

運動負荷による身体の状態変化に及ぼす牛乳に 特異的に含まれる共役リノール酸 (CLA) 摂取の効果 I. 走運動ラットに及ぼすCLAの影響

順天堂大学・スポーツ医科学研究所	名誉教授	山 口 正 弘
順天堂大学・医学部生化学第二		豊 嶋 博
文教大学	助 教 授	井 上 節 子
リノール油脂		岩 田 敏 夫
順天堂大学・スポーツ健康科学部	講 師	鯉 川 なつえ
順天堂大学・スポーツ健康科学部	教 授	澤 木 啓 祐
順天堂大学・医学部生化学第二	教 授	長 岡 功

要 約

共役リノール酸 (CLA) 摂取は生体に色々な魅力的な生理作用を齎すことが報告されている。

我々はCLA摂取したときの体調を調べ、CLAが運動能力を向上する機能を持つかどうか、調べることを目的とし、次のような研究結果を得た。

- 1) CLA摂取により、血中CLA濃度が高まった。走運動トレーニング負荷によっても、血中CLA濃度は殆んど変化しなかった。
- 2) 走運動トレーニングを負荷すると、血液ヘモレオロジーは粘性を高めたが、CLA摂取のラット群では粘性の高まりは弱く、血液ヘモレオロジー値は低位であった (非CLA摂取群比=70%)。血液はサラサラで、栄養物や酸素の供給は速やかに、疲労物質の除去も速やかにおこなわれる。
- 3) CLA摂取・走運動トレーニング負荷ラットから分離したラットのひらめ筋 (遅筋) や足底筋 (速筋) の呼吸作用は、非CLA摂取に比べ、より酸素消費率が大きく、両筋肉とも酸化能力を高めた。筋肉の培養液に乳酸を付加した実験結果から疲労し難い筋肉に発達したことが示された。
- 4) 走運動トレーニング負荷ラット群の血中乳酸濃度がCLA摂取により著しく低値を示した。
- 5) CLA摂取ラットの肝の乳酸脱水素酵素 (LDH) が活性化し、運動トレーニング負荷はその活性化がさらに著しく強まった。この結果から、Cori's cycle の活性化が起こり、4) の現象を裏付けた。
- 6) CLA摂取は血中ケトン体濃度を高め、運動トレーニング負荷は更にその作用を強めた。この結果は脂肪酸の β 酸化代謝の活性化が、主に筋肉で生じた事を示唆している。
- 7) 運動をすると、物理的及び活性酸素による化学的ストレスにより筋細胞膜が損傷を受け、筋細胞から筋肉機能に必要な酵素群が逸脱する。

筋肉に特異的に存在するクレアチンキナーゼ (CK) を指標として、CLA摂取群ラットの血中CK濃度は著しく低下した。CLA摂取下では、走運動トレーニング負荷でも血中CK濃度は高まらなかった。

上述の実験結果は運動を支えるエネルギー面では、血液をサラサラに保ち、筋へのエネルギー源の供給を容易にし、エネルギー生産系の酵素反応の阻害物質（乳酸等）を筋から速やかな除去など、筋肉のパワーの充足を強化する。また、脂肪酸の代謝活性化し、筋運動の持久力を高めることが示唆された。

更に、筋からの筋細胞から筋肉機能に必要な酵素群の逸脱を抑制する機能は運動下で長時間運動能力の減衰を抑制する効果を示し、運動の持久性を高め、または運動トレーニング後の回復の時間を短縮する効果の可能性が示された。

はじめに

アフリカの原野に住むマサイ族の特徴的体格（体脂肪が少なくスリムで、運動能力に優れている）は、彼等の特異的生活様式に由来するのではと、考えられる。

マサイ族は遊牧民で牛と共に、牧草と水を求めて生活している。主食は発酵牛乳で時々牛の耳から採血した血を飲むと言われている。

牛は典型的な反芻動物であるので、牛乳は勿論、肉や血液には共役リノール酸（CLA）がかなり含まれているので、当然マサイ族は常時CLAを摂取している。

CLAの摂取は生体に色々な魅力的な生理作用を示すことが報告されている。

Evansら¹⁾は、ヒトを含む動物や培養細胞でCLA摂取が脂質の代謝を変えることを明らかにした。その結果、種々の動物の体脂肪を減少させると、述べている。

体脂肪は生体の貯蔵エネルギー源としてきわめて重要であるが、同時に肥満は生活習慣病の主要な要因の一つでもある。また、運動選手は体脂肪には常に強い関心を持っている。因みに陸上長距離の男子トップアスリートは体脂肪率は5～8%、ランニング愛好家で10～13%、女子トップアスリートは10%以下と低体脂肪に維持することの生活習慣に注意を払っている。

現在の飽食の時代、体脂肪を落とし、生活習慣病の予防を図ることは重要なことであるが、各種競技のアスリートにとっても非常に重要である。

しかし、CLA摂取によって体脂肪を落とした場合、体調はどうなるのか、が問題となる。最近、色々この問題について研究されているが、運動を負荷した場合にCLA摂取によって、どのように身体に影響するかについての研究結果は非常に少ない。

我々は、ラットを用いCLA摂取によって、身体の運動能力にどのような影響を与えるか、主として生化学的指標を基に調べ、運動機能の向上やトレーニングの効果の効率化に利用出来るかを検討した。

実験方法

1. 実験動物

実験動物は体重約150gの雄ラット（Sprague Dawley）を用いた。実験開始時、体重は約180gのラットを3週間飼育した。なお、実験動物の使用に関しては、順天堂大学医学部実験動物委員会に申請し、承認を得、同・医学部特殊疾患モデル施設にて気温 23 ± 0.1 ℃、湿度 50 ± 1 %の環境で3週間飼育した。

飼料：オリエンタル酵母社製ラット用MF飼料（N飼料）とMF飼料に含まれている脂肪の1%のCLAを含む固形飼料（CLA飼料）を自由摂取した（表1）。

表1 普通飼料（MF飼料）とCLA飼料の成分

	普通飼料	CLA 飼料
水分	7.7 g	7.7 g
タンパク質	23.6	23.6
脂肪	5.3	5.247
CLA	0	0.053
炭水化物	54.4	54.4
ビタミン・ミネラル	6.1	6.1
食物繊維	2.9	2.9

走運動ラットの調整：ラットを運動トレーニング群と非運動トレーニング群に分け、それぞれにN飼料又はCLA飼料で飼育した。

運動負荷：夏目製作所製ラット用NK100型のトレッドウール（ウールの一周が1 m）（図1）による自由意志での走運動を負荷し、運動量を検査した。非運動ラットは、運動負荷装置のないゲージ（80×40×25cm）で3頭を単位として飼育した。

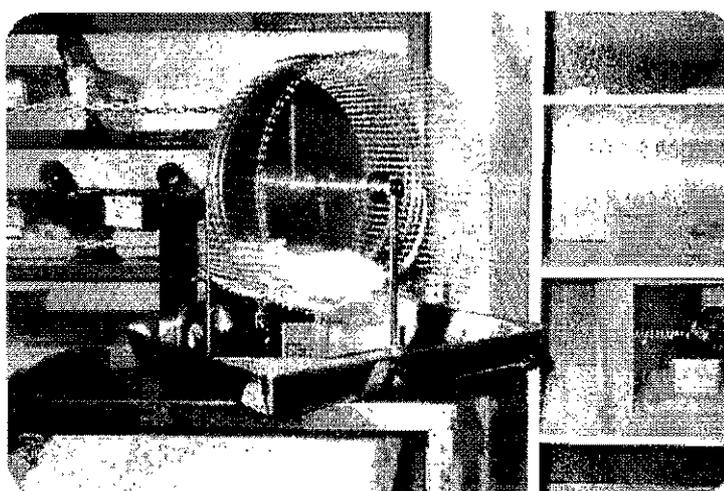


図1 トレッドウール（tread-wheel）による走運動負荷

2. 血液検査：

- i) 血算；ヘマトクリット、赤血球数、白血球数、血小板数、等。
- ii) 血液生化学検査；乳酸脱水素酵素 (LDH)、クレアチンキナーゼ (CK)、ケトン体等、三菱ビーシーエル社に依頼し、測定した。
- iii) 血液レオロジー；ヘパリン濃度が5%になる様に心臓から採血し、日立原町電子工業 (株) 製のマイクロレオロジー測定機 (Micro Channel Flow Analyzer Bloody 6-4: MC-FAN) を用いて全血通過時間を測定した。図2は典型的な血液通過を示す映像の写真である。上段は低粘度、即ちサラサラ血液、下段は高い粘性を示す、即ちドロドロ血液を示す。

