

# Microglia と Spreading depression の神 経損傷への影響

－ 実験頭部外傷モデルを用いた  
免疫組織化学的・神経行動学的検討 －

研究課題番号 09470289

平成9年度～平成11年度科学研究費補助金（基盤研究（B）（2））研究成果報告書

平成12年3月

研究代表者 山 浦 晶

（千葉大学医学部教授）

## 研究組織

研究代表者：山浦 晶 (千葉大学医学部教授)  
研究分担者：山上岩男 (千葉大学医学部附属病院講師)  
研究分担者：岩立康男 (千葉大学医学部附属病院助手)  
研究分担者：平井伸治 (千葉大学医学部助手)  
研究分担者：村井尚之 (千葉大学医学部附属病院助手)

## 研究経費

平成9年度	7, 600千円
平成10年度	3, 400千円
平成11年度	2, 200千円

## 研究発表

### (1) 学会誌等

Higuchi Y. Murai H. Sato M. Yamaura A

Effects of FK506 on neuronal cell death after lateral fluid percussion brain injury in rats.

Proceedings of ICRAN 99

1999年11月

pp 163-167

### (2) 口頭発表

1. Higuchi Y. Murai H. Sato M. Yamaura A.

Effects of FK506 on neuronal cell death after lateral fluid percussion brain injury in rats. ICRAN 99 1999年11月20-23日

2. 佐藤幹、樋口佳則、村井尚之、山浦晶

実験的頭部外傷における免疫抑制剤 FK506 の神経細胞死に対する効果

第11回神経外傷の基礎シンポジウム 1999年12月11日

### (3) 出版物

なし

## 【研究の目的】

当教室では1984年以来、独自に開発したラット用 fluid-percussion injury 装置を用い、受傷後早期(2時間)に脳挫傷側大脳皮質で糖代謝が亢進することを見だし(中村ら 1986,1987: 文部省科学研究費 B-59480301)、この現象が脳波および DC ポテンシャルの解析結果から Spreading Depression (SD) に由来するものであることを明らかにした(角南ら 1990: 文部省科学研究費 B-59480301)。その後海外においても、ヒトの頭部外傷後急性期に脳糖代謝が亢進し(Becker 1994)、spreading depression も起こりうることが報告され(Mayeovsky 1994)、当教室の実験頭部外傷モデルがヒト頭部外傷の病態をよく反映していることが明らかとなった。

最近当教室では特に microglia の反応に着目して研究を進めているが、外傷後早期に海馬 CA1 領域と歯状回とに誘導される活性化 microglia は amoeboid morphology を示し、損傷した神経細胞を貪食している可能性が示唆され、また受傷側大脳皮質と海馬に広範に誘導される活性化 microglia (bushy type)はその分布がSDのパターンに類似していることから、SDがこの活性化 microglia の誘導に強く関連するものと予想される。また外傷後慢性期においても、MHC class I・II 抗原性を生じた microglia が外傷後2週と4週とで確認され、活性化 microglia が急性期とは異なる機序を介して遅発性に神経細胞損傷・神経細胞死あるいは逆に神経細胞修復に関与している可能性が強く示唆されている。

頭部外傷および頭部外傷後遺症について、microglia の反応を修飾してその効果を検討した報告は未だみられていない。Microglia は脳内での phagocytosis や炎症反応の中核をなすのみならず、近年頭部外傷がそのリスク因子の一つとして報告されている(Mortimer et al.,1991; Mayeux et al.,1995) アルツハイマー病の老人斑形成とも関連の深いことが判明しており、Microglia の反応を修飾することで頭部外傷後の神経細胞死、運動機能障害、学習・記名能力障害に対する保護効果がおおいに期待される。またSDについては近年脳虚血の耐性を増す(Kobayashi et al.,1995) という報告がある一方で、局所脳虚血においては脳梗塞体積とSD様電位変化の回数との間に相関が見られたとする報告(Mies et al., 1994) もあり、各病態におよぼす影響についてはいまだ一定の見解が得られていない。また、SDはヒトにおいては片頭痛の発生に関与しているとされているが、頭部外傷後でもSDの発生は報告されており(Mayeovsky 1994)、外傷後損傷脳に対するSDの影響を電気生理学・病理組織学・神経行動学的手法を用いて明らかにさせていくことは、臨床治療への応用といった見地からも極めて重要な課題である。

本研究では、具体的には次の項目を目的とした。

- 1) 頭部外傷後に誘導される活性化 microglia に対し、急性期では主に神経細胞損傷・神経細胞死との関連について、慢性期ではその免疫調節細胞・抗原呈示細胞としての性質を明らかにする。
- 2) 免疫抑制剤 FK506 を実験頭部外傷モデルに投与し、免疫組織化学手法を用いて外傷後の神経グリアの反応と神経細胞死におよぼす効果を観察する。また同時に FK506 の投与効果について神経行動学的にも評価する
- 3) SDの microglia の反応と頭部外傷後の神経細胞死におよぼす効果を明らかにする。

## 【研究の経過】

### 1. 千葉大式ラット用 fluid-percussion injury 作成装置の改修

本年度ははじめに 1984 年に当教室で開発し、以来使用してきたラット用 fluid-percussion injury 外傷作成装置の老朽化に伴い一部改良を加えるとともに、海外の fluid-percussion injury 外傷作成装置に比しおよそ 2 分の 1 の低い最大水圧で外傷ができる機序につき検討した。今まで当教室の装置では、①最大圧力までの立ち上がりが早い、②陽圧に引き続き陰圧がかかることで説明してきたが、③頭部に接続する管自体に振動があり頭蓋骨にたいし加速度を発生しており水圧の変化と相乗効果を有していることが判明した。

装置の改修により視床等の脳深部には安定した障害を作成できるようになった一方、大脳皮質の障害は軽くなる傾向になり、外傷後の spreading depression (SD) の発生頻度が減少し SD の研究には難渋する結果となった。

### 2. 頭部外傷後の学習・運動障害の定量的評価について

脳挫傷による肉眼的な脳組織の脱落がないか最小限であるが microglia の活性化が広範にみられる軽傷頭部外傷（受傷時無呼吸 4～30 秒、死亡率 0）において、頭部外傷後の記憶力傷害や運動障害がみられるかどうかについてまず検討を加えた。

