



[原著]

## $\beta$ -ヒドロキシ- $\beta$ -メチル酪酸、アルギニン、グルタミン 配合飲料の脂質代謝に対する効果 —リポタンパク質リパーゼの変動—

大久保友貴、藤井朋保、相澤実穂、藤岡奈緒美、上敷領淳、森田哲生

福山大学薬学部生化学研究室

### 要旨

医療上の補助飲料として $\beta$ -ヒドロキシ- $\beta$ -メチル酪酸、アルギニン及びグルタミン配合飲料の摂取が褥瘡やサルコペニア等の改善に頻用され、有用性が高いとされている。しかし本飲料の有用性に対する脂質代謝に関する解析が不詳であるところから、本研究では本飲料のリポタンパク質代謝に対する効果、特にその代謝を律速するリポタンパク質リパーゼ (LPL) の挙動に着目して検討した。本飲料を36日間、強制経口投与したマウス群の体重や摂食量は、対照と比べほとんど差異は認められなかった。しかし本飲料の投与によって、LPLの生合成に大きく担う脂肪組織中の本酵素活性の顕著な減少が認められ、また本酵素の産生に寄与する重要な異なる臓器である筋組織中においても、本酵素活性の低下傾向が認められた。一方、本飲料投与群の血清中のLPL活性は著しく上昇し、トリアシルグリセロール(TG)値は顕著に低下した。すなわち、LPLはその産生臓器の細胞内から細胞外へ運搬され、さらに血管内へと移行する分泌型酵素であるところから、本飲料の摂取によって脂肪組織や筋肉などで産生された本酵素が血管内へと分泌が増加し、そのため血液中のカイロミクロンなどのリポタンパク質中のTGの加水分解が促進し、これが血清TG値の低下に繋がったと考えられる。すなわち、本飲料の摂取は脂質異常症、中でも高TG血症の改善に十分寄与することが示された。また、本飲料によるLPLの活性上昇が褥瘡やサルコペニア等に対する有用性の発現の一因となる可能性も考えられた。

キーワード： $\beta$ -ヒドロキシ- $\beta$ -メチル酪酸、リポタンパク質リパーゼ、  
脂質異常症、褥瘡、サルコペニア

### 序論

脂質はエネルギー源として、また細胞の構成成分として重要な栄養素であり、摂取された脂質の大部分は血液中をリポタンパク質として循環する。その際、カイロミクロン等のリポタンパク質中のトリアシルグリセロール(TG)は、血管内皮細胞上などに存在するリポタンパク質リパーゼ(LPL:EC 3.1.1.34)によって加水分解される。本酵素は脂肪組織や筋肉などの肝外組織で産生されたのち、細胞表面や血管内皮細胞上に移行し、ヘパラン硫酸結合を介して係留されている<sup>(1, 2)</sup>。LPLによって生成された遊離脂肪酸と、より高比重のリポタンパク質は各組織に供給されることから、LPLは脂

質代謝における極めて重要な役割を担っている。事実、LPLの失調や欠乏は種々の脂質異常症を惹起することが明らかとなっている<sup>(3)</sup>。

ところでわが国では人口の高齢化に伴い、サルコペニア及びロコモティブ症候群、並びに褥瘡の受傷などの増加が問題となっている<sup>(4)</sup>。最近、それらの改善に対し $\beta$ -ヒドロキシ- $\beta$ -メチル酪酸(HMB)、アルギニン(Arg)及びグルタミン(Gln)配合飲料の摂取によって、タンパク質代謝の改善が認められ、医療上の有用性が報告されている<sup>(5, 6)</sup>。これまでもArgやGlnには、タンパク質合成、特にコラーゲン合成系の促進や免疫系の賦活などが示されていると

連絡先：

E-mail: morita@fukuyama-u.ac.jp

〒729-0292 福山市東村町985

福山大学薬学部生化学教室

TEL:+81-84-936-2111 (内線:5221)

