

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2019年6月27日(27.06.2019)



(10) 国際公開番号

WO 2019/124355 A1

(51) 国際特許分類:

A23C 9/123 (2006.01) *A61K 35/744* (2015.01)
A23L 33/19 (2016.01) *A61K 35/747* (2015.01)
A61K 35/20 (2006.01) *A61P 21/00* (2006.01)

NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(21) 国際出願番号: PCT/JP2018/046523

(22) 国際出願日: 2018年12月18日(18.12.2018)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2017-242076 2017年12月18日(18.12.2017) JP

(71) 出願人: 株式会社明治(MEIJI CO., LTD.) [JP/
JP]; 〒1048306 東京都中央区京橋二丁目
2番1号 Tokyo (JP).

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS,
MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS,
SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 規則13の2に基づいて明細書とは別に提出され
た、寄託された生物材料に関する表示 (規則13
の2.4(d)(i)及び48.2(a)(viii))

(72) 発明者: 角 公一郎(SUMI Koichiro); 〒1920919
東京都八王子市七国一丁目29番1号 株式
会社明治 研究本部内 Tokyo (JP). 長田 衣代
(OSADA Kinuyo); 〒1920919 東京都八王子市
七国一丁目29番1号 株式会社明治 研究本
部内 Tokyo (JP). 芦田 欣也(ASHIDA Kinya);
〒1920919 東京都八王子市七国一丁目29番
1号 株式会社明治 研究本部内 Tokyo (JP). 川
島 昭浩(KAWASHIMA Akihiro); 〒1920919 東
京都八王子市七国一丁目29番1号 株式
会社明治 研究本部内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 永井 浩之, 外(NAGAI Hiroshi et al.);
〒1000005 東京都千代田区丸の内1丁目
6番6号 日本生命丸の内ビル 協和特
許法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH,
KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,
MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,

(54) Title: MUSCLE-SYNTHESIS-PROMOTING FERMENTED MILK

(54) 発明の名称: 筋肉合成促進用発酵乳

(57) Abstract: Provided is fermented milk capable of promoting muscle synthesis in a subject. Muscle synthesis in a subject can be promoted by having the subject ingest fermented milk having a milk protein concentration of at least 1.9 mass%.

(57) 要約: 対象の筋肉の合成を促進できる発酵乳が提供される。乳タンパク質濃度が1.9質量%以上である発酵乳を、対象へ摂取させることにより、対象の筋肉の合成を促進することができる。



WO 2019/124355 A1

明 細 書

発明の名称： 筋肉合成促進用発酵乳

関連出願の参照

[0001] 本願特許出願は、2017年12月18日に出願された日本出願特願2017-242076号に基づく優先権の主張を伴うものであり、この日本出願の全開示内容は、引用することにより本願発明の開示の一部とされる。

技術分野

[0002] 本発明は、乳タンパク質濃度が1.9質量%以上である筋肉合成促進用発酵乳に関する。

背景技術

[0003] サルコペニアなどに伴う筋肉の低下は、近年注目を集めている。筋肉の萎縮は、要介護および要支援のリスクを増加させ、高齢者のQOLや健康寿命を低下させる大きな要因といわれている。従って、サルコペニアなどに伴う筋肉の低下の予防は超高齢社会を迎えた日本の大きな課題である。

[0004] サルコペニアなどに伴う筋肉の低下の予防のためには、タンパク質や分岐鎖アミノ酸（BCAA）を摂取すること、もしくは、吸収速度が速く血中アミノ酸濃度が増加しやすいタンパク質源を摂取することが重要である。例えば、BCAAの一つであるロイシン（Leu）は、筋タンパク質の合成促進に重要な役割を果たしていることが知られており（非特許文献1～3参照）、特に、高齢者では、血中のLeu濃度のピークを高くすることが筋肉合成に有用であることが示唆されている（非特許文献4～6参照）。しかし、タンパク質やBCAAを多く摂取することは、そのような製品の製造適性の面や、摂取のし易さという点から困難であった。また、発酵乳における筋肉合成促進効果についてはこれまで全く知られていなかった。

[0005] 従って、筋肉の合成促進に用いることができる、製品の製造適性に優れ、摂取のし易い製品の開発が希求されている。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1: Anthony JC et al., 1999, Leucine supplementation enhances skeletal muscle recovery in rats following exercise., J Nutr. 1999, 129: 1102-1106.

非特許文献2: Koopman R et al., 2005, Combined ingestion of protein and free leucine with carbohydrate increases postexercise muscle protein synthesis in vivo in male subjects., Am J Physiol Endocrinol Metab., 288: E645-E653.

非特許文献3: Atherton PJ et al., 2010, Distinct anabolic signalling responses to amino acids in C2C12 skeletal muscle cells., Amino Acids., 38 :1533-1539.

非特許文献4: Breen L & Phillips SM., 2011, Skeletal muscle protein metabolism in the elderly: Interventions to counteract the 'anabolic resistance' of ageing., Nutr Metab (Lond). 8:68. doi: 10.1186/1743-7075-8-68.

非特許文献5: Katsanos CS et al., 2006, A high proportion of leucine is required for optimal stimulation of the rate of muscle protein synthesis by essential amino acids in the elderly., Am J Physiol Endocrinol Metab., 291: E381-E387.

非特許文献6: Rieu I et al., 2006, Leucine supplementation improves muscle protein synthesis in elderly men independently of hyperaminoacidemia. J Physiol., 575(Pt 1):305-315.

発明の概要

[0007] 本発明者らは、特定の発酵乳を対象へ摂取させることにより、対象の筋肉の合成を顕著に促進できることを見出した。

[0008] 従って、本発明は、筋肉合成促進用発酵乳および筋肉合成促進方法等を提供することを目的とする。

[0009] 本発明によれば、以下の発明が提供される。

(1) 乳タンパク質濃度が1.9質量%以上である、筋肉合成促進用発酵乳。

(2) 乳タンパク質濃度が3.0質量%以上である、(1)に記載の筋肉合成促進用発酵乳。

(3) 発酵乳が、ラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーシーズ・ブルガリカス (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) およびストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*) により発酵されたものである、(1)または(2)に記載の筋肉合成促進用発酵乳。

(4) (1)～(3)のいずれかに記載の発酵乳を含む、筋肉合成促進用食品。

(5) 乳タンパク質濃度が1.9質量%以上である発酵乳を、対象に摂取させることを含んでなる、筋肉合成促進方法。

(6) 筋肉合成促進用組成物の製造のための、乳タンパク質濃度が1.9質量%以上である発酵乳の使用。

(7) 筋肉合成促進用組成物の製造のための、乳タンパク質濃度が3.0質量%以上である、(6)に記載の発酵乳の使用。

(8) 発酵乳が、ラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーシーズ・ブルガリカス (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) およびストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*) により発酵されたものである、(6)または(7)に記載の、使用。

(9) 筋肉合成促進用食品の製造のための、(6)～(8)のいずれかに記載の発酵乳の使用。

[0010] 本発明の発酵乳を対象へ摂取させることにより、対象の筋肉の合成を顕著に促進できる点で有利である。また、本発明の発酵乳は製造適性に優れ、摂取し易い点でも有利である。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図1は、投与後の経過時間(分)に対する門脈血中総アミノ酸量(μM)を表す。「投与物なし(第1群)」とは脱脂発酵乳および脱脂乳のいずれ

も投与していない群を表す。「脱脂発酵乳（第7～11群）」と、「脱脂乳（第2～6群）」についての二元配置分散分析の結果は、Food Effect : $p < 0.01$ 、Time Effect : $P < 0.001$ 、および Food $\times$ Time Effect : $P < 0.01$ である。交互作用 (Food $\times$ Time Effect) が有意であったので各時点での単純主効果の対比較を実施し、結果を図1中に示した。図1中、「**」は脱脂発酵乳と脱脂乳の間のP値が < 0.01 であることを表し、「***」は脱脂発酵乳と脱脂乳の間のP値が < 0.001 であることを表す。このことは「脱脂発酵乳（第7～11群）」の門脈血中総アミノ酸量は、「脱脂乳（第2～6群）」よりも30分後、60分後の各ポイントで両群を比較した場合に有意差があることを意味する。また、図1中、「†」は「投与物なし（第1群）」に対するP値が < 0.05 であることを表し、「†††」は「投与物なし（第1群）」に対するP値が < 0.001 であることを表す。

[図2] 図2は、投与後の経過時間（分）に対する門脈血中ロイシン量 (μM) を表す。「投与物なし（第1群）」とは脱脂発酵乳および脱脂乳のいずれも投与していない群を表す。「脱脂発酵乳（第7～11群）」と、「脱脂乳（第2～6群）」についての二元配置分散分析の結果は、Food Effect : $p < 0.05$ 、Time Effect : $P < 0.001$ 、および Food $\times$ Time Effect : $P < 0.001$ である。交互作用 (Food $\times$ Time Effect) が有意であったので各時点での単純主効果の対比較を実施し、結果を図2中に示した。図2中、「***」は脱脂発酵乳と脱脂乳の間のP値が < 0.001 であることを表す。このことは「脱脂発酵乳（第7～11群）」の門脈血中ロイシン量は、「脱脂乳（第2～6群）」よりも30分後、60分後の各ポイントで両群を比較した場合に有意差があることを意味する。図2中、「†††」は「投与物なし（第1群）」に対するP値が < 0.001 であることを表す。

