

乳タンパク質および乳タンパク質由来ペプチドの
水分補給機能に関する研究

日本大学大学院生物資源科学研究科

伊藤健太郎

2016

目次

略語のリスト.....	1
緒論.....	2
第1章 乳タンパク質の水分保持効果と脱水症予防飲料の開発.....	5
第1節 緒言.....	5
第2節 材料および方法.....	6
第3節 結果.....	9
第4節 考察.....	11
第5節 小括.....	14
図表.....	15
第2章 ホエイペプチドの小腸における水分吸収促進効果.....	27
第1節 緒言.....	27
第2節 材料および方法.....	28
第3節 結果.....	31
第4節 考察.....	32
第5節 小括.....	34
図表.....	36
第3章 ホエイペプチド配合飲料の脱水症治療効果.....	44
第1節 緒言.....	44
第2節 材料および方法.....	45
第3節 結果.....	46
第4節 考察.....	48
第5節 小括.....	51
図表.....	52
総括.....	59

謝辞.....	60
引用文献.....	61

略語のリスト

4-AMBA	4-アミノメチル安息香酸
AA	アミノ酸混合物
ANG II	アンジオテンシン II
ANP	心房性ナトリウム利尿ペプチド
AQP	アクアポリン
BCAA	分岐鎖アミノ酸
CD	対照飲料
DW	蒸留水
GLUT	グルコーストランスポーター
L-NAME	N ω -nitro-L-arginine methyl ester
MPD	乳タンパク質強化飲料
NO	一酸化窒素
PepT1	ペプチドトランスポーター1
PR	フェノールレッド
PS	生理食塩水
SD	糖質・電解質配合スポーツ飲料
SGLT1	Na ⁺ ・グルコース共輸送体
SP	大豆ペプチド
STZ	ストレプトゾトシン
WP	ホエイペプチド
WPD	ホエイペプチド配合飲料

緒論

水は生体を構成する主要な物質の一つであり、ヒトでは体重の約 60%を占めている。生体内の水分は、細胞内液と細胞外液の二つに大きく分類することができる。細胞外液には血漿、間質液などの種類がある。生体内において水分は、栄養素と酸素を体内の各組織に運搬すること、老廃物を運搬し排出すること、および体温調節などの重要な働きをしている。

体内の水分量が不足した状態を脱水症と言う。ヒトは脱水症に陥ると、発汗ができなくなるとともに皮膚血流が低下するため、体温調節機能が抑制される¹⁾。したがって、暑熱環境下での作業やスポーツなどにおいて、脱水症を治療せずに放置すると熱中症の原因となる。その他にも、脱水症はスポーツにおけるパフォーマンスの低下^{2,4)}、疲労^{5,6)}、認知機能の低下⁷⁾、羊水過少症^{8,9)}、分娩遅延⁹⁾、尿路結石¹⁰⁾、尿路感染症¹¹⁾、便秘¹²⁾、血栓塞栓症¹³⁾、および冠動脈性心疾患¹⁴⁾など、様々な疾患・症状との関係が示唆されている。そのため、水分補給により脱水症を予防・治療することは重要である。

近年、日本では毎年約 5 万人が熱中症に罹患している¹⁵⁾。また、熱中症による死亡者は年々増加の傾向にあり¹⁶⁾、社会的な問題となっている。ここで、熱中症患者は年齢別に見ると 65 歳以上の高齢者が多く¹⁶⁾、人口あたりの発生率でも高齢者が高い。これは高齢者が脱水症になりやすいことが関係していると考えられる。すなわち、高齢者は、体内の総水分量が減少していること、口渴中枢機能の低下により喉の渇きを感じにくくなること、食事摂取量の減少により飲食物から摂取する水分量が減少すること、および腎機能の低下により排出される水分量が多くなることなどから、脱水症になりやすいと考えられている^{17,18)}。今後、社会の高齢化が進展することにより、高齢者の熱中症患者の増加が予想され、水分補給飲料の重要性がますます高まると考えられる。

脱水症に対応した水分補給飲料には、摂取した水分が体内に長く保持される効果(水分保持効果)、および体内への水分吸収が速やかであることという、2つの要件が求められると考えられる。脱水症の予防のために日常摂取する飲料には水分保持効果が、脱水症の治療のために摂取する飲料には速やかな水分吸収が、特に求められる機能であると考えられる。

水分保持には、腎臓における水および Na^+ の再吸収の機能が関わっており、細胞外液量と細胞外液の浸透圧とが密接に関係している。浸透圧は主にバソプレシンによって、細胞外液量は主にアルドステロンによって調節される。バソプレシンは腎臓における水再吸収を促進する働きをもつ。細胞外液の浸透圧が高まると、視床下部の浸透圧受容器により認識され、バソプレシンを分泌することにより尿量を抑制し、浸透圧を調節する。この浸透圧調節系が正常に働いている場合は、細胞外液の浸透圧に最も寄与している Na^+ の量が細胞外液量をほぼ決定していると言える。細胞外液量が低下した場合、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系が働く。アルドステロンは、腎臓での Na^+ 再吸収を促進する働きをし、体内の Na^+ 量を調節することで、細胞外液量を調節していると言える。また、心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) も細胞外液量の調節に関与している。血液量の増大によって心房壁が伸展されると ANP が放出される。ANP は腎臓に作用し、 Na^+ 利尿をもたらす細胞外液量を減少させるよう調節する。

小腸における水分吸収に関しては、 Na^+ とグルコースの吸収が関与している事が報告されている^{19,20)}。水分の吸収は腸管壁内外の浸透圧差を駆動力としており、小腸組織の Na^+ ・グルコース共輸送体 (SGLT1) による Na^+ とグルコースの吸収が、浸透圧差の形成に対して大きく寄与すると考えられている。水分子は、タイトジャンクションやアクアポリン (AQP) を経由して吸収されると考えられている。AQP は、水チャネルとして働くタンパク質である。AQP は 2 つのサブグループに分類することができる。一つは、水のみを選択的に透過させるもの (AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP6, および AQP8)²¹⁾、もう一つは、水の他にグリセロールや尿素などの低分子も透過させるもの (AQP3, AQP7, AQP9, および AQP10)²²⁾ である。小腸組織では、頂端膜側に AQP10²³⁾、基底膜側に AQP3²⁴⁾ が発現しており、水分吸収に関係している可能性が示唆されている。

小腸での水分吸収は、いくつかのホルモンによって調節を受けることが報告されている。アンジオテンシン II (ANG II) には、小腸での水分吸収を調節する作用があることも報告されている^{25,26)}。また ANP には、空腸における水分吸収を抑制する作用が報告されている^{27,28)}。これらのホルモンにより、体内の水分状態に応じて、小腸における水分吸収が調節されていることが示唆される。また、シグナル伝達物質として働く一酸化窒素 (NO) も、小腸での水分吸収に関わっ

ていることが示唆されている。NO 合成の前駆体であるアルギニンは、水分吸収を阻害する²⁹⁾。また、このアルギニンの効果は、NO 合成酵素阻害剤である N ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)により打ち消される²⁹⁾。一方、L-NAME の投与は用量依存的に水分吸収を阻害するという報告もある³⁰⁾。

これまで、水分補給飲料の機能に関しては電解質と糖質の効果を中心として研究がされてきたが、タンパク質についての研究は未だ多くない。タンパク質は消化管においてプロテアーゼによりペプチドや遊離アミノ酸に分解されて吸収される。SGLT1 による Na⁺およびグルコースの吸収が水分吸収に関与するのと同様、ペプチドトランスポーターによるペプチド吸収も水分吸収に関与していることを示唆する報告がある^{31,32)}。

牛乳は、古くから良い栄養源として利用されてきた。牛乳は、約 3%のタンパク質(乳タンパク質)を含む。乳タンパク質は 20°Cで pH4.6 にしたときに沈殿する成分であるカゼインと上澄液に残るホエイタンパク質に大別される。カゼインは摂取後、胃内で酸により固形化するため、ホエイタンパク質と比較して胃内からの排出が遅いという特徴を有する³³⁾。乳タンパク質は、大豆タンパク質よりも筋合成促進効果が高いことを示唆する報告がある³⁴⁻³⁶⁾。また、ホエイタンパク質はロイシンなどの分岐鎖アミノ酸を多く含み、カゼインよりも筋タンパク質合成促進効果、筋力向上効果が高い^{37,38)}。ホエイタンパク質を酵素により分解したホエイペプチドは、ホエイタンパク質よりもさらに吸収が速く³⁹⁾、筋タンパク質合成促進効果も高い⁴⁰⁾。また、ホエイペプチド^{41,42)}およびホエイタンパク質中の成分であるラクトフェリン⁴³⁾、 α -ラクトアルブミン⁴⁴⁾は抗炎症作用等の生理機能を有することが報告されている。

本研究では、乳タンパク質および乳タンパク質由来ペプチドの一つであるホエイペプチドの水分補給における機能を研究した。水分補給は、脱水症になる前に予防として行うケースと、脱水症になった後に治療目的で行うケースに大別できる。本研究では、乳タンパク質の水分保持および乳タンパク質由来ペプチドの水分吸収促進に対する機能を明らかにし、脱水症の予防および治療のための水分補給法に応用することを目的とする。

第1章 乳タンパク質の水分保持効果と脱水症予防飲料の開発

第1節 緒言

運動や暑熱環境での作業により体内に溜まった熱の放出のため、ヒトは発汗や皮膚血流の促進により体温調節を行う。発汗は効率の良い体温調節を可能とするが、脱水症を引き起こすリスクもある。脱水状態では発汗ができなくなるとともに皮膚血流が低下し、体温調節機能が抑制される¹⁾。したがって、熱中症の予防のためには水分補給により脱水症を防ぐことが重要である。脱水症を予防するために日常または運動等の前に摂取する飲料には、腸管から吸収された水分が尿としてすぐに排泄されるのではなく、体温調節に備えて体内に保持されることが求められる。水分保持効果の高い飲料を、暑熱環境下での作業や運動等の前に摂取することで、脱水症の予防効果が期待できる。

水分保持効果に関しては多くの研究が行われており、飲料への $\text{Na}^{+45)}$ や糖質⁴⁶⁾の添加が水分保持効果を高めることが報告されている。これらの報告は、十分な水分保持効果を得るためには、 Na^{+} は約50 mM、糖質は約12%(w/v)の濃度が必要であることを示唆している。しかし、脱水症予防のために日常的に使用する飲料には、これらの Na^{+} や糖質の濃度は高すぎると考えられる。日常的な Na^{+} の過剰摂取は高血圧⁴⁷⁾を、糖質の過剰摂取は糖尿病や高中性脂肪血症⁴⁸⁾を引き起こす危険性があるためである。一方、乳タンパク質にも水分保持効果があり、その効果は重量比で糖質よりも大きいという報告がある⁴⁹⁾。乳タンパク質を強化した飲料は、 Na^{+} や糖質の濃度を低く抑えながら、高い水分保持効果を有することが期待でき、脱水症予防を目的とした日常的な摂取に有用だと考えられる。

本章では、乳タンパク質の水分保持効果に着目し、脱水症予防のために日常的に摂取可能な水分補給飲料を提案することを目的として研究を行った。まず、乳タンパク質中のカゼインおよびホエイタンパク質の水分保持効果の比較、乳タンパク質濃度と水分保持効果の関係について検討を行った。次に、乳タンパク質を強化した飲料(Milk protein-enriched drink; MPD)の水分保持効果の評価のため、蒸留水(DW)や水分補給飲料として広く使用されている糖質・電解

質配合スポーツ飲料(SD)を対照として比較した。さらに、インスリンの腎における水再吸収促進効果に着目し、MPDの水分保持効果の機序について考察した。

第2節 材料および方法

試験試料

実験1では、カゼイン(和光純薬, 大阪; タンパク質 91.2%(w/w), 脂質 1.0%(w/w), 糖質 0.0%(w/w), ナトリウム 1.1%(w/w), 水分 4.8%(w/w))およびチーズホエイ由来のホエイタンパク質濃縮物(Fonterra, Auckland, New Zealand; タンパク質 91.9%(w/w), 脂質 0.3%(w/w), 糖質 0.6%(w/w), ナトリウム 0.5%(w/w), 水分 5.1%(w/w))を使用した。実験2では、乳タンパク質濃縮物(Fonterra, Auckland, New Zealand; タンパク質 77.2%(w/w), 脂質 1.2%(w/w), 糖質 9.2%(w/w), ナトリウム 0.1%(w/w), 水分 5.3%(w/w))を使用し、乳タンパク質の濃度が1, 5 および 10%(w/v)の水溶液を調製した。乳タンパク質以外の成分の水分保持効果への寄与を調べるため、5%水溶液に関しては、限外ろ過によりタンパク質を除去した水溶液を調製した。限外ろ過には、分画分子量が3,000Daのフィルター(Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany)を用いた。ろ液のタンパク質濃度はビシンコニン酸法(Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, U.S.A.)で測定した結果、タンパク質除去率は95%であった。実験3～実験6には、SDおよびMPDを用いた(Table 1-1)。

実験動物および飼育条件

7週齢の雄性SD系ラットを使用した(日本エスエルシー, 静岡)。ラットは、温度 $21.0\pm 2.0^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55.0\pm 15.0\%$ 、照明1日12時間(午前7時～午後7時)に環境調節を施した飼育室において飼育した。ラットには、CRF-1固型飼料(オリエンタル酵母工業, 東京)及びUV殺菌水を自由に摂取させた。各実験は、購入後1週間以上の馴化期間をおいてから実施した。

なお、本研究は、株式会社明治動物実験倫理委員会の定める動物実験における倫理規定に則って実施した。

実験 1 カゼインとホエイタンパク質の水分保持効果の比較

水分保持効果は, Ishihara らの方法⁵⁰⁾を参考に評価した。すなわち, ラットを用いて飲料の経口投与後の尿排泄量の測定により評価した。

ラットを約 20 時間の絶食および 4 時間の絶水をさせた後, 蒸留水, 5%カゼイン溶液, または 5%ホエイタンパク質溶液を 6 mL 経口投与し, 尿採取用のケージに移した。経口投与後 4 時間まで 30 分おきに尿を採取し, 尿排泄量を測定した。

実験 2 乳タンパク質濃度と水分保持効果の関係

実験 1 と同様の方法で, 経口投与および尿排泄量の測定を行った。試験試料として, 蒸留水, 1%, 5%, 10%乳タンパク質水溶液または 5%乳タンパク質水溶液の限外ろ過液を用いた。

実験 3 MPD の水分保持効果

実験 1 と同様の方法で, 経口投与および尿排泄量の測定を行った。試験試料として, DW, SD または MPD を用いた。

経口投与前, 経口投与後 2 時間および 4 時間後に伏在静脈より採血した。血液は, 自動血球分析装置 (XT-1800i; Sysmex, 神戸) を用いてヘマトクリット値およびヘモグロビン濃度の測定に用いた。ヘマトクリット値およびヘモグロビン濃度から経口投与前から経口投与 4 時間後の血漿変化量を求めた⁵¹⁾。残りの血液は, ヘパリン処理後遠心分離し, 血漿を調製した。また, 経口投与 4 時間後の採血終了後にイソフルラン吸入麻酔下で開腹し, 胃および小腸を摘出して内容物を採取した。内容物は凍結乾燥し, 内容物中の水分重量を測定した。

血漿中のクレアチニン濃度を, フジドライケム(富士フィルム, 東京)により, 尿中クレアチニン濃度をクレアチニン測定キット(和光純薬, 大阪)により測定した。

腎における水の再吸収率を, 次式⁵²⁾により計算した。

水の再吸収率(%)

$$= (1 - \text{尿生成量(mL/min)} / \text{糸球体濾過量(mL/min)}) \times 100$$

$$\doteq (1 - \text{尿生成量(mL/min)} / \text{クレアチニンクリアランス(mL/min)}) \times 100$$

$$= (1 - \text{血漿中クレアチニン濃度(mg/dL)}/\text{尿中クレアチニン濃度(mg/dL)}) \times 100$$

なお、糸球体濾過量としてクレアチンクリアランスを用いた。

実験 4 MPD 投与後の血漿中アルドステロンおよびバソプレシン濃度

ラットを約 20 時間の絶食および 4 時間の絶水をさせた後、DW, SD または MPD を 6 mL 経口投与した。経口投与 1 時間後にイソフルラン吸入麻酔下にて腹部大動脈より採血した。血液は、ヘパリン処理後遠心分離し、血漿を調製した。血漿中のアルドステロン濃度をラジオイムノアッセイ (LSI メディエンス, 東京) により、バソプレシン濃度を ELISA (Phoenix Pharmaceuticals, CA, U.S.A.) により測定した。

実験 5 MPD 投与後の血漿中インスリン推移

ラットを約 20 時間の絶食および 4 時間の絶水をさせた後、DW, SD または MPD を 6 mL 経口投与した。経口投与前および投与後に経時的に伏在静脈より採血した。血液は、ヘパリン処理後遠心分離し、血漿を調製した。血漿中のインスリン濃度を ELISA (森永生化学研究所, 横浜) で測定した。

実験 6 MPD の水分保持効果に対するインスリンの関与

MPD の水分保持効果に対するインスリンの関与を検討するため、ストレプトゾトシン (STZ) によりインスリン分泌能を欠損させたラットを用いた。STZ はグルコースと類似の構造を有するアルキル化剤系抗腫瘍薬である。STZ はグルコーストランスポーター (GLUT) 2 によりグルコースと同様に細胞内に取り込まれるが、他のタイプの GLUT には認識されない^{53, 54}。インスリンを産生する膵 β 細胞には GLUT2 が高発現しているため、STZ は膵 β 細胞へ比較的高い選択毒性を有する。

ラットに STZ または溶媒 (100 mM クエン酸緩衝液, pH4.5) を 50 mg/kg (10 mL/kg) 腹腔内投与した。腹腔内投与から 7 日後、空腹時血糖値が 270 mg/dL 以上の個体を選抜し、実験 1 と同様の方法で水分保持効果を評価した。ただし、STZ 投与群と溶媒投与群の間に体重の違いが

認められたため、実験 6 では試験飲料の投与量を 20 mL/kg とし、水分排泄率(水分投与量に対する尿排泄量の比)を評価した。試験飲料として、DW または MPD を 20 mL/kg 経口投与し、4 時間後まで尿排泄量を測定した。経口投与前、投与 30, 120, および 240 分後に伏在静脈より経時採血を行った。腎における水再吸収率を実験 3 と同様の方法で測定した。

