



Title	2 型糖尿病病態と血漿乳酸・アラニン値との関連性
Author(s)	樋口, 一世
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(臨床薬学)
Dissertation Number	甲第13775号
Issue Date	2019-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13775
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81005
Type	doctoral thesis
File Information	Issei_HIGUCHI.pdf



博士学位論文

2 型糖尿病病態と血漿乳酸・アラニン値との関連性

樋口 一世

北海道大学大学院生命科学院

臨床薬学専攻

臨床薬剤学研究室

令和 元年 9 月

目次

序論	1
第一章 代謝エネルギー源の乳酸、アラニン値と2型糖尿病病態との関連	4
第一節 緒言	4
第二節 試験方法	5
第一項 試験デザイン	5
第二項 評価項目	6
第三項 症例数の設定根拠	7
第四項 統計解析	7
第三節 実験材料および実験方法	8
第一項 患者検体	8
第二項 患者診療録	8
第三項 L-、D-乳酸値測定	11
(1) 試薬	11
(2) 機器	11
(3) 解析ソフト	11
(4) 乳酸蛍光誘導体化反応	12
(5) HPLC	12

(6) クロマトグラム	13
(7) 検量線	14
(8) ラクテートプロ TM 2LT-1730 [®] (簡易血中乳酸濃度測定器)	15
第四項 アラニン値測定	16
(1) 試薬	16
(2) 機器	16
(3) 解析ソフト	16
(4) アミノ酸誘導体化反応	17
(5) HPLC	17
(6) クロマトグラム	18
(7) 検量線	18
第四節 結果	20
第一項 患者背景	20
第二項 血漿L-、D-乳酸値およびアラニン値と既知の糖尿病診断マーカー との相関解析	22
第三項 血漿L-、D-乳酸値およびアラニン値と他の診療情報との相関解析	25
第四項 L-乳酸値正常群、異常群の2群間における検査値および患者背景 の解析	31
第五項 L-乳酸値正常群、異常群の2群間におけるロジスティック回帰分析	32
第六項 ラクテートプロ TM 2LT-1730 [®] (簡易血中乳酸濃度測定器)と既知の 糖尿病診断マーカーとの関連解析	34

第五節 考察	36
第六節 まとめ	40
第二章 MCT 遺伝子多型が糖尿病病態に及ぼす影響	41
第一節 緒言	41
第二節 試験方法	42
第一項 試験デザイン	42
第二項 評価項目	42
第三項 統計解析	42
第三節 実験材料	42
第一項 患者検体	42
第二項 患者診療録	42
第三項 試薬	43
第四項 機器	43
第五項 解析ソフト	43
第四節 実験方法	44
第一項 患者血液からの gDNA抽出	44
第二項 目的配列の PCR	44
第三項 シーケンス反応	45
第四項 キャピラリー電気泳動	45

第五節 実験結果	48
第一項 確認された MCT遺伝子多型および頻度	48
第二項 MCT1 T1470A 遺伝子多型と検査値および患者背景との関連解析	50
第六節 考察	53
第七節 まとめ	55
総括	56
参考文献	59
謝辞	73

略語表

本論文においては以下の略語を用いた。

ALT	alanine aminotransferase
ANK1	ankyrin 1
AST	aspartate aminotransferase
BG	biguanide
BMI	body mass index
BUN	blood urea nitrogen
CCr	creatinine clearance
CDKAL1	cyclin-dependent kinase 5 regulatory subunit-associated protein 1-like 1
CDKN 2A/B	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/B
CDS	coding sequence
CH ₃ CN	acetonitrile
CH ₃ OH	methanol
C ₂ H ₅ OH	ethanol
CI	confidence interval
CK	creatine kinase
CoA	coenzyme A

CPR	C-peptide immunoreactivity
DBP	diastolic blood pressure
dbSNP	single nucleotide polymorphism database
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxynucleoside triphosphate
DPDS	2,2'-dipyridyl disulfide
DPP4i	dipeptidyl peptidase-4 inhibitor
EDTA	ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid
eGFR	estimated glomerular filtration rate
FPG	fasting plasma glucose
GA	glycoalbumin
GAD	glutamic acid decarboxylase
gDNA	genomic DNA
GLP-1	glucagon-like peptide-1
GWAS	Genome-Wide Association Study
HbA1c	hemoglobin A1c
HDL-C	high-density lipoprotein cholesterol
HHEX	hematopoietically-expressed homeobox protein

HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitor
HOMA-R	homeostasis model assessment insulin resistance
HOMA- β	homeostasis model assessment beta-cell function
HPLC	high-performance liquid chromatography
IGF2BP2	insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2
IS	internal standard
KCNJ11	potassium voltage-gated channel subfamily J member 11
KCNQ1	potassium voltage-gated channel subfamily Q member 1
LDH	lactate dehydrogenase
LDL-C	low-density lipoprotein cholesterol
MCT	monocarboxylate transporter
MT	mutant
NBD-PZ	4-nitro-7-piperazino-2,1,3-benzoxadiazole
ODS	octadecylsilyl
OGTT	oral glucose tolerance test
OR	odds ratio
PCR	polymerase chain reaction
PDH	pyruvate dehydrogenase

Q	quartile
QOL	quality of life
ROS	reactive oxygen species
SBP	systolic blood pressure
S-CPR	serum C-peptide immunoreactivity
S-Cr	serum creatinine
SGLT2i	sodium-dependent glucose transporter 2 inhibitor
SLC	solute carrier
SLC30A8	solute carrier family 30, member 8
SNP	single nucleotide polymorphism
SU	sulfonylurea
T2D	type 2 diabetes
TCA	tricarboxylic acid
TCF7L2	transcription factor 7-like 2
T-CHO	total cholesterol
TG	triglyceride
THF	tetrahydrofuran
TPP	triphenylphosphine

TZD	thiazolidinediones
UACR	urine albumin-to-creatinine ratio
U-CPR/day	24-hour urinary excretion rate of C-peptide immunoreactivity
WT	wild type
α GI	alpha-glucosidase inhibitor
γ -GTP	gamma-glutamyl transpeptidase
Δ CPR	delta C-peptide immunoreactivity

序論

糖尿病はインスリン作用不足により慢性的な高血糖をきたす疾患である。厚生労働省発表の平成 28 年の国民健康・栄養調査結果では、糖尿病の疑いが強い人（糖尿病有病者）は約 1,000 万人を超え、糖尿病の可能性を否定できない人（糖尿病予備軍）の約 1,000 万人を含めると 2,000 万人と報告されており、社会的に大きな問題となっている¹⁾。また、日本人の糖尿病患者の 95%を占めるのは 2 型糖尿病であり、インスリンの分泌低下とインスリン抵抗性の増大が発症に関わっている。

2 型糖尿病の発症には、不摂生な食事、運動不足、肥満、アルコール、喫煙、ストレスなどの環境因子の他に、日本人においては 2 型糖尿病関連遺伝子として *KCNJ11*、*TCF7L2*、*SLC30A8*、*CDKAL1*、*HHEX*、*IGF2BP2*、*CDKN2A/B*、*KCNQ1*、*ANK1* 等が報告されており²⁻⁴⁾、2 型糖尿病はこの両因子が発症に関与する多因子疾患であることが知られている。

2 型糖尿病の慢性的な高血糖状態により糖尿病合併症が生じ、患者の **quality of life (QOL)** の著しい低下や生命予後を悪化させる。糖尿病合併症には、微小血管障害である神経障害、網膜症、腎症（糖尿病三大合併症）や大血管障害である虚血性心疾患、脳血管障害、末梢動脈疾患、糖尿病壊疽等の糖尿病足病変が知られている。その他にも骨折リスク、手根管症候群等の手の病変、歯周病に加え、近年では認知症⁵⁻¹⁰⁾や悪性疾患^{11, 12)}との関連も多く報告されている。今後もさらなる患者数の増加が懸念されており、糖尿病の早期発見・合併症の予防、進展抑制が極めて重要となることから糖尿病病態を評価する因子の探索が行われている。

乳酸は光学異性体であり、ヒトでは大部分が L-乳酸として存在し、D-乳酸は L-乳酸の約 1-5%程度である¹³⁾。L-乳酸は嫌氣的解糖系経路で産生されることが

知られており、血漿中の L-乳酸濃度は解糖速度と相関し、ミトコンドリアの酸化能 (oxidative capacity) を反映すると考えられている¹⁴⁾。酸化能の低下は 2 型糖尿病と強く相関することが示されており¹⁵⁾、近年、いくつかの臨床研究において、酸化能とエネルギー消費の指標となる血漿乳酸値の上昇とインスリン抵抗性が関連し^{16, 17)}、2 型糖尿病と深く関わることが報告されている (**Figure 1**)¹⁸⁾。一方で、D-乳酸はヒトでは主にメチルグリオキサール経路と腸内細菌による経路で産生され、糖尿病、感染症、潰瘍性大腸炎、腸管手術後の患者において血中 D-乳酸が上昇することが知られている¹⁹⁻²¹⁾。また糖原性アミノ酸である血漿中アラニン値は、2 型糖尿病病態時に糖新生の亢進によって変動することが報告されている (**Figure 1**)^{22, 23)}。しかしながら、これらの報告はいずれも血漿中の L-、D-乳酸およびアラニン値の採血の測定時点が不明であり、血糖値や Hemoglobin A1c (HbA1c) といった既知の糖尿病診断マーカーとの関連性は未だに不明な点が多いのが現状である。

一方、骨格筋は人体の乳酸代謝に重要な役割を果たしており、乳酸の産生や消費を行っている²⁴⁾。乳酸の輸送にはモノカルボン酸トランスポーター (Monocarboxylate transporter; MCT) が関与しており、MCT (SLC16) ファミリーは 14 種類のアイソフォームが報告されている。このうち MCT1-4 は乳酸やピルビン酸などの代謝中間体を輸送する^{25, 26)}。乳酸は骨格筋では主に MCT1 (SLC16A1) と MCT4 (SLC16A3) を介して骨格筋の細胞膜を通過し、細胞内外にプロトンと共輸送される。当研究室において、MCT1 と MCT4 による L-乳酸輸送が pH 依存的に変動することを明らかにしている^{27, 28)}。MCT1 および MCT4 と糖尿病の関連については、健常人と比較して 2 型糖尿病患者における骨格筋の MCT4 タンパク発現には差はないものの、MCT1 タンパク発現は大幅に減少しており、骨格筋の乳酸輸送能も低下することが報告されている²⁹⁾。我々は先行研究で、日

本の健常人において MCT1 と MCT4 の遺伝子多型が存在することを報告してきたが³⁰⁾、MCT1 遺伝子多型は運動機能^{31, 32)}やケトアシドーシス³³⁾等と関連するとの報告がなされているものの、2 型糖尿病と MCT やその遺伝子多型の関連性についての知見は乏しく、未だに不明な点が多い。そこで本研究では糖尿病病態の予測因子の探索を目的に、第一に酸化能マーカーである乳酸値や糖原性アミノ酸であるアラニン値の血中濃度と血糖値や HbA1c といった既知の糖尿病診断マーカーとの関連性を検証し、第二に MCT 遺伝子多型が糖尿病病態に及ぼす影響を精査することで、2 型糖尿病の進展予防の一助とすることとした。

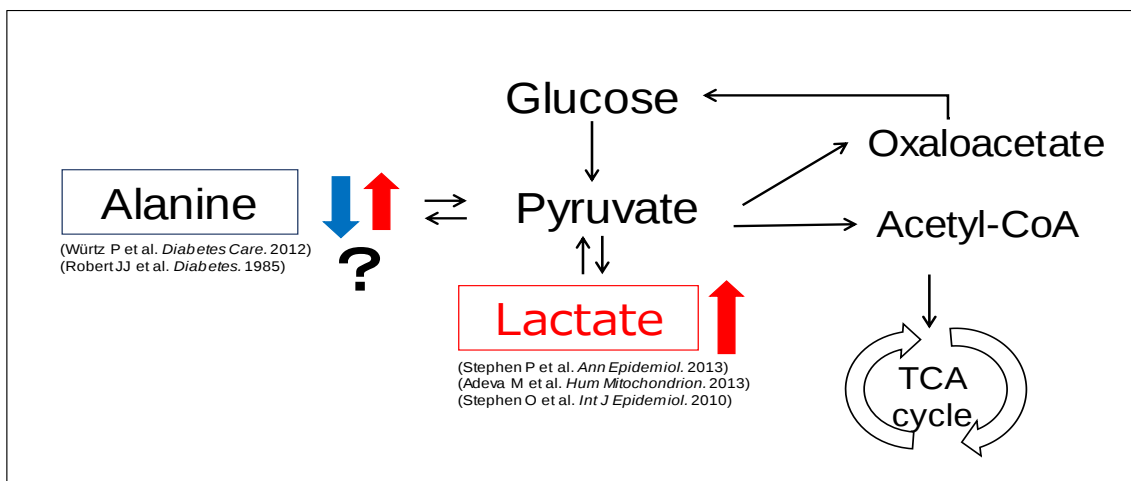


Figure 1 Association between type2 diabetes and metabolic energy source

第一章 代謝エネルギー源の乳酸、アラニン値と 2 型糖尿病病態との関連

第一節 緒言

我が国の糖尿病の大部分を占めるのは 2 型糖尿病であり、生活環境の変化により、今後も患者数の増加が懸念される。糖尿病三大合併症として網膜症、腎症、神経障害が知られており、病態の進行により糖尿病網膜症では年 3,000 人が失明し、糖尿病腎症は新規透析導入原因の第 1 位となっている。そのため糖尿病の進展予防が極めて重要となることから糖尿病病態を評価する因子の探索は急務である。

2 型糖尿病の進行には骨格筋における酸化能の低下の関与が示唆されており、乳酸値とインスリン抵抗性のマーカーとの関連が海外において報告されている^{16, 17, 34)}。しかし、これらの報告では血漿中の L-、D-乳酸値およびアラニン値の測定時点が不明であり、既知の糖尿病診断マーカーとの関連性においても未だに不明な点が多い。そこで、本章では、糖尿病病態と代謝エネルギー源である乳酸値およびアラニン値との関連性を明らかにするため、診療情報から得られた既知の糖尿病診断マーカー (血糖値、HbA1c)、インスリン分泌能、肝酵素、血中脂質濃度、患者基本情報、糖尿病三大合併症 (腎機能、糖尿病性網膜症、神経障害)、大血管障害 (心血管疾患、脳血管疾患)、服用薬等との関連性を検討した。

第二節 試験方法

第一項 試験デザイン

本研究は2014年4月から2017年3月に北海道大学病院内科II病棟に入院し、臨床研究の同意を得た2型糖尿病患者83名を対象とした前向き観察研究である

(Figure 2)。また、本研究はヘルシンキ宣言および臨床研究に関する倫理指針 (平成20年7月31日改正、以下臨床研究倫理指針) を遵守し、北海道大学病院 自主臨床研究審査委員会の承認を得て行った (臨床研究番号: 自013-0196)。

(1) 選択基準

- ① 同意取得時における年齢が20歳以上の患者
- ② 日本糖尿病学会発表の2010年糖尿病の診断基準により糖尿病型と診断された2型糖尿病患者 [血糖値 (空腹時 ≥ 126 mg/dL、oral glucose tolerance test [OGTT] 2時間 ≥ 200 mg/dL、随時 ≥ 200 mg/dLのいずれか)、HbA1c (NGSP) 値 $\geq 6.5\%$]
- ③ 本研究の参加にあたり十分な説明を受けた後、理解の上、患者本人の自由意思による文書同意が得られた患者

(2) 除外基準

- ① 1型糖尿病と診断を受けているまたは、グルタミン酸デカルボキシラーゼ (glutamic acid decarboxylase; GAD) 抗体等の膵臓関連自己抗体が陽性の患者
- ② 呼吸不全や肝不全の診断を受けている患者
- ③ 研究責任者が被験者として不適当と判断した患者

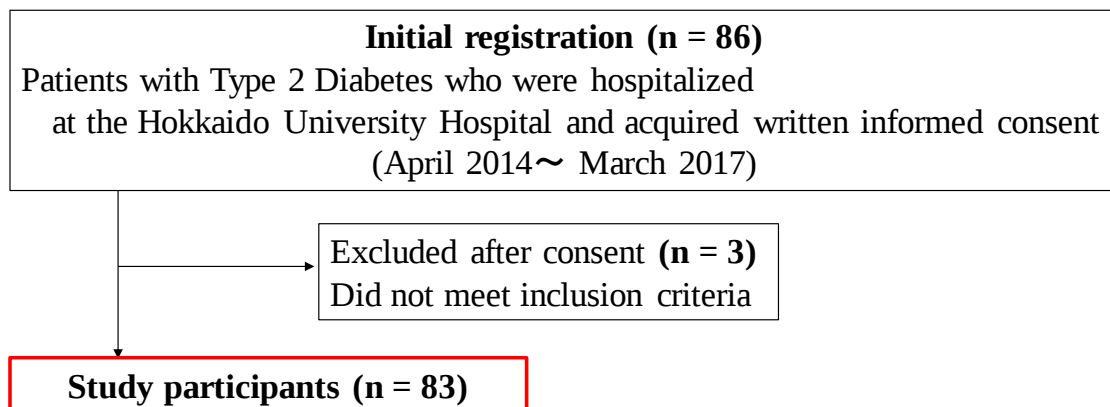


Figure 2 Flowchart of Study Participants

第二項 評価項目

以下の項目を評価項目として設定した。

(1) 主要評価項目

- ① L-、D-乳酸値およびアラニン値と既知の糖尿病診断マーカー(早朝空腹時血糖値 [fasting plasma glucose; FPG]、HbA1c) との相関性

(2) 副次的評価項目

- ① L-、D-乳酸値およびアラニン値と他の診療情報 (インスリン分泌能、肝酵素、血中脂質濃度、患者基本情報、糖尿病合併症、服用薬等) との関連性
- ② MCT基質であるL-乳酸値を輸送するMCT1およびMCT4遺伝子多型における健常人との頻度の違いやこれらのMCT遺伝子多型と診療情報 (既知の糖尿病診断マーカー、インスリン分泌能、肝酵素、血中脂質濃度、患者基本情報、糖尿病合併症、服用薬等) との関連性

第三項 症例数の設定根拠

本研究の主要評価項目である2型糖尿病患者におけるL-、D-乳酸値およびアラニン値と既知の糖尿病診断マーカーとの相関性を評価するため、関連ありとする相関係数の絶対値を0.3と設定し、両側有意水準5% (α エラー0.05)、検出力80% (β エラー0.2) として必要症例数を算出した。

