

高脂肪食摂取がラット骨格筋の活性酸素種消去活性に与える影響

小 成 直 人¹, 塚 本 未 来², 東 郷 将 成³, 木 本 理 可⁴,
内 田 英 二⁵, 武 田 秀 勝⁶, 神 林 勲⁷

Effect of high-fat feeding on scavenging activity of reactive oxygen species in rat skeletal muscle

Naoto Konari¹, Miku Tsukamoto², Masanari Togo³, Rika Kimoto⁴, Eiji Uchida⁵,
Hidekatsu Takeda⁶, Isao Kambayashi⁷

Abstract

High-fat diets are reported to increase oxidative stress in a variety of tissues. This study was designed to determine the effect of high-fat feeding on scavenging activity of reactive oxygen species (ROS) with a spin trap agent (CYPMPPO) in electron spin resonance spectroscopy (ESR) in rat skeletal muscle. As targeted ROS, superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$) and alkoxyl radical ($\cdot RO$) were used for estimating scavenging activity. Rats, aged 4 weeks, were fed either a normal diet (ND, n = 6) or high-fat diet (HFD, n = 7) for 11 weeks. The gastrocnemius muscle was removed after overnight fast, and then tissue fragments taken from superficial and deep portions were homogenized separately for ESR. Blood samples were obtained from hearts for biochemical analysis. After feedings, body weight and abdominal circumference were significantly greater in HFD rats than in rats fed ND. However, there were no significant differences between HFD and ND groups in either scavenging activity. No significant differences were also found in total cholesterol, HDL, LDL, triglyceride, free fatty acid, glycated hemoglobin A1c and glycoalbumin in blood biochemical analysis between groups. These results suggested that HFD did not change the scavenging activity of $O_2^{\cdot -}$ and $\cdot RO$ in the skeletal muscle.

Key words : obesity, superoxide anion, alkoxyl radical, gastrocnemius muscle , electron spin resonance spectroscopy

- | | |
|--|--|
| 1. 札幌医科大学大学院医学研究科
〒060-8556 札幌市中央区南1条西17丁目 | 1. Graduated School of Medicine, Sapporo Medical University
Minami 1-jo Nishi 17-chome, Chuo-ku, Sapporo 060-8556 |
| 2. 東海大学国際文化学部
〒005-8601 札幌市南区南沢5条1丁目1番1号 | 2. School of International Culture Relations, Tokai University
5-1-1-1 Minaminosawa, Minami-ku, Sapporo 005-8601 |
| 3. 室蘭太平洋病院
〒050-0054 室蘭市白鳥台5丁目19番2号 | 3. Muroran Taiheiyo Hospital
19-2 Hakutyoudai 5-chome, Muroran 050-0054 |
| 4. 旭川高等工業専門学校
〒071-8142 旭川市春光台2条2丁目1番6号 | 4. Asahikawa National College of Technology
2-2-1-6 Shunko-dai, Asahikawa 071-8142 |
| 5. 大正大学人間学部
〒170-8470 東京都豊島区西巣鴨3丁目20番1号 | 5. Faculty of Human Sciences, Taisho University
3-20-1 Nishi-sugamo, Toshima-ku, Tokyo 170-8470 |
| 6. 北星学園大学社会福祉学部
〒004-8631 札幌市厚別区大谷地西2条3丁目1番 | 6. School of Social Welfare, Hokusei Gakuen University
2-3-1 Oyachi, Atsubetsu-ku, Sapporo 004-8631 |
| 7. 北海道教育大学札幌校
〒002-8502 札幌市北区あいの里5条3丁目1番 | 7. Hokkaido University of Education Sapporo
5-3-1 Ainosato, Kita-ku, Sapporo 002-8502 |
- 著者連絡先 小成 直人
n.konari@sapmed.ac.jp

I 緒 言

体内において、骨格筋は身体を動かすことや姿勢を保持することのほかに様々な役割を担っている。その一つとして骨格筋細胞内におけるグルコースの貯蔵が挙げられる。膵臓のランゲルハンス島β細胞から放出されるインスリンにより血液中のグルコースはGLUT4を介してグリコーゲンとして変換、貯蔵され、血糖を調節している。

