¹H-NMR メタボローム解析を用いた絶食下コイ *Cyprinus carpio* L. の血漿中代謝物変動評価

國師恵美子,^{1*} 宇野 誠一,² 小山 次朗²

(2010年4月8日受付, 2010年10月4日受理)

¹鹿児島大学大学院連合農学研究科, ²鹿児島大学水産学部

Assessing the effects of starvation on freshwater carp *Cyprinus carpio* L.
by ¹H-NMR metabolomics approach

EMIKO KOKUSHI,¹ SEIICHI UNO² AND JIRO KOYAMA²

¹The United Graduate School of Agricultural Science, Kagoshima University, 50-20 Shimoarata 4-Chome, Kagoshima 890-0056, Japan, ²Education and Research Center for Marine Resources and Environment, Faculty of Fisheries, Kagoshima University, 50-20 Shimoarata 4-Chome, Kagoshima 890-0056, Japan

In the present study, the metabolite variations of the carp *Cyprinus carpio* L. starved for 7 days and 14 days were examined with ¹H-NMR metabolomics. Statistical analysis with principal component analysis (PCA) of the NMR spectrum-derived data showed that the starved group at 14 days was distinguished from the control group on a PCA score plot, although the group at 7 days was not significantly distinguished from the control. Several metabolites such as isoleucine, leucine, valine, lactate, alanine, arginine, glutamine, taurine, glucose, glycerol, tyrosine, histidine, phenylalanine, and formate in the plasma of the starved group at 14 days were significantly reduced. The reduction of glucose in carp at 14 days suggested that gluconeogenesis had not yet been induced. Meanwhile, the ketone bodies 3-D-hydroxybutyrate and acetoacetate were significantly elevated in carp plasma, suggesting that starvation induced fatty acid degradation in carp.

キーワード：メタボローム解析, ¹H-NMR, 絶食, コイ, 血漿, 代謝物

緒 言

養殖を行う上で蓄養魚の栄養状態や捕食状況, 最適な餌が投与されているか否か, などを把握することは魚の健康状態をより細かくチェックする上で絶対条件となる。そのため, 養殖魚としての品質を維持するため, 魚体の現在の健康状態を把握し, それを評価するための様々な手法が用いられている。^{1,2)}

魚病に罹患した場合や, 移動, 網代えなどの飼育環境の変化が起こったときには, 魚にかなりのストレスがかかる。このようなストレスが重なった場合, 魚が絶食状態に陥ることがたびたび観察される。このような絶食状態はストレスが起こった後の二次的影響だと言えるが, どこまでがストレスの影響であり, どこまでが絶食の影響かを見極めることは, 魚の健康状態を詳細に把握する際に重要となる。また絶食の魚類に対する影響について

は, これまで多くの研究がなされてきた。³⁻¹⁰⁾ 魚が絶食状態に陥ると体内の血糖を維持するために, 肝臓でグリコーゲンを分解してグルコースを生成あるいは, 筋肉から放出されるアミノ酸を利用しグルコースを生成して血液中に供給する, いわゆる糖新生でグルコースを生成する経路が活発化する。また細胞内のエネルギー源を糖質から脂質へと変換させるため, pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) によりビルビン酸からアセチル CoA への合成を阻害して, 糖質利用を抑制する。^{11,12)} さらに“通常の”エネルギー源としてグルコースのみ利用可能である脳細胞は, 絶食によるグルコース供給不足の状態下では, 脂肪酸を分解することにより生成されるアセト酢酸や 3-ヒドロキシ酪酸などのケトン体を, グルコースの代替エネルギー源として利用し始める。このように絶食状態下では魚体内で様々な代謝経路の変動が連動して起こる。したがって, 絶食による魚体内の影響を調べ

* Tel and Fax : 81-99-286-4296. Email : k6517195@kadai.jp

するためには、1つの代謝物変動を調べるのではなく、それぞれの代謝経路の代謝物変動を網羅的にとらえ、個々の代謝物変動から代謝経路全体の変化を詳細に調べる必要がある。

