

Study on effects of clenbuterol on bones and muscles of male rats

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/16500

氏名	北浦 孝
生年月日	
本籍	東京都
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博乙第237号
学位授与の日付	平成13年9月28日
学位授与の要件	論文博士(学位規則第4条第2項)
学位授与の題目	Study on effects of clenbuterol on bones and muscles of male rats (雄性ラットの骨と筋肉におよぼすクレンプテロールの影響に関する研究)
論文審査委員(主査)	辻 彰(薬学部・教授)
論文審査委員(副査)	米田 幸雄(自然科学研究科・教授) 二階堂 修(薬学部・教授) 宮本 謙一(医病院・教授) 玉井 郁巳(薬学部・助教授)

学位論文要旨

要約

Purpose: Clenbuterol is one of the beta-2 adrenergic receptor agonists with potent anabolic properties in muscles yet the concomitant effects on muscle and bone in young animals remain to be resolved. Therefore, the purpose of this study was to determine the effects of clenbuterol administration on bones and muscles of young rats.

Methods: Twelve male Sprague-Dawley rats (9-wk-old) were randomly assigned to either a control (CON, n=6) or clenbuterol group (CLE, n=6). Clenbuterol of 2 mg/kg body wt/day was administered subcutaneously for 4 weeks. Following treatment, the soleus (SOL), extensor digitorum longus (EDL), and ventricle (VENT) muscles and the femurs (FE) and tibiae (TI) bones were analyzed. The bone mineral content (BMC), the area, and the bone mineral density (BMD) of the FE and TI were measured by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). The longitudinal lengths of bones were measured with the Vernier Calipers. Muscle samples from the hindlimb were used to determine lactate dehydrogenase (LDH) activity and LDH isozymes, myosin heavy chain (MHC) isoforms, and lactate transporter (MCT1).

Results: The CLE showed smaller body weight than CON ($P<0.05$). The muscle wet weights in CLE tended ($P=0.08$) to be higher than CON in the SOL (9%) and EDL (12%), but the ratio of muscle wet weight-to-body weight were higher (SOL: $P<0.05$, EDL: $P<0.01$) than CON. VENT of CLE showed increases in both the wet weight and the ratio ($P<0.01$). FEs in CLE showed smaller values in BMC ($P<0.01$), the area ($P<0.01$), and the length ($P<0.05$) than CON, but not in BMD. TIs showed significant decreases ($P<0.01$) in BMC, the area and the length, but not in BMD. In skeletal muscles, clenbuterol induced the appearance of the fast type 2D myosin heavy chain isoform and decreased the slow type 1 isoform in the SOL muscle (13%) but had no effect on the EDL muscle. These data indicate that the MHC isoform pattern of SOL changed from slow to fast type. Clenbuterol increased LDH specific activity ($P<0.01$) and the ratio of LDH-M to LDH-H ($P<0.05$) in the SOL muscle. The LDH total activity

of the EDL muscle was also increased ($P<0.05$). Furthermore the percentage of MCT1 content significantly ($P<0.05$) decreased in both the SOL and the EDL muscles, 27% and 52%, respectively.

Conclusion: These results indicated that clenbuterol induced the muscular hypertrophy but inhibited the longitudinal growth of bones in male rats, which may be a serious concern in any ergogenic use. Furthermore, the present study suggests that clenbuterol might mediate the shift of MHC from slow to fast type and the changes in the regulation of lactate metabolism. Novel to the present study is the observation that clenbuterol administration decreases MCT1 content in the hindlimb skeletal muscles and the decrease of MCT1 is not muscle type-specific. It may suggest the genetic expressions of individual factors involving slow-type MHC, LDH-H, and MCT1 are associated with one another, but are regulated independently.

“Study on effects of clenbuterol on bones and muscles of male rats”

目的： β_2 アゴニストで気管支拡張作用を有するクレンプテロール

(Clenbuterol) は喘息の治療薬として用いられるが、そのサイクリックAMP

(cAMP) を介した薬理的作用により筋萎縮や骨粗鬆症の治療薬としての可能性が考えられている。しかし、これは骨格筋に作用し筋肥大を誘発するという事実から多くのスポーツ競技ではドーピング規制対象薬となっているにもかかわらず、副作用が他の蛋白同化ホルモン剤ほど報告されていないところから一般の若年者での使用拡大が懸念されている。ドーピング規制薬物の副作用を明らかにすることは薬物の適正使用上重要である。現時点ではクレンプテロールの骨におよぼす影響は骨格筋の肥大作用ほど調べられておらず、特に成長期における骨組織に及ぼす影響は報告されていない。そこで本研究ではこの点とさらに骨格筋における代謝特性と収縮特性の側面における影響を明らかにすることを目的に成長期の雄ラットを用いて検討した。

