

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 8 月 26 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08986

研究課題名(和文) 軽症頭部外傷モデルにおける酸化ストレスと神経炎症の時空間特性の解析

研究課題名(英文) Investigation of spatiotemporal characteristics of oxidative stress and neuroinflammation in mild traumatic brain injury

研究代表者

川内 聡子 (Kawauchi, Satoko)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・防衛医学研究センター 生体情報・治療システム研究部門・准教授)

研究者番号：20506505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、爆発衝撃波に起因する脳損傷の病態・メカニズムを解明するため、独自の衝撃波発生技術を用いたラットモデルを対象に、酸化ストレスと神経炎症の発生の時空間特性を解析した。衝撃波曝露後1～3日の超急性期において、組織障害性が高いと考えられる一酸化窒素が関与する活性酸素生成や脂質過酸化が、大脳皮質の広範な領域に観測され、これと神経炎症との関係が示唆された。受傷後早期の抗酸化剤投与が、病態の進行抑制に有用と考えられ、今後検証が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年爆弾テロの多発により、爆発衝撃波に起因する特異な脳損傷(頭部外傷)が世界的に増加し、とりわけ米国を中心に社会問題となっている。本研究は、衝撃波が脳に及ぼす影響(脳損傷メカニズム)の一端を明らかにしたものであり、その成果は同疾患の医学的対処法の確立や、防護技術開発に必要な基礎データを提供し、国民の安心・安全につながるものと期待される。本研究で用いたレーザーによる衝撃波発生法は、他の衝撃波源では困難な衝撃波曝露時の現象のリアルタイム観察を可能とする特徴を有し、独自性の高いデータを提供する。

研究成果の概要(英文)：To understand the pathophysiology and mechanisms of mild blast-induced traumatic brain injury, we performed analysis of spatiotemporal characteristics of oxidative stress and neuroinflammation in a rat model using our unique technique to generate a shock wave (SW). At Day 1 and Day 3 post-SW-exposure (in super acute phase), generations of highly-toxic reactive oxygen species associated with nitric oxide and lipid peroxidation were observed in the almost entire cortex. Results suggested that these were associated with neuroinflammation. Administration of antioxidants could be one of the potential therapeutic approach, for which further study is required to verify the efficacy.

研究分野：生体医光学

キーワード：軽症頭部外傷 頭部爆傷 酸化ストレス 神経炎症 衝撃波

1. 研究開始当初の背景

近年世界的な爆弾テロの多発により、特異な脳損傷(頭部外傷)を負うケースが急増し、とりわけ米国を中心に社会問題となっている。特に目立った外傷がなく、通常の画像診断で異常が認められないため軽症と診断されながら、めまいや頭痛、記憶障害や社会的行動異常を高率に発症するのが特徴である。このような脳損傷は、爆発に伴う衝撃波に起因すると考えられているが、メカニズムは不明であり、その解明が求められている。爆弾テロは、紛争地のみならず一般市街地においても頻発し、市民の安心・安全のため、世界的にその対策が急務となっている。

我々は、取り扱いが容易で衝撃波エネルギーの再現性・制御性に優れたレーザー誘起衝撃波(Laser-induced shock wave: LISW)を用いた動物モデルを提案し、他の衝撃波源では困難な各種実験を進めている。これまでにラット脳の光学的リアルタイム観察により、脳に出血が起きない強度のLISW適用により、大脳皮質にイオンの恒常性破綻を伴う拡延性脱分極(Spreading depolarization: SD)が発生・伝搬し、衝撃波適用側の大脳皮質全体において低酸素血症が最長約3時間続くことを報告した(S. Sato et al., PLoS ONE, e82891, 2014)。このような脳循環代謝異常は、その後の病理カスケードのトリガーとなりうるが、その詳細は不明である。

一般に生体組織では、低酸素負荷あるいは循環障害後の再灌流により活性酸素が発生し、酸化ストレスにより組織が障害されることが知られる。脳組織において酸化ストレスは、血液脳関門の破綻、神経炎症、さらには異常タンパク質の蓄積等と関係することが知られ、軽症頭部外傷の病態を理解する上で重要な事象と位置付けられる。

