

## 目 次

序論	3
<b>第1章 糖脂質代謝障害の疫学</b>	
1-1 動物の肥満の現状	8
1-2 肥満と疾病	13
1-3 糖尿病発症メカニズム	16
1-4 小括	18
<b>第2章 健康犬へのアスタキサンチン(ASX)投与</b>	
2-1 はじめに	19
2-2 実験方法	23
2-2-1 実験動物	
2-2-2 試薬	
2-2-3 投与方法	
2-2-4 サンプル採取	
2-2-5 測定項目と測定方法	
2-2-6 統計解析	
2-3 結果	25
2-4 考察	28
2-5 小括	29
<b>第3章 肥満犬へのアスタキサンチン(ASX)投与</b>	
3-1 はじめに	31
3-2 実験方法	31
3-2-1 供試動物	
3-2-2 試薬	
3-2-3 投与方法	

3-2-4	サンプル採取	
3-2-5	測定項目と測定方法	
3-2-6	統計解析	
3-3	結果	33
3-4	考察	37
3-5	小括	39

#### 第4章 糖尿病、クッシング症候群の犬へのアスタキサンチンの投与

4-1	糖尿病症例犬への ASX の投与例	41
4-1-1	症例の背景と ASX 投与方法および観察方法	
4-1-2	結果	
4-1-3	考察	
4-2	クッシング症候群症例犬への ASX の投与例	45
4-2-1	症例の背景と ASX 投与方法および観察方法	
4-2-2	結果	
4-2-3	考察	
4-3	小括	47

#### 第5章 まとめ

総括	51
文献	54
Summary	67
謝辞	70

## 序 論

わが国の獣医療は、第二次世界大戦後の社会的混乱期、戦後復興期、高度成長期を経て獣医学の教育体制の整備が進み、その後アメリカの獣医療に牽引される形で急速に進歩した。1970年以降には、それまで産業動物が中心だった獣医療に加えて、犬猫等の愛玩動物（ペット）を対象とした小動物獣医療の需要の高まりを背景に、基礎分野、臨床分野、公衆衛生分野、そして行政の領域に至るまで全方面に広がる目覚ましい進化を遂げている。さらに、近年の獣医療の高度化は、一部では人の高度医療に匹敵する域にまで発展している。同時に、人と動物の関係はより親密になり、家庭で飼育されている動物の存在は、飼い主と強い絆で結ばれたコンパニオンアニマル（伴侶動物）となっている。

現在、わが国は世界でも稀な超高齢化社会となっており、高齢者の加齢性疾患の有病率も高いため、それに関連した膨大な医療費が国家財政を圧迫している。かつては、人命を脅かす感染症による疾患が猛威を振るっていたが、20世紀後半からは、糖尿病や腎疾患、心臓血管系疾患、がんなどの非感染性疾患（non-communicable diseases, NCD）が増え、その治療にかかる費用も甚大である（井村 2015）。これは、感染性疾患は病原が微生物やウイルスであり、その治療や予防に対して薬剤が劇的な効果を発揮したのに対し、非感染性の疾患群の多くが、生体側の適応力、抵抗力の劣化すなわち老化(aging)によって発現するためである。老化現象は、組織および細胞の進行性の変化を特徴とする複雑な生物学的プロセスであり（Nabi 2010）、合成よりも劣化が優勢となり生物は老化する。老化の特徴は、病気とは異なり生物種のすべての個体に影響を与えることである。

獣医療においても、人の疾患発生傾向と同様で、家庭で飼育されている犬や猫の老化・高齢化に伴い、肥満、内分泌機能障害、腎疾患、変性関節疾患、歯周病、心臓病、行動問題、およびがん等の慢性疾患が増加傾向を示す。本邦の動物医療保険会社の統計では、5歳以下の犬の死亡原因となった主な疾患は、感染症や消化器疾患、腫瘍であるのに対し、10歳以上の犬の死亡原因は、腫瘍に続き、循環器疾患、泌尿器疾患が著しく増加している（アニコム家庭どうぶ

つ白書 2017) (須田 2011)。アメリカで調査された犬の死亡原因に関する研究 (Fleming 2011)においても、若齢犬の死亡原因と老齢犬の死亡原因は本邦の傾向とほとんど一致していた。

肥満状態は、多くの疾患の risk factor となる。人においては、メタボリックシンドロームは、内臓脂肪の蓄積と、それを基盤にしたインスリン抵抗性および糖代謝、脂質代謝異常、高血圧の集積するマルチプルリスクファクター症候群で、動脈硬化を発症しやすい病態と定義されている(メタボリックシンドローム診断基準検討委員会 2005)。メタボリックシンドロームの場合、心血管系疾患の罹患リスクは健常人の2倍高くなり、II型糖尿病の罹患リスクは健常人の5倍も高くなると言われている (Grundy SM 2004)。そしてそれらの病態は、遺伝的体質に加え、食事や運動などの基本的な生活習慣の乱れや偏りにより生じた肥満が起源となり危険因子の重積と加齢という経時的流れの中で種々の病態が連鎖して起こり、慢性腎臓病、糖尿病、終末として心血管系イベントの発症に至る一連の経過をたどる。この定型的なプロセスをメタボリックドミノ (Fig. 1) (伊藤 2011; 2018) といい、この考え方は人の予防医療を考える上で重要な概念でとなっている。



Fig. 1 メタボリックドミノ (伊藤裕、日本臨床 61 : 1837-1843. 2003 より引用)

犬においても、肥満がインスリン抵抗性、脂質異常症、体重の減量により改善する軽度の高血圧症と関連があることが報告されている(Jeusette IC 2005; German AJ 2009; Yamka RM 2006)。また、過体重の犬は糖尿病に罹患する可能性が高く(Lund EM 2006)、生涯にわたり過食させた場合、肥満し、代謝障害、寿命の低下につながる(Kealy RD 2002)。しかし、犬に発現する糖尿病のほとんどがI型糖尿病であることや、脂肪組織から分泌されるアディポネクチンが人では肥満で減少するのに対し、犬では肥満状態でも十分なアディポネクチンを分泌していること(Radin MJ 2009; Ricci R 2012; Brunson BL 2007)、CRPの上昇が、人においてはメタボリックシンドロームの一部としての心血管疾患や糖尿病のリスクと直接相関していたのに対し(Devarij S, 2009)、犬ではその傾向は様々であることから(Wakshlag JJ, 2011; TvariJonaviciute A 2013)、犬の肥満が必ずしも人のメタボリックシンドロームと一致したリスク生じるとは言えないが、自然発生的な肥満犬の約20%が人のメタボリックシンドロームに類似する犬の肥満関連代謝機能障害を呈しており(TvariJonaviciute A 2012)、肥満を防止することは糖脂質代謝に関連する疾患の発病および潜在的な死亡リスクの予防に重要な位置を占めていると考えられる。

近年、動物医療においても、健康寿命の延伸を目標とした予防医療が注目されている。予防医療は一次予防、二次予防、三次予防という形で構成されているが、ごく最近まで獣医療におけるその実態は、病気の早期発見、早期診断、早期治療に重点を置いたものであった(Fig. 2)。これは予防医療の中では、二次予防であり疾病段階での対策に当たる。しかし、健康寿命を延伸させるためには、前もって病気にならないための積極的な予防対策、すなわち一次予防である疾病前段階予防が重要である。一次予防の中で、感染症に関連する予防接種や寄生虫症に対する対策は長年実施されてきていることから、十分な成果を上げているところではあるが、健康寿命の延伸を妨げるインスリン抵抗性、高血圧、脂質代謝異常等を特徴とした肥満関連代謝機能障害に対する積極的な予防対策は不十分である。これらの病態には遺伝体質や環境因子が大きくかかわっており、個々の動物の背景により発病リスクが異なることから、健康検診や飼育指導においても、動物の体質を考慮した精度の高い健診プログラムを設計

するなどの介入が望まれる。

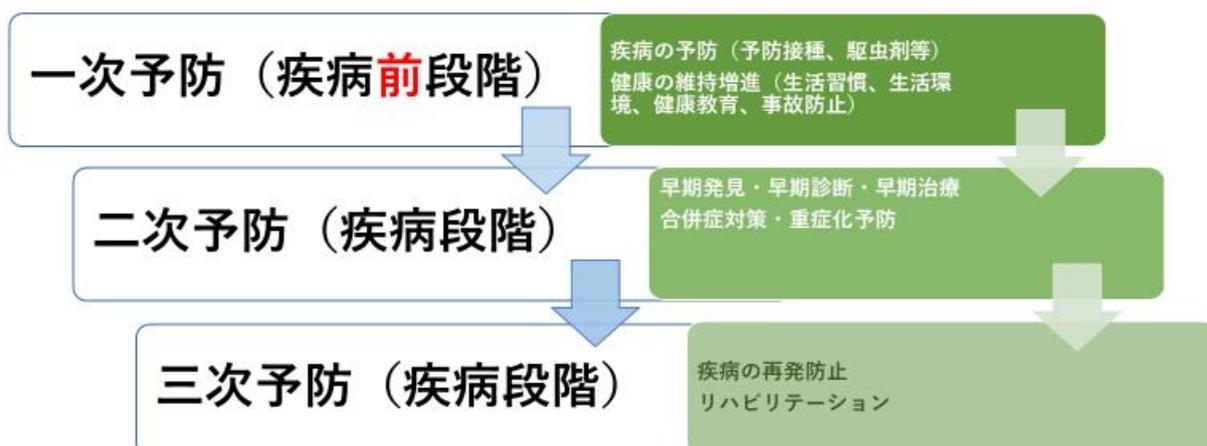


Fig. 2 予防医療の概念

肥満関連代謝機能障害の発病のトリガーとしては、老化、肥満、酸化ストレス、慢性炎症が深く関連している。潜在的な酸化ストレスの持続から細胞老化を引き起こし、細胞老化による異常を察知すると細胞の増殖は不可逆的に停止すると言われている(Takahashi 2006; Demaria 2014; Imai 2014)。その一方で、加齢とともに体内に蓄積した老化細胞は、さまざまな炎症性サイトカインやケモカイン、細胞外マトリックス分解酵素などの分泌タンパク質を高発現する細胞老化関連分泌現象(SASP)を伴い、周囲の細胞の細胞老化を誘導しさまざまな加齢性疾患の発症原因となることが示唆される(Takahashi 2012 ; Yoshimoto 2013)。よって、今後の獣医療において健康寿命の延伸を目標とした先制的な予防医療対策の中で、最も注視すべき局面は、肥満と老化現象を加速させる酸化ストレスを防ぐ健康指導であると推測される。肥満予防のための健康指導は、自ら選択したものを摂食するのではなく、飼い主から与えられた食物を生涯摂取する動物においては、飼い主自身の健康および栄養に対する意識が直接的に動物の健康あるいは将来罹患する疾病に大きく影響するためより肝心である。また、現在のところ動物薬には減量を目的にした治療薬はない。以前、選択的ミクロソームトリグリセリド輸送タンパク質(microsomal triglyceride transfer protein: MTP)阻害剤である *dirlotapide* (Slentol) が FDA の認証を受け、犬の肥満の治療

薬として発売されたが、その効果の如何に関わらず現在は使用されていない。肥満・過体重の治療として推奨されているのは、食事療法および運動療法であるが、目標を達成するのは容易ではない。

食品が生体に及ぼす機能は、栄養素としての一次機能、嗜好性に関与する二次機能、そして体調調節に深くかかわる三次機能の三つに分けられる。わが国では、1984年文部省特定研究「食品機能の系統的解析と展開」プロジェクトが開始され、その研究成果を受けて、1991年食品の三次機能を対象とした法律である「特定保健用食品制度」が施行され、科学的根拠に基づいて健康強調表示が許可された健康食品である通称「トクホ」食品が市場に流通するに至っている（清水 2015；寺尾 2007；山田 2017）。喫緊の課題である健康寿命の延伸を目的として、必須栄養素だけでなく非必須栄養素の生理活性成分を上手に利用した予防医療を推進する社会的な潮流は、小動物獣医療においても同様で、先制医療を啓発・牽引すべき臨床現場においては、疾病リスク低減の期待できる機能性成分を取り入れた健康指導が今後より有益になるものと考えられる。

以上のことから、本研究では、肥満や老化に伴い発生リスクの高い脂質代謝障害やメタボリックシンドローム発症予防に対し期待できる食品成分として、自然界に広く存在する天然カルテノイドの一種であるアスタキサンチンの利用について検討した。第1章では、糖脂質代謝障害の疫学について、動物の過体重・肥満の現状、肥満が疾病を起因する脂肪細胞の作用、糖尿病発症のメカニズムについて考察した。第2章では、アスタキサンチンが脂質代謝に及ぼす影響について検討する目的で、健常なビーグル犬へのアスタキサンチンの投与実験を行いその結果を考察した。第3章では肥満・過体重犬にアスタキサンチンを投与しその結果を考察した。第4章では糖尿病の犬の症例とクッシング症候群の犬の症例にアスタキサンチンの投与を行いその結果を考察した。第5章では、本研究の成果をまとめ、天然のカロテノイドであるアスタキサンチンをはじめ、食品成分が生体に及ぼす機能を利用した、予防医療の有益性について考察した。

## 第1章

### 糖脂質代謝障害の疫学

#### 1-1 動物の肥満の現状

肥満とはエネルギー摂取と消費の不均衡から、体内で余剰となったエネルギーが脂肪組織にトリグリセリドとして過剰に蓄積した状態と定義されている。犬が肥満する原因は、過食および運動不足によるエネルギーの不均衡が第一義とされるが、コンパニオンアニマルの場合、飼い主の過剰な愛情から食事以外に与えられる安価で容易に入手できるフードや口当たり良く美味しく加工されたおやつ等の多給、健康に関する認識不足や飼育上の注意不足によるところも大きな原因となる。

人においては、肥満は、わが国を含めた先進国だけでなく発展途上国においても顕著に増加しており、全世界的な健康問題となっている。日本では、ボディマスインデックス(BMI)を用い  $BMI \geq 25$  を肥満とし、それに加えて肥満に関連した健康障害を有するあるいは健康障害が予測される場合で医学的に減量を必要とする病態を肥満症とし単純肥満と区別している（日本肥満学会肥満症診断基準検討委員会 2000）。その後、脂質代謝関連の研究が進展し、脂肪細胞はトリグリセリドを蓄積する単なる貯蔵庫のような細胞ではなく、各種のアディポサイトカインと呼ばれる生理活性物質を産生・分泌し、生体機能の調整作用を担っており、その生化学的な作用の詳細が明らかにされてきたことから、肥満症を「脂肪細胞の質的異常による肥満症」と「脂肪細胞の量的異常による肥満症」の2つに分類している（日本肥満学会肥満症治療ガイドライン作成委員会 2006）(Fig. 3)。脂肪細胞の質的異常を呈するタイプは、内臓脂肪型肥満症でありメタボリックシンドローム型肥満症とも呼ばれ、種々の疾病を生じやすいため、皮下脂肪型肥満症より深刻であり警戒しなければならない病態とされている（Fig. 4）。

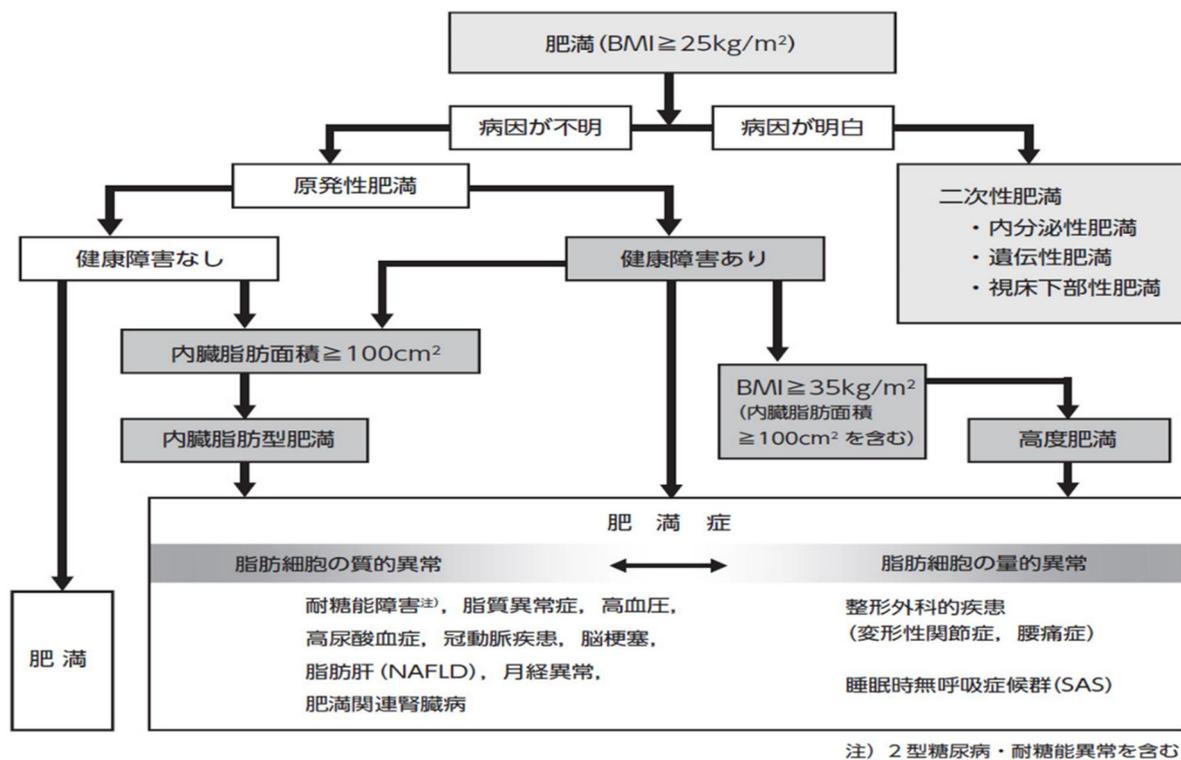


Fig. 3 人の肥満症診断フローチャート (肥満症診断基準 2011 より引用)

