ラットにおける血中乳酸を指標とした運動強度の評価

Evaluation of Exercise Intensity Indicated by Blood Lactate in Rats During Treadmill Exercise

佐賀医科大学地域保健科学講座

熊谷 秋三・西住 昌裕

Shuzo Kumagai and Masahiro Nishizumi

Department of Community Health Science, Saga Medical School, Saga

The purpose of the present study was to evaluate whether lactate threshold (LT) in rats could be detected from changes of blood lactate concentration during intensive graded exercise (IGE) with 2 protocols and prolonged exercise (PE) using motor driven treadmill. Rats used in this study were male and female Wistar strain rats 5 weeks of age. After running for 10 minutes per day for 1 week, IGE test was performed with 6 to 7 week old rats. Experimental periods for PE test ranged from 7 to 9 weeks old. Although blood lactate concentration during IGE test was exponentially increased, formal LT was hard to determine. In PE at speed of 23 m/min, blood lactate concentration initially increased, and thereafter stabilized or gradually decreased to the resting level. At this speed, rats could well tolerate running for 60 minutes. But, blood lactate concentration during PE at speed of 28 m/min linearly increased with lapse of time. Endurance time at this speed and peak blood lactate value averaged 38 minutes (30-44 minutes) and 7.0 mM (6.2-7.5 mM), respectively. From these results, we estimated that the velocity corresponding to LT in rats 6 to 9 weeks of age was about 23 m/min.

Key words: Rat, Blood lactate, Treadmill exercise, Graded exercise test, Prolonged exercise

ラット, 血中乳酸, トレッドミル運動, 漸増運動負荷テスト, 長時間運動

はじめに

今日, 健康増進ならびに, 高血圧・糖尿病などの成人病の予防・改善にとって適度の運動の必要性が論じられているが¹⁾, その運動処方の一要素として運動強度を知るために, 最大酸素摂取量 ($\dot{V}O_{2max}$) を測定して, その相対値を用いたり²⁾, あるいは血中乳酸の測定から求められる Lactate Threshold (LT) の利用³⁾ が実際に行われている。

しかし, 加齢現象をはじめ各種の疾病・中毒に及ぼす運動の影響を研究するに当たって, 人体での試験に代わり, 動物での実験が必要な場合が少なくない⁴⁻⁹⁾。実際, 高血圧自然発症ラット (SHR) において一定の身体トレーニングが血圧上昇抑制効果をもたらすとの報告は^{4,5)}, 人の高血圧症についてもコントロールの可能性を示唆し

ている。この際, ラットで運動強度の生理的指標として $\dot{V}O_{2max}$ の測定を行うことは, 人での測定に比べ煩雑であり, また骨格筋の代謝能を正確に反映していないとの欠点も指摘されている¹⁰⁾。そこで, 測定も比較的簡単であり, 運動中の生理的意義も確認されている血中乳酸^{11,12)} をラットの運動中に継続的に測定することにより, LT の決定が可能であるかどうかを検討すると共に, ラットにいくつかの運動負荷を行う場合の基準を設定することを目的として本実験を行った。

方 法

漸増運動負荷中の血中乳酸の変化を調べるために, 本実験では2種類のプロトコルを設定した (Fig. 1)。運動様式は, ランニングとし, 測定は実験動物強制運動測定器 (トレッドミル, シナノ製作所) を用いた。プロト

Fig. 1 Protocols used in this study. Blood samplings for lactate analysis were performed within 1 minute immediately after completion of each work load.

コール (A) では、初期スピード13 m/min から開始し、2分毎に5 m/min ずつ23 m/min まで漸増し、その後スピードを一定に保ち3種類の上り傾斜(8°, 14°, 20°)をつけて走行させた。初期スピードを13 m/min とした根拠は、このスピード以下では、ラットがベルト上で休む時間が多くなり運動量が一定に保てなかったという方法論上の限界と、歩行に相当するスピードを設定したかったことにある。プロトコール (B) では、スピード漸増法を採用し、初期スピード13 m/min で開始し2分毎に5 m/min ずつスピードを上昇させ、雌は33 m/min までの5負荷、雄は38 m/min までの6負荷を与えた。また別に、一定スピードでの30分(一部は60分)までの長時間運動の実験群も設定した。

