

頭部外傷後高次脳機能障害に対する  
水素治療の効果

おおつか ようへい  
大塚 陽平

(神経病学専攻)

防衛医科大学校

令和5年度

# 目 次

## 第1章 緒言

第1節 頭部外傷後高次脳機能障害	1 頁
第2節 頭部外傷後高次脳機能障害とグリア細胞	2 頁
第3節 頭部外傷によるアストロサイトの機能不全と活性酸素種	3 頁
第4節 水素ガスの薬理作用と頭部外傷に対する治療的効果	4 頁
第5節 Controlled Cortical Impact モデル	5 頁
第6節 本研究の目的	6 頁

## 第2章 対象と方法

第1節 実験動物	7 頁
第2節 マウス中等症頭部外傷モデル作成と水素ガス吸入療法	7 頁
第3節 評価	
第1項 行動実験	8 頁
(1) オープンフィールド試験	8 頁
(2) 高架十字迷路試験	9 頁
(3) Y 迷路試験	9 頁
第2項 神経機能評価	10 頁
第3項 脳浮腫評価	10 頁
第4項 組織学的評価	10 頁
(1) 血液脳関門 (Blood Brain Barrier: BBB) 損傷評価	11 頁
(2) グリア細胞活性評価	11 頁
(3) 神経錐体細胞損傷評価	12 頁
第4節 統計学的解析	13 頁

第3章	結果	
第1節	行動実験	
第1項	オープンフィールド試験	14 頁
第2項	高架十字迷路試験	14 頁
第3項	Y 迷路試験	14 頁
第2節	神経機能評価	15 頁
第3節	脳浮腫評価	15 頁
第4節	組織学的評価	
第1項	血液脳関門損傷評価 (アルブミン染色)	15 頁
第2項	グリア細胞活性評価	
(1)	ミクログリア活性評価 (Iba-1 染色)	16 頁
(2)	アストロサイト活性評価 (GFAP 染色)	16 頁
(3)	急性期における神経炎症評価 (S100B 染色)	17 頁
第3項	神経錐体細胞損傷評価 (Nissl 染色)	17 頁
第4章	考察	
第1節	高次脳機能障害に関する考察	18 頁
第2節	高次脳機能障害に対する水素ガス吸入の効果	19 頁
第1項	脳浮腫に対する効果	19 頁
第2項	神経炎症に対する効果	19 頁
第3項	神経錐体細胞に対する効果	20 頁
第3節	水素ガス治療プロトコールに関する考察	21 頁
第4節	水素治療の可能性	22 頁
第5章	結論	24 頁

謝辭	25 頁
略語一覽	26 頁
参考文献	27 頁
図表	37 頁

## 第1章 緒言

### 第1節 頭部外傷後高次脳機能障害

頭部外傷は外傷の中でも後遺障害が社会生活に及ぼす影響の大きい病態である。頭部外傷の罹患者は報告によりその数は異なるが、あるメタ解析では 349 人/10 万人・年と推計される(1)。頭部外傷患者のうち後遺症として高次脳機能障害を生ずるのは 5-8 人/10 万人・年と考えられ(2)、労働人口にあたる 18 歳～65 歳の年齢層では約 7 万人と推計されている(3)。高次脳機能障害は患者本人の社会復帰を困難にすると同時に、介護者にも大きな負担を強いることから社会に多大な損失をもたらす(4)。

高次脳機能障害は「運動麻痺、感覚障害、認知症などで説明できない中枢神経の障害による言語、認知、動作の障害」と定義され、注意障害、記憶障害、遂行機能障害、情動障害・社会的行動障害(攻撃性、脱抑制、性格変化など)を 4 主徴とする(3)。これら高次脳機能障害の症状の中では記憶障害の頻度が 88% と最も高く、注意障害 71%、遂行機能障害 71%、社会的行動障害 64%と続くと報告されている(5)。

高次脳機能障害の発症には、外力によって生じる機械的な神経ネットワークの破断(一次性脳損傷)のみならず、酸化ストレスや神経炎症等、二次性脳損傷によるグリア細胞や神経細胞への傷害(後述)が深く関与しており(6,7)、受傷後急性期から慢性期にかけて進行性の経過をたどるとされている(8,9)。高次脳機能障害は重症頭部外傷のみならず、軽症や中等症頭部外傷であっても生じ得ることから、高次脳機能障害発症プロセスにおける二次性脳損傷の重要性が示唆される(10)。そのため頭部外傷後の二次性脳損傷への早期治療介入は高次脳機能障害の発症を予防しうると考えられるものの、未だ有効な急性期治療は確立しておらず、現在の治療はリハビリテーションを中心とした対症療法に限られ

ている (11)。しかし、病態確立後の慢性期治療は回復までに長期間を要する上、しばしば永続的な障害が残存する (12)。我々は急性期治療による発症予防は頭部外傷後高次脳機能障害に対する有効な治療戦略となりうると考え、本研究を計画した。

## 第2節 頭部外傷後高次脳機能障害とグリア細胞

頭部外傷後高次脳機能障害の発症にはグリア細胞が深く関与していることが報告されている。脳に分布するグリア細胞は主にアストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイトであるが、中でも頭部外傷後の病態増悪に能動的に関与するのはアストロサイトとミクログリアと考えられている (13-15)。アストロサイトは脳の構造的な構成要素としてのみならず、神経伝達物質や電解質の調整による恒常性維持、血液脳関門 (Blood-Brain Barrier: BBB) の機能維持の役割を担っており、さらに神経ネットワークや記憶形成にも関与することが近年明らかになりつつある (16,17)。ミクログリアは主に中枢神経系の免疫細胞としての役割を持ち、損傷部位での炎症カスケードを惹起する。さらに健常時のミクログリアは学習や記憶の際のシナプス可塑性制御に重要な役割を果たすことが報告されている (18-20)。このようにグリア細胞の正常な活動は高次脳機能の維持に欠かせないものと考えられている。

一方、脳損傷時にもグリア細胞は極めて重要な役割を果たすことが知られている。頭部外傷後、傷害を受けた細胞からのシグナルを受けてアストロサイト、ミクログリアは活性化状態へと変化し、炎症性サイトカインや神経成長因子の放出など、健常時とは異なる働きを示す (13)。この神経炎症反応は脳損傷を最小限に抑え、神経機能回復を促進するために必要不可欠な機能であると考えられているが、グリア細胞の活性制御機構に破綻が生じることで慢性的な活性化

状態の持続、すなわち神経炎症の遷延化が起こる (14,15)。その結果、グリア細胞の正常機能が失われることに加え、慢性炎症が神経細胞変性を招き、記憶障害などの高次脳機能障害につながる事が報告されている (21-23)。

以上より、グリア細胞の過剰な活性化を制御することは脳損傷後の高次脳機能障害予防の重要な治療ターゲットとなりうると考えられている。

### 第3節 頭部外傷によるアストロサイトの機能不全と活性酸素種

アストロサイトの過剰な活性化には活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS)、活性窒素種 (Reactive Nitrogen Species: RNS) が深く関与することが報告されている (24)。ROS とは酸素フリーラジカルを含む酸素分子由来の分子種で、ミトコンドリア内での電子伝達系の代謝副産物として生成される $\cdot\text{O}_2^-$ 、 $\cdot\text{OH}$  (ヒドロキシラジカル)、 $\text{H}_2\text{O}_2$  を指す。また、 $\cdot\text{O}_2^-$  は NO と反応して、RNS である ONOO $^-$  (ペルオキシナイトライト) を生成する (25)。 $\cdot\text{OH}$  と ONOO $^-$  は ROS/RNS の中でも特に反応性が高く、細胞傷害性が強いと言われている。生体内には、スーパーオキシドディスムターゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、カタラーゼといった抗酸化酵素が備わっているが、過剰な ROS / RNS が生体の抗酸化力を上回ると酸化ストレスを生じる (26)。酸化ストレスは頭部外傷に伴う二次性脳損傷の主要因の一つとされ、以下の機序でアストロサイトの機能障害に関与すると考えられている。脳が外傷性損傷を受けると、まず初期にエネルギーの枯渇と細胞内カルシウムイオンの増加が生じる。増加したカルシウムイオンはミトコンドリアでの取り込み亢進により代償されるが、その際にミトコンドリアでは ROS が産生される。産生された ROS は DNA、タンパク質、脂質の過酸化により細胞を傷害し、アポトーシスを誘導する。さらに、ROS はミトコンドリア自体をも傷害し機能不全に至らしめる (27-29)。ミトコンドリアが機能不全

に陥るとカルシウムイオンの緩衝作用が失われ、さらなるカルシウムイオンの急増を招くことになる。グリア伝達においてカルシウムイオンは重要な役割を担っており、カルシウムイオンの恒常性破綻は、グリアーグリア間、グリアー神経細胞間でのシグナル伝達障害の一因となり、グリア細胞活性制御機構破綻を引き起こすこととなる (13)。さらにアストロサイトは脳の抗酸化作用においても中心的な役割を果たしており、アストロサイトの機能障害は酸化ストレスを助長する一因となる (30)。酸化ストレスによるアストロサイトの機能障害は頭部外傷後高次脳機能障害の主要因のひとつであると考えられている (31-33)。

#### 第4節 水素ガスの薬理作用と頭部外傷に対する治療的効果

水素ガス ( $H_2$ ) は元来不活性ガスと考えられてきた。しかし、水素ガスは生体内で $\cdot OH$ と反応して還元作用を示す抗酸化物質である事が明らかになり、さらに2007年に脳虚血再灌流ラットモデルに対して水素ガス吸入が劇的な脳保護効果を示したことが報告されて以降、神経細胞障害の治療として水素ガスに関する研究が盛んに行われるようになった (34)。水素ガスは、適度な抗酸化作用を有し、かつ高い組織移行性を示す点が他の抗酸化物質にはない特長である。水素ガスの還元力は、代表的な抗酸化物質であるビタミンCと比較すると低いにもかかわらず、ROS/RNSの中でも酸化反応性・細胞傷害作用ともに強いとされる $\cdot OH$ およびONOO $\cdot$ と選択的に反応し中和する。その一方で、 $H_2O_2$ やNOなど生理的な役割を持つROS/RNSには影響を与えないとされている (35)。さらに代謝生成物が水のみであり、代謝産物による副作用の懸念もないことから、きわめて安全性が高いと考えられる (35)。また、水素ガスは地球上でもっとも密度の小さい分子であるため拡散力が高く、親水性・疎水性を問わず標的臓器に速やかに到達する。抗酸化物質による治療が最大限の有効性を発揮するには



酸化ストレスが極大となるタイミングで、十分量の抗酸化物質が存在していることが重要である (36)。頭部外傷による ROS / RNS の産生が最も大きいのは受傷直後と考えられており (37)、この高い組織移行性は治療薬としての水素ガスの大きな利点といえる。

水素ガスの主要な作用は ROS / RNS に対する抗酸化作用だが、ミクログリア活性制御や炎症性サイトカインの抑制といった多面的な効果も報告されており、これらが直接的・間接的に作用し、薬理作用を形成すると考えられている (38)。水素ガスは頭部外傷分野においても、認知機能、神経機能の改善 (39-41)、頭部爆傷後のうつ様症状、社会性障害の改善 (42) などの効果が報告されている。しかし、これまでの頭部外傷に対する水素治療の有効性に関する報告は急性期 (7 日以内) の評価に限られており、慢性期 (28 日以降) での高次脳機能障害に対する効果を評価した報告はない。

## 第 5 節 Controlled Cortical Impact モデル

本研究で用いる Controlled Cortical Impact (CCI) モデルは、主に局所性脳損傷を再現する代表的な頭部外傷動物モデルであり、手技にはインパクトとコントロールパネルからなる装置を用いる (43)。速度、損傷の深さ、留置時間を設定すると、電動式インパクトのピストン運動によりインパクト先端のチップが対象に衝突して損傷を与える。CCI の特長としては設定を調整することで、軽症から重症まで様々な重症度のモデルを均一に作成可能な点が挙げられる (43)。

本研究では高次脳機能障害と組織学的な海馬の構造的変化の関連を中心に検討した。これは CCI のような局所性脳損傷モデルにおける高次脳機能障害、特に記憶障害や情動障害・社会的行動障害には海馬の構造的・機能的障害が関与

しているとされるためである (44,45)。海馬の中でも CA3 領域は腹側にあるため CCI による一次性脳損傷の影響を受けづらい。また、海馬の下位領域の中でも特に頭部外傷に伴う二次性脳損傷に脆弱であることが報告されていることから (46)、本研究において海馬 CA3 領域を組織学的評価の対象とした。

## 第 6 節 本研究の目的

高次脳機能障害の予防・治療は頭部外傷分野における重要な研究課題である。水素ガスはその特性から急性期治療に適した治療薬であると考えられる。これまで頭部外傷後に水素ガス吸入を行うことで、急性期の障害を減らすことができるという報告は散見されるものの、亜急性期～慢性期の高次脳機能障害発症を抑制できるか否かに関する報告は渉猟しえた限り見当たらなかった。本研究では中等症 CCI モデルマウスを用いて、頭部外傷後亜急性期～慢性期に出現する高次脳機能障害に対する急性期水素ガス吸入の予防効果を明らかにすることを目的とした。

急性期水素ガス治療効果の判定として脳浮腫の評価を行い、それに引き続くグリア細胞の活性化および神経細胞への影響を組織学的に評価した。そして、海馬 CA3 傷害に関わる高次脳機能障害とされる、記憶障害や情動障害・社会的行動障害の評価を亜急性期～慢性期に行い最終的な効果判定とした。

## 第2章 対象と方法

### 第1節 実験動物

全ての動物実験は防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認を得て行った(承認番号 19015)。実験の全過程において、動物の苦痛と不快を除くべく細心の注意を払った。

