

運動による筋肉疲労の回復に及ぼす牛乳摂取の影響

—ラットを用いた、運動疲労の回復のための 牛乳摂取法とそれに関する因子の解析—

順天堂大学・スポーツ健康科学部・栄養生化学教授 山 口 正 弘

順天堂大学・医学部・生化学教室第一助教授 亀 山 恒 夫

研究目的

運動トレーニングには常に筋肉疲労が伴う。トレーニング効果を高めるには速やかに、しかも十分な筋肉疲労の回復が必要である。

平成元年～3年までの「発育過程の運動トレーニング・ラットの体力に及ぼす牛乳および砂糖の影響」に於ける結果は：1) 十分牛乳を摂取した発育過程の運動トレーニング・ラットは自発的運動量を減少した。2) この運動トレーニング・ラットの脚筋にグリコーゲンが著しく蓄積していた。

筋グリコーゲン量が持久的運動能力の制限因子の一つであることはよく知られている。疲労困憊まで走運動すると脚筋グリコーゲンは枯渇し、走運動が不可能となる。この筋肉の機能を回復または、高めるには速やかな筋グリコーゲンの再補充および過補償現象を引き起こさせることが重要である。

今までの結果からM飼料は特に走運動トレーニング・ラット脚筋のグリコーゲン濃度を高め、また疲労困憊後に与えると、標準飼料(MM-1)に較べて速やかに枯渇した脚筋グリコーゲンの回復をもたらすことが解った。しかも、全脂粉乳の代わりに脱脂粉乳を用い、脂肪を大豆油にした飼料では、上述の結果が全く得られなかったことから、牛乳だけに含まれる脂肪が上述の影響をもたらすと考えられた(平成元年から3年までの結果)。

そこで、牛乳だけに特別に含まれる低級飽和脂肪酸が筋線維の呼吸を著しく促進すること、特にbutyrateが30～40%も高めることを見いだした(平成4年度の結果)。即ち、低級脂肪酸が筋肉の代謝を活性化し、筋肉にエネルギーをより多く供給する効

果をもたらすと考えられる。

そこで、我々は平成5年度に筋肉疲労の回復および筋運動における筋肉の代謝を高める為の栄養供給剤として利用出来るかどうかを調べるためにラットを用い、1) 牛乳飼料で飼育したラットの血清中のbutyric acidの濃度はどの様になっているのか？ 2) butyrateを摂取後、血液中のbutyric acidの濃度はどの様に变化するのか？等を検討した。

実験方法

1) 動物

発育過程のラットを標準飼料（船橋農場製MM-1）と全脂粉乳を30%含んだ飼料（M飼料）で飼育した。M飼料および標準飼料のラットを自由運動が出来るグループ（運動グループ）と運動がほとんど出来ないグループ（非運動グループ）に分けた。

2) 飼料中のbutyric acidの定量

標準飼料およびM飼料に含まれるbutyrate及びbutyric acidは定量的に次のように抽出した。飼料に3倍量の水を加え超音波で処理し、塩酸を加えてpHを約2に調整した後、エーテルを加えてbutyric acidを抽出し、エーテル層を分取した後、エーテルを飛ばし、脂肪酸を乾固し、その脂肪酸を0.1%磷酸を含む10%アセトニトリルに溶解して、分析用の試料とした（図1）。

3) 採血方法

原則として心臓穿取により採取した。butyrate採取後の血中butyric acid濃度の測定のsampleとしての血液は、ラットをエーテルで麻酔し、カテーテルを胃の中に挿入し、時間を追って尾静脈よりヘマトクリト管に採血した（図2）。

4) 血清の分離

採血した血液およびヘマトクリト管に採取した血液は30分放置後、遠心分離して血清を分画した。

5) 血清中のbutyric acidの定量

a) 血清から脂肪酸の抽出

血清50 μ l に 3 N HCl を 2 μ l 加えよく攪し、pHを約2に調整し、1 mlのエー

テルを加えて十分に攪し、5分放置後上層のエーテル層から0.8mlを分取して後、エーテルを飛ばし、脂肪酸を乾固し、その脂肪酸を0.1%燐酸を含む10%アセトニトリルに溶解して、分析用の試料とした(図3)。

b) 高速液体クロマトグラフィによる分析

島津製作所製高速液体クロマトグラフィGE-LCシステムG-1でHPLC Packed Column Inertsil SH 5 μ m 4.6x 150mmのカラムでbutyric acidを定量分析した。