測定動物は、Wistar 系ラットで5週齢の雄・雌各5匹を1群として両プロトコールにあてた。本テストは、1週間のランニングの練習期間(1日1回10分間の練習)をおいた後、6週と7週に実施した。10分間の練習中の運動量は、最初3日間は13 m/min(5分)と18 m/min(5分)であり、残り3日間はプロトコール (B) と同じであった。なお、測定が2週間に及んでいる理由は、尾静脈をカッティングすることによるラットへの侵襲をなるべく少なくするためと、傷が治癒するまでの期間をおくためである。したがって、6負荷のうち3負荷を6週齢で測定し、残りの負荷は1週間後(7週齢)に測定した。

血液は、継時的にカッティングした尾静脈よりマイクロキャピラリーによって20 μ l 採取した。得られた血液は、冷却された HClO_4 (0.6 N) 200 μ l ですみやかに除蛋白し、遠心分離後上澄を取り血中乳酸の分析に供した。血中乳酸の分析には、酵素法を用いた¹³⁾。

なお、測定時間はラットの自発運動の周期を考慮して、午前9:00から開始し11:30までにはすべての実験が終了するよう計画した。

結果と考察

各グループの実験期間中の体重変化を Fig. 2 に示す。雄・雌ともに、プロトコール (A) に用いられた群がグループ1であり、プロトコール (B) に用いられた群がグループ2である。グループ3は、後述する長時間運動用のグループである。各群とも週齢の増加に伴う体重の直線的増加傾向を認めた。体重の増加率は雄の方が顕著であった。性・週齢別にみた各グループ間の体重に有意差は認められなかった。

2種類のプロトコールを用いた漸増運動負荷中の血中

Fig. 2 Changes of body weight in rats during experimental period.

乳酸の変化を Fig. 3, 4 に示している。Fig. 4 から明らかなように、スピードの増加に伴う血中乳酸の指数関数的増加を認めた。Fig. 3 は、一定スピードに傾斜を負荷した時に、血中乳酸の変化が緩慢であるが、やはり指数関数的増加を認めた。この緩慢さの原因として、プロトコール (A) でのスピード漸増法に比べプロトコール (B) での運動強度(生体負担度)が低いためと考えた。また、同一スピードおよび傾斜下での血中乳酸濃度は、雌の方が雄より高値を示したが統計的に有意ではなかった。本実験の目的は、運動中に認められる血中乳酸の特徴ある

Fig. 3 Changes of blood lactate concentration during exercise (protocol A).

Fig. 4 Changes of blood lactate concentration during exercise (protocol B).

点である LT を決定することであった。この LT は、血中乳酸が安静値以上に上昇する点として定義され、その決定には、視覚的判定に加え統計的手法(線形回帰分析¹⁴⁾もしくは折れ線回帰分析¹⁵⁾が用いられている。人を対象にした研究によれば、LT は持久性パフォーマンス^{16,17)}や骨格筋中の遅筋線維 (Slow twitch fiber) および TCA 回路内の酵素活性との関連性が高い¹⁸⁾ことが認められている。しかしながら、本実験においてクリアーカットに LT を決定することは困難であった。その理由として、本実験での方法論上の限界が考えられた。まず、採血を頻繁に実施できず、LT を決定するために必要なプロット数が得られなかったことがあげられる。通常、LT の統計的解析には、データ数が20個以上(線形回帰分析の場合)

か20個前後(折れ線回帰分析の場合)ないと満足な解析結果が得られないことから、本実験において統計的手法の適用はできなかったことや、また、本実験でのデータ数が少ないことに関連して、低(歩行)スピードでのきめの細かい運動負荷の設定が人に比べラットでは不可能であることなどが考えられた。そこで我々は、LT のおよその目安をつけるためのステップとして両プロトコルでの血中乳酸の変化を参考に23 m/min とそれより一段階速い28 m/min の双方のスピードでの長時間運動を行うことにした。

このような手順をとった理由を以下に述べる。つまり、運動中の乳酸生成は低酸素状態の刺激によってのみ生じるのではなく、無氣的解糖と TCA 回路でのピルビン酸の利用とその割合のインバランスによっても生じると考えられており¹⁹⁾、LT は血液中において乳酸の処理よりも産生の割合が増加し始めた時点と考えられている。沢田らは、日常規則的にトレーニングを行っている青年男子を対象に、自転車エルゴメーターを用いた漸増運動負荷中の血中乳酸の特徴ある5つのポイントを求め、それぞれのポイントに相当する運動強度での長時間運動(最高60分間)を行い、その時の血中乳酸の経時的変化や運動持続時間を調べている。その中で、LT に相当する運動強度での血中乳酸は、初期(8分頃)に一過性に上昇するが、それ以降はわずかであるが漸減し、60分間の運動継続が可能であったことを報告している。そこで我々は、もし23 m/min のスピードが LT 付近であるならば、そのスピードで長時間運動を負荷した場合、同様な血中乳酸の変化が観察され、長時間の運動継続も可能であろうという仮説をたてた。この実験に用いたラットは、6週齢の雄1群と7週齢および9週齢の雌2群の計15匹であった。

