フレイルのバイオマーカー研究の展望

Metabolites for frailty biomarkers

亀田 雅博 近藤 祥司

要約

現在、老化先進国日本では、「老化の多様性」に直面しつつある。遺伝的獲得形質とは異なり、環境改善による寿命延長は、個体差や地域差の影響が出やすいので、「老化の多様性」に繋がる可能性がある。寝たきりの手前の状態であるフレイルも増加している。フレイルでは筋力低下のような身体的問題だけでなく、認知機能障害などの精神・心理的問題、独居などの社会的問題を含む。

メタボロームは、細胞が生きている間に合成・代謝する非常に小さなメタボライト（代謝物）成分（低分子）を、マススペクトロメトリーなどを応用する事により網羅的に計測する最先端技術である。メタボロームにより、新規バイオマーカーや、病態の解明が報告されている。フレイルに関するバイオマーカーも最近散見されるが、必ずしもその知見が一致せず、議論されている。その一因は、①メタボローム手技自身の多様性と、②フレイルの病態の多面性にあると考えられる。

我々は、独自のヒト血液メタボローム解析方法を構築し、①日周変動、②赤血球に豊富か、③個人差などの解析を重ねた。この技術を用いて、14個の老化マーカー、44個の飢餓マーカー、15個のフレイルマーカーなどの同定に成功した。特にフレイルマーカーに関しては、①抗酸化物質低下、②認知機能関連メタボライトのフレイルマーカーとの重複、③筋肉や窒素代謝関連メタボライトの運動能低下との関連、④老化マーカーと、フレイルマーカーの重複など、興味深い知見を得た。

他のグループのフレイルメタボライトを含め、その進展を概説する。

Key words フレイル, メタボライト, 抗酸化, 認知能, アミノ酸

(日老医誌 2021 ; 58 : 333-340)

背景

世界的な高齢化の結果、介護リソースなどの負担が各国での大きな課題となっている。このような中で寝たきりや老衰の手前の状態である“フレイル”が注目されている¹⁾。フレイルとは「高齢期に生理的予備能が低下することでストレスに対する脆弱性が亢進し、生活機能障害、要介護状態、死亡などの転帰に陥りやすい状態」である¹²⁾。フレイルは可逆性であることも

特徴とされ、運動や栄養摂取にて改善する余地がある状態とされる。そのため、早期に診断し介入治療することが重要視されてきている³⁾。フレイルには現在3つの主要な診断基準がある⁴⁵⁾。①身体的フレイルの評価であるFriedらによるCHS基準¹⁾、②multimorbidityをカバーしているRockwoodらによるFrailty Index⁶⁾、そして③エドモントンフレイルスケールなどの身体、認知、社会性を評価する総合診断ツールである⁷⁾。しかしながら、フレイルの病態そのものは不明

京都大学医学部附属病院高齢者医療ユニット

連絡責任者：近藤祥司 京都大学医学部附属病院高齢者医療ユニット〔〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町 54〕

e-mail: hkondoh@kuhp.kyoto-u.ac.jp

doi: 10.3143/geriatrics.58.333

な点が多い。この分析のためにゲノミクス、プロテオミクス、メタボロミクスなどの最新技術を利用した研究が行われている。

メタボロミクスはLC-MSなどにより低分子であるメタボライトを検出し、統計学的手法により解析する新しい科学的手法の1つである。メタボロミクスは疾患の病態生理の解明や、診断マーカーやバイオマーカーの探索の為に利用されている^{8)~10)}。

血液メタボライトは、遺伝、エピジェネティクス、恒常性維持機構や疾患状態のほかに、生理的反応や、ライフスタイル、栄養摂取など環境因子からも影響を受ける^{11)~13)}。よって、メタボライトプロファイルの解析は、フレイルの病態解明やバイオマーカー探索にも有力と思われた。

最近のフレイルに関する6つのメタボライトマーカー探索研究が報告されている^{14)~19)}。しかしながら、これらの報告は異なる研究デザインに基づいており、統一した結論がない状態であった(表1)。

