

杜仲葉抽出エキスの投与が運動雄ラットの 筋肥大に及ぼす影響

曲 剛健・布施孝介*・高 建十**
田崎洋佑・伊藤 朗

Effects of Tu-Chung Leaves Extract on Muscle Hypertrophy in Male Rats Under Voluntary Exercise

QU Gang-Jian, FUSE Kousuke*, GAO Jian-Shi**,
TASAKI Yousuke and ITO Akira

We evaluated the effects of daily administration of Tu-Chung (*Eucommia ulmoides* OLIV.) leaves extract on muscle hypertrophy in male rats. Eighteen male wistar rats aged 7 weeks were divided into 3 groups: exercise (voluntary running training) with administration of Tu-Chung leaves extract group (Tu+Ex G, n=7), exercise with distilled water group (Ex G, n=7), and sedantary without any administration group (Sed G, n=4). The Tu-Chung leaves extract or distilled water was orally administered at a volume of 1 ml daily for 5 weeks. The following results were obtained.

- 1) Body weight did not differ among the three groups.
- 2) The voluntary running distance was significantly longer in Tu+Ex G than in Ex G ($p < 0.001$).
- 3) The serum testosterone concentration was significantly higher in Tu+Ex G than in Ex G, but did not differ between Ex G and Sed G ($p < 0.001$).
- 4) The weights of the lower leg muscle group (gastrocnemius + soleus + plantaris of both legs) was significantly greater in Tu+Ex G than in Ex G and Sed G ($p < 0.001$), and in Ex G than in Sed G ($p < 0.001$).
- 5) The testis weight was significantly greater in Tu+Ex G than in Ex G or Sed G ($p < 0.001$ each).
- 6) The total muscle protein content was significantly higher in Tu+Ex G than in Ex G and Sed G ($p < 0.001$), and in Ex G than in Sed G ($p < 0.01$).
- 7) The total muscle RNA content was significantly higher in Tu+Ex G than in Ex G or Sed G ($p < 0.001$ each), and in Ex G than in Sed G ($p < 0.05$).

These results suggest that running exercise with administration of Tu-chung leaves extract enhances muscle hypertrophy, with increase in the testis weight and serum testosterone concentration.

Key words: Tu-Chung leaves extract, Voluntary running, Male rats, Testosterone, Lower leg muscle group

* 仙台第一高等学校 Sendai Daiichi Highschool

** 北京体育大学運動生理学教研室 Department of Sports Physiology, Beijing University of Physical Education, Beijing, P. R. China

1. 緒言

杜仲 (*Eucommia ulmoides* OLIV.) は植物学的に一属一種でトチュウ科に属す樹木である。中国では昔からその樹皮が滋養強壯、強精の薬として用いられている^{10,31)}。中国古代の漢方薬の古典である『神農本草経』²⁷⁾には杜仲樹皮が内臓の諸機能を補い、元気を益し、筋骨を堅固にし、志を強くし、久しく服すると体の動きを軽やかにし、老いなしと高く評価されている。また杜仲の薬理作用については、鎮痛、鎮静、利尿などの作用が報告されている^{4,25)}。さらに、杜仲の薬効については、副腎および精巢の重量増大、学習行動(記憶)低下の抑制、性行動低下の抑制、肝臓内グリコーゲンの増加などが報告されている^{6,7,16,17)}。

一方、杜仲の葉は杜仲樹皮と類似の成分のイリドイド類、シクロペンタノイド類、リグナン配糖体などを含むことが報告され^{3,5,6,29)}、樹皮と同様の効果を有することが報告されている^{4,26)}。

しかし、漢方薬全般としていえることであるが、杜仲に関しても薬効性の研究が多く、薬理作用に関する研究は少ない。また健常者が、杜仲成分を摂取しかつ運動負荷をした研究は皆無である。

