

学位論文題名

Edaravone (MCI-186) Scavenges Reactive Oxygen Species and Ameliorates Tissue Damage in the Mice Spinal Cord Injury Model

(マウスの脊髄損傷モデルにおけるエダラボン(MCI-186)による活性酸素種の減量および組織障害の減少効果の研究)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】脊髄損傷時の急性期においては、スーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシルラジカルなどの活性酸素が脂質過酸化反応、タンパク質酸化、DNA 損傷を通して二次的な組織損傷を引き起こすとされている。そのため、脊髄損傷時の二次損傷を防ぐために薬剤での治療が試みられている。そして現在ではメチルプレドニゾン大量投与療法が臨床的に認可されているが、その効果は十分であるとは言えない。

一方、エダラボン(MCI-186; 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one)はフリーラジカルスカベンジャーであり、急性期の脳梗塞に対して臨床的に使用されている。動物モデルでは、全脳または局所脳虚血モデル、頭部外傷モデルでの神経保護作用を有し、脳虚血、頭部外傷後の浮腫を著明に減少させることが報告されている。さらに脊髄虚血モデルと脊髄損傷モデルでも組織障害を有意に軽減させるとの報告もあるが、その機序ははっきりしていない。

本研究では、脊髄損傷においてエダラボンが活性酸素の産生を減少させ組織障害を改善させるかを明らかにすることを目的とする。

【材料と方法】

雌性 C57BL/6 マウス(生後 5-10 週, 体重は 15-20g)を用いて不完全脊髄損傷モデルを作成した。麻酔は 4.0%イソフルレン、笑気で行ない、直腸温を 34.5°Cから 36.0°Cに維持した。皮膚の正中切開後、手術顕微鏡下で T10 の椎弓切除を行なった。Pneumatic impact device の設定条件は、速度 2m/sec, 深さは 0.25mm とした。T10 レベルで不完全脊髄損傷作製後、術直後の神経学的評価を行った。

動物は、vehicle 投与群(n=10)とエダラボン投与群(n=10)の 2 グループに分けた。前者は vehicle を、後者はエダラボン 3mg/kg を脊髄損傷の 30 分前に腹腔内投与した。神経学的評価は、Kuhn らの behavioral function test を用い、脊髄損傷作成後 0, 1, 4, 7 日目に行なった。

脊髄損傷の体積測定のため、脊髄損傷後 7 日目に脊髄を採取した。採取時、4.0%イソフルレンで麻酔し、上行大動脈からヘパリン加生理食塩水を灌流後に 4%パラホルムアルデヒド溶液で灌流した。採取した脊髄はパラフィン包埋し、7 μ m の矢状断の切片とし、Luxol fast blue 染色を行なった。体積は Dohrmann の two-cone 法で算出した。

脊髄損傷急性期のスーパーオキシドに対するエダラボンの効果の時間的、空間的な分析を行なうため、別に vehicle 投与群(n=6)、エダラボン投与群(n=6)を作成した。それぞれ脊髄損傷作成から 1 時間後、3 時間後に 4%イソフルレン麻酔下に脊髄を採取した。採取した脊髄は直ちに液体窒素で凍結し、包埋した。10 μ m の厚さの切片とし、5mmol/l dihydroethidium (DHE) リン酸緩衝液溶液を暗室、加湿チャンバー内で 30°C, 30 分間インキュベートした。DHE はスーパーオキシ

ドで酸化されると ethidium bromide となり細胞核内の DNA と結合することで赤の蛍光を発する。赤の蛍光は 580nm ロングパスフィルターを介して蛍光顕微鏡で観察し、CCD カメラで記録した。それぞれの切片で脊髄損傷の中心部から 1mm と 2mm 離れた部位に ROI を設定し、輝度を測定した。(1mm の ROI の輝度) / (2mm の ROI の輝度) の比を算出し比較した。

DHE 陽性細胞が神経細胞か否かを評価するため、蛍光免疫染色を行なった。上述の通りの凍結切片作製後、マウス IgG で標識した抗 MAP2 モノクローナル抗体で染色した(n=3)。蛍光顕微鏡で観察し、デジタル記録を行なった。