FAX:+81-84-936-2024

2019年4月18日受付

2019年6月6日受理

ころから、それらが本飲料による組織の改善に重要な役割を果たしていると考えられる<sup>(5)</sup>。さらに HMB はヒトにとっての必須な分岐鎖アミノ酸であるロイシン(Leu)の代謝産物であるが、従来、Leu は筋肉においてアミノ基転移を受けて、 $\alpha$ -ケトイソカプロン酸(KIC)となり、さらに肝などのミトコンドリアでアセト酢酸やアセチル CoA へ代謝されるとされていた。しかし最近、KIC の 5%程度がそれとは異なる経路の肝サイトソール中で代謝され、HMB に変換されることが明らかにされた<sup>(6)</sup>。この HMB はヒト成人で 0.2-0.4 g/day と有意に産生され、これまでに筋肉におけるタンパク質の合成調節や分解抑制などの生理作用が示されている<sup>(7, 8)</sup>。これらのことが HMB、Arg 及び Gln の配合飲料によるタンパク質代謝の改善に対する有用性の発現に密接に関与していると考えられる。

しかしながら、本飲料の脂質代謝に対する影響については不詳である。そこで本研究ではリポタンパク質代謝上、特に重要な酵素である LPL に着目し、本飲料の摂取によるその挙動変化を検討した。

## 材料と方法

### 1 実験動物

4 週齢の ddY 系雄性マウス(清水実験動物(株))にマウス用固形飼料(オリエンタル酵母(株))と水道水を自由に摂取させ 1 週間馴化させ、実験に供した。なお、実験に当たっては、福山大学動物実験倫理委員会の審査後、同委員会の指針に従って実施した。

### 2 実験方法

馴化したマウスを 5 匹ずつ 2 群に分け、1 群には HMB、Arg 及び Gln 配合飲料として、アバンド®(1 包(24g)中、HMB : 1.2g、L-Arg : 7g、L-Gln : 7g 含有、アボットジャパン(株))を用い、これをマウスの体重 1 g 当たり、1mg (HMB として 48 $\mu$ g、L-Arg : 280 $\mu$ g、L-Gln : 280 $\mu$ g を含有)を 1 日 1 回 36 日に渡り、強制経口投与した。他の 1 群には対象として、精製水を投与した。これ以外の摂食・飲水は馴化の時と同様、自由とした。

また本実験を再度、繰り返して行い、本質的に同じ結果を得、再現性を確認した。また種々の分析に用いた試薬は生化学用特級試薬を供した。

### 3 試料の調製と LPL 活性の測定

実験開始から体重及び摂食量を計測しつつ、36 日目に採血し、血清を得た。また副睾丸脂肪組織並びに両側の下肢の骨格筋を採取し、30mM Tris-

HCl 緩衝液(pH7.4)を用いて、氷冷下破碎し、10(w/v)%ホモジネートを作成後、これを遠心分離(10,000 x g、10 分間、4 $^{\circ}$ C)し、上清を得た。LPL の酵素活性は、血清については $[^{14}\text{C}]$ Triolein (室町化学薬品)を基質とし、反応によって生じる遊離脂肪酸をアイソトープ法によって、また組織からの標品はイントラリポス (1.2%卵黄レシチン、2.5%グリセロール、1%大豆油：大塚製薬)を基質とし、反応によって生じる遊離脂肪酸を比色法によってそれぞれ測定した<sup>(2)</sup>。なお、各反応液には、LPL の補酵素の apoC-II を含む非働化血清を添加した。

