

博士論文

レジスタンス運動および抗炎症食品摂取が
慢性炎症モデルラットの
骨格筋萎縮、肝機能低下に及ぼす影響

2022年2月

日本体育大学大学院

体育科学研究科 体育科学専攻

角 公一郎

研究指導教員

中里 浩一 教授

博士論文

レジスタンス運動および抗炎症食品摂取が
慢性炎症モデルラットの
骨格筋萎縮、肝機能低下に及ぼす影響

The effects of resistance exercise
and anti-inflammatory food
on skeletal muscle atrophy and hepatic dysfunction
in the rat model of chronic inflammation

2022年2月

日本体育大学大学院

体育科学研究科 体育科学専攻

角 公一郎

Koichiro SUMI

研究指導教員

中里 浩一 教授

目 次

第1章：序論	1
1-1 サルコペニアと炎症	2
1-2 レジスタンス運動による骨格筋量増加・維持機構	4
1-3 サルコペニア対策としてのレジスタンス運動の有効性	6
1-4 サルコペニア対策としての抗炎症食品の有効性	7
1-5 レジスタンス運動による骨格筋量増加・維持機構	9
1-6 ラット慢性炎症モデル	15
1-7 本研究の目的と各章の構成	16
第2章：Peptidoglycan-polysaccharide 10S fraction 投与による	
ラット慢性炎症性筋萎縮モデルの構築	18
2-1 背景・目的	19
2-2 方法	21
2-3 結果	30
2-4 考察	48
2-5 小括	55
第3章：レジスタンス運動トレーニングと抗炎症性食品摂取が	
慢性炎症モデルラットの筋萎縮に及ぼす影響	57
3-1 背景・目的	58
3-2 方法	61
3-3 結果	70
3-4 考察	91

3-5 小括 99

第 4 章：等尺性または Stretch-Shortening Cycle 形式のレジスタンス運動が

慢性炎症ラットの肝機能に及ぼす影響 **101**

4-1 背景・目的 102

4-2 方法 104

4-3 結果 112

4-4 考察 122

4-5 小括 126

第 5 章：総合討論 128

5-1 結論 129

5-2 今後の展望 130

参考文献 137

謝辞 156

図 表

第 1 章： 序論

- Figure 1-1. 加齢に伴う骨格筋断面積の減少
- Table 1-1. サルコペニアの分類
- Figure 1-2. レジスタンス運動によるたんぱく質合成促進メカニズム概要
- Figure 1-3. レジスタンス運動と抗炎症食品による二次性サルコペニア改善スキーム
- Figure 1-4. ラット足関節筋力測定・運動負荷装置概要
- Figure 1-5. 高頻度パルス電気刺激による強制的な強縮発揮
- Figure 1-6. 等尺性、短縮性、および伸張性収縮
- Figure 1-7. 新ラット足関節筋力測定・運動負荷装置の構成概要
- Figure 1-8. 新ラット足関節筋力測定・運動負荷装置の概観
- Table 1-2. ラットにおける 5 日間の clenbuterol 4 mg /kg diet 含有飼料摂取の影響
- Figure 1-9. クレンブテロール (CB) 摂取による等尺性最大強縮トルクへの影響

第 2 章： Peptidoglycan-polysaccharide 10S fraction 投与による

ラット慢性炎症性筋萎縮モデルの構築

- Figure 2-1. 実験 2-1 の動物実験スキーム
- Figure 2-2. 実験 2-2 の動物実験スキーム
- Figure 2-3. 実験 2-2 の 2 群選抜後の動物実験スキーム
- Table 2-1. 第 2 章で使用した 1 次抗体リスト
- Figure 2-4. シンプルウエスタン分析の概要
- Figure 2-5. 体重、摂餌量、後肢踝厚、白血球数、および貧血指標の推移 (実験 2-1)
- Table 2-2. 組織重量 (実験 2-1)
- Figure 2-6. 体重当たりの相対組織重量と下肢関節炎所見例 (実験 2-1)

- Figure 2-7. 等尺性最大発揮筋力 (実験 2-1)
- Table 2-3. 血液生化学分析値 (実験 2-1)
- Figure 2-8. 体重, 摂餌量, 後肢踝厚, 白血球数, および貧血指標の推移 (実験 2-2)
- Figure 2-9. 正常および PG-PS 投与ラットにおける摂餌量および体重 (実験 2-2)
- Figure 2-10. 正常および PG-PS 投与ラットにおける炎症指標 (実験 2-2)
- Figure 2-11. 正常および PG-PS 投与ラットにおける骨格筋量および相対発揮トルク (実験 2-2)
- Figure 2-12. レジスタンス運動側および非運動側腓腹筋中の IGF-1 含有量および同化関連シグナル分子のリン酸化レベル (実験 2-2)
- Figure 2-13. 解剖時点における血中炎症性サイトカイン濃度とレジスタンス運動側腓腹筋中の同化関連シグナル分子のリン酸化レベルの相関関係 (実験 2-2)
- Figure 2-14. PG-SP による慢性炎症下での急性 RE による同化シグナル伝達

第 3 章 : レジスタンス運動トレーニングと抗炎症性食品摂取が

慢性炎症モデルラットの筋萎縮に及ぼす影響

- Table 3-1. 抗炎症食および対照食 (AIN-93G) の組成
- Figure 3-1. 実験 3-1 の動物実験スキーム
- Figure 3-2. 実験 3-2 の動物実験スキーム
- Figure 3-3. ISO 形式と SSC 形式のレジスタンス運動概要
- Table 3-1. 体重, 摂餌量および摂餌効率 (実験 3-1)
- Figure 3-4. ISO-Normal, ISO-PG, および ISO-PG+AI 群における炎症指標 (実験 3-1)
- Figure 3-5. ISO-Normal, ISO-PG, および ISO-PG+AI 群における循環サイトカイン濃度 (実験 3-1)
- Figure 3-6. ISO-Normal, ISO-PG, および ISO-PG+AI 群における ISO-レジスタンス運

動側および非運動側の腓腹筋湿重量 (実験 3-1)

Figure 3-7. ISO-Normal、ISO-PG、および ISO-PG+AI 群における ISO-レジスタンス運動側および非運動側足底筋の湿・乾燥重量 (実験 3-1)

Table 3-3. 腓腹筋重量と炎症指標との相関関係 (実験 3-1)

Figure 3-8. ISO レジスタンス運動側腓腹筋重量と炎症指標との相関における典型例(実験 3-1)

Figure 3-9. ISO-Normal、ISO-PG、および ISO-PG+AI 群における血漿 3-メチルヒスチジン濃度および血漿 3-メチルヒスチジンと TNF- α 濃度との相関 (実験 3-1)

Table 3-4. 体重、摂餌量および摂餌効率 (実験 3-2)

Figure 3-10. SSC-Normal、SSC-PG、および SSC-PG+AI 群における炎症指標 (実験 3-2)

Figure 3-11. SSC-Normal、SSC-PG、および SSC-PG+AI 群における循環サイトカイン濃度 (実験 3-2)

Figure 3-12. SSC-Normal、SSC-PG、および SSC-PG+AI 群における SSC-レジスタンス運動側および非運動側の腓腹筋湿重量 (実験 3-2)

Figure 3-13. SSC-Normal、SSC-PG、および SSC-PG+AI 群における SSC-レジスタンス運動側および非運動側足底筋の湿・乾燥重量 (実験 3-2)

Table 3-5. 足底筋乾燥重量と炎症指標との相関関係 (実験 3-2)

Figure 3-14. 足底筋乾燥重量と炎症指標との相関における典型例 (実験 3-2)

Figure 3-15. SSC-Normal、SSC-PG、および SSC-PG+AI 群における血漿 3-メチルヒスチジン濃度および血漿 3-メチルヒスチジンと TNF- α 濃度との相関 (実験 3-2)

Figure 3-16. 炎症と MPS、MPB および正味のたんぱく質出納との関係

Figure 3-17. 損傷後の骨格筋再生過程におけるマクロファージの役割

Figure 3-18. 第 3 章で得られた知見の小括

第4章： 等尺性または Stretch-Shortening Cycle 形式のレジスタンス運動が

慢性炎症ラットの肝機能に及ぼす影響

Figure 4-1. SSC-RE 実験および ISO-RE 実験のスキーム

Table 4-1. 第4章で使用した1次抗体リスト

Figure 4-2. SSC-RE 実験および ISO-RE 実験における正常ラットまたは PG-PS 投与ラットの血中サイトカイン濃度および白血球数

Figure 4-3. SSC-RE 実験および ISO-RE 実験における正常ラットまたは PG-PS 投与ラットの腓腹筋中 IL-6 含有量

Figure 4-4. SSC-RE 実験および ISO-RE 実験における正常ラットまたは PG-PS 投与ラットの肝臓重量、水分含量および肝機能指標

Figure 4-5. 各肝機能指標間の相関関係

Figure 4-6. 正常ラットまたは PG-PS 投与ラットにおける肝臓 NF κ B および STAT3 発現量

Figure 4-7. 第4章で得られた知見の小括

第5章： 総合討論

Figure 5-1. D₅-フェニルアラニンの経口摂取による同化抵抗性評価手法

Figure 5-2. PG-PS 投与ラットの同化抵抗性

Table 5-1. 市販の抗糖尿病薬とその薬効による骨格筋維持への影響

Figure 5-3. 本研究の総括

第 1 章

序論

1-1 サルコペニアと炎症

サルコペニアとは、加齢に伴う進行性の骨格筋喪失および/または衰弱を指し (Fig. 1-1、(Lexell *et al.*, 1988; 藤田聡, 2011))、身体機能障害、生活の質 (Quality of life; QOL) の低下、および死亡のリスクの増加につながる。サルコペニアの病因は、加齢以外の特定の要因がない「原発性サルコペニア」と、加齢に加えて疾患、不活動、栄養失調が疾患の病態に寄与する「二次性サルコペニア」に分類される (Table 1-1, (Cruz-Jentoft *et al.*, 2018))。

加齢以外特定の要因がないとされる「原発性サルコペニア」と疾患などを起因とする「二次性サルコペニア」ではあるが、共通の成因として慢性炎症 (Chronic Inflammation; CI) が関与する可能性が高い。がん、慢性心不全、慢性腎臓病 (CKD)、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、自己免疫疾患などの疾患に伴う慢性炎症は、持続的なインターロイキン (IL) -1β 、IL-6、腫瘍壊死因子 α (TNF α) などの循環炎症性サイトカインの増加を通じて、さまざまな組織に悪影響を及ぼすことが知られている (Chen *et al.*, 2017)。骨格筋においても、IL-1、IL-6、TNF- α などの循環炎症性サイトカインレベルの慢性的な増加がサルコペニア患者だけでなく、健常な高齢者においても、その喪失と衰弱に関連していることが示唆されている (Schaap *et al.*, 2006; Schaap *et al.*, 2009; Stenholm *et al.*, 2010; Dutra *et al.*, 2017)。つまり慢性炎症による骨格筋喪失/衰弱のメカニズムを理解し、その改善方法を見出すことは、「二次性サルコペニア」だけでなく、「原発性サルコペニア」対策を構築する上で重要であるといえる。

炎症を介した筋喪失のメカニズムの1つとして、たんぱく質異化に関与する転写因子 (例えば、Forkhead box O (FOXO)) の活性化による、骨格筋たんぱく質分解 (Muscle Protein Breakdown; MPB) の亢進がある (Bowen *et al.*, 2015; Costamagna *et al.*, 2015; Crossland *et al.*, 2019)。IL-1、IL-6、および TNF- α のラットへの投与は血中の3-メチルヒスチジン (3-MeHis) の量を増加させたと報告されている (Zamir *et al.*, 1992; Goodman, 1994)。3-MeHis は骨格筋に多量に含まれる収縮たんぱく質であるミオシンまたはアクチンの分解により血中の放出される、たんぱく質合成に再利用できないアミノ酸であり、完全ではない

ものの MPB を反映する指標として用いられる。さらに、Frost らは TNF- α の注入により、FOXO を介して Atrogin1 や筋肉の RING finger 1 (MuRF1) などのユビキチンリガーゼの mRNA 発現レベルが増加したことを報告しており (Frost *et al.*, 2007)、炎症性サイトカインによる MPB 亢進がサルコペニア、特に二次性サルコペニアの根底にあることが示唆される。

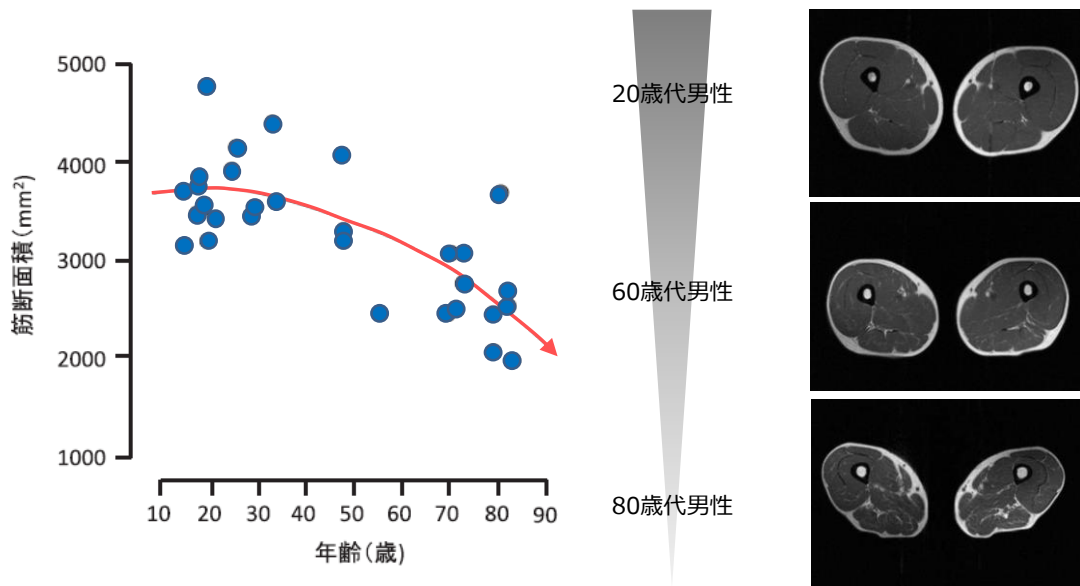


Fig. 1-1 加齢に伴う骨格筋断面積の減少

(Lexell *et al.*, 1988; 藤田聡, 2011) を元に一部改変作図

Table 1-1 サルコペニアの分類

原発性サルコペニア
加齢の影響のみで、活動・栄養・疾患の影響はない
二次性サルコペニア
<ul style="list-style-type: none"> ・ <u>活動によるサルコペニア</u> 廃用性筋萎縮、無重力など ・ <u>栄養によるサルコペニア</u> 飢餓、エネルギー摂取量不足 ・ <u>疾患によるサルコペニア</u> <ul style="list-style-type: none"> 侵襲：急性疾患、炎症（手術、外傷、急性感染症など） 悪液質：慢性疾患・慢性炎症 (がん、慢性心不全、CKD、COPD、自己免疫疾患など) 原疾患：（筋萎縮性側索硬化症、多発性筋炎、甲状腺機能亢進症など）

1-2 レジスタンス運動による骨格筋量増加・維持機構

十分な栄養と組み合わせたレジスタンス運動（Resistance Exercise; RE）は、骨格筋量と機能を向上、または維持するための最も効果的な方法の1つである。REは、mechanistic Target of Rapamycin Complex 1（mTORC1）および、Extracellular Signal-regulated Kinase（ERK）シグナル伝達を活性化することにより、骨格筋たんぱく質合成（Muscle Protein Synthesis; MPS）を増加させ、MPBを抑制することで骨格筋量の増加をもたらす（Fig. 1-2, (Drummond *et al.*, 2009)）。mTORC1は、たんぱく質の同化作用/異化作用のバランス制御におけるマスターレギュレーターであり、栄養状態、ホルモンなどの液性因子、物理的刺激など、周囲の環境からの複数の刺激を統合するハブとして働く(Hay & Sonenberg, 2004; Drummond *et al.*, 2009)。活性化されたmTORC1はセリン/スレオニンキナーゼとして機能し、p70S6キナーゼ(p70S6K)や4E binding protein 1（4E-BP1）などの標的分子のリン酸化を介して、たんぱく質合成を亢進する(Brown *et al.*, 1995; Brunn *et al.*, 1997)。

mTORC1によりリン酸化を受けて活性化された p70S6K は、下流の標的分子である

ribosomal protein S6 (rpS6) をリン酸化することにより、リボソーム複合体のアセンブリーを増強することで mRNA の翻訳開始を促す。また、他の下流標的として、eukaryotic elongation factor キナーゼ (eEFK) があり、この分子をリン酸化することで、その活性である eukaryotic elongation factor 2 (eEF2) のリン酸化を抑制する。eEF2 は脱リン酸化により活性化し、リボソーム複合体による mRNA の翻訳伸長を促進する(Drummond *et al.*, 2009)。

4E-BP1 は、mRNA キャップ結合タンパク質である eukaryotic initiation factor (eIF-4E) に結合することで、翻訳開始に必要な eIF4F 複合体の形成を阻害する分子である。4E-BP1 は mTORC1 にリン酸化されると、立体構造が変化し、eIF4E からの分離する。つまり、結果として、mTORC1 による 4E-BP1 のリン酸化は翻訳開始を亢進する(Shah *et al.*, 2000; Richter & Sonenberg, 2005)。mTORC1 を制御する上流のシグナル分子の 1 つとして Akt がある。Akt は、tuberous sclerosis 2 (TSC2) のリン酸化を介して mTORC1 を活性化する。Akt は、主にインスリンまたはインスリン様成長因子 1 (IGF-1) 受容体が作動することで、ホスファチジルイノシトール-3 キナーゼ (PI3K) を介して活性化される(Drummond *et al.*, 2009; Bowen *et al.*, 2015)。RE は、骨格筋における IGF-1 発現レベルを増加させることから、IGF-1 のオートクリン/パラクリンにより、Akt を活性化させると考えられている(Adams, 2002)。

ERK は、下流の標的因子である MAPK-interacting kinase 1 (Mink 1) や p90 ribosomal S6 kinase (p90RSK) などのキナーゼや転写因子の活性化を介して MPS を亢進させる(Pyronnet *et al.*, 1999; Stefanovsky *et al.*, 2006; Carriere *et al.*, 2008)。

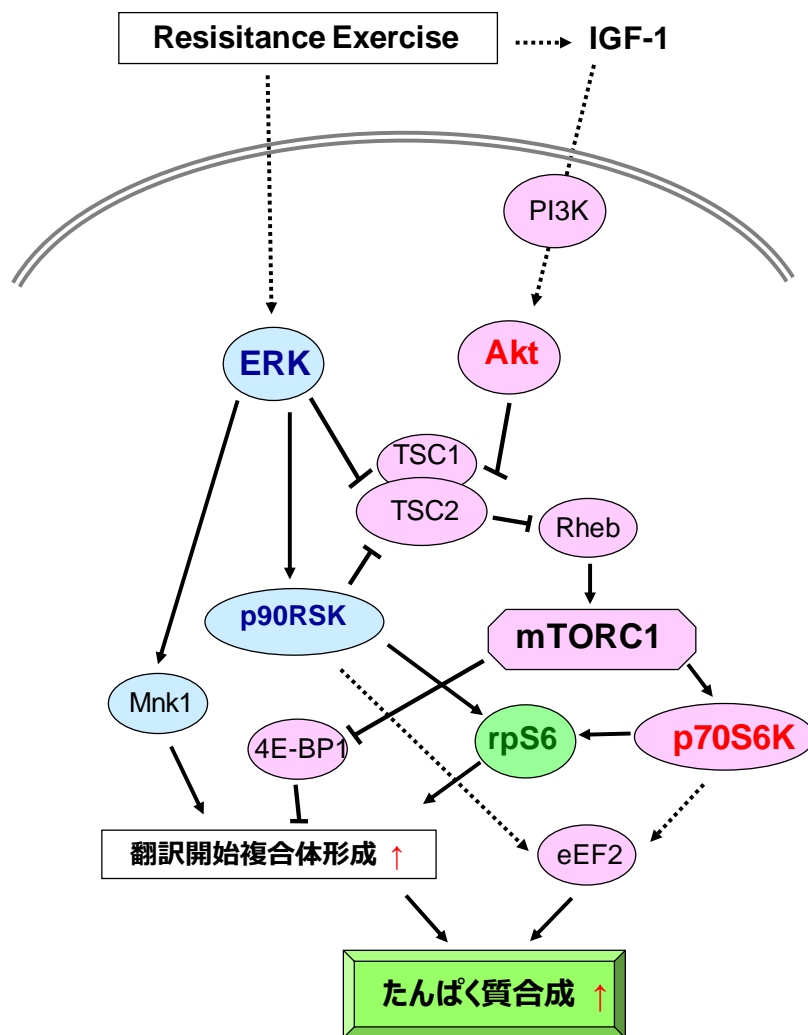


Fig. 1-2 レジスタンス運動によるたんぱく質合成促進メカニズム概要

(Drummond *et al.*, 2009)を元に一部改変作図

1-3 サルコペニア対策としてのレジスタンス運動の有効性

1-2 で示した通り、RE は MPS の亢進を介して、高齢者と悪液質患者における骨格筋量の減少を改善できる可能性がある(Battaglini *et al.*, 2012)。ただし、慢性炎症 (CI) 状態の患者において、RE による MPS 亢進が健常者と同程度に引き起こされるか否かについては明確ではない。炎症状態においては、インスリンやアミノ酸、特にロイシンなど、栄養によるたんぱく質同化刺激に対して感受性が弱まっていることが報告されており(Frost & Lang,

2011; Crossland *et al.*, 2019)、同様に、REによる同化刺激に対する感受性も弱まっている可能性がある。Kumarらは、REに対するmTORC1シグナル伝達およびMPSの亢進が年齢とともに減弱すること(Kumar *et al.*, 2009)、小川らは、高齢女性において、REを実施した際の骨格筋量の変化とTNF- α レベルとの間に負の相関関係にあることを報告している(Ogawa *et al.*, 2010)。さらに、*in vitro*の研究では、筋管細胞に対するIGF-1曝露によるmTORC1シグナル伝達経路の活性化が、TNF- α 存在下では鈍化したことが示されている(Grzelkowska-Kowalczyk & Wieteska-Skrzeczyńska, 2010)。これらの報告は直接的な証明ではないものの、慢性炎症によってREの同化作用が弱まる可能性を補強するものと考えられた。

一方、REにより、関節リウマチ患者に対するMPSが亢進すること(Mikkelsen *et al.*, 2015)、COPD患者の骨格筋断面積が増加すること(Vogliatzis *et al.*, 2007)が報告されていた。これらの知見は、REによるたんぱく質同化作用は、慢性炎症状態の患者であっても完全に失われるわけではないことを示唆している。ただし、慢性疾患の患者や高齢者は、健常若齢者と同等の強度・頻度でREを実施させることは現実的ではないことから、REによる恩恵を最大限享受できない可能性があった。

1-4 サルコペニア対策としての抗炎症食品の有効性

前述のように、CIによる炎症性サイトカインなどの慢性的な増加がMPB亢進やREを含む同化刺激に対する感受性減弱の起点である可能性がある。つまり、逆に考えると、炎症性サイトカインを抑制するための介入を組み合わせることでRE効果を最大化できると推測された。実際、老齢動物や高齢者を対象とした研究において、シクロオキシゲナーゼ(COX)阻害剤などの抗炎症薬が、食物またはREに対する同化応答を改善することが示されている(Rieu *et al.*, 2009; Trappe *et al.*, 2010)。ただし、すでに何らかの薬品を摂取していることが多い慢性疾患患者や高齢者において、薬を追加することは簡単ではない。

そこで、食品の機能、特に三次機能による抗炎症作用に着目し、REとの組み合わせによ

る二次性サルコペニア改善を目指すこととした (Fig. 1-3 参照)。1984 年から実施された文部省の特定・重点領域研究成果に基づいて、食品機能に、栄養としての一次機能、嗜好性に関する二次機能に、三次機能として生体調節機能が学術的に加えられた。(滝波弘一, 2003)。食品の三次機能が体系化されてからこれまでに、免疫・生体防御系、消化・循環系、内・外分泌系、神経系などの高次生命活動の恒常性維持や老化・疾病からの回復・予防など様々な三次機能が報告されており、本研究では免疫・生体防御調節機能を有する食品に着目した。

魚油に含まれる ω 3 長鎖脂肪酸であるエイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA)) (Chapkin *et al.*, 2009; Wall *et al.*, 2010)、牛乳に含まれる乳清たんぱく質の一つである α -ラクトアルブミン (α La) (Yamaguchi *et al.*, 2009; Yamaguchi *et al.*, 2014)は日常的に摂取している安全性の高い食品であるが、COX 阻害活性などの抗炎症性の三次機能を有することが示されていた。そこで我々の研究グループでは、実験動物用に、基本食のタンパク質と脂質の半分を α La と EPA/DHA が豊富な魚油 (2 : 1 EPA : DHA) に置き換えた抗炎症食を設計し、本研究に用いた。上記のたんぱく質源と脂質源の半量ずつの置換は、正常および疾病モデル動物において摂餌量に大きな影響を及ぼさないことを確認済みである。Mickleborough らによって、EPA と DHA を 2 : 1 の比率で含む油脂により、高強度運動後の炎症症状が軽減すること(Mickleborough, 2013)、さらに、基本食の脂質源を魚油に置き換えた栄養介入を受けた患者では、癌悪液質の重症度が 30~100%低下すること(Giles *et al.*, 2016)が示されており、当研究で設計した抗炎症食摂取により慢性炎症症状を緩和することが推測された。

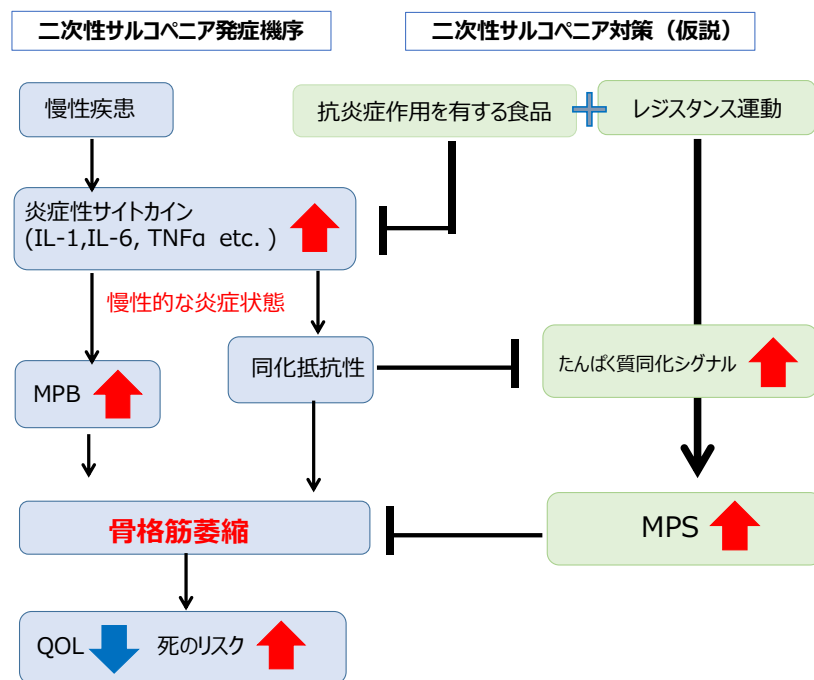


Fig. 1-3 レジスタンス運動と抗炎症食品による二次性サルコペニア改善スキーム

1-5 ラットレジスタンス運動モデル

慢性炎症状態における筋萎縮に対する RE の作用を理解するためには、最終的に臨床での検証が必要であるものの、実験動物による詳細な検討は大きな手掛かりとなる。そこで我々のグループでは、中里らが開発した筋力測定・運動負荷装置を用いたラットレジスタンス運動モデルに着目した。当装置は、ラットに麻酔下で電気刺激を印加し、発揮された足関節底屈トルクをフットプレートに接続されたロードセルによって検出する構成となっている (Fig. 1-4)。ミリ秒レベルのパルス電気刺激頻度を上げていくと、筋の収縮形式が単縮から強縮になり、100Hz 程度で最大強縮トルクが得られる (Fig. 1-5)。このような電気刺激による最大強縮は骨格筋同化シグナル伝達経路を活性化し、健常ラットにおいて筋肥大を誘発することから、RE 運動のモデルとして用いられている (Haddad & Adams, 2002; Adams *et al.*, 2004; Tsutaki *et al.*, 2013; Ogasawara *et al.*, 2016)。

また、中里らの装置はフットプレートのシャフトをサーボモーターとパウダーブレーキ

で制御することが可能となっており、フットプレート位置を固定したまま電気刺激を課した場合は等尺性 (Isometric; ISO) レジスタンス運動となり、フットプレートを任意の一定した角速度で回転させながら電子刺激を課した場合は、等速性 (Isokinetic) の伸長性 (Eccentric; ECC)、または短縮性 (Concentric; Con) 運動となる (Fig. 1-6)。中里らは、当装置を使用して、アップルポリフェノールの等尺性最大筋力の向上作用(Nakazato *et al.*, 2007)や、ECC 運動時の筋損傷予防効果(Nakazato *et al.*, 2010)を報告している。また、中里らと同グループの蔦木らは、当装置を用いた等尺性レジスタンス運動を 6 回継続するトレーニングにより、筋肥大が誘発されることを示している(Tsutaki *et al.*, 2013)。

これらの報告から、当装置による運動負荷はレジスタンス運動モデルとして妥当であることが明らかであった。ただし、電気刺激とフットプレートのコントロールがマニュアル式あることなどから、1 セット内で複数回運動させる場合、特に ECC や CON、それらのを組み合わせた形式のレジスタンス運動を安定的に課すといった面で、改良する余地があった。

そこで我々のグループでは中里らの協力の下で、上に示した装置と同等の性能を持ちつつ、電気刺激とフットプレート制御を協調して実施できる装置を開発した (Fig. 1-7,8)。

我々は当研究に先立って、中里らの装置と新規開発した装置の双方で、 $\beta 2$ アドレナリン受容体作動薬投与による筋肥大モデルラットを用いた検討を実施した。その結果、筋肥大に基づく等尺性筋力増加を 2 装置で同様に検出できることを確認しており、新規開発装置の最大筋力測定装置としての性能に問題がないことを確認した (新装置による結果を Table 1-2、Fig. 1-9 に示した(Sumi *et al.*, 2014))。また、経日的な 5 回の等尺性レジスタンス運動負荷 (トレーニングとする) により、上述の蔦木らの研究(Tsutaki *et al.*, 2013)と同様に、筋肥大が誘導されることを確認した (未発表データ)。これらの結果から、我々の新ラット足関節筋力測定・運動負荷装置により、中里らの先行知見と矛盾しない成果が得られることが確認できたため、本装置を用いて、慢性炎症下での RE の有効性検証を実施することとした。

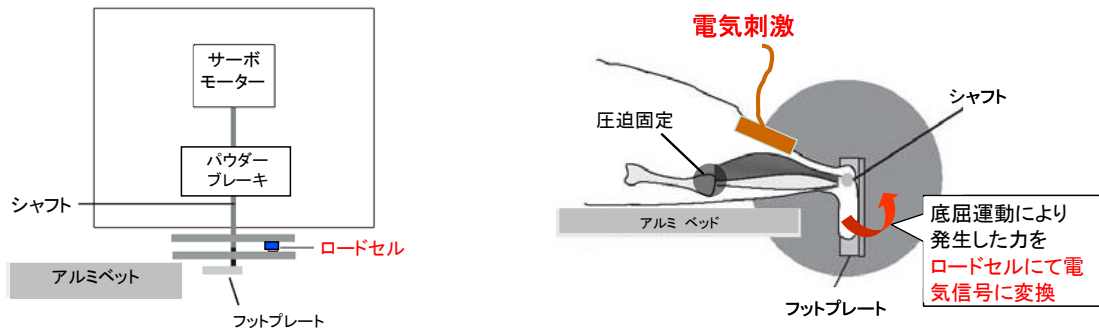


Fig. 1-4 ラット足関節筋力測定・運動負荷装置概要

(Nakazato *et al.*, 2007)より作図。

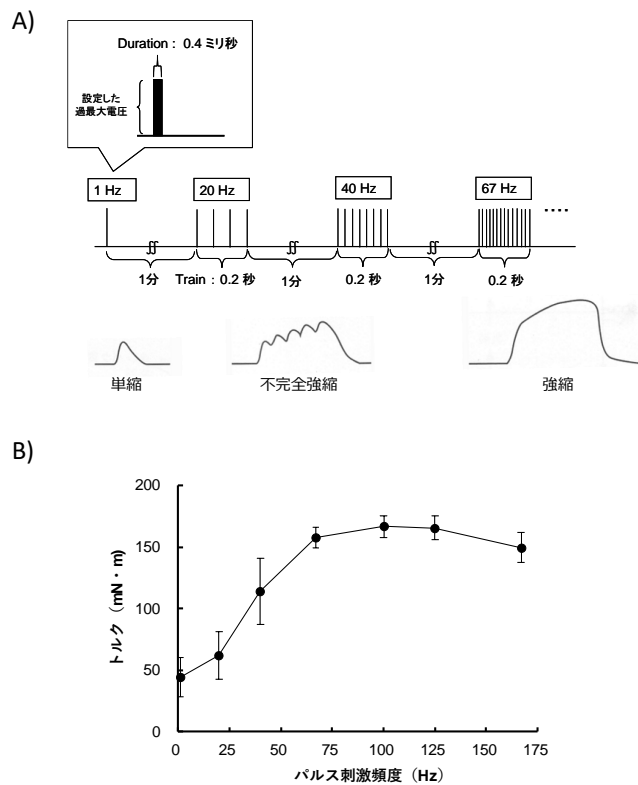


Fig. 1-5 高頻度パルス電気刺激による強制的な強縮発揮

A)パルス電気刺激頻度と単縮、強縮の関係。B) ラット足関節筋力・運動負荷装置を用いた、パルス刺激頻度による発揮トルク変動の測定例。75~100Hz で発揮トルクがプラトーに達しており、完全強縮となったことが示唆される。

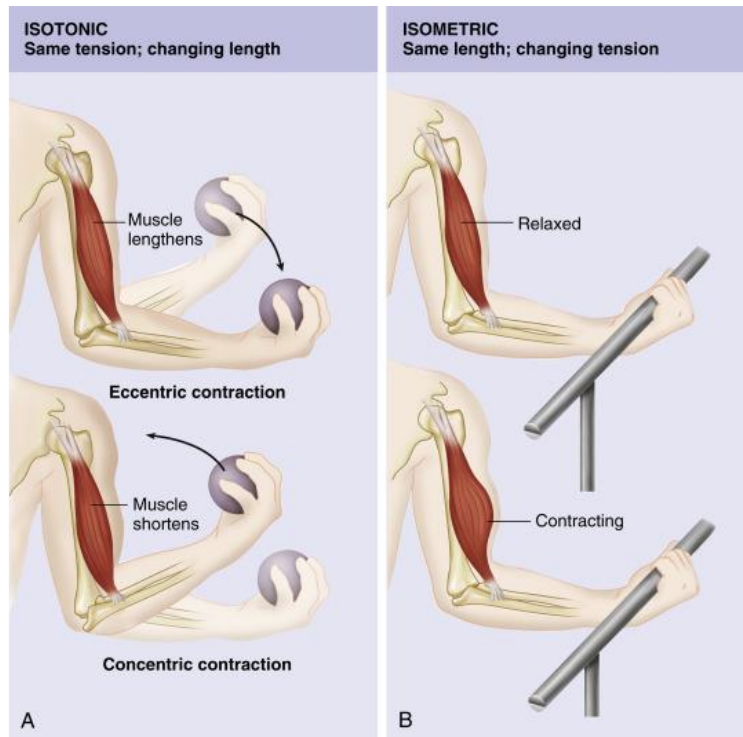


Fig. 1-6 伸張性（A 上段）、短縮性（A 下段）および等尺性（B 下段）収縮

文献(Dunleavy, 2019)より転載。伸張性、短縮性収縮は等張性収縮を例示したが、等速性場合もある。

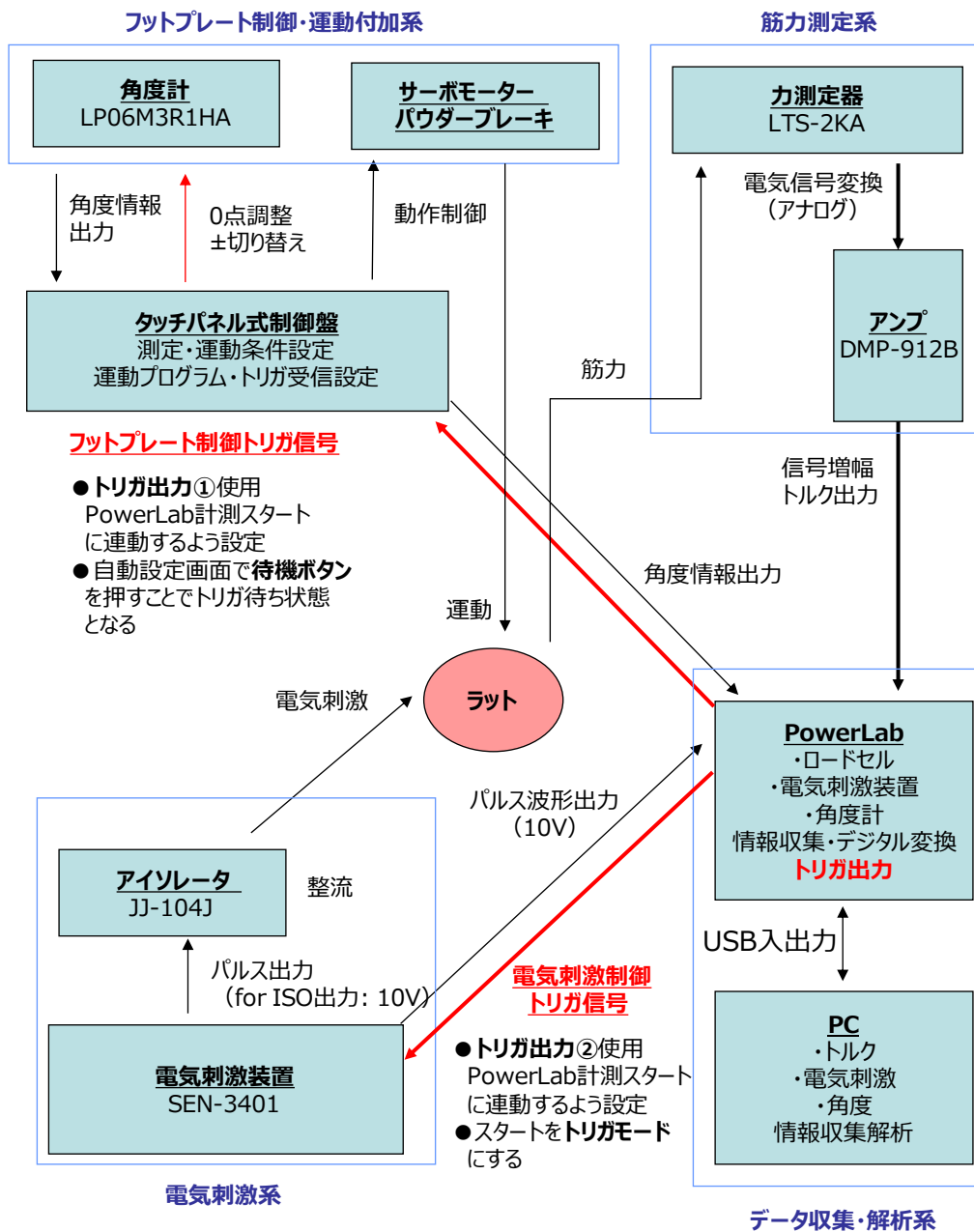


Fig. 1-7 新ラット足関節筋力測定・運動負荷装置の構成概要

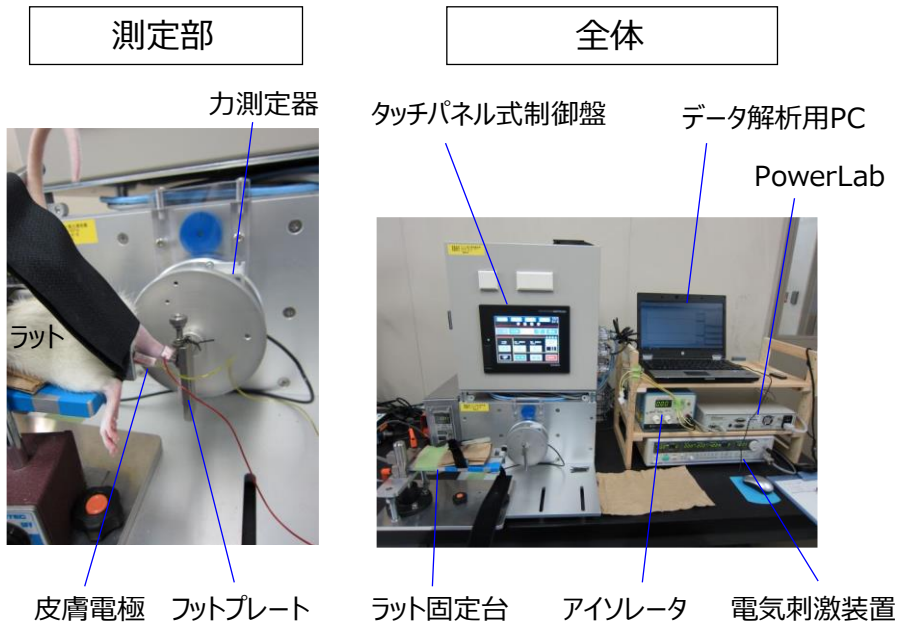


Fig. 1-8 新ラット足関節筋力測定・運動負荷装置の概観

Table 1-2 ラットにおける 5 日間の clenbuterol 4 mg /kg diet 含有飼料摂取の影響

(Sumi *et al.*, 2014)

	Control (n = 13)		Clenbuterol (n = 15)		
Body wt (g)					
Initial	274.2	± 2.6	273.7	± 2.7	
Final	293.9	± 2.9	307.2	± 3.4	**
Gain	19.7	± 0.9	33.5	± 1.2	***
Food intake (g)	98.5	± 2.2	91.8	± 1.9	*
Body wt gain/food intake (g/g)	0.20	± 0.01	0.37	± 0.01	***
Gastrocnemius (g)	1.35	± 0.02	1.57	± 0.02	***
Gastrocnemius/body wt (mg/g)	4.61	± 0.04	5.12	± 0.05	***
Soleus (g)	0.11	± 0.00	0.13	± 0.00	***
Soleus/body wt (mg/g)	0.38	± 0.01	0.41	± 0.01	**

Values are mean ±SE. wt Weight
Significantly different from control group, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001.

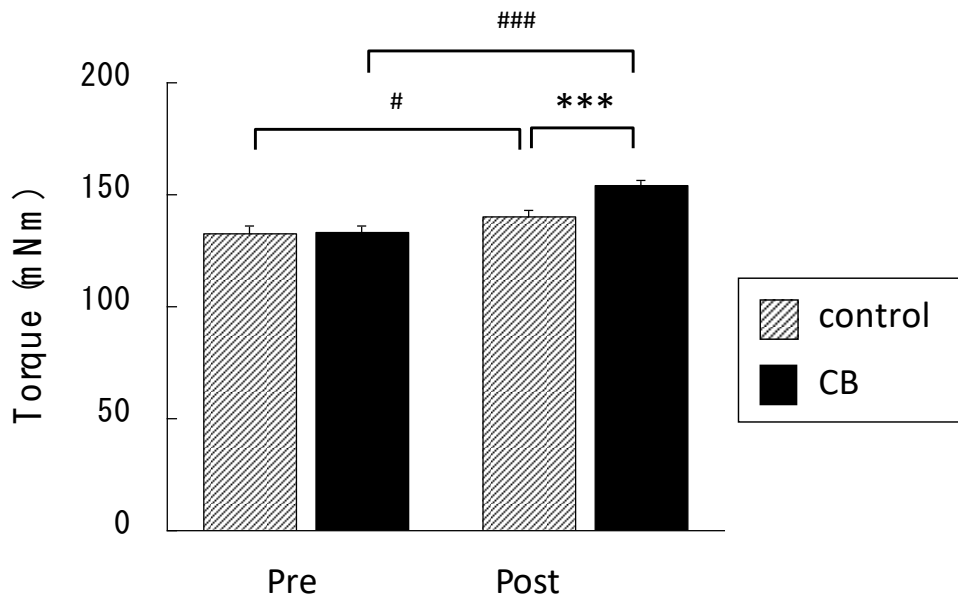


Fig.1-9. クレンプテロール (CB) 摂取による等尺性最大強縮トルクへの影響 (Sumi *et al.*, 2014).

