

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：32604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500865

研究課題名(和文) 介護予防運動プログラムと抗酸化栄養素の併用は加齢性骨格筋減弱抑制に有効か

研究課題名(英文) Effects of antioxidant nutrient supplementation with exercise program on prevention of sarcopenia.

研究代表者

高波 嘉一 (TAKANAMI, Yoshikazu)

大妻女子大学・家政学部・教授

研究者番号：40206777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：今後本格的な超高齢化を迎えるわが国において、効果的な介護予防対策は喫緊の課題である。本研究では、加齢性骨格筋減弱の効果的な予防策として、抗酸化栄養素であるアスタキサンチンが運動の効果を補完する可能性を明らかにするために検討を行った。廃用性筋萎縮ラットを用いた実験により、アスタキサンチンに筋萎縮抑制効果が認められた。中高齢女性を対象とした研究では、運動プログラムにタンパク質やアスタキサンチン摂取を併用した場合、骨格筋量は変化しなかったが、筋機能は運動単独に比べて改善することが示された。本研究により、運動とアスタキサンチン摂取の併用がフレイル(高齢者の虚弱)予防に有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the beneficial effects of antioxidant nutrient supplementation with exercise program on prevention of sarcopenia. Experiments using animal model revealed inhibitory effect of astaxanthin on disuse muscular atrophy. Astaxanthin supplementation in combination with exercise program improved physical and muscular function of elderly women despite skeletal muscle mass did not change. These results suggest that astaxanthin in combination with exercise program may be an effective measure to prevent frailty in elderly.

研究分野：応用健康科学

キーワード：介護予防 フレイル サルコペニア 廃用性筋萎縮 酸化ストレス 慢性炎症 アスタキサンチン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) わが国は、今後本格的な超高齢化時代を迎える。高齢者が健康で自立した状態をできるだけ長く維持し、社会活動を行いつつ日常生活を続けていくことは、個人にとっても社会全体にとっても極めて意義深いことである。これまで、要介護状態になるのを予防しようという介護予防の取り組みが社会全体で推し進められているが、必ずしも十分に満足できる成果が得られているとはいえないのが現状である。

(2) 要介護状態に至るには多くの因子がかかることがわかっているが、骨格筋タンパク質合成低下による加齢性骨格筋減弱(サルコペニア)はその中心的な要因の一つである。サルコペニア発症には加齢による生理的変化に加えて、身体不活動や低栄養が深く関与する。さらに最近注目されているのが、サルコペニア発症における酸化ストレスと慢性炎症の関与である(Meng S and Yu L. Int.J.Mol.Sci. 2010)。酸化ストレスは細胞内の様々な分子を傷害し、またミトコンドリア機能障害を引き起こすことでアポトーシスの引き金となる一方、転写因子などを介した炎症性シグナルの増幅により、骨格筋タンパク質合成低下と分解促進をもたらす。しかし、適切な運動や食事条件によりこのような状態が改善する可能性も指摘されている。

(3) 運動トレーニングは骨格筋タンパク質合成を賦活化するだけでなく、酸化ストレスや慢性炎症の改善にも有効とされている。したがって加齢性骨格筋減弱の予防策としては、適切な運動トレーニングが第一選択となる。しかし虚弱高齢者の場合、単独で骨格筋減弱抑制を期待できるほどの高強度の運動実施は、実際上困難と考えられる。そこで栄養の面から運動効果を補完できる可能性を持つ栄養素として、抗酸化作用と抗炎症作用を併せ持つアスタキサンチンの効果が期待される。

## 2. 研究の目的

(1) ラットの廃用性筋萎縮モデルを用いた動物実験により、アスタキサンチンの筋萎縮抑制効果とそのメカニズムを明らかにする。

(2) 高齢者を対象に、運動を中心とした介護予防プログラムへの参加とアスタキサンチン摂取の併用が、高齢者の酸化ストレスおよび慢性炎症を改善し、骨格筋減弱を効果的に抑制しうるかどうかを詳細に検討し、介護予防の新たなストラテジーを提案する基盤となる研究を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 7週齢のWister系雄ラットを48匹(1群6匹)使用し、1週間の予備飼育後、アスタキサンチン(0.02%)食群、コントロール食

群に分け、各群を坐骨神経除神経手術群、疑似手術(シャム)群に分けた。手術は試験飼料摂取開始2週間後に行い、筋採取は手術3日後または5日後に行った。

飼育期間の最終日は、麻酔を施したのち、両後肢からヒラメ筋を採取した。採取後直ちにヒラメ筋重量を測定した。体重の個体差が筋重量の差に与える影響を排除するため、筋重量比を以下の通り求めた。

