

運動による筋損傷に対する分岐鎖アミノ酸の投与効果

名古屋工業大学 下村 吉治

(共同研究者) 同

Gustavo Bajotto

Effects of Branched-chain Amino Acid Supplementation on Muscle Damage Induced by Exercise

by

Yoshiharu Shimomura, Gustavo Bajotto

Department of Materials Science and Engineering

Nagoya Institute of Technology

ABSTRACT

Branched-chain amino acids (BCAA) are major building blocks of proteins and are known to promote protein synthesis. In the present study, we addressed to examine the effects of BCAA on muscle damage induced by exercise in humans and rats. Since it has been reported that delayed-onset muscle soreness (DOMS) induced by squat exercise is decreased by supplementation of 5 g BCAA before exercise, we examined effects of the BCAA supplementation (0.1 g/kg BW) just after exercise. The results obtained showed that the BCAA supplementation just after exercise tended to decrease DOMS, but was not so effective as the supplementation before exercise. These findings let us to conclude that the BCAA supplement should be ingested before exercise to obtain the BCAA efficacy. In the animal study, we used rats catheterized through jugular vein in order to take blood samples at many time points. The skeletal muscles of the rat hindlimb were contracted by electric stimulation and muscle damage was detected by measurement of serum creatine kinase activity. Further study is required to establish the rat model for exercise-induced muscle damage.

要 旨

分岐鎖アミノ酸 (BCAA) は、タンパク質の主要構成成分であると同時に、タンパク質合成を促進するアミノ酸である。本研究では、運動により生じる筋損傷に対する BCAA 投与の効果をヒトおよびラットで検討することを目的とした。ヒトにおける研究では、スクワット運動により誘発される遅発性筋肉痛は運動前の 5g の BCAA 投与により有意に低下することが認められているので、本研究では運動直後に 0.1g/kg 体重 (約 5g) の BCAA を投与することによるその影響を検討した。その結果、運動後の BCAA 投与は遅発性筋肉痛を抑制する傾向はあったが、運動前投与に比べてその効果は小さかった。したがって、BCAA 投与効果を得るためには運動前の投与が有効であると結論された。ラットにおける研究では、頸静脈にカテーテルを固定し、連続的に採血できるラットを用いた。そのラット後肢の下肢骨格筋を電気刺激により強縮させることにより、筋損傷を誘発する動物モデルの調製を試みた。筋損傷は、血清クレアチンキナーゼ活性の測定により検出された。今後筋収縮の条件をさらに検討し、筋損傷モデルを完成させる予定である。

緒 言

ロイシン、イソロイシン、バリンの3種類のアミノ酸は分岐鎖アミノ酸 (branched-chain amino acids:BCAA) と呼ばれ、いずれもヒトの必須アミノ酸である。BCAA は、タンパク質の約 20% を構成するため¹⁾、ヒトは体内に大量の BCAA をタンパク質として保有するが、遊離アミノ酸としての BCAA 量は身体全体で数 g 程度であり非常に少ない^{2,3)}。この遊離 BCAA の体内における濃度は一定に保たれており、タンパク質合成の基質となるばかりでなく、タンパク質合成促進と分解抑制のシグナルになるなどの重要な生理作用を担っ

ている^{4,5)}。よって、BCAA をサプリメントとして投与するとタンパク質代謝に大きな影響が及ぶことが明らかにされつつある。この事実は、BCAA サプリメントが運動により発生する筋損傷の予防および回復に対して有効に作用する可能性を示唆しており、本研究ではこの点をヒトおよびラットで検討した。ヒトにおける研究では、われわれの最近の研究において運動前の 5g BCAA 摂取は運動翌日以降に発生する遅発性筋肉痛 (delayed-onset muscle soreness: DOMS) を有意に軽減したので (図 1)⁶⁾、本研究では BCAA を運