フレイルマーカー既報における研究デザインの違い

これらフレイルマーカーの論文の条件を比較してみると、Pujos-Guillot E, Marron Mらの論文は、認知機能評価が診断基準に入っていないFriedらによるCHSでフレイル診断がなされており、他の論文は認知機能や社会機能、医療評価などを含むRockwoodらによるFrailty Indexを使用していた(表2)。また対象がフレイルではなくプレフレイルを対象にしている論文も存在した¹⁶⁾。Adachiらの論文では重度寝たきりのフレイルが対象に含まれていた¹⁴⁾。以上の様に、同じフレイルを対象としていても、その詳細は、サルコペニック・フレイルや寝たきりまで含んでおり、患者群に隔たりがあった。実際に同じフレイルという集団でも、BMIなどの臨床パラメーターが地域や集団において増減することを認めた(表2)。一部の研究では、50歳代の患者も含まれていた。このように、研究により患者背景が異なると考える。

次に、メタボライトの計測については、これらの研究では、筋肉、血清、血漿などがサンプルとして利用

されていた。後述するように、細胞成分の有無がメタボロームの結果に差異を生じた可能性がある。またメタボライトの測定機器もLC-MSとGC-MSが併用されている場合もあり、計測機器の特性により計測しやすいメタボライトが存在することがメタボロームの差異に影響したと考えられる。また、メタボライトの測定値は、食事摂取やサンプル準備方法にも大きく影響を受けるのはよく知られているが、これらの研究では、絶食の条件や凍結保存処理のプロトコルに差異が認められた。このような解析方法の違いが、メタボローム測定結果にも影響すると考えられる。メタボローム研究においては実験サイズ以外に、患者プロファイルや実験プロトコルなども重要と思われる所以である²⁰⁾。

全血メタボローム技術の樹立

これまでヒトメタボロミクスにおいて、酵母とヒトのメタボロームの相同性、日内変動、血液の細胞分画差異、個人差についての研究を通じて、当研究室では全血において非標的かつ包括的な分析を行うメタボローム解析技術を確立した^{21)~24)}。この解析技術을もちいて、健康な若年者と高齢者の血液に対してメタボローム解析を行った結果、14個の老化に関連するメタボライトを報告した²⁴⁾。高齢者では抗酸化や酸化還元に関連するメタボライトの減少や尿素回路に関わるメタボライトの上昇を認めるなど、ヒト老化における多彩で複雑な生命現象を観察した。また若年健康者を対象にした絶食のメタボローム研究では、44の飢餓マーカーを同定した²⁵⁾。

全血メタボロームの有用性はいくつかある。①赤血球優位なメタボライトも計測可能となる点(図1)、②細胞成分メタボライトの安定性を確保しやすい点などである。実際、上記の14個の老化マーカーのうち、6個が赤血球優位なメタボライトであり、全血メタボローム解析の有用性が確認された。

この全血メタボローム技術を用いて、我々は、液体クロマトグラフィー質量分析器(LC-MS)により網羅的血液メタボロミクス解析をフレイル症例に対して行った。この結果、抗酸化物質、アミノ酸などを含む22のフレイル関連メタボライトを同定した²⁶⁾。その詳

表1 既報のフレイルマーカーのリスト

Report	抗酸化	アミノ酸	カルニチン	プリン代謝	尿素回路・腎機能	クエン酸回路	糖類	グルクロン酸
Adachi Y. et al. (2018)		(↑) グルタミン酸 (↓) チロシン, ヒスチジン, イソロイシン ロイシン, リジン, メチオニン フェニルアラニン, スレオニン トリプトファン, バリン						
Pujos-Guillot E. et al. (2019)		(↑) グルタミン酸, スレオニン	(↑) C5 カルニチン				(↓) マンノース	
Marron M. et al. (2019)		(↓) トリプトファン, ロイシン メチオニン, チロシン ヒスチジン, アスパラギン	(↑) C4 カルニチン	(↑) 尿酸	(↑) クレアチニン ジメチルアルギニン	(↑) フマル酸 マロン酸		(↑) グルクロン酸
Rattray N. et al. (2019)	(↓) γ トコトリエノール	(↑) D トリプトファン	(↓) 6つの長鎖 カルニチン	(↓) ウリジン	(↑) アルギニン	(↑) クエン酸	(↑) D- グルコース (↓) ミオイノシトール (↑) マンノース	
Livshits G. et al. (2018)		(↑) グルタミン酸, プロリン	(↑) C4 カルニチン	(↑) 尿酸, ウリジン				
Fazelzadeh P. et al. (2016)	(↓) カルノシン	(↓) ヒスチジン, セリン, グリシン チロシン, トリプトファン メチオニン, グルタミン酸	(↓) C0, C3, C5, C8 カルニチン			(↓) クエン酸		
Kameda M. et al. (2020)	(↓) アセチルカルノシン オキシカルニチン エルゴチオネイン	(↓) ロイシン, イソロイシン トリプトファン, メチオニン プロリン	(↓) C5 カルニチン	(↓) 尿酸				(↑) UDP- グルクロン酸

