

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25750334

研究課題名(和文) 骨格筋のエネルギー供給バランスを評価する非侵襲的マーカーの実用化

研究課題名(英文) Usefulness of noninvasive monitoring method for tissue-specific energy metabolism in human

研究代表者

宮崎 照雄 (Miyazaki, Teruo)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：60532687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：持久性運動時の糖、脂質、アミノ酸によるエネルギー源依存度の把握は、競技者にとって有用である。血液、尿、唾液等の生体サンプル内のエネルギー代謝物を、LC-MS/MS装置を用いて、持久性運動中、後の変化を観察した。フルマラソンや一過性の走運動を行った際、糖、骨格筋分岐鎖アミノ酸、骨格筋・肝の脂肪酸の代謝物について、血液中や尿中の有意な変化を観察できた。また、唾液サンプルを用いた検討では、運動中、後のエネルギー代謝状態の変化を経時的に観察できた。本成果により、高感度分析法が運動中や運動後の持久性運動によるエネルギー代謝状態をリアルタイムに、非侵襲的に観察できる有用な手段となる事が確認された。

研究成果の概要(英文)：This study examined noninvasive metabolic markers in serum, urine, and saliva by LC-MS/MS system to evaluate energy productive balance among nutrients during and after endurance exercise in human. Immediately after marathon race, high sensitive method could measure the elevations of lactate, acetyl-carnitine as end-production of fatty acid beta-oxidation, 3-hydroxybutyrate (3HB) as ketone body, 3-hydroxyisobutyrate (3HIB) and 3-hydroxy-3-methylbutyrate as intermediates of valine and leucine catabolism, and N-acetyltaurine (NAT) as a metabolite of acetate in serum. After a transient endurance running, urine NAT excretion was also observed over time. In addition, this method could observe the real-time energy metabolism of lipid and amino acid during and after the endurance exercise by measuring of 3HB and 3HIB in saliva. The results confirmed that the high-sensitive detective method was useful for noninvasive and real-time monitoring of tissue-specific energy metabolism in human.

研究分野：病態栄養学

キーワード：骨格筋 エネルギー代謝 運動 アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

持久性運動時には、糖の代謝に加え、脂質やアミノ酸によるエネルギー産生が亢進する。特に、骨格筋での糖・脂質・アミノ酸に対するエネルギー源の依存度の変化は、筋蛋白分解や筋量の減少、疲労の蓄積、故障や怪我の発生、コンディショニングの失敗などをもたらすリスクが高まる。そのため、筋エネルギー代謝状態を把握する事は、競技者にとって大変、有益な情報となる。

報告者らは、骨格筋のエネルギー供給源を反映する分岐鎖アミノ酸異化の中間代謝物や骨格筋脂肪酸β酸化反応産物、肝臓脂質代謝産物などが、飢餓時や運動時のエネルギー代謝が亢進する際に変化する事に着目し、これらを、血液中、唾液中、尿中などの生体サンプルにて測定できる高感度分析法を確立した。

2. 研究の目的

脂質やアミノ酸の代謝産物や中間代謝物を高感度に測定する手法を用いて、ヒト持久性運動時や運動後におけるエネルギー代謝状態を低・非侵襲的に評価する。

3. 研究の方法

(1)フルマラソンによる血中マーカーの変動

フルマラソン参加者28名に、BCAA製剤または偽薬を1日3回(3.2g/回)、競技前日から摂取させた。運動前日、運動直後、運動1日後の血清中のエネルギー代謝物をLC-MS/MS装置にて測定した。

(2)持久性走運動後の尿中マーカーの変動

健康男性に、運動前24時間の蓄尿を行った後、採血を行った。その後、60分間走(9km/h)を行わせ、運動直後から4時間後まで1時間毎と24時間後に、採血を行った。また、運動の1, 2, 3, 4, 6.5, 9.5, 19, 24時間後に採尿した。採取した血清、尿のエネルギー代謝物を測定した。