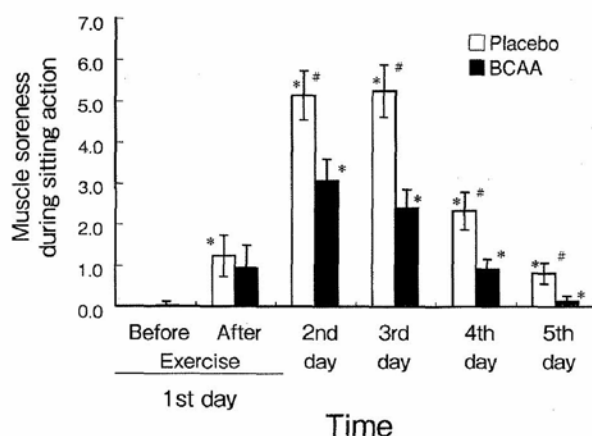


図1 スクワット運動により誘発される DOMS に対する運動前の BCAA (5g) 摂取の効果⁶⁾。

座る動作をした場合の主に大腿部の筋肉痛を visual analog scale 法で測定した。この図は、文献 6 中のデータを改変して作成した。値は平均値 ± SE (n=12), * 運動前との有意差, # 同じ時点における BCAA 実験との有意差を示す。

動直後に摂取した場合の影響について検討した。さらに、ラットにおける研究では、運動による筋損傷を研究する動物モデルを確立することを目的とした。

1. 方 法

1. 1 ヒトにおける研究

本研究では、名古屋工業大学の健康な女子大学生および大学院生 12 名 (年齢 21 ~ 24 歳) を被験者とした。DOMS の発生は、運動することにより影響されるので、いずれの被験者も定期的な運動習慣を持たないことを被験者の条件とした。女子のみを被験者とした理由は、運動習慣を持たず

なおかつ身体的に不活動な被験者を集めやすかったからである。被験者の身体的特徴は、身長 $159 \pm 1\text{cm}$ 、体重 $48.5 \pm 1.0\text{kg}$ 、体格指数 (BMI) 19.2 ± 0.4 であり、特に肥満した者は含まれなかった。

被験飲料として、200ml 中に 5.5g BCAA (Ile:Leu:Val の比率 = 1:2.3:1.2)⁷⁾、1g 粉末茶 (新茶人、味の素ゼネラルフーズ、東京)、1.2g 低カロリー甘味料 (パルスイート、味の素、東京) を溶解した飲料を用いた。プラセボ飲料として、BCAA の代わりに同量のデキストリン (サンデック #70、三和澱粉工業、榎原 (奈良)) を加え他の成分は同じである飲料を用いた。粉末茶を飲料に加えた理由は、BCAA の特有の苦味を隠すためであり、2つの飲料の味を同様にした。また、飲料はふた付きの紙コップにいれ、被験者は内容物を見ることができないようにした。被験者にはストローを用いて飲料を摂取させた。被験者と験者のいずれにもどちらの飲料を用いたかを知らせることなく実験を行った (double-blind test)。

被験者には、実験数日前と実験期間中の食生活及び生活習慣を通常のまま維持することを指示し、特に実験期間中はアミノ酸を含む飲料を摂取しないように指示した。被験者は実験日の前日午後9時までに夕食をすませ、その後は水以外の飲食をしないように制限した。被験者に、実験当日の午前8時30分までに実験室 (名古屋工業大学下村研究室) に集合してもらい、採血を行った。午前9時にグルコースを 100kcal 含むゼリー食品 (エネルギーゼリー、大塚製薬、東京) を朝食として摂取させ、その45分後にスクワット運動を実施した。スクワット運動は、20回を1セットとし、セット間に3分ずつの休憩をいれて合計7セット行った。1回のスクワット運動を2秒で行わせた。スクワット運動終了直後に採血し、その後任意に選択した半数の被験者 (6名) にBCAA飲料を、その他の被験者にプラセボ飲料を数分以内に摂取

