

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K11476

研究課題名(和文) 唾液を用いた運動時の三大栄養素利用状態評価法の開発

研究課題名(英文) Development of evaluation method for the three major nutrient utilization state during exercise using saliva sample

研究代表者

宮崎 照雄 (Miyazaki, Teruo)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60532687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：運動時や代謝性疾患時には、エネルギー代謝バランスが変化する。本研究では、エネルギー代謝の肝臓と骨格筋での違いから見出した三大栄養素(糖質、脂質、アミノ酸)別の代謝産物を唾液中で測定し、臓器間エネルギー代謝依存度の変化評価した。持久性運動により三大栄養素由来のエネルギー代謝産物が増加する事に加え、分岐鎖アミノ酸の運動前摂取により、骨格筋での分岐鎖アミノ酸燃焼が高まる事で、肝臓の脂質代謝、糖質代謝が抑制される事を、唾液で観察できた。代謝疾患動物の血液でも、同様の結果が得られた。肝臓と骨格筋との間で生じるエネルギー代謝バランスの変化を、唾液や血液を用いて、車輪図を用いて視覚的に観察する事ができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、非侵襲的に、自ら場所や時間、回数等に縛られる事なくサンプリングできる唾液を用いた。代謝の中心臓器である肝臓とエネルギー消費の中心臓器である骨格筋における三大栄養素由来のエネルギー代謝産物を高感度分析法にて測定し、臓器間の三大栄養素燃焼バランスを評価できた。そのため、運動選手のパフォーマンスやコンディショニングに加え、代謝性疾患患者の病態把握にも応用可能で、高齢者や子どもを含め幅広い層での活用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In endurance exercises and metabolic diseases, energy metabolism is altered. Based on the differences in energy metabolism between the liver and skeletal muscle, this study evaluated the influences of endurance exercise and branched-chain amino acids (BCAAs) ingestion on the metabolites of three macronutrients (carbohydrates, lipids, and amino acids) derived from the respective tissue in the saliva, which can be noninvasively collected. In the saliva, the metabolites were increased after the treadmill running, and also, the increase of the metabolite of muscular BCAA catabolism and the suppressions of the hepatic lipid metabolism and glycolysis by the BCAA ingestion could be evaluated in the saliva samples. Similar evidence was obtained in blood samples from the metabolic disease mouse model. From the results in saliva and blood, the changes in the energy metabolism balance between the liver and skeletal muscle could be visually observed using a wheel diagram.

研究分野：栄養エネルギー代謝

キーワード：エネルギー代謝 骨格筋 肝臓 分岐鎖アミノ酸

## 1. 研究開始当初の背景

運動時や代謝性疾患時には、エネルギー代謝、特に、三大栄養素(糖質、脂質、アミノ酸)のエネルギー利用バランスが変化する。この栄養素を用いるエネルギー代謝バランスの変化を把握する事は、運動パフォーマンスの向上やコンディショニング、疲労や怪我の防止に加え、代謝性疾患の病態管理や治療などにも、大変、重要な要素である。我々は、肝臓と骨格筋における三大栄養素をエネルギー源に利用する際の違いに着目し、それぞれの臓器で各栄養素がエネルギー産生に用いられる際に生じる中間代謝物を見出し、その代謝物を高感度に分析する方法を確立した。すなわち、肝臓においては、ケトン体である $\beta$ -ヒドロキシ酪酸(3HB)と糖原性アミノ酸(メチオニン)代謝物の $\alpha$ -ヒドロキシ酪酸(2HB)が、それぞれ、肝臓における脂質(脂肪酸異化)と糖質(糖新生)のマーカーになること、さらに、骨格筋においては、解糖系の代謝物である乳酸、分岐鎖アミノ酸(BCAA)のバリン中間代謝物の $\beta$ -ヒドロキシイソ酪酸(3HIB)とロイシン中間代謝物の $\beta$ -ヒドロキシ $\beta$ -メチル酪酸(3HMB)が、それぞれ、解糖、蛋白異化、蛋白同化のマーカーとして、挙げられる。さらに我々は、それら代謝物を HPLC-MS/MS 装置を用いた分析技術を活かして、唾液に含まれる微量な代謝物を定量し、血液中の濃度と高い相関を示す事も明らかにした。そこで、本研究では、これらの測定技術を活かし、唾液サンプルを用いて、エネルギー代謝状態を非侵襲的に評価する方法を開発する事を目的とした。

