

# 東邦大学学術リポジトリ



## OPAC

東邦大学メディアセンター

タイトル	実験的自己免疫性神経炎ラットにおける末梢神経内ヒドロキシラジカルの産生
別タイトル	Hydroxyl Radical Production in the Peripheral Nervous System in Experimental Autoimmune Neuritis
作成者(著者)	井上, 雅史
公開者	東邦大学
発行日	2015.03
掲載情報	東邦大学大学院医学研究科 博士論文. 11.
資料種別	学位論文
内容記述	主査: 岩淵聡 / タイトル: 実験的自己免疫性神経炎ラットにおける末梢神経内ヒドロキシラジカルの産生 / 著者: 井上雅史, 紺野晋吾, 萩原渉, 藤岡俊樹 / 掲載誌: 東邦医学会雑誌 / 巻号・発行年等: 62(1):2-10, 2015 / 本文ファイル: 出版者版
著者版フラグ	ETD
報告番号	32661甲第765号
学位授与年月日	2015.03.24
学位授与機関	東邦大学
その他資源識別子	<a href="https://mylibrary.toho-u.ac.jp/webopac/TD11900573">https://mylibrary.toho-u.ac.jp/webopac/TD11900573</a>
メタデータのURL	<a href="https://mylibrary.toho-u.ac.jp/webopac/TD20915022">https://mylibrary.toho-u.ac.jp/webopac/TD20915022</a>

# 実験的自己免疫性神経炎ラットにおける 末梢神経内ヒドロキシラジカルの産生

井上 雅史\* 紺野 晋吾 萩原 渉  
藤岡 俊樹

東邦大学医学部内科学講座神経内科学分野 (大橋)

## 要約

**目的:** 実験的自己免疫性神経炎 (experimental autoimmune neuritis : EAN) におけるヒドロキシラジカル ( $\cdot\text{OH}$ ) の変化とスカベンジャーによる消去効果を検討した。

**対象と方法:** 5~7 週齢のメス Lewis rat をウシ P2 蛋白 (aa53-78) 由来の合成ペプチドで免疫し EAN を誘発した。EAN 群とコントロール群 (complete Freund's adjuvant : CFA 群) において, ①運動障害の観察, ②馬尾神経の組織学的検索, ③組織内  $\cdot\text{OH}$  産生を反映する 2,3-dihydroxybenzoic acid (DHBA) の高速クロマトグラフィー電気化学検出器を用いたサリチル酸捕捉法による測定を行った。その後, フリーラジカルスカベンジャーの edaravone 10 mg/kg/日 を連日投与した影響を検討した。

**結果:** EAN 群は尾の弛緩性麻痺から発症し, 免疫後 15 日目にほぼ完全な弛緩性対麻痺に至りその後回復したが CFA 群は全実験期間を通じて運動症状は呈しなかった。EAN 群の末梢神経内 DHBA は免疫後 11, 14 日目に CFA 群に比して有意に増加した ( $p < 0.05$ )。Edaravone 投与により末梢神経内 DHBA は非投与群に比べ 11 日目に有意に減少し ( $p < 0.05$ )。運動麻痺は免疫後 18, 19 日目に有意に軽症であった ( $p < 0.05$ )。脂質酸化障害のマーカーである malondialdehyde は浸潤した macrophage の分布にほぼ一致して局在した。

**結論:** EAN の運動症状発症時期に増加する  $\cdot\text{OH}$  の消去は症状の早期からの回復をもたらし, EAN における末梢神経炎症による組織機能障害に  $\cdot\text{OH}$  が関与することが示唆された。

東邦医学会誌 62(1) : 2-10, 2015

索引用語 : 実験的自己免疫性神経炎, hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ), free radical scavenger, edaravone

ギラン・バレー症候群 (Guillain-Barré Syndrome : GBS) は 1916 年に報告された, 蛋白細胞解離を呈し急性に腱反射消失を伴う麻痺を特徴とする急性炎症性脱髄性多発根神経炎である。ポリオがほぼ撲滅された現在, GBS は, 世界的に急性の弛緩性麻痺を呈する最大要因であり, 神経学において重大な懸案の 1 つとなっている<sup>1)</sup>。多くは数カ月の経過で軽快する傾向を有し, 重症例に対しても血液浄化療法や経静脈的免疫グロブリン療法の有効性が確認されているが<sup>2,3)</sup>, 神経学的後遺症の頻度は高く, さらなる有効な治療法の開発が必要である。GBS の実験動物モデルである実験的自己免疫性神経炎 (experimental autoimmune

neuritis : EAN) は, 末梢神経構成成分, なかでもミエリン蛋白を用いて実験動物に免疫をすることにより引き起こすことができる。GBS も EAN もともに単核細胞の末梢神経内血管周囲腔への浸潤が組織学的な特徴であるが, これらの細胞は大部分が macrophage であり, 一部が  $\text{CD4}^+$  細胞,  $\text{CD8}^+$  細胞である<sup>4,5)</sup>。EAN では細胞移入の実験により type 1 T helper cells (Th1 細胞) が神経炎の障害の初期に働き macrophage の神経内への流入を引き起こすことにより脱髄が生じることが明らかにされている<sup>6)</sup>。その後, 病極期に末梢神経内で type 2 T helper cells (Th2 細胞) 優位へ変換することにより Th2 細胞や macrophage の浸潤