### 4 統計処理

統計解析は、平均値 $\pm$ 標準誤差で表し、有意差の検定は Student' t-test により行った。統計的有意差の水準は 5%未満とし

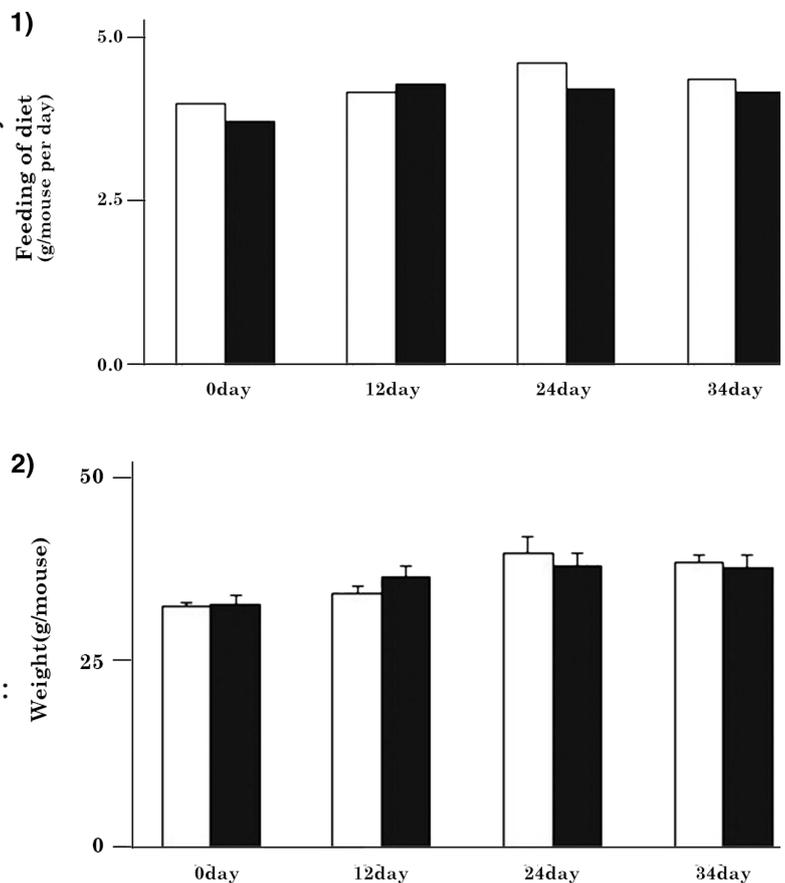


図 1-1 摂食量の変化

「材料と方法」中に記述したように処置した各群の各測定日における 1 日当たりの摂食量のマウス 1 匹当たりの摂食量を測定した。■は配合飲料投与群、□は精製水投与群を示す。

図 1-2 体重の変化

「材料と方法」中に記述したように処置した各群の各測定日における各マウスの体重を測定した。■は配合飲料投与群、□は精製水投与群を示す。

た。

**結果**

**1 摂食量及び体重における変化**

摂食量においては、実験開始から 36 日に渡り、精製水を投与した対照群と HMB、Arg 及び Gln 配合飲料投与群（補充群）と比べ、両群に有意な差は認められなかった（図 1-1）。また体重においても、実験開始から 36 日経過後、対照群では 120%の体重増加があったが、補充群においてもほぼ同様な増加が認められた（図 1-2）。すなわち本飲料を摂取しても、摂食量や体重の変化は対照群とほぼ同程度であった。

**2 脂肪組織における変化**

副睾丸脂肪組織の重量は、対照群と補充群とを比べると、ほぼ同程度であった（図 2-1）。しかし補充群における本組織 1 g 当たりの LPL 活性は、対照群と比べ約 50%に大きく低下が認められ、さらにその全組織当たりの LPL 活性も、補充群では著しい減少が認められた（図 2-2）。

**3 筋肉における変化**

下肢の骨格筋重量は、対照群と比べ補充群では、やや増加傾向であった（図 3-1）。しかし本組織の 1 g 当たりの LPL 活性は、対照群と比べ補充群では低下傾向が認められ、さらにその全組織当たりの LPL 活性も、補充群では減少傾向が認められた（図 3-2）。

**4 血液における変化**

血清中の TG 値は、対照群と比べ補充群では有意な低下が認められた（図 4-1）。さらに血清中の LPL 活性は、対照群と比べ補充群では著しい上昇が認められた（図 4-2）。

