

# 温熱療法におけるラット脳及びグリオーマの 局所血流変化に関する研究 — Laser Doppler Flowmetry による組織内局所血流測定 —

グリニョフ イゴリ

新潟大学大学院医学研究科外科系専攻脳神経外科学

(主任教授：田中 隆一)

## Measurement of Regional Blood Flow by Laser Doppler Flowmetry in Rat Normal Brain and Glioma During Interstitial Hyperthermia

Igor GRINEV

*Division of Neurosurgery*

*Graduate School of Medical and Dental Sciences,*

*Niigata University*

*(Director: Prof. Ryuichi TANAKA)*

### 要 旨

脳腫瘍の局所温熱療法において、脳および腫瘍の局所血流がどのように変化するかについては、未だ明らかではない。これまで、局所脳血流は脳表面においてのみ測定可能であったが、最近では Laser Doppler Flowmetry (以下 LDF) の開発により、深部脳組織の局所血流測定も可能となった。そこで、本研究では、ラットグリオーマに対する組織内加温時の、脳およびグリオーマの局所血流の変化を LDF を用いて検討した。

(方法) 実験には正常ラット (16 匹) およびラット C6 グリオーマモデル (15 匹) を用い、局所加温には針型電極を用いる 13.56 MHz RF 組織内加温システムを用いた。RF 電極、温度センサーおよび LDF プローベは右頭頂にアクリル製のテンプレートを用いて目的の脳あるいは腫瘍内まで定位的に挿入、設置した。温度センサーと LDF プローベはそれぞれ RF 電極から 2mm の位置に置いて、測定した。加温の目標温度は 39℃、41℃、43℃および 45℃とし、各群でそれぞれ目標温度に到達した時点で局所血流を測定した。また各群とも目標温度で 15 分間加温し、72 時間後に断頭して病理組織学的検索を行った。

(結果) 正常脳の加温では、39℃群および、41℃群では、局所脳血流は加温とともに徐々に増加して、それぞれ基礎値の 126%、140% となった。43℃群では、血流は基礎値の 149% にまで増加した後低下し、終了時には基礎値の 97% にまで減少した。また、45℃群では 45℃に到達

Reprint requests to: Igor GRINEV  
Dept. of Neurosurgery  
Brain Research Institute  
Niigata University  
1-757 Asahimachi-dori,  
Niigata 951-8585 Japan

別刷請求先： 〒951-8585 新潟市旭町通り 1-757  
新潟大学脳研究所脳神経外科

グリニョフ イゴリ

するとともに血流は基礎値の 158 % に増加し、その後急速に下降して基礎値の 60 % となった。一方、脳腫瘍モデルにおいては、正常脳と全く異なる結果を示し、39 °C 群で加温終了時に基礎値の 116 % の一過性の増加を示したが、41 °C 群、43 °C 群および 45 °C 群では温度上昇とともに局所腫瘍血流は減少し、それぞれ基礎値の 66 %、62 %、42 % となった。病理組織学的に加温による凝固壊死巣の大きさを検討してみると、39 °C 群、41 °C 群、43 °C 群および 45 °C 群における凝固壊死の大きさは、正常脳ではそれぞれ直径  $1.2 \pm 0.1\text{mm}$ 、 $2.4 \pm 0.2\text{mm}$ 、 $3.5 \pm 0.2\text{mm}$ 、 $4.1 \pm 0.2\text{mm}$ 、腫瘍では  $1.5 \pm 0.1\text{mm}$ 、 $3.2 \pm 0.2\text{mm}$ 、 $5.0 \pm 0.2\text{mm}$ 、 $5.5 \pm 0.3\text{mm}$  であり、いずれの加温群においても凝固壊死巣の大きさは腫瘍組織の方が正常組織よりも有意に大きかった。

(考察) LFD を用いてラット正常脳およびグリオーマの局所血流を測定した結果、局所加温による正常脳と脳腫瘍の局所血流量の変化の相違が明確となった。すなわち、正常脳においては温度の上昇とともに血流が増加し、43 °C 以上の加温では、150 % の血流増加に引き続き血流が減少した。一方腫瘍では、温度上昇に伴う血流増加のパターンは 41 °C 以上の加温では見られず、加温とともに減少することが確かめられた。したがって、脳腫瘍では本来血流が少ない上加温により血流が減少するために、腫瘍の選択的加温がさらに得やすい条件となり、加温に適した環境になっているものと推測された。また、腫瘍周囲の脳組織では、41 ~ 42 °C の比較的低い加温により著明な血流増加をきたすことから、局所温熱療法に化学療法を併用する意義が高いものと考えられた。

