ラットの激運動後における乳酸の酸化

八 田 秀 雄* 跡 見 順 子** 山 本 順 子***
浅 見 俊 雄** 宮 下 充 正*

LACTATE OXIDATION IN RATS AFTER STRENUOUS EXERCISE

HIDEO HATTA, YORIKO ATOMI, YORIKO YAMAMOTO,
TOSHIO ASAMI and MITSUMASA MIYASHITA

Abstract

Oxidation of lactate at rest (RE, n=4), or after short strenuous exercise (EX, n=6) was investigated in rats. Food and water were given ad libitum before experiment. In EX, rats ran to exhaustion at the speed of 80-100 m·min⁻¹. Immediately after exercise, 4 μ Ci of [U-¹⁴C] lactate was injected into aorta through an indwelling catheter. In RE, [U-¹⁴C] lactate was injected into the rats at rest. Expired gas was collected by a Brooks type bottomless chamber on treadmill belt for 120 min. In EX, exercise duration was 109±18 sec (mean±SE), and maximum blood lactate concentration after the exercise was 23.7±2.1 mM (mean±SE). Cumulative percent recovery of ¹⁴C as ¹⁴CO₂ for 120 min was 48.5±2.8% for EX and 61.7±0.9% for RE (mean±SE). Significant difference was found between these two rates (p<0.01). After 50 min of recovery, mean volume of ¹⁴CO₂ expired per min in RE was significantly greater than that in EX (p<0.01). Mean volume of ¹⁴CO₂ expired per min per $\dot{V}$ CO₂ in RE was always greater than that in EX, and significant difference was found at 7.5 min of recovery (p<0.01). It is concluded that although the rate of recovery of ¹⁴C as ¹⁴CO₂ after exercise is lower than that at rest, the major pathway of lactate metabolism after short strenuous exercise is oxidation.

(J. Physical Fitness Japan 1986, 35 : 111~116)

key words : rat, strenuous exercise, lactate, oxidation, [U-¹⁴C] lactate

I. 研 究 目 的

Hill および Meyerhof の研究以来¹⁾¹⁰⁾, 運動中に産生された乳酸は, 回復期において1/5が酸化され, 4/5が糖新生されるという考えが示されている. 運動中に無酸素的に乳酸を産生してエネルギーを得, 回復期に乳酸を元の糖に戻すという考えから, 運動後の酸素摂取量は酸素負債と呼ばれた. また筋には糖新生の律速酵素である, ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼなどが存在しないとされ, 乳酸は肝に運ばれて糖新生され

ると考えられてきた. しかし酸素負債は外的条件によって変化し, 必ずしも乳酸からの糖新生を表わすものではない, という考えも提示されている³⁾⁷⁾¹⁸⁾. その後放射性同位元素(RI)を用いるトレーサー実験により, 長時間運動中や筋の電気刺激中, およびそれらの回復期において, 乳酸は主として酸化され, 糖に戻される割合は高くないことが明らかとなった³⁾⁵⁾¹¹⁾¹⁴⁾. また筋中でも, 乳酸からグリコーゲンを合成できることが, 示されてきている⁴⁾¹⁵⁾¹⁷⁾. また乳酸の代謝には, アミノ酸の代謝が密接に関係していることも報告されてい

* 東京大学教育学部 Faculty of Education, University of Tokyo
文京区本郷7-3-1

** 東京大学教養学部 Department of Sports Sciences, College of Arts and Sciences, University of Tokyo
目黒区駒場3-8-1

*** 相模女子大学 Sagami Woman's University
相模原市文京2-2-1

る³⁾。したがって運動後の乳酸の代謝には、様々な可能性を考慮しなければならないといえ、不明な点が多い。

先行研究では、絶食時や長時間運動後のように、筋および肝グリコーゲン含量を低下させた状態で、乳酸の代謝を調べる実験が行なわれている。グリコーゲン含量を低下させた場合、運動中に乳酸は産生されにくく、回復期に乳酸は糖新生されやすくなると思われる。本研究では、ラットに食餌を自由に与えた状態で、数分で exhaustion に達する激運動を行なわせ、乳酸を多量に産生させた。この運動直後に、 ^{14}C で標識された乳酸を注入するトレーサー実験から、産生された乳酸のうち酸化される割合と、その時間経過を明らかにすることを目的とした。

