

26PO10-pm2-16



# 単回運動によって生じる筋疲労に対する 霊芝菌糸体培養培地抽出物(MAK)の効果

Effect of a water-soluble extract from culture medium of *Ganoderma lucidum* mycelia (MAK) against muscle fatigue caused by single bout of exercise

遠藤 未紗希<sup>1</sup>, 〇山市 涼太<sup>1</sup>, 岩田 直洋<sup>1</sup>, 神内 伸也<sup>1</sup>, 久保田 真<sup>2</sup>,

飯塚 大<sup>2</sup>, 岡崎 真理<sup>1</sup>, 日比野 康英<sup>1</sup>

<sup>1</sup>城西大・薬, <sup>2</sup>野田食菌工業(株)

## 背景および目的

運動は筋活動によって実現されるが、筋肉内のエネルギー基質の枯渇や酸化ストレスの上昇が筋活動に悪影響を及ぼすことが筋疲労の一因となっている。筋疲労が早期に発現することは望ましい状態とは言えない。疲労を遅延させることで運動時間が延長し、パフォーマンスの向上、さらには怪我の予防に繋がる。また、筋疲労の一因として、筋肉内のエネルギー源の枯渇や筋損傷などが知られており、これらを対策することで予防に繋がると考えられる。

霊芝菌糸体培養培地抽出物(MAK)は健康食品として用いられており、これまでに先行研究から抗酸化作用や肝臓・骨格筋における糖・脂質代謝の改善に関与することが明らかになっている。

本研究では、単回運動によって生じる筋疲労に対する効果を検討した。

## 実験方法

### 1. 実験材料

霊芝菌糸体培養培地抽出物は、野田食菌工業(株)において製造された「MAK」を使用した。MAKは、霊芝菌糸体をバガスと脱脂した米糠の混合固形培地に接種し、子実体発生直前に培地ごと破砕し、熱水抽出、噴霧乾燥したものである。MAKのエネルギーおよび含有成分をTable 1に示す。

Energy (kcal)	274
Moisture (g)	4.0
Crude protein (g)	13.7
Crude fat (g)	1.4
Sugar (g)	51.7
Crude fiber (g)	12.2
Crude ash (g)	17.0

粉体製品(100 gあたり)

Table 1 MAKのエネルギーと含有成分

### 2. 実験動物

SDラット(8週齢, ♂)を1週間予備飼育した後、MAK群にはMAK(1 g/kg/day)を胃ゾンデを用いて1週間経口投与した。一方でControl群には水を投与した。

### 3. 強制水泳試験および自発行動試験

アクリル製の円筒(直径20 cm, 高さ60 cm)に温水(28±1°C)を水深37 cmになるように入れた。ラットの尾部に体重の6%に相当する重りを負荷して水泳(最大60分間、または12分間)させ、鼻先が10秒水面下に沈むまでの時間(遊泳持続時間)を測定した。疲労からの回復度の評価には、強制水泳試験終了後から3時間後までの自発行動量を運動量測定装置(ACTIMO, シンファクトリー)を用いて測定した。

### 4. 血糖値および乳酸値の測定

血糖値は血糖自己測定器(ブリーズセンサーII, パイエル)を用いて測定した。乳酸値は簡易血中乳酸測定器(ラクテート・プロ2, アークレイ)を用いて測定した。

### 5. グリコーゲン測定

ラットの肝臓および骨格筋(腓腹筋+ヒラメ筋)のグリコーゲン含量は強制水泳負荷前および負荷3時間後に、Glycogen colorimetric / fluorometric assay kit(BioVision)を用いて測定した。

### 6. 細胞損傷に関する評価

乳酸脱水素酵素(LDH)およびクレアチンキナーゼ(CK)活性を解剖時に採取した血漿を用いて富士ドライケム(DRI-CHEM 7000i, 富士フィルム)により測定した。

### 7. mRNA発現量の測定

乳酸代謝関連遺伝子、β酸化関連遺伝子および炎症性サイトカインのmRNA量を強制水泳負荷前および負荷3時間後に抽出したラット骨格筋(腓腹筋+ヒラメ筋)を用いて、Real time RT-PCR法により測定した。

### 8. 酸化ストレス度の評価

体内の酸化ストレス度は強制水泳負荷前および負荷3時間後の血漿を用いてd-ROMs(Reactive Oxygen Metabolites)テストキットにより、活性酸素・フリーラジカル自動分析装置(F.R.E.E.)の血中ヒドロペルオキシド濃度を指標として測定した。酸化ストレス1単位[1 CARR U]は、0.08 mg/dLの過酸化水素に相当する。

## 日本薬学会第142年会 利益相反(COI)の開示

私の今回の演題に関連して、開示すべき利益相反は以下のとおりです。

◎ 研究費または奨学金(指定寄附金) ; あり (野田食菌工業株式会社)

## 結果

### 実験概要

使用動物: SDラット(8週齢, ♂)  
群分け: Control群(水, 1週間, p.o.)  
MAK群(1 g/kg/day, 1週間, p.o.)  
飼料: CE-2  
飲料: 水道水



【強制水泳条件】  
負荷: 体重あたり6%(最大60分間  
または、12分間)  
救出: 鼻先 10秒間の水没  
条件: 水深 37 cm, 水温 28 ± 1°C