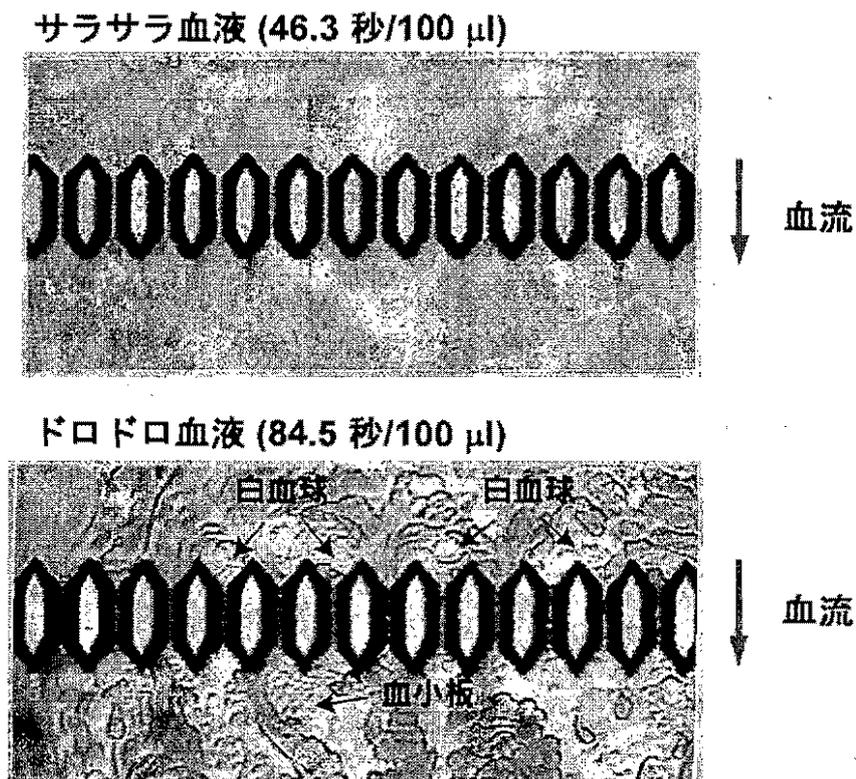
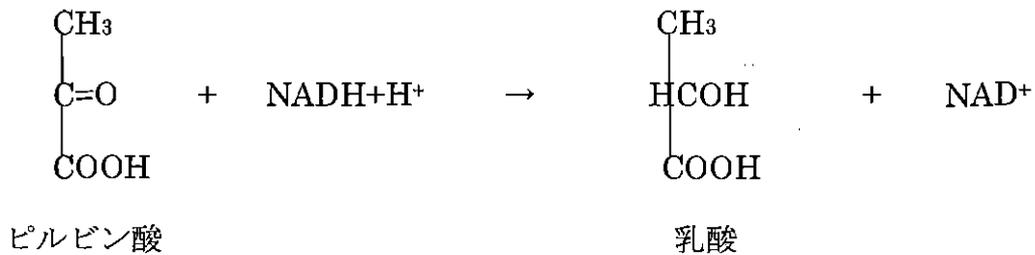


図2 細胞マイクロレオロジー測定機 (Micro Channel Flow Analyzer; MC-FAN) を用いた全血通過時間の測定

3. 筋肉と肝臓の生化学：

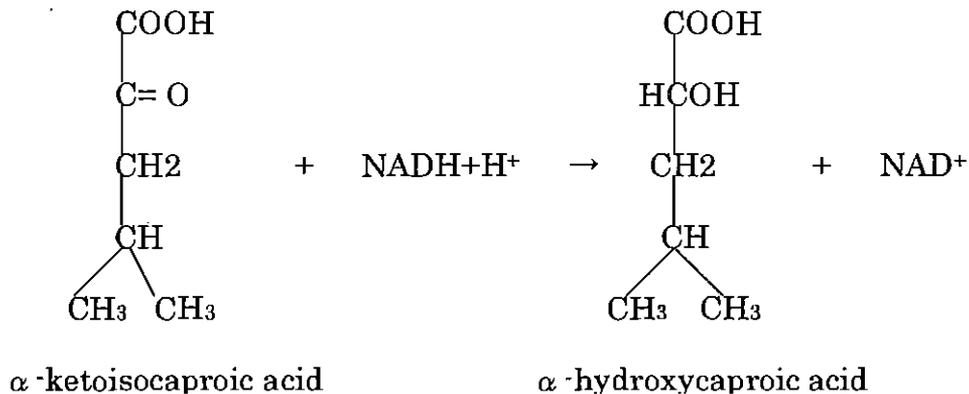
ひらめ筋 (遅筋) 及び足底筋 (速筋) および肝臓からそれぞれ、Hill^{2, 3)}の方法を改変した吉田^{2, 3)}の方法に従ってLDHを抽出し、37°Cで活性を測定した。分離した臓器重量の20倍量の充分冷えた0.2 M トリス-HCl緩衝液 (pH 7.2) を加え、ホモジネイト後、遠心分離した上清をLDH試料とした。一般的体細胞に存在するアイソザイムLDH HやLDH Mは乳酸とピルビン酸に親和性が強いので、基質としてピルビン酸リチウムを用い、補酵素のNADH+H⁺が各々の反応時間当たり減少する量を波長340 nmの吸光度の減少から活性を測定した。(下記の式を参照)



4. 辜丸のLDH Xの活性：

総LDH抽出は、上述の一般臓器に用いられるLDH抽出法を用いた。

辜丸に特異的に存在するLDH Xは乳酸とピルビン酸には殆ど親和性は認められないので、LDH Xの活性は、 α -ketoisocaproic acidを基質として、基質が α -hydroxycaproic acidに酸化されるときの $\text{NADH}+\text{H}^+$ が各々の反応時間当たり減少する量を波長340 nmの吸光度の減少から測定した。(下記の式を参照)

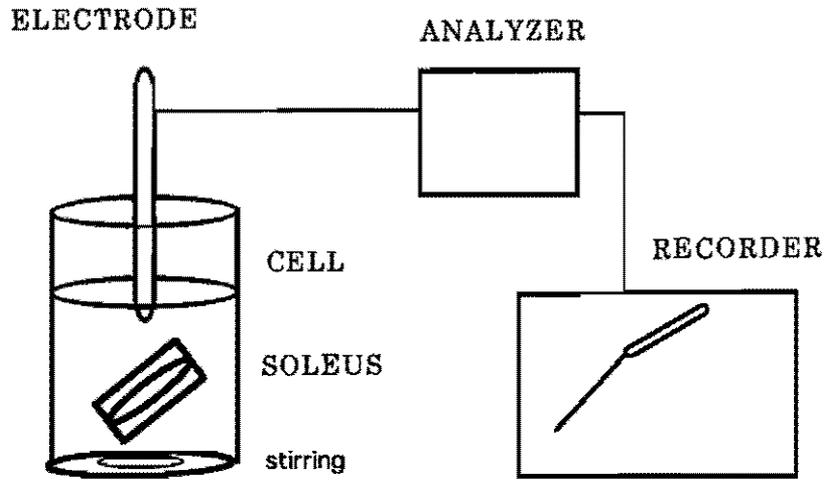


5. LDHアイソザイムの測定：

50 mM バルビタール緩衝液-pH8.5で作った0.8%アガロース・ゲル上でLDH試料(体細胞のLDH及び辜丸のLDH X)を電気泳動した後、直ちに、LDHは乳酸、LDH Xは α -hydroxycaproic acidをそれぞれ含む基質染色液(NAD, フェナジンメトサルフェイト、ニトロブルーテトラゾリウム、トリス緩衝液、pH7.4)に移しゲルを37°Cの温度下で反応させた。

6. 筋肉の呼吸活性の測定：

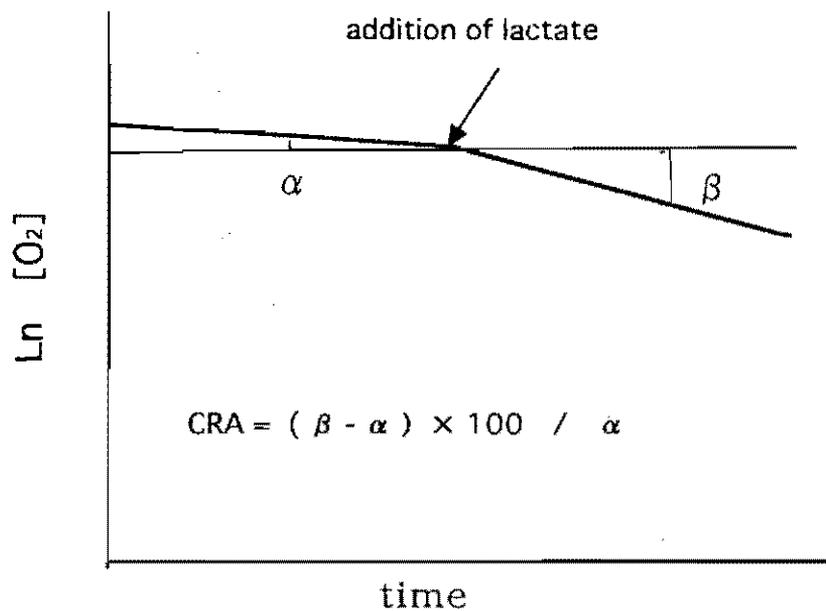
ラットから分離した新鮮なひらめ筋及び足底筋をそれぞれYSI社製酸素モニター「YSI Type 5300 oxygen monitor」のセル内に静止筋長の約120%に伸長した状態で固定し、0.1 mM グルコースと0.1U ヒト・インシュリンを含むKreb's-Ringer solutionに懸垂し、酸素の経時的消費を測定した(図3参照)。筋肉の呼吸作用は下記のCRA (change in respiratory action)の式で表した(図4)。



BUFFER (KREBS-RINGER SOLUTION
containing 0.1 mM Glc and 0.1 U human
insulin)