〒153-8515 東京都目黒区大橋 2-17-6

\*Corresponding Author: tel: 03 (3468) 1251

e-mail: masa742standard@yahoo.co.jp

受付 : 2014 年 11 月 10 日, 受理 : 2014 年 12 月 17 日

東邦医学会雑誌 第 62 巻第 1 号, 2015 年 3 月 1 日

ISSN 0040-8670, CODEN: TOIZAG

が抑制され回復が始まると考えられている<sup>7)</sup>。

活性酸素種は生体内での酸化反応に関わる、反応性の高い、短寿命の酸素種の総称である。ヒトの生体内にはスーパーオキシド ( $O_2^{\cdot-}$ ) や過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) やヒドロキシルラジカル ( $\cdot OH$ ) などが存在する。なかでも  $\cdot OH$  は銅イオンなどの遷移金属の存在下で Haber-Weiss 反応または  $O_2^{\cdot-}$ -assisted Fenton 反応によって  $O_2^{\cdot-}$  や  $H_2O_2$  から生成される、反応性が極めて高く非特異的に分子と反応するラジカルである<sup>8)</sup>。酵素蛋白質や細胞骨格蛋白質、脂質、糖質、核酸などと反応するが、特に、脂質を連鎖的に酸化させて細胞障害を引き起こす (連鎖的脂質過酸化反応)<sup>9)</sup>。この過程は脳血管障害<sup>10)</sup>、神経変性疾患<sup>11)</sup>、脱髄疾患<sup>12)</sup>、慢性炎症性脱髄性多発根神経炎 (chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: CIDP)<sup>13)</sup> など多くの神経疾患の病態に関与している。GBS や EAN では macrophage が髄鞘を貪食するとともに、活性酸素種 ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ) やアラキドン酸代謝物を産生し組織を障害する<sup>14-16)</sup> が  $\cdot OH$  に関しては報告が少ない。本研究では EAN の病態への  $\cdot OH$  の関与を明らかにするために  $\cdot OH$  を測定し、さらにフリーラジカルスカベンジャーを投与し  $\cdot OH$  を抑制した場合の効果を検討した。

## 方 法

本研究は東邦大学動物実験委員会により承認された (承認番号 11-41-138, 12-42-138, 13-43-138)。

### A) 実験 1: EAN における 2,3-dihydroxy benzoic acid (DHBA) の測定

#### 1) EAN の作成

メスの Lewis 系ラット (体重 110~130 g, 週年齢 7 週: 日本チャールス・リバー (株), 横浜) を用いた。ラット 20 匹にウシのミエリン P2 蛋白の一部, 53-78 アミノ酸シーケンズに相当する合成ペプチド (synthetic peptide 26; オペロンバイオテクノロジー (株), 東京) 150  $\mu$ g を complete Freund's adjuvant (CFA) とともに片側足底に注射した (EAN 群)<sup>17)</sup>。対照群 20 匹には CFA のみを片側足底に注射した (CFA 群)。

#### 2) 臨床症状の評価

免疫後連日、臨床症状を評価した。評価に用いたスコアは、0=無症状, 1=尾の麻痺, 2=不完全対麻痺, 3=完全対麻痺, 4=不完全四肢麻痺, 5=完全四肢麻痺である (EAN 群, CFA 群それぞれ, 免疫後 0~7 日目: n=20, 免疫後 8~11 日目: n=15, 免疫後 12~14 日目: n=10, 免疫後 15~21 日目: n=5)。

#### 3) 2,3-DHBA の測定

$\cdot OH$  は半減期が  $10^{-10}$  秒であり、直接的測定は電子スピン共鳴法以外の方法では困難な物質である。そこで本研究では、サリチル酸により  $\cdot OH$  を補足した後の代謝産物

である 2,3-DHBA を測定し評価をした。

免疫後 7, 11, 14, 25 日目に (各群 n=5), sodium salicylate 300 mg/kg を腹腔内投与し 15 分後にエーテル麻酔下に屠殺し馬尾神経を採取した。検体は 2,3-DHBA 測定時まで  $-80^{\circ}C$  の deep freezer にて保存した。約 30 mg の馬尾神経を 0.1 M perchloride acid (100  $\mu$ M ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA) と 100  $\mu$ M sodium metabisulfate を含有) 0.7 ml 中で超音波ホモジナイザー [Handy Sonic model UR-20P; (株)トミー精工, 東京] で 5 分間破碎し,  $4^{\circ}C$  20000 回転で 20 分間の遠沈分離後, その上清中の 2,3-DHBA を高速クロマトグラフィー電気化学検出器 (ESAmo-del 5500; ESA Inc., Chelmsford, MA, USA) を用いて測定した。高速クロマトグラフィーの移動相は 50 mM sodium acetate, 50 mM sodium citrate, 10% methanol, 15% acetonitrile (v/v) で作成し, phosphoric acid を用いて pH を 2.5 になるように調整した。測定値中の移動層は流速を 0.8 ml/分で送液した。これらの手法は McCabe et al. の方法を改変したものである<sup>18)</sup>。

#### 4) 組織学的検討

EAN において馬尾神経に浸潤する細胞は T 細胞とマクロファージが主体であることが知られている<sup>4,5)</sup>。T リンパ球の表面マーカーである CD3 を用いて組織中の T リンパ球を同定した。CD45 は全ての白血球に発現している表面マーカーであるが、連続切片を用いて CD3 陽性細胞と CD45 陽性細胞の組織内での分布を染色することで組織中のマクロファージを同定した。

2,3-DHBA 測定のための馬尾神経採取時に L4 レベル腰髄とともに神経根を採取した。10% 中性緩衝ホルマリン液で固定後パラフィン包埋し、厚さ 7~8  $\mu$ m の連続切片を作成した。Standard antigen retrieval protocol (クエン酸ナトリウムを用いた加熱法)の後、内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害し、一次抗体に一晩  $4^{\circ}C$  で反応させた。一次抗体は、抗ラット CD3 ウサギポリクローナル抗体 (ab 5690; Abcam plc., Cambridge, UK), 抗ラット CD45 ウサギポリクローナル抗体 (ab10558; Abcam), または抗 malondialdehyde (MDA) モノクローナル抗体 [マウス IgG; N213530; 日油 (株), 東京] である。洗浄後, VECTASTAIN<sup>®</sup> Universal Elite<sup>®</sup> ABC Kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) で調整したビオチン標識抗マウス/ウサギ IgG ウマ抗体を反応させ (室温, 30 分) ABC キットで調整した ABC 液と室温で 30 分間反応させた後 diaminobenzidine (DAB) で発色させた。陽性コントロールはラットリンパ節を用い、陰性コントロールは一次抗体を加えずに同様の操作を行った馬尾神経組織とした。