**考察**

Nissen et al.は、必

須の分岐鎖アミノ酸である Leu が筋肉中で  $\alpha$ -KIC となり、さらにその 5%程度が肝臓の細胞質で HMB に変換されることを見出し、さらにこれが循環系に移行することやコレステロール合成の前駆物質である  $\beta$ -ヒドロキシ- $\beta$ -メチルグルタリル CoA やアセチル CoA に代謝されることなどを報告した<sup>(8)</sup>。さらに HMB の生理的意義が検討され、筋タンパク質の合成・分解に大きく寄与していることが示唆された<sup>(7, 8)</sup>。そこで最近、HMB と以前から組織の改善にとって有用とされる Arg や Gln を併せて用い、サルコペニアや褥瘡を有する

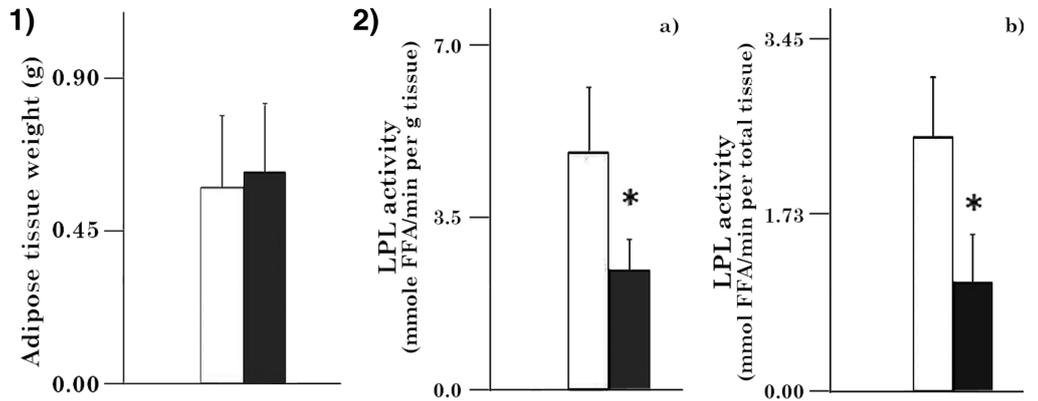


図 2-1 脂肪重量

「材料と方法」中に記述したように処置した各群の処置日における各マウスの副睾丸脂肪組織重量を測定した。■は配合飲料投与群、□は精製水投与群を示す。

図 2-2 副睾丸脂肪組織単位重量当たり、全重量当たり LPL 活性

「材料と方法」中に記述したように処置した各群の処置日における各マウスの副睾丸脂肪組織における単位重量当たり及び全重量当たりの LPL 活性を測定した。

■は配合飲料投与群、□は精製水投与群を示す。(\*p < 0.05)

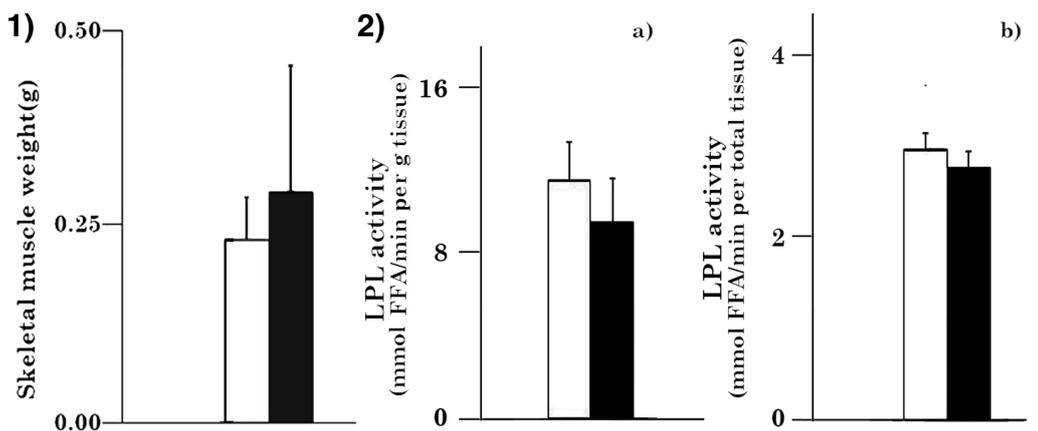


図 3-1 骨格筋重量

「材料と方法」中に記述したように処置した各群の処置日における各マウスの下肢骨格筋の組織重量を測定した。■は配合飲料投与群、□は精製水投与群を示す。

図 3-2 筋肉中単位重量当たり、全重量当たり LPL 活性

「材料と方法」中に記述したように処置した各群の処置日における各マウスの下肢骨格筋における単位重量当たり及び全重量当たりの LPL 活性を測定した。■は配合飲料投与群、□は精製水投与群を示す。