MECHANISM OF YSI TYPE 5300 OXYGEN MONITOR

図3



Typical Respiratory Action of Muscle

CRA: change in respiratory action

図4

$$CRA = (\ln [O_2] b - \ln [O_2] a) / \text{筋肉量g} / \text{培養時間 (分)}$$

a、bはそれぞれ培養時間 a と b を表す。

筋肉の乳酸処理能力を調べるために、安定した呼吸活性の状態に乳酸の濃度が30 mMになる様に乳酸を付加し、呼吸活性の変化を調べた (図4)。その時の呼吸作用の変化を、CRAの変化によって比較検討した。

7. 血中CLA濃度の測定：

実験に用いたCLAはリノール油脂株式会社で調製されたもので、純度は79%で9c-11t, 10t-12c, のアイソマーを含む混合CLAである。

血中CLA濃度の定量は、Kamegayaら⁴⁾のガスクロマトグラフィー法を基本に、ガスクロ装置をGL Sciences社製GC353Bに、カラムをキャピラリーカラムTC-FFAP 30 m × 0.53 mm I.D. 10 μmに、キャリア-ガスをN₂で40 ml/minにそれぞれ改変して行った(表2参照)。

表2

方法-3

ガスクロマトグラフィーによる血中CLAの定量

ガスクロ装置	GL Sciences社製 GC353B
カラム	キャピラリーカラムTC-FFAP 30m×0.53mm I.D. 1.0 μm
カラム温度 (恒温槽温度)	160°Cから昇温し220°Cまで2 °C/minで昇温
注入口温度	250°C
検出器温度	250°C
検出器	FID燃焼ガス 水素: 45ml/min, 空気: 500ml/min
サンプルキャリアーガス	N ₂ : 40ml/min
スプリットをしない	サンプル1 μlすべて注入

実験結果

1. 体重増加への影響

図5に成長期のラットがCLA摂取と運動トレーニング負荷により体重増加に及ぼす影響を調べた結果を示した。

CLA非摂取群 (n=6×2) では運動負荷により体重の増加率は抑制され、摂取飼料量は約10%増加したにも拘らず、3週間で体重差で約20%の違いが生じた。一方、CLA摂取群 (n=6×2) では、運動トレーニング負荷によっても体重増加率は変化がなく、3週間での体重差は殆ど見られなかった。しかし、摂取飼料量は非運動群に比べ約25%増加した。また、運動トレーニング負荷群でCLA飼料摂取群 (n=6) 及び非CLA飼料摂取群 (n=6) の夫々の平均運動量に個体差が大きく、有意な差が認められなかった。

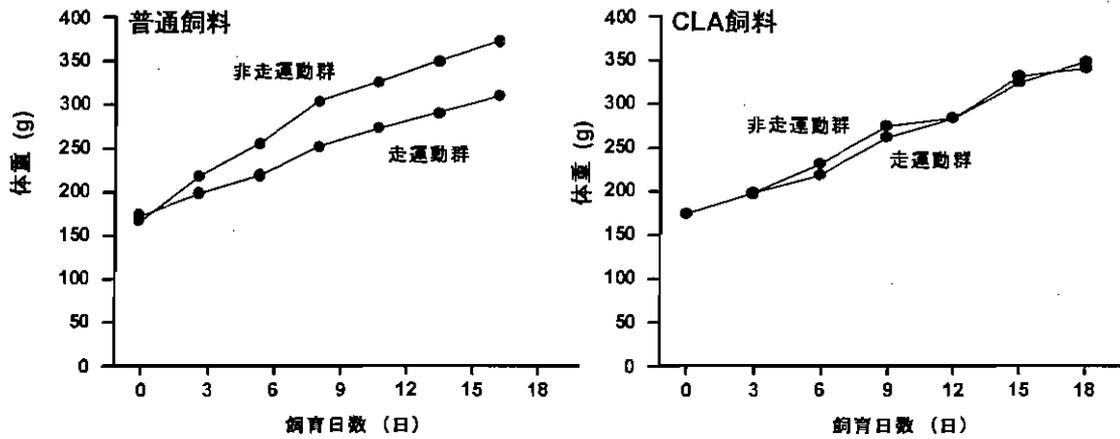


図5 普通飼料あるいはCLA飼料により飼育したラットの体重増加に及ぼす走運動負荷の影響

2. 血中CLA濃度

図6はCLA飼料摂取による血中CLA濃度に及ぼす影響をガスクロマトグラフィーによって調べた結果を示した。オリエンタル酵母社製MF飼料に含まれる油脂はCLAを含有しない大豆油を主成分とするもので、普通飼料摂取の非運動及び走運動トレーニングの、両ラット群血中にはCLAは検出されなかった。CLA飼料摂取ラットでは非運動及び走運動トレーニングラット群共それぞれ1.6 mg/dl及び1.5 mg/dlと検出されたが、誤差値を考えるとほとんど同濃度で走運動トレーニング負荷によって減少することは無いと思われる。

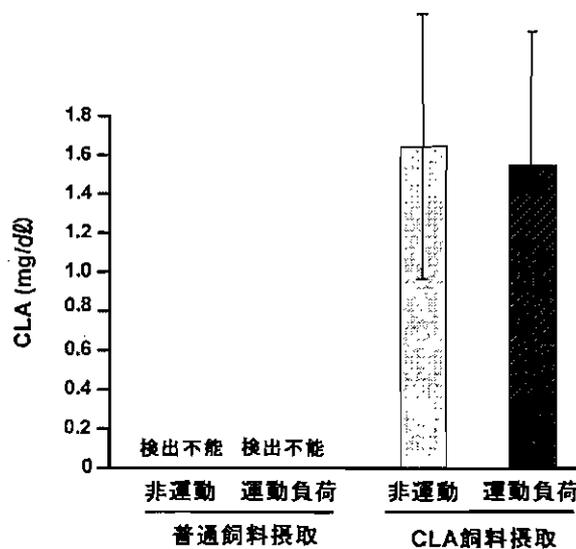


図6 血清CLA濃度に及ぼす走運動負荷とCLA摂取の影響

3. 血液ヘモレオロジー

図7はCLA飼料摂取によって、血液ヘモレオロジーに及ぼす影響を調べた結果を示した。ラットの血液はヒトに比べてかなり不安定であったが、短時間の測定で血液流速での結果が得られた。CLA飼

料摂取ラットの血液ヘモレオロジー値は、普通飼料摂取ラットの血液ヘモレオロジー値の約70%と低値であった。

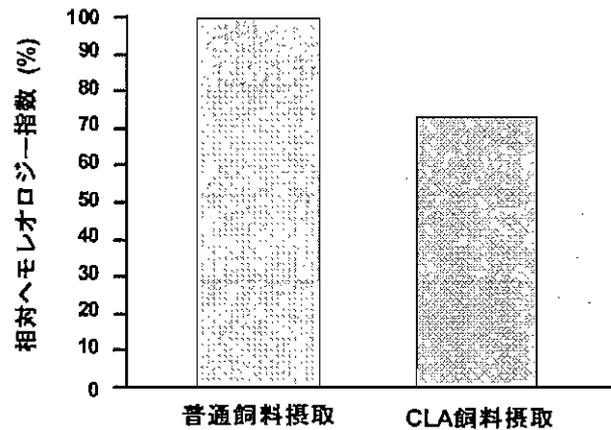


図7 血液ヘモレオロジーに及ぼすCLA摂取の影響

4. 血算

1) 表3、表4、表5、に、摂取したCLAが体内に取り込まれたラットの血算（赤血球数、白血球数、血小板数）に与える影響を調べた結果を示した。

赤血球数は普通飼料でもCLA飼料でも、走運動トレーニング負荷及び非運動でもほとんど変化が見られなかった（表3）。

表3 ラット赤血球数に及ぼすCLA摂取と走運動トレーニングの影響

	普通飼料摂取		CLA 飼料摂取	
	非運動	走運動トレーニング	非運動	走運動トレーニング
赤血球数 ($\times 10^4/\mu l$)	722 \pm 50.3	739.5 \pm 49.5	719.3 \pm 17.9	719.4 \pm 14.0

各ラット群は n = 5。

2) 白血球数については、個体差が大きく、有意差は無かったが、傾向として次のことが示された。普通飼料摂取ラットでは走運動トレーニング負荷で、減少の傾向が見られたのに対し、CLA摂取では、非運動ラットと同じ白血球数で変化が無かった（表4）。

表4 ラット白血球数に及ぼすCLA摂取と走運動トレーニングの影響

	普通飼料摂取		CLA 飼料摂取	
	非運動	走運動トレーニング	非運動	走運動トレーニング
白血球数 (No / μl)	8284 \pm 2642	7250 \pm 2268	7220 \pm 2537	7650 \pm 2271

各ラット群は n = 5。

3) 有意差はないが、表5に示されるように、非運動ラットでは、CLA摂取により血小板濃度が減少の傾向を示した。普通飼料摂取ラットでは走運動トレーニング負荷により減少したが、CLA飼料摂取ラットでは走運動トレーニング負荷による影響は見られなかった。

表5 ラット血小板数に及ぼすCLA摂取と走運動トレーニングの影響

	普通飼料摂取		CLA 飼料摂取	
	非運動	走運動トレーニング	非運動	走運動トレーニング
血小板数 ($\times 10^4 / \mu\text{l}$)	722 \pm 50.3	739.5 \pm 49.5	719.3 \pm 17.9	719.4 \pm 14.0

各ラット群は n = 5。

5. 血中乳酸濃度

図8は血中乳酸濃度に及ぼすCLA飼料摂取と走運動トレーニングの影響を調べた結果である。CLA飼料摂取ラットの血中乳酸濃度は普通飼料ラットのその約75%と低値であった。CLA摂取が非運動及び走運動トレーニング負荷でも血液中の乳酸濃度を減少させた。