対象動物として雄性 C57BL/6 マウス、6-7 週齢(日本エスエルシー、静岡)を合計 120 匹使用した。動物は 20-25°Cの室温下に 12 時間ごとの明暗サイクルのもとで、自由に食餌および飲水が可能な環境で予備飼育したのち実験を行った。

### 第2節 マウス中等症頭部外傷モデル作成と水素ガス吸入療法

中等症頭部外傷は Glasgow Coma Scale (GCS) で 9-12 点のものと定義されるが(47)、動物モデルへそのまま適用することはできないため、過去の文献を参考に「受傷後明らかな神経脱落症状を認めるものの、それらの症状が 1 週間以内に消失するもの」を中等症と定義し(48)、それに相当する傷害を与えることができる CCI 装置の設定を見出し(3mm flat tip、速度 6.0m/s、損傷の深さ 1.5mm、留置時間 0.1 秒)、本実験ではそれを適用した。

マウスを無作為に外傷+非治療群(TBI群)、外傷+水素治療群(TBI+H<sub>2</sub>群)、偽手術群(sham群)の3群に同数ずつ(n=40)振り分けたのちに、中等症頭部外傷モデルを以下のごとく作成した。

3%イソフルランの3分間吸入による麻酔導入後、ブプレノルフィン 0.01mg/kg を腹腔内に投与した。手術中は 1.5-2%イソフルランで麻酔を維持した。TBI群と TBI+H<sub>2</sub>群に対しては頭皮正中切開後、穿頭器を用いて左頭頂部(bregma と lambda の中点、正中から 2mm 外側を中心とする)に 5mm 大の骨窓を設け、骨窓の中心に CCI 装置 (ImpactOne, Leica Microsystems, Inc., IL, USA) を用

い、上記設定で脳挫傷を加えた。

外傷を加えてから 5 分後、マウスを動物実験用気密チャンバー (P-5100、バロテックハニユウダ、東京) に搬入し、TBI+H<sub>2</sub>群に対しては 1.3%水素ガス (水素 1.3%、酸素 21%、窒素 77.7%) を、TBI 群に対しては同チャンバー内で対照ガス (酸素 21%、窒素 79%) をそれぞれ 90 分間投与した。ガスは 2ml/h の流量でチャンバー内を灌流した。その後マウスをホームケージに戻し、通常条件下 (20-25°C、明暗 12 時間、自由飲食) で飼育した。sham 群に対しては頭部外傷を除き、TBI 群と同一の処置を施した。

### 第 3 節 評価

#### 第 1 項 行動実験

頭部外傷後 7、14、28 日目に下記の行動実験を行った (各日各群 n=8)。行動実験を繰り返すことによる学習の影響を排除するため、各回ごと異なる動物グループを使用した。オープンフィールド試験、高架十字迷路試験では、記録した映像を行動解析ソフト (TopScan, Clever System inc., VA, USA) を用いて解析した。Y 迷路試験では記録者は各マウスが属する群を秘匿された状態で観察を行い、盲検性を維持した。

##### (1) オープンフィールド試験

マウスの全般行動、不安行動を観察する目的でオープンフィールド試験を行った (49)。検査室は防音を施し、室内照明は 50-70 ルクス (照明を落とした明るさ) とした。マウスを 50×50×50cm のアリーナ中央に静置し、アリーナ全体が撮影できるよう懸架したビデオカメラでマウスの行動を 10 分間記録した。記録者はマウスをアリーナに移した後、直ちにマウスの視界に入らない場所へ移動

した。指標として総移動距離、アリーナ中央での滞在時間／移動距離、無動時間、探索行動、警戒行動、排泄回数を記録した。

## (2) 高架十字迷路試験

マウスの不安行動を観察するため高架十字迷路試験を行った (50)。検査室の条件はオープンフィールド試験と同一とした。25×7cm の 4 本のアームと中央 7cm 四方の正方形の板からなる十字迷路を床から 50cm の高さに設置した。4 本のアームのうち 2 本には高さ 15cm の不透明な壁を設けクローズドアームとした。マウス逃走防止のため迷路周囲に仕切りを設置した。鼻先をオープンアームに向けた状態で、マウスを中央に静置し、オープンフィールド試験同様マウスの行動をビデオカメラで 10 分間記録した。指標として総移動距離、各アームへの侵入回数、クローズドアーム／オープンアームでの滞在時間、クローズドアーム／オープンアームへの侵入回数を記録した。アームへの侵入は尻尾を除くマウスの体全体が入った状態と定義した。

## (3) Y 迷路試験

マウスの作業記憶を評価する目的で Y 迷路試験を行った (50)。検査室の条件はオープンフィールド試験と同一とした。高さ 10cm の斜壁面を有する 40×7cm の 3 本のアーム (A, B, C) と正三角形の中央部分からなる Y 字迷路を床から 50cm の高さに設置した。観察者はマウスを中央部分に静置した後、観察可能な範囲で極力マウスの視界に入らない位置へ移動し、8 分間各アームへの侵入順序を記録した。アームへの侵入は尻尾を除くマウスの体全体が入った状態と定義した。前回と異なるアームに侵入した場合を正解 (A→B→C と移動した場合は 2 回正解、A→B→A と移動した場合は 1 回正解) と定義し、Alteration index = 正解

数／総侵入回数を指標として用いた。

## 第2項 神経機能評価

受傷後 1、3、7、14、28 日目に麻痺や感覚障害などの神経機能評価を行った (各日各群 n=8)。検査室の条件はオープンフィールド試験と同一とした。評価には modified Neurological Severity Score (mNSS) を用いた (48)。テストは表 2 に示す 10 項目で構成され、課題を失敗した場合に 1 点を付与した (正常 0 点～最重症 10 点)。神経機能評価では記録者は各マウスが属する群を秘匿された状態で観察を行い、盲検性を維持した。

## 第3項 脳浮腫評価

脳浮腫の評価を行うため、受傷後 1 日目に乾燥重量法を用いた脳水分含有量 (Brain Water Content: BWC) を測定した (51) (各群 n=8)。マウスに 5%イソフルランを 5 分間吸入させ、頸椎脱臼したのち、ただちに氷上で脳を摘出した。摘出脳を半割し、左右大脳半球の重量を測定し湿潤重量とした。その後、100°C のオーブンで 48 時間熱乾燥処理後に再度重量を測定し乾燥重量とした。以下の式より BWC を算出した。

$$\text{BWC (\%)} = (\text{湿潤重量} - \text{乾燥重量}) / \text{湿潤重量} \times 100$$

## 第4項 組織学的評価

二種混合麻酔薬 (塩酸ケタミン+塩酸キシラジン) の腹腔内投与によりマウスに麻酔を施し、氷冷した 4%パラホルムアルデヒドで経心灌流固定を行った。摘出した脳を同固定液に一晩浸漬した。その後、脳を Bregma から尾側 2mm の位置で冠状切片に切り出し、70%エタノールに浸漬した。パラフィン包埋処理

後、厚さ 2 $\mu$ m の標本として作製し、後述する各種組織染色を行った。

標本の観察・撮影は蛍光顕微鏡 (BZ-710、キーエンス株式会社、大阪)を用いて行い、画像の解析は顕微鏡付属のアプリケーションを用いた。観察・解析は各マウスが属する群を秘匿された 2 人の観察者によって行い、その平均値をパラメータとして用いた。

#### (1) 血液脳関門 (Blood Brain Barrier: BBB) 損傷評価

BBB 損傷を評価するため、受傷後 1 日目にアルブミン免疫染色を行った (各群 n=8)。アルブミンは分子量約 66,000 と血清タンパク質の中では比較的小さいが、通常 BBB 透過性はなく、損傷箇所でのみ血管外に漏出するため BBB 損傷の良い指標となる (52)。

95°C で 15 分間加熱法にて抗原賦活化を行い、4°C で 1 晩一次抗体 rabbit polyclonal anti-albumin (proteintech, 16475-1-AP; 1:1000) を反応させたのち、室温で 1 時間二次抗体 Alexa-647-conjugated donkey anti-rabbit (Abcam, ab150075; 1:500) を反応させた。染色後、脳全体を撮影し、陽性部分の面積と脳全体面積を計測した。アルブミン漏出率 (%) = 陽性部分面積 / 全体面積  $\times$  100 を指標として用いた。

#### (2) グリア細胞活性評価

海馬 CA3 領域でのアストロサイト活性とミクログリア活性を評価するため、受傷後 1、3、7、14、28 日目にそれぞれ glial fibrillary acidic protein (GFAP) と Ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba-1) による免疫染色を行った (各日各群 n=8)。GFAP はアストロサイト特異的な中間系フィラメントタンパク質のひとつであり、アストロサイトの活性を反映して発現が増強する (53)。Iba-1 は中

中枢神経系ではミクログリアに特異的に発現するため、マーカーとして頻用される (23)。ミクログリア活性が上昇すると、数の増加に加え amoeboid 様の形態変化がみられ発現が増強することから、Iba-1 発現量はミクログリア活性の指標となる。

手技はアルブミン染色と同様の工程で行った。用いた抗体は以下の通りである。一次抗体：① chicken polyclonal anti-GFAP (Abcam, ab4674; 1:1000)、② rabbit polyclonal anti-Iba-1 (Abcam, ab178846 1:500)、二次抗体：① Alexa-488-conjugated goat anti-chicken (Abcam, ab150173; 1:500)、② Alexa-647-conjugated donkey anti-rabbit (Abcam, ab150075; 1:500)。染色後、受傷側海馬 CA3 領域を 400 倍で写真撮影し、範囲内における陽性部分の面積を指標として用いた。

上記に加え、急性期における神経炎症を評価するため受傷後 3 日目に GFAP と S100B の蛍光二重染色を行った (各群 n=8)。S100B はアストロサイトにより分泌され、細胞外空間や血中に拡散するカルシウム結合タンパクで、脳損傷に伴う神経炎症に関与する因子である。S100B の血清濃度は重症度を反映することが知られ、神経疾患の一次的な診断材料として利用される (13)。手技はアルブミン染色と同様の工程で行った。用いた抗体は以下の通りである。一次抗体：① chicken polyclonal anti-GFAP (Abcam, ab4674; 1:1000)、② rabbit polyclonal anti-S100B (GeneTex, GTX129573; 1:3000)、二次抗体：① Alexa-488-conjugated goat anti-chicken (Abcam, ab150173; 1:500)、② Alexa-647-conjugated donkey anti-rabbit (Abcam, ab150075; 1:500)。染色後、受傷側海馬 CA3 領域を 400 倍で写真撮影し、範囲内における陽性部分の面積を指標として用いた。

### (3) 神経錐体細胞損傷評価

海馬 CA3 での神経錐体細胞損傷の評価のため、受傷後 7、28 日目に Nissl 染



色を行った (52) (各日各群 n=8)。1%クレシルバイオレット溶液 (Sigma Aldrich, USA) に 20 分間浸漬したのち、95%エタノールで脱色した。受傷側および非受傷側の海馬 CA3 領域を 400 倍で写真撮影し、範囲内の非損傷神経錐体細胞をカウントした。核凝縮や形態変化を認めるものを損傷神経錐体細胞とし除外した (図 12)。神経錐体細胞損傷の指標は海馬 CA3 領域における受傷側と非受傷側の錐体細胞数の比率で評価した。なお、左右の側脳室の大きさが 20%以上異なる標本は左右非対称のため評価に適さないとして除外し、最終的に各日各群 n=5-7 で評価を行った。

#### 第 4 節 統計学的解析

全ての統計学的解析は Graphpad Prism 8.4.3 (Graphpad Software Inc., CA, USA) を用いて行った。データの 3 群間比較は one-way analysis of variance (ANOVA) を用い、事後の多重比較は Tukey's honestly significant difference test (HSD) の方法を用いて行った。有意水準は 0.05 とした。数値は平均値 ± 標準誤差で表記した。

## 第3章 結果

### 第1節 行動実験

#### 第1項 オープンフィールド試験

受傷後7日目には3群間で総移動距離に有意差を認めなかったが、14日目には、TBI群においてTBI+H<sub>2</sub>群、sham群と比較し有意に総移動距離の延長が認められた(それぞれ  $p<0.05$ 、 $p<0.01$ )。また、同様に28日目にもTBI群でTBI+H<sub>2</sub>群、sham群と比較し有意に総移動距離の延長を認めた(それぞれ  $p<0.05$ 、 $p<0.01$ ) (図3)。その他のすべての指標では全観察期間で3群間に有意差は認められなかった。

#### 第2項 高架十字迷路試験

受傷後7日目において、TBI群ではsham群と比較し有意にクローズドアームへの侵入頻度が低かった ( $p<0.05$ )。滞在時間には有意差は認められなかった。一方、TBI+H<sub>2</sub>群ではクローズドアームへの侵入頻度、滞在時間ともにsham群と有意差は認めなかった。受傷後14日目では7日目同様、TBI群でsham群と比較し有意にクローズドアームへの侵入頻度が低かった ( $p<0.05$ ) が、やはり滞在時間に有意差は見られなかった。TBI+H<sub>2</sub>群ではクローズドアームへの侵入頻度、滞在時間ともにsham群と有意差は認めなかった。28日目ではTBI群ではTBI+H<sub>2</sub>群、sham群と比較し有意にクローズドアームへの侵入頻度が低く(それぞれ  $p<0.05$ 、 $p<0.01$ )、また、クローズドアームでの滞在時間も有意に少なかった(それぞれ  $p<0.05$ 、 $p<0.05$ ) (図4A,B)。総移動距離、総侵入回数はTBI群で多い傾向が認められたものの統計学的な有意差は得られなかった。

#### 第3項 Y迷路試験

受傷後 7 日目では 3 群間に有意差は認めなかったが、受傷後 14 日目では TBI 群は sham 群と比較し、有意に alteration index の低下を認めた ( $p<0.05$ )。TBI 群と TBI+H<sub>2</sub> 群、TBI+H<sub>2</sub> 群と sham 群の間に有意差は認められなかった。受傷後 28 日目には TBI 群では TBI+H<sub>2</sub> 群、sham 群と比較し、有意に alteration index の低下を認めた(それぞれ  $p<0.05$ 、 $p<0.05$ ) (図 5)。