統計処理は、連続データは対応のない t 検定、ノンパラメトリックデータは Mann-Whitney U テストで行なった。

【結果】

vehicle 投与群、エダラボン投与群とも脊髄損傷作製直後は強度の後肢機能障害を呈し、その後は徐々に改善した。Motor score は vehicle 投与群、エダラボン投与群が 0 日目でそれぞれ 0.2 ± 0.6 , 0.2 ± 0.4 で有意差はなかったが、7 日目ではそれぞれ 3.3 ± 1.1 , 4.2 ± 1.2 であり、エダラボン投与群で有意に良好な改善が得られた($p=0.0146$)。Hind foot bar grab score では 4 日目で vehicle 投与群、エダラボン投与群がそれぞれ 1.7 ± 0.7 , 2.3 ± 0.8 であり、エダラボン投与群で有意に良好であった。その他の項目では両群間に有意差は認めなかった。

脊髄損傷の体積測定の結果は、vehicle 投与群が $2.43 \pm 0.48 \text{mm}^3$ に対し、エダラボン投与群は $3.82 \pm 1.71 \text{mm}^3$ であり、エダラボン投与により優位に体積は減少していた($p=0.0412$)。

DHE 染色による輝度測定の結果は、vehicle 投与群では損傷 1 時間後、3 時間ごとにも損傷中心の周辺部で蛍光輝度の上昇を認めていたが、エダラボン投与群では顕著ではなかった。輝度の比は損傷 1 時間後では vehicle 投与群、エダラボン投与群で 1.45 ± 0.20 , 0.87 ± 0.07 ($p<0.0001$)、損傷 3 時間後では 1.29 ± 0.18 , 0.82 ± 0.07 ($p<0.0001$) であり、いずれもエダラボン投与群で有意に低値であった。DHE と MAP2 の二重免疫染色では、DHE 陽性細胞の 90% 以上は MAP2 陽性であった。

【考察】

本研究では、脊髄損傷前のエダラボン 3mg/kg の投与により有意に脊髄損傷の体積を減少させ、運動機能の回復を良好にしていることを示した。さらに、DHE 染色によりスーパーオキシド産生の時間的、空間的な分析を行ない、二次損傷の保護の機序を検討した。

スーパーオキシドは受傷から 1 時間、3 時間後に損傷の周辺部で増加しており、また、主に神経細胞で産生されていることが示された。これまでもスーパーオキシドの産生は 24 時間まで続くという報告もある一方、水酸化ラジカルは 3 時間までは産生されるが 5 時間後には増加していないとの報告もある。本研究の結果も併せ、スーパーオキシドは損傷周辺部で水酸化ラジカルよりは長時間産生が継続する可能性が示唆された。

エダラボンは脊髄損傷周辺部のスーパーオキシドの増加を有意に減少させることが示され、その結果は活性酸素を除去することが脊髄損傷の体積を有意に減少させることを示唆している。また、今回の結果および過去の報告からは、エダラボンが脊髄損傷時にスーパーオキシドと水酸化ラジカルの濃度を低下させることとともに脂質過酸化も抑制することが知られている。そして虚血再還流モデルでは、再還流時の活性酸素産生も抑制することが知られている。

本研究ではエダラボンがスーパーオキシドの濃度を低下させ組織障害を防止し、7 日目の運動機能を改善することが示された。臨床応用されるためには、受傷後投与の time window を解明することが今後は必要である。

【結論】

本研究では、エダラボンが損傷部周辺のスーパーオキシド濃度を低下させ脊髄損傷の体積を減少させることで運動機能の改善が得られることを示した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 佐々木 秀 直
副 査 教 授 吉 岡 充 弘
副 査 教 授 岩 崎 喜 信

学 位 論 文 題 名

Edaravone (MCI-186) Scavenges Reactive Oxygen Species and Ameliorates Tissue Damage in the Mice Spinal Cord Injury Model

(マウスの脊髄損傷モデルにおけるエダラボン(MCI-186)による活性酸素種の減量および組織障害の減少効果の研究)

