

ストレスにおける腸管防御機構と選手のコンディショニングに関する研究
～プロバイオティクス摂取が腸管防御機構に及ぼす影響～

松生香里

目 次

要約	1
I. 緒言	2
II. 方法	4
III. 結果	7
IV. 考察	9
V. 謝辞	10
VI. 参考文献	11
VII. 図表	14

ストレスにおける腸管防御機構と選手のコンディショニングに関する研究 ～プロバイオティクス摂取が腸管防御機構に及ぼす影響～

松生香里(立命館大学)、 内丸 仁(仙台大学)、
玉川 明朗(東北大学)、 永富良一(東北大学)

要約

背景: 損傷した骨格筋の回復は十分な栄養摂取のもとに保障されている。一方、消化吸収の要である腸管上皮の防御には腸内細菌が重要である。乳酸菌摂取は腸管の防御や機能維持に関連し、身体のコンディション維持にも有効であることが知られている。ところで、ストレスによる腸管機能の低下が骨格筋の損傷からの回復過程に、腸管機能が関与するか否かは不明である。

目的: 本研究では、実験1) ストレスによって腸管防御的に発現する熱ショックタンパク質 (Heat shock protein: HSP70) と腸管機能の関係を調べること、実験2) 腸管機能を改善するプロバイオティクス (*Lactobacillus casei*: *L. casei*) の摂取が、骨格筋の修復・再生過程に影響するかどうかを調べること、実験3) 骨格筋修復が遅延する老化マウスにおいて、*L. casei* 摂取が損傷骨格筋の修復遅延を改善するかどうか調べることを目的とした。

方法: 被験動物は 10～12 週齢 (若齢) および 45～55 週齢 (老化) の C57BL/6J の雄マウスを用いた。実験1) のストレス実験モデルは 2 時間の拘束ストレスを行った。拘束ストレスの 30 分前に腸管蠕動運動を抑制させる薬剤 (副交感神経系抑制剤) であるスコポラミンを投与し、ストレス直後にマウスを解剖し、大腸組織を摘出、免疫組織化学染色とウエスタンブロッティングにて HSP70 の発現を評価した。実験2) および3) の骨格筋損傷は、若齢および老化マウスの腓腹筋に筋損傷を惹起する薬剤であるカルディオトキシン (Cardiotoxin: CTX) を注射することにより作成した。筋損傷を行わないコントロール脚は逆脚を用いた。各マウスは筋損傷 3 日、5 日、7 日、10 日、14 日、20 日後に腓腹筋を摘出し、損傷脚とコントロール脚の腓腹筋の筋重量を比較した。また、免疫組織化学染色法を用いて、各マウスの腓腹筋の損傷部位を dMHC (developmental Myosin Heavy Chain: dMHC) で染色し、筋細胞の増殖過程を比較した。次に、*L. casei* を 10^{-8} 個/日ずつ経口投与し、筋損傷の遅延を回復させることができるかどうかを調べるため、損傷筋とコントロール筋の筋重量と損傷筋の再生過程を観察した。

結果: 実験1) スコポラミン投与における腸管蠕動運動の抑制 (副交感神経系の抑制) のみで腸管 HSP70 発現の増加がみられたものの、拘束ストレスにおける腸管 HSP70 発現の増加はみられなかった。実験2) の若齢マウスの *L. casei* 摂取における損傷筋の修復・再生の改善は見られなかった。実験3) の老化マウスにおける *L. casei* 摂取は、コントロール群に比べ、*L. casei* 摂取群の骨格筋重量の回復過程、免疫組織化学染色を用いた損傷部位の観察においても、骨格筋重量および修復・再生の遅延の時間的改善がみられた。

結論: ストレスにおける腸管 HSP70 発現に腸管蠕動抑制に対する防御反応である可能性が考えられた。腸管機能を改善するプロバイオティクス、*L. casei* の摂取によって損傷した骨格筋の修復速度が改善されることが示唆された。

本研究結果が、スポーツ選手のコンディション改善に役立つ基礎情報として、スポーツ現場へ貢献できることを期待している。

代表者所属: 立命館大学スポーツ健康科学

I. 緒言

身体的・精神的ストレスは腸管機能を低下させることが知られている。我々は先行研究において、急性のストレスモデルである 2 時間拘束ストレスを用いた動物実験を行い、ストレスから腸管がどのように防御されているのかを調べた(1)。その結果、ストレスによって、血中で上昇したグルココルチコイドが腸管上皮のタイトジャンクション(密着結合)を低下させ、LPS(リポポリサッカライド)などの腸内細菌の菌体成分が腸管上皮を通過し、粘膜固有層に発現している LPS のレセプターである TLR4(Toll-like receptor4)に到達し、腸管防御的に熱ショックタンパク質(Heat shock protein: HSP70)を上昇させ、腸管を防御していることを報告した(1)。ストレスから腸管を防御するためには、血中のグルココルチコイドと腸内細菌の両方の働きが重要であることを示した。

一方、アスリートにおいても心身のストレスと腸の障害についての関連性が報告されている(2)。アスリートは過度のトレーニングによる精神的・身体的ストレスが重なることにより、腸管機能が低下した場合、コンディションを崩す可能性が考えられる。フルマラソンのレース後、およそ 16%のランナーに過敏性腸症候群様の症状が観察されたことが報告されている(3)。また、マラソンランナーなど長距離選手では、過度のトレーニングによる精神的・身体的ストレスから、腸管出血や下痢などの症状を呈することが多いと報告されている(4, 5)。また、マラソンや高強度長時間の運動では実際に著しい腸管機能の障害が起こることや、腸上皮の脱落、腹痛、下痢や虚血状態を起こすことも報告されている(6, 7)。このように、心身のストレスと腸管機能の低下には密接な関連が報告されている(1, 8-11)。