しかしながら、本研究の開始後、新型コロナウイルス感染症が世界的に蔓延し、本邦でも、非常事態宣言による行動や対人接触が制限された事により、新型コロナウイルス感染予防の観点から、ウイルスが高濃度に含有される唾液をサンプルとして用いるヒトを対象にした実験、特に、広く被験者を募って大人数を対象とした検討が困難な状況になった。そのため、1名の被験者における運動負荷前後に採取した唾液を分析に用いた。研究期間を1年間延長したが、新型コロナウイルス感染状況の収束が見込めなかったため、実験動物を用いて基礎的な検討も行った。

## 2. 研究の目的

HPLC-MS/MS 装置を用いた高感度分析方法を用いて、エネルギー代謝に変化が生じる運動後の唾液、ならびに、代謝性疾患動物モデルにおける血液中の栄養エネルギー代謝産物の動態を評価する事を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 持久性走運動前後の唾液中エネルギー代謝産物の変化に対する BCAA 摂取の影響。

健康男性において、60分間のトレッドミル走運動(9km/h)前後に、唾液を流涎法にて採取した。同一被験者において、運動30分前に、BCAA 6.4gを摂取させ、同様に、運動前後に唾液を採取した。

### (2) 代謝性疾患モデル動物における血液中エネルギー代謝産物に対する BCAA 摂取の影響。

代謝性疾患モデル動物として、ヒト型胆汁酸組成(Humanized Bile Acid)を有するマウス(HBA マウス)を本研究に用いた。マウスは種特異的な胆汁酸代謝を持つため、細胞傷害性の弱いコール酸とミユリコール酸が体内胆汁酸の殆どを占める。このマウス特異的な胆汁酸代謝の原因となる代謝酵素 Cyp2c70 と Cyp2a12 の遺伝子をダブルノックアウトする事で、ヒト型の胆汁酸で疎水性が高いケノデオキシコール酸とトリコール酸、ならびに、デオキシコール酸(DCA)を持つ HBA マウスモデルを作製した(Honda et al. J Lipid Res. 2020)。疎水性胆汁酸は細胞傷害性が強いことから、HBA マウスでは、週齢経過に伴い肝障害が自然発症する(Ueda et al. PlosOne. 2022)。

本研究では、細胞傷害性が高く、野生型(WT)マウスでの含有量が少ない DCA を、HBA マウスに経口摂取させる事で、肝障害悪化に伴うエネルギー代謝をさらに変化させた状態を作り出した上で、BCAA を経口摂取させた際のエネルギー栄養バランスの変化を評価した。

5週齢の雄性 HBA マウスに、DCA を(7.5 mg/100 mL)にて水道水に溶解し、飲料水として、15週間、自由摂取させた。コントロールとして、WT マウスに、同様に、DCA 添加水を15週間、自由摂取させた。15週間の DCA 含有水投与終了後に、それぞれのマウスに経口ゾンデを用いて、BCAA 溶液 300  $\mu$ L (1.5 g/kg 体重)、もしくは、生理食塩水 300  $\mu$ L を投与した。投与30分後に、3種混合麻酔による麻酔下で開腹し、下大静脈より採血による放血処理にて安楽死させた。採取した血液から血清を分離し、また、肝臓と骨格筋(腓腹筋)を採取し重量を測定した。

### (3) エネルギー代謝産物の測定。

採取したヒト唾液ならびにマウス血清において、HPLC-MS/MS 装置を用いて、エネルギー代謝産物を

測定した。エネルギー代謝産物として、乳酸、2HB、3HB、3HIB、3HMB を測定した。唾液ならびに血清 5  $\mu$ L を、内部標準である安定同位体 (100 ng [ $^{13}\text{C}_4$ ] 3-hydroxybutyrate, [ $^2\text{H}_3$ ]-lactate) を含む 95% アセトリル溶液 100  $\mu$ L に混和した後、遠心分離 (2,000  $\times g$ , 1 分) にて除タンパク処理を行った。除タンパクした上清を硝子試験管に回収し、窒素下で蒸発乾固した後に、2-pyridinemethanol を含む誘導体化剤 50  $\mu$ L を加え、室温で 30 分間インキュベーションし誘導体化処理を行った。その後、1 mL の *n*-ヘキサンにて抽出し、再度、窒素下で蒸発乾固を行った後、1% ギ酸水 60  $\mu$ L を加えて溶解した。溶解したサンプル 5  $\mu$ L を、HPLC-MS/MS 装置にインジェクションし、標準液にて作成した検量線を用いて、定量した (Miyazaki et al. Springer Plus. 2015)。

