

筑波大学

博士（医学）学位論文

Novel neuroprotection
using anti-oxidant nanomedicine
for head trauma in mice

(マウス頭部外傷モデルにおける
新規の抗酸化ナノメディシンを用いた脳保護効果)

2020

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

高橋 利英

目次

第1章 序論.....4

1-1 頭部外傷とそのメカニズム

1-2 頭部外傷後の活性酸素の発生と活性酸素消去剤について

1-3 RNP; Redox-active nitroxide radical-containing nanoparticles

1-4 RNP を用いた先行研究

第2章 研究の目的.....10

第3章 実験方法.....11

3-1 マウス頭部外傷モデルの作製

3-2 RNP の作製と尾静脈・腹腔内投与

3-3 Neurological severity score (NSS) による認知行動評価

3-4 Rotarod test による認知行動評価

3-5 脳挫傷体積の評価

3-6 蛍光免疫染色による Rh 添加 RNP(Rh-RNP)の脳挫傷周囲への分布の

検討

3-7 蛍光免疫染色によるアストロサイト・神経細胞・ミクログリアの動態
の検討

3-8 電子スピン共鳴法 (EPR; Electron paramagnetic resonance)
を用いた挫傷脳活性酸素種消去活性の測定

3-9 統計学的手法

第4章 結果……………24

4-1 RNP は認知行動評価を良好にした

4-2 RNP は脳挫傷体積を縮小させた

4-3 脳挫傷周囲における Rh-RNP は微小血管内で多く検出された

4-4 RNP は astrocyte の集簇を促し神経細胞脱落を抑制させた

4-5 RNP は神経破壊型ミクログリアの発生を抑制し
神経保護型ミクログリアの発生を促した

4-6 RNP はスーパーオキシドアニオン消去活性を上昇させた

第5章 考察……………39

5-1 RNP のフリーラジカル消去能

5-2 RNP 投与によるミクログリア双極性の変動

5-3 RNP 投与によるその他の効果

5-4 RNP の特性

5-5 RNP の分布

5-6 本研究の limitation と今後の課題

5-7 Future direction

第 6 章 結論.....47

謝辞.....48

参考文献.....49

第1章 序論

1-1 頭部外傷とそのメカニズム

頭部外傷は死亡および身体的・精神的後遺症が残存する確率が高く、社会に及ぼす損失が大きい。しかし、頭部外傷の病態メカニズムには解明できていない点も多く、確立された治療法も少ない。脳損傷悪化のメカニズムとしては、衝撃の瞬間による一次損傷と、生体反応反応によって進展する二次損傷に分けられる。一次損傷は挫傷や骨折といった脳実質・脳神経・脳血管等の機械的破壊であるのに対して、二次損傷は脳浮腫・出血・虚血の進展等が挙げられる。臨床的にも、受傷直後の頭部 computed tomography (CT) では軽症な一次損傷しか描出されなかった症例の多くで、二次損傷が加わることによる重症化を見逃さないための頭部 CT follow が数時間後に撮影されている (図1)。二次損傷の悪化因子として (二次) 軸索損傷、アセチルコリン、サイトカイン、マグネシウムイオン、遺伝子発現 (*c-fos*, *c-jun*, *junB*)、血小板活性化因子、カルシウムイオン、興奮性アミノ酸、内因性オピオイド等が考えられている¹⁻⁹。さらにフリーラジカル・活性酸素も悪化因子として考えられているが、解明されていない点も多い¹⁰。

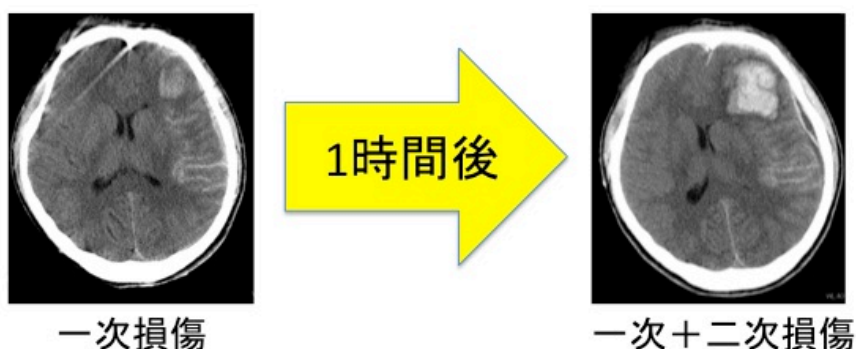


図1：初回の頭部 computed tomography (CT) より1時間後の頭部 CT follow up における、二次損傷による重症化。

1-2 頭部外傷後の活性酸素の発生と活性酸素消去剤について

フリーラジカルとは不対電子を持つ化学種の総称であり、活性酸素とは酸素分子がより反応性の高い化合物に変化したものの総称である。いずれも生体内に存在するが、superoxide dismutase (SOD) 等の活性酸素消去効果作用を有する物質により制御されている¹¹。脳損傷が起こることでミトコンドリア・血液脳関門・細胞膜が傷害されるが、それとは別にフリーラジカル・活性酸素が産生される。フリーラジカル・活性酸素が産生されると脂質過酸化反応が生じ、それもミトコンドリア・血液脳関門・細胞膜を傷害することになる。それらの傷害によりさらにフリーラジカル・活性酸素が発生することになる¹²。つまり、脳損傷が起こると体内の SOD では制御できないほどのフリーラジカル・活性酸素が産生され、それが脂質過酸化反応を引き起こしてさらなる脳損傷を引き起

こされる負のスパイラルが存在している (図 2)。Petty ら、Itoh ら、Wang らは頭部外傷モデルラットにフリーラジカルスカベンジャーを投与し、良好な転帰を得たと報告している¹³⁻¹⁵。しかし、低分子のフリーラジカルスカベンジャーの多くは正常細胞内の活性酸素を強く抑制することにより、神経保護効果と同時に神経毒性効果も呈する。そのためフリーラジカルスカベンジャーは頭部外傷において現時点では臨床で用いられていない^{15,16}。

脳保護効果がより期待されるフリーラジカルスカベンジャーとして 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO) という物質が挙げられる。これは SOD と似た作用および脂質過酸化の阻害によって活性酸素を抑制することができる安定したニトロキシラジカル化合物である¹⁷。しかし、正常組織を通過する際の非特異的分散、優位な腎クリアランス、そして生体内での抗酸化系システムによる減少によって半減期が 15 秒程度と短い。また、内皮細胞の一酸化窒素を増加させることにより低血圧をきたしうる¹⁸。低分子量抗酸化剤は正常なミトコンドリアへの内在化の後に生体内で正常な酸化還元反応を阻害する可能性もある¹⁹。

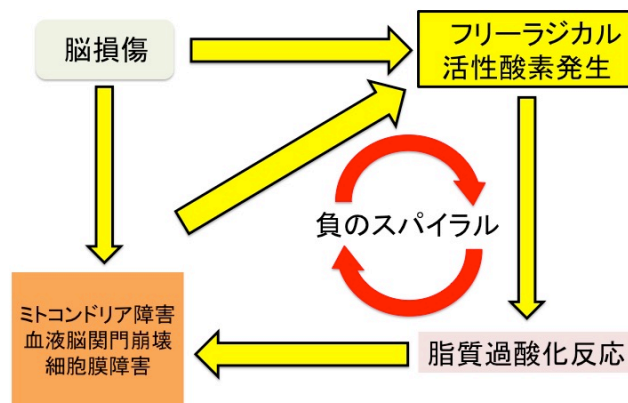


図 2 : 脳損傷における、フリーラジカル・活性酸素発生とミトコンドリア障害・血液脳関門崩壊・細胞膜障害のスパイラル関係

1-3 RNP; Redox-active nitroxide radical-containing nanoparticles

そこで長崎らは、ニトロキシラジカル(4-アミノ-TEMPO)含有ポリマー (ポリエチレングルコール[PEG]-b-ポリ[4-(2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-オキシル)アミノメチルスチレン])を設計し、Redox-active nitroxide radical-containing nanoparticles (RNP) という新規の抗酸化ナノメディシンを開発した^{20,21}。自己組織化してナノ粒子 (ニトロキシラジカル含有ナノ粒子) を形成する傾向があり、細網内皮系による食作用はその自己組織化コア-シェル構造によって抑制される (図 3)。RNP の特徴として、半減期が 15 分程度と長く (TEMPO の半減期の 60 倍)、外層が RNP コアの TEMPO 部分の周囲のステルスシールドを構成するため、TEMPO と比べて毒性ははるかに低い (図 4)。

さらに RNP コア中のアミノ基のプロトン化のために低 pH 環境でミセルが崩壊する (図 5)。つまり、脳挫傷や脳梗塞等の低 pH 環境となった脳損傷部での選択的な TEMPO の作用が期待される。

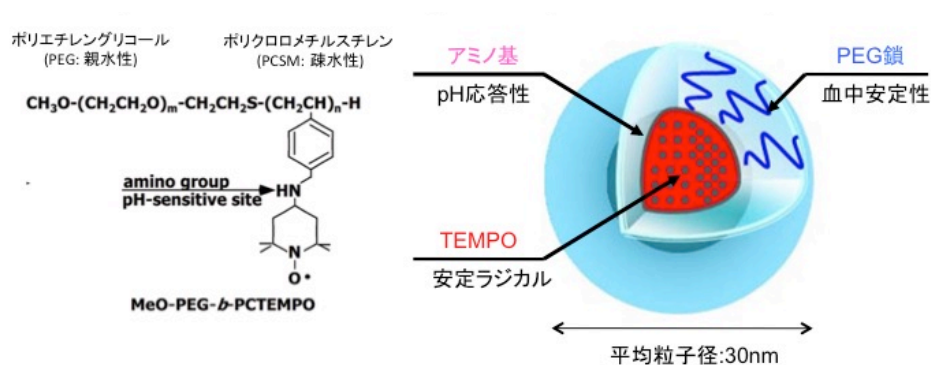


図 3 : Redox-active nitroxide radical-containing nanoparticles (RNP) の模式図

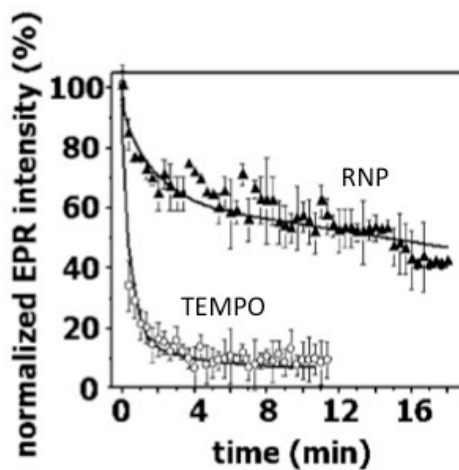


図 4 : Redox-active nitroxide radical-containing nanoparticles (RNP) と 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO) の半減期
 EPR: Electron paramagnetic resonance

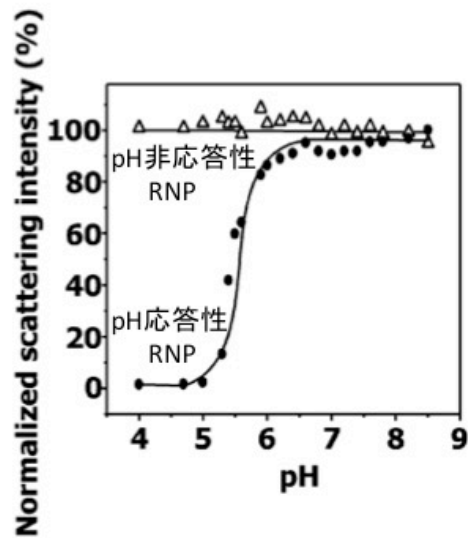


図 5 : Redox-active nitroxide radical-containing nanoparticles (RNP) の pH 応答性

1-4 RNP を用いた先行研究

丸島らはこれまでに RNP が副作用の少ない高性能酸化防止剤として効果的に作用することを確認し、RNP を用いて腎虚血再灌流障害モデルマウスに対する腎保護効果、一過性脳虚血モデルラットならびにマウスに対する脳保護効果、脳出血モデルラットに対する脳保護効果、一過性脳虚血モデルマウスに対する脳保護効果等を報告した^{19,22,23}。しかし、頭部外傷モデルに対して RNP を投与した研究は行われていなかった。

第2章 研究の目的

頭部外傷においてフリーラジカル・活性酸素が発生するため、フリーラジカ
ルスカベンジャーであるエダラボンを投与することでモデルラットの脂質過酸
化反応やアポトーシスが抑制された先行研究が報告されている¹³⁻¹⁵。しかし、
従来のフリーラジカルスカベンジャーの多くは低分子量であり、正常細胞内の
活性酸素を強く抑制することで神経保護効果と同時に神経毒性効果も呈する
^{15,16}。そのため頭部外傷におけるフリーラジカルスカベンジャーは臨床適応には
至っていない。

