

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20700534

研究課題名 (和文) 骨格筋カルノシン濃度と高強度運動パフォーマンスとの関連性

研究課題名 (英文) Relationship between skeletal muscle carnosine and intense exercise performance.

研究代表者

鈴木 康弘 (SUZUKI YASUHIRO)

独立行政法人日本スポーツ振興センター国立スポーツ科学センター・スポーツ科学研究部・研究員

研究成果の概要 (和文) : 本研究では, 高強度運動中に引き起こされる筋疲労に関連するさまざまな生理機能に関与していることが知られている, カルノシン (β -alanyl-L-histidine) に着目し, 骨格筋カルノシン濃度の非侵襲的測定法の開発とカルノシン摂取による生理的応答について検討した. その結果, 骨格筋カルノシン濃度の非侵襲的測定法の確立にはさらなる検討が必要であること, また, カルノシンの経口摂取により血中の非重炭酸緩衝系の貢献度が高まり, 重炭酸緩衝系が低下することなどが示唆された.

研究成果の概要 (英文) : I examined the development of the non-invasive measurement method of the histidine-containing dipeptide carnosine (β -alanyl-L-histidine) and physiological response of carnosine supplementation. As a result, it was suggested that further examination is necessary for the probability of the non-invasive measurement method of skeletal muscle carnosine concentration, and that oral supplementation of carnosine enhanced contribution of non-bicarbonate buffering action with decreasing bicarbonate buffering action in blood.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：運動生理学

科研費の分科・細目：スポーツ科学

キーワード：カルノシン, 緩衝作用, 高強度運動

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒスチジン含有ジペプチドであるカルノシン (β -alanyl-L-histidine) は, 多くの脊椎動物の骨格筋や神経細胞に存在することが知られているが, その生理的役割は未だ解明

されていない. しかしながら, カルノシンは, 水素イオン (H^+) 緩衝作用, 筋小胞体からのカルシウムイオン放出・取込みの調節, グルコース代謝の制御など, 高強度運動中に引き起こされる筋疲労に関連するさまざまな生

理機能に関与していることが知られている。

実際に我々は、骨格筋カルノシン濃度と30秒間全力ペダリング運動の体重あたりの平均パワーとの間に有意な正の相関関係があること、またその関係は運動後半(21-30秒)により顕著であることを報告している(Suzuki et al., 2002)。さらに我々は、自転車エルゴメーターを用いた8週間のスプリントトレーニングにより骨格筋カルノシン濃度は有意に増加すること、またスプリントトレーニングによるパフォーマンスの向上には骨格筋カルノシン濃度の増加が関与していることを報告している(Suzuki et al., 2004)。すなわち、骨格筋カルノシン濃度は短時間高強度運動パフォーマンスを決定する一要因であり、骨格筋カルノシン濃度を増加させることにより、筋疲労を軽減・遅延する能力が高まり、短時間高強度運動パフォーマンスが向上する可能性が示唆される。

そのため、骨格筋カルノシン濃度を簡易的に評価できれば、トレーニング状態の把握や短時間高強度運動パフォーマンスを評価することができると考えられる。

(2)骨格筋カルノシン濃度を増加させるためには、カルノシンをサプリメントとして経口摂取する方法が考えられる。ラットおよびマウスを対象とした研究では、カルノシンを経口摂取させることにより、骨格筋カルノシン濃度が有意に増加することが報告されている。また、ウマを対象とした研究およびヒトを対象とした研究において、カルノシンの構成アミノ酸であるβアラニンを長期間摂取させることにより、骨格筋カルノシン濃度が有意に増加することが報告されている。しかし、ヒトを対象としてカルノシンおよびその関連ペプチドであるアンセリン(β-alanyl-L-methyl-L-histidine)を経口摂取することにより運動パフォーマンスが向上するの否かについて検討した研究は少ない。

2. 研究の目的

(1)プロトンの磁気共鳴分光法(¹H-MRS)により、非侵襲的に骨格筋カルノシン濃度の評価法を確立すること、また¹H-MRSによる骨格筋カルノシン濃度と筋バイオプシー法による骨格筋カルノシン濃度との関係について検討することにより、¹H-MRS法による骨格筋カルノシン濃度評価の妥当性を検討することである。

