最も豊富であるのが、当グループである。CED 法は、脳白質における 30~70 ナノメートルという狭い細胞間隙 (glial structure 内部) へ、隈なく液体を送達することができる。しかし、外傷性脳損傷においては、脳組織の一次的破壊と二次的な脳浮腫により、すみやかに glial structure 内部の細胞間隙が閉塞していくものと考えられる。よって、局所低体温療法には、受傷後から治療開始までの golden time が存在すると考えられ、灌流する液体に高浸透圧液や神経保護作用のある薬剤を用いるといった工夫により、golden time を延長するという、かつてない試みが必要と予想される。

また、本研究グループは、2009 年より、CED 法における薬剤分布のコンピュータ・シミュレーションに取り組んできた。脳組織を多孔質媒体とみなし、その中を流れるカテーテル先端から注入される薬剤の振る舞いを 2 つの支配方程式 (「連続の式」および「Darcy の法則」) を連立して解くことでシミュレーションできると考えた。

最後に、脳保護療法において、現在、その有効性が確立されているのは、低温療法のみである。しかし、脳局所を十分に冷却することは、低温の全身性合併症が妨げとなり、不可能であった。本研究は、CED法を用いることで全身性の合併症をきたすことなく、標的組織である脳の著しい低温を実現しようとするものであり、このような試みは、過去にない斬新なものである。本研究は、その安全性と治療効果を動物実験レベルで実証するであろう。臨床応用を見据え、治療時のモニタリング方法およびシミュレーション方法を同時に開発する。将来的には、脳生理学の発展に伴い、重要な標的部位を中心に治療を行うといった新たな脳保護戦略にもつながる。外傷性脳損傷に対する治療効果を著しく高めるブレイク・スルーとなることが期待される研究である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、外傷性脳損傷に対する新しい治療方法、すなわち「脳局所低温療法」の開発である。現在、外傷性脳損傷に対して行われている低体温療法では、低体温による全身性の副作用が大きく、脳保護のために十分な低温、あるいは低温への長時間の暴露を達成できない。本研究は、中枢神経組織への薬剤灌流方法：Convection-enhanced delivery法を応用し、損傷部位周辺において神経保護薬を含む低温の液体を灌流し、全身性の合併症をきたすことなく、十分な脳低温を達成することを試みる。将来は、脳生理学の発展に伴い、重要な標的部位を中心に治療を行うといった新たな脳保護戦略を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) 正常ラットを用い、局所脳低温療法の安全性評価を行う。とくに、頭蓋内圧亢進をきたす可能性、損傷脳組織へとカテーテルを留置する際の機械的損傷に留意した検討を行う。さらに、灌流液をリアルタ

イムでMRモニタリングできるかどうかを確認する。

正常ラット(各群 n=3)に対して、convection-enhanced delivery法(CED法)を用い、10に冷却した人工髄液または高浸透圧液(対照群は室温(約20))を注入し、安全性を評価する。イソフルレン吸入麻酔(自発呼吸維持)を行い、ラットを腹臥位とする。頭部の剃毛ならびに約1cmの皮膚切開を行ったのち、頭蓋骨に直径1mmのburr holeを作成する。逆流防止効果のあるステップ・デザインのカニューラ(Krauze MT, et al, J Neurosurg 103: 923-959, 2005)を定位的に留置する。微量注入ポンプを用い、毎分1.0マイクロリットル×300分の冷却液注入を行う。注入中の脳表温度を赤外温度計測によってモニタリングする。麻酔を中止し、神経学的評価を行う。さらに、翌日、3日後、7日後、1ヶ月後の生命予後・神経学的予後を評価する。一部のラットについて、安楽死させた後に脳標本を摘出し、病理学的検討を行う。CED法は、本研究グループのラット脳へのCED実験に準じて行う(Tominaga T, Sugiyama SI, et al, J Neurooncol 82: 41-47, 2007)。