筋重量比=手術足(左足)筋重量÷未処置足(右足)筋重量

また、採取したヒラメ筋組織をサンプルとして、Cu,Zn-SOD、Mn-SOD、Mafbox、MuRF1、TNF- $\alpha$  の mRNA 発現量を、Applied Biosystems の 7300Real-time PCR Systems を用いて、SYBR Green 法にて、内部標準として用いた  $\beta$ -actin との相対比により求めた。

(2) 高齢者を対象に、運動を中心とした介護予防プログラムへの参加が骨格筋に及ぼす影響を評価する場合、タンパク質の摂取不足がない状態で検討する必要があると考えられたので、まずこの点を明らかにすることとした。主治医から許可の得られた中高齢女性9名(73.1 $\pm$ 8.3歳)を対象とし、これを2群に分け、片方を運動+卵白タンパク質飲料(タンパク質6g/日)摂取併用群(EP群:4名)もう一方を運動単独群(E群:5名)とした。対象者には、週1回介護予防運動プログラム(2時間/回:有酸素運動+マシンを利用した筋力トレーニング)への参加を3ヶ月間継続してもらった。プログラム実施期間前後の2回、体力測定、体組成測定(InBody730)、唾液採取を行った。唾液サンプルは凍結保存後、後日コルチゾールの測定に供した。

主治医から許可が得られ、栄養(特にタンパク質)不足状態ではない中高齢女性(71 $\pm$ 8.2歳)を対象とした。対象者には、週1回介護予防運動プログラム(2時間/回:有酸素運動+マシンを利用した筋力トレーニング)への参加を3ヶ月間継続してもらった。プログラム期間中は、アスタキサンチンを1日12mg、サプリメントで服用してもらった。3ヶ月間のプログラム実施期間前後の2回、体力測定、体組成測定(InBody730)、酸化ストレスマーカー測定のための早朝一番尿採取を行った。

## 4. 研究成果

(1) 筋萎縮に対するアスタキサンチンの効果:手術3日後のヒラメ筋の相対筋重量比は、対照群と比較してコントロール除神経群で有意に低く、アスタキサンチン除神経群では有意差はみられなかった(図1)。また手術5日後のヒラメ筋の相対筋重量比も、対照群と比較してコントロール除神経群で有意に低く、アスタキサンチン除神経群では有意差はみられなかった(図2)。つまり、コントロー

ル食では、除神経により有意に筋量が減少しており、筋萎縮が認められたが、アスタキサンチン食ではその筋萎縮が抑制されたといえる。

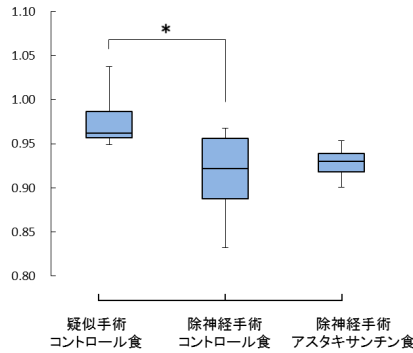


図1 除神経手術3日後のヒラメ筋の相対筋重量比

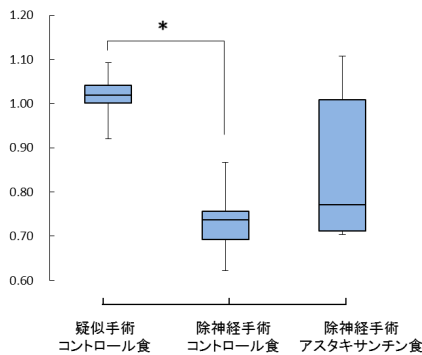


図2 除神経手術5日後のヒラメ筋の相対筋重量比

すなわち、アスタキサンチンの摂取は、除神経動物モデルにおける廃用性筋萎縮を抑制するものと考えられた。この結果より、アスタキサンチンはヒトにおける加齢性骨格筋減弱予防効果を期待しうる食品因子であることが示唆された。

・アスタキサンチンの筋萎縮抑制効果のメカニズムの検討：

まず、筋タンパク質分解経路のユビキチン-プロテアソーム系に関わる指標として Mafbox、MuRF1 に着目し、ヒラメ筋における mRNA 発現量を測定した。除神経手術3日後、5日後共に、コントロール除神経群とアスタキサンチン除神経群との間で Mafbox、MuRF1 の mRNA 発現量に有意差は認められなかった(表1, 2)。すなわち、廃用性筋萎縮の早期段階において、アスタキサンチン摂取のユビキチンリガーゼ遺伝子発現に対する影響はみられなかった。