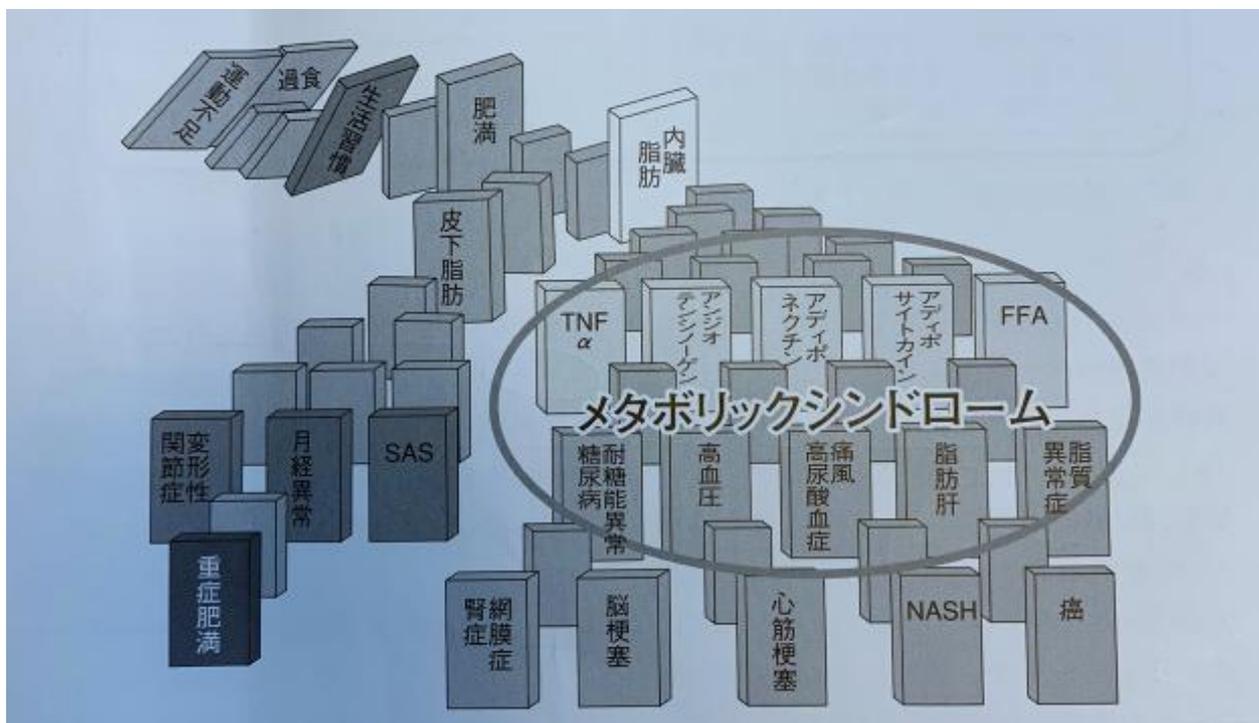


Fig. 4 肥満ドミノ

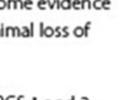
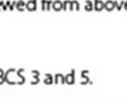
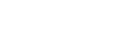
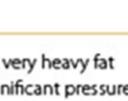
(宮崎 滋, Food Function 2008 Vol.1 p115 より引用)

一方、動物の臨床における肥満の評価として、現在までボディコンディションスコア(BCS)の5段階評価(Fig. 5)または9段階評価 (Laflamme 1997) (Fig. 6)が広く用いられ、原則として理想体重を10%上回った状態を過体重、20%上回った状態を肥満と判定している。



Fig. 5 Body Condition Score (BCS) 5段階評価 (WASVA Global Nutrition Committee 引用)

# Body Condition Scoring (BCS) systems

5 Point	9 Point	Description	
1/5	1/9	<p><b>Dogs:</b> Ribs, lumbar vertebrae, pelvic bones and all bony prominences evident from a distance. No discernible body fat. Obvious loss of muscle mass.</p> <p><b>Cats:</b> Ribs visible on short-haired cats; no palpable fat; severe abdominal tuck; lumbar vertebrae and wings of ilia obvious and easily palpable.</p>	   
1.5/5	2/9	<p><b>Dogs:</b> Ribs, lumbar vertebrae and pelvic bones easily visible. No palpable fat. Some evidence of other bony prominence. Minimal loss of muscle mass.</p> <p><b>Cats:</b> Shared characteristics of BCS 1 and 3.</p>	 
2/5	3/9	<p><b>Dogs:</b> Ribs easily palpated and may be visible with no palpable fat. Tops of lumbar vertebrae visible. Pelvic bones becoming prominent. Obvious waist.</p> <p><b>Cats:</b> Ribs easily palpable with minimal fat covering; lumbar vertebrae obvious; obvious waist behind ribs; minimal abdominal fat.</p>	   
2.5/5	4/9	<p><b>Dogs:</b> Ribs easily palpable, with minimal fat covering. Waist easily noted, viewed from above. Abdominal tuck evident.</p> <p><b>Cats:</b> Shared characteristics of BCS 3 and 5.</p>	 
3/5	5/9	<p><b>Dogs:</b> Ribs palpable without excess fat covering. Waist observed behind ribs when viewed from above. Abdomen tucked up when viewed.</p> <p><b>Cats:</b> Well proportioned; waist observed behind ribs; ribs palpable with slight fat covering; abdominal fat pad minimal.</p>	   
3.5/5	6/9	<p><b>Dogs:</b> Ribs palpable with slight excess fat covering. Waist is discernible viewed from above but is not prominent. Abdominal tuck apparent.</p> <p><b>Cats:</b> Shared characteristics of BCS 5 and 7.</p>	 
4/5	7/9	<p><b>Dogs:</b> Ribs palpable with difficulty; heavy fat cover. Noticeable fat deposits over lumbar area and base of tail. Waist absent or barely visible. Abdominal tuck may be present.</p> <p><b>Cats:</b> Ribs not easily palpable with moderate fat covering; waist poorly distensible; obvious rounding of abdomen; moderate abdominal fat pad.</p>	   
4.5/5	8/9	<p><b>Dogs:</b> Ribs not palpable under very heavy fat cover, or palpable only with significant pressure. Heavy fat deposits over lumbar area and base of tail. Waist absent. No abdominal tuck. Obvious abdominal distension may be present.</p> <p><b>Cats:</b> Shared characteristics of BCS 7 and 9.</p>	 
5/5	9/9	<p><b>Dogs:</b> Massive fat deposits over thorax, spine and base of tail. Waist and abdominal tuck absent. Fat deposits on neck and limbs. Obvious abdominal distention.</p> <p><b>Cats:</b> Ribs not palpable under heavy fat cover; heavy fat deposits over lumbar area, face and limbs; distention of abdomen with no waist; extensive abdominal fat pad.</p>	   



©2010 Journal of the American Animal Hospital Association. All rights reserved. Available at [aahanet.org/PublicDocuments/NutritionalAssessmentGuidelines.pdf](http://aahanet.org/PublicDocuments/NutritionalAssessmentGuidelines.pdf)

Fig.6 Body Condition Score (BCS)9 段階評価

(AAHA より引用)

しかしながら、BCS システムは元来中型犬から大型犬を対象に設計されてきたため、小型犬が多く飼育されている本邦の臨床現場では、BCS のみでは過体重や肥満傾向をとらえきれない事が多い。脂肪過多や肥満症の診断に、より客観性を持たせる方法として、BCS の判定に加え後躯の特定部位を測定し体脂肪率を算出する方法(Mawby 2004)、BCS 5 段階評価と脂肪率に遊離脂肪酸(NEFA)、中性脂肪(TG)、コレステロール(TC)などの脂質代謝の測定値を合わせて判定の精度を高める方法なども検討されてきた (Li 2012)。近年では、より正確な皮下脂肪及び内臓脂肪の量的評価法として、超音波や CT 等の画像診断を利用した評価法の有用性も注目されている (Wilkinson 1991; Payan-Carreira 2015; Otsuji 2016; Koizumi 2016; Kim 2018)が、日常の診療で確実に実施するのは難しいため、ヒトの肥満症診断基準に相当する明瞭な診断基準は確立されておらず肥満と肥満症の区別が依然として曖昧な現状である。一方で、肥満は、最も症例数の多い栄養性疾患であり、年々増え続けていることから伴侶動物にとって重要な健康問題として認識されている (Edney 1986; German 2006)。肥満・過体重犬の割合は、米国では 34.1%, 36.4% (Lund 1999; Weeth 2007)、イギリス、オーストラリアおよび中国ではそれぞれ 59.3%, 41.1%, 44.4%と報告されている (Courcier 2010; McGreevy 2005; Mao 2013)。わが国では、一般の動物病院に受診する犬の約 54.9%が肥満・過体重であることが報告されている (Usui 2016)。また肥満傾向に関しては、1986 年ごろは肥満犬の割合は概して全体の 25%程度と想定されていたが、2005 年には約 30-50%に肥満率が上昇している (Edney 1986; Courcier 2010)。

犬の肥満に関連する環境要因に関する研究では危険因子として、運動不足、おやつの過剰投与、飼い主の年齢が重大なリスク要因として挙げられ、さらに飼い主の所得と飼い主の健康に対する意識の低さも犬の肥満に関連していた (Courcier 2010; Montoya-Alonso 2017)。犬種による肥満好発性についてはよく知られており、コッカースパニエル、ビーグル、ラブラドルレトリバー、ゴールデンレトリバー、シュットランドシープドック、雑種のほかいくつかの大型犬種に肥満傾向があるとされている (Lund 2006)。わが国ではパグがビーグルに次ぐ肥満好発犬種と報告されている(船津 2003)。人と同様、犬においても、

加齢に伴う肥満傾向がみられ、幼少期の体重が関与している。さらに犬においては、避妊手術や去勢手術による、性腺ホルモンの変化が重要な因子である (Edney 1986; McGreevy 2005)。抗てんかん薬やグルココルチコイド等の薬剤、副腎皮質機能亢進症や甲状腺機能低下症などの内分泌障害は犬の体重増加および肥満と関連が深い(Lund 2006)。

## 1 - 2 肥満と疾病

脂肪細胞は、中性脂肪 (TG) を蓄積・貯蔵し、必要に応じて分解産物である遊離脂肪酸(FFA)やグリセロールを放出するだけでなく、体の機能調整に重要な各種のアディポサイトカイン (アディポカイン) と呼ばれる生理活性物質を産生・分泌しており生体最大の内分泌臓器である (Table. 1)。

Table.1 メタボリックシンドロームの病態に関与する主なアディポサイトカイン

Adipocytokines	Functions
Adiponectin	The activation of PPAPa and AMP-activated protein kinase(AMPK)
Leptin	The enhancement of energy expenditure, the reduction of feeding behavior
Tumor necrosis factor-a (TNF-a)	The inhibition of insulin signal by JNK activation
Angiotensinogen	The increase of blood pressure in renin-angiotensin system
Interleukin-6 (IL-6)	The inhibition of insulin signal via the enhancement of the suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) expression in myocytes and adipocytes
Monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)	The increase of blood NEFA level, and the expression of inflammatory cytokines such as TNF-a and IL-6
Resistin	The suppression of glucose uptake in myocytes and adipocyte, the enhancement of hepatic gluconeogenesis.
Plasminogen activator Inhibitor-1(PAI-1)	The inhibition of plasminogen activator.

脂肪は、蓄積する部位により脂肪細胞の機能が異なる。皮下脂肪沈着が増加した肥満の場合、体重の増加とともに物理的障害が出現する。変形性膝関節症などの骨・関節疾患をはじめ、気道、胸郭、腹部への脂肪の沈着は、気道を狭窄させ、呼吸筋、横隔膜の運動を抑制し、神経系支配の弛緩する睡眠時に無呼吸発作を生じるなどの異常をきたす。内臓脂肪蓄積型の肥満の場合、内臓脂肪由来のアディポサイトカインの産生・分泌異常により種々の疾病を生じやすい。例えば、アンジオテンシノーゲンは、本来肝臓で産生され、血液に分泌される血圧に関与するホルモンであるが、脂肪細胞からも分泌され、これが過剰に分泌されると強力な血管収縮作用を持つアンジオテンシン II に変換されるため高血圧を生じる。大型脂肪細胞から分泌される悪玉アディポカインとして知られる代表的な TNF $\alpha$  や IL6 は炎症性サイトカインで、これらは脂肪細胞のみならず、脂肪組織の間質に浸潤する炎症細胞であるマクロファージからも分泌されており、その量は脂肪細胞からの産生量よりも多いことがわかっている (Weisberg 2003; Lumrng 2007)。非肥満の健常動物では、脂肪組織には M2 マクロファージと呼ばれる抗炎症作用を持つ常在型マクロファージが存在し、M1 マクロファージはほとんど存在しない (Fujisaka 2009; Fujisaka 2013)。肥満に伴い M1 マクロファージの産生量が増え、M1 マクロファージからは TNF $\alpha$  や IL6 の産生量が著しく増加する (Fig. 7)。

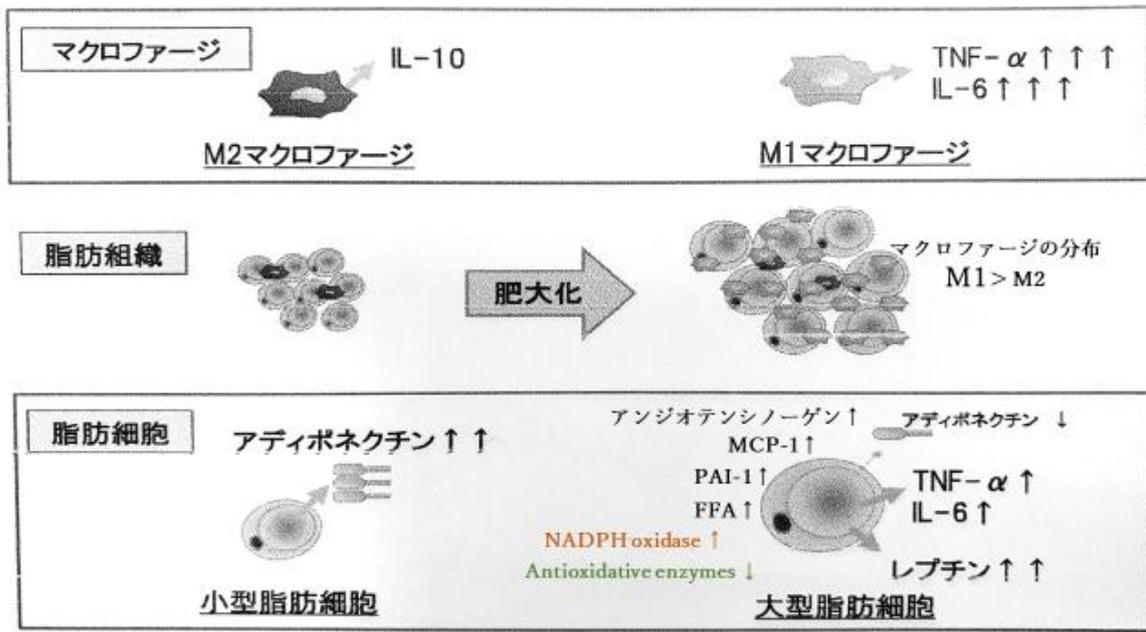


Fig.7 : 脂肪細胞の変化に伴うマクロファージおよびアディポネクチンの変化  
(薄井勲、糖尿病 56 巻 7 号 (2003) p.418 追記して引用)

このような炎症性サイトカインの産生亢進が肥満に伴う慢性炎症を起因しインスリンの作用を阻害するため耐糖能障害の原因になる。脂肪細胞から特異的に分泌されるアディポネクチンは、本来は AMPK(AMP-activated protein kinase) を骨格筋及び肝臓で活性化することによって、脂肪酸の燃焼と糖の取り込みを促進し、インスリン抵抗性を改善する善玉アディポカインであるが、肥満や脂肪細胞肥大化が惹起されると、顕著なダウンレギュレーションを受け、アディポネクチンの分泌低下からインスリン抵抗性を誘発する。エネルギー過剰状態を中枢神経に伝える役割を持つ脂肪細胞由来のレプチンも、本来は善玉アディポカインであり、肥満状態の個体では大型の脂肪細胞からのレプチン産生が増えるにも関わらず、レプチンに対する生体側の反応性が低下する。すなわち、内臓脂肪蓄積に伴うアディポネクチン及びレプチンの作用低下もまたインスリン抵抗性を高める原因となっている。さらに、肥満に伴い、脂肪細胞に過剰に蓄積されている TG は分解されて FFA として門脈中に放出され、肝臓で多量の VLDL(very low density lipoprotein) に合成され、全身に放出され高 TG 血症となる。人では、内臓脂肪蓄積による高 TG 血症は脂質代謝異常の病型であ