## 第 2 節 神経機能評価

mNSS を用いて評価した神経機能スコアは、受傷後 1、3 日目において TBI 群、TBI+H<sub>2</sub> 群では sham 群と比較して有意に高い値を示した。両日とも TBI 群と TBI+H<sub>2</sub> 群間で有意差は認められなかった。受傷後 7、14、28 日目においては TBI 群、TBI+H<sub>2</sub> 群の神経機能スコアは改善し、sham 群を含む 3 群間で有意差を認めなかった (図 6)。

## 第 3 節 脳浮腫評価

受傷後 1 日目に評価した BWC は受傷側において TBI 群  $79.5\pm 0.1\%$ 、TBI+H<sub>2</sub> 群  $79.1\pm 0.1\%$ 、sham 群  $78.8\pm 0.1\%$  であり、TBI 群では TBI+H<sub>2</sub> 群、sham 群に対して有意に高値であった (それぞれ  $p<0.05$ 、 $p=0.0005$ ) (図 7A)。非受傷側では TBI 群  $79.0\pm 0.1\%$ 、TBI+H<sub>2</sub> 群  $78.7\pm 0.1\%$ 、sham 群  $78.6\pm 0.1\%$  であり、TBI 群では sham 群に対して有意に高値であった ( $p<0.05$ ) (図 7B)。受傷側、非受傷側ともに TBI+H<sub>2</sub> 群と sham 群の間に有意差は認められなかった。

## 第 4 節 組織学的評価

### 第 1 項 血液脳関門損傷評価 (アルブミン染色)

受傷後 1 日目での BBB 損傷の指標としてアルブミン漏出率を評価した。sham

群ではアルブミン漏出はほとんど見られなかったのに対し、TBI+H<sub>2</sub>群では受傷部位周囲に漏出像がみられ、TBI群では受傷部位のみならず、神経線維束に沿って受傷側皮質下、そして脳梁を介して対側に至る広範な漏出像が観察された(図8A)。定量的評価ではアルブミン漏出率はそれぞれTBI群 16.9±1.5%、TBI+H<sub>2</sub>群 8.0±2.0%、sham群 1.5±0.2%であり、TBI+H<sub>2</sub>群でもsham群と比較して有意に高値であったものの(p<0.05)、TBI群ではTBI+H<sub>2</sub>群、sham群に対して有意にアルブミン漏出率は高かった(それぞれ p=0.0008、p<0.0001)(図8B)。

## 第2項 グリア細胞活性評価

### (1) ミクログリア活性評価 (Iba-1 染色)

ミクログリア活性はTBI群、TBI+H<sub>2</sub>群において受傷後1日目から上昇傾向を認めたが統計学的有意差は認められなかった。TBI群においては受傷後7日目に活性のピークが認められ、時間経過とともに活性低下傾向を示すも、受傷後28日目においてもTBI+H<sub>2</sub>群、sham群と比較し有意に活性が高く、炎症の遷延が示唆された。一方TBI+H<sub>2</sub>群では受傷後3日目に活性のピークを認め、徐々に活性は低下し、受傷後7日目以降sham群と有意差は認められなかった(図9)。

### (2) アストロサイト活性評価 (GFAP 染色)

GFAP染色でみたアストロサイト活性はTBI群ではsham群と比較し、受傷後1日目から28日目までのすべての時期で有意に高かった。さらにTBI群とTBI+H<sub>2</sub>群を比較した場合でもやはり受傷後1日目から28日目までのすべての時期で有意に高かった。TBI+H<sub>2</sub>群ではsham群と比較し、受傷後3日目、7日目で有意に高い活性が確認されたが、14日目以降、sham群と有意差は認められな

った。TBI群、TBI+H<sub>2</sub>群どちらの群も3日目にアストロサイト活性のピークが認められた(図10)。

### (3) 急性期における神経炎症評価(S100B染色)

急性期における神経炎症の指標として、受傷後3日目でのS100Bを免疫染色で評価した。S100B陽性範囲はGFAP染色陽性となったアストロサイトの細胞体とほぼ一致していた(図11A)。S100B陽性範囲の面積はTBI群 $3168.2 \pm 445.7$ 、TBI+H<sub>2</sub>群 $1274.8 \pm 159.2$ 、sham群 $204 \pm 34.9$ であり、TBI+H<sub>2</sub>群はsham群より有意に高値であったが( $p < 0.05$ )、TBI群ではTBI+H<sub>2</sub>群、sham群と比較し有意に高値であった(それぞれ $p < 0.001$ 、 $p < 0.0001$ )(図11B)。

### 第3項 神経錐体細胞損傷評価(Nissl染色)

受傷後7日目ではTBI群でTBI+H<sub>2</sub>群、sham群と比較し、有意に海馬CA3領域の錐体細胞数減少が認められた(それぞれ $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ )。TBI+H<sub>2</sub>群とsham群の間に有意差は認められなかった。受傷後28日目ではTBI群でTBI+H<sub>2</sub>群、sham群と比較し、有意に海馬CA3領域の錐体細胞数減少が認められた(それぞれ $p < 0.05$ 、 $p < 0.0001$ )。TBI+H<sub>2</sub>群においてもsham群と比較し、錐体細胞減少が認められた( $p < 0.05$ )(図12)。

## 第4章 考察

### 第1節 高次脳機能障害に関する考察

本研究では受傷後7日目以降、TBI群でオープンフィールド試験での総移動距離の延長、高架十字迷路でのオープンアームへの侵入回数／滞在時間増加、Y迷路試験での作業記憶障害を認めた。神経機能評価では7日目以降は明らかな神経学的異常所見を認めておらず、行動実験で見られた行動変容は高次脳機能障害を反映しているものと考えられた。各試験で特に28日目にTBI群での行動変容が顕著に認められ、進行性の病態であることが示唆された。

オープンフィールド試験における過活動は頭頂部CCI損傷後に見られる典型的な症状の一つであり、嗅球-海馬-嗅内野皮質経路の障害と考えられている(54)。さらに、古典的にはオープンフィールドでの高い活動性は不安がより少ないことを反映しているとされており、高架十字迷路で得られた抗不安様行動の結果とも整合性がとれる。記憶や学習に関して海馬が中心的な役割を担うことは意見が一致しており(44,45)、Y迷路試験での作業記憶障害は海馬障害として了解可能である。本実験で見られた行動異常は、頭頂部CCIモデルを用いた過去の報告と矛盾せず(49)、主に海馬損傷に起因する高次脳機能障害を反映したものであったと考える。海馬は神経新生が活発な部位であることから、脳組織の中でも特に二次性脳損傷の影響を受けやすいと言われており(55)、本研究で受傷後7日目には麻痺や感覚障害など粗大な神経機能が回復したにもかかわらず海馬の機能障害が持続したのもそれが理由のひとつであると考えられる。

頭部外傷後にしばしばみられる不安の表出とされる行動(オープンフィールド試験での中央領域回避、高架十字迷路試験でのクローズドアーム嗜好性)(50)は、本実験では認められなかった。報告により行動実験の結果に差異がある点には注意が必要であるが、モデルや重症度の違いにより高次脳機能障害の表現

型が異なることが報告されており (56)、今回のモデルは頭部外傷後の不安を評価する上では不適當であった可能性がある。症状特異的な治療薬の効果を見るうえではモデル選択も重要であることが示唆された。

## 第2節 高次脳機能障害に対する水素ガス吸入の効果

本研究ではマウス中等症 CCI モデルにおいて、急性期水素ガス吸入により受傷後亜急性期 (14 日目) から慢性期 (28 日目) における行動変容が抑制されたことを示した。水素ガス吸入による上記効果の報告は本研究が初である。

### 第1項 脳浮腫に対する効果

本研究ではまず、受傷後 1 日目での脳浮腫、BBB 障害の抑制効果が確認された。この結果は頭部外傷に対する水素治療の効果を見たこれまでの報告と一致する (51,57)。頭部外傷後の脳浮腫、BBB 障害は受傷後早期にみられる二次性変化の代表的なものであり、脳浮腫による頭蓋内圧亢進、微小循環の悪化は神経炎症など、より慢性期にみられる障害の増悪因子となりうる (58)。脳浮腫には受傷直後の代謝異常に起因する細胞毒性浮腫 (cytotoxic edema) と BBB 破綻に伴う血管原生浮腫 (vasogenic edema) の2つのフェイズがあるとされる (59)。ROS / RNS は BBB 破綻を引き起こすことが報告されており (59)、本研究の結果からは水素ガスが抗酸化作用を介して vasogenic edema を抑制した可能性が示唆された。受傷後超急性期における脳浮腫の抑制は以後の神経炎症などに対し抑制的に作用することも報告されており (60)、高次脳機能障害発症予防に寄与した可能性がある。

### 第2項 神経炎症に対する効果

本研究では水素ガス吸入の神経炎症に対する効果に関して 2 つの知見を得た。ひとつが受傷後亜急性期～慢性期における海馬でのアストロサイト、ミクログリアの活性遷延化抑制効果であり、もうひとつが受傷後急性期における S100B 発現抑制効果である。

S100B は中枢神経ではアストロサイトに特異的に発現するカルシウム結合タンパク質で炎症性メディエーターの一つであると考えられている。作用は濃度依存性と考えられており、低濃度では神経保護的に作用する一方、高濃度では神経傷害性を示すとされる (61)。高濃度の S100B はアストロサイト、ミクログリアの活性化を誘導することが報告されており、神経炎症の遷延化を引き起こす一因と考えられている (62)。遷延性神経炎症は神経細胞死を誘導することが知られており、高次脳機能障害との関連が指摘されている (63)。水素ガスはくも膜下出血モデルにおいて S100B の発現を抑制したとする報告があり (64)、本研究の結果と一致する。本研究におけるアストロサイト、ミクログリアの活性遷延化抑制には、水素ガス吸入による急性期での S100B の抑制が寄与したと考えられた。これは急性期の神経炎症の抑制が亜急性期～慢性期における神経炎症の遷延化の予防につながる可能性があることを示唆している。

### 第 3 項 神経錐体細胞に対する効果

本研究では受傷後 7 日目、28 日目での海馬錐体細胞の減少抑制効果が確認された。神経細胞は ROS の主要な発生源であり (29)、かつ神経細胞自体の抗酸化機構は脆弱であることから (65)、酸化ストレスが神経細胞死に深く関与していることが報告されている。神経細胞死には、ROS / RNS による直接的な細胞損傷に加え、上記 BBB 障害、脳浮腫、神経炎症すべてが増悪因子として関与すると報告されている (6)。本研究は主に頭部外傷後高次脳機能障害と海馬の構



造的变化との関連を見たものであり、どの要因が、どの程度高次脳機能障害抑制に寄与したのかは明らかにできていない。分子生物学的機序の解明については今後の課題としたい。

### 第3節 水素ガス治療プロトコールに関する考察

本研究では 1.3%水素ガスを受傷 5 分後から 90 分間投与する治療プロトコールを採用した。水素ガスは空気と混合した場合、約 4-75%の広い範囲で爆発性を有するため、臨床応用を考えた場合、水素濃度の上限は 4%である。虚血再灌流モデルに対して水素ガス吸入の効果を濃度別に見た研究 (34) では、その治療効果は  $1\% < 4\% \leq 2\%$  の順に高かったと報告されており、治療効果は必ずしも濃度依存的でないことが示唆されている。これは水素ガス吸入時の脳組織中水素濃度は 2%と 4%水素ガス吸入時で差がなく、2%水素ガス吸入で組織濃度が飽和するという報告と一致する (66)。一方で、同実験で 1%水素ガスでは十分な脳組織中の水素濃度は得られなかったともされている。本研究含め、1.3%水素ガス吸入で治療効果が認められたとする報告は多いが (52,64)、2%水素ガスを用いた場合さらなる改善効果が得られる可能性はある。しかしながら、1.3%という濃度が、高圧ガス保安法で定められる水素・空気混合ガスボンベ形態での水素ガスの最高濃度であり、外傷後早期での水素ガス治療の臨床応用を考えた場合、この利用形態がもっとも実用性が高いと考え、本研究ではそれを用いた。

また、水素ガスによる治療開始タイミングの検討を行った研究では「虚血時から再灌流後 30 分まで」、「再灌流 5 分前から再灌流後 30 分まで」、「再灌流開始の 5 分前まで」の 3 通りの治療タイミングが検討され、このうち、虚血時から再灌流後 30 分まで水素ガス吸入を行った群での治療効果が有意に高かった一方、再灌流前に投与を終了した群では治療効果が見られなかったことが報告さ

れている (34)。虚血再灌流モデルにおいては再灌流時に ROS 発生が最大となるため、この結果は「治療効果を得るためには十分量の H<sub>2</sub> が標的臓器に存在している必要があること」、さらに「水素ガスは投与中止後、比較的早期に体内から消失すること」を示唆している。頭部外傷では受傷前からの水素ガス投与は臨床にそぐわないため、本研究では受傷直後を開始タイミングとした。治療期間に関しては、本研究では 1 回のみ 90 分間の水素ガス投与を行ったが、頭部外傷モデルに対し水素ガスを用いた過去の報告では、受傷直後から 1 週間 1 日 2 回、1 時間ずつ投与するもの (41)、1 回 6 時間ずつとするもの (42)、など治療期間は報告により異なっている。ROS の発生様式からは本研究での受傷後早期のタイミングが投与時期として最も重要であると判断したが、ROS は外傷後も一定期間発生しているとする報告もあることを考慮すると (29)、一定期間治療を行うことで治療効果が高まる可能性があるかと推察される。現時点で明確な根拠となる報告はないため、水素ガス治療の開始時期および治療期間に関しては、今後の研究課題と考える。

