

博士論文

筋肥大を効果的に高めるたんぱく質
およびアミノ酸摂取の探索
(Protein and amino acid intake to effectively
enhance muscle hypertrophy)

2019年9月

立命館大学大学院スポーツ健康科学研究科
スポーツ健康科学専攻博士課程後期課程

吉居 尚美

立命館大学審査博士論文

筋肥大を効果的に高めるたんぱく質

およびアミノ酸摂取の探索

(Protein and amino acid intake to effectively
enhance muscle hypertrophy)

2019年9月

September 2019

立命館大学大学院スポーツ健康科学研究科

スポーツ健康科学専攻博士課程後期課程

Doctoral Program in Sport and Health Science

Graduate School of Sport and Health Science

Ritsumeikan University

吉居 尚美

YOSHII Naomi

研究指導教員：藤田 聡 教授

Supervisor: Professor FUJITA Satoshi

論文一覧

本博士学位申請論文は、以下の副論文をまとめたものである。

研究課題 1

【副論文】

Yoshii, N., Sato, K., Ogasawara, R., Kurihara, T., Hamaoka, T., Fujita, S.

Relationship between Dietary Protein or Essential Amino Acid Intake and Training-Induced Muscle Hypertrophy among Older Individuals. J Nutr Sci Vitaminol, 63 (6), 379-388, 2017.

研究課題 2

【副論文】

Yoshii, N., Sato, K., Ogasawara, R., Nishimura, Y., Shinohara, Y., Fujita, S.

Effect of Mixed Meal and Leucine Intake on Plasma Amino Acid Concentrations in Young Men. Nutrients, 10 (10), 1543, 2018.

表のタイトル

- 表 1 レジスタンストレーニング介入前(Pre)後(Post)における身体組成
- 表 2 レジスタンストレーニング介入前(Pre)後(Post)における最大筋力
- 表 3 レジスタンストレーニング介入前(Pre)後(Post)における血液指標
- 表 4 レジスタンストレーニング介入前(Pre)後(Post)における栄養素摂取量
- 表 5 たんぱく質, 必須アミノ酸, ロイシンの1日(朝食, 昼食, 夕食)の摂取量分布
- 表 6 1日のたんぱく質摂取量とレジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加との相関係数
- 表 7 1日のアミノ酸摂取量とレジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量との相関係数
- 表 8 朝食におけるたんぱく質摂取量 0.61 g/kg LBM/meal 以下の被験者(n=7)によるレジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加と朝食におけるたんぱく質摂取量との相関係数
- 表 9 朝食におけるたんぱく質摂取量 0.61 g/kg LBM/meal 以下の被験者(n=7)によるレジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加と各種アミノ酸摂取量との相関係数
- 表 10 試験食の必須アミノ酸組成
- 表 11 血中インスリン濃度の体内動態パラメータ

表 12 血糖値の体内動態パラメータ

表 13 血中必須アミノ酸濃度の体内動態パラメータ

表 14 血中ロイシン濃度の体内動態パラメータ

表 15 必須アミノ酸とロイシンの血中濃度時間曲線下面積(AUCi)(ロイシン摂取合計量が
2 g である試技)

表 16 必須アミノ酸とロイシンの血中濃度時間曲線下面積(AUCi)(ロイシン摂取合計量が
4 g である試技)

表 17 試験飲料の必須アミノ酸組成

表 18 最高血中濃度(Cmax)

図のタイトル一覧

- 図 1 1日(Post時)のたんぱく質摂取量とレジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加との関係(n=10)
- 図 2 1日(Post時)の必須アミノ酸摂取量とレジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加との関係(n=10)
- 図 3 1日(Post時)のロイシン摂取量とレジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加との関係(n=10)
- 図 4 レジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加と朝食における除脂肪量あたりたんぱく質摂取量(g/kg LBM/meal)との相関関係(n=7)
- 図 5 レジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加と朝食における除脂肪量あたり必須アミノ酸摂取量(mg/kg LBM/meal)との相関関係(n=7)
- 図 6 レジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加と朝食における除脂肪量あたりロイシン摂取量(mg/kg LBM/meal)との相関関係(n=7)
- 図 7 研究デザインと実験プロトコルのタイムライン
- 図 8 試験食
- 図 9 血中インスリン濃度の経時的变化
- 図 10 血糖値の経時的变化
- 図 11 血中必須アミノ酸濃度の経時的变化

図 12 血中ロイシン濃度の経時的変化

図 13 研究デザインと実験プロトコルのタイムライン

図 14 血中インスリン濃度の経時的変化

図 15 血糖値の経時的変化

図 16 血中必須アミノ酸濃度の経時的変化(A)と濃度曲線下面積(AUCi)(B)

図 17 血中ロイシン濃度の経時的変化(A)と濃度曲線下面積(AUCi)(B)

図 18 栄養・運動介入のモデルプラン

略語の一覧

AA	Amino acid
AMM	Appendicular muscle mass
AUCg	Area under the curve with respect to ground
AUCi	Area under the curve with respect to increase
BW	Body weight
BCAA	Branched-chain amino acid
CCK	Cholecystokinin
Cmax	Maximum concentration
DIAAS	Digestible indispensable amino acid score
DXA	Dual-energy X-ray absorptiometry
EAA	Essential amino acid
EAR	Estimated average requirement
GIP	Glucose-dependent insulintropic polypeptide
GLP-1	Glucagon-like peptide-1
HDL	High density lipoprotein
HbA1c	Hemoglobin A1c
His	Histidine
Ile	Isoleucine
kg BW	kg body weight
kg LBM	kg lean body mass
kg LSTM	kg lean soft tissue mass
LBM	Lean body mass
Leg SMM	Leg skeletal muscle mass
Leu	Leucine
Lys	Lysine
Met	Methionine
Mets	Metabolic equivalents of task

MPB	Muscle protein breakdown
MPS	Muscle protein synthesis
mTORC1	Mechanistic target of rapamycin complex 1
Phe	Phenylalanine
QOL	Quality of Life
RDA	Recommended dietary allowance
RM	Repetition maximum
RPE	Rating of perceived exertion
SMM	Skeletal muscle mass
Tmax	Time of maximum concentration
Thr	Threonine
Try	Tryptophan
Val	Valine

たんぱく質 食物として摂取するたんぱく質

タンパク質 生体の組織を構成するタンパク質

目次

原著論文の一覧

表のタイトル一覧

図のタイトル一覧

略語の一覧

第1章 緒言	3
第2章 文献研究	6
第3章 研究目的および研究意義	20
第4章【研究課題1】高齢者におけるレジスタンストレーニングによる筋肥大と食事によるたんぱく質およびアミノ酸摂取との関係	22
1. 緒言	22
2. 方法	24
3. 結果	29
4. 考察	46
5. 結論	52
第5章【研究課題2】食事摂取とロイシン摂取における血中アミノ酸濃度への影響	53
1. 緒言	53
2. 方法	56
3. 結果	63
4. 考察	73

5. 結論.....	78
第6章【研究課題3】酸性乳飲料摂取が血中アミノ酸濃度におよぼす影響.....	79
1. 緒言.....	79
2. 方法.....	82
3. 結果.....	86
4. 考察.....	91
5. 結論.....	94
第7章 総合討論.....	95
第8章 結論.....	101
謝辞.....	102
参考文献.....	103

第1章 緒言

現在、わが国では急速に高齢化が進展している。平成30年4月公表の総務省「平成29年度人口推計」によると、65歳以上人口の割合は27.7%で過去最高であり、その中でも75歳以上人口は13.8%を占める(総務省, 2018)。日本人の平均寿命は男性81.1歳、女性87.3歳である。しかし、自立し日常生活に制限のない生活を送ることができる期間である健康寿命は男性で平均72.1歳まで、女性で平均74.8歳までであり、介護や支援を必要とする期間が約10年間あると報告されている(総務省, 2018)。このような超高齢化社会において、高齢者自身が生活の質(Quality of Life ; QOL)を落とすことなく生活することが求められている。

加齢に伴う筋量の減少は1989年にRosenbergによって“サルコペニア(Sarcopenia)”と提唱された(Rosenberg, 1997)。サルコペニアとはギリシャ語で筋肉を意味する“sarx”と、減少を意味する“penia”を組み合わせることのできた造語である(Rosenberg, 1997)。サルコペニアは特異的な高齢者が罹る疾患ではなく、高齢者に広く蔓延している(Iannuzzi-Sucich *et al.*, 2002)。サルコペニアは、進行性および全身性の筋量および筋力の低下を特徴とする症候群と2010年European Working Group on Sarcopenia in Older people (EWGSOP)によって定義された(Cruz-Jentoft *et al.*, 2010)。その後、2014年にAsia Working Group for Sarcopenia (AWGS)によってアジア人を対象としたサルコペニア診断基準がとりまとめられた(Chen *et al.*, 2014)。EWGSOP および AWGS の双方共に、筋量と筋機能の両側面からサルコペニアを定義している。EWGSOP では、歩行速度が0.8 m/sec 以下、握力が男性30 kg 未満、女性20 kg 未満、筋量は四肢骨格筋量指標(Skeletal muscle mass index : SMI (筋量(kg) /身長(m)²))にて評価し、男性7.0 kg/m²、女性5.8 kg/m² 以下をサルコペニアと診断する(Cruz-Jentoft *et al.*, 2010)。アジア人に向けて AWGS は、歩行速度が0.8 m/sec 以下、握力が男性26 kg 未満、女性18 kg 未満、筋量はSMI が男性7.0 kg/m²、女性5.4 kg/m² 以下(DXA 法)をサルコペニアと診断する(Chen *et al.*, 2014)。以前は筋量だけで評価していたが2010年以降は、筋量と筋機能の2

つのパラメーターを使用してサルコペニアを診断すると定義した(Cruz-Jentoft *et al.*, 2010). 筋力は単に筋量だけに依存するものではなく、筋力と筋量の関係は直接的なものではないことが論理的根拠である(Goodpaster *et al.*, 2006). しかし、筋量は診断のアルゴリズム内で絶対的に必要な評価項目である。そのため筋量を DXA 法などにより正確に測定することが求められている。加齢に加え、サルコペニアのプロセスを加速する要因は、生物学的な多様な要因が影響している(Cruz-Jentoft *et al.*, 2010). 例えば、慢性疾患、特定の薬物による影響(Cawthon *et al.*, 2007), たんぱく質が不足した食事の摂取(Paddon-Jones *et al.*, 2008), 安静または座りがちな生活(身体活動量の低下)(Sayer *et al.*, 2008), インスリン抵抗性(Fujita *et al.*, 2009b), 筋タンパク質合成メカニズムの阻害(Cuthbertson *et al.*, 2005; Fry *et al.*, 2011)などの多要因が報告されている。筋量の減少は、サルコペニア以外の疾病である糖尿病(Jung *et al.*, 2013), 心臓血管疾患(Heitmann & Frederiksen, 2009)などの疾病および死亡率(Cesari *et al.*, 2009)と関連している。加齢に伴う筋量および筋機能の低下は、高齢者の転倒および骨折への危険性を増大させる(Evans, 1998). そのため、筋量および筋機能の低下は、高齢者の自立の喪失と関連している(Tan *et al.*, 2017). 以上のことから、サルコペニアを予防すること、とりわけサルコペニアの診断基準の主項目である筋量の減少を予防することは、様々な疾病を予防し、QOL の向上に貢献することにつながると考えられる。

ヒトは食物を摂取し、体内においてエネルギー源や体の構成成分として利用している。栄養とは、生物の生命現象の中で体外から取り入れた物質に化学反応(代謝)を加え、体成分の合成やエネルギーの獲得をし、生命活動や成長、生殖などに利用していく過程と定義されている(日本栄養・食糧学会, 2015). ヒトの場合には、食物を摂取し、消化吸收の後、その成分を体構成成分やエネルギーに利用して健康を維持・増進することと正常な成長を図る状態を栄養と示される(日本栄養・食糧学会, 2015). このような生体の生命現象を営むために外界から取り入れる物質を栄養素と定義している(日本栄養・食糧学会, 2015). ヒトの生命を維持するために多栄養素が必要であるが、生体を構成する主要栄養素であるたん

ばく質は生命現象を支える中心的な栄養素である。

生体内を構成する筋タンパク質は、1日24時間絶え間なく常に合成(Muscle protein synthesis ; MPS)と分解(Muscle protein breakdown ; MPB)を繰り返している(Kim *et al.*, 2015). 筋タンパク質合成と分解の差し引きの結果が、正味の筋タンパク質の出納バランスを示す(Kim *et al.*, 2016). 絶食状態では、筋タンパク質分解が合成を上回る(Phillips *et al.*, 1997). すなわち、筋タンパク質の出納バランスは異化状態となる。たんぱく質を含む食事を摂取すると、筋タンパク質合成が分解を上回る。すなわち、筋タンパク質の出納バランスは、同化状態となる(Kim *et al.*, 2015). 日常生活の1日の中で空腹と食事摂取を繰り返すことで、分解と合成が共につりあい骨格筋量を維持していると推察されている(Phillips, 2004). しかし、高齢者では多要因により分解が合成を上回り、骨格筋量が減少に傾いていると指摘されている(Cruz-Jentoft *et al.*, 2010).

栄養素の摂取だけでなく、運動によっても筋タンパク質の合成と分解が引き起こされる。単回のレジスタン運動は、筋タンパク質合成を刺激する(Phillips *et al.*, 1999). さらに、レジスタンス運動とたんぱく質およびアミノ酸摂取を組み合わせると、筋タンパク質の出納バランスは合成が分解を大きく上回り同化作用をもたらす(Tang *et al.*, 2009). しかし、高齢者は若年者に比較して、レジスタンス運動後のたんぱく質摂取量をより多く必要とする(Moore *et al.*, 2015). 以上のことから、高齢者における最適なレジスタンス運動、たんぱく質およびアミノ酸摂取量、またそれらの組み合わせを探索することは筋量の維持・増加を介したサルコペニア予防の観点からも重要である。

第2章 文献研究

1. たんぱく質・アミノ酸摂取量

1-1. たんぱく質必要量

ヒトにとってたんぱく質の摂取は、毎日欠かすことができない。それは体タンパク質が常に損失しているからである。体タンパク質の損失には、酸化(燃焼)されエネルギーとなるもの、内臓のターンオーバーによる損失、糞尿からの排泄、皮膚からの損失(汗、髪の毛、爪からの損失も含む)がある。そのため、たんぱく質の必要量は、身体の維持を目的とした代謝必要量が大部分を占めた量である(WHO/FAO/UNU, 2007)。たんぱく質必要量は、50%の人が必要な量を満たす(同時に50%の人が必要量を満たさない)と推定された摂取量として推定平均必要量(estimated average requirement ; EAR)が定義されている。推定平均必要量(EAR)にたんぱく質の標準偏差を2倍したものを加算し($RDA=EAR \times (1+2SD)$)、ほとんどの人(97~98%の人)が充足する量として推奨量(recommended dietary allowance ; RDA)を定義している(Rand *et al.*, 2003)。

2007年のWHO/FAO/UNU 合同専門協議会によると、高齢者を含む成人のたんぱく質RDAは0.83 g/kg BW/dayである(WHO/FAO/UNU, 2007)。アメリカ・カナダのRDAは、高齢者を含む健康な成人はすべて0.8 g/kg 体重(BW)/dayであり、すべての年齢層において同じであると報告している(Trumbo *et al.*, 2002; Medicine, 2005)。しかし新たなエビデンスによると、65歳以上の高齢者はたんぱく質摂取量を1.0 g/kg BW/day 超えて摂取すると筋量の維持に有益である可能性が示唆されている(Campbell *et al.*, 2001; Volpi *et al.*, 2003; Wolfe *et al.*, 2008; Deutz *et al.*, 2014)。筋量と筋機能の維持および増加を目的とした高齢者のための最適なたんぱく質摂取量が、異なる団体から提唱されている。国際的なPROT-AGE研究グループは、病気の有無にかかわらず65歳以上の高齢者は1.0-1.5 g/kg BW/dayのたんぱく質摂取量を推奨している(Bauer *et al.*, 2013)。欧州栄養学会(ESPEN)は、健康な高齢者は少なくとも1.0-1.2 g/kg BW/dayのたんぱく質摂取量を推奨している(Deutz *et al.*, 2014)。日本に

においてもアメリカ・カナダ基準同様に、推定平均必要量(EAR)にたんぱく質の標準偏差を2倍したものを加算し($RDA=EAR \times (1+2SD)$), RDA を算定している(菱田, 明 & 佐々木, 敏, 2014). 日本人の高齢者の RDA は 1.06 g/kg BW/day であるが, 日本では体重あたりでの表記は行わず, 参照体重を乗算した値(例えば, 男性 70 歳以上の 1 日量の RDA は 60 g)にて示されている(菱田, 明 & 佐々木, 敏, 2014). また Wolfe らは, 筋タンパク質合成の刺激は 15 g の必須アミノ酸で得られることを示している(Wolfe, 2002). そのため, 15 g 必須アミノ酸を含む高品質たんぱく質(牛肉やホエイプロテイン)であれば 1 食あたり 35 g 必要であり, 1 日 3 食摂取すると考えると体重あたりでは 1.5 g/kg BW/day であると示している(Wolfe *et al.*, 2008).

このように異なる団体から異なる RDA が提唱されているが, たんぱく質 RDA の国際基準は, 高齢者を含む健康な成人はすべて 0.8 g/ kg BW/day であり変更されていない. そのため, 筋量と筋機能の維持および増加を目的とした高齢者のための最適なたんぱく質摂取量が求められている.

1-2. 日常の食事たんぱく質摂取量と筋量の維持との関係(横断的・縦断的・長期介入研究)

高齢者において日常的な食事によるたんぱく質摂取は, 骨格筋量を維持するための重要な要素である. マサチューセッツ州にて心血管疾患の家族性危険因子を調査する目的で集められたグループの高齢男女 2600 人でのコホート研究では, たんぱく質の摂取量が一番少ないグループ(57.8 g/day)に比較してたんぱく質の摂取量が多いグループ(93.4 g/day)が, 両脚除脂肪量が多いことを示している (Sahni *et al.*, 2015). Houston らは, たんぱく質推奨量 (RDA) よりも多い食事たんぱく質摂取量である高齢者群と, RDA 以下の食事たんぱく質摂取量である高齢者群を対象に 3 年間追跡した調査を報告している. RDA よりも多い 1.1 g/kg BW/day の高齢者群は, RDA よりも少ない 0.7 g/kg BW/day の高齢者群に比較して除脂肪体

重の減少が少ない結果であった(Houston *et al.*, 2008). また Campbell らは, 高齢者において RDA である 0.8 g/kg BW/day のたんぱく質量の食事を 2 週間摂取した結果, 大腿部の筋横断面積は有意に減少したと報告している(Campbell *et al.*, 2001). Castaneda らは, 高齢女性において食事たんぱく質摂取量が 0.45 g/kg BW/day の低たんぱく質摂取群は 9 週間後, 除脂肪量が減少したが, 2 倍量の 0.90 g/kg BW/day たんぱく質量摂取群は除脂肪量が維持されたと報告している(Castaneda *et al.*, 1995). これらの報告は, 筋量の維持のために高齢者は, RDA のたんぱく質摂取量では筋量の維持には不十分であることが示される.

1-3.たんぱく質摂取量およびアミノ酸摂取量と筋タンパク質合成との関係(一過性)

1-3-1.たんぱく質摂取量(一過性)

たんぱく質は摂取されると消化吸収され, 血中へアミノ酸として出現する(Koopman *et al.*, 2009b; Pennings *et al.*, 2012). 血中アミノ酸は筋内へ取り込まれ, 筋細胞内のアミノ酸濃度が増加することで, 筋タンパク質合成を促進する(Bohe *et al.*, 2003). Moore らによると, 筋タンパク質合成を最大限に刺激する高品質たんぱく質(動物性高品質たんぱく質に分類される乳たんぱく質中のホエイプロテインまたは卵プロテイン)の一過性での摂取量は, 若年者は体重あたり 0.24 g/kg BW/meal(除脂肪量あたり 0.25 g/kg LMB/meal)とされている(Moore *et al.*, 2015). 体重あたり 0.24 g/kg BW/meal(除脂肪量あたり 0.25 g/kg LMB/meal)という摂取量は, それ以上のたんぱく質を摂取しても筋タンパク質合成速度(筋タンパク質合成速度が高齢者は 0.056%/h および若年者は 0.058%/h)が増加しない摂取量と定義されている. 同じ研究において高齢者の筋タンパク質合成を最大化させるたんぱく質の摂取量は, 体重あたり 0.40 g/kg BW/meal(除脂肪量あたり 0.61 g/kg LMB/meal)で報告されており, 若年者に比較して必要量が多い(Moore *et al.*, 2015). 筋タンパク質合成を最大限に刺激するたんぱく質量が含まれる食事を, 1 日 3 回繰り返し摂取することが理想であると考えると, 高

齢者では 1 日あたり 1.2 g/kg BW/day の摂取量となる。つまり RDA である 0.8 g/kg BW/day の摂取では、筋タンパク質合成を食事摂取毎で刺激することが出来ないと指摘している (Moore *et al.*, 2015)。

若年者と比較して高齢者は、筋タンパク質合成を最大限に刺激するのに必要なたんぱく質摂取量が増加するが、その原因として「Anabolic resistance」といわれる筋タンパク質同化への「抵抗性」が考えられる。この抵抗性は複数の要因から構成されると考えられており、たんぱく質摂取に対する筋タンパク質合成の応答の低下 (Kumar *et al.*, 2009)、食後の血流量の減少 (Timmerman *et al.*, 2010)、食後のタンパク質同化作用に対するインスリン抵抗性 (Fujita *et al.*, 2009b)、慢性的な炎症 (Toth *et al.*, 2005; Boirie, 2009) が報告されている。食後の筋タンパク質同化作用に対する「抵抗性」が、サルコペニアを説明する 1 要因であると考えられている (Moore *et al.*, 2015)。

1-3-2. アミノ酸摂取量(一過性)

身体を構成するアミノ酸は 20 種類あり、その中でも 9 種類 (ロイシン, イソロイシン, バリン, スレオニン, トリプトファン, フェニルアラニン, メチオニン, リジン, ヒスチジン) のアミノ酸は体内で合成することができないアミノ酸として必須アミノ酸 (または不可欠アミノ酸) (Essential amino acid : EAA) と定義されている (WHO/FAO/UNU, 2007)。

アミノ酸の中でも必須アミノ酸が筋タンパク質合成を引き起こすことが報告されている (Tipton *et al.*, 1999; Borsheim *et al.*, 2002)。40 g のアミノ酸摂取後の筋タンパク質合成速度と、40 g のアミノ酸の中の必須アミノ酸 18 g のみを摂取した後の筋タンパク質合成は有意な差がなく、必須アミノ酸摂取量の重要性が示されている (Volpi *et al.*, 2003)。また、必須アミノ酸の中でもロイシンが単独にて筋タンパク質合成を刺激することが示されている。

Wilkinson らは、ヒトにおいてロイシン 3.42 g 摂取で mTOR (mechanistic target of rapamycin

complex 1(mTORC1))活性および筋タンパク質合成速度の増加が起ることを報告している (Wilkinson *et al.*, 2013). Penning らは、高齢者でホエイプロテインたんぱく質 10, 20, 35 g の摂取後の筋タンパク質合成速度を報告している (Pennings *et al.*, 2012). 35 g 摂取後が有意に高値を示しているが、摂取量に含まれるロイシン量が最も多いため血中ロイシン濃度も量依存的に高値を示したと考えられる。またカゼインプロテインにロイシンを添加した場合と添加なしでの筋タンパク質合成速度は、ロイシンを添加した場合において有意に高値であることが示されている (Rieu *et al.*, 2006). Penning らは、ホエイプロテイン、カゼインプロテイン、加水分解物カゼインプロテイン摂取後の筋タンパク質合成速度を示している (Pennings *et al.*, 2011). ロイシン含有量の異なるたんぱく質を各 20 g ずつ摂取した後の筋タンパク質合成速度は、やはりロイシン含有量が最も高いホエイプロテインが有意に高値を示している。また摂取後の最高血中ロイシン濃度は、ホエイプロテイン $526 \pm 21 \mu\text{mol/L}$ 、加水分解カゼインプロテイン $381 \pm 14 \mu\text{mol/L}$ 、カゼインプロテイン $282 \pm 13 \mu\text{mol/L}$ であり、ロイシン含有量の最も多いホエイプロテインが血中濃度も高値を示し、各種たんぱく質摂取後の最高血中ロイシン濃度は筋タンパク質合成速度と正の相関関係であることを示している。これらの知見は、たんぱく質やアミノ酸の摂取に伴う筋タンパク質合成の増加が、摂取量に依存し、特にロイシンの含有量が重要であり、血中ロイシン濃度の推移が筋タンパク質合成に反映されることを示すものである。

1-4. 血中アミノ酸濃度への影響因子

1-4-1. 胃内容排出

摂取したたんぱく質は消化吸収されアミノ酸として血液中へ出現するが、血中アミノ酸濃度はたんぱく質摂取量だけではなく胃内容排出によって影響を受ける。食物を摂取すると、食塊は食道を通り胃へ送り込まれる (Muller *et al.*, 2018). 胃体部にあるペースメーカー

細胞(間質カハール細胞)による電気活動リズムの蠕動運動により食塊は粉碎される(Minami & McCallum, 1984). 蠕動運動は食塊と胃液とを混合し, 食塊中のたんぱく質は胃液中のペプシンにより消化される. また蠕動運動は, 食塊を胃幽門部へ送る(Minami & McCallum, 1984). 胃幽門部において直径 1-2 mm 以下に粉碎されていない食塊は逆流し, 糜粥の状態になるまで粉碎される(Hellstrom *et al.*, 2006). 糜粥状になると胃幽門部から十二指腸へ 1 - 4 kcal/min の速さで排出される(Hellstrom *et al.*, 2006). しかし, 糜粥状の食塊が十二指腸へ到達すると, 十二指腸からの神経伝達による反射作用にて胃幽門部は収縮する(Hellstrom *et al.*, 2006)(神経反射作用). 胃幽門部が収縮すると糜粥状の食塊は胃に留まり, 十二指腸から吸収することができず, 血中アミノ酸濃度は増加することができない. また, 糜粥状の食塊が十二指腸へ到達すると小腸は複数のホルモンを分泌する. そのホルモンが胃幽門部を収縮し, その結果, 糜粥状の食塊が胃から排出することが出来ず胃内容排出は遅延する(Hellstrom *et al.*, 2006)(ホルモン分泌作用). 経口による食物摂取後, 神経反射作用とホルモン分泌作用による 2 要因が主に働き, 胃幽門部は収縮し胃の内容物の排出が遅延する. 摂取する食物に含まれる栄養素によって, 胃の内容物の排出が遅延する程度が異なる(Abell *et al.*, 2008). 脂質が最も胃幽門部を収縮させ胃の内容物の排出が遅延し, 次いでたんぱく質, 糖質の順である(Abell *et al.*, 2008). Frost らは, トマトソースパスタに食物繊維(サイリウム 1.7 g)添加のみでは胃内容排出が遅延しないが, 30 g 油を添加すると食物繊維の添加有無にかかわらず胃内容排出が遅延することを報告している(Frost *et al.*, 2003). 他にも, 混合食に含まれる卵と, 卵が脂肪肝(フォアグラ)に置き換えられた場合の比較では, 脂質の多い脂肪肝(フォアグラ)は胃内容排出が遅延することを報告している(Tougas *et al.*, 2000). 加えてその他にも, 摂取食塊の温度, 高浸透圧, エネルギー密度(カロリー含有量)(Calbet & MacLean, 1997), 粘度(Vist & Maughan, 1995), 食物繊維(Holt *et al.*, 1979; Schwartz *et al.*, 1982)など, 数々の要因が胃幽門部の収縮に影響をおよぼし, 食塊が胃からの排出する時間に影響をおよぼす. これらは, 胃から排出される時間が遅延することによ

って、小腸から吸収され血液中へアミノ酸として出現する時間が遅延することを示す。たんぱく質摂取後の血中アミノ酸濃度は、たんぱく質摂取量だけでなく、胃からの排出時間による影響を受けると考えられる。

1-4-2. 初回通過での内臓保持量

摂取したたんぱく質は、胃で消化され、その後小腸上皮細胞で消化吸収し、ほとんどがアミノ酸として血液中へ出現する。しかし、血液中へ出現するアミノ酸は、摂取したたんぱく質量すべてがアミノ酸として出現する訳ではない。小腸上皮細胞が消化吸収を行う過程で、小腸はアミノ酸を保持する(Capaldo *et al.*, 1999; Volpi *et al.*, 1999)。小腸が保持したアミノ酸量の残りが血液に出現し、小腸から門脈へ集約され肝臓へ運ばれる。肝臓もまたアミノ酸を保持(吸収)し、その残りのアミノ酸が血液に存在し全身へ運ばれる(Capaldo *et al.*, 1999; Volpi *et al.*, 1999)。つまり、経口からたんぱく質を摂取し全身や骨格筋にアミノ酸が到達するまでに、消化吸収の過程で内臓(主に小腸と肝臓)がアミノ酸を保持する。たんぱく質を摂取後、内臓を初回に通過する際に保持されるアミノ酸は *first pass splanchnic extraction*(内臓初回通過保持量)と定義される(Volpi *et al.*, 1999)。Capaldo らは、中高年での多栄養素が含まれる混合食でのたんぱく質摂取は、消化吸収後に血液中に出現するアミノ酸量がたんぱく質摂取量の 30%であると報告している(Capaldo *et al.*, 1999)が、ホエイプロテイン摂取では、内臓保持量は 40%であると報告されている(Pennings *et al.*, 2012)。以上のことから、内臓保持量は摂取するたんぱく質の種類によって異なる可能性が示唆される。

1-4-3. “muscle full effect”

たんぱく質摂取に伴う血中アミノ酸濃度の上昇と筋タンパク質合成の増加に関わる関係

性で, Atherton らは “muscle full effect” という現象を報告している(Atherton *et al.*, 2010). 血中アミノ酸濃度が上昇し骨格筋細胞内へアミノ酸が取り込まれ, 筋細胞内のアミノ酸が満たされる(full)と, 細胞外の血中アミノ酸濃度が高値を維持しても筋細胞内の筋タンパク質合成の増加が維持されないと報告されている. Atherton らは, ホエイプロテイン 48 g を摂取し摂取後 45~90 分で筋タンパク質合成速度が増加したことを示している(Atherton *et al.*, 2010). しかし, 摂取後 120 分では血中アミノ酸濃度は高値を維持 (血中 Leu 濃度は約 300 μM)しているにもかかわらず, 筋タンパク質合成速度は減少しベースラインに戻る. 血中アミノ酸濃度の増加に伴う筋タンパク質合成の反応は一時的であり, それが“muscle full effect”である.

