

### 第3章 肝ケトン体生成の調節

#### A: 目的

反すう動物以外の動物では、肝臓は血中にケトン体を放出する唯一の器官であると考えられている<sup>27)</sup>。肝は生成したAcAc、3-OHBを拡散により血中へ放出している。肝のケトン体生成には主として遊離脂肪酸の供給およびインスリン、グルカゴンなどのホルモンにて生成が調節されていると考えられている。従来より肝臓のケトン体生成の研究は、肝のスライスやホモジネート、灌流法などで行われている。臓器灌流は組織のスライスやホモジネートなどに比し研究方法としては勝れてい

る<sup>27)</sup>。それは血流を介した取込みや分泌排泄機構の研究には灌流法以外の方法は適応できないからである。またホモジネートなどの簡単な系では、予想される代謝反応が全く認められず、灌流法によってはじめて観察される場合がある。この原因として、その代謝反応がNADHやNADPHなどのcofactorを必要としたり、あるいはATPからのエネルギー供与を受けないと進行しない反応であることが多い。更に一例として、グルカゴンやepinephrineなどのホルモンが、cAMPを介して肝glycogenの分解を促進させる一連の反応が、ラットの場合ではホモジネート系はもちろん、スライスを用いても観察されない例をあげることができる<sup>28)</sup>。ラットでは細胞膜を損傷させたことが、隣接した正常な細胞にも強く影響がおよぶからであると解釈されているが、その原因は不明である。このようなグルカゴンやepinephrineの解糖促進作用は肝灌流のみではじめて発現されている。同様に、乳酸を基質として、糖新生を測定する実験も、スライス以下の実験系では認められず、肝灌流によってのみ観察されている<sup>29)</sup>。今までのケトン体の研究は再灌流式肝灌流を用いて行われている。しかし再灌流法の短所として、分単位の変化を観察するのに適していないこと、また産生物自体(AcAc, 乳酸など)がケトン体の生成に影響を及ぼすことがあげられる。菅野ら<sup>30)</sup>は、赤血球を用いない灌流液で1時間肝灌流を行ったが、生化学的及び電顕を用いての組織状態に異常を認めなかったと報告している。そこでこの研究では、非再灌流式肝灌流法を用いてケトン体生成に及ぼす、絶食やFFAの影響、各種ホルモン(インスリン、グルカゴン、成長ホルモン、epinephrine)の効果、またpHや還元剤などの影響について検討した。

## B: 方法

固型飼料食（オリエンタル酵母、東京）の自由摂食により飼育したWistar系雄ラット（体重200-250g）を用いた。飽食または30時間絶食の状態にて、pento-barbital麻酔下（50mg/kg、腹腔内注射）に開腹、前述したMortimoreら<sup>17)</sup>の方法に準じた<sup>18)</sup>非再灌流式肝灌流を行った。門脈に留置したカテーテルにより、灌流液（20mM Krebs-Ringer-Tris buffer pH7.4）を37°C100% O<sub>2</sub>ガス循環下に注入し上大静脈より灌流液を採取した。灌流速度は20ml/minとした。30分間の前灌流後2分ごとに採液した。ホルモンやpH、アスコルビン酸の変化等は、reservoirを変えておこなった。

実験に用いたsoybean oil emulsion(Intrafat<sup>®</sup>)の組成はlinoleic acid 52.2%, oleic acid 22.1%, palmitic acid 12.7%, linolenic acid 8.2%, stearic acid 4.8%である。また灌流液中のケトン体(AcAc, 3-OHB)濃度の測定はMellanby法<sup>21)</sup>を用いた。

## C: 成績

### 1) 飽食、絶食状態での肝ケトン体生成の比較 (Fig.6)

飽食ラットを用い Krebs-Ringer-Tris bufferにて30分間前灌流後、単離灌流肝よりのAcAc、3-OHBの放出量は各々 $42.1 \pm 3.7$ 、 $8.3 \pm 1.9$  n mole/g liver/minであった。その値は続く30分の灌流にて各々、 $31.5 \pm 3.9$ (-25±5%)、 $4.6 \pm 1.9$ (-52±2%) n mole/g liver/minと低下した。絶食肝を用いた場合には各々、 $77.0 \pm 7.1$ 、 $27.0 \pm 4.5$  n moles/g liver/minであったが、やはり続く30分で、各々 $52.8 \pm 2.2$ (-28±5%)、 $17.6 \pm 5.9$ (-35±7%)と低下した。AcAc、3-OHBとも絶食肝では、飽食肝に比し有意に増加していた。

