

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 12 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350814

研究課題名(和文) ラット筋損傷モデルにおける炭酸ガス経皮吸収の効果についての検討

研究課題名(英文) The effect of transcutaneous application of CO2 on muscle injury using rat model

## 研究代表者

酒井 良忠 (Sakai, Yoshitada)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90397802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：筋損傷はスポーツ外傷などでよく見られる疾患であるが、その治療は時間かかり、またその修復を促進させる有効な治療法は存在しない。我々はハイドロゲルと純炭酸ガスを用いた新開発の炭酸ガス治療法も用い、ラットの筋損傷モデルの治癒促進をきたすかについて検討を行った。その結果、炭酸ガス治療群はより組織修復が進んでおり、筋合成タンパクや血管新生因子の発現増加がみられ、炭酸ガス治療が筋損傷の治癒促進に有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In sports and traumatology medicine, skeletal muscle injuries are common. However, we have not established the most optimal treatment for muscle injuries yet. Recently, we designed a novel transcutaneous CO2 application system using 100% CO2 gas, a transcutaneous CO2 absorption-enhancing hydrogel. In this study, we investigated the effects of transcutaneous CO2 application for injured tibialis anterior muscle in rat. We investigate histologically injured muscle with or without CO2 absorption. The CO2 group accelerate muscle healing. In addition, from immunostaining and realtime PCR experiments, neo-vascular factor and muscle synthesis factors were also upregulated by CO2 absorption. This study may imply that a transcutaneous CO2 application can bring a therapeutic breakthrough for promotion of injured muscle repair.

研究分野：リハビリテーション医学

キーワード：炭酸ガス経皮吸収 筋損傷

### 1. 研究開始当初の背景

炭酸ガス療法は、天然炭酸泉治療に始まり、現在では人工炭酸泉、天然炭酸泉由来ガス浴に発展し、特に炭酸ガスの血管拡張、血流増加作用に着目されて使用されている。近年では慢性閉塞性動脈硬化症による間欠性跛行やレイノー症状の改善効果について報告されており、また人工炭酸泉はスポーツやリハビリテーションの現場にも一部導入され、筋疲労回復などに用いられている。しかし経皮的に吸収された炭酸ガスの薬理効果に対する科学的なエビデンスはきわめて少なく、血管拡張、血流増加作用以外の作用については不明な点が多い。

我々は新しい炭酸ガス療法として、ハイドロゲルを用いて炭酸ガスを経皮吸収させるシステムに着目してきた。この方法は皮膚に親水性のハイドロゲルを塗布し、その上をプラスチック製アダプターで覆い、純炭酸ガスをその中に送入して経皮吸収させる方法であり、その薬理作用と生体内への効果について検討を行ってきており、いくつかの知見を得ている。このシステムにより生体内へ炭酸ガスが浸透し、血管拡張、血流増加のみならず、組織内（筋肉内）pH の低下をもたらすことで赤血球内において Bohr 効果を人工的に引き起こし、ヘモグロビンの酸素解離を促進し、この結果組織内の酸素分圧の増加がおこる。さらに、筋肉への直接的な影響として、ラットの前脛骨筋（速筋）を用いた解析により、新生血管の増加、筋関連因子の増加、b から a への筋線維の移行を報告している。これらの結果は炭酸ガス経皮吸収がトレーニング効果に加え、筋肉内においても組織修復促進作用を持つ可能性について示唆しているものと思われる。

筋肉において組織修復作用が最も必要となる状態は、筋損傷である。筋損傷はよく認められる疾患である。しかし、その治療には重症度により数週間から数か月必要であり、とくに仕事上やスポーツ選手における受傷では、復帰まで長期にわたる場合があり、その経済的、社会的損失が大きくなるのが問題である。また、筋損傷の治療は、弾性包帯による固定、リハビリテーションを行うが、明らかな筋損傷の治療促進に対する有効な治療法はないのが現状である。