2. 高齢者におけるレジスタンス運動

一過性のレジスタンス運動が、若年者のみならず高齢者においても筋タンパク質合成を増加させることはこれまで多くの研究グループによって報告されている。The American College of Sports Medicine が推奨するレジスタンストレーニングの運動負荷・運動量は、最大挙上重量の 70-85%(70-85% 1-RM)で 8-12 回を 3 セットである(Kraemer *et al.*, 2002)。フレイルおよび健常な高齢者であっても、高負荷レジスタンストレーニング(70~85% 1-RM)により筋量の有意な増加は得られる(Frontera *et al.*, 1988; Fiatarone *et al.*, 1994; Kosek *et al.*, 2006)。高齢者において、膝伸展運動および膝屈曲運動で高負荷のレジスタンス運動(75-80% 1-RM, 8-10 回 × 3 セット)を 24 週間行くと、3%の両脚骨格筋量の増加が得られることが報告されている(Leenders *et al.*, 2013)。Taaffe らは、高齢女性において運動量(仕事量)が同一になるように回数とセット数を調節し、低負荷群(40% 1-RM, 14 回)と高負荷群(80% 1-RM, 7 回)で比較している。その結果、筋横断面積の増加において両群で有意な差はなく、運動量を確保すれば低負荷でも高負荷と同様の筋肥大効果があることを示している(Taaffe *et al.*, 1996)。レジスタンス運動は、若年者だけでなくフレイル状態の高齢者においても、筋量および筋機能を有意に増加させることが示されており(Fiatarone *et al.*, 1994)、加齢に伴う筋量の減少を抑制または筋量を増大させる上で重要な運動様式である。

3. レジスタンストレーニング介入に伴う食事中たんぱく質摂取量と筋肥大との関係 (付加たんぱく質なし)

筋タンパク質合成は、たんぱく質摂取とレジスタンス運動により刺激される(Tang *et al.*, 2009). 骨格筋量の増加を求めて行うレジスタンストレーニングの介入において、付加的にたんぱく質を摂取しない場合は、毎日の食事からのたんぱく質の摂取量が重要である。Cambellらは、50~80歳の高齢者において12週間のレジスタンストレーニング中の食事たんぱく質量を変化させ、除脂肪量を比較した。RDAである体重あたり0.8 g/kg BW/dayのたんぱく質量の食事群と、RDAの2倍量の1.6 g/kg BW/dayのたんぱく質量の食事群の全身除脂肪量の増加は、両群共に介入前に比較して有意に増加したが、群間における有意差は示さなかった(Campbell *et al.*, 1995). また、Iglayらは50~80歳の高齢者においてたんぱく質摂取量が0.9 g/kg BW/day群と1.2 g/kg BW/day群でトレーニング後の筋肥大を比較しているが、群間において全身除脂肪量の増加に有意差は示されていない(Iglay *et al.*, 2007). これらの先行研究は、レジスタンストレーニングにおいて、RDAを満たしている場合は、食事からのたんぱく質摂取量の違いは除脂肪量の増加には影響しないことを示唆している。しかし、上記の研究は全て被験者の食生活に介入しており、介入のない日常的な食生活におけるたんぱく質の摂取ではない。また1日のたんぱく質摂取量のみならず各食事におけるたんぱく質摂取量が十分に摂取できているかどうかは検討されていない。

4. レジスタンス運動と組み合わせる付加たんぱく質摂取量に伴う筋タンパク質代謝への影響

4-1. 一過性のレジスタンス運動後に摂取する付加たんぱく質量の影響

これまで複数の研究において、レジスタンス運動を単独で実施するよりも、運動後にたんぱく質を摂取することで、運動誘発性の筋タンパク質合成が有意に高まることが一過性の研究にて報告されている。付加するたんぱく質は、多くの研究ではプロテイン(精製たんぱく質)で行っている。それは、プロテインが筋タンパク質合成を引き起こす必須アミノ酸の含有量が多いためである。たんぱく質の質は、DIAAS(Digestible Indispensable Amino Acid Score)によって評価される(Rutherfurd *et al.*, 2015)。DIAASは、評点パターンに対する任意のたんぱく質の必須アミノ酸(9種類(ロイシン, イソロイシン, バリン, スレオニン, トリプトファン, フェニルアラニン, メチオニン, リジン, ヒスチジン)の充足率に回腸での吸収率が加味されたスコアである(Rutherfurd *et al.*, 2015)。プロテインが乳由来のホエイプロテイン, ミルクプロテイン, 大豆由来のソイプロテイン, 卵由来の卵プロテインはDIAASが1.0以上の高い評価(Phillips, 2017)である。そのため、レジスタンス運動後に摂取する付加たんぱく質として一般的に用いられる。

若年者では、一過性のレジスタンス運動後に25gホエイプロテインを摂取すると、筋タンパク質合成速度は3時間後にピークに達し、5時間後に摂取前の状態へ戻る(Moore *et al.*, 2009b)。ホエイプロテイン摂取とレジスタンス運動を組み合わせると、ホエイプロテイン摂取後1時間以内での筋タンパク質合成速度が急激に増加する(Moore *et al.*, 2009b)。若年者に一過性のレジスタンス運動後にホエイプロテイン, カゼインプロテイン, ソイプロテインをEAAが同量になるように摂取させて比較すると、ホエイプロテイン摂取後の筋タンパク質合成速度が最も高く、その理由としてLeu含有量が1番多かったことが報告されている(Tang *et al.*, 2009)。レジスタンス運動後に摂取するホエイプロテインの量を比較した研究では、筋たんぱく質合成は量依存的に増加し、若年者では20gで最も筋タンパク質合

成が高まるが、40 g 摂取は 20 g 摂取以上に筋タンパク質合成を高めないことが報告されている(Tang *et al.*, 2009). また、Moore らも、若年者では一過性のレジスタンス運動後の卵プロテイン摂取は、20 g まで筋タンパク質合成速度を増加させるが、40 g の摂取では 20 g と差がなく、20 g で頭打ちとなることを報告している(Moore *et al.*, 2009a). 興味深いことに、高齢者では、レジスタンス運動後にホエイプロテインを 20 g 摂取するよりも 40 g 摂取するほうが有意に筋タンパク質合成速度の増加することが報告されている(Yang *et al.*, 2012).

以上のことから、一過性のレジスタンス運動と組み合わせるたんぱく質の摂取量は量依存的に筋タンパク質合成を増加させるが、高齢者は若年者に比較してより多くのたんぱく質が必要となり、加齢に伴う「抵抗性」が存在することが示唆される。

4-2. 長期介入のレジスタンス運動後に摂取する付加たんぱく質摂取量の影響

長期的なレジスタンストレーニング介入とたんぱく質付加の併用効果における研究では、前述した一過性の研究結果と異なり、通常の食生活にプロテインなどのサプリメントを付加することが必ずしも筋量の増加をもたらすわけではないことが報告されている。若年男性において、レジスタンストレーニング(80% 1-RM, 10-12 回 × 3 セット, 週 2 回, 12 週間)とスキムミルク(たんぱく質 25.7 g)の付加摂取は、等エネルギーのデキストリン付加摂取に比較して、より筋量を増加させた(Hartman *et al.*, 2007). 若年女性のレジスタンストレーニング(80% 1-RM, 6-10 回 × 4 セット, 週 5 回, 12 週間)とレジスタンス運動後のスキムミルク(たんぱく質 24 g)の付加摂取は、等エネルギーのデキストリン付加摂取に比較して、より筋量を増加させた(Josse *et al.*, 2010). しかし、相乗的な筋量の増加効果を示さない報告も存在する。若年男性(鍛錬者)のレジスタンストレーニング(80% 1-RM, 6-10 回 × 3-4 セット, 週 5 回, 10 週間)とミルクプロテイン(たんぱく質 42 g)の付加摂取は、付加なしに比較して筋量の増加が変わらなかった(Hoffman *et al.*, 2009).

高齢者においては、フレイルである高齢男女のレジスタンストレーニング(75% 1-RM,

8-10 回 × 4 セット, 週 2 回, 24 週間)と朝食と昼食後のミルクプロテイン(合計たんぱく質 30 g)の付加摂取は, 等エネルギーのラクトース付加摂取に比較して, より筋量を増加させた(Tieland *et al.*, 2012a). 高齢者においても, 相乗的な筋量の増加効果を示さない報告も存在する. 健康な男性のレジスタンストレーニング(75-80% 1-RM, 8 回 × 4-5 セット, 週 3 回, 12 週間)とカゼインプロテイン (たんぱく質 20 g)のレジスタンス運動後の付加摂取は, 付加なしに比較して筋量の増加に違いがなかった(Verdijk *et al.*, 2009). 健康な高齢男女のレジスタンストレーニング(75% 1-RM, 8-10 回 × 4 セット, 週 2 回, 24 週間)と朝食と昼食後のミルクプロテイン(合計たんぱく質 30 g)の付加摂取は, 等エネルギーのラクトース付加摂取に比較して, 筋量の増加に違いがなかった(Leenders *et al.*, 2013). 健康な高齢男性のレジスタンストレーニング(70-80% 1-RM, 8-10 回 × 2 セット, 週 3 回, 12 週間)とレジスタンス運動後と就寝前のホエイプロテイン(合計たんぱく質 40 g)の付加摂取は, 等エネルギー飲料の付加摂取に比較して, 筋量の増加に違いがなかった(Holwerda *et al.*, 2018).

若年者および高齢者共に, 相乗的な筋量の増加効果を示すまたは示さない報告が存在する. そのため, いくつかのメタ解析が報告されている. 高齢者と若年者が混在するメタ解析によると, 長期的な介入でのレジスタンストレーニングとたんぱく質付加摂取による筋肥大への相乗効果は, たんぱく質 1.6 g/kg BW/day のまでの摂取において認められることが報告されている(Morton *et al.*, 2017). また, 高齢者と若年者が混在する Cermak らのメタ解析によると, レジスタンストレーニング介入でのたんぱく質付加摂取の筋量の増加に及ぼす相乗効果は, わずかだが統計的に有意であると報告している(Cermak *et al.*, 2012). さらに, 肥満者を含めた高齢者での Liao らのメタ解析でも, レジスタンストレーニングとたんぱく質付加摂取の相乗的な筋量の増加効果は得られることが報告されている(Liao *et al.*, 2017). 付加するたんぱく質をホエイプロテインのみに絞った高齢者と若年者が混在するメタ解析においても, レジスタンストレーニングとホエイプロテイン付加摂取の相乗効果が得られることが報告されている(Miller *et al.*, 2014). それに反して, Thomas らのメタ解析によると

(Thomas *et al.*, 2016), たんぱく質およびアミノ酸付加摂取による相乗的な筋量の増加効果は、フレイル、サルコペニアを含む高齢者では得られないことが報告されている。Fingerらはフレイル、サルコペニアを含む高齢者でレジスタンストレーニングとたんぱく質付加摂取による相乗的な除脂肪量の増加は認められないとメタ解析にて報告している(Finger *et al.*, 2015)。近年報告された Ten Haaf らの 40 歳代が加わっているフレイルでない高齢者のメタ解析では(Ten Haaf *et al.*, 2018), レジスタンストレーニングとたんぱく質付加摂取の相乗的な効果は得られなかったが、その理由として、食事でのたんぱく質摂取が十分であった可能性が考察されている。

以上のように、レジスタンストレーニングとたんぱく質付加摂取の筋量に及ぼす相乗的な効果がメタ解析で検証されているが、効果がある報告と無い報告が混在している。これらの先行研究は付加したたんぱく質の効果を解析しており、日常的な食生活でのたんぱく質摂取量が解析因子となっていない。食事からのたんぱく質摂取量の違いが異なる研究結果を生んだ可能性も否定できない。

第3章 研究目的および研究意義

文献研究の結果から、以下の要点および問題点が挙げられた。

サルコペニアの予防・改善には筋量の維持・増加が重要である。筋量は筋タンパク質合成と分解の出納バランスにより制御されており、筋タンパク質合成が分解を上回ると同化され筋量は増加し、筋タンパク質分解が合成を上回り異化されると筋量が減少する。よってサルコペニア予防には、同化作用をもたらすレジスタンス運動と食事でのたんぱく質摂取が重要である。しかし、レジスタンス運動とプロテインなどのたんぱく質付加の長期介入の研究結果によると、両者は必ずしも筋量を相乗的に増加させるわけではない。その要因として、日常的な食事からのたんぱく質摂取量の影響が考慮されていないこと、特に1日のたんぱく質摂取量のみならず各食事におけるたんぱく質摂取量が考慮されていないことが挙げられる。また、ホエイたんぱく質に代表される消化吸収の早いたんぱく質の単独摂取が筋タンパク質合成に与える影響は多くの研究で明らかとなっているが、多栄養素が含まれる混合食摂取や加工食品が血中アミノ酸濃度の動態や筋タンパク質合成に及ぼす影響、さらにはサプリメントと混合食との併用による骨格筋のタンパク質代謝への影響についても十分に明らかにされていない。

研究目的

本研究ではサルコペニア予防のため、運動および栄養素摂取方法を念頭におき、「筋肥大を効果的に高めるたんぱく質およびアミノ酸摂取の探索」をすることを目的とし、本目的を達成するために以下の研究課題を設けた。

【研究課題 1】

高齢者を対象としたレジスタンストレーニング期間中の食事によるたんぱく質摂取量と筋肥大との関係の検討

【研究課題 2】

食事摂取と遊離アミノ酸ロイシンの単独および併用摂取に伴う血中アミノ酸濃度への影響の検討

【研究課題 3】

胃排出を早めることを目的に加工した酸性乳飲料摂取が血中アミノ酸濃度におよぼす影響の検討

研究の意義

本研究から得られる知見は、食品やサプリメントを通じた効率的な筋タンパク質の合成増加を促す栄養介入方法の開発に寄与し、サルコペニア予防に向けた栄養摂取のガイドライン策定にも貢献することから、社会的意義が高いと考えられる。

第4章【研究課題1】高齢者におけるレジスタンストレーニングによる筋肥大と食事によるたんぱく質およびアミノ酸摂取との関係

1. 緒言

骨格筋におけるタンパク質合成は、食事中のたんぱく質摂取によって活発に刺激される栄養反応プロセスである(Moore *et al.*, 2009b). 食事によるたんぱく質摂取の推奨量(RDA)は、健常な成人はすべて体重あたり 0.8 g/kg BW/day であり、すべての年齢層において同じである(Trumbo *et al.*, 2002). しかしながら、高齢者の食事によるたんぱく質摂取量の筋量を維持するために最適な摂取量は依然として未確定である.

食事による不十分なたんぱく質摂取量は身体へ影響をおよぼすことをいくつかの臨床研究が調査している. Houston らは、RDA よりもたんぱく質摂取量が多い高齢者群(1.1 g/kg BW/day)は、RDA よりたんぱく質摂取量が少ない高齢者群(0.7 g/kg BW/day)に比較して、3年後において除脂肪量の減少率が 40%少なかったと報告している(Houston *et al.*, 2008). また、高齢女性のたんぱく質摂取量が 0.45 g/kg BW/day の低たんぱく質摂取群は9週間後、除脂肪量、筋肉機能、免疫応答の低下がみられたが、2倍量の 0.9 g/kg BW/day のたんぱく質摂取群では同項目が維持されたと示されている(Castaneda *et al.*, 1995). 従って、高齢者において骨格筋量を維持するためには、毎日の十分なたんぱく質摂取量が重要であることは明らかである.

1 日の総たんぱく質摂取量に加えて、朝昼夕食の各食事でのたんぱく質摂取量の分配も筋タンパク質同化作用の調節に影響することが示されている. 朝昼夕食の3回の食事で不均一に分布されたたんぱく質の摂取量である高齢者は、より均等に分布されているたんぱく質の摂取量である高齢者よりもフレイルの発生率が高いことが横断研究で示されている(Bollwein *et al.*, 2013). 24時間の筋タンパク質合成速度を比較した研究では、朝昼夕食の1日を通して均一なたんぱく質摂取量の分布(各食事毎に約 30 g たんぱく質)である食事を摂

取する場合と、たんぱく質摂取量が不均等に分布(朝食 10 g, 昼食 20 g, 夕食 60 g)の食事を比較した。その結果、均等群において筋タンパク質合成速度が高い(筋タンパク質合成速度; 均等群, $0.075 \pm 0.006\%/h$; 不均等群, $0.056 \pm 0.006\%/h$)との報告がある(Mamerow *et al.*, 2014)。また、高齢者が筋タンパク質合成の刺激を促すためには、1回の摂取で少なくとも除脂肪量(LBM)あたり 0.61 g のたんぱく質量を摂取する必要があることが示されている(Moore *et al.*, 2015)。これらの研究結果は、1日の総たんぱく質摂取量に加えて、朝昼夕食の各食事におけるたんぱく質摂取量の重要性を示している。

一過性のレジスタンス運動が筋タンパク質合成速度を増加させることが示されている(Kumar *et al.*, 2009)。レジスタンス運動は、若年者だけでなく高齢者の筋量および筋機能を有意に増加させることができる(Fiatarone *et al.*, 1994)。一過性によるレジスタンス運動後のたんぱく質摂取は、レジスタンス運動による筋タンパク質合成速度をより増加することが示されている(Yang *et al.*, 2012)。しかし、レジスタンス運動にたんぱく質付加する併用効果に対する長期的な介入研究では、必ずしも筋量の増加をもたらすとは限らないとの報告がある(Verdijk *et al.*, 2009; Leenders *et al.*, 2013)。その要因として、食事中のたんぱく質摂取量が RDA 0.8 g/kg BW/day 以上摂取していたため、たんぱく質付加の効果が得られなかったのではないかと推測しており、日常の食事からのたんぱく質摂取量が筋肥大に関連する重要な要因であることが示される。

高齢者におけるレジスタンストレーニング介入の先行研究では、高齢男女のレジスタンストレーニングとミルクプロテインの朝食後と昼食後の付加摂取は、等エネルギーのラクトース付加摂取に比較して、相乗的に筋量を増加させることが報告されている(Tieland *et al.*, 2012a)。しかし、朝食・昼食・夕食の各食事からのたんぱく質摂取量による筋肥大への影響については検討されていない。従って本研究は、健常な高齢者の12週間のレジスタンストレーニング中の食事摂取とレジスタンストレーニングによる筋肥大の関係性について検討することを目的とした。

2. 方法

2-1. 対象者

対象者は、日常的にレジスタンス運動を行っていない健康な高齢男性 10 名(年齢 69 ± 2 歳, 体重 61.5 ± 2.2 kg, 身長 1.65 ± 0.02 m)とした。対象者へはインフォームド・コンセントとして、予め研究の趣旨、内容、それに伴うリスク、実験への参加の拒否と随時撤回の自由等を書面、および口頭にて十分に説明した。自主的な参加と実験の理解と同意が得られたものを対象とした。また事前の口頭および質問紙による問診を通して、重篤な慢性疾患(虚血性心疾患)を患っていると医師が判断した者 1 名は、対象者から除外した。実験介入前にレジスタンス運動を日常的に行っている対象者はいなかったが、全ての対象者においてウォーキングを毎日行うような活動的な日常生活であった。対象者は、実験期間中において日常の生活活動、日常の食事内容を継続するように指示した。本研究は、立命館大学倫理委員会の承認(承認番号 BKC-2012-004)を得た上でヘルシンキ宣言の精神に則って実施した。

2-2. 実験デザインおよびトレーニングプロトコール

2-2-1. レジスタンストレーニング

被験者はレジスタンス運動を週 3 回で 12 週間実施した。全ての運動は、朝食後の午前中(午前 8 時から 10 時の間)に実施された。各レジスタンス運動が適切に行われるために、全てのレジスタンス運動には指導者が付き添った。レジスタンス運動は膝伸展運動および膝屈曲運動の 2 種類をウェイトスタックマシン(Life Fitness, Rosemont, Illinois, USA)を用いて実施した。The American College of Sports Medicine が推奨するレジスタンス運動の負荷・運動量は、最大挙上重量の 70-85%(70-85% 1-RM)で 8-12 回×3 セットである(Kraemer *et al.*, 2002)。仕事量が同じであれば負荷強度が低くても同様の筋肥大効果が得られることが示されている(Taaffe *et al.*, 1996)ため、運動負荷は最大挙上重量の 50%負荷(50% 1-RM)を 14 回×3 セットで行った。レジスタンス運動のセット間の休息は 3 分間とした。14 回の 1 セット終

了毎にボルグスケールを用いて主観的運動強度(Rating of perceived exertion ; RPE)を, 6 から 20 までの範囲で指導者が確認し, RPE が 16 以下である場合は運動負荷重量を増加した. また負荷重量は 4 週間毎に 1-RM を再評価し, 運動負荷を常に 50% 1-RM にて行えるよう調整した.

2-1-2. 測定項目および測定方法

レジスタンストレーニング介入前後に以下の測定項目を行った. 測定は, レジスタンストレーニングを実施前の週および 12 週間のレジスタンストレーニングを行った後の週におこなった. いずれの測定の前日および当日は, 激しい運動やアルコール摂取を控えるよう指示した.

身体組成

全身除脂肪量および下肢骨格筋は, DXA 法(Dual energy X-ray absorptiometry ; 二重エネルギーX線吸収法)(Lunar Prodigy, GE Medical Systems, Little Chalfont, UK)にて測定した. プロトコルに従い, 対象者は DXA テーブル上に仰臥位にて測定された. 測定身体部位は, 腕, 脚, 胴体に分けられた. 測定結果は, Buckinx らの定義により分けられた(Buckinx *et al.*, 2018). 全身(Total body mass = body weight)から脂肪量を除いた量を除脂肪量(Lean body mass ; LBM または Fat-free mass ; FFM), 除脂肪量から骨量を除いた量を軟部組織量(Lean soft tissue mass ; LSTM), 両脚骨格筋量は, 両脚量から脂肪量と骨量を除いた骨格筋量(Leg skeletal muscle mass ; Leg SMM)とした(Buckinx *et al.*, 2018).