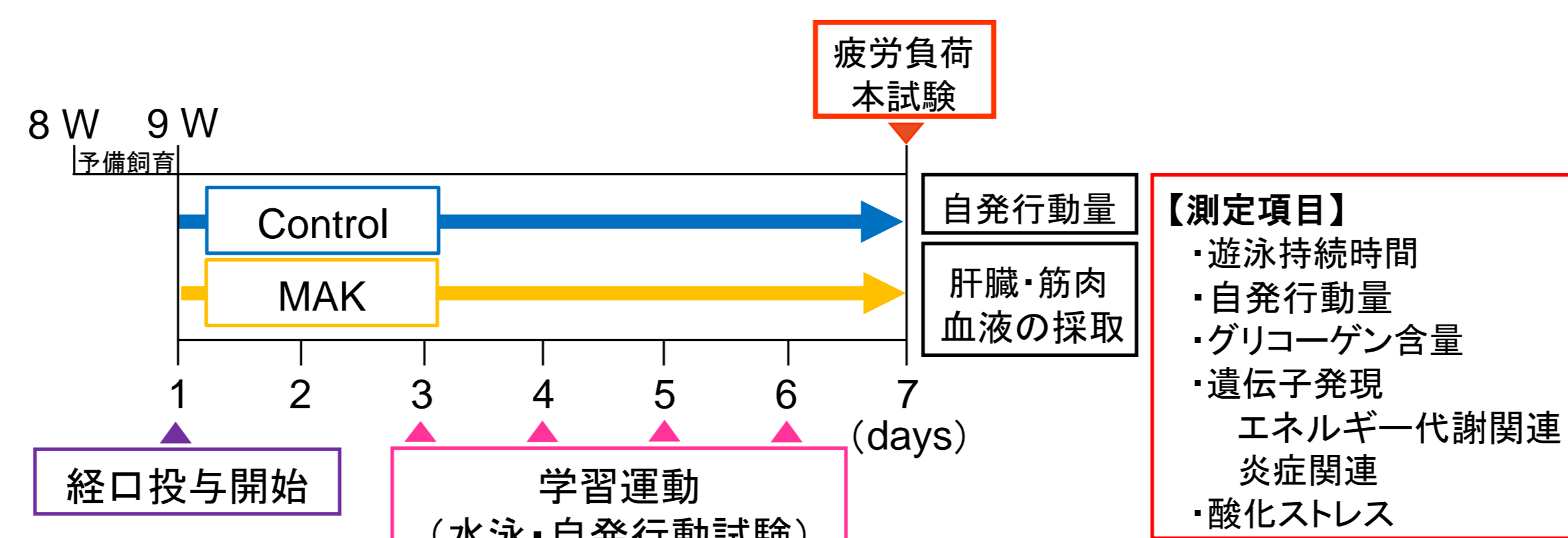


Fig. 1 疲労負荷モデルの作製と実験概要

MAK群にはMAKを1日1回胃ゾンデを用いて1週間経口投与し、Control群には水を投与した。ラットは、暗期(7:00~19:00)に体重当たり6%の重りを負荷して水泳(最大60分間、または12分間)させた後、疲労からの回復を自発行動試験により評価した。自発行動測定後、解剖し、肝臓・骨格筋・血液を採取した。

