Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Chronic ethanol feeding increases 7-hydroperoxycholesterol and oxysterols in rat skeletal muscle

藤田，哲男

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2003-03-31
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲2684
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002684

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

【 78 】

氏 名 ・(本 籍)　　藤田 哲男　　(兵庫県)

博士の専攻分野の名称　博士（医学）

学 位 記 番 号　　博い第1473号

学位授与の 要 件　　学位規則第４条第１項該当

学位授与の 日 付　　平成１５年３月３１日

【 学位論文題目 】

CHRONIC ETHANOL FEEDING INCREASES 7-HYDROPEROXYCHOLESTEROL AND OYXSTEROLS IN RAT SKELETAL MUSCLE

(慢性アルコール投与ラットの骨格筋におけるコレステロール過酸化の亢進)

審 査 委 員

主 査　教 授　上野 易弘

教 授　横崎 宏

教 授　久野 高義

1．　はじめに

慢性アルコール摂取に伴う骨格筋障害であるアルコール性 myopathy は、組織学的に Type II fiber (白筋線維、嫌気的。足底筋 plantar muscle で優位)の選択的筋萎縮を特徴としており、骨格筋のうち Type I fiber (赤筋線維、好気的。ヒラメ筋 soleus muscle で優位)は萎縮に対して抵抗性を示す。アルコール性 myopathy の発症機序は未だ明確ではないが、フリーラジカルに起因する細胞膜障害がその一要因となっている可能性が考えられる。

我々は以前に、アルコール急性投与後のラット骨格筋中のコレステロール過酸化物（Ch-OOH、7α-OOH 及び7β-OOH）を調べ、骨格筋で過酸化が亢進していることを示した。今回は、7α-OOH と7β-OOH に加えて、コレステロール酸化物である oxysterol（7α-OH、7β-OH、7-keto）を指標とし、アルコール慢性投与後の骨格筋膜脂質の過酸化について調べた。

2．　方法

試薬：同定用標品である 5α-hydroperoxycholest-6-en-3β-ol（5α-OOH）、7α-hydroperoxycholest-5-en-3β-ol（7α-OOH）、7β-hydroperoxycholest-5-en-3β-ol（7β-OOH）および内部標準の 5α-hydroperoxy-β-sitosterol（IS）はすべて我々が合成した。cholest-5-ene-3β、7α-diol（7α-OH）、cholest-5-ene-3β、7β-diol（7β-OH）、3β-hydroxycholest-5-en-7-one（7-keto）および oxysterol 定量用内部標準物質のβ-sitosterol は Steraloids 製、コレステロールは Sigma 製、ルミノール、チトクロム C（ウマ心筋製）および BHT（butylhydroxytoluene）は和光純薬製を用いた。

対象及び方法：体重 100 g の Wister 系雄性ラットを用いた。Lieber らの方法により、総カロリーの 35%に相当するエタノールを含む液体飼料又はその等カロリーを炭水化物で置換した対照飼料で 6 週間 pair feeding を行った。断頭後、骨格筋（ヒラメ筋及び足底筋）を採取した。骨格筋組織（100～150 mg）から Folch 法により粗脂質を抽出し、Sep-Pak（-NH_2）によりコレステロール画分を精製した。化学発光検出器付高速液体クロマトグラフ（HPLC-CL）を用いて Ch-OOH を、紫外吸収高速液体クロマトグラフ（HPLC-UV）を用いて oxysterol を測定した。カラムは Inertsil ODS-2（150×4.6 mm）、移動相にはアセトニトリル：メタノール：水（46：45：9）を用い、7α-OH、7β-OH およびコレステロールは 210 nm で検出し、7-keto は 245 nm にて検出した。

3．　結果

今回の実験のラット血中エタノール濃度は、アルコール乱用者に臨床的に認められる濃度（５０～６０mM）と同様であり、骨格筋の病態生理学的な変化もまた同様であった。

対照群およびアルコール慢性投与群のヒラメ筋と足底筋における 7α-OOH と7β-OOH の濃度を比較した。対照ラットのヒラメ筋中の 7α-OOH と7β-OOH の平均値はそれぞれ 0.96 nmol/g と 2.35 nmol/g であり、足底筋中の平均値は 3.39 nmol/g と 10.49 nmol/g であった。アルコール慢性投与ラットでは、対照群に比較してヒラメ筋では 7α-OOH は 54%、7β-OOH は 75%増加し、足底筋においては 7α-OOH は 42%、7β-OOH は 71%増加し、全て有意の増加であった。また、対照群とアルコール慢性投与群の 7α-OOH および 7β-OOH はいずれも足底筋の方がヒラメ筋よりも有意に高い値であった。これらの結果は、急性アルコール投与 24 時間後の結果と同じ傾向を示していた。