#### 方法

雄性 Wistar ラットを脳損傷作成前に rotarod、beam walking、beam balance のトレーニングを行っておき、脳損傷は千葉大式 lateral fluid-percussion 装置を用い最大陽圧 1 気圧で左側頭部に作成した。外傷後 28 日目まで運動障害について観察した。Rotarod は Ham ら (1994 年) の方法に準じ、高さ 60cm の直径 90mm で表面に溝を切って凹凸を持たせた円筒を回転加速度は 3rpm/10sec、最大角速度 30rpm で回転させ、1 日 5 回（各試行の間の休憩は 10 分以上とし、1 回の最大時間は 120 秒とした。）のトレーニングを手術前の 2 日間に行い、2 日目の最良の値を外傷前値とした。外傷後のテストでは 2 回の試行を行い良い方の値を採用した。beam walking は幅 16mm、長さ 105cm の板の上を対側に置いた暗箱まで歩かせるもので、Clifton ら (1991 年) の方法に準じて Table 1 の如く 7 段階で評価した。訓練は手術前の 2 日間に 1 日 2 回行い、テストでは 1 回の試行のみを行った。beam balance は 40cm の高さに設置した幅 10mm の棒に動物をのせ、落下せぬにいられた潜時をはかるもので落下する場所には紙パッドをしいて衝撃を和らげた。訓練は手術前の 2 日間に 1 日 2 回で 1 回は最大で 120 秒とし、テストでは 1 回の試行のみを行った。

記憶力試験はモリスの水迷路を用い Smith らの方法 (年) に準じ受傷後 1 週に行った。

統計学的検討では beam walking とモリスの水迷路のスコアはノンパラメトリックであり Mann-Whitney の U-test を用い、rotarod と beam balance での潜時には one way ANOVA を用

いた。

Table 1. Beam walking scoring system

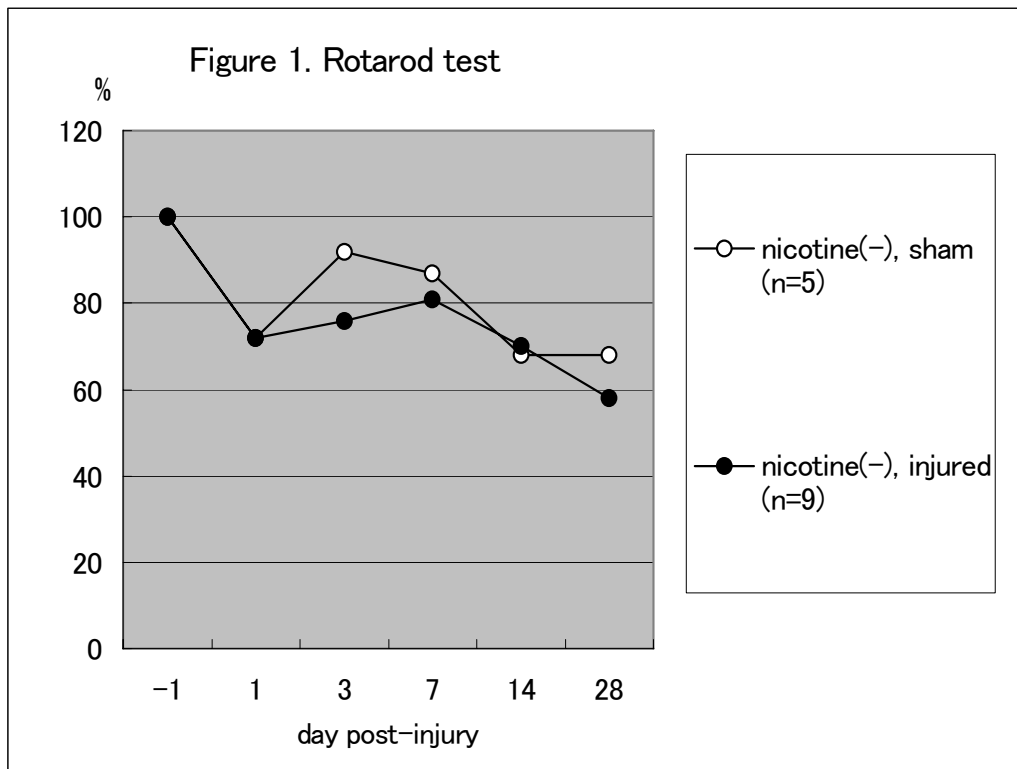
score	behavior
7	balances with steady posture; paws on the top of beam (2 minor foot slips* or less)
6	balances with steady posture; paws on the top of beam (more than 3 minor foot slips*)
5	grasps sides of beam and/or has shaky movement
4	one or more major foot slips# off beam
3	attempts to balance on the beam but falls off
2	drapes over beam and/or hangs on beam and falls off
1	falls off beam with no attempt to balance or hang on

\* minor foot slip: preserved body elevation and balance  
# major foot slip: nearly falls off beam