表2 既報のフレイルマーカーについての研究デザインのとまとめ

	実験 サイズ	サンプル	フレイル 診断	年齢	ボディマス 指数 (フレイル群)	絶食条件	測定機器
Adachi Y. et al. 2018	N = 59	血漿	CSHA-CFS	平均 83.0 歳	↓	一晩絶食	LC-MS
Pujos-Guillot E. et al. 2019	N = 60	血清	CHS (Prefrail)	平均 71.3 歳	→	N.D.	LC-MS
Marron M. et al. 2019	N = 287	血漿	SAVE (Modified CHS)	70 ~ 79 歳	→	8 時間以上	LC-MS
Rattray N. et al. 2019	N = 1,191	血清	Rockwood	56 ~ 84 歳 (平均 67.7 歳)	N.D.	N.D.	LC-MS GC-MS
Livshits G. et al. 2018	N > 2,000	血漿	Rockwood	23 ~ 85 歳 (平均 60.5 歳)	N.D.	6 時間以上	LC-MS
Fazelzadeh P. et al. 2016	N = 107	筋肉	CHS	平均 74.0 歳	↑	N.D.	LC-MS GC-MS NMR
Kameda M. et al. 2020	N = 19	全血	EFS	74 ~ 96 歳 (平均 84.2 歳)	→	12 時間以上	LC-MS

Plasma Sugar and derivatives 4 myo-Inositol 1,5 Anhydroglucitol Glucosamine Glucose Carnitines 7 Butyryl-carnitine Carnitine Hexanoyl-carnitine Isovaleryl-carnitine Dodecanoyl-carnitine Decanoyl-carnitine Octanoyl-carnitine Choline derivatives 2 CDP-choline Glycerophosphocholine Organic acids 7 Ketoisoleucine Citrate Glutarate 2-oxoglutarate Chenodeoxycholic acid cis-Aconitate Glyceric acid Methylated amino acids 5 Dimethyl-arginine Methyl-histidine Betaine Dimethyl-lysine Methyl-lysine Vitamins 2 4-Aminobenzoate Pantothenate	Amino acids and derivatives 28 2-aminoadipate Arginine Asparagine Citrulline Creatinine Histidine Phenylalanine Taurine Tryptophan Tyrosine Glutamine Glutamate methyl ester Hippurate Arginino-succinate Histamine Indoxyl-sulfate Isoleucine Kynurenine Leucine Ornithine Lysine Methionine Threonine Valine Quinic acid Quinolinic acid Proline Serine Acetylated amino acids 8 N-acetyl-arginine N-acetyl-glutamate N-acetyl-glutamine N-acetyl-isoleucine N2-acetyl-lysine N6-acetyl-lysine N-acetyl-ornithine N-acetyl-aspartate Nucleosides, nucleobases and derivatives 13 1-Methyl-adenosine 1-Methyl-guanosine Cytidine Hypoxanthine Urate Uridine Adenosine Adenine Caffeine Dimethyl-guanosine Dimethyl-xanthine Guanosine Uracil	Red blood cell Redox 7 Glutathione NAD+ NADP+ Ergothioneine <i>Ophthalmic acid</i> NADH NADPH Nucleotides 12 ADP AMP ATP GTP GDP IMP GMP UDP UMP UTP CDP <u>CTP</u> Sugar phosphates 11 6-phosphogluconate Diphospho-glycerate Fructose-1,6-diphosphate Fructose-6-phosphate Phosphoglycerate Glycerol-2-phosphate Glucose 6-phosphate Glyceraldehyde 3-phosphate Phosphoenolpyruvate Sedoheptulose 7-phosphate Pentose phosphate Methylated amino acids 8 Butyrobetaine Trimethyl-lysine Dimethyl-proline S-methyl-ergothioneine Trimethyl-histidine Trimethyl-phenylalanine Trimethyl-tryptophan Trimethyl-tyrosine Nucleotide-sugar derivatives 5 UDP-glucose GDP-glucose UDP-acetyl-glucosamine UDP-glucuronate N-acetyl-D-glucosamine Carnitines 3 Acetyl-carnitine Propionyl-carnitine Tetradecanoyl-carnitine Others 9 Citramalate Creatine Phosphocreatine Gluconate Glutamate Malate Aspartate Fumarate Nicotinamide Methylation related 2 S-adenosyl-homocysteine S-adenosyl-methionine
-Plasma 76-		-RBC 57-

