

博士論文

骨格筋萎縮抑制に向けた L-シトルリン含有
機能性食品の効果検証とその応用
(Verification and application of functional foods
containing L-citrulline for suppressing skeletal
muscle atrophy)

2022 年 9 月

立命館大学大学院スポーツ健康科学研究科
スポーツ健康科学専攻博士課程後期課程

宮竹 将

立命館大学審査博士論文

骨格筋萎縮抑制に向けた L-シトルリン含有
機能性食品の効果検証とその応用
(Verification and application of functional foods
containing L-citrulline for suppressing skeletal
muscle atrophy)

2022 年 9 月

September 2022

立命館大学大学院スポーツ健康科学研究科
スポーツ健康科学専攻博士課程後期課程
Doctoral Program in Sport and Health Science
Graduate School of Sport and Health Science
Ritsumeikan University

宮竹 将

MIYATAKE Sho

研究指導教員：藤田 聡教授

Supervisor: Professor FUJITA Satoshi

目次

1. 第一章 序論	1
2. 第二章【研究課題 1】L-シトルリンの経口摂取がラット骨格筋への物質送達 作用に及ぼす影響の検討	11
2.1 背景と目的	11
2.2 材料と方法	14
2.2.1 実験 1	14
2.2.2 実験 2	17
2.2.3 実験 3	19
2.3 結果	21
2.3.1 実験 1	21
2.3.2 実験 2	22
2.3.3 実験 3	24
2.4 考察	26
3. 第三章【研究課題 2】STZ 誘発糖尿病モデルラットにおける L-シトルリン の経口摂取が骨格筋タンパク質合成に及ぼす影響の検討	34
3.1 背景と目的	34
3.2 材料と方法	36
3.3 結果	40
3.4 考察	45
4. 第四章【研究課題 3】廃用性筋萎縮モデルラットにおける L-シトルリンを 含むタンパク質・ロイシンの混合物の経口摂取及び間欠的運動負荷の併用 が骨格筋に及ぼす影響の検討	51
4.1 背景と目的	51

4.2 材料と方法.....	54
4.3 結果.....	60
4.4 考察.....	69
5. 第五章 総合討論.....	76
謝辞.....	87
参考文献.....	88

1. 第一章 序論

社会背景

現在、日本では急速に高齢化が進展しており、2019年における65歳以上の人口は3589万人となり総人口に占める高齢者の割合（高齢化率）は28.4%となっている[1]。今後さらに高齢者人口は増加し、2030年には人口の約3分の1が高齢者になると推定されている。人々の健康に対する意識は近年ますます高まっているが、「健康上の問題で日常生活が制限されることなく生活できる期間」である健康寿命と平均寿命の差については、2019年時点で男性が約8.7年、女性が約12.1年で依然として男女ともに大きな差が存在する[2,3]。高齢化が急速に進行している我が国においては、健康寿命と平均寿命の差は医療費や介護給付費の負担の増大のみならず、個人の生活の質（QOL）の低下につながるものが危惧される。健康寿命をいかに延ばすかが今後の重要な課題であり、そのためには疾病の予防や健康維持に関心を持ち、日々の食事や運動を意識することが重要である。

骨格筋のタンパク質合成及び分解

骨格筋はヒトが骨格を動かす上で必要な筋肉であり、骨格筋の収縮により力が生じ運動や身体活動が可能となる。骨格筋は競技において優れた運動能力を発揮するためだけではなく、健康的に日常生活を送るという観点からも重要な組織である。しかしながら、ヒトでの骨格筋量は20-30歳でピークを迎え、その後30歳を超えると10年毎に約3-5%減少し、60歳を超えると骨格筋量の減少はさらに加速する[4,5]。加齢による骨格筋の減少および筋力の低下はサルコペニアと呼ばれ、日常生活に支障をきたし生活の質を低下させる[6-8]。骨格筋の量や機能の低下は加齢以外にも飢餓、不活動による廃用性筋萎縮、癌悪液

質、糖尿病、慢性腎疾患など多くの病態において惹起され[9-12]、人々の健康な生活を脅かす可能性がある。一方、骨格筋量を維持することは心臓病や糖尿病などの疾病のリスクの減少及び死亡率の減少に寄与することが報告されている[13-15]。以上より、骨格筋量を維持・増加するための適切かつ効果的な方法の開発は非常に重要な課題である。

骨格筋量は骨格筋のタンパク質の合成と分解のバランスによって決定される[16]。骨格筋量の維持及び増加のためには、筋タンパク質の合成を増加させ分解を減少させることが重要である。栄養摂取により骨格筋のタンパク質合成が増加し、タンパク質分解は減少する。これは、栄養摂取により増加する栄養素の増加やホルモンに起因するとされ、特に食後の血中のアミノ酸やインスリンの増加は骨格筋タンパク質の合成の主要な要因と考えられている[17,18]。血中から骨格筋細胞内へ取り込まれたアミノ酸は、遊離アミノ酸のプールに取り込まれ、そこから筋タンパク質合成に利用される。摂取したタンパク質由来のアミノ酸の筋タンパク質合成作用は主に必須アミノ酸（EAA）によってもたらされ、EAAの中でも分岐鎖アミノ酸（BCAA）、特にロイシンに強い同化作用が認められている[19,20]。ロイシンは、筋タンパク質合成を誘導する哺乳類ラパマイシン標的タンパク質（mammalian target of rapamycin complex 1; mTORC1）シグナル経路の活性化を介して筋タンパク質合成を促進する[21]（Fig. 1-1）。また、運動、なかでも骨格筋に負荷をかけて行うレジスタンス運動によってもmTORC1を介して筋タンパク質合成が活性化される[22]。さらに、運動後にアミノ酸摂取を行うことによって、運動後の筋タンパク質合成はより増加し筋タンパク質分解が抑制されることが報告されている[23]。

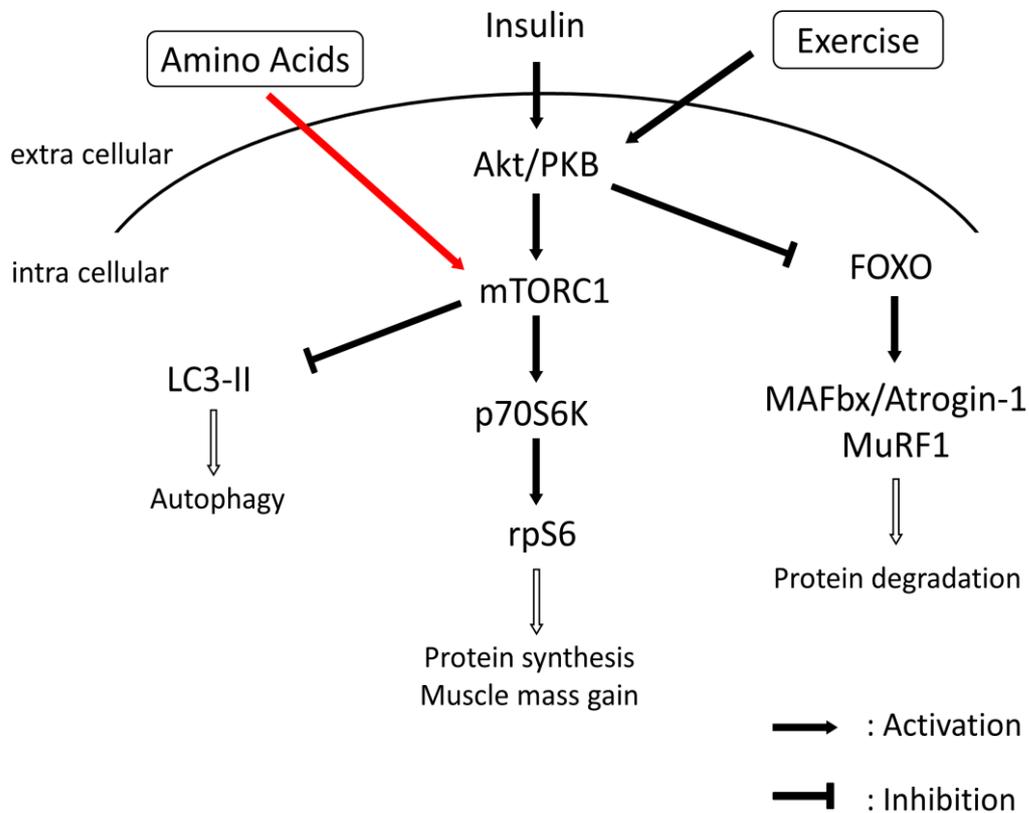


Fig. 1-1. Proposed scheme for the activation of the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway in the muscle protein synthesis by amino acids, resistant exercise and anabolic factors. Akt/PKB, protein kinase B; FOXO, forkhead box; LC3, microtubule-associated protein 1 light chain 3; mTOR, mammalian target of rapamycin; MAFbx/Atrogin-1, muscle atrophy F-box; MuRF1, muscle ring finger 1; p70S6K, ribosomal protein S6 kinase; rpS6, ribosomal protein S6.

一方、骨格筋量の減少は筋タンパク質の合成及び分解のアンバランスな状態が原因の一つであり、この不均衡は合成シグナル伝達の減少及び分解シグナル

伝達の増加によるものと考えられている。筋タンパク質合成の低下については、骨格筋肥大に重要な mTORC1 シグナル経路の減弱に起因する可能性が報告されている[24]。高齢者においては、タンパク質及びアミノ酸摂取後に誘導される筋タンパク質合成が若年者と比較して低下しており、同化抵抗性が存在することが報告されている[25,26]。すなわち、高齢者においてはアミノ酸が血中に存在していても mTORC1 やその下流のシグナル因子の活性化が抑制されている可能性が示唆されている[27]。しかしながら、このような高齢者においても十分な量のタンパク質の摂取や骨格筋へのアミノ酸供給の増加により、筋タンパク質合成は若年者と同様に惹起されることが報告されている[26,28,29]。

Moore et al.は骨格筋の筋タンパク質合成について、若齢者では 0.24 g/kg 以上のタンパク質摂取でプラトーに達するが、高齢者においても 0.4 g/kg 以上の摂取によりプラトーに達することを報告している[26]。

タンパク質を分解する経路としてはユビキチン・プロテアソーム系、オートファジー・リソソーム系及びカルパイン系が存在する[30,31]。骨格筋における主要な分解経路であるユビキチン・プロテアソーム系は、ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2) 及びユビキチンリガーゼ (E3) から構成された酵素群によって目的のタンパク質をユビキチン鎖で標識し選択的に分解するシステムである。また、オートファジー・リソソーム系は細胞内膜の生成・伸長に伴い、各種オルガネラ、細胞内構造物及びタンパク質凝集体などを主に非選択的に取り込むことで分解するシステムである。これらの筋タンパク質分解に関わるシグナル経路の亢進も骨格筋量の減少の原因の一つであると考えられている[31]。一方、タンパク質やアミノ酸の摂取及び運動により筋タンパク質分解の亢進を抑制する可能性が報告されている[32-36]。したがって、骨格筋量の維持及び減少抑制のためには、十分な量のタンパク質の摂取により筋

タンパク質の合成を増加させ分解を減少させることが重要であると考えられる。

骨格筋と血管

血管機能も骨格筋の筋タンパク質合成に影響を与える可能性が考えられる [37-39]。血管は大動脈から動脈が分かれ細動脈へと分岐し、細動脈は組織内へと侵入し骨格筋に血液を供給している。細動脈は骨格筋内で分岐を繰り返し、最終的に毛細血管へと移行する。近年では主に細動脈が骨格筋の血流調節に関わっていると考えられている [40,41]。血管は内膜・中膜・外膜の3層構造からなり、最内層には一層の血管内皮細胞が存在し、その外には血管平滑筋細胞が存在している。血管内皮ではさまざまな生理活性因子（血管拡張因子：一酸化窒素（NO）、プロスタサイクリン（PGI₂）、C型ナトリウム利尿ペプチドなど、血管収縮因子：エンドセリン、アンジオテンシン II、トロンボキサンなど）を産生・分泌することによって、血管の収縮及び拡張の調整を行っている [42,43]。骨格筋内の血流は、血管平滑筋細胞において血管の収縮及び拡張に関わるシグナル伝達経路のバランスで調整されている。なかでも血管の拡張を調整しているのが NO であり、NO 合成酵素（NOS）によりアミノ酸である L-アルギニンから L-シトルリンへの代謝反応の副産物として生じる（NO サイクル） [44-48]（Fig. 1-2）。NO の血管拡張の作用機序としては、NO が平滑筋細胞内グアニル酸シクラーゼを活性化して Cyclic guanosine monophosphate（cGMP）生成を促し、この cGMP により筋肉の収縮に関与する Ca²⁺の細胞内流入が抑制されることで血管平滑筋は弛緩し拡張する [49]。NOS は、主な発現部位やカルシウム依存性により神経型（nNOS）、誘導型（iNOS）及び内皮型（eNOS）の3種類に分類される。特に eNOS は血管に対するずり応力やブラジキニン、ア

セチルコリンなどのアゴニストに応答して活性が増強し NO 産生を亢進させることから、血管内皮機能をつかさどる分子の一つとして重要な働きをしていると考えられる。

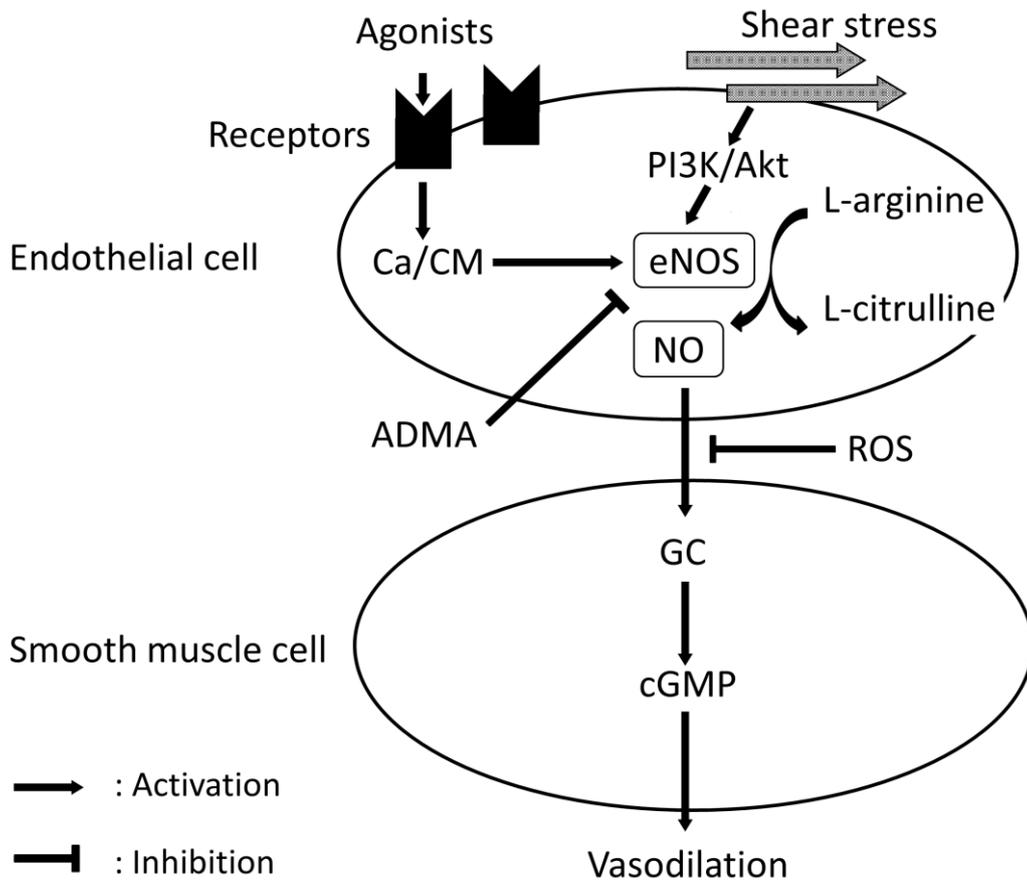


Fig. 1-2. The role and synthesis of nitric oxide. Endothelial nitric oxide synthase utilizes L-arginine to produce nitric oxide and L-citrulline. Endothelial nitric oxide synthase is activated in response to vasodilator agonists or shear stress. Nitric oxide diffuses to vascular smooth muscle and produces relaxation through activation of guanylate cyclase, thus augmenting intracellular cyclic guanosine monophosphate. Reactive oxygen species and asymmetrical dimethylarginine contribute to endothelial

dysfunction. ADMA, asymmetrical dimethylarginine; cGMP, cyclic guanosine monophosphate; CM, calmodulin; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; GC, guanylate cyclase; NO, nitric oxide; PI3K, phosphatidyl-inositol-3-kinase; ROS, reactive oxygen species.

一方、血管内皮機能の低下は糖尿病、高血圧、脂質異常症、加齢、肥満、運動不足、喫煙、閉経などにより惹起される[50-53]。血管内皮機能低下を惹起するメカニズムのうち最も重要なものとしてはNO産生の低下及びNOの不活化、あるいはこれら両者を伴うNOの生物学的活性の低下である。この原因としては血管内皮細胞におけるeNOSタンパク質の発現量及びリン酸化による活性の減少、ずり応力などによるeNOS活性化刺激の減弱、NO基質としてのL-アルギニンの不足、活性酸素種の産生増加に伴うNO活性の減弱などが挙げられる[54-56]。eNOS欠損マウスにおいてはNO産生が減少し、臓器及び骨格筋の血流が低下することが示唆されている[57]。

骨格筋の毛細血管ネットワークは骨格筋細胞への酸素供給や糖、アミノ酸などの栄養素及び代謝産物の送達において重要である。若齢者及び高齢者においてNO産生の増加を促す血管拡張薬の経口投与により骨格筋への酸素送達量が増加することが報告されている[58]。アカザ科に属する植物であるビートルートはNOドナーとしての機能が報告されており、経口摂取により運動中のラット骨格筋への酸素送達量が増加することが報告されている[59]。また、インスリン静脈投与によるNO依存的な血管拡張によって、ラット及びヒトの骨格筋のグルコースの取り込み量が増加する[60,61]。Fujita et al.は、インスリン投与による血流増加を介した血管内皮機能の改善によって、若年者及び高齢者にお

いて骨格筋タンパク質合成が増加することを報告し[38,39]、アミノ酸の摂取に関わりなく、血流の増加によっても筋タンパク質合成が増加する可能性が示唆された。一方、高齢者では、血管内皮機能の低下によってアミノ酸をはじめとする栄養素の骨格筋への送達量が減少することによって、骨格筋細胞におけるアミノ酸の利用効率及び筋タンパク質合成が減少する可能性が示唆されている[37,62]。以上のことから、骨格筋における筋タンパク質合成の減少を抑制するためには、骨格筋への物質送達の維持及び改善も重要であると考えられる。しかしながら、食品成分の摂取による血流改善及び血管拡張により骨格筋への栄養素などの送達量が増加するか十分な検討が行われていない。さらに、血管内皮機能が低下した骨格筋へのアミノ酸の送達量の増加が骨格筋の筋タンパク質合成に及ぼす影響については不明である。

NO サイクルを構成するアミノ酸である L-アルギニンの経口摂取により NO 産生を介した血流増加が報告されている[47,48,63]。L-アルギニンとともに NO サイクルを構成するアミノ酸である L-シトルリンは主に腎臓で L-アルギニンへ変換され血中 L-アルギニン濃度の上昇に寄与し[64]、L-シトルリンの経口摂取により血中 NO 産生が増加することが動物及びヒトで報告されている[63,65-67]。また、健常人に対する L-シトルリンの摂取により、動脈硬化の程度を示す上腕足首間脈波伝播速度 (baPWV) の値の改善及びアルギニンと NOS の内因性阻害剤の比 (アルギニン/非対称性ジメチルアルギニン (ADMA)) の増加が報告されており[66]、血管機能の改善が期待される。一方、高齢者に対する安静時及び運動後の L-シトルリン摂取、あるいは若年者及び心不全の高齢者に対する L-シトルリン摂取は血流に影響しなかったという報告もある[62,68]。以上より、L-シトルリン摂取による血管内皮機能及び血流への影響については統一された見解が得られていない。また、L-シトルリンの特徴としては、興味深

いことに、L-アルギニンを経口摂取する場合よりも L-シトルリンを経口摂取する場合の方が効果的に血中 L-アルギニン濃度を上昇させることが報告されている[69]。これは、経口摂取した L-アルギニンは肝臓においてその一部が代謝されるが、L-シトルリンは代謝されないためだと考えられている[70-72]。すなわち、NO の直接の前駆体は L-アルギニンであるが、内因性 L-アルギニンの濃度上昇には L-アルギニンを摂取するよりも L-シトルリンを摂取する方がより効果的である可能性が考えられる。以上より、NO 産生の増加を介した血管拡張及び血管内皮機能の改善が見込まれる L-シトルリンは、骨格筋への物質送達量の増加を介して、筋タンパク質合成の増加及び骨格筋量の維持・増加に有用な食品成分となることが期待される。

本研究の目的

本研究では、「血管拡張作用を有するアミノ酸である L-シトルリンの経口摂取が、骨格筋への物質送達に及ぼす影響及び骨格筋タンパク質合成に与える影響について検討すること」を目的とした。食品成分の経口摂取による骨格筋萎縮の予防・改善方法の開発によって、薬剤のような副作用の懸念を減らし、また日常の食事において長期的な摂取が可能となり、骨格筋の萎縮に伴う運動機能及び QOL 低下の抑制に寄与できると考えられる。そこで、本研究では次の研究課題を設定した (Fig. 1-3)。第二章の研究課題 1 では L-シトルリンの経口摂取による血管拡張作用が、正常ラット及び血管内皮機能の低下が報告[73,74]されている 1 型糖尿病モデルラットの骨格筋における物質送達に及ぼす影響について評価し、その作用メカニズムについて解明を行った。このとき、血液を骨格筋に供給している動脈血管に着目した。また、第三章の研究課題 2 では、血管内皮機能及び筋タンパク質合成の低下が報告[75-78]されている 1 型糖尿病

モデルラットを用いて、タンパク質及びロイシンの混合物と L-シトルリンの組み合わせが筋タンパク質合成に及ぼす影響について比較検討を行い、当該混合物摂取による筋タンパク質合成の増加を L-シトルリンが増強するか評価した。続いて、第四章の研究課題3では、不活動により惹起される廃用性筋萎縮モデルラットを用いて、L-シトルリンを含むタンパク質及びロイシンの混合物の摂取が骨格筋萎縮の抑制に及ぼす影響について、筋タンパク質合成及び分解の両観点から評価した。

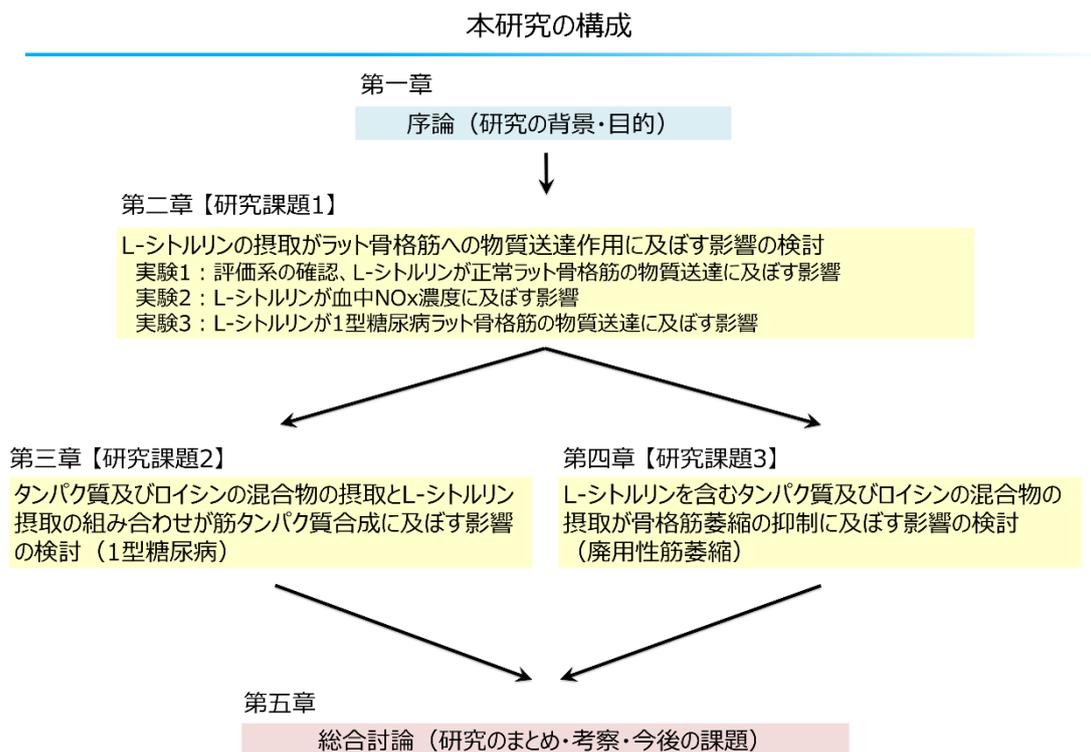


Fig. 1-3. Overview of doctoral thesis.

2. 第二章【研究課題1】L-シトルリンの経口摂取がラット骨格筋への物質送達作用に及ぼす影響の検討

2.1 背景と目的

骨格筋の毛細血管ネットワークは骨格筋細胞への糖やアミノ酸などの栄養素、酸素及び代謝産物の送達において重要である。血管内皮ではさまざまな生理活性因子を産生・分泌することによって、血管の収縮及び拡張の調整を行っている。骨格筋の血管は、血管平滑筋細胞において血管の収縮及び拡張に関わるシグナル伝達経路のバランスで調整されている。一方、糖尿病、高血圧、脂質異常症、加齢、肥満、運動不足などにより血管内皮機能の低下が惹起される[50-52]。この原因の一つとしては血管内皮細胞における eNOS の発現量の低下や活性酸素種の増加が挙げられる[54,55]。これらにより、血管拡張性因子である NO の産生が減少や NO の不活化が亢進し、臓器及び骨格筋の血管拡張が抑制されることが示唆されている。高血圧における血管内皮機能障害では特に酸化ストレスが重要であるが、NADH/NADPH オキシダーゼを介した活性酸素の産生増加による NO の不活化、NO 産生の減少、エンドセリン-1 やアンジオテンシン II などの血管収縮因子の増加が報告されている[79-81]。また、高コレステロール血症では、NADH/NADPH オキシダーゼ活性化による NO の不活化及び酸化低密度リポタンパク質 (LDL) による eNOS 発現量の減少などが挙げられる[81]。加齢においては、血管新生に関わる Vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現量の低下、その下流のシグナルである eNOS のリン酸化の減少、NO 産生の減少、エンドセリン-1 などの血管収縮因子の血中濃度増大などが認められる[82-84]。さらに、運動不足では必ずり応力の減少に伴い NO 産生は減少する[85,86]。

血管内皮機能の低下によってアミノ酸をはじめとする栄養素の骨格筋への送達量が減少することにより、骨格筋細胞におけるアミノ酸の利用効率が減少する可能性が示唆されている[37]。一方、インスリン投与による NO 依存的な血管拡張によってラット及びヒトの骨格筋のグルコースの取り込み量が増加する[60,61]。さらに、インスリンによる血流増加を介した血管内皮機能の改善によって、骨格筋タンパク質合成の増加が若年者及び高齢者において報告されている[38,39]。血管拡張薬シルデナフィルは cGMP シグナルの増強を介して NO 産生増加に寄与するが、この薬剤の経口投与により若齢者及び高齢者において骨格筋への酸素送達量が増加することが報告されている[58]。しかしながら、食品成分の摂取による血流改善及び血管拡張により骨格筋への栄養素などの送達量が増加するか十分な検討が行われていない。

L-シトルリンはスイカ果汁より単離・発見されたアミノ酸であり[87]、生体内では主に遊離した状態で血液、尿及び細胞中に存在する[47]。L-シトルリンはアルギノコハク酸合成酵素及びアルギノコハク酸リアーゼの作用により L-アルギニンに代謝される。血管内皮細胞において L-アルギニンは eNOS の基質となり NO 産生を促し、NO が平滑筋細胞に作用することで血管拡張作用を示す[47,48]。また、L-シトルリンの経口摂取による血中 NO 産生の増加及び血管内皮機能が動物及びヒトで報告されている[63,65-67]。以上より、L-シトルリンは血管拡張作用を介した骨格筋への物質送達増加作用により筋タンパク質合成の増加及び骨格筋量を維持・増加に有用な食品素材となることが期待される。

そこで、研究課題 1 では、正常ラットおよび血管内皮機能障害を有する病態モデルラットにおいて、L-シトルリンの経口投与が骨格筋への物質の送達量を増加すると仮説を立てた。本研究では、血管内皮機能障害を有する病態モデルとしては、血管内皮機能の低下が報告[73,74]されているストレプトゾトシン

(STZ) 誘発 1 型糖尿病モデルラットを選択した。STZ は選択的に膵 β 細胞を破壊し、1 型糖尿病を惹起する化合物である。STZ 誘発糖尿病モデルラットは 1 型糖尿病の研究に一般的に用いられているモデルであり、血糖値の急激な上昇及び骨格筋の萎縮を誘発する。これらの症状は 1 型糖尿病患者における症状と類似している[76]。さらに、1 型糖尿病においては骨格筋における血管数の減少、血管密度の減少、血流の低下及び血管新生の減少が報告されている[73,74,88]。1 型糖尿病では骨格筋における eNOS の発現及び活性が低下していることから[89]、NO 産生を介した L-シトルリンの血管拡張作用の評価を行うにあたり、本モデルラットは血管内皮機能が低下したモデルとして適していると考えた。研究課題 1 では仮説を検証するにあたり、実験 1、実験 2 及び実験 3 を実施した。実験 1 では、骨格筋へのエバンスブルー色素 (EBD) の送達量を物質送達量として評価するに際して、正常ラットにおいて、陽性対照として L-アルギニンを用いて評価系の確立を行い、L-シトルリン摂取による物質送達への影響を評価することを目的とした。実験 2 では、L-シトルリン摂取による骨格筋への物質送達の増加が NO 産生増加を介したことによる可能性について経時的な評価を行った。実験 3 は、STZ 誘発糖尿病モデルラットにおいて L-シトルリン摂取による物質送達への影響を評価することを目的として実施した。骨格筋線維は Type I 線維と Type II 線維に大別されるが、ラットのヒラメ筋では Type I 線維が約 83% を占めるのに対して、腓腹筋においては Type I 線維と Type II 線維はそれぞれ 10% 及び 90% の比率で存在する[90]。毛細血管密度は Type I 線維で高いことが知られていることから[91]、各実験では血管密度が異なるヒラメ筋及び腓腹筋をサンプリングし、比較検討することとした。