### 2) Soybean oil emulsionの肝ケトン体生成に及ぼす影響 (Fig.7)

次に肝ケトン体生成における基質の影響をみるために、Krebs-Ringer-Tris bufferに0.01% soybean oil emulsion(Intrafat®)を添加した。飽食肝を用い、開始からこの Intrafat® を添加したところAcAc、3-OHB双方とも $91.5 \pm 3.4$ 、 $37.6 \pm 3.6$  n moles/g liver/minと増加しやはり30分間の灌流中、一定した値を示した。この3-OHBの増加は、飽食及び絶食肝ともAcAcより大きかった。

### 3) インスリン、グルカゴン、成長ホルモン、epinephrineの肝ケトン体生成に及ぼす影響(Fig.8,9,10)

前と同じ条件、即ち0.01%の soybean oil emulsionを添加した条件で、30分間の前灌流後、10分間は同じ灌流液、次の10分間この灌流液に50mU/mlのインスリンを添加し、またもとに戻した。絶食肝ではAcAc、3-OHBの産生の低下が、各々5分、1分でみられた。AcAcの抑制はインスリン添加中止後、元に復した。一方、3-OHBは抑制されたままであった。AcAc、3-OHBとも各々最大-17.6±4.4%、-52.4±5.6%の抑制がみられた。飽食肝でのインスリンのケトン体生成の抑制はみられなかった。(Fig.8)

同じ条件で0.2μMのグルカゴンを添加したところ、飽食肝ではAcAc、3-OHBとも添加後5分、7分で有意な増加が得られた。それぞれ $157.4 \pm 10.2\%$ 、 $151.5 \pm 9.4\%$ の増加であった。一方、絶食肝では同量のグルカゴンの添加にてAcAcの軽度の増加をみたが3-OHBは変化がなかった。(Fig.9)

次に2μg/mlの成長ホルモンを絶食肝に添加したところAcAc、3-OHBとも有意な増加が得られた。また10μMのepinephrineを絶食肝に添加したところAcAc、3-OHBと

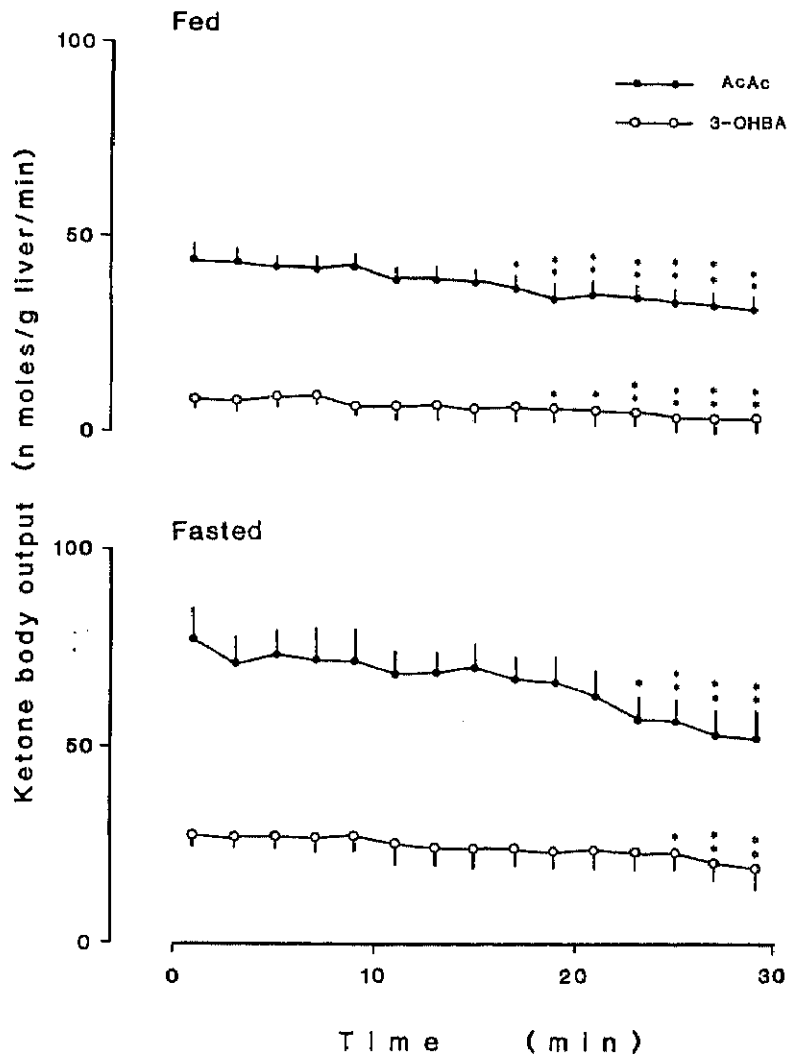


Fig. 6 Comparison of ketone body production between the isolated perfused fed and fasted rat livers, mean  $\pm$  SEM, N=5 in both experiments. Significantly different from the initial value,

\*  $p < 0.05$  , \*\*  $p < 0.01$ .

