

運動性筋損傷の早期回復に及ぼすミルクタンパク摂取の影響

愛知教育大学教育学部創造科学系：春日 規克、石道 峰典
幸篤 武、鈴木 英樹
中京女子大学健康科学部：伊藤 正江、西沢 富江

要 旨

本研究では、ミルクタンパク摂取の有無による運動性筋損傷と修復への影響を筋核、サテライトセルの筋形成制御因子から調べた。

実験は、Fischer344系ラットの長指伸筋とヒラメ筋を用いた。ラットは生後5週齢に通常食(対照)群とミルクタンパク食群に分けた。対照群の食餌飼料中の粗タンパク質24.2%は、脱脂大豆、トウモロコシ、きな粉、魚肉、コーングルテンミールで構成された。また、ミルクタンパク食群の粗タンパク質24.2%の内、10%がカゼイン、10%がホエイ、残り4.2%は対照群のタンパク組成で構成された。

損傷モデルは、小動物用トレッドミルを用いた下り走による伸張性収縮とした。対照群、ミルクタンパク食群ともに生後8週齢の時点で3日間のトレッドミル下り走(初期速度15m/min、最終速度28m/min、時間120分間、傾斜角度-16度)を行った。下り走後は前と同様にそれぞれの群に通常食またはミルクタンパク食を与え、回復実験まで飼育した。下り走最終日より、1、3、5、7日間の回復期間において、収縮機能、組織切片HE染色による損傷量の変化、免疫組織染色法による筋核・サテライトセルの様相、mRNAの定量分析を行った。

対照群に対してトレッドミル下り走後を調べた結果、最大強縮張力は下り走3日後に20%減少し、7日後にはほぼ回復した。この下り走3日後の筋横断像(H&E染色、免疫染色)には、筋損傷を示す細胞の膨潤やマクロファージの浸潤が観られたが、対照群とミルクタンパク食群間に顕著な違いは認められなかった。一方、下り走後1日目から7日目に至るまでに、損傷筋において筋核及びサテライトセルに筋形成制御因子であるMyoD及びmyogeninの発現が検出され、検出量は対照群に比べミルクタンパク食群により多く観察された。また、RT-PCR法を用いたMyoDとmyogeninへの転写因子mRNA発現量の測定結果においても、対照群に比べミルクタンパク食群のMyoD、myogenin発現が高まっていた。さらに、対照群に比べミルクタンパク食群に下り走1日後から7日後におけるKi67陽性反応を示すサテライトセル数が多く観察された。

ラットを用いた下り走により、下肢骨格筋に対して筋損傷を起し、その損傷程度と回復過程に対するミルクタンパク食の摂取の影響を検討した結果、ミルクタンパクの継続的な摂食が損傷量を抑える効果は観られなかった。しかし、再生期において筋核及びサテライトセルに筋形成制御因子をより多く発現し、またサテライトセルの増殖反応を強める傾向が見られたことから、ミルクタンパク食の摂取が筋修復に有効に働く可能性が示唆された。

1. 緒言

骨格筋は、運動器系組織として身体運動の発現に働き、また産熱器官としてや水分の貯蔵庫としても重要な組織である。骨格筋は可塑性・適応性に優れた組織であり、骨格筋の代謝特性や収縮特性は、スポーツ活動やトレーニングによりダイナミックに変化することはよく知られている。ところが、スポーツ活動を発現するための筋収縮は、常に筋線維(細胞)自体に傷害を生じさせる刺激となり、特に

過度の連続した収縮や伸展性筋収縮が筋肉痛を伴う筋損傷を誘発することは古くから知られている⁸⁾。筋(肉)痛は、成人の場合は運動実施の翌日から2日後にピークに達するが²⁶⁾、筋損傷は運動後約2・3日後にピークとなり、著しい筋力低下などの機能障害も見られる¹⁸⁾。運動後において安静を維持した場合には、激しい損傷であっても約10日後には損傷前の状態に回復するが、このような運動実施・トレーニング遂行の妨げとなる筋損傷やそれに先行する筋痛を早期回復するためには、再生機能の主役である筋核のタンパク合成と筋衛星細胞(サテライトセル)の働きが重要になると考える。骨格筋は多核細胞であり、多数の筋核を細長い細胞内に多数保持するが、損傷した部位の筋核はかなりの数の壊死を起こすことが知られている³²⁾。一方、サテライトセルは筋細胞を包む基底膜と形質膜の間に存在する未分化な幹細胞であり²³⁾、筋損傷や運動トレーニングなどによる刺激を受け、自己増殖し新たな筋細胞を形成することも、また既に存在する成熟筋細胞に融合し補修や筋肥大を助長することも知られている^{13, 14, 15)}。このため、損傷を受けた際の活性化サテライトセルの存在が筋の損傷程度や回復速度の指標とされてきている⁶⁾。さらに、損傷からの修復には、神経系・筋系・免疫系・核酸動態など生体すべての機能が関連するが、最近では多くのシグナル伝達系とその相互関係が多く検討され、サテライトセルの活性化に続く増殖・分化機能も注目されてきている¹⁰⁾。サテライトセルの活性化や増殖は、損傷筋細胞やマクロファージ、白血球に由来する増殖因子(LIF, IL-6, IGF等)、細胞外マトリックスから放出される因子(TGF- β , FGFs)、サテライトセル自体から発現する因子(HGF)やその他サイトカインからも制御されている^{37, 38)}。

一方、食事中のタンパクについては、運動にともなう筋肥大の促進などに有効性を持つことは古くから認識されているが、最近ではタンパクの種類別あるいはアミノ酸レベルでエネルギー源としての効率性やタンパク合成あるいは分解抑制に作用する機序なども検討されている^{28, 31, 34)}。しかし、過去の報告においてタンパクやアミノ酸レベルにて、摂取と筋再生過程を調べた研究に関する報告は極めて少ない。タンパクレベルの研究においては、運動後の疲労回復促進や損傷の早期回復に対しては、大豆タンパク摂取の有効性が報告されているのみである²¹⁾。大豆タンパク質の摂取が筋損傷に対する回復効果を助長する理由としては、運動後の早期のタンパク質の摂取により、エネルギー枯渇組織への糖輸送の補助と免疫機構の亢進を引き起こすためと考えられている。一方、ミルクに多く含まれるミルクタンパクにはカゼインとホエイがあり、そのアミノ酸含有量は大豆タンパクより当然高く、アミノ酸組成にて比較した場合にはエネルギー源として利用されやすい分岐鎖アミノ酸を多く含んでいる。また、カゼインは、骨格筋に含まれる筋タンパクの分解を抑制し、ホエイは筋タンパクの合成を促進する可能性が報告されている^{4, 9, 29, 34)}。特に、ミルクタンパクに多く含まれる分岐鎖アミノ酸の摂取が運動によるタンパク質の分解を抑制し、合成を促進すると考えられている。

運動を過度に実施した場合、または強い筋収縮以上の負荷が稼働筋に加わる伸張性収縮をともなう運動が多い場合には、運動後には単に筋細胞の一部のタンパク質の分解にとどまらず、損傷として筋痛を感じ、筋の微細構造であり筋力発揮の単位である筋原線維においても大きな崩壊を誘発する。しかし、運動後には疲労や損傷からの回復のために筋タンパクの代謝(合成/分解)が活性化することから、ミルクタンパクの摂取が運動後の疲労回復促進だけではなく筋損傷の早期回復に有効に働く可能性は十分に期待される。また、損傷により誘発されるサテライトセルの活性化は、それに続く増殖・分化・融合までの変化が非常に短期間に進行するため、再生期の筋組織・細胞環境においては、含有アミノ酸濃度、組成などがサテライトセル動態に影響する可能性が考えられる。

そこで本研究では、ミルクタンパクであるカゼイン及びホエイ摂取により筋損傷の回復が促進され

ると仮説を立て、カゼイン及びホエイ摂取の有無による運動性筋損傷後の筋修復過程とサテライトセルの動態に与える影響を検討した。

II. 実験方法

〈実験動物と飼育法〉

本研究では、Fischer344系雌性ラット(日本クレア)を用いての動物実験として計画し、被験筋を下肢の長指伸筋(EDL)とヒラメ筋(SOL)とした。ラットは生後5週齢の時点で平均体重がほぼ同じになるよう通常食(対照)群とミルクタンパク食群に分け(平均体重70±5g)、実験終了までの飼育期間中は異なる飼料を与えられた。対照群の食餌飼料中の粗タンパク質24.2%の原材料は、脱脂大豆、トウモロコシ、きな粉、魚肉、コーングルテンミールで構成された。また、ミルクタンパク食群の粗タンパク質は同じ24.2%として、ただしその内、10%がカゼイン、10%がホエイ、残り4.2%は脱脂大豆、トウモロコシ、きな粉、魚肉、コーングルテンミールで構成された。飼料のタンパク質以外の栄養成分、エネルギー値は通常食・ミルクタンパク食とも同じとした。飼育に用いた食餌飼料(日本農産工業)の基本的栄養成分を表1に示した。

飼育期間中は、飼育ケージ(W270× L440 ×H187mm)内に数cmの木製床敷チップを敷き、1ケージに2匹ずつ飼育し、食餌また飲水は自由摂取とした。また、飼育室を室温22±1°Cに保ち、昼夜反転の12時間明暗サイクルとした。

また、一連の実験は文部科学省による「研究機関等における動物実験の実施に関する基本指針」、日本学術会議による「動物実験の適正な実施にむけたガイドライン」(2006. 6. 1)、ならびに「愛知教育大学動物実験規程」を遵守して行った。

表 1 飼育飼料の栄養成分とエネルギー値

水分	9.0 %
粗タンパク質	24.2 %
粗脂肪	4.5 %
粗繊維	4.0 %
粗灰分	6.5 %
可溶性窒素	51.9 %
代謝エネルギー	2,773kcal/kg

〈筋損傷の誘発実験〉

損傷モデルは、小動物用トレッドミルを用いた下り走による下肢筋に対する伸張性収縮とした(図1)。下り走による筋の伸張性収縮を繰り返した場合には、筋損傷が発生することはよく知られた事実である。生後5週齢より3週間の通常食で飼育された対照群、

カゼイン及びホエイを多く含む飼料により飼育されたミルクタンパク食群ともに生後8週齢の時点で3日間のトレッドミル下り走を行った。この時の走行の条件は、初期速度15m/min、最終速度28m/minとし、時間120分間、傾斜角度-16度であった。下り走後は前と同様にそれぞれの群には通常食またはミルクタンパク食を与え回復実験まで飼育した。