そこで、今回我々は新しい炭酸ガス療法が筋損傷に効果をもたらすかについて検討を行った。

### 2. 研究の目的

今回我々はプピバカインを用いたラット前脛骨筋の筋損傷モデルを用いて、新しい炭酸ガス治療を施行して、その組織学的な修復状態と、筋合成系タンパク質、その他血管新生因子などを検討し、筋修復に促進的に作用するかを照明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1)ラット筋損傷モデル

8週齢の雄 Sprague Dawley ラットを用い、ペントバルビタールにて麻酔下にその前脛骨筋に対して 0.5% 塩酸プピバカインを小切開下に直視下に筋肉内注射し (0.3ml)、筋損傷モデルとした。

#### (2)炭酸ガス経皮吸収

炭酸ガス経皮吸収は、ハイドロゲルと純炭酸ガス、ポリエチレンバッグを用いた方法で施行した。

麻酔下に剃毛した下肢にハイドロゲルを塗布したのち、プラスチック製アダプターをかぶせて、純炭酸ガスを送気した (図 1)。頻度は 1 回 20 分、週 2 日施行した。また、麻酔のみで治療を施行しない群をコントロール (No treatment: NT 群) とした。

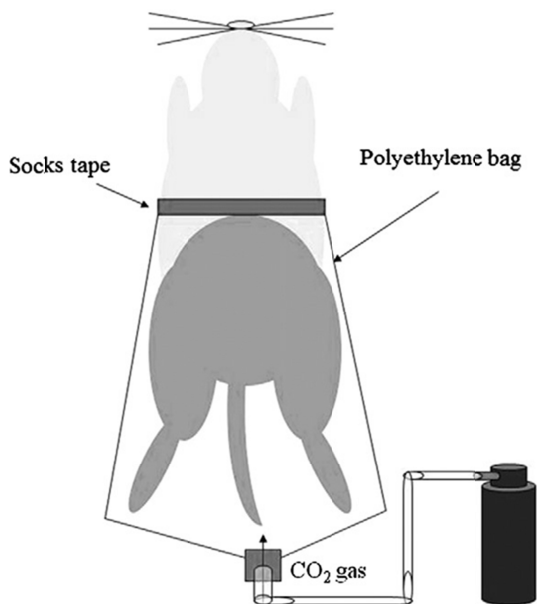


図 1 ラットへの炭酸ガス経皮吸収

#### (3)組織学的検討

炭酸ガス治療施行後 4, 6, 8 週にて組織学的検討を行った。Hematoxylin-Eosin 染色による形態学的な検討に加え、筋合成系タンパク質である、MyoD と myogenin について蛍光免疫染色を行った。さらにジストロフィンとラミニンの蛍光免疫染色を行った。

#### (4)Realtime PCR 法による筋合成系タンパク質と血管新生因子の mRNA 発現の定量

Taqman 法を用いた Realtime PCR により MyoD, myogenin と血管新生因子である VEGF の mRNA 発現の定量を行った

### 4. 研究成果

#### (1)筋質重量比

ラット体重に対する前脛骨筋の重量比について検討を行った。表 1 に示すとおり、炭酸ガス治療群のほうが重い傾向があったが、有意差は認めなかった。

	Muscle Weight(mg)/Body Weight(g) average	
	NT	CO <sub>2</sub>
1week	0.1481±0.0040	0.1717±0.0041
2weeks	0.1664±0.0069	0.1747±0.0023
4 weeks	0.1905±0.00089	0.1959±0.080
6 weeks	0.1964±0.0046	0.2085±0.0043
8 weeks	0.1990±0.0053	0.2065±0.0078

表 1. ラット前脛骨筋湿重量比 (n=6)

(2)組織学的検討 (Hematoxylin-Eosin 染色)  
図 2 に示すように、CO<sub>2</sub> 群では NT 群に比べて筋線維の肥大と炎症細胞浸潤の低下がみられ、筋組織の再構成が促進されており、約 2 週程度の治癒促進効果があると考えられた。