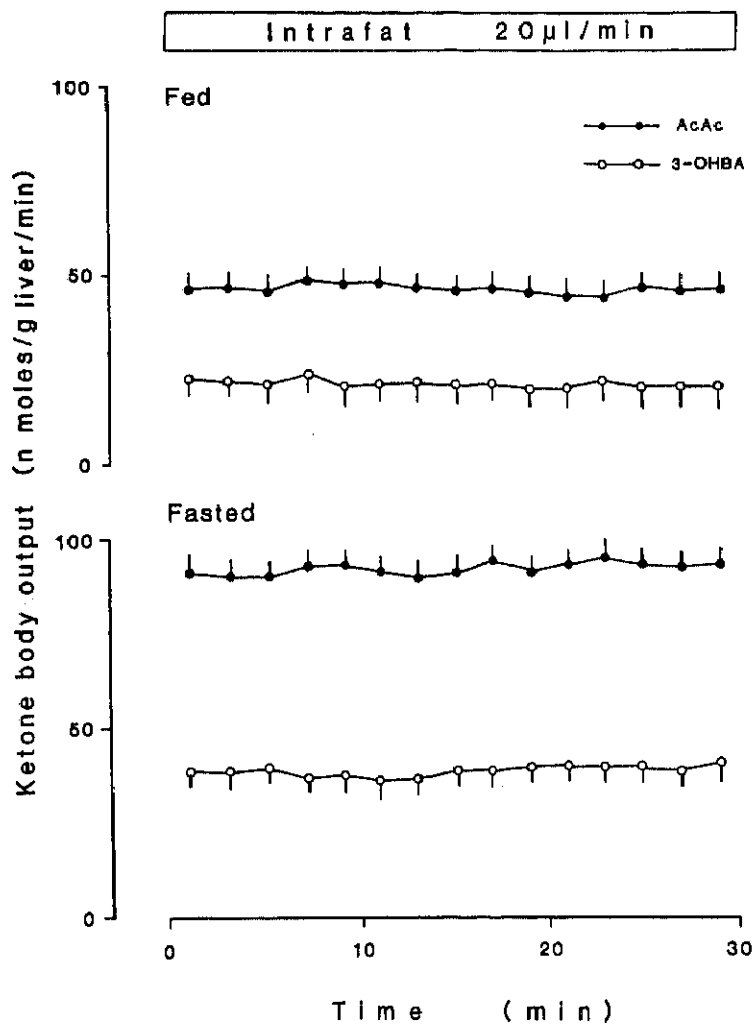


Fig.7 Effects of a soybean oil emulsion on ketogenesis in the isolated perfused rat liver. mean $\pm$ SEM , N=5 in both experiments.

