

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10971

研究課題名(和文) 頭部外傷に対するミノサイクリンの脳への直接投与の有効性についての検討

研究課題名(英文) Direct injection of minocycline in the brain after traumatic brain injury

研究代表者

恵川 淳二 (Egawa, Junji)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：00453168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：頭部外傷を与えたマウスに対し、脳の損傷部位にミノサイクリンを直接投与することで、マウスの機能的予後が改善するかについての検討を行なった。ミノサイクリンを投与した群は、コントロール(生理食塩水)を投与したマウスに比べて、やや運動機能の低下が少ない傾向があるが有意な結果ではなかった。損傷体積は、ミノサイクリン投与群とコントロール群で有意な差を認めなかった。免疫染色を行なったが、Iba-1およびGFAP共に、ミノサイクリン群およびコントロール群で差がなかった。GFAPで標識を行いウェスタンブロットも施行したが、両群で差はなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭部外傷の治療方法をマウスの頭部外傷モデルを使って検討した。炎症を抑えることを目的に、ミノサイクリンという抗生物質を脳に直接投与した。ミノサイクリンを投与したマウスでは、やや運動機能が保持されている傾向にあったが、統計学的には有意なものではなかった。組織や生化学検査も行ったが、大きな差はなかった。今後さらなる投与方法や薬物の研究が必要である。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether the direct injection of minocycline in the brain can improve the functional outcome after traumatic brain injury (TBI). We used the C57BL/6 mice for our experiment. Mice were subjected to TBI using a stereotaxic impactor. Immediately after TBI, minocycline or saline (control) was directly injected into the lesion area. The mice injected minocycline tend to maintain the better motor function compared to the saline injected mice (control group), but it is not statistically significant. There is no significant difference in the lesion volume between minocycline group and control group. We did not find any difference in immunohistochemistry images labeling with GFAP (glial fibrillary acidic protein) and Iba1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1) between minocycline group and control group. We also did not find the difference in western blot labeling with GFAP between the groups.

研究分野：集中治療

キーワード：頭部外傷 ミノサイクリン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

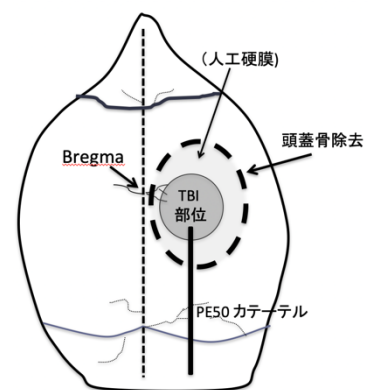
様々な手術や管理の質の進歩にも関わらず、頭部外傷(TBI: traumatic brain injury)の患者の転帰は依然不良で、運動および高次脳機能障害は受傷後より長期間持続することが知られている。予後を改善すべく様々な治療方法が試みられているが、薬物的治療についてはその効果は限定的である。TBI 暴露後より神経の再生が起り始めるが、この神経再生は炎症や阻害因子によって制限される。テトラサイクリン系の抗生物質であるミノサイクリンは抗炎症作用、抗アポトーシス効果、抗酸化作用などを有しており、脳虚血、パーキンソン病、ハンチントン舞踏病、アルツハイマー病、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化など様々な炎症性疾患に効果があるとされている。しかし、これらの動物研究の多くは腹腔内投与がなされており、臨床現場での使用とは乖離がある。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、テトラサイクリン系抗生物質であるミノサイクリンの脳への直接投与が頭部外傷モデルのマウスの機能的予後を改善するかを解明する事にある。本研究ではミノサイクリンの脳への直接投与が頭部外傷後の機能的予後を改善するかを調査する。本申請研究では、より臨床に即した実験を行う事により、ミノサイクリンを手術室や救命治療室の現場へ展開していく足がかりとなることを目的としている。

### 3. 研究の方法

実験には8~12週齢の C57BL/6 雄性マウスを使用した。TBIモデルの作成にあたっては過去の報告を修正して行った(Niesman et al. Journal of Neuroinflammation 2014, 11:39)。TBIの作成については、全身麻酔下にて、開頭手術を行い INP-150 pneumatic impactor を用いて大脳皮質部に外傷を与えた。ミノサイクリンまたは生理食塩水の投与は、PE50 カテーテルを損傷部位に留置し、頭蓋骨除去部に人工硬膜をカテーテルごと瞬間接着剤で貼り付け薬液が漏れないようにして、カテーテルから薬剤の投与を行なった。



- 1) 運動機能の評価として、Inverted Grid test を行なった。測定方法としては、マウスを金網に逆さ向きに捕まらせて、地面に落ちるまでの時間を計測し、時間と体重を掛け合わせる。ベースラインからの低下の程度をミノサイクリンとコントロール群で比較した。測定のタイムポイントとしては、術前、術後1週間から1ヶ月までとした。
- 2) 引き続いて、頭部外傷1ヶ月後の欠損部の体積を比較した。欠損部体積は、HE染色を行い100um 毎の欠損部の面積を計測し、それらに100um を乗じて計算を行なった。

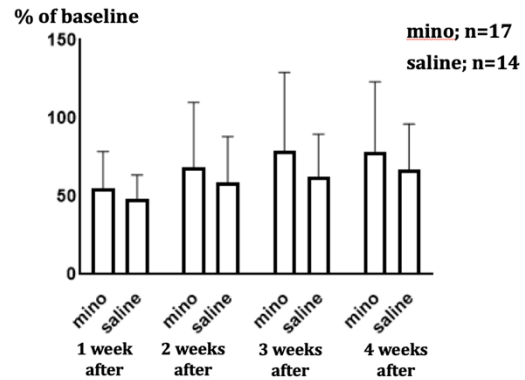
3) ミクログリアやアストロサイトの活性化に違いがあるかを観察するために、Iba-1 および GFAP で標識を行なって免疫組織学的検討を行なった。

