# 【原 著】

# 機能性食品の筋疲労効果を評価する新手法の提案 New Evaluation Method of Muscle Anti-Fatigue Effect

貴志浩久<sup>1,2,\*</sup>,不破輝彦<sup>2</sup>,久保村大樹<sup>3</sup>,杉浦敏文<sup>1,4</sup> Hirohisa KISHI<sup>1,2,\*</sup>, Teruhiko FUWA<sup>2</sup>, Daiki KUBOMURA<sup>3</sup>, Toshifumi SUGIURA<sup>1,4</sup>

> 1 静岡大学創造科学技術大学院自然科学専攻 2 職業能力開発総合大学校能力開発院心身管理・生体工学ユニット 3 焼津水産化学工業 4 静岡大学電子工学研究所

#### 【要 旨】

機能性食品における抗疲労効果に関してはアンケートによる主観評価法が主として用いられており、簡便、且つ直接的に疲労を評価している報告は少ない.本研究では筋電図方法を提案するとともに、健康な成人男性 17 名(平均年齢 35.5 ± 5 歳)に対して臨床試験を行い、その効果を検証した.試験プロトコールとして 1 回の対験をでは、一次回帰直線の傾きの回転角を疲労指標(AFI)とすることにより変動による差を低減させた。おりに、周波数解析区間を分けることにより、アンセリンの筋肉疲労軽減効果を確認した.

### 【キーワード】

アンセリン, 抗疲労効果, 機能性食品, 筋電図, 中心周波数

#### はじめに

近年、機能性食品が注目されている<sup>1,2)</sup>、さまざまな機 能性食品の生理活性の研究が行われており、その効能も 様々である. その中には抗疲労効果があるとされている 物質も含まれている. 疲労には肉体的疲労と精神的疲労 があり、精神的疲労を評価する事は難しいが、肉体的疲 労については可能である. 肉体的疲労は具体的に筋疲労 で評価される場合が多く,一般的に生理学的,電気的に 測定することができる. 被験対象はマウスの報告が多い が3-5)、その理由は生物が持つ個体差を遺伝子レベルま で管理して実験条件を整える事ができるからである. し かしマウスで効果が得られたとしても同様の効果が人間 で得られる保証はない. ヒトを対象とした場合はマウス とは異なり、被験者の生活を厳重に管理し、かつ病歴を 含む遺伝的特徴をも揃えることは現実的に不可能に近い. また, 実験日を含む相当な期間の個人の体調を管理し, 考慮に入れる事も非常に困難である.

特に機能性食品などの人体への効果を検証する場合はコントロール(対照群)との比較を行うプラセボ対照試験を用いて、一般的に異なる日に少なくとも2度の実験を行わなければならない。ヒトにおいては効果の評価手段として運動継続時間<sup>6)</sup> やアンケート<sup>7)</sup> で統計的に評価する場合が多いが、運動継続時間は被験者間の差もさることながら、同一被験者においてもその日の体調に影響を受けることから、通常のプラセボ対照試験による検証はかなり難しいと思われる。また、アンケートもその日

受理日: 2014年7月24日

<sup>\* 〒187-0035</sup> 東京都小平市小川西町 2-32-1 職業能力開発総合大学校能力開発院心身管理・生体工学ユニット Tel: 042-346-7738 Fax: 042-344-5609 E-mail: kishi@uitec.ac.jp

の体調や精神的な要因の影響を逃れられないと考えられる.より信頼性の高い方法として血中成分分析<sup>5,8)</sup>による評価法もあるが、侵襲的に血液を採取しなければならず、実験自体が複雑になる可能性がある.

本研究では、非侵襲で直接計測できる表面筋電図に着目し、個体差や体調等の差異をできる限り吸収できる筋疲労評価法を新規考案し、海洋性アンセリンを用いてその手法の有効性を検証した.