本研究では、杜仲葉抽出エキスの摂取が性腺に影響を及ぼすとの仮説にたち、杜仲のアナボリック作用について運動負荷を併用したラットを用いて検討した。

2. 方法

1) 実験動物および飼育条件

実験動物には7週齢のWistar系雄ラット18匹(184.3±7.2g)を用いた。これらは自由運動を行わせ、かつ杜仲葉エキスを投与する群(以下、運動+杜仲葉エキス群, Tu+Ex G; n=7)、自由運動を行わせるがエキスを投与しないで蒸留水を投与した群(運動のみの群, Ex G; n=7)、自由運動を行わずエキスのかわりに蒸留水を投与した群(安静群, Sed G; n=4)の3群に分類した。

ラットの飼育は全て個別に行い、運動+杜仲葉エキス群と運動のみの群は、回転式自由運動装置(シナノ製作所)の付いた飼育箱で飼育した。飼育期間中の飼料(オリエンタル酵母-MF)および飲料水は自由摂取とした。

飼育室は室温を22±2℃、湿度60±5%に維持し、AM8:00~PM8:00は点灯、PM8:00~AM8:00は消灯とした。

2) 杜仲葉エキスの調整法

杜仲葉エキスの調整は、王たちの報告²⁶⁾を参考にして行った。つまり杜仲葉100gに対しイオン交換水1ℓの割合で混合し、100℃で30分間煮沸してエキスを抽出し、抽出したエキスを冷却後、濾過を3回行った。得られたエキスは使用時まで褐色ビンに入れ、冷暗所で保存した。

3) 実験手順

①杜仲葉エキスの投与法

運動+杜仲葉エキス群の杜仲葉エキスの投与は、1回投与量を1.0mlと定め、7週齢時から5週間にわたり毎日16時に小動物用胃ゾンデを用いて経口投与した。運動のみの群と安静群にはプラセボとして等量の蒸留水を同様に投与した。また、毎日投与する前に体重を測定した。

②運動様式

運動様式は、強制運動による過度のストレスは男性ホルモンを低下させるという報告²⁴⁾を考慮して回転ゲージを用いて自発走行による自由運動とした。運動は毎日行い、運動量の計測は各ゲージに取付られたカウンターにより隔日投与直前に行った。

③筋、精巢および血清の採取

筋、精巢および血清の採取は実験終了時の12週齢時に行った。サンプルの採取は、すべてエーテル麻酔下で実施した。

採血は、下大動脈から約5ml採取し、2分間放置した後に3,000rpmで8分間遠心分離し上清を血清サンプルとした。なお、血清サンプルは分析時まで冷凍保存した。

被検筋は、自由走行運動時には主働筋の一つとして下脚後面の筋群が使われるため、被検筋として下脚筋群(腓腹筋+ヒラメ筋+足底筋)とした。筋組織は採取後、速やかに脂肪と結合組織を除外して重量を計測し、ただちに液体窒素により凍結して、分析時まで-80℃下で冷凍保存した。

精巢は、左側を摘出し、周辺組織を取り除いた後、ただちに重量を計測した。

4) 測定方法

①測定項目および測定方法

測定項目および測定方法(カッコ内に示す)は血清テストステロン濃度(RIA固相法¹¹⁾、筋中総タンパク質(Lowry法¹⁵⁾、筋中総RNA量(Brown法^{9,22)})である。

②筋組織からのタンパク質およびRNAの抽出

筋組織からのタンパク質およびRNAの抽出はSchmidt-Thannhauser-Schneider法(STS法)²²⁾に従い行った。

③筋中総タンパク質の定量

筋中総タンパク質の定量は、Lowry法^{15, 30)}に従い行った。なお、測定結果から筋1g中に含まれる総タンパク質量を算出し、筋中総タンパク質量とした。

④筋中総RNAの定量

筋中総RNAの定量は、オルシノールによるペントースの定性反応を用いたBrown法^{9, 22)}に従い行った。なお、測定値から筋中総タンパク質と同様に計算によって筋中総RNA量を求めた。