II. 実験方法

ラット：日本生物材料センターより購入した Wistar 系ラット、雄7匹、雌1匹を用いた。実験時の体重は、185~311 g であった。実験までに、トレッドミルによる走行の練習を行なわせた。実験前にラットに対して、アトム社製静脈用カテーテル(外径 0.65 mm)を、左頸動脈より大動脈に挿入した¹⁶⁾。カテーテルは背中側に回し、頸後部中央より出した。実験は、ラットの体重が手術前の

値に回復した後に行なった。また実験日まで、食餌と水は自由に与えた。

RI: $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ 乳酸 ナトリウム (New England Nuclear, 比放射能 $179.5 \text{ mCi} \cdot \text{mmol}^{-1}$) を、0.9% 塩化ナトリウム溶液として用いた。実験日ごとに、この溶液 $20 \mu\text{l}$ により、放射能を確認した。

ラットの呼気ガス採取、 $\dot{V}\text{O}_2$, $\dot{V}\text{CO}_2$ の測定：アクリル板を用いて、底のない $\dot{V}\text{O}_2$ 測定用チャンパー ($7.5 \times 29 \times 12 \text{ cm}$) を作成し、これをトレッドミルベルト上に乗せた(図1)²⁾。チャンパーの側面と後面の下部はベルトと密着させ、前面の下部にはベルトとの間にわずかの隙間を設けた。チャンパー内の呼気ガスは、イワキ社製ポンプにより吸引し、アニマ製 R1500-PS 自動ガス分析器に導いた。自動ガス分析器は、吸引ガス量を人間の測定における $\dot{V}_E$ にあたるものとして、 $\dot{V}\text{O}_2$, $\dot{V}\text{CO}_2$, R を算出した。トレッドミルベルトとチャンパー下部との間から、空気もれが生ずるかについて、窒素ガスを一定量チャンパー内に注入し、吸引ガス中の酸素濃度の変化を調べる実験を行なった。その結果、トレッドミル静止時には空気もれは問題とならず、 $40 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$ で稼働時にも、空気もれは3%以下であることを確認した。また呼気ガス反応の half-time は40秒である。吸引ガスの一部($0.5 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$)を流量計で確認しながら採

Fig. 1. Schematic diagram of the experimental apparatus.

取し, エタノールアミン・メチルセロソルブー 1: 2(v/v)液に, CO_2 を吸収させ, $^{14}\text{CO}_2$ 呼出量を求めた.

実験手順: 実験は運動群 (EX, $n=6$), および安静群 (RE, $n=4$) について行なった. まず RE, EX ともに, カテーテルより $100\ \mu\text{l}$ 採血し, ラットをチャンバー内に入れ, カテーテルをチャンバー外に導いた. EX では $25\ \text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ で 3 分間走行し 2 分間休息させた後, $80\sim 110\ \text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ の速度で走行させ, exhaustion に至らせた. exhaustion は, ラットが電気刺激を受けても走行できない状

態とした. 運動終了後直ちに採血し, 続いて $4\ \mu\text{Ci}$ の $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ 乳酸を注入した. ラットは, 回復 120 分まで安静を保たせた. 採血は回復 5, 10, 15, 30, 60, 120 分に行なった. $^{14}\text{CO}_2$ の捕集は, 回復 30 分までは 5 分ずつ, その後回復 40 分, 60 分, 90 分, 120 分と区切って行なった. RE では運動を行わず安静を保った状態で, $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ 乳酸を注入した. 採血は 15, 30, 60, 120 分に行なった. $^{14}\text{CO}_2$ の捕集は EX と同様である. 同一ラットを RE と EX とも行なわせる場合, 実験は最低一週間の間隔をおいて行ない, 実験開始時刻も同一となるように

Fig. 2. Blood lactate concentrations (mean $\pm$ SE) as a function of time in RE and EX.

Fig. 3. Evolution of $^{14}\text{CO}_2$ following injection of $4\ \mu\text{Ci}$ of $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ lactate into aorta in rats at rest or after strenuous exercise. Points are mean $\pm$ SE. *—significantly different between RE and EX ($p < 0.01$).