統計解析

各種測定値及び計算値は平均値±標準誤差で表した。統計解析は、Bartlett の検定で分散性を検定した後、等分散性が仮定できる場合は Tukey-Kramer の検定、等分散性が仮定できない場合は Steel-Dwass の検定を用いた。いずれの検定も有意水準は両側 5% とした。これらの検定には、統計学的検定ソフト(StatLight; Yukms, 川崎)を使用した。

第 3 節 結果

実験 1 カゼインとホエイタンパク質の水分保持効果の比較

各測定時間における累積の尿排泄量を Fig. 1-1 に示す。カゼインおよびホエイタンパク質は、経口投与 90, 120, 150, 180, 210 および 240 分後において、蒸留水と比較して有意な低値を示した($p<0.05$)。カゼインとホエイタンパク質の間に有意差は認められなかった。

実験 2 乳タンパク質濃度と水分保持効果の関係

各測定時間における累積の尿排泄量を Fig. 1-2 に示す。乳タンパク質 5% 水溶液は、90 分後と 150 分後で、蒸留水と比較して有意な低値を示した($p<0.05$)。乳タンパク質 10% 水溶液は、60 分後から 240 分後までの全ての時間において蒸留水と比較して有意な低値を示した($p<0.05$)。一方、乳タンパク質 1% 水溶液は、いずれの時間においても蒸留水との間に有意差は見られなかった。また、乳タンパク質 5% 水溶液は乳タンパク質 5% 水溶液の限外ろ過液に対して 90 分後および 150 分後に有意な低値を示した($p<0.05$)。乳タンパク質 5% 水溶液の限外ろ過液と蒸留水との間に有意差は見られなかった。

実験 3 MPD の水分保持効果

各測定時間における累積の尿排泄量を Fig. 1-3 に示す。90 分後から 240 分後まで、MPD は SD および DW と比較して有意な高値を示した ($p<0.05$)。また、90 分後から 240 分後まで、SD は DW と比較して有意な高値を示した ($p<0.05$)。

尿中 Na^+ 濃度、尿中 Na^+ 排泄量を Table 1-2 に示す。尿中 Na^+ 濃度は、MPD は SD および DW と比較して有意な高値を示した ($p<0.05$)。また、SD は DW と比較して有意な高値を示した ($p<0.05$)。SD と MPD の Na^+ 排泄量は同程度であり、DW と比較して高値傾向を示したが、いずれの群間にも有意差は認められなかった。

試験終了後の胃および小腸内容物中の水分量を Table 1-3 に示す。胃内容物の水分量は、DW と比較して SD および MPD が高値を示したが、投与量と比較して残存量はわずかであった。小腸内容物の水分量については、群間の有意差は確認されず、残存量はわずかであった。

経口投与前と経口投与 4 時間後でのヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度の変化量から血漿変化量を測定した。いずれの群においても血漿変化量は正の値を示したが、群間には統計学的な有意差は確認されなかった(データは省略)。

水の再吸収率を Fig. 1-4 に示す。MPD は、DW および SD と比較し、有意な高値を示した ($p<0.05$)。

実験 4 MPD 投与後の血漿中アルドステロン濃度

各飲料投与 1 時間後の血漿中アルドステロンおよびバソプレシン濃度を Fig. 1-5 に示す。アルドステロンは、MPD が DW と比較して有意な低値を示した ($p<0.05$)。一方、バソプレシンは、群間に有意差は認められなかった。

実験 5 MPD 投与後のインスリン推移

血漿中インスリン濃度の推移を Fig. 1-6 に示す。SD および MPD では投与後にインスリンが上昇し、30 分後にピークを示した。30 および 90 分後において、MPD は、SD および DW と比較して有意な高値を示した ($p<0.05$)。

実験 6 MPD の水分保持効果に対するインスリンの関与

水分排泄率を Fig. 1-7 に示す。正常ラットでは、経口投与 60, 90, 120, 180 および 240 分後において MPD が DW に対して有意な低値を示した ($p<0.05$)。一方、STZ 投与ラットでは、いずれの時点においても MPD と DW の間に有意な差は認められなかった。

腎での水再吸収率を Fig. 1-8 に示す。正常ラットにおいて MPD を投与した群が他の 3 群と比較して有意な高値を示した ($p<0.05$)。

経口投与 30 分後の血漿インスリン値を Fig. 1-9 に示す。正常ラットでは MPD が DW と比較して有意な高値を示した ($p<0.05$)。一方、STZ 投与ラットはいずれも正常ラットの DW 摂取後よりも有意な低値を示した ($p<0.05$)。

第 4 節 考察

カゼインおよびホエイタンパク質は同等の強さの水分保持効果を示したこと (Fig. 1-1) から、水分保持効果は乳タンパク質の種類に依存しないことが示唆された。ホエイタンパク質とカゼインは、アミノ酸配列や分子量、構造等が違うだけではなく、経口摂取した際には胃排出速度にも違いがある³³⁾ことから、これは予想外の結果であった。カゼインとホエイタンパク質の効果に差が見られなかった理由として、1) カゼインも投与 40 分以前から吸収され、血中アミノ酸が高値を示す³³⁾ことから、水分保持効果の評価系のタイムスケールにおいては差が生じなかった、または、2) 後述するように、乳タンパク質の水分保持効果はインスリン分泌促進と関係していると考えられるが、カゼインまたはホエイタンパク質摂取後の血中インスリン濃度推移に差は認められないという報告があり³³⁾、水分保持効果には差が生じなかった可能性が考えられる。

カゼインとホエイタンパク質の水分保持効果に差が認められなかったことから、以降の検討においては、風味や高い筋タンパク質合成促進効果³⁴⁻³⁶⁾などの面から飲料への応用に適している乳タンパク質を用いた。乳タンパク質の水分保持効果は、濃度依存的に高まることが示された (Fig. 1-2)。また、乳タンパク質による有意な水分保持効果を得るためには、飲料中の乳タンパク質濃度は約 5% 必要であることが示唆された。

今回の試験に使用した乳タンパク質には、微量の Na^+ や糖質が含まれている。 $\text{Na}^{+45)}$ や糖質⁴⁶⁾には水分保持効果があることが報告されているため、乳タンパク質水溶液の水分保持効果に、糖質や Na^+ が影響している可能性がある。そこで、5%乳タンパク質水溶液については、限外ろ過によりタンパク質を除去した水溶液との比較を行った。その結果、タンパク質を除去した水溶液の水分保持効果は蒸留水と同等で、乳タンパク質水溶液より効果が低いことを確認した (Fig. 1-2)。この結果から、5%乳タンパク質水溶液の水分保持効果に対する Na^+ や糖質の寄与は小さいことが確認された。

これらの結果から、約 5%の乳タンパク質を含む飲料は、水分保持効果が高いことが期待された。そこで次に、約 5%の乳タンパク質を配合した MPD の水分保持効果を、DW および既存の水分補給飲料である SD と比較した。その結果、MPD 摂取後の尿排泄量は最も低く (Fig. 1-3)、MPD の水分保持効果が高いことが示された。

SD および MPD の水分含量は、それぞれ 96%、92%であり、DW とは水の投与量に若干の差があった。しかし、今回の尿排泄量の結果は試験飲料ごとに大きく異なり、試験飲料中の水分含量の違いの影響は十分に小さいと推察される。なお、DW の水分投与量を MPD に合わせた際の影響を調べるため、6 mL の DW を投与した場合と、5.5 mL の DW を投与 (MPD を 6 mL 投与した際の水分量に相当) した場合の尿排泄量を比較したところ、240 分後の尿排泄量に有意差は認められなかった (データは省略)。

水分が体内に吸収されずに消化管内に残っている場合、摂取した水分を、発汗や皮膚血流量増加による体温調節のために、すぐに利用することができない。しかし、試験終了後の胃および小腸内容物中の水分量は、投与量に比べて十分低かったことから (Table 1-3)、遅くとも投与 4 時間後には、DW や SD と同様に、投与した MPD の水分の多くは体内に吸収されたと考えられる。

各飲料摂取後の血漿変化量を測定した結果、いずれの群においても、4 時間後の血漿量が増加していることが示唆された。MPD は他の飲料と比較して血漿変化量が高い傾向を示したが、統計学的な有意差は確認されなかった (データは省略)。血漿変化量では大きな群間差が認められなかった原因として、吸収された水分の多くが血漿ではなく、もう一つの細胞外液、すなわ

ち間質液の増加に寄与した可能性も考えられる。間質液の適度な増加は脱水症の予防となると考えられる。なぜなら、軽度な脱水により血漿量が減少した場合、間質液から血漿へと水分の移動が起こり、血漿量が維持される⁵⁵⁾ためである。なお、間質液が多量に増えた場合には浮腫が生じるが、今回の試験において4時間後の解剖時の観察では、各組織に浮腫などの異常は確認されず、安全な摂取量であったことが示唆された。MPD投与後に血漿、間質液および細胞内液の量がどのように変化しているかに関しては、今後の検討課題の一つである。

水分保持の機序としては、腎における水および Na^+ の再吸収が関係している可能性が考えられる。そこで、腎での水再吸収率を推定した。その結果、MPDはDWと比較して、投与後の腎での水再吸収率が高値を示した(Fig. 1-4)。一方、MPDはSDと Na^+ の投与量と排泄量が同程度であることから(Table 1-2)、 Na^+ の再吸収が促進したとは考えにくい。MPDの水分保持効果に対して、腎での水再吸収は大きく寄与しているが、 Na^+ 再吸収の寄与は比較的小さいと考えられる。

DWとMPDの水再吸収率の差は約1%であった。この程度の水再吸収率の差であっても、尿排泄量には大きな影響を及ぼす。例えば、イヌに利尿剤を投与した研究⁵⁶⁾では、0.57%の水再吸収率の変化により2倍以上の尿排泄量の違いを示した。

各試験飲料投与1時間において、水分保持に大きく関係すると考えられる血漿中アルドステロンおよびバソプレシン濃度を測定した(Fig. 1-5)。アルドステロンは腎での Na^+ 再吸収を、バソプレシンは水再吸収を促進する。MPDの水分保持効果にこれらのホルモンが関与している場合、これらのホルモンは高値を示すと考えられたが、結果はそれに反するものであった。したがって、MPDの水分保持は、アルドステロンおよびバソプレシンでは説明がつかず、その他の要因が存在することが示唆された。アルドステロンは細胞外液量が低下した際に分泌が促進される。したがって、アルドステロンの結果は、MPDの細胞外液量がDWと比較してより増加していることを反映していると考えられる。バソプレシンは細胞外液量の低下でも分泌されるが、特に血漿浸透圧の変化に対して鋭敏に反応することが知られている。したがって、バソプレシンの結果は、経口投与後1時間の時点においては、血漿浸透圧に大きな差がないことを示唆している。

今回、MPDは、DWおよびSDと比較して、投与後に有意に高い血漿インスリン濃度を示すことを確認した(Fig. 1-6)。この結果には、乳タンパク質のインスリン分泌促進効果⁵⁷⁾が大きく寄与していると考えられる。ところで、インスリンは生体内で血糖値調節の他にも様々な役割を果たしており、腎における水再吸収を促進する効果があることを示唆する報告がある。ウサギの近位尿管⁵⁸⁾、ラットの内部髄質集合管⁵⁹⁾を用いた検討で、インスリンに水再吸収を高める効果があることが報告されている。また、腎における水再吸収はAQP2に依存しているが、マウスの集合管細胞を用いた検討で、インスリンはAQP2の発現を高める効果が確認されている⁶⁰⁾。したがって、MPD投与後の高い水再吸収率に、乳タンパク質によるインスリン分泌も寄与している可能性が考えられる。

MPDの水分保持効果に対するインスリンの関与を検討するため、STZによりインスリン分泌能を欠損させたラットを用いた。STZ投与ラットではMPDの水分保持効果が認められなかった(Fig. 1-7)。また、STZ投与ラットにおいては、正常ラットと異なり、MPD摂取後の腎での水再吸収率が高値を示さなかった(Fig. 1-8)。なお、STZラットでは、MPD投与後にインスリンが分泌されなかったことから、インスリン分泌能が欠損していることが確認できた(Fig. 1-9)。これらの結果から、MPDの水分保持効果に対して、インスリン分泌による腎での水再吸収促進が関与している可能性が示された。

第5節 小括

乳タンパク質中のカゼインおよびホエイタンパク質は同等の水分保持効果を有すること、乳タンパク質の水分保持効果が用量依存的であることをラット試験で明らかにした。その効果を水分補給飲料に応用するために、乳タンパク質強化飲料を調製し、水分保持効果を確認したところ、蒸留水や一般的なスポーツ飲料よりも効果が高いことを明らかにし、脱水症予防に有効である可能性を示した。その作用機序として、インスリンによる腎での水再吸収促進が関与している可能性を示した。

图表

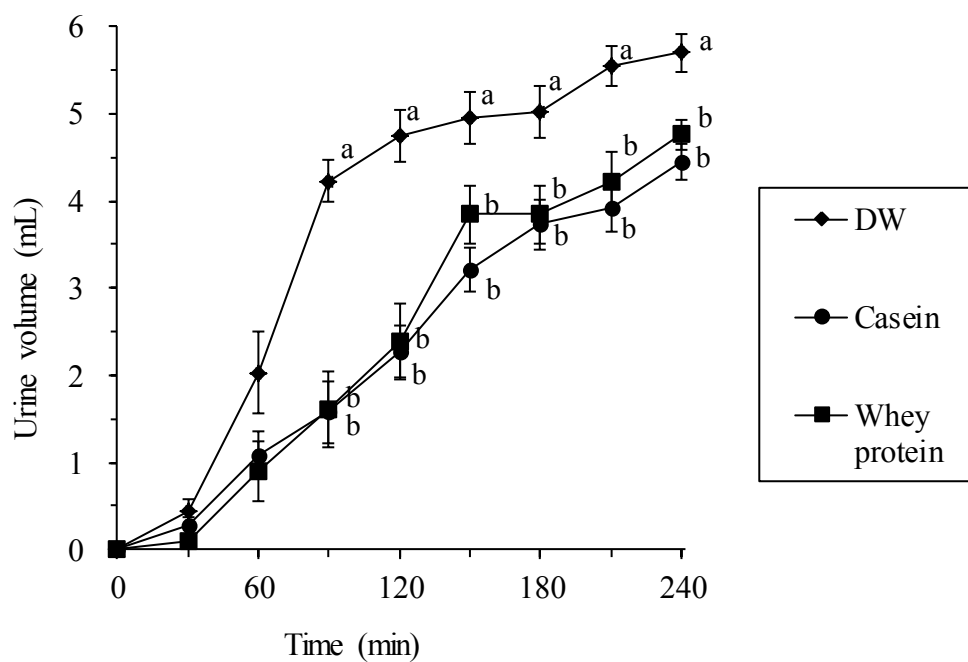


Fig. 1-1. Changes of cumulative urine excretion after the administration of casein and whey protein solutions.

Rats were starved for 20 h and deprived of water for 4 h, followed by an oral administration of 6 mL of one of the test solutions. Their urine was collected and the urine volume was measured for 4 h. DW, distilled water. Each value is expressed as mean \pm SEM (n=8). Values without a common letter differ significantly ($p < 0.05$).

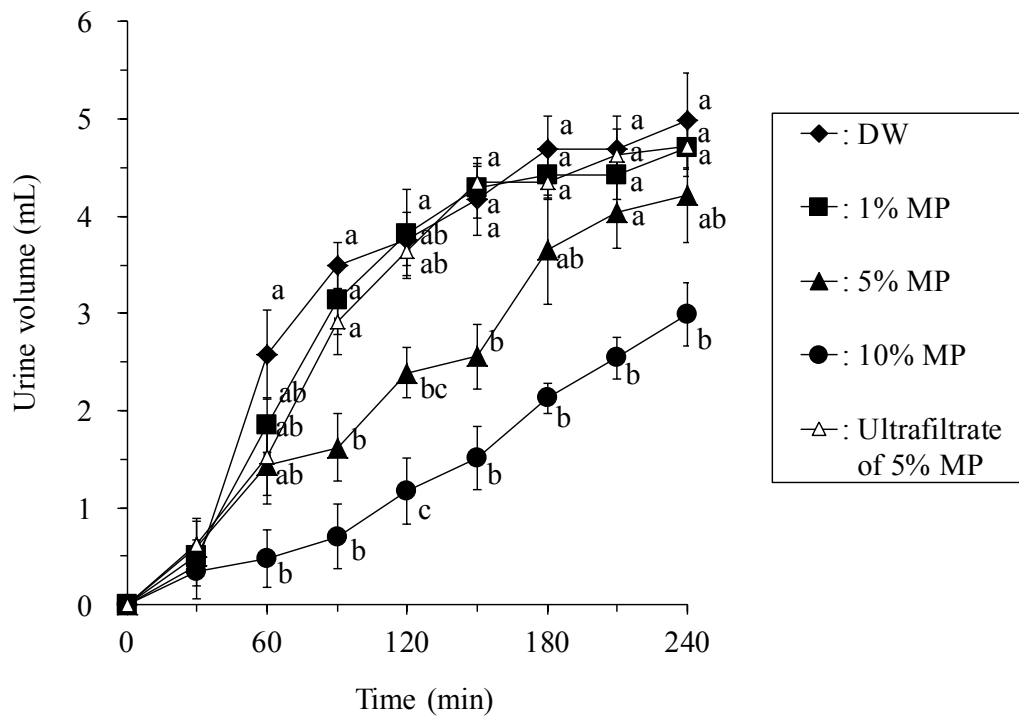


Fig. 1-2. Changes of cumulative urine excretion after the administration of milk protein solutions and its ultrafiltered solution.

Urine volumes were measured as described in the Fig. 1-1 legend. DW, distilled water; MP, milk protein. Each value is expressed as mean \pm SEM (n=8–9). Values without a common letter differ significantly ($p < 0.05$).

