

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19700459
 研究課題名（和文） 廃用性筋萎縮モデルラットに対する抗酸化作用を持つ薬物投与の影響
 研究課題名（英文） THE INFLUENCE OF ANTIOXIDANTS ON HINDLIMB UNLOADING-INDUCED MUSCLE ATROPHY IN RATS
 研究代表者
 松嶋 康之（MATSUSHIMA YASUYUKI）
 産業医科大学・医学部・非常勤医師
 研究者番号：10412660

研究成果の概要：廃用性筋萎縮モデルラットに、脳梗塞の急性期治療に用いられており活性酸素を除去する作用を持つ薬物である Edaravone を投与し、その影響を検討した。今回の研究では、7日間の後肢非荷重の期間中に Edaravone を投与しても、ヒラメ筋の湿重量で評価したラットの廃用性筋萎縮は改善しなかった。今後、筋肉中の活性酸素障害の程度や筋繊維の断面積の変化などを詳細に検討する必要がある。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	0	2,400,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	270,000	3,570,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：廃用性筋萎縮、抗酸化、薬物投与、酸化的ストレス、ラット、リハビリテーション、Edaravone

1. 研究開始当初の背景

廃用性筋萎縮は、長期臥床や骨折後のギプス固定などの筋肉の不使用によって筋萎縮が起こる病態であり、廃用性筋萎縮のメカニズムを知り、有効な治療法を確立することは、リハビリテーション医学や宇宙医学の分野で非常に重要な研究領域である。

廃用性筋萎縮が起こるメカニズムとして、筋の

不使用によりタンパク分解系が促進され、タンパク合成系が抑制されることが考えられている。萎縮筋においてタンパク分解系の促進やタンパク合成系の抑制が起こる原因の1つとして酸化的ストレスの関与が報告されている(Kondo H, et al. Trace element movement and oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. Am J Physiol 262:E583-90, 1992., Lawler JM,

et al. Hindlimb unloading increases oxidative stress and disrupts antioxidant capacity in skeletal muscle. *Free Radic Biol Med* 35:9-16, 2003.). また、酸化ストレスを軽減する抗酸化物質であるビタミンEやシステイン、鉄キレート剤であるデフェロキサミンを投与することで筋萎縮が防げたとする報告もある(Appell HJ, et al. Supplementation of vitamin E may attenuate skeletal muscle immobilization atrophy. *Int J Sports Med* 18:157-60, 1997., Ikemoto M, et al. Cysteine supplementation prevents unweighting-induced ubiquitination in association with redox regulation in rat skeletal muscle. *Biol Chem* 383:715-21, 2002., Kondo H, et al. Trace element movement and oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Am J Physiol* 262:E583-90, 1992.). 我々はラットの廃用性筋萎縮モデルにおいて活性酸素の除去および活性酸素によって障害された蛋白質成分の再生修復に重要な役割を持つ酵素であるチオレドキシシン系抗酸化防御酵素が低下することを報告した(Matsushima Y, Nanri H, Nara S, Okufuji T, Ohta M, Hachisuka K, Ikeda M: Hindlimb unloading decreases thioredoxin-related antioxidant proteins and increases thioredoxin-binding protein-2 in rat skeletal muscle. *Free Radic Res* 40:715-22, 2006.). 我々の研究結果から、低下したチオレドキシシン系抗酸化酵素を上昇させることが、廃用性筋萎縮の予防につながると予想される。

活性酸素を除去するフリーラジカルスカベンジャーである Edaravone は、脳梗塞急性期の脳での活性酸素障害を軽減することで脳梗塞の治療薬として臨床で用いられており、筋萎縮に対する効果が確認されれば臨床応用が広がる可能性がある。これまでに Edaravone の廃用性筋萎縮に対する効果は検討されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ラット尾部懸垂による実験的な廃用性筋萎縮モデルを用い、フリーラジカルスカベンジャーである Edaravone を投与することで、筋萎縮を防ぐことが出来るかどうかを研究することである。

