

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

井上雅史より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 519 号

学位申請者： 井 上 雅 史
いの うえ まさ し

学位審査論文： 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

公 表 誌： 東邦医学会雑誌 62(1):2-10, 2015

論文内容の要旨：

【目的】 Guillain-Barré 症候群 (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一つとなっている。多くは数ヶ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、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 CD4+細胞、CD8+細胞である。EAN では細胞移入の実験により 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なっている。その後、病極期に末梢神経内で Th2 細胞優位へ変換することにより Th2 細胞や macrophage の浸潤が抑制され回復が始まると考えられている。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 Harber-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。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)。この過程は脳血管障害、神経変性疾患、脱髄疾患、慢性炎症性多発神経根炎 (CIDP) 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・OHの関与を明らかにするために・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・OHを抑制した場合の効果を検討した。

【対象と方法】実験1:週年齢7週のマスのLewis系ラット20匹にウシP2蛋白(aa53-78)由来の合成ペプチド150 μ gをcomplete Freund's adjuvant (CFA)とともに片側足底に注射しEANを誘発した(EAN群)。対照群20匹にはCFAのみを片側足底に注射した(CFA群)。EAN群とCFA群において、①臨床症状の6段階評価(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)、②組織内・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、③馬尾神経の組織学的検索を行った。

実験2:実験1と同様の方法で50匹のEANラットを作成し、無治療群(EAN群)とフリーラジカルスカベンジャーの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edaravone10 mg/kg/日を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。臨床症状の評価は実験1と同様に行った。2,3-DHBAの測定はedaravone投与から12時間後に実験1と同様に行った。統計処理はExcel用アドインソフトStatcel 3rd editionを用い、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】EAN群は尾の弛緩性麻痺から発症し、免疫後15日目には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日、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日目で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。

【考察】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クオリティオブライフ(QOL)に関する報告は少ない。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。

【結論】EANの運動症状発症時期に増加する・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・OHが関与することが示唆され、新たな治療ターゲットとなる可能性が示唆された。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 519 号	氏 名	井 上 雅 史
学位審査担当者	主 査	岩 淵 聡
	副 査	高 橋 啓
	副 査	岩 崎 泰 雄
	副 査	黒 田 優
	副 査	中 野 裕 康
<p>学位審査論文の審査結果の要旨：</p> <p>Guillain-Barré 症候群 (GBS) は、弛緩性麻痺を呈する急性脱髄性多発根神経炎として知られている。GBS 患者の多くは 6-12 ヶ月前後で寛解する一方、重症例に対しては血液浄化療法や免疫グロブリン療法などが行われるものの、10-15% の症例では自力歩行不能などの後遺症を残す。今回、著者らは GBS の実験モデルとされている experimental autoimmune neuritis (EAN) を用いて、末梢神経内のヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) の変化とフリーラジカルスカベンジャーの効果を検討した。その結果、EAN 群では尾の弛緩性麻痺を発症し、免疫後 11 日、14 日目においてサリチル酸により $\cdot\text{OH}$ を捕捉し測定した 2,3-DHBA が有意に増加していた。またフリーラジカルスカベンジャー (edaravone) 投与により、極期症状の軽減は得られなかったが、免疫後 18 日、19 日目での回復が有意に良好であった。以上より、EAN における末梢神経炎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、$\cdot\text{OH}$ が GBS の新たな治療ターゲットになり得ると結論付けた。</p> <p>平成 27 年 2 月 24 日 (火) 16:00~17:00 医学部 3 号館第 2 セミナー室において、高橋教授、岩崎教授、黒田教授、中野教授、岩淵の出席のもと審査が行われた。研究概要説明の後に審査員より、今回マクロファージの発現をみるために CD68 ではなく、なぜ CD45 を用いたのか。組織学的に炎症所見が強いのはいつごろか。抗酸化作用のある vitamin E を使用した報告はあるか。edaravone の投与量が臨床使用量とかけ離れているのでは、edaravone 群では、症状の回復時期早めたが、症状の出現や症状の程度を抑えることができなかったのはどうしてか。などの質疑があったが、井上氏はこれらすべての質疑に対して的確に返答し、研究の限界・課題についても言及した。</p> <p>本研究において、EAN における末梢神経障害と $\cdot\text{OH}$ との関連を指摘し、フリーラジカルスカベンジャーにより臨床症状の早期の回復をもたらしたことは新発見であり、GBS の治療の新たなターゲットを見い出した優れた論文と判定し、審査委員全員の一致で学位授与に相当すると判断した。</p>		