2.2 材料と方法

研究課題 1 は実験 1、実験 2 及び実験 3 より構成されている。実験は株式会社大塚製薬工場（徳島、日本）の動物実験指針に従い、大塚製薬工場動物実験倫理委員会の承認を得て実施した（承認番号（実験 1）：OPFCAE-17-285、（実験 2）：OPFCAE-20-190、（実験 3）：OPFCAE-18-016）。

2.2.1 実験 1

実験動物

本実験の試験デザインを Fig. 2-1 に示す。実験動物には、9 週齢の Crl:CD (SD) 系雄性ラット（日本チャールス・リバー株式会社、横浜、日本）を用いた。飼育は室温 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 15\%$ 、明暗サイクル 12 時間（7:00 a.m.-7:00 p.m.）の環境下で行い、1 週間以上の馴化期間を設けた。試験期間中は標準飼料 AIN-93G（オリエンタル酵母工業株式会社、東京、日本）及び水を自由摂取させた。EBD アッセイによる骨格筋への物質送達の評価系を確認するにあたり、L-アルギニン系を陽性対照として用いた。雄性 SD ラットに対する 150-500 mg/kg の L-アルギニンの静脈投与により血流の改善が認められた Ohta et al. の報告[92]を参考に修正を加え実施した。0.9%生理食塩水（CON 群, n = 5）あるいは L-アルギニン（300 mg/kg、協和発酵バイオ株式会社）（ARG 群, n = 6）を解剖日（9:00 a.m.）に頸静脈内投与した（Fig. 2-1A）。静脈投与された L-アルギニンは肝臓による初回通過効果を免れ、血中 L-アルギニン濃度の上昇に直接寄与すると考えられた。続いて、L-シトルリン経口投与による骨格筋への物質送達を評価するために、蒸留水（CON 群, n = 5）、L-シトルリン（500 mg/kg、協和発酵バイオ株式会社、東京、日本）（CIT500 群, n = 6）あるいは L-シトルリン（1000 mg/kg）（CIT1000 群, n = 5）を 3 日間（各日 9:00 a.m.）経口投与した

(Fig. 2-1B)。

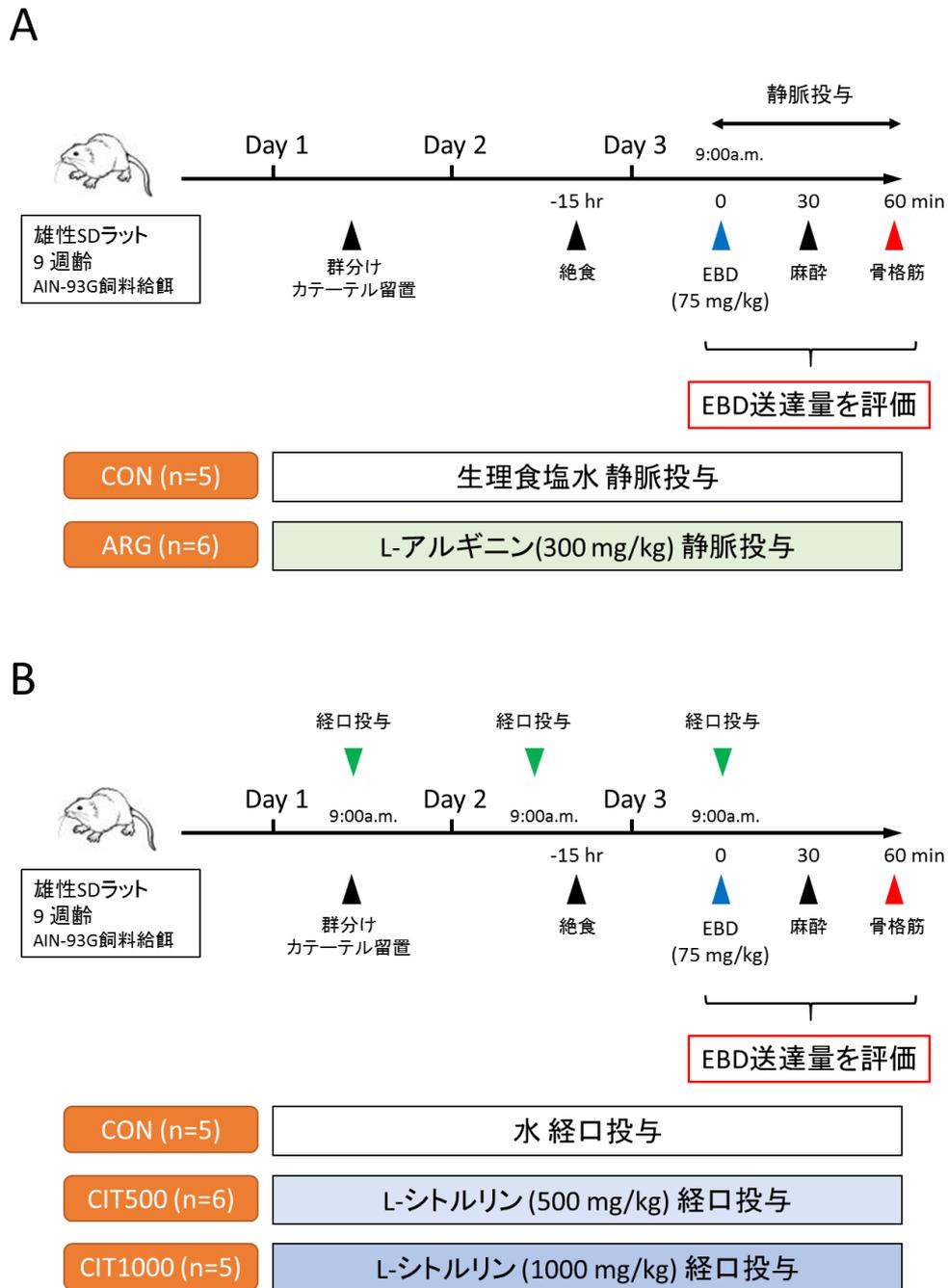


Fig. 2-1. The schedule of examination performed in study 1. (A) CON (n = 5), control rats; ARG (n = 6), rats administered L-arginine (300 mg/kg, i.v.). (B) CON (n = 5),

control rats; CIT500 (n = 6) and CIT1000 (n = 5), rats administered L-citrulline (500 mg/kg and 1000 mg/kg, p.o., respectively). Skeletal muscles were sampled 60 min after Evans blue dye (EBD) administration.

物質送達量の測定

EBD の投与ルートを確保するために解剖日 2 日前の午前に頸静脈へのカテーテル留置を行った。具体的には、50 mg/kg ペントバルビタールナトリウム（共立製薬株式会社、東京、日本）の腹腔内投与による麻酔下で頸部を毛刈りし、消毒用エタノールで消毒した。頸部を約 1 cm 切開して、右外頸静脈を剥離し切り込みを入れ、カテーテルを挿入した。カテーテルの他端は皮下を經由して肩甲骨中間部から体外に導出し、背負い式ハーネスを装着後、頸部切開部を縫合した。処置後の感染防止のためにアンピシリンナトリウム（Meiji Seika ファルマ株式会社、東京、日本）を大腿部筋内に 5 mg/rat で投与した。2 日目より 15 時間の絶食に供した。解剖日における EBD 量の評価は Xu et al. [93]及び Wang et al. [94]の報告に修正を加えて実施した。EBD（和光純薬工業株式会社、大阪、日本）は投与直前に 0.9%生理食塩水に溶解して使用した。解剖日の各被験物質の投与（9:00 a.m.）直後に 75 mg/kg の EBD を 10 秒間かけて頸静脈内投与後、0.4 mL の生理食塩水にてカテーテル内の EBD をフラッシュした。EBD の投与後に動物の全身が速やかに青色になったことを確認した。動物の運動による結果への影響を抑えるために、EBD 投与 30 分後に 50 mg/kg ペントバルビタールナトリウム麻酔を腹腔投与した。蛍光色素をトレーサーとして用いた先行研究では、ペントバルビタールナトリウムは骨格筋における毛細血管の評価に影響を与えないことが報告されている[95]。EBD 投与 60 分後に麻酔下で、骨

格筋線維タイプの構成比が異なるヒラメ筋及び腓腹筋を摘出し、湿重量を測定した。ヒラメ筋及び腓腹筋をそれぞれ 1.5 mL 及び 7.0 mL のホルムアミド（和光純薬工業株式会社）に 37°C で 20 時間浸漬し EBD を抽出した。抽出時間が 12 時間及び 20 時間で EBD 濃度に差が見られなかったことから、20 時間は EBD 抽出に十分な時間であると考えられた。抽出液を遠心分離（室温、12000 rpm、15 分）後、上清 100 µL を分析に用いた。プレートリーダー（DS ファーマバイオメディカル株式会社、大阪、日本）により 620 nm で波長測定を行った。標準曲線としてホルムアミドに溶解した EBD（0、1、2、4、8、16 及び 32 µg/mL）を用いて、骨格筋湿重量あたりの EBD 量を算出した。

2.2.2 実験 2

実験動物

本実験の試験デザインを Fig. 2-2 に示す。実験動物には、9 週齢の Crl:CD (SD) 系雄性ラット（日本チャールス・リバー株式会社）を用いた。飼育は、室温 23 ± 3°C、湿度 55 ± 15%、明暗サイクル 12 時間（明期 7:00 a.m.-7:00 p.m.）の環境下で行い、1 週間以上の馴化期間を設けた。試験期間中は標準飼料 AIN-93G（オリエンタル酵母工業株式会社）及び水を自由摂取させた。平均体重が同じになるように分け、蒸留水（CON 群, n = 6）あるいは L-シトルリン（1000 mg/kg）（CIT 群, 各時点 n = 6）を 3 日間（各日 9:00 a.m.）経口投与した。2 日目より 15 時間の絶食を行い、3 日目の蒸留水あるいは L-シトルリンの経口投与（9:00 a.m.）から 10 分、20 分及び 30 分後にイソフルラン麻酔下で腹大動脈より血液サンプルを採取した。

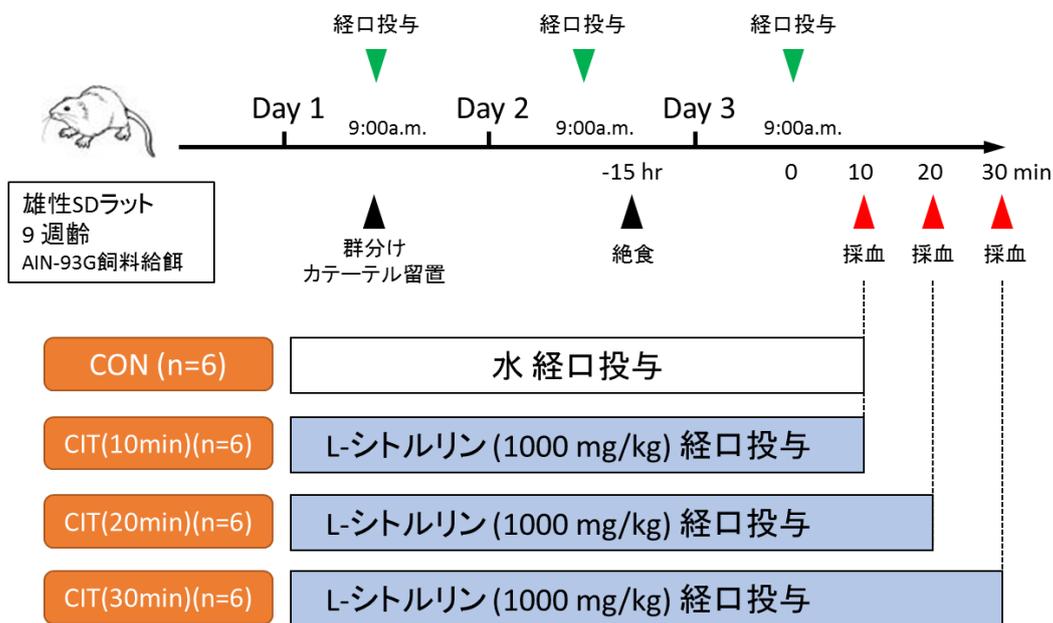


Fig. 2-2. The schedule of examination performed in study 2. CON (n = 6), control rats; CIT (n = 6 each), rats 10, 20, and 30 min after L-citrulline (1000 mg/kg, p.o.) administration.

血液の分析

血漿は EDTA-2Na を含む採血管に分注後、素早く氷上で冷却した。その後、遠心分離 (4°C、3000 rpm、10 分) を行い、血漿を回収した。血漿アミノ酸濃度は、LC/MS 法により決定した (LC-MS2020; Shimadzu Corporation、京都、日本)。血清は採血管に分注し室温で静置後、遠心分離 (4°C、3000 rpm、10 分) を行い回収した。血管拡張の指標である NO_x 濃度の分析には NO detector high performance liquid chromatography (HPLC) (ENO20; Eicom、京都、日本) を用いた。

2.2.3 実験 3

STZ 誘発糖尿病モデルラットの作製

本実験の試験デザインを Fig. 2-3 に示す。実験動物には、8 週齢の Crl:CD (SD) 系雄性ラット（日本チャールス・リバー株式会社）を用い、1 週間以上の馴化期間を設けた。試験期間中は標準飼料 AIN-93G（オリエンタル酵母工業株式会社）及び水を自由摂取させた。STZ（Sigma-Aldrich、ミズーリ、米国）を投与直前にクエン酸ナトリウム緩衝液（pH4.5）に溶解し、50 mg/kg で尾静脈内投与した。STZ 投与より 14 日後に血糖値が 300 mg/dL 以上を呈したラットを糖尿病ラットとし、以降の検討に用いた。試験期間中のラットの健康状態について下痢の症状は認められなかった。被験物質として正常ラットに蒸留水（CON 群, n = 5）、糖尿病ラットに蒸留水（STZ 群, n = 5）あるいは L-シトルリン（500 mg/kg）（STZ + CIT 群, n = 8）を 21 日間（各日 9:00 a.m.）経口投与した。

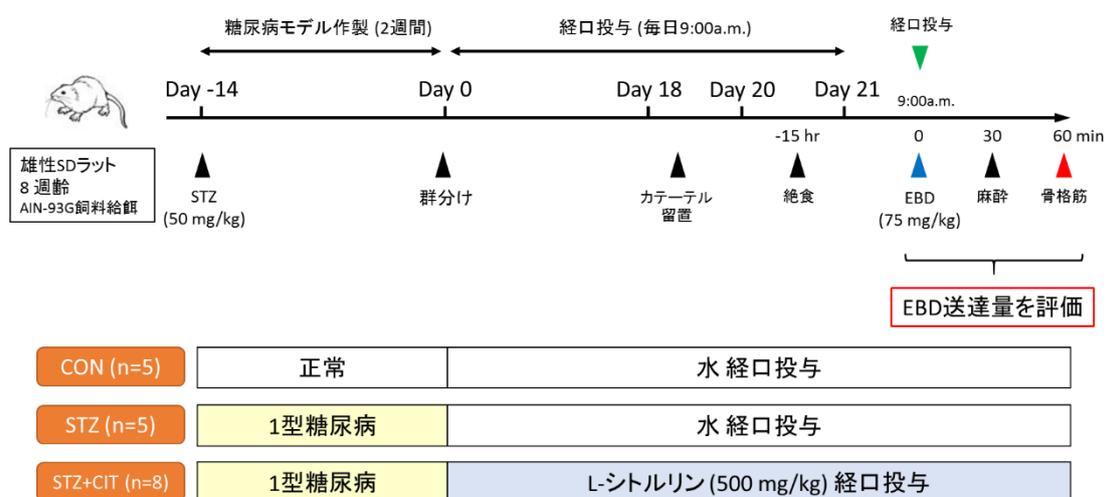


Fig. 2-3. The schedule of examination performed in study 3. CON (n = 5), control rats

administered water; STZ (n = 5), streptozotocin (STZ) rats administered water; STZ + CIT (n = 8), STZ rats administered L-citrulline (500 mg/kg, p.o.). Skeletal muscles were sampled 60 min after Evans blue dye (EBD) administration.

物質送達量の測定

実験 1 と同様に行った。すなわち、解剖日 2 日前の午前に右外頸静脈にカテーテルを留置した。解剖日前日より 15 時間の絶食に供し、解剖日における蒸留水あるいは L-シトルリンの経口投与 (9:00 a.m.) 直後に 75 mg/kg EBD を頸静脈内投与した。EBD 投与 30 分後に 50 mg/kg ペントバルビタールナトリウム麻酔を腹腔投与し、その 30 分後に麻酔下でヒラメ筋及び腓腹筋を摘出し、湿重量を測定した。組織をホルムアミドに 37°C で 20 時間浸漬し EBD を抽出後、EBD 濃度を測定し組織重量あたりの EBD 送達量を算出した。

統計処理

結果は平均値 \pm 標準偏差で示した。実験 1 において、CON 群及び ARG 群間の有意差検定には Mann-Whitney の U 検定を用いた。CON 群、CIT500 群及び CIT1000 群間の有意差検定は、ノンパラメトリックな一元配置分散分析 (one-way analysis of variance (ANOVA)) である Kruskal-Wallis 検定を行った後、CON 群を基準とする Steel 多重比較検定を用いた。実験 2 において、4 群間の比較には one-way ANOVA を行い、有意差のみられた項目について post-hoc test として CON 群に対する Dunnett 多重比較検定を行った。実験 3 において、3 群間の比較には one-way ANOVA を行い、有意差のみられた項目について Tukey-Kramer 検定を行った。有意水準は 5% とした。実験 3 の 3 群間の異なる

文字間には有意差が存在することを示す。統計処理は、EXSUS 7.7（株式会社 CAC エクシケア、東京、日本）を使用した。

2.3 結果

2.3.1 実験 1

物質送達量の測定

L-アルギニン投与後の EBD 送達量の結果を Fig. 2-4 に示す。ヒラメ筋及び腓腹筋において、CON 群と比較して ARG 群で骨格筋重量あたりの EBD 量が有意に増加した ($p < 0.05$)。L-シトルリン経口投与後の EBD 送達量の結果を Fig. 2-5 に示した。ヒラメ筋では CON 群と比較して CIT500 群及び CIT1000 群で骨格筋重量あたりの EBD 量が有意に増加した ($p < 0.05$)。一方、腓腹筋では群間で有意な差が認められなかった。

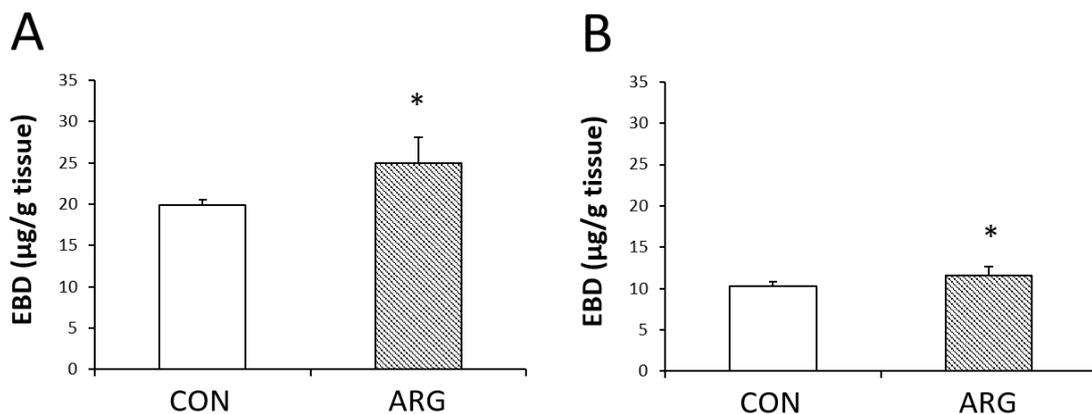


Fig. 2-4. Effects of L-arginine administration on the vascular delivery of Evans blue dye (EBD) to skeletal muscles. EBD levels after L-arginine administration in soleus (A) and gastrocnemius (B) muscles. CON (n = 5), control rats; ARG (n = 6), rats administered

L-arginine (300 mg/kg, i.v.). Data are presented as mean \pm standard deviation. * $p < 0.05$: compared with CON.

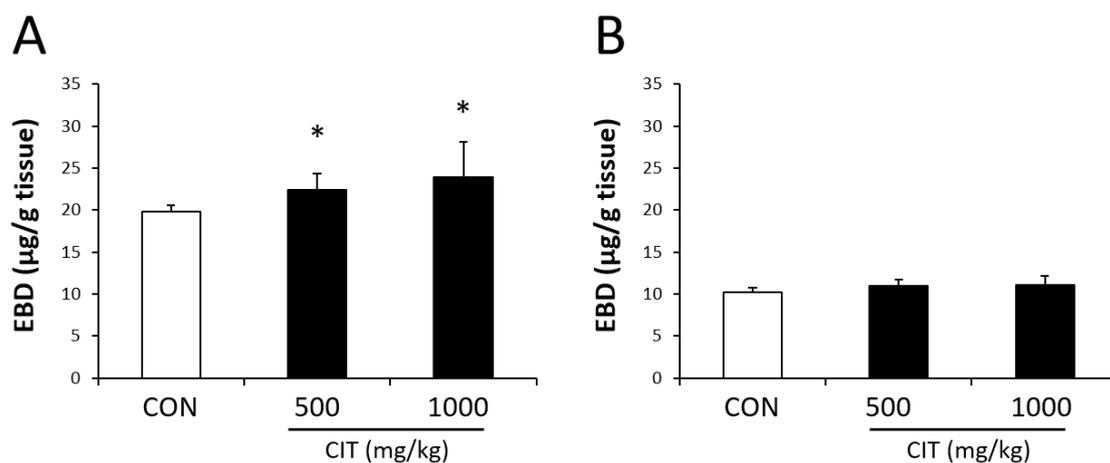


Fig. 2-5. Effects of L-citrulline administration on the vascular delivery of Evans blue dye (EBD) to skeletal muscles. EBD in soleus (A) and gastrocnemius (B) muscles. EBD levels were determined 60 min after the last oral administration. CON (n = 5), control rats; CIT500 (n = 6) and CIT1000 (n = 5), rats administered L-citrulline (500 mg/kg and 1000 mg/kg, p.o., respectively). Data are presented as mean \pm standard deviation. * $p < 0.05$: compared with CON.

2.3.2 実験 2

血漿アミノ酸濃度

血漿アミノ酸濃度の結果を Table 2-1 に示す。L-アルギニン、L-シトルリン及びオルニチンの濃度について、L-シトルリン経口投与より 10 分、20 分及び 30 分後のいずれの時点でもこれらのアミノ酸濃度は CON 群と比較して有意に増

加した ($p < 0.05$)。一方、イソロイシン、ロイシン、バリン及び BCAA の濃度については、L-シトルリン経口投与より 10 分、20 分及び 30 分後のいずれの時点でも CON 群と比較して有意に減少した ($p < 0.05$)。

Table 2-1 Plasma amino acid concentrations.

	CON	CIT		
		10 min	20 min	30 min
Alanine (nmol/mL)	509.8 ± 51.7	430.7 ± 38.1 *	480.1 ± 65.3	394.5 ± 68.6
Arginine (nmol/mL)	169.2 ± 12.1	325.9 ± 33.0 *	389.5 ± 35.5 *	455.4 ± 18.3 *
Citrulline (nmol/mL)	64.6 ± 7.8	1089.0 ± 98.9 *	1599.3 ± 178.3 *	2230.0 ± 192.3 *
Glutamic acid (nmol/mL)	127.9 ± 12.9	110.0 ± 9.5 *	114.2 ± 8.5	111.1 ± 9.8
Glutamine (nmol/mL)	743.8 ± 45.7	692.5 ± 77.7	674.3 ± 53.4	678.7 ± 68.0
Isoleucine (nmol/mL)	105.6 ± 12.2	87.0 ± 12.7 *	83.2 ± 9.9 *	89.4 ± 6.8 *
Leucine (nmol/mL)	155.7 ± 15.0	127.8 ± 18.6 *	122.9 ± 14.7 *	124.9 ± 11.8 *
Ornithine (nmol/mL)	55.2 ± 7.1	81.8 ± 8.4 *	120.3 ± 26.3 *	132.6 ± 16.0 *
Valine (nmol/mL)	201.2 ± 24.0	159.0 ± 23.2 *	164.7 ± 23.6 *	168.5 ± 11.9 *
BCAA (nmol/mL)	462.5 ± 50.6	373.8 ± 53.9 *	370.7 ± 47.5 *	382.7 ± 30.3 *

CON (n = 6), control rats; CIT (n = 6 each), rats 10, 20, and 30 min after L-citrulline (1000 mg/kg, p.o.) administration; BCAA, branched-chain amino acids. Data are presented as the mean ± standard deviation. * $p < 0.05$: compared with CON.

血清 Nox 濃度

血管拡張の指標である NO_x の亜硝酸イオン (NO₂⁻) 及び硝酸イオン (NO₃⁻) の血中濃度を Fig. 2-6 に示す。NO₂-濃度は群間で差は認められなかったが、NO₃-濃度は CON 群と比較し L-シトルリン経口投与後 10 分及び 20 分で有意に増加した ($p < 0.05$)。Nox 濃度については、CON 群と比較し L-シトルリン経口投与より 10 分後で増加傾向を示し ($p = 0.050$)、20 分後に有意な増加が

認められた ($p < 0.05$)。

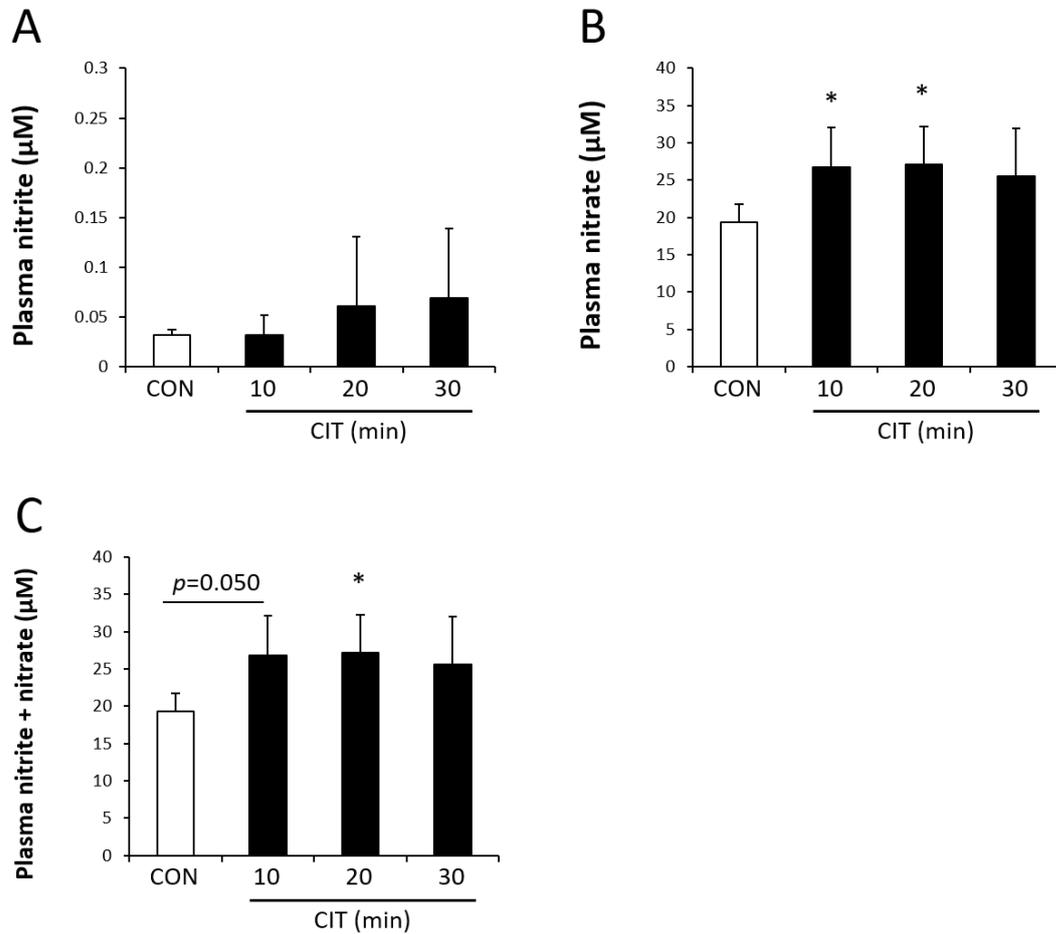


Fig. 2-6. Blood nitrite and nitrate levels. CON (n = 6), control rats; CIT (n = 6 each), rats 10, 20, and 30 min after L-citrulline (1000 mg/kg, p.o.) administration. Data are presented as mean \pm standard deviation. * $p < 0.05$: compared with CON.

2.3.3 実験 3

体重、骨格筋重量、血糖値

体重、ヒラメ筋及び腓腹筋重量の絶対値及び相対値、及び血糖値の結果を

Table 2-2 に示す。体重及び腓腹筋重量は CON 群と比較して STZ 群で有意に減少したが ($p < 0.05$)、STZ 群と STZ + CIT 群間で有意な差は認められなかった。血糖値は CON 群に対して STZ 群で有意に増加し ($p < 0.05$)、STZ 群と STZ + CIT 群間で有意な差は認められなかった。

Table 2-2 Body weight, absolute and relative skeletal muscle mass, and blood glucose level.