方法：8週齢のSD系雄ラットを対照(CON)群 ($n=6$) とクレンプテロール投与 (CLE) 群 ($n=6$) に分け、飼育 (室温 25 ± 3 °C、12時間明暗サイクル、 $25 \times 40 \times 20$ cm) し、9週齢時より薬物投与を開始した。CLEにはクレンプテロールを皮下注により (2mg/kg) 毎日4週間与えた。CONには同等量の生理食塩水を皮下注により投与した。飲水と飼料は自由摂取とした。最終投与の翌日、体重測定後ペントバルビタールナトリウムの腹腔内注射(50 mg/kg)による麻酔

をし、頸椎脱臼により処置し、筋肉と骨の摘出を行った。摘出筋は左右の遅筋のヒラメ筋 (SOL) と速筋の長指伸筋 (EDL) と心室筋 (VENT) であり、摘出後、筋湿重量を測定した。骨は左右の大腿骨 (FE) と脛骨・腓骨 (TI) を摘出した。附着する筋肉組織を除去し、骨塩量測定装置 (小形動物用 DCS-600 型、アロカ社) を用い DXA 法により骨面積と骨塩量および骨密度を測定した。また、長軸方向の先端間の距離 (骨長) を測定した。骨格筋は代謝特性を知るために乳酸脱水素酵素 (LDH) の酵素活性とアイソザイムおよび乳酸トランスポーター (MCT1) が分析された。収縮特性を知るためにミオシン重鎖 (Myosin-HC) のアイソフォーム分布が SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法 (SDS-PAGE) で調べられた。

結果: Table 1 に体重および筋湿重量の結果をまとめた。投与開始 2 週目より、

Table 1. Body weights and muscle weights.

	CON (n=6)	CLE (n=6)
Body wt, g	441.5 ± 11.9	420.5 ± 15.7 *
SOL		
Muscle wt, mg	205.6 ± 1.1	223.8 ± 25.0
Muscle wt/Body wt, mg/g	0.47 ± 0.01	0.53 ± 0.05 *
EDL		
Muscle wt, mg	242.5 ± 19.2	274.0 ± 32.1
Muscle wt/Body wt, mg/g	0.55 ± 0.04	0.65 ± 0.05 **
VENT		
Muscle wt, mg	1,085.3 ± 30.8	1,240.6 ± 36.2 **
Muscle wt/Body wt, mg/g	2.46 ± 0.10	2.96 ± 0.17 **

Values are means ± SD. n, no. of observations.

SOL, soleus; EDL, extensor digitorum longus. Body wt, body weight.

* Significantly different from control group (P<0.05).

** Significantly different from control group (P<0.01).

Table 2. Bone analyses of young male rats treated with or without clenbuterol.

	CON (n=6)	CLE (n=6)
Femur		
BMC, mg	314.2 ± 1.8	294.4 ± 8.2 **
Area, cm ²	2.23 ± 0.03	2.15 ± 0.02 **
BMD, mg/cm ²	141.1 ± 0.6	136.9 ± 2.7
Length, cm	3.84 ± 0.04	3.78 ± 0.04 *
Tibia		
BMC, mg	247.6 ± 5.7	230.7 ± 7.6 **
Area, cm ²	2.35 ± 0.06	2.23 ± 0.03 **
BMD, mg/cm ²	105.5 ± 4.7	103.6 ± 2.6
Length, cm	4.28 ± 0.02	4.19 ± 0.05 **

Values are means ± SD. n, no. of observations.

* Significantly different from control group (P<0.05).

** Significantly different from control group (P<0.01).

値を示したが、BMDは差が認められなかった。またこれらの影響は骨端部で大きいことが認められ、骨端成長線の閉鎖との関係が推察された。

CLEにおいて成長の抑制が認められた。しかし、CLEのEDL (速筋)、SOL (遅筋) のいずれにおいても筋湿重量の増加傾向が認められ、体重比は有意な増加を示した (P<0.05)。また心室筋においては湿重量、体重比ともにCLEで著明に増加していた (P<0.01)。

Table 2 に骨組織におよぼす影響をまとめた。骨格においてはFEとTIともにCLEのBMCと面積で有意に低値 (P<0.01) を示し、骨長もFE (P<0.05) とTI (P<0.01) とともに低

Table 3. MHC isoforms distribution.

		CON (n=6)	CLE (n=6)
SOL	MHC2B, %	0	0
	MHC2D, %	0	11.0 ± 2.5**
	MHC2A, %	25.8 ± 8.8	27.3 ± 1.8
	MHC1, %	74.2 ± 8.8	61.7 ± 3.4**
EDL	MHC2B, %	56.7 ± 20.6	57.1 ± 9.7
	MHC2D, %	40.7 ± 18.0	42.9 ± 9.7
	MHC2A, %	1.8 ± 4.3	0
	MHC1, %	0.8 ± 2.1	0

Values are means ± SD. n, no. of observations.
SOL, soleus; EDL, extensor digitorum longus.
** Significantly different from control group (P<0.01).

においては、Myosin-HCではほとんど影響は認められなかった。これより、遅筋のSOLに特異的な速筋化が確認された。

Table 4. LDH activity.

