

牛乳タンパク質による廃用性筋萎縮に対する効果に関する研究：

—乳清タンパク質とカゼインの混合比の検討—

名古屋大学大学院 生命農学研究科

応用分子生命科学専攻 栄養生化学研究室

下村 吉治、小寺 佑佳

要 約

骨格筋の萎縮は、筋不活動及び老化などによってもたらされ、現代の高齢社会においては、その予防策を検討することは重要である。タンパク質の摂取は、筋タンパク質維持に重要であるが、摂取タンパク質のアミノ酸組成によりその効果が異なる可能性が考えられる。その例として、牛乳タンパク質を構成するカゼインと乳清タンパク質が挙げられる。カゼインと比較し、乳清タンパク質は消化吸収が速いタンパク質であり、そのアミノ酸組成において、タンパク質合成を促進する分岐鎖アミノ酸をカゼインよりも多く含む。そこで、本研究では、ラット後肢懸垂によって起こる骨格筋の萎縮に対する食餌中の乳清タンパク質とカゼインの比率を変えた食餌の影響を比較検討した。5週齢 Sprague-Dawley 系雄ラットを5日間の予備飼育後、後肢懸垂中の食餌として AIN-93G 中のカゼインを 100%、80%、50%、20% 乳清タンパク質に置き換えた餌を用いた。6日間の後肢懸垂の後ヒラメ筋を採取した。体重、摂食量、ヒラメ筋重量、筋タンパク質濃度を測定した。後肢懸垂によって各群ラットの体重と摂食量に差は見られなかった。また、ヒラメ筋重量は、6日間の後肢懸垂により、約 55% に減少したが、食餌群間で差はなかった。しかし、筋総タンパク質濃度の減少は、有意ではないが乳清タンパク質を多く含む食餌群（特に 80% 乳清タンパク質群）で抑制される傾向にあった。これらの結果より、食餌中の乳清タンパク質を増加した牛乳タンパク質は後肢懸垂による筋萎縮時の筋タンパク質減少に対して抑制的に作用する可能性が示唆された。

キーワード：牛乳タンパク質、乳清タンパク質、カゼイン、後肢懸垂、廃用性筋萎縮、ヒラメ筋、ラット

1. 緒 言

タンパク質を構成するアミノ酸の中で、分岐鎖アミノ酸 (branched-chain amino acids (BCAA) : バリン、ロイシン、イソロイシン) の占める割合は 15%~26% と高く、また、BCAA は生体のタンパク質中にも比較的多く含まれているので、ヒトは多くの BCAA を摂取し、また体内に蓄えている [1-3]。近年、BCAA (特にロイシン) は、遺伝子発現における mRNA 翻訳を刺激してタンパク質合成を促進し、同時にリソゾーム系のタンパク質分解を抑制する作用を持つことが明らか

にされた [4-9]。したがって、BCAA は体づくり（特に骨格筋の形成）に有効であると考えられる。これらの所見より、BCAA はタンパク質合成の主要成分であると同時に、タンパク質代謝を調節する因子として作用するアミノ酸であると言える。

牛乳タンパク質は約 22 %の BCAA を含んでおり、他の動物性および植物性タンパク質（BCAA 含量：15～20 %）と比べるとその含量は高い。一方、牛乳タンパク質の成分は、約 80 %のカゼインと残り約 20 %の乳清タンパク質から成っているが、カゼインと乳清タンパク質の BCAA 含量は、それぞれ 20 %と 26 %であり、乳清タンパク質の BCAA 含量はかなり高い [3]。さらに、乳清タンパク質は、カゼインに比べて消化吸収されやすいので、その摂取後約 1 時間の早さで血中ロイシン濃度がピークに達することも分かっている [10,11]。この事実は、乳清タンパク質とカゼインの筋タンパク質代謝に及ぼす影響が異なることを示唆している。

骨格筋は、ヒトの体の中で最も多い組織であるため、その減少は、代謝への影響が大きく、Quality of life (QOL) の低下を招く可能性がある。骨格筋の減少は、糖尿病や癌などの疾病、神経損傷、加齢、飢餓、そして不活動によって誘発される [12]。その中でも、長期間不活動状態にあると筋萎縮（廃用性筋萎縮）を起こすことが知られている。その例としては、骨折時のギプス固定、長期臥床、宇宙旅行などの状態が挙げられ、これらの状態が続くと、筋線維が細くなり骨格筋は萎縮する [13-17]。骨格筋の中でも、下肢の代表的遅筋であるヒラメ筋は、重力に抗した姿勢保持・制御に関わり、歩行などで持続的に活動する抗重力筋であるため、筋不活動の影響を大きく受ける。筋萎縮は、タンパク質の合成と分解の均衡が崩れるために起こり [18-21]、ヒラメ筋では、そのタンパク質合成は 50 %以下になり、その分解は 150 %以上となる [16,22]。

BCAA は、上述のように筋肉づくりを促進するので、廃用性筋萎縮を抑制し、また萎縮筋の回復を促進する可能性が考えられる。このことから、廃用性筋萎縮や萎縮筋の回復時には、牛乳タンパク質は優れたタンパク質であり、特に乳清タンパク質についてはその効果が期待される。

昨年度（平成 19 年度）の申請者らの研究では、ラット後肢懸垂によって起こる骨格筋の萎縮に対する食餌中の乳清タンパク質とカゼインの影響を比較した [23]。5 週齢 Sprague-Dawley 系雄ラットを 5 日間の予備飼育後、後肢懸垂中の食餌により、カゼイン群と乳清タンパク質群に分けた。また、後肢懸垂しない通常飼育のラットを後肢懸垂の対照として、同様にカゼイン群と乳清タンパク質群に分け、合計 4 群とした。17 %タンパク質食を用いた実験 1 では、カゼイン食と乳清タンパク質食ともに食餌中タンパク質含量をアメリカ栄養学会より推奨されている AIN-93G [24] と同様の 17.08 %とした。カゼイン食として AIN-93G を用い、乳清タンパク質食として AIN-93G 中のカゼインを乳清タンパク質に置き換えた餌を用いた。30 %タンパク質食を用いた実験 2 では、食餌中タンパク質含量を、カゼイン食と乳清タンパク質食ともに 30%とした。両実験とも、6 日間の後肢懸垂後、ペントバルビタール麻酔下で屠殺し、ヒラメ筋を採取した。体重、摂食量、ヒラメ筋重量、筋タンパク質含量、総 RNA 含量を測定した。両実験ともに、体重、ラット当たりの摂食量に差は見られなかった。また、ヒラメ筋重量は、6 日間の後肢懸垂により、約 55%に減少