近年、食文化の欧米化が進行し、脂肪含有量の多い食品の摂取が増加し、それに伴い肥満も増加している。高脂肪食は骨格筋における脂肪組織重量を増加させる。脂肪組織が肥大化すると脂肪分解の亢進、遊離脂肪酸の放出が増加し、骨格筋におけるインスリン抵抗性を招くと考えられている（春日，2004）。高脂肪食による肥満はメタボリックシンドローム（内臓脂肪症候群）の主因子であり、インスリン抵抗性は高血糖、高脂血症、高血圧に関与している。これらの要因が重複した場合には虚血性心疾患、脳卒中および糖尿病の発症リスクが増大する（山田，2006）。

肥満者では酸化ストレスマーカーの値が増加している（Furukawa et al., 2004）。実験動物を用いた研究においても、10週間の高脂肪食摂取によりラット血清における8-epi-PGF2（脂質過酸化マーカー）が増加し（Shen et al., 2010）、Loft et al.（1998）は高脂肪食摂取により尿中8-オクソデハイドロデオキシグアノシン（8-oxodG）の増加を報告している。15週間の高脂肪食摂取によるラット骨格筋ではチオバルビツール酸反応物（TBARS）やカルボニル化タンパク群（PC groups）の増加（Gómez-Pérez et al., 2008）、16週間の高脂肪食摂取におけるマウス骨格筋ではカルボニル化タンパク（タンパク質酸化マーカー）、UCP2、3（脂質過多状態におけるミトコンドリアROS産生マーカー）の増加（Bonnard et al., 2008）が報告されている。これらの酸化ストレスマーカーの増加は、活性酸素種（Reactive oxygen species；以下ROS）の生成量の増大を反映するものである。実際に、ラットを対象に14週間の高脂肪食を摂取させ、骨格筋における過酸化水素生成量の増加が報告されている（Gómez-Pérez et al., 2008）。さらに、ラットの肝臓（Demori et al., 2006）やマウスの骨格筋（Bonnard et al., 2008; Yokota et al., 2009）でも同様な報告がある。よって、高脂肪食摂取により骨格筋などの組織でROS生成量が増大して酸化ストレスが招来され、それが原因で細胞の機能障害が生じる可能性が示唆される。

一方、生体にはROSを消去する抗酸化活性が備わっている。高脂肪食摂取によってROS生成量が増大しても、抗酸化活性が増加すれば酸化ストレスは生じない。高脂肪食摂取による抗酸化活性についての研究もなされている。Sreekumar et al.（2001）は、ラットに高脂肪食を36週間摂取させたところ、骨格筋内の抗酸化酵素に

関連する遺伝子転写レベルが対照群と比較して減少したことを認めている。また、ラットの骨格筋（Gómez-Pérez et al., 2008）やウサギの肝臓（Slim et al., 1996）において、高脂肪食によって抗酸化酵素の活性が低下したことも報告されている。しかしながら、高脂肪食摂取によって骨格筋の有する総合的な抗酸化活性がどのような影響を受けるのかを、骨格筋が実際に消去したROSの定量的評価で検討を行った研究は見当たらない。

そこで本研究は、細胞障害性はそれほど高くはないものの、他のROSの前駆体となるスーパーオキシドアニオン（Superoxide anion；以下 O_2^- ）と強力な脂質ペルオキシラジカルを発生させるとともに、抗酸化消去活性を直接的に定量化することに用いられるアルコキシルラジカル（Alkoxyl radical；以下 $\cdot RO$ ）（Kohri et al., 2009）を対象に電子スピン共鳴分光法（Electron spin resonance spectroscopy；以下ESR）を用いて、高脂肪食摂取がラット骨格筋の抗酸化活性に与える影響を検討することを目的とした。

II 方 法

A. 実験動物

実験動物は、Wistar系雄性ラット（日本エスエルシー）13匹を用いた。飼育環境は、室温 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 5\%$ であり、12時間の明暗サイクルの動物飼育室で飼育した。飼育期間中、飼料および飲水の摂取は自由とし、週2回、同一時間帯に体重および飼料の摂取量を計測した。また、ラットは2-3匹を1つのケージで飼育され、自発的な運動はケージ内の移動のみであった。飼料摂取量については1ケージの計測において減少した飼料の量を1ケージ内で飼育されているラット数で割り、飼料摂取量として換算した。

B. 実験の概要

ラットは3週齢時に購入し、その後、1週間の予備飼育を行った。予備飼育後、体重が等しくなるように普通食（Normal Diet；以下ND）群6匹、高脂肪食（High-Fat Diet；以下HFD）群7匹に分け、それぞれ飼料を摂取させた。実験飼料は、ND群にMF固形（オリエンタル酵母工業株式会社）を、HFD群にはラード含有率60%の58Y1（PMI社）を使用した。各飼料の成分比率はTable 1に示した。HFD群の飼料は、ND群よりも脂質比率が高く、脂質成分の大半はリン脂質の構成成分であるリノール酸やリノレン酸、アラキドン酸などの多価不飽和脂肪酸であった。両群のラットは実験飼料を11週間摂取した後、15週齢時に解剖された。摘出した腓腹筋は分析まで -80°C で凍結保存した。

C. 採血と血液生化学検査

ラットは15週齢時において、解剖前日の午後8時から

Table 1. Composition of experimental diets.

