

レーザー誘起衝撃波を使用した  
外傷性脳幹損傷マウスモデルによる  
超急性期の呼吸・循環障害に関する研究

やまむら こうじ  
山村 浩史

(口腔外科学専攻)

防衛医科大学校

令和5年度

# 目 次

第 1 章 緒言	4 頁
(1) 背景	4 頁
(2) 目的	5 頁
第 2 章 対象と方法	6 頁
(1) LISW の作製	6 頁
(2) LISW による部位特異的損傷マウスモデルの作製	6 頁
(3) 各損傷モデルの生存率、生理学的変化の評価	7 頁
(4) 受傷臓器の組織学的、免疫組織化学的評価	7 頁
(5) 統計解析	9 頁
第 3 章 結果	10 頁
(1) 生存率と生存時間分析	10 頁
(2) 生理学的評価	10 頁
(3) 受傷臓器の形態学的評価	10 頁
(4) 受傷臓器の組織学的、免疫組織化学的評価	11 頁
第 4 章 考察	12 頁
第 5 章 結論	16 頁

謝辞	17 頁
付記	18 頁
略語一覽	19 頁
引用文献	20 頁
図表	28 頁

## 第1章 緒言

### (1) 背景

世界各国において爆発損傷（以下、爆傷）による死者や負傷者が年々増加している [1, 2]。爆傷は紛争時に頻発するが、テロリズムのみならず産業現場や一般家庭での爆発事故でも発生し、民間においても軽視できない問題である [3]。爆傷は衝撃波や爆発の飛散物、爆風、化学物質、高温ガスなどにより、生体に損傷をもたらすとされるが、特に衝撃波による損傷は生命を脅かす可能性があり、特に考慮する必要があるとされている [1,4-6]。従来、爆傷による即死、または 1 時間以内の超急性期における致命的病態は衝撃波による重度の肺損傷であると考えられ、特に空気塞栓症が致死的であるとされている [7,8]。他の致命的要因としては、呼吸停止、あるいは迷走神経反射による循環不全などがあげられるが、即死のメカニズムについてはいまだ不明な点が多い [9-11]。我々はこれまでの先行研究で、衝撃波と爆風を作製可能なブラストチューブを用いてブタの損傷モデルを作製し、超急性期における病態メカニズムの解析を行ってきた。その結果、衝撃波と爆風による即死は、受傷直後の神経反射による呼吸停止が最大の要因であると考えられた [11]。

呼吸調整は延髄を中心とする脳幹部の呼吸中枢で行われ、さらに肺の機械受容器による求心性入力や大脳皮質の随意調整も加わり、複雑な呼吸調整が営まれている [12]。胸部が衝撃波に曝露されると、迷走神経反射による呼吸機能の破綻が生じると考えられているが [7]、呼吸中枢の衝撃波による影響はこれまでに検討されておらず、衝撃波曝露時の超急性期における致命的要因に頭頸部

が関与しているかどうかは明らかでない。

衝撃波の作製に関して、一般的に実爆やブラストチューブが使用されているが、レーザー光を用いて特異的な衝撃波を作成することも可能である[13-16]。このレーザー誘起衝撃波 (laser-induced shock wave ; LISW) 、適用する部位を限局して衝撃波の影響を検討することができるほか、強度の調整が可能であり、再現性や制御性にも優れている。また波源のごく近傍にセンサー類を設置することができるため、衝撃波に曝露された生体をリアルタイムでモニタリング可能である。このような特性を最大限に生かして、防衛医科大学校ではこれまでにいくつかの部位特異的損傷モデルが作製され、衝撃波が生体に及ぼす影響についての検討が重ねられてきた [10,15,17,18]。

## (2)目的

本研究は、生体が衝撃波に曝露した際の超急性期に致死的な病態に陥るメカニズムを解明することを目的とした。特に、衝撃波曝露時の超急性期における致死的な病態に呼吸機能の破綻が関連していると考え、これに関与する可能性のある臓器として大脳、脳幹、肺にそれぞれ衝撃波を適用し、超急性期における呼吸・循環機能障害の病態メカニズムについて検討した。

なお本研究における動物実験は全て、防衛医科大学校実験動物倫理委員（承認番号 20004）の承認を受けた後に関連規則や関係法令に慎重且つ適切に対応しながら実施した。

## 第 2 章 対象と方法

### (1) LISW の作製

LISW の発生原理を図 1 に示す。光吸収体（天然黒色ゴムシート、厚さ 0.5 mm）と透明層（ポリエチレンテレフタレート板、厚さ 1.0 mm）を接着した構造のターゲットに、高出力ナノ秒パルスレーザーを照射すると、レーザーが黒色ゴムに吸収されてプラズマが誘起され、その膨張に伴って衝撃波が発生する。このターゲットを標的組織上に置き、レーザー光を照射することで標的部位に衝撃波を適用することができる。本研究では、Q スイッチ・ルビーレーザー（エムエムアンドニーク、東京、日本）の 694 nm 光（パルス幅 20 ns）を用い、重症モデルを作製するためにレーザーフルエンス  $3.0 \text{ J/cm}^2$  に設定した（ピーク圧力：81.8 MPa、力積：19.9 Pa・s）。この条件における典型的な衝撃波波形を図 1 に示す。

### (2) LISW による部位特異的損傷マウスモデルの作製

C57BL/6 マウス（8-10 週齢雄、体重 23-26 g）（日本エスエルシー、静岡、日本）を使用した。マウスは 20 ~ 25 °C の室温下に 12 時間毎の明暗サイクル下で食餌および水が自由に摂取できる環境下で予備飼育した後に実験を行い、実験後の飼育も同様の環境下で行った。実験の全行程において、動物の苦痛と不快を最大限取り除くべく細心の注意を払った。LISW 照射部位は標的臓器が含まれるように、レーザー照射位置を前頭部（両耳を結んだ線の頭側 5 mm、標的臓器は脳）、後頭・上頸部（両耳を結ぶ線から尾側 5 mm、標的臓器は脳幹、特

に延髄)、右胸背部(正中線から尾側 20 mm かつ両耳を結ぶ線の右側 5 mm、標的臓器は右肺)に設定した。レーザー照射位置を群名とし、3 群に設定した(図 2)。1.5%イソフルラン(住友ファーマアニマルヘルス社、大阪、日本)を使用して十分に吸入麻酔した上で、除毛クリーム(Veet®除毛クリーム、Reckitt Benckiser、Sloug、United Kingdom)を用いて LISW 照射部位を除毛した。マウスは腹臥位の体位で固定し、各レーザー照射位置の皮膚上にターゲットを置き、レーザースポット径 4 mm で LISW を 1 回適用した(各群; n = 10)。

### (3)各損傷モデルの生存率、生理学的変化の評価

LISW 適用前後に、バイタルサインを測定した。心拍数と平均血圧はマウスの尾部にカフパルスセンサを取り付け、光電脈波法により尾動脈圧の経時変化を非観血的にモニタリングした(MABP; MK-2000ST、室町機械、東京、日本)。また、経皮的動脈血酸素飽和度(SpO<sub>2</sub>)と呼吸数はマウスの大腿部にクリップタイプセンサを取り付け、リアルタイムに非観血的なモニタリングを行った(マウス OX、STARR Life Science、Oakmont、United States)。LISW 適用後、生存・死亡の判定、呼吸・循環機能の変化を検討した。死亡の判定は全てのバイタルサインが測定不能になった時点とし、測定不能のまま 15 分を超えて身体が動かないことを確認した [10]。