(2) ラット外傷性脳損傷モデルを用い、局所脳低温療法の有効性を評価する。

ラット脳損傷モデル(各群 n=10)に対して、冷却した人工髄液(10)を受傷直後受傷30分後 受傷1時間後に注入し、無治療群(control)との比較において、その有効性を評価する。神経学的観察および病理学的検討を行う。さらに、同様の実験を、灌流液を高浸透圧液に変更して行う。

(3) 局所冷却液灌流分布を理論的に解析する。3次元MRデータから、計算に用いるための形状モデルをコンピュータ上で再構築する。画像解析・加工のための商用ソフトウェアを用い、実際の実験に使用する

ものと同サイズの仮想カニュラをモデル内に構築した後、周囲に計算格子を設定する。脳実質を多孔質媒体と仮定し、連続の式と Darcy の法則を連立させた流体計算および伝熱解析を、商用ソルバを用いて行う。境界条件として、脳組織の porosity、脳脊髄液の密度・動粘度・比熱、注入薬剤の密度・動粘度・比熱、初期温度その他を入力する。

#### 4. 研究成果

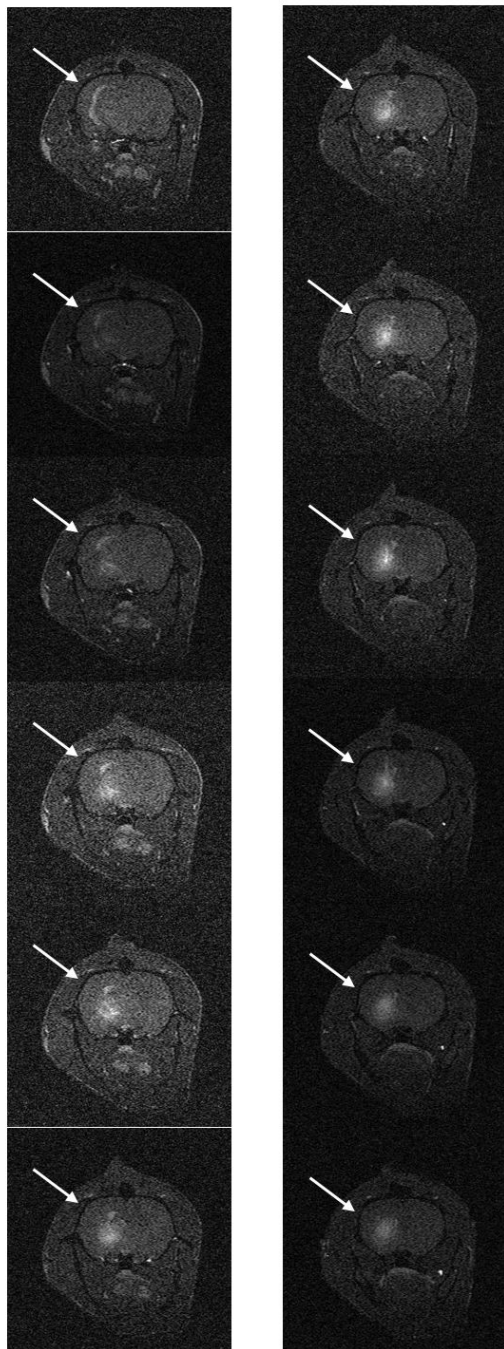


図3

(1) 正常ラットに対する冷却液灌流を行い、その安全性を確認した。10 に冷却した生理食塩水を 20 分間で合計 20[ $\mu$ L]、灌流した。神経学的予後および病理組織学的検討において、対照群との差を認めなかった。さらに、MRI を用いた灌流状態のリアルタイム・モニタリング方法を確立した。図 3 は、ラット脳内における灌流液分布の様子である。ガドリニウム造影剤を co-infusion することにより、明瞭な観察が可能であった(白矢印)。しかし、この方法では、液体成分である灌流液とガドリニウムとの分布が一致しているかどうかの疑問が残る。

