

ラット脳挫傷モデルにおける  
クロドロン酸リポソームの効果

日本大学大学院医学研究科博士課程  
外科系脳神経外科学専攻

根岸 弘

修了年 2019年

指導教員 吉野 篤緒

## 目次

1. 概要	1
2. 略語集	3
3. 緒言	4
4. 材料と方法	
4-1 脳挫傷モデル	5
4-2 免疫組織染色	6
4-3 組織 Nissl 染色	6
4-4 Western blotting	6
4-5 Polymerase chain reaction	7
4-6 残存脳体積の測定	7
4-7 統計解析	8
5. 実験動物の取扱及び実験における倫理的配慮	9
6. 結果	
6-1 マイクログリアの免疫組織染色	10
6-2 CD11b の定量	10
6-3 Galectin-3 の定量	10
6-4 PKC $\delta$ の定量	11
6-5 炎症性サイトカインの測定	11
6-6 MMP-9 の測定	11
6-7 残存脳体積の測定	12
7. 考察	
7-1 頭部外傷に対するクロドロン酸リポソームの効果	13
7-2 マイクログリアの最近の動向	14
8. 結論	16
9. 謝辞	17
10. 図表	18
11. 引用文献	35
12. 研究業績	40

## 1. 概要

頭部外傷は、外力が直接脳細胞に伝わることにより生じる一次性脳損傷と、その後に生じる虚血や脳浮腫、サイトカインの大量放出などの炎症反応によって生じる二次性脳損傷があり、これらが総じて脳細胞を障害することが知られている。外傷直後に細胞外液中に大量に放出されるグリア伝達物質である adenosine triphosphate の刺激により外傷部位周囲のマイクログリアは非活性型から活性型のマイクログリアに形態変化する。活性型マイクログリアは、遊走、貪食能を有しており、健常時には脳内のゴミの除去にあたると考えられている。しかし外傷などによる強度の刺激下では大量のサイトカインを放出し、過剰炎症反応によりかえって脳の二次性脳損傷を助長する。ただし、外傷後急性期の大量のサイトカインは有害に働くとの報告が多い一方で、慢性期にはサイトカインによる脳保護効果を証明した研究も多い。クロドロン酸リポソーム (clodronate-encapsulated liposome: CL) は、生体内のマクロファージを一時的に枯渇させる作用があり、脳内のマイクログリアにも効果があると報告されている。本研究では、ラット脳挫傷モデルを用いて、CL を超急性期に単回投与することによりマイクログリアによる炎症反応を抑制し、組織保護効果が得られるかを検討した。

外傷モデルとして、cortical contusion injury (CCI) モデルを用いた。外傷直後に大腿静脈内に CL を投与した群 (CCI-CL 群)、外傷直後に control liposome を投与した群 (CCI-Control 群)、外傷を与えずに CL を投与した Sham-CL 群を作製し、正常対照群である Naïve 群と比較した。CL の効果を評価するためにマイクログリアに対する免疫組織染色と、その発現量を定量するための Western blotting を行った。また組織炎症の指標である protein kinase C delta (PKC $\delta$ ) を Western blotting を用いて定量し、さらに炎症関連サイトカインの messenger ribonucleic acid の発現を観察するために Polymerase chain reaction を行った。炎症性サイトカインとして、interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ )、interleukin-4 (IL-4)、interleukin-6 (IL-6)、tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) を測定した。最終的に脳組織保護効果の評価のため、組織破壊の指標である matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) の発現を観察し、さらには残存脳体積の測定を行った。

抗 Iba-1 抗体を用いた免疫組織染色では、Naïve 群では大脳皮質、海馬をはじめ脳全体に Iba-1 陽性細胞を認めた。これらは形態学的に非活性型の ramified 型マイクログリアであった。CCI-Control 群では外傷 1 日後から Iba-1 陽性細胞の密度は明らかに高くなり、陽性細胞は全て活性型の amoeboid 型マイクログリアであった。CCI-CL 群では陽性細胞の密度は Naïve 群と比較しても同等で、形態学的にはそのほとんどが ramified 型であり amoeboid 型のマイクログリアは極めて少なかった。これらの陽性細胞を定量化するために Western blotting を行った。脳挫傷周囲皮質におけるマイクログリアの発現を定量した。抗体には

ramified 型と amoeboid 型の両方を認識する抗 CD11b 抗体と、amoeboid 型のみを標識する抗 Galectin-3 抗体を用いた。外傷 1 日後には、CCI-Control 群の CD11b 発現量は Naïve 群と比較し有意に上昇したが ( $p < 0.001$ )、CCI-CL 群では CL の投与により CCI-Control 群と比較し有意に発現の抑制を認めた ( $p < 0.001$ )。同様に Galectin-3 の発現量は外傷 1 日後には CCI-Control 群で Naïve 群と比較し有意に上昇したが ( $p < 0.001$ )、CCI-CL 群では CL の投与により有意に抑制された ( $p < 0.001$ )。しかし外傷 3 日後には CCI-Control 群、CCI-CL 群の CD11b、Galectin-3 の発現はともに上昇し Naïve 群と比較し有意に高い値を示した。

組織炎症の指標である PKC $\delta$  は、脳挫傷周囲皮質において外傷 1 日後には CCI-Control 群で Naïve 群と比較し有意に上昇したが ( $p = 0.008$ )、CCI-CL 群では CL の投与により CCI-Control 群と比較して有意に発現の抑制を認めた ( $p = 0.01$ )。しかし、外傷 3 日後には CCI-CL 群の PKC $\delta$  の発現は上昇し、CCI-Control 群との有意差は消失した。また脳挫傷周囲皮質における炎症関連サイトカインの発現は、外傷 1 日後では、IL-6 の発現は CCI-Control 群において、Naïve 群と比較し有意に上昇したが ( $p = 0.036$ )、CCI-CL 群では Naïve 群と有意な差を認めなかった。外傷 3 日後には、CCI-CL 群の IL-4 の発現は CCI-Control 群と比較し有意に抑制された ( $p = 0.04$ )。また TNF $\alpha$  の発現は、CCI-Control 群の値が Naïve 群に比較して有意に上昇したが ( $p = 0.009$ )、CCI-CL 群では CCI-Control 群に比較し有意に抑制された ( $p < 0.001$ )。さらに外傷側海馬においては、外傷 1 日後に CCI-CL 群の IL-4 の発現が Naïve 群と比較し有意に抑制された ( $p = 0.019$ )。また IL-6 の発現は、CCI-CL 群の値が CCI-Control 群に比較し有意に抑制された ( $p = 0.037$ )。外傷 3 日後には、CCI-Control 群で Naïve 群と比較し、IL-1 $\beta$  ( $P = 0.013$ ) と TNF $\alpha$  ( $p = 0.024$ ) が有意に上昇した。そのうち TNF $\alpha$  の発現は、CCI-CL 群では CCI-Control 群と比較し有意に抑制された ( $p = 0.002$ )。また IL-4 の発現は、Naïve 群より CCI-CL 群 ( $p = 0.004$ )、CCI-Control 群より CCI-CL 群 ( $p = 0.002$ ) がいずれも有意に抑制された。

組織破壊の指標である MMP-9 は、外傷 1 日後には 3 群間で有意な差を認めなかった。しかし 3 日後には CCI-Control 群では Naïve 群と比較し有意に上昇し ( $p = 0.006$ )、CL の投与により CCI-CL 群では CCI-Control 群に比較し有意に抑制された ( $p = 0.001$ )。

外傷 28 日後に残存脳体積の比較を行った。CCI-Control 群の脳体積は Naïve 群と比較して有意に減少したが ( $p = 0.004$ )、CCI-CL 群の脳体積は CCI-Control 群と比較して有意に回復した ( $p = 0.029$ )。

本研究により、外傷後にクロドロン酸リポソームの全身投与を行うと、脳内のマイクログリアが抑制され、抗炎症作用を発揮することがわかった。クロドロン酸リポソームの投与は脳挫傷後の二次性脳損傷の主体である過剰な炎症反応を抑制し、有効な治療法となりうる可能性が考えられた。

## 2. 略語集

ANOVA: analysis of variance

ATP: adenosine triphosphate

CCI: cortical contusion injury

CL: clodronate-encapsulated liposome

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

IL-1 $\beta$ : interleukin-1 beta

IL-4: interleukin-4

IL-6: interleukin-6

MMP-9: matrix metalloproteinase-9

mRNA: messenger ribonucleic acid

PBS: phosphate buffer saline

PCR: polymerase chain reaction

PKC $\delta$ : protein kinase C delta

TNF $\alpha$ : tumor necrosis factor alpha

### 3. 緒言

重症頭部外傷の患者は転機不良であることが多い。臨床的に治療の主体は、脳の二次性脳損傷に対するものとなる。二次性脳損傷を来す因子として、虚血や脳浮腫、頭蓋内圧亢進、活性酸素による障害など、過剰炎症反応によるサイトカインの大量放出が生じ、それにより脳細胞が障害を受けることはよく知られている[1-5]。

頭部外傷における抗炎症治療は古くから行われており、基礎研究レベルでは一定の成果を上げている。炎症を抑制する方法として、消炎鎮痛薬の使用の他には、サイトカインの拮抗[6]、炎症励起経路の非活性化[7, 8]、オートファジーの抑制[9, 10]、漢方薬[11]やスタチン[12]の投与、神経幹細胞の移植[13]、高圧酸素療法[14]、脳深部刺激療法[15]など様々な手法が研究されている。また臨床レベルでも種々の interleukin や tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ )、C 反応性蛋白などの炎症関連因子は頭部外傷においてバイオマーカーとしての性質を持ち、その程度は予後と相関することが示されている[16]。さらにはサイトカインの発現は頭部外傷後の双極性障害に関係するとの報告もある[17]。こうしたサイトカインをはじめとした抗炎症物質の有害性を報告した多くの研究がある一方で、少なくとも頭部外傷後の慢性期にはサイトカインは有益に働くとの報告もある[18]。

本研究では前述のような、既存の炎症を抑制する手法ではなく、脳内の免疫担当細胞であるマイクログリア自体を拮抗することで抗炎症効果を得られないかを検討した。近年、骨粗鬆症[19-21]やパジェット病[22]、慢性関節リウマチ[23]など炎症性疾患におけるクロドロン酸リポソーム (clodronate-encapsulated liposome: CL) の有用性が報告されており、欧米では既承認医薬品として用いられている。CL は生体内に投与すると、単球やマクロファージによって貪食され、その 90%以上をアポトーシスに導き、一時的に枯渇させる作用を有する。いわゆるマクロファージを自殺させる技術として知られている[24-27]。CL は血液脳関門を通過しないとされており薬剤の半減期は 17 時間とされている[28]。CL を全身投与し単球やマクロファージを枯渇させると、脳内へ浸潤するマクロファージも減少し[29]、さらには脳内のマイクログリアをも抑制することが報告されている[28]。

本研究では、ラットの脳挫傷後超急性期に CL を投与し、マクロファージとマイクログリアを制御することにより過剰な炎症反応を抑制し、二次性脳損傷が抑制可能かを検討した。

## 4. 材料と方法

### 4-1 脳挫傷モデル

外傷モデルには、270-330 g の雄性 Sprague-Dawley ラットを使用し、cortical contusion injury (CCI) を用いた。イソフルレン 4%の吸入麻酔で導入し、イヤーパーを用いて定位脳手術台に固定した。吸入麻酔の維持は、イソフルレン 2%で行った。体温測定プローブを直腸内に挿入し、術中は保温パッドで体温を 37°C に維持した。ポピドンヨードとエタノールで皮膚切開部を消毒し、10 万倍エピネフリン入りの 1%キシロカインで局所麻酔を行った。頭皮正中部を頭側から尾側方向に約 20 mm 切開し、骨膜も同様に切開した後に骨膜を剥離した。骨膜は左右に観音開きに翻転させて頭蓋骨を露出した。Bregma から 3 mm 尾側、3.5 mm 左側方を中心に半径 2 mm の骨窓を設けた。その中心に専用のインパクトターで等強度の脳挫傷を作製した。CCI の条件は、速度：3.50 m/s、深さ：2 mm、接触時間 100 msec、インパクトターの直径：2 mm とした。Goodman らの報告では、この強度は海馬への直接打撃を来さないが、皮質の脳挫傷及び海馬への二次性脳損傷を来す外傷の強度とされている[30]。表 1 のようにラットをランダムに群分けした。外科的処置を行っていない Naïve 群、外傷コントロールとして CCI 直後に大腿静脈内に control liposome