### (4)受傷臓器の組織学的、免疫組織化学的評価

LISW 適用 6 時間後に、生存マウスはケタミン(100 mg/kg)(ケタラール®筋注用、第一三共プロファーマ、東京、日本)とキシラジン

(10 mg/kg) (セラクター<sup>®</sup>2%注射液、バイエル薬品、東京、日本)を腹腔内注射して麻酔を行った。深麻酔下にて断頭し安楽死させ、脳と肺を採取し、4%パラフォルムアルデヒドに浸して保存した。採取した脳は、パラフォルムアルデヒドに24時間浸漬後、70%エタノールに置換した。パラフィン固定後に大脳縦裂から右側へ2 mmの部位で、矢状方向に4 µmのスライス幅でマイクロトーム(HM355S、Thermo、Waltham、United States)を用いてパラフィン切片を作製した。採取した肺は、パラフォルムアルデヒドに24時間浸漬後、冠状方向に厚さ4 µmのスライス幅でマイクロトームを用いてパラフィン切片を作製した。その後 hematoxylin & eosin (HE) 染色を行った。また、後頭・上頸部群の致死的要因を検討するため、後頭・上頸部群で生存したマウスの脳と無処置のマウスの脳について、Bodian 染色、Kluver-Barrera 染色を用いて、組織学的な比較検討を行った。Bodian 染色は0.5%プロテイン銀水溶液を用いて37°Cで48時間鍍銀させ、還元後に0.5%塩化金酸水溶液を用いて50分鍍金させた[19]。Kluver-Barrera 染色は0.1%LFB染色液を用いて57°Cで一晩染色した後に、0.1%クレシルバイオレット水溶液を用いて37°Cで10分染色した[20]。

免疫組織染色は抗 GFAP 抗体と抗 Iba-1 抗体を用いた。一次抗体として、抗 GFAP ニワトリポリクローナル抗体(ab4674、1:500、Abcam、Cambridge、United Kingdom)を用いて切片を4°Cで1晩反応させた。洗浄後に二次抗体としてヤギ抗ニワトリ IgY (ab150173、1:500、Abcam、Cambridge、United Kingdom)を使用し、SlowFade Goldantifade reagent with DAPI (Invitrogen、Waltham、United States)にて封入した[21]。また一次抗体として、抗 Iba-1 ウ



サギモノクローナル抗体 (ab178847、1 : 20000、Abcam、Cambridge、United Kingdom) を用いて切片を 4°C で 1 晩反応させた。洗浄後に二次抗体として、ImmPRESS HRP 抗ウサギ IgG (MP-7451、Vector laboratories、Newark、United States) を使用し、DAB (ニチレイバイオサイエンス、東京、日本) を用いて発色を行った。対比染色として、hematoxylin 染色を行った[17,22]。顕微鏡は BZ-X700 (キーエンス、大阪、日本) を使用した。Kluver-Barrera 染色の評価に関して、脳幹領域における 10 枚のランダムなデジタル画像を取得し、画像を処理して二値画像を作製し、FIJI software (version 2.9.0/1.53 t) を使用してしきい値処理を行った。白質損傷スコアに基づき、正常 (grade 0)、神経線維の乱れ (grade 1)、顕著な空胞の形成 (grade 2)、有髄線維の消失 (grade 3) で分類した [23-26]。

#### (5) 統計解析

統計学的検定は GraphPad Prism 8 日本語化アドオンセット (MDF、東京、日本) を用いた。バイタルサインは、各受傷時点で 3 群間を一元配置分散分析 (one-way factoria ANOVA) で検定し、post hoc test として Tukey 検定を用いて分析した。生存率は Pearson's chi-square test を使用して検定し、生存時間分析は Kaplan–Meier 法とログランク検定を使用して分析した。白質損傷スコア値は箱ひげ図を用いて群間比較し、マン・ホイットニーの U 検定を使用して分析した。この白質損傷スコア比較を除いて、その他の値は平均 ± 標準偏差 (±SD) を用いて記述した。また、 $p < 0.05$  を統計学的に有意差ありとした。

## 第3章 結果

### (1) 生存率と生存時間分析

生存率は、前頭部群で 80%、後頭・上頸部群で 40%、右胸背部群で 100%であった (図 3)。前頭部群では、死亡したマウスはすべて 3-4 分後に呼吸停止と脈拍消失を認めた。後頭・上頸部群では、死亡したマウスはすべて 30 秒以内に呼吸停止と脈拍消失を認めた。後頭・上頸部群は他の 2 群と比較して生存時間が有意に短縮していた (図 4)。

### (2) 生理学的評価

後頭・上頸部群では、LISW 適用直後に SpO<sub>2</sub> と脈拍数の有意な低下を認めた。生存したマウスにおいては、LISW 適用後 3 分以内に SpO<sub>2</sub> と脈拍数の改善がみられ、LISW 適用前とほぼ同様のレベルに回復した。前頭部群では SpO<sub>2</sub> と脈拍数に明らかな変化は見られなかった。右胸背部群では、LISW 適用後に SpO<sub>2</sub> の軽度低下を認め、LISW 適用前の値まで回復しない傾向がみられた (図 5)。

### (3) 受傷臓器の形態学的評価

前頭部群では大脳半球の脳表面に、後頭・上頸部群では小脳半球の脳表面に、右胸背部群では右肺にそれぞれ出血を伴うことを確認した。いずれの群においても、適用した部位以外に出血を伴う臓器はなかった。また、全例で頭蓋骨の骨折を認めなかった (図 6)。

#### (4) 受傷臓器の組織学的、免疫組織化学的評価

HE 染色において、すべての群で脳には明らかな変化を認めなかった。一方で、右胸背部群で右肺にのみ、肺胞壁の伸長と毛細血管の破壊に関連した肺胞出血を認めた (図 7)。Bodian 染色において、後頭・上頸部群と無処置群で脳を比較したところ、視床下部や大脳領域では両群とも明らかな変化がない一方で、延髄を含む脳幹領域では後頭・上頸部群にのみ軸索の腫脹やうねりが散見された (図 8)。Kluver-Barrera 染色において、後頭・上頸部群では無処置群と比較し、有髄線維の乱れを伴い、細胞質の空胞化がやや増加している傾向にあった (図 9)。また後頭・上頸部群は、脳幹領域における白質損傷スコアが無処置群と比較して有意に高値であった。免疫組織染色 (GFAP、Iba-1) において、後頭・上頸部群と無処置群に明らかな差は認められなかった (図 10)。

## 第4章 考察

衝撃波による損傷の研究では、他の臓器に影響を与えず、単一の臓器に衝撃波を適用することは技術的に困難であるとされている [13-16]。本研究では、LISW 適用部位以外に明らかな変化を認めなかったことから、LISW 適用部位に限局した部位特異的な損傷モデルを作製し、衝撃波による臓器別の影響について検討することができたと考える。

衝撃波による胸部損傷は重度の肺損傷を引き起こし、致命的な空気塞栓症を引き起こすことがある [4,7,8]。実際に LISW を胸部に適用した場合、重症な肺損傷が生じて即死したとの報告がある [10]。本研究では、胸部と頭頸部に同強度の LISW を適用し、致命的要因の検討を行ったが、胸部群では全例生存したのに対して、後頭・上頸部群では 60%の小動物が死亡した。このことから衝撃波による受傷部位として、胸部よりも後頭・上頸部の方がより生命に直結する重要な部位であることが示唆された。また、やはり同強度の LISW 適用によって前頭部群では 20%の小動物が死亡したが、本研究で検討した限りでは脳幹部を含む脳実質に明らかな組織学的変化を認めなかった。頭部外傷に伴う急性期の死亡原因として、硬膜下血腫やてんかんに起因する低酸素の影響などの可能性が考えられるが [27-29]、今回は後頭・上頸部群で有意に死亡率が高かったことに的を絞って検討をおこなった。前頭部群の詳細な死因究明については今後の課題としたい。

軸索腫脹と変性は、外傷性脳損傷の特徴であるとの報告がある [30]。軸索のうねりは軸索損傷の最初の形態学的特徴であり、その後、軸索腫脹が形成される

[31]。軸索腫脹部位では微小管の構成が破綻し、顕著に軸索輸送が減少しており、これが急性軸索損傷の典型的な特徴であると言われている [32]。また、白質領域は有髄化された神経線維で構成される領域であり、脳損傷により影響を受けると言われている [26]。本研究では LISW を後頭・上頸部へ適用すると、延髄周囲の脳幹領域のみに多数の軸索のうねりと軸索腫脹を認め、白質領域に関しても変化を認めた。このことから、後頭・上頸部群における致死的要因は、延髄を含む脳幹領域へ衝撃波の影響が及んだためと考えられた。