また、抗酸化酵素である Cu,Zn-SOD、Mn-SOD に着目し、ヒラメ筋における mRNA 発現量を測定した。除神経手術3日後、5日後共に、コントロール除神経群とアスタキサンチン除神経群との間で Cu,Zn-SOD、Mn-SOD の mRNA 発現量に有意差は認めら

れなかった(表1, 2)。すなわち、廃用性筋萎縮の早期段階において、アスタキサンチン摂取の抗酸化酵素への影響はみられなかった。

さらに、炎症マーカーとしてよく知られている TNF- $\alpha$  に着目し、ヒラメ筋における mRNA 発現量を測定した。除神経手術3日後、5日後共に、コントロール除神経群とアスタキサンチン除神経群との間で TNF- $\alpha$  の mRNA 発現量に有意差は認められなかった(表1, 2)。すなわち、廃用性筋萎縮の早期段階において、アスタキサンチン摂取の炎症指標への影響はみられなかった。

表1 除神経手術3日後のヒラメ筋 mRNA 発現量

	疑似手術 コントロール食	除神経手術 コントロール食	除神経手術 アスタキサンチン食	P値
Mafbox	1.0 $\pm$ 0.59	2.0 $\pm$ 0.85	2.6 $\pm$ 1.86	0.451
MuRF1	1.0 $\pm$ 0.29	1.7 $\pm$ 0.83	3.9 $\pm$ 2.70	0.111
Cu, Zn-SOD	1.0 $\pm$ 0.39	1.6 $\pm$ 1.11	3.5 $\pm$ 2.50	0.114
Mn SOD	1.0 $\pm$ 0.61	0.7 $\pm$ 0.52	1.1 $\pm$ 1.22	0.529
TNF- $\alpha$	1.0 $\pm$ 0.73	0.9 $\pm$ 0.30	1.5 $\pm$ 0.46	0.350

mean  $\pm$  SD

表2 除神経手術5日後のヒラメ筋 mRNA 発現量

	疑似手術 コントロール食	除神経手術 コントロール食	除神経手術 アスタキサンチン食	P値
Mafbox	1.0 $\pm$ 0.68	3.2 $\pm$ 3.76	3.8 $\pm$ 1.92	0.751
MuRF1	1.0 $\pm$ 0.21	3.1 $\pm$ 1.79	3.6 $\pm$ 2.22	0.725
Cu, Zn-SOD	1.0 $\pm$ 0.87	1.5 $\pm$ 0.80	1.0 $\pm$ 0.18	0.360
Mn SOD	1.0 $\pm$ 0.85	0.3 $\pm$ 0.15	0.5 $\pm$ 0.35	0.190
TNF- $\alpha$	1.0 $\pm$ 0.31	0.8 $\pm$ 0.47	1.0 $\pm$ 0.61	0.550

mean  $\pm$  SD

以上の廃用性筋萎縮モデルを用いた動物実験結果をまとめると、アスタキサンチンの摂取は、除神経による廃用性筋萎縮を抑制した。しかし筋萎縮に重要な役割を果たすユビキチン・プロテアーゼ系や、抗酸化酵素、炎症マーカーにはアスタキサンチン摂取の影響がみられず、その効果のメカニズムを明らかにすることはできなかった。今後さらに別の筋萎縮にかかわるシグナル経路への影響や、タンパク質発現、タンパク質リン酸化状態などへの影響も詳細に検討することで、アスタキサンチンの筋萎縮予防効果のメカニズムを明らかにする必要があると考える。

(2) 対象者全員が、3ヶ月間の介護予防運動プログラムを最後まで実施した。体重は、プログラム前後で E 群が 49.2  $\pm$  5.5 kg から 48.8  $\pm$  5.8 kg、EP 群が 54.8  $\pm$  11.7 kg から 55.4  $\pm$  10.3 kg と、両群とも変化は認められなかった。BMI も、プログラム前後で E 群が 21.5  $\pm$  1.7 kg/m<sup>2</sup> から 21.3  $\pm$  1.8 kg/m<sup>2</sup>、EP 群が 22.3  $\pm$  2.8 kg/m<sup>2</sup> から 22.6  $\pm$  2.3 kg/m<sup>2</sup> と、両群で変化は認められなかった。全身の骨格筋量は、プログラム前後で E 群が 18.3  $\pm$  1.5 kg から 18.9  $\pm$  1.4 kg、EP 群が 20.2  $\pm$  3.6 kg から 20.2  $\pm$  3.6 kg と、両群とも変化は

