

## 第4章 ケトン体の筋利用に関する基礎的検討

### A:目的

ケトン体は骨格筋、心筋、脳、腎などで酸化されエネルギーとなる。そして特に長期間の絶食時にはケトン体は貴重なエネルギー源である<sup>1)</sup>。一方、糖尿病状態では末梢でのケトン体酸化障害があり、ケトン体の利用低下がケトーシスに及ぼす影響は大きいと考えられている<sup>41)</sup>。しかし、ケトン体の末梢での利用に関する報告は少ない。更に従来より筋組織での代謝研究は、主として摘出された横隔膜<sup>42)</sup>やヒラメ筋<sup>43)</sup>を用いたin vitro実験系で行われている。しかし代謝研究が生体内での代謝追求を目的とする以上、可能な限り生体内に近い生理的条件下での実験が求められる。そこでこの研究では、Chanら<sup>20)</sup>の方法に準じラットを使用したin situ 下肢筋灌流法を用い、正常および糖尿病ラットでのケトン体の安静時の筋利用について検討した。

## B: 方法

正常ラットとしてWistar系雄ラットの8週令を用いた。また24時間絶食させた6週令Wistar系雄ラットの尾静脈よりストレプトゾトシン(STZ)25mg/kgを300 $\mu$ lの citrate buffer(pH4.5)に溶解し静注して作成したSTZ糖尿病ラットの8週令のものを用いた。STZ糖尿病ラットは特にインスリンを使用せずに飼育した。前述した筋灌流法を用い、24時間絶食にした正常およびSTZ糖尿病ラットにて実験を行った。術前に血糖およびケトン体測定用に尾静脈より0.6ml採血した。基礎灌流液に 100mg/dlのglucoseおよびAcAc, 3-OHB各々1mMを添加し、pH7.4としたものをケトン体添加群とした。これに対して基礎灌流液に100mg/dlの glucoseのみ添加したものをケトン体無添加群とした。手術終了後、5分間 95% O<sub>2</sub>+ 5% CO<sub>2</sub>混合ガスを通気させた基礎灌流液でWash outした後、再灌流装置につなぎ25分の前灌流の後、100分間灌流を行った。灌流液は10分おきに0.6ml採取し、遠心(3000rpm, 15分間)後、上清を-20°Cで保存し測定に供した。ケトン体、およびglucose濃度は前述したジアゾニウム塩法<sup>22)</sup>、 glucose oxidase法で測定した。更に灌流終了後、筋肉の Biopsyを行い、腓腹筋(赤色部)を摘出し、-196°Cの液体窒素中に保存した。この保存試料をもとにFig. 3に示すようにケトン体利用において最初に必要な酵素 3-oxo acid CoA-transferase活性、および解糖系の律速酵素である phosphofructokinase(PFK)の活性を前述した Williamson<sup>9)</sup>、ShonxとBoxerら<sup>26)</sup>の方法によりそれぞれ測定した。

## C: 成績

### 1) 正常およびSTZ糖尿病ラットの24時間絶食時の血中ケトン体および血糖値 (Table 1)

Table 1に血中ケトン体濃度および血糖値を示すが、血糖値はSTZ糖尿病ラットでは正常に比し有意に高値であった。一方、総ケトン体濃度に両者で有意差はみられなかった。

### 2) 正常ラットのケトン体添加群、安静時筋でのケトン体のuptake (Fig.13)

Fig.13にケトン体を添加した状態での灌流液中のケトン体濃度の経時的変化を示す。AcAcは時間と共に徐々に低下し、40分以後、前値に比し有意に低下した。一方、3-OHBは軽度低下傾向を示したが有意ではなかった。また総ケトン体は50分以後有意に低下した。この100分間のケトン体のuptakeをTable 2に示したが、AcAcのuptakeは3-OHBに比し有意に高値であった。

### 3) STZ糖尿病ラットのケトン体添加群、安静時筋でのケトン体のuptake (Fig.14)

Fig.14にケトン体を添加した状態での灌流液中のケトン体濃度の経時的変化を示す。AcAcは正常と同様に時間と共に徐々に低下し、40分以後、前値に比し有意な低下を認めた。一方、3-OHBは有意な変化を示さなかった。100分間のケトン体のuptakeを計算するとTable 2に示すようにSTZ糖尿病ラットのAcAc、総ケトン体のuptakeは正常に比し有意に低下していた。しかし3-OHBは有意差を認めなかった。