胸部が衝撃波に曝露されると無呼吸、徐脈、低血圧の特徴的な生理学的変化を呈し、肺 C 線維による迷走神経反射が関与しているとされる [33-36]。またモデルマウスに関して、右肺は左肺よりも迷走神経反射が起きやすいことが確認されている [37]。本研究では右胸部へ LISW を適用したが、明らかな迷走神経反射は認めなかった。

重度のびまん性脳損傷モデルでは、受傷後に呼吸抑制と低血圧を認め、呼吸抑制は末梢神経系ではなく中枢神経系の呼吸調整が関与していることが示唆されている [38]。また、爆発による重度の外傷性脳損傷モデルでは、脳幹不全により即死を引き起こした可能性があるとの報告もある [39]。ただし、いずれも神経病理学的分析は行われていない。脳幹損傷に関連する機能障害は、脳幹反射の異常、意識障害、呼吸不全、自律神経不全として現れることが報告されている。特に吻側腹側延髄損傷では、失調性呼吸（呼吸のリズム、深さ、強さなどの点で全く規則性のない状態）および中枢性無呼吸が観察されており、予後不良である [40]。また、脳幹損傷後には不整脈も頻繁に発生し、死亡率の増加と関連する [41]。脳幹反射は眼、咽頭など様々な臓器に関与するが、三叉神経心臓反射のよ

うに心拍数と血圧の突然の低下、不整脈、心停止、無呼吸をきたすなど、致命的な反射も存在する [42]。そして頭頸部への影響を伴う著明な徐脈と低血圧が存在する場合には、静脈空気塞栓症と脳幹反射を疑う必要があるとされる [43]。しかしながら、犬における重度の肺空気塞栓症後の血行力学的変化の研究では、モデル作製直後から心拍数と血圧の顕著な低下が生じることはなく、むしろ遅発性に生じることが確認されている [44]。以上から、本研究における受傷直後の心肺停止は、延髄を含む脳幹の損傷、あるいはそれによって引き起こされた重度の脳幹反射が原因であったことが示唆された。つまり、衝撃波による生体損傷の超急性期の病態メカニズムとして、延髄を含む脳幹領域への衝撃波の曝露が即死の原因となった可能性が高いと考えられた。

LISW は風圧を伴わず、そのエネルギーは空間的に限定されるため、衝撃波以外の影響および標的以外の組織や臓器への影響を共に排除することができ [45]、衝撃波による部位特異的な生体反応を検討する場合に利点であると考えられる。しかし爆傷の研究における一般的な比較対象は即席爆発装置 (IED) であり、IED における衝撃波の典型的な持続時間は 200  $\mu\text{s}$  から数 ms、ピーク圧力は 0.1 MPa から 3 MPa の範囲であると報告されている [46,47]。一方で、本研究における LISW の持続時間は 1.0  $\mu\text{s}$  程度、ピーク圧力は 80 MPa 程度であった。IED と比較した場合、本研究における衝撃波は持続時間が極めて短く、ピーク圧力が極めて高い傾向にあり、爆傷の研究としては本研究の限界であったと考えられる。爆傷の超急性期における衝撃波に関して、本研究の妥当性を検討するためには、今後の中型動物を用いた実爆やブラストチューブ等による研究が必要になるだろう。

本研究により、衝撃波による損傷に対する防護として、脳幹を保護できるような頭頸部の防護具の必要性が示唆された。また、衝撃波による致命的な損傷に対する初期治療として、中枢神経系に関連した呼吸賦活薬の検討の余地があると思われた。呼吸賦活薬の候補として、延髄の呼吸中枢に直接作用し呼吸興奮を起こすジモルホラミン、頸動脈小体および大動脈小体の末梢性化学受容器を刺激して、反射的に呼吸中枢を刺激するドキサプラムがあげられる [48-51]。衝撃波に対する防護具や呼吸賦活薬の有用性に関しては、今後の検討課題である。

## 第5章 結 論

1. LISW を用いて部位特異的に衝撃波を適用し、適用範囲に局限した損傷マウスモデルを作製することが可能であった。
2. 同強度の LISW を用いた場合、胸部よりも後頭・上頸部への適用が致命的な要因であった。
3. 延髄を含む脳幹に衝撃波を適用すると、脳幹損傷あるいはそれによって引き起こされる重度の脳幹反射が生じて即死に至ることが示唆された。



## 謝 辞

本研究にあたり、研究立案、研究方法、学会発表、論文執筆等、多くのご指導ご鞭撻を賜りました、防衛医学研究センター外傷研究部門 齋藤大蔵名誉教授、戸村哲教授、霧生信明助教、生体情報・治療システム研究部門 佐藤俊一教授、川内聡子准教授、ならびに歯科口腔外科 横江秀隆教授、村上馨准教授に心より深く感謝致します。

また研究器具や動物の管理にあたり、ご指導いただきました外傷研究部門実験補助の佐伯孝美様、須藤有希様、島田美奈子様には厚く御礼申し上げます。

またあらゆる場面におきまして、日常적으로ご支援を下さいました防衛医学研究センター外傷研究部門、生体情報・治療システム研究部門、防衛医科大学校病院救急部、歯科口腔外科、動物実験施設、ならびに共同利用研究施設の関係諸氏に御礼申し上げます。

付 記

本研究の一部を以下の論文で公表した。

筆頭者論文

1. **Yamamura K**, Kiri N, Tomura S, Kawauchi S, Murakami K, Sato S, Yokoe H. The cause of acute lethality of mice exposed to a laser-induced shock wave to the brainstem. *Scientific reports*, 2022;12:9490.

本研究の一部を以下の学術集会で発表した。

7th International Forum on Blast Injury Countermeasures 2023.5.17, 19

「Study on immediate death by blast injury using a site-specific injury model with laser-induced shock wave」

略語一覧

略語	外国語	日本語
LISW	Laser-induced shock wave	レーザー誘起衝撃波
J/cm <sup>2</sup>	Joule/cm <sup>2</sup>	ジュール/平方センチメートル
MPa	Megapascal	メガパスカル
Pa・s	Pascal-second	パスカル秒
HE	Hematoxylin & eosin	ヘマトキシリンエオジン
GFAP	Glial fibrillary acidic protein	グリア線維性酸性タンパク質
SpO <sub>2</sub>	Saturation of percutaneous oxygen	経皮的動脈血酸素飽和度
ANOVA	Analysis of variance	分散分析

## 引用文献

1. Tovar MA, Bell RS, Neal CJ. Epidemiology of Blast Neurotrauma: A meta-analysis of blast injury patterns in the military and civilian populations. *World neurosurgery*. 2021;146:308–314.
2. Singer P, Cohen JD, Stein M. Conventional terrorism and critical care. *Critical care medicine*. 2005;33:S61-65.
3. Ho AM. A simple conceptual model of primary pulmonary blast injury. *Medical hypotheses*. 2002;59:611–613.
4. Wightman JM, Gladish SL. Explosions and blast injuries. *Annals of emergency medicine*. 2001;37(6):664-678.
5. Argyros GJ. Management of primary blast injury. *Toxicology*. 1997;25:121(1):105-115.
6. Wood GW, Panzer MB, Shridharani JK, Matthews KA, Capehart BP, Myers BS, Bass CR. Attenuation of blast pressure behind ballistic protective vests. *Injury prevention*. 2013;19(1):19-25.
7. Clemedson CJ, Hultman HI. Air embolism and the cause of death in blast injuries. *Military surgeon*. 1954;114:424–437.
8. Bellamy, R. F. Conventional warfare: Ballistic, blast, and burn injuries. 5, 295–335 (1991).
9. Irwin RJ, Lerner MR, Bealer JF, Mantor PC, Brackett DJ, Tuggle DW. Shock after blast wave injury is caused by a vagally mediate

