

うつ様行動を呈する軽症頭部爆傷モデルマウスに対する
選択的セロトニン取り込み阻害薬の効果

せ の そう い ち ろ う
瀬野 宗一郎

(救急医学専攻)

防衛医科大学校

令和元年度

目次

	頁
第 1 章 緒言	1
第 2 章 うつ様行動を呈する軽症頭部爆傷モデルマウスに対する SSRI の効果とその機序の解明	2
2.1 背景	2
2.1.1 モノアミン仮説	2
2.1.2 うつ病と神経新生	3
2.1.3 TBI と神経新生	5
2.2 目的	6
2.3 方法	6
2.3.1 レーザー誘起衝撃波 (LISW)	6
2.3.2 薬剤投与及び動物の群分け	8
2.3.3 行動実験	8
2.3.4 ELISA 法	9
2.3.5 免疫組織染色	11
2.3.5.1 Brd-U と DCX の共染色	11
2.3.5.2 pCREB の陽性細胞率	13
2.3.6 統計学的手法	15
2.4 結果	16
2.4.1 行動実験における無動時間の比較	16
2.4.2 BDNF 蛋白量と Serotonin 量の解析	16

2.4.3	新生神経細胞数の比較	17
2.4.3.1	Brd-U 及び DCX 共陽性細胞数の解析	17
2.4.3.2	pCREB 陽性細胞率の解析	18
2.5	考察	19
第 3 章	総括	23
第 4 章	結論	25
第 5 章	謝辞	25
	略語一覧	27
	参考文献	29
	図	

第 1 章 緒 言

近年、海外でテロリズムの手段としてもっとも多く用いられているのは爆発物であり、世界各国において爆傷による死者や負傷者が年々増加している[1]。2020年に東京オリンピック・パラリンピック、2025年には大阪万博の開催が予定されており、日本国内でも爆発物によるテロリズムが起こる可能性は決して低いわけではなく、爆傷研究は益々重要な課題になってきている。

また、2007年以降、イラクやアフガニスタンで爆弾攻撃を受けた米軍兵士が、軽症であったにも関わらず、帰国後に記憶障害、集中力低下、人格変化などの高次脳機能障害、あるいは慢性期にうつ病を呈する、いわゆる軽症頭部爆傷（mild blast-induced traumatic brain injury: mild bTBI）の発生が報告されている[2-4]。非爆傷性の軽症頭部外傷（mild traumatic brain injury: mild TBI）の代表疾患である脳震盪では、回転加速度がその発生機序において重要な役割を果たすとされているが[5]、mild bTBIの発生機序は非爆傷性のそれとは異なると考えられている[6, 7]。

防衛医科大学校において、佐藤らは YAG レーザーによるレーザー誘起衝撃波（laser-induced shock wave: LISW）を用いて、マウスの bTBI モデルを

開発した[8]。LISWは、安全且つ小型で取扱いが容易であり、再現性や制御性にも優れている。さらには照射する部位や強度も選択できるという利点をもつ。そこで、防衛医科大学校外傷研究部門の戸村らは、このLISWを用いて慢性期（照射28日後）にうつ様行動を示すマウスの mild bTBI のモデルを作成した[9]。ここで”mild”の定義は、頭部の外表面上に肉眼的に明らかな外傷性変化がないものとした。

本研究は防衛医科大学動物実験倫理委員会の承認を受けて実施した（承認番号16010）。

第2章 うつ様行動を呈する軽症頭部爆傷モデルマウスに対するSSRIの効果とその機序の解明

2.1 背景

2.1.1 モノアミン仮説

1950年代、シナプス間隙のモノアミン濃度が上昇するとうつ状態が改善し、低下するとうつ状態が増悪するという、モノアミン仮説が提唱されるようになった[10]。うつ病に対する代表的な治療薬である選択的セロトニン取り込み阻害薬

(selective serotonin reuptake inhibitor: SSRI)は[11]、

神経接合部前シナプスで、モノアミンの一種であるセロトニンの再取り込みを阻害し、シナプス間隙のセロトニン濃度を上昇させ、それによって神経伝達を強化することで抗うつ効果を発揮すると言われてきた[12]。しかし、シナプス間隙におけるモノアミン濃度の上昇が抗うつ薬投与後比較的短時間で起こるにも関わらず、SSRIの効果発現は投与からおよそ1週間以降にみられ、症状の改善までには3か月程度かかることされており、モノアミン仮説で想定されている以外の作用機序が注目されるようになってきた[10, 12]。

2.1.2 うつ病と神経新生

うつ病の病態に、神経新生(neurogenesis)が関与している可能性が指摘されている[13-18]。神経新生とは、神経幹細胞や前駆細胞から新たな神経細胞が分化する生理現象であり、胚や胎児期に最も活性化し、脳の形成や発達に重要な役割を果たすと考えられている。個体が成長するにつれて新生する神経は減少していくが、海馬や脳室下帯では成熟後も神経新生が続くことが確認されている[17]。そして抗うつ薬の作用機序として新

たに提唱された説が、海馬における神経新生の活性化である。海馬歯状回において、ストレスは神経新生を抑制するが[13]、作用するモノアミンの種類に関わらず、抗うつ薬の投与は神経新生を促進すると言われている[13-16]。

神経新生には、機能性蛋白である脳由来神経栄養因子 (brain derived neurotrophic factor: BDNF) の関与が強く示唆されている[15, 17, 18]。BDNFは、神経成長因子 (neuron growth factor: NGF) と同様に neurotrophin family に属する神経栄養因子であり、神経細胞の維持、神経突起の伸長、神経伝達物質の合成促進などに関与する。

また、BDNFの遺伝子発現には、細胞内の転写因子である環状アデノシンーリン酸応答配列結合タンパク質 (cyclic adenosine monophosphate response element binding protein: CREB) がリン酸化された、リン酸化 CREB (phosphorylated cyclic adenosine monophosphate response element binding protein: pCREB) が必要であるが、抗うつ薬を慢性投与すると、この pCREBが増加すると言われている[19, 20]。BDNFと pCREBの反応経路を図1に示した[17, 21]。BDNFは細胞質内で様々な経路を経て pCREBを活性化させる。

pCREB は BDNF の遺伝子発現に関与している。

2.1.3 TBI と神経新生

TBI 受傷後にも、海馬の歯状回や側脳室の脳室下帯で神経新生が起こると言われている。神経新生は、早ければ受傷後 2 日で、受傷側の海馬や脳室下帯で起こる。神経新生は、海馬では 1 か月、脳室下帯では 2 週間持続し、長ければ 1 年間持続する [22]。TBI 受傷後、海馬や脳室下帯で神経幹細胞 (neural stem cell: NSC) が作られ、海馬や脳室下帯から受傷部位に移動する [23]。それとともに、血管内皮細胞から BDNF や血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) が分泌され、NSC の分化や増殖を促す [22]。TBI 受傷後 2 週間程度経過すると、新たに作られた神経細胞はその神経軸索を海馬まで延長させ始め、それが高次脳機能障害の改善に役立つ [22]。また、海馬における神経新生には、海馬での CREB のリン酸化が深く関与していると言われている [24-28]。

2.2 目的

戸村らの先行研究を踏まえて、本研究では mild bTBI のモデルマウスに対して、うつ病の治療薬とされている SSRI を投与し、その治療効果と機序の解明を試みた。

2.3 方法

2.3.1 レーザー誘起衝撃波 (LISW)

LISW の発生原理を図 2 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 (LISW) 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・Nd:YAG レーザー (Les Ulis Cedex 社、フランス) の第二高調波 532 nm 光 (パルス幅 6 ns) を用いて LISW を発生させた [8, 29]。

雄性 C57BL/6 マウス (8 週齢、22-25 g、日本 SLC 社、静岡) を用いて実験を行った。マウスは

気温 22-24 度で、自由に水を飲んだりエサを食べたりすることができる環境下で飼育した。

LISW 照射前に、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) とキシラジン (10 mg/kg) (セラクター®2%注射液、バイエル薬品、東京) を筋肉注射して麻酔を行った。麻酔後、体毛と皮膚の間に空気がトラップされて衝撃波が減衰するのを防ぐために、除毛クリーム (Veet®除毛クリーム、Reckitt Benckiser 社、フランス) を用いてマウスの頭部を剃毛した。左頭頂部にターゲットを置き、皮膚の上からレーザースポット径 6 mm で LISW を 1 回照射した (図 3)。

Mild bTBI モデルに必要な条件を、LISW 照射直後のマウスの脳表に肉眼的に明らかな外傷性変化が認められないこととした。先行研究において、フルエンス 0.6 J/cm^2 以上ではマウスの脳表に出血や骨折が認められたが、 0.5 J/cm^2 以下では明らかな外傷性変化を認めなかったため [9]、フルエンス 0.5 J/cm^2 を閾値と考え、この条件下で実験を行った (ピーク圧力: 48.56 MPa) [8, 29]。

2.3.2 薬剤投与及び動物の群分け

慢性期にうつ様行動を呈するモデルマウスに SSRI である Sertraline (セルトラリン塩酸塩、和光純薬工業、大阪) を投与している文献を参考にして [30-32]、Sertraline 15mg/kg を蒸留水に溶解し、ゾンデを用いて経口投与した。SSRI は可能な限り迅速に投与し、できる限りマウスに苦痛を与えないように十分に留意した。Sertraline の投与期間は、文献を参考に LISW 照射翌日から 14 日間とした [32, 33]。

マウスを以下の 3 群に分けた。

LISW+SSRI 群 : LISW を照射し、Sertraline (15mg/kg) を経口で 14 日間投与した。

LISW+Vehicle 群 : LISW を照射し、蒸留水を経口で 14 日間投与した。

Sham 群 : 麻酔後に頭部は剃毛するも LISW は照射せず、蒸留水を経口で 14 日間投与した。

今回の実験スケジュールを図 4 に示した。

2.3.3 行動実験

LISW 照射 28 日後に tail suspension test と強制水泳試験を行った。Tail suspension test や強制水泳試験は、

マウスのうつ様行動を評価する目的で行われる代表的な行動実験である[34-36]。

Tail suspension testでは、まず地面から70cmの高さに設置された棒に、マウスの尻尾を粘着性のテープで貼り付け（尻尾の先端から約1cm）、マウスを逆さ吊りの状態にした。それから6分間の間で、マウスが逆さ吊りの状態で動かなくなった時間（無動時間）を計測した[34, 35]。