それに対し RNP は毒性が弱く、さらに酸性化された脳損傷部に選択的に作用
するため、従来のフリーラジカルスカベンジャーよりも良好な神経保護効果を
得られる可能性がある。

本研究の目的は頭部外傷モデルマウスに RNP を投与し、神経学的行動および
脳挫傷組織像の評価を行うことで同物質の神経保護効果を検証することである。
頭部外傷モデルマウスにおける認知行動評価や脳挫傷体積の測定、脳挫傷周囲
のアストロサイト・神経細胞・ミクログリアの動態、活性酸素消去能の測定に
より神経保護効果を分析するとともに、RNP の分布も評価する。

第3章 実験方法

3-1 マウス頭部外傷モデルの作製

動物実験は筑波大学動物実験委員会により承認された（承認番号 18-053）。

全ての実験は「実験動物の管理と使用のための指針」に従って行われた。

オスの ICR マウス（体重 28-32 g；概ね 8 週齢）を使用した（Charles River, Japan より購入）。マウスは 12/12 時間の明/暗サイクルの環境に収容し、実験前に少なくとも 3 日間順応させた。食物および水は自由に与えた。

本研究で使用された頭部外傷モデルマウスは、以前に Flierl らによって報告された Marmarou の weight-drop モデルを改良した方法により作成した²⁴⁻²⁶。ketamine(70 mg/kg)+xylazine(16 mg/kg)を腹腔内投与した麻酔後のマウスを頭部固定器で固定し、頭部正中の皮膚を切開して sagittal suture より 2 mm 左側、coronal suture より前方の左前頭骨を受傷部位と設定した。受傷部位に 200 g の重りを 2.5 cm の高さから自由落下させて受傷させ、3-0 Vicryl 縫合糸で頭皮を縫合した（図 6）。麻酔から覚醒後、マウスはケージに戻して食物と水を自由に与えた。このようにして作成された頭部外傷モデルマウスの脳挫傷を図 7 に示すが、受傷 3 日後が 1 日後および 7 日後に比べて脳挫傷が重度となる傾向

がみられた。認知行動を Neurological severity score と rotarod test にて評価したが、受傷 1 日後から 7 日後まで一貫して sham よりも評価が悪かった。両試験とも sham 群 (n=7) と外傷群 (n=7) の結果を Mann-Whitney の U 検定にて有意差を求めたが (SPSS 25.0 version (IBM, Japan) を使用)、Neurological severity score では受傷 1、3、7 日後ともに外傷群は sham 群よりも有意に認知行動評価が悪かった (図 8)。また、rotarod test では受傷 1 日後でのみ外傷群は sham 群よりも有意に落下までの時間が短かった。受傷 3、7 日後は有意差を得られなかったものの、外傷群は sham 群よりも落下までの時間が短い傾向がみられた (図 9)。

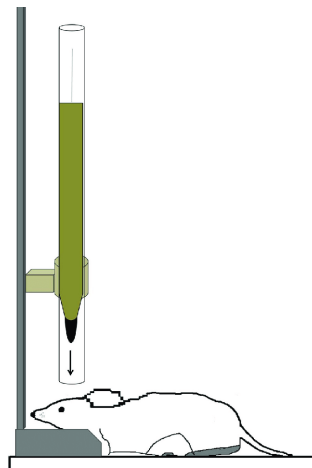


図 6 : 頭部外傷モデルマウス作成の模式図 (参考文献 26 より抜粋)。

図 7 A



受傷3日後

図 7 B

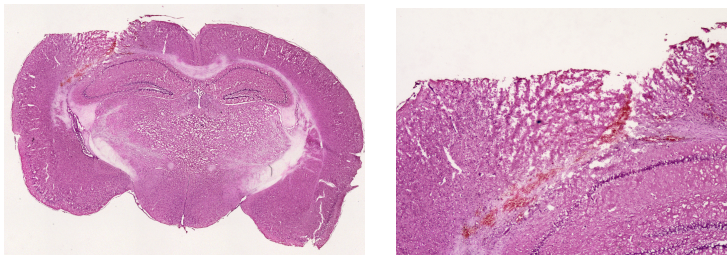


図 7 C

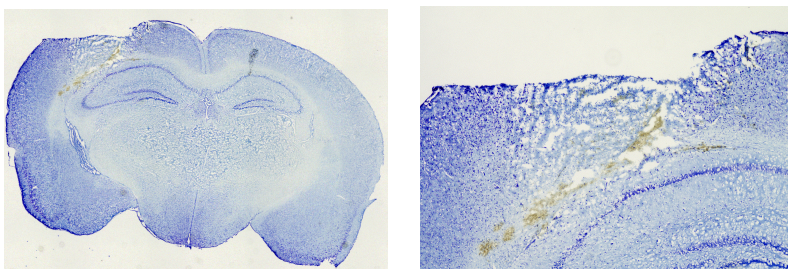


図 7 頭部外傷モデルマウスの脳挫傷（受傷 3 日後）

A : マクロ像。左脳（写真の左側）に脳挫傷あり。

B : Hematoxyli Eosin 染色。左が全体像、右が×4。挫傷部に赤血球を認める。

C : Cresyl Violet 染色。左が全体像、右が×4。挫傷部の損傷した細胞が shrink している。

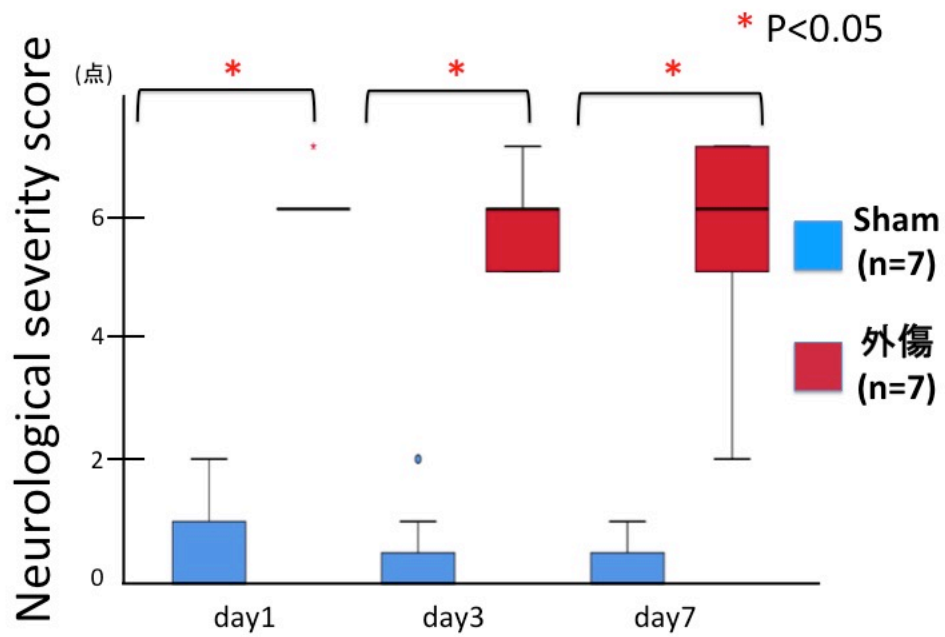


図 8 : sham 群、外傷群の day1、3、7 における Neurological severity score。各群 ; n=7。* p<0.05。

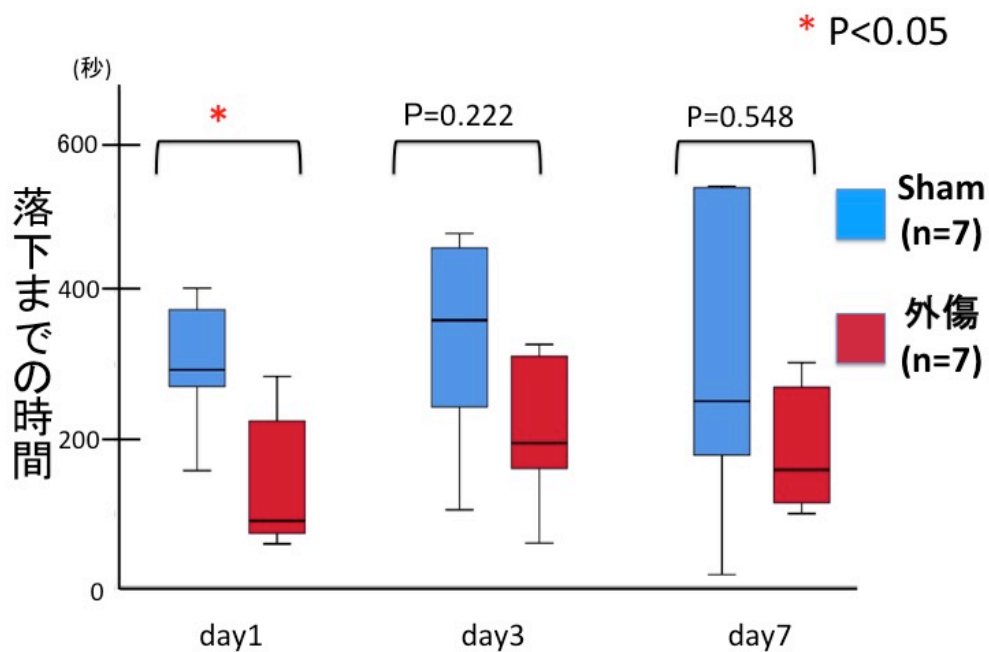


図 9 : sham 群、外傷群の day1、3、7 における Rotarod test の持続走行時間。各群 ; n=7。* p<0.05。

3-2 RNP の作製と尾静脈・腹腔内投与

pH 応答性 RNP は 4-アミノ-2, 2, 6, 6-テトラ-メチルピペリジン-N-1-オキシド (アミノ-TEMPO ; PEG-b-ポリ 4 (2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-オキシド)) に共有結合した PEG-b-ポリ (メチルスチレン) ブロックコポリマーから調製した。PEG-b-ポリ 4- (2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-オキシド) アミノメチルスチレンは透析による水性媒体中でコア-シェル自己組織化ポリマーミセルを形成した^{20,21}。平均 RNP 直径およびゼータ電位は光散乱分光計 (Zetasizer Nano; Malvern Instruments) を用いて測定したところ、それぞれ 20 nm および 5 mV であり、ポリ[4- (2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-オキシド) アミノメチルスチレン] セグメント中のアミノ基の PEG シェル層による完全な遮蔽を確認した。

頭部外傷直後に RNP (3 mg/kg, 1 mg/mL solution) を尾静脈に注射した。その後、受傷 1、3、5 日後に同量を腹腔内注射した。RNP、TEMPO、Micelle、あるいは、phosphate buffered saline (PBS) のいずれかを注射するよう全てのマウスを無作為化した。

予備研究において、0 mg/kg (PBS)、0.03 mg/kg、0.3 mg/kg、3 mg/kg、30

mg/kg の濃度の RNP を頭部外傷受傷直後のモデルマウスに尾静脈注射した。

Neurological severity score にて認知行動を評価すると 3 mg/kg の RNP を投与

した群が最も良好であったため、本研究では 3 mg/kg の濃度を採用した(図 9)。

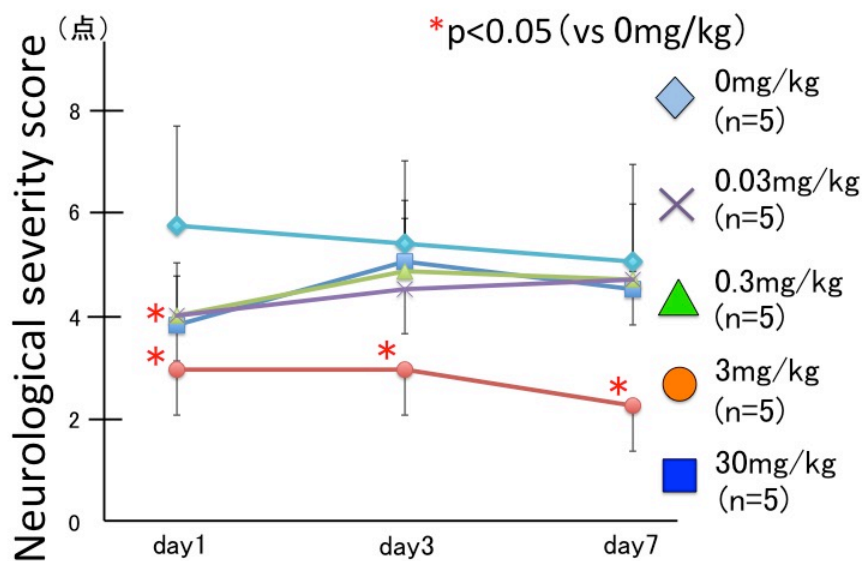


図 9 : 予備研究における Redox-active nitroxide radical-containing nanoparticles (RNP) 濃度別の Neurological severity score