一方、栄養摂取が運動能力や骨格筋の修復や肥大に関連することは周知であり、骨格筋の再生・肥大には、レジスタンス運動やトレーニングによって筋タンパク質の合成に貢献していることや、成長ホルモン、テストステロンやインスリン様成長因子が関わっていることが報告されている(12-17)。損傷した骨格筋の回復は十分な栄養摂取のもとに補償されており、タンパク質・アミノ酸摂取が骨格筋の修復・肥大に影響している(12, 14, 15, 17)。我々は、ストレスにおける腸管機能の低下によって、消化吸收機能が抑制され、損傷した骨格筋の修復・再生機構に影響する可能性に着目した。

そこで、過度のトレーニングによるストレスで腸管機能が低下した場合を想定し、本研究の実験1)では、マウスに副交感神経系の拮抗薬を投与させることにより、腸管の蠕動運動を抑制させ、急性のストレスによって腸管防御的に誘導される HSP70 発現がどのように変化するか調べることを目的とした。

腸管のコンディション維持や消化吸收機能の維持・改善するためには乳酸菌摂取が有効であることが報告されている(18-23)。Seth らは、ヒト大腸がん由来の細胞である Caco-2 細胞を用いた実験において、乳酸菌は腸管上皮のタイトジャンクションを構成しているタンパク質である ZO-1、E-cadherin、beta-catenin に作用し、腸管の防御を強化することを報告している(24)。Clancy らは、血中 CD4 陽性 T 細胞の IFN γ 産生能が減少しているオーバートレーニング状態のアスリートに1ヶ月間、乳酸菌を摂取させたところ、IFN γ の産生が回復し、オーバートレーニング状態が改善したことを報告している(25)。Aoi らは発酵ミルクを摂取させることにより長時間運動後の血中の筋損傷マーカーの値が改善することを報告している(26)。これらの報告から、腸管機能を維持・改善することはコンディション維持や筋損傷の回復に効果的である可能性が考えられる。

しかしながら、乳酸菌摂取が損傷した骨格筋の回復過程にどのように寄与しているかは明らかになっていない。そこで、腸管機能の維持や消化吸收機能の維持・改善にプロバイオティクスが有効であるという仮説から、実験2)では、プロバイオティクス(*Lactobacillus casei*: *L.casei*)を摂取した場合に、骨格筋の修復・再生過程が改善されるかどうかを明らかにすることを目的とした。

加齢とともに損傷した骨格筋の修復・再生が、若年者に比べて遅延することが知られている(27-30)。Brooks らは、動物を用いた実験において、老化マウスは若齢マウスに比べて、損傷骨格筋の再生が遅延することを報告

している(27)。これらのことから、実験3)では、骨格筋修復が遅延する老化マウスにおいて、*L.casei* 摂取が損傷骨格筋の修復・再生過程遅延の時間的改善および、成熟の促進がみられるかどうか調べることを目的とした。

本研究では、上述した実験1)～実験3)について明らかにし、スポーツ選手のコンディショニングのみならず、高齢者の運動処方に役立つ基礎情報として現場へ還元することを目的としている。

II. 方法

1. 実験動物

実験動物はC57BL/6Jの雄マウスを用いた。10～12週齢16匹、8～11週齢84匹(若齢マウス)、および45～55週齢84匹(老化マウス)を用いた。マウスは東北大学動物実験施設の動物飼育ガイドラインに沿って、1つのケージにマウスを6匹ずつ、12時間、明暗サイクルの環境下で飼育された。全ての実験は、東北大学医学部における倫理委員会の承認を得て行われた(承認番号:19医施-1)。

実験1)には、10～12週齢を用いた。実験2)には若齢マウス、実験3)には老化マウスを用い、水摂取(Vehicle)と*L.casei*摂取(*L.casei*)に分けて比較した。

2. 2時間拘束ストレスモデル

腸管防御機能を調べるため、先行研究を参考にし、マウスを午前8時から10時まで、50mlのコニカルチューブ内に2時間拘束した(1, 31)。マウスの体温が上昇しないように、また、呼吸ができるようコニカルチューブの側面を柵状にカットし、細工を施した。コントロール群のマウスは拘束ストレスを群から離れたケージ内で飼育した。2時間拘束ストレス直後、麻酔科に下大静脈より採血、大腸を摘出、免疫組織化学染色用の組織とウェスタンブロッティング用の組織に分けて、-80℃で保存した。

3. 腸管蠕動抑制操作

腸管機能を抑制させる薬剤として、副交感神経系拮抗薬であるスコポラミンを用いた。スコポラミンは生理食塩水に溶解し100mg/kg body weightの濃度に調整して、2時間拘束ストレスの30分前の午前7時30分にマウスの腹腔内に投与した。投与後は通常通り、ケージ内で飼育し、投与30分後に2時間拘束ストレスを行った。

4. 筋損傷操作

水または乳酸菌を1週間投与させたマウスの腓腹筋に筋損傷を惹起する薬剤である10μM濃度の蛇毒(Cardiotoxin:CTX)を注射した。CTXを注射する際、pentobarbital sodium, 60mg/kg body weightを腹腔内投与し、麻酔下においた。その後、右側腓腹筋の筋腹、数カ所にCTXを注射した。コントロール脚には左側腓腹筋を用い、右側腓腹筋と同量の生理食塩水を注射した。処置後、覚醒するまでの間、ケージ内で保温した。処置後、3、5、7、10、14、20日目(以下、3d、5d、7d、10d、14d、20d)に腓腹筋を摘出し、組織学的分析と生化学的分析に用い、損傷脚とコントロール脚の腓腹筋の筋重量を比較した。免疫組織化学染色法を用いて、各マウスの腓腹筋の損傷部位をdMHC (developmental Myosin Heavy Chain)で染色し、損傷筋の筋細胞増殖過程を観察した。また、損傷前の筋の周囲径と、損傷後20dの再生筋の周囲径を比較した。