強制水泳試験では、まずプラスチック製の容器（高さ：25cm、直径：20cm）に水を入れ（水温： $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、深さ13cm）、その水にマウスをそっと浸した。それから6分間の間で泳ぐのを止めている時間（無動時間）を各群で計測した[35, 36]。

各群の無動時間を比較することで、どの群のマウスがうつ様行動を示したかを検討した。

2.3.4 ELISA 法

LISW照射28日後に、マウスにケタミン（100mg/kg）とキシラジン（10mg/kg）を筋肉注射して麻酔した後、頸椎脱臼により安楽死させた。その後、速やかにマウスの左側の海馬を摘出し、液体窒素で一時的に凍結させた後に、 -80°C で冷凍保存した。

摘出海馬は、Pierce® RIPA Lysis 緩衝液（25mM トリ

ス-HCl、pH 7.6、150 mM NaCl、1% NP-40、1% デオキシコール酸ナトリウム、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム）（Thermo Fisher Scientific 社、米国）を用いてホモジナイズした。プロテアーゼ阻害剤は cOmplete®プロテアーゼ阻害剤カクテル錠（Roche 社、ドイツ）を使用した。ホモジナイズされた海馬を遠心分離し（4℃、15000 回転/分、10 分間）、その上澄み液を -80℃で冷凍保存した。

ホモジナイズされた受傷側海馬の上澄み液検体を用いて、ELISA 法で BDNF 蛋白量と Serotonin 量を定量した。BDNF の測定は、Mature BDNF Rapid™ ELISA キット（biosensis 社、オーストラリア）を用いた。Serotonin の測定は、Abnova® Serotonin ELISA キット（Abnova 社、台湾）を用いた。ELISA の手順に関しては、biosensis 社及び Abnova 社のマニュアルに沿って行った。

また、ホモジナイズされた受傷側海馬の上澄み液検体を用いて、海馬の総蛋白量を定量した。総蛋白量の定量は、Pierce™ BCA Protein Assay キット（Thermo Fisher Scientific 社、米国）を使用した。手順に関しては、Thermo Fisher Scientific 社のマニュアルに準じて行った。ELISA 法によって得られた BDNF 蛋白量や Serotonin 量を海馬の総蛋白量で割ることで、蛋白補正を行った。補正された値を各群で比較検討した。

総蛋白質量の定量や ELISA 法を行う際の吸光度の測定は、プレートリーダー (SPECTRA max PLUS 384®、モレキュラーデバイス ジャパン、東京) を使用して行った。

2.3.5 免疫組織染色

2.3.5.1 Brd-U と DCX の共染色

LISW 照射 28 日後に、マウスにケタミン (100 mg/kg) とキシラジン (10 mg/kg) を筋肉注射して麻酔した後に灌流固定を行った。前処置として、その 24 時間前に、マウスにケタミン (100 mg/kg) とキシラジン (10 mg/kg) を筋肉注射して麻酔し、5-bromo-2'-deoxyuridine: Brd-U (Brd-U ディテクションキット II、Roche 社、ドイツ) (10 ml/kg) を静脈投与した。灌流固定は、まず生理食塩水で経心的に灌流し、その後に 4%パラフォルムアルデヒド (和光純薬工業、大阪) で灌流固定した。灌流固定後にマウスの脳全体を取り出し、4%パラフォルムアルデヒドに浸して保存した。24 時間後に、4%パラフォルムアルデヒドから 70%エタノールに置換した。脳をパラフィンで固定後に、bregma から前方に 2.06 mm、後方に 2.54 mm の範囲で [37]、50 μ m のスライス幅で脳を切り出し、未染色のスライド標本をそれぞれ 6 枚作成した。

作成したパラフィン切片をキシレンとエタノールを用いて脱パラフィン化し、次に pH6.0 10mM クエン酸緩衝液 (10x Citrate Buffer, pH6.0、Emergo Europe 社、オランダ) を耐熱性容器に入れ、サンプルを浸し、121℃、15 分間のオートクレーブ処理 (TOMY LSX-300®、トミー精工、東京) を行った。取り出したサンプルをトリス緩衝生理的食塩水 (Tris Buffered Saline : TBS、ニッポンジーン、東京) で洗浄し、ブロッキング溶液 (3%スキムミルク (和光純薬工業、大阪) / TBS) を加えた後に、37℃で 30 分間静置した。一次抗体 (Anti-Doublecortin 抗体 (抗 DCX 抗体)、rabbit ポリクローナル抗体、1:800、Abcam 社、イギリス) を加えて、4℃で一晩静置した。TBS-T (TBS + Tween 20 (シグマアルドリッチ ジャパン、東京)) 及び TBS で洗浄後、二次抗体 (Donkey Anti-Rabbit IgG 抗体、1:500、Abcam 社、イギリス) を加えて、37℃で 60 分間静置した。TBS-T 及び TBS で洗浄後、ブロッキング溶液 (3%スキムミルク / TBS) を加えて、37℃で 30 分間静置した。さらに、Brd-U 抗体 (Brd-U デイテクションキット II、Roche 社、ドイツ) を加えた後に、37℃で 30 分間静置した。TBS-T 及び TBS で洗浄後、二次抗体 (Goat Anti-Mouse IgG 抗体、1:1000、Abcam 社、イギリス) を加え、37℃で 30 分間静置した。TBS-T 及び TBS で洗浄

後、封入剤（VECTASHIELD®、VECTOR、米国）で封入した。

Brd-U は、細胞周期の S 期において新たに合成されたデオキシリボ核酸（deoxyribonucleic acid : DNA）に取り込まれる。Brd-U が取り込まれた DNA は抗 Brd-U 抗体で検出することができるため、抗 Brd-U 抗体は DNA 複製を行う増殖細胞を検出することが可能である [38]。また、DCX は神経新生の初期段階から成熟ニューロンに分化するまでの全期間において発現が維持されているニューロンであるため、Brd-U と DCX の二重染色を行なうことにより、増殖能をもつニューロン、すなわち神経新生の解析を行なうことができると考えられている [24, 39]。

LISW 照射 28 日後に、受傷側海馬歯状回において Brd-U と DCX に共染色される細胞数を計測し、作成した 6 枚のスライドにおける細胞の合計数を比較検討した。BZ-X710®（キーエンス社、東京）を用いて、Brd-U 及び DCX に共染色される細胞の数を計測した。

2.3.5.2 pCREB の陽性細胞率

蛍光免疫組織染色と同様の手順で、未染色のスライド標本を作成した。スライド標本の洗浄は、リン酸緩衝食塩水（Phosphate Buffered Saline: PBS、和光純薬工業、

大阪)で行った。

まず、キシレンとエタノールを用いて、脱パラフィン操作を行った。次に、pH 6.0 10mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (10x Citrate Buffer pH6.0、Emergo Europe 社、オランダ) にスライド標本を浸して、抗原賦活化装置 (Decliaking Chamber™、BIOCARE MEDICAL、米国) を用いて 110℃で 10 分、抗原の賦活化を行った。内因性ペルオキシダーゼ除去のため、3%過酸化水素水 (30%過酸化水素水 (和光純薬工業、大阪) を 100%メタノールで 10 倍に希釈) を用いた。非特異性吸着の除去のため、10%ヤギ血清 (ニチレイバイオサイエンス、東京) を用い、その後 30 分間 37℃で静置した。一次抗体は、pCREB (rabbit モノクローナル抗体、1:5000、Abcam 社、イギリス) を用いた。この pCREB 抗体は、Ser133 がリン酸化されている CREB を認識する抗体である。一次抗体の希釈は PBS に 1%ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin: BSA、シグマアルドリッチ ジャパン、東京) を加えたもので行った。一次抗体を加えた後は、4℃で一晩静置した。二次抗体 (シンプルステイン MAX-PO®、ニチレイバイオサイエンス、東京) を加えた後に、30 分間常温で静置した。Diaminobenzidine : DAB 染色用のキット (ヒストファイブ DAB 基質キット®、ニチレイバイオサイエンス、東京)

を用いて、1分30秒染色を行った。対比染色として、ヘマトキシリン染色（ChemMate、Dako Cytomation社、米国）を5分間行った。最後に、エタノールとキシレンでスライド標本の脱水と透徹を行った。

受傷側である左側の海馬歯状回において、DAB染色で陽性になる細胞の数をBZ-X710®（キーエンス社、東京）で計測した。

2.3.6 統計学的手法

LISW照射直後のBDNF蛋白量とSerotonin量の検定は、スチューデントの t 検定を用いてLISW群とSham群の2群間で行った。3群間の検定は一元配置分散分析法（one-way ANOVA）で行い、2群間はpost-hoc testとしてTukey-Kramer法を用いて検定した。データは平均±標準誤差で示し、 $p < 0.05$ を統計学的有意とした。本研究におけるデータの統計解析には統計処理ソフトIBM SPSS® Statistics Grad Pack ver.24.0（IBM社、米国）を用いた。

2.4 結果

2.4.1 行動実験における無動時間の比較

LISW 照射 28 日後に行った tail suspension test において無動時間は、Sham 群で 159.3 ± 7.6 秒、LISW+Vehicle 群で 216.0 ± 20.1 秒、LISW+SSRI 群で 161.8 ± 10.7 秒であり ($n=5-6$)、LISW+Vehicle 群は他の 2 群に比べて有意に無動時間が延長していた ($p < 0.05$)。LISW+SSRI 群と Sham 群の間に有意な差は認めなかった (図 5)。

LISW 照射 28 日後に行った強制水泳試験において無動時間は、Sham 群で 154.0 ± 26.9 秒、LISW+Vehicle 群で 256.6 ± 19.7 秒、LISW+SSRI 群で 155.4 ± 33.4 秒であり ($n=6-7$)、やはり LISW+Vehicle 群は他の 2 群に比べて有意に無動時間が延長していた ($p < 0.05$)。LISW+SSRI 群と Sham 群の間に有意な差は認めなかった (図 6)。

2.4.2 BDNF 蛋白量と Serotonin 量の解析

LISW 照射直後の BDNF 蛋白量と Serotonin 量を定量した。BDNF は、Sham 群では 427.0 ± 22.1 pg/mg protein、LISW 照射群では 471.0 ± 26.4 pg/mg protein であった ($n=6$)。Serotonin は Sham 群では 3919.1 ± 517.8 pg/mg protein、LISW 照射群では 3797.6 ± 537.8 pg/mg protein であった ($n=6$)。BDNF、Serotonin のいずれも両群で有