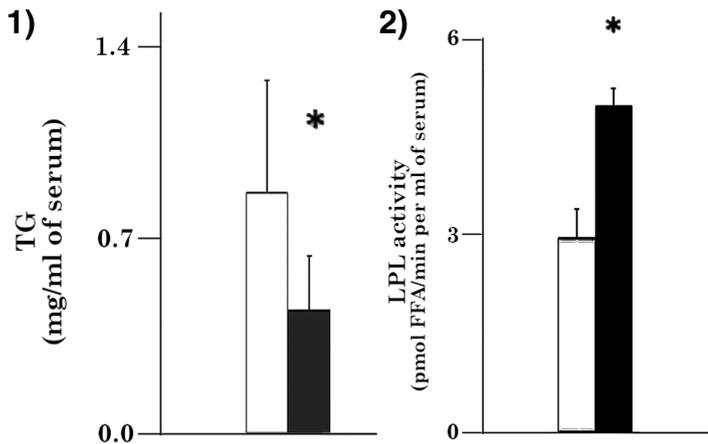


図 4-1 血清中 TG 値

「材料と方法」中に記述したように処置した各群の処置日における各マウスの血清中の TG 値を測定した。■は配合飲料投与群、□は精製水投与群を示す。 (\*;  $p < 0.05$ )

図 4-2 血清中 LPL 活性

「材料と方法」中に記述したように処置した各群の処置日における各マウスの血清中の LPL 活性を測定した。■は配合飲料投与群、□は精製水投与群を示す。 (\*;  $p < 0.05$ )

患者に対する経口補充が施行されている。さらにこれらの併用による経口補充の有用性が考えられている。しかし、タンパク質代謝の面からの検討は行われているが、脂質代謝に対する解析についての詳細は不明な点が多い<sup>(9)</sup>。そこで HMB、Arg 及び Gln 配合飲料を経口補充したマウスを用いて、リポタンパク質代謝において重要な役割を担う LPL について着目し検討したところ、摂食量や体重変化においては対象群と補充群とでほとんど差異が認められない状況下 (図 1)、LPL の主要産生組織である脂肪組織において、対照群と比べ補充群では、LPL 活性の著しく減少が認められた (図 2)。

さらに LPL の異なる産生組織である筋肉においても、対象群と比較し、補充群では、LPL 活性の低下傾向が認められた (図 3)。一方、補充群のマウスの血清における LPL 活性は、対象群と比べ著しく増加し、またこの際 TG 値は有意に減少することが示された (図 4)。

すなわち LPL は細胞内で合成され、細胞外へ分泌され、さらに血管内細胞表面上へと移行する、いわゆる分泌型酵素であるところから、HMB、Arg 及び Gln 配合飲料の経口投与によって、脂肪組織や筋肉における LPL の分泌が促進され、これによってそれぞれの組織における LPL が低下し、一方、血中の LPL は増加したと考えられる。さらにその結果、血中のリポタンパク質中の TG の LPL による加水分解が

進み、そのため TG 値が減少したと考えられる。すなわち HMB、Arg 及び Gln 配合飲料の経口補充は、脂質代謝における律速酵素である LPL の産生臓器からの分泌の促進や活性調節に大きく寄与すると考えられ、脂質異常症、特に高 TG 血症の改善に有用性が高いことが示唆された。

#### 謝辞

本研究の実施に当たり、教育医学研究所 (広島市) 並びに安浦病院 (呉市) 理事長 西本 慶次 先生の御支援に深謝致します。福山市医師会健康支援センター (福山市) 澄川 孝之 氏及び志田原 郁子 氏の御協力に謝意を表します。

