

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 岡田ゆう紀

本論文は、生命活動に不可欠なエネルギー産生機構が動物種により、あるいは生理状態によりどのように変動しているかを明らかにすることを目的としている。エネルギー代謝の新たなマーカーとされる M/L 比を中心に、その犬と猫での違い、1 型糖尿病での変化、激しいトレーニングを行っている競走馬、人為的に肥満を誘発した犬でどのように変化するかを検討した。最終的にそれらをまとめて M/L 比の診断マーカーとしての有用性を検討した。

具体的には細胞質の解糖系とミトコンドリアの電子伝達系を介した ATP 産生をつなぐ NADH 輸送の主要経路であるリンゴ酸-アスパラギン酸シャトル (MA シャトル: malate-aspartate shuttle) の律速酵素活性が動物のエネルギー代謝や健康状態を反映してどのように変動するか検討した。NADH は解糖により細胞質で発生する高エネルギー電子であり、ミトコンドリア内の電子伝達系-ATP 産生に必要不可欠な分子である。NADH はミトコンドリア内膜を直接通過出来ないためリンゴ酸-アスパラギン酸シャトルやグリセロリン酸シャトルを介してミトコンドリア内に  $H^+$  が輸送される。リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (malate dehydrogenase, MDH) はリンゴ酸-アスパラギン酸シャトルの律速酵素で、エネルギー代謝亢進 (ATP 産生) を反映する。乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH: lactate dehydrogenase) は解糖系の最終段階でピルビン酸と乳酸の可逆反応を触媒し、NADH と酸化型  $NAD^+$  の変換を共役的に促進する酵素で、細胞質内に最も多量に存在し、その活性が比較的安定していることから細胞質マーカーと捉えられる。MDH 活性を LDH 活性で除して MDH/LDH 比 (M/L 比) を算出し、これを新たなエネルギー代謝マーカーとした。激しい運動、がん細胞などエネルギー需要の著しい上昇が認められる細胞ではミトコンドリアの ATP 産生の活性化が期待され、その細胞質およびミトコンドリアにおいて MDH 活性と M/L 比の有意な上昇が認められる。一方、糖尿病など代謝障害やエネルギーの節約が求められる状況下では、MDH 活性、M/L 比が

減少することがこれまでの当該研究室の研究で明らかにされている。

### 1. 犬と猫の白血球エネルギー代謝と血漿代謝産物濃度の比較

猫白血球内のエネルギー代謝酵素、MDH、LDH、M/L比とグルタミン酸デヒドロゲナーゼ（GLDH: glutamate dehydrogenase）活性を測定し、犬の値と比較した。GLDHはグルタミン酸の可逆的な酸化脱アミノ反応を触媒するミトコンドリア酵素で、アミノ酸と糖代謝の相互接続に関連している。猫ではこれらの活性が犬に比べ有意に低いことから、猫の細胞ではグルコースがエネルギー源として犬のように有効に利用されていない可能性が示唆された。また猫ではフルクトキナーゼ（FK: fructose kinase）活性が高く、これは活発なフルクトース代謝を示唆し、それに伴うピルビン酸キナーゼ（PK: pyruvate kinase）、グルコース-6-リン酸脱水素酵素（G6PD: glucose-6-phosphate dehydrogenase）活性の高値は脂肪酸合成の亢進を示唆する。これらの違いは犬・猫の種特異的な糖脂質代謝機構の違いに由来し、特に猫のエネルギー源としての栄養素に対する特徴的な需要と消費（犬に比べグルコースへの依存度が低く、アミノ酸への依存度が高い）を表すとともに、犬に比べて猫で頻発する肥満、インスリン抵抗性、2型糖尿病の発症メカニズム解明の糸口となると申請者は考察している。

### 2. 1型糖尿病犬と正常犬の白血球MDH活性、M/L比の比較

高値の血漿グルコース、トリグリセリド、遊離脂肪酸を示した糖尿病犬では、MDH活性とM/L比の有意な低下がみとめられた。糖尿病のような糖代謝が著しく低下した状態では、MAシャトル活性の低下がみられ、これは糖尿病で懸念される末梢組織でのグルコースの取り込みと利用の障害につながる。M/L比は糖尿病犬におけるエネルギー代謝障害の有用なマーカーになり得る。