[図3] 図3は、投与後の経過時間（分）に対する骨格筋合成速度 (FSR (Fractional Synthesis Rate)) を表す。「投与物

なし（第1群）」とは脱脂発酵乳および脱脂乳のいずれも投与していない群を表す。「脱脂発酵乳（第7～11群）」と、「脱脂乳（第2～6群）」についての二元配置分散分析の結果は、Food Effect : $p < 0.01$ 、Time Effect : $P < 0.05$ 、およびFood $\times$ Time Effect : $P = 0.93$ である。交互作用（Food $\times$ Time Effect）が有意でなく、群（Food Effect）の主効果が有意であるということは、「脱脂発酵乳（第7～11群）」と「脱脂乳（第2～6群）」のFSRは30分後、60分後、90分後、120分後、および240分後において同様の推移（30～60分後を最大値として時間経過とともに低下していく）を示すが、投与240分後までの経過時間全体としてのFSRは「脱脂発酵乳（第7～11群）」で「脱脂乳（第2～6群）」より有意に高い値で推移したことを意味する。図3中、「†」は「投与物なし（第1群）」に対するP値が < 0.05 であることを表し、「†††」は「投与物なし（第1群）」に対するP値が < 0.001 であることを表す。

[図4]図4は、投与後の経過時間（分）に対する門脈血中総アミノ酸量（ μM ）を表す。「投与物なし（第A群）」とは脱脂発酵乳および脱脂乳のいずれも投与していない群を表す。脱脂発酵乳（第E～G群）」と、「脱脂乳（第B～D群）」についての二元配置分散分析の結果は、Food Effect : $P < 0.05$ 、Time Effect : $P < 0.001$ 、およびFood $\times$ Time Effect : $P < 0.01$ である。交互作用（Food $\times$ Time Effect）が有意であったので各時点での単純主効果の対比較を実施し、結果を図4中に示した。図4中、「***」は脱脂発酵乳と脱脂乳の間のP値が < 0.001 であることを表す。このことは「脱脂発酵乳（第E～G群）」の門脈血中総アミノ酸量は、「脱脂乳（第B～D群）」よりも30分後において両群を比較した場合に有意差があることを意味する。また、図4中、「††」は「投与物なし（第A群）」に対するP値が < 0.01 であることを表し、「†††」は「投与物なし（第A群）」に対するP値が < 0.001 であることを表す。

[図5]図5は、投与後の経過時間（分）に対する門脈血中ロイシン量（ μM ）を表す。「投与物なし（第A群）」とは脱脂発酵乳および脱脂乳のいずれも投与していない群を表す。「脱脂発酵乳（第E～G群）」と、「脱脂乳（第B～D群）」についての二元配置分散分析の結果は、Food Effect : $P < 0.001$ 、Time Effect : $P < 0.001$ 、およびFood $\times$ Time Effect : $P < 0.001$ である。交互作用（Food $\times$ Time Effect）が有意であったので各時点での単純主効果の対比較を実施し、結果を図5中に示した。図5中、「*」は脱脂発酵乳と脱脂乳の間のP値が < 0.05 であることを表し、「***」は脱脂発酵乳と脱脂乳の間のP値が < 0.001 であることを表す。このことは「脱脂発酵乳（第E～G群）」の門脈血中ロイシン量は、「脱脂乳（第B～D群）」よりも30分後、60分後の各ポイントで両群を比較した場合に有意差があることを意味する。図5中、「†††」は「投与物なし（第A群）」に対するP値が < 0.001 であることを表す。

[図6]図6は、投与後の経過時間（分）に対する骨格筋合成速度（FSR（Fractional Synthesis Rate））を表す。「投与物なし（第A群）」とは脱脂発酵乳および脱脂乳のいずれも投与していない群を表す。「脱脂発酵乳（第E～G群）」と、「脱脂乳（第B～D群）」についての二元配置分散分析の結果は、Food Effect : $P < 0.05$ 、Time Effect : $P < 0.05$ 、およびFood $\times$ Time Effect : $P = 0.16$ である。交互作用（Food $\times$ Time Effect）が有意でなく、群（Food Effect）の主効果が有意であるということは、投与後の時間に関わらず、投与後30～90分後において、「脱脂発酵乳（第E～G群）」の方が、「脱脂乳（第B～D群）」より有意に高い値で推移したことを意味する。図6中、「†」は「投与物なし（第A群）」に対するP値が < 0.05 であることを表す。

発明の具体的説明

[0012] 微生物の寄託

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* O L L 2 0 5 0 1 3 株は、2017年2月3日付け（原寄託日）で独立行政法人 製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター（日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室）に、受託番号N I T E B P - 0 2 4 1 1の下でブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

[0013] *Streptococcus thermophiles* O L S 3 2 9 0 株は、2004年1月19日付け（原寄託日）で独立行政法人 製品評価技術基盤機構 特許生物寄託センター（日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 120号室）に、受託番号F E R M B P - 1 9 6 3 8の下でブダペスト条約に基づき国際寄託されている。なお、本寄託菌株は2013年9月30日（発行日）（移管請求は2013年9月6日に受領された）に、国内寄託（原寄託）からブダペスト条約に基づく国際寄託に移管された。

[0014] 本発明の発酵乳は、乳タンパク質濃度が1.9質量%以上である筋肉合成促進用発酵乳（または、筋肉合成増強用発酵乳）である。発酵乳としては、特に限定されるものではないが、好ましくはヨーグルトである。

[0015] 本発明の発酵乳は、乳に乳酸菌等の発酵微生物を加えて、発酵させた培養物として得ることができる。本発明の発酵乳の製造に際し、乳酸菌スターターを所定量、例えば発酵乳の原料に対して0.1～10質量%、好ましくは0.2～3質量%、さらに好ましくは0.5～2質量%を添加して発酵ミックスとする。発酵乳の原料にスターターとして接種する発酵微生物としては、ラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーシーズ・ブルガリカス (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*)、ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasser* i)、ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) 等の乳酸桿菌や、ストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*) 等の乳酸球菌や、ビフィズス菌や、プロピオン酸菌や、酵母等の中から選ばれる1種または2種以上を用いることができ、好ましくは、ストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*) およびラクトバ

チルス・デルブルッキー・サブスピーシーズ・ブルガリカス (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) の組み合わせを用いることができる。発酵乳の原料にスターターとして接種する発酵微生物として、より好ましくは、ラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーシーズ・ブルガリカス (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) 2038株およびストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*) 1131株の組み合わせ、または、ラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーシーズ・ブルガリカス (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) OLL205013株 (受託番号: NITE BP-02411) およびストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*) OLS3290株 (受託番号: FERM BP-19638) の組み合わせを用いることができる。発酵乳の原料にスターターとして接種する発酵微生物として、特に好ましくは、ラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーシーズ・ブルガリカス (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) OLL205013株 (受託番号: NITE BP-02411) およびストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*) OLS3290株 (受託番号: FERM BP-19638) の組み合わせを用いることができる。

[0016] 本発明の発酵乳に含まれる無脂乳固形分の含有量は、本発明の効果を妨げない限り特に限定されないが、発酵乳に対して、好ましくは8～20質量%であり、より好ましくは14～17質量%である。ここで、無脂乳固形分とは、発酵乳中の全固形分から脂質を除いた成分を意味し、例えば、タンパク質、灰分、および糖質が含まれる。また、本発明の発酵乳の無脂乳固形分中のタンパク質には、乳発酵成分由来のタンパク質が含まれる。乳発酵成分は、生体から採取された乳のみならず、その分画または、加工したものを発酵して得ることができる。乳の分画または加工品としては、好ましくは牛乳の分画または加工品であり、例えば、部分脱脂乳、脱脂乳、脱脂濃縮乳、還元全乳、還元脱脂粉乳、還元部分脱脂乳、乳たんぱく質濃縮物 (MPC)、分離ミルクたんぱく質 (MPI)、ホエー、酸カゼイン、発酵乳またはクワル

ク等を製造した際に得られるカゼインホエー、酸ホエー、クワルクホエー、カゼイン、カゼインナトリウム、脱脂粉乳、全粉乳、ホエーたんぱく濃縮物（WPC）、ホエーたんぱく分離物（WPI）、 α -ラクトアルブミン、 β -ラクトグロブリン、ラクトフェリン、バター、バターミルク、クリーム、ホエーペプチド、大豆ホエー等を挙げることができ、脱脂濃縮乳、MPC、MPI、脱脂粉乳が特に好ましい。

[0017] 本発明の発酵乳に含まれる無脂乳固形分中の乳タンパク質濃度の下限は、特に制限はされないが、好ましくは30質量%であり、より好ましくは34質量%であり、さらに好ましくは42質量%である。また、本発明の発酵乳に含まれる無脂乳固形分中の乳タンパク質濃度の上限は、特に制限はされないが、好ましくは80質量%であり、より好ましくは65質量%であり、さらに好ましくは60質量%である。

[0018] また、本発明の発酵乳中の乳タンパク質濃度の下限は、特に制限はされないが、好ましくは1.9質量%であり、より好ましくは3.0質量%であり、さらに好ましくは4.0質量%であり、特に好ましくは5.8質量%である。また、本発明の発酵乳中の乳タンパク質濃度の上限は、特に制限はされないが、好ましくは15質量%であり、より好ましくは12質量%であり、さらに好ましくは11質量%であり、さらに好ましくは10質量%であり、特に好ましくは8質量%である。本発明の発酵乳中の乳タンパク質濃度の好ましい範囲としては、5.8～8質量%であり、より好ましい範囲としては、6～7質量%であり、さらに好ましい範囲としては6～6.5質量%である。本発明の発酵乳中の乳タンパク質濃度は、例えばケルダール法により測定することができる。

[0019] 本発明の発酵乳には、さらに食物繊維、安定剤、脂質、ビタミン、ミネラルなどを含んでもよい。

[0020] 食物繊維としては、本発明の効果を妨げない限り特に限定されないが、食品中に元来存在する可食性のもの、物理的、酵素的もしくは化学的処理により得られたもの、または合成されたものが挙げられる。また、食物繊維は、