下り走最終日より、1、3、5、7日間の回復期間において、収縮機能、組織切片HE染色による損傷量の変化、免疫組織染色法による筋核・サテライトセルの様相、mRNAの定量分析を以下の方法により行った。

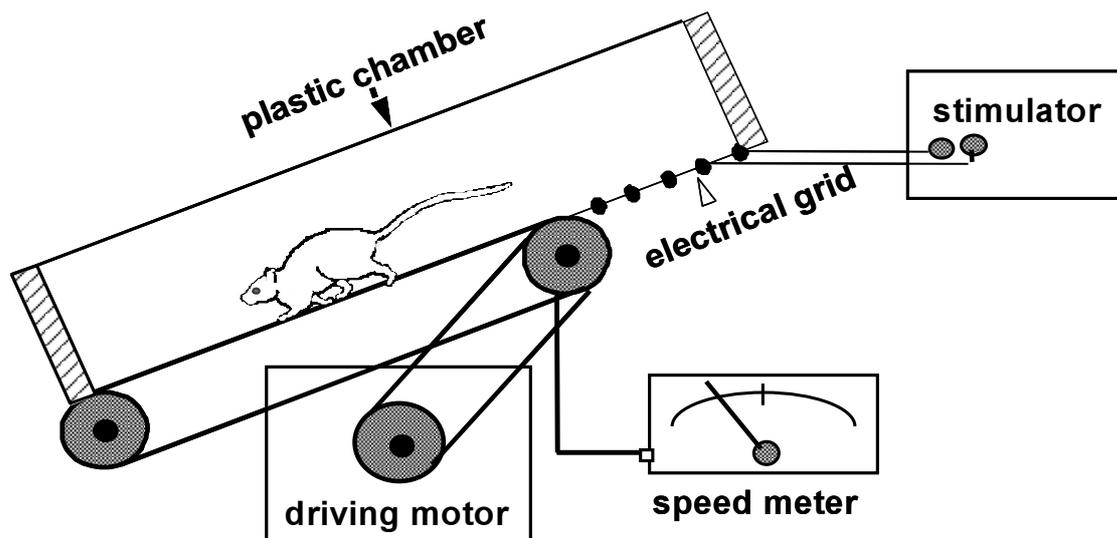


図1 小動物用トレッドミルを利用した下り走による伸張性収縮

<張力測定>

収縮特性の実験は、最初にネブタールによりラットを麻酔下において、出来るだけ出血を防ぎ被験筋(EDL)を露出させ、下腿と共に酸素95%:二酸化炭素5%で飽和させたリンゲルロック液中に浸漬した。リンゲルロック液の温度は $36 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ を保ち、溶液は毎分約20mlの割合で交換した。実験中のラットの血流は維持されたまま、被験筋末梢側の腱を切断し絹糸にて歪み計のフックに接続した。最大単収縮高が得られる筋長を至適長として歪み計を移動セットし、筋への刺激は支配神経からの間接刺激または筋への直接刺激により行い、刺激条件は持続時間が0.1msecの矩形波による極大電気刺激とした。最大強縮張力(頻度5msec, 時間350ms)と単収縮による収縮速度を求めた。

張力測定後は直ちに下肢筋全てを摘出し秤量した後、液体窒素により急速冷凍を行い、免疫染色、生化学測定までは -80°C にて保存した。

<組織染色>

凍結保存した筋(SOL)は、 -24°C のマイクローム内において $10\mu\text{m}$ の筋横断切片を作成し、H&E組織染色を行い、光学顕微鏡撮影された組織像から損傷程度をNIH画像処理にて算出した。

また、連続筋横断切片は、免疫蛍光染色により、膜構造の変化、並びに筋制御遺伝子、サテライトセルの動態を調べた。この際一次抗体としては、基底膜同定のためにrabbit polyclonal anti-Laminin (a marker molecule for the basement membrane; 1:3000; Sigma, St Louis, MO), 形質膜のマーカースとしてmouse monoclonal anti-Dystrophin (a marker molecule of the plasma membrane) (1:100; Sigma)、rabbit polyclonal anti-Dystrophin (1:100; Lab Vision UK, Ltd.)、サテライトセルの同定マーカーとなるmouse monoclonal anti-M cadherin(1:400;BD Bioscience, Am), goat polyclonal anti-M-cadherin (1:200; Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA)、食食ではなくサテライトセルの活性化シグナルに関与するマクロファージmouse monoclonal anti-CD163(ED2) (1:100; AbD serotec)、筋核・サテライトセル核の活性期に働く制御系遺伝子mouse monoclonal anti-MyoD (1:100; DAKO, Carpinteria, CA)、再生のための細胞増殖(細胞周期)の指標となるrabbit polyclonal anti-ki67

(nuclea antigen expressed on all proliferating during late G1, S, M and G2 phases of the cell cycle; 1:300; Vision, Novocastra), 再生時の分化のマーカーとなるmouse monoclonal anti-myogenin (1:100; BD PharMingen, San Diego, CA)、さらに収縮タンパク発現の指標となるmouse monoclonal anti-developmental myosin heavy chain(1:100; Vector Lab. inc., Am)を用いた。

実験手順は、切片を4% paraformaldehyde/ 0.1 M phosphate-buffer (pH 7.4)で15分間固定した後、phosphate-buffer saline (PBS, pH 7.4)で洗浄した。次に、切片は非特異的反応を防ぐために、ブロッキング溶液 (10% normal serum, 1% triton X-100/ 0.1 M PBS) 内にて1時間のインキュベートを行った。続けて一次抗体は、5% normal serumと0.3 % triton X-100を含む0.1 M PBSで適切な濃度に希釈し、4℃にて14から40時間インキュベートした。一次抗体のインキュベート後に切片をPBS洗浄し、ついで16~24時間の二次抗体でのインキュベートを行った。二次抗体は、5% normal serumと0.1% triton X-100を含む0.1 M PBSで適切な濃度に希釈した。二次抗体は、fluorescein-labeled horse anti-mouse IgG (1:300; Vector Labs), rhodamine-labeled goat anti-rabbit IgG (1:300; Chemicon, Temecala, CA) or the Alexa Fluor 568-labeled rabbit anti-goat IgG (1:300; Molecular Probes, Eugene, OR)を使用した。切片を0.1 M PBSで洗浄後、三重蛍光染色のため、また核を可視化するため Vectashield mounting medium with DAPI (Vector Labs)にて封入した。画像分析は全て蛍光顕微鏡 (BX51, Olympus Co., Tokyo, Japan) 及び RS image (Roper Scientific Inc., Chiba, Japan)を用いて行った。

<転写因子mRNA発現量(total RNA抽出とcDNA合成)>

筋の一部はmRNA発現量の測定に当てた。-80℃で保存された筋(各条件とも n=5)を、RNAlater-ICE (Ambion) を用いて解凍し、RT-PCRに用いた。被験筋(筋幅部; 20-30 mg)を、ジルコニアビーズを用いてホモジナイズし、Proteinase Kを加え、55℃で10分間インキュベートした。その後、RNeasy Fibrous Tissue mini kit (QIAGEN)を用いて、total RNAの抽出を行った。抽出されたtotal RNAの収量と純度は、BioPhotometer plus (Eppendorf)により測定された。全てのサンプルにおけるabsorbance ratio (260 nm /280 nm) は1.9以上であった。

cDNAの合成には、QuantiTect Rev. Transcription Kit (QIAGEN) を用い、テンプレートに用いたtotal RNAは1 μ gとした。

リアルタイムRT-PCR

PCRチューブとキャップは、96-well optical-grade PCR plates 及び optical strip caps (Bio-Rad)を用い、サーマルサイクラーには、Opticon™ DNA Engine (MJ Research) を用いた。

分析に使用したプライマー (invitrogen) の配列は以下の通りである。MyoD (5' - CCCGACGGCTCTCTGCTCCTT-3' (sense) and 5' - CGCCTGGGCTGGGTGCA -3' (antisense)), Myogenin (5' - TGCCACAAGCCAGACTACCCACC-3' (sense) and 5' - CGGGGCACTCACTGTCTCTCAA -3' (antisense))。また、内部標準遺伝子として、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH ; QIAGEN, QT00199633) を用いた。

PCR反応液は全量25 μ lとし、組成は以下の通りとした。2x QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix (12.5 μ l , QIAGEN)、プライマー (2.5 ~ 5 μ l)、cDNA (2.5 μ l ; 50 ng) RNase free water (5 ~

7.5 μ l)。PCRサイクルは、95°Cで5分間インキュベートの後、denaturation (95 ° C, 10 s)、annealing and extension (65 ° C, 30 s) を1サイクルとし、合計40サイクル行った。

〈統計処理〉

また、各測定値は群毎に平均値 (Mean) , 標準偏差 (Standard Deviation : S. D.) , 及び標準誤差 (Standard Error : S. E.) を求め、全群間の差を2要因 (経過日数、形態指標) の分散分析 (analysis of variance : ANOVA) にて検定した。それぞれの分散分析では、主効果が有意となった場合の多重比較にScheffe法を用いた。全ての検定において有意水準は5% ($p < 0.05$) とした。

以上の実験により、ミルクタンパクであるカゼイン及びホエイ摂取の有無が再生期の回復程度と回復に働くサテライトセル動態に及ぼす影響を調べた。

III. 結果

本実験では、運動性筋損傷に対するミルクタンパク摂取の影響をラットの下肢・長指伸筋 (EDL) とヒラメ筋 (SOL) から検討した。EDLは足関節背屈筋であり、またそのほとんどが速筋線維 (95%) で構成される速筋として、またSOLは底屈筋であり95%以上が遅筋線維で構成され代表的遅筋として多くの実験で用いられている。また、両筋とも下り走により構成線維に損傷が起こることも知られている。

