

中高年齢者における運動の糖代謝改善作用を促す 発酵乳バイオジェニックスの検討

京都府立大学 青井 渉
(共同研究者) 同 岩佐 真代
同 阿部 諒

Investigation of Fermented Milk-Derived Biogenics That Improve Exercise-Induced Glucose Metabolism in Middle-Aged to Elderly People

by

Wataru Aoi, Masayo Iwasa, Ryo Abe
Kyoto Prefectural University

ABSTRACT

Growing evidence has shown that certain biogenics produced during fermentation of milk could have physiological benefits. In a placebo-controlled double blind experimental design, we investigated the effect of a biogenic factor, milk casein hydrolysate, derived from lactobacillus fermented milk on muscle damage and glucose metabolism after exercise in middle-aged to elderly people. Ten middle-aged to elderly subjects (49 ± 2 yr) participated in each of two trials of the study: exercise with placebo (placebo trial) and exercise with milk casein hydrolysate (active trial) . Participants carried out downhill walking (decline grade: -5%, speed: 5 km/h, time: 30 min) . Test tablet (placebo or active) was taken before and after exercise in double-blind method. On the next day of exercise, muscle damage and metabolic parameters were measured. Although muscle soreness was not difference between trials, plasma creatine kinase was significantly lower in the active trial than the placebo trial. In

addition, carbohydrate oxidation after glucose administration was significantly higher in the active trial than the placebo trial. These observations suggested that intake of milk casein hydrolysate before and after low intensity exercise could improve glucose metabolism associated with suppressing delayed-onset muscle damage.

要 旨

乳の発酵過程で生成されるバイオジェニックスの機能性が注目されている。本研究では、中高齢者を対象として、運動後の筋損傷および糖代謝におよぼす乳酸菌発酵乳由来バイオジェニックス、カゼイン加水分解物の影響について検証した。運動が禁忌となる疾患を有さない中高齢男女10名(49±2歳)を対象とし、プラセボ対照二重盲検クロスオーバー試験を行った。対象者全員が、運動前後にプラセボを摂取する条件(プラセボ条件)および運動を前後に乳カゼイン加水分解物を摂取する条件(アクティブ条件)をランダムな順序で行った。運動は、トレッドミルを用いた下り坂歩行運動(時速5km, 下り勾配5%, 30分間)を負荷した。運動翌日に、筋損傷指標、代謝指標を測定した。筋肉痛は条件間で有意な差はなかったが、血漿クレアチンキナーゼ濃度はプラセボ条件と比較してアクティブ条件で有意に低値であった。また、糖負荷後の炭水化物酸化量は、アクティブ条件において有意に高値であった。以上の結果より、中高齢者における低強度運動前後における乳カゼイン加水分解物の摂取は、筋損傷を軽減することで糖代謝を改善することが示唆された。

緒 言

日常的運動はインスリン感受性を高め、糖尿病の予防・改善に寄与することが広く知られている。この運動の効果に、運動中だけでなく運動後しばらく起こる骨格筋での糖代謝の亢進が強く関与する。一方、強度の高い運動や習慣性のない運動の

後しばらく経過すると、骨格筋組織への食細胞の浸潤とともに微細構造の破壊が起こり、いわゆる遅発性筋損傷が誘発される¹⁾。遅発性筋損傷の主症状が筋肉痛であることは言うまでもないが、それ以外にも興奮収縮連関や代謝機能、循環機能が損なわれることがわかってきた。これまでに我々は、運動後の筋損傷時には骨格筋のインスリン依存性糖代謝が低下することを認めた²⁾。筋損傷は、筋収縮形態や身体特性に依存して低強度の健康づくり運動(ジョギング、ウォーキングなど)においても生じることから、メタボリック症候群や糖尿病の予防・改善を目的とした運動において、筋損傷にともなう糖代謝の減弱を抑制することができれば、運動効果を効率的に得ることができると考えられる。

バイオジェニックスは食品加工の過程で生成される成分の総称であり、その機能性について注目されている。乳酸菌発酵乳中には様々な生理活性が期待される成分を含むが、中でも発酵過程で生成されるカゼインタンパク質由来のペプチドやアミノ酸は、機能性成分候補として考えられる³⁾。我々は、運動誘発性筋損傷の発症メカニズムとともにその制御法について研究を進めてきた中で、*Lactobacillus helveticus* (*L. helveticus*) 発酵乳に含有されるバイオジェニックスがラット骨格筋の抗酸化酵素や抗炎症因子を増大させ、運動による筋損傷・炎症を軽減するという興味深い知見を得た⁴⁾。さらに、若齢者を対象とした試験においても、*L. helveticus* 発酵乳の摂取は運動後筋損傷時の酸化ストレスおよび糖代謝を改善することを明らかにした⁵⁾。したがって、発酵乳由来のバイ

