

後肢非荷重による筋萎縮からの回復過程に及ぼす DHEA 投与の効果

田中 陽子¹⁾、的場秀樹²⁾

Effects of DHEA Administration on Recovery from Rat Skeletal Muscle Atrophy Induced by Hind-limb Suspension

Yoko TANAKA¹⁾ and Hideki MATOBA²⁾

Abstract

The purpose of this study was to test the hypothesis that dehydroepiandrosterone (DHEA) accelerate recovery from hind-limb suspension-induced skeletal muscle atrophy in rats by relieving oxidative stress. Male Wistar-strain rats aged 6 weeks were allocated either to the control group or the hind-limb suspended group. Some rats of the suspended group were sacrificed at the end of the suspension of 10 day long. Some other rats of the suspended group were suspended and the allowed to recover for 5 days with DHEA, 25mg/kg/day or without DHEA. The rats of the control group were sacrificed at either time points when the suspended rats were sacrificed. For all rats, muscle mass, muscle protein concentration and content were measured. Oxidative stress and anti-oxidative capacity of the serum and skeletal muscles were also evaluated.

In the soleus muscle, DHEA did not accelerate the recovery of the muscle mass from the suspension-induced atrophy, although it improved anti-oxidative capacity. In the medial gastrocnemius muscle, DHEA promoted the muscle mass recovery without altering a redox status of the muscle. These results indicate that muscle mass recovery from suspension-induced atrophy does not depend on redox status of the skeletal muscle.

Key word ; DHEA, Muscle Atrophy, Oxidative Stress

1) 徳島大学大学院 人間・自然環境研究科

Graduate School of Human and Natural Environmental Sciences, The University of Tokushima, Tokushima 770-8502, Japan

2) 徳島大学大学院ソシオ・アーツ・アンド・サイエンス研究部

Institute of Socio-Arts and Sciences, The University of Tokushima, Tokushima 770-8502, Japan

I. 緒言

近年、酸化ストレスが悪性腫瘍、動脈硬化など様々な疾患の発生や病態の悪化に関連するとして注目されている(須田ら 2006)。なお、酸化ストレスとは「生体内の酸化反応と抗酸化反応のバランスが崩れ前者に傾き、生体が酸化的障害を起こすこと」と定義される(Sies 1997; 内藤と吉川 2003)。

身体活動と酸化ストレスの関係に関しては、生体が酸化ストレス状態となるのは、酸素消費が増加する時、すなわち高強度の運動を行う時であると考えられてきた(荒尾 1998)。しかし、最近では、酸素消費が低下し、筋萎縮が見られるギブス固定や後肢非荷重でも、酸化ストレス状態となることが明らかになった(Kondo et al. 1993; Lawler et al. 2003)。

さらに、萎縮筋における酸化ストレスは、骨格筋のタンパク質分解を促進することが示唆されている(二川ら 2002; Powers et al. 2005; 大石 2005)。筋萎縮からの回復過程において、回復初期には酸化ストレスが筋萎縮からの回復を遅らせる原因になっている可能性がある(Kondo et al. 1993; Lawler et al. 2006)。筋萎縮からの回復過程では、酸素の消費量が増加する。そのため、一過性に活性酸素のさらなる増加が起こる。Kondo et al. (1993)は、筋萎縮からの回復期におけるビタミンEの投与が酸化ストレスを軽減し、筋萎縮からの回復を促進すると報告した。

ビタミンE以外のラジカル補足型抗酸化物の一つとして dehydro-epiandrosterone (DHEA) がある(Aragno et al. 1999)。DHEAは、副腎で作られ、他のホルモンの供給源となるステロイド系ホルモンである。DHEAの生理作用としては、抗動脈硬化作用、抗肥満作用、抗糖尿病作用などがある(後藤ら 1998)。

DHEAを筋萎縮からの回復過程に投与することにより、ビタミンEと同様、

その抗酸化作用によって酸化ストレスを軽減し、筋萎縮の回復を促進する可能性がある。

そこで、本研究では、後肢非荷重による筋萎縮状態からの回復過程において、DHEAの投与が萎縮筋の酸化ストレスを軽減し、筋萎縮からの回復を促進するか否かを明らかにすることを目的とする。

II. 方法

A. 実験動物

6週齢の Wistar 系雄性ラット(日本クレア)を用い、市販のラット用飼料と水道水を自由摂取させた。午前 8 時から午後 8 時までを明期、午後 8 時から午前 8 時までを暗期として、12 時間サイクルで飼育室の明暗を調節した。飼育室の温度は 25±2°Cとした。本研究は徳島大学動物実験委員会の承認を得た。

B. 実験手順

3週間の予備飼育の後、各群の平均体重が等しくなるように、ラットを C 群(n=10: コントロール)、H 群(n=10: 後肢非荷重と DHEA 非投与)、D 群(n=5: 後肢非荷重と DHEA 投与)の 3 群に分けた。

C 群の内 5 匹(C-a 群)は、後肢非荷重をすることなく 10 日間飼育した後、解剖した。残りの 5 匹(C-b 群)は、さらに 5 日間飼育した。この 5 日間は、毎日、1 日 1 回とうもろこし油のみを 1 μl/g で皮下注射した。

H 群は、10 日間の後肢非荷重の後、筋萎縮を確認するために 5 匹(H-a 群)を解剖した。残った 5 匹(H-b 群)は、後肢非荷重を解放し、さらに 5 日間飼育した。この筋萎縮からの回復期間である 5 日間は、毎日、1 日 1 回とうもろこし油のみ 1 μl/g を皮下注射した。