2. 研究の目的

本研究は、衝撃波に起因する頭部外傷の病態・メカニズムの解明のため、レーザー誘起衝撃波(LISW)を適用したラットモデルを対象に、酸化ストレスと神経炎症に関連する事象の時空間特性を明らかにするとともに、その発生の分布から、拡延性脱分極の発生および衝撃波圧力伝搬特性との関係につき考察を行う。

3. 研究の方法

(1) LISWのラット脳への適用とSDのリアルタイム観測

LISWは、光吸収体(黒色天然ゴム)と透明プラスチックを接着した構造のターゲットに、高出力パルスレーザーを照射し、そこで誘起されるプラズマの膨張に伴って発生する。先行研究と同様、イソフルラン麻酔下にラット頭部を固定し、左頭頂部頭蓋骨上にターゲットと、その近傍に組織モニタリング用の光ファイバーを設置し、脳実質に出血が起きない強度のLISW(力積25~30 Pa·s, 直径4 mm)を適用し、拡散反射光の多相性変化によりSDの発生を確認した。

(2) 蛍光免疫組織化学染色を用いた酸化ストレスと神経炎症の評価

LISW適用後、1日、3日、7日、28日の各時刻において、ラット脳をかん流固定後摘出し、LISW適用位置の冠状断面で切片を作成し、各種マーカーを用いた免疫染色を行い、蛍光顕微鏡を用いて組織を観察した。評価に用いた各種マーカーは下記のとおりである。

(酸化ストレス)

- 3-Nitrotyrosin (3NT): 一酸化窒素(NO)とスーパーオキシドの反応生成物で、毒性の高いパーオキシナイトライト(ONOO⁻)がタンパク質と反応して産生される物質。
- 4-Hydroxynonenal (4HNE): 脳に豊富な不飽和脂肪酸と活性酸素の脂質過酸化反応による生成物質。
- Superoxide dismutase (SOD): 細胞内に発生した活性酸素を分解する酵素(抗酸化力の指標)。抗酸化力の低下が引き起こす酸化ストレスは、病態の悪化に関係すると考えられる。

(神経炎症関連)

- Glial fibrillary acidic protein (GFAP): 中枢神経系(CNS)の主要タンパク質であり、アストロサイトの活性化マーカー。炎症反応、損傷により発現が上昇する。
- Iba1: ミクログリア/マクロファージの活性化マーカー。ミクログリアは、CNSにおける常在マクロファージ細胞として存在、活性化ミクログリアは神経炎症のマーカーとされる。

4. 研究成果

各種マーカーを用いた免疫組織化学染色の結果は以下の通りであった。

(1) 3-Nitrotyrosin (3NT)

ONOO⁻のマーカーである 3NT は、衝撃波適用 1 日後、大脳皮質の神経細胞と血管（穿通枝）およびくも膜において増加し、3 日後にはさらに増加、その後減少に転じ 7 日後以降はコントロールと同レベルであった。このような変化は、大脳皮質左右両半球の頭頂部から脳底部を含む広範な領域と、これを覆うくも膜に全周性に見られ、SD の伝搬領域との一致性は低く、頭蓋骨を伝搬した衝撃波が、直下の髄膜、大脳皮質に広く作用したものと推察された。衝撃波による ONOO⁻生成のメカニズムについては、神経細胞と血管内皮細胞においては、衝撃波が細胞内カルシウム濃度を上昇させ、これにより一酸化窒素合成酵素 (nNOS および eNOS) が活性化し、NO が大量産生するとともに、ミトコンドリアからスーパーオキシドアニオンが放出され、これと結合した可能性が考えられる。一方、くも膜においては衝撃波の力学的刺激により誘導型 NOS が発現し、NO が産生された可能性が推察される。

(2) 4-Hydroxynonenal (4HNE)

4HNE は、衝撃波適用 1 日後および 3 日後において、大脳皮質の毛細血管に広く発現した (図 1)。その後は減少し、7 日後と 28 日後はコントロールと同レベルであった。4HNE の発現の局在は 3NT と異なったものの、分布が大脳皮質広範に及んだ点において 3NT との類似性が認められた。4HNE は血管壁の透過性や膜受容体および関連酵素の活性に影響を与えることが知られ、血液脳関門の破綻や脳血管異常を引き起こした可能性が推察される。