⑤統計処理

各項目の値は、全て平均値±標準偏差(means±SD)で示し、各群間の有意差検定には、等分散の検定(F検定)の値を基に、通例に従い、Students t-testあるいはWelch t-testを用いた。なお有意差検定の限界は、5%水準以下とした。

3. 結果

1) 体重および走行距離の変化

運動+杜仲葉エキス群と運動のみの群の体重および走行距離の変化をFig. 1に示した。

各群の体重は、実験期間中に差はみられず、実験終了時の体重は、運動+杜仲葉エキス群が345.4±6.1g、運動のみの群が347.4±4.5g、安静群が350.2±5.3gであり各群間に差は見られなかった。

自発走行距離は、両群とも飼育に伴い増加したが、飼育27日目から運動+杜仲葉エキス群が運動のみの群に比して有意な高値(p<0.05)を示し始め、飼育終了時(投与35日目)まで有意(p<0.001)な差が示した(運動+杜仲葉エキス群：32.5±3.7km/2days、運動のみの群：22.5±2.4km/2days)。

2) 筋重量および精巢重量

各群における5週間飼育後の下脚筋群重量および精巢重量をFig. 2に示した。

下脚筋群重量は、運動+杜仲葉エキス群が運動のみの群および安静群に比して有意(いずれもp<0.001)に高値を示した。また、運動のみの群が安静群に比して有意(p<0.001)に高値を示した。

精巢重量は、運動+杜仲葉エキス群が運動のみの群および安静群に比して有意(いずれもp<

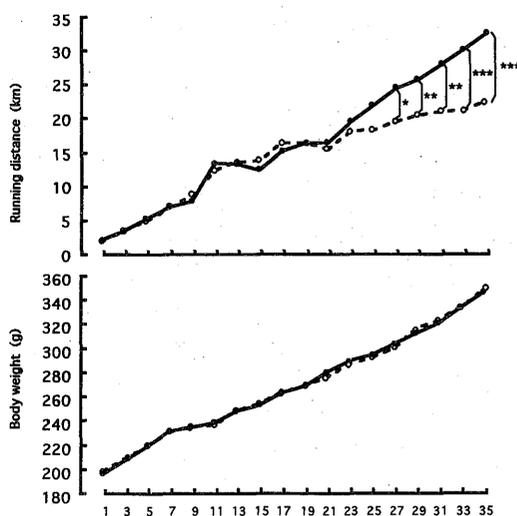


Fig. 1 Serial changes in voluntary running distance and body weight. Significant difference between exercise with distilled water group was shown with * (p<0.05), ** (p<0.01), and *** (p<0.001), —●— Tu+Ex G (n=7); - - -□- - Ex G (n=7).

0.001)に高値を示した。しかし、運動のみの群と安静群間には有意差がなかった。

3) 血清テストステロン濃度

各群における血清テストステロン濃度をFig. 3に示した。

血清テストステロン濃度は、運動+杜仲葉エキス群が運動のみの群に比して有意(p<0.01)に高値を示した。運動+杜仲葉エキス群が安静群に比して有意(p<0.01)に高値を示した。また、運動のみの群は安静群に比して有意ではないが高値傾向を示した。

4) 筋中総タンパク値および総RNA量

各群の筋中総タンパク値および筋中総RNA量をFig. 4に示した。

筋中総タンパク値は、運動+杜仲葉エキス群が運動のみの群および安静群に比して有意(いずれもp<0.001)に高値を示した。また、運動のみの群が安静群に比して有意(p<0.01)に高値を示した。

筋中総RNA量は、同様に運動+杜仲葉エキス群が運動のみの群および安静群に比して有意(いずれもp<0.001)に高値を示した。運動のみの群が安静群に比して有意(p<0.05)に高値を示し