したが、食餌群間では差はなかった。しかし、実験1では、後肢懸垂による総タンパク質含量の減少は、カゼイン食群と比較して、乳清タンパク質食群で抑制される傾向が認められた。実験2では、筋総タンパク質含量の減少は、実験1とは対照的に、カゼイン食群でのみ有意に抑制された。これらの結果より、後肢懸垂による筋タンパク質の減少に対する食餌タンパク質の乳清タンパク質とカゼインの効果では、食餌タンパク質含量が比較的少ない条件（約17%）では乳清タンパク質が有効に働き、食餌タンパク質が過剰（30%）になるとカゼインがむしろ有効に作用することが示唆された。

牛乳タンパク質は、乳清タンパク質とカゼインの両者を含んでいるので、先にも述べたようにタンパク質合成に有利に作用している可能性が考えられるが、一般的な牛乳タンパク質に含まれるそれらの比率（乳清タンパク質：カゼイン＝2：8）が、タンパク質摂取量が多くない条件で有効に作用しているかどうかは明らかでない。そこで、平成20年度の研究では、食餌タンパク質を約17%の条件で、乳清タンパク質とカゼインの比率を変化させた食餌をラットに摂取させ、廃用性筋萎縮による筋タンパク質減少に対する食餌タンパク質の効果を検討した。

2. 実験方法

ラットを実験動物として用いる本実験プロトコールは、名古屋工業大学動物実験安全部会委員会において承認され、その後実験を実施した。

【試薬および飼料】

ペントバルビタールナトリウム（ナカライテスク株式会社、京都）、EDTA・2Na（同仁化学研究所、熊本）、Protein Assay Reagent（Bio-Rad、CA、USA）、SV Total RNA Isolation System（Promega、WI、USA）、レビスインスリンキット（株式会社シバヤギ、群馬）、その他の試薬は、和光純薬工業株式会社（大阪）の製品を用いた。

実験に用いた AIN-93G および調製飼料は、すべて日本クレア株式会社（東京）から購入した。

【実験動物および適応期間の飼育方法】

実験動物として、5週齢、体重約110gのSprague-Dawley系雄ラット（日本SLC株式会社、静岡）を用いた。ラットを個別ケージに入れ、室温22±1℃、12時間ごとの明暗サイクル（明期：8時～20時）において飼育した。ラットの食餌は AIN-93G を用い、食餌および水を自由摂取の条件で、5日間飼育し、環境に適応させた。ラットを入荷した日を1日目として、4日目と5日目に、全ラットに後肢懸垂を1時間行い、本実験での後肢懸垂に慣れさせた。体重測定は、毎朝10時30分に行った。

【後肢懸垂の方法】

鎖の付いたカーテンレールをケージ内の上面に取り付けたラット後肢懸垂用ケージを開発し、実験に用いた。可動式カーテンレールを用いる事で、ラットが自由にケージ内を移動できるようにした。ラットにペントバルビタールナトリウム（50 mg/kg 体重）を腹腔内投与し、麻酔下で尾

の根元にテーピングで金具を固定した（図1）。ラットが覚醒してから、ケージの天井から垂らした鎖に金具をかけ、ラットの後肢が床に着かないように懸垂させ、模擬微少重力状態とした（図2）。



図1. 尾部に固定した金具



図2. 後肢懸垂の様子

【実験期間の飼育方法】

5日間適応期間の後、ラットを以下の8群に分け、各群 $n=5-6$ とした。群分けは、各群の平均体重が同じになるように調整した。各群の実験食として、すべて17%タンパク質含有食を用いた。

1. CT-100WP （通常飼育、乳清タンパク質100%食） $n=6$
2. CT-80WP （通常飼育、乳清タンパク質80%食） $n=5$
3. CT-50WP （通常飼育、乳清タンパク質50%食） $n=6$
4. CT-20WP （通常飼育、乳清タンパク質20%食） $n=6$
5. HS-100WP （後肢懸垂、乳清タンパク質100%食） $n=6$
6. HS-80WP （後肢懸垂、乳清タンパク質80%食） $n=5$
7. HS-50WP （後肢懸垂、乳清タンパク質50%食） $n=6$
8. HS-20WP （後肢懸垂、乳清タンパク質20%食） $n=5$

後肢懸垂群のラットは、後肢懸垂の状態を6日間保った。後肢懸垂群の対照としてコントロール（通常飼育）群を設けた。コントロール群のラットは、通常飼育を同期間（6日間）続けた。後肢懸垂開始日を実験1日目とし、実験1日目から、CT-100WP群とHS-100WP群にはAIN-93G中に含まれるカゼインをすべて乳清タンパク質に置き換えた飼料を用いた。CT-80WP群とHS-80WP群には、AIN-93G中に含まれるカゼインのうち、80%を乳清タンパク質に置き換えた飼料を用いた。CT-50WP群とHS-50WP群には、AIN-93G中に含まれるカゼインのうち50%を乳清タンパク質に置き換えた飼料、CT-20WP群とHS-20WP群には、AIN-93G中に含まれるカゼインのうち20%を乳清タンパク質に置き換えた飼料を用いた。飼料の組成は表1に示した。これらの食餌を6日間自由摂取させた。実験期間中のコントロール群のラットの体重測定および全ラットの摂食量測定は、毎朝10時30分に行った。

表1 飼料の組成

| 成分 | 乳清タンパク質 100%食 (重量%) | 乳清タンパク質 80%食 (重量%) | 乳清タンパク質 50%食 (重量%) | 乳清タンパク質 20%食 (重量%) |
|------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| コーンスターチ | 44.5236 | 44.1960 | 43.7235 | 43.2510 |
| ミルクカゼイン | 0 | 4 | 10 | 16 |
| 乳清タンパク質 | 18.4250 | 14.7400 | 9.2125 | 3.6850 |
| デキストリン | 10 | 10 | 10 | 10 |
| グラニュー糖 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 精製大豆油 | 7 | 7 | 7 | 7 |
| 結晶セルロース | 5 | 5 | 5 | 5 |
| ミネラル混合 (AIN-93G) | 3.5 | 3.5 | 3.5 | 3.5 |
| ビタミン混合 (AIN-93G) | 1 | 1 | 1 | 1 |
| レシチン | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 |
| 重酒石酸コリン | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 |
| 第3ブチルヒドロキノン | 0.0014 | 0.0014 | 0.0014 | 0.0014 |
| 合計 | 100 | 100 | 100 | 100 |