- d reflex. *The Journal of trauma*. 1999;47:105–110.
10. Miyawaki H, Saitoh D, Hagiwara K, Noguchi M, Sato S, Kinoshita M, Miyazaki H, Satoh Y, Harada N, Sakamoto T. Noradrenalin effectively rescues mice from blast lung injury caused by laser-induced shock waves. *Intensive care medicine experimental*. 2015;3:32.
  11. Sekine Y, Saitoh D, Yoshimura Y, Fujita M, Araki Y, Kobayashi Y, Kusumi H, Yamagishi S, Suto Y, Tamaki H, Ono Y, Mizukaki T, Nemoto M. Efficacy of body armor in protection against blast injuries using a swine model in a confined space with a blast tube. *Annals of biomedical engineering*. 2021;49:2944–2956.
  12. Paula MM, Richard MS, Lewis A, Murray DA, Eileen HB, Virginia CK, Audrey G, Mary VH, Andrew H, Paul WJ, Kieran K, Ann K, Suzanne CL, Donald AM, Denis O, Bonnie S, Michael S, Marita T. Dyspnea. Mechanisms, assessment, and management: a consensus statement. American Thoracic Society. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1999;159(1):321-340.
  13. Satoh Y, Sato S, Saitoh D, Tokuno, Hatano B, Shimokawaji T, Kobayashi H, Takishima K. Pulmonary blast injury in mice: a novel model for studying blast injury in the laboratory using laser-induced stress waves. *Lasers in surgery and medicine*. 2010;42(4):313-318.
  14. Cho SI, Gao SS, Xia A, Wang R, Salles FT, Raphael PD, Abaya H, Wachtel J, Baek J, Jacobs D, Rasband MN, Oghalai JS. Mechanisms of hearing

- loss after blast injury to the ear. *PloS one*. 2013;8:e67618.
15. Niwa K, Mizutari K, Matsui T, Kurioka T, Matsunobu T, Kawauchi S, Satoh Y, Sato S, Shiotani A, Kobayashi Y. Pathophysiology of the inner ear after blast injury caused by laser-induced shock wave. *Scientific reports*. 2016;6:31754.
  16. Svetlov SI, Prima V, Kirk DR, Gutierrez H, Curley KC, Hayes RL, Wang KKW. Morphologic and biochemical characterization of brain injury in a model of controlled blast overpressure exposure. *The Journal of trauma*. 2010;69:795–804.
  17. Tomura S, Seno S, Kawauchi S, Miyazaki H, Sato S, Kobayashi Y, Saitoh D. A novel mouse model of mild traumatic brain injury using laser-induced shock waves. *Neuroscience letters*. 2020;721:134827.
  18. Sato S, Kawauchi S, Okuda W, Nishidate I, Nawashiro H, Tsumatori G. Real-time optical diagnosis of the rat brain exposed to a laser-induced shock wave: observation of spreading depolarization, vasoconstriction and hypoxemia-oligemia. *PLoS one*. 2014;9(1):e82891.
  19. Bodian D. A new method for staining nerve fibers and nerve endings in mounted paraffin sections. *The Anatomical record*, 1936;65:89-97.
  20. Klüver H, Barrera E. A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 1953;12(4):400-403.
  21. Zhang D, Yamaguchi S, Zhang X, Yang B, Kurooka N, Sugawara R,

- Albuayjan HH, Nakatsuka A, Eguchi J, Hiyama T, Kamiya A, Wada J. Upregulation of Mir342 in Diet-Induced Obesity Mouse and the Hypothalamic Appetite Control. *Frontiers in endocrinology*. 2021;12:727915.
22. Yang Y, Li S, Huang H, Lv 2, Chen S, Dias ACP, Li Yu, Liu X, Wang Q. Comparison of the Protective Effects of Ginsenosides Rb1 and Rg1 on Improving Cognitive Deficits in SAMP8 Mice Based on Anti-Neuroinflammation Mechanism. *Frontiers in pharmacology*. 2020;11:834.
23. Liu Q, He S, Groysman L, Shaked D, Russin J, Cen S, Mack3 WJ. White matter injury due to experimental chronic cerebral hypoperfusion is associated with C5 deposition. *PLoS one*. 2013;8(12)
24. Miyamoto E, Nakao S, Tomimoto H, Wakita H, Yamada M, Masuzawa M, Takahira K, Sakamoto S, Shingu K. Ketamine attenuates hypocapnia-induced neuronal damage in the caudoputamen in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion. *Neuroscience letters*. 2004;354(1):26–29.
25. Wakita H., Tomimoto H., Akiguchi I., Lin J.-X., Miyamoto K., Oka y N. A cyclooxygenase-2 inhibitor attenuates white matter damage in chronic cerebral ischemia. *Neuroreport*. 1999;10(7):1461–1465.
26. Tapia RJM, Rojo FE, Aceves TGL, Velasco SG, Mata VR, Camarillo EP, Torres AP, Flores EYL, Muñoz PU, Navarro RN, L Navarro. A model of traumatic brain injury in rats is influenced by neuroprotection of

- diurnal variation which improves motor behavior and histopathology in white matter myelin. *Heliyon*. 2023;9(5):e16088.
27. Meislin H, Criss EA, Judkins D, Berger R, Conroy C, Parks B, Spaite DW, Valenzuela TD. Fatal trauma: the modal distribution of time to death is a function of patient demographics and regional resources. *The Journal of trauma*. 1997;43(3):433-440.
  28. Sauaia A, Moore FA, Moore EE, Moser KS, Brennan R, Read RA, Pons PT. Epidemiology of trauma deaths: a reassessment. *The Journal of trauma*. 1995;38(2):185-193.
  29. Kim AS, Moffatt E, Ursell PC, Devinsky O, Olgin J, Tseng ZH. Sudden neurologic death masquerading as out-of-hospital sudden cardiac death. *Neurology*. 2016;87(16):1669-1673.
  30. Tang-Schomer MD, Patel AR, Baas PW, Smith DH. Mechanical breaking of microtubules in axons during dynamic stretch injury underlies delayed elasticity, microtubule disassembly, and axon degeneration. *FASEB journal*. 2010;24:1401–1410.
  31. Pernici CD, Kemp BS, Murray TA. Time course images of cellular injury and recovery in murine brain with high-resolution GRIN lens system. *Scientific reports*. 2019;9:7946.
  32. Tang-Schomer MD, Johnson VE, Baas PW, Stewart W, Smith DH. Partial interruption of axonal transport due to microtubule breakage accounts for the formation of periodic varicosities after traumatic axonal injury.



- Experimental neurology. 2012;233:364–372.
33. Ohnishi M, Kirkman E, Guy RJ, Watkins PE. Reflex nature of the cardiorespiratory response to primary thoracic blast injury in the anaesthetised rat. *Experimental physiology*. 2001;86:357–364.
  34. Wolf SJ, Bebarta VS, Bonnett CJ, Pons PT, Cantrill SV. Blast injuries. *Lancet*. 2009;374:405–415.
  35. Guy RJ, Kirkman E, Watkins PE, Cooper GJ. Physiologic responses to primary blast. *The Journal of trauma*. 1998;45:983–987.
  36. Coleridge JC, Coleridge HM. Afferent vagal C fibre innervation of the lungs and airways and its functional significance. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*. 1984;99:47–72.
  37. Song N, Liu J, Proctor M, Yu J. Right and left vagus nerves regulate breathing by multiplicative interaction. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2015;219:25-29.
  38. Marmarou A, Foda MA, Brink WVD, Campbell J, Kita H, Demetriadou K. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *Journal of neurosurgery*. 1994;80:291–300.
  39. Kuehn R, Simard PF, Driscoll I, Keledjian K, Ivanova S, Tosun C, Williams A, Bochicchio G, Gerzanich V, Simard JM. Rodent model of direct cranial blast injury. *Journal of neurotrauma*. 2011;28:2155–2169.
  40. Benghanem S, Mazeraud A, Azabou E, Chhor V, Shinotsuka CR, Claassen J, Rohaut B, Sharshar T. Brainstem dysfunction in critically ill