近年、医薬分野では薬効確認や病気診断のための手法としてメタボローム解析と呼ばれる手法が注目され、ラットなどの哺乳類を対象とした研究例が急増している。生物体内で何らかの異常が起ると、体内では恒常性維持のため、積極的にアミノ酸や有機酸などの代謝物質が一定範囲内の量で投入される。しかし恒常性維持が不可能となると、その投入量が著しく増加、あるいは減少し始める。メタボローム解析はこのような代謝物質の増減を詳細に調べて、生体内の臓器あるいは機能の状態を明らかにする手法である。^{13,14)} メタボロミクスは遺伝子を対象としたゲノミクスやタンパク質を対象としたプロテオミクスと比較すると、生体内の現況を明らかにし、「生体内で、今、何が起きているか?」ということを確認できる手法である。メタボローム解析は必ず何らかの分析機器を必要とするが、その中でも¹H-NMRを用いた研究例は多い。これは、前処理に誘導体化などの複雑な操作を必要とせず簡便であり、再現性の良いデータを短時間で、しかも数多くの代謝物の情報を得ることができる、等の利点があるためである。

上述の通り、哺乳類に対する研究例は比較的多いメタボロミクスだが、魚類への適用例はまだ少なく、研究は緒についたばかりである。例えば、魚が絶食などに陥った場合、哺乳類と同様に複数の代謝物の増減が起こると考えられる。この変動をメタボローム解析でとらえることができれば、その異常が起こるごく初期段階から魚体中代謝物変動を正確に判断できる可能性が高い。また、血中の代謝物質（グルコースやアミノ酸）の増減から生体内のエネルギー代謝に関する状態も把握できる可能性がある。¹⁵⁾ 実際に、Weiら¹⁶⁾はラットに辰砂を暴露し、尿と血漿のメタボローム解析を行った結果、アミノ酸類の増減からエネルギー代謝に影響があったことを報告している。

本研究では日本の河川に広く生息し、食用として盛んに養殖も行われているコイ *Cyprinus carpio* L. を2週間絶食させ、その間に生じる血漿中代謝物質変動を核磁気共鳴装置 (Nuclear Magnetic Resonance: ¹H-NMR) により測定し、絶食によって引き起こされるコイの生理学的変化をメタボローム解析によって調べることを目的とした。

試料および方法

飼育条件 コイは鹿児島県大口市の養魚場から入手した。150 Lの脱塩素した水道水を入れた200 L円形ポリカーボネイトタンクに、コイを20尾収容して1週間馴

致した。馴致期間中、配合飼料（観賞魚用ペレット6号、日本配合飼料）を、体重の1%相当量毎日給餌した。馴致後、同一水槽内で飼育していた供試魚から無作為に5尾採取し、対照群及び絶食群の0日目とした。残った供試魚を絶食群及び継続的に体重の1%相当量の給餌を行う対照群として分け、別々の200 Lタンクに収容して試験を行った。対照群からは試験開始後14日目に5尾採取し、採血を行った。絶食群は馴致後、直ちに給餌を中止して、その後14日間にわたり絶食させ、絶食開始7日目及び14日目に採取した5尾からそれぞれ採血を行った。採血後は血漿を得て、NMR測定まで-80℃下で保存した。馴致期間、絶食期間共にエアレーションは十分に行い、12時間明暗周期を保った。飼育水は毎日、脱塩素水道水で換水し、水温は23.6±0.6℃、pHは7.1±0.3、溶存酸素濃度は5.0-6.0 mg/Lであった。絶食試験開始直前のコイの体重は68.5±7.9 gであった。なお、本研究は鹿児島大学の動物実験指針規定に基づいて行った。

