

〔資 料〕

閉経後女性の体脂肪蓄積, 筋肉量および骨密度低下の抑制を 目的とした食事条件を提案するための基礎研究

—自発運動可能な卵巣摘除メスラットの下肢骨格筋重量, 大腿骨骨密度および
走行運動レベルに対する食餌アミノ酸添加の影響—

青山美穂・佐竹祐美・鈴木理菜・竹村沙也夏・舘野愛彩美
知工 栞・西貝優里・沼上友梨・森岡春希・海老沢秀道

Basic Study to Review Whether Dietary Modifications for the Repression
of the Body-fat Accumulation, Muscle-mass Loss and Bone Mineral
Density (BMD) Loss in Postmenopausal Women:
Effects of Dietary Amino Acid Supplements to the Diet on Muscle-mass,
Femoral Bone Mineral Density and Running Activity of the
Ovariectomized Adult Rats under Food-restriction

Miho AOYAMA, Yumi SATAKE, Rina SUZUKI, Sayaka TAKEMURA,
Asami TATENNO, Shiori CHIKU, Yuri NISHIGAI, Yuri NUMAGAMI,
Haruki MORIOKA and Hidemichi EBISAWA

The present study aims to review whether dietary modifications will prevent body fat accumulation, muscle mass wasting and bone mineral density loss in postmenopausal women who incorporate physical exercise into daily life.

9-week-old ovariectomized Wistar strain female rats were divided into four groups: CA-Ex, Gln-Ex, Leu-Ex and CitD-Ex. Depending on which group they were in, the rats were given a 20% casein protein based experimental diet supplemented with nothing (control diet, CA-Ex); 5% of L-glutamine (Gln-Ex); 5% of L-leucine (Leu-Ex); or 2.5% of L-citrulline+2.5% of D-serine (CitD-Ex), each 11 g per day for 10 weeks. All of these rats were housed in individual cage with a running wheel for 10 weeks. A sham operation was carried out on another group of rats (Sham) and were given the same diet as CA-Ex, the control diet.

Results were as follows:

- 1) Uterus weights of the ovariectomized rats, that is group CA-Ex, Gln-Ex, Leu-Ex and CitD-Ex, appeared to show lower values than that of the group Sham.
- 2) No significant differences were observed in a) changes in body weight, b) blood analyses, c) liver, kidney, uterus and muscle weights, and d) femoral-bone mineral density in groups Gln-Ex, Leu-Ex, and CitD-Ex as compared to the group CA-Ex.
- 3) Relatively higher running activity was observed in group CitD-Ex than that of group CA-Ex. This observation suggests that increasing dietary L-citrulline plus D-serine in postmenopausal rats may lead to an increase in physical activity.

Further research is needed to understand the physiological and nutritional significance of the unexpected results that dietary amino acid may accelerate the physical activity.

Key words: L-citrulline (L-シトルリン), D-serine (D-セリン), running activity (走行運動), ovariectomized rat (卵巣摘除ラット)

目 的

本研究は、閉経後女性の筋・骨格系の量的な低下を抑止するための食事条件を提案することを主な目的とした基礎研究である。

閉経後、女性は体脂肪率の増加、筋肉量の低下および骨密度の低下が認められる⁽¹⁾。このような運動器の量的な減少は、サルコペニアおよび転倒リスクを高め、結果として高齢期 QOL 低下の要因となる。閉経にともなう筋肉量低下あるいは筋力低下に対する運動あるいはホルモン置換療法の有効性が知られている^(2,3)。しかし、閉経後女性の運動器に対する食事アミノ酸の有効性評価は、ほとんどおこなわれていない。

アミノ酸と骨代謝あるいは骨格筋タンパク質代謝との関係を研究したいくつかの報告は、グルタミンおよび D-セリンが骨格維持機構に関わっている可能性⁽⁴⁾、ロイシンとシトルリンが mTOR シグナルを介した骨格筋タンパク質合成促進に関わっていることを示唆している⁽⁵⁾。シトルリンはまた経口投与によって骨格筋タンパク質合成が促進する可能性が、ヒトで示されている⁽⁶⁾。

