



## Synergistic Effect of Cold Mannitol and Na<sup>+</sup>/Ca<sup>++</sup> Exchange Blocker on Blood-Brain Barrier Opening

池田, 充

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2002-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2517

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002517>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



## 【112】

氏名・(本籍) 池田 充(香川県)

博士の専攻分野の名称 博士(医学)

学位記番号 博い第1434号

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の日付 平成14年3月31日

### 【学位論文題目】

**Synergistic Effect of Cold Mannitol and  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  Exchange Blocker on Blood-Brain Barrier Opening**

(血液脳関門の開放に対する低温マンニトールと  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  Exchange Blocker の相乗効果について)

### 審査委員

主査 教授 甲村 英二

教授 尾原 秀史 教授 伊東 博

## 1.緒言

血液脳関門は脳血管内皮細胞に存在し、中枢神経系の恒常性を保つのに重要な役割を果たしている。血液脳関門は一方では抗癌剤や抗生素投与などの薬剤の脳内への移行を制限する。体循環内薬剤の脳実質内病変への移行を増加させる目的で、高浸透圧効果により血液脳関門の透過性を一時的に亢進させる治療方法が行われている。

1.1M マンニトールは、臨床上の安全性が確立されており、脳浮腫軽減によく用いられる高浸透圧薬剤であるが、血液脳関門の透過性を亢進させることはできない。代りに 1.4M から 1.6M の高濃度のマンニトールが用いられているが、この高濃度のマンニトールは動脈内に注入時に脳腫脹や痙攣等の合併症をきたすことが報告されている。一方、最近、実験的に低温にした溶液を注入することにより血液脳関門の透過性が亢進されることが報告された。この報告では、この正確な血液脳関門の透過性亢進の機序は確認されていない。

今回の研究では、安全性の確立されている 1.1M マンニトールを常温下 (24°C) と低温 (4°C) という異なった温度で、動脈内に注入し、血液脳関門の透過性を定量的に評価した。また、低温マンニトールの動注に、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  exchange blocker (KB-R7943) の全身投与を加えて血液脳関門の透過性亢進時間の延長性についても研究した。今回の研究は血液脳関門の透過性亢進に関する温度操作とカルシウム動態の操作が相乗効果を有することを示した最初の研究である。

## 2.方法

46 匹の成雄 Sprague-Dawley (SD)ラット（平均体重  $388 \pm 9\text{g}$ ）を用いた。トリクロロアセトアルデヒド (400mg/kg) による全身麻酔下に、右側総頸動脈を露出し、PE-50 ポリエチレンチューブを用いて、外頸動脈に逆行性にカニュレーションを施行した。体温は温熱器を用いて  $36.5 \pm 0.3^\circ\text{C}$  に調節し、脳温は温度センサーを右側頭筋下に挿入して測定した。マンニトール (30 秒)、 $[^{14}\text{C}]$ -sucrose の溶液 (60 秒)、生理食塩水 (30 秒) の順番に注入した。この際、総頸動脈近位をクリップでそれぞれ一時血流遮断し、流速は  $8.3 \times 10^{-2}\text{ml/s}$  とし、注入圧を生理学的範囲に調整した。 $[^{14}\text{C}]$ -sucrose の溶液及び、生理食塩水の注入はマンニトール注入後 ( $24^\circ\text{C} : n=12$ 、 $4^\circ\text{C} : n=14$ )、5 分後と 30 分後でそれぞれ行い、引き続き脳組織を 5 つの部位 (注入同側前頭葉、注入同側頭頂葉、視床下部、脳幹、注入対側前頭頭頂葉) に分けて摘出し、組織溶解液で溶解後、シンチレーションカウンターで測定した。血液脳関門の透過率は  $\text{PA}(\text{s}^{-1})$  として、脳組織 $[^{14}\text{C}]$  ( $\text{dpm g}^{-1}$ )/溶液 $[^{14}\text{C}]$  ( $\text{dpm ml}^{-1}$ )/sec として表した。加えて、カルシウムイオンの細胞内から血管内への流入を阻止するために KB-R7943 (3mg/kg) を低温のマンニトール注入前に静脈内投与し ( $n=14$ )、上記と同様の方法を用いて血液脳関門の透過率を測定した。コントロールとしては同様の方法を行い、マンニトールの代わりに同様量の生理食塩水を注入した。 $(n=6)$ 。血液ガスをマンニトールの注入前、注入後 5 分、及び 30 分で測定した。これらの結果は 2 群間でそれぞれに Student's *t* test を行い、 $P < 0.05$  を有意差ありとした。