使用したカゼインのタンパク質含有量は85.4%、乳清タンパク質では92.7%であった。

[血液および組織サンプルの採取方法]

実験7日目の朝8時に食餌を除去し、11時にペントバルビタールナトリウム (60 mg/kg 体重) 麻酔下で、血液、ヒラメ筋、腓腹筋+足底筋を採取し、屠殺した。後肢懸垂群のラットは、後肢懸垂状態で麻酔した。血液は、下大静脈より約3mM採取し、直ちに50µlの200mM EDTA-2Na (pH7.5)を加えた後、3000gで10分間遠心分離し、血漿を調製した。ヒラメ筋と腓腹筋+足底筋は、採取後直ちに液体窒素で凍結し、重量を測定した。すべてのサンプルは分析まで-80℃で保存した。

[筋タンパク質濃度の測定]

(1) 筋タンパク質の抽出に用いた Buffer の組成

Buffer A : 10 mM Tris-Cl (pH 6.8), 250 mM sucrose, 100 mM KCl, 5 mM EDTA

Buffer B : 10 mM Tris-Cl (pH 6.8), 175 mM KCl, 2 mM EDTA,
0.5% (w/v) Triton X-100

Buffer C : 10 mM Tris-Cl (pH 7.0), 150 mM KCl

Buffer D : 10 mM Tris-Cl (pH 7.4), 100 mM KCl, 1 mM EDTA

(2) 筋タンパク質の抽出

採取したヒラメ筋を、液体窒素で冷却したステレンス製乳鉢と乳棒を用いて粉末にした。粉末にした筋肉約15mgに25倍量のBuffer Aを加え、ポリトロンホモジナイザーを用いて60秒間ホモジナイズした。そこから、30µl採取し、同量のBuffer Aを加え、総タンパク質測定に用

いた。総タンパク質測定用のサンプルを除いた残りのサンプル溶液を4℃、1,000 gで10分間遠心分離した。遠心分離した後の上清を可溶性タンパク質とした。得られた沈殿に25倍量のBuffer Bを加え、vortex mixerを用いて懸濁した。懸濁した後、4℃、10,000 gで10分間遠心分離し、遠心分離した後の上清を除去した。同様の操作を、再度25倍量のBuffer Bを加えて行った。続いて、沈殿に20倍量のBuffer Cを加え、vortex mixerを用いて懸濁した。懸濁した後、4℃、10,000 gで10分間遠心分離し、遠心分離した後の上清を除去した。沈殿に40倍量のBuffer Dを加え、vortex mixerを用いて懸濁し、筋原線維タンパク質とした。希釈した総タンパク質、得られた可溶性タンパク質、筋原線維タンパク質に同量の1.5 M NaOHを加え希釈し、タンパク質測定用のサンプルとした。

(3) タンパク質濃度測定

タンパク質濃度の測定は、Bradford法 [25] に従ったBio-Rad Protein Assayを用いて行い、反応液中の595 nmの吸収を分光光度計により測定した。標準タンパク質として、2 mg/mlの免疫グロブリンG (IgG: immunoglobulin G) を用いた。

[筋RNA量の測定]

総RNA量は、SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI) を用いて測定した。

[血漿インスリン分析]

血漿中のインスリン濃度は、レビスインスリンキットを用いて測定した。

[統計処理]

統計処理は、Tukey-Kramer testを用いて検定した。p<0.05を有意とした。以上の統計解析にはStat View5.0 (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA, USA) を用いた。数値はすべて平均±標準誤差 (SE) で示した。

3. 結果

[体重]

実験期間中の体重変化の結果を表2に示した。

後肢懸垂ラットの体重は、コントロールラットに比べて、有意ではないが低値傾向を示した。乳清タンパク質100%食群では、後肢懸垂による体重への有意な影響は認められなかった。この結果は、昨年度の研究と同様の傾向であった。

表2 屠殺時のラット体重

| 群 | 体重 (g) | 群 | 体重 (g) |
|--------|---------|--------|---------|
| CT-100 | 186 ± 5 | HS-100 | 173 ± 6 |
| CT-80 | 193 ± 6 | HS-80 | 177 ± 6 |
| CT-50 | 192 ± 4 | HS-50 | 181 ± 3 |
| CT-20 | 196 ± 6 | HS-20 | 183 ± 6 |

[摂食量]

6日間の実験期間中の摂食量を表3に示した。

後肢懸垂期間のラット総摂食量と100g体重あたりの総摂食量では、8群間で差は認められなかった。

表3 摂食量

| 群 | 総摂食量 (g) | 摂食量 (g/100 g BW) |
|--------|----------|------------------|
| CT-100 | 106±4 | 57±1.0 |
| CT-80 | 105±6 | 54±1.3 |
| CT-50 | 103±3 | 54±0.6 |
| CT-20 | 105±4 | 54±0.7 |
| HS-100 | 96±2 | 55±0.8 |
| HS-80 | 94±5 | 54±1.7 |
| HS-50 | 96±3 | 53±0.9 |
| HS-20 | 100±3 | 55±0.6 |

[筋重量]

ヒラメ筋重量と、コントロールラットの筋重量を100とした時の後肢懸垂ラットの筋重量の割合を、それぞれ図3Aと3Bに示した。ヒラメ筋重量は、すべての食餌群において後肢懸垂により有意に減少し、コントロールラットの約55%になった。その重量は、コントロールラットと後肢懸垂ラットのいずれでも食餌による影響を受けなかったが、乳清タンパク質80%食群でわずかに高い傾向にあった。これは、コントロールラットを100としたときの後肢懸垂ラットのヒラメ筋重量の割合でも同様の傾向を示した(図3B)。

腓腹筋+足底筋重量と、コントロールラットの筋重量を100とした時の後肢懸垂ラットの筋重量の割合を、それぞれ図4Aと4Bに示した。腓腹筋+足底筋重量は、すべての食事群で後肢懸垂により約15%であるが有意に低下した。その重量は食餌による影響を受けなかった。

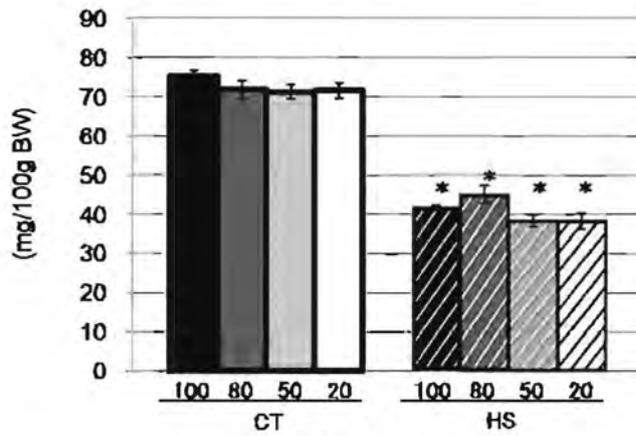


図3A ヒラメ筋重量
(* P<0.05 vs. CT)