	CON	STZ	STZ + CIT
Body weight (g)	459.3 ± 39.2 ^a	374.0 ± 42.9 ^b	383.1 ± 40.3 ^b
Soleus muscle (mg)	184.5 ± 9.4	157.4 ± 23.5	163.7 ± 23.4
Soleus muscle/body weight (mg/g)	0.40 ± 0.03	0.42 ± 0.06	0.43 ± 0.05
Gastrocnemius muscle (mg)	2346.1 ± 171.8 ^a	1913.4 ± 313.5 ^b	2006.3 ± 158.3 ^b
Gastrocnemius muscle/body weight (mg/g)	5.1 ± 0.1	5.1 ± 0.3	5.3 ± 0.4
Blood glucose levels (mg/dL)	125.0 ± 11.8 ^a	675.4 ± 277.8 ^b	585.9 ± 169.0 ^b

CON (n = 5), control rats administered water; STZ (n = 5), streptozotocin (STZ) rats administered water; STZ + CIT (n = 8), STZ rats administered L-citrulline (500 mg/kg, p.o.). Data are presented as mean ± standard deviation. a, and b: the different letters indicate significant differences among the CON, STZ, and STZ + CIT groups ($p < 0.05$).

物質送達量の測定

EBD 送達量の結果を Fig. 2-7 に示す。ヒラメ筋において、骨格筋重量あたりの EBD 量は、CON 群と比較して STZ 群で減少傾向を示し ($p = 0.072$)、STZ 群と比較して STZ + CIT 群で有意に増加した ($p < 0.05$)。腓腹筋においては、STZ 群と比較して STZ + CIT 群で増加傾向を示した ($p = 0.052$)。

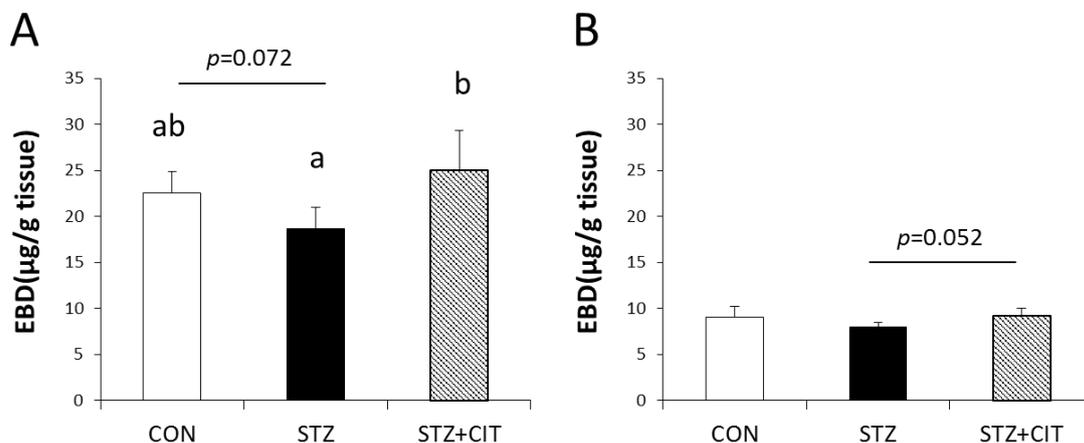


Fig. 2-7. Effects of L-citrulline administration on the vascular delivery of Evans blue dye (EBD) to muscles in diabetic rats. EBD in soleus (A) and gastrocnemius (B) muscles. EBD levels were determined 60 min after the last oral L-citrulline administration. CON (n = 5), rats administered water; streptozotocin (STZ) (n = 5), STZ rats administered water; STZ + CIT (n = 8), STZ rats administered L-citrulline (500 mg/kg, p.o.). Data are presented as mean \pm standard deviation. a, and b: the different letters indicate significant differences among the CON, STZ, and STZ + CIT groups ($p < 0.05$).

2.4 考察

一過性の L-シトルリンの経口摂取により血管拡張作用を示す血中 NO 産生の増加及び血管内皮機能の改善が報告されている[63,66,67]。そこで研究課題 1 では、L-シトルリンの経口摂取が骨格筋への物質送達量に与える影響について検

討を行った。本研究では、正常ラット及び STZ 誘発糖尿病モデルラットにおいて、L-シトルリンの急性経口摂取により 60 分後における骨格筋への EBD 送達量が増加した。L-シトルリンの経口摂取後早期に血中 NO_x 濃度が増加し、NO の血管拡張作用による可能性が考えられた。

実験 1 で EBD アッセイによる評価を行ううえで陽性対照として設定した ARG 群において、300 mg/kg の L-アルギニン正常ラットに静脈投与することで、ヒラメ筋及び腓腹筋の筋重量あたりの EBD 量が CON 群と比較して有意に増加することが確認された。これは、L-アルギニンが血管内皮細胞において eNOS の基質となり NO 産生を促進し、血管拡張が生じたことによる可能性が考えられた[47,48]。続いて、500 mg/kg あるいは 1000 mg/kg の L-シトルリンを経口投与したところ、ヒラメ筋重量あたりの EBD 量が有意に増加した。このことから、L-シトルリンの経口投与によりヒラメ筋へ送達された EBD 量が増加したと考えられた。一方で、腓腹筋では同様な現象は確認できなかった。この原因としては、毛細血管密度が高い遅筋線維の割合が高いヒラメ筋[91]は速筋線維優位な腓腹筋に比べ、L-シトルリン投与による血管拡張作用の影響を受けやすい可能性が考えられた。すなわち、L-シトルリンによる物質送達作用の効果は遅筋優位なヒラメ筋で得られやすい可能性が考えられた。各骨格筋の CON 群における骨格筋重量あたりの EBD 量に着目すると、ヒラメ筋では $19.9 \pm 0.7 \mu\text{g/g}$ であり、腓腹筋では $10.3 \pm 0.5 \mu\text{g/g}$ であったことから、実際に定常状態のヒラメ筋では腓腹筋と比較して血管密度が大きいことが示唆された。細動脈は主に骨格筋の血液量の調整に関わっているが[40,41]、本研究において、L-シトルリンの経口摂取によって増加した NO 産生は細動脈における平滑筋を弛緩し、毛細血管の拡張を介してラット骨格筋中の EBD 量を増加した可能性

が考えられた。

実験 2 の結果から、ラットにおいて L-シトルリンの経口投与による血中 NO_x 濃度の増加が投与後 10 分及び 20 分で確認された。8 週齢の雄性 NZW ウサギに対して 500 mg/kg の L-シトルリンを経口投与したが、投与後 30、60 及び 120 分において血中 NO_x 濃度に差が認められなかったことが報告されている[96]。また、健常中高年男性において 5.6 g/日のシトルリン経口摂取より 60 分後の血中 NO_x 濃度はプラセボと比較して有意な差が認められなかったことが報告されている[66]。実験 2 の結果から、L-シトルリン経口投与後の血中 NO_x 濃度は比較的早期（10-20 分）に増加している可能性が考えられた。L-シトルリン経口投与後のラット血中 NO_x 濃度の経時変化についてはまだ十分な検討が行われていないが、本結果より、L-シトルリン投与による NO_x 濃度の評価においては、投与後 30 分以内の評価が重要である可能性が考えられた。L-シトルリン経口投与後の経時的な血中 NO_x 濃度の推移についてはより詳細な検討を今後行っていく必要がある。一方、血中 NO_x 濃度の増加は骨格筋における血管拡張を必ずしも反映していない可能性について考慮する必要がある。今後の検討としては、L-シトルリン投与後の骨格筋における NO_x の産生を測定する必要があると考えられる。さらに、骨格筋における血管内皮機能の評価として、L-シトルリン投与後の骨格筋における eNOS のタンパク質発現量及びリン酸化状態についても評価が必要である。

実験 2 の血中アミノ酸濃度の結果に着目すると、L-シトルリンの経口投与後少なくとも 30 分まで血漿 L-アルギニン及び L-シトルリン濃度は上昇を続けた。Morita et al.らは正常ラットにおいて 500 mg/kg の L-シトルリンを経口投与したところ、血漿 L-アルギニンが約 120 分まで緩やかに上昇したことを報告し

ている[96]。健常人においては2、5、10あるいは15 gのL-シトルリンを経口投与したところ、血漿L-シトルリン濃度が投与後約38-56分で最大値を示したと報告されている[97]。実験2の血中アミノ酸とNO_xの結果から、血漿L-アルギニン及びL-シトルリン濃度が最大値を示す以前に血中NO_x濃度は増加する可能性が示唆された。一方、実験2において血漿BCAA濃度はL-シトルリン投与後に減少した(Table 2-1)。このとき、グルタミン酸及びアラニンの血中濃度がL-シトルリンの経口投与10分後に有意に減少したことから、骨格筋におけるBCAAの代謝が増加した可能性が示唆された。先行研究では、健常人においてL-シトルリン経口摂取による血中BCAA濃度の減少が報告されており、L-シトルリン摂取によるアミノ酸利用量の増加の可能性が示唆された[98]。また、加齢ラットを用いた研究では、400 mg/kgのタンパク質を、単独で摂取したときよりも400 mg/kgのL-シトルリンとともに摂取した方が、投与4時間後において血漿アミノ酸濃度が低下したことを報告している[99]。しかしながら、L-シトルリン摂取による血中BCAA濃度減少の明確な理由については依然として不明である。

高血糖状態では、炎症、遊離脂肪酸、酸化ストレス、終末糖化産物(AGEs)などを要因として、血管収縮ペプチドの発現増加及びNOなどの血管拡張因子の産生低下が認められ、血管内皮機能障害が惹起される[100]。さらに、1型糖尿病では骨格筋の血管数、血管径、毛細血管/筋線維比、血管密度及び血流の減少などが報告されている[73,74,88]。ラット及びヒトにおいて1型及び2型糖尿病では遅筋線維で構成されているヒラメ筋の血管体積が強く影響を受けるという報告がある[101-104]。これらの血管の構造的及び機能的な変化は毛細血管における物質送達に影響を及ぼす可能性がある。1型糖尿病患者及び2型糖尿病患者

においては、L-アルギニンの摂取による下肢の血流の改善及び血中 NO_x 濃度の増加が報告されている[105,106]。また、1型糖尿病モデルラットにおいて2週間のL-シトルリン投与は網膜細動脈における血管拡張障害を改善する傾向を示した[107]。しかしながら、1型糖尿病において、L-シトルリン摂取による骨格筋における血管拡張作用については検討が行われていない。実験3では、ヒラメ筋においてCON群と比較してSTZ群で骨格筋中のEBD量が減少傾向を示したことから、STZ誘発糖尿病モデルラットでは骨格筋への物質送達が増加した可能性が示唆された。これより、本モデルは骨格筋の血管拡張が低下し物質送達が増加したモデルとして適切である可能性が考えられた。実験3では、STZ誘発糖尿病ラットに対してL-シトルリンを経口投与したところ、STZ群と比較してSTZ+CIT群においてヒラメ筋中のEBD量が有意に増加し、腓腹筋中のEBD量が増加傾向を示した。これは、L-シトルリンの経口摂取による血中NO産生の増加及び血管内皮機能の改善が理由である可能性が考えられた。実験1では、L-シトルリン投与による骨格筋中EBD量の増加はヒラメ筋のみで確認されたが、実験3ではヒラメ筋及び腓腹筋のいずれの骨格筋においてもその影響が考えられた。さらに、本研究のpilot studyでは2型糖尿病モデルであるGK/Slcラット（10週齢、雄性）において、1000 mg/kgのL-シトルリンの3週間の経口投与により、ヒラメ筋及び腓腹筋中のEBD量が蒸留水を投与した対照群と比較して有意に増加することを確認している（それぞれ 16.3 ± 0.6 vs. 18.2 ± 1.0 $\mu\text{g/g}$, $p < 0.05$ 及び 6.3 ± 0.6 vs. 7.0 ± 0.6 $\mu\text{g/g}$, $p < 0.05$ ）。以上より、1型糖尿病だけでなく、2型糖尿病においてもL-シトルリンの経口摂取により骨格筋線維タイプに関わらず骨格筋へのEBDの送達量が増加する可能性が考えられる。

実験3のSTZ誘発糖尿病モデルラットでは、CON群と比較して血糖値の有意な増加を示したが、L-シトルリンの投与による血糖値への影響は認められな

った。先行研究においては、2型糖尿病モデルマウスである KK-Ay マウスに対して9週間の L-シトルリン投与による HOMA-R (homeostasis model assessment for insulin resistance) やインスリン分泌の減少を介したグルコース代謝の改善 [108]、及び高脂肪食を給餌した肥満マウスに対して15週間の L-シトルリン投与による骨格筋のミトコンドリア機能改善を介した血糖値の減少 [109] が報告されている。本研究との結果の違いは使用した病態モデルが異なることや L-シトルリンの投与期間が本研究では短かったことに起因する可能性が考えられた。また、実験3の結果から腓腹筋重量は CON 群と比較して STZ 群で有意に減少した。一方、STZ 群と STZ + CIT 群間でヒラメ筋及び腓腹筋重量に有意な差は認められなかったことから (Table 2-2)、STZ 誘発糖尿病において L-シトルリン単独の投与は骨格筋重量に影響しない可能性が考えられた。L-シトルリンと他のタンパク質やアミノ酸を組み合わせる場合、筋タンパク質合成に及ぼす影響について検討を行う必要がある。

研究課題1にはいくつかのリミテーションが存在する。まず、本研究では物質送達を EBD アッセイにより評価したが、EBD は生体内で代謝されず、静脈投与直後より血中タンパク質、特にアルブミンと高い親和性を示す [94]。アルブミンと結合した EBD は血管内に限局することから、骨格筋の血管内における EBD 量を反映していると考えられる [93]。この特性を利用して EBD はヒトや動物において組織中の血液量の定量あるいは血管の透過性の評価に一般的に用いられている。一方、定常状態において EBD は血管内皮を透過することができないことから、血管外に存在する物質の骨格筋細胞への送達量を評価するためにはさらなる検討が必要である。EBD の経時的な変化についても詳細に検討する必要がある。次に、本研究の L-シトルリン投与による骨格筋中の EBD

量の増加はアミノ酸のうち L-シトルリン特異的な現象なのかを検証するために他のアミノ酸との比較検討を行う必要があると考えられる。また、研究課題 1 は、3 つの独立した実験から構成されているが、これは EBD アッセイによる評価を行ううえで、採血が血液量の結果に影響を及ぼす可能性を排除するために実験を分けて実施した。さらに、研究課題 1 では心拍出量の測定を行わなかった。EBD アッセイの評価において使用した麻酔であるペントバルビタールは、複数の報告で動物の心拍出量に影響しないことが報告されており[110,111]、本研究では解剖日にすべての動物に対して同じタイミング及び量の麻酔で処置したため、同一実験内の群間で麻酔による影響に差はないと考えられる。また、先行研究では、若齢者において 7 日間の 6 g/日の L-シトルリン経口摂取により心拍出量が増加しないことが報告されている[112]。ラットでは代謝率と窒素の必要量がヒトの 10 倍[113]であることを考慮すると、本研究で使用した 1000 mg/kg の L-シトルリンは体重 50 kg のヒトにおいて 5 g に相当する。これらより、本研究の投与量の範囲内において L-シトルリンが心拍出量に及ぼす影響は小さい可能性が考えられる。一方、1 型糖尿病においては心拍出量が増加することが報告されていることから[113,114]、心拍出量の評価が今後必要である。また、本研究において L-シトルリン投与後の EBD の送達を骨格筋以外の組織では評価しなかったが、L-シトルリンは脳血流や網脈細動脈の血管拡張に影響を及ぼすことが報告されている[115,116]。これより、組織への EBD 送達は骨格筋特異的でない可能性が考えられる。一方、雄性 SD ラットに対して L-アルギニン（50-150 mg/kg）を投与した先行研究[92]では、骨格筋、腹部皮膚及び心臓で血流が増加したが背部や脾臓では変化せず、NO に対する応答性が組織間で異なる可能性が考えられた。以上より、L-シトルリンが骨格筋以外の組織（脳、肝臓、腎臓、皮膚など）における EBD 送達への影響についても評価を

行い、本研究結果が骨格筋特異的な現象だったかを今後検討する必要がある。

本章では、正常ラットに対する L-シトルリン経口摂取により骨格筋への EBD 送達量が増加することが示された。また、L-シトルリン経口摂取後に血中 L-アルギニン、L-シトルリン及び NO_x 濃度が増加したことから、本結果は NO の血管拡張作用による可能性が示唆された。さらに、STZ 誘発糖尿病モデルラットの骨格筋において L-シトルリンの経口摂取により筋線維タイプを問わず EBD 送達量が増加したことから、L-シトルリンは血管内皮機能の低下が報告されている病態モデルにおいても血管内皮機能を改善する食品成分として有効である可能性が考えられた。しかしながら、食品成分の摂取による骨格筋への栄養素送達量の増加が骨格筋の筋タンパク質合成を実際に増加させるか不明である。そこで、研究課題 2 では STZ 誘発糖尿病モデルラットを用いて、L-シトルリンの経口投与による骨格筋への物質送達作用が筋タンパク質合成に及ぼす影響について検討を行った。

3. 第三章【研究課題 2】 STZ 誘発糖尿病モデルラットにおける L-シトルリンの経口摂取が骨格筋タンパク質合成に及ぼす影響の検討

3.1 背景と目的

骨格筋は筋タンパク質の合成と分解のバランスによって保たれており、古いタンパク質を分解し新しく作り出すリモデリングが骨格筋内で常に行われている[16]。運動や食事で摂取したタンパク質由来のアミノ酸は筋タンパク質合成を亢進させることが報告されている[18,22]。アミノ酸摂取による筋タンパク質合成刺激には用量依存効果があり、高濃度の血中アミノ酸は筋細胞へのアミノ酸輸送を増加し、筋細胞内の遊離アミノ酸濃度を高めることによって筋タンパク質合成を刺激し、同化作用が促される[117,118]。アミノ酸の筋タンパク質合成作用は主に必須アミノ酸（EAA）によってもたらされ、EAAの中でも分岐鎖アミノ酸（BCAA）、特にロイシンに強い同化作用が認められている[19,20]。ロイシンの効果は用量依存的であり、骨格筋における筋タンパク質合成に関わる mTORC1 シグナル経路の活性化を介して筋タンパク質合成を促進する[21]。mTORC1 の標的タンパク質として p70S6K が報告されており、その下流の rpS6 をリン酸化することでタンパク質合成が促進される[119]。また、アミノ酸摂取に関わりなく、血流の増加によっても筋タンパク質合成が増加する可能性が示唆されている[37-39]。Dillon et al.は若齢者及び高齢者において血管拡張薬であるニトロプルシドの摂取による血管拡張が骨格筋へのアミノ酸送達増加に寄与する可能性を報告している[37]。一方、高齢者では血管機能障害に伴う NO 産生の低下により、組織へのアミノ酸送達の減少が筋タンパク質合成の減少に関わる可能性が示唆されている[62]。しかしながら、骨格筋へのアミノ酸の送達量の増加が骨格筋の筋タンパク質合成を実際に増加させるかその詳細は不明で

ある。

骨格筋の萎縮は加齢、飢餓、不活動、癌悪液質、糖尿病など多くの病態において惹起されるが[9-12]、筋タンパク質合成の減少がその原因の一つである。糖尿病においては、筋タンパク質の合成と分解のバランスの崩壊により骨格筋萎縮が惹起されると考えられている[77,120]。1型及び2型糖尿病患者においては健常者と比較して骨格筋量が減少しており、特に1型糖尿病患者では下肢の骨格筋量の減少が顕著であることが報告されている[75,121,122]。STZ誘発性糖尿病モデルマウスにおいては、骨格筋重量の減少及びmTORC1シグナル経路のリン酸化の減少が報告されている[77,78]。さらに、1型糖尿病においてはこれら筋タンパク質合成の減少に加えて、ユビキチン・プロテアソーム系及びオートファジー・リソソーム系といった筋タンパク質分解系の亢進が関わることが報告されている[75,76]。したがって、1型糖尿病において筋タンパク質合成の増加を促進することは骨格筋重量の維持に重要であると考えられる。以上より、STZ誘発糖尿病モデルラットは、第二章で述べた血管内皮機能の低下[73,74]に加えて、筋タンパク質合成シグナル活性の減弱が報告されていることから、L-シトルリン摂取による血管拡張及び筋タンパク質合成への影響を評価するうえで適切な病態モデルであると考えられた。

研究課題1では、L-シトルリンの経口摂取は正常ラット及びSTZ誘発糖尿病モデルラットにおいて、NO産生増加を介して骨格筋への物質送達を増加する作用を有している可能性を示した。そこで、L-シトルリンの経口摂取は、骨格筋への物質送達量の増加により骨格筋の筋タンパク質合成を増加させると仮説を立てた。研究課題2では、STZ誘発糖尿病モデルラットを用いて、タンパク質及びロイシンの混合物とL-シトルリンの摂取が筋タンパク質合成に及ぼす影響について検証することを目的とした。また、糖尿病に対するタンパク質やア

ミノ酸の投与が筋タンパク質合成に及ぼす影響についての報告は少ないことから、タンパク質及びロイシンの混合物の摂取が mTORC1 シグナル経路に及ぼす影響についても検討し、当該混合物摂取による筋タンパク質合成への影響を L-シトルリンが増強するかを評価することとした。

3.2 材料と方法

実験動物と試験デザイン

本実験は、株式会社大塚製薬工場の動物実験指針に従い、大塚製薬工場の動物実験倫理委員会の承認を得て実施した（承認番号：OPFCAE-18-015）。本実験の試験デザインを Fig. 3-1 に示す。実験動物には、8 週齢の Crl:CD (SD) 系雄性ラット（日本チャールス・リバー株式会社）を用いた。飼育は室温 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 15\%$ 、明暗サイクル 12 時間（明期: 7:00 a.m. – 7:00 p.m.）の環境下で行い、2 週間以上の馴化期間を設けた。試験期間中は標準飼料 AIN-93G（オリエンタル酵母工業株式会社）及び水を自由摂取させた。STZ（Sigma-Aldrich）を投与直前にクエン酸ナトリウム緩衝液（pH4.5）に溶解し、50 mg/kg で尾静脈内投与した。STZ 投与より 14 日後に随時血糖値が 300 mg/dL 以上を呈したラットを糖尿病ラットとし、以降の検討に用いた。試験期間中のラットの健康状態について下痢の症状は認められなかった。試験溶液として正常ラットに蒸留水（CON, n = 8）、糖尿病ラットに蒸留水（STZ, n = 8）、タンパク質源としてミルクタンパク質及びホエイタンパク質、遊離アミノ酸としてロイシンを含む混合物（PL）（STZ + PL, n = 8）、あるいは PL に L-シトルリンを含む混合物（PLC）（STZ + PLC, n = 8）をそれぞれ経口投与した。試験溶液の栄養成分組成及び投与量を Table 3-1 及び Table 3-2 に示した。各試験溶液は 15 mL/kg にて 21 日間経口投与（各日 9:00 a.m.）した。解剖日前日より 15 時間の絶食

後、解剖日の経口投与（9:00 a.m.）より 30 分後にイソフルラン麻酔下において腹大動脈より血液サンプル、ヒラメ筋及び腓腹筋を採取した。組織サンプルを素早く液体窒素で凍結し分析まで-80°C で保存した。

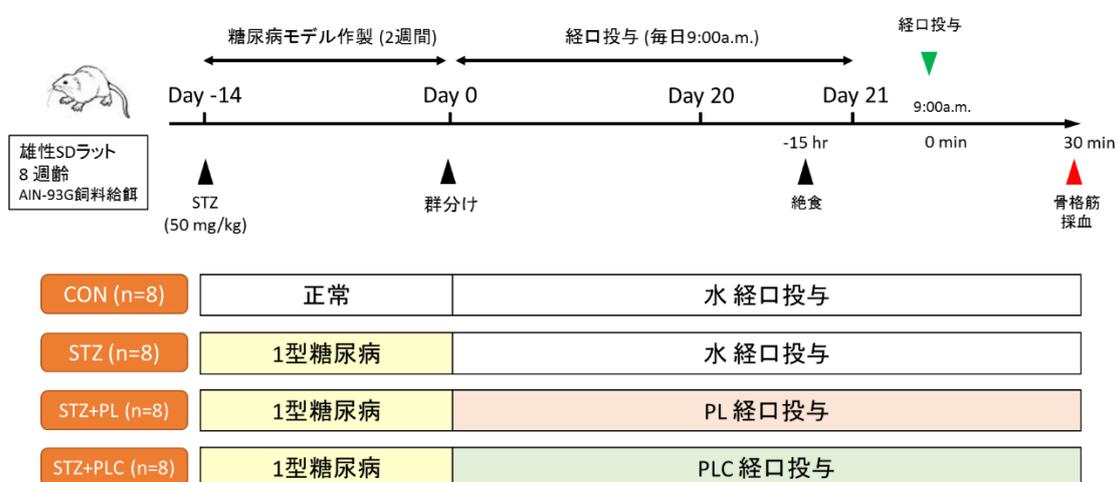


Fig. 3-1. The schedule of examination performed in this study. CON (n = 8), SD rats administered with water; streptozotocin (STZ) (n = 8), STZ rats administered with water; STZ + PL (n = 8), STZ rats administered with PL; and STZ + PLC (n = 8), STZ rats administered with PLC. PL, protein and leucine mixture; PLC, protein, leucine and L-citrulline mixture.

Table 3-1. Macronutrient composition of the PL and PLC

Ingredient	PL	PLC
Milk protein (g/100 mL)	4.80	4.80
Whey protein (g/100 mL)	2.08	2.08
Leucine (g/100 mL)	1.14	1.14
L-citrulline (g/100 mL)	0	0.80
Water (g/100 mL)	90.17	89.37

PL, protein and leucine mixture; PLC, protein, leucine and L-citrulline mixture.

Table 3-2. Dose of the test diets

Ingredient	PL	PLC
Protein (g/kg)	1.03	1.03
Leucine (g/kg)	0.17	0.17
L-citrulline (g/kg)	0	0.12

PL, protein and leucine mixture; PLC, protein, leucine and L-citrulline mixture.

血液分析

血液サンプルは EDTA-2Na を含む採血管に分注後、素早く氷上で冷却した。その後、遠心分離（4°C、3000 rpm、10 分）を行い血漿を分離し回収した。すべての血漿サンプルは、-80°C で保存した。血漿アミノ酸濃度は LC/MS 法により決定した（LC-MS2020; Shimadzu Corporation）。

Western Blotting

ウェスタンブロットは先行研究[123]に改変を加えて行った。-80°C で冷凍保存した骨格筋サンプルについて 30 mg を 200 μ L の RIPA バッファー（20 mM Tris-HCl（pH 7.5）, 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 1%

sodium deoxycholate, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM b-glycerophosphate, 1 mM Na₃VO₄, 1 µg/ml leupeptin.) (Cell Signaling Technology、マサチューセッツ、米国) に加えホモジナイズした。PIPA バッファーには事前にプロテアーゼインヒビターミクスチャー (cOmplete Mini; EDTA-free; Roche、マンハイム、ドイツ) 及びホスファターゼインヒビターミクスチャー (PhosSTOP; Roche) を適量加えた。遠心分離 (15000 rpm、10 分、4°C) を行った後に上清を回収し、プロテインアッセイラピッドキットワコーII (和光純薬工業株式会社、大阪、日本) を用いてタンパク質濃度を決定した。サンプルを 3×サンプルバッファー (5.0% vol/vol b-mercaptoethanol, 187.5 mM Tris-HCl (pH 6.8, 25°C) , 6% (w/v) SDS, 30% glycerol, 0.03% (w/v) , bromophenol blue) (Cell Signaling Technology) で調製し、97°C で 7 分間煮沸した。SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて、30 µg のタンパク質を電気泳動し分離後、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) メンブレンに転写した。転写後、メンブレンをポンソーS 溶液 (株式会社ビークル、京都、日本) に浸して染色し総タンパク質染色を行い、シグナル強度をデジタルイメージングシステム (FUSION-SOLO.7S.EDGE、Vilber-Lourmat 社、フランス) によりスキャンした。その後、メンブレンは 0.1M 水酸化ナトリウム水溶液で脱色した。0.05% の Tween 20 を含むトリス緩衝生理食塩水 (TBS-T, pH 7.6) でメンブレンを洗浄後、5% ウシ血清由来アルブミンを含む TBS-T に浸し、室温で 1 時間ブロッキングを行った。その後、メンブレンを TBS-T で洗浄し一次抗体に 4 °C で一晩反応させた。一次抗体としては、phospho-p70 S6 Kinase (Thr389) (cat. no. 9205)、total p70 S6 Kinase (cat. no. 2708)、phospho-S6 ribosomal protein (Ser240/244) (cat. no. 2215)、total S6 ribosomal protein (cat. no. 2217) (いずれも Cell Signaling Technology) を用いた。メンブレンを再び TBS-T で洗浄し、二次抗体を用いて室温で 1 時間反応を行った。化学発光基質試薬

(Luminata Western HRP substrate; Merck、ダルムシュタット、ドイツ) を用いてタンパク質のバンドのシグナル強度を検出した。デジタルイメージングシステム (Molecular Imager VersaDoc™ MP 500; BIORAD、カリフォルニア、米国) によりスキャンし、シグナル強度の解析には ImageJ 1.50i (National Institutes of Health、メリーランド、米国) を使用した。目的タンパク質のリン酸化レベルは、リン酸化タンパク質のシグナル強度を対応するタンパク質のトータルのシグナル強度で補正し算出した。また、目的タンパク質のトータルのシグナル強度をメンブレンに転写された総タンパク質染色のシグナル強度で補正した。

統計処理

データは平均値 ± 標準偏差 (SD) で示した。CON 群及び STZ 群の 2 群間の差を対応のない t 検定で解析した。また STZ 群、STZ + PL 群及び STZ + PLC 群の 3 群間の比較には、one-way ANOVA を行い、有意差のみられた項目について post-hoc test として Tukey-Kramer 検定を行った。統計処理は、EXSUS 7.7 (株式会社 CAC エクシケア) を使用した。有意水準は $p < 0.05$ とし、STZ 群、STZ + PL 群及び STZ + PLC 群の 3 群間の異なる文字間には有意差が存在することを示す。

3.3 結果

体重と血糖値

体重及び血糖値の結果を Table 3-3 に示した。体重は CON 群と比較して STZ 群で有意に減少したが ($p < 0.05$)、STZ 群、STZ + PLC 群及び STZ + CIT 群間で有意な差は認められなかった。血糖値は CON 群に対して STZ 群で有意に増加し ($p < 0.05$)、STZ 群、STZ + PLC 群及び STZ + CIT 群間で有意な差は認め

られなかった。

Table 3-3. Body weight and blood glucose level.