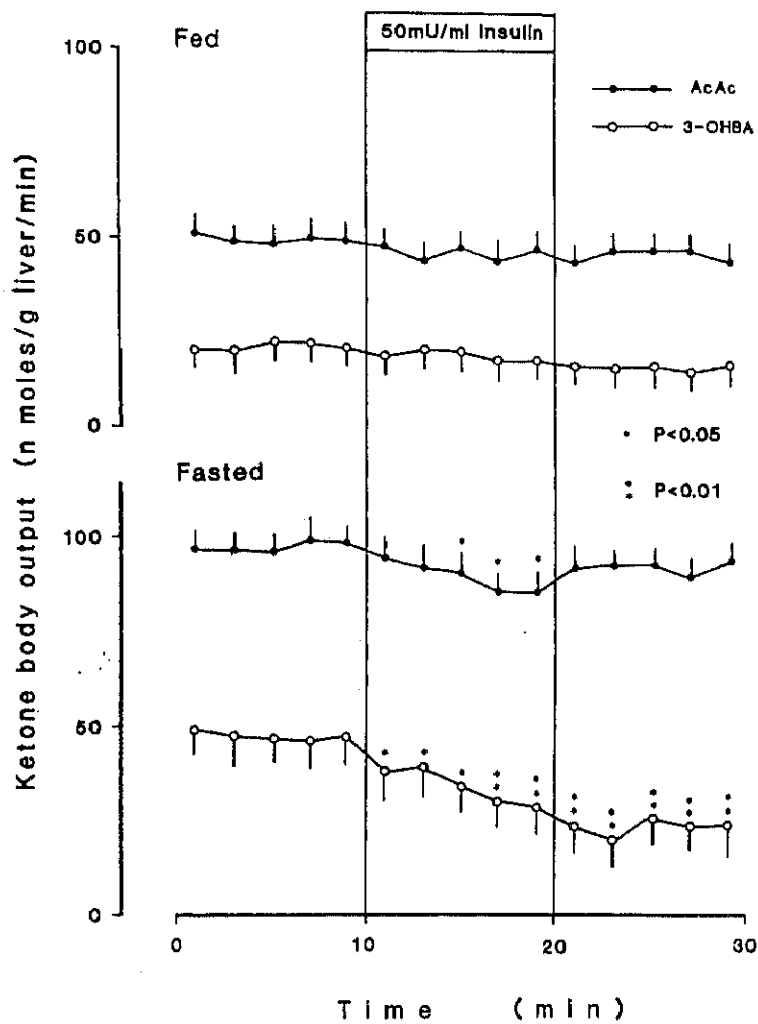


Fig.8 Effects of 50 mU/ml insulin on ketogenesis in the isolated perfused fed and fasted rat livers. The perfusate contained 20  $\mu$ l/min of a soybean oil emulsion. mean  $\pm$  SEM, N=5 in both experiments. Significantly different from the mean of basal values (1-9 min), \* p<0.05, \*\* p<0.01.

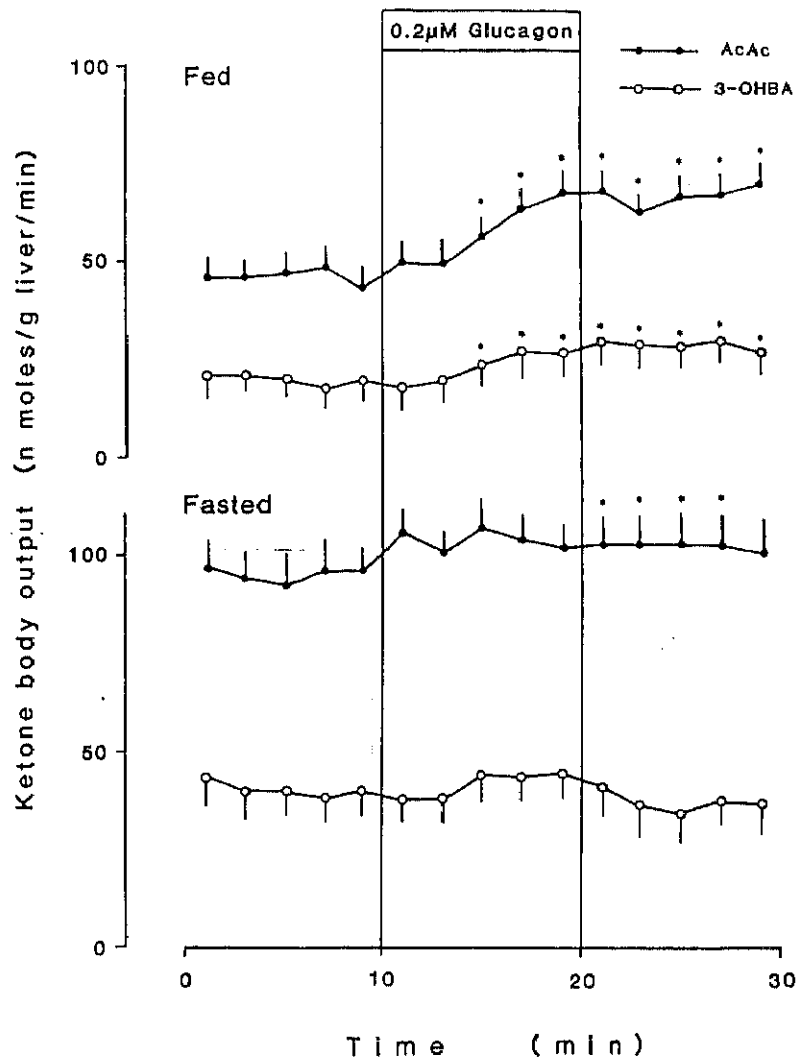


Fig.9 Effects of  $0.2\mu\text{M}$  glucagon on ketogenesis in the isolated perfused fed and fasted rat livers. The perfusate contained  $20\mu\text{l}/\text{min}$  of a soybean oil emulsion.  $\text{mean}\pm\text{SEM}$ ,  $N=5$  in both experiments. Significantly different from the mean of basal values (1-9 min),  
 \*  $p<0.05$ .