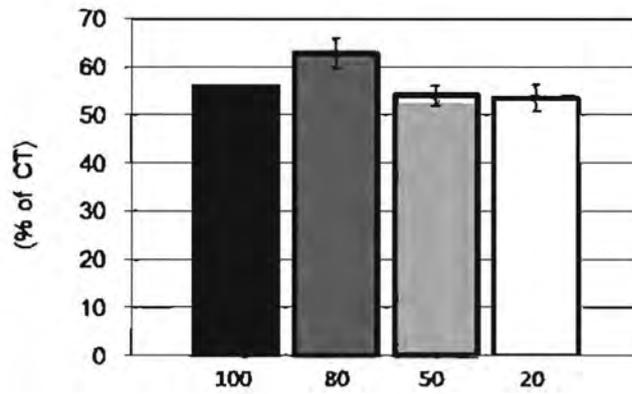


図3B ヒラメ筋重量の比率
(CTを100とした時のHSの割合)

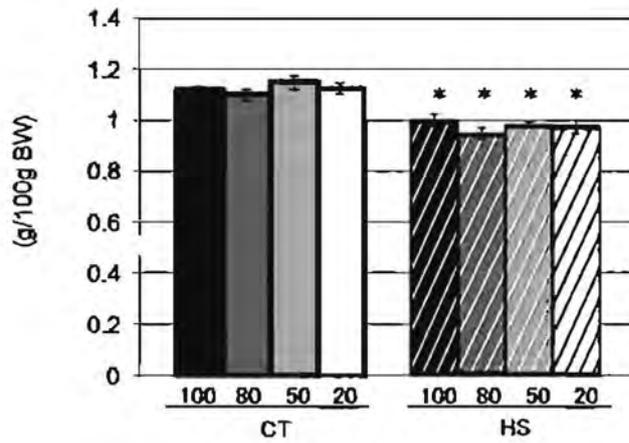


図4A 腓腹筋+足底筋重量
(* P<0.05 vs. CT)

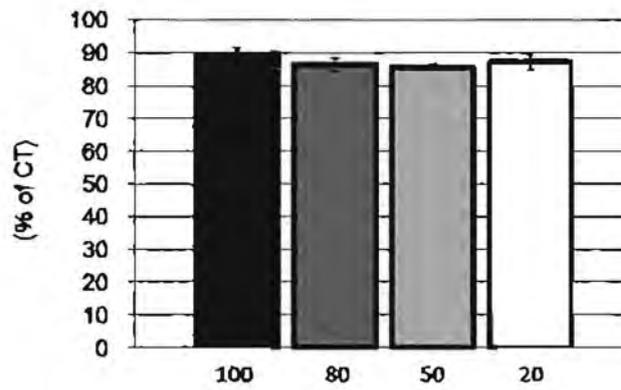


図4B 腓腹筋+足底筋重量の比率
(CTを100とした時のHSの割合)

[ヒラメ筋タンパク質含量]

可溶性タンパク質量、筋原線維タンパク質量、総タンパク質量の分析結果から、組織 1g 当たりのタンパク質量（濃度）を算出し、その結果を図 5 (A-C) に示した。さらに、コントロールラットを 100 とした時の後肢懸垂ラットの割合の分析結果を図 6 (A-C) に示した。

ヒラメ筋全組織中のタンパク質量を体重 100 g 当たりで補正して示したタンパク質量の分析結果を図 7 (A-C) に示した。さらに、コントロールラットを 100 とした時の後肢懸垂ラットの割合の分析結果を図 8 (A-C) に示した。

(1) ヒラメ筋タンパク質濃度（図 5 (A-C)、図 6 (A-C))

コントロールラットでは、可溶性タンパク質濃度、筋原線維タンパク質濃度、総タンパク質濃度のいずれも、食餌による有意な影響を受けなかった。しかし、可溶性タンパク質濃度と総タンパク質濃度で、わずかに乳清タンパク質 80 %食群が高い傾向を示した。

後肢懸垂によって、可溶性タンパク質濃度の減少は認められなかった。後肢懸垂ラットにおいては、食餌による有意な影響はなかったが、コントロールラットと同様に乳清タンパク質 80 %食群は、わずかながら高い傾向にあった。

筋原線維タンパク質濃度は、後肢懸垂によって有意な減少を示した。しかし、後肢懸垂ラットの筋原線維タンパク質濃度では食餌間で有意な差はなかった。

ヒラメ筋の総タンパク質濃度は、乳清タンパク質 100 %食群で、後肢懸垂による減少が抑制される傾向がみられた。

コントロールラットに対する比率で後肢懸垂ラットのヒラメ筋タンパク質濃度を示した場合には、可溶性、筋原線維、および総タンパク質濃度のいずれも、食餌による影響は認められなかった。

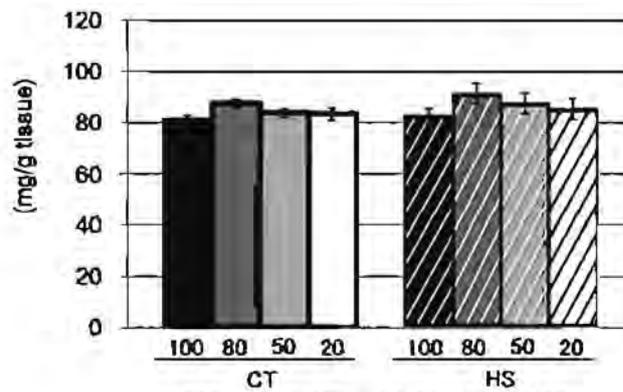


図5A ヒラメ筋solubleタンパク質濃度

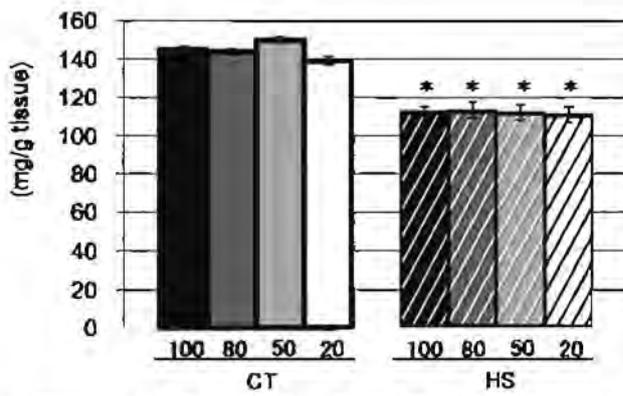


図5B ヒラメ筋myofibrilタンパク質濃度 (* P<0.05 vs. CT)

