

持久運動能力の測定装置開発とその食品栄養学的制御

石原 健吾（相山女学園大学生生活科学部）

1. はじめに

食品成分は持久運動能力に影響を及ぼすことが知られているが、それを定量的に評価することは必ずしも容易ではない。持久運動は、全身運動であるため、骨格筋や心臓、肺などの培養細胞系を用いた食品作用の評価系は必要ではあるものの、*in vivo* での統合的な作用を解析する評価系の必要性は薄れない。理想的には、全ての食品成分をヒトを用いた二重盲検試験に供することが出来ればよいが、被験者の確保に多くの困難がある。従って、食品成分の持久運動能力増強作用を評価する際には、抗肥満作用や抗がん作用の評価と同様に、実験動物を利用したスクリーニング系が必要である。また、スクリーニングを主たる目的とする場合には、ラットよりもマウスを用いた評価形を構築することが望ましい。

従来、実験動物に定量的に運動を負荷する際には、トレッドミルと呼ばれる走行運動装置が用いられてきた。一般的なトレッドミルは、幅広いベルトの上をレーンで区切り、同時に 10 匹の動物に運動を負荷する装置である。トレッドミルの構造上、10 匹の動物が同時に運動を開始する必要があるため（普通は、徐々に速度を上げて走らせる。動いているベルトコンベアーに飛び乗って走り始めるのは大変だ！）、全ての動物に同じ時間の運動を負荷し、かつ経時的に動物から採血、あるいは屠殺することは難しい。非侵襲的に持久運動能力を評価することが出来れば、これらの問題点は解決する。しかし少なくとも、トレッドミルを用いて疲労困憊まで運動させることには、多くの問題点があり望ましいアプローチではなかった。

そこで、食品成分の持久運動能力増強作用をスクリーニング的に評価する目的に特化した実験系を構築することを試みた。実験系の構築において、優先した課題は、マウスを用いて、持久運動能力を非侵襲的に定量出来ることであった。さらに、装置で複数の動物を運動させる場合には、一定時間の間隔をおいて順番に運動を開始できることを第 2 の優先事項とした。

非侵襲的にパフォーマンスを測定するためには、限界までの運動能力を測定する手法が一般的であるが、動物を用いて限界まで走行運動を行うように *motivate* することは容易ではない。そこで、水流を用いた強制水泳系を構築した。

2. マウス用流水プールの構築と実験条件の整備

アクリル製の水槽（長さ 90cm 幅および高さ 45cm）に 38cm の深さまで 34℃のお湯を満たし、ポンプを接続して水槽内の水を循環させ、水槽表面に流れを発生させた。ポンプの流量をバルブの開閉によって制御することで表面流速を調節できることがわかった。流れの中にマウスをつけると、上流に向かって遊泳することから、実験に先立つ遊泳練習が殆ど不要である点は、トレッドミルと比した利点であると思われた。また、水槽の後方では流速の若干の低下が認められたが、この淀み区間があるために、複数の動物を運動させる場合でも、一定時間の間隔をおいて順番に運動を開始することも流水プールの利点である。

遊泳を続け、疲労困憊に至ったマウスは水槽後部で水没するので、観察者が一定の基準に基づいてマウスの疲労を判断して遊泳を中止させ、遊泳時間を非侵襲的な持久運動能力の指標とした。未知試料のアッセイに先立ち、疲労までの遊泳時間を、持久運動能力の指標としてよいか確認するために複数の試験を行った。

持久運動能力に影響を与える因子は、2つに大別される。すなわち、酸素運搬能、糖質の貯蔵量（＝脂質代謝の亢進）である。これらの2つの要素に関して、モデルとなる栄養状態を作成し、疲労までの遊泳時間の変化が有意なレベルで検出できるか、試みた。これらに加えて、長期的な持久運動トレーニングが既知の生理的応答を引き起こしているか確認した。

鉄欠乏食によって貧血状態を引き起こした後、鉄を賦与して貧血を回復させ、実験期間中の遊泳時間が血液中のヘモグロビン濃度の増減に対応していることを確認した。また、低糖質食によって、筋肉、肝臓中のグリコーゲン濃度を減少させ、その後、高糖質食を摂取させて、遊泳時間がグリコーゲン濃度に対応していることを確認した。また数週間の遊泳トレーニングによって、後肢筋肉のクエン酸シンターゼ活性の上昇、グリコーゲン濃度の上昇が起きていることを確認した。

開発した流水プールで測定した遊泳時間が、既知の栄養条件によって予想された変化を示したため、未知試料の評価を始めた。メカニズムが推定できるが、持久運動能力に対する影響は未知であるものや、全く持久運動能力に対する作用が不明な食品をスクリーニングしたが、効果が観察されたのは、以下の食品である。

- ・糖質の補給に対する効果・・・CCD（サイクリッククラスターデキストリン）
- ・脂質代謝の亢進による効果・・・カプサイシン、その類縁体、ガルシニアエキス
- ・メカニズムの詳細が不明であるもの・・・生薬 31 種配合製剤ナンパオ