Group	ND	HFD
Food	MF	58Y1 (Lard 60%)
Protein (g)	23.6	23.6
Fat (g)	5.3	34.9
Carbohydrate (g)	54.4	25.9
Fiber (g)	2.9	6.5
Energy from protein (%)	26.2	18.3
Energy from fat (%)	13.3	60.9
Energy from carbohydrate (%)	60.4	20.1
KJ/100g	1507	2160

12時間以上絶食した後、解剖された。ジエチルエーテルで麻酔後、体重および腹囲周囲径の計測を行った。ラットの四肢を固定後、開胸し、採血を心臓から行った。血液は、分離剤入りの採血管とフッ化ナトリウム入りの採血管にそれぞれ必要量が分取され、分析は岸本医科学研究所に依頼した。依頼した血液生化学検査項目は、脂質項目として総コレステロール (Total cholesterol; 以下T-ch), HDLコレステロール (HDL cholesterol; 以下HDL), LDLコレステロール (LDL cholesterol; 以下LDL), 中性脂肪 (Triglyceride; 以下TG) および遊離脂肪酸 (Free Fatty acid; 以下FFA) を、糖質項目として糖化ヘモグロビン (Glycated Hemoglobin Alc; 以下HbAlc), 糖化アルブミン (Glycoalbumin; 以下GA) であった。また、動脈硬化指数 (Arteriosclerotic index; 以下AI) を、 $[T\text{-ch} - \text{HDL}] / \text{HDL}$ (Murgu et al., 1980) の計算式で算出した。

D. 腓腹筋の摘出

採血後、固定されたラットの両後肢から腓腹筋を摘出した。摘出された腓腹筋は血液を拭った後、分析までの間、 -80°C で凍結保存された。

E. ESR用試料の作成とタンパク質濃度の測定

ラット腓腹筋の表層と深層は、筋線維組成が異なることが知られており、特に外側頭の深層側には遅筋線維が多く分布している (春日ほか, 2010)。この違いを考慮し、深層側は外側頭の視覚的に最も赤色部位から筋組織を採取し、表層側は概ね深層摘出部位の皮膚側から筋組織を採取した。ESR用試料の作成は、Masuda et al. (2003) の方法に若干の修正を加え、表層と深層に分けて行っ

た。試料である筋組織は、ホモジネート溶液 (1.15% KCl) にて1:10の割合で希釈され、デジタルホモジナイザー (井内盛栄堂社製) を使用し、1000 rpmで6分間均質化された。作成された試料のタンパク質濃度の測定は、SMARTSPEC™ 3000 (BIO-RAD社製) を用いて、Bradford法で行った。濃度の測定は、各試料につき2回実施し、その平均値を分析に用いた。

F. ROS消去活性の測定

ROS消去活性の分析は、ESR (JES-REIX, 日本電子株式会社製) を用いたスピントラップ法にて実施した。前処理した混合液に光ファイバー式可視光照射装置 (RUVF-203SR, ラジカルリサーチ社製) にて可視光を照射することにより、 $\text{O}_2^{\cdot -}$ および $\cdot\text{RO}$ を発生させ信号を検出し (Control signal), 一方で同様の系に測定試料を添加した際の $\text{O}_2^{\cdot -}$ および $\cdot\text{RO}$ の信号を検出した (Sample signal)。なお、スピントラップ剤には、CYPMPO [2-(5,5-Dimethyl-2-oxo-2 λ 5-[1,3,2]dioxaphosphinan-2-yl)-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrole1-oxide] を用いた。