高分子水溶性食物繊維であっても低分子水溶性食物繊維であっても、不溶性食物繊維であってもよい。かかる食物繊維としては、セルロース、カルボキシメチルセルロース、寒天、キサンタンガム、サイリウム種皮、ジュランガム、低分子アルギン酸ナトリウム、アルギン酸プロピレングリコールエステル、ポリデキストロース、アラビアガム、難消化性デキストリン、ビートファイバー、グァーガム、グァーガム酵素分解物、小麦胚芽、湿熱処理デンプン（難消化性デンプン）、レジスタントスターチ、タマリンドシードガム、ローカストビーンガム、プルラン、イヌリン等の多糖類が挙げられる。また、食物繊維として、ガラクトオリゴ糖、フラクトオリゴ糖、乳果オリゴ糖、ビートオリゴ糖、ゲンチオリゴ糖、キシロオリゴ糖、大豆オリゴ糖等のオリゴ糖またはそれらオリゴ糖の組み合わせが挙げられる。

[0021] 安定剤としては、水溶性大豆多糖類、セルロース、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸、アルギン酸プロピレングリコールエステル、でんぷん、加工でんぷん、カラギナン、キサンタンガム、ジェランガム、タマリンドシードガム、タラガムおよびそれらの組み合わせが挙げられる。

[0022] 脂質としては、食品または医薬用途に使用可能なものであれば特に限定されず、いずれのものであっても良い。このような脂質としては、植物性油脂、動物性油脂、微生物油脂、合成トリグリセリド、リン脂質等が挙げられる。これらは、単独で使用しても、任意に組み合わせて使用しても良い。

[0023] ビタミンとしては、食品または医薬用途に使用可能なものであれば特に限定されず、1種であっても複数の混合物であっても良い。

[0024] ミネラルとしては、食品または医薬用途に使用可能なものであれば特に限定されず、1種であっても複数の混合物であっても良い。

[0025] 本発明において、「筋肉合成促進」とは、本発明の筋肉合成促進用発酵乳を対象が摂取しない場合と比較して、本発明の筋肉合成促進用発酵乳を対象が摂取した場合に僅かでも多く筋肉の合成がみられれば、筋肉合成促進効果を有するとする。ここで、「筋肉合成速度上昇」とは、対象の絶食下での筋肉の合成速度に対して、本発明品などのタンパク質を含んだ食品を対象が摂

取した場合に僅かでも筋肉の合成速度が速くなれば、筋肉合成速度上昇効果を有するとする。さらに、筋肉合成速度の上昇はタンパク質を含んだ食品を摂取してから数時間にわたり認められることが知られており、そのタンパク質合成速度上昇の積算がタンパク質を含んだ食品の実質の「筋肉合成促進効果」である。つまり、本発明の好ましい態様によれば、本発明の「筋肉合成促進」とは、同じ乳タンパク質濃度を有する発酵していない乳を摂取した場合と比較して、本発明の発酵乳を摂取した場合の方が摂取後のある一定時間の筋合成速度上昇の程度が大きい、および／または摂取後ある時間幅における筋合成速度上昇持続時間が長い場合に、筋肉合成促進効果を顕著に有するとする。本発明のより好ましい態様によれば、本発明の「筋肉合成促進」とは、同じ乳タンパク質濃度を有する発酵していない乳を摂取した場合と比較して、本発明の発酵乳を摂取した場合の方がF S Rが速い場合に、筋肉合成促進効果をより顕著に有するとする。

[0026] 本発明の筋肉合成促進用発酵乳は、好ましくは骨格筋合成促進用発酵乳である。骨格筋とは、筋肉の中で骨格に付着し、関節の可動や姿勢制御などの役割を持つものであり、心筋以外の横紋筋を意味する。

[0027] また、本発明の好ましい態様によれば、本発明の筋肉合成促進用発酵乳を摂取した対象は、同じ乳タンパク質濃度を有する発酵していない乳を対象が摂取した場合と比較して摂取後の経過時間全体で、骨格筋合成速度（F S R）が、例えば、好ましくは0.1%/日以上、より好ましくは0.3%/日以上、さらに好ましくは0.5%/日以上上昇する。本発明のより好ましい態様によれば、本発明の筋肉合成促進用発酵乳を摂取した対象は、同じ乳タンパク質濃度を有する発酵していない乳を対象が摂取した場合と比較して摂取後の各時点（例えば、摂取後30分、60分、90分、120分、および240分）のいずれか若しくはいずれの時点においても骨格筋合成速度（F S R）が、例えば、好ましくは0.1%/日以上、より好ましくは0.3%/日以上、さらに好ましくは0.5%/日以上上昇する。

[0028] 本発明の別の好ましい態様によれば、本発明の筋肉合成促進用発酵乳を摂

取した対象は、絶食状態の対象の骨格筋合成速度から好ましくは0.1%/日以上、より好ましくは0.3%/日以上、さらに好ましくは0.5%/日以上上昇した値を、好ましくは60分以上、より好ましくは120分以上、さらに好ましくは240分以上推移し続けることができる。

[0029] 本発明の特に好ましい態様によれば、本発明の筋肉合成促進用発酵乳を摂取した対象は、同じ乳タンパク質濃度を有する発酵していない乳を対象が摂取した場合と比較して摂取後の経過時間全体で、骨格筋合成速度（FSR）が、例えば、好ましくは0.1%/日以上、より好ましくは0.3%/日以上、さらに好ましくは0.5%/日以上上昇するものであり、かつ絶食状態の対象の骨格筋合成速度から好ましくは0.1%/日以上、より好ましくは0.3%/日以上、さらに好ましくは0.5%/日以上上昇した値を、好ましくは60分以上、より好ましくは120分以上、さらに好ましくは240分以上推移し続けることができる。

[0030] 本発明の特に好ましい別の態様によれば、本発明の筋肉合成促進用発酵乳を摂取した対象は、同じ乳タンパク質濃度を有する発酵していない乳を対象が摂取した場合と比較して摂取後の各時点（例えば、摂取後30分、60分、90分、120分、および240分）のいずれか若しくはいずれの時点においても骨格筋合成速度（FSR）が、例えば、好ましくは0.1%/日以上、より好ましくは0.3%/日以上、さらに好ましくは0.5%/日以上上昇するものであり、かつ絶食状態の対象の骨格筋合成速度から好ましくは0.1%/日以上、より好ましくは0.3%/日以上、さらに好ましくは0.5%/日以上上昇した値を、好ましくは60分以上、より好ましくは120分以上、さらに好ましくは240分以上推移し続けることができる。

[0031] 本発明の好ましい態様によれば、本発明の発酵乳（例えば、乳タンパク質濃度が1.9質量%以上である発酵乳）を含む筋肉合成促進用食品（好ましくは、骨格筋合成促進用食品）が提供される。ここで、食品とは、下記の食品組成物と同じものであってもよく、具体的には、本発明の発酵乳を含有できる食品であればどのような形態のものであってもよいが、例えば、即席麺

、レトルト食品、缶詰、電子レンジ食品、即席スープ・みそ汁類、フリーズドライ食品などの即席食品類；清涼飲料、果汁飲料、野菜飲料、豆乳飲料、コーヒー飲料、茶飲料、粉末飲料、濃縮飲料、アルコール飲料などの飲料類；パン、パスタ、麺、ケーキミックス、パン粉などの小麦粉製品；飴、キャラメル、チューイングガム、チョコレート、クッキー、ビスケット、バー、ケーキ、パイ、スナック、クラッカー、和菓子、ムース、デザート菓子などの菓子類；ソース、トマト加工調味料、風味調味料、調理ミックス、たれ類、ドレッシング類、つゆ類、カレー・シチューの素類などの調味料；加工油脂、バター、マーガリン、マヨネーズなどの油脂類；乳飲料、ヨーグルト類、乳酸菌飲料、アイスクリーム類、クリーム類などの乳製品；農産缶詰、ジャム・マーマレード類、シリアルなどの農産加工品；冷凍食品、流動食などが挙げられる。

[0032] 筋肉合成促進の有無は、例えば、筋肉合成速度に基づいて判断される。筋肉合成速度の測定は、例えば、FSRを測定することによって行われ、具体的には本願明細書の実施例に記載の方法によりFSRを測定することができる。

[0033] 本発明の別の態様によれば、乳タンパク質濃度が1.9質量%以上である発酵乳を、対象に摂取させることを含んでなる、筋肉合成促進方法（好ましくは、骨格筋合成促進方法）が提供される。本発明の別の好ましい態様によれば、乳タンパク質濃度が1.9質量%以上である発酵乳を対象に摂取させることを含んでなる、筋肉合成促進方法（但し、ヒトに対する医療行為を除く）が提供される。ここで、「ヒトに対する医療行為」とは、医師等の処方が必要として、ヒトに対して医薬品を摂取させる（投与する）行為などを意味する。また、上記実施態様において、対象は、好ましくは、スポーツ選手、スポーツ愛好者（アスリート）、生活習慣病の改善のために運動を必要とする者、高齢者などの健康増進のために運動を必要とする者、乳幼児及び／又は子供などの発育／成長の過程で筋肉を作っていく必要のある者、又は筋肉低下疾患（例えば、サルコペニア）を患い、運動により筋肉合成の促進を

必要とする患者やそのような疾患を予防するために運動を必要とする者が挙げられる。本発明の筋肉合成促進方法は、本発明の筋肉合成促進用発酵乳について、本願明細書に記載された内容に従って実施することができる。

[0034] 本発明の筋肉合成促進用発酵乳を対象に摂取させる（投与する）時期は、特に限定されないが、血液中のアミノ酸濃度を速やかに上昇させるという特徴を鑑みると、血液中のアミノ酸濃度が低くなっている状態での摂取がとくに有効であると考えられ、朝、昼、晩の食事の際や、食間、また運動後に好適に用いることができる。