Chaleckis R, et al. *Mol Biosyst.* 2014

図1 全血メタボロームにおける赤血球優位なメタボライトと血漿優位なメタボライトのリスト

図2 全血メタボロミクスにおける老化関連マーカーのまとめ

- フレイル
- ⋯ 移動能低下
- - - 認知能低下
- · - · 老化マーカー
- 抗酸化物質
- ↑ 増加しているメタボライト

細を解説する。

全血メタボロームによるフレイルマーカー解析

臨床的に歩行機能や認知機能などの生理的機能が有意差を持って低下していたフレイル群に対して、網羅的血液メタボローム解析を行い、15のフレイルマーカー、6つの認知能マーカー、12の移動能マーカーの合計22のフレイル関連マーカーを報告した²⁶⁾。15のフレイルマーカーのうち、7つ (*acetyl-carnosine*, *ergothioneine* (ET), *S-methyl-ergothioneine* (*S-methyl-ET*), *trimethyl-histidine*, *ophthalmic acid* (OA), *2-ketobutyrate*, *urate*) が抗酸化に関連するメタボライトであった (図2)。*Acetyl-carnosine* は *carnosine* がアセチル化された物質で、*Carnosine* はジペプチドであり抗酸化作用を持つと言われている²⁷⁾。

Trimethyl-histidine や *S-methyl-ET* は ET 合成に関わるとされるメタボライトで²⁸⁾、OA は抗酸化物質のグルタチオンの代謝に関わっており²⁹⁾、*2-ketobutyrate* は OA の前駆物質といわれている。したがって、ET や OA の代謝経路がフレイルにおいて影響を受けていると考えられる。また、5つのアミノ酸 (*methionine*, *proline*, *tryptophan*, *isoleucine*, *leucine*) がフレイルで低下していることを報告したが、3つのアミノ酸 (*methionine*, *proline*, *tryptophan*) は抗酸化に関わることが報告されていた^{30)~33)}。つまり今回の細胞分画の情報を含む全血フレイルメタボロームにおいては、広範囲な系において抗酸化物質が低下している可能性を示唆していた (表1, 図2)。

最近の縦断研究の知見でも抗酸化物質のフレイルへの関与が示唆されており、見解が一致している³⁴⁾。同時に報告した認知マーカーや運動マーカーは一部フレイルマーカーと重複し、フレイルは年齢に関連する障

害と相関する病態であることがメタボライト側からも示唆された (図 2)²⁶⁾。

認知能関連では 6 つ中 (acetyl-carnosine, ET, tryptophan, creatine, UDP-glucuronate, UDP-glucose) 5 つのメタボライトが重複し, 3 つが抗酸化に関わるメタボライトであった。また 12 の移動能マーカー (acetyl-carnosine, OA, 2-ketobutyrate, methionine, proline, UDP-glucuronate, N 3-methyl-histidine, isovaleryl-carnitine, arginine, hippurate, adenine, N-acetyl-aspartate) を報告したが, フレイルマーカーと重複しない窒素代謝や筋肉に関連する 4 つのメタボライトを報告した。N3-methyl-histidine は筋肉の崩壊の指標となる筋肉のマーカーとして報告されており³⁵⁾, arginine は尿素回路を構成するアミノ酸で窒素代謝に関わっている。Isovaleryl-carnitine は短鎖のカルニチンであり, カルニチンは筋肉に豊富に存在し, ミトコンドリアへ Acetyl-CoA を供給する。Hippurate は主にミトコンドリアで代謝されアンモニア代謝に関わっていると報告されている³⁶⁾。4 つのメタボライトとも移動能低下群にて低値を示していた。

また興味深いことに, これらのフレイルマーカーと老化メタボライトは一部重複しており (acetyl-carnosine, OA, 1,5-anhydroglucitol (1,5-AG), isoleucine, leucine), 老化とフレイルにおける共通の代謝系が存在する可能性を示唆していた (図 2)²⁴⁾²⁶⁾。ハルマンは老化の酸化ストレス仮説を提唱した³⁷⁾。フレイルは「高齢期に生理的予備能が低下することでストレスに対する脆弱性が亢進し, 生活機能障害, 要介護状態, 死亡などの転帰に陥りやすい状態」とされるが, この原因は生体の抗酸化物質の低下が, ストレスへの脆弱性に反映されている可能性がある。そして老化とフレイルの共通の病態生理として, 抗酸化機能が含まれている可能性がある。