意差は認めなかった（図 7）。

次に、LISW 照射 28 日後の BDNF 蛋白量と Serotonin 量を定量した。BDNF は、Sham 群で 497.6 ± 46.0 pg/mg protein、LISW+Vehicle 群で 484.2 ± 29.1 pg/mg protein、LISW+SSRI 群で 675.8 ± 66.0 pg/mg protein であった（ $n=9-10$ ）。LISW+SSRI 群は他の 2 群に比べて有意に BDNF の蛋白量が増加していた（ $p < 0.05$ ）。一方で LISW+Vehicle 群と Sham 群の間には有意な差がなかった（図 8）。Serotonin は、Sham 群で 3364.8 ± 332.1 pg/mg protein、LISW+Vehicle 群で 3253.2 ± 349.2 pg/mg protein、LISW+SSRI 群で 4692.2 ± 414.8 pg/mg protein であった（ $n=9-10$ ）。LISW+SSRI 群は他の 2 群に比べて有意に Serotonin 量が増加していたが（ $p < 0.05$ ）、LISW+Vehicle 群と Sham 群の間には有意差を認めなかった（図 9）。

2.4.3 新生神経細胞数の比較

2.4.3.1 Brd-U 及び DCX 共陽性細胞数の解析

蛍光免疫組織染色により Brd-U 陽性細胞を緑色（図 10a）、DCX 陽性細胞を赤色（図 10b）にそれぞれ発色させた。従って、Brd-U 及び DCX に共陽性細胞は黄色く発色した（図 10c）。

共陽性細胞は、Sham 群で 34.7 ± 2.5 個、LISW+Vehicle 群で 36.0 ± 2.4 個、LISW+SSRI 群で 45.1 ± 2.0 個であり ($n=7$)、LISW+SSRI 群は他の 2 群に比べて共陽性細胞数が有意に増加していた ($p < 0.05$)。LISW+Vehicle 群は Sham 群と比較しても有意な差を認めなかった (図 11)。

2.4.3.2 pCREB 陽性細胞率の解析

LISW 照射 28 日後に、受傷側海馬歯状回において DAB 染色で pCREB 抗体陽性細胞数の割合を比較検討した。海馬歯状回 of 全細胞の面積と pCREB 抗体陽性細胞の面積を BZ-X710[®] (キーエンス社、東京) を用いて自動解析して算出し、海馬歯状回における、pCREB 抗体陽性細胞の面積 / 全細胞数の面積を各群で比較検討した。

pCREB 抗体陽性細胞数の割合は、Sham 群で $23.6 \pm 1.2\%$ 、LISW+Vehicle 群で $9.2 \pm 1.7\%$ 、LISW+SSRI 群で $25.6 \pm 1.5\%$ であり ($n=5$)、LISW+Vehicle 群は他の 2 群に比べて pCREB 抗体陽性細胞数の割合が有意に低下していた ($p < 0.001$)。一方、LISW+SSRI 群は Sham 群と比較しても有意な差は認めなかった (図 12、13)。

2.5 考察

本研究の行動実験の結果において、LISW+Vehicle 群は、LISW 照射 28 日後に、他の 2 群に比べて有意にうつ様行動を呈することが示された。このとき、LISW+SSRI 群と Sham 群を比較しても両群間に有意差を認めなかった。このことから、本来は LISW 照射によりうつ様行動を呈するはずであったのが、SSRI の投与によって、症状発現が回避されたものと考えられた。

LISW 照射 28 日後に、SSRI を投与した群で Brd-U 及び DCX に共染色される細胞が海馬歯状回で増加していた。この結果から、LISW 照射後に SSRI を投与することで、海馬歯状回において神経新生が促進されたことが示唆された。SSRI を慢性投与するだけでも、海馬歯状回における神経新生が活性化されるとの報告があり [14]、この変化は SSRI の神経新生促進作用を反映しているものである可能性が考えられる。この神経新生の詳細な機序は今のところ未解明であるが、図 1 に示した通り、これまで様々な因子の関連が示唆されている [40]。そこで本研究では、特に BDNF、Serotonin 及び pCREB に着目し、その関連を調べた。

LISW 照射後に SSRI を投与することで、BDNF 蛋白質と Serotonin 量が受傷側海馬で増加していた。SSRI はシナプス間隙の Serotonin の再取り込みを阻害するため、SSRI を投与すると海馬で Serotonin が増加したのはもったもなこともかもしれない。また、SSRI は単にシナプス間隙の Serotonin 濃度を上昇させるだけではなく、シナプス間隙の BDNF の濃度も上昇させることが報告されている [17]。さらにシナプス間隙での BDNF 濃度の上昇は Serotonin 受容体にも作用して、シナプス間隙での Serotonin 濃度を上昇させ、逆にシナプス間隙での Serotonin 濃度の上昇は、BDNF の発現を促進する作用があると言われている [41]。つまり、SSRI を投与することで、海馬で BDNF と Serotonin が相互に発現を促進するように作用し、結果として両者が共に海馬歯状回における神経新生を促進させた可能性が考えられる。

pCREB は TBI 受傷後に、海馬でダウンレギュレーションを受けるとの報告がある [24]。本研究では、LISW+Vehicle 群において、海馬歯状回の pCREB が Sham 群と比較して有意に減少してい

た。このことは、pCREBがLISW照射の影響でダウンレギュレーションを受けた結果と考えることができる。一方、LISW+SSRI群では、Sham群と比較してもpCREBの発現量に有意差を認めなかった。つまり、LISW照射によって起こるはずであったpCREBのダウンレギュレーションが、SSRIを投与したことで回避された可能性が示唆された。前述した通り、SSRIの投与はBDNFやSerotoninの海馬での増加の一端を担っている。したがって本研究では、このBDNFやSerotoninの増加が、pCREBのダウンレギュレーションに関して重要な役割を果たしている可能性が示された。これまでのところ、BDNFやSerotoninとpCREBのダウンレギュレーションとの詳細な関係性に言及した報告は見当たらず、今後更なる検討が必要になるであろう。

図1にも示したように、BDNF-pCREBの経路には、他にも様々な因子が関与している[40]。今後、本研究で調べた以外の因子の関与も検討することで、SSRIがもたらす抗うつ効果の機序がより詳細に判明する可能性も考えられる。また、今回の研究に用いたSSRIは、セロトニン以外にド

ーパミンやノルアドレナリン等の輸送にも影響を及ぼした可能性が否定できない。したがって、他のモノアミンとの関連性を検討することも重要であろう[42]。

本研究は、LISWを用いて、mild bTBIでみられるうつ様行動の発症機序の解明を目指した。爆傷の研究は、従来は shock tube や open field blast system を使用して行われてきた[43, 44]。LISWは従来の装置と比較して、照射する部位や外傷強度を自由に選択できるという利点を持つ[8, 29]。本研究では、LISWをマウスの左頭頂部に一回照射したが、その照射部位を右に変更したり、前頭葉や小脳に照射したり、他の小動物を用いたり、回数や外傷強度を手軽に変更したりすることも可能である。例えば、外傷強度を変えることで moderate bTBI や severe bTBI のモデルを作成することも可能であり、同じ mild bTBI でも受傷部位を変更したモデルを作成することも可能である。今後、新たなモデルと今回のモデルの実験結果を比較検討することで、bTBIの病態解明につながる新たな知見を見出すことができるかもしれない。また、受傷側だけではなく対側

海馬を観察することでも、有用な所見が得られる可能性はあると思われる。本研究で対側海馬を観察しなかったことは、問題点の1つであると考えられる。さらに、行動実験の実験例数が5例に止まっており、十分であったか検討を要する。n数を増やしても同様の結果が得られるかどうかを、検討する必要があったと思われる。

SSRIは、mild bTBIモデルマウスがLISW照射28日後に示すうつ様行動を改善させた。今回は抗うつ薬としてSSRIを使用した。[11]、今後はSSRIとは違った作用機序をもつ抗うつ薬を選択して同様の実験計画を立てることも可能であり、本研究の結果と比較検討することもできるだろう。

第3章 総括

本研究では、LISWを照射したmild bTBIモデルマウスを用いて実験を行った。このモデルマウスは、未治療ではLISW照射28日後にうつ様行動を示したが、SSRI投与により症状に改善がみられた。

その機序を解明するために、『神経新生

(neurogenesis)』に着目して実験を進めた。うつ病に対しても、TBIに対しても、その回復や修復の機序には神経新生が関わっていることが示唆されている[13-20, 22-28, 40]。LISW照射後にSSRIを投与した群で、海馬歯状回においてBrd-UとDCXで共染色される細胞が有意に増加していたことから、今回のモデルマウスでも、mild bTBI受傷後のSSRI投与によって海馬歯状回で神経新生が活性化されたことが示唆された。

海馬歯状回での神経新生に関わる因子として、本研究では、BDNF、Serotonin及びpCREBに着目した。SSRIを投与すると、海馬でBDNFとSerotoninが上昇し、海馬歯状回で、LISW照射の影響で起こるはずであったpCREBのダウンレギュレーションが回避された可能性があると考えられた。海馬でのBDNFやSerotoninの増加及び、海馬歯状回でのpCREBのダウンレギュレーションの回避は、海馬歯状回での神経新生を活性化させることに重要な役割を果たしている可能性が考えられた。そしてこの神経新生の活性化が、mild bTBIでみられるうつ様行動の改善効果を発揮したと考えられた(図14)。

第 4 章 結 論

- 1) SSRI 投与により海馬において BDNF 蛋白質量と Serotonin 量が増加した。
- 2) LISW 照射により、海馬歯状回で pCREB のダウンレギュレーションが起きた。SSRI を投与することで、このダウンレギュレーションが回避された可能性がある。
- 3) BDNF 及び Serotonin の増加や、pCREB のダウンレギュレーションの回避は、海馬歯状回での神経新生を促進した可能性がある。
- 4) SSRI は mild bTBI のうつ様行動を改善させ、その機序には神経新生が関わっていることが示唆された。

第 5 章 謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を頂き、ご指導、ご高閲を賜りました防衛医学研究センター外傷研究部門・齋藤大蔵教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本研究を実施するにあたり、実験指導、論文作成、全般に渡り直接ご指導を頂きました防衛医学研究センター外傷研究部門・戸村哲准教授に深く感謝申し上げます。研究の各所

においてご指導を賜りました、防衛医学研究センター外傷研究部門・宮崎裕美先生、LISWに関してご指導頂きました、生体情報・治療システム研究部門佐藤俊一教授、川内聡子先生に感謝申し上げます。

最後に、実験にご協力頂いた外傷研究部門実験補助の須藤有希様、島田美奈子様、佐伯孝美様、傳川泉様、野口緑様、森本奈々様、合田和香美様、獅子倉麻里様、及び動物実験施設、共同利用研究施設の職員の方々に御礼申し上げます。