以上のことから本研究は、閉経後女性の骨格筋量低下および骨密度低下の抑制が可能な食事条件を提案するための基礎研究として、走行運動が可能な条件で飼育されている閉経後モデルラットに L-グルタミン、L-ロイシン、L-シトルリン+D-セリンを添加した食餌を与え、下肢筋肉重量および大腿骨骨密度が増加するか否かを明らかにすることを目的とした。

実験方法

実験動物

実験動物は9週齢の Wistar 系メスラット（三共ラボラトリーズ）を用いた。ラットは、1群6匹として5群に分け、それぞれ CA-Ex 群、Gln-Ex 群、Leu-Ex 群、CitD-Ex 群および Sham 群とした。

閉経後モデルの作成

上記5群の内 Sham 群以外のラットにソムノペ

ンチル麻酔下で卵巣摘出手術（OVX）を施し、閉経後モデルラットを作成した。術後1週間、市販固形食（CRF-1）を自由に与えて回復させ、実験に用いた。Sham 群には偽手術を施し、同様に回復させた。

食餌条件および飼育条件

ラットには AIN86 を基本とした Table 1 の実験食のいずれかを10週間投与した。実験食は、20% カゼインタンパク質を基礎食（20 CA, コントロール食条件）とした。CA-Ex 群と Sham 群には 20 CA を、Gln-Ex 群には 20 CA に 5% グルタミンを添加した飼料、Leu-Ex 群には 20 CA に 5% ロイシンを添加した飼料、CitD-Ex 群には 20 CA に 2.5% シトルリンと 2.5% D-セリンを同時に添加した飼料をそれぞれ投与した。CitD-Ex 群のこの食餌条件は、シトルリンによる骨格筋タンパク質代謝調節と D-セリンによる骨代謝調節の相加効果を意図したものである。飼料投与量は、体脂肪増加の抑制および索餌行動の誘導を目的として、1日 11 g の制限食条件とした。実験食は粉末重量の二分の一の水を加えて捏ね、団子状としたものを 16 時から 17 時の間に投与した。水は水道水を自由に与えた。ラットは個別飼育した。

本研究におけるアミノ酸添加量は、予備実験をおこない、成長曲線および臓器重量に明らかな影響を及ぼさずまた残食を生じない最大量として設定した。CitD-Ex 群におけるアミノ酸添加量は、両アミノ酸の合計量を他の実験食におけるアミノ酸量とそろえるため、添加量をそれぞれ 2.5% とした。

運動条件

CA-Ex, Gln-Ex, Leu-Ex, CitD-Ex 群のラットは、自発走行運動が可能な回転カゴ付きケージ（回転カゴ周囲長 1 メートル、バイオリサーチ社製）で飼育した。走行運動可能条件で飼育した理由は、ラットの筋・骨代謝が運動により活性化されることを期待したためである。ラットはこの飼育ケージ内で自由に走行運動が可能である。走行運動は実験食投与開始後 3 週間目から開始した。この理由は、卵巣摘除手術後の体重減少が治まるのを待ったためである。

Table 1. Compositions of experimental diet

	CA-Ex	Gln-Ex	Leu-Ex	CitD-Ex
L-Glutamine	0	50	0	0
L-Leucine	0	0	50	0
L-Citrulline	0	0	0	25
D-Serine	0	0	0	25
Casein ^{*1}	220	220	220	220
α -Corn starch [*]	406.7	373.3	373.3	373.3
Sucrose	203.3	186.7	186.7	186.7
Cellulose powder [*]	50	50	50	50
Mineral mix. ^{*2}	50	50	50	50
Vitamin mix. ^{*3}	20	20	20	20
Corn oil	50	50	50	50
Total amount	1000	1000	1000	1000

* : Obtained from Oriental Yeast, Co. LTD.

¹ : Protein contents 85%. ² : AIN93M. ³ : AIN93.