第四項 統計解析

本研究では以下の統計解析方法を用いて解析を行った。

- (1) L-、D-乳酸値およびアラニン値と既知の糖尿病診断マーカーや診療情報との相関

Spearman's rank correlation test

- (2) L-乳酸値四分位数 (L-lactate quartiles) 解析

Kruskal-Wallis test、Steel-Dwass test

- (3) 両群間での L-乳酸値の比較

Mann-Whitney's U testあるいはFisher's exact test、Logistic regression analysis

統計解析処理の後、 $P < 0.05$ を統計学的有意差ありと判定した。

統計解析はEXCEL統計Ver.7.0、JMP[®] Pro 14.0.0、SPSS version 23を用いて行った。

第三節 実験材料および実験方法

第一項 患者検体

L-、D-乳酸値、アラニン値および遺伝子多型の測定に用いた血液検体は、入院翌日の早朝に10時間以上絶食した状態で採取した。血漿乳酸値およびDNA配列決定に用いる血液は3 mL potassium-EDTA tubes (Becton Dickinson and Company [BD], USA)、血漿アラニン値の測定に用いる血液は3 mL lithium-heparin tubes (BD) の採血管に採取した。

検体はすぐに氷上に静置し、30~60分以内に以下の方法で処理した。

- (1) 乳酸値測定用検体は遠心分離 ($2,000 \times g$, 10 min, 4°C) を行い、得られた血漿をマイクロ遠心チューブに移し、測定時まで -80°C で保管した。
- (2) アラニン値測定用検体は遠心分離 ($500 \times g$, 8 min, 4°C) を行い、得られた血漿をマイクロ遠心チューブに移し、測定時まで -80°C で保管した。
- (3) 遺伝子多型測定用検体は全血にてマイクロ遠心チューブに測定時まで -80°C で保管した。
- (4) ラクテートプロTM2LT-1730[®] (簡易血中乳酸濃度測定器)
ラクテートプロTM2LT-1730[®]を使用し、他の採血と同じタイミングで指先から血液5 μl (米粒半分程度) の1点採血を行った。

第二項 患者診療録

以下の項目について患者診療録から情報を得た (Table 1)。

- (1) 糖尿病診断マーカー：FPG、HbA1c、glycoalbumin (GA)
- (2) 患者基本情報：年齢、性別、罹病期間、喫煙状態、飲酒状況、身長、体重、Body Mass Index (BMI)、腹囲、内臓脂肪量、収縮期、拡張期血圧
- (3) インスリン分泌能指標：グルカゴン負荷試験、尿中または血中CPR

- (delta C-peptide immunoreactivity [Δ CPR], serum C-peptide immunoreactivity [S-CPR], 24-hour urinary excretion rate of C-peptide immunoreactivity [U-CPR/day]), Homeostasis model assessment beta-cell function (HOMA- β)
- (4) インスリン抵抗性指標 : Homeostasis model assessment insulin resistance (HOMA-R)
- (5) 肝酵素 : aspartate aminotransferase (AST)、alanine aminotransferase (ALT)、gamma-glutamyl transpeptidase (γ -GTP)、lactate dehydrogenase (LDH)
- (6) 腎機能 : Urine albumin-to-creatinine ratio (UACR)、estimated glomerular filtration rate (eGFR)、serum creatinine (S-Cr)、blood urea nitrogen (BUN)、creatinine clearance (CCr)
- (7) 血中脂質濃度 : 総コレステロール (total cholesterol; T-CHO)、LDLコレステロール (low-density lipoprotein cholesterol; LDL-C)、HDLコレステロール (high-density lipoprotein cholesterol; HDL-C)、トリグリセリド (triglyceride; TG)、LDL-C:HDL-C ratio (LDL-C/HDL-C)、TG:HDL-C ratio (TG/HDL-C)
- (8) 糖尿病三大合併症 (糖尿病網膜症・糖尿病腎症・糖尿病神経障害)、冠動脈疾患、脳血管障害、動脈硬化の有無
- (9) 疾患名、治療内容 (服用薬・用法・用量・使用期間等)

上記、臨床検査値は入院日翌日の早朝空腹時に同時に採血した血液データである。

Table 1 Laboratory data

Indices of diabetes	FPG, HbA1c, GA
Basic information	Age, Gender, Duration of diabetes, Smoking status, Alcohol intake Family history, Height, Body weight, BMI, Waist, Visceral fat, SBP, DBP
Insulin secretion	Δ CPR, S-CPR, U-CPR/day, HOMA- β
Insulin resistance	HOMA-R
Kidney function test	UACR, eGFR, S-Cr, BUN, CCr
Liver enzyme activity	AST, ALT, LDH, γ -GTP
Blood lipid concentration	T-CHO, LDL-C, HDL-C, TG, LDL-C/HDL-C, TG/HDL-C
Diabetes complications	Diabetic retinopathy, Diabetic nephropathy, Diabetic neuropathy Coronary artery disease, Cerebrovascular disease
Medication use	SU, Glinide, BG, TZD, DPP4i, GLP-1, α GI, SGLT2i, Insulin Lipid-lowering drug (including HMG-CoA), Antihypertensive drug

SU, sulfonylurea; BG, biguanide; TZD, thiazolidinediones; DPP4i, dipeptidyl
 peptidase-4 inhibitor; GLP-1, glucagon-like peptide-1; α GI, alpha-glucosidase
 inhibitor; SGLT2i, sodium-dependent glucose transporter 2 inhibitor; HMG-CoA,
 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitor;

第三項 L-、D-乳酸値測定

(1) 試薬

使用した主な試薬と購入先を以下に示す。

試薬名	購入先
4-nitro-7-piperazino-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-PZ)	東京化成工業
Triphenylphosphine (TPP)	東京化成工業
2,2'-dipyridyl disulfide (DPDS)	東京化成工業
Sodium D-lactate	Sigma-Aldrich
Sodium L-lactate	Sigma-Aldrich
Methanol (CH ₃ OH)	富士フイルム和光純薬
Acetonitrile (CH ₃ CN)	富士フイルム和光純薬
Formic Acid (abt.99%)	富士フイルム和光純薬

その他の試薬は Sigma-Aldrich、富士フイルム和光純薬、ナカライテスク等の特級および生化学用のものを用いた。

(2) 機器

Pump (HITACHI L-7100)、Column oven (Shimadzu CTO-6A)、Detector (HITACHI L-7485)、Chromato-PRO (Run Time Instruments)

(3) 解析ソフト

Chromato-PRO バージョン5.0.0.199 (Run Time Instruments)

(4) 乳酸蛍光誘導体化反応

第一章、第三節、第一項で得られた血漿を検討に用いた。血漿中のL-およびD-乳酸の蛍光誘導体化は、Hasegawaらの方法に準拠した²⁰⁾。血漿80 μL に蒸留水50 μL を加え、さらに除タンパク処理のために $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{CN}$ (1:1) 280 μL を添加し、この混合溶液を1 分間攪拌した後に遠心分離 ($800 \times g$, 5 min, 4°C) を行った。この上清をコスモフィルターW[®] (ナカライテスク) でろ過した後、この溶液40 μL を遮光エッペンドルフチューブに移し、2 mM NBD-PZ dissolved in CH_3CN 100 μL 、200 mM TPP dissolved in CH_3CN 30 μL 、200 mM DPDS dissolved in CH_3CN 30 μL を添加し、この混合溶液を数秒間攪拌した後、室温で2時間反応させた。その後、5% formic acid 水溶液200 μL を添加し、この混合溶液を数秒間攪拌し反応を停止させた。誘導体化したこの溶液300 μL をエッペンドルフチューブに移し、エバポレーターで120分間遠心濃縮後、移動相120 μL に溶解し、これをhigh-performance liquid chromatography (HPLC) サンプルとして、70 μL をインジェクションした (Figure 3)。

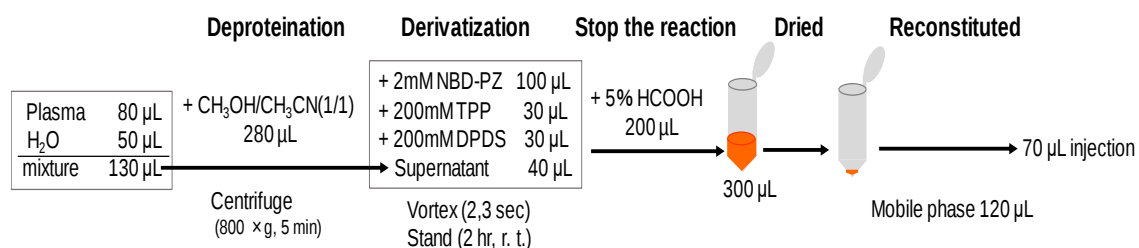


Figure 3 Plasma L- and D-lactate fluorescent derivatization flowchart

(5) HPLC

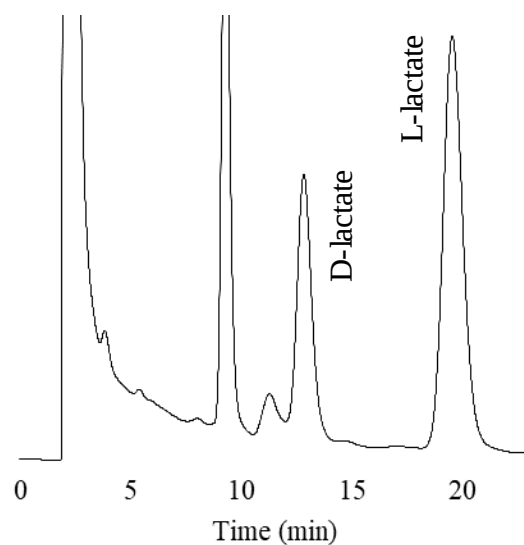
Table 2に示す条件でHPLCにより定量を行った。

Table 2 L-, D-lactate HPLC condition

Column	CHIRALPAK AD-RH (5 μ m, 4.6 $\times$ 150 mm I.D.) (Daicel)
Column Temp.	35°C
Flow rate	1.0 mL/min
Total run time	40 min
Detection	FL Ex 491 nm, Em 547 nm
Eluent	A) CH ₃ OH/HCOOH (pH 2.0) = 3/7, v/v B) CH ₃ OH A/B = 10/90, v/v
Injection	70 μ L

(6) クロマトグラム

2 mM の L-および D-乳酸の HPLC サンプルのクロマトグラムを **Figure 4** に示した。保持時間はそれぞれ 20.0 min、12.5 min であり、ピークの分離に成功した。

**Figure 4 Typical HPLC chromatogram of quantifying plasma L- and D-lactate**

(7) 検量線

- ① 本測定系の L-乳酸の定量限界は 125 μM であった。L-乳酸濃度 125 μM ~2 mM における area 5 点で描いた検量線は、相関係数 $R \geq 0.99$ であり良好な直線性を示した (Figure 5)。

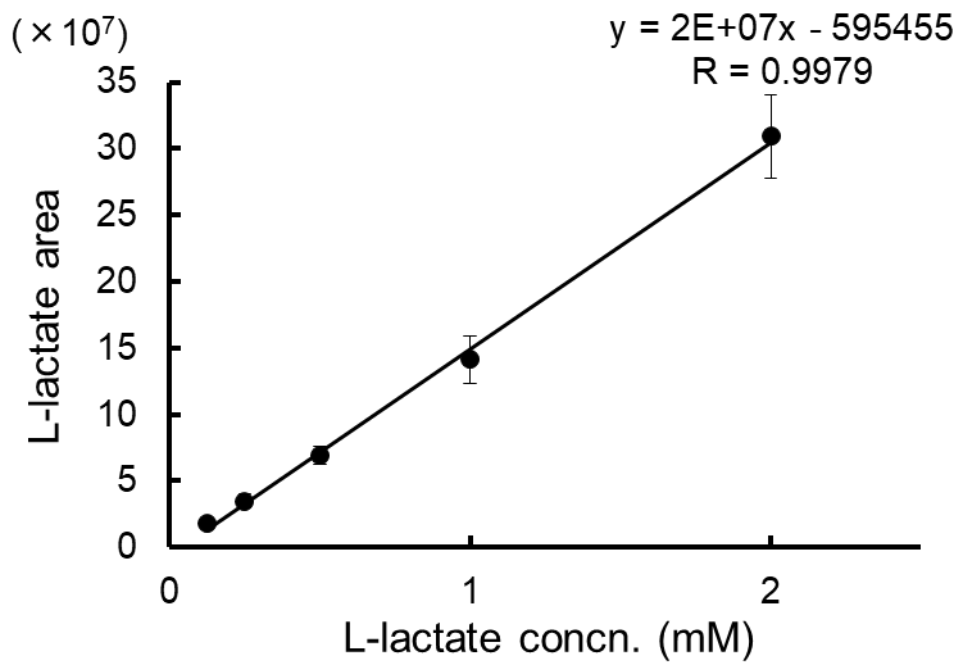


Figure 5 Calibration curve of L-lactate concentration

- ② 本測定系の D-乳酸の定量限界は 125 μM であった。D-乳酸濃度 125 μM ~2,000 μM における area 5 点で描いた検量線は、相関係数 $R \geq 0.99$ であり良好な直線性を示した (Figure 6)。

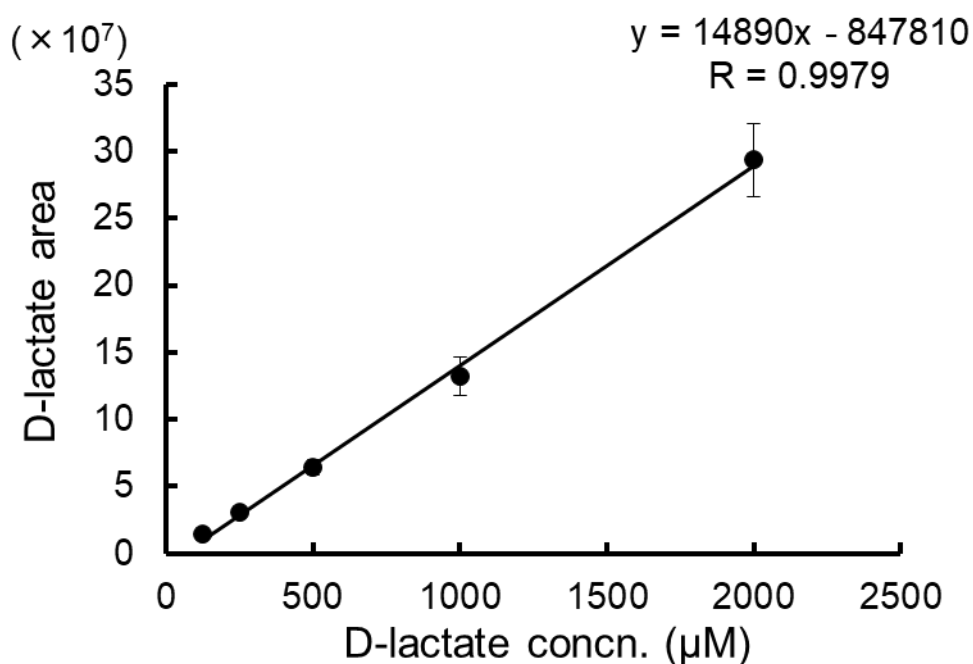


Figure 6 Calibration curve of D-lactate concentration

(8) ラクテートプロTM2LT-1730[®] (簡易血中乳酸濃度測定器)

ラクテートプロTM2LT-1730[®] (アークレイ) は簡易血中乳酸濃度測定器であり、必要な血液量が 5 μl と米粒の半分程度で指先からの採血で済み、侵襲性が少なく簡便な方法である。測定原理はセンサーの電極上に塗布された試薬であるフェリシアン化カリウムとラクテートオキシダーゼとの酵素反応を用いて血液中の L-乳酸濃度に応じて発生する電流を測定する方法である³⁵⁾。検査室で汎用される血漿乳酸測定試薬であるデタミナーLA[®]³⁶⁾と良好な相関があるため、L-乳酸値の測定法として検討した。測定タイミングに関しては第一章、第三節、第一項に示した。

第四項 アラニン値測定

(1) 試薬

使用した主な試薬と購入先を以下に示す。

試薬名	購入先
L-alanine	富士フイルム和光純薬
L-norleucine	Sigma-Aldrich
AccQ Fluor Reagent Kit	Waters
AccQ Fluor Reagent	Waters
Methanol (CH ₃ OH)	富士フイルム和光純薬
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	ナカライテスク
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	ナカライテスク
Tetrahydrofuran (THF)	ナカライテスク

その他の試薬は Sigma-Aldrich、富士フイルム和光純薬、ナカライテスク等の特級および生化学用のものを用いた。

(2) 機器

Heat Block (ASONE EB-303)、Pump (HITACHI L-7100)、Column oven (Shimadzu CTO-6A)、Detector (HITACHI L-7485)、Chromato-PRO (Run Time Instruments)

(3) 解析ソフト

Chromato-PRO バージョン5.0.0.199 (Run Time Instruments)

(4) アミノ酸誘導体化反応

第一章、第三節、第一項で得られた血漿を検討に用いた。血漿中のアラニンのアミノ酸誘導体化は、Wangらの方法に準拠した³⁷⁾。血漿70 μL に3 mM L-norleucine (IS) 30 μL を加え、この混合溶液10 μL にAccQ Fluor Borate Buffer 70 μL を添加した。さらにAccQ Fluor Reagent 20 μL を添加し、直ちに10秒間攪拌して室温で1分間静置した後、55°Cで10分間加熱して誘導体化反応を行った。誘導体化後は、CH₃OH 100 μL を添加して遠心分離 (15,000 $\times$ g, 5 min, 4°C) し、除タンパク処理を行った。これをHPLCサンプルとして、10 μL をインジェクションした (Figure 7)。

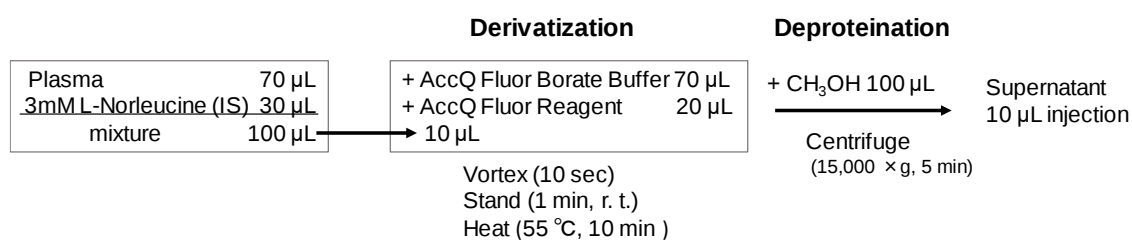


Figure 7 Amino acid derivatization flowchart

(5) HPLC

Table 3に示す条件でHPLCにより定量を行った。

Table 3 Alanine HPLC condition

Column	Inertsil ODS-3 (3 μm , 4.6 $\times$ 100 mm I.D.) (GLScience)
Column Temp.	40°C
Flow rate	1.2 mL/min
Total run time	30 min
Detection	FL Ex 340 nm, Em 450 nm
Eluent	A) CH ₃ OH/50 mM Na ₂ HPO ₄ /50 mM NaH ₂ PO ₄ /THF=10/45/45/1, v/v/v/v B) CH ₃ OH/50 mM Na ₂ HPO ₄ /50 mM NaH ₂ PO ₄ =3/1/1, v/v/v A/B = 100/0 - 15 min - 65/35 - 15 min - 0/100, v/v
Injection	10 μL