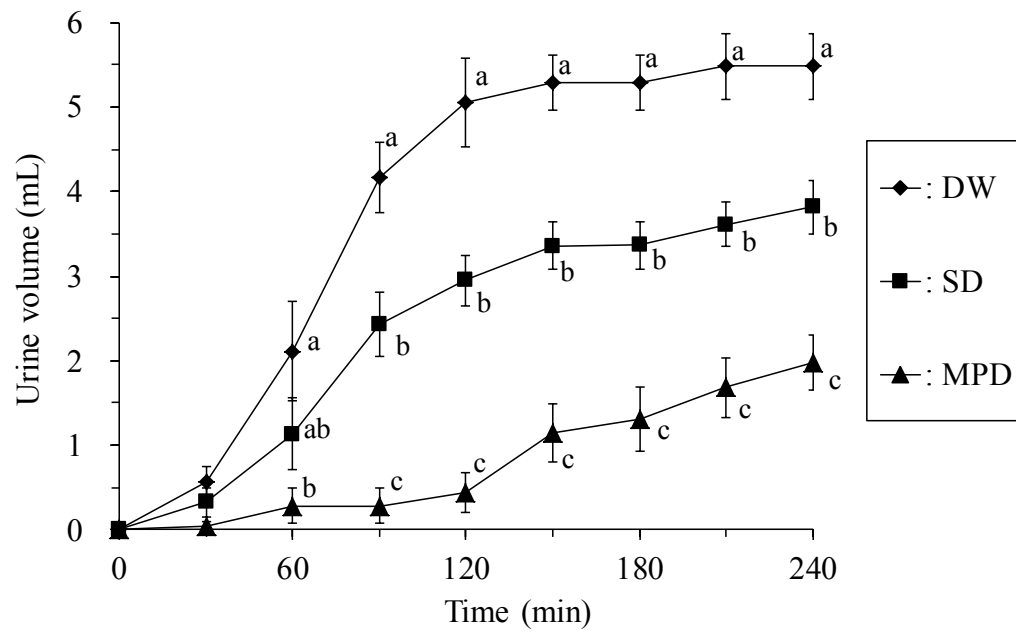


Fig. 1-3. Changes of cumulative urine excretion after the administration of experimental drinks.

Urine volumes were measured as described in the Fig. 1-1 legend. DW, distilled water; SD, sports drink; MPD, milk protein-enriched drink. Each value is expressed as mean \pm SEM (n=7). Values without a common letter differ significantly ($p < 0.05$).

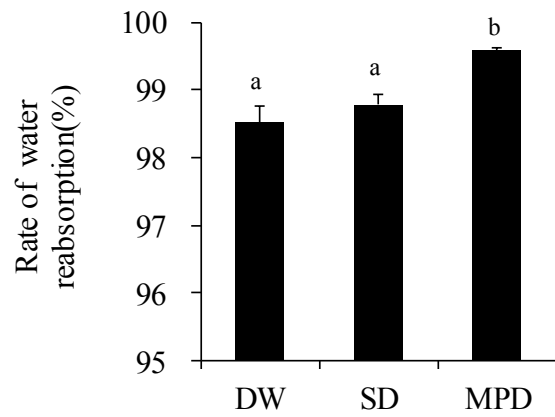


Fig. 1-4. Rate of water reabsorption after the administration of experimental drinks.

Water reabsorption rates in the renal tubules were calculated along with creatinine clearance and the urine production rate. Each value is expressed as mean \pm SEM (n=7). Values without a common letter differ significantly ($p < 0.05$).

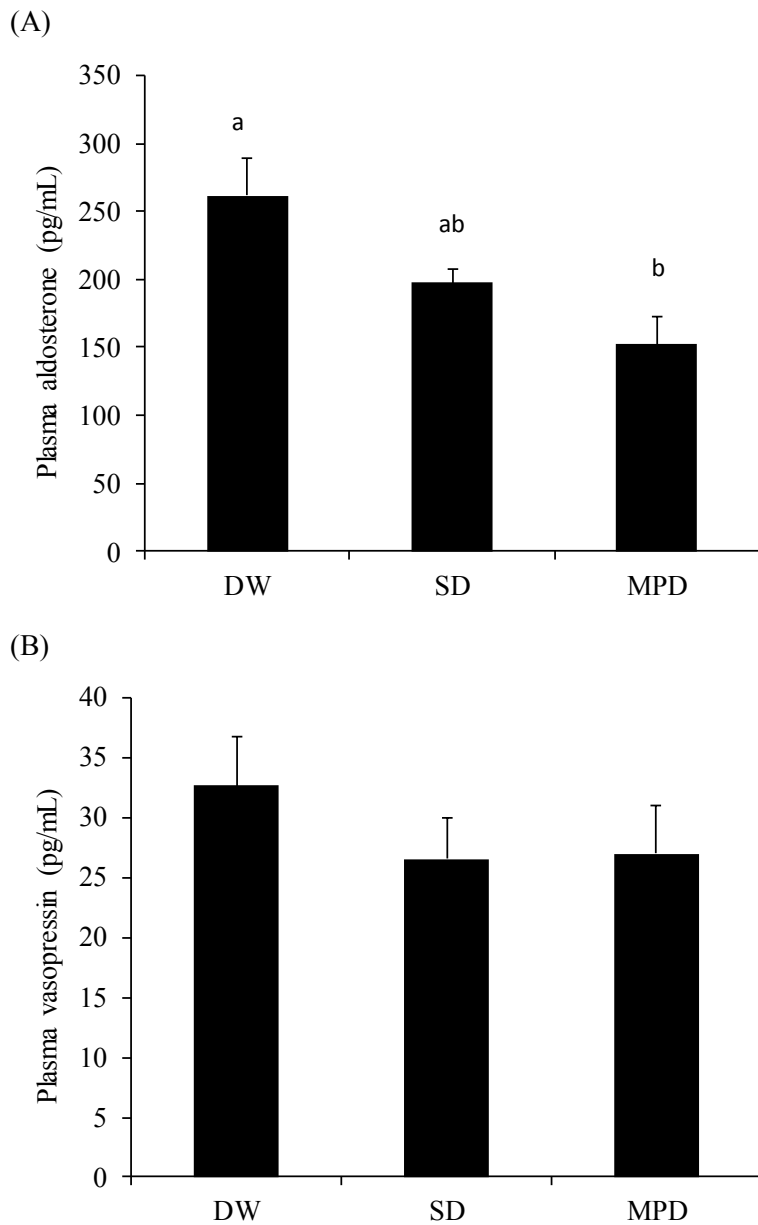


Fig. 1-5. Plasma aldosterone and vasopressin after the administration of the three experimental drinks.

Rats were starved for 20 h and deprived of water for 4 h, followed by an oral administration of 6 mL of one of the experimental drinks. Blood samples were taken at 1 h after the administration of the experimental drinks and the plasma aldosterone and vasopressin were measured. Each value is expressed as mean \pm SEM (n=10). Values without a common letter differ significantly ($p < 0.05$).

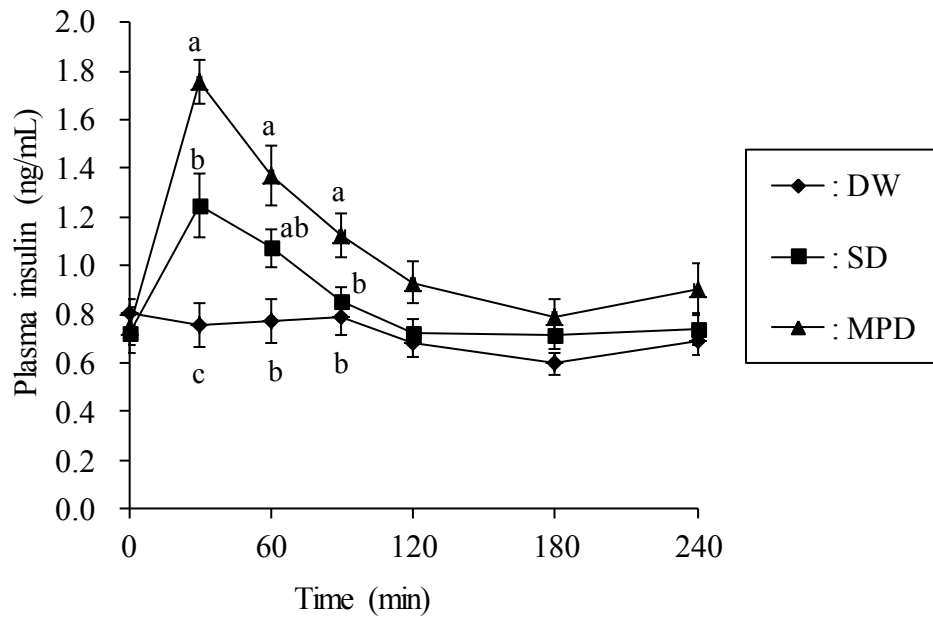


Fig. 1-6. Changes of plasma insulin after the administration of the three experimental drinks.

Rats were starved for 20 h and deprived of water for 4 h, followed by an oral administration of 6 mL of one of the experimental drinks. Blood samples were taken sequentially and the plasma insulin concentration was measured. Each value is expressed as mean \pm SEM (n=7). Values without a common letter differ significantly ($p < 0.05$).

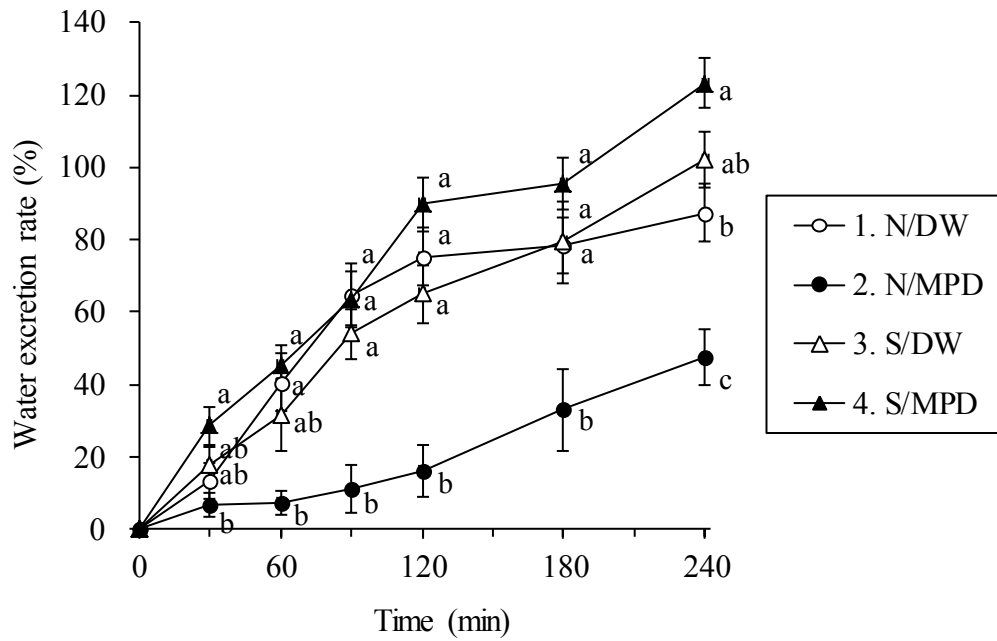


Fig. 1-7. Changes of water excretion rate after the administration of the experimental drinks.

Urine volumes were measured as described in the Fig. 1-1 legend. The data were expressed as water excretion rate. N, normal rats; S, STZ rats; DW, distilled water; MPD, milk protein-enriched drink. Each value is expressed as mean \pm SEM (n=8-9). Values without a common letter differ significantly ($p < 0.05$).

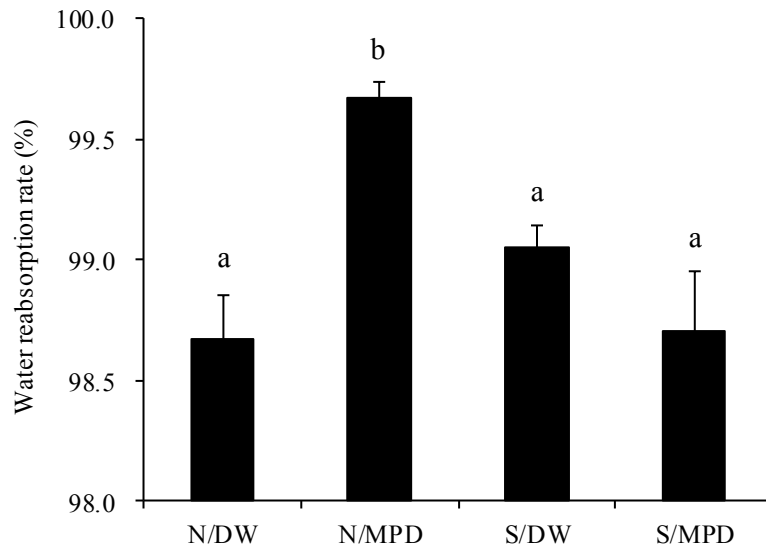


Fig. 1-8. Effects of MPD on water reabsorption rates in normal and STZ-induced rats.

Water reabsorption rates in the renal tubules were calculated along with creatinine clearance and the urine production rate. N, normal rats; S, STZ rats; DW, distilled water; MPD, milk protein-enriched drink. Each value is expressed as mean \pm SEM (n=8-9). Values without a common letter differ significantly ($p < 0.05$).

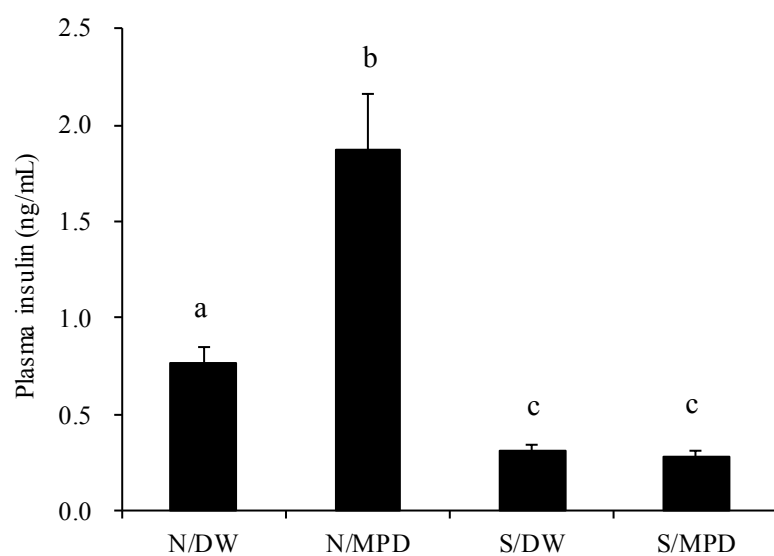


Fig.1-9. Plasma insulin after administration of the experimental drinks in normal and STZ-induced rats.

Blood samples were taken at 30 min after the administration of the experimental drinks and the plasma insulin was measured. N, normal rats; S, STZ rats; DW, distilled water; MPD, milk protein-enriched drink. Each value is expressed as mean \pm SEM (n=8-9). Values without a common letter differ significantly ($p < 0.05$).

Table 1-1. Compositions of the experimental drinks

Composition	SD	MPD	
		Ex-3-5	Ex-6
Protein (%)	0.0	4.6	5.0
Fat (%)	0.0	1.3	1.6
Carbohydrate (%)	6.2	5.0	4.8
Sodium (mM)	21	19	20

SD, sports drink; MPD, milk protein-enriched drink.

Table 1-2. Urinary sodium concentration and excretion

	DW	SD	MPD
Urine volume (mL)	5.48 ± 0.39 ^a	3.82 ± 0.32 ^b	1.98 ± 0.33 ^c
Na ⁺ concentration (mg/mL)	0.26 ± 0.01 ^a	0.47 ± 0.06 ^b	1.13 ± 0.16 ^c
Na ⁺ excretion (mg)	1.56 ± 0.18	1.93 ± 0.36	2.08 ± 0.27

DW, distilled water; SD, sports drink; MPD, milk protein-enriched drink. Sodium concentration and excretion of urine accumulated for 4 h were measured. Each value is the mean ± SEM (n=7).

Values without a common letter differ significantly ($p < 0.05$).

Table 1-3. Water weights in the lumens of stomach and small intestine 4 h after the administration of the test drinks.

	DW	SD	MPD
Stomach (g)	0.078 ± 0.020 ^a	0.236 ± 0.032 ^b	0.222 ± 0.051 ^b
Small intestine (g)	0.502 ± 0.043	0.637 ± 0.062	0.478 ± 0.048

DW, distilled water; SD, sports drink; MPD, milk protein-enriched drink. Each value is the mean ± SEM (n=7). Values without a common letter differ significantly ($p < 0.05$).