### 自発行動に与えるMAKの影響

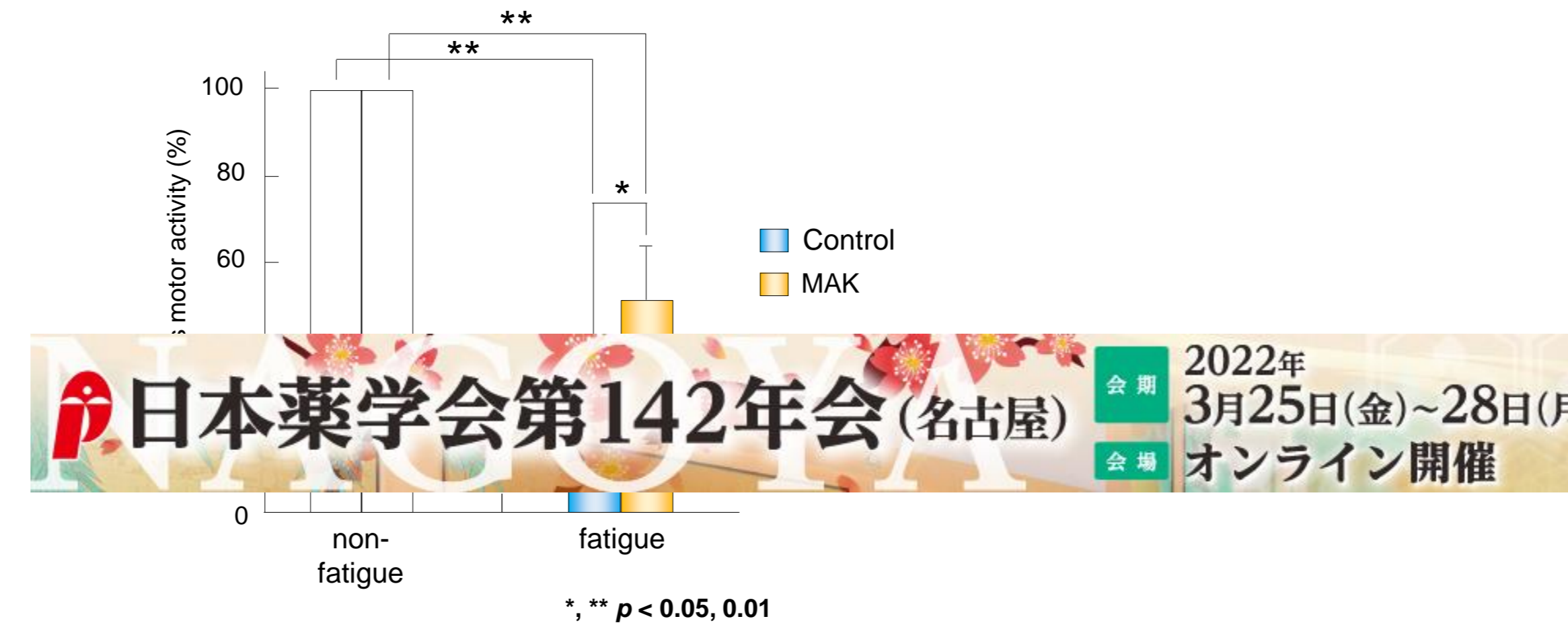


Fig. 3 運動負荷による自発行動量への影響

強制水泳による運動負荷後3時間の自発行動量を評価した。ControlおよびMAKの両群において、運動負荷前の自発行動量と比較して負荷後の行動量は有意に減少したが、Control群と比較してMAK群では疲労による自発行動量の減少の度合いが有意に抑制された。

### 遊泳持続時間に与えるMAKの影響

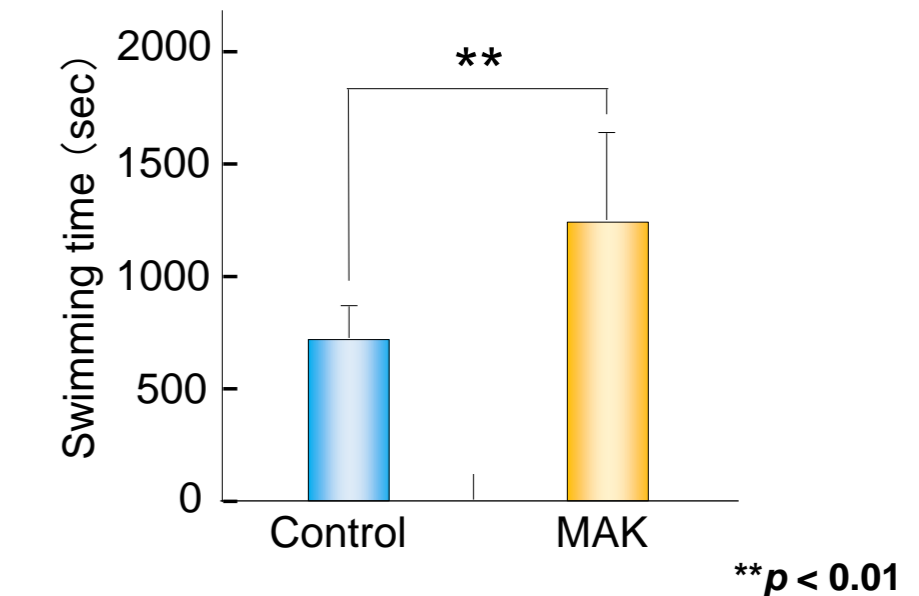


Fig. 2 遊泳持続時間

遊泳時間は最大60分(3600秒)を上限とした。Control群と比較してMAK群で約1.7倍遊泳時間が有意に延長した。

### 血糖値および乳酸値に与えるMAKの影響

	non-fatigue		fatigue(6%)	
	Control	MAK	Control	MAK
Blood glucose level (mg/dL)				
pre	112 ± 3.1	118 ± 3.9	119 ± 3.5	123 ± 9.5
past	-	-	97 ± 23.4	127 ± 31.0
past(3 hour)	-	-	110 ± 12.4	134 ± 11.5
Lactic acid (mg/dL)				
pre	1.9 ± 0.2	1.9 ± 0.1	1.6 ± 0.4	1.6 ± 0.10
past	-	-	13.5 ± 5.1	7.7 ± 3.68
past(3 hour)	-	-	2.0 ± 0.4	1.3 ± 0.29

Table 2 血糖値・乳酸値

強制水泳による運動負荷前(pre)、負荷直後(past)、負荷3時間後(past(3 hour))における血糖値および乳酸値を測定した。負荷直後の乳酸値は負荷前と比較して両群ともに上昇したが、MAK群はControl群と比較して低値を示した。また、負荷3時間後の血糖値および乳酸値は負荷前とほぼ同等な値を示した。