(3)持久性走運動中・後の唾液中マーカーの変動

健康男性に、60分間(8km/h×30分, 9km/h×30分)のトレッドミル走を行わせた。その際、運動30分前、または、運動直後に、BCAA(6.4g)を摂取させた。運動中5分毎と運動4時間後までの30分毎と24時間後に、唾液を採取した。採取した唾液中のエネルギー代謝物を測定した。

(4)LC-MS/MS装置によるエネルギー代謝物の高感度分析

採取した血清、尿、唾液5μLを用いて、内部標準として安定同位体(¹³C₄ 3-hydroxybutyrate, acetyl-L-[²H₃]carnitine, [²H₃]-lactate, acetyl-[²H₄]taurine)を含有した100μLの95%アセトニトリル溶液に混和、遠心分離して、除蛋白を行った。除蛋白したサンプルを、55°C、窒素下にて蒸発乾固した。蒸発乾固後、2-ピリジンメタノールに混和して誘導体化反応を行い、ジエチルエ

ーテルにて抽出、再蒸発乾固した。蒸発乾固したサンプルは、1%ギ酸水にて再溶解した後、LC-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。LC-MS/MS装置による分析条件は、参考文献(業績投稿論文1,3)の方法に則り、行った。

4. 研究成果

(1)フルマラソンによる血中マーカーの変動

フルマラソン直後、骨格筋β酸化反応産物であるアセチルカルニチン(AcCT)、肝臓脂質異化産物であるケトン体の3-ヒドロキシ酪酸(3HB)、解糖系代謝物である乳酸、酢酸代謝物であるN-アセチルタウリン(NAT)、骨格筋バリン異化中間代謝物である3-ヒドロキシイソ酪酸(3HIB)、骨格筋ロイシン異化中間代謝物である3-ヒドロキシ-3-メチル酪酸(3HMB)の血清濃度が、プラセボ摂取群、BCAA摂取群の両群で、いずれも有意に上昇した(図1)。それら代謝物の血中濃度の上昇は、運動1日後には、運動前の値にまで、回復した。

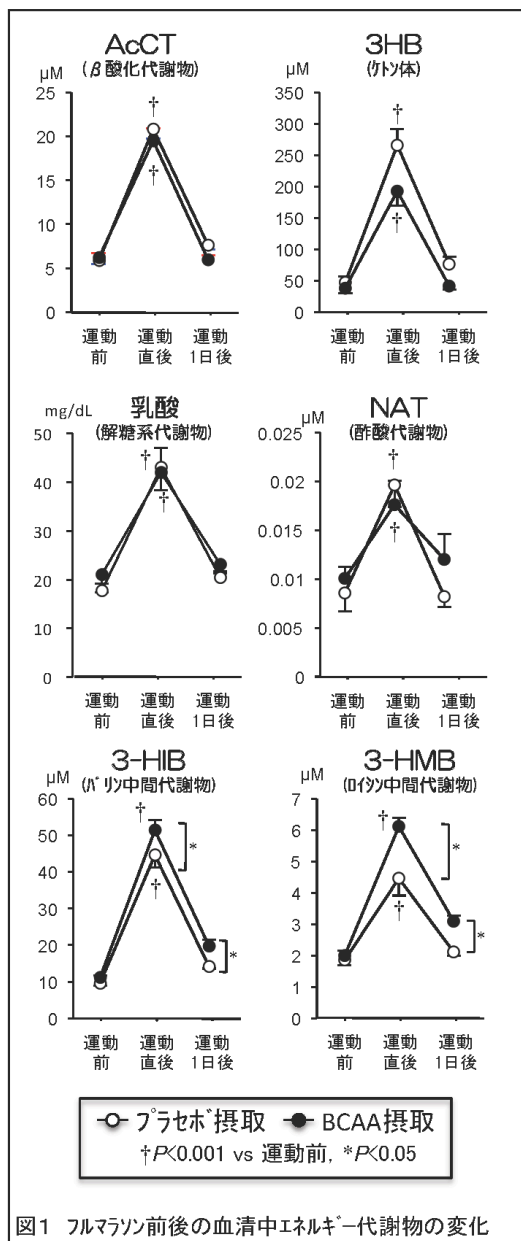


図1 フルマラソン前後の血清中エネルギー代謝物の変化

また、BCAA の摂取によって、運動直後と 1 日後の血清 3HIB と 3HMB 濃度が非摂取群と比較して、有意に高値を示した。

これらの結果より、高感度分析法を用いる事で、フルマラソンによる持久性の長時間運動で亢進する糖代謝、脂質代謝、アミノ酸代謝の代謝物を高感度にモニターする事ができた。