### 3.結果

コントロール群では、PA(s<sup>-1</sup>)は注入同側前頭葉で 5.5±0.7、注入同側頭頂葉で 7.3±1.4、視床下部で 8.4±1.7、脳幹部で 7.2±1.2 であった。24°Cのマンニトール投与群では、5 分後及び 30 分後共にコントロール群と有意差はなく血液脳関門の透過性亢進は認めなかった。4°Cのマンニトール投与群では、5 分後で PA(s<sup>-1</sup>)は上記同様の順番に 45.1±11.6、40.7±12.0、48.2±11.7、57.2±14.5 であり、これらはコントロール群に比べて 5.6-8.2 倍を示し、有意な増加を示し、血液脳関門の透過性亢進を示した。しかし、30 分後にはこれらの値は減少し、コントロール群と有意差は認めなかった。また、注入対側前頭頭頂葉の PA(s<sup>-1</sup>)はコントロール群では 3.0±0.6 で、低温マンニトール投与群のそれとも有意差はなく、注入同側のみに血液脳関門の透過性亢進は生じることを示した。

KB-R7943 を投与した群では、低温マンニトール投与 5 分後においてそれぞれの部位で 27.1±10.5、26.2±9.3、31.0±9.0、26.8±9.8 とコントロール群に比べて 3.6-4.9 倍を示した。低温マンニトール投与 5 分後で KB-R7943 の投与群及び非投与群で PA(s<sup>-1</sup>)は有意差は示さず、この薬剤は低温効果による血液脳関門の透過性亢進の程度には関係のないことを示した。しかし、30 分後で PA(s<sup>-1</sup>)はそれぞれの部位で 15.6±2.5、17.4±3.1、15.5±2.8、14.7±3.2 とコントロール群に比し 1.8-2.8 倍と有意な増加を認めた。このことは、KB-R7943 投与が血液脳関門の透過性亢進を延長することを示した。

血液ガスは、マンニトール注入 5 分後で pH 及び HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>が、注入前よりも有意な低下を示したが、他のパラメーターに有意差はなく、また注入 30 分後ではどのパラメーターにも注入前と有意差はなかった。これらからマンニ

トール注入直後には一過性に代謝性アシドーシスとなるが、30 分後には正常に回復することを示した。脳温はマンニトール注入 1 分後で最低値 (24°C注入で 34.4±0.2°C、4°C注入で 33.1±0.2°C) となるが、その後 2 分で元の温度に回復した。

### 4.討論

血液脳関門の透過性を一過性に上げるために、高浸透圧のマンニトールの内頸動脈注入法が用いられている。この透過性亢進の機序の一つとして、高浸透圧による脳血管内皮細胞の縮化により、内皮細胞の細胞間結合が拡大して生じると考えられている。この機序を起こさせるのに 1.4 から 1.6M の高濃度のマンニトールが使われる。これは 1.0 から 1.2M の濃度ではこの機序が生じないためで、1.1M の濃度を用いた我々の結果も同様であった。この高浸透圧効果のない濃度で、4°Cまで温度を低下させることにより血液脳関門の透過性を亢進するという別の方法を使い、前回我々が報告した 1.6M を用いた場合の血液脳関門の透過性と同様の結果を示した。

文献上血液脳関門の透過性と体温の関係は、低体温下で血液脳関門の透過性は減少、ただしその効果は温度に対して正関数を示すのではなく、体温 23°C 程度で最大に減少するとされている。この現象の機序はまだ解明されていない。一方、最近、低温の溶液の注入により一時的に血液脳関門の透過性が亢進することが報告された。この場合、血液脳関門の透過性を亢進するために 8±1°C の溶液が必要とされている。この機序の説明としては、低温が内皮細胞の細胞間結合の安定性に影響を及ぼし、7-8°C という臨界点を越えると細胞間結合の破綻が起るのではないかと提案されている。