(6) クロマトグラム

50 μM アラニンおよび 45 μM ノルロイシン (IS) の HPLC サンプルのクロマトグラムを **Figure 8** に示した。保持時間はそれぞれ 12.5 min、27.5 min であり、ピークの分離に成功した。

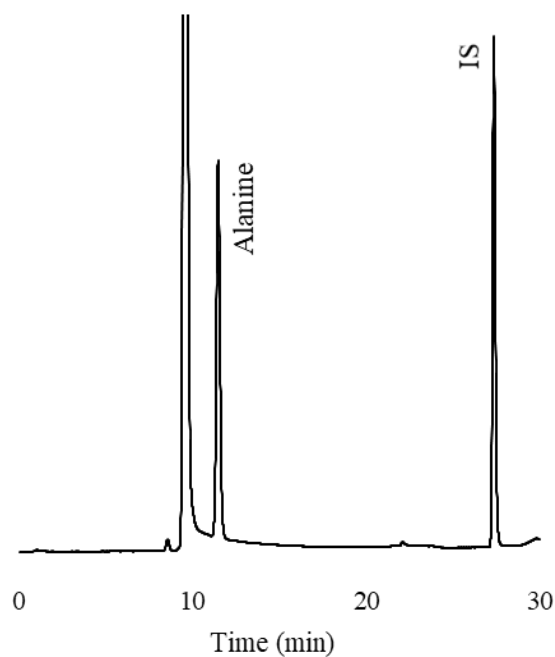


Figure 8 Typical HPLC chromatogram of quantifying plasma alanine

(7) 検量線

本測定系のアラニンの定量限界は 2.5 μM であった。アラニン 2.5~50 μM における peak area ratio (alanine/norleucine) 5 点で描いた検量線は相関係数 $R \geq 0.99$ であり良好な直線性を示した (**Figure 9**)。

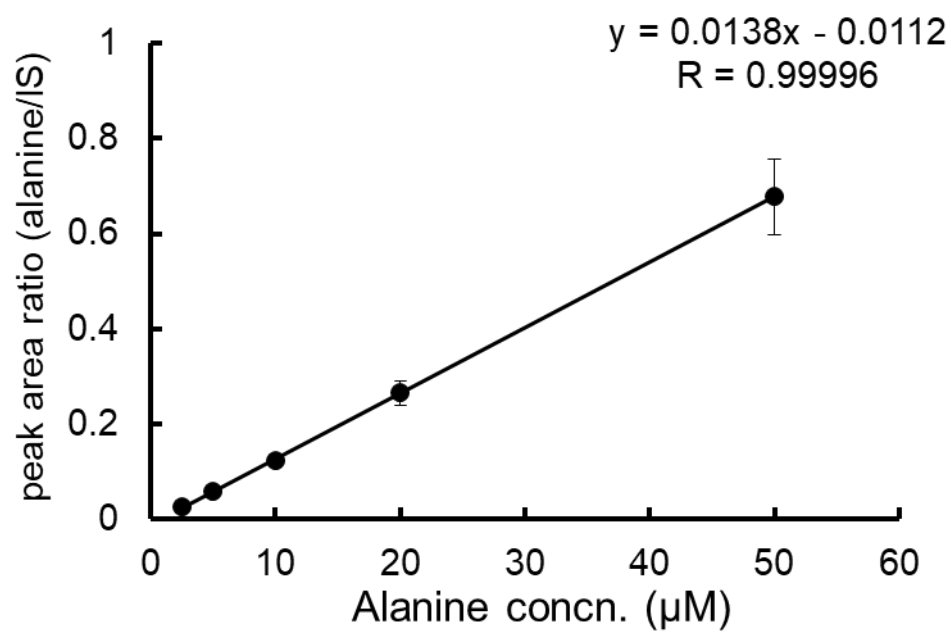


Figure 9 Calibration curve of plasma alanine concentration

第四節 結果

第一項 患者背景

本研究に登録された 2 型糖尿病患者 83 名の患者背景を **Table 4** に示す。

Reference range は北海道大学病院の正常基準値範囲を示している。血漿中の L-乳酸値及びアラニン値の中央値は基準値内であったが、D-乳酸値は基準¹³⁾と比較して高値を示した。また、FPG および HbA1c を含む糖尿病診断マーカーは基準値と比較して高く、高血糖であった。一方、インスリン分泌の指標 (Δ CPR、S-CPR、U-CPR/day)、糖尿病性腎症の指標 (UACR、eGFR、S-Cr)、肝酵素 (AST、ALT、 γ -GTP、LDH) ならびに脂質マーカー (LDL、HDL-C、TG) は基準範囲内であった。インスリン抵抗性の指標 HOMA-R は基準より高く、インスリン抵抗性が認められた。また、動脈硬化の指標である LDL-C/HDL-C は高値であった。その他に BMI や腹囲に関しても基準値と比較して高値を示した。糖尿病合併症に関しては神経障害、網膜症ならびに腎症の有病率はそれぞれ 77.5%、43.4%、34.9%であった。また、血糖降下薬に関する使用はビグアナイド薬、DPP4 阻害薬、インスリンが上位を占め、2 型糖尿病治療として標準的な傾向を示した。

Table 4 Patient characteristics

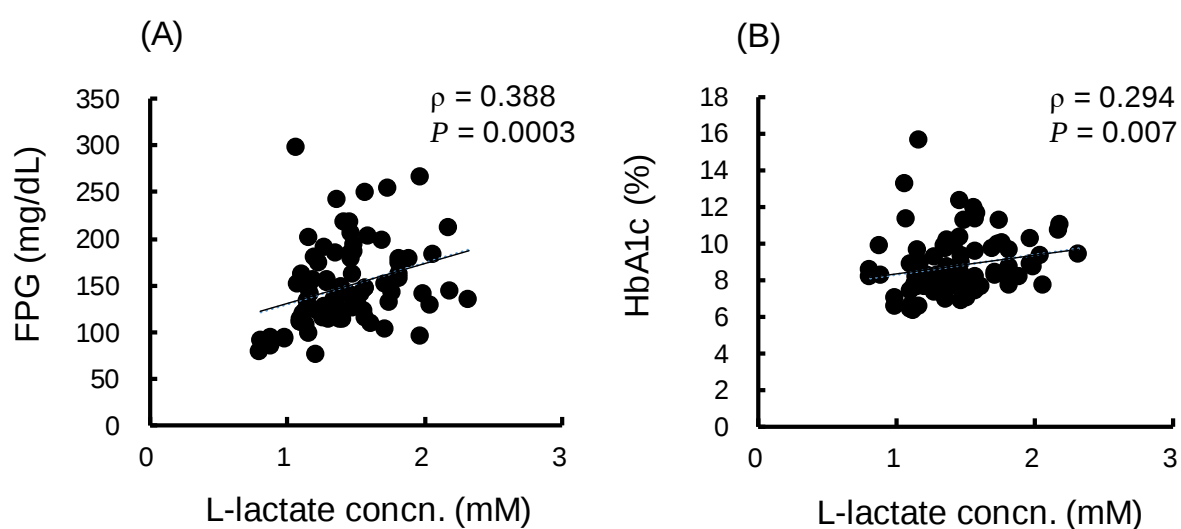
Parameters			Measured value range	Reference range
Indices of diabetes	L-lactate	(mM)	1.4 (1.2 – 1.6)	0.44 – 1.5
	D-lactate	(μM)	198.5 (134.9 – 377.4)	13.0 – 48.0
	Alanine	(μM)	291.9 (254.7 – 373.9)	180 – 560
	FPG	(mg/dL)	141.0 (119 – 178)	73 – 109
	HbA1c	(%)	8.2 (7.6 – 9.7)	4.9 – 6.0
	GA	(%)	20.1 (16.1 – 24.2)	12.3 – 16.5
	Age	(years)	60 (48 – 67)	
	Duration of diabetes	(years)	11.5 (5 – 18)	
	Gender	(Male %)	56.6	
	Smoking status			
Basic information	never	(%)	33	
	former	(%)	37	
	current	(%)	30	
	Alcohol intake			
	never	(%)	53	
	current	(%)	47	
	Family history	(%)	63.3	
	Height	(cm)	163.8 (157.4 – 171.1)	
	Body weight	(kg)	72.2 (61.3 – 87.6)	
	BMI	(kg/m ²)	26.8 (23.2 – 31.7)	<25
Insulin secretion	Waist	(cm)	94.0 (85.5 – 104.0)	
	Visceral fat	(cm ²)	98.0 (63.0 – 131.0)	<100
	SBP	(mmHg)	130 (117 – 148)	<140
	DBP	(mmHg)	74 (67 – 84)	<90
	ΔCPR	(ng/mL)	1.48 (0.8 – 2.6)	2.0 –
	S-CPR	(ng/mL)	2.14 (1.00 – 2.90)	0.69 – 2.45
	U-CPR/day	(μg/day)	50.8 (36.1 – 82.6)	53.6 – 130.8
	HOMA-β	(%)	44.1 (21.5 – 71.1)	40.0 – 100
	Insulin resistance			
	HOMA-R		3.0 (1.8 – 5.2)	≤1.6
Kidney function test	UACR	(mg/g·Cr)	12.3 (5.9 – 59.2)	
	eGFR	(mL/min/1.73m ²)	74.5 (58.8 – 88.0)	
	S-Cr	(mg/dL)	0.7 (0.6 – 0.9)	M 0.65 – 1.07 F 0.46 – 0.79
	BUN	(mg/dL)	14 (12 – 17)	8 – 20
	CCr	(mL/min/1.73m ²)	106.9 (80.8 – 129.9)	108.6 – 191.2
	AST	(U/L)	22 (17 – 32)	13 – 30
	ALT	(U/L)	22 (16 – 41)	M 10 – 42 F 7 – 23
	LDH	(U/L)	167 (145 – 203)	124 – 222
	γ-GTP	(U/L)	26 (17 – 46)	M 13 – 64 F 9 – 32
Blood lipid concentration	T-CHO	(mg/dL)	166 (147 – 186)	142 – 248
	LDL-C	(mg/dL)	100 (80 – 124)	65 – 139
	HDL-C	(mg/dL)	45 (37 – 53)	M 40 – 90 F 40 – 103
	TG	(mg/dL)	112 (86 – 159)	M 40 – 149 F 30 – 149
	LDL-C/HDL-C		2.13 (1.71 – 2.94)	0.00 – 1.50
	TG/HDL-C		2.40 (1.79 – 4.09)	
	CK	(U/L)	88 (57 – 110)	M 59 – 248 F 41 – 153
Diabetic complications	Diabetic nephropathy	(%)	34.9	
	Diabetic retinopathy	(%)	43.4	
	Diabetic neuropathy	(%)	77.5	
	Coronary artery disease	(%)	22.9	
	Cerebrovascular disease	(%)	20.5	
Medication use	SU	(%)	28.9	
	Glinide	(%)	3.6	
	BG	(%)	63.9	
	TZD	(%)	8.4	
	DPP4i	(%)	49.4	
	GLP-1	(%)	16.9	
	αGI	(%)	15.7	
	SGLT2i	(%)	6.0	
	Insulin	(%)	41.0	
	Lipid-lowering drug	(%)	63.9	
	HMG-CoA	(%)	51.8	
	Antihypertensive drug	(%)	53.0	

Data are medians (interquartile range) or %

第二項 血漿L-、D-乳酸値およびアラニン値と既知の糖尿病診断マーカーとの 相関解析

L-、D-乳酸値およびアラニン値と既知の糖尿病診断マーカー (FPG および HbA1c)との相関解析の結果を **Figure 10** に示す。

L-乳酸値は FPG ($\rho = 0.388$, $p = 0.0003$) と有意な正の相関が認められ、HbA1c ($\rho = 0.294$, $p = 0.007$) に関しても同様に有意な関連を示した (**Figure 10A, B**)。一方で、D-乳酸値やアラニン値は既知の糖尿病診断マーカーと有意な相関は認められなかった (**Figure 10C, D, E, F**)。



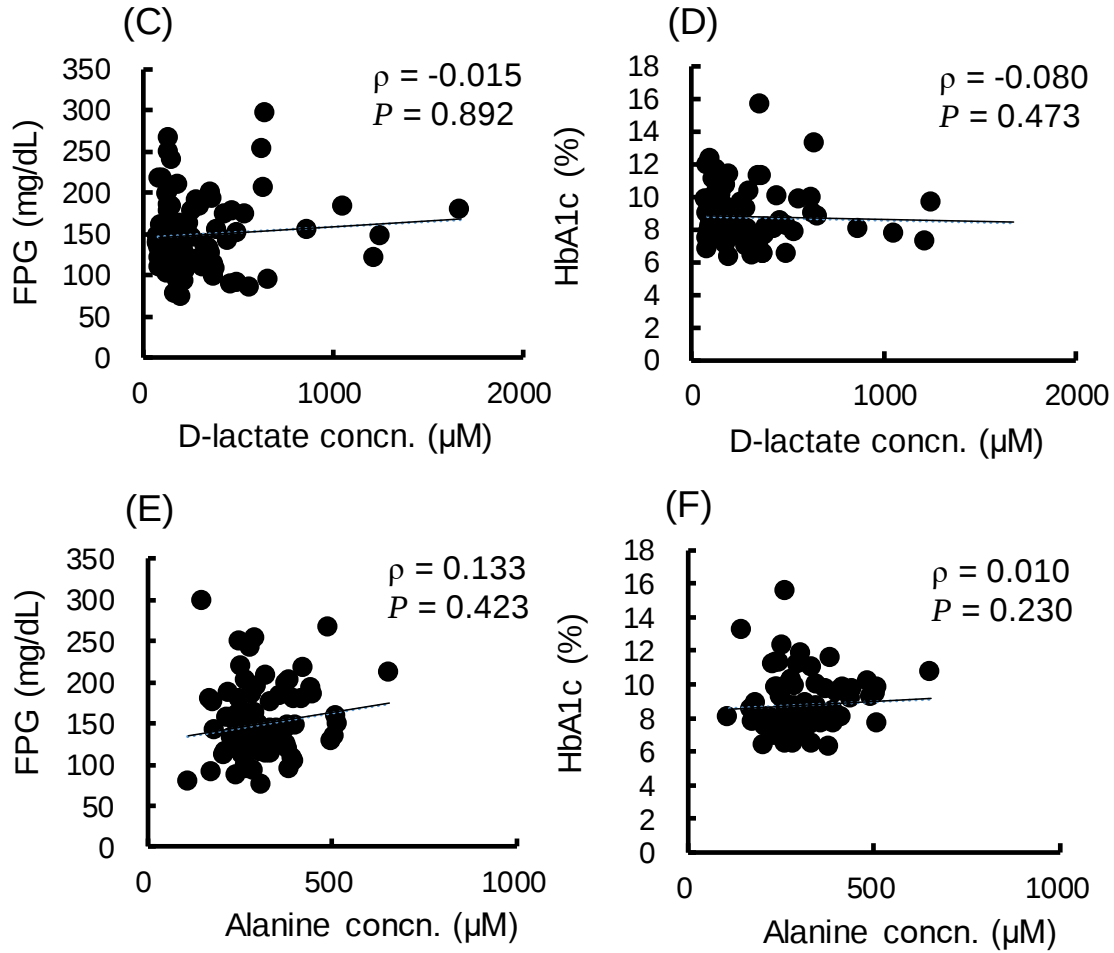


Figure 10 Correlation between plasma L-, D-lactate and alanine levels and diabetes markers in Japanese patients with type 2 diabetes (T2D)

Correlation between plasma L-lactate (A, B), D-lactate (C, D), and alanine (E, F) levels and the diabetes markers including fasting plasma glucose (FPG) and hemoglobin A1c (HbA1c) in Japanese patients with T2D.

さらに L-乳酸値四分位数解析では、FPG は L-乳酸値第 1 四分位数 (quartile 1; Q1) と比較して、L-乳酸値第 3 四分位数 (quartile 3; Q3) および L-乳酸値第 4 四分位数 (quartile 4; Q4) において有意に高い値を示した (**Figure 11A**)。また、HbA1c に関しては L-乳酸値第 1 四分位数 (Q1) と比較し、L-乳酸値第 4 四分位

数 (Q4) において有意に高いことが示された (Figure 11B)。

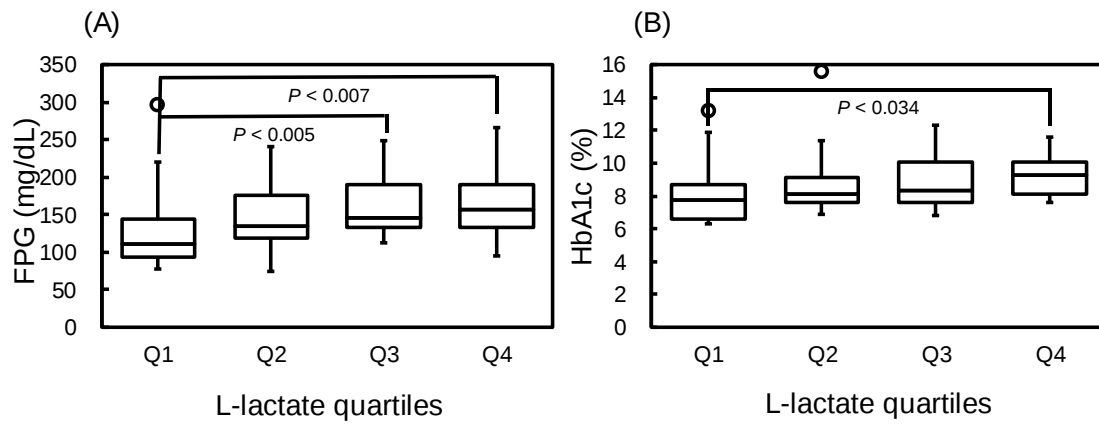


Figure 11 Comparison of fasting plasma glucose (FPG) and hemoglobin A1c (HbA1c) concentrations among the L-lactate quartiles

Comparison of fasting plasma glucose (FPG) (A) and hemoglobin A1c (HbA1c) (B) concentrations among the L-lactate quartiles. $p < 0.05$ was considered to represent statistical significance.