[0035] ここで、対象とは、筋肉の合成促進を必要とする対象であることが好ましく、筋肉合成促進効果、筋肉分解抑制効果、抗疲労・疲労回復効果、筋肉痛抑制効果、予備能力向上効果を期待または必要とする対象がより好ましい。例えば、健康増進、運動能力向上、潜在的もしくは顕在的な疲労の回復を目的として、高齢者、栄養失調者、病中・病後者、運動者などが挙げられる。また、この対象はヒト以外の動物（馬、牛などの家畜、犬、猫などの愛玩動物、動物園などで飼育されている鑑賞動物など）であってもよいが、ヒトであることが好ましい。

[0036] 本発明の筋肉合成促進方法は、好ましくは、骨格筋合成促進方法である。

[0037] 本発明の一つの好ましい態様によれば、本発明の筋肉合成促進方法において、前記発酵乳（例えば、乳タンパク質濃度が1.9質量%以上である発酵乳）をタンパク質含量で一食あたり1g以上となるように摂取させることができる。具体的には、1～40g、好ましくは3～30g、より好ましくは5～25g、さらに好ましくは8～20g、特に好ましくは10～15gとなるように摂取させることができる。

[0038] 本発明の別の態様によれば、筋肉合成促進（好ましくは骨格筋合成促進）のための、乳タンパク質濃度が1.9質量%以上である発酵乳の使用が提供される。本発明の一つの好ましい態様によれば、本発明の使用は、非治療的使用である。

[0039] 本発明の別の態様によれば、乳タンパク質濃度が1.9質量%以上である

発酵乳を含む、筋肉合成促進用食品組成物（筋肉合成促進用食品）が提供される。本発明において、食品組成物（食品）とは、医薬組成物（医薬品）以外のものであって、溶液、懸濁液、乳濁液、粉末、ペースト、半固体成形物、固体成形物など、経口摂取可能な形態であればよく特に限定されない。食品組成物（食品）とは、具体的には、本発明の発酵乳を含有できる食品であればどのような形態のものであってもよく、例えば、即席麺、レトルト食品、缶詰、電子レンジ食品、即席スープ・みそ汁類、フリーズドライ食品などの即席食品類；清涼飲料、果汁飲料、野菜飲料、豆乳飲料、コーヒー飲料、茶飲料、粉末飲料、濃縮飲料、アルコール飲料などの飲料類；パン、パスタ、麺、ケーキミックス、パン粉などの小麦粉製品；飴、キャラメル、チューイングガム、チョコレート、クッキー、ビスケット、バー、ケーキ、パイ、スナック、クラッカー、和菓子、ムース、デザート菓子などの菓子類；ソース、トマト加工調味料、風味調味料、調理ミックス、たれ類、ドレッシング類、つゆ類、カレー・シチューの素類などの調味料；加工油脂、バター、マーガリン、マヨネーズなどの油脂類；乳飲料、ヨーグルト類、乳酸菌飲料、アイスクリーム類、クリーム類などの乳製品；農産缶詰、ジャム・マーマレード類、シリアルなどの農産加工品；冷凍食品、流動食などが挙げられる。

[0040] また、食品には、健康食品、機能性食品、栄養補助食品、機能性表示食品、特定保健用食品、病者用食品、乳幼児用調製粉乳、妊産婦もしくは授乳婦用粉乳、または筋肉合成促進のために用いられる物である旨の表示を付した食品のような分類のものも包含される。また、本発明において、食品とは飲料を含む概念である。

[0041] 本発明の別の態様によれば、筋肉合成促進用食品組成物（食品）の製造のための、乳タンパク質濃度が1.9質量%以上である発酵乳の使用が提供される。

[0042] 本発明の別の態様によれば、筋肉合成を促進するための、乳タンパク質濃度が1.9質量%以上である発酵乳が提供される。

[0043] 本発明の筋肉合成促進方法に用いられる発酵乳等や、本発明の食品組成物

に含まれる発酵乳等などは、上記本発明の筋肉合成促進用発酵乳と同じであってもよい。

実施例

[0044] 以下の例に基づいて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

[0045] [実施例 1]

本発明の脱脂発酵乳の調製

下記表 1 に記載の配合によりベースミックスを調合した。調合後、95℃で殺菌し、スターターを添加して43℃で発酵した（終了時のpHは4.3）。発酵後、冷却し、均質化した後、65℃で30分間殺菌した。調合後のベースミックスの組成を表2に示した。

スターターとして、ラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーシーズ・ブルガリカス (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) 2038株とストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*) 1131株（いずれの菌も「明治ブルガリアヨーグルト」（登録商標、株式会社明治製）から入手した）とを組み合わせ用いた。

また、ベースミックスの配合に用いた脱脂粉乳は株式会社明治より入手した。

[0046] [表1]

表 1：ベースミックスの配合比

	配合比 (質量%)
脱脂粉乳	16.55
スターター	2.00
水	81.45
合計	100.00

[0047]

[表2]

表2：調合後のベースミックスの組成

	組成 (質量%)
脂質	0. 1 7
無脂乳固形分	1 6. 0 0 *
水	8 3. 8 3
合計	1 0 0. 0 0

*無脂乳固形分 1 6. 0 0 質量%中、6. 0 9 質量%が乳タンパク質に相当した。すなわち、調合後の発酵乳に含まれる無脂乳固形分中の乳タンパク質濃度は、3 8. 1 質量%であった。

[0048] [実施例 2]

筋合成促進作用の評価

7 週齢の S D 系雄ラット（日本クレア株式会社より入手した）の 7 日間以上の馴化飼育終了後、体重を測定し、平均より大きくはずれた個体を除外し、下記の 1 1 群に分けた（第 2 群～第 1 1 群は $n = 8$ であり、第 1 群のみ $n = 1 2$ で行った）。試験前日からラットを約 1 8 時間絶食させた。脱脂乳は、表 1 に記載のベースミックスを調合、9 5 °C で殺菌し、冷却後に均質化した後、6 5 °C で 3 0 分間殺菌して調製したものをを用いた。脱脂発酵乳は実施例 1 と同様の方法で調製したものをを用いた。

第 1 群：脱脂乳および脱脂発酵乳のいずれの投与も行わずに、上記の約 1 8 時間絶食後に解剖を行った（投与の 0 分後とした）。

第 2 群：脱脂乳を投与し、その投与の 3 0 分後に解剖を行った。

第 3 群：脱脂乳を投与し、その投与の 6 0 分後に解剖を行った。

第 4 群：脱脂乳を投与し、その投与の 9 0 分後に解剖を行った。

第 5 群：脱脂乳を投与し、その投与の 1 2 0 分後に解剖を行った。

第 6 群：脱脂乳を投与し、その投与の 2 4 0 分後に解剖を行った。

第 7 群：脱脂発酵乳を投与し、その投与の 3 0 分後に解剖を行った。

第 8 群：脱脂発酵乳を投与し、その投与の 6 0 分後に解剖を行った。

第 9 群：脱脂発酵乳を投与し、その投与の 9 0 分後に解剖を行った。

第10群：脱脂発酵乳を投与し、その投与の120分後に解剖を行った。

第11群：脱脂発酵乳を投与し、その投与の240分後に解剖を行った。

[0049] 第1群以外のラットに上記の試験溶液（脱脂乳または脱脂発酵乳）を経口投与し、その投与後に上記のタイミングで解剖を実施した。解剖の15分前には、骨格筋合成速度測定の特レーサーである重水素ラベルフェニルアラニンを尾静脈より注射した（45 mg/kg BW）。解剖はイソフルラン麻酔下で行い、門脈採血後、腹部大静脈より全採血し、安楽死させた。足底筋をラットから摘出後、直ちに液体窒素で凍結させた。

[0050] <門脈血中アミノ酸測定>

血漿に、7%トリクロロ酢酸を1:1の割合で添加し、遠心分離を行い除蛋白した後、0.2 µmフィルター（クロマトディスク4A、GLサイエンス製）で濾過し分析サンプルとした。アミノ酸分析はUPLC-MS/MSを使用して以下の条件で定量した。

（1）UPLC-MS/MS装置：Waters TQD（日本Waters製）

（2）LC条件

・LC用カラム：Intra Amino Acid 3 µm, 50*3 mm（Intact社製）

・移動相A：

アセトニトリル（和光LC-MS用（和光純薬工業株式会社製））9%

テトラヒドロフラン（HPLC用 安定剤不含（和光純薬工業株式会社製））75%

1 Mギ酸アンモニウム（HPLC用（和光純薬工業株式会社製））0.4%

ギ酸（HPLC用（和光純薬工業株式会社製））0.3%

超純水15.3%

・移動相B：

アセトニトリル20%

1 Mギ酸アンモニウム8%

超純水 72%

・移動相流速：0.6 mL/min

・カラム温度：35℃

・移動相比率：0%B (0–2.5 min)

0–17%B (グラジエント、2.5–6.5 min)

100%B (6.5–10 min)

0%B (10–12 min)

Total running time (12 min)

(3) MS/MS条件

・Capillary Voltage: 3000 V

・Source Temp: 120℃

・Desolvation Temp: 400℃

・Cone Gas Flow: 48 L/h

・Cone Voltage: 25 V

・Cone Energy: 15 eV

(4) 定量

アミノ酸混合標準液 H型 (和光純薬工業株式会社製) に、アスパラギン酸、グルタミン酸、トリプトファンを添加して、20種類のアミノ酸混合標準液 (250 μM) として用いた。このアミノ酸混合標準液の希釈系列を検量線として用いて、各サンプルのアミノ酸濃度を定量した。

[0051] <FSR測定>

(1) 骨格筋のホモジナイズ

凍結保存した足底筋全量 (約250–300 mg) をビーズ入りホモジナイズチューブ (CK Mix Kit Tube 7 mL) に移し、氷冷した3 mLの0.3 M過塩素酸溶液を加え、高速細胞破碎装置 PreCellys Evolution (M&S社) を用いてホモジナイズした。

