

自発的レジスタンス運動と分岐鎖アミノ酸を豊富に含む 高タンパク質間食がグルココルチコイド投与ラットの骨に及ぼす影響

松尾 達博

序 論

加齢は生物学的、生理学的機能を低下させるが、中でも体タンパク質合成の低下による骨減弱症の発症は高齢者にとって重要な問題の一つである。骨減弱症を防ぐためには、十分なタンパク質を摂取することに加えて、体タンパク質合成を刺激するレジスタンス運動を行うことが必要だと考えられている。

一般的に、加齢に伴う基礎代謝量の低下⁽¹⁾に伴い、食餌摂取量が低下するため、必然的に摂取タンパク質量は少なくなる。このことが体タンパク質合成能力を低下させると考えられるが、Boirieら⁽²⁾の報告によると、肝臓や消化管などの内臓組織のタンパク質合成能力は加齢により、かえって増加する。そのため、摂取したタンパク質由来のアミノ酸の多くが内臓組織のタンパク質合成に優先的に利用され、骨や筋肉などの末梢組織へのアミノ酸供給量が少なくなる。このことが骨タンパク質合成を低下させ、骨減弱症に至ると考えられる。

高齢者にタンパク質をサプリメントとして摂取させると、骨形成ホルモンの生成が増加することで、骨吸収が減少し、骨タンパク質合成が促進することが明らかにされている⁽³⁾。また、食後のインスリン分泌が高い状態でタンパク質を摂取すると、末梢組織へのアミノ酸供給が増加する⁽⁴⁾⁻⁽⁶⁾。高齢化モデルラットを用いた我々の先行研究⁽⁶⁾において、食餌3時間後に高タンパク質間食(カゼイン60%+スクロース40%)を摂取させると、摂取させない場合に比べて血中アミノ酸濃度が1日を通じて高くなることが明らかになった。このことは食餌に由来するアミノ酸が肝臓や消化管などの内臓組織のアミノ酸要求量を満たしたことにより、間食に由来するアミノ酸が内臓組織を通過し、筋肉や骨などの末梢組織に供給されたことを示している。

一方、レジスタンス運動は筋肉および骨のタンパク質合成を刺激することや、骨カルシウム含量や骨強度を増加させることが知られている⁽⁷⁾⁻⁽⁹⁾。したがって、レジスタンス運動は骨減弱

症の防止に有効であると考えられる。軽レジスタンス運動である自発的クライミング運動は骨に軽い負荷を与えることが知られており^{(5), (6), (10)-(16)}、実際に成長期ラット⁽¹²⁾、精巣摘出ラット⁽¹³⁾、卵巣摘出ラット⁽¹⁴⁾およびグルココルチコイド投与ラット^{(15),(16)}において骨カルシウム含量、骨強度を増加させることが報告されている。

ところで、必須アミノ酸のうち、分岐鎖アミノ酸(バリン、ロイシン、イソロイシン;BCAAs)は筋肉で分解されることが知られている⁽¹⁷⁾。BCAAsは食物中の必須アミノ酸の約50%、ヒトの筋肉タンパク質中の約35%を占める⁽¹⁸⁾。BCAAsの中でも特にロイシンはタンパク質合成の翻訳段階を活性化することによって体タンパク質の合成を高める作用を持つことがin vitro⁽¹⁹⁾や後肢灌流筋⁽²⁰⁾を用いた実験で明らかになっている。また、運動によりBCAAsの分解が亢進することも知られている⁽²¹⁾。これらのように運動と筋タンパク質代謝に関与するBCAAsの働きは重要であるが、BCAAsと骨代謝に関してはほとんど検討されていない。

そこで、本研究では、グルココルチコイドを皮下投与して筋肉および骨を減弱化させた高齢化モデルラットを用い^{(5), (6), (15), (16), (22)}、自発的クライミング運動を日常化させながらBCAAsを豊富に含む高タンパク質間食を摂取させることで、骨の減弱化を抑制できるか否かについて検討した。