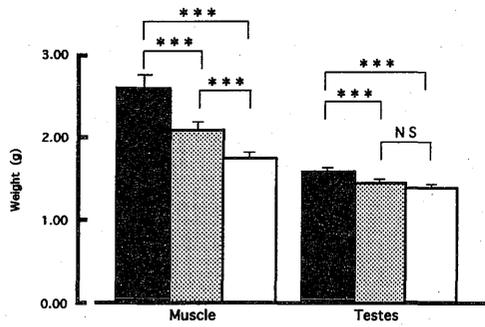


Fig. 2 Effects of Tu-Chung leaves extract on muscle and testes weights among each group. Values are means \pm SD. Significant difference ($p < 0.001$) between each group was shown in ***.

■ Tu+Ex G (n=7)
 ▨ Ex G (n=7)
 □ Sed G (n=4)

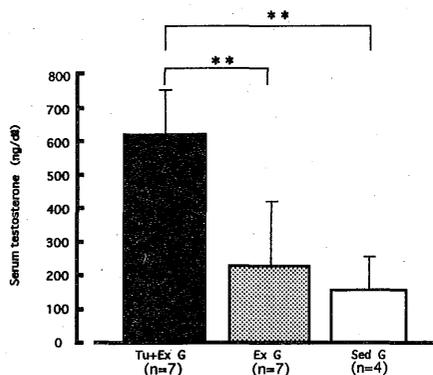


Fig. 3 Serum testosterone concentration after 5 weeks administration of Tu-Chung leaves extract or water in each group. Values are means \pm SD. Significant difference ($p < 0.01$) between each group was shown in **.

た。

4. 考察

本研究は、杜仲葉エキスの体力増進作用の生理的メカニズムを解明する一助として、運動ラットに杜仲葉エキス投与し、筋肥大に及ぼす影響について検討したものである。

ラットの自発的運動量は、体重の影響を強く受けるといわれている¹³⁾。本実験の両運動群の自

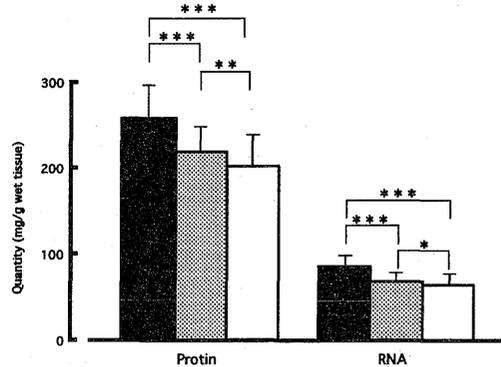


Fig. 4 Quantity of muscle (gastrocnemius + soleus + plantaris) protein and RNA after 5 weeks administration of Tu-Chung leaves extract or water in each group. Values are means \pm SD. Significant difference between each group was shown in * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$).

■ Tu+Ex G (n=7)
 ▨ Ex G (n=7)
 □ Sed G (n=4)

発的運動量は、運動+杜仲葉エキス群と運動のみの群間の体重に有意差がないにもかかわらず、運動+杜仲葉エキス群は飼育23日目より運動のみの群に比して高値傾向を示し始め、実験終了時には有意な差を示した。このことは、本実験における自発的運動量の差は体重による影響ではなく、杜仲葉エキス投与による影響を示唆している。杜仲葉エキス長期投与による自発的運動量の増加に関しては、先行研究がほとんどなく、本実験の結果について杜仲葉エキスの強壯、強精作用が一つ考えられるが、さらに検討する必要がある。

トレーニングに及ぼす筋重量の増加および筋肥大の影響要素としては、強度、持続時間、頻度などが挙げられる。Petow und Siebelt¹⁹⁾はラットにトレッドミル走を行わせ、相対的に高いスピードのランニングは筋重量の増加を起こさせるが、低いスピードのランニングでは影響を与えないと報告している。Walker²⁸⁾は同じ方法でマウスに運動をさせたが、上記の報告と異なり、運動の継続時間の方が運動の強度よりも重要であると報告している。また、勝田たち¹³⁾は、ラットに自発走行運動を行わせ、筋線維の肥大および筋重量の増加することを報告している。しかし、同じ自発走行運動でも、筋線維肥大を示したが、筋重量には