## 結果

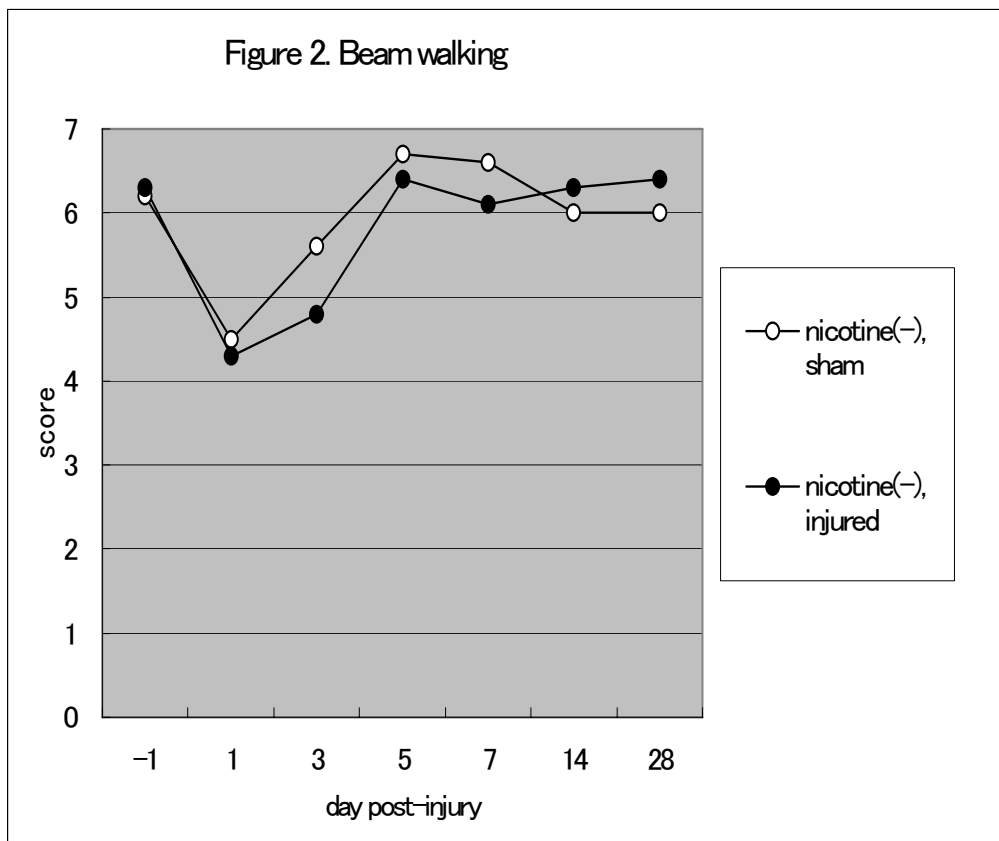
### Rotarod

2日間のトレーニングで到達した rotarod 上の潜時は  $86 \pm 20$  (平均  $\pm$  SD) 秒で、。各々の動物での外傷前値に対する外傷または sham 手術後 1・3・7・14・28 日目の潜時を前値に対する割合をとり各群の平均値をグラフ (Figure 1) にし比較検討した。今回の外傷レベルは比較的軽く外傷による運動障害は認められなかった。



### Beam walking

2日間のトレーニングで各動物は良好な成績（スコア5以上）に達した。前値および外傷または sham 手術後1・3・5・7・14・28日目のスコアをグラフ（Figure 2）にすると、すべての群で一日目に前値と比べ有意の低下が認められ、開頭手術操作または麻酔による影響と思われた。今回の外傷レベルは比較的軽く rotarod 同様に外傷による運動障害に有意の差は認められなかった。



### Beam balance

トレーニングにおいて平均潜時は 64 +/- 30 秒であった。受傷後 sham と外傷群とで潜時に開きが生まれたが7日目までは有意な差とならず、14日目で有意な差となった（Figure 3）。Sham 手術群に対する外傷群の潜時を割合で表すと Figure 4 となり、外傷後に値が低下し、28日後まで回復する傾向が認められなかった。

### 記銘力試験

外傷後1週での水迷路試験でのスコアは sham 群(n=5)が、それぞれ 83, 122, 125, 135, 176 (median: 125)であった。一方外傷群(n=9)は、3, 63, 65, 70, 71, 74, 85, 101, 141 (median: 71)で、2群間の u-test の結果は p=0.02 と有意であった。

Figure 3. Beam balance

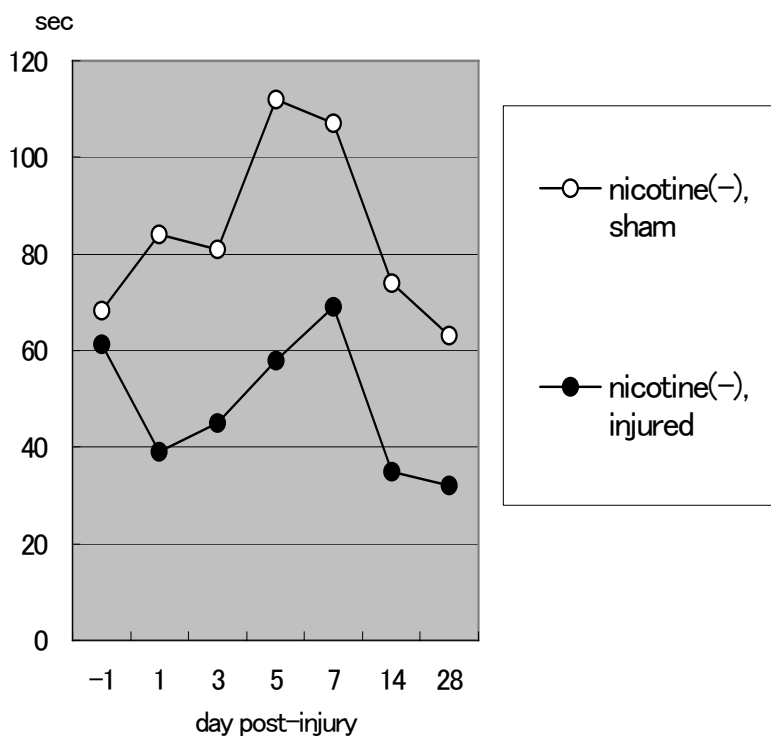
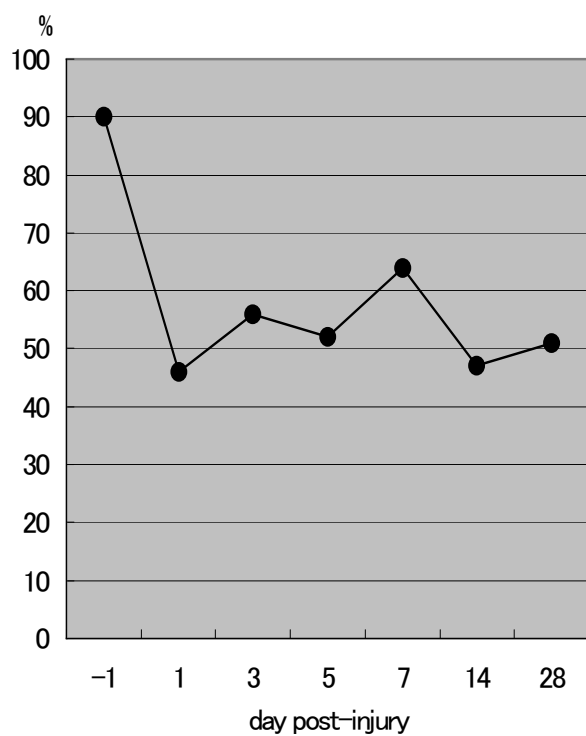