本研究の主旨は、以下の学会において筆頭演者として発表した。

- ・ The 2nd Japan-US Technical Information Exchange Forum on Blast Injury (2017年4月、埼玉)
- ・ 第78回脳神経外科学会総会(2019年10月、大阪)

略語一覧

ANOVA: analysis of variance、分散分析法

BDNF: brain derived neurotrophic factor、脳由来神経
栄養因子

Brd-U: 5-bromo-2'-deoxyuridine、5-ブロモ 2-デオキ
シウリジン

BSA: Bovine serum albumin、ウシ血清アルブミン

bTBI: blast traumatic brain injury、頭部爆傷

cAMP: cyclic adenosine monophosphate、環状アデノシ
ン一リン酸

CREB: cyclic adenosine monophosphate response
element binding protein、環状アデノシン一リン酸応答
配列結合タンパク質

DAB: diaminobenzidine、ジアミノベンジジン

DCX: doublecortin、ダブルコーチン

DNA: deoxyribonucleic acid、デオキシリボ核酸

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay、エライザ
法

LISW: laser-induced shock wave、レーザー誘起衝撃波

mild bTBI: mild blast traumatic brain injury、軽症頭
部爆傷

mild TBI: mild traumatic brain injury、軽症頭部外傷

NGF: neuron growth factor、神経成長因子

NSC: neural stem cell、神経幹細胞

PBS : phosphate buffered saline、リン酸緩衝食塩水

p.o.: per os、経口投与

pCREB: phosphorylated cyclic adenosine

monophosphate response element binding protein、

リン酸化環状アデノシンーリン酸応答配列結合タンパク質

SSRI: selective serotonin reuptake inhibitor、選択的セロトニン取り込み阻害薬

TBI: traumatic brain injury、頭部外傷

TBS: tris buffered saline、トリス緩衝生理的食塩水

TBS-T: tris buffered saline with Tween 20、ツイーン20入りトリス緩衝生理的食塩水

VEGF: vascular endothelial growth factor、血管内皮増殖因子

参 考 文 献

- [1] Singer P, Cohen JD, Stein M. Conventional terrorism and critical care. *Crit Care Med.* 2005;33:S61-5.doi:10.1097/01.ccm.0000151068.33935.3e
- [2] Cook PA, Johnson TM, Martin SG, Gehrman PR, Bhatnagar S, Gee JC. A Retrospective Study of Predictors of Return to Duty versus Medical Retirement in an Active Duty Military Population with Blast-Related Mild Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma.* 2018;35:991-1002.doi:10.1089/neu.2017.5141
- [3] Rosenfeld JV, McFarlane AC, Bragge P, Armonda RA, Grimes JB, Ling GS. Blast-related traumatic brain injury. *Lancet Neurol.* 2013;12:882-93.doi:10.1016/s1474-4422(13)70161-3
- [4] Petrie EC, Cross DJ, Yarnykh VL, Richards T, Martin NM, Pagulayan K, et al. Neuroimaging, behavioral, and psychological sequelae of repetitive combined blast/impact mild traumatic brain injury in Iraq and Afghanistan war veterans. *J Neurotrauma.* 2014;31:425-36.doi:10.1089/neu.2013.2952
- [5] Giza CC, Kutcher JS, Ashwal S, Barth J, Getchius TS, Gioia GA, et al. Summary of evidence-based guideline update: evaluation and management of concussion in sports: report of

the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2013;80:2250-7.doi:10.1212/WNL.0b013e31828d57dd

[6] Stemper BD, Shah AS, Budde MD, Olsen CM, Glavaski-Joksimovic A, Kurpad SN, et al. Behavioral Outcomes Differ between Rotational Acceleration and Blast Mechanisms of Mild Traumatic Brain Injury. *Front Neurol*. 2016;7:31.doi:10.3389/fneur.2016.00031

[7] Zuckerman A, Ram O, Ifergane G, Matar MA, Sagi R, Ostfeld I, et al. Controlled Low-Pressure Blast-Wave Exposure Causes Distinct Behavioral and Morphological Responses Modelling Mild Traumatic Brain Injury, Post-Traumatic Stress Disorder, and Comorbid Mild Traumatic Brain Injury-Post-Traumatic Stress Disorder. *J Neurotrauma*. 2017;34:145-64. doi:10.1089/neu.2015.4310

[8] 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:e82891.doi:10.1371/journal.pone.0082891

[9] Tomura T, Seno S, Miyazaki H, Kobayashi Y, Sato S, Saitoh

D. A novel mouse model of mild blast-induced traumatic brain injury. *JUFBI* 2017. 2017:41

[10] Haase J, Brown E. Integrating the monoamine, neurotrophin and cytokine hypotheses of depression--a central role for the serotonin transporter? *Pharmacol Ther.* 2015;147:1-11.doi:10.1016/j.pharmthera.2014.10.002

[11] Ursano RJ, Bell C, Eth S, Friedman M, Norwood A, Pfefferbaum B, et al. Practice guideline for the treatment of patients with acute stress disorder and posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry.* 2004;161:3-31

[12] Najjar S, Pearlman DM, Alper K, Najjar A, Devinsky O. Neuroinflammation and psychiatric illness. *J Neuroinflammation.* 2013;10:43.doi:10.1186/1742-2094-10-43

[13] Hanson ND, Owens MJ, Nemeroff CB. Depression, antidepressants, and neurogenesis: a critical reappraisal. *Neuropsychopharmacology.* 2011;36:2589-602.doi:10.1038/npp.2011.220

[14] Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci.* 2000;20:9104-10

[15] Hashimoto K. Brain-derived neurotrophic factor as a biomarker for mood disorders: an historical overview and

future directions. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2010;64:341-57.doi:10.1111/j.1440-1819.2010.02113.x

[16] Lutz PE. Multiple serotonergic paths to antidepressant efficacy. *J Neurophysiol.* 2013;109:2245-9.doi:10.1152/jn.01093.2012

[17] Duman RS, Li N. A neurotrophic hypothesis of depression: role of synaptogenesis in the actions of NMDA receptor antagonists. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2012;367:2475-84.doi:10.1098/rstb.2011.0357

[18] Shetty AK. Hippocampal injury-induced cognitive and mood dysfunction, altered neurogenesis, and epilepsy: can early neural stem cell grafting intervention provide protection? *Epilepsy Behav.* 2014;38:117-24.doi:10.1016/j.yebeh.2013.12.001

[19] Gur TL, Conti AC, Holden J, Bechtholt AJ, Hill TE, Lucki I, et al. cAMP response element-binding protein deficiency allows for increased neurogenesis and a rapid onset of antidepressant response. *J Neurosci.* 2007;27:7860-8.doi:10.1523/jneurosci.2051-07.2007

[20] Blendy JA. The role of CREB in depression and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry.* 2006;59:1144-50.doi:10.1016/j.biopsych.2005.11.003

- [21] Wang H, Xu J, Lazarovici P, Quirion R, Zheng W. cAMP Response Element-Binding Protein (CREB): A Possible Signaling Molecule Link in the Pathophysiology of Schizophrenia. *Front Mol Neurosci.* 2018;11:255.doi:10.3389/fnmol.2018.00255
- [22] Gennai S, Monsel A, Hao Q, Liu J, Gudapati V, Barbier EL, et al. Cell-based therapy for traumatic brain injury. *Br J Anaesth.* 2015;115:203-12.doi:10.1093/bja/aev229
- [23] Richardson RM, Singh A, Sun D, Fillmore HL, Dietrich DW, 3rd, Bullock MR. Stem cell biology in traumatic brain injury: effects of injury and strategies for repair. *J Neurosurg.* 2010;112:1125-38.doi:10.3171/2009.4.jns081087
- [24] Wu H, Li J, Xu D, Zhang Q, Cui T. Growth Differentiation Factor 5 Improves Neurogenesis and Functional Recovery in Adult Mouse Hippocampus Following Traumatic Brain Injury. *Front Neurol.* 2018;9:592.doi:10.3389/fneur.2018.00592
- [25] Li Q, Wang P, Huang C, Chen B, Liu J, Zhao M, et al. N-Acetyl Serotonin Protects Neural Progenitor Cells Against Oxidative Stress-Induced Apoptosis and Improves Neurogenesis in Adult Mouse Hippocampus Following Traumatic Brain Injury. *J Mol Neurosci.* 2019;67:574-88. doi:10.1007/s12031-019-01263-6

- [26] Lu KT, Huang TC, Wang JY, You YS, Chou JL, Chan MW, et al. NKCC1 mediates traumatic brain injury-induced hippocampal neurogenesis through CREB phosphorylation and HIF-1alpha expression. *Pflugers Arch.* 2015;467:1651-61. doi:10.1007/s00424-014-1588-x
- [27] Wang W, Li Q, Zou F, Yu Z, Wang Y, Lu T, et al. Increased expression of AGS3 in rat brain cortex after traumatic brain injury. *J Neurosci Res.* 2013;91:726-36. doi:10.1002/jnr.23195
- [28] Wu H, Lu D, Jiang H, Xiong Y, Qu C, Li B, et al. Simvastatin-mediated upregulation of VEGF and BDNF, activation of the PI3K/Akt pathway, and increase of neurogenesis are associated with therapeutic improvement after traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2008;25:130-9. doi:10.1089/neu.2007.0369
- [29] Kawauchi S, Okuda W, Nawashiro H, Sato S, Nishidate I. Multispectral imaging of cortical vascular and hemodynamic responses to a shock wave: observation of spreading depolarization and oxygen supply-demand mismatch. *J Biomed Opt.* 2019;24:1-17. doi:10.1117/1.jbo.24.3.035005
- [30] Miao YL, Guo WZ, Shi WZ, Fang WW, Liu Y, Liu J, et al. Midazolam ameliorates the behavior deficits of a rat posttraumatic stress disorder model through dual 18 kDa

translocator protein and central benzodiazepine receptor and neurosteroidogenesis. *PLoS One*. 2014;9:e101450.doi:10.1371/journal.pone.0101450

[31] Zhang LM, Zhou WW, Ji YJ, Li Y, Zhao N, Chen HX, et al. Anxiolytic effects of ketamine in animal models of posttraumatic stress disorder. *Psychopharmacology (Berl)*. 2015;232:663-72.doi:10.1007/s00213-014-3697-9