(170828AG06: Encapsula NanoSciences LLC, USA) を投与した CCI-Control 群、CCI 後に 5 mg/mL の liposomal clodronate (170913SP03: Encapsula NanoSciences LLC, USA、分子量: 288.9-359.9) を大腿静脈内に投与した CCI-CL 群、および外傷を与えずに CL を静脈内投与した Sham-CL 群に群分けした。術創の骨膜、皮膚を密に縫合して閉創し、イヤーパーを外した後に仰臥位に体位変換し、同様に大腿部を消毒、局所麻酔を行った。右側腹部から正中方向に約 20 mm の皮膚切開を行い、大腿動静脈、大腿神経を同定し、大腿静脈を剥離した。大腿静脈を挙上し、ハミルトンシリンジ (4015-11001: GL Sciences, JAPAN) を用いて各々の薬剤を 5  $\mu$ L 投与した。投与量と投与方法は CL を In vivo モデルに用いた先行研究を参照した[31, 32]。穿刺部は、双極電気メスで焼灼した。皮下組織、皮膚を縫合して閉創した。閉創後に維持麻酔を終了し、37°C の室温内で覚醒させた。CCI から 1 日、3 日後に 5%イソフルランで深麻酔をかけ、断頭後に Polymerase chain reaction (PCR)、Western blotting 用の検体を摘出した。脳を摘出した後に 2 mm 間隔に薄切し、脳挫傷組織、脳挫傷周囲皮質、脳挫傷から遠い同側の皮質、外傷側海馬、対側皮質、対側海馬の 6 部位に分けて摘出した。PCR 用の検体は、摘出後すぐに細断し RNALater (AM7024: Thermo Fisher Scientific, USA) 内に保存した。Western blotting 用の検体は、摘出した後に凍結乾燥機 (FDU-12AS: AS ONE, JAPAN) で真空乾燥し乾燥重量を測定、その 4 倍量の超純水を加えた。氷上で超音波破碎機を用いて組織を破碎した。その後、毎分 15,000 回転で 15 分間遠心し、上清を -80 度で保存した。

組織染色用の検体採取には、270-330 g の雄性 Sprague-Dawley ラットを使用し、CCI から 1、3、28 日後に塩酸メドミジン 0.15 mg/kg、ミダゾラム 2 mg/kg、酒石酸ブトルフェノール 2.5 mg/kg の三種混合薬を腹腔内投与して深麻酔した。疼痛刺激に反応がなくなったのを確認し、開胸した。左心室に留置針を留置し、200 mL の生理食塩水で脱血した後、200 mL の 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し脳を摘出した。同様の固定液で 24 時間後固定し、10、20、30%のショ糖加 phosphate buffer saline (PBS) 溶液内で 24 時間ずつ段階的にクライオプロテクションした。その後液体窒素で瞬間凍結し組織を -80°C 内に保存した。

#### 4-2 免疫組織染色

免疫染色用の組織はクライオスタットで 20  $\mu\text{m}$  に薄切した。500  $\mu\text{m}$  ごとに切片を採取し、PBS 溶液中に組織を浮遊させた状態で染色を行った。はじめに 3%過酸化水素水を用いて内因性ペルオキシダーゼを除去した。次に 2%ウマ血清を用いてブロッキングを行った。一次抗体は、抗 Iba-1 抗体 (019-19741: Wako Pure Chemical Industry, JAPAN) を使用し、一次抗体感作は 4°C 内で 24 時間行った。二次抗体反応および ABC 法は、VECTASTAIN Elite ABC HRP Kit (PK-6101: Vector Laboratories, USA) を用いた。発色は、ジアミノベンジジンで行った後、組織をスライドガラスにマウントし、脱水、透徹後にカバースリップした。

#### 4-3 組織 Nissl 染色

Nissl 染色 (クレシルバイオレット染色) の組織は、免疫組織染色と同様に凍結状態のままクライオスタットで 20  $\mu\text{m}$  に薄切した。組織採取は、500  $\mu\text{m}$  ごとにスライドガラスに切片を採取した。染色には、前処理 (蒸留水 5 分)、エタノールおよびキシレンで脱脂を行い、水洗した後に 0.2%クレシルバイオレット溶液で染色した。分別は、2.5%酢酸加 90%エタノール溶液で行い、その都度鏡検しながら染色具合を確認した。脱水、透徹後カバースリップした。

#### 4-4 Western blotting

CCI から 1、3 日後の脳挫傷周囲組織、脳挫傷と同側海馬の検体を 20 倍に希釈し、RC DC Protein assay Kit (5000122JA: Bio-Rad, USA) を用いて総タンパク濃度を測定した。濃度の測定には、吸光度計 (Model 680: Bio-Rad, USA) を用い、吸光度を元に Laemmli sample buffer (1610737: Bio-Rad, USA) と beta-mercaptoethanol (1610710: Bio-Rad, USA) を用いてサンプルを調製した。1 ウェルあたり総タンパクとして 15  $\mu\text{g}$  の検体をローディング



グした。タンパク分離は、ポリアクリルアミド電気泳動で行い、4-20%の濃度勾配ゲル (567-1095: Bio-Rad, USA) を用いて、120 V、400 mA で 70 分間泳動した。分子量マーカーには、プレシジョンプラスプロテイン 2 色スタンダード (1610374: Bio-Rad, USA) を使用した。ゲルの転写は乾燥法である iBlot システム (IB1001: Thermo Fisher Scientific, USA) を用い、メンブレンはポリビニデンジフルオロライド膜 (IB401001: Thermo Fisher Scientific, USA) を使用した。一次抗体反応は、500 倍希釈の抗 CD11b 抗体 (bs-1014R: Bioss, USA)、1,000 倍希釈の抗 Galectin-3 抗体 (ARP54779: Aviva System Biology, USA) および 1,000 倍希釈の抗 protein kinase C delta (PKC $\delta$ ) 抗体 (PA5-17552: Thermo Fisher Scientific, USA) を使用した。抗 CD11b 抗体感作は 4°C 内で 48 時間、抗 Galectin-3 抗体感作は 4°C 内で 24 時間、抗 PKC $\delta$  抗体感作は室温で 24 時間反応させた。二次抗体反応は、抗ウサギ IgG 抗体 (AP182P: Millipore, USA) を用い、室温で 2 時間感作させた。発色は、enhanced chemi luminescence 法で行い (WP20005: Thermo Fisher Scientific, USA)、検出器 (ChemiDoc XRS: Bio-Rad, USA) にてバンドを検出した。総タンパク質量の測定には SyproRuby 染色を行った。まず 7%酢酸加 10%メタノールで 15 分反応させ、超純水で洗浄した後に SyproRuby (170-3127: Bio-rad, USA) で 15 分反応させた。検出器 (ChemiDoc XRS: Bio-Rad, USA) にてバンドを検出し、Image Lab ソフトウェア (version 6.0: Bio-Rad, USA) を用いて測定した。

#### 4-5 Polymerase chain reaction

組織を RNALater 内から摘出し、RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (74804: Quiagen, GERMANY) を用いて messenger ribonucleic acid (mRNA) を精製した。精製した RNA 量は超微量分光光度計 (NanoDrop Lite: Thermo Fisher Scientific, USA) を用いて定量した。SuperScript IV Reverse Transcriptase Kit (18090010: Thermo Fisher Scientific, USA) を用いて逆転写し、complementary deoxyribonucleic acid を作製した。PCR は、Platinum Taq (10966-034: Thermo Fisher Scientific, USA) を用い、プライマーは表 2 のように設計して、サーマルサイクラー (T100 Thermal Cycler: Bio-Rad, USA) で行った。泳動は GelRed (41003: Biotium, USA) 添加 2%アガロースゲルを用い、120 V、400 mA で 38 分間行った。バンド検出は、検出器 (ChemiDoc XRS: Bio-Rad, USA) を用いて行った。インターナルコントロールとして、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。

#### 4-6 残存脳体積の測定

Nissl 染色した標本を用い、Bregma を基準に AP +1 mm から -6 mm まで 1 mm ごとの 8 切片を ImageJ (version 1.52a: National Institutes of Health, USA) ソフトウェアを用いて解析した。両側大脳半球をトレースし各切片の面積を測定し、その値を積分して脳体積を求めた。

#### 4-7 統計解析

各種データの統計解析には、SPSS Statistics (version 21: IBM, USA) を使用した。多群間の比較には one way analysis of variance (ANOVA) を使用し、ANOVA の要因に有意差があった場合のみ post-hoc 検定を Tukey の方法を使用して行った。分散が等しくないデータに関しては、イプシロンにより自由度を補正した。全ての検定で p 値が 0.05 未満を有意とした。データはすべて、平均±標準偏差で示した。

#### 5. 動物取扱及び実験における倫理的配慮

実験動物の取扱及び実験手技は、日本大学医学部実験指針を遵守して行い、日本大学動物実験委員会が制定する日本大学動物実験マニュアルに準じて行った。実験動物が苦痛を感じないような最大限の配慮を行った。飼育は上記で認定された施設で行った。飼育環境は、室温 22-23℃、湿度 50-60%の室内であり、飼育室の明暗設定は、8時から20時を明期、20時から8時を暗期として12時間ごとの明暗サイクルを設けた。実験中は、食事、水分を自由に摂取させ、経過中に過侵襲と判断された場合の人道的エンドポイントの設定を行った上で研究を行った。研究者は、上記委員会が制定する年一回の講習会を受講している。

## 6. 結果

### 6-1 マイクログリアの免疫組織染色

外傷 1 日後の脳切片を抗 Iba-1 抗体で染色したところ、Naïve 群 (図 1 A、図 2 A)、Sham-CL 群 (図 1 B、図 2 B) では大脳皮質、海馬を含めた脳全体に抗 Iba-1 抗体の陽性細胞を認めた。これらの陽性細胞の大きさは、約 20  $\mu\text{m}$  であり、細胞体が小さく多くの突起を有していることから、非活性型の ramified 型マイクログリアであった。CCI-Control 群においても脳全体に陽性細胞を認めたが、Naïve 群と比較すると ramified 型マイクログリアはほとんど無く、細胞体が肥大化し突起を有さない活性型の amoeboid 型マイクログリアが多く認められた (図 1 C、図 2 C)。CCI-CL 群では、脳全体に ramified 型マイクログリア及び amoeboid 型マイクログリアを認めたが、CCI-Control 群と比較すると明らかに細胞密度は低く、特に amoeboid 型のマイクログリアは少なかった (図 1 D、図 2 D)。外傷側海馬についても同様の所見が観察された (図 3、図 4)。

### 6-2 CD11b の定量

マイクログリアの発現を定量化するために、脳挫傷周囲皮質を検体としてマイクログリアの表面マーカーである抗 CD11b 抗体を用いた Western blotting を行った。

Naïve 群の値は、 $15.1 \pm 2.5$  であり、外傷を与えず、CL のみ投与した Sham-CL 群は、 $12.7 \pm 2.6$  であった (図 5)。外傷 1 日後に CCI-Control 群では、Naïve 群および Sham-CL 群と比較して  $72.7 \pm 2.6$  と有意に CD11b の発現は上昇した ( $p < 0.001$ )。しかし CCI-CL 群では CL の投与により CCI-Control 群と比較すると  $20.9 \pm 8.8$  と有意な発現の抑制を認めた ( $p < 0.001$ )。外傷 3 日後では、CCI-Control 群では、 $60.5 \pm 11.2$  と高い値を維持し、Naïve 群および Sham-CL 群と比較して有意な発現の上昇を認めた ( $p < 0.001$ ) (図 6)。CCI-CL 群では  $76.7 \pm 17.7$  と Naïve 群 ( $p < 0.001$ ) および Sham-CL 群 ( $p < 0.001$ )、CCI-Control 群 ( $p = 0.027$ ) と比較して有意な発現の上昇を認めた。

### 6-3 Galectin-3 の定量

脳挫傷周囲皮質を検体として、活性型マイクログリアの指標である抗 Galectin-3 抗体を用いた Western blotting を行った。

Naïve 群の値は  $80.1 \pm 1.9$  であり、外傷を与えず、CL のみ投与した Sham-CL 群は、 $82.6 \pm 2.1$  であった (図 7)。外傷 1 日後には CCI-Control 群では、 $349.3 \pm 185.3$  と Naïve 群および Sham-CL 群と比較して Galectin-3 の発現は有意に上昇し ( $p < 0.001$ )、CCI-CL 群では CL の投与により  $138.5 \pm 25.2$  と CCI-Control 群と比較して有意な抑制を認めた ( $p < 0.001$ )。外傷 3 日後には、CCI-control 群は  $387.8 \pm 7.5$  と高値を維持し、Naïve 群および Sham-CL 群と比

較して有意な発現の上昇を認めた ( $p < 0.001$ ) (図 8)。また、CCI-CL 群では発現が上昇し、 $624.8 \pm 12.4$  といずれの群と比較しても有意に高い値を示した ( $p < 0.001$ )。