1). 下り走による伸張性収縮後の体重・筋重量の変化

対照群 (N)、ミルクタンパク群 (M)、両群の下り走前後の体重・筋重量を平均値と標準偏差により表2に示した。

表2 下り走後の体重、筋重量の比較

		days after downhill running				
		Pre control	1	3	5	7
Body weight (g)	N (5)	139.9 ± 5.8	143.2 ± 7.6	143.0 ± 12.3	151.0 ± 6.4	153.3 ± 2.6
	M (5)	144.7 ± 4.6	149.3 ± 8.8	149.0 ± 10.3	148.0 ± 7.3	152.2 ± 5.1
EDL weight (mg)	N (5)	59.3 ± 2.1	56.3 ± 3.5	62.0 ± 3.8	61.8 ± 3.4	65.5 ± 3.8 *
	M (5)	65.0 ± 1.7	61.8 ± 4.7	61.8 ± 5.4	64.8 ± 4.5	64.0 ± 3.9
SOL weight (mg)	N (5)	54.4 ± 1.3	53.9 ± 3.8	53.5 ± 3.3	55.5 ± 5.6	56.8 ± 2.7
	M (5)	55.3 ± 2.3	54.3 ± 4.2	56.6 ± 4.3	54.0 ± 6.4	59.8 ± 3.8 *

(), number, N, normal diet, M, Milk protein diet
 *, Significant difference from the pre control ($p < 0.05$)

体重は、生後8週齢のFischer344系雌性ラットとしては平均的体重であり、飼育飼料による差異は認められなかった。また、3日間の下り走による有意な変化は、両群ともにみられなかった。通常、トレッドミル走行をラットに負荷した場合には、最初に飼育ケージ近くでトレッドミルモーター音をならす、トレッドミル上でベルトを動かさずにラットを飼育するなどといった方法により、運動環境に十

分に慣らした後に低速で短時間のランニング条件からトレーニングを開始する。しかし、本実験では急性の刺激損傷効果と日数で区切った継時的回復変化を調べるため、事前の訓練無しに3日間の下り走を実施した。このため、ラットに対しては筋へのダメージ以外にも強制的運動負荷がストレスとなり、摂餌量の低下とそれともなう体重減少が起こる可能性が懸念された。しかし、下り走後の体重変化は少なく、下り走がそれほど大きなストレスとはならず、下り走後にもそれぞれの飼料を摂っており、摂餌効果を比較する上でも問題がないと思われた。

筋重量においては、下り走前に比べ両群の両筋ともに、下り走1日後で若干の低値が見られたが有意な差ではなかった。また、対照群の下り走7日後のEDLとミルクタンパク群の下り走7日後 SOLにそれぞれの下り走を行う前の値(前置)よりも有意な増大が見られたが、このことはラットの発育期が12週齢程度まで続くことを考えると、再生能ではなく成長ともなう変化が大きいと思われた。その他の項目において、全ての時期間に、また両群間での有意な差は認められなかった。

2) 伸張性収縮後における筋損傷後の最大張力変化

トレッドミル走行による3日間の下り走後における最大張力の変化を図2に示した。この張力測定は対照群の5匹のみとした。血流維持の状態においても、下肢をリングロック液に浸漬し数度の電気刺激を加えた場合、筋細胞間隙における水分量の増加が起こり、筋重量や組織染色像に影響を及ぼす。さらには最大張力発揮などにより筋核内の遺伝子制御系に変化が生じる可能性が高い。このため、通常は張力測定を行った反対側脚筋より形態・染色測定等を行うが、本研究では抗体染色、免疫蛍光染色、また転写因子mRNA発現量と測定が多岐にわたったため、張力測定による機能性の変化は対照群の

下り走による影響を観察するだけにとどまった。

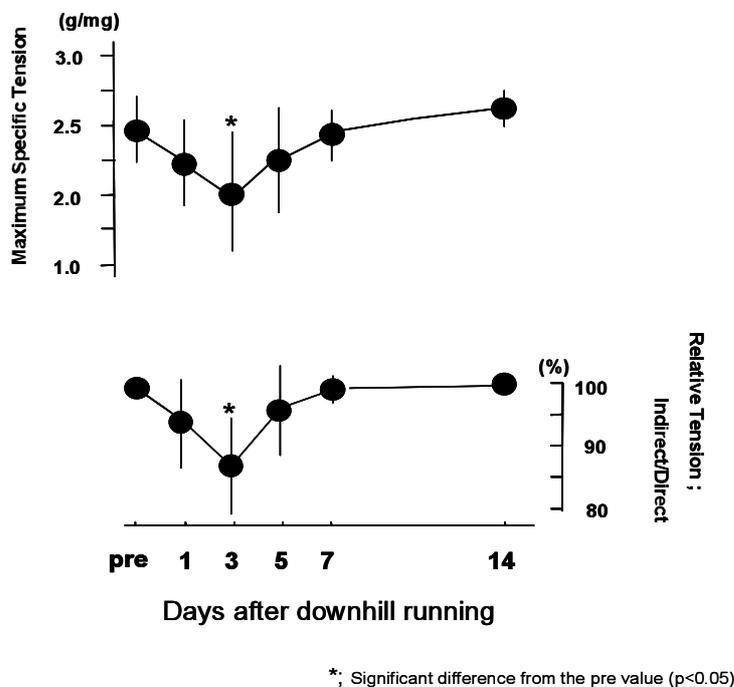


図2 下り走後の最大発揮張力と間接刺激/直接刺激比の変化

り、損傷時の影響が固体間でのばらつきを大きくしていることも示された。

図 2の下図は、直接刺激により求めた張力に対する間接刺激張力の比を示した。上図の直接刺激張

力が筋収縮タンパクの欠損量を反映するのに対して、この間接刺激張力/直接刺激張力比は、神経筋接合部の刺激伝達機構(シナプス伝達)の状態を反映する。下り走前においては、間接刺激においても直接刺激においても違いがないため100%を示す。しかし、下り走での伸張性刺激により、間接刺激張力/直接刺激張力比は低下し、3日後には87%まで低下した。また、3日以降は直接刺激張力と同様に回復が見られ、7日後にはシナプス伝達においてもほぼ完全に回復した。

また、図には示していないが、単収縮から調べた収縮時間及び弛緩時間は、下り走前後において有意な変化は認められなかった。

3) 下り走による伸張性収縮後の筋の形態的損傷

下り走にともなう伸張性収縮により引き起こされる筋損傷から再生の過程を形態的に観察する目的で、SOLの横断切片にH&E染色を施し分析した。個体差や筋の部位により損傷程度は大きく異なるが、対照群と下り走後の損傷の特徴的像を図3に示した。筋損傷を横断切片H&E染色像から判定した場合、細胞膜損傷による細胞外液中のカルシウムイオンの細胞内流入が原因と考えられる過収縮をおこした膨張線維や、流入カルシウムによるタンパク分解酵素の活性化のために収縮・構造タンパクを分解し消失した線維、さらには貪食反応によりタンパク消失線維内に多数のマクロファージの核と断片化した線維が観察された。また再生初期にはサテライトセルの増殖融合による極細い線維の集合体等が観察された。

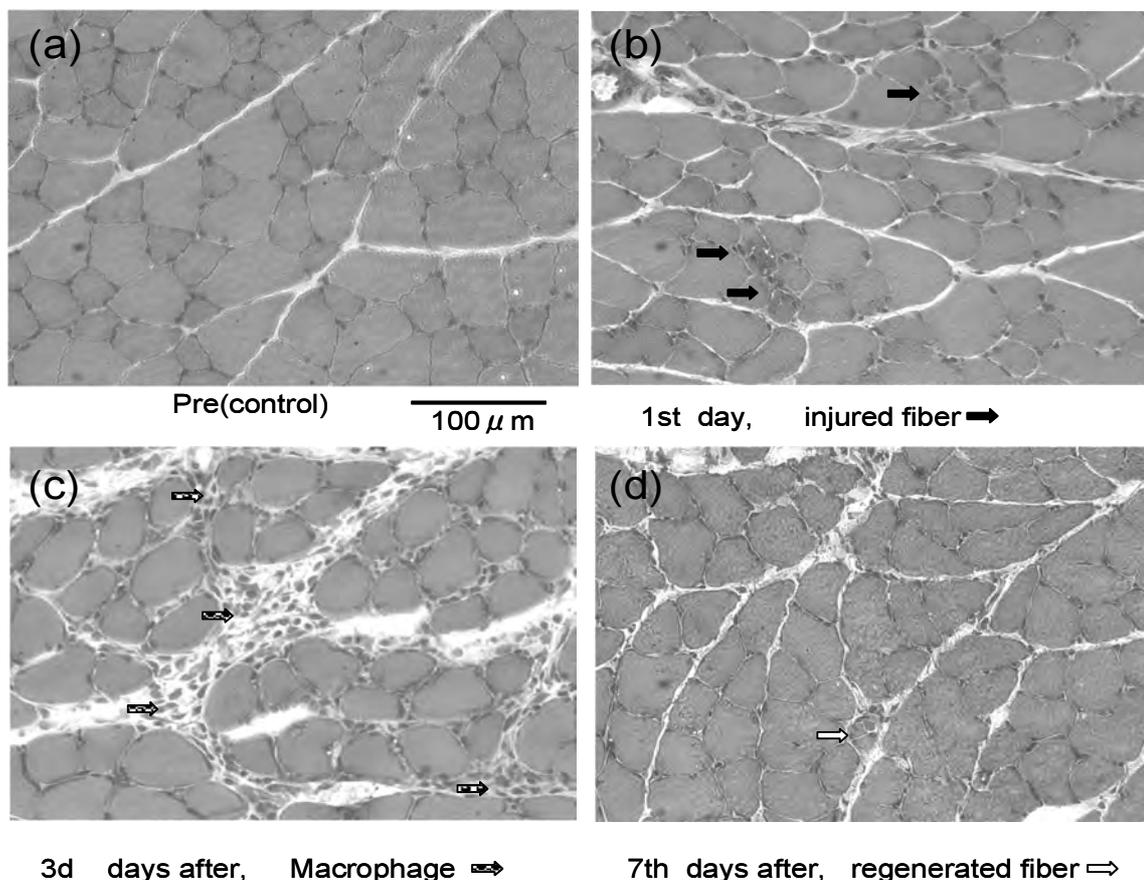


図3 下り走後の筋損傷 (筋横断切片像)

図3の下り走の1日後には(b)、矢印で示した線維においてマクロファージの核がタンパクを消失した筋細胞内に入り込んだ像が見られた。また3日後の写真(c)では、細胞間液が増え、そこにマクロファージの浸潤と考えられる核が多数染色されていた。また、1つ1つの細胞は膨潤しているため丸みを帯びていることも観察された。7日後(d)には回復を示す極細い線維の新生過程と思われる線維が観察された。これらの形態的特徴は対照群、ミルクタンパク食群において同様に見られた。