	Specific Activity (IU/g.w.wt)		Total Activity (IU)	
	CON	CLE	CON	CLE
SOL	85.9 ± 13.1	110.0 ± 12.2**	173 ± 29	24.9 ± 5.2*
EDL	248.0 ± 23.3	278.0 ± 29.2	60.8 ± 8.2	78.2 ± 16.0*

LDH; Lactate dehydrogenase
Values are meansSD for 6 rats in each group.
SOL, soleus; EDL, extensor digitorum longus.
* Significantly different from control group (P<0.05).
** Significantly different from control group (P<0.01).

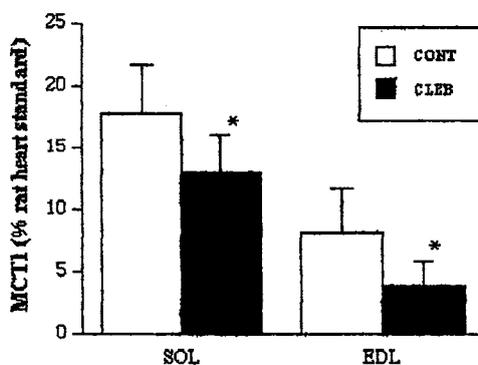


Fig. 1. MCT1 protein content in SOL and EDL.
Data were obtained from CONT (n=6) and CLEB (n=5).
MCT1 in muscles is expressed as a percentage of rat heart MCT1 content, which was set to 100% for each Western blot.
Values are means ± SD. Significant difference between CONT and CLEB. * P<0.05.

が比活性値やアイソザイム分布には変化が認められなかった。しかし、Fig.1 に示したように、興味深いことに乳酸トランスポーター(MCT1)はSOL(27%)と

Table 3にMyosin-HCのアイソフォームの変化を示した。骨格筋においてはCLEの遅筋のSOLにおいてMyosin-HCのType 1の割合の減少とType 2Dの増加が認められたがEDL

Table 4にLDH活性に関する結果をまとめた。CLEではLDH比活性の有意な上昇 (P<0.01) と心臓形アイソザイム(LDH-H)の減少が認められ、無酸素的解糖系代謝の促進が示唆された。また、SOLにおいてはLDH-M Typeの増加 (P<0.05) も認められ、明らかな解糖系代謝の促進を裏付けるものであった。一方、EDLのLDHでは総活性値の増加 (P<0.05) は認められた

EDL(52%)の両方とも有意に 低下 ($P<0.05$) しており、乳酸代謝に関わるLDHのアイソザイムの変化とMCT1の変化に違いがあることを示唆していた。

結論：雄ラットに対するクレンプテロールの投与により、心筋だけでなくSOL（ヒラメ筋）とEDL（長指伸筋）にも筋の肥大が生じた。しかし、長骨成長は抑制されることが示された。これは、筋の力発揮の増強を目的に安易に薬物使用をすることに注意を喚起するものである。また、クレンプテロールは筋の収縮要素であるミオシンの遅筋タイプから速筋タイプへのタイプ移行と乳酸代謝に重要な影響を及ぼすことが明らかとなった。しかし、MCT1の変化から見るとクレンプテロールによる影響は筋のタイプに特異的に起きる現象では無く、それぞれの蛋白質の発現が深いかかわり合いを持ちながらも独立した要素で制御されていることを示すものであった。

学位論文審査結果の要旨

β_2 アゴニストで気管支拡張作用を有するクレンプテロールは、骨格筋に作用して筋肥大を誘発することから、スポーツ競技におけるドーピング規制対象薬となっているにも関わらず、一般の若年層での使用拡大が懸念されている。本研究は、クレンプテロールの成長期における骨組織に及ぼす影響および骨格筋における代謝特性と収縮特性における影響を明らかにすることを目的とし、ラットにクレンプテロールを投与し以下に列挙する新規な知見を得た。

- (1) クレンプテロールの投与により、心筋だけでなく遅筋のヒラメ筋と速筋の長指伸筋のいずれにおいても筋の肥大が生じるが、骨長成長は抑制される。
- (2) クレンプテロールは筋の収縮要素であるミオシンにおいて遅筋タイプから速筋タイプへの移行と解糖系代謝を促進した。
- (3) 乳酸トランスポーターMCT1 のタンパク質濃度を心筋と比較したとき、クレンプテロールの投与により遅筋および速筋のいずれにおいても減少した。この MCT1 の変化と乳酸代謝に関わる乳酸脱水素酵素のアイソザイムの変化と異なっていた。

以上の結果は、薬物投与が筋肉の肥大化のみならず骨形成の抑制や乳酸代謝に重大な影響を及ぼすことを示すものであり、筋力の発揮の増強を目的に安易に薬物投与をすることに注意を喚起する上で、その薬学的意義は大きいものと認められる。よって、本論文は博士（薬学）論文に値するものと判断された。