5. 麻酔薬

マウスの腓腹筋にCTXの注射を行う際、pentobarbital sodium, 60mg/kg body weightを腹腔内投与した。また、組織採取のための解剖には、セボフルラン吸入麻酔薬(Abbot Japan)を使用し、脱血処理の後、安楽死させ、大腸組織および被験筋を摘出した。

6. プロバイオティクス (*Lactobacillus casei*: *L. casei*) の投与

L. casei は、若齢マウス、老化マウスの *L. casei* 摂取群のマウスに7日間、 10^8 個/日ずつ経口投与した。*L. casei* (ATCC393: Microbiologics) の培養は、コロンビアCAN寒天培地にコロンビア血液寒天培地を添加したスタッフ/ストレップ選択培地 (Oxoid company) を用いた。マウスへの摂取は、筋損傷の7日前から行い、筋損傷後20日まで毎日行った。

7. 抗体

本研究で用いた一次抗体は以下に示した。

rabbit polyclonal anti-HSP70 antibody (1:500, Stressgen)、mouse monoclonal anti-developmental Myosin heavy chain (dMHC) antibody (1:100, Novocastra)、rabbit polyclonal anti-Lminin antibody (1:200, Invitrogen)。

また、本研究で使用した二次抗体は以下に示した。

Alexa Fluor 555-conjugated donkey anti-rabbit IgG (1:400, Invitrogen)、Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rat IgG (1:400, Invitrogen)、Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG (1:400, Invitrogen)、nuclear stain marker Topro-3 (1:400, Invitrogen)。

8. 免疫組織化学染色

免疫組織化学染色用のマウスの大腸組織または腓腹筋は、採取した後、Tissue-Tek OCT compound (Sakura Finetechnical) で包埋し、あらかじめ液体窒素で冷やしておいたisopentaneにて凍結保存した。その後、 -80°C で保存した。免疫組織化学染色のために、大腸組織は厚さ $4\mu\text{m}$ 、筋組織は $8\mu\text{m}$ の縦断切片をクライオスタットにより作成した。切片を4%paraformaldehydeで20分間固定した後、0.3% Triton X-100を含んだblocking solution (Dako) で30分インキュベートさせた。一次抗体は、0.01% Triton X-100 を含んだTBS (pH8.0) に、各抗体の使用濃度に希釈して用いた。二重蛍光染色のため、一次抗体を添加後、 4°C で24時間、インキュベートした。24時間後、PBSで洗い、その後、二次抗体で1時間インキュベートさせた。二次抗体は、0.01% Triton X-100 を含んだTBS (pH8.0) に、各抗体の使用濃度に希釈して用いた。インキュベート後、切片をPBSで洗浄し、Vectashield mounting medium (Vector Labs) にて封入した。画像分析は全て共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon, Tokyo, Japan) を用いて行った。

9. 電気泳動とウェスタンブロッティング

マウスから摘出した大腸組織、およそ30mgをホモジナイズした。ホモジナイズ液の組成は2mM EDTA、4mM Tris、10mM KCL、1% TritonX100、pH7.4を用いた。ホモジネートは15,000gにて上清を分離し、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (12.5%アクリルアミド) を行った。泳動後、タンパクをゲルからセミドライ式ブロッティング法にてPVDFメンブレンに転写した。メンブレンをカゼイン溶液で1時間ブロッキングし、その後、0.05% Tween20を含んだTBS (pH8.0) に、各抗体の使用濃度に希釈して用いた。1次抗体の希釈濃度、rabbit polyclonal anti-HSP70 antibody (1:1000, Stressgen)、mouse monoclonal anti-beta-actin antibody (1:2000, Sigma) で24時間インキュベートさせた。24時間後、PBSで洗い、その後、HRP常識したanti-rabbit IgG (1:1000, Cell Signaling)、または anti-mouse IgG (1:1000, Cell Signaling) で1時間インキュベートさせた。インキュベート後、PBSで洗い、ECL immunoblotting kit (Cell Signaling) で発色させ、イメージアナライザ (LAS-1000, Fujifilm, Tokyo, Japan) で画像を取り込んだ。

10. 統計処理

全ての数値は、平均値と標準誤差で示した。統計的有意差はANOVAを用いて行い、グループ間の比較はPost-Hoc testとしてScheffeの方法を適用した。相関係数の検定は、ピアソンの相関係数検定法を用いた。また、統計的有意性は5%水準とした。

Ⅲ. 結果

1. 腸管蠕動運動の抑制(副交感神経系抑制)と拘束ストレス後の腸管HSP70発現

ストレスにおける腸管防御機能の低下と腸管蠕動運動の関連を調べるため、先行研究と同様に、2時間拘束ストレスによって腸管防御的に発現するHSP70をウエスタンブロッティングおよび免疫組織化学染色にて調べた(Fig.1A, 1B.)。2時間拘束ストレス後、大腸組織のHSP70発現は上昇した(Fig. 1A, 1B.)。

次に、腸管蠕動運動を抑制する薬剤(副交感神経系抑制剤)であるスコポラミンを腹腔内投与し、2時間拘束ストレスで腸管防御的に発現する腸管HSP70の変化をウエスタンブロッティングにて分析した(Fig. 2.)。腸管HSP70はスコポラミン投与によって発現し、Restraintにおいても、高いレベルを保持した(Fig. 2.)。

2. 若齢マウスにおける*L.casei*摂取の影響

*L.casei*摂取が若齢マウスの損傷骨格筋の修復・再生過程にどのように影響するかを調べた。*L.casei*を摂取させた*L.casei*群とコントロールとして水を摂取させたVehicle群に分けて比較した。マウスの腓腹筋にCTXを注射し、筋損傷を惹起させ、その後のマウスの体重および損傷筋とコントロール脚の腓腹筋重量の回復過程を比較した(Fig. 3.)。Vehicle群と*L.casei*群の損傷筋の重量は7d~10dに低下するものの、20dにはコントロール脚の重量まで回復がみられ、両群の回復過程に差はみられなかった。