そこで、筋横断全体の面積に対する損傷線維とマクロファージ浸潤により拡張した細胞間質部の占める面積をNIH画像解析から求め、損傷面積として図4に示した。

下り走前の対照筋においては筋損傷部はみられない。また、対照群とミルクタンパク食群の下り走から1・3・5・7日後の筋横断面に対する損傷面積を比較した場合、いずれの時期においても両群間に顕著な違いがみられなかった。両群ともに、下り走1日後ではほぼ10%の範囲において、また下り走3日後は、ほぼ12から14%の範囲において損傷部が観察された。5日後以降は損傷筋線維部またマクロファージの浸潤部が減少し、ミルクタンパク群の7日後では筋損傷部を判断する現象はみられなくなった。

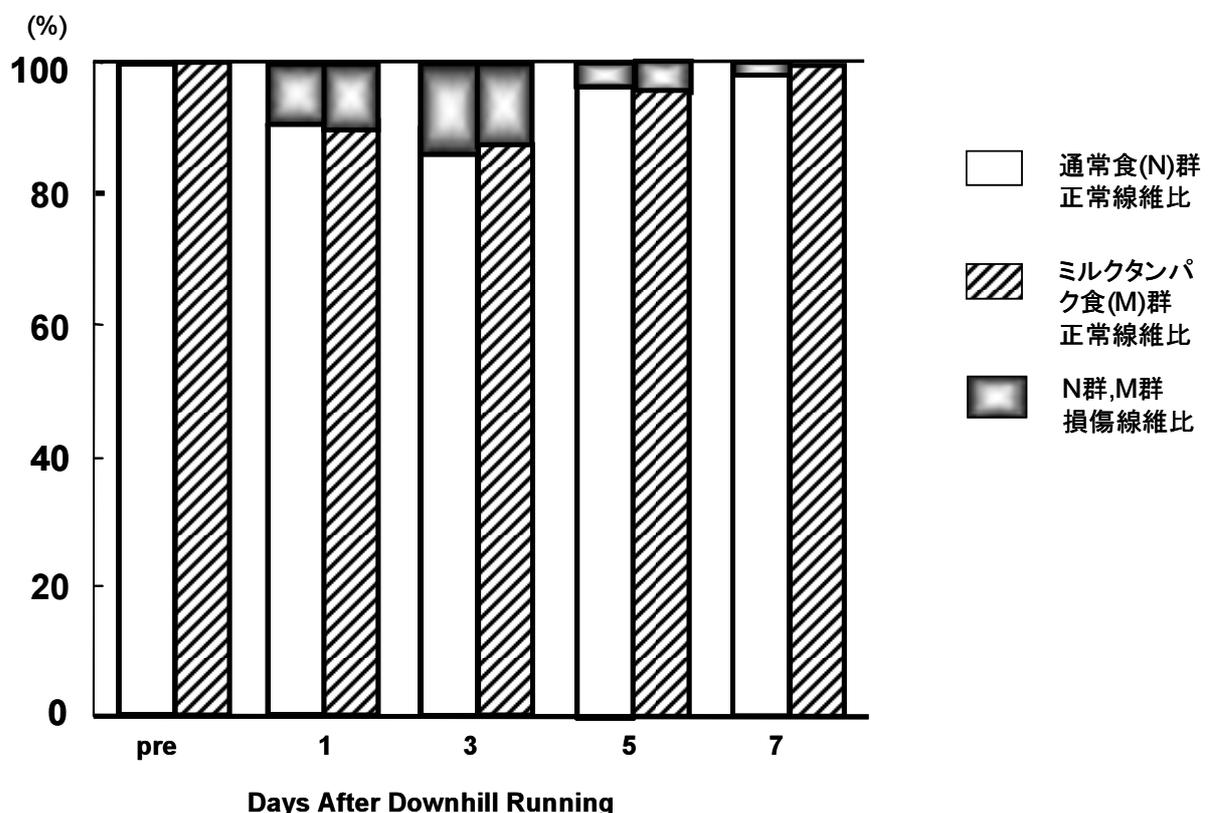


図4 下り走後における正常筋線維と損傷線維の比率変化

4). 下り走後における免疫蛍光染色結果

下り走後のSOL筋横断切片に対し膜構造の乱れなど形態損傷を免疫蛍光染色像から確認するため、Laminin、Dystrophin、DAPIによる三重染色を行った。図5には下り走3日後の対照群(上段)とミルクタ

ンパク食群(下段)の染色像を示した。下り走後の筋では、全体の筋線維が丸く膨潤しており、Laminin染色で示す基底膜はミルクタンパク食群が比較的シャープであるのに対して、対照群は波打つような変形が起きている細胞像が多くみられた。さらに、Dystrophin染色では矢印で示した数カ所に分かる細胞骨格の輪郭に光強度の低下した像が観察された。これらの膜の形態について、蛍光染色像のみからでは2群間での明確な比較は困難であるが、通常食の方が脆弱化は大きいようであった。

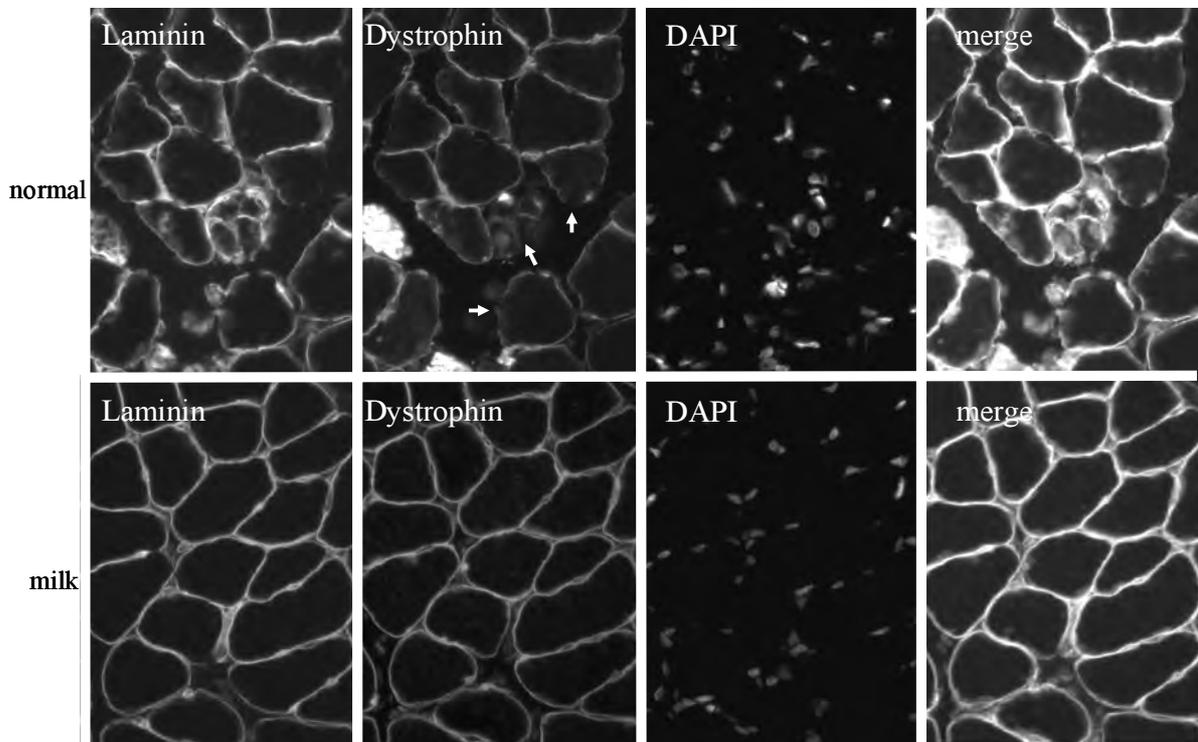


図5 下り走3日後の通常食とミルクタンパク食群ヒラメ筋に対するLaminin, Dystrophin, DAPIによる三重染色 50 μ m

図6には、下り走の1日後・3日後のED2陽性のマクロファージ染色を行った結果を示した。ED2はサテライトセルの活性化に関与するマクロファージ核に発現するタンパクである。図に見られるように対照食群とミルクタンパク食群の染色性は多少異なるが、下り走後においてED2陽性のマクロファージの発現量に顕著な違いは見られなかった。

次に、下り走3日後の対照群(上段)とミルクタンパク食群(下段)のMyoD染色像を示した。緑(白く光る点)に染色される核は、筋核・サテライトセルの活性期に働く制御系遺伝子であるMyoDを示す。下り走1日後から7日後までの期間にMyoDの発現が両群に見られ、特に3日後のミルクタンパク食群にMyoDの発現が多く確認された。次に、このMyoDは筋核にもサテライトセルにも両方に発現しているかを確認した。図8(上段)はミルクタンパク食群のヒラメ筋において、筋核に発現するMyoDを知る目的で、MyoD、Dystrophin、DAPIによる三重染色を行い、その写真を示した。Dystrophin陽性形質膜の内側に位置し、DAPI染色で示される筋核において、MyoDの陽性反応が検出された。筋核におけるタンパク合成へのシグナルが伝達されていることを示す結果であった。また、図8-下段は、MyoD、M-cadherin、DAPIによる三重染色の結果を示した。M-cadherinはサテライトセルを筋線維上に固定する接着タンパクでありサテライトセルの有効なマーカーとなる。MyoDの陽性反応が検出された核がM-cadherinと重なり、サテライトセル核が下り走後に活性化を受けていることが示された。