3. 呼気ガス分析装置の導入

開発した流水プールは、食品成分の評価に有用であったが、いくつか課題があった。その一つが流水プールでの運動強度を他の運動実験系と比較することが困難であったことだ。ヒトを用いた試験において生理的な運動強度は、酸素消費量で表されることが多いために、流水プールで得られた実験結果をヒトに外挿するためには酸素摂取量から流水プールでの運動強度を推定することが必須であると考えられた。

アルコシステム社製の質量分析機を用いた酸素摂取量測定装置を導入した。本装置はヒトおよびラット用に開発されたものであったが、マウス用としての納入実績はなかった。マウスの呼気ガスは、僅少（呼吸による大気中酸素、二酸化炭素濃度の変化は0.5%以下）であるので、まず、マウスの酸素摂取量を正確に測定するためにマウス用呼気ガスチャンバーのデザインなどのハード面、測定条件などソフト面での最適化を行った。

最適化によってマウスの呼気ガスを採取、分析できることを証明するために、酸素摂取量がマウスの心拍数に比例していることを確認した。マウスの腹腔内に心拍テレメトリーセンサー（Data Science International社）を施術し、センサーから発信されるAM波の受信ボード上に呼気ガスチャンバーまたはトレッドミル（コロンバス社）を設置して、心拍数と酸素摂取量を同時測定した。36時間にわたる安静状態ならびに22分間の運動時のいずれにおいても、心拍数と酸素摂取量は、直線的な対応関係を示した。

最適化した呼気ガス分析装置を用いて、流水プールでの運動中の酸素摂取量を測定した。流水を妨げないようなチャンバーを設計して水面に被せ、遊泳中の酸素摂取量を測定した。ポンプの流量毎分5、7Lの運動強度はそれぞれ66.7、85.8%Vo₂ max に相当することが推定された。

4. 呼気ガス分析装置の複数ライン化

その頃、細田公則先生（京都大学医学部）から、骨格筋でUCP3を過剰発現させたトランスジェニックマウスの基礎代謝量を測定して欲しいという共同研究の依頼を頂いた。当時、呼気ガス分析装置は同時に一ライン（一匹）の測定しか出来なかったため、野生型3匹とトランスジェニック3匹の測定を終えるのに6日間が必要であったが、UCP3のoverexpressionによって安静時の酸素消費量が増加する傾向を観察することが出来た。有意な差を得るためには、より多くの匹数をこなす必要があり、測定装置の複数ライン化が必要であった。また、前述のように、マウスの呼吸による酸素濃度の変化は僅少であるため、測定中の測定装置の感度のドリフトも測定値に無視できない影響を与えること

も懸念されたので、装置の複数ライン化に取り組んだ。

装置メーカーと協力して、6ライン用のライン切り替え装置を作成したが、当初納品された装置は、同じマウスを測定してもラインによって測定値が異なるものであった。その原因が、各ラインに設置されたガス流量計の精度にあることを明らかにし、切り替え装置内でのガス流路の設計を見直すことによって、感度ドリフトの少ない差圧積分型流量計をガス流路の共通部分に一つ設けた。その結果、測定ラインによって酸素摂取量の測定値が異なることもなくなった。

最終的に呼気ガス分析装置を12ライン化することによって、呼気ガス分析装置の感度ドリフトに関係なく、同時に12匹のマウスの呼気ガス分析を行うことが出来るようになった。その結果、安定同位体 ^{13}C で標識した化合物をマウスに摂取させ、呼気中に排出された $^{13}\text{CO}_2$ 濃度の微妙な変化から栄養素の代謝速度を測定することが可能になった。マウスに最適化および複数ライン化した呼気ガス分析装置によって、以下の点を明らかにした。

- ・ UCP3のトランスジェニックマウスにおいて酸素摂取量が亢進していること。
- ・ 流水プールで遊泳時間の延長が確認されたガルシニアエキスの効果は、脂質代謝の亢進によるものであること。
- ・ 2型糖尿病モデルマウスに分離大豆タンパク質ならびに大豆タンパク質組成のアミノ酸混合物を摂取させると、飼料中の ^{13}C グルコースの酸化量が亢進し、 ^{13}C トリオレインの酸化量が減少すること、すなわち大豆タンパク質の摂取によって2型糖尿病モデルマウスの糖質利用能が回復したこと。

5. 流水プールの改良および複数ライン化

以前に開発した流水プールは、流水面で同時に6匹のマウスを遊泳させるものであった。マウス間での接触、干渉が遊泳時間に与える影響を排除するために、プールの複数ライン化に取り組んだ。水流の吹き出し口を新たに設計し、ポンプから送られた水を逆L字型のタンクに一旦プールして水面に噴出する構造とした。その結果、表面流速の安定性、調節性が著しく改善され、遊泳運動中に漸増的に流量を変化させることが可能になった。漸増的な運動負荷方法は、自転車エルゴメーターやトレッドミルを用いた運動において一般的に行われており、ようやく流水遊泳においても可能となった。これらの改善によって、流水プール運動系に於いて、疲労の判定が客観的になると共に、遊泳時間の再現性の上昇、個体差の減少が認められた。

これらの改良は、実験時間の短縮、実験者の負担の軽減、実験に必要なコストの削減、使用する実験動物数の減少に寄与するだけでなく、新たな食品素材の機能評価につながることを期待している。