(2)カルノシンおよびアンセリンの経口摂取が血中カルノシン濃度および高強度運動パフォーマンスに及ぼす影響について検討することである。

3. 研究の方法

(1)被験者には健康な一般成人男女18名(男15, 女3)を用いた(年齢27.2±4.8歳, 身長172.7±4.6cm, 体重66.7±9.1kg)。すべての被験者に実験の主旨、内容および危険性について説明をし、参加の同意を得た。すべての被験者は、はじめにMR装置を用いて¹H-MRSによる測定を行い、その後直ちにニードルバイオプシー法によって、右脚外側広筋より筋サンプルを採取した。¹H-MRSによる骨格筋カルノシン濃度(Car-MRS)は、安静時に1.5Tの超電導MR装置(Magnetom Symphony, シーメンス社製)の中で仰臥位になり、直径10cmのサーフェイスコイルを右脚外側広筋上に装着し測定を行った。¹H-MRS測定パラメータは、1-pulseシークエンスを用い、繰り返し時間1,500ms, データポイント2,048, スペクトル幅2,000Hz, ダミースキャン4回, 積算256回の条件で、外側広筋に設定された40×15×40mmの関心領域からデータを収集した。得られたスペクトルから、カルノシンおよびクレアチンのピーク面積を測定し、これらの比(Car/Cr)を算出し、これをCar-MRSとした。一方、ニードルバイオプシー法によるカルノシン濃度(Car-Biopsy)は、筋サンプルを凍結乾燥し、除タンパクした後、アミノ酸分析器を用いて測定した。また、筋サンプルに対してSDS-PAGEを用いたミオシン重鎖(myosin heavy chain: MHC)解析を行い、MHC I, IIA, IIBの相対的割合を算出した。

(2)被験者には健康な一般成人男性8名を用いた(年齢19.8±1.4歳, 身長171.8±6.5cm, 体重64.7±7.6kg)。すべての被験者に実験の主旨、内容および危険性について説明をし、参加の同意を得た。

被験者にはあらかじめ実験開始前3時間は食事をしないように指示しておき、実験室に来室後ウォーミングアップまで安静にさせた。その間に運動中における血中カルノシン・アンセリン濃度および血液ガス動態を検討するための連続採血に備えて、橈骨動脈に留置針(22G)を留置した。その際、被験者の苦痛を最小限にするために局所麻酔を施した。採血は、留置針に接続したエクステンションチューブと三方活栓を介してヘパリン処理されたシリンジを用いて行った。採血の準備終了後、安静時の採血を実施した。

安静時の採血終了後、カルノシンおよびアンセリンを豊富に含むエキス(Chicken Breast Extract: CBEX)またはプラセボのいずれかのスープを1缶(190g)摂取させ、ウォーミングアップを開始した。ウォーミングアップは60Wの負荷でのペダリング運動を5分間行わせた後、体重の7.5%の負荷での5秒間全力ペダリング運動を5分間のペダリング運動(60W)を挟んで2回行わせるもの

であった。運動テストは試験スープ摂取 30 分後とし、ウォーミングアップ終了 10 分後に開始した。なお、本研究ではダブルブラインド・クロスオーバーデザインを用い、さらに試技の順番はランダムとし、2 回目のテストは 1 回目のテスト終了後、少なくとも 3 日以上の間隔をあけて行われた。

また、間欠的運動パフォーマンスを評価するために、5 秒間全力ペダリング運動を 25 秒間の完全休息をはさみ 10 セット繰り返すインターバルテストを行わせ、その際の各セットの平均パワー (Mean Power) を測定した。インターバルテストは、電磁ブレーキ式自転車エルゴメーターを用いて、CBEX 試技、プラセボ試技ともに体重の 7.5% の負荷で行われた。カルノシン、アンセリンおよびこれらの構成アミノ酸濃度、血液ガスパラメーター、血中乳酸濃度 (La) を測定するために、安静時 (Rest)、インターバルテスト開始 1 分前 (Pre)、インターバルテストにおける各セット終了後 (1-10) および回復期 (P1-P5) に採血を行った。

カルノシン・アンセリン濃度およびこれらの構成アミノ酸濃度を測定するための血液サンプルは、採血後素早く液体窒素で瞬間凍結し、分析当日まで -80°C で保管した。分析のために、血液サンプルを解凍後 1 ml に対し 2 倍量の純水を加えてホモジナイズし、完全に溶血させた後、1/3 量の 20 % トリクロロ酢酸溶液を加えてタンパク質を沈殿させ、遠心分離 ($3,000\times g$, 10 分間) し上清を回収した。残りの沈殿に 6 % トリクロロ酢酸溶液を加えて沈殿を崩し、再度遠心分離 ($3,000\times g$, 10 分間) して上清を回収し、この操作をさらにもう一度繰り返した。得られた上清を集めて 5 倍量のジエチルエーテルを加えてよく混合し、しばらく放置した後、上層 (エーテル層) を除いた。この操作をさらに 2 回繰り返し下層 (水槽) を回収した後、凍結乾燥により完全乾固させ、100 μl のクエン酸リチウム緩衝液 (アミノ酸分析器用第 1 緩衝液, 日本電子社製) に溶解させた後、アミノ酸分析器 (JLC-500, 日本電子社製) により、カルノシン・アンセリンおよびその構成アミノ酸である β -アラニン、ヒスチジン、1 メチルヒスチジン濃度を測定した。