運動は、連続した2日間ないし3日間の走行運動可能期間と5日間ないし4日間の非運動期間を1サイクルとして、実験食期間の第3週から第10週までの7週の間におこなった。

運動は、回転カゴ付きケージ6台を用いて行い、全ラットの運動量測定に2週を要した。

回転カゴは1周1メートル長のホイールを備え、回転数を1分間毎に記録することができるものであった。本研究では、1回転を1メートルの走行距離として評価した。結果は、走行運動を開始した実験食期の第3週～第4週（走行運動開始時）および実験食期間終了週の第11週～第12週のそれぞれ48時間の走行距離を60分間毎の走行距離としてまとめた。

屠殺条件

実験食期末にラットをソムノペンチル麻酔下に腹部大静脈から採血・屠殺した。その後、血清を得た。子宮およびそのほかの臓器を摘出し、臓器重量を測定した。左大腿骨を摘出し、X線CT (Latheta 200型)を用いて骨構造解析をおこなった。また代表的な下肢骨格筋である腓腹筋を摘出し、重量を測定した。

なお本研究は、昭和女子大学実験動物委員会の審査を経て実施された。許可番号：18-02。

統計処理

数値は平均値±標準偏差として記載した。

CA-Ex群(コントロール条件)とGln-Ex群, Leu-Ex群あるいはCitD-Ex群との間の有意差は、一元配置分散分析後Williamsの多重比較検定をおこない、 $p < 0.05$ を有意差ありと評価した。

実験結果と考察

飼料摂取量と体重変化

すべてのラットは、与えられた飼料をすべて摂取した。体重変化の結果をFigure 1に示した。CA-Ex, Gln-Ex, Leu-Ex, CitD-Ex群の体重は卵巣摘除ラット手術および制限食条件のため実験食期間の3週目まで減少し、その後増加に転じた。Sham群の体重も同様であった。実験食期間を通して、コントロール条件のCA-Ex群の体重に比べて、Gln-Ex, Leu-Ex, CitD-Ex群の体重はいずれも有意な相違を示さなかった。すなわち、本研究で用いた食餌へのアミノ酸添加条件は、ラットの成長を阻害するなどの過剰摂取状況をもたらさなかった。

臓器重量

臓器重量の結果をTable 2に示した。

卵巣摘除によって子宮は萎縮する。Sham群の子宮重量は 2.04 ± 0.28 g/kg BWであった。そこで、

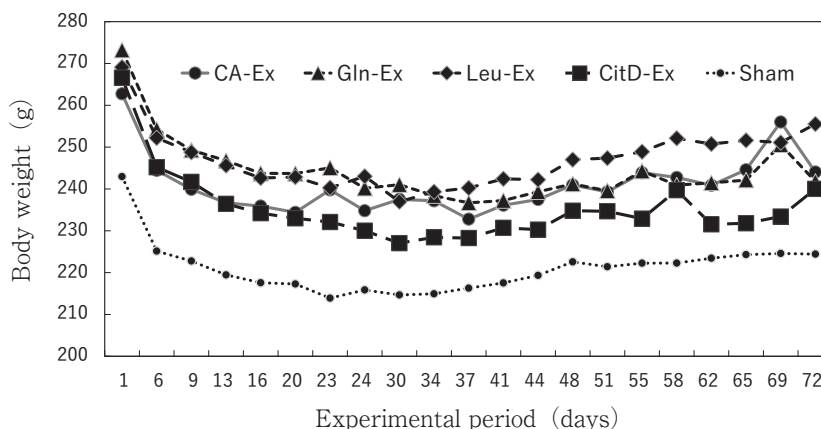


Figure 1. Changes in body weight

Table 2. Body weight and organ weight

Group	n	Body weight		Organ weight		
		Initial	Final	Liver	Kidney	Uterus
		g			g/kg BW	
CA-Ex	6	262.8±16.4	244.1±4.9	29.5±3.3	3.76±0.31	0.52±0.20
Gln-Ex	4	273.2±6.1	241.8±15.9	28.0±1.6	3.74±0.35	0.45±0.06
Leu-Ex	5	269.1±14.7	255.5±11.7	25.1±2.3*	3.97±0.34	0.52±0.18
CitD-Ex	5	266.6±12.0	240.0±6.8	26.8±3.7	4.20±0.23*	0.49±0.17
Sham	5	243.0±11.5	224.6±9.8	30.9±2.2	3.56±0.25	2.04±0.28

Right kidneys were weighed. *: Significantly different from group CA-Ex.