- patients. *Critical care*. 2020;24:5.
41. Stober T, Sen S, Anstatt T, Bette L. Correlation of cardiac arrhythmias with brainstem compression in patients with intracerebral hemorrhage. *Stroke*. 1988;19:688–692.
  42. Chowdhury T, Petropolis A, Cappellani RB. Cardiac emergencies in neurosurgical patients. *BioMed research international*. 2015;2015:751320.
  43. Recinos MA, Hsieh J, Mithaiwala H, Mucci JJ, Recinos PF. A rare appearance of the trigeminocardiac reflex during resection of posterior parasagittal meningioma. *Surgical neurology international*. 2021;12:183.
  44. Tanus-Santos JE, Gordo WM, Udelsmann A, Cittadino MH, Moreno H Jr. Nonselective endothelin-receptor antagonism attenuates hemodynamic changes after massive pulmonary air embolism in dogs. *Chest*. 2000;118:175–179.
  45. Miyai K, Kawauchi S, Kato T, Yamamoto T, Mukai Y, Yamamoto T, Sato S. Axonal damage and behavioral deficits in rats with repetitive exposure of the brain to laser-induced shock waves: Effects of inter-exposure time. *Neuroscience letters*. 2021;749:135722.
  46. Courtney MW, Courtney AC. Working toward exposure thresholds for blast-induced traumatic brain injury: Thoracic and acceleration mechanisms. *Neuroimage*. 2011;54(Suppl 1):S55–61.

47. Jitsu M, Niwa K, Suzuki G, Obara T, Iwama Y, Hagsawa K, Takahashi Y, Matsushita Y, Takeuchi S, Nawashiro H, Sato S, Kawauchi S. Behavioral and histopathological impairments caused by topical exposure of the rat brain to mild-impulse laser-induced shock waves: impulse dependency. *Frontiers in neurology*. 2021;12:621546.
48. Kyosuke K, Muneyoshi O, Yukio H, Hideyuki Y. A novel adipocytokine, omentin, inhibits agonists-induced increases of blood pressure in rats. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*. 2013;75(8):1029-1034.
49. Hiromi I, Kazuaki S, Norio O, Mayumi O, Masakazu I, Hiroshi A. Measurement of respiratory function using whole-body plethysmography in unanesthetized and unrestrained nonhuman primates. *The Journal of toxicological sciences*. 2010;35(6):863-870.
50. Greenstone M, Lasserson TJ. Doxapram for ventilatory failure due to exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2003;(1):CD000223.
51. Yost CS. A new look at the respiratory stimulant doxapram. *CNS drug reviews*. 2006;12(3-4):236-249.

図 表

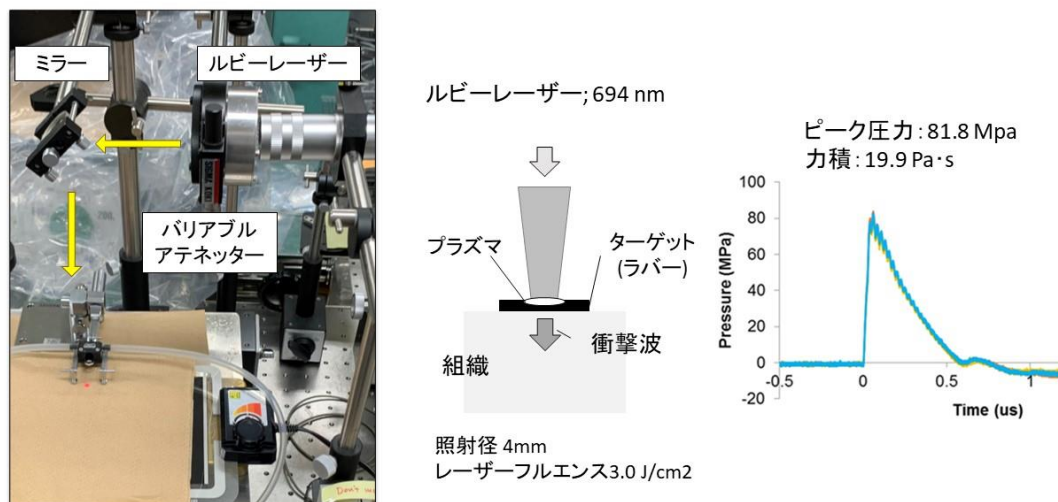


図 1 レーザー誘起衝撃波 (LISW) の原理と衝撃波波形

衝撃波の作製装置には、波長 694 nm のルビーレーザーを使用した。本研究では、ルビーレーザーのエネルギーを高出力に設定し、その後バリアブルアテネッターを通して、レーザーの出力を減衰させることで、最終的にターゲットに至るエネルギーフルエンスを安定化させた。ターゲットの照射径は 4 mm、エネルギーフルエンスは 3.0 J/cm<sup>2</sup> とした。作製された衝撃波の波形は、ピーク圧力 82 MPa、力積 20 Pa·s であり、作製された衝撃波は、衝撃波管等で作製された一般的な衝撃波の波形よりも持続時間は大幅に短く、ピーク圧力は高い傾向にある波形であった。

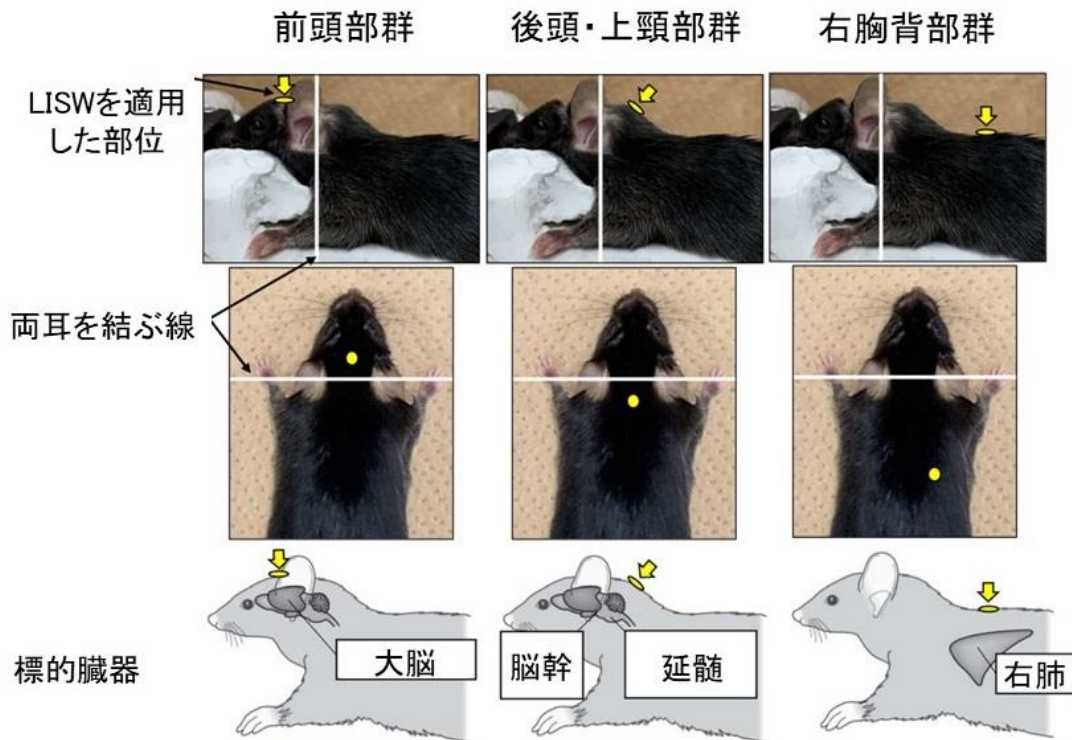


図2 3群の部位特異的損傷モデルマウスの作製方法

LISW を適用した部位を群名とし、前頭部群（標的は脳）、後頭・上頸部群（標的は脳幹）、右胸背部群（標的は右肺）の3群を作製した。黄色点がレーザーの照射位置で、黄色矢印がレーザー照射方向である。LISW 適用直前から、生理学的変化として SpO<sub>2</sub>、脈拍数、平均血圧、呼吸数を測定した。