[32] Qiu ZK, Zhang LM, Zhao N, Chen HX, Zhang YZ, Liu YQ, et al. Repeated administration of AC-5216, a ligand for the 18 kDa translocator protein, improves behavioral deficits in a mouse model of post-traumatic stress disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2013;45:40-6. doi:10.1016/j.pnpbp.2013.04.010

[33] Kuo JR, Cheng YH, Chen YS, Chio CC, Gean PW. Involvement of extracellular signal regulated kinases in traumatic brain injury-induced depression in rodents. *J Neurotrauma*. 2013;30:1223-31.doi:10.1089/neu.2012.2689

[34] Cryan JF, Mombereau C, Vassout A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005;29:571-625.doi:10.1016/j.neubiorev.2005.03.009

- [35] Miyazaki H, Miyawaki H, Satoh Y, Saiki T, Kawauchi S, Sato S, et al. Thoracic shock wave injury causes behavioral abnormalities in mice. *Acta Neurochir (Wien)*. 2015;157:2111-20; discussion 20.doi:10.1007/s00701-015-2613-3
- [36] Osanloo N, Najafi-Abedi A, Jafari F, Javid F, Pirpiran M, Memar Jafari MR, et al. Papaver Rhoeas L. Hydroalcoholic Extract Exacerbates Forced Swimming Test-Induced Depression in Mice. *Basic Clin Neurosci*. 2016;7:195-202.doi:10.15412/j.bcn.03070304
- [37] Anegawa E, Kotorii N, Ishimaru Y, Okuro M, Sakai N, Nishino S. Chronic Powder Diet After Weaning Induces Sleep, Behavioral, Neuroanatomical, and Neurophysiological Changes in Mice. *PLoS One*. 2015;10:e0143909.doi:10.1371/journal.pone.0143909
- [38] Konishi T, Takeyasu A, Natsume T, Furusawa Y, Hieda K. Visualization of heavy ion tracks by labeling 3'-OH termini of induced DNA strand breaks. *J Radiat Res*. 2011;52:433-40.doi:10.1269/jrr.10097
- [39] Abrous DN, Koehl M, Le Moal M. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev*. 2005;85:523-69.doi:10.1152/physrev.00055.2003
- [40] Yan T, He B, Wan S, Xu M, Yang H, Xiao F, et al.

Antidepressant-like effects and cognitive enhancement of Schisandra chinensis in chronic unpredictable mild stress mice and its related mechanism. *Sci Rep.* 2017;7:6903. doi:10.1038/s41598-017-07407-1

[41] Popova NK, Ilchibaeva TV, Naumenko VS. Neurotrophic Factors (BDNF and GDNF) and the Serotonergic System of the Brain. *Biochemistry (Mosc).* 2017;82:308-17. doi:10.1134/s0006297917030099

[42] Kawa L, Arborelius UP, Yoshitake T, Kehr J, Hokfelt T, Risling M, et al. Neurotransmitter Systems in a Mild Blast Traumatic Brain Injury Model: Catecholamines and Serotonin. *J Neurotrauma.* 2015;32:1190-9. doi:10.1089/neu.2014.3669

[43] Rachmany L, Tweedie D, Rubovitch V, Li Y, Holloway HW, Kim DS, et al. Exendin-4 attenuates blast traumatic brain injury induced cognitive impairments, losses of synaptophysin and in vitro TBI-induced hippocampal cellular degeneration. *Sci Rep.* 2017;7:3735. doi:10.1038/s41598-017-03792-9

[44] Cernak I, Merkle AC, Koliatsos VE, Bilik JM, Luong QT, Mahota TM, et al. The pathobiology of blast injuries and blast-induced neurotrauma as identified using a new experimental model of injury in mice. *Neurobiol Dis.* 2011;41:538-51. doi:10.1016/j.nbd.2010.10.025

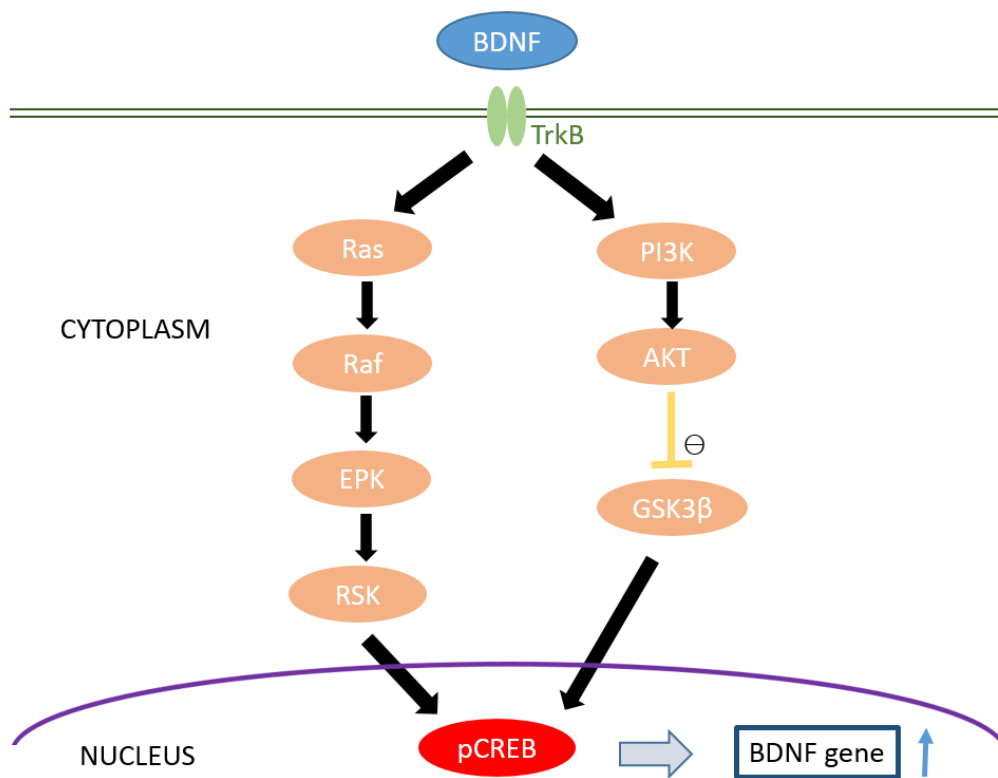


図 1 BDNF – pCREB の経路

BDNF は細胞質内で様々な経路を経て pCREB を活性化させる。pCREB は BDNF の遺伝子発現に関与している。

【略語】 BDNF: brain derived neurotrophic factor, TrkB: tropomyosin receptor kinase B, Ras: Ras protein, Raf: Raf protein, EPK: Extracellular signal-regulated kinase, RSK: ribosomal S6 kinase, PI3K: phosphoinositide 3-kinase, AKT: protein kinase B, GSK 3β: glycogen synthase kinase-3β, pCREB: phosphorylated cyclic adenosine monophosphate response element binding protein

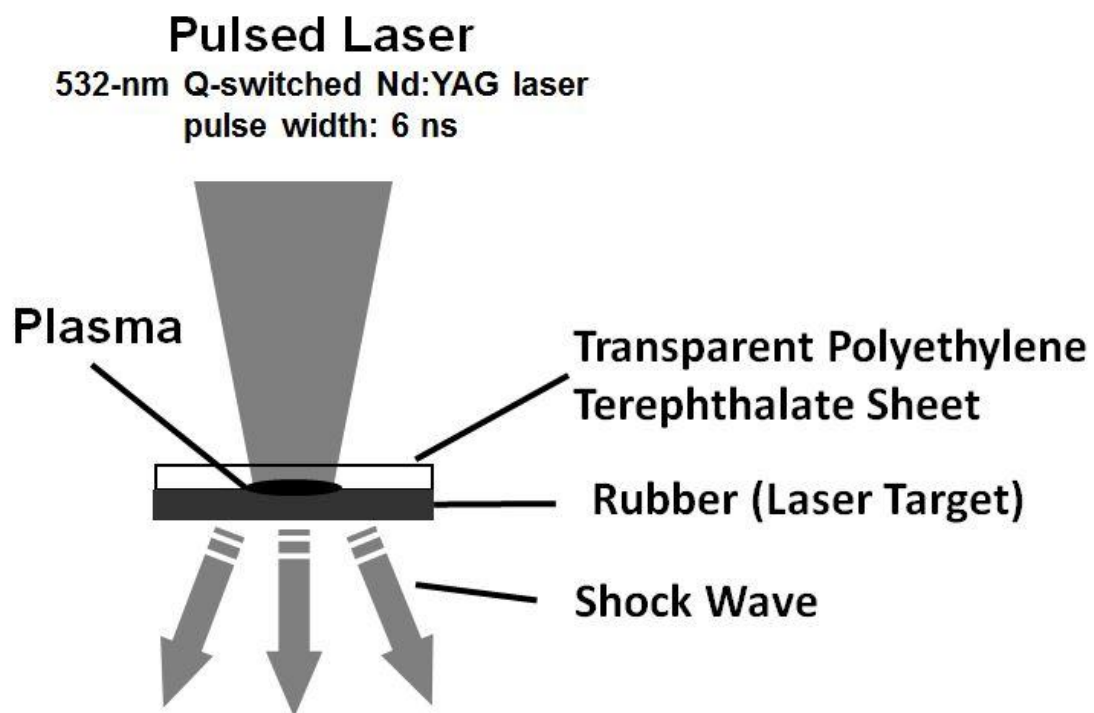


図 2 LISW の照射の様子

Q スイッチ YAG レーザーを、透明板と黒色ゴム板との合板であるレーザーターゲットに照射すると、2 枚の板の間にプラズマが形成され、これが LISW に変換される。