Table 3. Biochemical blood analysis values

Group	n	Albumin	AST	ALT	BUN
		g/100 ml	Karmen	Karmen	mgN/100 ml
CA-Ex	6	3.04±0.20	68.1±22.9	8.4±1.2	16.0±2.9
Gln-Ex	4	2.84±0.13	85.5±18.6	8.6±2.4	13.0±2.2
Leu-Ex	5	3.12±0.06	72.9±3.5	11.4±7.0	12.6±1.7
CitD-Ex	5	2.88±0.18	93.2±31.3	10.8±3.1	12.9±1.7
Sham	5	3.01±0.16	73.1±8.3	12.4±3.0	12.4±3.5

*No significant difference was observed between group CA-Ex and other groups.

CA-Ex 群, Gln-Ex 群, Leu-Ex 群および CitD-Ex 群において, 子宮重量が Sham 群のそのの 1/2 (1.0 g/kg BW) 以上を示したラットは卵巣摘除できていないと判定し, すべての測定結果を採用しなかった。その結果各群の例数は, CA-Ex 群 6 匹, Gln-Ex 群 4 匹, Leu-Ex 群 5 匹, CitD-Ex 群 5 匹となった。

肝臓重量は CA-Ex 群に比べて Leu-Ex 群はやや低い値を示した。一方 CitD-Ex 群の腎重量は CA-Ex 群に比べてやや高い値を示した。

血液生化学検査値

血液分析の結果を Table 3 に示した。総タンパク質およびアルブミン濃度, ALT, BUN はいずれも正常範囲内の値を示し, CA-Ex 群と Gln-Ex 群, Leu-Ex 群あるいは CitD-Ex 群との間に有意差は見られなかった。一方, AST は, すべての実験食群でやや高い値を示した。本研究でこのような高値になった原因は不明であるが, コントロール食条件の CA-Ex との間に有意差は認められず, また正常条件である Sham 群とも大差ない値であった。以上

Table 4. Effects on muscle weight and femoral-BMD of dietary amino acid supplementation in OVX rats with voluntary running exercise

Group	Gastrocnemius m.		n	Total-BMD	Cortical-BMD	Cancellous-BMD
	n	g/kg BW				
CA-Ex	6	6.41±0.35	4	492±26	999±36	367±13
Gln-Ex	4	6.49±0.34	4	474±22	1008±22	342±19
Leu-Ex	5	6.76±0.36	3	484±33	1003±11	356±48
CitD-Ex	5	6.32±0.31	4	523±37	1038±43	386±58
Sham	5	6.00±0.45	5	595±30	1030±21	489±40

BMD: Bone mineral density.

Gastrocnemius muscle and femoral-BMD of left leg were measured.

Femoral-BMD in distal area was measured by X-ray CT.

No significant differences were observed between group CA-Ex and other experimental groups in muscle weights and femoral-BMD.

から、血清 ALT の結果は本研究で用いたラットの肝臓あるいは他の臓器で炎症が起きていることを示すものではないと思われる。Table 3 に示した項目以外に血糖値、カルシウム濃度、クレアチン濃度を測定したが、Sham 群を含めすべての群で正常範囲の値を示し、また CA-Ex 群と他の実験食群との間に有意な相違は観察されなかった。

以上の血液生化学検査値の結果から、本研究で用いた食餌へのアミノ酸添加条件は、ラットのタンパク質栄養状態低下および肝臓機能障害をもたらさなかった。

このように体重変化、摂食量、血液生化学検査値および臓器重量の結果から評価すると、本研究条件における走行運動が可能な飼育環境およびアミノ酸添加条件は、閉経後モデルラットに異常所見をもたらさなかったものと結論された。

下肢骨格筋重量と大腿骨骨密度

走行運動可能条件における食餌アミノ酸添加が下肢骨格筋および骨密度に及ぼす影響を観察するために腓腹筋重量および大腿骨骨密度を測定し、その結果を Table 4 に示した。CitD-Ex 群の食餌条件は、シトルリンによる骨格筋タンパク質代謝調節と D-セリンによる骨代謝調節の相加効果を意図したものであった。