次に、*L.casei*群とVehicle群の損傷筋の筋修復・再生過程を、免疫組織化学染色にて調べ、筋線維数およびdMHCが発現している筋線維数と中心核を有する筋線維数を測定し、これらの割合を求めた(Fig.4, 5.)。Vehicle群、*L.casei*群ともに、損傷後5dからdMHCが発現している細胞が多く観察され、7d~10dにはおよそ80%、筋細胞の中心核を有する筋線維が出現しはじめ、dMHC発現はしだいに減少した。損傷後20dではほとんどの筋線維が分化し、核は筋細胞膜直下の分布が確認された(Fig.4, 5.)。10~20%程度ではあるが、中心核を有する筋線維もみられた。また、Vehicle群と*L.casei*群の損傷筋の筋損傷前と20dの筋線維周囲径を測定した(Fig.6.)。筋線維周囲径は、Vehicle群と*L.casei*群のコントロール筋と損傷後20dとの間に差は認められなかった。以上の結果から、若齢マウスの*L.casei*摂取における骨格筋修復過程の時間的改善は見られなかった。

3. 老化マウスにおける*L.casei*摂取の影響

老化マウスの損傷骨格筋の修復が遅延することが先行研究によって明らかにされていることから、老化マウスに*L.casei*を摂取させることで、損傷後の骨格筋修復・再生過程に時間的な改善および成熟の促進がみられるかどうかを調べた。若齢マウスと同様に、マウスの腓腹筋にCTXを注射し、筋損傷を惹起させ、その後のマウスの体重および損傷筋とコントロール筋の腓腹筋重量の回復過程を比較した(Fig. 7.)。Vehicle群の損傷筋重量は7d~10dに低下し、20dにおいても回復がみられなかった。一方、*L.casei*群では、筋損傷後5dから10dまでは低下がみられるが、その後、コントロール筋と同レベルまでの回復がみられた。

次に、*L.casei*群とVehicle群の損傷筋の筋修復・再生過程を、免疫組織化学染色にて調べ、筋線維数およびdMHC発現を観察した(Fig.8, 9.)。Vehicle群、*L.casei*群ともに、損傷5dではおよそ40%のdMHC発現細胞が観察された。一方で、中心核を有する筋線維は、Vehicle群では損傷後5dから発現がみられ、14dに出現数がピークとなり、20dにおいても75%の出現が認められた。しかしながら、*L.casei*群の中心核数は、筋損傷後5dで出現し始め、10dでピークとなり、20dにはほぼ20%の筋線維が分化し、核は筋細胞膜直下の分布が確認された(Fig. 8, 9.)。Vehicle群と*L.casei*群の損傷筋の筋損傷前と20dの筋線維周囲径を測定した(Fig.10.)。筋線維周囲径は、

Vehicle群と*L.case*群ともに、コントロール筋と損傷後20dの間に差は認められなかった。*L.case*群はコントロール筋および、損傷後20dにおいて、Vehicle群と比べて、顕著な筋線維周囲径の成熟がみられた。

以上の結果から、老化マウスでは、*L.case*摂取により、再生筋線維周囲径の回復促進、筋重量および組織学的な回復に対する著しい改善効果がみられた。*L.case*摂取は損傷筋の回復過程を改善させた。

IV. 考察

ストレスから腸管を防御するためには、HSP70発現が重要であることが明らかにされている(32)。先行研究において、我々は、精神的・身体的ストレスによって、腸管防御的に誘導されるHSP70の発現機構について調べた。腸管防御的に発現するHSP70は、血中のグルコルチコイドと腸内細菌の両方の働きが重要であることを報告した(1)。

本研究では、アスリートが高強度のトレーニングにおけるストレスにより、腸管機能が低下した場合、プロバイオティクスである*L.casei*摂取によって腸管機能を維持することで、損傷骨格筋の修復・再生過程を改善できるかどうか調べることを目的に実験を行った。

実験1)では、薬剤で腸管機能を抑制した際、ストレスにおける腸管防御的に発現するHSP70発現がどのように変化するかを調べた(Fig.1, 2.)。著者らの先行研究と同様に2時間拘束ストレスモデルを用いて、腸管防御的にHSP70発現が増加するかを調べたところ、スコポラミンを投与しないコントロールでは拘束ストレス後、大腸組織のHSP70発現は上昇したが、腸管蠕動運動を抑制剤(副交感神経系抑制薬)であるスコポラミンを投与では、蠕動抑制のみで腸管HSP70発現が増強した。

Matzingerはストレスに対するHSPの誘導がきっかけとなって免疫系が働き、危険から逃れることが可能になるという“danger theory”を提唱している(33)。また、Ortegaらは中等度の運動中に発現する血中のHSP72がストレスメディエータとして好中球の細菌貪食あるいは殺菌作用に関与する可能性を報告している(34)。Fleshnerらは血中に分泌されるHSPが免疫細胞の機能を調節するサイトカインの分泌制御に関係しているためHSPは“danger signal”ではないかと提案している(35)。

著者らは先行研究において、グルコルチコイドをレセプターレベルのブロッカーで遮断すると、ストレス下の腸管HSP70の発現誘導がなくなり、また腸内細菌を除去してもストレス下で腸管HSP70発現が抑制されることから、ストレスによって上昇した血中グルコルチコイドの影響で大腸上皮のタイトジャンクションを低下させ、腸内細菌が腸管上皮の間隙をくぐり抜け、粘膜固有層に発現しているTLR4に到達し、腸管防御的にHSP70発現を上昇させることを報告した(1)。TLR4とHSP70発現の関連が腸管蠕動にかかわっている可能性も考えられるが、先述したように、HSPは生体の恒常性維持に働くメディエータとしての役割も兼ね備えているため、スコポラミンによって、腸管蠕動運動抑制(副交感神経系の抑制)のみで発現するHSP70には、急性ストレス時の腸管防御機構において、副交感神経系抑制時は大腸におけるHSP70発現は腸内細菌の侵入に依存しない他の経路がかかわっている可能性が考えられる。HSPは種々のストレスから身体を防御しようとする様々な働きがあり、本研究結果である腸管蠕動抑制のみでHSP70が上昇するメカニズムについては、著者らの先行研究で示したストレス防御として、グルコルチコイドと腸内細菌の経路が考えられるため、今後、検討すべき課題である。