[0052] (2) 上清の分離と筋ホモジナイズサンプルの洗浄

筋ホモジナイズサンプル1 mLを遠心分離 (4℃、8000×g、15 m

i n) した後、上清を分離した。上清は0.2 μ m フィルターでろ過し、「(5) LC/MS/MS によるフェニルアラニンの定量」に用いた(筋上清定量用サンプル)。上清を分離した筋ホモジナイズサンプルは、超純水を用いて1 mL で洗浄を2回行った後、1 L の0.1 N HCl に懸濁した。

[0053] (3) 筋ホモジナイズサンプルのタンパク質加水分解

900 μ L の6 N HCl (1%フェノール) に洗浄後の筋ホモジナイズサンプル100 μ L を添加し、PICO-TAGワークステーション(日本 Waters 製)を用いて、窒素置換後、減圧密封した。ヒートブロックを用いて150℃で1時間加熱し、筋タンパク質の加水分解を行った(筋加水分解物)。

[0054] (4) 筋加水分解物定量用サンプルの調製

筋加水分解物200 μ L を遠心エバポレーターを用いて濃縮した。濃縮物を10%アセトニトリル100 μ L に溶解させ0.2 μ m フィルターでろ過し、筋加水分解物定量用サンプルとした。

[0055] (5) LC/MS/MS によるフェニルアラニンの定量

LC/MS/MS (TQD、日本 Waters 製)を用いて、筋上清定量用サンプルおよび筋加水分解物定量用サンプルについて、フェニルアラニン(Phe) および重水素ラベルフェニルアラニン(Phe(Ring-D5)) の濃度を定量した。以下の通りの分析条件で行った。

<LC条件>

- ・LC用カラム: ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μ m
- ・移動相A: 0.05%トリフルオロ酢酸/超純水
- ・移動相B: 0.05%トリフルオロ酢酸/アセトニトリル
- ・移動相流速: 0.3 mL/min
- ・カラム温度: 40℃
- ・サンプル注入量: 3 μ L
- ・移動相比率

0~3.4 min: A100%→A85%B15% (グラジエント)

3. 4～4. 5 min : A 70% B 30%

4. 5～6. 0 min : A 50% B 50%

6. 0～8. 0 min : A 20% B 80%

8. 0～10. 5 min : A 100%

Total running time : 10. 5 min

<MS/MS条件>

・フラグメントイオン

Phe : m/z 166. 19 > 120. 10

Phe (Ring-D5) : m/z 171. 19 > 125. 10

・Capillary Voltage : 3000V

・Source Temperature : 120℃

・Desolvation Temperature : 400℃

・Desolvation Gas Flow : 849 L/h

・Cone Gas Flow : 48 L/h

・Cone Voltage : 25V

・Cone Energy : 15 eV

[0056] (6) 骨格筋合成速度 (FSR (Fractional Synthesis Rate)) の算出

LC/MS/MSによるフェニルアラニン (Phe) および重水素ラベルフェニルアラニン (Ring-D5) (Phe (Ring-D5)) の定量結果を基に、次式 (I) によってFSRを算出した (A. Kanda et al., Br J Nutr, Feb. 7, 1-7, 2013)。

[数1]

$$FSR (\% / \text{日}) = (E_b \times 100) / (E_a \times t) \quad (I)$$

[上記式 (I) 中、

E_a : 骨格筋中に遊離状態で存在するフェニルアラニンのエンリッチメント
(=筋上清定量用サンプル中のエンリッチメント)

E b : 骨格筋中にタンパク質に同化して存在するフェニルアラニンのエンリッチメント

(=筋加水分解物定量用サンプル中のエンリッチメント)

t : P h e (R i n g - D 5) を尾静脈投与してから、摘出した骨格筋を凍結保存するまでの時間 (単位 : 日)

エンリッチメント = $P h e (R i n g - D 5) / (P h e + P h e (R i n g - D 5))$] 。

[0057] <統計解析>

統計手法は、階層的な解析を実施した。つまり、まず群 (F o o d) と投与後の経過時間 (T i m e : 反復計測ではない) および F o o d × T i m e による二元配置分散分析を実施し、F o o d の主効果、または F o o d × T i m e の交互作用が有意であった場合、次のような手順で群間の対比較を実施した。まず、F o o d の主効果が有意でかつ F o o d × T i m e の交互作用が有意でなかった場合は、F o o d と T i m e での分散分析モデルを再度構築して対比較を実施した。F o o d × T i m e の交互作用が有意であった場合は、単純主効果検定により各時間での対比較を実施した。さらに、各群でどの T i m e ポイントで投与物なしの場合 (ベースライン) との差異があるのかを検討するために、対照群 (第 1 群) と脱脂発酵乳 (第 2 ~ 6 群)、脱脂乳群 (第 7 ~ 11 群) ごとの D u n n e t t 検定を実施した。全ての解析は P 値が 0.05 未満の場合を有意とし、統計解析には J M P 11 (S A S I n s t i t u t e I n c.) を用いた。

[0058] 結果を図 1 および図 2 に示す。図 1 および 2 の結果から、タンパク質濃度を揃えて脱脂乳または脱脂発酵乳を投与した場合、脱脂発酵乳の投与時には、脱脂乳の投与時と比較して、門脈血中の総アミノ酸、ロイシン濃度が投与 30 分後、60 分後で有意に高い値を示し、脱脂発酵乳は、脱脂乳と比較して所定のアミノ酸の吸収速度が速いことが確認された。更に、驚くべきことに足底筋の F S R は 30 ~ 240 分後まで、脱脂乳よりも脱脂発酵乳で有意に高く推移した (図 3 参照)。これらの結果より、脱脂発酵乳は、脱脂乳よ

り高い筋肉合成促進効果、特に骨格筋合成促進効果を有することが示された。したがって、当該発酵乳は、タンパク質源として特に骨格筋合成に有用であり、スポーツのため、または高齢者の健康維持のために有用である可能性が強く示唆された。

[0059] [実施例3]

7週齢の雄性SDラット（日本クレア株式会社より入手した）を、馴化飼育終了後、絶食させた（約18時間）。FSR評価試験当日、体重が全体の平均より大きく外れた個体を除外したあと、ラットを8匹ずつ以下の7群に分けた（第A群～第G群はn=8であった）。試験前日からラットを約18時間絶食させた。

[0060] 脱脂乳は、無脂乳固形分（SNF）が16%になるよう調合後、95℃で殺菌し、冷却後に均質化（15MPa）した後、65℃で30分殺菌して調製したものをを用いた。脱脂発酵乳は、発酵温度を42℃とし、スターターとして、ラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーシーズ・ブルガリカス（*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*）OLL205013株（受託番号NITE BP-02411）とストレプトコッカス・サーモフィルス（*Streptococcus thermophilus*）OLS3290株（受託番号FERM BP-19638）を用いた点以外は、実施例1と同様に調製した。発酵終了時のpHは4.3～4.4であった。各試験溶液は、調製後、-20℃で保存し、投与の直前に解凍して常温にしたものをを用いた。各試験溶液の性状を、表3に示した。

第A群：投与物：脱脂乳および脱脂発酵乳のいずれの投与も行わずに、上記の約18時間絶食後に解剖を行った（投与の0分後とした）。

第B群：脱脂乳を投与し、その投与の30分後に解剖を行った。

第C群：脱脂乳を投与し、その投与の60分後に解剖を行った。

第D群：脱脂乳を投与し、その投与の90分後に解剖を行った。

第E群：脱脂発酵乳を投与し、その投与の30分後に解剖を行った。

第F群：脱脂発酵乳を投与し、その投与の60分後に解剖を行った。

第G群：脱脂発酵乳を投与し、その投与の90分後に解剖を行った。

第A群以外のラットに上記の試験溶液（脱脂乳または脱脂発酵乳）を経口投与し、その投与後に、上記のタイミングで解剖を実施した。解剖の15分前には、骨格筋合成速度測定の特レーサーである重水素ラベルフェニルアラニン（ 45 mg/kg BW ）を尾静脈より注射した（ 45 mg/kg BW ）。解剖はイソフルラン麻酔下で行い、門脈血を部分採血後、腹部大静脈より全採血し、安楽死させた。下腿三頭筋を摘出後、直ちに液体窒素で凍結させた。

[0061] [表3]

表3：試験溶液の性状

試験溶液	pH	比重(g/ml) (10°C)	たんぱく質 含量(w/w%)	たんぱく質投与 用量 (g/kgBW)	炭水化物/脂質/灰分 (w/w%)
脱脂乳	6.5	1.06	6.05	0.64	8.8 / 0.0 / 1.3
脱脂発酵乳	4.4	1.06	5.93	0.63	8.9 / 0.0 / 1.3

※表3中の各項目の分析方法は以下の通りである：

比重：浮標法

以下、一般財団法人 食品開発分析センターSANATECにて委託分析

たんぱく質量：ケルダール法（係数6.38）

脂質：レーゼゴットリーブ法

灰分：直接灰化法

水分：常圧加熱乾燥法

炭水化物：全重量 - 水分量 - 脂質量 - たんぱく質量 - 灰分量

[0062] <門脈血中アミノ酸測定>

血漿を3%スルホサリチル酸処理により除たんぱく質した後、Intra Amino Acidカラム（Intact社製）を使用したLC-MS/MS法により門脈血中の20種のアミノ酸を外部標準法にて定量した。

[0063] <FSR測定>

骨格筋のホモジナイズ、上清の分離と筋ホモジナイズサンプルの洗浄、および筋ホモジナイズサンプルのタンパク質加水分解は、実施例2と同様に実施し、筋加水分解物を得た。筋加水分解物200 μL を遠心エバポレーターを用いて濃縮した。濃縮物を25 μM 内部標準含有10%アセトニトリル80 μL に溶解させ（原液）、また25 μM 内部標準含有10%アセトニトリルを用いて20倍希釈した（20倍希釈液）。原液、20倍希釈液それぞれ