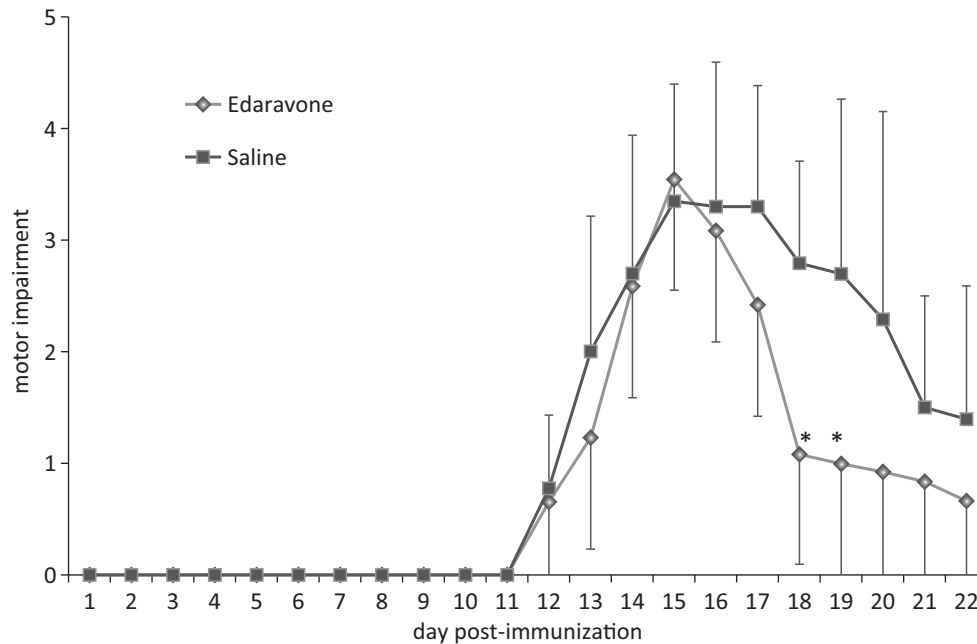


Fig. 1 Clinical course of experimental autoimmune neuritis (EAN) and the effects of edaravone treatment

The EAN group developed flaccid paralysis of the tail tip at 11 days after immunization. This gradually progressed to flaccid paraplegia. Clinical score was worst at 14–16 days after immunization. The EAN+edaravone group also developed paralysis at 11 days and had the worst clinical scores at 14–16 days. Symptom onset and severity did not significantly differ between groups. Recovery started at 17 days in both groups. The extent of improvement in clinical score in the EAN+edaravone group after 18 days (specifically days 18 and 19) was better than in the EAN group. Error bars indicate standard deviation (SD).

\* $p < 0.05$  by Mann-Whitney  $U$  test (EAN vs EAN+edaravone)

## B) 実験2：フリーラジカスカルベンジャーの投与と効果判定

EANの作成，臨床症状の評価，2,3-DHBAの測定方法は実験1と同様である。

3-methyl-1-phenyl-2-pyrazoline-5-one (edaravone) をフリーラジカスカルベンジャーとして選択した [東京化成工業 (株), 東京]. 50匹のEANラットを無治療群 (EAN群) と edaravone 投与群 (E群) の2群に分け (各群25匹), E群には免疫翌日からラットに対する edaravone 最大無毒性量とされる  $10 \text{ mg/kg/日}^{19}$  を20日間連日腹腔内に投与し, EAN群には同量の生理食塩水を20日間連日, 腹腔内投与した. 運動症状は実験1の2)と同様に評価した (免疫後0~9日目:  $n=50$ , 免疫後10~11日目:  $n=40$ , 免疫後12~14日目:  $n=30$ , 免疫後15~16日目:  $n=20$ , 免疫後17~21日目:  $n=10$ ). 免疫後9, 11, 14, 16, 21日目に (各群  $n=5$ ), edaravone 投与から12時間後に sodium salicylate  $300 \text{ mg/kg}$  を腹腔内投与し15分後にエーテル麻酔下に屠殺し馬尾神経を採取し, 実験1と同様の方法で神経組織内の2,3-DHBAを測定した.

## C) 統計学的検討

統計処理はExcel用アドインソフト Statcel 3rd edition [(有)オーエムエス出版, 所沢]を用いた. 各測定値の解析はMann-Whitney  $U$  testを用いた.  $p < 0.05$  のときを有意差ありとした.

## 結 果

### 1) 臨床症状

実験1および実験2のEAN群ではラットはいずれも免疫後11日目以降尾の先端の弛緩性麻痺から発症し弛緩性対麻痺へと進展し, 免疫後14~16日目に症状の極期となり, その後は徐々に回復した. 実験1では免疫後25日目には軽度の尾の先端のみの運動麻痺を残すのみとなった. 実験2でも, 免疫後22日目に尾の中等度の麻痺を残すのみとなった. 実験1のCFA群は観察期間を通して麻痺を発症しなかった.