D 群は、10 日間の後肢非荷重の後、後肢非荷重を解放し、筋萎縮からの回復期間として、さらに 5 日間飼育した。この 5 日間は、毎日、1 日 1 回 DHEA を

投与した。DHEAは、とうもろこし油に5mg/200μlで溶解した状態で、DHEA 25mg/kg(とうもろこし油 1μl/g)を皮下注射した。

全てのラットにおいて毎日、摂餉量と摂水量を記録した。体重は、群分け前、群分け後5日目、10日目に測定し、10日目以降の5日間は毎日体重を測定した。尾部末端よりの採血を、非荷重開始前(群分け1日目)、非荷重終了直後(群分け10日目)、回復5日目(群分け15日目)に実施した。

C. 後肢非荷重

ラットの後肢非荷重の期間や筋萎縮からの回復期間は、Kondo et al. (1993)およびGoto et al. (2004)の報告を参考に決定した。骨格筋の萎縮は、非荷重5-10日間で十分に筋重量が減少するため、本研究では、後肢非荷重の期間を10日間とした。そして、筋萎縮からの回復期間は5日間とした。

ラットの後肢非荷重の方法としては、後肢の関節を固定せずに、尾部を吊り上げて後肢を非荷重の状態にするGoto et al. (2004)の方法を参考に行つた。後肢非荷重時のラットのケージは、直径30cm×高さ15cmの半透明の円形容器を2つ合わせたものを用いた。ケージの天井には360度回転できるノックカーナーを設置した。さらに、上になるケージに、空気穴として直径1cm程の穴を20個程開けた。

1. 後肢非荷重の方法

- ラットの尾部にテープを接着し易くするため、尾部の毛を除毛する。
- 非伸縮テープ(ZONAS 2.5cm巾, アシックス)を10-12cmの長さに切り、縦に6-7cmの切れ込みを入れる。
- 切れ込みに非荷重用にハリガネを変形させたバネを取り付ける。
- バネのついた非伸縮テープを、尾部の体側1/2の上側に貼り付ける。
- 非伸縮テープを貼り付けた下側に

は5cm程の長さに切った非伸縮テープ(ZONAS 2.5cm巾, アシックス)を、補強のために貼り付ける。

- 尾部に貼り付けた非伸縮テープの上部、中部、下部に、非伸縮テープ(ZONAS 1.3cm巾, アシックス)を一周ずつ巻きつけてテープを固定する。
- ラットが非伸縮テープを噛みちぎらないように、ビターアップル(ニチドウ)を、十分スプレーする。
- ノックカーナーに、尾部に貼り付けたバネを引っ掛けることによって後肢を非荷重の状態にする(図1、図2)。

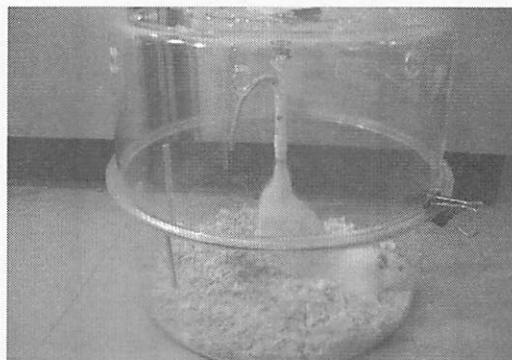


図1 ラットの後肢非荷重(全体)



図2 ラットの後肢非荷重(尾部)

2. 後肢非荷重の解放

後肢非荷重を10日間行った後、後肢非荷重を解放した。解放時には、ノックカーナーに引っ掛けたバネを外し、金具をテープから切り離した。再還流を防ぐために、尾部に巻きつけたテープは剥がさなかった。

D. DHEA の投与

DHEA は、酸化促進作用と抗酸化作用の両方の性質をもつ。そのため D 群への DHEA 投与は、抗酸化作用が発揮されるように、Bocuzzi et al. (1997) および Mastrocola et al. (2003) の報告を参考に、投与量と投与方法を決定した。

DHEA 溶解の手順は、まず 2ml 用チューブに、とうもろこし油 $200\mu\text{l}$ に対して、DHEA 5mg を入れた。次に、チューブを 80°C 程のお湯で湯煎し、超音波洗浄器を用いて攪拌した。DHEA が、とうもろこし油に完全に溶解するまで、湯煎と攪拌を繰り返し行った。DHEA 投与の準備は、毎日、投与直前に行った。

DHEA の投与には、1ml 用注射器と 22G の注射針を用いた。DHEA を皮下注射後、皮下組織への DHEA の吸収を促すために、注射部位周辺を十分にマッサージした。

E. 組織の処理および重量測定

解剖されるラットは、解剖前日 18:00 より絶食とし、水分のみを自由摂取させた。解剖当日、尾部からの採血終了後、ペントバルビタール麻酔を行った（体重 100g 当たり 5mg を腹腔内注射）。麻酔下において、腹大静脈から翼状針を用いて採血した。採取した血液は 30 分間室温で静置した。30 分後、遠心機(himac RT1543 ローター、日立)を用いて 5°C 、8000rpm で 10 分間遠心し血清を得、分析まで -47°C で保存した。

腹大静脈からの採血終了後、左の副腎、両側の副睾丸部脂肪を摘出し重量を測定した。

骨格筋については、ヒラメ筋、足底筋、外側腓腹筋、内側腓腹筋を摘出し、それぞれ湿重量を測定した。摘出された骨格筋は、液体窒素により凍結し、分析まで液体窒素中に保存した。