### 3. サラブレッド競走馬と乗用馬の血漿と白血球のM/L比の比較

激しいトレーニングを行っている競走馬では、血漿MDHとLDH活性の上昇

が認められ、M/L比は乗用馬の2倍であった。さらに、競走馬では血漿遊離脂肪酸、トリグリセリド、総コレステロールの有意な高値が認められ、肝臓と骨格筋におけるエネルギー代謝の亢進を反映している。血漿脂質代謝関連物質（アディポネクチン、遊離脂肪酸、トリグリセリド、総コレステロール）は組織における脂肪代謝活性を反映し、エネルギー代謝亢進を誘導する。したがって、競走馬は激しい運動によりエネルギー要求量が増加し、グルコースに加えエネルギー源として脂肪をより積極的に利用することにより激しい運動に適応していると考えられた。競走馬においては、白血球のM/L比より血漿M/L比測定がエネルギー代謝指標として適当であると考えられた。その理由として、種特有の組織間のLDHアイソザイムプロファイルの相違が挙げられる。馬では血漿と白血球のアイソエンザイムが異なることが分かっており、血漿ではLDH1、2、3、白血球ではLDH3、4が優位である。一般にLDH1は心臓と赤血球、LDH2は単球とマクロファージ、LDH3は肺、LDH4は腎臓、胎盤、脾臓に多く見られ、LDH5は肝臓と横紋筋に多く存在する。したがって、血漿のLDHアイソザイムプロファイルは体全体におけるエネルギー代謝の状態を反映する。筋肉を主に体全体のエネルギー要求量が増大する競走馬では主に肝臓のエネルギー代謝状態を反映する白血球よりも全体のエネルギー代謝状態を反映する血漿M/L比のほうがより良い指標となり得ると申請者は考察している。

#### 4. 人為的な急性体重増加犬と正常犬のM/L比の比較

競走馬研究における血漿M/L比の有用性を受けて、血漿と白血球を用いたエネルギー代謝酵素活性を人為的に体重増加させた犬において測定した。目的はボディーコンディションスコア（BCS: body condition score）値とM/L比との相関を調べ、過体重・肥満に随伴する脂質代謝異常や代謝性疾病の予防につながる早期段階での肥満判定基準の確立である。4週間、過食状態（2×維持エネルギー要求量（MER: maintenance energy requirement））におかれ、平均28.2%の体重増加が認められたビーグル犬では、有意差はみとめられないものの、1×MERの食餌を与えられたコントロール群に比べM/L比

が上昇する傾向が血漿と白血球でみられた。これは過食に随伴する栄養過多とエネルギー代謝の上昇が M/L 比に反映されたことを示唆する。過体重の程度、体重増加のスピード、肥満の期間、肥満の種類、および供試サンプル（白血球、血漿、肝臓、筋組織）など課題はあるものの、M/L 比は新たな代謝マーカーとして早期の肥満を判定する指標のひとつとなり得る。

家庭動物の寿命延長に伴い、肥満、糖尿病などの生活習慣病とともに、癌など重篤な疾病の発生も増加している。重篤な疾病の発生を事前に予測し、早期発見するためには比較的容易かつ安価に測定できる血漿代謝産物を用いた評価・判定が有用となろう。M/L 比は体全体のエネルギー代謝状態を鋭敏に反映する。種々の疾病ではエネルギー代謝状態が変動するので、その変動を正確に反映する M/L 比は疾病の診断マーカーとして有用であると考えられる。一般生化学代謝マーカーに加え M/L 比の組み合わせにより患者のエネルギー代謝状態の正確かつ総合的な判定、それに基づいた早期の予防・治療戦略構築が可能となる。今後、より多くの疾病症例での検討により、その有用性がさらに高まることが期待されると申請者は結論している。

以上のように、本論文は、白血球および血漿 M/L 比が動物のエネルギー代謝状態を反映する有用なマーカーとなりうることを明らかにした。特に肥満や糖尿病などエネルギー代謝障害では早期診断マーカーとして応用できることを明らかにした点で、学術上、応用上貢献するところが少なくない。

よって審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。