させた。それぞれの飲料の摂取量は、BCAAもしくはデキストリンとして 0.1g/kg 体重とした。運動終了1時間後と2時間後に再び採血した。その翌日 (実験2日目) と実験3日目の午前8時30分に、被験者に同様な絶食状態で研究室に集合してもらい、採血を行った。

第1回目の実験から約3ヶ月後に第2回目の実験を同様にを行い、この実験では被験者は第1回目に摂取した飲料と異なる飲料を摂取させた (crossover test)。これらの2回の実験の間隔を3ヶ月とした理由は、予備実験において約2ヶ月半以上の間隔をあければ1回目の運動の影響は消失することを確認したためである。

採取した血液を用いて、血中乳酸とアンモニア、血漿グルコース、血清遊離脂肪酸 (FFA)、インスリン、ミオグロビン濃度、および血清クレアチンキナーゼ活性と乳酸脱水素酵素活性を測定した。これらの分析はSRL (東京) に依頼した。

実験日のスクワット運動前後と、実験2日目から5日目までの早朝の座る動作、立ち上がる動作、および手で筋肉を押さえた場合 (触診) の下肢の筋肉痛 (主に大腿部) を visual analog scale 法⁶⁾ により測定した。この測定は、10cm 線上の左端を無痛とし、右端を最大の痛みとして、被験者の測定時の状態をその線上に記す方法である。同じ期間の筋疲労も同様な方法で測定した。

以上のヒトにおける研究は、名古屋大学医学部臨床受託研究審査委員会の承認を得た後、被験者に十分な研究の説明を行い被験者より文書による同意書 (informed consent) を得た後に実施された。

結果は全て平均値±標準誤差 (SE) で示した。なお、本研究の被験者として12名を用いたが、実験日の運動負荷前に最大疲労の1/10以上の筋疲労を示した被験者が2名いたので、本研究の結果としてそれら2名の被験者のデータを除外し10名の被験者のデータを用いた。筋肉痛および筋疲労

の結果の統計処理は、Wilcoxon signed-rank test を用いて行った。血液成分の結果の統計処理では、1 群内の経時的変化の有意性を 1-way repeated measures ANOVA で分析し、各時点での群間の有意性を 2-way repeated measures ANOVA と Tukey test を用いて分析した。有意性は $p < 0.05$ のレベルとした。

1. 2 ラットにおける研究

8 週齢の Sprague-Dawley 系ラットを日本 SLC (浜松) より購入し、3 日後にカテーテル留置の手術を施した。ラットを麻酔し、右頸部の皮膚を切開して右頸静脈を露出し、その部位よりカテーテル (外径 1mm, 長さ約 13cm のシリコンチューブ) を約 4cm 挿入し、その先端を右心房付近に到達させた状態でカテーテルと血管を縛ることにより固定した。カテーテルの他端を、皮下を経由して首背部の皮膚を約 1cm 切開して露出し、その状態で頸部と背部の皮膚を縫合した。この手術後、ラットに抗生物質 (penicillin / streptomycin) 混合液 (Walkersville, Walkersville (MD, USA)) を投与し、5 日後に実験に供した。

上記ラットをペントバルビタール (50mg/kg 体重) 麻酔し、L 字形金具を用いてラット左後肢の踵を 90° 角にテーピングで固定した。裁縫用の縫い針 (約 5cm) 2 本にそれぞれ + / - の電極を接続し、それらをラット右後肢頸骨の両側の皮膚に 3cm ほど貫通させて留置した。この縫い針に、6V の電圧の square-wave pulse (100-Hz, 0.05ms duration, 100ms train) を 3 分間通電することにより、筋収縮 (tetanic contractions) を誘発した⁸⁾。