分析項目は、筋タンパク質、酸化ストレス度、抗酸化能力とした。また、後肢非荷重によって起こる筋萎縮は、

ヒラメ筋や腓腹筋で筋重量の有意な減少が認められている(Kondo et al. 1993; 二川ら 2002)。そのため、本研究におけるすべての分析に用いる被験筋は、ヒラメ筋と内側腓腹筋とした。

F. 筋タンパク質の測定

1. 筋タンパク質濃度の測定

a. 筋のホモジナイズ

筋のホモジナイズは、Ingalls et al. (2004) の方法により行なった。

- 1) 試料を入れる 1.5ml 用チューブの重量を、測定しておく（遠心用、上清保存用）。
- 2) 筋を切り、筋重量を測定し、ホモジナイザーに入れる。
- 3) 筋の 19 倍量の抽出溶液 (20mM MOPS (pH6.8), 5.8mM KOH, 250mM sucrose, 100mM KC1, 5mM EDTA) を加える。
- 4) ホモジナイザー用攪拌機を用いて、氷冷水槽中で、各筋をホモジナイズする。
- 5) ホモジネートの $50\mu\text{l}$ は、総タンパク質濃度測定用試料としてチューブにとり、タンパク質濃度測定まで冷凍保存する。
- 6) 残りのホモジネートは、前もって重量を測定しておいた遠心用チューブに入れ、ホモジネートが入った状態のチューブ重量を測定する。
- 7) 遠心用チューブ内に含まれる筋重量を算出しておく。
- 8) 遠心機(himac RT1543 ローター、日立)を用いて、チューブを 4°C 、5000g で 15 分間遠心し、上清を可溶性画分 (soluble protein fraction)、沈殿を筋原線維画分 (myofibrillar protein fraction) として、それぞれタンパク質測定用試料とする。
- 9) 遠心後、上清を上清用チューブに全て移してチューブ重量を測定し、これを可溶性タンパク質濃度測定用試料とする。
- 10) チューブに残った沈殿物には、

resuspension 溶液 (20mM MOPS (pH7.0), 7.8mM KOH, 150mM KCl) を加え、チューブ重量を測定する。加える溶液量は、チューブ内に含まれている筋重量 1g に対し、resuspension 溶液 7.143ml を加えるものとする。

11) 沈殿を resuspension 溶液に十分に溶解させ、これを筋原纖維タンパク質濃度測定用試料とする。

b. 筋タンパク質濃度の測定

筋タンパク質濃度の定量には、DC Protein Assay (BIO-RAD) を用いた。

G. 酸化ストレス度の測定

血漿における酸化ストレス度の指標には、活性酸素代謝物濃度を用い、骨格筋における酸化ストレス度の指標には、総ヒドロペルオキシドを用いた。

1. 血漿における活性酸素代謝物濃度の測定

血漿における活性酸素代謝物濃度の測定は、Alberti et al. (2000) の方法によった。

a. 試薬の調整

1) 0.1M 酢酸ナトリウムと 0.1M 酢酸を 3:2 の割合で混合し、0.1M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.8) を作成する。

2) DEPPD (97.06mg/ml) を希釗して、0.37M DEPPD 水溶液を作成する。

b. 測定手順

1) 分光計用セルに 0.1M 酢酸ナトリウム緩衝液を 1ml 入れる。

2) 血漿を 5μl 加える。

3) 分光光度計のセルホルダーを 37°C に設定し、分光計用セルを 5 分間静置する。

4) 5 分後、波長 505nm で、吸光度を測定する。

5) 0.37M DEPPD 水溶液を 10μl 加えて攪拌し、反応を開始する。

6) 反応開始後 1 分から 6 分まで、1 分毎に吸光度を測定する。

7) 反応開始後 6 分間の吸光度変化

から、活性酸素代謝物濃度を算出する。

2. 骨格筋における総ヒドロペルオキシドの測定

骨格筋における総ヒドロペルオキシドの測定は Hermes-Lima et al. (1995) の方法によった。

a. 筋のホモジナイズ

1) 筋を切り、筋重量を測定し、ホモジナイザーに入れる。

2) 筋の 9 倍容のメタノールを、ホモジナイザー加える。

3) ホモジナイザー用攪拌機を用いて、氷冷水槽中で、各筋をホモジナイズする。

4) ホモジネートを 1.5ml 用チューブに移し、5°C、1000g で 10 分間遠心する。

5) 遠心後、上清を新たなチューブに移し総ヒドロペルオキシド測定用試料とする。

b. 試薬の調整

1) 0.1M 酢酸ナトリウムと 0.1M 酢酸を 3:2 の割合で混合し、0.1M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.8) を作成する。

2) FeSO₄ を 0.1M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.8) に溶かし、1mM FeSO₄ を作成する。