材料および方法

実験動物と実験計画

実験動物には、5週齢Wistar系雄ラット(日本SLC株式会社、静岡)55匹を用いた。飼育室については、8:00~20:00時を明期とする12時間の明暗サイクルとし、温度を $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度を50-60%に維持した。ラットを個別のステンレス製ケージに入れ、市販の粉末飼料(CE-2、日本クレア株式会社、東京)を自由に摂取させ3日間予備飼育した後、4週間自発的クライミング運動に適応させた。適応期間中、飲水瓶を設置したタワーケージ($\phi 20\text{cm} \times 200\text{cm}$)に21:30~8:00時に入れ、クライミング運動に適応させた。食餌については8:30~9:30時、20:30~21:30時にCE-2を摂取させた。

適応期間後、ラットを①Ct群:コントロール(生理食塩水投与+安静)(8匹)、②GS群:グルココルチコイド投与+安静(8匹)、③GSC群:グルココルチコイド投与+安静+カゼイン間食

(8匹)、④GSB群:グルココルチコイド投与+安静+BCAA間食(8匹)、⑤GE群:グルココルチコイド投与+クライミング運動(8匹)、⑥GEC群:グルココルチコイド投与+クライミング運動+カゼイン間食(7匹)、⑦GEB群:グルココルチコイド投与+クライミング運動+BCAA間食(8匹)の7群に分けた。クライミング運動群には自発的クライミング運動を21:30~8:00時に実施させた。グルココルチコイド投与群には、毎日9:30時よりプレドニゾロン2mg/kgを皮下投与した。食餌組成を表1に示した。8:30~9:30時、20:30~21:30時に各実験食を摂取させ、間食摂取群には1日の総摂取タンパク質量の70%を含む高タンパク質間食を12:30~13:30時にそれぞれ摂取させた。各群の食餌摂取量、タンパク質摂取量およびエネルギー摂取量が同等になるように8週間飼育した。

表1 食餌組成

群	Ct, GS, GE		GSC, GEC		GSB, GEB	
	食餌	食餌	間食	食餌	間食	
	(g/kg)					
カゼイン	200.0	80.0	800.0	80.0	420.0	
L-バリン	-	-	-	-	39.0	
L-ロイシン	-	-	-	-	96.1	
L-イソロイシン	-	-	-	-	44.9	
DL-メチオニン	3.0	1.2	9.0	1.2	9.0	
コーンスターチ	582.0	771.8	-	771.8	-	
スクロース	68.0	-	294.0	-	294.0	
セルロース	50.0	50.0	-	50.0	-	
大豆油	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	
ミネラル混合*	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	
ビタミン混合*	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	
塩化コリン	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	
ブチルヒドロキシトルエン	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	
合計	1000	1000	1000	1000	1000	

Ct, 生理食塩水投与+安静; GS, グルココルチコイド投与+安静; GSC, グルココルチコイド投与+安静; カゼイン間食; GSB, グルココルチコイド投与+安静+BCAA間食; GE, グルココルチコイド投与+クライミング運動; GEC, グルココルチコイド投与+クライミング運動+カゼイン間食; GEB, グルココルチコイド投与+クライミング運動+BCAA間食。

*AIN-76処方

飼育最終日の10:00時より断頭屠殺し、血液を採取後、骨格筋、右大腿骨および右脛骨を摘出した。血液を3000rpmで15分間遠心分離し、得られた血清を -20°C で保存した。骨格筋および骨を分析まで -80°C で保存した。

形態、破断強度、重量およびカルシウム含量の測定

大腿骨および脛骨の形態、破断強度、重量およびカルシウム含量の測定を先行研究⁽¹⁵⁾と同様の方法で測定した。

タンパク質含量の測定

大腿骨および脛骨のタンパク質含量の測定にはケルダール法を用いた。試料の分解には Tecator Digestor Auto(フォス・ジャパン株式会社、東京)を、希釈、蒸留および滴定には Kjeltec 2400(フォス・ジャパン株式会社、東京)を用いた。