通電する直前、および通電後 0.5, 1, 2, 3, 4 時間後にカテーテルより 0.2ml の血液を採取し、それより血清を調製した。

血清中のクレアチンキナーゼ活性を、CPKII-テストワコー (和光, 大阪) を用い分光学的方法により測定した。

2. 結果および考察

2. 1 ヒトにおける研究

われわれは、本研究で用いたスクワット運動により平均して最大の痛みの 50% ほどの筋肉痛 (DOMS) が運動の翌日 (2 日目) および 3 日目に誘発されることを既に確認している⁶⁾。この DOMS は、最近報告したように、5g BCAA を運動前に摂取することにより有意に減少することを見いだした (図 1)⁶⁾。この BCAA の筋肉痛抑制効果のメカニズムの詳細は不明であるが、BCAA を運動前に摂取することにより、運動後の血中ミオグロビン濃度の上昇を抑制することが認められたので (未発表データ)、BCAA 摂取による筋損傷の抑制が BCAA による DOMS 低下のメカニズムに含まれることが考えられる。

本研究では、DOMS および血中成分に対する運動直後 BCAA 投与の効果を検討した。本研究の実験条件は、0.1g/kg 体重の BCAA (約 5g) を運動直後に摂取させた以外は以前の研究⁶⁾ と全く同じであった。その結果では、コントロール (プラセボ飲料摂取) における DOMS は運動 2 日目から 3 日目にかけて最大となり、その程度は約 50% であったので、以前の研究とほぼ同じ傾向を示した (図 2)。座る動作、立ち上がる動作、および触診におけるいずれの筋肉痛も BCAA 摂取により減少する傾向はあったが、BCAA とプラセボ実験の間で有意な差は認められなかった (図 2)。

同様に測定した筋疲労でも、BCAA 摂取はそれを減少する傾向はあったが、有意な効果は認められなかった (図 3)。

血中のエネルギー基質であるグルコースと FFA 濃度、およびその調節ホルモンであるインスリン濃度の変動を図 4 に示した。血漿グルコース濃度は、BCAA とプラセボ実験のいずれでも実験期間を通してわずかな変動を示したのみであった。血

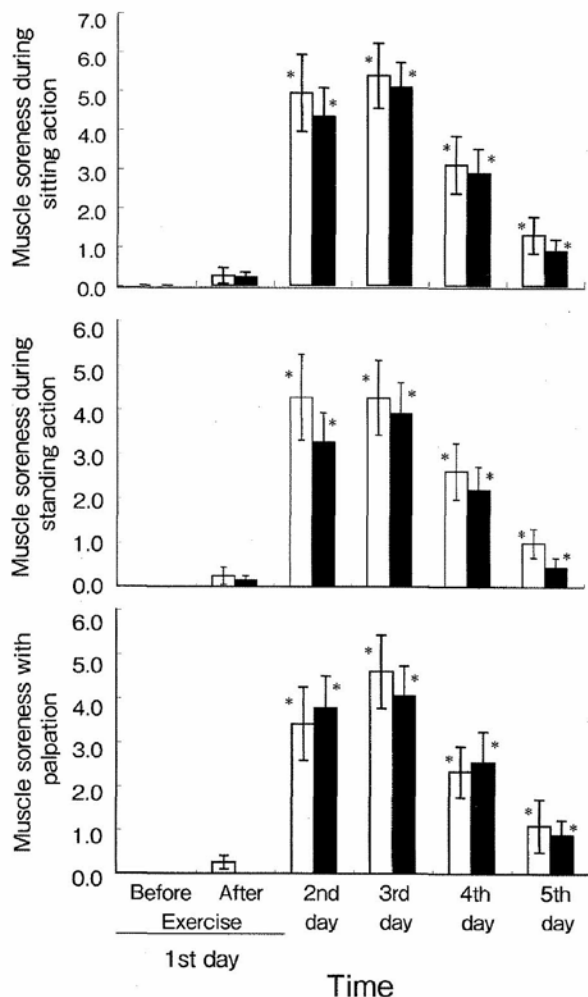


図2 スクワット運動により誘発されるDOMSに対する運動直後のBCAA (0.1 g/kg 体重) 摂取の効果 (ヒトにおける研究)