実験2ではE群は免疫11日目から尾の弛緩性麻痺を発症して, 徐々に増悪し免疫後14日目にはほぼ完全な弛緩性対麻痺となったが, その後, 徐々に回復した. 免疫後18, 19日目ではE群の回復の程度はEAN群より良好であっ

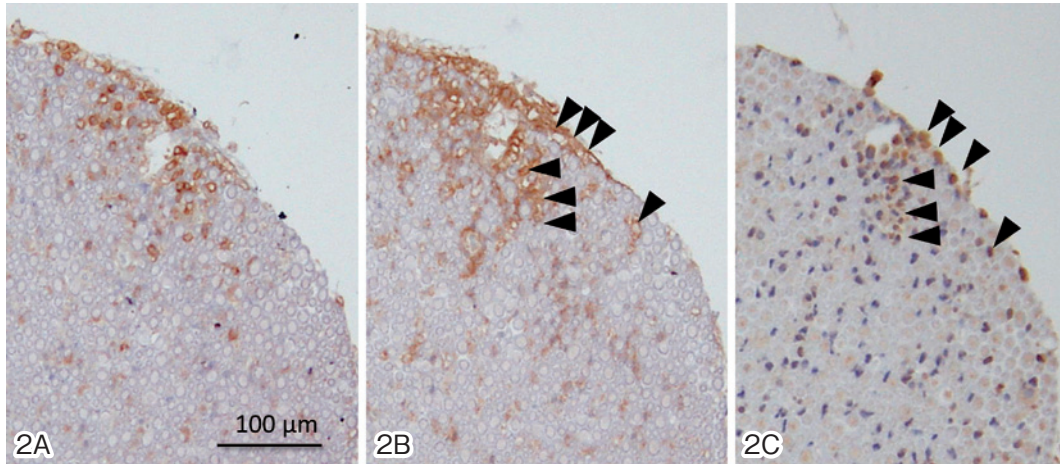


Fig. 2 Immunohistochemistry of serial sections of cauda equina in experimental autoimmune neuritis (EAN) at 11 days after immunization  
Malondialdehyde (MDA) immunoreactivity is shown by arrowheads (2C). Immunoreactive areas are unevenly distributed and occasionally surrounded by CD45<sup>+</sup> cells (arrowheads) (2B) but not by CD3<sup>+</sup> infiltrating cells (2A).

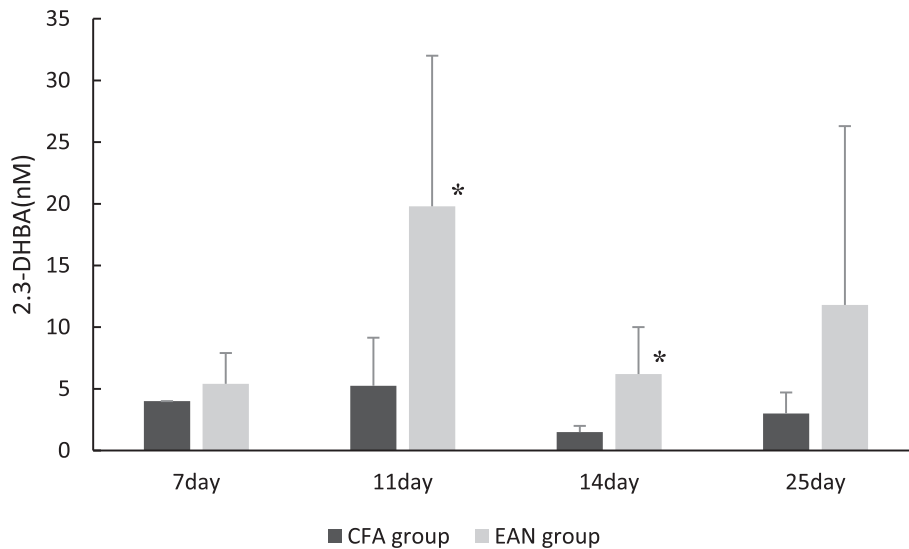


Fig. 3 Time course of 2,3-dihydroxy benzoic acid (DHBA) level in cauda equina of complete Freund's adjuvant (CFA) and experimental autoimmune neuritis (EAN) groups  
Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). 2,3-DHBA production in cauda equina was significantly higher in EAN rats than in CFA control rats at 11 and 14 days.  
\* $p < 0.05$  by Mann-Whitney  $U$  test (CFA vs EAN group)

た ( $p < 0.05$ ) (Fig. 1). EAN 群と E 群の両群間で発症の時期, 症状の極期の臨床スコアに差は認めなかった。

## 2) 組織学的変化

EAN 群の免疫後 11 日目の馬尾神経内には炎症細胞浸潤が多数認められた。MDA は浸潤した炎症細胞のなかでも CD45 陽性細胞の周囲に斑状に強い染色性を示したが、CD3 陽性細胞の周囲ではその染色性は乏しかった (Fig. 2A~C)。

## 3) 2,3-DHBA の変化

実験 1 の馬尾組織内 2,3-DHBA は EAN 群において CFA 群より免疫後 11, 14 日目で有意に増加していた ( $p < 0.05$ ) (Fig. 3)。

実験 2 の edaravone 投与 12 時間後の馬尾組織内 2,3-DHBA は E 群において EAN 群より免疫後 11 日目で有意に低下していた ( $p < 0.05$ ) (Fig. 4)。

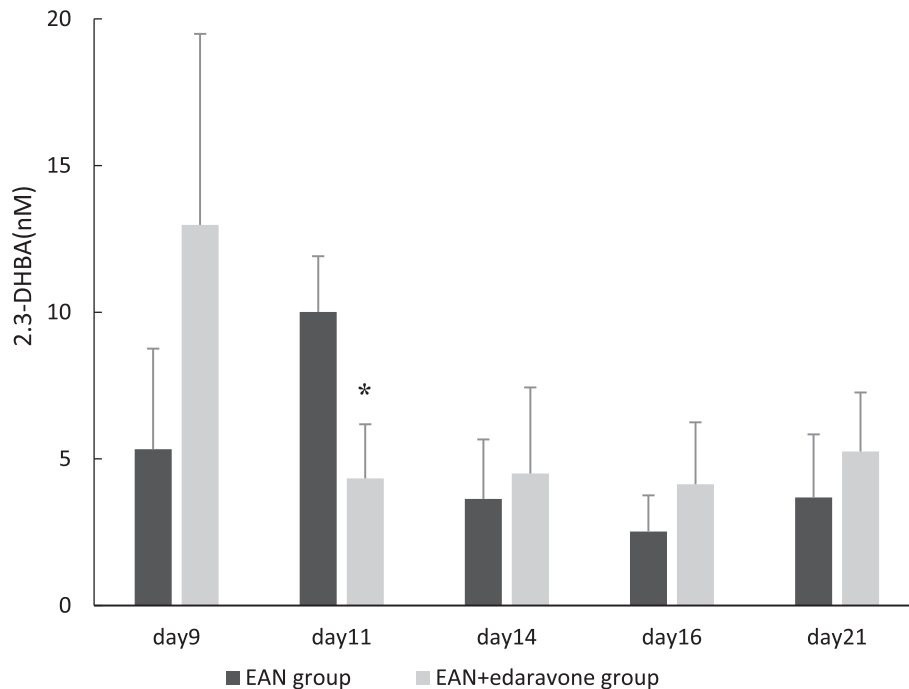


Fig. 4 Time course of hydroxyl radical formation in cauda equina of rats with experimental autoimmune neuritis (EAN), with or without edaravone treatment