4) また、定量的検討を行うために、GFAP で標識を行いウェスタンブロットを実施した。

#### 4. 研究成果

##### 1) Inverted Grid test

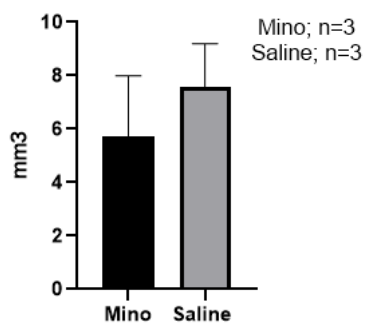
ミノサイクリン投与群はコントロール群に比べて、すべてのタイムポイントで機能低下の程度が少ないが、有意な差には至らなかった (mino; ミノサイクリン、saline; 生理食塩水)



##### 2) 欠損部体積の評価

欠損部隊席についても、ミノサイクリンと生理食塩水で有意な差は認めなかった。

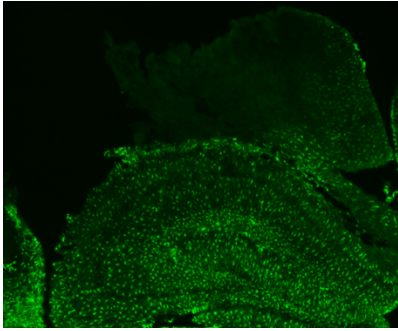
Mino  $5.7 \pm 2.3$ , Saline  $7.5 \pm 1.6$  (P=0.32)



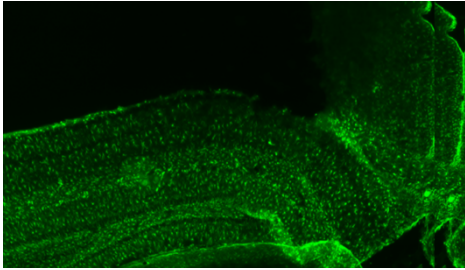
##### 3) 免疫組織染色

GFAP、Iba-1 共にミノサイクリンとコントロールで差が見られなかった。

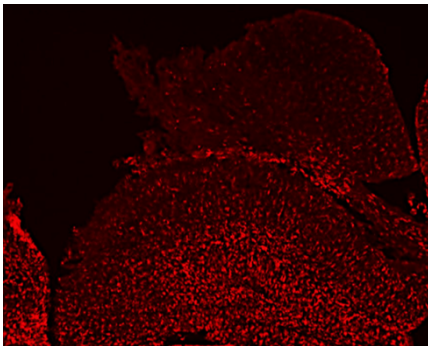
##### a) GFAP (ミノサイクリン)



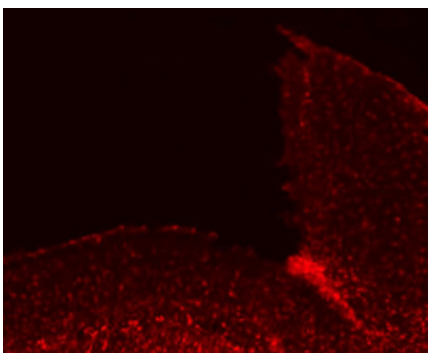
b) GFAP (生理食塩水)



c) Iba-1 (ミノサイクリン)



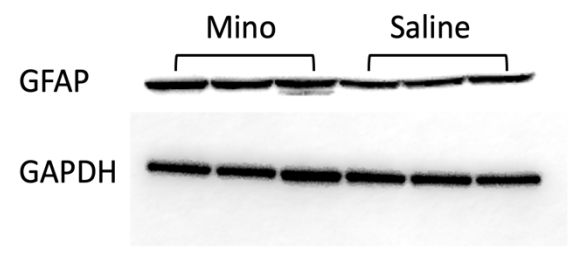
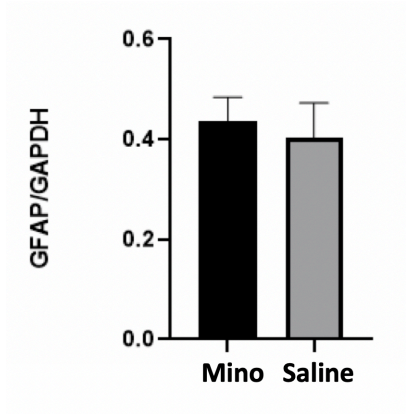
d) Iba-1 (生理食塩水)



#### 4) ウェスタンブロット

GFAP で標識を行なった。ミノサイクリンとコントロールで差が見られなかった。

Mino  $0.44 \pm 0.05$ , Saline  $0.44 \pm 0.07$  (P=0.7)



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〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	井上 聡己  (Inoue Satoki)  (50295789)	奈良県立医科大学・医学部・病院教授    (24601)	
研究分担者	川口 昌彦  (Kawaguchi Masahiko)  (60275328)	奈良県立医科大学・医学部・教授    (24601)	
研究分担者	瓦口 至孝  (Kawaraguchi Yositaka)  (90433333)	奈良県立医科大学・医学部・非常勤講師    (24601)	