	CON	STZ	STZ + PL	STZ + PLC
Body weight (g)	477.3 ± 19.2	394.4 ± 56.1 *	397.4 ± 53.4	403.5 ± 42.9
Blood glucose levels (mg/dL)	121.4 ± 7.5	538.0 ± 249.3 *	434.8 ± 244.2	411.9 ± 201.8

Effect of L-citrulline administration on body weight and blood glucose level in rats.

CON (n = 8), SD rats administered with water; streptozotocin (STZ) (n = 8), STZ rats administered with water; STZ + PL (n = 8), STZ rats administered with PL; and STZ + PLC (n = 8), STZ rats administered with PLC. Data are presented as mean ± standard deviation. * p < 0.05: compared with CON.

血漿アミノ酸濃度

血漿アミノ酸濃度を Table 3-4 に示した。最後の経口投与より 30 分後に血液サンプルを採取し、LC/MS 法により測定した。イソロイシン、バリン、ロイシン、EAA 及び BCAA の血漿濃度は、STZ 群と比較して STZ + PL 群及び STZ + PLC 群で有意に増加した (p < 0.05)。L-アルギニン及びオルニチンの血漿濃度は、STZ 群と比較して STZ + PLC 群で有意に増加した (p < 0.05)。L-シトルリンの血漿濃度は、STZ 群及び STZ + PL 群と比較して STZ + PLC 群で有意に増加した (p < 0.05)。

Table 3-4. Plasma amino acid concentrations.

	CON	STZ	STZ + PL	STZ + PLC
Arginine (nmol/mL)	137.5 ± 19.5	155.4 ± 36.0 ^a	217.9 ± 63.3 ^{ab}	281.6 ± 63.6 ^b
Citrulline (nmol/mL)	66.3 ± 10.8	85.5 ± 14.5 ^{*a}	100.7 ± 25.6 ^a	474.6 ± 253.8 ^b
Isoleucine (nmol/mL)	114.1 ± 7.5	120.1 ± 21.9 ^a	245.3 ± 68.4 ^b	220.8 ± 86.5 ^b
Leucine (nmol/mL)	167.9 ± 11.4	189.9 ± 34.3 ^a	1097.3 ± 233.4 ^b	977.3 ± 377.7 ^b
Ornithine (nmol/mL)	93.8 ± 21.4	94.1 ± 30.0 ^a	102.7 ± 34.9 ^{ab}	146.5 ± 47.8 ^b
Valine (nmol/mL)	212.3 ± 11.8	240.9 ± 43.9 ^a	444.7 ± 131.8 ^b	403.7 ± 152.9 ^b
EAA (nmol/mL)	2984.5 ± 137.4	2671.0 ± 296.4 ^a	3452.2 ± 412.3 ^b	3785.3 ± 472.1 ^b
BCAA (nmol/mL)	494.3 ± 29.6	551.0 ± 98.6 ^a	1787.2 ± 422.3 ^b	1601.7 ± 601.2 ^b

Effect of L-citrulline administration on plasma amino acid concentrations in rats. CON (n = 8), SD rats administered with water; streptozotocin (STZ) (n = 8), STZ rats administered with water; STZ + PL (n = 8), STZ rats administered with PL; and STZ + PLC (n = 8), STZ rats administered with PLC. Data are presented as mean ± standard deviation. * p < 0.05: compared with CON. a and b: the different letters indicate significant differences among the STZ, STZ + PL, and STZ + PLC groups (p < 0.05).

p70S6K 及び rpS6 のリン酸化レベル

p70S6K 及び rpS6 のリン酸化レベル及びトータルタンパク質の発現量を Fig. 3-2 (ヒラメ筋) 及び Fig. 3-3 (腓腹筋) に示した。ヒラメ筋において、rpS6 のリン酸化レベルは CON 群と比較して STZ 群で減少傾向を示した (p = 0.082, Fig. 3-2C)。また、ヒラメ筋における p70S6K 及び rpS6 のリン酸化レベルは STZ 群と比較して STZ + PL 群及び STZ + PLC 群でそれぞれ有意に増加したが (p < 0.05)、STZ + PL 群及び STZ + PLC 群間で有意な差は認められなかった (Fig. 3-2A, C)。ヒラメ筋における p70S6K のトータルタンパク質の発現量が STZ 群と比較して STZ + PLC 群で有意に増加した (p < 0.05, Fig. 3-2B)。ヒラメ筋と同様に腓腹筋において、p70S6K 及び rpS6 のリン酸化レベルは STZ 群と比

較して STZ + PL 群及び STZ + PLC 群で有意に増加した ($p < 0.05$, Fig. 3-3 A、C)。しかしながら、STZ + PL 群及び STZ + PLC 群間で有意な差は認められなかった。また、p70S6K 及び rpS6 のトータルタンパク質発現量は群間で差は認められなかった (Fig. 3-3 B, D)。

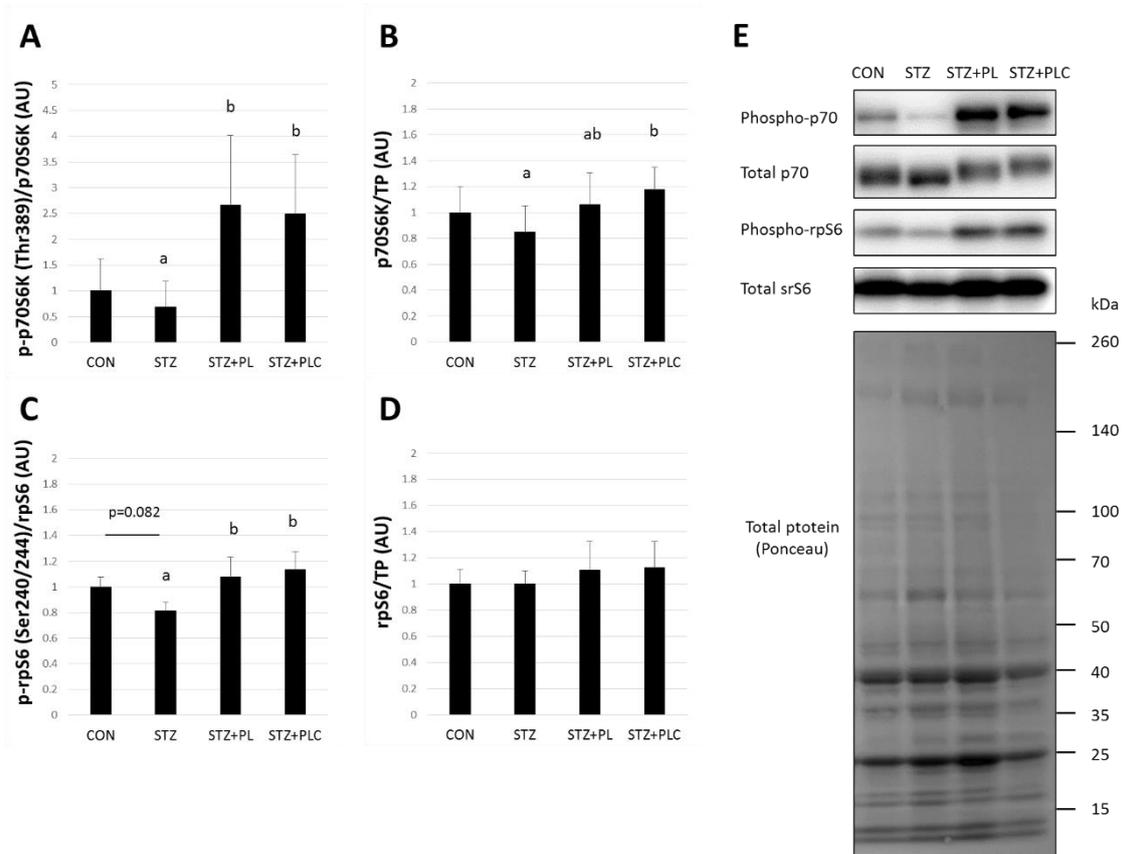


Fig. 3-2. Effects of administration of test diets on the expression level of phosphorylated p70S6K (Thr389) and rpS6 (Ser240/244) in soleus muscle (A-D). (E) Representative blots of the proteins for p70S6K phosphorylation at Thr389, p70S6K, rpS6 phosphorylation at Ser240/244, rpS6, and total protein are shown. Four groups of rats were assigned. CON (n = 8), SD rats administered with water; streptozotocin (STZ) (n = 8), STZ rats administered with water; STZ + PL (n = 8), STZ rats administered

with PL; and STZ + PLC (n = 8), STZ rats administered with PLC. Data are presented as mean \pm standard deviation. a and b: the different letters indicate significant differences among the STZ, STZ + PL, and STZ + PLC groups ($p < 0.05$). AU, arbitrary unit; TP, total protein.

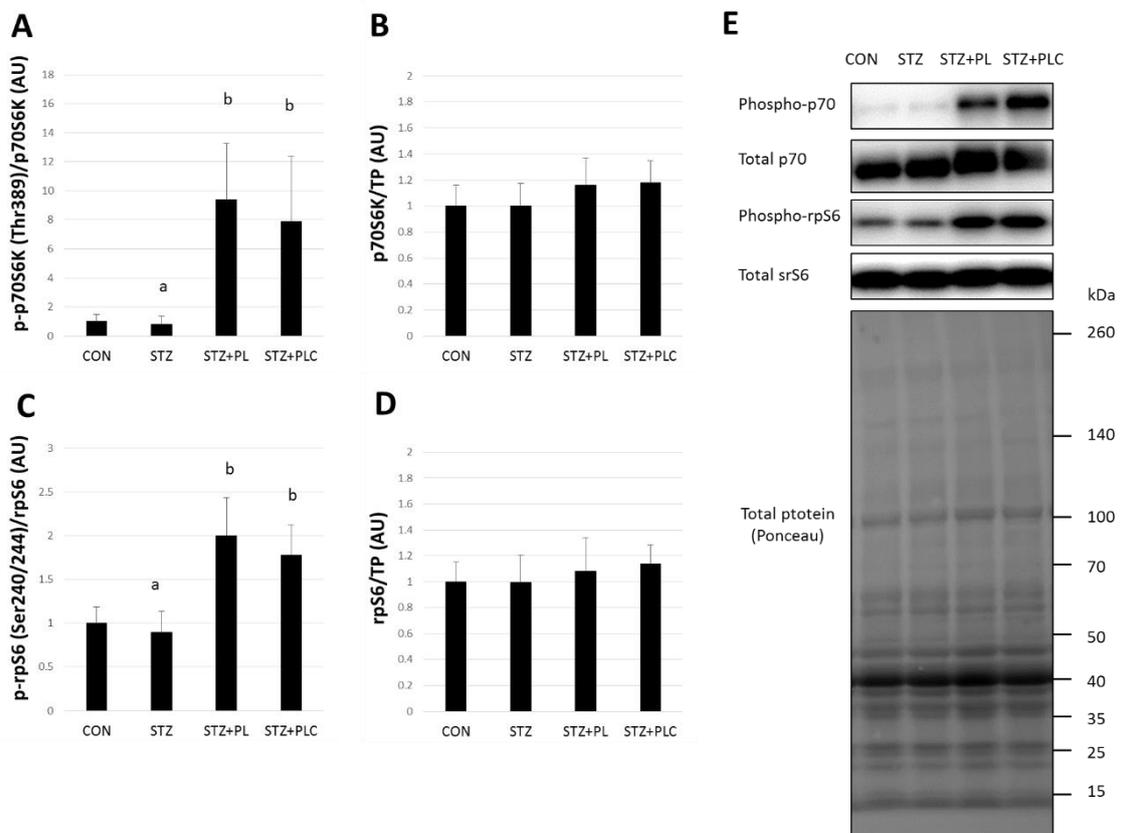


Fig. 3-3. Effects of administration of test diets on the expression level of phosphorylated p70S6K (Thr389) and rpS6 (Ser240/244) in gastrocnemius muscle (A-D). (E) Representative blots of the proteins for p70S6K phosphorylation at Thr389, p70S6K, rpS6 phosphorylation at Ser240/244, rpS6, and total protein are shown. Four groups of rats were assigned. CON (n = 8), SD rats administered with water; streptozotocin (STZ) (n = 8), STZ rats administered with water; STZ + PL (n = 8), STZ

rats administered with PL; and STZ + PLC (n = 8), STZ rats administered with PLC.

Data are presented as mean \pm standard deviation.. a and b: the different letters indicate significant differences among the STZ, STZ + PL, and STZ + PLC groups ($p < 0.05$).

AU, arbitrary unit; TP, total protein.

3.4 考察

STZ 誘発糖尿病モデルラットにおいて、タンパク質及びロイシンの混合物を経口投与することでヒラメ筋及び腓腹筋の筋タンパク質合成シグナル (p70S6K 及び rpS6) の活性化レベルが有意に増加した。一方、当該混合物における L-シトルリン配合の有無でこれらの筋タンパク質合成シグナルの活性化に有意な差は認められなかった。これより、STZ 誘発糖尿病モデルラットにおいて、タンパク質及びロイシンの混合物の投与が筋タンパク質合成に及ぼす効果に対して L-シトルリンは影響しない可能性が示唆された。

本研究では、骨格筋のタンパク質合成が低下するモデルとして STZ 誘発糖尿病モデルラットを用いた。先行研究では 1 型糖尿病モデルマウスにおいて筋タンパク質合成シグナルのリン酸化が減弱していることが報告されている [77,120]。本研究結果では、正常ラットと比較して STZ 誘発糖尿病モデルラットにおいて体重の有意な減少及び血糖値の有意な増加を示したことから、1 型糖尿病の特徴を呈した。さらに、本研究の STZ 誘発糖尿病モデルラットのヒラメ筋において、rpS6 のリン酸化レベルが正常動物と比較して減少傾向を示したことから、定常状態における筋タンパク質合成シグナルの活性化が減弱している可能性が考えられた。一方、腓腹筋における筋タンパク質合成シグナルで同様な現象は確認されなかった。STZ 誘発糖尿病モデルマウスの下腿三頭筋にお

いては、STZ 投与から 1 週間後及び 3 週間後では rpS6 のリン酸化に変化が認められず、5 週間後にリン酸化レベルが有意に低下したことが報告されている [77]。STZ 投与後の評価タイミングが筋タンパク質合成の結果に影響する可能性が考えられた。

本研究では STZ 誘発糖尿病モデルラットに対してタンパク質及びロイシンの混合物（総ロイシンとして 0.28 g/kg）を経口投与したが、筋タンパク質合成に関わるシグナル因子の活性化は mTORC1 経路を介したものによる可能性が考えられた。このとき、筋線維タイプ構成比の異なるヒラメ筋及び腓腹筋のいずれにおいても筋タンパク質合成シグナルの増加が認められた。先行研究では、8 週間の 1.35 g/kg のロイシンの投与により 1 型糖尿病モデルラットにおけるヒラメ筋の萎縮抑制が報告されている [124]。一方、1 型糖尿病モデルラットに対する 1.35 g/kg のロイシンの単回投与あるいは 5%ロイシン混餌飼料の 8 週間の長期投与が骨格筋における mTORC1 シグナル経路のリン酸化に影響を及ぼさなかったことが報告されている [125,126]。本研究と先行研究の違いについては、骨格筋を採取したタイミングが挙げられる。本研究では投与より 0.5 時間後だったのに対して、先行研究では、投与より 1 時間後あるいは 6 時間後であり [125,126]、糖尿病モデルにおいて mTORC1 の活性化を評価するタイミングとして不適切だった可能性がある。

研究課題 1 では、L-シトルリンの経口投与により STZ 誘発糖尿病モデルラットにおいて骨格筋への物質送達が増加することを確認した。また、本研究の pilot study では、PL と比較して PLC の摂取による血中 NO₂-濃度の有意な増加（53.3 ± 27.6 vs. 115.3 ± 47.7 nM, p < 0.05）を確認したことから、L-シトルリンによる血管拡張が生じた可能性が考えられた。先行研究においては、

薬剤あるいはインスリンによる血流の増加によって筋タンパク質合成が増加する可能性が示唆されている[37-39]。そのため、L-シトルリンの投与が筋タンパク質合成に影響を及ぼす可能性が考えられた。そこで本研究では、STZ 誘発糖尿病モデルラットに対してL-シトルリンをタンパク質及びロイシンの混合物に加えて投与した。当該混合物の投与により血中L-シトルリンの有意な増加が確認されたが、L-シトルリンは筋タンパク質合成に関わるシグナル因子の活性化に影響を及ぼさなかった。また、研究課題1の結果からL-シトルリンによる物質送達の増加は主にヒラメ筋において認められたが、ヒラメ筋及び腓腹筋で筋タンパク質合成におけるL-シトルリンの効果に統計学的に有意な差は認められなかった。

Jegatheesan et al.は、高齢ラットに対して0.4 g/kgのホエイタンパク質（ロイシン：約0.04 g/kg）及び0.4 g/kgのL-シトルリンを投与した際に、ホエイタンパク質単独の投与と比較して、投与4時間後の骨格筋におけるp70S6Kのリン酸化が有意に増加したことを報告したが、本結果にL-シトルリンによる血管拡張作用が寄与したかは不明である[99]。一方、制限給餌下の雌性成体ラットに1.0 g/kgのロイシン及び1.0 g/kgのL-シトルリンを2週間投与し、投与より16時間後に筋タンパク質合成速度及び筋力の評価を行ったところ、これらのアミノ酸をそれぞれ単独で投与した場合と比較して差が認められなかった[127]。研究課題2ではラットに対してタンパク質を1.0 g/kg、遊離ロイシンを0.17 g/kg（総ロイシンとして0.28 g/kg）及びL-シトルリンを0.12 g/kgで投与した。先行研究及び本研究の動物実験の結果を踏まえてロイシン及びL-シトルリンの投与量に着目すると、ロイシンの投与量に対してL-シトルリンの投与量が低値の場合に、L-シトルリンによる筋タンパク質合成への影響が認められない可能性が考えられた。すなわち、特にロイシンは強い筋タンパク質同化作用を示すこ

とから[19,20]、投与量によってはL-シトルリンが筋タンパク質合成の増加に及ぼす影響がマスクされた可能性が考えられた。また、Churchward-Venne et al.の先行研究では、高齢者に対して15 gのホエイタンパク質（ロイシン：1.8 g）及び10 gのL-シトルリンを投与した際に、タンパク質単独投与時と比較して、投与後2.5時間及び5時間に外側広筋の血流、タンパク質合成速度及び筋合成シグナルリン酸化レベルに変化が認められなかった[62]。本先行研究では、血管拡張に対してL-シトルリンの投与量が不十分であった可能性、あるいは評価を行ったタイミングの問題による可能性について言及している。以上より、L-シトルリンと他のアミノ酸あるいはタンパク質を摂取した場合にL-シトルリンが筋タンパク質合成の活性化へ及ぼす影響について一致した見解が得られていない。

研究課題1の実験2ではL-シトルリンの経口投与から30分後に血中L-アルギニン濃度及びNO_x濃度が高値を示したことから、研究課題2においても試験溶液の投与から30分後に評価を行った。一方、前述の各先行研究では投与より2.5-16時間後の異なるタイミングで評価が行われており研究間で統一されていない。筋タンパク質合成に対するL-シトルリンの影響を検証するためには、投与後の経時的な評価をより詳細に行う必要があると考えられた。また、研究課題1において、1.0 g/kgのL-シトルリン経口投与より30分後の血中L-シトルリン濃度及びL-アルギニン濃度はそれぞれ 2230.0 ± 192.3 nmol/mL及び 455.4 ± 18.3 nmol/mLであった。一方、研究課題2においては、PLC（L-シトルリンとして0.12 g/kg）の経口投与より30分後の血中L-シトルリン濃度及びL-アルギニン濃度はそれぞれ 474.6 ± 253.8 nmol/mL及び 281.6 ± 63.6 nmol/mLであった。これらより、研究課題2ではL-シトルリン投与後に骨格筋への物質送達増加に寄与するアミノ酸の血中濃度の上昇が不十分であった可能性が考え

られた。さらに、先行研究においてタンパク質あるいはロイシンと L-シトルリンの投与量の比に着目した検討が行われていないことから、これらの最適な比についても検討を行う必要がある。以上より、筋タンパク質合成に対する L-シトルリン摂取の効果検討において、L-シトルリン投与後の評価のタイミング、L-シトルリンの投与量、L-シトルリンと他のタンパク質・アミノ酸との投与量比に着目した詳細な検討が今後の課題として考えられる。

本研究において STZ 誘発糖尿病モデルラットのヒラメ筋における p70S6K トータルタンパク質に着目すると、タンパク質、ロイシン及び L-シトルリンの混合物の経口投与により、その発現量の有意な増加が確認された (Fig. 3-2B)。一方、タンパク質及びロイシンの混合物のみの投与によっては同様な増加は認められなかった。先行研究では、24 日間隔日で行った抵抗運動によって、ラット骨格筋における p70S6K トータルタンパク質の発現及び骨格筋量の有意な増加が報告されている[128]。本研究における p70S6K トータルタンパク質の発現量の増加は、タンパク質、ロイシン及び L-シトルリンの摂取に応答して mTORC1 シグナル経路のキャパシティを増強し、骨格筋量の増加に寄与する可能性が示唆された。

本章では、STZ 誘発糖尿病モデルラットにおいて、タンパク質及びロイシンの混合物の経口投与が mTORC1 下流の筋タンパク質合成シグナル因子を活性化することを確認した。一方、当該混合物における L-シトルリン添加により血中 L-シトルリン濃度は増加したが、筋タンパク質合成シグナル因子の活性化に有意な差は認められなかった。L-シトルリンの摂取が、骨格筋への物質の送達量の増加により骨格筋の筋タンパク質合成を増加させるか今後更なる検討が必

要である。

L-シトルリンを含むタンパク質及びロイシンからなる混合物の摂取が筋タンパク質合成に及ぼす影響について検証を行うべく、筋タンパク質合成が低下した他の病態モデルを用いた検討が今後の課題として挙げられる。そこで、研究課題3においては、不活動により惹起される廃用性筋萎縮モデルを用いて、タンパク質、ロイシン及びL-シトルリンの摂取が骨格筋の筋タンパク質合成及び分解に及ぼす影響について検討を行い、当該混合物による栄養介入と運動の組み合わせが骨格筋へ及ぼす影響について評価した。

4. 第四章【研究課題3】 廃用性筋萎縮モデルラットにおける L-シトルリンを含むタンパク質・ロイシンの混合物の経口摂取及び間欠的運動負荷の併用が骨格筋に及ぼす影響の検討

4.1 背景と目的

骨格筋量は骨格筋のタンパク質の合成と分解のバランスによって決定される[129]。骨格筋量の維持及び増加のためには、筋タンパク質の合成を増加させ分解を減少させることが重要である。運動や摂取したタンパク質由来のアミノ酸は筋タンパク質合成を亢進させることが報告されている[18,22]。アミノ酸による筋タンパク質合成については特にロイシンに強い同化作用が認められている[19,20]。筋タンパク質合成に関わる中心的な経路である mTORC1 シグナル経路において、insulin-like growth factor-1 (IGF-1) は受容体に結合後、下流の phosphoinositide 3-kinase (PI3K) 及び Akt をリン酸化することで活性化し、その結果 mTORC1 が活性化される[23]。mTORC1 の標的タンパク質としては p70S6K が報告されており、その下流の rpS6 をリン酸化することでタンパク質合成が促進される[119]。運動は Akt を介して mTORC1 を活性化し、BCAA は mTORC1 を直接活性化することで筋タンパク質合成を増加させると考えられている[119,130]。

骨格筋の萎縮は加齢や飢餓、不活動、癌悪液質、糖尿病、慢性腎疾患など多くの病態において惹起される[9-12]。骨格筋萎縮の原因の一つである廃用性筋萎縮は、固定処置、寝たきり及び微小重力環境下等で引き起こされ、顕著な骨格筋の萎縮を生じる[131]。超高齢化社会を迎えた本国においては寝たきり患者の数が増加し続けており、介護問題や医療費の増大など社会的な問題となっている。しかしながら、現在行われている廃用性筋萎縮に対する予防・治療法

は、運動トレーニングなどの運動療法のみであり、食事療法や薬物療法も未だその効果が確立していない。そのため、廃用性筋萎縮において骨格筋量を維持・増加するための栄養介入及び運動方法の確立は重要であり早急に解決すべき課題である。

Dupont et al.は、後肢懸垂による廃用性筋萎縮モデルラットのヒラメ筋で Akt、mTORC1 及び p70S6K のリン酸化が低下することを報告した[132]。すなわち、廃用性筋萎縮では mTORC1 シグナル経路の減弱により筋タンパク質合成が低下する可能性が考えられている[24,133]。また、7 日間の後肢懸垂による廃用性筋萎縮モデルラットでは、運動介入として 4 時間/日の間欠的再過重負荷 (intermittent loading; IL) により、ヒラメ筋において mTORC1 シグナル経路の活性化を介した骨格筋横断面積の増加が報告されている[134]。一方、廃用性筋萎縮において、筋萎縮を抑制する IL とタンパク質・アミノ酸の投与の併用効果については不明である。

不活動に伴う骨格筋量の減少においては、筋タンパク質合成の低下に加え、筋タンパク質分解が顕著に亢進していることが報告されている[132,135-137]。骨格筋のタンパク質を分解する主な経路としてはユビキチン・プロテアソーム系及びオートファジー・リソソーム系が存在することが報告されている[30]。不活動に伴う筋萎縮においてユビキチン・プロテアソーム系を阻害することにより骨格筋の萎縮が軽減されることから、ユビキチン・プロテアソーム系が主要な分解系であることが示唆されている[135-137]。骨格筋特異的な E3 ユビキチンリガーゼである muscle atrophy F-box (MAFbx) /Atrogin-1 及び muscle ring finger 1 (MuRF1) の遺伝子発現は様々な骨格筋萎縮モデルにおいて惹起され、これらの遺伝子はユビキチン・プロテアソーム系における骨格筋萎縮の分子マーカーとして用いられる[138,139]。後肢懸垂による廃用性筋萎縮モデルラット

では、ILによりヒラメ筋において Atrogin-1 及び MuRF1 の遺伝子発現の抑制が報告されている[134]。また、14日間の後肢懸垂による筋萎縮に対して、長期的な BCAA の経口投与によりラット骨格筋横断面積の増加及び、骨格筋 Atrogin-1 及び MuRF1 の遺伝子発現の減少が報告されている[140,141]。

また、絶食や、除神経による不活動モデルでは、骨格筋のオートファジー関連遺伝子の発現が増加することが報告されており[142]、オートファジー・リソソーム系も骨格筋萎縮に対して重要な分解系であることが示唆されている。オートファゴソーム膜に特異的に結合するタンパク質である LC3-II (LC3-I に phosphatidylethanolamine が結合した形) の量はオートファゴソーム形成と正の相関を示すことから、オートファジーの誘導のマーカーとして使用されている[143]。また、ULK1 は ULK1 複合体の構成因子の一つであり、ULK1 の Ser757 のリン酸化はオートファジーの抑制に関わることが示されている[144,145]。不活動モデルラットを用いた研究においては、14日間の後肢懸垂でヒラメ筋及び腓腹筋でオートファジー・リソソーム系が活性化されたという報告がある[146]。一方、同様な条件下で腓腹筋及び大腿四頭筋においては有意な変化がみられなかったとする報告もある[147]。廃用性筋萎縮におけるオートファジー・リソソーム系の関与については不明な点が多い。

研究課題1においては、正常ラットにおいて L-シトルリンが NO 産生増加を介して骨格筋への物質送達を増加する可能性を示した。また、血管内皮機能の低下及び骨格筋の萎縮が認められる STZ 誘発糖尿病モデルラットにおいても L-シトルリン摂取による骨格筋への物質送達の増加が確認された。研究課題2では、STZ 誘発糖尿病モデルラットにおいてタンパク質、ロイシン及び L-シトルリンの混合物の投与を行い、筋タンパク質合成シグナル因子の活性化の増加を確認した。そこで、研究課題3では、廃用性筋萎縮において運動及び L-シト

ルリンを含むタンパク質及びロイシンからなる混合物の摂取の併用が筋萎縮を効果的に抑制すると仮説を立てた。この仮説を検証するにあたり、骨格筋萎縮を検討するうえで確立された動物モデルである後肢懸垂による廃用性筋萎縮モデルラットを選択した。廃用性筋萎縮モデルラットを用いて、IL 及び L-シトルリンを配合した高タンパク質配合液体栄養補助食品 (high-protein liquid oral nutritional supplement; HP) の経口投与を行い、ヒラメ筋及び腓腹筋において、骨格筋重量、筋タンパク質合成 (mTORC1 シグナル経路) 及び分解 (ユビキチン・プロテアソーム系及びオートファジー・リソソーム系) に関わる遺伝子及びタンパク質の発現に対する影響を評価した。

4.2 材料と方法

実験動物と試験デザイン

本実験は、株式会社大塚製薬工場の動物実験指針に従い、大塚製薬工場の動物実験倫理委員会の承認を得て実施した (承認番号: OPFCAE-18-398)。本実験の試験デザインを Fig. 4-1 に示す。実験動物には、9 週齢の雄性 F344 ラット (F344/DuCrIj) (日本チャールス・リバー株式会社) を用いた。この系統のラットは継時的な体重増加が比較的少ないことから後肢懸垂モデルに適していると考えられ、一般的に用いられている。飼育は室温 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 15\%$ 、明暗サイクル 12 時間 (明期: 7:00 a.m. – 7:00 p.m.) の環境下で行った。14 日間の馴化期間を設け、順化終了後に次の 4 グループに群分けした: 通常飼育群 (CON, $n = 6$)、後肢懸垂群 (HU, $n = 9$)、後肢懸垂中に IL を実施する群 (HU + IL, $n = 10$)、及び後肢懸垂中に IL 及び HP 経口投与を行う群 (HU + IL + HP, $n = 10$)。HU 群、HU + IL 群及び HU + IL + HP 群のラットは 14 日間非荷重状態とした。試験期間中は標準飼料 AIN-93G (オリエンタル酵母工業株式会

社) をベースとした 10%カゼイン配合実験飼料を 9 g/日 (タンパク質: 4.1 g/kg/日) で pair-feeding し、水を自由摂取させた。HU + IL + HP 群の動物には、液体栄養補助食品 HP を 15 mL/kg で 1 日 2 回 (9:00 a.m.及び 5:00 p.m.) 経口投与した。試験溶液の栄養成分組成及び投与量を Table 4-1 及び Table 4-2 に示した。HP はタンパク質源として 4.8 g/100 mL のミルクタンパク質及び 2.0 g/100 mL のホエイタンパク質を含んでおり、遊離アミノ酸として 1.1 g/100 mL のロイシン及び 0.8 g/100 mL の L-シトルリンを含んでいる。他の群の全てのラットには HP 中の全てのタンパク質を非必須アミノ酸 (NEAA; 等量のモルのアラニン、グリシン、プロリン、グルタミン酸、アスパラギン酸及びセリン) に置き換えた対照食品を同用量及び同タイミング (9:00 a.m.及び 5:00 p.m.) で経口投与した。摂餌量を試験期間中毎日 4:00 p.m.に電子天秤で測定した。解剖日前日より 15 時間の絶食後、解剖日に IL 及び経口投与 (9:00 a.m.) を行い、その 30 分後にイソフルラン麻酔下において腹大動脈より血液サンプル、ヒラメ筋及び腓腹筋を採取した。電子精密天秤で骨格筋重量を測定後、組織サンプルを素早く液体窒素で凍結し分析まで -80°C で保存した。

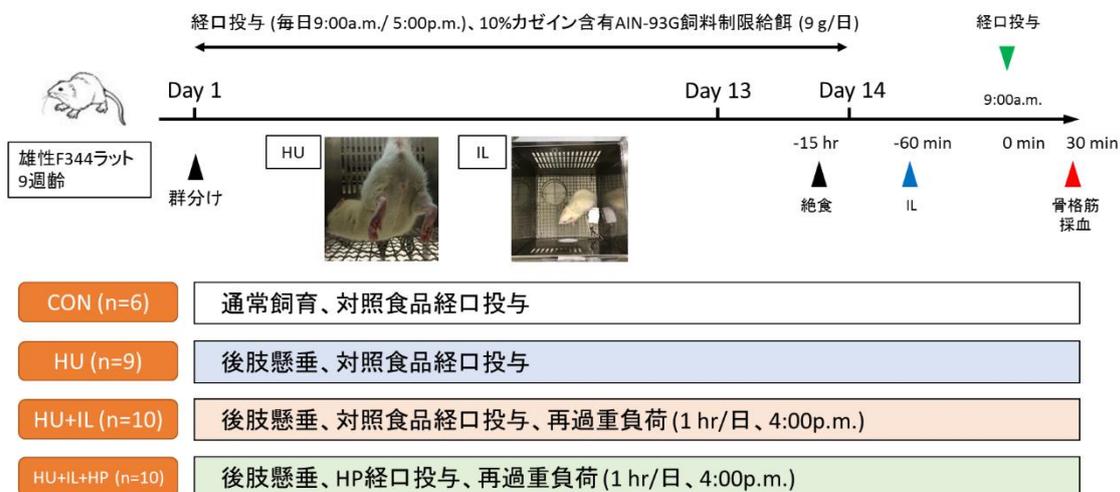


Fig. 4-1. The schedule of examination performed in this study. Four groups of rats were assigned: control (CON, n = 6), hind limb unloading (HU, n = 9), intermittent loading (IL) during HU (HU + IL, n = 10), and IL during HU followed by high-protein oral nutritional supplement (HP) administration (HU + IL + HP, n = 10).

