

鯨類遊離アミノ酸動態の特異性とその意義に関する研究

麻布大学大学院獣医学研究科

動物応用科学専攻 博士後期課程 介在動物学分野

DA0604 宮地 一樹

鯨類遊離アミノ酸動態の特異性とその意義に関する研究

2009. 03

麻布大学大学院獣医学研究科

動物応用科学専攻 博士後期課程 介在動物学分野

DA0604 宮地 一樹

## 目次

序論	・・・	1
第1章 鯨類の血漿遊離アミノ酸濃度の解析		
1-1 はじめに	・・・	8
1-2 方法		
1-2-1 対象動物	・・・	13
1-2-2 鯨類の採血および血漿アミノ酸解析	・・・	14
1-2-3 マウスの採血および血漿アミノ酸解析	・・・	14
1-2-4 血漿 BCAA 濃度およびフィッシャー比	・・・	15
1-2-5 給餌の有無による血漿アミノ酸濃度の変化	・・・	15
1-2-6 性別および飼育形態の違いによる血漿アミノ酸濃度の違い	・・・	16
1-2-7 統計処理	・・・	16
1-3 結果		
1-3-1 血液一般性状および生化学検査	・・・	18
1-3-2 血漿アミノ酸濃度	・・・	19
1-3-3 血漿 BCAA 濃度およびフィッシャー比	・・・	23
1-3-4 給餌による血漿アミノ酸濃度への影響	・・・	25

1-3-5	性別および飼育形態の違いによる血漿アミノ酸濃度の違い	・・・31
-------	----------------------------	-------

#### 1-4 考察

1-4-1	鯨類における血漿アミノ酸濃度の種差	・・・33
-------	-------------------	-------

1-4-2	水中生活への適応による血漿アミノ酸濃度の変化	・・・34
-------	------------------------	-------

1-4-3	鯨類の血漿 BCAA 濃度	・・・36
-------	---------------	-------

1-4-4	鯨類のフィッシャー比	・・・37
-------	------------	-------

1-4-5	鯨類の必須アミノ酸の推測	・・・38
-------	--------------	-------

1-4-6	性別および飼育形態の違いが血漿アミノ酸濃度へ及ぼす影響	・・・40
-------	-----------------------------	-------

## 第2章 バンドウイルカの尿中遊離アミノ酸濃度の解析

2-1	はじめに	・・・42
-----	------	-------

#### 2-2 方法

2-2-1	バンドウイルカの採尿および解析方法	・・・46
-------	-------------------	-------

2-2-2	マウスの採尿および解析方法	・・・46
-------	---------------	-------

2-2-3	尿中クレアチニン測定	・・・46
-------	------------	-------

2-2-4	統計処理	・・・48
-------	------	-------

2-3	結果	・・・49
-----	----	-------

2-4	考察	・・・51
-----	----	-------

第3章 鯨類の骨格筋、皮膚、および腸管中遊離アミノ酸濃度の解析	
3-1 はじめに	・・・54
3-2 方法	
3-2-1 鯨類の骨格筋、皮膚、および腸管サンプル採取	・・・59
3-2-2 マウスの骨格筋、皮膚、および腸管サンプル採取	・・・59
3-2-3 骨格筋中、皮膚中、および腸管中アミノ酸解析	・・・59
3-2-4 統計処理	・・・60
3-3 結果	
3-3-1 骨格筋中アミノ酸濃度	・・・61
3-3-2 皮膚中アミノ酸濃度	・・・63
3-3-3 腸管中アミノ酸濃度	・・・65
3-4 考察	・・・67
第4章 総合考察	・・・70
要約	・・・75
謝辞	・・・81
参考文献	・・・82

## 序論

約40億年前に生命が海で誕生して以来、生物は多様な進化を遂げてきた。三畳紀後期（約2億2,500万年前）に最初の哺乳類と言われるアデロバシレウスが登場し、多種多様な進化が始まる。その中で最も興味深い進化を遂げた哺乳類のひとつに海棲哺乳類が挙げられる。海棲哺乳類は新生代始新世（約5,000万年前）の頃、陸上から再び海に戻った。分子系統学から、クジラ目（鯨類：*Cetacea*）に最も近縁な陸棲哺乳類は偶蹄目カバ科（*Hippopotamidae*）であることが報告されている（Nikaido *et al.*, 1999）。加えて、近年、これまでミッシングリンクとされてきた、鯨類と偶蹄目の共通の特徴を持つ化石が発見される（Thewissen *et al.*, 2007）など、鯨類の進化についての知見は少なくない。鯨類は環境適応の結果として、生体に様々な変化が生じ、現存する種は約80種と言われている。

鯨類と偶蹄目の共通の特徴を持つ化石の形態と、安定酸素同位元素の構成より、鯨類の先祖が水中で暮らすようになったのは、捕食者を回避するために水中に逃げ込んだとの仮説が立てられた（Thewissen *et al.*, 2007）。水中生活を行っているが、鯨類は哺乳類であるため肺呼吸を行い、母乳により子どもを育てている。さらに、二心房二心室の心臓、7つの頸椎、3つの耳小骨など、陸棲哺乳類と同じ特徴を持っている。その一方、鯨類は水の抵抗が少ない流線形のフォルムを持ち、呼吸を容易に行うため、噴気孔が背側に位置している。また、多くの対向流熱交換システムを発達させることにより体温調節を行う（Rommel *et al.*, 1998）など、水中生活に適応した解剖学的・形態学的特徴を獲得している。

鯨類ではその脳も特徴的である。鯨類の脳は前後に扁平な横長の形をしており、大脳半球表面には複雑な脳溝を持っている。鯨類の脳は大きく、これまでに記録されている最も重い脳は、体長15mのマッコウクジラ（英名：sperm whale, 学名：*Physeter macrocephalus*）のもので、9200gもある（Kojima, 1951）。また、身体の大きさに対する脳の大きさの比率である脳化指数 {脳重量 (g) / (体重 (g))<sup>2/3</sup>} は、ヒト (0.89) に次いでバンドウイルカ（英名：bottlenose dolphin, 学名：*Tursiops truncatus*）(0.64) が大きく、チンパンジー (0.30) と比べて2倍以上である（Russell, 1979）。他にも、神経細胞の密度を測定し、脳表面積から大脳皮質全体に分布する神経細胞の数を推定した結果、ヒトでは約120億個、バンドウイルカでは約180億個の神経細胞が存在するという（Ridgway, 1986）。さらに、脳に占める大脳の割合は人間と同等であり、これらのことからイルカの高い知能が推察される。一方、魚類は脊椎動物の中で最も脳の発達程度が低く、その原因のひとつとして、水中の溶存酸素を利用しているため、酸素を大量に必要とする脳を十分に発達させることが不可能であったと考えられている（島本, 2008）。魚類とは異なり、鯨類は脳の発達および維持に十分な、高い酸素貯蔵能力を有している。

鯨類は肺呼吸により酸素を取り込み、血中および筋肉中にヘモグロビン、ミオグロビンを豊富に含むことにより、多くの酸素を体内に貯蔵することを可能にしている（Kooyman and Ponganis, 1998）。このことは、鯨類が水中生活へ適応するにあたり、最も重要な生理学的変化のひとつであったと考えられる。しかし、酸素が結合しているオキシヘモグロビン、オキシミオグロビンは決して安定ではなく、活性中心のヘム鉄が容易に酸化され、酸素結合能を持たないメトヘモグロビン、メトミオグロビンとなる。その

際、活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) の放出を伴い (Shikama, 1998)、潜水と浮上に伴う無呼吸/再酸素化や虚血再灌流は、さらに多くのROS発生を引き起こす (Filho *et al.*, 2002)。メトヘモグロビン、メトミオグロビンやROSの過剰な蓄積は、生体にとって致命的であるため、鯨類は強い抗酸化作用を有している (Filho *et al.*, 2002)。バンドウイルカでは、強い抗酸化作用を持つ非タンパク体の存在が示されているが、その物質までは特定されていない (Ninfali and Aluigi, 1998)。

鯨類の行動学的特徴のひとつとして、群れの形成が挙げられる。アカボウクジラ科 (*Ziphiidae*) やカワイルカ類 (*Iniidae*, *Platanistidae*, *Pontoporiidae*) は比較的小さい2-5頭の群れを作り、海洋性のハクジラ類の多くは大きな群れを形成し、時には数千頭に及ぶこともある。群れの中には複雑なネットワークにより高度な社会が構築されているため、適切なコミュニケーション手段が必要となってくる。鯨類はコミュニケーション手段を駆使して、餌の探索や繁殖、捕食者からの回避の効率化を図り、水中環境への適応を進めてきたと思われる。

鯨類は触覚、視覚、聴覚を用いてコミュニケーションを行っているが、触覚によるコミュニケーションは、個体同士が接することが可能な距離にいる必要がある。視覚によるコミュニケーションは、光量や透明度、水深の影響を受けるため、比較的近距離のコミュニケーションに用いられていると考えられる。一方、音波は水中を約1,500m/秒で進み、短時間で広範囲に届き、多くの情報を送ることができるため、多くの鯨類が鳴音によるコミュニケーションを発達させてきた (Caldwell *et al.*, 1962; Jacobs *et al.*, 1993)。高度な社会を構築・維持するために鳴音を駆使し、餌の探索や繁殖、捕食者からの回避の



効率化を図り、水中環境への適応度を高めてきたと思われる。

鳴音には、継続時間が数十から数百マイクロ秒程度で広帯域のスペクトルを持つパルス音と、継続時間が数百ミリ秒以上で狭帯域の非パルス音（ホイッスル）の二つに大別される。パルス音は、数ミリ秒以上のパルス間隔を持つ超音波であるクリックスと、パルス間隔が短く比較的低周波領域に主なエネルギーを持つバーストパルスに分類される。クリックスは主にエコロケーションに用いられ、物体の定位、判別、認知などを行うことが可能である。ホイッスルは、群れを形成する種において、お互いの位置を確認しあい、群れのまとまりを保つなど、社会的交渉に重要な役割を果たしている（Caldwell and Caldwell, 1968; Würsig and Würsig, 1979; Ding *et al.*, 1995）。また、鯨類はシグニチャーホイッスルと呼ばれる、個体認識に十分な情報を含有した、個体特有のホイッスルを持っており、お互いの確認に用いていると考えられている（Janik, 2000; Janik *et al.*, 2006）。

鯨類において、行動学的知見は、行動観察などの非侵襲的な手法から得ることができ、解剖学的・形態学的知見は死亡飼育個体やデッドストランディング個体を剖検することにより得られる。そのため、鯨類に関する行動学のおよび解剖・形態学的知見は比較的多く得られている。一方、生理学的・栄養学的知見を得るためには、負荷が加わる手法を用いることが多く、鯨類は水中生活を行っていることもあり、研究アプローチの困難さから、鯨類における生理学的・栄養学的知見は多くない。

本来、人工的な環境下で動物を適切に飼育管理するとき、生理学的・栄養学的知見は必要不可欠である。水族館などの飼育施設の多くは、獣医師もしくは飼育員による血液一般性状・生化学検査（hematology and clinical blood chemistry; HCBC）と行動観察によっ

て健康管理を行っている。しかしながら、HCBCおよび行動観察において、特に異常の見られなかった個体の死亡が報告されており (Waples and Gales, 2002)、突然死など不幸な報告は数え切れず、さらなる検査方法の導入の必要性が求められている。彼らのQOL (quality of life) を向上させるためにも、十分な生理学的・栄養学的知見は必須であると考える。それと同時に、生理学的知見を得ることは、海棲哺乳類における大きな謎である「水中への適応」と「ストランディング」の解明にも不可欠である。なお、ストランディングとは、海棲哺乳類が海岸に打ち上げられたり、入り江や河川などに迷入したり、何らかの異常な状態であり、その原因は諸説存在するが、有力な原因は未だ明らかになっていない (Yamada, 2000)。

生体にとって、最も重要な物質のひとつであるタンパク質を主に構成しているのが20種類のアミノ酸である。タンパク質を構成するアミノ酸において、生体内で合成されず、食事から摂取する必要があるアミノ酸を必須アミノ酸 (不可欠アミノ酸)、体内で合成されるため必ずしも摂取する必要がないアミノ酸を非必須アミノ酸 (可欠アミノ酸) と称する。必須アミノ酸が不足するとタンパク質合成が阻害され、体重は減少し、窒素出納値は負になる。成長期の個体であれば成長阻害を起こす。

アミノ酸はタンパク質の構成成分としてだけでなく、組織中や血漿中に遊離した形で存在し、生体内で多様な機能を有している。成長・加齢・妊娠・運動などの生理的状态や、ストレス・疲労・低栄養・疾病・外傷などの病的状態において、その生体内バランスが変化することはよく知られており、生体内遊離アミノ酸組成と生理的・病的状態には強い関連がある (Fischer *et al.*, 1975; Morgan *et al.*, 1978; Wurtman, 1983; Alam *et al.*,

1998; Aguilo *et al.*, 2000; Minowa *et al.*, 2000; Outerbridge *et al.*, 2002; Smriga and Torii, 2003a, b; Fernstrom, 2005; Rogeri and Costa Rosa, 2005; Hood *et al.*, 2006; Suarez and Krishnan, 2006; Mizuno *et al.*, 2007)。さらに、一部の遊離アミノ酸は、低分子生理活性物質の前駆体 (Wurtman, 1983; Smriga *et al.*, 2002; Fernstrom, 2005; Yudkoff *et al.*, 2005; Suarez and Krishnan, 2006; Mizuno *et al.*, 2007) や、神経伝達物質としての機能 (Gadea and López-Colomé, 2001; Hutson *et al.*, 2001; Xiang *et al.*, 2003; Inagawa *et al.*, 2005; Yudkoff *et al.*, 2005; Matsugami *et al.*, 2006) も有している。加えて、様々な薬理作用も報告されており (Banderet and Lieberman, 1989; Müting *et al.*, 1992; Brittenden *et al.*, 1994; Wells *et al.*, 1999; Moinard *et al.*, 2000; Platell *et al.*, 2000; Smriga and Torii, 2003a; Rogeri and Costa Rosa, 2005; Charlton, 2006)、生命維持や健康維持・増進に必要不可欠である。

本研究では鯨類を対象とし、第1章では血漿遊離アミノ酸、第2章では尿中遊離アミノ酸、第3章では骨格筋、皮膚、および腸管中遊離アミノ酸の解析を行った。遊離アミノ酸は、血漿と組織中に存在し、腎臓において再吸収もしくは排泄されることにより、生体内で動的平衡を保っており (Emelyanova *et al.*, 2004)、生理状態をよく反映している。そのため、血漿、尿中、組織中の遊離アミノ酸を解析することで、鯨類の生理学的・栄養学的特徴を明らかにする大きな手がかりとなると考えられる。また、生体内遊離アミノ酸のモニタリングおよびコントロールはヒト・動物を問わず、健康管理に極めて重要であり、医療をはじめ、様々な分野への応用が可能である。そうした観点から、これまで報告のない、鯨類の生体内遊離アミノ酸解析を試みた。それにより鯨類の生体内遊離アミノ酸の参照値が明らかになり、生理学的・栄養学的知見の獲得およびアミノ酸の飼育管

理等への応用に有益であると思われる。なお、本研究に用いた鯨類は分類上、ハクジラ  
亜目マイルカ科に属するバンドウイルカ、カマイルカ（英名：pacific white-sided dolphin,  
学名：*Lagenorhynchus obliquidens*）、ハナゴンドウ（英名：Risso's dolphin, 学名：*Grampus*  
*griseus*）、オキゴンドウ（英名：false-killer whale, 学名：*Pseudorca crassidens*）の4種であ  
る。

## 第1章 鯨類の血漿遊離アミノ酸濃度の解析

### 1-1 はじめに

Protein (タンパク質) はギリシャ語のProteios (第一のもの) に由来しており、生命現象にとって最も重要な物質である。その主要な作用は、1) 酵素やホルモンとしての代謝調節、2) 受容体タンパク質としての生体内情報の伝達、3) 抗原抗体反応を通じての生体防御、4) 筋タンパク質としての身体の維持・運動など、多岐にわたる。タンパク質はアミノ酸から成り、量的にはタンパク質に組み込まれているアミノ酸が大部分を占めるが、その他にも血漿遊離アミノ酸 (以下、血漿アミノ酸)、組織中遊離アミノ酸の形で存在している。アミノ酸はこれら3つの形で体内に存在し、その全体をアミノ酸プールと呼び、通常は動的平衡状態を保っている (Emelyanova *et al.*, 2004)。このアミノ酸プールの種差は、代謝の違いによりもたらされることが示唆されており (Peters *et al.*, 1971)、同様の傾向を示すものの、それぞれ種特異的な生体内アミノ酸組成を示す (弓狩ら, 1977)。血漿アミノ酸はアミノ酸プール全体から見ると非常に小さいが、生体内で生じているアミノ酸プールの変化は血漿アミノ酸に反映されるため、それらを解析することで生理的状态や臨床症状を知ることが可能である (Fischer *et al.*, 1975; Morgan *et al.*, 1978; Wurtman, 1983; Alam *et al.*, 1998; Aguilo *et al.*, 2000; Minowa *et al.*, 2000; Outerbridge *et al.*, 2002; Smriga and Torii, 2003a, b; Fernstrom, 2005; Rogeri and Costa Rosa, 2005; Hood *et al.*, 2006; Suarez and Krishnan, 2006; Mizuno *et al.*, 2007)。

タンパク質合成のためには20種類のアミノ酸が必要である。タンパク質を構成してい

るアミノ酸のうち、体内で他のアミノ酸から合成されたり、糖の代謝物から合成されたりするため、食物から摂取しなくても成長や生理機能に支障をきたさないアミノ酸を、非必須アミノ酸（あるいは可欠アミノ酸）と呼ぶ。一方、体内では合成されず、食物から必ず摂取する必要があるアミノ酸を必須アミノ酸（あるいは不可欠アミノ酸）と呼ぶ。Rose (1957) は、アミノ酸混合物中から1種類ずつアミノ酸を除き、どのアミノ酸を除いたときに成人の窒素出納が負になるか(窒素出納試験)、もしくは成長が抑制されるか(成長抑制試験)を調べることによって8種類のアミノ酸が必須アミノ酸であることを見出した。後に、KoppleとSwendseid (1975) によって、ヒスチジンも加えられ、成人における必須アミノ酸は、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、スレオニン、トリプトファン、バリンの9種類であることがわかった。必須アミノ酸は動物種によって異なることが知られており、例えばネコでは以上に加えてタウリンも必須アミノ酸である (Knopf *et al.*, 1978)。

アミノ酸はタンパク質合成の基質となるだけでなく、遊離の状態で神経伝達や酸塩基平衡の調整、低分子生理活性物質の前駆体としても重要な役割を果たしている。他にも、抗酸化作用 (Kohen *et al.*, 1988)、免疫増強作用 (Brittenden *et al.*, 1994; Saito *et al.*, 1999; Wells *et al.*, 1999; Moinard *et al.*, 2000; Rogeri and Costa Rosa, 2005) や、肝臓障害等により生じた血漿アミノ酸異常を是正することにより薬理作用を発現することも知られている (Banderet and Lieberman, 1989; Müting *et al.*, 1992; Tremel *et al.*, 1994; Thurman *et al.*, 1997; Platell *et al.*, 2000; Smruga and Torii, 2003a; Charlton, 2006)。例えば、オルニチンは各種アミノ酸等の代謝産物であるアンモニアを無毒な尿素に変換するオルニチン回路に関与する。

Mütingら（1992）は、アルコール性肝硬変患者25人に対し、13年間にわたりオルニチンアスパラギン酸塩を9 g/day摂取させ続けたところ、血中アンモニアが約7割まで減少したと報告している。また、オルニチン摂取による骨格筋増強・萎縮抑制（Elam *et al.*, 1989）や免疫賦活（Le Boucher *et al.*, 1999; Robinson *et al.*, 1999）作用などが報告されており、多種多様な機能を有している。他にも、分岐鎖アミノ酸（branched chain amino acid; BCAA）であるイソロイシン、ロイシン、バリンを運動前に摂取すると、運動中の主観的運動強度と心因性疲労度は低下するが、これはBCAAが血液脳関門において、トリプトファンを取り込みと競合することにより、脳内でセロトニン合成が抑制されるためと考えられている（Blomstrand *et al.*, 1997）。なお、主観的運動強度とは、生体にかかる運動負荷を運動者がどの程度の負担として感じているかを評価する尺度である。

BCAAと芳香族アミノ酸（aromatic amino acid; AAA）であるフェニルアラニン、チロシンのモル比（BCAA/AAA）で表されるフィッシャー比（Fischer's ration）は、肝機能評価に用いられている（Fischer *et al.*, 1975）。多くのアミノ酸と同様AAAも肝臓で代謝されるため、肝機能の低下が見られると血漿AAA濃度の上昇が見られる（Fischer *et al.*, 1975）。一方、BCAAは主に骨格筋で代謝されるため、肝機能に低下が見られても血漿BCAA濃度に変化は見られない。そのため、肝機能障害により、BCAA/AAAで表されるフィッシャー比は有意に低下する（Fischer *et al.*, 1975）。また、肝硬変患者ではアンモニア代謝が障害され、高アンモニア血症となる（Yamato *et al.*, 1995）。その結果、BCAAを基質として骨格筋が代償的にアンモニアを解毒するため、筋肉へのBCAA取り込みが亢進し、血漿BCAAが減少する（Yamato *et al.*, 1995）。肝硬変患者において、フィッシャー比が低い患者

ほど生存率が低くなることも報告されており (Yoshida *et al.*, 1989)、BCAA補充を適切に行うことで生存率が改善するとの報告もある (Muto *et al.*, 2005)。その他にも、数種類の血漿アミノ酸を組み合わせることにより、糖尿病モデルラットと正常ラットを識別することが可能であり、臨床への応用が期待されている (Noguchi *et al.*, 2006)。

以上のように、血漿アミノ酸を解析することで生理学的・栄養学的情報が得られるため、その情報を基に、食品や臨床にアミノ酸が応用されている。アミノ酸はヒトのみならず、イヌやネコなどのペットから、ウシやブタなどの畜産動物に至るまで広範囲で用いられ、我々の生活と密接に関与しており、アミノ酸に関する知見はなおも蓄積されている。しかしながら、鯨類におけるアミノ酸に関する報告はない。血漿アミノ酸は、アミノ酸プールの変化をよく反映しており、生命維持に密接に関連し、種特異的な組成を示す。そのため、血漿アミノ酸組成を解析することにより、鯨類の生理学的特徴や飼育管理の新たな理解を得る手がかりとなると考えられる。そこで本章は、鯨類の血漿アミノ酸組成を解析し、同時に解析したマウスおよび既に報告のある陸棲哺乳類の血漿アミノ酸組成と比較検討することにより、鯨類の新たな生理学的・栄養学的知見を得ることを目的とした。マウスを比較対照とした理由として、マウスではアミノ酸に関する先行報告 (Margolis, 1974; Margolis *et al.*, 1979; Bonfanti *et al.*, 1999; Vissers *et al.*, 2003; Hutson, 2006) があり、鯨類における各アミノ酸についての知見を得るために、それらの報告は有用であると考えられる。それに加え、その他の陸棲哺乳類における血漿アミノ酸に関する報告 (Fischer *et al.*, 1975; Morgan *et al.*, 1978; Wurtman, 1983; Alam *et al.*, 1998; Aguilo *et al.*, 2000; Minowa *et al.*, 2000; Outerbridge *et al.*, 2002; Smriga and Torii, 2003a, b; Fernstrom,