オジェニックスは、糖代謝の改善を目的とした運動効果を高める上で有用である可能性がある。このような背景から、本研究では、中高齢者を対象として、下り勾配歩行運動後の筋損傷および糖代謝におよぼす乳酸菌発酵乳由来のカゼイン加水分解物の影響について検証することを目的とした。

1. 研究方法

1.1 対象者

運動習慣が無く、運動が禁忌となる疾患を有さない中高齢男女10名（男性7名：年齢 50 ± 3 歳、身長 172 ± 2 cm、体重 72 ± 2 kg、女性3名：年齢 46 ± 1 歳、身長 153 ± 1 cm、体重 49 ± 1 kg）を対象とした。対象者全員に口頭および書面にて、研究の目的と意義、方法、予測される危険性、プライバシー遵守およびデータの管理や公表について十分に説明を行い、書面にて同意を得た。本試験は、京都府立大学倫理委員会の承認を得て行われた。

1.2 試験手順

プラセボ対照二重盲検クロスオーバー試験として行われた。対象者全員が、運動前後にプラセボを摂取する条件（プラセボ条件）および運動前後に乳カゼイン加水分解物を摂取する条件（アクティブ条件）の2条件をランダムな順序で行った。

試験1日目、対象者は運動開始2時間前に朝食を摂取した。その後研究室に入室して試験食（タブレット2粒）を水とともに摂取し、その30分後からトレッドミル（My Mountain 5050, TOBEONE, 韓国）を用いた歩行運動（下り勾配5%）を30分間行った。3分間かけて速さを時速5kmまで上げ、運動終了まで時速5kmを保った。運動中は3分毎に主観的運動強度（ボルグ指数）の評価を行った。運動終了30分後に試験食（タブレット2粒）を摂取した。その後、翌日まで激しい運動を控えて安静に過ごすこと、乳製品やサプリメントの摂取および飲酒を控えることを対象

者に指示し、午後10時以降は水以外の飲食を禁止した。

試験2日目、11時間の絶食状態で来訪し、前日夜からの絶食状態を維持したままに研究室に入室し、椅子に腰掛け10分間安静にした。10分間座位安静にした後、血圧および脈波伝播速度を測定した。グルコース50g（トレーラン G50g, 味の素製薬株式会社）を摂取し、その30分後より仰臥位で呼気ガスの計測を30分間行った。糖摂取60分後に血液を採取し、血糖、血漿インスリン濃度および血漿クレアチンキナーゼ濃度の測定に用いた。下肢筋および臀筋における筋肉痛程度の評価を行った。測定に対する慣れのバイアスを考慮し、条件間は少なくとも2週間以上空けた。試験1日目の食事内容について聞き取りを行い、毎回同じ内容の食事を摂取するよう指示した。

1.3 試験食

試験食として、形状、味ともに同一のアクティブおよびプラセボタブレット（アサヒグループホールディングス株式会社）を用いた。乳由来カゼインをタンパク質分解酵素処理により加水分解し、タブレット状にしたものをアクティブ食（乳カゼイン分解物186mg/粒含有）とした。加水分解を行っていないカゼインをタブレット状にしたものをプラセボ食（乳カゼインナトリウム186mg/粒含有）とした。

1.4 測定項目

1.4.1 間接的エネルギー代謝

呼気ガス分析器（Aeromonitor AE310S, ミナト医科学）を用いて、糖負荷30分後から30分間、酸素摂取量と二酸化炭素排泄量を測定した。酸素摂取量と二酸化炭素排泄量の値から呼吸商および炭水化物酸化量を算出した。

1.4.2 血液成分

糖負荷 60 分後に指先穿刺を行い、血液を得た。血糖値を糖負荷自己検査用グルコース測定器（グルテストエース R, 株式会社三和化学研究所）を用いて測定した。採取後、すぐに遠心分離をして血漿を得た。血漿は測定まで -80℃ で保存し、筋損傷の指標である血漿クレアチンキナーゼ濃度を enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA) 法 (BioAssay Systems, USA) により測定した。また、血漿インスリン濃度を ELISA 法 (MercoDia, Sweden) により測定した。