キーワード：ハイパーサーミア、グリオーマ、血流、組織内加温

## 緒 言

温熱治療が悪性脳腫瘍を含む癌に対して有効な治療法であることは、これまでの多くの報告から明らかである<sup>3)18)21)24)25)27)</sup>。温熱治療における抗腫瘍効果は腫瘍の存在する環境、腫瘍組織の血流、pH、酸素、栄養あるいは腫瘍細胞におけるストレス蛋白の発現などの様々な因子により修飾されることが知られている<sup>1)5)7)8)14)23)</sup>。悪性脳腫瘍とくにグリオーマにおいては、不規則な腫瘍血管の増生がみられるが腫瘍内血流は低下しており、腫瘍組織が選択的に加温されやすい。また、悪性グリオーマは壊死傾向が顕著であり、腫瘍細胞は低酸素、高 pH、低栄養状態にあるため放射線治療には抵抗性を示すものの、温熱には感受性が高い。その中でも、とくに腫瘍組織の血流は局所温熱治療の効果に影響をおよぼす重要な因子である<sup>9)10)12)13)19)20)28)</sup>。

脳および脳腫瘍に対する局所加温の血流におよぼす影響については、これまで明確に示されていない。そこで本研究では、脳組織内血流測定が可能となった Laser Doppler Flowmetry (以下 LDF)

を用いてラット脳およびグリオーマに対する組織内加温時の局所血流動態を検討した。

## 材料と方法

### 1. 実験動物

実験には、体重 250 - 350g の雄 Wistar ラット (31 匹) を用い、正常群 (16 匹) およびグリオーマ群 (15 匹) に分けた。グリオーマの作成には C6 グリオーマ細胞を用い、それぞれのラットの右頭頂部の正中より 3mm 外側、冠状縫合より 4mm 後方に骨窓を開け、骨表面より 4mm の深さにおよそ 106 個の腫瘍細胞を移植した。直径約 5.0mm の腫瘍が形成される移植後 10 日目に<sup>2)28)</sup>、RF 組織内加温を行った。すべての実験は、50 % 酸素、47 % 笑気および 3 % ハロセンの混合気によるガス麻酔下にて行われた。

### 2. 針型電極による RF 組織内加温

ラットを定位脳手術用固定装置 (ナリシゲ社製) に腹臥位にて固定した。頭皮を正中切開した後、右頭頂骨に正中から 3mm 外側、冠状縫合から後方へ 2, 4, 6mm の位置に 3 つの骨窓を開け、それ

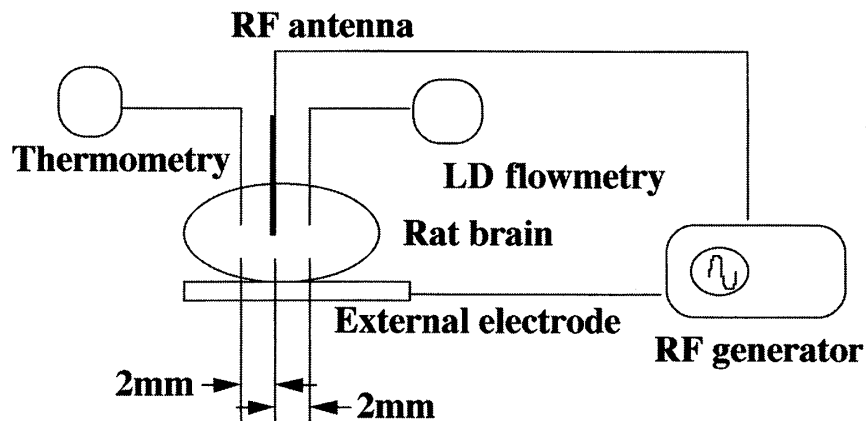


図1 実験シェーマ

ラットの脳内にテンプレートで温度センサー、RF アンテナ、血流プローベを同時に挿入留置させた後、RF アンテナとラット腹部の対外電極間で加温した。RF アンテナから 2mm 離れた局所の目標温度を 39℃、41℃、43℃、45℃に設定し、局所血流変化を経時的にモニターした。

ぞれ、前から熱電対サーミスタープローベ（オムロン社製：直径 0.9mm）、RF 針型電極（直径 0.79mm）、組織血流測定用針状プローベ（直径 1.0mm）をアクリル製のテンプレートを用いて 4mm の深さの脳あるいは腫瘍内まで挿入した<sup>6)</sup>。図 1、2 に、それぞれ本実験シェーマおよびラット定位脳手術固定装置を示す。実験中直腸温をモニターし、遠赤外線ランプを用いてラットの体温を  $36.5 \pm 0.8^\circ\text{C}$  に保つよう調節した。