Figure 4. Beam balance latency ratio (injured/sham)



## まとめ

運動能力試験では、beam balance にのみに外傷による運動障害を認めるのみで極軽い障害と思われた。しかしながら、beam walking の運動障害も充分回復した受傷1週後で、モリスの水迷路を用いた記銘力試験では有意な ( $p=0.02$ ) 記銘力傷害が認められた。本実験のような軽度の外傷実験の結果から頭部外傷後の記銘力傷害には神経構造の脱落を伴わない分子生物学的機序があることが強く示唆された。

また、外傷後の運動障害とその治療法を考案する際には fluid-percussion injury の障害をより強くするか、致死率が低く大脳の局所障害の強い controlled impact injury モデルを用いるかなどの方法が必要であると思われた。



### 3. 頭部外傷後の microglia の活性化について

外傷後 24 時間以内の急性期における microglia の活性化を主に海馬にて検討したところ、外傷後 5 分では BBB の破壊を示す HRP 陽性 neuron がわずかに散見されたが OX42 陽性 microglia は認められなかった。1 時間後では HRP 陽性 neuron が同側の CA1、CA4 と両側の歯状回に認められた。Resting microglia は活性化されて、“bushy type”が両側の海馬に瀰漫性に認められ、“amoeboid type”が同側の CA1、CA4 と両側の歯状回に認められた。また、“rod type”が HRP 陽性 neuron に近接して認められた。6 時間では、HRP 陽性 neuron は認められなくなり両側海馬に瀰漫性に認められた“bushy type” microglia は resting type に戻っていたが、“amoeboid type” microglia はより著しく変形し活性化されているものと思われた。24 時間後では、HRP 陽性 neuron の認められた大脳皮質の範囲に hsp72 陽性 neuron が認められるようになり、同部位にストレスが強くかかっていたものと思われる。これら急性期反応の詳細については、添付の資料 1. 投稿中の論文 “Acute microglial activation and the neuronal response in the rat hippocampus after mild traumatic brain injury”に示す通りである。

外傷後 1 から 7 日目までの亜急性期 microglia の活性化等については、深麻酔下に 4%パラホルムアルデヒドを用い灌流固定し、microglia の反応を抗 OX42、アストロサイトの反応を抗 GFAP 抗体、また軸索損傷を抗アルツハイマー前駆蛋白(APP)抗体により、免疫組織化学的染色を行った。OX42 陽性の microglia は、外傷部位の皮質、外傷側の海馬 CA1 内側、CA3、歯状回、視床に認められた。視床は、他部位に比較し、OX42 陽性 microglia の発現のピークが遅延しており、7 日目で最も多くの陽性細胞が認められた。GFAP 陽性の反応性アストロサイトは、3 日目をピークに、外傷側半球を中心に認められた。軸索損傷の視標である顆粒状の APP の蓄積は、7 日目の観察で外傷側脳梁、外包、帯状回背側部、視床にかけて認められた。以上の結果より、外傷による損傷脳、特に視床における軸索損傷には、microglia の活性化が影響を与えている可能性が示唆され、次項の免疫抑制剤 FK506 の損傷脳に対する保護効果についての研究も特に視床に注目しながら行った。

## 4. 免疫抑制剤 FK506 投与の効果について

### **Summary**

In this study, we have examined the effects of FK506 on delayed neuronal cell death in the thalamus after experimental traumatic brain injury. Rats received an intravenous injection of 1.0 mg/kg of FK506 or vehicle or daily intraperitoneal injections for 7 days after injury. Neuronal cell loss and enhanced immunoreactivity of OX42 were evaluated in the laterodorsal (LD) nucleus of the thalamus. The number of survived neuronal cells in single treated rats was significantly larger than vehicle treated rats 7 and 14 days postinjury. In contrast, the number of survived neuronal cells in daily treated rats did not differ from that in vehicle treated rats. The number of OX42 positive microglia in daily FK506 treated rats was significantly fewer than that in vehicle treated rats, but that was similar between vehicle and single treated rats. These findings indicated that FK506, when administered immediately after the injury, limited neuronal cell death in LD nucleus in traumatic brain injury in rats. They also suggested that microglial activation might play an important role on neuronal survival after brain injury.

### **Introduction**

FK506 is an immunosuppressant and is used clinically in organ transplantation [1]. FK506 binds FK506-binding protein (FKBP12) and the complex acts to selectively inhibit calcineurin, the calcium-calmodulin activated protein phosphatase [2]. Recently, attention has been called to the neuroprotective effect of immunosuppressants in the various brain injuries, especially cerebral ischemia. Cyclosporin A, which is also an immunosuppressant and a potent inhibitor of Ca<sup>2+</sup>-induced mitochondrial damage, brought the protective effect to the axonal damage in traumatic brain injury[3-5]. Although the search for neuroprotective effects of FK506 on the cerebral ischemia has been extensively attempted [6-11], the effects of FK506 on the traumatic brain injury has been rarely reported. We have developed a lateral fluid percussion brain injury in the rat in which hemorrhage is minimal and typically restricted to the external capsule. A similar injury has been reported by Sato et al [12]. These investigators reported delayed neuronal cell death in the thalamus, which is remote from the impact site. In this study, we have evaluated the effects of FK506 to the neuronal damage in the thalamus after the lateral fluid percussion brain injury in rats.

## Materials and Methods

### Surgical Preparation

Adult male Sprague-Dawley rats ( $n = 50$ ), weighing 350 - 450 g, were anesthetized with 4 % chloral hydrate (9 ml/kg, intraperitoneally) and prepared for lateral fluid percussive brain injury (1.5 atm). In each animal, a catheter was inserted into the left femoral artery to monitor blood pressure and analyze blood gases. After incision of the temporal muscle, a circular craniectomy, 4 mm in diameter, was made with a dental drill just above the left zygoma. A polyethylene tube was placed against the intact dura, fixed securely to the skull with dental acrylic cement, filled with isotonic saline, and then connected to a fluid percussive device. Rats were divided into 2 groups according to the drug received. In single-treatment group, the rats received an intravenous injection of 1.0 mg/kg of FK506 [Fujisawa Pharmaceutical, Osaka, Japan] or vehicle once immediately after the injury. In daily-treatment group, the rats received an intraperitoneal injection of 1.0 mg/kg of FK506 or vehicle immediately after the injury and once a day for 6 days after the injury. Normal body temperature (36.5 - 37.5°C) was maintained with a heating pad at least 1 hr before and after the injury.