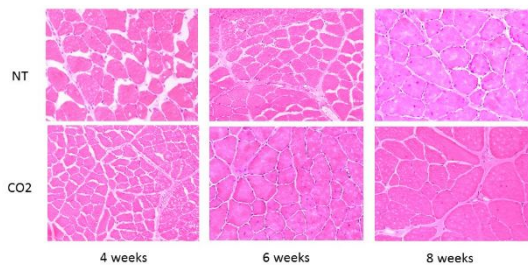


図 2 Hematoxylin-Eosin 染色

(3)免疫組織学的検討

筋合成、分化のマーカーである MyoD の染色では、CO<sub>2</sub> 群が NT 群に比べてあ 4, 6 週目で発現が強く、8 週目では発現が低下していた (図 3)。

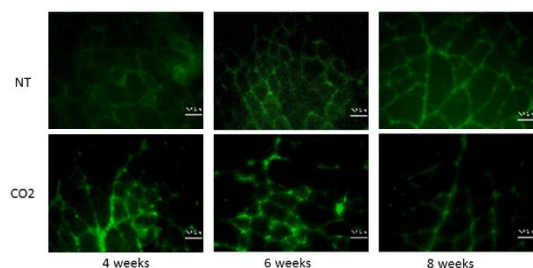


図 3 蛍光免疫染色 (MyoD)

また、myogenin の免疫染色では CO<sub>2</sub> 群が NT 群に比べて 4 - 8 週の時点で発現が強かった。(図 4)

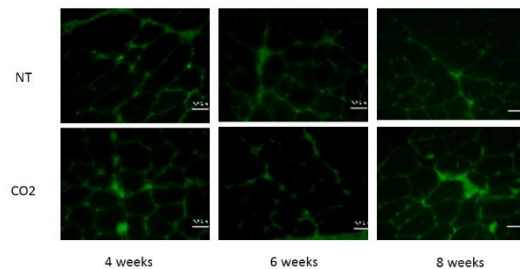


図 4 蛍光免疫染色 (myogenin)

さらに筋の構成タンパク質である、ジストロフィンの染色を行った結果、CO<sub>2</sub> 群では NT 群に比べて、4, 6 週でジストロフィンの発現が多く、8 週では差がなくなっていた。(図 5)

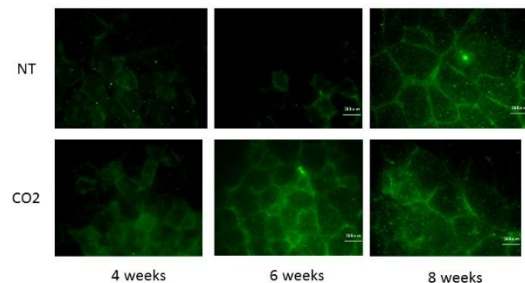


図 4 蛍光免疫染色 (ジストロフィン)

加えて細胞基底膜を染色するラミニンによる蛍光染色では、ジストロフィンと同様に 4, 6 週にて CO<sub>2</sub> 群が NT 群と比べて基底膜の構造の均一化が図れており、8 週では両群間に大きな外観上の変化はなかった。(図 5)

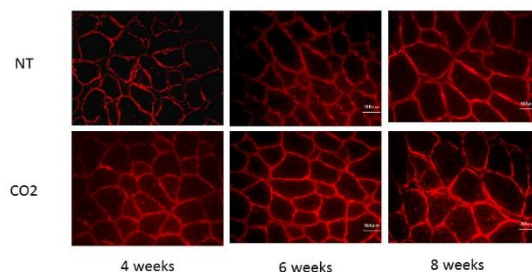


図 5 蛍光免疫染色 (ラミニン)

(4) Realtime PCR 法による筋合成系タンパク質、血管新生因子 mRNA 発現量の検討

筋合成蛋白である MyoD の mRNA 発現量は CO2 群で 4 週目に有意に大きかった(図 6)。また myogenin は 4, 6 週で CO2 群のほうが発現量が有意に大きかった(図 7)。さらに血管新生因子の一つである VEGF の mRNA 発現量は 6 週で CO2 群が有意に大きかった(図 8)。