#### 材料・方法

#### 1. 被験者

被験者は健常な男性 17 名 (平均年齢 35.5 ± 5 歳 体重 75.5 ± 5 kg) である。実験の前日は暴飲暴食を避け、また実験当日、朝食は絶食とした。被験者には研究の目的と趣旨、実験説明を行い、本人の承諾を得、静岡大学倫理委員会の承認の下に行った。

#### 2. 被験食品

本研究では主に生理学的評価によって既に様々な機能性 $^{4.8}$ が証明されているアミノ酸食品であるアンセリン (焼津水産化学工業 (株))を用いた。アンセリンは 200 mL (30°C)の水に 11 mg/kg の割合で溶かした。対照となる水も 200 mL (30°C)を用意した。

## 3. 被験筋

被験筋は大腿直筋とし、エタノールで皮膚をぬぐい股の付け根と膝頭の中間点から 1 cm ずつ離して電極を取り付けた.

# 4. 測定システム

筋電アンプ (EMG-021, 原田電子工業 (株)) を経て 1 kHz, 16 bit で AD 変換 (National Instrument NI USB-6210) を行い, オフラインでの解析を行った.

#### 5. 評価方法

アンセリンと水の二重盲検クロスオーバー臨床試験とし、各測定は最低1週間を開けて実施した。また測定ごとの単回摂取とし被験者及び測定者には摂取する内容が分らないようにした。測定は図1のように座位状態で行い、足を水平に保つ等尺性収縮運動を負荷とした。試験プロトコールを表1に示す。アンセリンか水を摂取後直ちに測定を開始、安静20分、運動5分(運動1)、安静15分、運動3分(運動2)、安静5分の合計48分(2880秒)とした。

#### 6. 解析方法

運動時の筋電図信号を 10 sec ごとに短時間フーリエ変換 (Short Time Fourier Transformation, STFT) を行いパワースペクトルを算出した. 窓関数にはハニング窓を適用した. 周波数解析区間は 20–214 Hz とし以下の式で表される周波数中央値 (Median Frequency, MDF) を求めた.

$$\int_{20}^{MDF} P(f)df = \int_{MDF}^{214} P(f)df$$

$$P(f): パワースペクトル f: 周波数$$
(1)

算出された MDF の変化傾向を疲労評価に用いるために、両データに 1 次回帰直線をあてはめその傾きを算出した(図 2). 1 回目と 2 回目の運動の MDF の傾きから,1 回目の傾きとの角度差(式 2)を計算しそれを疲労の指標、疲労角度指標 (Angle Fatigue Index, AFI) とした. この値が正であれば筋放電が増加、負であれば除波化し疲労してきているといえる. また、負の値の絶対値が高くなる



図1 計測姿勢 運動時は、足から台をはずしその状態を維持する

表1 計測プロトコール

0分	20 分	5分	15 分	3分	5 分
摂取	安静1	運動 1	安静 2	運動 2	安静 3

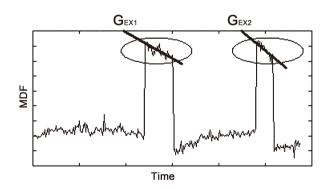


図2 MDF の時系列データと回帰直線の説明解析された MDF の一例を時系列に示す. 〇で囲われた範囲が運動時の MDF である. 運動時の回帰直線を求め、傾き  $G_{\text{Ext}}$  を算出する. 2 回目の傾きが負の方向に大きいほど疲労しているといえる.

ほど疲労が進行していると考えられる.

$$AFI = Angle = \cos^{-1}\theta = \frac{(1 \times 1) + (G_{Ex1} \times G_{Ex2})}{\sqrt{1^2 + G_{Ex1}^2} \times \sqrt{1^2 + G_{Ex2}^2}}$$

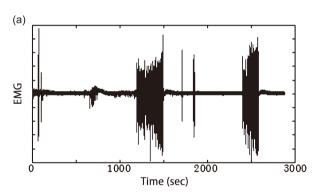
 $G_{Ext}$ : 運動 1 回帰直線の傾き  $G_{Ex2}$ : 運動 2 回帰直線の傾き

アンセリンと水の解析結果の比較には paired t-test を用い、有意水準は 0.05 とした。 さらに周波数の解析区間を  $10~\rm{Hz}$  から上限を  $50~\rm{Hz}$  ごとに変化させて解析を行った。

#### 結 果

アンセリン,水のそれぞれの筋電図波形を図3に示す.2度振幅が大きくなっている部分がそれぞれ運動1と運動2である.運動が進むにつれ次第に筋の動員が増え運動経過にともない振幅が増大している。アンセリンと水での差は見られなかった.