#### 第 4 節 水素治療の可能性

現時点で頭部外傷後高次脳機能障害に対して臨床で使用できるエビデンスの高い急性期治療薬はない。頭部外傷は神経炎症、脳浮腫、酸化ストレス、神経興奮毒性など種々の因子が様々な程度で作用しあう非常に不均一な病態であるためか、動物実験で効果が確認された治療薬も、臨床試験で思うような結果が得られていない現状にある。このことは、神経炎症も生理的範囲であれば神経保護的に作用するため、強い抗炎症作用を持つ薬剤が症例によってはむしろ逆効果となったり、あるいは治療薬自体の副作用が効果を打ち消してしまっていることが原因かもしれない (10)。本研究で用いた水素ガスは、細胞傷害性 ROS

/ RNS のみに作用する特徴から生理的作用を阻害することなく、代謝産物による副作用の懸念もない。また、取り扱いも容易かつ安価なため、頭部外傷後急性期に全症例に投与するといった運用も不可能ではない。さらに、その組織移行性の高さから分子状水素は水素ガス吸入に限らず、水素水の飲用や点滴での投与など投与経路を問わず効果を発揮するといわれている点も臨床応用に適していると考えられる (35)。COVID-19 の影響で中止されてしまったが、心停止後症候群に対する水素ガス吸入治療が先進医療の枠組みで実臨床において行われ、良好な結果が報告されたこと (67) からも、頭部外傷に対する水素治療の臨床応用実現への期待感がもてる。以上から水素治療は頭部外傷に対する次世代の治療戦略として実現可能性の高いものであると期待する。一方で、水素治療をはじめとする急性期治療は、治療開始タイミングの遅れにより治療効果が減弱する可能性があることには留意しなければならない。今後、臨床応用できるよう検討を重ねていきたいと考える。

## 第5章 結論

頭部外傷後、急性期の水素ガス吸入は受傷後14日～28日目での高次脳機能障害を抑制した。頭部外傷後慢性期における水素ガス吸入の治療効果をみた報告は本研究が初であり、その作用は脳浮腫抑制、海馬におけるグリア細胞活性制御など複合的な要素によってもたらされたものであることが示唆された。急性期水素ガス吸入療法が頭部外傷後高次脳機能障害に対する新たな治療手段となる可能性がある。

## 謝辞

本研究にあたり、ご指導ご鞭撻を賜りました防衛医科大学校脳神経外科学講座教授 和田孝次郎先生、防衛医学研究センター外傷研究部門教授 戸村哲先生に深謝いたします。また、動物の飼育、各種実験手技に関してご指導賜りました防衛医学研究センター外傷研究部門 須藤有希様、島田美奈子様には厚く御礼申し上げます。本研究を遂行するにあたって、多義に渡りご支援ご尽力いただきました防衛医科大学校脳神経外科学講座の皆様、防衛医学研究センター外傷研究部門の皆様、共同利用研究施設の皆様に心より感謝申し上げます。

## 略語一覧

- ANOVA analysis of variance 分散分析
- BBB Blood-Brain Barrier 血液脳関門
- BWC Brain Water Content 脳水分含有量
- CCI Controlled Cortical Impact 制御皮質衝撃
- DAMPs Damaged-Associated Molecule Pattern 損傷関連分子パターン
- GCS Glasgow Coma Scale グラスゴーコーマスケール
- GFAP glial fibrillary acidic protein グリア線維性酸性蛋白質
- Iba-1 Ionized calcium-binding adapter molecule 1 イオン化カルシウム結合  
アダプター因子 1
- mNSS modified Neurological Severity Score 改定神経学的重症度スコア
- RNS Reactive Nitrogen Species 活性窒素種
- ROS Reactive Oxygen Species 活性酸素種

## 参考文献

1. Selassie Anbesaw W, Zaloshnja Eduard, Langlois Jean A., Miller Ted, Jones Paul, Steiner Claudia. Incidence of Long-term Disability Following Traumatic Brain Injury Hospitalization, United States, 2003. *Journal of Head Trauma Rehabilitation*. 2008;23(2):123-31.
2. 高村政志, 丸林徹, 三原洋祐. 熊本県頭部外傷データベース - これまでの経過とこれからの課題 -. *神経外傷*. 1998;21:118-24
3. 中島八十一, 寺島彰. 高次脳機能障害ハンドブック - 診断・評価から自立支援まで. 医学書院, 東京, pp.1-20,2006.
4. Adnan A Hyder, Colleen A Wunderlich, Prasanthi Puvanachandra, G Gururaj, Olive C Kobusingye. The impact of traumatic brain injuries: a global perspective. *Neurorehabilitation*. 2007;22:341-53.
5. 蜂須賀研二, 加藤徳明, 岩永勝. 日本の高次脳機能障害者の発症数. *高次脳機能研究*. 2011;31:143-50.
6. Mark W Greve, Brian J Zink. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Mt Sinai J Med*. 2009 Apr;76(2):97-104.
7. Oliver I Schmidt, Christoph E Heyde, Wolfgang Ertel, Philip F Stahel. Closed head injury--an inflammatory disease? *Brain Res Brain Res Rev*. 2005 Apr;48(2):388-99.
8. David Tweedie, Lital Rachmany, Vardit Rubovitch, Elin Lehrmann, Yongqing Zhang, Kevin G Becker, Evelyn Perez, Jonathan Miller, Barry J Hoffer, Nigel H Greig, Chaim G Pick. Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist prevents mTBI-induced changes in hippocampus gene expression and memory deficits in mice. *Exp Neurol*. 2013 Jan;239:170-82.
9. Megan M Muccigrosso, Joni Ford, Brooke Benner, Daniel Moussa, Christopher

Burnsides, Ashley M Fenn, Phillip G Popovich, Jonathan Lifshitz, Fredrick Rohan Walker, Daniel S Eiferman, Jonathan P Godbout. Cognitive deficits develop 1 month after diffuse brain injury and are exaggerated by microglia-associated reactivity to peripheral immune challenge. *Brain Behav Immun.* 2016 May;54:95-109.

10. Andrew I R Maas, David K Menon, P David Adelson, Nada Andelic, Michael J Bell, Antonio Belli, Peter Bragge, Alexandra Brazinova, András Büki, Randall M Chesnut, Giuseppe Citerio, Mark Coburn, D Jamie Cooper, A Tamara Crowder, Endre Czeiter, Marek Czosnyka, Ramon Diaz-Arrastia, Jens P Dreier, Ann-Christine Duhaime, Ari Ercole, Thomas A van Essen, Valery L Feigin, Guoyi Gao, Joseph Giacino, Laura E Gonzalez-Lara, Russell L Gruen, Deepak Gupta, Jed A Hartings, Sean Hill, Ji-yao Jiang, Naomi Ketharanathan, Erwin J O Kompanje, Linda Lanyon, Steven Laureys, Fiona Lecky, Harvey Levin, Hester F Lingsma, Marc Maegele, Marek Majdan, Geoffrey Manley, Jill Marsteller, Luciana Mascia, Charles McFadyen, Stefania Mondello, Virginia Newcombe, Aarno Palotie, Paul M Parizel, Wilco Peul, James Piercy, Suzanne Polinder, Louis Puybasset, Todd E Rasmussen, Rolf Rossaint, Peter Smielewski, Jeannette Söderberg, Simon J Stanworth, Murray B Stein, Nicole von Steinbüchel, William Stewart, Ewout W Steyerberg, Nino Stocchetti, Anneliese Synnot, Braden Te Ao, Olli Tenovuo, Alice Theadom, Dick Tibboel, Walter Videtta, Kevin K W Wang, W Huw Williams, Lindsay Wilson, Kristine Yaffe, for the InTBIR Participants and Investigators. Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research. *Lancet Neurol.* 2017;16:987–1048
11. Ramon Diaz-Arrastia, Patrick M Kochanek, Peter Bergold, Kimbra Kenney, Christine E Marx, Col Jamie B Grimes, L T C Yince Loh, L T C Gina E Adam,



- Devon Oskvig, Kenneth C Curley, Wanda Salzer. Pharmacotherapy of traumatic brain injury: state of the science and the road forward: report of the Department of Defense Neurotrauma Pharmacology Workgroup. *J Neurotrauma*. 2014 Jan 15;31(2):135-58.
12. Evan M Lutton, Roshanak Razmpour, Allison M Andrews, Lee Anne Cannella, Young-Jin Son, Vladimir V Shuvaev, Vladimir R Muzykantov, Servio H Ramirez. Acute administration of catalase targeted to ICAM-1 attenuates neuropathology in experimental traumatic brain injury. *Sci Rep*. 2017 Jun 19;7(1):3846.
  13. Venkata S S S Sajja, Nora Hlavac, Pamela J VandeVord. Role of Glia in Memory Deficits Following Traumatic Brain Injury: Biomarkers of Glia Dysfunction. *Front Integr Neurosci*. 2016 Feb 29;10:7.
  14. Maria Cristina Morganti-Kossmann, Mario Rancan, Philip F Stahel, Thomas Kossmann. Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword. *Curr Opin Crit Care*. 2002 Apr;8(2):101-5.
  15. Jenna M Ziebell, Maria Cristina Morganti-Kossmann. Involvement of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines in the pathophysiology of traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*. 2010 Jan;7(1):22-30.
  16. Harold K Kimelberg, Maiken Nedergaard. Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets. *Neurotherapeutics*. 2010 Oct;7(4):338-53.
  17. R Moraga-Amaro, J M Jerez-Baraona, F Simon, J Stehberg. Role of astrocytes in memory and psychiatric disorders. *J Physiol Paris*. 2014 Sep-Dec;108(4-6):240-51.
  18. Kathryn A Frankola, Nigel H Greig, Weiming Luo, David Tweedie. Targeting TNF- $\alpha$  to elucidate and ameliorate neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2011 May;10(3):391-403.

19. Helmut Kettenmann, Uwe-Karsten Hanisch, Mami Noda, Alexei Verkhratsky. Physiology of microglia. *Physiol Rev.* 2011 Apr;91(2):461-553.
20. Helmut Kettenmann, Frank Kirchhoff, Alexei Verkhratsky. Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron.* 2013 Jan 9;77(1):10-8.
21. Uwe-Karsten Hanisch, Helmut Kettenmann. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci.* 2007 Nov;10(11):1387-94.
22. Anil F Ramlackhansingh, David J Brooks, Richard J Greenwood, Subrata K Bose, Federico E Turkheimer, Kirsi M Kinnunen, Steve Gentleman, Rolf A Heckemann, Karen Gunanayagam, Giorgio Gelosa, David J Sharp. Inflammation after trauma: microglial activation and traumatic brain injury. *Ann Neurol.* 2011 Sep;70(3):374-83.
23. Rebekah C Mannix, Michael J Whalen. Traumatic brain injury, microglia, and Beta amyloid. *Int J Alzheimers Dis.* 2012;2012:608732.
24. Hsueh SC, Lecca D, Greig NH, Wang JJYJ, Selman W, Hoffer BJ. Hydrogen gas treatment improves the neurological outcome after traumatic brain injury via increasing miR-21 expression. *J Neurosurg.* 2018;7(3):1–16.
25. J S Beckman, J P Crow. Pathological implications of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite formation. *Biochem Soc Trans.* 1993 May;21(2):330-4.
26. Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling.* 2006;8(9-10):1865-79.
27. M A Colicos, C E Dixon, P K Dash. Delayed, selective neuronal death following experimental cortical impact injury in rats: possible role in memory deficits. *Brain Res.* 1996 Nov 11;739(1-2):111-9.

28. Gang Cheng, Rong-hua Kong, Lei-ming Zhang, Jian-ning Zhang. Mitochondria in traumatic brain injury and mitochondrial-targeted multipotential therapeutic strategies. *Br J Pharmacol*. 2012 Oct;167(4):699-719.
29. Rachel L. Hill, Indrapal N. Singh, Juan A. Wang, Edward D. Hall. Time courses of post-injury mitochondrial oxidative damage and respiratory dysfunction and neuronal cytoskeletal degradation in a rat model of focal traumatic brain injury. *Neurochem Int*. 2017 December ; 111: 45–56.
30. Mary E Hamby, Michael V Sofroniew. Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders. *Neurotherapeutics*. 2010 Oct;7(4):494-506.
31. Edward D Hall, Patrick G Sullivan, Tonya R Gibson, Krissi M Pavel, Brian M Thompson, Stephen W Scheff. Spatial and temporal characteristics of neurodegeneration after controlled cortical impact in mice: more than a focal brain injury. *J Neurotrauma*. 2005 Feb;22(2):252-65.
32. S Camandola, G Poli, M P Mattson. The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2,3-nonenal increases AP-1-binding activity through caspase activation in neurons. *J Neurochem*. 2000 Jan;74(1):159-68.
33. Kevin J Anderson, Kelly M Miller, Isabella Fugaccia, Stephen W Scheff. Regional distribution of fluoro-jade B staining in the hippocampus following traumatic brain injury. *Exp Neurol*. 2005 May;193(1):125-30.
34. Ikuroh Ohsawa, Masahiro Ishikawa, Kumiko Takahashi, Megumi Watanabe, Kiyomi Nishimaki, Kumi Yamagata, Ken-Ichiro Katsura, Yasuo Katayama, Sadamitsu Asoh, Shigeo Ohta. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med*. 2007 Jun;13(6):688-94.
35. Shigeo Ohta. Recent progress toward hydrogen medicine: potential of molecular