組織内加温には 13.56MHz ラジオ波発生装置 HEH-50（オムロン社製）を用い、通常 0.2-0.6 Watt の出力にて加温した。加温は RF 電極の 2mm 前方の温度センサーが目標温度（39℃、41℃、43℃、45℃）に達するまで約 15 分かけて加温し、目標温度に達成した後は 15 分間維持して加温を終了した<sup>22)</sup>（図 3）。39℃加温はグリオーマ群 3 匹、正常群 3 匹、41℃加温はグリオーマ群 3 匹、正常群 3 匹、43℃加温はグリオーマ群 6 匹、正常群 7 匹、45℃加温はグリオーマ群 3 匹、正常群 3 匹をそれぞれ加温した。

### 3. 局所血流測定

正常脳および腫瘍の局所血流は、LDF 血流測定

用プローベを用いて RF 電極から 2mm 離れた脳内および腫瘍内で計測した。血流測定には、Laser Doppler Flowmetry（ALF-21、アドバンス社製）を用いた。

### 4. 病理組織学的検索

加温終了 72 時間後にラットを麻酔下に断頭した後脳を取り出し、10%ホルムアルデヒドにて固定した。パラフィン切片作成後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、病理組織学的検索を行った。電極の挿入部とその周囲に広がる凝固壊死巣の最大径を測定した。

## 結 果

### 1. 加温による正常脳の血流変化

目標温度 39℃群および 41℃群では、局所脳血流は加温とともに徐々に増加して、それぞれピークは基礎値の 126%、140%にまで達し、加温終了後もしばらく血流増加は持続した。43℃群では、加温がピークになって 3 分で基礎値の 149%にまで増加した後下降し、終了時には基礎値の 97%にまで減少した。また、45℃群では 45℃に