結 果

1. M飼料が疲労困憊ラット・脚筋グリコーゲン濃度の回復に与える影響の確認。

走運動前のラット(c-ラット群)腓腹筋のグリコーゲン含量は 1.26 ± 0.22 mg/g muscle(n=5)で、走運動で疲労困憊により 0.35 ± 0.18 mg/g muscle(n=5)と減少した。疲労困憊後、一週間飼料を変えて与えた。脱脂粉乳飼料では 0.32 ± 0.2 mg/g muscleと全く回復しなかったが、M飼料(全脂粉乳)では 1.16 ± 0.36 mg/g muscleと疲労困憊前の状態に回復した(図4)。

脱脂粉乳飼料とM飼料の成分の差は脂肪の質にあると考えられる。

2. 筋肉の呼吸に対するbutyrateの影響の確認

脂肪の質の違いがどのように筋肉に影響を与えるのかを確認した。牛乳の脂肪(乳脂)の特徴は低級脂肪酸を含むことである。中でもbutyrateは乳脂の10%を占めていて、乳製品以外の食品にはほとんど含まれていないことが報告されている。

低級脂肪酸を含んだ脂肪を摂取し、消化-吸収された後、脂肪に再合成されることなく、遊離の脂肪酸の状態では血液に入り組織に運ばれるので、これらの低級脂肪酸が直接筋肉に影響を与えることが考えられる。

YSI Biological oxygen monitorを用いて筋肉の呼吸活性を測定した。炭素数が4および6のbutyrateとcaproateは呼吸を高めたが、炭素数が8以上のoctanate、capuroateおよびpalmitateは呼吸を阻害した。特に、butyrateは著しい活性化を示した(図5)。

この活性化は筋肉に張力を加えた、いわゆる筋肉が運動しているとき、しかもグルコースが筋肉に十分取り込まれる状態で、butyrateの効果が高まった。

以上のことから、butyrateに注目して調べた。

3. M飼料および標準飼料 (MM-1) のbutyric acid含量

実験用のラットの一般的飼料MM-1とM飼料 (全脂粉乳飼料) および脱脂粉乳飼料のbutyrate含量を調べた。表1に見られる様にM飼料には30mg/gと高濃度に含まれていたが、MM-1と脱脂粉乳飼料には極めて僅かであった。

4. M飼料で飼育したラット血清のbutyric acid濃度

M飼料のラットとMM-1飼料のラットのそれぞれの血清butyric acidの濃度は二回の実験で0.726と2.44mg/dl (表2) および0.39と2.58mg/dl (表3)であり、butyrateを多く摂取しているラットの血清が低い値を示した。このことはbutyrateを摂取しているラットの体細胞がbutyrateをより多く、又はより速やかに取り込んでエネルギー源として利用できるように適応したと考えられる。

5. 運動トレーニング・ラット血清のbutyric acid濃度

表3に示される様にM飼料でもMM-1飼料でも走トレーニング・ラット血清のbutyrate濃度は非トレーニングのものより著しく低かった。特にM飼料のトレーニング・ラット血清のbutyrate濃度は低かった。

トレーニングすることによって筋肉がより多くのbutyrateをエネルギー源として利用することが出来るように適応したと考えられる。

6. butyrate摂取後の血清butyric acidの濃度変化

stomach probeを通して、ラットの胃中に牛乳に含まれる10倍のNa-butyrateを1ml注入した後、時間を追って尾静脈よりヘマトクリト管で採血し血清のbutyric acid濃度を高速液体クロマトグラフィで調べた (図1)。図6と7はその結果を示したものである。ラットの個体により二種類のタイプの変化が観察された。一つは血中butyr-

icacidの濃度が投与後30-90分で0.3~0.4mMと5~6倍になり4時間後には投与前にもどるものと、もう一つは30、90、240と徐々に高まり、240分で血中濃度が5~6倍になった。

考 察

グリコーゲンの枯渇による筋疲労に対して牛乳飼料がグリコーゲンの再補充に効果があることが解った(図4)。この機構についてはいろいろ考えられるが、脱脂粉乳飼料では効果が無かったこと、及び酸素モニターに張力をかけた筋肉を固定し直接butyrateを作用させることにより、酸素を取り込む能力(呼吸活性)が高めることが出来た(図5)、ことからbutyrateが筋の枯渇したグリコーゲンの再補充に深く関係していると考えられる。