3) 反応液 (0.25M FeSO₄, 25mM 硫酸, 0.1M Xylenol Orange) を作成する。

4) t-ブチルヒドロペルオキシド溶液を希釗して、0.25mM, 0.5mM, 1mM, 1.5mM, 2mM の標準液を作成する。

c. 測定手順

1) 1.5ml 用チューブに、反応液を 0.493ml 入れる。

2) さらに、標準液/試料(筋肉ホモジネート)を 7μl 加える。

3) 試剤混合のため、攪拌 (MicroIncubator M-36, TAITEC) しながら 2 時間置く。

4) 2 時間後、マイクロプレートに 200μl ずつ移す。

5) Microplate Reader (BIO-RAD Model

550)を用いて、波長 570nm で吸光度を測定する。

- 6) 検量線を作成し、作成した検量線を用いて試料の総ヒドロペルオキシドを算出する。

H. 抗酸化能力の測定

血漿および骨格筋における抗酸化能力の測定は、Re et al. (1999) の方法によった。

1. 血漿の抗酸化能力の測定

a. 試薬の調整

- 1) ABTS ラジカル溶液 (7mM ABTS, 2.45mM Potassium persulfate) を作成し、暗所、室温で 12-16 時間置く。
- 2) ラジカル溶液を、5mM PBS 緩衝液で希釈して、吸光度 0.70 ± 0.02 になるように調整する。分光光度計の波長は 734nm、セルホルダー温度は 30°C に設定する。
- 3) 6-ヒドロキシテトラメチルクロマニカルボン酸 (Trolox) を、エタノールで希釈して、1.5mM、0.75mM の標準液を作成する。

b. 血漿試料の準備

血漿は、吸光度がブランク値の 20-80% 減少するように、H₂O で適時希釈したものと試料として用いる。

c. 測定手順

- 1) 分光計用セルに、ABTS ラジカル溶液を 0.99ml 入れる。
- 2) 反応開始前に、分光光度計を用いて、吸光度を確認する。
- 3) 吸光度を確認した後、標準液/血漿試料を 10 μl 加えて攪拌し、反応を開始する。
- 4) 反応開始後 1 分から 6 分まで、1 分毎に吸光度を測定する。
- 5) 検量線を作成し、作成した検量線を用いて試料の抗酸化能力を算出する。

2. 骨格筋の抗酸化能力の測定

a. 筋のホモジナイズ

- 1) 筋を切り、筋重量を測定し、ホモ

ジナイザーに入れる。

- 2) 筋の 19 倍量の 0.1M リン酸塩緩衝液 (pH7.4) を、ホモジナイザー加える。
- 3) ホモジナイザー用攪拌機を用いて、氷冷水槽中で、各筋をホモジナイズする。
- 4) ホモジネートをチューブに移し、これを抗酸化能力測定用試料とする。

試薬の調整と測定手順は、血漿における抗酸化能力の測定と同様に行つた。

I. 統計

すべての測定項目のデータは、平均値土標準偏差で表した。統計処理には、Jandel 社の Sigma Stat を用いた。すべての検定において、有意水準は 5% とした。

III. 結果

A. 体重と摂餌量

各群の平均体重に有意差がない状態で実験を開始した。実験開始 10 日目において、後肢非荷重群は体重増加の程度が低い傾向がみられた。しかし、有意差はなかった。実験終了時における H-b 群の体重は C-b 群と比較して有意に低かった ($P<0.05$)。しかし、DHEA 投与の有無による有意差はなかった。

1 日の平均摂餌量は、後肢非荷重により有意に減少した ($P<0.05$)。また、非荷重解放後においても、摂取量は有意に減少した状態であった ($P<0.05$)。しかし、DHEA 投与の有無による有意差はなかった。

B. 組織重量と萎縮率

副腎重量および副睾丸部脂肪重量は、後肢非荷重による変化がみられなかった。実験終了時における副睾丸部脂肪重量 (H-b 群) は、C-b 群と比較して有意に少なかった ($P<0.05$)。しかし、DHEA 投与の有無による有意差はなかった。一方、副腎重量では、DHEA 投与

に関わらず、実験終了時においても変化はみられなかった。

図3に示したとおり、すべての筋において、筋重量は10日間の後肢非荷重により有意に減少した(すべて $P<0.001$)。さらに、非荷重解放後5日目の筋重量(H-b群)も、C-b群の値と比較して有意な低値を示した($P<0.05$)。また、DHEA投与の有無による有意差は認められなかった。一方、実験終了時のH-b群およびD群を、それぞれ非荷重終了時(H-a群)と比較すると、D群では、ヒラメ筋および内側腓腹筋が有意な回復を示し(それぞれ $P<0.01$, $P<0.05$)、H-b群では、ヒラメ筋、足底筋、外側腓腹筋が有意な回復を示した(それぞれ $P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.05$)。

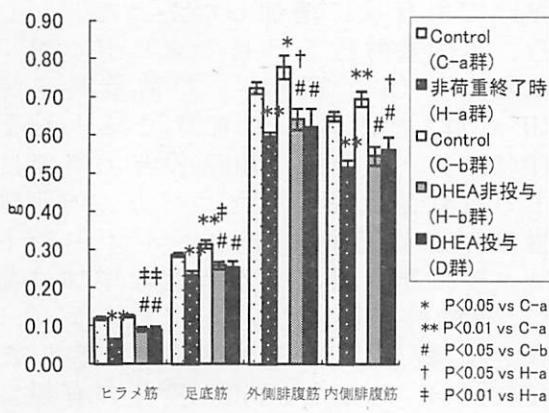


図3 筋重量

C. 組織と体重比

副腎および副睾丸部脂肪の体重当りの組織重量は、後肢非荷重による有意な変化がみられなかった。実験終了時においても有意な変化はみられなかった。

体重当りの筋重量は、摘出したすべての筋において、10日間の後肢非荷重により有意に減少した(すべて $P<0.01$)。さらに、すべての筋において、非荷重解放後5日目の体重当りの筋重量(H-b群)は、C-b群の値と比較して有意に低値であった($P<0.05$)。また、すべての筋においてDHEA投与