続いて、水、アンセリンそれぞれの運動 2 の 10 sec



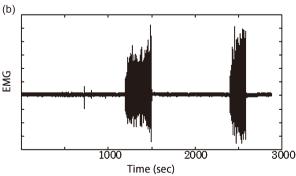


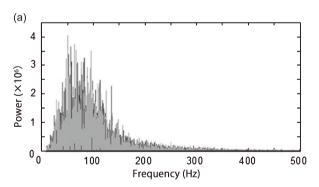
図3 水及びアンセリン摂取時生筋電図の一例(2880 秒 48 分間)

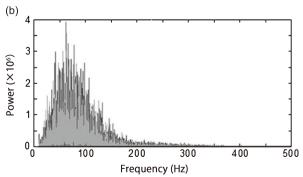
(a) にアンセリン摂取時, (b) に水摂取時の筋電図を示す 振幅が大きい場所が運動時の EMG である. 運動時間とともに 振幅が大きくなっている. ごとのスペクトルを合成したものを図4に示す.スペクトルは10-300 Hz 程度まで観察できる. 周波数のピークは概ね100 Hz 以下に見られた. また水摂取とアンセリン摂取の比較では100 Hz 付近でスペクトルの違いがみられた. これは後述の図7に反映されているものと思われる.

MDF の時系列データの一例を図 5(a), (b) に示す. 実線が運動の1回目,点線が運動の2回目である. どの状態も時間の経過とともに MDF の値が減少している. その結果を元にそれぞれ運動時の一時回帰直線の傾きを算出,運動の1回目と運動の2回目の傾きを比較した. アンセリンでは17名中3名,水では,17名中1名が疲労しているはずの2回目の方が傾きが小さくなった. また水はアンセリンに比べ傾きが大きくなる傾向が17名中14名に見られた.

図 6 にアンセリン摂取時と水摂取時の 17 名分の疲労 角度指数を示す。アンセリン摂取時の方が水摂取時に比 べ疲労角度指数が全体的に高く、水に比べ疲労が軽減し ていた (p<0.01).

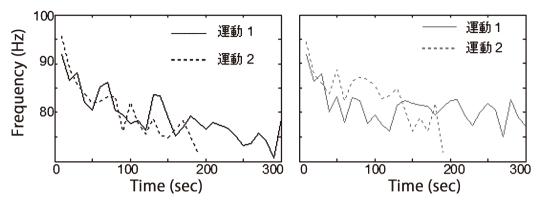
また、解析周波数範囲を 10 Hz からの上限を変化させた場合の各被験者の角度差平均の結果を図7に示した、 上限 50 Hz を境にして水の角度が指数関数的に減少して



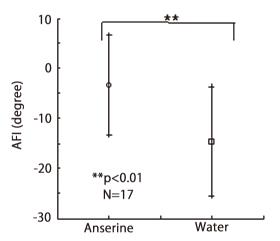


**図4** 水及びアンセリン摂取時における運動2の筋電図スペクトルの一例

(a) にアンセリン摂取時, (b) に水摂取時の筋電図を示す 10 s ごとの STFT スペクトルデータを重ねて示している.