3-3 Neurological severity score (NSS) による認知行動評価

Flierlらの報告を参考にしたNSSを用いて、マウスの認知行動を頭部外傷受傷の1、3、7日後に評価した(RNP, n=9; TEMPO, n=9; Micelle, n=9; PBS, n=9)²⁴。全てのマウスは運動機能、バランス等の10個のタスクを実行し、タスクが実行できなければ1点加算する(全て成功したら0点となる)。スコアは0から最大10までであり、

脳損傷後の認知行動機能の重症度を反映する。

このスコアリングシステムはマウスの外傷後機能障害を評価するために開発されたものであり、頭部外傷後の認知行動評価の推移を観察するのに適している²⁷。NSS 評価方法を表 1 に示す。

表 1 Neurological severity score の得点表（最低 0 点、最高 10 点）

課題	説明	点数	
		成功	失敗
円柱脱出	直径 30cm の円柱からの脱出(制限時間 3 分)	0	1
片麻痺	受傷脳の対側の上下肢麻痺の否定	0	1
直進歩行	床に置かれたマウスの直進歩行	0	1
聴覚反射	大きな手拍子への反応	0	1
探索行為	おかれた環境に対する探索行為	0	1
梁上平衡	幅 7mm の梁上での 10 秒以上のバランス継続	0	1
円柱上平衡	直径 5mm 幅の円柱上での 10 秒以上のバランス継続	0	1
梁上歩行:3cm	幅 3cm の梁を 30cm 歩行	0	1
梁上歩行:2cm	幅 2cm の梁を 30cm 歩行	0	1
梁上歩行:1cm	幅 1cm の梁を 30cm 歩行	0	1

3-4 ローターロッドテストによる認知行動評価

ロータロッドテストは中枢神経障害のげっ歯類モデルにおける感覚運動協調性および運動学習を評価するために使用される²⁸。このテストでは前肢と後肢の両方の協調運動の評価も含んでいる。マウスをローターロッド上に置き、落

下するまでの時間を記録した。シングルレーンロータロッド (MK-630B、室町機械株式会社) を用い、ローターは初速 4 rpm で回転し、5 分後に 40 rpm になるまで徐々に加速した。

頭部外傷受傷前 (受傷前日と当日) にマウスはトレーニングを各日 3 回行い、受傷 1、3、7 日後に各日 3 回試験して落下までの平均時間を記録した (RNP, n=9; TEMPO, n=9; Micelle, n=9; PBS, n=9)。マウスが落下しなくてもロッドに捕まったまま 1 回転した場合には、落下したものとしてその時間を記録した。

3-5 脳挫傷体積の評価

受傷 7 日後のマウスにペントバルビタール 5 mL を腹腔内投与して安楽死させ、PBS による経心臓灌流後に脳を取り出して 4%パラホルムアルデヒドに 1 日浸した。さらに 1 日 30%スクロース液に浸し、Tissue-Tek O.C.T コンパウンド (Sakura Finetek Japan) に脳サンプルを埋め込んだ。10 μm 厚の冠状切片をクリオスタットで切断し、クリシルバイオレットで染色して光学顕微鏡を用いて観察した (RNP, n=9; TEMPO, n=9; Micelle, n=9; PBS, n=9)。挫傷体積は過去に報告されているように挫傷面積の合計 $\times 0.3 \text{ mm}^3$ として計算した²⁹。

3-6 蛍光免疫染色による Rhodamine-labeled RNP (Rh-RNP)の脳挫傷周囲への分布の検討

脳挫傷周囲における RNP 分布を評価するために Rh-RNP を使用した。

Rh-RNP はジメチルホルムアミド中で透析し、ローダミン-N-ヒドロキシスクシンイミドをブロックコポリマーに添加することによって作成した。得られた Rh-RNP を頭部外傷モデルマウスの受傷直後に尾静脈注射、受傷 1、3、5 日後に腹腔内投与した。前述と同様に、受傷 7 日後に安楽死させたマウスから脳を取り出し 10 μm 厚の冠状切片をクリオスタットで切断した。

rat polyclonal anti-mouse CD31 (1:100; no. 550274; BD Bioscience)、mouse monoclonal anti-rhodamine (1:500; ab9093; Abcam)、and rabbit monoclonal anti-NeuN (1:500; ab9093; Abcam) および BSA を 4 $^{\circ}\text{C}$ の環境下で一晩インキュベートした。一次抗体のインキュベーション後、切片を PBS で洗浄し、Alexa Fluor 結合二次抗 (1:400; Invitrogen) と共に室温で 60 分間インキュベートした。カバーガラスで 4',6-diamidino-2-phenylindole を含有する封入剤 (no. SCR-38448; Dianova GmbH) を用いて封入した。スライドを蛍

光顕微鏡 (Biozero, BS8000; Keyence Inc) で観察した。ネガティブコントロールとして PBS 投与マウスからの凍結脳切片を同じプロトコールで染色し、脳挫傷周囲を観察した。

3-7 蛍光免疫染色によるアストロサイト・神経細胞・ミクログリアの動態の検討

凍結した脳切片を、アストロサイト (GFAP)、神経細胞 (NeuN)、ミクログリア (Iba-1)、神経破壊型ミクログリア (CD16/32)、神経保護型ミクログリア (CD206) のマーカーで染色した。切片を rabbit polyclonal anti-GFAP (1:500; ab7260; Abcam)、rabbit monoclonal anti-NeuN (1:500; ab9093; Abcam)、rabbit polyclonal anti-Iba-1 (1:500; 019-19741; Wako)、rat monoclonal anti-mouse CD16/32 (1:100; no. 553142; BD Bioscience)、goat polyclonal anti-mouse CD206 (1:100; AF2535; R&D systems) の一次抗体と共に 4°C で一晩インキュベートした。一次抗体のインキュベーション後、切片を蛍光結合二次抗体と共にインキュベートし、封入剤を用いてマウントした。

それぞれの細胞数を無作為に選択した挫傷周囲の 15 視野 (×400) でカウン

トした (Iba-1 のみ 30 視野でカウントした)。

3-8 電子スピン共鳴法 (EPR ; Electron paramagnetic resonance)

を用いた挫傷脳活性酸素消去活性の測定

挫傷脳における多重フリーラジカル消去能 (Multiple free radical scavenging capacities ; MULTIS) は、以前に報告された electron paramagnetic resonance に基づく方法で測定した^{30,31}。活性酸素はスーパーオキサイドアニオン、ヒドロキシラジカル、アルコキシラジカル、ペルオキシラジカルを使用した。頭部外傷モデルマウスを受傷 1 日後に安楽死させ (RNP, n=5; TEMPO, n=5; PBS, n=5)、PBS で経心臓灌流後に左半球を取り出した。脳を 700 μ L の PBS でホモジナイズして遠心分離 (3780 G、10 分間) した。上澄み液を回収し-80°C で保存した。

それぞれの活性酸素は前駆物質に可視光もしくは紫外線を照射することにより実験室で合成した (照射は RUVF-203SR UV illuminator; Radical Research Inc, Tokyo, Japan を使用)。EPR スピントラップ剤として CYPMPO (5-(2,2-Dimethyl-1,3-propoxycyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline-N-oxid

e;Shidai system, Saitama, Japan)を用いた。リン酸バッファー (PB; Phosphate buffer) もしくは蒸留水中を溶媒としたフローインジェクション系にて施行した。それぞれのフリーラジカルの生成に用いた前駆物質・感受物質・照射条件を表 2 に示す。EPR 装置は PRX-1X EPR 装置 (Radical Research Inc.) を用い、WIN-RAD operation software を用いて解析した。活性酸素消去活性はそれぞれの活性酸素に対応する標準ラジカル消去物質を用いて、標準曲線を作成して算出した。

標準物質として、スーパーオキシドアニオンに対しては SOD、ヒドロキシラジカルに対してはグルタチオン (GSH; glutathione)、アルコキシラジカルに対しては TROLOX (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)、ペルオキシラジカルに対しては α リポ酸 (α LA ; α -lipoic acid) を用いた。

表 2 各フリーラジカルの生成に用いた前駆物質・感受物質・照射条件

Free radical	Spin trap	precursor/Sensitizer	UV/VL	Irradiation time	Proportion of sample
O ₂ ⁻	CYPMPO	Riboflavin 20 μM	VL	60 s	3.4%
OH [·]	CYPMPO	H ₂ O ₂ 10 mM	UV	5 s	1.7%
RO [·]	CYPMPO	AAPH 10 mM	UV	5 s	3.4%
ROO [·]	CYPMPO	tBPH 10 mM	UV	10 s	1.7%

O₂⁻:スーパーオキサイドアニオン

OH[·]:ヒドロキシラジカル

RO[·]:アルコキシラジカル

ROO[·]:ペルオキシラジカル

UV; ultra violet (300-400 nm)

VL; visual light (500-600 nm)

AAPH; 2,2'-azobis-2-methyl-propanimidamide, dihydrochloride

tBHP; tert-butyl hydroperoxide

CYPMPO;

5-(2,2-dimethyl-1,3-propoxycyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide

3-9 統計学的手法

すべての値は平均値±標準誤差として表した。SPSS 25.0 version (IBM, Japan)

を用いてグループ間の連続データは、因子が時間と薬剤の2つであるNSSとロ

ータロッドテストは二限配置分散分析を行った。他の評価は全て因子が薬剤の

1つのみであり、一元配置分散分析を行った。どちらも分散分析後にTukey法

を用いて各群間差を評価した。p<0.05を有意とした。

第 4 章 結果

4-1 RNP は認知行動評価を良好にした

RNP 群は受傷 1、3、7 日後のいずれにおいても他群よりも NSS が低く、神経評価が良好であった (図 10)。二限配置分散分析では有意差を得られなかったものの、その後の Tukey 法にて受傷 1 日後は RNP 群と TEMPO 群は PBS 群よりも有意に NSS が低く ($p<0.05$)、受傷 3、7 日後には RNP 群のみが PBS 群よりも有意に NSS が低かった ($p<0.05$)。

またローターロッドテストでは、RNP 群は受傷 1、3、7 日後のいずれにおいても他群より落下までの時間が長かった (図 11)。二限配置分散分析では有意差を得られなかったものの、その後の Tukey 法にて受傷 1、3、7 日後のいずれにおいても RNP 群のみが PBS 群よりも有意に落下までの時間が長かった ($p<0.05$)。

結果、RNP 群は認知行動評価が有意に良好であった。

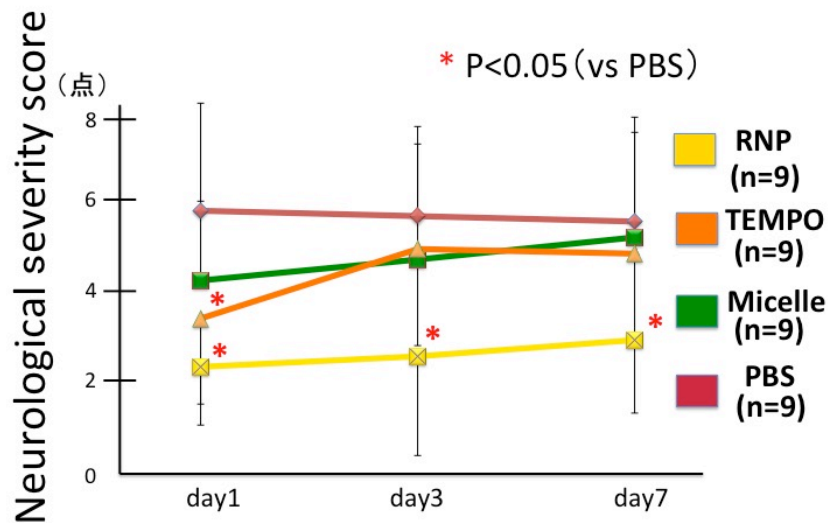


図 10 : RNP 群、TEMPO 群、Micelle 群、PBS 群の day1、3、7 における Neurological severity score。各群 ; n=9。* p<0.05 (vs PBS)。