統計方法

本研究で得られたデータを平均値±標準偏差で表した。各群間の有意差検定には一元分散分析を用い、有意性が認められた場合、FisherのPLSD法を用いた。 $P<0.05$ を統計的有意性があると判定した。

結 果

屠殺時体重、食餌摂取量、タンパク質摂取量およびエネルギー摂取量(表2)

屠殺時体重はCt群に比べて他の6群で有意に小さかった。食餌摂取量はCt群に比べて他の6群で有意に少なく、GE群に比べてGS群で有意に少なかった。タンパク質摂取量はGS群がGEB群を除く他の5群に比べて有意に少なく、GS群およびGSB群を除く他の4群と比べてGEB群で有意に少なかった。エネルギー摂取量はCt群およびGE群に比べてGS群で有意に少なかった。

骨の形態(表3、4)

大腿骨の長さはCt群に比べて他の6群で有意に短かった。大腿骨の径はGS群に比べてGE群で有意に大きかった。脛骨の長さはGS群、GSB群およびGEC群に比べてCt群で有意に長かった。脛骨の径においては、各群間に有意な差は見られなかった。

表2 屠殺時体重、食餌摂取量、タンパク質摂取量およびエネルギー摂取量

群	屠殺時体重 (g)	食餌摂取量 (g/日)	タンパク質摂取量 (g/日)	エネルギー摂取量 (kcal/日)
Ct	264 ± 8 ^a	11.8 ± 0.2 ^a	2.3 ± 0.0 ^{ab}	40.8 ± 0.6 ^a
GS	220 ± 11 ^b	10.8 ± 0.5 ^c	2.2 ± 0.1 ^d	38.9 ± 1.7 ^b
GSC	219 ± 16 ^b	11.0 ± 0.4 ^{bc}	2.3 ± 0.0 ^b	40.4 ± 0.7 ^{ab}
GSB	224 ± 16 ^b	11.0 ± 0.7 ^{bc}	2.3 ± 0.1 ^{bc}	39.8 ± 1.3 ^{ab}
GE	222 ± 5 ^b	11.3 ± 0.2 ^b	2.3 ± 0.0 ^b	40.0 ± 1.1 ^a
GEC	225 ± 13 ^b	11.0 ± 0.3 ^{bc}	2.3 ± 0.0 ^b	39.8 ± 2.4 ^{ab}
GEB	226 ± 9 ^b	11.0 ± 0.2 ^{bc}	2.2 ± 0.1 ^{cd}	38.8 ± 0.6 ^{ab}

Ct, 生理食塩水投与+安静; GS, グルココルチコイド投与+安静; GSC, グルココルチコイド投与+安静+カゼイン間食; GSB, グルココルチコイド投与+安静+BCAA間食; GE, グルココルチコイド投与+クライミング運動; GEC, グルココルチコイド投与+クライミング運動+カゼイン間食; GEB, グルココルチコイド投与+クライミング運動+BCAA間食.

データを平均値±標準偏差で示す. 異なるアルファベット間に有意差あり, P<0.05.