CA-Ex 群の腓腹筋重量は Gln-Ex 群、Leu-Ex 群

あるいは CitD-Ex 群との間に有意な相違を示さず、本実験条件での食餌へのアミノ酸添加は、閉経後の下肢骨格筋重量に影響しない結果となった。分岐鎖アミノ酸特にロイシンは mTOR を介したシグナル伝達経路を促進して筋タンパク質合成を高めることが明らかにされているが⁽⁷⁾、本研究では腓腹筋重量の増加は確認できなかった。本研究では食餌投与量を 11 g/日に制限した。この食餌制限条件は、体重変化から明らかのように、体重維持には充分であるがロイシンによる筋タンパク質合成促進を可能とするためのエネルギー量としては充分ではなかったのかもしれない。タンパク質代謝が摂取エネルギーレベルの影響を受けるのは周知のことである。13 g 程度の軽度食餌制限条件での再実験が必要と思われる。

なお、コントロール条件同様の食餌を投与し、回転カゴによる走行運動をおこなわせなかったラットの下肢骨格筋重量および大腿骨骨密度を測定したが、得られた結果は CA-Ex 群の値との間に有意差は見られなかった（データ示さず）。

X 線 CT による大腿骨骨構造解析の結果、CA-Ex 群の全骨密度および海綿骨骨密度は、走行運動可能環境であったにもかかわらず Sham に比べて明らかに低い値を示した。このように走行運動可能環境下においても、卵巣摘除はラット大腿骨骨密度を低下した。一方、Gln-Ex 群、Leu-Ex 群あるいは CitD-Ex 群の全体骨骨密度、皮質骨骨密度

および海綿骨骨密度はいずれも CA-Ex 群のこれらの値と大差ない値を示し、本研究で用いたアミノ酸添加条件は卵巣摘除ラットによる大腿骨骨密度の低下を抑制しなかった。またこのほかに、測定結果を示していないが大腿骨の骨強度を評価するために大腿骨破断強度と柔軟性も測定したが、アミノ酸添加による利的効果は観察されなかった。

以上のことから、本実験条件での食餌へのロイシン、グルタミン、シトルリン+D-セリン添加は、閉経後の下肢骨筋重量増加および大腿骨の量的および質的改善に、利的効果を示さなかった。この理由は不明だが、食餌制限条件で実施したため食餌に添加したアミノ酸がエネルギー源として消費され、筋・骨代謝調節因子としての作用が低下したことが想定される。エネルギー量をもう少し高めた食餌をより長期に投与する条件での研究が必要である。

走行運動量

実験食期第3週～第4週の走行運動量を「運動開始時」、第11週～第12週の結果を「実験終了時の結果」としてまとめ、それぞれの平均値を Figure 2-A および Figure 2-B として示した。

運動開始時の60分間毎の走行運動量は、ラットを回転カゴに移し替えた時刻の16時付近に高値を示し、それ以外の時刻には明らかな運動は観察されなかった。一方実験終了時における運動量は、ラットを回転カゴに移し替えた時刻に高値を示しただけでなく、第1日目の7～8時および第2日目の18時～7時以外の時間帯で高い運動量を示していた。すなわち、実験終了時に走行運動量が増加していることが想定された。

そこで、この48時間の総走行距離を計算し、その平均値を Figure 3 に示した。その結果、運動開

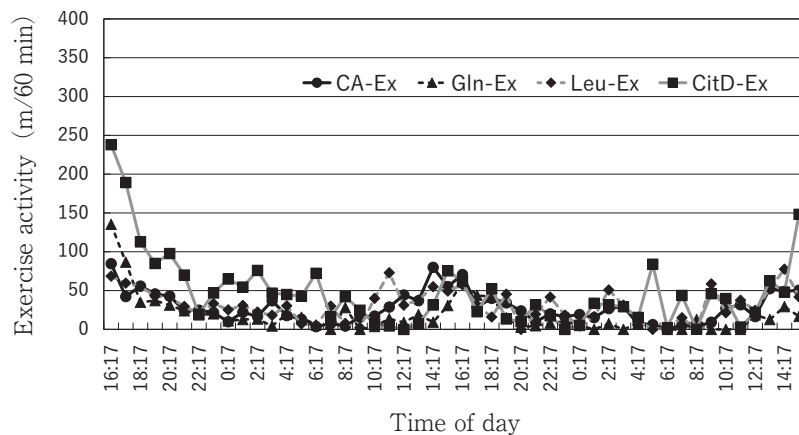


Figure 2-A. Exercise activity at start phase

Values expressed are distances run every 60 min.