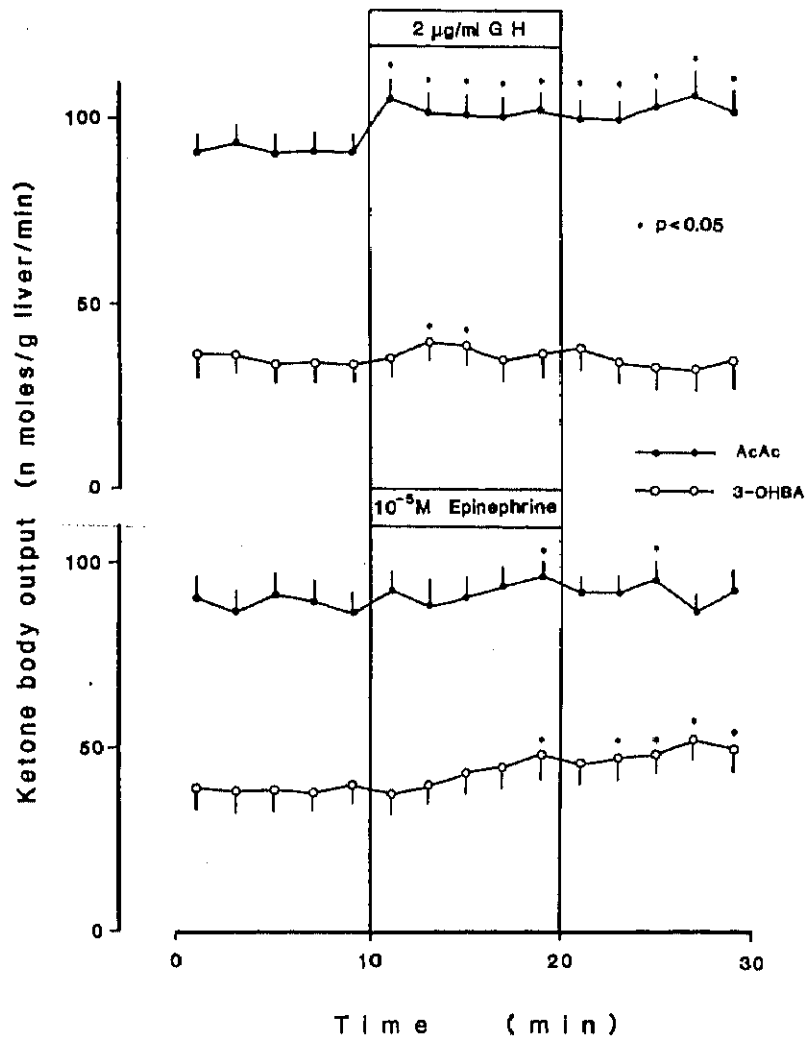


Fig. 10 Effects of growth hormone and epinephrine on ketogenesis in the isolated perfused fasted rat liver. The perfusate contained 20 µl/min of a soybean oil emulsion. mean ± SEM, N=5 in both experiments. Significantly different from the mean of basal values (1-9 min), \* p<0.05.



も有意な増加が得られた。(Fig.10)

4) ケトン体生成に及ぼすpHの影響 (Fig.11)

アシドーシスの際のケトン体生成について、pHを10分間7.4より6.5、7.1へ変化させたところ、Fig.11 に示すようにAcAc、3-OHBとも添加後1分後より低下しpH7.4に戻すと元に復した。抑制の程度はpH6.4の方が著しかった。pH6.5での3-OHBの生成低下はAcAcのそれよりも大きかったが、pH7.1での3-OHBの抑制は僅かであった。

5) アスコルビン酸の肝ケトン体生成に及ぼす影響 (Fig.12)