### 肝・骨格筋グリコーゲン含量に与えるMAKの影響

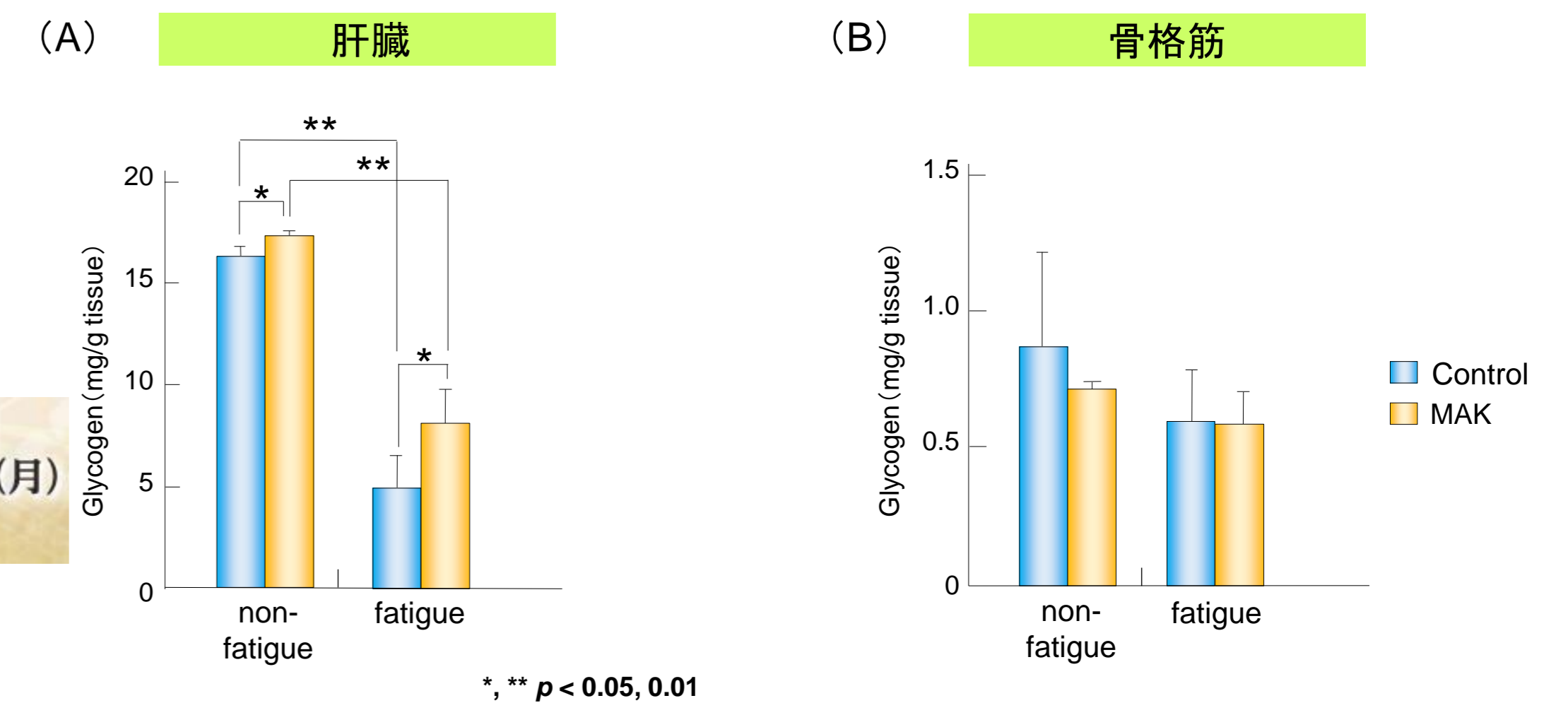


Fig. 4 肝臓および骨格筋におけるグリコーゲン含量

(A) 肝臓、(B) 骨格筋の運動負荷前および負荷後のグリコーゲン含量を評価した。肝臓のグリコーゲン含量は、運動負荷前からMAK群でControl群と比較して高値を示した。運動負荷後は両群で有意に減少したが、MAK群でControl群と比較して高値を示した。骨格筋では、負荷前のControl群と比較して運動負荷前後の全ての群間で変化は認められなかった。