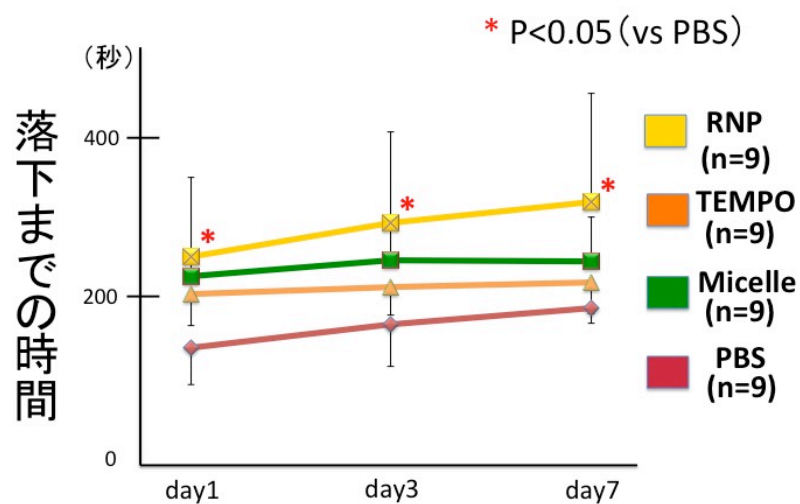


図 11 : RNP 群、TEMPO 群、Micelle 群、PBS 群の day1、3、7 における Rotarod test の持続走行時間。各群 ; n=9。* p<0.05 (vs PBS)。

4-2 RNP は脳挫傷体積を縮小させた

脳挫傷体積は RNP 群で $13.27 \pm 8.00 \text{ mm}^3$ 、TEMPO 群で $26.40 \pm 7.19 \text{ mm}^3$ 、
Micelle 群で $33.91 \pm 15.27 \text{ mm}^3$ 、PBS 群で $31.44 \pm 6.80 \text{ mm}^3$ であり、RNP 群
は他の全ての群に対して有意に挫傷体積が小さかった ($p < 0.05$; 図 12)。

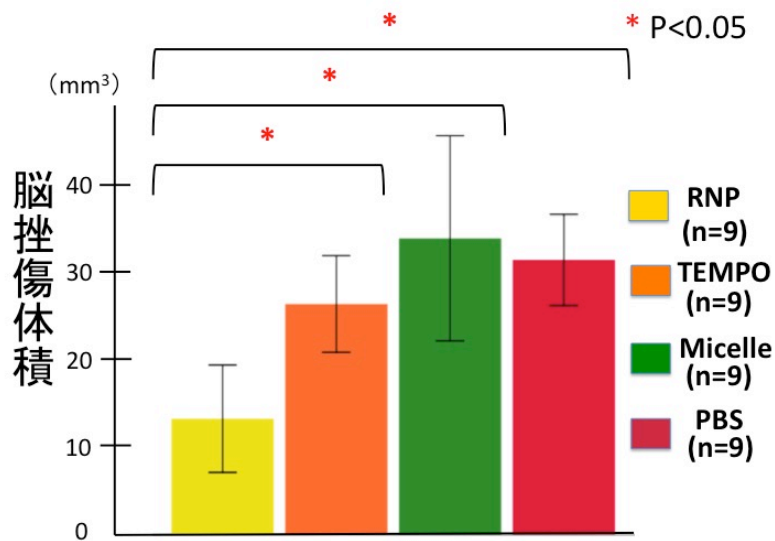
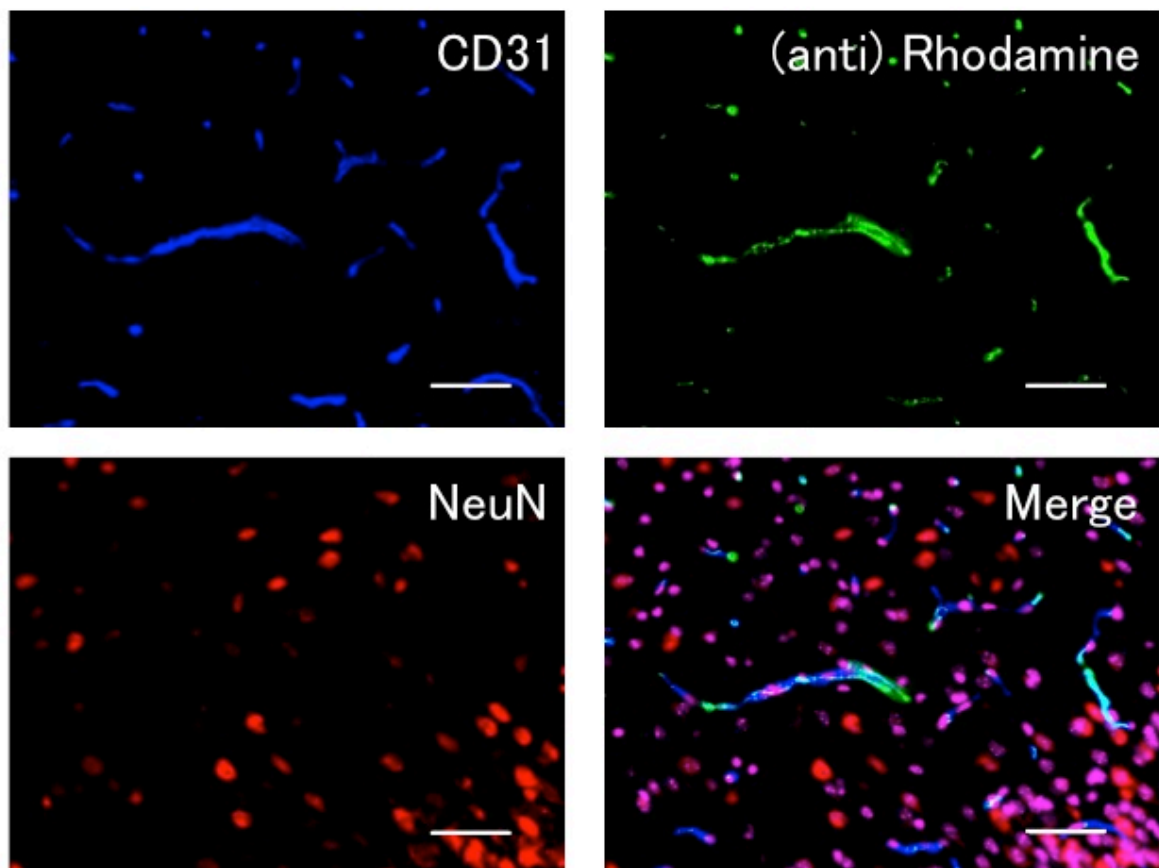


図 12 : RNP 群、TEMPO 群、Micelle 群、PBS 群の day 7 における脳挫傷体積。各群 ; n=9。 * $p < 0.05$

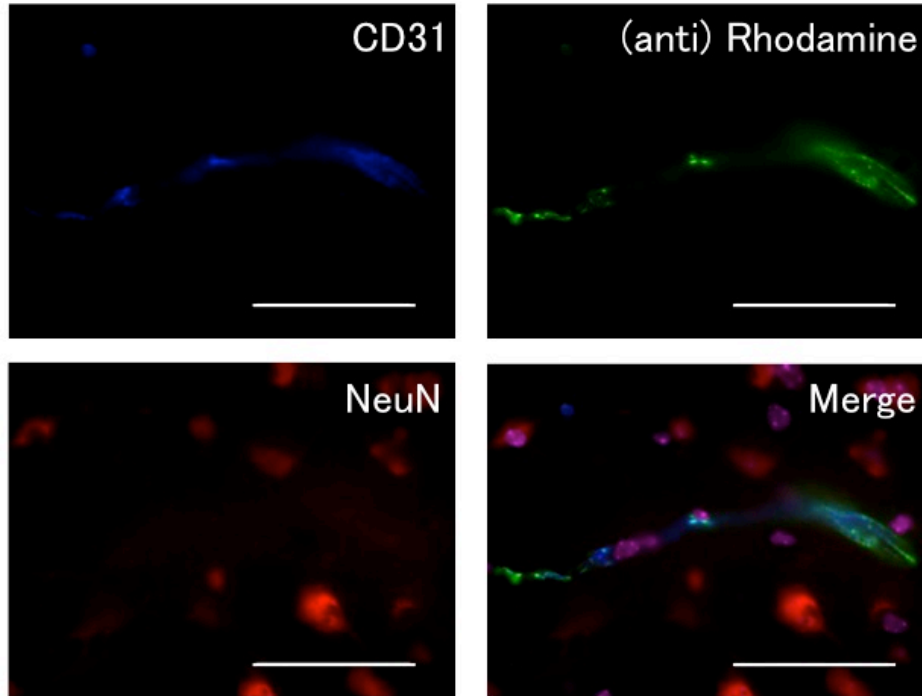
4-3 脳挫傷周囲における Rh-RNP は微小血管内で多く検出された

Rh-RNP 分布を評価するために免疫蛍光分析を行った。図 13A および図 13B は、ブレグマスライスの脳挫傷周辺部の代表的な蛍光画像である（図 13A × 400； 図 13B ×1000）。Rhodamine は微小血管内で多く検出された。ネガティブコントロールである PBS 投与群の脳挫傷周囲では(anti)Rhodamine はほぼ検出されなかった（図 13C ×400）。

図 13A



☒ 13B



☒ 13C

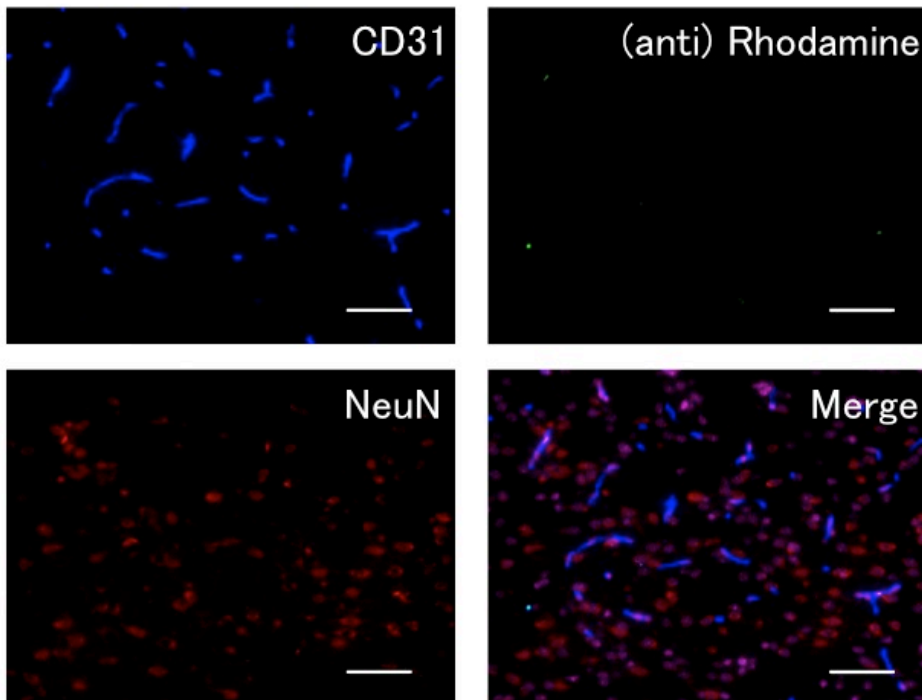


図 13 : 脳挫傷周辺部の Rh-RNP 分布を免疫蛍光染色により評価 (青 CD31 ; 赤 NeuN ; 緑 rhodamine ; ピンク DAPI)。Bar=50 μ m。

A、B : Rh-RNP を投与した頭部外傷モデルマウスの脳挫傷周辺領域

(A \times 400、 B \times 1000)

C : PBS を投与した頭部外傷モデルマウスの脳挫傷周辺領域 (\times 400)

4-4 RNP は astrocyte の集簇を促し神経細胞脱落を抑制させた

脳挫傷周囲の astrocyte の動向を調べるために各群の脳標本における GFAP 陽性細胞数を数えた。図 14A は各群における受傷 7 日後の脳挫傷周囲の \times 400 視野での蛍光写真である。GFAP 陽性細胞数は RNP 群が他群に比べて有意に多かった ($p < 0.05$) (図 14B)。これにより RNP は astrocyte の集簇を促していることが明らかであった。

同じく脳挫傷周囲の神経細胞の動態を調べるため、各群の脳標本における NeuN 陽性細胞数を数えた。図 15A は各群における受傷 7 日後の脳挫傷周囲の \times 400 視野での蛍光写真である。NeuN 陽性細胞数も、RNP 群が他群に比べて有意に多かった ($p < 0.05$) (図 15B)。これにより RNP は神経細胞脱落を抑制していることが明らかであった。