3. 研究の方法

12 週令のウィスター系雄性ラットを使用し、尾部懸垂による廃用性筋萎縮モデルを作製した。尾部懸垂されたラットは、後肢は床面に接地しないが、前肢で自由にケージ内を移動することが可能で、飼料と水は自由に摂取させた。懸垂期間は 7 日間とし、懸垂を行わない群と懸垂を行う群それぞれについて、薬物投与群と薬物非投与群を作製し、温度と湿度は一定の環境で飼育した。懸垂を行わない群はケージ内で通常に飼育し、懸垂を行う群と餌の消費量が同様になるように、毎日餌の投与量を調整した。

薬物としてフリーラジカルスカベンジャーである Edaravone を用いた。Edaravone の投与量は過去のラットでの実験において有効投与量とされている量を参考に、3mg/kg1 日1回腹腔内投与、あるいは 10mg/kg1 日 2 回腹腔内投与を選んだ。懸垂期間前後にラットの体重を測定した。懸垂期間終了後に後肢のヒラメ筋を採取し、筋肉の湿重量を測定し、左右の平均値を解析に用いた。各群間の比較は Student t 検定を用い、 $p < 0.05$ を有意差があるとした。

(1) Edaravone 3mg/kg1 日 1 回腹腔内投与

薬物投与群として、Edaravone 3mg/kg の 1 日 1 回腹腔内投与を懸垂期間中 7 日間行い、薬物非投与群ではコントロールとして同量の生理食塩水を腹腔内投与した。つまり、コントロール群 (Control) : 懸垂(-) 生理食塩水投与 (n=6)、Edaravone 群 (Ed) : 懸垂(-) Edaravone 投与 (n=6)、懸垂群 (Hindlimb unloading: HU) : 懸垂(+) 生理食塩水投与 (n=6)、懸垂+

Edaravone 群(HU+Ed):懸垂(+) Edaravone 投与 (n=6)の 4 群を作製し比較した。

(2)Edaravone 10mg/kg 1 日 2 回腹腔内投与

薬物投与群として Edaravone10mg/kg の腹腔内投与を 1 日 2 回、懸垂期間中 7 日間行い、薬物非投与群ではコントロールとして同量の生理食塩水を腹腔内投与した。(1)と同様に、Control 群 (n=5)、Edaravone 群 (n=5)、HU 群 (n=5)、HU+Ed 群 (n=5)の 4 群を作製し比較した。

4. 研究成果

(1)Edaravone 3mg/kg1 日 1 回腹腔内投与での結果

ラットの懸垂前の体重と 7 日間の懸垂期間終了後の体重、及び前後の体重の%変化量を表 1 に示す。懸垂期間の前及び後において、4 群間の体重に有意差は認めなかった(表 1)。

表 1. 懸垂期間前後の体重(平均±標準偏差)

群	前体重, g	後体重, g	%変化量
Control	433.7±24.2	431.5±22.4	-0.5
Ed	432.4±29.2	426.1±32.8	-1.4
HU	453.3±19.9	422.2±25.0	-6.9
HU+Ed	457.4±27.7	425.5±30.0	-7

ヒラメ筋の湿重量は、懸垂を行った群では懸垂を行わなかった群と比較して有意に低下しており、懸垂によって筋萎縮が起こっていた(図 1)。ヒラメ筋の湿重量は、HU 群と HU+Ed 群に有意差を認めず、Edaravone 投与によってヒラメ筋の湿重量低下を予防することはできなかった(図 1)。

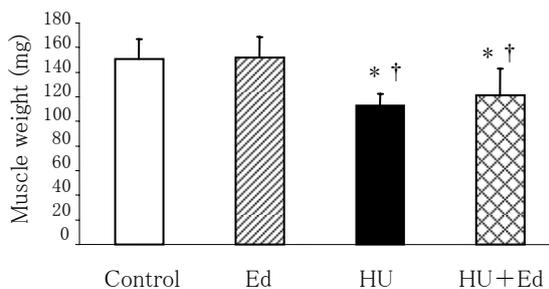


図 1. ヒラメ筋の筋重量の比較

Ed と HU+Ed においては、Edaravone を 3mg/kg1 日 1 回腹腔内投与した。* :p<0.05 (Control に対する t 検定), †:p<0.05 (Ed に対する t 検定)