表3 大腿骨の構造および機能的特徴

群	重量 (mg)	長さ (mm)	径 (mm)	最大荷重 (N)	タンパク質 (mg/大腿骨)	カルシウム (mg/大腿骨)
Ct	390 ± 17 ^a	343 ± 4 ^a	3.39 ± 0.1 ^{ab}	111.7 ± 7.0 ^a	84.9 ± 8.0 ^a	114 ± 6 ^a
GS	357 ± 19 ^{bc}	331 ± 6 ^b	3.29 ± 0.1 ^b	92.7 ± 6.5 ^b	76.2 ± 10.0 ^{bc}	100 ± 6 ^{bc}
GSC	353 ± 31 ^{bc}	334 ± 7 ^b	3.35 ± 0.1 ^{ab}	92.6 ± 9.5 ^b	76.0 ± 13.0 ^{bc}	100 ± 6 ^{bc}
GSB	344 ± 25 ^{cd}	333 ± 8 ^b	3.34 ± 0.2 ^{ab}	99.3 ± 4.8 ^b	70.1 ± 9.0 ^b	97 ± 9 ^c
GE	370 ± 26 ^{ab}	334 ± 3 ^b	3.44 ± 0.1 ^a	97.3 ± 4.6 ^b	80.9 ± 13.0 ^{bc}	104 ± 3 ^b
GEC	364 ± 21 ^{bc}	333 ± 5 ^b	3.37 ± 0.1 ^{ab}	98.1 ± 6.4 ^b	81.3 ± 10.0 ^{bc}	104 ± 6 ^{bc}
GEB	370 ± 14 ^{ab}	336 ± 6 ^b	3.41 ± 0.1 ^{ab}	98.6 ± 5.3 ^b	78.2 ± 7.0 ^{bc}	105 ± 6 ^b

Ct, 生理食塩水投与+安静; G, グルココルチコイド投与+安静; GSC, グルココルチコイド投与+安静+カゼイン間食; GSB, グルココルチコイド投与+安静+BCAA間食; GE, グルココルチコイド投与+クライミング運動; GEC, グルココルチコイド投与+クライミング運動+カゼイン間食; GEB, グルココルチコイド投与+クライミング運動+BCAA間食.

データを平均値±標準偏差で示す. 異なるアルファベット間に有意差あり, P<0.05.

骨の破断強度(表3、4)

大腿骨の破断強度試験における最大荷重はCt群に比べて他の6群で有意に小さかった。脛骨の破断強度試験における最大荷重は安静群(GS群、GSC群およびGSB群)に比べてCt群および運動群(GE群、GEC群およびGEB群)で有意に大きかった。

骨の重量(表3、4)

大腿骨の重量はGE群およびGEB群を除く他の4群に比べてCt群で有意に大きく、GSB群に比べてGE群およびGEB群で有意に大きかった。脛骨の重量はGS群およびGSB群に比べてCt群で有意に大きく、安静群(GS群、GSC群およびGSB群)に比べてGE群が有意に大きかった。

表4 脛骨の構造的および機能的特徴

群	重量 (mg)	長さ (mm)	径 (mm)	最大荷重 (N)	タンパク質 (mg/脛骨)	カルシウム (mg/脛骨)
Ct	312 ± 17 ^{ab}	384 ± 4 ^a	2.74 ± 0.12	57.0 ± 3.9 ^a	69.4 ± 11.0	86.8 ± 7.7 ^a
GS	283 ± 10 ^d	374 ± 4 ^b	2.82 ± 0.15	49.6 ± 6.8 ^c	64.3 ± 7.0	79.3 ± 5.4 ^b
GSC	292 ± 23 ^{bcd}	370 ± 8 ^b	2.71 ± 0.11	50.5 ± 6.4 ^{bc}	67.3 ± 12.0	77.8 ± 7.7 ^b
GSB	286 ± 17 ^{cd}	375 ± 10 ^b	2.87 ± 0.10	50.0 ± 3.4 ^{bc}	66.6 ± 7.0	77.7 ± 9.5 ^b
GE	315 ± 23 ^a	378 ± 6 ^{ab}	2.74 ± 0.18	55.4 ± 5.4 ^{ab}	70.8 ± 13.0	84.5 ± 5.4 ^{ab}
GEC	301 ± 18 ^{abd}	373 ± 6 ^b	2.71 ± 0.15	54.3 ± 6.6 ^{abc}	67.8 ± 5.0	84.5 ± 7.6 ^{ab}
GEB	305 ± 18 ^{abc}	372 ± 6 ^{ab}	2.73 ± 0.13	52.2 ± 4.7 ^{abc}	69.9 ± 7.0	84.1 ± 8.1 ^{ab}

Ct, 生理食塩水投与+安静; G, グルココルチコイド投与+安静; GSC, グルココルチコイド投与+安静+カゼイン間食; GSB, グルココルチコイド投与+安静+BCAA間食; GE, グルココルチコイド投与+クライミング運動; GEC, グルココルチコイド投与+クライミング運動+カゼイン間食; GEB, グルココルチコイド投与+クライミング運動+BCAA間食.