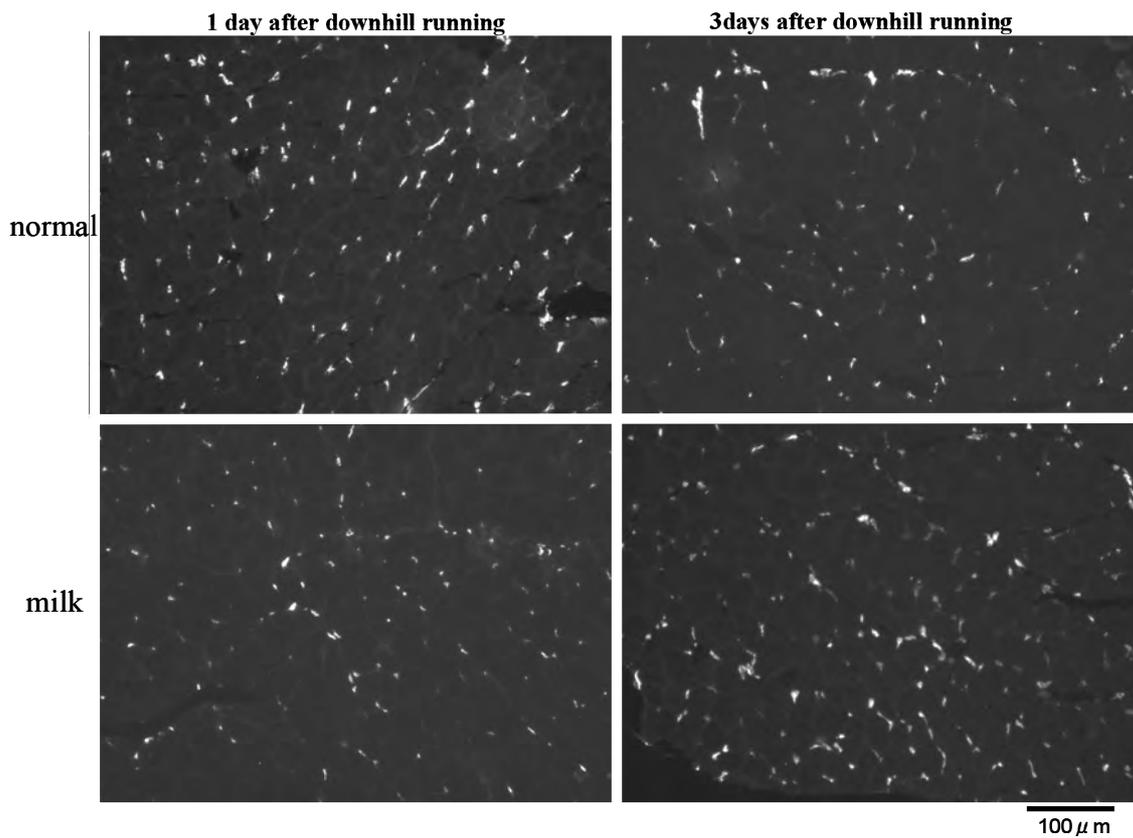


図6 下り走1日後と3日後のヒラメ筋横断面像上のED2陽性 macrophageの発現

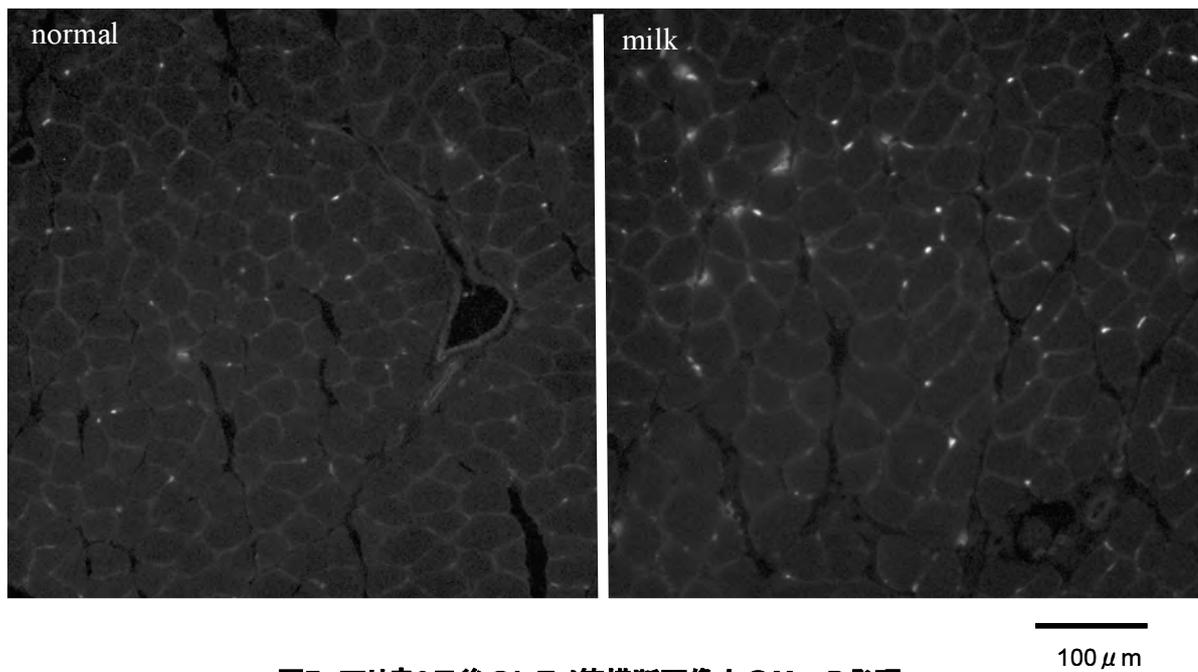


図7 下り走3日後のヒラメ筋横断面像上のMyoD発現

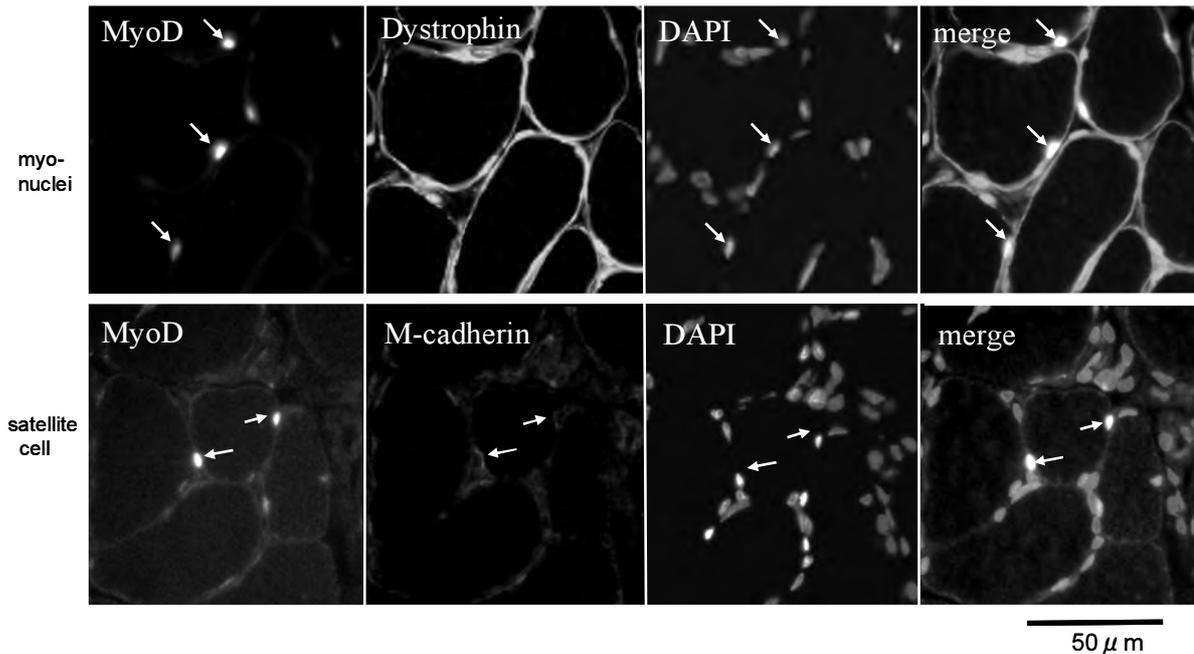


図8 下り走3日後におけるミルクタンパク食群ヒラメ筋内の筋核及びサテライトセルのMyoDの発現

図9には、下り走5日後のヒラメ筋に対するmyogenin染色像を示した。緑に染色される核は、筋核・サテライトセルにおいて分化制御に関わる遺伝子myogeninを示す。MyoDに比較して発現量は少ないが、分析を行った下り走1日後から7日後までの全ての期間にmyogeninの発現が両群に見られ、特に5日後のミルクタンパク食群に多くの発現が確認された。

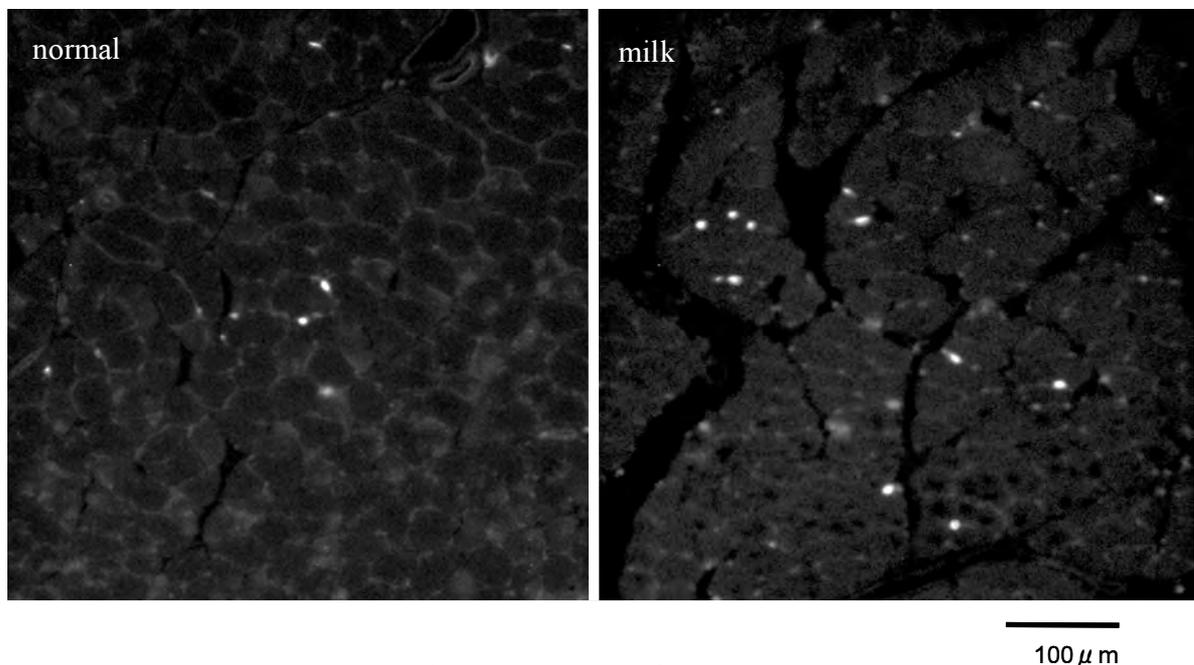


図9 下り走5日後のヒラメ筋横断面像上のmyogenin発現

myogeninが筋核とサテライトセルの両方に発現しているかに関しては、ヒラメ筋におけるmyogenin, Dystrophin, DAPIによる三重染色(図10-上段)の結果から筋核でも、また、myogenin, M-cadherin, DAPIによる三重染色(図10-下段)からサテライトセルでもmyogeninの発現が確認された。