アスコルビン酸を灌流液に添加したところ、3-OHBの生成は1分以内に増加し中止後低下した。一方AcAcは逆に低下し添加中止後元に復した。

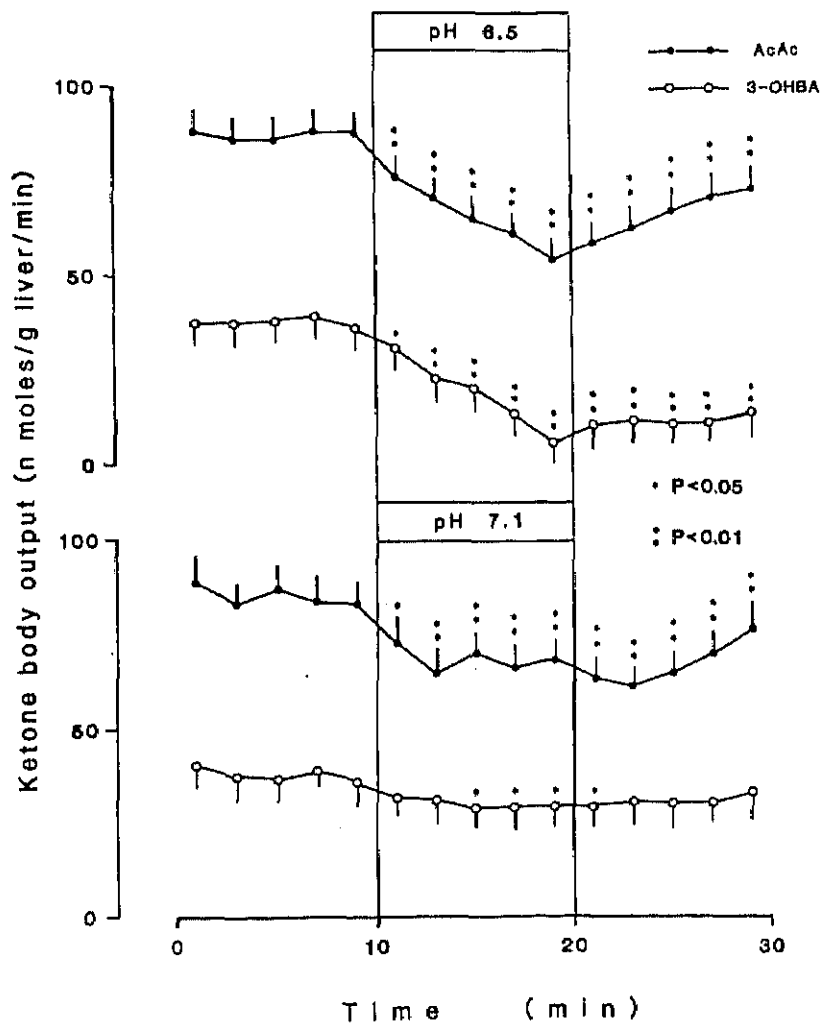


Fig. 11 Effects of pH on ketogenesis in the isolated perfused fasted rat liver. The perfusate contained 20  $\mu$ l/min of a soybean oil emulsion. mean  $\pm$  SEM, N=5 in both experiments. Significantly different from the mean of the basal values (1-9 min), \* p<0.05, \*\* p<0.01.