データを平均値±標準偏差で示す。異なるアルファベット間に有意差あり, P<0.05.

骨のタンパク質含率および含量(表3、4)

大腿骨のタンパク質含率に各群間に有意な差は見られなかったが、タンパク質含量はGSB群に比べてCt群で有意に大きかった。脛骨のタンパク質含率および含量は各群間に有意な差は見られなかった。

骨のカルシウム含率および含量(表3、4)

大腿骨のカルシウム含率には各群間に有意な差は見られなかったが、カルシウム含量はCt群に比べて他の6群で有意に小さく、GB群およびGEB群に比べてGSB群で有意に小さかった。脛骨のカルシウム含率は各群間に有意な差は見られなかったが、安静群(GS群、GSC群およびGSB群)に比べてCt群で有意に大きかった。

骨格筋の重量(表5)

ヒラメ筋重量はCt群に比べてGS群で有意に小さく、GS群と比べてGSB群、GE群、GEC群およびGEB群で有意に大きかった。ヒフク筋重量はCt群に比べて他の6群で有意に小さかった。前脛骨筋重量はCt群に比べてGE群およびGEC群を除く他の4群で有意に小さかった。

表5 骨格筋重量

群	ヒラメ筋 (mg)	前脛骨筋 (mg)	ヒフク筋 (g)
Ct	176 ± 15 ^{ab}	814 ± 34 ^a	2.35 ± 0.12 ^a
GS	160 ± 10 ^c	722 ± 35 ^c	2.01 ± 0.12 ^b
GSC	166 ± 7 ^{bc}	738 ± 32 ^{bc}	2.04 ± 0.16 ^b
GSB	173 ± 8 ^{ab}	742 ± 58 ^{bc}	2.08 ± 0.11 ^b
GE	182 ± 7 ^a	769 ± 48 ^{ab}	2.00 ± 0.07 ^b
GEC	183 ± 16 ^a	770 ± 56 ^{ab}	2.04 ± 0.12 ^b
GEB	182 ± 12 ^a	765 ± 52 ^{bc}	2.04 ± 0.12 ^b

Ct, 生理食塩水投与+安静; GS, グルココルチコイド投与+安静;
GSC, グルココルチコイド投与+安静+カゼイン間食; GSB, グルココルチコイド投与+安静+BCAA間食; GE, グルココルチコイド投与+クライミング運動; GEC, グルココルチコイド投与+クライミング運動+カゼイン間食; GEB, グルココルチコイド投与+クライミング運動+BCAA間食.
データを平均値±標準偏差で示す. 異なるアルファベット間に有意差あり,
P<0.05.

考 察

本研究において、軽レジスタンス運動であるクライミング運動はグルココルチコイド投与に伴う骨減弱化を抑制することが示された。しかし、高タンパク質間食(カゼインおよびBCAA)がグルココルチコイド投与に伴う骨減弱症を抑制することは示されなかった。したがって、骨減弱症の予防には、食事療法よりも運動療法が効果的であると考えられる。

グルココルチコイドは肝臓でのタンパク質合成を促進する一方で、骨格筋および骨のタンパク質分解を促進することで、老化と類似した症状を作り出すことが知られている^{(23),(24)}。本研究では、体重増加量がグルココルチコイド投与により有意に減少し、さらに大腿骨および脛骨の最大荷重およびカルシウム含量も低下した。一方、相対肝臓重量を比較すると、グルココルチコイド投与によって大きくなり(Ct vs GS; 25.2 vs 31.1mg, $p < 0.05$)、肝臓におけるタンパク質合成がグルココルチコイドによって亢進していることが裏付けられた。