の有無による有意差は認められなかった。さらに、実験終了時のH-b群およびD群を、それぞれ非荷重終了時のH-a群と比較すると、H-b群では、ヒラメ筋および足底筋に有意な回復がみられ(それぞれ $P<0.01$, $P<0.05$)、D群では、ヒラメ筋のみに有意な回復がみられた($P<0.01$)。

D. 筋タンパク質

1. 筋タンパク質濃度

筋タンパク質濃度は、ヒラメ筋および内側腓腹筋では異なる結果を示した。ヒラメ筋における総タンパク質濃度は、後肢非荷重により有意に減少した($P<0.05$)。筋原纖維タンパク質濃度も、後肢非荷重により有意に減少した($P<0.01$)。また、後肢非荷重解放後5日目の筋原纖維タンパク質濃度(H-b群)は、C-b群の値と比較して有意に低値であった($P<0.05$)。しかし、DHEA投与の有無による有意差はなかった。可溶性タンパク質濃度は、後肢非荷重により有意に増加した($P<0.01$)。そして、回復5日間を経ることにより有意に減少した($P<0.05$)。しかし、DHEA投与の有無による有意差はなかった。

一方、内側腓腹筋の総タンパク質濃度は、後肢非荷重により有意に增加了($P<0.01$)。筋原纖維タンパク質濃度も、同様に後肢非荷重により有意に增加了($P<0.05$)。また、総タンパク質濃度は、回復5日間を経ることにより有意に減少した($P<0.05$)。しかし、DHEA投与の有無による有意差はなかった。可溶性タンパク質濃度においては、実験を通しての変化はみられなかった。

2. 筋タンパク質含量

骨格筋における筋タンパク質含量の結果を図4および図5に示す。筋タンパク質含量は、ヒラメ筋および内側腓腹筋において類似の結果を示した。総タンパク質含量、可溶性タンパク質含量は、後肢非荷重により有意に減少

し ($P<0.01$)、実験終了時における H-b 群も C-b 群の値と比較して有意に低値であった ($P<0.05$)。しかし、DHEA 投与の有無による有意差はなかった。筋原纖維タンパク質含量は、ヒラメ筋においては総タンパク質含量や可溶性タンパク質含量と同様の結果であつ

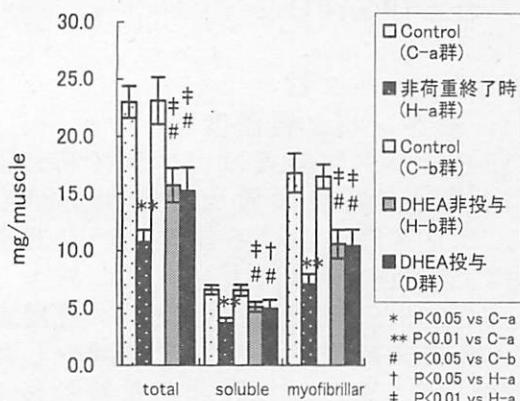


図 4 ヒラメ筋のタンパク質含量

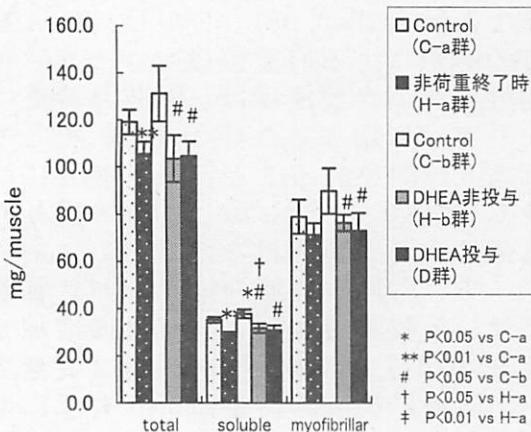


図 5 内側腓腹筋のタンパク質含量

た。一方、内側腓腹筋においては、後肢非荷重による有意な減少は認められなかつた。しかし、実験終了時における H-b 群は、C-b 群と比較して有意な低値を示した ($P<0.05$)。だが、DHEA 投与の有無による有意差はなかつた。さらに、後肢非荷重による総タンパク質含量の減少は、ヒラメ筋が内側腓腹筋と比較してより顕著な減少を示した。このようなタンパク質含量の減少程度の違いは、可溶性タンパク質、筋原纖維タンパク質においても同様で

あつた。

また、ヒラメ筋における総タンパク質含量、可溶性タンパク質含量、筋原纖維タンパク質含量のすべてにおいて、非荷重終了時の H-a 群と比較して、実験終了時の H-b 群は、回復 5 日間を経ることにより有意な回復を示した (それぞれ $P<0.001$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.01$)。しかし、そのすべてにおいて、DHEA 投与の有無による有意差はなかつた。

E. 骨格筋における酸化ストレス度と抗酸化能力

1. 骨格筋の総ヒドロペルオキシド濃度

骨格筋における総ヒドロペルオキシド濃度の結果を図 6 に示す。ヒラメ筋における総ヒドロペルオキシドは、後肢非荷重によつても、実験終了時においても有意に増加しなかつた。むしろ、非荷重解放 5 日目の総ヒドロペルオキシド (H-b 群) は、非荷重終了時 (H-a 群) と比較して有意に減少した ($P<0.05$)。しかし、DHEA 投与の有無による有意差はなかつた。一方、内側腓腹筋における総ヒドロペルオキシドは、後肢非荷重による有意な増加はなく、実験終了時において H-b 群は、C-b 群と比較して有意な増加を示した ($P<0.05$)。しかし、DHEA 投与の有無による有意差はなかつた。