1.4.3 筋肉痛程度

屈伸動作時における大腿四頭筋、大胸筋および大臀筋の筋肉痛程度について、visual analog scale を用いて評価した。

1.4.4 血圧、心拍および脈波伝播速度

上腕血圧計 (EW3100, 松下電工株式会社) を用い、座位にて収縮期血圧、拡張期血圧および心拍数の測定を行った。血圧脈波検査装置 (FORM BP-203PRE III, オムロンコーリン株式会社) を用い、仰臥位にて脈波伝播速度を測定した。

1.5 統計検定

結果は平均値 ± 標準誤差で表示した。測定データに正規性がある場合、対応のある t 検定を、正規性が無い場合、ウイルコクソン符号付順位和検定を用いた。有意水準を 5% とした。

2. 研究結果

2.1 運動中の主観的運動強度

運動中の主観的運動強度は、運動 3 分でプラセボ条件 8.3 ± 0.7 、アクティブ条件 8.8 ± 0.8 、運動 30 分でプラセボ条件 11.5 ± 0.7 、アクティブ条件 12.5 ± 0.9 であり、運動によって有意に上昇した ($P < 0.001$)。いずれの運動時間においても、条件間で有意な差はみられなかった。

2.2 筋損傷指標

運動翌日の血漿クレアチンキナーゼ濃度は、プラセボ条件と比較してアクティブ条件で有意に低値であった ($P = 0.017$) (図 1)。筋肉痛程度は、大腿筋、下腿筋、臀筋および 3 部位の合計値のいずれにおいても両条件で有意な差はみられなかった (表 1)。

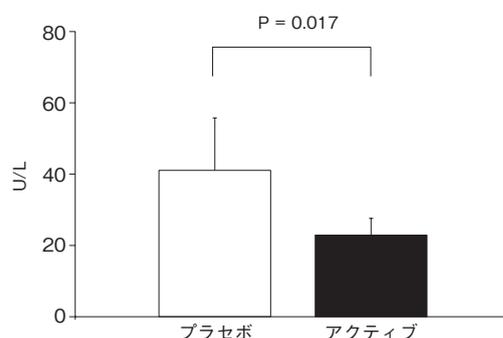


図 1 血漿クレアチンキナーゼ濃度
Values are mean ± S.E.. (n = 10)

表 1 筋肉痛

	プラセボ	アクティブ	P
大腿筋 (score)	1.1 ± 0.7	1.0 ± 0.6	0.36
下腿筋 (score)	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.34
大臀筋 (score)	0.7 ± 0.3	0.4 ± 0.1	0.29
3部位合計値 (score)	2.5 ± 1.0	1.9 ± 0.9	0.34

Values are mean ± S.E.. (n = 10)

2.3 酸素摂取量、呼吸商および炭水化物酸化量

運動翌日における酸素摂取量および呼吸商 (30 分間平均値) は、条件間で差は見られなかった (図 2A, B)。しかしながら、炭水化物酸化量はプラセボ条件と比較してアクティブ条件で有意に高値であった ($P = 0.048$) (図 2C)。