- hydrogen for preventive and therapeutic applications. *Curr Pharm Des.* 2011;17(22):2241-52.
36. 大澤郁朗. 水素分子の生理作用と水素水による疾患防御. *日老医誌.* 2012;49:680-8.
37. H A Kontos, E P Wei. Superoxide production in experimental brain injury. *J Neurosurg.* 1986 May;64(5):803-7.
38. Hong-Wei Hu, Zhi-Guo Chen, Jian-Gang Liu, Gang Chen. Role of hydrogen in traumatic brain injury: a narrative review. *Med Gas Res.* 2021 Jul-Sep;11(3):114-20.
39. Lu Wang, Chongfa Zhao, Shuang Wu, Guanghui Xiao, Xin Zhuge, Ping Lei, Keliang Xie. Hydrogen Gas Treatment Improves the Neurological Outcome after Traumatic Brain Injury via Increasing miR-21 Expression. *SHOCK.* 2018;50(3):308–15.
40. Xituan Ji, Wenbo Liu, Keliang Xie, Weiping Liu, Yan Qu, Xiaodong Chao, Tao Chen, Jun Zhou, Zhou Fei. Beneficial effects of hydrogen gas in a rat model of traumatic brain injury via reducing oxidative stress. *Brain Res.* 2010;1354:196-205.
41. Qing-hui Zhao, Fei Xie, Da-zhi Guo, Fang-di Ju, Jin He, Ting-ting Yao, Peng-xiang Zhao, Shu-yi Pan, Xue-mei Ma. Hydrogen inhalation inhibits microglia activation and neuroinflammation in a rat model of traumatic brain injury. *Brain Res.* 2020 Dec 1;1748:147053.
42. Yasushi Satoh, Yoshiyuki Araki, Masashi Kashitani, Kiyomasa Nishii, Yasushi Kobayashi, Masanori Fujita, Shinya Suzuki, Yuji Morimoto, Shinichi Tokuno, Gentaro Tsumatori, Tetsuo Yamamoto, Daizoh Saitoh, Toshiaki Ishizuka. Molecular Hydrogen Prevents Social Deficits and Depression-Like Behaviors Induced by

- Low-Intensity Blast in Mice. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2018 Sep 1;77(9):827-36.
43. Nicole D Osier, C Edward Dixon. The Controlled Cortical Impact Model: Applications, Considerations for Researchers, and Future Directions. *Front Neurol*. 2016 Aug 17;7:134.
44. T Bartsch, P Wulff. The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability. *Neuroscience*. 2015 Nov 19;309:1-16.
45. Pen-Sen Huang, Ping-Yen Tsai, Ling-Yu Yang, Daniela Lecca, Weiming Luo, Dong Seok Kim, Barry J Hoffer, Yung-Hsiao Chiang, Nigel H Greig, Jia-Yi Wang. 3,6'-Dithiopomalidomide Ameliorates Hippocampal Neurodegeneration, Microgliosis and Astrogliosis and Improves Cognitive Behaviors in Rats with a Moderate Traumatic Brain Injury. *Int J Mol Sci*. 2021 Jul 31;22(15):8276.
46. 島克司, 加藤裕, 苗代弘. 頭部外傷後の二次的脳損傷. *蘇生*. 1993; 17(1):6-12
47. David Gomez, James P Byrne, Aziz S Alali, Wei Xiong, Chris Hoeft, Melanie Neal, Harris Subacius, Avery B Nathens. Inclusion of highest glasgow coma scale motor component score in mortality risk adjustment for benchmarking of trauma center performance. *J Am Coll Surg*. 2017 Dec;225(6):755-62.
48. Lorraine Siebold, Andre Obenaus, Ravi Goyal. Criteria to define mild, moderate, and severe traumatic brain injury in the mouse controlled cortical impact model. *Exp Neurol*. 2018 Dec;310:48-57.
49. Laura B. Tucker, John F. Burke, Amanda H. Fu, Joseph T. McCabe. Neuropsychiatric Symptom Modeling in Male and Female C57BL/6J Mice after Experimental Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*. 2017 Feb 15;34(4):890-905.
50. Ruoyu Zhang, Junming Wang, Leo Huang, Tom J Wang, Yinrou Huang, Zefu Li, Jinxin He, Chen Sun, Jing Wang, Xuemei Chen, Jian Wang. The pros and cons of

- motor, memory, and emotion-related behavioral tests in the mouse traumatic brain injury model. *Neurol Res.* 2022 Jan;44(1):65-89.
51. Kenji Dohi, Brian C Kraemer, Michelle A Erickson, Pamela J McMillan, Andrej Kovac, Zuzana Flachbartova, Kim M Hansen, Gul N Shah, Nader Sheibani, Therese Salameh, William A Banks. Molecular hydrogen in drinking water protects against neurodegenerative changes induced by traumatic brain injury. *PLoS One.* 2014 Sep 24;9(9):e108034.
52. Kimihiro Nagatani, Kojiro Wada, Satoru Takeuchi, Hiroaki Kobayashi, Yoichi Uozumi, Naoki Otani, Masanori Fujita, Shoichi Tachibana, Hiroshi Nawashiro. Effect of hydrogen gas on the survival rate of mice following global cerebral ischemia. *Shock.* 2012 Jun;37(6):645-52.
53. Teemu M Luoto, Rahul Raj, Jussi P Posti, Andrew J Gardner, William J Panenka, Grant L Iverson. A Systematic Review of the Usefulness of Glial Fibrillary Acidic Protein for Predicting Acute Intracranial Lesions following Head Trauma. *Front Neurol.* 2017 Dec 4;8:652.
54. Davide Viggiano. The hyperactive syndrome: metanalysis of genetic alterations, pharmacological treatments and brain lesions which increase locomotor activity. *Behav Brain Res.* 2008 Dec 1;194(1):1-14.
55. Steven T DeKosky, Kevin M Taffe, Eric E Abrahamson, C Edward Dixon, Patrick M Kochanek, Milos D Ikonovic. Time Course Analysis of Hippocampal Nerve Growth Factor and Antioxidant Enzyme Activity following Lateral Controlled Cortical Impact Brain Injury in the Rat. *J Neurotrauma.* 2004 May;21(5):491-500.
56. Ye Xiong, Asim Mahmood, Michael Chopp. Animal models of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurosci.* 2013 Feb;14(2):128-42.

57. Zonggang Hou, Wei Luo, Xuejun Sun, Shuyu Hao, Ying Zhang, Feifan Xu, Zhongcheng Wanga, Baiyun Liub. Hydrogen-rich saline protects against oxidative damage and cognitive deficits after mild traumatic brain injury. *Brain Res Bull.* 2012 Sep 1;88(6):560-5.
58. Unterberg AW, Stover J, Kress B, Kiening KL. Edema and brain trauma. *Neuroscience.* 2004;129:1021-9.
59. Nasrin Soltani, Zahra Soltani, Mohammad Khaksari, Ghasem Ebrahimi, Mojdeh Hajmohammadi, Maryam Iranpour. The Changes of Brain Edema and Neurological Outcome, and the Probable Mechanisms in Diffuse Traumatic Brain Injury Induced in Rats with the History of Exercise. *Cell Mol Neurobiol.* 2020 May;40(4):555-67.
60. Tony Wang, B.S., David Yu-Te Chou, Jamie Y. Ding, Vance Fredrickson, Changya Peng, Steven Schafer, Murali Guthikonda, Christian Kreipke, José A. Rafols, Yu Chuan Ding. Reduction of brain edema and expression of aquaporins with acute ethanol treatment after traumatic brain injury. *J Neurosurg* 2013;118:390–6.
61. Van Eldik LJ, Wainwright MS. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restorative neurology and neuroscience.* 2003;21(3, 4):97-108.
62. Ponath G, Schettler C, Kaestner F, Voigt B, Wentker D, Arolt V, et al. Autocrine S100B effects on astrocytes are mediated via RAGE. *Journal of neuroimmunology.* 2007;184(1-2):214-22.
63. Aungst SL, Kabadi SV, Thompson SM, Stoica BA, Faden AI. Repeated mild traumatic brain injury causes chronic neuroinflammation, changes in hippocampal synaptic plasticity, and associated cognitive deficits. *J Cereb Blood Flow Metab*

2014;34: 1223-1232.

64. Kosuke Kumagai, Terushige Toyooka, Satoru Takeuchi, Naoki Otani, Kojiro Wada, Arata Tomiyama, Kentaro Mori. Hydrogen gas inhalation improves delayed brain injury by alleviating early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage. *Sci Rep.* 2020 Jul 23;10(1):12319.
65. Ying Deng, Brian M. Thompson, Xiang Gao, Edward D. Hall. Temporal relationship of peroxynitrite-induced oxidative damage, calpain-mediated cytoskeletal degradation and neurodegeneration after traumatic brain injury. *Exp Neurol.* 2007 May;205(1):154-65.
66. Chi Liu, Ryosuke Kurokawa, Masayuki Fujino, Shinichi Hirano, Bunpei Sato, Xiao-Kang Li. Estimation of the hydrogen concentration in rat tissue using an airtight tube following the administration of hydrogen via various routes. *Sci Rep.* 2014 Jun 30;4:5485.
67. Tomoyoshi Tamura, Masaru Suzuki, Koichiro Homma, Motoaki Sano; HYBRID II Study Group. Efficacy of inhaled hydrogen on neurological outcome following brain ischaemia during post-cardiac arrest care (HYBRID II): a multi-centre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *EClinicalMedicine.* 2023 Mar 17;58:101907.



## 図表

評価項目	評価目的	day1	day3	day7	day14	day28
行動実験	高次脳機能			○	○	○
Neurological Severity Score	神経学的異常	○	○	○	○	○
Brain Water Content	脳浮腫	○				
アルブミン染色	血液脳関門破綻	○				
GFAP染色	アストロサイト活性	○	○	○	○	○
Iba-1染色	ミクログリア活性	○	○	○	○	○
S100B染色	炎症性メディエーター		○			
Nissl染色	神経細胞死			○		○

表1: 評価項目

評価項目を表に示す。行動実験を受傷後7、14、28日目に行い高次脳機能障害の指標とした。神経学的評価は受傷後1、3、7、14、28日目に行った。脳浮腫評価目的でのBWC測定、BBB破綻評価目的でのアルブミン染色を受傷後1日目に行った。グリア細胞活性評価目的でGFAP染色、Iba-1染色を受傷後1、3、7、14、28日目に行い、GFAP活性が最も高かった3日目にS100B発現量を評価した。神経錐体細胞評価目的でNissl染色を受傷後7、28日目に評価した。組織学的評価はアルブミン染色を除きすべて受傷側海馬CA3領域を対象とした。

項目	1点	0点
片側1肢、または2肢の麻痺を認める	安静時/尾をもって持ち上げた際 体を1側に折り曲げる	正常
3cm幅の平らな渡り木を50cm渡りきる	できない	できる
2cm幅の平らな渡り木を50cm渡りきる	できない	できる
1cm幅の平らな渡り木を50cm渡りきる	できない	できる
0.5cm幅の平らな渡り木を50cm渡りきる	できない	できる
直径0.5cmの円柱上で30秒間保持	できない	できる
直径30cmの円内から2分以内に脱出する	無動、脱出できない	脱出できる
片側に寄らずに歩く	まっすぐ歩けない	まっすぐ歩く
音に対する反応	飛び上がる、固まって動かなくなる、 反応しない	一瞬固まったのちすぐに動き出す
30秒間の探索行動	立ち上がり行動なし	立ち上がり行動

表2：神経機能評価法 (49)

上記10項目について評価し、点数の合計を神経機能スコアとした (0-10点)

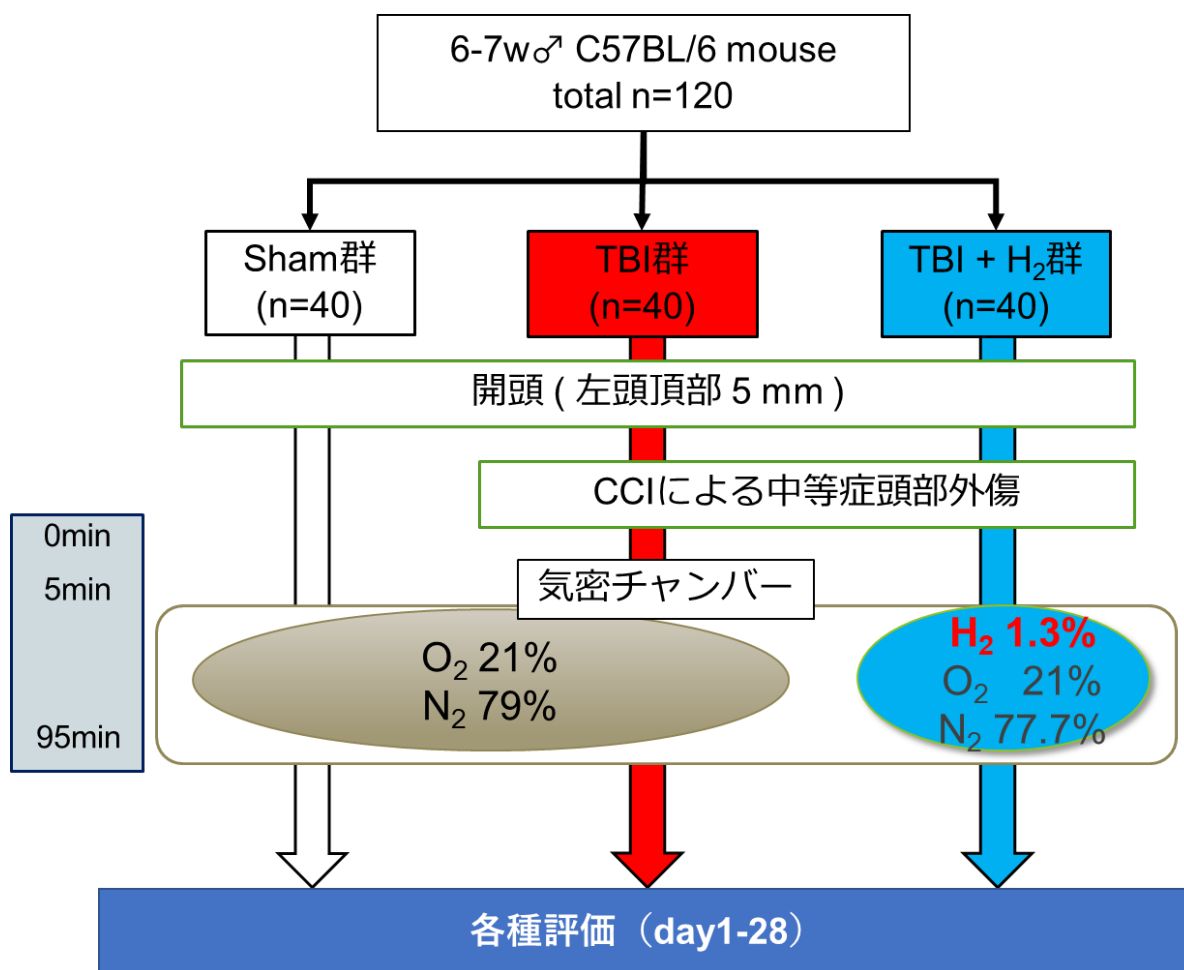


図 1：実験動物の振り分け

6-7週齢の雄性 C57BL/6 マウス計 120 匹を TBI 群、TBI+H<sub>2</sub> 群、sham 群の 3 群に無作為に振り分けた。すべての群に対し頭皮正中切開後、左頭頂部に開頭を設けた。TBI 群、TBI+H<sub>2</sub> 群に対してはその後 CCI による脳挫傷を加えた。閉創から 5 分後にマウスを気密チャンバーに搬入し、sham 群と TBI 群に対しては大気ガスを、TBI+H<sub>2</sub> 群に対しては 1.3% 水素ガスを 90 分間投与した。