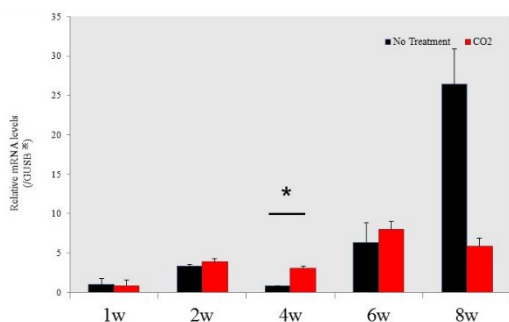


図 6 MyoD mRNA 発現量の検討 (n=6, \*p<0.05)

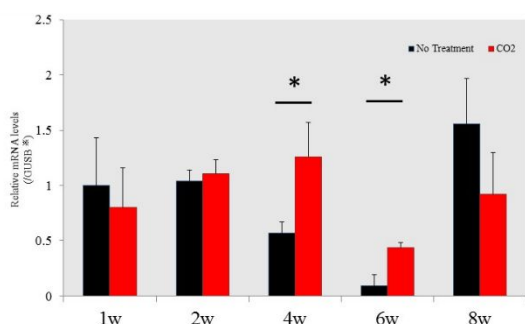


図 7 myogenin mRNA 発現量の検討 (n=6, \*p<0.05)

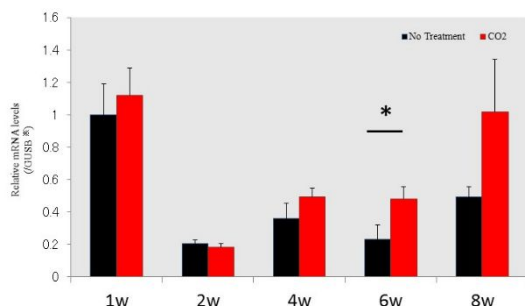


図 8 VEGF mRNA 発現量の検討 (n=6, \*p<0.05)

(5) 考察

組織学的検討より、炭酸ガス治療を行うことにより、筋線維の増大、炎症細胞浸潤の減少

が見られ、さらに筋合成系タンパク質の増加、ジストロフィンの増加、基底膜構成の再構築促進が行われている。NT 群では 8 週で組織学的のはほぼ治癒しているのに対し、CO2 群で 6 週でほぼ治癒が得られており、ラットの塩酸ピリパカインによる筋損傷モデルにおいては、当治療法が約 2 週間の筋修復促進効果を持つことが判明した。炭酸ガス治療は非常に侵襲の少ない治療法であり、この治療法がヒトの筋損傷にも同様の効果を持つとするならば、非侵襲の有効な治療法となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 3 件)

Shiho Akahane, Yoshitada Sakai, Takeshi Ueha, Hanako Nishimoto, Miho Inoue, Risa Harada, Keisuke Oe, Takahiro Niikura, Ryosuke Kuroda, Masahiro Kurosaka  
Transcutaneous application of CO2 activates muscle synthesis and vascular endothelial system in injured tibialis anterior (TA) muscle in rat models. Orthopaedic Research Society 62nd Annual Meeting 2016. Orlando USA 2016.3.8

赤羽 志保, 酒井 良忠, 上羽 岳志, 西本 華子, 井上 美帆, 小林 慶通, 原田 理沙, 新倉 隆宏, 黒田 良祐, 黒坂 昌弘  
炭酸ガス経皮吸収はラット前脛骨筋損傷モデルの治癒を促進する  
第 52 回日本リハビリテーション医学会学術集会 新潟 2015.5.28

Shiho Akahane, Yoshitada Sakai, Takeshi Ueha, Hanako Nishimoto, Keisuke Oe, Takahiro Niikura, Ryosuke Kuroda, Masahiro Kurosaka.  
Transcutaneous Application Of CO2 Accelerates Muscle Injury Repair In Rat Models. Orthopaedic Research Society 61st Annual Meeting 2015. Las Vegas, USA 2015.3.28

[図書](計 0 件)

[産業財産権]  
出願状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

酒井 良忠 (SAKAI Yoshitada)

神戸大学・大学院医学研究科・特命教授  
研究者番号：90397802