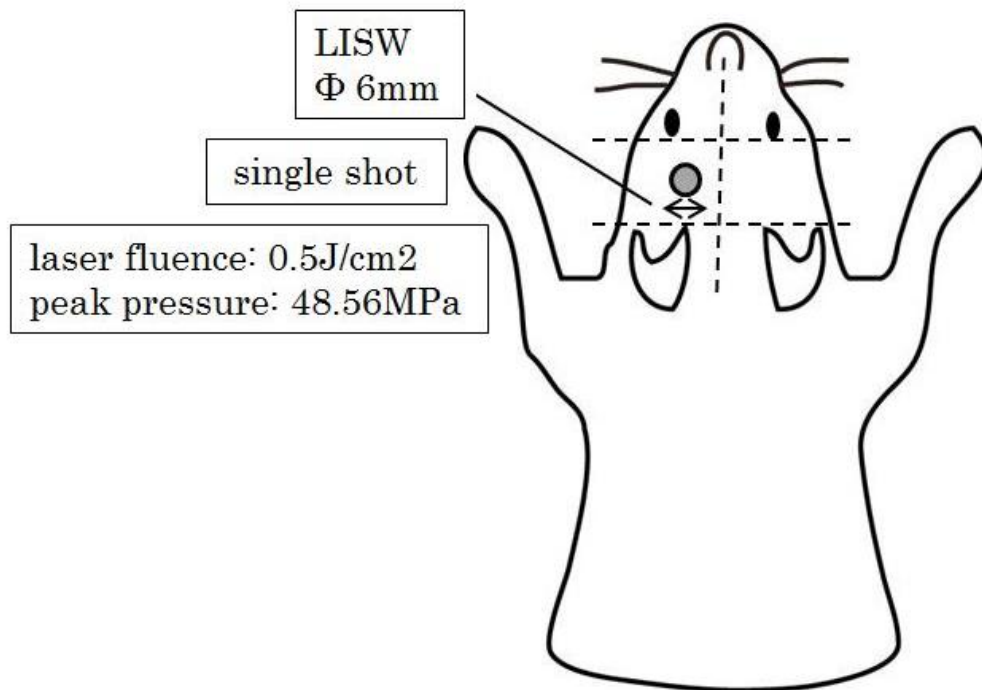


図 3 LISW 照射部位

ケタミンとキシラジンによる麻酔後に、左頭頂部にターゲットを置き、皮膚の上からレーザースポット径 6mm で LISW を 0.5 J/cm² のフルエンス、ピーク圧力 48.56 MPa で 1 回照射した。



図 4 実験スケジュール

SSRI (15mg/kg) は LISW 照射翌日から 14 日後まで経口で投与した。照射直後に海馬の BDNF 蛋白量と Serotonin 量を測定した。LISW 照射 28 日後に、行動実験 (tail suspension test 及び強制水泳試験)、海馬の BDNF 蛋白量と Serotonin 量、二重蛍光免疫組織染色 (Brd-U 及び DCX)、免疫組織染色 (pCREB) を行った。

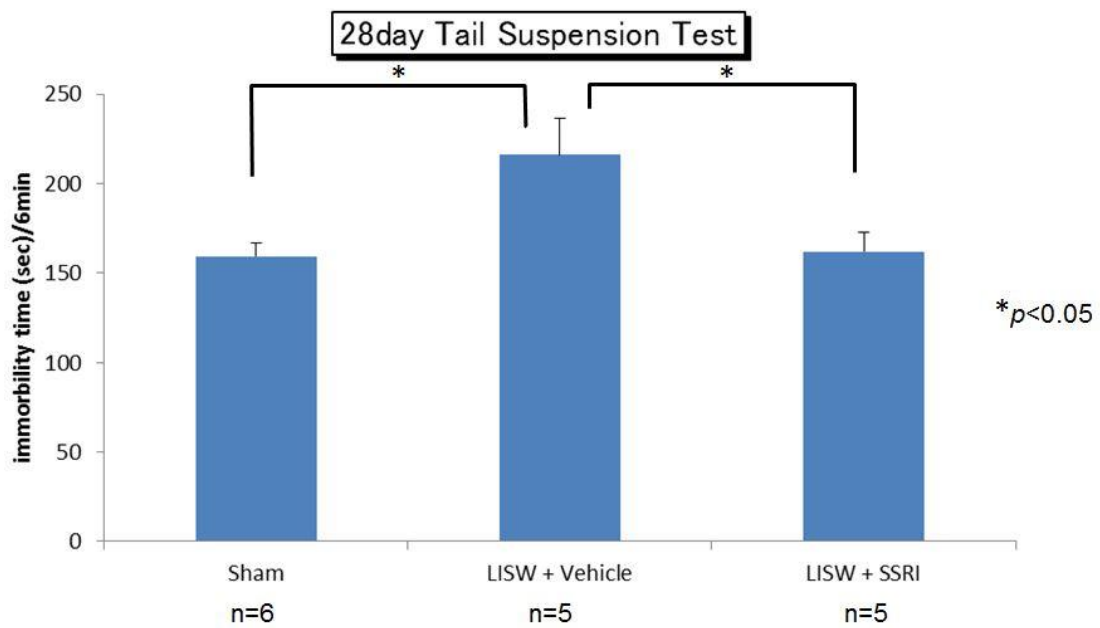


図 5 LISW 照射 28 日後の

Tail Suspension Test における無動時間の比較

LISW+Vehicle 群は他の 2 群に比べて有意に無動時間が長かった。LISW+Vehicle 群は、LISW 照射 28 日後に、他の 2 群に比べて有意にうつ様行動を呈することが示された。(Sham 群 : n=6、LISW + Vehicle 群及び LISW+SSRI 群 : n=5)

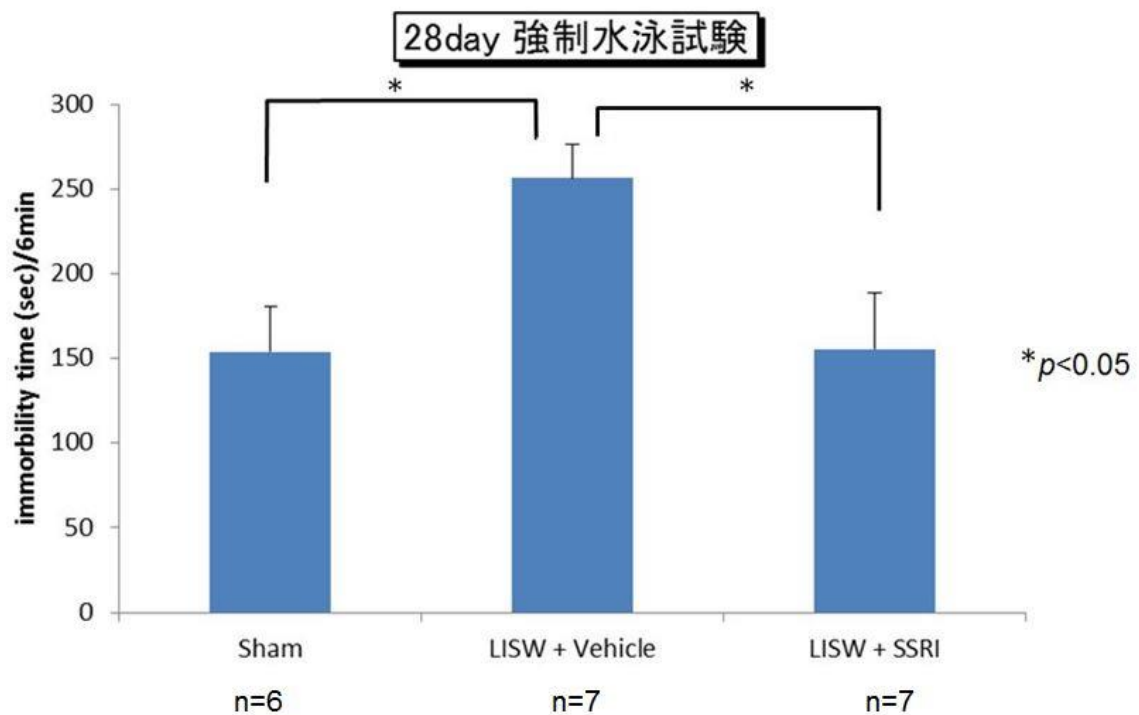


図 6 LISW 照射 28 日後の

強制水泳試験における無動時間の比較

LISW+Vehicle 群は他の 2 群に比べて有意に無動時間が長かった。LISW+Vehicle 群は、LISW 照射 28 日後に、他の 2 群に比べて有意にうつ様行動を呈することが示された。(Sham 群 : n=6、LISW + Vehicle 群及び LISW+SSRI 群 : n=7)