(2) 持久性走運動後の尿中マーカーの変動

一過性の持久性走運動後の尿中代謝産物の推移について、酢酸のタウリン抱合体である NAT の尿排泄量(時間当たりの排泄量)を経時的に測定した(図2)。持久性運動後、NAT 尿排泄量は、やや上昇傾向を示した後、約 10 時間後より、顕著に上昇した。24 時間経過後は、運動前の値まで減少した。

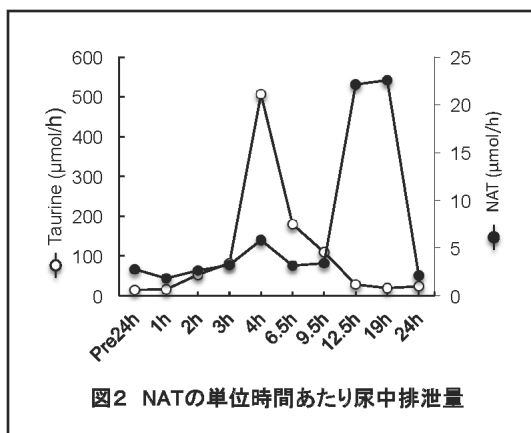


図2 NATの単位時間あたり尿中排泄量

NAT は、持久性運動中に肝臓にて脂質より産生される酢酸を骨格筋内でタウリンが抱合する事で作られ、その後、尿へ排泄される。酢酸は、運動中は骨格筋のエネルギー源に利用されるが、運動後は、骨格筋に取り込まれた酢酸は不用となる。過剰なアセチル CoA の蓄積を防ぐため、タウリンが酢酸を抱合し、NAT として、骨格筋外へ尿排泄されると考えられている。運動後、約 10 時間に見られた NAT 尿排泄の上昇は、酢酸を介した骨格筋エネルギー源の緩衝ならびに、細胞外排泄、尿排泄に係る時間を反映しているものと推測された。

(3) 持久性走運動中・後の唾液中マーカーの変動

60 分間のトレッドミル走運動中、ならびに、運動後に採取した唾液から、肝脂質代謝産物であるケトン体(3HB)と骨格筋分岐アミノ酸異化産物である 3HIB の濃度を測定した(図 3)。3HB は、運動開始約 30 分から徐々に上昇し、運動を終了した 60 分後まで継続して上昇した。さらに、運動終了後も、上昇し続けた。運動終了後も、血清 3HIB 濃度は、食事を摂取した 1.5 時間後まで、上昇し続け、以後、減少した。BCAA を事前摂取していても、運動中の 3HB 濃度の上昇は見られたが、運動終了後には減少した。また、運動直後に BCAA を摂取すると、運動後の 3HB の濃度上昇の抑制が、顕著であった。

運動中の 3HB 濃度は、運動開始約 20 分後

から軽度上昇し、運動終了後は減少した。BCAA を事前摂取によって、運動開始から終了まで、血中 3HIB 濃度が顕著に上昇し続け、運動終了後は、減少した。また、運動直後の BCAA 摂取によって、運動直後の血中 3HIB 濃度の上昇が見られた。