<b>Number of mice</b>			
<b>Group</b>	<b>Frontal</b>	<b>Upper neck</b>	<b>Thoracic</b>
Survival	8	4	10
Mortality	2	6	0
Total	10	10	10

図 3 LISW 適用後の生存率

生存率は、前頭部群で 80%、後頭・上頸部群で 40%、右胸背部群で 100%であった（各群：n = 10）。

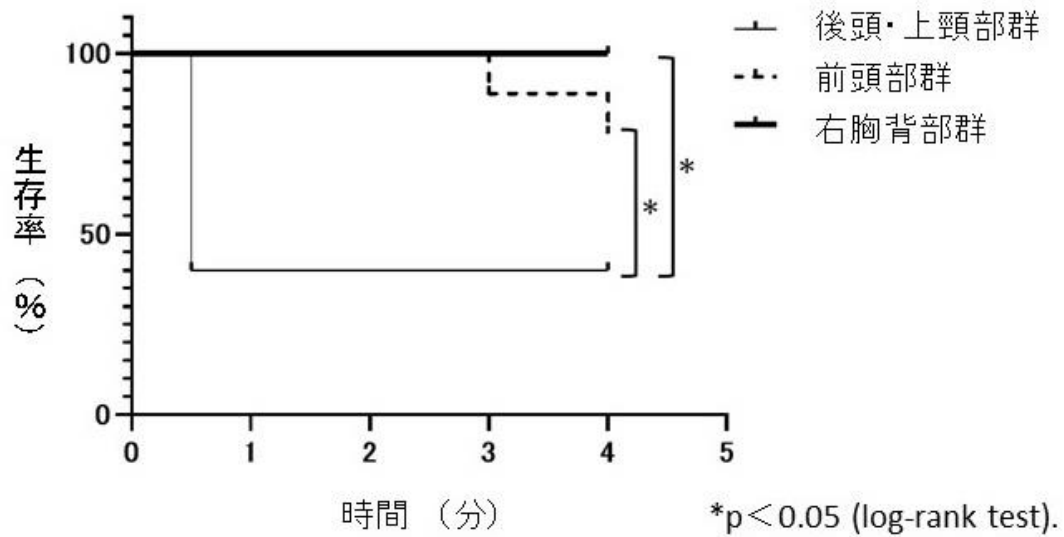


図 4 LISW 適用後の生存曲線

LISW 適用後の生存曲線を示す。前頭部群では、死亡したマウスはすべて、3-4 分後に呼吸停止と脈拍消失を認めた。後頭・上頸部群では、死亡したマウスはすべて 1 分以内に呼吸停止と脈拍消失を認めた。後頭・上頸部群は他の 2 群と比較して生存時間が有意に短縮していた (各群 : n = 10)。

Minute	Peripheral oxyhemoglobin saturation (%)			Pulse rate (beats per minute)			Mean blood pressure (mmHg)			Respiratory rate (breathes per minute)		
	Frontal (n)	Upper neck (n)	Thoracic (n)	Frontal (n)	Upper neck (n)	Thoracic (n)	Frontal (n)	Upper neck (n)	Thoracic (n)	Frontal (n)	Upper neck (n)	Thoracic (n)
#	97.1 ± 1.4 (10)	97.1 ± 0.8 (10)	96.4 ± 1.4 (10)	389.9 ± 68.7 (10)	413.4 ± 66.1 (10)	355.8 ± 63.6 (10)	91.5 ± 17.2 (10)	97.7 ± 27.6 (10)	91.5 ± 18.5 (10)	110.1 ± 30.3 (10)	112.3 ± 26.4 (10)	141.2 ± 43.7 (10)
0.5	96.6 ± 1.8 (10)	59.9 ± 18.8** (8)	90.1 ± 7.4 (10)	372.2 ± 74.8 (10)	270.7 ± 57.4* (8)	365.7 ± 61.8 (10)				123.3 ± 51.6 (10)	100.6 ± 26.7 (8)	152.1 ± 51.7 (10)
1	96.7 ± 2.7 (10)	75.5 ± 23.7 (4)	92.2 ± 6.1 (10)	374.3 ± 58.8 (10)	347.0 ± 82 (4)	354.5 ± 66.4 (10)	80.7 ± 27.2 (10)	82.5 ± 10.9 (4)	77.5 ± 20.0 (10)	82.8 ± 40.9 (10)	89.0 ± 42.3 (4)	141.3 ± 63.0 (10)
1.5	97.6 ± 0.9 (10)	81.3 ± 27.8 (4)	93.6 ± 4.9 (10)	358.3 ± 65.5 (10)	329.0 ± 67.9 (4)	358.9 ± 73.2 (10)				104.6 ± 62.0 (10)	106.5 ± 60.7 (4)	150.1 ± 52.5 (10)
2	97.5 ± 1.3 (10)	88.6 ± 15 (4)	92.5 ± 6.7 (10)	338.2 ± 78.8 (10)	374.5 ± 119.0 (4)	356.9 ± 76.0 (10)	76.0 ± 21.2 (10)	90.8 ± 47.7 (4)	89.2 ± 36.5 (10)	137.3 ± 88.0 (10)	96.3 ± 67.1 (4)	157.7 ± 58.4 (10)
2.5	96.7 ± 3.7 (10)	85.1 ± 20.1 (4)	92.4 ± 6.4 (10)	341.8 ± 89.9 (10)	344.8 ± 69.9 (4)	352.1 ± 74.1 (10)				106.6 ± 42.9 (10)	139.5 ± 60.4 (4)	114.5 ± 49.5 (10)
3	97.0 ± 2.4 (10)	95.8 ± 2 (4)	91.7 ± 7.5 (10)	337.6 ± 84.1 (10)	335.0 ± 51.7 (4)	362 ± 83.3 (10)	84.4 ± 18.3 (10)	83.0 ± 28.8 (4)	88.5 ± 23.2 (10)	115.2 ± 35.2 (10)	84.5 ± 42.4 (4)	142.8 ± 51.2 (10)
3.5	97.0 ± 1.8 (9)	96.7 ± 0.7 (4)	91.6 ± 7.5 (10)	311 ± 49.6 (9)	357.0 ± 65.0 (4)	354.9 ± 81.3 (10)				110.8 ± 35.3 (9)	148.8 ± 88.4 (4)	117.6 ± 36.6 (10)
4	97.3 ± 1.0 (9)	96.8 ± 0.6 (4)	93.1 ± 5.6 (10)	321.7 ± 60.9 (9)	385.0 ± 119.6 (4)	356.7 ± 77.6 (10)	80.1 ± 23.1 (9)	96.3 ± 7.9 (4)	87.6 ± 13.5 (10)	102.3 ± 34.7 (9)	177.8 ± 133.0 (4)	127.0 ± 44.3 (10)

**Table 2.** Comparison of post-LISW vital signs. n: number of animals excluding dead animals in each group. \*\* $p < 0.01$ , vs. Frontal and Thoracic groups. \* $p < 0.05$ , vs. Frontal and Thoracic groups. #: Immediately before LISW application.