各代謝物において、運動前や BCAA 非摂取条件に対する運動後や BCAA 摂取による変化率を算出し、車輪図を作成した。

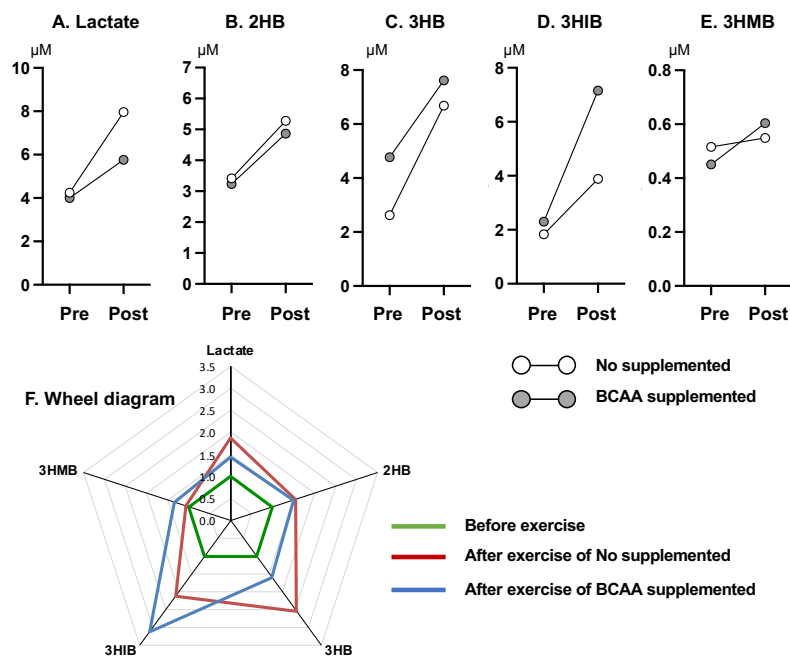


図1. ドレッドミル運動前後の唾液中エネルギー代謝産物の変化に対する BCAA 摂取の影響. (A~E) 運動前後の唾液中代謝物濃度 [(A) 乳酸, (B) 2-ヒドロキシ酪酸, (C) 3-ヒドロキシ酪酸, (D) 3-ヒドロキシイソ酪酸, (E) 3-ヒドロキシ-3-メチル酪酸], (F) エネルギー代謝車輪図

#### 4. 研究成果

##### (1) 持久性走運動前後の唾液中エネルギー代謝産物の変化に対する BCAA 摂取の影響.

図1に、トレッドミル走運動前後、ならびに、BCAA 摂取有無条件における唾液中エネルギー代謝物濃度を示した (図1A~1E)。測定した全ての代謝物は、運動後において増加を示した。運動により増加した唾液中乳酸濃度は、BCAA の摂取により抑制された (図1A)。運動により上昇する唾液中 2HB 濃度は、BCAA 摂取の影響を受けなかった (図1B)。唾液中 3HB 濃度は、運動前の BCAA 摂取により高値を示したが、運動後には、BCAA 非摂取条件との差は見られなかった (図1C)。唾液中 3HIB 濃度は、BCAA 非投与条件においても運動後に上昇したが、BCAA 摂取によって、さらに顕著に高まった (図1D)。唾液中 3HMB 濃度は、BCAA 非摂取条件では運動後に僅かに上昇したのに対し、BCAA 摂取により運動後の上昇が顕著になった (図1E)。図1Fに、各種エネルギー代謝物の変化比の車輪図を示した。運動前と比較し、BCAA 非摂取条件の運動後では、3HMB を除く全ての代謝物で増加が確認された。運動前と比較し、骨格筋糖代謝 (解糖系)、肝臓の糖新生系、肝臓の脂質代謝系、骨格筋の BCAA 異化系が亢進していた。一方、BCAA を摂取する事で、運動後の乳酸と 3HB は低下し、3HIB と 3HMB は上昇した。運動前に BCAA を摂取する事で、運動中の骨格筋における BCAA をエネルギー産生に利用する事で、糖代謝ならびに肝脂質代謝によるエネルギー産生が