を0.2 μ m フィルターでろ過し、筋加水分解物定量用サンプル（原液、20倍希釈液）とした。内部標準には $^{13}\text{C}_9$, ^{15}N , α , β^1 , β^2 , 2, 3, 4, 5, 6- D_8 -Phe（IC-Pheとする、Sigma社製）を用いた。

LC/MS/MS（TQD, Waters）を用いて、筋上清定量用サンプルおよび筋加水分解物定量用サンプル（原液、20倍希釈液）について、フェニルアラニン（Phe）および重水素ラベルフェニルアラニン（Phe（Ring-D5））のエンリッチメントを計測した。LC条件は実施例2と同じ条件とした。MS/MS条件は、フラグメントイオンにIC-Phe： m/z 184.17 > 137.17を追加した点以外は、実施例2と同じ条件とした。

[0064] ・エンリッチメントの測定方法を以下に示す。

$$\text{D}_5\text{-Pheのエンリッチメント} = \text{Res}(\text{D}_5\text{-Phe}) / (\text{Res}(\text{D}_5\text{-Phe}) + \text{Res}(\text{Phe}))$$

$\text{Res}(\text{D}_5\text{-Phe})$ = IC-Pheに対する $\text{D}_5\text{-Phe}$ の相対ピーク強度

$\text{Res}(\text{Phe})$ = IC-Pheに対するPheの相対ピーク強度

[0065] <骨格筋合成速度（FSR）の算出>

LC/MS/MSによって算出した足底筋のたんぱく質中および遊離のPhe（Ring-D5）のエンリッチメントを基に、上記式（1）に従い、骨格筋合成速度（FSR）を算出した。

[0066] <統計解析手法>

統計手法は、階層的な解析を実施した。つまり、まず脱脂乳、脱脂発酵乳（Food）と投与後時間（Time：反復計測ではない）およびFood $\times$ Timeによる2元配置分散分析を実施し、Foodの主効果、またはFood $\times$ Timeの交互作用が有意であった場合、次のような手順で群間の対比較を実施した。まず、Foodの主効果が有意でかつFood $\times$ Timeの交互作用が有意でなかった場合は群間のFSRに差異が認められると判

断した。Food×Timeの交互作用が有意であった場合は、単純主効果検定を実施し、有意差が認められた時間での対比較を実施した。P値が0.05未満の場合を有意とした。更に、各群でどのTimeポイントで投与なしの場合（ベースライン）との差異があるのかを検討するために、投与なし群と脱脂乳、脱脂発酵乳群ごとのDunnett検定を実施した。統計解析にはJMP11（SAS Institute Inc.）を用いた。

[0067] <脱脂乳または脱脂発酵乳投与後のアミノ酸吸収>

門脈血中の総アミノ酸（TAA）、ロイシン（Leu）濃度（量）を図3および4に示した。

脱脂乳投与後の門脈血中のTAA濃度は、30分後および90分後で絶食時より有意に高くなったものの、ロイシン濃度の有意な変動は認められなかった。これに対して、脱脂発酵乳では、TAA、Leuともに投与30分後で、絶食時より有意に高くなった。また、TAAは投与後30分、Leuは投与30分後および60分後の門脈血中濃度は脱脂乳より顕著に高かった。この結果から、適切なスターターを用いて発酵させることにより、原料脱脂乳と比較してアミノ酸の吸収性を高くできることが分かった。

[0068] <脱脂乳または脱脂発酵乳投与後のFSR推移>

足底筋のFSRの結果を図5に示した。

群（Food）と時間を要因とした二元配置分散分析では、群および時間の主効果が有意であり、群×時間の交互作用は認められなかった。つまり、投与後の時間に関わらず、投与後30～90分後において、脱脂発酵乳投与群で脱脂乳投与群より足底筋FSRが顕著に高く推移したことが示された。

また、投与を実施していない投与なし群と各群の各時点でのFSRの差異を解析したところ、脱脂乳群では全ての時点で投与なし群との有意な差異が認められなかったのに対し、脱脂発酵乳群では投与後30分後で有意な上昇を認め、投与60分後でも上昇している傾向が確認できた（ $P=0.07$ ）。

受託番号

[0069] N I T E B P - 0 2 4 1 1

F E R M B P - 1 9 6 3 8

様式第4

国際

特許手続上の微生物の寄託の
国際的承認に関するブダペスト条約BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE
RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page下記国際寄託当局によってブダペスト条約に
基づく規則7.1に従い発行される

原寄託についての受託証

寄託者 氏名(名称) 株式会社明治 代表取締役 川村 和夫 様

DEPOSITOR Name Meiji Co., Ltd. President and Representative Director KAZUO KAWAMURA

住所 〒104-8306
東京都中央区京橋二丁目2番1号

Address 2-1, Kyobashi 2-Chome, Chuoh-ku Tokyo 104-8306, Japan

I. 微生物の表示		IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
識別の表示: Identification reference given by the DEPOSITOR: Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus OLL285013		受託番号: Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: NITE BP- 02411	
II. 科学的性質及び分類学上の位置		SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
I 欄の微生物には、次の事項が記載されていた。: The microorganism identified under I above was accompanied by: ☒ 科学的性質 a scientific description ☒ 分類学上の位置 a proposed taxonomic designation			
III. 受領及び受託		RECEIPT AND ACCEPTANCE	
本国際寄託当局は、2017年2月3日(原寄託日)に受領した I 欄の微生物を受託した。 This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on February 3, 2017 (date of the original deposit).			
IV. 移管請求の受領		RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
本国際寄託当局は、I 欄の微生物を 年 月 日(国内寄託日)に受託しており、 ブダペスト条約に基づく国際寄託への移管請求を 年 月 日に受領した。 The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).			
V. 国際寄託当局		INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
名称: 独立行政法人科学技術評価機構 特許微生物寄託センター Name: National Institute of Technology and Evaluation センター長 山崎 秀智 Shuji Yamazaki, Director General 住所: 〒292-0818 千葉県千葉市中央区新大塚2-5-8 122号室 Address: #122, 2-5-8 Kazusakamatsuri, Kisarazu-shi, Chiba 292-0818, Japan 発行日: 2017年3月31日 Date: March 31, 2017			

様式第4

国際

特許手続上の微生物の寄託の
国際的承認に関するブダペスト条約

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE
RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

下記国際寄託当局によってブダペスト条約に
基づく規則7.1に従い発行される

原寄託についての受託証

寄託者 氏名(名称) 株式会社 明治 代表取締役 川村 和夫 様

DEPOSITOR Name Meiji Co., Ltd. President and Representative Director Kazuo KAWAMURA

住所 〒136-8908
東京都江東区新砂1丁目2番10号

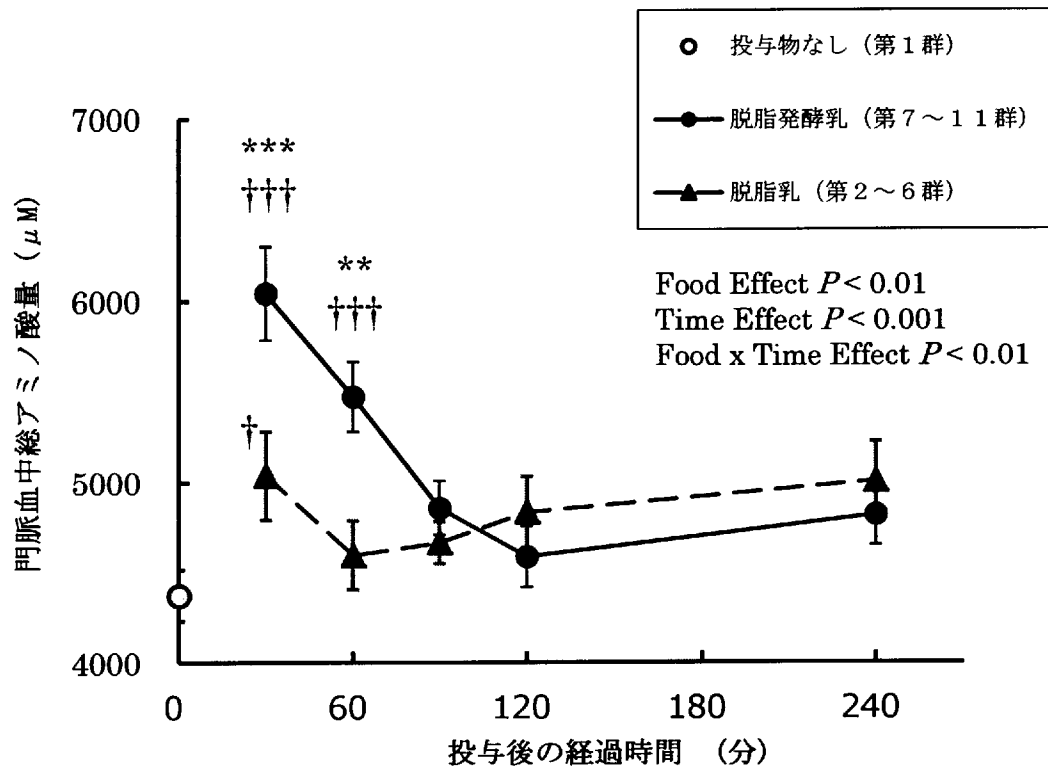
Address 2-10, Shinsuna 1 Chome Koutou-ku, Tokyo-to 136-8908, Japan