座る動作、立つ動作、および触診における主に大腿部の筋肉痛をvisual analog scale法で測定した。*運動前との有意差を示す。

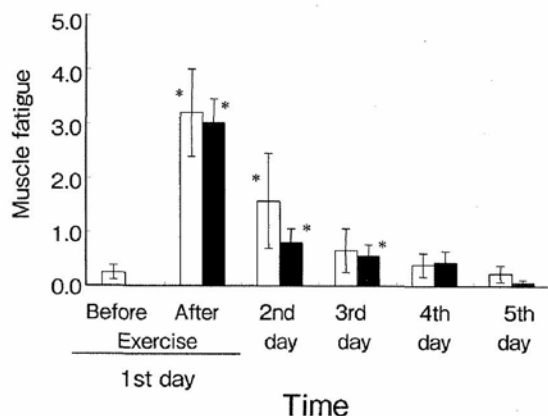


図3 スクワット運動により誘発される筋疲労に対する運動直後のBCAA (0.1 g/kg 体重) 摂取の効果 (ヒトにおける研究)。

主に大腿部の筋疲労をvisual analog scale法で測定した。

*運動前との有意差を示す。

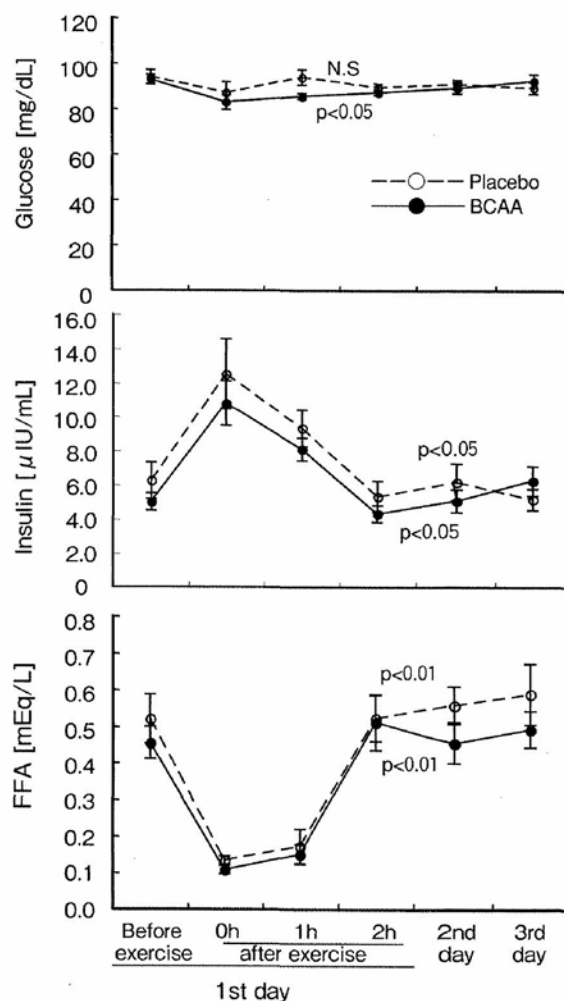


図4 血漿グルコース、血清インスリンとFFA濃度の変動 (ヒトにおける研究)。

各成分の経時的変動は1-way repeated measures ANOVAにより検定し、そのF値を図中に示した。NS:有意性なし。

清インスリン濃度は、いずれの実験でも運動後に高値を示したが、これは朝食でゼリー食品を摂取させたためと考えられる。両実験間に差はなかった。血清FFA濃度は血清インスリンとほぼ対照的なパターンを示したが、両実験間に有意差はなかった。

疲労と関係する血液成分である乳酸とアンモニア濃度の変動を図5に示した。乳酸濃度は、運動直後に高値を示したが、両実験ともに同じパターンを示した。血中アンモニア濃度は両実験ともにわずかな変動を示したのみで、実験間に有意差はなかった。運動前にBCAAを摂取させた場合に血中アンモニア濃度の上昇が報告されているが⁹⁾、本実験のように運動後にBCAAを摂取させた場