Animals were euthanized at 1 day (A:  $n = 10$ ), 3 days (A:  $n = 10$ ), 7 days (A:  $n = 10$ , B:  $n=10$ ) and 14 days (A:  $n=10$ ) after injury and perfused with 100 ml of heparinized saline and 400 ml of 4 % paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 (PB). Brains were removed and stored in the same fixative for 24 hr and in 30% sucrose solution in 0.1 M PB for 48 hr. Thereafter brains were rapidly frozen at - 30°C. Coronal sections, 10 mm in thickness, were cut using a cryotome and mounted on PLL-coated slides. Coronal sections were selected at 3 mm caudal to bregma.

### Immunolocalization of NeuN and OX42

After being rinsed in 0.05 M phosphate buffered saline, pH 7.4 (PBS), sections were incubated in 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> containing 0.01% NaN<sub>3</sub> for 10 minutes to quench any endogenous peroxidatic activity, then rinsed in PBS. Sections were incubated in each of the following solutions for the time indicated: 2% goat serum/0.2% Triton-X100/0.1% bovine serum albumin (GS/TX/BSA), 5 minutes; 10% goat serum/0.2% Triton-X100/0.1% bovine serum albumin, 30 minutes; mouse anti-NeuN monoclonal antibody (1:2000 in GS/TX/BSA; Chemicon International Inc., CA) or mouse anti-OX42 monoclonal antibody (1:1000 in GS/TX/BSA; Serotec Limited, Indianapolis, IN), 24 hr at 4°C; PBS, 3 x 5 min; horseradish peroxidase conjugate anti-mouse IgG (1:200 in GS/TX/BSA; MBL, Nagoya, Japan), 90 min; PBS, 3 x 5 min. The final reaction product was visualized using

0.05% 3,3-DAB as the chromogen in the presence of 0.02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The immunostained sections were then dehydrated in graded alcohols, cleared in xylene, coverslipped, and viewed with a light microscope.

#### Quantitative Assessment of NeuN and OX42

Quantitative analysis was performed on the immunohistochemical staining in the thalamus of injured sites. Three coronal sections at the level of cortical impact were examined in each animal. We counted NeuN positive nuclei with perikarya and processes in a rectangle, 0.5 mm X 0.5 mm, positioned on the laterodorsal (LD) thalamus nucleus region. We defined OX42 positive cells as the cell bodies that were greater than 10  $\mu$  m and quantified them within a rectangular area (0.5 mm X 0.5 mm).

#### Statistical Analyses

*Physiological Parameters:* The arterial blood pressure was measured over time in each group. Blood gases were measured before injury and in approximately 10-15 minutes post injury. Physiological values were compared between vehicle and drug-treated group using Student's t tests. Significance was defined as  $P < 0.05$ .

*Morphometry:* Vehicle and drug treated groups were compared at each time point using Mann-Whitney U test. Significance was defined as  $P < 0.05$ .

## Results

#### Physiological parameters

There were no significant differences in pH and PaO<sub>2</sub> preinjury as compared to postinjury values (Table 1). PaCO<sub>2</sub> significantly decreased postinjury in both vehicle and FK506 treated groups. However, there were no significant differences in PaCO<sub>2</sub> between vehicle and FK506-treated groups (Table 1). Mean arterial blood pressure (MABP) transiently increased immediately after injury in both vehicle and FK506 treated groups compared with preinjury values ( $P < 0.01$ ) (Fig. 1). This transient elevation of MABP was accompanied by apnea lasting approximately 20 sec in duration. MABP returned to preinjury levels by 5 min postinjury in both vehicle and FK506 treated groups (Fig. 1).

#### General Morphology

This injury typically resulted in widespread thin subarachnoid hemorrhage. Subarachnoid hemorrhage was noted not only adjacent to the site of impact, but also along the surface of cerebellum and brainstem. Intraparenchymal

hemorrhage was restricted in the external capsule, in the cingulum and the corpus callosum.

#### Number of neurons in LD nucleus (Fig. 2)

In vehicle treated group, the number of neuronal cells decreased maximally 7 days after injury. In single-treatment group, there was no significant difference between vehicle and FK506 treated rats at 1 or 3 days after injury. However, the number of survived neuronal cells in single-treatment rats was significantly larger than vehicle treated group at 7 and 14 days postinjury ( $P=0.021$  and  $P=0.045$ , respectively). In contrast, the number of survived neuronal cells in daily FK506 treated rats did not differ from that in vehicle treated rats.

#### Induction of OX42 in LD nucleus (Fig. 3 and 4)

In sham-operated animals, microglia typically exhibited a small cell body with ramified cell body. These cells were immunostained with OX42 throughout the brain. In the injured brain, some cells exhibited a more intensely immunostained large cell body and a more dense arborization of processes.

In single treatment group, the number of OX42 positive microglia in LD nucleus was similar at 7 days after injury between vehicle and FK506 treated rats. In daily treatment group, the number of OX42 positive was significantly less than that in vehicle treated rats ( $P=0.040$ ).

### **Discussion**

The lateral fluid percussion brain injury is reported to induced apoptosis[13] and neuronal cell loss in the thalamus [12]. Decreasing cell number and expressing of OX42 of microglia were maximal in LD nucleus 7 days after injury in this model. FK506 significantly increased the survival neurons 7 and 14 days after injury in the rats with single treatment of FK506 immediately after injury.

The neuroprotective effect is putatively mediated via the inhibition of calcineurin by a complex of FK506 and FKBP12 in animal models of focal cerebral ischemia[6]. The precise role of calcineurin in the pathophysiology in cerebral ischemia has remained unclear. Identifying the substrates for neuroprotective actions of FK506 has been progressing.