2005; Rogeri and Costa Rosa, 2005; Hood *et al.*, 2006; Suarez and Krishnan, 2006; Mizuno *et al.*, 2007) も参考にすることにより、鯨類の血漿アミノ酸に関する、より深い理解を得ることが可能である。また、血漿アミノ酸濃度解析による、健康状態評価への応用の可能性を検討することも目的とした。アミノ酸による栄養評価を行う際、鯨類を対象として窒素出納試験や成長抑制試験を行うことは倫理的な問題もあり、現実的ではない。必須アミノ酸は体内では合成されないため、食事制限により低下を示すと考えられる。Kopple と Swendseid (1975) がヒスチジンを必須アミノ酸であると決定した研究でも、ヒスチジン制限から23時間後には血漿ヒスチジン濃度が半減することを報告している。一方、必須アミノ酸は摂取することにより、必要量に達すると血漿濃度が急激に上昇する。これらの性質を利用して、給餌の有無による鯨類の血漿アミノ酸濃度の変動から必須アミノ酸を推察した。

## 1-2 方法

### 1-2-1 対象動物

国内8園館で飼育されているバンドウイルカ、カマイルカ、ハナゴンドウ、およびオキゴンドウを対象とし、血漿アミノ酸解析を行った。各個体は、獣医師および飼育員による血液一般性状・生化学検査 (hematology and clinical blood chemistry; HCBC) と行動観察による健康状態評価が行われた。それにより健康であると見なされた個体を本実験の対象とした。各鯨類の個体数 (N) および血液サンプル数 (n) はTable 1-1に示した通りである。個体によっては重複して採血を行っており、個体あたり平均2-3回 (最大18回) 採血を行った。給餌による血漿アミノ酸変化の解析以外は、同一個体から同一日に複数回の採血は行わず、最低でも2週間以上の採血間隔を設けている。

Table 1-1 採血個体の個体数 (N) および血液サンプル数 (n)

	個体数 (N)		血液サンプル数 (n)
	♂	♀	
バンドウイルカ	10	27	95
カマイルカ	10	1	19
ハナゴンドウ	2	2	19
オキゴンドウ	1	1	4

### 1-2-2 鯨類の採血および血漿アミノ酸解析

尾鰭の血管より、ヘパリン加真空採血管に2-3mlの血液を得た。対象個体は採血に対して十分に馴致されており、採血に困難はなかった。給餌、日内変動による影響を考慮し、各園館とも採血日の初回給餌前、同じ時間帯（8:00-10:00）に採血した。得られた血液を直ちに遠心分離（2,000g, 10min）し、血漿を分取した。除タンパク処理のため、血漿に対し2倍量の5%トリクロロ酢酸（trichloroacetic acid; TCA）と混和し、遠心分離（10,000rpm, 15min, 4°C）した。遠心後、上清を分取し、Centrifugal Filter Devices（Ultracel YM-10, Regenated Cellulose 10,000 MWCO; Millipore, Concord Rd. Billerica, MA, USA）を用いて分画分子量10,000の限外濾過を行い、アミノ酸解析に供した。サンプルはアミノ酸解析が行われるまで-80°Cで保存した。解析は、味の素株式会社ライフサイエンス研究所所有の高速アミノ酸分析計L-8800A（株式会社日立ハイテクノロジーズ, 東京）で行い、イミダゾールジペプチドの一種であるカルノシン（ $\beta$ -アラニル-ヒスチジン）を含む、27種類の血漿アミノ酸を解析した。

### 1-2-3 マウスの採血および血漿アミノ酸解析

6週齢のICR系マウス（日本クレア株式会社, 東京）6匹（雌雄各3匹）を用いた。室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、照明時間12時間/日（午前6時点灯, 午後6時消灯）条件の動物室において、プラスチックケージで飼育した。飼料は固形飼料、飲料水は水道水を用い、自由摂食・飲水とした。採血は頸椎脱臼による安楽死の後、心臓直接穿刺により行った。採血を行う前日の消灯時より、絶食を行った。血液処理および解析方法は1-2-2と同様である。

#### 1-2-4 血漿BCAA濃度およびフィッシャー比

血漿イソロイシン、ロイシン、バリン濃度の合計により、血漿BCAA濃度を算出した。血漿AAA濃度を、血漿フェニルアラニン、チロシン濃度の合計により求め、フィッシャー比 (BCAA/AAA) を求めた。

#### 1-2-5 給餌の有無による血漿アミノ酸濃度の変化

バンドウイルカにおいて、給餌の有無による血漿アミノ酸濃度の変化を確認するために、それぞれ① (8:00-10:00)、② (10:00-12:00)、③ (12:00-14:00) に採血を行った。給餌による影響を受けない群 (給餌なし) は、各時間帯で異なる個体から採血を行った。給餌による影響を受ける群 (給餌あり) は、下田海中水族館 (静岡県下田市) にて飼育されているバンドウイルカ (N=3) について、①-③の各給餌前に経時的に採血を行った。採血プロトコールおよび個体数 (N) はFigure 1-1に示した。血液処理および解析方法は1-2-2と同様である。

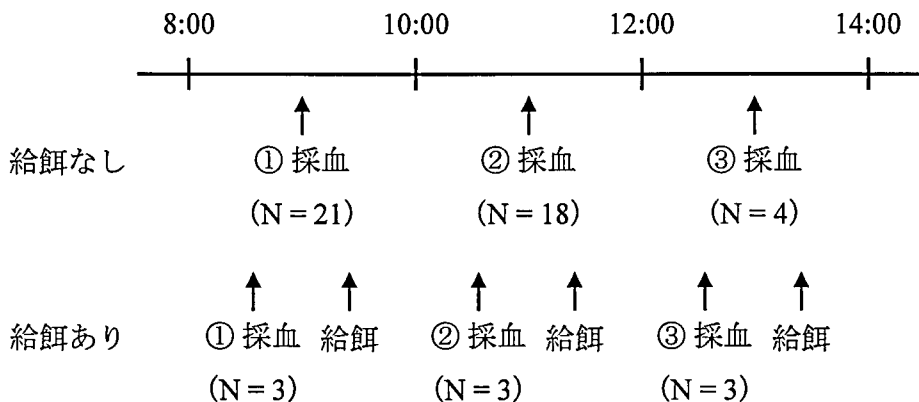


Figure 1-1 採血プロトコール

次に、各時間帯で得られた血漿アミノ酸濃度を基に、各アミノ酸の変化率を示した。給餌なしは、①における血漿アミノ酸濃度の平均値を100%とし、②と③における各アミノ酸の変化率を求めた。給餌ありは、①で得られた血漿アミノ酸濃度を100%とし、同一個体内の②と③における変化率を求めた。

#### 1-2-6 性別および飼育形態の違いによる血漿アミノ酸濃度の違い

バンドウイルカにおける、性別および飼育形態の違いによる、血漿アミノ酸濃度の違いを確認するために、オス (N=7) とメス (N=9)、プール (およそ1,000 m<sup>2</sup>, 水深3-4 m) 飼育 (N=6) と生簀 (およそ18,000 m<sup>2</sup>, 水深3-6 m) 飼育 (N=10) について群分けし、血漿アミノ酸解析を行った。プール飼育のうち、オス個体は3頭であった。また、どちらも屋外の施設であり、水温も同程度であった。対象は、季節や採血時間などの影響を最小限にするために、①に採血された全てのオス個体とし、同日時に採血されたメス個体を比較対照とした。さらにその中で、プール飼育個体と生簀飼育個体に分類した。血液処理および解析方法は1-2-2と同様である。

#### 1-2-7 統計処理

重複して採血を行った個体については、個体内における各アミノ酸の平均値を求め、当該個体のアミノ酸濃度として、各鯨類の血漿アミノ酸濃度 ( $\mu\text{mol/dl}$ ) の平均値  $\pm$  S.E. の算出に用いた。各アミノ酸濃度の解析において、検出限界以下を示したサンプルについては、平均値の算出および統計解析からは除外した。各鯨類およびマウスの血漿アミ

ノ酸濃度の比較は、ランダム効果を各鯨類およびマウス個体とした、一般線形混合モデル (general linear mixed effects model; GLMM) を適用し、有意差 ( $p < 0.05$ ) はGLMM associated ANOVAにて評価した。種間、給餌の有無の比較を行うために、多重比較としてHolm-Bonferroni法を用いて解析した。

### 1-3 結果

#### 1-3-1 血液一般性状および生化学検査

各園館で健康管理の一環として行っているHCBCと行動評価の結果、採血個体は健康であると判断された。HCBCデータの譲与について、各園館の獣医師、もしくは飼育員から了承を得られた個体のHCBC結果のみ、Table 1-2に示している。

Table 1-2 各鯨類の血液一般性状および生化学検査

	バンドウイルカ (n = 56)	カマイルカ (n = 19)	ハナゴンドウ (n = 16)	オキゴンドウ (n = 3)
赤血球 ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	2.9 - 4.6	5.4 - 6.2	3.6 - 4.6	3.8 - 4.0
ヘマトクリット (%)	33.7 - 60.2	52.5 - 61.7	42.1 - 51.3	49.4 - 51.0
血小板 ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )	6.1 - 22.1	12.3 - 21.5	11.3 - 22.2	n.d.
白血球 ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	4.7 - 11.9	2.6 - 5.5	6.9 - 12.1	6.5 - 7.9
総タンパク量 (g/dl)	5.3 - 8.8	6.1 - 9.5	6.2 - 6.9	n.d.
アルブミン (g/dl)	3.4 - 6.5	6.0 - 6.2	3.4 - 3.9	5.7 - 6.0
アルブミン/グロブリン	1.0 - 2.0	0.9 - 1.6	1.1 - 1.5	1.3 - 1.5
AST (IU/l)	137 - 300	185 - 444	161 - 268	98 - 101
ALT (IU/l)	17 - 84	51 - 111	23 - 82	4 - 7
ALP (IU/l)	358 - 2517	190 - 1337	923 - 2517	881 - 934
コレステロール (mg/dl)	55 - 305	92 - 188	218 - 322	n.d.
BUN (mg/dl)	36 - 110	27 - 66	50 - 66	61 - 72
CPK (U/l)	73 - 208	102 - 167	n.d.	n.d.

AST; アスパラギン酸アミノ基転移酵素、ALT; アラニンアミノ基転移酵素、ALP; アルカリフォスファターゼ、BUN; 血中尿素窒素、CPK; クレアチニンフォスフォキナーゼ、n.d.; 測定せず (no data)

### 1-3-2 血漿アミノ酸濃度

Table 1-3にはバンドウイルカ、カマイルカ、ハナゴンドウ、オキゴンドウ、およびマウスにおける、血漿アミノ酸27種類の濃度を示した。マウス血漿中において、カルノシンは検出されなかった。各鯨類およびマウスの血漿アミノ酸濃度について、GLMM associated ANOVA を行った後、Holm-Bonferroniの多重比較検定を行った結果をTable 1-4と1-5に示した。検出限界以下のサンプルを含み、統計解析を行うことができなかったβ-アラニンとカルノシンを除く、25アミノ酸濃度の比較では、バンドウイルカは、カマイルカ、ハナゴンドウ、オキゴンドウとの比較において、それぞれ6アミノ酸の濃度に有意差 ( $p < 0.05$ ) が見られた。また、カマイルカとハナゴンドウは8アミノ酸、カマイルカとオキゴンドウでは4アミノ酸の濃度に有意差 ( $p < 0.05$ ) が見られた。ハナゴンドウとオキゴンドウの比較においても6アミノ酸の濃度に有意差 ( $p < 0.05$ ) が見られた。マウスの比較において、ハナゴンドウとの比較では11アミノ酸、その他の3種との比較では12アミノ酸の濃度に有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められた。同じ鯨類でも、種によって血漿アミノ酸濃度が異なり、マウスとの比較においては、より多くの血漿アミノ酸濃度に違いが見られた。

全27項目中、各鯨類における血漿3-メチルヒスチジン濃度は非常に高く、マウスの血漿3-メチルヒスチジン濃度の50倍以上高値を示し、GLMM associated ANOVAを行ったところ、各鯨類とマウスの間に有意差 ( $F [4, 99] = 12.96, p < 0.05$ ) が見られた。Holm-Bonferroni法により、各鯨類とマウス、バンドウイルカとカマイルカおよびハナゴンドウ、ハナゴンドウとオキゴンドウ間に有意差 ( $p < 0.05$ ) が見られた。



Table 1-3 鯨類 4 種類とマウスの血漿アミノ酸濃度

	バンドウイルカ (N = 21)	カマイルカ (N = 10)	ハナゴンドウ (N = 4)	オキゴンドウ (N = 2)	マウス (N = 5)
アラニン	42.69 ± 4.07	32.39 ± 1.98	41.06 ± 5.15	58.90 ± 21.72	35.88 ± 2.44
β-アラニン	0.79 ± 0.08 <sup>f</sup>	0.58 ± 0.12 <sup>d</sup>	0.36 <sup>a</sup>	0.70 <sup>a</sup>	0.80 <sup>a</sup>
アルギニン	7.56 ± 0.49	7.51 ± 0.75	4.85 ± 0.56	8.39 ± 0.13	13.61 ± 0.76
アスパラギン	4.09 ± 0.52	3.41 ± 0.34	3.68 ± 0.51	2.96 ± 1.10	4.98 ± 0.30
アスパラギン酸	0.36 ± 0.04 <sup>e</sup>	0.33 ± 0.02	0.47 ± 0.07	0.16 ± 0.07	3.77 ± 0.58
シスタチオニン	0.96 ± 0.10 <sup>g</sup>	0.74 ± 0.05	1.71 ± 0.24	0.87 ± 0.08	0.53 ± 0.02
システイン	3.26 ± 0.24	2.33 ± 0.18	3.95 ± 0.18	2.75 ± 0.12	3.59 ± 0.25
グルタミン酸	3.58 ± 0.28	4.62 ± 0.23	5.61 ± 0.93	7.15 ± 1.38	12.77 ± 1.40
グルタミン	39.45 ± 1.93	44.13 ± 1.35	61.37 ± 3.47	73.84 ± 12.61	57.50 ± 2.39
グリシン	24.83 ± 1.33	23.79 ± 1.86	40.45 ± 3.80	29.82 ± 13.68	38.65 ± 4.24
ヒスチジン	6.97 ± 0.31	7.28 ± 0.31	4.15 ± 0.32	7.86 ± 1.96	6.09 ± 0.28
イソロイシン	6.66 ± 0.46	8.26 ± 1.20	6.73 ± 0.76	7.48 ± 0.32	6.83 ± 0.39
ロイシン	11.90 ± 0.74	13.70 ± 1.81	12.74 ± 1.39	14.26 ± 0.62	9.96 ± 0.76
リジン	9.18 ± 0.72	9.54 ± 1.28	7.84 ± 1.05	10.60 ± 1.61	33.94 ± 1.91
メチオニン	4.26 ± 0.33	3.58 ± 0.33	3.43 ± 0.33	3.87 ± 0.25	4.17 ± 0.31
1-メチルヒスチジン	1.73 ± 0.27 <sup>g</sup>	2.63 ± 0.25	1.61 ± 1.31	0.50 <sup>a</sup>	0.61 ± 0.21 <sup>b</sup>
3-メチルヒスチジン	51.07 ± 3.22	35.81 ± 2.01	34.64 ± 4.43	44.27 ± 5.06	0.69 ± 0.20 <sup>c</sup>
オルニチン	1.89 ± 0.11	1.98 ± 0.20	1.90 ± 0.16	1.63 ± 0.10	5.54 ± 0.15
フェニルアラニン	8.13 ± 0.32	9.06 ± 0.52	7.50 ± 0.58	8.25 ± 0.57	6.00 ± 0.30
プロリン	8.61 ± 1.01	7.42 ± 1.07	7.83 ± 0.73	9.45 ± 8.35	5.56 ± 2.20
セリン	7.01 ± 0.49	7.71 ± 0.61	6.66 ± 0.70	10.00 ± 1.89	16.35 ± 0.97
タウリン	5.71 ± 0.42	5.01 ± 0.57	9.51 ± 1.67	3.70 ± 1.21	129.43 ± 12.24
スレオニン	9.24 ± 0.92	8.47 ± 0.75	7.46 ± 0.67	11.10 ± 1.39	18.83 ± 1.53
トリプトファン	4.70 ± 0.28	6.78 ± 0.48	3.64 ± 0.28	5.76 ± 0.44	8.70 ± 0.78
チロシン	5.34 ± 0.34	5.26 ± 0.54	5.28 ± 0.62 <sup>b</sup>	5.31 ± 1.58	6.84 ± 0.48
バリン	20.78 ± 1.18	21.47 ± 1.70	19.79 ± 1.13	24.10 ± 0.56	17.25 ± 1.24
カルノシン	3.41 ± 0.21	2.14 ± 0.12	3.24 ± 0.54	2.82 ± 1.48	N.D.

血漿アミノ酸濃度は平均値 ± S.E. (μmol/dl) で示した。N.D.は検出されなかった (not detected) ことを示している。濃度右上のアルファベットは検出された個体数 (N) が異なることを示している (a = 1, b = 3, c = 4, d = 9, e = 15, f = 17, g = 19)。

Table 1-4 血漿アミノ酸濃度の鯨類間比較

	T.t. vs. L.o.	T.t. vs. G.g.	T.t. vs. P.c.	L.o. vs. G.g.	L.o. vs. P.c.	G.g. vs. P.c.
アラニン	NS	NS	L	NS	L	L
β-アラニン	H	NS	—	NS	—	—
アルギニン	NS	NS	NS	NS	NS	NS
アスパラギン	NS	NS	NS	NS	NS	NS
アスパラギン酸	NS	NS	NS	NS	NS	NS
シスタチオン	NS	L	NS	L	NS	NS
システイン	NS	NS	NS	L	NS	NS
グルタミン酸	L	L	L	NS	NS	NS
グルタミン	NS	L	L	L	L	L
グリシン	NS	L	L	L	L	NS
ヒスチジン	NS	H	L	H	NS	L
イソロイシン	L	NS	NS	NS	NS	NS
ロイシン	NS	NS	NS	NS	NS	NS
リジン	NS	NS	NS	NS	NS	NS
メチオン	NS	NS	NS	NS	NS	NS
1-メチルヒスチジン	L	NS	NS	H	NS	NS
3-メチルヒスチジン	H	H	NS	NS	NS	L
オルニチン	NS	NS	NS	NS	NS	NS
フェニルアラニン	L	NS	NS	H	NS	NS
プロリン	NS	NS	NS	NS	NS	L
セリン	NS	NS	L	NS	L	L
タウリン	NS	NS	NS	NS	NS	NS
スレオニン	NS	NS	NS	NS	NS	NS
トリプトファン	L	NS	NS	H	NS	NS
チロシン	NS	NS	NS	NS	NS	NS
バリン	NS	NS	NS	NS	NS	NS
カルノシン	H	NS	NS	NS	L	NS

一行目には各鯨類の学名を頭文字で示している (T.t.; バンドウイルカ, L.o.; カマイルカ, G.g.; ハナゴンドウ, P.c.; オキゴンドウ)。 $p < 0.05$ において、先に記載した種が有意に高値 (High) もしくは低値 (Low) を示した場合、それぞれHとLで示している。NSは有意な差がなかったこと (Not Significant) を示している。—; 検出限界以下のサンプルを含み、統計処理を行うことができなかったことを示している。

Table 1-5 血漿遊離アミノ酸濃度のマウスと各鯨類の比較

	バンドウイルカ vs. マウス	カマイルカ vs. マウス	ハナゴンドウ vs. マウス	オキゴンドウ vs. マウス
アラニン	NS	NS	NS	H
β-アラニン	—	—	—	—
アルギニン	L	L	L	L
アスパラギン	NS	NS	NS	NS
アスパラギン酸	L	L	L	L
シスタチオニン	NS	NS	H	NS
システイン	NS	NS	NS	NS
グルタミン酸	L	L	L	L
グルタミン	L	NS	NS	H
グリシン	L	L	NS	NS
ヒスチジン	NS	NS	NS	H
イソロイシン	NS	NS	NS	NS
ロイシン	NS	NS	NS	NS
リジン	L	L	L	L
メチオニン	NS	NS	NS	NS
1-メチルヒスチジン	NS	H	NS	NS
3-メチルヒスチジン	H	H	H	H
オルニチン	L	L	L	L
フェニルアラニン	NS	H	NS	NS
プロリン	NS	NS	NS	NS
セリン	L	L	L	L
タウリン	L	L	L	L
スレオニン	L	L	L	L
トリプトファン	L	NS	L	NS
チロシン	NS	NS	NS	NS
バリン	NS	NS	NS	NS
カルノシン	—	—	—	—

$p < 0.05$ において、先に記載した鯨類が有意に高値 (High) もしくは低値 (Low) を示した場合、それぞれHとLで示している。NSは有意な差がなかったこと (Not Significant) を示している。—; 検出限界以下のサンプルを含み、統計処理を行うことができなかったことを示している。

### 1-3-3 血漿BCAA濃度およびフィッシャー比

血漿イソロイシン、ロイシン、バリンの総量である血漿BCAA濃度はバンドウイルカ、カマイルカ、ハナゴンドウ、オキゴンドウ、マウスで、それぞれ $39.34 \pm 2.28 \mu\text{mol/dl}$ 、 $43.43 \pm 4.62 \mu\text{mol/dl}$ 、 $39.26 \pm 3.27 \mu\text{mol/dl}$ 、 $45.84 \pm 1.50 \mu\text{mol/dl}$ 、 $34.04 \pm 2.37 \mu\text{mol/dl}$ であった。GLMM associated ANOVAを行ったところ、有意な差は認められなかった ( $F [4, 100] = 0.80$ )。

Figure 1-2には、各サンプルのフィッシャー比を表した。バンドウイルカ、カマイルカ、ハナゴンドウ、オキゴンドウ、マウスの平均値  $\pm$  S.E.は、それぞれ $3.07 \pm 0.09$ 、 $2.98 \pm 0.15$ 、 $3.83 \pm 0.24$ 、 $3.15 \pm 0.35$ 、 $2.67 \pm 0.23$ であった。GLMM associated ANOVAを行ったところ、有意差が見られた ( $F [4, 100] = 3.21, p < 0.05$ )。Holm-Bonferroniの多重比較検定を行った結果、バンドウイルカとハナゴンドウ、カマイルカとハナゴンドウ、ハナゴンドウとマウスのフィッシャー比に有意差 ( $p < 0.05$ ) が見られた。また、各鯨類のフィッシャー比において、100サンプル中12サンプルが2.4以下を示した。これは、ヒトにおいて肝機能低下が疑われる値である (石井, 2007)。