り心血管系疾患リスクを高める。また、肝臓内で過剰に合成された VLDL は、肝細胞内に蓄積され脂肪肝となるばかりでなく、VLDL が肝細胞間組織に沈着し白血球などの細胞浸潤を伴う場合、非アルコール性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)といわれ、肝硬変、肝癌への移行も憂慮される。犬では肥満に起因するインスリン抵抗性は、視床下部-下垂体-副腎の活性化につながり(Jericó MM 2009)、クライアント所有の肥満犬および高コレステロール血症の犬における高脂血症の存在は、VLDL や LDL などのアテローム生成リポタンパク質の上昇に関連していた。(Jericó MM 2009) 人に認められるようなアテローム性動脈硬化症は、犬では稀な病態であるが、肥満、高脂血症、インスリン抵抗性により影響をうける内分泌機能、脂質代謝、炎症性サイトカインの分泌異常に伴う炎症は、肝臓に慢性的な負担を与えることになる。

脂肪細胞では活性酸素種(reactive oxygen species, ROS)産生酵素の一つである NADPH オキシダーゼ活性が認められており、FFA を多量に含む脂肪細胞では NADPH オキシダーゼが活性化する結果、酸化ストレスを発生する。脂肪組織局所で NADPH 酵素の活性化により過剰に発生した ROS が、ミトコンドリア内の ROS 消去酵素で処理しきれなかった場合、過剰となった ROS により TNF $\alpha$  等の炎症性サイトカインがさらに増加し、善玉アディポカインが作用低下を引き起こし、インスリン抵抗性が惹起されると同時に酸化ストレス状態となる。肥満モデルマウスに NADPH オキシダーゼ阻害薬であるアポシニンを投与した実験で、脂肪組織の過酸化脂質量の低下、アディポネクチンの発現上昇、TNF $\alpha$  の発現低下が認められ、糖尿病や高脂血症の改善が認められたことが報告されている(Furukawa 2004)。そのほか、肥満と腫瘍発生率にも関連があり(Lund 2006; Weeth 2007; German 2010)、過体重犬及び肥満犬の寿命は、正常な体重のそれと比較して、ほとんどすべての犬種においても短い傾向があった(Kealy2002; Salt 2019)。

以上のように、肥満により脂肪細胞に炎症細胞が浸潤しアディポサイトカインの分泌異常が起こることや脂肪組織局所での活性酸素産生が亢進することが

メタボリックシンドロームの発生および各種関連病態の進行に大きく関与している。

### 1-3 糖尿病の発症メカニズム

糖尿病は複数の遺伝素因と環境要因が重なりあって発症する(Imamura 1998; Catchpole B 2005; Fall 2007)。犬の糖尿病は、原因の如何によらず膵臓からのインスリンの分泌不全により発症するインスリン依存型である1型糖尿病が多い。膵島は空胞変性し膵β細胞が脱落するため、内因性インスリンが回復することではなく、外因性のインスリンで血糖維持をする必要がある。一方、猫の糖尿病は、遺伝的素因と肥満、運動不足など生活習慣による環境要因が加わり、インスリンの分泌低下は認められず、膵β細胞から十分なインスリンが分泌されているにも関わらず、生体側がインスリン抵抗性を獲得することで、インスリンの作用が発揮されない病態を呈する2型糖尿病が多い(Lusby 2009)。そのため、多くが適切な治療管理により内因性のインスリンが回復する。ヒトと猫の2型糖尿病の共通の病態として膵島における膵アミロイド症がある(Kirk 2006; Jurgens 2011; Kamata 2014)。肥満などによってインスリン抵抗性が起こるとβ細胞はインスリン分泌を増加させて対応するが、これにより膵島におけるアミロイドA蛋白の沈着を起こし膵アミロイド症が発生する。酸化ストレスが継続することによりβ細胞がアポトーシスを起こし、β細胞が不可逆的なレベルまで傷害を受けた場合、β細胞数が減少しさらなるインスリン分泌能の低下を引き起こし1型糖尿病に移行することもあるため早期の対策を要する。いずれの型の糖尿病においても、犬猫における糖尿病の発症には、食生活の偏りや運動不足、加齢および内分泌ホルモン失調による代謝機能の低下など様々なストレスが誘発した肥満症、アディポサイトカインの分泌異常と酸化ストレスが増悪させた慢性炎症が発病の一因を担っている。

糖尿病発症のメカニズムにおいて、脂肪組織の関与は非常に重要である。先に示したように、脂肪細胞は脂肪組織の代謝だけでなくその他の組織器官の代謝や調節にも深く関与し影響を与えるという特徴を持っている。肥満すること

により、大型化した脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインの産生異常がインスリン抵抗性を招く。また、肥大化した脂肪細胞からは FFA（遊離脂肪酸）が多量に産生され血液中への放出が増加する。FFA の過剰によってインスリンの標的器官である骨格筋、肝臓に中性脂肪合成の基質である FA-CoA が増加し、骨格筋では IRS-1 の機能障害を、肝臓では IRS-2 の機能障害を起こして、インスリン抵抗性を惹起させる (Okuno 1998; Dresner 1999)。これらのインスリン抵抗性状態が持続し、さらに蓄積した脂肪細胞に酸化ストレスが加わることにより、脈管系内皮障害及び炎症が波及し、高血圧、食後高血糖、高脂血症が惹起される (Witztum 1991)。高血圧に伴い、各臓器への炎症細胞の浸潤と活性酸素の産生増加が生じ、各臓器において酸化ストレス状態の持続から臓器へのダメージが加速する。膵臓においては耐糖能障害が長期に続くことにより、膵臓のランゲルハンス島における炎症及び酸化ストレスから、膵臓機能障害、インスリン分泌不全へとつながり糖尿病を発症する。

#### 1-4 小括

動物の肥満は、人の肥満同様多くの疾病を起因するリスク因子として極めて重要な病態である。動物の肥満症の評価は、ボディコンディションスコア (BCS) が一般的で、広く利用されているところではあるが、単純肥満と脂肪の量的異常や質的異常による肥満症を分類する診断アプローチは未だ確率されていない。内臓脂肪として過剰に蓄積された余剰の脂肪は、体組織に様々な影響を及ぼす炎症を引き起こす。脂肪細胞は、エネルギーの貯蔵庫としての機能だけでなく、体の機能調整に重要な様々なアディポサイトカインを産生分泌している。肥満が疾病を起因するメカニズムとして最も重要な要素は、内臓に異所性に蓄積した脂肪に見られる脂肪細胞の機能変化（リモデリング）である。肥大化した脂肪細胞から大量に産生される各種の炎症性サイトカイン、遊離脂肪酸 FFA、脂肪組織間に浸潤する起炎性の M1 マクロファージ、加えて NADPH 酸化酵素の活性化、抗酸化酵素の活性低下による酸化ストレス状態が持続的に起こり肥満

ドミノが加速し、インスリン抵抗性、耐糖能異常、高血圧、脂質異常症などメタボリックシンドロームの発症につながる。以上のことから、肥満抑制に重点を置いた種々の予防対策は、健康寿命を目指す上で重要であると考えられた。

## 第 2 章

### 健康犬へアスタキサンチン(ASX)投与が脂質代謝に及ぼす影響

#### 2-1 はじめに

前章で述べたように、肥満により脂肪細胞の機能変化が生じ、アディポサイトカインの分泌異常が起こることや脂肪組織局所での活性酸素(ROS)産生が亢進することがメタボリックシンドロームの発生およびその関連病態の進行に大きく関与している。そこで、酸化ストレス状態を惹起する ROS を積極的に除去することで、メタボリックシンドロームの発病予防や脂質代謝関連疾患の重症化予防に役立つことが推測される。

アスタキサンチン (3,3'-dihydroxy- $\beta$ ,  $\beta'$ -carotene-4,4'-dione) (ASX)は、広く天然に存在する赤色のカルテノイドの一種である (Fig.8) (真岡 2012, 2014)。

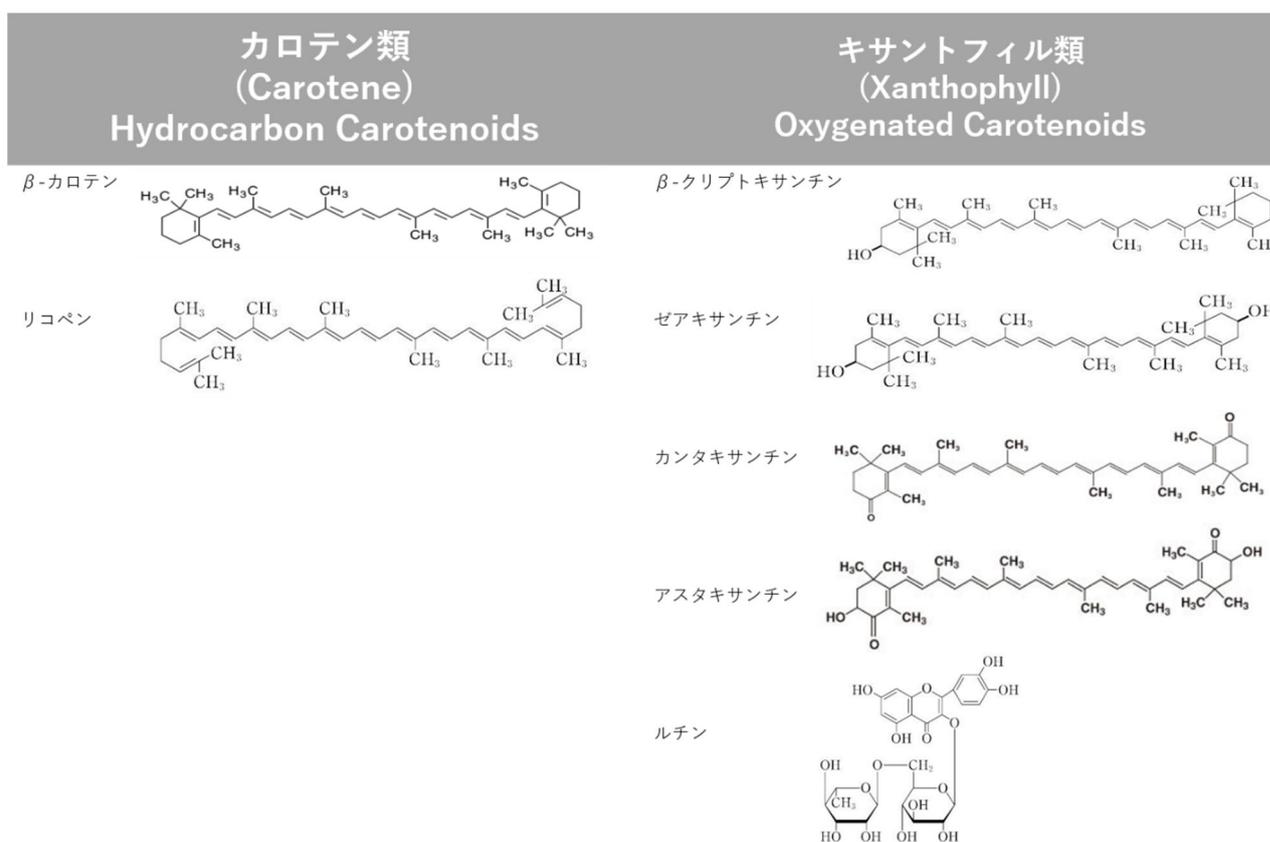


Fig.8 代表的な天然カルテノイド

このアスタキサンチンは、天然界、特に海洋に多く存在する赤色の色素で、マリンカルテノイドと呼称されることもある。海洋性細菌、ある種の酵母、藻類などによって産生される二次代謝産物であり、これらが自然界の中で食物連鎖を通じて、エビやカニなどの甲殻類、サケ、コイ、キンギョ等に比較的多く取りこまれて存在する。野菜に含まれるβカロテンやルテインなどは、ヒトの生理機能維持にも不可欠な栄養素として知られているが、それらのカルテノイドは植物界で普遍的に生合成され葉緑体中に存在し、光合成の補助色素として機能している。動物はカルテノイドを生合成できないので、動物に存在するカルテノイドは、すべて食物から摂取されたものに由来する(真岡 2007)。すなわち動物は食物連鎖でのみカルテノイドを取り込み、食物から吸収したカルテノイドを体内で酸化や還元、二重結合の転移など部分的に化学変換をすることができ、体内で独自に代謝変換している (Fig.9)。

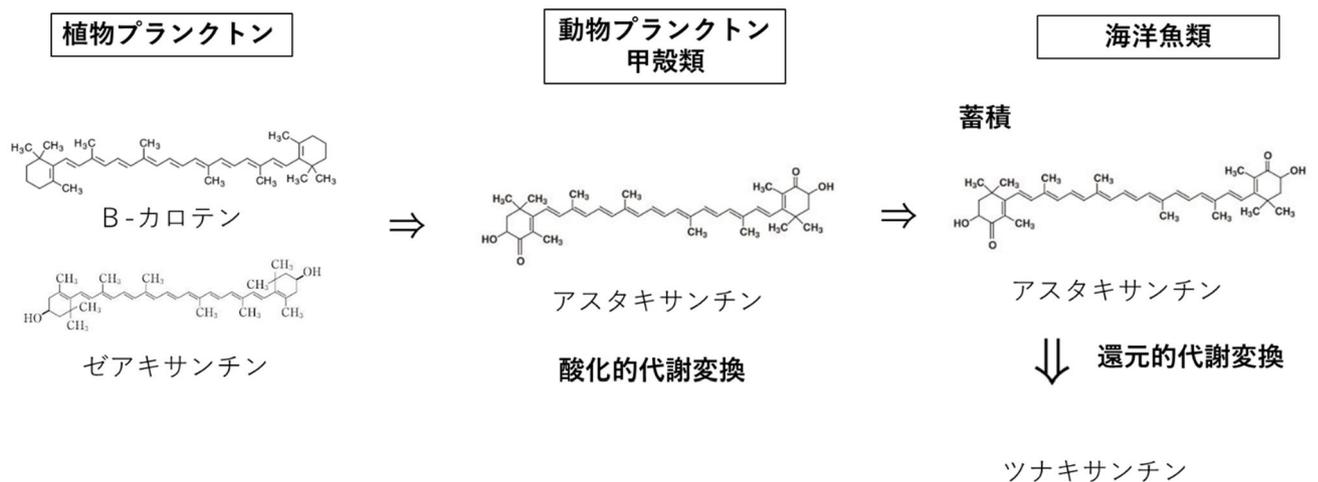


Fig.9 海洋の食物連鎖とカルテノイド

ASX の化学構造は  $\beta$  カロテンやルテインのそれと極めて類似している (Fig.10)。

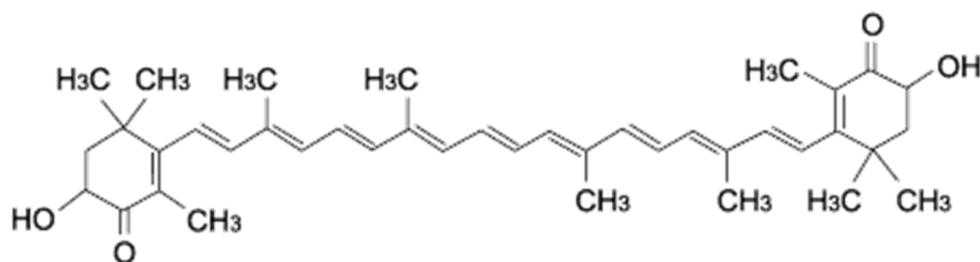


Fig.10 アスタキサンチンの化学構造

カルテノイドには、炭化水素であるカロテンと酸素原子を有するキサントフィルがある。ASX の組成式は  $(C_{40}H_{52}O_4)$  で、酸素化されており、分子中に 2 個の水酸基 (-OH) と 2 個のカルボニル基 (-C(=O)-) を持つため、カロテノイドファミリーのキサントフィルに分類される。さらに共役二重結合を 13 個 (ケト基 2 個を含む) 持つ。この特徴的な構造から、アスタキサンチンは、細胞膜を貫通する形で存在できることから、細胞膜の内部に発生するフリーラジカルや活性酸素種 (ROS: reactive oxygen species) と細胞膜表面に発生する ROS の両方を捕捉することができる。生体膜の構造を変化させることなく ROS などの酸化ストレスから保護されることは、酸化ストレスに起因する様々な疾病の予防に直結する。例えば、毛細血管の内皮細胞は酸化ストレスに特に脆弱である。糖尿病の合併症である網膜症や腎症は、毛細血管内皮細胞の酸化ストレスに関連しているため、細胞膜の酸化ストレスを防御することが合併症の進展予防につながる。また、エネルギー産生の場合とされるミトコンドリアでは、酸化還元反応がおこなわれ ROS の産生が避けられない。ASX は、エネルギー産生の場合であるミトコンドリアの膜電位を還元状態に保持し、酸化状態に移行するのを抑制することが報告されている (Wolf 2010)。ミトコンドリアはアンチエイジングのターゲットであり、ミトコンドリアの機能を保持改善することは、すなわち老化防止の重要な要素である。さらに ASX は、種々の実験系からも過酸化脂質の生成を抑制するが報告されている (Lim 1992; McNulty 2007)。糖尿病の病態では、体内で活性酸素の産生が高まることがわかっており、これが合併症を引き起こす原因になっている。糖尿病モデルマウスを用いた実験では、ASX 投与によりその強力な酸化ストレス軽減作用により糖尿病性腎症発症が抑制されてい

る可能性が示されている (Uchiyama 2002; Naito 2004)。近年では、ヒトの臨床研究が数多く実施され、ASX の脂質過酸化抑制作用が示されている (Kim 2011; Nakagawa 2011)。

脂質過酸化分解生成物の一つであるマロンジアレデヒド(MDA)(C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>)は、脂質酸化損傷マーカーとして広く用いられている。多価不飽和脂肪酸(PUFA)は活性酸素やフリーラジカルによる酸化を受けやすく、ヒドロキシラジカル(HO-)と容易に反応して脂質ペルオキシラジカル(LOO-)を形成する。この脂質ペルオキシラジカルは別の PUFA と反応し脂質ヒドロペルオキシド(LOOH)と(LOO-)を形成する。さらに、(LOO-)は分子内 2 重結合に反応して、環状エンドペルオキシドを形成し、これがさらに分解されてマロンジアルデヒド(MDA)が形成される (Janero DR 1990)。抗酸化物質投与の効果を判定する目的で、MDA を測定した犬の報告において、抗酸化物質の投与後に MDA 値が顕著に減少していたことから、MDA が脂質過酸化抑制を評価する際に信頼性が高いマーカーであると考えられた(Kawasumi K 2013; Muranaka S 2013; Kawasumi K 2018)。

ASX は、他の植物由来の抗酸化物質 (フィトケミカル) 類と比較して、より優れた抗酸化機能を持つことが報告されている (Ikeuchi 2007; Bhuvanewari 2010)。また ASX には抗酸化活性だけではなく、抗炎症作用、免疫増強作用、DNA 修復作用など様々な生理活性があることが報告されている。(Kurashige 1990; Shimidzu 1996)。動物を健康に長生きさせるためには、肥満を予防する事、食生活や生活習慣から生ずる酸化ストレスを可能な限り除去する事が課題となる。

本研究では、食品抗酸化成分による酸化ストレス予防の可能性を評価する目的で、健康犬に ASX を投与しエネルギー代謝にかかわる血液中の代謝物質、ホルモン、酵素類を測定した。これらの結果をもとに、ASX 投与が健康な犬に与える抗酸化作用と安全性を検証した。

## 2 - 2 実験方法

### 2-2-1 実験動物

理想的な体重体型(BCS3)を持つ健康なビーグル犬 10 頭を本実験に使用した。健康なビーグル犬の平均年齢は 2 歳(1-3 歳)、平均体重は 10.4kg (9.7-11.1kg)であった。それらの健康なビーグル犬を、各群の平均体重に差異が生じないように、コントロール群(No. 1-5)と試験群(No. 6-10)の 2 群に分けた。雌雄の割合は、コントロール群に雌 3 頭、雄 2 頭、試験群に、雄 3 頭、雌 2 頭であった。実験に先立ち、これらの犬は実験開始前の 2 か月間、同じ環境(NAS 研究所、成田市、千葉県)で体重に合わせた市販のペットフード (日本ペットフード)を与えて管理した。また、試験期間中は 1 週間毎に体重測定を行い、体重に合わせたカロリー摂取量になるように厳密に管理した。

### 2-2-2 試薬

アスタキサンチンとして *Hematococcus pluvialis* 由来のバイオマス(AstaReal<sup>®</sup> AW1011; AstaReal Inc., WA, USA)を用いた。

### 2-2-3 投与方法

試験群の健康なビーグル犬(No. 6-10)には、0.3mg/kg ASX を 1 日 1 回食事とともに投与した。1 週間毎に体重と BCS を測定し ASX の投与量を調整した。

### 2-2-4 サンプル採取

試験前と試験開始 6 週間後に、午前の食事投与前の空腹時血液を採取した。採取した血液はヘパリン加真空採血管にとり、直ちに遠心分離したのち、血漿は検査測定に使用するまで $-80^{\circ}\text{C}$ に保管した。

### 2-2-5 測定項目と測定方法

グルコース(GLU)、総コレステロール(TC)、中性脂肪(TG)、総蛋白質(TP)、血中尿素窒素(BUN)、クレアチニン(CRE)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、乳酸脱水素酵素 (LDH) は、富士フィルムモノリス株式会社

にて自動分析器(JCA-BM2250; JEOL, Tokyo, Japan)を用いて測定した。血漿中の遊離脂肪酸(NEFA)は、市販の測定キット NEFAC-テストワコー (和光純薬工業株式会社、大阪)を用いて測定した。インスリン(INS)、アディポネクチン(ADN)、腫瘍壊死因子(TNF $\alpha$ )はそれぞれ市販のラットインスリン ELISA kit (AKRIN-010T,和光純薬工業株式会社、大阪)、マウス/ラットアディポネクチン ELISA キット(大塚製薬株式会社、東京), TNF $\alpha$  犬 ELISA kit (LS-F1347-1, Life Span Bioscience, Inc, Seattle, WA,USA) を用いて測定した。血漿マロンジアルデヒド (MDA) は、NWLSS<sup>TM</sup> Malondialdehyde assay kit (Northwest Life Science Specialties, LLC, Vancouver, Canada)を用いて測定した。

#### 2-2-6 統計解析

測定値は、Windows Microsoft Excel の分析ツールを用いて統計処理をした。測定値は標準誤差(mean  $\pm$  SE)で表示し、両側 t 検定により分析し、統計学的有意水準を  $p < 0.05$  および  $p < 0.01$  に設定した。

#### 2-3 結果

健康なビーグル犬において、コントロール群とした ASX 非投与群と ASX 投与した試験群の各測定項目の結果を示した (Table. 2)。試験群では、TG、MDA、LDH について、ASX 投与後 6 週間の測定値は投与前 0 週の値と比較して有意に低下した ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ) (Fig.10)。さらに MDA、LDH は、6 週間後の測定値をコントロール群と試験群との間で比較したとき、試験群の値が有意に低かった ( $p < 0.01$ )。一方、体重および AST、ALT、ALP、TP、BUN、Creatinine、Glucose 等の生化学検査値には、両群とも試験の前後また、6 週間後の両群間の値にも有意な変化は認められなかった。同様に NEFA、Insulin、Adiponectin、TNF $\alpha$  の測定値に関しても、両群の 0 週目と 6 週目においてにおいて試験の前後で特記すべき変化を認めなかった。また、BW と BCS についても同様に 0 週目と 6 週目で有意な変化は認められず、6 週間後の両群間にも有意な変化は認められなかった。

**Table. 2 Comparison of biomarkers level of healthy dogs with and without astaxanthin supplementation**

Parameter	without ASX (n=5)		with ASX (n=5)	
	0 week	6 weeks	0 week	6 weeks
Body weight (kg)	10.5 ± 0.2	11.3 ± 0.3	10.3 ± 0.2	11.1 ± 0.3
Body condition score	3	3	3	3
Glucose (mg/dL)	87.4 ± 1.8	79.8 ± 2.1	90.6 ± 2.5	87.4 ± 2.3
Triglyceride (mg/dL)	30.6 ± 1.3	38.0 ± 6.6	37.2 ± 1.3	23.6 ± 4.1*
Total cholesterol (mg/dL)	144.8 ± 20.0	131.6 ± 8.9	113.8 ± 6.5	133.6 ± 9.1
NEFA (mEq/L)	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.0	1.0 ± 0.1
Total protein (g/dL)	7.1 ± 0.1	7.0 ± 0.1	6.8 ± 0.1	6.6 ± 0.1
Blood urea nitrogen (mg/dL)	13.4 ± 0.7	12.0 ± 0.7	12.4 ± 0.7	10.2 ± 0.6
Creatinine (mg/dL)	0.7 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.7 ± 0.1
Malondialdehyde (µmol/L)	1.5 ± 0.2	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.2	0.9 ± 0.0****
Insulin (ng/mL)	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1
Adiponectin (µg/mL)	18.4 ± 4.0	27.5 ± 3.3	27.0 ± 6.3	30.5 ± 4.3
TNF-α (pg/mL)	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0
AST (IU/L)	32.2 ± 1.8	35.2 ± 2.4	37.2 ± 1.3	33.6 ± 1.5
ALT (IU/L)	28.5 ± 4.1	30.2 ± 5.2	31.6 ± 1.2	36.4 ± 2.9
ALP (IU/L)	184.0 ± 46.3	166.6 ± 36.0	152.4 ± 8.7	152.6 ± 8.7
LDH (IU/L)	83.4 ± 5.7	113.6 ± 12.6	89.4 ± 6.3	57.4 ± 2.4****

**Notes:** Data are presented as the mean ± SE. Statistical significance is indicated by asterisks. \*Significantly different (p<0.05) from the value at 0 week in the test group with ASX (paired t-test). \*\*Significantly different (p<0.01) from the value at 0 week in the test group with ASX (paired t-test). \*\*\*Significantly different (p<0.001) from the value at 6 weeks of the control group without ASX (paired t-test).

**Abbreviations:** ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ASX, astaxanthin; LDH, lactate dehydrogenase; NEFA, non-esterified fatty acid; SE, standard error; SE, standard error.

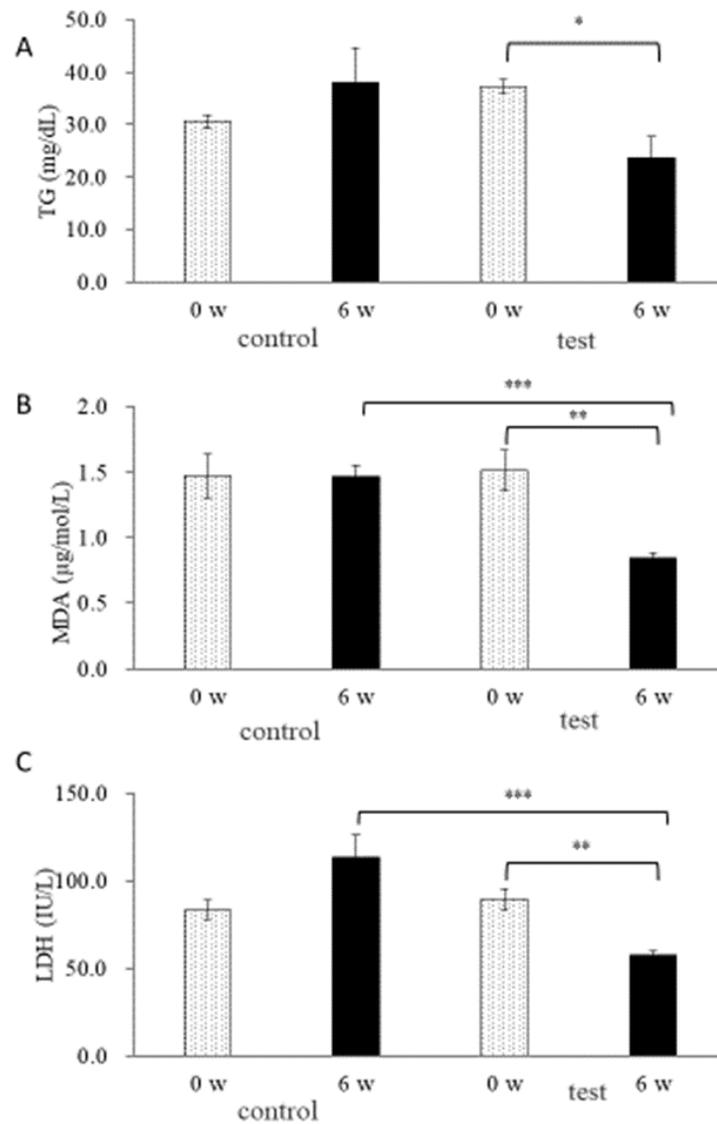


Fig. 11 Comparison of TG, MDA and LDH levels on healthy Beagle dogs

Notes: Statistical significance is indicated by asterisks.

\* Significantly different ( $p < 0.05$ ) from the value at 0 week in the test group with ASX (paired  $t$ -test).

\*\* Significantly different ( $p < 0.01$ ) from the value at 0 week in the test group with ASX (paired  $t$ -test).

\*\*\* Significantly different ( $p < 0.01$ ) from the value at 6 weeks of the control group without ASX (paired  $t$ -test).

## 2-4 考察

理想的な体重、BCS をもつ健常なビーグル犬に対して6週間の ASX の補給をした結果、体重および BCS には変化は認められなかったが、投与の前後で TG、MDA が顕著に低下した。TG は正常値範囲内での低下であったものの、MDA がともに低下していたことで、健康な犬への ASX 補給が脂質代謝ならびに抗酸化活性を高めていることが分かった。MDA は、脂質の酸化反応過程の中で、最終的な脂質過酸化反応(Lipid peroxidation: LPO)の生成物の一つである。生体膜、細胞膜の構成脂質成分は多価不飽和脂肪酸(Polyunsaturated fatty acid: PUFA)で、環境要因やさまざまな内的要因で活性酸素種/フリーラジカル、特に一重項酸素による傷害を受けやすい。脂質の酸化によって産生されるアルデヒドである MDA は、反応性が高く量も多いため、脂質過酸化反応の主要なマーカーとして用いられている。すなわち本実験において、MDA が有意に低下したことは、ASX の投与により脂質過酸化反応が抑制されたことを示している。

ASX は、体内に取り込まれると、その特異的な化学構造のため、細胞膜の脂質二重膜を貫通する形で存在するため、細胞膜の内部に発生する活性酸素種/フリーラジカルのみならず、膜表面に発生する ROS も捕捉することができる特性を持っている。さらに ASX の補給が心臓、腎臓(Alam 2018)、肝臓(Islam 2017)における酸化ストレスを予防し、さらに MDA 濃度を低下させ、糖尿病の動物において糖尿病性腎症の病理学的特徴を改善させることが報告されている(Naito 2004)。肥満を促進させる高脂肪食に ASX を添加し長期投与したマウスの実験において、60 日間の ASX 添加投与後、肝機能が保護され体重増加が抑制されており (Ikeuchi 2007)、またマウスへの ASX 添加投与により、体重増加、高脂血症、高インスリン血症、TNF $\alpha$ ならびに IL-6 増加に対して改善傾向が認められたことが報告されている(Arunkumar 2012)。

実験動物を用いた ASX の各病態への効果を検討する ASX 投与実験では、ASX の投与量は、ラットも用いた実験で 25mg/kg/day(Alam 2018)、10mg/kg/day(Islam 2017)、マウスを用いた実験では、6mg/kg-30mg/kg (Ikeuchi 2007; Arunkumar 2012)が用いられ、優良な効果を上げている。人においては

6mg/day (Spiller GA 2003)、20mg/day(Res PT 2013) の4-8週間の継続的投与で悪い影響は認められていない。さらに、ASXは、機能的消化不良に悩まされている患者に投与した試験において安全性が示唆されている(Kpscinkas L 2008)。犬への投与実験では、約8kgの犬に10mg-40mg/dayのASX投与量で免疫応答が高まったとの報告がある(Chew B 2011)。これらの報告を参考にし、今回の実験では投与量として0.3mg/kg/day (30mg/10kg BW)を用いたが、投与に関連した悪影響は認められなかった。ASXの添加に関しては、EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP)においてサプリメントとして広い安全域を持つ機能的成分であることが記載されており、また様々な形でその安全性について報告されている(European Food Safety Authority 2014; Brown 2018)。

犬の過体重や肥満は増加傾向にあり、脂肪細胞の肥大化によって活性酸素が過剰に産生され各組織に慢性炎症が惹起される。また加齢に伴う抗酸化能の低下も各種疾患の発症にかかわっている。すなわち、ASXを継続的に摂取する事で、生体のもつ抗酸化能だけでは処理できない活性酸素(主に一重項酸素)を消去し、脂質過酸化反応を抑制することは、過体重や肥満傾向の犬のみならず健康な犬においても疾病予防の面で有益であると考えられる。

## 2-5 小括

アスタキサンチン ASX は、強力な抗酸化物質として知られる。ASXは脂質過酸化反応抑制作用、一重項酸素消去活性に優れた抗酸化物質であることから、ヒトの健康維持保善効果を持つ機能的食品成分として、また魚の養殖など水産業界等でも広く利用されている。過剰な活性酸素種 reactive oxygen species (ROS) 産生による酸化ストレスが慢性炎症を引き起こす。この一連の反応は、脂肪毒性 lipotoxicity と呼ばれ、メタボリックシンドロームの基盤となる。今回、理想的体型 (BCS 3)の健康な犬(健康犬)10頭を用い、0.3mg/kg/dayのASXを6週間、経口摂取させる実験を行った結果、ASX投与群においてはトリグリセリド

TG、マロンジアレデヒド MDA、乳酸脱水素酵素 LDH の測定値が、投与前と投与 6 週間後を比較して投与後に有意に低下したことから、健康な犬における ASX の補給により肝機能が向上することが明らかとなった。これは、ASX の酸化作用による肝脂質代謝改善効果によるものと考えられた。その他の生化学検査値に特に目立った変化はみられなかった。ASX の持つ脂質過酸化抑制作用は、健常な動物において明らかで、ASX は健康維持、肥満から誘導される疾病予防の目的で利用可能な機能性食品成分であることが推測された。

## 第3章

### ASX 投与が肥満犬に及ぼす影響

#### 3-1 はじめに

健常犬において ASX により脂質代謝が改善することが明らかとなった。肥満犬においても同様の効果が得られるかを検討した。

#### 3-2 実験方法

##### 3-2-1 共試動物

一次診療施設の動物病院に来院した肥満犬の中から、以下に示す選定条件を満たす 5 頭を選出した (Table 3)。選定条件は、BCS が 4 または 5 の過体重・肥満犬であること、CBC 値及び CRP 値が正常値範囲であること、慢性疾患または基礎疾患がある場合は、その疾患の臨床症状が重篤なものではなく、過去一年間の診療記録から治療が適切に行われ臨床症状が管理され全身状態が安定している犬であること、確実な服薬順守が期待できること、投与試験に対し飼い主からの確実な同意が得られる症例とした。食事内容や散歩などの生活習慣については、個々の症例毎の平常通りの生活とし、変更を加えないことを指示した。

##### 3-2-2 試薬

*Hematococcus pluvialis* 由来のアスタキサンチン (AstaReal<sup>®</sup> AW1011; Real Inc., WA, USA) を用いた。

##### 3-2-3 投与方法

アスタキサンチン 0.3mg/kg を 1 日 1 回食事とともに投与した。

Table 3: Profiles of clinically overweight and obese dogs

Case Number	1		2		3		4		5	
	0W	8W	0W	8W	0W	8W	0W	8W	0W	8W
Breed	Miniature Dachshund		Mongrel		Miniature Schnauzer		Kishu dog		Labrador retriever	
Age (years)	10		14		11		8		3	
Sex	NM		NM		NM		NF		NM	
Clinical complication	Hypothyroidism		Cushing syndrome		Hypothyroidism, Arthritis		Arthritis		None	
BW (Kg)	10.0	11.3	15.4	15.6	7.3	7.2	25.5	25.5	59.5	59.6
Ideal weight (Kg)	7		11		6		15		35	
BCS	5		4		4		5		5	

Abbreviations: BCS, body condition score; BW, body weight; NF, neutered female; NM, neutered male; W, weeks.

### 3-2-4 サンプル採取

試験前と試験開始 8 週間後に、午前の食事前の空腹時血液を採取した。採取した血液はヘパリン加真空採血管にとり、直ちに遠心分離したのち、血漿は検査測定に使用するまで $-60^{\circ}\text{C}$ に保管した。

### 3-2-5 測定項目と測定方法

体重(BW)、ボディコンディションスコア(BCS)に加え、第 2 章の実験で測定した一般生化学検査 10 項目、遊離脂肪酸(NEFA)、インスリン(INS)、アディポネクチン(ADN)、マロンジアルデヒド(MDA)を同様の方法で測定した。

グルコース(GLU)、総コレステロール(TC)、中性脂肪(TG)、総蛋白質(TP)、血中尿素窒素(BUN)、クレアチニン(CRE)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、アルカリフォスファターゼ(ALP)、乳酸脱水素酵素(LDH)は、富士フィルムモノリス株式会社にて自動分析器(JCA-BM2250, JEOL Ltd., Tokyo, Japan)を用いて測定した。血漿中の遊離脂肪酸(NEFA)は、市販の測定キット NEFA C-テストワコー(和光純薬工業株式会社、大阪)を用いて測定した。インスリン(INS)、アディポネクチン(AND)はそれぞれ市販のラットインスリン ELISA kit (AKRIN-010T,和光純薬工業株式会社、大阪)、マウス/ラットアディポネクチン ELISA KIT (大塚製薬株式会社、東京)を用いて測定した。血漿マロンジアルデヒド(MDA)は、NWLSS<sup>TM</sup> Malondialdehyde assay kit (Northwest Life Science Specialties, LLC, Vancouver, Canada)を用いて測定した。

### 3-2-6 統計解析

測定値は、Windows Microsoft Excel の分析ツールを用いて統計処理をした。測定値は  $\text{mean} \pm \text{SE}$ . で表示し、両側 t 検定により分析し、統計学的有意水準を  $p < 0.05$  および  $p < 0.01$  に設定した。

## 3-3 結果

ASX 投与前と投与 8 週間後の測定値の結果を示した (Table. 4)。TG 濃度および ALT 活性は 5 症例のすべてで低下した。LDH 活性は 5 症例中 4 症例で低下し、MDA 濃度は 5 症例中 3 症例で低下した。その他の測定値には、大きな変化は認められなかった。同様に、TG、MDA 濃度および ALT、LDH 活性は、肥満・過体重の犬においても顕著に低下したが、体重などの一般臨床所見には特筆すべき変化は認めなかった (Fig.12)。なお、Fig.12 に示した TG、MDA、ALT、LDH のグラフには、第 2 章で得た健常犬への ASX 6 週間投与前後の値を参考のため追記して表示した。

投与実験に使用した臨床的肥満犬は、犬種、年齢、基礎疾患および食事や運動などの生活習慣が個々に全く異なることから、検査結果の統計的な処理行わなかった。

**Table 4** Changes in biomarkers level of clinically overweight and obese dogs with astaxanthin supplementation

Case Number	1		2		3		4		5	
	OW	8W	OW	8W	OW	8W	OW	8W	OW	8W
Breed	Miniature Dachshund		Mongrel		Miniature Schnauzer		Kishu dog		Labrador retriever	
Age (years)	10		14		11		8		3	
Sex	NM		NM		NM		NF		NM	
Clinical complication	Hypothyroidism		Cushing syndrome		Hypothyroidism, Arthritis		Arthritis		None	
Body weight (kg)	10	11.3	15.4	15.6	7.3	7.2	25.5	25.5	59.5	59.6
Body condition score	5	5	4	4	4	4	5	5	5	5
Glucose (mg/dL)	87	87	102	87	91	92	74	83	93	104
Triglyceride (mg/dL)	89	57	270	73	450	99	21	18	117	41
Total cholesterol (mg/dL)	162	148	360	297	178	188	224	230	173	179
NEFA (mEq/L)	0.54	0.54	0.58	0.63	1.15	0.39	0.58	0.60	0.46	0.54
Total protein (g/dL)	8.2	8.1	5.8	5.7	7.6	6.8	7.4	7.3	6.6	6.6
Blood urea nitrogen (mg/dL)	23	24	16	21	14	11	16	15	14	11
Creatinine (mg/dL)	0.6	0.6	0.4	0.4	0.4	0.3	0.7	0.7	0.9	0.8
Malondialdehyde ( $\mu$ mol/L)	1.63	2.74	3.85	1.95	10.97	3.06	1.73	1.89	3.06	2.42
Insulin ( $\mu$ g/mL)	3.6	5.5	3.5	1.0	4.7	3.2	4.3	3.8	0.5	0.7
Adiponectin ( $\mu$ g/mL)	10.8	13.9	2.0	1.5	NT	0.14	4.8	3.4	9.7	13.3
AST (IU/L)	31	39	25	24	211	32	21	18	52	38
ALT (IU/L)	250	99	270	215	123	74	72	61	135	97
ALP (IU/L)	1460	352	4714	4215	348	404	2122	2130	118	126
LDH (IU/L)	68	173	74	64	7417	177	73	34	187	76

Abbreviations: ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ASX, astaxanthin; LDH, lactate dehydrogenase; NEFA, non-esterified fatty acid; NF, neutered female; NM, neutered male; NT, not tested; W, weeks.

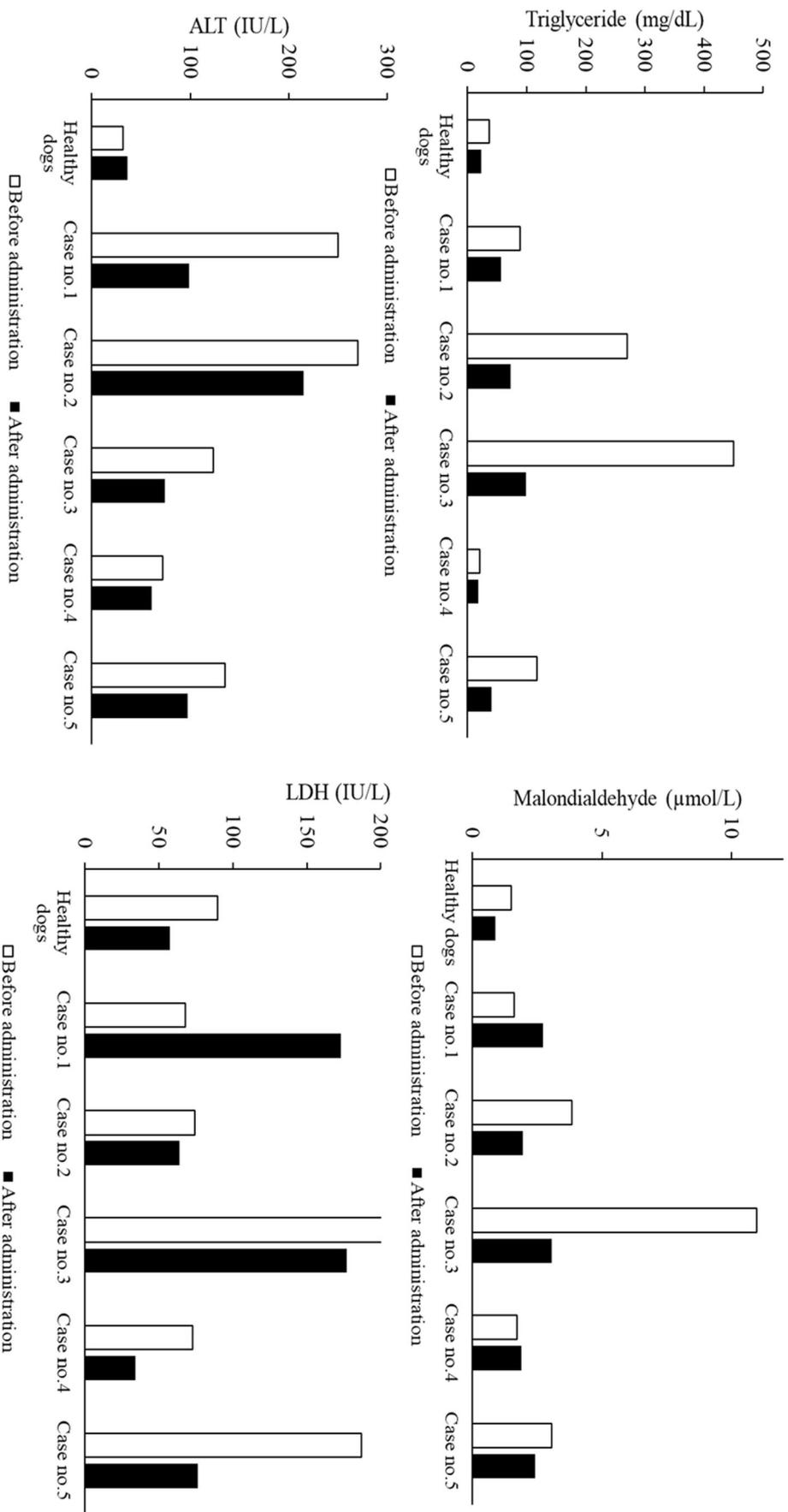


Fig. 12 Comparison of TG, MDA, LDH and ALT levels on healthy dogs and obese dogs with before and after ASX supplementation

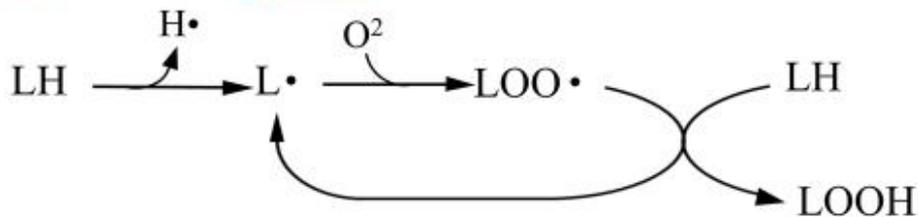
### 3-4 考察

脂肪組織は、エネルギー源ならびにエネルギーの貯蔵庫としての働きのみならず、そこには多数の免疫細胞が確認されており、内分泌メカニズムおよびパラクライン効果を介して全身の代謝を修飾することができる重要な免疫器官としての役割を持ち、それらは肥満によって大きな影響を受ける(Huby 2015)。肥満動物に蓄積された内臓脂肪は、血漿中の NEFA や急性炎症性蛋白質(CRP)および MDA を産生する(Okamura 2018; Ormazabal 2018)。本実験の被検体である 5 頭の肥満犬のうち、症例 1～3 は適正に管理されているが内分泌系の基礎疾患があり治療薬を服用している症例で、症例 4 と 5 は常時使用している服用薬のない症例であった。ASX 投与前の測定値の中で、症例 1～3 の TG および ALT は、症例 4, 5 と比較して高値を示していた。症例 4 と 5 を比較すると、TG、ALT および LDH の ASX 投与前の測定値は、肥満度が重度の症例 5 の方が高値を示していた。すなわち、高度に肥満した犬では、明らかな臨床症状を伴っていないなくとも、潜在的に肝臓の代謝に負荷がかかっている状態であることが推測された。

血清脂質濃度の調節には、生体内のさまざまな代謝系が関与するが、中でも肝臓の脂肪酸酸化系と脂肪酸合成系が大きな役割を果たしている。肝臓は吸収合成した脂肪をリポ蛋白質の形で血液中に分泌し、末梢組織に脂質を転送する働きを担っている。また、脂肪酸を燃焼させエネルギーを獲得する組織でもあり、飢餓時には脂肪組織に蓄えられていた TG が分解され、肝臓へ脂肪酸が輸送されβ酸化により分解される。肥満により肥大化した脂肪細胞はアディポサイトカイン分泌異常をはじめ脂肪分解調節系の異常が生じており、過剰な中性脂肪分解に起因する慢性的な血中 FFA 濃度の上昇が、骨格筋や肝臓におけるインスリン抵抗性を惹起することがわかっている (Tanaka 2007)。すなわち、肥満している動物の場合、肝臓には慢性的な負荷がかかる。重度の内臓脂肪型肥満では、肝臓における TG の蓄積に始まり、肝細胞への酸化ストレスが加わることにより非アルコール性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD)や非アルコール性脂肪肝炎(nonalcoholic steatohepatitis: NASH)が発症するという考え

方が提唱されている (Day 1998)。動物実験モデルにおいては、アディポネクチンが肝臓の脂肪化・線維化を抑制することが示されているが (Xu 2003)、肥満・インスリン抵抗性の増大にともない、肝臓や血液中での炎症性サイトカインの発現が増加し、抗炎症作用のあるアディポネクチンの発現が低下し肝細胞障害を促進する。これらの炎症を誘導する因子には、酸化ストレスも大きくかかわっている。肥満の病態では、脂肪組織での酸化ストレスに伴う脂質過酸化の連鎖反応 (Fig. 13) による脂質過酸化物の蓄積が、肝臓の線維化を誘導するとされている。(宮澤 1991)

- 生体膜の脂質層では、スーパーオキシド( $O_2^{\cdot -}$ )は、大部分がペルヒドロキシラジカル( $HOO\cdot$ )として存在し脂質過酸化を開始する



- 脂質(LH)は、フリーラジカルの影響で、脂質ラジカル(L·)やペルヒドロキシラジカル( $HOO\cdot$ )として存在し、酸化の過程で脂質ペルオキシラジカル( $LOO\cdot$ )、脂質ヒドロペルオキシド(LOOH)を生じ、過酸化反応が加速する

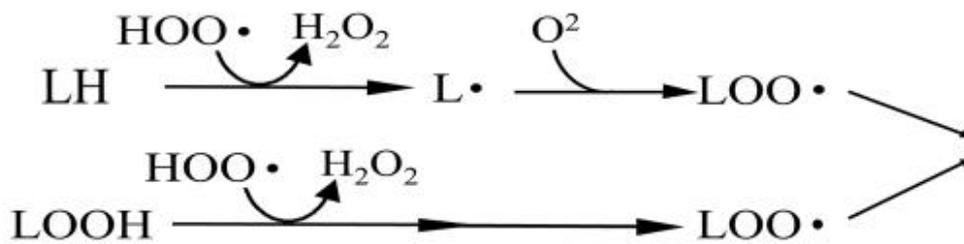


Fig. 13 : 脂質過酸化連鎖反応で生じる活性酸素  
(宮澤陽夫 化学と生物 29 巻 12 号 P.799 参照)

ASX は、2 価鉄励起フリーラジカル連鎖反応による脂質過酸化反応という測定系において、ビタミン E の 250 倍から 500 倍の強力な抗酸化活性を示している (Miki 1991)。本実験において肥満犬の ALT の高値が ASX の摂取後い

ずれの症例においても低下したことは、ASX の摂取により過剰な脂質過酸化が抑制され肝細胞の障害が軽減されたためであったと考えられる。また、肝細胞が保護されることにより、肝機能が改善し、TG、LDH、MDA 等も改善傾向に誘導されたと考えられた。本実験において、ASX の投与は、体重の減少効果は明らかではなかったが、肥満に伴う細胞レベルでの悪影響に対し、特に肝機能の改善という点で有益であった。

過体重・肥満となっている犬は、犬種や遺伝的体質、年齢による代謝機能の低下に加え、脂肪細胞の機能変化が進行しており、潜在的メタボリックシンドローム段階にある。毎日の食生活の中で、摂取カロリーと消費カロリーを調節するうえで、食事の量の調節だけでなく、食物繊維（難消化性デキストリン）、食後高血糖を抑制する  $\alpha$ -グルコシダーゼや D-allulose などの成分の利用(Sako 2010; Nishi 2016, 2017)も積極的に考えていくべきである。同時に酸化ストレス状態を是正することが、効率よく糖脂質代謝改善を促すことにつながる。高度の抗酸化作用を持つ ASX は、肥満・過体重の犬において、糖脂質代謝改善を促す食品成分として利用価値の高い機能性食品成分であると考えられた。

### 3-5 小 括

肥満の病態では、慢性的な肝障害と酸化ストレスに伴う脂質過酸化の連鎖反応により、さらに脂肪細胞のリモデリングが助長される。ASX は、ビタミン E の 250 倍から 500 倍の強力な抗酸化活性を有する。前章の健常犬への ASX 投与により犬の肝臓における脂質代謝が改善することが明らかになったことから、肥満犬における影響について検討した。一般の動物診療施設に来院した BCS 4 または BCS 5 の肥満犬に ASX0.3mg/kg/day を 8 週間経口投与した。その結果、血漿 TG 濃度および ALT 活性は、5 症例のすべてで低下した。LDH 活性は、5 症例中 4 症例で、MDA 濃度は 5 症例中 3 症例で低下した。体重 BCS 他一般臨床所見には、目立った変化は認められなかった。本実験においては、統計的な比較はできなかったが、肥満犬の各症例で ASX 投与後に ALT の

高活性がいずれの症例においても低下したことは、ASXにより過剰な脂質過酸化が抑制され肝細胞の障害が軽減したためであると考えられる。また、肝細胞が保護されることにより、肝機能が改善し、TG、LDH、MDA 等も改善傾向に誘導されたものと考えられた。家庭内で飼育される犬の多くは、飼い主のライフスタイルも大きく、適正な食事を与えられていても、運動不足が多く、摂取カロリーと消費カロリーのバランスが崩れやすい。高度の抗酸化作用を持つASXは、肥満・過体重に伴うメタボリックシンドローム疾患の予防として、潜在的に進行する脂肪細胞の機能不全を防止し糖脂質代謝改善を促す食品成分として、利用価値の高い機能性食品成分であると考えられた。

## 第4章

### 糖尿病およびクッシング症候群の犬に対する ASX 投与

#### 4-1 糖尿病症例犬への ASX の投与例

##### 4-1-1 症例の背景と ASX 投与方法および観察方法

症例は、マルチーズ、去勢雄、11歳齢、体重4.4kg、BCS 3で、2014年3月時、体重減少(3.7kg)と皮膚炎を主訴に受診し、糖尿病及び毛包虫症と診断されインスリンによる治療中であった。同年7月のASX投与開始時点において、正常時体重に回復しており、毛包虫症緩解、インスリン治療継続中であった。2014年7月28日、糖尿病管理のため定期健診に来院した飼い主に、糖尿病を罹患している犬にアスタキサンチンを投与する治験について説明し、書面により同意を得た。同日、空腹時血液を採取し、血液検査・血液化学検査、超音波検査、ACTH刺激試験を実施した。採取した血清の一部をNEFA値、MDA値測定のため $-60^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。血液検査は動物病院内の自動血球計算器にて測定し、血液化学検査およびコルチゾール値の測定は株式会社モノリスに外注した。NEFA値の測定は、NEFA C-test ワコー(和光純薬工業株式会社、東京)、MDA値の測定は、Malondialdehyde Assay kit (Northwest Life Science Specialties LLC, Vancouver, Canada)をそれぞれ用い測定した。付加して投与するASXは、アスタキサンチンフリー体3mgを含有するアスタボーテ(アスタリール株式会社 東京)(0.68mg/kg)を使用し、1日1回食事とともに60日間投与した。ASX投与開始0日目、投与開始後60日目、投与終了後60日目に身体検査および採血を実施し経過を観察した。

##### 4-1-2 結果

観察した測定結果をTable 5、Table 6に示した。ASX投与開始時は、Glu  $173\text{mg dL}^{-1}$ 、糖化アルブミン(GA)14.0%、フルクトサミン(FRA)  $269\mu\text{mol L}^{-1}$ で、身体検査や尿検査等で糖尿病の臨床症状は認められず、糖尿病は適切に管理されていた。ACTH刺激試験の結果はボーダーラインで、腹部超音波検査による副腎のサイズは左右ともに最大幅が6mmとやや腫大していたが、多飲・多尿・多

食・腹部膨満・皮膚症状・筋力低下等のクッシング症候群に関連する臨床症状は認められなかった。肝酵素ならびに脂質代謝関連の項目は、TG 443 mg dL<sup>-1</sup>, ALT 180 IU L<sup>-1</sup>, ALP 3884 IU L<sup>-1</sup>,  $\gamma$ -GTP 26 IU L<sup>-1</sup>, NEFA 2.5698 mEq L<sup>-1</sup>, MDA 7.3333  $\mu$  mol L<sup>-1</sup>であった。AX 投与後 60 日目の検査値は、ALT 107 IU L<sup>-1</sup>, ALP 3166 IU L<sup>-1</sup>,  $\gamma$ -GTP 17.7 IU L<sup>-1</sup>, NEFA 1.6129 mEq L<sup>-1</sup>, MDA 5.7666  $\mu$  mol L<sup>-1</sup>と減少した。糖尿病関連の検査値は Glu 148mg dL<sup>-1</sup>, GA 15.5%, FRA 257  $\mu$  mol L<sup>-1</sup>と安定していた。AX 投与中止 30 日後、飲水量が増えているとのことで来院したため、その他の臨床症状に異常は認められなかったが、FRA 値は正常範囲であったが、Glu 341 mg dL<sup>-1</sup>, GA 17.0%と血糖値のコントロールが不安定であり、ACTH 刺激試験の値が、コルチゾール値が pre 2.4  $\mu$  g dL<sup>-1</sup>, post 22.1  $\mu$  g dL<sup>-1</sup>と上昇していたため、糖尿病の治療に加えクッシング症候群の治療としてトリロスタン 10mg (アドレスタン、共立製薬、東京) の内服を開始した。インスリンの治療に加え、クッシング症候群の治療を平行して実施した 30 日後で、AX 中止 60 日後の各測定値は、ALT、ALP、 $\gamma$ -GTP は、それぞれ 105 IU L<sup>-1</sup>, 3499 IU L<sup>-1</sup>, 22.6 IU L<sup>-1</sup> で肝機能に大きな変動は認められなかったが、コルチゾール値は pre 2.6  $\mu$  g dL<sup>-1</sup>, post 19.1  $\mu$  g dL<sup>-1</sup> で良好であった一方で、尿検査の異常や、多飲・多尿・多食等の臨床症状は認められなかったが、糖尿病関連の検査値がそれぞれ Glu 361 mg dL<sup>-1</sup>, GA 19.1 %, FRA 313  $\mu$  mol L<sup>-1</sup>と上昇傾向を示した。ASX 投与中止後 60 日目の NEFA および MDA の測定値は、ASX 投与中 60 日目の測定値 NEFA 1.6129 mEq L<sup>-1</sup>, MDA 5.7666  $\mu$  mol L<sup>-1</sup>と比較して、それぞれ NEFA 4.043 mEq L<sup>-1</sup>, MDA 22.1666  $\mu$  mol L<sup>-1</sup>と著しく増加した。

Table. 5 Changes in blood chemistry profiles (TC, TG, ALT,  $\gamma$  GTP, ALP, Glu, GA, FRA, NEFA, MDA) before and after astaxanthin supplementation

	Reference range	Before taking ASX	60 days after taking ASX	30 days after stop taking ASX	60 days after stop taking ASX
TC (mg dL <sup>-1</sup> )	85-337	333	324	301	239
TG (mg dL <sup>-1</sup> )	26-137	443	533	415	353
ALT (IU L <sup>-1</sup> )	20-99	180	107	127	105
$\gamma$ -GTP (IU L <sup>-1</sup> )	0.0-20.0	26	17.07	22.2	22.6
ALP (IU L <sup>-1</sup> )	49-298	3884	3166	3424	3499
Glu (mg dL <sup>-1</sup> )	63-118	173	148	341	361
GA (%)	8.8-14.5	14.0	15.5	17.0	19.1
FRA ( $\mu$ mol L <sup>-1</sup> )	167-308	269	257	271	313
NEFA (mEq L <sup>-1</sup> )	0.9 $\pm$ 0.3	2.569	1.612	—	4.043
MDA ( $\mu$ mol L <sup>-1</sup> )	4.9 $\pm$ 2.2	7.3333	5.7666	—	22.1666

Table. 6 Results of ACTH stimulation test and clinical signs

	Serum Cortisol Value ( $\mu$ g dL <sup>-1</sup> )		Clinical signs
	Pre	Post	
Before taking ASX	2.1	21.8	NAA
60 days after taking ASX	NT	NT	NAA
30 days after stop taking ASX	2.4	22.1	PD
60 days after stop taking ASX	2.6	19.1	NAA

NT: not tested, NAA: no apparent abnormalities, PD: polydipsia

#### 4-1-3 考察

犬の糖尿病は、生涯にわたり適切な血糖値のコントロールが必要な疾患である。また同時に、糖尿病治療の具体的な目標は、QOL改善のために合併症・併発症を予防することである。本症例は、ASX投与開始前の時点では、血糖値は適正に管理されていたが、高TG血症、高ALP活性上昇、肝酵素の軽度の上昇に加え、NEFA値およびMDA値の上昇が認められた。この臨床症例では、過去の報告からASXの安全域が広く、安全性に問題はない事が確認されている事から(Brown D 2018; Park JS 2010)、第2章と第3章に使ったASXの用量より多い0.68mg/kg (3mg/day)の1日1回投与したが、その投与によって影響を認めた項目は、肝酵素とNEFA、MDAで先の実験結果と同様であった。60日間のASXの負荷投与によりALT, r-GTPなどの肝酵素値が低下したことで、ASX投与が脂質代謝及び肝機能の改善に好影響を与えたことが示唆される。さらに被毛密度が高まり、毛艶が良くなるなど、外貌上の好ましい変化が認められた。糖尿病のマウスにASXを摂取させた実験において、AST, ALTが有意に低下し、肝臓グルタチオン量の低下が抑制され、死亡率が顕著に低下したことが報告されている(品田1996)。さらに本症例での投与実験でASX中止後30日目に多飲の症状に加え、ACTH刺激試験の検査値が上昇していたことから、糖尿病の管理に加えクッシング症候群の治療も開始したが、さらに30日後の検査ではコルチゾール値が安定し、ALT, TC, TGが低下しているにも関わらず、血糖値のコントロールが不完全になっていたことは、ASXの投与中は糖尿病症例犬のインスリン抵抗性が緩和されていた可能性を示唆しているものと推測した。ASXがインスリンシグナル伝達系に及ぼす影響を調査し、脂肪細胞やラット由来培養細胞L6骨格筋細胞を用いたin vitroの実験で、アスタキサンチンがTNF- $\alpha$ とパルミチン酸を含むサイトカインおよび遊離脂肪酸によるインスリン抵抗性を改善するかどうかを調べた実験で、ASXは酸化ストレスから細胞を保護することによってインスリン抵抗性を改善し、それらの影響によって誘導されるグルコースの取り込みの減少を回復させ、同時に活性酸素種(ROS)の生成を減少させた事を報告している(Ishiki 2013)。糖尿病では、高血糖によってROSの生成

が増えるだけでなく NEFA の上昇をきたすが、NEFA への過剰な曝露は、膵臓  $\beta$  細胞からのインスリン分泌を損なうことによる糖尿病誘発性合併症によって潜在的に重要であると見なされている。ASX 中止した 60 日後の MDA 値ならびに NEFA 値が上昇していたことは、言い換えれば糖尿病のコントロール不全が、脂質代謝マーカーである NEFA 値、過酸化脂質マーカーである MDA 値に顕著な影響を及ぼしたものと考えられる。これらの所見から、糖尿病犬の経過観察に NEFA 値や MDA 値が活用できると同時に、糖尿病治療においては合併症の予防のみならず、インスリン抵抗性を抑制する目的においても ASX の付加的投与は有益であると考えられた。

#### 4-2 クッシング症候群犬への ASX の投与例

##### 4-2-1 症例の背景と ASX 投与方法および観察方法

症例は、ミニチュアダックスフンド、避妊雌、11 歳齢、体重 7.3kg、BCS 4、クッシング症候群のためトリロスタンにて治療管理 4 か月目、臨床症状の安定しているやや肥満傾向のミニチュアダックスフンドであった。*Hematococcus pluvialis* 由来の ASX (アスタリール株式会社 東京) 2mg/day (0.27mg/kg) を投与し、ASX 投与前、ASX 投与 30 日後、ASX 投与 120 日後の肝酵素ならびに脂質代謝関連の項目について、total cholesterol (TC), triglyceride (TG), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), non-esterified fatty acid (NEFA) 値を測定した。血液化学検査は動物病院内の測定器に測定し、NEFA 値の測定は、NEFA C-test ワコー (和光純薬工業株式会社 東京) にて測定した。

##### 4-2-2 結果

検査結果を Table. 7 に示した。NEFA 値は、ASX 投与前、ASX 投与 30 日後、ASX 投与 120 日後でそれぞれ 2.98 mEq L<sup>-1</sup>, 2.82 mEq L<sup>-1</sup>, 0.97 mEq L<sup>-1</sup> で、ASX 投与 120 日後の値は正常範囲域であった。TG の値は、ASX 投与前と ASX 投与 120 日後でそれぞれ、676 mg dL<sup>-1</sup> と 315 mg dL<sup>-1</sup> で顕著な低下傾向が認められた。ALT, ALP, TC の値には、ASX 投与前、ASX 投与 30 日後、ASX 投与 120 日後で顕著な変動は認められなかった。BCS の変化は認められなかった。

Table. 7 Changes in blood chemistry profiles (TC, TG, ALT, ALP, NEFA,) before and after astaxanthin supplementation

	Reference range	Before taking ASX	30 days after taking ASX	120 days after taking ASX
TC (mg dL <sup>-1</sup> )	85~337	338	357	337
TG (mg dL <sup>-1</sup> )	26~137	676	642	315
ALT (IU L <sup>-1</sup> )	20~99	29	76	31
ALP (IU L <sup>-1</sup> )	49~298	1351	2512	1516
NEFA (mEq L <sup>-1</sup> )	0.9±0.3	2.97849	2.8172	0.96774

#### 4-2-3 考察

ASX は、クッシング症候群の治療に付加して投与することにより、脂質代謝のバイオマーカーである NEFA 値を低下させることが示唆された。BCS への明らかな変化は認められなかったが、飼い主の視点からは、持久力やジャンプ力の向上などが認められ、活力の充実、被毛密度や毛艶の改善、皮膚の質感の改善等など臨床症状の改善に有益であった。本臨床実験では、ASX の投与量を 2mg/day としたため、過体重の本症例の場合体重当たりの投与量が 0.27mg/kg となったが、120 日間という期間を継続して投与しその影響を観察したところ、NEFA 値が 30 日目と比較して、120 日目の時点で正常値であったこと、TG についても長期間投与後の値が顕著に低下したことから、継続して投与することで脂質代謝に好影響を及ぼすことが示唆された。また、ASX とトリロスタンの併用で一般状態や血液検査上でのいかなる副作用は認められなかったことは、ASX の機能性食品成分としての安全性に対しても有益な情報であった。

#### 4-3 小 括

糖尿病およびクッシング症候群の症例に対し、各疾患が適正に管理されている状態で ASX を付加して投与し、その影響を調べた。BCS 3、非肥満犬で、インスリン投与により糖尿病治療中の 11 歳齢のマルチーズ、去勢雄に ASX 0.68mg/kg/day を投与し、血液代謝産物、NEFA、MDA 濃度を測定した。ASX 投与 60 日の ALT 値、 $\gamma$  GTP 値、NEFA 値、MDA 値が改善した。その後、ASX 投与を中止し、60 日後再度同項目を測定した結果、臨床症状に変化はなかったが、MDA 値が改善した。その後、ASX 投与を中止し 60 日後再度同項目を測定した結果、臨床症状に変化はなかったが、MDA 値が著しく増加し、NEFA 値、 $\gamma$  GTP 値も増加した。ASX の投与は、インスリン抵抗性を抑制する上でも有効であると考えられた。BCS 4、過体重、11 歳齢、ミニチュアダックスフンド、避妊雌のクッシング症候群の治療過中の症例に、0.28mg/kg/day を経口投与し、血液生化学検査値、NEFA 値を測定した。投与後 30 日目において TC、TG、ALT、NEFA 値には大きな変化は認められなかったが、120 日目において TG および NEFA 値が改善した。以上のことから、ASX の投与は主に肝における脂質過酸化を抑制し、肝機能を改善することにより、糖尿病やクッシング症候群の治療に有効であることが明らかとなった。脂質過酸化を抑制し、肝機能を改善することは肥満に伴う糖尿病をはじめとする種々の代謝性疾患の予防や動物の生活の質 QOL の維持に重要である。したがって、脂質過酸化を抑制する ASX などの抗酸化物質は肥満、それに続くメタボリックシンドロームの予防に有用である。

## 第5章

### まとめ

わが国は、人口減少の問題と同時に高齢者の有病率の増加が、医療財政の面でも社会保障の面でも大きな問題となっている。動物の健康を支える獣医療を考えると、健康な伴侶動物の存在が人の心身の健康維持に多大な影響を与えている一方で、慢性疾患を患い飼い主の精神的・経済的負担になっている高齢動物の増加に注目せざるを得ない臨床現場を見過ごすことはできず、獣医療が確実に転換期を迎えていると考える。近年、疾患の起源に注目したさまざまな先制的予防医療の取り組みが進められている。本研究では、動物個々の体質を考慮し、健診と生活習慣の改善や指導に、より重点をおいた健康指導を提供するうえで、糖脂質代謝障害の発生予防が期待できる機能性食品成分としてアスタキサンチンについて検討した。

犬の肥満と疾病動向を調査した結果、肥満の増加が顕著であり、中高齢犬の死因につながる疾患の多くが、生活習慣の乱れや偏りにより生じた肥満に関連して発現するメタボリックシンドロームと呼ばれる一連の病態から派生していることが予想される。それら病態はインスリン抵抗性、耐糖能障害、高血圧、脂質異常症といった徴候を示し、さらに加齢という経時的変化が加わることでより複雑に連鎖して種々の疾患やその合併症が発症する。

「フリーラジカル・活性酸素」が多くの疾病の発症にかかわることが多くの研究で解明されつつあることから、糖脂質代謝障害と加齢がどのようなメカニズムで肥満をはじめとする疾病の発症につながるのかを酸化ストレスの側面から検討した。好気性生物にとって酸素は必要不可欠であるが、取り込まれた酸素の数パーセントは、フリーラジカル・活性酸素に変換されると言われている。生体内で過剰に生じた活性酸素種(ROS)は、生体成分と様々に反応し、生体傷害を引き引き起こす。特に、酸化ストレスの標的となるのは、細胞膜の構成成分であるリン脂質、特に酸化されやすい不飽和脂肪酸である。肥満することにより体内に過剰に蓄積された脂肪細胞もまた ROS の影響を受け、生体内脂質過酸化反応により生成された脂質過酸化物質や連鎖反応の途中で発生したフリーラジ