#### 6-4 PKC $\delta$ の定量

組織炎症の指標である PKC $\delta$  を定量化するために脳挫傷周囲皮質を検体として抗 PKC $\delta$  抗体を用いて Western blotting を行った。

Naïve 群の値は、 $49.7 \pm 4.9$  であった (図 9)。外傷 1 日後には CCI-Control 群では Naïve 群と比較して  $99.9 \pm 33.1$  と有意に PKC $\delta$  の発現の上昇 ( $p = 0.008$ ) を認め、CCI-CL 群では CL の投与により  $51.8 \pm 27.8$  と有意な発現の抑制を認めた ( $p = 0.01$ )。外傷 3 日後には、CCI-Control 群では  $104.8 \pm 33.1$  と引き続き高値を示し、Naïve 群と比較して有意な発現の上昇 ( $p = 0.01$ ) を認めた (図 10)。CCI-CL 群では、 $85.2 \pm 27.8$  と CCI-Control 群と比較して有意差は認めなかったが発現の抑制を認めた。

#### 6-5 炎症性サイトカインの測定

炎症性サイトカインとして、interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ )、interleukin-4 (IL-4)、interleukin-6 (IL-6)、TNF $\alpha$  の mRNA の発現を測定した。

脳挫傷周囲皮質では、外傷 1 日後に、IL-6 の発現が CCI-Control 群で Naïve 群と比較し有意に上昇した ( $p = 0.036$ ) (図 11)。外傷 3 日後では、IL-4 が CCI-CL 群で薬剤投与により有意に発現が抑制された ( $p = 0.04$ )。TNF $\alpha$  は、CCI-Control 群で外傷により有意な上昇が認められ ( $p = 0.009$ )、CL の投与により CCI-CL 群では有意に発現が抑制された ( $p < 0.001$ )。

脳挫傷と同側海馬では、外傷 1 日後に、IL-4 は Naïve 群と比較すると CCI-CL 群で CL 投与により有意な発現の抑制を示した ( $p = 0.019$ ) (図 12)。また IL-6 は、CCI-CL 群が CCI-Control 群と比較し有意な抑制を認めた ( $p = 0.037$ )。外傷 3 日後には、CCI-Control 群の IL-1 $\beta$  ( $p = 0.013$ )、TNF $\alpha$  ( $p = 0.024$ ) は、外傷により有意な上昇を認めた。IL-4 は、CCI-CL 群で Naïve 群 ( $p = 0.004$ ) や CCI-Control 群 ( $p = 0.002$ ) と比較するといずれも有意に抑制された。TNF $\alpha$  は、CL の投与により抑制され、CCI-CL 群では CCI-Control 群と比較し有意に抑制された ( $p = 0.002$ )。

#### 6-6 MMP-9 の測定

組織損傷の指標として matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) の mRNA の発現を測定した。

脳挫傷周囲皮質では、外傷 1 日後において、MMP-9 の発現は、3 群間で有意差を認めなかった (図 13)。しかし外傷 3 日後には CCI-Control 群では Naïve 群に比較し有意に上昇した ( $p = 0.006$ )。CCI-CL 群では、CL の投与により有意な抑制を認めた ( $p = 0.001$ )。

脳挫傷と同側海馬では、外傷 1 日後に MMP-9 の発現は、3 群間で有意な差を認めなかった (図 14)。外傷 3 日後には、CCI-CL 群で CCI-Control 群と比較して CL の投与による有意な発現の抑制を認めた ( $p=0.001$ )。

#### 6-7 残存脳体積の測定

脳挫傷の体積を比較するために、正常側と外傷側の脳体積を比較した。

正常側の  $379.6 \pm 22.1 \text{ mm}^3$  に比較して CCI-Control 群では  $322.1 \pm 4.4 \text{ mm}^3$  と外傷側脳体積の有意な減少を認めた ( $p=0.004$ ) (図 15)。CCI-CL 群は、 $362.8 \pm 22.3 \text{ mm}^3$  と CCI-Control 群と比較すると CL の投与により脳体積は有意に回復した ( $p=0.029$ )。

## 7. 考察

### 7-1 頭部外傷に対するクロドロン酸リポソームの効果

CLは、破骨細胞の活動を阻害するビスフォスホネートであり骨粗鬆症や悪性腫瘍に対する治療薬として用いられている[33, 34]。細胞内でATP類似体として作用し、ATP代謝を阻害することで破骨細胞を抑制する効果がある[35, 36]。CLを全身投与すると、全身のマクロファージをアポトーシスへ導き、枯渇させることが報告されている[24]。中枢神経疾患においてもその効果が報告されている。Maらは、マウスの中大脳動脈閉塞モデルにCLを全身投与すると、脳虚血後の脱髄、マイクログリアの活性化を抑制することで、脳萎縮を抑制し最終的に神経機能予後を改善したと報告している[37]。脳卒中モデルを用いてCLの同様の効果を検討した報告はほかにも多数存在する[38-40]。Waltlらはマウスウイルス脳炎モデルにCLを全身投与すると、脳炎由来のてんかんを有意に抑制できたと報告している[29]。またDehghaniらは、海馬スライスモデルを用いてCLのサイトカイン抑制効果を報告している。リポポリサッカライドなどで傷害した海馬スライスにCLを投与すると、マイクログリアの活性化が抑制され、それに伴いTNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6などの炎症性サイトカインの分泌も減少したと報告している[41]。これまで脳挫傷モデルを用いてCLの効果を検討した報告は存在しないため、本研究ではCCIモデルを作製しCLの効果を検討した。本研究におけるCLの効果はこれまで他のモデルで報告されているものと同様で、マイクログリアの活性化を抑制し、炎症性サイトカインの分泌を抑制させた。しかし本研究ではさらに詳細にCLによる抗炎症効果を検討するため組織炎症の指標であるPKC $\delta$ を測定した。CL投与によりPKC $\delta$ も有意に抑制されたことから、やはりCLは強い抗炎症効果を有するものと考えられた。PKC $\delta$ は、数十種類のアイソザイムから構成されるタンパク質ファミリーの一つで、細胞の増殖や分化、細胞死に関わるシグナル伝達に関わっていることが報告されている。パーキンソン病モデルにおいて、PKC $\delta$ はアポトーシスを導く重要なメディエーターであり、PKC $\delta$ 阻害剤を用いることで神経保護効果を得られると報告されている[42]。さらに近年の報告では、アポトーシス性細胞死の実行因子として知られているカスパーゼシグナル伝達経路の活性化は、PKC $\delta$ の経路を介してマイクログリアの活性化と関連していることが示された。これらの経路を抑制すると結果的に神経毒性が低下し、神経保護を図ることができると報告されている[43]。さらに本研究ではCLの投与によりMMP-9の発現や脳挫傷体積が減少したことから、CLにより組織に対する損傷が抑制されたものと考えられ、何らかの治療効果を有する可能性が示唆された。これまでのCLを使用した研究の多くは、カスパーゼ活性の解析を中心としたアポトーシスの関与に注目している[39]。しかし、CLにより挫傷体積が有意に減少したという本研究の結果は、脳挫傷腔の形成に大きく関与するネクローシス[44]にも抗炎症作用を介して関与した可能

性がある。CL の治療効果について結論するためには行動試験を行う必要があり、これは今後の課題である。

本研究では、マイクログリアの発現と炎症性サイトカインの分泌に時期的な乖離が認められた。さらに CCI-CL 群のマイクログリアの発現量は、外傷 3 日後には CCI-Control 群と比較してむしろ増えていた。本研究では CL を単回投与しており、半減期を考慮すると外傷 3 日後には CL の効果が消失しているものと考えられた。マイクログリアの活性化や炎症性サイトカイン分泌のピーク、および薬効が消失した際の細胞の活動性を考慮して投与量や投与期間を検討する必要があると考えられた。つまり外傷 3 日後には炎症性サイトカイン、PKC $\delta$  の発現が抑制されたものの、マイクログリアの発現は上昇していることから 3 日後以降に炎症反応が励起されている可能性がある。挫傷腔が完成されるとされている外傷 28 日後に測定した脳挫傷体積が減少していることは、CL が組織保護効果を有することを示しているが、投与期間の調整により更なる効果が得られる可能性があると考えられた。頭部外傷後のサイトカインの分泌については、様々な検討がなされている。動物外傷モデルを用いた報告では、サイトカインの分泌は外傷直後にピークに達するというものや [45]、外傷 24 時間後にピーク [46] を迎えるなど様々である。これは外傷のモデルや強度、測定するサイトカインの種類により異なると考えられ、頭部外傷の複雑さを反映していると考えられる。さらに一部のサイトカインは頭部外傷後に脳保護的に働くとの報告や、時期によって脳保護性にまたは障害性に作用すると報告されており [18, 47]、今後は実臨床症例での解析も含めて検討する必要があると考えられた。

脳損傷時の CL の作用機序については大きく二つの説が存在する。マクロファージは脳損傷時に脳内に浸潤していくといわれており、この浸潤するマクロファージが CL により減少するという説と、外傷や虚血により血液脳関門が破綻すると CL が脳内に漏出し、脳内の免疫担当細胞であるマイクログリアが減少するというものである [28, 29, 48-50]。本研究では用いた抗体の関係でどちらの機序が主に貢献しているか不明である。これも今後の研究課題の一つである。ただし、Naïve 群と Sham-CL 群を比較しても細胞形態や細胞数に変化がみられないことから、CL は正常に機能する血液脳関門は通過しないというこれまでの報告は正しいものと考えられた。

## 7-2 マイクログリアの最近の動向

脳挫傷や脳虚血において、マイクログリアが活性化し、機能的、形態的に変化して様々な炎症関連物質を分泌することは周知の事実である [51]。しかしこれまで考えられていた以上に複雑な機序が明らかになってきた。マクロファージの機能には、相反する障害性（炎症性）と保護性（抗炎症性）があることが解明されていたが [52, 53]、脳の炎症に関わ



るマクログリアにも同様に極性があり、活性型マクログリアには障害性に働く M1 型と保護性に働く M2 型があると考えられ、注目されている[54, 55]。また活性型マクログリアから分泌されるサイトカインにも、IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$  などの障害性サイトカインと IL-4 などの保護性サイトカインがある[56, 57]。Perez-Polo らは、ラットの外傷モデルにおいて、IL-1 $\beta$  受容体拮抗薬や TNF $\alpha$  阻害剤が外傷後に生じる神経細胞死を抑制し、機能予後を改善したと報告している[58]。またマウスの外傷モデルにおいて、IL-1 $\beta$  中和抗体の投与が機能予後を改善したとの報告など[59]、サイトカインの分泌を抑制することの有効性を示す報告は多い。その一方で、単にサイトカインを拮抗すれば抗炎症効果を得られるのではないとの報告や[60]、サイトカインは外傷後の時期により予後の改善、悪化のいずれにも寄与するとの報告もされている[18]。本研究では急性期に、すべての型のマクロファージやマクログリアを抑制した。現時点で M1 型と M2 型を別々に制御することは手技的に困難であるが、今後は抗炎症療法を行う時期とも併せて詳細に検討していく必要があると考えられた。

## 8. 結論

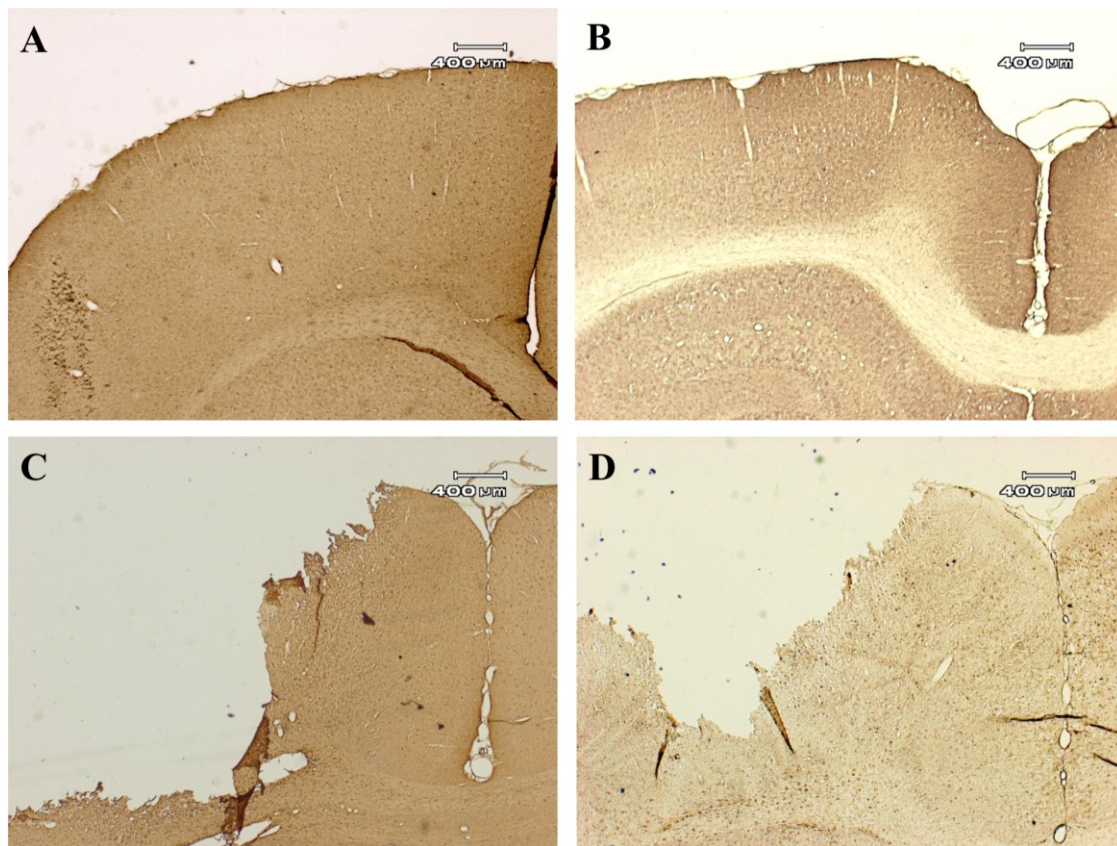
ラット脳挫傷モデルにおいて、クロドロン酸リポソームの全身投与は、炎症を抑制し、脳の二次性脳損傷治療に貢献できる可能性があると考えられた。