下肢筋力

下肢筋力の測定は, BIODEX SYSTEM 4(Biodex System 4; Biodex Medical Systems, Shirley, NY, USA)を用いて行った. 等尺性最大筋力は, 膝関節角度を 90°(屈曲位)に設定し屈曲およ

び伸展の最大発揮力を測定した。等速性最大筋力は、膝関節可動域を 90°(屈曲位)から 180°(完全伸展位)とし 60°/sec にて屈曲および伸展の最大発揮力を測定した。いずれも最大筋力(最大トルク:Nm)はレジスタンストレーニング介入前後に測定を行い評価した。正確性を求めるにあたり、測定を行った 3 日後に再び同一の測定者にて測定を行い、測定時は同レベルの声掛けを行い測定した。

栄養調査

栄養調査は、レジスタンストレーニング介入前と介入終了直前に実施した。摂取エネルギーおよび摂取栄養素は、3 日間の自己記入式食事秤量記録法を用い、写真撮影を併用して行った。栄養調査は、平日 2 日間、休日を 1 日含む 3 日間とし、各栄養素の総量を平均し 1 日分の摂取量とした。全ての食品および飲料は、調理前にスケール(2-kg kitchen scales KD-812; Tanita, Tokyo, Japan)にて各食品別々に計量した。写真撮影は、使い捨てカメラを使用し食事摂取前、摂取後の写真を撮影した。これらの写真を元に記録不備の食材等を確認し、また矛盾がある場合は対象者に問い合わせ確認を行った。栄養計算は、2010 年食品成分表に準じている栄養計算ソフトであるエクセル栄養君(version 6, Kenpakusha Co., Tokyo, Japan)を用いて全ての計算を一人の管理栄養士が行った。

身体活動量

身体活動量は 3 軸加速度計(Active Style Pro; Omron Healthcare, Kyoto, Japan)を用いて評価した。3 軸加速度計は、不活動時間(1.6 METs 未満および非装着時間の合計)、低強度身体活動時間(1.6 METs 以上, 3.0 METs 未満)、中・高強度身体活動時間(3.0 METs 以上)を算出するが、中・高強度身体活動(3.0 METs 以上)のみを身体活動量として採用し、中・高強度身体活動時間(h)、被験者の体重(kg)、METs、1.05 を乗じたものを身体活動量(kcal)とした。対象者は、起床から就寝までの間、入浴などの水中での活動以外において 3 軸加速度計を

腰部に装着した。また同時に身体活動の簡易な 1 日毎の欄を設けた記録用紙にて、非装着時間の有無、自転車乗車時間、水泳時間について記録した。非日常活動(風邪を引いて寝込んだ、旅行へ行った等)があれば、特記事項として記入した。3 軸加速度計を 1 週間装着するように指示し、1 週間の身体活動量の総量を平均し 1 日量とした。

血液分析

採血は、食事の影響を避けるために前日の夕食以降を絶食とした。採血当日の朝、実験室に来室し 30 分間の休息を設け、空腹条件下において肘正中皮静脈より採血を行った。採血後の血液は、血漿用および血清用の真空採血管へ採取した。血漿用の真空採血管(EDTA-2Na およびフッ化 Na)は、血液採取後直ちに血液を 2~3 回軽く転倒混和し、チューブ内血液の液面まで氷水に浸かる状態で 15 分以上冷却した。血清用の真空採血管(血清分離剤入り)は血液採取後 15 分間常温で静置した後、チューブを氷水で冷却した。その後、両採血管を冷却状態で 4 °C、3,000 rpm で 15 分間、遠心分離 (MX 200, TOMMY 精工製, 福島, 日本)を行い、直ちに上清の血漿および血清を血液との界面に触れないように上清の中央部分から採取し-80°C で凍結保管した。血清は、総コレステロール(コレステロール酸化酵素 COD-POD 法), HDL-コレステロール(直接法), 中性脂肪(酵素法, GK-GPO・遊離グリセロール消去法)を分析し、血漿は血糖値(The hexokinase G6PDH/UV ヘキソキナーゼ G6PDH/UV 法), HbA1c(The latex agglutination ラテックス凝集法)を分析した。各項目の分析は、臨床検査センターのメディック(Medic, Inc. 滋賀, 日本)に依頼した。

2-3. 統計処理

全ての測定値は、平均値±標準誤差で示した。レジスタンストレーニング介入前後の比較には、対応のある t 検定を用いた。たんぱく質およびアミノ酸摂取量とレジスタンスト

レーニングによる両脚骨格筋量の増加との関係は、Pearson の相関関係を用いて検討した。朝食、昼食、夕食のたんぱく質およびアミノ酸摂取量については繰り返しのある一元配置分散分析を用いて有意な主効果の有無を検定し、その後主効果が認められた場合は多重比較検定として Bonferroni のポストホック検定にて有意差を検定した。いずれの場合も、有意水準は両側検定で危険率 5%未満とした。データは市販の統計ソフト SPSS Version 19.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA) を用いて分析した。

3. 結果

3-1. 身体組成および筋力

表 1 には、レジスタンストレーニング介入前後における身体組成の変化を示した。レジスタンストレーニング介入前に比較して介入後は、体重、全身軟部組織量(除脂肪量から骨量を除いた量；LSTM)および両脚骨格筋量(Leg SMM)が有意に増加した($p<0.05$)。一方、体脂肪率は有意に減少した($p<0.05$)。

表 1. レジスタンストレーニング介入前(Pre)後(Post)における身体組成

		Pre	Post
Body weight	(kg)	61.5 ± 2.2	62.4 ± 2.2 *
LSTM	(kg)	47.0 ± 2.0	47.7 ± 2.1 *
Leg SMM	(kg)	15.0 ± 0.8	15.4 ± 0.8 *
% Body fat	(%)	21.5 ± 1.5	20.7 ± 1.5 *

平均値±標準誤差(n=10), *; $p<0.05$ vs. Pre

表 2 には、レジスタンストレーニング介入前後における筋力の変化を示した。介入前に比較して介入後は、等尺性膝伸展、等尺性屈曲それぞれの最大トルクが増加した($p<0.05$)。同様に、等速性膝伸展、等速性屈曲それぞれの最大トルクも有意に増加した($p<0.05$)。

また、膝伸展および膝屈曲の最大挙上重量(1-RM)は有意に増加した(膝伸展 $22.9\pm 3.8\%$ 増加, 膝屈曲 $24.0\pm 4.6\%$ 増加, $p<0.05$)(表記載なし)。

表 2. レジスタンストレーニング介入前(Pre)後(Post)における最大筋力

		Pre	Post
Isometric torque			
extension	(Nm)	178.9 ± 17.2	193.2 ± 19.0 *
flexion	(Nm)	62.8 ± 5.5	69.3 ± 6.2 *
Isokinetic torque			
extension	(Nm)	135.9 ± 10.3	152.6 ± 11.8 *
flexion	(Nm)	81.8 ± 6.6	88.1 ± 7.5 *

平均値 \pm 標準誤差(n=10), *; $p<0.05$ vs. Pre

3-2. 身体活動量

レジスタンストレーニング介入前の身体活動量(基礎代謝量は除く)は 630 ± 39 kcal/day で、介入後は 728 ± 88 kcal/day であり有意な差はなかった。

3-3. 血液指標

表 3 には、レジスタンストレーニング介入前後における血液指標を示した。総コレステロール、HDL-コレステロール、中性脂肪、血糖、および HbA1c は、レジスタンストレーニング介入に対する応答としての有意な変化を示さなかった。

表 3. レジスタンストレーニング介入前(Pre)後(Post)における血液指標

		Pre		Post
Total-cholesterol	(mg/dL)	202	± 13	215 ± 13
HDL-cholesterol	(mg/dL)	69	± 6	67 ± 7
Triglycerides	(mg/dL)	80	± 8	92 ± 14
Glucose	(mg/dL)	101	± 4	99 ± 4
HbA1c	(%)	5.5	± 0.2	5.5 ± 0.1

平均値±標準誤差(n=10).

3-4. 栄養素摂取量

表 4 には、レジスタンストレーニング介入前後における栄養素摂取量を示した。栄養素摂取量は、レジスタンストレーニング介入に対する応答としての有意な変化を示さなかった。

表 4. レジスタンストレーニング介入前(Pre)後(Post)における栄養素摂取量

		Pre	Post
Energy	(kcal/day)	2657 ± 211	2419 ± 215
Fat	(g/day)	81 ± 8	64 ± 8
Carbohydrate	(g/day)	346 ± 30	333 ± 27
Protein	(g/day)	109 ± 10	102 ± 9
	(g/kg BW/day)	1.76 ± 0.13	1.62 ± 0.11
	(g/kg LSTM/day)	2.30 ± 0.17	2.12 ± 0.14
EAA	(mg/day)	41069 ± 4108	37883 ± 3928
	(mg/kg BW/day)	660 ± 56	600 ± 51
	(mg/kg LSTM/day)	866 ± 73	785 ± 64
Leu	(mg/day)	8113 ± 130	7460 ± 746
	(mg/kg BW/day)	130 ± 10	118 ± 10
	(mg/kg LSTM/day)	171 ± 13	155 ± 12

平均値±標準誤差(n=10).

3-5. たんぱく質, 必須アミノ酸, ロイシンの1日の摂取量分布

表5には, たんぱく質, 必須アミノ酸, およびロイシンの摂取量を1日の各食事別(朝食, 昼食, 夕食)に示した. Pre と Post の摂取量には, 有意な差が認められなかったため, Post 時の平均1日の摂取量を示した. たんぱく質は, 朝食での摂取量が夕食摂取量に比較して有意に少なく($p<0.05$), また昼食においても夕食摂取量に比較して摂取量が少なかった($p<0.01$). 同様に必須アミノ酸においても, 夕食に比較して朝食および昼食が有意に少なかった($p<0.05$). ロイシンは, 夕食に比較して昼食の摂取量は有意に少なかった($p<0.05$). 朝食のロイシン摂取量は, 夕食でのロイシン摂取量に比較して40%程度少ないにもかかわらず有意ではなかった.

表5. たんぱく質, 必須アミノ酸, ロイシンの1日(朝食, 昼食, 夕食)(Post 時)の摂取量分布

		Breakfast	Lunch	Dinner
Energy	(kcal)	690 ± 130	740 ± 68	958 ± 111
Protein	(g)	27.5 ± 5.8*	26.5 ± 3.4 **	45.7 ± 4.3
	(g/kg BW)	0.43 ± 0.09*	0.43 ± 0.06 **	0.73 ± 0.06
	(g/kg LSTM)	0.55 ± 0.10*	0.57 ± 0.08 **	0.95 ± 0.08
EAA	(mg)	10269 ± 2279	9535 ± 1458*	17218 ± 2113
	(mg/kg BW)	161 ± 34*	154 ± 23*	272 ± 28
	(mg/kg LSTM)	206 ± 40*	204 ± 32*	358 ± 38
Leu	(mg)	2108 ± 470	1897 ± 280*	3304 ± 384
	(mg/kg BW)	33 ± 7	31 ± 4*	52 ± 5
	(mg/kg LSTM)	42 ± 8	40 ± 6*	69 ± 7

平均値±標準誤差(n=10). *, $p<0.05$, **, $p<0.01$, vs. Dinner.

3-6. たんぱく質および必須アミノ酸摂取量とレジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加との関係

図1には、1日(Post時)のたんぱく質摂取量とレジスタンストレーニングによって増加した両脚骨格筋量との関係を示した。たんぱく質摂取量が増加すると両脚骨格筋量の増加が増加する傾向がみられた($r=0.62$, $p=0.06$)。

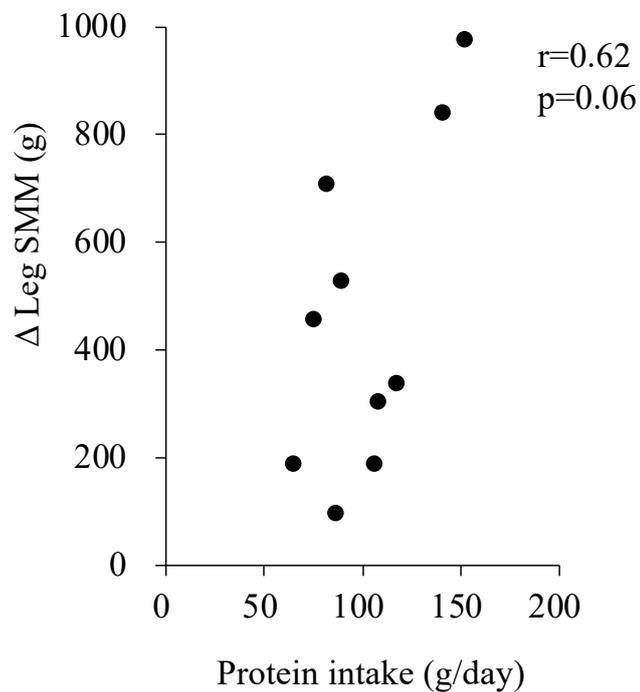


図1. 1日(Post時)のたんぱく質摂取量とレジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加との関係($n=10$)

図2には、1日(Post時)の必須アミノ酸摂取量と両脚骨格筋量の増加と関係を示した。必須アミノ酸摂取量と両脚骨格筋量の増加の間には有意な正の相関関係が認められた($r=0.71$, $p=0.02$)。

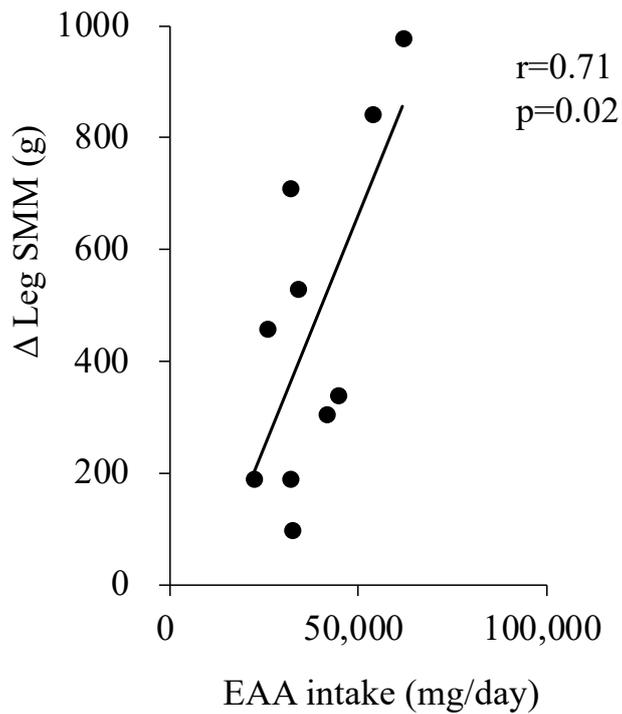


図 2. 1日(Post時)の必須アミノ酸摂取量とレジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加との関係($n=10$)

図3には、1日(Post時)のロイシン摂取量と両脚骨格筋量の増加と関係を示した。ロイシン摂取量と両脚骨格筋量の増加との間には有意な正の相関関係が認められた($r=0.70$, $p=0.03$).

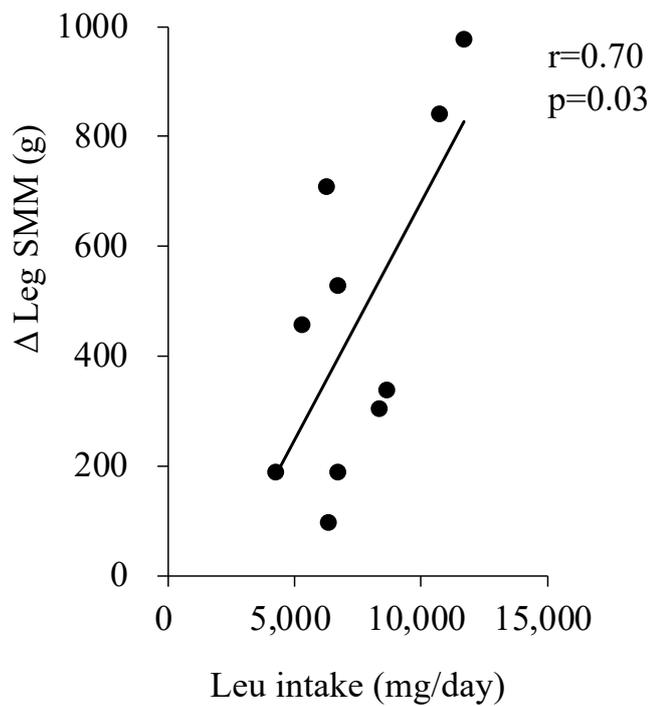


図 3. 1日(Post時)のロイシン摂取量とレジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加との関係($n=10$)

表 6 には, 1 日(Post 時)のたんぱく質摂取量とレジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加とにおける相関係数を示した. 1 日のたんぱく質摂取量(g/day), 1 日の体重あたりのたんぱく質摂取量(g/kg BW/day), 1 日の軟部組織量(LSTM)あたりのたんぱく質摂取量(g/kg LSTM/day)の全てにおいて有意な相関関係は認められなかった.

表 6. 1 日(Post 時)のたんぱく質摂取量とレジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加との相関係数

	(g/day)		(g/kg BW/day)		(g/kg LSTM/day)	
	r	p Value	r	p Value	r	p Value
Protein	0.62	0.06	0.57	0.09	0.44	0.20

r; 相関係数. p Value; 有意確率. (n=10)

表 7 には, 1 日(Post 時)のアミノ酸摂取量とレジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加とにおける回帰分析の相関係数を示した. 1 日のアミノ酸摂取量(mg/day)では, トリプトファン, ヒスチジン以外の必須アミノ酸, 分岐鎖アミノ酸, ロイシン, イソロイシン, リジン, メチオニン, フェニルアラニン, スレオニン, バリンにおいて有意な相関関係が認められた.

1 日の体重あたりのアミノ酸摂取量(mg/kg BW/day)では, フェニルアラニン, トリプトファン, ヒスチジン以外の必須アミノ酸, 分岐鎖アミノ酸, ロイシン, イソロイシン, リジン, メチオニン, スレオニン, バリンにおいて有意な相関関係が認められた.

1 日の軟部組織量(LSTM)あたりアミノ酸摂取量(mg/kg LSTM/day)ではメチオニンのみ有意な相関関係が認められた.

表 7. 1 日(Post 時)のアミノ酸摂取量とレジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加との相関係数

	(mg/day)		(mg/kg BW/day)		(mg/kg LSTM/day)	
	r	p Value	r	p Value	r	p Value
EAA	r=0.71	0.02	r=0.71	0.02	r=0.59	0.07
BCAA	r=0.70	0.02	r=0.67	0.03	r=0.58	0.08
His	r=0.62	0.05	r=0.62	0.05	r=0.53	0.12
Ile	r=0.69	0.03	r=0.67	0.03	r=0.58	0.08
Leu	r=0.70	0.03	r=0.66	0.04	r=0.57	0.08
Lys	r=0.71	0.02	r=0.70	0.02	r=0.62	0.06
Met	r=0.72	0.02	r=0.73	0.02	r=0.63	0.05
Phe	r=0.65	0.04	r=0.59	0.07	r=0.49	0.15
Thr	r=0.68	0.03	r=0.67	0.03	r=0.57	0.09
Trp	r=0.62	0.06	r=0.57	0.09	r=0.46	0.18
Val	r=0.71	0.02	r=0.68	0.03	r=0.59	0.07

r; 相関係数. p Value; 有意確率. (n=10)

3-7. 朝昼夕食毎(Post 時)のたんぱく質およびアミノ酸の摂取量とレジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加との関係

朝食, 昼食, 夕食の食事毎 1 食のたんぱく質およびアミノ酸摂取量と, レジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加との間には有意な相関関係は認められなかった (n=10)(図および表記載なし). 先行研究では, 筋タンパク質合成のために必要であるたんぱく質摂取量は, 1 回での摂取量として除脂肪量あたり 0.61 g/kg LBM/meal との報告がある (Moore *et al.*, 2015). 朝食, 昼食, 夕食の食事毎 1 食において 0.61 g/kg LBM/meal をカット-オフ値とし, 1 食でのたんぱく質摂取量が 0.61 g/kg LBM/meal 以上のたんぱく質を摂取していた被験者を除外し, 1 食でのたんぱく質摂取量が除脂肪量あたり 0.61 g/kg LBM/meal 未満の被験者のたんぱく質摂取量と両脚骨格筋量の増加との関係性を評価した.

朝食において, 朝食 1 食あたりのたんぱく質摂取量が除脂肪量あたり 0.61 g/kg LBM/meal 未満であった被験者 7 名(0.61 g/kg LBM/meal 以上の摂取量であった 3 名は除外)の除脂肪量あたりの朝食たんぱく質摂取量(g/kg LBM/meal)とレジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加との間に有意な相関関係が認められた($r=0.88$, $p=0.01$, $n=7$)(図 4).

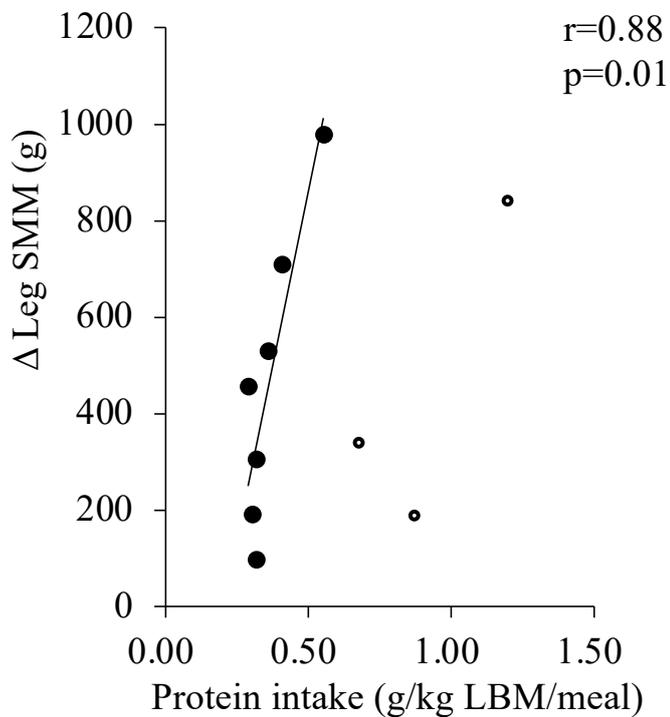


図 4. レジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加と朝食における除脂肪量あたりたんぱく質摂取量(g/kg LBM/meal)との相関関係(n=7)

●:たんぱく質摂取量<math>< 0.61</math> g/kg LBM/朝食(n=7), ○:たんぱく質摂取量 ≥ 0.61 g/kg LBM/朝食(n=3)のため相関関係から除外した値. (朝食における除脂肪量あたりたんぱく質摂取量 0.61 g/kg LBM/meal 以下の 7 名のみ(除脂肪量あたりたんぱく質摂取量 0.61 g/kg LBM/meal 以上の 3 名は除外)).

同様に朝食において、朝食1食あたりのたんぱく質摂取量が除脂肪量あたり 0.61 g/kg LBM/meal 未満であった被験者7名(0.61 g/kg LBM/meal 以上の摂取量であった3名は除外)の除脂肪量あたりの朝食必須アミノ酸摂取量(mg/kg BW/meal)とレジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加との間に有意な正の相関関係が認められた($r=0.84$, $p=0.02$, $n=7$)(図 5).

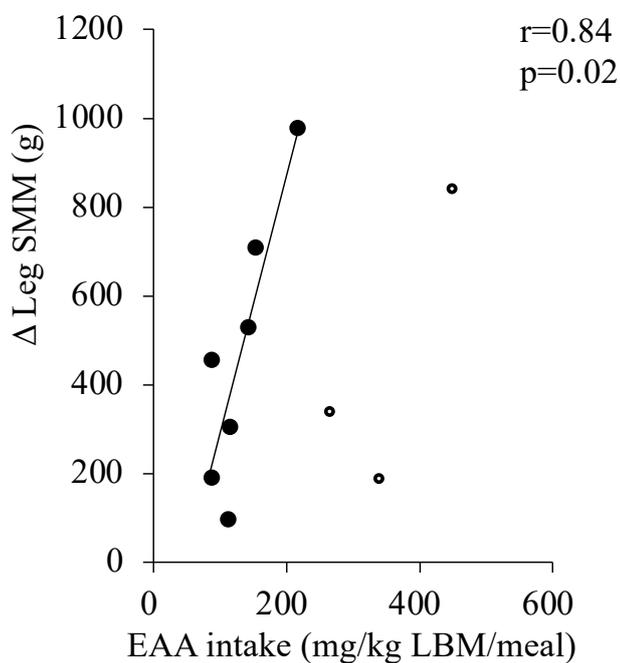


図 5. レジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加と朝食における除脂肪量あたり必須アミノ酸摂取量(mg/kg LBM/meal)との相関関係($n=7$)

◆:たんぱく質摂取量<0.61 g/kg LBM/朝食($n=7$), ◇:たんぱく質摂取量 \geq 0.61 g/kg LBM/朝食($n=3$)のため相関関係から除外した値. (朝食における除脂肪量あたりたんぱく質摂取量 0.61 g/kg LBM/meal 以下の7名のみ(除脂肪量あたりたんぱく質摂取量 0.61 g/kg LBM/meal 以上の3名は除外)).

同様に朝食において、朝食1食あたりのたんぱく質摂取量が除脂肪量あたり 0.61 g/kg LBM/meal 未満であった被験者7名(0.61 g/kg LBM/meal 以上の摂取量であった3名は除外)の除脂肪量あたりの朝食ロイシン摂取量(mg/kg BW/meal)とレジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加との間に有意な正の相関関係が認められた($r=0.89$, $p=0.02$, $n=7$)(図 6).

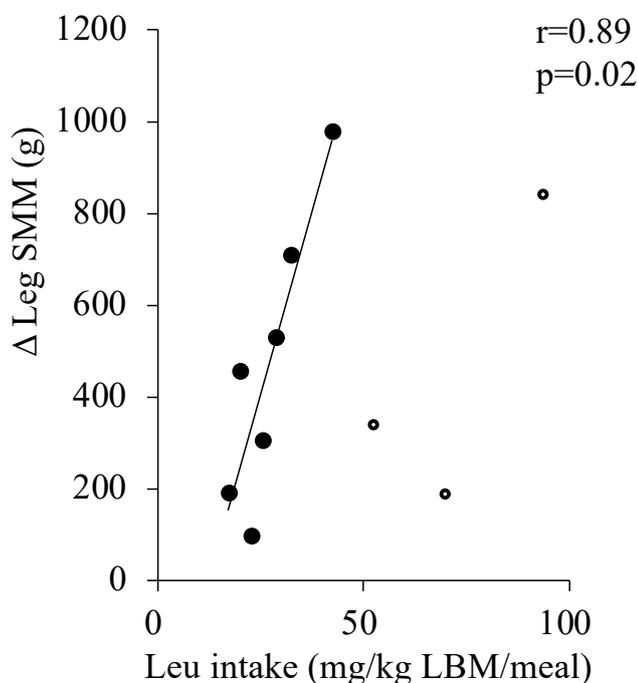


図 6. レジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加と朝食における除脂肪量あたりロイシン摂取量(mg/kg LBM/meal)との相関関係($n=7$)

▲:たんぱく質摂取量<0.61 g/kg LBM/朝食($n=7$), △:たんぱく質摂取量 \geq 0.61 g/kg LBM/朝食($n=3$)のため相関関係から除外した値.(朝食における除脂肪量あたりたんぱく質摂取量 0.61 g/kg LBM/meal 以下の7名のみ(除脂肪量あたりたんぱく質摂取量 0.61 g/kg LBM/meal 以上の3名は除外)).

朝食1食においてたんぱく質摂取量 0.61 g/kg LBM/meal 未満であった被験者7名での、朝食のたんぱく質摂取量とレジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加との単回帰分析による相関係数を評価した(表8)。レジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加は、朝食のたんぱく質摂取量(g/meal)、朝食の体重あたりたんぱく質摂取量(g/kg BW/meal)、朝食の軟部組織量(LSTM)あたりたんぱく質摂取量(g/kg LSTM/meal)の全てにおいて有意な正の相関関係を示した。

表 8. 朝食におけるたんぱく質摂取量 0.61 g/kg LBM/meal 以下の被験者(n=7)によるレジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加と朝食におけるたんぱく質摂取量との相関係数

	(g/meal)		(g/kg BW/meal)		(g/kg LSTM/meal)	
	r	p Value	r	p Value	r	p Value
Protein	0.87	0.01	0.91	0.01	0.88	0.01

r; 相関係数. p Value; 有意確率. (n=7)

朝食1食においてたんぱく質摂取量 0.61 g/kg LBM/meal 未満であった被験者7名での朝食の各種アミノ酸摂取量とレジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加との単回帰分析による相関係数を評価した(表9)。レジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加は、朝食の各種アミノ酸摂取量(mg/meal)のうち、必須アミノ酸、分岐鎖アミノ酸、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、スレオニンと有意な相関関係を示した。またレジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加は、朝食の体重あたり各種アミノ

酸摂取量(mg/kg BW/meal)のうち、分岐鎖アミノ酸、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、スレオニンと有意な相関関係を示した。またレジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加は、朝食の軟部組織量(LSTM)あたり各種アミノ酸摂取量(mg/kg LSTM/meal)のうち、必須アミノ酸、分岐鎖アミノ酸、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、スレオニンと有意な相関関係を示した。

表 9. 朝食におけるたんぱく質摂取量 0.61 g/kg LBM/meal 以下の被験者(n=7)によるレジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加と各種アミノ酸摂取量との相関係数

	(mg/meal)		(mg/kg BW/meal)		(mg/kg LSTM/meal)	
	r	p Value	r	p Value	r	p Value
EAA	r=0.84	0.02	r=0.71	0.08	r=0.83	0.02
BCAA	r=0.86	0.01	r=0.89	0.01	r=0.87	0.01
His	r=0.59	0.17	r=0.47	0.29	r=0.40	0.37
Ile	r=0.85	0.01	r=0.89	0.01	r=0.87	0.01
Leu	r=0.87	0.01	r=0.91	0.01	r=0.89	0.01
Lys	r=0.84	0.02	r=0.85	0.02	r=0.83	0.02
Met	r=0.83	0.02	r=0.85	0.02	r=0.81	0.03
Phe	r=0.74	0.06	r=0.76	0.05	r=0.73	0.06
Thr	r=0.81	0.03	r=0.84	0.02	r=0.80	0.03
Trp	r=0.62	0.14	r=0.49	0.26	r=0.41	0.36
Val	r=0.69	0.08	r=0.61	0.15	r=0.53	0.22

r; 相関係数. p Value; 有意確率. (n=7)

朝食 1 食においてたんぱく質摂取量 0.61 g/kg LBM/meal 未満であった被験者 7 名での回帰分析の結果(表 8, 表 9), 朝食 1 食あたり摂取量, 朝食 1 食での体重あたり摂取量, 朝食 1 食での軟部組織量(LSTM)あたり摂取量の 3 種類のどの摂取量にも有意な相関関係が認められたのは、たんぱく質、分岐鎖アミノ酸、ロイシン、イソロイシン、リジン、メチオニ

ン, スレオニンであった. アミノ酸の中でも特にロイシン摂取量と両脚骨格筋量の増加との間に最も強い相関関係が認められた(表 9).