第2章 ホエイペプチドの小腸における水分吸収促進効果

第1節 緒言

第2章と第3章では、脱水症の治療のための水分補給法の確立を目指した。脱水症の速やかな治療のための飲料には、体内への水分吸収の速さが求められる。第1章で示した通り、乳タンパク質は高い水分保持効果を有する。しかし、乳タンパク質は胃内でカークを形成し胃排出が遅いことから、速い水分吸収を実現するという点においては不利だと考えられる。一方、乳タンパク質を酵素分解して得たペプチドは、胃内でカーク形成しないため、胃排出が速いという利点がある。そこで、第2章では乳タンパク質由来のペプチドの水分補給における有用性を検討した。

腸管からの水分吸収は、 Na^+ ・グルコース共輸送体1(SGLT1)による Na^+ とグルコースの吸収によって促進される。飲料中の糖質と Na^+ の比率と水分吸収速度については詳細な検討が行われている⁶¹⁾。SGLT1による水分吸収促進の推定メカニズムについては、大きく分けて2つの説がある。1つは、基質の輸送によって形成される局所的な浸透圧勾配を駆動力とする受動的な水輸送である^{62,63)}。他は、共輸送体による基質輸送と水輸送がタンパク質レベルで共役しており、共輸送体が能動的な水ポンプの様に働くという説^{19,20)}である。しかし、SGLT1に限らず、その他のトランスポーター、例えばアミノ酸トランスポーターやペプチドトランスポーター等による基質輸送においても水分吸収が促進される可能性が報告されている。

例えば、アミノ酸が小腸の水分吸収に及ぼす影響に関しては、経口補水液をベースにした研究がいくつかなされており、アミノ酸の種類によって効果が異なることが示唆されている。経口補水液へのグリシン配合は、水分吸収の点で有効性は見出されなかった^{64,65)}。一方、グルタミン⁶⁶⁾、アラニン⁶⁵⁾、またはロイシン⁶⁷⁾を配合した経口補水液は高い水分吸収を示した。逆に、アルギニンは水分吸収を妨げ、水分分泌を促すとの報告がある^{29,68)}。

ペプチドが小腸の水分吸収に及ぼす影響に関しては、そのトランスポーターであるPepT1と小腸での水分吸収の関係についての2つの報告がある。すなわち、PepT1によるジペプチド誘導体(グリシルサルコシン)の吸収が、水分吸収に関与していることを示唆する報告³¹⁾や、遠位

結腸においても PepT1 が発現しており、水分吸収に関与していることを示唆する報告³²⁾がある。しかし、これまでに、食品に応用可能なペプチドの水分吸収に関する報告は少ない。

食品に利用されている代表的なペプチドとして、ホエイペプチド(ホエイタンパク質酵素分解物;WP)や大豆ペプチド(大豆タンパク質酵素分解物;SP)がある。WP は SP と比較して、摂取後に血漿中アミノ酸としてより速く吸収されることを示唆する報告がある^{39,69)}。ペプチドの吸収と水分吸収が関係していると仮定すると、WP には高い水分吸収促進効果があることが期待できる。また、WP には、運動後の摂取によって筋タンパク質合成を促進する効果⁴⁰⁾や、骨格筋中グリコーゲンレベルを高める効果⁷⁰⁾が報告されている。もし WP に水分吸収促進効果があることを見出すことができれば、これら 2 つの効果と合わせ、特に運動時の摂取に有用な食品となることが期待できる。

本研究では、食品タンパク質由来の 2 つのペプチドである WP と SP のラット小腸における水分吸収促進効果を比較した。その結果、WP に高い水分吸収促進効果があることを見出した。そこで、WP の水分吸収促進効果について考察するために、WP と同組成のアミノ酸混合物の水分吸収促進効果の比較、WP の水分吸収促進効果に対する PepT1 の寄与についての検討、および WP に多く含まれる分岐鎖アミノ酸(BCAA)含有ジペプチドの水分吸収促進効果の検討を行った。

第 2 節 材料および方法

試験試料

WP は明治(東京)製のもの、SP は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)から購入したものをを用いた。これらのペプチドはホエイタンパク質または大豆タンパク質を酵素分解して調製されたものである。WP はエンドペプチダーゼによる分解後、未分解タンパク質を限外ろ過膜処理により除去している。WP および SP のサイズ排除クロマトグラフィーの溶出プロフィールを Fig. 2-1 に示す。サイズ排除クロマトグラフィーには、カラムとして TSKgel G2000 SWXL(東ソー, 東京), 溶離液として 45%アセトニトリル, 0.1%トリフルオロ酢酸を用いた。流速は 0.5 mL/分, カラムオープン温度は 30 °Cとし, 214 nm の吸光度測定により検出を行った。分子量マーカータには, シトクロム c

(MW = 12,400), 副腎皮質刺激ホルモン (MW = 2,933), オキシトシン (MW = 1,007), およびグルタチオン (MW = 307)を用いた。WP, SP の数平均分子量はそれぞれ, 611, 570 Da であった。WP の成分組成は, タンパク質 80.0%(w/w), 糖質 10.0%(w/w), 脂質 0.1%(w/w), 灰分 6.4%(w/w), ナトリウム 1.3%(w/w)であった。SP の成分組成は, タンパク質 86.9%(w/w), 糖質 2.7%(w/w), 脂質 0.2%(w/w), 灰分 6.4%(w/w), ナトリウム 1.1%(w/w)であった。WP と SP の遊離アミノ酸含量は, それぞれ 1.3, 2.6 g/100g protein であった。WP および SP のアミノ酸組成を Table 2-1 に示す。WP および SP 中の BCAA 含有ジペプチドを, Morifuji らの方法⁷¹⁾にしたがい, 液体クロマトグラフィー質量分析法により定量した。実験 3 において使用したアミノ酸混合物 (AA) は, WP と同じアミノ酸組成になるよう調製した。4-アミノメチル安息香酸 (4-AMBA) は東京化成工業 (東京) から購入した。実験 4 で使用した Val-Leu, Ile-Leu, Leu-Leu, Gly-Gly は和光純薬工業 (大阪) から購入した。

実験動物および飼育条件

第 1 章 第 2 節と同様の方法で実施した。

ラット小腸灌流試験

Nishinaka らの方法⁷²⁾を参考にして実施した。ラットにウレタンを 1.5 g/kg 皮下投与し, 麻酔をかけた。正中線で開腹し, 小腸の胃から 1~2 cm の部分を切開し, 試験溶液注入のためのチューブを挿入した。また, 灌流後の溶液の回収のためのチューブを回腸の終端部に挿入した。シリンジから試験溶液をゆっくりと注入し, 小腸内を洗浄した。続いてシリンジポンプにより試験溶液を 0.75 mL/min の速度で注入し, 灌流させた。灌流は 60 分間行い, 最後の 20 分間, 灌流液を採取した。灌流液採取の終了後, 腹部大動脈より全採血してラットを安楽死させ, 灌流に用いた部位の小腸を摘出した。摘出した小腸は, 凍結乾燥して乾燥重量を測定した。

各試験溶液には, 内部標準物質としてフェノールレッド (PR) を 20 mg/L 添加した。この物質は, 非吸収性の物質であり, 内部標準物質として使用できる。灌流前および灌流後の溶液に水酸化ナトリウムを加えてアルカリ性にした後, 560 nm の吸光度測定を行い, PR 濃度を定量した。

また、灌流前および灌流後の溶液中のペプチドを塩酸によって加水分解した後、各アミノ酸濃度を HPLC により測定⁷³⁾し、ペプチドまたはアミノ酸の総濃度を測定した。次式により、みかけの水分吸収速度およびペプチド/アミノ酸吸収速度を計算した。

$$\text{水分吸収速度(mL/min/g)} = V \cdot (1 - R_i/R_o) / W_i$$

$$\text{ペプチド/アミノ酸吸収速度 (mg/min/g)} = V \cdot (P_i - P_o \cdot R_i/R_o) / W_i$$

V: 注入速度(mL/min), W_i: 小腸の乾燥重量(g)

R_i: 灌流前の溶液の PR 濃度(mg/L), R_o: 灌流後の溶液の PR 濃度(mg/L)

P_i: 灌流前のペプチド/アミノ酸濃度 (mg/mL), P_o: 灌流後のペプチド/アミノ酸濃度 (mg/mL)

実験 1 では、溶媒として生理食塩水 (PS), および 0.5%(w/v)の WP または SP を添加した水溶液を用い、各ペプチドの水分吸収促進効果を評価した。各群 6 匹のラットを用いた。実験 2 では、0.125, 0.25, 0.5, 1.0%(w/v)の WP を添加した水溶液を用い、WP の濃度と水分吸収促進効果の関係を検討した。各群 4-6 匹のラットを用いた。実験 3 では、ペプチドとアミノ酸の効果の比較および WP の効果への PepT1 の寄与を検討するため、0.5%(w/v)の WP および AA を添加した水溶液、およびそれぞれに 20 mM の 4-AMBA を添加した水溶液を用いた。各群 8 匹のラットを用いた。4-AMBA は PepT1 の競合阻害剤として作用し、4-AMBA 自体は PepT1 によって輸送されないことが報告されている⁷⁴⁾。実験 4 では、WP に多く含まれるジペプチドの水分吸収促進効果を検討した。WP は、Val-Leu, Ile-Leu, および Leu-Leu をそれぞれ、0.84, 0.58, および 0.94g/100g protein 含んでいる。そこで、試験溶液として Val-Leu, Ile-Leu, Leu-Leu, および Gly-Gly を 20 mM 添加した水溶液を用いた。各群 5-6 匹のラットを用いた。なお、全ての試験溶液は、Na⁺濃度を調整することにより、浸透圧を生理食塩水と揃えて調製した (Table 2-2)。

統計解析

各種測定値および計算値は平均値±標準誤差で表した。多群の比較は、Bartlett の検定で等分散性を確認した後、Tukey-Kramer の検定を行った。2 群の比較は、F 検定により等分散性を確認した後、Student の t 検定を用いた。いずれの検定も有意水準は両側 5%とした。これらの検定には、統計学的検定ソフト(Excel Statistics; SSRI, 東京)を使用した。

第 3 節 結果

実験 1 ホエイペプチドと大豆ペプチドの水分吸収促進効果の比較

各試験溶液の小腸における水分吸収速度を Fig. 2-2A に示す。WP は PS および SP と比較して有意な高値を示した ($p<0.05$)。また、SP は PS と比較して有意な高値を示した ($p<0.05$)。PS は水分吸収速度がほぼゼロを示した。

WP および SP のペプチド/アミノ酸吸収速度を Fig. 2-2B に示す。WP は SP よりも有意に高いペプチド/アミノ酸吸収速度を示した ($p<0.05$)。

実験 2 ホエイペプチドの水分吸収促進効果の用量依存性

各濃度の WP 溶液の水分吸収速度を Fig. 2-3A に示す。0.125~1.0%の全ての群で 0%と比較して有意に高い水分吸収速度を示した ($p<0.05$)。0.125~0.5%までは、ペプチド濃度に依存してほぼ直線的に増加したが、1.0%ではプラトーに達した。各濃度の WP 溶液のペプチド吸収速度を Fig. 2-3B に示す。0.125~1.0%まで濃度に依存した増加を示した。

実験 3 ホエイペプチドとアミノ酸混合物との比較および PepT1 阻害剤添加の影響

WP と AA の水分吸収促進効果の比較、および PepT1 阻害剤である 4-AMBA 添加が水分およびペプチド/アミノ酸吸収速度に与える影響を検討した。WP は AA と比較して有意に高い水分吸収速度およびペプチド/アミノ酸吸収速度を示した (Fig. 2-4A, 2-4B; $p<0.05$)。4-AMBA の添加は AA の水分吸収速度およびアミノ酸吸収速度に対しては有意な影響を及ぼさなかったが、WP の水分吸収速度およびペプチド/アミノ酸吸収速度を有意に低下させた ($p<0.05$)。

ホエイペプチドの吸収速度と水分吸収速度の関係

WPについて、ペプチド/アミノ酸吸収速度と水分吸収速度の相関分析を行った(Fig. 2-5)。実験 1~3 の 0.5%の WP のデータをまとめ、解析を行った。WP では、ペプチド/アミノ酸吸収速度と水分吸収速度の間に、有意な強い正の相関が認められた($r=0.82, p<0.01$)。なお、実験ごとに解析した場合においても、強い相関が認められた(データは省略)。

実験 4 BCAA 含有ジペプチドの水分吸収促進効果の検討

WP に比較的多く含まれる BCAA 含有ジペプチドである Val-Leu, Ile-Leu, および Leu-Leu の水分吸収促進効果を検討した(Fig. 2-6A)。今回検討したジペプチドは全て水分吸収速度を高めた。特に, Ile-Leu は高い水分吸収促進効果を示し, Val-Leu と比較して有意な高値を示した($p<0.05$)。しかし, いずれの BCAA 含有ジペプチドも, 比較対照として置いた Gly-Gly との間に有意な差は認められなかった。ペプチド吸収速度は Val-Leu が他の 3 つのジペプチドと比較して有意な低値を示した(Fig. 2-6B, $p<0.05$)。

第 4 節 考察

WP および SP のいずれも小腸における水分吸収を促進する効果を有すること, WP は SP よりも高い効果を有することが示唆された(Fig. 2-2A)。WP の高い水分吸収促進効果に対しては, その高いペプチド吸収速度(Fig. 2-2B)が関係していると考えられる。なお, ラット小腸を用いた *in vitro* 試験⁶⁹⁾, 健常人での試験³⁹⁾によって, ホエイタンパク質由来のペプチドは大豆タンパク質由来のペプチドよりも吸収が速いことが示唆されている。今回のペプチド吸収速度の結果は, それらの研究と同様であった。

WP は, その濃度に依存して水分吸収速度を高めた(Fig. 2-3A)。しかし, 0.5%から 1.0%の間において, その効果はプラトーに達した。高濃度の WP では, 高い水分吸収速度により灌流中に血液量が増加し, 生体内において血液量の恒常性維持の機構が働き, 水分吸収が抑制された可能性が考えられる。すなわち, 血液量が増加すると, 心房壁の伸展により放出される ANP を介して, 空腸における水分吸収が抑制されることがラット試験において報告されている^{27, 28)}。

浸透圧と濃度 (w/v %)を揃えた比較においては、AAよりもWPの方が高い水分吸収促進効果を示した(Fig. 2-4A)。この結果は、WPの水分吸収促進効果は、水分吸収促進効果のあるアミノ酸⁶⁵⁻⁶⁷⁾だけでは説明できないことを示唆している。また、WPの作用様式としては、ペプチド自体の作用と、ペプチドが小腸刷子縁のペプチダーゼにより分解されて生じたアミノ酸の作用という2つが考えられる。AAよりもWPの方が高い水分吸収促進効果を示したことから、WPの水分吸収促進効果に対しては、アミノ酸よりもペプチド自体の作用の方が大きく寄与していると推察された。

WPはAAよりも高いペプチド/アミノ酸吸収速度を示した(Fig. 2-4B)。先行研究においても、遊離のアミノ酸よりもジペプチドの方がアミノ酸の吸収が速いことを示唆する報告⁷⁵⁾や、カゼイン由来のペプチドの方が同組成のアミノ酸混合物よりも吸収が速いという報告^{76,77)}がある。今回の結果は、これらの先行研究と同様に、アミノ酸輸送系よりもペプチド輸送系の吸収が速い可能性を示唆している。WPの高い水分吸収促進効果には、ペプチド輸送系による高い吸収速度が関係している可能性がある。

小腸刷子縁膜におけるペプチドのトランスポーターはPepT1である。今回用いたWP中のペプチドの多くはPepT1によって輸送されると考えられる。PepT1阻害剤である4-AMBAの添加により、WPの水分吸収促進効果が有意に低下したこと(Fig. 2-4)から、PepT1によるペプチドの吸収が水分吸収促進効果に少なくとも一部関与していることが示された。また、WPのペプチド/アミノ酸吸収速度と水分吸収速度の強い相関(Fig. 2-5)も、ペプチド吸収が水分吸収に関与していることを示唆している。

今回使用したWPは、BCAA含有ジペプチドを多く含む。その中でも特に含有量が多い3種類のジペプチドについて水分吸収促進効果を検討した結果、Ile-Leuが比較的高い効果を示すことが示唆された(Fig. 2-6A)。ただし、いずれのBCAA含有ジペプチドにおいても、比較対照としたGly-Glyとの間に水分吸収速度の有意差は認められなかった。したがって、今回の結果だけでは、WPの高い水分吸収促進効果を十分に説明することはできなかった。WPには、より効果の強いペプチドが存在している可能性があり、今後更なる検討が必要である。

ジペプチドの検討結果 (Fig. 2-6) からは、多くのジペプチドは水分吸収を促進すること、そしてジペプチドの種類によって効果の強さが異なることが示唆された。また、水分吸収速度とジペプチドの吸収速度のパターンはある程度類似してはいるが、完全には一致しない。ペプチドの種類によって、ペプチド 1 分子が吸収されるに伴い吸収される水分子の量が異なる可能性が考えられる。

小腸における水分吸収速度は、麻酔下でのラット小腸灌流系により評価した。動物を用いた小腸灌流系については、多くの報告があり^{61, 64, 72)}、水分吸収速度の評価方法として確立されている。しかし、本試験系は麻酔下で行うため、麻酔による消化管機能への影響は否定できない。今後は、非麻酔下での水分吸収速度を評価する系を検討することも必要であると考えられる。

ペプチド/アミノ酸の吸収速度は、小腸灌流前後の溶液を加水分解し、アミノ酸を定量することで測定した。この方法では、灌流中に分泌される消化液や、小腸内容物などに由来するタンパク質やアミノ酸が検出される可能性がある。実際に、ペプチドやアミノ酸を添加していない PS は、タンパク質吸収速度が若干の負の値を示した(データは省略)。しかし、これらは WP 等のペプチド/アミノ酸吸収速度と比較すると十分に低い数値であった。したがって、今回のペプチド/アミノ酸吸収速度の測定方法に大きな問題はないと考えられる。

今回用いた全ての試験溶液は、NaCl 濃度を調整することにより、浸透圧を生理食塩水と揃えた (Table 2-2)。これは、小腸における水分吸収は、溶液の浸透圧に大きく影響を受ける⁶⁴⁾ためである。なお、試験溶液の浸透圧を揃えることで、Na⁺濃度には多少の差が生じた。水分吸収は SGLT1 による Na⁺とグルコースの吸収に伴って促進すると考えられているため、Na⁺濃度の違いも影響する可能性はある。しかし、今回のようにグルコースを含まない条件においては SGLT1 による水分吸収が起こらないため、Na⁺濃度よりも浸透圧の方が水分吸収に対しての影響が大きいと考えた。

第 5 節 小括

本章では、食品に応用可能なペプチドとして WP および SP の小腸における水分吸収促進効果を検討した。両者ともその効果を有するが、WP は SP よりも高い効果を有することを明らかにし

た。また、WP の水分吸収促進効果に対しては、分解によって生じる遊離アミノ酸よりも、ペプチド自体の寄与の方が大きいことが示唆された。さらに、WP の水分吸収促進効果に少なくとも一部、PepT1 が関与していることを示した。

图表

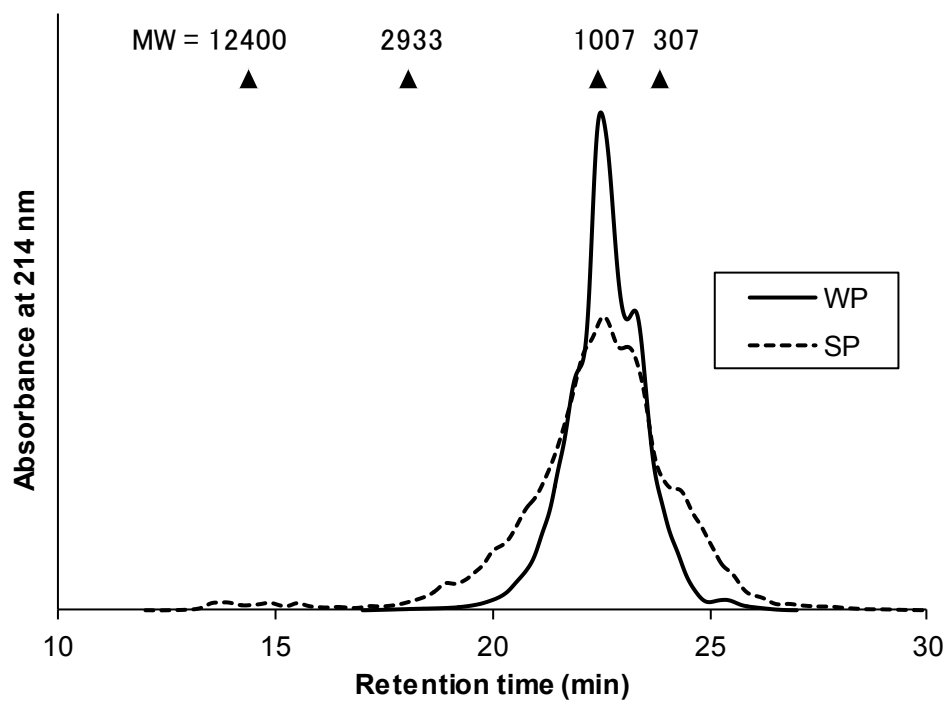
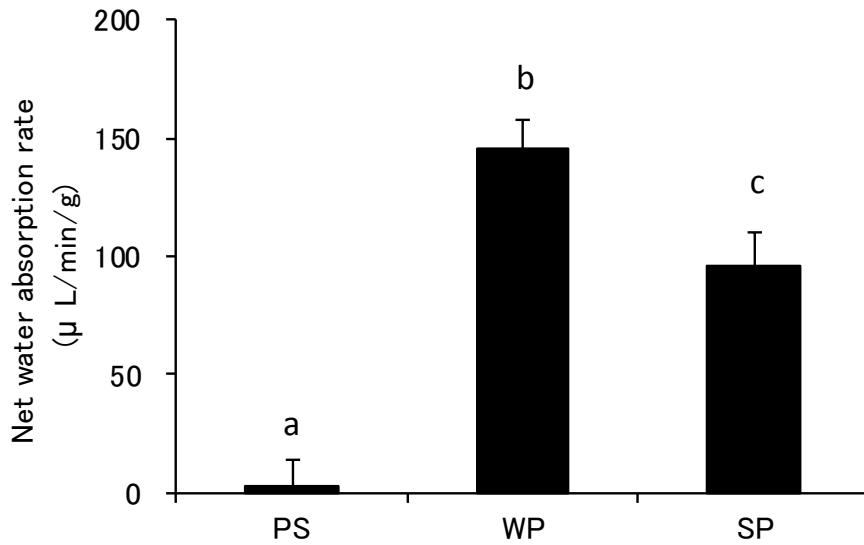


Fig. 2-1. Elution profile of size exclusion chromatography of the sample peptides.