Table 4-1. Macronutrient composition of the HP and control

	HP	Control
Milk protein (g/100 mL)	4.83	0
Whey protein (g/100 mL)	2.00	0
Citrulline (g/100 mL)	0.80	0
Leucine (g/100 mL)	1.14	0
NEAA (g/100 mL)	0	10.72
Fat (g/100 mL)	1.78	1.54
Carbohydrate (g/100 mL)	19.20	17.78

HP, high-protein oral nutritional supplementation; NEAA, non-essential amino acid.

Table 4-2. Dose of the test diets

	HP	Control
Energy (kcal/kg)	19.18	19.20
Protein (g/kg)	1.02	0
Citrulline (g/kg)	0.12	0
Leucine (g/kg)	0.17	0
NEAA (g/kg)	0	1.61
Fat (g/kg)	0.27	0.23
Carbohydrate (g/kg)	2.88	2.67

HP, high-protein oral nutritional supplementation; NEAA, non-essential amino acid.

後肢懸垂及び IL

後肢懸垂は Morey et al. [148]に従い実施した。すなわち、ラットの尾部に接着テープを巻きラットの尾部を釣り上げることで、試験期間中に下肢が地面に接着しないようにした。ラットは地面に対して約 30°の角度を保ち、360°自由な移動及び飼料へのアクセスが可能だった。IL は後肢懸垂を解除し下肢に再過重負荷を加えることで行った。試験期間中は解剖日を除き毎日 4:00 p.m.、解剖日は 8:00 a.m.より IL を開始し、それぞれ 1 時間実施した。

血液分析

血液サンプルは EDTA-2Na を含む採血管に分注後、素早く氷上で冷却した。その後、遠心分離 (4°C、3000 rpm、10 分) を行い、血漿を分離し回収した。すべての血漿サンプルは、-80°C で保存した。血漿アミノ酸濃度は LC/MS 法により決定した (LC-MS2020; Shimadzu Corporation)。

Western Blotting

ウェスタンブロットは先行研究[123]に改変を加えて行った。具体的には、-80°Cで冷凍保存した骨格筋サンプルについて30 mgを200 µLのRIPAバッファ（Cell Signaling Technology）に加えホモジナイズした。RIPAバッファには事前にプロテアーゼインヒビターミクスチャー（cOmplete Mini; EDTA-free; Roche）及びホスファターゼインヒビターミクスチャー（PhosSTOP; Roche）を適量加えた。遠心分離（15000 rpm、10分、4°C）を行った後に上清を回収し、プロテインアッセイラピッドキットワコーII（和光純薬工業株式会社）を用いてタンパク質濃度を決定した。サンプルを3×サンプルバッファ（Cell Signaling Technology）で調製し、97°Cで7分間煮沸した。SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて、30 µgのタンパク質を電気泳動し分離後、ポリフッ化ビニリデンメンブレンに転写した。転写後、0.05%のTween 20を含むトリス緩衝生理食塩水（TBS-T, pH 7.6）でメンブレンを洗浄し、5%ウシ血清由来アルブミンを含むTBS-Tに浸し、室温で1時間ブロッキングを行った。その後、メンブレンをTBS-Tで洗浄し一次抗体に4°Cで一晩反応させた。一次抗体としては、phospho-Akt (Ser473) (cat. no. 9271)、total Akt (cat. no. 9272)、phospho-p70 S6 Kinase (Thr389) (cat. no. 9205)、total p70 S6 Kinase (cat. no. 2708)、phospho-S6 ribosomal protein (Ser240/244) (cat. no. 2215)、total S6 ribosomal protein (cat. no. 2217)、LC3B (cat. no. 2775)、phospho-ULK1 (Ser757) (cat. no. 14202)、total ULK1 (cat. no. 8054)（いずれも Cell Signaling Technology）を用いた。メンブレンを再びTBS-Tで洗浄し、二次抗体を用いて室温で1時間反応を行った。化学発光基質試薬（Luminata Western HRP substrate; Merck）を用いてタンパク質のバンドのシグナル強度を検出した。デジタルイメージングシステム（Molecular Imager VersaDoc™ MP 500; BIORAD）によりスキャンし、シグナル強度の解析

には ImageJ 1.50i (National Institutes of Health) を使用した。目的のタンパク質のリン酸化レベルは、リン酸化タンパク質のシグナル強度を対応するタンパク質のトータルのシグナル強度で補正した。オートファジー・リソソーム系は LC3B II/I 比により評価を行った。

TaqMan 定量 RT-PCR

20 mg の骨格筋サンプルを用いて RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (QIAGEN、ヒルデン、ドイツ) によりトータル RNA を抽出した。トータル RNA 濃度は紫外可視分光光度計 (NanoDrop 2000c; Thermo Fisher Scientific、マサチューセッツ、米国) を用いて決定した。Atrogin-1 (Rn00591730_m1) 及び MuRF-1 (Rn00590197_m1) について mRNA 発現レベルを TaqMan[®] Gene Expression assays (Applied Biosystems、マサチューセッツ、米国) により定量化した。ノーマライゼーション遺伝子としては 18S rRNA (Rn03928990_g1) を用いた。RT-PCR は TaqMan[®] RNA-to-CT 1-Step Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いた。60 ng のトータル RNA に対して 10 μ L TaqMan[®] RT-PCR Mix、0.5 μ L TaqMan RT Enzyme mix、5.5 μ L RNase-free water 及び 1 μ L TaqMan[®] Gene Expression assays を 1 反応として混合した。7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用いて次の条件により RT-PCR を行った: 48°C 15 分及び 95°C 10 分の反応後、95°C 15 秒及び 60°C 1 分の反応を 40 サイクル行った。遺伝子発現は $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法により算出し[149]、ノーマライゼーション遺伝子発現により補正を行った。目的の遺伝子及びノーマライゼーション遺伝子の増幅効率がほぼ同等であることを確認した。

統計処理

データは平均値 ± 標準偏差 (SD) で示した。体重、摂取熱量及び骨格筋重量について、CON 群及び HU 群の 2 群間の差を対応のない t 検定で解析した。また、これらの項目について HU 群、HU + IL 群及び HU + IL + HP 群の 3 群間の比較には、one-way ANOVA で評価後、有意差が認められた場合は post hoc テストとして Tukey 多重比較検定で解析した。血漿アミノ酸濃度、タンパク質及び遺伝子発現レベルについて、CON 群及び HU 群の 2 群間の差を Mann-Whitney の U 検定で解析した。また、これらの項目について HU 群、HU + IL 群及び HU + IL + HP 群の 3 群間の比較には、ノンパラメトリックな ANOVA である Kruskal-Wallis 検定で評価後、有意差が認められた場合は Steel-Dwass 検定で解析した。骨格筋重量及び筋タンパク質合成シグナルの活性化の相関は、Pearson の相関係数を用いて解析した。統計処理は、EXSUS 7.7 (株式会社 CAC エクシケア) を使用した。有意水準は $p < 0.05$ とし、HU 群、HU + IL 群及び HU + IL + HP 群の 3 群間の異なる文字間には有意差が存在することを示す。

4.3 結果

体重、摂取熱量と骨格筋重量

体重、摂取熱量、及び骨格筋重量を Table 4-3 にまとめた。14 日間の後肢懸垂後に体重は有意に減少した ($p < 0.05$)。平均摂取熱量は、CON 群と比較して HU 群で有意に減少したが ($p < 0.05$)、HU 群、HU + IL 群及び HU + IL + HP 群間で有意な差は認められなかった。体重あたりのヒラメ筋重量について、CON 群と比較して HU 群で 58.5% まで減少した ($p < 0.05$)。相対的なヒラメ筋重量について、IL を行った HU + IL 群では HU 群と比較して有意に増加したが ($p < 0.05$)、HU + IL 群と HU + IL + HP 群間で差は認められなかった。体重あたりの腓腹筋重量は、CON 群と比較して後肢懸垂により 89.4% に減少した ($p <$

0.05)。また、HU 群と比較して HU + IL 群で有意に増加し ($p < 0.05$)、さらに HU + IL 群と比較して HU + IL + HP 群で有意に増加した ($p < 0.05$)。

Table 4-3. Body weight, caloric intake, and absolute and relative skeletal muscle mass.

	CON	HU	HU + IL	HU + IL + HP
Body weight before HU (g)	221.1 ± 8.6	214.8 ± 7.2	212.4 ± 11.8	215.1 ± 7.2
Body weight after HU (g)	211.4 ± 6.4	186.1 ± 7.2 *	186.9 ± 4.7	190.8 ± 7.7
Caloric intake (kcal/day)	44.3 ± 0.2	43.5 ± 0.4 *	43.4 ± 0.4	43.5 ± 0.4
Soleus muscle (mg)	76.5 ± 3.8	39.3 ± 3.3 * ^a	51.5 ± 3.2 ^b	53.0 ± 3.8 ^b
Soleus muscle /body weight (mg/g)	0.36 ± 0.01	0.21 ± 0.02 * ^a	0.28 ± 0.02 ^b	0.28 ± 0.02 ^b
Gastrocnemius muscle (mg)	957.5 ± 36.4	753.3 ± 41.0 * ^a	783.2 ± 26.9 ^a	825.7 ± 41.0 ^b
Gastrocnemius muscle /body weight (mg/g)	4.5 ± 0.1	4.0 ± 0.1 * ^a	4.2 ± 0.1 ^b	4.3 ± 0.1 ^c

Four groups of rats were assigned: control (CON, n = 6), hind limb unloading (HU, n = 9), intermittent loading (IL) during HU (HU + IL, n = 10), and IL during HU followed by high-protein oral nutritional supplement (HP) administration (HU + IL + HP, n = 10). The data shown represent the mean ± standard deviation. * $p < 0.05$: compared with CON. a,b, and c: the different letters indicate significant differences among the HU, HU + IL, and HU + IL + HP groups ($p < 0.05$).

血漿アミノ酸濃度

血漿アミノ酸濃度を Table 4-4 に示した。最後の経口投与より 30 分後に血液サンプルを採取し、LC/MS 法により測定した。血漿 BCAA、EAA 及びロイシン濃度は、HU 群及び HU + IL 群と比較して HU + IL + HP 群で有意に増加した

($p < 0.05$)。血漿 L-アルギニン及び L-シトルリン濃度についても同様に、HU 群及び HU + IL 群と比較して HU + IL + HP 群で有意に増加した ($p < 0.05$)。

Table 4-4. Plasma amino acid concentrations.

	CON	HU	HU + IL	HU + IL + HP
Arginine (nmol/mL)	185.5 ± 15.2	129.3 ± 11.3 ^{*,a}	135.8 ± 17.5 ^a	172.1 ± 27.2 ^b
Citrulline (nmol/mL)	85.5 ± 6.7	61.4 ± 5.1 ^{*,a}	66.6 ± 9.1 ^a	285.4 ± 54.4 ^b
Isoleucine (nmol/mL)	86.7 ± 13.1	103.7 ± 10.3 [*]	98.3 ± 15.6	110.0 ± 19.6
Leucine (nmol/mL)	127.7 ± 20.7	160.5 ± 18.5 ^{*,a}	155.7 ± 28.7 ^a	481.0 ± 70.8 ^b
Ornithine (nmol/mL)	62.7 ± 3.2	56.0 ± 4.8 [*]	60.6 ± 8.2	63.1 ± 9.1
Valine (nmol/mL)	155.7 ± 18.4	188.1 ± 14.8 ^{*,a}	177.8 ± 28.1 ^a	227.0 ± 29.0 ^b
EAA (nmol/mL)	1334.5 ± 140.1	1375.7 ± 89.9 ^a	1366.1 ± 129.5 ^a	1837.3 ± 200.0 ^b
BCAA (nmol/mL)	370.1 ± 51.5	452.3 ± 42.1 ^{*,a}	431.9 ± 72.0 ^a	818.0 ± 117.3 ^b

Four groups of rats were assigned: control (CON, $n = 6$), hind limb unloading (HU, $n = 9$), intermittent loading (IL) during HU (HU + IL, $n = 10$) and IL during HU followed by high-protein oral nutritional supplement (HP) administration (HU + IL + HP, $n = 10$). Plasma samples were collected 30 min after the last IL and oral administration. Data are shown as the mean ± standard deviation. * $p < 0.05$: compared with the CON group. a and b: the different letters indicate significant differences among the HU, HU + IL, and HU + IL + HP groups ($p < 0.05$). EAA, essential amino acid; BCAA, branched-chain amino acid.

Akt、p70S6K 及び rpS6 のリン酸化レベル

Akt (Ser473)、p70S6K (Thr389) 及び rpS6 (Ser240/244) のリン酸化レベルを Fig. 4-2 に示した。ヒラメ筋において、p70S6K 及び rpS6 のリン酸化レベルは HU 群と比較して HU + IL 群及び HU + IL + HP 群で有意に増加した ($p <$

0.05, Fig. 4-2B, C)。いずれのタンパク質のリン酸化レベルにおいても、HU + IL 群及び HU + IL + HP 群間で有意な差は認められなかった。腓腹筋において、Akt のリン酸化レベルは HU 群と比較して HU + IL + HP 群で有意に増加した ($p < 0.05$, Fig. 4-2D)。また、腓腹筋の p70S6K 及び rpS6 のリン酸化レベルは HU 群と比較して HU + IL 群で有意に増加し ($p < 0.05$, Fig. 4-2E, F)、さらに HU + IL 群と比較して HU + IL + HP 群で有意に増加した ($p < 0.05$)。

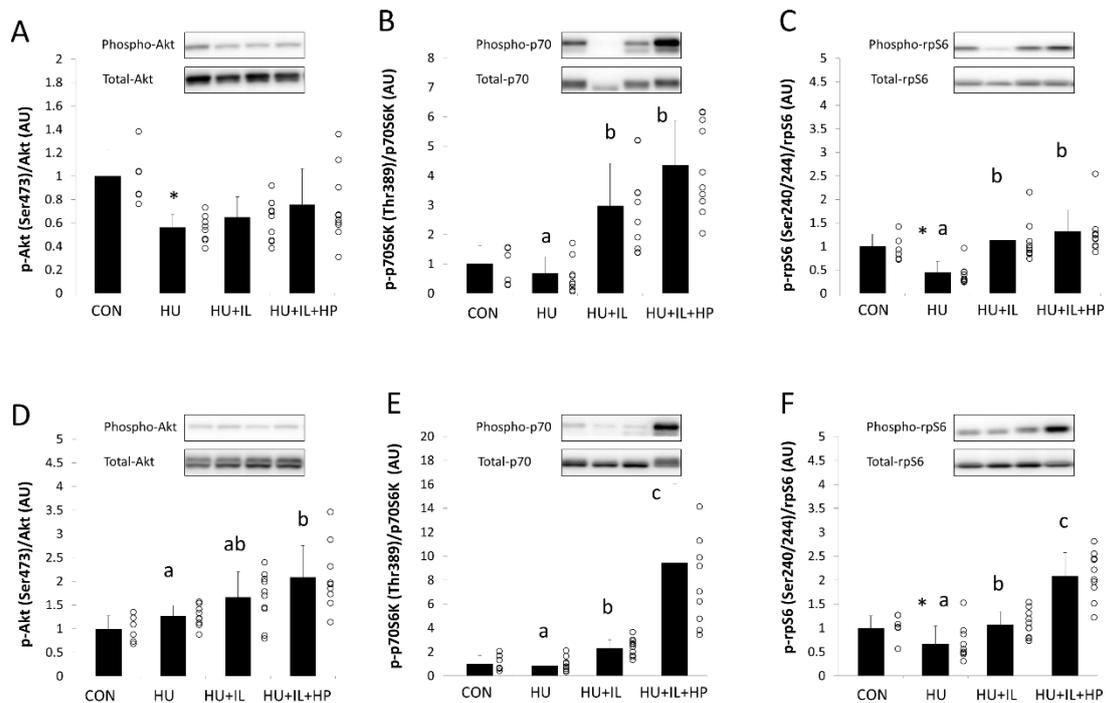


Fig. 4-2. Effects of intermittent loading (IL) and high-protein oral nutritional supplement (HP) administration on the expression levels of phosphorylated Akt (Ser473), p70S6K (Thr389), and rpS6 (Ser240/244) in (A–C) soleus muscle and (D–F) gastrocnemius muscle. Four groups of rats were assigned: control (CON, $n = 6$), hind limb unloading (HU, $n = 9$), IL during HU (HU + IL, $n = 10$), and IL during HU

followed by HP administration (HU + IL + HP, n = 10). The data are shown as the mean \pm standard deviation. * $p < 0.05$, compared with the CON group. a, b, and c: different letters indicate significant differences among the HU, HU + IL, and HU + IL + HP groups ($p < 0.05$). Circles represent individual data points in each group. AU, arbitrary unit.

Atrogin-1 及び MuRF1 の遺伝子発現レベル

ユビキチン・プロテアソーム系のマーカーである Atrogin-1 及び MuRF1 の遺伝子発現レベルの結果を Fig. 4-3 に示した。ヒラメ筋において Atrogin-1 及び MuRF1 の mRNA 発現レベルは、CON 群と比較して HU 群で有意に増加し ($p < 0.05$, Fig. 4-3A, B)、HU 群と比較して HU + IL 群及び HU + IL + HP 群で有意に減少した ($p < 0.05$)。腓腹筋においても Atrogin-1 及び MuRF1 の mRNA 発現レベルは CON 群と比較して HU 群で有意に増加し ($p < 0.05$, Fig. 4-3C, D)、Atrogin-1 の mRNA 発現レベルは HU 群と比較して HU + IL 群及び HU + IL + HP 群で有意に減少した ($p < 0.05$)。ヒラメ筋及び腓腹筋いずれの骨格筋においても Atrogin-1 及び MuRF1 の mRNA 発現レベルについて、HU + IL 群及び HU + IL + HP 群間で有意な差は認められなかった。

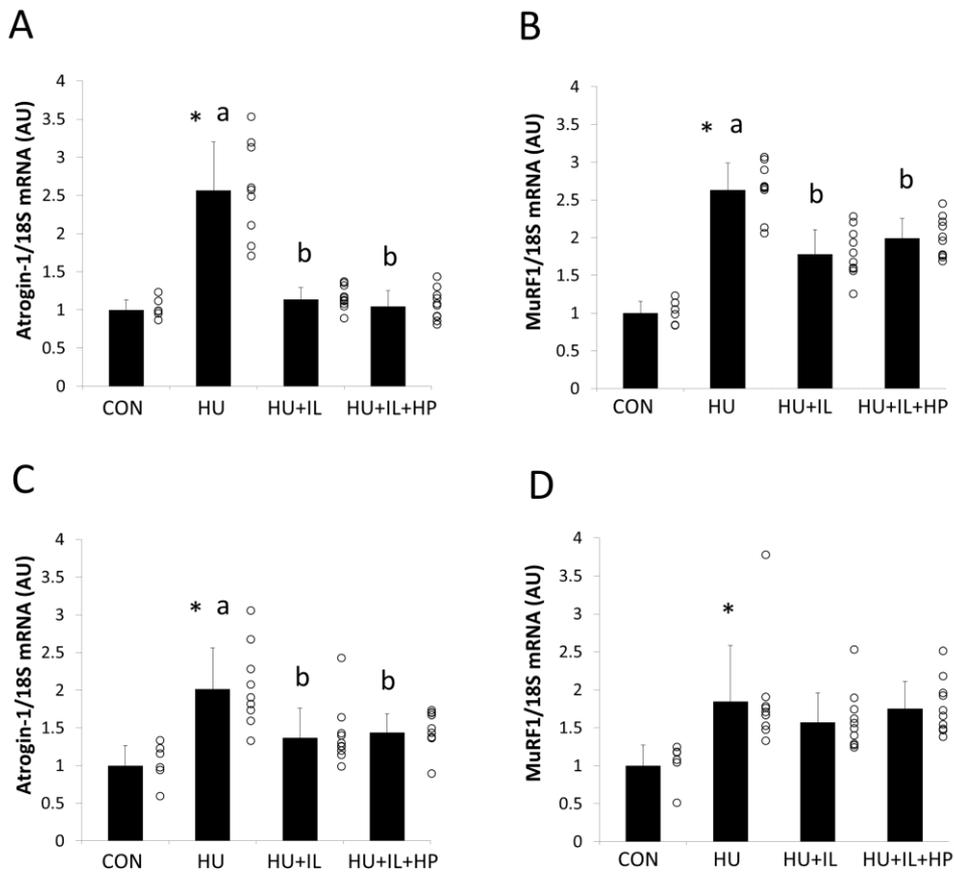


Fig. 4-3. Effects of intermittent loading (IL) and high-protein oral nutritional supplement (HP) administration on the mRNA expression levels of atrogin-1 and MuRF1 in (A,B) soleus muscle and (C,D) gastrocnemius muscle. Four groups of rats were assigned: control (CON, n = 6), hind limb unloading (HU, n = 9), IL during HU (HU + IL, n = 10), and IL during HU followed by HP administration (HU + IL + HP, n = 10). The data are shown as the mean \pm standard deviation. * $p < 0.05$, compared with the CON group. a and b: different letters indicate significant differences among the HU, HU + IL, and HU + IL + HP groups ($p < 0.05$). Circles represent individual data points in each group. AU, arbitrary unit.

オートファジー関連遺伝子 LC3-II と ULK1

オートファジー制御に関わる LC3B II の発現量及び ULK1 (Ser757) のリン酸化レベルの結果を Fig. 4-4 に示した。ヒラメ筋及び腓腹筋において、LC3B II/LC3B I 比は CON 群と比較して HU 群で有意に増加した ($p < 0.05$, Fig. 4-4A, C)。ヒラメ筋及び腓腹筋における LC3B II/LC3B I 比は、HU 群と比較して HU + IL 群及び HU + IL + HP 群で有意に減少したが ($p < 0.05$, Fig. 4-4A, C)、HU + IL 群及び HU + IL + HP 群間で有意な差は認められなかった。ULK1 (Ser757) のリン酸化レベルは、ヒラメ筋では HU 群と比較して HU + IL 群及び HU + IL + HP 群で有意に増加し ($p < 0.05$, Fig. 4-4B)、腓腹筋では HU 群及び HU + IL 群と比較して HU + IL + HP 群で有意に増加した ($p < 0.05$, Fig. 4-4D)。

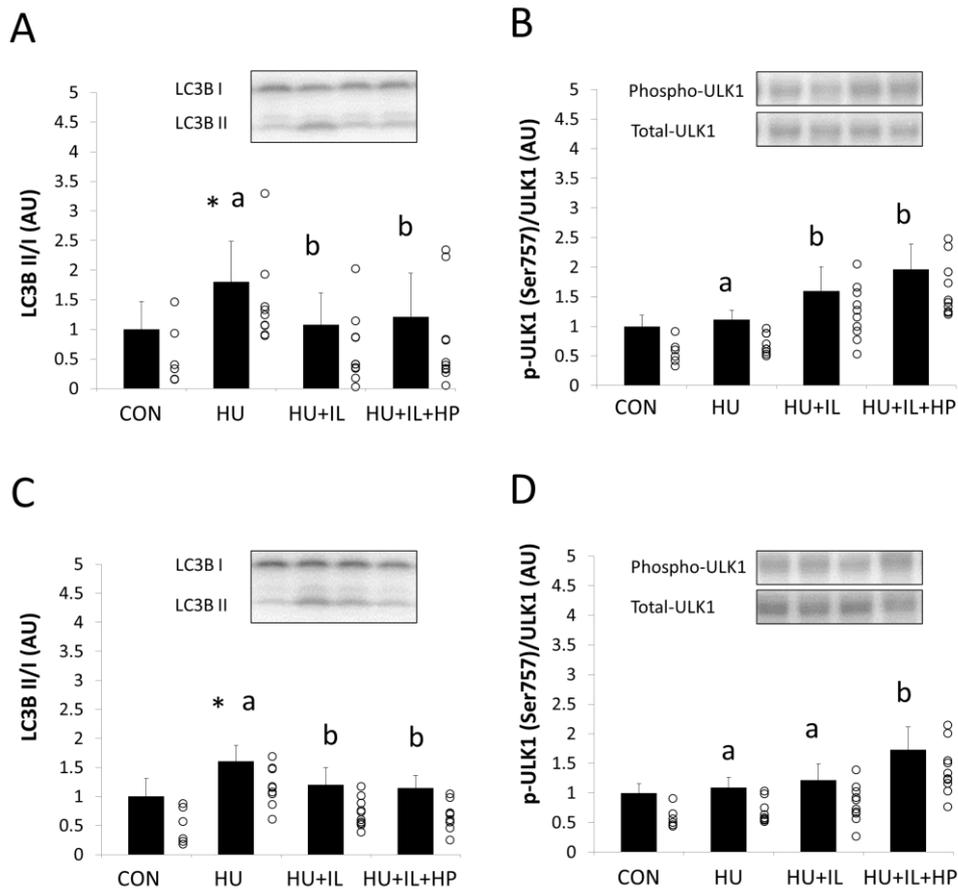


Fig. 4-4. Effects of intermittent loading (IL) and high-protein oral nutritional supplement (HP) administration on the LC3B II/I ratio and levels of phosphorylated ULK1 in (A,B) soleus muscles and (C,D) gastrocnemius muscles. Four groups of rats were assigned: control (CON, n = 6), hind limb unloading (HU, n = 9), IL during HU (HU + IL, n = 10), and IL during HU followed by HP administration (HU + IL + HP, n = 10). The data are shown as the mean \pm standard deviation. * $p < 0.05$: compared with the CON group. a and b: different letters indicate significant difference among the HU, HU + IL, and HU + IL + HP groups ($p < 0.05$). Circles represent individual data points in each group. AU, arbitrary unit.