Rats were killed 12 hours after the final edaravone injection. 2,3-dihydroxy benzoic acid (DHBA) level in the cauda equina was significantly lower in the edaravone-treated EAN rats than in the EAN rats at 11 days. 2,3-DHBA level is expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD).

\* $p < 0.05$  by Mann-Whitney  $U$  test (EAN vs EAN + edaravone)

## 考 察

本研究では EAN で臨床症状の増悪に平行して、馬尾組織内の 2,3-DHBA が増加し、それは  $\cdot\text{OH}$  の産生に起因することが示唆された。また  $\cdot\text{OH}$  をスカベンジャーで除去することで EAN の臨床症状の回復時期が早まることが確認された。

EAN ラットは GBS の実験モデルであるが、実際の GBS は希少疾患であり患者の quality of life (QOL) に関する報告は少ない<sup>20)</sup>。しかしながら一般的に疾病の改善が早まることは、機能回復の実感から社会復帰へ向けての期待が高まり、結果として QOL が向上すると予想される。また、最終的な改善度が同等であっても機能障害の早期からの回復は在院日数の短縮を可能にする。そして GBS は年齢を問わず発症する疾患であるが、生産年齢層の罹患による傷病休暇や療養休暇は大きな社会的損失となることや、入院医療費の包括支払い制度を導入している医療施設における診療単価と在院日数の密接な関係を考慮すると、本研究の結果は有意義なものと考えられた。

$\cdot\text{OH}$  の定量にはサリチル酸 (salicylic acid : SA) 補足法を用いて 2,3-DHBA を測定し評価をした。投与された

acetyl SA は血漿内で加水分解を受け SA に代謝される。SA の 40% は肝臓でグルクロン酸抱合を受けるが、残りの 40% が  $\cdot\text{OH}$  から酸化を受け 2,3-DHBA と 2,5-DHBA、一部は catechol が産生される<sup>21)</sup>。2,5-DHBA は SA からミクロソーム系のチトクローム P450 により直接産生される経路も存在するため  $\cdot\text{OH}$  の指標としては特異度が低い。一方で 2,3-DHBA は産生前後で酵素代謝を受けず生体内の  $\cdot\text{OH}$  産生の有用な指標とされる<sup>22)</sup>。また、ラットに投与した sodium salicylate は SA の Na 塩で、溶媒中では SA に変化し投与後は速やかに生体内に分布する。

炎症と活性酸素種には密接な関係があり、炎症時に活性酸素は主に炎症巣に浸潤する好中球や macrophage などの貪食細胞や血管内皮のキサンチンオキシダーゼ、ホスホリパーゼ A2 によるアラキドン酸カスケード、細胞内ミトコンドリアなどにより産生される。Macrophage は貪食するとき大量の酸素を消費し、急激に活性酸素種を産生する。基質である nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) を用いて NADPH オキシダーゼの作用により酸素 1 分子に電子 1 つが供与されて  $\text{O}_2\cdot^-$  が生成され、これが作用の場である細胞外や、異物を取り込むファゴソームにも放出される。ついで貪食した対象物を分解除去する

過程で、macrophage は interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) などにより活性化され、interleukin (IL)-1 や IL-6, IL-12, tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) など種々のサイトカインや、nitric oxide (NO), 活性酸素などの生理活性物質を産生する。

活性酸素種は酸化反応により細胞内シグナル伝達にも関与する。Nuclear factor kappaB (NF- $\kappa$ B) は細胞外刺激により核内に移行し遺伝子発現を誘導する転写因子の1つであり、IL-1 や IL-2, TNF などのサイトカインをはじめ、セレクチンなどの接着分子、誘導型一酸化窒素合成酵素 (inducible nitric oxide synthase : iNOS), cyclooxygenase, Fas リガンドなど多くの炎症や免疫応答に関与する遺伝子の発現も制御している<sup>23)</sup>。

実験1 から EAN 馬尾神経内での 2,3-DHBA の産生、すなわち  $\cdot$ OH 産生の開始は7日目と11日目の間で始まり、有意に増加する時期は免疫後11~14日目であることが確認され、臨床症状の発現から症状極期に達するまでの時期に一致していた。臨床症状発現の1~2日前から、馬尾神経内に浸潤する Th1 細胞からの TNF 産生が増加し macrophage を活性化するので<sup>24-26)</sup>、 $\cdot$ OH は時期的にも活性化された macrophage から分泌されたものと考えて矛盾しない。さらに組織学的には、脂質過酸化分解生成物の1つであり脂質過酸化の主要なマーカーとしてよく用いられている MDA は macrophage の周囲で染色性が高かった。 $\cdot$ OH と反応した多価不飽和脂肪酸は、脂質ペルオキシラジカル (lipid peroxy radical : LOO $\cdot$ ) を形成し、さらに別の多価不飽和脂肪酸と反応して脂質ヒドロペルオキシド (lipid hydro peroxide : LOOH) と LOO $\cdot$  を形成する。さらにこれらを経由して反応性に富み、生体毒性の本体と考えられている多種類の活性カルボニル化合物を生じる。この過程での LOO $\cdot$  から分子内2重結合に反応して形成された環状エンドペルオキシドの分解産物が MDA である<sup>27)</sup>。すなわち MDA の存在は馬尾組織内での連鎖的脂質過酸化反応を示唆している。