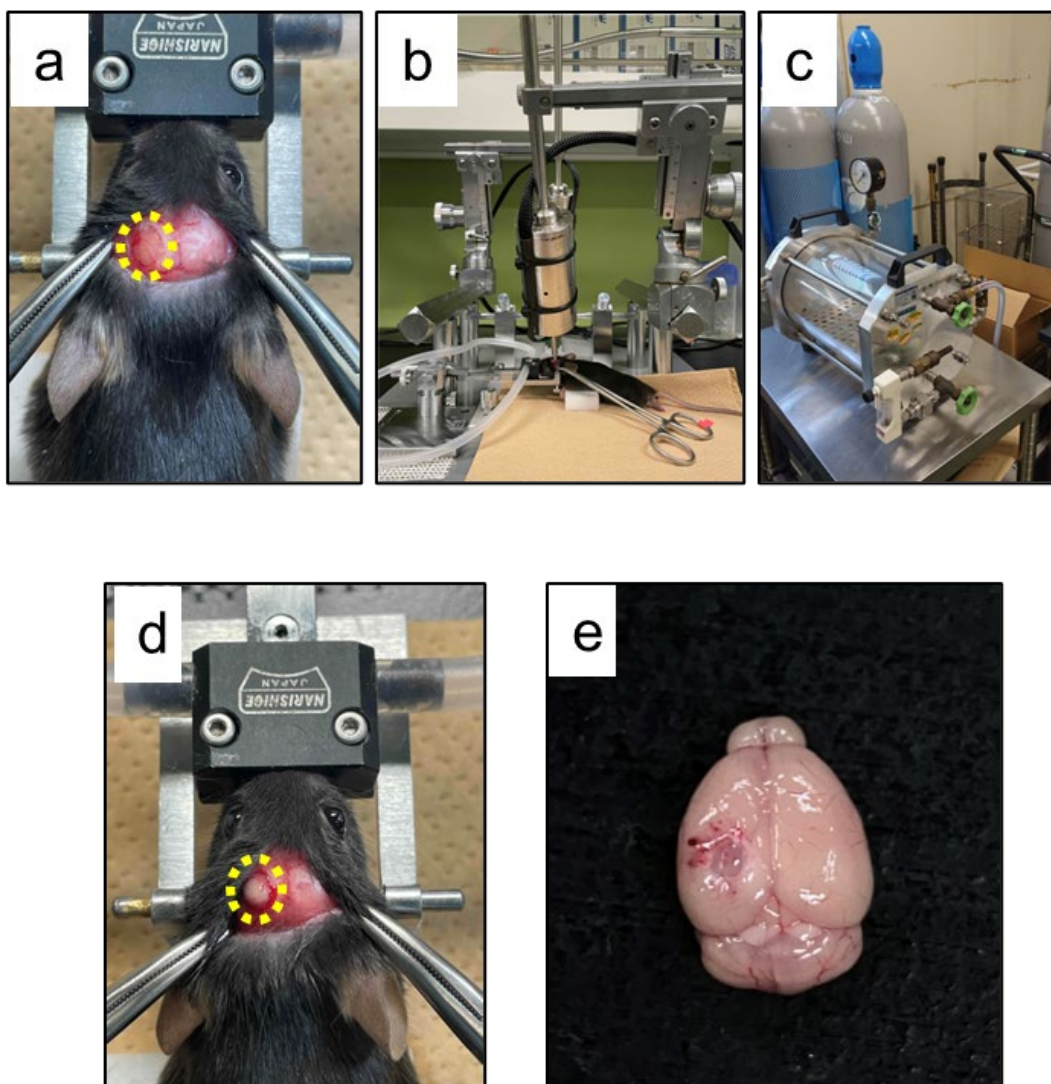


図2 : Controlled Cortical Impactモデル作成

a : 左頭頂部に径5mmの開頭を設けたところ

b : Controlled Cortical Impact装置

c : 動物実験用気密チャンバー

d : CCI装置による脳挫傷を加えた後。受傷部の脳が盛り上がっている。

e : CCI後1日目に摘出した脳。受傷部が陥凹している。

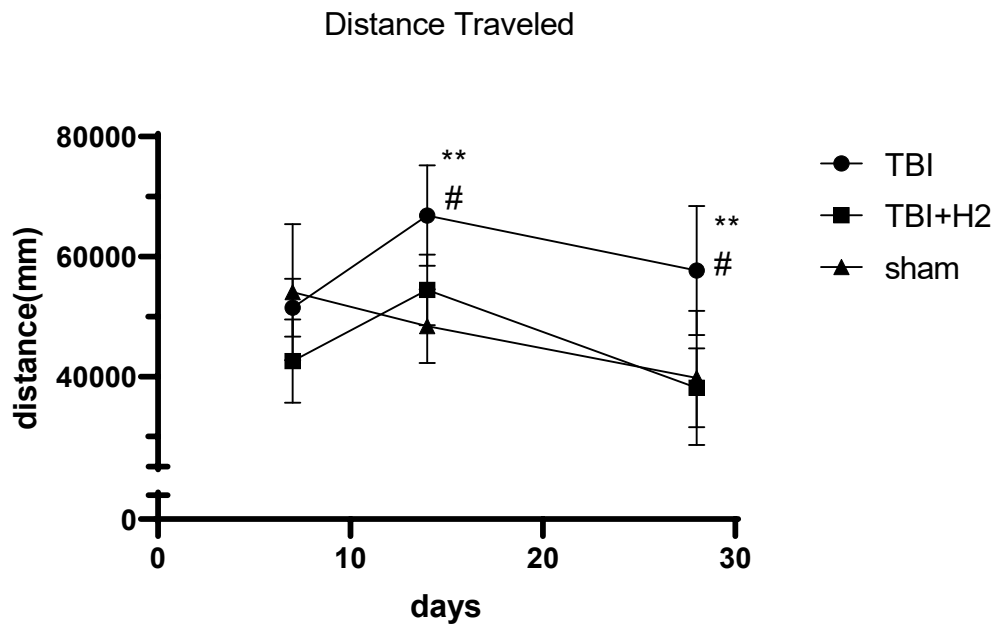


図3：オープンフィールド試験の結果 (各日各群 n=8)

オープンフィールドアリーナ内での 10 分間の総移動距離を示す。

受傷後 7 日目には 3 群間で総移動距離に有意差を認めなかった。14 日目には、TBI+H<sub>2</sub> 群、sham 群と比較し TBI 群で有意に総移動距離が長かった。同様に 28 日目にも TBI 群で TBI+H<sub>2</sub> 群、sham 群と比較し有意に総移動距離が長かった。

\*\* : p<0.01 TBI 群 vs. sham 群

# : p<0.05 TBI 群 vs. TBI+H<sub>2</sub> 群

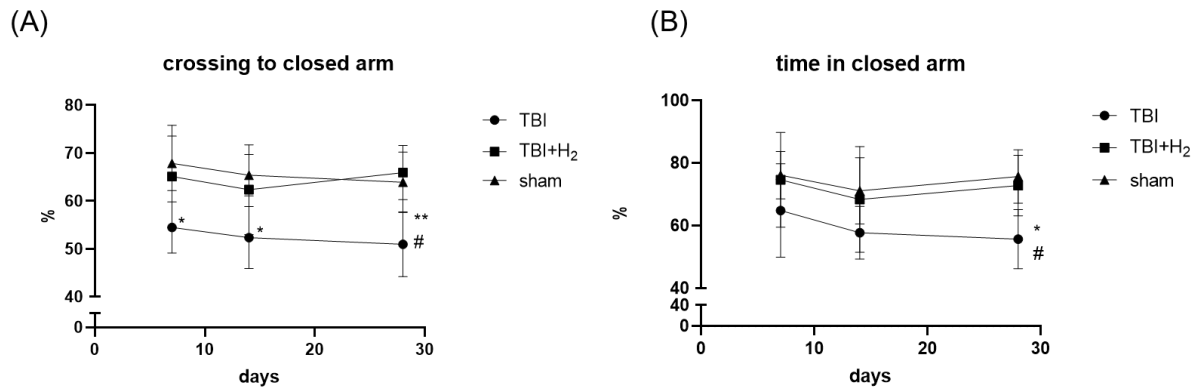


図4：高架十字迷路試験の結果 (各日各群 n=8)

10分間の観察期間中におけるクローズドアームへの侵入頻度 (A) とクローズドアームでの滞在時間の割合 (B) を示す。

受傷後7日目にTBI群ではsham群と比較し有意にクローズドアームへの侵入頻度が低かった。滞在時間に有意差は認められなかった。14日目ではTBI群でsham群と比較し有意にクローズドアームへの侵入頻度が低かったが、滞在時間に有意差は見られなかった。28日目ではTBI群ではTBI+H<sub>2</sub>群、sham群と比較し有意にクローズドアームへの侵入頻度が低く、かつクローズドアームでの滞在時間も有意に少なかった。全期間を通してTBI+H<sub>2</sub>群はsham群と類似した傾向を示した。

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  TBI群 vs. sham群

#:  $p < 0.05$  TBI群 vs. TBI+H<sub>2</sub>群

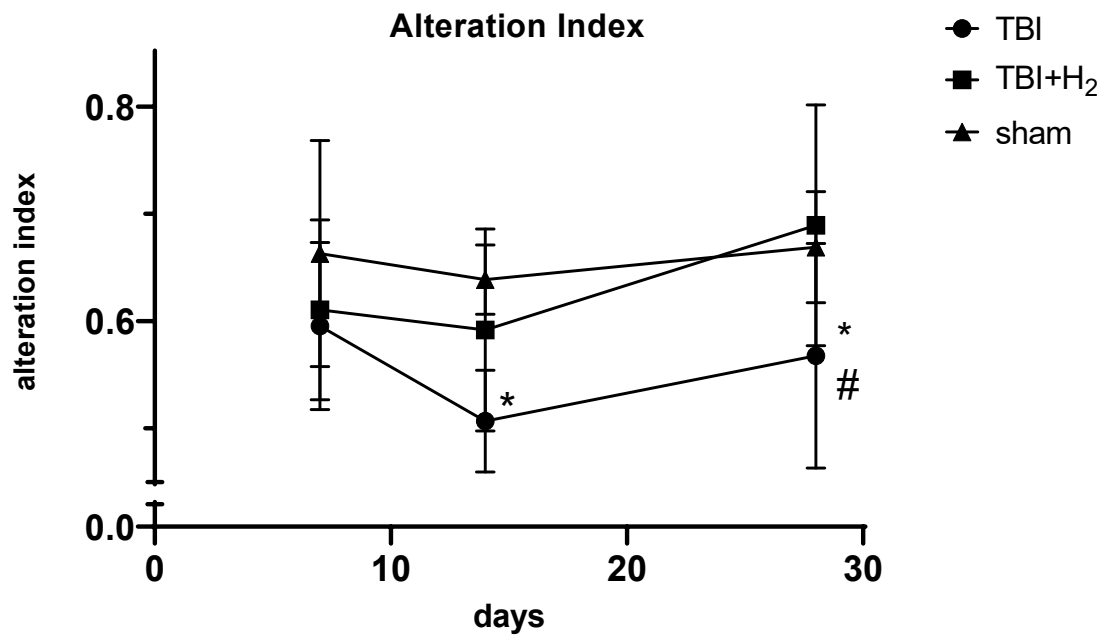


図5：Y迷路試験の結果(各日各群 n=8)

受傷後7日目では3群間に有意差は認めなかった。受傷後14日目にTBI群は sham群と比較し有意にalteration indexの低下を認めた。受傷後28日目にTBI群ではTBI+H<sub>2</sub>群、sham群と比較し、有意にalteration indexの低下を認めた。

