近赤外光による脳血流の制御：基礎と臨床

苗代 弘¹, 和田 孝次郎¹, 魚住 洋一¹, 小林 弘明¹, 竹内 誠¹,
長谷 公洋¹, 川内 聡子², 佐藤 俊一²

¹防衛医科大学校 脳神経外科 (〒359-8513 埼玉県所沢市並木3-2)

²防衛医科大学校 防衛医学研究センター 情報システム研究部門 (〒359-8513 埼玉県所沢市並木3-2)

Effects of Transcranial Near-Infrared Light on Cerebral Blood Flow

Hiroshi NAWASHIRO,¹ Kojiro WADA,¹ Youichi UOZUMI,¹ Hiroaki KOBAYASHI,¹ Satoru TAKEUCHI,¹
Kimihiko NAGATANI,¹ Satoko KAWAUCHI,² and Shunichi SATO²

¹Department of Neurosurgery, National Defense Medical College,
3-2 Namiki, Tokorozawa, Saitama 359-8513

²Division of Biomedical Information Sciences, National Defense Medical College Research Institute, National Defense Medical College,
3-2 Namiki, Tokorozawa, Saitama 359-8513

(Received January 6, 2012)

Positive behavioral improvement has been observed following transcranial near-infrared light therapy in humans with chronic traumatic brain injury and acute stroke. We first examined the effect of 808 nm laser diode irradiation on regional cerebral blood flow (rCBF) in mice. An 808 nm CW diode laser was applied to the hemisphere transcranially. Transcranial near-infrared laser irradiation increased rCBF by 30% compared to control value in mice. Near-infrared laser irradiation also provoked a significant increase in cerebral nitric oxide concentration. In the clinical setting, transcranial near-infrared light-emitting diode irradiation to the forehead in a patient with persistent vegetative state following head injury was done. rCBF showed focal increase of 20%, compared to the pre-treatment value. The patient showed some improvement in his neurological condition after light-emitting diode therapy. Transcranial near-infrared irradiation might increase rCBF with some improvement of neurological condition in patients. Further study is warranted.

Key Words: Near infrared laser, Cerebral blood flow, Nitric oxide, Brain injury

1. はじめに

脳重量は、体重の2%程であるが、脳血流量は心拍出量の15-20%を占める。重量%に比し血流%が10倍程と圧倒的に多い理由は、脳が多大の酸素とグルコースを消費することにある。脳血流量は、灌流圧(平均動脈圧から頭蓋内圧を差し引いた圧)と血管抵抗の積に比例するが、局所脳血流量は、局所の神経活動と緊密に連動(neurovascular coupling)している。シナプス間隙に隣接して神経伝達物質の再取り込みや、神経栄養因子を出す星細胞は、その一方の突起を細血管に絡めて、神経興奮と局所の脳血流の増加をカップリングさせている。神経興奮に伴う局所脳血流の増加は、局所の酸素需要を上回る供給をもたらす。局所の酸素化ヘモグロビンの相対的増加、脱酸素化ヘモグロビンの相対的減少を来す。この現象を、核磁気共鳴法で画像化したものが、functional magnetic resonance imagingであり、近赤外分光法(NIRS: near-infrared spectroscopy)を用いて画像化したも

のが、近赤外光イメージングである。近赤外線は、生体透過性が高く、頭皮、頭蓋を介して大脳皮質の信号変化を捉えうる。近赤外線の生体作用の一つとして、各種臓器における血流増加作用が知られているが¹⁻³⁾、脳血流に及ぼす効果については、ほとんど報告がない。一方、近赤外光の生体作用の一つとして、神経保護効果が報告されている⁴⁻¹⁰⁾。我々は、近赤外光の脳血流量に及ぼす効果を検討し報告して来た^{11,12)}。動物実験の基礎的なデータと、ヒトにおける臨床データを提示する。将来的に目指している近赤外光による脳血流の制御、神経活動賦活作用の可能性について言及したい。

2. 近赤外線の生物学的効果 とくに中枢神経に対する効果

まず、現在までに報告されている近赤外光の中枢神経に対する生体作用と臨床研究の結果を示す。1980年代に、Karuが近赤外線の生物学的効果はcytochrome c

oxidase (a terminal enzyme complex of the electron transport chain located in the inner mitochondrial membrane) のcopper anionsの吸収スペクトラムに一致することを見出した¹³⁾。最近、近赤外線が、mitochondrial optic neuropathyを改善するとの報告や⁸⁾、リンパ球に照射するとATPレベルが上昇するとの報告があり¹⁴⁾、近赤外線受容体としてのcytochrome c説を支持する。近赤外線照射が、MPTP-treated miceのドーパミン作動性神経細胞に対して保護効果があるとの詳細な報告⁹⁾、近赤外線照射が、neuronal sproutingとmigrationを促進するとの報告¹⁰⁾などもあり興味深い。しかし、cytochrome c以外の受容体の存在を示唆する報告も散見され、未だ十分に解明されていない。