第三項 血漿L-、D-乳酸値およびアラニン値と他の診療情報との相関解析

L-、D-乳酸値およびアラニン値と他の診療情報との相関解析の結果を **Table 5**、**Table 6** ならびに **Table 7** に示す。

Table 5 Spearman's rank correlation coefficients (vs. L-lactate concentration)

Parameters		Correlation coefficient (ρ)	P value
Indices of diabetes	FPG	0.388	< 0.001
	HbA1c	0.294	0.007
	GA	0.238	0.048
Basic information	Age	-0.107	0.334
	Duration of diabetes	0.015	0.897
	Body weight	0.189	0.088
	BMI	0.165	0.136
	Waist	0.188	0.101
	Visceral fat	0.131	0.255
	SBP	-0.119	0.282
	DBP	0.105	0.344
Insulin secretion	Δ CPR	-0.051	0.648
	S-CPR	0.111	0.316
	U-CPR/day	-0.042	0.709
	HOMA- β	-0.245	0.083
Insulin resistance	HOMA-R	0.173	0.224
Kidney function test	UACR	0.086	0.445
	eGFR	0.178	0.107
	S-Cr	-0.026	0.813
	BUN	0.007	0.949
	CCr	0.170	0.143
Liver enzyme activity	AST	0.162	0.143
	ALT	0.253	0.021
	LDH	0.024	0.828
	γ -GTP	0.304	0.005
Blood lipid concentration	LDL-C	0.007	0.951
	HDL-C	-0.123	0.269
	TG	0.301	0.006
	LDL-C/HDL-C	0.117	0.293
	TG/HDL-C	0.259	0.018

Table 6 Spearman's rank correlation coefficients (vs. D-lactate concentration)

Parameters		Correlation coefficient (ρ)	P value
Indices of diabetes	FPG	-0.015	0.892
	HbA1c	-0.080	0.473
	GA	-0.117	0.336
Basic information	Age	-0.209	0.057
	Duration of diabetes	-0.087	0.444
	Body weight	0.155	0.161
	BMI	0.135	0.224
	Waist	0.132	0.252
	Visceral fat	0.154	0.182
	SBP	0.049	0.660
	DBP	0.177	0.108
Insulin secretion	Δ CPR	0.143	0.201
	S-CPR	0.086	0.438
	U-CPR/day	-0.134	0.234
	HOMA- β	0.170	0.233
Insulin resistance	HOMA-R	0.259	0.067
Kidney function test	UACR	0.077	0.492
	eGFR	-0.077	0.489
	S-Cr	0.148	0.181
	BUN	0.080	0.474
	CCr	-0.056	0.628
Liver enzyme activity	AST	0.141	0.203
	ALT	0.139	0.210
	LDH	-0.053	0.634
	γ -GTP	-0.028	0.805
Blood lipid concentration	LDL-C	-0.111	0.319
	HDL-C	0.044	0.692
	TG	-0.060	0.589
	LDL-C/HDL-C	-0.107	0.335
	TG/HDL-C	-0.067	0.545

Table 7 Spearman's rank correlation coefficients (vs. alanine concentration)

	Parameters	Correlation coefficient (ρ)	P value
Indices of diabetes	FPG	0.133	0.230
	HbA1c	0.100	0.374
	GA	0.097	0.423
Basic information	Age	0.162	0.143
	Duration of diabetes	0.170	0.131
	Body weight	0.084	0.449
	BMI	0.077	0.490
	Waist	0.007	0.949
	Visceral fat	-0.008	0.943
	SBP	-0.024	0.829
	DBP	-0.064	0.567
Insulin secretion	Δ CPR	-0.204	0.066
	S-CPR	0.006	0.957
	U-CPR/day	-0.208	0.062
	HOMA- β	0.217	0.126
Insulin resistance	HOMA-R	0.313	0.025
Kidney function test	UACR	-0.027	0.811
	eGFR	-0.021	0.848
	S-Cr	-0.008	0.943
	BUN	-0.008	0.941
	CCr	-0.045	0.703
Liver enzyme activity	AST	0.157	0.155
	ALT	0.135	0.225
	LDH	0.246	0.025
	γ -GTP	0.167	0.131
Blood lipid concentration	LDL-C	-0.102	0.357
	HDL-C	-0.024	0.832
	TG	0.083	0.455
	LDL-C/HDL-C	-0.038	0.730
	TG/HDL-C	0.055	0.621

L-乳酸値は肝酵素である ALT と有意な関連を認め、 γ -GTP に関しても同様に有意な正の相関を示した (**Figure 12B, C**)。しかしながら、AST との間には有意な相関はみられなかった (**Figure 12A**)。また、D-乳酸値またはアラニン値と肝酵素との間に有意な相関は認められなかった (**Figure 12D, E, F, G, H, I**)。

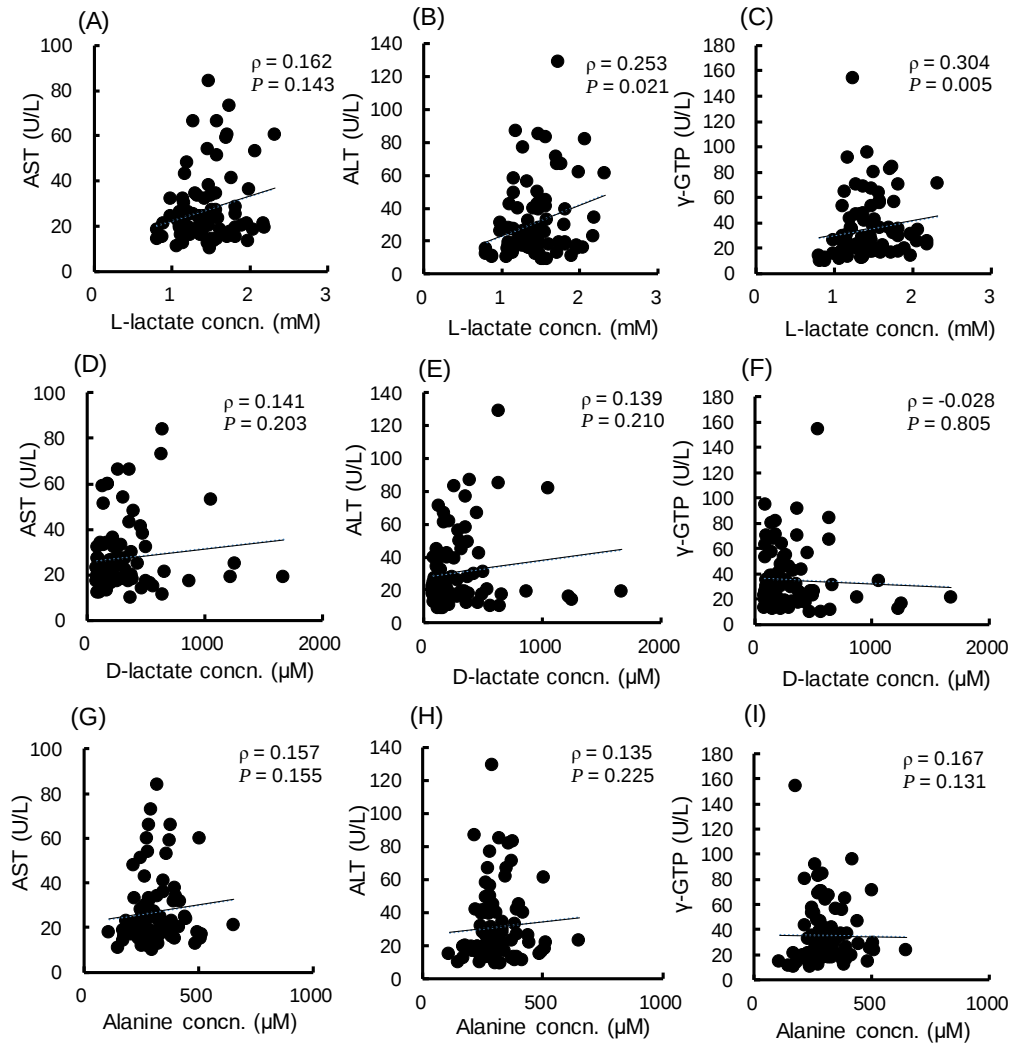


Figure 12 Correlations between plasma L-lactate D-lactate, or alanine concentrations and liver enzyme activities

Correlations between plasma L-lactate (A-C), D-lactate (D-F), or alanine (G-I) and liver enzyme activities (aspartate aminotransferase [AST], alanine aminotransferase [ALT], and gamma-glutamyl transpeptidase [γ-GTP]).

さらに L-乳酸値四分位数解析では、ALT は L-乳酸値第 1 四分位数(Q1)と比較して L-乳酸値第 4 四分位数(Q4)において有意に高かった。γ-GTP は、L-乳酸値第 1 四分位数(Q1)と比較し、L-乳酸値第 3 四分位数(Q3)および L-乳酸値第 4 四分位数(Q4)において有意に高い値を示した (Figure 13A, B)。

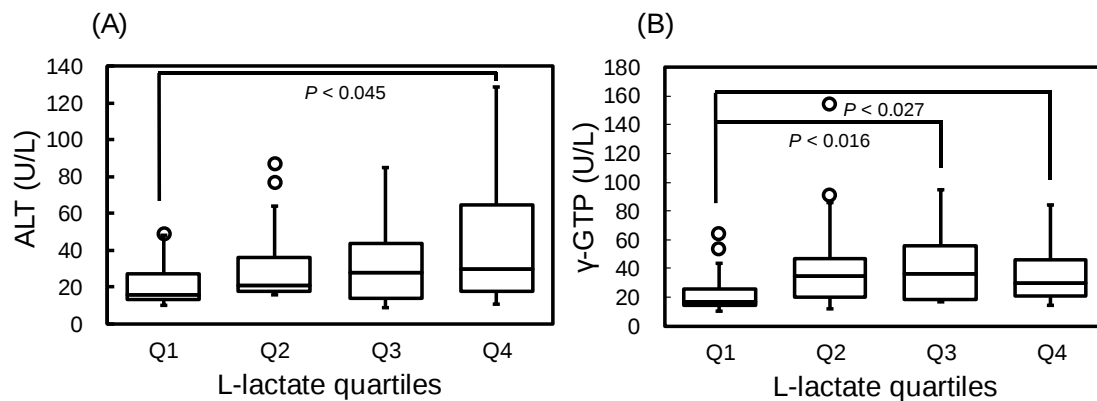


Figure 13 Comparison of alanine aminotransferase (ALT), and gamma-glutamyl transpeptidase (γ-GTP) among the L-lactate quartiles

Comparison of alanine aminotransferase (ALT) (A) and gamma-glutamyl transpeptidase (γ-GTP) (B) among the L-lactate quartiles. $p < 0.05$ was considered to represent statistical significance.

また、L-乳酸値は TG と有意な正の相関が認められ、TG/HDL 比に関しても有意な関連性を示した (Figure 14A, B)。一方で、D-乳酸値およびアラニン値とこれらのマーカーのいずれとの間にも有意な相関はみられなかった (Figure 14C, D, E, F)。

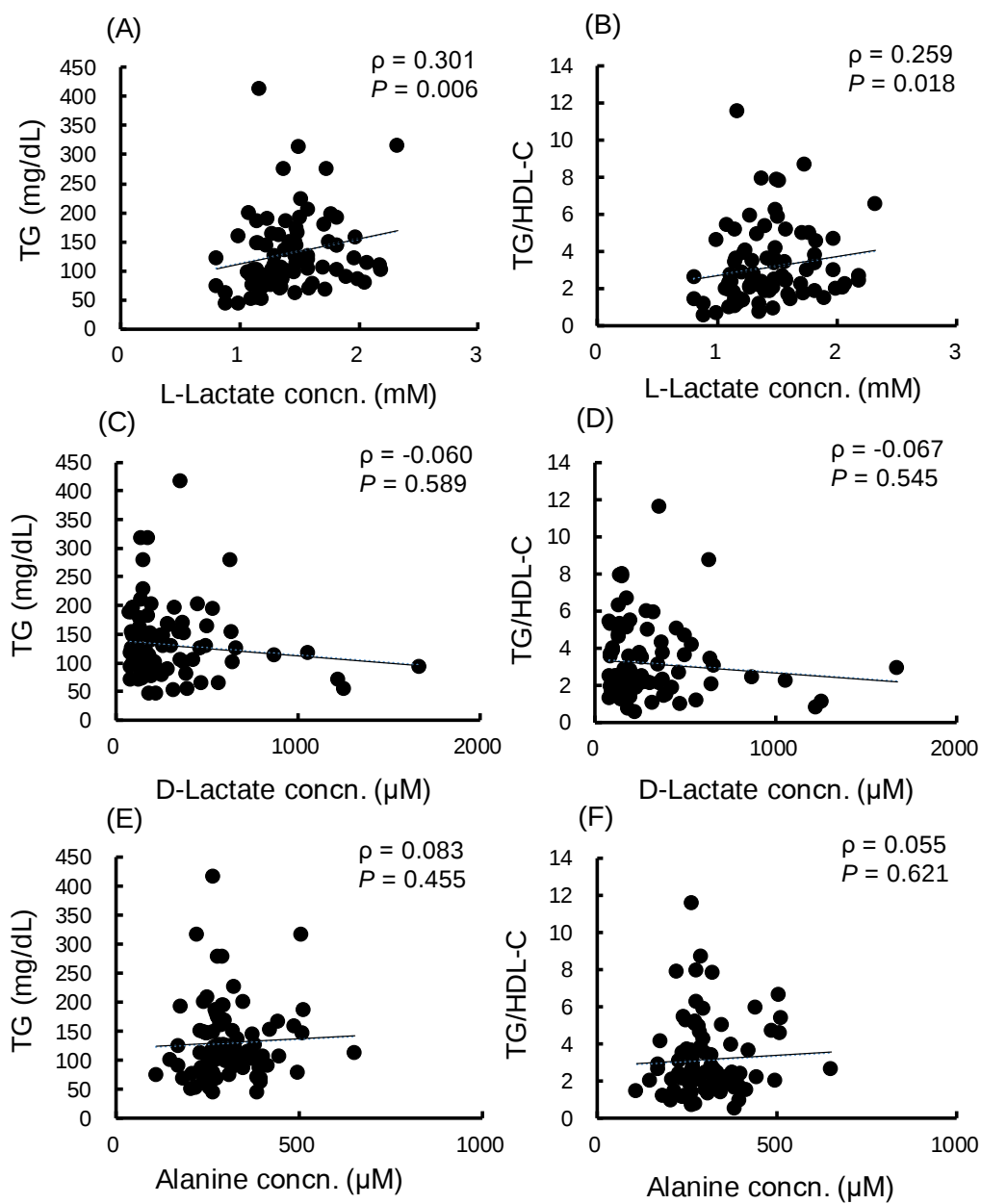


Figure 14 Correlations between plasma L-lactate D-lactate, or alanine concentrations and blood lipid concentration

Correlations between plasma L-lactate (A, B), D-lactate (C, D), or alanine (E, F) and plasma triglyceride (TG) concentration and the TG: HDL-C ratio (TG/HDL-C).

第四項 L-乳酸値正常群、異常群の2群間における検査値および患者背景の解析

L-乳酸値を正常群、異常群の2群に分けた際の検査値および患者背景に関して差があるかを検証した (Table 8)。

乳酸値異常群において乳酸値正常群と比較して糖尿病診断マーカーであるFPG および HbA1c、肝酵素の ALT、 γ -GTP、脂質マーカーの TG、TG/HDL 比において有意に高く、2群間の比較においても Spearman's rank correlation test と類似した結果となった。また、年齢や性別、罹病期間、喫煙状況、飲酒状況、体重、BMI、腹囲、内臓脂肪量、血圧、インスリン分泌能、糖尿病合併症、服用薬に関しては両群間では有意な差は認められなかった。

Table 8 Mann-Whitney U and chi-square test data for L-lactate concentration, comparing patients with normolacticacidemia and hyperlacticacidemia

Parameters			L-lactate (0.56 – 1.50 mM)		P value normolacticacidemia vs hyperlacticacidemia
			normolacticacidemia	hyperlacticacidemia	
	No. of subjects		45	38	
Indices of diabetes	FPG	(mg/dL)	126(112 – 154)	154(134 – 188)	0.002
	HbA1c	(%)	8.1(7.5 – 9.1)	8.9(7.9 – 10.2)	0.013
	GA	(%)	19.0(14.6 – 23.1)	21.1(17.0 – 26.3)	0.040
Basic information	Age	(years)	62(50 – 68)	56(46 – 65)	0.057
	Duration of diabetes	(years)	12(5 – 20)	10(5 – 18)	0.555
	Gender	(Male %)	48.9	65.8	0.185
	Smoking status	(current %)	28.9	31.6	0.979
	Alcohol intake	(current %)	51.1	42.1	0.550
	Family history	(%)	68.2	57.1	0.438
	Body weight	(kg)	68.5(60.3 – 86.7)	75.3(66.7 – 89.4)	0.228
	BMI	(kg/m ²)	25.8(23.0 – 30.7)	28.1(23.6 – 32.0)	0.246
	Waist	(cm)	93.3(84.5 – 101.3)	96.0(86.5 – 106.0)	0.265
	Visceral fat	(cm ²)	98.0(57.5 – 121.0)	97.0(68.5 – 134.3)	0.694
	SBP	(mmHg)	132(122 – 148)	125(113 – 148)	0.212
	DBP	(mmHg)	73(66 – 84)	77(67 – 84)	0.432
	ΔCPR	(ng/mL)	1.40(0.78 – 2.79)	1.74(0.75 – 2.49)	0.841
	S-CPR	(ng/mL)	1.59(0.87 – 2.85)	2.27(1.08 – 2.90)	0.405
Insulin secretion	U-CPR/day	(μg/day)	50.1(35.6 – 82.7)	57.4(35.1 – 82.9)	0.805
	Hepatic function	(Abnormal %)	17.8	44.7	0.015
	AST	(U/L)	21(17 – 26)	24(18 – 44)	0.138
	ALT	(U/L)	19(16 – 28)	32(17 – 53)	0.042
Liver enzyme activity	γ-GTP	(U/L)	23(15 – 42)	32(19 – 55)	0.034
	LDL-C	(mg/dL)	98(73 – 127)	101(84 – 122)	0.648
Blood lipid concentration	HDL-C	(mg/dL)	47(37 – 56)	43(40 – 50)	0.405
	TG	(mg/dL)	102(75 – 149)	126(104 – 177)	0.011
	LDL-C/HDL-C		1.92(1.51 – 3.10)	2.28(1.88 – 2.81)	0.188
	TG/HDL-C		2.14(1.40 – 3.63)	2.82(2.05 – 4.76)	0.033
Diabetic complications	Diabetic nephropathy	(%)	33.3	36.8	0.918
	Diabetic retinopathy	(%)	37.8	50.0	0.370
	Diabetic neuropathy	(%)	81.0	73.7	0.611
	Coronary artery disease	(%)	22.2	23.7	1.000
	Cerebrovascular disease	(%)	20.0	21.1	1.000
	SU	(%)	24.4	34.2	0.462
Medication use	Glinide	(%)	4.4	2.6	1.000
	BG	(%)	53.3	76.3	0.052
	TZD	(%)	6.7	10.5	0.697
	DPP4i	(%)	51.1	47.4	0.905
	GLP-1	(%)	11.1	23.7	0.219
	αGI	(%)	20.0	10.5	0.364
	SGLT2i	(%)	4.4	7.9	0.656
	Insulin	(%)	42.2	39.5	0.976
	Lipid-lowering drug	(%)	60.0	68.4	0.571
	HMG-CoA	(%)	46.7	57.9	0.424
	Antihypertensive drug	(%)	48.9	57.9	0.550

Data are medians (interquartile range) or %.