#### 引用文献

- 1) Nilsson-Ehle P, Garfinkel AS, Schotz MC.; Lipolytic enzymes and plasma lipoprotein metabolism. *Annu Rev Biochem.* 1980;49:667-93.
- 2) Kerakawati R, Morita T.: Endothelin-1 stimulates secretion of lipoprotein lipase from Ehrlich ascites tumor cells. *J Health Sci* 2010;56, 467-71.
- 3) Ashraf AP, Hurst ACE, Garg A.: Extreme hypertriglyceridemia, pseudo hyponatremia, and pseudoacidosis in a neonate with lipoprotein lipase deficiency due to segmental uniparental disomy. *J Clin Lipidol.* 2017;11,757-62.
- 4) 葛谷雅文; 超高齢社会におけるサルコペニアとフレイル *日本内科学会誌.* 2015;104:2602-7.
- 5) Williams JZ, Abumrad N, Barbul A.; Effect of a specialized amino acid mixture on human collagen deposition. *J Surg Res.* 2002;106:299-302.
- 6) Wong A, Chew A, Wang CM, Ong L, Zhang SH, Young S.; The use of a specialised amino acid mixture for pressure ulcers: a placebo-controlled trial. *J Wound Care.* 2014;23:259-69.
- 7) Nissen SL, Abumrad NN.; Nutrition role of the leucine metabolite  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (HMB). *J Nutr.Biochem.* 1997;8:300-11.

- 8) Nissen S, Sharp R, Ray M, Rathmacher JA, Rice D, Fuller JC Jr, Connelly AS, Abumrad N.; Effect of leucine metabolite beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on muscle metabolism during resistance-exercise training. *J Appl Physiol* (1985). 1996;81:2095-104.
- 9) Leroux M, Lemery T, Boulet N, Briot A, Zakaroff A, Bouloumié A, Andrade F, Pérez-Matute P, Arbones-Mainar JM, Carpéné C.; Effects of the amino acid derivatives,  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate, taurine, and N-methyltyramine, on triacylglycerol breakdown in fat cells. 2019 Mar 27. doi: 10.1007/s13105-019-00677-5.

# Effects of Oral Supplementation with a Combination of $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate, Arginine and Glutamine on Lipid Metabolism – Changes in Lipoprotein Lipase –

Yuuki Ookubo, Tomoyasu Fujii, Miho Aizawa, Naomi Fujioka, Jun Kamishikiryo,  
Tetsuo Morita

Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuyama University

## Summary

The supplementation of the combination with  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methyl butyric acid (HMB), arginine (Arg) and glutamine (Gln) is frequently used for supporting the medical care to improve pressure ulcers and sarcopenia. However, the enzymatic mechanism of this supplementation effect on dyslipidemia has not been analyzed so far. In this study, we investigated the effects of this supplementation on the activity of lipoprotein lipase (LPL), a key enzyme in the lipid metabolism.

In terms of the weight and dietary intake, a group of mice given this supplementation for 36 days showed no significant difference in comparison with a control group given no supplementation. On the other hand, LPL activities significantly decreased in the epididymal adipose tissue and the muscle of lower limbs of mice treated with the supplementation, compared with that of the control group. At the same time, the LPL activity in the serum of the treated mice was markedly increased, and triacylglycerol (TG) in serum was reduced, compared with those in the control group. It is likely that, LPL, an enzyme known to be secreted to vessels from organs like adipose, muscle and heart, hydrolyzes TG in lipoproteins in serum, resulted in lower serum TG.

These results, though partially, explains why the supplementation of the combination with HMB, Arg and Gln is effective for improving the hypertriglyceridemia.

**Keywords:**  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate, lipoprotein lipase, dyslipidemia, pressure ulcer, sarcopenia

**Correspondence address:** Tetsuo MORITA

Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuyama University

985 Higashimuramachi, Fukuyama 729-0292, Japan

Tel.+81-936-2111(Ext:5221)

E-mail: morita@fukuyama-u.ac.jp