大腿骨の重量およびカルシウム含量は、GSB群に比べてGEB群で有意に大きかった。脛骨の重量はGS群、GSC群およびGSB群に比べてGE群で有意に大きかった。また、最大荷重はGS群に比べてGE群で有意に大きく、Ct群と同等の程度であった。この結果より、クライミング運動にはグルココルチコイド投与で減弱した骨を成長期非運動モデルであるCt群と同等の強度にまで回復させる効果があることが示された。さらに脛骨の重量においてGS群に比べてGEB群で有意に大きくなり、クライミング運動の効果をBCAA間食が強めることが示された。一方、大腿骨および脛骨のタンパク質含量には各群間に有意な差は見られなかった。また、大腿骨の最大荷重にクライミング運動による有意な効果は見られなかった。クライミング運動の骨に対する効果は骨の種類により異なることが先行研究⁽²⁵⁾でも確認されている。本研究においてもクライミング運動は大腿骨と比較して脛骨に対する刺激が強いことが示唆された。

骨減弱症を抑制するためには、同時に筋減弱症を抑制することが重要であると考えられる。実際、高齢女性を対象にした研究で、大腿筋の筋力と大腿骨の骨密度は相関すると報告されている⁽²⁶⁾。筋減弱症を予防するには、レジスタンス運動を日常的に実施させることだけでなく、必須アミノ酸、特にBCAAsを豊富に含むタンパク質を摂取することが重要である。BCAAsは骨格筋タンパク質を構成する必須アミノ酸の約35%を占めており⁽¹⁸⁾、肝臓ではなく、骨格筋で分解されること^{(27),(28)}から、骨格筋代謝に深く関係している。我々の先行研究⁽⁶⁾

において、主たる食餌の3時間後に高タンパク質間食(カゼイン60%+スクロース40%)を摂取させることによって、血液中の必須アミノ酸濃度およびBCAA濃度が一日を通じて有意に高くなることが示された。そこでBCAAを間食の一部に利用することによって、BCAAを中心とするアミノ酸がより多く末梢組織に供給され、骨格筋のタンパク質分解が抑制されることが予想された。本研究では、ヒラメ筋重量がGS群に比べてGSB群で有意に大きくなり、BCAAによる骨格筋タンパク質分解の抑制が示された。しかし、他の骨格筋ではBCAAsの効果は見られなかった。このことは骨格筋と骨との関係を示したBlainら⁽²⁶⁾の報告を支持するものである。

一方、骨の構成タンパク質はグリシン、プロリンおよびヒドロキシプロリンから構成されているコラーゲンが主体である⁽²⁹⁾。BCAA間食にはこれらのアミノ酸が豊富に含まれず、骨タンパク質合成に効果的に利用されなかったと考えられる。

本研究の結果より、レジスタンス運動が加齢に伴う骨減弱症を予防する最も効果的な方法であることが示唆された。今後、レジスタンス運動の効果を強めるための栄養条件について、更なる研究が必要である。

要 約

自発的レジスタンス運動(クライミング)と分岐鎖アミノ酸(BCAAs)を豊富に含む高タンパク質間食(BCAA間食)が、グルココルチコイドを投与した高齢化モデルラットの骨重量と骨強度に及ぼす影響について検討した。5週齢Wistar系雄ラット55匹を7群に分け、そのうちの3群を運動群、残りを非運動群とした。非運動群の1群を対照群(Ct)として生理食塩水を投与し、残りの6群にグルココルチコイド(プレドニゾロン2mg/kg/日)を投与した。グルココルチコイド投与群を非間食群(GS、GE)、カゼイン間食群(GSC、GEC)、BCAA間食群(GSB、GEB)に分類した。全群のラットに8:30-9:30時、20:30-21:30時に食餌を摂取させ、間食摂取群には12:30-13:30時にそれぞれの高タンパク質間食を摂取させた。飼育室は8:00-20:00時を明期として、8週間飼育した。運動群(GE、GEC、GEB)には、上部に飲水瓶を設置したタワーケージ(φ20cm×200cm)内で、毎日21:30-8:00時にクライミング運動を実施させた。体重増加はグルココルチコイド投与によって抑制された。大腿骨重量、脛骨重量および脛骨破断強度(最大荷重)はクライミング運動によって有意に上昇した。カゼインおよびBCAA間食