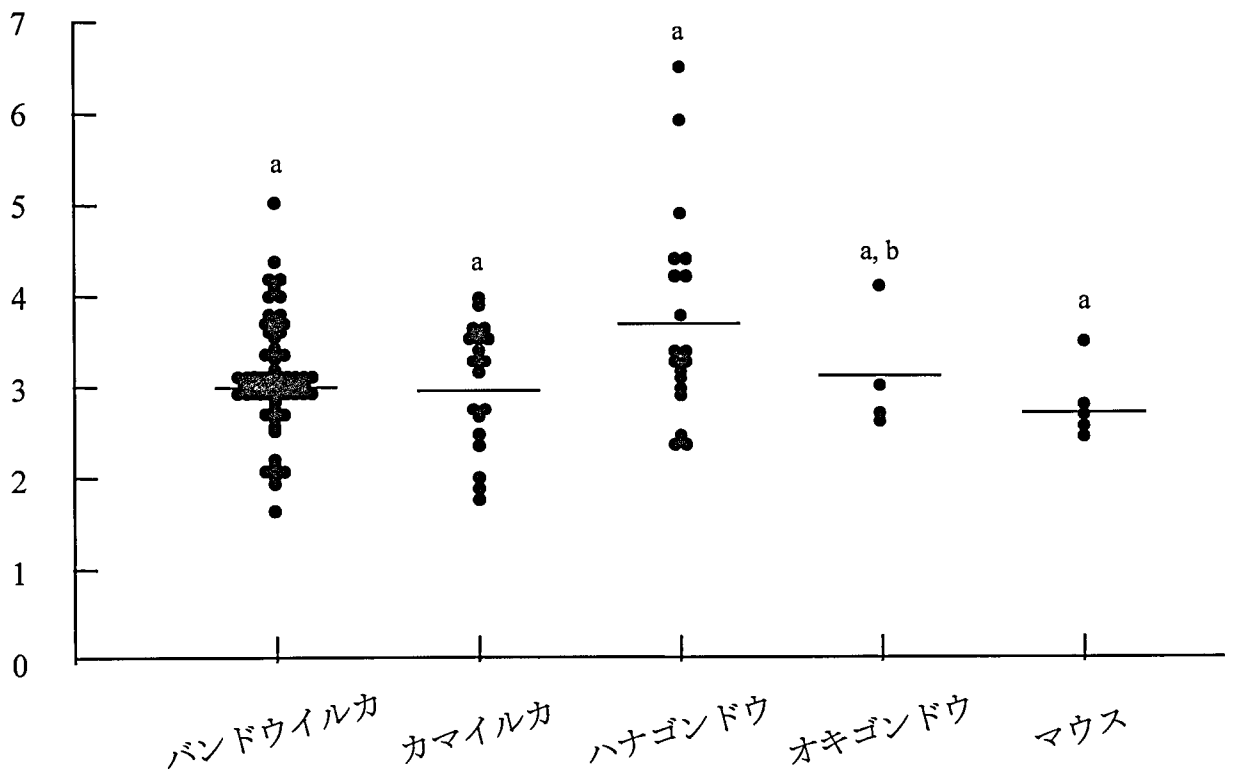


Figure 1-2 鯨類4種とマウスのフィッシャー比 (●)

異なるアルファベット間には有意差 ( $p < 0.05$ ) があることを示している。バーは平均値を示している。

#### 1-3-4 給餌による血漿アミノ酸濃度への影響

バンドウイルカにおける、給餌の有無による血漿アミノ酸濃度の変化をTable 1-6と1-7に示した。給餌なしでは、③の時間においてアスパラギン酸が検出されなかった。それぞれの場合における、各採血時間での血漿アミノ酸濃度を比較した結果、給餌なしで11種類（約40%）のアミノ酸濃度に、給餌ありで18種類（約65%）のアミノ酸濃度に有意差 ( $p < 0.05$ ) が見られた。3-メチルヒスチジン濃度は、どちらの場合においても有意な差は見られず、血漿3-メチルヒスチジン濃度は給餌の影響を受けないことが示された。

Figure 1-3には給餌の有無による血漿アミノ酸濃度の変化率を示した。給餌なしでは、多くのアミノ酸濃度は減少する、もしくは変化が見られなかった。給餌なしにおいて25%以上の濃度の減少を示し、かつ給餌ありにおいて150%以上の濃度の増加が認められたのはイソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、タウリン、スレオニン、チロシン、バリンの9種類であった。これら9種類のアミノ酸濃度は給餌の有無により変動率が大きいことが示された。

Table 1-6 給餌なしの各時間帯におけるバンドウイルカ血漿アミノ酸濃度

	① (N = 21)	② (N = 18)	③ (N = 4)
アラニン	42.69 ± 4.07	42.11 ± 4.18	26.18 ± 6.39
β-アラニン	<sup>d</sup> 0.79 ± 0.08 *	1.05 ± 0.11 *	2.54 ± 0.71 †
アルギニン	7.56 ± 0.49	7.43 ± 0.52	5.89 ± 1.29
アスパラギン	4.09 ± 0.52 *	5.11 ± 0.67 †	1.46 ± 0.46 *
アスパラギン酸	<sup>b</sup> 0.36 ± 0.04	<sup>a</sup> 0.32 ± 0.05	N.D.
シスタチオニン	<sup>e</sup> 0.96 ± 0.10	0.92 ± 0.07	0.83 ± 0.03
システイン	3.26 ± 0.24	3.30 ± 0.27	2.37 ± 0.23
グルタミン酸	3.58 ± 0.28	3.52 ± 0.38	5.34 ± 1.35
グルタミン	39.45 ± 1.93 *	47.84 ± 2.07 †	41.64 ± 5.14 **
グリシン	24.83 ± 1.33	24.25 ± 1.30	18.36 ± 1.15
ヒスチジン	6.97 ± 0.31 *	7.86 ± 0.23 †	5.94 ± 0.11 *
イソロイシン	6.66 ± 0.46	5.83 ± 0.47	4.33 ± 0.57
ロイシン	11.90 ± 0.74	11.01 ± 0.88	7.72 ± 0.92
リジン	9.18 ± 0.72	7.70 ± 0.43	5.22 ± 0.57
メチオニン	4.26 ± 0.33	4.17 ± 0.20	3.04 ± 0.07
1-メチルヒスチジン	<sup>e</sup> 1.73 ± 0.27 *	<sup>c</sup> 0.63 ± 0.12 †	0.67 ± 0.15 **
3-メチルヒスチジン	51.07 ± 3.22	44.43 ± 2.05	40.16 ± 2.33
オルニチン	1.89 ± 0.11	1.76 ± 0.11	1.54 ± 0.20
フェニルアラニン	8.13 ± 0.32 *	8.13 ± 0.32 †	5.80 ± 0.32 *
プロリン	8.61 ± 1.01 *	6.58 ± 0.77 *	1.37 ± 0.49 †
セリン	7.01 ± 0.49 *	7.78 ± 0.49 †	5.18 ± 0.75 *
タウリン	5.71 ± 0.42	4.72 ± 0.39	3.89 ± 0.90
スレオニン	9.24 ± 0.92	10.00 ± 0.76	6.27 ± 0.99
トリプトファン	4.70 ± 0.28 *	6.00 ± 0.43 †	5.92 ± 0.75 **
チロシン	5.34 ± 0.34 *	5.57 ± 0.40 †	3.71 ± 0.15 *
バリン	20.78 ± 1.18	19.52 ± 1.69	15.41 ± 1.86
カルノシン	3.41 ± 0.21 *	3.72 ± 0.24 †	3.94 ± 0.17 **

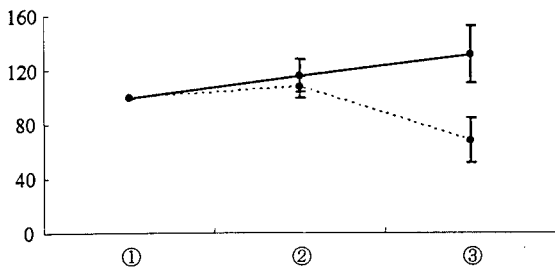
採血は①：8:00-10:00、②：10:00-12:00、および③：12:00-14:00に行った。血漿アミノ酸濃度は平均値 ± S.E. (μmol/dl) で示した。N.D.は検出されなかった (not detected) ことを示している。濃度左上のアルファベットは検出された個体数 (N) が異なることを示している (a = 10, b = 15, c = 16, d = 17, e = 19)。同一行内の異なった符合 (\*および†) 間には有意差 (p < 0.05) が認められた。

Table 1-7 給餌ありの各時間帯におけるバンドウイルカ血漿アミノ酸濃度

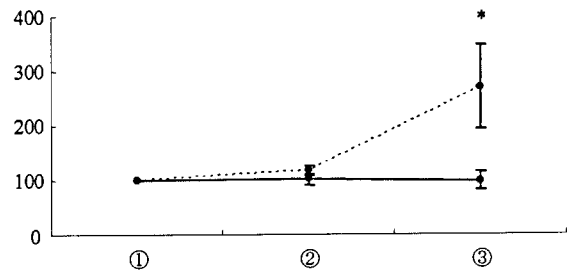
	① (N = 3)	② (N = 3)	③ (N = 3)
アラニン	46.38 ± 6.04	52.52 ± 5.01	58.26 ± 1.07
β-アラニン	1.17 ± 0.10	1.17 ± 0.10	1.13 ± 0.14
アルギニン	7.56 ± 0.55 *	10.00 ± 1.03 *†	16.27 ± 2.42 †
アスパラギン	3.32 ± 0.49	4.18 ± 1.02	5.34 ± 0.94
アスパラギン酸	0.30 ± 0.14 *	0.46 ± 0.14 *	2.30 ± 0.55 †
シスタチオン	0.72 ± 0.21	0.56 ± 0.22	0.51 ± 0.08
システイン	4.39 ± 0.31	2.94 ± 1.25	3.29 ± 0.36
グルタミン酸	3.45 ± 0.36 *	3.99 ± 0.98 *	12.02 ± 2.28 †
グルタミン	46.06 ± 9.76	50.81 ± 13.48	48.62 ± 4.30
グリシン	24.25 ± 0.64 *	36.56 ± 2.96 †	38.35 ± 2.99 †
ヒスチジン	6.53 ± 0.41 *	7.83 ± 0.69 *	11.58 ± 1.11 †
イソロイシン	5.57 ± 0.41 *	12.37 ± 1.27 *	35.93 ± 5.26 †
ロイシン	10.89 ± 0.90 *	20.13 ± 1.66 *	59.25 ± 9.50 †
リジン	9.64 ± 0.73 *	14.58 ± 2.09 *	31.66 ± 2.29 †
メチオニン	4.10 ± 0.55 *	6.15 ± 0.66 *	11.61 ± 1.05 †
1-メチルヒスチジン	0.58 ± 0.12	0.66 ± 0.10	0.76 ± 0.13
3-メチルヒスチジン	32.65 ± 5.21	36.22 ± 6.36	44.02 ± 7.17
オルニチン	2.08 ± 0.17 *	2.63 ± 0.70 *	7.60 ± 0.53 †
フェニルアラニン	7.73 ± 0.29 *	10.13 ± 0.46 *†	19.52 ± 4.14 †
プロリン	13.72 ± 0.58 *	17.98 ± 0.89 *	30.57 ± 3.41 †
セリン	8.90 ± 1.17	10.60 ± 1.38	14.47 ± 1.50
タウリン	3.84 ± 0.03 *	7.72 ± 0.71 †	33.21 ± 1.58 §
スレオニン	10.64 ± 1.48 *	13.42 ± 3.16 *	29.11 ± 4.29 †
トリプトファン	7.03 ± 0.16 *	9.55 ± 0.57 *†	11.54 ± 1.09 †
チロシン	5.28 ± 0.93 *	7.00 ± 2.01 *	16.12 ± 1.62 †
バリン	23.13 ± 1.34 *	37.58 ± 1.32 *	82.62 ± 9.84 †
カルノシン	3.29 ± 0.25 *	2.93 ± 0.21 *†	2.18 ± 0.23 †

給餌は①：8:00-10:00、②：10:00-12:00、および③：12:00-14:00に行われ、採血は給餌前に行った。血漿アミノ酸濃度は平均値 ± S.E. (μmol/dl) で示した。同一行内の異なった符合 (\*, †, および§) 間には有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められた。

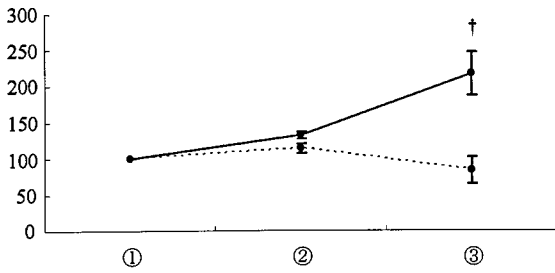




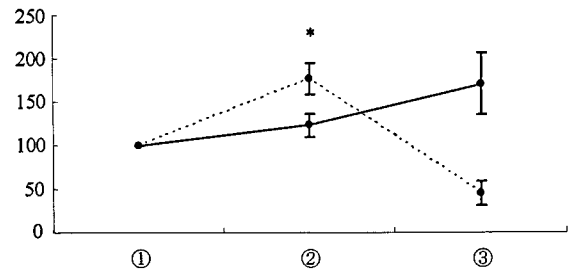
アラニン



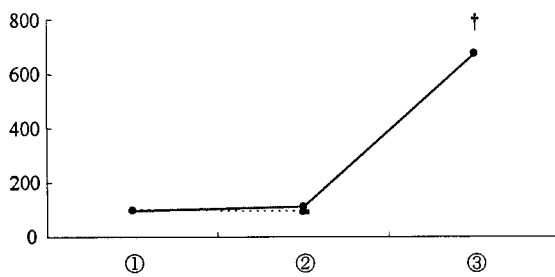
β-アラニン



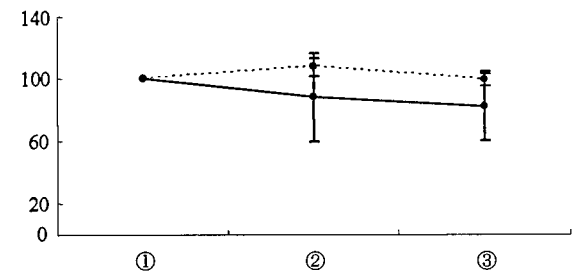
アルギニン



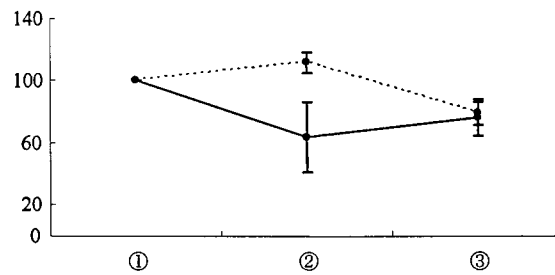
アスパラギン



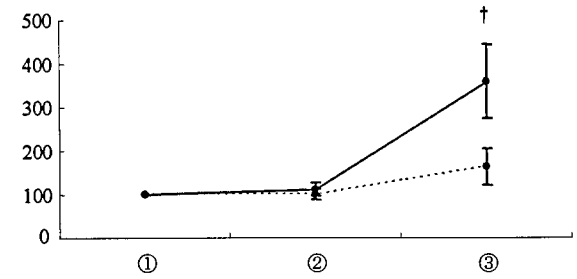
アスパラギン酸



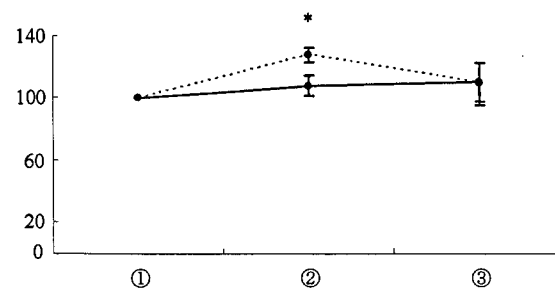
シスタチオン



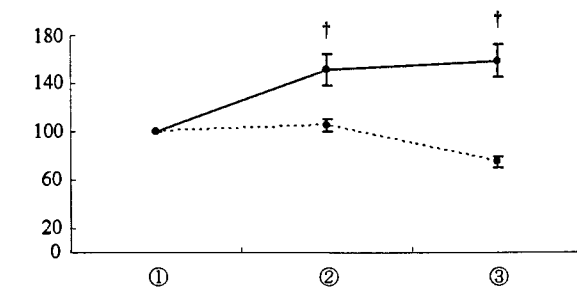
システイン



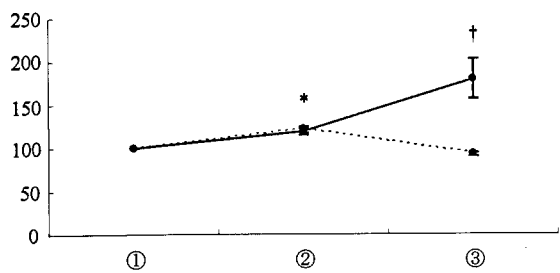
グルタミン酸



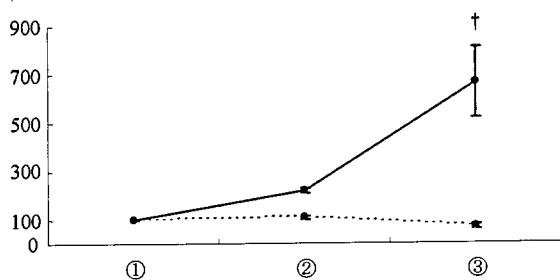
グルタミン



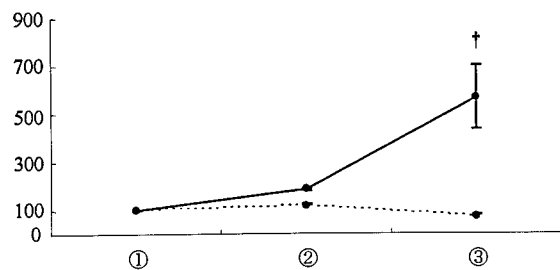
グリシン



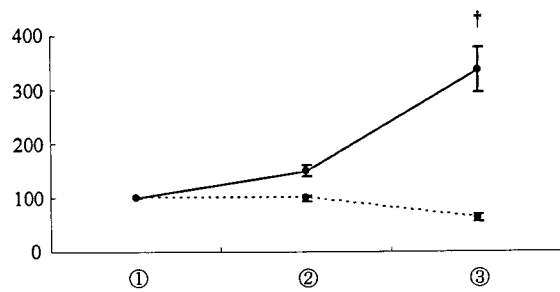
ヒスチジン



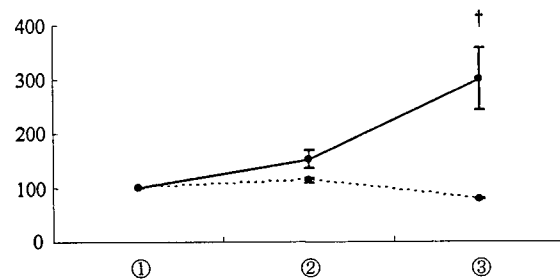
イソロイシン



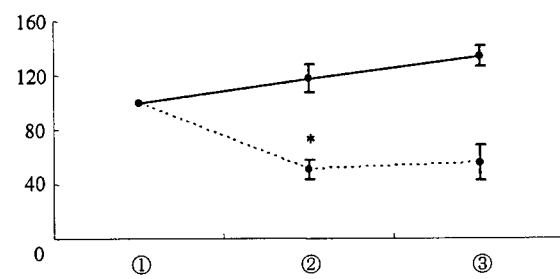
ロイシン



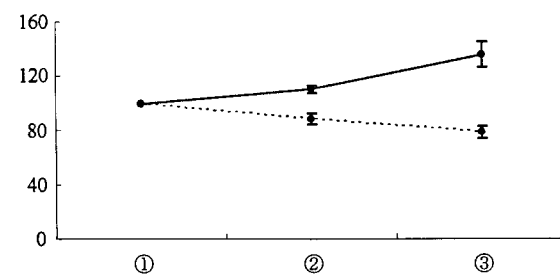
リジン



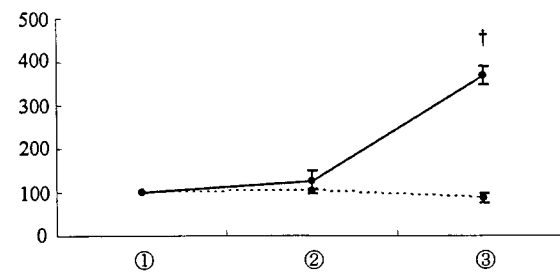
メチオニン



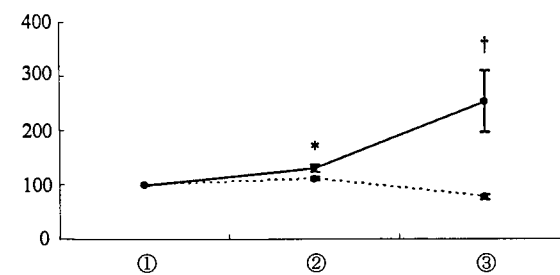
1-メチルヒスチジン



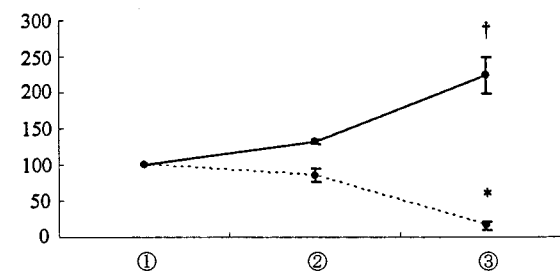
3-メチルヒスチジン



オルニチン



フェニルアラニン



プロリン

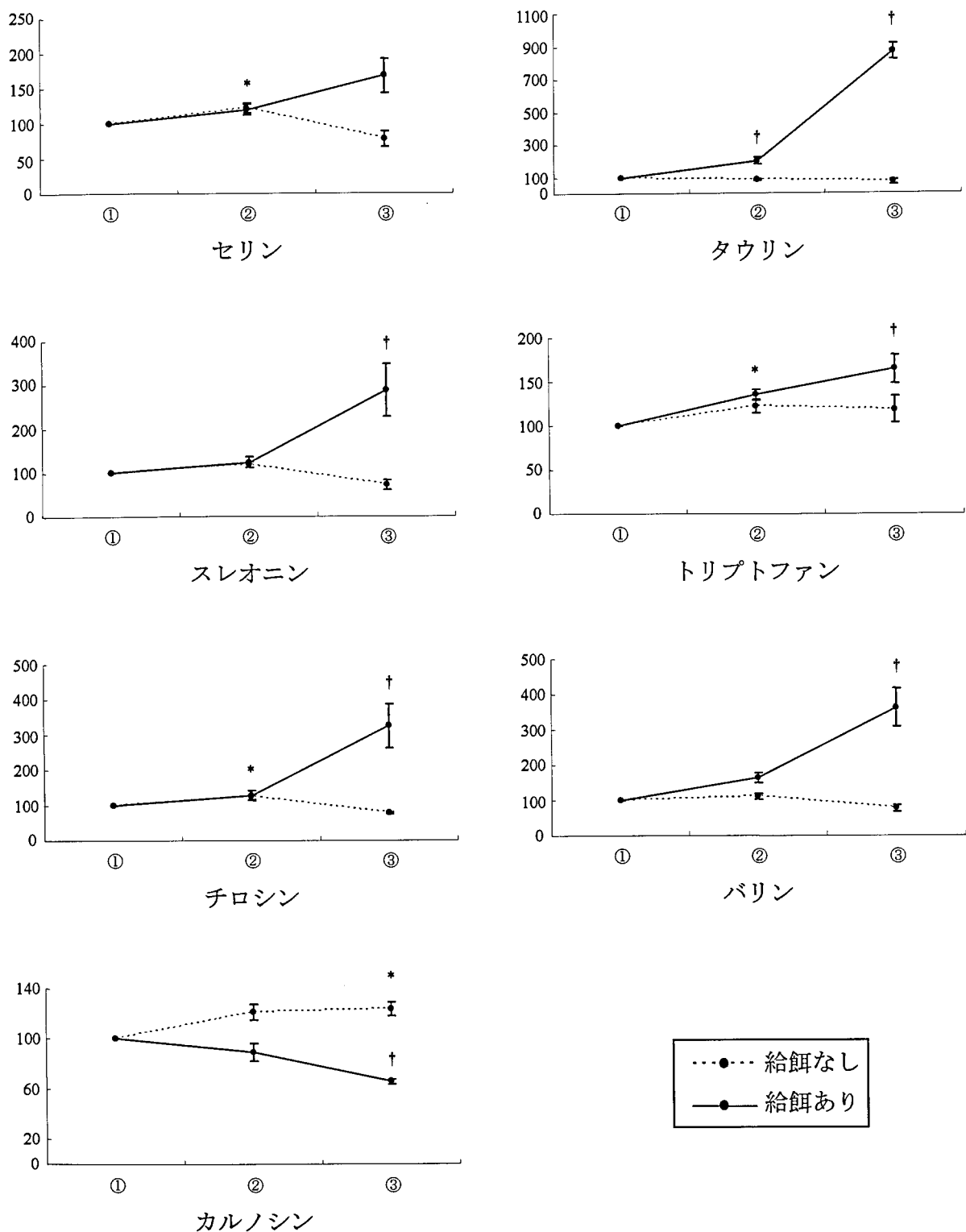


Figure 1-3 給餌の有無によるバンドウイルカ血漿アミノ酸濃度の変化 (%)