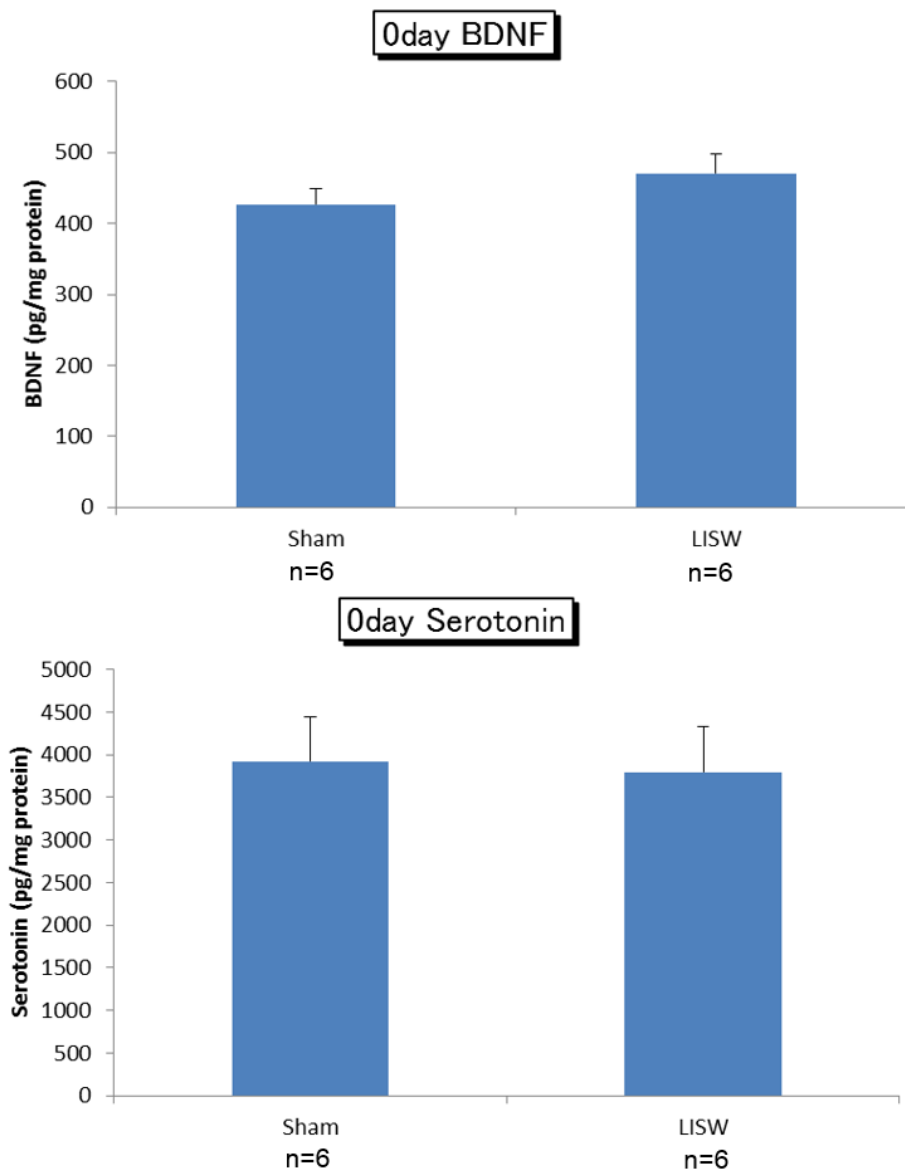


図 7 LISW 照射直後の

BDNF 蛋白量と Serotonin 量の比較

受傷側海馬における BDNF 蛋白量と Serotonin 量は、LISW 照射直後は LISW 群と Sham 群で有意な差がなかった。

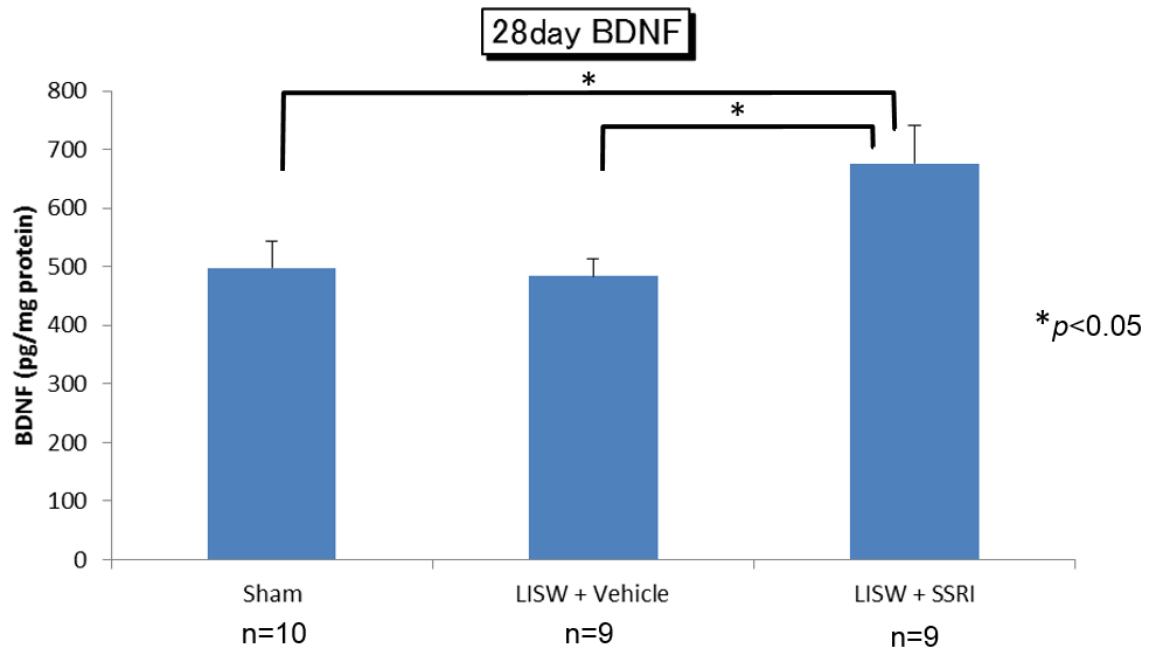


図 8 LISW 照射 28 日後の BDNF 蛋白量の比較

LISW+SSRI 群は他の 2 群に比べて有意に BDNF の蛋白量が増加していた。LISW 照射後に SSRI を投与すると、照射 28 日後の海馬において BDNF 蛋白量が増加することが示された。(Sham 群 : n=10、LISW + Vehicle 群及び LISW+SSRI 群 : n=9)

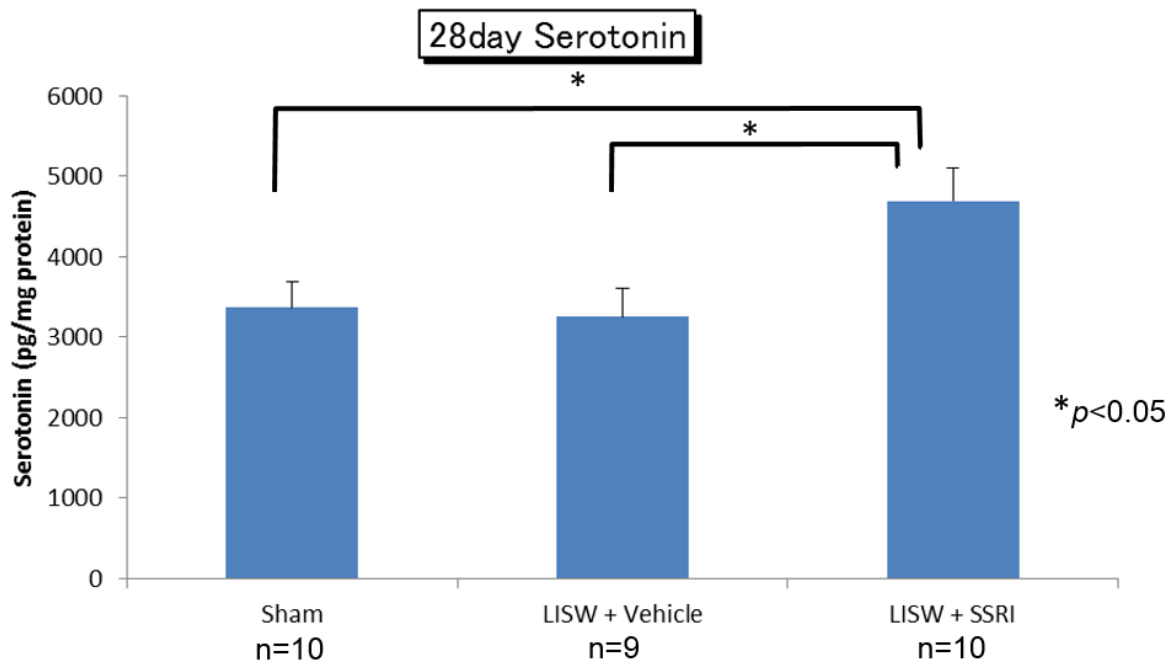


図 9 LISW 照射 28 日後の Serotonin 量の比較

LISW+SSRI 群は他の 2 群に比べて有意に Serotonin 量が増加していた。LISW 照射後に SSRI を投与すると、照射 28 日後の海馬において Serotonin 量が増加することが示された。(LISW + Vehicle 群 : n=9、Sham 群及び LISW+SSRI 群 : n=10)

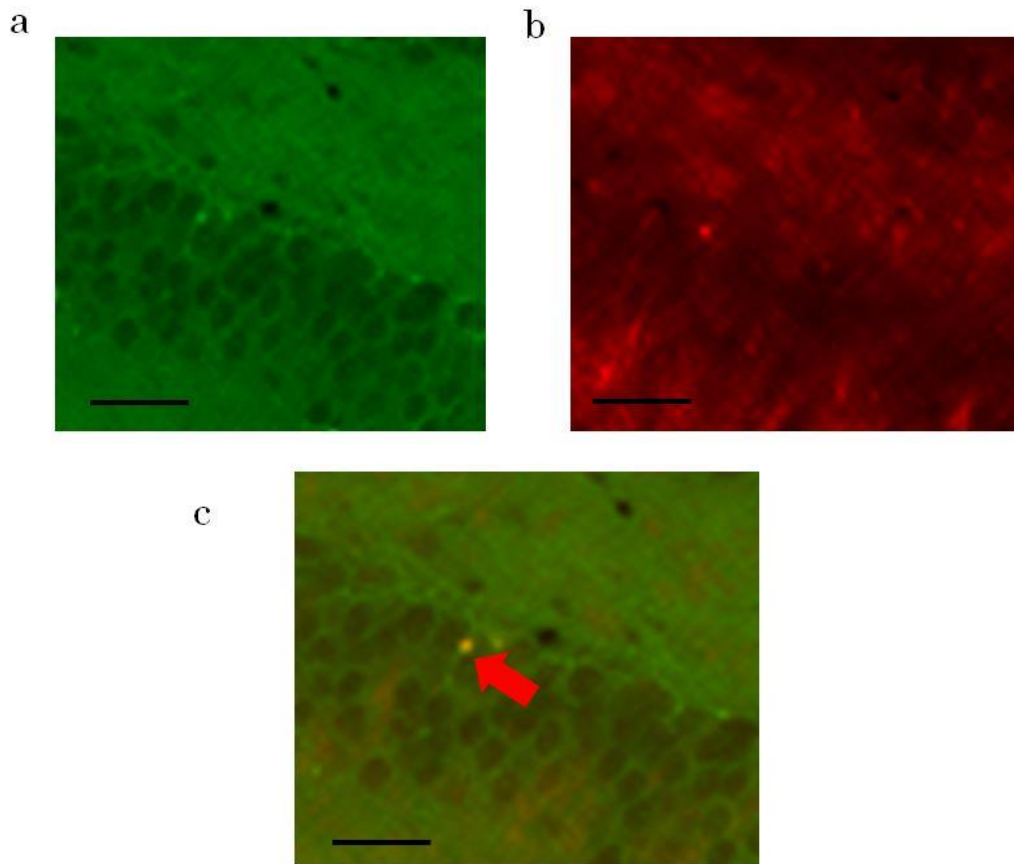


図 10 海馬歯状回で、蛍光免疫組織染色により
Brd-U 及び DCX に共染色される細胞

蛍光免疫組織染色により (a) Brd-U 陽性細胞を緑色、(b) DCX 陽性細胞を赤色に発色させた。(c) 海馬歯状回において、Brd-U 及び DCX に共染色される細胞は、矢印のように黄色く発色した (倍率: 400 倍、スケール: $25 \mu\text{m}$)。