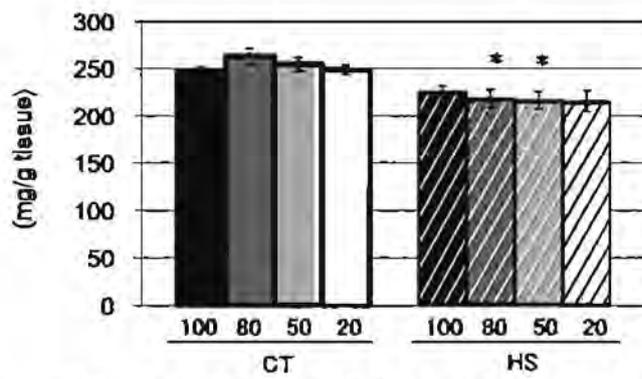


図5C ヒラメ筋総タンパク質濃度 (* P<0.05 vs. CT)

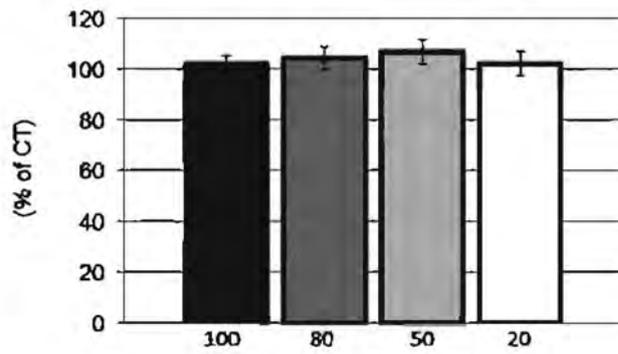


図6A ヒラメ筋solubleタンパク質濃度の比率
(CTを100とした時のHSの割合)

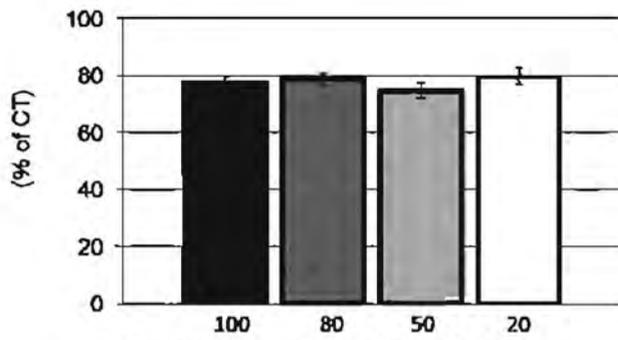


図6B ヒラメ筋myofibrilタンパク質濃度の比率
(CTを100とした時のHSの割合)

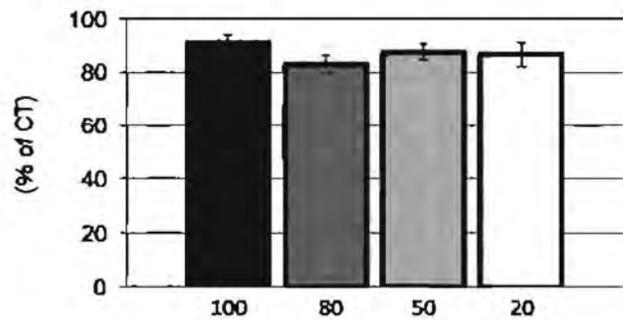


図6C ヒラメ筋総タンパク質濃度の比率
(CTを100とした時のHSの割合)

(2) ヒラメ筋タンパク質量（ヒラメ筋全組織中のタンパク質量を体重 100 g 当たりで補正して示したタンパク質量）（図 7 (A-C)、図 8 (A-C)）

コントロールラットのヒラメ筋タンパク質量は、可溶性タンパク質量、筋原線維タンパク質量、および総タンパク質量のいずれにおいても、食餌による有意な影響を受けなかった。しかし、タンパク質濃度の結果と同様に、可溶性タンパク質量と総タンパク質量で、わずかに乳清タンパク質 80 %食群が高い傾向を示した。

後肢懸垂ラットのヒラメ筋の各タンパク質量は、食餌間で有意な差はなかったが、すべてにおいて乳清タンパク質 80 %食群がわずかに高い傾向にあった。

後肢懸垂ラットのヒラメ筋タンパク質量をコントロールラットのその比率で表すと、可溶性タンパク質量、筋原線維タンパク質量、および総タンパク質量のいずれでも、食餌による有意な影響はなかったが、総タンパク質量において、乳清タンパク質 100 %食群と 80 %食群でわずかに高い傾向にあった。

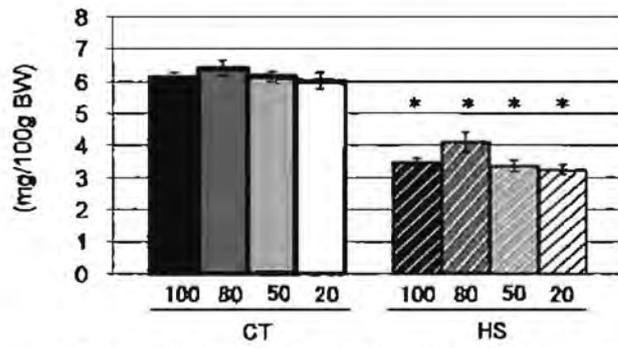


図7A ヒラメ筋solubleタンパク質量 (* P<0.05 vs. CT)

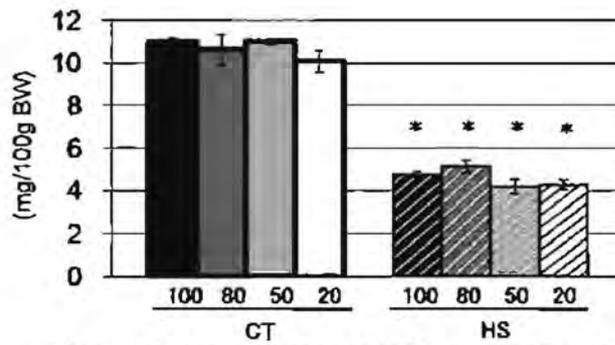


図7B ヒラメ筋myofibrilタンパク質量 (* P<0.05 vs. CT)