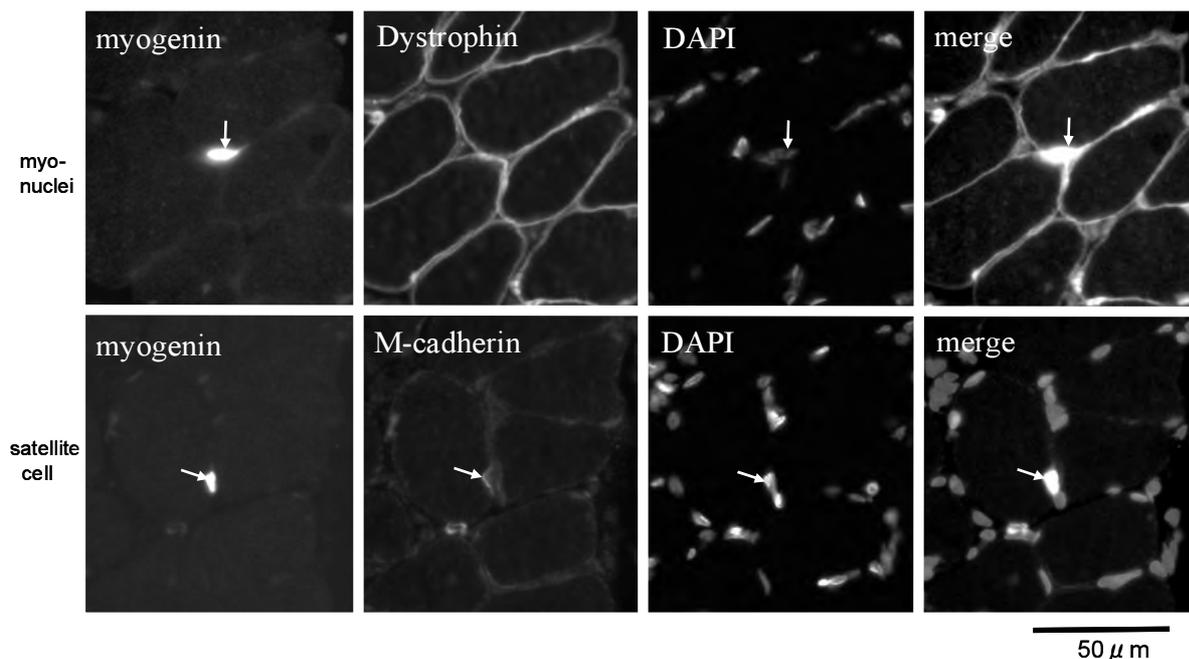


図10 下り走3日後におけるミルクタンパク食群ヒラメ筋内の筋核及びサテライトセルのmyogeninの発現

図11には、増殖能を持つサテライトセルの核において細胞周期の回転段階で発現するKi67染色の結果を示した。対照群とミルクタンパク食群ともに、下り走3日後のヒラメ筋にKi67の顕著な発現が確認された。また、両群を比較した場合では、明らかにミルクタンパク食群の筋においてサテライトセルの増殖反応が高まっていることが示された。筋損傷後のサテライトセルにおけるKi67の発現をより明確に知る目的で、両群下り走3日後のヒラメ筋に対し、M-cadherin、Ki67、DAPIによる三重染色を行い図12に示した(上段-対照群、下段-ミルクタンパク食群)。Ki67陽性反応が検出された核がM-cadherinと重なる、細胞周期に入っていることを示すサテライトセル(矢印)がミルクタンパク食群の筋に多く観察された。

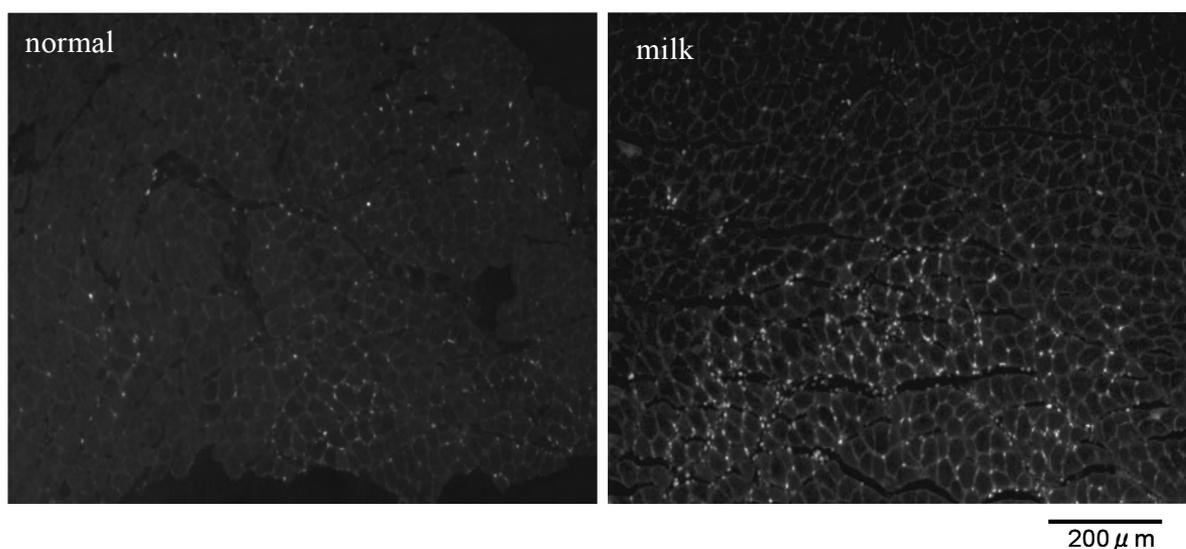


図11 下り走3日後のヒラメ筋横断面像上のKi67の発現

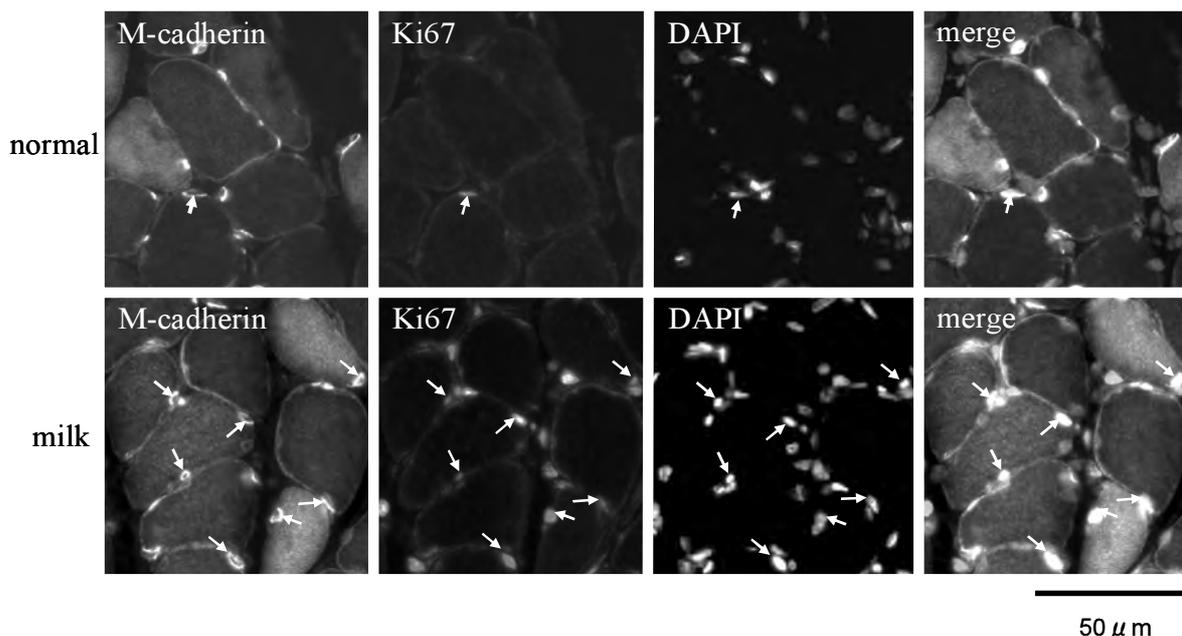


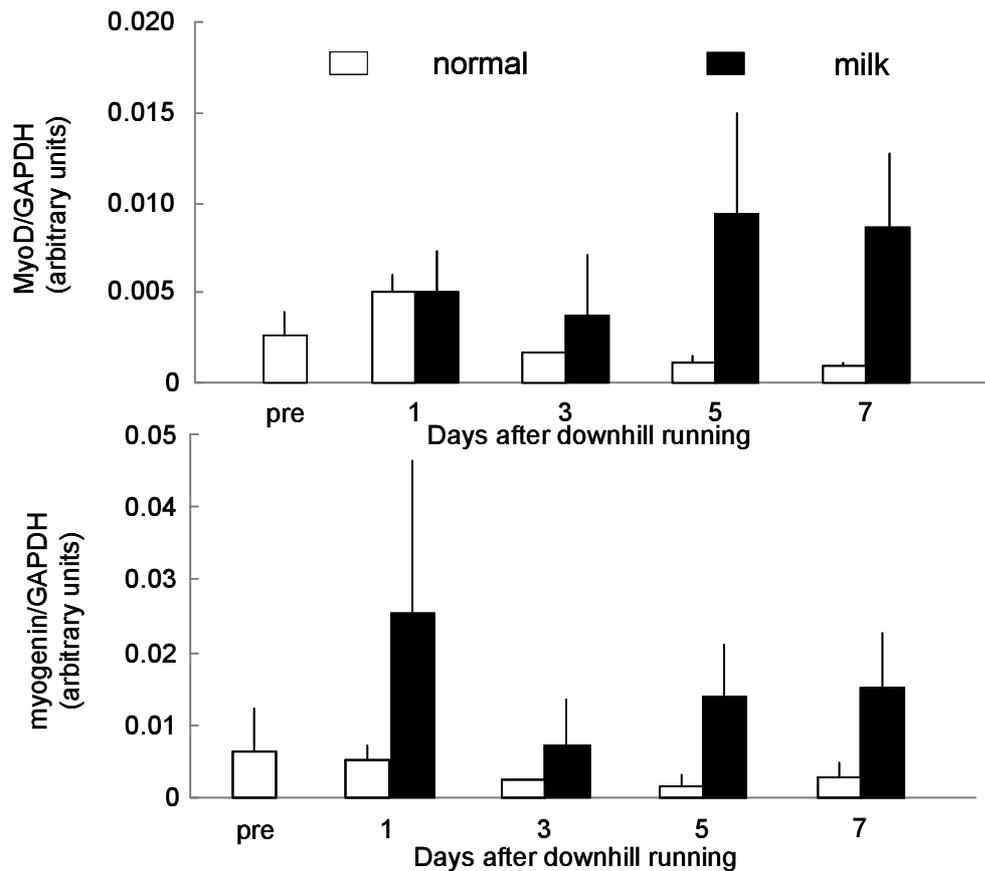
図12 下り走3日後における通常食とミルクタンパク食群ヒラメ筋のM-cadherin, Ki67, DAPIの三重染色像