Fig. 5 に23 m/min のスピードでの長時間運動中の血中乳酸の変化を示している。3群とも血中乳酸は初期に一過性に上昇し、その後時間の経過に伴いわずかではあるが漸減する傾向を認めた。

次に、28 m/min のスピードで長時間運動中の血中乳酸の変化と運動持続時間について検討を加えた。用いたラットは、7週齢の雄1群と8週齢および9週齢の2群の計15匹であった。その結果を Fig. 6 に示す。3群共に、運動時間の増加に伴い血中乳酸は増加傾向を認めた。各群とも30分目になるとランニングの継続を拒否する行動をとり始めた。その時の血中乳酸濃度は平均4 mM であり、それが生理的な疲労の徴候であるのか、心理的な要因によるランニングの継続拒否なのかの判断は困難で

Fig. 5 Changes of blood lactate concentration during prolonged exercise at constant speed of 23 m/min.

Fig. 6 Changes of blood lactate concentration during prolonged exercise at constant speed of 28 m/min.

あった。そこで、グループ3-1の8週齢雌ラットを対象に、28 m/minのスピードでexhaustionに達したと著者らが判断できるところまでランニングを継続させたところ、このグループの平均運動持続時間は38分(33分~44分)でexhaustionに到達し、その時の血中乳酸濃度は平均7 mM (6.2 mM~7.5 mM)であった。また、我々が別に行ったラットの遊泳試験(未発表)でも最長耐久時間(40分後)の血中乳酸値もこれにほぼ近い値であった。PatchとBrooks²¹⁾は、11週齢のラットを用い2種類の運動強度での長時間運動中の血中乳酸の変化を報告している。すなわち、傾斜1%で14.3 m/minのスピードという軽運動と傾斜15%で28.7 m/minのスピードという激運動の2つの条件下でランニングを継続させた場合、運動強度の違いこそあるが、本実験で観察された血中乳酸の変化と類似した成績をすでに異なった個体を対象に報告している。また、激運動30分目での血中乳酸濃度は、ほぼ6 mMに達しており、彼らの論文からその時点がexhaustionであったかどうかは不明であるが、我々が認めた28 m/minでのスピードでのexhaustion時の血中

乳酸濃度と近似する値であることから、本実験で認められた運動継続拒否は、生理的な疲労によるexhaustionと考えた。

以上の成績から、6~9週齢といった発育期にあるラットの場合、血中乳酸の動的なバランスから考えてLTに相当するスピードは、およそ23 m/min付近であろうと推定した。すなわち、このスピード以下であれば、運動継続に必要なエネルギーの動員は、炭水化物と脂肪の双方から得られることにより有気的代謝過程によるATPの再合成が行われランニングが長時間継続できるものと考えられる²²⁾。しかし、28 m/minのスピード以上になると、運動継続に必要なエネルギーの動員は、主に炭水化物に依存することになり、無気的代謝の終末産物として乳酸が蓄積してくる²²⁾。筋中ならびに血中乳酸の増加は、ATPの再合成を抑制し、ついに筋収縮は阻害され運動継続が不可能な状態になると思われる。

以上の成績から、運動中のラットの血中乳酸測定は、その濃度変化から筋収縮のためのエネルギーの動員に関与する代謝過程が有気的あるいは無気的にdominantであるかの判断にとって有効な情報をもたらすものと考えられた。また、本研究での成績は、同一個体を対象にして血中乳酸の測定が尾静脈より測定可能であることが実証されたことから、ラットの体力(疲労)評価や運動強度の設定にとって本法は有効であると思われる。とくに、乳酸分析に関しては、ラットの尾静脈からの採血が微量であることから、ごく微量な採血量でも十分に感度よく迅速に分析可能な分析法の導入も必要と考え、すでに血中乳酸のFlow injection analysisによる分析法を公表している²³⁾。

文 献

- 1) 阿部正和, 小野三嗣編: 運動療法, 朝倉書店(1977).
- 2) 体育科学センター: 健康づくり運動カルテ, 講談社, 東京(1976).
- 3) Kiyonaga, A., Arakawa, K., Tanaka, H. and Shindo, M.: Blood pressure and hormonal responses to aerobic exercise, Hypertension, 7, 125-131 (1985).
- 4) Tipton, C.M., Matthees, R.D., Marcus, K.D., Rowlett, K.A. and Leininger, J.R.: Influence of exercise intensity, age, and medication on resting systolic blood pressure of SHR populations, J. Appl. Physiol., 55, 1305-1310 (1983).