おわりに

フレイルのメタボローム研究は, 始まったばかりである。現状では, フレイルの診断法の違いや, メタボローム解析方法の違いにより, 結論が異なる。一方, 我々の全血メタボローム研究では, フレイルスケール,

認知能検査, 移動能検査と言った臨床知見に基づき高齢者を多面的に評価し, フレイル・非フレイル群のメタボロームとの比較を統計学的に解析した。131 例のメタボライトの網羅的解析により, 22 のフレイル関連マーカーを発見した。今後これらメタボロームの知見が, 臨床応用含めて, 研究の進展に寄与することを期待したい。

謝辞

この研究は沖縄科学技術大学院大学の柳田充弘教授と照屋貴之博士のご協力によって行われました。

著者の COI (Conflict of Interest) 開示: 本論文発表内容に関連して特に申告なし

文献

- 1) Fried LP, Tangen CM, Walston J, Newman AB, Hirsch C, Gottdiener J, et al.: Frailty in older adults: evidence for a phenotype. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2001; 56: M146-156.
- 2) Chen X, Mao G, Leng SX: Frailty syndrome: an overview. *Clin Interv Aging* 2014; 9: 433-441.
- 3) Yamada M, Arai H: Self-Management Group Exercise Extends Healthy Life Expectancy in Frail Community-Dwelling Older Adults. *Int J Environ Res Public Health* 2017; 14.
- 4) Dent E, Lien C, Lim WS, Wong WC, Wong CH, Ng TP, et al.: The Asia-Pacific Clinical Practice Guidelines for the Management of Frailty. *J Am Med Dir Assoc* 2017; 18: 564-575.
- 5) Dent E, Dal Grande E, Price K, Taylor AW: Frailty and usage of health care systems: Results from the South Australian Monitoring and Surveillance System (SAMSS). *Maturitas* 2017; 104: 36-43.
- 6) Rockwood K, Stadnyk K, MacKnight C, McDowell I, Hebert R, Hogan DB: A brief clinical instrument to classify frailty in elderly people. *Lancet* 1999; 353: 205-206.
- 7) Rolfson DB, Majumdar SR, Tsuyuki RT, Tahir A, Rockwood K: Validity and reliability of the Edmonton Frail Scale. *Age Ageing* 2006; 35: 526-529.
- 8) Sreekumar A, Poisson LM, Rajendiran TM, Khan AP, Cao Q, Yu J, et al.: Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progres-