## 図 5 LISW 適用後の生理学的変化

後頭・上頸部群では、LISW 適用直後に SpO<sub>2</sub> と脈拍数の有意な低下を認め、特に SpO<sub>2</sub> は著明な変化であった。その後、3 分以内に LISW 適用前の SpO<sub>2</sub>、脈拍数とほぼ同様の値となった。前頭部群では SpO<sub>2</sub> と脈拍数に明らかな変化は認めなかった。右胸背部群では、LISW 適用後に SpO<sub>2</sub> の軽度低下を認め、適用前の値まで回復しない傾向にあった。



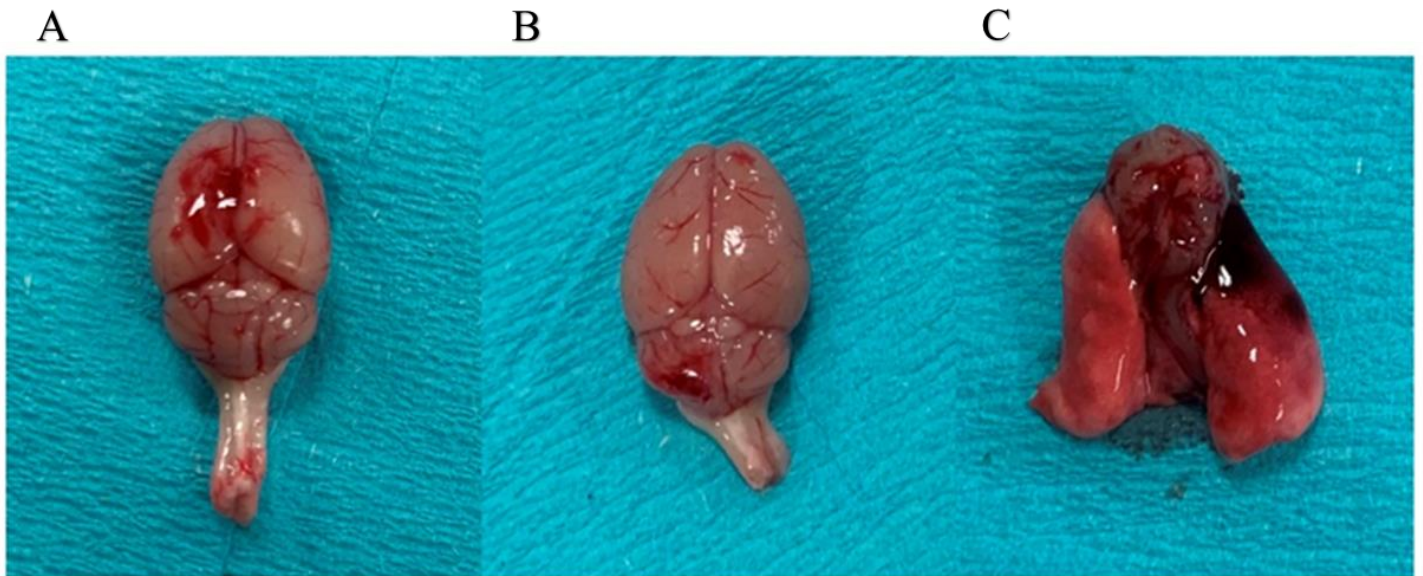


図6 受傷臓器の形態学的変化

A：前頭部群

B：後頭・上頸部群

C：右胸背部群

各群で LISW 適用後に採取した臓器を示す。前頭部群では大脳の脳表面に、後頭・上頸部群では小脳の脳表面に、右胸部群では右肺に出血を伴うことを確認した。それぞれ適用した部位以外に出血を伴う臓器は認めなかった（各群：n = 10）。

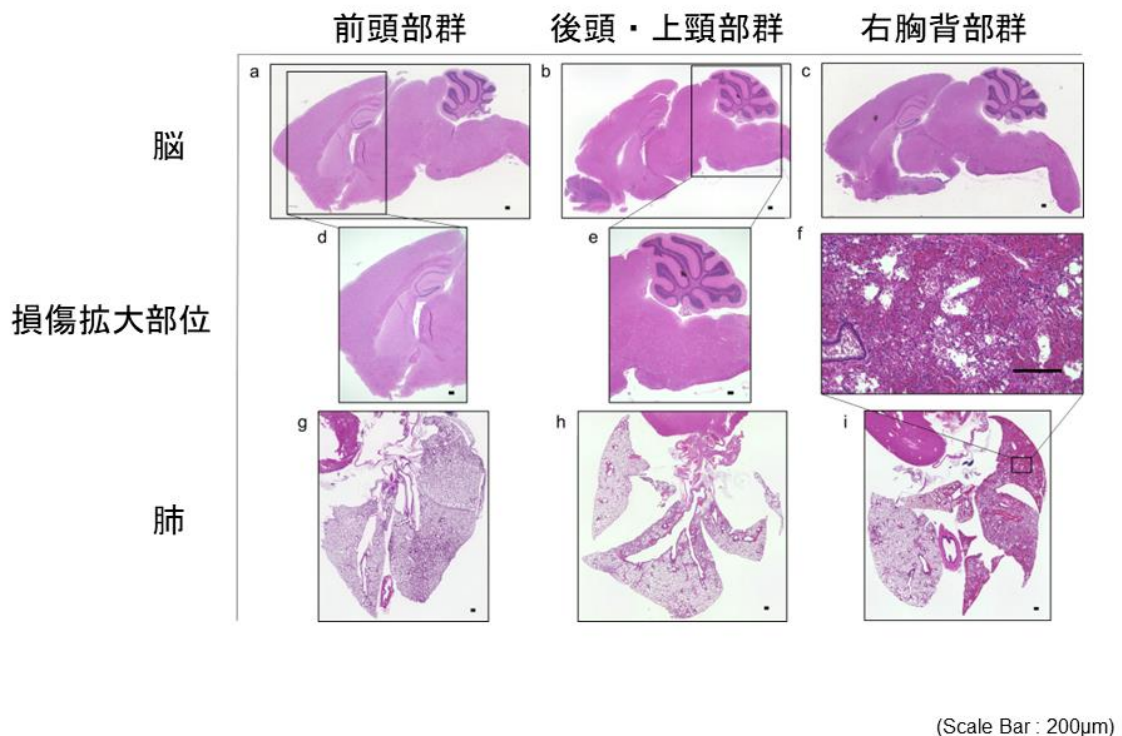


図 7 LISW 適用後の組織学的変化 (HE 染色)

3 群ともに脳に明らかな組織学的変化は認めなかった (a-e)。右胸背部群では、右肺にのみ肺胞壁の伸長と毛細血管破壊に関連する肺胞出血を認めた (f, i)。右肺以外に損傷部位は認めず、右肺に限局した損傷モデルであった (各群:n = 10)。

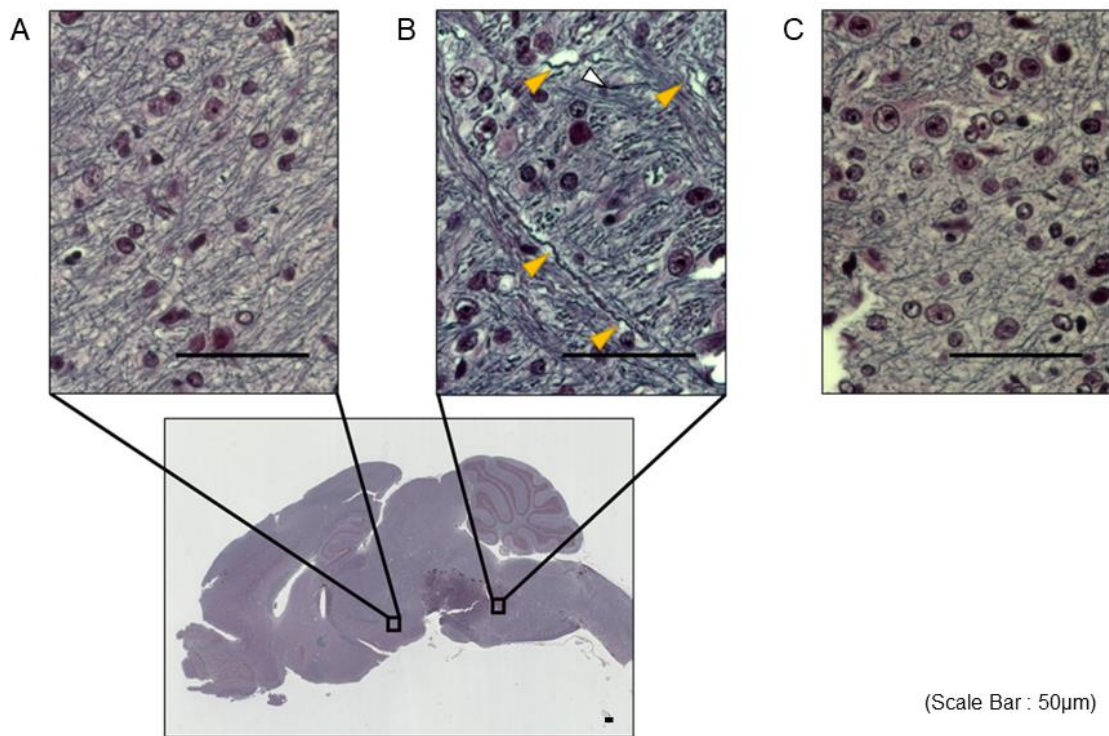


図 8 後頭・上頸部に LISW 適用後の組織学的変化 (Bodian 染色)