1) $\text{O}_2^{\cdot -}$ 消去活性

$\text{O}_2^{\cdot -}$ 消去活性の測定は、既報 (日下部ほか, 2009) に若干の修正を加えて行った。Control signalとしてリボフラビン (20 μM) を5 μl , EDTA (50 mM) を10 μl , CYPMPO (100 mM) を10 μl , リン酸緩衝液 (Phosphate buffered; PB) (100 mM) を75 μl 加え, Sample signalとしてリボフラビン (20 μM) を5 μl , EDTA (50 mM) を10 μl , CYPMPO (100 mM) を10 μl , PB (100 mM) を45 μl , 蒸留水で50:1の割合で希釈された試料10–20 μl を加え, それぞれをよく混和した後, シリンジ付きディスポ偏平セルで100 μl の混合液を吸い上げ, それをESRにセットし, 信号を検出した。なお, ESR測定条件は, Sweep width = 7.5×1 mT, Sweep time = 2 min, Gain = 4.0×100 , Modulation width = 1.0×0.1 mT, Time constant = 10 sec, Center field = 336.2 mT, Power = 6.0 mW, Frequency = 9.20 GHzとした。

2) $\cdot\text{RO}$ 消去活性

$\cdot\text{RO}$ 消去活性の測定には、既報 (Kohri et al., 2009) に若干の修正を加えて行った。Control signalとしてAAPH [2,2'-azobis (amidinopropane) dihydrochloride] (10 mM) を10 μl , CYPMPO (100 mM) を10 μl , PB (100 mM) を80 μl 加え, Sample signalとしてAAPH (10 mM) を10 μl , CYPMPO (100 mM) を10 μl , PB (100 mM) を50 μl , 蒸留水で10:1の割合で希釈された試料30–50 μl を加え, それぞれをよく混和した後, シリンジ付きディスポ偏平セルで100 μl の混合液を吸い上げ, それをESRにセットした。なお, ESR測定条件は, Sweep width = 7.5×1 mT, Sweep time = 2 min, Gain = 6.3×100 , Modulation width = 1.25×0.1 mT, Time constant = 10 sec, Center field = 336.2 mT, Power = 6.0 mW,

Frequency = 9.20 GHzとした。

3) ROS消去活性の評価

$O_2^{\cdot -}$ および $\cdot RO$ 消去活性の評価には、スピントラップ剤CYPMPO (CYP)と測定試料(AOx)が、単位濃度あたりで反応した $O_2^{\cdot -}$ および $\cdot RO$ 濃度の比率を以下の式で算出し〔式参照；(I_0 : Control signalで、全ての $O_2^{\cdot -}$ または $\cdot RO$ 発生量に対応, I : 筋ホモジネート試料存在下でのESR信号, $I_0 - I$: 筋ホモジネート試料が消去した $O_2^{\cdot -}$ または $\cdot RO$ 量)〕, トロロックス (Trolox) 当量に換算した値を用いた。

$$\text{ROS消去活性} = [(I_0 - I) / I] / [(AOx) / (CYP)]$$

なお、本研究ではESR測定において、適切なシグナル強度を得るために試料によって反応溶液 (100 μ l) に加える量を $O_2^{\cdot -}$ 消去活性の測定では10 - 20 μ l, $\cdot RO$ 消去活性の測定では30 - 50 μ lの範囲で変えた。このため、反応溶液中のタンパク質量が試料によって異なるため、いずれのROS消去活性の値とも、単位タンパク質濃度当たり (μ g) に換算した。

G. 統計処理

測定結果は、全て平均値 $\pm$ 標準誤差 (Mean $\pm$ SE) で表した。2群の平均値の分析の場合は対応のないt検定を用い、3群以上の分析には統計ソフト (JSTAT) を用いて、一元配置の分散分析を行った。なお、いずれの場合も危険率は、全て5 %未満を有意と判断した。

Ⅲ 結 果

A. 身体組成と試料摂取量

3週齢から15週齢時のラットの体重推移をFig. 1に示した。両群の体重には、8週齢から有意差 ($p < 0.05$) が認められた。解剖時の体重は、ND群で339.5 $\pm$ 5.3 g, HFD群で404.0 $\pm$ 14.1 gであった。また、解剖時の腹囲は、ND群で18.8 $\pm$ 0.8 cm, HFD群で21.4 $\pm$ 0.4 cmであり、HFD群がND群と比較して有意 ($p < 0.01$) に高かった。

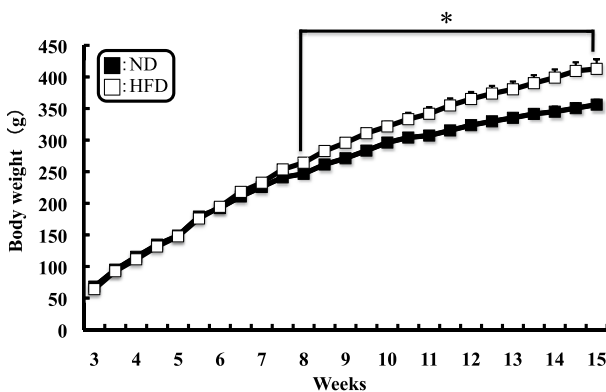


Fig. 1 Change of body weight in ND and HFD groups.
* ($p < 0.05$) denotes significant difference between groups.