朝食同様に昼食においてもたんぱく質摂取量 0.61 g/kg LBM/meal をカット-オフ値とし, 0.61 g/kg LBM/meal 以上たんぱく質を摂取していた対象者(4名)を除外した後に, 6名にて昼食のたんぱく質摂取量および必須アミノ酸摂取量とレジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加との関連を回帰分析で評価したが, 全ての摂取量において有意な相関関係は認められなかった. また, 夕食ではたんぱく質摂取量 0.61 g/kg LBM/meal カット-オフ値以下のたんぱく質摂取量である被験者はいなかった.

4. 考察

健常な高齢男性においてレジスタンストレーニングを12週間行うことにより、筋力および筋量が有意に増加した。さらに、本研究においてたんぱく質およびアミノ酸摂取量とレジスタンストレーニングによる筋量の増加に有意な相関関係を示した。これは高齢男性のレジスタンストレーニング期間中におけるたんぱく質およびアミノ酸摂取の重要性を示すものである。

推奨されているレジスタンス運動の負荷である70-85% 1-RMで8-12回×3セット(Kraemer *et al.*, 2002)と同様の仕事量になるように、本研究では50% 1-RMで14回×3セットで行った。その結果、両脚骨格筋量は平均2.9%(範囲; 0.7~6.1%)増加した。また、ニーエクステンションの最大筋力(1-RM)が23%増加した。除脂肪量の増加が、両脚の筋力の増加を伴うことは先行研究によって報告されている(Tieland *et al.*, 2012a)。従って、本研究でおこなったレジスタンストレーニング負荷は高齢者の筋肥大を誘発させる強度として妥当であったと考えられる。さらに、筋力においても中負荷レジスタンストレーニングの効果が得られることが示され、高負荷のレジスタンストレーニングが行なえないような身体的制限のある場合や高負荷の筋力発揮が出来ない高齢者にも適した運動強度であることが考えられる。

血液パラメーターであるグルコース、トリグリセリド、またはコレステロールは、レジスタンストレーニング介入前と介入後では有意な変化は見られなかった。先行研究において、高齢女性での16週間(Elliot *et al.*, 2006)または中高年男性では20週間(Kokkinos *et al.*, 1991)のレジスタンストレーニング介入後のトリグリセリド、コレステロールの値に変化がなかったことが示されており、本研究の血液パラメーターの結果と一致する。しかしながら、その他の先行研究は、高齢男女におけるレジスタンストレーニング介入後にインスリン感受性の改善(Miller *et al.*, 1994)、総コレステロール値の低下を報告している(Leenders *et al.*, 2013)。以上のように、一致した見解が得られていないため、この点に関しては今後さ

らなる研究が必要である。

1 日のエネルギー摂取量は、レジスタンストレーニング介入前と介入後で有意な変化はみられなかった。さらにたんぱく質、炭水化物、脂肪の主要栄養素摂取量においても有意な変化はみられなかった。先行研究では、高齢者でのレジスタンストレーニングは総エネルギー摂取量に影響を与えないことが示されている(Verdijk *et al.*, 2009; Arnarson *et al.*, 2013; Leenders *et al.*, 2013) (Godard *et al.*, 2002; Tieland *et al.*, 2012b)。本研究の結果は、先行研究の結果と同様にレジスタンストレーニング介入前と介入後でエネルギー摂取量の変化はなかった。

健常な日本人高齢男女の日常的なたんぱく質の摂取量は RDA よりも高く、64～74 歳男性は 1.27 g/kg BW/day、64～74 歳女性 1.31 g/kg BW/day との報告がある(Ishikawa-Takata & Takimoto, 2018)。本研究においては、1 日のたんぱく質摂取量は 1.62 ± 0.11 g/kg BW/day であり、RDA(0.8 g/kg BW/day)よりも摂取量は多かった。800 人以上の高齢イタリア人横断的研究である InCHIANTI 研究は、たんぱく質の摂取量が多いグループに比較して一番少ない摂取量のグループは、フレイルリスクが 2 倍であると報告している(Bartali *et al.*, 2006)。さらに、マサチューセッツ州にて心血管疾患の家族性危険因子を調査する目的で集められたグループの高齢男女 2600 人でのコホート研究では、たんぱく質の摂取量が一番少ないグループに比較してたんぱく質の摂取量が多いグループが、両脚除脂肪量が多いことを示している(Sahni *et al.*, 2015)。これらの知見は、筋量および筋機能維持における 1 日の食事のたんぱく質摂取量の重要性を示しており、本被験者においても RDA 以上のたんぱく質摂取が行えていたことが筋量増加に繋がったと考える。アジアのサルコペニアの筋量測定基準である 7.0 kg/m^2 未満(DXA 法)に当てはまる被験者が pre 測定時で 4 名存在したが、レジスタンストレーニング介入後の post 時には 3 名であり、1 名が筋量の増加の効果が得られた。朝食のたんぱく質摂取量は、4 名全てが $0.61 \text{ g/kg LBM/meal}$ 以下であった。1 日の摂取量だけではなく朝食のたんぱく質摂取量とサルコペニアが関係している可能性が考えられ

た.

本研究では新たに、レジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加と1日の食事からの必須アミノ酸摂取量およびロイシン摂取量との間に正の相関関係を認めた。筋タンパク質同化作用に対する必須アミノ酸およびロイシンの重要性はこれまでに報告されている。ロイシンは単独で、mTORC1シグナル伝達およびそれに続く筋タンパク質合成を刺激することを *in vivo* および *in vitro* の両方において示している(Anthony *et al.*, 2000)。レジスタンス運動とロイシンが高配合であるたんぱく質の摂取を組み合わせる場合は、摂取せず絶食状態でレジスタンス運動を行なった場合に比較して筋タンパク質合成速度はより増加する(Moore *et al.*, 2009a)。また、レジスタンス運動後に摂取したホエイプロテインたんぱく質の量と筋タンパク質合成速度の間には、用量依存的な関係性が実証されている(Yang *et al.*, 2012)。先行研究の報告にあるたんぱく質に含まれるロイシン量だけでなく、本研究では日常摂取している食事に含まれるロイシン量においても用量依存的な関係を認めた。本研究の結果は、多栄養素の含まれる混合食であってもロイシンの重要性を示唆している。

食事からのロイシン摂取量とレジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加との間に正の相関関係が認められた。しかし、他のアミノ酸(リジン, メチオニン, スレオニン)の摂取量とレジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加との間にも有意な正の相関関係が認められた。先行研究によると、血中アミノ酸濃度の低下は筋タンパク質合成を鈍らせるが、そこへロイシンのみ単独摂取をしても筋タンパク質合成速度は回復しないことが報告されている(Frexes-Steed *et al.*, 1992)。これは、筋タンパク質合成を維持するためには、全てのアミノ酸の必要性を示している。しかし、ロイシン以外のアミノ酸の単独での筋タンパク質同化作用は明確ではなく、本研究においても多栄養素が含まれる混合食での日常摂取であったため明確には出来なかった。今後、さらなる研究が必要である。

近年の研究では、1日に摂取した食事たんぱく質摂取量だけでなく、朝昼夕の各食事のたんぱく質摂取量の分布割合が、高齢者の筋量および筋肉機能に影響を及ぼすことが示さ

れている。Bollweinらは、1日の食事たんぱく質摂取量がRDAを超えているフレイル(虚弱)群、プレフレイル(虚弱前段階)群、非フレイル(非虚弱)群を比較した。食事たんぱく質摂取量は、群間に有意な差が示されなかった。しかし、非フレイル群は朝食、昼食、夕食の各食事で、均一的にたんぱく質を摂取するというたんぱく質摂取量の分布パターンを示したが、フレイル群およびプレフレイル群では、朝食でのたんぱく質摂取量が少なく、午後以降の昼食と夕食でのたんぱく質摂取量が多いという不均等な分布パターンを示した(Bollwein *et al.*, 2013)。本研究の全ての被験者において、朝食と昼食に比較して夕食でのたんぱく質摂取量が多く、たんぱく質摂取量は不均等であることが示された。しかし、本研究の被験者10名のうちサルコペニアと診断される筋量(7.0kg/m^2 以下)であった被験者は4名のみであった。

Mooreらは、一過性による筋タンパク質合成速度を最大限に刺激するためには、高齢者では除脂肪量あたり $0.61\text{ g/kg LBM/meal}$ のたんぱく質の摂取が必要であることを示している(Moore *et al.*, 2015)。このことは、筋タンパク質合成を刺激するためには、1回の食事において少なくとも 0.61 g/kg LBM のたんぱく質摂取量が必要であり、1日3回のそれぞれの食事においても 0.61 g/kg LBM のたんぱく質が含まれる必要があることを示している。本研究の高齢者は、1日のたんぱく質摂取量はRDA以上に上回って摂取していたが、各食事でのたんぱく質摂取量は均等ではなく、夕食に比較して朝食または昼食が有意に少なかった。興味深いことに、朝食のたんぱく質摂取量において筋タンパク質合成を最大限に刺激するために必要な量である 0.61 g/kg LBM を下回っていた被験者が7名存在した。朝食たんぱく質摂取量が 0.61 g/kg LBM 以下であった被験者($n=7$)において、レジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加とたんぱく質および必須アミノ酸摂取量との間に有意な正の相関関係が示された(図4, 5, 6)。特に、ロイシン摂取量とレジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加との間には、最も高い相関係数が示された(表9)。これらの結果は、朝食中に含まれるたんぱく質摂取量が 0.61 g/kg LBM 以下であると、レジスタンストレー

ニングに伴う筋肥大に対して悪影響をおよぼすことを示唆している。また、昼食においても夕食に比較してたんぱく質または必須アミノ酸の摂取量は少なく、0.61 g/kg LBM を下回っていた被験者が存在した。しかし、昼食たんぱく質量が 0.61 g/kg LBM を下回っていた被験者におけるレジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加とたんぱく質摂取量との間には、有意な相関関係はみられなかった。朝食では相関関係が得られ、昼食では相関関係が得られなかった結果の不一致のメカニズムは、現在の結果から明らかにすることは出来なかった。考えられる要因としては、1 日の内で最も長い絶食期間である就寝中から明けて初めて食される食事が朝食であることがあげられる。朝食のたんぱく質摂取量は、就寝中の絶食状態に起こっている筋タンパク質分解を抑制することに影響をおよぼす可能性が考えられる。また、本研究ではレジスタンス運動を午前中に行っており、レジスタンス運動は直前(Fujita *et al.*, 2009a)または直後(Yang *et al.*, 2012)に摂取されたたんぱく質が高い筋タンパク質合成を刺激するため、レジスタンス運動を行う前に当たる朝食でのたんぱく質摂取量は昼食および夕食に比較して影響が大きかった可能性がある。食事摂取のタイミングが、レジスタンストレーニングによる筋肥大に与える影響については、今後さらなる研究が必要である。

本研究の栄養素摂取量の分析は、個々の食事を写真撮影で記録し、各材料を調理する前に秤量した量を用いて計算した。食品成分標準表における食品成分の基準値は、クロマトグラフィーを用いたアミノ酸分析に基づいており、本研究では各食事のアミノ酸組成についても分析することが可能であった。また本研究においては、食事を朝昼夕食と 3 食に分類し比較検討したが、食事と食事の間に摂取した軽食はどちらかの時間に近い食事側に含めて分類した。先行研究において、健常な高齢者の横断的研究では軽食に含まれるたんぱく質摂取量は、1 日に占めるたんぱく質摂取量の男性 1.4%、女性 2.3%でしかなかったとの報告があり(Rousset *et al.*, 2003)、軽食(間食)の 1 日の総たんぱく質摂取量に対する貢献度は小さいと推測されるためである。

本研究の大きな限界点は、被験者が少数であったことである。特に、朝食時のロイシン摂取量とレジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加については、注意深く解釈する必要がある。筋タンパク質合成を最大限に刺激する量のカットオフポイントは、最適な摂取量以下を決定するためには実行可能な基準値である。しかし、たんぱく質摂取量が基準値以上であり除外した被験者は、レジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加が、より多い結果ではなかった。今後の研究においては、多く被験者を用いて食事摂取量とレジスタンストレーニングによる筋肥大との関係性をより詳細に評価することが求められる。

5. 結論

食事によるたんぱく質およびアミノ酸摂取量が、高齢男性のレジスタンストレーニングに対する筋肥大の応答に重要な因子であることを示した。さらに、本研究では1日の摂取量だけでなく朝食1食でのたんぱく質摂取量およびアミノ酸摂取量がレジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加と関係することを示した。本研究は、高齢者において筋量を増加・保持するために重要な知見である。

第5章【研究課題2】食事摂取とロイシン摂取における血中アミノ酸濃度への影響

1. 緒言

研究課題1では、食事によるたんぱく質および必須アミノ酸摂取が、高齢男性のレジスタンストレーニングに対する筋肥大応答に重要な因子であることが明らかとなった。特に、朝食のたんぱく質および必須アミノ酸摂取がレジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加と相関関係を示したことから、1日総摂取量のみならず1食での摂取量の重要性を示唆するものであった。食後の血中アミノ酸濃度の上昇は筋タンパク質合成を活性化する(Hudson *et al.*, 2017)。朝食後により高い血中アミノ酸濃度を得るためには(すなわち、筋タンパク質合成を誘導するためには)、たんぱく質食品だけでなく、遊離アミノ酸を摂取することが有用である可能性がある。これまで行われてきた一過性の先行研究では、ホエイプロテインやカゼインプロテインなどの単独たんぱく質の摂取にて検討されている場合が多く、多栄養素が含まれる混合食摂取での一過性の血中アミノ酸濃度の変動や筋タンパク質合成は、十分に明らかにされていない。

たんぱく質摂取量の増加は、筋タンパク質合成速度を用量依存的に増加させる(Moore *et al.*, 2009a)。たんぱく質の中でも必須アミノ酸は、筋タンパク質合成の材料としてだけでなく筋タンパク質合成速度を促進する刺激となっている(Tipton *et al.*, 1999; Borsheim *et al.*, 2002)。また、必須アミノ酸の中でも特にロイシンが、筋タンパク質合成を単独にて刺激することが報告されている(Wilkinson *et al.*, 2013)。そのため、同量のたんぱく質量を摂取してもロイシンを添加した場合は、筋タンパク質合成速度が増加する(Rieu *et al.*, 2006)。これらの結果は、たんぱく質およびロイシン摂取後に起こる血中ロイシン濃度の増加が、筋タンパク質合成の引き金(Trigger)になることを示唆している。また、血中ロイシン濃度の最高値は、筋タンパク質合成速度と正の相関関係を示している(Pennings *et al.*, 2011)。これら

の知見は、筋タンパク質合成の増加における血中ロイシン濃度の重要性を示すものである。

日常的に行われる食事摂取は、たんぱく質、炭水化物、脂質、その他栄養素が含まれた混合食である。経口摂取した食物は胃に送られ、食塊は一旦胃で滞留される(Tougas *et al.*, 2000; Frost *et al.*, 2003)。その後食塊は、胃から排出され小腸に到達し、消化を受けた後に腸壁から吸収され血液中へ出現する(Capaldo *et al.*, 1999)。胃から排出する速度である胃内容排出速度(The rate of gastric emptying)は、固体の摂取物より液体の摂取物の方が早い(Collins *et al.*, 1983)。また脂質は、他の栄養素に比較して胃からの排出が遅くなる(Tougas *et al.*, 2000; Frost *et al.*, 2003)。これらの報告は、摂取物の形態および同時に摂取する栄養素によって胃内容排出が影響を受けることを示すものである。

血中ロイシン濃度は、筋タンパク質合成の刺激に関わる重要な要因である。Kimらは、たんぱく質量が26 g含まれる多栄養素の混合食を摂取した後の血中ロイシン濃度の最高値は、200 μM 以上には増加しないことを報告している(Kim *et al.*, 2017b)。さらに、混合食に含まれるたんぱく質が、動物性(卵)か植物性(シリアル)のどちらにも関わらず 200 μM 以上には増加しないことを報告している。またHudsonらは、たんぱく質量が30 g含まれる多栄養素の混合食を摂取した後の血中ロイシン濃度の最高値は 244 μM (32 \pm 1 $\mu\text{g/mL}$)であったと報告している(Hudson *et al.*, 2017)。一方、高品質で精製されたたんぱく質であるホエイプロテインたんぱく質 20 g(ロイシンを 2.5 g 含む)を単独摂取した場合は、400 μM を超える血中ロイシン濃度の最高値(526 \pm 21 $\mu\text{mol/L}$)が得られる(Pennings *et al.*, 2011)。また、体重あたり 30 mg/kg(例えば、体重 70 kg では 2.1 g)の遊離ロイシン単独摂取では、400 μM を超える血中ロイシン濃度の最高値が得られる(Matsumoto *et al.*, 2014)。以上のことから、混合食による食品たんぱく質摂取は、高品質たんぱく質の摂取や遊離アミノ酸摂取と比較して、血中ロイシン濃度の最高値が低値になることが推測される。しかしこれまで日常に摂取している多栄養素が含まれる混合食と、混合食に含まれるアミノ酸と同量の遊離アミノ酸単体との摂取後のアミノ酸濃度の推移を比較した研究はみられない。

よって本研究では、混合食摂取と混合食中に含まれるロイシン量を遊離アミノ酸として摂取した後の血中アミノ酸濃度の推移を比較し、さらに混合食に加えて遊離ロイシンを追加摂取した際の相乗効果の有無について検討することを目的とした。

2. 方法

2-1. 被験者

被験者は健康な若年男性 10 名(年齢 25 ± 1 歳, 体重 65.8 ± 1.5 kg, 身長 1.73 ± 0.02 m)を対象とした。被験者には事前に研究の目的, 測定項目, 実験内容について口頭および文書にて十分な説明を行い, 理解の上同意書を得たものを対象とした。また, 実験を行う前に問診表にて健康上の問題のないことを確認した。なお, 本研究は, 立命館大学倫理委員会(承認番号 BKC-IRB-2015-032)を得てヘルシンキ宣言に基づいて実施した。ウォッシュアウト期間を含む 4 条件が行われる試験実施期間中は, 激しい運動は控えるよう伝え, 日常的な身体活動レベルを維持し, 日常的な食事を摂取するように指示した。

2-2. 実験プロトコル

被験者は合計 4 条件をランダムクロスオーバーデザインで行なった。各条件間に少なくとも 1 週間以上の間隔を空けて行った。(i)ロイシン(Bulk Sports, Leucine Power, Inc, Bulk Sports, Sendai, Japan)2 g のみ摂取(LEU), (ii)食事(たんぱく質 27.5 g, 内ロイシン 2.15 g を含む, PFC 比= 22 : 25 : 53)のみ摂取(MEAL), (iii)食事摂取直後ロイシン 2 g 摂取 (MEAL-LEU), (iv)食事摂取 180 分後ロイシン 2 g 摂取(MEAL-LEU180), 合計 4 条件をランダムに実施した。

試験前日の夕食に被験者は, 同一の規定食(エネルギー 729 kcal たんぱく質 24.1 g, 脂質 25.1 g, 炭水化物 97.8 g)を摂取し, 翌朝試験実施までは水以外を絶食とした。翌朝 8 時に絶食状態で研究室に訪問させ, 30 分間ほど安静を保った後に前腕の皮静脈に留置針を刺入し, 静脈血の採取を行った。LEU では, 絶食状態での採血をタイムポイント 0 分として採血し, その後試験食の摂取はせず採血後すぐにロイシン 2 g を摂取し 240 分後まで(タイムポイント 0-240 分)採血を行った。試験食を摂取する 3 条件である MEAL, MEAL-LEU, MEAL-LEU180 では, LEU 同様に早朝 8 時に絶食状態で研究室に訪問させ 30 分間ほど安静を保った後に前腕の皮静脈に留置針を刺入し, 静脈血の採取を行なった(タイムポイント

-20分). その後20分間にて試験食を摂取し, 完食した直後に採血を行い(タイムポイント0分), その後は420分まで採血を行った(図7). LEU以外のMEAL, MEAL-LEU, MEAL-LEU180は, 試験食を摂取するため絶食状態での採血がタイムポイント-20分である. MEAL-LUEでは, 試験食完食直後にロイシン2gを摂取したポイントを0分とした(タイムポイント0分). MEAL-LEU180では, 試験食完食(タイムポイント0分)した後から180分後にロイシン2gを摂取した(タイムポイント180分). 各試技でのロイシン2gの摂取には水200mlと同時に摂取した. 採血が終了する240分または420分後までの間は安静を保った.

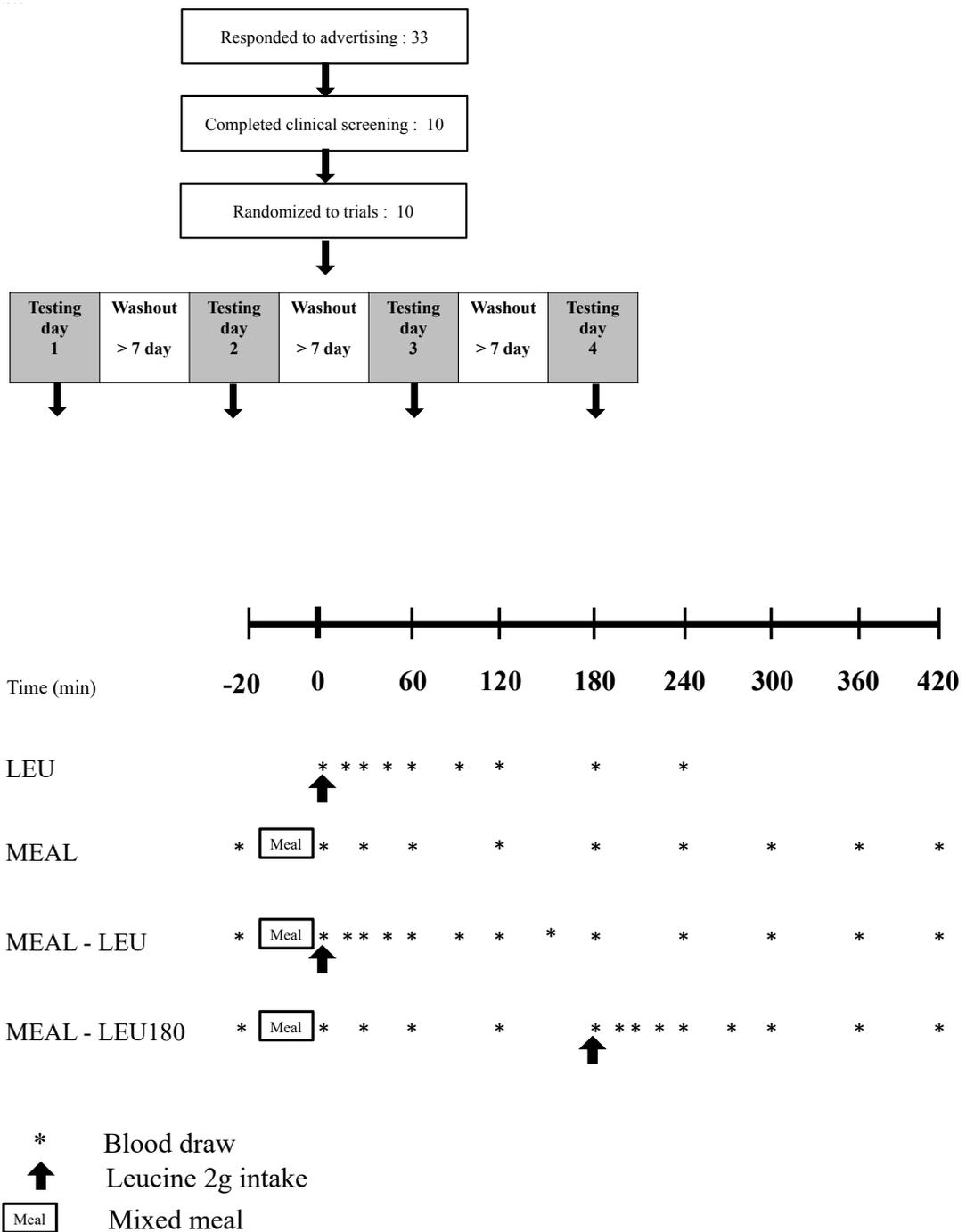


図 7. 研究デザインと実験プロトコルのタイムライン

LEU : ロイシン摂取のみ, MEAL : 食事摂取のみ, MEAL-LEU : 食事摂取直後ロイシン摂取, MEAL-LEU180 : 食事摂取 180 分後ロイシン摂取.