血液脳関門の透過性の可逆的変化の他の機構として、カルシウム依存性の細胞骨格が短縮することにより、内皮細胞間結合が一時的破綻を生じ透過性が亢進することが考えられる。この現象は、我々が以前に報告した高浸透圧効果による *in vitro* での内皮細胞内カルシウム濃度の増加や、*in vivo* で KB-R7943 を用いることにより血液脳関門の破綻が延長することからも証明されている。

KB-R7943 は透過率には影響せず、透過率の延長にのみ影響がある。低温のマンニトールと KB-R7943 を組み合わせて用いることにより、血液脳関門の透過性亢進は 30 分後でも有意に認められた。この手法は、血液脳関門の可逆的透過性亢進を安全に得るのに有望な方法といえる。今後、低温のマンニトール注入による血液脳関門の透過性亢進の機序を明らかにする必要がある。内皮細胞が低温 ( $8 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) に曝されることにより、短期間に内皮細胞内イオンの恒常性が障害されると報告されており、低温により細胞内カルシウムが急激に増加し、高浸透圧様の状態になり細胞内機能に変化を来すと考えられる。今回の研究から、KB-R7943 の使用により、低温による血液脳関門の透過性亢進には高浸透圧性同様にカルシウム動態が影響すると示唆される。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第 1434 号	氏名	池田 充
論文題目	血液脳関門の開放に対する低温マンニトールと $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{++}$ Exchange Blockerの相乗効果について Synergistic Effect of Cold Mannitol and $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{++}$ Exchange Blocker on Blood-Brain Barrier Opening		
審査委員	主査 甲村 英二 副査 尾原秀史 副査 伊東 宏		
審査終了日	平成 14 年 2 月 19 日		

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

血液脳関門は脳血管内皮細胞より形成され、中枢神経系の恒常性を保つのに重要な役割を果たしている。血液脳関門は一方では抗癌剤や抗生剤などの薬剤の脳内への移行を制限する。体循環内薬剤の脳実質内への移行を増加させる目的で、高浸透圧効果により血液脳関門の透過性を一時的に亢進させる治療方法が行われている。従来より血液脳関門の透過性亢進目的で 1.4M から 1.6M の高濃度のマンニトールが用いられているが、1.1M マンニトールは、血液脳関門の透過性を亢進させることはできない。

今回の研究では、1.1M マンニトールを常温下 (24°C) と低温 (4°C) という異なる温度で、動脈内に注入し、血液脳関門の透過性を定量的に評価した。また、低温マンニトールの動注に、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  exchange blocker (KB-R7943) の全身投与を加えて血液脳関門の透過性亢進時間の延長についても研究した。

46 匹の成雄 Sprague-Dawley (SD) ラット (平均体重  $388 \pm 9$  g) を用いた。トリクロロアセトアルデヒド (400mg/kg) による全身麻酔下に、右側総頸動脈を露出し、カニューレーションを施行した。体温は  $36.5 \pm 0.3$  °C に調節し、脳温は温度センサーを右側頭筋下に挿入して測定した。マンニトール (30 秒)、 $[\text{I}^4\text{Cl}]$ -sucrose の溶液 (60 秒)、生理食塩水 (30 秒) の順に注入した。 $[\text{I}^4\text{Cl}]$ -sucrose の注入はマンニトール注入 (24°C : n=12, 4°C : n=14) 5 分後と 30 分後でそれぞれを行い、引き続き脳組織を 5 つの部位 (注入同側前頭葉、注入同側頭頂葉、視床下部、脳幹、注入対側前頭頭頂葉) に分けてシンチレーションカウンターで測定した。血液脳関門の透過率 PA(s<sup>-1</sup>) は、脳組織 [ $^{14}\text{C}$ ] (dpm g<sup>-1</sup>) / 溶液 [ $^{14}\text{C}$ ] (dpm ml<sup>-1</sup>) / sec として表した。カルシウムイオンの細胞内から血管内への流入を阻止するために KB-R7943 (3mg/kg) を低温のマンニトール注入前に静脈内投与し (n=14)、上記方法により血液脳関門の透過率を測定した。対照群にはマンニトールの代わりに同量の生理食塩水を注入した (n=6)。血液ガスをマンニトール注入前、注入後 5 分、及び 30 分で測定した。結果は 2 群間で Student's t test を行い、P < 0.05 を有意差ありとした。