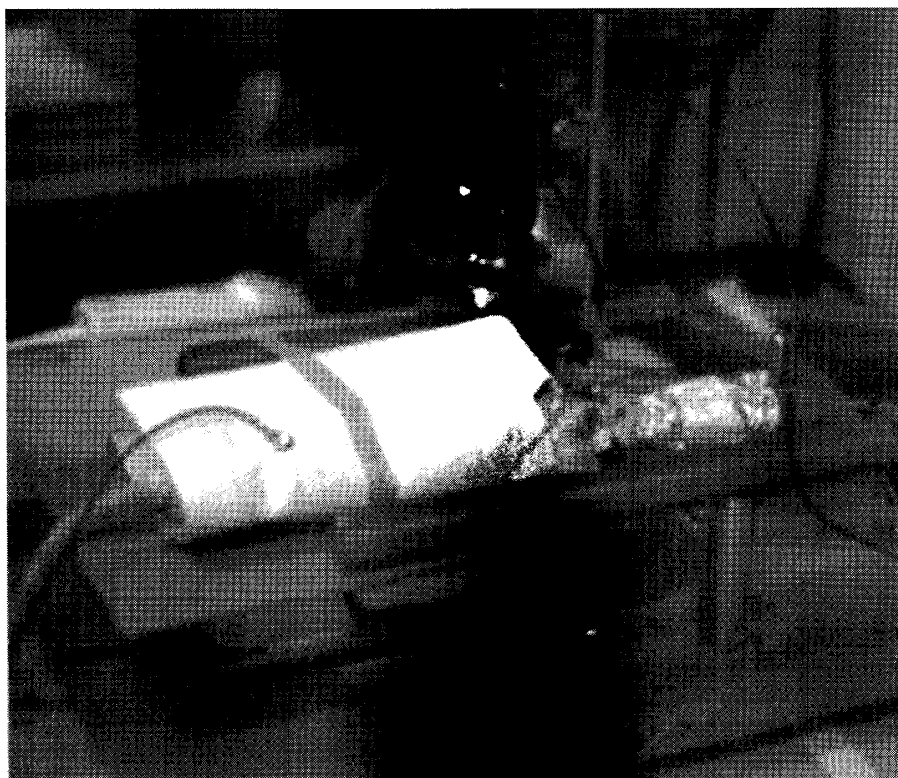


図2 定位脳手術装置

ラットの頭部を固定し、加温を行い、局所血流を測定した。

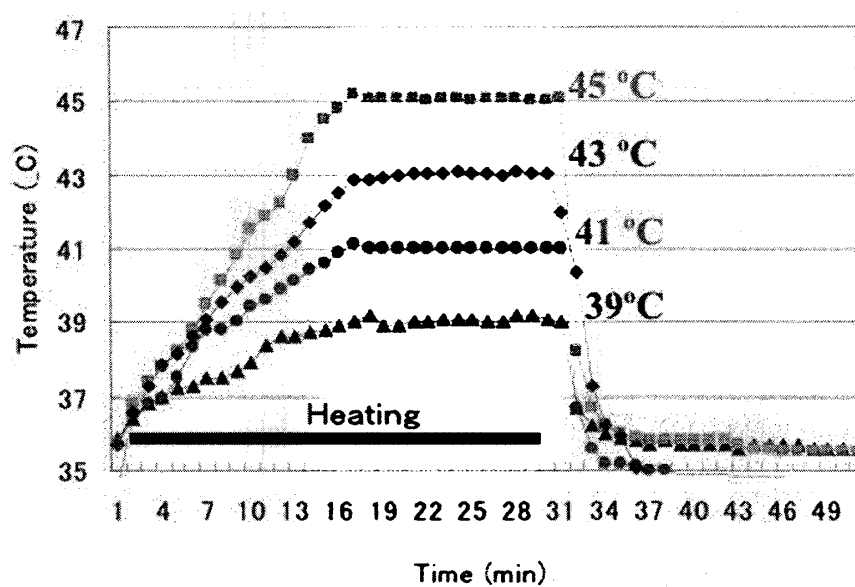


図3 加温スケジュール

加温開始15分で目標温度(39℃、41℃、43℃および45℃)に達し、15分間目標温度を維持させた後、加温を終了する。

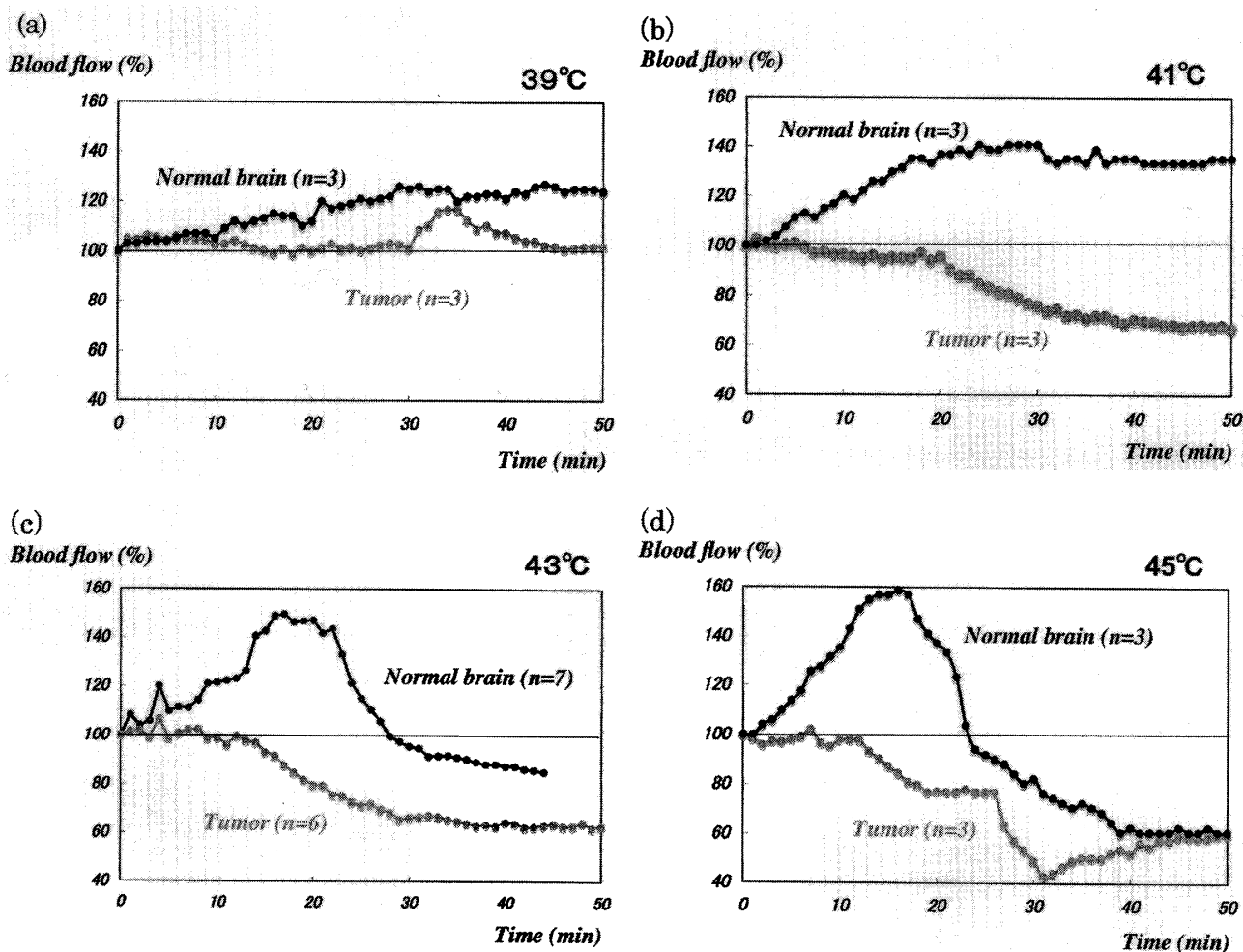


図4 正常脳および腫瘍における目標温度と局所血流変化

縦軸血流変化は、基礎値の相対百分率で示されている。正常脳では、39℃群、41℃群の加温では、局所血流は緩徐増加するパターンを示し、43℃群、45℃群においては急激な血流増加後に下降した。