一方、血液ガスパラメーターおよび血中乳酸濃度を測定するための血液サンプルは、シリンジのまま直ちに氷冷し、可能な限り素早く分析した。血液ガスパラメーターとして、水素イオン濃度 (pH)、二酸化炭素分圧 (PCO_2) および重炭酸イオン濃度 ($[\text{HCO}_3^-]$) を自動血液ガス分析器 (Radiometer 社製, ABL520) を用いて測定した。また、La の分析には自動乳酸分析器 (1500SPORTS: YSI 社製) を用いた。なお、これらの分析は、採取後 15 分以内に終了した。

4. 研究成果

(1) Car-MRS および Car-Biopsy は、それぞれ 3.20 ± 0.73 , 17.3 ± 6.3 mmol/l であった。また、MHC I, IIA, IIB はそれぞれ、 42.8 ± 16.9 , 42.0 ± 12.9 , 15.2 ± 11.7 % であった。

Car-MRS と Car-Biopsy との関係について検討すると、両者の間には有意な相関関係は認められなかった ($r = 0.295$, ns)。一方、MHC IIB と Car-Biopsy との間に有意な正の相関関係 ($r = 0.627$, $p < 0.01$) が認められたが、Car-MRS との間には有意な相関関係は認められなかった ($r = 0.226$, ns)。このことから、本研究における ^1H -MRS を用いた骨格筋カルノシン濃度の評価方法は、妥当ではないことが示唆された (図 1)。

先行研究において Car-Biopsy と Type IIB 線維との間に有意な正の相関関係が認められている。本研究でも MHC IIB と Car-Biopsy との間に有意な正の相関関係が認められたが、Car-MRS との間には有意な相関関係は認められなかった。このことから、Car-MRS より Car-Biopsy のデータの方が信頼性は高いと考えられる。本研究では、クレアチン濃度が被験者間で一定であると仮定して ^1H -MRS によって得られたカルノシンピークとクレアチンピークのスペクトル比を算出して骨格筋カルノシン濃度の指標として用いた。しかし、クレアチンは速筋線維に多く含有していることが知られており、比較的速筋線維を多く有している被験者のカルノシン濃度は過大評価されている可能性も考えられる。 ^1H -MRS によって評価したカルノシン濃度の測定は、ファントムを用いるなどして、さらに検討していく必要がある。

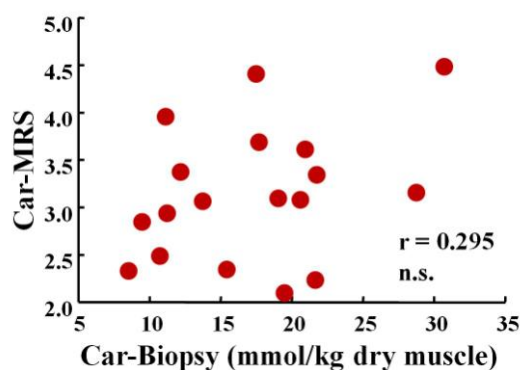


図 1 Car-Biopsy と Car-MRS との関係

(2) インターバルテストにおける各セットの平均パワーは、いずれのセットにおいても CBEX 摂取とプラセボ摂取との間に有意差は認められなかった。また、10 セット合計 (9.48 ± 0.55 , 9.36 ± 0.51 $\text{W}\cdot\text{kg}^{-1}$)、前半 5 セット (9.40 ± 1.33 , 9.29 ± 0.54 $\text{W}\cdot\text{kg}^{-1}$) および後半 5 セット (9.32 ± 1.02 , 9.22 ± 0.69 $\text{W}\cdot\text{kg}^{-1}$)