¹H-NMR メタボローム解析 保存した血漿は氷上でゆるやかに解凍した後、上澄み250 µLを採取した。また解凍時にフィブリンが析出した試料に関しては析出したフィブリンをガラス棒などで十分に粉碎した後、10分間遠心分離（4℃, 10000 g）を行い、上澄み250 µLを採取した。これに重水（D₂O, 99.9%）250 µLと3-トリメチルシリルプロピオン酸ナトリウム-2,2,3,3-d₄（TSP、和光純薬工業株式会社）0.1%重水溶液を100 µLを加えた。TSPはNMR測定時の内部標準物質として用いた。また、メタボローム解析においてサンプル中のpH調整として緩衝液などを用いることがあるが、本研究の血漿サンプルではpHのずれはほとんど生じなかったため、緩衝液での調整は行わなかった。上記の操作後、さらに10000 gで20分間（4℃）遠心分離を行い、上澄み600 µLをNMR管（WG 5 ECONOMY、内径5 mm、日本電子株式会社製）へ収容した。その後、直ちに600 MHz NMR（JNM-ECA600、日本電子）により血漿中代謝物質の測定を行った。^{17,18)}

NMR測定前に試料ごとにグラジエントシムを行った後、¹H-NMRにてシングルパルス測定を行った。得られたスペクトルに対してCarr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) 法にWater Suppression Enhanced Through T1 Effect (WET) 法を組み合わせた方法¹⁹⁾で、水や生体内高分子物質など夾雑ピークを測定対象外として、再度NMR測定を行ってスペクトラムを得た。シングルパルス測定で得たデータは脂質の比較に用いた。またCPMG-WET法は、脂質以外の代謝物質を対象として面積値の比較に用いた。血漿中から検出された代謝物質は、個々の標品から得られたスペクトルと照らし合わせて同定した。さらにHuman Metabolome Databaseの

Fig. 1 Method of integration (bucket area).

ホームページ上で公開されている各代謝物の NMR スペクトルも代謝物同定の参考にした (HMDB : <http://www.hmdb.ca/>)。

^1H -NMR データの数値化及び主成分分析 NMR 測定後, ALICE2 (Ver. 4, 日本電子) を用いて常法に従い,¹⁸⁾ スペクトルの 0 ppm から 10 ppm を 0.04 ppm 毎に区切り (バケット), それぞれの区分を積分した (バケット積分) (Fig. 1)。水のスペクトルの干渉により, 4.2 から 6.0 ppm のバケットより代謝物のスペクトルが見出せないため, その部分のバケット積分値は算出せず, その後の解析に加味しなかった。各積分値を SIM-CA P+ (Ver. 11.5, Umetrics 社) にて標準化した後, 主成分分析 (PCA) を行い,^{14,18,19)} どの時点で対照群とは異なった代謝物変動が絶食群に起こったかを調べた。また, PCA を行った際, ローディングプロットによりどの代謝物質が含まれたバケット積分値が PCA 分離に寄与していたかを調べた。

血漿中の生体内代謝物質及び脂質の増減 個々のピーク面積値 = 血漿中代謝物濃度とし (Fig. 2), PCA のスコアプロット上で統計的に有意に異なったグループを形成した絶食群に関して, どのような代謝物質が増減したかを調べた。また通常, 多くの魚類は絶食状態に陥ると体内の脂質が減少することが知られている。そこで, 本研究では NMR にて測定したシングルパルスのスペクトラムを用いて化学シフトの 1.45 から 1.59 ppm にある脂質ピークの面積値を取り, 対照群と絶食群で比較した。

Fig. 2 Method of integration (individual area).

統計解析 PCA 以外の統計解析は SPSS 14.0J (SPSS 社) を用いて行った。PCA スコアプロット上での対照群と絶食群間のプロット分離の統計的有意性は, Wilks' lambda²²⁾ ($p < 0.05$) による判別分析を行った。また, 絶食群と対照群の個々の代謝物量 (上記ピーク面積値) 比較及び脂質の増減比較には, NMR スペクトラム上の各々の代謝物スペクトルから面積値を求め, ANOVA 及び t 検定 ($n = 5$, 両側検定, $p < 0.05$) による解析を行った。