I. 微生物の表示 IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
識別の表示: Identification reference given by the DEPOSITOR Streptococcus thermophilus DL53290	受託番号: Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: FERM BP- 19638
II. 科学的性質及び分類学上の位置 SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
I 欄の微生物には、次の事項が記載されていた。: The microorganism identified under I above was accompanied by: ☐ 科学的性質 a scientific description ☒ 分類学上の位置 a proposed taxonomic designation	
III. 受領及び受託 RECEIPT AND ACCEPTANCE	
本国際寄託当局は、年 月 日(原寄託日)に受領した I 欄の微生物を受託した。 This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on (date of the original deposit).	
IV. 移管請求の受領 RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
本国際寄託当局は、I 欄の微生物を 2004 年 1 月 19 日(国内寄託日)に受託しており、 ブダペスト条約に基づく国際寄託への移管請求を 2013 年 9 月 6 日に受領した。 The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on January 19, 2004 (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on September 6, 2013 (date of receipt of request for conversion).	
V. 国際寄託当局 INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
名称: 独立行政法人科学技術振興機構 特許生物寄託センター Name: International Patent Organism Depositary National Institute of Technology and Evaluation センター長 清水 憲一 Keichi Shimizu, Director General 住所: 〒252-0818 千葉県木更津市かずさ緑野2-5-8 120号室 Address: #120, 2-5-8 Kazusakamitari, Kisarazu-shi, Chiba 252-0818, Japan 発行日: 2013 年 9 月 30 日 Date: September 30, 2013	

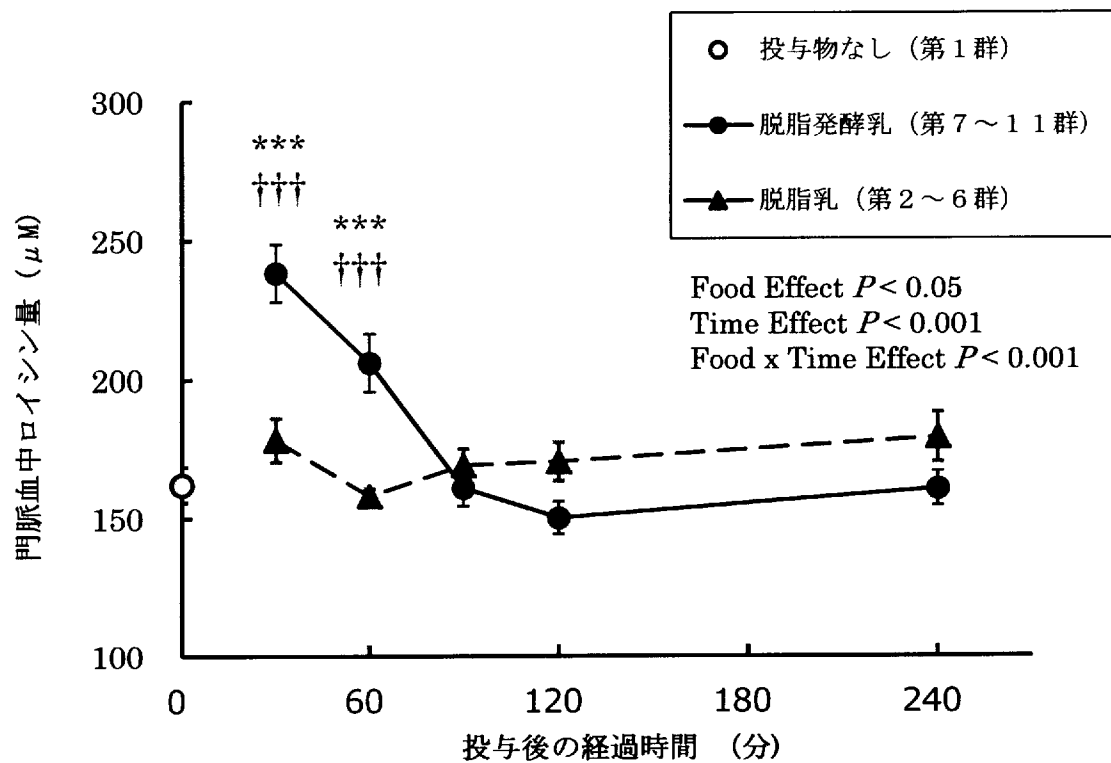
請求の範囲

- [請求項1] 乳タンパク質濃度が1.9質量%以上である、筋肉合成促進用発酵乳。
- [請求項2] 乳タンパク質濃度が3.0質量%以上である、請求項1に記載の筋肉合成促進用発酵乳。
- [請求項3] 発酵乳が、ラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーシーズ・ブルガリカス (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) およびストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*) により発酵されたものである、請求項1または2に記載の筋肉合成促進用発酵乳。
- [請求項4] 請求項1～3のいずれか一項に記載の発酵乳を含む、筋肉合成促進用食品。
- [請求項5] 乳タンパク質濃度が1.9質量%以上である発酵乳を、対象に摂取させることを含んでなる、筋肉合成促進方法。

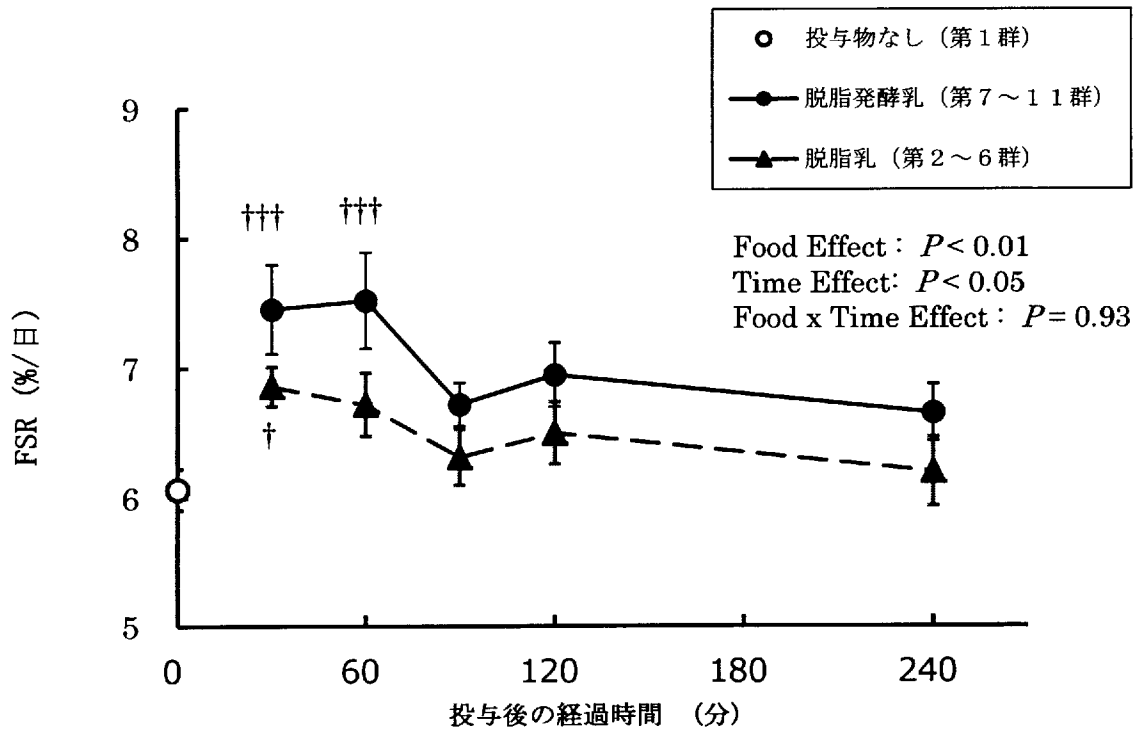
[図1]



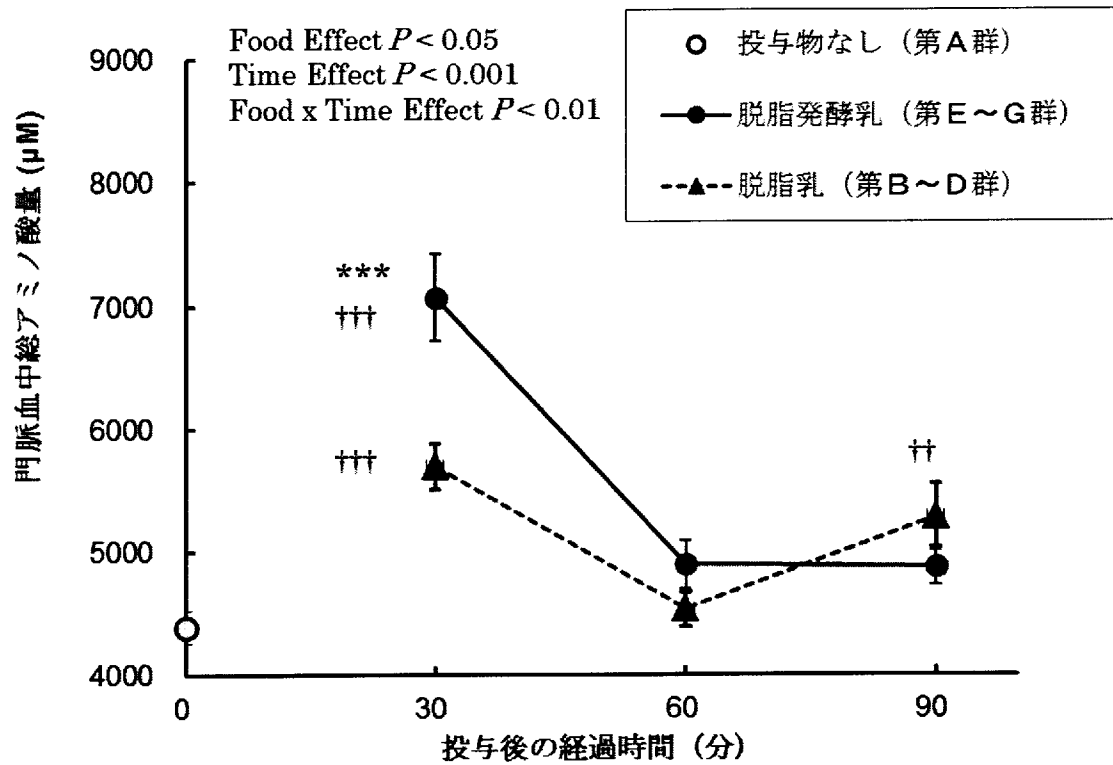
[図2]