給餌なし (---●---) は① (8:00-10:00) を100%としたときの② (10:00-12:00)、③ (12:00-14:00) における血漿アミノ酸濃度の変化率 (%) の平均値 ± S.E.を表した。給餌あり (—●—) は、①を100%としたときの②、③における血漿アミノ酸濃度の変化率を表した。縦軸は変化率 (%), 横軸は時間帯を示している。  
\*と†は、それぞれ給餌なしと給餌ありにおいて、①と比較して有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められたことを示す。

### 1-3-5 性別および飼育形態の違いによる血漿アミノ酸濃度の違い

性別および飼育形態が異なるバンドウイルカについて、それぞれの血漿アミノ酸濃度とGLMM associated ANOVAを行った結果をTable 1-8に示した。オスでは、セリン濃度がメスより有意に高く ( $F [1, 26] = 7.62, p < 0.05$ )、多くのアミノ酸でオスの方が高濃度を示した。これは、成人男性は成人女性と比較して、多くの血漿アミノ酸濃度が高値を示すというArmstrongとStaveの報告(1973)と同様の結果となった。プール飼育では血漿タウリン濃度が生簀飼育より有意に高く ( $F [1, 26] = 6.13, p < 0.05$ )、多くのアミノ酸でプール飼育の方が高濃度を示した。

Table 1-8 バンドウイルカでの性別および飼育形態の違いによる血漿アミノ酸の比較

	性別		飼育形態	
	オス (N = 7)	メス (N = 9)	生簀飼育 (N = 10)	プール飼育 (N = 6)
アラニン	55.84 ± 9.49	36.92 ± 3.97	47.98 ± 6.55	40.57 ± 8.67
β-アラニン	<sup>d</sup> 0.97 ± 0.10	<sup>e</sup> 0.82 ± 0.12	<sup>g</sup> 0.85 ± 0.09	<sup>a</sup> 1.08 ± 0.05
アルギニン	8.36 ± 0.99	7.17 ± 0.73	7.84 ± 0.76	7.45 ± 1.05
アスパラギン	4.15 ± 0.83	3.47 ± 0.53	4.00 ± 0.68	3.38 ± 0.54
アスパラギン酸	<sup>d</sup> 0.44 ± 0.05	<sup>c</sup> 0.40 ± 0.05	<sup>e</sup> 0.41 ± 0.05	<sup>b</sup> 0.45 ± 0.06
シスタチオニン	<sup>e</sup> 0.96 ± 0.21	<sup>f</sup> 1.02 ± 0.20	1.02 ± 0.14	<sup>c</sup> 0.93 ± 0.39
システイン	3.32 ± 0.54	3.11 ± 0.40	3.59 ± 0.21	2.55 ± 0.72
グルタミン酸	3.57 ± 0.42	3.41 ± 0.36	3.43 ± 0.31	3.57 ± 0.50
グルタミン	41.29 ± 4.00	34.42 ± 2.42	38.66 ± 3.15	35.38 ± 3.36
グリシン	26.43 ± 2.57	25.70 ± 2.07	26.66 ± 2.32	24.95 ± 1.74
ヒスチジン	7.36 ± 0.55	6.55 ± 0.53	6.89 ± 0.51	6.92 ± 0.63
イソロイシン	7.80 ± 0.75	6.65 ± 0.76	6.96 ± 0.75	7.46 ± 0.80
ロイシン	14.32 ± 1.21	11.40 ± 1.15	12.09 ± 1.17	13.66 ± 1.39
リジン	10.43 ± 1.11	8.85 ± 1.34	9.67 ± 1.20	9.32 ± 1.42
メチオニン	4.89 ± 0.70	3.91 ± 0.51	4.52 ± 0.54	4.05 ± 0.72
1-メチルヒスチジン	<sup>e</sup> 1.62 ± 0.52	<sup>f</sup> 1.85 ± 0.48	<sup>g</sup> 1.45 ± 0.42	<sup>d</sup> 2.29 ± 0.56
3-メチルヒスチジン	54.24 ± 5.30	49.65 ± 5.17	49.05 ± 5.29	56.00 ± 4.03
オルニチン	2.02 ± 0.21	1.87 ± 0.18	2.06 ± 0.13	1.72 ± 0.28
フェニルアラニン	8.77 ± 0.66	7.87 ± 0.49	8.35 ± 0.51	8.12 ± 0.71
プロリン	11.21 ± 2.27	7.55 ± 1.19	9.91 ± 1.70	7.89 ± 1.78
セリン	7.75 ± 0.98 *	5.87 ± 0.55	7.22 ± 0.69	5.82 ± 0.94
タウリン	6.62 ± 0.63	5.73 ± 0.70	5.43 ± 0.59 †	7.26 ± 0.60
スレオニン	10.98 ± 2.15	8.11 ± 1.13	9.79 ± 1.60	8.65 ± 1.67
トリプトファン	4.84 ± 0.67	4.40 ± 0.41	4.75 ± 0.56	4.33 ± 0.31
チロシン	6.22 ± 0.68	4.81 ± 0.41	5.59 ± 0.60	5.15 ± 0.46
バリン	25.01 ± 1.59	20.42 ± 1.72	22.51 ± 2.00	22.31 ± 1.16
カルノシン	3.83 ± 0.35	3.26 ± 0.36	3.34 ± 0.24	3.79 ± 0.58

血漿アミノ酸濃度は平均値 ± S.E. (μmol/dl) で示した。濃度左上のアルファベットは検出された個体数 (N) が異なることを示している (a = 2, b = 3, c = 4, d = 5, e = 6, f = 8, g = 9)。\*と†はそれぞれ性別もしくは飼育形態の違いにより有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められたことを示す。

## 1-4 考察

### 1-4-1 鯨類における血漿アミノ酸濃度の種差

4種類の鯨類について血漿アミノ酸の解析を行った結果、血漿アミノ酸濃度に種差があることが明らかになった。血漿アミノ酸組成の種差に影響を与える要因として次のことが考えられる。最も大きな要因は与えられる餌である。飼育下の鯨類は主にサバやアジなどの魚類が与えられ、ハナゴンドウやオキゴンドウではそれに加え、イカなどの頭足類が与えられる。これらは主に野生下で鯨類が捕食していると考えられているものである (Ridgway and Harrison, 1999)。しかし、アミノ酸解析に用いた血液は給餌前に採血を行っており、前日の給餌から約17時間以上が経過しているため、食餌による直接的な影響は比較的少ないものと考えられる (Peters *et al.*, 1971)。また、環境要因が血漿アミノ酸組成に与える影響も大きい。Table 1-9には本研究で用いた4種類の鯨類の一般的な特徴を示した。

Table 1-9 本研究で用いられた鯨類の一般的な特徴 (Ridgway and Harrison, 1999)

	体長 (cm)	体重 (kg)	生息域
バンドウイルカ	~400	~300	温帯から熱帯域
カマイルカ	~250	~200	冷帯から温帯域
ハナゴンドウ	~400	~400	温帯から熱帯域
オキゴンドウ	~600	~1400	温帯から熱帯域

本研究で用いた各鯨類は、多くの飼育施設で同じか、もしくは類似した飼育環境下 (飼育施設面積、水深、水温、気温など) に置かれている。これは全国の飼育施設を対象に行

った調査からも推測できる（大洗水族館, 1992）。一方、有意に異なる血漿アミノ酸濃度を示したアミノ酸の数は、どの鯨類間比較においても同様であり、鯨類における血漿アミノ酸濃度の種差は、野生から飼育への環境の変化に起因するとは考えづらい。4種類のサルとヒトの血漿アミノ酸濃度を解析した結果において、どの比較においても異なるアミノ酸の数は同様であり、血漿アミノ酸組成の種差は代謝の違いによりもたらされると報告されている（Peters *et al.*, 1971）。このことから、鯨類の血漿アミノ酸濃度に認められた種差も、代謝の違いに起因すると考えられ、鯨類においても血漿アミノ酸は生理状態を十分に反映していると考えられる。

日本ではこれまで約30種類の鯨類の飼育が試みられてきたが、現在飼育されているのは約10種類である。DefranとPryor（1980）も、全ての鯨類が飼育成功を収めているわけではなく、飼育成功率は種によって異なると述べている。これは鯨類により、異なった飼育管理法が必要であることを示唆している。今回、4種類の鯨類における、血漿アミノ酸濃度の参照値およびその種差を明らかにしたことで、HCBCに加え、各鯨類における生理的変化や健康状態の指標のひとつとして、血漿アミノ酸も有用であると考えられる。また、血漿アミノ酸は栄養状態を反映しているため、通常時に加え、病中病後などのホメオスタシスが変化した場合の栄養状態評価、それに続く調餌やサプリメントの投与計画にも有用な情報を与えると考えられる。

#### 1-4-2 水中生活への適応による血漿アミノ酸濃度の変化

鯨類とマウスの比較において、血漿アミノ酸濃度は大きく異なることが示され、なか

でも特徴的だったのは3-メチルヒスチジンであり、鯨類の血漿中には多く含まれていた。

3-メチルヒスチジンは骨格筋のアクチンとミオシンに存在するヒスチジン残基が、翻訳後にメチル基修飾（メチル化）を受けることにより産生される（Young *et al.*, 1972）。対応するtRNAが存在していないので、3-メチルヒスチジンはタンパク質再合成に用いられることはなく、多くの動物種でそれ以上の代謝を受けずに、ほとんどが尿中に排泄される（Young *et al.*, 1972）。そのため、3-メチルヒスチジンは筋タンパク質異化の指標として用いられている（Burman *et al.*, 1979; Afting *et al.*, 1981; Nagasawa *et al.*, 1996; Vissers *et al.*, 2003; Nakashima *et al.*, 2005）。一方、ブタやヒツジ、ウサギなどはイミダゾールジペプチドの一種であるバレニン（ $\beta$ -アラニル-3-メチルヒスチジン）を保有している（Harris, 1981; Harris and Milne, 1987）。これらの動物は、バレニンの基質である3-メチルヒスチジンの再吸収を行い、バレニン合成に用いている（Rathmacher *et al.*, 1996）。そのため、バレニンを多く保有している鯨類（Suyama *et al.*, 1970）でも、血漿3-メチルヒスチジンが高濃度であった要因のひとつとして、再吸収が行われていることが考えられる。しかし、これまで報告されている多くの陸棲哺乳類や鳥類の血漿3-メチルヒスチジン濃度は2.00  $\mu\text{mol/dl}$ 未満であり、再吸収を行っているブタやヒツジでも4.00  $\mu\text{mol/dl}$ 未満である（Young and Munro, 1978; Blazer-Yost and Jezyk, 1979; Harris and Milne, 1981; Rathmacher *et al.*, 1993; Nagasawa *et al.*, 1996; Rathmacher *et al.*, 1996; Goldstein *et al.*, 1999; Vissers *et al.*, 2003; Nakashima *et al.*, 2005）。陸棲哺乳類と比較して鯨類の血漿3-メチルヒスチジンはあまりに高濃度であり、鯨類での3-メチルヒスチジン動態を明らかにするためにも、尿や骨格筋の3-メチルヒスチジン濃度の解析が必要である。



バンドウイルカの血漿中には、強い抗酸化作用を持つ非タンパク体が存在することが示されたが、その物質までは特定されなかった (Ninfali and Aluigi, 1998)。カルノシン、ヒスチジン、3-メチルヒスチジンは抗酸化作用を持つことが知られており (Kohen *et al.*, 1988)、カルノシンは脂質酸化、タンパク質酸化に対して、有効な抗酸化作用を示すことも知られている (Nagasawa *et al.*, 2001)。本研究において、3-メチルヒスチジンとカルノシンが血漿中に高濃度に含まれていたことから、これらの物質が鯨類の血中に存在する強い抗酸化作用に寄与している可能性は高い。血液と並んで酸化反応およびROSが多い組織として、骨格筋が挙げられる。そこで、骨格筋のアミノ酸濃度を解析することにより、鯨類の抗酸化作用における3-メチルヒスチジンとカルノシンの寄与が明らかになるかもしれない。

#### 1-4-3 鯨類の血漿BCAA濃度

BCAAの中でも、とくにロイシンは血液脳関門を急速に通過し、脳内の興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の合成に重要な役割を果たしている (Yudkoff *et al.*, 2005)。そのためBCAAの代謝に関連している分岐鎖 $\alpha$ -ケト酸脱水素酵素 (Branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase; BCKDH) を不活化するBCKDHキナーゼ (BDK) を持たない、BDKノックアウトマウスは、血液、脳、心臓、腎臓、および骨格筋中BCAA濃度が低値を示し、てんかん発作や成長阻害が生じる (Joshi *et al.*, 2006)。BDKノックアウトマウスとは異なり、メープルシロップ尿症の患者は血中および組織中のBCAA濃度が高値を示し、精神発達遅滞や痙攣などを示す (Hutson *et al.*, 2001; Hutson, 2006)。したがって、海棲哺乳

乳類が水中で生活していることを考えると、神経症状や発達遅滞などは溺死のリスクを増加させるため、BCAAの過不足が海棲哺乳類に与える影響は大きい。本研究で得られた鯨類の血漿BCAA濃度は、これまでに報告されている陸棲哺乳類の血漿BCAA濃度 (Blazer-Yost and Jezyk, 1979; Goldstein *et al.*, 1999; Blomstrand, 2001) と同程度であり、鯨類間およびマウスとの比較においても有意差が認められなかった。Platellら (2000) は、BCAA投与による様々な効果を報告しているが、鯨類においても同様の効果が得られると考えられる。しかし、上述したように過剰なBCAA投与は精神発達遅滞や痙攣などのリスクを増加させる。そのため、鯨類の血漿BCAA濃度に関する本研究の結果は、今後飼育管理において、安全にBCAAを投与する上で、重要になる。

#### 1-4-4 鯨類のフィッシャー比

WaplesとGales (2002) は、HCBCおよび行動評価において異常が見られなかった個体の死亡を報告しており、さらなる検査法導入の必要性を言及している。そこで本研究では、鯨類の新たな健康評価法としてフィッシャー比の導入を考えたい。Figure 1-2にはバンドウイルカ、カマイルカ、ハナゴンドウ、オキゴンドウ、およびマウスのフィッシャー比を示した。それぞれの平均値および多くのサンプルが、ヒトにおける正常値 (2.4以上) (石井, 2007) の範囲内であり、鯨類の飼育管理にフィッシャー比を用いる場合、これまで報告されているフィッシャー比に関する知見を適応することが可能であると考えられる。そのため、フィッシャー比による肝機能評価や、Mutoら (2005) が肝硬変患者におけるBCAA補充の効果を報告したように、鯨類においても同様の効果が得られる可

能性は高い。

今回解析した鯨類のうち、12サンプルは2.4以下を示し、フィッシャー比の概念から言えば肝臓機能の低下が疑われる個体であった（石井, 2007）。一方、フィッシャー比を算出するために用いた血液サンプルは、各園館の獣医師と飼育員のHCBCおよび行動評価により健康であると見なされた個体から得ている。そのためWaplesとGales（2002）の報告にもあるように、HCBCや行動評価では検出されなかった肝機能の低下を、フィッシャー比が検知した可能性が考えられる。そのような個体に対して、BCAAを補充することによってフィッシャー比の是正を行うことは、より適切な飼育管理を可能にすると思われる。

#### 1-4-5 鯨類の必須アミノ酸の推測

アミノ酸による栄養学的評価を行う際、まず必要となるのは必須アミノ酸と非必須アミノ酸の分類である。必須アミノ酸は食物から摂取する必要があるため、人工飼育下において、必須アミノ酸の摂取は、飼育に関わっている人間にゆだねられている。しかしながら、これまで鯨類のアミノ酸に関する研究は行われておらず、鯨類における必須アミノ酸は全く不明である。そこで本研究では、鯨類の必須アミノ酸を推測するために、給餌の有無による血漿アミノ酸の変化を解析した。必須アミノ酸は完全に食物由来のため、制限されることにより血漿濃度の低下が見られ、給餌により上昇すると考えられる。

Figure 1-3において、変動の大きかった9種類のアミノ酸のうち、チロシンとタウリン以外の7種類がヒトにおける必須アミノ酸と同様であった。チロシンはフェニルアラニン

から合成されるが、幼少期や病的状況下などでは生体が必要とする量を合成できないため、準必須アミノ酸（条件付き不可欠アミノ酸）に分類されている。そのためチロシンは必要量を満たさなかったことにより、必須アミノ酸と同様の動態を示したものと考えられる。また、タウリンは動物種によっては必須であり、給餌の有無による影響を大きく受けたことから、鯨類においても必須アミノ酸である可能性は高い。以上のことより、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、タウリン、スレオニン、バリン は給餌の有無により血漿濃度に大きく変動が見られるため、鯨類における必須アミノ酸であることが示唆された。

KoppleとSwendseid（1975）が実験的に証明するまでヒスチジンは必須アミノ酸として扱われていなかった。高等動物においてはヒスチジンの体内分解速度は極めて遅く、再利用率が著しく高いため、Rose（1957）が行った実験においても、ヒスチジン欠乏条件で窒素出納が負にならなかった。本研究においても、ヒスチジンが他に比べてその変動が小さかったのは同様の理由が考えられ、鯨類においてもヒスチジンが必須アミノ酸である可能性は高い。今回の問題点として、給餌を行っていない群では、同一個体から経時的に採血を行っていないため、血漿アミノ酸の日内変動の傾向を示しているに過ぎない。しかし、給餌を行わずに同一個体から経時的に採血を行うことは技術的および倫理的に問題があり、現段階で行うことは現実的に不可能である。

給餌により血漿3-メチルヒスチジン濃度は有意に変化しなかったことから、鯨類の血漿中に高濃度に存在している3-メチルヒスチジンは、餌由来ではなくではなく内的要因に由来することが示された。

#### 1-4-6 性別および飼育形態の違いが血漿アミノ酸濃度へ及ぼす影響

プール飼育と生簀飼育で与えている餌に大きな違いがなく、両施設の水温および雌雄の比率は同様であるため、これらの偏りがアミノ酸組成の違いに影響を与えたとは考えづらい。性別、飼育形態の違いにより、血漿アミノ酸組成に差が見られた要因のひとつとして、運動量の違いが考えられる。運動によるアミノ酸必要量の違いが、血漿アミノ酸濃度に影響を与えたと考えられる。また、他の動物において、年齢による血漿アミノ酸濃度の変化が報告されており (Blazer-Yost and Jezyk, 1979)、鯨類でも年齢による血漿アミノ酸組成の違いは存在すると考えられる。しかし、飼育個体とはいえ、鯨類は主に野生下で捕獲され搬入されるため、正確な年齢把握は困難である。性別や成長段階、飼育環境などが異なれば、ホメオスタシスも一様ではなく、アミノ酸の需要と供給のバランスの違いが血漿アミノ酸組成に反映されたと考えられる。そのため、血漿アミノ酸を指標とした栄養評価を行い、性別や成長段階、飼育環境を考慮し、各個体に必要なアミノ酸が十分に摂取できるよう調餌やサプリメント投与を行うことは、鯨類の健康維持・増進にとって重要であると考えられる。

第1章では、バンドウイルカ、カマイルカ、ハナゴンドウ、オキゴンドウ、およびマウスの血漿アミノ酸濃度の解析を行った。その結果、鯨類では3-メチルヒスチジンが陸棲哺乳類と比較して、非常に高濃度で血漿中に存在することが明らかになった。また、マウスで検出されなかったカルノシンが4種類の鯨類では含まれることが明らかになった。3-メチルヒスチジンとカルノシンは強い抗酸化作用を持つことが知られている。これは

おそらく、水中生活への適応による進化の過程で生じた、生理学的変化のひとつであると考えられる。また、その他のアミノ酸を解析することにより、血漿BCAA濃度、フィッシャー比も明らかになった。医療の現場で用いられているこれらの指標を明らかにしたことで、鯨類の飼育管理にも応用できる。また、Noguchiら（2006）は血漿アミノ酸濃度を多彩なアルゴリズムに適応させることによって、様々な生理的・病的状態の診断への応用を提案しており、鯨類の健康管理においても有用であると考えられる。例えば、各施設で定期的に行っているHCBCに加え、血漿アミノ酸を測定することにより、健康状態の評価を行い、生体内バランスに変化が生じた際には、アミノ酸投与によりそのアンバランスを是正することによって、病的状態の改善を試みることも可能である。本章ではさらに、アミノ酸に関する栄養学的知見も得ることができた。今後、この知見を基に、種差や性別、成長段階、飼育環境の違いによるアミノ酸必要量を決定し、それに見合った調餌・サプリメント投与計画を立てることで、飼育個体の健康維持・増進、疾病予防、さらには長寿化に役立つことが期待される。

## 第2章 バンドウイルカの尿中遊離アミノ酸濃度の解析

### 2-1 はじめに

血中の遊離アミノ酸は腎糸球体で濾過され、多くが近位尿細管で再吸収されて血中に戻るが、再吸収されなかったアミノ酸は尿中へ排泄されており (Tanaka *et al.*, 1989)、アミノ酸プールが生体内で動的平衡を保つ上で腎臓が果たす役割は大きいと考えられる。そのため、筋タンパク質の消耗、代謝異常などにより血漿アミノ酸の増加・減少が生じた場合、尿中遊離アミノ酸 (以下, 尿中アミノ酸) も同様に増加・減少することが知られている (Tizianello *et al.*, 1980; Wassner *et al.*, 1980; Rennie and Millward, 1983; Nagasawa *et al.*, 1996)。また、腎機能により血漿アミノ酸濃度が影響を受けることも報告されており、健康なネコと比較して、慢性腎不全を患っているネコでは血漿アミノ酸に変化が見られ、これは腎クリアランスの変化により生じたものと考えられる (Goldstein *et al.*, 1999)。このように血漿アミノ酸と尿中アミノ酸には関連が見られる。

鯨類の腎臓は300-6,000個の小腎が集まってひとつの腎臓を形作っており、この形体は分葉腎と呼ばれている。また、海棲哺乳類の腎臓は他の哺乳類と比較して相対的に大きく、ネフロンに富んでおり、これはおそらく塩分を排泄するための機能だと考えられていた (Slijper, 1958) が、実際はそれほど高張尿を排泄するわけではない (Ortiz, 2001)。さらに、modification of diet in renal disease (MDRD) 法による推定糸球体濾過量 (estimated glomerular filtration rate; eGFR) によると、バンドウイルカのeGFRは、ヒトや他の哺乳類と類似しており、排泄能力に大きな違いはないものと考えられる (Venn-Watson *et al.*,