3. 近赤外線による脳虚血治療

そもそも近赤外線照射で脳梗塞の治療が試みられ、部分的成功を収めたとの報告^{15,16)}に接したのが、今回の研究の動機である。発症後24時間以内の脳梗塞660症例を対象にした無作為前向き二重盲検試験である。急性期脳梗塞の患者を対象にした。対象患者選定基準は以下の如くである。40-90歳。発症から24時間以内。NIHSS 7-22 Informed consentが得られた患者。除外項目、除外基準は、頭蓋内出血。発症前のmodified Rankin Scale (mRS)が3以上。痙攣発症。血糖値が400 mg/dl以上または60 mg/dl以下。収縮期血圧が220 mm Hg以上または80 mm Hg以下。拡張期血圧が140 mm Hg以上または50 mm Hg以下。細菌塞栓の疑いがあるもの。脳腫瘍。頭皮に問題があるもの。血栓溶解療法を受けたもの。頭蓋内にクリップ、バルブなどが植え込まれているもの。最近2週間以内にPhotodynamic therapyを受けたもの。および妊娠を除外した。primary efficacy end pointは、発症90日目の良好なmRS (0-2)。他にmRSとNational Institutes of Health Stroke Scale score (NIHSS) の改善度である。結果：660例中331例が近赤外線治療を、327例がsham control。近赤外線治療群の内、予後良好は120例 (36.3%)、sham control群の予後良好が101例 (30.9%) ($p = 0.094$)、odds ratio 1.38 (95% CI, 0.95 to 2.00)。post hoc analysisを行ったところ、NIHSS16未満の比較的軽症患者において、統計学的有意に予後良好であるとの結果が得られた ($p = 0.044$)。両群の死亡率、重篤合併症発生率は、それぞれ17.5%と17.4%、37.8%と41.8%で有意差は無かった¹⁶⁾。本臨床研究では、近赤外線照射で脳梗塞の機能予後を改善しうる可能性が示されたが、機序に関しては全く不明で、近赤外線照射による脳血流への影響も全く検討されていない。そこで我々は、その機序を解明すべく、近赤外線照射による脳血流への影響を検討する基礎的研究を行った。

4. 近赤外線による脳血流増加効果

経頭蓋近赤外線レーザー照射によるマウス局所脳血流増加を認めた (Fig. 1) 我々の研究を紹介する¹¹⁾。低出力

Fig. 1 Representative examples of the exposure field and perfusion images. (a) The exposure field was set to 3 mm in diameter (2 mm posterior to and 3 mm left of the bregma). Scale bar is 5 mm in length. At the time of measurement, perfusion images were obtained (b: pre, c: 15 min after NIR laser irradiation). Targeted increase in cerebral blood flow of the irradiated field was observed (c).

近赤外線レーザー照射LLLTLは、0.8, 1.6, 3.2 W/cm²の3種類のエネルギー強度で検討した。LLLTLをC57/BL/6Jマウス脳に経頭蓋的に照射し血流を測定する事で、マウス脳LLLTLにおける至適エネルギー強度を決定した。次にnitric oxide (NO)と脳血流の関与を精査する為に、LLLTL照射中の脳内NO濃度の変化を測定するとともに、nitric oxide synthase (NOS) 阻害剤であるN^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)、神経型NOS特異的阻害剤である7-nitroindazole (7-NI)をそれぞれ投与したマウスのLLLTL照射時における脳血流の変化を検討した。またNMDA受容体拮抗薬であるMK-801を用いて、グルタミン酸興奮性神経伝達とLLLTL照射における血流上昇の関連性を検討した。LLLTL照射中の頭蓋骨表面および脳内の温度測定を行った。最後に両側頸部頸動脈一過性閉塞モデル (bilateral cervical carotid artery occlusion model: BCCAO model)を用いて、虚血再灌流障害に対するLLLTL効果の検討を行った。照射群と非照射群の残存脳血流の測定および、TUNEL (in situ terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin nick end-labeling) 染色による海馬CA-1錐体細胞のアポトーシスの程度を比較した。