WP, whey peptides; SP, soy peptides.

(A)



(B)

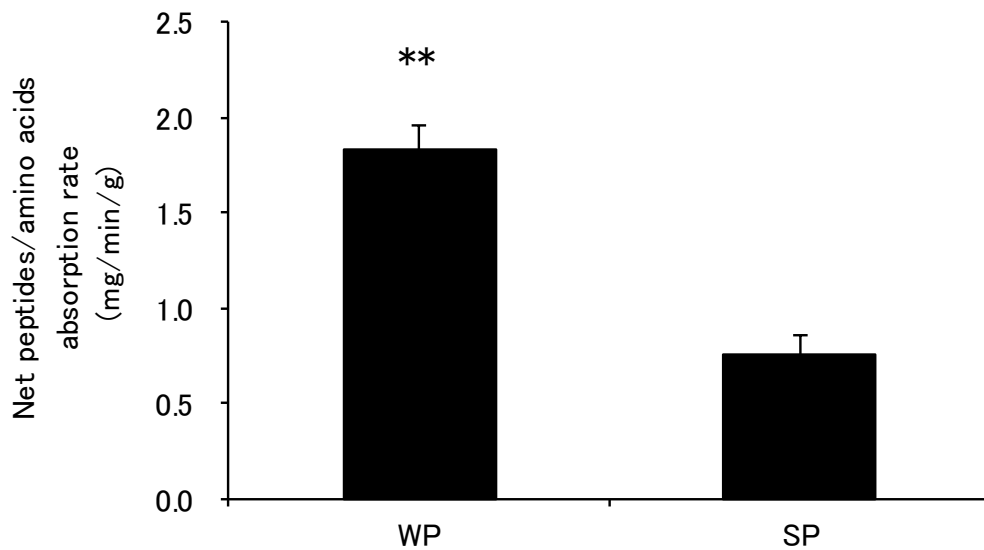
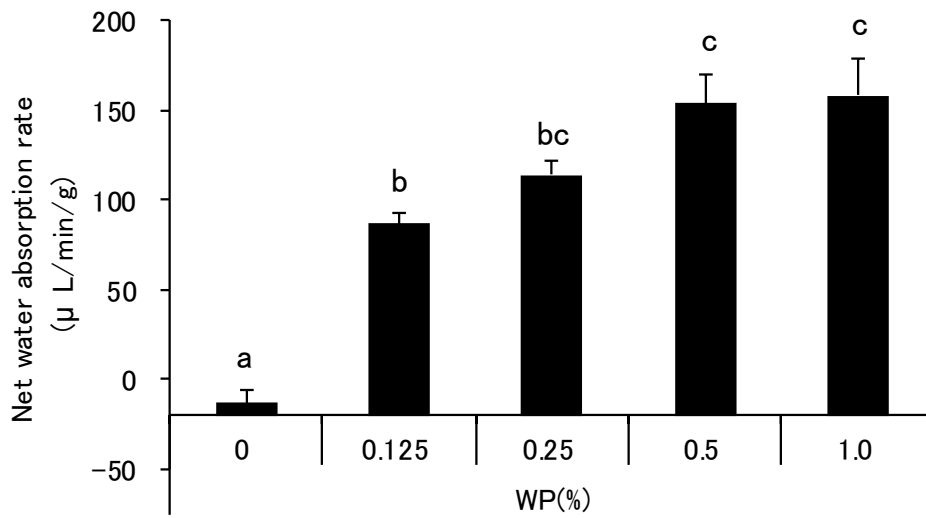


Fig. 2-2. Comparison of WP with SP on the net absorption rates of (A) water and (B) peptides/amino acids.

Each test solution was infused into the small intestine by a syringe pump. Perfusates were collected for 20 min after an equilibrium period of 40 min. Values are the means \pm SEM (n=6).

Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$). ** $p < 0.01$ compared with SP. PS, physiological saline; WP, whey peptides; SP, soy peptides.

(A)



(B)

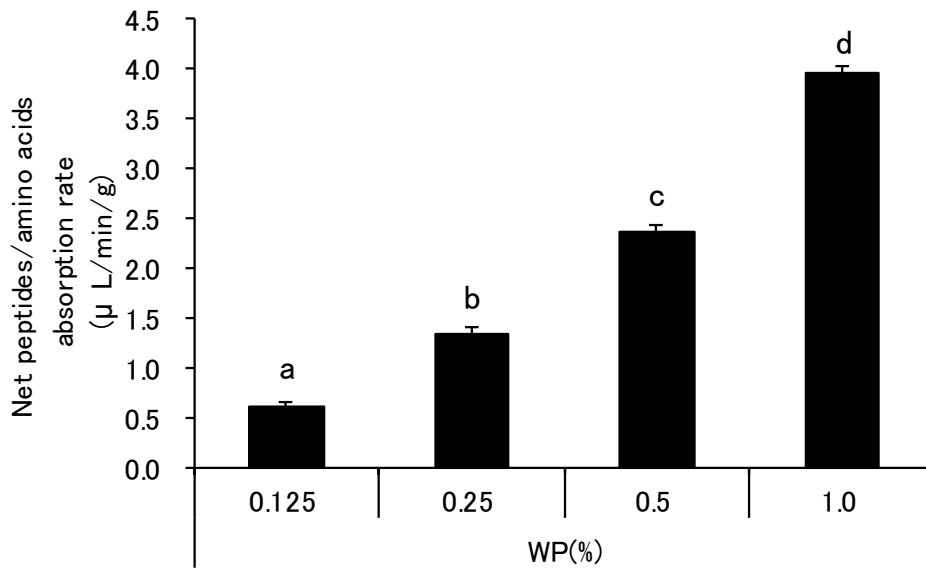
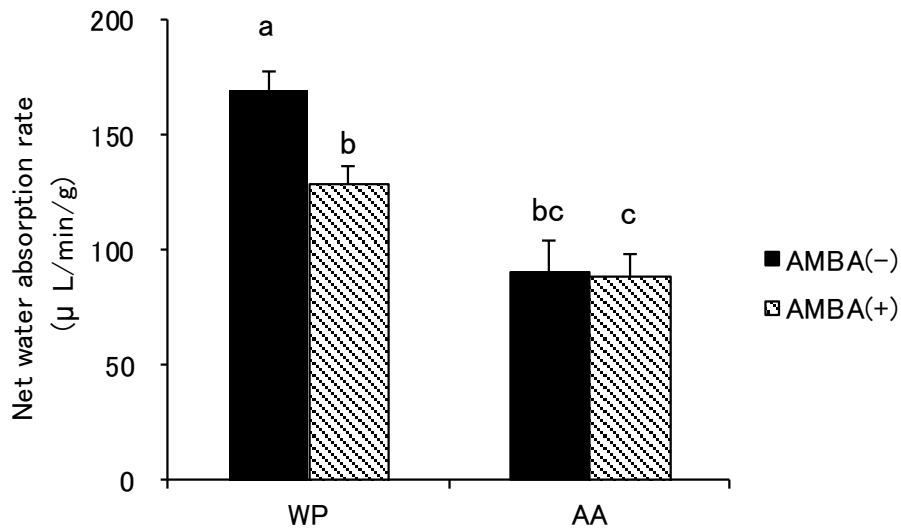


Fig. 2-3. Relationship between WP concentration and the net absorption rates of (A) water and (B) peptides/amino acids.

The absorption rates of water and peptides/amino acids were determined as summarized in the legend for Fig. 2-2. Values are the means \pm SEM (n=4-6). Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

(A)



(B)

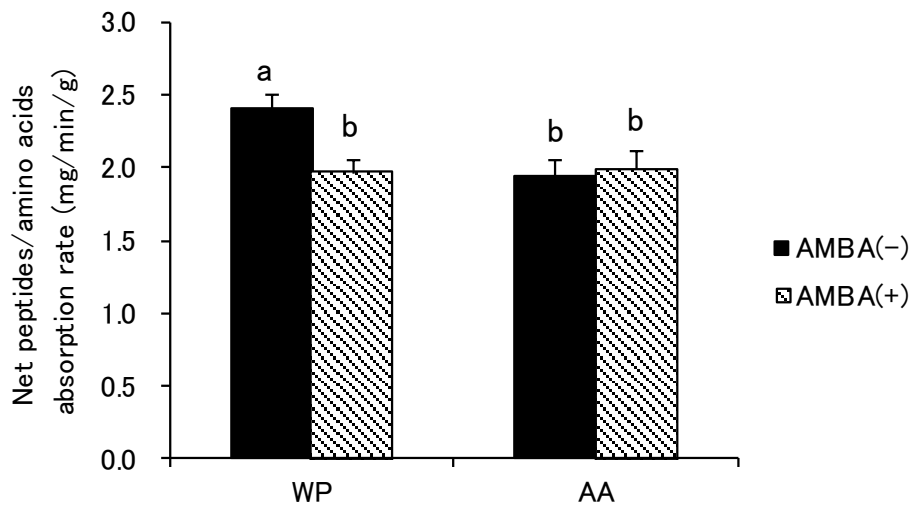


Fig. 2-4. Comparison of WP with AA on the net absorption rates of (A) water and (B) peptides/amino acids with/without PepT1 inhibitor AMBA.

The absorption rates of water and peptides/amino acids were determined as summarized in the legend for Fig. 2-2. Values are the means \pm SEM (n=8). Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$). WP, whey peptides; AA, amino acid mixture; AMBA, 4-aminomethylbenzoic acid.

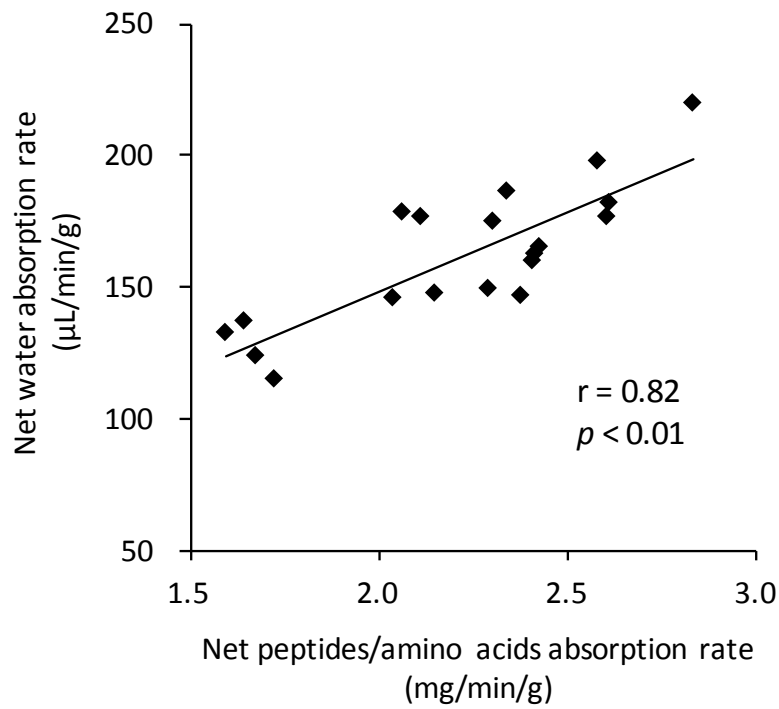


Fig. 2-5. Relationship between the peptides/amino acids absorption rate and the water absorption rate.

The data of 0.5% WP in Figs. 2-2, 2-3, and 2-4 were gathered and plotted. Correlation analysis was carried out to examine the relationship between the peptides/amino acids absorption rate and the water absorption rate in WP.

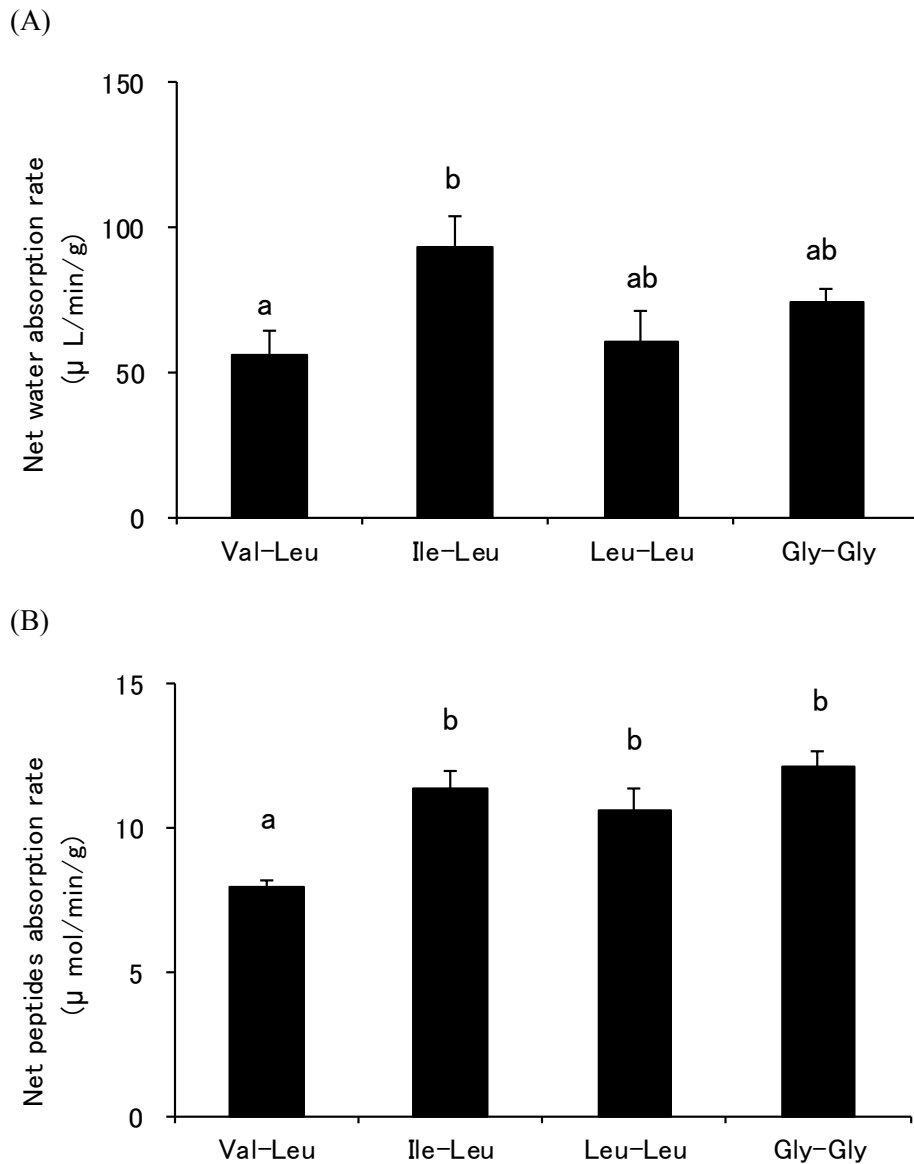


Fig. 2-6. Effect of BCAA-containing dipeptides on the net absorption rates of (A) water and (B) peptides.

The absorption rates of water and peptides were determined as summarized in the legend for Fig.

2-2. Values are the means \pm SEM (n=5-6). Different letters indicate significant differences

($p < 0.05$).

Table 2-1. Amino acid compositions (g/100 g) in WP and SP

	WP	SP
Ala	5.0	4.0
Arg	2.8	7.6
Asx	11.1	12.7
Cys	2.4	0.6
Glx	17.4	23.5
Gly	1.8	4.2
His	2.2	2.4
Ile	4.9	4.1
Leu	11.2	6.8
Lys	10.1	6.4
Met	2.1	1.0
Phe	3.3	4.1
Pro	5.4	5.4
Ser	4.8	5.3
Thr	5.3	3.8
Trp	1.8	0.7
Tyr	3.4	3.1
Val	5.1	4.3
Total	100.0	100.0

WP, whey peptides; SP, soy peptides; Asx, Asp+Asn; Glx, Glu+Gln.