した。

試料の分析方法：採取した血液は、直ちに氷冷した 0.6N HClO_4 により除蛋白した。除蛋白液中の乳酸濃度は、酵素法により求めた⁹⁾。 CO_2 吸収液中の $^{14}\text{CO}_2$ の放射能は、液体シンチレーション法により求めた。吸収液 1 ml を、 10 ml のトルエンシンチレーターに溶解させ、Packard Tricarb 3255スペクトロメーターによりカウントした。計数効率、 $47\sim 50\%$ であった。

III. 結 果

EXにおいて激運動の持続時間は、 109 ± 18 秒(平均 $\pm$ SE)であった。運動後の最大血中乳酸濃度

Table 1. Cumulative percent recovery of ^{14}C as $^{14}\text{CO}_2$ for 120 min of recovery. * -female rat

Rat	RE	EX
1	60.6	45.0
2*	60.0	43.3
3	63.7	
4	62.4	
5		39.7
6		55.6
7		51.4
8		55.9
Mean	61.7	48.5
SE	0.9	2.8

は、 $23.7\pm 2.1\text{ mM}$ (平均 $\pm$ SE)であった(図2)。運動終了から採血を行ない RI を注入するまでの時間は、 96 ± 16 秒(平均 $\pm$ SE)であった。注入された乳酸が酸化される反応は速く、RE, EXとも回復5分までに、多くの $^{14}\text{CO}_2$ が呼出された(図3)。REでは回復7.5分において、1分あたりの $^{14}\text{CO}_2$ 呼出量が最大となった。EXでは1分あたりの $^{14}\text{CO}_2$ 呼出量は、最大値でREと同様であるものの、時間が遅れる傾向を示した。また回復50分以降では、1分あたりの $^{14}\text{CO}_2$ 呼出量は、REがEXに比して有意に大であった($p<0.01$)。EXでは回復120分までに、注入された放射能の平均48.5%が、 $^{14}\text{CO}_2$ となって呼出された(表1)。またREでは、注入放射能の平均61.7%が呼出された。この割合は、両群間で有意差が認められた($p<0.01$)。1分あたりの $^{14}\text{CO}_2$ 呼出量を、 $\dot{V}\text{CO}_2$ あたりにする、と、両群間の差が大となり、回復7.5分では有意差が認められた($p<0.01$)(図4)。

IV. 考 察

本研究で用いたラットの $\dot{V}\text{O}_2$ 測定装置では、トレッドミルベルトとチャンバー下部との間から、空気もれが生ずるかが問題となる。そこでチャンバー内に窒素ガスを注入し、吸引ガス中の酸素濃度がどれだけ低下するかにより、これを確認した。本研究では、トレッドミルの静止している回復期において、呼気ガス中の $^{14}\text{CO}_2$ を測定した

Fig. 4. Evolution of $^{14}\text{CO}_2$ per $\dot{V}\text{CO}_2$ following injection of $4\mu\text{Ci}$ of $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ lactate at rest or after strenuous exercise.

ことから、空気もれは問題にならないと思われる。また激運動中の $\dot{V}O_2$ は、反応の half-time が40秒であり、空気もれも考えられ、正確に求めることはできなかった。この $\dot{V}O_2$ 測定用チャンパーは、側面と後面がトレッドミルベルトと密着しており、ラットを exhaustion に追いこみやすく、EX では運動後に血中乳酸濃度が20 mM を越え、非常に強度の高い運動を行わせ得た。また本研究では雌雄両ラットを用いたが、表1のように、雌と雄とで結果に差は認められなかった。

Brooks and Gaesser は³⁾、長時間運動後のラットに、 ^{14}C -乳酸を腹腔投与するトレーサー実験を行なっている。そして乳酸は主として酸化されたこと、また回復4時間までにグリコーゲンにとりこまれたのは、注入放射能の18.3%であったことを報告した。本研究の方法が、この報告の方法と大きく異なる点は、本研究では実験前に食餌を自由とし、ラットに短時間の激運動を行なわせたことと、カテーテルにより RI を動脈投与したことである。一夜の絶食と長時間運動の後では、筋および肝グリコーゲンは涸渇状態となり⁷⁾、その場合乳酸からのグリコーゲン合成が、亢進すると思われる。また RI の投与については血中投与が望ましく¹²⁾、腹腔投与では、RI の吸収と血中への拡散に時間を要する点が、大きな問題であろう。