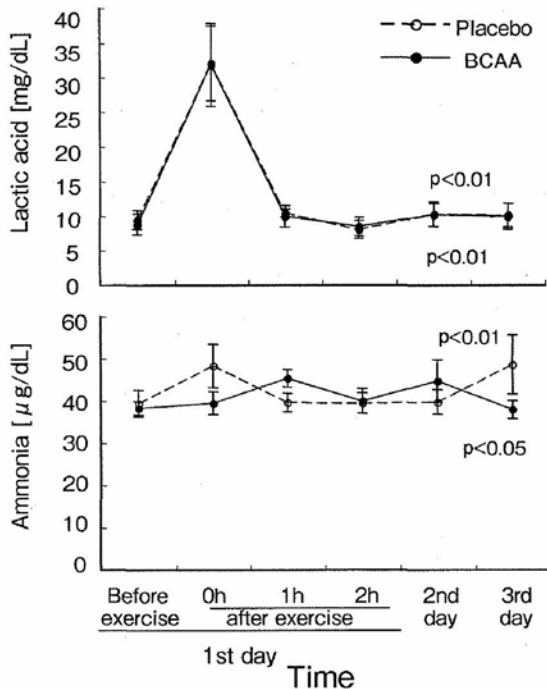


図5 血中乳酸とアンモニア濃度の変動
(ヒトにおける研究)

各成分の経時的変動は1-way repeated measures ANOVAにより検定し、そのF値を図中に示した。

合では血中アンモニア濃度の上昇は認められなかった。

血中の筋損傷マーカーの変動を図6に示した。血清クレアチンキナーゼ活性は、BCAA実験では有意に変動せず、プラセボ実験でのみ有意な変動を示したが、両実験の間にほとんど差は認められなかった。血清乳酸脱水素酵素活性は両実験ともに変動しなかった。これらの血清クレアチンキナーゼ活性と乳酸脱水素酵素活性の変動が小さかったことから、本研究で用いたスクワット運動により誘発される筋損傷の程度はかなり小さいと判断される。

一方、血清ミオグロビン濃度は、上記の2つの筋損傷マーカーよりも鋭敏なマーカーであることが示唆されている¹⁰⁾。本研究では、血清ミオグロビン濃度は両実験ともにスクワット運動により上昇したが、両実験間に差はなかった。この血清ミオグロビン濃度の結果は、運動前にBCAAを摂取させた場合とは異なるものであり、運動後にBCAAを摂取させても運動により誘発される筋損