認められなかった (表 3)。

表3 対象者の体組成の変化

	運動単独群		運動+卵白タンパク質摂取併用群	
	プログラム前	プログラム後	プログラム前	プログラム後
身長 (cm)	151.2 ± 2.8		156.0 ± 7.3	
体重 (kg)	49.2 ± 5.5	48.8 ± 5.8	54.8 ± 11.7	55.4 ± 10.3
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	21.5 ± 1.7	21.3 ± 1.8	22.3 ± 2.8	22.6 ± 2.3
体脂肪率 (%)	28.6 ± 5.1	26.0 ± 4.0	29.5 ± 6.0	30.7 ± 5.7
骨格筋量 (kg)	18.3 ± 1.5	18.9 ± 1.4	20.2 ± 3.6	20.2 ± 3.6

mean ± SD

また、体幹、右腕、左腕、右脚、左脚の筋量も同様に、両群で変化は認められなかった。すなわち、週 1 回 3 ヶ月間の介護予防運動プログラムで、明らかな体組成の変化は認められず、また卵白タンパク質摂取の効果もみられなかった。

体力測定の結果をみると、まず握力は、プログラム前後で E 群では 19.6 ± 3.3 kg から 19.7 ± 2.7 kg と変化なかったが、EP 群では 22.0 ± 3.5 kg から 23.6 ± 3.1 kg と、EP 群で筋力値の上昇が認められた。開眼片足立ちテストは、プログラム前後で E 群が 28.4 ± 25.8 秒から 38.5 ± 19.6 秒、EP 群が 24.1 ± 21.8 秒から 36.7 ± 19.3 秒と、両群で静的バランスの改善が認められた。5m 最大歩行テストは、E 群では 3.1 ± 0.3 秒から 3.0 ± 0.2 秒、EP 群では 3.1 ± 0.4 秒から 2.9 ± 0.2 秒と、EP 群で歩行能力の改善が認められた。TUG テストは、E 群では 7.1 ± 1.2 秒から 7.4 ± 0.6 秒と変化なかったが、EP 群では 7.9 ± 0.4 秒から 6.6 ± 0.1 秒と、EP 群で複合的動作能力の改善が認められた (表 4)。

表4 対象者の体力測定結果

	運動単独群		運動+卵白タンパク質摂取併用群	
	プログラム前	プログラム後	プログラム前	プログラム後
握力 (kg)	19.6 ± 3.3	19.7 ± 2.7	22.0 ± 3.5	23.6 ± 3.1
ファンクショナルリーチ (cm)	33.5 ± 2.3	36.8 ± 3.2	36.9 ± 3.1	33.5 ± 5.2
開眼片足立ち時間 (sec)	28.4 ± 25.8	38.5 ± 19.6	24.1 ± 21.8	36.7 ± 19.3
5m通常歩行 (sec)	3.7 ± 0.4	3.3 ± 0.2	3.6 ± 0.4	3.6 ± 0.3
5m最大歩行 (sec)	3.1 ± 0.3	3.0 ± 0.2	3.1 ± 0.4	2.9 ± 0.2
Timed Up & Go (sec)	7.2 ± 1.2	7.4 ± 0.6	7.9 ± 0.4	6.6 ± 0.1

mean ± SD

ストレスのバイオマーカーである唾液中コルチゾール濃度を EP 群で測定したところ、プログラム前後で 3.02 ± 0.50 pg/μg protein から 2.80 ± 1.22 pg/μg protein と、改善が認められた。

以上の結果より、3 ヶ月間という比較的短期間の運動プログラムであっても、タンパク質の摂取が不足しないよう配慮した上で実施することにより、筋力や歩行能力、複合的動作能力が改善することが示唆された。この結果を踏まえて、3 ヶ月間の介護予防運動プログラムとアスタキサンチンの併用効果を検討する本実験においても、被験者にタンパク質の積極的な摂取を促した上で参加してもらうこととした。

対象者全員が、3 ヶ月間の介護予防運動プログラムを最後まで実施した。体重は、プログラム前後で 52.0 ± 11.0 kg から 52.0 ± 11.2 kg と、変化は認められなかった。BMI も、プログラム前後で 22.1 ± 1.9 kg/m<sup>2</sup> から 22.1 ± 1.9 kg/m<sup>2</sup> と、変化が認められなかった。全身の骨格筋量は、プログラム前後で 19.0 ± 5.0 kg から 18.6 ± 4.8 kg と、変化は認められなかった (表 5)。また、体幹、右腕、左腕、右脚、左脚の筋量も同様に変化は認められなかった。