一方、腫瘍において39℃では一過性上昇パターンが認められるも、41℃、43℃、45℃では緩徐下降パターンを示し、正常脳加温との相違を認めた。

- (a) 39℃群 (正常脳, グリオーマ), (b) 41℃群 (正常脳, グリオーマ)  
 (c) 43℃群 (正常脳, グリオーマ), (d) 45℃群 (正常脳, グリオーマ)

到達するとともに血流は158%に達し、その後急速に下降して基礎値の60%となった。加温による血流増加パターンは、39℃、41℃群では緩徐上昇型で、43℃群および45℃群では、急激上昇・下降型であり、両者は異なるパターンを示した(図4)。

## 2. 加温による脳腫瘍の血流変化

一方、脳腫瘍モデルにおいては、血流変化は正

常脳の場合とは全く異なるパターンを示した。すなわち、39℃群でははじめは血流の変化はほとんどなく、加温の終了時に116%まで一過性に増加を示して下降した。41℃群、43℃群および45℃群では温度上昇とともに局所腫瘍血流は徐々に減少し、それぞれ基礎値に対して66%、62%、42%にまで減少した(図4)。

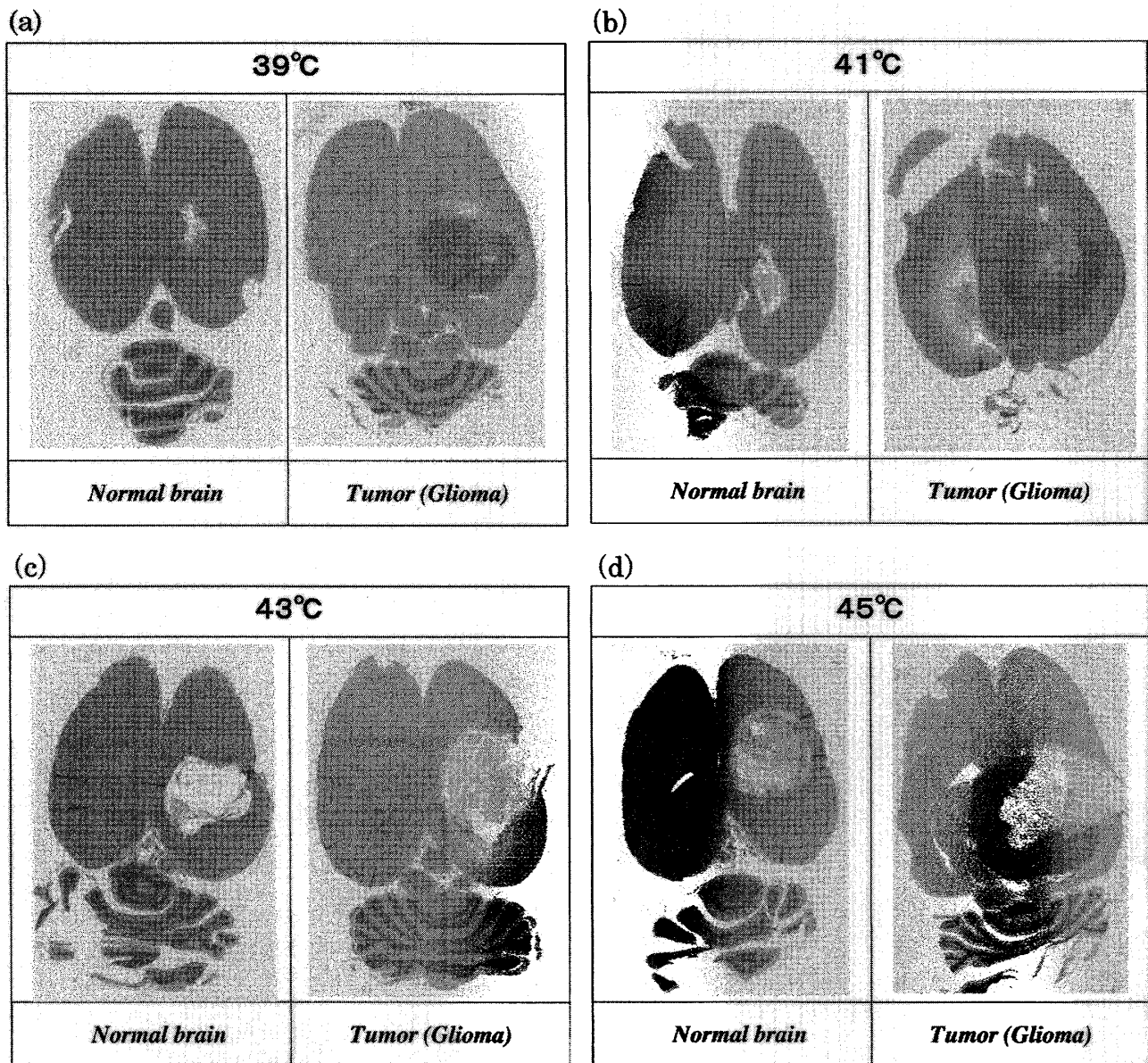


図5 ラット正常脳および腫瘍における加温後の組織標本 (HE 染色)

加温による凝固壊死巣は温度とともに増大する。凝固壊死巣の大きさは、同じ温度の正常脳に比べ腫瘍では有為に大きい。

- (a) 39℃群 (正常脳, グリオーマ), (b) 41℃群 (正常脳, グリオーマ)  
 (c) 43℃群 (正常脳, グリオーマ), (d) 45℃群 (正常脳, グリオーマ)

### 3. 組織学的検討

病理組織学的に加温による凝固壊死巣の大きさを検討してみると、正常脳では 39℃群, 41℃群, 43℃群, 45℃群で壊死の大きさの直径はそれぞれ  $1.2 \pm 0.1\text{mm}$ ,  $2.4 \pm 0.2\text{mm}$ ,  $3.5 \pm 0.2\text{mm}$ ,  $4.1 \pm$

$0.2\text{mm}$  であり、腫瘍では  $1.5 \pm 0.1\text{mm}$ ,  $3.2 \pm 0.2\text{mm}$ ,  $5.0 \pm 0.2\text{mm}$ ,  $5.5 \pm 0.3\text{mm}$  であった。いずれの加温群においても凝固壊死巣の大きさは腫瘍組織の方が正常組織よりも有意に大きかった (表 1, 図 5)。