クレンプテロール供与前 (Pre) および 5 日間供与後 (Post) における、ラット足関節強縮トルクの *in vivo* 測定結果。腓腹筋への経皮電気刺激により最大強縮トルクを惹起させた。データは平均値 ± 標準誤差で示した。 (control group; n = 13, CB group; n = 15). ***P < 0.001 (群間比較) . #P < 0.05, ###P < 0.001 (各群における前後比較)。

1-6 ラット慢性炎症モデル

本研究では、RE が CI 条件下においても骨格筋の同化反応を促進すると仮定した。さらに、抗炎症食品が CI 条件下における同化反応を改善し、筋萎縮を改善するとの仮説を実証することを目的とした。これらの仮説を探求するための慢性炎症モデルとしては、

- ①慢性的に炎症症状が持続するが、致命的でないこと。
- ②ラット足関節筋力測定・運動負荷装置によってレジスタンス運動を課せること。
- ③摂餌量が大幅に減少しないこと。

などの条件を満たすことが必要であると考えられた。

これまでに様々な疾病モデル(Granado *et al.*, 2007; Mastrocola *et al.*, 2008; Steffen *et al.*, 2008; Castellero *et al.*, 2011; Ramírez *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; de Oliveira Nunes Teixeira *et al.*, 2013; Filippin *et al.*, 2013; Little *et al.*, 2017)や、炎症性サイトカイン投与による炎症模倣モデル(Zamir *et al.*, 1992; Goodman, 1994; Frost *et al.*, 2007)が報告されていたが、本研究においては、上記の条件を満たす可能性のあるモデルとして、Theurlらによって報告された Peptidoglycan-polysaccharide 10S fraction (PG-PS) 投与による慢性炎症モデルラット(Theurl *et al.*, 2009)に着目して取り組むこととした。

1-7 本研究の目的と各章の構成

本研究では二次性サルコペニア対策としてのレジスタンス運動と抗炎症食品の有用性の検証を目的として、以下各章で示した課題に取り組んだ。

第2章：PG-PS 投与によるラット慢性炎症性筋萎縮モデルの構築

慢性炎症性貧血モデル作出に使用される PG-PS の投与用量を最適化し、RE と抗炎症食品の評価に適した、新たな慢性炎症性筋萎縮モデルラット (CI ラット) を構築した。また、構築したモデルラットに急性の RE を課し、同化シグナル伝達への影響を検討した。

第3章：RE と抗炎症性食品摂取が慢性炎症モデルラットの筋萎縮に及ぼす影響

第2章で構築した CI ラットに対する、複数回の RE トレーニングおよび抗炎症食品摂取による筋萎縮軽減作用を検証した。また、RE 運動形式による違いを検証するため、等尺性 RE トレーニング実験に引き続いて、ECC、ISO、CON 収縮を組み合わせ、Stretch-Shortening Cycle (SSC) 形式の RE および抗炎症食品摂取による筋萎縮軽減作用を検証した。

第4章：RE が慢性炎症モデルラットの肝機能に及ぼす影響

慢性炎症時の RE は骨格筋の維持だけでなく、他臓器の機能不全などを改善する可能性が

ある。第4章では、肝臓機能に着目してISO、SSC形式のREの作用を比較検討し、二次性サルコペニアの予後不良対策におけるRE形式による影響の違いを検証した。

第5章：総合討論

第2～4章までで得られた知見を結論し、二次性サルコペニア対策としてのREおよび抗炎症食品摂取の有用性、および今後の臨床応用に向けた進め方を議論した。

第 2 章

Peptidoglycan-polysaccharide 10S fraction 投与による ラット慢性炎症性筋萎縮モデルの構築

2-1 背景・目的

第1章で示した通り、サルコペニアは身体機能低下だけでなく、QOL低下および致死リスク増加につながることから(Cruz-Jentoft *et al.*, 2018)、そのメカニズムおよび対抗策に関する知識の集積が求められている。本研究では特に慢性疾患患者などでみられる二次性サルコペニア(Cruz-Jentoft *et al.*, 2018)に着目して、レジスタンス運動および抗炎症作用を有する食品摂取の対抗策としての有用性検証に取り組むこととした。

これまで、慢性的な炎症状態が惹起され、また付随して骨格筋萎縮が引き起こされる動物モデルとして、癌、糖尿病、心不全、腎不全および関節炎モデルが報告されている(Granado *et al.*, 2007; Mastrocola *et al.*, 2008; Steffen *et al.*, 2008; Castellero *et al.*, 2011; Ramirez *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; de Oliveira Nunes Teixeira *et al.*, 2013; Filippin *et al.*, 2013; Little *et al.*, 2017)。ただし、これらのモデルではその疾病の致死性や重度障害やそれに伴う摂餌量低下などが懸念され、レジスタンス運動負荷によるトレーニングや、抗炎症食品摂取の影響を評価する上で不適當であると考えられた。

また、実験的に炎症性サイトカインである IL-1、IL-6 および TNF α などを慢性的に投与することで骨格筋に対する影響を調べることも実施されてきた(Zamir *et al.*, 1992; Goodman, 1994; Frost *et al.*, 2007)。これらは各炎症性サイトカインの骨格筋への影響とそのメカニズムを検証する上で優れているものの、生理的な条件とは言い難い。

そこで、本研究では慢性炎症による筋萎縮に対する RE や食品の有効性評価に適したモデル候補として Theruri らが報告した *Streptococcus Pyogenes* の細胞壁を単離・精製した peptidoglycan-polysaccharide 10S fraction (PG-PS) をラット腹腔内投与することによって得られる慢性炎症性貧血モデル(Theurl *et al.*, 2009)に着目した。PG-PS 投与による炎症応答には他の疾患モデルには無い特徴があり、投与後 3~4 日目をピークに急性炎症反応が起こり、一回落ち着いた後に投与 12 日目頃から慢性的な炎症反応が長期間持続する。また、致死性は低く、長期的な炎症状態持続の帰結として PG-PS 投与 3 週間後頃から貧血症状が惹起される(Theurl *et al.*, 2009)。貧血は易疲労感や活力低下などの症状が出るだけでなく、

特に高齢者においては運動機能低下(Penninx *et al.*, 2004) や骨格筋量低下(Cesari *et al.*, 2004; Moon *et al.*, 2015) と関連することが知られている。貧血の原因として最も頻度が高いのは鉄欠乏性貧血であるが、悪性腫瘍や、自己免疫疾患（関節リウマチなど）、慢性心不全、肝不全、慢性腎不全、慢性閉塞性肺疾患（COPD）などの基礎疾患や肥満、加齢に伴う慢性炎症に起因する場合がある。このような炎症性貧血は、IL-6 や TNF- α などの炎症性サイトカインが関与する鉄利用障害や造血能低下などにより惹起される(譲, 2014)。つまり、PG-PS 投与による貧血モデルは生理的なレベルでの慢性炎症症状を再現したモデルであると考えられ、付随して骨格筋萎縮も惹起されることが予想された。しかし、これを確かめた報告はこれまでに認められなかった。また、PG-PS 投与による炎症反応は脾臓の免疫細胞から放出される炎症性サイトカインが関与する全身性の応答であるが(Kimpel *et al.*, 2003)、ラムノース当量で 25ug~15ug/gBW での PG-PS 投与においては下肢の浮腫や足関節幅の増大といったリウマチ様関節炎症状など局所的な影響が大きくなる(Kimpel *et al.*, 2003; Bernier *et al.*, 2004; Hannig *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2011)。重度の足関節炎は浮腫などに起因する肥厚を呈することから、ラット足関節筋力測定・運動負荷装置による RE 負荷が難しい可能性があった。

そこで、第 2 章においては、まず、Theruri らが報告した PG-PS 投与による慢性炎症性貧血モデルラットを再現し、付随して骨格筋萎縮が誘導されるか否かを検証することとした。その後、PG-PS の投与用量を最適化により、慢性炎症による貧血や骨格筋萎縮が一貫して誘導されるが、関節炎症状、摂餌量への影響が小さい、新しい慢性炎症性筋萎縮モデルラットの構築を目指した。

更に、新たに構築した慢性炎症モデルラットにおいて、同化抵抗性が認められるか否かを検証する目的で、急性 RE に対するたんぱく質同化シグナル伝達経路の分析を実施した。

2-2 方法

2-2-1 試薬、材料

Streptococcus Pyogenes の細胞壁を単離・精製した peptidoglycan-polysaccharide 10S fraction (PG-PS) は Becton, Dickinson and Company (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA) から入手した。AIN-93G の原材料の内、L-シスチンおよび大豆油は富士フィルム和光純薬 (大阪、日本) から、それ以外の原料はオリエンタル酵母工業 (東京、日本) から入手した。

2-2-2 実験動物

本章の動物実験は(株)明治動物実験倫理審査委員会の承認の元 (承認番号: 2015_3871_0191 および 2015_3871_0252)、2015 年~2016 年にかけて実施された。また、全ての動物実験は(株)明治で作成された「動物実験における倫理規定」および「動物実験審査申請書ガイドライン」に記載の項目を遵守して実施した。

雌性 Lewis ラット (7 週齢~8 週齢) は日本チャールズ・リバー (神奈川、日本) から入手した。受け入れた動物は最低 1 週間の環境馴化期間を経て実験に供した。なお、12 時間の明-暗サイクル、室温を 23°C とし、個別ケージで飼育した。馴化期間は標準固形飼料 CRF-1 (日本クレア) で飼育した。

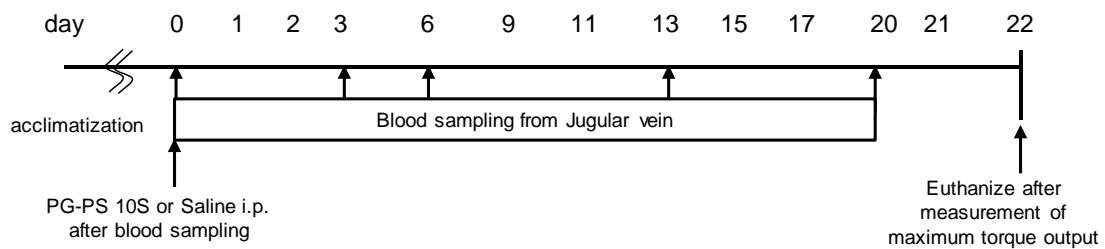
2-2-3 動物実験スキーム

2-2-3-1 実験 2-1 : PG-PS 用量設定試験 1

実験 2-1 の動物実験スキームを Fig. 2-1 に示した。雌性 Lewis ラット 18 匹を環境馴化後、AIN-93G (粉餌) に変更して更に 5 日間馴化して実験に用いた。馴化後、ラット 18 匹を、無作為に試験開始前解剖 (Pre) 群 3 匹、対照 (Control) 群 3 匹、低用量 (Low-PGPS) 群、中用量 (Mid-PGPS) 群、高用量 (High-PGPS) 群それぞれ 4 匹の 4 群に割り付けた。割り付け後、後肢踝厚さを電子ノギスで計測し、採血を実施した。その後、Low-PGPS、Mid-PGPS、High-PGPS 群に PG-PS 10S (ラムノース当量で約 5mg/mL の peptidoglycan-polysaccharide

polymer を含有する生理食塩溶液) をラムノース当量で各々7.5、10、15 μ g/gBW となるように腹腔内投与した。試験前解剖群および対照群には同量の生理食塩水を腹腔内投与した。試験前解剖群は、腹腔投与日の夜から絶食させ、翌日、イソフルレン麻酔下で経皮電気刺激による等尺性最大筋力測定を実施した。筋力測定 1 時間後にイソフルラン麻酔下で腹部下行大静脈から全採血し、屠殺した。その後、速やかに肝臓、脾臓、十二指腸、下肢骨格筋を採取・秤量し、凍結保存した。

その他の群のラットは腹腔投与 1、2、3、4、7、9、11、14、17、21 日後の足関節幅を電子ノギスで計測し、4、7、14、21 日後は併せて部分採血を実施した。なお、部分採血は全てイソフルラン麻酔下で頸静脈から 200 μ L 採取した。投与 23 日後の夜より絶食させ、翌日、イソフルレン麻酔下で経皮電気刺激による等尺性最大筋力測定を実施した（詳細な方法は 2-2-6 に示した）。筋力測定 1 時間後にイソフルラン麻酔下で腹部下行大静脈から全採血し、屠殺した。その後、速やかに肝臓、脾臓、後腹壁脂肪、下肢骨格筋を採取・秤量し、凍結保存した。



Group	n	Dose of PG-PS at a rhamnose dose equivalent (μ g /g B.W.)	note
Pre	3	0	Euthanized at day1
Control	3	0	
Low-PGPS	4	7.5	
Mid-PGPS	4	10	
High-PGPS	4	15	

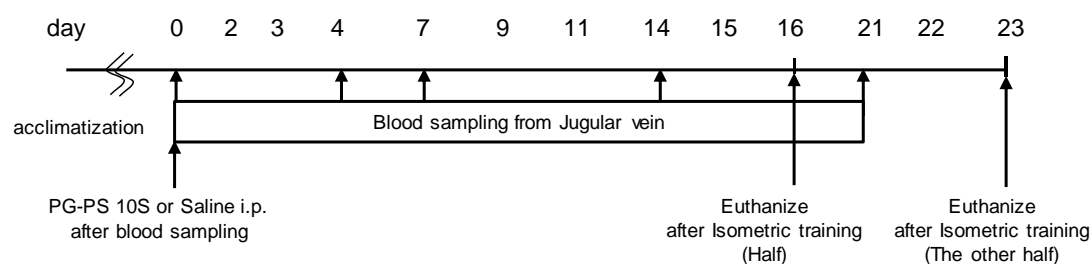
Fig. 2-1 実験 2-1 の動物実験スキーム

2-2-3-2 実験 2-2 : PG-PS 用量設定試験 2

実験-2-2 の動物実験スキームを Fig. 2-2 に示した。雌性 Lewis ラット 24 匹を環境馴化後、AIN-93G (粉餌) に変更して更に 4 日間馴化して実験に用いた。馴化後、ラットを無作為に試験対照 (Control) 群 6 匹、低用量 (Low-PGPS) 群 5 匹、中用量 (Mid-PGPS) 群 7 匹、高用量 (High-PGPS) 群 6 匹に割り付けた。割り付け後、足関節幅を電子ノギスで計測し、採血を実施した。その後、Low-PGPS、Mid-PGPS、High-PGPS 群に PG-PS 10S をラムノース当量で各々 2.5、5、7.5 $\mu\text{g/gBW}$ (平均) となるように腹腔内投与した。対照群には同量の生理食塩水を腹腔内投与した。ラットは腹腔投与 1、2、3、4、7、9、11、14、16、21 日後の足関節幅を電子ノギスで計測し、4、7、14、21 日後は併せて部分採血を実施した。なお、部分採血は全てイソフルラン麻酔下で頸静脈から 200 μL 採取した。

本試験では、各群の約半数を腹腔投与 15 日後の夜から絶食させ、翌日、イソフルレン麻酔下で経皮電気刺激による等尺性レジスタンス運動を課した (詳細な方法は 2-2-6 に示した)。レジスタンス運動 1 時間後にイソフルラン麻酔下で腹部下行大静脈から全採血し、屠殺した。その後、速やかに肝臓、脾臓、十二指腸、下肢骨格筋を採取・秤量し、凍結保存した。

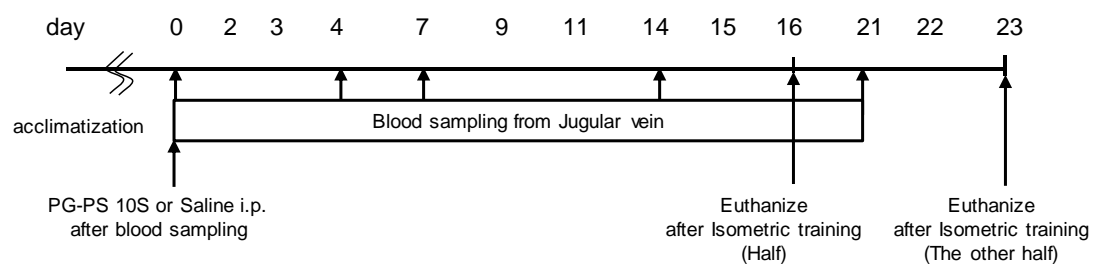
残りの個体は、投与 22 日後の夜より絶食させ、翌日、イソフルレン麻酔下で経皮電気刺激による等尺性レジスタンス運動を課した。レジスタンス運動 1 時間後にイソフルラン麻酔下で腹部下行大静脈から全採血し、屠殺した。その後、速やかに肝臓、脾臓、後腹壁脂肪、下肢骨格筋を採取・秤量し、凍結保存した。



Group	n (2week n / 3 week n)	Dose of PG-PS at a rhamnose dose equivalent ($\mu\text{g} / \text{g B.W.}$)	note
Control	6 (3 / 3)	0	
Low-PGPS	5 (2 / 3)	2.5	
Mid-PGPS	7 (3 / 4)	5	
High-PGPS	6 (3 / 3)	7.5	Same dose as Low-PGPS group at experiment 2-1

Fig. 2-2 実験 2-2 の動物実験スキーム

なお、実験 2 においては、予備解析実施後に、Control 群および Mid-PGPS 群を選抜し、それぞれ Normal 群、PG-PS 群と再設定後、詳細な分析を 2 群間で実施した。選抜後の試験スキームを Fig. 2-3 に示す。



Group (renamed)	n (2week n / 3 week n)	Dose of PG-PS at a rhamnose dose equivalent ($\mu\text{g} / \text{g B.W.}$)	note
Normal	6 (3 / 3)	0	Control group at exp. 2-2
PGPS	7 (3 / 4)	5	Mid PG-PS group at exp. 2-2

Fig. 2-3 実験 2-2 の 2 群選抜後の動物実験スキーム

2-2-4 血液学分析

白血球数、赤血球数、およびヘモグロビン含量は EDTA を添加した全血を使用して、全自動血算分析装置 XT-1800i (シスメックス、兵庫、日本)で分析した。

2-2-5 血漿サイトカイン分析

血漿中の IL-1 β 、IL-6 および TNF α 濃度はマルチプレックスイムノアッセイシステム Bio Plex200 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて測定した。上記の3種のサイトカインを同時測定するために、Rat reagent kit (Bio-Rad、171-304070M) およびラット IL-1 β (Bio-Rad、171-L1008M)、ラット IL-6 (Bio-Rad、171-L1012M)および、ラット TNF- α (Bio-Rad、171-L1025M)捕捉磁気ビーズを組み合わせたカスタムパネルを構築して使用した。

2-2-6 等尺性最大筋力測定および等尺性レジスタンス運動

等尺性最大筋力測定および等尺性レジスタンス運動は第 1 章で示した新規作成ラット足関節筋力測定・運動負荷装置を用いて以下の方法で実施した。

2-2-6-1 等尺性最大筋力測定

ラットをイソフルラン麻酔下で固定台上にうつ伏せに固定した。右下肢の膝を固定台に圧迫固定し、足関節をフットプレートに 90°の角度で固定した。剃毛したふくらはぎに皮膚電極を貼り、電気刺激により強制的に強縮運動させた。電気刺激に用いるパルス幅は 4ms とし、負荷電圧は、単独パルス刺激による単縮発揮筋力が最大となるように設定した。強縮は上記の幅、電圧のパルスを 100Hz で 300 回 (約 3 秒間) 課すことで発揮させた。強縮は 5 秒間隔を開けて 2 回発揮させた。フットプレートにかかる力 (トルク) をラット足関節筋力測定・運動負荷装置に組み込まれたストレインゲージでリアルタイムに測定し、2000Hz の頻度で Power Lab にてデジタルデータとして収集した。なお、30Hz 以下の計測値はノイズとしてデジタルフィルタ処理した。取得したデジタルデータは事前に作成した標準分銅を用

いた検量線により国際標準単位に換算した。得られた強縮発揮トルクの最大値を等尺性最大発揮筋力とした。

2-2-6-2 等尺性レジスタンス運動

ラットをイソフルラン麻酔下で固定台上にうつ伏せに固定した。右下肢の膝を固定台に圧迫固定し、足関節をフットプレートに 90°の角度で固定した。剃毛したふくらはぎに皮膚電極を貼り、電気刺激により強制的に強縮運動させた。電気刺激に用いるパルス幅は 4ms とし、負荷電圧は、単独パルス刺激による単縮発揮筋力が最大となるように設定した。強縮は上記の幅、電圧のパルスを 100Hz で 300 回（約 3 秒間）課すことで発揮させた。等尺性レジスタンス運動は上記の強縮刺激を 5 秒間隔で 5 回発揮させることを 1 セットとし、セット間に 3 分間休憩をはさんで 4 セット実施させた（計 20 回の強縮刺激負荷）。フットプレートにかかる力（トルク）をラット足関節筋力測定・運動負荷装置に組み込まれたストレインゲージでリアルタイムに測定し、2000Hz の頻度で Power Lab にてデジタルデータとして収集した。30Hz 以下の計測値はノイズとしてデジタルフィルタ処理した。取得したデジタルデータは事前に作成した標準分銅を用いた検量線により国際標準単位に換算した。得られた強縮発揮トルクの最大値を等尺性最大発揮筋力とした。

2-2-7 細胞内シグナル分析

分析サンプルの調製方法は(Sumi *et al.*, 2014)に記載の方法を一部改変して用いた。具体的には、まず、液体窒素下で乳鉢と乳棒を用いて粉末化した骨格筋サンプルに、氷冷した 0.1% プロテアーゼ阻害剤カクテル（Sigma, St. Louis, MO USA）およびフォスファターゼ阻害剤（50 mM フッ化ナトリウム, 24 mM β -グリセロリン酸、および 1 mM オルトバナジン酸ナトリウム）を添加した RIPA バッファー（CST, Beverly, MA, USA）を加えホモジネートした。ホモジネートは 21,880 g、4°C で 10 分遠心分離し、上清を採取した。採取した上清中のたんぱく質濃度を Bradford protein assay kit (Expedeon Protein Solutions, Harston,

Cambridgeshire, UK)を用いて測定し、終濃度が 2 mg または 0.5mg/mL となるように Leammi ウェスタンブロットサンプルバッファーと混合して 85°C で 10 分変性処理し、細胞内シグナル分析サンプルとした。

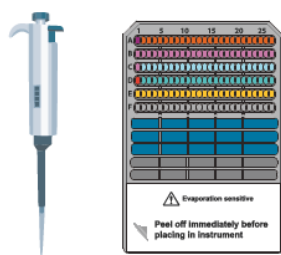
シンプルウェスタン分析は全自動キャピラリー電気泳動イムノアッセイシステム Wes (Protein Simple, California, USA) を用い、メーカー指定の Separation module および Detection module を使用して分析した (Fig. 2-4)。具体体には、変性後の分析サンプルを分析直前に Separation module に付属する蛍光マスターミックスと 4:1 で混合し、Separation module のゲルプレートに 5 uL アプライした。ブロッキングおよび 1 次抗体希釈液には Detection module 付属の antibody diluent を用いた。使用した 1 次抗体のリストおよび希釈倍率を Table 3-1 に示した。使用した抗体については、Table 2-1 の希釈倍率において、特異的なピークが分離・検出可能であり、そのピークのみかけの分子量が理論分子量とほぼ同様の位置にあることを確認してから用いた。2 次抗体には Detection module 付属の ready-to-use の horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ウサギ IgG 抗体を用いた。ピークの検出には Detection module 付属の Luminol-peroxide mixture を用いた。Separation module 付属のキャピラリーおよび分析サンプルおよび各試薬をアプライしたゲルプレートを Wes にセットし、メーカー推奨のプロトコルで分析を実施した。得られたクロマトグラムは Compass software (Protein Simple, California, USA)を用いて Gaussian fitting protocol によりスムージングし、ピーク面積を算出した。また、当ソフトを利用してクロマトグラムをウェスタンブロット様のバンド画像に変換した。シンプルウェスタン分析は各分析たんぱく質につき、最低 2 回実施し、平均した値を用いて解析した。

細胞内 IGF-1 濃度分析は市販の ELISA キット (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) を用いてメーカー指定の方法で分析した。

Table 2-1 第2章で使用した1次抗体リスト

ターゲット	total/Phospho	メーカー	型番	希釈率
p70S6K	total	CST	#9202	1:50
p70S6K	phospho-Thr389	CST	#9205	1:150
Akt	total	CST	#9272	1:150
Akt	phospho-Ser473	CST	#9271	1:50
ERK1/2	total	CST	#9102	1:500
ERK1/2	phospho-Thr202/Tyr204)	CST	#9101	1:50
4E-BP1	total	CST	#9452	1:100
4E-BP1	phospho-Thr37/46	CST	#9459	1:300
FOXO1	total	CST	#2880	1:500
FOXO1	phospho-Ser256	CST	#84192	1:100
β-tubulin	total	CST	#2146	1:300

①サンプルおよび試薬のゲルプレートへのアプライ



②ゲルプレートおよびキャピラリーのWesへのセット



③キャピラリー内自動分離～抗体抗原反応～検出

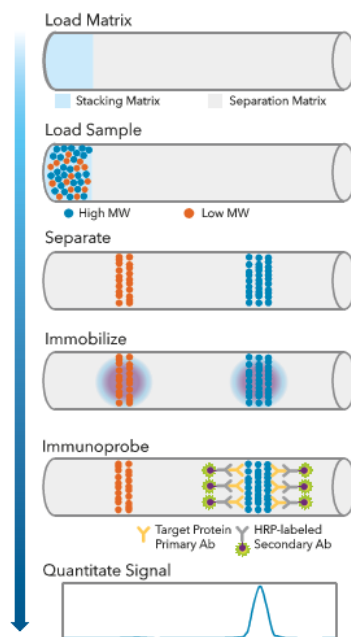


Fig. 2-4 シンプルウエスタン分析の概要

Protein Simple 社ホームページ (<https://proteinsimple.jp/>) に記載の図を再構成して示した。

2-2-8 血液生化学分析

血清中のアルブミン、尿素窒素、クレアチニン、ALT、AST、アミラーゼ、LDH、CPKはそれぞれの専用分析スライドを用いてドライケム Nx500i (FujiFilm、東京、日本) で測定した。血清鉄はメタロアッセイ鉄測定 LS (ニトロソ PSAP 法) キット (Metallogenics、千葉、日本) を用いて測定した。

2-2-9 統計解析

全ての値は、平均値±標準偏差 (SD) または標準誤差 (SE) で示した。また一部の棒グラフには個別の値を重ねてプロットした。統計解析に当たっては各群の値の分布を正規分布とみなして次の分析を実施した。試験 3-1 および試験 3-2 の予備解析として実施した対照群と PG-PS 投与 3 群との比較には Dunnet test を用いた。試験 3-2 において、PG-PS 投与群を 1 群に絞った後の 2 群間の比較には Student's t test または Welch test を用いた。同個体内の 2 値間の比較には paired t-test を用いた。繰り返し測定でない時間の主効果、群の主効果、および時間×群の交互作用は 2-way ANOVA で分析した。有意水準は $P < 0.05$ とした。全ての統計解析は JMP 11 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を用いて実施した。

2-3 結果

2-3-1 実験 2-1 の結果

2-3-1-1 体重、摂餌量、白血球数、後肢踝厚、および貧血指標の推移

PG-PS 投与用量 (7.5, 10, および 15ug ラムノース当量/gBW) による慢性炎症症状の推移を比較検討するために、白血球数、および貧血指標を経日的に測定した。過去の報告で評価された PG-SP 投与による下肢の足体積(Kimpel *et al.*, 2003; Bernier *et al.*, 2004; Hannig *et al.*, 2007)の代替評価として下肢踝厚を測定した。また、将来的に抗炎症食品などを評価することを想定して摂餌量および体重への影響も併せて検討した。体重は Control 群で経日的に増加したのに対して、PG-PS を投与した各群では投与後、数日間体重が減少した後、増加に転じたが、投与 13 日ごろから体重増加が緩やか、または減少に転じた (Fig. 2-5A)。摂餌量は PG-PS 投与直後で大幅に減少し、その後回復したが、投与 13 日後ごろから、PGPS 投与群で control 群より有意に低くなる時点が認められた (Fig. 2-5B)。体重と摂餌量の推移は同様な推移を示しており、PG-PS を投与した群で control 群より有意に体重が低値となったのは摂餌量の低下が大きく起因したと考えられた (Fig. 2-5AB)。

PG-PS 投与による後肢踝厚の推移は、投与 8 日後までに急性的な踝厚の肥厚が認められた後、10 日後あたりから再度、踝厚が肥厚する 2 段階の反応を示した。High-PG-PS 群では 2 段階の踝厚の肥厚が顕著であり、先行文献(Theurl *et al.*, 2009)をほぼトレースする結果となった。Mid-PG-PS および Low-PG-PS 群は、急性期の踝厚の肥厚は用量依存的であったが、慢性期では高用量群に追いつく肥厚が観察された (Fig. 2-5C)。白血球数においても、初期段階では高用量群で最も高値となったが、慢性期では中、低用量群で平均値が高くなった (Fig. 2-5D)。PG-PS 投与 13 日目から Low-PG-PS, Mid-PG-PS, High-PG-PS 群全てで Control 群と比較してヘモグロビン濃度や赤血球数の低下が認められ、炎症性貧血の惹起が認められた (Fig. 2-5E, F)。

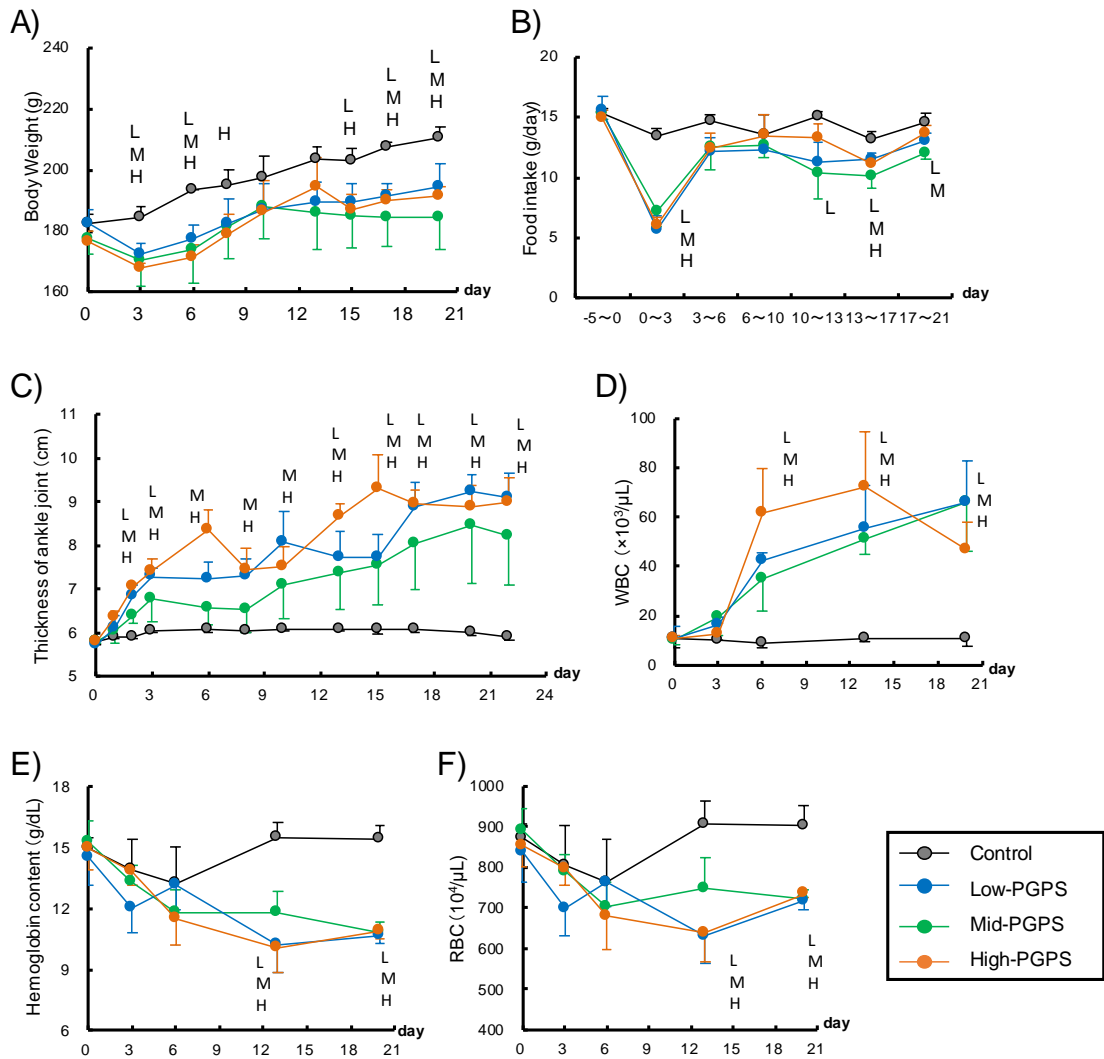


Fig. 2-5 体重、摂餌量、後肢踝厚、白血球数、および貧血指標の推移 (実験 2-1)

A)体重、B)1日当たりの摂餌量、C)後肢踝厚、D)白血球数、E)ヘモグロビン濃度、およびF)赤血球数の推移。Mean±SD. L, M, H; P < 0.05 at Low-PGPS, Mid-PGPS, or High-PGPS group vs Control group respectively (Dunnett test).

2-3-1-2 剖検時の組織重量

剖検時の組織重量を Table 2-2 に、体重当たりの相対重量を Fig.2-6 に示した。PG-PS を投与した全ての群で control 群と比較して肝臓重量が有意に増加していた。また、脾臓重量は

control 群と比較して Mid-PGPS 群、High-PGPS 群で有意な増大が認められた (Table 2-2)。これらの組織とは逆に、後腹壁脂肪や採取した全ての下肢骨格筋で PG-PS を投与した全ての群での重量の有意な減少を認めた (Table 2-2)。相対重量も同様に、PG-PS を投与した 3 群で、control 群と比較して肝臓相対重量の増加が認められた (Fig.2-6A)。脾臓相対重量は Mid-PGPS 群、High-PGPS 群で control 群と比較して有意な増加を認めた (Fig. 2-6B)。また、後腹壁脂肪、下肢骨格筋群相対重量の有意な低下を認めた (Fig. 2-6B-D)。これらの相対重量の変動は、肝臓においては PG-PS 投与濃度依存性は認められなかったが、脾臓増大、脂肪減少、骨格筋減少の程度には用量依存的な傾向が観察された (Fig. 2-6)。また、骨格筋の萎縮は踝の腫れとともに解剖前の外見上からも分かるほどであった (Fig. 2-6E)。

Table 2-2 組織重量 (実験 2-1)

	Pre group	Control	Low-PGPS	Mid-PGPS	High-PGPS
	mean ± SD	mean ± SD	mean ± SD	mean ± SD	mean ± SD
臓器重量					
肝臓 (mg)	5833 ± 306	5788 ± 190	10235 ± 1607 *	11828 ± 2583 **	10561 ± 2644 *
脾臓 (mg)	317 ± 37	351 ± 12	795 ± 154	1334 ± 392 **	1566 ± 316 ***
後腹壁脂肪 (mg)	1064 ± 121	1681 ± 582	484 ± 300 **	285 ± 103 ***	312 ± 159 ***
骨格筋重量					
腓腹筋 (mg)	866 ± 38	1034 ± 47	479 ± 133 ***	451 ± 40 ***	420 ± 63 ***
足底筋 (mg)	159 ± 13	197 ± 4	109 ± 25 ***	96 ± 4 ***	97 ± 11 ***
ヒラメ筋 (mg)	77 ± 2	93 ± 2	65 ± 6 ***	70 ± 5 ***	61 ± 7 ***
長趾伸筋 (mg)	74 ± 5	84 ± 6	52 ± 11 ***	53 ± 4 ***	44 ± 4 ***

*P < 0.05、**P < 0.01、***P < 0.001 (vs Control Dunnettの検定) Preは検定なし参考値

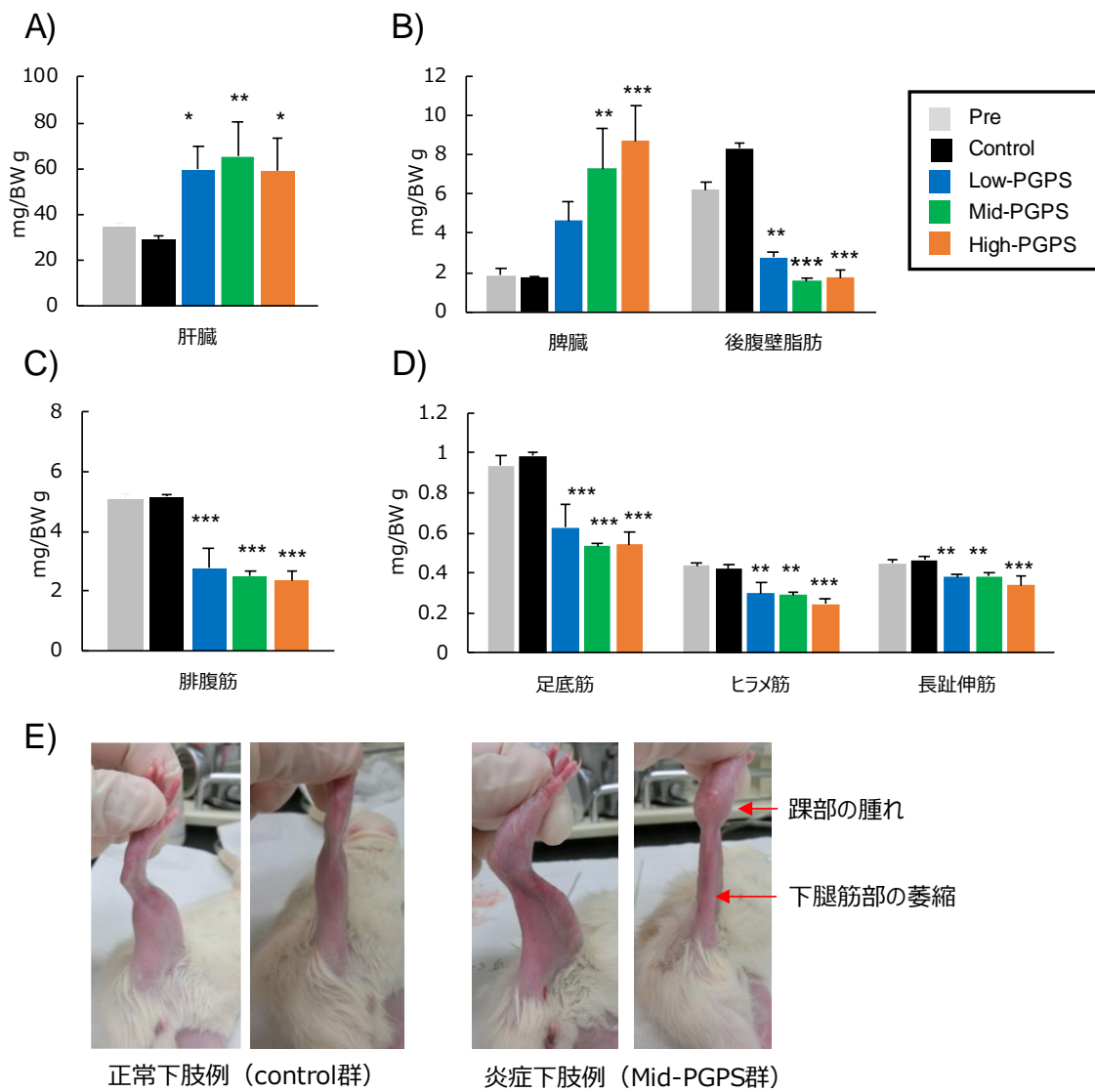


Fig. 2-6 体重当たりの相対組織重量と下肢関節炎所見例 (実験 2-1)

A)肝臓、B)脾臓および後腹壁脂肪、C)腓腹筋、
 およびD)足底筋、ヒラメ筋、長趾伸筋の相対重量。
 E)正常下肢と PG-PS 投与時の下肢所見例。

Mean±SD. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 vs Control group respectively (Dunnett test).