2. 骨格筋の総ヒドロペルオキシド含量

ヒラメ筋における総ヒドロペルオキシド含量は、後肢非荷重により有意に減少し ($P<0.01$)、実験終了時においても、まだ有意に減少した状態であつた ($P<0.05$)。ただし、非荷重終了直後と比較すると増加傾向を示した。しかし、DHEA 投与により増加を抑制した傾向がみられた。

内側腓腹筋における総ヒドロペルオキシド含量もヒラメ筋と同様に、後肢非荷重により有意に減少し ($P<0.01$)、実験終了時においても、ま

だ有意に減少した状態であった ($P<0.05$)。ただし、非荷重終了時 (H-a群) と比較すると増加傾向を示し、DHEA投与により有意な増加を示した ($P<0.05$)。

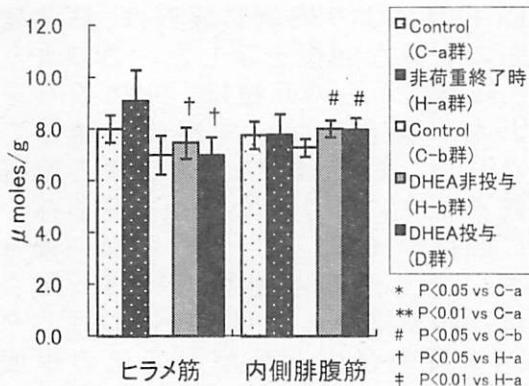


図 6 骨格筋の総ヒドロペルオキシド濃度

3. 骨格筋における抗酸化能力

骨格筋の抗酸化能力の結果を、図 7 に示す。ヒラメ筋および内側腓腹筋に

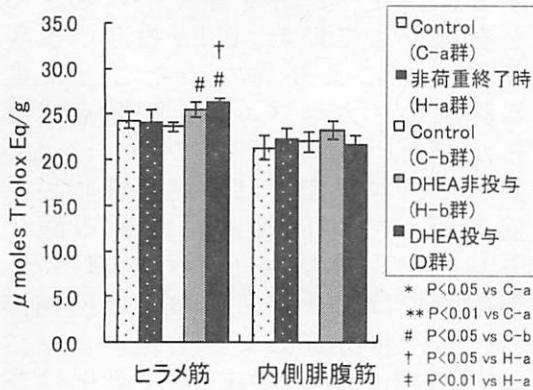


図 7 骨格筋における抗酸化能力

おける抗酸化能力は、ともに後肢非荷重による変化はなかった。さらに、内側腓腹筋における抗酸化能力は、実験終了時においても有意な変化はみられなかった。一方、ヒラメ筋では、実験終了時における H-b 群は、C-b 群と比較して有意な増加を示した ($P<0.05$)。しかし、DHEA投与の有無による有意差はなかった。ただし、DHEA投与群を非荷重終了時の H-a 群と比較した場合、DHEA投与群のみに抗酸化能

力の有意な上昇を認めた ($P<0.05$)。

F. 血漿における酸化ストレス度と抗酸化能力の経時的変化

1. 血漿活性酸素代謝物濃度

血漿活性酸素代謝物濃度の経時的变化の結果を図 8 に示す。血漿におけ

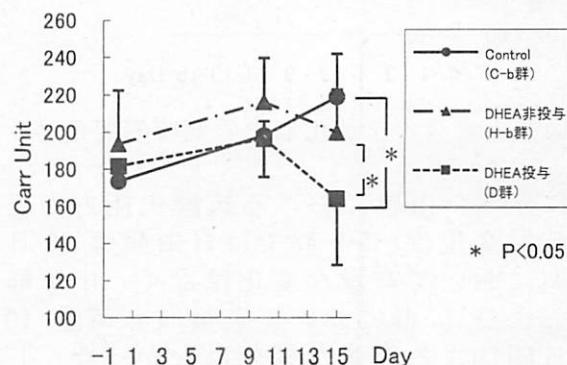


図 8 血漿活性酸素代謝物濃度の経時的変化

る活性酸素代謝物濃度の経時的变化は、C-b 群では、自由飼育 10 日間において増加傾向が見られた。さらに、自由飼育 5 日間を経ることにより、活性酸素代謝物濃度のさらなる増加傾向があった。しかし、C-b 群の経時的变化において有意差はなかった。H-b 群および D 群の経時的变化は後肢非荷重により増加傾向を示し、回復 5 日間を経ることにより減少傾向を示した。しかし、DHEA投与の有無による有意差は認められなかった。そこで、回復期間 5 日間における活性酸素代謝物濃度の変化量を算出すると、H-b 群では -16.67 Carr Unit の減少があり、D 群では -32.00 Carr Unit の減少があった。すなわち、D 群は H-b 群に比べて約 2 倍の変化量を示した。また、実験終了時における 3 群の活性酸素代謝物濃度の値を比較すると、D 群が、C-b 群および H-b 群よりも有意に低値であった ($P<0.05$)。