結 果

絶食による体重変化は, 絶食開始直前は 68.5 ± 7.9 g であったのに対して, 絶食 7 日目と 14 日目ではそれぞれ 65.4 ± 7.8 g, 64.21 ± 7.3 g であり, 絶食により減少した。 ^1H -NMR によりコイの血漿中代謝物から, Fig. 3 に示す NMR スペクトラムが得られた。このスペクトラム上で同定されたコイ血漿中代謝物は 18 種類であった (Table 1)。この他に, ^1H -NMR 上のスペクトルのみでは同定できないが, 大きなシグナルを示す代謝物が 3 種類あった。この同定不可能な 3 物質のうち, 2 物質は化学シフト値から芳香族炭化水素を持つ代謝物であると予想された。本研究では上記 18 物質と, 未知物質 3 物質の計 20 物質, さらに 1.45 から 1.59 ppm にある脂質を対象として比較した。

主成分分析 対照群の 0, 14 日目及び絶食群 7, 14 日目 ^1H -NMR スペクトルから算出したバケット積分値を用いて主成分分析を行い, その結果を PCA スコアプロット上に示した。スコアプロットは第一主成分 (PC1) と第二主成分 (PC2) を対象として作成した (Fig. 4a-c)。

試験期間を通して対照群のコイに代謝物変動のなかったことを確認するため, 0 および 14 日目のバケット積分値から PCA スコアプロットを作成し, その差異を調べた (Fig. 4a)。この結果から, 飼育期間中の対照群代謝物質はほとんど変動しなかったと考え, 絶食群 7 日

Fig. 3 600 MHz ^1H -NMR spectrum (1.0–10.0 ppm) of carp plasma in the control group. The numbers on the spectrum denote the following: 1. isoleucine, 2. leucine, 3. valine, 4. 3-D-hydroxybutyrate, 5. lactate, 6. alanine, 7. arginine, 8. proline, 9. methionine, 10. acetoacetate, 11. glutamine, 12. unknown, 13. taurine, 14. glucose and glycerol, 15. tyrosine, 16. histidine, 17. phenylalanine, 18. unknown, 19. formate, 20. unknown. IS indicates internal standard (TSP).

目との比較は0日目の対照群のデータとの間で行った。試験開始直前0日目の対照群個体と7日目の絶食群個体のプロットは、スコアプロット上で視覚的には分離しているように見えるものの、この両群間に統計的に有意な差異は認められなかった (Fig. 4b)。一方、14日目の絶食群個体と同日の対照群個体のプロットは、PCA スコアプロット上で有意に異なったグループを形成した (Fig. 4c)。14日目の絶食群個体は対照群個体に比較すると第2主成分の方向に明確に分離した。両者の分離にどのような代謝物質が寄与しているかは、ローディングプロット (主成分の係数) により推測することができる。第2主成分のローディングプロットによると、3-ヒドロキシ酪酸 ($\delta = 1.2$ ppm), 乳酸 (1.32 ppm), タウリン (3.25 ppm) が PCA スコアプロットの分離に大きく寄与し、この他分岐アミノ酸類 (イソロイシン (0.96 ppm), ロイシン (1.00 ppm), バリン (1.04 ppm)) やそのほとんどがグルコースであるバケット群 (3.24–4.2 ppm) も PCA の分離に寄与していた (Fig. 4d)。

血漿中の生体内代謝物質の増減 NMR シングルパルスにて取得した脂質のピーク面積値を対照群と絶食群で比較したところ、絶食群の7日目及び14日目では対照群に比較して有意な減少が示された。

絶食群7日目と対照群は PCA スコアプロット上で統計的に有意な差はなかった。しかし、各代謝物の NMR スペクトル上のピーク面積を求め、両群間で比較したと

ころ、絶食群個体の乳酸、アラニン、グルタミン酸の面積値は有意に減少していた。一方、PCA スコアプロット上で有意な差異が見られた14日目の絶食群血漿中からは様々な代謝物質変動が見られた (Table 1)。特に、アミノ酸のロイシン、イソロイシン、バリン、アラニン、グルタミン酸、アルギニン、プロリン、ヒスチジン、チロシン及びフェニルアラニン、アミノ酸以外では乳酸、グリセロール、グルコース及びギ酸塩の濃度が有意に減少した (Fig. 5a–c)。一方、アセト酢酸及び3-ヒドロキシ酪酸の濃度は有意に増加していた。