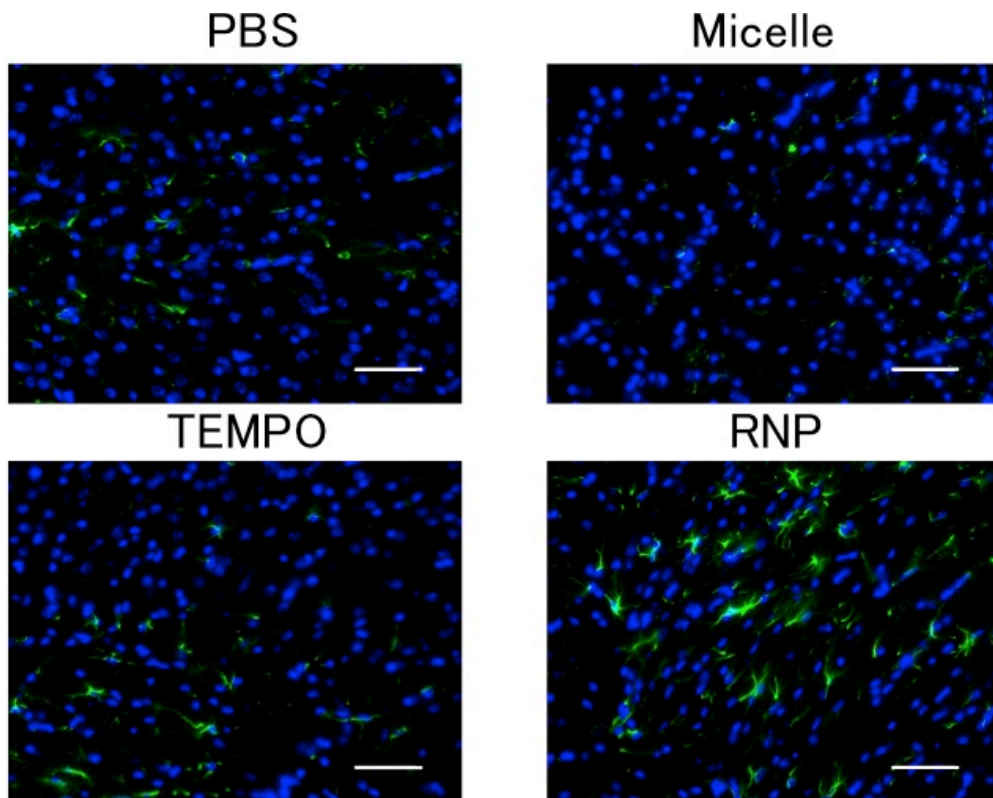


図 14A : day7 における脳挫傷周辺部の astrocyte 集簇を免疫蛍光染色により評価 (緑 GFAP ; 青 DAPI)。×400、Bar=50 μm。

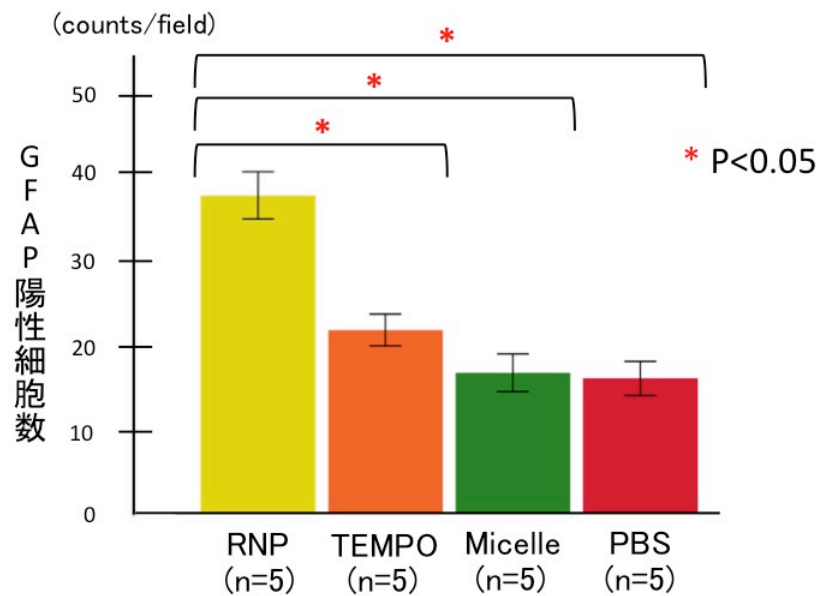


図 14B : day7 における脳挫傷周辺部の GFAP 陽性の細胞数。各群 ; n=5。* p<0.05

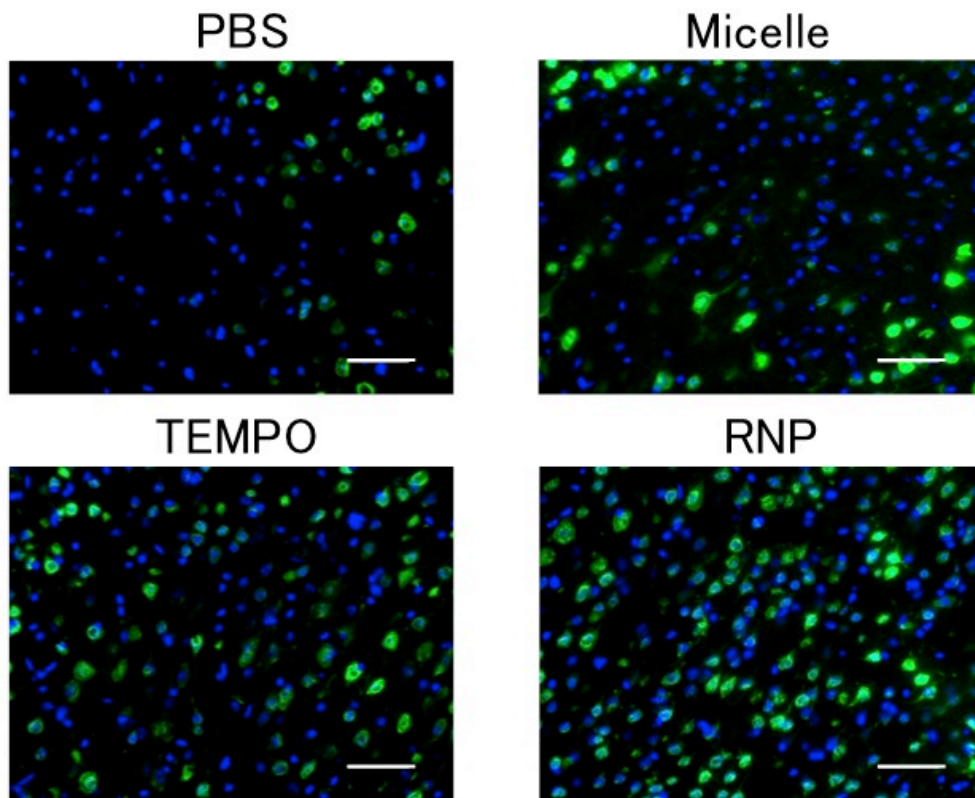


図 15A : day7 における脳挫傷周辺部の神経細胞脱落を免疫蛍光染色により評価 (緑 NeuN ; 青 DAPI)。400 倍、Bar=50 μ m。

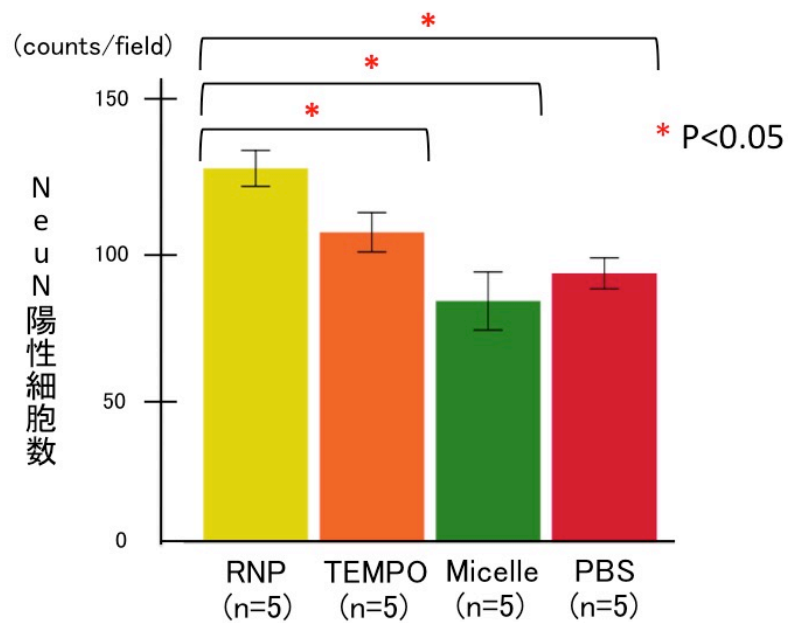


図 15B : day7 における脳挫傷周辺部の NeuN 陽性の細胞数。各群 ; n=5

4-5 RNP は神経破壊型ミクログリアの発生を抑制し神経保護型ミクログリアの発生を促した

脳挫傷周囲のミクログリアの動態を調べるために各群の脳標本における Iba-1 陽性細胞数を数えた。Iba-1 染色単独のみならず、CD16/32 染色陽性の神経破壊型ミクログリア細胞数、CD206 陽性の神経保護型ミクログリア細胞数も数えた。Iba-1 陽性細胞数は、受傷 1 日後、3 日後、7 日後のいずれも RNP 群は他群と比べて有意差を認めなかった ($p>0.05$ 、図 16)。

図 17A (A:PBS 群、B:RNP 群) は PBS 群および RNP 群における受傷 7 日後の脳挫傷周囲の $\times 400$ 視野での蛍光写真である。さらに図 18A (A:PBS 群、B:RNP 群) も PBS 群および RNP 群における受傷 7 日後の脳挫傷周囲の $\times 400$ 視野での蛍光写真である。

CD16/32 陽性細胞は受傷 3 日後において、RNP 群と TEMPO 群は Micelle 群および PBS 群に比べて有意に少なかった ($p<0.05$)。また、受傷 7 日後においては、RNP 群と TEMPO 群は Micelle 群および PBS 群に比べて、さらに Micelle 群も PBS 群に比べて有意に少なかった ($p<0.05$ 、図 17B)。CD206 陽性細胞は受傷 7 日後において RNP 群は他群全てに比べて有意に多かった

($p < 0.05$)。さらに TEMPO 群も Micell 群および PBS 群に比べて有意に多かった ($p < 0.05$ 、図 18B)。これにより RNP はミクログリア全体の集簇を有意に促す結果とはならなかったものの、神経破壊型ミクログリアの産生を有意に抑制し、かつ、神経保護型ミクログリアの産生を有意に促進した結果となった。