2-3-1-3 等尺性最大筋力

等尺性最大筋力は、PG-PS を投与した全ての群で control 群と比較して有意な減少を示した (Fig. 2-7)。

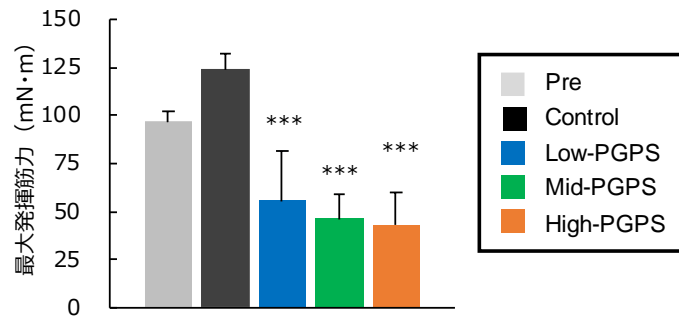


Fig. 2-7 等尺性最大発揮筋力 (実験 2-1)

***P < 0.001 vs Control group respectively (Dunnnett test).

2-3-1-4 血液生化学分析

血液生化学分析の結果、PG-PS を投与した全群で、control 群と比較してアルブミンおよびアミラーゼが有意に低値であった (Table 2-3)。一方、AST、ALT、クレアチニンおよび尿素窒素は、ALT の平均値は PG-PS を投与した 3 群で control 群と比較して高い値ではあったものの、PG-PS を投与した群と control 群との有意な差異を認めなかった (Table 2-3)。LDH や CPK も PG-PS を投与した群で高値となった個体が認められたが、control 群も含めて標準偏差が大きく、PG-PS 10 投与による有意な影響は検出されなかった (Table 2-3)。

血清鉄は PG-PS を投与した 3 群で control 群と比較して顕著な減少を認めた (Table 2-3)。この結果は、先行文献(Theurl *et al.*, 2009)と同様であった。

Table 2-3 血液生化学分析値（実験 2-1）

	Pre group	Control	Low-PGPS	Mid-PGPS	High-PGPS
	mean ± SD	mean ± SD	mean ± SD	mean ± SD	mean ± SD
アルブミン (g/dL)	4.1 ± 0.4	5.3 ± 0.4	2.7 ± 0.2 ***	3.3 ± 0.5 ***	3.3 ± 0.3 ***
尿素窒素 (mg/dL)	18.6 ± 4.0	17.8 ± 0.7	16.8 ± 1.4	18.1 ± 2.3	18.4 ± 0.9
クレアチニン (mg/dL)	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.1
AST (U/L)	81.7 ± 15.0	70.7 ± 1.5	136.8 ± 22.1	181.8 ± 130	130.0 ± 35.4
ALT (U/L)	23.3 ± 2.5	20.7 ± 3.5	21.5 ± 2.9	24.5 ± 7.9	19.5 ± 3.9
アミラーゼ (U/L)	1539 ± 233	1657 ± 203	1042 ± 219 *	1073 ± 256 *	1034 ± 326 *
LDH (U/L)	662 ± 91	558 ± 158	801 ± 282	2020 ± 2743	605 ± 345
CPK (U/L)	857 ± 210	444 ± 177	464 ± 36	498 ± 184	781 ± 725
血清鉄 (µg/dL)	247 ± 12	253 ± 39	70 ± 16 ***	70 ± 26 ***	74 ± 15 ***

*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (vs Con Dunnettの検定) Preは検定なし参考値

2-3-2 実験 2-2 の予備解析

2-3-2-1 体重、摂餌量、白血球数、後肢踝厚、および貧血指標の推移（予備的検討）

レジスタンストレーニングを実施に当たって、全群の体重、摂餌量、後肢踝厚、白血球数、および貧血指標の経日的推移をまず予備的に解析し、最適な PG-PS 投与用量を設定した。

体重は Control 群で経日的に増加したのに対して、High-PG-PS 群（実験 2-1 の Low-PG-PS 群に相当する PG-PS 投与用量(7.5ug/gBW)）では実験 2-1 と同様に投与後、数日間体重が減少した後、増加に転じ、投与 13~14 日ごろから体重増加が減少に転じた (Fig. 2-8A)。一方で、Low-PG-PS 群、Mid-PG-PS 群では投与直後および投与 13~14 日後からの体重減少の程度が小さかった (Fig.2-8A)。摂餌量は PG-PS を投与した 3 群で、PG-PS 投与直後はほぼ同様に減少したが、PG-PS 投与 7 日目以降の摂餌量の減少の程度は PG-PS 用量依存的であり、Low-PG-PS 群および Mid-PG-PS 群ではその程度が小さかった (Fig. 2-8B)。

PG-PS 投与による後肢踝厚の推移は、High-PG-PS 群では実験 2-1 と同様に投与 4 日後までに急性的な踝厚の肥厚が認められた後、10 日後あたりから再度、踝厚が肥厚する 2 段階の反応を示した。一方で、Mid-PG-PS 群は急性期の踝厚の肥厚が顕著には認められず、慢性期においても High-PG-PS 群と比較して肥厚が小さかった (Fig. 2-8C)。Low-PG-PS 群では急性期、慢性期ともに踝厚の肥厚がほぼ認められなかった (Fig. 2-8C)。

白血球数は High-PG-PS および Mid-PG-PS 群で漸増する推移を示したのに対し、Low-PG-PS 群では白血球数の増加の程度が大幅に小さかった (Fig. 2-8D)。ヘモグロビン濃度および赤血球数は、High-PG-PS および Mid-PG-PS 群で漸減する推移を示したのに対し、Low-PG-PS 群ではヘモグロビン濃度、赤血球数の減少がほぼ認められなかった (Fig. 2-8E,F)。

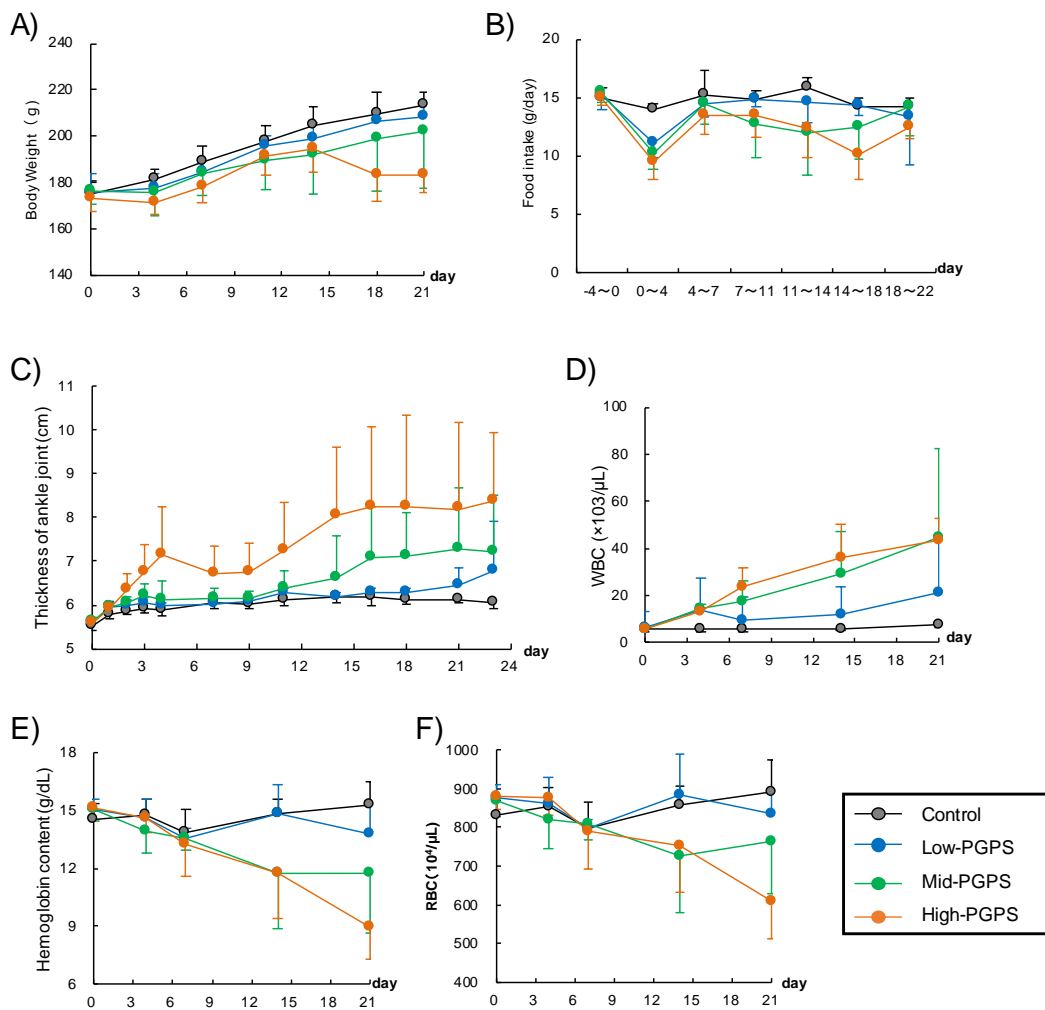


Fig. 2-8 体重、摂餌量、後肢踝厚、白血球数、および貧血指標の推移（実験 2-2）

A)体重、B)1日当たりの摂餌量、C)後肢踝厚、D)白血球数、E)ヘモグロビン濃度、および
F)赤血球数の推移。Mean±SD。統計解析は未実施

2-3-2-2 PG-PS 最適投与用量の決定

慢性炎症に対するレジスタンス運動および抗炎症食品の有効性を評価するための動物モデルとして、以下の条件が必要であると考えた。

- ①慢性的に炎症症状が持続するが、致命的でないこと。
- ②ラット足関節筋力測定・運動負荷装置によってレジスタンス運動を課せること。

③摂餌量が大幅に減少しないこと。

以上の条件から、白血球数の増加、炎症性貧血の惹起が認められるものの、踝厚肥厚の程度は小さく、また体重・摂餌量の低下も小さかった Mid-PGPS 群の PG-PS 投与用量（5.0ug ラムノース当量/gBW）が最適であると判断した。そこで、実験 2-2 における以後の解析では、実験 2-2 の control 群を Normal 群、Mid-PGPS 群を PGPS 群として 2 群比較を実施した。

2-3-3 実験 2-2 の 2 群選抜後の結果

2-3-3-1 体重および摂餌量の推移

Normal 群のラットは、一貫して同等量（約 15g/日）の餌を摂取した（Fig 2-9）。PG-PS 群のラットは、PG-PS を注射した直後（0 日目から 4 日目）において、Normal 群より有意に少ない摂餌量であった（約 10g/日）が、投与 4 日～7 日後までの間は、Normal 群ラットと同じレベルに戻った。PG-PS 投与 7 日後から PG-PS 群ラットの摂餌量は再び減少し、14 日後までの間は Normal 群ラットと比較して有意に低い摂餌量であった。PG-PS 投与直後の大きな摂餌量減少を反映して、PG-PS 群ラットでは、正常ラットと比較して平均体重が推移したが、実験期間全体を通じて、両群に有意差は認められなかった（Fig. 2-9B）。

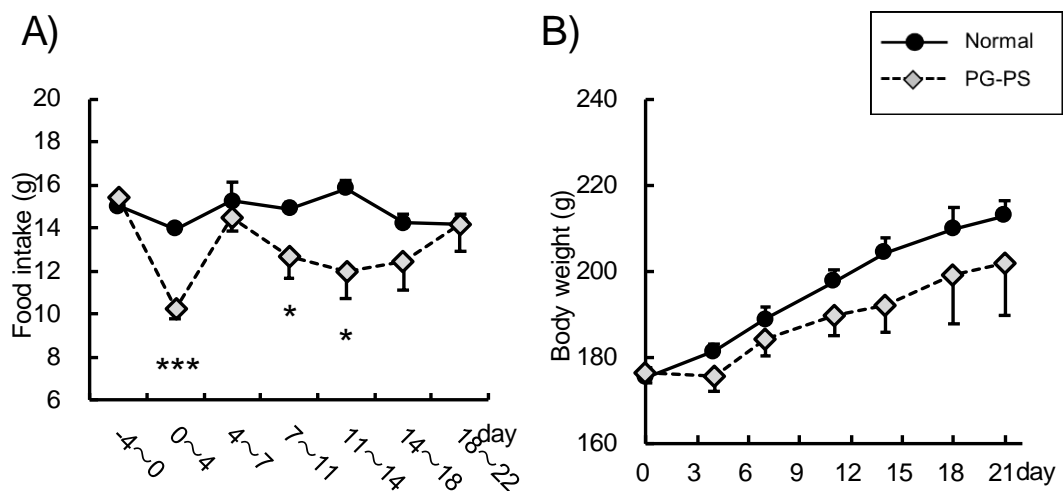


Fig. 2-9. 正常および PG-PS 投与ラットにおける摂餌量および体重（実験 2-2）。

Normal 群および PG-PS 群ラットの摂餌量 (A) および体重 (B) 推移。Normal 群および PG-PS 群のデータはそれぞれ day 16 までは 6、7 例、day 17 以降は 3 および 4 例の平均値±標準誤差。*** $P < 0.001$ and * $P < 0.05$ （各測定時点での群間比較）。

2-3-3-2 炎症指標

最適化した用量でのPG-PS投与が一貫した全身性炎症を誘発したことを確認するために、各炎症関連指標を評価した (Fig. 2-10)。PG-PS投与の1~3日後、下肢踝厚はNormal群ラットよりも有意に増加した (Fig. 2-10A)。下肢踝厚は値その後11日目までは横ばいで推移したものの、PG-PS投与16日ごろから肥厚傾向が強まった。ただし、16日以降もの肥厚は漸増する訳ではなかった。白血球数や血中の炎症性サイトカインレベルの増大は、全身性炎症と密接に関連する(Theurl *et al.*, 2009)。実験3-2において、PG-PS群の白血球数はPG-PS投与後に漸増し、Normalラットと比較して4、7、および14日目に有意に高値となった (Fig. 2-10B)。PG-PS群ラットの炎症性サイトカインIL-1 β 、IL-6、およびTNF- α の平均血漿濃度は、PG-PS投与16日後と23日後の両方でNormal群ラットよりも高かった (Fig. 2-10C)。これらの結果は、最適化された用量のPG-PS投与が全身性炎症を一貫して誘発したことを示した。

炎症性サイトカインは赤血球の形成を阻害し、赤血球の寿命を縮めるため、全身性炎症によって血中ヘモグロビンレベルは低下する(Theurl *et al.*, 2009; Richardson *et al.*, 2013)。実験2-2においてPG-PS群のヘモグロビン濃度は、PG-PS投与後、特に7日目から14日目まで継続的に減少することが観察されまた (Fig. 2-10D)。PG-PS群ラットのヘモグロビン濃度は、投与14日後において、Normal群ラットよりも有意に低く、最適化した用量のPG-PS投与が炎症性サイトカイン量の持続的な上昇をもたらした可能性を示した。

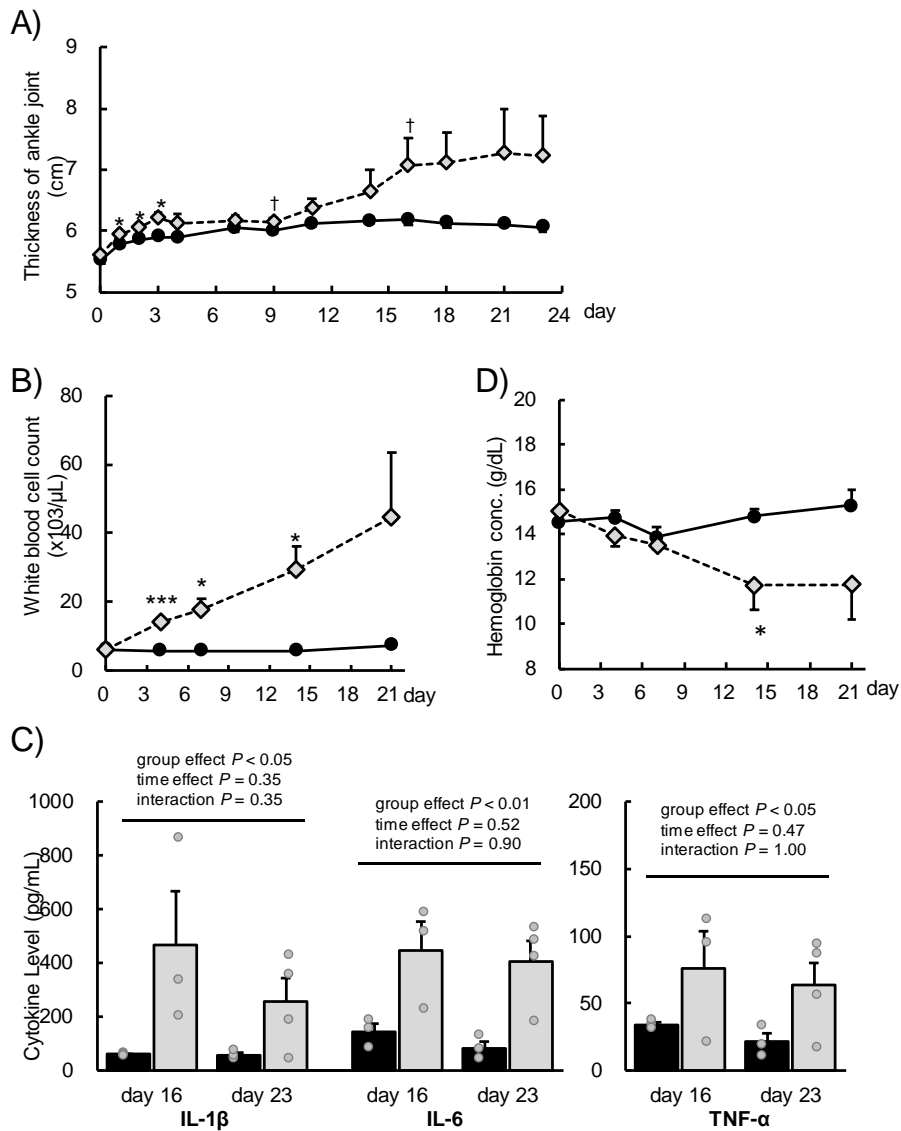


Fig. 2-10. 正常およびPG-PS投与ラットにおける炎症指標（実験2-2）

(A) 後肢足関節厚および (B) 白血球数推移。 (C) day 16 または day 23 における解剖時点での血漿中の炎症性サイトカイン IL-1β、IL-6、TNF-α 濃度。 (D) ヘモグロビン濃度推移。 Normal 群および PG-PS 群のデータはそれぞれ day 16 までは 6、7 例、day 17 以降は 3 および 4 例の平均値±標準誤差。 ***P<0.001, *P<0.05, and †P<0.1 (各測定時点での群間比較、図 (A)、(B)、および (D))。 Normal 群および PG-PS 群のデータはそれぞれ day 16 では各 3 例、day 23 では 3 および 4 例の平均値±標準誤差 (図 C)。 図 C では two-way ANOVA の結果を各項目の上部に示した。

2-3-3-3 腓腹筋重量および等尺性最大筋力

最適化された用量の PG-PS 投与による筋萎縮の誘導を確認するために、腓腹筋重量と等尺性最大筋力を測定した。PG-PS 群ラットの腓腹筋重量は、投与後 16 日目と 23 日目時点で Normal 群ラットよりもそれぞれ約 24%、30%低かった (Fig. 2-11A)。また、2-way-ANOVA の結果 (group effect; $P < 0.05$, time effect; $P = 0.80$, group x time interaction; $P = 0.75$) は、PG-PS 投与により骨格筋重量が有意に低下することを支持した (Fig. 2-11A)。更に、腓腹筋重量は、最大等尺性筋力と有意な正の相関を示し (Fig. 2-11B)、筋肉重量あたり最大発揮筋力 (Specific torque) においては PG-PS による影響がなかったことを裏付けていた (Fig. 2-11C)。これらの結果から、最適化した用量の PG-PS 投与は骨格筋萎縮を誘導するものの、少なくとも投与 23 日後までの時点では骨格筋の最大出力に関する機能に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

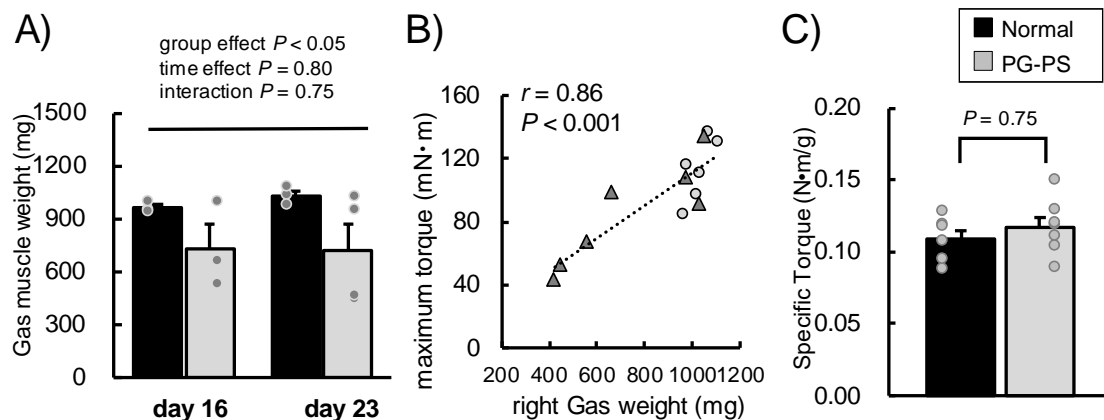


Fig. 2-11. 正常および PG-PS 投与ラットにおける骨格筋量および相対発揮トルク

(実験 2-2)

(A) 腓腹筋湿重量。Two-way ANOVA の結果をグラフ上部に示した。Normal 群および PG-PS 群のデータはそれぞれ day 16 では各 3 例、day 23 では 3 および 4 例の平均値±標準誤差で示した。(B) 右腓腹筋湿重量と最大等尺性トルクの関係を表す散布図。円と三角形のマーカ―はそれぞれ Normal 群と PG-PS 群の個々の値を示す。Pearson の相関係数およびその有意性

を図中に示した。(C) day 16 と day 23 に解剖した個体の値を統合した相対発揮トルク (Normal 群 : n = 6, PG-PS 群 : n = 7)。

2-3-3-4 細胞内シグナル伝達

実験 2-2 において最適化した用量の PG-PS 投与によりラットに慢性炎症および付随する筋萎縮が誘導されることが明らかとなった。そこで更に、当慢性炎症モデルラットにおいて、急性レジスタンス運動を課した場合の同化シグナル伝達が正常なラットと比べて変化しているか否かを検証した。

Normal 群ラットに対する急性 RE は、運動側腓腹筋における、IGF-1 発現量および、Akt、FOXO1、ERK1/2、p70S6K、および 4EBP1 のリン酸化レベルを非運動側腓腹筋と比べて、約 2.1、2.6、1.3、1.7、9.0、および 1.3 倍に増加させた (Fig. 2-12B-F)。PG 群における運動側腓腹筋中の IGF-1 発現量、ERK12、p70S6K、および 4EBP1 のリン酸化レベルは、Normal 群と同様に、非運動側と比較して、約 2.1 倍、1.7 倍、3.4 倍、および 1.3 倍高まっていた (Fig. 3-12D-F)。その一方で、PG 群に対する急性 RE は Akt および FOXO1 のリン酸化レベルの有意な上昇を誘導しなかった (Fig. 2-12B,C)。

Normal 群と PG 群の両方で、基礎タンパク質発現の指標としての β -tubelin 発現レベルは、運動側と非運動側の腓腹筋ではほぼ同等だった (Fig. 2-12G)。これに対して、PG 群の運動側腓腹筋中の IGF-1 発現量は Normal 群と比較して有意に高かったにもかかわらず、Akt、FOXO1 のリン酸化レベルは Normal 群ラットよりも有意に低く、また ERK、および 4E-BP1 のリン酸化レベルは低い傾向 ($P < 0.1$) であった (Fig. 3-12A-D, F)。これらの結果から、いくつかの同化シグナル伝達分子に関して、PG-PS による慢性炎症によって RE による活性化が阻害されることが示唆された。

この示唆を補強するために、同化シグナル伝達分子のリン酸化レベルと循環炎症性サイトカインレベルとの相関を解析した。その結果、運動側腓腹筋における Akt のリン酸化レ

ベルと血漿 IL-6 濃度との間に有意かつ高い負の相関を認めた (Fig. 2-13A)。これに対して、ERK または p70S6K のリン酸化レベルと循環 IL-6 濃度との間に有意な相関は認められなかった (Fig. 2-13B,C)。更に運動側腓腹筋における Akt のリン酸化レベルは循環 IL-1 β 、TNF- α 濃度とも負に相関していた (Fig. 2-13D,E)。これらの結果は、PG-PS 投与によって誘導された循環炎症性サイトカインレベルの増大が、骨格筋の RE に対する同化反応、特に Akt / FOXO1 経路の活性化を抑制する可能性があることを示した。

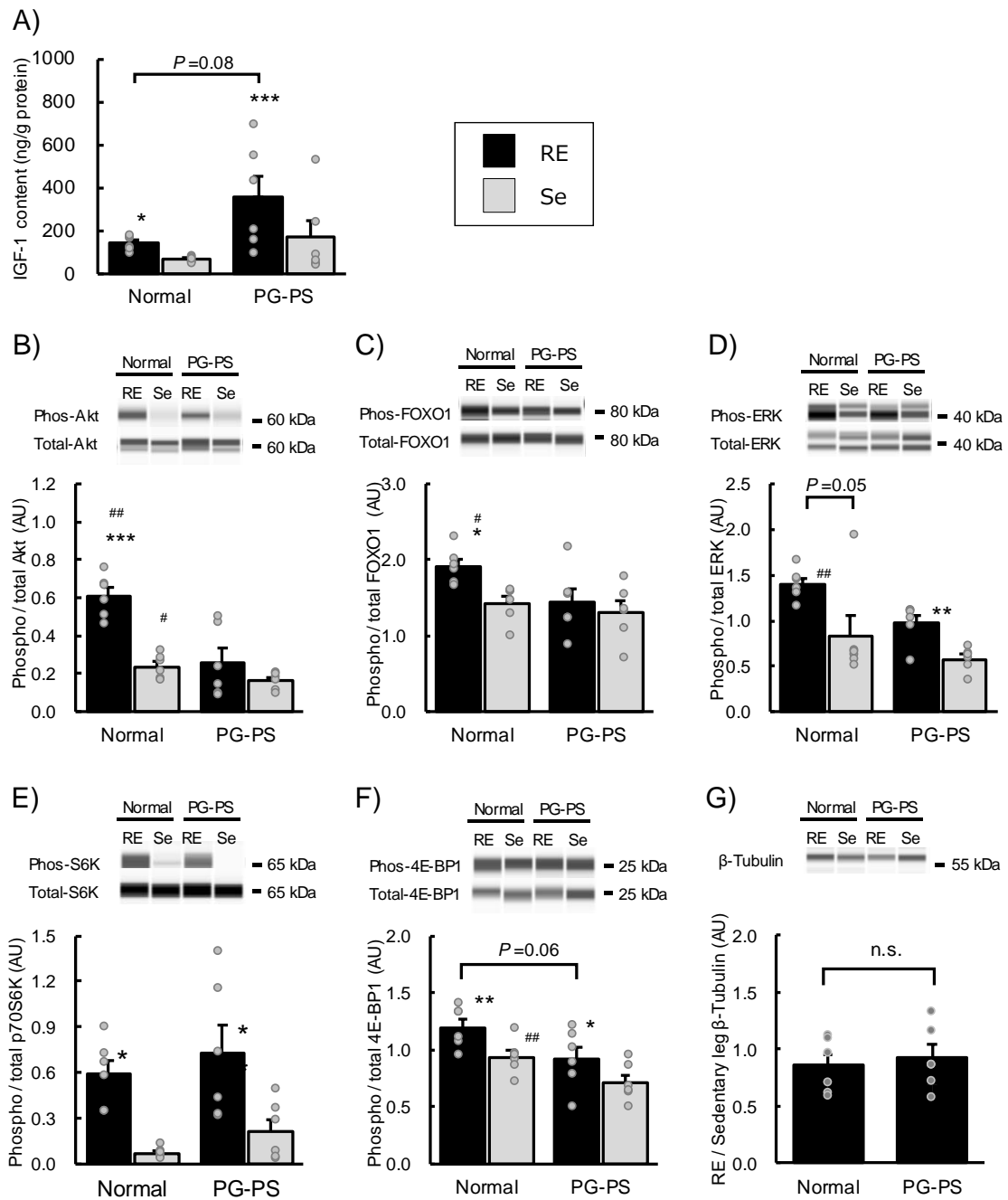


Fig. 2-12. レジスタンス運動側および非運動側腓腹筋中の IGF-1 含有量および同化関連シグナル分子のリン酸化レベル (実験 2-2)

(A) 腓腹筋中 IGF-1 含量。(B) Akt, (C) FOXO1, (E) ERK, (F) p70S6K および (G) 4E-BP1 のリン酸化レベル。リン酸化レベルは、各分子のリン酸化されたタンパク質の発現強度を同じ分子の総タンパク質の発現強度で除した値として示した。Normal 群と PG-PS 群で基底のたん

ぱく質発現量が運動側および非運動側の腓腹筋で同程度であることを確認する目的で、 β -Tubulin のたんぱく質発現量を分析した。(D) に運動側および非運動側腓腹筋の β -Tubulin 発現量比を示した。代表的な Simple Western 分析のシグナル画像を、各グラフの上部に表示した。すべての一次抗体について、特異的なシグナルが想定される分子量において検出可能であることを前もって確認し、Simple Western 分析を実施した。*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (運動側と非運動側腓腹筋の比較)。#P < 0.05, ##P < 0.01 (対応する側 (運動側、または非運動側) 腓腹筋における群間比較)。RE : Resistance exercise (運動側)、Se : Sedentary (非運動側)。day 16 と day 23 に解剖した個体のデータを統合して解析した。平均値 \pm 標準誤差 (Normal 群、PG-PS 群ともに n = 6)。

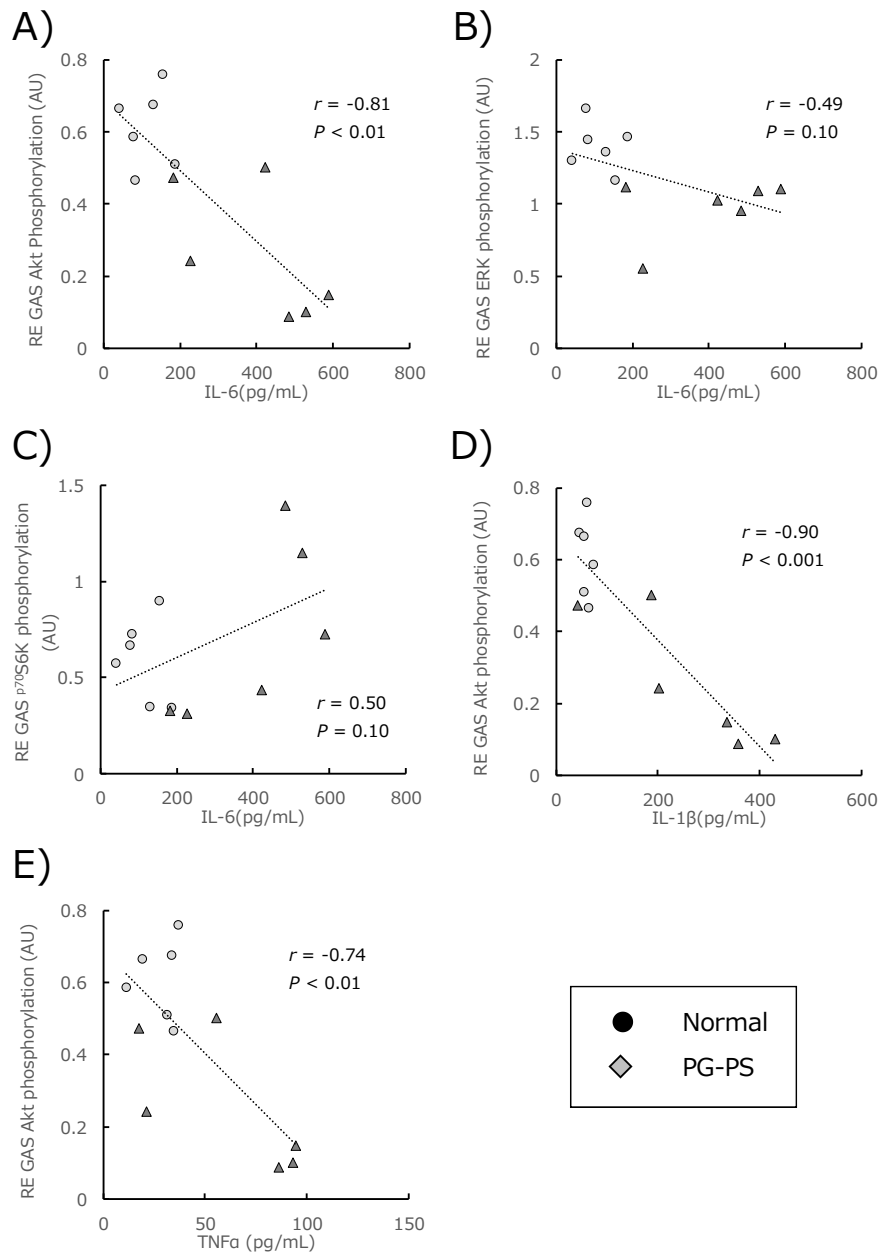


Fig. 2-13. 解剖時点における血中炎症性サイトカイン濃度とレジスタンス運動側腓腹筋中の同化関連シグナル分子のリン酸化レベルの相関関係 (実験 2-2)

(A) Akt vs. IL-6; (B) ERK vs. IL-6; (C) p70S6K vs. IL-6; (D) Akt vs. IL-1 β ; (E) Akt vs. TNF- α .

Pearson の相関係数 r および、その有意性を図中に示した。

2-4 考察

第2章においては、(1) これまでに報告されていなかった低用量のPG-PS投与においても一貫した炎症応答が持続し、骨格筋萎縮につながることを明らかにした。また、当PG-PS投与ラットを用いて、(2) 慢性炎症下においても急性の等尺性レジスタンス運動により、たんぱく質合成系のシグナル伝達が活性化するが、Aktに関するシグナル伝達において抵抗性が惹起されていることが示された。

この新しい慢性炎症性筋萎縮モデルは二次性サルコペニアに対する、運動、栄養といった対策立案およびそのメカニズム検討に有効に活用できると考えられた。以下に本章で明らかにした事象について考察した。

2-4-1 PG-PS投与による慢性炎症性筋萎縮モデルラットの構築

本章ではまず、レジスタンス運動および抗炎症食品摂取が二次性サルコペニアの予防・改善に有効か否かを検証するためのラットモデルの確立を目指した。この目的のためには、これまで報告されている、癌、糖尿病、心不全、腎不全および関節炎などの全身性炎症と骨格筋萎縮を伴う動物モデル(Granado *et al.*, 2007; Mastrocola *et al.*, 2008; Steffen *et al.*, 2008; Castellero *et al.*, 2011; Ramírez *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; de Oliveira Nunes Teixeira *et al.*, 2013; Filippin *et al.*, 2013; Little *et al.*, 2017)が活用できると考えられた。ただし、癌モデルは疾患が進行性であり致死率が高いこと、糖尿病モデルは食事に制限がかかること、心不全、腎不全モデルは手術を必要とし、且つ致死率も高く長期の運動負荷に適さないことなどの課題があった。

比較的致死率が低く、かつ慢性的な炎症状態の維持が可能なモデルとして、溶連菌細胞壁精製物PG-PSを15 μ gラムノース当量/g体重で雌性Lewisラットに腹腔内投与することで得られる慢性炎症性貧血モデル(Theurl *et al.*, 2009)の応用を検討することとした。ただし、PG-PSは15~30 μ gラムノース当量/g体重での投与により、リウマチ様関節炎を惹起することも示されていた(Kimpel *et al.*, 2003; Bernier *et al.*, 2004; Hannig *et al.*, 2007)。関節炎が重度であ

ると、電気刺激によるレジスタンス運動負荷が難しいと予想され、当モデル構築で目的とした検証が実施できない可能性があった。

そこで、まず、PG-PS 投与による炎症応答は主に脾臓を介することが示されていたことから(Kimpel *et al.*, 2003)、比較的低用量で PG-PS を投与することで、持続的な炎症性サイトカイン分泌などの全身症状を誘発しつつも、関節炎といった局所症状の重症化を回避できるとの作業仮説を立案し、PG-PS の最適用量の検証を実施した。

本章ではまず、実験 2-1 として、慢性炎症性貧血モデル(Theurl *et al.*, 2009)で用いられたのと同用量 (15 μ g ラムノース当量/gBW) および、その 2/3、1/2 用量である 10、7.5 μ g ラムノース当量/gBW における炎症症状、下肢踝厚および基本的な生理状態についての情報収集を実施した。

実験 2-1 によってまず、先行文献(Theurl *et al.*, 2009)と同用量の PG-PS 投与により、白血球数の増加、赤血球数、ヘモグロビン濃度、血清鉄濃度低下といった貧血症状、下肢踝の関節炎症状など慢性炎症症状を再現できた。また、これらの症状は先行文献用量の半量である 7.5 μ g ラムノース当量/gBW においても認められた。過去の PG-PS を使用した研究(Kimpel *et al.*, 2003; Bernier *et al.*, 2004; Hannig *et al.*, 2007; Theurl *et al.*, 2009; Garcia *et al.*, 2011; Richardson *et al.*, 2013)において、骨格筋量・機能への影響は報告されていなかったため、PG-PS 用量最適化で目指すモデル構築において、筋萎縮や筋機能は最も重要な検証事項であった。実験 2-1 の結果は、過去に慢性炎症性貧血モデルとして使用された用量 (15 μ g ラムノース当量/g 体重) およびその半量の PG-PS 投与であっても、投与 22 日後の時点で顕著な筋萎縮と筋力低下が惹起されることを初めて示した。

また、血中 ALT/AST 活性は顕著な増大を示さなかったものの、PG-PS 投与による肝臓重量の増大や血中アルブミン濃度低下が認められ、肝臓機能低下を疑う所見が得られた。また、血中アミラーゼも低下していた。通常、脾臓が炎症状態であるとアミラーゼは高値となるが、

慢性的な機能不全が惹起された場合、低値となることが知られている。その為、この結果は PG-PS 投与による慢性炎症により、腓機能低下が引き起こされたことを反映している可能性がある。クレアチニンや尿素窒素、血中 LDH や CPK は PG-PS 投与群と control 群で顕著な差異を認めず、腎臓や心臓への PG-PS の影響が限定的であることを示唆した。

これらの実験 2-1 の結果から、PG-PS 投与ラットが、慢性炎症性筋萎縮モデルとして応用可能であることが明らかとなった。ただし、実験 2-1 の最低用量の PG-PS においても、関節炎による重度の下肢腓肥厚を認め、等尺性最大筋力測定のための装置へのラット設置に難しさが感じられた。そこで、より関節炎症状を低減する必要があると結論し、実験 2-2 を計画、実行した。

実験 2-2 においては、実験 2-1 での最低用量 7.5ug ラムノース当量/gBW および、5、2.5 ug ラムノース当量/gBW の PG-PS 投与の影響をまず、白血球数、貧血症状、下肢腓厚さに着目して予備解析した。その結果、最低用量である 2.5 ug ラムノース当量/gBW の PG-PS 投与では白血球数増加や貧血症状の発現が認められず、慢性炎症モデルとして不適であることが明らかとなった。これに対して、5 ug ラムノース当量/gBW の PG-PS 投与時には、7.5ug ラムノース当量/gBW 投与時と同等レベルでの白血球数増加、貧血症状の発現を認めた。一方で、下肢腓厚さの肥厚の程度は 7.5ug ラムノース当量/gBW 投与時より小さかった。これらの結果から、5 ug ラムノース当量/gBW の PG-PS 投与が、一貫した慢性炎症の惹起と関節炎症状のバランスの上で最適な条件であると判断し、これ以降の検討は当用量の PG-PS を用いることとした。

実験 2-2 において最適化された用量 (5ug ラムノース当量/BW) の PG-PS 投与は、実験 2-1 における過去の文献(Theurl *et al.*, 2009)と同用量 (15ug ラムノース当量/BW) の PG-PS 投与時よりも、下肢腓厚の肥厚の程度を 60%以上小さくした。さらに、最適化した PG-PS の投与後、摂餌量は一時的に減少したが、その後回復し、実験期間を通じた体重増加も観察さ

れた。このような、摂餌と体重増加への影響の小ささは、摂餌障害に伴う交絡因子の影響回避や、ペアフィーディング群設置の必要性がないことで並行比較対象群数を増やせる面で有用である。

また、最適化した用量の PG-PS 投与において、先行知見(Theurl *et al.*, 2009)と同様に WBC 数の漸増とヘモグロビンの減少が認められた。更に、高用量 (30ug ラムノース当量/BW) の PG-PS を用いた先行研究(Kimpel *et al.*, 2003)で、血中濃度上昇が認められた炎症性サイトカインである IL-1 β 、IL-6、および TNF- α は、最適化した用量の PG-PS であっても、投与 16 ~23 日後での上昇が認められた。これらの結果から、最適化した低用量 PG-PS により全身性の慢性炎症を一貫して惹起できると結論した。ただし、PG-PS 投与後の炎症状態の持続は進行性疾患と同様に、悪液質や食欲不振症候群(Aoyagi *et al.*, 2015)などを将来的に伴う可能性がある。そのため、本モデルを用いて、より長期の実験を実施する場合は、先立ってこの潜在的な懸念を払拭する必要がある。

実験 2-2 において最適化された用量(5ug ラムノース当量/BW)の PG-PS 投与においても、実験 2-1 と同様に、骨格筋重量の低下と付随する等尺性最大筋力の低下が認められた。これらの結果から、最適化された用量の PG-PS 投与により、筋萎縮が惹起されることが明らかとなった。

IL-6 や TNF- α などの炎症性サイトカインレベルの上昇は筋力発揮能力に悪影響を与えることが報告されており(Peake *et al.*, 2010; Maggio *et al.*, 2013)、慢性的な炎症状態は筋量と筋量あたりの筋力の両方を低下させる可能性がある。実験 2-2 において PG-PS 投与による骨格筋重量あたりの最大発揮筋力は低下しなかった。この結果から、少なくとも本研究期間においては、筋力発揮能力への慢性炎症の影響が小さかったことが示唆された。ただし、将来的には当モデルを活用した研究を深耕し、筋線維の種類、微小血管、ミトコンドリア機能など、慢性炎症によって誘発される筋萎縮の特徴をより深く理解する必要がある。これまでの結果は、最適化した用量の PG-PS を投与することで、二次性サルコペニア研究に有用な慢

性炎症性筋萎縮モデルラットを作出できることを明らかにした。

2-4-2 慢性炎症下における、急性レジスタンスによるたんぱく質合成シグナル伝達

骨格筋量が増加する状況において、主に mTORC1 シグナル伝達経路の活性化を介して骨格筋たんぱく質合成 (MPS) が亢進する(Bodine *et al.*, 2001)。実験 2-2 において、正常な Lewis ラットの右下肢に急性 RE を課したとき、非運動側と比較して、腓腹筋中の Akt、ERK、p70S6K、および 4E-BP1 のリン酸化レベルが増大することが示された。これらの結果は、SD ラットを用いて、電気刺激による急性等尺性運動を課した場合に観察された結果と一致した(Haddad & Adams, 2002; Ogasawara *et al.*, 2016)。さらに、腓腹筋内の IGF-1 濃度も、小笠原らの報告(Ogasawara *et al.*, 2013)と同様に、運動を課した側で増大した。

一方、実験 2-2 において最適化された慢性炎症ラット (CI ラット) においては、ERK、p70S6K および 4E-BP1 のリン酸化レベルは正常ラットと同様に、急性 RE によって著しく増加した。ただし、p70S6K を以外の分子のリン酸化レベルは運動側筋において、正常ラットより低い傾向が認められた。さらに驚くべきことに、CI ラットの運動側腓腹筋では、正常ラットの運動側腓腹筋と比較して IGF-1 濃度が高くなっていても関わらず、Akt リン酸化レベルの増加が観察できなかった。循環 TNF- α および IL-6 の上昇は、骨格筋の TNF α 、IL-6 受容体によって感知され、insulin receptor substrate 1 (IRS-1) の作用を阻害することが報告されている(De Luca & Olefsky, 2008; Crossland *et al.*, 2019)。IRS-1 は IGF-1 シグナルにおける Akt の上流の制御因子であることから、上記の結果は、慢性炎症による IRS-1 の機能阻害に起因する可能性がある。実験 2-2 において、循環 IL-6 および IL-1 β と運動側筋中の Akt リン酸化レベルは負相関しており、上記の示唆、つまり炎症サイトカインによる IGF-1 シグナル抑制が起こっていたことを支持している。

Akt とは異なり、炎症性サイトカインの循環量は RE による p70S6K のリン酸化レベルの上昇に顕著な影響を与えなかった。これらの結果は、Akt は mTORC1 シグナル伝達経路における重要な調節因子であるが、運動誘発性の mTORC1 活性化に必須の調節因子ではないこ

とを示唆している。実際、PI3K の阻害剤 wortmannin により Akt のリン酸化を阻害した場合、インスリンを介した p70S6K のリン酸化レベル増大は阻害されるのに対し、協働筋切除による過負荷に応答した p70S6K リン酸化レベルの増大は抑制されないことが示されている(Miyazaki *et al.*, 2011)。このような、過負荷によって誘発される mTORC1 活性化は Akt 非依存的に、ERK 活性化を介して引き起される可能性が示されている(Miyazaki *et al.*, 2011)。さらに、いくつかの総論は、機械的負荷による骨格筋 mTORC1 経路活性化において、細胞内カルシウム濃度、またはホスファチジン酸レベルの変化を介した、Akt 非依存的な経路が関与する可能性を示している(Philp *et al.*, 2010; Hornberger, 2011)。また最近、ATP 投与による細胞内カルシウム流入は Akt のリン酸化を増加させないが、ERK および p70S6K リン酸化を引き起こすことが示された(Ito *et al.*, 2018)。これらの知見から、実験 2-1 で示された結果は、PG-PS 投与による CI のラットにおいて、RE による同化シグナル伝達が完全に廃止されることはないが、特に Akt を介したシグナル伝達が減弱することを示している。ヒトを対象とした研究において、高齢者では RE によって、若齢者と同様に p70S6K および 4E-BP1 のリン酸化レベルは上昇したのに対し、若齢者と比較して Akt、ERK リン酸化レベルの上昇、MPS 亢進が減弱したことが示されている(Drummond *et al.*, 2008)。この臨床研究で示された結果は、ERK の調査結果を除いて、実験 2-2 で示された結果と類似している。

また、若齢者においては RE と併せてたんぱく質摂取を組み合わせることで、RE 単独より MPS が上昇することが知られている。慢性炎症により Akt シグナル伝達が減弱すると仮定した場合、高齢者や慢性疾患患者において、RE とたんぱく質摂取の組み合わせによる利益を享受するためには、若齢者より多くのたんぱく質摂取が必要になる(Yang *et al.*, 2012)。これらの結果は、高齢者の同化抵抗によるサルコペニアが主に IGF-1 / Akt シグナル伝達の減弱によって引き起こされることを示唆する最近の総説と矛盾しない(Barclay *et al.*, 2019)。

一方、Akt は MPS を促進するだけでなく、FOXO1 を不活性化することによって骨格筋たんぱく質分解 (MPB) を抑制する(Crossland *et al.*, 2019)。実験 2-2 において、CI ラットでは RE を課しても Akt および FOXO1 のリン酸化レベルが上昇しにくいことが明らかとなった。

つまり、慢性炎症は Akt/FOXO シグナル伝達の減弱を介して、RE による MPB 抑制作用を打ち消し、筋量増加を低減する可能性がある。MPS や MPB の直接測定、シグナル伝達分子のリン酸化レベルの時間推移に関する検討は本研究のいて未実施であり、本研究で得られた示唆を証明するための今後の課題である。

2-5 小括

本章では二次性サルコペニア発症メカニズムとその予防策としてのレジスタンス運動や抗炎症食品の有効性を検証するための慢性炎症性筋萎縮モデルラットの構築を目指した。

目指すモデルの条件として、

- ①慢性的に炎症症状が持続するが、致命的でないこと。
- ②ラット足関節筋力測定・運動負荷装置によってレジスタンス運動を課せること。
- ③摂餌量が大幅に減少しないこと。

を設定して、PG-PS 投与による慢性炎症モデルラットの構築に取り組み、以下の成果を得た。

1) 慢性炎症性貧血モデルとして報告されていた PG-PS 投与ラットにおいて、筋萎縮が惹起されることが明らかとなった。ただし、既報で使用されていた PG-PS 用量の使用は重度の関節炎症状を伴うことなどから、レジスタンス運動が課しづらいといった課題があった。

2) PG-PS 投与用量の最適化検討を実施した結果、慢性炎症症状、筋萎縮が一貫して誘導されるものの、関節炎症状が小さい最適用量として 5 ug ラムノース当量/gBW を設定できた。

3) 最適化用量 PG-PS 投与による慢性炎症モデルラットにおいて、急性 RE による同化に関する mTORC1 や ERK シグナル伝達が完全に抑制されることはなかったが、炎症性サイトカインの増加に関連した Akt シグナル伝達の減弱を認めた。

以上の結果から、本章で最適化した用量の PG-PS を投与したラットは慢性炎症性筋萎縮モデルラットとして活用できることが示された。また、当慢性炎症ラットにおいて、Akt シグナル伝達経路を中心とした同化抵抗性が惹起されていることが示唆された (Fig. 2-14)。

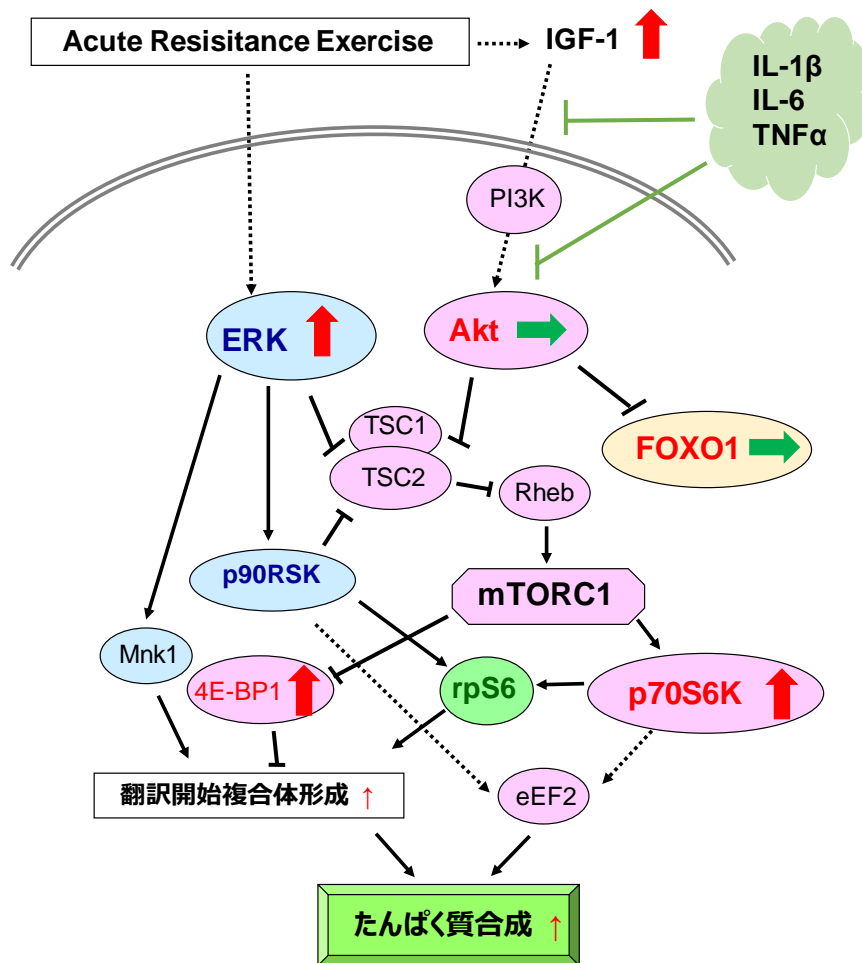


Fig. 2-14. PG-SP による慢性炎症下での急性 RE による同化シグナル伝達

第3章

レジスタンス運動トレーニングと抗炎症性食品摂取が
慢性炎症モデルラットの筋萎縮に及ぼす影響

3-1 背景・目的

第2章において、急性等尺性 RE は、慢性炎症下においても mTORC1 下流の p70S6K や 4E-BP1、および ERK1/2 のリン酸化を亢進させたが、その程度は健常ラットよりも低かった。また RE を課した骨格筋中の IGF-1 発現量は増加したにも関わらず、Akt のリン酸レベル上昇認められなかった。更に、Akt のリン酸化レベルは IL-1 β 、IL-6、TNF α といった炎症性サイトカインの循環濃度に伴って減衰していた。これらの結果は、PG-PS による慢性炎症により、炎症性サイトカインをメディエーターとして Akt をターゲットとした同化抵抗性が惹起されてたことを示唆した。Crossland らの最近の総説では、IL-1 および IL-6 は Toll like receptor 4 (TLR4) 下流の Inhibitor of NF κ B kinase (IkBk)の活性化を介して、インスリン受容体や IGF-1 受容体からのシグナルを PI3K に伝達する IRS-1 を阻害すること、TNF α は TNF α receptor-1 (TNFR1)を介した IRS-1 阻害だけでなく、IRS-1 を介さない経路においても Akt のリン酸化を阻害することが紹介されており(Crossland *et al.*, 2019)、第2章で得られた結果はこれに矛盾しない。

第2章の結果はまた、炎症性サイトカインによる、Akt のリン酸化阻害が下流の標的である FOXO1 のリン酸化阻害につながることを示唆した。FOXO1 は脱リン酸化されることで核に移行し、ユビキチンリガーゼ MuRF1、Atrogin-1 の発現上昇を誘導することでユビキチン-プロテアソーム系のたんぱく質分解を亢進する(Crossland *et al.*, 2019)。つまり、慢性炎症による Akt/FOXO1 Axis の阻害は、RE トレーニングによる MPS 亢進作用の鈍化だけでなく、MPB を亢進させることで筋萎縮の根本原因となりえる。その為、抗炎症食摂取により炎症状態を抑制することが出来れば、RE に対する同化抵抗性を改善するだけでなく、MPB 亢進を抑制することを通じて筋萎縮を改善できると考えた。

そこで本章ではまず実験 3-1 として、PG-PS 投与による慢性炎症モデルラットに等尺性 (ISO) RE トレーニングを実施させた場合の骨格筋萎縮軽減作用と、ISO-RE トレーニングと併せて EPA/DHA 高含有魚油と α -ラクトアルブミン (α LA) を含む抗炎症食を摂取させた場合の骨格筋萎縮に対する影響を検証した。

骨格筋の収縮には、筋長が一定の状態収縮する等尺性 (ISO)、筋長の短縮を伴う短縮性 (CON)、筋肉が張力と逆の方向に伸ばされる伸長性 (ECC) の 3 タイプがある (Faulkner, 2003)。レジスタンス運動は、等尺性収縮形式だけでなく、ECC と CON 形式で実施される。また、ヒトにおける実際の筋力トレーニング現場においては、全てのタイプを含んだ動的収縮形式で実施されることが多い。

例えば、連続する伸張性、等尺性、短縮性の収縮 (Stretch-Shortening Contraction) で構成される Stretch-Shortening Cycle (SSC) 運動は、筋肉量と機能を改善するための効果的なトレーニングモダリティとして報告されている (Baker, 2018)。一般的に、有酸素運動は IL-10 などの抗炎症性サイトカイン分泌増加を介して、全身性の抗炎症作用を発揮するのに対し、RE の抗炎症作用は小さいと考えられているが (Lira *et al.*, 2014)、SSC 形式の RE は抗炎症作用の面でも効果的なトレーニングモダリティである可能性がある。SSC に含まれる ECC 収縮は、運動した骨格筋 (Jonsdottir *et al.*, 2000; Ochi *et al.*, 2011) だけでなく、循環血液中 (Rohde *et al.*, 1997; Steensberg *et al.*, 2000; Philippou *et al.*, 2009) の IL-6 を増加させることが報告されている。運動による血漿 IL-6 レベルの一過性の上昇は、免疫細胞を刺激し、IL-10 の分泌を促進する可能性がある (Steensberg *et al.*, 2003)。また、ECC 収縮を含む SSC 形式のトレーニングにより、骨格筋における炎症シグナルが減少することが報告されている (Rader *et al.*, 2018a)。

収縮形式が異なる場合でも、仕事量が同じであれば、同様の骨格筋肥大効果が見込めることが示唆されている (Franchi *et al.*, 2017)。しかし、慢性炎症状態においては同化抵抗性が惹起されることから、抗炎症作用の違いから、RE のタイプによるトレーニング効果が異なる可能性があった。また、上述のように、SSC 形式の RE による抗炎症作用は、一過的な IL-6 増加などの炎症応答に起因する可能性がある。その為、抗炎症性食品の摂取により、運動誘発性の一過性炎症応答が減弱した場合、SSC による抗炎症作用が打ち消される可能性がある。

そこで実験 3-1 に引き続いて、実験 3-2 として、慢性炎症モデルラットに SSC 形式の RE

トレーニングを実施させた場合の骨格筋萎縮軽減作用と、SSC-RE トレーニングと併せて抗炎症食を摂取させた場合の骨格筋萎縮に対する影響を検証した。

3-2 方法

3-2-1 試薬、材料

PG-PS は Becton, Dickinson and Company (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA) から入手した。魚油 EPA-28 (28~29% eicosapentanoic acid (EPA)、13% docosahexaenoic acid (DHA) 含有) は日本水産 (東京、日本) から入手した。 α -ラクトアルブミン (商品名: BioPURE Alphalactalbumin) は Davisco Foods International, Inc. (Eden Prairie, MN, USA) から入手した。AIN-93G の原材料の内、L-シスチンおよび大豆油は富士フィルム和光純薬 (大阪、日本) から、それ以外の原料はオリエンタル酵母工業 (東京、日本) から入手した。UPLC-MSMS に使用した試薬・溶媒は富士フィルム和光純薬 (大阪、日本) から入手した。

3-2-2 実験動物

本章の動物実験は(株)明治動物実験倫理審査委員会の承認の元 (承認番号: 2016_3871_0139 および 2015_3871_0214)、2016 年に実施された。また、全ての動物実験は(株)明治で作成された「動物実験における倫理規定」および「動物実験審査申請書ガイドライン」に記載の項目を遵守して実施した。

雌性 Lewis ラット (7 週齢~8 週齢) は日本チャールズ・リバー (神奈川、日本) から入手した。受け入れた動物は最低 1 週間の環境馴化期間を経て実験に供した。なお、12 時間の明-暗サイクル、室温を 23°C とし、個別ケージで飼育した。馴化期間は標準固形飼料 CRF-1 (日本クレア) で飼育した。

3-2-3 飼料

試験期間中の飼料として AIN-93G および抗炎症食品含有飼料 (Anti-inflammatory diet ; AI 食) を調製して用いた。AI 食は AIG-93G のたんぱく質源であるカゼイン、脂質源である大豆油を 50% ずつ、 α -ラクトアルブミンおよび魚油 EPA28 と置換して調整した。各飼料の配合を表 3-1 に示した。

Table 3-1 抗炎症食および対照食 (AIN-93G) の組成

Ingredients	AIN-93G	AI-diet
Casein	200	100
α-Lactoalbumin	0	100
L- cystine	3	3
Corn starch	400	400
α-corn starch	132	132
Sucrose	100	100
Soybean oil	70	35
Fish oil (Contains ~29% EPA, 13% DHA)	0	35
Cellulose	50	50
AIN93G-mineral mix	35	35
AIN93-vitamin mix (Contains Choline bitartrate)	10	10
<i>tert</i> -butylhydroquinone	0.014	0.014
total	1000	1000

AI-diet; Anti-inflammatory diet

3-2-3 動物実験スキーム

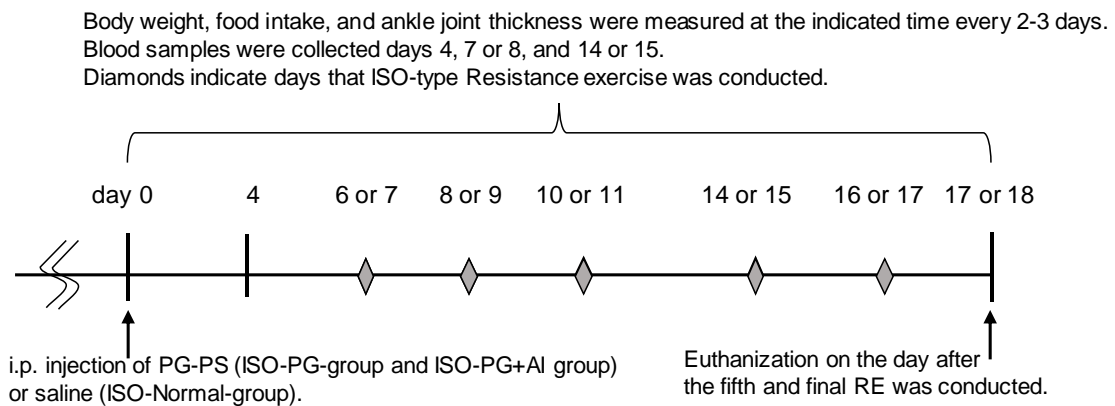
3-2-3-1 実験 3-1 : 等尺性 RE トレーニング試験

実験 3-1 の動物実験スキームを Fig. 3-1 に示した。雌性 Lewis ラット 22 匹を環境馴化後、AIN-93G (粉餌) に変更して更に 4 日間馴化し、部分採血と後肢踝厚の測定を実施した。その後、無作為に 16 匹のラットを選抜し、PG-PS をラムノース当量で 5μg/gBW となるように腹腔内投与した。残りの 6 匹のラットは ISO-Normal 群とし、同量の生理食塩水を腹腔内投与した。PG-PS を投与した 16 匹のラットは腹腔投与 4 日後の平均白血球数が同等となるように 8 匹ずつ ISO-PG 群と ISO-PG+AI 群に割り付けた。割り付け直後から、ISO-PG+AI 群の餌を AIN-93G から AI 食に変更した。

下肢踝厚は腹腔投与 2 日後から 2~4 日毎に測定し、解剖までに計 7 回測定した。腹腔投与 4 日後から解剖までに 2 回部分採血を実施した。また、全てのラットには腹腔投与 6~7 日後から 2~3 日に 1 回の頻度で 5 回等尺性レジスタンストレーニングを課した。最後のトレーニング日の夜から絶食させ、翌日イソフルラン麻酔下で全採血により屠殺し、速やかに

腓腹筋、足底筋を採取した。採取した骨格筋は、湿重量を測定し、液体窒素で凍結し、使用時まで-80°Cで保存した。足底筋は Free Zone bulk tray dryer (Labconco Corporation, Kansas City, MO, USA)を用いて-50°C、0.05 mBar の環境下で凍結乾燥し、乾燥重量を測定し、水分含量を算出した。

本実験では最後のトレーニング時に ISO-PG 群、ISO-PG+AI 群のラット各 1 匹が死亡した。これらのラットは麻酔下でのトレーニング時の死亡であり PG-PS による炎症による死亡か否か判定できなかつたため解析から除外した。その為、最終的に ISO-PG 群、ISO-PG+AI 群の解析対象は各 7 匹となった (Fig. 3-1)。



Group	n	Dose of PG-PS at a rhamnose dose equivalent ($\mu\text{g} / \text{g B.W.}$)	Diet after PG-PS or saline i.p.
ISO-Normal	6	0	AIN-93G
ISO-PG	8 -> 7	5	AIN-93G
ISO-PG+AI	8 -> 7	5	Anti-inflammatory (AI) diet

Fig. 3-1 実験 3-1 の動物実験スキーム

3-2-3-2 実験 3-2 : SSC-RE トレーニング試験

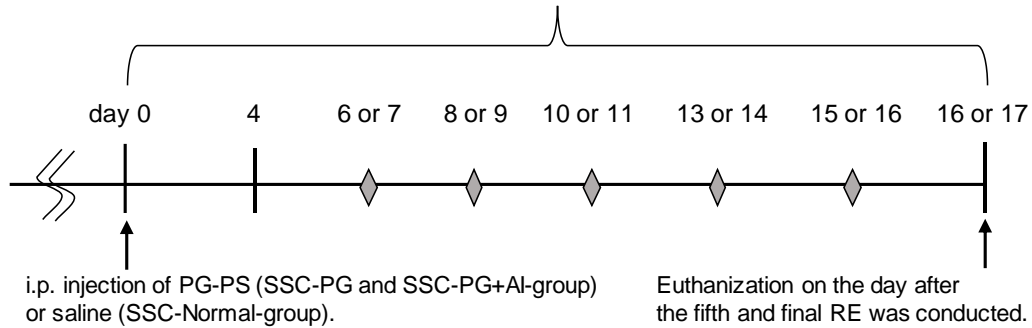
実験 3-2 の動物実験スキームを Fig. 3-2 に示した。雌性 Lewis ラット 23 匹を環境馴化後、AIN-93G (粉餌) に変更して更に 4 日間馴化し、部分採血と後肢踝厚の測定を実施した。その後、無作為に 16 匹のラットを選抜し、PG-PS をラムノース当量で $5\mu\text{g/gBW}$ となるように

腹腔内投与した。残りの6匹のラットはSSC-Normal群とし、同量の生理食塩水を腹腔内投与した。PG-PSを投与した16匹のラットは腹腔投与4日後の平均白血球数が同等となるように8匹ずつSSC-PG群とSSC-PG+AI群に割り付けた。割り付け直後から、SSC-PG+AI群の餌をAIN-93GからAI食に変更した。

後肢踝厚は腹腔投与2日後から2~4日毎に測定し、解剖までに計7回測定した。腹腔投与4日後から解剖までに2回部分採血を実施した。また、全てのラットには腹腔投与6~7日後から2~3日に1回の頻度で5回Stretch-Shortening Cycle (SSC)形式のレジスタンストレーニングを課した。最後のトレーニング日の夜から絶食させ、翌日イソフルラン麻酔下で全採血により屠殺し、速やかに腓腹筋、足底筋を採取した。採取した骨格筋は、湿重量を測定し、液体窒素で凍結し、使用時まで-80°Cで保存した。足底筋はFree Zone bulk tray dryer (Labconco Corporation, Kansas City, MO, USA)を用いて-50°C、0.05 mBarの環境下で凍結乾燥し、乾燥重量を測定し、水分含量を算出した。

本実験ではSSC-PG+AI群のラット1匹がPG-PS投与約10日後に死亡した。このラットは麻酔下での死亡でありPG-PSによる炎症による死亡か否か判定できなかったため解析から除外した。その為、最終的にSSC-PG+AI群の解析対象は7匹となった (Fig. 3-2)。

Body weight, food intake, and ankle joint thickness were measured at the indicated time every 2-3 days. Blood samples were collected on days 4, 7 or 8, and 14 or 15. Diamonds indicate days that SSC-type Resistance exercise was conducted.



Group	n	Dose of PG-PS at a rhamnose dose equivalent ($\mu\text{g} / \text{g B.W.}$)	Diet after PG-PS or saline i.p.
SSC-Normal	7	0	AIN-93G
SSC-PG	8	5	AIN-93G
SSC-PG+AI	8 -> 7	5	Anti-inflammatory (AI) diet

Fig. 3-2 実験 3-2 の動物実験スキーム

3-2-4 レジスタンス運動負荷

ラットへのレジスタンス運動はラット足関節筋力測定・運動負荷装置を用いて右下腿への経皮電気刺激により以下の方法で課した。

3-2-3-1 等尺性レジスタンス運動（実験 3-1）

ラットをイソフルラン麻酔下で固定台上にうつ伏せに固定した。右下肢の膝を固定台に圧迫固定し、足関節をフットプレートに 90°の角度で固定した。剃毛したふくらはぎに皮膚電極を貼り、電気刺激により強制的に強縮運動させた。電気刺激に用いるパルス幅は 4ms とし、負荷電圧は、単独パルス刺激による単縮発揮筋力が最大となるように設定した。強縮は上記の幅、電圧のパルスを 100Hz で 300 回（約 3 秒間）課すことで発揮させた。等尺性レジスタンス運動は上記の強縮刺激を 5 秒間隔で 5 回発揮させることを 1 セットとし、セット間に 3 分間休憩をはさんで 4 セット実施させた（計 20 回の強縮刺激負荷）。フットプレートにかかる力（トルク）をラット足関節筋力測定・運動負荷装置に組み込まれたストレイ

ンゲージでリアルタイムに測定し、2000Hzの頻度でPower Labにてデジタルデータとして収集した。30Hz以下の計測値はノイズとしてデジタルフィルタ処理した。取得したデジタルデータは事前に作成した標準分銅を用いた検量線により国際標準単位に換算した。得られた強縮発揮トルクの最大値を等尺性最大発揮筋力とした。

3-2-3-2 SSC形式レジスタンス運動（実験3-2）

SSC形式のレジスタンス運動プロトコルは、Raderらの報告（Rader *et al.*, 2016; Rader *et al.*, 2017, 2018a, b）を参考にして一部改変して設定した。具体的には、ラットをイソフルラン麻酔下で固定台上にうつ伏せに固定し、右下肢の膝を固定台に圧迫固定した。足関節をフットプレートに90°の角度で固定した。剃毛したふくらはぎに皮膚電極を貼った後、パルス幅は4msの単独パルス刺激を用いて単縮発揮筋力が最大となる電圧を設定した。SSC形式のレジスタンス運動においても、等尺性レジスタンス運動同様、強縮を上記の幅、電圧のパルスを100Hzで300回（約3秒間）課すことで発揮させた。ただし、SSC形式のレジスタンス運動においては、強縮刺激開始前にフットプレートの角度を100°とし、強縮刺激開始0.5秒後から60°/秒の角速度で50°までフットプレートを強制的に回転させた。さらに、50°の位置で0.5秒間静止後、60°/秒の角速度で100°まで逆回転させた（図3-3）。電気刺激とフットプレートの回転の協調は電気刺激装置からの開始信号をラット足関節筋力測定・運動負荷装置で受信後、フットプレートの回転プログラムが開始されるように設定することで再現性を確保した。

SSC形式のレジスタンス運動は上記の強縮刺激を5秒間隔で10回発揮させることを1セットとし、セット間に3分間休憩をはさんで4セット実施させた（計40回の強縮刺激負荷）。フットプレートにかかる力（トルク）をラット足関節筋力測定・運動負荷装置に組み込まれたストレインゲージでリアルタイムに測定し、2000Hzの頻度でPower Labにてデジタルデータとして収集した。30Hz以下の計測値はノイズとしてデジタルフィルタ処理した。取得したデジタルデータは事前に作成した標準分銅を用いた検量線により国際標準単位に

換算した。得られた強縮発揮トルクの最大値を最大発揮筋力とした（図 3-3）。

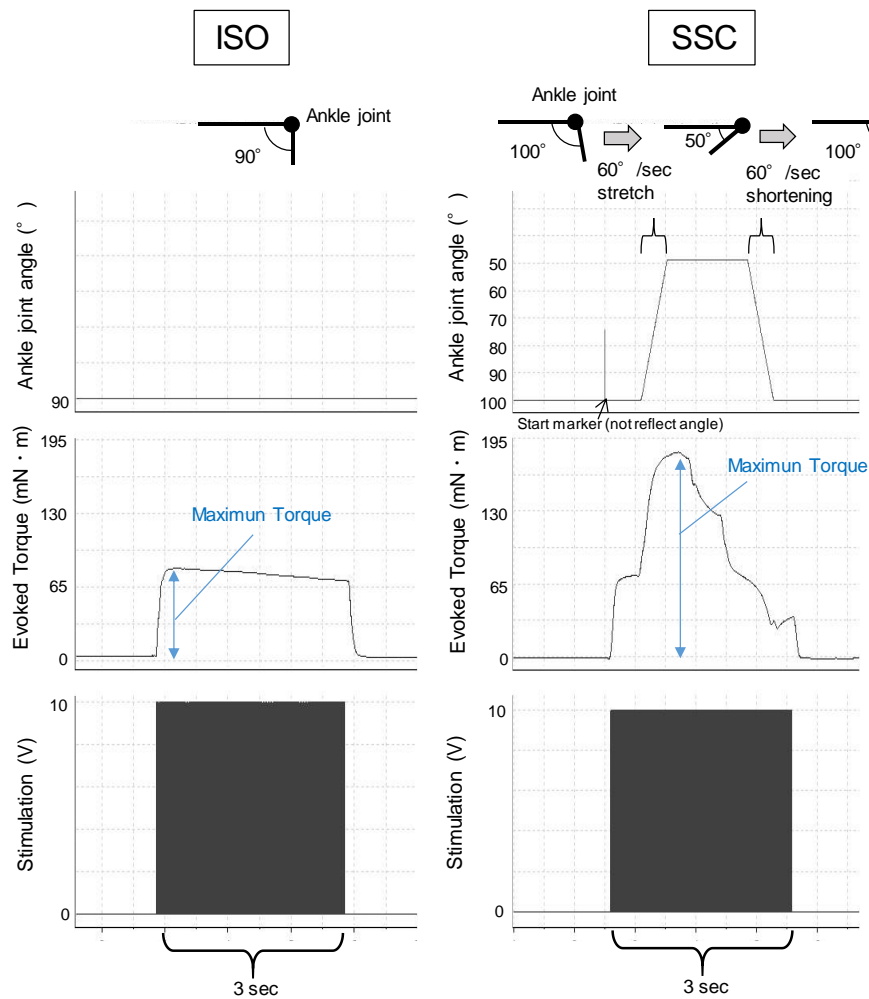


Fig. 3-3 ISO 形式と SSC 形式のレジスタンス運動概要

1 回の強縮時の足関節角度（上段）、発揮トルク（中段）、および電気刺激（下段）例を示した。

3-2-4 血液学分析

白血球数、およびヘモグロビン含量は EDTA を添加した全血を使用して、全自動血算分析装置 XT-1800i（シスメックス、兵庫、日本）で分析した。

3-2-5 血漿サイトカイン分析

血漿中の IL-1 β 、IL-6、IL-10 および TNF α 濃度はマルチプレックスイムノアッセイシステム Bio Plex200 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて測定した。上記の 3 種のサイトカインを同時測定するために、Rat reagent kit (Bio-Rad、171-304070M) およびラット IL-1 β (Bio-Rad、171-L1008M)、ラット IL-6 (Bio-Rad、171-L1012M)、ラット IL-10 (Bio-Rad、171-L1014M) および、ラット TNF- α (Bio-Rad、171-L1025M) 捕捉磁気ビーズを組み合わせたカスタムパネルを構築して使用した。

3-2-6 血漿 3-メチルヒスチジン測定

血漿サンプル中の 3-メチルヒスチジン (3-MeHis) は ultra-performance liquid-chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MSMS、TQD, Waters Corporation, Milford, MA, USA) を用いて以下の方法で分析した。血漿サンプルに等量の 6% トリクロロ酢酸を添加し、遠心分離後に上清を採取することで除たんぱく質処理した。得られた上清を 0.2 μ m 孔のポリオレフィン系メンブレンでろ過し、UPLC-MSMS 分析サンプルとした。UPLC は Intradia amino acid column (50 mm x ϕ 3 mm, Imtakt Corp., Kyoto, Japan) を用いて以下の条件で 3-MeHis を分離した。サンプル注入量を 1 μ L とし、カラム温度を 50 $^{\circ}$ C に保持した。移動相 A には 9% アセトニトリル、16% 25mM ギ酸アンモニウム、0.3% ギ酸を含有したテトラヒドロフランを用いた。移動相 B には 25% 100mM ギ酸アンモニウムを含有したアセトニトリルを用いた。3-MeHis はカラム注入後、600 μ L/min の流量で 2.5 分間 0% 移動相 A で維持、4 分かけて直線的に移動相 B を 17% まで上昇させ、その直後、移動相 B 100% に切り替え 3.5 分カラムを洗浄する、1 サイクル 10 分のグラジエント条件で、7.9 分のリテンションタイムで検出できた。質量分析計は正電荷エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI+) モードで以下の条件で用いた。

capillary voltage, 3 kV; cone voltage, 25 V; cone gas flow, 50 L/hr; source temperature 100 $^{\circ}$ C;

desolvation temperature, 400 °C; desolvation gas flow 850 L/hr; collision gas flow 0.25 mL/min; and collision energy 15 V.

3-MeHis の測定は multiple reaction monitoring (MRM) モードで、3-MeHis 由来の親イオン ($[m/z] = 170.2$) および娘イオン ($[m/z] = 124.2$) を選択的に検出することで実施した。当条件により、3.125~200 μM の範囲で 3-MeHis 標準物質の検量線の直線性が確保できたため、この範囲になるように分析サンプルを調製した。

3-2-7 統計解析

経日変動を表すための散布図は平均値 \pm 標準誤差 (SE) で示した。ただし、その他の場合は特に PG-PS を投与した各群において、分散が大きかったため、個別のデータプロットを含む箱ひげ図 (箱の上端 ; 上四分位、中線 ; 中央値、下端 ; 下四分位) で示した。箱の上端または下端より箱の長さの 1.5 倍より高い、または低い値は箱ひげ図に含めず、外れ値としてプロットしたが、統計解析には含めた。

3 群間の比較解析には、Tukey-Kramer test または Steel-Dwass nonparametric multiple comparison test を用いた。同個体内の 2 値比較には Paired-t test または Wilcoxon signed-rank test を用いた。有意水準は $P < 0.05$ とし、全ての統計解析は JMP 11 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて実施した。

3-3 結果

3-3-1 試験 3-1 の結果

3-3-1-1 体重、摂餌量 (実験 3-1)

実験 3-1 における、実験前後の体重、実験前後での体重増加、一日当たりの摂餌量、摂餌量あたりの体重増加量(food efficiency)を表 3-2 に示した。試験後の体重、試験前後での体重増加、および摂餌量は ISO-PG 群で ISO-Normal 群より有意に低値であった (表 3-2)。これらの結果は ISO-RE を複数回実施していない第 2 章での結果と同様であり、習慣的な ISO-RE が摂餌量や体重変動に大きく影響しなかったことを示唆している。また、food efficiency も ISO-PG 群で ISO-Normal 群より有意に低値であった (表 3-2)。慢性炎症時には熱産生が増大し組織構築への栄養利用率が下がることが示唆されており(Aoyagi *et al.*, 2015)、ISO-PG 群での Food efficiency の低下はこれを反映したものである可能性がある。

一方、ISO-RE に加えて抗炎症食を摂取させた ISO-PG+AI 群では、試験後の体重、試験前後での体重増加、および摂餌量は ISO-Normal 群との間に有意な差異はなかった。また、試験後の体重では、ISO-PG 群より有意に高値を示した。ISO-PG+AI 群の food efficiency は分散が大きかったこともあり、有意差は認められなかったが、平均値は ISO-Normal 群より高く、ISO-PG 群より大幅に高かった。これらの結果は、抗炎症食が慢性炎症による food efficiency の低下を抑制し、体重増加を正常に近づけた可能性を示唆している。

Table 3-2 体重、摂餌量および摂餌効率 (実験 3-1)

	ISO-Normal			ISO-PG			ISO-PG+AI		
	mean	SEM		mean	SEM		mean	SEM	
Body weight (g)									
Pre	170.4	± 5.3		169.6	± 1.0		170.6	± 1.1	
Post	199.0	± 5.8	a	185.5	± 2.9	b	199.3	± 3.5	a
Gain	28.6	± 1.0	a	15.8	± 3.1	b	28.7	± 3.3	ab
Food intake (g/day)	13.8	± 0.4	a	11.7	± 0.3	b	12.5	± 0.5	ab
Food efficiency (mg/g)	118.1	± 2.1	a	76.2	± 14.6	b	128.9	± 11.5	ab

Food efficiency は試験期間中の体重増加を総摂餌量で除した値として示した。各項目において、異なる文字 (a, b) が示されている群間に有意差あり (P < 0.05)。

3-3-1-2 下肢踝厚、白血球数およびヘモグロビン濃度の推移 (実験 3-1)

実験 3-1 における、下肢踝厚、白血球数およびヘモグロビン濃度の推移を Fig. 3-4 に示した。

ISO-PG 群の肢踝厚、白血球数およびヘモグロビン濃度推移は ISO-Normal 群では全ての項目がほぼ横ばいであったのに対し、下肢踝厚は PG-PS 投与 2~4 日後で一時高値となり、その後一旦低下するが、PG-PS 投与 10 日前後からより高くなり (Fig.3-4A)、白血球数は漸増 (Fig.3-4B)、ヘモグロビン濃度は漸減した (Fig.3-4C)。これらの結果は解剖直前以外で ISO-RE を実施していない第 2 章の結果と同様であり、習慣的な ISO-RE が PG-PS 投与後のこれらの炎症指標の増悪に大きく影響しなかったことを示唆している。

一方、ISO-PG+AI 群では、ISO-PG 群との間に有意な差異は認められなかったものの、下肢踝厚の増大 (Fig.3-4A)、白血球数の増大 (Fig.3-4B) および、ヘモグロビン濃度の減少 (Fig.3-4C) が軽減される傾向を認めた。これらの結果は、抗炎症食の摂取により PG-PS 投与後の炎症応答が一部抑制されたことを示唆している。

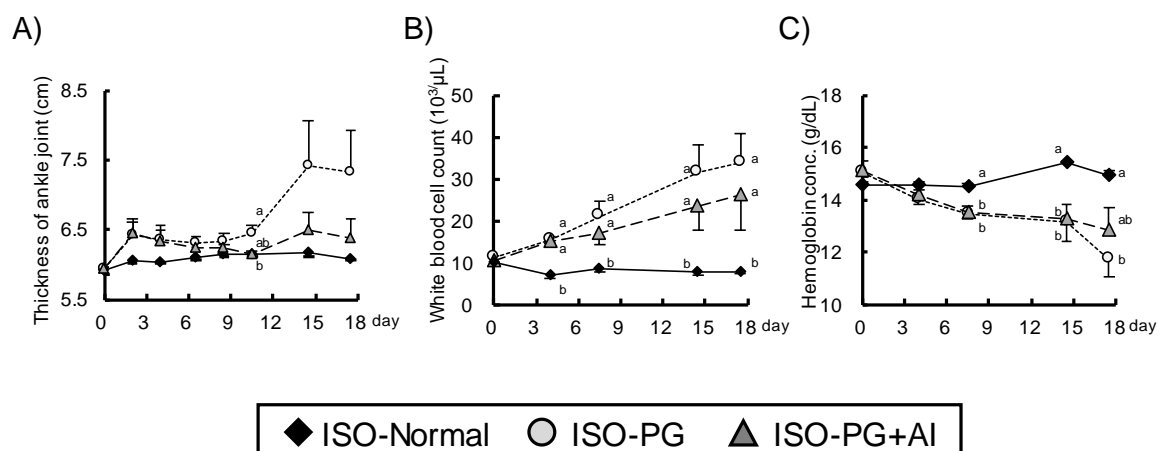


Fig. 3-4. ISO-Normal、ISO-PG、および ISO-PG+AI 群における炎症指標 (実験 3-1)

(A) 非運動側の後肢足関節厚、(B) 白血球数、(C) ヘモグロビン濃度。各測定時点において、異なる文字 (a, b) が示されている群間に有意差あり ($P < 0.05$)。後肢足関節厚 (A) において、図中に示していないが、day 10-11 および day 18 時点で ISO-Normal 群と ISO-PG 群の間に有意傾向あり ($P < 0.1$)。

3-3-1-3 サイトカイン濃度 (実験 3-1)

実験 3-1 における、PG-PS 投与 7-8 日、14-15 日および 17-18 日後の血漿 IL-1 β 、IL-6、TNF- α および IL-10 濃度を Fig. 3-5 に示した。

多くの時点で、代表的な炎症性サイトカインである、IL-1 β 、IL-6、および TNF α の ISO-PG 群における血漿中濃度は ISO-Normal 群よりも有意に高かった (Fig 3-5 上段、2 段目、3 段目)。これらの結果は、ISO-RE トレーニングが PG-PS 投与による炎症性サイトカイン濃度上昇に顕著な影響を及ぼさなかったことを示した。一方で、ISO-PG+AI 群の血漿 IL-1 β 、IL-6、および TNF α 濃度は、ISO-Normal 群、および ISO-PG 群との有意な差異は認められなかったものの、その中央値は全ての評価時点で ISO-PG 群より低値であった (Fig. 3-5 上段、

2 段目、3 段目)。これらの結果は、PG-PS 投与による慢性炎症ラットにおいて、抗炎症食の摂取が循環炎症性サイトカイン量を正常な状態に近づけることを示唆した。

抗炎症性サイトカインとして知られている IL-10 の血漿中濃度は、ISO-PG 群の一部個体で検出できたものの、ほとんどの個体で検出レベルを下回っていた。これらの結果は、本試験期間の中において、PG-PS 投与および ISO-RE による IL-10 血漿中濃度への影響が大きくないことを示している。

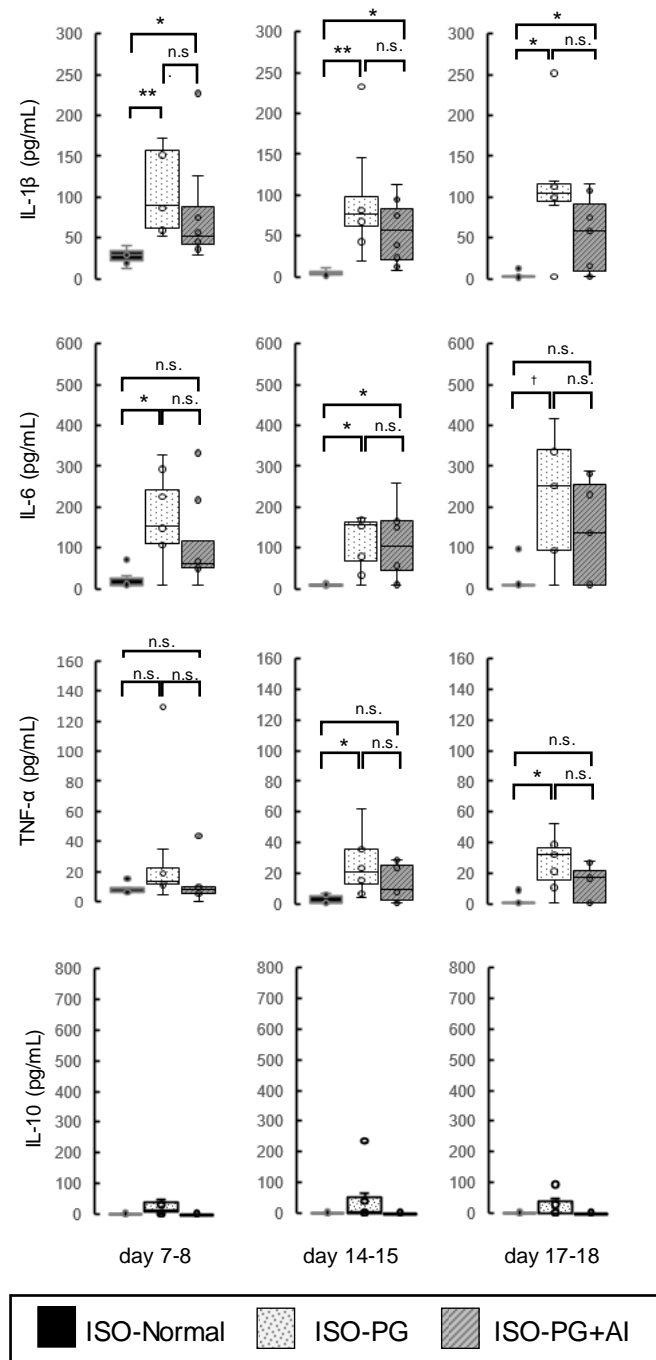


Fig. 3-5. ISO-Normal、ISO-PG、および ISO-PG+AI 群における循環サイトカイン濃度

(実験 3-1)

最上段： day 7-8、day 14-15 および day 17-18 (解剖時)の血漿 IL-1 β 濃度。二段目：同時点での血漿 IL-6 濃度。三段目：同時点での血漿 IL-TNF- α 濃度。最下段：同時点での血漿 IL-10 濃度。**P < 0.01, *P < 0.05 and †P < 0.1 (各測定時点での 2 群間多重比較)

3-3-1-4 骨格筋量 (実験 3-1)

ISO-RE トレーニング自体は PG-PS 投与による慢性炎症症状を大きく改善しなかったが、ISO-RE と併せて抗炎症食を供した場合には炎症症状の一部が緩和された。そこで、この違いが筋萎縮に与えた影響を検証した。

腓腹筋湿重量の結果を Fig. 3-6 に、足底筋湿重量、乾燥重量、水分量等の結果を Fig. 3-7 に示した。ISO-PG 群の非運動側 (Sedentary) 腓腹筋湿重量は ISO-Normal 群の腓腹筋湿重量よりも有意に低かった (Fig. 3-6A)。この結果から、習慣的に ISO-RE を実施した場合においても、第 2 章で示した結果と同様に PG-PS 投与により、骨格筋萎縮が引き起こされることが示された。一方で、ISO-PG+AI 群の腓腹筋湿重量は ISO-PG 群との間に有意差は認められなかったものの ($P > 0.1$)、その下四分位が、ISO-PG 群の中央値よりも高かった。また ISO-PG 群と異なり、ISO-Normal 群の腓腹筋湿重量との間にも有意差が認めず、両群の中間の値を示した (fig.3-6A)。これらの結果から、ISO-RE に併せて抗炎症食の摂取すると、慢性炎症による骨格筋萎縮が緩和されることが示唆された。

運動を課した側の腓腹筋湿重量も、非運動側と同様に、ISO-PG+AI 群では ISO-PG 群よりも重量減少が抑制される傾向が認められた (Fig. 3-6B)。また、ISO-RE トレーニングによる筋肥大、すなわち運動側腓腹筋の非運動側腓腹筋と比較した場合の有意な増量が全ての群で認められた (Fig. 3-6C)。ただし、本研究では経皮電気刺激によって RE を課したことから、皮膚の直下に位置する腓腹筋の湿重量増加が浮腫による水分増加や筋の損傷による出血を反映している懸念があった。そこで、腓腹筋より深部に位置し、経皮電気刺激によるトレーニング効果が示されている(Ochi *et al.*, 2015)足底筋を用いた検証を実施した。その結果、足底筋湿重量においても、非運動側、運動側とも腓腹筋重量と同様の傾向を認めた (Fig. 3-7A-B)。また、足底筋乾燥重量も非運動側、運動側共に ISO-PG+AI 群では ISO-PG 群よりも ISO-Normal 群からの重量減少が緩和される傾向が認められた (Fig. 3-7C-D)。湿重量と乾燥重量から算出した足底筋水分率は、非運動側、運動側共に全ての群間で有意差を認めず、約 75%であった (Fig. 3-7E)。この水分量は過去に報告された骨格筋水分量とほぼ同等であった

(Goldberg, 1967)。更に、非運動側、運動側共に、全群を通してその湿重量と乾燥重量との間には有意な正相関を認め、非運動側と運動側の相関直線はほぼ重なっていた (Fig. 3-7F)。これらの結果は、足底筋においては ISO-RE に起因する水分量増加の影響がほぼなかったことを示している。足底筋乾燥重量においても、ISO-Normal、ISO-PG、ISO-PG+AI 群全てで、運動側が非運動側より有意に高値であったことから、ISO-RE トレーニングによる増量が実質的な筋組織量の増加に基づくことが証明された。

これらの結果は、慢性炎症状態という異化が亢進した状況であっても、ISO-RE によるトレーニングが骨格筋の維持・増量に有効であること、および ISO-RE と併せて抗炎症食を摂取することで更に骨格筋萎縮を緩和できる可能性があることを示した。

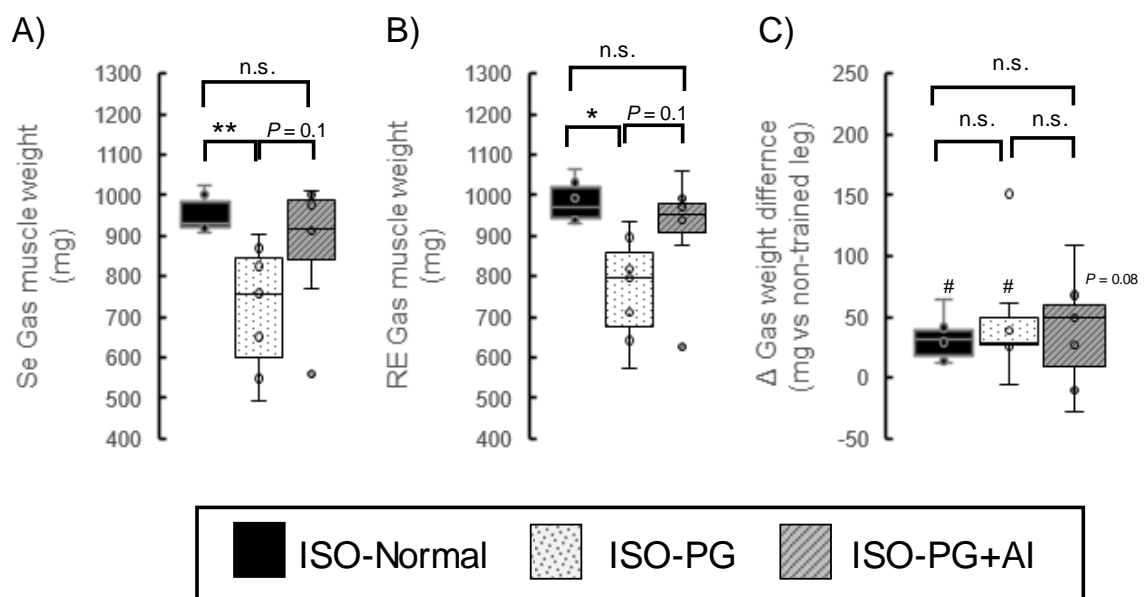
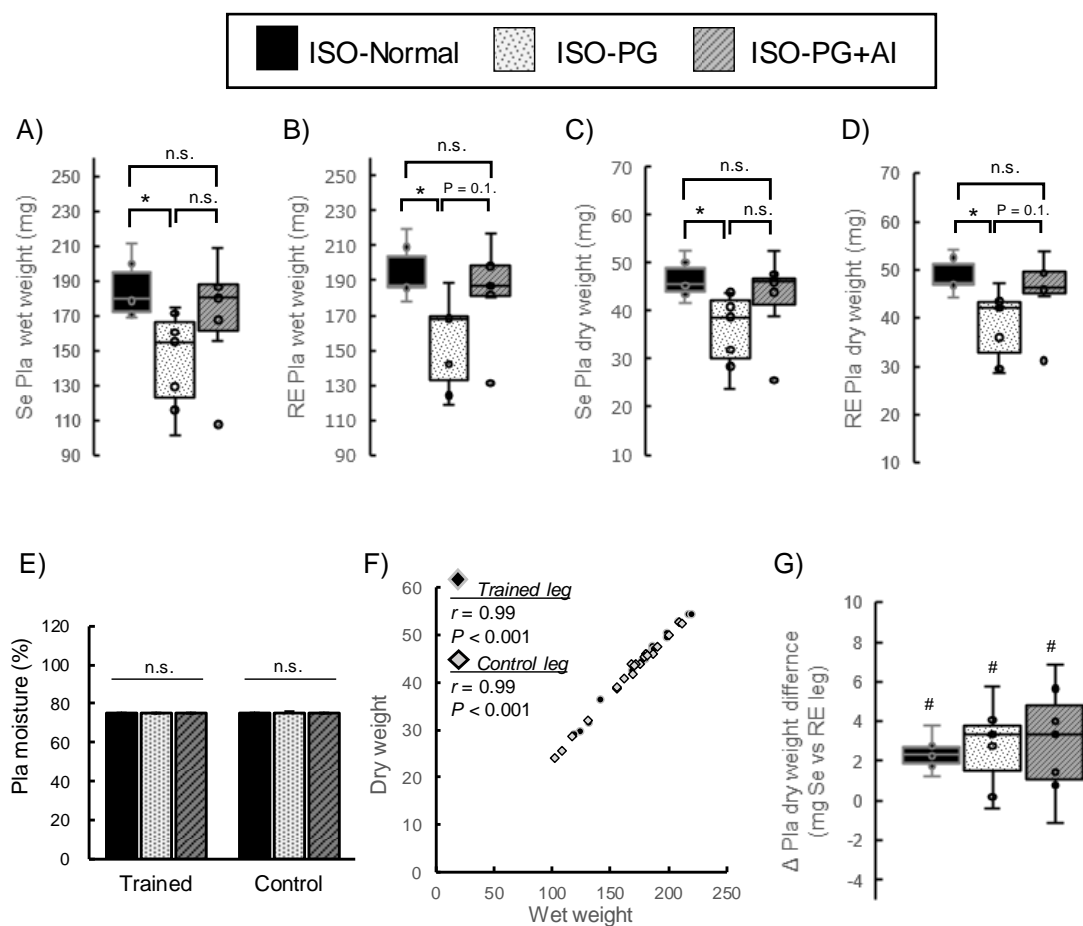


Fig. 3-6. ISO-Normal、ISO-PG、および ISO-PG+AI 群における ISO-レジスタンス運動側および非運動側の腓腹筋湿重量 (実験 3-1)

(A) 非運動側 (Sedentary ; Se) 、および(B) Isometric レジスタンス運動側 (RE) の腓腹筋 (Gas) 湿重量。(C) Isometric レジスタンス運動による腓腹筋湿重量増加量。 ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ (2 群間多重比較)。 # $P < 0.05$ (群内での運動側と非運動側腓腹筋間の比較)



**Fig. 3-7. ISO-Normal、ISO-PG、および ISO-PG+AI 群における ISO-レジスタンス運動側
および非運動側足底筋の湿・乾燥重量 (実験 3-1)**

(A) 非運動側 (Sedentary; Se)、および(B) Isometric レジスタンス運動側 (RE) の足底筋 (Pla) 湿重量。(C) 非運動側 (Sedentary ; Se)、および(D) Isometric レジスタンス運動側 (RE) の足底筋 (Pla) 乾燥重量。* $P < 0.05$ (2 群間多重比較)。(E) 非運動側 (Control)、および Isometric レジスタンス運動側 (Trained) の足底筋 (Pla) 水分量 (平均値 \pm 標準誤差)。(F) 足底筋湿重量と乾燥重量の相関関係。Pearson の相関係数とその有意性を図中に示した。(E) Isometric レジスタンス運動による足底筋乾燥重量増加量。# $P < 0.05$ (群内での運動側と非運動側足底筋間の比較)

3-3-1-5 筋萎縮と炎症指標との相関関係 (実験 3-1)

ISO-RE トレーニングと併せて抗炎症食を摂取することで、PG-PS 投与による慢性炎症指標の増加、および筋萎縮が軽減する傾向を認めたことから、これらの相関関係を検討した。その結果、非運動側、運動側の腓腹筋湿重量と全ての観測時点での白血球数、IL-1 β 、および TNF- α 、day17-18 を除く観測時点での IL-6 との間に有意な負の相関関係を認めた (Table 3-3)。また、Fig. 3-8 に示したように、これらの負の相関係数-0.8 以上と非常に高い例も多く、炎症指標が高くなるほど、骨格筋萎縮が悪化する相互関係性が明らかとなった。

Table 3-3 腓腹筋重量と炎症指標との相関関係 (実験 3-1)

	Gastrocnemius wet weight	
	RE side <i>r</i>	Sedentary side <i>r</i>
WBC		
day 4	-0.56 *	-0.55 *
day 7-8	-0.80 ***	-0.84 ***
day 14-15	-0.90 ***	-0.90 ***
day 17-18	-0.93 ***	-0.92 ***
IL-1 β		
day 7-8	-0.86 ***	-0.82 ***
day 14-15	-0.81 ***	-0.77 ***
day 17-18	-0.84 ***	-0.81 ***
IL-6		
day 7-8	-0.90 ***	-0.87 ***
day 14-15	-0.79 ***	-0.82 ***
day 17-18	-0.35	-0.33
TNF- α		
day 7-8	-0.66 **	-0.58 **
day 14-15	-0.85 ***	-0.81 ***
day 17-18	-0.76 ***	-0.70 ***

RE : Resistanse exercise. WBC : white blood cell count. *r* : Pearson の相関係数.

*P < 0.05, **P < 0.01, and ***P < 0.001。

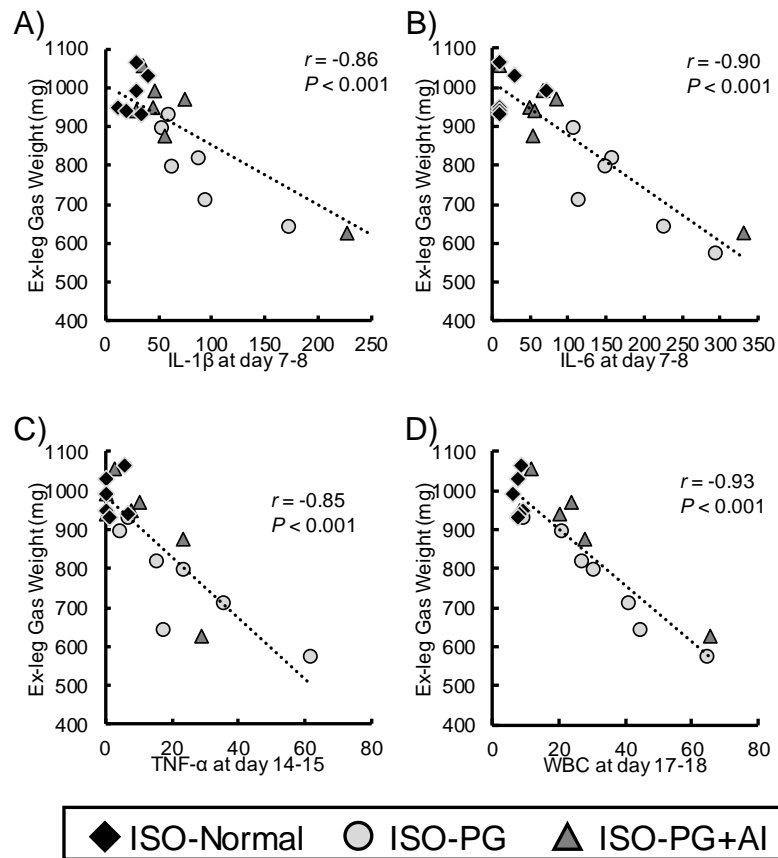


Fig. 3-8. ISO レジスタンス運動側腓腹筋重量と炎症指標との相関における典型例

(実験 3-1)

Isometric レジスタンス運動側腓腹筋湿重量と、(A) day 7-8 時点での IL-1 β 、(B) day 7-8 時点での IL-6、(C) day 14-15 時点での TNF- α 、および (D) day 17-18 時点での WBC との相関関係を示す散布図。Pearson の相関係数 r とその有意性を各図中に示した。

3-3-1-6 血漿 3-MeHis 濃度 (実験 3-1)

3-3-1-5 で示した炎症指標と骨格筋萎縮との負の相関関係を紐づける機序として、骨格筋たんぱく質分解 (MPB) に着目して血漿 3-MeHis 濃度を評価した。3-MeHis はアクチンやミオシンなど収縮たんぱく質が分解されて血中に放出される修飾アミノ酸であり、たんぱく

質合成に再利用されない。その為、心筋のたんぱく質分解の影響が排除できないなど、完全ではないものの、全身の MPB を反映するマーカーとして用いられる(Kochlik *et al.*, 2018)。

ISO-Normal 群において、血漿 3-MeHis の中央値は 37 μM と比較的低値であり、右下肢への局所的な ISO-RE トレーニングが全身の MPB を大きく増加させていないことが推定された。それに対して、ISO-PG 群の血漿 3-MeHis 濃度は ISO-Normal 群と比較して有意に高値であり、PG-PS による慢性炎症により全身の MPB が増加していることが示唆された (Fig. 3-9A)。一方で ISO-PG+AI 群の血漿 3-MeHis 濃度はその中央値が ISO-Normal 群とほぼ同等であり、ISO-PG 群と比較して有意に低値であった (Fig. 3-9A)。また全体として、血漿 3-MeHis 濃度と TNF- α 濃度との間には有意な正の相関関係を認めた (Fig. 3-9B)。これらの結果は、PG-PS に応答した炎症症状の重さの程度が全身 MPB の上昇の程度に寄与することを示唆した。また、ISO-RE トレーニングと併せて抗炎症食を摂取すると、炎症サイトカインの抑制を介して、MPB 亢進を軽減する可能性が示された。

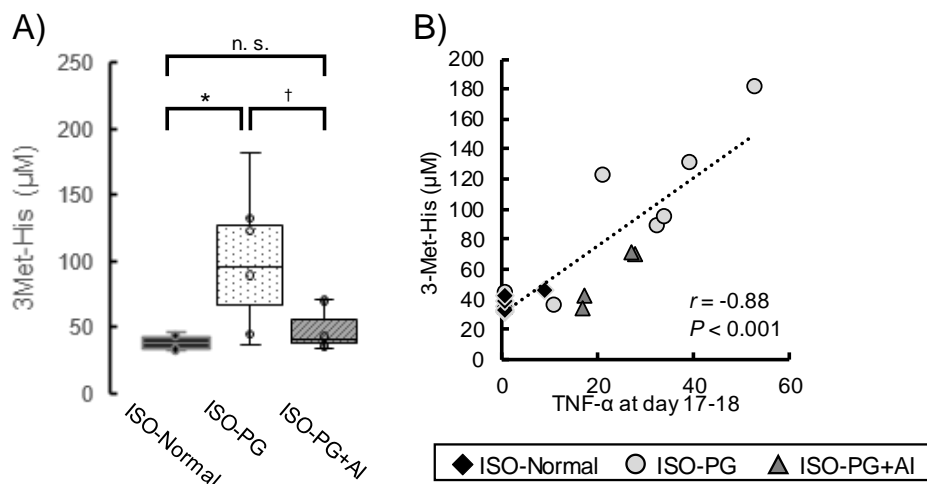


Fig. 3-9. ISO-Normal、ISO-PG、および ISO-PG+AI 群における血漿 3-メチルヒスチジン濃度および血漿 3-メチルヒスチジンと TNF- α 濃度との相関 (実験 3-1)

(A) 解剖時の血漿 3-MeHis 濃度。* $P < 0.05$ and † $P < 0.1$ (2 群間多重比較)。(B)解剖時点での血漿 3-MeHis 濃度 と TNF- α 濃度との相関関係を示す散布図。Pearson の相関係数 r とその有意性を図中に示した。

3-3-2 試験 3-2 の結果

3-3-2-1 体重、摂餌量 (実験 3-2)

実験 3-2 における、実験前後の体重、実験前後での体重増加、一日当たりの摂餌量、food efficiency を表 3-4 に示した。試験後の体重、試験前後での体重増加、および摂餌量に SSC-PG 群と SSC-Normal 群との差異は認められなかった (表 3-4)。また、food efficiency は SSC-PG 群で SSC-Normal 群より平均的に低値であったが、有意な減少は認められなかった (表 3-2)。これらの結果は等尺性レジスタンス運動を実施した実験 3-1 の結果と異なっており、習慣的な SSC-RE が PG-PS による摂餌量や food efficiency の低下を抑制し、体重減少を軽減した可能性がある。

SSC-RE に加えて抗炎症食を摂取させた SSC-PG+AI 群では、試験後の体重、試験前後での体重増加、摂餌量、および food efficiency は ISO-Normal 群とほぼ同等であった。これらの結果は、SSC-RE によるトレーニングを実施している場合には抗炎症食による追加の food efficiency の改善や、体重増加がないことを示唆している。

Table 3-4 体重、摂餌量および摂餌効率 (実験 3-2)

	SSC-Normal		SSC-PG		SSC-PG+AI	
	mean	SEM	mean	SEM	mean	SEM
Body weight (g)						
Pre	155.2 ±	5.5	159.5 ±	1.0	160.7 ±	2.1
Post	192.7 ±	3.5	190.1 ±	3.6	196.8 ±	3.8
Gain	37.6 ±	4.2	30.5 ±	3.3	36.2 ±	3.5
Food intake (g/day)	15.8 ±	0.3	14.3 ±	0.6	15.0 ±	0.2
Food efficiency (mg/g)	152.8 ±	14.4	135.1 ±	9.7	153.9 ±	11.9

Food efficiency は試験期間中の体重増加を総摂餌量で除した値として示した。各項目において、全ての 2 群間に有意差は認められなかった ($P > 0.05$)。

3-3-2-2 下肢踝厚、白血球数およびヘモグロビン濃度の推移 (実験 3-2)

実験 3-2 における、下肢踝厚、白血球数およびヘモグロビン濃度の推移を図 3-10 に示した。

SSC-PG 群の肢踝厚、白血球数およびヘモグロビン濃度推移は ISO-Normal 群では全ての項目がほぼ横ばいであったのに対し、下肢踝厚は PG-PS 投与 2 日後から有意に高値となり、その後、横ばいで推移し、PG-PS 投与 13 日前後からより高くなるという実験 3-1 とは少し異なる挙動を示した (Fig.3-10A)。一方、白血球数、およびヘモグロビン濃度はそれぞれ漸増 (Fig.3-10B)、漸減した (Fig.3-10C)。

SSC-PG+AI 群では、下肢踝厚の増大 (Fig.3-10A)、白血球数の増大 (Fig.3-10B) においては SSC-PG 群より低値で推移したものの、有意な差異は認められなかった。また、SSC-PG+AI 群では、ヘモグロビン濃度が SSC-PG 群より高値で推移し、PG-PS 投与 14 日後の時点では SSC-PG 群の値より有意に高値であった (Fig.4-10C)。これらの結果は ISO-RE を SSC 形式に変更した場合でも、これらの炎症指標の増悪には大きく影響しないこと、および実験 3-1 と同様に SSC-RE と併せて抗炎症食を摂取することで、PG-PS 投与後の持続的な炎症応答を一部抑制できることを示唆した。

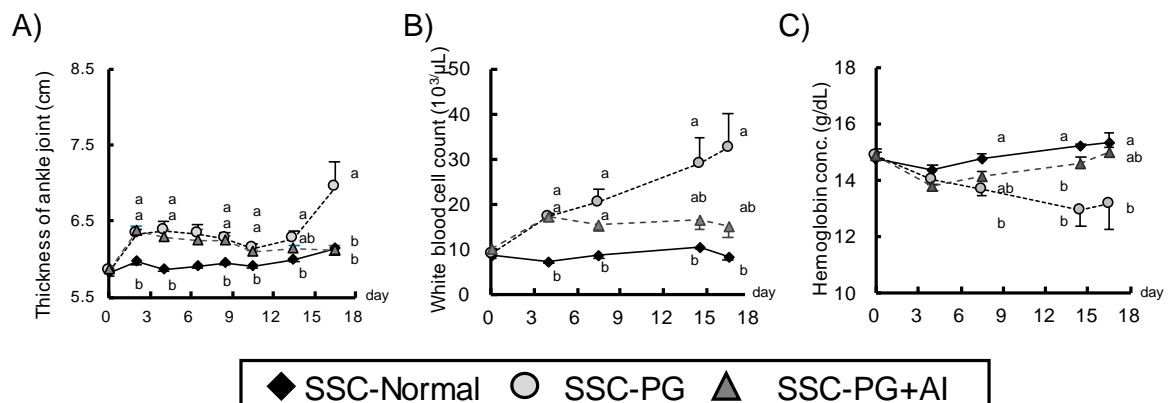


Fig. 3-10. SSC-Normal、SSC-PG、および SSC-PG+AI 群における炎症指標 (実験 3-2)

(A) 非運動側の後肢足関節厚、(B) 白血球数、(C) ヘモグロビン濃度。各測定時点において、異なる文字 (a, b) が示されている群間に有意差あり ($P < 0.05$)。

3-3-2-3 サイトカイン濃度 (実験 3-2)

実験 3-2 における、PG-PS 投与 7-8 日、14-15 日および 17-18 日後の血漿 IL-1 β 、IL-6、TNF- α および IL-10 濃度を Fig. 3-11 に示した。

PG-PS 投与 7~8 日後において、IL-1 β は、SSC-Normal 群と比較して SSC-PG 群で有意に高値となったものの (Fig.3-11 上段)、IL-6 や TNF α 濃度の顕著な増大は認められなかった (Fig.3-11 2,3 段目)。一方、SSC-PG+AI 群では、PG-PS 投与 7~8 日後の IL-1 β の増大を抑制する傾向が認められた ($P < 0.1$ 、Fig.4-11 上段)。PG-PS 投与 14~15 日後、および 16~17 日後においては、SSC-PG 群の IL-1 β 、IL-6、および TNF α 濃度の中央値は最も高かったものの、分散が大きく、SSC-Normal 群との有意差は認められなかった (Fig. 3-11 1~3 段目)。また、PG-PS 投与 14~15 日後、および 16~17 日における SSC-PG+AI 群のこれらの炎症性サイトカイン濃度は全体として有意差は認められないものの、高値となる個体が SSC-PG 群よりも少なかった。

抗炎症性サイトカインである IL-10 の血漿中濃度は PG-PS 投与 7~8 日後ではほとんど検出できなかったが、PG-PS 投与 14~15 日後、および 16~17 日後においては、SSC-Normal 群においても検出された (Fig.3-11 下段)。また、SSC-PG 群では PG-PS 投与 14~15 日後、17~18 日後の時点での IL-10 濃度が SSC-Normal 群と比較して有意に高値であった (Fig.3-11 下段)。一方、SSC-PG+AI 群においても、IL-10 濃度が PG-PS 投与 14~15 日後、16~17 日後の時点で、SSC-Normal 群よりも有意に高値となったものの、その程度は SSC-PG 群と比較すると小さかった (Fig.3-11 下段)。

これらの結果から、SSC 形式のトレーニングは ISO 形式のトレーニングと異なり、これらの炎症性、抗炎症性サイトカイン濃度に何らかの影響を及ぼしていることが示唆された。SSC-RE と併せての抗炎症食摂取は、炎症性サイトカイン濃度の上昇を軽減するものの、抗炎症性サイトカインの増加も抑制する可能性がある。

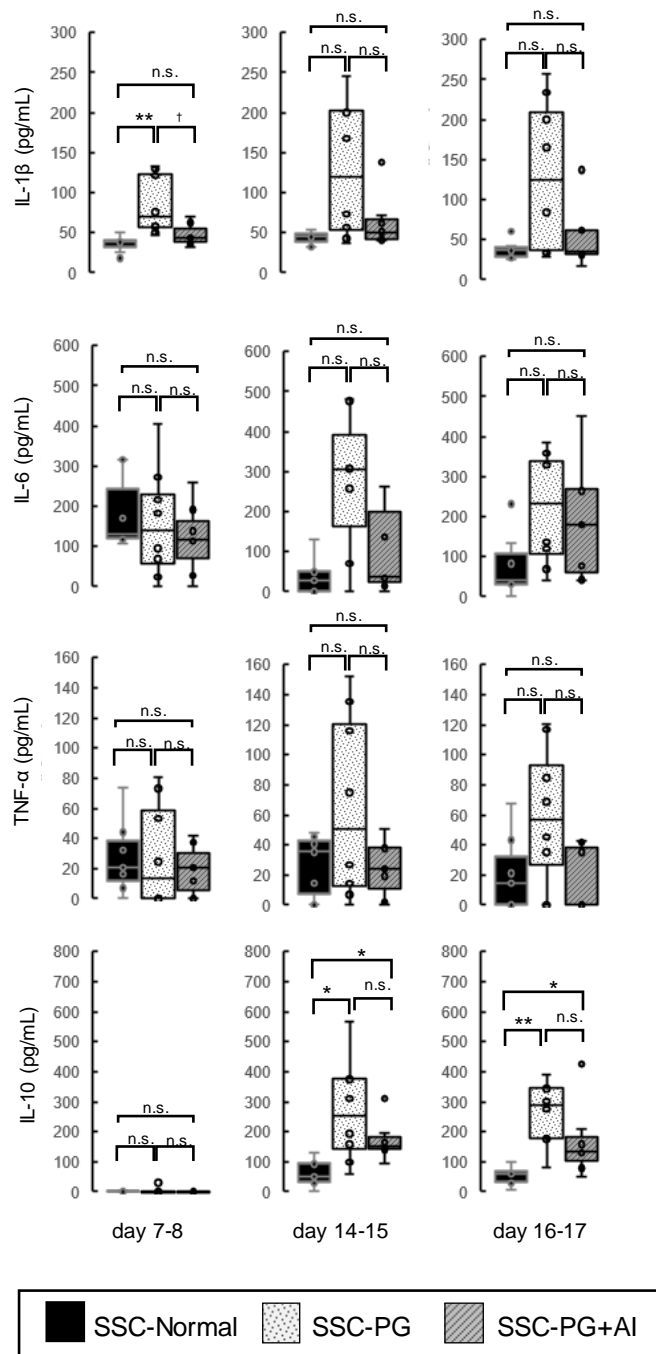


Fig. 3-11. SSC-Normal、SSC-PG、および SSC-PG+AI 群における循環サイトカイン濃度

(実験 3-2)

最上段： day 7-8、day 14-15 および day 16-17 (解剖時)の血漿 IL-1 β 濃度。二段目：同時点

での 血漿 IL-6 濃度。三段目： 同時点での 血漿 IL-TNF- α 濃度。最下段： 同時点での

血漿 IL-10 濃度。**P < 0.01, *P < 0.05 and †P < 0.1 (各測定時点での 2 群間多重比較)

3-3-2-4 骨格筋量 (実験 3-2)

腓腹筋湿重量の結果を Fig. 3-12 に、足底筋湿重量、乾燥重量、水分量等の結果を Fig. 3-13 に示した。SSC-PG 群の非運動側 (Sedentary) および、運動側 (Re) 腓腹筋湿重量は SSC-Normal 群の腓腹筋湿重量よりも低い傾向であった ($P < 0.1$, Fig. 3-12AB)。これらの結果から、SSC-RE を実施した場合においても、実験 3-1 と同様に PG-PS 誘導性慢性炎症による骨格筋萎縮が引き起こされることが示された。ただし、ISO-RE の場合と比較して、Normal 群と同等の腓腹筋重量を維持する個体が多く、SSC-RE による好影響があった可能性がある。

SSC-PG+AI 群の腓腹筋湿重量は、非運動側、運動側ともにほぼ SSC-Normal 群と同水準に維持されており、SSC-PG 群と比較して非運動側で有意に、運動側で有意傾向 ($P < 0.1$) をもって高値であった (Fig. 3-12AB)。また、SSC-RE トレーニングによるみかけの筋肥大、すなわち運動側腓腹筋の非運動側腓腹筋と比較した場合の有意な湿重量増加が全ての群で認められ、その程度に群間の差異は認められなかった (Fig. 3-12C)。

足底筋の湿重量は非運動側、運動側共に、腓腹筋と同様 SSC-PG 群で SSC-Normal 群より低値となる個体が多かったが、有意ではなかった (Fig. 3-13AB)。更に、乾燥重量では SSC-Normal 群と SSC-PG 群との差異がより小さくなる傾向であった (Fig. 3-13C)。一方、SSC-PG+AI 群の足底筋湿重量、乾燥重量は非運動側、運動側共に、腓腹筋と同様に SSC-Normal 群と同程度に維持されていた。

SSC を課した本試験では、全ての群で運動側の足底筋水分率が非運動側と比較して有意、または有意傾向 ($P < 0.1$) をもって高値であった (Fig. 3-13E)。これは、ISO を課した場合と異なり、SSC を課した場合では部分的に浮腫の影響が残っていたことを示唆した。ただし、湿重量と乾燥重量は群に関わらず有意に高い正相関関係を示しており、非運動側、運動側別の湿重量による群間比較の妥当性は引き続き担保されていると考えられた (Fig. 3-13F)。一方、運動側と非運動側を比較する筋肥大の解析では湿重量での結果と異なった。SSC-RE トレーニングは、SSC-Normal 群、SSC-PG 群において運動側足底筋乾燥重量の非運動側からの有意な増量、つまり筋肥大を引き起こしたが、SSC-PG+AI 群では筋肥大が認められなかつ

た (Fig. 3-13G)。これらの結果は、SSC-RE トレーニングが PG-PS 投与による慢性炎症状態下での実質的な筋組織の維持に有効であること、更に非運動側でも一部慢性炎症による筋萎縮を軽減する可能性があることを示した。一方、SSC-RE トレーニング実施時の抗炎症食の摂取は、全体として筋萎縮軽減に有効であるものの、SSC-RE による運動側足の筋肥大効果を消失させる可能性が示された。

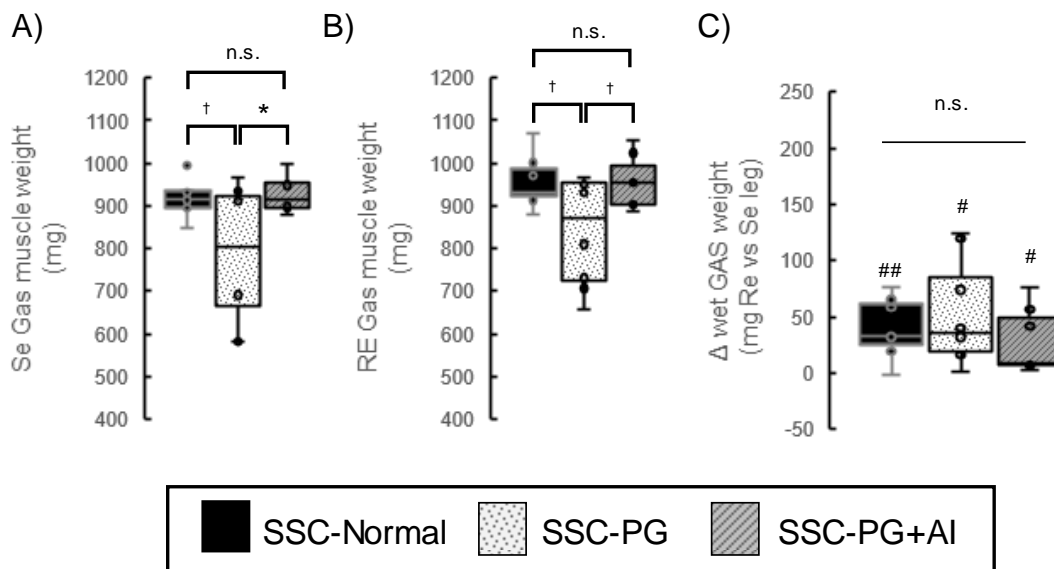


Fig. 3-12. SSC-Normal、SSC-PG、および SSC-PG+AI 群における SSC-レジスタンス運動側および非運動側の腓腹筋湿重量 (実験 3-2)

(A) 非運動側 (Sedentary ; Se) 、および(B) SSC レジスタンス運動側 (RE) の腓腹筋 (Gas) 湿重量。(C) SSC レジスタンス運動による腓腹筋湿重量増加量。 † $P < 0.1$, * $P < 0.05$. (2 群間多重比較)。 # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ (群内での運動側と非運動側腓腹筋間の比較)。 n.s; not significant ($P > 0.1$)。

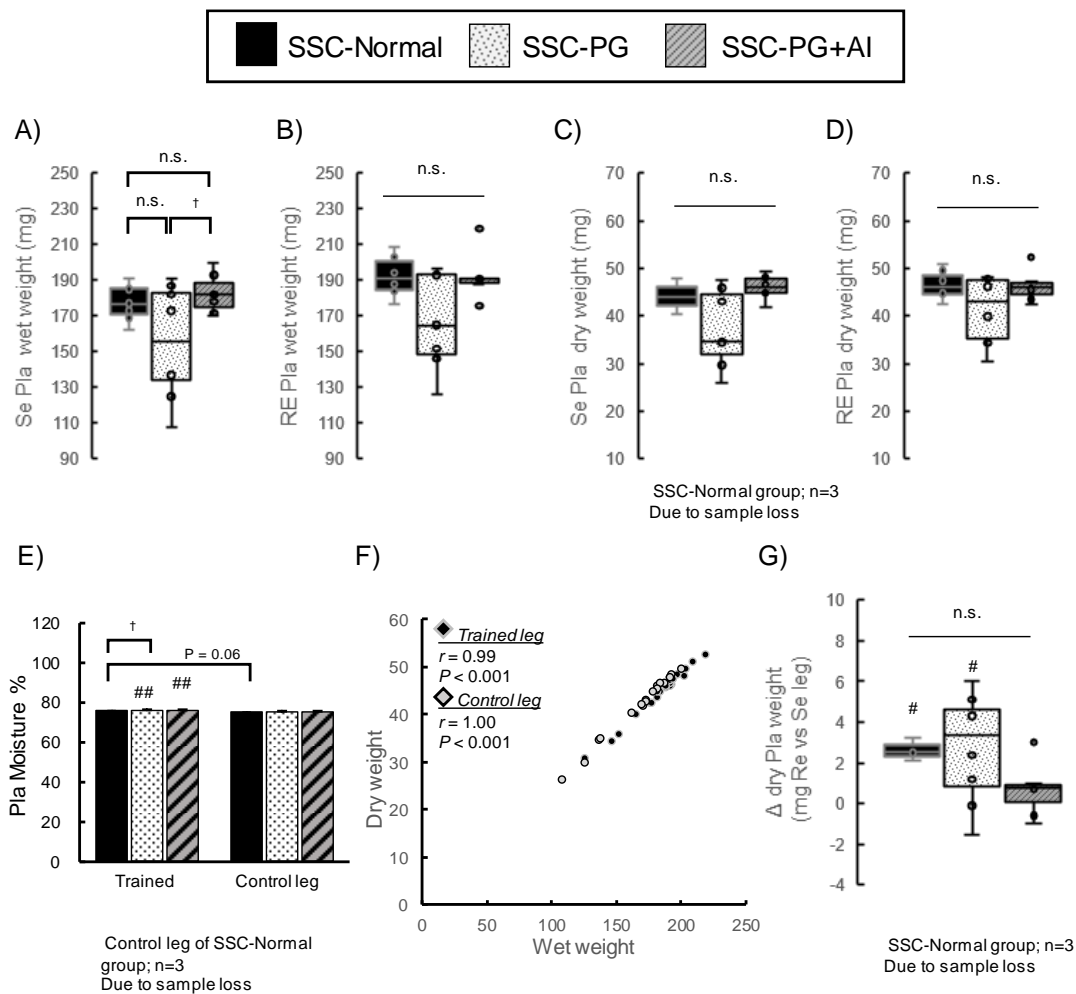


Fig. 3-13. SSC-Normal、SSC-PG、および SSC-PG+AI 群における SSC-レジスタンス運動側および非運動側足底筋の湿・乾燥重量（実験 3-2）

(A) 非運動側 (Sedentary ; Se) 、および(B)SSC レジスタンス運動側 (RE) の足底筋 (Pla) 湿重量。(C) 非運動側 (Sedentary ; Se) 、および(D) SSC レジスタンス運動側 (RE) の足底筋 (Pla) 乾燥重量。†P < 0.01 (2 群間多重比較)。(E) 非運動側 (Control Leg) 、および SSC レジスタンス運動側 (Trained) の足底筋 (Pla) 水分量 (平均値±標準誤差)。(F) 足底筋湿重量と乾燥重量の相関関係。Pearson の相関係数とその有意性を図中に示した。(E)SSC レジスタンス運動による足底筋乾燥重量増加量。#P < 0.05 (群内での運動側と非運動側足底筋間の比較)。n.s.; not significant (P > 0.1).

3-3-2-5 筋萎縮と炎症指標との相関関係 (実験 3-2)

実験 3-2 では上述のように湿重量より、乾燥重量の方が骨格筋の実質的な組織重量を反映していたことから、足底筋乾燥重量と各炎症指標との相関関係を検討した。その結果、非運動側、運動側の足底筋乾燥重量と PG-PS 投与 7 日後以降の全ての時点での白血球数、IL-1 β 、および TNF- α 、day7-8 を除く観測時点での IL-6 との間に有意な負の相関関係を認めた (Table 3-5)。また、Fig. 3-14 に示したように、これらの負の相関係数-0.8 以上と非常に高い例が多く、炎症指標が高くなるほど、骨格筋萎縮が悪化する相互関係が明らかとなった。ただし、ISO を課した実験 3-1 では運動側で非運動側よりより相関係数が高い傾向であったが、SSC を課した実験 3-2 では非運動側の相関係数が高い傾向であった点、および IL-1 β 、IL-6 濃度と足底筋乾燥重量との相関係数が最も高くなった時点が、実験 3-1 より遅い時点であった点などの相違があった。

Table 3-5 足底筋乾燥重量と炎症指標との相関関係 (実験 3-2)

	Plantaris dry weight	
	RE side <i>r</i>	Sedentary side <i>r</i>
WBC		
day 4	-0.25	-0.41
day 7-8	-0.75 ***	-0.67 ***
day 14-15	-0.87 ***	-0.82 ***
day 16-17	-0.88 ***	-0.86 ***
IL-1 β		
day 7-8	-0.73 ***	-0.64 **
day 14-15	-0.90 ***	-0.90 ***
day 16-17	-0.77 ***	-0.76 ***
IL-6		
day 7-8	-0.48 *	-0.28
day 14-15	-0.74 ***	-0.73 ***
day 16-17	-0.70 **	-0.68 ***
TNF- α		
day 7-8	-0.54 *	-0.44 *
day 14-15	-0.82 ***	-0.81 ***
day 16-17	-0.70 **	-0.67 ***

RE : Resistanse exercise. WBC : white blood cell count. *r* : Pearson の相関係数.

*P < 0.05, **P < 0.01, and ***P < 0.001.

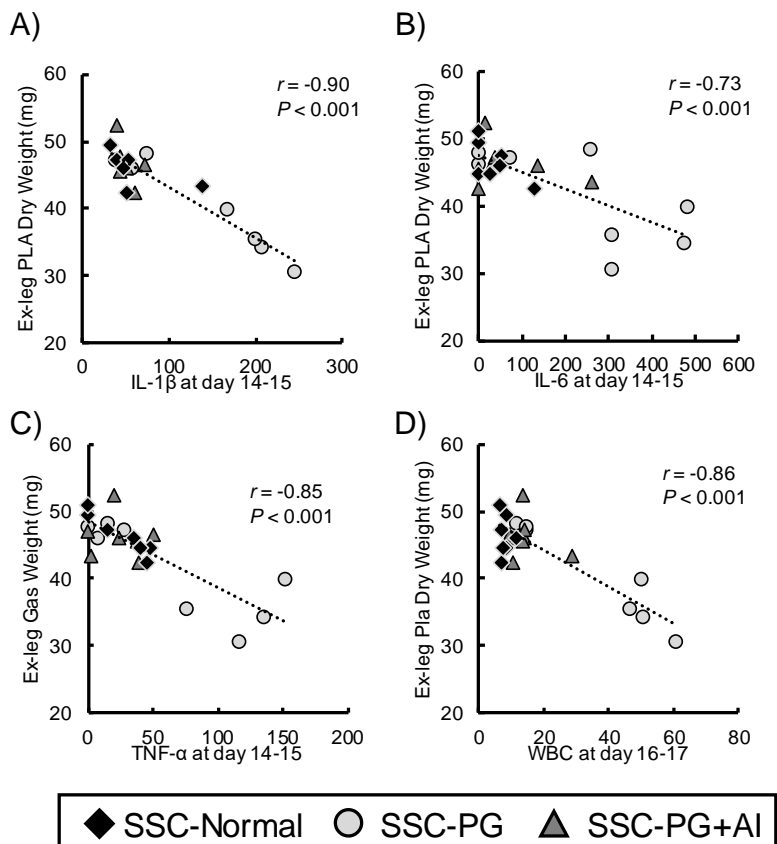


Fig. 3-14. 足底筋乾燥重量と炎症指標との相関における典型例（実験 3-2）

SSC レジスタンス運動側足底筋乾燥重量と、(A) day 14-15 時点での IL-1 β 、(B) day 14-15 時点での IL-6、(C) day 14-15 時点での TNF- α 、および (D) day 16-17 時点での WBC との相関関係を示す散布図。Pearson の相関係数 r とその有意性を各図中に示した。

3-3-2-7 血漿 3-MeHis 濃度 (実験 3-2)

SSC-Normal 群において、血漿 3-MeHis の中央値は 66 μ M と実験 3-1 での ISO-Normal 群の中央値より高値であった。また、SSC-PG 群の血漿 3-MeHis 濃度は SSC-Normal 群と同水準であった (Fig. 3-15A)。一方で SSC-PG+AI 群の血漿 3-MeHis 濃度は、SSC-Normal 群と比較して有意に、SSC-PG 群と比較して有意傾向 ($P < 0.1$) をもって低値であった (Fig. 3-15A)。

これらの結果は、SSC トレーニングによって、基底の MPB が ISO トレーニング時よりも高まっており、PG-PS による影響がマスクされた可能性がある。ただし、実験 3-1 と比較して弱いものの、全群を通して血漿 3-MeHis 濃度と解剖時点での TNF- α 濃度間に有意な正相関を認めており (Fig. 3-15B)、SSC-RE と併せて抗炎症食を摂取した場合は、MPB をより低く維持できる可能性が示された。

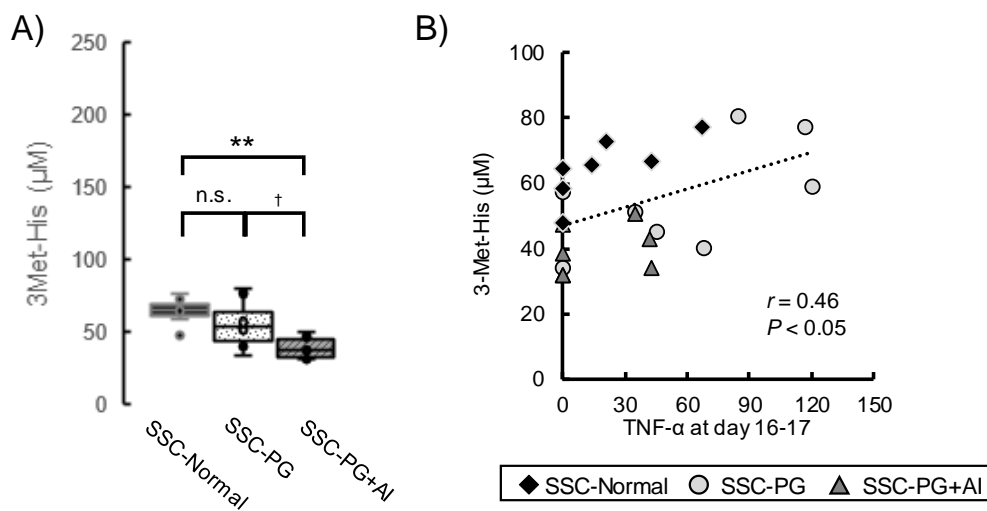


Fig. 3-15. SSC-Normal、SSC-PG、および SSC-PG+AI 群における血漿 3-メチルヒスチジン濃度および血漿 3-メチルヒスチジンと TNF- α 濃度との相関 (実験 3-2)

(A) 解剖時の血漿 3-MeHis 濃度。** $P < 0.01$, † $P < 0.1$ (2 群間多重比較)。(B)解剖時点での血漿 3-MeHis 濃度 と TNF- α 濃度との相関関係を示す散布図。Pearson の相関係数 r とその有意性を図中に示した。

3-4 考察

第3章においては、まず実験 3-1 から (1) 慢性炎症条件下での ISO-RE トレーニングにより骨格筋萎縮を軽減できること、および (2) 慢性炎症下での骨格筋量や血中 3-MeHis は循環炎症性サイトカイン濃度と関連しており、抗炎症食品摂取により筋萎縮を改善できる可能性が示された。

更に実験 3-2 から、(3) 慢性炎症条件下での SSC-RE トレーニングにより骨格筋萎縮を軽減できること、および (4) 慢性炎症下での骨格筋量や血中 3-MeHis は循環炎症性サイトカイン濃度と関連しており、抗炎症食品摂取により筋萎縮を改善できることが追認された。ただし、(5) 抗炎症食品の摂取は、慢性炎症下における ISO-RE の筋肥大効果を弱めることはなかったが、SSC-RE の筋肥大効果を打ち消す可能性があることが示された。これらの第3章で得られた示唆に関して、以下で考察した。

3-4-1 慢性炎症条件下での ISO-RE トレーニングによる骨格筋萎縮抑制作用

慢性疾患によって引き起こされる筋萎縮に対する RE の影響は、主に協働筋切除を使用した機能的過負荷モデルによって以前に調べられてきた。例えば、Otis らは、機能的過負荷が担癌ラットの足底筋萎縮を予防することを報告した(Otis *et al.*, 2007)。また、Chen らは慢性腎不全モデルラットにおいては、基底の Akt シグナル伝達の減弱が認められるものの、健康なラットと同様に、機能的過負荷に応答した Akt シグナル伝達経路の活性化が認められ、足底筋萎縮が改善すると報告している(Chen *et al.*, 2008)。これらの先行知見は、レジスタンス運動が慢性炎症下でも筋肉量の維持または増加に有効であることを示唆している。ただし、臨床的に実行可能なレベルの負荷（例えば、強度、頻度、および収縮形式）での効果は不明であった。

この研究では、機械的過負荷と異なり、強度、頻度、収縮形式を調整可能な電気刺激による RE モデルを採用した。電気刺激による骨格筋の強縮による負荷は、機能的過負荷と比較して、人間が RE を実施した場合に認められる同化シグナル伝達の亢進と似た応答をもたら

す(Ogasawara *et al.*, 2016)。また、正常なラットにおける電気刺激による ISO-RE トレーニングが、湿重量と筋線維断面積の増加を伴う顕著な筋肥大につながることも示されており(Ogasawara *et al.*, 2016)、より生理的な条件に近い RE モデルであると考えられる。

本研究の健康なラットにおいて、ISO-RE トレーニングを課した側の腓腹筋と足底筋の湿重量は、それぞれ約 3%、5% 有意に増加した。過去の報告では、同様の電気刺激による ISO-RE を 6 回または 12 回実施させるトレーニングにおいて、骨格筋湿重量が約 6%~10% の増加したことが報告されており(Tsutaki *et al.*, 2013; Ogasawara *et al.*, 2016)、本研究で認められた ISO-RE トレーニングによる筋肥大効果は妥当なレベルであったと考えられた。

また、本研究では PG-PS 投与による慢性炎症性筋萎縮ラットにおいても、ISO-RE トレーニングを課した側の骨格筋湿重量が増加することを示した。ただし、Haddad らは尾懸垂による筋萎縮モデルラットに対する電気刺激による RE トレーニング後に観察された骨格筋湿重量増加は浮腫によるものであり、実質的な筋萎縮を軽減しなかったことを報告していた(Haddad *et al.*, 2006)。その為、本研究では浮腫の影響を除去するために、足底筋において湿重量だけでなく乾燥重量とも評価した。その結果、ISO-RE トレーニングを課した側の足底筋乾燥重量は湿重量と同等の約 5% 有意に増加しており、足底筋の実質組織量の増加が示された。つまり、本研究は、ISO-RE トレーニングが慢性炎症に伴う筋萎縮を予防するのに有効であることを示した。

3-4-2 ISO-RE と抗炎症食品摂取の組み合わせによる慢性炎症性筋萎縮改善作用

3-4-1 の示唆は、RE が高齢者でも筋肥大を促進できるという先行研究(Moro *et al.*, 2018)と矛盾しない。ただし、第 2 章において、慢性炎症下では ISO-RE による Akt/FOXO1 Axis を中心とした同化抵抗性が惹起されたことが示されており、その程度が弱まっている可能性がある。

高齢者における介入研究では、COX 阻害剤による炎症抑制は急性 RE による MPS を増強

しなかったが(Dideriksen *et al.*, 2016)、継続的な RE トレーニングによる筋肥大効果を増大させた(Trappe *et al.*, 2010)ことを報告している。これらの報告は、日々の抗炎症食品摂取により炎症症状が緩和でできれば RE の筋萎縮改善効果が高まる可能性を示していた。

本章では、PG-PS 投与による慢性炎症性筋萎縮モデルラットへの RE トレーニングに α -La および EPA / DHA を含む抗炎症食品を組み合わせ、上記の可能性を検証した。抗炎症食を与えられたラットでは、通常食を摂取した場合と比較して白血球数増加、足首関節の肥厚、および炎症性サイトカイン分泌などの炎症症状が相対的に軽い傾向であった。本研究で用いた抗炎症食は PG-PS 投与による炎症症状を完全には抑制しなかったものの、通常食を摂取した場合と比較して RE トレーニングを課した側、課さなかった側の両方で、骨格筋量を高く維持する傾向があった。更に、骨格筋量と白血球数、循環炎症性サイトカインレベルの間には驚くほど高い負の相関があった。これらの結果は、抗炎症食摂取によるわずかな炎症状態の改善でさえ、骨格筋量を保つ上で意義がある可能性を示した。また、本章では、抗炎症食の摂取が、PG-PS 投与に関連した 3-MeHis の増加を軽減すること、3-MeHis 濃度が炎症性サイトカイン、特に TNF- α の循環濃度と正相関することを示した。

第 2 章では、PG-PS による慢性炎症が Akt / FOXO1 応答を弱めることが示唆されており、実験 3-1 で得られた結果は、抗炎症食が Akt/FOXO Axis シグナル伝達の感受性を回復し、MPB 増加とその帰結である筋萎縮を軽減した可能性を示した。

一般的に、健常であれば基底 MPB は年齢とともに顕著に増加することはないが(Breen & Phillips, 2011)、肥満、活動量低下や寝たきりなどの不動、悪液質などで慢性炎症が重篤化すると、それに伴って MPB が増加するモデルが示されている(Churchward-Venne *et al.*, 2014)(Fig. 3-16)。したがって、RE と抗炎症食との組み合わせは、原発性サルコペニアよりも二次性サルコペニアに対してより効果的な対策となることが示された。

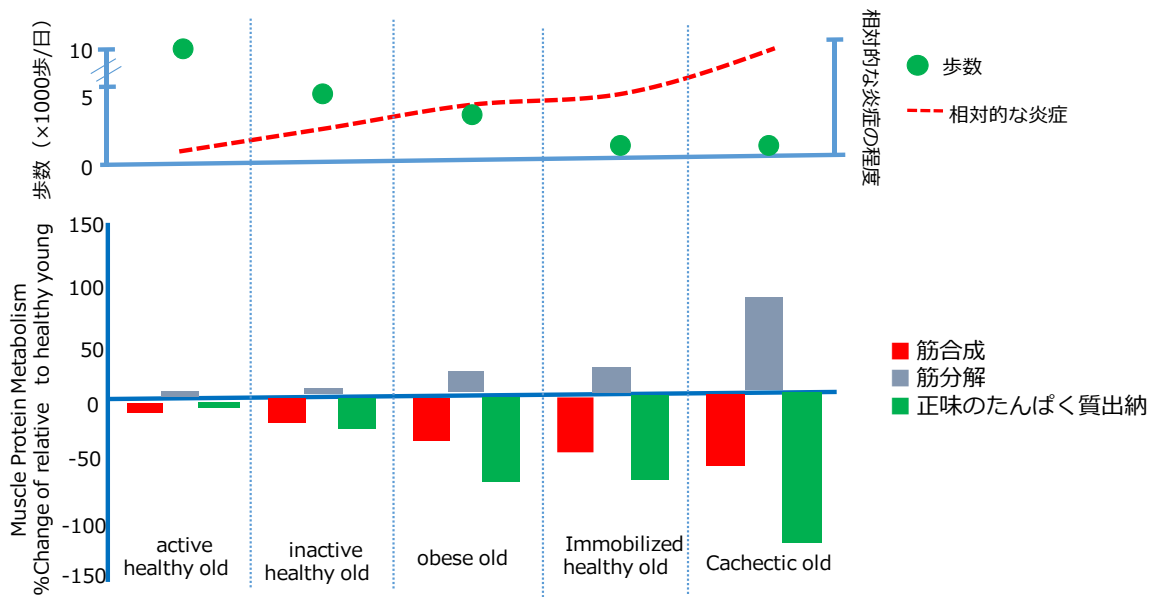


Fig. 3-16. 炎症と MPS、MPB および正味のたんぱく質出納との関係

(Churchward-Venne *et al.*, 2014)より作図

3-4-3 慢性炎症条件下での SSC-RE トレーニングによる骨格筋萎縮抑制作用

実験 3-1 において、ISO 形式の RE トレーニングが慢性炎症状態下でも骨格筋の維持・増量に有効であることを示した。ただし、この結果が他の収縮形式を含む RE でも同様に再現されるか否かは不明であった。そこで本章では、筋肉量と機能を改善するための効果的なトレーニング形式としての報告(Baker, 2018)がある、SSC 形式での RE トレーニングによる骨格筋萎縮への作用を実験 3-2 で検討した。我々は SSC-RE においては、運動自体の抗炎症作用が見込めることから(Rader *et al.*, 2018a)、ISO-RE よりも効果的な筋萎縮効果が期待できると考えた。

SSC は、骨格筋に高強度の負荷をかける目的において、効果的なモダリティとして提案されているが、過度な強度および頻度の SSC は、適応力および回復力が低下した高齢者・病者では、逆に骨格筋量・機能向上に寄与しない可能性がある(Rader & Baker, 2017)。そこで、当研究では Rader らのグループが構築した SSC プロトコルに基づいて運動条件を設定した

(Rader *et al.*, 2016; Rader *et al.*, 2018a)。Reder らの SSC プロトコルは ECC および CON を課す際の関節動作速度を比較的遅く設定しており、SSC としては低強度ではあるものの、高齢ラットの筋肉量増加を効果的に促すことが示されている。

実験 3-2 では我々の設定した SSC-RE トレーニングにおいて実験 3-1 の ISO-RE トレーニング時には認められなかった循環 IL-10 の増加を認めた。このことから、我々の設定した SSC-RE プロトコルにより、SSC に特徴的な抗炎症作用が再現されていることが示唆された。

健康なラットにおいて、SSC-RE トレーニングを課した側の腓腹筋と足底筋の湿重量は、それぞれ約 4%、8% 有意に増加した。ただし、実験 3-2 では実験 3-1 では認めなかった運動側足底筋における水分量の増加傾向を認めた。前述のように電気刺激による RE トレーニングは浮腫を誘発するが、ISO-RE の場合は最終セッションから 24 時間以降後に解剖した場合はその影響がほとんど見られない。一方で、ECC 形式の RE は条件によっては筋損傷を惹起することもあることから、より浮腫を発生しやすい。そのため、ECC を含む SSC を課した実験 3-2 では、最終セッションから 24 時間後の時点では浮腫が完全には解消されなくなったと考えられる。そこで、乾燥重量での足底筋肥大を分析した。ただし、SSC-Normal 群ラット足底筋は 4 例分を他の分析項目の予備検討に使用していたため、残りの 3 例での検討となった。正常なラットに対する SSC-RE トレーニングは、足底筋湿重量を、平均 9% 増加させたのに対して、乾燥重量では 6% の増加に留まった。実験 3-1 において ISO-RE 課した足底筋乾燥重量の増加は約 5% であったので、我々の設定した SSC-RE は、ISO-RE とほぼ同等の骨格筋肥大効果を有すると推定された。一方、PG-PS 投与による慢性炎症ラットにおける SSC-RE トレーニングは、約 8% 測定筋重量を増加させた。ISO-RE トレーニングによる足底筋乾燥重量の増加は約 9% であった。これらの結果から、慢性炎症下での筋肥大効果においても、少なくとも本研究での RE 回数と頻度においては、SSC 形式と ISO 形式における顕著な違いはなかった。

3-4-4 SSC-RE と抗炎症食品摂取の組み合わせによる慢性炎症性筋萎縮改善作用

3-4-3 において、第 3 章で使用した ISO および SSC 形式の RE トレーニングには、健常な状態、および慢性炎症状態の双方でほぼ同等の筋肥大効果があることが示された。ただし、ISO-RE トレーニングを課した場合、IL-1 β 、IL-6 および TNF- α といった炎症性サイトカインは健常ラットでは非常に低いレベルで推移したのに対して、PG-PS 投与ラットでは全観測時点での顕著な増加が認められた。その一方で、SSC-RE を課した健常ラットでは、比較的高い炎症性サイトカイン濃度を示し、試験後半では抗炎症サイトカインである IL-10 が検出された。SSC-RE は筋内および循環 IL-6 を増加させる ECC 形式の収縮を含む(Rohde *et al.*, 1997; Steensberg *et al.*, 2000; Philippou *et al.*, 2009)。また、激しいランニングなどの Stretch-Shortning Contraction を含む運動が、血漿 IL-10 を増加させることが報告されている (Nunes *et al.*, 2013)。これらの知見は、実験 3-2 においては PG-PS に対する炎症応答とは別に、SSC-RE トレーニングによって引き起こされる炎症応答が混在した可能性を示した。

実験 3-2 においては実験 3-1 に比較して、各群の炎症性サイトカイン濃度の差異が明確ではなかったが、全体の傾向としては実験 3-1 と同様、つまり、SSC-Normal 群より SSC-PG 群で高く、SSC-PG+AI 群では上昇が抑制される傾向であった。

この傾向と矛盾せず、3 群の腓腹筋湿重量、足底筋湿/乾燥重量は、SSC-Normal 群より SSC-PG 群で低く、SSC-PG+AI 群では各筋量低下が抑制される傾向であった。また、運動側、非運動側ともに足底筋乾燥重量と循環炎症性サイトカイン濃度との間には高い負相関が認められた。更に、実験 3-1 程高い相関ではないものの、3-MeHis と循環 TNF α 濃度との間には正相関関係を認めた。これらの結果は、SSC-RE による介入時と併用した場合においても、抗炎症食品摂取が、二次性サルコペニア対策として有効であることを示した。

ただし、実験 3-1 では ISO-Normal 群、ISO-PG 群および ISO-PG+AI 群全てで、運動側足底筋乾燥重量が非運動側より有意に高かったのに対し、実験 3-2 では、SSC-PG+AI 群でのみ、運動側足底筋乾燥重量の顕著な増加が認められなかった。この結果はつまり、抗炎症食品

は ISO-RE による筋肥大効果には大きな影響を及ぼさないが、SSC-RE トレーニングによる筋肥大効果を打ち消す可能性があることを示している。形式の異なる RE であっても、正味の負荷量が同等であれば、同様の筋肥大が見込めるが、筋肥大をもたらす途中経過のイベントには違いがあると考えられている(Franchi *et al.*, 2017)。例えば、ISO や CON 形式の RE と比較して、ECC 形式の RE においては筋損傷が多く認められる(Clarkson *et al.*, 1986; Gibala *et al.*, 1995)。重度の筋損傷は筋再生を阻害してしまうが、適度な筋損傷は炎症物質の放出、サテライト細胞の活性化、IGF-1 シグナルの上方制御など、骨格筋たんぱく質の蓄積を増強する方向に適応させる(Schoenfeld, 2012)。筋損傷による肥大を含む適応は、マクロファージによる損傷部位の貪食、サテライト細胞の分化・融合の促進による筋組織の補填など、免疫細胞の集積と骨格筋との相互作用により起こる(Chazaud, 2016; Peake *et al.*, 2016)(Fig. 3-17)。また、ECC 形式の RE では、ISO 形式の RE よりも白血球の集積が多いことが示されている(Pizza *et al.*, 2002)。つまり、ECC を含む形式の RE トレーニングによる筋肥大の少なくとも一部には炎症性の応答が必要である可能性がある。実際、直接的な証拠ではないものの、ECC を含むと考えられる機能的過負荷による筋肥大は NSAIDs によって減弱する(Soltow *et al.*, 2006; Novak *et al.*, 2009)。これらの知見から、実験 3-2 においては、抗炎症食が SSC-RE に由来する炎症応答まで抑制したために、筋肥大効果が打ち消された可能性がある。まとめると、RE と抗炎症食品の組み合わせによる介入は、二次性サルコペニア改善策として有効であるが、RE の効果を最大限引き出すためには、その形式や抗炎症食品摂取タイミングなど更なる検討が必要である。

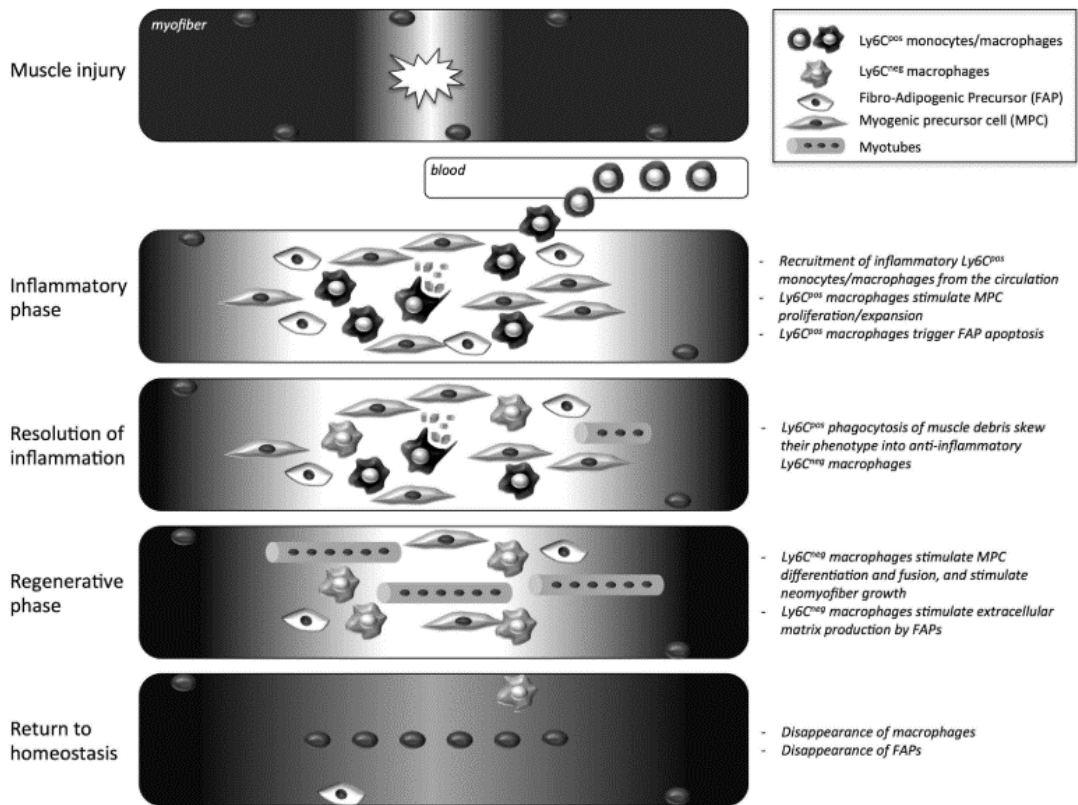


Fig. 3-17. 損傷後の骨格筋再生過程におけるマクロファージの役割

(Chazaud, 2016) より転載

損傷時（最上段）から恒常性の回復（最下段）までを、炎症段階、炎症の解消、および再生段階を含む連続したイベントとして記述した模式図。各段階におけるマクロファージの作用は、各段階の図の右に説明されている。図中に記載された細胞イラストに関する情報は図の右上に記載されている。

3-5 小括

本章では二次性サルコペニア対策としてのレジスタンス運動トレーニングと抗炎症食の有効性を PG-PS 投与による慢性炎症性筋萎縮モデルラットを用いて検証した。その結果、以下の示唆が得られた。

- 1) 慢性炎症状態下において、ISO 形式および SSC 形式の RE トレーニングは共に、骨格筋量の維持・増大に有効である。
- 2) 抗炎症食品の摂取により、循環炎症サイトカイン濃度低下を介して慢性炎症による MPB の亢進を抑制し、骨格筋萎縮を軽減できる可能性がある。
- 3) 慢性炎症状態下において RE トレーニングと抗炎症食品摂取と組み合わせた場合、ISO 形式の RE トレーニングは相加的な骨格筋量増加を誘導するが、SSC 形式の RE トレーニングでは相加的な筋量増加が打ち消される可能性がある。

以上の結果 (Fig. 3-18 に概要をまとめた) から、

RE トレーニングに抗炎症食品を組み合わせることは二次性サルコペニア対策において有効な戦略となることが期待できる。ただし、RE 運動形式や組み合わせる抗炎症食品の摂取タイミングなど、より詳細な研究が必要であると結論する。

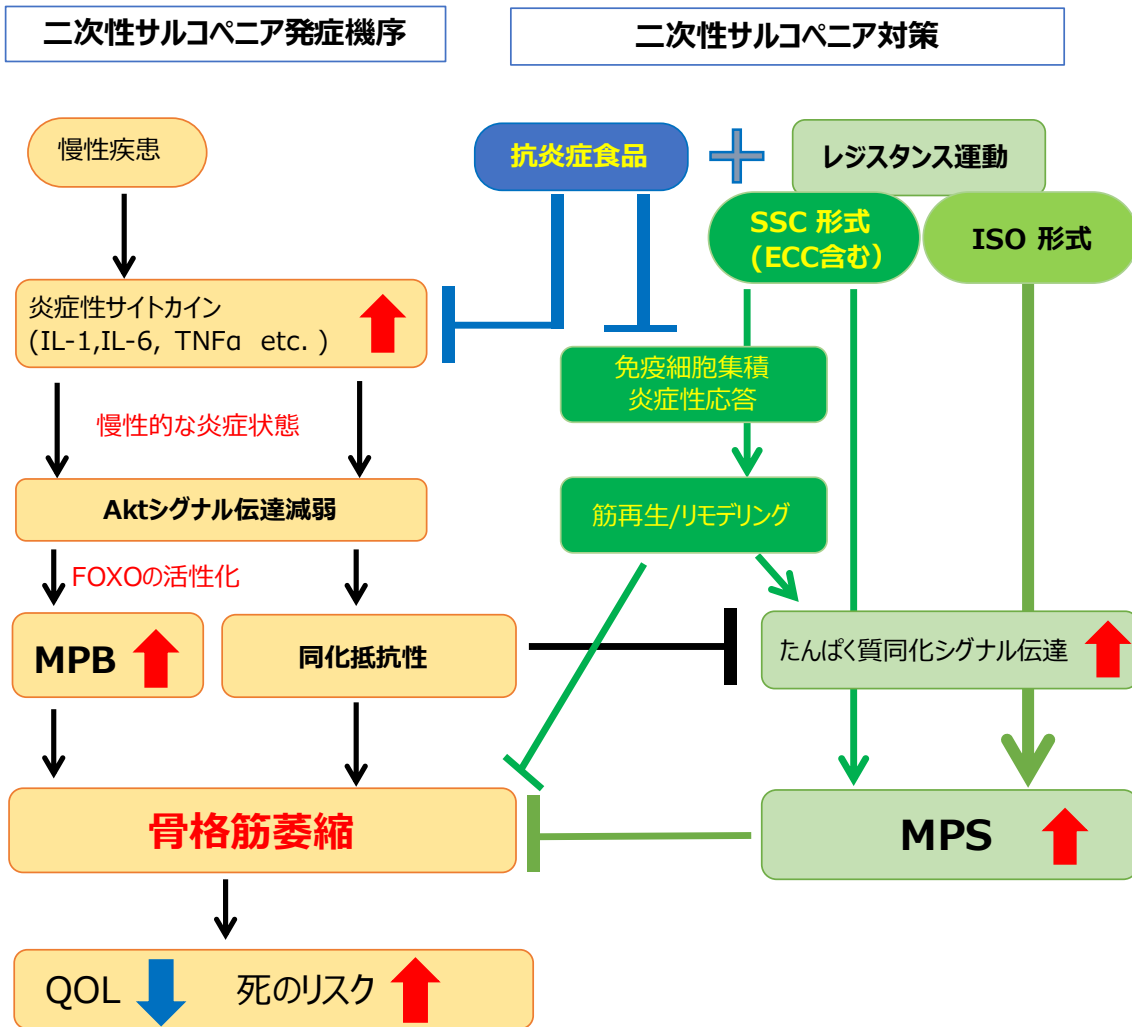


Fig. 3-18. 第3章で得られた知見の小括

第 4 章

等尺性または **Stretch-Shortening Cycle** 形式のレジスタンス
運動が慢性炎症ラットの肝機能に及ぼす影響

4-1 背景・目的

運動、特に有酸素運動は、少なくとも部分的に IL-10 などの循環抗炎症性サイトカイン濃度を増加させることを介して、全身性の慢性炎症を抑制すると考えられている(Lira *et al.*, 2014)。一方、レジスタンス運動 (RE) においては、たんぱく質同化作用に注目されることが多く、抗炎症作用への期待は大きくない(Lira *et al.*, 2014)。ただし、RE であっても ECC 収縮は、運動した骨格筋(Jonsdottir *et al.*, 2000; Ochi *et al.*, 2011)だけでなく、循環血液(Rohde *et al.*, 1997; Steensberg *et al.*, 2000; Philippou *et al.*, 2009)においても一過的な IL-6 の上昇をもたらす。血漿 IL-6 レベルの上昇は、脾臓などに存在する免疫細胞を刺激し、IL-10 分泌を促すことから(Steensberg *et al.*, 2003)、ECC 型の RE は局所的/全身的に炎症状態を緩和する可能性がある。実際、ECC 収縮を含む Stretch-Shortening Cycle (SSC) 形式の RE を課した骨格筋において、炎症シグナル応答が抑制されることが報告されている(Rader *et al.*, 2018a)。第 3 章において、ISO-RE トレーニングを実施した場合は、健常ラット、PG-PS 投与による慢性炎症モデルラット共に、循環 IL-10 の増加を認めなかった。一方、SSC-RE トレーニングを実施した場合は、健常ラットと慢性炎症ラットで程度の違いは認められるが、双方で 3 回目のセッション後 (第一セッションの約 7 日後) から、循環 IL-10 レベルが大きく上昇した。これらの一連の知見は、SSC-RE トレーニングが ISO-RE トレーニングと比較して運動を課した筋だけでなく、全身性の炎症症状を軽減する面で有利である可能性を示している。

PG-PS 投与による慢性炎症は、主に脾臓における免疫応答を反映しているが(Kimpel *et al.*, 2003)、Harfarth らは肝臓において、白血球浸潤などの炎症症状が誘導されることを報告した(Herfarth *et al.*, 1996)。第 2 章において、PG-PS 投与によって、肝臓肥大やアルブミン濃度低下が誘導されたことは、肝臓の組織学的/機能的異常が惹起されることを裏付けている。Harfarth らはまた、IL-10 の投与が、PG-PS によって誘発される肝臓の炎症症状を軽減することを示した(Herfarth *et al.*, 1996)。第 3 章において SSC-RE トレーニングは循環中の IL-10 を増加させることが示されたことから、PG-PS による肝機能障害を改善しようと考えた。第 4 章ではこの仮説を検証するために、PG-PS による慢性炎症モデルラットの肝機能障害に対

する SSC-RE および ISO-RE トレーニング実施の影響を比較した。

4-2 方法

4-2-1 試薬、材料

PG-PS は Becton, Dickinson and Company (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA) から入手した。AIN-93G の原材料の内、L-シスチンおよび大豆油は富士フィルム和光純薬 (大阪、日本) から、それ以外の原料はオリエンタル酵母工業 (東京、日本) から入手した。UPLC-MSMS に使用した試薬・溶媒は富士フィルム和光純薬 (大阪、日本) から入手した。

4-2-2 実験動物

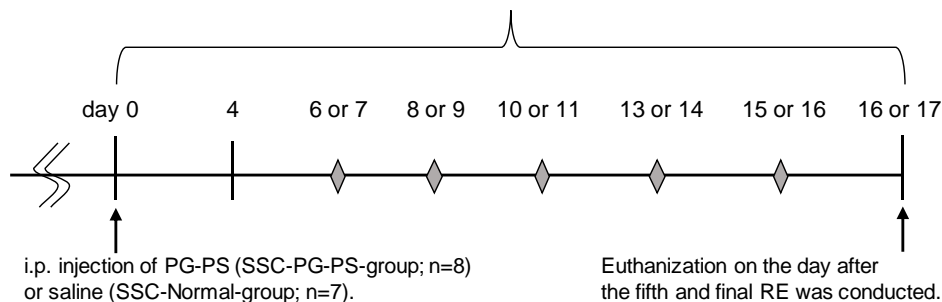
本章の動物実験は(株)明治動物実験倫理審査委員会の承認の元 (承認番号: 2016_3871_0139 および 2015_3871_0214)、2016 年に実施された。また、全ての動物実験は(株)明治で作成された「動物実験における倫理規定」および「動物実験審査申請書ガイドライン」に記載の項目を遵守して実施した。

雌性 Lewis ラット (7 週齢~8 週齢) は日本チャールズ・リバー (神奈川、日本) から入手した。受け入れた動物は最低 1 週間の環境馴化期間を経て実験に供した。なお、12 時間の明-暗サイクル、室温を 23°C とし、個別ケージで飼育した。馴化期間は標準固形飼料 CRF-1 (日本クレア) で飼育した。

4-2-3 動物実験スキーム

本研究では等尺性および SSC 形式のレジスタンストレーニングが慢性炎症モデルラットの肝機能に及ぼす影響を比較検討することを目的とした。ただし、ISO 形式および SSC 形式のレジスタンストレーニングを並行して実施することは手技的に困難であり、各々別の実験として以下のように設定し、結果の比較を実施した。それぞれの実験スキームの概要を Fig.4-1 に示した。

SSC Body weight, food intake, and ankle joint thickness were measured at the indicated time every 2-3 days. Blood samples were collected on days 4, 7 or 8, and 14 or 15. Diamonds indicate days that RE was conducted.



ISO Body weight, food intake, and ankle joint thickness were measured at the indicated time every 2-3 days. Blood samples were collected days 4, 7 or 8, and 14 or 15. Diamonds indicate days that RE was conducted.

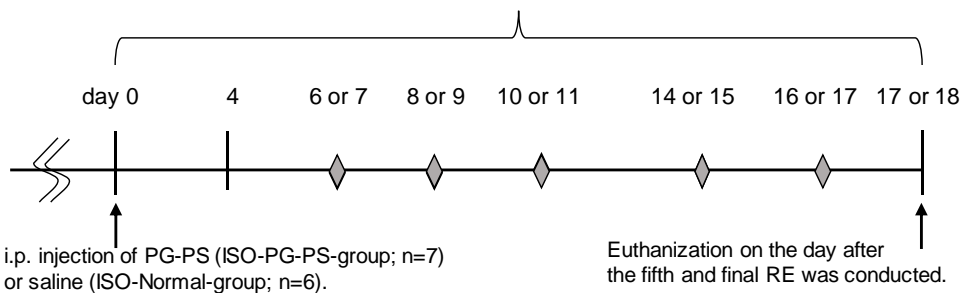


Fig. 4-1. SSC-RE 実験および ISO-RE 実験のスキーム

上段 : SSC-RE 実験、下段 : ISO-RE 実験

4-2-3-1 等尺性トレーニング試験

雌性 Lewis ラット 15 匹を環境馴化後、AIN-93G（粉餌）に変更して更に 4 日間馴化し、部分採血と後肢踝厚の測定を実施した。その後、無作為に 8 匹のラットを選抜、ISO-PG-PS 群とし、PG-PS をラムノース当量で $5\mu\text{g/gBW}$ となるように腹腔内投与した。残りの 7 匹のラットは ISO-Normal 群とし、同量の生理食塩水を腹腔内投与した。

下肢踝厚は腹腔投与 2 日後から 2~4 日毎に測定し、解剖までに計 7 回測定した。腹腔投与 4 日後から解剖までに 2 回部分採血を実施した。また、全てのラットには腹腔投与 6~7

日後から 2~3 日に 1 回の頻度で 5 回等尺性レジスタンストレーニングを課した。最後のトレーニング日の夜から絶食させ、翌日イソフルラン麻酔下で全採血により屠殺し、速やかに腓腹筋および肝臓を採取した。採取した肝臓は、湿重量を測定後、分割して液体窒素で凍結し、使用時まで-80°Cで保存した。肝臓の一部は Free Zone bulk tray dryer (Labconco Corporation, Kansas City, MO, USA)を用いて-50°C、0.05 mBar の環境下で凍結乾燥し、乾燥重量から、水分含量を算出した。

4-2-3-2 SSC トレーニング試験

雌性 Lewis ラット 15 匹を環境馴化後、AIN-93G (粉餌)に変更して更に 4 日間馴化し、部分採血と後肢踝厚の測定を実施した。その後、無作為に 8 匹のラットを選抜、SSC-PG-PS 群とし、PG-PS をラムノース当量で 5 μ g/gBW となるように腹腔内投与した。残りの 7 匹のラットは SSC-Normal 群とし、同量の生理食塩水を腹腔内投与した。

下肢踝厚は腹腔投与 2 日後から 2~4 日毎に測定し、解剖までに計 7 回測定した。腹腔投与 4 日後から解剖までに 2 回部分採血を実施した。また、全てのラットには腹腔投与 6~7 日後から 2~3 日に 1 回の頻度で 5 回、SSC 形式のレジスタンストレーニングを課した。最後のトレーニング日の夜から絶食させ、翌日イソフルラン麻酔下で全採血により屠殺し、速やかに腓腹筋および肝臓を採取した。採取した肝臓は、湿重量を測定後、分割して液体窒素で凍結し、使用時まで-80°Cで保存した。肝臓の一部は Free Zone bulk tray dryer (Labconco Corporation, Kansas City, MO, USA)を用いて-50°C、0.05 mBar の環境下で凍結乾燥し、乾燥重量から水分含量を算出した。

4-2-4 レジスタンス運動負荷

ラットへのレジスタンス運動はラット足関節筋力測定・運動負荷装置を用いて右下腿への経皮電気刺激により以下の方法で課した。

4-2-3-1 等尺性レジスタンス運動

ラットをイソフルラン麻酔下で固定台上にうつ伏せに固定した。右下肢の膝を固定台に圧迫固定し、足関節をフットプレートに 90°の角度で固定した。剃毛したふくらはぎに皮膚電極を貼り、電気刺激により強制的に強縮運動させた。電気刺激に用いるパルス幅は 4ms とし、負荷電圧は、単独パルス刺激による単縮発揮筋力が最大となるように設定した。強縮は上記の幅、電圧のパルスを 100Hz で 300 回（約 3 秒間）課すことで発揮させた。等尺性レジスタンス運動は上記の強縮刺激を 5 秒間隔で 5 回発揮させることを 1 セットとし、セット間に 3 分間休憩をはさんで 4 セット実施させた（計 20 回の強縮刺激負荷）。フットプレートにかかる力（トルク）をラット足関節筋力測定・運動負荷装置に組み込まれたストレインゲージでリアルタイムに測定し、2000Hz の頻度で Power Lab にてデジタルデータとして収集した。30Hz 以下の計測値はノイズとしてデジタルフィルタ処理した。取得したデジタルデータは事前に作成した標準分銅を用いた検量線により国際標準単位に換算した。得られた強縮発揮トルクの最大値を等尺性最大発揮筋力とした。

4-2-3-2 SSC 形式レジスタンス運動

SSC 形式のレジスタンス運動プロトコルは、Rader らの報告 (Rader *et al.*, 2016; Rader *et al.*, 2017, 2018a, b) を参考にして一部改変して設定した。具体的には、ラットをイソフルラン麻酔下で固定台上にうつ伏せに固定し、右下肢の膝を固定台に圧迫固定した。足関節をフットプレートに 90°の角度で固定した。剃毛したふくらはぎに皮膚電極を貼った後、パルス幅は 4ms の単独パルス刺激を用いて単縮発揮筋力が最大となる電圧を設定した。SSC 形式のレジスタンス運動においても、等尺性レジスタンス運動同様、強縮を上記の幅、電圧のパルスを 100Hz で 300 回（約 3 秒間）課すことで発揮させた。ただし、SSC 形式のレジスタンス運動においては、強縮刺激開始前にフットプレートの角度を 100°とし、強縮刺激開始 0.5 秒後から 60°/秒の角速度で 50°までフットプレートを強制的に回転させた。さらに、50°の位置で 0.5 秒間静止後、60°/秒の角速度で 100°まで逆回転させた (Fig. 3-3 参照)。電気刺激とフ

ットプレートの回転の協調は電気刺激装置からの開始信号をラット足関節筋力測定・運動負荷装置で受信後、フットプレートの回転プログラムが開始されるように設定することで再現性を確保した。

SSC形式のレジスタンス運動は上記の強縮刺激を5秒間隔で10回発揮させることを1セットとし、セット間に3分間休憩をはさんで4セット実施させた(計40回の強縮刺激負荷)。フットプレートにかかる力(トルク)をラット足関節筋力測定・運動負荷装置に組み込まれたストレインゲージでリアルタイムに測定し、2000Hzの頻度でPower Labにてデジタルデータとして収集した。30Hz以下の計測値はノイズとしてデジタルフィルタ処理した。取得したデジタルデータは事前に作成した標準分銅を用いた検量線により国際標準単位に換算した。得られた強縮発揮トルクの最大値を最大発揮筋力とした(Fig. 3-3を参照)。

4-2-4 血液学分析

白血球数、およびヘモグロビン含量はEDTAを添加した全血を使用して、全自動血算分析装置XT-1800i(シスメックス、兵庫、日本)で分析した。

4-2-5 血漿サイトカイン分析

血漿中のIL-1 β およびIL-10濃度はマルチプレックスイムノアッセイシステムBio Plex200(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)を用いて測定した。上記の3種のサイトカインを同時測定するために、Rat reagent kit(Bio-Rad、171-304070M)およびラットIL-1 β (Bio-Rad、171-L1008M)、ラットIL-6(Bio-Rad、171-L1012M)、ラットIL-10(Bio-Rad、171-L1014M)捕捉磁気ビーズを組み合わせたカスタムパネルを構築して使用した。

4-2-6 血液生化学分析

血清中のアルブミン濃度、ALTおよびAST活性はそれぞれの専用分析スライドを用いてドライケムNx500i(FujiFilm、東京、日本)で測定した。

4-2-6 血漿遊離アミノ酸測定

血漿サンプル中の遊離アミノ酸濃度は ultra-performance liquid-chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MSMS、TQD, Waters Corporation, Milford, MA, USA) を用いて以下の方法で分析した。血漿サンプルに等量の 6%トリクロロ酢酸を添加し、遠心分離後に上清を採取することで除たんぱく質処理した。得られた上清を 0.2 μ m 孔のポリオレフィン系メンブレンでろ過し、UPLC-MSMS 分析サンプルとした。UPLC は Intrada amino acid column (50 mm x ϕ 3 mm, Imtakt Corp., Kyoto, Japan)を用いてカラムメーカー推奨の方法を一部調整して、以下の条件で実施した。移動相 A には 9% アセトニトリル、16% 25mM ギ酸アンモニウム、0.3% ギ酸を含有したテトラヒドロフランを用いた。移動相 B には 25% 100mM ギ酸アンモニウムを含有したアセトニトリルを用いた。サンプル注入量を 1 μ L とし、カラム温度を 50 $^{\circ}$ C に保持した。サンプル注入後、600 μ L/min の流量で 2.5 分間 0%移動相 A で維持、4 分かけて直線的に移動相 B を 17%まで上昇させ、その直後、移動相 B 100%に切り替え 3.5 分カラムを洗浄する、1 サイクル 10 分のグラジエント条件で 20 種のたんぱく質構成アミノ酸 (Asp, Thr, Ser, Asn, Glu, Gln, Pro, Gly, Ala, Val, Cystine, Met, Ile, Leu, Tyr, Phe, Lys, His, Arg, Trp) を分離した。質量分析計は正電荷エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI+) モードで以下の条件で用いた。

capillary voltage, 3 kV; cone voltage, 25 V; cone gas flow, 50 L/hr; source temperature 100 $^{\circ}$ C; desolvation temperature, 400 $^{\circ}$ C; desolvation gas flow 850 L/hr; collision gas flow 0.25 mL/min; and collision energy 15 V.

各アミノ酸の測定は multiple reaction monitoring (MRM) モードで、各アミノ酸由来の親イオンおよび娘イオンを選択的に検出することで実施した。当条件により、2.5~250 μ M の範囲で上記 20 種のアミノ酸標準物質の検量線の直線性が確認できたため、この範囲になるように分析サンプルを調製して分析した。Fischer's ratio は分岐鎖アミノ酸 (BCAA; Leu, Ile,

Val) の合算濃度を芳香族アミノ酸 (AAA; Phe, Tyr) の合算濃度で除すことで算出した。肝機能不全に起因するアミノ酸代謝不良は AAA の血流への増加につながり、結果として Fischer's ratio の低下をもたらすことが報告されている(Fischer *et al.*, 1976; Hagenfeldt *et al.*, 1983; de Boer *et al.*, 1986; Benjamin *et al.*, 1988)。

4-2-7 細胞内たんぱく質分析

分析サンプルの調製方法は(Sumi *et al.*, 2014)に記載の方法を一部改変した第 3 章に記載の方法で調製した。具体的には、まず、液体窒素下で細かくミンストした腓腹筋、または肝臓サンプルに、氷冷した 0.1% プロテアーゼ阻害剤カクテル (Sigma, St. Louis, MO USA) およびフォスファターゼ阻害剤 (50 mM フッ化ナトリウム, 24 mM β -グリセロリン酸、および 1 mM オルトバナジン酸ナトリウム) を添加した RIPA バッファー (CST, Beverly, MA, USA) を加えホモジネートした。ホモジネートは 21,880 g、4°C で 10 分遠心分離し、上清を採取した。採取した上清中のたんぱく質濃度を Bradford protein assay kit (Expedeon Protein Solutions, Harston, Cambridgeshire, UK)を用いて測定し、終濃度が 0.5mg/mL となるように Leammi ウェスタンブロットサンプルバッファーと混合して 85°Cで 10 分変性処理した。

腓腹筋サンプル中の IL-6 含量は、市販の ELISA kit (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) を用いて測定した。

肝臓中のたんぱく質分析は、全自動キャピラリー電気泳動イムノアッセイシステム Wes (Protein Simple, California, USA) を用いたシンプルウェスタン分析で実施した。詳細は第 2 章を参照。使用した 1 次抗体のリストおよび希釈倍率を Table 4-1 に示した。使用した抗体については、Table 4-1 の希釈倍率において、特異的なピークが分離・検出可能であり、そのピークのみかけの分子量が理論分子量とほぼ同様の位置にあることを確認してから用いた。2 次抗体にはシンプルウェスタン専用 ready-to-use の horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ウサギ IgG 抗体または市販の抗マウス IgG 抗体 (CST, Beverly, MA, USA) を CanGet Signal solution (TOYOBO, 大阪、日本)で 1:200 希釈したものを用いた。クロマトグラムの解析は

Compass software (Protein Simple, California, USA)を用いた。シンプルウエスタン分析は各分析たんぱく質につき、最低2回実施し、平均した値を用いて解析した。

Table 4-1 第4章で使用した1次抗体リスト

ターゲット	total/Phospho	メーカー	型番	希釈率
NFκB p65	total	CST	#8242	1:300
NFκB p65	phospho-Ser536	CST	#3033	1:150
STAT3	total	CST	#12640	1:300
STAT3	phospho-Tyr705	CST	#9131	1:150
iNOS*	total	BD bioscience	610329	1:200
β-tubulin	total	CST	#2146	1:150

※Wes専用のantibody-diluentをCanGet Signal solution (TOYOBO, 大阪、日本) に置換して使用した。

4-2-7 統計解析

全ての値は平均値±標準偏差 (SD) で示した。ISO または SSC レジスタンス運動試験内での2群比較には Student's t test または Welch test を用いた。1群内の経日的な値の変動を解析するために、繰り返し測定のある ANOVA を用いて時間の主効果を検証後、F 値が有意であった場合は Dunnett's test を用いて追比較を実施した。SSC と ISO の試験結果を比較する場合は、まず、PG-PS 投与の主効果 (The effect of PG-PS)、レジスタンス運動タイプの主効果 (The effect of RE-type) およびそれらの相互作用 (Interaction) を 2way-ANOVA で検証した。Interaction に有意性が認められた場合は、単純主効果検定による追解析を実施した。興味のある2値間の相関は Pearson の相関係数を算出し、その有意性を検証した。全ての統計解析の有意水準は5%とし、JMP 11 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を用いて実施した。

4-3 結果

4-3-1 サイトカイン濃度および白血球数に対するレジスタンストレーニング形式の影響

SSC 試験および ISO 試験における PG-PS 投与による慢性炎症状態を確認するために、血漿 IL-1 β 、IL-10 濃度推移および白血球数の増加の程度を比較した。炎症性サイトカインである IL-1 β 濃度は、SSC-Normal 群および ISO-Normal 群共に横ばいで推移した。これに対して、SSC-PG-PS 群、ISO-PG-PS 群の IL-1 β 濃度は、PG-PS 投与 4 日後から解剖時点までの全ての時点で、それぞれの試験での正常群と比較して有意または有意傾向 ($P < 0.1$) をもって高値であった (Fig. 4-2AB)。IL-6 濃度は SSC-Normal 群において、生理食塩水投与 7-8 日後において一過性の有意な上昇が認められた (Fig. 4-2C)。SSC-PG-PS 群では、PG-PS 投与 7-8 日後は、SSC-Normal 群と同程度の IL-6 濃度であったが、その後も高い濃度のままで推移し、PG-PS 投与 14-15 日後、および解剖時点において SSC-Normal 群より有意に高かった (Fig. 4-2C)。一方で ISO-Normal 群の IL-6 濃度は横ばいで推移し、SSC-Normal 群で認められた一過性の IL-6 濃度上昇は認められなかった。これに対して ISO-PG-PS 群の IL-6 濃度は全ての観測時点で ISO-Normal 群より有意に高かった (Fig. 4-2C)。

代表的な抗炎症性サイトカインである IL-10 濃度は、SSC-Normal 群において、試験後半の 2 時点で、生理食塩水投与 4 日後の値からの有意な上昇が認められた (Fig. 4-2D)。また、SSC-PG-PS 群においても、試験後半の 2 時点で IL-10 濃度の上昇が認められ、その濃度は同じ時点の SSC-Normal 群よりも有意に高かった (Fig. 4-2E)。

一方で ISO-Normal 群では IL-10 濃度の上昇は試験期間を通じて認められなかった (Fig. 4-2F)。また ISO-PG-PS 群の IL-10 濃度は PG-PS 投与 7-8 日後の時点で、ISO-Normal 群よりも有意に高値であったが、その差異の程度は小さかった。更に、SSC 試験で認められたような、試験期間後半における IL-10 濃度の顕著な上昇も認められなかった (Fig. 4-2F)。

白血球数の増加曲線下面積 (Area under the curve; AUC) において、PG-PS の主効果は有意な傾向 ($P = 0.07$) であったが、レジスタンストレーニングのタイプの違い (Re-type) の主効果、および PG-PS の主効果と Re-type の主効果との相互効果は有意ではなかった (Fig. 5-

2G)。これらの結果から、SSC または ISO 形式のレジスタンストレーニングを実施した場合の両方で PG-PS による慢性的炎症症状が惹起されるものの、IL-6 および IL-10 の発現に関しては SSC 形式の RE が影響することが明らかとなった。