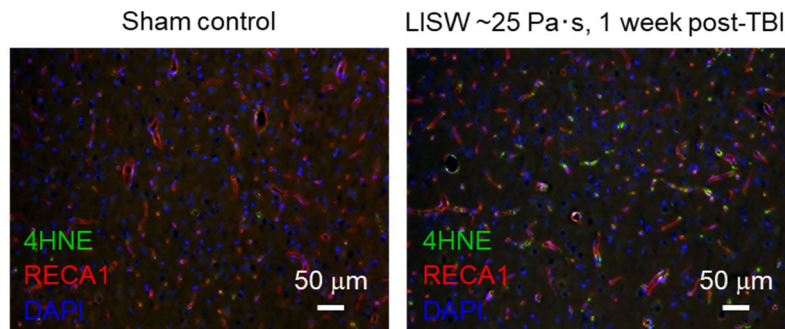


図 1 ラット大脳皮質の 4HNE 蛍光免疫染色画像 : Sham control と衝撃波適用ラットの比較。画像は衝撃波適用側 (左半球) の染色像を示す。衝撃波適用条件では、緑色の 4HNE 陽性領域が、赤色の内皮細胞と重なって分布している。青色の DAPI は細胞核を表す。

(3) Superoxide dismutase (SOD)

SOD (SOD2) は、正常ラットにおいて主として大脳皮質の神経細胞に発現が認められ、衝撃波適用により減少傾向を示した。その時間特性は、上述した 3NT と 4HNE が増加する時間帯 (1 日後および 3 日後) に対応して減少傾向を示し、同時間帯の酸化ストレスに抗酸化作用の低下が関係していると考えられた。

(4) Iba1

活性化ミクログリア様の Iba1 陽性細胞は、衝撃波適用 1 日後に大脳皮質広範に観測され始め、3 日後にはさらに増加傾向を示し、その後 7 日後と 28 日後にはコントロールと同レベルに減少し、3NT の時間特性と類似した。活性化ミクログリアは、傷害性 (M1 型) の場合、炎症性サイトカインやグルタミン酸の他、NO を放出することが知られる。3NT の増加には上述したメカニズムの他、ミクログリアの活性化も関与したかもしれない。

(5) Glial fibrillary acidic protein (GFAP)

上述した 4 つのマーカーが衝撃波適用 1 日後から変化を示したのに対し、GFAP は適用 3 日後から、衝撃波適用直下の皮質軟膜下層および穿通枝血管に局限して発現が認められ、さらに 7 日目まで増加が続き、28 日目にはコントロールと同レベルまで減少、上述した酸化ストレスや神経炎症関連事象と異なる時空間特性を示すことがわかった。このことは、GFAP 発現の衝撃波エネルギー閾値が、上述した 4 つの事象よりも高いことを示しており、衝撃波に起因する脳損傷の複雑さを示唆している。GFAP の発現には、頭蓋骨直下の髄膜に局限した微小出血が関係している可能性が推察される。

本研究において観測した酸化ストレス、神経炎症は、全プロセスのごく一部であるが、その発生の時空間特性から、衝撃波特有の病態メカニズムが明らかになったものと考えている。冒頭述べた SD の発生による低酸素血症の発生、すなわち組織の低酸素負荷は、それぞれものが酸化ストレスを生じうるが、本研究の観察範囲ではこれに一致した分布を示す酸化ストレスの発生は認められず、衝撃波の伝搬特性がより支配的であると考えられた。本研究の観察結果から、受傷