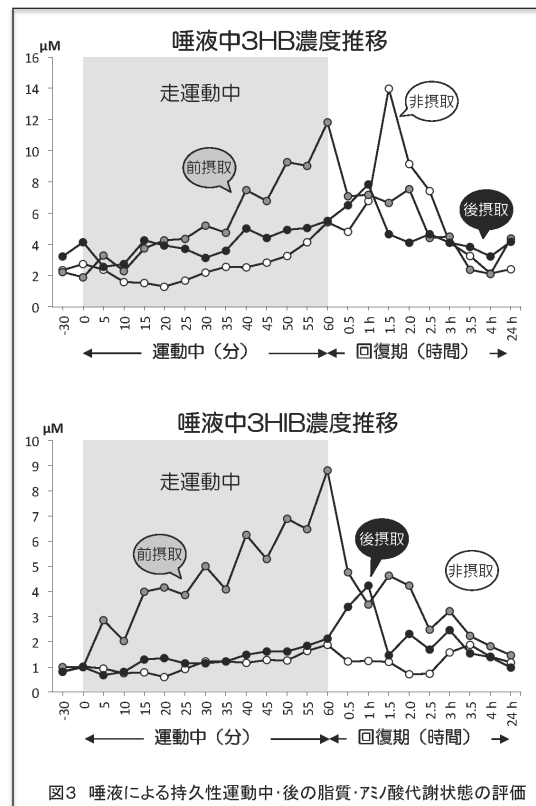


図3 唾液による持久性運動中・後の脂質・アミノ酸代謝状態の評価

以上の結果から、唾液をサンプルに用いることで、運動中ならびに運動後の脂質、アミノ酸の代謝状態を非侵襲的に、且つ、リアルタイムに評価する事が実現できた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

1. Miyamoto Y, Miyazaki T, Honda A, Shimohata H, Hirayama K, Kobayashi M. Retention of acetylcarnitine in chronic kidney disease causes insulin resistance in skeletal muscle. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition. <査読有り> (In press) 2016.
2. Miyazaki T, Honda A, Ikegami T, Iwamoto J, Monma T, Hirayama T, Saito Y, Yamashita K, Matsuzaki Y. Simultaneous quantification of salivary 3-hydroxybutyrate, 3-hydroxyisobutyrate,

- 3-hydroxy-3-methylbutyrate, and 2-hydroxybutyrate as possible markers of amino acid and fatty acid catabolic pathways by LC-ESI-MS/MS. SpringerPlus. <査読有り> 4:494, 2015. doi: 10.1186/s40064-015-1304-0
3. Miyazaki T, Ishikura K, Honda A, Ra SG, Komine S, Miyamoto Y, Ohmori H, Matsuzaki Y. Increased N-acetyltaurine in serum and urine after endurance exercise in human. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. <査読有り> 803:53-62, 2015. doi: 10.1007/978-3-319-15126-7_5
- [学会発表] (計 29 件)
1. Miyazaki T, Honda A, Ikegami T, Matsuzaki Y. TGR5 activation inhibits muscular BCAA catabolism via thyroid hormone activation. Falk Symposium 203. XXIV International Bile Acid Meeting: Bile Acids in Health and Disease, June 17-18, 2016, Düsseldorf, Germany
 2. Miyazaki T, Nakamura Y, Ebina K, Mizushima T, Ra SG, Ishikura K, Matsuzaki Y, Ohmori H, Honda A. The role of N-acetyltaurine on the normalization of energy metabolism balance in the skeletal muscle after endurance exercise. 20th international taurine meeting (Seoul, Korea). 5月23-27日, 2016年.
 3. 石倉恵介, 小峰昇一, 羅成圭, 時野谷勝幸, 菅澤威仁, 鍋倉賢治, 吉岡利貢, 宮崎照雄, 竹越一博, 宮川俊平, 大森肇. マラソン誘発性筋損傷と炎症に対する分岐鎖アミノ酸投与の抑制効果. 第28回ランニング学会大会(岡山市). 3月12-13日, 2016年.
 4. 中村優歩, 宮崎照雄, 大野貴弘, 羅成圭, 海老名慧, 菅澤威仁, 竹越一博, 本多彰, 松崎靖司, 大森肇. 高強度持久性運動による骨格筋 N-アセチルタウリンの増加. 第2回国際タウリン研究会日本部会(福井市). 3月5-6日, 2016年.
 5. 石倉恵介, 中村祐介, 辻明宏, 宮崎照雄, 大宮川俊平, 大森肇. 食事制限下のトレーニングによる骨格筋アミノ酸濃度変化に及ぼすタウリン投与の影響. 第2回国際タウリン研究会日本部会(福井市). 3月5-6日, 2016年.
 6. Miyazaki T, Honda A, Ikegami T, Matsuzaki Y. Serum 3-hydroxyisobutyrate as a biomarker of muscular BCAA catabolism in liver cirrhosis patients. the 25th Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL 2016). February 20-24, 2016. Shinagawa, Tokyo, Japan.
 7. 宮崎照雄, 本多彰, 池上正, 松崎靖司. 唾液サンプルによる栄養代謝状態の評価. 第8回三大学交流セミナー. 1月29日, 2016年
 8. 宮崎照雄, 本多彰, 池上正, 松崎靖司. 骨格筋 BCAA 異化状態を反映するバリン中間代謝物 3-ヒドロキシイソ酪酸の評価. 第70回日本体力医学会大会(和歌山市). 9月18-20日 2015年.
 9. 海老名慧, 小峰昇一, 大野貴弘, 時野谷勝幸, 石倉恵介, 松井崇, 羅成圭, 宮崎照雄, 宮川俊平, 征矢英昭, 大森肇. タウリン投与による長時間運動時の血糖維持～糖新生基質としての遊離アミノ酸の動態を筋線維タイプ別に検討する～. 第70回日本体力医学会大会(和歌山市). 9月18-20日 2015年.
 10. Miyazaki T, Ishikura K, Honda A, Ra SG, Ohmori H, Matsuzaki Y. Serum concentrations of 3-hydroxyisobutyrate and 3-hydroxy-3-methylbutyrate as BCAA metabolites in endurance exercise.