経頭蓋LLLTLを行うことで照射野に一致した脳血流増大が観察された。1.6 W/cm²・45分間照射群において最も効率よく約30%脳血流を上昇させる事が出来た。組織学的検討では照射後の脳損傷を示す変化は認めなかった。脳組織温度は1.6 W/cm²照射強度30分間の照射で平均0.8℃と小幅に上昇した。またL-NAME投与群と非投与群における1.6 W/cm²照射強度45分間照射中の骨表面の温度変化は両群同等であった。脳組織内NO濃度の変化は、1.6 W/cm²照射群は開始直後からNOの濃度が上昇し、照射終了直後に速やかに基準値に復帰した。L-NAME投与群はNO濃度上昇が著しく抑制され、0.8 W/cm²照射群は1.6 W/cm²のそれと比較し約15%のNO濃度上昇のみ得られた。L-NAME投与群の脳血流は擬照射群 (sham群)と同程度に抑制され、LLLTLによる脳血流上昇効果は得られなかった。NMDA受容体と相互作用があるとされる神経型NOSを抑制する7NI投与群は、15分の照射では脳血流上昇は得られなかったが、30分、45分間と照射することでsham群と比較して有意な脳血流上昇を得た。MK-801投与群では、1.6 W/cm²強度LLLTL

15分後の血流上昇はコントロール群と同程度であったが、30分、45分と照射を続けた際の脳血流上昇はコントロール (1.6 W/cm^2 LLLT照射群) と比較して有意差をもって抑制された。これら結果から、30分、45分と長時間のLLLTを行う事で得られる脳血流上昇には、神経細胞の興奮が関与している可能性が示唆された。本研究の結果から、至適時間のLLLTには中枢神経系の賦活作用がある可能性が示唆された。後交通動脈がない事が確認されたマウス(コントロール群: $n=8$, LLLT群: $n=9$)についてBCCAOモデルを用いて脳虚血再灌流障害に対する 1.6 W/cm^2 LLLTの効果を検討したところコントロール群と比較し有意差を持って脳血流が維持された。この効果は照射半球のみならず、非照射半球でも有意差を持って血流が維持された。さらにLLLT照射群ではCA-1錐体細胞および照射側皮質のTUNEL陽性細胞がLLLT非照射群と比較して明らかに減少していた。以上からLLLTには虚血再灌流障害に対する神経保護効果があることが明らかになった。また 1.6 W/cm^2 LLLTによるDNA損傷の増加はないことも確認された。

経頭蓋近赤外線レーザー照射によるマウス局所脳血流の有意な増加を報告し、その作用機序に一酸化窒素が関与していることを明らかにした。2009年のStrokeに掲載された大規模前向き無作為二重盲検臨床試験の結果を踏まえ、現在NEST-3 trialが予定されている(*Effectiveness and safety of transcranial laser therapy for acute ischemic stroke*, Stroke **40** (2009) 1359)。我々も、2008年、学内倫理委員会に申請し承認を得て、中枢神経損傷に対する近赤外線による治療を行っている。マウスin vivoとastrocyte, PC12神経系培養細胞in vitroの基礎的実験で、近赤外線によって、細胞外液中の神経伝達物質のglutamateとdopamineが上昇する事を見出した。臨床試験では、頭蓋内圧亢進と脳ヘルニアに続発する除脳硬直を呈し、外減圧術等で救命し得たが、8ヶ月以上、四肢自動運動無し、開眼するも追視なく、従命の全くない40歳男性に対し、家族の同意を得て、前額部にLED(出力: $13 \text{ mW} \times 23 = 299 \text{ mW}$) (Fig. 2) による低出力近赤外線治療を朝夕30分間2回施行した。治療前と8週間の治療後の

Fig. 2 A photograph of a model being treated, L-light (SUN-MECHATRONICS, Tokyo).

Fig. 3 A computed tomography scan of the head before any light emitting diode (LED) treatments (performed at 220 days post- head trauma), showing a focal low density area in the subcortical white matter, antero-lateral to the right frontal horn; and a ventriculo-peritoneal shunt is in place in the right frontal horn (A). Single-photon emission computed tomography with N-isopropyl [123I]-p-iodoamphetamine (IMP-SPECT) before LED treatment, performed at 227 days post- head trauma (B). IMP-SPECT scan at 30 minutes after the 146th LED treatment. The post- LED SPECT scan was performed 300 days post- head trauma. This post-LED SPECT scan showed a focal increase of 20%, compared with the pre-treatment value of regional cerebral blood flow in the left anterior frontal cortex (C, arrow).