\*:  $p < 0.05$  TBI群 vs. sham群

#:  $p < 0.05$  TBI群 vs. TBI+H<sub>2</sub>群

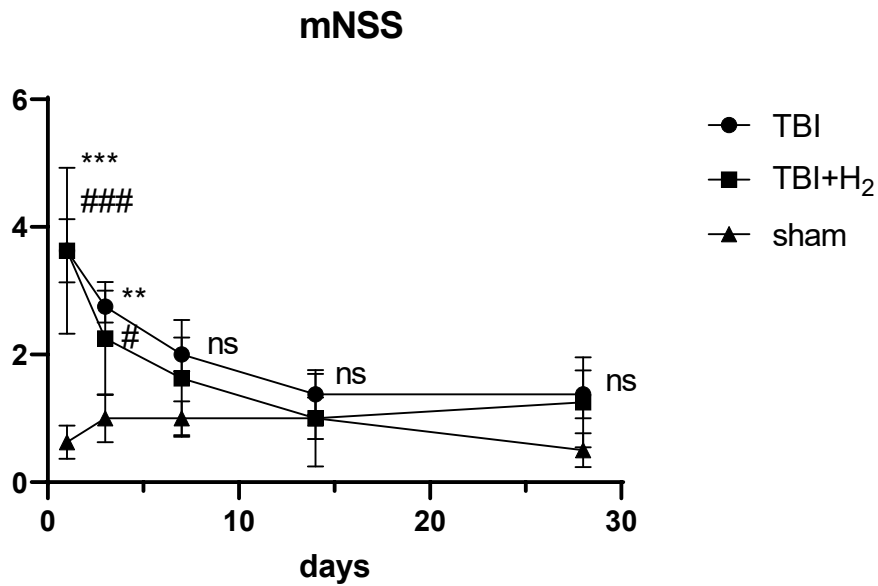


図6：神経機能評価 (各日各群 n=8)

受傷後 1、3 日目において TBI 群、TBI+H<sub>2</sub> 群では sham 群と比較して有意に高い値を示した。両日とも TBI 群と TBI+H<sub>2</sub> 群間で有意差は認められなかった。受傷後 7、14、28 日目において 3 群間で有意差を認めなかった。

\*\*： p<0.01, \*\*\*: p<0.001 TBI群 vs. sham群

#: p<0.05, ###: p<0.001 TBI群 vs. TBI+H<sub>2</sub>群



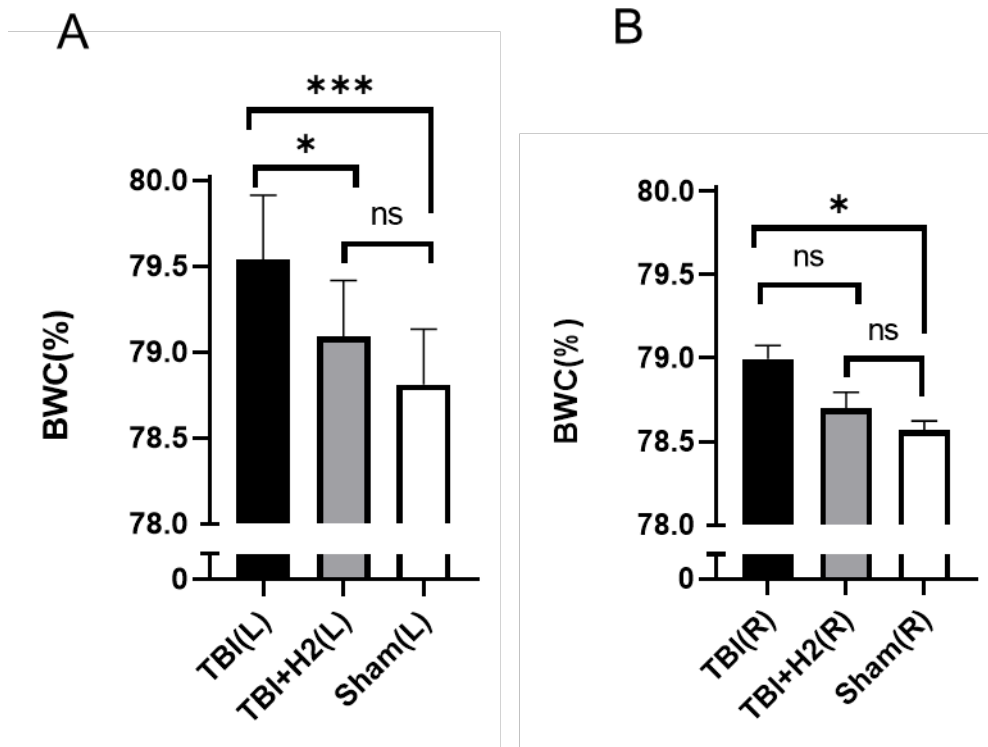


図7：脳浮腫評価 (各群 n=8)

受傷側 (A)、非受傷側 (B) の脳水分含有量 (Brain Water Content: BWC) を示す。TBI群では受傷側、非受傷側ともに脳浮腫を認めた。TBI+H<sub>2</sub>群では脳浮腫は抑制され、sham群と有意差を認めなかった。

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

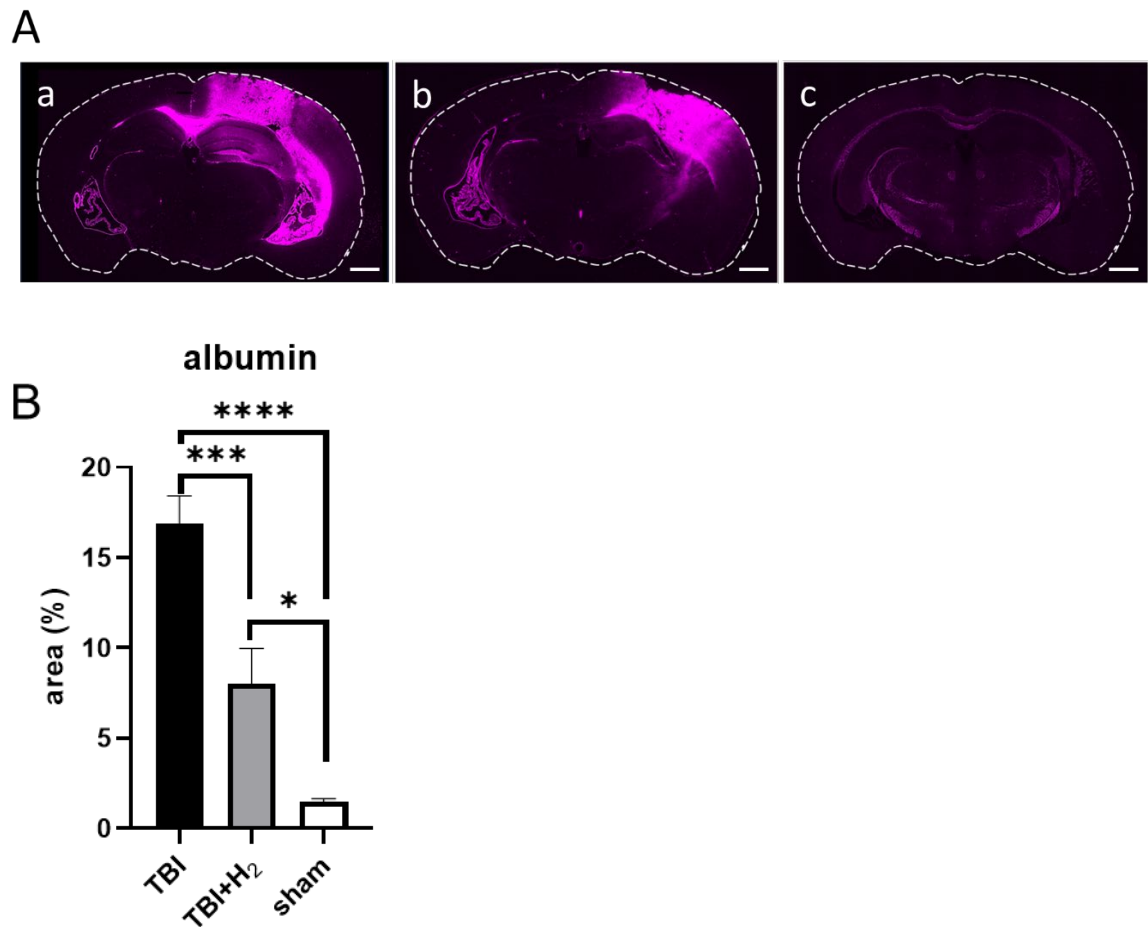


図8：血液脳関門損傷評価

A：TBI群 (a)、TBI+H<sub>2</sub>群 (b)、sham群 (c)のアルブミン染色像

TBI群では広範なアルブミン血管外漏出像が認められた一方、TBI+H<sub>2</sub>群では受傷部位周囲に留まった。スケールバー=1mm

B：アルブミン漏出率 (各群 n=8)

TBI+H<sub>2</sub>群ではTBI群と比較し、有意にアルブミン漏出率は低く、BBB破綻が抑制されたことが示唆された。アルブミン漏出率 (%) = 陽性部分面積 / 全体面積 × 100

\*: p<0.05, \*\*\*: p<0.001, \*\*\*\*: p<0.0001

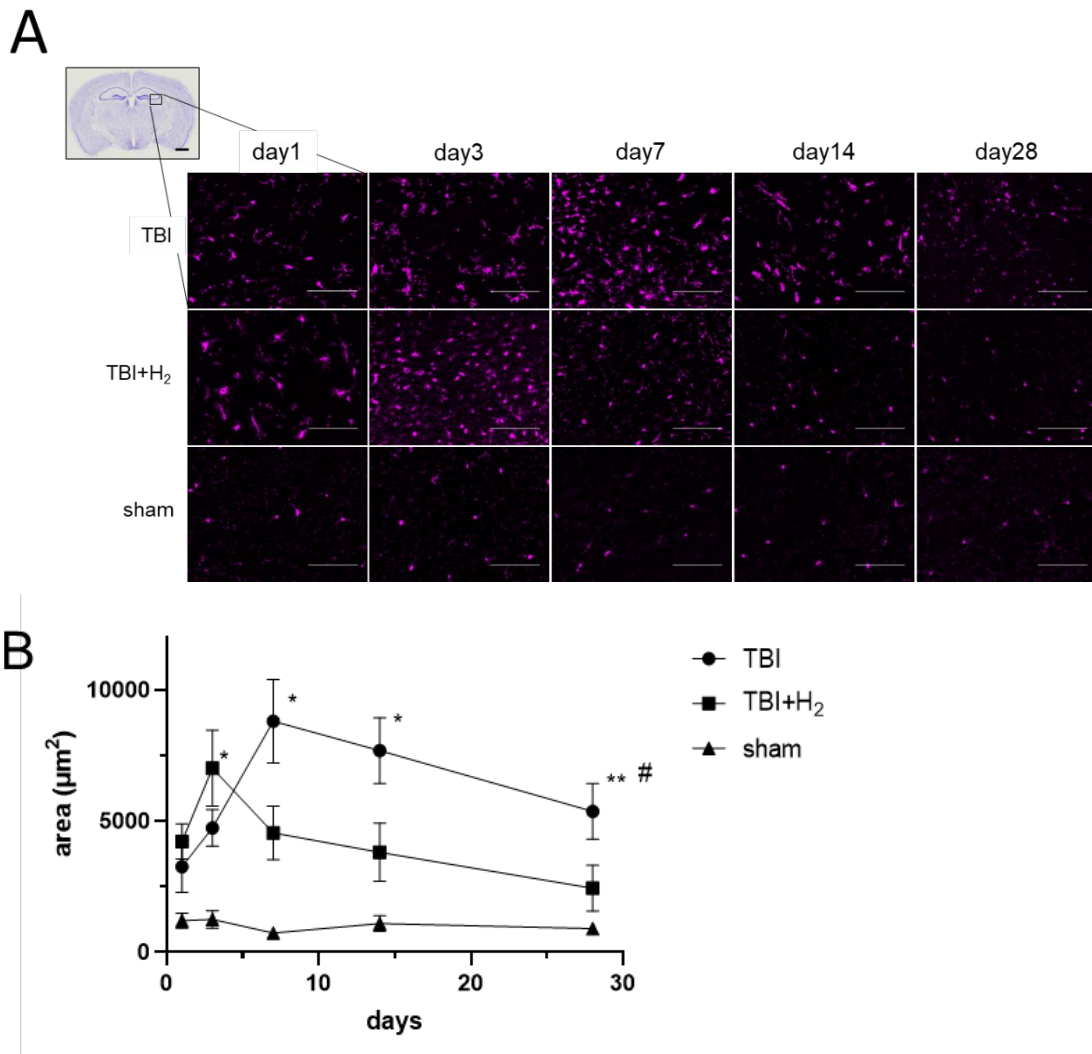


図9：Iba-1染色によるミクログリア活性評価

A：受傷側海馬CA3領域におけるミクログリア活性の経時的変化を示す。

黒スケールバー=1mm、白スケールバー=100µm

B：受傷側海馬CA3領域におけるIba-1陽性面積の定量的評価 (各日各群 n=8)

TBI群でのみ受傷後28日目までのIba-1活性遷延を認めた。Iba-1活性はTBI群では受傷後7日目、TBI+H<sub>2</sub>群では受傷後3日目に最高値を示した。