第五項 L-乳酸値正常群、異常群の2群間におけるロジスティック回帰分析

L-乳酸値が糖尿病診断マーカーと有意な相関が認められたことから、これらの糖尿病診断マーカーが乳酸上昇に影響する独立因子となるか検討するためロジスティック回帰分析を行った。従属変数を L-乳酸値正常群、異常群の 2 値と

し、独立変数は既報を参考に選択し^{34,38-40)}、単変量解析において P values ≤ 0.2 となった因子を対象として、ステップワイズ法 (変数増加法) を用いて実施した。また、連続変数に関しては、名義変数に変換した。単変量解析において、FPG (空腹時 126 mg/dL 以上)、Age (60 歳以上)、性別 (男性)、肝酵素異常 (AST、ALT、 γ -GTP の内、Table 1 の基準値以上)、TG (150 mg/dL 以上)、BG 内服が $P \leq 0.2$ となった (Table 9)。さらに多変量解析の結果、FPG (空腹時 126 mg/dL 以上) が乳酸上昇に影響する独立因子となることが示された (Table 10)。

Table 9 Univariate analysis of risk factors hyperlacticacidemia (L-lactate)

Variable	OR	95% CI	P value
FPG	6.31	2.09 – 19.1	< 0.01 [†]
Age	0.43	0.18 – 1.05	0.06 [†]
Gender (Male)	2.01	0.83 – 4.89	0.12 [†]
Smoking state	1.14	0.44 – 2.91	0.79
Alcohol intake	0.70	0.29 – 1.66	0.41
Family history	0.62	0.25 – 1.56	0.31
BMI	1.68	0.69 – 4.10	0.25
Waist	1.51	0.54 – 4.22	0.43
Visceral fat	0.94	0.38 – 2.30	0.89
Blood pressure	0.63	0.26 – 1.56	0.32
Δ CPR	0.72	0.30 – 1.77	0.48
S-CPR	1.74	0.72 – 4.20	0.22
U-CPR/day	0.68	0.28 – 1.67	0.40
Hepatic function	3.74	1.38 – 10.1	< 0.01 [†]
LDL-C	1.47	0.45 – 4.82	0.53
HDL-C	1.17	0.47 – 2.88	0.74
TG	2.04	0.78 – 5.4	0.14 [†]
TG/HDL-C	1.58	0.64 – 3.91	0.32
Diabetic nephropathy	0.86	0.35 – 2.12	0.74
Diabetic retinopathy	0.61	0.25 – 1.46	0.26
Diabetic neuropathy	1.52	0.53 – 4.36	0.44
Coronary artery disease	0.92	0.33 – 2.57	0.87
Cerebrovascular disease	0.94	0.32 – 2.73	0.91
BG use	2.82	1.09 – 7.29	0.03 [†]
Lipid-lowering drug	1.44	0.59 – 3.64	0.43
HMG-CoA	1.57	0.66 – 3.75	0.31
Antihypertensive drug	1.44	0.60 – 3.43	0.41

OR; odds ratio, 95% CI; 95% confidence interval

[†] P values ≤ 0.2 were included in the multiple logistic regression analysis.

Table 10 Multivariable analysis of risk factors hyperlacticacidemia (L-lactate)

Variable	OR	95% CI	P value
FPG	6.52	1.88 – 22.7	< 0.01*
Age	0.48	0.16 – 1.40	0.18
Gender (Male)	2.74	0.96 – 7.84	0.06
Hepatic function	2.68	0.83 – 8.70	0.10
TG	0.85	0.26 – 2.77	0.78
BG use	2.36	0.80 – 7.01	0.12

OR; odds ratio, 95% CI; 95% confidence interval

*P values <0.05 were considered statistically significant.

第六項 ラクテートプロTM2LT-1730[®] (簡易血中乳酸濃度測定器) と既知の糖尿病診断マーカーとの関連解析

簡易血中乳酸濃度測定器のラクテートプロTM2LT-1730[®] で測定した L-乳酸値と既知の糖尿病診断マーカーとの関連解析の結果を **Figure 15** に示す。

ラクテートプロTM2LT-1730[®] で測定した L-乳酸値と HPLC で測定した L-乳酸値および HbA1c は有意な関連が認められた (**Figure 15A, C**)。しかしながら、FPG とは相関はみられなかった (**Figure 15B**)。

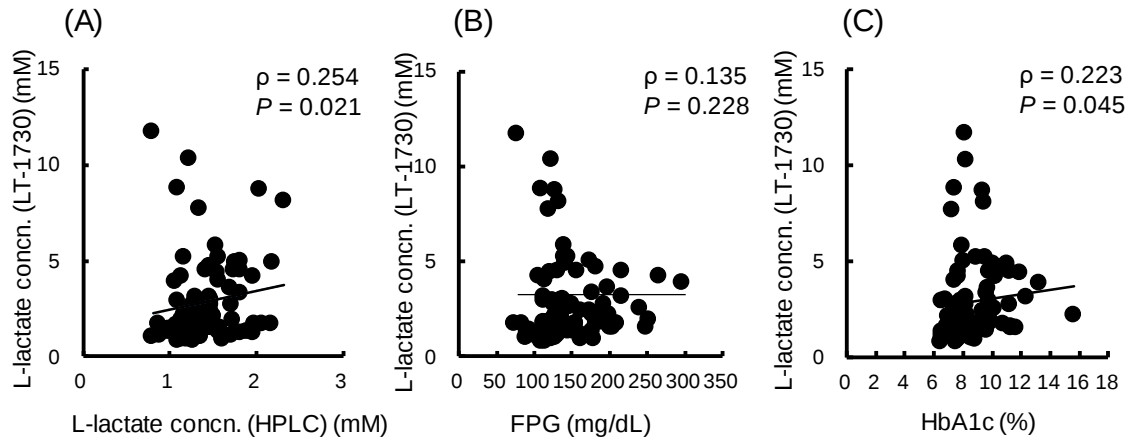


Figure 15 Correlation between whole blood L-lactate (LT-1730) and plasma L-lactate (HPLC) levels and diabetes markers

Correlation between whole blood L-lactate (LT-1730) and plasma L-lactate (HPLC) (A), and the diabetes markers including fasting plasma glucose (FPG) (B) and hemoglobin A1c (HbA1c) (C).

第五節 考察

本研究では代謝エネルギー源の乳酸、アラニン値と 2 型糖尿病病態との関連を検討した。2 型糖尿病入院患者 83 名は高血糖であり、2 型糖尿病病態の特性を有した。また、D-乳酸値が基準より高値であったことは、糖尿病時において血中 D-乳酸が上昇するという既報と一致した¹⁹⁻²¹⁾。さらに今回の症例における年齢、糖尿病罹病期間、喫煙状況、BMI、血圧、LDL-C ならびに HDL-C は他の日本人 2 型糖尿病患者の既報データと同様であった⁴⁾。本研究の糖尿病神経障害の有病率が 77.5%と高く、前述の日本人 2 型糖尿病患者の既報データと比較しても高かった。このことは本研究の 2 型糖尿病患者における糖尿病罹病期間の中央値が 11.5 年と長く、三大合併症の中で神経障害は発症までに要する時間が短いためであると推察される。一方で、本研究における網膜症および腎症の有病率は既報に近いデータであった⁴⁾。また、インスリン抵抗性の指標 HOMA-R は基準より高値を示したが、HOMA-R は FPG および空腹時血中インスリンから算出するため、外因性インスリンを使用している患者では測定できない。本研究では、参加者の 41%がインスリンを使用しており、HOMA-R は限られた数の参加者に対して算出されたためと考えられる。

次に 2 型糖尿病病態との関連を明らかにすべく、代謝エネルギー源の L-、D-乳酸値およびアラニン値と診療情報との相関解析を行った。その結果、L-乳酸値と既知の糖尿病診断マーカーである FPG および HbA1c は有意な相関が認められた。さらに、極端な測定値の影響が少なく、データの広がりや中心傾向を評価しやすいため臨床研究でよく用いられる四分位数解析においても L-乳酸値と既知の糖尿病マーカーは Spearman's rank correlation test と類似した結果を得た。一方で、D-乳酸値やアラニン値はいずれの既知の糖尿病診断マーカーとも有意な差は認めなかった。前述のとおり、今回の症例では D-乳酸値が基準より高値

であったが、糖尿病診断マーカーとの相関がみられなかった。この理由としては罹病期間が長く、糖尿病病態が進行した場合では指標にならない可能性が考えられた。今後、健常人や早期糖尿病患者と D-乳酸値の関連を検討する必要がある。また、糖原性アミノ酸であるアラニン値は基準範囲が広く変動を捉えるのが難しく、糖新生において重要な基質であるが、代謝中間体であるため連動しなかった可能性が考えられる。また、L-乳酸値測定法として簡便な方法であるラクテートプロTM2LT-1730[®] (アークレイ) においても検討した。HPLC で測定した L-乳酸値および HbA1c と有意な関連が認められたものの、FPG とは相関はなく、本研究においては HPLC で測定した L-乳酸値と比較して精度が低い可能性が示された。要因としてラクテートプロTM2LT-1730[®]は汗、検体量、環境温度の影響を受けやすく正確な手技で測定しないと正しい測定結果を得られないため、今回の検討では、測定手技にバラつきが生じた可能性が考えられた。

L-乳酸値と糖尿病診断マーカーとの間に相関が認められたので、次に糖代謝において重要な役割を果たしている肝臓に着目し、肝酵素と L-乳酸値との関連を検討した。L-乳酸値は肝酵素である ALT および γ -GTP と有意な相関が認められた。四分位数解析においても L-乳酸値と肝酵素は Spearman's rank correlation test と類似した結果を得た。しかしながら、AST との間には有意な相関は認めなかった。これは AST が ALT および γ -GTP と異なり、肝臓に特異的に分布していないためと考えられる。Wang らは ALT および γ -GTP の高値は 2 型糖尿病のリスク増加と有意に関連していると報告しており⁴²⁾、また韓国の研究グループでは脂肪肝疾患のない患者における γ -GTP または ALT と 2 型糖尿病リスクの間に相関があることが明らかにされ⁴³⁾、このことは脂肪肝に影響されないことを示唆している。さらに、ALT の高値はより低い肝インスリン感受性に関連し、2 型糖尿病の発症を予測すること⁴⁴⁾、また、高い γ -GTP は 2 型糖尿病発症のた

めの重要な経路である酸化ストレス⁴⁵⁾や炎症⁴⁶⁾を介することが見出されている。しかし、ALT または γ -GTP と 2 型糖尿病との関連は全身インスリン抵抗性^{44, 47)}、および血中脂質濃度⁴⁷⁻⁵⁰⁾のような 2 型糖尿病発症における他の重要な病理学的特徴とは独立していることが示されている。いくつかの研究において ALT および γ -GTP を指標とすると 2 型糖尿病リスクの予測性を改善することが報告されている^{48, 51-54)}。

続いて肝酵素と同様に糖尿病との関連が報告されている脂質マーカーと L-乳酸値との関連を調査した。その結果、L-乳酸値は TG や TG/HDL-C と有意な相関が認められた。TG および TG/HDL-C はいくつかの先行研究においてインスリン抵抗性のサロゲートマーカーとして報告されている^{38, 55, 56)}。この結果からも酸化能マーカーである L-乳酸値の上昇が糖尿病リスクと関連する可能性が示された。しかし、L-乳酸値とインスリン抵抗性の代表的指標である HOMA-R との間に有意な相関関係が認められなかったことは、前述のとおり限られた数の患者に対して算出されたことが考えられる。

続いて、L-乳酸値を正常群、異常群の 2 群に分けた際の検討においても、糖尿病診断マーカー、肝酵素の ALT、 γ -GTP、脂質マーカーの TG、TG/HDL-C において Spearman's rank correlation test と同様に有意な差が認められた。一方、本研究では糖尿病合併症の有病率は両群間で有意な差はなかった。糖尿病合併症との関連は副次的評価項目であったため検証にはより大きなサンプルサイズが必要と考える。また、服用薬で乳酸代謝に影響を与える可能性が懸念された BG 薬の服用率^{57, 58)}は今回の結果からは統計上、両群間で有意な差はなく、さらに、本研究のメトホルミン服用群とメトホルミン非服用群に分けた際の L-乳酸値の中央値は近似していた (1.3 mM [1.1~1.5] vs 1.5 mM [1.3~1.7]) (data not shown)。

また、BG 薬以外にも高乳酸血症のリスク因子が存在するため^{34, 38-40)}、今回の

主要評価項目である糖尿病診断マーカーが乳酸上昇の独立因子となるか検討するため、ロジスティック回帰分析を行った。HbA1c に関しては 2 型糖尿病入院患者 83 名中、基準値範囲内の患者は 2 名しかおらず名義変数に変換することが難しかった。また、HbA1c は FPG と相関が強いため、独立変数として FPG を選択した。多変量解析の結果、FPG が乳酸上昇に影響する独立因子となった。

Scheijen らは健常人と比較して 2 型糖尿病患者において L-乳酸濃度が高いことを報告している²¹⁾。Juraschek らは酸化能のマーカーである血漿中乳酸の上昇が糖尿病リスクと関連し、酸化能低下が糖尿病発症に関与する可能性を示している³⁹⁾。また、乳酸は酸化的呼吸障害のマーカーでもあり⁵⁹⁾、ミトコンドリア機能障害と関連し¹⁴⁾、ミトコンドリア機能の喪失は糖尿病を含む様々なヒトの疾患に関係しているとされている⁶⁰⁾。

これらの知見は、本研究の L-乳酸値が FPG および HbA1c といった既知の糖尿病診断マーカーと関連し 2 型糖尿病において増加することを支持する。これまでの臨床研究では不明であった採血点に関して、また、本研究では L-乳酸値と既知の糖尿病診断マーカーをはじめとした臨床検査値の採血を同時に行っていることからデータの信頼性が高いと考える。

第六節 まとめ

血漿 L-乳酸値は既知の糖尿病診断マーカーと相関し、2 型糖尿病病態時に上昇することが明らかになった。また、FPG は L-乳酸値上昇の独立因子であることが示唆された。L-乳酸値は 2 型糖尿病リスクとの関連や予測因子として報告がある肝酵素 (ALT や γ -GTP) やインスリン抵抗性のサロゲートマーカーである TG および TG/HDL-C と相関が認められたことから、酸化能マーカーである血漿 L-乳酸値は 2 型糖尿病の有用な予測因子である可能性が示された。一方、副次的評価項目であった糖尿病合併症との関連はなかった。今回のサンプルサイズに関し、主要評価項目である代謝エネルギー源と既知の糖尿病診断マーカーとの相関の検討においては適切であったが、糖尿病合併症との関連を明らかにするためにはより大きなサンプルサイズが必要と考える。また、本研究では入院した 2 型糖尿病患者を対象としたため、罹病期間が比較的長い患者が多く、今後、健常人、境界型糖尿病、早期糖尿病患者を含めた検証が望まれる。

第二章 MCT 遺伝子多型が糖尿病病態に及ぼす影響

第一節 緒言

MCT は推定 12 回膜貫通型の膜タンパク質であり、14 種類のアイソフォームが知られており、内因性および外因性のモノカルボン酸を輸送し、乳酸の血中濃度および組織内濃度は MCT により厳密に制御されている。その中で MCT1 および MCT4 は代謝エネルギー源の乳酸やピルビン酸を輸送する。MCT は細胞内 pH やエネルギー代謝の調節に関与し、生体内の恒常性に寄与している²⁵⁾。当研究室において MCT1 T1470A 遺伝子多型により L-乳酸輸送が増加することを報告している²⁷⁾。MCT 遺伝子多型に関して、当研究室で日本の健常人において MCT1 および MCT4 遺伝子多型が存在することを見出している³⁰⁾。また、MCT 遺伝子多型は疾患や機能に関連することが報告されており、MCT1 において rs1049434 (D490E) が運動機能と有意に相関し^{31, 32)}、rs606231302 (R313Q) はケトアシドーシスの重症度に関連することが示されている³³⁾。糖尿病に関連する MCT 遺伝子多型としては、MCT11 や MCT13 が報告されている⁶¹⁻⁶⁴⁾。

第一章で MCT 基質である L-乳酸値と糖尿病病態に関連が見られた。しかしながら、これまで糖尿病病態時において MCT 発現が変動することが知られている²⁹⁾ものの、MCT やその遺伝子多型と 2 型糖尿病の関連について未だに不明な点が多く、検証はまだ十分ではない。

本章では MCT1 および MCT4 に着目し、その遺伝子多型が 2 型糖尿病病態に及ぼす影響を明らかにするため、MCT1 および 4 遺伝子多型の頻度の違いやこれらの遺伝子多型と糖尿病病態との関連性について検討した。

第二節 試験方法

第一項 試験デザイン

第一章 第二節 第一項と同一である。(臨床研究番号: 自013-0196)