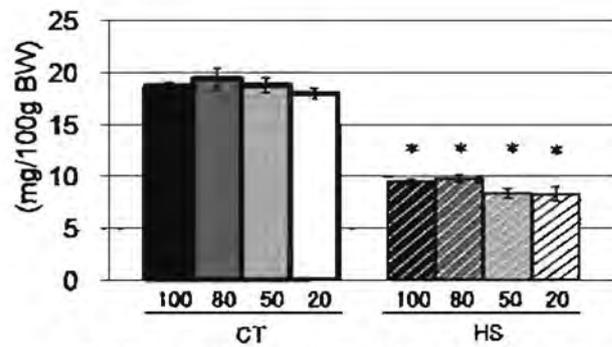


図7C ヒラメ筋総タンパク質量 (* P<0.05 vs. CT)

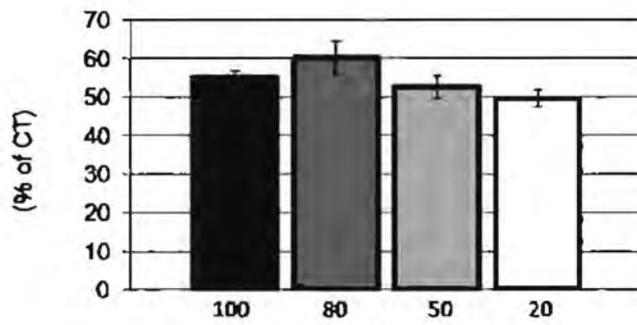


図8A ヒラメ筋solubleタンパク質量の比率
(CTを100とした時のHSの割合)

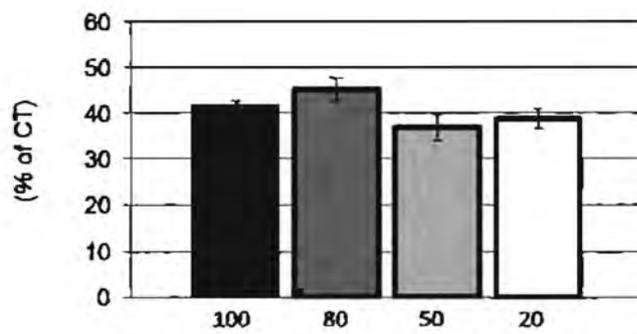


図8B ヒラメ筋myofibrilタンパク質量の比率
(CTを100とした時のHSの割合)

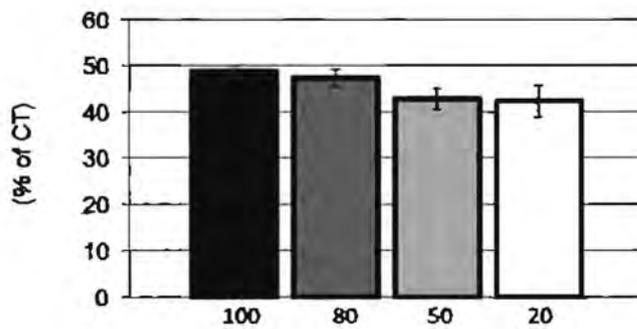


図8C ヒラメ筋総タンパク質量の比率
(CTを100とした時のHSの割合)

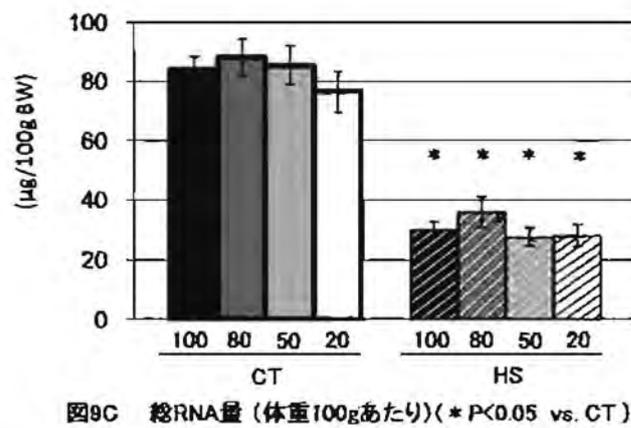
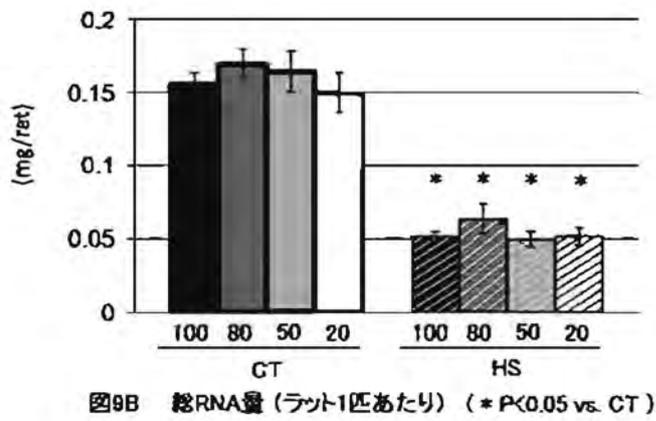
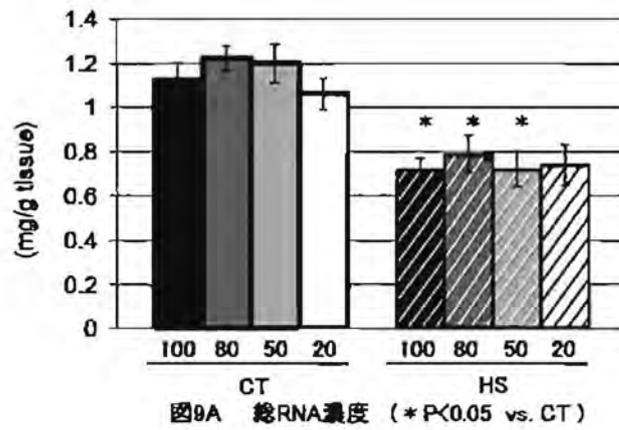
[ヒラメ筋総 RNA 含量]

ヒラメ筋の総 RNA 含量は、組織 1g 当たりの総 RNA 量（濃度）、ヒラメ筋全組織当たりの総 RNA 量、およびヒラメ筋全組織当たりの総 RNA 量を 100g 体重当たりで補正した総 RNA 量を算出し、図 9 (A-C) に示した。さらに、それぞれの総 RNA 量を、コントロールラットを 100 とした時の後肢懸垂ラットの割合を算出した結果を図 10 (A-C) に示した。