実験2)において、若齢マウスを用いて*L.casei*摂取が損傷骨格筋の修復・再生過程を改善することができるかどうかを調べたが、組織学的な損傷筋の修復・再生過程に影響がみられなかった(Fig. 3-6.)。一方、実験3)において、老化マウスの*L.casei*摂取が損傷骨格筋の修復・再生過程を改善することができるかどうかを調べた結果、損傷筋の重量の回復過程、組織学的な所見において、修復・再生過程に時間的な改善が認められた(Fig. 7-10.)。

腸管の免疫系を賦活化すると考えられている腸内細菌は腸管で共生し外界からの細菌やウイルスの防御、生体の恒常性維持に働いている(32)。Clancyらは、オーバートレーニング状態の選手の血中CD4T細胞のIFN γ の産生能が著しく低下しているが、このアスリートに1ヶ月間、乳酸菌を摂取させるとIFN γ の産生が回復したことを報告している。このことから、若齢マウスにおいて効果が見られなかった理由は、腸管機能の低下が認められず、一方、老化マウスにおいては、腸管機能の老化を、*L.casei*摂取によって改善した可能性が考えられる。

腸内環境を正常に維持するためには乳酸菌が有効かもしれないが、腸管機能を賦活化させる作用を求めるのではなく、恒常性を維持することが重要であると考えられる。

老化マウスにおいて*L.casei*摂取によって、筋線維周囲径の成熟が見られた。腸管機能を維持することは筋線維再生後の筋の成熟に関与している可能性が考えられる。老化における腸管機能の修飾は、サルコペニア予防に繋がる可能性が考えられる。本研究の実験2)および実験3)では、*L.casei*摂取が損傷筋の修復・再生における効果について調べ、老化マウスにおいて、回復過程に効果がみられたが、現時点においては現象を確認したのみである。今後は、これらのメカニズム解析を行う必要がある。また、本研究では動物実験でマウスを用いているが、将来的にはアスリート、高齢者など、ヒトを対象とした研究に発展させる必要性が考えられる。

本研究は、ストレスにおける腸管機能の低下と選手のコンディショニングについて、腸管機能を維持するプロバイオティクス(*L.casei*)摂取が損傷した骨格筋の修復・再生にどのようにかかわっているかを調べ、以下のようにとまとめた。

1) ストレスにおける腸管機能防御には、腸管蠕動抑制における防御反応としてHSP70発現増強が考えられ、先行研究における、グルココルチコイドと腸内細菌の両方によるHSP70発現とは異なる経路がかかわっている可能性が示唆された。

2) 若齢マウスにおける*L.casei*摂取は、再生筋線維周囲径の回復促進、筋重量および組織学的な回復に対する効果は得られなかった。

3) 加齢マウスにおける*L.casei*摂取は、筋重量および組織学的な回復が観察され、また、再生筋線維周囲径の回復促進効果が得られた。このことから、加齢マウスにおいて腸管機能維持が筋線維再生後の成熟に関与している可能性が考えられた。筋損傷からの回復過程における腸管機能の修飾はサルコペニア予防に繋がる可能性が考えられた。

今後の展望として、腸管機能維持がサルコペニアの予防と関連している可能性について検討し、将来的にはスポーツ選手のみならず、高齢者の運動処方に役立つ基礎資料として現場への還元を考えている。

V. 謝辞

本研究のご支援を頂いた上月スポーツ・教育財団に深謝申し上げます。

VI. 参考文献

1. Matsuo K, Zhang X, Ono Y, & Nagatomi R (2009) Acute stress-induced colonic tissue HSP70 expression requires commensal bacterial components and intrinsic glucocorticoid. (Translated from eng) *Brain Behav Immun* 23(1):108-115 (in eng).
2. Berg A, Muller HM, Rathmann S, & Deibert P (1999) The gastrointestinal system--an essential target organ of the athlete's health and physical performance. (Translated from eng) *Exerc Immunol Rev* 5:78-95 (in eng).
3. Sullivan SN & Wong C (1992) Runners' diarrhea. Different patterns and associated factors. (Translated from eng) *J Clin Gastroenterol* 14(2):101-104 (in eng).
4. Ho GW (2009) Lower gastrointestinal distress in endurance athletes. (Translated from eng) *Curr Sports Med Rep* 8(2):85-91 (in eng).
5. Heer M, *et al.* (1987) Acute ischaemic colitis in a female long distance runner. (Translated from eng) *Gut* 28(7):896-899 (in eng).
6. Ash CJ, Cook JR, & Homer LD (1990) The use of rectal temperature to monitor thermal injury of marathon runners in temperate weather. *Mo Med* 87(5):298-303.
7. Bounous G & McArdle AH (1990) Marathon runners: the intestinal handicap. *Med Hypotheses* 33(4):261-264.
8. Zhang X, Okutsu M, Kanemi O, Gametchu B, & Nagatomi R (2005) Repeated stress suppresses interferon-gamma production by murine intestinal intraepithelial lymphocytes. (Translated from eng) *Tohoku J Exp Med* 206(3):203-212 (in eng).
9. Fukudo S, *et al.* (1999) Psychophysiological stress induces heat shock cognate protein 70 messenger RNA in the hippocampus of rats. (Translated from eng) *Neuroscience* 91(4):1205-1208 (in eng).
10. Fukudo S, Abe K, Hongo M, Utsumi A, & Itoyama Y (1997) Brain-gut induction of heat shock protein (HSP) 70 mRNA by psychophysiological stress in rats. (Translated from eng) *Brain Res* 757(1):146-148 (in eng).
11. Fukudo S, Abe K, Hongo M, Utsumi A, & Itoyama Y (1995) Psychophysiological stress induces heat shock cognate protein (HSC) 70 mRNA in the cerebral cortex and stomach of rats. (Translated from eng) *Brain Res* 675(1-2):98-102 (in eng).
12. Tipton KD, Gurkin BE, Matin S, & Wolfe RR (1999) Nonessential amino acids are not necessary to stimulate net muscle protein synthesis in healthy volunteers. (Translated from eng) *J Nutr Biochem* 10(2):89-95 (in eng).
13. Tipton KD, *et al.* (2004) Ingestion of casein and whey proteins result in muscle anabolism after resistance exercise. (Translated from eng) *Med Sci Sports Exerc* 36(12):2073-2081 (in eng).
14. Hulmi JJ, Lockwood CM, & Stout JR (2010) Effect of protein/essential amino acids and resistance training on skeletal muscle hypertrophy: A case for whey protein. (Translated from eng) *Nutr Metab (Lond)* 7:51 (in eng).
15. Fujita S, *et al.* (2009) Essential amino acid and carbohydrate ingestion before resistance exercise does not enhance postexercise muscle protein synthesis. (Translated from eng) *J Appl Physiol*