第二項 評価項目

第一章 第二節 第二項と同一である。

第三項 統計解析

本研究では以下の統計解析方法を用いて解析を行った。

(1) 遺伝子多型頻度の比較

Fisher's exact test

(2) 両群間でのMCT1 T1470A遺伝子多型の比較

Mann-Whitney's U testあるいはFisher's exact test

統計解析処理の後、 $P<0.05$ を統計学的有意差ありと判定した。

統計解析ソフトは第一章 第二節 第四項と同一である。

第三節 実験材料

第一項 患者検体

第一章 第三節 第一項と同一である。

第二項 患者診療録

第一章 第三節 第二項と同一である (Table 1)。

第三項 試薬

使用した主な試薬と購入先を以下に示す。

試薬名	購入先
Relia Prep Blood gDNA Miniprep System	Promega
PfuUltra High Fidelity DNA Polymerase kit	Agilent Technologies
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit	Thermo Fisher Scientific
Ethanol (C ₂ H ₅ OH)	富士フイルム和光純薬
Sodium acetate Trihydrate	富士フイルム和光純薬
Acetic acid	富士フイルム和光純薬
Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid, disodium salt, dihydrate	DOJINDO
Hi-Di Formamide	Applied Biosystems

その他の試薬は Sigma-Aldrich、富士フイルム和光純薬、ナカライテスク等の特級および生化学用のものを用いた。

第四項 機器

Thermal cycler (BIO-RAD T100)、Concentrator plus (eppendorf)、Heat Block (ASONE EB-303)、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)

第五項 解析ソフト

Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) 、
Sequence Scanner Software v.2 (Thermo Fisher Scientific) 、 PolyPhen-2
(<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) 、 SIFT (<http://sift.jcvi.org/>)

第四節 実験方法

第一項 患者血液からの gDNA 抽出

第二章、第三節、第一項で得られた患者血液から gDNA 抽出を行った。gDNA 抽出は Relia Prep Blood gDNA Miniprep System を用いた。Proteinase K 20 μ L に患者血液 200 μ L を添加し、緩やかに 5 回ピペッティングを行った。Cell Lysis Buffer 200 μ L を加え、10 秒間攪拌した後、56°C で 10 分間インキュベートした。Binding Buffer 250 μ L を加え、10 秒間攪拌した後、Collection Tube に組み合わせた ReliaPrep Binding Column にサンプルをマウントした。ライセートが完全に溶出するまで遠心分離 (20,000 $\times$ g, 1 min, 4°C) を行い、ろ液を捨てた。Column wash Solution 500 μ L を加え、遠心分離 (20,000 $\times$ g, 3 min, 4°C) を行い、ろ液を捨てた。この操作を 3 回繰り返した。Collection Tube が空の状態です遠心分離 (20,000 $\times$ g, 3 min, 4°C) 後、ReliaPrep Binding Column を 1.5 mL マイクロチューブにマウントした。Nuclease free water (Promega) 50 μ L を加え、1 分間静置した後、遠心分離 (20,000 $\times$ g, 1 min, 4°C) を行った。抽出により得られたサンプルを gDNA サンプルとして用いた。

第二項 目的配列の PCR

得られた gDNA サンプルについて、PfuUltra High Fidelity DNA Polymerase kit を用いて目的配列の PCR を行った (Table 11)。なお、Primer3Plus を使用し、MCT1 および MCT4 はゲノム上でコーディング領域が 4 ヲ所に分かれているため、それぞれあるいはいくつかを合わせた領域を増幅するように primer を設計した (Table 12)。

PCR 反応後の溶液について C₂H₅OH 沈殿精製 (C₂H₅OH/Sodium acetate) を行った。反応溶液 10 μ L に Nuclease free water 15 μ L、3 M Sodium acetate (pH 5.2) 5 μ L、

99.5% C₂H₅OH 75 µL を添加した。室温で 20 分間静置した後、遠心分離 (20,000 × g, 30 min, 4°C) を行った。上清を除いた後、75% C₂H₅OH 100 µL でリンスし、遠心分離 (20,000 × g, 10 min, 4°C) を行った。上清を除いた後、2 分間減圧乾固し、Nuclease free water 10 µL に溶解した。これを鋳型 DNA サンプルとして反応に用いた。

第三項 シーケンス反応

得られた鋳型 DNA サンプルについて、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit を用いてシーケンス反応を行った (Table 11)。

シーケンス反応後の溶液について、C₂H₅OH 沈殿精製 (C₂H₅OH/EDTA) を行った。反応溶液 10 µL に Nuclease free water 15 µL、125 mM EDTA (pH 8.0) 6 µL、99.5 % C₂H₅OH 75 µL を添加した。室温で 15 分間静置した後、遠心分離 (20,000 × g, 20 min, 4°C) を行った。上清を除いた後、75 % C₂H₅OH 100 µL でリンスし、遠心分離 (20,000 × g, 10 min, 4°C) を行った。上清を除いた後、2 分間減圧乾固し、Hi-Di Formamide 20 µL に溶解した。これをシーケンスサンプルとして反応に用いた。

第四項 キャピラリー電気泳動

シーケンスサンプルを 95°C で 2 分間加熱した後、氷上で急冷した。サンプルを MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific) に移し、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer を用いてキャピラリー電気泳動及び蛍光検出を行い、MCT 遺伝子コーディング領域の塩基配列を解析した。Primer 配列は Table 13 に示す。決定した塩基配列と reference 配列 (GRCh38) と比較して、遺伝子多型の有無を解析した。

Table 11 PCR condition

PfuUltra DNA Polymerase		BigDye Terminator	
Reaction mixture		Reaction mixture	
10 × buffer	1 × (2 mM Mg ²⁺)	2.5 × Premix	1 ×
dNTPs	each 200 μM	5 × buffer	1 ×
Forward primer	0.4 μM	Sequence primer	0.16 pmol/μL
Reverse primer	0.4 μM	PCR template	0.5–2 ng/μL
Polymerase	0.05 U/μL		
gDNA	1–2 ng/μL		
PCR cycle		PCR cycle	
95°C	2 min	96°C	1 min
↓		↓	
95°C	30 sec	96°C	10 sec
↓		↓	
55–60°C	30 sec	50°C	5 sec
↓		↓	
72°C	2–5 min	60°C	4 min
↓			
72°C	10 min		

Table 12 Primer sequences for PCR analysis

Isoform	Region		Primer sequence (5' to 3')	Length (bp)	Annealing temperature (°C)	Extension time (min)
MCT1 / SLC16A1	CDS1	Forward	GGATTACTAATAGGCATGATCCACCAC	623	56	2
		Reverse	GATACATCAGTTGGAGCAAATCAAG			
	CDS2	Forward	TCCATGGCACCCAACACCG	1770	57	2
		Reverse	CACTCTCGCACCAAGTTGCC			
	CDS3	Forward	CTCACAACAGTGACCTGTGCC	986	55	2
		Reverse	ATCCCGCATAGACACAGAATCC			
	CDS3–4	Forward	TGAGAAAGCTGGAAAATCTGGTG	3962	56	4.5
		Reverse	GAGCACCCTGGTAGATTACAGGC			
MCT4 / SLC16A3	CDS1	Forward	AGCCACTGCCCTTTAGAGCC	722	57	2
		Reverse	AGCCGACCCGTTGGACAG			
	CDS2–3	Forward	AAGGTGGCTGTTCC TGAGCTG	1567	59	2
		Reverse	CTAATGGAGACCCGCTAGCCC			
	CDS4	Forward	CGTGACTCCTGCCACCAACCG	1019	59	2
		Reverse	GGTTTATTTCCATCTTCCAGGGGTG			

Table 13 Primer sequences for sequence analysis

Isoform	Region	Primer sequence (5' to 3')
MCT1 / SLC16A1	CDS1	GGATTACTAATAGGCATGATCCACCAC
	CDS2	AAGAACCTTGTGAACATCCATTACC
	CDS3	CTACAAGTCCCATAGATGGTCG
	CDS3–4	AGCATCAAGGGTACATAAATGAGAAAG CATGATGCATTATAAACAGAGGATCAG
MCT4 / SLC16A3	CDS1	TCCACCAGACACCAGGTCAG TGTCATCATGGCCTGCGCTC
	CDS2–3	TGAGCCTGTGGGAACCTG GGTGAGCTACGCCAAGGAC
	CDS4	TAACCTTGCGGCTTGGCTTC

第五節 実験結果

第一項 確認された MCT 遺伝子多型および頻度

今回の 2 型糖尿病患者 83 名において、MCT1 および MCT4 のコーディング領域の遺伝子解析を行った。確認された MCT 遺伝子多型の波形を **Table 14** に示す。その結果、MCT1 では rs1049434 (T1470A, D490E) の 1 つ、MCT4 では rs368788465 (C641T, S 214F) の 1 つの遺伝子多型が確認された。また、MCT1 T1470A 多型では野生型、ヘテロ変異型、ホモ変異型の 3 つ、MCT4 C641T 多型では野生型、ヘテロ変異型の 2 つが認められた。今回の 2 型糖尿病患者における MCT1 T1470A 多型のアレル頻度は 0.590 であった。一方で、MCT4 C641T 多型のアレル頻度は 0.012 であった (**Table 15A**)。2 型糖尿病患者と日本の健常人におけるアレル頻度の比較結果を **Table 15B** に示す。MCT1 T1470A 多型の 2 型糖尿病患者のアレル頻度 0.590 は健常人 0.701 と比較して低値であった。一方、MCT4 C641T 多型のアレル頻度は 2 型糖尿病患者、健常人共に低く、類似していた。**Figure 16** は MCT1 および 4 遺伝子多型のトポロジーモデルであり、それぞれのアミノ酸変異部分を示す。

Table 14 Electropherograms of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of SLC16A1 and SLC16A3 detected in this study.

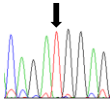
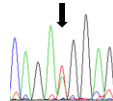
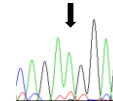
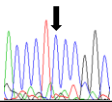
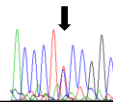
SNP ID				Sequence waveform		
Isoform	Nucleotide	Amino acid	dbSNP	wt/wt	wt/mt	mt/mt
MCT1	T1470A	D490E	rs1049434			
MCT4	C641T	S214F	rs368788465			

Table 15A MCT allele frequency (Type 2 diabetes)

isoform	SNP ID		dbSNP	Allele frequency (n = 83)	genotype frequency		
	base	amino acid			wt/wt	wt/mt	mt/mt
MCT1	T1470A	D490E	rs1049434	0.590	18	32	33
MCT4	C641T	S214F	rs368788465	0.012	81	2	0

Table 15B Comparison of MCT allele frequency (Type 2 diabetes and Healthy Japanese people)

Isoform	SNP ID (base)	T2D patient		Healthy people		P value
		Allele	frequency	Allele	frequency	Healthy people vs T2D patient
MCT1	T1470A	0.590		0.701		0.040
MCT4	C641T	0.012		0.005		0.606

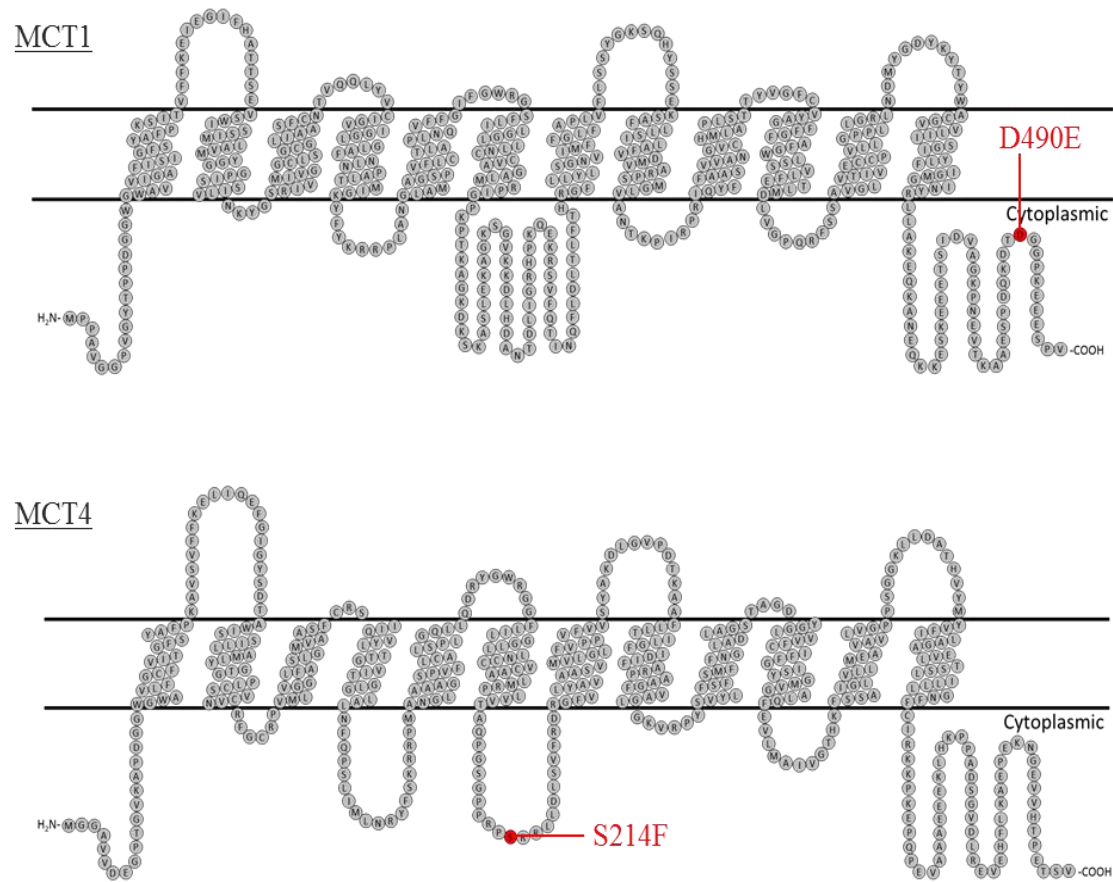


Figure 16 Predicted MCT membrane topology and confirmed SNPs

第二項 MCT1 T1470A 遺伝子多型と検査値および患者背景との関連解析

MCT 基質である乳酸を輸送する MCT1 T1470A 遺伝子多型について、野生型 (WW) とヘテロ・ホモ変異型 (WM+MM) の 2 群に分け、検査値および患者背景に差があるか否かを検定した。統計解析の結果を **Table 16** に示す。検定の結果、既知の糖尿病診断マーカーである FPG はヘテロ・ホモ変異型 (WM+MM) において有意に低下した ($P=0.04$) (**Figure 17A**)。また有意な差はないものの、HbA1c に関しても同様の傾向が認められた (**Figure 17B**)。また、インスリンの追加分泌の指標である ΔCPR においてもヘテロ・ホモ変異型 (WM+MM) において有意に低下した ($P=0.02$) (**Figure 17C**)。また、肝酵素の AST ($P=0.005$)、ALT ($P=0.003$)、 $\gamma\text{-GTP}$ ($P=0.024$) はヘテロ・ホモ変異型 (WM+MM) においていずれも有意に低かった (**Figure 17D, E, F**)。

一方で、糖尿病合併症、服用薬に関しては両群間で有意な差は認めなかった。

Table16 Mann-Whitney U and chi-square test data for MCT1 T1470A genotype, comparing patients with WW and WM+MM

Parameters			MCT1 T1470A genotype		P value	
			WW	WM + MM	WW vs	WM + MM
Indices of diabetes	No. of subjects		18	65		
	FPG (mg/dL)		161.5(120– 199)	138.0(117– 168)		0.040
	HbA1c (%)		9.0(8.0– 10.6)	8.1(7.6– 9.6)		0.075
	Age (years)		57(42– 65)	60(49– 67)		0.235
	Duration of diabetes (years)		5(2– 14)	12(5– 20)		0.048
Basic information	Gender (Male %)		50.0	58.5		0.522
	Smoking status (current %)		33.3	29.2		0.737
	Alcohol intake (current %)		55.6	44.6		0.578
	Family history (%)		58.8	64.5		0.666
	Body weight (kg)		76.0(61.0– 89.6)	71.5(61.6– 85.9)		0.551
	BMI (kg/m ²)		28.5(23.7– 33.3)	26.5(22.8– 31.2)		0.395
	Waist (cm)		97.3(88.9– 105.3)	94.0(83.0– 102.8)		0.312
	Visceral fat (cm ²)		90.5(71.8– 128.8)	100.0(50.0– 132.0)		0.938
	SBP (mmHg)		129(113– 145)	132(118– 148)		0.691
	DBP (mmHg)		78(67– 87)	73(67– 83)		0.288
	ΔCPR (ng/mL)		2.31(1.57– 3.33)	1.35(0.72– 2.27)		0.020
Insulin secretion	S-CPR (ng/mL)		2.36(1.49– 3.08)	1.67(0.93– 2.69)		0.122
	U-CPR/day (μg/day)		66.9(45.3– 78.9)	46.3(32.8– 92.0)		0.216
Insulin resistance	HOMA-β (%)		36.4(25.6– 86.7)	45.3(20.0– 71.1)		0.807
	HOMA-R		4.82(2.35– 9.89)	2.80(1.68– 4.57)		0.072
Kidney function test	UACR (mg/g·Cr)		9.4(4.0– 34.8)	12.4(6.3– 61.1)		0.145
	eGFR (mL/min/1.73m ²)		84.0(60.3– 98.1)	72.4(58.1– 85.7)		0.102
	S-Cr (mg/dL)		0.69(0.55– 0.89)	0.76(0.65– 0.93)		0.185
	BUN (mg/dL)		15(10– 18)	14(12– 17)		0.634
	CCr (mL/min/1.73m ²)		111.3(86.0– 123.0)	99.6(76.5– 132.3)		0.502
Liver enzyme activity	AST (U/L)		28.5(22.8– 51.8)	20.0(17.0– 27.0)		0.005
	ALT (U/L)		36.5(19.0– 54.3)	19.0(15.5– 36.5)		0.030
	γ-GTP (U/L)		39.5(22– 73)	25.0(17– 38)		0.024
Blood lipid concentration	LDL-C (mg/dL)		111(74– 142)	99(80– 118)		0.462
	HDL-C (mg/dL)		41(35– 50)	45(40– 54)		0.062
	TG (mg/dL)		138(99– 193)	106(86– 150)		0.104
	LDL-C/HDL-C		2.55(1.70– 3.57)	2.10(1.70– 2.61)		0.224
	TG/HDL-C		3.53(2.12– 5.07)	2.33(1.71– 3.78)		0.062
Diabetic complications	Diabetic nephropathy (%)		22.2	38.5		0.268
	Diabetic retinopathy (%)		33.3	46.2		0.331
	Diabetic neuropathy (%)		77.8	77.4		1.000
	Coronary artery disease (%)		22.2	23.1		1.000
	Cerebrovascular disease (%)		27.8	18.5		0.386
	L-lactate (mM)		1.44(1.22– 1.62)	1.37(1.16– 1.60)		0.619
	D-lactate (μM)		170.6(120.2– 323.1)	218.9(137.3– 381.7)		0.237
	Alanine (μM)		291.5(261.1– 334.4)	293.0(253.1– 374.4)		0.842
Medication use	SU (%)		27.8	29.2		0.904
	Glinide (%)		5.6	3.1		0.525
	BG (%)		77.8	60.0		0.267
	TZD (%)		0.0	10.8		0.338
	DPP4i (%)		38.9	52.3		0.314
	GLP-1 (%)		16.7	16.9		1.000
	αGI (%)		27.8	12.3		0.110
	SGLT2i (%)		0.0	7.7		0.580
	Insulin (%)		33.3	43.1		0.457
	Lipid-lowering drug (%)		66.7	63.1		0.779
	HMG-CoA (%)		44.4	53.8		0.480
	Antihypertensive drug (%)		66.7	49.2		0.190

Data are medians (interquartile range) or %.