表5 対象者の体組成の変化

	運動+アスタキサンチン摂取併用群	
	プログラム前	プログラム後
身長 (cm)	151.7 ± 10.9	
体重 (kg)	52.0 ± 11.0	52.0 ± 11.2
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.1 ± 1.9	22.1 ± 1.9
体脂肪率 (%)	30.7 ± 6.8	31.8 ± 6.4
骨格筋量 (kg)	19.0 ± 5.0	18.6 ± 4.8

mean ± SD

体力測定の結果をみると、まず握力は、プログラム前後で 21.3 ± 4.1 kg から 22.0 ± 3.7 kg と、筋力値の上昇傾向が認められた。開眼片足立ちテストは、プログラム前後で 30.1 ± 27.6 秒から 31.1 ± 25.5 秒と、静的バランスの改善傾向が認められた。TUG テストは、8.0 ± 2.0 秒から 7.5 ± 1.8 秒と、複合的動作能力の改善傾向が認められた (表 6)。

表6 対象者の体力測定結果

	運動+アスタキサンチン摂取併用群	
	プログラム前	プログラム後
握力 (kg)	21.3 ± 4.1	22.0 ± 3.7
ファンクショナルリーチ (cm)	34.3 ± 5.7	35.3 ± 7.0
開眼片足立ち時間 (sec)	30.1 ± 27.6	31.1 ± 25.5
5m通常歩行 (sec)	3.7 ± 0.7	3.7 ± 0.8
5m最大歩行 (sec)	3.1 ± 0.5	3.2 ± 0.9
Timed Up & Go (sec)	8.0 ± 2.0	7.5 ± 1.8

mean ± SD

さらに尿中酸化ストレスマーカーについて検討した。尿中 8-OHdG は、プログラム前後で 6.4 ± 1.8 ng/mg creatinine から 7.5 ± 2.7 ng/mg creatinine と変化がみられなかった。しかし尿中ヘキサノイルリジンは、プログラム前後で 24.2 ± 14.4 pmol/mg protein から 15.1 ± 6.5 pg/μg protein、また尿中バイオピリンは、0.78 ± 0.39 μmol/g creatinine から 0.59 ± 0.19 μmol/g creatinine と減少傾向を示しており、運動プログラムにアスタキサンチンを併用したことで、酸化ストレスが抑制されたものと考えられた。(表 7)

表7 尿中酸化ストレスマーカー測定結果

	運動+アスタキサンチン摂取併用群	
	プログラム前	プログラム後
8-OHdG (ng/mg creatinine)	6.4 ± 1.8	7.5 ± 2.7
ヘキサノイルリジン (pmol/mg creatinine)	24.2 ± 14.4	15.1 ± 6.5
バイオピリン (μmol/g creatinine)	0.78 ± 0.39	0.59 ± 0.19

mean ± SD

以上の、中高齢女性に対する3ヶ月間の運動プログラムとアスタキサンチン摂取の併用効果に関する検討結果をまとめると、骨格筋量を始めとする体組成の改善は明らかでなかった。しかし、酸化ストレスが抑制され、筋機能、身体機能の改善効果が認められた。

上記のヒトを対象として加齢性骨格筋萎縮抑制効果を検討した研究結果をまとめると、介護予防運動プログラムは、単独でも身体機能改善に一定の効果を示した。しかし、タンパク質の摂取増大やアスタキサンチン摂取の併用により、さらに明確な筋機能、身体機能の改善効果を示した。一方で骨格筋量に対する改善効果は、介入期間が3ヶ月間と短期間であったこともあり、明らかにすることができなかった。今後はより長期の介入期間を設定し、対象者数を増やして検討することや、高齢男性を対象として介護予防運動プログラムとアスタキサンチン摂取の併用効果を検討することなどで、アスタキサンチン摂取の有用性をより明確にできるものと考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 1件)

高波 嘉一 他、診断と治療社、酸化ストレスの医学、2014、403-409

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

なし

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

高波 嘉一 (TAKANAMI, Yoshikazu)  
大妻女子大学・家政学部・教授

研究者番号：40206777

##### (2)研究分担者

川合 ゆかり (KAWAI, Yukari)  
公益財団法人レイ・バスターール医学研究センター・基礎研究部・研究員  
研究者番号：80530253

青井 渉 (AOI, Wataru)  
京都府立大学・生命環境科学研究科(系)・助教  
研究者番号：60405272

村瀬 訓生 (MURASE, Norio)  
東京医科大学・医学部・講師  
研究者番号：10317894