なお、development Myosin抗体による蛍光染色を行ったが、損傷筋における胎児(新生児)型ミオシンの顕著な陽性反応は全ての測定期間で検出されなかった。

5). 下り走にともなうMyoD並びにmyogenin mRNA発現量の変化

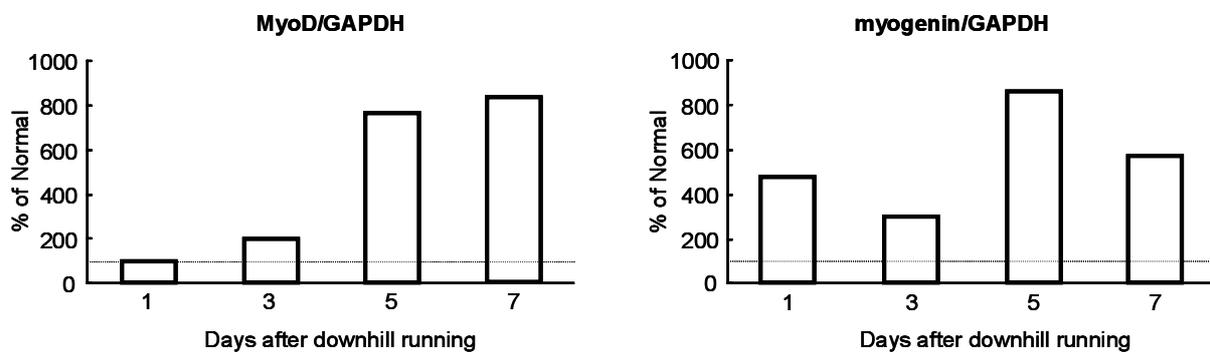
GAPDH(glyceraldehydes-3phosphatedehydrogenase)にて標準化した際の、下り走後1から7日のMyoD並びにmyogenin mRNA発現量の相対値を図13に示した。下り走前値に比べ MyoD mRNA発現量は、下り走1日後に対照群(白棒)、ミルクタンパク食群(黒棒)ともに上昇がみられた。下り走3日後以降では、対照群においてMyoD mRNA発現量は低下傾向を示したのに対して、ミルクタンパク食群では高い水準で推移していた。一方、筋への分化に関与するmyogenin mRNA発現量を分析した結果、対照群では大きな変動がみられなかったのに対して、ミルクタンパク食群では下り走1日後から上昇がみられ、3日後に一旦減少するものの7日後まで高い水準で推移した。

対照群とミルクタンパク食群の発現量比較を明確にするため、図13に示したMyoD, myogenin mRNA発現量の数値を利用し、下り走後の各時期における対照群の平均値を100%とした際のミルクタンパク食群のMyoD並びにmyogenin mRNA発現量の相対値を算出し図14にまとめた。MyoD mRNA発現量は、下り走3日後において、対照群の214%まで上昇し、7日後において845%と最大に達した。一方、myogenin mRNA発現量は、下り走1日後において475%まで上昇し、5日後において854%と最大に達した。しかし、mRNA発現量を測定する際、一試料につき複数回の検定を行うべきであったが、今回は試料の関係から一度の測定のみとしたため個体差が大きく現れ、統計上の有意な差はみられなかった。



(GAPDH; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)

図13 下り走後のMyoD, myogeninのmRNA発現量の変化



(GAPDH; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)

図14 対照群に対するMyoD, myogenin のmRNA発現量の比較

IV. 考察

身体活動を発現する筋収縮は、機械的エネルギーを発生するが故に常に筋細胞自体に損傷を与える可能性がある。特に、スポーツ活動後に経験する筋(肉)痛時にも「筋損傷」は起きている事は古くから知られている⁸⁾。筋は運動刺激により容易に損傷を受けるが、短期間に修復し完全に再生されるため問題視されにくい。しかし、一般に経験する筋痛時にも筋全体の約3%程度に損傷が起きていると考えられ、この損傷量がそのまま筋出力に影響するならば、運動機能の低下を引き起こすことは間違いなく絶対的不利な状況下での競技を強いられ、スポーツ科学の立場からは筋損傷を抑制・排除する方策を検討する必要がある。しかし、運動刺激・筋収縮の繰り返しがタンパク分解を促進させる一方では、その分解がタンパク合成の引き金となる。損傷(タンパク分解)が引き金となりタンパク合成が促進することで筋肥大などの運動適応が進むことを考えた場合、運動誘発性の筋損傷をそのマイナス面だけを強調すべきでは無いのかもしれない。損傷から修復・再生に至るタンパク合成能をより高める働きにも着目すべきとも考えられる。また、筋損傷が大きい場合には再生筋の組織や細胞の構造上に異常が発生すること^{19,25)}、さらに運動性損傷後の再生期に運動を継続した場合、筋細胞の形態異常や回復遅延が生じることが報告されており^{19,33)}、筋損からの再生機構にも注視すべき点がみられる。さらに、筋損傷後の修復メカニズムは、胎児期の筋細胞の発生機構や活動性筋肥大時の細胞増殖や移植後の再生過程と同じプロセスを辿るため、筋損傷の研究成果の応用範囲は広い。

ミルクタンパク質の継続的な摂取とレジスタンス・トレーニングによる筋肥大や除脂肪体重の増加が促進されることが報告されている²⁷⁾。ミルクタンパクにはカゼイン、ホエイが含まれ、カゼインはタンパクの抗酸化作用を高めタンパク分解の抑制に⁹⁾、ホエイは合成促進に関与する³⁴⁾ことが報告されている。また、カゼインに激しい運動後の筋痛やCK逸脱酵素の上昇を抑える効果があること²⁸⁾、ホエイは筋力トレーニング効果を助長すること⁴⁾が報告されている。これらのミルクタンパクのタンパク分解・合成に働く詳細なメカニズムは不明であるが、カゼインならびにホエイに含まれるアミノ酸組成、特に分岐鎖アミノ酸含有量がその働きに強く関与すると考えられる。

筋内のアミノ酸濃度は食事組成に影響されることが知られており、より高濃度の分岐鎖アミノ酸(BCAA)の含有状態が運動時のタンパク分解を抑制する。Shimomura Y ら²⁹⁾は、ヒトを対象とした実験において、運動前にBCAAを投与することによりスクワット運動2-3日後に発症する筋損耗と遅発性筋痛が抑えられる事を示し、運動による筋の分解に対するBCAAの抑制効果があることを示した。また、BCAAの中で特にロイシンは骨格筋におけるタンパク合成を促進させることが調べられている⁵⁾。これらのことから、ミルクタンパクの摂取による骨格筋内での高いBCAA組成の保有維持が、運動にともなう活動筋の過剰タンパク分解を抑制し、さらに分解からの回復への促進効果をもたらすことが期待される。

本研究で行った下り走では、運動にともなう筋損傷と最大筋力の低下が観察された。筋損傷を筋横断面像からの形態特性から調べた結果、下り走前の対照筋では筋線維が密に接しあう多角構造が見られるのに対して、下り走後は損傷線維と膨潤した丸い筋線維が多くみられ、また細胞間隙が広がりマクロファージの浸潤が認められた。このような筋損傷は、1)筋細胞膜の損傷による細胞外Caイオンの細胞内への流入とそれに続く、2)細胞内筋小胞体からのCaイオンの放出、3)その増加した細胞内Caイオン濃度による過収縮と4)タンパク分解酵素が活性化、5)最初におこる α -アクチニンの分解とそれに続く収縮タンパクの融解・流失と筋原線維の断裂、necrosisといった過程で損傷が進行する²⁴⁾。また、

再生もほぼ同時にスタートし、6) 損傷にともない急速な血流増加と毛細管の透過性亢進によるマクロファージの出現、7) マクロファージによる壊死物質の貪食とリソソームによるタンパク分解・消化とともに、8) 種々の増殖因子・成長因子へのシグナル伝達の亢進、9) さらには筋核での蛋白合成やサテライトセルの活性化が起きていると考えられる^{6, 22)}。本実験結果においても、損傷筋細胞像やマクロファージの浸潤が、またタンパク合成やサテライトセルの活性化に関与するED2マクロファージの出現が確認された。

我々が過去に調べた筋横断面上の損傷筋細胞のほとんどが、毛細管の分布が無い筋内周膜に隣接する速筋線維であった⁷⁾。つまり、内周膜とそれに隣接する速筋線維のすばやい収縮運動の連続による摩擦が、筋細胞膜に損傷を与えたと考えられた。しかし、対照群とミルクタンパク食群における下り走後のH&E染色による損傷像には内周膜に隣接する筋線維に特異的損傷はみられず、また損傷量を比較した結果でも差はみられなかった。両群の下り走による筋損傷は同様に起きていたと考えられた。免疫蛍光染色の結果では(図5)、対照群とミルクタンパク食群間に筋細胞の基底膜を示すLamininと、形質膜を示すDystrophinの脆弱化の程度が異なることが示めされたが、ミルクタンパクの摂取が激しい伸張性運動により誘発される筋損傷あるいはタンパク分解に対し、明確な抑制効果を有することを判断できる実験結果は得られなかった。

下り走後1日目から7日目に至るまで筋核及びサテライトセルにおけるMyoD及びmyogeninの発現が検出された。この結果は、協働筋切除により筋に多大な負荷ストレスを加えた時の変化と同様の現象であり¹¹⁾、下り走による損傷筋に、タンパク合成を促すシグナルが伝わり、筋タンパクへの分化再生が進んでいたことを示す結果であった。また、筋形成制御因子であるMyoDやmyogeninは、ミオシン軽鎖・重鎖やトロポニンなどの筋特異的タンパク質遺伝子の転写活性化の促進^{1, 3, 20)}や酸化系エネルギー代謝の亢進³⁰⁾にも関与している。従って、本研究で示された下り走後の筋損傷時において、対照群に比べミルクタンパク食群により多くのMyoDやmyogeninの発現がみられたことは、筋再生の制御機構にミルクタンパクが有効であることを示す結果と考えられた。