The functions of FK506 besides the immunosuppressive effect have been also investigated. FK506 inhibits nitric oxide (NO) production by preventing the dephosphorylation of nitric oxide synthase (NOS)[14]. This effect seems to be involved in the neuroprotective effect of FK506 in the model of focal cerebral ischemia [14, 6]. FK506 also decreased the delayed neuronal cell death in

forebrain ischemia on gerbils[8, 10] and is suggested to act as a neuroprotective agent via unknown pathways other than neuronal NOS inhibition[10].

Fluid percussion brain injury provided the reduction in the cerebral blood flow on injured hemisphere (CBF)[15-18]. Traumatic brain injury increased constitutive NOS activity 5 min after injury and inducible NOS activity 3 days after injury in the injured cortex[19, 20]. Furthermore the inhibitor of neuronal and inducible NOS reduced in the area of cortical contusion[19, 20]. These indicated that the posttraumatic cerebral ischemia and NO were involved in secondary brain damage of traumatic brain injury. FK506 can cross the blood-brain barrier and its content in brain tissue rises rapidly after intravenous administration. FK506 concentration in brain tissue is sustained at a neuroprotective level for 3 days[21]. Therefore, FK506 injected immediately after injury might affect the traumatic neuronal damage mediated the NOS inhibition at the early stage of brain damage in our model.

Meanwhile FK506 failed to prevent the neuronal cell loss in the rats received daily treatment after injury. Although daily administration of FK506 significantly inhibited microglial activation 7 days after injury, there was no significant difference in microglial activation between vehicle and single-treatment in this study. Our result suggested the interesting information about the function of microglial activation.

Microglia are ubiquitously distributed in the central nervous system and comprised up to 20% of the total glial cell population in the brain[22]. Microglia acts as scavengers removing tissue debris under conditions of cell death. Previous reports have demonstrated the close association between microglial activation and degeneration of neural pathways in the experimental axotomy model [23, 24]. OX42 positive microglia increased in the thalamus, which was remote from the impact site, after the fluid percussive injury and might also response injured axonal pathways[25]. While the functional significance of microglial activation remains unclear, microglia might exert both neurotoxic and neurotrophic effects. The factors released from microglia might play a neurotoxic role in the various brain injury; including superoxide[26], nitric oxide[27, 28], tumor necrosing factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )[29] and tissue plasminogen activator (tPA)[30, 31].

In contrast, microglia can secrete neurotrophic and growth factors under the various insults. Microglia secreted transforming growth factor-b (TGF-b)[32-34]. TGF-b suppressed glial scar formation and might support tissue repair in brain injury[35]. Microglia produced insulin-like growth factor (IGF-1) in rats with hypoxic-ischemic brain injury[36]. Microglia also released nerve growth factors (NGF)[37, 38], neurotrophin-3[39], basic fibroblast growth factor (bFGF)[40] and

brain-derived neurotrophic factor (BDNF)[41] with or without various stimulation in vitro. These studies collectively indicated that microglia might offer the neuroprotective effects on the injured brain.

In our study, daily injection of FK506 for 6-days period might suppress microglial reactivation and its neurotrophic effect after traumatic injury in this model.

## Reference

1. Starzl TE, Todo S, Fung J, Demetris AJ, Venkataramman R and Jain A, FK 506 for liver, kidney, and pancreas transplantation, *Lancet*,2, 1000-4, 1989
2. Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I and Schreiber SL, Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP- FK506 complexes, *Cell*,66, 807-15, 1991
3. Buki A, Okonkwo DO and Povlishock JT, Postinjury cyclosporin A administration limits axonal damage and disconnection in traumatic brain injury [In Process Citation], *J Neurotrauma*,16, 511-21, 1999
4. Okonkwo DO, Buki A, Siman R and Povlishock JT, Cyclosporin A limits calcium-induced axonal damage following traumatic brain injury, *Neuroreport*,10, 353-8, 1999
5. Okonkwo DO and Povlishock JT, An intrathecal bolus of cyclosporin A before injury preserves mitochondrial integrity and attenuates axonal disruption in traumatic brain injury, *J Cereb Blood Flow Metab*,19, 443-51, 1999
6. Sharkey J and Butcher SP, Immunophilins mediate the neuroprotective effects of FK506 in focal cerebral ischaemia, *Nature*,371, 336-9, 1994
7. Drake M, Friberg H, Boris-Moller F, Sakata K and Wieloch T, The immunosuppressant FK506 ameliorates ischaemic damage in the rat brain, *Acta Physiol Scand*,158, 155-9, 1996
8. Ide T, Morikawa E and Kirino T, An immunosuppressant, FK506, protects hippocampal neurons from forebrain ischemia in the mongolian gerbil, *Neurosci Lett*,204, 157-60, 1996
9. Sharkey J, Crawford JH, Butcher SP and Marston HM, Tacrolimus (FK506) ameliorates skilled motor deficits produced by middle cerebral artery occlusion in rats, *Stroke*,27, 2282-6, 1996

10. Tokime T, Nozaki K and Kikuchi H, Neuroprotective effect of FK506, an immunosuppressant, on transient global ischemia in gerbil, *Neurosci Lett*,206, 81-4, 1996
11. Yagita Y, Kitagawa K, Matsushita K, Taguchi A, Mabuchi T, Ohtsuki T, Yanagihara T and Matsumoto M, Effect of immunosuppressant FK506 on ischemia-induced degeneration of hippocampal neurons in gerbils, *Life Sci*,59, 1643-50, 1996
12. Sato M, Knight JR and Noble LJ, Neuronal death after traumatic brain injury: time course and regional variability, *J Neurotrauma*,15, 895, 1998
13. Conti AC, Raghupathi R, Trojanowski JQ and McIntosh TK, Experimental brain injury induces regionally distinct apoptosis during the acute and delayed post-traumatic period, *J Neurosci*,18, 5663-72, 1998
14. Dawson TM, Steiner JP, Dawson VL, Dinerman JL, Uhl GR and Snyder SH, Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity [see comments], *Proc Natl Acad Sci U S A*,90, 9808-12, 1993
15. Yamakami I and McIntosh TK, Effects of traumatic brain injury on regional cerebral blood flow in rats as measured with radiolabeled microspheres, *J Cereb Blood Flow Metab*,9, 117-24, 1989
16. Yamakami I and McIntosh TK, Alterations in regional cerebral blood flow following brain injury in the rat, *J Cereb Blood Flow Metab*,11, 655-60, 1991
17. Dietrich WD, Alonso O, Busto R, Prado R, Dewanjee S, Dewanjee MK and Ginsberg MD, Widespread hemodynamic depression and focal platelet accumulation after fluid percussion brain injury: a double-label autoradiographic study in rats, *J Cereb Blood Flow Metab*,16, 481-9, 1996
18. Dietrich WD, Alonso O, Busto R, Prado R, Zhao W, Dewanjee MK and Ginsberg MD, Posttraumatic cerebral ischemia after fluid percussion brain injury: an autoradiographic and histopathological study in rats, *Neurosurgery*,43, 585-93; discussion 593-4, 1998
  