2-3. 試験食

実験当日摂取する試験食は、日本風な食事内容とした。卵、魚、牛乳を含むたんぱく質、その他に米、野菜などを材料とした食品を当日調理した食事であった(図 8)。メニューは、焼き塩鮭、だし巻き卵、ツナサラダ、味噌汁、米飯、カフェラテであった。エネルギー499 kcal、たんぱく質 27.5 g(ロイシン 2.15 g を含む)、脂質 14.1 g、炭水化物 65.5 g、PFC 比は P:F:C=22:25:53 であった。試験食の栄養成分およびロイシンなどのアミノ酸量の分析は、一般財団法人 日本食品分析センター(Japan Food Research Laboratories, Tokyo, Japan)に依頼した(表 10)。

表 10. 試験食の必須アミノ酸組成

	(g)
His	0.91
Ile	1.23
Leu	2.15
Lys	1.93
Met	0.67
Phe	1.25
Thr	1.17
Trp	0.36
Val	1.50



図 8. 試験食

2-4. 血液分析

採血直後，EDTA-2Na 入り真空採血管へ採取し，軽く転倒混和し直ちに氷水中で冷却した．冷却状態で遠心分離(4°C，3000 rpm，15 分間)し，その後血漿上清を採取した．全てのサンプルは，-80°C にて凍結保管した．

血中アミノ酸濃度は，採取された血漿上清に 15%スルホサリチル酸を加え，遠心分離(4°C，7000 G，10 分間)を行った．上清を限外フィルター用いて再び遠心分離(4°C，14000 G，60 分間)し，下層を採取し除タンパク質後のサンプルとした(Noguchi *et al.*, 2008; Nishioka *et al.*, 2013)．アミノ酸濃度分析は，高速アミノ酸分析計 L-8900(Hitachi, Tokyo, Japan) を用いて測定した．アミノ酸をイオン交換クロマトグラフィーで分離し，ニンヒドリン試薬を用いたポストカラム反応後に分光光度にて検出した．ヒスチジン(Histidine ; His)，イソロイシン(Isoleucine ; Ile)，ロイシン(Leucine ; Leu)，リジン(Lysine ; Lys)，メチオニン(Methionine ; Met)，フェニルアラニン(Phenylalanine ; Phe)，スレオニン(Threonine ; Thr)，トリプトファン(Tryptophan ; Trp)，バリン(Valine ; Val)の必須アミノ酸の血中濃度を測定した．

インスリン濃度は，酵素抗体法(Enzyme linked immunoassay ; ELISA, a human insulin

ELISA kit Ultrasensitive(Mercodia AB., Uppsala, Sweden))を使用し、血漿上清をサンプルとして説明書に従い測定した。ディプリケイトで測定し、その2つの値の平均値をデータとして用いた。変動係数は、 $5.3\pm 0.6\%$ であった。

血糖値は採血直後の血液にて、血糖測定システム(酵素比色法 (GOD/POD 法))であるメディセーフフィット、メディセーフフィットチップ(テルモ株式会社(TERUMO Inc., Tokyo, Japan))を用いて測定した。

2-5. 統計処理

基本的統計量は、平均値 \pm 標準誤差で示した。AUC は、先行研究で報告があるように AUCi(Area under the curve with respect to increase ; AUCi)と AUCg(Area under the curve with respect to ground ; AUCg)がある(Pruessner *et al.*, 2003)。AUCi は空腹安静時の血中濃度を0とし、その後の経過時間時の血中濃度の変化量を計算し AUC とするが、AUCg は空腹安静時での血中濃度を0とせず $0\ \mu\text{M}$ から実際の濃度を含めての AUC とする。本研究では安静時からの摂取後の変化量に着目するため AUCi にて示した。摂取ロイシン合計量が異なるため、AUCi は2群に分けて比較した。摂取ロイシン合計量が2gであるロイシン摂取のみ(LEU)と食事摂取のみ(MEAL)、食事に追加して遊離ロイシンを摂取するため摂取ロイシン合計量が4gである食事摂取直後ロイシン2g摂取(MEAL-LEU)と食事摂取180分後ロイシン2g摂取(MEAL-LEU180)で比較した。ロイシン摂取合計量が2gであるLEUとMEALは、摂取後の一過性の濃度変化に着目するため240分までのAUCiを算出した。食事摂取を行う試技は20分間の食事摂取時間を設けたため、AUCiを算出する時間がMEALは260分間(-20-240分)とした(LEUは240分間(0-240分))。また、ロイシン摂取合計量が4gであるMEAL-LEUとMEAL-LEU180のAUCiを算出する時間は、20分間の食事摂取時間を設け420分までとし440分間(-20-420分)とした。4試技間の最高血中濃度(Concentration max ; Cmax)、最高血中濃度到達時間(Time max ; Tmax)、安静時濃度の比較は、一元配置分散分

析により主効果の有無を検討した。その後、主効果が認められた水準において多重比較 (Bonferroni post hoc test) 検定にて、有意な差がある箇所を同定した。2 試技間の AUCi の比較は、対応のある Student の t 検定にて評価した。いずれの場合も、有意水準は両側検定で危険率 5%未満とした。データは統計ソフト SPSS version 19 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) を用いて分析した。

3. 結果

3-1. 血中インスリン濃度

インスリン濃度の経時的变化を図9に示した。安静空腹時の各条件間において、濃度に有意な差は認められなかった($4 \pm 1, 4 \pm 1, 4 \pm 0, 5 \pm 1 \mu\text{U/mL}$, それぞれ LEU, MEAL, MEAL-LEU, MEAL-LEU180, $p > 0.1$)。最高血中濃度 C_{max} は, LEU は $6 \pm 1 \mu\text{U/mL}$ であり(表 11), 食事を摂取した他の3条件に比較して有意に低値であった($p < 0.05$)。 T_{max} は, どの条件間においても有意な差は認められなかった。

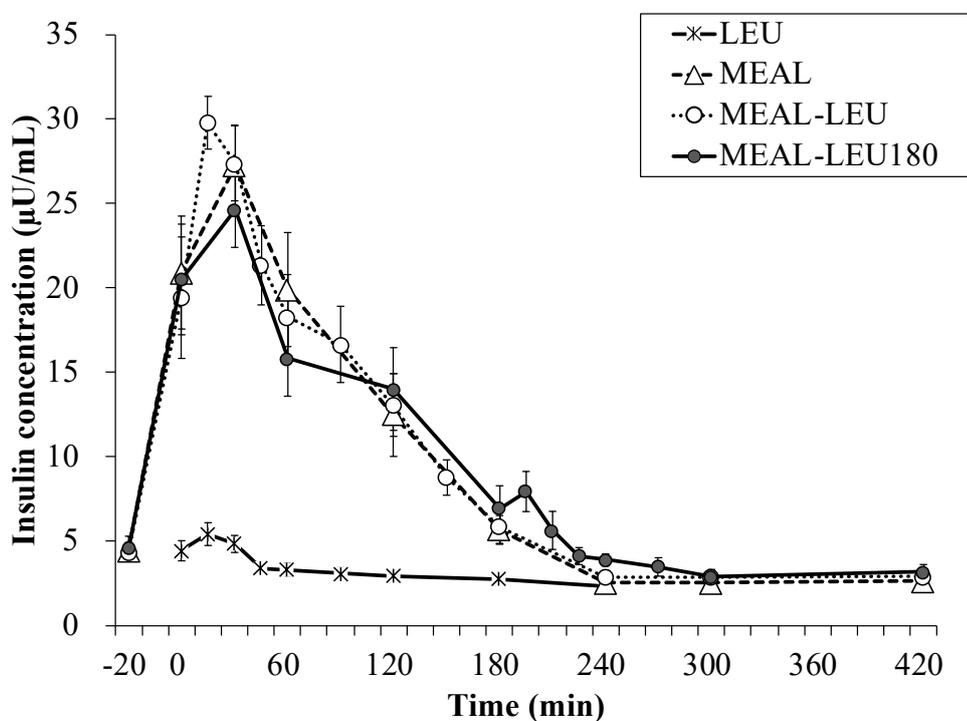


図 9. 血中インスリン濃度の経時的变化

平均値±標準誤差. LEU; ロイシン摂取のみ, MEAL; 食事摂取のみ, MEAL-LEU; 食事摂取直後ロイシン摂取, MEAL-LEU180; 食事摂取 180 分後ロイシン摂取.

表 11. 血中インスリン濃度の体内動態パラメータ

	LEU	MEAL	MEAL-LEU	MEAL-LEU180
Cmax (μU/mL)	6 ± 1 ^a	31 ± 2 ^b	32 ± 1 ^b	27 ± 6 ^b
Tmax (min)	17 ± 4	24 ± 6	18 ± 3	21 ± 17

平均値±標準誤差。同文字を共有しない場合に有意差あり(p<0.05)。LEU；ロイシン摂取のみ，MEAL；食事摂取のみ，MEAL-LEU；食事摂取直後ロイシン摂取，MEAL-LEU180；食事摂取 180 分後ロイシン摂取。

3-2. 血糖値

血糖値の経時的変化を図 10 に示した. 安静空腹時の各条件間において, 濃度に有意な差は認められなかった(91±2, 95±2, 94±3, 93±2 mg/dL それぞれ LEU, MEAL, MEAL-LEU, MEAL-LEU180, $p>0.1$). C_{max} は, LEU は 94±2 mg/dL であり(表 12), 食事を摂取した他の 3 条件に比較して有意に低値であった ($p<0.05$). T_{max} は, どの条件間にも有意な差は認められなかった.

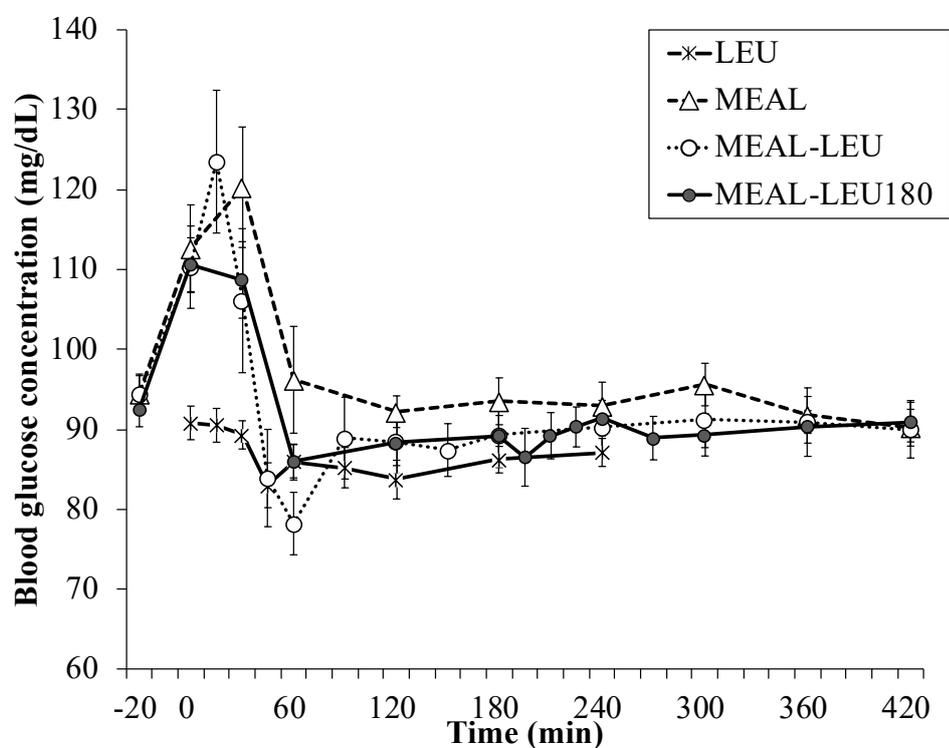


図 10. 血糖値の経時的変化

平均値±標準誤差. LEU; ロイシン摂取のみ, MEAL; 食事摂取のみ, MEAL-LEU; 食事摂取直後ロイシン摂取, MEAL-LEU180; 食事摂取 180 分後ロイシン摂取.

表 12. 血糖値の体内動態パラメータ

	LEU	MEAL	MEAL-LEU	MEAL-LEU180
Cmax (mg/dL)	94 ± 2 ^a	133 ± 5 ^b	131 ± 6 ^b	118 ± 3 ^b
Tmax (min)	11 ± 4	18 ± 5	11 ± 2	9 ± 5

平均値±標準誤差。同文字を共有しない場合に有意差あり(p<0.05)。LEU；ロイシン摂取のみ，MEAL；食事摂取のみ，MEAL-LEU；食事摂取直後ロイシン摂取，MEAL-LEU180；食事摂取 180 分後ロイシン摂取。

3-3. 血中必須アミノ酸濃度

血中必須アミノ酸濃度の経時的变化を図 11 に示した。安静空腹時の各条件間において、濃度に有意な差は認められなかった(982±25, 990±21, 993±15, 1006±14 μM, それぞれ LEU, MEAL, MEAL-LEU, MEAL-LEU180, $p>0.1$)。LEU に比較して MEAL-LEU180 の C_{max} は有意に高値であった($p<0.05$)(表 13)。MEAL, MEAL-LEU, MEAL-LEU180 の 3 試技に比較して LEU の T_{max} は、有意に早かった($p<0.05$)。また MEAL と MEAL-LEU の試技間の T_{max} に有意な差は認められなかった。

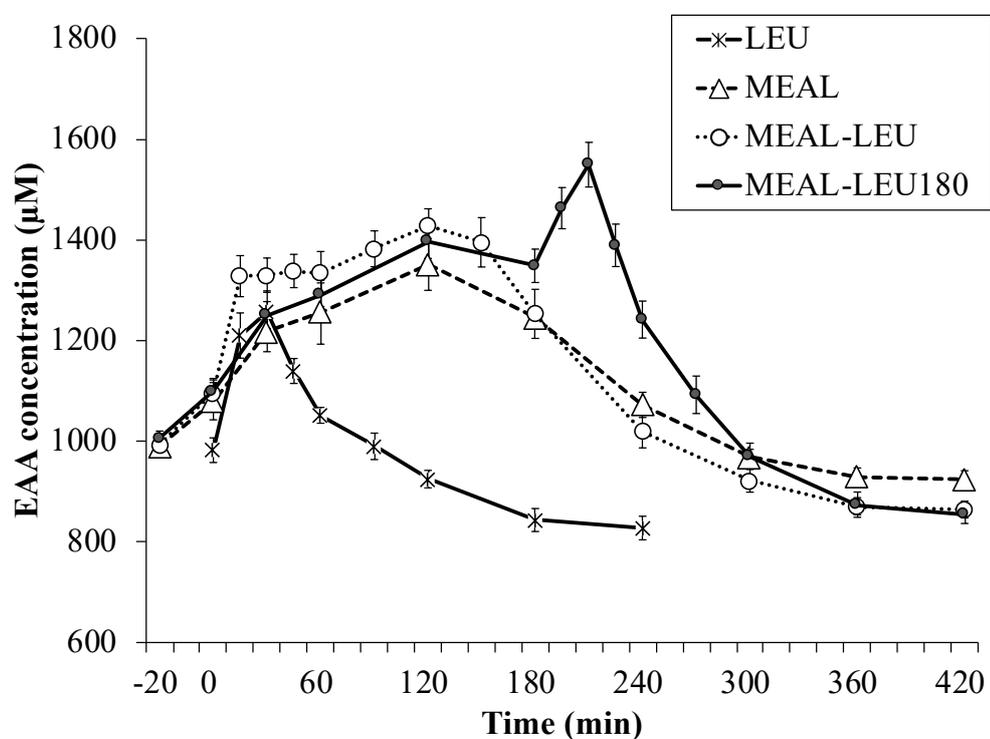


図 11. 血中必須アミノ酸濃度の経時的变化

平均値±標準誤差. LEU; ロイシン摂取のみ, MEAL; 食事摂取のみ, MEAL-LEU; 食事摂取直後ロイシン摂取, MEAL-LEU180; 食事摂取 180 分後ロイシン摂取.

表 13. 血中必須アミノ酸濃度の体内動態パラメータ

	LEU	MEAL	MEAL-LEU	MEAL-LEU180
Cmax (μM)	1273 ± 40 ^a	1380 ± 39 ^{a, b}	1479 ± 35 ^{b, c}	1570 ± 39 ^c
Tmax (min)	27 ± 4 ^a	132 ± 12 ^b	108 ± 15 ^b	220 ± 9 ^c

平均値±標準誤差. 同文字を共有しない場合に有意差あり(p<0.05). LEU; ロイシン摂取のみ, MEAL; 食事摂取のみ, MEAL-LEU; 食事摂取直後ロイシン摂取, MEAL-LEU180; 食事摂取 180 分後ロイシン摂取.

3-4. 血中ロイシン濃度

血中ロイシン濃度の経時的变化を図 12 にて示した。安静空腹時の各条件間において、濃度の有意な差は認められなかった(137±4, 140±4, 142±4, 143±4 μM, それぞれ LEU, MEAL, MEAL-LEU, MEAL-LEU180, $p>0.1$)。LEU に比較して MEAL および MEAL-LEU の C_{max} は、有意に低値であった($p<0.05$)(表 14)。LEU と MEAL-LEU180 の試技間には、 C_{max} に有意な差は認められなかった。MEAL と MEAL-LEU に比較して LEU の T_{max} は、有意に早かった($p<0.05$)。

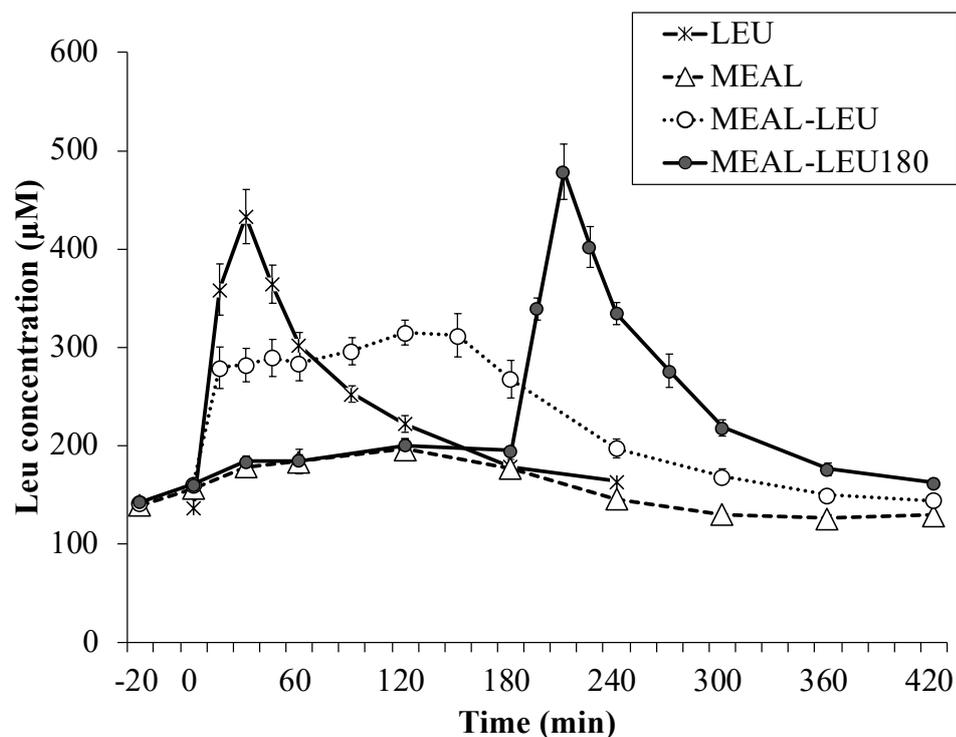


図 12. 血中ロイシン濃度の経時的变化

平均値±標準誤差。LEU；ロイシン摂取のみ，MEAL；食事摂取のみ，MEAL-LEU；食事摂取直後ロイシン摂取，MEAL-LEU180；食事摂取 180 分後ロイシン摂取。

表 14. 血中ロイシン濃度の体内動態パラメータ

	LEU	MEAL	MEAL-LEU	MEAL-LEU180
Cmax (μM)	442 ± 24 ^a	205 ± 8 ^b	347 ± 16 ^c	481 ± 27 ^a
Tmax (min)	33 ± 3 ^a	117 ± 14 ^b	96 ± 17 ^b	229 ± 2 ^c

平均値±標準誤差。同文字を共有しない場合に有意差あり(p<0.05)。LEU；ロイシン摂取のみ，MEAL；食事摂取のみ，MEAL-LEU；食事摂取直後ロイシン摂取，MEAL-LEU180；食事摂取 180 分後ロイシン摂取。

3-5. 血中濃度時間曲線下面積(AUCi)

ロイシン摂取合計量が 2 g である LEU, MEAL の AUCi を表 15 に示した. 必須アミノ酸 AUCi は, LEU に比較して MEAL が有意に高値であった($p<0.05$). ロイシン AUCi は, MEAL に比較して LEU が有意に高値であった($p<0.05$).

ロイシン摂取合計量が 4 g である MEAL-LEU, MEAL-LEU180 の AUCi を表 16 に示した. 必須アミノ酸とロイシンの AUCi は, MEAL-LEU と MEAL-LEU180 の 2 試技間に有意な差は認められなかった.

表 15. 必須アミノ酸とロイシンの血中濃度時間曲線下面積(AUCi)(ロイシン摂取合計量が 2 g である試技)

	LEU	MEAL
EAA ($\mu\text{M}\cdot\text{min}$)	-3859 ± 2481	$58848 \pm 3050^*$
Leu ($\mu\text{M}\cdot\text{min}$)	25561 ± 1112	$8154 \pm 840^*$

平均値 \pm 標準誤差. *; $p<0.05$ vs. LEU. LEU は 240 分間(0-240 分), MEAL は 260 分間(-20-240 分). LEU ; ロイシン摂取のみ, MEAL ; 食事摂取のみ.

表 16. 必須アミノ酸とロイシンの血中濃度時間曲線下面積(AUCi)(ロイシン摂取合計量が 4 g である試技)

	MEAL-LEU	MEAL-LEU180
EAA ($\mu\text{M}\cdot\text{min}$)	59318 \pm 5812	73167 \pm 6848
Leu ($\mu\text{M}\cdot\text{min}$)	35847 \pm 2982	35167 \pm 1735

平均値 \pm 標準誤差. MEAL-LEU および MEAL-LEU180 は 440 分間(-20 - 420 分), MEAL-LEU ; 食事摂取直後ロイシン摂取, MEAL-LEU180 ; 食事摂取 180 分後ロイシン摂取.

4. 考察

遊離ロイシン単独摂取の血中ロイシン濃度の最高値は、同量のロイシンを含む食事摂取に比較して高値であった。さらに、食事摂取での血中ロイシン濃度を高めるために食事直後に追加して遊離ロイシンを摂取したが、血中ロイシン濃度の最高値(Cmax)は遊離ロイシン単独に比較して低値であった。以上の結果から、混合食と遊離アミノ酸の同時摂取は遊離アミノ酸の吸収を阻害する可能性が示唆された。

遊離ロイシン単独摂取に比較して、同量のロイシン量を含む食事の血中ロイシン濃度のCmaxは有意に低値であった(表 14)。遊離ロイシン単独摂取(LEU)と食事摂取(MEAL)を比較するにあたり、遊離ロイシン単独摂取量と同量のロイシン 2 g を食品内に含む食事を試験食とした結果、本研究の試験食に含まれるたんぱく質量は 27.5 g であった。先行研究において、遊離アミノ酸やホエイプロテインたんぱく質を摂取した場合は、急激な血中ロイシン濃度の増加が報告されている(Pennings *et al.*, 2011; Pennings *et al.*, 2012; Matsumoto *et al.*, 2014)。しかし、日常の食事を再現する多栄養素が含まれる混合食の摂取実験では、遊離アミノ酸や乳たんぱく質ホエイプロテインを摂取した時のような急激な血中アミノ酸濃度の増加は得られておらず(Kim *et al.*, 2015; Hudson *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2017b)、これは本研究の結果と一致する。食事摂取(MEAL)の血中ロイシン濃度 Cmax は、遊離ロイシン単独摂取(LEU)の 47±2 %の濃度であった。

血中ロイシン濃度の最高値を示す Cmax に至る時間である Tmax は、食事摂取(MEAL)が遊離ロイシン単独摂取(LEU)に比較して有意に長かった(表 14)。Tmax が遅延した要因としては、摂取後の食物を一度滞留させる胃からの排出が、遊離ロイシン単独摂取に比較して食事摂取は遅延したと考えられる。胃内容排出速度は、食物の形態(液体または固体)(Collins *et al.*, 1983)、同時に摂取する栄養素(特に脂質)に影響される(Tougas *et al.*, 2000; Frost *et al.*, 2003)。先行研究において、胃内容排出は油の添加により遅延することを報告している(Frost *et al.*, 2003)。日常摂取する食事は、たんぱく質と同時に他の栄養素が常に含ま

れている混合食であるため、アミノ酸単独摂取に比較して胃内容排出は遅延し、その後小腸で消化吸収され血液中に出現するまでに時間を要し、血中ロイシン濃度の増加の遅延がみられたことが考えられる。

血中ロイシン濃度の AUC_i は、遊離ロイシン単独摂取(LEU)に比較し食事摂取(MEAL)が有意に低値を示した(表 15)。AUC_i は、摂取したたんぱく質が消化吸収され体循環している血液中に出現した量を評価している。本実験の試験食に使用した食品たんぱく質は、卵、魚、大豆製品、牛乳であった。食物たんぱく質の質を定量化したスコアリングシステムである DIAAS(Digestible Indispensable Amino Acid Score)(Wolfe *et al.*, 2018)にて高品質たんぱく質であると評価された食品たんぱく質であった。試験食であった混合食は日本の日常的な朝食をイメージし、それに適する食品たんぱく質を選択した。DIAAS 評価が高いたんぱく質を摂取しても、摂取量全てが血液中に循環するわけではない。たんぱく質は消化吸収され、吸収を行う小腸および肝臓で保持されるアミノ酸(First pass splanchnic extraction ; 内臓保持量)がある(Capaldo *et al.*, 1999; Volpi *et al.*, 1999; Fouillet *et al.*, 2009; Koopman *et al.*, 2009a; Pennings *et al.*, 2012)。アミノ酸の中でも分岐鎖アミノ酸は、小腸での吸収後に行われる肝臓での保持や代謝を回避することが示されている(Wahren *et al.*, 1976)。数々の栄養素が含まれる混合食でのたんぱく質摂取は、消化吸収後に血液中に出現するアミノ酸量はたんぱく質摂取量の 30%である(Capaldo *et al.*, 1999)。たんぱく質摂取 5 時間後においても摂取したたんぱく質の未消化分が腸に存在し、内臓保持量と腸に存在する未消化分のアミノ酸の存在があるため、たんぱく質摂取量の半分以上は血液中に出現しない(Capaldo *et al.*, 1999)。また、Penning らは、ホエイプロテインたんぱく質を摂取した後に消化吸収され循環される血液中に出現するアミノ酸は、摂取量のおよそ 60%であり、残り 40%は食事摂取後 4 時間を経過しても血液中に出現しなかったと報告している(Pennings *et al.*, 2012)。従って、本研究の結果である遊離ロイシン単独摂取に比較して食事摂取の EAA の AUC_i が低値であった要因は、食事には胃内容排出が遅くなる脂質(Tougas *et al.*, 2000; Frost *et al.*, 2003)

が含まれていたことだけではなく、消化吸収時に起こる内臓保持量が存在したために血液中へのアミノ酸出現率が減少したことが考えられる。

血中 EAA 濃度の AUC_i は、遊離ロイシン単独摂取(LEU)に比較し食事摂取(MEAL)が有意に高値を示した(表 15)。Matsumoto らの報告では、遊離 Leu を単独で経口摂取すると、Ile, Val, Phe の血中濃度を有意に減少させると示している(Matsumoto *et al.*, 2014)。しかし、同じ分岐鎖アミノ酸である Val, Ile の単独摂取では、他の BCAA の血中濃度の減少が起こらず、Leu が血中濃度の強力な調節因子であることが報告されている。本研究においても遊離ロイシン単独摂取(LEU)は、Ile, Val, Phe の血中濃度を低下させたため、必須アミノ酸の AUC_i がマイナスとなったと考える。

食事摂取直後にロイシンを摂取した条件(MEAL-LEU)に比較して、食事摂取 180 分後にロイシンを摂取した条件(MEAL-LEU180)の血中ロイシン濃度の最高血中濃度 C_{max} は、有意に高値であった(表 16)。遊離ロイシンは滞留することなく速やかに吸収されるが、食事摂取は食物が胃で滞留され、胃からの排出に時間を有する(Tougas *et al.*, 2000; Frost *et al.*, 2003)。本研究の食事摂取直後にロイシンを摂取した条件(MEAL-LEU)は、本来ならば速やかに吸収される遊離ロイシンが、直前に摂取している食事が胃に滞留しているため、遊離ロイシンは混合食と混合され、混合食と一緒に胃内で留まった可能性がある。そのため、遊離ロイシンは速やかに吸収されず、血中に出現することが出来ないため、血中ロイシン濃度の最高値 C_{max} が低値になった可能性が考えられる。しかし、多栄養素が含まれる混合食は、摂取後 2 時間で胃からの排出が進んでいる(Parkman *et al.*, 1998; Tougas *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2001)。そのため、食事摂取 180 分後にロイシンを摂取した条件(MEAL-LEU180)は、胃に滞留していた混合食が 180 分までに胃から小腸へ排出されており、食事摂取 180 分後に摂取した遊離ロイシンは、摂取後素早く胃から排出され小腸で吸収され血液中出现した可能性がある。また、食事摂取 180 分後にロイシンを摂取した条件(MEAL-LEU180)と遊離ロイシン単独摂取(LEU)の間において、血中ロイシン濃度 C_{max} は有意差がなかった。

この結果は、絶食状態で摂取した遊離ロイシン単独摂取での速やかな吸収と同様の吸収が、食事摂取 180 分後においても行われ、速やかに血液中にロイシンが出現していることが示される。

本研究にはいくつかの限界点がある。経口摂取した混合食のたんぱく質は、消化吸収されてアミノ酸となった後、全てが血液中出现するわけではないことである。血中濃度は、様々な臓器によって保持されたアミノ酸、また放出されたアミノ酸の正味のバランスを示しているためである。本研究では、安定同位体を用いていないため血液濃度からの明確なアミノ酸の代謝動態を評価することが出来なかった(Koopman *et al.*, 2009a; Pennings *et al.*, 2012)。しかし、本研究の目的は、遊離アミノ酸の摂取量が混合食内に含まれるアミノ酸量と同量になるよう設定し、それらの摂取時に出現してくる血中アミノ酸濃度を比較することであった。そのため本研究では、各種アミノ酸が混合されているホエイプロテインたんぱく質や必須アミノ酸を使用しなかった。単独遊離ロイシンを使用することにより、ロイシン含有量を一致させた試験食を使用し比較検討を行った。