骨格筋重量と p70S6K あるいは rpS6 のリン酸化レベルの相関関係

体重あたりのヒラメ筋重量あるいは腓腹筋重量、及びそれぞれの骨格筋における p70S6K あるいは rpS6 のリン酸化レベルの相関関係を Fig. 4-5 に示した。ヒラメ筋重量と p70S6K のリン酸化レベルに有意な正の相関が認められ ($r = 0.56, p = 0.0015, \text{Fig. 4-5A}$)、ヒラメ筋重量と rpS6 のリン酸化レベルに有意な正の相関が認められた ($r = 0.66, p = 0.0001, \text{Fig. 4-5B}$)。また、腓腹筋重量と p70S6K のリン酸化レベルに有意な正の相関が認められ ($r = 0.68, p = 0.0001, \text{Fig. 4-5C}$)、腓腹筋重量と rpS6 のリン酸化レベルに有意な正の相関が認められた ($r = 0.58, p = 0.0011, \text{Fig. 4-5D}$)。

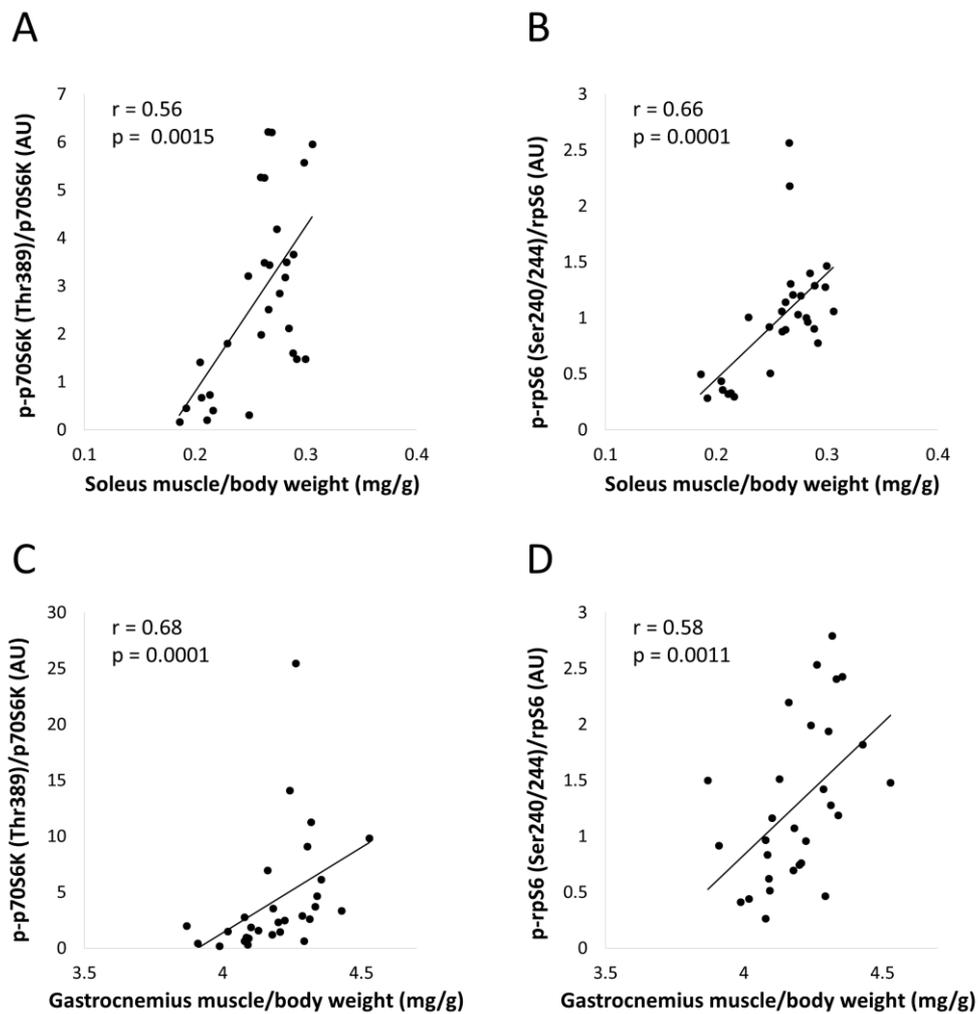


Fig. 4-5. Correlations between relative soleus muscle mass and (A) p70S6K phosphorylation or (B) rpS6 phosphorylation, and relative gastrocnemius muscle mass and (C) p70S6K phosphorylation or (D) rpS6 phosphorylation.

4.4 考察

廃用性筋萎縮において運動及びタンパク質あるいはアミノ酸投与の併用が骨格筋へ及ぼす影響を検討した報告はない。研究課題3では、後肢懸垂による廃用性筋萎縮モデルラットにIL及びL-シトルリンを含むHPの経口投与を行い、

筋タンパク質合成及び分解に関わる遺伝子及びタンパク質発現レベルに対する影響を評価した。HPの投与により血中EAA、BCAA、ロイシン、L-アルギニン及びL-シトルリン濃度が有意に増加した。腓腹筋において、IL単独よりもILとHP投与を組み合わせることで体重あたりの骨格筋重量及びmTORC1シグナル経路の下流のp70S6K及びrpS6のリン酸化レベルが有意に増加した。このとき、体重あたりのヒラメ筋あるいは腓腹筋の重量は、p70S6KあるいはrpS6のリン酸化レベルとそれぞれ有意な正の相関を示した。いずれの骨格筋においても後肢懸垂により遺伝子発現が惹起されたユビキチン・プロテアソーム系及びオートファジー・リソソーム系はILにより抑制されたが、ILとHP投与の併用はILの効果に影響を及ぼさなかった。以上より、IL単独よりもILとHP投与を併用することによって、mTORC1シグナル経路の活性化を介して廃用性筋萎縮に対する抑制効果が増強する可能性が示された。

p70S6K及びrpS6のリン酸化はmTORC1シグナル経路の活性化の指標であり、筋タンパク質合成に関与している[119]。廃用性筋萎縮ではmTORC1シグナル経路の活性の低下により筋タンパク質合成が低下することが知られている[24,133]。7日間、14日間及び28日間の後肢懸垂による筋萎縮において、いずれの期間においてもラットヒラメ筋のmTORC1及びp70S6Kのリン酸化が低下することが報告されている[132]。本研究では、ヒラメ筋及び腓腹筋におけるrpS6のリン酸化は14日間の後肢懸垂により有意に低下した。後肢懸垂により相対的なヒラメ筋重量及び腓腹筋重量が減少したが、これはmTORC1シグナル経路の活性の減弱が一つの原因である可能性が考えられた。Miyazaki et al.は、7日間の後肢懸垂による廃用性筋萎縮モデルラットにおいて、ILはヒラメ筋におけるmTORC1のリン酸化を増加させると報告している[134]。本研究におい

て、後肢懸垂により筋萎縮が惹起されたラットに対して1時間/日のILを行ったところ、ヒラメ筋だけではなく腓腹筋においてp70S6K及びrpS6のリン酸化が有意に増加した。さらにHPの投与を組み合わせることで、腓腹筋においてp70S6K及びrpS6のリン酸化をより増加させ、後肢懸垂に供した動物における相対的な腓腹筋重量はILとHPを組み合わせた際に最も高値を示した。一方、ヒラメ筋においてはHP投与の効果は認められなかった。骨格筋線維はType I線維とType II線維に大別されるが、ラットのヒラメ筋ではType I線維が約83%を占めるのに対して、腓腹筋においてはType I線維とType II線維はそれぞれ10%及び90%の比率で存在する[90]。Type II線維ではp70S6K トータルタンパク質の発現量がType I線維より高いことがラット及びヒトで報告されており[150,151]、mTORC1シグナル経路のキャパシティが高いことが示唆される。これより、HP投与の効果がヒラメ筋及び腓腹筋で異なったのは、骨格筋線維タイプごとのアミノ酸に対する応答性の違いによる可能性が考えられた。すなわち、腓腹筋はヒラメ筋よりもアミノ酸に対する応答が大きかった可能性が考えられた。しかしながら、骨格筋線維タイプごとのアミノ酸に対する応答性の違いを検討した報告はない。今後は骨格筋線維タイプごとにより詳細な検討を行う必要がある。

骨格筋特異的なE3ユビキチンリガーゼであるAtrogin-1は、筋タンパク質分解を促進する[139]。本研究では、後肢懸垂によりヒラメ筋及び腓腹筋のAtrogin-1のmRNA発現レベルが増加し、ユビキチン・プロテアソーム系が惹起された可能性が考えられた。後肢懸垂による廃用性筋萎縮モデルラットにおいて、ILはヒラメ筋におけるAtrogin-1の発現を抑制することが報告されており[134]、本研究の結果は先行研究と一致した。さらに本研究では、腓腹筋にお

いても IL は廃用性筋萎縮ラットの Atrogin-1 の発現を減少させることが明らかとなった。また、後肢懸垂により増加したヒラメ筋の Atrogin-1 の発現が長期的な BCAA の経口投与により減少したという報告がある[141]。一方、本研究ではヒラメ筋及び腓腹筋のいずれにおいても HP 投与は IL の効果を高めなかったことから、IL を行う際の HP 投与はユビキチン・プロテアソーム系に影響を与えない可能性が考えられた。

Akt は mTORC1 の上流に存在するが、Akt のリン酸化は mTORC1 の活性化を調節している。また、リン酸化された Akt は、Atrogin-1 及び MuRF1 の転写因子である FOXO をリン酸化しその活性を抑制することで筋タンパク質分解を抑制する[12,152-154]。後肢懸垂による廃用性筋萎縮モデルラットにおいて、4 時間/日の IL によりヒラメ筋における Akt のリン酸化が増加したという報告があるが[134]、本研究では 1 時間/日の IL によりヒラメ筋の Akt のリン酸化に変化は見られなかった。これは、本研究と先行研究間の IL の実施時間の違いによる可能性が考えられた。また、除神経誘発性筋萎縮ラットに対する 0.39 g/kg ロイシンの投与によりヒラメ筋の Akt 及び mTORC1 のリン酸化が増加したという報告があるが[155]、後肢懸垂による筋萎縮モデルラットにおいて 0.6 g/kg の BCAA の経口投与によってヒラメ筋の Akt のリン酸化は変化しなかったという報告もある[141]。これらより、廃用性筋萎縮において Akt のリン酸化に対するアミノ酸投与の効果についての結果は一致しておらず、完全な解明には至っていない。本研究において IL と HP を組み合わせた場合に、腓腹筋において Akt のリン酸化が増加することが明らかとなった。IL と HP の組み合わせは Akt のリン酸化の増加を介して mTORC1 シグナル経路の活性化に寄与する可能性が考えられた。

筋タンパク質を分解する機構としてはオートファジー・リソソーム系も挙げられ、LC3-IIは哺乳類のオートファジーのマーカーとして使用されている[143,156]。本研究においては、後肢懸垂によりヒラメ筋及び腓腹筋のLC3B-II/LC3B-I比が増加したことから、後肢懸垂によりオートファジー・リソソーム系が惹起された可能性が考えられた。これは、ヒラメ筋及び腓腹筋におけるMaki et al.やZhang et al.の報告[141,146]と一致したが、一方で大腿四頭筋において後肢懸垂はオートファジー・リソソーム系に影響を及ぼさなかったとするSpeacht et al.の報告[147]とは異なる。これらの違いは評価した骨格筋の違いに起因する可能性が考えられる。筋線維タイプに着目したより詳細な評価が今後必要であると考えられる。本研究の結果から、ヒラメ筋及び腓腹筋においてILは後肢懸垂により誘発されたオートファジー・リソソーム系を抑制することが明らかとなった。一方、ヒラメ筋及び腓腹筋において、さらなるHP投与はオートファジー・リソソーム系を抑制しない可能性が考えられた。Maki et al.は、0.6 g/kgのBCAA投与が後肢懸垂により萎縮したヒラメ筋横断面積を増加したにもかかわらず、後肢懸垂により増加したLC-3 IIの発現量は変化がなかったと報告している[141]。廃用性筋萎縮により惹起されるオートファジーに対するアミノ酸の効果についてはさらなる研究が必要である。また、ULK1複合体の構成因子の一つであるULK1のリン酸化はオートファジー制御に関わることが知られている[144]。活性化されたmTORC1はULK1のSer757をリン酸化し、オートファジー・リソソーム系を抑制する[145,157]。本研究では、腓腹筋においてはILとHP投与の併用がULK1のSer757のリン酸化の増加に影響を及ぼす可能性が考えられた。本研究におけるLC3B-II/LC3B-I比の低下及びULK1の抑制的リン酸化の増加は、mTORC1の活性化による可能性が示唆された。

本研究にはいくつかのリミテーションが存在する。まず、本研究では廃用性筋萎縮モデル動物を用いて検討を行ったが、HPの摂取時にL-シトルリン配合の有無が筋タンパク質合成に及ぼす影響について比較検討を行うことができなかった。身体活動の低下により毛細血管の退行が惹起されることが多くの先行研究で示されている[158-161]。後肢懸垂による廃用性筋萎縮モデルラットでは、ヒラメ筋における毛細血管径、毛細血管体積及び毛細血管/筋線維比の減少が認められており、eNOS発現、血流及び血管内皮機能の低下が示唆されている[162-164]。一方、廃用性筋萎縮におけるL-シトルリンの投与効果については、ギプス固定による廃用性筋萎縮モデルマウスに対する14日間のL-シトルリン投与は骨格筋肥大に影響を及ぼさなかったことが報告されているもの[165]、L-シトルリンが血管内皮機能に及ぼす影響に着目した先行研究は行われていない。廃用性筋萎縮において、L-シトルリンの摂取が血管内皮機能の改善及び骨格筋への物質送達の増加を介して、タンパク質やアミノ酸による筋タンパク質合成作用を増強する可能性についての検討を今後行う必要がある。すなわち、廃用性筋萎縮モデルを用いて、L-シトルリン配合あるいは非配合のタンパク質及びロイシンからなる混合物の摂取が骨格筋への物質送達作用及びmTORC1シグナル経路の活性化に及ぼす影響についての比較検討が必要である。次に、本研究では後肢懸垂中にHP投与のみを行う群を設けなかったため、廃用性筋萎縮に対するILとHP投与の相互作用について解析を行うことができなかった。本研究のpilot studyにおいて、14日間の後肢懸垂による廃用性筋萎縮モデルラットに対して本研究と同用量のHPの経口投与のみを行った場合、後肢懸垂により萎縮したヒラメ筋及び腓腹筋重量に変化は認められなかった。一方、そのpilot studyにおいて、HPの投与により腓腹筋のp70S6K及び

rpS6 のリン酸化レベルは後肢懸垂に供した群と比較してそれぞれ 285.3%及び 108.2%増加した。すなわち、HP の投与により mTORC1 シグナル経路が活性化したにもかかわらず骨格筋重量に変化が認められなかった。最後に、IL と HP の併用の効果はヒラメ筋と腓腹筋で結果が異なったが、線維タイプ特異的ミオシン重鎖タンパク質の免疫染色及び骨格筋の横断面積の測定により、この違いをより詳細に評価できる可能性がある。

本章では、後肢懸垂による廃用性筋萎縮モデルラットにおいて、IL 及び HP の経口投与の併用による骨格筋への影響を筋タンパク質合成及び分解の両側面から評価した。腓腹筋において、IL 単独よりも IL と HP 投与を組み合わせることによって不活動に伴う筋萎縮に対する抑制効果が増強する可能性が考えられ、これは mTORC1 シグナル経路の活性化を介した作用による可能性が考えられた。運動及びタンパク質、ロイシン及び L-シトルリンからなる混合物による栄養介入の併用は、廃用性筋萎縮に対する効果的な予防法の開発に繋がる可能性がある。

5. 第五章 総合討論

摂取したタンパク質由来のアミノ酸の筋タンパク質合成作用は主に BCAA、特にロイシンにおいて強い同化作用が報告されている[19,20]。また、アミノ酸の摂取に関わりなく、血流の増加によっても筋タンパク質合成が増加する可能性が示唆されている[37-39]。しかしながら、食品成分の摂取による骨格筋への栄養素の送達量の増加が、骨格筋の筋タンパク質合成を増加させるかについては十分な検討が行われていない。骨格筋の萎縮は運動機能及び QOL の低下につながるため、骨格筋量を維持・増加するために食品成分の摂取による新規の方法の確立は重要である。本研究では、血管拡張作用を有するアミノ酸である L-シトルリンの摂取が骨格筋への物質送達及び骨格筋タンパク質合成に与える影響について正常動物及び病態モデル動物を用いて評価することを目的として実施した。

研究課題 1 では、L-シトルリンの経口摂取が骨格筋への物質送達量に与える影響について調べた。正常ラットにおいて、L-シトルリンの急性経口投与より 60 分後のヒラメ筋への EBD 送達量が増加した。L-シトルリンの経口投与後早期に NO_x の増加が認められ、NO の血管拡張作用による可能性が考えられた。また、血管内皮機能が報告されている STZ 誘発糖尿病モデルラットにおいて L-シトルリン投与によってヒラメ筋及び腓腹筋への EBD 送達量が増加する可能性が示唆された。

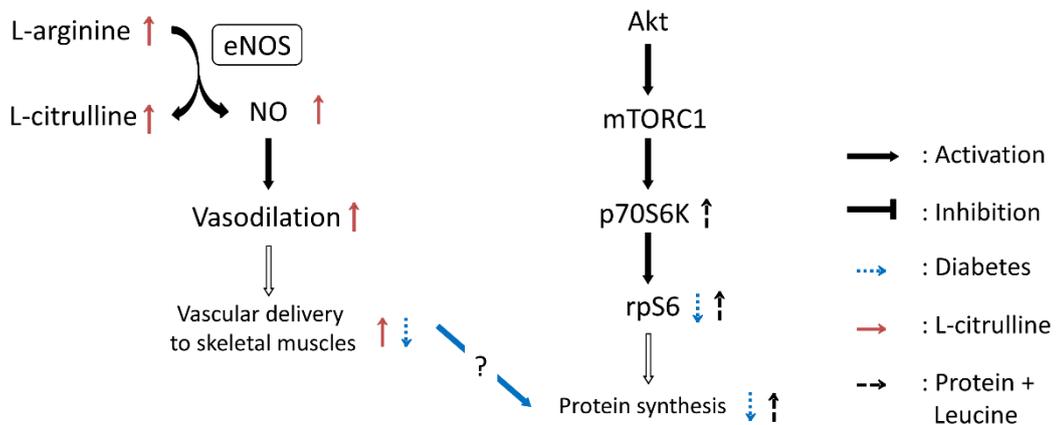
研究課題 2 においては、STZ 誘発糖尿病モデルラットに対してタンパク質及びロイシンの混合物の経口投与による筋タンパク質合成への影響、及び L-シトルリン投与による骨格筋への物質送達増加作用が当該混合物に伴う筋タンパク質合成に与える影響について比較検討した。タンパク質及びロイシンの混合物の投与により、ヒラメ筋及び腓腹筋における mTORC1 下流の筋タンパク質合成

シグナル因子 p70S6K 及び rpS6 が活性化した。一方、当該混合物における L-シトルリン配合の有無により筋タンパク質合成シグナル因子の活性化に有意な差は認められず、L-シトルリンは影響しない可能性が示唆された。

研究課題 3 では、14 日間の後肢懸垂による廃用性筋萎縮モデルラットにおいてタンパク質、ロイシン及び L-シトルリンを配合した栄養補助食品の経口摂取及び運動として間欠的再荷重負荷の併用が骨格筋の筋タンパク質合成及び分解に与える影響を評価した。運動単独よりも栄養投与を組み合わせることによって、腓腹筋における p70S6K 及び rpS6 のリン酸化レベルや筋重量が増加した。その作用メカニズムとして mTORC1 シグナル経路の活性化が関与することが示唆された。研究課題 1、研究課題 2 及び研究課題 3 の結果の概要を Fig. 5-1 に示す。

A

Type 1 diabetes



B

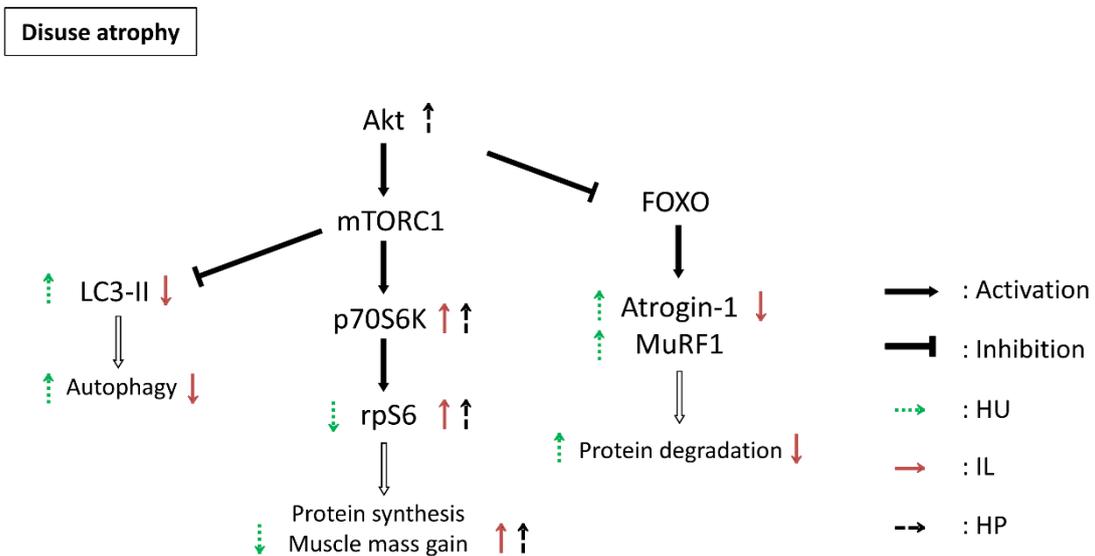


Fig. 5-1. (A) Proposed regulations of the vascular delivery to skeletal muscles induced by administration of L-citrulline, and the mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling induced by administration of protein and amino acid in type 1 diabetes rat muscles. (B) Proposed regulation of the mTORC1 signaling pathway induced by intermittent loading (IL) and the administration of L-citrulline containing high-protein oral nutritional supplement (HP) in rat gastrocnemius muscles during hind limb unloading (HU).

本研究では、L-シトルリンの血管拡張作用に着目して検討を行ったところ、骨格筋への物質送達が増加する可能性が示唆された。本研究の研究課題 1 の実験 1 における正常ラットのヒラメ筋中 EBD 量の結果 (Fig. 2-5) に着目すると、0.5 g/kg の L-シトルリンの経口投与により EBD 量は 13.1% 増加した。また、研究課題 1 の実験 3 の結果 (Fig. 2-7) では、正常ラットと比較して STZ 誘発糖尿病ラ

ットではヒラメ筋中 EBD 量は 16.9%減少し、糖尿病ラットに対する 0.5 g/kg の L-シトルリンの経口投与により EBD 量は 33.8%増加した。さらに、正常ラットと比較しても 11.1%増加した。これより、糖尿病といった血管機能障害を有する病態であっても L-シトルリンの摂取により物質送達が回復する可能性が考えられた。このとき、ラットにおける 0.5 g/kg の L-シトルリンの摂取量を体重 50 kg のヒトでの摂取量に換算すると約 4.2 g/日に相当する。また、研究課題 1 の実験 1 の結果では、0.3 g/kg の L-アルギニンの静脈投与によってヒラメ筋中の EBD 量は対照群と比較して 25.5%増加した。先行研究では高齢者において、食後のインスリン濃度に相当する範囲内でインスリンを静脈投与した際には筋合成の増加及び血流の増加は認められなかった[39]。一方、生理学的な範囲内で高値になるようにインスリンを静脈投与することで筋合成の増加及び約 17%の血流の増加が確認された[39]。以上より、L-シトルリンは L-アルギニンや高用量のインスリンにより認められるような血管拡張作用が期待できる。

研究課題 2 及び研究課題 3 においてラットに対するタンパク質及び L-シトルリンの投与量はそれぞれ 1.0 g/kg 及び 0.12 g/kg だった。研究課題 2 の結果 (Table 3-4) から、STZ 群に対する STZ + PL 群の血中 L-アルギニン濃度の上昇 (+ 62.5 nmol/mL) と、STZ + PL 群に対する STZ + PLC 群の血中 L-アルギニン濃度の上昇 (+ 63.7 nmol/mL) は同程度であったことから、L-シトルリンとその約 8 倍量のタンパク質の摂取が血中 L-アルギニン濃度の上昇に及ぼす影響は同程度だと考えられた。さらに、研究課題 2 の pilot study において雄性 SD ラットに対して PL あるいは PLC を経口投与し 30 分後の NO₂-濃度を評価したところ、PL に対して PLC による有意な増加を確認した。これらより、血中 L-アルギニン濃度の増加及びそれに伴う血管拡張作用は少量の L-シトルリン摂取によって達成できる可能性が考えられた。0.12 g/kg の L-シトルリンの投与量は

ヒトにおいて血管機能改善が報告されている最小有効量である 0.8 g に相当する[67]。以上より、1 日で摂取可能な範囲内の L-シトルリンの摂取により、ヒトにおいても効果的に血中 L-アルギニン濃度を増加でき、骨格筋への物質送達を増加する可能性が考えられた。

研究課題 2 では STZ 誘発糖尿病モデルラットにおいて、タンパク質及びロイシンの混合物を経口投与することで、ヒラメ筋及び腓腹筋の筋タンパク質合成に関わるシグナル因子 (p70S6K 及び rpS6) の活性化の増加を確認した。一方、当該混合物において L-シトルリン添加による筋タンパク質合成シグナルのさらなる増加は認められなかった。

先行研究では、高齢ラットに対して 0.4 g/kg のホエイタンパク質 (ロイシン : 約 0.04 g/kg 相当) 及び 0.4 g/kg の L-シトルリンを投与した際に、ホエイタンパク質のみの投与と比較して、骨格筋における p70S6K のリン酸化が有意に増加したことが報告されている[99]。一方、成体ラットに対して 1.0 g/kg のロイシン及び 1.0 g/kg の L-シトルリンを投与し、16 時間後に筋タンパク質合成速度及び筋力を評価したところ、これらのアミノ酸をそれぞれ単独で投与した場合と比較して差が認められなかった[127]。本研究の研究課題 2 では STZ 誘発糖尿病ラットに対して 1.0 g/kg のタンパク質及び 0.17 g/kg の遊離ロイシン (総ロイシンとして 0.28 g/kg 相当) に加えて 0.12 g/kg の L-シトルリンを投与した。先行研究及び本研究におけるロイシン及び L-シトルリンの投与量及び投与量の比に着目すると、本研究においてロイシンの投与量に対して L-シトルリンの投与量が低いことにより、L-シトルリンによる筋タンパク質合成への影響が認められなかった可能性が考えられた。すなわち、強い筋タンパク質同化作用を示すロイシンによって、L-シトルリンが筋タンパク質合成の増加に及ぼす影

響がマスクされた可能性が考えられた。

一方、研究課題 2 の pilot study では、正常ラットにおいて PL と比較して PLC (L-シトルリンとして 0.12 g/kg) の摂取により血中 NO₂-濃度の有意な増加を確認した (53.3 ± 27.6 vs. 115.3 ± 47.7 nM, p < 0.05)。これより、タンパク質及びロイシンの混合物に対する L-シトルリンの添加によって骨格筋への物質送達が増加する可能性が示唆された。さらに、研究課題 3 においては、廃用性筋萎縮モデルラットにおいて、L-シトルリンを含むタンパク質やロイシンなどからなる混合物の摂取は運動との併用により、運動による骨格筋萎縮抑制効果を増強した。血流の増加によって筋タンパク質合成が増加する[37-39]ことが示唆されていることから、L-シトルリンがタンパク質やアミノ酸摂取による筋タンパク質合成を増加させる可能性がある。今後は投与量や投与量の比に着目した詳細な検討が必要である。

本研究では、ラットにおいて Type I 線維 (遅筋) 優位なヒラメ筋及び Type II 線維 (速筋) 優位な腓腹筋についてそれぞれ解析を行った。研究課題 1 では、L-シトルリンの摂取は正常ラットのヒラメ筋における物質送達を増加させる可能性が考えられた。また、L-シトルリンの摂取は STZ 誘発糖尿病モデルラットのヒラメ筋における EBD 量を 33.8%増加させ、腓腹筋においては 15.5%増加させた。ヒラメ筋で L-シトルリンの効果が強く認められた理由としては、ヒラメ筋は毛細血管密度が高い遅筋線維の割合が高く [91]、NO に対する応答性の違い [92]などから L-シトルリン投与による血管拡張作用の影響を受けやすかったことによる可能性が考えられた。研究課題 2 では、STZ 誘発糖尿病モデルラットに対するタンパク質及びロイシンの混合物の摂取において、L-シトルリンの配合の有無による p70S6K 及び rpS6 のリン酸化への影響はヒラメ筋及び腓腹筋の

いずれにおいても認められなかった。一方、p70S6K トータルタンパク質に着目すると、タンパク質、ロイシン及びL-シトルリンの混合物を摂取した場合のみ、ヒラメ筋において有意な増加が確認されたが (Fig. 3-2B)、L-シトルリンの摂取の関与については不明である。研究課題3では、後肢懸垂により筋萎縮が惹起されたラットに対して、1時間/日のILを14日間行ったところ、ヒラメ筋及び腓腹筋において筋重量、p70S6K及びrpS6のリン酸化が有意に増加したが、L-シトルリンを含むHPの投与と併用した際には腓腹筋においてのみその効果が増強された。このとき、L-シトルリンの物質送達作用がヒラメ筋で強く出る可能性があるとする研究課題1の結果とは一致しなかった。Type II線維ではp70S6K トータルタンパク質の発現量がType I線維より高いことが報告されており[150,151]、mTORC1シグナル経路の応答能が高いことが示唆される。すなわち、構成する骨格筋線維タイプに起因して腓腹筋はヒラメ筋よりもアミノ酸に対するmTORC1シグナル経路の応答が大きかった可能性が考えられた。研究課題3のpilot studyでは、後肢懸垂に供したラットに対してHPの投与を行ったところ、その30分後にヒラメ筋のrpS6のリン酸化レベルが有意に増加したことを確認している。定常状態のmTORC1のリン酸化レベルは腓腹筋よりもヒラメ筋で高値を示す可能性が示唆されている[166,167]ことを踏まえると、ILにより増加したリン酸化レベルのHP投与によるさらなる増加がヒラメ筋ではマスクされ検出できなかった可能性が考えられた。研究課題3においては、L-シトルリンの配合の有無による比較検討、及びILの実施時間の短縮・頻度の減少を変更点として再検証を行うことで、L-シトルリンの影響及びHP投与がヒラメ筋に与える影響について明らかにできると考えられる。

糖尿病や廃用性筋萎縮ではmTORC1シグナル経路活性の減弱が報告されてい

るが[24,77,120,133]、これらの病態に対するタンパク質やアミノ酸の投与が筋タンパク質合成に及ぼす影響についての報告は少ない。研究課題2及び研究課題3の結果から、STZ誘発糖尿病モデルラット及び廃用性筋萎縮モデルラットにおいて、タンパク質及びアミノ酸の摂取は骨格筋のmTORC1シグナル経路を活性化する可能性が考えられ、骨格筋の萎縮抑制に有用である可能性が示唆された。