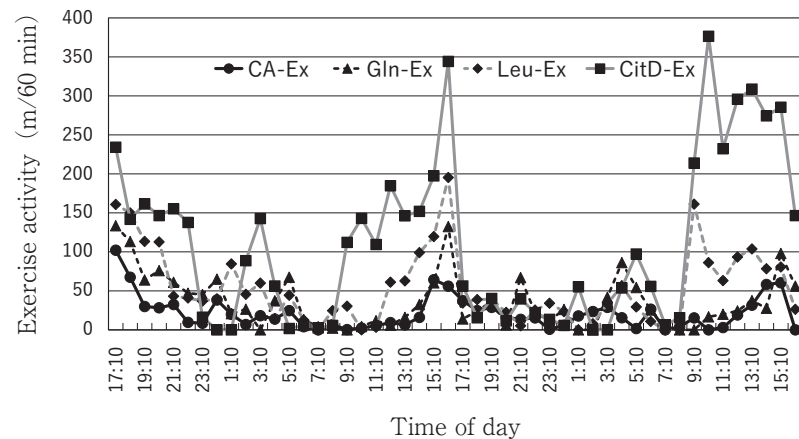


Figure 2-B. Exercise activity at terminal phase

Values expressed are distances run every 60 min.

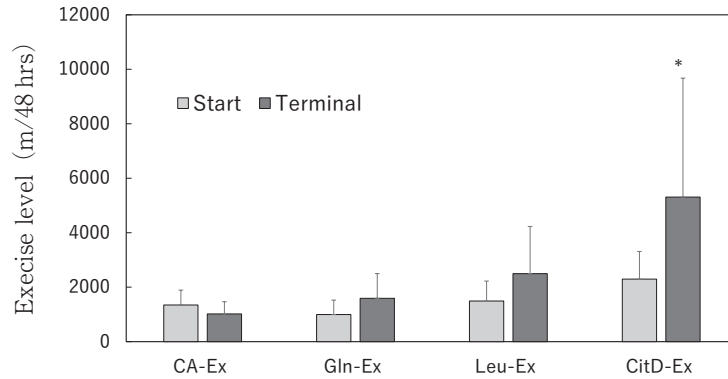


Figure 3. Running exercise levels

The height of filled and hatched column indicates running distances at start and end of experimental periods, respectively.

*: Significantly different from group CA-Ex, at $p < 0.05$.

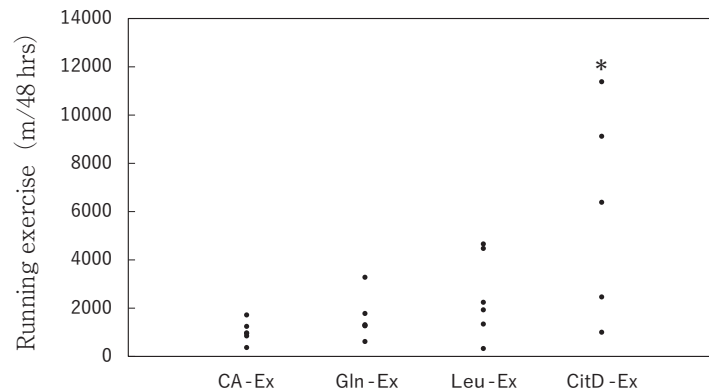


Figure 4. Running exercise levels in individual rat at terminal of experimental period

Mean values in groups CA-Ex, Gln-Ex, Leu-Ex and CitD-Ex were 1019 ± 446 , 1591 ± 907 , 2497 ± 1732 and 6071 ± 4368 , respectively.

*: Significantly different from the group CA-Ex, at $p < 0.05$.