インスリン濃度は、4 試技全てにおいて、摂取前と比較して有意に増加したことを確認した。遊離ロイシン単独摂取においてもインスリンが分泌されることが報告されている(Yang *et al.*, 2010)。しかし、食事摂取を行った 3 試技に比較して遊離ロイシン単独摂取は、インスリン濃度の増加が少なかった。食後相当のインスリン濃度の増加は筋タンパク質合成を刺激する(Rasmussen *et al.*, 2006)ことから、食事摂取の試技においてはインスリン分泌による筋タンパク質合成の刺激が得られた可能性が示唆される。しかしアミノ酸誘発性の筋タンパク質合成とインスリン刺激が相加的に作用するかどうかは本研究では明らかにできず、今後の検討が必要である。また、血糖値は食事摂取を行っている 3 試技でのみ、濃度が増加したことを確認した。先行研究(Kameyama *et al.*, 2014)の白米摂取後の血糖値の推移と同様であった。

混合食摂取と遊離ロイシンを摂取した後の血中アミノ酸濃度の推移は、加齢による影響

について検証が報告されていない。将来的には、若年者と高齢者で比較することが望ましいが、まずは基礎データの構築を目的として若年者と対象として実験を行った。

5. 結論

本研究の結果から、空腹時において遊離ロイシンの単独摂取は血中ロイシン濃度を著しく増加させた。しかし、同量のロイシンを含む混合食を摂取した場合の血中ロイシン濃度の増加は、遊離ロイシンの単独摂取に比較して有意に低値であった。さらに血中ロイシン濃度増加を目的として食事摂取直後にロイシンを摂取した場合は、ロイシン摂取量が2倍になっているにも関わらず血中ロイシン濃度の著しい増加は抑制された。以上の結果から、血中アミノ酸濃度を高める意図で遊離アミノ酸を摂取する場合は、食事摂取との同時摂取ではなくタイミングを考慮する必要があることが示唆された。

第6章【研究課題3】酸性乳飲料摂取が血中アミノ酸濃度におよぼす影響

1. 緒言

研究課題1では、食事によるたんぱく質および必須アミノ酸摂取が、高齢男性のレジスタンストレーニングに対する筋肥大応答に重要な因子であった。特に1日総摂取量のみならず朝食1食でのたんぱく質摂取量が0.61 g/kg LBM/meal以下の場合、骨格筋の増量が少なく、たんぱく質摂取量の重要性が明らかとなった。研究課題1で重要な因子であった朝食でのたんぱく質摂取量を増加させるためには、たんぱく質食品の中でもロイシンを高配合で含んでいる乳製品を加えて摂取することも1つの方法である。また、乳製品は朝食に加えやすい食品である。

高い血中アミノ酸濃度を得るためには、たんぱく質を摂取してからアミノ酸として小腸で吸収されるまでの時間が速いことが求められる。乳製品に含まれるたんぱく質は、大きく分けてホエイとカゼインがある。ホエイはpHにかかわらず可溶しているが、カゼインはミセルを形成した状態で直径50~600 nmのコロイド(Colloid)として存在している(Fox & Brodkorb, 2008)。カゼインミセルの表面の電荷は、酸性(pH 4.6)に晒されると電荷を持たなくなくなるため、ミセルが集合し凝固する(Farrell *et al.*, 2004)。胃内は胃酸が分泌されるためpHが低く、経口摂取したカゼインは胃内で酸に晒され凝固する(Mahe *et al.*, 1996)。胃内にある食塊は、粒子が1~3 mm以下の糜粥で胃幽門から排出される(Meyer *et al.*, 1988)。凝固したカゼインは粒子が大きいため胃幽門から排出することが出来ず、胃の蠕動運動により糜粥状態になるまで粉碎され、胃から排出される。可溶状態のホエイに比較して粉碎時間を必要とするカゼインは、胃排出が遅延し小腸に到達するまでの時間を要する(Mahe *et al.*, 1996)。従って、カゼイン摂取は、経口摂取から小腸で吸収され血中アミノ酸濃度へ反映されるまでの時間をより多く必要とするため、摂取後短時間で急激な血中濃度の上昇が得られない。Tangらは、必須アミノ酸が同量含まれる量のホエイとカゼイン摂取後の血中

ロイシン濃度を測定している。ホエイ摂取は、30分後で約250 μM の最高血中濃度(C_{max})となる。しかし、カゼイン摂取は30分後で約150 μM の C_{max} となり、摂取90分後以降には、ホエイ、カゼインの両群に血中濃度 C_{max} の有意差は示さない(Tang *et al.*, 2009)。胃での粉砕時間を要するカゼイン摂取は、血中アミノ酸濃度へ反映されるまでの時間を要するだけでなく、最高血中濃度も低値である。従って、ホエイ摂取は血中アミノ酸濃度を短時間で C_{max} も高値に増加させることが可能であるが、カゼイン摂取はホエイよりも高い C_{max} が得られない(Boirie *et al.*, 1997; Pennings *et al.*, 2011; Luiking *et al.*, 2016)。

酸性乳(Acidified milk)は、乳たんぱく質、大豆多糖類、ペクチンを含む溶液にクエン酸溶液を加えて混合された飲料であり、pH が 4.1 の酸性である(Nakayama *et al.*, 2017)。Nakayama らは、人工胃液(0.6%(w/v ペプシン))と脱脂粉乳を混合すると凝固が形成されるが、酸性乳は凝固せず溶液のままであったことを報告している(Nakayama *et al.*, 2017)。動物を用いた実験において、脱脂粉乳のゾンデによる摂取後、血中アミノ酸濃度は増加が少ないことを示している。脱脂粉乳摂取は胃内で胃酸によりカゼインが凝固し、胃内容排出が遅れ、その後小腸での消化吸収に影響を及ぼし血中アミノ酸濃度が高値にならない結果であったと推測されている(Nakayama *et al.*, 2017)。比較して、動物を用いて酸性乳を摂取させた後は、胃内で凝固せず胃排出が行われ、その後小腸から吸収され、血中アミノ酸濃度が増加したと報告している(Nakayama *et al.*, 2017)。ラットにおいて、酸性乳摂取後の血中アミノ酸濃度は脱脂粉乳摂取に比較して増加し、また筋タンパク質合成速度も脱脂粉乳摂取に比較して酸性乳摂取は有意に高値であった(Nakayama *et al.*, 2017)。胃からの排出は、ラットでは2 mm 以上の粒子(Jang *et al.*, 2013)、イヌでは5 mm 以上の粒子であると胃幽門から排出できない(Itoh *et al.*, 1986)。しかし、ヒトでは3~7 mm 粒子が胃幽門を通過することが可能であり、また水を同時に摂取すると直径17.6 mm のタブレットが胃幽門を通過する(Park *et al.*, 1984)。そのため、酸性乳摂取後の速やかな胃排出と血中アミノ酸濃度の上昇が、ヒトの臨床試験においても確認されるかどうかは不明である。

筋タンパク質合成を最大に刺激するために若年者では1回20gのホエイプロテインが必要であると報告がある(Witard *et al.*, 2014). 牛乳200gに含まれるたんぱく質量は6.6gである(Ministry of Education, 2015). 牛乳200gの摂取では、筋タンパク質合成を刺激するために必要な1回の摂取量としては不足する。また、ホエイプロテインの摂取に比較して牛乳摂取は、牛乳内に含まれているカゼインが胃内で凝固し消化吸収が遅れることが推測される。本研究の酸性乳は、胃内で凝固しないため、たんぱく質含有量が牛乳と同量であっても血中アミノ酸濃度がより上昇することが推測される。また、酸性乳は脂質を含まない乳飲料であり、胃排出が早いことが推測される。そこで本研究はヒトを対象として、筋タンパク質合成につながる血中アミノ酸濃度の増加を主測定項目とし、酸性乳摂取後の血中アミノ酸濃度の推移を脱脂乳摂取との比較検討を行なった。

2. 方法

2-1. 被験者

被験者は、健常な男性 8 名(年齢 23 ± 1 歳, 体重 66.2 ± 4.8 kg, 身長 1.73 ± 0.04 m)を対象とした。被験者には事前に研究の目的, 測定項目, 実験内容について口頭および文書にて十分な説明を行い, 理解の上同意書を得たものを対象とした。また, 実験を行う前に問診表にて健康上の問題のないことを確認した。なお, 本研究は, 立命館大学倫理委員会(承認番号 BKC-IRB-2015-029)を得てヘルシンキ宣言に基づいて実施した。ウォッシュアウト期間を含む 4 条件が行われる試験実施期間中は, 激しい運動は控えるよう伝え, 日常的な身体活動レベルを維持し, 日常的な食事を摂取するように指示した。

2-2. 実験プロトコル

被験者は 2 条件をランダムクロスオーバーデザインで行なった。各条件間に少なくとも 1 週間以上の間隔を空けて行った。酸性乳の摂取(Acidified), 脱脂粉乳(スキムミルク)の摂取(Skim)の 2 条件をランダムに行った。

試験前日の夕食に被験者は, 同一の規定食(エネルギー 729 kcal, たんぱく質 24.1 g, 脂質 25.1 g, 炭水化物 97.8 g)を摂取し, 翌朝試験実施までは水以外を絶食とした。翌朝 8 時に絶食状態で研究室に訪問させ, 30 分間ほど安静を保った後に前腕の皮静脈に留置針を刺入し静脈血の採取を行った。その後, 各試験飲料(たんぱく質 7 g 含有)を摂取し, 採血を摂取後 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 分に行い血中アミノ酸濃度の推移を評価した。採血が終了する 180 分後までの間は安静を保った(図 13)。

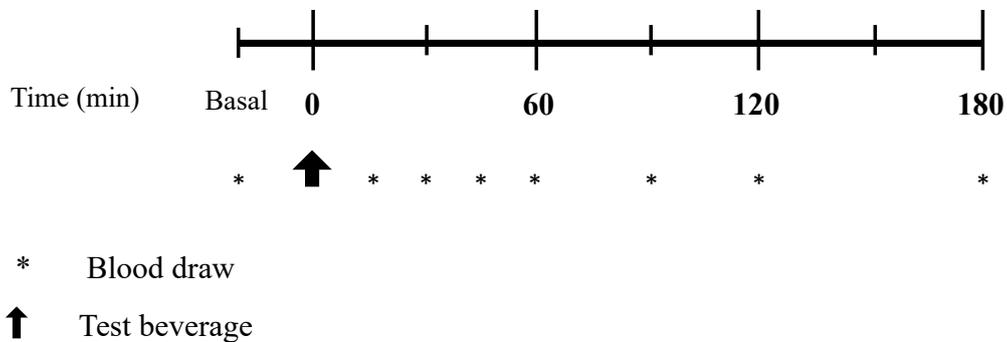


図 13. 研究デザインと実験プロトコルのタイムライン

2-3. 試験飲料

実験当日摂取する試験飲料である酸性乳(Acidified), 脱脂粉乳(Skim)の必須アミノ酸組成を表 17 に示した. 酸性乳飲料(200 mL)の栄養成分は, エネルギー46 kcal, たんぱく質 7.0 g(内ロイシン 0.82 g を含む), 脂質 0.0 g, 糖質 4.6 g で, pH は 4.1 であった. 脱脂粉乳飲料は, 20 g の脱脂粉乳を 186 g の水に溶解して調整した. 脱脂粉乳飲料(200 mL)の栄養成分は, エネルギー72 kcal, たんぱく質 7.0 g(内ロイシン 0.80 g を含む), 脂質 0.2 g, 糖質 10.5 g で, pH は 6.9 であった. 試験飲料, 栄養成分およびアミノ酸組成のデータは明治株式会社 (Meiji Co., Ltd., Tokyo, Japan)より提供を受けた.

表 17. 試験飲料の必須アミノ酸組成

	Acidified milk g/200mL	Skim milk g/200mL
His	0.21	0.22
Ile	0.43	0.43
Leu	0.82	0.80
Lys	0.60	0.56
Met	0.20	0.19
Phe	0.38	0.37
Thr	0.38	0.39
Trp	0.45	0.44
Val	0.63	0.64

2-4. 血液分析

採血直後，EDTA-2Na 入り真空採血管へ採取し，軽く転倒混和し直ちに氷水中で冷却した．冷却状態で遠心分離(4°C, 3000 rpm, 15 分間)し，その後血漿上清を採取した．全てのサンプルは，-80°C にて凍結保管した．

血中アミノ酸濃度は，採取された血漿上清に 15%スルホサリチル酸を加え，遠心分離(4°C, 7000 G, 10 分間)を行った．上清を限外フィルター用いて再び遠心分離(4°C, 14000 G, 60 分間)し，下層を採取し除タンパク質後のサンプルとした(Noguchi *et al.*, 2008; Nishioka *et al.*, 2013)．濃度分析は，高速アミノ酸分析計 L-8900(Hitachi, Tokyo, Japan)を用いて測定した．アミノ酸をイオン交換クロマトグラフィーで分離し，ニンヒドリン試薬を用いたポストカラム反応後に分光光度にて検出した．ヒスチジン(Histidine ; His)，イソロイシン(Isoleucine ; Ile)，ロイシン(Leucine ; Leu)，リジン(Lysine ; Lys)，メチオニン(Methionine ; Met)，フェニルアラニン(Phenylalanine ; Phe)，スレオニン(Threonine ; Thr)，トリプトファン(Tryptophan ; Trp)，バリン(Valine ; Val)の必須アミノ酸の血中濃度を測定した．

インスリン濃度は、酵素抗体法(Enzyme linked immunoassay ; ELISA, a human insulin ELISA kit Ultrasensitive(Mercodia AB., Uppsala, Sweden))を使用し、血漿上清をサンプルとして説明書に従い測定した。ディuplicateで測定し、その2つの値の平均値をデータとして用いた。変動係数は、 $6.0 \pm 0.7\%$ であった。

血糖値は採血直後の血液にて、血糖測定システム(酵素比色法(GOD/POD 法))であるメディセーフフィット、メディセーフフィットチップ(テルモ株式会社 (TERUMO Inc. , Tokyo, Japan))を用いて測定した。

2-5. 統計処理

基本的統計量は、平均値 \pm 標準誤差で示した。血中濃度の経時的変化は、2条件間(酸性乳条件、脱脂粉乳条件)の比較を、繰り返しのある2元配置分散分析(2-way ANOVA)により各時間に対する交互作用および主効果を検討した。有意な交互作用が認められた場合は、一元配置分散分析により単純主効果の有無を検討した。その後、単純主効果が認められた水準において多重比較 Bonferroni のポストホック検定にて、有意な差がある箇所を同定した。血中濃度時間曲面化面積(Area under the curve ; AUC)は、絶食時からの摂取後の変化量に着目するため、空腹安静時の血中濃度を0とし、その後の経過時間時の血中濃度の変化量を計算した AUC_i(Area under the curve with respect to increase ; AUC_i)として示した。最高血中濃度(Concentration max ; C_{max})、最高血中濃度到達時間(Time max ; T_{max})、AUC_iにおける2条件間の比較は、t検定にて検討した。いずれの場合も、有意水準は両側検定で危険率5%未満とした。データは統計ソフト SPSS version 19(SPSS Inc. , Chicago, IL, USA)を用いて分析した。

3. 結果

3-1. 血中インスリン濃度

血中インスリン濃度の経時的变化を図 14 に示した。2 条件間において、摂取前(安静空腹状態)での濃度は、有意な差は認められなかった($4\pm 1, 4\pm 1, \mu\text{U}/\text{mL}$ それぞれ酸性乳, 脱脂粉乳, $p>0.1$)。血中濃度の経時的变化において、飲料摂取条件 \times 時間における交互作用は、認められなかった($p=0.375$)(図 15)が、下位検定により時間の主効果が認められた($p<0.05$)。2 条件間における C_{max} (表 18)は、有意な差は認められなかった。

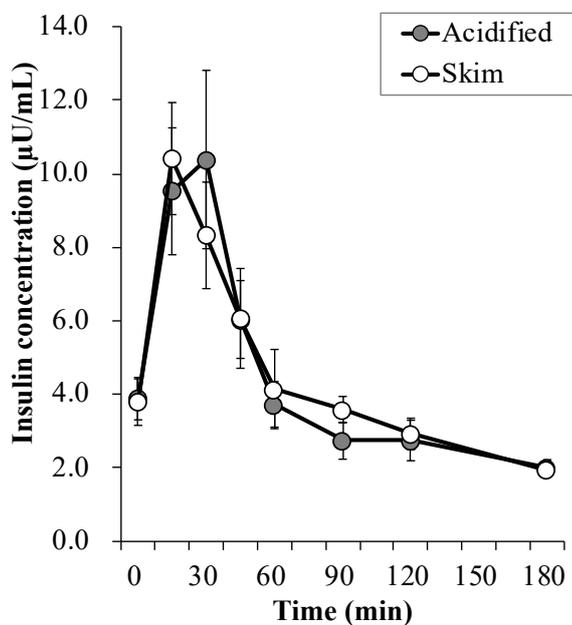


図 14. 血中インスリン濃度の経時的变化

Acidified ; 酸性乳, Skim ; 脱脂粉乳

表 18. 最高血中濃度(Cmax)

	Skim	Acidified
Insulin ($\mu\text{U}/\text{mL}$)	11 \pm 2	11 \pm 2
Blood glucose (mg/dL)	95 \pm 3	96 \pm 3
EAA (μM)	1236 \pm 42	1502 \pm 43 *
Leu (μM)	208 \pm 9	260 \pm 13 *

平均值 \pm 標準誤差, * $p < 0.05$ vs. Skim, Acidified, 酸性乳 ; Skim, 脫脂乳.

3-2. 血糖値

血糖値の経時的変化を図 15 に示した。2 条件間において、摂取前(安静空腹状態)での濃度は、有意な差は認められなかった($89\pm 2, 92\pm 3$ mg/dL それぞれ酸性乳, 脱脂粉乳, $p>0.1$)。血中濃度の経時的変化は、飲料摂取条件×時間における交互作用は認められなかった($p=0.113$)(図 15)が、下位検定により時間の主効果が認められた($p<0.05$)。2 条件間における C_{max} (表 18)は、有意な差は認められなかった。

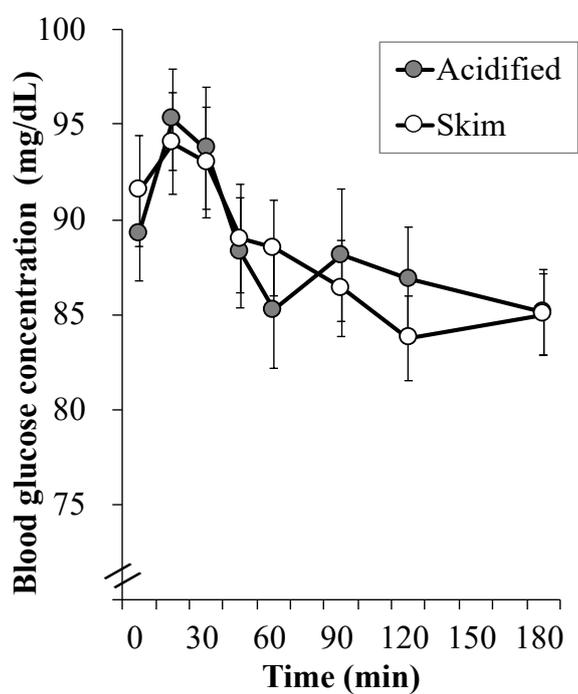


図 15. 血糖値の経時的変化

Acidified, 酸性乳 ; Skim, 脱脂乳.

3-3. 血中必須アミノ酸濃度

血中必須アミノ酸濃度の経時的变化を図 16 示した. 2 条件間において, 摂取前(安静空腹状態)での濃度には, 有意な差はなかった($991 \pm 16, 926 \pm 31 \mu\text{M}$ それぞれ酸性乳, 脱脂粉乳, $p > 0.1$). 血中濃度の経時的变化は, 飲料摂取条件 \times 時間における有意な交互作用が認められた($p = 0.001$)(図 16A). 酸性乳群は摂取後 30 分で最大に達し, その後は経時的に下降した($p < 0.05$). 脱脂乳群は摂取後 15 分まで緩やかに増加し, その後も緩やかに下降した($p < 0.05$). 摂取後 30, 45, 60 分において, 脱脂乳群に比較して酸性乳群が有意に高値を示した($p < 0.05$). AUC_i は脱脂乳群に比較して酸性乳群が高値である傾向($p = 0.079$)を示した(図 16B). 最高血中濃度 C_{max} は, 酸性乳群は $1502 \pm 43 \mu\text{M}$ であり脱脂乳群に比較して有意に高値であった($p < 0.05$)(表 18).

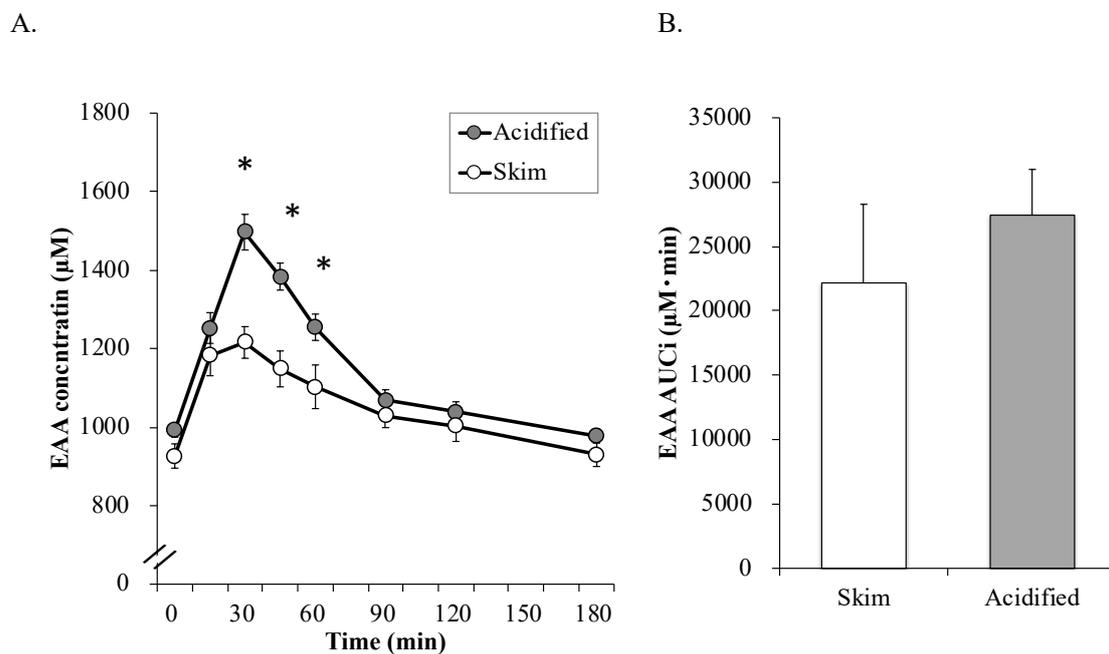


図 16. 血中必須アミノ酸濃度の経時的变化(A)と濃度曲線下面積(AUC_i)(B).

平均値 \pm 標準誤差, * $p < 0.05$ vs. Skim, Acidified, 酸性乳 ; Skim, 脱脂乳.

3-4. 血中ロイシン濃度

血中ロイシン濃度の経時的变化を図 17 に示した. 2 条件間において, 摂取前(安静空腹状態)の濃度には, 有意な差はなかった($141\pm 3, 134\pm 5 \mu\text{M}$ それぞれ酸性乳, 脱脂粉乳, $p>0.1$). 酸性乳群は摂取後 15, 30 分まで増加し, その後は下降した($p<0.05$). 脱脂乳群は摂取後 15 分まで緩やかに増加し, その後も緩やかに下降した($p<0.05$). 血中濃度の経時的变化において飲料摂取条件 \times 時間における有意な交互作用が認められた($p=0.003$)(図 17A). 摂取後 30, 45, 60 分において, 脱脂乳群に比較して酸性乳群が有意に高値を示した($p<0.05$). AUCi は酸性乳群が高値であった($p<0.05$)(図 17B). 最高血中濃度 C_{max} は, 酸性乳群 $260\pm 13 \mu\text{M}$ であり脱脂乳群に比較して有意に高値であった($p<0.05$)(表 18).

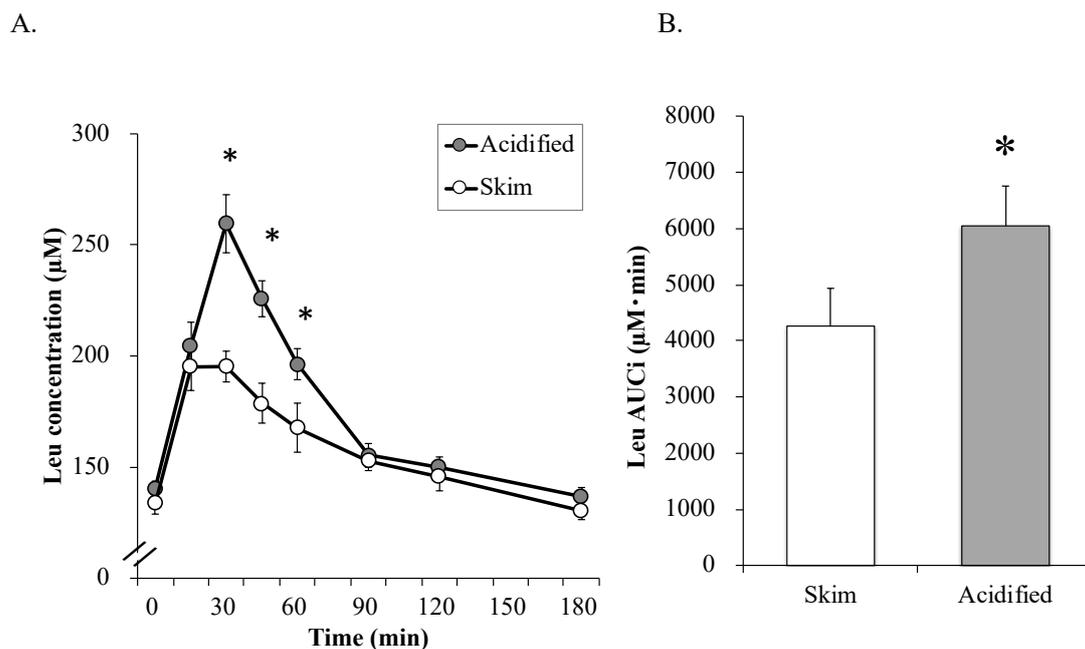


図 17. 血中ロイシン濃度の経時的变化(A)と濃度曲線下面積(AUCi)(B).

平均値 \pm 標準誤差, * $p<0.05$ vs. Skim, Acidified, 酸性乳 ; Skim, 脱脂乳.