19. Wada K, Chatzipanteli K, Busto R and Dietrich WD, Role of nitric oxide in traumatic brain injury in the rat, *J Neurosurg*,89, 807-18, 1998
20. Wada K, Chatzipanteli K, Kraydieh S, Busto R and Dietrich WD, Inducible nitric oxide synthase expression after traumatic brain injury and neuroprotection with aminoguanidine treatment in rats, *Neurosurgery*,43, 1427-36, 1998
21. Butcher SP, Henshall DC, Teramura Y, Iwasaki K and Sharkey J, Neuroprotective actions of FK506 in experimental stroke: in vivo evidence



- against an antiexcitotoxic mechanism, *J Neurosci*,17, 6939-46, 1997
22. Lawson LJ, Perry VH, Dri P and Gordon S, Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain, *Neuroscience*,39, 151-70, 1990
  23. Graeber MB, Streit WJ and Kreutzberg GW, Axotomy of the rat facial nerve leads to increased CR3 complement receptor expression by activated microglial cells, *J Neurosci Res*,21, 18-24, 1988
  24. Gehrman J, Schoen SW and Kreutzberg GW, Lesion of the rat entorhinal cortex leads to a rapid microglial reaction in the dentate gyrus. A light and electron microscopical study, *Acta Neuropathol*,82, 442-55, 1991
  25. Aihara N, Hall JJ, Pitts LH, Fukuda K and Noble LJ, Altered immunoexpression of microglia and macrophages after mild head injury, *J Neurotrauma*,12, 53-63, 1995
  26. Sankarapandi S, Zweier JL, Mukherjee G, Quinn MT and Huso DL, Measurement and characterization of superoxide generation in microglial cells: evidence for an NADPH oxidase-dependent pathway, *Arch Biochem Biophys*,353, 312-21, 1998
  27. Nakashima MN, Yamashita K, Kataoka Y, Yamashita YS and Niwa M, Time course of nitric oxide synthase activity in neuronal, glial, and endothelial cells of rat striatum following focal cerebral ischemia, *Cell Mol Neurobiol*,15, 341-9, 1995
  28. Takeuchi A, Isobe KI, Miyaishi O, Sawada M, Fan ZH, Nakashima I and Kiuchi K, Microglial NO induces delayed neuronal death following acute injury in the striatum, *Eur J Neurosci*,10, 1613-20, 1998
  29. Kita T, Liu L, Tanaka N and Kinoshita Y, The expression of tumor necrosis factor-alpha in the rat brain after fluid percussive injury, *Int J Legal Med*,110, 305-11, 1997
  30. Rogove AD and Tsirka SE, Neurotoxic responses by microglia elicited by excitotoxic injury in the mouse hippocampus, *Curr Biol*,8, 19-25, 1998
  31. Wang YF, Tsirka SE, Strickland S, Stieg PE, Soriano SG and Lipton SA, Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice [see comments], *Nat Med*,4, 228-31, 1998
  32. Kiefer R, Lindholm D and Kreutzberg GW, Interleukin-6 and transforming growth factor-beta 1 mRNAs are induced in rat facial nucleus following motoneuron axotomy, *Eur J Neurosci*,5, 775-81, 1993
  33. Colosetti P, Olsson T, Miyazono K and Funo K, Axotomy of rat facial nerve induces TGF-beta and latent TGF-beta binding protein, *Brain Res Bull*,37,

561-7, 1995

34. Kiefer R, Streit WJ, Toyka KV, Kreutzberg GW and Hartung HP, Transforming growth factor-beta 1: a lesion-associated cytokine of the nervous system, *Int J Dev Neurosci*,13, 331-9, 1995
35. Lindholm D, Castren E, Kiefer R, Zafra F and Thoenen H, Transforming growth factor-beta 1 in the rat brain: increase after injury and inhibition of astrocyte proliferation, *J Cell Biol*,117, 395-400, 1992
36. Beilharz EJ, Russo VC, Butler G, Baker NL, Connor B, Sirimanne ES, Dragunow M, Werther GA, Gluckman PD, Williams CE and Scheepens A, Co-ordinated and cellular specific induction of the components of the IGF/IGFBP axis in the rat brain following hypoxic-ischemic injury, *Brain Res Mol Brain Res*,59, 119-34, 1998
37. Mallat M, Houlgatte R, Brachet P and Prochiantz A, Lipopolysaccharide-stimulated rat brain macrophages release NGF in vitro, *Dev Biol*,133, 309-11, 1989
38. Heese K, Fiebich BL, Bauer J and Otten U, Nerve growth factor (NGF) expression in rat microglia is induced by adenosine A2a-receptors, *Neurosci Lett*,231, 83-6, 1997
39. Elkabes S, DiCicco-Bloom EM and Black IB, Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function, *J Neurosci*,16, 2508-21, 1996
40. Shimojo M, Nakajima K, Takei N, Hamanoue M and Kohsaka S, Production of basic fibroblast growth factor in cultured rat brain microglia, *Neurosci Lett*,123, 229-31, 1991
41. Miwa T, Furukawa S, Nakajima K, Furukawa Y and Kohsaka S, Lipopolysaccharide enhances synthesis of brain-derived neurotrophic factor in cultured rat microglia, *J Neurosci Res*,50, 1023-9, 1997

## Legends

### Table 1

Blood gas analyses before and after traumatic brain injury

### Fig. 1

Mean arterial blood pressure (MABP) in animals administered saline or FK506. Values are the mean  $\pm$  standard deviations.