次に、対照群およびアルコール慢性投与群のヒラメ筋と足底筋について oxysterol 濃度を比較した。対照ラットのヒラメ筋中の 7α-OH、7β-OH、7-keto の平均値はそれぞれ 24.7 nmol/g、29.1 nmol/g、80.1 nmol/g であり、足底筋中の平均値は 29.3 nmol/g、15.0 nmol/g、37.3 nmol/g であった。アルコール慢性投与群では、対照群に比べて、ヒラメ筋では 7α-OH は 37%、7β-OH は 37%、7-keto は 35%増加した。足底筋では 7α-OH は 24%、7β-OH は 43%、7-keto は 43%の増加が認められた。これらは、足底筋の 7α-OH と 7-keto を除き、対照群との間に有意差が認められた。又、7β-OH と 7-keto の濃度は、対照群、アルコール慢性投与群ともにヒラメ筋が足底筋よりも高かった。

4．　考察

これ迄に我々は、急性アルコール投与に対する骨格筋脂質の変化を調べ、アルコール投与 2.5 時間後には、足底筋において 7α-OOH と 7β-OOH は有意な増加を示すが、ヒラメ筋では有意に増加しないこと、アルコール投与 24 時間後には、7α-OOH、7β-OOH ともにヒラメ筋と足底筋の両方で有意に増加することを示し、これら骨格筋で急性アルコール投与により酸化ストレスが増強したことを明らかにした。

本研究では、LC-MS を用いてラット骨格筋の oxysterol の分子構造を初めて見出し、慢性アルコール投与に対する骨格筋脂質の変化を調べた。Ch-OOH は、アルコール投与後、足底筋、ヒラメ筋の何れでも 7α-OOH、7β-OOH ともに有意に増加し、ヒラメ筋での増加程度は急性アルコール投与の場合よりも大きかった。又、対照群、アルコール慢性投与群ともに 7α-OOH、7β-OOH 濃度がいずれも、ヒラメ筋の方が足底筋よりも低濃度であることは、ヒラメ筋が足底筋に比べて抗酸化能が高いことによると考えられた。これらの結果より、Ch-OOH を指標とすると、ヒラメ筋と足底筋のアルコール投与による影響の差は、投与後早期に顕著に認められると言える。

Oxysterol は、慢性アルコール投与後、ヒラメ筋においては 7α-OH、7β-OH、7-keto が有意に増加し、足底筋では 7β-OH が有意に増加した。この結果は、oxysterol も酸化ストレスの良き指標となることを示している。又、対照群、アルコール慢性投与群ともに、ヒラメ筋の 7β-OH 及び 7-keto の濃度が足底筋よりも高いのは、Type I fiber 優位のヒラメ筋では抗酸化系酵素の活性が Type II fiber 優位の足底筋よりも高く、膜障害性が強い Ch-OOH が足底筋におけるよりも速やかに oxysterol に変化するためである可能性が考えられる。

Oxysterol は細胞毒性を持つことが知られており、平滑筋細胞や血管内皮細胞において酸化 LDL が示す病原性を担い、又、直接に細胞を障害する可能性も指摘されている。中でも 7β-OH と 7-keto は細胞膜透過性及び細胞障害性接着の亢進により細胞毒性を示すとされる。骨格筋のコレステロールの大半が筋細胞膜（筋鞘）に存在する為、その過酸化物や酸

化物の増加は筋細胞膜機能を障害し、アルコール性 myopathy をもたらす原因になりうると考えられた。

5．結論

本研究は、ラットの骨格筋中に7α-OH、7β-OH、7-keto 等のコレステロール酸化物を初めて同定すると共に、慢性アルコール投与によって、Ch-OOH のみならずこれら oxysterol が増加することを明らかにした。これは、慢性アルコール投与による骨格筋での酸化ストレスの増大を示唆する所見と考えられた。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第1474号	氏　名	藤田哲男
論文題目	Chronic Ethanol Feeding Increases 7-Hydroperoxycholesterol and Oxysterols in Rat Skeletal Muscle 慢性アルコール投与ラットの骨格筋におけるコレステロール過酸化の亢進		
審査委員	主　査　上野易弘 副　査　横崎衣 副　査　久野高義		
審査終了日	平成 15年 1 月31 日		