Table 2. Blood biochemical profiles of ND and HFD groups.

	ND	HFD
Total cholesterol (mg/dl)	55.8 $\pm$ 5.9	64.4 $\pm$ 4.5
HDL cholesterol (mg/dl)	25.8 $\pm$ 1.4	23.9 $\pm$ 0.7
LDL cholesterol (mg/dl)	7.0 $\pm$ 2.9	15.6 $\pm$ 5.4
Triglyceride (mg/dl)	104.0 $\pm$ 12.6	81.0 $\pm$ 9.4
Free fatty acid (mEq/l)	1.1 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1
Glycated hemoglobin A1c (%)	3.7 $\pm$ 0.1	3.7 $\pm$ 0.1
Glycoalbumin (%)	3.8 $\pm$ 0.2	4.1 $\pm$ 0.3
Arteriosclerotic index	1.1 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.2*

* ($p < 0.05$) denotes significant difference between groups. Mean $\pm$ SE

15週齢時の飼料摂取量は、HFD群は14.0 g, ND群は16.4 gであった。一方、摂取エネルギー量はHFD群が302.4 KJであったのに対して、ND群は247.1 KJであり、HFD群はND群の1.2倍の摂取エネルギー量を示した。

B. 血液生化学検査

血液生化学検査の結果をTable 2に示した。T-ch, HDL, LDL, TG, FFA, HbA1cおよびGAにおいて群間に差はなかった。しかしながら、AIにおいて、HFD群がND群と比較して有意 ($p < 0.05$) に高値を示した。

C. 筋のタンパク質濃度とROS消去活性

ESR用試料における筋タンパク質濃度は、ND群の表層で60.08 $\pm$ 7.58 μ g/ml, 深層で67.33 $\pm$ 5.82 μ g/ml, HFD群の表層で62.27 $\pm$ 6.45 μ g/ml, 深層で64.61 $\pm$ 8.22 μ g/mlであった。ROS消去活性の比較をFig. 2に示した。 $O_2^{\cdot -}$ 消去活性 (mmol TE/L) は、ND群とHFD群の表層で66.11 $\pm$ 8.02と55.19 $\pm$ 10.47, 深層で60.77 $\pm$ 11.76と70.90 $\pm$ 13.88であった。また、 $\cdot RO$ 消去活性 (μ mol TE/L) は、ND群とHFD群の表層で77.37 $\pm$ 22.49と89.98 $\pm$ 8.46, 深層で95.26 $\pm$ 45.41と80.37 $\pm$ 9.57であった。いずれの消去活性においても、群間と部位間に有意差は認められなかった。

Ⅳ 考 察

本研究では、4週齢のラットに不飽和脂肪酸の豊富な高脂肪食を11週間摂取させた。その結果、HFD群はND群と比較して体重 (Fig. 1) や腹囲が有意 ($p < 0.05$) に増加した。一方、血液性状ではAIにおいてHFD群が高かったが、他の項目には差はなかった。飼料の摂取でラットに肥満を誘発させた先行研究で用いられている高脂肪食摂取期間は、4週間 (東田ほか, 2008), 6週間 (Chansemaume et al., 2006), 14週間 (Gómez-Pérez et al., 2008), 16-20週間 (Loft et al., 1998), 36週間 (Sreekumar

et al., 2001) および51週間 (青木・黒木, 2007) など様々である。これらの研究では、高脂肪食群で体重や体脂肪率の増加および血液性状に変化が認められている。本研究で用いた11週間という期間は、先行研究と比較してほぼ中位に位置することから、摂取期間は妥当であったと考えられる。また、高脂肪食誘発肥満における先行研究の実験飼料は、38.8 % fat (Shen et al., 2010), 46 % fat (Greathouse et al., 2005), 50 % fat (Lionetti et al., 2007), 60 % fat (Sreekumar et al., 2001), 64 % lipid (Gómez-Pérez et al., 2008) などがある。これらの先行研究と比較して、ラード含有率60 %の実験飼料もまた妥当であったと考えられるため本研究のモデルは実験モデルとして適切であるといえる。しかしながら、本実験において血液性状にAI以外では差が認められなかった。その原因については明らかではないが、実験飼料の摂取開始が4週齢と他の研究よりも比較的早く、摂取期間がラットの成長期に相当していたことが影響していると推察される。