“WW” on the table represents the wild type (wt)/wt genotype of the MCT1 T1470A

polymorphism and “WM+MM” represents the wt/mutated type (mt) and mt/mt genotypes of the same polymorphism.

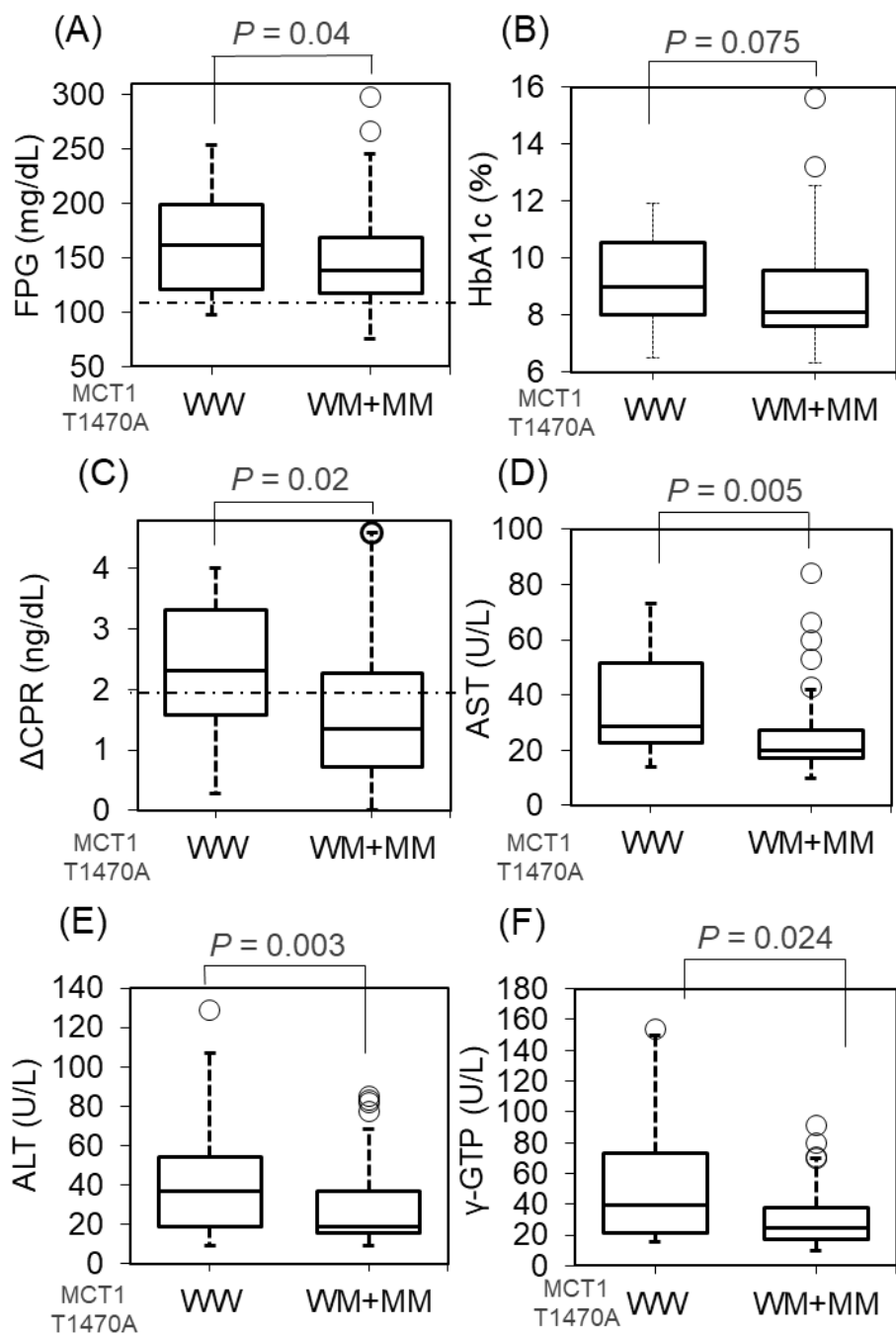


Figure 17 Influence of an MCT1 polymorphism on indices of diabetes, insulin secretion and liver enzyme activities

Influence of an MCT1 polymorphism on indices of diabetes (FPG and HbA1c) (A, B) and insulin secretion (Δ CPR) (C) and liver enzyme activities (AST, ALT, and γ -GTP) (D-F).

第六節 考察

我々は以前に日本の健常人92名におけるMCT1 T1470A多型の頻度を報告し³⁰⁾、アレル頻度は0.701であった。本研究の2型糖尿病患者のMCT1 T1470A多型のアレル頻度は0.590であった。この両群間において、Fisher's exact testで解析をしたところ、健常人の方がAアレルは有意に多かった。一方、MCT4 C641T多型は健常人と同様に本研究でもみられたがその頻度は低く、MCT4 C641T多型が機能に影響を及ぼすといった報告は現時点ではない。

また、MCT1 T1470A 遺伝子多型における野生型 (WW) とヘテロ・ホモ変異型 (WM+MM) の2群間の分け方に関してはいくつかの既報を参照して行った⁶⁵⁻⁶⁷⁾。今回の結果、MCT1 T1470A 多型では変異型の方が血糖値や肝酵素活性が有意に低かった。また、 Δ CPR は空腹時 CPR とグルカゴンを投与した5分後のCPRの差であり、インスリンの追加分泌能の指標となる検査であるが、変異型の方が血糖をより低減させる一方で、 Δ CPRは低いという相反する結果となった。しかし、変異型においてもインスリン分泌能は保たれている。一方、野生型は変異型と比較して、血糖値は高値であるとともに、BMI、腹囲、内臓脂肪量が高い傾向を示している。さらに野生型は Δ CPR以外のインスリン分泌能の指標も高いため、インスリンの効きにくい状態、すなわちインスリン抵抗性が強い可能性が考えられた。なお、インスリン分泌を促進するSU剤およびグリニド薬の服用に関して両群間で差はなかった。また、インスリン抵抗性改善薬であるビグアナイド薬およびチアゾリジン薬の服用に関しても差は認められなかった。我々はこれまでにMCT1 T1470A 多型においてMCT1を介した基質輸送が増加することを見出している²⁷⁾。乳酸を輸送するMCTは、筋肉や肝臓から他の組織へ乳酸を運ぶ⁶⁸⁾。また、乳酸の上昇と糖尿病のリスクとの関連³⁹⁾が示唆されており、2型糖尿病時の骨格筋においてMCT1発現は低下することが報告されている²⁹⁾。これらを本結果と合わせて考察するとMCT1 T1470A 変

異型は野生型と比較して機能が亢進し、代謝が上がることで血糖値や肝酵素活性を低減させ、高い酸化能をもたらす可能性が示された。また、乳酸は糖新生前駆体であるので、高濃度の乳酸の存在はより肝臓におけるグルコース産生を増加させる。したがって、このメカニズムは、高血糖や2型糖尿病の発症に脂質誘発性の肝臓のインスリン抵抗性と組み合わせで寄与する可能性がある。一方、本研究では **limitation** も存在する。多型頻度の比較は副次的評価項目であり、今回の頻度の差を考慮しても今後大きなサンプルサイズにおいて評価が必要と考える。

第七節 まとめ

本研究の2型糖尿病患者83名のMCT1およびMCT4コーディング領域の塩基配列を解析した結果、MCT1 T1470A 遺伝子多型およびMCT4 C 641T 遺伝子多型が確認された。このうち、変異が多くみられたMCT1 T1470A 多型に着目し、野生型と変異型の2群に分け、検査値および患者背景に差があるかどうかを検討したところ、MCT1 T1470A 多型の変異型は、野生型と比較して血糖値や肝酵素をより低減させ、MCT1 活性が酸化能と関連し、MCT1 T1470A 多型の変異型は野生型よりも高い酸化能をもたらす可能性が示された。

また、今回の結果において2型糖尿病患者において健常人と比較し、A アレルが有意に低かった。MCT1 T1470A 多型の変異型が2型糖尿病の低リスク因子となることを証明するためには、糖尿病発症に関連するMCT 遺伝子多型として報告されているMCT11 やMCT13 や他の交絡因子も含め、より大きなサンプルサイズにおいて検討する必要がある。

総括

2 型糖尿病は環境因子と遺伝因子により発症する多因子疾患であり、我が国の糖尿病の 95%を占める。日本国民の約 15%が糖尿病有病者および糖尿病予備軍であり、慢性的な高血糖状態により様々な糖尿病合併症を引き起こす。糖尿病および関連する合併症の医療費は増加しており、糖尿病の予防や早期発見、合併症の予防や進展抑制が極めて重要なため、糖尿病の進行または病状を反映するバイオマーカーの探索が急務となっている。そこで本研究では、2 型糖尿病病態時に変動することが報告されている代謝エネルギー源の乳酸や糖原性アミノ酸であるアラニンに着目し、これらが糖尿病病態の予測因子になりうるか検証することと、これらの代謝エネルギー源を輸送する MCT 遺伝子多型との関連を精査することで糖尿病の進展予防の一助とすることを目的とした。

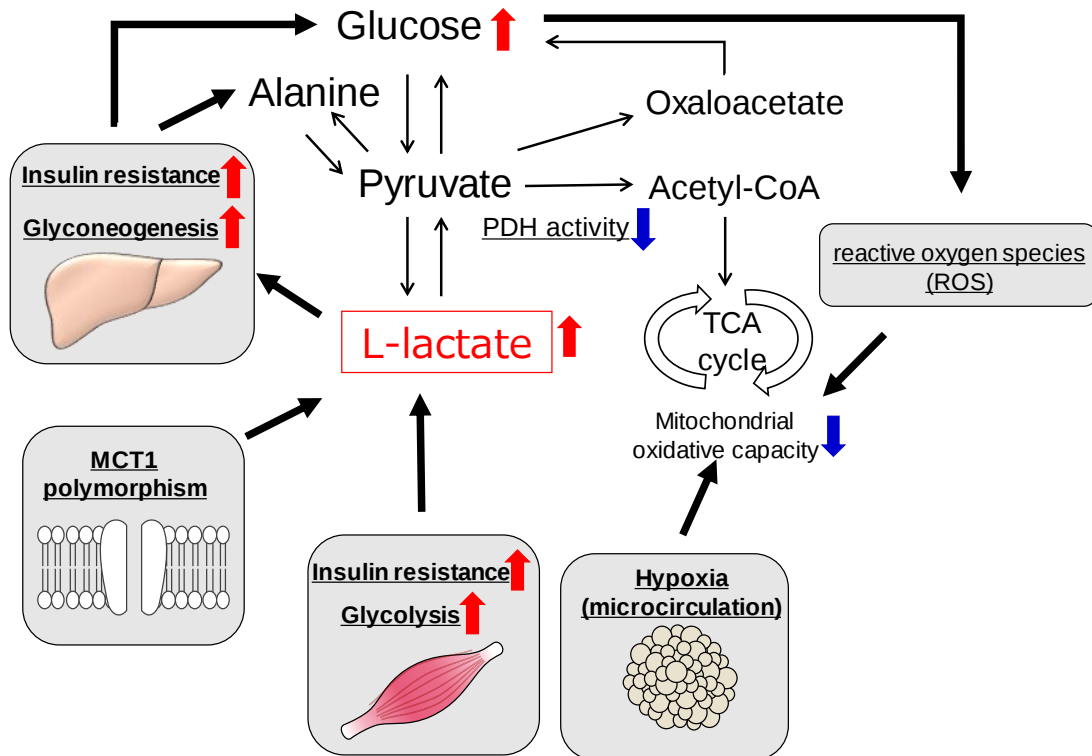
第一章では 2 型糖尿病において血漿 L-乳酸値は早朝空腹時血糖値と HbA1c を含む糖尿病診断マーカーと有意な相関があり、2 型糖尿病において増加することが明らかになった。また、早朝空腹時血糖値は多変量解析の結果、L-乳酸値上昇の独立因子であることが示された。2 型糖尿病リスクの予測因子として報告がある肝酵素（ALT、 γ -GTP）やインスリン抵抗性のサロゲートマーカーである TG や TG/HDL-C と L-乳酸値も関連することが明らかになった。今回の結果では、D-乳酸値やアラニン値と糖尿病診断マーカーやその他のマーカーと相関はみられなかった。以上のことから酸化能マーカーである L-乳酸値が 2 型糖尿病の進行または病状にとって重要な潜在的なバイオマーカーである可能性が示された。

第二章では、MCT 基質である L-乳酸値と糖尿病病態に関連が見られたため、MCT 遺伝子多型が糖尿病病態に及ぼす影響を精査した。本研究の 2 型糖尿病患者 83 名において健常人と同様に MCT1 T1470A 遺伝子多型および MCT4 C641T 遺伝子多型が確認された。また、MCT1 T1470A 多型のアレル頻度は今回の 2 型

糖尿病患者において健常人と比較し、A アレルが低い結果となった。また、MCT1 活性が酸化能と関連し、MCT1 T1470A 変異型の方が高い酸化能をもたらす可能性が示された。以上のことから MCT1 T1470A 変異型は野生型よりも血糖値や肝酵素活性をより低減させる可能性が示された。

これまでの大規模臨床研究では、採血点に関して不明であることが多く、本研究では L-、D-乳酸値、アラニン値ならびに遺伝子多型用検体の採血に関して、既知の糖尿病診断マーカーをはじめとした臨床検査値の採血と同時に行っていること、また、糖尿病合併症の各種検査も採血の直近で入院中に行っているため、データの信頼性は高いと考える。一方、副次的評価項目であった糖尿病合併症とこれら代謝エネルギー源との関連はなかった。しかしながら、今回のサンプルサイズの設定は主要評価項目である代謝エネルギー源と既知の糖尿病診断マーカーとの相関の検討においては適切であったが、糖尿病合併症や遺伝子多型との関連を明らかにするためにはより大きなサンプルサイズが必要である。また、本研究では入院した 2 型糖尿病患者を対象としたため、罹病期間が比較的長い患者が多く、今後、健常人、境界型糖尿病、早期糖尿病患者を含めた検証が望まれる。

Type2 diabetes



参考論文

- 1) 厚生労働省 (2017) 平成 28 年 国民健康・栄養調査結果の概要
https://www.mhlw.go.jp/file/04-Houdouhappyou-10904750-Kenkoukyoku-Gantaisakukenkouzoushinka/kekkgaiyou_7.pdf
- 2) Ramachandran A, Ma RC, Snehalatha C. Diabetes in Asia. *Lancet*. 2010
375(9712):408-18.
- 3) Imamura M, Maeda S, Yamauchi T, Hara K, Yasuda K, Morizono T, Takahashi A, Horikoshi M, Nakamura M, Fujita H, Tsunoda T, Kubo M, Watada H, Maegawa H, Okada-Iwabu M, Iwabu M, Shojima N, Ohshige T, Omori S, Iwata M, Hirose H, Kaku K, Ito C, Tanaka Y, Tobe K, Kashiwagi A, Kawamori R, Kasuga M, Kamatani N; Diabetes Genetics Replication and Meta-analysis (DIAGRAM) Consortium, Nakamura Y, Kadowaki T. A single-nucleotide polymorphism in ANK1 is associated with susceptibility to type 2 diabetes in Japanese populations. *Hum Mol Genet*. 2012
21(13):3042-9.

- 4) Yasuda K, Miyake K, Horikawa Y, Furuta H, Hirota Y, Mori H, Jonsson A, Sato Y, Yamagata K, Hinokio Y, Wang HY, Tanahashi T, Nakamura N, Oka Y, Iwasaki N, Iwamoto Y, Yamada Y, Seino Y, Maegawa H, Kashiwagi A, Takeda J, Maeda E, Shin HD, Cho YM, Park KS, Lee HK, Ng MC, Ma RC, So WY, Chan JC, Lyssenko V, Tuomi T, Nilsson P, Groop L, Kamatani N, Sekine A, Nakamura Y, Yamamoto K, Yoshida T, Tokunaga K, Itakura M, Makino H, Nanjo K, Kadowaki T, Kasuga M. Variants in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Nature Genet.* 2008 40(9):1092-7.
- 5) Cukierman T, Gerstein HC, Williamson JD. Cognitive decline and dementia in diabetes--systematic overview of prospective observational studies. *Diabetologia.* 2005 48(12):2460-9.
- 6) Whitmer RA, Karter AJ, Yaffe K, Quesenberry CP Jr, Selby JV. Hypoglycemic episodes and risk of dementia in older patients with type 2 diabetes mellitus. *JAMA.* 2009 301(15):1565-72.
- 7) Rizzo MR, Marfella R, Barbieri M, Boccardi V, Vestini F, Lettieri B, Canonico S, Paolisso G. Relationships between daily acute glucose fluctuations and cognitive performance among aged type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2010 33(10):2169-74.

- 8) Omorogieva Ojo, Joanne Brooke. Evaluating the Association between Diabetes, Cognitive Decline and Dementia. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2015 (12):8281-94.
- 9) Toshiharu Ninomiya. Diabetes Mellitus and Dementia. *Curr Diab Rep*. 2014 14(5):487-95.
- 10) Li J, Shao YH, Gong YP, Lu YH, Liu Y, Li CL. Diabetes mellitus and dementia - a systematic review and meta-analysis. *Eur Rev Med Pharmacol Sc*. 2014 18(12):1778-89.
- 11) 糖尿病と癌に関する委員会報告 糖尿病 2013 56 (6):374-390.
- 12) 糖尿病と癌に関する委員会報告 第2報 糖尿病 2016 59 (3):174-177.
- 13) McLellan AC, Phillips SA, Thornalley PJ. Fluorimetric Assay of D-Lactate. *Anal Biochem*. 1992 206(1):12-6.
- 14) Avogaro A, Toffolo G, Miola M, Valerio A, Tiengo A, Cobelli C, Del Prato S. Intracellular lactate- and pyruvate-interconversion rates are increased in muscle tissue of non-insulin-dependent diabetic individuals. *J Clin Invest*. 1996 98(1):108-15.