糖尿病モデル動物を用いた先行研究では、1型糖尿病モデルラットにおける8週間の1.35 g/kgのロイシン経口投与によりヒラメ筋の萎縮が抑制されたことが報告されている[124]。一方、1型糖尿病モデルラットに対して1.35 g/kgのロイシンを経口投与したところ、投与1時間後の下肢骨格筋のrpS6のリン酸化レベルに統計学的な有意差が認められなかったことが報告されている[125]。このとき、糖尿病モデルラットでは非糖尿病ラットと比較して同量のロイシン投与に対する筋タンパク質合成シグナルの増加の程度が低いことについて言及している。また、Martins et al.は1型糖尿病モデルラットに対して8週間にわたる5%ロイシン配合飼料を長期摂取させたところ、給餌終了より6時間後において病態モデルで低下した長趾伸筋におけるmTORC1及びp70S6Kのリン酸化レベルに変化が認められなかったことを報告している[126]。1型糖尿病においてアミノ酸投与が筋タンパク質合成シグナルのリン酸化に及ぼす影響については結果が一致していない。また、廃用性筋萎縮モデル動物を用いた先行研究では、除神経誘発性廃用性筋萎縮モデルラットに対する0.39 g/kgのロイシン投与によりヒラメ筋におけるAkt及びmTORC1のリン酸化が増加したという報告がある[155]。一方、後肢懸垂による廃用性筋萎縮モデルラットでは0.6 g/kgのBCAA（ロイシンとして0.28 g/kg）の経口投与によってヒラメ筋のAktのリン酸化が変化しなかったと報告されている[141]。これらの結果より、廃用性筋萎縮にお

いてアミノ酸投与による mTORC1 シグナル経路の活性化への効果が異なっている。

以上のように、先行研究間ではアミノ酸の投与量や評価のタイミングなどが異なっていた。研究課題 2 及び研究課題 3 においては、STZ 誘発糖尿病モデルラットあるいは廃用性筋萎縮ラットに対してタンパク質、ロイシン及び L-シトルリンの混合物を投与したが、投与より 0.5 時間後に骨格筋の p70S6K 及び rpS6 のリン酸化レベルの増加を確認した。タンパク質由来分のロイシンも考慮すると当該混合物を摂取した場合の総ロイシン量は 0.28 g/kg 相当だった。アミノ酸のうち、特にロイシンに強い筋タンパク質同化作用が認められ、ロイシンの効果は用量依存的であるが[21]、先行研究におけるロイシンの投与量はいずれも本研究の投与量よりも多かった。また、骨格筋を採取したタイミングについては、本研究では投与より 0.5 時間後であったのに対して、先行研究では投与より 1 時間後あるいは 6 時間後であった[125,126]。これらを踏まえると、本研究と先行研究の結果が一致しない原因の一つとしては、投与量よりむしろ、投与後に評価を行うタイミングが異なったことによる可能性が考えられた。投与後の経時的な評価をより詳細に行っていく必要があると考えられた。

本研究では動物を用いて、1 型糖尿病及び廃用性筋萎縮におけるタンパク質、ロイシン及び L-シトルリンの混合物の投与が骨格筋の筋タンパク質合成に及ぼす効果について評価したが、ヒトへの応用研究には至っていない。若年者においては 10-20 g のタンパク質の摂取により抵抗運動時の筋タンパク質合成速度は最大となる[168]。また近年、ロイシン閾値の考え方が提唱され、摂取するタンパク質の種類に関わらず 2 g 以上のロイシン摂取がタンパク質同化に重要とされる[169]。20 g のホエイタンパク質中には約 2.3 g のロイシンが含まれ

ており[170,171]、前述のロイシン閾値を満たしている。これらより、本研究では研究課題 2 及び研究課題 3 において、125 mL の試験溶液中に 10 g のミルクタンパク質及びホエイタンパク質、及び 1.4 g の遊離ロイシンを含有することで総ロイシン量を 2.3 g とした。また、冠動脈攣縮性狭心症患者において、0.8 g の L-シトルリンの 8 週間の摂取により、血管内皮機能の指標である血流依存性血管拡張反応（FMD）が有意に増加し、NO 合成酵素の内因性阻害物質である非対称性ジメチルアルギニン（ADMA）値が有意に低下した[67]。ヒトにおいて L-シトルリンの血管内皮機能への有効性が 0.8 g 以上で確認されていることから、本試験溶液中の L-シトルリン量を 1 g とした。ラットに対する本試験溶液の投与量については、ヒトとラットにおける体表面積の違いが 6 倍[172]であることに基づいて設定した。すなわち、研究課題 2 及び研究課題 3 において、ラットに対して試験溶液として 1.0 g/kg のミルクタンパク質及びホエイタンパク質、0.17 g/kg のロイシン及び 0.12 g/kg の L-シトルリンを経口投与した。研究課題 2 及び研究課題 3 の結果より、1 型糖尿病及び廃用性筋萎縮において前述の用量のタンパク質、ロイシン及び L-シトルリンの経口投与は実際に mTORC1 シグナル経路を活性化し、骨格筋の萎縮抑制に寄与する可能性が考えられた。

1 型糖尿病では骨格筋量の減少に mTORC1 シグナル経路の活性化の減少及びユビキチン・プロテアソーム系やオートファジー・リソソーム系の亢進が関わることが報告されている[75-78]。さらに、健常者と比較して、1 型糖尿病患者では骨格筋量が減少しており、下肢骨格筋量の減少が顕著である[75]。また、不活動に伴う骨格筋量の減少の原因としては、筋タンパク質合成の低下及び筋タンパク質分解の亢進が考えられている[132,135-137]。以上より、これらの病態ではヒトにおいてもタンパク質、ロイシン及び L-シトルリンの摂取により骨

骨筋萎縮の予防及び改善に効果を有する可能性がある。今後は、ヒトにおいて骨格筋量及び筋タンパク質代謝に及ぼす影響を検証することで、効果的な筋萎縮抑制方法の確立に繋がることが期待される。

本研究では、食品成分の摂取による骨格筋の萎縮を予防・改善する方法の開発を見据えて、L-シトルリンの経口摂取が、骨格筋への物質送達に及ぼす影響及び骨格筋の筋タンパク質合成に及ぼす影響について検討を行った。研究課題1では、正常ラットを用いて、L-シトルリンの経口摂取が早期のNO産生増加を介して骨格筋への物質送達量を増加することを明らかにした。さらに、L-シトルリン摂取は血管内皮機能が低下したSTZ誘発糖尿病モデルラットにおいても骨格筋への物質送達量を増加させる可能性が新規に示された。また、研究課題2ではSTZ誘発糖尿病モデルラットにおいて、L-シトルリンはタンパク質及びロイシンの混合物による筋タンパク質合成の亢進に影響を及ぼさない可能性が考えられた。研究課題3では、廃用性筋萎縮モデルラットを用いて、タンパク質、ロイシン及びL-シトルリンからなる混合物の摂取と運動の併用は、運動単独よりも筋タンパク質合成を介して骨格筋重量を増加させることを明らかにした。筋タンパク質合成に対するL-シトルリンの摂取による効果検討において、先行研究の結果を踏まえると、L-シトルリンの投与量、L-シトルリンと他のアミノ酸との投与量比、及び評価のタイミングに着目したより詳細な検討が次の課題として考えられる。今後、血管拡張と筋合成の関係を明らかにし食品成分による新規の筋萎縮抑制方法を確立することで、疾病や加齢による骨格筋の萎縮に伴う運動機能及びQOLの低下の抑制に繋げていきたい。

謝辞

本研究を進めるにあたり、運動生理学や栄養学分野のみならず研究全般にわたる懇切なご指導、ご助言を賜りました立命館大学スポーツ健康科学研究科藤田聡教授に心より感謝申し上げます。本論文の執筆に際し、副査を引き受けてくださった、至学館大学 村上太郎教授、立命館大学 家光素行教授、立命館大学 橋本健志教授には、大変貴重なご指導、ご助言をいただきました。厚く御礼申し上げます。

福岡大学 木戸康平助教授、京都大学 横川拓海助教授、立命館大学 佐瀬晃平氏には、ウェスタンプロット法の手技について懇切丁寧にご指導いただくとともに、研究の推進にあたり多くのご助言をいただきました。心より感謝いたします。また、藤田研究室の皆様にも感謝申し上げます。

株式会社大塚製薬工場メディカルフーズ研究所 副所長の日野和夫氏には、貴重なご指導、ご助言をいただき、本研究を進めるにあたり甚大なるご配慮をいただきました。心より感謝いたします。

最後になりますが、いつも温かく見守り、支えてくれた家族に心から感謝いたします。

参考文献

1. 内閣府. 令和 2 年版高齢社会白書.
https://www8.cao.go.jp/kourei/whitepaper/w-2020/html/gaiyou/s1_1.html. **2020**.
2. 厚生労働省. 第 16 回厚生科学審議会 健康日本 21 (第二次) 推進専門委員会 資料. <https://www.mhlw.go.jp/content/10904750/000872952.pdf>. **2021**.
3. 厚生労働省. 令和 2 年版厚生労働白書.
<https://www.mhlw.go.jp/wp/hakusyo/kousei/19/dl/all.pdf>. **2020**.
4. Holloszy, J.O. The biology of aging. *Mayo Clin Proc* **2000**, *75 Suppl*, S3-8; discussion S8-9.
5. Melton, L.J., 3rd; Khosla, S.; Crowson, C.S.; O'Connor, M.K.; O'Fallon, W.M.; Riggs, B.L. Epidemiology of sarcopenia. *J. Am. Geriatr. Soc.* **2000**, *48*, 625-630.
6. Evans, W.J. What is sarcopenia? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **1995**, *50 Spec No*, 5-8, doi:10.1093/gerona/50a.special_issue.5.
7. Roubenoff, R.; Castaneda, C. Sarcopenia-understanding the dynamics of aging muscle. *Jama* **2001**, *286*, 1230-1231, doi:10.1001/jama.286.10.1230.
8. Lexell, J. Human aging, muscle mass, and fiber type composition. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **1995**, *50 Spec No*, 11-16, doi:10.1093/gerona/50a.special_issue.11.
9. Fujita, S.; Volpi, E. Amino acids and muscle loss with aging. *J Nutr* **2006**, *136*, 277S-280S, doi:10.1093/jn/136.1.277S.
10. Foletta, V.C.; White, L.J.; Larsen, A.E.; Leger, B.; Russell, A.P. The role and regulation of MAFbx/atrogen-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy. *Pflugers Arch* **2011**, *461*, 325-335, doi:10.1007/s00424-010-0919-9.
11. Jackman, R.W.; Kandarian, S.C. The molecular basis of skeletal muscle atrophy.

- Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2004**, 287, C834-843,
doi:10.1152/ajpcell.00579.2003.
12. Bonaldo, P.; Sandri, M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis Model Mech* **2013**, 6, 25-39, doi:10.1242/dmm.010389.
 13. Heitmann, B.L.; Frederiksen, P. Thigh circumference and risk of heart disease and premature death: prospective cohort study. *BMJ* **2009**, 339, b3292, doi:10.1136/bmj.b3292.
 14. Srikanthan, P.; Karlamangla, A.S. Muscle mass index as a predictor of longevity in older adults. *Am. J. Med.* **2014**, 127, 547-553, doi:10.1016/j.amjmed.2014.02.007.
 15. Hong, S.; Chang, Y.; Jung, H.S.; Yun, K.E.; Shin, H.; Ryu, S. Relative muscle mass and the risk of incident type 2 diabetes: A cohort study. *PLoS One* **2017**, 12, e0188650, doi:10.1371/journal.pone.0188650.
 16. Welle, S.; Thornton, C.; Statt, M.; McHenry, B. Postprandial myofibrillar and whole body protein synthesis in young and old human subjects. *Am J Physiol* **1994**, 267, E599-604, doi:10.1152/ajpendo.1994.267.4.E599.
 17. Bolster, D.R.; Jefferson, L.S.; Kimball, S.R. Regulation of protein synthesis associated with skeletal muscle hypertrophy by insulin-, amino acid- and exercise-induced signalling. *Proc Nutr Soc* **2004**, 63, 351-356, doi:10.1079/PNS2004355.
 18. Yoshizawa, F.; Kimball, S.R.; Vary, T.C.; Jefferson, L.S. Effect of dietary protein on translation initiation in rat skeletal muscle and liver. *Am J Physiol* **1998**, 275, E814-820, doi:10.1152/ajpendo.1998.275.5.E814.
 19. Volpi, E.; Kobayashi, H.; Sheffield-Moore, M.; Mittendorfer, B.; Wolfe, R.R.

- Essential amino acids are primarily responsible for the amino acid stimulation of muscle protein anabolism in healthy elderly adults. *Am J Clin Nutr* **2003**, *78*, 250-258, doi:10.1093/ajcn/78.2.250.
20. Anthony, J.C.; Yoshizawa, F.; Anthony, T.G.; Vary, T.C.; Jefferson, L.S.; Kimball, S.R. Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. *J Nutr* **2000**, *130*, 2413-2419, doi:10.1093/jn/130.10.2413.
 21. Yoshizawa, F.; Mochizuki, S.; Sugahara, K. Differential dose response of mTOR signaling to oral administration of leucine in skeletal muscle and liver of rats. *Biosci Biotechnol Biochem* **2013**, *77*, 839-842, doi:10.1271/bbb.120737.
 22. Yarasheski, K.E.; Zachwieja, J.J.; Bier, D.M. Acute effects of resistance exercise on muscle protein synthesis rate in young and elderly men and women. *Am J Physiol* **1993**, *265*, E210-214, doi:10.1152/ajpendo.1993.265.2.E210.
 23. Drummond, M.J.; Dreyer, H.C.; Fry, C.S.; Glynn, E.L.; Rasmussen, B.B. Nutritional and contractile regulation of human skeletal muscle protein synthesis and mTORC1 signaling. *J Appl Physiol (1985)* **2009**, *106*, 1374-1384, doi:10.1152/jappphysiol.91397.2008.
 24. Bodine, S.C.; Stitt, T.N.; Gonzalez, M.; Kline, W.O.; Stover, G.L.; Bauerlein, R.; Zlotchenko, E.; Scrimgeour, A.; Lawrence, J.C.; Glass, D.J., et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol* **2001**, *3*, 1014-1019, doi:10.1038/ncb1101-1014.
 25. Volpi, E.; Mittendorfer, B.; Rasmussen, B.B.; Wolfe, R.R. The response of muscle protein anabolism to combined hyperaminoacidemia and glucose-

- induced hyperinsulinemia is impaired in the elderly. *J Clin Endocrinol Metab* **2000**, *85*, 4481-4490, doi:10.1210/jcem.85.12.7021.
26. Moore, D.R.; Churchward-Venne, T.A.; Witard, O.; Breen, L.; Burd, N.A.; Tipton, K.D.; Phillips, S.M. Protein ingestion to stimulate myofibrillar protein synthesis requires greater relative protein intakes in healthy older versus younger men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **2015**, *70*, 57-62, doi:10.1093/gerona/glu103.
27. Cuthbertson, D.; Smith, K.; Babraj, J.; Leese, G.; Waddell, T.; Atherton, P.; Wackerhage, H.; Taylor, P.M.; Rennie, M.J. Anabolic signaling deficits underlie amino acid resistance of wasting, aging muscle. *FASEB J* **2005**, *19*, 422-424, doi:10.1096/fj.04-2640fje.
28. Pennings, B.; Koopman, R.; Beelen, M.; Senden, J.M.; Saris, W.H.; van Loon, L.J. Exercising before protein intake allows for greater use of dietary protein-derived amino acids for de novo muscle protein synthesis in both young and elderly men. *Am J Clin Nutr* **2011**, *93*, 322-331, doi:10.3945/ajcn.2010.29649.
29. Symons, T.B.; Schutzler, S.E.; Cocke, T.L.; Chinkes, D.L.; Wolfe, R.R.; Paddon-Jones, D. Aging does not impair the anabolic response to a protein-rich meal. *Am J Clin Nutr* **2007**, *86*, 451-456, doi:10.1093/ajcn/86.2.451.
30. Sandri, M. Protein breakdown in muscle wasting: role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. *Int J Biochem Cell Biol* **2013**, *45*, 2121-2129, doi:10.1016/j.biocel.2013.04.023.
31. Belcastro, A.N.; Shewchuk, L.D.; Raj, D.A. Exercise-induced muscle injury: a calpain hypothesis. *Mol. Cell. Biochem.* **1998**, *179*, 135-145, doi:10.1023/a:1006816123601.

32. Herningtyas, E.H.; Okimura, Y.; Handayaningsih, A.E.; Yamamoto, D.; Maki, T.; Iida, K.; Takahashi, Y.; Kaji, H.; Chihara, K. Branched-chain amino acids and arginine suppress MaFbx/atrogen-1 mRNA expression via mTOR pathway in C2C12 cell line. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1780*, 1115-1120, doi:10.1016/j.bbagen.2008.06.004.
33. Takagi, M.; Uchida, T.; Takatsu, E.; Kishimoto, H.; Ida, K.; Ishida, Y.; Ono-Ohmachi, A.; Morita, Y.; Kato, K.; Ochi, A., et al. Distinct Effects of Dietary Whey Peptide and Soy Protein on Denervation Mediated Muscle Atrophy. *J Nutr Food Sci* **2016**, *1*, 002.
34. Sugawara, T.; Ito, Y.; Nishizawa, N.; Nagasawa, T. Regulation of muscle protein degradation, not synthesis, by dietary leucine in rats fed a protein-deficient diet. *Amino Acids* **2009**, *37*, 609-616, doi:10.1007/s00726-008-0180-0.
35. Stefanetti, R.J.; Lamon, S.; Rahbek, S.K.; Farup, J.; Zacharewicz, E.; Wallace, M.A.; Vendelbo, M.H.; Russell, A.P.; Vissing, K. Influence of divergent exercise contraction mode and whey protein supplementation on atrogen-1, MuRF1, and FOXO1/3A in human skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985)* **2014**, *116*, 1491-1502, doi:10.1152/jappphysiol.00136.2013.
36. Kim, S.J.; Roy, R.R.; Kim, J.A.; Zhong, H.; Haddad, F.; Baldwin, K.M.; Edgerton, V.R. Gene expression during inactivity-induced muscle atrophy: effects of brief bouts of a forceful contraction countermeasure. *J Appl Physiol (1985)* **2008**, *105*, 1246-1254, doi:10.1152/jappphysiol.90668.2008.
37. Dillon, E.L.; Casperson, S.L.; Durham, W.J.; Randolph, K.M.; Urban, R.J.; Volpi, E.; Ahmad, M.; Kinsky, M.P.; Sheffield-Moore, M. Muscle protein metabolism responds similarly to exogenous amino acids in healthy younger and

- older adults during NO-induced hyperemia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2011**, *301*, R1408-1417, doi:10.1152/ajpregu.00211.2011.
38. Fujita, S.; Rasmussen, B.B.; Cadenas, J.G.; Grady, J.J.; Volpi, E. Effect of insulin on human skeletal muscle protein synthesis is modulated by insulin-induced changes in muscle blood flow and amino acid availability. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2006**, *291*, E745-754, doi:10.1152/ajpendo.00271.2005.
39. Fujita, S.; Glynn, E.L.; Timmerman, K.L.; Rasmussen, B.B.; Volpi, E. Supraphysiological hyperinsulinaemia is necessary to stimulate skeletal muscle protein anabolism in older adults: evidence of a true age-related insulin resistance of muscle protein metabolism. *Diabetologia* **2009**, *52*, 1889-1898, doi:10.1007/s00125-009-1430-8.
40. Poole, D.C. Edward F. Adolph Distinguished Lecture. Contemporary model of muscle microcirculation: gateway to function and dysfunction. *J Appl Physiol (1985)* **2019**, *127*, 1012-1033, doi:10.1152/jappphysiol.00013.2019.
41. Poole, D.C.; Pittman, R.N.; Musch, T.I.; Ostergaard, L. August Krogh's theory of muscle microvascular control and oxygen delivery: a paradigm shift based on new data. *J Physiol* **2020**, *598*, 4473-4507, doi:10.1113/JP279223.
42. Furchgott, R.F.; Zawadzki, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **1980**, *288*, 373-376, doi:10.1038/288373a0.
43. Ignarro, L.J.; Buga, G.M.; Wood, K.S.; Byrns, R.E.; Chaudhuri, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1987**, *84*, 9265-9269, doi:10.1073/pnas.84.24.9265.

44. Zhao, Y.; Vanhoutte, P.M.; Leung, S.W. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J Pharmacol Sci* **2015**, *129*, 83-94, doi:10.1016/j.jphs.2015.09.002.
45. Zhu, J.; Song, W.; Li, L.; Fan, X. Endothelial nitric oxide synthase: a potential therapeutic target for cerebrovascular diseases. *Mol Brain* **2016**, *9*, 30, doi:10.1186/s13041-016-0211-9.
46. Tousoulis, D.; Kampoli, A.M.; Tentolouris, C.; Papageorgiou, N.; Stefanadis, C. The role of nitric oxide on endothelial function. *Curr Vasc Pharmacol* **2012**, *10*, 4-18, doi:10.2174/157016112798829760.
47. Curis, E.; Nicolis, I.; Moinard, C.; Osowska, S.; Zerrouk, N.; Benazeth, S.; Cynober, L. Almost all about citrulline in mammals. *Amino Acids* **2005**, *29*, 177-205, doi:10.1007/s00726-005-0235-4.
48. Palmer, R.M.; Ashton, D.S.; Moncada, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* **1988**, *333*, 664-666, doi:10.1038/333664a0.
49. Morgado, M.; Cairrao, E.; Santos-Silva, A.J.; Verde, I. Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. *Cell. Mol. Life Sci.* **2012**, *69*, 247-266, doi:10.1007/s00018-011-0815-2.
50. Higashi, Y.; Yoshizumi, M. Exercise and endothelial function: role of endothelium-derived nitric oxide and oxidative stress in healthy subjects and hypertensive patients. *Pharmacol Ther* **2004**, *102*, 87-96, doi:10.1016/j.pharmthera.2004.02.003.
51. Higashi, Y.; Noma, K.; Yoshizumi, M.; Kihara, Y. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J* **2009**, *73*, 411-418, doi:10.1253/circj.cj-08-1102.
52. De Vriese, A.S.; Verbeuren, T.J.; Van de Voorde, J.; Lameire, N.H.; Vanhoutte,

- P.M. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *130*, 963-974, doi:10.1038/sj.bjp.0703393.
53. Benjamin, E.J.; Larson, M.G.; Keyes, M.J.; Mitchell, G.F.; Vasan, R.S.; Keaney, J.F., Jr.; Lehman, B.T.; Fan, S.; Osypiuk, E.; Vita, J.A. Clinical correlates and heritability of flow-mediated dilation in the community: the Framingham Heart Study. *Circulation* **2004**, *109*, 613-619, doi:10.1161/01.CIR.0000112565.60887.1E.
54. Guzik, T.J.; Mussa, S.; Gastaldi, D.; Sadowski, J.; Ratnatunga, C.; Pillai, R.; Channon, K.M. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* **2002**, *105*, 1656-1662, doi:10.1161/01.cir.0000012748.58444.08.
55. Hickner, R.C.; Kemeny, G.; McIver, K.; Harrison, K.; Hostetler, M.E. Lower skeletal muscle nutritive blood flow in older women is related to eNOS protein content. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **2003**, *58*, 20-25, doi:10.1093/gerona/58.1.b20.
56. Hink, U.; Li, H.; Mollnau, H.; Oelze, M.; Matheis, E.; Hartmann, M.; Skatchkov, M.; Thaiss, F.; Stahl, R.A.; Warnholtz, A., et al. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res* **2001**, *88*, E14-22, doi:10.1161/01.res.88.2.e14.
57. Duplain, H.; Burcelin, R.; Sartori, C.; Cook, S.; Egli, M.; Lepori, M.; Vollenweider, P.; Pedrazzini, T.; Nicod, P.; Thorens, B., et al. Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* **2001**, *104*, 342-345, doi:10.1161/01.cir.104.3.342.

58. Nyberg, M.; Piil, P.; Egelund, J.; Sprague, R.S.; Mortensen, S.P.; Hellsten, Y. Potentiation of cGMP signaling increases oxygen delivery and oxidative metabolism in contracting skeletal muscle of older but not young humans. *Physiol Rep* **2015**, *3*, doi:10.14814/phy2.12508.
59. Ferguson, S.K.; Hirai, D.M.; Copp, S.W.; Holdsworth, C.T.; Allen, J.D.; Jones, A.M.; Musch, T.I.; Poole, D.C. Impact of dietary nitrate supplementation via beetroot juice on exercising muscle vascular control in rats. *J Physiol* **2013**, *591*, 547-557, doi:10.1113/jphysiol.2012.243121.
60. Baron, A.D.; Tarshoby, M.; Hook, G.; Lazaridis, E.N.; Cronin, J.; Johnson, A.; Steinberg, H.O. Interaction between insulin sensitivity and muscle perfusion on glucose uptake in human skeletal muscle: evidence for capillary recruitment. *Diabetes* **2000**, *49*, 768-774, doi:10.2337/diabetes.49.5.768.
61. Vincent, M.A.; Clerk, L.H.; Lindner, J.R.; Klibanov, A.L.; Clark, M.G.; Rattigan, S.; Barrett, E.J. Microvascular recruitment is an early insulin effect that regulates skeletal muscle glucose uptake in vivo. *Diabetes* **2004**, *53*, 1418-1423, doi:10.2337/diabetes.53.6.1418.
62. Churchward-Venne, T.A.; Cotie, L.M.; MacDonald, M.J.; Mitchell, C.J.; Prior, T.; Baker, S.K.; Phillips, S.M. Citrulline does not enhance blood flow, microvascular circulation, or myofibrillar protein synthesis in elderly men at rest or following exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2014**, *307*, E71-83, doi:10.1152/ajpendo.00096.2014.
63. Hayashi, T.; Juliet, P.A.; Matsui-Hirai, H.; Miyazaki, A.; Fukatsu, A.; Funami, J.; Iguchi, A.; Ignarro, L.J. l-Citrulline and l-arginine supplementation retards the progression of high-cholesterol-diet-induced atherosclerosis in rabbits. *Proc Natl*

- Acad Sci U S A* **2005**, *102*, 13681-13686, doi:10.1073/pnas.0506595102.
64. Dhanakoti, S.N.; Brosnan, J.T.; Herzberg, G.R.; Brosnan, M.E. Renal arginine synthesis: studies in vitro and in vivo. *Am J Physiol* **1990**, *259*, E437-442, doi:10.1152/ajpendo.1990.259.3.E437.
65. Chen, P.Y.; Sanders, P.W. L-arginine abrogates salt-sensitive hypertension in Dahl/Rapp rats. *J Clin Invest* **1991**, *88*, 1559-1567, doi:10.1172/JCI115467.
66. Ochiai, M.; Hayashi, T.; Morita, M.; Ina, K.; Maeda, M.; Watanabe, F.; Morishita, K. Short-term effects of L-citrulline supplementation on arterial stiffness in middle-aged men. *Int J Cardiol* **2012**, *155*, 257-261, doi:10.1016/j.ijcard.2010.10.004.
67. Morita, M.; Sakurada, M.; Watanabe, F.; Yamasaki, T.; Doi, H.; Ezaki, H.; Morishita, K.; Miyakex, T. Effects of Oral L-Citrulline Supplementation on Lipoprotein Oxidation and Endothelial Dysfunction in Humans with Vasospastic Angina. *Immunol Endocr Metab Agents Med Chem* **2013**, *13*, 214-220, doi:10.2174/18715222113139990008.
68. Kim, I.Y.; Schutzler, S.E.; Schrader, A.; Spencer, H.J.; Azhar, G.; Deutz, N.E.; Wolfe, R.R. Acute ingestion of citrulline stimulates nitric oxide synthesis but does not increase blood flow in healthy young and older adults with heart failure. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2015**, *309*, E915-924, doi:10.1152/ajpendo.00339.2015.
69. Schwedhelm, E.; Maas, R.; Freese, R.; Jung, D.; Lukacs, Z.; Jambrecina, A.; Spickler, W.; Schulze, F.; Boger, R.H. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of oral L-citrulline and L-arginine: impact on nitric oxide metabolism. *Br J Clin Pharmacol* **2008**, *65*, 51-59, doi:10.1111/j.1365-2125.2007.02990.x.