4. 考察

本研究は、酸性乳摂取がどのように血中アミノ酸濃度の時間的な推移に影響を及ぼすかについて脱脂粉乳摂取と比較した。酸性乳は脱脂粉乳に比較して、血中ロイシン濃度は有意に高値を示し、AUC_i も有意に高値であった。ほぼ同様のアミノ酸組成を同量有するたんぱく質であっても、酸加工されることにより、血中アミノ酸濃度の推移に違いが生じることが示された。

脱脂乳摂取に比較して酸性乳摂取は、摂取後 30, 45, 60 分において血中必須アミノ酸濃度および血中ロイシン濃度が有意に高値を示した。動物モデルを用いた実験では、酸性乳に比較して脱脂乳投与 30 分後の血中アミノ酸濃度の増加は、低値であることが報告されている(Nakayama *et al.*, 2017)。本研究のヒトにおいても、脱脂乳摂取は、酸性乳摂取に比較して血中アミノ酸濃度の増加が低値であった。ヒトにおいても、脱脂乳に含まれるカゼインが胃内で凝固し、そのため小腸での吸収にも影響を及ぼし、血中アミノ酸濃度の増加が得られず低値であったと推測される。しかし、酸性乳に含まれるカゼインは、胃内の酸性下で液状状態を保つため(流動性を維持)、胃幽門から容易に排出され、素早く小腸から吸収された可能性がある。そのため酸性乳の摂取は、血中必須アミノ酸および血中ロイシン濃度を高値に引き上げることが可能であったと推察される。

乳たんぱく質ホエイ摂取は、カゼイン摂取のように胃内で凝固されないため、摂取後の血中アミノ酸濃度が短時間で増加する(Luiking *et al.*, 2016)。Penning らは、20 g ホエイ摂取後の血中ロイシン濃度 C_{max} は、526±21 μmol/L であり、20 g カゼイン摂取後は 281±13 μmol/L であると報告している。C_{max} がカゼインプロテインに比較してホエイプロテインで高値であるため、筋タンパク質合成速度が高値であることを示している(Pennings *et al.*, 2011)。また、たんぱく質摂取後における血中必須アミノ酸濃度 C_{max} と筋タンパク質合成速度は正の相関関係を示しており、アミノ酸の中でも特に血中ロイシン濃度 C_{max} は、筋タンパク質合成速度との有意な正の相関関係を示している(Pennings *et al.*, 2011)。本研究に

において、血中ロイシン濃度 C_{max} は脱脂乳摂取で $208 \pm 13 \mu\text{M}$ 、酸性乳摂取では $260 \pm 13 \mu\text{M}$ であり約 $50 \mu\text{M}$ 高値であった。この結果は、脱脂乳摂取に比較して酸性乳摂取が、同量のたんぱく質および同じアミノ酸組成を含んでいるにもかかわらず、より筋タンパク質合成を誘導する乳飲料であることが推察されるが、 $50 \mu\text{M}$ の濃度差が実際の筋タンパク質合成に及ぼす影響については、安定同位体のトレーサーを用いた実験などで詳細な比較が求められる。

消化吸収後の血中への出現量を示す AUC_i は、脱脂乳摂取に比較して酸性乳摂取が必須アミノ酸 AUC_i は高値である傾向が得られ、ロイシン AUC_i は有意に高値を示した。筋タンパク質合成には、筋の材料としてロイシン以外の必須アミノ酸、その他の非必須アミノ酸の全てのアミノ酸が必要である(WHO/FAO/UNU, 2007)。必須アミノ酸 AUC_i が脱脂乳摂取に比較して酸性乳摂取で高値である結果は、筋タンパク質合成の材料として筋細胞へより多くのアミノ酸をより継続的に供給できることを示唆している。先行研究では、牛乳または大豆たんぱく質の豆乳摂取後において、腸や臓器に取り込まれ保持され血中に出現しないアミノ酸量(内臓保持量)は摂取量全体の 60%に達すると報告されている(Fouillet *et al.*, 2009)。また、加水分解物カゼインプロテイン摂取は、カゼインプロテイン摂取に比較して内臓保持量が少ない(Koopman *et al.*, 2009a)ことや、ホエイプロテイン摂取はカゼインプロテイン摂取に比較して内臓保持量が少ないとの報告もあり(Pennings *et al.*, 2011)、数々の要因がたんぱく質の消化・吸収に影響することが考えられる。本研究の血中ロイシン濃度 AUC_i は、脱脂乳摂取に比較して酸性乳摂取が有意に高値であった結果は、含まれるたんぱく質が胃内で凝固されなかったことだけでなく、酸加工により内臓保持量が少なかった可能性も推測されるが、今後検討する必要がある。

本研究には2つの限界点がある。本研究はたんぱく質摂取後の胃内容排出速度をシンチグラフィ法(Abell *et al.*, 2008)やパラセタモール法(Holwerda *et al.*, 2016)で測定していない。そのため、血中アミノ酸濃度 C_{max} の差が胃内容排出速度の違いによることを明確に示す

ことはできない。しかし、胃内容排出速度が早いと血中アミノ酸濃度の上昇が得られ、血中アミノ酸濃度 C_{max} が高値であることが示されている(Holwerda *et al.*, 2016)。従って、たんぱく質を同量にした試験飲料を摂取し、血中アミノ酸濃度による比較検討を行なった。また我々は安定同位体を用いていないため、血中アミノ酸濃度 C_{max} が高値である酸性乳摂取が、実際に筋タンパク質合成速度を増加させることを示していない。しかし、血中アミノ酸濃度が高値であると骨格筋へのアミノ酸供給が促され、それが筋タンパク質合成につながることを示されている(Kim *et al.*, 2017a)。また、筋タンパク質合成速度と最高血中アミノ酸濃度は相関関係を示している(Pennings *et al.*, 2011)。従って、血中アミノ酸濃度の推移を評価した。

インスリン濃度は、試験飲料摂取後に2試技とも増加したことを確認した。摂取たんぱく質の量によってインスリンの分泌量は異なるが(Pennings *et al.*, 2012)、ホエイプロテインおよびカゼインプロテイン摂取においてもインスリンが分泌されることが報告されている(Pennings *et al.*, 2011)。本研究の試験飲料である乳製品摂取後の経時的な推移は、ホエイプロテインおよびカゼインプロテイン摂取と同様であり過去の研究を支持する結果となった。しかし、アミノ酸誘発性の筋タンパク質合成とインスリン刺激が相加的に作用するかどうかは本研究では明らかにできず、今後の検討が必要である。

酸性乳および脱脂粉乳摂取後の血中アミノ酸濃度の推移は、加齢による影響について検証が報告されていない。将来的には、若年者と高齢者と比較することが望ましいが、まずは基礎データの構築を目的として若年者と対象として実験を行った。

5. 結論

本研究の結果から、同じアミノ酸組成を持っている乳たんぱく質が、加工の違いによって消化吸収後の血中アミノ酸濃度に影響をおよぼした。酸加工された酸性乳摂取の血中必須アミノ酸濃度および血中ロイシン濃度の最高血中濃度は、脱脂乳摂取に比較して有意に高値を示した。また血中ロイシン濃度 AUC_i も有意に高値であった。以上のことから、乳たんぱく質の酸加工は、消化吸収効率を高めることを通して、血中アミノ酸濃度の最高値を増加させる可能性が示唆された。

第7章 総合討論

本研究では、サルコペニア予防のための栄養素の摂取法を念頭におき、筋肥大を効果的に高めるたんぱく質およびアミノ酸摂取方法を探索することを目的とした。この目的を達成するために、研究課題1では高齢者におけるレジスタンストレーニングの実施期間における通常の食事でのたんぱく質摂取量と筋肥大との関係を検討した。研究課題2では、食事摂取と遊離アミノ酸摂取における血中アミノ酸濃度への影響を、研究課題3では、加工された乳製品である酸性乳飲料摂取が血中アミノ酸濃度におよぼす影響を検討した。

本博士研究において研究課題1では、朝食によるたんぱく質摂取量および必須アミノ酸摂取量が、高齢男性のレジスタンストレーニングに対する筋肥大応答に重要な因子であることを示した。朝食のたんぱく質摂取量が0.61 g/kg LBM/meal以下の被験者のレジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加と、たんぱく質および必須アミノ酸(特にロイシン)摂取量との間に強い相関関係が認められた(図4, 5, 6)。これまで、長期介入の1日および各食事でのたんぱく質摂取量とレジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加の相関関係を示した報告はみられない。唯一、Campbellらのレビューで相関関係が示されている(Campbell & Leidy, 2007)。Campbellらのグループが過去15年間に報告している論文6本(Campbell *et al.*, 1995; Campbell *et al.*, 1999a; Campbell *et al.*, 1999b; Iglay *et al.*, 2007; Campbell *et al.*, 2002b; Campbell *et al.*, 2002a)をまとめて解析している。年齢は50-80歳、被験者数が合計106名、12週間のレジスタンス運動長期介入実験(80% 1RM, 8回×2セット, 週2~3回)の結果であり、1日の体重あたりのたんぱく質摂取量とレジスタンス運動による除脂肪量の増加量の相関関係を示している。しかし、運動頻度が週2~3回と異なるため、各被験者の最終的な運動量が異なっている可能性がある。本研究課題1では全ての被験者において、50% 1-RMを14回×3セット, 週3回を正確におこなった。その結果、0.61 g/kg LBM/meal以下の摂取量である被験者に限定されるが、朝食たんぱく質摂取量およびアミノ酸摂取量とレジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加と相関関係を示したこ

とは本研究の新規な点だと考える。朝食でのたんぱく質摂取量と必須アミノ酸摂取量およびロイシン摂取量は重要であり，朝食のたんぱく質摂取量が少ない場合(0.61 g/kg LBM/meal 以下)はレジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加が見込めないことが示唆される。そのため，朝食でのたんぱく質摂取量が高齢男性でのレジスタンストレーニングに対する筋肥大応答に重要な因子であることが提示できると考える。レジスタンストレーニングに取り組む高齢者においては，1日の総摂取量のみならず，各食事のたんぱく質摂取量，特に朝食のたんぱく質摂取において，その量と質(たんぱく質中のロイシン含有量)に注意を払う必要があると考えられる。

研究課題2では，研究課題1で明らかとなった朝食のたんぱく質摂取に焦点を当てて研究を進めた。研究課題1で高齢者が摂取していた朝食たんぱく質摂取量が 27.5 ± 5.8 gであったことから，研究課題2で同量のたんぱく質を含む朝食とした。高齢者は若年者に比較して経口的アミノ酸を同量摂取しても，LeuおよびEAA濃度の血中濃度の推移の個人差が大きい(Cuthbertson *et al.*, 2005)。そのため研究課題2では，基礎データの構築を目的として若年者を対象として実験を行った。筋タンパク質合成速度と相関関係にある血中アミノ酸濃度(Pennings *et al.*, 2011)に着目し，多栄養素が含まれる混合食摂取と混合食に含まれる同量の遊離ロイシン単独摂取での血中アミノ酸濃度の推移を検討した。遊離ロイシン単独摂取が混合食摂取に比較して血中ロイシン濃度を著しく増加させたことから，朝食でのたんぱく質摂取量が不足しがちな日本人においては，不足するたんぱく質を補完する手段として消化吸収が速やかに行われる遊離アミノ酸であるロイシンの有効性が示唆された。しかしながら，研究課題2において，朝食でたんぱく質摂取を充足させる目的で，混合食摂取直後に遊離ロイシンを組み合わせる摂取したが，遊離ロイシン単独摂取でのロイシン濃度上昇への効果が抑制された。そのため混合食に加えて遊離ロイシン摂取を行う場合には，混合食摂取後180分の時間を置いてから摂取することが勧められる。以上のことから，食事と遊離アミノ酸を組み合わせる相乗効果を狙う場合でも，摂取のタイミングを考慮する

必要性が示唆された。

研究課題1では、食事によるたんぱく質および必須アミノ酸摂取が、高齢男性のレジスタンストレーニングに対する筋肥大応答に重要な因子であることが示された。さらに、研究課題2では、多栄養素が含まれる混合食と遊離ロイシン単独摂取の比較をおこない、血中ロイシン濃度の増加に著しい違いがあることが示された。その要因として、胃からの排出速度が影響していた可能性が示された。そこで研究課題3では、胃排出速度がたんぱく質の消化吸收速度に強く影響する因子であることを考慮し、乳たんぱく質を加工した酸性乳飲料が血中アミノ酸濃度の推移に及ぼす影響を検討した。動物実験では酸加工することで乳たんぱく質の胃での凝固が抑制されたと報告されているが、ヒト臨床試験においても酸性乳摂取後の血中必須アミノ酸濃度および血中ロイシン濃度の最高濃度は、脱脂乳摂取後に比較し高値であった。血中ロイシン濃度の最高血中濃度が増加することは、筋タンパク質合成に繋がることが示されている(Pennings *et al.*, 2011)。本研究の結果は、ヒトでも乳たんぱく質の酸加工が胃排出を促進し、同じアミノ酸組成であっても、より効率的に筋たんぱく質合成を高めることができる可能性を示唆している。

The European Society for Clinical Nutrition and Metabolism(ESPEN)では、すべての高齢者ができるだけ活動性を高く自立した生活を保持することを目的に、健康保持のための運動(筋力・筋持久力・柔軟性)を加味しながらの栄養プランを提案している(Deutz *et al.*, 2014)。高齢者は少なくとも 1.0~1.2 g/kg BW/day のたんぱく質を摂取すること、また疾患や後期高齢であるなどのリスクがある場合は 1.2~1.5 g/kg BW/day 摂取する必要があると示している。しかし、1食毎のたんぱく質摂取量については言及されておらず、今後のガイドライン策定にはさらなる研究が求められる。研究課題1と2から、レジスタンストレーニングによる両脚骨格筋量の増加と関係性があった朝食のたんぱく質摂取を充足させる方法として食事に遊離アミノ酸や胃排出を高めた加工食品を追加摂取する場合は、それらを摂取するタイミングを考慮する必要がある。特に通常食と同時に摂取した場合、混合食による食塊が

存在することによって胃内容排出が遅延し、血中アミノ酸濃度の増加が緩やかとなるためである。遊離アミノ酸や加工食品は食事摂取の前もしくは摂取後 3 時間を経過した後に摂取すると、胃内容排出の停滞の影響を受けず速やかに吸収され血中アミノ酸濃度を増加させる特性を生かすことが可能であると考えられる。

筋肥大を効果的に高めるたんぱく質摂取とレジスタンス運動とのタイミングは、レジスタンス運動による筋タンパク質合成の刺激を得てから食事のたんぱく質摂取を行うことが最適なタイミングであると考えられる。そのため、レジスタンス運動は昼食前または夕食前のどちらかのタイミング(食間)で行うことが勧められる(図 18)。また、昼食前または夕食前は胃内容排出の影響の少ないタイミング(食事摂取後 180 分以上経過の点)であると推察されるため、消化吸収の早い遊離アミノ酸または酸加工した乳飲料の摂取に適切なタイミングであると考えられる。そのため、レジスタンス運動を行なった後、消化吸収の早い遊離アミノ酸または酸加工した乳飲料の摂取し、その後食事を摂取する方法が提案される。

また、胃内容排出の影響を受けることが全くない時間帯は、起床してから朝食を摂取するまでの時間帯しかない。そのため、1 日の生活の中で最も高い最高血中 Leu 濃度が得られるのは、朝食前の摂取であると考えられる。起床して朝食を摂取するまでに消化吸収の早い遊離アミノ酸または酸加工した乳飲料を摂取し、血中アミノ酸濃度の増加を得てから朝食を摂取する方法が提案できる。1 日のタイムコースをまとめると、朝食前に消化吸収の早い遊離アミノ酸または酸加工した乳飲料を摂取し、たんぱく質を含む朝食を摂取し、昼食前または夕食前のどちらかでレジスタンス運動を行い、レジスタンス運動後に消化吸収の早い遊離アミノ酸または酸加工した乳飲料を摂取し、その後に昼食または夕食でたんぱく質を摂取する(図 18)、という栄養・運動介入のスケジュールが 1 つのモデルプランとして勧められる。

さらに上記に加えて最も重要なことは、朝食、昼食、夕食の各食事でのたんぱく質摂取量を満たすことである。一過性による筋タンパク質合成を最大限に刺激する高品質たんぱ

く質量は高齢者 0.40 g/kg BW/meal(除脂肪量あたり 0.61 g/kg LMB/meal)であるため(Moore *et al.*, 2015), 体重 65 kg 高齢者であれば朝食, 昼食, 夕食のそれぞれの食事でたんぱく質摂取量 26 g, 1 日合計 78 g(体重あたり 1.2 g/kg BW/day)を摂取することが勧められる.

レジスタンストレーニングの効果を最大限に活かすには, 朝食でのたんぱく質の適切な摂取量, 消化吸収の早い食品を付加する場合は摂取タイミング, そしてサルコペニアの予防として, レジスタンストレーニングの継続が若年期から求められる.

本博士研究は, 介護予防として高齢者が取り組むレジスタンストレーニングの実施において, 食生活の重要性を示した. さらに, たんぱく質の量だけでなく, その形態(他の栄養素との混合や加工方法)が血中アミノ酸濃度に強く影響することを示した. 食事摂取基準で示される 1 日の総摂取量のみならず, 各食事のたんぱく質摂取量やたんぱく質の“質”により焦点を当てた栄養介入に取り組むことで, 日常生活でサルコペニア予防を実践することが可能である.

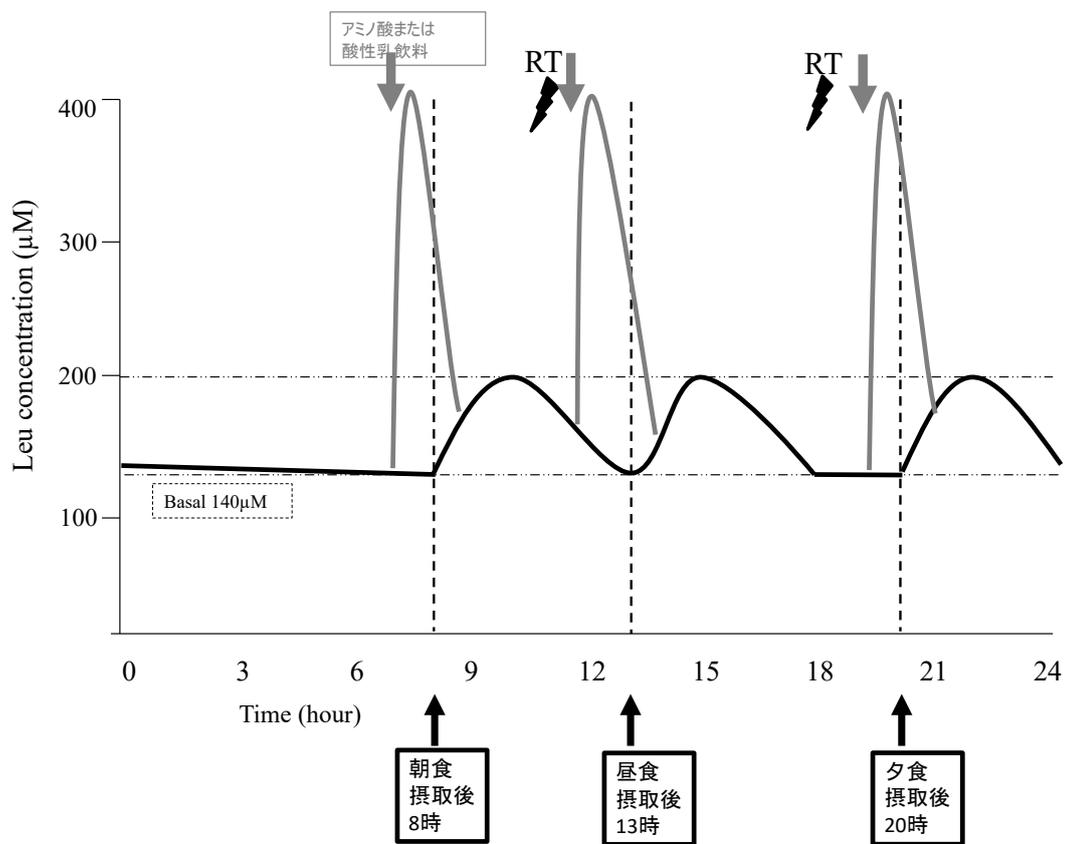


図 18. 栄養・運動介入のモデルプラン

第 8 章 結論

本研究の結果から、高齢者における中負荷による筋量の増加が確認された。しかし、トレーニングによる筋肥大を効果的に高めるためには、1日のたんぱく質およびアミノ酸摂取量のみならず1食毎の摂取量が重要であることが示された。特に朝食でのたんぱく質摂取の充足が望まれる。食事でのたんぱく質摂取の調節が困難である場合は、遊離アミノ酸や消化吸収が早い加工した食品などの付加摂取も有用である。しかし、食事との同時摂取では特性が活かされないため、食事の前に摂取すること、または食間が勧められる。以上の結果から、本研究は筋量の増加をより効率的に導くたんぱく質およびアミノ酸の摂取方法を提示したものとする。

謝辞

本研究を進めるにあたり、親身で丁寧なご指導、ご助言を賜りました指導教員である立命館大学スポーツ健康科学研究科藤田聡教授に心より御礼を申し上げます。研究者としての心構えから、本研究の遂行および論文執筆に際し、多大なるご指導を賜りました。長きに渡りましたが、貴重な時間を過ごさせて頂きましたことに深く感謝申し上げます。

副査として幾度も査読いただき、有意義なご助言を賜りました至学館大学村上太郎教授、立命館大学スポーツ健康科学研究科真田樹義教授ならびに家光素行教授に厚く御礼申し上げます。研究、実験、論文執筆に際して貴重なご助言を賜りました神戸大学佐藤幸治准教授、名古屋工業大学小笠原理紀准教授、防衛大学蒔苗裕平講師に厚く御礼申し上げます。

また、これまでの実験にご協力いただいた被験者の皆様に厚く御礼を申し上げます。いつも親身になって頂いた、藤田研究室の皆様、小林浩子さん、内藤加代子さん、これまで藤田研究室に在籍されていた皆様、バーミンガム大学西村友輔さん、これまで立命館大学スポーツ健康科学研究科博士課程後期課程に在籍されていた皆様に心より感謝申し上げます。本研究を遂行するにあたり貴重なご指導を賜りました東京医科大学の浜岡隆文教授、黒澤祐子講師に厚く御礼申し上げます。博士課程前期課程における研究に関わりご指導賜りました京都女子大学中井誠一教授、いつも御心遣い頂いておりました立命館大学スポーツ健康科学研究科岡本直輝教授に厚く御礼申し上げます。

最後に、いつも支えてくれた家族、友人、立命館大学スポーツ健康科学研究科、スポーツ健康科学部の皆様に心から感謝致します。

参考文献

- Abell TL, Camilleri M, Donohoe K, Hasler WL, Lin HC, Maurer AH, McCallum RW, Nowak T, Nusynowitz ML, Parkman HP, Shreve P, Szarka LA, Snape WJ, Jr. & Ziessman HA. (2008). Consensus recommendations for gastric emptying scintigraphy: a joint report of the American Neurogastroenterology and Motility Society and the Society of Nuclear Medicine. *Am J Gastroenterol* **103**, 753-763.
- Anthony JC, Yoshizawa F, Anthony TG, Vary TC, Jefferson LS & Kimball SR. (2000). Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. *J Nutr* **130**, 2413-2419.
- Arnarson A, Geirsdottir OG, Ramel A, Briem K, Jonsson PV & Thorsdottir I. (2013). Effects of whey proteins and carbohydrates on the efficacy of resistance training in elderly people: double blind, randomised controlled trial. *Eur J Clin Nutr* **67**, 821-826.
- Atherton PJ, Etheridge T, Watt PW, Wilkinson D, Selby A, Rankin D, Smith K & Rennie MJ. (2010). Muscle full effect after oral protein: time-dependent concordance and discordance between human muscle protein synthesis and mTORC1 signaling. *Am J Clin Nutr* **92**, 1080-1088.
- Bartali B, Frongillo EA, Bandinelli S, Lauretani F, Semba RD, Fried LP & Ferrucci L. (2006). Low nutrient intake is an essential component of frailty in older persons. *Journals of Gerontology Series a-Biological Sciences and Medical Sciences* **61**, 589-593.
- Bauer J, Biolo G, Cederholm T, Cesari M, Cruz-Jentoft AJ, Morley JE, Phillips S, Sieber C, Stehle P, Teta D, Visvanathan R, Volpi E & Boirie Y. (2013). Evidence-based recommendations for optimal dietary protein intake in older people: a position paper from the PROT-AGE Study Group. *J Am Med Dir Assoc* **14**, 542-559.
- Bohe J, Low A, Wolfe RR & Rennie MJ. (2003). Human muscle protein synthesis is modulated by extracellular, not intramuscular amino acid availability: a dose-response study. *Journal of Physiology-London* **552**, 315-324.
- Boirie Y. (2009). Physiopathological mechanism of sarcopenia. *J Nutr Health Aging* **13**, 717-723.
- Boirie Y, Dangin M, Gachon P, Vasson MP, Maubois JL & Beaufrere B. (1997). Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**,

14930-14935.

- Bollwein J, Diekmann R, Kaiser MJ, Bauer JM, Uter W, Sieber CC & Volkert D. (2013). Distribution but not amount of protein intake is associated with frailty: a cross-sectional investigation in the region of Nurnberg. *Nutr J* **12**, 109.
- Borsheim E, Tipton KD, Wolf SE & Wolfe RR. (2002). Essential amino acids and muscle protein recovery from resistance exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283**, E648-657.
- Buckinx F, Landi F, Cesari M, Fielding RA, Visser M, Engelke K, Maggi S, Dennison E, Al-Daghri NM, Allepaerts S, Bauer J, Bautmans I, Brandi ML, Bruyere O, Cederholm T, Cerreta F, Cherubini A, Cooper C, Cruz-Jentoft A, McCloskey E, Dawson-Hughes B, Kaufman JM, Laslop A, Petermans J, Reginster JY, Rizzoli R, Robinson S, Rolland Y, Rueda R, Vellas B & Kanis JA. (2018). Pitfalls in the measurement of muscle mass: a need for a reference standard. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* **9**, 269-278.
- Calbet JA & MacLean DA. (1997). Role of caloric content on gastric emptying in humans. *J Physiol* **498** (Pt 2), 553-559.
- Campbell WW, Barton ML, Cyr-Campbell D, Davey SL, Beard JL, Parise G & Evans WJ. (1999a). Effects of an omnivorous diet compared with a lactoovovegetarian diet on resistance-training-induced changes in body composition and skeletal muscle in older men. *Am J Clin Nutr* **70**, 1032-1039.
- Campbell WW, Crim MC, Young VR, Joseph LJ & Evans WJ. (1995). Effects of resistance training and dietary protein intake on protein metabolism in older adults. *Am J Physiol* **268**, E1143-1153.
- Campbell WW, Joseph LJ, Anderson RA, Davey SL, Hinton J & Evans WJ. (2002a). Effects of resistive training and chromium picolinate on body composition and skeletal muscle size in older women. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* **12**, 125-135.
- Campbell WW, Joseph LJ, Davey SL, Cyr-Campbell D, Anderson RA & Evans WJ. (1999b). Effects of resistance training and chromium picolinate on body composition and skeletal muscle in older men. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)* **86**, 29-39.
- Campbell WW & Leidy HJ. (2007). Dietary protein and resistance training effects on muscle and body

- composition in older persons. *J Am Coll Nutr* **26**, 696S-703S.
- Campbell WW, Trappe TA, Jozsi AC, Kruskall LJ, Wolfe RR & Evans WJ. (2002b). Dietary protein adequacy and lower body versus whole body resistive training in older humans. *The Journal of Physiology* **542**, 631-642.
- Campbell WW, Trappe TA, Wolfe RR & Evans WJ. (2001). The recommended dietary allowance for protein may not be adequate for older people to maintain skeletal muscle. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **56**, M373-380.
- Capaldo B, Gastaldelli A, Antonello S, Auletta M, Pardo F, Ciociaro D, Guida R, Ferrannini E & Sacca L. (1999). Splanchnic and leg substrate exchange after ingestion of a natural mixed meal in humans. *Diabetes* **48**, 958-966.
- Castaneda C, Charnley JM, Evans WJ & Crim MC. (1995). Elderly women accommodate to a low-protein diet with losses of body cell mass, muscle function, and immune response. *Am J Clin Nutr* **62**, 30-39.
- Cawthon PM, Marshall LM, Michael Y, Dam TT, Ensrud KE, Barrett-Connor E & Orwoll ES. (2007). Frailty in older men: prevalence, progression, and relationship with mortality. *J Am Geriatr Soc* **55**, 1216-1223.
- Cermak NM, Res PT, de Groot L, Saris WHM & van Loon LJC. (2012). Protein supplementation augments the adaptive response of skeletal muscle to resistance-type exercise training: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* **96**, 1454-1464.
- Cesari M, Pahor M, Lauretani F, Zamboni V, Bandinelli S, Bernabei R, Guralnik JM & Ferrucci L. (2009). Skeletal Muscle and Mortality Results From the InCHIANTI Study. *Journals of Gerontology Series a-Biological Sciences and Medical Sciences* **64**, 377-384.
- Chen LK, Liu LK, Woo J, Assantachai P, Auyeung TW, Bahyah KS, Chou MY, Chen LY, Hsu PS, Krairit O, Lee JSW, Lee WJ, Lee Y, Liang CK, Limpawattana P, Lin CS, Peng LN, Satake S, Suzuki T, Won CW, Wu CH, Wu SN, Zhang TM, Zeng P, Akishita M & Arai H. (2014). Sarcopenia in Asia: Consensus Report of the Asian Working Group for Sarcopenia. *J Am Med Dir Assoc* **15**, 95-101.