- 5) 橋本 勲, 樋口 満, 山川喜久江, 鈴木慎次郎: 日常の定期的運動の血圧上昇, 抑制因子の研究—強制と自由運動の違いがラットの血圧に及ぼす影響—, 体力科学, **30**, 206-213 (1981).
- 6) Holloszy, J.O., Smith, E.K., Vining, M. and Adams, S.: Effect of voluntary exercise on longevity of rats, *J. Appl. Physiol.*, **59**, 826-831 (1985).
- 7) 中村周吉郎: 脳卒中易発症高血圧自然発症ラットに対する長期走運動の血圧などに及ぼす効果, 体力科学, **28**, 307-313 (1979).
- 8) Wexler, B.C.: Jogging reduces obesity and hypertension in obese/SHR, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **173**, 541-546 (1983).
- 9) 木村修三, 垣平博臣: 亜硝酸ナトリウム (NaNO_2) のマウス運動機能に及ぼす影響について, 産業医学, **24**, 471-474 (1982).
- 10) Katch, V.A., Weltman, S., Sady, S. and Freedson, F.: Validity of the relative percent concept for equating training intensity, *Eur. J. Appl. Physiol.*, **39**, 210-217 (1978).
- 11) Graham, T.E.: Mechanisms of blood lactate increase during exercise, *Physiologist*, **27**, 299-303 (1984).
- 12) Karlsson, J. and Jacobs, I.: Onset of blood lactate accumulation during muscular exercise as a threshold concept. I. Theoretical consideration, *Int. J. Sports Med.*, **3**, 190-201 (1982).
- 13) Gutman, I. and Wahlefeld, A.W.: In *Method of enzymatic analysis* (Editor: H.U. Bergmeyer), p. 1464, Academic Press, New York (1974).
- 14) Orr, G.W., Green, H.J., Hughson, R.L. and Bennett, G.W.: A computer linear regression model to determine ventilatory anaerobic threshold, *J. Appl. Physiol.*, **52**, 1349-1532 (1982).
- 15) 福場良之, 神戸幸宏: Lactate threshold と ventilatory threshold の関係の再検討, *Annals Physiol. Anthropol.*, **4**, 43-49 (1985).
- 16) Kumagai, S., Tanaka, K., Matsuura, Y., Matsuzaka, A., Hirakoba, K. and Asano, K.: Relationships of the anaerobic threshold with 5 km, 10 km, and 10 mile races, *Eur. J. Appl. Physiol.*, **49**, 13-23 (1982).
- 17) Farrell, P.A., Wilmore, J.H., Coyle, E.F., Billings, J.E. and Costill, D.L.: Plasma lactate accumulation and distance running performance, *Med. Sci. Sports*, **11**, 338-344 (1979).
- 18) Ivy, J.L., Withers, R.T., Van Handel, P.J., Elger, D.H. and Costill, D.L.: Muscle respiratory capacity and fiber type as determinants of the lactate threshold, *J. Appl. Physiol.*, **48**, 523-527 (1980).
- 19) Holloszy, J.O.: Biochemical adaptation to exercise; Aerobic metabolism. In *Exercise and Sports Sci. Rev.* (Editor: J.H. Wilmore), p. 45-71, Academic Press, New York (1973).
- 20) 沢田 亨, 田中宏暁, 進藤宗洋, 牟田口孝, 石井 睦: 血中乳酸の変移点を基準とした運動強度における長時間運動中の血中乳酸の変化, 日本体育学会第35回大会号, 342 (1984).
- 21) Patch, L.D. and Brooks, G.A.: Effects of training on $\dot{V}\text{O}_{2\text{max}}$ and $\dot{V}\text{O}_2$ during two running intensities in rats, *Pflügers Arch.*, **386**, 215-219 (1980).
- 22) オストランド, P.O., ラダール, K.: “運動生理学” 浅野勝己訳, p. 347-348, 大修館書店 (1976).
- 23) Kumagai, S., Hirai, Y., Hasegawa, T., Tokudome, S., Tomokuni, K. and Nishizumi, M.: Enzymatic determination of blood lactate by flow injection analysis, *Annals Physiol. Anthropol.*, **5**, 97-100 (1986) (In press).

(受付 1986年1月30日 受理 1986年4月14日)