運動中では血中乳酸の増加とともに、乳酸の代謝回転率も高まること⁵⁾、またトレーニングによって、運動中の乳酸除去能力が向上することが報告されている⁶⁾。ヒトに ^{14}C -乳酸や ^{13}C -乳酸を注入したトレーサー実験でも、運動中に多くの乳酸が酸化されていることが、明らかとなった¹¹⁾¹⁴⁾。したがって乳酸は産生されるだけでなく、一方では代謝されており、運動のエネルギーは、乳酸の酸化によっても得ていることがわかる。特に酸化能力の高い slow 線維において、多く乳酸が酸化されると推察することができよう¹⁵⁾。運動後では、乳酸は肝に送られ1/5が酸化され、残りがグリコーゲンに戻るとされた。その後、筋内でも乳酸からグリコーゲンが合成されることが、明らかとなった⁴⁾¹⁵⁾¹⁷⁾。しかし血中、筋中乳酸は、運動後15~30分で運動前の値に戻るが、その時点で筋、

肝グリコーゲン含量は回復しておらず、乳酸が直接グリコーゲンに戻されるとは考えにくいことを、Gaesser and Brooks⁷⁾が報告した。本研究の結果も、運動中に産生された乳酸は、回復期には主として酸化されて除去され、グリコーゲンに戻される割合は酸化される割合よりも、低いと思われることを示した。そこで回復期における酸素摂取量は、これを酸素負債として、乳酸がグリコーゲンに戻される過程を示す、とするのみでは適切でないといえよう。実際には多くの要素が、運動後の酸素摂取量に影響していると考えられる¹⁸⁾。

ここで Hermansen and Vaage⁹⁾は、ヒトの筋生検から、運動後において筋中の乳酸は、主として筋内でグリコーゲンに戻されると報告しており、不明な点が多い。

安静時に比して激運動後では、乳酸の酸化される割合が低下する理由については、運動によって筋グリコーゲン含量が低下し、回復期においてグリコーゲンが合成されていることが考えられる。二例ずつ同一の実験条件で求めた。腓腹筋のグリコーゲン含量は、運動前5.2, 5.9, 運動直後1.9, 2.1, 回復120分5.1, 5.5 mg·g wet weight⁻¹であった。回復120分までに、グリコーゲンが合成され、運動前の水準に戻っていることがわかる。したがって激運動後では、乳酸は主として酸化されるものの、安静時に比してグリコーゲンへ合成される割合も高いことから、本研究の結果が得られたと推察できる。これには、エピネフリンが糖新生を高めることが報告されており¹³⁾、運動によって放出された、エピネフリンの影響も考えられよう。回復50分以降で、EX が RE に比して、 $^{14}CO_2$ 呼出量が有意に低いことは、EX では RE よりも、乳酸の代謝回転率が高いことを示していると思われる。そこで乳酸は、どの部位でどのように代謝されているかを求めることが、今後の課題である。

V. ま と め

ラットを用いて、激運動後における乳酸の酸化を調べた。食餌を自由に与えたラットに対して、平均109秒で exhaustion に至る運動を行なわせ、

運動終了直後に $4 \mu\text{Ci}$ の $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ 乳酸を動脈注入した。運動後の最大血中乳酸濃度は、 $23.7 \pm 2.1 \text{ mM}$ (平均 $\pm$ SE) であった。1分あたりの $^{14}\text{CO}_2$ 呼出量は、安静群では回復7.5分で最大となり、運動群では最大値は同様であるものの、時間が遅れる傾向を示した。回復120分までに、注入放射能のうち、安静群 $61.7 \pm 0.9\%$ 、運動群 $48.5 \pm 2.8\%$ (平均 $\pm$ SE) が、 $^{14}\text{CO}_2$ となって呼出された。 $^{14}\text{CO}_2$ 呼出量は $\dot{V}\text{CO}_2$ あたりになると両群間の差が大となった。そこで激運動後には、安静時に比して酸化される割合は低いが、乳酸は主として酸化されることが示された。