### 乳酸代謝関連遺伝子発現量に与えるMAKの影響

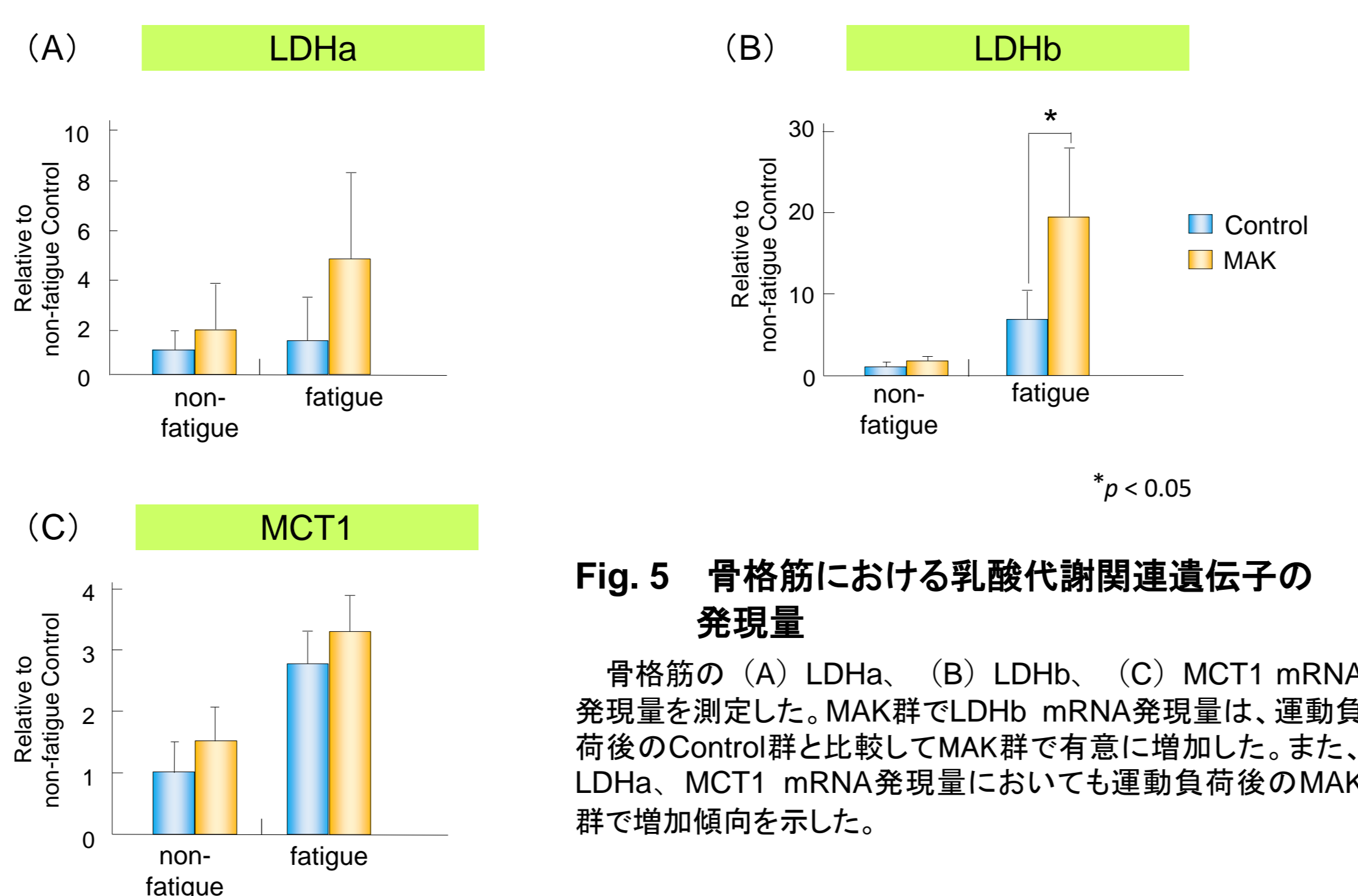


Fig. 5 骨格筋における乳酸代謝関連遺伝子の発現量

骨格筋の(A) LDHa、(B) LDHb、(C) MCT1 mRNA発現量を測定した。MAK群でLDHb mRNA発現量は、運動負荷後のControl群と比較してMAK群で有意に増加した。また、LDHa、MCT1 mRNA発現量においても運動負荷後のMAK群で増加傾向を示した。