フリーラジカルスカベンジャーとして選択した edaravone は脳保護剤として2001年4月にわが国で承認された薬剤である。有害なフリーラジカルを消去することで無害化し脳を酸化障害から保護する作用機序を有し、脳梗塞急性期に伴う神経症候、日常生活動作障害、機能障害を改善する<sup>28)</sup>。本剤は生理的条件下では約50%がアニオンとして存在し、この edaravone アニオンが電子を供与して種々のラジカルを消去する。その際生じた edaravone ラジカルは反応系中の酸素分子と反応して edaravone ペルオキシラジカルに変化し、最終的にフリーラジカルとは無関係な反応生成物となる<sup>29)</sup>。

EAN では血管内皮型一酸化窒素合成酵素 (endothelial nitric oxide synthase : eNOS) が血管内皮細胞や Schwann

細胞で、iNOS は坐骨神経内の macrophage において症状極期で増加しのちに減少する<sup>30)</sup>。NO は至適濃度では生体防衛的に働くが、高濃度で産生され過剰になると O<sub>2</sub> $\cdot^-$  や H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が産生され、さらに NO と O<sub>2</sub> $\cdot^-$  が反応し酸化力の高いペルオキシ亜硝酸 (ONOO $^-$ ) や  $\cdot$ OH が形成される<sup>31)</sup>。従って、過剰な NOS が産生した NO の活性酸素種への変化による血管内皮細胞や Schwann 細胞の機能障害も想定された。しかし NOS の EAN 病態での役割は依然として不明の部分が多い<sup>32)</sup>。

Edaravone は連鎖的脂質過酸化反応の過程の LOO $\cdot$  によるリン脂質リポソーム膜の過酸化および ONOO $^-$  によるチロシンのニトロ化もそれぞれ抑制する<sup>33)</sup>。本研究では発症早期の  $\cdot$ OH の抑制により臨床症状の早期回復がみられた。Macrophage によるミエリン貪食を一次的障害とするならば、連鎖的脂質過酸化反応はそれに続く二次的障害と考えられる。EAN での macrophage のミエリン貪食には活性酸素種が必要で、NADPH オキシターゼ阻害剤でこれらを抑制すると脱髄が軽減したとする報告<sup>34)</sup>がある。本剤は一次障害と二次障害の双方に対して防衛的に作用する可能性があるが、今回の研究では、edaravone 投与は症状の極期の重症度とその持続期間に影響を及ぼさなかったため、後者をより軽減することで回復の促進に寄与したと考えられた。

末梢神経系には、中枢神経系に存在する血液脳関門 (blood-brain barrier : BBB) に対応した血液神経関門 (blood-neural barrier : BNB) が存在し末梢神経系を全身循環系の影響から保護している。この BNB の存在は神経系の恒常性が保たれること以外に、全身循環系からの有毒物質の侵入の遮断、あるいは疾患に関連するリンパ球の末梢神経実質内侵入を阻止するなど、炎症性、あるいは中毒性・代謝性末梢神経障害には保護的に働いている。しかし GBS や CIDP では BNB が破綻し、炎症細胞や各種炎症性サイトカインなどが末梢神経実質へ侵入し病態に関与する<sup>35)</sup>。EAN でも血管内皮細胞の解離に基づく BNB 破綻が報告されている<sup>36,37)</sup>。実際に、モデル動物は異なるが、実験的視神経炎での検討では視神経内で  $\cdot$ OH は血管内皮細胞障害により BBB を障害し血管透過性を変化させるが、鉄キレート剤による  $\cdot$ OH 除去によりその障害の程度が軽減することが明らかになっている<sup>38)</sup>。

Edaravone はイヌでは血液中から脳脊髄液中へ速やかに移行し、BBB を比較的通過しやすいとされているが<sup>39)</sup>、ラットでは脳への移行は少ない<sup>40)</sup>。BNB の通過については報告がないが、BBB における効果と同様の効果が予想され  $\cdot$ OH 消去により BNB 障害やそれに続く破綻の軽減が macrophage をはじめとした炎症細胞の侵入を軽減し、血管透過性変化による組織浮腫をも軽減し、馬尾組織に保護的に働いた可能性が考えられた。

$O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ の除去でEANの症状が軽減する報告<sup>41)</sup>はあるが、本研究はこれらの代謝産物であり最も反応性が高い $\cdot OH$ の変動と脂質酸化障害を*in vivo*で明らかにし、スカベンジャーであるedaravoneによる効果を明らかにしたものである。EANの治療戦略としてmacrophage遊走因子<sup>42)</sup>の抑制や、Th1/Th2バランスに関わるサイトカインの調整<sup>43,44)</sup>などが報告されているが、 $\cdot OH$ 除去は単独またはこれらの方法と併用も可能である。そして本剤はヒトへの安全性が確認されておりGBSへの臨床応用にも期待ができる。

本研究では、免疫翌日からスカベンジャーを投与したが、実際の臨床ではGBS患者は症状が発症した後に医療機関を受診し治療を受ける。従ってEANでも症状が発症した段階から投与を開始し効果を検討する必要がある。また $\cdot OH$ は生体内の内在性スカベンジャーでは消去を受けない物質であるが、前駆体の $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ はsuperoxide dismutaseやglutathione peroxidaseによる消去を受けているため、今回測定された $\cdot OH$ はedaravoneの効果だけでなく $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ の変動の影響も反映している結果である。今後は内在性スカベンジャーやサイトカインの変動も合わせて検討し、 $\cdot OH$ のEANの病態への関与を明らかにしたい。