は骨重量および骨強度に有意な効果をもたらさなかった。これらの結果から、加齢に伴う骨減弱化を防止するためには、レジスタンス運動が最も有効であることが示された。

参考文献

- (1) Tzankoff, S. P., Norris, A.H.: Effect of muscle mass decrease on age-related BMR changes. *J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exercise Physiol.*, **43**, 1001-1006 (1977).
- (2) Boirie, Y., Gachon, P., Beaufre, B.: Splanchnic and whole-body leucine kinetics in young and elderly men. *Am. J. Clin. Nutr.*, **65**, 489-495 (1997).
- (3) Dawson-Hughes, B., Harris, S. S., Rasmussen, H., Song, L., Dallal, G.E.: Effect of dietary protein supplements on calcium excretion in healthy older men and women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **89**, 1169-1173 (2004).
- (4) Gaudichon, C., Mahe, S., Benamouzig, R., Luengo, C., Fouillet, H., Dare, S., Van Oycke, M., Ferriere, F., Rautureau, J., Tome, D.: Net postprandial utilization of [¹⁵N]-labeled milk protein nitrogen is influenced by diet composition in humans. *J. Nutr.*, **129**, 890-895 (1999).
- (5) Matsuo, T., Suzuki, M.: Effect of resistance exercise with pulse protein feeding pattern on muscle mass and protein content in rats given glucocorticoid-injections. *Health Sci.*, **22**, 275-283 (2006).
- (6) Matsuo, T., Suzuki, M.: Effect of resistance exercise and high-protein snacks consisting of different proteins on muscle mass and protein synthesis in rats given glucocorticoid-injections. *Health Sci.*, **21**, 246-256 (2005).
- (7) Vincent, K., Braith, R.W.: Resistance exercise and bone turnover in elderly men and women. *Med. Sci. Sports Exerc.*, **34**, 17-23 (2002).
- (8) Okano, G., Suzuki, M., Kojima, M., Sato, Y., Lee, S.J., Okamura, K., Noriyasu, S., Doi, T., Shimomura, Y., Fushiki, T., Shimizu, S.: Effect of timing of meal intake after squat exercise training on bone formation in the rat hindlimb. *J. Nutr. Sci. Vitamnol.*,

- 45**, 543-552 (1999).
- (9) Chrusch, M.J., Chilibeck, P.D., Chad, K.E., Davison, K.S., Burke, D.G.: Creatine supplementation combined with resistance training in older men. *Med. Sci. Sports Exerc.*, **33**, 2111-2117 (2001).
- (10) Notomi, T., Okimoto, N., Okazaki, Y., Tanaka, Y., Nakamura, T., Suzuki, M.: Effect of tower climbing exercise on bone mass, strength and turnover in growing rats. *J. Bone Miner. Res.*, **16**, 166-174 (2001).
- (11) Matsuo, T., Suzuki, H., and Suzuki, M.: Resistance exercise increases the capacity of heme biosynthesis more than aerobic exercise in rats. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **29**, 19-27 (2000).
- (12) Notomi, T., Okazaki, Y., Okimoto, N., Tanaka, Y., Nakamura, T., Suzuki, M.: Effect of tower climbing exercise on bone mass, strength and turnover in orchidectomized growing rats. *J. Appl. Physiol.*, **93**, 1152-1158 (1994).
- (13) Notomi, T., Okimoto, N., Okazaki, Y., Nakamura, T., Suzuki, M.: Tower climbing exercise started 3 months after ovariectomy recovers bone strength of the femur and lumbar vertebrae in aged osteopenic rats. *J. Bone Miner. Res.*, **18**, 140-149 (2003).
- (14) Matsuo, T., Kang, H., Suzuki, H., and Suzuki, M.: Voluntary resistance exercise improves blood hemoglobin concentration in severely iron deficient rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **48**, 161-164 (2002).
- (15) Matsuo, T., Nozaki, t., Okamura, K., Matsumoto, K., Doi, T., Gohtani, S., and Suzuki, M.: Effect of voluntary resistance exercise and high-protein snacks on bone mass, composition, and strength in rats given glucocorticoid injections. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 2518-2523 (2003).
- (16) Matsuo, T., Nozaki, t., Okamura, K., Matsumoto, K., Doi, T., Gohtani, S., and Suzuki, M.: effect of voluntary resistance exercise and high-protein snacks on bone mass, composition, and strength in rats given glucocorticoid injections. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 2518-2523 (2003)
- (17) Rennie, M.J.: Influence of exercise on protein and amino acid metabolism. In : Handbook