始時の走行運動量はすべての群で 1500~3000 m 程度で、また CA-Ex 群と他の実験群との間に有意差は見られなかった。一方実験終了時における運動量は運動開始時におけるそれよりもやや高値を示す傾向にあり、実験終了時における CA-Ex 群の走行運動量に比べて CitD-Ex 群のそれは有意な高値を示した。Figure 4 に実験終了時の走行運動量をラット個別に示した。CitD-Ex 群の走行運動量は、他の群に比べて大きなバラツキを示し、食餌シトルリンあるいは D-セリンに対する反応性に個体差が存在することが想定された。

本研究条件において観察された走行運動量と食餌アミノ酸添加との関係性は、偶然得られた結果かもしれないが、閉経後の運動を促進することが可能な

アミノ酸の存在を示すものかもしれない。確認実験をおこなうとともに作用機序解明を目指した研究が必要である。

要 約

本研究は、閉経後女性の体脂肪蓄積、筋肉量および骨密度低下の抑制を目的とした食事条件を提案するための基礎研究として、自発的走行運動が可能な飼育環境に維持された閉経後モデルラットの下肢骨格筋重量および大腿骨骨密度に対する食餌アミノ酸添加の影響を観察した。

その結果、食餌への 5% L-グルタミン (Gln-Ex 群)、5% L-ロイシン (Leu-Ex 群) あるいは 2.5% L-シトルリン+2.5% D-セリン (CitD-Ex 群) 添加は、

これらアミノ酸を添加しなかった飼料 (CA-Ex 群) を摂取した同一条件ラットに比べて, 1) 体重変化, 2) 血液生化学検査値, 3) 臓器重量, 4) 腓腹筋重量および大腿骨骨密度はいずれも有意な相違を示さなかった。すなわち, 本研究条件における食餌へのアミノ酸添加条件は筋・骨格系に対して利的効果を示さなかった。一方予期せぬことに, 走行運動量は食餌へのアミノ酸添加によって増加傾向を示した。

文 献

- 1: Virginie Messier, Rémi Rabasa-Lhoret, Sébastien Barbat-Artigas, Belinda Elisha, Antony D. Karelis, Mylène Aubertin-Leheudre: Menopause and sarcopenia: A potential role for sex hormones: *Maturitas*, 68, 331-336, 2011.
 - 2: M. L. Maltais, J. Desroches, I. J. Dionne: Changes in muscle mass and strength after menopause: *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 9, 186-197, 2009.
 - 3: Hanna-Kaarina Juppi, Sarianna Sipilä, Neil J. Cronin, Sira Karvinen, Jari E. Karppinen, Tuija H. Tammelin, Pauliina Aukee, Vuokko Kovanen, Urho M. Kujala, Eija K. Laakkonen: Role of menopausal transition and physical activity in loss of lean and muscle mass: A follow-up study in middle-aged Finnish women: *J Clin Med.*, 9, 1588, 2020; doi:10.3390/jcm9051588.
 - 4: 宝田剛志: アミノ酸シグナルによる骨格維持機構: *YAKUGAKU ZASSHI*, 133, 799-802, 2013.
 - 5: Luc Cynober, Jean-Pascal de Bandt, Christophe Moinard: Leucine and citrulline: Two major regulators of protein turnover: *World Rev Nutr Diet.*, 105, 97-105, 2013.
 - 6: Marion Jourdan, K. Sreekumaran Nair, Rickey E. Carter, Jill Schimke, G. Charles Ford, Julie Marc, Christian Aussel, Luc Cynober: Citrulline stimulates muscle protein synthesis in the post-absorptive state in healthy people fed a low-protein diet—A pilot study: *Clin Nutr.*, 34, 449-456, 2015.
 - 7: 岸恭一・西村敏英監修 日本必須アミノ酸協会編: タンパク質・アミノ酸の科学, pp126-140, 工業調査会, 2007.
- (あおやま みほ 平成 30 年度管理栄養学科卒業生)
(さたけ ゆみ 平成 30 年度管理栄養学科卒業生)
(すずき りな 平成 30 年度管理栄養学科卒業生)
(たけむら さやか 平成 30 年度管理栄養学科卒業生)
(たての あさみ 平成 30 年度管理栄養学科卒業生)
(ちく しおり 平成 30 年度管理栄養学科卒業生)
(にしがい ゆり 平成 30 年度管理栄養学科卒業生/
筑波大学人間総合科学研究科体育学専攻生)
(ぬまがみ ゆり 平成 30 年度管理栄養学科卒業生)
(もりおか はるき 平成 30 年度管理栄養学科卒業生)
(えびさわ ひでみち 管理栄養学科)