**図5** アンセリンと水の MDF 時系列データの一例 スペクトルから算出された運動時のみの MDF の時系列変化を示している.



**図 6** アンセリンと水の場合での傾きの角度差 (p<0.01, paired t-test)

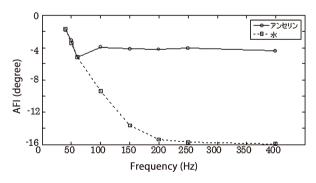


図7 解析周波数範囲を変化させた場合のアンセリンと水の角度差

解析周波数の下限 10 Hz から上限だけの範囲を 30 Hz から変化させたときの算出された被験者の疲労角度指標の平均値を示す.

おり、アンセリン摂取の方は 100 Hz 以降あまり変化がなかった.

# 考察

# 1. 評価法

機能性食品などの抗疲労効果の評価はマウスを被験体として行われることが多いが、同じ方法がヒトにも応用できるとは限らない。その中でも運動継続時間はマウスでもヒトでも用いられる方法であるが、ヒトの場合は被験者毎の運動能力の差、試験当日、及びそれまでの体調と精神状態の管理などを考慮した上での疲労の評価は困難であると考えられる。血液分析や筋生検も有用だと思われるが、いずれも侵襲的である。

非侵襲的な筋疲労の評価法として、筋音9、筋張力10, 筋電図等があるが、その中でも非侵襲である表面筋電図 を用いた評価法は簡便で有用性が高い. 解析方法には、 カオス手法<sup>11)</sup>, スペクトル解析<sup>12)</sup>, 重畳 M 波<sup>13)</sup>, ARV<sup>14)</sup> など多数あるが、周波数解析が主流でありよく用いられ ている. 疲労に伴い筋電位スペクトルが低周波側に移行 する(徐派化)事が知られている15,スペクトル解析に も,STFT<sup>16)</sup>,wavelet<sup>17)</sup>など様々な解析法があり,本研 究では最も研究されて報告が多く, 手法の確立してい る STFT を用いる事にした、そのスペクトルの移行指標 として平均パワー周波数 (Mean Power Frequency, MPF)<sup>16</sup>, MDF<sup>16)</sup> がある. この二つの指標は筋疲労評価によく用 いられている. MDF の方が高周波の影響を受けにくい とされているが16,実際のところ大差がないという報告 もある<sup>18)</sup>. 本研究では MDF と MPF の両方を用いたが, MDF の方がより明確に疲労の検出ができていた為、本 論文では MDF を使用した結果のみを述べた.

前述のように筋疲労の進行にともなってスペクトルが 低周波側に移行することが知られている. MDF の値の 変化により疲労している事がわかっても, どの程度の疲

労なのかを評価できない. そこで低周波域に移行する速 度を筋疲労の指標に用いる事を考案し、測定プロトコー ルとして運動を二回行う事にした. さらに運動の種別に ついては、動的収縮運動は定常的ではなく筋収縮が途切 れるため解析が STFT では難しく19)、報告事例も少ない ため、静的な等尺性収縮運動である足あげ維持運動を採 用した。プロトコールの時間設定であるが、アンセリン を経口摂取してから 40 分後に血中アンセリン濃度が最 大になるため<sup>20)</sup>, 40 分後に 2 回目の運動を設定した. 1 回目と2回目の運動時の10 sec ごとの MDF を算出し、 その時系列から一次回帰直線を算出して傾きを求めた. 当初は1回目と2回目の傾きの比を疲労の指標としてい たが、人によってはその傾きが正になる場合がみられた. これは運動強度が最大自発筋収縮 30% MVC (Maximum Voluntary Contraction) 以上から一般的に筋疲労が生じ<sup>21)</sup>. 40% MVC までは MDF は上昇するという報告と一致す る現象であった22). 個人の筋資質によっては筋の動員が 長く続いて傾きが正になることが原因と考えられる. そ のため傾きの比から二本の回帰直線の角度を求め、それ を筋疲労の指標とした. その角度をAFIと名付けた.

同一の被験者で異なる日に摂取する食品を変えて2回試験を実施する.但し2度目の試験は,摂取物質が排出された状態,及び運動による疲労が残っていないとされる最低1週間以上の期間を開けて実施する. それぞれ同じプロトコールで試験を実施し運動時の傾きを求め AFI を算出する. それら AFI を比較する事で摂取した物質の抗疲労性を評価する. この評価法は試験プロトコール内に2度運動を実施し,"その差"から評価することにより,試験日による体調の変動を少なくすることができると考えられる.