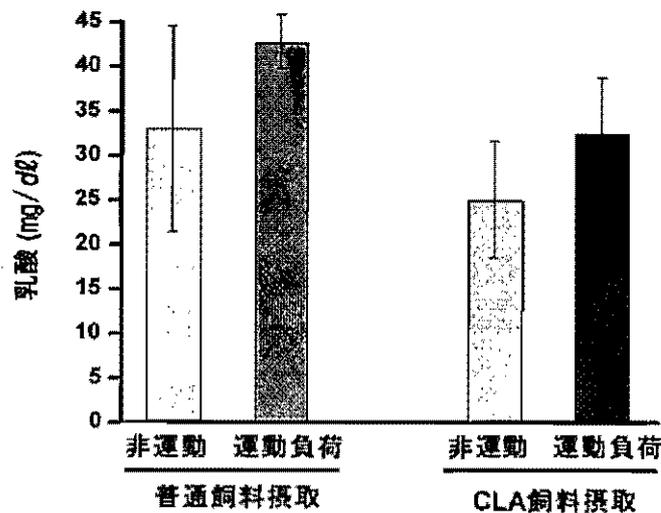


図8 血清乳酸濃度に及ぼすCLA摂取と走運動負荷の影響

6. 筋肉の酸素消費

非運動群でも走運動トレーニング負荷群に於いても、CLA摂取によって血中乳酸レベルが低いことから筋肉のエネルギー生産系への影響が考えられた。図9は単離したひらめ筋と足底筋の筋エネルギー生産能力を反映する筋肉の酸素消費作用（呼吸作用）を調べた結果である。

筋肉の培養時間をそれぞれ、a分とb分、残存酸素量をそれぞれ [O₂] aと [O₂] b、としたとき、酸素の消費係数 (CRA) を次式で表し、それぞれの筋肉のROC値を比較した。

$$\text{CRA} = (\ln [\text{O}_2] a - \ln [\text{O}_2] b) / \text{筋肉g} / (b - a)$$

非運動で普通飼料摂取とCLA飼料摂取ラットのひらめ筋のCRAは-0.050と-0.190、足底筋のそれぞれのCRAは-0.0342と-0.0423と、CLA摂取により脚筋の酸素消費能力が向上した。特に遅筋であるひらめ筋は酸素消費能力が3.8倍も高まった(表6)。

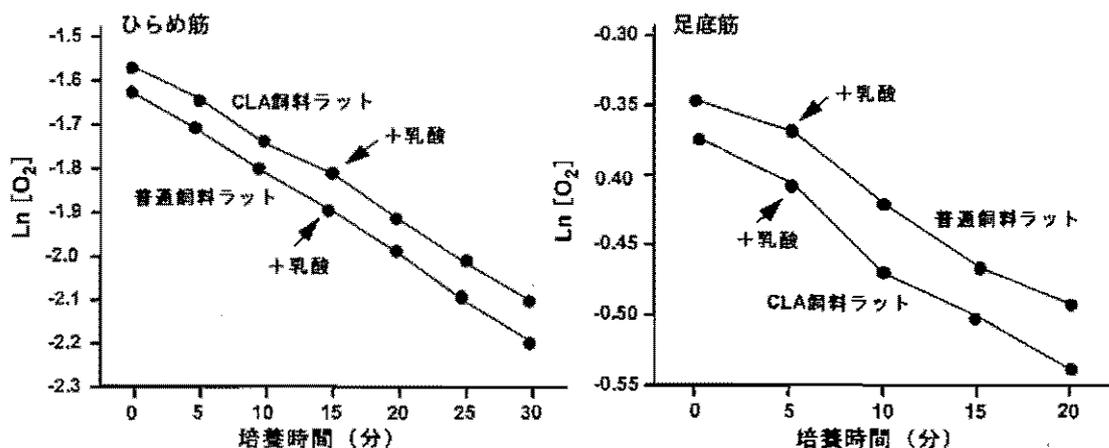


図9 ひらめ筋(遅筋)と足底筋(速筋)の呼吸に及ぼすCLA摂取の影響

表6 CLA摂取ラットのひらめ筋と足底筋の酸素消費係数および乳酸付加による酸素消費係数に及ぼす影響

	普通飼料摂取ラット		CLA飼料摂取ラット	
	ひらめ筋	足底筋	ひらめ筋	足底筋
酸素消費係数 ¹⁾	-0.050	-0.0342	-0.190	-0.0423
乳酸付加後の 酸素消費係数 ²⁾	-0.065	-0.0762	-0.213	-0.0984

1) $(\ln[O_2]_b - \ln[O_2]_a) / \text{筋肉量 g} / \text{培養時間 (分)}$

2) 30 mM 乳酸を付加

また、筋肉が疲労困憊を引き起こす30 mM 乳酸を筋肉培養液に付加したときの酸素消費量を調べた。骨格筋は筋運動を支えると同時に、それによって生じた乳酸をCO₂とH₂Oに酸化する能力を持っている。この能力の程度は筋培養液に乳酸を付加したときの酸素消費量によって判定できる。普通飼料摂取ラットのひらめ筋では乳酸付加前を100とすると乳酸付加後は130となり、足底筋では100に対し223を示した。CLA飼料摂取ラットのひらめ筋では乳酸付加前を100とすると乳酸付加後は112となり、足底筋では100に対して233を示した(表6)。

CLA摂取による、筋肉の乳酸処理能力の向上作用は速筋(足底筋)により強く示された。

表7は走運動トレーニング負荷ラットの脚筋の酸素消費作用を調べた結果を示した。ひらめ筋の酸素消費活性は普通飼料摂取ラットを100とするとCLA飼料摂取ラットのそれは170と活性化した。足底筋の酸素消費活性は普通飼料摂取ラットを100とするとCLA飼料摂取ラットは79と抑制され、ひらめ筋

に対する効果と逆の作用が示された。

30 mM乳酸を筋培養液に付加した状態では、ひらめ筋の酸素消費活性は普通飼料摂取ラットを100とするとCLA飼料摂取ラットのそれは147と活性化した。しかし、足底筋の酸素消費活性は普通飼料摂取ラットを100とするとCLA飼料摂取ラット118ときわめてわずかの活性化が見られた(表7)。CLA摂取の影響は運動トレーニング負荷によってかなり異なることが示された。

表7 走運動トレーニング負荷とCLAを摂取したラットのひらめ筋と足底筋の酸素消費係数および乳酸付加による酸素消費係数に及ぼす影響

	普通飼料摂取ラット		CLA 飼料摂取ラット	
	ひらめ筋	足底筋	ひらめ筋	足底筋
酸素消費係数 ¹⁾	-0.078	-0.075	-0.133	-0.059
乳酸付加 ²⁾ 後の 酸素消費係数	-0.097	-0.115	-0.143	-0.136

1) $(\ln[O_2]_b - \ln[O_2]_a) / \text{筋肉量 g} / \text{培養時間 (分)}$

2) 30 mM 乳酸を付加

7. 血中遊離脂肪酸 (NEFA) 濃度及び血中脂肪 (TG) 濃度とCLA摂取と走運動トレーニング負荷の影響

非運動ラットではCLA摂取により血中NEFA濃度は0.87mg/dlから0.448mg/dlと51%に減少した。運動トレーニング負荷では普通飼料摂取で0.87mg/dlから0.635mg/dlと73%に、CLA摂取群で0.448mg/dlから0.335mg/dlと75%に、それぞれ低下した(表8)。

血中脂肪 (TG) 濃度も同じ様にCLA摂取の影響を受けた。非運動ラットではCLA摂取により血中脂肪濃度は125.9mEq/lから87.4mEq/lと、67%に減少した。運動トレーニング負荷では普通飼料摂取で125.9mEq/lから108.5Eqm/lと86%に、CLA摂取群で87.4 mEq/lから69.5 mEq/lと80%に、それぞれ低下した。血中NEFA濃度や血中TG濃度の増減はほぼ平行していた(表8)。

表8 ラット血中遊離脂肪酸(NEFA)及び血中脂肪(TG)濃度に及ぼすCLA摂取と走運動トレーニングの影響

	普通飼料摂取		CLA 飼料摂取	
	非運動	走運動トレーニング	非運動	走運動トレーニング
NEFA(mEq/l)	0.870 ± 0.159	0.635 ± 0.132	0.448 ± 0.134	0.335 ± 0.066
TG (mg/dl)	125.9 ± 31.6	108.5 ± 26.4	87.4 ± 16.8	69.5 ± 27.1

各ラット群: n = 6

8. 筋肉のLDH活性

i) 図10はひらめ筋のLDH活性に及ぼすCLA摂取と走運動トレーニング負荷の影響を調べた結果である。普通飼料摂取ラットの非運動群のLDH活性は $0.047 \mu\text{mol NADH / mg protein / min}$ で、CLA飼料摂取-非運動群ラットでは $0.030 \mu\text{mol NADH / mg protein / min}$ と低下し、運動トレーニング負荷ラットでは普通飼料で $0.0325 \mu\text{mol NADH / mg protein / min}$ 、CLA飼料摂取で $0.0256 \mu\text{mol NADH / mg protein / min}$ の活性を示した。