70. Hartman, W.J.; Torre, P.M.; Prior, R.L. Dietary citrulline but not ornithine counteracts dietary arginine deficiency in rats by increasing splanchnic release of citrulline. *J Nutr* **1994**, *124*, 1950-1960, doi:10.1093/jn/124.10.1950.
71. Bode-Boger, S.M.; Boger, R.H.; Galland, A.; Tsikas, D.; Frolich, J.C. L-arginine-induced vasodilation in healthy humans: pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship. *Br J Clin Pharmacol* **1998**, *46*, 489-497, doi:10.1046/j.1365-2125.1998.00803.x.
72. Bescos, R.; Sureda, A.; Tur, J.A.; Pons, A. The effect of nitric-oxide-related supplements on human performance. *Sports Med* **2012**, *42*, 99-117, doi:10.2165/11596860-000000000-00000.
73. Kivela, R.; Silvennoinen, M.; Touvra, A.M.; Lehti, T.M.; Kainulainen, H.; Vihko, V. Effects of experimental type 1 diabetes and exercise training on angiogenic gene expression and capillarization in skeletal muscle. *FASEB J* **2006**, *20*, 1570-1572, doi:10.1096/fj.05-4780fje.
74. Ono, Y.; Esaki, K.; Takahashi, Y.; Nakabayashi, M.; Ichinose, M.; Lee, K. Muscular blood flow responses as an early predictor of the severity of diabetic neuropathy at a later stage in streptozotocin-induced type I diabetic rats: a diffuse correlation spectroscopy study. *Biomed Opt Express* **2018**, *9*, 4539-4551, doi:10.1364/BOE.9.004539.
75. Sala, D.; Zorzano, A. Differential control of muscle mass in type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, *72*, 3803-3817, doi:10.1007/s00018-015-1954-7.
76. Sala, D.; Ivanova, S.; Plana, N.; Ribas, V.; Duran, J.; Bach, D.; Turkseven, S.; Laville, M.; Vidal, H.; Karczewska-Kupczewska, M., et al. Autophagy-

- regulating TP53INP2 mediates muscle wasting and is repressed in diabetes. *J Clin Invest* **2014**, *124*, 1914-1927, doi:10.1172/JCI72327.
77. Hulmi, J.J.; Silvennoinen, M.; Lehti, M.; Kivela, R.; Kainulainen, H. Altered REDD1, myostatin, and Akt/mTOR/FoxO/MAPK signaling in streptozotocin-induced diabetic muscle atrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2012**, *302*, E307-315, doi:10.1152/ajpendo.00398.2011.
78. Zhang, J.; Zhuang, P.; Wang, Y.; Song, L.; Zhang, M.; Lu, Z.; Zhang, L.; Wang, J.; Alemu, P.N.; Zhang, Y., et al. Reversal of muscle atrophy by Zhimu-Huangbai herb-pair via Akt/mTOR/FoxO3 signal pathway in streptozotocin-induced diabetic mice. *PLoS One* **2014**, *9*, e100918, doi:10.1371/journal.pone.0100918.
79. Rajagopalan, S.; Kurz, S.; Munzel, T.; Tarpey, M.; Freeman, B.A.; Griending, K.K.; Harrison, D.G. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* **1996**, *97*, 1916-1923, doi:10.1172/JCI118623.
80. Ogita, H.; Liao, J. Endothelial function and oxidative stress. *Endothelium* **2004**, *11*, 123-132, doi:10.1080/10623320490482664.
81. Chapman, M.J.; Sposito, A.C. Hypertension and dyslipidaemia in obesity and insulin resistance: pathophysiology, impact on atherosclerotic disease and pharmacotherapy. *Pharmacol Ther* **2008**, *117*, 354-373, doi:10.1016/j.pharmthera.2007.10.004.
82. Maeda, S.; Tanabe, T.; Miyauchi, T.; Otsuki, T.; Sugawara, J.; Iemitsu, M.; Kuno, S.; Ajisaka, R.; Yamaguchi, I.; Matsuda, M. Aerobic exercise training

- reduces plasma endothelin-1 concentration in older women. *J Appl Physiol* (1985) **2003**, 95, 336-341, doi:10.1152/jappphysiol.01016.2002.
83. Tschudi, M.R.; Barton, M.; Bersinger, N.A.; Moreau, P.; Cosentino, F.; Noll, G.; Malinski, T.; Luscher, T.F. Effect of age on kinetics of nitric oxide release in rat aorta and pulmonary artery. *J Clin Invest* **1996**, 98, 899-905, doi:10.1172/JCI118872.
84. Iemitsu, M.; Maeda, S.; Jesmin, S.; Otsuki, T.; Miyauchi, T. Exercise training improves aging-induced downregulation of VEGF angiogenic signaling cascade in hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2006**, 291, H1290-1298, doi:10.1152/ajpheart.00820.2005.
85. Sessa, W.C.; Pritchard, K.; Seyedi, N.; Wang, J.; Hintze, T.H. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ Res* **1994**, 74, 349-353, doi:10.1161/01.res.74.2.349.
86. Higashi, Y.; Sasaki, S.; Kurisu, S.; Yoshimizu, A.; Sasaki, N.; Matsuura, H.; Kajiyama, G.; Oshima, T. Regular aerobic exercise augments endothelium-dependent vascular relaxation in normotensive as well as hypertensive subjects: role of endothelium-derived nitric oxide. *Circulation* **1999**, 100, 1194-1202, doi:10.1161/01.cir.100.11.1194.
87. Wada, M. [About citrulline, a new amino acid in the pressed juice of watermelon, *Citrullus vulgaris* schrad]. *Biochemische Zeitschrift* **1930**, 224, 240-249.
88. Lopez-Diez, R.; Shen, X.; Daffu, G.; Khursheed, M.; Hu, J.; Song, F.; Rosario, R.; Xu, Y.; Li, Q.; Xi, X., et al. Ager Deletion Enhances Ischemic Muscle

- Inflammation, Angiogenesis, and Blood Flow Recovery in Diabetic Mice.
Arterioscler Thromb Vasc Biol **2017**, *37*, 1536-1547,
doi:10.1161/ATVBAHA.117.309714.
89. Perreault, M.; Dombrowski, L.; Marette, A. Mechanism of impaired nitric oxide synthase activity in skeletal muscle of streptozotocin-induced diabetic rats.
Diabetologia **2000**, *43*, 427-437, doi:10.1007/s001250051325.
90. Bar, A.; Pette, D. Three fast myosin heavy chains in adult rat skeletal muscle.
FEBS Lett **1988**, *235*, 153-155, doi:10.1016/0014-5793(88)81253-5.
91. Groen, B.B.; Hamer, H.M.; Snijders, T.; van Kranenburg, J.; Frijns, D.; Vink, H.; van Loon, L.J. Skeletal muscle capillary density and microvascular function are compromised with aging and type 2 diabetes. *J Appl Physiol (1985)* **2014**, *116*, 998-1005, doi:10.1152/jappphysiol.00919.2013.
92. Ohta, F.; Takagi, T.; Sato, H.; Ignarro, L.J. Low-dose L-arginine administration increases microperfusion of hindlimb muscle without affecting blood pressure in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104*, 1407-1411,
doi:10.1073/pnas.0610207104.
93. Xu, Q.; Qaum, T.; Adamis, A.P. Sensitive blood-retinal barrier breakdown quantitation using Evans blue. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **2001**, *42*, 789-794.
94. Wang, H.L.; Lai, T.W. Optimization of Evans blue quantitation in limited rat tissue samples. *Sci Rep* **2014**, *4*, 6588, doi:10.1038/srep06588.
95. Snyder, G.K.; Farrelly, C.; Coelho, J.R. Capillary perfusion in skeletal muscle. *Am J Physiol* **1992**, *262*, H828-832, doi:10.1152/ajpheart.1992.262.3.H828.
96. Morita, M.; Hayashi, T.; Ochiai, M.; Maeda, M.; Yamaguchi, T.; Ina, K.; Kuzuya, M. Oral supplementation with a combination of L-citrulline and L-

- arginine rapidly increases plasma L-arginine concentration and enhances NO bioavailability. *Biochem Biophys Res Commun* **2014**, *454*, 53-57, doi:10.1016/j.bbrc.2014.10.029.
97. Moinard, C.; Nicolis, I.; Neveux, N.; Darquy, S.; Benazeth, S.; Cynober, L. Dose-ranging effects of citrulline administration on plasma amino acids and hormonal patterns in healthy subjects: the Citrudose pharmacokinetic study. *Br J Nutr* **2008**, *99*, 855-862, doi:10.1017/S0007114507841110.
98. Suzuki, T.; Morita, M.; Kobayashi, Y.; Kamimura, A. Oral L-citrulline supplementation enhances cycling time trial performance in healthy trained men: Double-blind randomized placebo-controlled 2-way crossover study. *J Int Soc Sports Nutr* **2016**, *13*, 6, doi:10.1186/s12970-016-0117-z.
99. Jegatheesan, P.; Vicente, C.; Marquet de Rouge, P.; Neveux, N.; Ramassamy, R.; Magassa, S.; Aussel, C.; Raynaud-Simon, A.; Cynober, L.; De Bandt, J.P. Combined effect of citrulline and lactoserum on amino acid availability in aged rats. *Nutrition* **2021**, 87-88, 111196, doi:10.1016/j.nut.2021.111196.
100. Hadi A R Hadi; Suwaidi, J.A. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. **2007**.
101. Kondo, H.; Fujino, H.; Murakami, S.; Nagatomo, F.; Roy, R.R.; Ishihara, A. Regressed three-dimensional capillary network and inhibited angiogenic factors in the soleus muscle of non-obese rats with type 2 diabetes. *Nutr Metab (Lond)* **2011**, *8*, 77, doi:10.1186/1743-7075-8-77.
102. Hickey, M.S.; Carey, J.O.; Azevedo, J.L.; Houmard, J.A.; Pories, W.J.; Israel, R.G.; Dohm, G.L. Skeletal muscle fiber composition is related to adiposity and in vitro glucose transport rate in humans. *Am J Physiol* **1995**, *268*, E453-457,

doi:10.1152/ajpendo.1995.268.3.E453.

103. Sexton, W.L.; Poole, D.C.; Mathieu-Costello, O. Microcirculatory structure-function relationships in skeletal muscle of diabetic rats. *Am J Physiol* **1994**, *266*, H1502-1511, doi:10.1152/ajpheart.1994.266.4.H1502.
104. Kindig, C.A.; Sexton, W.L.; Fedde, M.R.; Poole, D.C. Skeletal muscle microcirculatory structure and hemodynamics in diabetes. *Respiration Physiology* **1998**, *111*, 163-175, doi:10.1016/s0034-5687(97)00122-9.
105. Fayh, A.P.; Krause, M.; Rodrigues-Krause, J.; Ribeiro, J.L.; Ribeiro, J.P.; Friedman, R.; Moreira, J.C.; Reischak-Oliveira, A. Effects of L-arginine supplementation on blood flow, oxidative stress status and exercise responses in young adults with uncomplicated type I diabetes. *Eur J Nutr* **2013**, *52*, 975-983, doi:10.1007/s00394-012-0404-7.
106. Jablecka, A.; Bogdanski, P.; Balcer, N.; Cieslewicz, A.; Skoluda, A.; Musialik, K. The effect of oral L-arginine supplementation on fasting glucose, HbA1c, nitric oxide and total antioxidant status in diabetic patients with atherosclerotic peripheral arterial disease of lower extremities. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **2012**, *16*, 342-350.
107. Mori, A.; Takei, T.; Suzuki, N.; Sakamoto, K.; Morita, M.; Nakagawa, S.; Nakahara, T.; Ishii, K. L-Citrulline ameliorates the attenuation of acetylcholine-induced vasodilation of retinal arterioles in diabetic rats. *Heliyon* **2021**, *7*, e06532, doi:10.1016/j.heliyon.2021.e06532.
108. Kudo, M.; Yoshitomi, H.; Momoo, M.; Suguro, S.; Yamagishi, Y.; Gao, M. Evaluation of the Effects and Mechanism of L-Citrulline on Anti-obesity by Appetite Suppression in Obese/Diabetic KK-Ay Mice and High-Fat Diet Fed SD

- Rats. *Biol. Pharm. Bull.* **2017**, *40*, 524-530, doi:10.1248/bpb.b16-01002.
109. Eshreif, A.; Al Batran, R.; Jamieson, K.L.; Darwesh, A.M.; Gopal, K.; Greenwell, A.A.; Zlobine, I.; Aburasayn, H.; Eaton, F.; Mulvihill, E.E., et al. L-Citrulline supplementation improves glucose and exercise tolerance in obese male mice. *Exp Physiol* **2020**, *105*, 270-281, doi:10.1113/EP088109.
110. 千葉, 茂俊. ペントバルビタールの心臓作用. *心臓* **2002**, *34*, 699-706.
111. Redfors, B.; Shao, Y.; Omerovic, E. Influence of anesthetic agent, depth of anesthesia and body temperature on cardiovascular functional parameters in the rat. *Lab Anim* **2014**, *48*, 6-14, doi:10.1177/0023677213502015.
112. Shariffi, B.; Dillon, K.; Gillum, T.; Boyer, W.; Sullivan, S.; Lee, E.; Kim, J.-K. Effect of Combined Grape Seed Extract and L-Citrulline Supplementation on Hemodynamic Responses to Exercise in Young Males. *Journal of Dietary Supplements* **2022**, 10.1080/19390211.2021.2023246, 1-12, doi:10.1080/19390211.2021.2023246.
113. Devereux, R.B.; Roman, M.J.; Paranicas, M.; O'Grady, M.J.; Lee, E.T.; Welty, T.K.; Fabsitz, R.R.; Robbins, D.; Rhoades, E.R.; Howard, B.V. Impact of diabetes on cardiac structure and function: the strong heart study. *Circulation* **2000**, *101*, 2271-2276, doi:10.1161/01.cir.101.19.2271.
114. de Simone, G.; Mureddu, G.F.; Vaccaro, O.; Greco, R.; Sacco, M.; Rivellesse, A.; Contaldo, F.; Riccardi, G. Cardiac abnormalities in type 1 diabetes. *Ital Heart J* **2000**, *1*, 493-499.
115. Kurauchi, Y.; Mokudai, K.; Morita, M.; Kamimura, A.; Mori, A.; Sakamoto, K.; Nakahara, T.; Ishii, K. L-Citrulline improves cerebral blood flow in migraine model rats. *Journal of Functional Foods* **2017**, *38*, 540-544,

- doi:10.1016/j.jff.2017.09.054.
116. Mori, A.; Morita, M.; Morishita, K.; Sakamoto, K.; Nakahara, T.; Ishii, K. L-Citrulline dilates rat retinal arterioles via nitric oxide- and prostaglandin-dependent pathways in vivo. *J Pharmacol Sci* **2015**, *127*, 419-423, doi:10.1016/j.jphs.2015.02.012.
117. Rennie, M.J.; Edwards, R.H.; Halliday, D.; Matthews, D.E.; Wolman, S.L.; Millward, D.J. Muscle protein synthesis measured by stable isotope techniques in man: the effects of feeding and fasting. *Clin Sci (Lond)* **1982**, *63*, 519-523, doi:10.1042/cs0630519.
118. Biolo, G.; Tipton, K.D.; Klein, S.; Wolfe, R.R. An abundant supply of amino acids enhances the metabolic effect of exercise on muscle protein. *Am J Physiol* **1997**, *273*, E122-129, doi:10.1152/ajpendo.1997.273.1.E122.
119. Makanae, Y.; Fujita, S. Role of Exercise and Nutrition in the Prevention of Sarcopenia. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **2015**, *61 Suppl*, S125-127, doi:10.3177/jnsv.61.S125.
120. Newsholme, P.; Abdulkader, F.; Rebelato, E.; Romanatto, T.; Pinheiro, C.H.; Vitzel, K.F.; Silva, E.P.; Bazotte, R.B.; Procopio, J.; Curi, R., et al. Amino acids and diabetes: implications for endocrine, metabolic and immune function. *Front Biosci (Landmark Ed)* **2011**, *16*, 315-339, doi:10.2741/3690.
121. Tajiri, Y.; Kato, T.; Nakayama, H.; Yamada, K. Reduction of skeletal muscle, especially in lower limbs, in Japanese type 2 diabetic patients with insulin resistance and cardiovascular risk factors. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* **2010**, *8*, 137-142, doi:10.1089/met.2009.0043.
122. Park, S.W.; Goodpaster, B.H.; Strotmeyer, E.S.; Kuller, L.H.; Broudeau, R.;

- Kammerer, C.; de Rekeneire, N.; Harris, T.B.; Schwartz, A.V.; Tylavsky, F.A., et al. Accelerated loss of skeletal muscle strength in older adults with type 2 diabetes: the health, aging, and body composition study. *Diabetes Care* **2007**, *30*, 1507-1512, doi:10.2337/dc06-2537.
123. Kido, K.; Sato, K.; Makanae, Y.; Ato, S.; Hayashi, T.; Fujita, S. Herbal supplement Kamishimotsuto augments resistance exercise-induced mTORC1 signaling in rat skeletal muscle. *Nutrition* **2016**, *32*, 108-113, doi:10.1016/j.nut.2015.06.015.
124. Gawada, N. The effect of leucine supplementation on the skeletal muscles of streptozotocin (STZ)diabetic rats. *Records of Pharmaceutical and Biomedical Sciences* **2018**, *2*, 22-25, doi:10.21608/rpbs.2018.3642.1001.
125. Anthony, J.C.; Reiter, A.K.; Anthony, T.G.; Crozier, S.J.; Lang, C.H.; MacLean, D.A.; Kimball, S.R.; Jefferson, L.S. Orally administered leucine enhances protein synthesis in skeletal muscle of diabetic rats in the absence of increases in 4E-BP1 or S6K1 phosphorylation. *Diabetes* **2002**, *51*, 928-936, doi:10.2337/diabetes.51.4.928.
126. Martins, C.E.C.; Lima, V.B.S.; Schoenfeld, B.J.; Tirapegui, J. Effects of leucine supplementation and resistance training on myopathy of diabetic rats. *Physiol Rep* **2017**, *5*, e13273, doi:10.14814/phy2.13273.
127. Ventura, G.; Noirez, P.; Breuille, D.; Godin, J.P.; Pinaud, S.; Cleroux, M.; Choisy, C.; Le Plenier, S.; Bastic, V.; Neveux, N., et al. Effect of citrulline on muscle functions during moderate dietary restriction in healthy adult rats. *Amino Acids* **2013**, *45*, 1123-1131, doi:10.1007/s00726-013-1564-3.
128. Ogasawara, R.; Kobayashi, K.; Tsutaki, A.; Lee, K.; Abe, T.; Fujita, S.;

- Nakazato, K.; Ishii, N. mTOR signaling response to resistance exercise is altered by chronic resistance training and detraining in skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) **2013**, *114*, 934-940, doi:10.1152/jappphysiol.01161.2012.
129. Welle, S.; Thornton, C.; Jozefowicz, R.; Statt, M. Myofibrillar protein synthesis in young and old men. *Am J Physiol* **1993**, *264*, E693-698, doi:10.1152/ajpendo.1993.264.5.E693.
130. Li, F.; Yin, Y.; Tan, B.; Kong, X.; Wu, G. Leucine nutrition in animals and humans: mTOR signaling and beyond. *Amino Acids* **2011**, *41*, 1185-1193, doi:10.1007/s00726-011-0983-2.
131. Stein, T.P.; Wade, C.E. Metabolic consequences of muscle disuse atrophy. *J Nutr* **2005**, *135*, 1824S-1828S, doi:10.1093/jn/135.7.1824S.
132. Dupont, E.; Cieniewski-Bernard, C.; Bastide, B.; Stevens, L. Electrostimulation during hindlimb unloading modulates PI3K-AKT downstream targets without preventing soleus atrophy and restores slow phenotype through ERK. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2011**, *300*, R408-417, doi:10.1152/ajpregu.00793.2009.
133. Hornberger, T.A.; Hunter, R.B.; Kandarian, S.C.; Esser, K.A. Regulation of translation factors during hindlimb unloading and denervation of skeletal muscle in rats. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2001**, *281*, C179-187, doi:10.1152/ajpcell.2001.281.1.C179.
134. Miyazaki, M.; Noguchi, M.; Takemasa, T. Intermittent reloading attenuates muscle atrophy through modulating Akt/mTOR pathway. *Med Sci Sports Exerc* **2008**, *40*, 848-855, doi:10.1249/MSS.0b013e318163275f.
135. Ikemoto, M.; Nikawa, T.; Takeda, S.; Watanabe, C.; Kitano, T.; Baldwin, K.M.;

- Izumi, R.; Nonaka, I.; Towatari, T.; Teshima, S., et al. Space shuttle flight (STS-90) enhances degradation of rat myosin heavy chain in association with activation of ubiquitin-proteasome pathway. *FASEB J* **2001**, *15*, 1279-1281, doi:10.1096/fj.00-0629fje.
136. Taillandier, D.; Arousseau, E.; Meynial-Denis, D.; Bechet, D.; Ferrara, M.; Cottin, P.; Ducastaing, A.; Bigard, X.; Guezennec, C.Y.; Schmid, H.P., et al. Coordinate activation of lysosomal, Ca²⁺-activated and ATP-ubiquitin-dependent proteinases in the unweighted rat soleus muscle. *Biochem J* **1996**, *316* (Pt 1), 65-72, doi:10.1042/bj3160065.
137. Tawa, N.E., Jr.; Odessey, R.; Goldberg, A.L. Inhibitors of the proteasome reduce the accelerated proteolysis in atrophying rat skeletal muscles. *J Clin Invest* **1997**, *100*, 197-203, doi:10.1172/JCI119513.
138. Bodine, S.C.; Latres, E.; Baumhueter, S.; Lai, V.K.; Nunez, L.; Clarke, B.A.; Poueymirou, W.T.; Panaro, F.J.; Na, E.; Dharmarajan, K., et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* **2001**, *294*, 1704-1708, doi:10.1126/science.1065874.
139. Bodine, S.C.; Baehr, L.M. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2014**, *307*, E469-484, doi:10.1152/ajpendo.00204.2014.
140. Jang, J.; Yun, H.Y.; Park, J.; Lim, K. Protective effect of branched chain amino acids on hindlimb suspension-induced muscle atrophy in growing rats. *J Exerc Nutrition Biochem* **2015**, *19*, 183-189, doi:10.5717/jenb.2015.15062704.
141. Maki, T.; Yamamoto, D.; Nakanishi, S.; Iida, K.; Iguchi, G.; Takahashi, Y.; Kaji, H.; Chihara, K.; Okimura, Y. Branched-chain amino acids reduce hindlimb

- suspension-induced muscle atrophy and protein levels of atrogin-1 and MuRF1 in rats. *Nutr Res* **2012**, *32*, 676-683, doi:10.1016/j.nutres.2012.07.005.
142. Zhao, J.; Brault, J.J.; Schild, A.; Cao, P.; Sandri, M.; Schiaffino, S.; Lecker, S.H.; Goldberg, A.L. FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab* **2007**, *6*, 472-483, doi:10.1016/j.cmet.2007.11.004.
143. Glick, D.; Barth, S.; Macleod, K.F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol* **2010**, *221*, 3-12, doi:10.1002/path.2697.
144. Ganley, I.G.; Lam du, H.; Wang, J.; Ding, X.; Chen, S.; Jiang, X. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem* **2009**, *284*, 12297-12305, doi:10.1074/jbc.M900573200.
145. Kim, J.; Kundu, M.; Viollet, B.; Guan, K.L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* **2011**, *13*, 132-141, doi:10.1038/ncb2152.
146. Zhang, S.F.; Zhang, Y.; Li, B.; Chen, N. Physical inactivity induces the atrophy of skeletal muscle of rats through activating AMPK/FoxO3 signal pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **2018**, *22*, 199-209, doi:10.26355/eurrev_201801_14118.
147. Speacht, T.L.; Krause, A.R.; Steiner, J.L.; Lang, C.H.; Donahue, H.J. Combination of hindlimb suspension and immobilization by casting exaggerates sarcopenia by stimulating autophagy but does not worsen osteopenia. *Bone* **2018**, *110*, 29-37, doi:10.1016/j.bone.2018.01.026.
148. Morey, E.R.; Sabelman, E.E.; Turner, R.T.; Baylink, D.J. A new rat model simulating some aspects of space flight. **1979**.

149. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **2001**, *25*, 402-408, doi:10.1006/meth.2001.1262.
150. Atherton, P.J.; Higginson, J.M.; Singh, J.; Wackerhage, H. Concentrations of signal transduction proteins exercise and insulin responses in rat extensor digitorum longus and soleus muscles. *Mol. Cell. Biochem.* **2004**, *261*, 111-116, doi:10.1023/b:mcbi.0000028745.58567.81.
151. Edman, S.; Soderlund, K.; Moberg, M.; Apro, W.; Blomstrand, E. mTORC1 Signaling in Individual Human Muscle Fibers Following Resistance Exercise in Combination With Intake of Essential Amino Acids. *Front Nutr* **2019**, *6*, 96, doi:10.3389/fnut.2019.00096.
152. Stitt, T.N.; Drujan, D.; Clarke, B.A.; Panaro, F.; Timofeyva, Y.; Kline, W.O.; Gonzalez, M.; Yancopoulos, G.D.; Glass, D.J. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol. Cell* **2004**, *14*, 395-403, doi:10.1016/s1097-2765(04)00211-4.
153. Sandri, M.; Sandri, C.; Gilbert, A.; Skurk, C.; Calabria, E.; Picard, A.; Walsh, K.; Schiaffino, S.; Lecker, S.H.; Goldberg, A.L. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* **2004**, *117*, 399-412, doi:10.1016/s0092-8674(04)00400-3.
154. Brunet, A.; Bonni, A.; Zigmond, M.J.; Lin, M.Z.; Juo, P.; Hu, L.S.; Anderson, M.J.; Arden, K.C.; Blenis, J.; Greenberg, M.E. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **1999**, *96*, 857-868, doi:10.1016/s0092-8674(00)80595-4.

155. Ribeiro, C.B.; Christofolletti, D.C.; Pezolato, V.A.; de Cassia Marqueti Durigan, R.; Prestes, J.; Tibana, R.A.; Pereira, E.C.; de Sousa Neto, I.V.; Durigan, J.L.; da Silva, C.A. Leucine minimizes denervation-induced skeletal muscle atrophy of rats through akt/mtor signaling pathways. *Front Physiol* **2015**, *6*, 73, doi:10.3389/fphys.2015.00073.
156. Kabeya, Y.; Mizushima, N.; Ueno, T.; Yamamoto, A.; Kirisako, T.; Noda, T.; Kominami, E.; Ohsumi, Y.; Yoshimori, T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* **2000**, *19*, 5720-5728, doi:10.1093/emboj/19.21.5720.
157. Egan, D.F.; Shackelford, D.B.; Mihaylova, M.M.; Gelino, S.; Kohnz, R.A.; Mair, W.; Vasquez, D.S.; Joshi, A.; Gwinn, D.M.; Taylor, R., et al. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* **2011**, *331*, 456-461, doi:10.1126/science.1196371.
158. Kano, Y.; Shimegi, S.; Takahashi, H.; Masuda, K.; Katsuta, S. Changes in capillary luminal diameter in rat soleus muscle after hind-limb suspension. *Acta Physiol. Scand.* **2000**, *169*, 271-276, doi:10.1046/j.1365-201x.2000.00743.x.
159. Fujino, H.; Kohzuki, H.; Takeda, I.; Kiyooka, T.; Miyasaka, T.; Mohri, S.; Shimizu, J.; Kajiya, F. Regression of capillary network in atrophied soleus muscle induced by hindlimb unweighting. *J Appl Physiol (1985)* **2005**, *98*, 1407-1413, doi:10.1152/jappphysiol.00961.2004.
160. Roudier, E.; Gineste, C.; Wazna, A.; Dehghan, K.; Desplanches, D.; Birot, O. Angio-adaptation in unloaded skeletal muscle: new insights into an early and muscle type-specific dynamic process. *J Physiol* **2010**, *588*, 4579-4591,

- doi:10.1113/jphysiol.2010.193243.
161. Olfert, I.M.; Birot, O. Importance of anti-angiogenic factors in the regulation of skeletal muscle angiogenesis. *Microcirculation* **2011**, *18*, 316-330, doi:10.1111/j.1549-8719.2011.00092.x.
162. Hirayama, Y.; Nakanishi, R.; Maeshige, N.; Fujino, H. Preventive effects of nucleoprotein supplementation combined with intermittent loading on capillary regression induced by hindlimb unloading in rat soleus muscle. *Physiol Rep* **2017**, *5*, doi:10.14814/phy2.13134.
163. Kanazashi, M.; Tanaka, M.; Murakami, S.; Kondo, H.; Nagatomo, F.; Ishihara, A.; Roy, R.R.; Fujino, H. Amelioration of capillary regression and atrophy of the soleus muscle in hindlimb-unloaded rats by astaxanthin supplementation and intermittent loading. *Exp Physiol* **2014**, *99*, 1065-1077, doi:10.1113/expphysiol.2014.079988.
164. Woodman, C.R.; Schrage, W.G.; Rush, J.W.; Ray, C.A.; Price, E.M.; Hasser, E.M.; Laughlin, M.H. Hindlimb unweighting decreases endothelium-dependent dilation and eNOS expression in soleus not gastrocnemius. *J Appl Physiol* (1985) **2001**, *91*, 1091-1098, doi:10.1152/jappl.2001.91.3.1091.
165. Ham, D.J.; Kennedy, T.L.; Caldow, M.K.; Chee, A.; Lynch, G.S.; Koopman, R. Citrulline does not prevent skeletal muscle wasting or weakness in limb-casted mice. *J Nutr* **2015**, *145*, 900-906, doi:10.3945/jn.114.203737.
166. Sakamoto, K.; Hirshman, M.F.; Aschenbach, W.G.; Goodyear, L.J. Contraction regulation of Akt in rat skeletal muscle. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 11910-11917, doi:10.1074/jbc.M112410200.
167. Consitt, L.A.; Saneda, A.; Saxena, G.; List, E.O.; Kopchick, J.J. Mice

- overexpressing growth hormone exhibit increased skeletal muscle myostatin and MuRF1 with attenuation of muscle mass. *Skelet Muscle* **2017**, 7, 17, doi:10.1186/s13395-017-0133-y.
168. Moore, D.R.; Robinson, M.J.; Fry, J.L.; Tang, J.E.; Glover, E.I.; Wilkinson, S.B.; Prior, T.; Tarnopolsky, M.A.; Phillips, S.M. Ingested protein dose response of muscle and albumin protein synthesis after resistance exercise in young men. *Am J Clin Nutr* **2009**, 89, 161-168, doi:10.3945/ajcn.2008.26401.
169. Reidy, P.T.; Rasmussen, B.B. Role of Ingested Amino Acids and Protein in the Promotion of Resistance Exercise-Induced Muscle Protein Anabolism. *J Nutr* **2016**, 146, 155-183, doi:10.3945/jn.114.203208.
170. Tipton, K.D.; Elliott, T.A.; Cree, M.G.; Wolf, S.E.; Sanford, A.P.; Wolfe, R.R. Ingestion of casein and whey proteins result in muscle anabolism after resistance exercise. *Med Sci Sports Exerc* **2004**, 36, 2073-2081, doi:10.1249/01.mss.0000147582.99810.c5.
171. Dideriksen, K.J.; Reitelseder, S.; Petersen, S.G.; Hjort, M.; Helmark, I.C.; Kjaer, M.; Holm, L. Stimulation of muscle protein synthesis by whey and caseinate ingestion after resistance exercise in elderly individuals. *Scand. J. Med. Sci. Sports* **2011**, 21, e372-383, doi:10.1111/j.1600-0838.2011.01318.x.
172. Reagan-Shaw, S.; Nihal, M.; Ahmad, N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* **2008**, 22, 659-661, doi:10.1096/fj.07-9574LSF.