2008)。

運動や絶食、疾病などにより、筋タンパク質の分解が生じると3-メチルヒスチジンの血中への漏出が見られ、血漿3-メチルヒスチジン濃度は上昇する (Nagasawa *et al.*, 1996; Nakashima *et al.*, 2005; Akamatsu *et al.*, 2007)。筋タンパク質の分解により血中に放出された3-メチルヒスチジンは、そのほとんどが再吸収されず尿中に排泄され (Young *et al.*, 1972)、血漿と尿中3-メチルヒスチジン濃度に相関があることが知られている (Nagasawa *et al.*, 1996)。そのため、尿中3-メチルヒスチジンも血漿3-メチルヒスチジンと同様、筋タンパク質分解の指標として用いられている (Nagabhushan and Rao, 1976; Dohm *et al.*, 1982)。ヒトにおいて、血中に生じた3-メチルヒスチジンの95.5%は代謝を受けずに尿中に排泄されるが (Long *et al.*, 1975)、他にも次の二つの異なる動態を示す動物種が存在している。

ひとつは、体内で3-メチルヒスチジンがさらに代謝を受ける動物種である。ラットやマウスなどでは、3-メチルヒスチジンが代謝を受け、その代謝産物が尿中に排泄されることが報告されている (Tomas *et al.*, 1984; Murray *et al.*, 1985; Vissers *et al.*, 2003)。3-メチルヒスチジンはヒスチジン脱炭酸酵素により脱炭酸を受け3-メチルヒスタミンとなり、さらにモノアミン酸化酵素Bにより酸化され3-メチルイミダゾール酢酸となる。アイソトープによる実験から、ラット尿中の約27%は代謝を受けず3-メチルヒスチジンのまま排泄され、約70%は代謝を受けN-アセチル-3-メチルヒスチジンとなって排泄されることが明らかとなった (Murray *et al.*, 1985)。また、マウスでは性差が確認されており、オスでは約70%、メスでは約30%が代謝を受けず3-メチルヒスチジンとして排泄される (Murray



*et al.*, 1985)。

もうひとつに、イミダゾールジペプチドの一種であるバレニン<sup>1</sup>を体内に保持している動物種である。これらの動物はブタ、ヒツジ、ウサギなどが知られており、筋タンパク質の分解により生じた3-メチルヒスチジンは、尿中へ排泄するのではなく、保持することにより、新しく増大した筋組織中にバレニンを蓄積していく (Rathmacher *et al.*, 1996)。鯨類はその骨格筋に多くのバレニンを保有していることから (Suyama *et al.*, 1970; Harris and Milne, 1981; Harris and Milne, 1987)、3-メチルヒスチジンの再吸収を行っていることが推測される。体内の3-メチルヒスチジン動態を解析する場合、アイソトープ (3-<sup>[2</sup>H<sub>3</sub>] Methylhistidineなど) を用いて、コンパートメントモデルを構築する (Murray *et al.*, 1985; Rathmacher *et al.*, 1993; Rathmacher *et al.*, 1995; Rathmacher *et al.*, 1996)。しかし、コンパートメントモデルの構築には、対象個体への頻回におよぶ採血や、24時間にわたる全尿採取、骨格筋のバイオプシーが必要であるため、水中生活を行っている鯨類に適用することは不可能である。

カルノシンもバレニン同様、イミダゾールジペプチドの一種であり、骨格筋 (Bauer and Schulz, 1994; Bakardjiev and Bauer, 1994) や脳 (Horinishi *et al.*, 1978; Bauer *et al.*, 1982) などに存在している (Tsubone *et al.*, 2007)。また、カルノシンは血液脳関門を通過することも知られており (Jin *et al.*, 2005)、神経伝達もしくはモジュレーター作用 (Margolis, 1974; Sakai *et al.*, 1987; Bonfanti *et al.*, 1999)、抗酸化作用 (Kohen *et al.*, 1988)、神経保護作用 (Boldyrev *et al.*, 2004)、骨格筋における緩衝作用 (Davey, 1960) など、生体内で多様な機能を有していると考えられている (Tsubone *et al.*, 2007)。Gardnerら (1991) がヒトに

においてカルノシンの吸収後の動態を解析した結果、経口摂取されたカルノシンは、摂取2時間後に尿中への排泄ピークが見られ、その後は減少することを示し、5時間後までに、摂取されたカルノシンの14%が回収された。

生体内アミノ酸が動的平衡を保つ上で腎臓が果たす役割は大きく、尿中アミノ酸解析は鯨類における生理学的知見や、アミノ酸の体内動態に関する情報を得るために、重要であると考えられる。しかし、鯨類の尿中アミノ酸を解析した報告はこれまでにない。そこで本研究では、オペラント条件付けを利用し、ステージ上で自発的排尿が可能であるバンドウイルカから尿サンプルを採取し、尿中アミノ酸濃度の解析を行った。また、比較対照としてマウスの尿中アミノ酸濃度の解析を行うことにより、バンドウイルカにおける生理学的知見の獲得と、アミノ酸の体内動態の推測を目的とした。尿中アミノ酸濃度は、同時に解析を行ったクレアチニン値によって補正された。クレアチニンは主として骨格筋で産生された後、体内で代謝を受けることなく腎臓から排泄される。したがって、腎機能の急激な変化がなければ、クレアチニンは糸球体で濾過され尿中に排泄される。排泄量は体格に比例し、他の物質と同じく濃縮されるため、尿の濃縮の程度による濃度補正を行うことが可能である。

## 2-2 方法

### 2-2-1 バンドウイルカの採尿および解析方法

新潟市水族館マリンピア日本海（新潟県新潟市）で飼育されているバンドウイルカ（N = 3）は飼育員の指示によりステージ上で排尿が可能であり、採尿を行うことができる。採尿時間による変動を考慮し、採尿は13:00–15:00に行われた。得られた尿を遠心分離（2,000g, 5min）し、尿上清を分取した。除タンパク処理およびアミノ酸解析は第1章と同様である。解析されたアミノ酸は尿中クレアチニン値により補正された。尿中BCAA濃度は、尿中イソロイシン、ロイシン、バリン濃度の合計により求めた。

### 2-2-2 マウスの採尿および解析方法

マウスの飼育条件は第1章と同様である。採尿は2-2-1と同様、13:00–15:00に行った（N = 6）。尿サンプル処理および解析方法は2-2-1と同様である

### 2-2-3 尿中クレアチニン測定

#### a 試薬

1.0 g/dlピクリン酸（2, 4, 6-Trinitrophenol; TNP）

TNP（和光純薬工業株式会社，大阪）1gに約80mlの蒸留水を加えて加熱しながら溶解し、100mlに定容した。

## 1M水酸化ナトリウム (NaOH)

NaOH (和光純薬工業株式会社, 大阪) 2gを約40mlの蒸留水に溶解し、50mlに定容した。

## 1.0 mg/ml クレアチニン標準液

クレアチニン (和光純薬工業株式会社, 大阪) 100mgを0.1M塩酸溶液 (和光純薬工業株式会社, 大阪) で溶解し、100mlになるように定容した。使用時まで4°Cで保存した。

## b 測定手順

尿中クレアチニン測定には96穴マイクロプレート (EIA/RIA Plate, 96 well, No Lid, Flat Bottom, Certified High Binding, Non-Sterile, Polystyrene: Corning Incorporated, NY, USA) を使用したヤッフエ法を用いた。1.0 mg/mlクレアチニン標準液および尿は100倍希釈し、測定に用いた。10 µg/mlクレアチニン標準液、100倍希釈尿および蒸留水をそれぞれスタンダード (STD)、サンプルおよびブランク (BLK) とし、各2穴に120µlずつ添加した。次に、1.0 g/dl TNPおよび1M NaOHを40 µl/well加え攪拌した。室温で20分間静置した後、吸光度 (490nm) をマイクロプレートリーダー (Model 680: Bio-Rad Laboratories, CA, USA) を用いて測定した。尿中クレアチニン濃度 (mg/dl) は以下の式により求めた。

クレアチニン濃度 (mg/dl)

$$= (\text{サンプルの吸光度} - \text{BLKの吸光度}) / (\text{STDの吸光度} - \text{BLKの吸光度}) \times 100$$

#### 2-2-4 統計処理

重複して採尿を行った個体については、個体内における各アミノ酸の平均値を求め、当該個体のアミノ酸濃度として、各鯨類およびマウスの尿中アミノ酸濃度の平均値  $\pm$  S.E.の算出に用いた。尿中アミノ酸濃度はクレアチニン補正を行い、平均値  $\pm$  S.E. ( $10^{-2}$   $\mu\text{mol}/\text{mg creatinine}$ ) で表した (Table 2-1)。各アミノ酸濃度の解析において、検出限界以下を示したサンプルについては、平均値の算出および統計解析からは除外した。バンドウイルカとマウスの尿中クレアチニン濃度および尿中アミノ酸濃度の比較は、ランダム効果をバンドウイルカおよびマウス個体とした、GLMMを適用し、有意差 ( $p < 0.05$ ) は GLMM associated ANOVAにて評価した。

## 2-3 結果

バンドウイルカとマウスの尿中クレアチニン濃度はそれぞれ $77.01 \pm 15.81$  mg/dl、 $102.57 \pm 6.35$  mg/dlであり、有意差 ( $F[1, 15] = 3.13, p < 0.05$ ) があつた。尿の濃縮の程度に差が見られたため、尿中アミノ酸濃度はクレアチニン補正を行った。

Table 2-1にはクレアチニン補正を行った尿中アミノ酸濃度を示した。バンドウイルカの尿中で検出されなかつた、イソロイシンとトリプトファンを除く、25種類のアミノ酸濃度に有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められた。

バンドウイルカの尿中カルノシン濃度は、マウスと比較して、有意に高値を示した ( $F[1, 11] = 41.21, p < 0.05$ )。一方、カルノシンの基質である $\beta$ -アラニンとヒスチジン濃度は、バンドウイルカでは有意に低値を示した (それぞれ $F[1, 15] = 95.07, F[1, 15] = 20.49, p < 0.05$ )。

バンドウイルカの尿中3-メチルヒスチジン濃度は、マウスの尿中3-メチルヒスチジン濃度の約5分の1程度であり、有意に低値を示した ( $F[1, 15] = 8.95, p < 0.05$ )。また、マウスの尿中3-メチルヒスチジン濃度はオス ( $22.24 \pm 3.30 \times 10^{-2}$   $\mu\text{mol}/\text{mg creatinine}$ ) の方がメス ( $11.15 \pm 0.60 \times 10^{-2}$   $\mu\text{mol}/\text{mg creatinine}$ ) より約2倍高値を示した。これはMurrayら (1985) の報告と同様であり、マウスでは3-メチルヒスチジンは代謝されて排泄されていることが確認された。

尿中BCAA濃度は、バンドウイルカとマウスにおいて、それぞれ $5.68 \pm 0.36 \times 10^{-2}$   $\mu\text{mol}/\text{mg creatinine}$ 、 $48.86 \pm 6.19 \times 10^{-2}$   $\mu\text{mol}/\text{mg creatinine}$ であり、両者に有意差 ( $F[1, 15] = 23.72, p < 0.05$ ) が見られ、マウスでは高濃度を示した。

Table 2-1 バンドウイルカとマウスの尿中アミノ酸濃度

	バンドウイルカ (N = 3)	マウス (N = 6)
アラニン	4.61 ± 0.83 *	25.49 ± 2.16
β-アラニン	7.81 ± 1.90 *	33.42 ± 1.83
アルギニン	0.65 ± 0.19 *	12.56 ± 0.89
アスパラギン	4.21 ± 0.40 *	14.61 ± 1.04
アスパラギン酸	0.31 ± 0.16 *	4.27 ± 0.65
シスタチオン	3.62 ± 0.49 *	15.60 ± 1.02
システイン	7.37 ± 1.13 *	29.88 ± 5.10
グルタミン酸	1.60 ± 0.26 *	15.63 ± 0.82
グルタミン	7.79 ± 0.87 *	48.79 ± 3.36
グリシン	23.28 ± 3.26 *	68.91 ± 6.13
ヒスチジン	2.43 ± 0.14 *	7.73 ± 0.63
イソロイシン	N.D.	<sup>b</sup> 3.84 ± 0.65
ロイシン	1.31 ± 0.35 *	30.37 ± 4.75
リジン	2.24 ± 0.25 *	18.08 ± 1.60
メチオン	1.12 ± 0.11 *	20.78 ± 3.00
1-メチルヒスチジン	10.25 ± 1.90 *	21.25 ± 5.30
3-メチルヒスチジン	3.51 ± 0.11 *	16.69 ± 2.90
オルニチン	0.71 ± 0.06 *	11.35 ± 0.59
フェニルアラニン	0.55 ± 0.08 *	3.70 ± 0.19
プロリン	0.78 ± 0.08 *	10.06 ± 0.32
セリン	3.45 ± 0.17 *	20.78 ± 1.61
タウリン	1015.95 ± 147.49 <sup>*</sup>	1095.65 ± 133.53
スレオニン	9.27 ± 0.80 *	31.18 ± 2.17
トリプトファン	N.D.	<sup>a</sup> 0.29
チロシン	5.15 ± 0.98 *	17.32 ± 1.40
バリン	2.89 ± 0.35 *	16.57 ± 1.93
カルノシン	30.88 ± 9.87 *	<sup>b</sup> 0.96 ± 0.13

尿中アミノ酸濃度はクレアチニン値で補正し、平均値 ± S.E. ( $10^2 \mu\text{mol}/\text{mg creatinine}$ ) で示した。N.D.は検出されなかった (not detected) ことを示している。濃度左上のアルファベットは検出された個体数 (N) が異なることを示している (a = 1, b = 3)。\*はGLMM associated ANOVAにより、両群の比較に有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められたことを示す。

## 2-4 考察

第2章では、バンドウイルカとマウスの尿中アミノ酸濃度の解析を行った。その結果、比較を行った全てのアミノ酸濃度において、有意差が認められた。これまでの報告では、鯨類と陸棲哺乳類の排泄能力に大きな違いはないとされてきた (Venn-Watson *et al.*, 2008) が、少なくともアミノ酸に関しては大きな違いがあることが明らかとなった。その中でも、カルノシンは最も顕著な違いを示した。

カルノシンが血中に留まっている時間は短く (Begum *et al.*, 2005)、その生理作用は一過性である可能性が推測される。血中のカルノシンは速やかに1) 血中に存在する分解酵素に分解される、2) 尿中に排泄される、3) 骨格筋などに取り込まれる、と考えられている (Begum *et al.*, 2005)。また、経口から摂取されたカルノシンは尿中に排泄されることも報告されている (Gardner *et al.*, 1991)。しかしながら、鯨類が餌としている魚類にはカルノシンがほとんど含まれていないこと (Suyama *et al.*, 1970) を考えると、鯨類に見られた高濃度の尿中カルノシンが餌由来であることは考えづらい。そのため、鯨類における、高濃度の尿中カルノシンは、餌由来ではなく、主に血中に存在するカルノシンが排泄された結果である可能性が高い。一方、マウスでは血中に加え、腎臓にもカルノシン分解酵素が存在することが知られており (Margolis *et al.*, 1979; Begum *et al.*, 2005)、カルノシンは分解酵素により、 $\beta$ -アラニンとヒスチジンに分解される (Begum *et al.*, 2005)。バンドウイルカの尿中カルノシン、 $\beta$ -アラニン、ヒスチジン濃度の結果より、バンドウイルカではこれら分解酵素活性が低いか、もしくは全くないという可能性が考えられる。

バンドウイルカの尿中3-メチルヒスチジン濃度はマウスと比較して低値であり、これ



までに報告されている陸棲哺乳類の尿中3-メチルヒスチジン濃度 (Young and Munro, 1978; Blazer-Yost and Jezyk, 1979; Rathmacher *et al.*, 1995; Rathmacher *et al.*, 1996) と比較しても、非常に低値である。第1章で鯨類の血漿3-メチルヒスチジン濃度は非常に高値を示したにもかかわらず、尿中3-メチルヒスチジン濃度が非常に低値を示したことは興味深い。その理由のひとつに、バレニンの存在が関連していると思われる。

ブタやヒツジ、ウサギといった動物は筋組織中にバレニンを有し (Suyama *et al.*, 1970; Harris and Milne, 1981; Harris and Milne, 1987)、3-メチルヒスチジンの再吸収によって合成を行っている (Rathmacher *et al.*, 1996)。鯨類もバレニンを多く保有しており (Suyama *et al.*, 1970)、バンドウイルカに見られた尿中3-メチルヒスチジンの低値は、再吸収が起きた結果だと考えられる。しかし、その再吸収の程度は大きく、例えば陸棲哺乳類の中で、筋組織中に多くバレニンを保有しているブタでさえ、尿中3-メチルヒスチジン濃度は  $0.22 \pm 0.01 \mu\text{mol}/\text{mg creatinine}$  (Rathmacher *et al.*, 1996) と、バンドウイルカの約6.3倍高値を示す。そのため鯨類において、再吸収された3-メチルヒスチジンは、バレニン合成以外にも生体内で重要な役割を果たしていると考えられ、そのひとつとして、第1章で考察した抗酸化作用が考えられる。すなわち、酸化作用による影響が大きい骨格筋中の3-メチルヒスチジン濃度を解析することにより、3-メチルヒスチジンと酸化に関して、さらなる理解が得られると思われる。

血漿ではその濃度に有意な差が見られなかったBCAAであるが、バンドウイルカの尿中では、マウスと比較して有意に低値を示した。これはバンドウイルカとマウスのBCAA再吸収能の違いに起因するものだと考えられる。再吸収されたBCAAは体内に保持され

ると考えられるが、第1章で血漿濃度に差が見られなかったことより、組織中に取り込まれている可能性が高い。ヒトにおいて、BCAA投与により骨格筋中BCAA濃度が上昇し、骨格筋から放出される必須アミノ酸量の減少が見られ、筋タンパク質の分解が抑制されることが示されている (MacLean *et al.*, 1994)。また、BCAAは骨格筋においてエネルギー源となることもわかっている (Platell *et al.*, 2000)。したがって、バンドウイルカにおいて再吸収されたBCAAは骨格筋中に取り込まれ、筋タンパク質の分解抑制やエネルギー源としての役割を果たしていると推察される。鯨類は索餌や呼吸などの生命維持、社会的交渉や繁殖などのために長い距離を泳ぎ (中島, 2006)、潜水と浮上を繰り返している。そのため、鯨類にとって筋タンパク質分解を最小限に抑制することや、エネルギー源を確保することは、種の繁栄にとって必要不可欠であったと考えられる。

### 第3章 鯨類の骨格筋、皮膚、および腸管中遊離アミノ酸濃度の解析

#### 3-1 はじめに

鯨類は索餌や呼吸などの生命維持、社会的交渉や繁殖などのために長い距離を泳ぎ(中島, 2006)、潜水と浮上を繰り返している。バンドウイルカは水深90m付近で最も中性浮力が得られ、引力と浮力のバランスが取れた状態となる (Skrovan *et al.*, 1999)。潜水時には引力がかかるため比較的容易に潜ることが可能であるが、浮上時にも同様に引力はかかり、それに逆らう力が必要となる (Skrovan *et al.*, 1999)。これらのことより、鯨類が通常行っている筋運動は陸棲哺乳類とは比較にならないほどの仕事量であると考えられる。そのため、鯨類には抗疲労機序が存在していることが容易に想像できる。中島 (2006) は、鯨類の骨格筋に豊富に含まれているバレニンとカルノシンに抗疲労効果があるとの仮説を提唱し、マウスへの投与により遊泳時間の延長および懸垂スコアの上昇が見られ、筋疲労に対する効果が明らかになった。また、カルノシンの基質であるβ-アラニンの投与により骨格筋中のカルノシンに増加が見られ、それに伴い総仕事量が増加することも報告されている (Hill *et al.*, 2007)。

無機リン酸 (inorganic phosphate; Pi) の蓄積が筋疲労の原因のひとつであることは、Dawsonら (1978) によって指摘されており、その後の研究から、Piの濃度が増加すると、ミオシンATPase活性の最大値あるいは筋原線維のCa<sup>2+</sup>に対する感受性などが低下することが明らかとなった (Vandenboom, 2004)。また、骨格筋では、Ca<sup>2+</sup>濃度の調節は筋小胞体により行われているが、Piは筋小胞体の機能も抑制することが示唆されている (Duke

and Steele, 2000; Dutka *et al.*, 2005)。カルノシンは、筋小胞体のカルシウムチャネルへのCa<sup>2+</sup>親和性の亢進や再取り込みの亢進などにより、抗疲労作用を持つことが知られている (Begum *et al.*, 2005)。

筋疲労が起こるその他の要因として、ROSの関与も知られ (和田ら, 2006)、抗酸化物質により筋疲労が改善することも知られている (Reid, 2008)。ROS暴露により筋疲労が生じた骨格筋では、ミオシンに構造的な変化が起こっており、ミオシン重鎖の酸化が報告されている (Yamada *et al.*, 2006)。酸化の影響についてLoweら (2001) は、ミオシン頭部には収縮機能に重要な役割を果たすスルフヒドリル基が数個存在し、これらが酸化されると、アクチンと強く結合するミオシン頭部の数が減少することを示した。骨格筋中のカルノシンは抗酸化作用を持っており (Kohen *et al.*, 1988)、これによっても抗疲労効果を発揮することが明らかになってきた (Begum *et al.*, 2005)。

海棲哺乳類やペンギン科など、生命維持のために水中に深く長く潜ることを要求される動物は、陸棲哺乳類よりも優れた酸素貯蔵能力を持っている。彼らの骨格筋にはミオグロビンが豊富に含まれており、約30–50%の酸素を筋中に保有している (Kooyman and Ponganis, 1998)。ミオグロビンを豊富に含む骨格筋は強い赤色を呈するため赤筋と呼ばれ、ミオグロビンが乏しい速筋線維と比較して、持久力があり収縮速度が遅いので遅筋線維とも呼ばれている。一般的に哺乳動物のミオグロビンは約150個のアミノ酸残基からなるタンパク質であり、その中にはヒスチジン残基が多く含まれ (四釜ら, 2001)、酸素結合能にヒスチジン残基が関連することが知られている (Phillips and Schoenborn, 1981)。ミオグロビンに酸素が結合した状態のオキシミオグロビンは決して安定ではなく、活性

中心のヘム鉄が容易に酸化され、その際にROSを放出する (Shikama, 1998)。また潜水時は、骨格筋などの好氣的代謝に依存している臓器や組織において、急激な血流量の制限を受け、無酸素／再酸素化および虚血再灌流によって、さらに多くのROSが発生する (Filho *et al.*, 2002)。ROSは酸素分子 ( $O_2$ ) 由来の分子種で、 $O_2$ が還元されて生じるスーパーオキシドや過酸化水素などが含まれる。一般的に、生体内のROSは、主として代謝系の副産物であると考えられている。ROSは殺菌作用や、生体内のシグナル伝達分子としての作用などを有しているが、過度のROS曝露は細胞障害や癌化の原因など、生体にとって毒性を示すため、生体には抗酸化機構が備わっている。

抗酸化物質としてはビタミン等が広く知られているが、Kohenら (1988) はカルノシンと並び、ヒスチジン、3-メチルヒスチジンにも抗酸化作用を持つことを示した。また、バレニンもカルノシンと同じイミダゾールジペプチドであり、その構造内に3-メチルヒスチジンを含有しているため、同様に抗酸化作用を持っていると考えられる。潜水性の動物は体内に多くの抗酸化物質を含んでいることが解明されつつあり (Filho *et al.*, 2002)、鯨類の骨格筋内には抗酸化作用を持つカルノシンが豊富に含まれることが知られている (Suyama *et al.*, 1970; Harris and Milne, 1981; Harris and Milne, 1987) が、アミノ酸に関しては未だ情報がない。