局所脳血流をIMP-SPECTで定量評価した(Fig. 3)。治療後、照射部位の頭皮にトラブルは無く、左上肢の自動運動、合目的運動が出現し、前頭葉脳血流の有意な増加を認め、acetazolamideに対する脳血流増加効果も改善した¹²⁾。マウスにおいて認められた、脳血流増加作用が、低エネルギー近赤外線を使ってヒトにおいても同様に認められる可能性が示唆された。最近、うつ病の患者の前額部に赤外光を照射し、脳血流を反映するtotal hemoglobinをNIRSで照射中にモニターしたところ、増加を認めたが、有意差には至らなかったとの報告がある¹⁷⁾。さらなる検討を要する。

5. まとめ

本研究によって経頭蓋近赤外線レーザー照射はマウス局所脳血流を上昇させ得ることが判明した。その作用機序にNOS活性およびNO濃度が関与していることが明らかとなった。近赤外線レーザーを至適条件で照射する事で、中枢神経系を活性化させうる可能性があること、また虚血再灌流障害に対して神経保護作用がある事も併せて示された。経頭蓋近赤外線レーザー照射は、今後、脳循環の基礎的、臨床的研究のtoolとして期待される。

参考文献

- 1) M. R. Hamblin: *Proc. SPIE* 6846 (2008) 684602-1.
- 2) J. Kubota: *Lasers Med. Sci.* **17** (2002) 146.
- 3) S. Mii, C. Kim, H. Matsui, H. Oharazawa, T. Shiwa, H. Takahashi, and A. Sakamoto: *J. Nippon Med. Sch.* **74** (2007) 23.
- 4) J. T. Eells, M. M. Henry, P. Summerfelt, M. T. Wong-Riley, E. V. Buchmann, M. Kane, N. T. Whelan, and H. T. Whelan: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100** (2003) 3439.
- 5) A. Oron, U. Oron, J. Chen, A. Eilam, C. Zhang, M. Sadeh, Y. Lampl, J. Streeter, L. DeTaboada, and M. Chopp: *Stroke* **37** (2006) 2620.

- 6) P. A. Lapchak, J. Wei, and J. A. Zivin: *Stroke* **35** (2004) 1985.
- 7) P. A. Lapchak, M. K. Han, K. F. Salgado, J. Streeter, and J. A. Zivin: *Stroke* **39** (2008) 3073.
- 8) J. C. Rojas, J. Lee, J. M. John, and F. Gonzalez-Lima: *J. Neurosci.* **28** (2008) 13511.
- 9) V. E. Shaw, S. Spana, K. Ashkan, A. L. Benabid, J. Stone, G. E. Baker, and J. Mitrofanis: *J. Comp. Neurol.* **518** (2010) 25.
- 10) S. Rochkind, D. El-Ani, Z. Nevo, and A. Shahar: *Lasers Surg. Med.* **41** (2009) 277.
- 11) Y. Uozumi, H. Nawashiro, S. Sato, S. Kawauchi, K. Shima, and M. Kikuchi: *Lasers Surg. Med.* **42** (2010) 566.
- 12) H. Nawashiro, K. Wada, K. Nakai, and S. Sato: *Photomed. Laser Surg.* (2011) Nov 2. [Epub ahead of print].
- 13) T. Karu: *Ten Lectures on Basic Science of Laser Phototherapy* (Grangesberg, Sweden, Prima Books, 2007).
- 14) S. Benedicenti, I. M. Pepe, F. Angiero, and A. Benedicenti: *Photomed. Laser Surg.* **26** (2008) 451.
- 15) Y. Lampl, J. A. Zivin, M. Fisher, R. Lew, L. Welin, B. Dahlof, P. Borenstein, B. Andersson, J. Perez, C. Caparo, S. Ilic, and U. Oron: *Stroke* **38** (2007) 1843.
- 16) J. A. Zivin, G. W. Albers, N. Bornstein, T. Chippendale, B. Dahlof, T. Devlin, M. Fisher, W. Hacke, W. Holt, S. Ilic, S. Kasner, R. Lew, M. Nash, J. Perez, M. Rymer, P. Schellinger, D. Schneider, S. Schwab, R. Veltkamp, M. Walker, J. Streeter, and NeuroThera Effectiveness and Safety Trial-2 Investigators: *Stroke* **40** (2009) 1359.
- 17) F. Schiffer, A. L. Johnston, C. Ravichandran, A. Polcari, M. H. Teicher, R. H. Webb, and M. R. Hamblin: *Behav. Brain Funct.* **5** (2009) 46.

レーザーワード

LLLT(低レベルレーザー治療)(low-level laser therapy)

American National Standards Institute(ANSI)の基準では, LLLTに伴う皮膚照射は, 320 mW/cm^2 までとされている. LLLTに関してはTechnology Assessment May 3, 2004 Grace Wang Office of the Medical Director, Department of Labor and Industriesを参照することをお勧めする. 疼痛緩和や手根管症候群に有効であることが示されている.

さらに創傷治癒を促進する可能性もある. しかしながら, その機序に関しては, 未解明な点が多く, 照射線量と生物学的効果の関連性も不明確である. 非侵襲的で生体に有益である可能性が注目されているが, 基礎的研究を含めてさらなる解明が必要である.

(苗代 弘)