表1 目標温度と加温による壊死のサイズ (mm).

	39°C	41°C	43°C	45°C
正常脳	1.2±0.1	2.4±0.2	3.5±0.2	4.1±0.2
脳腫瘍	1.5±0.1	3.4±0.2	5.0±0.2	5.5±0.3

(単位: mm)

## 考 察

悪性腫瘍の温熱療法において、加温効果に影響を与える生物学的因子として最も重要なものは局所血流量であり、一般に正常組織に比べて血流の少ない腫瘍組織が選択的に加温されやすいことが、腫瘍の局所加温の大きな生物学的根拠となっている<sup>20)</sup>。また、本来血流の多い正常脳は局所加温によって加温し難い臓器であり、脳保護の観点からみても脳腫瘍は局所加温の良い適応となると考えられる。

本研究でLFDを用いてラット正常脳およびグリオーマの局所血流を測定した結果、局所加温による正常脳と脳腫瘍の局所血流量の変化の相違が明確となった。すなわち、正常脳においては温度の上昇とともに組織血流量が増加し、43℃以上の加温では、150%の血流増加に引き続き血流量減少が起こる。一方腫瘍では、温度上昇に伴う血流増加のパターンは41℃以上の加温では見られなくなり、加温とともに減少していくことが確かめられた。

局所加温後の脳および脳腫瘍の血流動態に関しては、従来あまり詳細には検討されていない。Salcman<sup>16)</sup>は犬のマイクロウェーブ加温で脳血流の緩徐な増加を報告し、Moriyama<sup>11)</sup>はサル<sup>11)</sup>のマイクロウェーブ加温で45℃の加温で一時的な増加を示したあと血流減少が起こることを示している。Ohmoto<sup>15)</sup>は、ラット脳のマイクロウェーブ加温で、41℃の加温では20分で2倍に血流が増えること、43℃の加温で10分で134%に増加した後減少し、31%にまで減少すると報告している。大動物での検討では、Sato<sup>17)</sup>はサルの実験で正常脳で血流が基礎値の13.5%の増加

するのに対して腫瘍では6.5%程度しか血流増加がみられないとしている。いずれの報告も実験方法が異なり、本研究で示したような各温度毎の分析が乏しく、比較することは難しいが、正常脳組織においては41℃までは緩徐増加パターンを認め、43℃以上の加温では急速上昇後下降する点で一致する。