本研究の要旨は、第74回日本体力医学会関東地方会において発表した。

本研究は、東京大学アイソトープ総合センターの施設を使用して行なった。関係各位に深く感謝します。

(受付 昭和60年6月29日)

References

- 1) Bendall, J. R. and Taylor, A. A. (1970) : The Meyerhof quotient and the synthesis of glycogen from lactate in frog and rabbit muscle. A reinvestigation. *Biochem. J.*, **118**, 887-893.
- 2) Brooks, G. A. and White, T. P. (1978) : Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *J. Appl. Physiol.*, **45**, 1009-1015.
- 3) Brooks, G. A. and Gaesser, G. A. (1980) : End points of lactate and glucose metabolism after exhausting exercise. *J. Appl. Physiol.*, **49**, 1057-1069.
- 4) Crabtree, B., Higgins, S. J. and Newsholme, E. A. (1972) : The activities of pyruvate carboxylase, phosphoenolpyruvate carboxylase and fructose diphosphatase in muscles from vertebrates and invertebrates. *Biochem. J.*, **130**, 391-396.
- 5) Depocas, F., Minaire, Y. and Chatonnet, J. (1969) : Rates of formation and oxidation of lactic acid in dogs at rest and during moderate exercise. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **47**, 603-610.
- 6) Donovan, C. M. and Brooks, G. A. (1983) : Endurance training affects lactate clearance, not lactate production. *Am. J. Physiol.*, **244**, E83-E92.
- 7) Gaesser, G. A. and Brooks, G. A. (1980) : Glycogen repletion following continuous and intermittent exercise to exhaustion. *J. Appl. Physiol.*, **49**, 722-728.
- 8) Gutmann, I. and Wahlfeld, A. W. (1974) : L-(+)-Lactate. Determination with lactate dehydrogenase and NAD. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, 2nd Ed., edited by H. U. Bergmeyer. Academic Press. New York. 1464-1468.
- 9) Hermansen, L. and Vaage, O. (1977) : Lactate disappearance and glycogen synthesis in human muscle after maximal exercise. *Am. J. Physiol.*, **233**, E422-E429.
- 10) Hill, A. V. (1914) : The oxidative removal of lactic acid. *J. Physiol.*, **48**, x-xi.
- 11) Hubbard, J. L. (1973) : The effect of exercise on lactate metabolism. *J. Physiol.*, **231**, 1-18.
- 12) Katz, J., Okajima, F., Chenoweth, M. and Dunn, A. (1981) : The determination of lactate turnover in vivo with ^3H - and ^{14}C -labelled lactate. The significance of sites of tracer administration and sampling. *Biochem. J.*, **194**, 513-524.
- 13) Kusaka, M. and Ui, M. (1977) : Activation of the Cori cycle by epinephrine. *Am. J. Physiol.*, **232**, E145-E155.
- 14) Mazzeo, R. S., Brooks, G. A., Schoeller, D. A. and Budinger, T. F. (1982) : Pulse injection, ^{13}C tracer studies of lactate metabolism in humans during rest and two levels of exercise. *Biomed. Mass. Spectro.*, **9**, 310-314.
- 15) McLane, J. A. and Holloszy, J. O. (1979) : Glycogen synthesis from lactate in the three types of skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, **254**, 6548-6553.
- 16) Popovic, V. and Popovic, P. (1960) : Permanent cannulation of aorta and vena cava in rats and ground squirrels. *J. Appl. Physiol.*, **15**, 727-728.
- 17) Shiota, M., Golden, S. and Katz, J. (1984) : Lactate metabolism in the perfused rat hindlimb. *Biochem. J.*, **222**, 281-292.
- 18) Welch, H. G., Faulker, J. A., Barclay, J. A. and Brooks, G. A. (1970) : Ventilation response during recovery from muscular work and its relation with O_2 debt. *Med. Sci. Sports*, **2**, 15-19.