## 9. 謝辞

本研究の遂行におきまして、懇切な指導を賜りました日本大学医学部脳神経外科学系主任教授の吉野篤緒教授に深く感謝を申し上げます。

10. 図表

図1 脳挫傷周囲皮質における Iba-1 染色 弱拡大



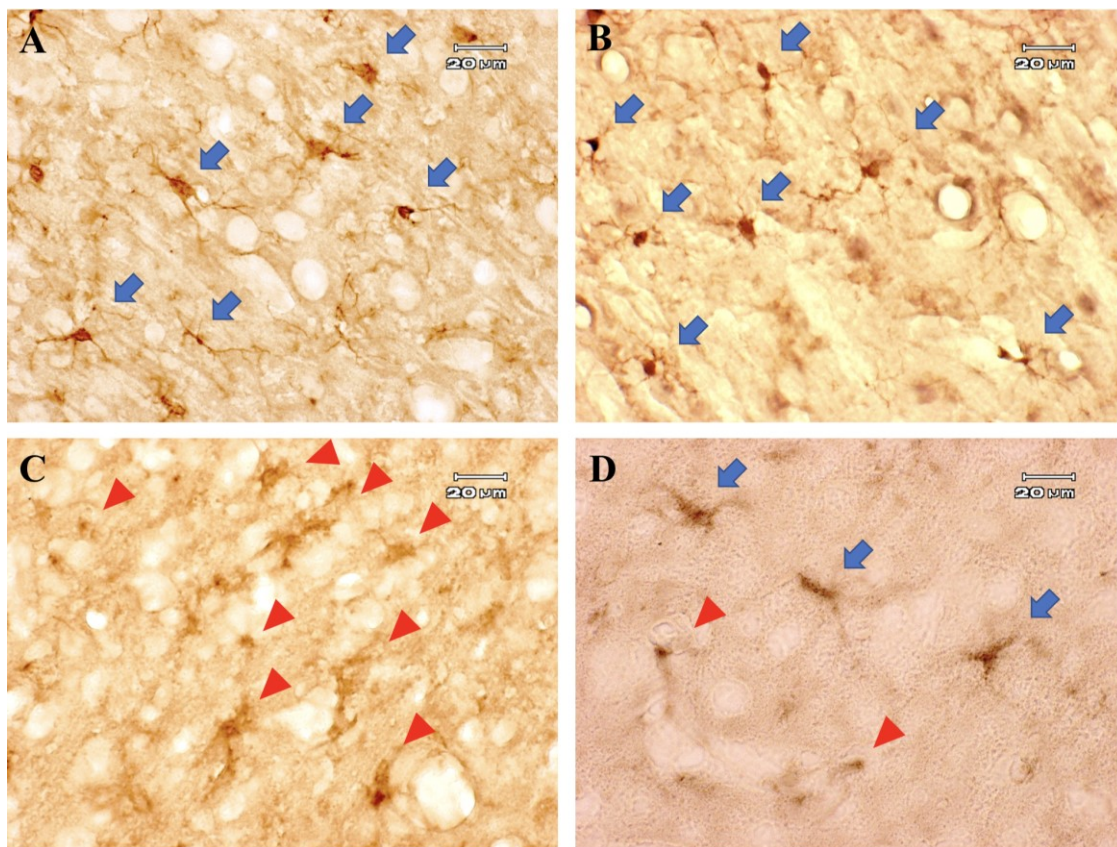
脳挫傷側の弱拡大組織標本。いずれも 15 倍。

Naïve 群 (A)、Sham-CL 群 (B)、CCI-Control 群 (C)、CCI-CL 群 (D)。

Naïve 群と CCI-Control 群を比較すると、Iba-1 陽性の細胞数は外傷により増加している。

CCI-CL 群では、CL の投与により明らかに陽性細胞の密度は減少している。

図2 脳挫傷周囲皮質における Iba-1 染色 強拡大



脳挫傷側の強拡大組織標本。いずれも 300 倍。

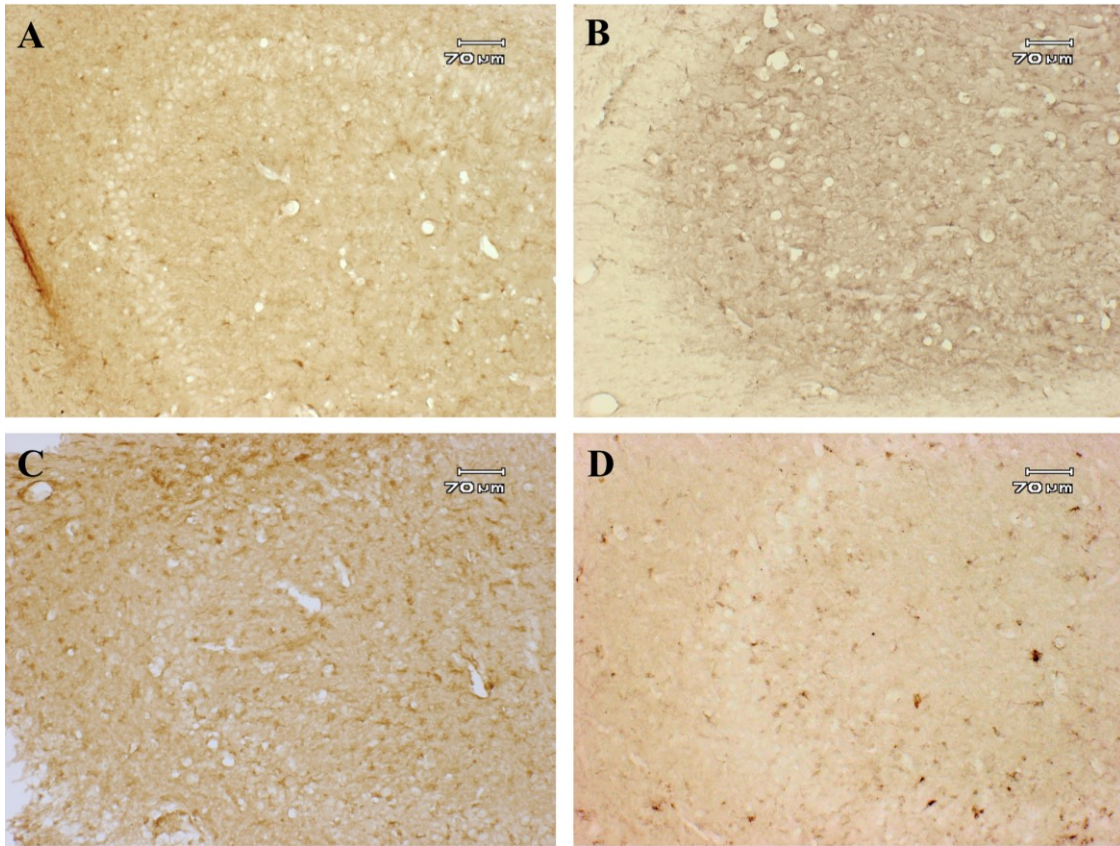
Naïve 群 (A)、Sham-CL 群 (B)、CCI-Control 群 (C)、CCI-CL 群 (D)。

Naïve 群と Sham-CL 群では、非活性型である ramified 型マイクログリアが多く観察される。CCI-Control 群では、外傷により活性型である amoeboid 型マイクログリアが多く観察される。CCI-CL 群では、CL の投与により ramified 型、amoeboid 型マイクログリアはともに減少している。

矢印：ramified 型マイクログリア

矢頭：amoeboid 型マイクログリア

図3 脳挫傷と同側海馬における Iba-1 染色 弱拡大

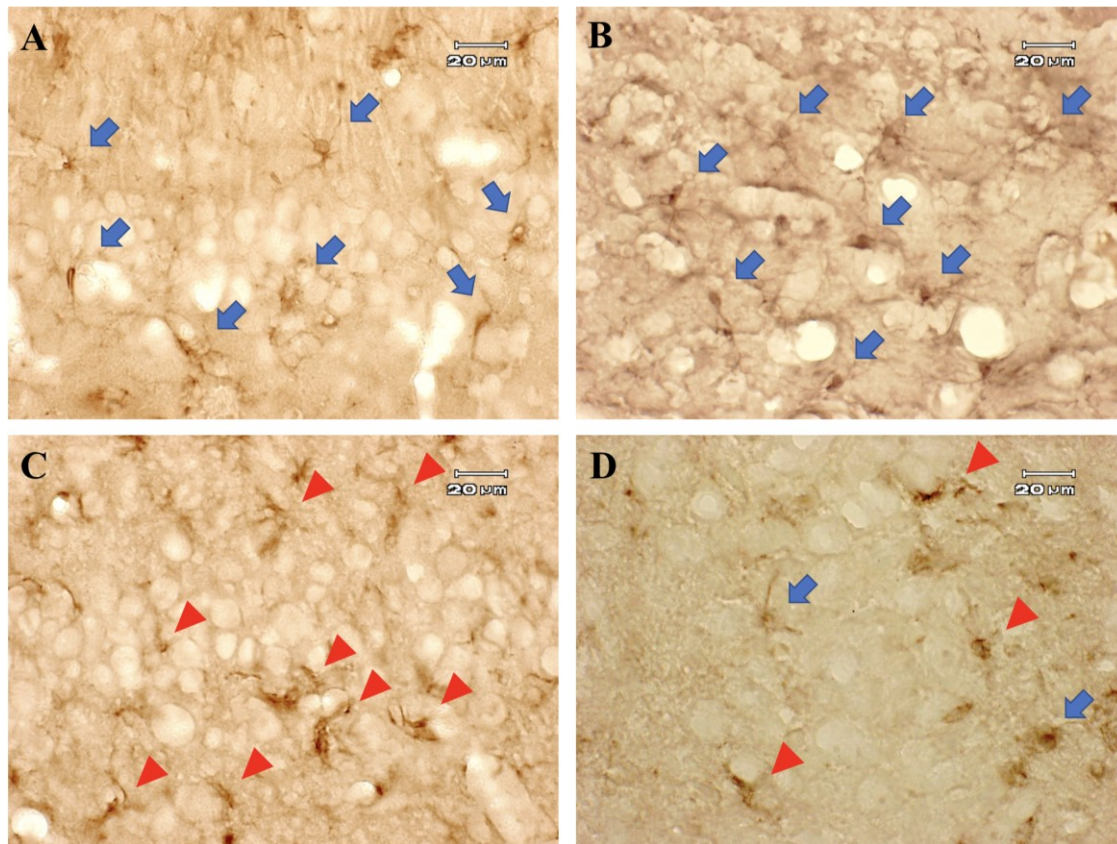


脳挫傷と同側海馬の弱拡大組織標本。いずれも 75 倍。

Naïve 群 (A)、Sham-CL 群 (B)、CCI-Control 群 (C)、CCI-CL 群 (D)。

海馬においても、Naïve 群と CCI-Control 群を比較すると、Iba-1 陽性の細胞数は外傷により増加している。CCI-CL 群では、CL の投与により明らかに陽性細胞の密度は減少している。