一方、脳腫瘍の血流に関しては報告が少なく、一定の結果が得られていないが、脳腫瘍においては、加温による血管拡張が起こりにくく、血流が増加しにくく、本研究で示したように加温とともに血流が減少するものと考えられる。この血流減少は、おそらく腫瘍組織が加温により凝固壊死を生じることや、腫瘍の微小血管が閉塞することなどによると考えられる。したがって、脳腫瘍では本来血流が少ない上に加温により血流が減少するために、腫瘍の選択的加温がさらに得やすい条件になるものと推測される。一方、腫瘍周囲の脳組織では、41～42℃の比較的低い加温でも、著明な血流増加が見られることから、局所温熱療法に化学療法を併用する意義が高いものと考えられる。

本研究では、この脳深部の局所血流のダイナミックな変化を経時的に捉えるという点から、LDF法を選択した。脳の局所脳血流の変化を実際に捉える方法としては水素クリアランス法をはじめとし、14Cヨードアンチピリン法、マイクロスフェア法、そして今回用いたLDF法などがあり、それぞれ利点、欠点を有する<sup>26)</sup>。水素クリアランス法は計測値の正確さは群をぬくものの、脳表面でなければ計測できず、また断続的計測である。ヨードアンチピリン法やマイクロスフェア法では血流の絶対値が得られるものの、経時的に計測するこ

とはできない。本研究で用いた LDF 法は、絶対値の正確さは前 3 者に及ばないものの、経時的な局所血流の変化を見ることが可能であること、脳深部の血流が測れると言う大きな利点を有している。

## 結 語

LFD を用いてラット正常脳およびグリオーマの局所血流を測定した結果、局所加温による正常脳と脳腫瘍の局所血流量の変化の相違が明確となった。すなわち、正常脳においては温度の上昇とともに血流が増加し、43℃以上の加温では、150%の血流増加に引き続き血流が減少した。一方腫瘍では、温度上昇に伴う血流増加のパターンは 41℃以上の加温では見られず、加温とともに減少することが確かめられた。したがって、脳腫瘍では本来血流が少ない上に加温により血流が減少するために、腫瘍の選択的加温がさらに得やすい条件となり、加温に適した環境になっているものと推測された。また、腫瘍周囲の脳組織では、41～42℃の比較的低い加温により著明な血流増加をきたすことから、局所温熱療法に化学療法を併用する意義が高いものと考えられた。

## 謝 辞

最後に、本研究においてご指導を賜りました新潟大学脳研究所脳神経外科田中隆一教授、高橋英明講師、宇塚岳夫博士ならびに実験にご協力いただきました木山信子様へ心から御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Adachi H, Fujisawa H, Maekawa T, Yamashita T and Ito H: Changes in the extra cellular glutamate concentrations in the rat cortex following localized hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 11: 587-599, 1995.
- 2) Auer RN, Del Maestro RF and Anderson R: A simple and reproducible experimental in vivo glioma model. *Canad J Neurol Sci* 8: 325-331, 1981.
- 3) Fajardo LF: Pathological effects of hyperthermia in normal tissues. *Cancer Res* Oct 44 (10Suppl): 4826s-4835s, 1988.
- 4) 伏島 徹: 実験脳腫瘍の増殖能及び局所循環・代謝におよぼす放射線照射の影響. *新潟医学会雑誌* 106: 528-535, 1992.
- 5) Groothuis DR, Fisher JR, Lapin G, Bigner DD and Vick NA: Permeability of different experimental brain tumor models to horseradish peroxidase. *J Neuropathol Exp Neurol* 41: 164-185, 1982.
- 6) Kaatee RS, Nowak PC, van der Zee J, de Bree J, Kanis BP, Crezee H, Levendag PC and Visser AG: Clinical thermometry, using the 27 MHz multi-electrode current-source interstitial hyperthermia systems in brain tumors. *Radiother Oncol* 59: 227-231, 2001.
- 7) Kakinuma K, Tanaka R and Takahashi H: Targeting chemotherapy for malignant brain tumor using thermo sensitive liposome and localized hyperthermia. *J Neurosurgery* 84: 180-184, 1996.
- 8) Kitai R, Kabuto M, Kubota T, Kobayashi H, Matsumoto H, Hayashi S, Shioura H, Ohtsubo T, Katayama K and Kano E: Sensitization to hyperthermia by intracellular acidification of C6 glioma cells. *J Neurooncol* Sep 39: 197-203, 1998.
- 9) Lokshina AM, Song CW, Rhee JG and Levitt SH: Effect of fractionated heating on the blood flow in normal tissues. *Int J Hyperthermia* 1: 117-129, 1985.
- 10) Mizumatsu S, Ono Y, Tamiya T, Matsumoto K, Ohmoto T and Furuta T: Combination effect of hyperthermia and MX2 on cultured glioma cell lines. *Gan To Kagaku Ryoho* 26: 789-795, 1999.
- 11) Moriyama E: Cerebral Blood Flow Changes During Localized Hyperthermia; *Neurol Med Chir* 30: 923-929, 1990.
- 12) Nah BS, Choi IB, Oh WY, Osborn JL and Song CW: Vascular thermal adaptation in tumors and normal tissue in rats. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1: 95-101, 1996.
- 13) Nishimura Y, Shibamoto Y, Jo S, Akuta K,