### β酸化関連遺伝子発現量に与えるMAKの影響

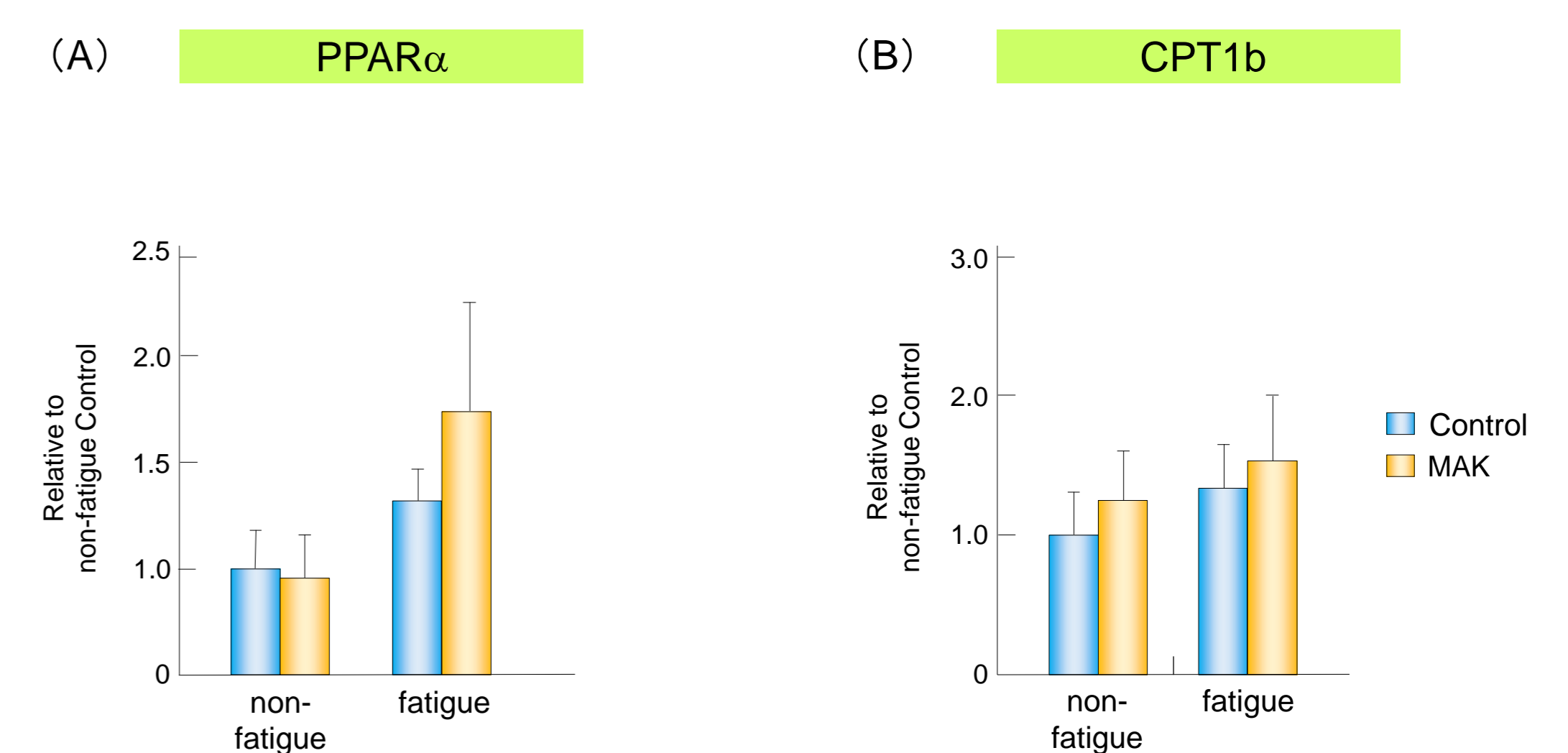


Fig. 6 骨格筋におけるβ酸化関連遺伝子の発現量

ラットの骨格筋の運動負荷前および負荷後のエネルギー消費に関わる/酸化関連遺伝子である(A) PPARα、(B) CPT1b mRNA発現量を測定した。PPARα mRNA発現量は、運動負荷によって両群で増加傾向を示し、特にMAK群においてその傾向が強く見られた。一方、CPT1b mRNA発現量は、運動負荷の有無に関わらず大きな変化は認められなかった。