この様なCLA摂取によるLDHのアイソザイムの変化を、電気泳動パターンによって調べた(図11)。図に見られる様に、基本的には大きな変化は見られなかったが、走運動トレーニング負荷ラット群は非運動群ラットに比べてLDH Hサブユニットが増加した傾向が見られ、CLA摂取によってその傾向が高まった。

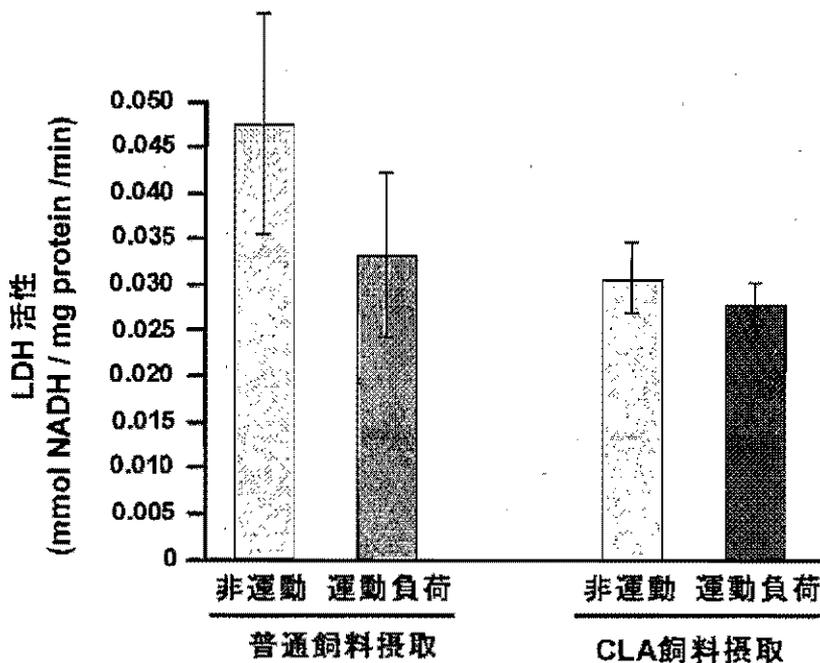


図10 ひらめ筋(遅筋)のLDH活性に及ぼすCLA摂取と走運動負荷の影響

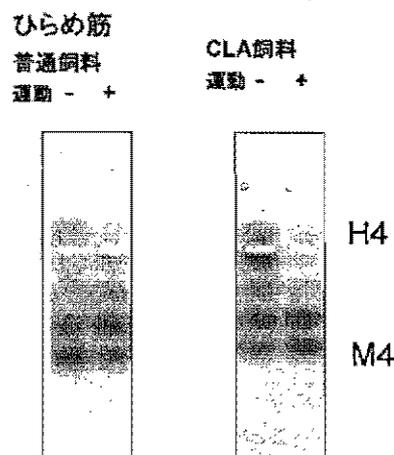


図11 ひらめ筋LDHのアイソザイム・パターンに及ぼすCLA摂取と走運動負荷の影響

ii) 図12は足底筋のLDH活性に及ぼすCLA摂取と走運動トレーニング負荷の影響を調べた結果である。普通飼料摂取ラットの非運動群のLDH活性は $0.083 \mu\text{mol NADH / mg protein / min}$ で、CLA飼料摂取-非運動群ラットでは $0.071 \mu\text{mol NADH / mg protein / min}$ と低下し、運動トレーニング負荷ラットでは普通飼料で $0.072 \mu\text{mol NADH / mg protein / min}$ 、CLA飼料摂取で $0.078 \mu\text{mol NADH / mg protein / min}$ の活性を示した。

この様なCLA摂取によって、LDHのアイソザイムの変化を電気泳動パターンによって、調べた。図13に見られる様に、基本的には大きな変化は見られなかったが、走運動トレーニング負荷ラット群は非運動群ラットに比べてLDH Hサブユニットが増加した傾向が見られ、CLA摂取によってその傾向が高まった。

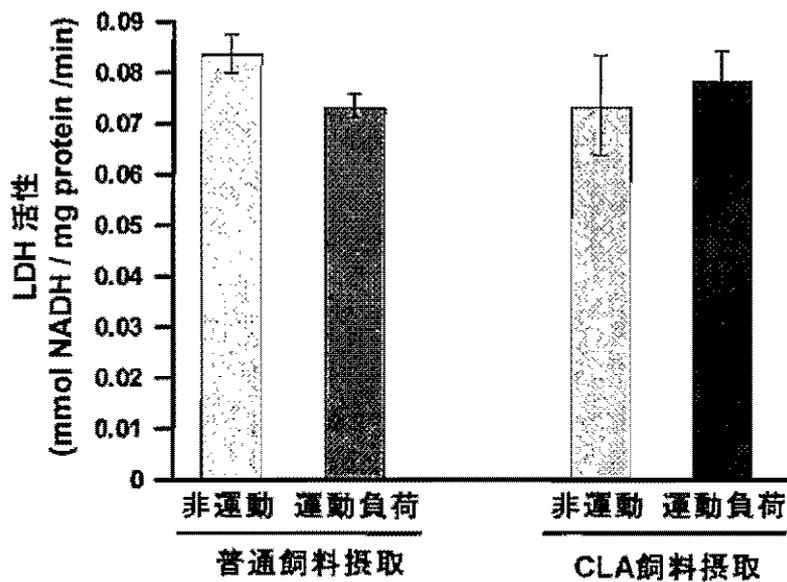


図12 足底筋（速筋）のLDH活性に及ぼすCLA摂取と走運動負荷の影響

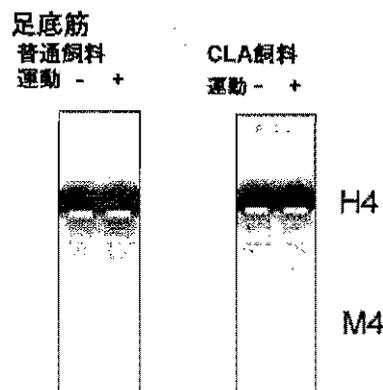


図13 足底筋LDHのアイソザイム・パターンに及ぼすCLA摂取と走運動負荷の影響

9. 肝臓のLDH活性

図14はLDH活性に及ぼすCLA摂取と走運動トレーニング負荷の影響を調べた結果である。普通飼料

摂取ラットの非運動群のLDH活性は $0.116 \mu\text{mol NADH} / \text{mg protein} / \text{min}$ で、CLA飼料摂取—非運動群ラットでは $0.082 \mu\text{mol NADH} / \text{mg protein} / \text{min}$ と低下し、運動トレーニング負荷ラットでは普通飼料で $0.095 \mu\text{mol NADH} / \text{mg protein} / \text{min}$ 、CLA飼料摂取で $0.108 \mu\text{mol NADH} / \text{mg protein} / \text{min}$ の活性を示した。非運動群では、CLA摂取が肝臓のLDH活性に大きな影響を与えた。

この様なCLA摂取によって引き起こされたLDH活性の変化が、LDHアイソザイム・パターンの変化にも反映しているかどうか、LDHのアイソザイムの変化を電気泳動パターンによって調べた(図15)。図に見られる様に、走運動トレーニング負荷ラット群は非運動群ラットと、ほとんど同じであった。

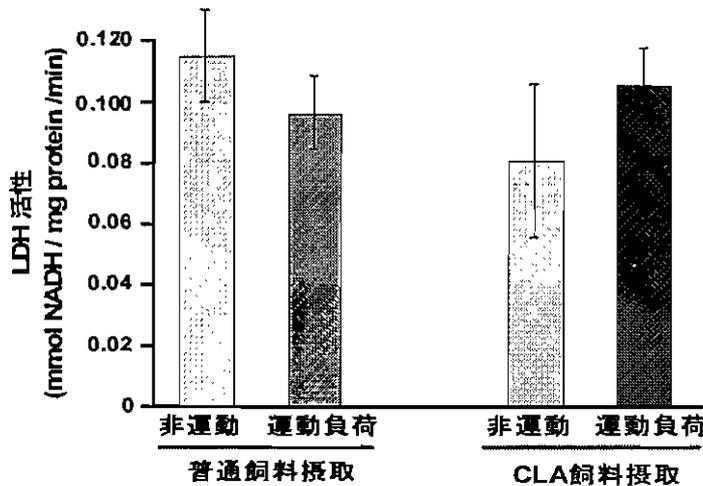


図14 肝LDH活性に及ぼすCLA摂取と走運動負荷の影響

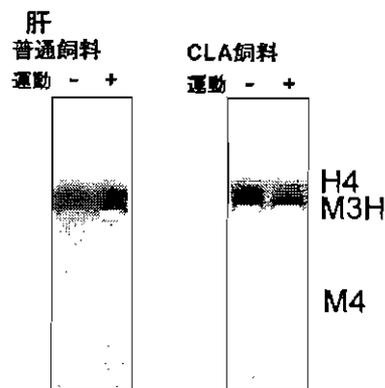


図15 肝LDHのアイソザイム・パターンに及ぼすCLA摂取と走運動負荷の影響

10. 血液ケトン体濃度

図16は血中ケトン体濃度に及ぼすCLA摂取と走運動トレーニング負荷の影響を調べた結果を示した。非運動群ではCLA摂取および非摂取で血液ケトン体濃度(共に $220 \text{ mg} / \text{dl}$ 程度)に殆ど差異は見られなかった。