2. 血漿における抗酸化能力

血漿抗酸化能力の経時的变化を図 9

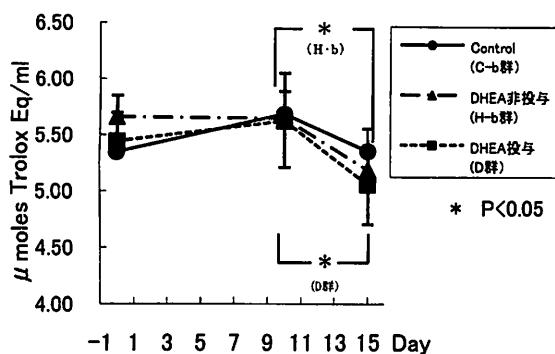


図9 血漿の抗酸化能力の経時的变化

に示す。血漿における抗酸化能力の経時的变化は、C-b 群では自由飼育 10 日間において有意な变化はなく、H-b 群および D 群においても後肢非荷重 10 日間による有意な变化はなかった。しかし、H-b 群および D 群は、後肢非荷重を解放することによって抗酸化能力が有意に減少した ($P<0.05$)。しかし、DHEA 投与の有無による有意差はなかった。

IV. 考察

本研究の目的は、後肢非荷重による筋萎縮状態からの回復過程において、抗酸化物である DHEA の投与が萎縮筋の酸化ストレスを軽減し、筋萎縮からの回復を促進するか否かを明らかにすることであった。

そこで、本研究では、まず 10 日間の後肢非荷重を行った。その結果、遅筋であるヒラメ筋および速筋である内側腓腹筋の両筋とも有意に萎縮したことを確認した。また、これまでの多くの研究報告と一致し、萎縮の程度は、遅筋であり、抗重力筋でもあるヒラメ筋の方が、速筋である内側腓腹筋と比べ顕著であった (Thomason & Booth 1990; 二川ら 2002; 大石 2005)。

次に、本研究では、後肢非荷重を解放し、解放後における筋萎縮からの回復に及ぼす DHEA 投与の有無の影響を比較検討した。その結果、ヒラメ筋では、DHEA 投与を行わない場合において

も筋萎縮からの有意な回復を示した。しかし、DHEA 投与はヒラメ筋における筋萎縮からの回復を促進しなかった。一方、内側腓腹筋では、DHEA 投与を行わない場合には筋萎縮からの有意な回復は認められなかつた。しかし、DHEA 投与により内側腓腹筋は、筋萎縮からの有意な回復を示した。このように、筋萎縮からの回復は、DHEA 投与を行わない場合において遅筋と速筋で異なつた。また、DHEA 投与による影響も筋タイプにより異なつた。筋萎縮からの回復が DHEA 投与を行わない場合においても遅筋と速筋で異なつたことは、筋萎縮からの回復時におけるタンパク質の合成と分解の程度および速さが、筋タイプにより異なつたためと考えられる。この点と関連して、Goldspink(1977)は、不動化による筋萎縮からの回復過程において、遅筋であるヒラメ筋は速筋に比べ、タンパク質の合成および分解の回復がより顕著に、且つ、より速やかに起きることを報告している。DHEA 投与の影響が筋タイプにより異なつたことに関する詳細なメカニズムは、現時点では明らかでない。

さらに、本研究では、筋萎縮時および筋萎縮からの回復時における酸化ストレスおよび抗酸化能力を調べた。筋萎縮時では、ヒラメ筋および内側腓腹筋とも、非荷重による酸化ストレスおよび抗酸化能力の有意な变化は認められなかつた。筋萎縮からの回復時には、ヒラメ筋では DHEA 投与を行わない場合、非荷重終了時と比較して抗酸化能力の有意な变化は認められなかつた。しかし、DHEA 投与により有意な增加を示した。また、ヒラメ筋における酸化ストレスは、DHEA 投与を行わない場合においても非荷重終了時と比較して有意な改善を示した。この酸化ストレスの改善は、DHEA 投与により助長される傾向がみられた。一方、内側腓腹筋では、DHEA 投与の有無に関わらず、抗酸化能力および酸化ストレス

の有意な変化は認められなかった。このように、回復時の酸化ストレスおよび抗酸化能力に及ぼす DHEA 投与の有無の影響は、ヒラメ筋と内側腓腹筋で異なるとの結果を得た。筋萎縮からの回復期における骨格筋の酸化・還元状態の変化に関しては、これまで十分には検討されていない。しかし、Lawler et al. (2006)によると、本研究の結果とは異なり、ヒラメ筋では、後肢非荷重時には抗酸化能力の低下およびそれに伴う酸化ストレスの上昇がみられる。また、このようなヒラメ筋における抗酸化能力の低下と酸化ストレスの上昇は、非荷重解放後に一段と強められる。そして、このような酸化・還元状態の変化は、筋萎縮からの回復を遅らせることが示唆されている (Kondo et al. 1993)。DHEA 非投与でのヒラメ筋の萎縮からの回復に関する研究の結果が従来の報告と異なる理由は明らかでない。

一方、上述の通り、本研究では筋萎縮からの回復過程において DHEA の抗酸化作用は、遅筋であるヒラメ筋においてのみ発現するとの所見を得た。このように、筋タイプにより DHEA の抗酸化作用の発現の様相が異なる原因は、ミトコンドリア含量や抗酸化酵素活性、そして遷移金属濃度が、遅筋において速筋よりもはるかに多いことに帰因すると考えられる(近藤と糸川 1994)。すなわち、Lawler et al. (2003) は、後肢非荷重による抗酸化能力の低下は、ミトコンドリアにおいてより顕著であることを示した。このことから、骨格筋における抗酸化能力の変動は、ミトコンドリア含量に大きく依存すると考えられる。したがって、ミトコンドリア含量の多い遅筋は、速筋よりも DHEA の抗酸化作用が、より大きく発現されると推察される。