2種類のROS消去活性の比較をしたところ (Fig. 2), 群間において、表層と深層のどちらにも有意差は認められなかった。Gómez-Pérez et al. (2008) は15月齢のWister系雌雄ラットを対象に14週間の高脂肪食を摂取させ、腓腹筋ミトコンドリアにおける過酸化水素生成量の増加を報告している。本研究と異なる種ではあるが同様なモデルとしてBonnard et al. (2008) は5週齢の雄のC57BL/6マウスを対象に16週間の高脂肪、糖食を摂取させ、腓腹筋における過酸化水素生成量の増加を報告して

いる。Yokota et al. (2009) もマウスの骨格筋組織において、同様の報告を行っている。

本研究と先行研究の結果を考え合わせると、高脂肪食摂取によって骨格筋内のROS生成量は増加すると考えられるが、骨格筋自体が有する抗酸化活性は変化しないことから、骨格筋内の酸化ストレスが増大すると推察される。先行研究 (Sreekumar et al., 2001) では、ラットに高脂肪食 (脂質エネルギー比率60 %) を摂取させたところ、骨格筋において、 $O_2^{\cdot -}$ を特異的に消去する銅-亜鉛およびマンガンスーパーオキシドジスムターゼの遺伝子転写レベルが対照群と比較して減少したことを認めている。また、14週間の高脂肪食 (脂質エネルギー比率64 %) 摂取で、マンガンスーパーオキシドジスムターゼ活性が有意に低下したことも報告されている (Gómez-Pérez et al., 2008)。これらの結果に従えば、本研究の $O_2^{\cdot -}$ 消去活性はHFD群がND群よりも低値を示すことになる。しかしながら、そのような結果にはならなかった。本研究ではその原因を明らかにすることはできないが、高脂肪食の摂取期間、対象としたラットの系統や高脂肪食摂取の開始週齢等の違いが考えられる。

ROの消去に関与する特異的な抗酸化酵素は存在しない。 $^{\cdot}RO$ はヒドロキシラジカルに次いで反応性が高く、非常に強力なROSである (近藤, 1997)。脂肪酸やリン脂質で生じたヒドロペルオキシドは、生体内において、金属イオンと反応してROを生成させる (二木ほか, 1995)。ヒドロペルオキシドは、グルタチオンペルオキシダーゼやグルタチオン-S-トランスフェラーゼという抗酸化酵素によって消去できることから、これらの酵素の活性が高ければ、 $^{\cdot}RO$ の生成を抑制することが可能である。しかしながら、Sreekumar et al. (2001) は高脂肪食の摂取によって、グルタチオンペルオキシダーゼとグルタチオン-S-トランスフェラーゼの遺伝子転写レベルは対照群と比較して減少もしくは変化しないことを報告している。本研究と異なる種ではあるが同様なモデルであるBonnard et al. (2008) の研究では、14週間の高脂肪食摂取はグルタチオンペルオキシダーゼの遺伝子転写レベルに影響を与えなかったことを報告している。加えて、Gómez-Pérez et al. (2008) は高脂肪食摂取でマンガンスーパーオキシドジスムターゼ活性が有意に低下したことを報告しているが、グルタチオンペルオキシダーゼとグルタチオンリダクターゼの活性には高脂肪食摂取の影響はなかったことを認めている。本研究では、HFD群の $^{\cdot}RO$ 消去活性はND群と差はなかった。以上のことから、高脂肪食の摂取によって、骨格筋は $^{\cdot}RO$ などの脂質ラジカルによって酸化ストレスが増大する可能性が考えられる。

本研究では異なる筋線維タイプでのROS消去活性をHFD群とND群のそれぞれで比較したが (Fig. 2), どちらの群にも有意差はみられなかった。このことは、ROS消去活性には筋線維タイプは影響しないことを意