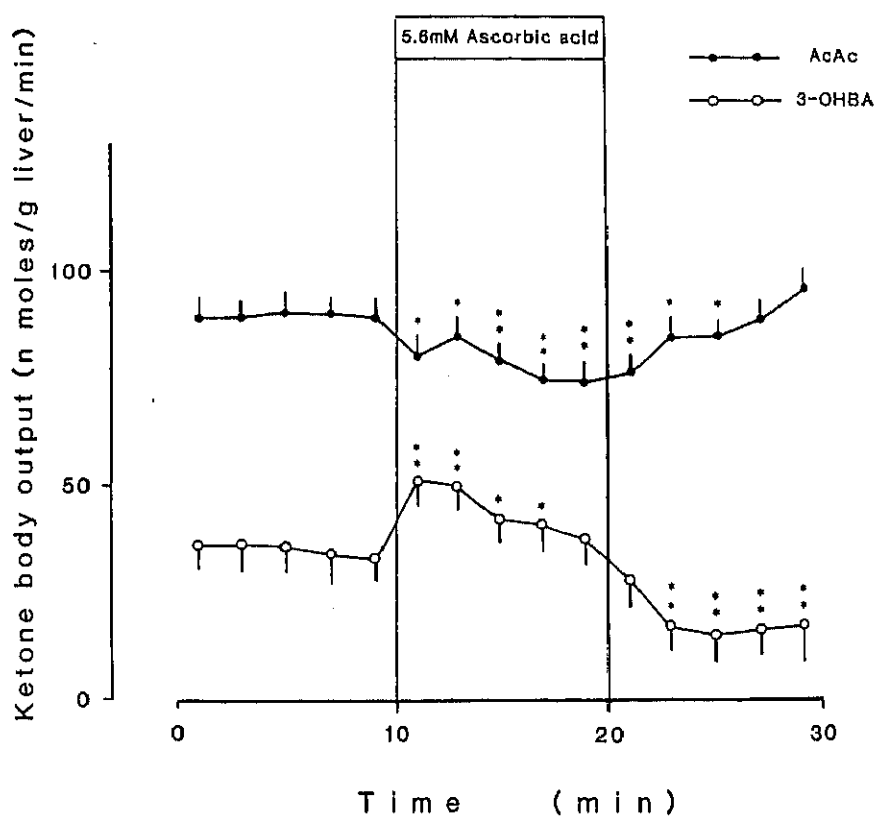


Fig. 12 Effects of 5.6 mM ascorbic acid on ketogenesis in the isolated perfused rat liver. The perfusate contained 20  $\mu$ l/min of a soybean oil emulsion. mean  $\pm$  SEM, N=5. Significantly different from the mean of basal values (1-9 min.), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

#### D: 考察

この研究において、ケトン体の基質を添加しないで灌流した場合、飽食及び絶食でのAcAc、3-OHBの放出は、徐々に低下した。%低下率で示すとAcAcより3-OHBの方が大きかった。次に灌流液にケトン体の基質であるsoybean oil emulsionを添加したところ、ケトン体の生成増加をきたし、灌流中一定の値を保った。そして3-OHBの増加の方が著しかった。このことはketogenesisは、基質であるFFAによってその生成が規制されているといえる。Snowellら<sup>31)</sup>も我々と同様の非再灌流法にて、飽食ラットを用い0.6mMのオレイン酸を含むラットの全血で灌流した場合、そのケトン体の放出が、66.6-133.3 n moles/g liver/minであると報告しているが、これは我々の成績(69.2±1.3)とほぼ同程度であった。そしてオレイン酸の添加にて3-OHB/AcAc比は0.2より0.4と上昇したが、この3-OHB/AcAc比は肝のKtのredox stateを示すNADH/NAD比と平行しており、 $\beta$ 酸化にてNADHが産生されるが、AcAcより3-OHBの生成に使われケトン体生成亢進時には、この比が上昇することを意味している。このことはこの研究の5)での成績と一致している。即ちアスコルビン酸の添加にてredoxの変化として肝が還元に傾いたため、3-OHBは上昇し、AcAcは低下することを示し、ケトン体の測定が肝のredox stateを知るのによい手段であることを示した。一方、坂本ら<sup>32)</sup>は、再灌流式肝灌流を用いケトン体生成をみているが、絶食肝では1180 n mole/g liver/min、飽食肝では373 n mole/g liver/min と報告している。これらの値は我々のおこなった非再灌流式肝灌流での値に比し高値である。この違いは、再灌流法では生成物であるAcAcによって更に3-OHBが生成され、その時に生じるNADにより $\beta$ 酸化がすすみ、更にketogenesisが亢進したためと考えられる。次に、ketogenesisに及ぼすホルモン作用について時間経過で観察することができた。インスリンは絶食肝にて添加直後より3-OHBの生成を抑制した。またグルカゴンは飽食肝で7分以内にAcAcと3-OHBの生成を亢進した。GHは添加直後に、また epinephrineは主として3-OHBを添加後9分で亢進させた。インスリンに関しては、主として末梢の脂肪細胞よりの遊離脂肪酸の供給を低下させることによって、ケトン体生成を減少させると考えられている<sup>33)</sup>。一方、HaftとMillerら<sup>34)</sup>はアロキサン糖尿病ラットにてインスリンにより絶食の灌流肝にてケトン体生成の抑制をみている。またWoodsideとHeinbergら<sup>35)</sup>は抗インスリン血清の添加にて灌流肝でのKetogenesisが亢進したと報告している。更にNeufeltら<sup>36)</sup>は生理的なイ