- 14th International Congress on Amino Acids, Peptides and Protein, August 3-7th, 2015; Vienna, Austria.
11. 海老名慧, 小峰昇一, 大野貴弘, 時野谷勝幸, 石倉恵介, 松井崇, 羅成圭, 宮崎照雄, 宮川俊平, 征矢英昭, 大森肇. タウリン投与による長時間運動時の血糖維持～遊離アミノ酸を基質として糖新生の検討～. 第23回日本運動生理学会大会(世田谷区). 7月25-26日, 2015年
 12. Ishikura K, Komine S, Ra SG, Miyazaki T, Miyakawa S, Ohmori H. Ameliorating effect of branched-chain amino acids supplementation on marathon-induced muscle damage, inflammation and muscle soreness. The 20th annual congress of the European College of Sport Science, June 24-27, 2015; Malmö, Sweden.
 13. 宮崎照雄, 本多彰, 松崎靖司. 肝代謝代償能を評価する骨格筋分岐鎖アミノ酸異化バイオマーカー. 第51回日本肝臓学会総会(熊本市). 5月21-22日, 2015年.
 14. 宮崎照雄, 石倉恵介, 本多彰, 羅成圭, 宮本和宣, 小峰昇一, 宮川俊平, 大森肇, 松崎靖司. 持久性運動によるアセチルタウリンの生成. 第1回国際タウリン研究会日本部会(神戸市). 2月21-22日, 2015年.
 15. 海老名慧, 小峰昇一, 大野貴弘, 時野谷勝幸, 石倉恵介, 松井崇, 羅成圭, 宮崎照雄, 宮川俊平, 征矢英昭, 大森肇. 長時間運動時の血糖低下をタウリン投与が抑制する機序～遊離アミノ酸を基質とした糖新生からの検討～. 第1回国際タウリン研究会日本部会(神戸市). 2月21-22日, 2015年.
 16. 大森肇, 小峰昇一, 三好貴士, 松井崇, 石倉恵介, 羅成圭, 宮崎照雄, 正田純一, 宮川俊平, 征矢英昭. 長時間運動の持続時間と血糖レベルの関係に及ぼすタウリン投与の影響. 第1回国際タウリン研究会日本部会(神戸市). 2月21-22日, 2015年.
 17. 宮崎照雄, 宮本和宣, 本多彰, 池上正, 岩本淳一, 松崎靖司. 肝硬変患者における低侵襲的骨格筋 β 酸化マーカーの有用性. 第7回三大学交流セミナー. 2月16日, 2015年
 18. Miyazaki T, Honda A, Ikegami T, Matsuzaki Y. Determination of serum 3-hydroxyisobutyrate, a possible biomarker for the catabolism of branched-chain amino acids in skeletal muscles, in patients with liver cirrhosis. Falk Symposium 195. Challenges and Management of Liver Cirrhosis, Oct 10-11, 2014; Freiburg, Germany.
 19. 宮崎照雄, 石倉恵介, 本多彰, 宮川俊平, 大森肇, 松崎靖司. 長時間運動によるロイシン中間代謝物 3-ヒドロキシイソ吉草酸(3HMB)の血中濃度変化と分岐鎖アミノ酸(BCAA)摂取の影響. 第69回日本体力医学会大会(長崎市). 9月19-21日 2014年.
 20. 宮崎照雄, 本多彰, 池上正, 松崎靖司. 骨格筋分岐鎖アミノ酸異化状態の低侵襲的評価. 第14回日本抗加齢医学会総会(大阪市). 6月6-8日, 2014年
 21. 宮崎照雄. 肝硬変患者における低侵襲的骨格筋 β 酸化マーカーの有用性. 第173回東京医科大学医学会総会(新宿区). 6月7日, 2014年
 22. 宮崎照雄, 本多彰, 池上正, 松崎靖司. 肝硬変患者における骨格筋 BCAA 異化マーカー血中 3-ヒドロキシイソ酪酸濃度の評価. 第22回肝病態生理研究会(千代田区). 5月31日, 2014年
 23. Miyazaki T, Ishikura K, Honda A, Ra SG, Komine S, Ohmori H, Matsuzaki Y. Increased N-acetyltaurine in serum and urine after endurance exercise in human.