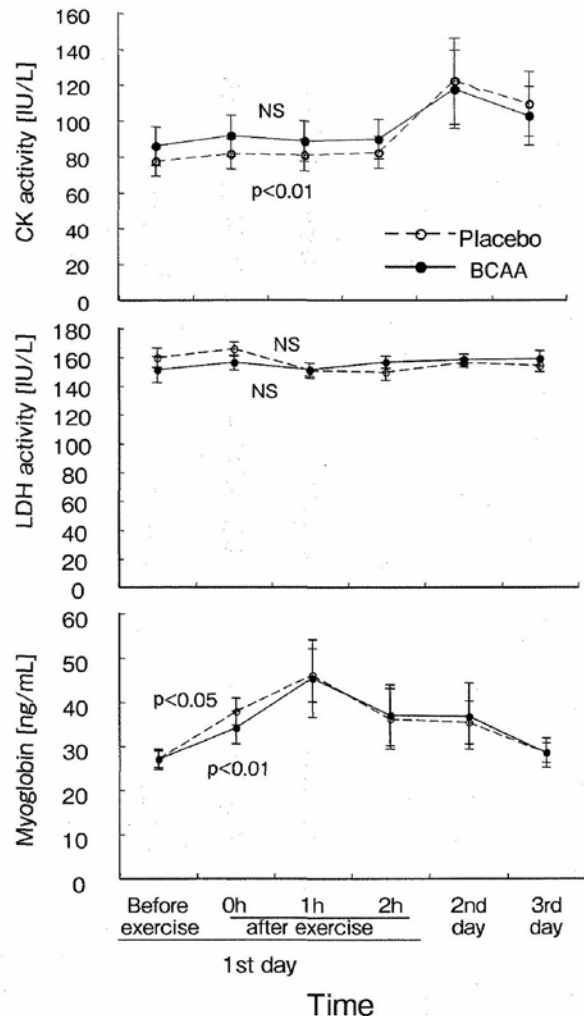


図6 血清中の筋損傷マーカーの変動(ヒトにおける研究)
血清のクレアチンキナーゼ(CK)活性、乳酸脱水素酵素(LDH)活性、およびミオグロビン濃度を筋損傷マーカーとして測定した。各成分の経時的変動は1-way repeated measures ANOVAにより検定し、そのF値を図中に示した。NS:有意性なし。

傷を抑制できない可能性を示している。

以前の研究⁶⁾と本研究の結果を総合すると、運動によるDOMSを減少するためには、5g程度のBCAAを運動前に摂取することが必要であると結論される。運動後にBCAAを摂取するとその効果は低いと結論される。運動前にBCAAを摂取することにより、運動による血清ミオグロビン濃度の上昇を抑制できるので、筋損傷の抑制がDOMSの減少に重要な役割を果たしている可能性が示唆される。ロイシンは、BCAAの中で最も生理作用の強いアミノ酸であり、筋タンパク質合成促進と分解抑制の作用を持つことが明らかにされている^{4, 5)}。このロイシンの作用はBCAA摂取

による DOMS の減少に関与すると考えられるが、運動後に BCAA を摂取した場合には BCAA のその効果が小さかったので、運動前に BCAA を摂取して筋損傷を抑制することが DOMS の減少に寄与したと考えられる。

2. 2 ラットにおける研究

本研究では、ラットの頸静脈にカテーテルを固定し筋損傷を起こすことなく採血でき、さらにこのラット後肢の下肢骨格筋を電気刺激により強縮させ、筋損傷を誘発する実験動物モデルを調製した。図7に示すように、筋収縮する前の血清クレアチンキナーゼ活性は約150IU/Lであり、この値はこれまでに報告されている腹部切開による下大静脈から採血した場合の酵素活性（約500IU/L）¹¹⁾よりも低い値であった。この結果は、本研究で調製したラットモデルは、筋損傷が少ない状態で採血できることを示している。6Vで3分間のsquare-wave pulseによる筋収縮は、血清クレアチンキナーゼ活性を0.5時間後に上昇する傾向を示したが、十分な上昇ではなかった。今後、筋収縮時間、電圧の高さなどの検討を行い、この筋損傷モデルを完成する予定である。さらに、このモデルを利用して筋損傷に対するBCAA効果とそのメカニズムも検討する予定である。

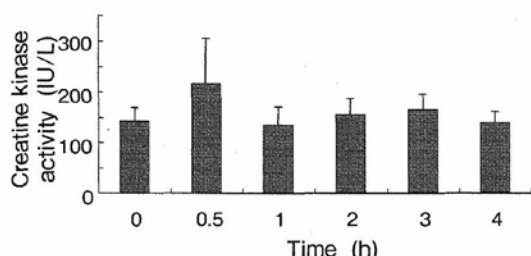


図7 電気刺激により筋収縮を誘発したラットの血清クレアチンキナーゼ活性の変化
各時点の値は平均値±SE (n=4)を示す。

アチンキナーゼ活性は約150IU/Lであり、この値はこれまでに報告されている腹部切開による下大静脈から採血した場合の酵素活性（約500IU/L）¹¹⁾よりも低い値であった。この結果は、本研究で調製したラットモデルは、筋損傷が少ない状態で採血できることを示している。6Vで3分間のsquare-wave pulseによる筋収縮は、血清クレアチンキナーゼ活性を0.5時間後に上昇する傾向を示したが、十分な上昇ではなかった。今後、筋収縮時間、電圧の高さなどの検討を行い、この筋損傷モデルを完成する予定である。さらに、このモデルを利用して筋損傷に対するBCAA効果とそのメカニズムも検討する予定である。