- Collins PJ, Horowitz M, Cook DJ, Harding PE & Shearman DJ. (1983). Gastric emptying in normal subjects--a reproducible technique using a single scintillation camera and computer system. *Gut* **24**, 1117-1125.
- Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F, Martin FC, Michel JP, Rolland Y, Schneider SM, Topinkova E, Vandewoude M, Zamboni M & European Working Group on Sarcopenia in Older P. (2010). Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing* **39**, 412-423.
- Cuthbertson D, Smith K, Babraj J, Leese G, Waddell T, Atherton P, Wackerhage H, Taylor PM & Rennie MJ. (2005). Anabolic signaling deficits underlie amino acid resistance of wasting, aging muscle. *FASEB J* **19**, 422-424.
- Deutz NE, Bauer JM, Barazzoni R, Biolo G, Boirie Y, Bosy-Westphal A, Cederholm T, Cruz-Jentoft A, Krznaric Z, Nair KS, Singer P, Teta D, Tipton K & Calder PC. (2014). Protein intake and exercise for optimal muscle function with aging: recommendations from the ESPEN Expert Group. *Clin Nutr* **33**, 929-936.
- Elliot TA, Cree MG, Sanford AP, Wolfe RR & Tipton KD. (2006). Milk ingestion stimulates net muscle protein synthesis following resistance exercise. *Med Sci Sports Exerc* **38**, 667-674.
- Evans WJ. (1998). Exercise and nutritional needs of elderly people: effects on muscle and bone. *Gerodontology* **15**, 15-24.
- Farrell HM, Jr., Jimenez-Flores R, Bleck GT, Brown EM, Butler JE, Creamer LK, Hicks CL, Hollar CM, Ng-Kwai-Hang KF & Swaisgood HE. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk--sixth revision. *J Dairy Sci* **87**, 1641-1674.
- Fiatarone MA, O'Neill EF, Ryan ND, Clements KM, Solares GR, Nelson ME, Roberts SB, Kehayias JJ, Lipsitz LA & Evans WJ. (1994). Exercise training and nutritional supplementation for physical frailty in very elderly people. *N Engl J Med* **330**, 1769-1775.
- Finger D, Goltz FR, Umpierre D, Meyer E, Rosa LH & Schneider CD. (2015). Effects of protein supplementation in older adults undergoing resistance training: a systematic review and meta-analysis. *Sports Med* **45**, 245-255.

- Fouillet H, Juillet B, Gaudichon C, Mariotti F, Tome D & Bos C. (2009). Absorption kinetics are a key factor regulating postprandial protein metabolism in response to qualitative and quantitative variations in protein intake. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **297**, R1691-R1705.
- Fox PF & Brodtkorb A. (2008). The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. *International Dairy Journal* **18**, 677-684.
- Frexes-Steed M, Lacy DB, Collins J & Abumrad NN. (1992). Role of leucine and other amino acids in regulating protein metabolism in vivo. *Am J Physiol* **262**, E925-E935.
- Frontera WR, Meredith CN, Oreilly KP, Knuttgen HG & Evans WJ. (1988). STRENGTH CONDITIONING IN OLDER MEN - SKELETAL-MUSCLE HYPERTROPHY AND IMPROVED FUNCTION. *J Appl Physiol* **64**, 1038-1044.
- Frost GS, Brynes AE, Dhillon WS, Bloom SR & McBurney MI. (2003). The effects of fiber enrichment of pasta and fat content on gastric emptying, GLP-1, glucose, and insulin responses to a meal. *Eur J Clin Nutr* **57**, 293-298.
- Fry CS, Drummond MJ, Glynn EL, Dickinson JM, Gundermann DM, Timmerman KL, Walker DK, Dhanani S, Volpi E & Rasmussen BB. (2011). Aging impairs contraction-induced human skeletal muscle mTORC1 signaling and protein synthesis. *Skelet Muscle* **1**, 11.
- Fujita S, Dreyer HC, Drummond MJ, Glynn EL, Volpi E & Rasmussen BB. (2009a). Essential amino acid and carbohydrate ingestion before resistance exercise does not enhance postexercise muscle protein synthesis. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)* **106**, 1730-1739.
- Fujita S, Glynn EL, Timmerman KL, Rasmussen BB & Volpi E. (2009b). Supraphysiological hyperinsulinaemia is necessary to stimulate skeletal muscle protein anabolism in older adults: evidence of a true age-related insulin resistance of muscle protein metabolism. *Diabetologia* **52**, 1889-1898.
- Godard MP, Williamson DL & Trappe SW. (2002). Oral amino-acid provision does not affect muscle strength or size gains in older men. *Med Sci Sports Exerc* **34**, 1126-1131.

- Goodpaster BH, Park SW, Harris TB, Kritchevsky SB, Nevitt M, Schwartz AV, Simonsick EM, Tylavsky FA, Visser M & Newman AB. (2006). The loss of skeletal muscle strength, mass, and quality in older adults: the health, aging and body composition study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **61**, 1059-1064.
- Guo JP, Maurer AH, Fisher RS & Parkman HP. (2001). Extending gastric emptying scintigraphy from two to four hours detects more patients with gastroparesis. *Dig Dis Sci* **46**, 24-29.
- Hartman JW, Tang JE, Wilkinson SB, Tarnopolsky MA, Lawrence RL, Fullerton AV & Phillips SM. (2007). Consumption of fat-free fluid milk after resistance exercise promotes greater lean mass accretion than does consumption of soy or carbohydrate in young, novice, male weightlifters. *Am J Clin Nutr* **86**, 373-381.
- Heitmann BL & Frederiksen P. (2009). Thigh circumference and risk of heart disease and premature death: prospective cohort study. *Br Med J* **339**, 8.
- Hellstrom PM, Gryback P & Jacobsson H. (2006). The physiology of gastric emptying. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* **20**, 397-407.
- Hoffman JR, Ratamess NA, Tranchina CP, Rashti SL, Kang J & Faigenbaum AD. (2009). Effect of protein-supplement timing on strength, power, and body-composition changes in resistance-trained men. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* **19**, 172-185.
- Holt S, Heading RC, Carter DC, Prescott LF & Tothill P. (1979). Effect of gel fibre on gastric emptying and absorption of glucose and paracetamol. *Lancet* **1**, 636-639.
- Holwerda AM, Lenaerts K, Bierau J & van Loon LJC. (2016). Body Position Modulates Gastric Emptying and Affects the Post-Prandial Rise in Plasma Amino Acid Concentrations Following Protein Ingestion in Humans. *Nutrients* **8**.
- Holwerda AM, Overkamp M, Paulussen KJM, Smeets JSJ, van Kranenburg J, Backx EMP, Gijsen AP, Goessens JPB, Verdijk LB & van Loon LJC. (2018). Protein Supplementation after Exercise and before Sleep Does Not Further Augment Muscle Mass and Strength Gains during Resistance Exercise Training in Active Older Men. *J Nutr*.
- Houston DK, Nicklas BJ, Ding JZ, Harris TB, Tylavsky FA, Newman AB, Lee JS, Sahyoun NR, Visser

- M, Kritchevsky SB & Study HA. (2008). Dietary protein intake is associated with lean mass change in older, community-dwelling adults: the Health, Aging, and Body Composition (Health ABC) Study. *Am J Clin Nutr* **87**, 150-155.
- Hudson JL, Paddon-Jones D & Campbell WW. (2017). Whey protein supplementation 2 hours after a lower protein breakfast restores plasma essential amino acid availability comparable to a higher protein breakfast in overweight adults. *Nutr Res* **47**, 90-97.
- Iannuzzi-Sucich M, Prestwood KM & Kenny AM. (2002). Prevalence of sarcopenia and predictors of skeletal muscle mass in healthy, older men and women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **57**, M772-777.
- Iglay HB, Thyfault JP, Apolzan JW & Campbell WW. (2007). Resistance training and dietary protein: effects on glucose tolerance and contents of skeletal muscle insulin signaling proteins in older persons. *Am J Clin Nutr* **85**, 1005-1013.
- Ishikawa-Takata K & Takimoto H. (2018). Current protein and amino acid intakes among Japanese people: Analysis of the 2012 National Health and Nutrition Survey. *Geriatrics & gerontology international*.
- Itoh T, Higuchi T, Gardner CR & Caldwell L. (1986). Effect of particle size and food on gastric residence time of non-disintegrating solids in beagle dogs. *J Pharm Pharmacol* **38**, 801-806.
- Jang SF, Goins BA, Phillips WT, Santoyo C, Rice-Ficht A & McConville JT. (2013). Size discrimination in rat and mouse gastric emptying. *Biopharm Drug Dispos* **34**, 107-124.
- Josse AR, Tang JE, Tarnopolsky MA & Phillips SM. (2010). Body composition and strength changes in women with milk and resistance exercise. *Med Sci Sports Exerc* **42**, 1122-1130.
- Jung KJ, Kimm H, Yun JE & Jee SH. (2013). Thigh circumference and diabetes: obesity as a potential effect modifier. *J Epidemiol* **23**, 329-336.
- Kameyama N, Maruyama C, Matsui S, Araki R, Yamada Y & Maruyama T. (2014). Effects of consumption of main and side dishes with white rice on postprandial glucose, insulin, glucose-dependent insulintropic polypeptide and glucagon-like peptide-1 responses in healthy Japanese men. *Br J Nutr* **111**, 1632-1640.

- Kim IY, Deutz NEP & Wolfe RR. (2017a). Update on maximal anabolic response to dietary protein. *Clin Nutr.*
- Kim IY, Schutzler S, Schrader A, Spencer H, Kortebein P, Deutz NE, Wolfe RR & Ferrando AA. (2015). Quantity of dietary protein intake, but not pattern of intake, affects net protein balance primarily through differences in protein synthesis in older adults. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **308**, E21-28.
- Kim IY, Schutzler S, Schrader A, Spencer HJ, Azhar G, Ferrando AA & Wolfe RR. (2016). The anabolic response to a meal containing different amounts of protein is not limited by the maximal stimulation of protein synthesis in healthy young adults. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **310**, E73-80.
- Kim IY, Shin YA, Schutzler SE, Azhar G, Wolfe RR & Ferrando AA. (2017b). Quality of meal protein determines anabolic response in older adults. *Clin Nutr.*
- Kokkinos PF, Hurley BF, Smutok MA, Farmer C, Reece C, Shulman R, Charabogous C, Patterson J, Will S, Devane-Bell J & et al. (1991). Strength training does not improve lipoprotein-lipid profiles in men at risk for CHD. *Med Sci Sports Exerc* **23**, 1134-1139.
- Koopman R, Crombach N, Gijzen AP, Walrand S, Fauquant J, Kies AK, Lemosquet S, Saris WH, Boirie Y & van Loon LJ. (2009a). Ingestion of a protein hydrolysate is accompanied by an accelerated in vivo digestion and absorption rate when compared with its intact protein. *Am J Clin Nutr* **90**, 106-115.
- Koopman R, Walrand S, Beelen M, Gijzen AP, Kies AK, Boirie Y, Saris WH & van Loon LJ. (2009b). Dietary protein digestion and absorption rates and the subsequent postprandial muscle protein synthetic response do not differ between young and elderly men. *J Nutr* **139**, 1707-1713.
- Kosek DJ, Kim JS, Petrella JK, Cross JM & Bamman MM. (2006). Efficacy of 3 days/wk resistance training on myofiber hypertrophy and myogenic mechanisms in young vs. older adults. *J Appl Physiol* **101**, 531-544.
- Kraemer WJ, Adams K, Cafarelli E, Dudley GA, Dooly C, Feigenbaum MS, Fleck SJ, Franklin B, Fry AC, Hoffman JR, Newton RU, Potteiger J, Stone MH, Ratamess NA & Triplett-McBride T.

- (2002). Joint Position Statement: progression models in resistance training for healthy adults. *Med Sci Sports Exerc* **34**, 364-380.
- Kumar V, Selby A, Rankin D, Patel R, Atherton P, Hildebrandt W, Williams J, Smith K, Seynnes O, Hiscock N & Rennie MJ. (2009). Age-related differences in the dose-response relationship of muscle protein synthesis to resistance exercise in young and old men. *J Physiol* **587**, 211-217.
- Leenders M, Verdijk LB, Van der Hoeven L, Van Kranenburg J, Nilwik R, Wodzig W, Senden JMG, Keizer HA & Van Loon LJC. (2013). Protein Supplementation during Resistance-Type Exercise Training in the Elderly. *Med Sci Sports Exerc* **45**, 542-552.
- Liao CD, Tsao JY, Wu YT, Cheng CP, Chen HC, Huang YC, Chen HC & Liou TH. (2017). Effects of protein supplementation combined with resistance exercise on body composition and physical function in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr* **106**, 1078-1091.
- Luiking YC, Abrahamse E, Ludwig T, Boirie Y & Verlaan S. (2016). Protein type and caloric density of protein supplements modulate postprandial amino acid profile through changes in gastrointestinal behaviour: A randomized trial. *Clin Nutr* **35**, 48-58.
- Mahe S, Roos N, Benamouzig R, Davin L, Luengo C, Gagnon L, Gausserges N, Rautureau J & Tome D. (1996). Gastrojejunal kinetics and the digestion of [15N]beta-lactoglobulin and casein in humans: the influence of the nature and quantity of the protein. *Am J Clin Nutr* **63**, 546-552.
- Mamerow MM, Mettler JA, English KL, Casperson SL, Arentson-Lantz E, Sheffield-Moore M, Layman DK & Paddon-Jones D. (2014). Dietary protein distribution positively influences 24-h muscle protein synthesis in healthy adults. *J Nutr* **144**, 876-880.
- Matsumoto T, Nakamura K, Matsumoto H, Sakai R, Kuwahara T, Kadota Y, Kitaura Y, Sato J & Shimomura Y. (2014). Bolus ingestion of individual branched-chain amino acids alters plasma amino acid profiles in young healthy men. *Springerplus* **3**.
- Medicine Io. (2005). Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrates, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein and Amino Acids. *The National Academies Press* **Washington, DC, USA**.
- Meyer JH, Elashoff J, Porter-Fink V, Dressman J & Amidon GL. (1988). Human postprandial gastric

- emptying of 1-3-millimeter spheres. *Gastroenterology* **94**, 1315-1325.
- Miller JP, Pratley RE, Goldberg AP, Gordon P, Rubin M, Treuth MS, Ryan AS & Hurley BF. (1994). STRENGTH TRAINING INCREASES INSULIN ACTION IN HEALTHY 50-YR-OLD TO 65-YR-OLD MEN. *J Appl Physiol* **77**, 1122-1127.
- Miller PE, Alexander DD & Perez V. (2014). Effects of whey protein and resistance exercise on body composition: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Coll Nutr* **33**, 163-175.
- Minami H & McCallum RW. (1984). The physiology and pathophysiology of gastric emptying in humans. *Gastroenterology* **86**, 1592-1610.
- Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT). (2015). STANDARD TABLES OF FOOD COMPOSITION IN JAPAN - 2015 - (Seventh Revised Version). http://www.mext.go.jp/en/policy/science_technology/policy/title01/detail01/1374030htm.
- Moore DR, Churchward-Venne TA, Witard O, Breen L, Burd NA, Tipton KD & Phillips SM. (2015). Protein Ingestion to Stimulate Myofibrillar Protein Synthesis Requires Greater Relative Protein Intakes in Healthy Older Versus Younger Men. *Journals of Gerontology Series A-Biological Sciences and Medical Sciences* **70**, 57-62.
- Moore DR, Robinson MJ, Fry JL, Tang JE, Glover EI, Wilkinson SB, Prior T, Tarnopolsky MA & Phillips SM. (2009a). Ingested protein dose response of muscle and albumin protein synthesis after resistance exercise in young men. *Am J Clin Nutr* **89**, 161-168.
- Moore DR, Tang JE, Burd NA, Reresch T, Tarnopolsky MA & Phillips SM. (2009b). Differential stimulation of myofibrillar and sarcoplasmic protein synthesis with protein ingestion at rest and after resistance exercise. *J Physiol* **587**, 897-904.
- Morton RW, Murphy KT, McKellar SR, Schoenfeld BJ, Henselmans M, Helms E, Aragon AA, Devries MC, Banfield L, Krieger JW & Phillips SM. (2017). A systematic review, meta-analysis and meta-regression of the effect of protein supplementation on resistance training-induced gains in muscle mass and strength in healthy adults. *Br J Sports Med* **52**, 376-384.
- Muller M, Canfora EE & Blaak EE. (2018). Gastrointestinal Transit Time, Glucose Homeostasis and Metabolic Health: Modulation by Dietary Fibers. *Nutrients* **10**.

- Nakayama K, Kanda A, Tagawa R, Sanbongi C, Ikegami S & Itoh H. (2017). Post-Exercise Muscle Protein Synthesis in Rats after Ingestion of Acidified Bovine Milk Compared with Skim Milk. *Nutrients* **9**.
- Nishioka M, Imaizumi A, Ando T & Tochikubo O. (2013). The overnight effect of dietary energy balance on postprandial plasma free amino acid (PFAA) profiles in Japanese adult men. *PLoS One* **8**, e62929.
- Noguchi Y, Shikata N, Furuhashi Y, Kimura T & Takahashi M. (2008). Characterization of dietary protein-dependent amino acid metabolism by linking free amino acids with transcriptional profiles through analysis of correlation. *Physiol Genomics* **34**, 315-326.
- Paddon-Jones D, Short KR, Campbell WW, Volpi E & Wolfe RR. (2008). Role of dietary protein in the sarcopenia of aging. *Am J Clin Nutr* **87**, 1562S-1566S.
- Park HM, Chernish SM, Rosenek BD, Brunelle RL, Hargrove B & Wellman HN. (1984). Gastric emptying of enteric-coated tablets. *Dig Dis Sci* **29**, 207-212.
- Parkman HP, Urbain JL, Knight LC, Brown KL, Trate DM, Miller MA, Maurer AH & Fisher RS. (1998). Effect of gastric acid suppressants on human gastric motility. *Gut* **42**, 243-250.
- Pennings B, Boirie Y, Senden JM, Gijsen AP, Kuipers H & van Loon LJ. (2011). Whey protein stimulates postprandial muscle protein accretion more effectively than do casein and casein hydrolysate in older men. *Am J Clin Nutr* **93**, 997-1005.
- Pennings B, Groen B, de Lange A, Gijsen AP, Zorenc AH, Senden JM & van Loon LJ. (2012). Amino acid absorption and subsequent muscle protein accretion following graded intakes of whey protein in elderly men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **302**, E992-999.
- Phillips SM. (2004). Protein requirements and supplementation in strength sports. *Nutrition* **20**, 689-695.
- Phillips SM. (2017). Current Concepts and Unresolved Questions in Dietary Protein Requirements and Supplements in Adults. *Frontiers in nutrition* **4**, 10.
- Phillips SM, Tipton KD, Aarsland A, Wolf SE & Wolfe RR. (1997). Mixed muscle protein synthesis and

- breakdown after resistance exercise in humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **273**, E99-E107.
- Phillips SM, Tipton KD, Ferrando AA & Wolfe RR. (1999). Resistance training reduces the acute exercise-induced increase in muscle protein turnover. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **276**, E118-E124.
- Pruessner JC, Kirschbaum C, Meinlschmid G & Hellhammer DH. (2003). Two formulas for computation of the area under the curve represent measures of total hormone concentration versus time-dependent change. *Psychoneuroendocrinology* **28**, 916-931.
- Rand WM, Pellett PL & Young VR. (2003). Meta-analysis of nitrogen balance studies for estimating protein requirements in healthy adults. *Am J Clin Nutr* **77**, 109-127.
- Rasmussen BB, Fujita S, Wolfe RR, Mittendorfer B, Roy M, Rowe VL & Volpi E. (2006). Insulin resistance of muscle protein metabolism in aging. *FASEB J* **20**, 768-769.
- Rieu I, Balage M, Sornet C, Giraudet C, Pujos E, Grizard J, Mosoni L & Dardevet D. (2006). Leucine supplementation improves muscle protein synthesis in elderly men independently of hyperaminoacidaemia. *J Physiol* **575**, 305-315.
- Rosenberg IH. (1997). Sarcopenia: origins and clinical relevance. *J Nutr* **127**, 990s-991s.
- Rousset S, Mirand PP, Brandolini M, Martin JF & Boirie Y. (2003). Daily protein intakes and eating patterns in young and elderly French. *Br J Nutr* **90**, 1107-1115.
- Rutherford SM, Fanning AC, Miller BJ & Moughan PJ. (2015). Protein digestibility-corrected amino acid scores and digestible indispensable amino acid scores differentially describe protein quality in growing male rats. *J Nutr* **145**, 372-379.
- Sahni S, Mangano KM, Hannan MT, Kiel DP & McLean RR. (2015). Higher Protein Intake Is Associated with Higher Lean Mass and Quadriceps Muscle Strength in Adult Men and Women. *J Nutr* **145**, 1569-1575.
- Sayer AA, Syddall H, Martin H, Patel H, Baylis D & Cooper C. (2008). The developmental origins of sarcopenia. *J Nutr Health Aging* **12**, 427-432.

- Schwartz SE, Levine RA, Singh A, Scheidecker JR & Track NS. (1982). Sustained pectin ingestion delays gastric emptying. *Gastroenterology* **83**, 812-817.
- Taaffe DR, Pruitt L, Pyka G, Guido D & Marcus R. (1996). Comparative effects of high- and low-intensity resistance training on thigh muscle strength, fiber area, and tissue composition in elderly women. *Clin Physiol* **16**, 381-392.
- Tan LF, Lim ZY, Choe R, Seetharaman S & Merchant R. (2017). Screening for Frailty and Sarcopenia Among Older Persons in Medical Outpatient Clinics and its Associations With Healthcare Burden. *J Am Med Dir Assoc*.
- Tang JE, Moore DR, Kujbida GW, Tarnopolsky MA & Phillips SM. (2009). Ingestion of whey hydrolysate, casein, or soy protein isolate: effects on mixed muscle protein synthesis at rest and following resistance exercise in young men. *J Appl Physiol* **107**, 987-992.
- Ten Haaf DSM, Nuijten MAH, Maessen MFH, Horstman AMH, Eijsvogels TMH & Hopman MTE. (2018). Effects of protein supplementation on lean body mass, muscle strength, and physical performance in nonfrail community-dwelling older adults: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr* **108**, 1043-1059.
- Thomas DK, Quinn MA, Saunders DH & Greig CA. (2016). Protein Supplementation Does Not Significantly Augment the Effects of Resistance Exercise Training in Older Adults: A Systematic Review. *J Am Med Dir Assoc* **17**, 9.
- Tieland M, Dirks ML, van der Zwaluw N, Verdijk LB, van de Rest O, de Groot LC & van Loon LJ. (2012a). Protein supplementation increases muscle mass gain during prolonged resistance-type exercise training in frail elderly people: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Am Med Dir Assoc* **13**, 713-719.
- Tieland M, van de Rest O, Dirks ML, van der Zwaluw N, Mensink M, van Loon LJ & de Groot LC. (2012b). Protein supplementation improves physical performance in frail elderly people: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Am Med Dir Assoc* **13**, 720-726.
- Timmerman KL, Lee JL, Fujita S, Dhanani S, Dreyer HC, Fry CS, Drummond MJ, Sheffield-Moore M, Rasmussen BB & Volpi E. (2010). Pharmacological vasodilation improves insulin-stimulated

- muscle protein anabolism but not glucose utilization in older adults. *Diabetes* **59**, 2764-2771.
- Tipton KD, Ferrando AA, Phillips SM, Doyle D & Wolfe RR. (1999). Postexercise net protein synthesis in human muscle from orally administered amino acids. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **276**, E628-E634.
- Toth MJ, Matthews DE, Tracy RP & Previs MJ. (2005). Age-related differences in skeletal muscle protein synthesis: relation to markers of immune activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288**, E883-891.
- Tougas G, Eaker EY, Abell TL, Abrahamsson H, Boivin M, Chen J, Hocking MP, Quigley EM, Koch KL, Tokayer AZ, Stanghellini V, Chen Y, Huizinga JD, Ryden J, Bourgeois I & McCallum RW. (2000). Assessment of gastric emptying using a low fat meal: establishment of international control values. *Am J Gastroenterol* **95**, 1456-1462.
- Trumbo P, Schlicker S, Yates AA & Poos M. (2002). Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. *J Am Diet Assoc* **102**, 1621-1630.
- Verdijk LB, Jonkers RA, Gleeson BG, Beelen M, Meijer K, Savelberg HH, Wodzig WK, Dendale P & van Loon LJ. (2009). Protein supplementation before and after exercise does not further augment skeletal muscle hypertrophy after resistance training in elderly men. *Am J Clin Nutr* **89**, 608-616.
- Vist GE & Maughan RJ. (1995). The effect of osmolality and carbohydrate content on the rate of gastric emptying of liquids in man. *J Physiol* **486 (Pt 2)**, 523-531.
- Volpi E, Kobayashi H, Sheffield-Moore M, Mittendorfer B & Wolfe RR. (2003). Essential amino acids are primarily responsible for the amino acid stimulation of muscle protein anabolism in healthy elderly adults. *Am J Clin Nutr* **78**, 250-258.
- Volpi E, Mittendorfer B, Wolf SE & Wolfe RR. (1999). Oral amino acids stimulate muscle protein anabolism in the elderly despite higher first-pass splanchnic extraction. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **277**, E513-E520.
- Wahren J, Felig P & Hagenfeldt L. (1976). Effect of protein ingestion on splanchnic and leg metabolism in normal man and in patients with diabetes mellitus. *J Clin Invest* **57**, 987-999.

- WHO/FAO/UNU. (2007). Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition: Report of a Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation. In *Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition: Report of a Joint Who/Fao/Unu Expert Consultation*, pp. 1-270. World Health Organization, Geneva.
- Wilkinson DJ, Hossain T, Hill DS, Phillips BE, Crossland H, Williams J, Loughna P, Churchward-Venne TA, Breen L, Phillips SM, Etheridge T, Rathmacher JA, Smith K, Szewczyk NJ & Atherton PJ. (2013). Effects of leucine and its metabolite beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on human skeletal muscle protein metabolism. *J Physiol* **591**, 2911-2923.
- Witard OC, Jackman SR, Breen L, Smith K, Selby A & Tipton KD. (2014). Myofibrillar muscle protein synthesis rates subsequent to a meal in response to increasing doses of whey protein at rest and after resistance exercise. *Am J Clin Nutr* **99**, 86-95.
- Wolfe RR. (2002). Regulation of Muscle Protein by Amino Acids. *The Journal of Nutrition* **132**, 3219S-3224S.
- Wolfe RR, Baum JI, Starck C & Moughan PJ. (2018). Factors contributing to the selection of dietary protein food sources. *Clin Nutr* **37**, 130-138.
- Wolfe RR, Miller SL & Miller KB. (2008). Optimal protein intake in the elderly. *Clin Nutr* **27**, 675-684.
- Yang JC, Chi YJ, Burkhardt BR, Guan YF & Wolf BA. (2010). Leucine metabolism in regulation of insulin secretion from pancreatic beta cells. *Nutr Rev* **68**, 270-279.
- Yang Y, Breen L, Burd NA, Hector AJ, Churchward-Venne TA, Josse AR, Tarnopolsky MA & Phillips SM. (2012). Resistance exercise enhances myofibrillar protein synthesis with graded intakes of whey protein in older men. *Br J Nutr* **108**, 1780-1788.
- 総務省. (2018). 平成 29 年度人口推計. <https://www.stat.go.jp/data/jinsui/2017np/indexhtml>.
- 日本栄養・食糧学会. (2015). 栄養・食糧学用語辞典 第 2 版. 建帛社, 68-69.
- 菱田, 明 & 佐々木, 敏. (2014). 日本人の食事摂取基準 2015 年版. 第一出版株式会社.