有意な差異が認められなかったという勝田¹⁴⁾の報告もある。このようにトレーニングによる筋肥大の報告については、必ずしも一致していない。

本研究では、各群の下脚筋群重量が、運動+杜仲葉エキス群が運動のみの群に比して、運動のみの群が安静群に比してそれぞれ有意に高値を示した。このことは、運動+杜仲葉エキス群と運動のみの群間の筋重量の違いは、杜仲葉エキスの投与による影響が考えられる。また、安静群と運動のみの群間の筋重量の差は、自発走行運動の有無によって生じたものと思われる。本研究は、下脚筋群重量のみ検討したが、今後の課題として、筋線維形態の面から検討することが必要である。

精巣は、精子の産生と性ホルモン分泌の二つ機能を持っている^{8,18)}。馬たち¹⁶⁾は、杜仲葉エキスを投与したラットの精巣では組織学的に精細管の屈曲延長と精子形成の亢進がみられたとし、これらは杜仲の強壯、強精作用に対する薬効と報告している。

本実験では血清テストステロン濃度について、運動のみの群と安静群間に有意な差がみられず、運動+杜仲葉エキス群が運動のみの群および安静群に比して、それぞれ有意に高値を示した。また、テストステロンの分泌腺である精巣重量が血清テストステロン濃度と同様の動態を示した。これらの結果は、先行研究を支持するものと思われる。すなわち、杜仲葉エキスの投与が運動ラットの精巣重量を増大させ、テストステロンの分泌を促進することを示唆している。

テストステロンは、筋組織のアミノ酸の取り込みを増加させ、筋肥大を促進する作用があると報告されている^{1,2,12,18)}。本実験の各群の筋中総タンパク質量を比較すると、運動+杜仲葉エキス群が運動のみの群に、運動のみの群が安静群に比してそれぞれ有意に高値を示した。このことは、運動によって筋組織のアミノ酸の取り込みが増加したことを示唆している。従って杜仲葉エキスの筋肥大効果は、テストステロンの増加に起因とした効果に、運動の効果がプラスされたことを示唆している。また、生体内のタンパク質合成に関わる総RNA量は、筋中総タンパク質と同様に、運動+杜仲葉エキス群と運動のみの群が安静群に比してそれぞれ有意に高値を示した。運動+杜仲葉エキス群は運動のみの群と比較して有意に高値を示している。本研究の両運動群の自発的運動量は運

動+杜仲葉エキス群が飼育23日目より運動のみの群に比して有意な高値を示し始め、実験終了時まで有意な高値を示した。このことは、運動が筋中でのタンパク質合成を促進していると考えられ、杜仲葉エキスが筋中でのタンパク質合成に正の影響を及ぼしていることを示唆している。塩谷ら²³⁾は産卵鶏の筋中総RNA量および総タンパク質の加齢による減少に対して、杜仲葉エキスはこういった傾向を抑制し、抗加齢化作用を持つと報告している。本実験の結果は、運動が成長期のラットの筋肥大を促進し、また杜仲葉エキスが筋肥大を促進するため、両者の併用がその効果を一層亢進しているものと考えられる。従って運動のみよりも、運動とエキスの併用が筋のアミノ酸の取り込みを増加させ、またタンパク質合成を亢進させ、筋重量の増加をもたらされたものと推察される。

以上のことから、運動と杜仲葉エキス投与を併行して行うことが、運動のみを行うより有意に精巣重量の増加をもたらし、さらにテストステロン分泌を促進させることを示唆している。また、その結果、筋中へのアミノ酸の取り込みが亢進し、筋タンパク質の合成が促進され、筋重量の増加をもたらされたものと推察された。