走運動トレーニング負荷群では、普通飼料摂取とCLA飼料摂取でそれぞれ $235 \text{ mg} / \text{dl}$ 、 $280 \text{ mg} / \text{dl}$ と、CLA摂取の影響が強く示された。

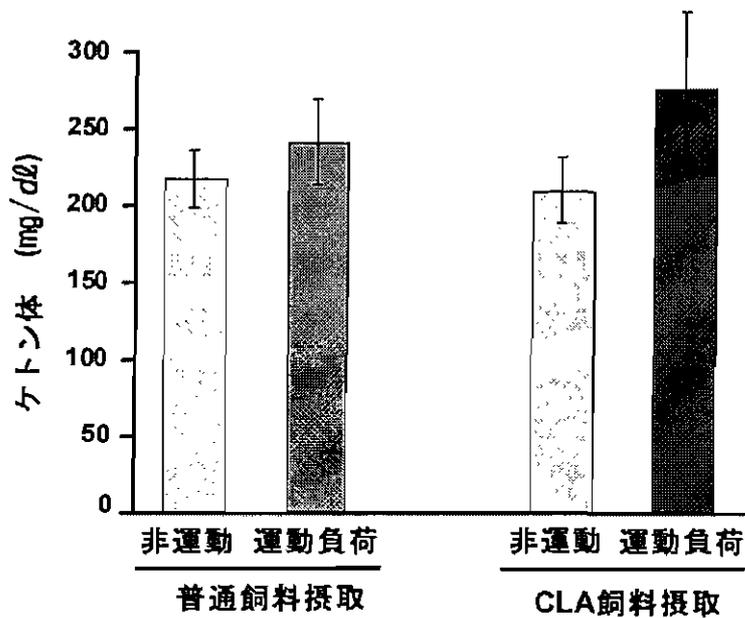


図16 血清ケトン体濃度に及ぼすCLA摂取と走運動負荷の影響

11. 逸脱酵素

筋運動負荷によって主として筋肉から血中に逸脱する二種類の酵素、LDHとクレアチンキナーゼ (CK) につき検討した。

- i) 図17は、血中LDH活性に及ぼすCLA摂取と走運動トレーニング負荷の影響を調べた結果である。普通飼料摂取ラットでは非運動ラット群の血中LDH活性は3700 IU/dlで、走運動トレーニング負荷ラット群は3500 IU/dlと同程度の値を示した。CLA飼料摂取ラットでは、非運動ラット群の血中LDH活性は、2500 IU/dlと低値で、走運動トレーニング負荷ラット群では1500 IU/dlと、著しい低値を示した。

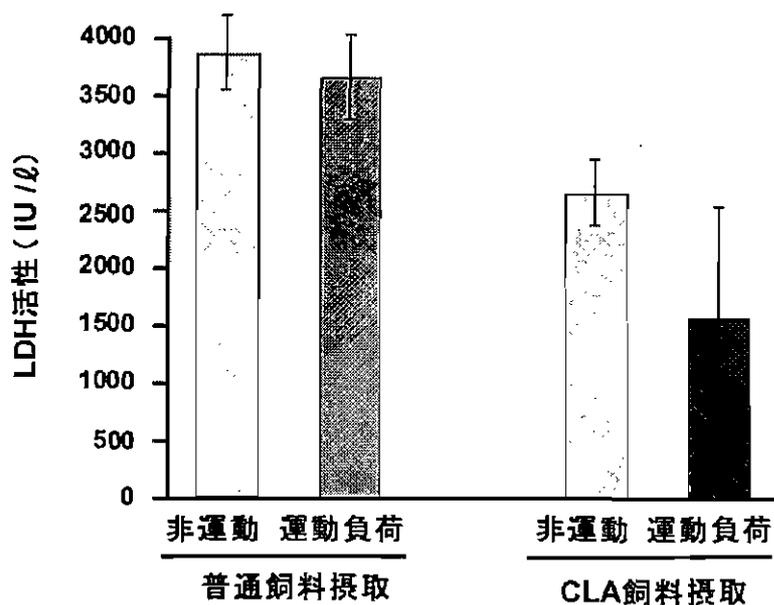


図17 血清LDH濃度に及ぼすCLA摂取と走運動負荷の影響

ii) 図18は、血中CK活性に及ぼすCLA摂取と走運動トレーニング負荷の影響を調べた結果である。普通飼料摂取ラットでは、非運動ラット群の血中CK活性は510 IU/dlで、走運動トレーニング負荷ラット群は880 IU/dlと著しく増加した。CLA飼料摂取ラットでは、非運動ラット群の血中CK活性は210 IU/dl、走運動トレーニング負荷ラット群でも230 IU/dlと、著しい低値を示した。

筋運動を負荷すると血中のCK濃度が高まる。図18に示されている様に、普通飼料摂取群ラットでは、運動トレーニング負荷の影響によってCKの血中濃度が高まっている。しかし、CLA摂取によって、非運動ラットで血中CK濃度は43%に激しく減少し、運動負荷ラットでも著しく低値を示した。運動トレーニング負荷では、普通飼料摂取群では170%に増加したが、CLA摂取群では運動トレーニング負荷で僅か10%の上昇しか見られなかった。

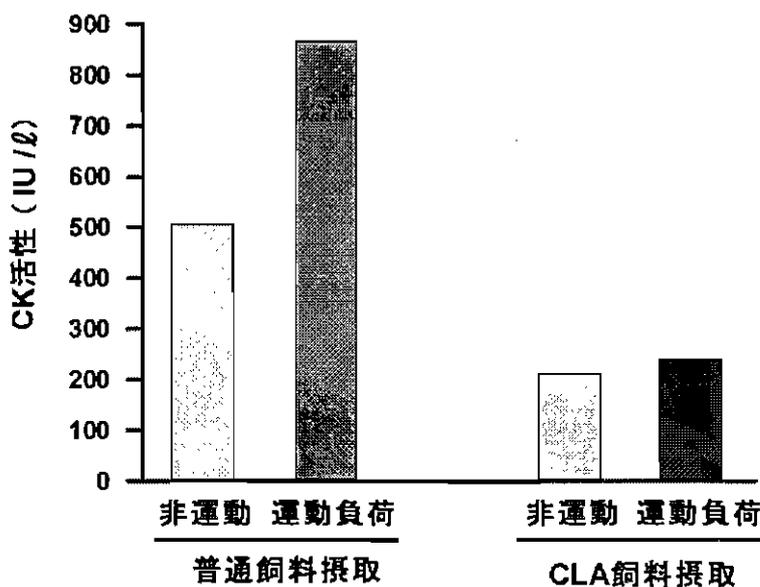


図18 血清クレアチンキナーゼ(CK)濃度におよぼすCLA摂取と走運動負荷の影響

12. 辜丸の乳酸脱水素酵素X (LDH X)

表9および図19は、辜丸のLDH X活性に及ぼすCLA摂取と走運動負荷の影響を調べた結果である。表に示される様に、運動負荷やCLA摂取による影響は殆んど見られなかった。

表9 ラット辜丸のLDH X活性に及ぼすCLA摂取と走運動トレーニング負荷による影響

	普通飼料摂取		CLA 飼料摂取	
	非運動	走運動トレーニング	非運動	走運動トレーニング
LDH X	2.17±0.32	2.21±0.26	2.21±0.35	2.06±0.35

LDH X : mmol NADH /mg protein /min.

各ラット群 : n = 5

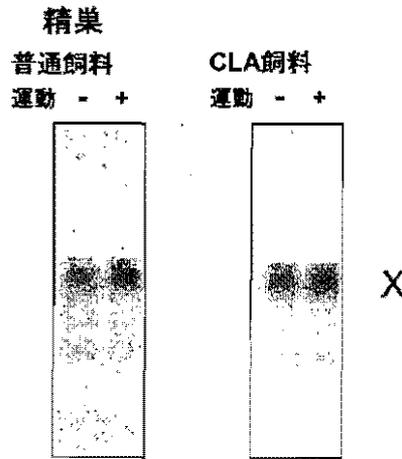


図19 精巢LDH Xのアイソザイム・パターンに及ぼすCLA摂取と走運動トレーニング負荷の影響

以上1～12に示した実験結果は、CLA摂取単独でも、走運動トレーニング負荷単独でもラットの血液ならびに臓器（睪丸を除き）に変化が生じることを明らかにした。CLA摂取は、走運動トレーニング負荷で生じた色々な変化の、あるものは抑制し、又あるものは促進する効果を持つことが示された。

考 察

1. 体重の増加率とCLA摂取

図5に示されるように、普通飼料摂取ラットでは、非運動に比べて走運動時には飼料を約10%程度増量摂取するが、体重の増加率は約20%低下した。一方、CLA摂取ラットについては、非運動ラットは飼料の摂取量も体重の増加率も普通飼料摂取ラット群と殆んど同じであったが、走運動トレーニング・ラット群では摂取する飼料の摂取量は、非ラット群に比べて約10%増加した。しかし、自由意志走行距離については、CLA摂取群では、個体差が大きく、或るラットは普通飼料摂取ラットの走運動量の65%を示したが、他のラットは120%増を示すなど、自発的走行運動量は著しくばらついた。しかし、このばらつきにも拘らず、両ラット群の平均体重増加率は殆んど等しかった。

摂取した食物が精神作用に影響を与えることが示されている^{5, 6)}ので、ここに示された自発的走運動量のばらつきをもたらす作用は、CLAが脳内ホルモンの調節をする可能性を示している。