2.4 血糖値および血漿インスリン濃度

運動翌日における糖負荷 60 分後の血糖値、血漿インスリン濃度は、条件間で有意な差はみられなかった (表 2)。

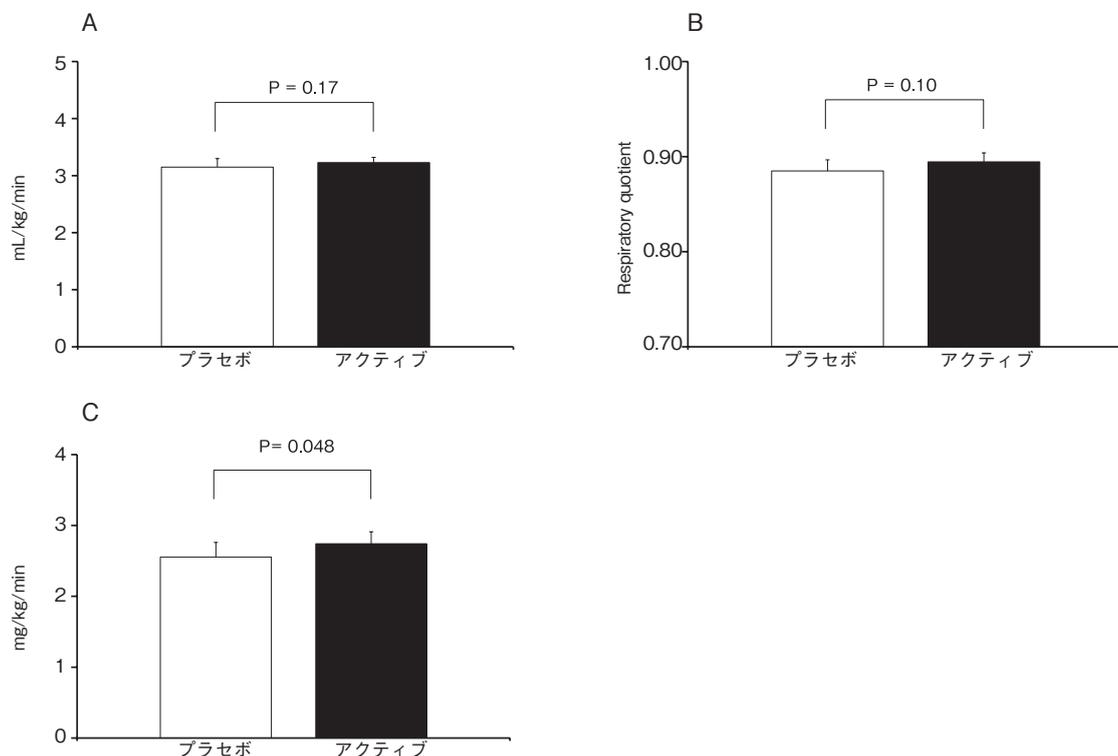


図2 酸素摂取量(A),呼吸商(B)および炭水化物酸化量(C)
Values are mean ± S.E..(n = 10)

表2 血糖および血漿インスリン(糖負荷60分)

	プラセボ	アクティブ	P
血糖値(mg/dL)	151 ± 11	158 ± 10	0.22
血漿インスリン(mU/L)	15 ± 3	17 ± 4	0.14

Values are mean ± S.E..(n = 10)

2.5 血圧, 心拍数および脈波伝播速度

運動翌日, 収縮期血圧は条件間で有意差は見られなかったが, 拡張期血圧はプラセボ条件と比較してアクティブ条件において有意に高値であった (P=0.020) (表3)。一方, 心拍数は, プラセボ条件と比較してアクティブ条件において有意に低値を示した (P=0.030)。脈波伝播速度は, 条件間で有意な差は見られなかった。

表3 血圧, 心拍数および脈波伝播速度

	プラセボ	アクティブ	P
収縮期血圧(mmHg)	126 ± 6	129 ± 6	0.15
拡張期血圧(mmHg)	81 ± 4	87 ± 5	0.02
心拍数(beats/min)	70 ± 4	67 ± 3	0.03
脈波伝播速度(cm/s)	1242 ± 72	1225 ± 50	0.31

Values are mean ± S.E..(n = 10)

3. 考察

本研究において, 下り勾配歩行運動前後における乳カゼイン加水分解物の摂取は, 運動翌日の筋逸脱酵素クレチンキナーゼ値の上昇を抑制するとともに, 炭水化物酸化量を促進させることが示された。これまでに我々は, 高強度レジスタンス運動前後に *L. helveticus* 発酵乳および乳カゼイン加水分解物を摂取することによって, 翌日の筋損傷が抑制され, 糖代謝が改善することを若齢者において確認してきたが⁵⁾, 中高齢者における低強度運動時においても同様の機能性を発揮することが示唆された。

骨格筋は体内最大の糖代謝臓器であることから, 日常的運動習慣が糖尿病, メタボリック症候群の予防・改善のための柱となることは広く認識されている。これは主に筋細胞において, インスリン依存性および非依存性のシグナル伝達系が活

性化され、グルコース輸送担体4の細胞膜トランスポーターが増加し、細胞内へのグルコース取り込みが増加することに起因する^{6,7)}。一過性運動による骨格筋糖代謝の促進は運動強度や持続時間などにもよるが、運動中および直後だけでなく運動24-48時間後まで持続することが知られている。一方、筋損傷をともなう運動においては、必ずしも糖代謝の活性化は起こらず、むしろ安静状態より低下することもヒト、マウスにおいて報告されている^{2,8,9)}。