コントロールラットのヒラメ筋総 RNA 濃度は、食餌による有意な影響を受けなかったが、乳清タンパク質 80 % 食群が最も高い傾向にあった。総 RNA 濃度は、後肢懸垂によりすべての食餌群ともに有意に減少した。後肢懸垂ラットにおける食餌の影響はなかったが、これにおいても有意ではないが乳清タンパク質 80 % 食群が最も高い傾向にあった。

ヒラメ筋全組織当たりの総 RNA 量、およびその総 RNA 量を 100g 体重当たりで補正した総 RNA 量も同様の傾向を示した。

後肢懸垂ラットの総 RNA 濃度および総 RNA 量をコントロールラットのその比率で表した結果では、食餌群間で違いはなかった。



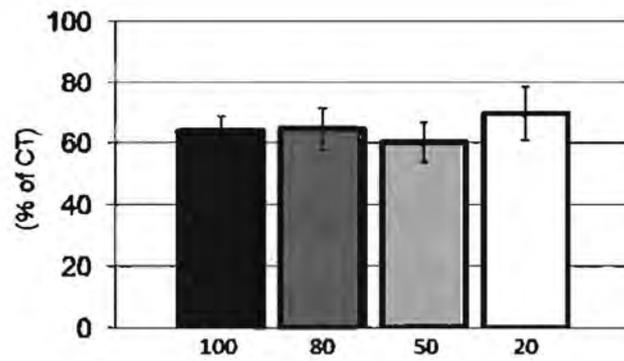


図10A 総RNA濃度の比率
(CTを100とした時のHSの割合)

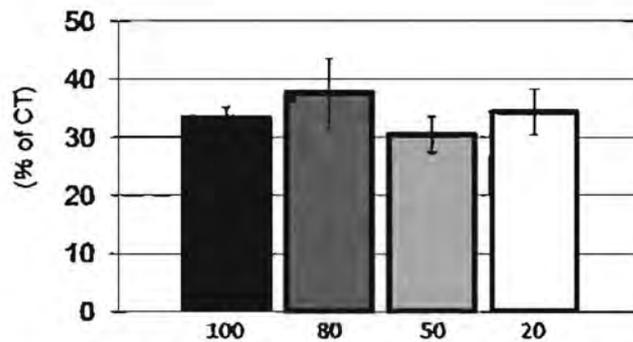


図10B 総RNA量(ラット1匹あたり)の比率
(CTを100とした時のHSの割合)

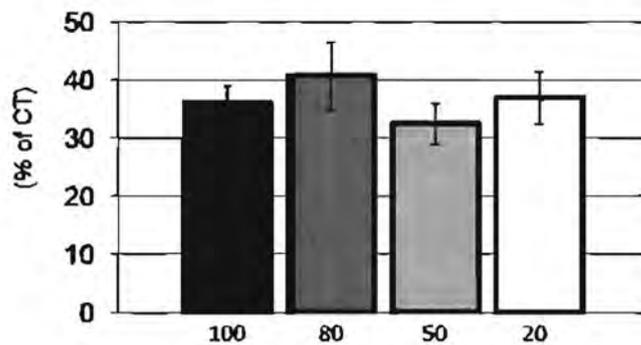


図10C 総RNA量(体重100gあたり)の比率
(CTを100とした時のHSの割合)

[血漿インスリン濃度]

血漿中のインスリン濃度を表3に示した。

インスリン濃度は、後肢懸垂と食餌による、どちらの影響も受けなかった。

表3 血漿インスリン濃度

| 群 | インスリン濃度 (ng/mL) | 群 | インスリン濃度 (ng/mL) |
|--------|--------------------|--------|--------------------|
| CT-100 | 2.6±0.2 | HS-100 | 2.1±0.3 |
| CT-80 | 2.1±0.4 | HS-80 | 2.0±0.4 |
| CT-50 | 1.7±0.2 | HS-50 | 1.5±0.2 |
| CT-20 | 1.8±0.3 | HS-20 | 2.0±0.1 |

4. 考 察

牛乳タンパク質を構成するカゼインと乳清タンパク質を比較すると、前者は全タンパク質の80%を占め牛乳中に多く含まれるが、後者はカゼインに比べて消化吸収が速く [10, 11]、体タンパク質合成を促進するアミノ酸であるBCAAを多く含む特徴を持つ [3]。そのため、乳清タンパク質は骨格筋の不活動等による萎縮および筋タンパク質の損失を抑制する可能性が考えられる。そこで本研究では、ラットの一般的な飼料（タンパク質含量約17%）中のタンパク質を、カゼインと乳清タンパク質の比率を変化させて調製した飼料を用い、ラットの後肢懸垂による廃用性筋萎縮とそれに伴うタンパク質の損失に対する食餌の影響を検討した。

摂食量は、8群間で差がなかったのにも関わらず、体重は、食餌中に含まれる乳清タンパク質が増えるほど、減少する傾向が見られた。これは、昨年の研究結果と同様の傾向であった。血中のロイシン濃度の上昇は、エネルギー代謝を上昇する可能性も指摘されているので [26]、摂食後の血中BCAA濃度を素早く上昇させる乳清タンパク質の性質が、この原因の一つと推察される。

後肢懸垂ラットの体重100g当たりのヒラメ筋重量では、食餌群間で有意な差はなかったが、乳清タンパク質：カゼインが8：2の食餌群と乳清タンパク質のみの食餌群で若干の減少抑制が確認された。また、ヒラメ筋の総タンパク質量では、乳清タンパク質100%食群において、わずかに減少が抑制された。これらの結果より、乳清タンパク質摂取により、筋萎縮時の筋タンパク質の減少を抑制する可能性が示唆された。また、可溶性タンパク質濃度や体重100gあたりで補正したタンパク質量においても、乳清タンパク質：カゼインが8：2の食餌群でわずかながら筋タンパク質量の減少を抑制する傾向にあった。これらは、総RNA量でも同様の傾向を示した。

カゼインと乳清タンパク質の両方を摂取する場合、その割合は、牛乳中に含まれるこれらの割合（乳清タンパク質：カゼイン＝2：8）や乳清タンパク質単独よりも、乳清タンパク質とカゼインの割合が8：2である方が廃用性筋萎縮の筋タンパク質の減少に効果をもたらす可能性が考えられる。なぜならば、乳清タンパク質を多く含むことによって、アミノ酸を速く消化吸収してタンパク質合成を刺激し、さらにカゼインを一部含むことにより持続的にアミノ酸の供給を行うこと