3. まとめ

これまでのヒトにおける研究において、スクワット運動によるDOMSは運動前の5gのBCAA摂

取により有意に減少された。本研究では、スクワット運動直後に0.1g/kg体重のBCAA（約5g）を摂取させた場合の効果を検討した。その結果、運動後のBCAA摂取はDOMSを減少する傾向はあったが、有意な効果は認められなかった。したがって、DOMSを減少するためのBCAA効果は運動前の摂取が有効であることが明らかとなった。スクワット運動による血清ミオグロビン濃度の上昇は、運動前のBCAA摂取においてのみ抑制されたので、運動前のBCAA摂取により筋損傷が抑制されたと考えられる。ラットにおける研究では、頸静脈にカテーテルを固定したラットを用い、そのラット後肢の下肢骨格筋を電気刺激により強縮する実験動物モデルが調製された。今後筋収縮の条件を検討することにより、筋損傷の実験動物モデルを確立する予定である。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に心より感謝申し上げます。また、本研究に協力していただいた名古屋大学医学部附属病院総合診療部の佐藤寿一先生、名古屋工業大学大学院生の渡辺聡子さん、稲熊麻美さん、学部生の前川卓摩君に深謝いたします。

文 献

- 1) Harper, A. E., Miller, R. H. & Block, K. P., Branched-chain amino acid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.*, 4, 409-454 (1984)
- 2) Rennie, M. J., Influence of exercise on protein and amino acid metabolism. In: *Handbook of Physiology, Section 12: Exercise: Regulation and Integration of Multiple Systems* (Rowell, L. B. & Shepherd, J. T., eds.), Oxford University Press, New York (1996)
- 3) Ahlborg, G., Felig, P., Hagenfeldt, L., Hendler, R. & Wahren, J., Substrate turnover during prolonged exercise in man. *J. Clin. Invest.*, 53, 1080-1090

- (1974)
- 4) Bolster, D. R., Jefferson, L. S. & Kimball, S. R., Regulation of protein synthesis associated with skeletal muscle hypertrophy by insulin-, amino acid- and exercise-induced signalling. *Proc. Nutr. Soc.*, 63, 351-356 (2004)
 - 5) Garlick, P.J., The role of leucine in the regulation of protein metabolism. *J. Nutr.*, 135, 1553S-1556S (2005)
 - 6) 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, 529S-532S (2006)
 - 7) Energy and protein requirements., Report of a joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. *World Health Organ Tech. Rep. Ser.*, 724, 1-206 (1985)
 - 8) Shimomura, Y., Fujii, H., Suzuki, M., Fujitsuka, N., Naoi, M., Sugiyama, S., and Harris, R.A., Branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase complex activation by tetanic contractions in rat skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta*, 1157, 290-296 (1993)
 - 9) MacLean, D. A., Graham, T. E. & Saltin, B., Branched-chain amino acids augment ammonia metabolism while attenuating protein breakdown during exercise. *Am. J. Physiol.*, 267, E1010-E1022 (1994)
 - 10) Sorichter, S., Puschendorf, and Mair, J., Skeletal muscle injury induced by eccentric muscle action: muscle proteins as markers of muscle fiber injury. *Exercise Immunol. Review*, 5, 5-21 (1999)
 - 11) Shimomura, Y., Suzuki, M., Sugiyama, S., Hanaki, Y., and Ozawa, T., Protective effect of coenzyme Q10 on exercise-induced muscular injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 176, 349-355 (1991)