### 細胞損傷の評価に与えるMAKの影響

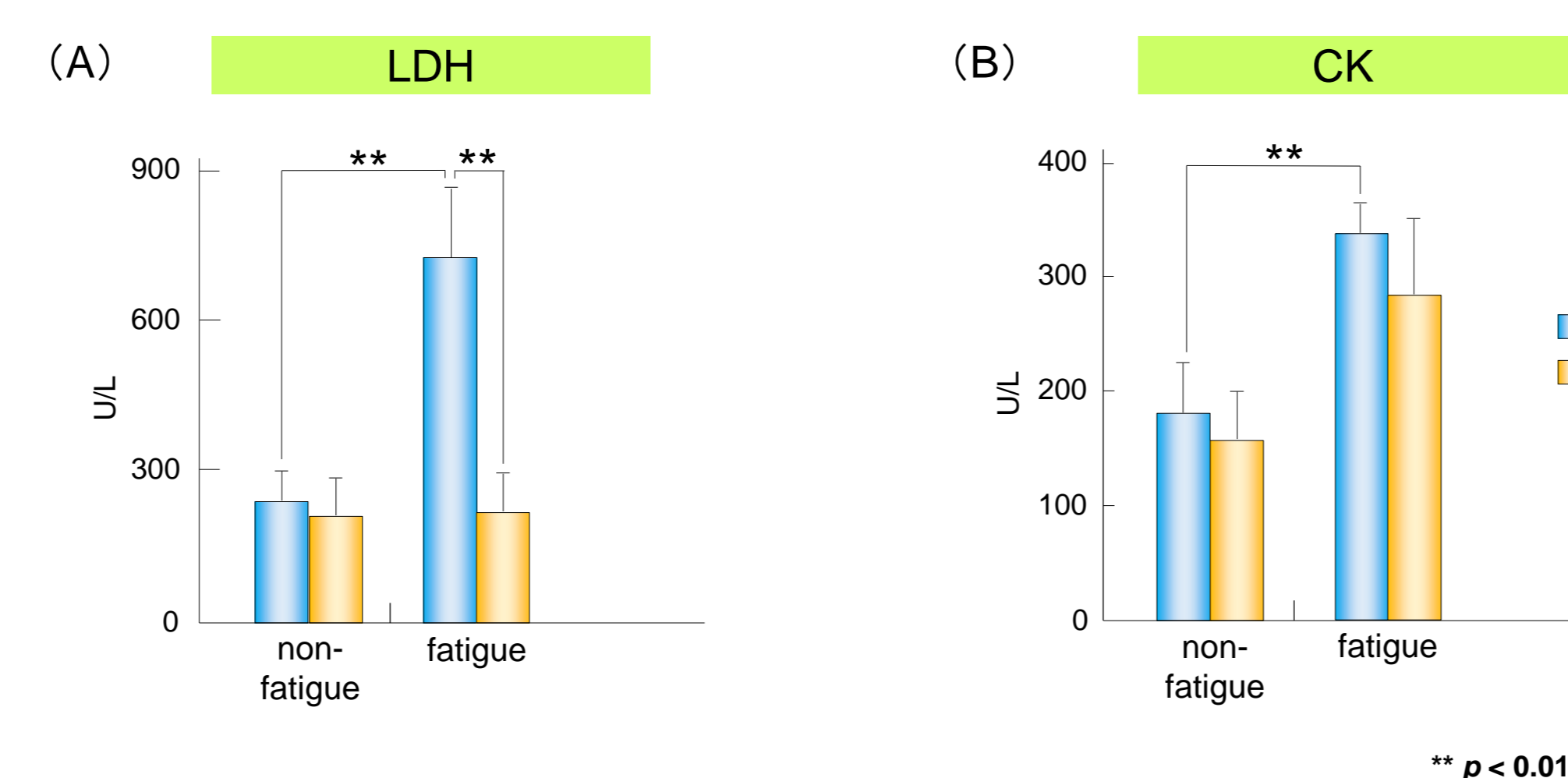


Fig. 7 細胞損傷に及ぼす影響

細胞損傷の指標として、血漿中の(A) 乳酸脱水素酵素(LDH)、(B) クレアチンキナーゼ(CK)活性を測定した。LDH活性はControl群で運動負荷前と比較して負荷後で顕著に上昇したが、MAK群では負荷前後で同レベルであった。また、負荷後においては、Control群と比較してMAK群ではその上昇が有意に抑制された。一方、CK活性はControl群で負荷前と比較して負荷後で顕著に上昇したもののMAK群との差は見られなかった。

### 炎症性サイトカイン

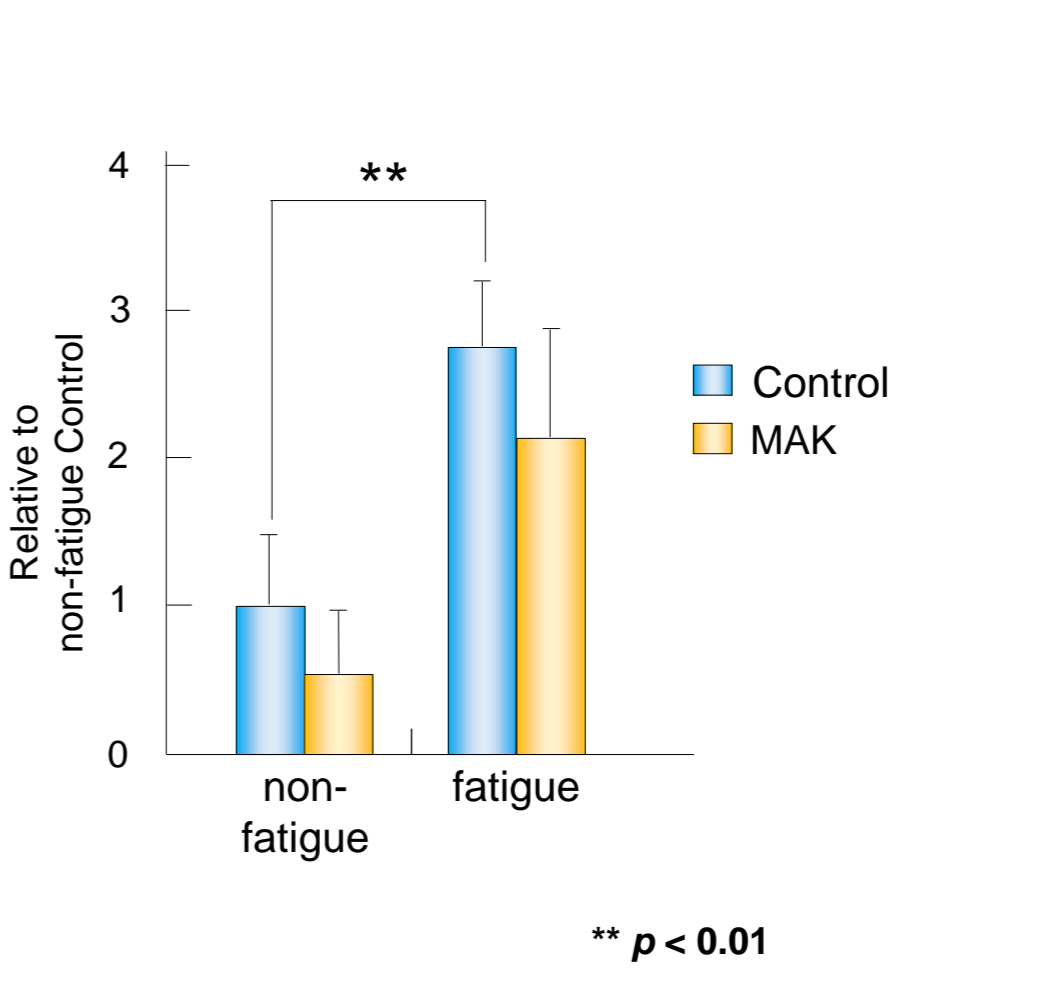


Fig. 8 骨格筋におけるIL-1β発現量に与える影響

骨格筋のIL-1β mRNA発現量を測定した。運動負荷によって両群で発現量の増加傾向が見られ、特にControl群では負荷前と比較して有意な増加が認められた。しかし、負荷後の両群で差はなかった。