ができるかと推察される。本研究では、明確な結論を得ることができる結果は得られなかったが、これらの2つのタンパク質の性質が相乗効果をもたらした可能性が考えられる。また、乳清タンパク質には体重（体脂肪）増加を抑えることも確認されたことから [27,28]、現在市販されている牛乳と比較し、乳清タンパク質を多く含む乳製品は、体重増加や廃用性筋萎縮の抑制に効果的かもしれない。

現在では、メタボリックシンドロームと深く関係する体重増加を抑制できる食品の開発、および老化や不活動等により誘発されるサルコペニアおよび廃用性筋萎縮を予防する食品の開発が期待されている。本研究の所見は、乳清タンパク質がこれらの食品開発の材料となる食品素材である可能性を示唆するものである。

5. 文 献

- [1] Harper AE, Miller RH, Block KP. Branched-chain amino acid metabolism. *Annu Rev Nutr.* 1984; 4: 409-54.
- [2] Shimomura Y, Honda T, Shiraki M, Murakami T, Sato J, Kobayashi H, Mawatari K, Obayashi M, Harris RA. Branched-chain amino acid catabolism in exercise and liver disease. *J Nutr.* 2006; 136 (1 Suppl): 250S-3S.
- [3] Layman DK, Baum JJ. Dietary protein impact on glycemic control during weight loss. *J Nutr.* 2004; 134 (4): 968S-73S. Review.
- [4] Anthony JC, Yoshizawa F, Anthony TG, Vary TC, Jefferson LS, Kimball SR. Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. *J Nutr.* 2000; 130 (10): 2413-2419.
- [5] Anthony JC, Anthony TG, Kimball SR, Jefferson LS. Signaling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. *J Nutr.* 2001; 131 (3): 856S-860S. Review.
- [6] Kimball SR, Jefferson LS. Regulation of global and specific mRNA translation by oral administration of branched-chain amino acids. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 313 (2): 423-427. Review.
- [7] Kimball SR, Jefferson LS. Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis. *J Nutr.* 2006; 136 (1 Suppl): 227S-231S. Review.
- [8] Crozier SJ, Kimball SR, Emmert SW, Anthony JC, Jefferson LS. Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle. *J Nutr.* 2005; 135 (3): 376-382.
- [9] Kanazawa T, Taneike I, Akaishi R, Yoshizawa F, Furuya N, Fujimura S, Kadowaki M. Amino acids and insulin control autophagic proteolysis through different signaling pathways in relation to mTOR in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem.* 2004; 279 (9): 8452-8459.
- [10] Boirie Y, Dangin M, Gachon P, Vasson MP, Maubois JL, Beaufrere B. Slow and fast dietary

- proteins differently modulate postprandial protein accretion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 ; 94 (26) : 14930-14935.
- [11] Dangin M, Boirie Y, Garcia-Rodenas C, Gachon P, Fauquant J, Callier P, Ballevre O, Beaufrere B. The digestion rate of protein is an independent regulating factor of postprandial protein retention. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001 ; 280 (2) : E340-E348.
- [12] Bajotto G, Shimomura Y. Determinants of disuse-induced skeletal muscle atrophy : exercise and nutrition countermeasures to prevent protein loss. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2006 ; 52 (4) : 233-247. Review.
- [13] Jasper SR, Tischler ME. Atrophy and growth failure of rat hindlimb muscles in tail-cast suspension. *J Appl Physiol.* 1984 ; 57 (5) : 1472-1479.
- [14] Witzmann FA, Kim DH, Fitts RH. Hindlimb immobilization : length-tension and contractile properties of skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 1982 ; 53 (2) : 335-345
- [15] Thomason DB, Herrick RE, Surdyka D, Baldwin KM. Time course of soleus muscle myosin expression during hindlimb suspension and recovery. *J Appl Physiol.* 1987 ; 63 (1) : 130-137.
- [16] Thomason DB, Biggs RB, Booth FW. Protein metabolism and beta-myosin heavy-chain mRNA in unweighted soleus muscle. *Am J Physiol.* 1989 ; 257 (2 Pt 2) : R300-R305.
- [17] Riley DA, Bain JL, Thompson JL, Fitts RH, Widrick JJ, Trappe SW, Trappe TA, Costill DL. Decreased thin filament density and length in human atrophic soleus muscle fibers after spaceflight. *J Appl Physiol.* 2000 ; 88 (2) : 567-572.
- [18] Sitnick M, Foley AM, Brown M, Spangenburg EE. Ovariectomy prevents the recovery of atrophied gastrocnemius skeletal muscle mass. *J Appl Physiol.* 2006 ; 100 (1) : 286-293.
- [19] Kasper CE, White TP, Maxwell LC. Running during recovery from hindlimb suspension induces transient muscle injury. *J Appl Physiol.* 1990 ; 68 (2) : 533-539.
- [20] Childs TE, Spangenburg EE, Vyas DR, Booth FW. Temporal alterations in protein signaling cascades during recovery from muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003; 285 (2): C391-C398.
- [21] Jackman RW, Kandarian SC. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004 ; 287 (4) : C834-C843. Review.
- [22] Riley DA, Slocum GR, Bain JL, Sedlak FR, Sowa TE, Mellender JW. Rat hindlimb unloading: soleus histochemistry, ultrastructure, and electromyography. *J Appl Physiol.* 1990; 69 (1): 58-66.
- [23] 下村吉治, 平成 19 年度牛乳栄養学術研究会委託研究報告書, 2008 ; pp. 17-36.
- [24] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents : final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993 ; 123 : 1939-1951.
- [25] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein

utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 ; 72 : 248-254.

- [26] She P, Reid TM, Bronson SK, Vary TC, Hajnal A, Lynch CJ, Hutson SM. Disruption of BCATm in mice leads to increased energy expenditure associated with the activation of a futile protein turnover cycle. *Cell Metab.* 2007 ; 6 (3) : 181-194 .
- [27] Siddiqui SM, Chang E, Li J, Burlage C, Zou M, Buhman KK, Koser S, Donkin SS, Teegarden D. Dietary intervention with vitamin D, calcium, and whey protein reduced fat mass and increased lean mass in rats. *Nutr Res.* 2008 ; 28 (11) : 783-790.
- [28] Royle PJ, McIntosh GH, Clifton PM. Whey protein isolate and glycomacropeptide decrease weight gain and alter body composition in male Wistar rats. *Br J Nutr.* 2008 ; 100 (1) : 88-93.