図 4 は、生理食塩水による灌流の様子を、ガドリニウム造影剤を用いることなく、直接画像化したものである。この方法論の確立により、ラットのような小動物に対する薬剤灌流をリアルタイムでモニタリングすることが可能となった。

(2) ラット外傷性脳損傷モデルにおいての概念実証を試みた。その結果、実験的脳損傷を加えた直後より、頭蓋内圧亢進が速やかに起こり、CED 法による冷却生理食塩水の灌流が困難であることが明らかになった。このような問題点を克服する方法として、高浸透圧液の有用性が報告されていた (Sandberg DI et al, J Neurooncol 58:187-192, 2002)。しかし、本研究の実験系においては、高浸透圧液の有用性を再現することはできなかった。現在、実験的脳損傷の程度および損傷を加えた後の経過時間と、CED 法による灌流液注入の可否との相関を検討中である。さらに、灌流液を変更することでブレイクスルーを起こすべく、研究を継続している。

(3) 脳組織を多孔質媒体とみなし、その中を流れるカテーテル先端から注入される薬剤の振る舞いを 2 つの支配方程式(「連続の式」および「Darcy の法則」)を連立して解くことで、灌流の様子をシミュレーションする方法を開発した(図 5)。

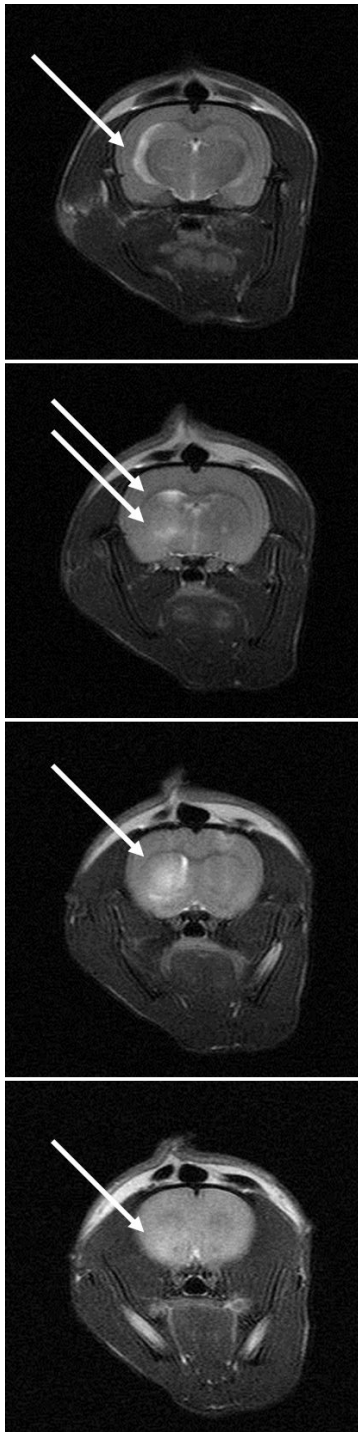


図4

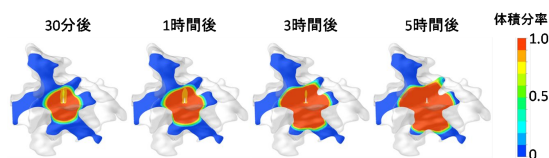


図5 CED法による冷却液灌流シミュレーション

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

富永悌二 (Tominaga, Teiji)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号 : 00217548

### (2)研究分担者

遠藤俊毅 (Endo, Toshiki)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号 : 00535370

齋藤竜太 (Saito, Ryuta)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号 : 10400243

中川敦寛 (Nakagawa, Atsuhiko)

東北大学病院・助教

研究者番号 : 10447162

新妻邦泰 (Niizuma, Kuniyasu)

東北大学・医工学研究科・助教

研究者番号 : 10643330

杉山慎一郎 (Sugiyama, Shinichiro)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号 : 30623152