（要旨は1，000字～2，000字程度）

慢性アルコール摂取に伴う骨格筋障害であるアルコール性ミオパチーは、組織学的にType Ⅱ fiber（白筋線維、嫌気的。足底筋で優位）の選択的筋線維萎縮を特徴としており、Type 1 fiber（赤筋線維、好気的。ヒラメ筋で優位）は萎縮に対して抵抗性を示す。アルコール性ミオパチーの発症機序は未だ明確ではないが、フリーラジカルに起因する細胞膜障害が一要因となっている可能性が考えられる。

本研究では、アルコール慢性投与後の骨格筋膜脂質の過酸化亢進について明らかにする為、コレステロール過酸化物（7α-OOH 及び7β-OOH）及び同酸化物（oxysterol。7α-OH 及び7β-OH、7-keto）を指標として、アルコール慢性投与後の骨格筋膜脂質の過酸化について比較検討した。

Wister 系雄性ラットを用い、Lieber 等の方法により、総カロリーの35%をエタノールに置換した液体飼料又はその等カロリーを炭水化物で置換した対照飼料で6週間 pair feeding を行った。断頭後、骨格筋（ヒラメ筋及び足底筋）を採取、筋組織（100～150 mg）から Folch 法により粗脂質を抽出し、Sep-Pak(-NH2)によりコレステロール画分を精製した。化学発光検出器付高速液体クロマトグラフ（HPLC-CL）を用いてコレステロール過酸化物を、紫外吸収高速液体クロマトグラフ（HPLC-UV）を用いて oxysterol を測定した。

対照群及びアルコール慢性投与群のヒラメ筋と足底筋における7α-OOH と7β-OOH の濃度を比較した所、対照ラットのヒラメ筋中の7α-OOH と7β-OOH の平均値はそれぞれ 0.96 nmol/g と2.35 nmol/g、足底筋中の平均値は3.39 nmol/g と10.49 nmol/g であった。アルコール慢性投与ラットでは、対照群に比較してヒラメ筋では7α-OOH は54%、7β-OOH は75%増加し、足底筋においては7α-OOH は42%、7β-OOH は71%増加し、全て有意の増加であった。又、対照群とアルコール慢性投与群の7α-OOH 及び7β-OOH はいずれも足底筋の方がヒラメ筋よりも有意に高い値であった。これらの結果は、急性アルコール投与24時間後の結果と同じ傾向を示していた。

次に、対照群及びアルコール慢性投与群のヒラメ筋と足底筋について oxysterol 濃度を比較した。対照ラットのヒラメ筋中の7α-OH、7β-OH、7-keto の平均値はそれぞれ24.7 nmol/g、29.1 nmol/g、80.1 nmol/g、足底筋中の平均値は各々29.3 nmol/g、15.0 nmol/g、37.3 nmol/g であった。アルコール慢性投与群では、対照群に比べて、ヒラメ筋では7α-OH は37%、7β-OH は37%、7-keto は35%増加した。足底筋では7α-OH は24%、7β-OH は43%、7-keto は43%増加し、足底筋の7α-OH と7-keto を除き、対照群との間に有意差が認められた。又、7β-OH と7-keto の濃度は、対照群・アルコール慢性投与群共にヒラメ筋が足底筋よりも高かった。

4. 考察

本研究では、先ず、LC-MS を用いてラット骨格筋中の oxysterol の分子構造を初めて見出した。

次に、コレステロール過酸化物は、アルコール投与後、足底筋・ヒラメ筋の何れでも7α-OOH、7β-OOH ともに有意に増加した。又、対照群・アルコール慢性投与群共に7α-OOH、7β-OOH 濃度がいずれも、ヒラメ筋の方が足底筋よりも低濃度であることは、ヒラメ筋が足底筋に比べて抗酸化能が高いことによると考えられた。一方、コレステロール酸化物は、アルコール慢性投与後、ヒラメ筋では7α-OH、7β-OH、7-keto が有意に増加し、足底筋では7β-OH が有意に増加した。この結果は、oxysterol も酸化ストレスの良い指標となることを示している。

Oxysterol は細胞毒性を有し、中でも7β-OH と7-keto は細胞膜透過性及び細胞障害性接着の亢進により細胞毒性を示すとされる。骨格筋のコレステロールの大半が筋細胞膜（筋鞘）に存在する為、その過酸化物や酸化物の増加は筋細胞膜機能を障害し、アルコール性ミオパチーの原因になりうると考えられた。

本研究は、アルコール慢性投与後のラット骨格筋膜脂質の過酸化について、コレステロール過酸化物並びに酸化物の量的変化の点から研究したものであるが、ラット骨格筋中にコレステロール酸化物を初めて同定すると共に、アルコール慢性投与によってコレステロール過酸化物及び酸化物が増加することを示したものであり、アルコール慢性投与による骨格筋での酸化ストレスの増大を示唆する重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。