図4 脳挫傷と同側海馬における Iba-1 染色 強拡大



脳挫傷と同側海馬の強拡大組織標本。いずれも 300 倍。

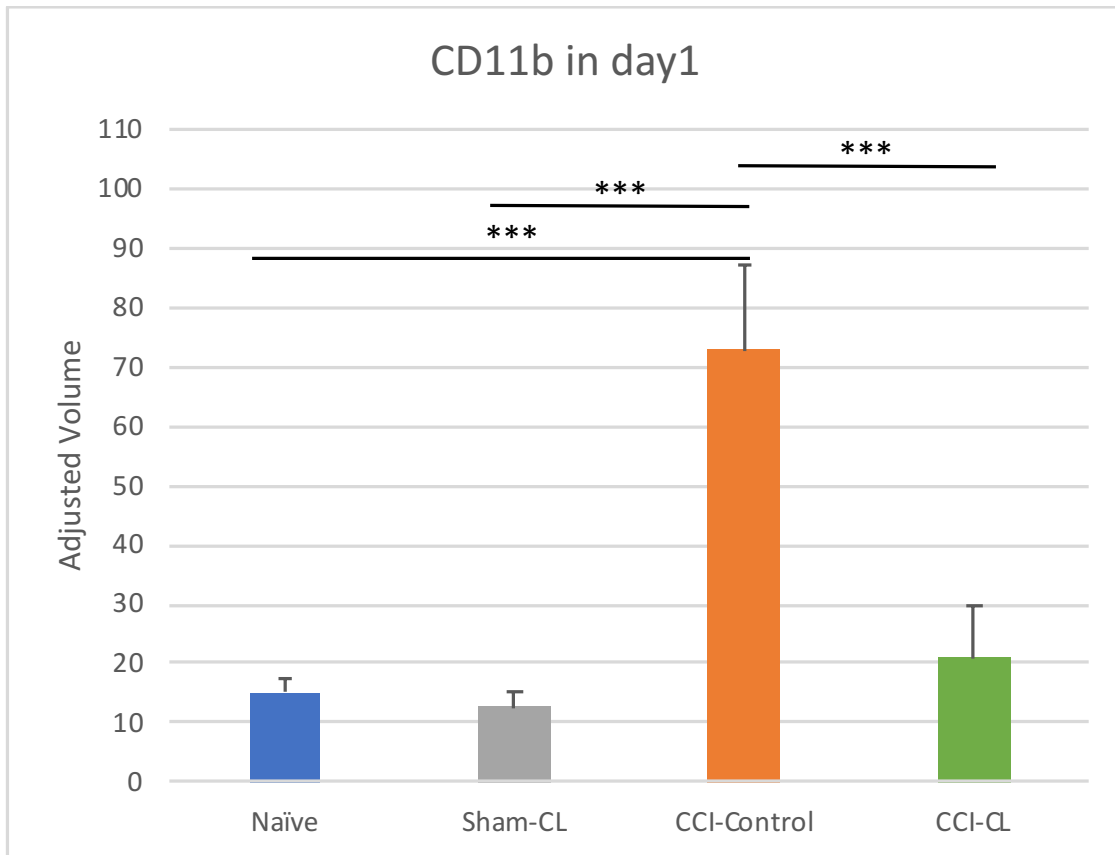
Naïve 群 (A)、Sham-CL 群 (B)、CCI-Control 群 (C)、CCI-CL 群 (D)。

Naïve 群と Sham-CL 群は、非活性型である ramified 型マイクログリアが多く観察される。CCI-Control 群では、外傷により活性型である amoeboid 型マイクログリアが多数観察される。CCI-CL 群では、CL の投与により ramified 型、amoeboid 型マイクログリアはともに減少している。

矢印：ramified 型マイクログリア

矢頭：amoeboid 型マイクログリア

図5 外傷1日後の脳挫傷周囲皮質における抗CD11b抗体を用いたWestern blotting

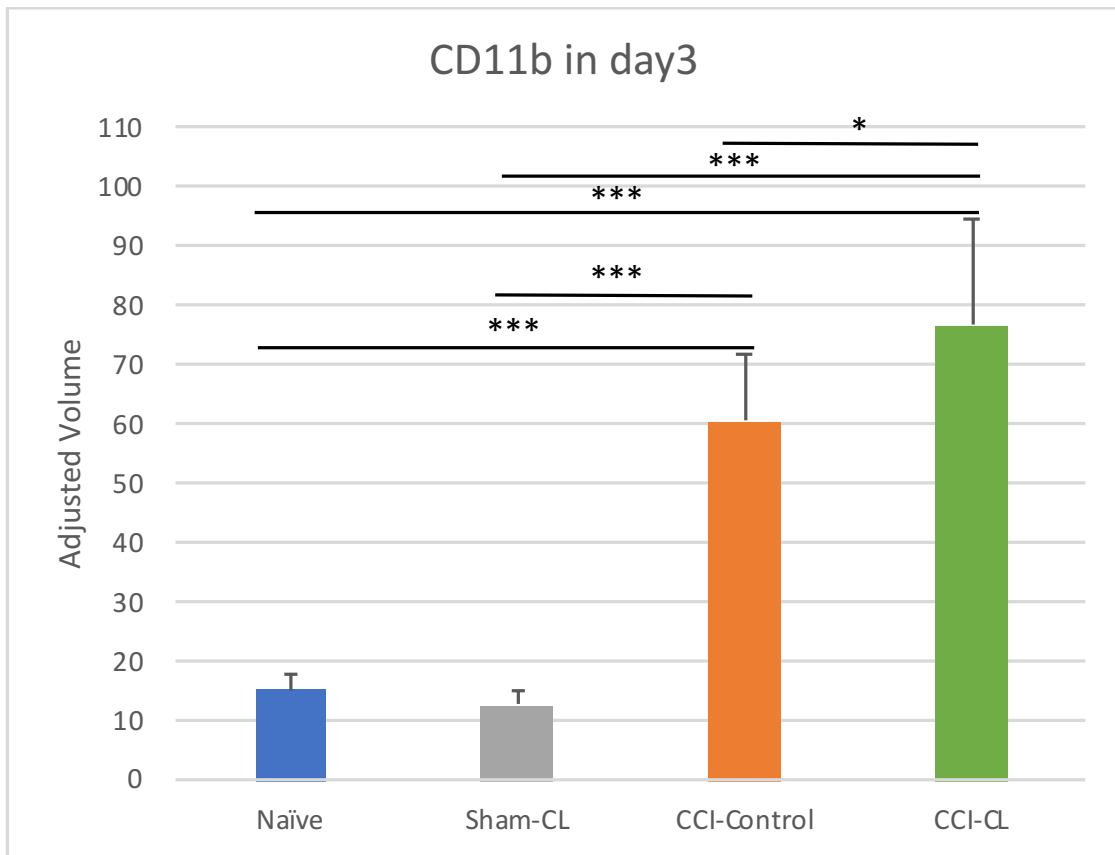


CCI-Control 群では、CD11b の発現は Naive 群、Sham-CL 群と比較して有意な上昇を認めた。CCI-CL 群では CL の投与により CCI-Control 群と比較して有意な発現の抑制を認めた。

\*\*\*:  $p < 0.001$



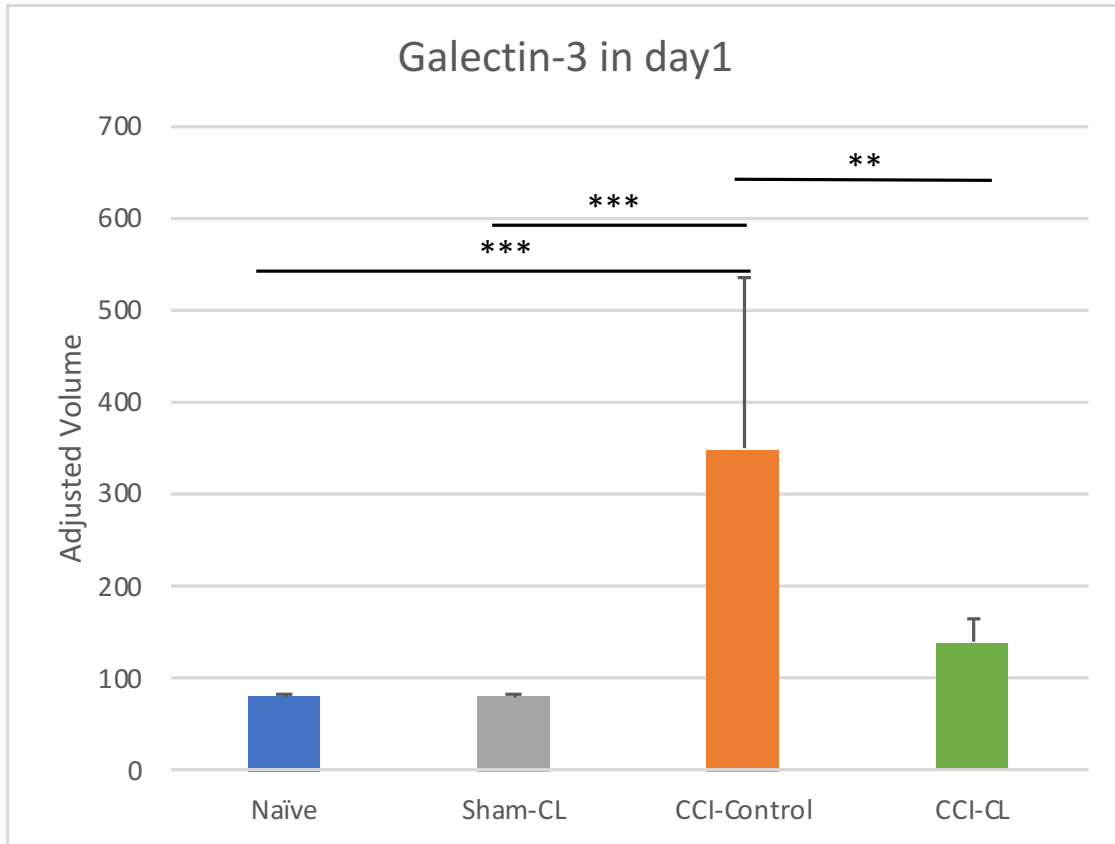
図6 外傷3日後の脳挫傷周囲皮質における抗CD11b抗体を用いたWestern blotting



CCI-Control 群では、CD11b の発現は Naïve 群、Sham-CL 群と比較して有意な上昇を認めた。CCI-CL 群では、いずれの群と比較しても有意な発現の上昇を認めた。

\*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.001$

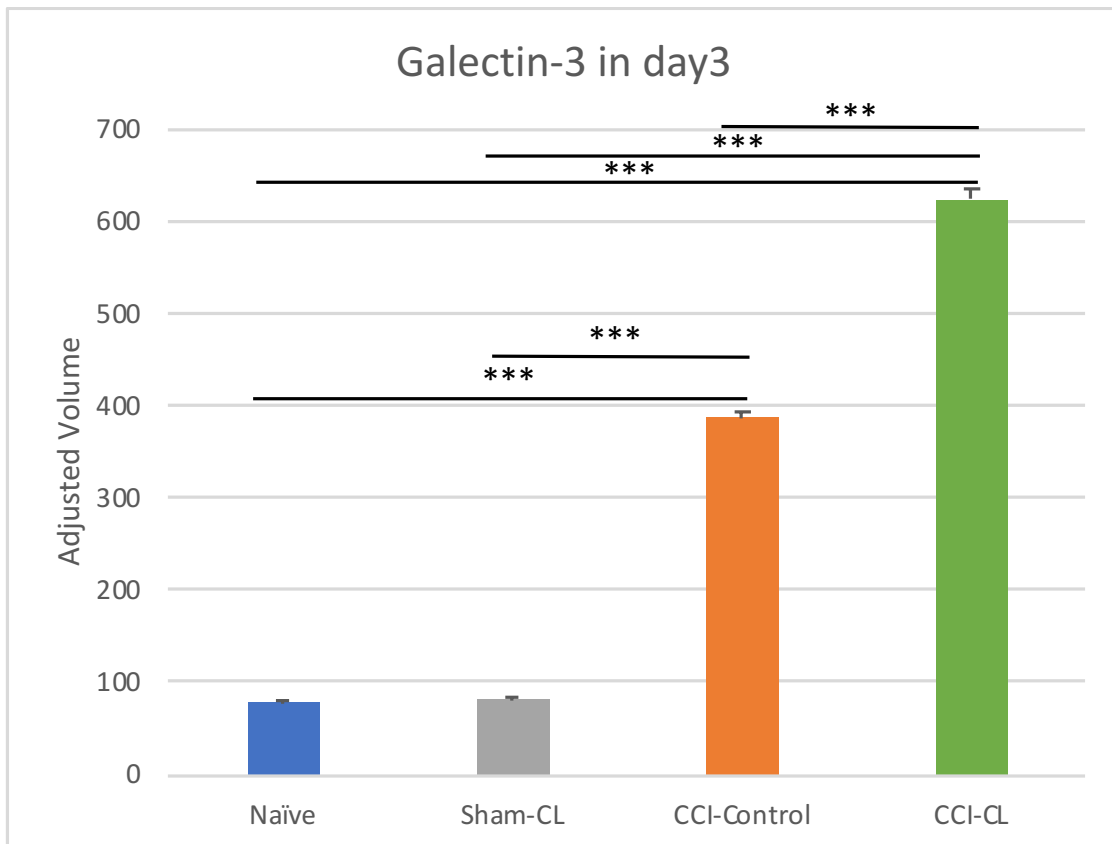
図7 外傷1日後の脳挫傷周囲皮質における抗 Galectin-3 抗体を用いた Western blotting