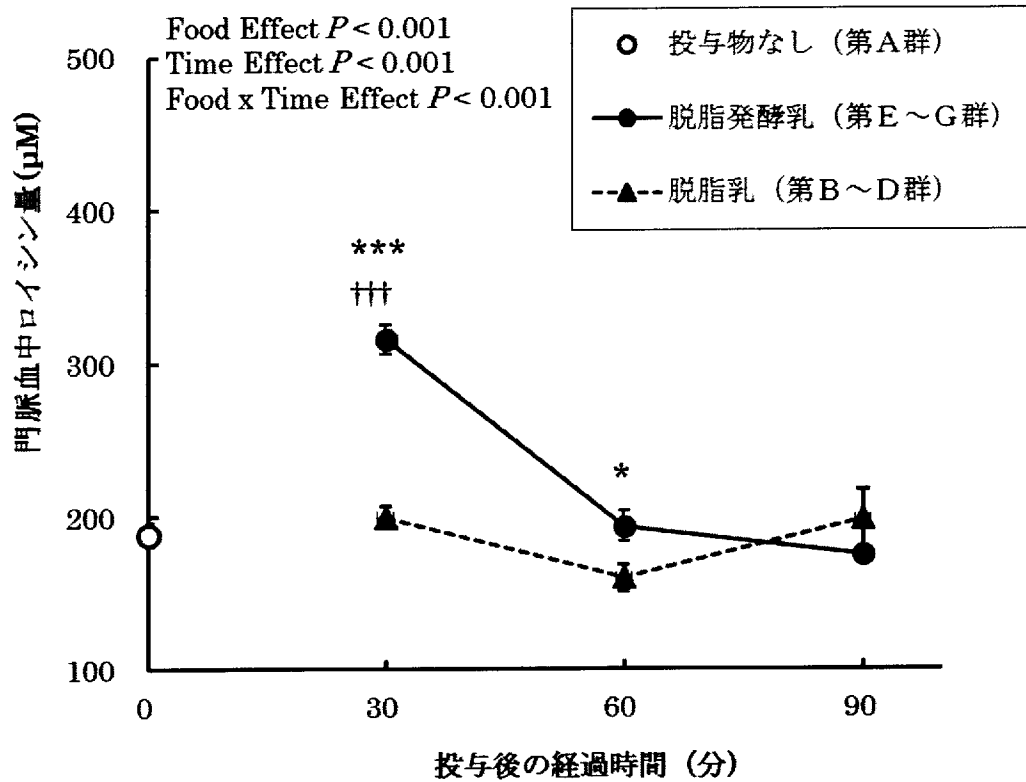
[図3]



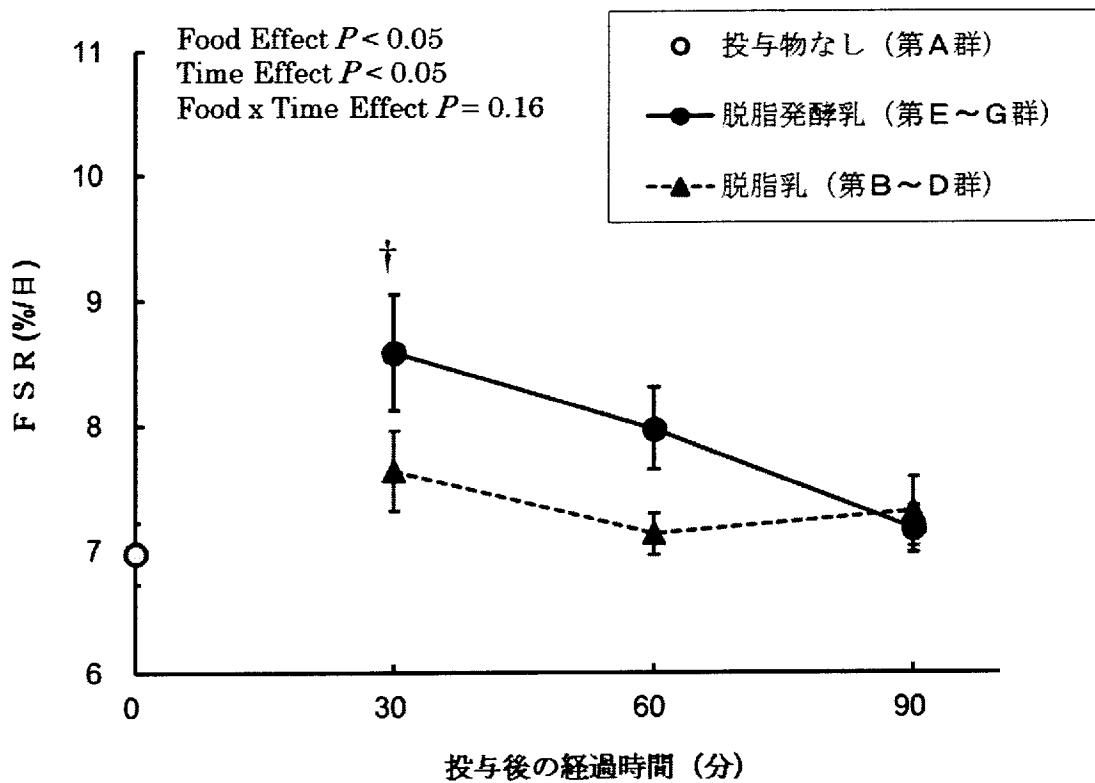
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/046523

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. A23C9/123 (2006.01) i, A23L33/19 (2016.01) i, A61K35/20 (2006.01) i,
A61K35/744 (2015.01) i, A61K35/747 (2015.01) i,
A61P21/00 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. A23C9/123, A23L33/19, A61K35/20, A61K35/744, A61K35/747,
A61P21/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2019
Registered utility model specifications of Japan	1996-2019
Published registered utility model applications of Japan	1994-2019

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/FSTA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 2018/186425 A1 (MEIJI CO., LTD.) 11 October 2018, paragraphs [0034], [0035] (Family: none)	1-5
P, X	角公一郎他, ラットを用いた発酵乳たんぱく質の吸収性と筋たんぱく質合成作用の検討, 第72回日本栄養・食糧学会大会講演要旨集, 27 April 2018, p. 193, 2D-06a, entire text, non-official translation (KAKU, Koichiro et al., "Review on absorbent properties of fermented milk protein and muscle protein synthesis effect using rat", Lecture abstracts of the 72nd annual meeting of Japan Society of Nutrition and Food Science)	1-5



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

01 March 2019 (01.03.2019)

Date of mailing of the international search report

26 March 2019 (26.03.2019)

Name and mailing address of the ISA/

Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/046523

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2015/037720 A1 (MEIJI CO., LTD.) 19 March 2015, claims, paragraphs [0022], [0032]-[0033], [0042], example 2 & CN 105658231 A	1-2, 4-5 3
Y A	JP 9-84521 A (SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO., LTD.) 31 March 1997, claims (Family: none)	3 1-2, 4-5
X	JP 2017-176141 A (MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD.) 05 October 2017, claims, examples, paragraph [0021] (Family: none)	1-5
X Y	JP 2017-169477 A (MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD.) 28 September 2017, claims, examples (Family: none)	1-2, 4-5 3
X Y	WO 2017/029803 A1 (MEIJI CO., LTD.) 23 February 2017, paragraph [0011] (Family: none)	1-2, 4-5 3
X Y	JP 2016-136915 A (NIHON RAKUNO KYODO KK) 04 August 2016, claims (Family: none)	1-2, 4-5 3
A	WO 2012/063826 A1 (CALPIS CO., LTD.) 18 May 2012, paragraph [0013] & CN 103221531 A	1-5

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A23C9/123(2006.01)i, A23L33/19(2016.01)i, A61K35/20(2006.01)i, A61K35/744(2015.01)i,
A61K35/747(2015.01)i, A61P21/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A23C9/123, A23L33/19, A61K35/20, A61K35/744, A61K35/747, A61P21/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 9 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 9 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 9 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/FSTA (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
P, X	W0 2018/186425 A1 (株式会社明治) 2018.10.11, [0034], [0035] (ファミリーなし)	1-5
P, X	角公一郎 他, ラットを用いた発酵乳たんぱく質の吸収性と筋たん ぱく質合成作用の検討, 第72回日本栄養・食糧学会大会 講演要旨 集, 2018.4.27, p. 193, 2D-06a, 全文	1-5

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 1 . 0 3 . 2 0 1 9

国際調査報告の発送日

2 6 . 0 3 . 2 0 1 9

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

千葉 直紀

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

4 B

3 4 3 4

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	WO 2015/037720 A1 (株式会社明治) 2015.03.19, 特許請求の範囲, [0022], [0032]-[0033], [0042], 実施例 2 & CN 105658231 A	1-2, 4-5 3
Y A	JP 9-84521 A (雪印乳業株式会社) 1997.03.31, 特許請求の範囲 (フ ァミリーなし)	3 1-2, 4-5
X	JP 2017-176141 A (森永乳業株式会社) 2017.10.05, 特許請求の範 囲, 実施例, [0021] (ファミリーなし)	1-5
X Y	JP 2017-169477 A (森永乳業株式会社) 2017.09.28, 特許請求の範 囲, 実施例, (ファミリーなし)	1-2, 4-5 3
X Y	WO 2017/029803 A1 (株式会社明治) 2017.02.23, [0011] (ファミリーなし)	1-2, 4-5 3
X Y	JP 2016-136915 A (日本酪農協同株式会社) 2016.08.04, 特許請求 の範囲 (ファミリーなし)	1-2, 4-5 3
A	WO 2012/063826 A1 (カルピス株式会社) 2012.05.18, [0013] & CN 103221531 A	1-5