第1章において、鯨類では血漿3-メチルヒスチジンが陸棲哺乳類と比較して非常に高濃度であることが示された。これまで報告されているように、骨格筋は主要な3-メチルヒスチジンの産生・貯蔵場所であり、血漿3-メチルヒスチジンの多くは骨格筋に由来している (Young *et al.*, 1972; Afting *et al.*, 1981; Harris, 1981; Wassner and Li, 1982; Millward and

Bates, 1983; Brenner *et al.*, 1987; Nagasawa *et al.*, 1996; Rathmacher *et al.*, 1996; Nakashima *et al.*, 2005)。3-メチルヒスチジンは骨格筋において、速筋線維に存在するミオシン重鎖の球状頭部と、アクチンポリペプチドの73番目に存在するヒスチジン残基が、翻訳後にメチル化されることにより産生される (Elzinga *et al.*, 1973; Young and Munro, 1978)。一方、胎児の骨格筋のミオシンや心筋、遅筋線維では欠くことが報告されている (Kuehl and Adelstein, 1970)。鯨類の骨格筋にも、速筋線維が含まれていることも知られており (Dearolf *et al.*, 2000)、鯨類においても、陸棲哺乳類と同様、3-メチルヒスチジンは骨格筋で産生されていると考えられる。そのため、鯨類体内における3-メチルヒスチジンの由来を明らかにするために、骨格筋のアミノ酸解析を行うことは必要である。鯨類の3-メチルヒスチジンは、わずかながら皮膚や腸管にも由来することが確認されているので、皮膚や腸管中の濃度も検討する必要があるだろう。

持久的な運動時には、骨格筋の筋タンパク質分解が亢進する。BCAA摂取において、運動中の筋タンパク質分解抑制効果が認められている (MacLean *et al.*, 1994)。また、BCAAは骨格筋においてエネルギー源となることもわかっている (Platell *et al.*, 2000)。鯨類に見られる持久的な運動を可能にするためには、抗疲労作用や筋タンパク質分解抑制作用、筋運動を行うためのエネルギー源は必要不可欠である。第1章・第2章の結果より、鯨類はBCAAを多く骨格筋に貯蔵していると予想された。さらに運動時において、腸管はBCAAの供給源として重要な役割を担っていることが示唆されている (Millward *et al.*, 1994; Hamada *et al.*, 1999)。

本章では、骨格筋中、皮膚中、腸管中遊離アミノ酸 (以下、骨格筋中、皮膚中、腸管中

アミノ酸) を解析するために、水族館で死亡したバンドウイルカおよびストランドイングにより死亡したバンドウイルカの骨格筋および皮膚、ならびにハナゴンドウの骨格筋、腸管、および皮膚を用いた。陸棲哺乳類動物としてマウスを比較対照とし、同時にマウスの骨格筋、腸管、および皮膚のアミノ酸解析も行った。それにより、潜水性の動物である鯨類が保有している抗酸化作用へのアミノ酸の寄与と、鯨類における3-メチルヒスチジンの由来を解明する一助となる。また、抗疲労作用、筋タンパク質分解抑制作用やエネルギー源として、鯨類の持続的な運動を可能にする要因のひとつとして、カルノシンやBCAAの寄与を示唆することができると考えられる。

## 3-2 方法

### 3-2-1 鯨類の骨格筋、皮膚、および腸管サンプル採取

バンドウイルカの骨格筋（最長筋：*musculus longissimus*）（n = 8）および皮膚（n = 9）、ハナゴンドウの骨格筋（最長筋：*musculus longissimus*）（n = 1）、皮膚（n = 1）、および腸管（起始部、中間部、および末端部）（N = 1）は、国立科学博物館（東京都新宿区）ならびに横浜・八景島シーパラダイス（神奈川県横浜市）より分与された。各臓器はデッドストランディング個体、もしくは水族館死亡個体である。

### 3-2-2 マウスの骨格筋、皮膚、および腸管サンプル採取

マウスの飼育条件は第1章と同様である。頸椎脱臼による安楽死後、骨格筋（最長筋：*musculus longissimus*）、皮膚（剃毛処理済）、腸管（小腸および大腸）を採取した。

### 3-2-3 骨格筋中、皮膚中、および腸管中アミノ酸解析

骨格筋、皮膚、および腸管の処理は株式会社日立ハイテクノロジーズ（東京都港区）の方法に従った（Hitachi High-Technologies Corporation, 2007）。各臓器1gに蒸留水を約8ml加え、ホモジナイズした後、10mlに定容した。懸濁液を遠心分離（3,500g, 10min, 4°C）し、上清 I を得た。上清 I 500μlに10%TCA 1mlを加え攪拌し、遠心分離（10,000rpm, 10min, 4°C）により上清 II を得た。上清 II 500μlをn-ヘキサン500μlと混和し遠心分離（10,000rpm, 10min, 4°C）後、水層をDisposable Syringe Filter Unit（13HP020A: ADVANTEC, Tokyo, Japan）を用いて濾過しサンプルとした。サンプルは解析が行われるまで-80°Cで保存した。解



析は第1章と同様である。骨格筋および腸管中BCAA濃度は、骨格筋および腸管中イソロイシン、ロイシン、バリン濃度の合計により求めた。

#### 3-2-4 統計処理

各鯨類およびマウスの骨格筋、皮膚、腸管中アミノ酸濃度 (mg/g tissue) を平均値  $\pm$  S.E. で表した (Table 3-1, 3-2, 3-3)。各アミノ酸濃度の解析において、検出限界以下を示したサンプルについては、平均値の算出および統計解析からは除外した。バンドウイルカとマウスの骨格筋および皮膚中アミノ酸濃度の比較には、ウェルチのt検定を用いた。重複して採取を行ったハナゴンドウの腸管については、個体内における平均値を各アミノ酸濃度とした。ハナゴンドウとマウスの腸管中アミノ酸濃度の比較は、ランダム効果をハナゴンドウおよびマウス個体とした、GLMMを適用し、有意差 ( $p < 0.05$ ) はGLMM associated ANOVAにて評価した。

### 3-3 結果

#### 3-3-1 骨格筋中アミノ酸濃度

Table 3-1にはバンドウイルカ、ハナゴンドウ、マウスの骨格筋中アミノ酸濃度を示した。ハナゴンドウとマウスにおいて、システインと1-メチルヒスチジンは検出されなかった。またマウスにおいて、筋中3-メチルヒスチジンは、6サンプル中1サンプルしか検出されなかった。これら以外のアミノ酸（24種類）のうち、バンドウイルカとマウスの比較において、19種類（約80%）のアミノ酸濃度に有意差（ $p < 0.05$ ）が認められた。

バンドウイルカとハナゴンドウの骨格筋中カルノシン濃度は、マウスの骨格筋中カルノシン濃度と比較して、どちらも約50倍高値を示し、有意差（ $p < 0.05$ ）が見られた。

バンドウイルカの骨格筋中 $\beta$ -アラニンとヒスチジン濃度はマウスの骨格筋中濃度と比較して、どちらも有意に高値を示した（ $p < 0.05$ ）。ハナゴンドウの骨格筋中 $\beta$ -アラニンとヒスチジン濃度もマウスより高値を示した。

骨格筋中3-メチルヒスチジン濃度は、バンドウイルカとハナゴンドウにおいて、マウスと比較して高値を示した。また、ハナゴンドウの骨格筋中3-メチルヒスチジンよりも、バンドウイルカの骨格筋中3-メチルヒスチジンは約3倍高濃度を示した。

バンドウイルカ（ $10.37 \pm 1.79 \mu\text{mol/g tissue}$ ）の骨格筋中BCAA濃度は、マウス（ $1.34 \pm 0.08 \mu\text{mol/g tissue}$ ）と比較して、有意に高値を示した（ $p < 0.05$ ）。ハナゴンドウは $5.44 \mu\text{mol/g tissue}$ でマウスより高濃度を示した。バンドウイルカとハナゴンドウでは、BCAAを骨格筋中に豊富に含んでいることが明らかになった。

Table 3-1 バンドウイルカ、ハナゴンドウ、マウスの骨格筋中アミノ酸濃度

	バンドウイルカ (n = 8)	ハナゴンドウ (n = 1)	マウス (n = 6)
アラニン	11.54 ± 1.20 *	10.15	3.82 ± 0.10
β-アラニン	0.49 ± 0.05 *	0.57	<sup>c</sup> 0.24 ± 0.01
アルギニン	1.44 ± 0.34	0.87	0.94 ± 0.11
アスパラギン	0.99 ± 0.20 *	0.71	0.25 ± 0.02
アスパラギン酸	0.92 ± 0.27 *	0.30	0.23 ± 0.02
シスタチオニン	0.11 ± 0.02 *	0.07	<sup>d</sup> 0.07 ± 0.01
システイン	<sup>b</sup> 0.12 ± 0.04	N.D.	N.D.
グルタミン酸	2.88 ± 0.61 *	1.22	1.02 ± 0.03
グルタミン	3.54 ± 0.62	2.30	2.96 ± 0.21
グリシン	3.86 ± 0.36 *	3.10	5.52 ± 0.35
ヒスチジン	1.40 ± 0.19 *	1.07	0.36 ± 0.04
イソロイシン	1.98 ± 0.33 *	1.18	0.28 ± 0.02
ロイシン	4.89 ± 0.94 *	2.44	0.39 ± 0.03
リジン	2.65 ± 0.54	1.84	2.41 ± 0.33
メチオニン	1.20 ± 0.22 *	0.52	0.20 ± 0.01
1-メチルヒスチジン	<sup>d</sup> 0.12 ± 0.02	N.D.	N.D.
3-メチルヒスチジン	1.20 ± 0.07	0.45	<sup>a</sup> 0.09
オルニチン	0.58 ± 0.37	0.38	0.09 ± 0.01
フェニルアラニン	2.20 ± 0.40 *	1.16	0.26 ± 0.01
プロリン	1.21 ± 0.40	1.66	0.27 ± 0.10
セリン	2.89 ± 0.47 *	2.08	0.93 ± 0.04
タウリン	11.81 ± 4.90 *	4.35	64.71 ± 2.38
スレオニン	2.37 ± 0.37 *	1.70	0.78 ± 0.04
トリプトファン	0.61 ± 0.12 *	0.82	0.21 ± 0.04
チロシン	1.43 ± 0.24 *	0.88	0.25 ± 0.01
バリン	3.50 ± 0.59 *	1.82	0.66 ± 0.04
カルノシン	66.91 ± 5.02 *	69.58	1.35 ± 0.20

骨格筋中アミノ酸濃度は平均値 ± S.E. (μmol/g tissue) で示した。N.D.は検出されなかった (not detected) ことを示している。濃度左上のアルファベットは検出されたサンプル数 (n) が異なることを示している (a = 1, b = 2, c = 3, d = 4)。\* はマウスとの比較により、各アミノ酸で有意差 (p < 0.05) が認められたことを示す。

### 3-3-2 皮膚中アミノ酸濃度

Table 3-2にはバンドウイルカ、ハナゴンドウ、マウスの皮膚中アミノ酸濃度を示した。ハナゴンドウとマウスにおいて、 $\beta$ -アラニン、カルノシン、システイン、1-メチルヒスチジンは検出されなかった。加えて、ハナゴンドウにおいてはアスパラギンも検出されなかった。また、バンドウイルカではアスパラギンが9サンプルのうち、マウスでは3-メチルヒスチジンは6サンプルのうち、1サンプルからしか検出されなかった。これら以外のアミノ酸（21種類）のうち、バンドウイルカとマウスの比較において、12種類（約60%）のアミノ酸濃度に有意差（ $p < 0.05$ ）が認められた。

バンドウイルカの皮膚中3-メチルヒスチジンの濃度は、マウスと比較して約45倍高濃度の3-メチルヒスチジンが含まれることが示された。

Tabel 3-2 バンドウイルカ、ハナゴンドウ、マウスの皮膚中アミノ酸濃度

	バンドウイルカ (n=9)	ハナゴンドウ (n=1)	マウス (n=6)
アラニン	11.34 ± 1.79 *	5.70	2.68 ± 0.14
β-アラニン	<sup>e</sup> 1.31 ± 0.65	N.D.	N.D.
アルギニン	<sup>e</sup> 0.52 ± 0.10	0.20	0.72 ± 0.03
アスパラギン	<sup>a</sup> 0.70	N.D.	<sup>b</sup> 0.31 ± 0.04
アスパラギン酸	0.67 ± 0.09 *	0.20	0.35 ± 0.03
シスタチオニン	<sup>e</sup> 0.31 ± 0.04 *	0.41	0.16 ± 0.02
システイン	<sup>c</sup> 0.27 ± 0.06	N.D.	N.D.
グルタミン酸	2.14 ± 0.47	2.35	1.59 ± 0.09
グルタミン	<sup>d</sup> 1.04 ± 0.25 *	0.14	2.20 ± 0.20
グリシン	5.92 ± 1.11	5.77	3.74 ± 0.05
ヒスチジン	1.19 ± 0.14 *	0.83	0.35 ± 0.04
イソロイシン	1.02 ± 0.21 *	0.25	0.42 ± 0.02
ロイシン	1.96 ± 0.36 *	0.62	0.68 ± 0.03
リジン	2.02 ± 0.31 *	0.65	1.26 ± 0.09
メチオニン	0.59 ± 0.09 *	0.22	0.32 ± 0.02
1-メチルヒスチジン	<sup>d</sup> 0.32 ± 0.06	N.D.	N.D.
3-メチルヒスチジン	5.57 ± 1.14	1.44	<sup>a</sup> 0.12
オルニチン	<sup>e</sup> 0.86 ± 0.25	0.20	0.60 ± 0.04
フェニルアラニン	1.46 ± 0.23 *	0.82	0.47 ± 0.02
プロリン	1.09 ± 0.45	0.37	0.45 ± 0.20
セリン	<sup>e</sup> 2.21 ± 0.37	0.31	2.33 ± 0.10
タウリン	14.39 ± 2.47	9.15	14.69 ± 0.62
スレオニン	1.06 ± 0.25	0.32	0.78 ± 0.03
トリプトファン	0.39 ± 0.14	0.25	0.32 ± 0.06
チロシン	0.85 ± 0.14 *	0.26	0.51 ± 0.02
バリン	3.13 ± 0.52 *	1.01	1.28 ± 0.07
カルノシン	2.81 ± 0.78	N.D.	N.D.

皮膚中アミノ酸濃度は平均値 ± S.E. (μmol/g tissue) で示した。N.D.は検出されなかったことを示している。濃度左上のアルファベットは検出されたサンプル数 (n) が異なることを示している (a=1, b=2, c=3, d=7, e=8)。\*はマウスとの比較により、各アミノ酸で有意差 (p < 0.05) が認められたことを示す。

### 3-3-3 腸管中アミノ酸濃度

Table 3-3にはハナゴンドウとマウスの腸管中アミノ酸濃度を示した。1-メチルヒスチジンはどちらにおいても検出されなかった。これ以外のアミノ酸（26種類）において、11種類（約40%）のアミノ酸濃度に有意差（ $p < 0.05$ ）が認められた。

ハナゴンドウの腸管中3-メチルヒスチジン濃度は、マウスと比較して有意に高値を示した（ $F[1, 4] = 434.88, p < 0.05$ ）。

腸管中BCAA濃度は、ハナゴンドウとマウスで、それぞれ $23.36 \mu\text{mol/g tissue}$ 、 $30.83 \pm 2.59 \mu\text{mol/g tissue}$ であり、有意差は認められなかった（ $F[1, 7] = 434.88$ ）。

Table 3-3 ハナゴンドウとマウスの腸管中アミノ酸濃度

	ハナゴンドウ (N = 1)	マウス (N = 6)
アラニン	23.71	17.45 ± 1.35
β-アラニン	0.82 *	<sup>c</sup> 0.20 ± 0.01
アルギニン	0.36 *	9.77 ± 1.34
アスパラギン	0.83 *	3.71 ± 0.29
アスパラギン酸	4.05	5.93 ± 0.45
シスタチオニン	0.07	0.09 ± 0.01
システイン	0.15	0.47 ± 0.15
グルタミン酸	16.74	14.41 ± 0.94
グルタミン	4.36 *	6.73 ± 0.46
グリシン	9.95	17.08 ± 1.17
ヒスチジン	3.24	2.48 ± 0.18
イソロイシン	5.17	5.65 ± 0.46
ロイシン	9.06	11.35 ± 0.99
リジン	8.01	11.51 ± 3.42
メチオニン	3.30	3.88 ± 0.37
1-メチルヒスチジン	N.D.	N.D.
3-メチルヒスチジン	0.48 *	<sup>b</sup> 0.07 ± 0.01
オルニチン	4.69 *	1.34 ± 0.31
フェニルアラニン	4.62	5.64 ± 1.24
プロリン	3.15	6.18 ± 0.53
セリン	1.79 *	11.87 ± 0.95
タウリン	12.86 *	40.95 ± 1.61
スレオニン	3.36 *	7.05 ± 0.54
トリプトファン	0.61 *	1.09 ± 0.23
チロシン	1.77 *	4.98 ± 1.18
バリン	9.13	8.14 ± 0.64
カルノシン	0.23	<sup>a</sup> 0.29 ± 0.02

腸管中アミノ酸濃度は平均値 ± S.E. (μmol/g tissue) で示した。N.D.は検出されなかったことを示している。濃度左上のアルファベットは検出された個体数 (N) が異なることを示している (a = 2, b = 3, c = 4)。\*は GLMM associated ANOVAにより、両群の比較に有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められたことを示す。

### 3-4 考察

バンドウイルカとハナゴンドウの骨格筋において、カルノシンおよびその基質であるβ-アラニンとヒスチジンが、マウスと比較して高濃度に含まれていることが明らかになった。そのため、バンドウイルカとハナゴンドウの骨格筋ではカルノシンの合成が盛んに行われていると考えられる。抗疲労作用を持つカルノシンと、その基質を骨格筋中に豊富に含んでいることは、鯨類の持久的な運動を可能にしている要因のひとつであると考えられる。このことは、水中生活を行う鯨類にとって、生命維持や種の繁栄に大きく寄与していると考えられる。

鯨類は豊富にヘモグロビンやミオグロビンを持つことにより、体内に多くの酸素を貯蔵することを可能にし、水中生活に適応してきた。しかし、一方では、酸素を多く貯蔵することにより、酸化反応およびROSへの曝露による危険性を増大させる結果となった (Filho *et al.*, 2002)。ROSは筋疲労に関わるだけでなく、細胞障害などの毒性も示す。また、ヘモグロビンやミオグロビンの酸化は、酸素結合能を減退させるため、生体内での酸化反応の亢進は致命的である。そのため、これらのアミノ酸による抗酸化機序は、生体内での酸化反応およびROSへの曝露による危険性を最小限に抑制し、生命維持や種の保存に貢献していると考えられる。バンドウイルカとハナゴンドウの骨格筋中3-メチルヒスチジン濃度の違いは運動量の違いに起因していると考えられる。一般的にバンドウイルカの方が、ハナゴンドウよりも活動量が多く、ROS産生が盛んであり、抗酸化作用を持つ3-メチルヒスチジンが骨格筋中に豊富に含まれていることが推測される。

鯨類の体内において、3-メチルヒスチジンは抗酸化作用により重要な役割を果たして



いることが示唆された。陸棲哺乳類において、血漿3-メチルヒスチジンは皮膚や腸管からわずかに由来し、多くは骨格筋に由来している (Wassner and Li, 1982; Millward and Bates, 1983; Brenner *et al.*, 1987; Emery and Preedy, 2003)。バンドウイルカおよびハナゴンドウの骨格筋と皮膚、ハナゴンドウの腸管中アミノ酸を解析した結果、いずれもマウスより高濃度の3-メチルヒスチジンを含んでいた。そのため、鯨類においても陸棲哺乳類同様、血漿3-メチルヒスチジンは主に骨格筋に由来し、皮膚や腸管由来の血漿3-メチルヒスチジンも存在すると推察される。

骨格筋中BCAA濃度の結果より、鯨類は骨格筋にBCAAを豊富に貯蔵することにより、筋タンパク質抑制やエネルギー源に利用していると考えられる。このことは、カルノシンの抗疲労作用と同様、鯨類の持久的な筋運動に大きく寄与していると考えられる。また、バンドウイルカの骨格筋中BCAA濃度は、ハナゴンドウの骨格筋中BCAA濃度の約2倍であった。両者はほぼ同じくらいの体形であるが、活動量はバンドウイルカの方が多。そのため、骨格筋中BCAA濃度も高値を示したのかもしれない。一方、ハナゴンドウとマウスの腸管中BCAA濃度に大きな差は認められなかったことより、陸棲哺乳類同様、鯨類の腸管はBCAAの供給源としての役割を持っていると考えられるが、陸棲哺乳類ほどの寄与はないものと予想される。

以上の結果から、鯨類における血漿3-メチルヒスチジンの由来も骨格筋、皮膚、腸管である可能性が示された。骨格筋中に多く含まれていた3-メチルヒスチジンとカルノシンは、抗酸化作用を有している物質として知られており (Kohen *et al.*, 1988)、カルノシンには抗疲労作用を持つことも確認されている (Begum *et al.*, 2005)。また、骨格筋中に

はBCAAも豊富に含まれており、筋タンパク質分解抑制やエネルギー源としての役割を果たしていると考えられる。以上のことは、鯨類の骨格筋における抗酸化能力や運動能力には、3-メチルヒスチジンやヒスチジン、 $\beta$ -アラニン、BCAA、カルノシンといったアミノ酸の寄与が大きいことを強く示唆するものである。

## 第4章 総合考察

鯨類の血漿、尿、骨格筋中アミノ酸濃度において、マウスと比較したところ、特に興味深い分布を示したカルノシン、 $\beta$ -アラニン、ヒスチジン、3-メチルヒスチジン、およびBCAAの濃度をTable 4-1に示した。

Table 4-1 マウスとの比較による鯨類のアミノ酸分布の特徴

	血漿	尿	骨格筋
3-メチルヒスチジン	High	Low	High
BCAA	NS	Low	High
カルノシン	High	High	High
$\beta$ -アラニン	NS	Low	High
ヒスチジン	NS	Low	High

Highはバンドウイルカが高濃度を示したことを表している。NSは濃度に有意差が認められなかったことを表している。Lowはバンドウイルカが低濃度を示したことを表している。

### 4-1 3-メチルヒスチジン

陸棲哺乳類において、3-メチルヒスチジンは筋タンパク質分解の指標として、広く利用されている。筋タンパク質分解により血中に漏出したこのアミノ酸のほとんどは、尿中に排泄され、再利用されることはない。しかし、鯨類では、尿中への排泄はわずかで、その大半が再吸収され、結果的に陸棲哺乳類の50倍以上の濃度で血中に維持されている。3-メチルヒスチジンは、抗酸化作用を有することが知られていることから、次のような

進化が考えられる。海棲哺乳類は酸素を効率よく取り込み、かつ保持しなくてはならない。鯨類も同様であり、多量のアミノ酸などによって代謝に必要なときまで酸素分子を貯蔵しなければならない。しかし同時に、酸素の持つ酸化作用や、代謝過程で発生するROSを極力抑える必要がある。3-メチルヒスチジンの動態は、まさにその抗酸化作用に関わるものである。鯨類の持続的な運動によって、血中に分解された3-メチルヒスチジンは、わずかに排泄されるのみで、再吸収により血中に高濃度で維持され、酸化反応やROSを抑制しているのである。この巧みな生理機構を持って、鯨類は海に適応したのであろう。