カルにより、タンパク質や酵素、核酸などの生体構成成分も持続的に傷害を受けることにより、がんや動脈硬化、糖尿病の合併症につながる。酸化ストレスの影響を最小限にするためには、酸化物を取り込まないと同時に、還元力すなわち抗酸化力を高めることが重要である。

抗酸化能が期待される食品成分には多種多様な天然成分が報告されているが、本研究では細胞の生体膜上で効率的に抗酸化能を発揮できる成分として、動物が体内で合成することができず、食物から摂取する必要があるカルテノイドの中で、アスタキサンチンの有効性について検討した。アスタキサンチンはその特徴的な構造上、細胞膜内を貫通する形で存在することができるため、細胞膜やミトコンドリア膜でフリーラジカルを捕捉し、脂質の過酸化抑制ならびに膜リン脂質の過酸化連鎖反応を阻止することができるため、他のキサントフィルよりも効率よく抗酸化能を発揮することが分かっている。脂質過酸化反応の過程では、種々の多様なアルデヒド類が生成されるが、最終的な生成物である MDA は、脂質過酸化物を測定する信頼性の高い特異的なバイオマーカーとして知られている。適正な BCS を持つ健康な犬にアスタキサンチンを投与した結果、ASX を投与した群は投与しなかった群と比較して MDA 値が有意に低下しており、同時に TG、LDH も有意に低下した。これらの結果は、加齢による代謝機能の低下や先天的な体質などで肥満しやすい動物に対し、先制的に脂質過酸化による細胞傷害を抑制するという目的で、食事にアスタキサンチンを添加することを疾病発症予防として提案できる可能性があることを示唆した。また、すでに肥大化した脂肪細胞を多量に保有している未病状態の肥満犬に ASX を投与した実験からは、MDA への影響にも増して、TG、ALT への影響が顕著であり、肝細胞が保護されることにより肝機能が改善し脂質代謝が活性化することが分かった。さらに、糖尿病やクッシング症候群に罹患している犬に対して ASX を付加して投与したことにより、MDA、NEFA の測定値が正常化し、肝機能が改善していたことから、すでに病的状態である犬に対しても ASX を投与することで、治療を阻害することなく QOL を高めることわかった。糖尿病治療の具体的な目標は、QOL 改善のために、合併症を予防することである。ASX は、疾病により脆弱になっている細胞膜の連鎖的脂質過酸化反応により過剰に生成

されたフリーラジカルや酸化ストレスによる生体成分への悪影響を減弱させることで役立っているものと考えられる。

今後の獣医療においては、一次診療施設に求められる診療分野の中で、先制的疾病予防のための健康検診及び健康指導はその重要性がより高まるものと思われる。個々の動物に対して、遺伝素因、生活環境、生活習慣、飼い主の性格や経済力なども含めて、疾病予防に特化した食事・生活指導を提案できるような、個々の動物を包括的に診る関わりが大切である。MDA や NEFA などを含め老化や酸化ストレス、脂質代謝能などを評価するバイオマーカーがさらに開発され、健康検診の検査システムで利用できるようになることで、ASX のような機能性食品成分が動物の先制的疾病予防により活用され、慢性疾患の発症防止と健康寿命の延伸に効果を上げることにつながると考えられる。

## 総 括

### 1. 糖脂質代謝障害の疫学

動物の肥満は、人の肥満同様多くの疾病を起因するリスク因子として極めて重要な病態である。動物の肥満症の評価は、ボディコンディションスコア(BCS)が一般的で、広く利用されているところではあるが、単純肥満と脂肪の量的異常や質的異常による肥満症を分類する診断アプローチは未だ確率されていない。体内に過剰に蓄積され余剰となった脂肪は、体組織に様々な影響を及ぼし炎症を引き起こす。脂肪細胞は、エネルギーの貯蔵庫としての機能だけでなく、体の機能調整に重要な各種のアディポサイトカインを産生分泌している。肥満が疾病を起因するメカニズムに最も重要な要素は、内臓脂肪蓄積型の肥満における脂肪細胞の機能変化である。肥大化した脂肪細胞から大量に産生される各種の炎症性サイトカイン、FFA、脂肪組織間に浸潤する起炎性の M1 マクロファージ、加えて NADPH 酸化酵素の活性化、抗酸化酵素の発現低下による酸化ストレス状態が持続的に連鎖的に起こり肥満ドミノが加速し、インスリン抵抗性を高め、耐糖能異常、高血圧、脂質異常症などメタボリックシンドロームの発症につながる。以上のことから、動物の予防医療にとって、肥満の予防に重点を置いた一次予防対策は、健康長寿を目指す上で極めて重要であると考えられた。

### 2. 犬へのアスタキサンチン(ASX)投与が脂質代謝に及ぼす影響

ASX は、脂質過酸化反応抑制作用ならびに一重項酸素消去活性に優れた抗酸化物質であることから、ヒトの健康維持保善効果を持つ機能性食品成分としてまた魚の養殖など水産業界等でも広く利用されている。過剰な ROS 産生による酸化ストレス状態は慢性炎症を引き起こし、肥満もまた慢性炎症を引き起こし、それらは生活習慣病のリスクファクターとなることが明らかにされている。今回、理想的体型の健常な犬 10 頭を用い、0.3mg/kg の ASX を 6 週間の摂取させる投与実験を行った結果、ASX 投与群においては TG、MDA、LDH の測定値が、投与前と投与 6 週間後を比較して投与後に有意に低下したことから、

健康な犬における ASX (0.3mg/kg BW/day) の補給により肝機能が向上し、脂質過酸化反応を抑制する抗酸化作用を発揮する効果があることが分かった。またその他の生化学検査値に変化を及ぼさなかったため、ASX は安全な食品成分と考えられた。ASX の持つ脂質過酸化抑制作用は、健康な動物において有益であったことから、ASX は健康維持、疾病予防の目的で利用できる機能性食品成分であることが推測された。

### 3. アスタキサンチン(ASX)投与が肥満犬に及ぼす影響

肥満の病態においては、慢性的な肝細胞障害と酸化ストレスに伴う脂質過酸化の連鎖反応にから、さらに肝細胞の障害を助長する。ASX は、ビタミン E の 250 倍から 500 倍の強力が抗酸化活性を有している。前章の健康犬への ASX 投与実験により犬における脂質代謝が改善することが明らかになったことから、肥満犬における影響について検討した。一時診療施設に来院した BCS4 または 5 の肥満犬に ASX0.3mg/kg を 8 週間投与した。その結果 TG 濃度及び ALT 活性は、5 症例のすべてにおいて低下した。LDH 活性は、5 症例中 4 症例で、MDA 濃度は 5 症例中 3 症例で低下した。体重他一般臨床所見には、特筆すべき変化は認められなかった。本実験において肥満犬の ALT の高値が ASX の摂取後いずれの症例においても低下したことは、ASX の摂取により過剰な脂質過酸化が抑制され肝細胞の障害が抑制されたためであったと考えられる。また、肝細胞が保護されることにより、肝機能が改善し、TG、LDH、MDA 等も改善傾向に誘導されたものと考えられた。家庭内で飼育される犬は、飼い主のライフスタイルも大きく影響し、適正な食事を与えられていても、運動不足・活動不足が多く、摂取カロリーと消費カロリーのバランスが崩れやすい。高度の抗酸化作用を持つ ASX は、肥満・過体重に伴うメタボリックシンドローム疾患の予防として、潜在的に進行する脂肪細胞の機能不全を防止し糖脂質代謝改善を促す食品成分として、利用価値の高い機能性食品成分であると考えられた。

### 4. 糖尿病、クッシング症候群の犬へのアスタキサンチンの投与

糖尿病及びクッシング症候群の症例に対し、各疾患が適正に管理されている

状態で ASX を付加して投与した。BCS3 で肥満していない糖尿病治療中の 11 歳齢、マルチーズ、去勢雄に ASX 0.68mg/kg を投与し、血液生化学検査値、NEFA 値、MDA 値を測定した。60 日後の ALT 値、 $\gamma$ -GTP 値、NEFA 値、MDA 値が改善した。その後 ASX を中止し 60 日後再度同項目を測定したところ、臨床症状に変化はなかったが、MDA 値が著しく増加し、NEFA 値、 $\gamma$ -GTP 値も増加した。ASX の付加的投与は、インスリン抵抗性の抑制の意味でも有効であると考えられた。BCS4、過体重、11 歳齢、ミニチュアダックスフンド、避妊雌のクッシング症候群治療中の症例に ASX 0.28mg/kg を投与し、血液生化学検査値、NEFA 値を測定した。投与後 30 日目において TC, TG, ALT, NEFA には、大きな変化は認められなかったが、120 日目においいて TG 及び NEFA 値が改善した。以上のことから、ASX の投与は糖尿病やクッシング症候群の治療管理に、脂質の過酸化を抑制し、併発症予防や QOL の維持に有効に寄与する可能性が覗われた。

## 文 献

アニコム家庭どうぶつ白書: 2017

Alam MN, Hossain MM, Rahman MM, et al. Astaxanthin prevented oxidative stress in heart and kidneys of isoproterenol-administered aged rats. *J Diet Suppl* 15:42–54. 2018

Arunkumar E, Bhuvaneshwari S, Anuradha CV. An intervention study in obese mice with astaxanthin, a marine carotenoid: effects on insulin signaling and pro-inflammatory cytokines. *Food Funct* 3:120–126. 2012

Bhuvaneshwari S, Arunkumar E, Viswanathan P, Anuradha CV. Astaxanthin restricts weight gain, promotes insulin sensitivity and curtails fatty liver disease in mice fed a obesity-promoting diet. *Process Biochem* 45:1406–1414. 2010

Brown DR, Gough LA, Deb SK, Sparks SA, Mcnaughton LR. Astaxanthin in exercise metabolism, performance and recovery: a review. *Front Nutr* 4:76. 2018

Brunson BL, Zhong Q, Clarke KJ, et al. Serum concentrations of adiponectin and characterization of adiponectin protein complexes in dogs. *Am J Vet Res.* 68:57–62. 2007

Catchpole B, Ristic JM, Fleeman LM, Davison LJ. Canine diabetes mellitus: Can old dogs teach us new tricks? *Diabetologia* 48:1948–1956. 2005

Chew BP, Mathison BD, Hayek MG, Massimino S, Reinhart GA, Park JS. Dietary Astaxanthin Enhances Immune Response in Dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 2011 140. 199-206

Courcier EA, Thomson RM, Mellor DJ, Yam PS. An epidemiological study of environmental factors associated with canine obesity. *J Small Anim Pract* 51: 362-367. 2010

Day CP, James OF: Steathophepatitis: a tale of two “hits”? *Gastroenterology* 114: 842-845. 1998

Demaria M, Ohtani N, Youssef SA, Rodier F, Toussaint W, Mitchell JR, Laberge RM, Vijg J, Van Steeg H, Dollé ME, Hoeijmakers JH, de Bruin A, Hara E, Campisi J. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell* 31: 722-33. 2014

Devaraj S, Singh U, Jialal I. Human C-reactive protein and the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol.* 20(3):182–189. 2009

Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, Slezak LA, Andersen DK, Hundal RS, Rothman DL, Petersen KF, Shulman GI. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1–associated phosphatidylinositol 3-kinase activity *J. Clin. Invest* 103:253–259. 1999

Edney AT, Smith PM: Study of obesity in dogs visiting veterinary practices in the United Kingdom. *Vet Rec* 118: 391-396. 1986

European Food Safety Authority. Scientific opinion on the safety and efficacy of synthetic astaxanthin as feed additive for salmon and trout, other fish, ornamental fish, crustaceans and ornamental birds. *EFSAJ.* 12:3724. 2014

Available from: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/>

Fall T, Hamlin HH, Hedhammar A, Kämpe O, Egenvall A. Diabetes mellitus in a

population of 180,000 insured dogs: incidence, survival, and breed distribution. *J Vet Intern Med* 21:1209-16. 2007

Fleming J M, Creevy K E, Promislow D E L: Mortality in North American Dogs from 1984 to 2004: An Investigation into Age-, Size-, and Breed-Related Causes of Death. *J Vet Intern Med* 25: 187-198. 2011

Fujisaka S, Usui I, Bukhari A, Ikutani M, Oya T, Kanatani Y, Tsuneyama K, Nagai Y, Takatsu K, Urakaze M, Kobayashi M, Tobe K. Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes* 58: 2574-2582. 2009

Fujisaka S, Usui I, Ikutani M, Aminuddin A, Takikawa A, Tsuneyama K, Mahmood A, Goda N, Nagai Y, Takatsu K, Tobe K. Adipose tissue hypoxia induces inflammatory M1 polarity of macrophages in an HIF-1 $\alpha$ -dependent and HIF-1 $\alpha$ -independent manner in obese mice. *Diabetologia* 56: 1403-1412. 2013

Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 114:1752-61. 2004

Funatsu T., Maeda N., Taniya R., Yamamoto N. Examination of Body Condition Score (BCS) and Relation between BCS and Disease in Dogs. *J Anim Clin Med* 12:87-91. 2003

German AJ, Hervera M, Hunter L, Holden SL, Morris PJ, Biourge V, Trayhurn P. Improvement in insulin resistance and reduction in plasma inflammatory adipokines after weight loss in obese dogs. *Domest Anim Endocrinol* 37:214-216. 2009

German AJ, ryan VH, German AC, Wood IS, Trayhum P. Obesity, its associated disorders and the role of inflamatory adipokines in companion animals. *Vet J* 185:4-9. 2010

Huby AC, Antonova G, Groenendyk J, et al. Adipocyte-derived hormone leptin is a direct regulator of aldosterone secretion, which promotes endothelial dysfunction and cardiac fibrosis. *Circulation* 132:2134–2145. 2015

伊藤 裕：メタボリックドミノとCKD，日本内科学雑誌 100: 191-198. 2011

伊藤 裕：メタボリックドミノとは 生活習慣病の新しいとらえ方．日本臨床 61: 1837-1843, 2003

伊藤 裕：メタボリックドミノと先制医療，日本内科学会雑誌 107: 1913-1920. 2018

Ikeuchi M, Koyama T, Takahashi J, Yazawa K. Effects of astaxanthin in obese mice fed a high-fat diet. *Biosci Biotechnol Biochem* 71:893–899. 2007

Imai Y, Takahashi A, Hanyu A, Hori S, Sato S, Naka K, Hirao A, Ohtani N, Hara E. Crosstalk between the Rb pathway and AKT signaling forms a quiescence-senescence switch. *Cell Rep* 7:194-207. 2014

Imamura T, Koffler M, Helderman JH, Prince D, Thirlby R, Inman L, Unger RH. Severe diabetes induced in subtotally depancreatized dogs by sustained hyperglycemia. *Diabetes* 37:600-609. 1988

Islam MA, Al Mamun MA, Faruk M, Ul Islam MT, Rahman MM, Alam MN, Rahman AFMT, Reza HM, Alam MA. Astaxanthin Ameliorates Hepatic Damage and Oxidative

Stress in Carbon Tetrachloride-administered Rats. *Pharmacognosy Res* 9(Suppl 1): S84–S91. 2017

Ishiki M, Nishida Y, Ishibashi H, Wada T, Fujisaka S, Takikawa A, Urakaze M, Sasaoka T, Usui I, Tobe K. Impact of Divergent Effects of Astaxanthin on Insulin Signaling in L6 Cells. *Endocrinology* 154: 2600–2612. 2013

井村裕夫: 先制医療とは何か-なぜ今それが必要か. *実験医学*, 33:1018-1019. 2015

Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine* 9: 515-540. 1990

Jeusette IC, Lhoest ET, Istasse LP, Diez MO. Influence of obesity on plasma lipid and lipoprotein concentrations in dogs. *American Journal of Veterinary Research* 66:81–86. 2005

Jürgens CA, Toukatly MN, Fligner CL, Udayasankar J, Subramanian SL, Zraika S, Aston-Mourney K, et al.  $\beta$ -Cell loss and  $\beta$ -cell apoptosis in human type 2 diabetes are related to islet amyloid deposition. *Am J Pathol* 178:2632-40. 2011

Kamata K, Mizukami H, Inaba W, Tsuboi K, Tateishi Y, Yoshida T, Yagihashi S. Islet amyloid with macrophage migration correlates with augmented  $\beta$ -cell deficits in type 2 diabetic patients. *Amyloid* 21: 191-201. 2014

Kealy RD, Lawler DF, Ballam JM, Mantz SL, Biery DN, Greeley EH, Lust G, Segre M, Smith GK, Stowe HD. Effects of diet restriction on life span and age-related changes in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 220:1315-1320. 2002

Kim D, Noh D, Oh T, Lee K. Body fat assessment by computed tomography and radiography in normal Beagle dogs. *J Vet Med Sci* 80:1380-1384. 2018

Kim JH, Chang MJ, Choi HD, Youn YK, Kim JT, Oh JM, Shin WG. Protective effects of haematococcus astaxanthin on oxidative stress in healthy smokers. *J Med Food* 14: 1469-1475. 2011

Kirk CA. Feline diabetes mellitus: low carbohydrates versus high fiber? *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 36:1297-306 2006

Koizumi, M., Noda, C., Shimokawa, A., Kusumi, T., Kobayashi, T., Watari, K., Otsuji, K. IDENTIFICATION OF THE PALPATION SITE IN THE DIAGNOSIS OF BODY CONDITION SCORE IN DOGS. (25th ECVIM-CA Congress, 2015) *J Vet Intern Med* 30: 348–439. 2016