CCI-Control 群では、Galectin-3 の発現は Naïve 群、Sham-CL 群と比較して有意な上昇を認めた。CCI-CL 群では CL の投与により CCI-Control 群と比較して有意な発現の抑制を認めた。

\*\* :  $p < 0.01$ 、\*\*\* :  $p < 0.001$

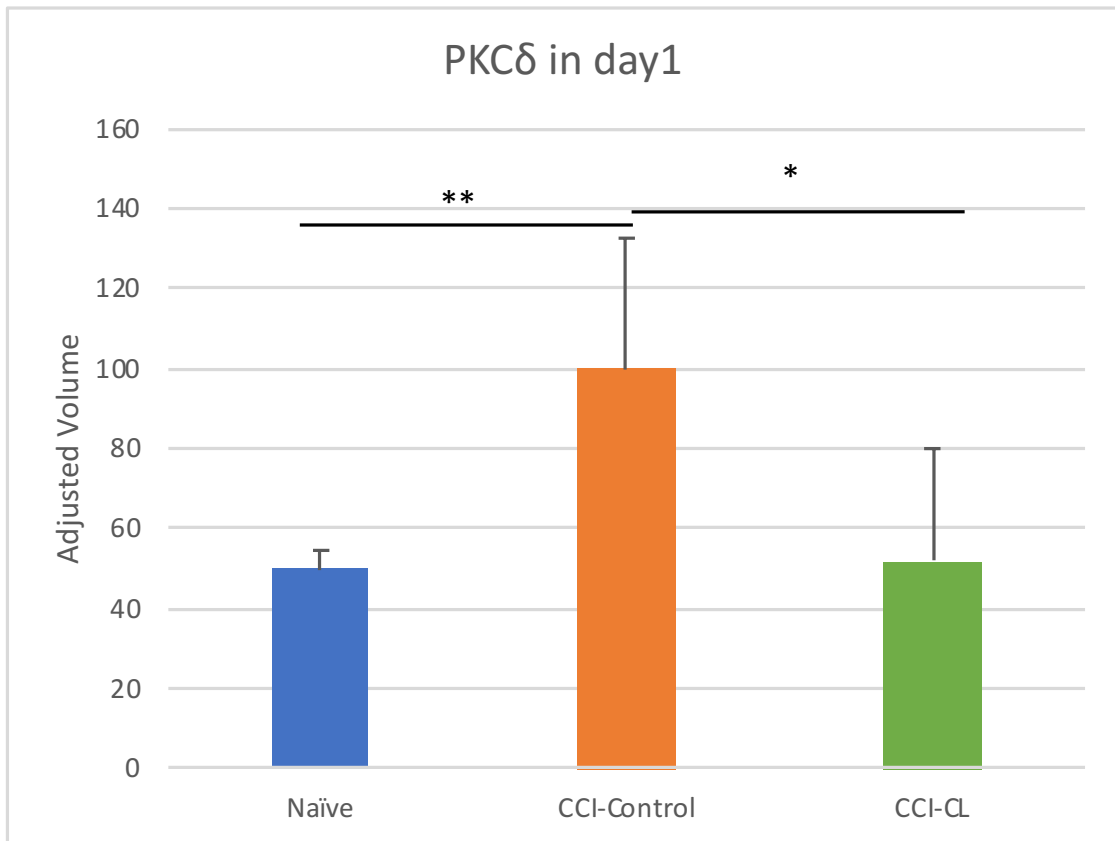
図8 外傷3日後の脳挫傷周囲皮質における抗 Galectin-3 抗体を用いた Western blotting



CCI-Control 群では、Galectin-3 の発現は Naïve 群、Sham-CL 群と比較して有意な上昇を認めた。CCI-CL 群では、いずれの群と比較しても有意な発現の上昇を認めた。

\*\*\*:  $p < 0.001$

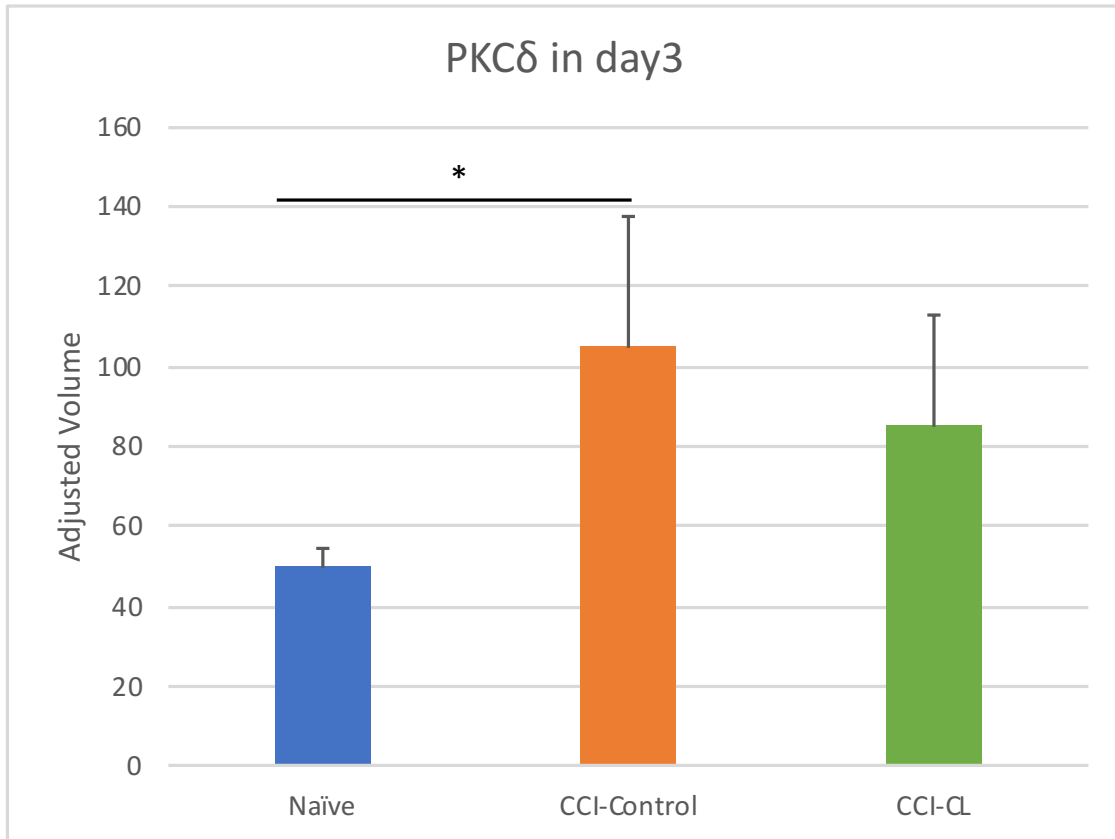
図9 外傷1日後の脳挫傷周囲皮質における抗PKC $\delta$ 抗体を用いたWestern blotting



CCI-Control 群では、PKC $\delta$  の発現は Naïve 群と比較して有意な上昇を認めた。CCI-CL 群では、CCI-Control 群と比較すると有意な発現の抑制を認めた。

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$

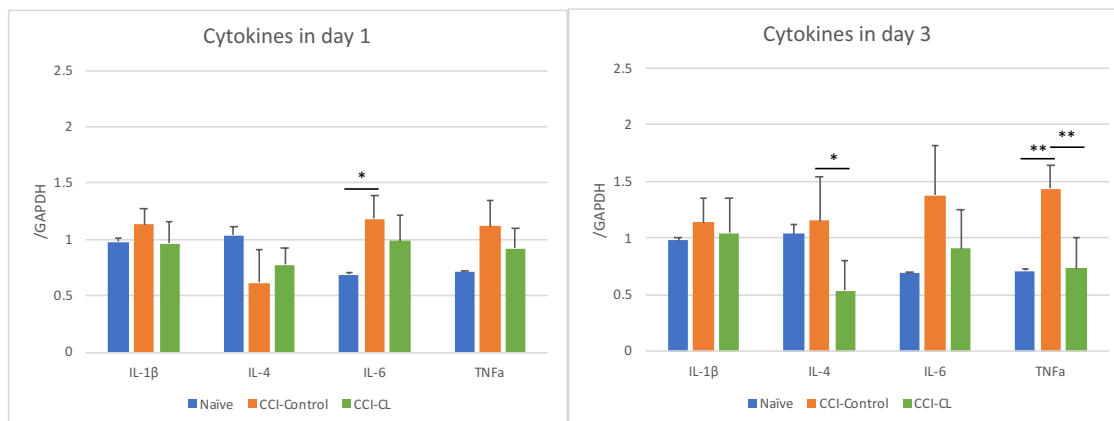
図 10 外傷 3 日後の脳挫傷周囲皮質における抗 PKC $\delta$  抗体を用いた Western blotting



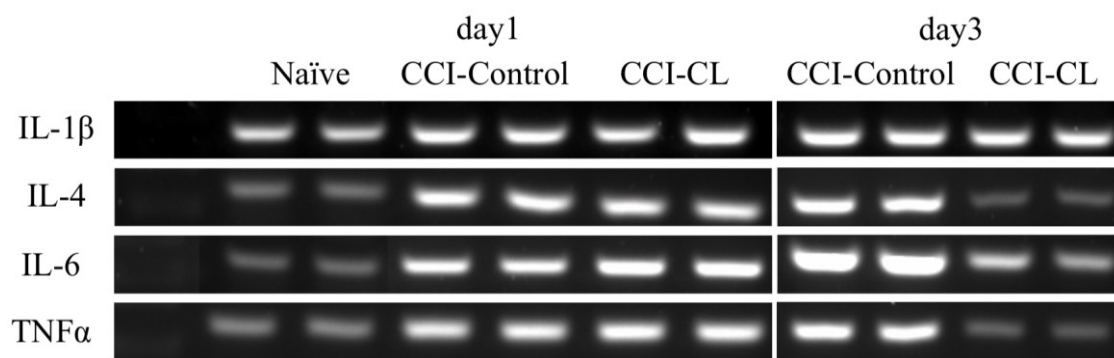
CCI-Control 群では、PKC $\delta$  の発現は Naïve 群と比較して有意な上昇を認めた。CCI-CL 群では、CCI-Control 群と比較すると有意差は認めなかったが発現の抑制を認めた。

\*:  $p < 0.05$

図 11 脳挫傷周囲皮質における各サイトカインの PCR

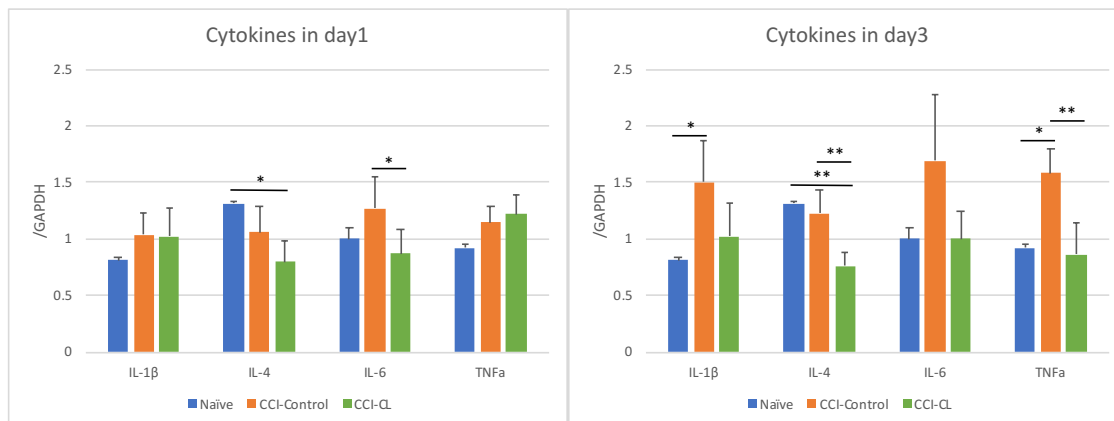


\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$

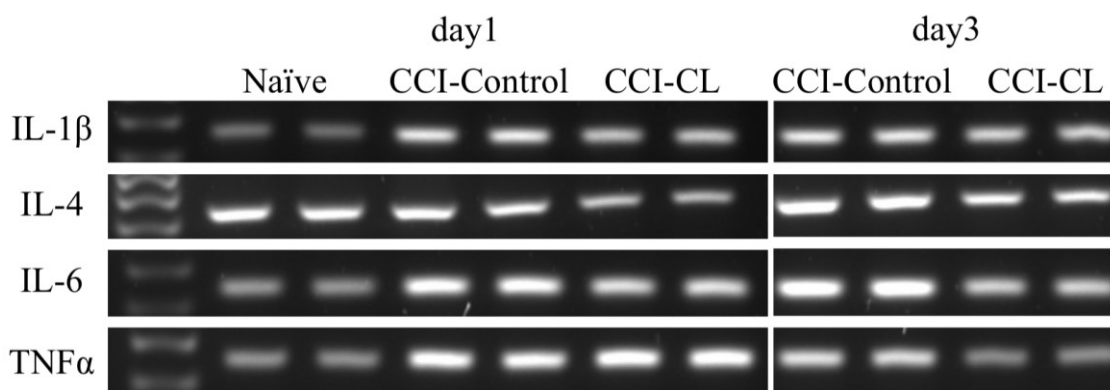


外傷 3 日後には、TNF $\alpha$  の発現は CCI-Control 群において Naïve 群と比較し、外傷により有意に上昇した。IL-4 と TNF $\alpha$  の発現は、CCI-CL 群において CCI-Control 群と比較すると CL の投与により有意な抑制を認めた。