- of physiology, Sect. 12 : Exercise : Regulation and Integration of multiple systems (Rowell, L. B. & shepherd, J. T., eds.) chapter **22**, 995-1035, American Physiological Society, Bethesda, MD. (1996).
- (18) Harper, A. E., Miller, R. H., Block, K. P. Branched-chain amino acid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.*, **4**, 409-454 (1984).
- (19) Buse, M.G. and reid, S.S.: Leucine. A possible regulator of protein turnover in muscle. *J. Clin. Invest.*, **56**, 1250-1261 (1975).
- (20) Buse, M.G., Atwell, R., Mancusi, V.: In vitro effect of branched chain amino acids on the ribosomal cycle in muscles of fasted rats. *Horm. Metab. Res.* **11**, 289-292. (1979).
- (21) Shimomura, Y., Murakami, T., Nakai, N., Nagasaki, M., Harris, R.A.: Exercise promotes BCAA catabolism: Effects of BCAA supplementation on skeletal muscle during exercise. *J. Nutr.*, **4**, 583-1587 (2004).
- (22) Gardiner, P.F., Hible, B., Simpson, D.R., Roy, R. Ederton, V.R.: Effect of a mild weight-lifting program on the progress of glucocorticoid-induced atrophy in rat hindlimb muscles. *Pflugers Arch.*, **385**, 147-153 (1980).
- (23) Savary, I., Debras, E., Dardevet, D., Sornet, C., Capita, P., Prugnaud, J., Mirand, P.P., Grizard, J.: Effect of glucocorticoid excess on skeletal muscle and heart protein synthesis in adult and old rats. *Br. J. Nutr.*, **79**, 297-304 (1998).
- (24) Fimbel, S., Abdelmalki, A., Mayet, M.H., Sempore, B., Koubi, H., Pugeat, M., Dechaud, H., Flavie, R.J.: Exercise training fails to prevent glucocorticoid-induced muscle alterations in young growing rats. *Pflugers Arch.*, **424**, 369-376 (1993).
- (25) Matsuo, T.: Effects of voluntary resistance exercise and pulse patterned high-protein snack on bone mass, composition and strength in rats given glucocorticoid-injections. *Tech. Bull. Fac. Agr. Kagawa Univ.*, **58**, 21-25 (2006).
- (26) Blain, H., Vuillemin, A., Teissier, A., Guillemin, F., and Jeandel, C.: Influence of strength and body weight and composition on regional bone mineral density in healthy women aged 60 years and over. *Gerontology.*, **47**, 207-212 (2001).
- (27) Ichihara, A., Noda, C., and Tanaka, K.: Oxidation of branched chain amino acids with

- special reference to their transaminase.: In "Metabolism and Ketoacids". Walser, M., and Williamson, J.R., eds. Elsevier. New York. pp. 227-231. (1981).
- (28) Miller, L.L.: The role of the liver and the non-hepatic tissues in regulation of free amino acid levels in the blood in "Amino Acid Pools", Holden, J.T., eds. Elsevier. New York. pp.708-721. (1962).
- (29) Hawk, P.B., Amino acids, Hawk's Physiological Chemistry, New York, pp.127-159 (1985).