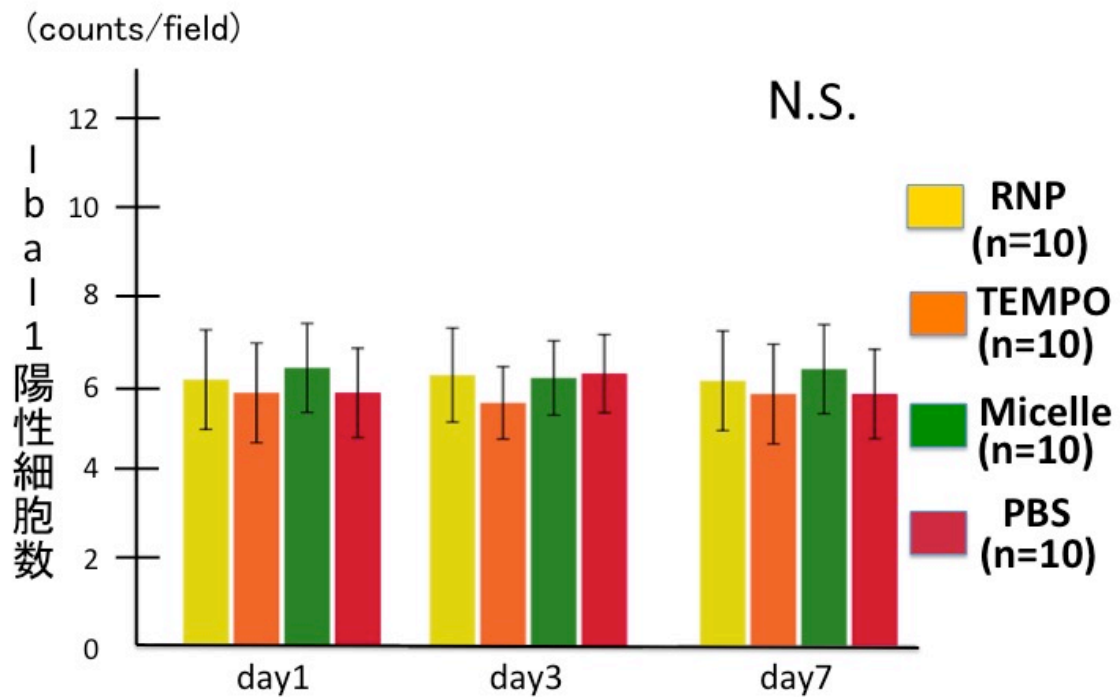


図 16 : day1、3、7 における脳挫傷周辺部の Iba-1 陽性の細胞数。各群 ; n=10

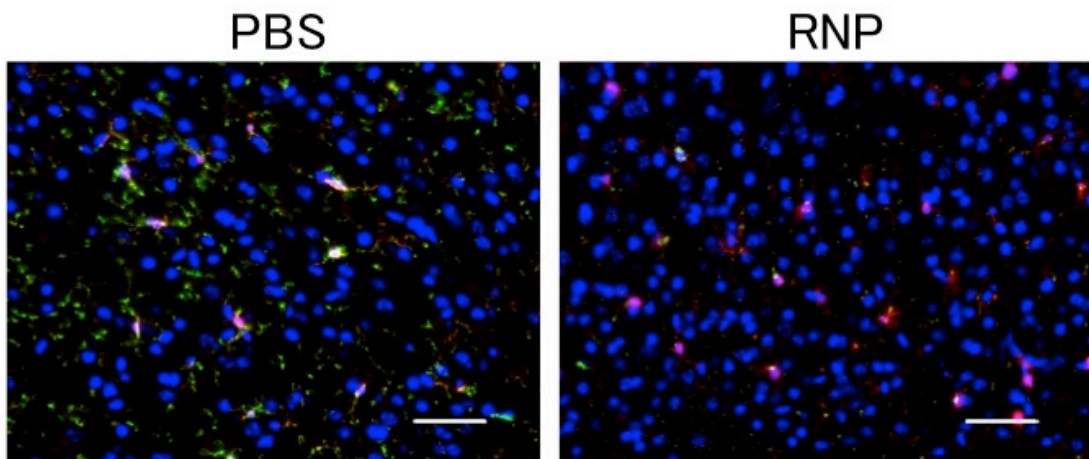


図 17A : day7 における脳挫傷周辺部の神経破壊型ミクログリアの産生を免疫蛍光染色により評価 (緑 CD16/32 ; 赤 Iba-1 ; 青 DAPI)。400 倍、Bar=50 μ m。

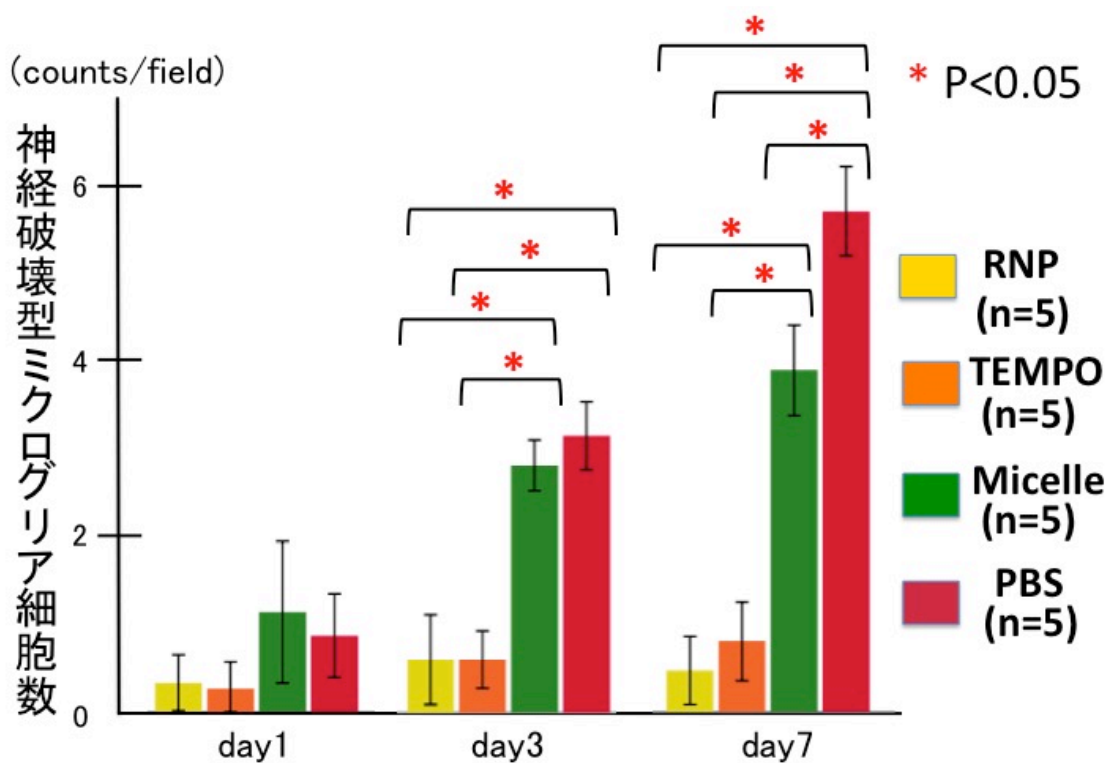


図 17B : day1、3、7 における脳挫傷周辺部の CD16/32 陽性かつ Iba-1 陽性の細胞数。各群 ; n=5。* p<0.05

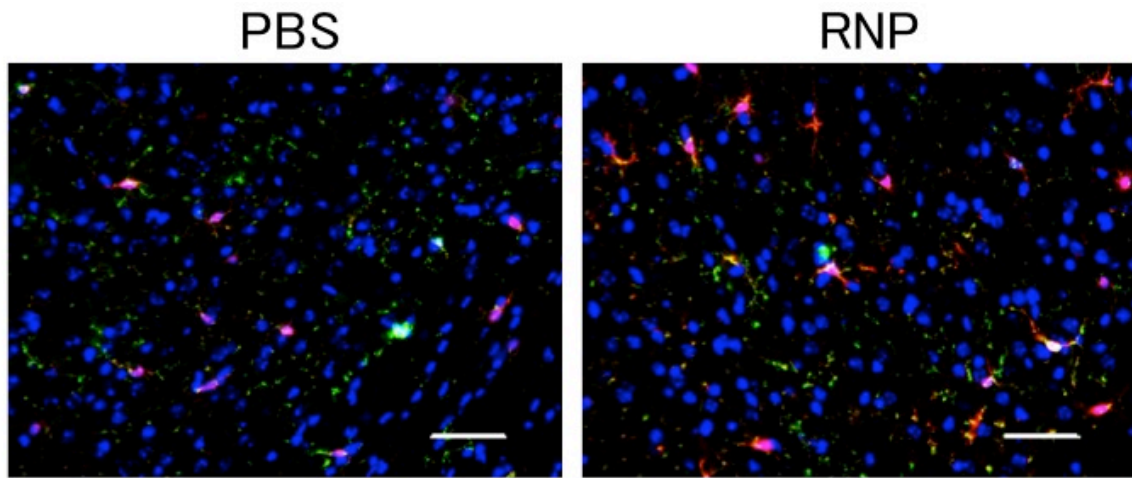


図 18A : day7 における脳挫傷周辺部の神経保護型ミクログリアの産生を免疫蛍光染色により評価 (緑 CD206 ; 赤 Iba-1 ; 青 DAPI)。400 倍、Bar=50 μ m。

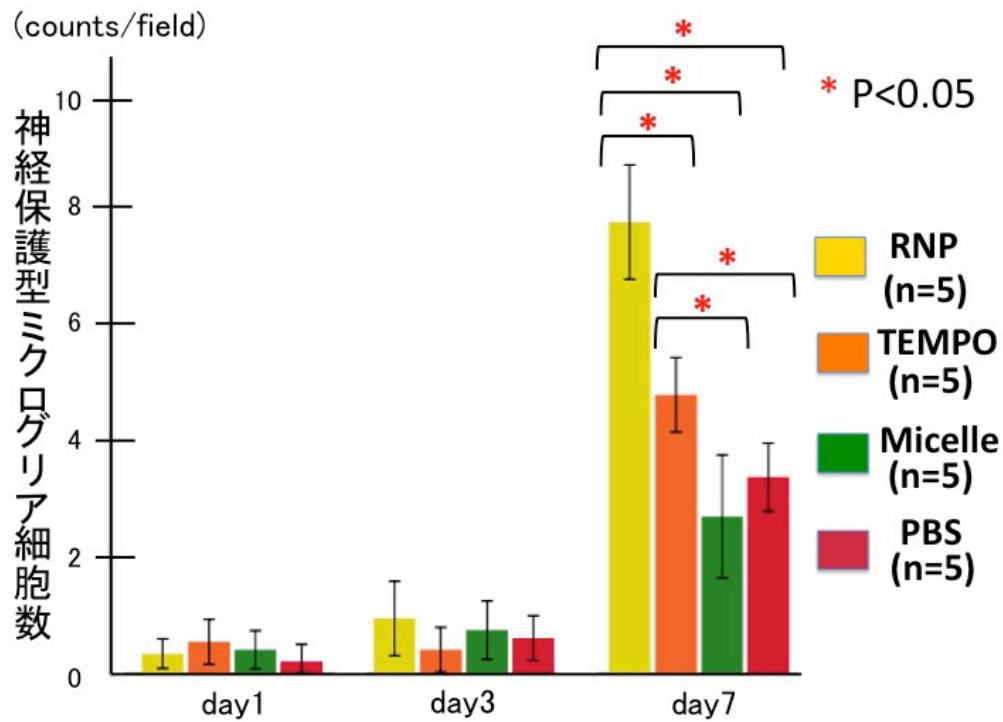


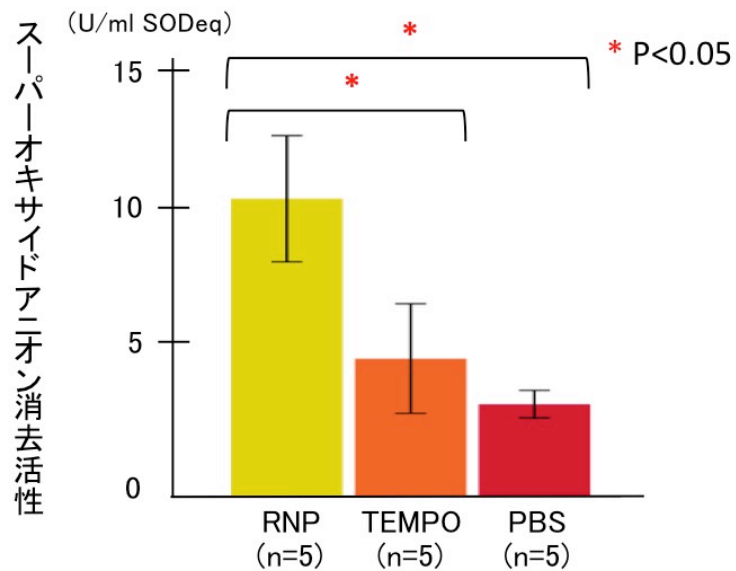
図 18B : day1、3、7 における脳挫傷周辺部の CD206 陽性かつ Iba-1 陽性の細胞数。各群 ; n=5。* p<0.05

4-6 RNP はスーパーオキシドアニオン消去活性を上昇させた

MULTIS 法を用いてホモジナイズした脳のスーパーオキシドアニオン、ヒドロキシラジカル、アルコキシラジカル、ペルオキシラジカルの消去活性を測定した。RNP 群、TEMPO 群、PBS 群における受傷脳のスーパーオキシドアニオンの消去活性を図 19A に示す。消去活性は RNP 群 9.76 ± 2.31 、TEMPO 群 4.52 ± 2.01 、PBS 群 3.03 ± 0.51 であり、RNP 群は他群より有意に消去活性が高かった($p < 0.05$)。

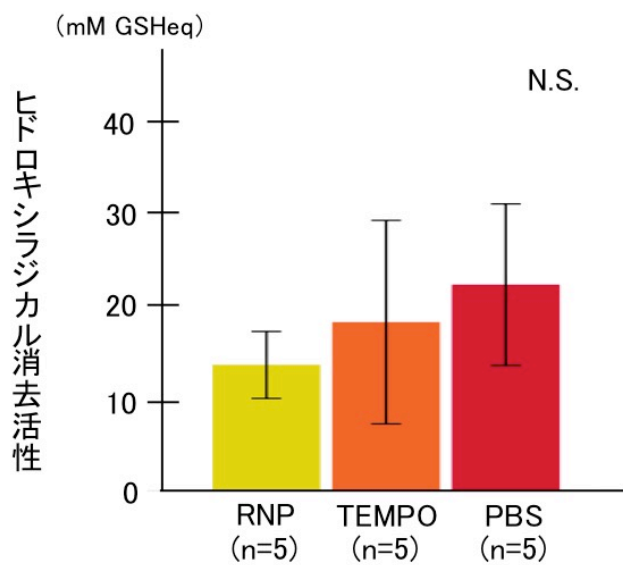
ヒドロキシラジカル、アルコキシラジカル、ペルオキシラジカルの消去活性はいずれも各群間での有意差を示さなかった。ヒドロキシラジカルの消去活性は RNP 群 13.07 ± 2.92 、TEMPO 群 18.35 ± 8.89 、PBS 群 22.42 ± 7.06 であり (図 19B)、アルコキシラジカルの消去活性は RNP 群 830.88 ± 274.22 、TEMPO 群 891.11 ± 189.31 、PBS 群 637.45 ± 79.86 であり (図 19C)、ペルオキシラジカルの消去活性は RNP 群 545.77 ± 439.38 、TEMPO 群 255.92 ± 450.20 、PBS 群 328.64 ± 217.40 であった(図 19D)。