図 12 脳挫傷と同側海馬における各サイトカインの PCR

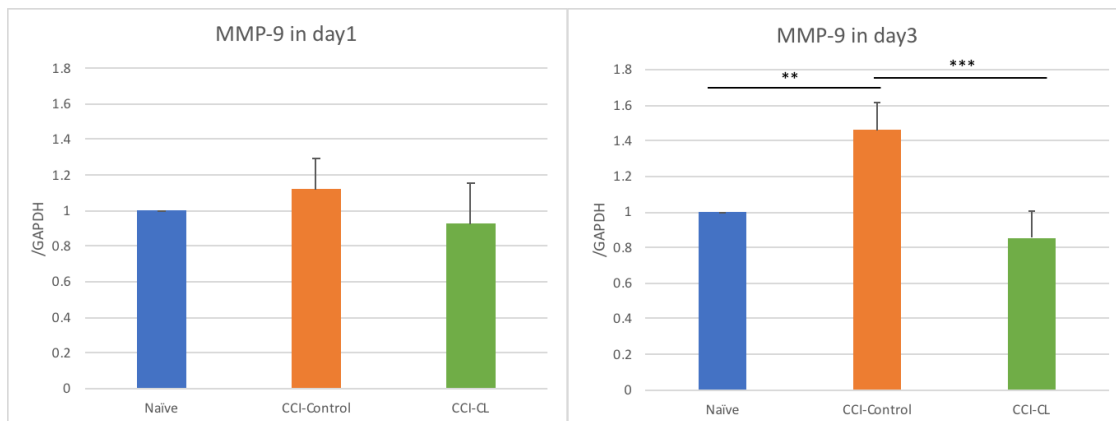


\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$

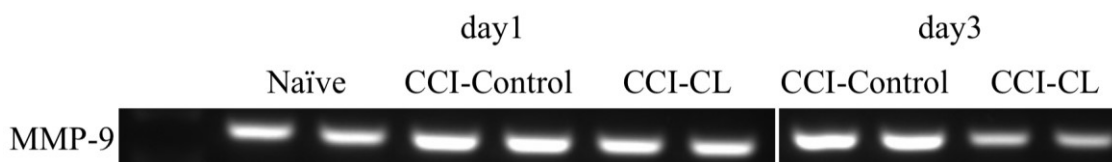


外傷 1 日後には、IL-4 の発現は CCI-CL 群において Naïve 群と比較し CL の投与により有意な抑制を認めた。IL-6 の発現は CCI-CL 群において CCI-Control 群と比較して CL の投与により有意な抑制を認めた。外傷 3 日後には、IL-4 の発現は CCI-CL 群においていずれの群と比較しても有意な抑制を認めた。TNFα の発現は CCI-Control 群において Naïve 群と比較すると有意に上昇し、CCI-CL 群では CCI-Control 群と比較して CL の投与により有意な抑制を認めた。

図 13 脳挫傷周囲皮質における MMP-9 の PCR



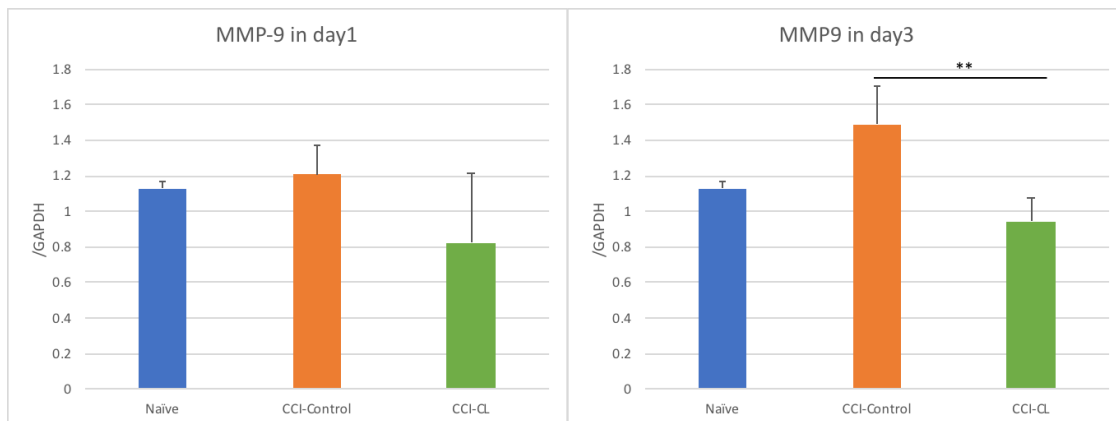
\*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.001$



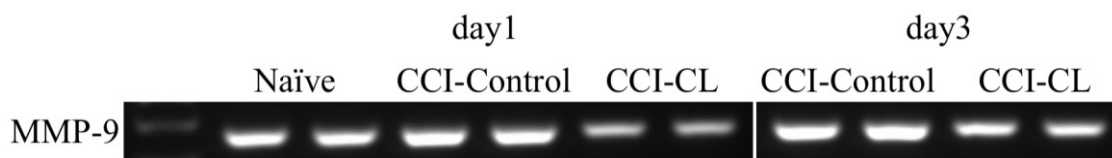
外傷 3 日後には、MMP-9 の発現は CCI-Control 群において Naive 群と比較し、外傷により有意に上昇した。CCI-CL 群において CCI-Control 群と比較すると CL の投与により有意な抑制を認めた。



図 14 脳挫傷と同側海馬における MMP-9 の PCR

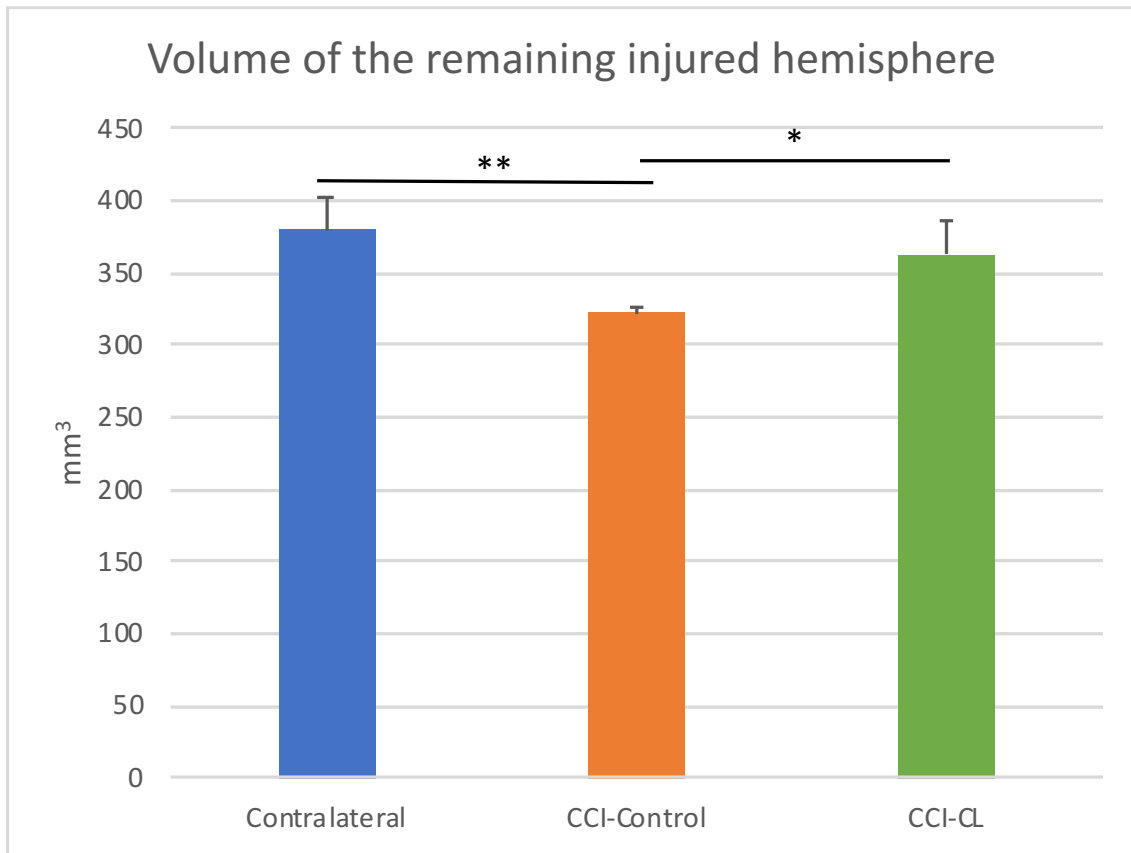


\*\* :  $p < 0.01$



外傷3日後には、MMP-9の発現はCCI-CL群においてCCI-Control群と比較するとCLの投与により有意な抑制を認めた。

図 15 残存脳体積の測定



正常側（Contralateral）に比較して CCI-Control 群の外傷側の体積は有意に減少した。CCI-CL 群の外傷側では、CCI-Control 群の外傷側と比較すると CL の投与により有意な脳体積の増加を認めた。

\*:  $p < 0.05$ 、 \*\*:  $p < 0.01$

表1 本研究に使用した外傷モデルの内訳

	組織染色用			Western blotting、 PCR 用	
	1 日モデル	3 日モデル	28 日モデル	1 日モデル	3 日モデル
Naïve 群	n=2			n=2	
Sham-CL 群	n=3			n=3	
CCI-Control 群	n=2	n=2	n=4	n=6	n=6
CCI-CL 群	n=2	n=2	n=6	n=6	n=6

表2 本研究に使用したプライマーとその条件

	Forward	Reverse	AT	Cy
IL-1 $\beta$	GGATGATGACGACCTGC	CTTGTTGGCTTATGTTCTG	54	32
IL-4	CAGACGTCCTTACGGCAACA	AGACCGCTGACACCTCTACA	58	35
IL-6	AAGTCGGAGGCTTAATTACACATGT	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA	62	32
TNF $\alpha$	CTTATCTACTCCCAGGTTCTCTTCAA	GAGACTCCTCCCAGGTACATGG	57	31
MMP-9	GATCCCCAGAGCGTTACTCG	GTTGTGGAAACTCACACGCC	63	31
GAPDH	AAGAAGGTGGTGAAGCAGGC	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	63	23