- 19th international taurine meeting (Krakow, Portland). 5月21-24日, 2014年.
24. Komine S, Miyosi T, Matsui T, Ishikura K, Ra SG, Miyazaki T, Shoda J, Soya H, Ohmori H. Taurine supplementation suppresses hypoglycemia and increases endurance running time in rats. 19th international taurine meeting (Krakow, Portland). 5月21-24日, 2014年.
25. Ohmori H, Miyoshi T, Komine S, Matsui T, Ishikura K, Ra SG, Miyazaki T, Soya H, Miyakawa S. Effect of taurine supplementation on change of blood glucose and liver glycogen during and after exhaustive running. 19th international taurine meeting (Krakow, Portland). 5月21-24日, 2014年.
26. 宮崎照雄, 宮本和宜, 本多彰, 池上正, 岩本淳一, 松崎靖司. 肝硬変患者における低侵襲的骨格筋 β 酸化マーカーの有用性. 第172回東京医科大学医学会総会(新宿区). 11月2日, 2013年
27. Miyazaki T. The heterogeneous hepatoprotective properties of taurine. The 13th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins, Galveston, Texas, USA. October 5-7, 2013.
28. 宮崎照雄, 石倉恵介, 本多彰, 羅成圭, 宮川俊平, 大森肇, 松崎靖司. アセチルカルニチン測定による脂肪酸 β 酸化活性の評価. 第68回日本体力医学会大会(千代田区). 9月21-23日 2013年
29. 宮崎照雄, 本多彰, 池上正, 岩本淳一, 宮本和宜, 松崎靖司. 肝硬変患者の骨格筋における脂肪酸 β 酸化活性の評価. 第49回日本肝臓学会総会(新宿区). 6月6-7日, 2013年

〔図書〕(計1件)

1. 坂本啓, 諏訪雅貴, 宮崎照雄. 朝倉書店.

運動生理学20講 第三版(勝田茂, 征矢英昭 編), 第6講 運動時の糖質・脂質・蛋白質代謝, 2015年4月, 44-50頁.

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮崎 照雄 (MIYAZAKI Teruo)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号:60532687