### 体内酸化ストレス度

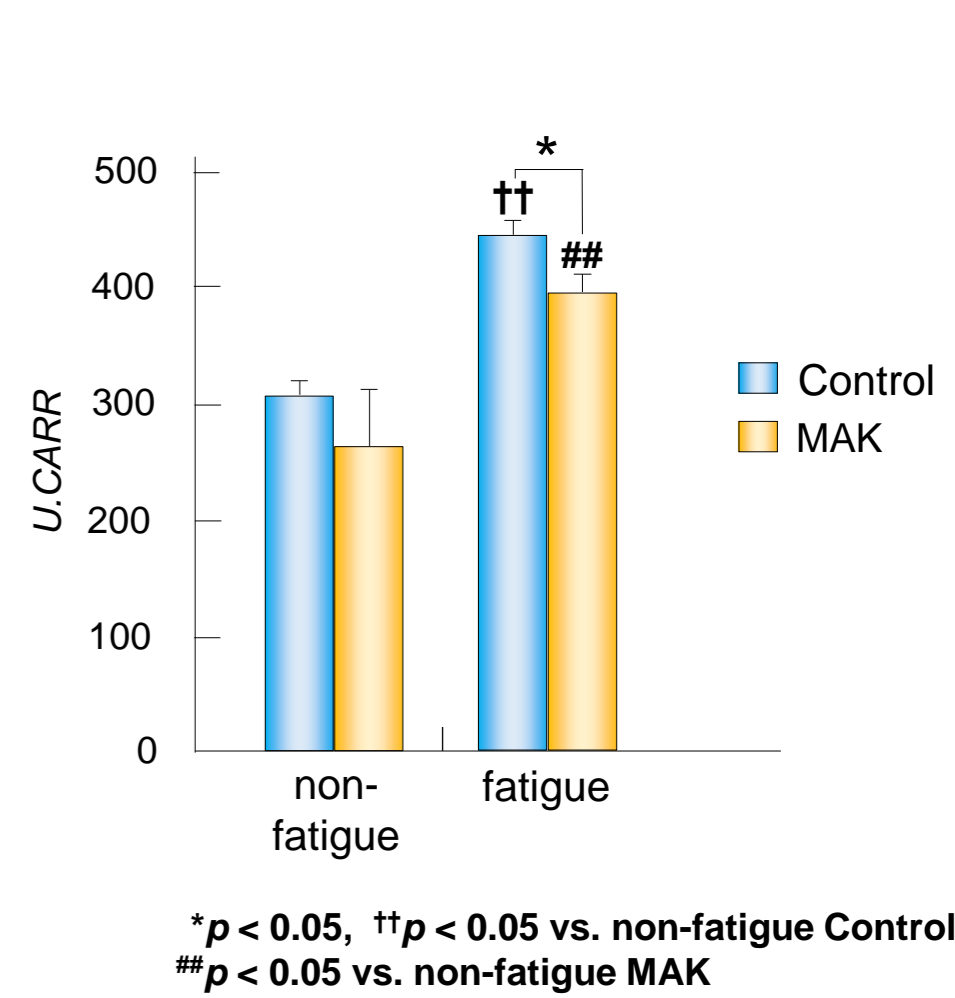


Fig. 9 体内酸化ストレス度に与える影響

体内酸化ストレス度を血漿を用いて評価した。運動負荷によって両群において酸化ストレス度が上昇したが、MAK群ではControl群と比較して有意にその上昇を抑制した。

## 結果および考察

本研究において、MAKの摂取は強制水泳試験による遊泳持続時間を延長させるとともに、負荷後の自発行動量の減少度合いを抑制することが明らかとなった。運動による身体的疲労の要因の1つに肝臓および筋肉のグリコーゲン量の枯渇が報告されているが、MAKは負荷による肝臓および筋肉グリコーゲン含量の低下を抑制した。これまでに、糖尿病モデルマウスにMAKを摂取させると、肝臓のGLUT2発現が増大し、肝グリコーゲン量が増加するとともに、筋肉のGLUT4膜移行を促進して糖取り込みを増加させることを明らかにしていることから、運動負荷により生じる疲労の軽減においてもこれら作用が寄与していることが示唆された。近年、運動時のエネルギー源として乳酸が利用されるとの報告が多くある。今回の結果から、MAKは、高強度運動時の乳酸代謝を亢進し、乳酸をエネルギー源として利用している可能性が示唆された。運動による細胞損傷により血中LDH値が、筋損傷により血中CK値が上昇することが知られている。また、細胞損傷により生じる炎症やそれに伴う過剰な酸化ストレスの増加も報告されている。MAKは血中LDH値、CK値とともに運動負荷による上昇を抑制した。さらに、炎症性サイトカインの1つであるIL-1β 遺伝子発現量及び体内酸化ストレス度の運動負荷による上昇を抑制した。今回の研究結果とこれまでの知見を総合すると、MAKは運動負荷によるエネルギー源の枯渇や筋損傷を軽減することで筋疲労の症状を遅延させる効果を有することが考えられた。