Table 2-2. Sodium concentration and osmolality of test solutions

Ex. 1			
	PS	WP	SP
Sodium (mM)	148	138	143
Osmolality (mOsm/kg H ₂ O)	283	281	283

Ex. 2					
	WP (%)				
	0	0.125	0.25	0.5	1.0
Sodium (mM)	148	144	142	136	130
Osmolality (mOsm/kg H ₂ O)	286	286	286	286	286

Ex. 3				
	WP	WP +AMBA	AA	AA +AMBA
Sodium (mM)	138	126	120	111
Osmolality (mOsm/kg H ₂ O)	286	286	286	286

Ex. 4				
	Val-Leu	Ile-Leu	Leu-Leu	Gly-Gly
Sodium (mM)	135	139	135	139
Osmolality (mOsm/kg H ₂ O)	283	284	283	287

PS, physiological saline; WP, whey peptides; AA, amino acid mixture; AMBA, 4-aminomethylbenzoic acid.

第3章 ホエイペプチド配合飲料の脱水症治療効果

第1節 緒言

脱水症治療のための飲料において最も重要な要件は、速やかに血漿量を回復させることである。この効果には、胃排出、小腸での水分吸収、腎での水・Na⁺再吸収などの生理機能が関係する。また、発汗時には、水分だけではなくNa⁺などのミネラルも失われる。したがって、水分とともにNa⁺を補給することも必要である。

現在、水分補給のための飲料として、糖質と電解質を配合したSDがよく用いられている。米国医学研究所は、暑熱環境下での長時間の運動の際に摂取するSDの組成のガイドラインにおいて、20~30 mMのNa⁺、2~5 mMのK⁺、および5~10%(w/v)の糖質を含む飲料を推奨している⁷⁸⁾。市販のSDの多くは、20 mM程度のNa⁺および5~6%(w/v)程度の糖質を含んでいる。ヒト試験により、SDはプレーンな水と比較して、脱水後に摂取した際の血漿量の回復効果が大きいことが報告されている⁷⁹⁻⁸³⁾。しかし、これらの報告においては、摂取後短時間での効果は検討していないか、またはSDでは血漿量が脱水前の水準に回復するまでには1時間程度かかることが示唆される。運動競技時の健康管理および良好なパフォーマンスを維持する観点では、より早期に水分状態を回復できる飲料が望まれると考えられる。

第2章において、ホエイペプチドが小腸における水分吸収速度を高めることを見出した。したがって、ホエイペプチドを添加した飲料は脱水症の早期改善に有効であることが期待できる。そこで第3章では、ホエイペプチドを添加した糖質・電解質飲料の脱水症早期改善に対する効果を検討することを目的とした。まず、ラット小腸灌流モデルを用いて、ホエイペプチド濃度、およびNa⁺濃度と小腸での水分吸収速度の関係を検討し、最適な組成のホエイペプチド配合飲料(WPD)を調製した。そして、WPDの脱水症改善に対する有効性を、脱水症モデルラットを用いて検討した。また、WPDの脱水症に対する有効性を、従来の水分補給飲料であるSDと比較した。

第2節 材料および方法

試験飲料

ホエイペプチドおよび Na^+ 濃度の検討のため、ホエイペプチドを 0~0.5%(w/v)、 Na^+ を 0~30 mM、 K^+ を 3 mM、および糖質を 0.6%(w/v)含む試験飲料を調製した。糖質としては、トレハロースを使用した。トレハロースは2つのグルコースが1,1-グリコシド結合した二糖である。非還元性の糖質であるため、ホエイペプチドと共に飲料に配合して加熱殺菌した場合でもメイラード反応を起こさないことから使用した。ホエイペプチドは Arla Food 社 (Viby, Denmark) から購入した。このペプチドはホエイタンパク質をプロテアーゼにより加水分解して調製したものである。サイズ排除クロマトグラフィーによって測定した重量平均分子量は 717 Da、数平均分子量は 595 Da であった。なお、第3章で用いたホエイペプチドは、第2章で用いたものとは分解酵素等が異なる。分子量分布やアミノ酸組成等に大きな違いはなく、ラット小腸における水分吸収促進効果も同等であることを確認している(データは省略)が、風味の面でより優れているペプチドに変更した。ホエイペプチド濃度検討の試験には、ホエイペプチド濃度が 0, 0.1, 0.3, または 0.5%(w/v)、 Na^+ 濃度が 10 mM の試験飲料を用いた。 Na^+ 濃度検討の試験には、 Na^+ 濃度が 0, 10, 20, または 30 mM、ホエイペプチド濃度が 0.3%(w/v)の試験飲料を用いた。これらの検討結果から、WPD、および対照飲料(CD)を調製した(Table 3-1)。CD は WPD からホエイペプチドを除外した組成の糖質・電解質飲料である。また、既存飲料との比較のため、第1章と同じ SD を使用した (Table 3-1)。

実験動物および飼育条件

第1章 第2節と同様の方法で実施した。

ラット小腸灌流試験

第2章 第2節と同様の方法で実施した。

脱水症モデルラットによる評価

脱水症に対する有効性は、絶水と利尿剤投与によるラット脱水症モデルを用いて検討した。ラットに20時間の絶食をさせた。また、絶食開始4時間後から16時間の絶水をさせた。絶水開始時にフロセミドを50 mg/kg 経口投与した。続いて、ラットに試験飲料を20 mL/kg 経口投与した。絶食開始前、経口投与前、投与後5、10、15、20、および30分後にイソフルラン吸入麻酔下で頸静脈より経時的に採血した。採取した血液は、自動血液分析装置 XT-1800iV (Sysmex, 神戸)によってヘマトクリット値、血中ヘモグロビン濃度を測定し、血漿量変化率を求めた⁵¹⁾。絶水後の血漿量が絶水前と比較して10%以上低下したときに脱水症と定義した。また、血漿浸透圧は蒸気圧式オスモメーターVapro 5600 (Wescor, Logan, UT, USA)により測定した。糖質・電解質飲料へのホエイペプチド添加の効果を検討するため、試験飲料としてWPD、CD、およびDWを用いた。また、WPDと既存飲料の有効性を比較するため、試験飲料としてWPDおよびSDを用いた。

統計解析

各種測定値及び計算値は平均値±標準誤差で表した。多群の比較では、Bartlettの検定で等分散性が仮定できることを確認し、Dunnettの検定またはTukey-Kramerの検定を行った。二群の比較では、F検定により等分散性が仮定できることを確認し、Studentのt検定を行った。これらの検定には、統計学的検定ソフト(StatLight; Yukms, 川崎)を使用した。p値が0.05未満の場合を統計的有意差ありと判定した。

第3節 結果

ホエイペプチド濃度と水分吸収速度の関係

試験飲料中のホエイペプチド濃度と水分吸収速度の関係を検討した。水分吸収速度はホエイペプチド濃度に依存した増加を示した。ホエイペプチド非添加に対して、0.3%および0.5%ホエイペプチドは有意な高値を示した(それぞれ $p<0.05$, $p<0.01$; Fig. 3-1A)。また、試験飲料中のホエイペプチド濃度に依存して、ペプチド/アミノ酸吸収速度も増加を示し、ホエイペプチド非添

加に対して、0.3%および0.5%ホエイペプチドは有意な高値を示した(それぞれ $p<0.05$, $p<0.01$; Fig. 3-1B)。

0.3%および0.5%ホエイペプチドのデータについて、ペプチド/アミノ酸吸収速度と水分吸収速度の関係をプロットした(Fig. 3-1C)。両者には有意な強い正の相関が認められた($r=0.95$, $p<0.01$)。

これらの結果から、糖質・電解質飲料へのホエイペプチド添加は、小腸での水分吸収を促進することが示された。

Na⁺濃度と水分吸収速度の関係

試験飲料中のNa⁺濃度と水分吸収速度の関係を検討した。Na⁺濃度が20 mMのときに最も高い水分吸収速度を示し、0 mMと比較して有意な高値を示した(Fig. 3-2, $p<0.05$)。30 mM Na⁺は0 mM Na⁺と比較して高値傾向を示したが、有意差は認められなかった($p<0.1$)。

試験飲料の組成と水分吸収速度の検討結果(Figs. 3-1, 3-2)から、0.5%のホエイペプチドおよび20 mMのNa⁺を配合したWPDを調製して以降の検討を行った。

脱水症モデルに対するWPDの効果

絶水および利尿剤投与が、体重と血漿量の変化に与える影響を検討した(Table 3-2)。絶食のみのラットと比較し、絶食・絶水をさせたラットでは体重および血漿量に有意な変化は認められなかった。絶食・絶水に加えて利尿剤を投与することで、体重および血漿量が有意に低下した($p<0.05$)。

WPD, CD, またはDWを経口投与後の血漿量変化率の推移を測定した(Fig. 3-3A)。WPDはCDと比較して、10, 15, および20分後において有意な高値を示した($p<0.05$)。また、WPDはDWと比較してすべての採血時点において有意な高値を示した($p<0.05$)。CDは5分後においてDWと比較して有意な高値を示した($p<0.05$)。

WPD, CD, またはDWを経口投与後の血漿浸透圧の推移を測定した(Fig. 3-3B)。血漿浸透圧は、飲料の経口投与後5分後には低下し、30分後まで投与前の値に向かって緩やかに上昇

した。DWと比較して、CDおよびWPDでは浸透圧の低下が抑制され、20分後では有意な高値を示した($p<0.05$)。

これらの結果から、糖質・電解質飲料へのホエイペプチド添加は、脱水症からの早期改善効果を高めることが示唆された。

既存の水分補給飲料とWPDの比較

WPDの小腸における水分吸収速度は、SDと比較して有意な高値を示した(Fig. 3-4A, $p<0.01$)。

脱水症モデルラットへの経口投与後の血漿量変化率において、WPDは、SDと比較して5、10、および15分後において有意な高値を示した(Fig. 3-4B, $p<0.05$)。WPDは、15分後には血漿量が脱水前とほぼ同等の水準にまで回復した。

これらの結果から、WPDは既存の水分補給飲料よりも早期に脱水状態を改善できることが示唆された。

第4節 考察

本章では、糖質・電解質飲料にホエイペプチドを添加することで水分吸収が高まること、およびホエイペプチドによる水分吸収促進効果は飲料中の Na^+ 濃度に依存することを見出した。また、 Na^+ 濃度を最適化したWPDは、ホエイペプチドを添加していない糖質・電解質飲料および既存のSDよりも、短時間で脱水症状からの回復が可能であることを見出した。WPDは、脱水症の早期回復に有効で新規な水分補給飲料となることが期待される。

ホエイペプチド濃度の検討により、ホエイペプチドによる用量依存的な水分吸収促進(Fig. 3-1A)、およびペプチド吸収速度と水分吸収速度の有意な強い正の相関(Fig. 3-1C)が確認された。これらの結果は、先行研究³¹⁾や第2章の研究と同様に、ペプチド吸収が水分吸収と関係していることを強く示唆している。

ホエイペプチドが配合された飲料において、 Na^+ 濃度は水分吸収速度に影響を与えた(Fig. 3-2)。この結果には、SGLT1による水分吸収促進効果が関係していることが考えられる。それに

加えて、 Na^+ 濃度は PepT1 によるペプチド吸収への関与を介して水分吸収速度に影響した可能性もある。なぜなら、PepT1 の働きは直接的には H^+ に依存しているが、間接的には Na^+ にも依存していると考えられるためである。すなわち、PepT1 はペプチドと共に H^+ を輸送するが、共に輸送された H^+ は、小腸細胞の頂端膜に存在する Na^+/H^+ 交換輸送体 3 (NHE3) による Na^+ との交換輸送によりリサイクルされているという説がある⁸⁴⁾。この説によれば、ペプチド吸収は Na^+ に間接的に依存していると考えられる。このため、20 mM の Na^+ を添加することで、 H^+ のリサイクルが効率よく回り、ペプチドの吸収が速やかに起こり、それと共に水分吸収も促進されたという可能性が考えられる。

今回、ラットを脱水状態にさせるために、絶水および利尿剤フロセミドの投与を行った。フロセミドは腎において Na^+ の再吸収を抑制することにより利尿作用を示す薬剤である。先行研究でも、フロセミドは、ラット⁸⁵⁾ およびヒト⁸⁶⁾ の脱水の促進のために用いられている。今回の系においても、一晩の絶水だけではラットは脱水状態とならず、さらに利尿剤を投与することにより、脱水状態となることが確認された (Table 3-2)。

ラット脱水モデルにおいて、WPD は CD よりも脱水状態からの回復が早かった (Fig. 3-3A)。糖質・電解質飲料へのホエイペプチド添加は、脱水症からの回復を早めることが示唆された。この効果には、ホエイペプチドの小腸における水分吸収促進効果 (Fig. 3-1A) が大きく関係すると考えられる。また、WPD は、投与後 5-10 分などの初期の段階から、DW よりも血漿量増加率が高値を示した。このことは、WPD はペプチドや糖質を含むものの、胃排出も遅くないことを示唆している。さらに、WPD の血漿量増加率は CD および DW よりも高値で平衡に達した。これには、WPD 投与後の血漿浸透圧の推移 (Fig. 3-3B) も関係していると考えられる。なぜならば、血漿浸透圧の低下は水分の排泄を促進することで血漿量を減少させるためである。CD と WPD の浸透圧の低下の程度が DW と比較して抑えられたことには、 Na^+ や糖質が寄与していると考えられる。また、WPD は CD よりも血漿量増加率が高かったにも関わらず、血漿浸透圧は CD とほぼ同じ推移を示した。ホエイペプチドが血漿中に遊離アミノ酸やジペプチドなどとして吸収されること、およびペプチドの吸収とリンクして Na^+ が吸収されることにより、血漿の浸透圧の低下を防いでいる可能性が考えられる。

WPD は、SD と比較しても脱水状態からの回復が早かった (Fig. 3-4B)。WPD は既存の飲料よりも脱水症を早期に回復させることができることが示唆された。この結果にも、小腸における水分吸収速度の違い (Fig. 3-4A) が、大きく影響していると考えられる。なお、SD の小腸での水分吸収速度は極めて低値を示したが、これは Nishinaka らの研究⁷²⁾と類似した結果であった。ヒトにおいて、飲料中の糖質が 6% を超えると、摂取後の体内への水分吸収が遅くなることを示唆する報告がある⁸⁷⁾。また、高濃度の糖質は胃排出を遅らせることが報告されている⁸⁸⁻⁹⁰⁾。したがって、SD の脱水症回復が WPD よりも遅かったことは、今回用いた SD の糖質濃度が 6% 以上と比較的高いことも関係していると考えられる。

脱水状態のヒトにおいて、脱脂乳摂取後の血漿量は、SD と同様に推移したという研究結果がある⁹¹⁾。脱脂乳中のカゼインおよびホエイタンパク質は消化管内で分解され、ペプチドやアミノ酸として吸収される。これらのペプチドも、今回用いたホエイペプチドと同様に、水分吸収促進効果を有する可能性がある。しかし、カゼインは胃内でのカーク形成のため胃排出が遅く、アミノ酸としての吸収が遅い。そのため、血漿量増加の効果においては、脱脂乳では SD 以上の効果は得られなかったのだと考えられる。また、ホエイタンパク質の糖質・電解質飲料への添加は運動後の水分補給機能に影響しなかったという報告がある⁹²⁾。ホエイタンパク質は胃内でカーク形成しないため、カゼインよりも早く消化吸収される³³⁾が、ホエイペプチドは未分解のホエイタンパク質よりも、さらに速やかに血漿中にアミノ酸として吸収されることが示唆されている³⁹⁾。したがって、早期に血漿量を回復させる効果を得るためには、ホエイペプチドを用いることが最も有効であると考えられる。

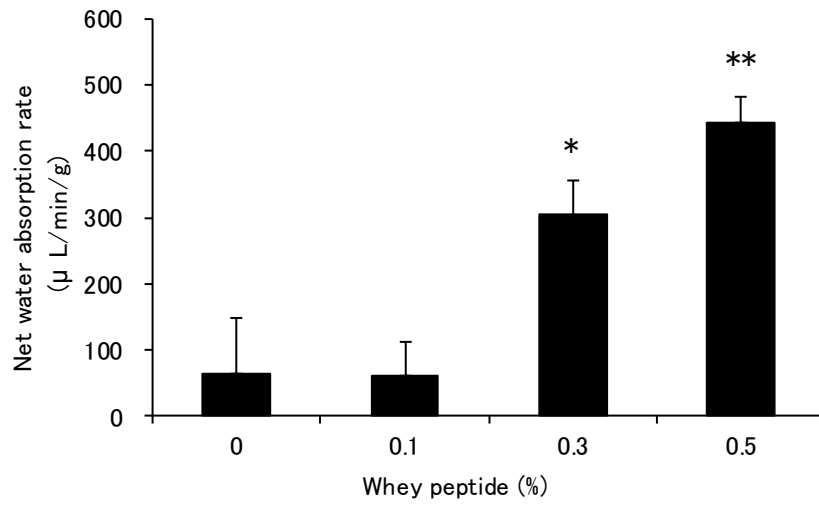
脱水症の改善が求められる代表的なシーンの一つに、運動がある。ホエイペプチドは、脱水の治療以外の点からも運動後の補給に適していると考えられる。すなわち、ホエイペプチドには、運動後の摂取によって筋タンパク質合成を促進する効果⁴⁰⁾や、骨格筋中グリコーゲンレベルを高める効果⁷⁰⁾が報告されている。以上を踏まえると、ホエイペプチドは運動後の摂取において特に有用だと考えられる。

第5節 小括

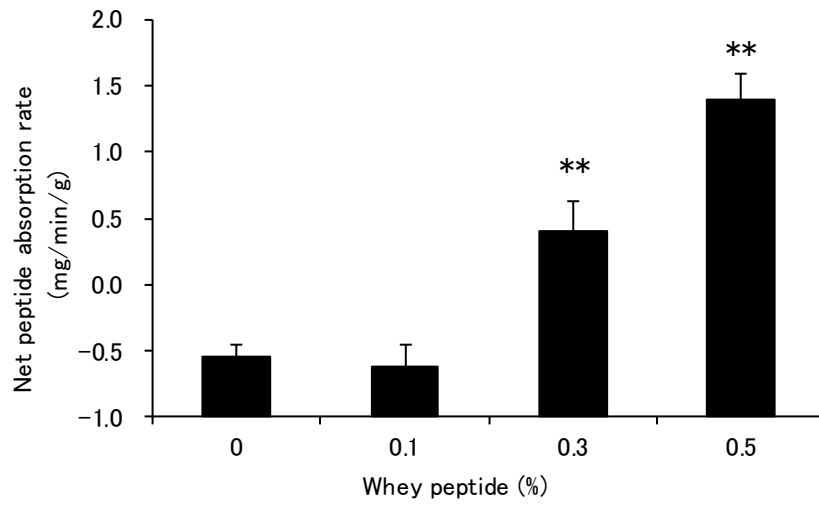
ホエイペプチドの水分吸収促進効果を水分補給飲料に応用するため、ホエイペプチドおよび Na^+ 濃度を最適化したホエイペプチド配合飲料を調製した。利尿剤投与と絶水によるラット脱水モデルを用いて、糖質・電解質飲料へのホエイペプチドの添加は、血漿量をより早く、より多く増加させる効果があることをはじめて示した。また、ホエイペプチド配合飲料は、既存の水分補給飲料である糖質・電解質スポーツ飲料よりも脱水症の治療に有効であることが示唆された。

图表

(A)



(B)



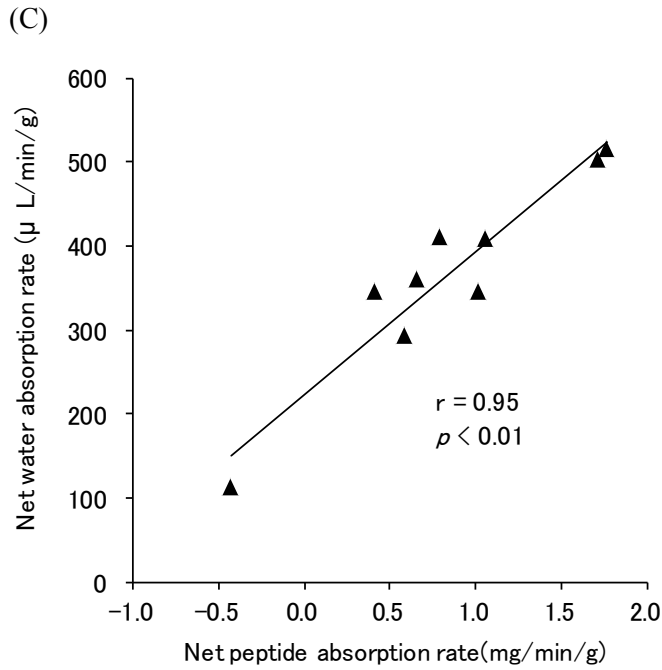


Fig. 3-1. Relationship between whey peptide concentration in the test solution and water absorption.