図 19A



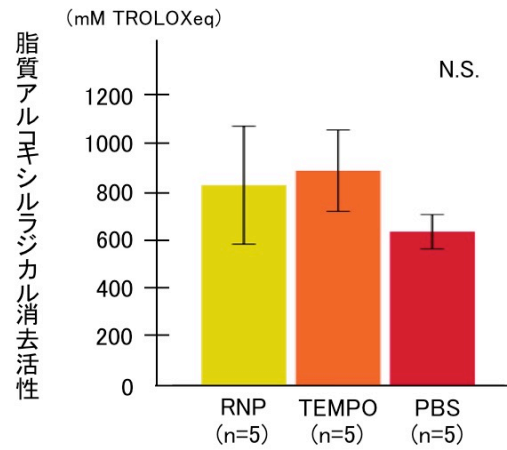
A : スーパーオキシドアニオン消去活性 (単位 : U/mL SOD equivalent)

図 19B



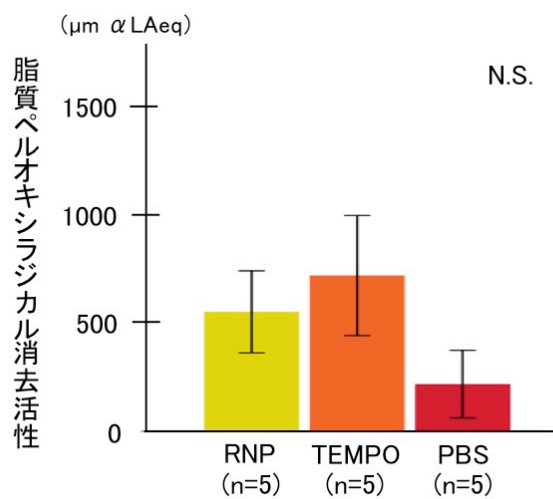
B : ヒドロキシラジカル消去活性 (単位 : mM GSH equivalent)

図 19C



C : 脂質アルコキシラジカル消去活性 (単位 : mM Trolox equivalent)

図 19D



D : 脂質ペルオキシラジカル消去活性 (単位 : μM α-lipoic acid equivalent)

図 19 : day1 の挫傷脳の活性酸素捕捉能を MULTIS 法により評価した。各群 ; n=5。 * p<0.05

第5章 考察

5-1 RNP のフリーラジカル消去能

図 18A に示すように RNP 投与は他の活性酸素の前駆体であるスーパーオキサイドアニオンに対する捕捉能力を改善した。スーパーオキサイドアニオンは組織の損傷で遊走している鉄イオン (2+) と反応し、ヒドロキシラジカル、そしてアルコキシラジカル/ペルオキシラジカルが産生され、さらにそれがスーパーオキサイドアニオンを産生するというラジカル連鎖反応を起こす^{32,33}。

RNP 投与群で受傷 1 日後のスーパーオキサイドアニオン消去活性効果の上昇を認めたが、ヒドロキシラジカル、アルコキシラジカル、ペルオキシラジカルの有意な消去活性効果上昇は認めなかった。これは RNP 投与によりスーパーオキサイドアニオンの産生を抑制したことでラジカル連鎖反応も抑制され、ヒドロキシラジカル、アルコキシラジカル、ペルオキシラジカルが多量に産生されなかったためと考えられる。

5-2 RNP 投与によるミクログリア双極性の変動

ミクログリアには双極性があり、M1 表現型と呼ばれる神経破壊型と、M2 表

現型と呼ばれる神経保護型に分類される^{34,35}。M1 表現型は炎症性サイトカイン、誘発性 NOS 等のメディエーターを産生して神経破壊作用を発現し、受傷後 14 日目まで上昇し続ける³⁴。M2 表現型はスカベンジャー受容体、成長因子である TGF- β 、抗炎症性サイトカインである IL-10 等を産生して神経保護効果を発現するが、受傷後 5 日目まで上昇し以後減少する³⁵。RNP 投与により受傷 3 日以降の神経破壊型ミクログリアの産生が抑えられ、受傷 7 日での神経保護型ミクログリアの産生が促進されており、これにより脳保護効果をきたしたものと考えられる。

5-3 RNP 投与によるその他の効果

RNP 投与により、受傷 1 日後から NSS およびローターロッドテストによる認知行動評価は良好であり、受傷 7 日後の脳挫傷体積も減少した。免疫染色でも受傷 7 日後の神経細胞脱落は抑制されており、アストロサイトの集簇は増加していた。アストロサイトは神経再生を妨げたり炎症性サイトカインを産生したりして細胞傷害性に働く一方で神経栄養因子の産生等の細胞保護効果も有しており、RNP 投与により神経保護効果がより強く発現したことで良好な認知行

動評価や脳挫傷体積減少が得られた可能性もある³⁶。

5-4 RNP の特性

フリーラジカル・活性酸素が脳挫傷病態悪化に寄与していると考えられており、過去にもフリーラジカルスカベンジャーを投与することによる脳挫傷モデルラットの転帰改善が報告されている¹³⁻¹⁵。脳挫傷モデルラットにエダラボンを投与した研究では、Itoh らは受傷1日後、3日後の脂質過酸化反応が減少しており、Wang らは受傷3日後のアポトーシスが減少したと報告した^{13,15}。しかし、エダラボン等の低分子量のフリーラジカルスカベンジャーの多くは正常細胞内の活性酸素を強く抑制することにより、神経保護効果と同時に神経毒性効果も呈する。そのためフリーラジカルスカベンジャーは頭部外傷において現時点では臨床で用いられていない^{15,16}。

そこで、私は新しいナノ粒子である RNP の神経保護効果を検証した。RNP は長い半減期 (TEMPO の 60 倍) を有し、外層が RNP コアの TEMPO 部分の周囲のステルスシールドを構成するため TEMPO と比べて毒性はるかに低い。さらに RNP コア中のアミノ基のプロトン化のために脳挫傷のような低 pH 環境

でミセルが崩壊し、選択的に TEMPO が作用する。

RNP 投与によりラット脳出血モデルに対する脳保護効果や、マウス一過性脳虚血モデルに対する脳保護効果を過去に報告したが、脳挫傷モデルへの投与は初めてである^{19,22,23,37}。RNP は血液投与では 24~48 時間で体外へ排出されるが、腹腔内投与では投与 2 日後に血中濃度が最高になり 1 週間後も血液中で観測可能だと過去に報告されている³⁸。今回、受傷直後は即効性を期待して静脈注射とし、以降は持続性を期待して腹腔内投与とした。

本研究では他のフリーラジカルスカベンジャーを対照群として、RNP と直接比較することはしなかった。しかし、脳梗塞治療の一環として広く投与されているエダラボンは、ペルオキシ亜硝酸あるいはスーパーヒドロキシラジカルが引き起こす血管内皮細胞障害・神経細胞障害・脂質過酸化を阻害する薬剤である。これに対し、本研究では RNP はスーパーオキシドアニオンの発生を阻害するという結果が得られた。さらに、細尾らは一過性脳虚血モデルマウスに対し、RNP はスーパーヒドロキシラジカルの発生を阻害したと報告している¹⁹。つまり、RNP はエダラボンと比べてラジカル連鎖反応のより上流の反応を断ち切る作用を有すると考えられるため、エダラボンよりも高い脳保護効果を有し

ている可能性がある (図 20)。

さらに、RNP は day1 の比較的早期にスーパーオキシドアニオン消去活性を増大させている。そこから少し遅れた day3 で神経破壊型ミクログリアを抑制し始め、さらに遅れた day7 で神経保護型ミクログリアの産生促進・脳挫傷体積縮小・神経細胞脱落抑制が認められた。day1 から day7 まで一貫して認知行動評価は良好であったが、これは早期にスーパーオキシドアニオン消去活性が増大したためと考えられる (図 21)。RNP はエダラボンよりもラジカル連鎖反応の上流の反応を断ち切るのであれば、神経保護効果がエダラボンよりも早期に認められる可能性が考えられる。

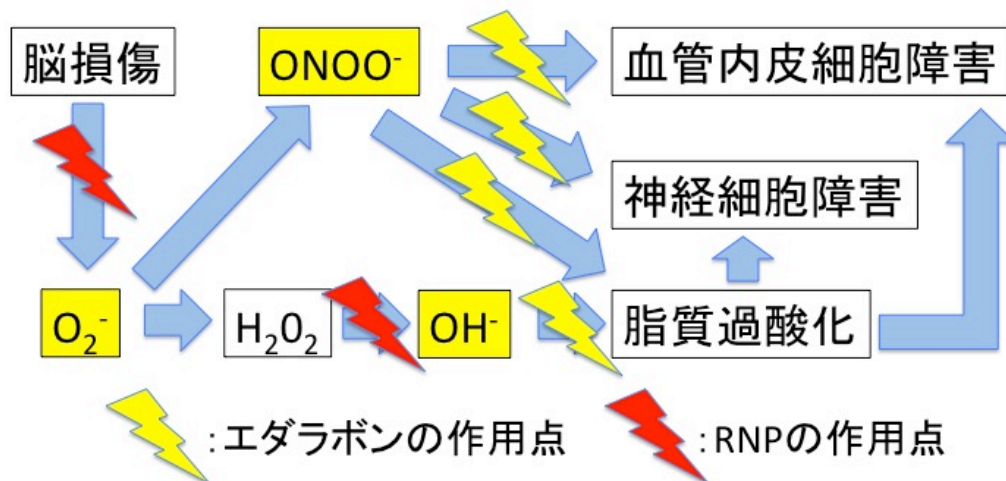


図 20 : Redox-active nitroxide radical-containing nanoparticles (RNP) とエダラボンの作用点の相違 (田辺三菱製薬ホームページより改変)

O_2^- :スーパーオキシドアニオン、 H_2O_2 過酸化水素、 $ONOO^-$ ペルオキシ亜硝酸、 OH^- :ヒドロキシラジカル

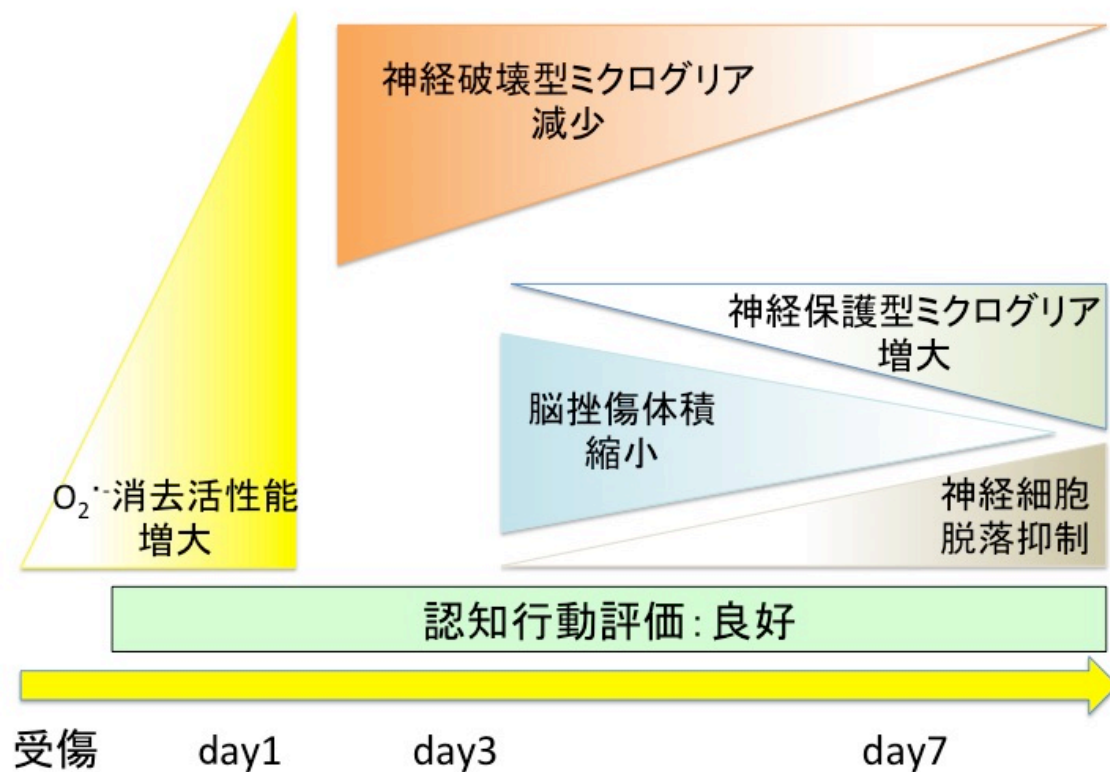


図 21 : Redox-active nitroxide radical-containing nanoparticles (RNP) 投与による効果発現の時系列