2. 血中CLA

表1に見られるように、我々が用いたCLA飼料はオリエンタル酵母社のMF飼料で、脂肪含量は5.3%で大豆油が原料である。CLA飼料はサフラン油から調製したCLAを0.053%とMF飼料の脂肪5.247%含むように調製した。摂取したCLAは、図6に見られるように、容易に血中に反映された。MF飼料はCLAを殆んど含まないので、ラットの血中CLAはCLA飼料からのみ由来する。本実験の飼育条件では、血中濃度は平均1.6 mg/dlの定常状態を示し、走運動トレーニング負荷しても平均1.5 mg/dlと殆んど変化が見られなかった。

このことは、運動ラットがエネルギー源として特にCLAを利用するという可能性は少ないと考えられる。

3. 血液ヘモレオロジー

普通飼料摂取ラットー血中にCLAを含まないーの血液ヘモレオロジーを100とするとCLA飼料摂取ラットの血液ヘモレオロジーは約70であった。一般に血液ヘモレオロジーの変化は、主に幾つかの生理学的因子、即ち、具体的には血清の粘性やヘマトクリトや血液細胞の構造的変化に依存することが示されている。^{7, 8)}ここでは、血算のデーターから赤血球数や白血球数や血小板数が殆んど同じであったことから(表3、4、5)、赤血球の硬さや集合体のつくり易さが関係している。

それ故、この両者の血液ヘモレオロジーの違いは、血中のCLAの影響によるものと考えられる。即ち、血液細胞の細胞膜にCLAが取り込まれ細胞膜の柔軟性が増加し、集合体の形成が抑制される結果と考えられる。

4. 血中乳酸濃度とCLA

図8に示される様に、CLA摂取により血中乳酸濃度は低下した。血中乳酸は主として筋肉から由来する⁹⁻¹²⁾。運動トレーニングで発達した筋肉は非運動の筋肉より常時エネルギー消費量が高いので、当然、筋肉でのエネルギー生産能力も発達する。

筋運動を支える一番基本的なエネルギー獲得系は解糖系である。好氣的筋肉では、解糖系ークエン酸サイクルー電子伝達系と共役し、エネルギー源であるグルコースは完全にCO₂とH₂Oに代謝される。筋運動の様に短時間に多量のエネルギー、即ち、ATPを消費する。このATPを補填するための酸素が不足したり、またクエン酸サイクルー電子伝達系が十分発達していない筋肉では嫌氣的な解糖系の作用によって、ATPを補う。このとき、燃えカスとして、乳酸が生産され血液中に放出される(図20)。走運動トレーニング負荷により普通飼料摂取ラットの血中乳酸濃度は高まることについては、運動のエネルギーがグルコースを利用した嫌氣的解糖系に強く依存していることを示している。

一方、走運動トレーニング負荷でもCLA飼料摂取ラットの血中乳酸濃度の高まりが著しく抑制されることに付いては、1) 筋肉のエネルギー生産系のエネルギー源としてグルコースやグリコーゲンを利用しない可能性。2) Cori's cycleが活性化し血中の乳酸を迅速に肝で処理し血中乳酸濃度を低下する可能性。等が示唆される。

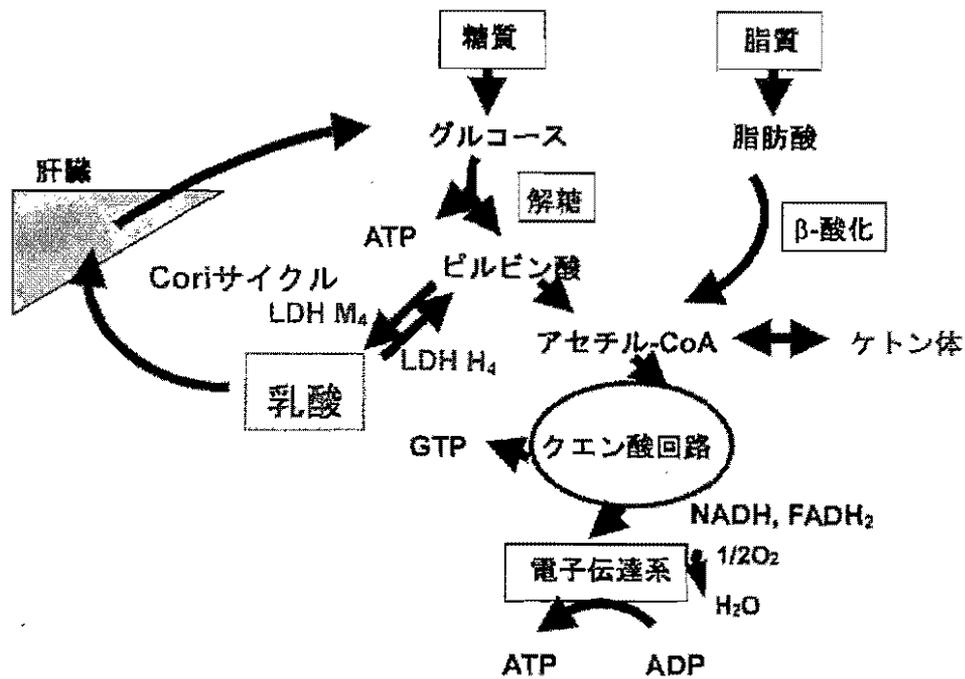


図20 糖・脂質からのATP生産機構

5. 筋肉の呼吸作用とCLA摂取

図9や表6に見られるように、好氣的エネルギー獲得系を持つひらめ筋の酸素消費係数は非運動ラットではCLA飼料摂取によりかなり酸素消費係数が増加、即ち、より酸化能力が強められた。しかし、嫌氣的エネルギー獲得筋である足底筋ではCLA飼料摂取によって酸化能力は殆んど高まらなかった。運動トレーニング・ラットでも、ひらめ筋はCLA摂取によって、より酸化能力が高まり、乳酸処理能力も強まる。しかし、速筋である足底筋はCLA摂取によって嫌氣的に変えたが、乳酸処理能力は強まった。

一般に知られている様に、このような実験事実は、走運動トレーニングが筋肉を有酸素的に変化させることを示しているが、CLA摂取はその作用をさらに促進させることが示された。

6. 筋肉の乳酸脱水素酵素 (LDH) とCLA摂取

ひらめ筋と足底筋ではCLA摂取の影響が異なった。図10に示すように、CLA飼料ラットのひらめ筋のLDH活性はCLA摂取によって著しく低下し、走運動トレーニングによってLDH活性が更に減少した。一方、図12で示される様に、足底筋ではCLA摂取によるLDH活性は普通飼料ラットで12%抑制され、運動トレーニング負荷では、普通飼料ラットと異なり、6%の促進が示された。

上記の実験結果は、元々好氣的選筋としてのひらめ筋は、CLA摂取によってLDH活性が減少し、乳酸生産が抑制され、それ故、筋の疲労も抑制されると考えられる。

しかし、速筋で嫌氣的足底筋ではCLA摂取の影響は極めて僅かであるが、強いて言うならば、CLA摂取で運動トレーニング負荷により瞬発力を支える嫌氣的代謝が活性化する傾向が示された。

7. 血中ケトン体濃度とCLA摂取

血中ケトン体は体組織での主として脂肪酸の β 酸化の活性に依存している。図16に見られるように、普通飼料摂取で運動トレーニング負荷すると血中ケトン体は約11%濃度が高まる。CLA飼料摂取で運動トレーニング負荷すると血中ケトン体は約23%濃度が高まった。CLA摂取が運動トレーニングと協調して血中ケトン体濃度を高めた。このことは脂肪酸の β 酸化がCLA摂取によって著しく活性化することを示唆している（図20）。

8. 肝のLDH活性とCLA摂取

非運動でCLA摂取ラットのLDH活性は普通飼料摂取ラットのLDH活性の約70%に低下した。走運動トレーニング負荷によって肝のLDH活性は普通飼料摂取ラットで17%低下したのに対し、CLA飼料摂取ラットでは逆に30%の上昇が見られた（図14）。肝の主要な役割の一つは血糖生産維持で、LDHの主要な役割は血液中の乳酸を肝に取り込み、グルコースを再生し血糖とすることで、いわゆる“Cori's cycle”の“かなめ”なのである。それ故、肝のLDH活性化や血中乳酸濃度の低下から、明らかに“Cori's cycle”の活性化が認められる（図20）。

9. 睪丸の乳酸脱水素酵素X (LDH X) とCLA摂取

睪丸より分泌されるテストステロンは運動トレーニング負荷と協調して筋肉の収縮性タンパク質の合成を高めることが報告されている¹⁵⁾。テストステロンの分泌量は睪丸の精子形成能力に関係し¹⁶⁾、精子形成にはLDH Xが必須である。LDH Xは生後22日以後成熟ラットにのみ出現し¹⁷⁾、精子形成の段階で確認できる。それ故、睪丸のLDH X活性は精子形成能力を反映するもので、精子形成に必須なテストステロンの生産活性と結びつく。

ラットに3週間のCLA摂取と走運動トレーニングで、LDH X殆んど影響かされるは示されなかった（表9、図19）。CLA摂取は睪丸でのテストステロン生産能力に影響しなかった。