においても CBEX 摂取とプラセボ摂取との間に有意差は認められなかった。

図 2 に、インターバルテストにおける血中乳酸濃度 (La), 二酸化炭素分圧 (PCO_2), pH, および重炭酸イオン濃度 ($[HCO_3^-]$) の変化を示した。CBEX 摂取, プラセボ摂取ともに, La は運動開始から運動終了まで上昇すること, PCO_2 は運動開始後一時的に増加し, その後は低下すること, pH と $[HCO_3^-]$ は運動開始から運動終了まで低下することが認められた。中でも, pH は運動直後 (Post) において CBEX 摂取時がプラセボ摂取時と比較して有意に高値を示した。また, $[HCO_3^-]$ は 5 セット目終了時から運動終了 3 分後まで CBEX 摂取時がプラセボ摂取時と比較して有意に高値を示し, 最小値も有意に高値を示した。

本研究では, CBEX 摂取はプラセボ摂取と比較して, インターバルテストの後半における $[HCO_3^-]$ の低下抑制が認められたことから, カルノシンおよびアンセリンの経口摂取は $[HCO_3^-]$ による緩衝作用, すなわち重炭酸緩衝系の貢献度を小さくする可能性を示唆している。運動中に生成される乳酸から解離して血中に排出された H^+ は, そのほとんどが重炭酸緩衝作用によって緩衝されると報告されている。しかし, 重炭酸緩衝系の酸解離定数 (pKa) は 6.1 であるのに対して, CBEX に含まれるカルノシンおよびアンセリンの pKa はそれぞれ 6.83, 7.03 であり, より生理的 pH に近い pKa を有している。乳酸から解離した H^+ はただちに生理的に pH に近い pKa を有している非重炭酸緩衝によって緩衝されその後, 重炭酸緩衝によって緩衝されると考えられる。つまり, カルノシンおよびアンセリンは $[HCO_3^-]$ と比較して高強度運動中に高い緩衝作用を発揮し, 乳酸から解離した H^+ を素早く取込むことができるものと考えられる, そのため, カルノシンおよびアンセリンを含む CBEX 摂取により, 血中における非重炭酸緩衝作用の貢献度が高まり, 重炭酸緩衝作用の貢献度が低下したものと考えられる。

一方, 非重炭酸緩衝作用の貢献度が高まることにより, 運動によって生じた乳酸由来の H^+ を素早く取り込めるようになったのであれば, 運動中および回復中における筋 pH の低下を軽減させる可能性がある。しかしながら, 本研究では, インターバルテストにおけるパフォーマンスの向上は認められなかったことから, 筋 pH の低下は必ずしも運動パフォーマンスの低下を引き起こさない可能性がある。このことについては今後さらに検討する必要がある。

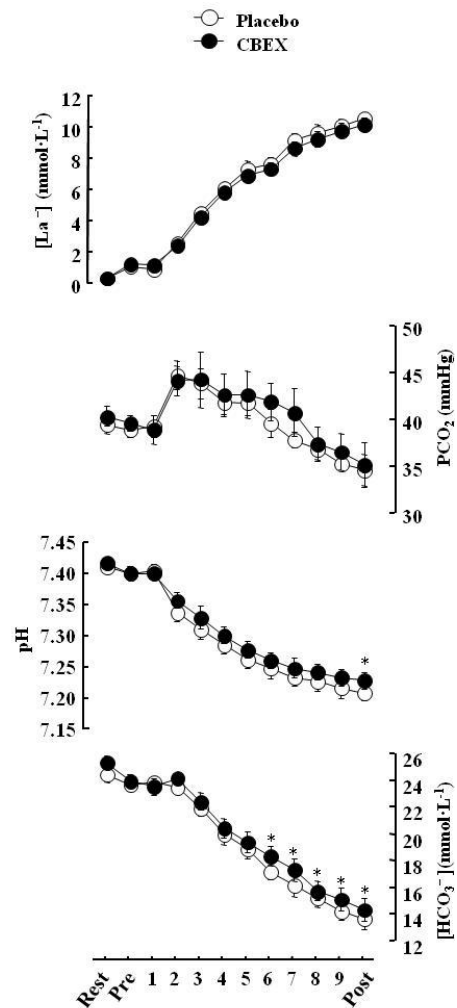


図 2 インターバルテストにおける血液パラメータの変化

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 1 件)

鈴木 康弘, 大岩 奈青, 奥脇 透, 高橋 英幸: 骨格筋カルノシン濃度の非侵襲的評価法の妥当性, 第 5 回 J I S S スポーツ科学会議, 東京, 2008. 12.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 康弘 (SUZUKI YASUHIRO)

独立行政法人日本スポーツ振興センター
国立スポーツ科学センター・スポーツ科学研究部・研究員

研究者番号: 00392697

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：