後早期の抗酸化剤投与が、病態の進行抑制に有用と考えられ、今後検証する計画である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hiroshi Nawashiro, Satoko Kawauchi, Yasuyuki Tsunoi, Shunichi Sato	4. 巻 12
2. 論文標題 Time Courses of BOLD Responses During Transcranial Near-Infrared Laser Irradiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Stimul	6. 最初と最後の頁 778-780
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brs.2019.01.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sakiko Kinoshita, Satoko Kawauchi, Takeshi Nagamatsu, Izumi Nishidate, Tomoyuki Fujii, Shunichi Sato	4. 巻 27
2. 論文標題 Real-time Monitoring of Hypoxic-Ischemic Brain Damage in Neonatal Rats Using Diffuse Light Reflectance Spectroscopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Reprod Sci	6. 最初と最後の頁 172-181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s43032-019-00020-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takaaki Maekawa, Takahiro Uchida, Yuka Nakata-Horiuchi, Hiroaki Kobayashi, Satoko Kawauchi, Manabu Kinoshita, Daizoh Saitoh, Shunichi Sato	4. 巻 15
2. 論文標題 Oral Ascorbic Acid 2-glucoside Prevents Coordination Disorder Induced via Laser-Induced Shock Waves in Rat Brain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0230774
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0230774	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Inaba M, Kawauchi S, Adachi T, Sato S, Nishidate I	4. 巻 10711
2. 論文標題 Effects of nitric oxide on cortical hemodynamic responses in the rat brain exposed to a shock wave.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of SPIE	6. 最初と最後の頁 1071111-1-3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1117/12.2319359	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 川内聡子	4. 巻 27
2. 論文標題 レーザー誘起衝撃波を用いた頭部爆傷研究	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 弾道学研究	6. 最初と最後の頁 38-41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 稲葉将来, 川内聡子, 足立健, 佐藤俊一, 西舘泉	4. 巻 RTM-18
2. 論文標題 衝撃波に対する脳内細胞応答に関する研究	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 レーザー学会第524回研究会報告 (ニューロフォトニクス)	6. 最初と最後の頁 19-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawauchi S, Okuda W, Nawashiro H, Sato S, Nishidate I	4. 巻 24
2. 論文標題 Multispectral imaging of cortical vascular and hemodynamic responses to a shock wave: observation of spreading depolarization and oxygen supply-demand mismatch	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Optics	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1117/1.JBO.24.3.035005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Jitsu M, Niwa K, Suzuki G, Obara T, Iwama Y, Hagsawa K, Takahashi Y, Matsushita Y, Takeuchi S, Nawashiro H, Sato S, Kawauchi S	4. 巻 12
2. 論文標題 Behavioral and histopathological impairments caused by topical exposure of the rat brain to mild-impulse laser-induced shock waves: Impulse dependency	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 621546
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fneur.2021.621546	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 9件）