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$       TBI群 vs. sham群

#:  $p < 0.05$       TBI群 vs. TBI+H<sub>2</sub>群

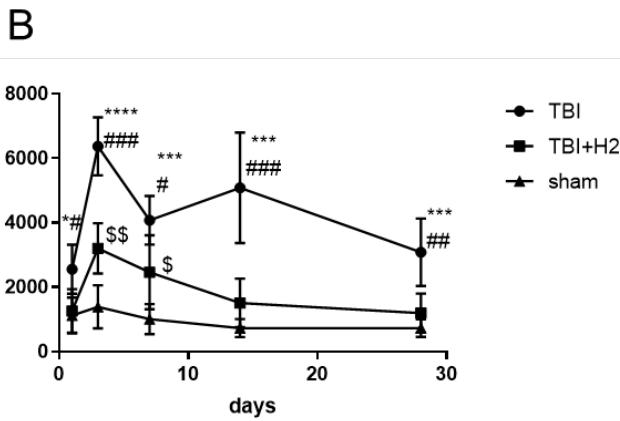
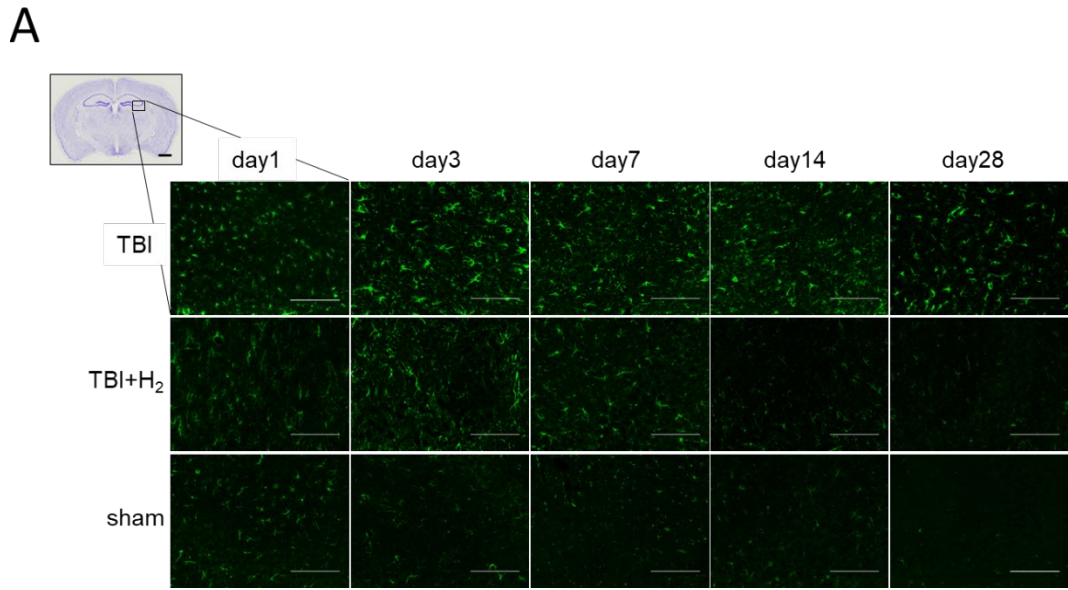


図10 : GFAP染色によるアストロサイト活性評価

A : 受傷側海馬CA3領域におけるアストロサイト活性の経時的変化を示す。

黒スケールバー=1mm、白スケールバー=100µm

B : 受傷側海馬CA3領域におけるGFAP陽性面積の定量的評価 (各日各群 n=8)

TBI群でのみ受傷後28日目までのGFAP活性遷延を認めた。GFAP活性はTBI群、TBI+H<sub>2</sub>群両群で受傷後3日目に最高値を示した。

\*: p<0.05, \*\*\*: p<0.001, \*\*\*\*: p<0.0001 TBI群 vs. sham群

#: p<0.05, ##: p<0.01, ###: p<0.001 TBI群 vs. TBI+H<sub>2</sub>群

\$: p<0.05, \$\$: p<0.01 TBI+H<sub>2</sub>群 vs. sham群

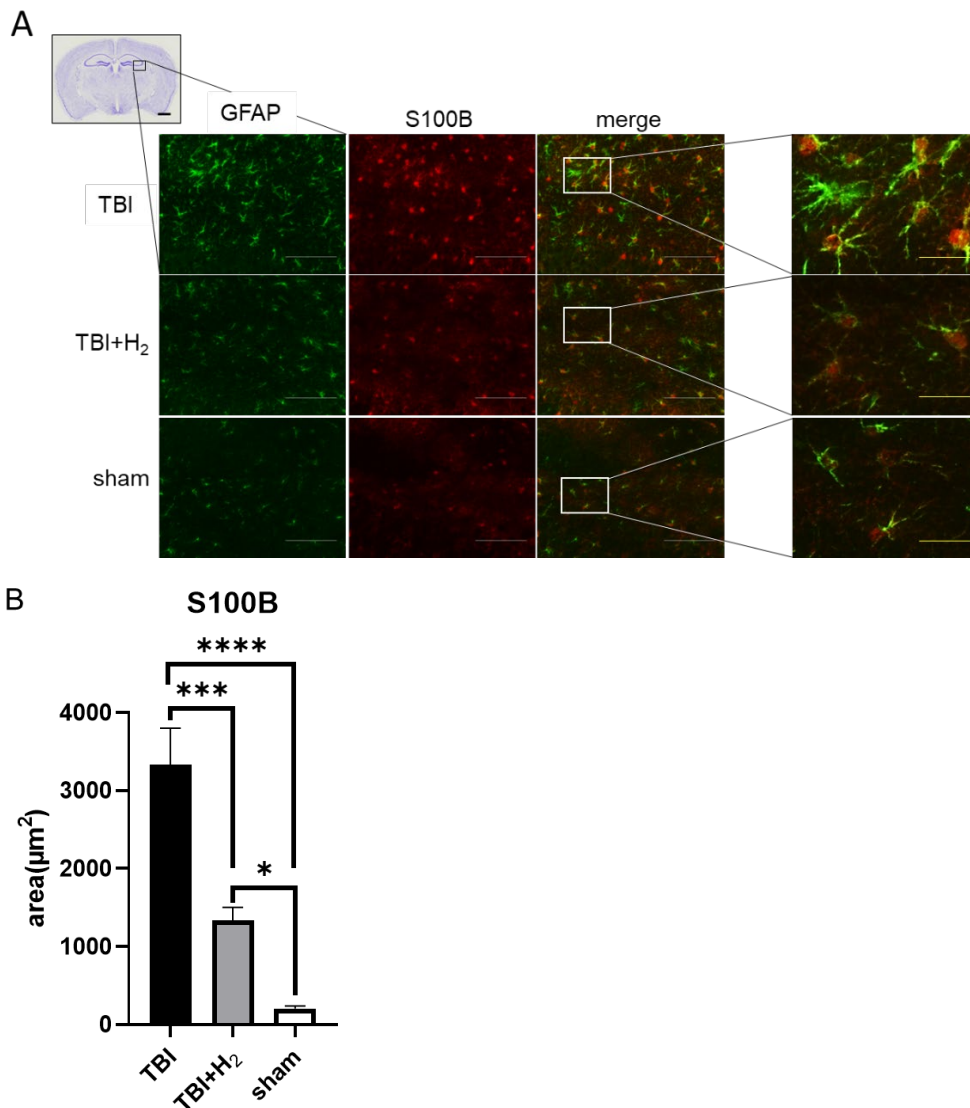


図11：GFAPとS100Bの二重染色によるアストロサイト機能評価

A：受傷後3日目での受傷側海馬CA3領域におけるGFAPとS100Bの二重染色像

S100Bはアストロサイトの細胞体と一致して発現が認められる。TBI群ではGFAPの発現増強のみならず、S100B発現も増強している。

黒スケールバー=1mm、白スケールバー=100μm、黄スケールバー=25μm

B：受傷側海馬CA3領域におけるS100B発現の定量的評価 (各群 n=8)

S100B陽性範囲の面積はTBI群で有意に高値であった。

\*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*\*\*:  $p < 0.0001$

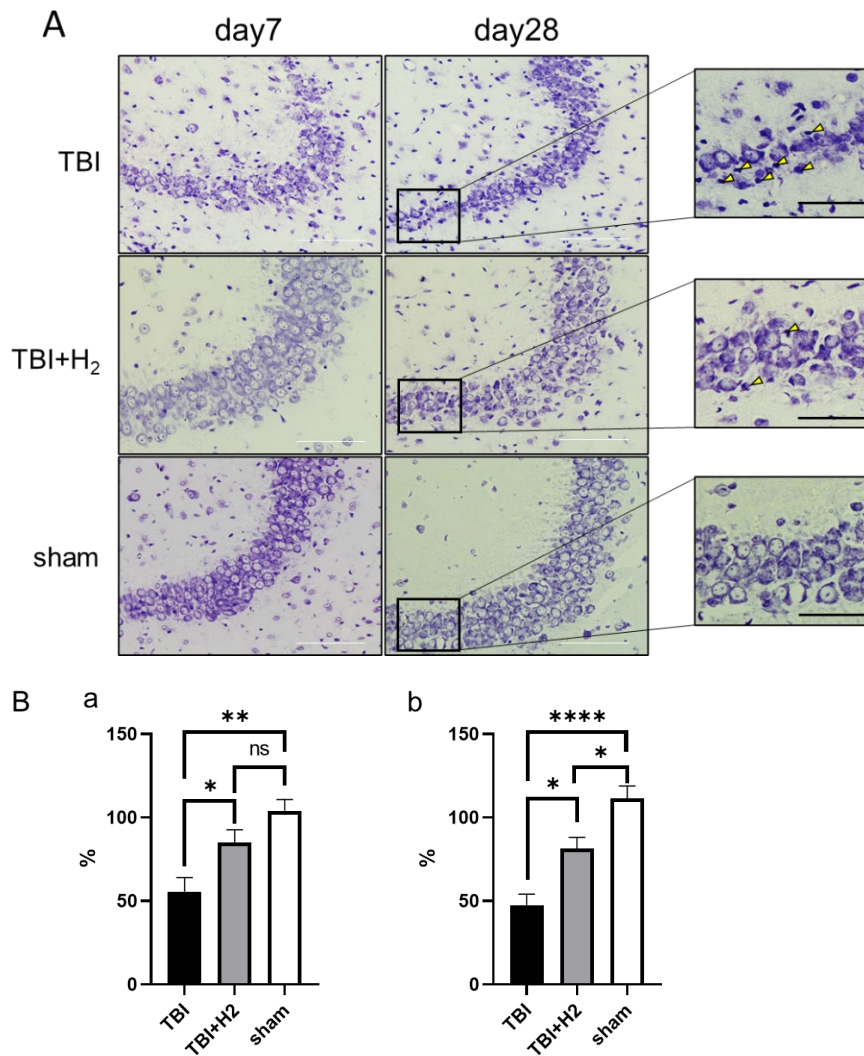


図12：神経錐体細胞損傷評価

A：受傷後7日目、28日目のNissl染色による海馬CA3領域の観察

黄矢頭は核の凝集を認める変性神経細胞である。

白スケールバー=100 $\mu$ m、黒スケールバー=25 $\mu$ m

B：受傷後7日目(a)と28日目(b)の受傷側海馬における神経錐体細胞の割合 (各日各群 n=5-7)

受傷後7日目、28日目どちらにおいてもTBI+H<sub>2</sub>群ではTBI群と比較し、海馬CA3領域での生存神経細胞の割合は有意に多かった。

\*: p<0.05, \*\*: p<0.01, \*\*\*\*: p<0.0001

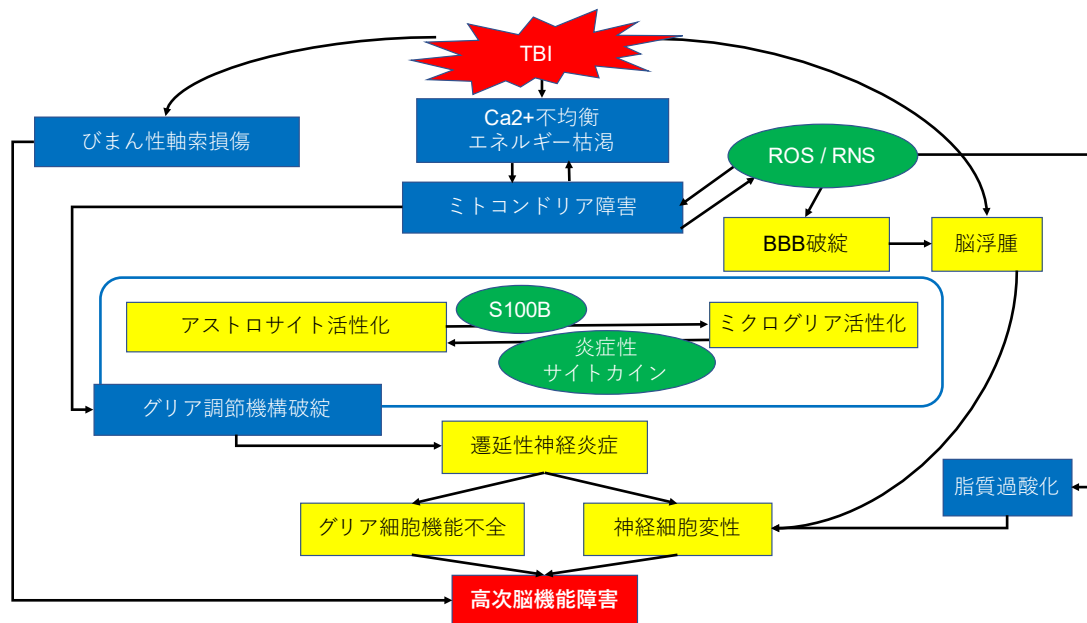


図13：頭部外傷後高次脳機能障害発症の機序

黄色背景は本研究で確認した機序、青背景は推定される機序である。

頭部外傷後の損傷細胞からのカルシウムの細胞外への流出、エネルギーの枯渇はミトコンドリア障害を引き起こしROSが発生する。ROS/RNSは脂質過酸化の機序で神経細胞変性の原因となることに加え、BBBの破綻を招き、脳浮腫を増悪させる。さらに、ミトコンドリア障害を助長し、さらなるエネルギーの枯渇、カルシウム負荷を惹起する。カルシウム負荷はミトコンドリア障害のみならず、グリア間シグナル伝達障害の要因となり、グリア調整機構の破綻の一因となる。グリア活性調節はカルシウムのみでなく、種々のサイトカイン・ケモカインを介してグリア間で複雑に調整されている。グリア調整機構の破綻は遷延性神経炎症の直接的な要因となり、グリア細胞機能不全、神経細胞変性に至り高次脳機能障害につながる。