損傷した筋組織では、食細胞の浸潤をともなう炎症、酸化ストレスが惹起される^{1,10)}。炎症性サイトカインやケモカイン、活性酸素種は筋細胞のインスリン依存性糖取り込みを低下させることから、これらの因子が筋損傷運動後の糖代謝減弱に関与することが指摘されている^{2,9,11)}。逆に、酸化ストレスや炎症性因子を制御することができれば、筋損傷時の糖代謝低下を抑制することができると考えられる。以前、我々は動物実験において、*L. helveticus* 発酵乳が骨格筋における抗酸化酵素を誘導することによって、筋損傷や炎症性因子および酸化ストレスの増大を抑制することを見出した⁴⁾。そのため、乳カゼイン加水分解物を摂取することで抗酸化酵素の誘導を介して筋損傷抑制作用、さらには糖代謝改善に効果を発揮した可能性がある。

運動後の筋損傷時には、骨格筋の機能低下だけでなく、動脈ステイフネスの上昇を引き起こすことが示されている¹²⁾。このステイフネス上昇は、筋損傷をともなって発生した炎症性因子が循環中に影響をおよぼした結果であると考えられている。血管ステイフネスの上昇は心血管疾患の独立した危険因子であるが、日常的に運動を行うことで血管ステイフネスが低下すること、また一過性の有酸素運動後においても血管ステイフネスは一時的に低下することが知られ、運動による心血管疾患予防の一因となることが示唆され

ている^{13,14)}。しかし、筋損傷をともなう運動においては逆に血管ステイフネスを高めることから、健康づくりのための運動としては不適切であることが考えられる。本研究において、運動翌日の脈波伝播速度はプラセボ条件と比較してアクティブ条件でやや低値であったものの、有意な差はみられなかった。運動後の筋肉痛程度がそれほど大きくなかったことから、歩行運動のような強度の低い運動では血管ステイフネスに大きな影響をおよぼさなかったことも考えられる。

乳カゼイン加水分解物の作用機序は不明であるが、バリン-プロリン-プロリン、イソロイシン-プロリン-プロリンなど特異的に含有されるペプチドが機能性を発揮した可能性がある。これらは、血管収縮因子活性を阻害する等、循環機能を改善することで知られており^{15,16)}、本研究において、運動翌日の安静時心拍数がアクティブ条件において低値であったことは、これらの関与を支持するとも考えられる。さらに最近、これらのトリペプチドが抗炎症作用を有することも細胞実験や動物実験において報告されている^{17,18)}。今後、作用機序に関するさらなる検討が必要である。

食習慣の欧米化や日常身体活動量の減少をともなう非感染性疾患リスクの上昇が問題となっている我が国では、平成24年に「21世紀における第二次国民健康づくり運動(健康日本21(第二次))」¹⁹⁾を、平成25年に「健康づくりのための身体活動基準2013」²⁰⁾策定するなど、日常生活における運動の習慣化を促す取り組みが行われているところである。運動時に生じる筋損傷を軽減し、糖代謝を高めることは、運動を習慣化し、運動効果を高めるための一助になると考えられ、乳カゼイン加水分解物は健康づくりのための運動を行う際にその有用性が期待される。

総括

本研究では、中高齢者を対象に、運動前後の乳

カゼイン加水分解物摂取が翌日の筋損傷，糖代謝におよぼす影響をプラセボ対照二重盲検クロスオーバー試験において検討した。その結果，乳カゼイン加水分解物摂取によって，下り勾配歩行運動翌日の筋損傷が軽減されるとともに糖代謝の改善がみられた。本研究結果により，中高齢者における健康づくり運動において，運動効果を高める一助として発酵乳由来バイオジェニックス乳カゼイン加水分解物が有用であることが示唆された。

