

論文名：

血液生化学自動分析装置を用いた酵素活性多項目同時測定法の開発と応用（要約）

新潟大学大学院自然科学研究科

氏名 細川 陽子

---

### 【緒論】

生態系における代謝機能の研究は酵素活性の測定を中心に発展してきた。しかし測定時の温度管理や時間制御等の操作が煩雑で、測定者の技術や経験も結果に影響するため、酵素活性の測定は一般に非常に困難であり、遺伝子発現解析のような一斉分析、網羅的解析手法の開発もあまり進んでいないのが現状である。そこで本研究では、臨床検査で多用されている生化学自動分析装置を酵素活性の測定に適用し、栄養・代謝機能研究のツールのひとつとして活用させることを目的とした。

### 【血液生化学多項目自動分析装置を用いた酵素活性測定方法の開発】

本研究で用いた **Biolis 24i Premium**（東京貿易メディシス㈱）（以下、自動分析装置と略記）は、最大 36 種類の酵素について 1 回につき 40 検体が測定可能であり、吸光光度計を用いた従来法に比べて、処理可能検体数が飛躍的に向上している。また測定に必要な試薬やサンプルも 1/10 程度の量で済むため、ランニングコストの面でも非常に優れている。今回の研究では、生体内の糖・脂質代謝に関係する 8 種類の酵素をピックアップした（グルコキナーゼ（EC2.7.1.2, GK）、ピルビン酸キナーゼ（EC2.7.1.40, PK）、グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ（EC1.1.1.49, G6PD）、クエン酸シンターゼ（EC2.3.3.1, CS）、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ（EC1.1.1.41, IDH）、アセチル-CoAカルボキシラーゼ（EC6.4.1.2, ACC）、脂肪酸シンターゼ（FAS）、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ（EC2.3.1.21, CPT2））。自動分析装置と吸光光度計とでラット肝臓中の酵素活性を測定した結果、8 種類の酵素全てにおいて相関（ $R^2=0.77\sim 0.99$ ）を示すことが確認され、自動分析装置を用いた多試料・多酵素の同時測定が可能となった。

### 【ラット肝臓中酵素活性の摂食/絶食時間の影響】

ラットに制限給餌を行い、摂食後の絶食時間がどのように酵素活性に影響しているかを調べた。5 日間制限給餌した Wistar 系雄ラット(5 週齢)20 匹に 2 時間の摂食（AIN93G 粉末状試料）を行い、直後にサンプリング(Feed)、8 時間絶食(Fasting-8)、24 時間絶食(Fasting-24)、24 時間絶食後 2 時間再摂食(Re-Feed)の 4 群に分け(n=5)、自動分析装置で肝臓中の酵素活性測定を行い、消化時間との関係を調べた。測定結果より、解糖系酵素 PK, GK およびペントース-リン酸経路の酵素 G6PD は、絶食時間が長くなるに従い活性が低下する傾向にあり、糖代謝の時間依存性が見られたが、TCA 回路の酵素 CS は絶食時間に関わらず恒常的に作用している傾向が推測された。また、絶食後の再摂食の結果、TCA 回路の酵素 IDH 活性は促進され、脂肪酸合成の酵素 ACC 活性は抑制される傾向が見られたことから、再摂食後の脂肪酸合成の働きは抑制される傾向にあることも推測された。

## 【長期高脂肪食投与ラットの糖・脂質代謝に及ぼす湿熱処理高アミロース米の影響】

高アミロース米は難消化性デンプン(Resistant Starch ; RS)含量が高く消化速度が遅いため、食後血糖値上昇が緩やかであり、糖・脂質代謝への影響が考えられている。一方、湿熱処理(Heat Moisture Treatment ; HMT)は、デンプンの糊化に不十分な低水分条件下、相対湿度 100%、100~125℃で加熱する処理を指し、デンプンの結晶構造の変化や食物繊維・RS 含量の増加、デンプン消化速度の低下等が報告されている。これらの性質から、高アミロース米や湿熱処理米は生活習慣病やメタボリックシンドロームの予防や抑制に効果があると期待されている。本研究では、アミロース含量と湿熱処理の有無の違いがある米粉末を含む高脂肪食をラットに長期間投与し、肝臓中の酵素活性を測定することで、米試料が生体内の糖・脂質代謝へ与える影響を調べた。

試験用米粉末は、コシヒカリ(KH)と越のかおり(KK ; 高アミロース米)とで、未処理玄米と湿熱処理玄米を用意し、精米後に炊飯、乾燥し粉碎した 4 種の試料(KH, HMT-KH, KK, HMT-KK)を用いた。AIN76 を基準とした高脂肪飼料に上記米粉を各々 48.5%含まれるように調整し、ラット用飼料とした。動物実験は、Wistar 系雄ラット 4 群(n=6)に上記飼料と水を自由摂取で与えて 35 日間飼育し、36 日目に解剖とサンプリングを行った。体重、飼料摂取量、肝臓・脂肪組織等の重量測定と血液成分(血糖値、コレステロール、トリグリセリド)の測定、および肝臓の酵素活性測定を行った。

米粉の成分分析より、RS 含量と食物繊維量は高アミロース米の方が多く、湿熱処理で増加する傾向があり、デンプン消化速度の結果と対応していた。飼料の違いによるラットの成長への影響は見られなかったが、高アミロース米摂取による糞重量の有意な増加が確認された。血液成分の分析値から、空腹時血糖値(28 日目)と血中トリグリセリドは、湿熱処理米の摂取によって値が有意に低下した。肝臓中酵素活性の測定結果より、G6PD と IDH は高アミロース含量によって活性が上昇した。また、湿熱処理によって ACC 活性は抑制され、GK・PK・CPT2 は活性化された。これらの結果より、解糖系の代謝は促進され、脂肪酸合成系の代謝は抑制される傾向にあると推測された。

以上の結果より、高アミロース米や湿熱処理米の摂取によってデンプン消化速度が低下し、血糖値上昇が穏やかになった結果、血中インスリン濃度が低下したと推測した。その結果、脂肪酸合成が抑制されたため、血中トリグリセリド濃度の低下が生じたと考察した。

## 【総括】

血液生化学多項目自動分析装置を用いた、酵素活性測定方法の開発を行った。糖・脂質代謝に関係する 8 種類の酵素についての自動測定が可能となり、多種類・多数の試料の一斉分析が可能になった。動物実験で得られた肝臓を用いて測定を行い、活性値から生体内の代謝の様子の推測が可能となった。今後、栄養・代謝機能研究における有用なツールのひとつとして、更なる活用が期待される。