10. 逸脱酵素とCLA摂取

図18に示される様に、CLA摂取により血中CK濃度が著しく減少した。哺乳動物ではCKは筋肉細胞と脳細胞にのみ存在する。本実験の条件下では、脳細胞からの影響とは考え難い。それゆえ、次の可能性が考えられる。1) 運動トレーニング負荷、即ち筋肉の激しい収縮—弛緩によって生ずる物理的作用による筋細胞膜の損傷が原因で、筋細胞内のCKが逸脱したと考えられる。摂取されたCLAは、血液へ、さらに筋細胞膜に取り込まれ、膜に柔軟性をあたえ、膜からCKの逸脱を抑制する可能性が示唆される。2) CLAは強いantioxidant作用を持つことが報告されている¹⁷⁾。体内で生じたoxidantは運動負荷で著しく増加するが、CLAはその活性化酸素を中和解毒し筋細胞膜の主成分であるリン脂質の過酸化脂質への酸化を抑える作用があることから膜の変性を抑圧し、CKの逸脱を抑制する可能性が示唆される。

図6で見られるように、CLA摂取で運動トレーニング負荷しても、血中CLA濃度は僅か7%程度の減少なので、主に、1)の可能性が強く、2)の作用の寄与は小さいと思われる。

11. CLA 摂取と走運動トレーニング負荷が運動機能の向上に期待される効果

① 筋肉が疲労し難くなる。

筋運動のエネルギーは、その供給の経路の略図(図20)に見られるように、解糖系-TCAサイクル-電子伝達系-酸素、及び脂肪酸-β酸化経路-TCAサイクル-電子伝達系-酸素を通じて得られる。筋収縮は短時間に多量のATPを消費する。一方、筋細胞を含むすべての細胞は、ヒトで常に約5mM ATP, ラットで約8mM ATPを保たないと細胞死を招く。このATPの必要量を満たすために、上記の代謝系で、運動時の迅速なATPの補充に酸素を利用しない嫌氣的解糖系でのATP生産が加わるので、乳酸が生産される。

運動による筋肉の疲労には二種類ある。即ちスプリント型疲労とマラソン型疲労がある。前者は最大の筋収縮を伴う走運動で、血管は圧縮され血流は最大30%程度減少するため、組織への酸素の供給も減少する¹³⁾。CLA摂取により血液ヘモレオロジーを低下することは、運動負荷による血流の低迷状態を軽減することにより、酸素の供給が不十分になる傾向を抑制する効果を示すと考えられる。

運動負荷による血中乳酸の増加の原因は筋疲労の結果で、筋中乳酸の増加は筋中のプロトン濃度を高めるため、1)筋収縮性タンパク質相互の親和性が軽減され、2)筋小胞体に結合しているCa²⁺の親和性が強まり、筋収縮のon-offを調節する筋小胞体からのCa²⁺の放出が弱まる。¹⁴⁾ 3)解糖系を構成している酵素群はそれぞれの基質との親和性が半減するため、解糖系でのATP合成量も半減する。乳酸の上述3点の作用等により運動能力が著しく低下する。

運動能力を著しく弱める筋肉での乳酸生産および乳酸の蓄積に対し、速筋である足底筋には影響は少ないが、CLA摂取により、遅筋であるひらめ筋の乳酸を生産を支える酵素LDHが減少し、それは運動トレーニング負荷によりさらに減少した(図10、12)。それにより乳酸生産が抑制され、運動負荷によって生ずる乳酸による筋肉の急性的機能低下が予防できると考えられる。

② 持久力の向上をもたらす。

CLA摂取と走運動トレーニング負荷が肝のLDH活性を著しく高めた。マラソン型走行では、スプリント型走行とは異なり乳酸の生産は僅かであり、乳酸が主原因であるスプリント型筋疲労は生じない。スプリント型走行では主に筋グリコーゲンがエネルギー源として利用され、筋グリコーゲン量は急速に減少し乳酸が多量に生産される。マラソン型走行ではグリコーゲンは徐々に減少し、筋中のグリコーゲンが枯渇した時、筋疲労が起こる。

CLA摂取は、筋グリコーゲンのローディングを促す作用はないが、CLA摂取と走運動トレーニング負荷によって、脚筋、特にひらめ筋の呼吸作用が著しく活性化する(表7)、即ち運動トレーニング負荷のみでも筋肉は酸化型になるが、加えてCLAを摂取すると、更に、酸化型が強くなり、

同時に血中ケトン体濃度の著しい上昇（図16）が伴った。この実験事実から、筋運動のエネルギー源として脂肪酸がより多量に利用されるような筋肉に、変化したことを示した。

運動のエネルギー供給の面から考えると、速筋は元々嫌氣的エネルギー獲得系によって運動が支えられている。CLA摂取はこの速筋に僅かであるが好氣的エネルギー獲得系要素を加える効果が示された。例えば、陸上競技の運動を考えると中距離走のパフォーマンスの向上に効果が期待できる。また、遅筋はより酸化的になり、脂肪酸を運動のエネルギー源として利用できる様な代謝型に変化するので、持久性を強める筋肉をもたらす効果があると考えられる。なお、この効果は筋グリコーゲン・ローディングが伴えば更に強まるであろう。

CLA摂取がもたらすいま一つの大きな効果は、筋肉からの逸脱酵素の抑制である。運動の負荷は筋細胞膜に物理的及び化学的な損傷を与え、それによって、筋細胞内の酵素が血液中に逸脱する。本実験では筋形質に存在するLDHと、筋細胞に特異的な筋原繊維に局在するCKの逸脱が著しく抑えられた（図17）。

運動負荷により筋内部の筋形質よりLDHが、筋原繊維よりCKが逸脱する。LDHは嫌氣的解糖系を支える重要な酵素で、これが逸脱していくと、筋運動を支えるエネルギーの生産が徐々に低下していく。また、CKは機敏で迅速な筋運動を支えるエネルギー源としての役割を持つもので、このCKが逸脱していくと、筋運動は鈍足化し、刺激に対する応答の運動は不完全なものになっていく。

CLA摂取は、運動負荷による筋からの種々酵素の逸脱を抑制する効果により運動時の筋の運動能力をより長時間保つことを可能にする。

参考文献

- 1) : Evans M, Brown J, McIntosh M. "Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid (CLA) on adiposity and lipid metabolism." J Nutr Biochem. 13(9):508.(2002)
- 2) Hill, B.R. and Clifford, Z.E., Electrophoresis of serum components in plastic disease. Cancer Res. vol 14: 513 - 518 (1964)
- 3) 吉田光孝、飯島直子：乳酸脱水素酵素、臨床検査、vol, 15 no. 12, 1221 - 1228 (1971)
- 4) Kamegai, T., Kasai, M., and Ikeda, I. Improved method for preparation of the methyl ester of conjugated linoleic acid. J. Oleo Sci., vol 50, 237 - 241 (2001)
- 5) 山口正弘、亀山恒夫、刈間理介、柴佳保里、神山洋一郎、中里泰三 「牛乳に多量に含まれる短鎖脂肪酸の中樞神経（行動）に及ぼす作用」
平成7 - 9年度牛乳栄養学術研究会委託研究報告書 (I) 169 - 183頁
- 6) 山口正弘、澤木啓介、中里泰三、亀山恒夫、阿部裕、久保田洋一、竹内敏康、文元秀雄、島崎正次、桐野衛二、鈴木聡彦、井上令一「脳機能性食品としての牛乳に特異的に含まれる短鎖脂

脂肪酸 —牛乳に多量に含まれる酪酸の中樞神経系に及ぼす作用—」

平成11年度 牛乳栄養学実研究会委託研究報告書、278 - 292 頁

- 7) Burn, J.F., Circuit, C. and Rosette, A. : Paramwters hemorheologiques et exercice physique. Sport Med. Acta 12, 56-60 (1986)
- 8) Vandewalle, H. Lacombe, C., Lehevere, J.C. and Poirot, C.: Blood viscosity after a-1h submaximal exercise with and without drinking. Int. J. Sport Med. 9, 104-107 (1988)
- 9) Donovan, C.M. and Brooks, G.A.,: Endurance training affects clearance, not lactate production. A m. J. Physiol. 244 (Endocriol. Metab. 7): E82 - 92 (1983)
- 10) Sumida, K. D. and Donovan, C. M. Endurance training fails to inhibit skeletal muscle glucose uptake during exercise. J. Appl. Physiol. 76:1876 - 1881 (1994)
- 11) Hermansen, L. Effect of metabolic changes on force generation in skeletal muscle during maximal exercise. Chiba Found. Symp., 8, 75~88 (1981)
- 12) Sahlin, K. Intercellular pH and energy metabolism in skeletal muscle of man , with special reference to exercise. Acta Physiol. Scand., Suppl.455, 1 - 56 (1978)
- 13) Sahlin, K. Intercellular pH and energy metabolism in skeletal muscle of man, with special reference to exercise. Acta. Physiol. Scand., Suppl. 445, 1 -56 (1978)
- 14) Nakamura, Y. and Schwartz, A. The influence of hydrogen ion concentrations on calcium binding and release by skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. J. Gen. Physiol., 59, 22—32(1972)
- 15) Bagatell, C.J. and Bremner, W.J. :Sperm counts and reproductive hormones in male marathoners and lean controls. Fertility and Sterility, 53, 688- 692 (1990)
- 16) Blanco, A. : On the functional significance of LDH X. Johns Hopkins Med. J., 146, 231 - 235 (1980)
- 17) Hodgen, G.D. and Sherims, R.J.:Enzymes as marker of testicular growth and development in the rat. End. 93, 985 - 989 (1973)