AT: Annealing temperature、Cy: Cycle。

11. 引用文献

1. Freytag, E. and R. Lindenberg, *Morphology of cortical contusions*. AMA Arch Pathol, 1957. **63**(1): p. 23-42.
2. Lindenberg, R. and E. Freytag, *The mechanism of cerebral contusions. A pathologic-anatomic study*. Arch Pathol, 1960. **69**: p. 440-469.
3. Lindenberg, R. and E. Freytag, *Morphology of brain lesions from blunt trauma in early infancy*. Arch Pathol, 1969. **87**(3): p. 298-305.
4. Gurdjian, E.S., *Cerebral contusions: re-evaluation of the mechanism of their development*. J Trauma, 1976. **16**(1): p. 35-51.
5. Chesnut, R.M., et al., *The role of secondary brain injury in determining outcome from severe head injury*. J Trauma, 1993. **34**(2): p. 216-222.
6. Flygt, J., et al., *Neutralization of Interleukin-1beta following Diffuse Traumatic Brain Injury in the Mouse Attenuates the Loss of Mature Oligodendrocytes*. J Neurotrauma, 2018. **35**(23): p. 2837-2849
7. Wei, H.L., S.Q. Ma, and C.X. Li, *Deficiency of unc-51 like kinase 1 (Ulk1) protects against mice traumatic brain injury (TBI) by suppression of p38 and JNK pathway*. Biochem Biophys Res Commun, 2018. **503**(2): p. 467-473.
8. Chen, X., et al., *Omega-3 polyunsaturated fatty acid attenuates the inflammatory response by modulating microglia polarization through SIRT1-mediated deacetylation of the HMGB1/NF-kappaB pathway following experimental traumatic brain injury*. J Neuroinflammation, 2018. **15**(1): p. 116.
9. Lai, Y., et al., *Autophagy is increased after traumatic brain injury in mice and is partially inhibited by the antioxidant gamma-glutamylcysteinyl ethyl ester*. J Cereb Blood Flow Metab, 2008. **28**(3): p. 540-550.
10. Zhang, L. and H. Wang, *Autophagy in Traumatic Brain Injury: A New Target for Therapeutic Intervention*. Front Mol Neurosci, 2018. **11**: p. 190.
11. Wang, A., et al., *Tetramethylpyrazine reduces blood-brain barrier permeability associated with enhancement of peripheral cholinergic anti-inflammatory effects for treating traumatic brain injury*. Exp Ther Med, 2017. **14**(3): p. 2392-2400.
12. Xu, X., et al., *Anti-inflammatory and immunomodulatory mechanisms of atorvastatin in a murine model of traumatic brain injury*. J Neuroinflammation, 2017. **14**(1): p. 167.
13. Liu, S.J., et al., *Co-grafting of neural stem cells with olfactory ensheathing cells promotes neuronal restoration in traumatic brain injury with an anti-inflammatory mechanism*. J

- Neuroinflammation, 2014. **11**: p. 66.
14. Lim, S.W., et al., *Microglial activation induced by traumatic brain injury is suppressed by postinjury treatment with hyperbaric oxygen therapy*. J Surg Res, 2013. **184**(2): p. 1076-1084.
  15. Chan, H.H., et al., *Lateral cerebellar nucleus stimulation promotes motor recovery and suppresses neuroinflammation in a fluid percussion injury rodent model*. Brain Stimul, 2018. **11**(6): p. 1356-1367
  16. Huie, J.R., et al., *Testing a Multivariate Proteomic Panel for Tbi Biomarker Discovery: A Track-Tbi Pilot Study*. J Neurotrauma, 2018.
  17. Bodnar, C.N., J.M. Morganti, and A.D. Bachstetter, *Depression following a traumatic brain injury: uncovering cytokine dysregulation as a pathogenic mechanism*. Neural Regen Res, 2018. **13**(10): p. 1693-1704.
  18. Scherbel, U., et al., *Differential acute and chronic responses of tumor necrosis factor-deficient mice to experimental brain injury*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(15): p. 8721-8726.
  19. Kanis, J.A., E.V. McCloskey, and M.N. Beneton, *Clodronate and osteoporosis*. Maturitas, 1996. **23 Suppl**: p. S81-86.
  20. Muratore, M., et al., *Clinical utility of clodronate in the prevention and management of osteoporosis in patients intolerant of oral bisphosphonates*. Drug Des Devel Ther, 2011. **5**: p. 445-454.
  21. Nardi, A., et al., *Clodronate news of efficacy in osteoporosis*. Clin Cases Miner Bone Metab, 2016. **13**(1): p. 33-35.
  22. Yates, A.J., et al., *Intravenous clodronate in the treatment and retreatment of Paget's disease of bone*. Lancet, 1985. **1**(8444): p. 1474-1477.
  23. Barrera, P., et al., *Synovial macrophage depletion with clodronate-containing liposomes in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(9): p. 1951-1959.
  24. Van Rooijen, N., *The liposome-mediated macrophage 'suicide' technique*. J Immunol Methods, 1989. **124**(1): p. 1-6.
  25. van Rooijen, N. and E. van Kesteren-Hendriks, *Clodronate liposomes: perspectives in research and therapeutics*. J Liposome Res, 2002. **12**(1-2): p. 81-94.
  26. van Rooijen, N. and E. Hendriks, *Liposomes for specific depletion of macrophages from organs and tissues*. Methods Mol Biol, 2010. **605**: p. 189-203.
  27. Frediani, B. and I. Bertoldi, *Clodronate: new directions of use*. Clin Cases Miner Bone Metab, 2015. **12**(2): p. 97-108.
  28. Drabek, T., et al., *Microglial depletion using intrahippocampal injection of liposome-*

- encapsulated clodronate in prolonged hypothermic cardiac arrest in rats*. Resuscitation, 2012. **83**(4): p. 517-526.
29. Waltl, I., et al., *Macrophage depletion by liposome-encapsulated clodronate suppresses seizures but not hippocampal damage after acute viral encephalitis*. Neurobiol Dis, 2018. **110**: p. 192-205.
30. Goodman, J.C., et al., *Lateral cortical impact injury in rats: pathologic effects of varying cortical compression and impact velocity*. J Neurotrauma, 1994. **11**(5): p. 587-597.
31. Asai, H., et al., *Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation*. Nature Neuroscience, 2015. **18**(11): p. 1584-1593.
32. Dang, S.C., et al., *Clodronate-containing liposomes attenuate lung injury in rats with severe acute pancreatitis*. J Zhejiang Univ Sci B, 2010. **11**(11): p. 828-835.
33. Russell, R.G. and M.J. Rogers, *Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again*. Bone, 1999. **25**(1): p. 97-106.
34. Frediani, B., L. Cavalieri, and G. Cremonesi, *Clodronic acid formulations available in Europe and their use in osteoporosis: a review*. Clin Drug Investig, 2009. **29**(6): p. 359-379.
35. Van Rooijen, N. and A. Sanders, *Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications*. J Immunol Methods, 1994. **174**(1-2): p. 83-93.
36. Selander, K.S., et al., *Characteristics of clodronate-induced apoptosis in osteoclasts and macrophages*. Mol Pharmacol, 1996. **50**(5): p. 1127-1138.
37. Ma, Y., et al., *Macrophage depletion reduced brain injury following middle cerebral artery occlusion in mice*. J Neuroinflammation, 2016. **13**: p. 38.
38. Pires, P.W., et al., *Improvement in middle cerebral artery structure and endothelial function in stroke-prone spontaneously hypertensive rats after macrophage depletion*. Microcirculation, 2013. **20**(7): p. 650-661.
39. Fernandez-Lopez, D., et al., *Microglial Cells Prevent Hemorrhage in Neonatal Focal Arterial Stroke*. J Neurosci, 2016. **36**(10): p. 2881-2893.
40. Ni, W., et al., *Role of Erythrocyte CD47 in Intracerebral Hematoma Clearance*. Stroke, 2016. **47**(2): p. 505-511.
41. Dehghani, F., et al., *Clodronate inhibits the secretion of proinflammatory cytokines and NO by isolated microglial cells and reduces the number of proliferating glial cells in excitotoxically injured organotypic hippocampal slice cultures*. Experimental Neurology, 2004. **189**(2): p. 241-251.

42. Zhang, D., et al., *Neuroprotective effect of protein kinase C delta inhibitor rottlerin in cell culture and animal models of Parkinson's disease*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. **322**(3): p. 913-922.
43. Burguillos, M.A., et al., *Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity*. Nature, 2011. **472**(7343): p. 319-324.
44. Villapol, S., K.R. Byrnes, and A.J. Symes, *Temporal dynamics of cerebral blood flow, cortical damage, apoptosis, astrocyte-vasculature interaction and astrogliosis in the pericontusional region after traumatic brain injury*. Front Neurol, 2014. **5**: p. 82.
45. Jassam, Y.N., et al., *Neuroimmunology of Traumatic Brain Injury: Time for a Paradigm Shift*. Neuron, 2017. **95**(6): p. 1246-1265.
46. Stover, J.F., et al., *Temporal profile of cerebrospinal fluid glutamate, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in relation to brain edema and contusion following controlled cortical impact injury in rats*. Neurosci Lett, 2000. **288**(1): p. 25-28.
47. Sordillo, P.P., L.A. Sordillo, and L. Helson, *Bifunctional role of pro-inflammatory cytokines after traumatic brain injury*. Brain Inj, 2016. **30**(9): p. 1043-1053.
48. Denker, S.P., et al., *Macrophages are comprised of resident brain microglia not infiltrating peripheral monocytes acutely after neonatal stroke*. J Neurochem, 2007. **100**(4): p. 893-904.
49. Lambertsen, K.L., et al., *Microglia protect neurons against ischemia by synthesis of tumor necrosis factor*. J Neurosci, 2009. **29**(5): p. 1319-1330.
50. Faustino, J.V., et al., *Microglial cells contribute to endogenous brain defenses after acute neonatal focal stroke*. J Neurosci, 2011. **31**(36): p. 12992-13001.
51. Bal-Price, A. and G.C. Brown, *Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity*. J Neurosci, 2001. **21**(17): p. 6480-6491.
52. Lucas, M., et al., *Requirements for apoptotic cell contact in regulation of macrophage responses*. J Immunol, 2006. **177**(6): p. 4047-4054.
53. Tang, Y. and W. Le, *Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases*. Mol Neurobiol, 2016. **53**(2): p. 1181-1194.
54. Stoll, G., S. Jander, and M. Schroeter, *Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions*. Prog Neurobiol, 1998. **56**(2): p. 149-171.
55. Lai, A.Y. and K.G. Todd, *Differential regulation of trophic and proinflammatory microglial effectors is dependent on severity of neuronal injury*. Glia, 2008. **56**(3): p. 259-270.
56. Chao, C.C., et al., *Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism*.



- J Immunol, 1992. **149**(8): p. 2736-2741.
57. Block, M.L., L. Zecca, and J.S. Hong, *Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(1): p. 57-69.
58. Perez-Polo, J.R., et al., *Inflammatory cytokine receptor blockade in a rodent model of mild traumatic brain injury*. J Neurosci Res, 2016. **94**(1): p. 27-38.
59. Ekmark-Lewen, S., et al., *Diffuse traumatic axonal injury in mice induces complex behavioural alterations that are normalized by neutralization of interleukin-1beta*. Eur J Neurosci, 2016. **43**(8): p. 1016-1033.
60. Helmy, A., et al., *Recombinant human interleukin-1 receptor antagonist promotes M1 microglia biased cytokines and chemokines following human traumatic brain injury*. J Cereb Blood Flow Metab, 2016. **36**(8): p. 1434-1448.

12. 研究業績

I. 発表	①一般発表	5	(筆頭 5 / 共同 0)
	②特別発表	なし	
II. 論文	①原著論文	なし	
	②症例報告	1	
	③総説	なし	
III. 著書		1	

## I. 発表

### ①一般発表

- 1 根岸 弘、山室 俊、四條克倫、小林一太、大島秀規、吉野篤緒：ステロイド治療が奏効した斜台部 IgG4 関連肥厚性硬膜炎の一例，日本脳神経外科学会 第 75 回学術総会，福岡，2016 年 10 月
- 2 根岸 弘、下田健太郎、加納利和、古市 眞：当院における急性期血行再建術の現状，第 54 回埼玉県医学会総会，浦和，2017 年 2 月
- 3 根岸 弘、下田健太郎、加納利和、古市眞：脳底動脈閉塞に対する経上腕動脈アプローチによる血行再建術，第 42 回日本脳卒中学会学術総会，大阪，2017 年 3 月
- 4 根岸 弘、稲原裕也、吉田宏一朗、澁谷浩司、渡辺 充、茂呂修啓、吉野篤緒：慢性硬膜下血腫術後 7 日目における頭部単純 CT での再発の予見について，第 137 回日本脳神経外科学会 関東支部会，東京，2018 年 12 月
- 5 Negishi Hiroshi, Takamine Yusuke, Furukawa Yuto, Kobayashi Masato, Kumagawa Takahiro, Shijo Katsunori, Moro Nobuhiro, Maeda Takeshi, Yoshino Atsuo : Liposome-encapsulated clodronate in a rat model of cerebral contusion injury, Neuroscience 2018, San Diego, 2018 年 11 月

## Ⅱ. 論文

### ②症例報告

- 1 根岸 弘、渡辺 充、四條克倫、太田 隆、小林一太、須磨 健、大島秀規、吉野篤緒：  
再発を繰り返す慢性硬膜下血腫の 1 例, Jpn J Neurosurg, 25:356-360, 2016

### Ⅲ.著書

- 1 根岸 弘、平山晃康、吉野篤緒：難治性、多房性慢性硬膜下血腫における神経内視鏡下手術, 脳神経外科速報, 26:1097-1099, 2016