- sion. *Nature* 2009; 457: 910–914.
- 9) Suhre K, Shin SY, Petersen AK, Mohny RP, Meredith D, Wägele B, et al.: Human metabolic individuality in biomedical and pharmaceutical research. *Nature* 2011; 477: 54–60.
 - 10) van der Greef J, van Wietmarschen H, van Ommen B, Verheij E: Looking back into the future: 30 years of metabolomics at TNO. *Mass Spectrom Rev* 2013; 32: 399–415.
 - 11) Psychogios N, Hau DD, Peng J, Guo AC, Mandal R, Bouatra S, et al.: The human serum metabolome. *PLoS One* 2011; 6: e16957.
 - 12) Blackburn EH, Epel ES, Lin J: Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science* 2015; 350: 1193–1198.
 - 13) Kastenmuller G, Raffler J, Gieger C, Suhre K: Genetics of human metabolism: an update. *Hum Mol Genet* 2015; 24: R93–R101.
 - 14) Adachi Y, Ono N, Imaizumi A, Muramatsu T, Andou T, Shimodaira Y, et al.: Plasma Amino Acid Profile in Severely Frail Elderly Patients in Japan. *Int J Gerontol* 2018; 12: 290–293.
 - 15) Livshits G, Malkin I, Bowyer RCE, Verdi S, Bell JT, Menni C, et al.: Multi-OMICS analyses of frailty and chronic widespread musculoskeletal pain suggest involvement of shared neurological pathways. *Pain* 2018; 159: 2565–2572.
 - 16) Pujos-Guillot E, Petera M, Jacquemin J, Centeno D, Lyan B, Montoliu I, et al.: Identification of Pre-frailty Sub-Phenotypes in Elderly Using Metabolomics. *Front Physiol* 2018; 9: 1903.
 - 17) Marron MM, Harris TB, Boudreau RM, Clish CB, Moore SC, Murphy RA, et al.: Metabolites Associated with Vigor to Frailty Among Community-Dwelling Older Black Men. *Metabolites* 2019; 9.
 - 18) Rattray NJW, Trivedi DK, Xu Y, Chandola T, Johnson CH, Marshall AD, et al.: Metabolic dysregulation in vitamin E and carnitine shuttle energy mechanisms associate with human frailty. *Nat Commun* 2019; 10: 5027.
 - 19) Fazelzadeh P, Hangelbroek RW, Tieland M, de Groot LC, Verdijk LB, van Loon LJ, et al.: The Muscle Metabolome Differs between Healthy and Frail Older Adults. *J Proteome Res* 2016; 15: 499–509.
 - 20) Kondoh H, Kameda M, Yanagida M: Whole Blood Metabolomics in Aging Research. *Int J Mol Sci* 2020; 22.
 - 21) Pluskal T, Nakamura T, Villar-Briones A, Yanagida M: Metabolic profiling of the fission yeast *S. pombe*: quantification of compounds under different temperatures and genetic perturbation. *Mol Biosyst* 2010; 6: 182–198.
 - 22) Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A, Oresic M: MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics* 2010; 11: 395.
 - 23) Chaleckis R, Ebe M, Pluskal T, Murakami I, Kondoh H, Yanagida M: Unexpected similarities between the *Schizosaccharomyces* and human blood metabolomes, and novel human metabolites. *Mol Biosyst* 2014; 10: 2538–2551.
 - 24) Chaleckis R, Murakami I, Takada J, Kondoh H, Yanagida M: Individual variability in human blood metabolites identifies age-related differences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113: 4252–4259.
 - 25) Teruya T, Chaleckis R, Takada J, Yanagida M, Kondoh H: Diverse metabolic reactions activated during 58-hr fasting are revealed by non-targeted metabolomic analysis of human blood. *Sci Rep* 2019; 9: 854.
 - 26) Kameda M, Teruya T, Yanagida M, Kondoh H: Frailty markers comprise blood metabolites involved in anti-oxidation, cognition, and mobility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020; 117: 9483–9489.
 - 27) Prokopieva VD, Yarygina EG, Bokhan NA, Ivanova SA: Use of Carnosine for Oxidative Stress Reduction in Different Pathologies. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 2939087.
 - 28) Asmus KD, Bensasson RV, Bernier JL, Houssin R, Land EJ: One-electron oxidation of ergothioneine and analogues investigated by pulse radiolysis: redox reaction involving ergothioneine and vitamin C. *Biochem J* 1996; 315 (Pt 2): 625–629.
 - 29) Soga T, Baran R, Suematsu M, Ueno Y, Ikeda S, Sakurakawa T, et al.: Differential metabolomics reveals ophthalmic acid as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption. *J Biol Chem* 2006; 281: 16768–16776.
 - 30) Marcuse R: Antioxidative effect of amino-acids. *Nature* 1960; 186: 886–887.
 - 31) Liang X, Zhang L, Natarajan SK, Becker DF: Proline mechanisms of stress survival. *Antioxid Redox Signal* 2013; 19: 998–1011.
 - 32) Maleknia SD, Brenowitz M, Chance MR: Millisecond radiolytic modification of peptides by synchrotron X-rays identified by mass spectrometry. *Anal Chem* 1999; 71: 3965–3973.

- 33) Meucci E, Mele MC: Amino acids and plasma antioxidant capacity. *Amino Acids* 1997; 12: 373–377.
- 34) Marron MM, Harris TB, Boudreau RM, Clish CB, Moore SC, Murphy RA, et al.: A metabolite composite score attenuated a substantial portion of the higher mortality risk associated with frailty among community-dwelling older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2020.
- 35) Sjolín J, Stjernström H, Henneberg S, Hambræus L, Friman G: Evaluation of urinary 3-methylhistidine excretion in infection by measurements of 1-methylhistidine and the creatinine ratios. *Am J Clin Nutr* 1989; 49: 62–70.
- 36) Lees HJ, Swann JR, Wilson ID, Nicholson JK, Holmes E: Hippurate: the natural history of a mammalian-microbial cometabolite. *J Proteome Res* 2013; 12: 1527–1546.
- 37) Harman D: Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956; 11: 298–300.
-