考 察

対照群の PCA スコアプロットの結果から、14日間にわたる絶食試験期間中における対照群のコイ体内では、代謝物質に大きな変動はなかったと考えられる。また、0日目と絶食7日目においても PCA スコアプロット上で有意な差は認められなかったことから、絶食7日目ではコイ体内代謝物質には大きな変動はないと考えられた。しかし、個々の代謝物ピーク面積値を比較したところ、絶食7日目では脂質の有意な減少が認められたと同時に、乳酸やアラニン、グルタミン酸なども対照群と比較すると有意に減少していた。これらの変動は PCA によって包括的に統計解析を行っても見出せない差異であった。

一方、絶食14日目では PCA スコアプロット上で統計的に有意な差異が認められたため、少なくとも絶食

Table 1 Summary of metabolic variations in starved carp plasma at 14 days

Metabolite	Chemical shift	Key ^a	Metabolic variations
isoleucine	0.93 (t), 1.00 (d)	1	↓
leucine	0.94 (d), 0.95 (d)	2	↓
valine	0.98 (d), 1.04 (d)	3	↓
3-D-hydroxybutyrate	1.20 (d), 2.31 (m), 2.41 (m)	4	↑
lactate	1.33 (d)	5	↓
alanine	1.47 (d)	6	↓
arginine	1.71 (m), 3.23 (t)	7	↓
proline	2.00 (m), 3.33 (dt)	8	—
methionine	2.13 (s)	9	—
acetoacetate	2.26 (s)	10	↑
glutamine	2.13 (m), 2.45 (m), 3.77 (t)	11	↓
UK1	2.67 (m)	12	—
taurine	3.25 (t), 3.41 (t)	13	↓
glucose	3.40–4.00 (m)	14	↓
glycerol	3.56 (m), 3.64 (m)	14	↓
tyrosine	6.88 (m), 7.17 (m)	15	↓
histidine	7.04 (d), 7.80 (d)	16	↓
phenylalanine	7.32 (d), 7.36 (m), 7.42 (m)	17	↓
UK2	8.22 (d)	18	↓
formate	8.45 (s)	19	↓
UK3	9.91 (s)	20	↓

↑: Significantly higher than control ($p < 0.05$)↓: Significantly lower than control ($p < 0.05$)

—: No significant difference between exposure and control

s: singlet, d: doublet, t: triplet, q: quartet, m: multiplet

UK: unknown

Key^a: Numbers correspond to position of metabolites on NMR spectra in Figure 3.

14 日目の時点ではコイ体内で大きな代謝物質変動が起こったと考えられた。この時のローディングプロットの結果から、PCA スコアプロットの分離に寄与していた代謝物質は、3-ヒドロキシ酪酸、乳酸、タウリン、分岐アミノ酸類及びグルコースなどであった。絶食 14 日目では 7 日目同様、対照群に比較して脂質の有意な減少が認められた。絶食により糖質を利用したエネルギー生産が抑制されたために、脂質が利用されたのではない

かと考えられた。さらに、絶食 14 日目では NMR で検出可能であったバリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、メチオニン、およびフェニルアラニンなどの必須アミノ酸のうち、メチオニン及びプロリンを除いたその全てが絶食群血漿中からほぼ検出されないか、あるいはそれらの濃度が大きく低下していた (Fig. 5a–b)。非必須アミノ酸と比較して、必須アミノ酸は絶食の影響を強く受けることが知られており、⁸⁾ それが NMR スペクトラム上でも顕著に現れていた。また幾つかの代謝経路を経て必須アミノ酸から形成される代謝物 (例えばフェニルアラニン→チロシンなど) も、絶食 14 日目にはそれらの濃度が大きく低下しているのが観察された (Fig. 5c)。この結果から多くの代謝経路が、14 日間の絶食によって比較的大きく影響を受けたと考えられた。