5. まとめ

本研究は、運動雄ラットへの杜仲葉エキス投与が筋肥大に及ぼす影響について検討することを目的とした。実験は7週令のWistar系雄ラット18匹を用いて、運動+杜仲葉エキス群(n=7)、運動のみの群(n=7)、安静群(n=4)の3群に分類した。杜仲葉エキスおよび蒸留水の投与は、毎日1mlで5週間にわたって経口投与した。運動は、回転ゲージを用いた自発走行を5週間毎日を実施し、運動量の計測は隔日に行った。

結果は次の通りである。

- ①体重は、各群間に有意差がなかった。
- ②自発走行距離は、運動+杜仲葉エキス群が運動のみの群より投与開始4週目から有意($p < 0.001$)に高値を示した。
- ③下脚筋群重量は、運動+杜仲葉エキス群が運動のみの群および安静群に比して有意(いずれも $p < 0.001$)に高値を示した。また、運動のみの群は、安静群に比して有意($p < 0.001$)な高値を示した。
- ④精巣重量は、運動+杜仲葉エキス群が運動の

みの群および安静群に比して有意(いずれも $p < 0.001$)に高値を示した。また、運動のみの群は安静群に比して有意差が認められなかった。

- ⑤血清テストステロン濃度は、運動+杜仲葉エキス群が運動のみの群より有意($p < 0.01$)に高値を示した。運動+杜仲葉エキス群が安静群に比して有意($p < 0.01$)に高値を示した。また、運動のみの群は安静群に比して、有意差が認められなかった。
- ⑥筋中総タンパク質量は、運動+杜仲葉エキス群が運動のみの群および安静群に比して有意(いずれも $p < 0.001$)に高値を示した。また、運動のみの群は安静群に比し有意($p < 0.01$)に高値を示した。
- ⑦筋中総RNA量は、運動+杜仲葉エキス群が運動のみの群および安静群に比し有意(いずれも $p < 0.001$)に高値を示した。また運動のみの群は安静群に比して有意($p < 0.05$)に高値を示した。

以上の結果より、運動は筋肥大を亢進させるが、運動に加えて杜仲葉エキスを摂取すると、精巢を増大させ、テストステロンの分泌を増加させ、より筋タンパク質合成を促進し、結果として筋肥大を亢進させることが示唆された。