#### 4-2 BCAA

鯨類はBCAAの尿中への排泄を抑制し、骨格筋中に積極的に取り込んでいる可能性が高いことが示唆された。鯨類は、生命維持や種の繁栄などのために持続的な運動が要求される。骨格筋中BCAAは筋タンパク質分解の抑制およびエネルギー源としての作用を持っており、鯨類における持続的な運動を可能にする要因のひとつとして寄与していると考えられる。

#### 4-3 カルノシン

カルノシンは、腸管から吸収されるか骨格筋から放出され、一度血中に入るが、血中に存在している時間は短く、血中のカルノシンは速やかに、1) 血中の分解酵素に分解される、2) 尿中に排泄される、3) 骨格筋などに取り込まれる、と考えられている (Begum

*et al.*, 2005)。また、カルノシンの経口投与により、一時的な知覚障害を数人が訴えた (Gardner *et al.*, 1991) こと、ヒヨコへの過剰投与により、異常興奮行動を示した (Tomonaga *et al.*, 2004) ことを考えると、過剰なカルノシンは生体にとって有害であると考えられている (Begum *et al.*, 2005)。以上のことより、鯨類の体内ではカルノシン合成が盛んに行われ、生体内での生理作用の後、速やかに尿中に排泄される必要があったため、尿中にカルノシンが高濃度で検出されたのだろう。また、陸棲哺乳類では血中や腎臓にカルノシン分解酵素が存在することが知られており (Margolis *et al.*, 1979; Begum *et al.*, 2005)、バンドウイルカではこの酵素の活性が低いか、もしくは全くないという可能性も考えられる。

カルノシンは抗疲労作用を有しており、BCAAとともに、鯨類における持久的な筋運動を可能にする要因のひとつとして、寄与していると考えられる。また、3-メチルヒスチジン同様、抗酸化作用も有している。しかし、カルノシンの生理作用は多彩であり、過剰なカルノシンは生体にとって有害であることから、その速やかな代謝が必要であり、このことが3-メチルヒスチジンの動態と異なる一因であると考えられる。

#### 4-3 その他のアミノ酸

その他のアミノ酸についても、鯨類における血漿、尿、組織中遊離アミノ酸の参照値を明らかにした。そのなかでも、血漿アミノ酸は、鯨類においても、生理・栄養状態をよく反映しており、飼育管理への応用の可能性を示唆することができた。また、Noguchiら (2006) は、血漿アミノ酸濃度を多彩なアルゴリズムに適応することによる生理的・

病的状態の診断への応用を提案しており、鯨類の健康管理において、有用な検査法となり得る可能性は非常に高いと考えられる。また、アミノ酸バランスに変化が生じた場合、アミノ酸投与によりアンバランスを是正することにより、病的状態の改善を試みることも可能であり、鯨類の新たな飼育管理法のひとつとして、アミノ酸の有用性が示唆された。

鯨類では、3-メチルヒスチジンやカルノシンを積極的に体内で保持もしくは合成することにより、優れた抗酸化および抗疲労機序を持ち、骨格筋中にBCAAを高濃度に保つことにより筋タンパク質分解の抑制およびエネルギー源の確保を行っていることが示唆された。これは水中生活を行う上で、長時間の「休息」が死を招く鯨類において、非常に理にかなったメカニズムである。そのため、この抗酸化システムが破綻したとき、生体内では酸化反応が亢進し、ヘモグロビンおよびミオグロビンの酸化も亢進すると考えられる。このことは、酸素結合能を持たないメトヘモグロビンおよびメトミオグロビンの増加と、それにともなう酸素欠乏状態に陥ることを意味する。また、易疲労や筋タンパク質分解の亢進、エネルギー源の枯渇は、呼吸のための浮上を制限し、鯨類における、正常な水中生活を困難にするであろう。水中での生活に異常を来たした鯨類は、より酸素制限の少ない陸上への回避を求め、水中生活を破棄してしまう現象、いわゆるストランディングを起こす可能性が考えられる。また、鯨類飼育管理において、既存の健康評価法に加え、血漿アミノ酸濃度を解析することの有用性を示唆することもできた。今後、本研究で明らかになったことを、これまで明らかにされてこなかったストランディング

など、鯨類に関する未解決な事柄の解明に応用することで、新たな知見の獲得が期待でき、鯨類の飼育管理に応用することで、飼育個体の健康維持・増進、疾病予防、さらには長寿化などに役立つことも期待される。

## 要約

鯨類は極めて特殊な進化を遂げた哺乳類の一種であり、一般のヒトからの人気も高い。このため、水族館などの施設において多くが飼育されている。本来、動物を人工的な環境下で適切に飼育管理するには、生理学的・栄養学的知見は必要不可欠であるが、鯨類におけるこれらの知見は少ない。また、血液検査と行動観察では、特に異常の見られなかった個体の死亡が頻繁に報告されており、既存の方法による健康評価だけでは限界があり、さらなる検査方法の導入が必要である。

遊離アミノ酸は血漿と組織中に存在し、腎臓において再吸収もしくは排泄されることにより、生体内で動的平衡を保っているが、生理的状态や病的状態により、そのバランスに変化が生じることが知られている。また、この動的平衡状態には種差があり、代謝の違いによりもたらされると考えられている。血漿、尿中、組織中の遊離アミノ酸の解析は、生理学的特徴を明らかにする大きな手がかりとなると考えられる。さらに、生体内遊離アミノ酸のモニタリングおよびコントロールはヒト・動物を問わず、健康管理に極めて重要であり、鯨類の飼育管理への応用も可能であると考えられる。本研究の目的は、鯨類の中でも一般的に飼育されているハクジラ亜目マイルカ科の生体内アミノ酸（カルノシン含む）を解析することにより、鯨類の生理学的・栄養学的知見を得ること、および飼育管理等への応用の可能性を検討することである。第1章では、バンドウイルカ (*Tursiops truncatus*)、カマイルカ (*Lagenorhynchus obliquidens*)、ハナゴンドウ (*Grampus griseus*)、オキゴンドウ (*Pseudorca crassidens*) の血漿アミノ酸の解析を行った。第2章で



は、バンドウイルカの尿を用いて尿中アミノ酸の解析を行った。第3章ではバンドウイルカとハナゴンドウの骨格筋、皮膚、およびハナゴンドウの腸管中遊離アミノ酸の解析を行った。各章では、比較対照として陸棲哺乳類であるマウスのアミノ酸解析も同時に行うことにより、鯨類でのアミノ酸に係る生理学的特徴を考察した。

## 第1章 鯨類の血漿遊離アミノ酸濃度の解析

- 1) 血漿アミノ酸解析の結果、それぞれの鯨類間比較において25アミノ酸中4-8アミノ酸に有意差が見られ、種差があることが明らかになった。マウスと鯨類との比較においては、25アミノ酸中11-12アミノ酸に有意差が認められた。種間における血漿アミノ酸組成の違いは、代謝の違いによりもたらされることが知られており、本研究でもそれが確認された。そのため、鯨類においても血漿アミノ酸は生理状態をよく反映しており、飼育管理を行う上で、有用な指標となり得ると考えられる。
- 2) バンドウイルカの血漿アミノ酸濃度において、メスよりもオス、生簀よりもプール飼育の方が高値を示した。性別や飼育環境が異なれば、ホメオスタシスも一様ではなく、アミノ酸必要量に違いが生じ、血漿アミノ酸組成に反映したと考えられる。そのため、血漿アミノ酸を指標とした栄養評価・管理を行うことは、飼育下の鯨類の健康維持・増進にとって重要であると考えられる。
- 3) 鯨類では血漿3-メチルヒスチジンが、マウスの約50倍以上の高値を示した。また、マウス血漿では検出されなかったカルノシンが、鯨類の血漿中には含まれていた。これらが高値を示す要因として餌の影響の可能性が考えられた。そのため、給餌後の血漿

3-メチルヒスチジン、カルノシン濃度を測定したが、どちらも有意な上昇は見られず、餌由来でないことが示された。

- 4) 血液検査と行動評価により、健康であると見なされた個体のフィッシャー比を測定した結果、100サンプル中12サンプルが2.4以下を示した。これは、ヒトにおいて肝機能低下が疑われる値であった。このことは、フィッシャー比を用いることにより、血液検査や行動評価では検出されなかった肝機能の低下を検知したことを示唆する。そのような個体は、フィッシャー比の是正により、より適切な飼育管理が可能になると考えられる。

## 第2章 バンドウイルカの尿中遊離アミノ酸濃度の解析

- 1) 比較を行った25アミノ酸全てにおいて、バンドウイルカとマウスの尿中アミノ酸濃度に有意差が見られた。従来、鯨類と陸棲哺乳類の排泄能に大きな違いはないとされてきたが、アミノ酸の再吸収・排泄に関しては大きな違いがあることが明らかとなった。
- 2) バンドウイルカの尿中3-メチルヒスチジン濃度 ( $3.51 \times 10^{-2} \mu\text{mol}/\text{mg creatinine}$ ) はマウス尿中 ( $16.69 \times 10^{-2} \mu\text{mol}/\text{mg creatinine}$ ) と比較して低値を示し、その再吸収が示唆される。
- 3) マウス尿中と比較して、バンドウイルカ尿中にはカルノシンが約30倍高濃度で検出された。バンドウイルカにおいて、尿中にもカルノシンが高濃度で検出されたことは、3-メチルヒスチジンとは異なるカルノシンの多彩な生理作用に起因すると考えられる。
- 4) バンドウイルカとマウスにおいて、尿中分岐鎖アミノ酸 (BCAA) 濃度はそれぞれ

5.68、 $48.86 \times 10^2 \mu\text{mol/mg creatinine}$ であり、マウスが10倍近い高値を示した。このことは、バンドウイルカはBCAAの再吸収を積極的に行っていることを示唆する。

### 第3章 鯨類の骨格筋、皮膚、および腸管中遊離アミノ酸濃度の解析

- 1) バンドウイルカとハナゴンドウの骨格筋中カルノシン濃度（それぞれ66.91, 69.58  $\mu\text{mol/g tissue}$ ）は、マウス（1.35  $\mu\text{mol/g tissue}$ ）と比較して高値を示した。基質である $\beta$ -アラニンとヒスチジンも高濃度で含まれており、カルノシンは骨格筋で盛んに合成され、抗疲労作用や抗酸化作用によって、鯨類の高い運動能力に寄与していると考えられた。
- 2) バンドウイルカとハナゴンドウの骨格筋、皮膚、腸管には、3-メチルヒスチジンが豊富に含まれていることが示された。そのため、鯨類における血漿3-メチルヒスチジンは骨格筋、皮膚、腸管の由来であることが示唆された。
- 3) マウスの骨格筋中BCAA（1.34  $\mu\text{mol/g tissue}$ ）と比較して、バンドウイルカとハナゴンドウの骨格筋中BCAA（それぞれ10.37, 5.44  $\mu\text{mol/g tissue}$ ）は、約10倍高濃度に含まれていた。本結果と尿中BCAA濃度の結果から、鯨類は骨格筋中にBCAAを積極的に取り込んでいると考えられた。骨格筋中BCAAは筋タンパク質分解の抑制およびエネルギー源として、鯨類における持久的な筋運動を可能にする要因のひとつとして、寄与していると考えられる。

## 第4章 総合考察

本研究では、鯨類における血漿、尿、骨格筋、皮膚、腸管中遊離アミノ酸濃度を明らかにした。その中でも、血漿アミノ酸は、生体の生理的状态の変化をよく反映しており、鯨類の飼育管理にも応用できる可能性は高いと考えられる。例えば、各施設で定期的に行っている血液検査に加え、血漿アミノ酸濃度の測定はさらなる健康状態評価法として有用であると考えられる。また、そのバランスに変化が生じた場合、アミノ酸投与により、アンバランスを是正することで、病的状態の改善を試みることも可能である。

陸棲哺乳類において、3-メチルヒスチジンは筋タンパク質分解の指標として、広く利用されている。筋タンパク質分解により血中に漏出したこのアミノ酸のほとんどは、尿中に排泄され、再利用されることはない。しかし、鯨類では、尿中への排泄はわずかで、その大半が再吸収され、結果的に陸棲哺乳類の50倍以上の濃度で血中に維持されている。3-メチルヒスチジンは、抗酸化作用を有することが知られていることから、次のような進化が考えられる。海棲哺乳類は酸素を効率よく取り込み、かつ保持しなくてはならない。鯨類も同様であり、多量のアミノ酸などによって代謝に必要なときまで酸素分子を貯蔵しなければならない。しかし同時に、酸素の持つ酸化作用や、代謝過程で発生するROSを極力抑える必要がある。3-メチルヒスチジンの動態は、まさにその抗酸化作用に関わるものである。鯨類の持続的な運動によって、血中に分解された3-メチルヒスチジンは、わずかに排泄されるのみで、再吸収により血中に高濃度で維持され、酸化反応やROSを抑制しているのである。この巧みな生理機構を持って、鯨類は海に適応したのであろう。カルノシンも3-メチルヒスチジン同様、抗酸化作用を持つが、カルノシンは

多彩な生理作用を持つこと、過剰なカルノシンは生体にとって有害であることから、その速やかな代謝が必要となる。このことが3-メチルヒスチジンの動態と異なる一因であろう。さらに、カルノシンによる抗疲労作用、BCAAによる筋タンパク質分解抑制作用やエネルギー源としての役割は、鯨類の運動能力を説明する有力な証拠となる。

これらのことは、鯨類の水中適応を説明する上で、合理的なメカニズムである。すなわち、持久的な運動を必要とする鯨類では、筋肉（骨格筋）運動の結果放出された3-メチルヒスチジンを再吸収することにより、ROSを抑え、またカルノシンやBCAAの生理作用によって、水中適応を可能にしたものと思われる。一方、これらのシステムが破綻した場合、生体内では酸化反応の亢進、易疲労や筋タンパク質分解の亢進、さらにエネルギー源の枯渇によって、鯨類の正常な水中生活を困難にするであろう。これら血漿アミノ酸濃度を解析することは、鯨類の飼育管理への有用性も高く、またスタンディングなどの原因を考える上でも有益である。

## 謝辞

本研究の実施にあたり、終始懇切なご指導とご鞭撻を賜りました麻布大学大学院獣医学研究科介在動物学分野、太田光明教授に本学位論文作成にあたりまして、ここに深くお礼申し上げます。

また、学位審査の副査をお引き受けいただきました麻布大学大学院獣医学研究科の高槻成紀教授、村上賢教授に深く感謝いたします。

味の素株式会社ライフサイエンス研究所、坂内慎氏、長尾健児氏に多大なご助力を賜り、深くお礼申し上げます。

サンプルを御提供して頂いたアドベンチャーワールド、伊豆三津シーパラダイス、エプソン品川アクアスタジアム、国立科学博物館動物研究部、下田海中水族館、太地町立くじらの博物館、新潟市水族館マリニピア日本海、横浜・八景島シーパラダイス、ワールドドルフィンリゾートの獣医師、飼育員、職員の皆様に多大なご助力を賜り、深くお礼申し上げます。

本研究実施、また長期にわたる学生生活にあたり、様々にご支援をいただきました大谷伸代講師をはじめとした麻布大学獣医学部動物応用科学科介在動物学研究室の皆様にご深く感謝いたします。

麻布大学大学院獣医学研究科において研究ならびに学生生活を送るにあたり終始見守り、支えて頂いた両親に深く感謝いたします。

## 参考文献

- Afting, E.G., Bernhardt, W., Janzen, R.W. and Röthig, H.J. Quantitative importance of non-skeletal-muscle N tau-methylhistidine and creatine in human urine. *Biochemical Journal*. 200 (2), 449, 1981
- Aguilo, A., Castano, E., Tauler, P., Guix, M.P., Serra, N. and Pons, A. Participation of blood cells in the changes of blood amino acid concentrations during maximal exercise. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 11 (2), 81-86, 2000
- Akamatsu, H., Saitoh, Y., Serizawa, M., Miyake, K., Ohba, Y. and Nakashima, K. Changes of serum 3-methylhistidine concentration and energy-associated metabolites in dairy cows with ketosis. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 69 (10), 1091-1093, 2007
- Alam, Z., Coombes, N., Waring, R.H., Williams, A.C. and Steventon, G.B. Plasma levels of neuroexcitatory amino acids in patients with migraine or tension headache. *Journal of the Neurological Sciences*. 156 (1), 102-106, 1998
- Armstrong, M.D. and Stave, U. A. Study of plasma free amino acid levels. II. Normal values for children and adults. *Metabolism: clinical and experimental*. 22 (4), 561-569, 1973
- Bakardjiev, A. and Bauer, K. Transport of beta-alanine and biosynthesis of carnosine by skeletal muscle cells in primary culture. *European Journal of Biochemistry*. 225 (2), 617-623, 1994
- Banderet, L.E. and Lieberman, H.R. Treatment with tyrosine, a neurotransmitter precursor. Reduces environmental stress in humans. *Brain Research Bulletin*. 22 (4), 759-762, 1989

- Bauer, K., Hallermayer, K., Salnikow, J., Kleinkauf, H. and Hamprecht, B. Biosynthesis of carnosine and related peptides by glial cells in primary culture. *The Journal of Biological Chemistry*. 257 (7), 3593-3597, 1982
- Bauer, K. and Schulz, M. Biosynthesis of carnosine and related peptides by skeletal muscle cells in primary culture. *European Journal of Biochemistry*. 219 (1-2), 43-47, 1994
- Begum, G., Cunliffe, A. and Leveritt, M. Physiological role of carnosine in contracting muscle. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*. 15 (5), 493-514, 2005
- Blazer-Yost, B. and Jezyk, P.F. Free amino acids in the plasma and urine of dogs from birth to senescence. *American Journal of Veterinary Research*. 40 (6), 832-838, 1979
- Blomstrand, E., Hassmen, P., Ek, S., Ekblom, B. and Newsholme, E.A. Influence of ingesting a solution of branched-chain amino acids on perceived exertion during exercise. *Acta Physiologica Scandinavica*. 159 (1), 41-49, 1997
- Blomstrand, E. Amino acids and central fatigue. *Amino Acids*. 20 (1), 25-34, 2001
- Boldyrev, A., Bulygina, E., Leinsoo, T., Petrushanko, I., Tsubone, S. and Abe, H. Protection of neuronal cells against reactive oxygen species by carnosine and related compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology: Part B, Biochemistry & Molecular Biology*. 137 (1), 81-88, 2004
- Bonfanti, L., Peretto, P., De Marchis, S. and Fasolo, A. Carnosine-related dipeptides in the mammalian brain. *Progress in Neurobiology*. 59 (4), 333-353, 1999



- Brenner, U., Herbertz, L., Thul, P., Walter, M., Meibert, M., Muller, J.M. and Reinauer, H. The contribution of small gut to the 3-methylhistidine metabolism in the adult rat. *Metabolism: Clinical and Experimental*. 36 (5), 416-418, 1987
- Brittenden, J., Park, K.G.M., Ross, C., Ashby, J., Ah-See, A.K. and Eremin, O. L-arginine stimulates host defenses in patients with breast cancer. *Surgery*. 115 (2), 205-212, 1994
- Burman, K.D., Wartofsky, L., Dinterman, R.E., Kesler, P. and Wannemacher, R.W.Jr. The effect of T3 and reverse T3 administration on muscle protein catabolism during fasting as measured by 3-methylhistidine excretion. *Metabolism: Clinical and Experimental*. 28 (8), 805-813, 1979
- Caldwell, M.C., Haugen, R.M. and Caldwell, D.K. High-energy sound associated with fright in the dolphin. *Science*. 138 (3543), 907-908, 1962
- Caldwell, M.C. and Caldwell, D.K. Vocalization of naive captive dolphins in small groups. *Science*. 159 (3819), 1121-1123, 1968
- Charlton, M. Branched-chain amino acid enriched supplements as therapy for liver disease. *The Journal of Nutrition*. 136, 295S-298S, 2006
- Davey, C.L. The significance of carnosine and anserine in striated skeletal muscle. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 89, 303-308, 1960
- Dawson, M.J., Gadian, D.G. and Wilkie, D.R. Muscular fatigue investigated by phosphorus nuclear magnetic resonance. *Nature*. 274 (5674), 861-866, 1978

- Dearolf, J.L., McLellan, W.A., Dillaman, R.M., Frierson, Jr, D. and Pabst, D.A. Precocial development of axial locomotor muscle in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Journal of Morphology*. 244 (3), 203-215, 2000
- Defran, R.H. and Pryor, K. The behavior and training of cetaceans in captivity. In: Herman, L.M. (Ed), *Cetacean Behavior: Mechanisms and Functions*. Krieger publishing company., Florida, pp. 319–362, 1980
- Ding, W., Wuersig, B. and Evans, W.E. Whistles of bottlenose dolphins: comparisons among populations. *Aquatic Mammals*. 2165-65, 1995
- Dohm, G.L., Williams, R.T., Kasperek, G.J. and van Rij, A.M. Increased excretion of urea and N tau-methylhistidine by rats and humans after a bout of exercise. *Journal of Applied Physiology*. 52 (1), 27-33, 1982
- Duke, A.M. and Steele, D.S. Characteristics of phosphate-induced  $Ca^{2+}$  efflux from the SR in mechanically skinned rat skeletal muscle fibers. *The American journal of physiology: Cell Physiology*. 278 (1), C126- C135, 2000
- Dutka, T.L., Cole, L. and Lamb, G.D. Calcium phosphate precipitation in the sarcoplasmic reticulum reduces action potential-mediated  $Ca^{2+}$  release in mammalian skeletal muscle. *The American journal of physiology: Cell physiology*. 289 (6), C1502-C1512, 2005
- Elam, R.P., Hardin, D.H., Sutton, R.A. and Hagen, L. Effects of arginine and ornithine on strength, lean body mass and urinary hydroxyproline in adult males. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*. 29 (1), 52-56, 1989

- Elzinga, M., Collins, J.H., Kuehl, W.M. and Adelstein, R.S. Complete amino-acid sequence of actin of rabbit skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 70 (9), 2687-2691, 1973
- Emelyanova, L.V., Koroleva, E.M. and Savina, M.V. Glucose and free amino acids in the blood of lampreys (*Lampetra fluviatilis L.*) and frogs (*Rana temporaria L.*) under prolonged starvation. *Comparative Biochemistry and Physiology: Part A, Molecular & Integrative Physiology*. 138 (4), 527-532, 2004
- Emery, P.W. and Preedy, V.R. Measuring muscle protein turnover in vivo: what can 3-methylhistidine production tell us? *Clinical Science*. 104 (6), 557-558, 2003
- Fernstrom, J.D. Branched-chain amino acids and brain function. *Journal of Nutrition*. 135 (6), 1539-1546, 2005
- Filho, D.W., Sell, F., Ribeiro, L., Ghislandi, M., Carrasquedo, F., Fraga, C.G., Wallauer, J.P., Simoes-Lopes, P.C. and Uhart, M.M. Comparison between the antioxidant status of terrestrial and diving mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology: Part A, Molecular & Integrative Physiology*. 133 (3), 885-892, 2002
- Fischer, J.E., Funovics, J.M., Aguirre, A., James, J.H., Keane, J.M., Wesdorp, R.I., Yoshimura, N. and Westman, T. The role of plasma amino acids in hepatic encephalopathy. *Surgery*. 78 (3), 276-290, 1975
- Gadea, A. and López-Colomé, A.M. Mini-review glial transporters for glutamate, glycine and GABA I. Glutamate transporters. *Journal of Neuroscience Research*. 63 (6), 453-460, 2001