ンスリン濃度では絶食灌流肝でのケトン体生成に影響を及ぼさないとしているが、インスリンと glucoseの同時添加では抑制されると報告している。これらの結果は、肝のホルモン環境とインスリン濃度がケトン体生成に強く影響を及ぼしていることがわかる。Fig.8のように、高濃度のインスリンは飽食肝ではケトン体生成を抑制しなかった。このことは既に飽食肝ではインスリン過剰状態にさらされていたためと考えられる。同様にグルカゴン作用は飽食肝でよくみられた。また絶食肝ではケトン体の生成は2倍以上高値であったが、このことは肝でのホルモン状態即ち、とりわけグルカゴン/インスリン比が脂肪酸酸化を亢進しその結果ケトン体生成を増加させたと考えられる。グルカゴンが肝でのケトン体産生の主たるホルモンであることは多くの報告がある。McGarryら<sup>37) 38)</sup>はグルカゴンによるmalonyl-CoA濃度の低下がcarnitine acyltransferaseを亢進させ、このことがケトン体生成を増加させると述べている。この研究ではAcAcは、グルカゴン添加後5分以内で上昇し、9分でプラトーに達した。一方、同様の系でcAMPとグルコースの放出をみた山谷ら<sup>39)</sup>の実験では、両者の放出は2分以内にみられ6分でプラトーに達している。このことは ketogenesisと glycogenolysisの酵素反応の時間の差を示している可能性が考えられる。従来よりGHとカテコラミンは主として脂肪細胞の分解によりFFAの肝への供給を増加させることによりケトン体生成を増加させると報告されている<sup>6)</sup>。Burrinら<sup>8)</sup>は肝灌流を用い10 $\mu$ Mのepinephrineが直接肝に作用して有意なケトン体の増加を来したと報告している。しかしながらPenhosら<sup>40)</sup>は飽食、絶食肝いずれにおいてもGHは直接の肝ケトン体生成作用はないと報告している。この研究ではGHは絶食肝で軽度のAcAc、3-OHBの生成の増加を来した。Penhosとの差は灌流方法の差によるものと考えられる。またpHの低下によりketogenesisの生成低下がみられたが、重篤なアシドーシスの際には、ケトン体の生成は抑制され、その進展はないと考えられる。このことは多くの酵素はpHに敏感であり、pHにより活性が変化するが、ケトン体生成系においてもこのpHの低下によるケトン体生成の抑制が考えられた。

以上よりこの研究にて、多くのホルモン、pHなどで肝のケトン体生成が経時的に変化することを示し、この非再灌流式肝灌流がケトン体生成の研究に有用なことを示した。

#### E: 小括

非再灌流式肝灌流を用い、次のようなケトン体生成の時間経過を観察することができた。

- 1) 絶食肝では飽食肝よりもAcAc、3-OHBの放出量( $77.0 \pm 7.1$  vs.  $42.1 \pm 3.7$  n mole/g liver/min,  $27.0 \pm 4.5$  vs.  $8.3 \pm 1.9$  n mole/g liver/min)は有意に増加していた。また双方とも30分で徐々に低下した。
- 2) ケトン体の基質である0.01% soybean oil emulsionを添加したところ、飽食、絶食肝ともケトン体生成は増加し、一定の値を保った。
- 3) 50mU/mlのインスリンの添加により絶食肝ではAcAc、3-OHBとも各々5分、1分で有意な生成抑制(各々の最大抑制率;  $-17.6 \pm 4.4\%$ ,  $-52.4 \pm 5.6\%$ )がみられた。
- 4)  $0.2 \mu\text{M}$ のグルカゴンの添加により飽食肝では添加後5分、7分でAcAc、3-OHBの有意な生成増加(各々の最大増加率;  $157.4 \pm 10.2\%$ ,  $151.5 \pm 9.4\%$ )がみられた。また絶食肝で $2 \mu\text{g/ml}$ の成長ホルモン及び $10 \mu\text{M}$ のepinephrineの添加でAcAc、3-OHBの有意な生成増加がみられ、直接肝でのケトン体生成作用が示された。
- 5) 灌流液のpHを7.4より6.5、7.1と低下させたが、AcAc、3-OHBとも有意な生成抑制がみられた。
- 6) また還元剤であるアスコルビン酸を5.6mM添加したところ肝が還元に傾いた結果、AcAcは低下し3-OHBは増加し3-OHB/AcAc比の増加がみられ、この比が肝のredox state(NADH/NAD)を反映することが示された。

以上よりこの非再灌流式肝灌流法は絶食やFFA、ホルモンなどのKetogenesisに及ぼす効果を経時的に観察することが可能であり、肝でのケトン体生成の研究に非常に有用であることが示された。