(2)Edaravone 10mg/kg 1 日 2 回腹腔内投与での結果

ラットの懸垂前の体重と 7 日間の懸垂期間終了後の体重、及び前後の%変化量を表 2 に示す。懸垂期間の前及び後において、4 群間の体重に有意差は認めなかった(表 2)。

表 2. 懸垂期間前後の体重(平均±標準偏差)

群	前体重, g	後体重, g	%変化量
Control	437.5±38.7	442.0±35.5	+1
Ed	439.8±24.9	449.3±30.1	+2.2
HU	433.5±21.6	415.3±30.8	-4.2
HU+Ed	430.18±21.1	413.8±26.2	-3.8

ヒラメ筋の湿重量は、懸垂を行った群では懸垂を行わなかった群と比較して有意に低下しており、懸垂によって筋萎縮が起こっていた(図 2)。ヒラメ筋の湿重量は、HU 群と HU+Ed 群に有意差を認めず、Edaravone 投与によってヒラメ筋の湿重量低下を予防することはできなかった(図 2)。

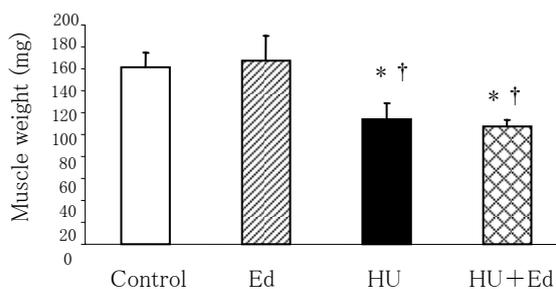


図 2. ヒラメ筋の筋重量の比較

EdとHU+Edにおいては、Edaravoneを10mg/kg 1日2回腹腔内投与した。* : $p < 0.05$ (Control に対する t 検定), †: $p < 0.05$ (Ed に対する t 検定)

(3) 考察と今後の展望

今回の研究は廃用性筋萎縮モデルに対して Edaravone 投与を試みた初めての研究である。Edaravone の投与量として、はじめに3mg/kg 1日1回腹腔内投与を用いたが、これは主として静脈内投与でラットの脳梗塞の予防に有効とされている量であり、投与量が少ない可能性があった。次にラットの腹腔内投与で血管内皮障害や高血圧の改善に有効との報告がある10mg/kg 1日2回投与での実験を行った。いずれの投与量においても Edaravone 投与によってヒラメ筋の湿重量低下を防ぐことはできなかった。

今回、筋萎縮の評価として湿重量を用いたが、湿重量は筋肉に含まれる水分量も含むために、筋萎縮を正確には反映していないことが考えられる。過去の報告において廃用性筋萎縮の予防効果をみるために筋湿重量で確認したものもあるが、より精細な評価を行うためには筋肉の乾燥重量や筋肉中のタンパク量、筋線維の断面積の測定が適している。より詳細な評価が必要と考え、現在ヒラメ筋の凍結切片を作成し、筋線維の断面積の測定を行っているところである。

また、今回の実験で Edaravone 投与によって、実際に筋肉中の酸化ストレスの軽減が起こっていたか確認する必要がある。酸化ストレスの

軽減が起こっていないのであれば、Edaravone の投与方法や投与量の問題があったと考えられる。また、Edaravone 投与による筋肉の酸化ストレスの変化や抗酸化酵素の変化について確認することで、廃用性筋萎縮における酸化ストレスの役割を知ることができる。今後、筋肉中の酸化ストレスの程度と抗酸化酵素の変化をウエスタンブロットと免疫組織染色を用いて評価する予定である。

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0件)

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松嶋 康之 (MATSUSHIMA YASUYUKI)
産業医科大学・医学部・非常勤医師
研究者番号:10412660

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: