

筋損傷モデルに対する大豆ペプチド摂取の効果： 免疫学的検討を中心に

増田研一^{*1}・戸村多郎²・松尾貴子²・内田靖之³

¹ 関西鍼灸短期大学整形外科 ² 関西鍼灸短期大学解剖学教室 ³ 関西鍼灸短期大学生理学教室

Effects of Soybean Peptide on the Damaged Muscle : Immunological Research

Ken-ichi MASUDA, Taroh TOMURA, Takako MATSUO and Yasuyuki UCHIDA

Kansai College of Oriental Medicine, Osaka 590-0482

ABSTRACT

We investigated effects of soybean peptide on the muscle damage in order to examine the immunological influence of soybean protein. Thirty-two Wistar male rats about 150 g weight were meal-fed in two groups, 16 rats each, 1) with a 20% casein, and 2) 20% soybean peptide as their protein source for two weeks. Each group of 16 rats was further divided into two, a) with no weight-bearing by the tail suspension method, and b) with exercise of treadmill until reaching all out. We especially focused on the damages of the skeletal muscle through b) the hard exercise from an immunological point of view. We compared those groups on parameters of the blood samples, and the histological specimens. Clear effects of soybean peptide were resulted from the lower value of creatine phosphokinase and IL-6, specifically in the no weight-bearing groups. In terms of histology, the type I fiber of the soleus muscle increased in the exercise group. *Soy Protein Research, Japan* 4, 83-86, 2001.

Key words : soybean, muscle, creatine phosphokinase, IL-6, histology

スポーツ現場において、プロテインやアミノ酸に代表されるサプリメント摂取はごく一般的に行われており、近年ではその目的（筋力増強やコンディショニングなど）に合わせて成分や吸収率、さらには摂取のタイミングなどが細かく設定される傾向にある。しかしそれらの具体的効果の検討はほとんどなされていない。一方、スポーツにおける筋損傷・筋障害の中で、運動中や運動直後には疼痛などの症状はないが、運動後

8～12時間経過してから明らかになり始め24～72時間後にピークとなり、5日～1週間程度で消失する^{1,2)}遷延性筋損傷の概念が注目されつつある。

この病態の原因はいまだ不明な点が多く、乳酸説、筋痙攣説、筋温上昇説、活性酸素説などが提唱されている³⁾が、近年物理的筋損傷に続発する免疫学的因子が注目されてきている⁴⁾。

今回小動物を使用して筋損傷モデルを作成し、特に免疫学的因子に着目して大豆ペプチド摂取の効果を検討した。

*〒590-0482 大阪府泉南郡熊取町若葉2-11-1

方 法

筋損傷モデルの作成

32匹の雄性Wistar系ラット(7週齢, 体重約150g)を対象として選択した。32匹を無作為に16匹ずつ2群に分け, 1匹ずつケージに入れて2週間飼育した。この2群の飼料のたん白質源としては, 各々20%のカゼインと20%の大豆ペプチド(ハイニュートDL, 不二製油製株式会社)を使用し, 摂取量は自由とした(Table 1)。水分摂取量も自由とした。

今回臨床の場で日常的に経験する筋損傷の原因から考慮して, 今回は2つのモデルを考えた。すなわち

2週間の非荷重負荷:骨折の牽引治療やギブス固定などで, 患部局所に荷重をかけない場合はよく経験される。一般に2週間を1サイクルとする例が多いが, 症例によっては著明な筋萎縮, さらには骨の萎縮をも認める。今回のラットに対しては, 指骨ピンを尾の基部に刺入して飼育ケージから牽引する手法を用いて下肢を完全に非荷重とした。これを2週間継続し, その後屠殺して後述する採血・組織採取を行った。

運動負荷:前述の遷延性筋損傷から考慮し, 2週間の飼育期間最終日にトレッドミル(運動速度15

m/min)を用いて, オールアウトに達するまで運動負荷を与えた。全例1時間以内にオールアウトに達した。その24時間後に後述する採血・組織採取を行った。

したがって32匹を, A群:カゼイン摂取の非荷重群8匹, B群:大豆ペプチド摂取の非荷重群8匹, C群:カゼイン摂取の運動負荷群8匹, D群:大豆ペプチド摂取の運動負荷群8匹に分けた。

比較項目

2週間における体重の変化率

膝窩リンパ節の湿重量(両側の合計)

血液学的指標:クレアチンホスホキナーゼ(CPK), IL-1, IL-6, TNF- α (いずれもRIA法による)。対照として, 同週齢の無処置ラット10匹の血液も同様に採取し, 比較検討した。

ひらめ筋, 腓腹筋の組織学的所見:ATPase染色を用いて, 筋線維のTypeを比較検討した。

上記の項目に関して, A/B群間, C/D群で差異, すなわちカゼイン摂取と大豆ペプチド摂取の効果の違いを比較検討した。

比較検討は中央値を境界とする χ^2 検定を使用し, 危険率5%未満で有意差ありと判断した。

結 果

2週間における体重の変化率

A群 34.4 ± 2.3 , B群 34.6 ± 3.4 , C群 62.4 ± 4.4 , D群 65.0 ± 3.2 (%)であり, A/B群間およびC/D群間, すなわちカゼイン摂取群と大豆ペプチド摂取群の間に有意な差異は見いだせなかった。

膝窩リンパ節の湿重量(両側の合計)

2週間飼育後屠殺時における両膝窩リンパ節の湿重量の合計は, A群 0.63 ± 0.08 , B群 0.57 ± 0.12 , C群 0.53 ± 0.09 , D群 0.56 ± 0.07 (g)であり, A/B群間およびC/D群間, すなわちカゼイン摂取群と大豆ペプチド摂取群の間に有意な差異は見いだせなかった。

Table 1. Composition of experimental diets

Ingredient	Control	Soybean peptide diet	
		%	
Casein	20.0	-	
Soybean peptide	-	20.0	
Corn oil	5.0	5.0	
Mineral mixture	3.5	3.5	
Vitamin mixture	1.0	1.0	
Choline bitartrate	0.2	0.2	
Cellulose powder	2.0	2.0	
α -Corn starch	68.3	68.3	

Table 2. Physiological effects of soybean peptide (mean \pm SD)

	No weight-bearing		Exercise		
	casein	soybean peptide	casein	soybean peptide	
Body weight (%)	34.4 ± 2.3	34.6 ± 3.4	62.4 ± 4.4	65.0 ± 3.2	
Lymph node weight (g)	0.63 ± 0.08	0.57 ± 0.12	0.53 ± 0.09	0.56 ± 0.07	
CPK (mU/mL)	35.3 ± 4.9	32.1 ± 3.1	68.9 ± 15.6	$46.3 \pm 4.5^*$	※ control : 19.0 ± 5.8
IL-1 (pg/mL)	36.7 ± 3.9	30.2 ± 3.7	18.5 ± 0.8	17.5 ± 1.2	※ control : less than 16.0
IL-6 (pg/mL)	79.6 ± 6.2	$20.5 \pm 2.4^*$	23.7 ± 0.8	$17.5 \pm 0.3^*$	※ control : less than 16.0
TNF- α (pg/mL)	11.8 ± 0.4	less than 10.0	less than 10.0	less than 10.0	※ control : less than 10.0

* $P < 0.05$.

血液学的指標 (Table 2)

CPK: A群 35.3 ± 4.9 , B群 32.1 ± 3.1 , C群 68.9 ± 15.6 , D群 46.3 ± 4.5 (mU/mL) であり, A/B群間には有意な差異は認められなかったが, C/D群間には有意な差を認めた ($P < 0.05$). なお対照群の値は 19.0 ± 5.8 mU/mL であった.

IL-1: A群 36.7 ± 3.9 , B群 30.2 ± 3.7 , C群 18.5 ± 0.8 (5例は 16.0 pg/mL 以下), D群 17.5 ± 1.2 (5例は 16.0 pg/mL 以下) (pg/mL) であり, A/B群間およびC/D群間, すなわちカゼイン摂取群と大豆ペプチド摂取群の間に有意な差異は見いだせなかった. なお対照群の値は全例 16.0 pg/mL 以下であった.

IL-6: A群 79.9 ± 6.2 , B群 20.5 ± 2.4 , C群 23.7 ± 0.8 , D群 17.5 ± 0.3 (4例は 16.0 pg/mL 以下) で

あり, A/B群間, C/D群間で有意 ($P < 0.05$) な差異を認めた. すなわち非荷重負荷および運動負荷両方の場合において, 大豆ペプチド摂取群の方がIL-6値の上昇が低く抑えられていた. なお対照群の値は全例 16.0 pg/mL 以下であった.

TNF- α : A群 11.8 ± 0.4 (6例は 10.0 pg/mL 以下), B群・C群・D群・対照群の値はいずれも全例 10.0 pg/mL 以下であった.

ひらめ筋, 腓腹筋の組織学的所見 (Figs. 1~4)

非荷重負荷群では両方の筋において線維径の減少とtype II線維の比率が増大していた. しかしカゼイン摂取群と大豆ペプチド摂取群との間に有意な差異はなかった (Figs. 1, 2).

運動負荷群では大豆ペプチド摂取群の方がtype I

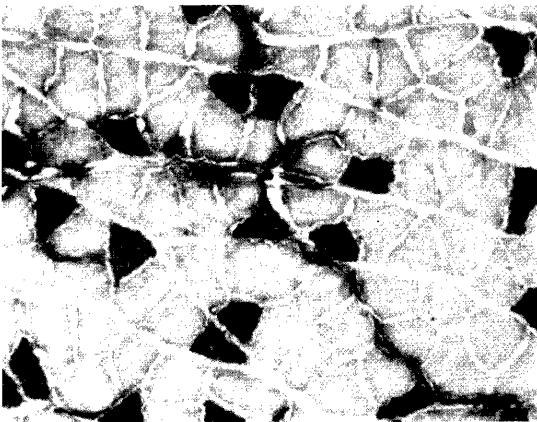


Fig. 1. Structure of soleus muscle in no weight-bearing group (casein diet). [$\times 300$, ATPase staining]

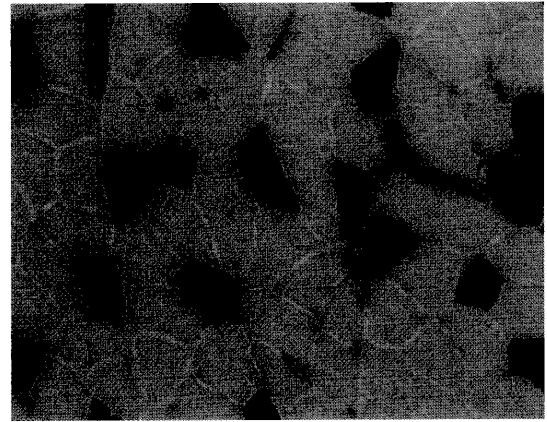


Fig. 2. Structure of soleus muscle in no weight-bearing group (soybean peptide diet). [$\times 300$, ATPase staining]



Fig. 3. Structure of soleus muscle in exercise group (casein diet). [$\times 300$, ATPase staining]

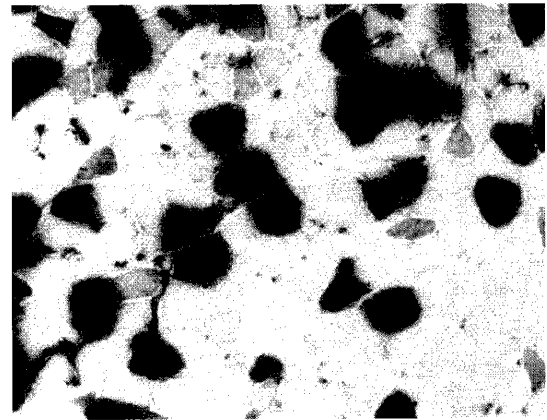


Fig. 4. Structure of soleus muscle in exercise group (soybean peptide diet). [$\times 300$, ATPase staining]

線維の比率が増大していた ($P<0.05$) (Figs. 3, 4).