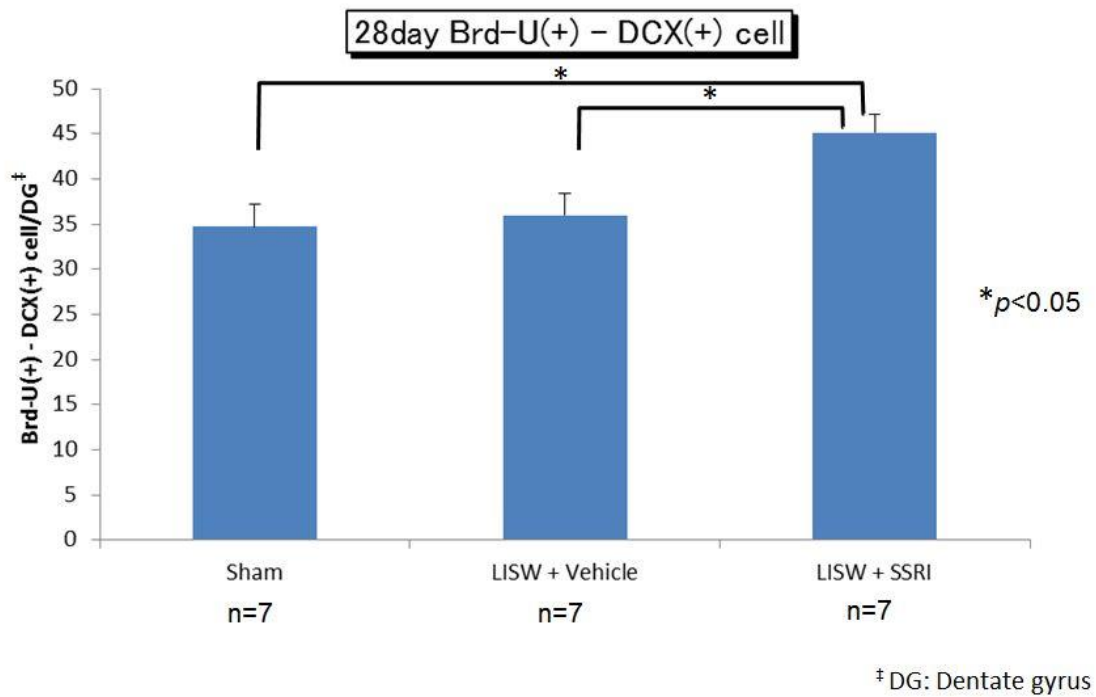


図 11 LISW 照射 28 日後の Brd-U と DCX に

共陽性細胞数の比較

LISW+SSRI 群は他の 2 群に比べて有意に Brd-U と DCX に共陽性細胞数が増加していた。LISW+SSRI 群では海馬歯状回において、他の群に比べて神経新生が亢進している可能性が示唆された。

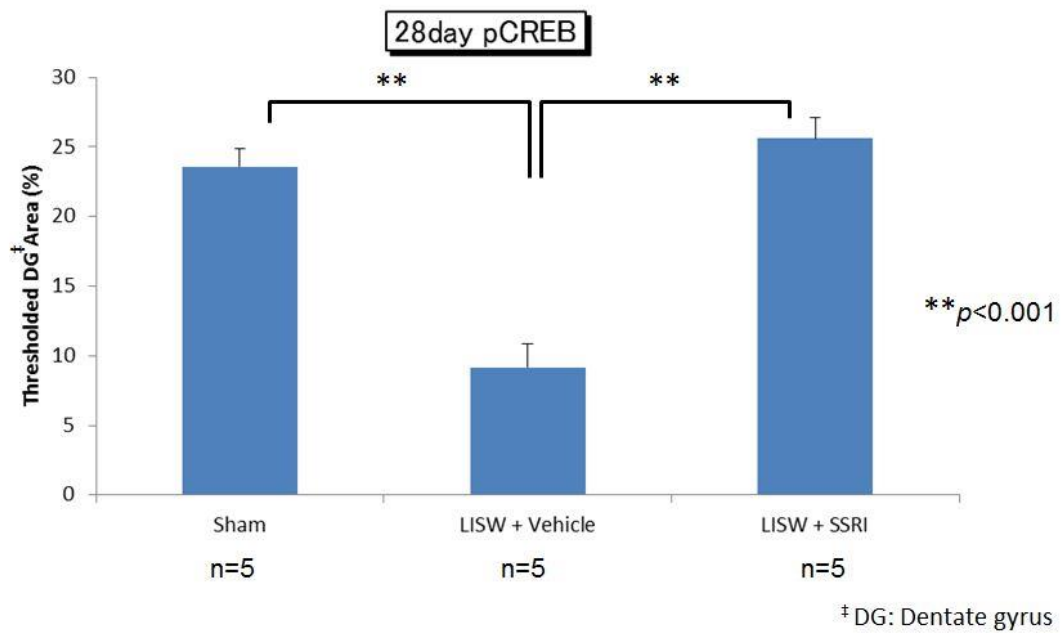


図 12 LISW 照射 28 日後の pCREB の

陽性細胞率の比較

LISW+Vehicle 群は他の 2 群に比べて pCREB 抗体陽性細胞数の割合が有意に低下していた。LISW+SSRI 群と Sham 群の間に有意な差は認めなかった。

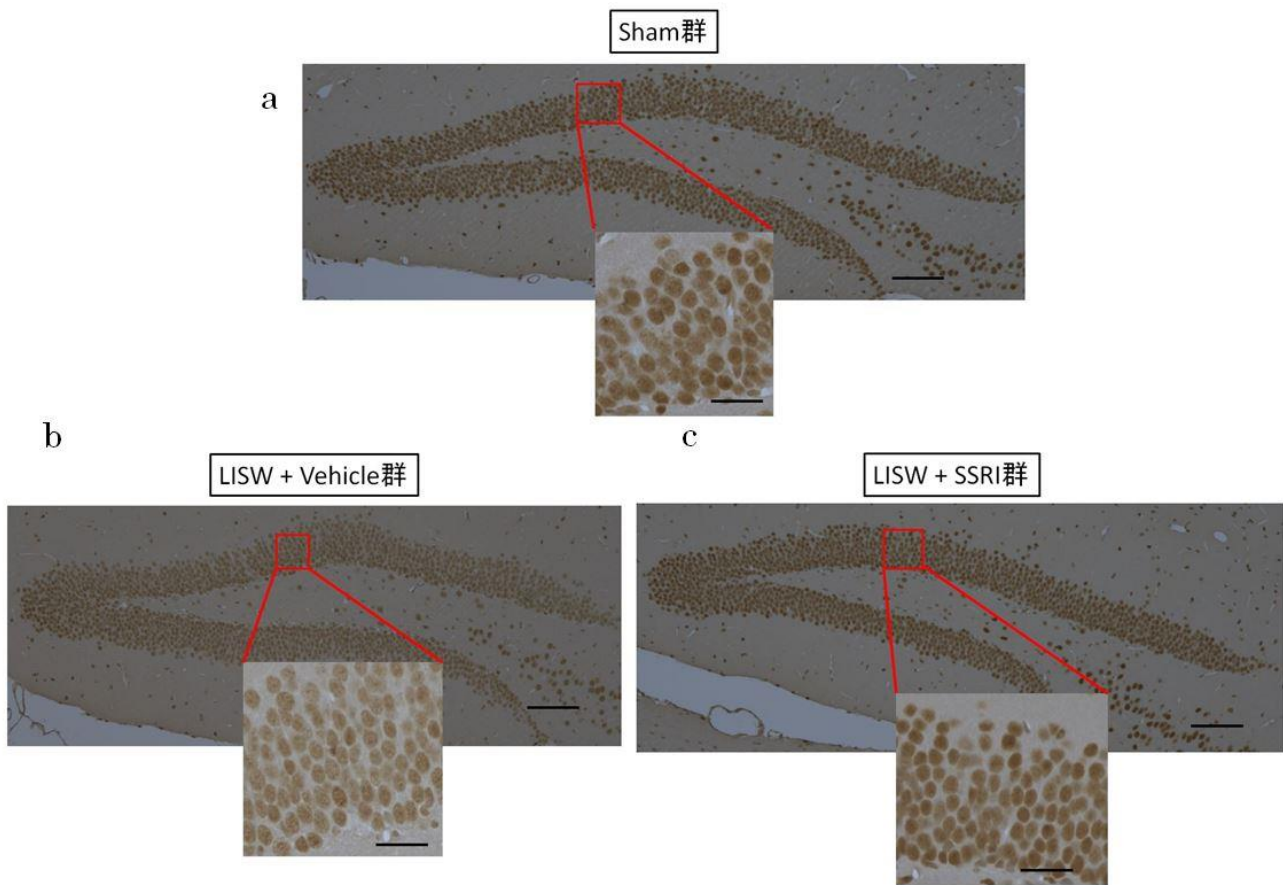


図 13 各群における海馬歯状回での pCREB

陽性細胞の割合

海馬歯状回において、各群で DAB 染色に濃染される pCREB 陽性細胞の割合を算出した。LISW + Vehicle 群 (b) では、他の 2 群 (a、c) と比較して有意に pCREB 陽性細胞の割合が低かった (倍率 : 100 倍、スケール : 100 μ m ; 倍率 : 400 倍、スケール : 25 μ m)。

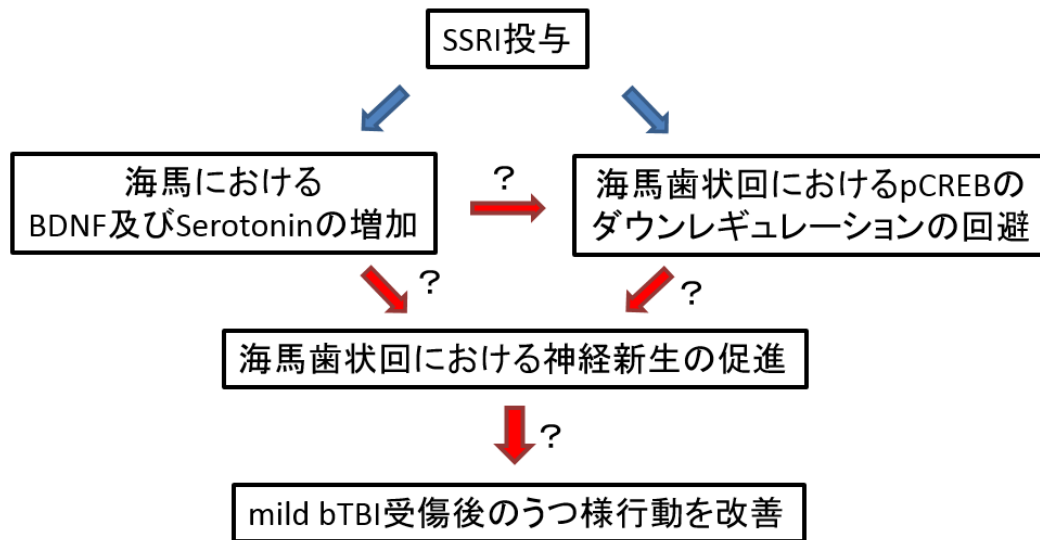


図 14 SSRI 投与による抗うつ効果発現の機序