脊髄損傷急性期では、スーパーオキシドなどの活性酸素種がDNA損傷などを通して二次的な組織損傷を引き起こすとされている。二次損傷を防ぐために様々な薬剤が試みられているが、臨床使用されているメチルプレドニゾロンの効果は十分であるとは言えない。一方、エダラボンはフリーラジカルスカベンジャーであり、急性期の脳梗塞に対して臨床的に使用されている。脳虚血モデル、頭部外傷モデルでの神経保護作用、抗浮腫が報告されている。さらに脊髄虚血モデルと脊髄損傷モデルでも組織障害を軽減させるとの報告もあるが、その機序は解明されていない。本研究は、脊髄損傷においてエダラボンがもたらす活性酸素種の減量および組織障害の改善効果の機序解明を目的とした。

方法は、C57BL/6マウスに空気圧損傷装置を用いてT10レベルに不完全脊髄損傷モデルを作成した。vehicle治療群(n=10)とエダラボン3mg/kg治療群(n=10)の2グループに分け、それぞれ脊髄損傷の30分前に腹腔内投与した。神経学的評価は、Kuhnらの評価法を用い、脊髄損傷作成後0, 1, 4, 7日目に行った。損傷体積測定のため脊髄損傷後7日目に灌流固定し脊髄を採取した。7 μ mの矢状断の切片とし、Luxol fast blue染色を行った。体積はDohrmannのtwo-cone法で算出した。

脊髄損傷急性期のスーパーオキシドに対するエダラボンの効果の時間的、空間的な分析を行うため、別に動物モデルを作製した。vehicle投与1時間後(n=6)、3時間後(n=6)、エダラボン投与1時間後(n=6)、3時間後(n=6)に脊髄を採取、液体窒素で凍結し、包埋した。10 μ mの切片を作製し、DHE(dihydroethidium)で染色を行った。蛍光顕微鏡の画像を記録し、脊髄損傷の中心部から1mm(a)と2mm(b)離れた部位にROIを設定し、(aの輝度) / (bの輝度)の比を比較した。

DHE陽性細胞が神経細胞か否かを評価するため、抗MAP2モノクローナル抗体で蛍光免疫染色を行った。また、統計処理は、連続データは対応のないt-検定、ノンパラメトリックデータはMann-Whitney Uテストで行った。

両群とも脊髄損傷作製直後は強度の後肢機能障害を呈し、その後は徐々に改善した。Motor score および Hind foot bar grab score ではエダラボン治療群で有意に良好であった。脊髄損傷の体積測定の結果は、エダラボン投与により有意に体積は減少していた。DHE 染色による輝度測定の結果は、vehicle 治療群では損傷1時間後、3時間後とも損傷の周辺部で蛍光輝度の上昇を認めていたが、エダラボン投与群では顕著ではなかった。輝度の比は損傷1時間後、損傷3時間後のいずれもエダラボン投与群で有意に低値であった。二重免疫染色では、DHE 陽性細胞の90%以上はMAP2 陽性であった。

本研究では、エダラボン 3mg/kg の前治療により有意に脊髄損傷の体積を減少させ、運動機能の回復を良好にしていることを示した。さらに DHE 染色により、スーパーオキシドは受傷から1時間、3時間後に損傷の周辺部で増加しており、エダラボンは脊髄損傷周辺部のスーパーオキシドの増加を有意に減少させることが示された。その結果は活性酸素を除去することで脊髄損傷の体積を有意に減少させることを示唆している。また、神経細胞がスーパーオキシドの標的であることが示された。

公開発表において、主査から、スーパーオキシド産生に関して虚血病変のペナンブラ領域との対比、急性期から慢性期への時系列上の産生細胞の変化に関する質問があった。次いで副査の岩崎教授から、薬剤投与のタイミング、投与量、神経症状および組織学的な評価の時期など実験計画の決定に関する質問があった。さらに副査の吉岡教授から、損傷部の中でのアポトーシス、壊死の割合、出血がスーパーオキシド産生に及ぼす影響、病変の経時変化、薬剤の用量依存性についての質問があった。また、一般聴衆から組織損傷の程度と神経症状の相関に関する質問があった。約30分に亘り活発な質疑応答が行われ、いずれの質問に対しても申請者は自らの研究に基づく経験や過去の論文の内容を引用し、適切な回答をした。

この論文は、脊髄損傷の二次障害に対する新たな薬剤応用の可能性を示し、かつフリーラジカル生成および薬剤で抑制される状態を時間的、空間的に分析し、薬剤効果の発現機序を初めて証明した点で優れており、臨床応用の際に重要な実験的根拠となりえるもので、意義のある研究である。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。