しかし、実際butyrateを摂取した後、どのような時間的経過で血中に反映するのが問題である。図6と7に示されるように、摂取後、血butyrateの濃度が高まったが、個体によって二つの型が有ることが解った。一つは摂取後、30ないし60分で血中濃度が最高に達し急激に低下する型(type1)(図6)、他の一つは徐々に濃度が高まり4時間経ってもまだ濃度が上がり続けた(type2)(図7)。

どのような消化-吸収系の違いによって、二つの型が生ずるかは全く不明であるが、type1はbutyrateが即効で効果は短時間で終るもので、type2は遅効で効果は長時間持続するラットと考えられる。

以上のことは、筋運動でbutyrateがエネルギー源として利用されるための摂取方法の根拠を示すものである。type1のラットでは走運動する30分前にbutyrateを摂取すれば筋運動にbutyrateが利用され、グリコーゲンが節約されるため筋疲労が起りにくくなることが想像される。type2のラットは走運動の4時間前に摂取することにより効果が現れると想像される。

表 1 BUTYRATE CONTENT IN MILK AND STANDARD FEEDS FOR RATS

FEED	MILK	SKIM MILK	MM-1
BUTYRIC ACID (mg / g feed)	30.6	5.6	3.2

表 2 BUTYRIC ACID CONCENTRATION IN SERA OF RATS FED WITH STANDARD AND MILK FEEDS

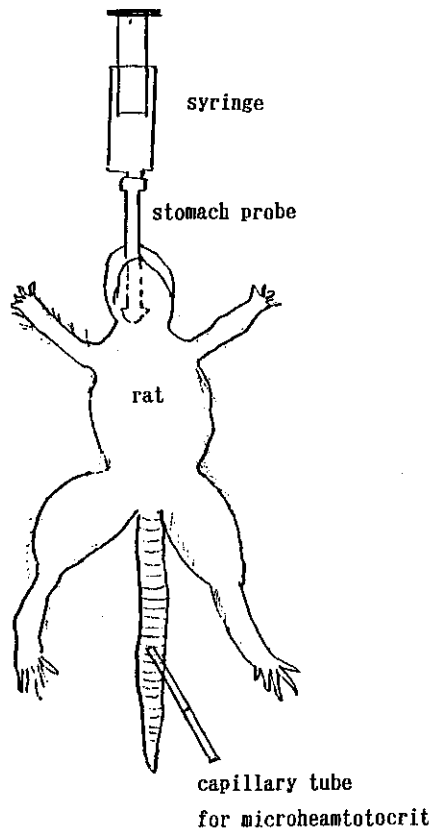
rats	butyric acid concentration in serum
with standard feed (n=3)	2.44±2.1 mg/dl
with milk feed (n=3)	0.726±0.67 mg/dl

表 3 BUTYRIC ACID CONCENTRATION IN SERA OF TRAINING RATS FED WITH STANDARD AND MILK FEEDS

with standard feed		butyric acid concentration in serum
untraining (n=4)		2.58±1.8 mg/dl
training (n=4)		0.94±0.57 mg/dl
with milk feed		
untraining (n=4)		0.39±0.12 mg/dl
training (n=4)		0.13±0.07 mg/dl

Milk or Standard Feeds 100 mg
 ↓
 add 0.3 ml of water
 ↓
 mix and treat with
 supersonic waves
 Porridge-like feed
 ↓
 add 16 μl of 3N HCl
 ↓
 to make pH to ~2
 ↓
 mix enough
 ↓
 add 3.0 ml of ether
 ↓
 mix and treat with
 supersonic waves
 mixed solution
 ↓
 centrifuge
 ↓
 take out from supernatant
 (ether layer)
 ↓
 dry up
 ↓
 desolve in 10% aceto-
 nitrile-0.1% phosphoric
 acid solution
 ↓
 samples for HPLC analysis

图 1. PREPARATION OF BUTYRIC ACID FROM MILK AND STANDARD FEEDS FOR HPLC ANALYSIS



☒ 2

INJECTION OF BUTYRATE INTO RAT STOMACH THROUGH STOMACH PROBE AND TAKING BLOOD SAMPLES FROM TAIL VEIN OF RAT.