後頭・上頸部群に関して、視床下部領域では、LISW を後頭・上頸部に適用しても明らかな変化を認めなかった (A)。延髄領域では、軸索のうねり (黄色矢印) とやや腫大した軸索 (白矢印) を認めた (B)。無処置群に関して、延髄領域に後頭・上頸部群と類似するような所見は認めなかった (C) (各群:  $n = 4$ )。

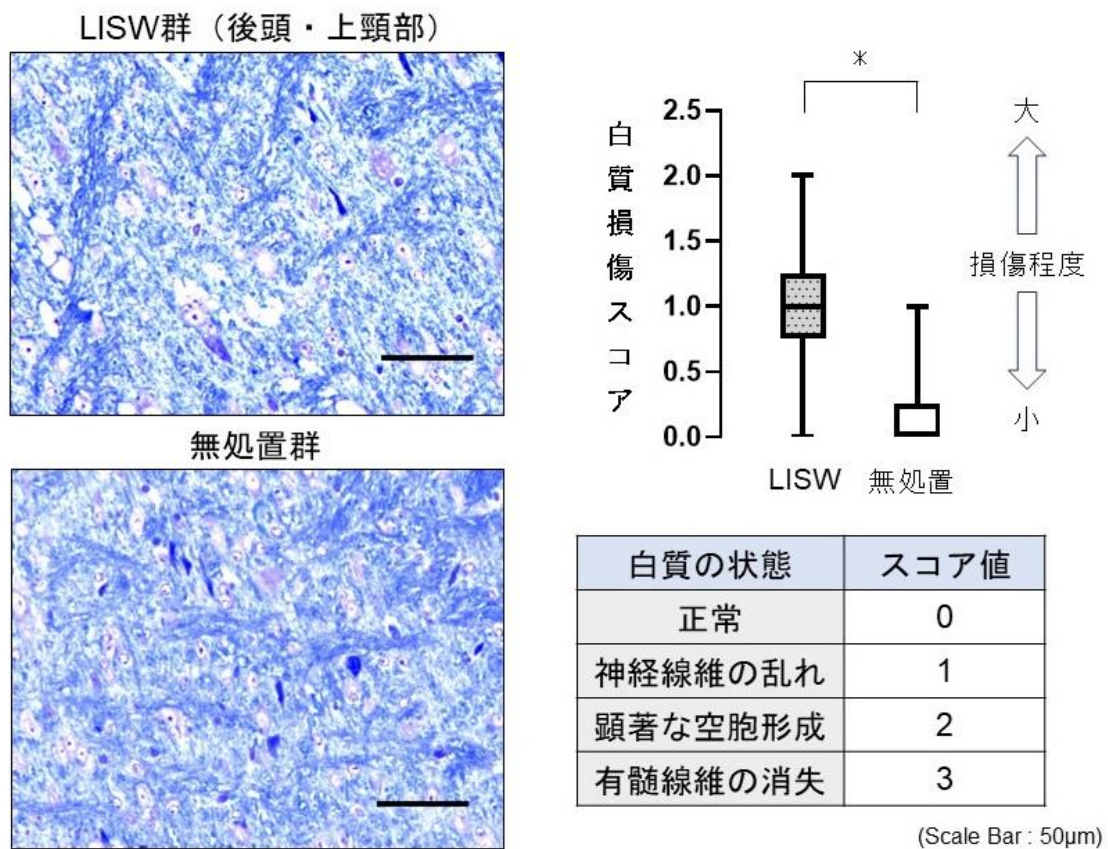


図9 後頭・上頸部に LISW 適用後の組織学的変化（Kluver-Barrera 染色）  
 脳幹領域における Kluver-Barrera 染色において、後頭・上頸部群では無処置群と比較し、有髓線維の乱れを伴い、細胞質の空胞化がやや増加している傾向にあった（各群画像：n = 40）。白質損傷スコアにおいて、無処置群と比較し、後頭・上頸部群が有意に高値であった（\*p < 0.05）。



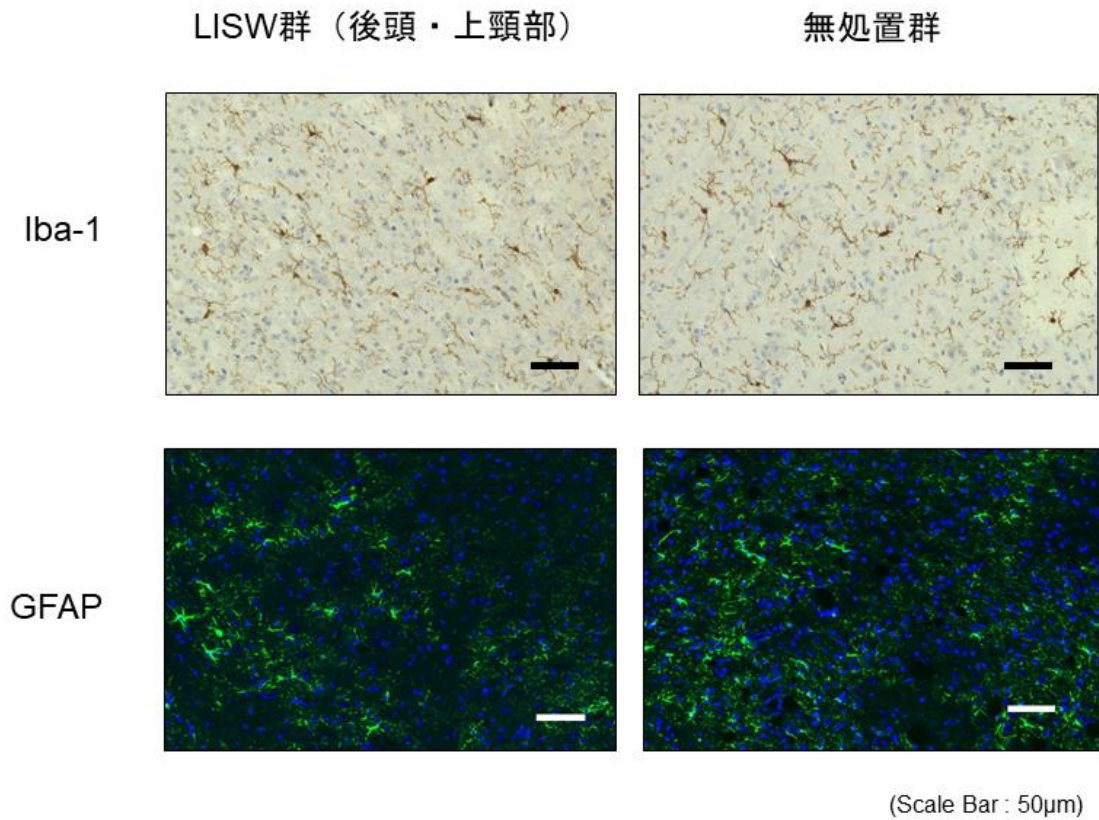


図 10 後頭・上頸部に LISW 適用後の免疫組織化学的变化 (Iba-1、GFAP)

脳幹領域における免疫組織化学的染色 (Iba-1、GFAP) において、後頭・上頸部群と無処置群で明らかな変化は認めなかった。GFAP 陽性細胞 (緑色)、細胞核 (青色) (各群 : n = 4)。