#### 2. アンセリンの効果

アンセリンはアミノ酸が結合したジペプチド( $\beta$ -アラニン -N-メチルヒスチジン)であり、ミオシン ATP アーゼの活性<sup>23</sup>、解糖反応の促進<sup>24</sup>、など様々な生理活性が研究され報告されている。また抗疲労効果の評価法はマウスの強制水泳実験<sup>8,25</sup>)や運動継続時間<sup>6,8</sup>、血液検査<sup>6</sup>、アンケート<sup>7,8</sup>)などがあるが直接被験者の人体から疲労を評価している報告は少ない。図 6 の結果より、角度疲労指標 AFI は水の方が全体的に小さい傾向があり、これはアンセリンと比べてより疲労しているということである。この結果はアンセリンに関する他の報告と同様な結果であった<sup>3,7,8,20</sup>).

また図7の結果ではAFIに関してアンセリンと水で明確な差が現れており、アンセリンは高周波域(50-150 Hz 付近)に影響していると思われる。筋電図

の周波数帯域は筋繊維の種類によって分けられ、高周波域は速筋、低周波域は遅筋からの影響があると考えられている<sup>25</sup>.このことからアンセリンは速筋に対してより有効な効果を示すのではないかと推測される。今後、速筋優位の腓腹筋や遅筋優位のヒラメ筋の比較計測を行い、筋肉の種類による周波数の影響について調べ、もし速筋に大きく影響するならばアンセリンが各筋肉の構成判断に利用できるのではないかと考えている。

#### 結 論

表面筋電図と考案した AFI を用いた筋疲労測定法は ヒトにおいて,非侵襲,かつ簡便な新評価法になり得る と推察した.

#### 辩 辞

本研究において被験者として協力していただいた方々に深く御礼申し上げます.

#### 助成源

なし

## 参考文献

- 1) 越阪部緒美. 企業における機能性食品の開発. 日本薬学会ファルマシア. 2006; 42(9): 929-932.
- 2) 田島 眞. 機能性食品. 日本家政学会誌. 2006; 57(10): 713-714
- 3) 原田理恵,田口靖希,補島浩司ら.トリ胸肉抽出物(チキンエキス)のマウス遊泳持久力に対する効果.日本栄養・食糧学会誌.2002;55(2):73-78.
- 4) 菊池数晃, 渡辺一浩. カツオ煮汁から得られるアンセリン 含有粉末「マリンアクティブ」の特性と機能. New Food Industry. 2001; 43(9): 15-20.
- 5) 若松純一, 長尾哲二, 沼田正寛ら. 牛肉の抗疲労効果について. 日畜会報. 1997; 68(6): 579-586.
- 6) Takahashi Y. Salmon Muscle Extract Containing Anserine as a Suressor of Fatigue in Humans. Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology 2008; 55(9): 428–431.
- 7) Kikuchi K, Matahira Y, Okada M. Contious Ingestion of the Health Food Containing an Anserine, "Marine Active" Reduces the Tiredness which Test Subjects Feel. J New Rem & Clin 2002; 51(6): 525–530.
- 8) 西谷真人. 新規抗疲労成分イミダゾールジペプチド. 日本 補完代替医療学会誌. 2009; 6(3): 123-129.
- 9) Malek MH, Cobum JW. The utility of electromyography and mechanomyography for assessing neuromuscular function a non-