14 日目の絶食群個体の血漿中で有意に減少 (イソロイシン、ロイシン、バリン、乳酸、アラニン、アルギニン、グルタミン酸、グルコース、グリセロール、チロシン、ヒスチジン及びフェニルアラニン)、あるいは増加していた代謝物 (3-ヒドロキシ酪酸及びアセト酢酸) は、主としてエネルギー代謝を担う TCA 回路に関連する物質であった (Fig. 6)。その中でも、グルコースの減少は注目される。グルコースは魚が生命活動を維持するために最も利用効率の良い糖質であり、通常、糖質の供給が十分なときは解糖系が活発に働いてエネルギー生成が行われる。^{23,24)} 一方、本研究におけるコイは絶食前に与えられていた餌から吸収したグルコースをエネルギー生成に利用していたが、その後、餌からの供給がないために、結果として 14 日目にそれらの体内グルコース量が大きく減少したと考えられた。このような絶食によるグルコース減少はチョウザメの一種 *Acipenser fulvescens* でも観察されている。⁹⁾ コイがさらに長期間絶食状態におかれると、糖新生によって血中グルコース濃度を上昇させ、血糖値を一定に保つことが報告²⁵⁾ されている。しかし、本研究の絶食個体群では、糖新生時に同時に観察されるアラニンあるいは乳酸濃度の増加²⁶⁾ が認められなかったことから、糖新生は絶食 14 日目の段階では起こっていなかったと考えられた。

本研究では、多くの代謝物濃度の減少が見られたが、絶食群個体血漿中では 3-ヒドロキシ酪酸とアセト酢酸の 2 つのケトン体濃度は有意に増加していた。絶食状態初期では前述の通りグルコースの供給量が大幅に減少するためにその消費量を抑える必要がある。そこで脂肪酸がグルコースにかわるエネルギー源として利用された結果、ケトン体が大量に生成されたものと考えられた。本研究におけるコイ血漿中の両ケトン体の増加は、脂肪酸分解が亢進され、生成された両ケトン体が血液中に排出された結果と考えられた。

さらに上記以外にも、チロシン、アルギニン、グルタ

Fig. 4 PCA score plots of PC1 vs. PC2 from ^1H -NMR spectrum profiles in carp plasma. (a) control ($\circ$: 0-day) vs control ($\square$: 14-day), (b) control ($\circ$: 0-day) vs starvation group ($\blacksquare$: 7-day), and (c) control ($\square$: 14-day) vs starvation group ($\blacktriangle$: 14-day). Percentage values beside the X and Y axis are data variances for PC1 and PC2, respectively. (d) Loading plot of PC2 (control vs starvation at 14 days).

ミン, タウリン, グリセロールおよびギ酸の濃度が有意に減少していた (Table 1). チロシンはフェニルアラニンヒドロキシラーゼによりフェニルアラニンから変化したアミノ酸であるが, 絶食の結果, フェニルアラニンの

摂取がなくなったことに伴って, チロシンの濃度も減少したと考えられた。本研究ではタウリンの大きな減少も見られたが, タウリンはシステインから合成される多機能アミノ酸である。グリセロールは通常, エネルギーの

Fig. 5 Comparison of spectrum on ^1H -NMR spectroscopy between the control and starvation group. (a) chemical shift from 0.7 to 1.5 ppm, (b) chemical shift from 3.3 to 4.0 ppm, (c) chemical shift from 6.5 to 8.5 ppm. Dotted lines denote the control, and solidlines denote the starved group at 14-day.

Fig. 6 Changes in the TCA cycle and around related metabolites based on ^1H -NMR spectra of fish plasma. Asterisk indicates significant difference for the control group ($P < 0.05$). The Y axis represents peak area. White and black bars denote peak area for the control and starvation group. Data are shown as mean $\pm$ standard deviation.