We examined the relationship between whey peptide concentration in the test solution and (A) water absorption rate or (B) peptide absorption rate using a rat small intestine perfusion model. We used whey peptides at 0%, 0.1%, 0.3%, and 0.5%. The Na⁺ concentration was 10 mM. Values are mean + SEM (n=4–6). **p*<0.05, ***p*<0.01 compared to the 0% whey peptide group. (C) We plotted the peptide absorption rate and the water absorption rate for test solutions containing 0.3% and 0.5% whey peptides.

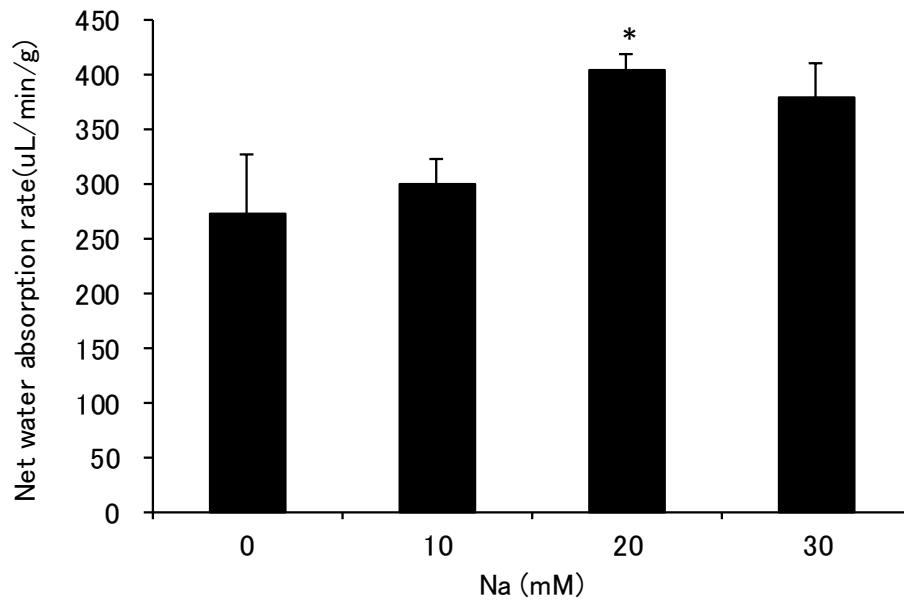
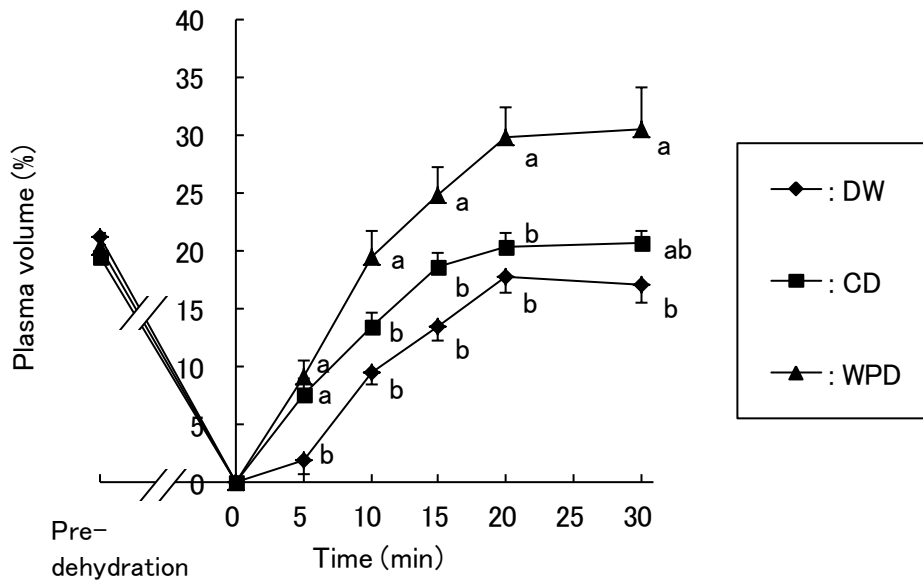


Fig. 3-2. Relationship between Na⁺ concentration in the test solution and water absorption rate.

We examined the relationship between Na⁺ concentration in the test solution and water absorption rate using a rat small intestine perfusion model. We used Na⁺ at 0, 10, 20, and 30 mM. The whey peptide concentration was 0.3%. Values are mean + SEM (n=4-5). * $p < 0.05$ compared to the 0 mM Na⁺ group.

(A)



(B)

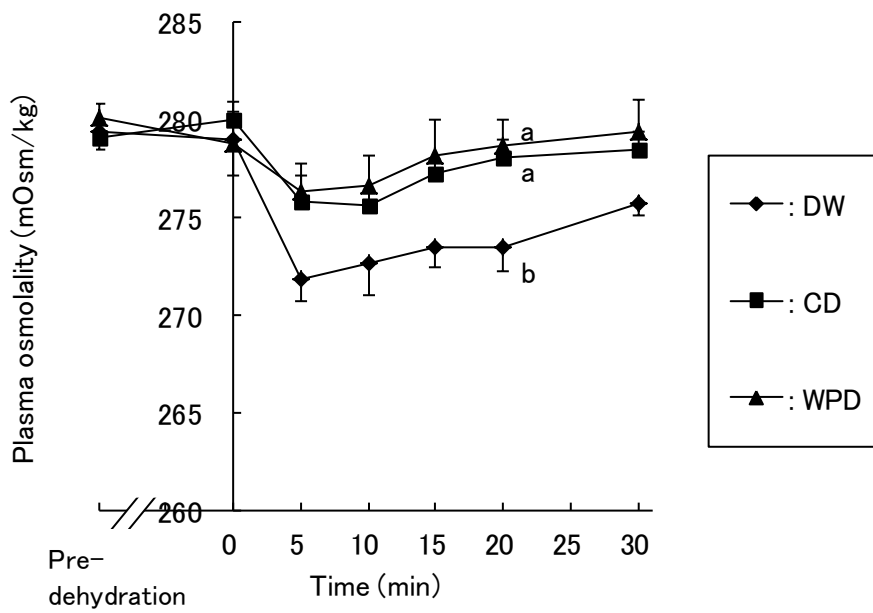
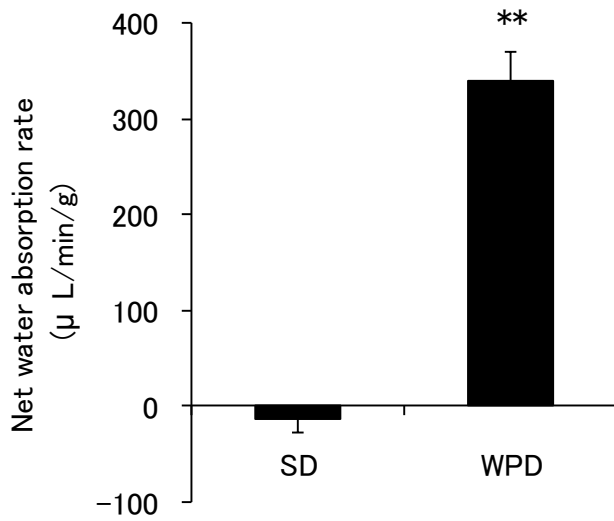


Fig. 3-3. Effectiveness of WPD on alleviating dehydration.

Rats were dehydrated by 16-h water deprivation and diuretic administration. Each test drink was administered orally, and blood was collected over time. (A) Rates of change in plasma volume were measured. Values are mean + SEM (n=8-9). (B) Plasma osmolality was measured. Values are mean + SEM (n=8-10). Values without a common letter differ significantly ($p < 0.05$). DW, distilled water; CD, control drink; WPD, wey peptide drink.

(A)



(B)

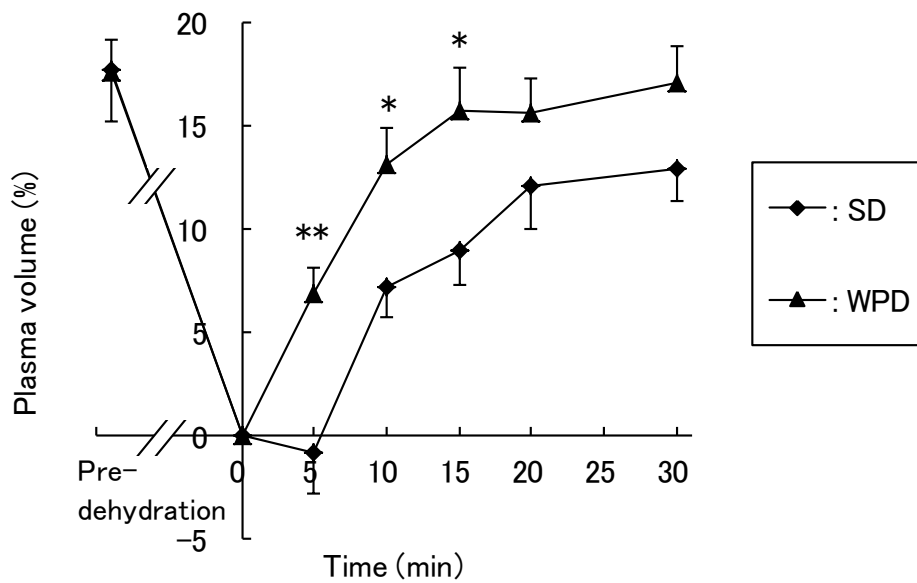


Fig. 3-4. Comparison of the effectiveness of WPD with that of SD.

(A) Water absorption rates on SD and WPD were measured using the rat small intestine perfusion model. Values are mean + SEM (n=4). (B) Rates of change in plasma volume after the administration of WPD or SD were measured as summarized in the Fig. 3-3 legend. Values are mean + SEM (n=8-9). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to the SD group. SD, sports drink; WPD, whey peptide drink.

Table 3-1. Compositions of the test drinks

Composition	WPD	CD	SD
Whey peptides (w/v%)	0.5	0	0
Carbohydrate (w/v%)	0.6	0.6	6.2
Sodium (mM)	21	20	21
Potassium (mM)	5	3	5

WPD, whey peptide drink; CD, control drink; SD, sports drink (commercially available).

Table 3-2. Effect of water deprivation and diuretic administration on body weight and plasma volume

Fasting	+	+	+
Water-deprivation	-	+	+
Diuretics administration	-	-	+
Δ BW (%)	-5.5 ± 0.3^a	-5.4 ± 0.1^a	-8.4 ± 0.1^b
Δ PW (%)	-8.4 ± 0.9^a	-5.9 ± 1.7^a	-22.3 ± 1.6^b

We examined the effect of 16-h water deprivation and the administration of 50 mg/kg furosemide on body weight and plasma volume. Values are mean + SEM (n=7–8). Values without a common letter differ significantly ($p < 0.05$). Δ BW, body weight change; Δ PV, plasma volume change.

総括

本研究において、乳タンパク質や乳タンパク質由来のホエイペプチドという生物資源が、それぞれ水分保持効果や小腸における水分吸収促進効果を有することを明らかにした。そして、これらの生物資源を利用することで、脱水症を予防するための飲料および脱水症を治療するための飲料の開発が可能であることを示した。これにより、熱中症をはじめとする、脱水症によって生じる様々な悪影響に対する効果的な対策が可能となり、人々の健康に貢献することができると考えられる。

本研究では、乳タンパク質による水分保持効果およびホエイペプチドによる水分吸収促進効果の機序についても検討を行い、前者にはインスリン分泌による腎での水再吸収促進が、後者には PepT1 が少なくとも一部関与していることを示した。これらの水分補給機能には、他の機序が存在する可能性もあり、より詳細な検討が必要である。

本研究成果は、子供から高齢者、普段運動をしないヒトからアスリートといった、幅広い対象者の健康管理に貢献できると期待される。今後は、臨床試験により、MPD および WPD の脱水症に対する有用性を明らかにすることが課題である。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導とご鞭撻を賜りました日本大学生物資源科学部 教授 小田 宗宏 博士に心より厚く御礼申し上げます。

本論文の作成にあたり、適切なお助言を賜りました日本大学生物資源学部 教授 増田 哲也 博士, 教授 細野 朗 博士, 准教授 松藤 寛 博士に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、適切なるご指導とご助言を賜りました福岡女子大学 准教授 高橋 徹 博士に深く感謝申し上げます。

博士論文を作成する機会を与えていただき、多大なるご配慮、ご協力をいただいた株式会社 明治 研究本部 研究本部長 伊藤 裕之 博士, 機能性評価研究一部・二部長 山地 健人 博士, ミルクサイエンス G 長 山口 真 博士, 高齢者栄養 G 長 芦田 欣也 博士をはじめとする株式会社 明治の皆様にご心から感謝申し上げます。

最後に、本研究を進めるにあたり、温かく応援し支えてくれた妻と両親に感謝いたします。

引用文献

- [1] Nadel, E.R., Fortney, S.M. and Wenger, C.B. (1980) Effect of hydration state of circulatory and thermal regulations. J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exerc. Physiol., 49, 715-721.
- [2] Sawka, M.N. (1992) Physiological consequences of hypohydration: exercise performance and thermoregulation. Med. Sci. Sports Exerc., 24, 657-670.
- [3] Yoshida, T., Nagashima, K., Nose, H., Kawabata, T., Nakai, S., Yorimoto, A. and Morimoto, T. (1997) Relationship between aerobic power, blood volume, and thermoregulatory responses to exercise-heat stress. Med. Sci. Sports Exerc., 29, 867-873.
- [4] Yoshida, T., Takanishi, T., Nakai, S., Yorimoto, A. and Morimoto, T. (2002) The critical level of water deficit causing a decrease in human exercise performance: a practical field study. Eur. J. Appl. Physiol., 87, 529-534.
- [5] Gonzalez-Alonso, J., Calbet, J.A. and Nielsen, B. (1999) Metabolic and thermodynamic responses to dehydration-induced reductions in muscle blood flow in exercising humans. J. Physiol., 520 Pt 2, 577-589.
- [6] Pross, N., Demazieres, A., Girard, N., Barnouin, R., Santoro, F., Chevillotte, E., Klein, A. and Le Bellego, L. (2013) Influence of progressive fluid restriction on mood and physiological markers of dehydration in women. Br. J. Nutr., 109, 313-321.
- [7] Wilson, M.M. and Morley, J.E. (2003) Impaired cognitive function and mental performance in mild dehydration. Eur. J. Clin. Nutr., 57 Suppl 2, S24-29.
- [8] Hofmeyr, G.J. and Gulmezoglu, A.M. (2002) Maternal hydration for increasing amniotic fluid volume in oligohydramnios and normal amniotic fluid volume. The Cochrane database of systematic reviews, Cd000134.
- [9] Fait, G., Pautner, D., Gull, I., Lessing, J.B., Jaffa, A.J. and Wolman, I. (2003) Effect of 1 week of oral hydration on the amniotic fluid index. J. Reprod. Med., 48, 187-190.
- [10] Borghi, L., Meschi, T., Amato, F., Briganti, A., Novarini, A. and Giannini, A. (1996) Urinary volume, water and recurrences in idiopathic calcium nephrolithiasis: a 5-year randomized