- invasive approach. Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America 2012; 23(1): 23–32.
- 10) Takahashi Y. Salmon Muscle Extract Containing Anserine as a Suressor of Fatigue in Humans. Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology 2008; 55(9): 428–431.
- 11) Yoshida H. The estimation of fatigue using chaos analysis. Journal of Biomechanisms 2004; 28(4): 201–212.
- Komi PV, Tesch P. EMG frequency spectrum musclestructure and fatigue during dynamic contractions in man. Eur J Appl Physiol 1979; 42: 41–50.
- 13) Kiryu T, SaitohY, Ishioka K. A muscle fatigue index based on the relationship between preceding backgroundactivity and myotatic reflex response(MRR). IEEE Trans Biomed Eng, BME 1992; 39(2): 105–111.
- 14) Sakurai T, Sakurazawa S. Study about detection of multiple muscle fatigue and its transition. IEICE Technical report MBE 2011; 110(399): 109–113.
- Sadoyama T, Miyao H. Frequency analysis of surface EMG to evaluation of muscle fatigue. Eur J Appl Physiol 1981; 43(3): 239–246.
- 16) 木塚朝博, 増田 正, 木竜 徹ら. "表面筋電図". バイオメカニズム学会編. 東京電機大学出版局. 2006: 50-56.
- 17) Karlsson S, Yu J, Akay M. Time-Frequency analysis of myoelec-

- tric signals during dynamic contractions. a comparative study. IEEE Trans Biomed 2000; 47(2): 228–238.
- Ishikawa Y, Yagi T. Study on contraction of muscle activity monitoring system. IEICE Technical report NC 2010; 110(295): 13–17
- 19) 長嶺慶明, 三輪浩二. 運動時筋電図の周波数分析による筋特性評価の試み. 電子情報通信学会技術研究報告. ME とバイオサイバネティックス. 2005; 104(756): 9-12.
- 20) 又平芳春. 魚肉ペプチドの抗疲労効果. Food style 21. 2001; 5(9): 52-55.
- 21) 荒川秀樹, 中村 健. 脊柱起立筋の筋疲労評価 (第二報). リハビリテーション医. 2000; 37(10): 676-678.
- 22) 佐藤寿晃, 森 直樹. 随意収縮及び電気刺激による筋疲労後の筋電図的解析. 山形保健医療研究. 2006; 9: 11-14.
- 23) Avena RM, Bowen WJ. Effects of carnosine and anserine on muscle adenosine triphosphatases. The Journal of Biological Chemistry 1969; 244(6): 1600–1604.
- 24) Davey CL. The effects of carnosine and anserine on glycolytic reactions in skeletal muscle. Archives of Biochemistry and Biophysics 1960; 89(2): 296–302.
- 25) 永田 晟, 室 増男. 表面筋電パワースペクトルのパターン分類. 人間工学. 1982; 18(1): 35–42.

# **ABSTRACT**

# New Evaluation Method of Muscle Anti-Fatigue Effect

Hirohisa KISHI<sup>1,2</sup>, Teruhiko FUWA<sup>2</sup>, Daiki KUBOMURA<sup>3</sup>, Toshifumi SUGIURA<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Graduate school of Science and Technology, Shizuoka University
<sup>2</sup> Mental/Physical Management and Biological Engineering Unit, Polytechnic University
<sup>3</sup> Yaizu Suisankagaku Industry

<sup>4</sup> Research of Institute of Electronics, Shizuoka University

Although a number of studies have reported the anti-fatigue effect of anserine, its evidence seems to be still insufficient except the subjective evaluations by questionnaires. The aim of the present study was to propose a method to evaluate the anti-fatigue effect of anserine by a simple protocol and to verify the effectiveness of the method. Subjects were 17 healthy male volunteers  $(35.5\pm5 \text{ yr.}, 75.5\pm5.0 \text{ kg})$ . They performed the isometric exercise tolerance test (ETT) on the rectus femoris muscle twice. Median frequencies (MDFs) of electromyogram and their regression curves were calculated for two ETTs. The angles between these curves were defined as a muscle fatigue index and were compared between anserine and water (control) intakes. The results indicate that anserine can alleviate muscle fatigue in humans. To the best of our knowledge, this is the first direct demonstration of the anti-fatigue effect of anserine on muscle in humans.

Key words: anserine, anti-fatigue effect, functional food, electromyogram, median frequency