貯蔵物質として脂肪細胞に貯蔵されているが、本研究で見られた大きな減少は、絶食によるエネルギー補給のためのグリセロール消費に由来するものと考えられる。またギ酸塩の減少も見られたが、この代謝物がコイ体内においてどのような役割を示しているか不明である。ギ酸塩を含めた上記アミノ酸類及び脂質の減少は、絶食により、餌からのこれら代謝物の供給が途絶えたことによる影響であると考えられる。

これまで絶食下におけるコイの代謝物変動の研究は数多くなされている。^{8,27,28)}しかし、これらの研究の多くは長期にわたる絶食試験によるものであり、また、脂肪酸やグルコースなど一部の代謝物質にのみ注目しているものがほとんどである。本研究では14日間という絶食初期段階のコイ体内中の様々な代謝物変動を、 ^1H -NMRを用いたメタボローム解析によって網羅的にとらえることが可能であった。さらに、 ^1H -NMRで得たメタボロームのデータをPCAによって統計解析する手法は、絶食による影響を判断する上で迅速かつ簡易な手法であることが分かった。本手法は魚の健康状態の変化を視覚的に判断することがある程度可能となる。しかし、

PCAだけでは詳細な影響は見出すことができない。²⁹⁾そのため、PCAで異常が発見された場合、変動した代謝物質の種類やその代謝物質に関わる代謝経路への影響を調べるために、さらなる詳細な解析が必要となることも示唆された。

本研究で行ったような短期間の絶食により、様々な代謝物質変動が起こることは余り知られてはおらず、絶食初期から代謝物質変動を検出できるメタボローム解析の有用性が改めて示された。また今回認められた代謝物質の変動は、今後魚類に対するストレスの影響を調べる場合、絶食による代謝物質変動の寄与を探る上での基礎データとなるものとする。

謝 辞

本研究を行うにあたり、メタボローム解析に関する貴重な情報及び解析方法を御教示頂いた三菱化学メディエンス株式会社の原田智隆氏に深く感謝致します。また、核磁気共鳴装置の提供と測定法に関して有益な意見を頂いた鹿児島大学工学部ナノ構造先端材料工学専攻生体適合材料工学講座橋本雅仁先生に感謝致します。