考 察

整形外科領域, スポーツ医学領域において, 筋損傷は日常的に経験するものであるが, 特に遷延性筋損傷はそのメカニズムが確定されていない. 種々のサプリメントがこれらの対策として使用されているが, その作用メカニズムについての検討はほとんどなされていない. 初期の機械的・物理的筋損傷が筋細胞の壊死をもたらし, 引き続いて生じる炎症性サイトカイン (IL-1・6, TNF- α) の産生がプロスタグランジン産生やたん白質分解を引き起こし, 結果として筋細胞のアポトーシス, ひいては遷延性筋損傷の原因となる, という意見がある⁴⁾.

近年, 特に運動負荷と血中炎症性サイトカインの関係についての研究が報告されているが, IL-1は運動負荷後に上昇する傾向にあり, IL-6は有意に上昇する,

そしてTNF- α は検出不能という報告が多い^{5,6)}. 今回の検討でもおおむね同様の結果が得られた. カゼイン摂取群と大豆ペプチド摂取群の差異であるが, CPK (運動負荷) およびIL-6値の上昇の程度が後者の方が低く抑えられていると判断した. つまり, 吸収率の優れている大豆ペプチドが初期に生じるとされる物理的筋損傷の程度を比較的軽度で止めているのではないかと考えた.

ATPase染色を用いた組織学的検討では, 非荷重負荷群ではカゼイン摂取と大豆ペプチド摂取で特に大きい差は見いだせず, 運動負荷群でtype I線維の割合が増加していたことから, やはり筋組成の変化の点からは運動負荷が必要であり筋持久力が上昇した可能性を示唆したと考えた.

今後はヒト, 特にスポーツ選手を対象とし, より厳密に摂取量やタイミングも考慮に入れたプロトコルを考えるべきであると考えた. その検討がより適切なコンディション維持目的のサプリメント使用の基礎的知識につながると判断した.

要 約

大豆たん白質の免疫学的影響を調査する目的で, 筋損傷モデルに対する大豆ペプチド投与の効果进行调查した. 32匹の雄性ラット (体重約150g) を2週間, たん白質源として20%カゼインと大豆ペプチドを使用した2つの群に分けて飼育した. 16匹は尾部牽引法を用いた非荷重群とし, 残りはトレッドミルを用いてオールアウトに至る運動群とした. 今回の調査では, 特に免疫学的観点から前記の負荷による骨格筋の損傷を検討した. 即ち, 両群における血液生化学的パラメーターと筋組織を比較した. 大豆ペプチドによる効果の比較的明白な所見としては, 特に非荷重群におけるCPKとIL-6の低値があげられた. そして組織学的所見としてはひらめ筋のtype I線維の割合の増加が見いだされた.

文 献

- 1) Cleak MJ(1992): Delayed onset muscle soreness: mechanisms and management. *J Sports Sci*, **10**, 325-341.
- 2) Miles MP(1994): Exercise-induced muscle pain, soreness, and cramps. *J Sports Med Physical Fitness*, **34**, 203-216.
- 3) 野坂和則(2000): 遅発性筋痛. 臨床スポーツ医学, **17**, 655-663.
- 4) 山崎 元 監訳 (1998): 運動と免疫 ナップ, 東京, pp. 65-81.
- 5) Ullum H, Haahr PM and Diamant M(1994): Bicycle exercise enhances plasma IL-6 but does not change IL-1 α , IL-1 β , IL-6 or TNF- α pre-mRNA in BMNC. *J Appl Physiol*, **77**, 93-97.
- 6) Sprenger H, Jacobs C and Nain M(1992): Enhanced release of cytokines, interleukin-2 receptors, and neopterin after long-distance running. *Clin Immunol Immunopathol*, **63**, 188-195.