謝 辞

本研究の遂行にあたり，研究助成を賜りました公益財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に厚く御礼申し上げます。また，試験の遂行にご協力を頂いた京都府立大学健康科学研究室の皆様，試験食を提供いただいたアサヒグループホールディングス株式会社に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Aoi W., Naito Y., Takamami Y., Kawai Y., Sakuma K., Ichikawa H., Yoshida N., Yoshikawa T.: Oxidative stress and delayed-onset muscle damage after exercise. *Free. Radic. Biol. Med.*, **37** (4) 480-7 (2004)
- 2) Aoi W., Naito Y., Tokuda H., Tanimura Y., Oya-Ito T., Yoshikawa T.: Exercise-induced muscle damage impairs insulin signaling pathway associated with IRS-1 oxidative modification. *Physiol. Res.*, **61** (1) 81-8 (2012)
- 3) 光岡知足: プロバイオティクスの歴史と進化. 日本乳酸菌学会誌, **22** (1) 26-37 (2011)
- 4) Aoi W., Naito Y., Nakamura T., Akagiri S., Masuyama A., Takano T., Mizushima K., Yoshikawa T.: Inhibitory effect of fermented milk on delayed-onset muscle damage after exercise. *J. Nutr. Biochem.*, **18** (2) 140-5 (2007)
- 5) Iwasa M., Aoi W., Mune K., Yamauchi H., Furuta K., Sasaki S., Takeda K., Harada K., Wada S., Nakamura Y., Sato K., Higashi A.: Fermented milk improves glucose metabolism in exercise-induced muscle damage in young healthy men. *Nutr. J.*, **12** (2013)
- 6) Wojtaszewski J.F., Hansen B.F., Gade Kiens B., Markuns J.F., Goodyear L.J., Richter E.A.: Insulin signaling and insulin sensitivity after exercise in human skeletal muscle. *Diabetes*, **49**(3) 325-31 (2000)
- 7) Röckl K.S., Witczak C.A., Goodyear L.J.: Signaling mechanisms in skeletal muscle: acute responses and chronic adaptations to exercise. *IUBMB Life*, **60** (3) 145-53 (2008)
- 8) Asp S., Watkinson A., Oakes N.D., Kraegen E.W.: Prior eccentric contractions impair maximal insulin action on muscle glucose uptake in the conscious rat. *J. Appl. Physiol.*, **82** (4) 1327-32 (1997)
- 9) Del Aguila L.F., Krishnan R.K., Ulbrecht J.S., Farrell P.A., Correll P.H., Lang C.H., Zierath J.R., Kirwan J.P.: Muscle damage impairs insulin stimulation of IRS-1, PI 3-kinase, and Akt-kinase in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **279** (1) E206-12 (2000)
- 10) Wang H.J., Pan Y.X., Wang W.Z., Zucker I.H., Wang W.: NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in skeletal muscle modulates the exercise pressor reflex. *J. Appl. Physiol.*, **107** (2) 450-9 (2009)
- 11) Aoi W., Naito Y., Yoshikawa T.: Role of oxidative stress in impaired insulin signaling associated with exercise-induced muscle damage. *Free Radic. Biol. Med.*, **65** 1265-72 (2013)
- 12) Barnes J.N., Trombold J.R., Dhindsa M., Lin H.F., Tanaka H.: Arterial stiffening following eccentric exercise-induced muscle damage. *J. Appl. Physiol.*, (1985) **109**(4) 1102-8 (2010)
- 13) Cameron J.D., Dart A.M.: Exercise training increases total systemic arterial compliance in humans. *Am. J. Physiol.*, **266** (2) H693-701 (1994)
- 14) Tanaka H., Dinanno F.A., Monahan K.D., Clevenger C.M., DeSouza C.A., Seals D.R.: Aging, habitual exercise, and dynamic arterial compliance. *Circulation*, **102** (11) 1270-75 (2000)
- 15) Siltari A., Kivimäki A.S., Ehlers P.I., Korpela R., Vapaatalo H.: Effects of milk casein derived tripeptides on endothelial enzymes in vitro; a study with synthetic tripeptides. *Arzneimittelforschung*, **62** (10) 477-81 (2012)
- 16) Nonaka A., Nakamura T., Hirota T., Matsushita A., Asakura M., Ohki K., Kitakaze M.: The milk-

- derived peptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro attenuate arterial dysfunction in L-NAME-treated rats. *Hypertens. Res.*, **37** (8) 703-7 (2014)
- 17) Chakrabarti S Wu J. Milk-derived tripeptides IPP (Ile-Pro-Pro) and VPP (Val-Pro-Pro) promote adipocyte differentiation and inhibit inflammation in 3T3-F442A cells. *PLoS One*, **10**(2) e0117492 (2015)
- 18) Sawada Y., Sakamoto Y., Toh M., Ohara N., Hatanaka Y., Naka A., Kishimoto Y., Kondo K., Iida K.: Milk-derived peptide Val-Pro-Pro (VPP) inhibits obesity-induced adipose inflammation via an angiotensin-converting enzyme (ACE) dependent cascade. *Mol. Nutr. Food Res.*, **59** (12) 2502-10 (2015)
- 19) 厚生労働省：健康日本 21(第二次) . http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/kenkou/kenkounippon21.html
- 20) 厚生労働省：「健康づくりのための身体活動基準 2013」及び「健康づくりのための身体活動指針(アクティブガイド)」について . <http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/2r9852000002xple.html>