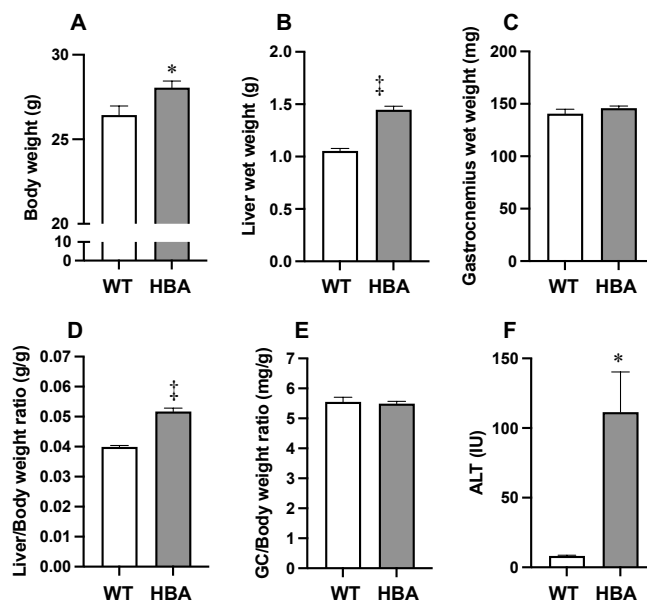


図2. 体重、肝臓、骨格筋重量の比較. (A) 体重, (B) 肝臓湿重量, (C) 腓腹筋湿重量, (D) 肝臓体重比, (E) 腓腹筋体重比, (F) 血清 ALT 値. \* $P < 0.05$ , ‡ $P < 0.0001$  vs. WT group (対応のない Student's t 検定)。

運動後の乳酸と 3HB は低下し、3HIB と 3HMB は上昇した。運動前に BCAA を摂取する事で、運動中の骨格筋における BCAA をエネルギー産生に利用する事で、糖代謝ならびに肝脂質代謝によるエネルギー産生が

抑制される事を示していると考えられた。

(2)代謝性疾患モデル動物における血液中エネルギー代謝産物に対するBCAA摂取の影響。

図2に、WT マウスと HBA マウスにおける体重ならびに組織(肝臓, 骨格筋)重量の比較を示した。WT マウスと比較し、HBA マウスでは、体重の有意な増加が見られた(図 2A)。また、HBA マウスでは、肝臓の湿重量も有意に増加しており(図 2B)、体重に対する肝重量比も有意に高かった(図 2C)。肝障害の指標である

血清ALT値は、HBA 群で有意に上昇しており(図 2F)、HBA 群の有意な肝重量の増加は、炎症を伴う肝障害に依るものであった。一方、腓腹筋湿重量は、WT マウスと HBA マウスとに有意な違いはなく(図 2D)、体重に対する筋重量比にも有意差は見られなかった(図 2E)。

図3に、WT マウスと HBA マウスの血清中のエネルギー代謝物濃度を示した。血中乳酸濃度は、HBA マウスで有意に減少を示したが、BCAA 摂取の影響は見られなかった(図3A)。血清 2HB 濃度においては、両マウス間、ならびに、BCAA 摂取の影響はなかった(図3B)。血清 3HB 濃度は、WT マウスと比較し、HBA マウスにおいて有意な減少が見られたが、BCAA 摂取の影響は無かった(図3C)。血清 3HIB 濃度は、BCAA 摂取により有意に増加した(図3D)。血清 3HMB 濃度も、BCAA 投与により、両マウスにおいて、有意に増加した(図3E)。

図3F に、各種エネルギー代謝物の変化比の車輪図を示した。WT マウスと比較し、HBA マウスでは、乳酸値と 3HB 値の低下が見られた。BCAA 投与により、両マウスともに、乳酸、3HB、2HB には変化は見られなかったが、3HIB と 3HMB 濃度比の顕著な増加が確認された。WT マウスと比較し、HBA マウスでは、BCAA 摂取による 3HIB 比の上昇は抑制される一方で、3HMB 比は高い傾向だった。HBA マウスでは、肝障害により肝脂質代謝と骨格筋糖代謝が低下する一方で、BCAA 投与では骨格筋ミトコンドリア内の代謝物である 3HIB は抑制され、骨格筋細胞質内の代謝物である 3HMB は高まった事から、HBA マウスの骨格筋でのミトコンドリアの代謝が低下している事を反映していると考えられた。

以上の結果をまとめると、運動時や代謝性疾患において、唾液や血液中で、各種エネルギー経路の代謝産物(乳酸、2HB、3HB、3HIB、3HMB)を、高感度 HPLC-MS/MS 測定法で定量する事で、肝臓と骨格筋における糖質、脂質、アミノ酸を用いたエネルギー産生バランスが評価できる可能性が高まった。