- 15) Pagel-Langenickel I, Bao J, Pang L, Sack MN. The role of mitochondria in the pathophysiology of skeletal muscle insulin resistance. *Endocr Rev.* 2010 31(1):25-51.
- 16) Lovejoy J, Newby FD, Gebhart SS, DiGirolamo M. Insulin resistance in obesity is associated with elevated basal lactate levels and diminished lactate appearance following intravenous glucose and insulin. *Metabolism.* 1992 41(1):22-7.
- 17) Reaven GM, Hollenbeck C, Jeng CY, Wu MS, Chen YD. Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate, and insulin for 24 h in patients with NIDDM. *Diabetes.* 1988 37(8):1020-4.
- 18) Chen YD, Varasteh BB, Reaven GM. Plasma lactate concentration in obesity and type 2 diabetes. *Diabete Metab.* 1993 19(4):348-54.
- 19) Talasniemi JP, Pennanen S, Savolainen H, Niskanen L, Liesivuori J. Analytical investigation: assay of D-lactate in diabetic plasma and urine. *Clin Biochem.* 2008 41(13):1099-103.
- 20) Hasegawa H, Fukushima T, Lee JA, Tsukamoto K, Moriya K, Ono Y, Imai K. Determination of serum D-lactic and L-lactic acids in normal subjects and diabetic patients by column-switching HPLC with pre-column fluorescence derivatization. *Anal Bioanal Chem.* 2003 377:886-91.

- 21) Scheijen JL, Hanssen NM, van de Waarenburg MP, Jonkers DM, Stehouwer CD, Schalkwijk CG. L(+) and D(-) lactate are increased in plasma and urine samples of type 2 diabetes as measured by a simultaneous quantification of L(+) and D(-) lactate by reversed-phase liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Exp Diabetes Res.* 2012 2012:234812.
- 22) Würtz P, Tiainen M, Mäkinen VP, Kangas AJ, Soininen P, Saltevo J, Keinänen-Kiukaanniemi S, Mäntyselkä P, Lehtimäki T, Laakso M, Jula A, Kähönen M, Vanhala M, Ala-Korpela M. Circulating metabolite predictors of glycemia in middle-aged men and women. *Diabetes Care.* 2012 35(8):1749-56.
- 23) Robert JJ, Beaufriere B, Koziat J, Desjeux JF, Bier DM, Young VR, Lestrade H. Whole body de novo amino acid synthesis in type I (insulin-dependent) diabetes studied with stable isotope-labeled leucine, alanine, and glycine. *Diabetes.* 1985 34(1):67-73.
- 24) Bonen A. The expression of lactate transporters (MCT1 and MCT4) in heart and muscle. *Eur J Appl Physiol.* 2001 86(1):6-11.
- 25) Halestrap AP. The SLC16 gene family - structure, role and regulation in health and disease. *Mol Aspects Med.* 2013 34(2-3):337-49.
- 26) Halestrap AP, Wilson MC. The monocarboxylate transporter family--role and regulation. *IUBMB Life.* 2012 64(2):109-19.

- 27) Sasaki S, Futagi Y, Kobayashi M, Ogura J, Iseki K. Functional characterization of 5-oxoproline transport via SLC16A1/MCT1. *J Biol Chem*. 2015 290(4):2303–11.
- 28) Sasaki S, Kobayashi M, Futagi Y, Ogura J, Yamaguchi H, Takahashi N, Iseki K. Crucial residue involved in L-lactate recognition by human monocarboxylate transporter 4 (hMCT4). *PLoS One*. 2013 8(7):e67690.
- 29) Juel C, Holten MK, Dela F. Effects of strength training on muscle lactate release and MCT1 and MCT4 content in healthy and type 2 diabetic humans. *J Physiol*. 2004 556: 297-304.
- 30) Kimura Y, Kobayashi M, Asari M, Higuchi I, Narumi K, Furugen A, Iseki K. Genetic variations in the monocarboxylate transporter genes (SLC16A1, SLC16A3, and SLC16A11) in the Japanese population. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2018 33(5):215-8.
- 31) Fedotovskaya ON, Mustafina LJ, Popov DV, Vinogradova OL, Ahmetov II. A common polymorphism of the MCT1 gene and athletic performance. *Int J Sports Physiol Perform*. 2014 9(1):173-80.
- 32) Massidda M, Eynon N, Bachis V, Corrias L, Culigioni C, Piras F, Cugia P, Scorcu M, Calò CM. Influence of the MCT1 rs1049434 on Indirect Muscle Disorders/Injuries in Elite Football Players. *Sports Med Open*. 2015 1(1):33.

- 33) van Hasselt PM, Ferdinandusse S, Monroe GR, Ruiter JP, Turkenburg M, Geerlings MJ, Duran K, Harakalova M, van der Zwaag B, Monavari AA, Okur I, Sharrard MJ, Cleary M, O'Connell N, Walker V, Rubio-Gozalbo ME, de Vries MC, Visser G, Houwen RH, van der Smagt JJ, Verhoeven-Duif NM, Wanders RJ, van Haaften G. Monocarboxylate transporter 1 deficiency and ketone utilization. *N Engl J Med*. 2014 371(20):1900-7.
- 34) Juraschek SP, Shantha GP, Chu AY, Miller ER 3rd, Guallar E, Hoogeveen RC, Ballantyne CM, Brancati FL, Schmidt MI, Pankow JS, Young JH. Lactate and risk of incident diabetes in a case-cohort of the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *PLoS One*. 2013 8(1):e55113.
- 35) ラクテートプロ[®]センサー添付文書
http://www.info.pmda.go.jp/downfiles/ivd/PDF/730056_13A2X10073000001_A_01_06.pdf
- 36) デタミナーLA[®] (血漿乳酸測定試薬) 添付文書
http://www.info.pmda.go.jp/downfiles/ivd/PDF/230187_13A2X00172064001_A_01_02.pdf
- 37) Wang H, McNeil YR, Yeo TW, Anstey NM. Simultaneous determination of multiple amino acids in plasma in critical illness by high performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2013 940:53-8.

- 38) Crawford SO, Hoogeveen RC, Brancati FL, Astor BC, Ballantyne CM, Schmidt MI, Young JH. Association of blood lactate with type 2 diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities Carotid MRI Study. *Int J Epidemiol.* 2010 39(6):1647-55.
- 39) Juraschek SP, Selvin E, Miller ER, Brancati FL, Young JH. Plasma lactate and diabetes risk in 8045 participants of the atherosclerosis risk in communities study. *Ann Epidemiol.* 2013 23(12):791-6.
- 40) Adeva-Andany M, López-Ojén M, Funcasta-Calderón R, Ameneiros-Rodríguez E, Donapetry-García C, Vila-Altesor M, Rodríguez-Seijas J. Comprehensive review on lactate metabolism in human health. *Mitochondrion.* 2014:76-100.
- 41) Yokoyama H, Araki SI, Kawai K, Yamazaki K, Tomonaga O, Shirabe SI, Maegawa H. Declining trends of diabetic nephropathy, retinopathy and neuropathy with improving diabetes care indicators in Japanese patients with type 2 and type 1 diabetes (JDDM 46). *BMJ Open Diabetes Res Care.* 2018 6(1):e000521.
- 42) Wang YL, Koh WP, Yuan JM, Pan A. Association between liver enzymes and incident type 2 diabetes in Singapore Chinese men and women. *BMJ Open Diabetes Res Care.* 2016 4(1):e000296.
- 43) Kim CH, Park JY, Lee KU, Kim JH, Kim HK. Association of serum gamma-glutamyltransferase and alanine aminotransferase activities with risk of type 2 diabetes mellitus independent of fatty liver. *Diabetes Metab Res Rev.* 200925:64-9.

- 44) Vojarova B, Stefan N, Lindsay RS, Saremi A, Pratley RE, Bogardus C, Tataranni PA. High alanine aminotransferase is associated with decreased hepatic insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002 51(6):1889-95.
- 45) Turgut O, Tandogan I. Gamma-glutamyltransferase to determine cardiovascular risk: shifting the paradigm forward. *J Atheroscler Thromb*. 2011 18(3):177-81.
- 46) Lee DH, Jacobs DR Jr. Association between serum gamma-glutamyltransferase and C-reactive protein. *Atherosclerosis*. 2005 178(2):327-30.
- 47) Hanley AJ, Williams K, Festa A, Wagenknecht LE, D'Agostino RB Jr, Kempf J, Zinman B, Haffner SM; insulin resistance atherosclerosis study. Elevations in markers of liver injury and risk of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes*. 2004 53(10):2623-32.
- 48) Sattar N, Scherbakova O, Ford I, O'Reilly DS, Stanley A, Forrest E, Macfarlane PW, Packard CJ, Cobbe SM, Shepherd J; west of Scotland coronary prevention study. Elevated alanine aminotransferase predicts new-onset type 2 diabetes independently of classical risk factors, metabolic syndrome, and C-reactive protein in the west of Scotland coronary prevention study. *Diabetes*. 2004 53(11):2855-60.

- 49) Doi Y, Kubo M, Yonemoto K, Ninomiya T, Iwase M, Tanizaki Y, Shikata K, Iida M, Kiyohara Y. Liver enzymes as a predictor for incident diabetes in a Japanese population: the Hisayama study. *Obesity (Silver Spring)*. 2007 15(7):1841-50.
- 50) Cho NH, Jang HC, Choi SH, Kim HR, Lee HK, Chan JC, Lim S. Abnormal liver function test predicts type 2 diabetes: a community-based prospective study. *Diabetes Care*. 2007 30(10):2566-8.
- 51) Schulze MB, Weikert C, Pischon T, Bergmann MM, Al-Hasani H, Schleicher E, Fritsche A, Häring HU, Boeing H, Joost HG. Use of multiple metabolic and genetic markers to improve the prediction of type 2 diabetes: the EPIC-Potsdam Study. *Diabetes Care*. 2009 32(11):2116-9.
- 52) Balkau B, Lange C, Vol S, Fumeron F, Bonnet F. Nine-year incident diabetes is predicted by fatty liver indices: the French D.E.S.I.R. study. *BMC Gastroenterol*. 2010 10:56.
- 53) Wannamethee SG, Papacosta O, Whincup PH, Thomas MC, Carson C, Lawlor DA, Ebrahim S, Sattar N. The potential for a two-stage diabetes risk algorithm combining non-laboratory-based scores with subsequent routine non-fasting blood tests: results from prospective studies in older men and women. *Diabet Med*. 2011 28(1):23–30.

- 54) Lorenzo C, Hanley AJ, Rewers MJ, Haffner SM. Discriminatory value of alanine aminotransferase for diabetes prediction: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabet Med*. 2016 33(3):348-55.
- 55) Murguía-Romero M, Jiménez-Flores JR, Sigrist-Flores SC, Espinoza-Camacho MA, Jiménez-Morales M, Piña E, Villalobos-Molina R, Méndez-Cruz R, Reaven GM. Plasma triglyceride/HDL-cholesterol ratio, insulin resistance, and cardiometabolic risk in young adults. *J Lipid Res*. 2013 54(10):2795-9.
- 56) Miksztowicz V, Schreier L, McCoy M, Lucero D, Fassio E, Billheimer J, Rader DJ, Berg G. Role of SN1 lipases on plasma lipids in metabolic syndrome and obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014 34(3):669-75.
- 57) Yokoyama S, Tsuji H, Hiraoka S, Nishihara M. Investigation of Risk Factors Affecting Lactate Levels in Japanese Patients Treated with Metformin. *Biol Pharm Bull*. 2016 39(12):2022-7.
- 58) Mongraw-Chaffin ML, Matsushita K, Brancati FL, Astor BC, Coresh J, Crawford SO, Schmidt MI, Hoogeveen RC, Ballantyne CM, Young JH. Diabetes medication use and blood lactate level among participants with type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities carotid MRI study. *PLoS One*. 2012 7(12):e51237.

- 59) Py G, Lambert K, Perez-Martin A, Raynaud E, Préfaut C, Mercier J. Impaired sarcolemmal vesicle lactate uptake and skeletal muscle MCT1 and MCT4 expression in obese Zucker rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001 281(6):E1308-15.
- 60) Jeong EM, Chung J, Liu H, Go Y, Gladstein S, Farzaneh-Far A, Lewandowski ED, Dudley SC Jr. Role of mitochondrial oxidative stress in glucose tolerance, insulin resistance, and cardiac diastolic dysfunction. *J Am Heart Assoc*. 2016 5(5):e003046.
- 61) SIGMA Type 2 Diabetes Consortium, Williams AL, Jacobs SB, Moreno-Macías H, Huerta-Chagoya A, Churchhouse C, Márquez-Luna C, García-Ortíz H, Gómez-Vázquez MJ, Burt NP, Aguilar-Salinas CA, González-Villalpando C, Florez JC, Orozco L, Haiman CA, Tusié-Luna T, Altshuler D. Sequence variants in SLC16A11 are a common risk factor for type 2 diabetes in Mexico. *Nature*. 2014 506(7486):97-101.
- 62) Traurig M, Hanson RL, Marinelarena A, Kobes S, Piaggi P, Cole S, Curran JE, Blangero J, Göring H, Kumar S, Nelson RG, Howard BV, Knowler WC, Baier LJ, Bogardus C. Analysis of SLC16A11 Variants in 12,811 American Indians: Genotype-Obesity Interaction for Type 2 Diabetes and an Association With RNASEK Expression. *Diabetes*. 2016 65(2):510-9.

- 63) Rusu V, Hoch E, Mercader JM, Tenen DE, Gymrek M, Hartigan CR, DeRan M, von Grotthuss M, Fontanillas P, Spooner A, Guzman G, Deik AA, Pierce KA, Dennis C, Clish CB, Carr SA, Wagner BK, Schenone M, Ng MCY, Chen BH; MEDIA Consortium; SIGMA T2D Consortium, Centeno-Cruz F, Zerrweck C, Orozco L, Altshuler DM, Schreiber SL, Florez JC, Jacobs SBR, Lander ES. Type 2 Diabetes Variants Disrupt Function of SLC16A11 through Two Distinct Mechanisms. *Cell*. 2017 29;170(1):199-212.e20.
- 64) Hara K, Fujita H, Johnson TA, Yamauchi T, Yasuda K, Horikoshi M, Peng C, Hu C, Ma RC, Imamura M, Iwata M, Tsunoda T, Morizono T, Shojima N, So WY, Leung TF, Kwan P, Zhang R, Wang J, Yu W, Maegawa H, Hirose H; DIAGRAM consortium, Kaku K, Ito C, Watada H, Tanaka Y, Tobe K, Kashiwagi A, Kawamori R, Jia W, Chan JC, Teo YY, Shyong TE, Kamatani N, Kubo M, Maeda S, Kadowaki T. Genome-wide association study identifies three novel loci for type 2 diabetes. *Hum Mol Genet*. 2014 23(1):239-46.
- 65) Guo X, Chen C, Liu B, Wu Y, Chen Y, Zhou X, Huang X, Li X, Yang H, Chen Z, Xing J. Genetic variations in monocarboxylate transporter genes as predictors of clinical outcomes in non-small cell lung cancer. *Tumor Biol*. 2015 36(5):3931-9.
- 66) Kikuchi N, Fuku N, Matsumoto R, Matsumoto S, Murakami H, Miyachi M, Nakazato K. The Association Between MCT1 T1470A Polymorphism and Power-Oriented Athletic Performance. *Int J Sports Med*. 2017 38(1):76-80.

- 67) Sawczuk M, Banting LK, Ciężczyk P, Maciejewska-Karłowska A, Zarębska A, Leońska-Duniec A, Jastrzębski Z, Bishop DJ, Eynon N. MCT1 A1470T: a novel polymorphism for sprint performance? *J Sci Med Sport*. 2015 18(1):114-8.
- 68) Brooks GA. Lactate shuttles in nature. *Biochem Soc Trans*. 2002 30(2):258-64.

謝辞

本研究を遂行し学位論文を作成するにあたり、終始ご懇篤な御指導・御鞭撻を賜りました北海道大学大学院薬学研究院臨床薬剤学研究室 井関 健教授に厚く御礼申し上げます。

本研究に関して終始ご懇篤な御指導・御鞭撻を頂くとともに、常に支えてくださいました同大学薬学研究院臨床薬剤学研究室 小林 正紀准教授に心より深く感謝申し上げます。

また、本論文の副査としてご審査賜りました北海道大学大学院薬学研究院臨床薬物動態解析学研究室 菅原 満教授、ならびに北海道大学大学院薬学研究院臨床病態解析学研究室 武田 宏司教授に深く感謝致します。

さらに本研究の遂行にあたり終始御指導、御助言を頂きました北海道科学大学薬学部 山田 武宏教授、山形大学医学部附属病院薬剤部 山口 浩明教授、北海道大学薬学研究院臨床薬剤学研究室 鳴海 克哉助教、同研究室 古堅 彩子助教に謹んで感謝致します。

臨床研究を遂行するにあたりご指導、ご協力いただきました北海道大学大学院医学研究科免疫・代謝内科学教室 渥美 達也教授、同教室 中村 昭伸診療講師、ならびに北海道大学大学院医学研究院糖尿病・肥満病態治療学分野 三好 秀明特任教授、北海道大学病院11-2病棟スタッフの皆様、そして本研究への参加に同意を頂いた患者様に厚く御礼申し上げます。

大学院修士課程在籍時にご指導賜り、現在の礎を作ってくださいました北海道医療大学薬学部病態生理学講座 飯塚 健治教授、徳光 幸子氏、関川 彬氏、八木

直美氏に深く感謝致します。

本研究における種々の検討にあたり多大なご協力をいただきました臨床薬剤学研究室 木村 有希学士に深く感謝致します。また、同じ社会人大学院生として励まし支えてくださいました北海道大学病院薬剤部 齋藤 佳敬博士、石川 修平博士に深く感謝致します。

研究ができる環境の維持など本研究を遂行するにあたり多くの面でご助言いただきました臨床薬剤学研究室のすべての方々に感謝致します。また多忙の業務の中、研究を継続できるようご配慮いただきました北海道大学病院薬剤部のスタッフの方々に感謝致します。

最後に、全ての面において苦楽を共にし、多くの部分で支えていただいた妻 樋口 尚子、子 樋口 穂に心から感謝するとともに、多くの部分で支えていただいた両親ならびに友人の皆様に深く感謝の意を示します。