- prospective study. J. Urol., 155, 839-843.
- [11] Mazzola, B.L., von Vigier, R.O., Marchand, S., Tonz, M. and Bianchetti, M.G. (2003) Behavioral and functional abnormalities linked with recurrent urinary tract infections in girls. J. Nephrol., 16, 133-138.
- [12] Arnaud, M.J. (2003) Mild dehydration: a risk factor of constipation? Eur. J. Clin. Nutr., 57 Suppl 2, S88-95.
- [13] Chee, Y.L. and Watson, H.G. (2005) Air travel and thrombosis. Br. J. Haematol., 130, 671-680.
- [14] Chan, J., Knutsen, S.F., Blix, G.G., Lee, J.W. and Fraser, G.E. (2002) Water, other fluids, and fatal coronary heart disease: the Adventist Health Study. Am. J. Epidemiol., 155, 827-833.
- [15] 総務省消防庁, 平成 27 年の熱中症による救急搬送状況, Available from: http://www.fdma.go.jp/neuter/topics/houdou/h27/10/271016_houdou_1.pdf
- [16] 厚生労働省, 熱中症による死亡数 人口動態統計 (確定数), Available from: <http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/tokusyu/necchusho14/index.html>
- [17] 松月弘恵 (2012) 高齢者の脱水予防について. 日本栄養士会雑誌, 55, 624-625.
- [18] 谷口英喜 (2013) 経口補水療法ハンドブック—熱中症, 脱水症に役立つ 脱水症状を改善する「飲む点滴」の活用法. 日本医療企画, 東京.
- [19] Loo, D.D., Zeuthen, T., Chandy, G. and Wright, E.M. (1996) Cotransport of water by the Na⁺/glucose cotransporter. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 93, 13367-13370.
- [20] Loo, D.D., Wright, E.M. and Zeuthen, T. (2002) Water pumps. J. Physiol., 542, 53-60.
- [21] Agre, P. and Nielsen, S. (1996) The aquaporin family of water channels in kidney. Nephrologie, 17, 409-415.
- [22] Engel, A. and Stahlberg, H. (2002) Aquaglyceroporins: channel proteins with a conserved core, multiple functions, and variable surfaces. Int. Rev. Cytol., 215, 75-104.
- [23] Mobasher, A., Shakibaei, M. and Marples, D. (2004) Immunohistochemical localization of

- aquaporin 10 in the apical membranes of the human ileum: a potential pathway for luminal water and small solute absorption. Histochem. Cell Biol., 121, 463-471.
- [24] Ramirez-Lorca, R., Vizuete, M.L., Venero, J.L., Revuelta, M., Cano, J., Ilundain, A.A. and Echevarria, M. (1999) Localization of aquaporin-3 mRNA and protein along the gastrointestinal tract of Wistar rats. Pflugers Arch., 438, 94-100.
- [25] Jin, X.H., Wang, Z.Q., Siragy, H.M., Guerrant, R.L. and Carey, R.M. (1998) Regulation of jejunal sodium and water absorption by angiotensin subtype receptors. Am. J. Physiol., 275, R515-523.
- [26] Levens, N.R. (1985) Control of intestinal absorption by the renin-angiotensin system. Am. J. Physiol., 249, G3-15.
- [27] Pettersson, A. and Jonsson, C.O. (1989) Effects of atrial natriuretic peptide (ANP) on jejunal net fluid absorption in the rat. Acta Physiol. Scand., 136, 419-426.
- [28] Lubcke, R., Brunner, J., Hutcheson, F.A. and Barbezat, G.O. (1991) Only pharmacological doses of atrial natriuretic peptide affect intestinal ion transport in non-volume expanded rats. Gut, 32, 1117-1120.
- [29] Mourad, F.H., Barada, K.A., Abdel-Malak, N., Bou Rached, N.A., Khoury, C.I., Saade, N.E. and Nassar, C.F. (2003) Interplay between nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide in inducing fluid secretion in rat jejunum. J. Physiol., 550, 863-871.
- [30] Schirgi-Degen, A. and Beubler, E. (1995) Significance of nitric oxide in the stimulation of intestinal fluid absorption in the rat jejunum in vivo. Br. J. Pharmacol., 114, 13-18.
- [31] Chen, M., Singh, A., Xiao, F., Dringenberg, U., Wang, J., Engelhardt, R., Yeruva, S., Rubio-Aliaga, I., Nassl, A.M., Kottra, G., Daniel, H. and Seidler, U. (2010) Gene ablation for PEPT1 in mice abolishes the effects of dipeptides on small intestinal fluid absorption, short-circuit current, and intracellular pH. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 299, G265-274.
- [32] Wuensch, T., Schulz, S., Ullrich, S., Lill, N., Stelzl, T., Rubio-Aliaga, I., Loh, G.,

- Chamaillard, M., Haller, D. and Daniel, H. (2013) The peptide transporter PEPT1 is expressed in distal colon in rodents and humans and contributes to water absorption. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 305, G66-73.
- [33] Boirie, Y., Dangin, M., Gachon, P., Vasson, M.P., Maubois, J.L. and Beaufrere, B. (1997) Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 94, 14930-14935.
- [34] Hartman, J.W., Tang, J.E., Wilkinson, S.B., Tarnopolsky, M.A., Lawrence, R.L., Fullerton, A.V. and Phillips, S.M. (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.
- [35] Wilkinson, S.B., Tarnopolsky, M.A., Macdonald, M.J., Macdonald, J.R., Armstrong, D. and Phillips, S.M. (2007) Consumption of fluid skim milk promotes greater muscle protein accretion after resistance exercise than does consumption of an isonitrogenous and isoenergetic soy-protein beverage. Am. J. Clin. Nutr., 85, 1031-1040.
- [36] Kanda, A., Nakayama, K., Sanbongi, C., Nagata, M., Ikegami, S. and Itoh, H. (2016) Effects of Whey, Caseinate, or Milk Protein Ingestion on Muscle Protein Synthesis after Exercise. Nutrients, 8, 339.
- [37] Burd, N.A., Yang, Y., Moore, D.R., Tang, J.E., Tarnopolsky, M.A. and Phillips, S.M. (2012) Greater stimulation of myofibrillar protein synthesis with ingestion of whey protein isolate v. micellar casein at rest and after resistance exercise in elderly men. Br. J. Nutr., 108, 958-962.
- [38] Cribb, P.J., Williams, A.D., Carey, M.F. and Hayes, A. (2006) The effect of whey isolate and resistance training on strength, body composition, and plasma glutamine. Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab., 16, 494-509.
- [39] Morifuji, M., Ishizaka, M., Baba, S., Fukuda, K., Matsumoto, H., Koga, J., Kanegae, M. and Higuchi, M. (2010) Comparison of different sources and degrees of hydrolysis of dietary

- protein: effect on plasma amino acids, dipeptides, and insulin responses in human subjects. J. Agric. Food Chem., 58, 8788-8797.
- [40] Kanda, A., Nakayama, K., Fukasawa, T., Koga, J., Kanegae, M., Kawanaka, K. and Higuchi, M. (2013) Post-exercise whey protein hydrolysate supplementation induces a greater increase in muscle protein synthesis than its constituent amino acid content. Br. J. Nutr., 110, 981-987.
- [41] 糸久枝, 岡崎恵子, 山口真, 塚原正俊, 佐々木一 (2005) 乳清タンパク質および乳清タンパク質トリプシン分解ペプチドの ConA 誘発肝炎発症抑制作用. 日本病態栄養学会誌, 8, 15-21.
- [42] Ma, Y., Liu, J., Shi, H. and Yu, L.L. (2016) Isolation and characterization of anti-inflammatory peptides derived from whey protein. J. Dairy Sci., 99, 6902-6912.
- [43] Crouch, S.P., Slater, K.J. and Fletcher, J. (1992) Regulation of cytokine release from mononuclear cells by the iron-binding protein lactoferrin. Blood, 80, 235-240.
- [44] Yamaguchi, M., Yoshida, K. and Uchida, M. (2009) Novel functions of bovine milk-derived alpha-lactalbumin: anti-nociceptive and anti-inflammatory activity caused by inhibiting cyclooxygenase-2 and phospholipase A2. Biol. Pharm. Bull., 32, 366-371.
- [45] Maughan, R.J., Leiper, J.B. and Shirreffs, S.M. (1997) Factors influencing the restoration of fluid and electrolyte balance after exercise in the heat. Br. J. Sports Med., 31, 175-182.
- [46] Osterberg, K.L., Pallardy, S.E., Johnson, R.J. and Horswill, C.A. (2010) Carbohydrate exerts a mild influence on fluid retention following exercise-induced dehydration. J. Appl. Physiol., 108, 245-250.
- [47] Intersalt Cooperative Research Group. (1988) Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion. Intersalt Cooperative Research Group. BMJ, 297, 319-328.
- [48] Mensink, R.P. and Katan, M.B. (1992) Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins. A meta-analysis of 27 trials. Arterioscler. Thromb., 12, 911-919.

- [49] James, L.J., Clayton, D. and Evans, G.H. (2011) Effect of milk protein addition to a carbohydrate-electrolyte rehydration solution ingested after exercise in the heat. Br. J. Nutr., 105, 393-399.
- [50] Ishihara, K., Kato, Y., Usami, A., Yamada, M., Yamamura, A., Fushiki, T., Seyama, Y. (2013) Electrolyte-free milk protein solution influences sodium and fluid retention in rats. J. Nutr. Sci., 2, 1-7.
- [51] Dill, D.B. and Costill, D.L. (1974) Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma, and red cells in dehydration. J. Appl. Physiol., 37, 247-248.
- [52] Nagashima, K., Kusaka, H., Sato, K. and Karasawa, A. (1994) Effects of KW-3902, a novel adenosine A1-receptor antagonist, on cephaloridine-induced acute renal failure in rats. Jpn. J. Pharmacol., 64, 9-17.
- [53] Schnedl, W.J., Ferber, S., Johnson, J.H. and Newgard, C.B. (1994) STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. Diabetes, 43, 1326-1333.
- [54] Wang, Z. and Gleichmann, H. (1998) GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. Diabetes, 47, 50-56.
- [55] Durkot, M.J., Martinez, O., Brooks-McQuade, D. and Francesconi, R. (1986) Simultaneous determination of fluid shifts during thermal stress in a small-animal model. J. Appl. Physiol., 61, 1031-1034.
- [56] Suzuki, Y., Hamaguchi, Y. and Yamagami, I. (1977) [Pharmacological studies on diuretics (8). Diuretic activity and mechanism of action of a new hypotensive diuretic, SE-1520 (author's transl)]. Nihon Yakurigaku Zasshi, 73, 321-335.
- [57] Nilsson, M., Stenberg, M., Frid, A.H., Holst, J.J. and Bjorck, I.M. (2004) Glycemia and insulinemia in healthy subjects after lactose-equivalent meals of milk and other food proteins: the role of plasma amino acids and incretins. Am. J. Clin. Nutr., 80, 1246-1253.
- [58] Baum, M. (1987) Insulin stimulates volume absorption in the rabbit proximal convoluted tubule. J. Clin. Invest., 79, 1104-1109.

- [59] Magaldi, A.J., Cesar, K.R. and Yano, Y. (1994) Effect of insulin on water and urea transport in the inner medullary collecting duct. Am. J. Physiol., 266, F394-399.
- [60] Bustamante, M., Hasler, U., Kotova, O., Chibalin, A.V., Mordasini, D., Rousselot, M., Vandewalle, A., Martin, P.Y. and Feraille, E. (2005) Insulin potentiates AVP-induced AQP2 expression in cultured renal collecting duct principal cells. Am. J. Physiol. Renal Physiol., 288, F334-344.
- [61] Lifshitz, F. and Wapnir, R.A. (1985) Oral hydration solutions: experimental optimization of water and sodium absorption. J. Pediatr., 106, 383-389.
- [62] Sasseville, L.J., Cuervo, J.E., Lapointe, J.Y. and Noskov, S.Y. (2011) The structural pathway for water permeation through sodium-glucose cotransporters. Biophys. J., 101, 1887-1895.
- [63] Duquette, P.P., Bissonnette, P. and Lapointe, J.Y. (2001) Local osmotic gradients drive the water flux associated with Na(+)/glucose cotransport. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 98, 3796-3801.
- [64] Cunha Ferreira, R.M., Elliott, E.J., Watson, A.J., Brennan, E., Walker-Smith, J.A. and Farthing, M.J. (1992) Dominant role for osmolality in the efficacy of glucose and glycine-containing oral rehydration solutions: studies in a rat model of secretory diarrhoea. Acta Paediatr., 81, 46-50.
- [65] Wapnir, R.A., Zdanowicz, M.M., Teichberg, S. and Lifshitz, F. (1988) Oral hydration solutions in experimental osmotic diarrhea: enhancement by alanine and other amino acids and oligopeptides. Am. J. Clin. Nutr., 48, 84-90.
- [66] Silva, A.C., Santos-Neto, M.S., Soares, A.M., Fonteles, M.C., Guerrant, R.L. and Lima, A.A. (1998) Efficacy of a glutamine-based oral rehydration solution on the electrolyte and water absorption in a rabbit model of secretory diarrhea induced by cholera toxin. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., 26, 513-519.
- [67] Pillai, G.V., Brueton, M.J., Burston, D. and Sandhu, B.K. (1994) Studies of water movement

- across the gut using oral rehydration solutions in a rat perfusion model. Aliment. Pharmacol. Ther., 8, 555-558.
- [68] Hegarty, J.E., Fairclough, P.D., Clark, M.L. and Dawson, A.M. (1981) Jejunal water and electrolyte secretion induced by L-arginine in man. Gut, 22, 108-113.
- [69] Suzukawa, K., Tani, H., Osanai, H., Shirato, M. and Nakano, S. (2003) Penetration of different kinds of peptides or collagen through the intestinal membrane. Jpn J. Phys. Fitness Sports Med., 52, 99-110.
- [70] Morifuji, M., Kanda, A., Koga, J., Kawanaka, K. and Higuchi, M. (2010) Post-exercise carbohydrate plus whey protein hydrolysates supplementation increases skeletal muscle glycogen level in rats. Amino Acids, 38, 1109-1115.
- [71] Morifuji, M., Koga, J., Kawanaka, K. and Higuchi, M. (2009) Branched-chain amino acid-containing dipeptides, identified from whey protein hydrolysates, stimulate glucose uptake rate in L6 myotubes and isolated skeletal muscles. J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo), 55, 81-86.
- [72] Nishinaka, D., Kishino, F. and Matsuura, A. (2004) Water and electrolyte absorption from hypotonic oral rehydration solution in rat small intestine and colon. Pediatr. Int., 46, 315-321.
- [73] SHIMADZU, High Speed, High Resolution Analysis Analysis of Pre-Column Derivatized Amino Acids by the Nexera SIL-30AC Autosampler, Available from: <http://www.shimadzu.com/an/hplc/support/lc/ap/n9j25k00000d8sb7.html>
- [74] Meredith, D., Boyd, C.A., Bronk, J.R., Bailey, P.D., Morgan, K.M., Collier, I.D. and Temple, C.S. (1998) 4-aminomethylbenzoic acid is a non-translocated competitive inhibitor of the epithelial peptide transporter PepT1. J. Physiol., 512 (Pt 3), 629-634.
- [75] Steinhardt, H.J. and Adibi, S.A. (1986) Kinetics and characteristics of absorption from an equimolar mixture of 12 glycyl-dipeptides in human jejunum. Gastroenterology, 90, 577-582.

- [76] Silk, D.B., Clark, M.L., Marrs, T.C., Addison, J.M., Burston, D., Matthews, D.M. and Clegg, K.M. (1975) Jejunal absorption of an amino acid mixture simulating casein and an enzymic hydrolysate of casein prepared for oral administration to normal adults. Br. J. Nutr., 33, 95-100.
- [77] Shimaoka, I., Kayashita, J., Nakajoh, M., Mori, S. and Itokawa, Y. (1992) Measurement of intestinal absorption of calcium-casein peptide in rats by portal cannulation. J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci., 45, 339-345.
- [78] Institute of Medicine (1994) Fluid Replacement and Heat Stress.
- [79] Chang, C.Q., Chen, Y.B., Chen, Z.M. and Zhang, L.T. (2010) Effects of a carbohydrate-electrolyte beverage on blood viscosity after dehydration in healthy adults. Chin. Med. J. (Engl.), 123, 3220-3225.
- [80] Gonzalez-Alonso, J., Heaps, C.L. and Coyle, E.F. (1992) Rehydration after exercise with common beverages and water. Int. J. Sports Med., 13, 399-406.
- [81] Shirreffs, S.M., Aragon-Vargas, L.F., Keil, M., Love, T.D. and Phillips, S. (2007) Rehydration after exercise in the heat: a comparison of 4 commonly used drinks. Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab., 17, 244-258.
- [82] Wong, S.H. and Chen, Y. (2011) Effect of a carbohydrate-electrolyte beverage, lemon tea, or water on rehydration during short-term recovery from exercise. Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab., 21, 300-310.
- [83] 田畑泉 (2012) 市販糖電解質飲料中の糖組成の違いが水分補給効果に及ぼす影響. 体育の科学, 62, 538-543.
- [84] Ganapathy and Leibach, F.H. (1985) Is intestinal peptide transport energized by a proton gradient? Am. J. Physiol., 249, G153-160.
- [85] Nakajima, Y., Nose, H. and Takamata, A. (1998) Plasma hyperosmolality and arterial pressure regulation during heating in dehydrated and awake rats. Am. J. Physiol., 275, R1703-1711.

- [86] Ikegawa, S., Kamijo, Y., Okazaki, K., Masuki, S., Okada, Y. and Nose, H. (2011) Effects of hypohydration on thermoregulation during exercise before and after 5-day aerobic training in a warm environment in young men. J. Appl. Physiol., 110, 972-980.
- [87] Jeukendrup, A.E., Currell, K., Clarke, J., Cole, J. and Blannin, A.K. (2009) Effect of beverage glucose and sodium content on fluid delivery. Nutr. Metab. (Lond.), 6, 9.
- [88] Vist, G.E. and Maughan, R.J. (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.
- [89] Coyle, E.F., Costill, D.L., Fink, W.J. and Hoopes, D.G. (1978) Gastric emptying rates for selected athletic drinks. Res. Q., 49, 119-124.
- [90] Foster, C., Costill, D.L. and Fink, W.J. (1980) Gastric emptying characteristics of glucose and glucose polymer solutions. Res. Q. Exerc. Sport, 51, 299-305.
- [91] Watson, P., Love, T.D., Maughan, R.J. and Shirreffs, S.M. (2008) A comparison of the effects of milk and a carbohydrate-electrolyte drink on the restoration of fluid balance and exercise capacity in a hot, humid environment. Eur. J. Appl. Physiol., 104, 633-642.
- [92] Hobson, R. and James, L. (2015) The addition of whey protein to a carbohydrate-electrolyte drink does not influence post-exercise rehydration. J. Sports Sci., 33, 77-84.