## 結 論

- 1) EANの馬尾神経組織内の $\cdot OH$ は炎症が活動的な時期に一致して増加していた。
- 2)  $\cdot OH$ スカベンジャーにより $\cdot OH$ の濃度は低下し、運動麻痺の回復が促進された。
- 3) 末梢神経内 $\cdot OH$ が神経炎症に関与し新たな治療ターゲットとなる可能性が示唆された。

**Conflicts of interest (COI)** : 筆頭著者を始め、すべての著者は、COI関係にある企業などはない。

## 文 献

- 1) Yuki N, Hartung HP: Guillain-Barré syndrome. *N Engl J Med* **366**: 2294-2304, 2012
- 2) Raphaël JC, Chevret S, Hughes RA, et al.: Plasma exchange for Guillain-Barré syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* CD001798, 2002 (DOI: 10.1002/14651858.CD001798.pub2.)
- 3) Diener HC, Haupt WF, Kloss TM, et al.: A preliminary, randomized, multicenter study comparing intravenous immunoglobulin, plasma exchange, and immune adsorption in Guillain-Barré syndrome. *Eur Neurol* **46**: 107-109, 2001
- 4) Zettl UK, Gold R, Toyka KV, et al.: *In situ* demonstration of T cell activation and elimination in the peripheral nervous system during experimental autoimmune neuritis in the Lewis rat. *Acta Neuropathol* **91**: 360-367, 1996
- 5) Rosen JL, Brown MJ, Rostami A: Evolution of the cellular response in P2-induced experimental allergic neuritis. *Pathobiology*

- 60: 108-112, 1992
- 6) Jung S, Huitinga I, Schmidt B, et al.: Selective elimination of macrophages by dichloromethylene diphosphonate-containing liposomes suppresses experimental autoimmune neuritis. *J Neurol Sci* **119**: 195-202, 1993
- 7) Fujioka T, Jimi T, Hilliard BA, et al.: The expression of cytokine mRNA in the cauda equina of Lewis rats with experimental allergic neuritis. *J Neuroimmunol* **84**: 223-229, 1998
- 8) Temple MD, Perrone GG, Dawes IW: Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends Cell Biol* **15**: 319-326, 2005
- 9) Halliwell B, Gutteridge JMC: Free Radicals in Biology and Medicine. *Free Radicals in Biology and Medicine* (4th ed.) Oxford University Press, New York, 2007
- 10) Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, et al.: Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radic Biol Med* **39**: 841-852, 2005
- 11) Halliwell B: Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? *J Neurochem* **97**: 1634-1658, 2006
- 12) Smith KJ, Kapoor R, Felts PA: Demyelination: The role of reactive oxygen and nitrogen species. *Brain Pathol* **9**: 69-92, 1999
- 13) Haslbeck KM, Schleicher ED, Friess U, et al.: N (epsilon)-Carboxymethyllysine in diabetic and non-diabetic polyneuropathies. *Acta Neuropathol* **104**: 45-52, 2002
- 14) Kiefer R, Kieseier BC, Stoll G, et al.: The role of macrophages in immune-mediated damage to the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol* **64**: 109-127, 2001
- 15) Hartung HP, Hughes RA, Taylor WA, et al.: T cell activation in Guillain-Barré syndrome and in MS: Elevated serum levels of soluble IL-2 receptors. *Neurology* **40**: 215-218, 1990
- 16) De La Hoz CL, Castro FR, Santos LM, et al.: Distribution of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- $\alpha$  in the peripheral nervous system of Lewis rats during ascending paresis and spontaneous recovery from experimental autoimmune neuritis. *Neuroimmunomodulation* **17**: 56-66, 2010
- 17) Rostami A, Gregorian SK, Brown MJ, et al.: Induction of severe experimental autoimmune neuritis with a synthetic peptide corresponding to the 53-78 amino acid sequence of the myelin P2 protein. *J Neuroimmunol* **30**: 145-151, 1990
- 18) McCabe DR, Maher TJ, Acworth IN: Improved method for the estimation of hydroxyl free radical levels *in vivo* based on liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **691**: 23-32, 1997
- 19) 岩瀬隆之, 小林 潔, 務基 衛, ほか: MCI-186のラットにおける30日間静脈内反復投与毒性試験および14日間回復試験. *薬理と治療* **25**: S1531-1548, 1997
- 20) Amatya B, Khan F, Whishaw M, et al.: Guillain-Barré syndrome: Prevalence and long-term factors impacting bladder function in an Australian community cohort. *J Clin Neurol* **9**: 144-150, 2013
- 21) Leonards JR: Presence of acetylsalicylic acid in plasma following oral ingestion of aspirin. *Proc Soc Exp Biol Med* **110**: 304-308, 1962
- 22) Ingelman-Sundberg M, Kaur H, Terelius Y, et al.: Hydroxylation of salicylate by microsomal fractions and cytochrome P-450. Lack of production of 2,3-dihydroxybenzoate unless hydroxyl radical formation is permitted. *Biochem J* **276**: 753-757, 1991
- 23) Karin M, Ben-Neriah Y: Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF- $\kappa$ B activity. *Annu Rev Immunol* **18**: 621-663, 2000
- 24) Young HA, Hardy KJ: Role of interferon- $\gamma$  in immune cell regulation. *J Leukoc Biol* **58**: 373-381, 1995
- 25) Schmidt B, Stoll G, van der Meide P, et al.: Transient cellular ex-