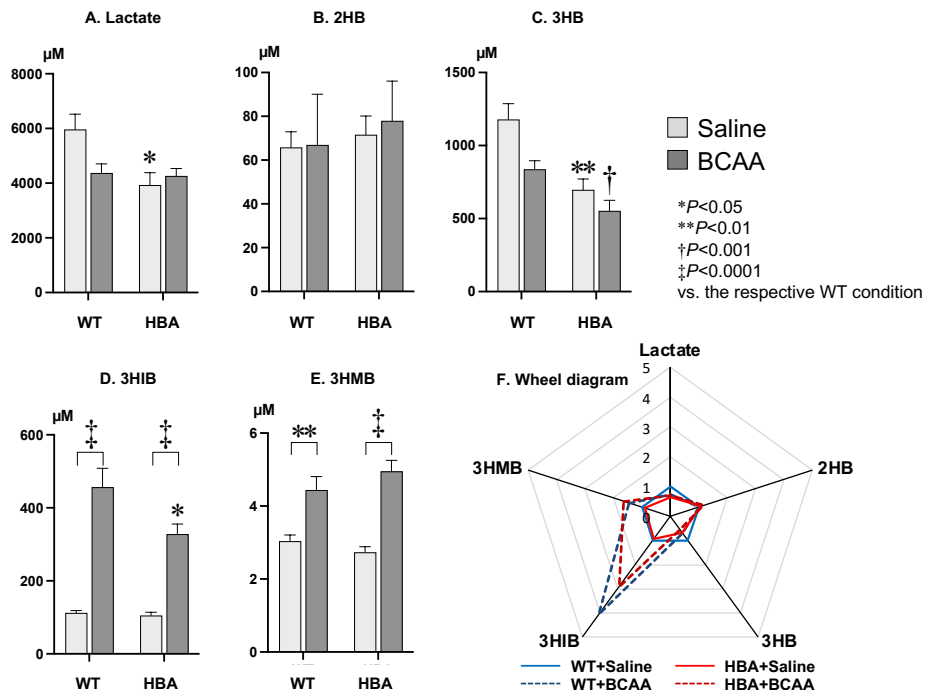


図3.BCAA 投与による WT 群と HBA 群の血清中のエネルギー代謝物値の変化。(A)乳酸, (B)2-ヒドロキシ酪酸, (C)3-ヒドロキシ酪酸, (D)3-ヒドロキシイソ酪酸, (E)3-ヒドロキシ-3-メチル酪酸, (F)エネルギー代謝車輪図。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 宮崎照雄, 大森肇, 本多彰
2. 発表標題 血中代謝産物測定による持久性運動時のエネルギー代謝バランスの評価
3. 学会等名 第28回日本運動生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Teruo Miyazaki, Song-Gyu Ra, Keisuke Ishikura, Hajime Ohmori, Akira Honda
2. 発表標題 Comparison of 3HMB and 3HIB productions between the resistance and endurance exercises with BCAA ingestion
3. 学会等名 25th Annual Congress of the European College of Sport Science (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Teruo Miyazaki, Tadashi Ikegami, Akira Honda
2. 発表標題 Salivary analysis of valine intermediate 3-hydroxyisobutyrate that is a possible marker of muscular BCAA utilization for energy production in exercise
3. 学会等名 24th Annual Congress of the European College of Sport Science (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎照雄, 海老名慧, 大森肇, 本多彰
2. 発表標題 バリン中間代謝物3-ヒドロキシイソ酪酸の脳組織内増加が, 運動能に及ぼす影響
3. 学会等名 第27回日本運動生理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎照雄, 大森肇, 本多彰
2. 発表標題 N-acetyl-taurineの生成を介した骨格筋エネルギー代謝調節機構
3. 学会等名 第74回日本体力医学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎照雄, 羅成圭, 石倉恵介, 大森肇, 本多彰
2. 発表標題 骨格筋におけるN-アセチルタウリンを介したエネルギー代謝調節機構
3. 学会等名 第6回国際タウリン研究会日本部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮崎照雄, 池上正, 本多彰
2. 発表標題 ヒト型胆汁酸マウスを用いた胆汁酸のサルコペニア発症に及ぼす影響の検討
3. 学会等名 第28回日本消化器関連学会週間
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮崎照雄, 上田元, 池上正, 本多彰
2. 発表標題 胆汁酸の骨格筋エネルギー代謝に及ぼす影響-ヒト型胆汁酸マウスを用いた検討-
3. 学会等名 第77回日本体力医学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Teruo Miyazaki, Hajime Ueda, Tadashi Ikegami, Akira Honda
2. 発表標題 Involvements of bile acids on sarcopenia by regulations of muscular TGR5 and VDR activities in the double knockout mice with human-like bile acid composition
3. 学会等名 AASLD The Liver Meeting 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮崎照雄, 上田元, 岩本淳一, 池上正, 本多彰
2. 発表標題 血中リトコール酸濃度の増加がサルコペニア発症に及ぼす影響
3. 学会等名 第43回胆汁酸研究会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	本多 彰  (Honda Akira)  (10468639)	東京医科大学・医学部・教授   (32645)	
研究分担者	池上 正  (Ikegami Tadashi)  (40439740)	東京医科大学・医学部・教授   (32645)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------