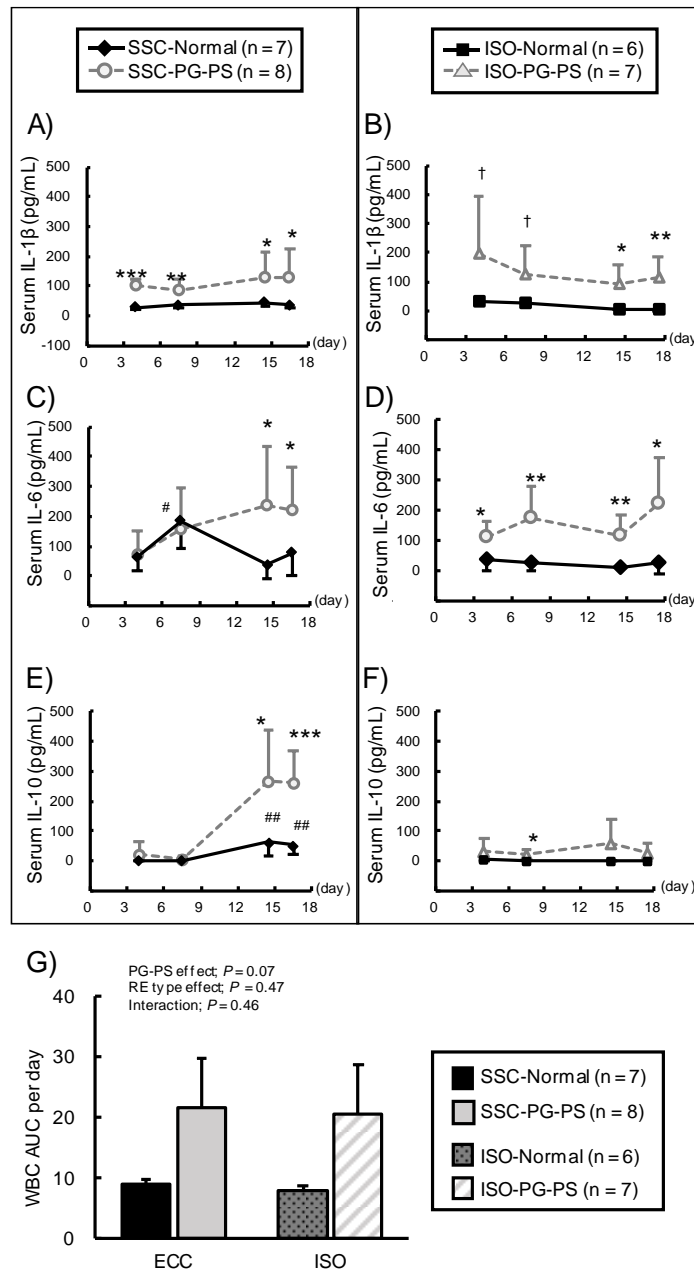


Fig. 4-2. SSC-RE 実験および ISO-RE 実験における正常ラットまたは PG-PS 投与ラットの血中サイトカイン濃度および白血球数

SSC-Normal 群、SSC-PG-PS 群 (A、C、E) および、ISO-Normal、ISO-PG-PS 群 (B、D、F) ラットの血漿 IL-1 β 、IL-6 および IL-10 濃度推移。***P < 0.001 **P < 0.01, *P < 0.05 (各時点での群間差)。†P < 0.1. #P < 0.05, and ##P < 0.01 (SSC-Normal 群における、day4 の値との群内比較)。(G) SSC 実験および ISO 実験の WBC の推移グラフから算出した曲線下面積 (Area under the curve: AUC) を試験日数で除した値。試験期間で標準化した WBC の AUC は SSC、ISO 実験における PG-PS による慢性炎症の程度を比較するために算出した。Two-ways ANOVA の結果を (G) 図の上部に示した。

4-3-2 腓腹筋中の IL-6 量に対するレジスタンストレーニング形式の影響

SSC 形式のレジスタンス運動が骨格筋内のサイトカイン発現に及ぼす影響を調査するために、腓腹筋内 IL-6 含量 (mIL-6) を測定した。IL-6 は電気刺激による収縮時(Farmawati *et al.*, 2012)や TNF α 、IL-1 β などの炎症性サイトカインへの曝露時(Chevrel *et al.*, 2005)に免疫細胞との共培養なしでも骨格筋細胞から分泌されることから、マイオカインの一つと考えられている(Pedersen & Febbraio, 2008)。

運動側腓腹筋の mIL-6 は SSC 運動を課した群で ISO を課した群より有意に低くなった (RE type effect; P < 0.01, Fig. 4-3 右) が、非運動側腓腹筋の mIL-6 ではトレーニング形式の違いによる差異は認められなかった (RE type effect; P = 0.45, Fig. 4-3.左)。これらの結果は、継続的な 5 回の SSC 運動によるトレーニングが健康な状態および慢性炎症状態の両方で基底の mIL-6 発現を減少させたことを示唆している。

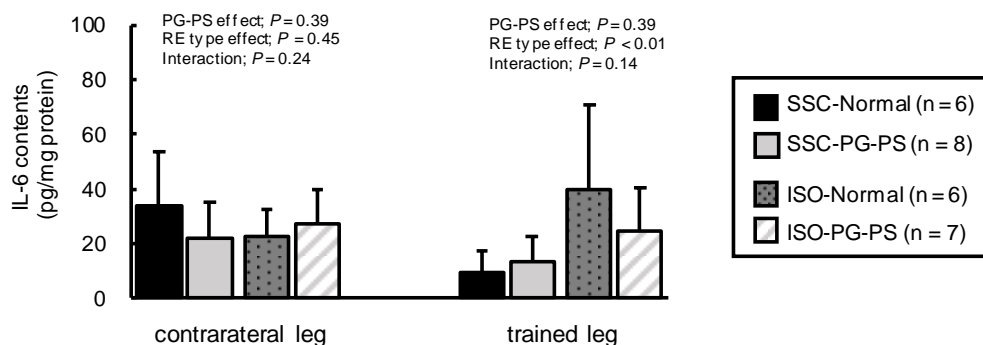


Fig. 4-3. SSC-RE 実験および ISO-RE 実験における正常ラットまたは PG-PS 投与ラットの腓腹筋中 IL-6 含有量

contrarateral leg : 非運動側。Trained leg : SSC または ISO レジスタンス運動側筋。

最後のレジスタンス運動セッションの1日後に解剖、採取した腓腹筋内の IL-6 含量。

Two-way ANOVA の結果を図中に示した。

4-3-3 肝機能障害へのレジスタンストレーニング形式の影響

SSC および ISO 形式のレジスタンストレーニングが肝機能障害に及ぼす影響の違いを調査するために、相対肝臓重量、肝臓組織水分率および一般的に肝機能の指標として用いられる血清中のアルブミン濃度、AST、ALT 活性および遊離アミノ酸濃度を測定した (Fig. 5-4)。

相対肝臓重量や水分率において、PG-PS の主効果は有意であったが、RE-type の主効果および、これらの交互作用は有意ではなかった (Fig. 4-4A,B)。つまり、PG-PS 投与により、水分増加を伴った相対的な肝臓重量の増加が認められたが、RE 形式の違いによる影響は認められなかった。血清アルブミン濃度は ISO トレーニング時、SSC トレーニング時双方で PG-PS による有意な減少を認めた (Fig. 4-4C)。これは、PG-PS による慢性炎症が肝臓機能低下を誘導したことを示唆している。血清 AST 活性は SSC-PG-PS 群で ISO-PG-PS 群より有意に低値であった (Fig. 4-4D)。更に ISO-PG-PS、SSC-PG-PS 両群の血漿 AST 活性と血漿 IL-10/IL-1b 比との間に有意な負の相関関係を認めた (Fig. 4-4E)。抗炎症サイトカインである

IL-10 と炎症性サイトカインである IL-1 β の比率は相対的な抗炎症性応答の指標として用いられており、SSC-PG-PS 群において、IL-10 の発現上昇が慢性炎症による肝臓損傷を抑制した可能性がある。

ラットにおいて血液中の遊離アミノ酸のパターンは、肝切除後に変化することが報告されている(Holecek *et al.*, 1996)。それぞれの Normal 群と比較したとき、SSC-PG-PS 群および ISO-PG-PS 群では、多くの血漿遊離アミノ酸濃度で上記の肝臓切除後のパターンに類似する変動を認めた (Fig. 4-4F,G)。一方で、芳香族アミノ酸 (AAA)、特にフェニルアラニン (Phe) の増加の大きさは、SSC-PG-PS 群で ISO-PG-PS 群よりも有意に小さかった (Fig. 4-4H)。更に、SSC-PG-PS 群と ISO-PG-PS 群の血漿遊離 Phe 濃度は、IL-10/IL-1 β 比と有意に負相関していた (Fig. 4-4I)。これらの遊離アミノ酸濃度変動の帰結として、SSC-RE は ISO-RE と比較して、慢性炎症による Fisher 比の低下を有意に抑制した (Fig. 4-4J)。

第 4 章において、肝機能低下の指標である、血中のアルブミン濃度、AST 活性、Phe 濃度、および Fisher 比といった変数は、各ペア間で有意に相関していた (Fig. 4-5)。この結果は、各指標が PG-PS 誘導性慢性炎症ラットの肝機能障害を矛盾なく表していることを示唆しており、一貫して ISO-RE と比較して SSC-RE において肝機能障害が抑制されたことを示している。

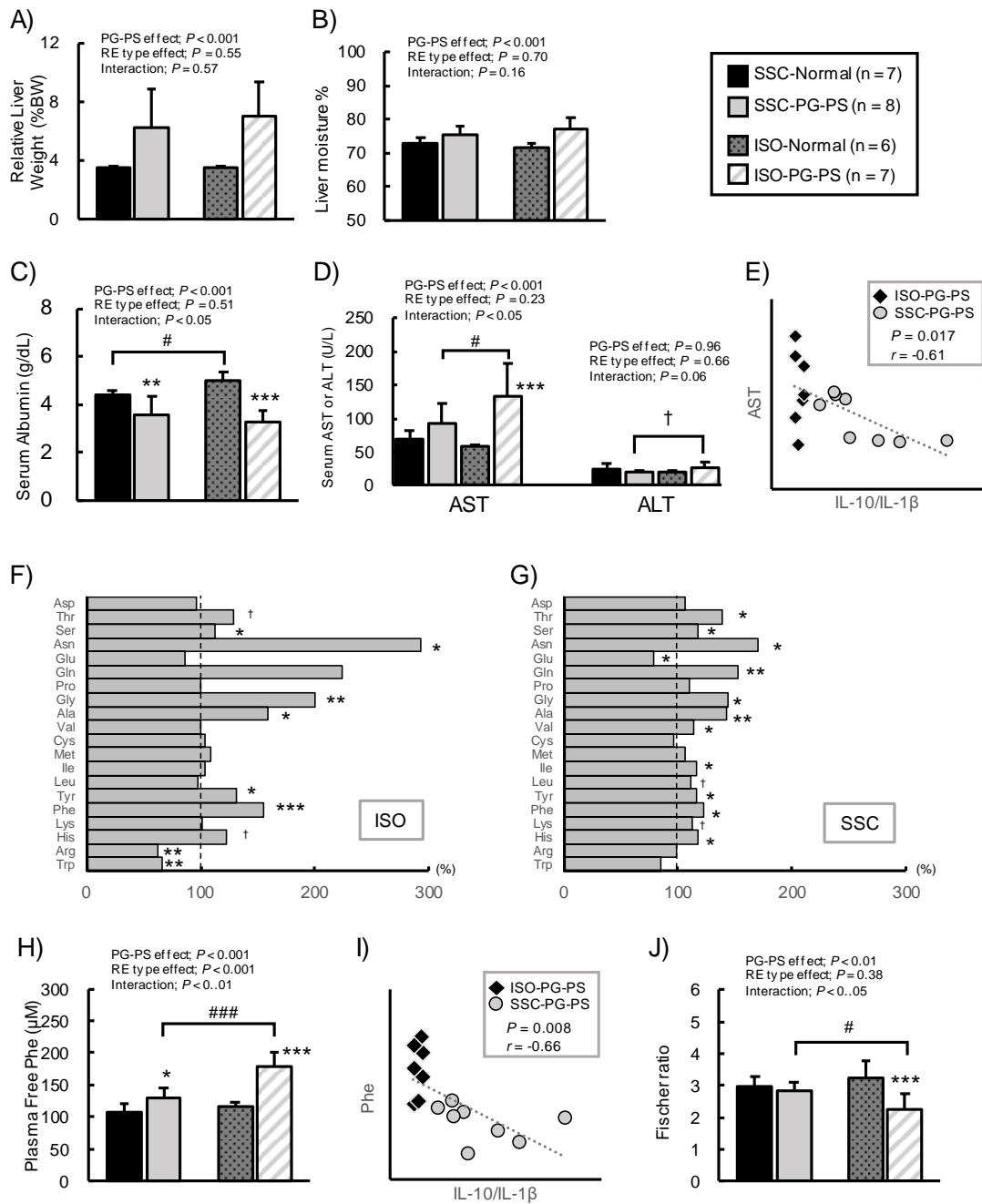


Fig. 4-4. SSC-RE 実験および ISO-RE 実験における正常ラットまたは PG-PS 投与ラットの

肝臓重量、水分含量および肝機能指標

(A) 体重当たりの肝臓重量、(B) 肝臓水分含有率 (C) 血清アルブミン濃度、(D) 血清 ALT、AST 活性、(H) 血漿フェニルアラニン濃度、および (J) Fischer 比。Two-way ANOVA の結果を図中に示した。*** $P < 0.001$ ** $P < 0.01$ and * $P < 0.05$ (Post-hoc analysis; SSC または ISO 実

験内での Normal 群 と PG-PS 群の比較)。†P < 0.1, #P < 0.05, and ###P < 0.001((Post-hoc analysis; Normal 群、PG-PS 群毎の SSC vs ISO 実験間の比較)。それぞれの正常群と比較した、(F) ISO または (G) SSC 実験での PG-PS 投与ラットの血漿中遊離アミノ酸濃度の変化率。***P < 0.001 **P < 0.01, *P < 0.05, and †P < 0.1 (ISO、SSC 実験内での二群比較)。IL-10 /IL-1β 値に対する AST (E) および血漿フェニルアラニン濃度 (I) の相関関係を表す散布図。Pearson の相関係数 r とその有意性を各図中に示した。

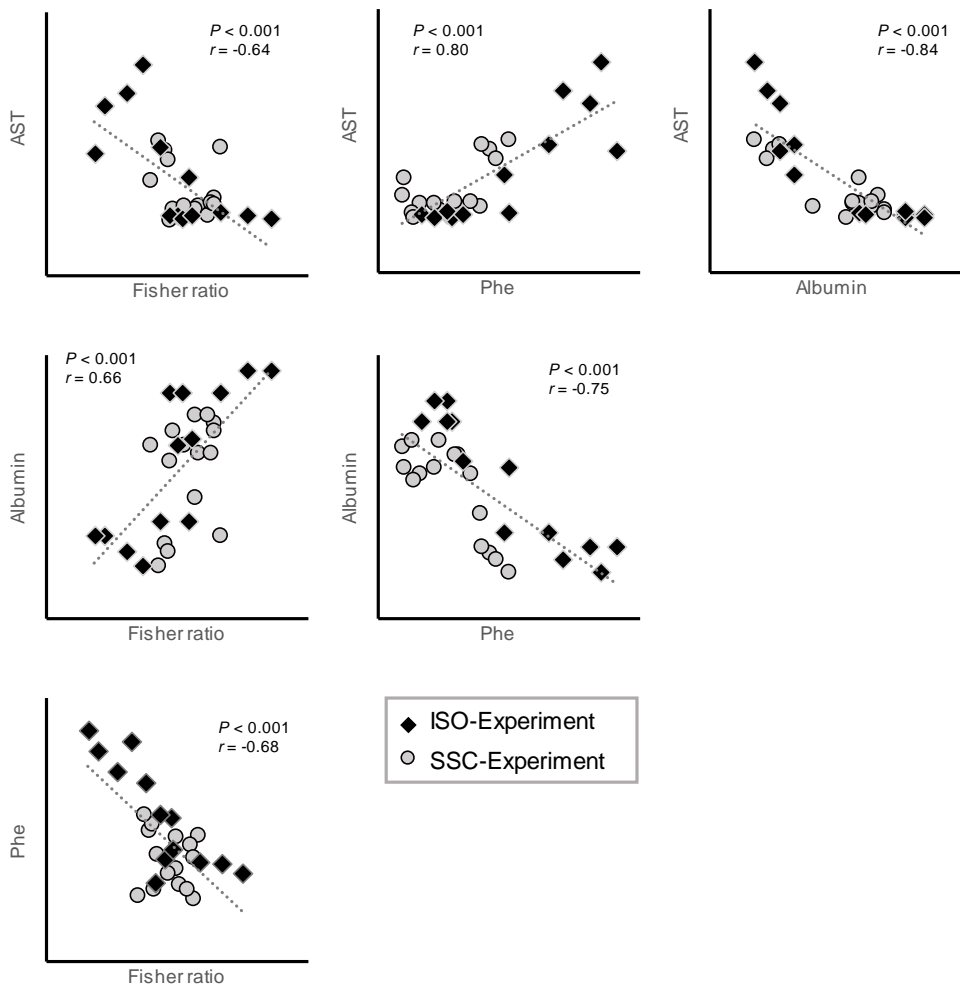


Figure 4-5. 各肝機能指標間の相関関係

AST 活性、遊離フェニルアラニン濃度、および Fisher 比の間の相関関係を表す散布図。Pearson の相関係数 r とその有意性を各図中に示した。

4-3-3 肝臓における炎症関連たんぱく質発現に対するレジスタンストレーニングの影響

慢性炎症下での SSC-RE による肝機能保護効果の機序を明らかとするために、代表的な炎症誘導性たんぱく質である inducible Nitric oxide synthase (iNOS) および、中心的な転写因子である NFκB の肝臓中発現レベルを計測した。また、炎症反応の調節因子として STAT3 (Lin & Karin, 2007; He & Karin, 2011) の発現レベルも併せて測定した。

PG-PS の主効果は Total-STAT3 以外の全ての測定項目で有意であり、PG-PS 投与による発現、リン酸化レベルの上昇が認められた (Fig. 4-6)。ただし、Total-NFκB の発現レベルにおいては、PG-PS 投与と Re-type の相互作用が有意であり、SSC トレーニング時には有意な発現上昇を認めなかった (Fig. 4-6D)。iNOS (Fig. 4-6B)、リン酸化 NFκB (Fig. 4-6C)、リン酸化 STAT3 (Fig. 4-6F) の発現レベル、および NFκB (Fig. 4-6E)、STAT3 (Fig. 4-6H) のリン酸化レベルにおいて、Re-type の主効果は有意ではなかった。これらの結果は、PG-PS 誘導性慢性炎症ラットにおいて、SSC 形式のトレーニングは ISO 形式のトレーニングと比較して上記の炎症関連分子の発現レベルを少なくとも増悪させないことが示した。

ただし、STAT3 のリン酸化レベルと血中アルブミン濃度および AST 活性との間に、それぞれ有意な負相関、正相関関係を認めており (Fig. 4-6I)、肝臓における STAT3 リン酸化などの炎症応答性イベントが、肝機能低下に寄与している可能性がある。

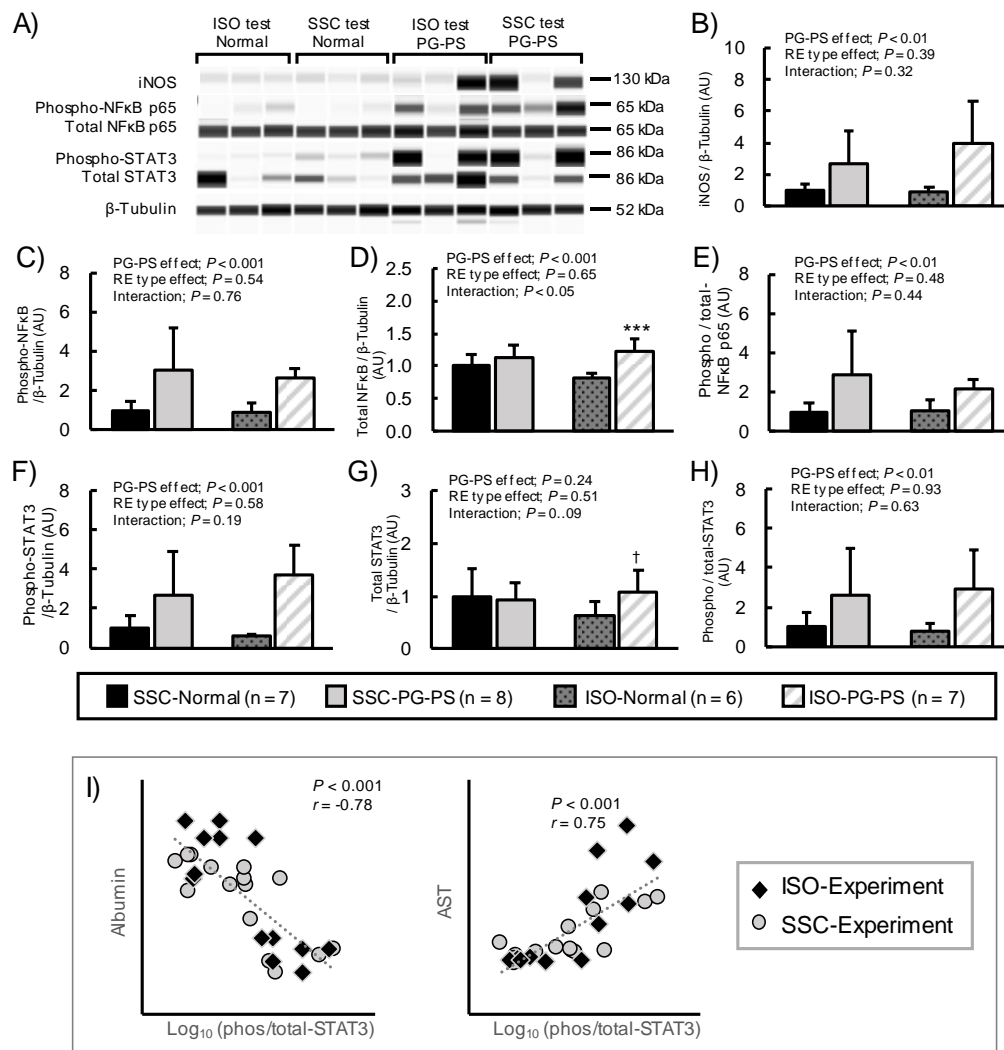


Fig. 4-6. 正常ラットまたは PG-PS 投与ラットにおける肝臓 NFκB および STAT3 発現量

(A)代表的な iNOS、NFκB、STAT3 および β-Tubulin の Simple western 分析シグナル画像。肝臓中の(B) iNOS、(C) リン酸化 NFκB、(D)総 NFκB 発現量 (β-tubulin 発現量で正規化)。(E) NFκB のリン酸化レベル(リン酸化たんぱく質発現量を総たんぱく質発現量で除した値)。肝臓中(F) リン酸化ま STAT3 たは (G) 総 STAT3 発現量 (β-tubulin 発現量で正規化)。(H) STAT3 リン酸化レベル。図 B-H 中の数値は、SSC-Normal 群の平均値を 1 として表示した。two-way ANOVA の結果を図 B-H 中上部に記載した。† $P < 0.1$ 、*** $P < 0.001$ (Post-hoc analysis: ISO-Normal 群 vs ISO-PG-PS 群)。(I) アルブミン濃度 および AST 活性 と STAT3 リン酸

化レベル（常用対数変換値）との相関関係を表す散布図。Pearson の相関係数 r とその有意性を図中に示した。

4-4 考察

第4章では、PG-PSによって誘発される肝機能障害に対するSSC-REおよびISO-REトレーニングによる影響の違いを検証した。その結果まず、SSC-REは一過性の循環性IL-6の増加を介して、循環IL-10増加を誘導することが示唆された。また、PG-PSによって誘発された肝機能障害は、ISO-REトレーニングを課した場合より、SSC-REトレーニングを課した場合で軽減すること、またその肝機能障害抑制に、循環IL-10濃度上昇が関与する可能性を見出した。これら第4章で得られた示唆に関して、以下で考察した。

4-4-1 SSC-RE トレーニングによる循環IL-10増加とその機序

第4章では、正常ラットへのSSC-REトレーニングは、第一セッション直後の観測時点でのみ循環IL-6を増加させた。ISO-REトレーニングを受けた正常ラットでは試験期間を通じて循環IL-6濃度は低く推移したことから、SSC-REトレーニングは開始直後において一過的に循環IL-6濃度上昇を引き起こすことが示唆された。これらの結果は、SSC-REにのみ、IL-6の筋内、および循環濃度を上昇させるECC型の筋収縮が含まれることと矛盾しない(Rohde *et al.*, 1997; Steensberg *et al.*, 2000; Philippou *et al.*, 2009)。

また、ラットに高強度ランニングトレーニングを課した研究において、骨格筋内IL-6(mIL-6)を含む筋肉内炎症サイトカインの発現低下(Lira *et al.*, 2009)と血漿IL-10濃度の上昇が認められている(Nunes *et al.*, 2013)。高強度ランニングはStretch-Shortening Contractionを含むことから、これらの先行知見は、SSC形式のトレーニングは、開始直後においてmIL-6の増加、血中放出を増加させるが、その継続によりmIL-6の枯渇および/または下方制御を引き起こす可能性を示している。第4章において、我々は各REセッションを5回実施した後のmIL-6の発現が、運動側腓腹筋でのみ、SSC-REを課した群でISO-REを課した群より低くなることを示した。この現象は上記の示唆と矛盾しておらず、急性的なSSC-REがmIL-6発現上昇および血中への放出を介して、循環IL-6濃度上昇を引き起こし、SSC-REの継続が筋内IL-6の枯渇または発現の下方修正をもたらした結果であると解釈できる。外部からのIL-

6 投与による一過的な循環 IL-6 濃度増加が循環 IL-10 の増加をもたらすことが報告されていることから(Steensberg *et al.*, 2003)、SSC-RE 開始直後の一過性の IL-6 濃度上昇が、循環 IL-10 濃度上昇を誘発した可能性がある。

まとめると、ISO-RE とは異なり、SSC-RE は、有酸素運動と同様に抗炎症効果をもたらす可能性がある。ただし、運動による循環 IL-6 の増加は一般に数時間レベルの一過性な上昇であるが(Pedersen *et al.*, 2001)、PG-PS を投与したラットの循環炎症性サイトカインは ISO、SSC-RE によるトレーニング実施期間を含めて常に上昇していた。それにも関わらず、SSC-RE トレーニング時のみ大幅な IL-10 の増加を認めた機序については現状説明ができず、慢性炎症状態においても、骨格筋由来の IL-6 が循環 IL-10 の増加に寄与すると結論するために、さらなる研究が必要である。

4-4-2 SSC-RE トレーニングによる慢性炎症モデルラットにおける肝機能改善効果

第 4 章で示した結果は、SSC-RE が、ISO-RE と比較して PG-PS によって誘発される肝機能障害を軽減するのに効果的であることを示した。

Herfarth らは、PG-PS 投与ラットにおいて肝臓の組織変性と機能低下を引き起こされること、および IL-10 の投与により PG-PS 投与ラットの肝臓中 IL1 β 、IL-6、および TNF- α 発現を抑制し、肝肉芽腫および単球浸潤を減少させることを示した(Herfarth *et al.*, 1996)。

SSC-RE と ISO-RE は共に PG-PS による慢性炎症モデルラットの水分増加を伴う肝臓重量増加を抑制しなかったが、SSC-RE は ISO-RE よりも肝臓組織の損傷を反映する血清中 AST 活性を低く維持した。

肝臓の本質的な機能低下は、血中 Phe 濃度や Fischer's ratio に反映される AAA 代謝やアルブミン合成の恒常性を破綻させる。例えば、肝臓の部分的切除を受けた患者では AAA 代謝能の減弱により血中 Phe 濃度が上昇する(Dejong *et al.*, 2007)。第 4 章において、SSC-RE は、ISO-RE と比較して PG-PS によって誘導される血漿 Phe 増加および Fisher 比の低下を抑制した。また、血清 AST 活性、アルブミン濃度、血漿 Phe 濃度および Fischer's ratio との間

に有意な相関関係を認めており、第4章において、これらの指標が一貫して肝臓機能を反映していたことを示している。これらの結果から、SSC-RE トレーニングは、ISO-RE と比較して PG-PS 投与慢性炎症ラットにおける肝機能低下を軽減することが示された。

さらに、血清 AST および血漿 Phe レベルは、相対的な炎症性サイトカインと抗炎症性サイトカインのバランスを示す指標としての IL-10/IL-1 β 比と相関していた。これらの結果から、SSC-RE トレーニングに特徴的に認められた IL-10 の増加が、SSC-RE の肝臓機能保護作用を少なくとも部分的に説明しているものと結論した。

4-4-3 肝臓中の炎症性分子におけるレジスタンス運動タイプの影響

第4章において、PG-PS 投与による肝臓における iNOS の高発現および、NF κ B p65 サブユニットの高発現および、リン酸化レベル増加が認められた。

iNOS の高発現は、多くの慢性疾患で観察され(Laveti *et al.*, 2013)、IL-10 による影響を受けることが報告されている。例えば、肝移植における虚血性再灌流は iNOS 高発現を誘導するが、IL-10 により抑制できることが報告されている(Yang *et al.*, 2007)。これらの知見から SSC-RE による肝臓 iNOS 発現の下方制御を仮定したが、合致する結果は得られなかった。

総 NF κ B の高発現は、四塩化炭素によって引き起こされる肝臓の急性損傷モデルや慢性線維症モデルで認められる(Li *et al.*, 2017)。また、いくつかの報告により、炎症条件下では肝臓 NF κ B p65 サブユニットの Ser536 残基におけるリン酸化レベルが増加することが示されている(Jiang *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2018)。IL-10 は、肝臓への白血球の浸潤抑制(Herfarth *et al.*, 1996; Louis *et al.*, 1998)、マクロファージのポピュレーションにおける抗炎症性 M2 型の上方制御作用を有することが示されている(Das *et al.*, 2015)。第4章において SSC-RE は ISO-RE と比較して PG-PS による慢性炎症下での肝臓中 NF κ B 発現量を低く保つことが示された。この結果は、肝臓組織への炎症性免疫細胞流入抑制や抗炎症性マクロファージ比率の増加を介した、IL-10 レベル増加の帰結である可能性がある。

また IL-10 は、肝臓に存在するマクロファージ様免疫細胞である Kupffer 細胞において IL-

6 シグナル伝達と競合し、STAT3 分子のリン酸化を下方制御することにより、Kupffer 細胞を炎症誘発性から抗炎症性に部分的に切り替える(Wang *et al.*, 2011)。また、STAT3 リン酸化は IL-10 ノックアウトマウスで上方制御される(Miller *et al.*, 2011)。第 4 章では、SSC-RE による明確な STAT3 リン酸化レベルの下方制御は認められなかったものの、STAT3 のリン酸化レベルが血清 AST 活性、およびアルブミン濃度とそれぞれ正、負に相関していることを発見した。つまり上記の先行知見を鑑みると、SSC-RE に特徴的な循環 IL-10 の増加は、STAT3 のリン酸化レベルの下方制御を介して、PG-PS による肝機能障害の軽減に寄与した可能性がある。

まとめると、第 4 章においては、SSC-RE に特徴的な IL-10 の増加が PG-PS による肝機能不全を軽減する潜在的な細胞内メカニズムに関する検討を実施したが、直接的な証明は得られなかった。

4-5 小括

前章の結果から SSC 形式の RE では、ISO 形式の RE と比較して、循環 IL-10 レベルが高まることから、筋萎縮対策として以外にも全身性慢性炎症下での利益があるのではないかと考えた。先行知見および第 2 章のデータから、PG-PS 投与による慢性炎症ラットにおいて、筋萎縮以外に肝臓機能の低下が誘導されていることが示唆されていた。そこで、PG-PS 投与による肝機能障害に対して、SSC-RE トレーニングが良い影響を及ぼすか否かを ISO-RE トレーニングと比較することで検討した。その結果、以下の示唆が得られた。

1) SSC-RE は ISO-RE では認められない、急性実施時の循環 IL-6 の一過性の上昇をもたらす、これにより循環 IL-10 増加が誘導されている可能性がある。ただし、この推測を証明するためにはより工夫した研究が必要である。

2) SSC-RE トレーニング実施時は ISO-RE トレーニング実施時と比較して、PG-PS による肝臓機能低下を抑制した。またこの肝臓機能低下軽減効果には少なくとも一部で IL-10 が関与している可能性を見出した。

3) SSC-RE の肝臓への作用機序を探索するため、IL-10 に関連する炎症関連分子 iNOS、および炎症シグナル伝達に関与する NFκB、STAT3 について分析した。しかし残念ながら、SSC-RE や IL-10 と肝臓中の炎症関連分子との明らかな関与を示す証拠は得られなかった。

以上の成果から、

SSC-RE には循環 IL-10 の増加を少なくとも一部の機序として、ISO-RE と比較して高い抗炎症作用があること、および慢性炎症下における肝臓機能低下を軽減できることが示唆された。つまり、ISO-RE と比較して、SSC-RE は直接運動を課す骨格筋ではない部位・組織にお

いて、間接的に抗炎症効果を及ぼしうる面で二次性サルコペニア対策として有益な可能性
がある (Fig. 4-7)。

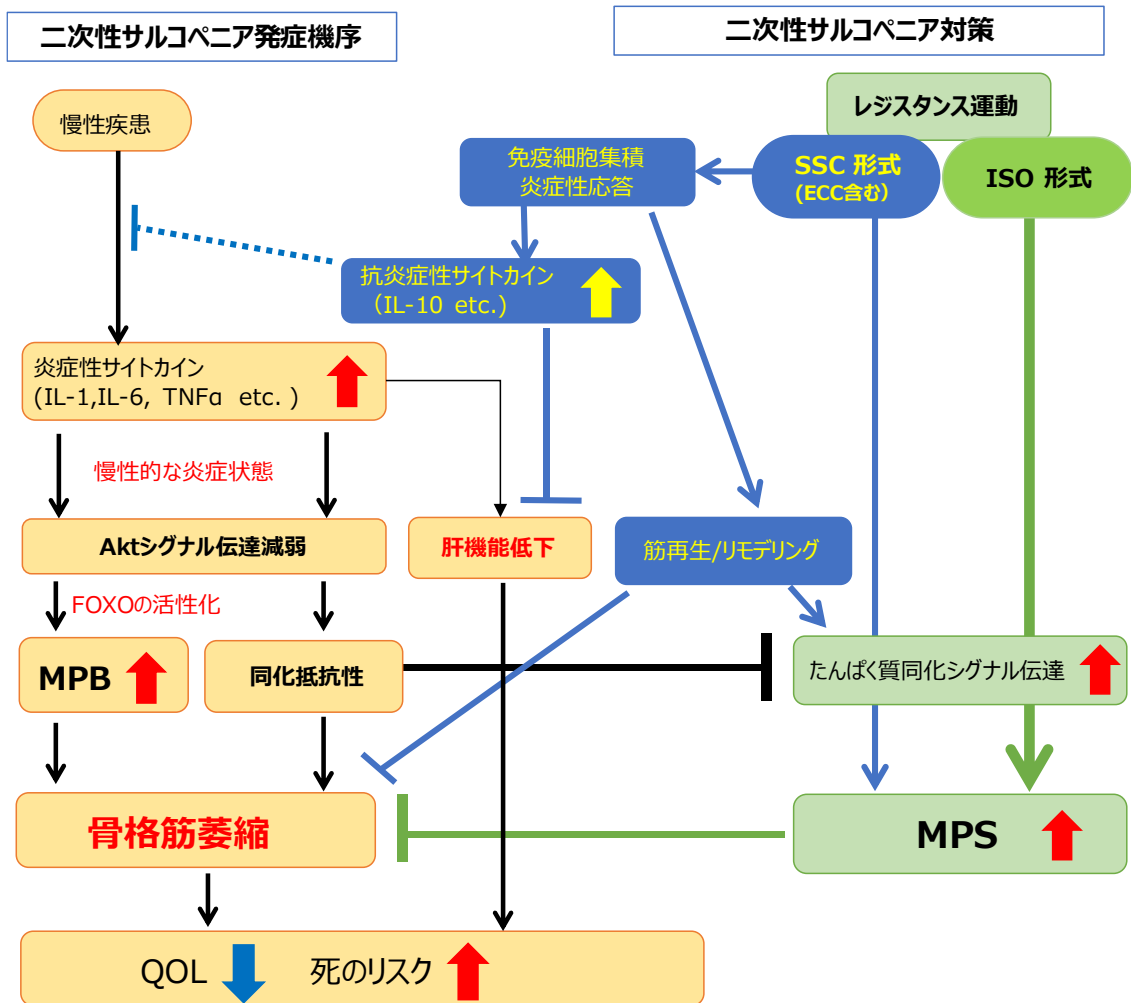


Fig. 4-7. 第4章で得られた知見の小括

第 5 章

総合討論

5-1 結論

本研究の目的は、慢性的な疾病に起因する「二次性サルコペニア」への対策としてのレジスタンス運動、および抗炎症作用を有する食品摂取の有効性を動物モデルを用いて評価し、臨床応用に向けた知見を集積することであった。この目的のために、1) 筋萎縮症状を呈する慢性炎症モデルラットの確立、2) 慢性炎症モデルラットにおける筋萎縮に対する、レジスタンス運動、およびレジスタンス運動と抗炎症食品摂取の組み合わせの影響評価、3) 慢性炎症モデルラットにおける肝臓機能不全に対する、レジスタンス運動の影響評価を実施し、以下の示唆を得た。

1) Peptidoglycan-polysaccharide 10S fraction 投与によるラット慢性炎症性筋萎縮モデルの構築 (第2章)

慢性炎症性貧血モデル作出に使用されていた、PG-PS の投与用量を最適化し、慢性炎症症状、筋萎縮が一貫して誘導されるものの、関節炎症状が小さい、レジスタンス運動を課す目的に適した新たな慢性炎症モデルラットを構築した。また、当モデルラットに急性 ISO-RE を課した結果、mTORC1 シグナル伝達が完全に抑制されることはなかったが、炎症性サイトカインの増加に関連した Akt シグナル伝達の減弱を認めた。この結果から、PG-PS による慢性炎症モデルラットにおいては、一部同化刺激に対する抵抗性が惹起されていることが示唆された。

2) レジスタンス運動トレーニングと抗炎症性食品摂取が慢性炎症モデルラットの筋萎縮に及ぼす影響 (第3章)

慢性炎症モデルラットにおいて、ISO 形式および SSC 形式の RE トレーニングは共に、骨格筋量の維持・増大に有効であった。また、抗炎症食品摂取は、循環炎症サイトカイン上昇抑制、MPB 亢進抑制に関連して、骨格筋萎縮を改善する可能性が示された。ただし、抗炎

症食品摂取と組み合わせた場合、ISO形式のREトレーニングでは骨格筋量増加が認められたのに対し、SSC形式のREトレーニングではその筋量増加効果が打ち消された。これらの結果から、REトレーニングに抗炎症食品を組み合わせることは二次性サルコペニア対策において有効な戦略となることが期待できるものの、RE運動形式や組み合わせる抗炎症食品の摂取タイミングなどに検討の余地があることが明らかとなった。

3) 等尺性または Stretch-Shortening Cycle 形式のレジスタンス運動が慢性炎症ラットの肝機能に及ぼす影響 (第4章)

SSC-REトレーニング実施時はISO-REトレーニング時には認められない一過性の循環IL-6の増加が認められ、IL-10の増加に関与している可能性がある。また、SSC-REトレーニング実施時は少なくとも一部IL-10の発現上昇に関連して、ISO-REトレーニング実施時と比較して、PG-PSによる肝臓機能低下が軽減された。以上の成果から、SSC-REはISO-REと比較して高い抗炎症作用を有し、慢性炎症下において、筋萎縮だけでなく肝臓機能低下をはじめとする遠隔組織においても慢性炎症による症状を軽減できる可能性がある。

以上のことから本研究によりレジスタンス運動またはレジスタンス運動と抗炎症食品摂取の組み合わせが、二次性サルコペニアおよび二次性サルコペニアによる予後不良改善に有効である可能性が示された。一方で、レジスタンス運動の形式により、レジスタンス運動自体の抗炎症作用や、抗炎症食品と組み合わせた場合の効果が異なる可能性が示された。

5-2 今後の展望

本研究においては、PG-PS慢性炎症モデルラットを用いて、慢性炎症下においては、Aktシグナル伝達を中心として、急性REに対する同化抵抗性が惹起されるものの、継続的なREトレーニングによる筋肥大効果が認められた。一方で、抗炎症食摂取による炎症軽減が骨格筋量維持に大きく寄与すること、炎症抑制の寄与はREよりはるかに大きい可能性が示され

た。慢性炎症による同化抵抗性は、REだけでなく、インスリンやアミノ酸による同化刺激も減弱する(Frost & Lang, 2011; Crossland *et al.*, 2019)。つまり毎日の食事中たんぱく質の利用効率を下げた可能性がある。実際、実験 3-1 においては、PG-PS 投与により Food efficiency (摂餌摂取量あたりの体重増加量) の減少と抗炎症食による改善が認められた。ただし、実験 3-2 では PG-PS 投与による Food efficiency の低下が認められなかった。これは SSC-RE トレーニング自体の抗炎症作用によって、同化抵抗性が一部改善していた可能性があるが、これを証明するためには同化抵抗性のより詳しい評価が必要となる。例えば、Biolo らは、食事と同時に D5-Phe を摂取させた際の血中 D5-Phe とその代謝により産生する D4-Tyr の比率 (AUC-D4-Tyr/AUC-D5-Phe) が同化抵抗性を反映すること、および不活動による同化抵抗性が高まるほど骨格筋量が低下することを臨床的に示した (Fig. 5-1. (Biolo *et al.*, 2017))。我々のグループにおいて当手法を導入し、PG-PS 投与ラットの同化抵抗性を予備的に検討した結果、同化抵抗性と体重増加との間に高い負の相関があることを示唆する結果を得ている (Fig. 5-2.未発表データ)。今後はこの予備検討を深耕し、PG-PS 投与による慢性炎症と同化抵抗性、摂餌効率と筋萎縮に関する関連を調査していきたいと考えている。高齢者において身体活動の増加は、運動直後だけでなく数日間、食後の筋たんぱく質合成を高めることが示唆されている(Burd *et al.*, 2013)。つまり、運動自体が同化抵抗性を改善する可能性があるため、タイプの異なるレジスタンス運動トレーニングの同化抵抗性に対する影響も調査に値する。

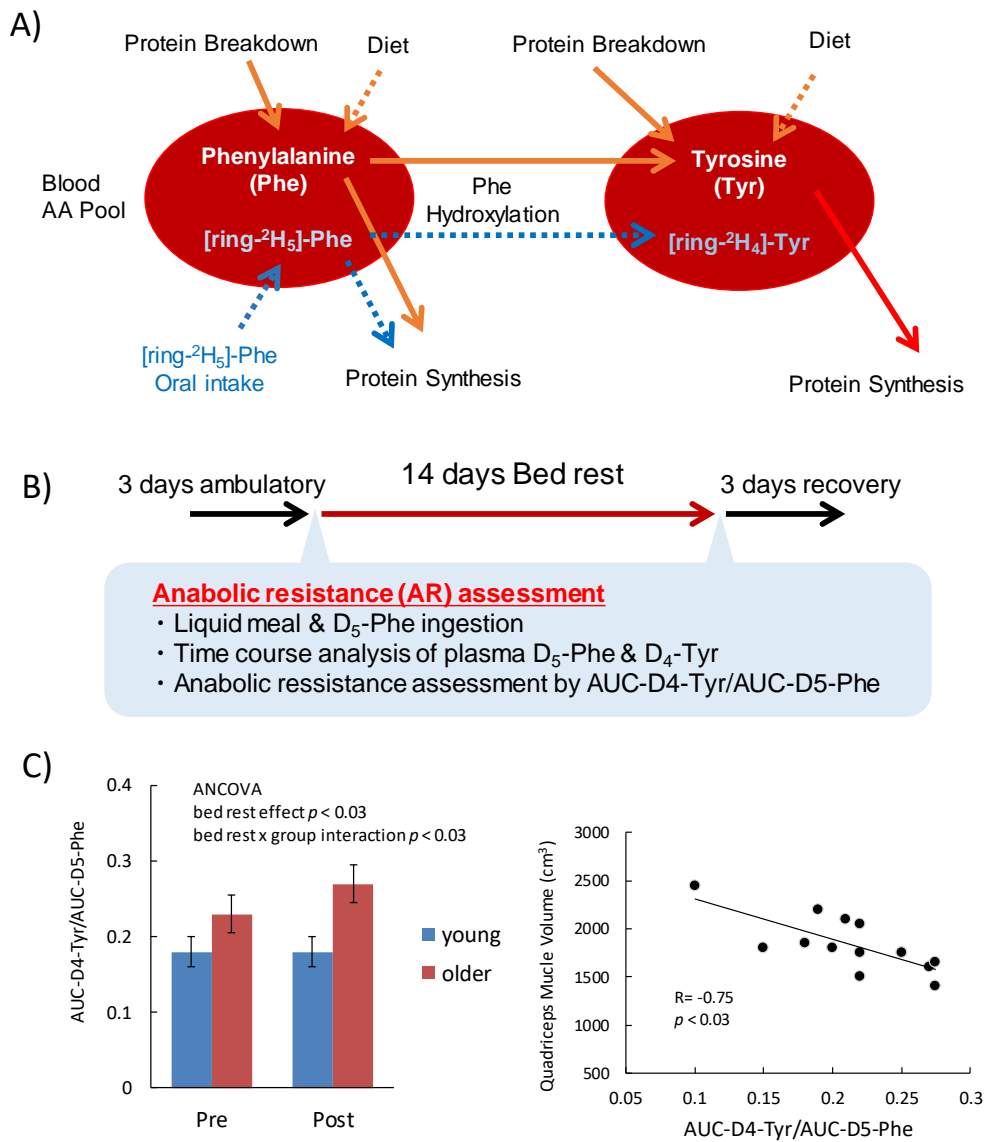


Fig. 5-1. D₅-フェニルアラニン経口摂取による同化抵抗性評価法 (Biolo *et al.*, 2017)

(A) 血中 D₄-Tyr/D₅-Phe による同化抵抗性評価の原理、(B) ヒト臨床研究プロトコル概要、
 (C) 臨床試験結果。若齢者と高齢者における 14 日のベットレストによる同化抵抗性の変動
 (左) および、同化抵抗性指標と大腿四頭筋体積の関係 (右)。D : Deuterium、重水素