文 献

- 1) Koedprang W, Nakajima M, Maita M, Taniguchi N. Correlation of hematology and plasma chemistry levels in silver crucian carp *Carassius langsdorfii*. *Fish. Sci.* 2002; **68**: 721–728.
- 2) 角埜 彰, 小山次朗. マダイの血液性状を指標とした汚染物質の影響評価, 環境毒性学会誌 2004; **7**: 81–95.
- 3) Shoji J, Aoyama M, Fujimoto H, Iwamoto A, Tanaka M. Susceptibility to starvation by piscivorous Japanese Spanish mackerel *Scomberomorus niphonius* (Scombridae) larvae at first feeding, *Fish. Sci.* 2002; **68**: 59–64.
- 4) 田中 克, 渡辺良郎. 「魚類の初期減耗研究」恒星社厚生閣, 東京. 1994. 105–118.
- 5) 坂口宏海. 絶食時におけるハマチの血液, 肝臓の化学成分などの変化について. 日本誌 1976; **42**: 1267–1272.
- 6) 坂口宏海, 浜口 章. 養殖マダイの絶食時における血液, 肝臓成分などに与える水温の影響. 日本誌 1981; **47**: 27–33.
- 7) 竹内俊郎, 渡辺 武. コイ及びニジマスの体組成および脂肪酸組成に及ぼす絶食および水温の影響. 日本誌 1982; **48**: 1307–1316.
- 8) Blasco J, Fernández J, Gutiérrez J. The effects of starvation and re-feeding on plasma amino acid levels in carp, *Cyprinus carpio*. *J. Fish. Biol.* 1991; **38**: 587–598.
- 9) Gillis TE, Blantyne JS. The effects of starvation on plasma free amino acid and glucose concentrations in lake sturgeon. *J. Fish. Biol.* 1996; **49**: 1306–1316.
- 10) 三坂尚行, 水野伸也, 宮腰靖之, 竹内勝巳, 鷹見達也, 笠原 昇. 飢餓中のサクラマス当歳魚の肝臓におけるトリグリセリドおよびグリコーゲン含量の変動. 日本誌 2004; **70**: 168–174.
- 11) 荒木 信, 野崎由佳, 本島清人. エネルギー代謝調節鍵酵素 PDK4 の正常時及び病態時における発現調節. 薬学雑誌 2007; **127**: 153–162.
- 12) Sugden MC, Holness MJ. Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2003; **284**: 855–862.
- 13) Nicholson JK, Foxall PJD. 750 MHz ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy of human blood plasma. *Anal. Chem.* 1995; **67**: 793–811.
- 14) Nicholson, JK, Connelly J, Lindon JC, Holmes E. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2002; **1**: 153–161.
- 15) Tiihonen K, Nikinmaa M. Short Communication: Substrate Utilization by Carp (*Cyprinus Carpio*) Erythrocytes. *J. exp. Biol.* 1991; **161**: 509–514.
- 16) Wei L, Liao P, Wu H, Li X, Pei F, Li W, Wu Y. Toxicological effects of cinnabar in rats by NMR-based metabolic profiling of urine and serum. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2008; **227**: 417–429.
- 17) Waters NJ, Holmes E, Williams A, Waterfield CJ, Duncan Farrant R, Nicholson JK. NMR and pattern recognition studies on the time-related metabolic effects of alpha-naphthylisothiocyanate on liver, urine, and plasma in the rat: An integrative metabonomic approach. *Chem. Res. Toxicol.* 2001; **14**: 1401–1412.
- 18) 宇野誠一, 國師恵美子, 小山次朗. 魚類血漿を用いた有害化学物質の ^1H -NMR メタボロミクス影響評価. 環境毒性学会誌 2008; **11**: 63–67.
- 19) Van QN, Chmurny GN, Veenstra TD. The depletion of protein signals in metabonomics analysis with the WET-CPMG pulse sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; **301**: 952–959.
- 20) Holmes E, Nicholson JK, Nicholls AW, Lindon JC, Connor SC, Polley S, Connelly J. The identification of novel biomarkers of renal toxicity using automatic data reduction techniques and PCA of proton NMR spectrum of urine. *Chemometrics Intell. Lab. Syst.* 1998; **44**: 245–255.
- 21) Holmes E, Nicholson JK, Tranter G. Metabonomic characterization of genetic variations in toxicological and metabolic responses using probabilistic neural networks. *Chem. Res. Toxicol.* 2001; **14**: 182–191.
- 22) 石村貞夫. 「すぐわかる多変量解析」東京図書, 東京. 1992; 140–144.
- 23) 伊藤 信, 潮 秀樹, 柿沼 誠. 「水圏生化学の基礎」恒星社厚生閣, 東京. 2008; 113–117.
- 24) Fothergill-Gilmore LA, Michels PA. Evolution of glycolysis. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1993; **59**: 105–235.
- 25) Pilkus SJ, Mahgrabi MR, Claus TA. Hormonal Regulation of Hepatic Gluconeogenesis and Glycolysis. *Ann. Rev. Biochem.* 1988; **57**: 755–783.
- 26) Leech AR, Goldstein L, Cha CJ, Goldstein JM. Alanine biosynthesis during starvation in skeletal muscle of the spiny dogfish, *Squalus acanthias*. *J. Exp. Zool.* 1979; **207**: 73–80.
- 27) Friedrich M, Stepanowska K. Effects of starvation on nutritive value of carp (*Cyprinus carpio* L.) and selected biochemical components of its blood. *Acta Ichthyol. Piscatoria*, 2001; **31**: 29–36.
- 28) Guan B, Hu W, Zhang T, Wang Y, Zhu Z. Metabolism traits of ‘all-fish’ growth hormone transgenic common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquacul.* 2008; **284**: 217–223.
- 29) Weljie AM, Newton J, Mercier P, Carlson E, Slupsky CM. Targeted profiling: quantitative analysis of ^1H NMR metabolomics data. *Anal. Chem.* 2006; **78**: 4430–4442.