対照群では、PA(s<sup>-1</sup>) は注入同側前頭葉で  $5.5 \pm 0.7$ 、注入同側頭頂葉で  $7.3 \pm 1.4$ 、視床下部で  $8.4 \pm 1.7$ 、脳幹部で  $7.2 \pm 1.2$  であった。24°C のマンニトール投与群では、5

分後及び 30 分後共に対照群と有意差はなく血液脳関門の透過性亢進は認めなかった。4°C のマンニトール投与群では、5 分後で PA(s<sup>-1</sup>) は上記同様の順番に  $45.1 \pm 11.6$ 、 $40.7 \pm 12.0$ 、 $48.2 \pm 11.7$ 、 $57.2 \pm 14.5$  であり、これらは対照群に比べて有意な増加であり血液脳関門の透過性亢進を示した。しかし、30 分後では対照群と有意差は認めなかつた。また、注入対側前頭頭頂葉の PA(s<sup>-1</sup>) は対照群低温マンニトール投与群で有意差はなく、注入同側のみに血液脳関門の透過性亢進は生じることが示された。

KB-R7943 投与群では、低温マンニトール投与 5 分後においてそれぞれの部位で  $27.1 \pm 10.5$ 、 $26.2 \pm 9.3$ 、 $31.0 \pm 9.0$ 、 $26.8 \pm 9.8$  と対照群に比べて有意に増加した。低温マンニトール投与 5 分後で KB-R7943 の投与群及び非投与群で PA(s<sup>-1</sup>) は有意差は示さず、この薬剤は低温効果による血液脳関門の透過性亢進の程度には関係のないことを示した。しかし、30 分後で PA(s<sup>-1</sup>) はそれぞれの部位で  $15.6 \pm 2.5$ 、 $17.4 \pm 3.1$ 、 $15.5 \pm 2.8$ 、 $14.7 \pm 3.2$  と対照群に比し 1.8-2.8 倍と有意な増加を認めた。KB-R7943 投与が血液脳関門の透過性亢進を延長することが示された。

高浸透圧のマンニトールの内頸動脈注入法による透過性亢進の機序の一つとして、高浸透圧による脳血管内皮細胞の縮化により、内皮細胞の細胞間結合が疎となって生じると考えられている。この目的で 1.4 から 1.6M の高濃度のマンニトールが使われる。この高浸透圧効果のない濃度でも、4°Cまで薬液温度を低下させることにより、前回我々が報告した常温の 1.6M を用いた場合の血液脳関門の透過性と同様の結果が得られた。低温による効果の説明としては、低温が内皮細胞の細胞間結合の安定性に影響を及ぼし、7-8°C という臨界点を越えると細胞間結合の破綻が生じるのではないかと推測されている。

KB-R7943 は透過率には影響せず、透過率の延長にのみ影響がある。低温のマンニトールと KB-R7943 を組み合わせて用いることにより、血液脳関門の透過性亢進は 30 分後でも有意に認められた。この手法は、血液脳関門の可逆的透過性亢進を安全に得るのに有望な方法といえる。今後、低温のマンニトール注入による血液脳関門の透過性亢進の機序を明らかにする必要がある。内皮細胞が低温 (8 ± 1°C) に曝されること

により、短期間に内皮細胞内イオンの恒常性が障害されると報告されており、低温により細胞内カルシウムが急激に増加し、高浸透圧様の状態になり細胞内機能に変化を来すと考えられる。今回の研究から、KB-R7943 の使用により、低温による血液脳閥門の透過性亢進には高浸透圧性と同様にカルシウム動態が影響することが示唆された。本研究は血液脳閥門について薬剤投与による一時的開放を定量的に研究したものであるが、従来は高濃度マンニトール頸動脈動注によってのみ血液脳閥門の一時的開放が可能であったところ、本研究は注入薬液を 4°C に冷却することにより一般に用いられる濃度のマンニトールによって開放されるという新たな重要な知見を得たものとして価値ある業績と認める。よって本研究は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。