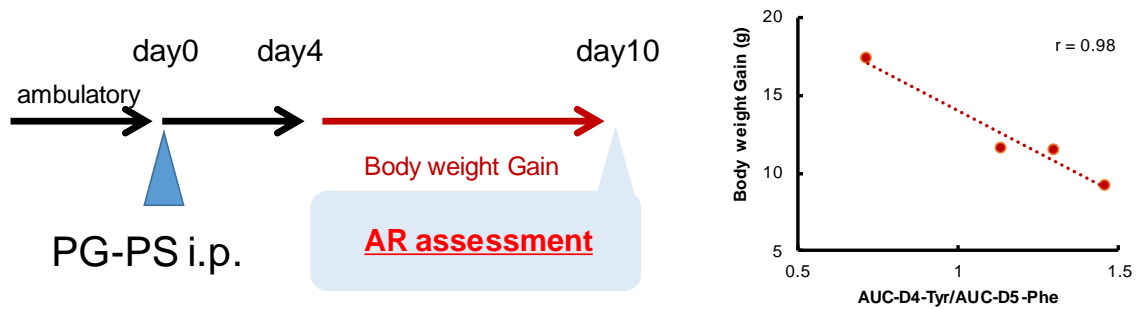


Fig. 5-2. PG-PS 投与ラットの同化抵抗性（予備検討、未発表データ）

PG-PS 投与 4 日後から 10 日後（摂餌量が比較的安定している慢性炎症期）における体重増加と同化抵抗性指標である $AUC-D_4\text{-Tyr}/AUC-D_5\text{-Phe}$ との間に高い負の相関関係が認められた。

本研究において、PG-PS 投与マウスにおいて、抗炎症食の摂取が特に SSC-RE トレーニングによる筋肥大効果を減弱させる可能性が示された。最近の総論において、若齢者における COX 阻害活性を持つ鎮痛剤や非ステロイド性抗炎症剤（NSAIDs）の使用が急性の RE によるたんぱく質同化シグナル伝達/たんぱく質合成上方制御、サテライト細胞活性化を阻害し、筋肥大などの長期的な RE トレーニングの利益を毀損する懸念を示している(Lundberg & Howatson, 2018)。我々も過去に本研究で使用した $\alpha\text{-La}$ を投与した上で、ECC による筋損傷を健常ラットに惹起させた場合、運動箇所の浮腫を抑制できたものの、筋損傷からの回復は逆に遅れるという、この懸念と矛盾しない結果を得ている（未発表データ）。

一方で、常時慢性的な炎症状態にある高齢者や慢性疾患時における COX 阻害剤の RE への影響については一貫しない(Trappe *et al.*, 2010; Trappe *et al.*, 2013; Dideriksen *et al.*, 2016; Duff *et al.*, 2016)。これらの相違に関しては、抗炎症剤の薬効、選択性（COX1~3）、RE の形式や強度、頻度など様々な要因を調整することで利益が勝る方向に改善できる可能性があり、今後より詳細な検討を進めたい。

Stangl らは、抗糖尿病薬として既に使用されている薬剤に骨格筋萎縮を改善しうる効果があることに言及しており(Stangl *et al.*, 2019)、COX 阻害以外の経路に着目した検討も価値があると考えられる。上記の総説では、peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ 作動薬である resiglitazone や AMP-activated protein kinase (AMPK) 活性化作用をもつ metformin、dipeptidyl peptidase (DPP)-4 阻害薬である sitagliptin などが挙げられている (Table 5-1)。選択性の面で薬品に劣るものの、食品成分にもこれらの作用を有するものがあることから(Ortuño Sahagún *et al.*, 2012; Lyons & Roche, 2018; Shaikh *et al.*, 2021)、今後二次性サルコペニア対策として RE との組み合わせの有効性を検討していきたい。

本研究をまとめると、等尺性 RE には骨格筋の損傷が小さいことに加えて、抗炎症食品と組み合わせても筋肥大効果が減弱しにくいというメリットがあると考えられた。また ECC を含む SSC-RE は代謝的に低コストで骨格筋に高負荷をかけられること(Franchi *et al.*, 2017)、RE 自体に全身性の抗炎症作用が期待できること(Rader & Baker, 2017)などのメリットがある反面、抗炎症食との組み合わせで筋肥大効果が減弱するというデメリットがある可能性が示された。ただし、COX 阻害以外を主因とする抗炎症作用を有する食品との組み合わせ効果は不明であり、より効果的な二次性サルコペニア対策戦略を構築するために研究を深耕していきたい (Fig. 5-3)。

Table 5-1. 市販の抗糖尿病薬とその薬効による骨格筋維持への影響

薬剤種別 (試験薬)	作用	骨格筋への 総合的な影響	機序/現状の知見
インスリン	血糖低減 ISR作動 agonist	Neutral/ <i>beneficial</i>	たんぱく同化刺激として作用 (高齢者では作用弱い、抵抗性が関与か)
Glitazone (rosiglitazone)	PPAR γ agonist	<i>Beneficial</i> 心血管、肝臓に対する リスクもあるので使用制限	ミトコンドリア活性上昇、 <i>インスリン抵抗性改善</i> 、 <i>炎症低減</i> たんぱく質異化抑制、筋量改善
Biganides (metformin)	AMPK agonist	Unclear	<i>インスリン抵抗性改善</i> など 筋の代謝改善につながるが、 潜在的に筋委縮につながる機序
Sfonylureas (glibenclamide)	K-ATP channel Blocker インスリン分泌促進	<i>Unfavorable</i>	ラットおよびヒトで筋委縮が認められた
Glinides (repaglinide)	K-ATP channel Blocker インスリン分泌促進	<i>Unfavorable</i>	In vitro とげっ歯類で 筋委縮が認められた
GLP-1 analogue (litagliptide)	GLP-1様作用 インスリン分泌、 産生	<i>Possibly beneficial</i>	GLUT4発現亢進、グルコース取り込み増大、 <i>SMI増</i>
DPP4-阻害剤 (sitagliptin)	GLP-1分解阻害	<i>Possibly beneficial</i>	<i>SMI高値</i>
SGLT2阻害薬	尿細管糖再取り込み 阻害	Unclear Possibly neutral	SMI 変動なし

(Stangl *et al.*, 2019)より一部改変作図。

ISR; Inuline receptor, PPAR; peroxisome proliferator-activated receptor, AMPK; AMP-activated protein kinase, DPP4; dipeptidyl peptidase-4, SGLT2; Sodium-glucose co-transporter-2, GLP-1; Glucagon-like peptide-1, GLUT4; glucose transporter type 4, SMI; Skeltal muscle index

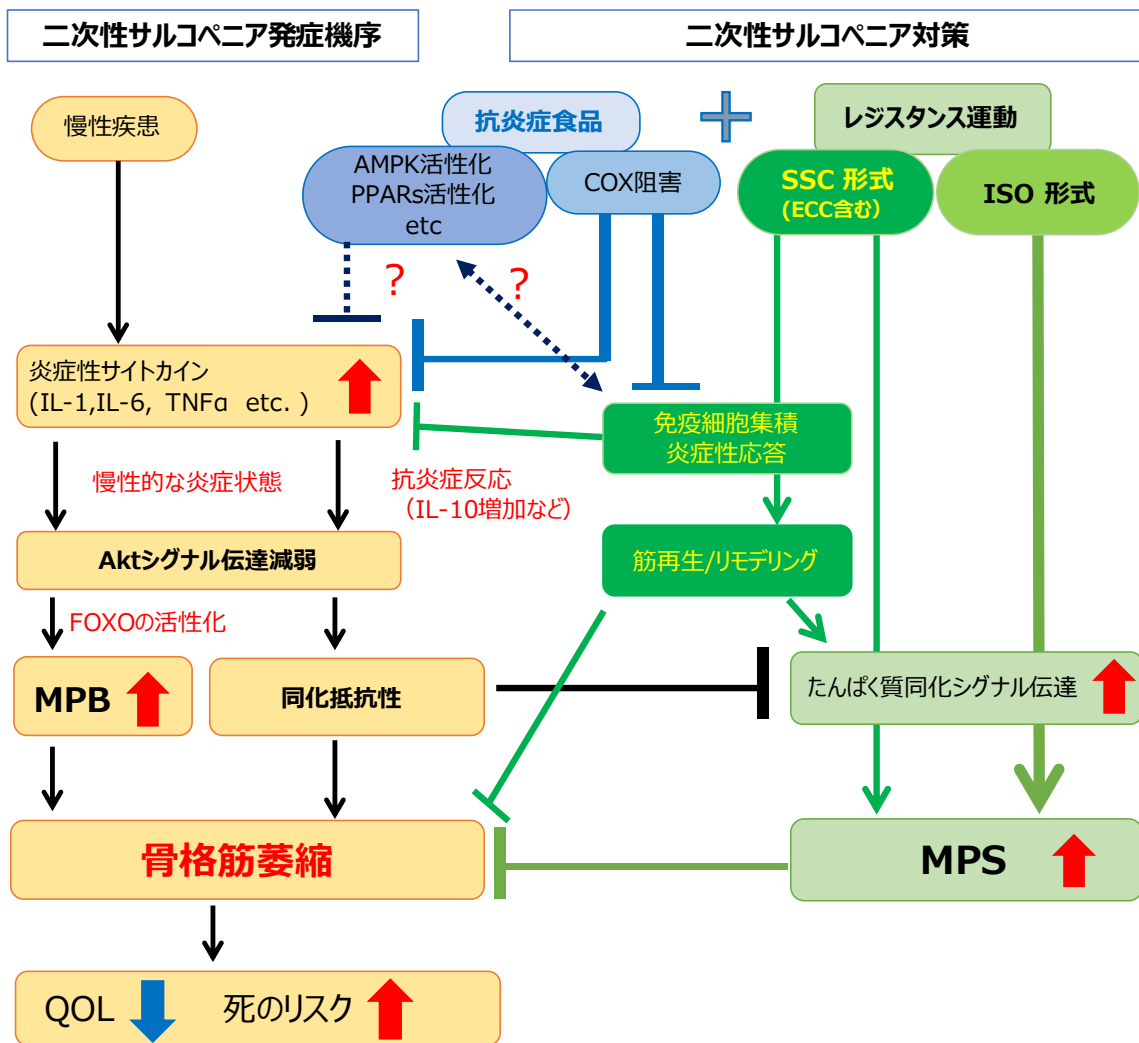


Fig. 5-3. 本研究の総括

参考文献

- Adams GR (2002). Invited Review: Autocrine/paracrine IGF-I and skeletal muscle adaptation. *Journal of applied physiology* **93**, 1159-1167.
- Adams GR, Cheng DC, Haddad F & Baldwin KM (2004). Skeletal muscle hypertrophy in response to isometric, lengthening, and shortening training bouts of equivalent duration. *Journal of applied physiology* **96**, 1613-1618.
- Aoyagi T, Terracina KP, Raza A, Matsubara H & Takabe K (2015). Cancer cachexia, mechanism and treatment. *World journal of gastrointestinal oncology* **7**, 17-29.
- Baker BA (2018). Efficacy of age-specific high-intensity stretch-shortening contractions in reversing dynapenia, sarcopenia, and loss of skeletal muscle quality. *Journal of functional morphology and kinesiology* **3**, 36.
- Barclay RD, Mackenzie RW, Burd NA, Tyler CJ & Tillin NA (2019). The Role of the IGF-1 Signalling Cascade in Muscle Protein Synthesis and Anabolic Resistance in Ageing Skeletal Muscle. *Frontiers in nutrition* **6**, 146.
- Battaglini C, Hackney A & Goodwin M (2012). Cancer cachexia: muscle physiology and exercise training. *Cancers* **4**, 1247-1251.
- Benjamin IS, Engelbrecht GH, Saunders SJ & van Hoorn-Hickman R (1988). Amino acid imbalance following portal diversion in the rat. The relevance of nutrition and of hepatic function. *J Hepatol* **7**, 208-214.
- Bernier SG, Lazarus DD, Clark E, Doyle B, Labenski MT, Thompson CD, Westlin WF & Hannig G (2004). A methionine aminopeptidase-2 inhibitor, PPI-2458, for the treatment of rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 10768-10773.

- Biolo G, Pišot R, Mazzucco S, Di Girolamo FG, Situlin R, Lazzer S, Grassi B, Reggiani C, Passaro A, Rittweger J, Gasparini M, Šimunič B & Narici M (2017). Anabolic resistance assessed by oral stable isotope ingestion following bed rest in young and older adult volunteers: Relationships with changes in muscle mass. *Clin Nutr* **36**, 1420-1426.
- Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC & Glass DJ (2001). Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nature cell biology* **3**, 1014.
- Bowen TS, Schuler G & Adams V (2015). Skeletal muscle wasting in cachexia and sarcopenia: molecular pathophysiology and impact of exercise training. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* **6**, 197-207.
- Breen L & Phillips SM (2011). Skeletal muscle protein metabolism in the elderly: Interventions to counteract the 'anabolic resistance' of ageing. *Nutrition & Metabolism* **8**, 68.
- Brown EJ, Beal PA, Keith CT, Chen J, Shin TB & Schreiber SL (1995). Control of p70 S6 kinase by kinase activity of FRAP in vivo. *Nature* **377**, 441-446.
- Brunn GJ, Hudson CC, Sekulić A, Williams JM, Hosoi H, Houghton PJ, Lawrence Jr JC & Abraham RT (1997). Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science* **277**, 99-101.
- Burd NA, Gorissen SH & Van Loon LJC (2013). Anabolic resistance of muscle protein synthesis with aging. *Exercise and Sport Sciences Reviews* **41**, 169-173.
- Carriere A, Ray H, Blenis J & Roux PP (2008). The RSK factors of activating the Ras/MAPK signaling cascade. *Front Biosci* **13**, 4258-4275.
- Castillero E, Nieto-Bona MP, Fernández-Galaz C, Martín AI, López-Menduiña M, Granado M, Villanúa

- MA & López-Calderón A (2011). Fenofibrate, a PPAR α agonist, decreases atrogenes and myostatin expression and improves arthritis-induced skeletal muscle atrophy. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **300**, E790-E799.
- Cesari M, Penninx BW, Lauretani F, Russo CR, Carter C, Bandinelli S, Atkinson H, Onder G, Pahor M & Ferrucci L (2004). Hemoglobin levels and skeletal muscle: results from the InCHIANTI study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **59**, 249-254.
- Chapkin RS, Kim W, Lupton JR & McMurray DN (2009). Dietary docosahexaenoic and eicosapentaenoic acid: emerging mediators of inflammation. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **81**, 187-191.
- Chazaud B (2016). Inflammation during skeletal muscle regeneration and tissue remodeling: application to exercise-induced muscle damage management. *Immunology & Cell Biology* **94**, 140-145.
- Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X & Zhao L (2017). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* **9**, 7204-7218.
- Chen Y, Sood S, Biada J, Roth R & Rabkin R (2008). Increased workload fully activates the blunted IRS-1/PI3-kinase/Akt signaling pathway in atrophied uremic muscle. *Kidney international* **73**, 848-855.
- Chevrel G, Granet C & Miossec P (2005). Contribution of tumour necrosis factor α and interleukin (IL) 1 β to IL6 production, NF- κ B nuclear translocation, and class I MHC expression in muscle cells: in vitro regulation with specific cytokine inhibitors. *Annals of the rheumatic diseases* **64**, 1257-1262.
- Churchward-Venne TA, Breen L & Phillips SM (2014). Alterations in human muscle protein metabolism with aging: protein and exercise as countermeasures to offset sarcopenia. *Biofactors* **40**, 199-205.
- Clarkson PM, Byrnes WC, McCormick KM, Turcotte LP & White JS (1986). Muscle soreness and serum

- creatine kinase activity following isometric, eccentric, and concentric exercise. *Int J Sports Med* **7**, 152-155.
- Costamagna D, Costelli P, Sampaolesi M & Penna F (2015). Role of inflammation in muscle homeostasis and myogenesis. *Mediators of inflammation* **2015**.
- Crossland H, Skirrow S, Puthuchery ZA, Constantin-Teodosiu D & Greenhaff PL (2019). The impact of immobilisation and inflammation on the regulation of muscle mass and insulin resistance: different routes to similar end-points. *The Journal of physiology* **597**, 1259-1270.
- Cruz-Jentoft AJ, Bahat G, Bauer J, Boirie Y, Bruyère O, Cederholm T, Cooper C, Landi F, Rolland Y & Sayer AA (2018). Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis. *Age and ageing* **48**, 16-31.
- Das A, Sinha M, Datta S, Abas M, Chaffee S, Sen CK & Roy S (2015). Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration. *The American journal of pathology* **185**, 2596-2606.
- de Boer JE, Oostenbroek RJ, van Dongen JJ, Janssen MA & Soeters PB (1986). Sequential metabolic characteristics following portacaval shunt in rats. *Eur Surg Res* **18**, 96-106.
- De Luca C & Olefsky JM (2008). Inflammation and insulin resistance. *FEBS Letters* **582**, 97-105.
- de Oliveira Nunes Teixeira V, Filippin LI, Viacava PR, de Oliveira PG & Xavier RM (2013). Muscle wasting in collagen-induced arthritis and disuse atrophy. *Experimental Biology and Medicine* **238**, 1421-1430.
- Dejong CHC, van de Poll MCG, Soeters PB, Jalan R & Olde Damink SWM (2007). Aromatic amino acid metabolism during liver failure. *The Journal of nutrition* **137**, 1579S-1585S.
- Dideriksen K, Reitelseder S, Malmgaard-Clausen NM, Bechshøft R, Petersen RK, Mikkelsen UR & Holm

- L (2016). No effect of anti-inflammatory medication on postprandial and postexercise muscle protein synthesis in elderly men with slightly elevated systemic inflammation. *Experimental gerontology* **83**, 120-129.
- Drummond MJ, Dreyer HC, Fry CS, Glynn EL & Rasmussen BB (2009). Nutritional and contractile regulation of human skeletal muscle protein synthesis and mTORC1 signaling. *Journal of Applied Physiology* **106**, 1374-1384.
- Drummond MJ, Dreyer HC, Pennings B, Fry CS, Dhanani S, Dillon EL, Sheffield-Moore M, Volpi E & Rasmussen BB (2008). Skeletal muscle protein anabolic response to resistance exercise and essential amino acids is delayed with aging. *Journal of applied physiology* **104**, 1452-1461.
- Duff WR, Kontulainen SA, Candow DG, Gordon JJ, Mason RS, Taylor-Gjevre R, Nair B, Szafron M, Baxter-Jones AD, Zello GA & Chilibeck PD (2016). Effects of low-dose ibuprofen supplementation and resistance training on bone and muscle in postmenopausal women: A randomized controlled trial. *Bone Rep* **5**, 96-103.
- Dunleavy K (2019). 1 - Introduction to Therapeutic Exercise for Rehabilitation. In *Therapeutic Exercise Prescription*. ed. Dunleavy K & Slowik AK, pp. 2-11. Elsevier, St. Louis.
- Dutra MT, Avelar BP, Souza VC, Bottaro M, Oliveira RJ, Nóbrega OT & Moreno Lima R (2017). Relationship between sarcopenic obesity-related phenotypes and inflammatory markers in postmenopausal women. *Clinical physiology and functional imaging* **37**, 205-210.
- Farmawati A, Kitajima Y, Nedachi T, Sato M, Kanzaki M & Nagatomi R (2012). Characterization of contraction-induced IL-6 up-regulation using contractile C2C12 myotubes. *Endocrine journal*, EJ12-0316.
- Faulkner JA (2003). Terminology for contractions of muscles during shortening, while isometric, and during lengthening. *Journal of applied physiology* **95**, 455-459.

- Filippin LI, Teixeira VN, Viacava PR, Lora PS, Xavier LL & Xavier RM (2013). Temporal development of muscle atrophy in murine model of arthritis is related to disease severity. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* **4**, 231-238.
- Fischer JE, Rosen HM, Ebeid AM, James JH, Keane JM & Soeters PB (1976). The effect of normalization of plasma amino acids on hepatic encephalopathy in man. *Surgery* **80**, 77-91.
- Franchi MV, Reeves ND & Narici MV (2017). Skeletal Muscle Remodeling in Response to Eccentric vs. Concentric Loading: Morphological, Molecular, and Metabolic Adaptations. *Frontiers in physiology* **8**, 447-447.
- Frost RA & Lang CH (2011). mTor signaling in skeletal muscle during sepsis and inflammation: where does it all go wrong? *Physiology* **26**, 83-96.
- Frost RA, Nystrom GJ, Jefferson LS & Lang CH (2007). Hormone, cytokine, and nutritional regulation of sepsis-induced increases in atrogen-1 and MuRF1 in skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **292**, E501-E512.
- Garcia AE, Mada SR, Rico MC, Dela Cadena RA & Kunapuli SP (2011). Clopidogrel, a P2Y12 receptor antagonist, potentiates the inflammatory response in a rat model of peptidoglycan polysaccharide-induced arthritis. *PloS one* **6**, e26035-e26035.
- Gibala MJ, MacDougall JD, Tarnopolsky MA, Stauber WT & Elorriaga A (1995). Changes in human skeletal muscle ultrastructure and force production after acute resistance exercise. *J Appl Physiol (1985)* **78**, 702-708.
- Giles K, Guan C, Jagoe TR & Mazurak V (2016). Diet composition as a source of variation in experimental animal models of cancer cachexia. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* **7**, 110-125.

- Goldberg AL (1967). Work-induced growth of skeletal muscle in normal and hypophysectomized rats. *American Journal of Physiology-Legacy Content* **213**, 1193-1198.
- Goodman MN (1994). Interleukin-6 induces skeletal muscle protein breakdown in rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **205**, 182-185.
- Granado M, Martín AI, Villanúa MÁ & López-Calderón A (2007). Experimental arthritis inhibits the insulin-like growth factor-I axis and induces muscle wasting through cyclooxygenase-2 activation. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **292**, E1656-E1665.
- Grzelkowska-Kowalczyk K & Wieteska-Skrzeczyńska W (2010). Treatment with TNF- α and IFN- γ alters the activation of Ser/Thr protein kinases and the metabolic response to IGF-I in mouse C2C12 myogenic cells. *Cellular & molecular biology letters* **15**, 13.
- Haddad F & Adams GR (2002). Selected contribution: acute cellular and molecular responses to resistance exercise. *Journal of applied physiology* **93**, 394-403.
- Haddad F, Adams GR, Bodell PW & Baldwin KM (2006). Isometric resistance exercise fails to counteract skeletal muscle atrophy processes during the initial stages of unloading. *Journal of applied physiology* **100**, 433-441.
- Hagenfeldt L, Eriksson LS & Wahren J (1983). Amino acids in liver disease. *Proceedings of the Nutrition Society* **42**, 497-506.
- Hannig G, Bernier SG, Hoyt JG, Doyle B, Clark E, Karp RM, Lorusso J & Westlin WF (2007). Suppression of inflammation and structural damage in experimental arthritis through molecular targeted therapy with PPI-2458. *Arthritis & Rheumatism* **56**, 850-860.
- Hay N & Sonenberg N (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes & development* **18**, 1926-1945.

- He G & Karin M (2011). NF- κ B and STAT3–key players in liver inflammation and cancer. *Cell research* **21**, 159.
- Herfarth HH, Mohanty SP, Rath HC, Tonkonogy S & Sartor RB (1996). Interleukin 10 suppresses experimental chronic, granulomatous inflammation induced by bacterial cell wall polymers. *Gut* **39**, 836-845.
- Holecek M, Mraz J & Tilser I (1996). Plasma amino acids in four models of experimental liver injury in rats. *Amino Acids* **10**, 229-241.
- Hornberger TA (2011). Mechanotransduction and the regulation of mTORC1 signaling in skeletal muscle. *The international journal of biochemistry & cell biology* **43**, 1267-1276.
- Ito N, Ruegg U & Takeda Si (2018). ATP-Induced Increase in Intracellular Calcium Levels and Subsequent Activation of mTOR as Regulators of Skeletal Muscle Hypertrophy. *International journal of molecular sciences* **19**, 2804.
- Jiang R, Chen D, Hou J, Tan Z, Wang Y, Huang X, Wang X & Sun B (2014). Survival and inflammation promotion effect of PTPRO in fulminant hepatitis is associated with NF- κ B activation. *The Journal of Immunology* **193**, 5161-5170.
- Jonsdottir IH, Schjerling P, Ostrowski K, Asp S, Richter EA & Pedersen BK (2000). Muscle contractions induce interleukin-6 mRNA production in rat skeletal muscles. *The Journal of physiology* **528**, 157-163.
- Kimpel D, Dayton T, Fuseler J, Gray L, Kannan K, Wolf RE & Grisham M (2003). Splenectomy attenuates streptococcal cell wall–induced arthritis and alters leukocyte activation. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology* **48**, 3557-3567.
- Kochlik B, Gerbracht C, Grune T & Weber D (2018). The Influence of Dietary Habits and Meat

- Consumption on Plasma 3-Methylhistidine—A Potential Marker for Muscle Protein Turnover. *Molecular nutrition & food research* **62**, 1701062.
- Kumar V, Selby A, Rankin D, Patel R, Atherton P, Hildebrandt W, Williams J, Smith K, Seynnes O & Hiscock N (2009). Age-related differences in the dose–response relationship of muscle protein synthesis to resistance exercise in young and old men. *The Journal of physiology* **587**, 211-217.
- Laveti D, Kumar M, Hemalatha R, Sistla R, Gm Naidu V, Talla V, Verma V, Kaur N & Nagpal R (2013). Anti-inflammatory treatments for chronic diseases: a review. *Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)* **12**, 349-361.
- Lexell J, Taylor CC & Sjöström M (1988). What is the cause of the ageing atrophy? Total number, size and proportion of different fiber types studied in whole vastus lateralis muscle from 15- to 83-year-old men. *J Neurol Sci* **84**, 275-294.
- Li X, Wang L & Chen C (2017). Effects of exogenous thymosin β 4 on carbon tetrachloride-induced liver injury and fibrosis. *Scientific reports* **7**, 5872.
- Lin W-W & Karin M (2007). A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *The Journal of clinical investigation* **117**, 1175-1183.
- Lira FS, Koyama CH, Yamashita AS, Rosa JC, Zanchi NE, Batista Jr ML & Seelaender MC (2009). Chronic exercise decreases cytokine production in healthy rat skeletal muscle. *Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease* **27**, 458-461.
- Lira FS, Neto JCR & Seelaender M (2014). Exercise training as treatment in cancer cachexia. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* **39**, 679-686.
- Little RD, Prieto-Potin I, Pérez-Baos S, Villalvilla A, Gratal P, Cicuttini F, Largo R & Herrero-Beaumont G (2017). Compensatory anabolic signaling in the sarcopenia of experimental chronic arthritis.

Scientific reports **7**, 6311.

Louis H, Van Laethem JL, Wu W, Quertinmont E, Degraef C, Van den Berg K, Demols A, Goldman M, Le Moine O & Geerts A (1998). Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration, hepatocyte proliferation, and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. *Hepatology* **28**, 1607-1615.

Lundberg TR & Howatson G (2018). Analgesic and anti-inflammatory drugs in sports: Implications for exercise performance and training adaptations. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports* **28**, 2252-2262.

Lyons CL & Roche HM (2018). Nutritional Modulation of AMPK-Impact upon Metabolic-Inflammation. *International journal of molecular sciences* **19**, 3092.

Maggio M, De Vita F, Lauretani F, Buttò V, Bondi G, Cattabiani C, Nouvenne A, Meschi T, Dall'Aglio E & Ceda G (2013). IGF-1, the cross road of the nutritional, inflammatory and hormonal pathways to frailty. *Nutrients* **5**, 4184-4205.

Mastrocola R, Reffo P, Penna F, Tomasinelli CE, Boccuzzi G, Baccino FM, Aragno M & Costelli P (2008). Muscle wasting in diabetic and in tumor-bearing rats: role of oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* **44**, 584-593.

Mickleborough TD (2013). Omega-3 polyunsaturated fatty acids in physical performance optimization. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* **23**, 83-96.

Mikkelsen UR, Dideriksen K, Andersen MB, Boesen A, Malmgaard-Clausen NM, Sørensen IJ, Schjerling P, Kjær M & Holm L (2015). Preserved skeletal muscle protein anabolic response to acute exercise and protein intake in well-treated rheumatoid arthritis patients. *Arthritis research & therapy* **17**, 271.

- Miller AM, Wang H, Bertola A, Park O, Horiguchi N, Hwan Ki S, Yin S, Lafdil F & Gao B (2011). Inflammation-associated interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 activation ameliorates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in interleukin-10-deficient mice. *Hepatology* **54**, 846-856.
- Miyazaki M, McCarthy JJ, Fedele MJ & Esser KA (2011). Early activation of mTORC1 signalling in response to mechanical overload is independent of phosphoinositide 3-kinase/Akt signalling. *The Journal of physiology* **589**, 1831-1846.
- Moon J-H, Kong M-H & Kim H-J (2015). Relationship between low muscle mass and anemia in Korean elderly men: Using the Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES IV-V). *Journal of Clinical Gerontology and Geriatrics* **6**, 115-119.
- Moro T, Brightwell CR, Deer RR, Graber TG, Galvan E, Fry CS, Volpi E & Rasmussen BB (2018). Muscle protein anabolic resistance to essential amino acids does not occur in healthy older adults before or after resistance exercise training. *The Journal of nutrition* **148**, 900-909.
- Nakazato K, Ochi E & Waga T (2010). Dietary apple polyphenols have preventive effects against lengthening contraction-induced muscle injuries. *Mol Nutr Food Res* **54**, 364-372.
- Nakazato K, Song H & Waga T (2007). Dietary apple polyphenols enhance gastrocnemius function in Wistar rats. *Medicine and science in sports and exercise* **39**, 934-940.
- Novak ML, Billich W, Smith SM, Sukhija KB, McLoughlin TJ, Hornberger TA & Koh TJ (2009). COX-2 inhibitor reduces skeletal muscle hypertrophy in mice. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **296**, R1132-R1139.
- Nunes RB, Alves JP, Kessler LP & Lago PD (2013). Aerobic exercise improves the inflammatory profile correlated with cardiac remodeling and function in chronic heart failure rats. *Clinics* **68**, 876-882.

- Ochi E, Nakazato K & Ishii N (2011). Muscular hypertrophy and changes in cytokine production after eccentric training in the rat skeletal muscle. *The Journal of Strength & Conditioning Research* **25**, 2283-2292.
- Ochi E, Nosaka K, Tsutaki A, Kouzaki K & Nakazato K (2015). Repeated bouts of fast velocity eccentric contractions induce atrophy of gastrocnemius muscle in rats. *Journal of muscle research and cell motility* **36**, 317-327.
- Ogasawara R, Fujita S, Hornberger TA, Kitaoka Y, Makanae Y, Nakazato K & Naokata I (2016). The role of mTOR signalling in the regulation of skeletal muscle mass in a rodent model of resistance exercise. *Scientific reports* **6**, 31142.
- Ogasawara R, Sato K, Higashida K, Nakazato K & Fujita S (2013). Ursolic acid stimulates mTORC1 signaling after resistance exercise in rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **305**, E760-E765.
- Ogawa K, Sanada K, Machida S, Okutsu M & Suzuki K (2010). Resistance exercise training-induced muscle hypertrophy was associated with reduction of inflammatory markers in elderly women. *Mediators of inflammation* **2010**.
- Ortuño Sahagún D, Márquez-Aguirre AL, Quintero-Fabián S, López-Roa RI & Rojas-Mayorquín AE (2012). Modulation of PPAR- γ by Nutraceuticals as Complementary Treatment for Obesity-Related Disorders and Inflammatory Diseases. *PPAR Research* **2012**, 318613.
- Otis JS, Lees SJ & Williams JH (2007). Functional overload attenuates plantaris atrophy in tumor-bearing rats. *BMC cancer* **7**, 146.
- Peake J, Gatta PD & Cameron-Smith D (2010). Aging and its effects on inflammation in skeletal muscle at rest and following exercise-induced muscle injury. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **298**, R1485-R1495.

- Peake JM, Neubauer O, Della Gatta PA & Nosaka K (2016). Muscle damage and inflammation during recovery from exercise. *Journal of applied physiology* **122**, 559-570.
- Pedersen BK & Febbraio MA (2008). Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev* **88**, 1379-1406.
- Pedersen BK, Steensberg A, Fischer C, Keller C, Ostrowski K & Schjerling P (2001). Exercise and cytokines with particular focus on muscle derived IL-6. *Exercise immunology review* **7**, 18-31.
- Penninx BW, Pahor M, Cesari M, Corsi AM, Woodman RC, Bandinelli S, Guralnik JM & Ferrucci L (2004). Anemia is associated with disability and decreased physical performance and muscle strength in the elderly. *J Am Geriatr Soc* **52**, 719-724.
- Philippou A, Bogdanis G, Maridaki M, Halapas A, Sourla A & Koutsilieris M (2009). Systemic cytokine response following exercise-induced muscle damage in humans. *Clinical chemistry and laboratory medicine* **47**, 777-782.
- Philp A, Hamilton DL & Baar K (2010). Signals mediating skeletal muscle remodeling by resistance exercise: PI3-kinase independent activation of mTORC1. *Journal of applied physiology* **110**, 561-568.
- Pizza FX, Koh TJ, McGregor SJ & Brooks SV (2002). Muscle inflammatory cells after passive stretches, isometric contractions, and lengthening contractions. *J Appl Physiol (1985)* **92**, 1873-1878.
- Pyronnet S, Imataka H, Gingras AC, Fukunaga R, Hunter T & Sonenberg N (1999). Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. *The EMBO journal* **18**, 270-279.
- Rader EP & Baker BA (2017). Inflammaging and the age-specific responsiveness to stretch-shortening

- contractions. *Exercise and sport sciences reviews* **45**, 195-200.
- Rader EP, Layner K, Triscuit AM, Chetlin RD, Ensey J & Baker BA (2016). Age-dependent muscle adaptation after chronic stretch-shortening contractions in rats. *Aging and disease* **7**, 1.
- Rader EP, Naimo MA, Ensey J & Baker BA (2017). Agonist muscle adaptation accompanied by antagonist muscle atrophy in the hindlimb of mice following stretch-shortening contraction training. *BMC musculoskeletal disorders* **18**, 60.
- Rader EP, Naimo MA, Ensey J & Baker BA (2018a). High-intensity stretch-shortening contraction training modifies responsiveness of skeletal muscle in old male rats. *Experimental gerontology* **104**, 118-126.
- Rader EP, Naimo MA, Ensey J & Baker BA (2018b). VCAM-1 upregulation accompanies muscle remodeling following resistance-type exercise in Snell dwarf (Pit1dw/dw) mice. *Aging cell* **17**, e12816.
- Ramírez C, Russo TL, Sandoval MC, Dentillo AA, Couto MAS, Durigan JLQ & Salvini TF (2011). Joint inflammation alters gene and protein expression and leads to atrophy in the tibialis anterior muscle in rats. *American journal of physical medicine & rehabilitation* **90**, 930-939.
- Richardson CL, Delehanty LL, Bullock GC, Rival CM, Tung KS, Kimpel DL, Gardenghi S, Rivella S & Goldfarb AN (2013). Isocitrate ameliorates anemia by suppressing the erythroid iron restriction response. *The Journal of clinical investigation* **123**.
- Richter JD & Sonenberg N (2005). Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* **433**, 477-480.
- Rieu I, Magne H, Savary-Auzeloux I, Averous J, Bos C, Peyron M-A, Combaret L & Dardevet D (2009). Reduction of low grade inflammation restores blunting of postprandial muscle anabolism and limits sarcopenia in old rats. *The Journal of physiology* **587**, 5483-5492.

- Rohde T, MacLean DA, Richter EA, Kiens B & Pedersen BK (1997). Prolonged submaximal eccentric exercise is associated with increased levels of plasma IL-6. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **273**, E85-E91.
- Schaap LA, Pluijm SMF, Deeg DJH, Harris TB, Kritchevsky SB, Newman AB, Colbert LH, Pahor M, Rubin SM & Tylavsky FA (2009). Higher inflammatory marker levels in older persons: associations with 5-year change in muscle mass and muscle strength. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences* **64**, 1183-1189.
- Schaap LA, Pluijm SMF, Deeg DJH & Visser M (2006). Inflammatory markers and loss of muscle mass (sarcopenia) and strength. *The American journal of medicine* **119**, 526-e529.
- Schoenfeld BJ (2012). Does Exercise-Induced Muscle Damage Play a Role in Skeletal Muscle Hypertrophy? *The Journal of Strength & Conditioning Research* **26**.
- Shah OJ, Anthony JC, Kimball SR & Jefferson LS (2000). 4E-BP1 and S6K1: translational integration sites for nutritional and hormonal information in muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **279**, E715-E729.
- Shaikh S, Lee E-J, Ahmad K, Ahmad S-S, Lim J-H & Choi I (2021). A Comprehensive Review and Perspective on Natural Sources as Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitors for Management of Diabetes. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* **14**, 591.
- Soltow QA, Betters JL, Sellman JE, Lira VA, Long JH & Criswell DS (2006). Ibuprofen inhibits skeletal muscle hypertrophy in rats. *Med Sci Sports Exerc* **38**, 840-846.
- Stangl MK, Böcker W, Chubanov V, Ferrari U, Fischereeder M, Gudermann T, Hesse E, Meinke P, Reincke M, Reisch N, Saller MM, Seissler J, Schmidmaier R, Schoser B, Then C, Thorand B & Drey M (2019). Sarcopenia - Endocrinological and Neurological Aspects. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*

127, 8-22.

Steensberg A, Fischer CP, Keller C, Møller K & Pedersen BK (2003). IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **285**, E433-E437.

Steensberg A, Van Hall G, Osada T, Sacchetti M, Saltin B & Pedersen BK (2000). Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. *The Journal of physiology* **529**, 237-242.

Stefanovsky V, Langlois F, Gagnon-Kugler T, Rothblum LI & Moss T (2006). Growth factor signaling regulates elongation of RNA polymerase I transcription in mammals via UBF phosphorylation and r-chromatin remodeling. *Molecular cell* **21**, 629-639.

Steffen BT, Lees SJ & Booth FW (2008). Anti-TNF treatment reduces rat skeletal muscle wasting in monocrotaline-induced cardiac cachexia. *Journal of applied physiology* **105**, 1950-1958.

Stenholm S, Maggio M, Lauretani F, Bandinelli S, Ceda GP, Di Iorio A, Giallauria F, Guralnik JM & Ferrucci L (2010). Anabolic and catabolic biomarkers as predictors of muscle strength decline: the InCHIANTI study. *Rejuvenation research* **13**, 3-11.

Sumi K, Higashi S, Natsume M, Kawahata K & Nakazato K (2014). Temporal changes in ERK phosphorylation are harmonious with 4E-BP1, but not p70S6K, during clenbuterol-induced hypertrophy in the rat gastrocnemius. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* **39**, 902-910.

Theurl I, Aigner E, Theurl M, Nairz M, Seifert M, Schroll A, Sonnweber T, Eberwein L, Witcher DR & Murphy AT (2009). Regulation of iron homeostasis in anemia of chronic disease and iron deficiency anemia: diagnostic and therapeutic implications. *Blood* **113**, 5277-5286.

Trappe TA, Carroll CC, Dickinson JM, LeMoine JK, Haus JM, Sullivan BE, Lee JD, Jemiolo B,

- Weinheimer EM & Hollon CJ (2010). Influence of acetaminophen and ibuprofen on skeletal muscle adaptations to resistance exercise in older adults. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **300**, R655-R662.
- Trappe TA, Standley RA, Jemiolo B, Carroll CC & Trappe SW (2013). Prostaglandin and myokine involvement in the cyclooxygenase-inhibiting drug enhancement of skeletal muscle adaptations to resistance exercise in older adults. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **304**, R198-205.
- Tsutaki A, Ogasawara R, Kobayashi K, Lee K, Kouzaki K & Nakazato K (2013). Effect of intermittent low-frequency electrical stimulation on the rat gastrocnemius muscle. *BioMed research international* **2013**.
- Vogiatzis I, Stratakos G, Simoes DCM, Terzis G, Georgiadou O, Roussos C & Zakynthinos S (2007). Effects of rehabilitative exercise on peripheral muscle TNF α , IL-6, IGF-I and MyoD expression in patients with COPD. *Thorax* **62**, 950-956.
- Wall R, Ross RP, Fitzgerald GF & Stanton C (2010). Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutrition reviews* **68**, 280-289.
- Wang H, Lafdil F, Kong X & Gao B (2011). Signal transducer and activator of transcription 3 in liver diseases: a novel therapeutic target. *Int J Biol Sci* **7**, 536-550.
- Yamaguchi M, Takai S, Hosono A & Seki T (2014). Bovine milk-derived α -lactalbumin inhibits colon inflammation and carcinogenesis in azoxymethane and dextran sodium sulfate-treated mice. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **78**, 672-679.
- Yamaguchi M, Yoshida K & Uchida M (2009). Novel functions of bovine milk-derived α -lactalbumin: anti-nociceptive and anti-inflammatory activity caused by inhibiting cyclooxygenase-2 and phospholipase A2. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **32**, 366-371.

Yang Y, Breen L, Burd NA, Hector AJ, Churchward-Venne TA, Josse AR, Tarnopolsky MA & Phillips SM (2012). Resistance exercise enhances myofibrillar protein synthesis with graded intakes of whey protein in older men. *British Journal of Nutrition* **108**, 1780-1788.

Yang ZF, Ho DWY, Ngai P, Lau CK, Zhao Y, Poon RTP & Fan ST (2007). Antiinflammatory properties of IL-10 rescue small-for-size liver grafts. *Liver Transplantation* **13**, 558-565.

Zamir O, Hasselgren P-O, Higashiguchi T, Frederick JA & Fischer JE (1992). Tumour necrosis factor (TNF) and interleukin-1 (IL-1) induce muscle proteolysis through different mechanisms. *Mediators of inflammation* **1**, 247-250.

Zhang H, Jia R, Wang F, Qiu G, Qiao P, Xu X & Wu D (2018). Catalpol protects mice against Lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute liver injury through inhibiting inflammatory and oxidative response. *Oncotarget* **9**, 3887.

Zhang L, Rajan V, Lin E, Hu Z, Han HQ, Zhou X, Song Y, Min H, Wang X & Du J (2011). Pharmacological inhibition of myostatin suppresses systemic inflammation and muscle atrophy in mice with chronic kidney disease. *The FASEB Journal* **25**, 1653-1663.

讓 金 (2014). 新戦略による貧血治療. *中山書店*, 264-272.

滝波弘一 (2003). 食品の特性・特質. *日本農芸化学会誌* **77**, 560-562.

藤田聡 (2011). サルコペニア予防における運動と栄養摂取の役割. *基礎老化研究* **35**, 23-27.

謝辞

指導教員である日本体育大学大学院 体育科学研究科 健康科学・スポーツ医科学系 中里浩一教授には、所属企業である株式会社明治との共同研究として、当研究を立ち上げた当時から、現在に至るまで、10年以上にわたり、ご指導、ご鞭撻を賜り、この度、共同研究成果を学位論文としてまとめることが出来ました。運動生理学研究の初心者であった私に対して、基本的な知識や実験手法、研究の組み立てかた、結果の解釈、論文の作成に到るまで丁寧、かつ迅速な応答でご指導いただきました。様々な困難もありましたが、本日まで研究を続けてこられたのは先生のご協力があったからこそであると心より感謝申し上げます。

また、日本体育大学 岡本 孝信教授、須永 美歌子教授には、研究立ち上げ当時から、研究室や学会などの場で気さくに対応していただき、物怖じすることなく体育科学に関する研究者コミュニティに参画することができました。心から感謝申し上げます。

研究立ち上げ当時の日本体育大学 運動生理学研究室においては、当時学生であった、小林幸次さん、小笠原理紀さん、葛木新さん、Kihyuk Lee さん、鴻崎香里奈さんに快く受け入れていただき、共に実験をし、多くの知識や技術を学ばせて頂きました。2011年には日本体育大学内で東日本大震災に見舞われるなど、大変なこともありましたが、楽しく、充実した研究生を送らせていただいたこと、心より感謝いたします。

また、2020年度には研究生として再度、日本体育大学大学院 体育科学研究科 体育科学専攻に所属させていただき、田村優樹助教、小谷鷹哉助教、Jay Jung さんをはじめとする研究室の皆様とは、共同研究や、勉強会などを通じて、大変興味深い知見や貴重なご助言を頂きました。心より感謝いたします。

当研究の立ち上げを後押し頂いた株式会社明治 河端恵子部長、夏目みどり課長、研究の深耕を支援いただいた芦田欣也課長、共に実験をしてくれた東誠一郎さん、佐久田美慧さん、今野沙織さん、齊藤由梨さん、宗像衣代さんをはじめ、当研究を認め、支援いただいた職場の上司、同僚の皆様には、この場を借りて厚く御礼申し上げます。

そして、様々な不自由を被りながらも、研究推進のためと理解し、支援してくれた妻宏美と2人の息子、常に心の支えであった両親に感謝いたします。

当博士論文は、多くのご理解とご支援の下、まとめることが出来ました。この場では挙げられなかった関係者の皆様にも、心より感謝申し上げます。