Kurashige M, Okimasu E, Inoue M, Utsumi K. Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. *Physiol Chem Phys Med NMR* 22 :27–38. 1990

Laflamme DP. Development and Validation of a Body Condition Score System of Dogs. *Canine Practice* 22: 10-15. 1997

Li G, Lee P, Mori N, Yamamoto I, Kawasumi K, Tanabe H, Arai T. Supplementing five-point body condition score with body fat percentage increases the sensitivity for assessing overweight status of small to medium sized dogs. *Vet Med* 3:71-78. 2012

Lim BP, Nagao A, Terao J, Tanaka K, Suzuki T, Takama K. Antioxidant activity of xanthophylls on peroxy radical-mediated phospholipid peroxidation. *Biochem Biophys Acta* 1126:178-184. 1992

Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 117: 175-184. 2007

Lund EM, Armstrong PJ, Kirk CA, Kolar LM, Klausner JS. Health status and population characteristics of dogs and cats examined at private veterinary practices in the United States. *J Am Vet Med Assoc* 214:1336-41. 1999

Lund, E., Armstrong, P., Kirk, C., Klausner, J. Prevalence and risk factors for obesity in adult dogs from private US veterinary practices. *Int J Appl Res Vet Med* 4: 177-186. 2006

Lusby AL, Kirk CA, Bartges JW. The role of key adipokines in obesity and insulin resistance in cats. *J Am Vet Assoc* 235:518-522. 2009

Mao J, Xia Zm, Chen J, Yu J. Prevalence and risk factors for canine obesity surveyed in veterinary practices in Beijing, China. *Prev Vet Med* 112 :438-42. 2013

眞岡 孝至. カロテノイドの多様な生理作用. 食品・臨床栄養, 2: 3-14. 2007

眞岡 孝至. 天然カロテノイドの分析と構造研究. ネオサイエンス 第 12 巻 第 10 号: 485-494. 2012

眞岡 孝至. カロテノイド-天然色素とその役割. ENEOS technical review. 第 56 巻第 3 号 88- 95. 2014

Mawby DI, Bartges JW, d'Avignon A, Laflamme DP, Moyers TD, Cottrell T. Comparison of various methods for estimating body fat in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 40:109-14. 2004

McGreevy PD, Thomson PC, Pride C, Fawcett A, Grassi T, Jones B: Prevalence of obesity in dogs examined by Australian veterinary practice and the risk factors involved. *Vet Rec* 156, 695-702. 2005

McNulty HP, Byun J, Lockwood SF, Jacob RF, Mason RP. Differential effects of carotenoids on lipid peroxidation due to membrane interactions: X-ray diffraction analysis. *Biochem Biophys Acta* 1768: 167-174. 2007

Miki W. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl Chem* 63:141-146. 1991

宮澤陽夫. 活性酸素と脂質. 化学と生物 Vol.29, No12: 798-806. 1991 Available from <https://doi.org/10.1271/kagakutoseibutsu1962.29.798>

宮崎 滋. 肥満と疾病. *Functional Food*, Vol.1 No.2 113-118. 2008

Montoya-Alonso JA, Bautista-Castaño I, Peña C, Suárez L, Juste M.C, Tvarijonaviciute A. Prevalence of Canine Obesity, Obesity-Related Metabolic Dysfunction, and Relationship with Owner Obesity in an Obesogenic Region of Spain. *Frontiers in Vet Sci* 25.vol 4, Article 59, 2017

Nabi, S.U., Dey, S., Gupta, G., Kumar, A., Vala, J. and Jan, M.H.: A study of neuromuscular dysfunctions in geriatric dogs. *Haryana Vet* 49: 73-74. 2010

Naito Y, Uchiyama K, Aoi W, Hasegawa G, Nakamura N, Yoshida N, Maoka T, Takahashi J, Yoshikawa T. Prevention of diabetic nephropathy by treatment with astaxanthin in diabetic db/db mice. *Biofactors* 20:49-59. 2004

Nakagawa K, Kiko T, Miyazawa T, Carpennero Burdeos G, Kimura F, Satoh A,

Miyazawa T. Antioxidant effects of astaxanthin on phospholipid peroxidation in human erythrocytes. *Br J Nutr* 105:1563-1571. 2011

日本肥満学会肥満症診断基準検討委員会：新しい肥満の判定と肥満症の診断基準. 肥満研究：日本肥満学会誌 = Journal of Japan Society for the Study of Obesity. 6, 18-28, 2000

日本肥満学会肥満症治療ガイドライン作成委員会：肥満症治療ガイドライン 2006. 肥満研究：日本肥満学会誌 = Journal of Japan Society for the Study of Obesity, 12, 220-224, 2006

Nishii N, Nomizo T, Takashima S, Matsubara T, Tokuda M, Kitagawa H. Effects of D-allulose on glucose metabolism after the administration of sugar or food in healthy dogs. *J Vet Med Sci* 78:1657-1662. 2016

Nishii N, Takashima S, Kobatake Y, Tokuda M, Kitagawa H. The long-term safety of D-allulose administration in healthy dogs. *J Vet Med Sci* 79:1780-1784. 2017

Okamura A, Watanabe M, Fukudome I, et al. Relationship between visceral obesity and postoperative inflammatory response following minimally invasive esophagectomy. *World J Surg* 42: 3651–3657. 2018

Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, Umesono K, Akanuma Y, Fujiwara T, Horikoshi H, Yazaki Y, Kadowaki T. Troglitazone Increases the Number of Small Adipocytes without the Change of White Adipose Tissue Mass in Obese Zucker Rats. *J Clin Invest* 101: 1354–1361. 1998

Ormazabal P, Scazzocchio B, Vari R, et al. Effect of protocatechuic acid on insulin responsiveness and inflammation in visceral adipose tissue from obese individuals:

possible role for PTP1B. *Int J Obes* 42:2012–2021. 2018

Otsuji K, Suzuki M, Furukawa N, Kobayashi N, Koizumi A, Kusumi A, Kobayashi T. Efficacy of the body condition score (BCS) model in the BCS diagnosis. In: *WSAVA Proceedings*; 2014:481. *J Vet Intern Med* 30, 348–439. 2016

Park JS, Kim HW, Mathison BD, Hayek MG, Massimino S, Reinhart GA, Chew BP. Astaxanthin uptake in domestic dogs and cats. *Nutrition & Metabolism* 7:52. 2010

Payan-Carreira R, Martins L, Miranda S, Oliverio P, Silva SR. In vivo assessment of dog subcutaneous fat depots by real time ultrasonography and image analysis. *Acta Vet Scand* 58:13-18. 2015

Radin MJ, Sharkey LC, Holycross BJ. Adipokines: a review of biological and analytical principles and an update in dogs, cats, and horses. *Vet Clin Pathol* 38:136–156. 2009

Ricci R, Bevilacqua F. The potential role of leptin and adiponectin in obesity: a comparative review. *Vet J.* 191(3):292–298. 2012

Sako T, Mori A, Lee P, Goto H, Fukuta H, Oda H, Saeki K, Miki Y, Makino Y, Ishioka K, Mizutani H, Kojima Y, Koikeda S, Arai T. Supplementing transglucosidase with a high-fiber diet for prevention of postprandial hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic dogs. *Vet Rec Commun* 34: 161-72. 2010

Salt C, Morris, PJ, Wilson, D, Lund EM. Association between life span and body condition in neutered client-owned dogs. *J Vet Intern Med* 33:89-99, 2019

Shimidzu N, Goto M, Miki W. Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms. *Fish Sci* 62:134–137. 1996

清水俊雄：食品機能表示と科学： 59–121、同文書院 東京 2015

品田恵子、藍物南美、鶴田幸代、チェン グュエン・ヴァン. 糖尿病改善におけるアスタキサンチンの効果 日本農芸化学会誌 70: 29. 1996

須田沖夫. 家庭動物（犬 猫）の高齢化対策. 日獣会誌 64:22-25. 2011

Tanaka T. et al. Central melanocortin signaling restores skeletal muscle AMP activated protein kinase phosphorylation in mice fed a high-fat diet. *Cell Metab* 5:395-402. 2007

寺尾純二. メタボリックシンドロームと機能性食品. *Functional Food Vol.1* 23-27  
フジメディカル出版 2007

Takahashi, A., Ohtani, N., Yamakoshi, K., Iida, S., Tahara, H., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Ide, T., Saya, H. & Hara, E. Mitogenic signaling and the p16INK4a/Rb pathway co-operate to enforce irreversible cellular senescence. *Nature Cell Biol* 8, 1291-1297. 2006

Takahashi, A., Imai Y, Yamakoshi K, Kuninaka S, Ohtani N, Yoshimoto S, Hori S, Tachibana M, Anderton E, Takeuchi T, Shinkai Y, Peters G, Saya H, Hara E. DNA damage signaling triggers degradation of histone methyltransferases through APC/C(Cdh1) in senescent cells. *Mol Cell* 45:123-31. 2012

Tvarijonaviciute A, Ceron JJ, Holden SL, et al. Obesity-related metabolic dysfunction in dogs: a comparison with human metabolic syndrome. *BMC Vet Res* 8:147. 2012

Tvarijonaviciute A, Ceron JJ, Holden SL, Biourge V, Morris PJ, German AJ. Effect of

weight loss in obese dogs on indicators of renal function or disease. *J Vet Intern Med* 27:31–38. 2013

Uchiyama K, Naito Y, Hasegawa G, Nakamura N, Takahashi J, Yoshikawa T. Astaxanthin protects beta-cells against glucose toxicity in diabetic db/db mice *Redox Rep* 7:90-293. 2002

Usui S, Yasuda H, Koketsu Y. Characteristics of obese or overweight dogs visiting private Japanese veterinary clinics. *Asian Pac J Trop Biomed* 6: 338-343. 2016

Weeth LP, Fascetti AJ, Kass PH, Suter SE, Santos AM, Delaney SJ. Prevalence of obese dogs in a population of dogs with cancer. *Am J Vet Res* 68 :389-98. 2007

Verkest KR, Fleeman LM, Morton JM, Ishioka K, Rand JS. Compensation for obesity-induced insulin resistance in dogs: assessment of the effects of leptin, adiponectin, and glucagon-like peptide-1 using path analysis. *Domest Anim Endocrinol* 41:24-34. 2011

Wakshlag JJ, Struble AM, Levine CB, Bushey JJ, Laflamme DP, Long GM. The effects of weight loss on adipokines and markers of inflammation in dogs. *Br J Nutr* 106 S11–S14. 2011

Weeth LP, Fascetti, AJ, Kass PH, Suter SE, Santos AM, Delaney SJ. Prevalence of obese dogs in a population of dogs with cancer. *American Journal of Veterinary Research* 68: 389-398. 2007

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112: 1796-1808. 2003

Wilkinson M J A, McEwan N A: Use of Ultrasound in the Measurement of Subcutaneous Fat and Prediction of Total Body Fat in Dogs. *JN* 121, suppl11, S47–S50. 1991

Witztum JI., Steinberg D. Role of Oxidized Low Density Lipoprotein in Atherogenesis. *J Clin Invest* 88: 1785-1792. 1991

Wolf AM, Asoh S, Hiranuma H, Ohsawa I, Iio K, Satou A, Ishikura M, Ohta S. Astaxanthin protects mitochondrial redox state and functional integrity against oxidative stress. *J Nutr Biochem* 21: 381-389. 2010

Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu L Y, lam K S.L, Cooper G J.S. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest* 112: 91-100. 2003

Yamka RM, Friesen KG, Frantz NZ. Identification of canine markers related to obesity and the effects of weight loss on the markers of interest. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine* 4:282–292. 2006

山田和彦, 田中弘之, 石見桂子, 梅垣敬三, 井出留美 : 保健機能食品の課題と展望, 日本栄養・食糧学会雑誌 70: 91-99. 2017

Yoshimoto S, Loo TM, Atarashi K, Kanda H, Sato S, Oyadomari S, Iwakura Y, Oshima K, Morita H, Hattori M, Honda K, Ishikawa Y, Hara E, Ohtani N. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature* 499(7456):97-101. 2013

## Summary

### 1. Epidemiology of glycolipid metabolism

Obesity is one of the crucial risk factors impair the health of dogs, same as it is noted in human obesity. The rates of the obesity are increasing. Body condition score (BCS) is widely used for obesity assessment in dogs and cats. However, the diagnostic approach of obesity among simple overweight, pathological obesity from fat amount abnormality or fat qualitative abnormality is not established. Excessive amount of fat accumulated in the body become trigger to cause inflammation to the organs. Adipocytes is not only the energy storage but also have functions produce and secrete various kind of adipocytokines that are important for regulate the body functions. The cause of obesity leading to diseases is a change in the function of enlarged adipocytes. Excessively secreted inflammatory cytokines and FFA produced from enlarged adipocytes, proinflammatory M1 macrophages infiltrating between adipose tissues, activation of NADPH oxidase and decreased expression of antioxidant enzymes provoke oxidative stress. These conditions lead to insulin resistance, impaired glucose tolerance, hypertension, dyslipidemia and accelerate the flow of the metabolic syndrome process. From the above, prevention of obesity is crucial to achieve healthy longevity in companion animals.

### 2. Effects of astaxanthin (ASX) administration on lipid metabolism in dogs

ASX is the potent anti-oxidant that shows inhibition of lipid peroxidation and singlet oxygen scavenging activity. It has been used as a functional food ingredient that act maintaining and preserving good health condition in human. It is also widely used in the fishery industry such as fish farming. Oxidative stress causes chronic inflammation and has been shown to be a risk factor for lifestyle-related diseases. ASX was administered experimentally to healthy dogs that have ideal weight and the effects to biochemical profiles and hormones relating to lipid metabolism were examined. The values of TG, MDA and LDH were significantly decreased in the group received ASX

6 weeks compared with the value before the administration. The result suggests that supplementation of ASX (0.3 mg / kg BW / day) in healthy dogs improves liver function and suppresses lipid peroxidation. In addition, ASX was considered a safe food ingredient because it did not alter other biochemical values. Since the lipid peroxidation inhibitory effect of ASX was beneficial in healthy dogs, it is suggesting that ASX is a functional food ingredient that can be used for maintaining the health condition and prevent the diseases encounter in the aging process.

### 3. Effects of astaxanthin (ASX) administration on obese dogs

The hidden chronic hepatocellular damage and lipid peroxidation by oxidative stress in obese conditions promote potential hepatocytes damage. As ASX has 250 times to 500 times powerful antioxidative activity of Vitamin E, ASX was administered in 5 clinically obese dogs. ALT values were decreased after 8 weeks administration of ASX in all 5 cases. It is considered that ASX inhibit excessive lipid peroxidation and suppressed further hepatocyte damage. Protections of hepatocellular damage by ASX improve liver function and thereby TG, LDH and MDA also ameliorate simultaneously. Household dogs are affected by owner's lifestyle, the balance between calorie intake and calorie consumption is easily lost even with ideal food content. The result of this experiment of ASX administration in obese dogs showed ASX could prevent potentially advanced adipocyte dysfunction and promotes improvement of glycolipid metabolism. ASX was expected as highly useful functional food that prevents glycolipid metabolism impairments associated with obesity and overweight.

### 4. Administration of astaxanthin to the dogs with diabetes and Cushing's syndrome

ASX was administered to the cases of diabetes mellites and Cushing's syndrome that has been properly managed. Administration of ASX did not significantly affect the values of TC and TG in diabetic dog with normal BCS. Positive effects were seen in the values of liver enzymes, NEFA and MDA. In the case of diabetic patient receiving insulin, 60 days after discontinuation of ASX showed deterioration of NEFA and MDA

values and fail to control diabetes. The contentious administration of ASX was also considered to prevent suppressing insulin resistance.

ASX administration to the overweight dog affected Cushing's syndrome, the patient showed dramatic improvement in TG and NEFA levels. During the 6-month dosing period, the dog gradually gained vitality, improved skin texture and hair density, after all the dog got better appearance. These results suggest that ASX administration not only contribute to the management of diabetes and Cushing's syndrome, furthermore ASX supplementation is effectively prevent complications and improve QOL through suppressing lipid peroxidation.

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、先制的予防獣医療の重要性について、数多くの研究ならびに多方面にわたる活動を通して説き示してくださいました日本獣医生命科学大学獣医学部獣医生化学研究室、新井敏郎教授に心より感謝いたします。

多くの機能性食品成分の中で、動物が自身で合成できない天然のアスタキサンチンが強力な抗酸化活性を発揮し、ヒトの健康維持に効果を上げていたことがアスタキサンチンの影響を研究する発端となりました。本研究に先立ち、抗酸化物質の影響を観察する研究の一環として参加させていただいたケルセチンの研究や抗酸化能の判定など、各実験段階において助言をいただいた日本獣医生命科学大学獣医学部獣医生化学研究室、川角浩准教授、紀文食品株式会社、駿河康平さんならびに門倉一成さん、アスタリール株式会社、富永久美さん（前職）に感謝いたします。

獣医師は科学者であり、臨床と研究は表裏一体であるのご指導くださった東京大学名誉教授、長谷川篤彦先生に心からの感謝の意を表します。臨床の現場には多くの研究すべき問題が潜んでおり、それらの問題を真摯に研究し臨床応用することで社会に貢献するという姿勢で仕事に励み、常に研究する心を失わない事が大切であると示してくださいました。その心構えを礎として、今後も励んでいきたいと思えます。

これまで、研究室の先生方をはじめ、家族、職場のスタッフ、飼い主様、友人など数多くの方々のご協力とご指導をいただき研究論文作成ができました。心から皆様に感謝いたします。ありがとうございました。