106(5):1730-1739 (in eng).

16. Tipton KD, *et al.* (2007) Stimulation of net muscle protein synthesis by whey protein ingestion before and after exercise. (Translated from eng) *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292(1):E71-76 (in eng).
17. Borsheim E, Tipton KD, Wolf SE, & Wolfe RR (2002) Essential amino acids and muscle protein recovery from resistance exercise. (Translated from eng) *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283(4):E648-657 (in eng).
18. Pagnini C, *et al.* (2010) Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity. (Translated from eng) *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(1):454-459 (in eng).
19. West NP, Pyne DB, Peake JM, & Cripps AW (2009) Probiotics, immunity and exercise: a review. (Translated from eng) *Exerc Immunol Rev* 15:107-126 (in eng).
20. Verdu EF (2009) Probiotics effects on gastrointestinal function: beyond the gut? (Translated from eng) *Neurogastroenterol Motil* 21(5):477-480 (in eng).
21. Neish AS (2009) Microbes in gastrointestinal health and disease. (Translated from eng) *Gastroenterology* 136(1):65-80 (in eng).
22. O'Toole PW & Cooney JC (2008) Probiotic bacteria influence the composition and function of the intestinal microbiota. (Translated from eng) *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2008:175285 (in eng).
23. Tlaskalova-Hogenova H, *et al.* (2004) Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. (Translated from eng) *Immunol Lett* 93(2-3):97-108 (in eng).
24. Seth A, Yan F, Polk DB, & Rao RK (2008) Probiotics ameliorate the hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by a PKC- and MAP kinase-dependent mechanism. (Translated from eng) *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294(4):G1060-1069 (in eng).
25. Clancy RL, *et al.* (2006) Reversal in fatigued athletes of a defect in interferon gamma secretion after administration of *Lactobacillus acidophilus*. (Translated from eng) *Br J Sports Med* 40(4):351-354 (in eng).
26. Aoi W, *et al.* (2007) Inhibitory effect of fermented milk on delayed-onset muscle damage after exercise. (Translated from eng) *J Nutr Biochem* 18(2):140-145 (in eng).
27. Brooks SV & Faulkner JA (1994) Skeletal muscle weakness in old age: underlying mechanisms. (Translated from eng) *Med Sci Sports Exerc* 26(4):432-439 (in eng).
28. Faulkner JA, Brooks SV, & Zerba E (1995) Muscle atrophy and weakness with aging: contraction-induced injury as an underlying mechanism. (Translated from eng) *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 50 Spec No:124-129 (in eng).
29. Carlson BM, Dedkov EI, Borisov AB, & Faulkner JA (2001) Skeletal muscle regeneration in very old rats. (Translated from eng) *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56(5):B224-233 (in eng).
30. Lynch GS, Faulkner JA, & Brooks SV (2008) Force deficits and breakage rates after single lengthening contractions of single fast fibers from unconditioned and conditioned muscles of young and old rats. (Translated from eng) *Am J Physiol Cell Physiol* 295(1):C249-256 (in eng).
31. Kanemi O, Zhang X, Sakamoto Y, Ebina M, & Nagatomi R (2005) Acute stress reduces

intraparenchymal lung natural killer cells via beta-adrenergic stimulation. (Translated from eng) *Clin Exp Immunol* 139(1):25-34 (in eng).

32. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, & Medzhitov R (2004) Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118(2):229-241.
33. Matzinger P (1998) An innate sense of danger. *Semin Immunol* 10(5):399-415.
34. Ortega E, *et al.* (2006) Role of Hsp72 and norepinephrine in the moderate exercise-induced stimulation of neutrophils' microbicide capacity. *Eur J Appl Physiol* 98(3):250-255.
35. Fleshner M, Campisi J, & Johnson JD (2003) Can exercise stress facilitate innate immunity? A functional role for stress-induced extracellular Hsp72. (Translated from eng) *Exerc Immunol Rev* 9:6-24 (in eng).