5-5 RNP の分布

細尾らはマウス一過性脳虚血モデルに対して RNP を投与した際、RNP は血液脳関門を通過して脳損傷部へ到達したと報告した¹⁹。しかし、今回の頭部外傷モデルでは RNP は血管内への分布は確認されたものの、血液脳関門を通過しての損傷部への到達はそれほど認められなかった。これは、血管に直接損傷を与える虚血より挫傷は血液脳関門損傷が軽微となる可能性があること、また、今回の脳挫傷モデルでは一次損傷を免れた部位を観察しているため血液脳関門

の破綻が重度でなかったことが原因と考えられる。

RNP は細毛内皮系を通過するクリアランスが減少しており、PEG 鎖表面が密に詰まったナノ粒子が血液循環中に良好に保持されている^{39,40}。これにより RNP は脳血管壁へのアクセスが良好になっている。ナノ粒子の電荷もクリアランスに影響を与えている。大部分の細胞表面はわずかに負に帯電しているので正に帯電したナノ粒子は組織表面に吸着し血管内循環が鈍っており、負に帯電したナノ粒子はスカベンジャー受容体に取り込まれる。RNP は TEMPO などの従来の低分子量抗酸化剤よりも PEG 化された中性の表面電荷と *in vivo* での長い半減期 (15 分) を有している。この作用により RNP が挫傷部に到達せずとも、血管内に長く留まることで炎症性サイトカイン等の血流拡散を抑制し神経保護効果に寄与した可能性も考えられる。

5-6 本研究の limitation と今後の課題

この研究での limitation を述べる。第一に頭部外傷モデル作成にあたり、脳挫傷部は組織が壊滅してしまうため同部の組織評価ができていない (組織評価したのは挫傷周囲部である)。この点については挫傷組織の壊滅が軽度である頭

部外傷モデルを用いて新たに組織評価をする必要がある。第二に、RNP 分布が生体内で経時的にどのように変化するかを調べていない。RNP を臨床で用いるためにはその点を追加研究する必要がある。

5-7 Future direction

本研究ではマウス頭部外傷モデルを用いて RNP の脳保護効果を認知行動評価や組織学的評価により示したが、今後はマウスの性差や週齢による違いの検討や大型動物モデルを用いた検討を行い、RNP の有効性と安全性、およびヒトへの実用化を見据えた研究を行う必要がある。

また、頭部外傷の他に脳梗塞や脳出血などの脳疾患においても脳虚血巣や脳出血周囲の脳組織にフリーラジカルを発生させ、病態を悪化させる。RNP はこれらの様々な脳疾患や脳損傷の病態に対しても臨床応用できる可能性があり、脳疾患分野の治療発展への寄与が期待される。

第 6 章 結論

本研究の結果から、RNP が頭部外傷の治療に有用な抗酸化ナノメディシンであると考えられた。RNP 投与は認知行動評価を良好にし、脳挫傷体積を減少させ、神経破壊型ミクログリアを抑制、神経保護型ミクログリアを産生することにより脳挫傷後の神経保護効果を呈すると考えられた。

謝辞

今回、このような貴重な研究の機会をいただき、御指導・御鞭撻いただきました、筑波大学医学医療系脳神経外科 松村明教授に感謝申し上げます。また、研究手法および論文作成など直接的かつ具体的な御指導をいただきました、筑波大学医学医療系脳神経外科 丸島愛樹先生に感謝申し上げます。

RNP の作成、無償で御提供いただき、研究手法および論文作成の御指導いただきました、筑波大学数理物質科学研究科 長崎幸夫教授に感謝申し上げます。

電子スピン共鳴法 (EPR) の解析、評価法、論文の御指導をいただきました筑波技術大学東西医学統合医療センター 平山暁教授に感謝申し上げます。また、EPR の手法を直接かつ具体的に御指導いただきました、筑波技術大学東西医学統合医療センター 長野由美子先生に感謝申し上げます。

検体の解析等において、御指導・御協力いただきました筑波大学大学院人間総合科学研究科 (脳神経外科) 技官の塚田喜子さん、宮川牧子さんに感謝申し上げます。

参考文献

1. Altura BM, Altura BT, Gebrewold A, Ising H, Gunther T. Magnesium deficiency and hypertension: correlation between magnesium-deficient diets and microcirculatory changes in situ. *Science*. 1984;223(4642):1315-1317.
2. Choi DW, Maulucci-Gedde M, Kriegstein AR. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci*. 1987;7(2):357-368.
3. Goodman JC, Robertson CS, Grossman RG, Narayan RK. Elevation of tumor necrosis factor in head injury. *J Neuroimmunol*. 1990;30(2-3):213-217.
4. Kochanek PM, Nemoto EM, Melick JA, Evans RW, Burke DF. Cerebrovascular and cerebrometabolic effects of intracarotid infused platelet-activating factor in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1988;8(4):546-551.
5. Lyeth BG, Hayes RL. Cholinergic and opioid mediation of traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 1992;9 Suppl 2:S463-474.
6. Maxwell WL, Povlishock JT, Graham DL. A mechanistic analysis of nondisruptive axonal injury: a review. *J Neurotrauma*. 1997;14(7):419-440.
7. McIntosh TK, Fernyak S, Yamakami I, Faden AI. Central and systemic kappa-opioid agonists exacerbate neurobehavioral response to brain injury in rats. *Am J Physiol*. 1994;267(3 Pt 2):R665-672.
8. Raghupathi R, McIntosh TK. Regionally and temporally distinct patterns of induction of c-fos, c-jun and junB mRNAs following experimental brain injury in the rat. *Brain Res Mol Brain Res*. 1996;37(1-2):134-144.
9. Siesjo BK. Basic mechanisms of traumatic brain damage. *Ann Emerg Med*. 1993;22(6):959-969.
10. Kontos HA. Oxygen radicals in CNS damage. *Chem Biol Interact*. 1989;72(3):229-255.
11. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med*. 2000;109(1):33-44.

12. Ikeda Y, Long DM. The molecular basis of brain injury and brain edema: the role of oxygen free radicals. *Neurosurgery*. 1990;27(1):1-11.
13. Itoh T, Satou T, Nishida S, Tsubaki M, Hashimoto S, Ito H. The novel free radical scavenger, edaravone, increases neural stem cell number around the area of damage following rat traumatic brain injury. *Neurotox Res*. 2009;16(4):378-389.
14. Petty MA, Poulet P, Haas A, Namer IJ, Wagner J. Reduction of traumatic brain injury-induced cerebral oedema by a free radical scavenger. *Eur J Pharmacol*. 1996;307(2):149-155.
15. Wang GH, Jiang ZL, Li YC, et al. Free-radical scavenger edaravone treatment confers neuroprotection against traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma*. 2011;28(10):2123-2134.
16. Lapchak PA. A critical assessment of edaravone acute ischemic stroke efficacy trials: is edaravone an effective neuroprotective therapy? *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2010;11(10):1753-1763.
17. Soule BP, Hyodo F, Matsumoto K, et al. The chemistry and biology of nitroxide compounds. *Free Radic Biol Med*. 2007;42(11):1632-1650.
18. Hahn SM, Sullivan FJ, DeLuca AM, et al. Hemodynamic effect of the nitroxide superoxide dismutase mimics. *Free Radic Biol Med*. 1999;27(5-6):529-535.
19. Hosoo H, Marushima A, Nagasaki Y, et al. Neurovascular Unit Protection From Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury by Radical-Containing Nanoparticles in Mice. *Stroke*. 2017;48(8):2238-2247.
20. Yoshitomi T, Miyamoto D, Nagasaki Y. Design of core-shell-type nanoparticles carrying stable radicals in the core. *Biomacromolecules*. 2009;10(3):596-601.
21. Yoshitomi T, Suzuki R, Mamiya T, Matsui H, Hirayama A, Nagasaki Y. pH-sensitive radical-containing-nanoparticle (RNP) for the L-band-EPR imaging of low pH circumstances. *Bioconjug Chem*. 2009;20(9):1792-1798.
22. Chonpathompikunlert P, Fan CH, Ozaki Y, Yoshitomi T, Yeh CK,

- Nagasaki Y. Redox nanoparticle treatment protects against neurological deficit in focused ultrasound-induced intracerebral hemorrhage. *Nanomedicine (Lond)*. 2012;7(7):1029-1043.
23. Marushima A, Suzuki K, Nagasaki Y, et al. Newly synthesized radical-containing nanoparticles enhance neuroprotection after cerebral ischemia-reperfusion injury. *Neurosurgery*. 2011;68(5):1418-1425; discussion 1425-1416.
 24. Flierl MA, Stahel PF, Beauchamp KM, Morgan SJ, Smith WR, Shohami E. Mouse closed head injury model induced by a weight-drop device. *Nat Protoc*. 2009;4(9):1328-1337.
 25. Marmarou A, Foda MA, van den Brink W, Campbell J, Kita H, Demetriadou K. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg*. 1994;80(2):291-300.
 26. Khandelwal VK, Singh P, Ravingerova T, Gregory M, Gandhi H, Chaudhary M. Comparison of different osmotic therapies in a mouse model of traumatic brain injury. *Pharmacological reports : PR*. 2017;69(1):176-184.
 27. Chen Y, Constantini S, Trembovler V, Weinstock M, Shohami E. An experimental model of closed head injury in mice: pathophysiology, histopathology, and cognitive deficits. *J Neurotrauma*. 1996;13(10):557-568.
 28. Ji X, Peng D, Zhang Y, et al. Astaxanthin improves cognitive performance in mice following mild traumatic brain injury. *Brain Res*. 2017;1659:88-95.
 29. Tao XG, Shi JH, Hao SY, Chen XT, Liu BY. Protective Effects of Calpain Inhibition on Neurovascular Unit Injury through Downregulating Nuclear Factor-kappaB-related Inflammation during Traumatic Brain Injury in Mice. *Chin Med J (Engl)*. 2017;130(2):187-198.
 30. Hirayama A, Okamoto T, Kimura S, et al. Kangen-karyu raises surface body temperature through oxidative stress modification. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*. 2016;58(3):167-173.
 31. Oowada S, Endo N, Kameya H, Shimmei M, Kotake Y. Multiple

- free-radical scavenging capacity in serum. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*. 2012;51(2):117-121.
32. Biemond P, Swaak AJ, van Eijk HG, Koster JF. Superoxide dependent iron release from ferritin in inflammatory diseases. *Free Radic Biol Med*. 1988;4(3):185-198.
 33. Biemond P, van Eijk HG, Swaak AJ, Koster JF. Iron mobilization from ferritin by superoxide derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes. Possible mechanism in inflammation diseases. *J Clin Invest*. 1984;73(6):1576-1579.
 34. Karve IP, Taylor JM, Crack PJ. The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *Br J Pharmacol*. 2016;173(4):692-702.
 35. Wang G, Zhang J, Hu X, et al. Microglia/macrophage polarization dynamics in white matter after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013;33(12):1864-1874.
 36. Burda JE, Bernstein AM, Sofroniew MV. Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Exp Neurol*. 2016;275 Pt 3:305-315.
 37. Mei T, Kim A, Vong LB, et al. Encapsulation of tissue plasminogen activator in pH-sensitive self-assembled antioxidant nanoparticles for ischemic stroke treatment - Synergistic effect of thrombolysis and antioxidant. *Biomaterials*. 2019;215:119209.
 38. Feliciano CP, Tsuboi K, Suzuki K, Kimura H, Nagasaki Y. Long-term bioavailability of redox nanoparticles effectively reduces organ dysfunctions and death in whole-body irradiated mice. *Biomaterials*. 2017;129:68-82.
 39. Lee SY, Ferrari M, Decuzzi P. Shaping nano-/micro-particles for enhanced vascular interaction in laminar flows. *Nanotechnology*. 2009;20(49):495101.
 40. Walkey CD, Olsen JB, Guo H, Emili A, Chan WC. Nanoparticle size and surface chemistry determine serum protein adsorption and macrophage uptake. *J Am Chem Soc*. 2012;134(4):2139-2147.