- pression of  $\gamma$ -interferon in myelin-induced and T-cell line-mediated experimental autoimmune neuritis. *Brain* **115**:1633-1646, 1992
- 26) Bancroft GJ, Kelly JP, Kaye PM, et al: Pathways of macrophage activation and innate immunity. *Immunol Lett* **43**: 67-70, 1994
- 27) Yamada S, Kumazawa S, Ishii T, et al: Immunochemical detection of a lipofuscin-like fluorophore derived from malondialdehyde and lysine. *J Lipid Res* **42**: 1187-1196, 2001
- 28) Edaravone Acute Infarction Study Group: Effect of a novel free radical scavenger, edaravone (MCI-186), on acute brain infarction. Randomized, placebo-controlled, double-blind study at multicenters. *Cerebrovasc Dis* **15**: 222-229, 2003
- 29) Ono S, Okazaki K, Sakurai M, et al: Density functional study of the radical reactions of 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one (MCI-186): Implication for the biological function of MCI-186 as a highly potent antioxidative radical scavenger. *J Phys Chem A* **101**: 3769-3775, 1997
- 30) Lee Y, Shin T: Expression of constitutive endothelial and inducible nitric oxide synthase in the sciatic nerve of Lewis rats with experimental autoimmune neuritis. *J Neuroimmunol* **126**: 78-85, 2002
- 31) Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG: Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. *Biochem J* **357**: 593-615, 2001
- 32) Shin T, Ahn M, Matsumoto Y, et al: Mechanism of experimental autoimmune neuritis in Lewis rats: The dual role of macrophages. *Histol Histopathol* **28**: 679-684, 2013
- 33) Yamamoto Y, Kuwahara T, Watanabe K, et al: Antioxidant activity of 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one. *Redox Rep* **2**: 333-338, 1996
- 34) van der Goes A, Brouwer J, Hoekstra K, et al: Reactive oxygen species are required for the phagocytosis of myelin by macrophages. *J Neuroimmunol* **92**: 67-75, 1998
- 35) 神田 隆: 末梢神経疾患研究の現在, 末梢神経疾患と血液神経  
関門. *臨神経* **49**: 959-962, 2009
- 36) Powell HC, Olee T, Brostoff SW, et al: Comparative histology of experimental allergic neuritis induced with minimum length neuritogenic peptides by adoptive transfer with sensitized cells or direct sensitization. *J Neuropathol Exp Neurol* **50**: 658-674, 1991
- 37) Powell HC, Myers RR, Mizisin AP, et al: Response of the axon and barrier endothelium to experimental allergic neuritis induced by autoreactive T-cell lines. *Acta Neuropathol* **82**: 364-377, 1991
- 38) Guy J, McGorray S, Qi X, et al: Conjugated deferoxamine reduces blood-brain barrier disruption in experimental optic neuritis. *Ophthalmic Res* **26**: 310-323, 1994
- 39) 高松 康雄, 渡辺 俊明: イヌにおける 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one (MCI-186) の脳脊髄液中濃度に関する研究. *薬理と治療* **25**(suppl 7): S1793-1797, 1997
- 40) 小松 貞子, 中井 弘司, 正木 克佳, ほか: ラットにおける 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one (MCI-186) の体内動態に関する研究 (1) 単回静脈内投与時の血中濃度推移, 分布, 代謝および排泄. *薬物動態* **11**: 463-480, 1996
- 41) Hartung HP, Schäfer B, Heininger K, et al: Suppression of experimental autoimmune neuritis by the oxygen radical scavengers superoxide dismutase and catalase. *Ann Neurol* **23**: 453-460, 1988
- 42) Zou LP, Pelidou SH, Abbas N, et al: Dynamics of production of MIP-1 $\alpha$ , MCP-1 and MIP-2 and potential role of neutralization of these chemokines in the regulation of immune responses during experimental autoimmune neuritis in Lewis rats. *J Neuroimmunol* **98**: 168-175, 1999
- 43) 清塚 鉄人: 実験的自己免疫性神経炎ラットに対する Atorvastatin の効果. *東邦医会誌* **52**: 438-444, 2005
- 44) 久手堅 司: 実験的自己免疫性神経炎ラットに対する sildenafil の効果. *東邦医会誌* **56**: 9-15, 2009

# Hydroxyl Radical Production in the Peripheral Nervous System in Experimental Autoimmune Neuritis

Masashi Inoue Shingo Konno Wataru Hagiwara  
and Toshiki Fujioka

Division of Neurology (Ohashi), Department of Internal Medicine, School of Medicine,  
Faculty of Medicine, Toho University

---

## ABSTRACT

**Background:** Few studies have investigated hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ) formation in experimental autoimmune neuritis (EAN), an animal model of human Guillain-Barré syndrome. We examined  $\cdot\text{OH}$  formation and the role of  $\cdot\text{OH}$  during EAN progression.

**Methods:** A synthetic peptide of the P2 protein in bovine peripheral nerve myelin was injected into the hind limb of female Lewis rats. Motor impairment was assessed daily.  $\cdot\text{OH}$  in the cauda equina (CE) was measured by the salicylate-trapping method, using high-performance liquid chromatography and an electrochemical detector (ESA model 5500). To eliminate  $\cdot\text{OH}$ , EAN rats were treated daily with the free radical scavenger intraperitoneal edaravone (10 mg/kg/day). In addition, CE tissue was used for immunohistologic examination of malondialdehyde, an important marker of lipid oxidation products.

**Results:** EAN rats developed flaccid paralysis of the tail tip at 11 days post-immunization (DPI), which gradually progressed to flaccid paraplegia. Motor dysfunction peaked at 14–16 DPI and was followed by spontaneous recovery. Production of 2,3-dihydroxybenzoic acid (DHBA), which is produced from  $\cdot\text{OH}$  and salicylate, was higher in the EAN group than in control at 11 and 14 DPI. Recovery from EAN was faster in the group treated with edaravone than in the untreated EAN group, although symptom onset and severity did not significantly differ between these groups. 2,3-DHBA production in the CE was significantly lower at 11 DPI in edaravone-treated rats than in the untreated EAN group. Immunohistologic study revealed malondialdehyde in mononuclear cell infiltration foci, mainly comprising macrophages, in the CE of EAN rats.

**Conclusions:** Hydroxyl radical was produced in CE during acute EAN. Scavenging of hydroxyl radical resulted in early resolution of EAN, which suggests a close relationship between functional impairment and hydroxyl radical in this model.

J Med Soc Toho 62 (1): 2–10, 2015

---

**KEYWORDS:** experimental autoimmune neuritis (EAN), hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ), free radical scavenger, edaravone