免疫染色像で示されたMyoDやmyogeninの発現と同様に、筋からmRNAを抽出しリアルタイムRT-PCR法を用いたMyoDとmyogeninへの転写因子mRNA発現量の測定した結果においてもミルクタンパク食群にMyoDやmyogeninの発現が高まっていることが示された。図14に示されたように、下り走後におけるMyoDとmyogeninへの転写因子mRNA発現量のミルクタンパク食群の値は対照群の2から数倍まで長期にわたり高い値がみられ、その有効性が示唆された。

一方、MyoDやmyogeninは筋核においてもサテライトセルにおいても発現する。筋組織内においては、サテライトセルの数に比べ筋核の数は断然多いため、mRNA発現量で示されるミルクタンパク食群のMyoD、myogeninの発現量の増加は、筋核における高い再生能を示す結果と考えられる。しかし、下り走1日後から7日後において、特に3日後においてはKi67陽性反応を示すサテライトセルが数多く観察され(図12)、筋の修復再生にサテライトセルが大きく貢献していることが示された。Ki67は増殖機能を持つ細胞の核でG0期以外の時期に発現し、G1期では核周辺に、S期およびG2期では核マトリックスにおいて、M期に入ると染色体に局在するタンパクである。このためKi67の陽性反応は、MyoDの発現により筋細胞系譜に決定されたサテライトセルが増殖反応期に入ったことを示すものであり、続いて増殖が終了しmyogeninした場合は分化を経てサテライトセル同士あるいは既存筋線維と融合すると考えられている³⁰⁾。

従って、本研究でみられたMyoD、myogeninにあわせてKi67を発現するサテライトセルが、ミルクタンパク食群ではより多くみられたことは、ミルクタンパクの継続的な摂食が、幹細胞の増殖反応を強め、筋修復に有効に働く可能性を示唆するものであった。

以上、本研究では実験動物ラットを用いた下り走により、下肢骨格筋に対して筋損傷を起こし、その損傷程度と回復過程に対するミルクタンパク食の摂取の影響を検討した。その結果、下り走による運動誘発性の筋損傷の程度には、ミルクタンパク摂取の影響は観察されなかった。しかし、免疫蛍光染色やPCR法を用いたmRNA発現量から調べたMyoD、myogenin量は通常食に比べミルクタンパクの継続的摂取群に高い発現が認められた。また、特に筋再生に関与するサテライトセルの増殖がミルクタンパク食群において亢進しており、運動性筋損傷後の筋再生能の促進に対するミルクタンパク食摂取の有効性が示唆された。

V. 参考文献

- 1) Allen, D. L., Sartorius, C. A., Sycuro, L. K., and Leinwand, L. A. Different pathways regulate expression of the skeletal myosin heavy chain genes. *J. Biol. Chem.*, 276:43524-43533. (2001)
- 2) Asmussen, E., Observations on experimental muscle soreness *Acta Physiol Scand*, 28:364-382. (1953)
- 3) Brunsgaard, J. C, Liestol, K., Ekmark, M., Kollstad, K., and Gundersen. K., Number and spatial distribution of nuclei in the muscle fibers of normal mice studies in vivo. *J. hysiol.*, 551:467-478. (2003)
- 4) Cribb PJ, Williams AD, Carey MF, Hayes A. The effect of whey isolate and resistance training on strength, body composition, and plasma glutamine. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.*, 16-5:494-509. (2006)
- 5) Harper AE, Miller RH, Block KP. Branched-chain amino acid metabolism. *Annu Rev Nutr.*, 4:409-54. (1984)
- 6) Hawke, T. J. and Grary, D. L. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J. Appl. Physiol.*, 91:534-551. (2001)
- 7) 平野朋枝、西沢富江、小笠原仁美、春日規克、伸張性収縮により引き起こされる筋線維損傷。-骨格筋の構造及び筋線維タイプとの関係から-、*岡崎女子短期大学研究紀要*, 33:143-150. (2000)
- 8) Hough, T. Ergographic studies in muscular soreness. *Am. J., Physiol.*, 7:76-92. (1902)
- 9) Hulmi J. J., Kovanen V., Lisko I., Selänne H., and Mero A. A., The effects of whey protein on myostatin and cell cycle-related gene expression responses to a single heavy resistance exercise bout in trained older men. *Eur J Appl Physiol.*, 102-2:205-13. (2008)
- 10) Husman, I., Growth factor in skeletal muscle regeneration. *Cytokine Growth Factor*, 28:249-258. (1996)
- 11) Ianuzzo, C. D, Gollnick, P. D., and Armstrong, R/B. Compensatory adaptations of skeletal muscle fiber types to a long-term functional overload. *Life Science.*, 19:151-1523. (1976)
- 12) 石道峰典, 平野朋枝, 西沢富江, 春日規克, 協働筋切除に伴う過負荷が再生時骨格筋の機能的、形態的特性に及ぼす影響. *体力科学*, 52-3:241-247. (2003)

- 13) Ishido, M., Uda, M., Masuhara, M., and Kami, K., Alterations of M-cadherin, neural cell adhesion molecule and β -catenin expression in satellite cells during overload-induced skeletal muscle hypertrophy, *Acta Physiologica*, 187-3:407-418. (2006)
- 14) Ishido, M., Kasuga, N., and Masuhara, M., Time course changes of the expression of IGF-I, phosphorylated Akt and phosphorylated mTOR in myofibers of the early stage of functionally overloaded skeletal muscle. *Adv. Ex. Sports Physiol.*, 14-2:25-30. (2008)
- 15) 石道峰典, 春日規克, 自発走トレーニングを伴う慢性過負荷が骨格筋の形態特性、筋線維タイプ構成比に及ぼす影響、*日本運動生理学雑誌*, 15-1:19-25. (2008)
- 16) Ishido, M., Kasuga, N. and Masuhara, M., The expression patterns of Pax7 in satellite cells during overload-induced rat adult skeletal muscle hypertrophy. *Acta Physiologica*, 95-4:459-69. (2009)
- 17) Kami, K., and Liff, G., dNF and their receptor expressions following muscle crush injury. *Muscle Nerve*, 22:1576-1586. (1999)
- 18) 春日規克, 平野朋枝, 西沢富江, 竹倉宏明, 伸張性収縮による筋損傷・会浮く期の機能と形態変化, *愛知教育大学研究報告*, 50:53-59. (2001)
- 19) 春日規克 他, 運動性筋損傷から回復後に見られる極細筋線維の機能特性、*体力科学*, 54-3:269-278. (2005)
- 20) Lin, H., Yutzey, K. E., and Konieczny, S. F. Muscle-specific expression of the troponin I gene requires interactions between helix-loop-helix muscle regulatory factors and ubiquitous transcription factors. *Mol. Cell Biol.*, 11:267-280. (1991)
- 21) Lu, H. K., Hsieh, C. C., Hsu, J. J., Yang, Y. K., and Chou, H. N., Preventive effects of *Spirulina platensis* on skeletal muscle damage under exercise-induced oxidative stress. *Eur J Appl Physiol.*, 98-2:220-6. (2006)
- 22) MacIntyre, D. L., Reid, W. D., and McKenzie, D. C. Delay muscle soreness the inflammatory response to muscle injury and its clinical implications. *Sports Med.*, 20:24-40. (1995)
- 23) Mauro, A., Satellite cells of skeletal muscle fibers. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 9:493-495. (1961)
- 24) Newham, D. J., McPhail, G., Mills, K. R., and Edwards, R. H. T. Ultrastructural changes after concentric and eccentric contractions of human muscle. *J. Neurol. Sci.*, 61:109-122. (1983)
- 25) Nishizawa, T., Tamaki, H., Kasuga, N., and Takekura, H., Deterioration and regeneration of neuromuscular junction architecture in rat skeletal muscle fibers damaged by bupivacaine hydrochloride. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 24: 527-537, (2003)
- 26) Nosaka, K., and Clarkson, P. M., Changes in indicators of inflammation after eccentric exercise of the elbow flexors. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 28:953-961, (1996)
- 27) Phillips, S. M., Hartman, J. W., and Wilkinson, S. B., Dietary protein to support anabolism with resistance exercise in young men. *J Am Coll Nutr.*, 24-2:134S-139S, (2005)
- 28) Saunders, M. J., Moore, R. W., Kies, A. K., Luden, N. D., and Pratt, C. A., Carbohydrate and protein hydrolysate coingestions improvement of late-exercise time-trial performance. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.*, 19-22:136-49, (2009)

- 29) Shimomura ,Y., Yamamoto, Y., Bajotto, G., Sato, J., Murakami, T., Shimomura ,N., Kobayashi, H., and Mawatari, K., Nutraceutical effects of branched-chain amino acids on skeletal muscle. *J . Nutr. ,* 136-2 : 529S-532S. (2006)
- 30) Smith, C, K., Janney, M. J., and Allen, R. E. Temporal expression of myogenic regulatory genes during activation, proliferation, and differentiation of rat skeletal muscle satellite cells. *J. Cell Physiology.,* 159:379-385. (1994)
- 31) Song, Y., Igawa, S., and Horii, A., Antioxidant enzymes response to endurance exercise training and dietary proteins in rat skeletal muscle and liver. *Appl. Human Sci.,* 15-5:219-25. (1996)
- 32) Sudo, M., and Kano, Y., Myofiber apoptosis occurs in the inflammation and regeneration phase following eccentric contractions in rats. *J . Physiol. Sci.,* 59-6:405-12. (2009)
- 33) Takekura, H., Tamaki, H., Nishizawa, T., and Kasuga, N., Plasticity of the transverse tubles following degeneration and subsequent reinervation in rat slow and fast muscle fibres. *J. Muscle Res. Cell Motil,* 23:439-451. (2003)
- 34) Tang, J.E., Moore, D.R., Kujbida ,G.W., Tarnopolsky, M.A., and Phillips, S.M., Ingestion of whey hydrolysate, casein, or soy protein isolate: effects on mixed muscle protein synthesis at rest and following resistance exercise in young men. *J Appl Physiol. ,* 107-3:987-92. (2009)