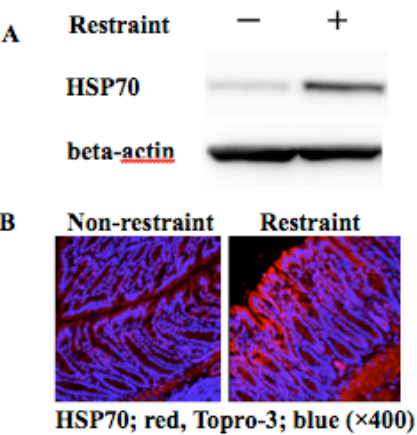


Fig. 1. Effects of 2-h restraint stress on HSP70 expression in colonic tissue (A, Western blotting; B, immunohistochemistry).

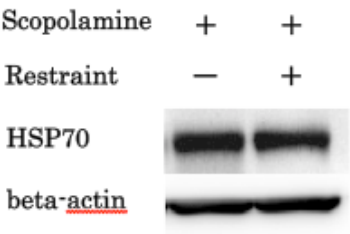


Fig. 2. Effects of 2-h restraint stress on HSP70 expression in colonic tissue after scopolamine administration (Western blotting).

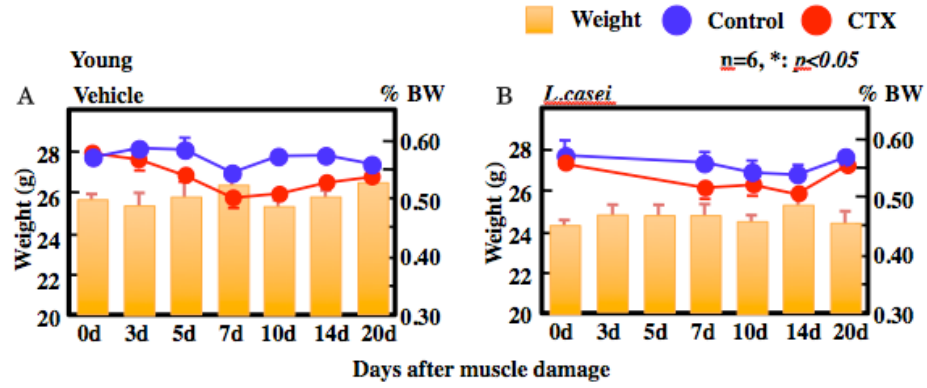


Fig. 3. Body weight and gastrocnemius muscle weight changes in after CTX injection by Vehicle and *L.casei* treatment in young mice (A, Vehicle; B, *L.casei*). (n=6, *: $p<0.05$)

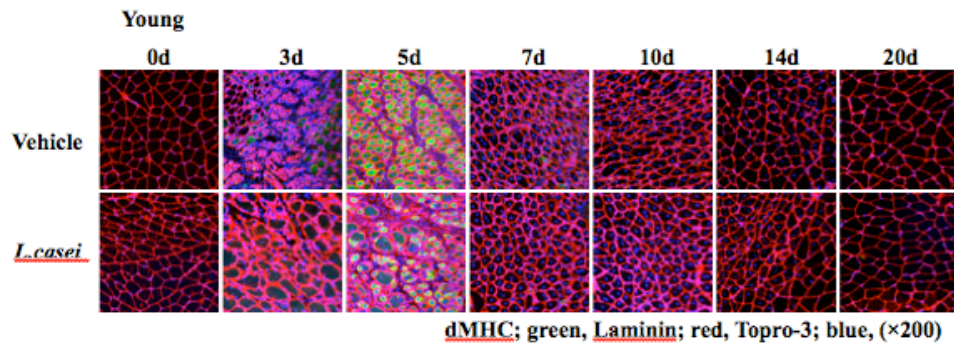


Fig. 4. Immunohistochemical staining for dMHC and Laminin changes in after injured gastrocnemius muscle by vehicle and *L.casei* administration in young mice.

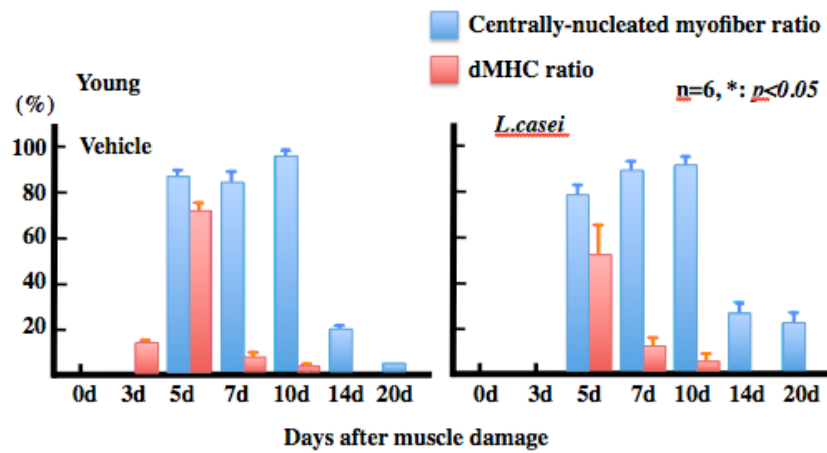


Fig. 5. Muscle fiber circumference in control and CTX injected after 20day by vehicle and *L.casei* administration in young micemice. (n=6, *, $p<0.05$)

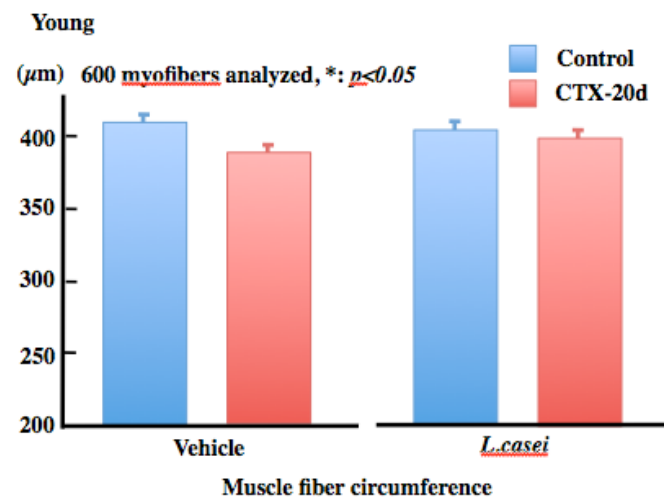


Fig. 6. Muscle fiber circumference in control and CTX injected after 20day by vehicle and *L.casei* administration in young mice. (n=6, *, $p<0.05$)