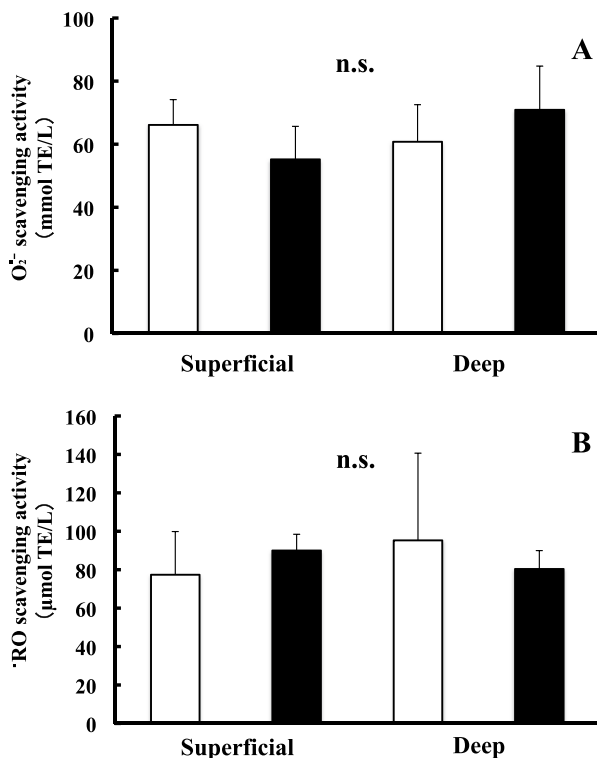


Fig. 2 $O_2^{\cdot -}$ (A) and $^{\cdot}RO$ (B) scavenging activity in ND (□) and HFD (■) groups. n.s. : no significance

味する。Masuda et al. (2003) は、通常食摂取ラットを対象に心筋と4種類の骨格筋の総合的な抗酸化活性 (SOD 活性換算) を ESR によるスピントラップ法 [5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO)] で評価し、腓腹筋の表層と深層で差がないことを報告しており、この報告は本研究の結果と一致する。

本研究では、11週間の高脂肪食摂取によってラット腓腹筋のROS消去活性は変化しないという結果が得られた。高脂肪食摂取によって、多くの先行研究でROS生成は増加するとされ、酸化ストレスマーカーの増加も認められている。本研究の結果は、これらの結果を支持するものである。しかしながら、本研究では酸化ストレスマーカーの測定を行っておらず、先行研究 (Chanseume et al., 2006) には高脂肪食摂取によって骨格筋ミトコンドリアのROS生成量の低下を認めている報告もあり、今後より詳細な検討を行っていく必要があると思われる。

V 総括

本研究は、11週間にわたり高脂肪食を摂取したラット (HFD群) と普通食を摂取したラット (ND群) を対象とし、骨格筋のROS消去活性をESRによるスピントラップ法で検討した。実験飼料はいずれの群も4週齢から開始し、15週齢まで11週間摂取させた。15週齢で麻酔下において心臓採血を行い、腓腹筋を摘出後、それぞれ表層と深層から筋組織を採取し、均質化した。消去活性の評価の対象としたROSは、 $O_2^{\cdot -}$ と $^{\cdot}RO$ であった。結果は以下の通りである。

1. 15週齢時において、HFD群がND群よりも体重と腹囲が有意に増加したが、血液性状ではAI以外には差は認められなかった。
2. $O_2^{\cdot -}$ 消去活性および $^{\cdot}RO$ 消去活性は両群間に差はみられず、表層と深層にも差はなかった。

以上のことから、高脂肪食摂取によって骨格筋のROS消去活性は変化せず、先行研究で報告されている高脂肪食摂取における骨格筋での酸化ストレスの増加を支持することができると考えられる。

参考文献

青木貴子・黒木由季子 (2007) 長期の高脂肪食と運動とが体脂肪に及ぼす影響。岐阜市立女子短期大学研究紀要, 56 : 31-34.

Bonnard, C., Durand, A., Peyrol, S., Chanseume, E., Chauvin, M.A., Morio, B., Vidal, H., and Rieusset, J. (2008) Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. J. Clin. Invest., 118 : 789-800.

Chanseume, E., Brugere, C.M., Patrac, V., Bielicki, G., Rousset, P., Couturier, K., Salles, J., Renou, J.P., Boirie, Y., and Morio, B. (2006) Diets high in sugar, fat, and energy induce muscle type-specific adaptations in mitochondrial functions in rats. J. Nutr., 136 : 2194-2200.

Demori, I., Voci, A., Fugassa, E., and Burland, B. (2006) Combined effects of high-fat diet and ethanol induce oxidative stress in rat liver. Alcohol, 40:185-191.

二木鋭雄・島崎弘幸・美濃真編 (1995) 抗酸化物質－フリーラジカルと生体防御－ (初版2刷). 学会出版センター：東京, pp. 3-15.

Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., and Shimomura, I. (2004) Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. J.Clin.Invest., 114:1752-1761.

東田和彦・三上恵里・園生智広・樋口満・寺田新 (2008) 異なる脂肪酸組成の高脂肪食摂取がラット骨格筋のミトコンドリア酵素活性およびPGC-1 α 蛋白含量に及ぼす影響。日本運動生理学雑誌, 15 : 45-51.

Gómez-Pérez, Y., Amengual-Cladera, E., Català-Niell, A., Thomàs-Moyà, E., Gianotti, M., Proenza, A.M., and Lladó, I. (2008) Gender dimorphism in high-fat-diet-induced insulin resistance in skeletal muscle of aged rats. Cell.Physiol.Biochem., 22:539-548.

春日規克・石道峰典・鈴木英樹・幸篤武 (2010) タイプ移行した筋線維の特性。愛知教育大学研究報告, 59 : 35-41.

春日雅人編 (2004) インスリン抵抗性 (第1版第2刷). 文光堂：東京, pp.42

日下部未来・神林勲・臼井夕貴・高橋寿美子・木本理可・武田秀勝 (2009) 高強度間欠的運動が血清総抗酸化能に与える影響。北海道体育学研究, 44 : 1-7.

Greathouse, K.L., Samuels, M., DiMarco, N.M., and Criswell, D.S. (2005) Effects of increased dietary fat exercise on skeletal muscle lipid peroxidation and antioxidant capacity in male rats. Eur.J.Nutr., 44:429-435.

Kohri, S., Fujii, H., Oowada, S., Endoh, N., Sueishi, Y., Kusakabe, M., Shimmei, M., and Kotake, Y. (2009) An oxygen radical absorbance capacity-like assay that directly quantifies the antioxidant's scavenging capacity against AAPH-derived free radicals. Anal. Biochem., 386:167-171.

近藤元治 (1997) フリーラジカルって何だ? (第1版第4刷). 日本医学館：東京, pp. 57-70.

Lionetti, L., Molica, M.P., Crescenzo, R., Andrea, E.

- D', Ferrano, M., Bianco, F., Liverini, G., and Iossa, S. (2007) Skeletal muscle subsarcolemmal mitochondrial dysfunction in high-fat fed rats exhibiting impaired glucose homeostasis. *Int. J. Obes.*, 31:1596-1604.
- Loft, S., Thorling, E.B., and Poulsen, H.E. (1998) High fat diet induced oxidative DNA damage estimated by 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine excretion in rats. *Free Rad.Res.*, 29:595-600.
- Masuda, K., Tanabe, K., Kuno, S., Hirayama, A., and Nagase, S. (2003) Antioxidant capacity in rat skeletal muscle tissues determined by electron spin resonance. *Comp. Biochem. Physiol. (Part B)* 134 : 215-220.
- Murgo, J.P., Westerhof, N., Giolma, J.P., and Altobelli, M.S. (1980) Aortic input impedance in normal man : relationship to pressure wave forms. *Circulation*, 62 : 105-116 .
- Sreekumar, R., Unnikrishnan, J., Fu, A., Nygren, J., Short, K.R., Schimke, J., Barazzoni, R., and Sreekumaran Nair, K. (2002) Impact of high-fat diet and antioxidant supplement on mitochondrial functions and gene transcripts in rat muscle. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.*, 282:E1055-E1061.
- Shen, X-H., Tang, Q-Y., Huang, J., and Cai, W. (2010) Vitamin E regulates adipocyte expression in a rat model of dietary-induced obesity. *Exp. Biol. Med.*, 235:47-51.
- Slim, R.M., Toborek, M., Watkins, B.A., Boissonneault, G.A., and Hennig, B. (1996) Susceptibility to hepatic oxidative stress in rabbits fed different animal and plant fats. *J.Am.Coll.Nutr.*, 15:289-294.
- 山田信博 (2006) メタボリックシンドロームの概念と臨床診断基準. *脈管学*, 46 : 417-422.
- Yokota, T., Kinugawa, S., Hirabayashi, K., Matsushima, S., Inoue, N., Ohta, Y., Hamaguchi, S., M, A.Sobirin., Ono, T., Suga, T., Kuroda, S., Tanaka, S., Terasaki, F., Okita, K., and Tsutsui, H. (2009) Oxidative stress in skeletal muscle impairs mitochondrial respiration and limits exercise capacity in type 2 diabetic mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 297 : H1069-H1077.

〔平成24年4月5日 受付〕
〔平成24年7月10日 受理〕