- Hiraoka M, Takahashi M and Abe M: Relationship between heat-induced vascular damage and thermo sensitivity in four mouse tumors. *Cancer Res* 48: 7226-7230, 1988.
- 14) Ohmoto Y, Fujisawa H, Ishikawa T, Sakabe T, Nishizaki T, Ito H and Suzuki M: Changes in local cerebral glucose utilization following radiofrequency-induced local hyperthermia in the rat - an autoradiographic study. *Jpn J Hyperthermic Oncol* 17: 2001.
- 15) Ohmoto Y, Fujisawa H, Ishikawa T, Koizumi H, Matsuda T and Ito H: Sequential changes in cerebral blood flow, early neuropathological consequences and blood-brain barrier disruption following radiofrequency-induced localized hyperthermia in the rat. *Int J Hyperthermia* 12: 321-334, 1996.
- 16) Salcman M, Moriyama E, Elsner HJ, Rossman H, Gettleman RA, Neuberth G and Corradino G: Cerebral blood flow and the thermal properties of the brain: a preliminary analysis. *J Neurosurg* 70: 592-598, 1989.
- 17) Satoh T, Nakasone S and Nishimoto A: Cerebral blood flow response to the tissue temperature in tumour and brain tissues. *Int J Hyperthermia* 5: 683-696, 1989.
- 18) Sneed PK and Stea B: Thermoradiotherapy for brain tumor. ed by Seegenschmiedt MH, Fessenden P and Vernon CC; Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp159-173, 1995.
- 19) Song CW: Effect of local hyperthermia on blood flow and microenvironment: a review. *Cancer Res* Oct 44 (10 Suppl): 4721s-4730s, 1984.
- 20) Song CW, Choi IB, Nah BS, Sahu SK and Osborn JL: Microvasculature and Perfusion in Normal Tissues and Tumors. in *Thermoradiotherapy and thermochemotherapy*, ed by Seegenschmiedt MH, Fessenden P, Vernon CC, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp139-154, 1995.
- 21) Takahashi H, Suda T, Motoyama H, Uzuka T, Takahashi S, Morita K, Kakinuma K and Tanaka R: Radiofrequency interstitial hyperthermia of malignant brain tumors: development of heating system. *Experimental Oncology* 22: 186-190, 2000.
- 22) Takahashi H, Tanaka R, Hondo H, Nakajima T, Watanabe M, Sekihara Y and Kakinuma K: Clinical experiences of RF hyperthermia for malignant brain tumors. *Neurosurgeons* 12: 245-255, 1993.
- 23) Takahashi H, Tanaka R, Watanabe M, Kakinuma K, Suda T, Takahashi S, Masuda H, Saito A and Nakajima T: Clinical result of RF interstitial hyperthermia for malignant brain tumors. *Japanese J of Hyperthermic Oncology* 11: 61-67, 1995.
- 24) Takahashi S, Tanaka R, Watanabe W, Takahashi H, Kakinuma K, Suda T, Yamada M and Takahashi H: Effects of whole-body hyperthermia on the canine central nervous system. *Int J Hyperthermia* 15: 203-216, 1999.
- 25) Tanaka R, Kim CH, Yamada N and Saito Y: Radiofrequency hyperthermia for malignant brain tumors. *Neurosurgery* 21: 478-483, 1987.
- 26) Uranishi R, Nakase H, Sakaki T and Kempinski OS: Evaluation of Absolute Cerebral Blood Flow by Laser-Doppler Scanning - Comparison with Hydrogen Clearance. *J Vasc R* 36: 100-105, 1999.
- 27) Uzuka T, Tanaka R, Takahashi H, Kakinuma K, Matsuda J and Kato K: Planning of hyperthermic treatment for malignant glioma using computer simulation. *Int J Hyperthermia* 17: 114-122, 2001.
- 28) 渡辺明良: Rous sarcoma virus 誘発ラット脳腫瘍における DNA 合成期細胞の分布と血流量および糖代謝との関係. *脳神経* 40: 637-645, 1988.

(平成16年12月27日受付)