### Fig. 2

The number of neurons in the laterodorsal nucleus of the thalamus. The number of NeuN labeled neurons in rats received single-treatment of FK506 is significantly larger than that in vehicle treated animals at 7 and 14 days postinjury. There is no significant difference in the number of neurons between rats received daily-treatment of FK506 and vehicle treated animals at 7 days postinjury. \*P<0.05. Values are the mean  $\pm$  standard deviations.

### Fig. 3

Enhanced expression of the CR3 receptor in the laterodorsal nucleus of the thalamus. There is no significant difference in OX42 positive microglia between rats received single-treatment of FK506 and vehicle treated rats at 7 and 14 days postinjury. The number of OX42 positive microglia significantly decreased in rats received daily-treatment of FK506 compared with vehicle treated rats at 7 days postinjury. \*P<0.05. Values are the mean  $\pm$  standard deviations.

### Fig.4

OX42 positive microglia in the laterodorsal nucleus of the thalamus at 7 days after injury in saline treated (A, C) and FK506 treated (B, D) rats. The single treatment (A, B) and the daily treatment (C, D). There is few difference in OX42 positive microglia between rats received single-treatment of FK506 and vehicle treated rats (A, B). The number of OX42 positive microglia in rats received daily-treatment of FK506 is fewer than that in vehicle treated rats (C,D). Scale bar = 100  $\mu$  m.

## 【今後の研究の展開】

実験当初に、1984年に当教室で開発し以来使用してきたラット用 fluid-percussion injury 外傷作成装置の老朽化に伴い改修を行ったところ、多大の時間を費やす結果となった。この改修で視床等の脳深部には安定した障害を作成できるようになった一方、大脳皮質の障害は軽くなる傾向になり、外傷後の spreading depression (SD) の発生頻度が減少しSDの研究には難渋するようになった。また、現在の装置では大脳皮質の障害を安定性・再現性を保ちながら強くしていくことは難しく、安定したモデルは軽傷に限られている。その運動障害は今回の結果からもわかるように軽く、頭部外傷後の運動障害とその治療法を考察していく上では今後問題があると思われる。従って、致死率が低く大脳の局所障害の強い controlled cortical impact injury モデルなどでの検討も必要であると思われた。

現在は、今回確認された FK506 の神経細胞死を抑制した神経保護効果については生理学的・神経行動学的な評価を行い、controlled cortical impact injury モデルを用いて SD 等の観察を開始したところである。

今回の FK506 の投与方法を変えた実験結果から、頭部外傷後に活性化または誘導される microglia はその時期により機能が異なっている可能性が示唆され、FK506 を亜急性期にのみ投与する regimen を加えより詳細に検討していくことが必要と思われた。今までのところ 24 時間以内の急性期は microglia の働きを抑え、その後の亜急性期である 1 週までの働きを高めることが有用であると思われる。今後は microglia の homing 機能を利用した効果的な神経保護因子の導入なども併せて検討していきたい。

## 【研究成果のまとめ】

- 1984年に当教室で開発し、以来使用してきたラット用 fluid-percussion injury 外傷作成装置の老朽化に伴い一部改良を加え、海外の fluid-percussion injury 外傷作成装置に比しおよそ2分の1の低い最大水圧で外傷ができる機序につき検討した。今まで当教室の装置では、①最大圧力までの立ち上がりが早い、②陽圧に引き続き陰圧がかかることで説明してきたが、③頭部に接続する管自体に振動があり頭蓋骨にたいし加速度を発生しており水圧の変化と相乗効果を有していることが判明した。
- 脳挫傷による肉眼的な脳組織の脱落がないか最小限であるが microglia の活性化が広範にみられる軽傷頭部外傷において、頭部外傷後の記銘力傷害や運動障害がみられるかどうかについて検討した。運動能力試験では、beam balance において障害を認めたが、軽度であった。運動障害よりほぼ回復した受傷1週後でのモリスの水迷路を用いた記銘力試験では有意な ( $p=0.02$ ) 記銘力傷害が認められ、本実験の外傷のレベルから頭部外傷後の記銘力傷害には神経構造の脱落を伴わない分子生物学的機序があることが強く示唆された。
- 外傷後24時間以内の急性期における microglia の活性化を主に海馬にて検討した。1時間後では HRP 陽性 neuron が同側の CA1、CA4 と両側の歯状回に認められた。Resting microglia は活性化されて、“bushy type”が両側の海馬に瀰漫性に認められ、“amoeboid type”が同側の CA1、CA4 と両側の歯状回に認められた。また、“rod type”が HRP 陽性 neuron に近接して認められた。6時間後では、HRP 陽性 neuron は認められなくなり両側海馬に瀰漫性に認められた“bushy type” microglia は resting type に戻っていたが、“amoeboid type” microglia はより著しく変形し活性化されているものと思われる。24時間後では、HRP 陽性 neuron の認められた大脳皮質の範囲に hsp72 陽性 neuron が認められるようになり、同部位にストレスが強くかかっていたものと思われる。
- 外傷後1、3、7日後の亜急性期に、microglia の反応を抗 OX42、アストロサイトの反応を抗 GFAP 抗体、また軸索損傷を抗アルツハイマー前駆蛋白(APP)抗体により、検討した結果、外傷による損傷脳、特に視床における軸索損傷には、ミクログリアの活性化が影響を与えている可能性が示唆された。
- 免疫抑制剤 FK506 の損傷脳に対する保護効果について、脳の免疫担当細胞である microglia の受傷後の反応および神経細胞死とを、視床の laterodorsal (LD) nucleus を中心に観察を行った。FK506 を外傷直後に一回投与を行った場合は頭部外傷後の神経細胞死を部分的に抑制し神経保護効果を認めるが、連続して投与することにより microglia の活性化を抑えるとともに一回投与で認められた神経保護効果を相殺する効果があったと思われる。このことから microglia の活性化が頭部外傷後の神経細胞の生存に重要な働きをしている可能性が示唆された。
- Spreading depression の影響に関しては、改良された外傷作成装置では大脳皮質の障害が以前に比し軽く、受傷後に spreading depression を起こす頻度が少なくなり研究の効率に支障を生じるようになったため、大脳皮質により障害の強い controlled cortical impact injury モデルを用いて検討を開始した。