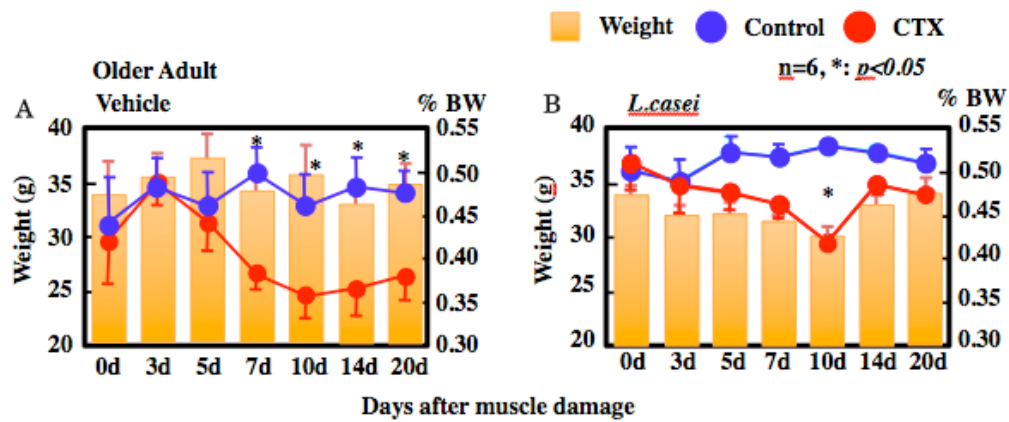


Fig. 7. Body weight and gastrocnemius muscle weight changes in after CTX injection by vehicle and *L.casei* treatment in older adult mice (A, Vehicle; B, *L.casei*). (n=6, *: $p < 0.05$)

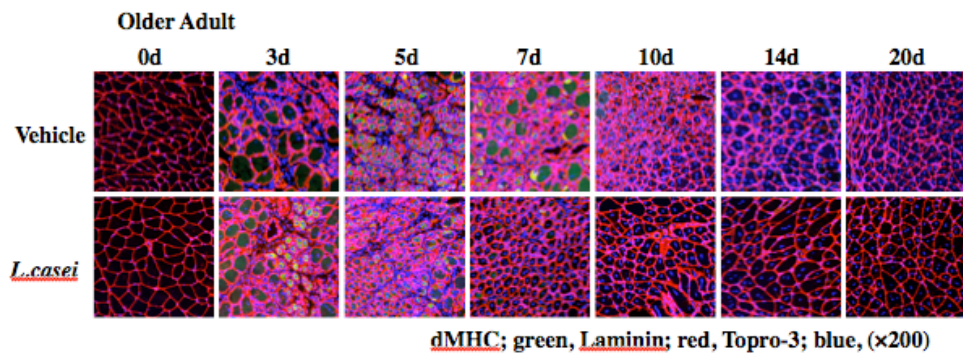


Fig. 8. Immunohistochemical staining for dMHC and Laminin changes in after CTX injected gastrocnemius muscle by vehicle and *L.casei* administration in older adult mice.

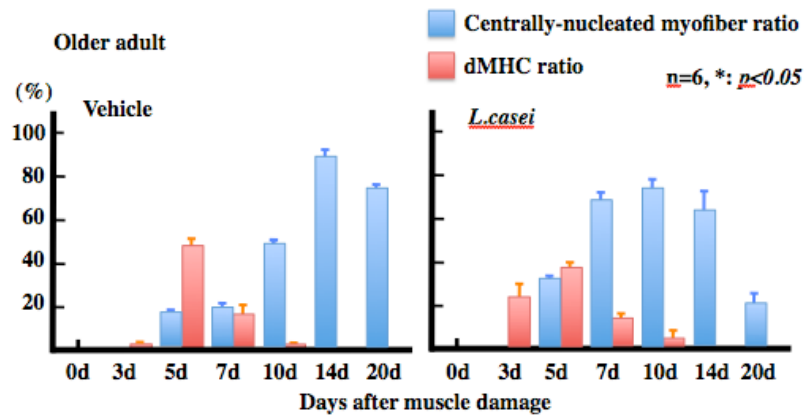


Fig. 9. dMHC and centrally nucleated-myofiber ratios after CTX by vehicle and *L.casei* administration in older adult mice. (n=6, *: $p < 0.05$)

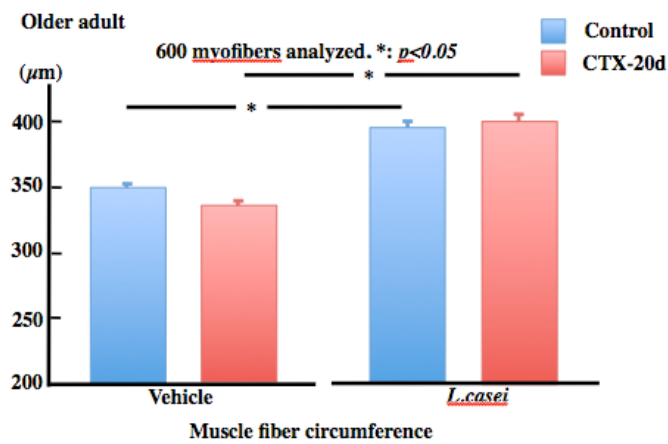


Fig. 10. Muscle fiber circumference in control and CTX injected after 20day by vehicle and *L.casei* administration in older adult mice. (n=6, *: $p < 0.05$)