50 μ l of serum
 ↓
 add 2 μ l of 3N HCl
 to make pH to ~2
 mix enough
 ↓
 add 1.0 ml of ether
 mix enough
 standing for 10 min
 ↓
 take out 800 μ l from
 supernatant (ether layer)
 ↓
 dry up and then dissolve
 in 10% acetonitrile-0.1%
 phosphoric acid
 ↓
 Samples for HPLC analysis

☒ 3

PREPARATION OF BUTYRIC ACID FOR HPLC ANALYSIS FROM SERA OF RATS FED WITH MILK AND STANDARD FEEDS

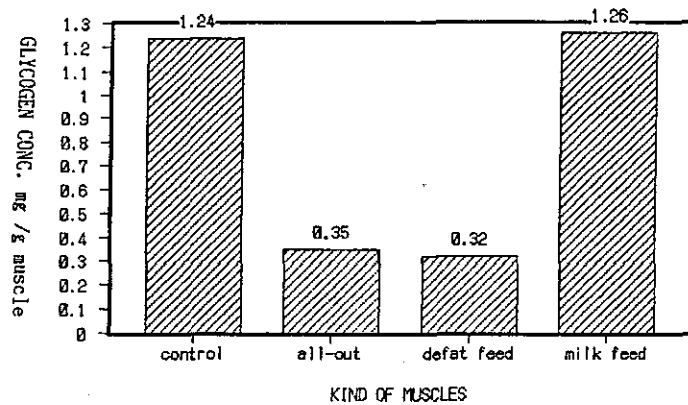


Fig 4 EFFECTS OF DIETS ON GLYCOGEN CONTENT IN RAT MUSCLE AFTER ONE WEEK OF ALL-OUT



Fig 5 COMPARISON OF THE PROMOTING ACTION OF TENSION DEPENDENT RESPIRATION IN SOLEUS WITH ADDITION OF SATURATED FATTY ACIDS CONTAINED IN MILK.
 Symbols of buty, capr, octa, laur and palm show butyrate, caproate, octanate, laurate and palmitate, respectively.

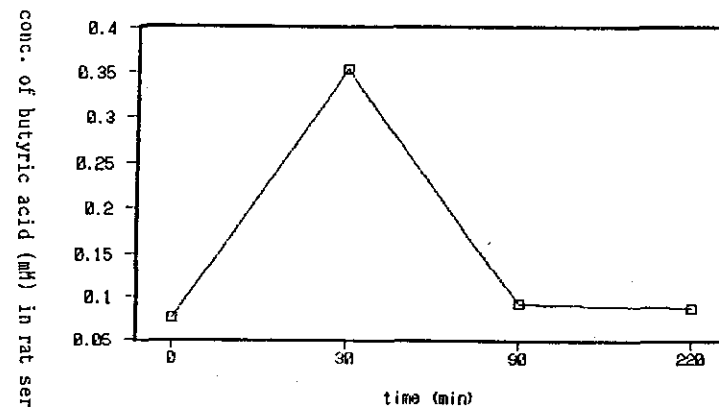


Fig 6 CHANGES IN BUTYRIC ACID CONC. OF RAT SERUM AFTER INTAKE OF Na-BUTYRATE.

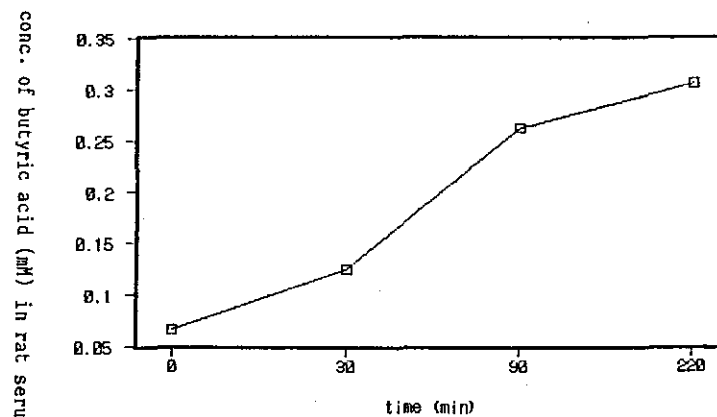


Fig 7 CHANGES IN BUTYRIC ACID CONC. OF RAT SERUM AFTER INTAKE OF Na-BUTYRATE.