V. まとめ

本研究は、後肢非荷重による筋萎縮状態からの回復過程において、

Dehydro-epiandrosterone (DHEA) の投与が萎縮筋の酸化ストレスを軽減し、筋萎縮からの回復を促進するか否かを明らかにすることを目的とした。

6 週齢の Wistar 系雄性ラットを、コントロール群 (n=10)、後肢非荷重後に非荷重を解放した DHEA 非投与群 (n=10)、後肢非荷重後に非荷重を解放し、回復期に DHEA を投与した DHEA 投与群 (n=5) の 3 群に分けた。非荷重期間は 10 日間、回復期間は 5 日間とした。DHEA の投与は皮下注射により 1 日 1 回 25mg/kg とした。

得られた結果は、次の通りであった。すなわち、ヒラメ筋では、DHEA は抗酸化能力を向上させたにも関わらず、筋萎縮からの回復を促進できなかった。一方、内側腓腹筋においては、DHEA は酸化・還元状態を変化させることなく、筋萎縮からの回復を促進した。したがって、本研究の条件下では、筋萎縮からの回復は、筋の酸化・還元状態には依存しないと結論される。内側腓腹筋に対する DHEA の筋萎縮からの回復促進効果は、筋の酸化・還元状態の変化以外の要因を介したものと推察される。

VI. 文献

Alberti A, Bolognini L, Macciantelli D, Caratelli M(2000), The radical cation of n,n-diethyl-para-phenylenediamine: A possible indicator of oxidative stress in biological samples. *Research on Chemical Intermediate*, Vol.26, No.3, pp.253-267

Aragno M, Tamagno E, Gatto V, Brignardello E, Parola S, Danni O, Bocuzzi G(1999), Dehydroepiandrosterone protects tissues of streptozotocin-treated rats against oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol.26, No.11-12, pp.1467-1474

荒尾 孝(1998), 運動は活性酸素の発生を高めるか? 大野秀樹ら(編)身体運動・栄養・健康の生命科学 Q&A 活性酸素と運動, 杏林書院, pp.28-29

- Boccuzzi G, Aragno M, Seccia M, Brignardello E, Tamagno E, Albano E, Danni O, Bellomo G(1997), Protective effect of dehydroepiandrosterone against copper-induced lipid peroxidation in the rat. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol.22, No.7, pp.1289-1294
- Goldspink DF(1977), The influence of activity on muscle size and protein turnover. *J Physiol*, Vol.264, No.1, pp.283-296
- 後藤公宣, 高柳涼一, 名和田新(1998), DHEA、DHEA-S, ホルモンと臨床, Vol.46, 春季増刊号, (有)医学の世界社, pp.292-302
- Goto K, Honda M, Kobayashi T, Uehara K, Kojima A, Akema T, Sugiura T, Yamada S, Ohira Y, and Yoshioka T(2004), Heat stress facilitates the recovery of atrophied soleus muscle in rat. *Japanese Journal of Physiology*, Vol.54, pp.285-293
- Hermes-Lima M, Willmore WG, Storey KB(1995), Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol.19, No.3, pp.271-280
- Ingalls CP, Wenke JC, Nofal T, Armstrong RB(2004), Adaptation to lengthening contraction-induced injury in mouse muscle. *J Appl Physiol*, Vol.97, No.3, pp.1067-1076
- Kondo H, Kodama J, Kishibe T, Itokawa Y(1993), Oxidative stress during recovery from muscle atrophy. *FEBS Lett*, Vol.326, No.1-3, pp.189-191
- 近藤久雄, 糸川嘉則(1994), 廃用性筋萎縮と酸化的ストレス, 臨床スポーツ医学, Vol.11, No.7, pp.785-790
- Lawler JM, Song W, Demaree SR(2003), Hindlimb unloading increases oxidative stress and disrupts antioxidant capacity in skeletal muscle. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol.35, No.1, pp.9-16
- Lawler JM, Song W, Kwak HB(2006), Differential response of heat shock proteins to hindlimb unloading and reloading in the soleus. *Muscle & Nerve*, Vol.33, No.2, pp.200-207
- Mastrocola R, Aragno M, Betteto S, Brignardello E, Catalano MG, Danni O, Boccuzzi G(2003), Pro-oxidant effect of dehydroepiandrosterone in rats is mediated by PPAR activation. *Life Sci*, Vol.73, No.3, pp.289-299
- 内藤裕二, 吉川敏一(2003), 酸化ストレス度の項目と評価, 治療, Vol.85, No.8, pp.185-188
- 二川健, 平坂勝也, 池本円, 加納美保子, 浅野間友紀, 岸恭一(2002), 無重力による筋萎縮とその食事による予防, 四国医誌, Vol.58, No.6, pp.289-295
- 大石康晴(2005), 不活動と筋萎縮のメカニズム, 体育の科学, Vol.55, No.8, pp.578-583
- Powers SK, Kavazis AN, DeRuisseau KC(2005), Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, Vol.288, No.2, R337-344
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C(1999), Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol.26, No.9-10, pp.1231-1237
- Sies H (1997), Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*, Vol.82, No.2, pp.291-295
- 須田玲子, 黒瀬等(2006), 活性酸素に対する細胞応答, 吉川敏一(編)別冊「医学のあゆみ」酸化ストレス Ver.2 フリー・ジカル医学生物学の最前線, 医歯薬出版, pp.38-42
- Thomason DB, Booth FW(1990), Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. *J Appl Physiol*, Vol.68, No.1, pp.1-12

(受付日2009年9月30日)

(受理日2009年10月22日)