1. 発表者名 Satoko Kawauchi, Masaki Inaba, Yuriiko Muramatsu, Akemi Kono, Yukari Komuta, Izumi Nishidate, Kenichi Kaida, Takeshi Adachi, Shunichi Sato
2. 発表標題 Roles of nitric oxide in shock wave-caused cerebral hemodynamic abnormalities in rats: laser-induced shock wave study
3. 学会等名 4th International Forum on Blast Injury Countermeasures 2019 (IFBIC 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Izumi Nishidate, Takuya Osawa, Masaki Inaba, Satoko Kawauchi, Shunichi Sato
2. 発表標題 Visualization of neurovascular functions in in vivo rat brain using RGB camera-based diffuse reflectance imaging
3. 学会等名 4th International Forum on Blast Injury Countermeasures 2019 (IFBIC 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shunichi Sato, Satoko Kawauchi, Yukari Komuta, Akemi Kono, Yuriiko Muramatsu, Takuya Osawa, Masaki Inaba, Izumi Nishidate, Kenichi Kaida
2. 発表標題 Meningeal damage may be associated with spreading depolarization and glial scar formation in the cortex: laser-induced shock wave study
3. 学会等名 4th International Forum on Blast Injury Countermeasures 2019 (IFBIC 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoshi Tomura, Satoko Kawauchi, Shunichi Sato, Daizoh Saitoh
2. 発表標題 Experimental focal blast vs non-blast traumatic brain injury research: a comparison between laser-induced shock wave model and CCI model
3. 学会等名 4th International Forum on Blast Injury Countermeasures 2019 (IFBIC 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shunichi Sato, Masaki Inaba, Takuya Osawa, Takeshi Adachi, Izumi Nishidate, Satoko Kawauchi
2. 発表標題 Shock wave-induced spreading depolarization and concomitant hemodynamic abnormalities in the rat brain
3. 学会等名 3rd International Conference on Spreading depolarization (iCSD 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoko Kawauchi, Izumi Nishidate, Hiroshi Nawashiro, Shunichi Sato
2. 発表標題 Near-infrared reflectance imaging for monitoring spreading depolarizations and accompanying lesion progression in a rat focal cerebral ischemia model
3. 学会等名 3rd International Conference on Spreading depolarization (iCSD 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaki Inaba, Satoko Kawauchi, Takeshi Adachi, Shunichi Sato, Izumi Nishidate
2. 発表標題 In vivo imaging of shock wave-induced nitric oxide generation in the rat cortex
3. 学会等名 SPIE Photonics West 2020 Biomedical Optics (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大沢拓也, 川内聡子, 佐藤俊一, 西舘泉, 並木美太郎
2. 発表標題 衝撃波頭部曝露による拡延性脱分極, 血行動態異常への衝撃波時間幅の影響 -レーザー誘起衝撃波を用いたラット実験-
3. 学会等名 レーザー学会第534回研究会(光・レーザーの医学・医療応用)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川内聡子, 稲葉将来, 村松佑里子, 幸野明美, 小牟田縁, 西舘泉, 海田賢一, 足立健, 佐藤俊一
2. 発表標題 衝撃波が誘起するラット脳血行動態異常における一酸化窒素の役割
3. 学会等名 爆傷フォーラム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inaba M, Kawauchi S, Adachi T, Sato S, Nishidate I
2. 発表標題 Effects of nitric oxide on cortical hemodynamic responses in the rat brain exposed to a shock wave
3. 学会等名 OPTICS & PHOTONICS International Congress 2018, The 4th Biomedical Imaging and Sensing Conference 2018 (BISC 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sato S, Kawauchi S, Ohsawa T, Nishidate I
2. 発表標題 What laser-induced shock wave can do and cannot do for blast injury research
3. 学会等名 Japan-USA Technical Information Exchange Forum on Blast Injury (JUFBI-2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kawauchi S, Sakamaki M, Komuta Y, Nishidate I, Kaida K, Sato S
2. 発表標題 Real-time observation of physiological changes and their histopathological consequences in the rat brain exposed to a laser-induced shock wave
3. 学会等名 Japan-USA Technical Information Exchange Forum on Blast Injury (JUFBI-2018)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川内聡子
2. 発表標題 レーザー誘起衝撃波を用いた頭部爆傷研究
3. 学会等名 平成30年度弾道学研究会講演会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 稲葉将来, 川内聡子, 足立健, 佐藤俊一, 西舘泉
2. 発表標題 衝撃波に対する脳内細胞応答に関する研究
3. 学会等名 レーザー学会第524回研究会（ニューロフォトニクス）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Inaba M, Kawauchi S, Adachi T, Sato S, Nishidate I
2. 発表標題 Study on the cellular and molecular responses to a shock wave in the rat brain
3. 学会等名 SPIE Photonics West BiOS 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲葉将来, 川内聡子, 足立健, 佐藤俊一, 西舘泉
2. 発表標題 衝撃波による脳血行動態異常の分子動態：ラット頭部レーザー誘起衝撃波曝露モデルを用いた検討
3. 学会等名 平成30年度衝撃波シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大沢拓也, 川内聡子, 佐藤俊一, 西館泉, 並木美太郎
2. 発表標題 爆傷研究を目的としたレーザー誘起衝撃波の圧力特性に関する研究
3. 学会等名 平成30年度衝撃波シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川内聡子, 稲葉将来, 村松佑里子, 幸野明美, 小牟田 縁, 西館 泉, 足立 健, 佐藤俊一
2. 発表標題 衝撃波に曝露したラット脳における一酸化窒素の可視化
3. 学会等名 第18回医用分光学会
4. 発表年 2020年

〔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	佐藤 俊一 (Sato Shunichi) (90502906)	防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、 動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・防衛医 学研究センター 生体情報・治療システム研究部門・教授 (82406)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------