- Gardner, M.L., Illingworth, K.M., Kelleher, J. and Wood, D. Intestinal absorption of the intact peptide carnosine in man, and comparison with intestinal permeability to lactulose. *The Journal of Physiology*. 439, 411-422, 1991
- Goldstein, R.E., Marks, S.L., Cowgill, L.D., Kass, P.H. and Rogers, Q.R. Plasma amino acid profiles in cats with naturally acquired chronic renal failure. *American Journal of Veterinary Research*. 60 (1), 109-113, 1999
- Hamada, K., Matsumoto, K., Okamura, K., Doi, T., Minehira, K. and Shimizu, S. Effect of amino acids and glucose on exercise-induced gut and skeletal muscle proteolysis in dogs. *Metabolism: Clinical and Experimental*. 48 (2), 161-166, 1999
- Harris, C.I. Reappraisal of the quantitative importance of non-skeletal-muscle source NT-methylhistidine in urine. *The Biochemical Journal*. 194, 1011-1014, 1981
- Harris, C.I. and Milne, G. The inadequacy of urinary N<sup>t</sup>-methyl histidine excretion in the pig as a measure of muscle protein breakdown. *British Journal of Nutrition*. 45 (2), 423-429, 1981
- Harris, C.I. and Milne, G. The identification of the N<sup>t</sup>-methyl histidine-containing dipeptide, balenine, in muscle extracts from various mammals and the chicken. *Comparative Biochemistry and Physiology: Part B, Biochemistry & Molecular Biology*. 86 (2), 273-279, 1987
- Hill, C.A., Harris, R.C., Kim, H.J., Harris, B.D., Sale, C., Boobis, L.H., Kim, C.K. and Wise, J.A. Influence of beta-alanine supplementation on skeletal muscle carnosine concentrations and high intensity cycling capacity. *Amino Acids*. 32 (2), 225-233, 2007

- Hitachi High-Technologies Corporation. Measurement of amino acids in Tuna (Physiological Fluids Analysis Method). <https://members.hht-net.com/sinavi/Menu/PDF/LC070039.pdf>, 2007
- Hood, S.D., Hince, D.A., Robinson, H., Cirillo, M., Christmas, D. and Kaye, J.M. Serotonin regulation of the human stress response. *Psychoneuroendocrinology*. 31 (9), 1087-1097, 2006
- Horinishi, H., Grillo, M. and Margolis, F.L. Purification and characterization of carnosine synthetase from mouse olfactory bulbs. *Journal of Neurochemistry*. 31 (4), 909-919, 1978
- Hutson, S.M., Lieth, E. and LaNoue, K.F. Function of leucine in excitatory neurotransmitter metabolism in the central nervous system. *The Journal of Nutrition*. 131 (3), 846S-850S, 2001
- Hutson, S.M. The case for regulating indispensable amino acid metabolism: the branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase kinase-knockout mouse. *The Biochemical Journal*. 400 (1), e1-3, 2006
- Inagawa, K., Seki, S., Bannai, M., Takeuchi, Y., Mori, Y. and Takahashi, M. Alleviative effects of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) on behavioral abnormalities in aged dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*. 67 (10), 1063-1066, 2005
- Jacobs, M., Nowacek, D.P., Gerhart, D.J., Cannon, G., Nowicki, S. and Forward, R.B. Seasonal changes in vocalizations during behavior of the Atlantic bottlenose dolphin. *Estuaries*. 16 (2), 241-246, 1993
- Janik, V.M. Whistle matching in wild bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Science*. 289 (5483), 1355-1357, 2000

- Janik, V.M., Sayigh, L.S. and Wells, R.S. Signature whistle shape conveys identity information to bottlenose dolphins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103 (21), 8293-8297, 2006
- Jin, C.L., Yang, L.X., Wu, X.H., Li, Q., Ding, M.P., Fan, Y.Y., Zhang, W.P., Luo, J.H. and Chen, Z. Effects of carnosine on amygdaloid-kindled seizures in Sprague-Dawley rats. *Neuroscience*. 135 (3), 939-947, 2005
- Joshi, M.A., Jeoung, N.H., Obayashi, M., Hattab, E.M., Brocken, E.G., Liechty, E.A., Kubek, M.J., Vattam, K.M., Wek, R.C. and Harris, R.A. Impaired growth and neurological abnormalities in branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase kinase-deficient mice. *The Biochemical Journal*. 400 (Pt 1), 153, 2006
- Knopf, K., Sturman, J.A., Armstrong, M. and Hayes, K.C. Taurine: an essential nutrient for the cat. *The Journal of Nutrition*. 108 (5), 773-778, 1978
- Kohen, R., Yamamoto, Y., Cundy, K.C. and Ames, B.N. Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 85 (9), 3175-3179, 1988
- Kojima, T. On the brain of the Sperm whale (*Physeter catadon*). *Scientific Reports Whales Research Institute Tokyo*. 6, 49-72, 1951
- Kooyman, G.L. and Ponganis, P.J. The physiological basis of diving to depth: birds and mammals. *Annual Review of Physiology*. 60, 19-32, 1998

- Kopple, J.D. and Swendseid, M.E. Evidence that histidine is an essential amino acid in normal and chronically uremic man. *The Journal of Clinical Investigation*. 55 (5), 881-891, 1975
- Kuehl, W.M. and Adelstein, R.S. The absence of 3-methylhistidine in red, cardiac and fetal myosins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 39 (5), 956-964, 1970
- Le Boucher, J., Farges, M.C., Minet, R., Vasson, M.P. and Cynober, L. Modulation of immune response with ornithine A-ketoglutarate in burn injury: an arginine or glutamine dependency? *Nutrition*. 15 (10), 773-777, 1999
- Long, C.L., Haverberg, L.N., Young, V.R., Kinney, J.M., Munro, H.N. and Geiger, J.W. Metabolism of 3-methylhistidine in man. *Metabolism: Clinical and Experimental*. 24 (8), 929-935, 1975
- Lowe, D.A., Surek, J.T., Thomas, D.D. and Thompson, L.V. Electron paramagnetic resonance reveals age-related myosin structural changes in rat skeletal muscle fibers. *The American journal of physiology: Cell Physiology*. 280 (3), C540-C547, 2001
- MacLean, D.A., Graham, T.E. and Saltin, B. Branched-chain amino acids augment ammonia metabolism while attenuating protein breakdown during exercise. *The American journal of physiology: Endocrinology and Metabolism*. 267 (6), E1010-1022, 1994
- Margolis, F.L. Carnosine in the primary olfactory pathway. *Science*. 184 (4139), 909-911, 1974
- Margolis, F.L., Grillo, M., Brown, C.E., Williams, T.H., Pitcher, R.G. and Elgar, G.J. Enzymatic and immunological evidence for two forms of carnosinase in the mouse. *Biochimica et Biophysica Acta*. 570 (2), 311-323, 1979

- Matsugami, T.R., Tanemura, K., Mieda, M., Nakatomi, R., Yamada, K., Kondo, T., Ogawa, M., Obata, K., Watanabe, M., Hashikawa, T. and Tanaka, K. From the Cover: Indispensability of the glutamate transporters GLAST and GLT1 to brain development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103 (32), 12161-12166, 2006
- Millward, D.J. and Bates, P.C. 3-Methylhistidine turnover in the whole body, and the contribution of skeletal muscle and intestine to urinary 3-methylhistidine excretion in the adult rat. *The Biochemical Journal*. 214, 607-615, 1983
- Millward, D.J., Bowtell, J.L., Pacy, P. and Rennie, M.J. Physical activity, protein metabolism and protein requirements. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 53 (1), 223-240, 1994
- Minowa, K., Pawlak, R., Takada, Y. and Takada, A. Nicotine attenuates stress-induced changes in plasma amino acid concentrations and locomotor activity in rats. *Brain Research Bulletin*. 51 (1), 83-88, 2000
- Mizuno, K., Tanaka, M., Nozaki, S., Yamaguti, K., Mizuma, H., Sasabe, T., Sugino, T., Shirai, T., Kataoka, Y., Kajimoto, Y., Kuratsune, H., Kajimoto, O. and Watanabe, Y. Mental fatigue-induced decrease in levels of several plasma amino acids. *Journal of Neural Transmission*. 114 (5), 555-561, 2007
- Moinard, C., Caldefie, F., Walrand, S., Felgines, C., Vasson, M.P. and Cynober, L. Involvement of glutamine, arginine, and polyamines in the action of ornithine alpha-ketoglutarate on macrophage functions in stressed rats. *Journal of Leukocyte Biology*. 67 (6), 834-840, 2000



- Morgan, M.Y., Milsom, J.P. and Sherlock, S. Plasma ratio of valine, leucine and isoleucine to phenylalanine and tyrosine in liver disease. *Gut*. 19 (11), 1068-1073, 1978
- Murray, A.J., Nield, M.K., Jones, L.M., Galbraith, N. and Tomas, F.M. Metabolism of N-tau-methylhistidine by mice. *Biochemical Journal*. 232 (2), 409, 1985
- Müting, D., Kalk, J.F. and Klein, C.P. Long-term effectiveness of high-dosed ornithine-aspartate on urea synthesis rate and portal hypertension in human liver cirrhosis. *Amino Acids*. 3 (2), 147-153, 1992
- Muto, Y., Sato, S., Watanabe, A., Moriwaki, H., Suzuki, K., Kato, A., Kato, M., Nakamura, T., Higuchi, K. and Nishiguchi, S. Effects of oral branched-chain amino acid granules on event-free survival in patients with liver cirrhosis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 3 (7), 705-713, 2005
- Nagabhushan, V.S. and Rao, B.S. Metabolism of 3-methyl histidine in experimentally induced protein-energy malnutrition in rats: urinary excretion and muscle content of 3-methyl histidine. *Life Sciences*. 18 (6), 639-647, 1976
- Nagasawa, T., Yoshizawa, F. and Nishizawa, N. Plasma N<sup>t</sup>-methylhistidine concentration is a sensitive index of myofibrillar protein degradation during starvation in rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 60 (3), 501-502, 1996
- Nagasawa, T., Yonekura, T., Nishizawa, N. and Kitts, D.D. In vitro and in vivo inhibition of muscle lipid and protein oxidation by carnosine. *Molecular and cellular biochemistry*. 225 (1), 29-34, 2001

- Nakashima, K., Komatsu, T., Yamazaki, M. and Abe, H. Effects of fasting and refeeding on expression of proteolytic-related genes in skeletal muscle of chicks. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 51 (4), 248-253, 2005
- Nikaido, M., Rooney, A.P. and Okada, N. Phylogenetic relationships among cetartiodactyls based on insertions of short and long interspersed elements: Hippopotamuses are the closest extant relatives of whales. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96 (18), 10261-10266, 1999
- Ninfali, P. and Aluigi, G. Variability of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) in different animal species. *Free Radical Research*. 29 (5), 399-408, 1998
- Noguchi, Y., Zhang, Q.W., Sugimoto, T., Furuhashi, Y., Sakai, R., Mori, M., Takahashi, M. and Kimura, T. Network analysis of plasma and tissue amino acids and the generation of an amino index for potential diagnostic use. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 83 (2), 513S-519S, 2006
- Ortiz, R.M. Osmoregulation in marine mammals. *Journal of Experimental Biology*. 204 (11), 1831-1844, 2001
- Outerbridge, C.A., Marks, S.L. and Rogers, Q.R. Plasma amino acid concentrations in 36 dogs with histologically confirmed superficial necrolytic dermatitis. *Veterinary Dermatology*. 13 (4), 177-186, 2002

- Peters, J.H., Berridge, B.J., Chao, W.R., Cummings, J.G. and Lin, S.C. Amino acid patterns in the plasma of old and new world primates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 39 (3), 639-647, 1971
- Phillips, S.E.V. and Schoenborn, B.P. Neutron diffraction reveals oxygen-histidine hydrogen bond in oxymyoglobin. *Nature*. 292 (5818), 81-82, 1981
- Platell, C., Kong, S.E., McCauley, R. and Hall, J.C. Branched-chain amino acids. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 15 (7), 706-717, 2000
- Rathmacher, J.A., Link, G. and Nissen, S. Measurement of 3-methylhistidine production in lambs by using compartmental-kinetic analysis. *British Journal of Nutrition*. 69 (3), 743-755, 1993
- Rathmacher, J.A., Flakoll, P.J. and Nissen, S.L. A compartmental model of 3-methylhistidine metabolism in humans. *The American journal of physiology: Endocrinology and Metabolism*. 269 (1), E193-E198, 1995
- Rathmacher, J.A., Nissen, S.L., Paxton, R.E. and Anderson, D.B. Estimation of 3-methylhistidine production in pigs by compartmental analysis. *Journal of Animal Science*. 74 (1), 46-56, 1996
- Reid, M.B. Free radicals and muscle fatigue: Of ROS, canaries, and the IOC. *Free Radical Biology & Medicine*. 44 (2), 169-179, 2008
- Rennie, M.J. and Millward, D.J. 3-Methylhistidine excretion and the urinary 3-methylhistidine/creatinine ratio are poor indicators of skeletal muscle protein breakdown. *Clinical Science*. 65 (3), 217-225, 1983

- Ridgway, S.H. Dolphin brain size. In: Bryden, M.M. and Darrison, R.J. (Eds), *Research on Dolphins*. Clarendon Press., Oxford, pp. 59-70, 1986
- Ridgway, S.H. and Harrison, S.R. (Eds), *Handbook of Marine Mammals*. Academic Press., London, 1999
- Robinson, L.E., Bussiere, F.I., Le Boucher, J., Farges, M.C., Cynober, L.A., Field, C.J. and Baracos, V.E. Amino acid nutrition and immune function in tumour-bearing rats: a comparison of glutamine-, arginine- and ornithine 2-oxoglutarate-supplemented diets. *Clinical Science*. 97, 657-669, 1999
- Rogeri, P.S. and Costa Rosa, L.F.B.P. Plasma glutamine concentration in spinal cord injured patients. *Life Sciences*. 77 (19), 2351-2360, 2005
- Rommel, S.A., Pabst, D.A. and McLellan, W.A. Reproductive thermoregulation in marine mammals. *American Scientist*. 86 (5), 440-448, 1998
- Rommel, S.A. and Lowenstine, L.J. Gross and Microscopic Anatomy. In: Dierauf, L.A. and Gulland, F.M.D. (Eds), *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine (second edition)*. CRC press., Florida, pp. 129-164, 2001
- Rose, W.C. The amino acid requirements of adult man. *Nutrition abstracts and reviews. Series A: Human and Experimental*. 27 (3), 631-647, 1957
- Russell, I.S. 6 Brain size and intelligence: a comparative perspective. *Brain, Behaviour and Evolution*. 126-153, 1979

- Saito, H., Furukawa, S. and Matsuda, T. Glutamine as an immunoenhancing nutrient. *Supplement to JPEN. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition.* 23 (5), 59-61, 1999
- Sakai, M., Yoshida, M., Karasawa, N., Teramura, M., Ueda, H. and Nagatsu, I. Carnosine-like immunoreactivity in the primary olfactory neuron of the rat. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 43 (3), 298-300, 1987
- Shikama, K. The molecular mechanism of autoxidation for myoglobin and hemoglobin: A Venerable Puzzle. *Chemical Reviews.* 98 (4), 1357-1374, 1998
- Skrovan, R.C., Williams, T.M., Berry, P.S., Moore, P.W. and Davis, R.W. The diving physiology of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). II. Biomechanics and changes in buoyancy at depth. *The Journal of Experimental Biology.* 202 (Pt 20), 2749-2761, 1999
- Slijper, E.J. Organ weights and symmetry problems in porpoises and seals. *Archives Neerlandaises de Zoologie.* 13, 97-113, 1958
- Smriga, M., Kameishi, M., Tanaka, T., Kondoh, T. and Torii, K. Preference for a solution of branched-chain amino acids plus glutamine and arginine correlates with free running activity in rats: involvement of serotonergic-dependent processes of lateral hypothalamus. *Nutritional Neuroscience.* 5 (3), 189-199, 2002
- Smriga, M. and Torii, K. Prolonged treatment with L-lysine and L-arginine reduces stress-induced anxiety in an elevated plus maze. *Nutritional Neuroscience.* 6 (2), 125-128, 2003a

- Smriga, M. and Torii, K. Metabolic interactions between restraint stress and L-lysine: the effect on urea cycle components. *Amino Acids*. 24 (4), 435-437, 2003b
- Suarez, E.C. and Krishnan, K.R. The relation of free plasma tryptophan to anger, hostility, and aggression in a nonpatient sample of adult men and women. *Annals of Behavioral Medicine : A Publication of the Society of Behavioral Medicine*. 31 (3), 254-260, 2006
- Suyama, M., Suzuki, T., Maruyama, M. and Saito, K. Determination of carnosine, anserine and balenine in the muscle of animals. *Bulletin of the Japanese Society of Science and Fisheries*. 36, 1048-1053, 1970
- Thewissen, J.G.M., Cooper, L.N., Clementz, M.T., Bajpai, S. and Tiwari, B.N. Whales originated from aquatic artiodactyls in the Eocene epoch of India. *Nature*. 450 (7173), 1190, 2007
- Thurman, R.G., Zhong, Z., von Frankenberg, M., Stachlewitz, R.F. and Bunzendahl, H. Prevention of cyclosporine-induced nephrotoxicity with dietary glycine 1. *Transplantation*. 63 (11), 1661, 1997
- Tizianello, A., De Ferrari, G., Garibotto, G., Gurreri, G. and Robaudo, C. Renal metabolism of amino acids and ammonia in subjects with normal renal function and in patients with chronic renal insufficiency. *Journal of Clinical Investigation*. 65 (5), 1162, 1980
- Tomas, F.M., Jones, L.M. and Pym, R.A. Muscle protein breakdown in chickens selected for different growth and food consumption characteristics. *Proceedings of the Nutrition Society of Australia*. 9107, 1984

- Tomonaga, S., Tachibana, T., Takagi, T., Saito, E.S., Zhang, R., Denbow, D.M. and Furuse, M. Effect of central administration of carnosine and its constituents on behaviors in chicks. *Brain Research Bulletin*. 63 (1), 75-82, 2004
- Tremel, H., Kienle, B., Weilemann, L.S., Stehle, P. and Fürst, P. Glutamine dipeptide-supplemented parenteral nutrition maintains intestinal function in the critically III. *Gastroenterology*. 107 (6), 1595-1601, 1994
- Tsubone, S., Yoshikawa, N., Okada, S. and Abe, H. Purification and characterization of a novel imidazole dipeptide synthase from the muscle of the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Comparative Biochemistry and Physiology: Part B, Biochemistry & Molecular Biology*. 146 (4), 560-567, 2007
- Vandenboom, R. The myofibrillar complex and fatigue: a review. *Canadian journal of Applied Physiology*. 29 (3), 330-356, 2004
- Venn-Watson, S., Smith, C.R., Dold, C. and Ridgway, S.H. Use of a serum-based glomerular filtration rate prediction equation to assess renal function by age, sex, fasting, and health status in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Marine Mammal Science*. 24 (1), 71-80, 2008
- Vissers, Y.L.J., von Meyenfeldt, M.F., Braulio, V.B., Luiking, Y.C. and Deutz, N.E.P. Measuring whole-body actin/myosin protein breakdown in mice using a primed constant stable isotope-infusion protocol. *Clinical Science*. 104 (6), 585-590, 2003
- Waples, K.A. and Gales, N.J. Evaluating and minimising social stress in the care of captive bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*). *Zoo Biology*. 21 (1), 5-26, 2002

- Wassner, S.J., Schlitzer, J.L. and Li, J.B. A rapid, sensitive method for the determination of 3-methylhistidine levels in urine and plasma using high-pressure liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*. 104 (2), 284-289, 1980
- Wassner, S.J. and Li, J.B. N<sup>t</sup>-methylhistidine release: contributions of rat skeletal muscle, GI tract, and skin. *The American journal of physiology: Endocrinology and Metabolism*. 243 (4), 293-297, 1982
- Wells, S.M., Kew, S., Yaqoob, P., Wallace, F.A. and Calder, P.C. Dietary glutamine enhances cytokine production by murine macrophages. *Nutrition*. 15 (11-12), 881-884, 1999
- Würsig, B. and Würsig, M. Behavior and ecology of the bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*, in the South Atlantic. *Fishery Bulletin*. 77 (2), 399-412, 1979
- Wurtman, R.J. Behavioural effects of nutrients. *Lancet*. 1 (8334), 1145-1147, 1983
- Xiang, J., Ennis, S.R., Abdelkarim, G.E., Fujisawa, M., Kawai, N. and Keep, R.F. Glutamine transport at the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *Neurochemistry International*. 43 (4-5), 279-288, 2003
- Yamada, T. Marine Mammal Strandings. *Japanese Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 5, 11-18, 2000
- Yamada, T., Mishima, T., Sakamoto, M., Sugiyama, M., Matsunaga, S. and Wada, M. Oxidation of myosin heavy chain and reduction in force production in hyperthyroid rat soleus. *Journal of Applied Physiology*. 100 (5), 1520-1526, 2006



- Yamato, M., Muto, Y., Yoshida, T., Kato, M. and Moriwaki, H. Clearance rate of plasma branched-chain amino acids correlates significantly with blood ammonia level in patients with liver cirrhosis. *International Hepatology Communications*. 3 (2), 91-96, 1995
- Yoshida, T., Muto, Y., Moriwaki, H. and Yamato, M. Effect of long-term oral supplementation with branched-chain amino acid granules on the prognosis of liver cirrhosis. *Gastroenterologia Japonica*. 24 (6), 692-698, 1989
- Young, V.R., Alexis, S.D., Baliga, B.S., Munro, H.N. and Muecke, W. Metabolism of administered 3-methylhistidine: Lack of muscle transfer ribonucleic acid charging and quantitative excretion as 3-methylhistidine and its N-acetyl derivative. *Journal of Biological Chemistry*. 247 (11), 3592-3600, 1972
- Young, V.R. and Munro, H.N. N<sup>t</sup>-methylhistidine (3-methylhistidine) and muscle protein turnover: an overview. *Federation Proceedings*. 37 (9), 2291-2300, 1978
- Yudkoff, M., Daikhin, Y., Nissim, I., Horyn, O., Luhovyy, B., Lazarow, A. and Nissim, I. Brain amino acid requirements and toxicity: the example of leucine. *The Journal of Nutrition*. 135 (6 Suppl), 1531S-1538S, 2005
- 石井祐正. アミノ酸および窒素化合物. *最新 臨床検査のABC*. 橋本信也編, 東京, 日本医師会. 172-173, 2007
- 大洗水族館. 水生哺乳類の飼育空間について. *動物園水族館雑誌* 34 (2・3), 33-48, 1992
- 四釜慶治, 松岡有樹, 菅原芳明. ミオグロビン・ヘモグロビンの自動酸化反応. *生物物理* 41 (2), 74-79, 2001

島本信夫. 魚類の進化. *日本海洋生物研究所 年報* 74-82, 2008

中島卓真. 鯨肉抽出物(バレニン含有)摂取による抗疲労効果. *食品と開発* 41 (11), 62-64,

2006

弓狩康三, 中村朝郎, 永嶋伸也, 高見徹, 秋山由紀雄. アミノ酸およびアミンの生体含量.

*生化学実験講座11: アミノ酸代謝と生体アミン (下)*. 日本生化学学会編, 東京, 東京

化学同人. 1076-1100, 1977

和田正信, 坂本誠, 杉山美奈子, 松永智. 高強度運動における筋疲労の要因: 無機リン酸,

グリコーゲンおよび活性酸素種の影響. *体育学研究* 51 (4), 399-408, 2006