引用文献

- 赤祖父一知, 生水真紀夫(1991): 性ステロイド剤(男・女). 日本医事新報 3497: 27-34.
- Ashford RJ, and Pan VM (1986): Effect of diabetes on the rats of synthesis and degradation of ribosomes in rat muscle and liver in vivo. J Biol Chem 261(9): 4059-4065.
- Charles JS, Ravikumar PR, and Huang FC (1976): Isolation and synthesis of pinosresinol diglucoside, a major antihypertensive principle of *Tu-Chung* (*Eucommia ulmoides*, Oliver.). J Am Chem Soc 98: 5412-5413.
- 陳 廉, 常 複蓉, 王 殿俊, 華 玉棋, 葉 其正, 徐 健娥, 張 如蘭, 季 錫中(1986): 杜仲皮和葉的對比實驗研究. 南京中医学院学報 2: 40-43.
- Deyama T, Ikawa T, Kitagawa S, and Nishibe S (1985): The constituents of *Eucommia ulmoides*, O.IV. II. Isolation and structures of threeneo lignan glycosides. Chem Pharm Bull 34: 523-527.
- Deyama T, Ikawa T, and Nishibe S (1985): The constituents of *Eucommia ulmoides*, O.IV. II. Isolation and structures of threeneo lignan glycosides. Chem Pharm Bull 33: 3651-3657.
- 今井孝司, 貴史豊和, 井上博之, 西山信好, 斉藤洋(1988): 連続ストレス負荷マウスの性行動及び学習効果に対するイリドイドの影響. 薬学雑誌 108: 572-585.
- 伊藤 朗(1990): 図説・運動生理学入門, 初版, 医歯薬出版, 東京, pp.82-84.
- 岩井真昭(1977): 生化学実験講座 1. タンパク質の化学, 初版(日本生化学会編), 東京化学同人, 東京, pp.45-54.
- 江蘇新医学院(1977): 中薬大辞典, 上海科学技術出版社, 上海, pp.1031-1033.
- 金井 泉, 金井正光 編(1983): 臨床検査法提要, 第29版, 金原出版, 東京, pp.255-410.
- 神立 誠 編(1971): たんぱく質の知識, 初版, 幸出版, 東京, pp.95-104.
- 勝田 茂, 高橋徹三, 高松 薫, 緒方道彦, 松村成司, 樋口 満(1982): 成熟ラットの持久性トレーニング効果に関する性差の検討. 筑波大学運動処方特別プロジェクト研究報告, 107-129.
- 勝田 茂, 田中 守, 高松 薫(1982): ラットの自発的走運動が骨格筋線維におよぼす影響の組織化学的研究. 筑波大学体育科学系紀要 5: 125-134.
- Lowry OH, Roseberg NJ, Lewis A, and Randall J (1951): Protein measurement with Folin Phenol reagent. J Biol Chem 193: 265-275.
- 馬 永華, 葉 加南, 服部征雄, 金子周司, 野村靖幸, 倉茂洋一, 若木邦彦, 難波恒雄(1986): 杜仲葉の研究(II) 杜仲葉水エキス長期投与によるラットへの影響について. 和漢医薬会誌 4: 29-34.
- 難波恒雄, 服部征雄, 葉 加南, 馬 永華, 野村靖幸, 金子周司, 北村佳久, 小泉 保, 片山和憲(1986): 杜仲葉の研究(I) 水抽出画分の一般薬理作用. 和漢医薬会誌 3: 89-97.
- 落合京一郎(1952): 男性ホルモン, 医学書院, 東京, pp.28-49.
- Petow H, und Siebert W (1925): Studien über Arbeitshypertrophie des Muskels. Z Klin Med 102: 427-433.
- Rogozkin V: Metabolic effects of anabolic steroid on skeletal muscle. Med Sci Sports 11: 160-163.
- 佐藤徳光(1982): 動物実験の基本. 初版. 西村書店, 東京, pp.112-113.
- 嶋田 拓, 寺山 宏(1975): 生化学実験講座 2, 初版(日本生化学会編), 東京化学同人, 東京, pp.5-20.
- 塩谷正勝, 佐藤常男, 白井 弥, 平 敬宏, 高橋周七(1990): 産卵鶏の加齢変化に対する杜仲葉の長期投与の影響. 和漢医薬会誌 7: 18-23.

- 24) 田中宏暁(1991)：ストレスと男性ホルモン.
HEALTH DIGEST 16(4)：1-6.
- 25) 呉麗青, 張黎明(1986)：杜仲葉和杜仲皮的藥理實驗. 中草藥 17：15-18.
- 26) 王景祥, 張黎明, 楚万照(1987)：杜仲葉和杜仲皮的成分比較. 中草藥 18(8)：11-14.
- 27) 魏·吳普, 清·孫星行(1985)：神農本草經. 商務印書館, 北京, pp.43.
- 28) Walker MG (1966): The effect of exercise on skeletal muscle fibres. *Comp Biochem Physiol* 19：791-797.
- 29) 山抱基純, 中沢慶久, 下山明美, 志摩宣行, 松田光代, 紙野康美(1990)：杜仲葉成分の分析. 日立造船技報 51(1)：34-38.
- 30) 吉田文男, 樋口正(1986)：フェノール試薬法(Lowry法)による定量. 臨床検査 30(6)：633-638.
- 31) 中華人民共和国衛生部藥典委員会(1981)：中華人民共和國藥典, 人民衛生出版社, 北京, p.285.