### 4) 正常およびSTZ糖尿病ラットの安静時筋でのglucose uptake (Fig.15, 16)

正常ラットのケトン体添加群とケトン体無添加群のglucose濃度の経時的変化をFig.15に示す。両群とも時間とともにglucose濃度は徐々に低下したが、50分以降、ケトン体添加群のglucose濃度の方が無添加群に比し有意に高値であった。一方Fig.16に示すようにSTZ糖尿病ラットのケトン体添加群では、glucose濃度に有意な低下はみられなかった。また100分間のglucose uptakeはTable 2に示すように、正常ラットではケトン体無添加群の方がケトン体添加群に比し有意に高値であった。また正常およびSTZ糖尿病ラットのケトン体を添加したもので比較すると正常ラットの方が有意に高値であった。

### 5) 正常およびSTZ糖尿病ラットの筋組織中の3-oxo acid CoA-transferase活性の比較 (Table 3)

Table 3に示すように3-oxo acid CoA-transferase活性は正常ラットのケトン体

添加群では無添加群に比し有意に高値であった。またSTZ糖尿病ラットでは正常に比し有意に低下していた。

6) 正常およびSTZ糖尿病ラットの筋組織中のPFK活性の比較 (Table 3)

Table 3に示すようにPFK活性は正常ラットのケトン体添加群では無添加群に比し有意に低下していた。またSTZ糖尿病ラットでは正常に比し有意に低下していた。

Table 1 正常およびSTZ糖尿病ラットの24時間絶食時の血中ケトン体および血糖値

	N	血中ケトン体 ( $\mu$ M)			血糖値 (mg/dl)
		AcAc	3-OHB	総ケトン体	
正常ラット	5	339 $\pm$ 17	576 $\pm$ 51	916 $\pm$ 60	98 $\pm$ 7
STZ糖尿病ラット	5	213 $\pm$ 21	621 $\pm$ 70	834 $\pm$ 72	324 $\pm$ 34

NS (between total ketone bodies)  
 P<0.05 (between blood glucose)

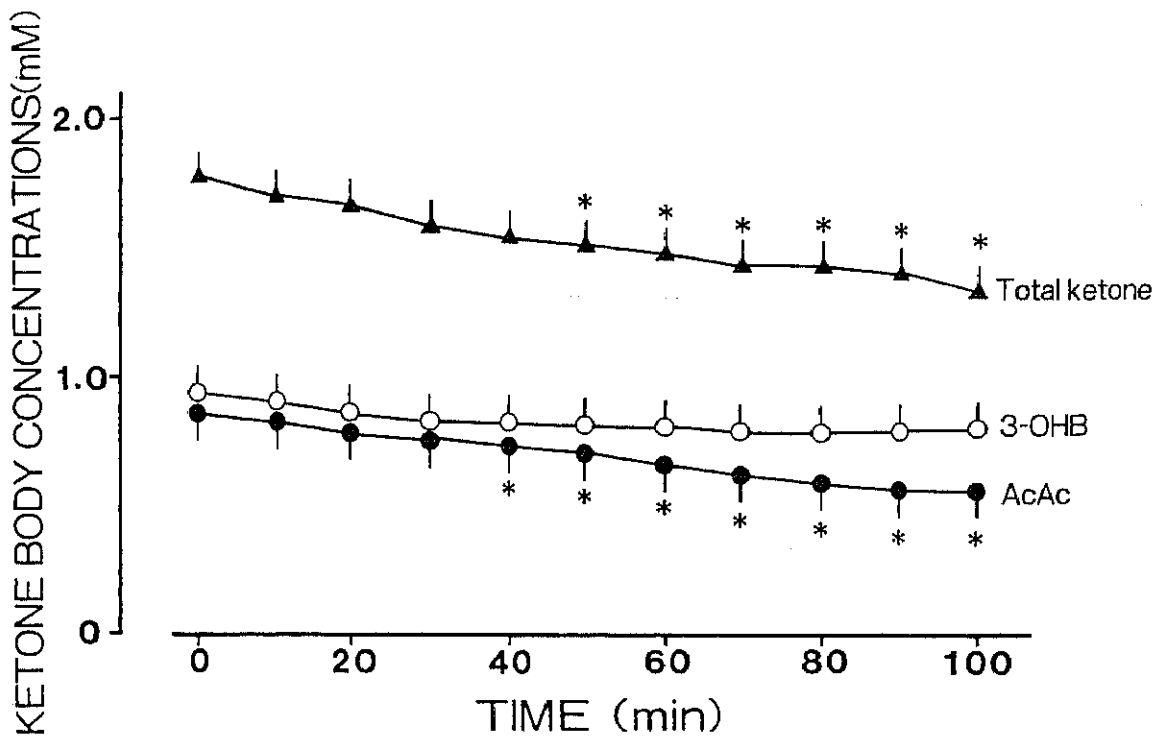


Fig. 13 Ketone body concentrations of perfusate in the perfused hindquarter of normal rat. mean $\pm$ SEM, N=5

\* p<0.05 significantly different from the basal value(0 min)

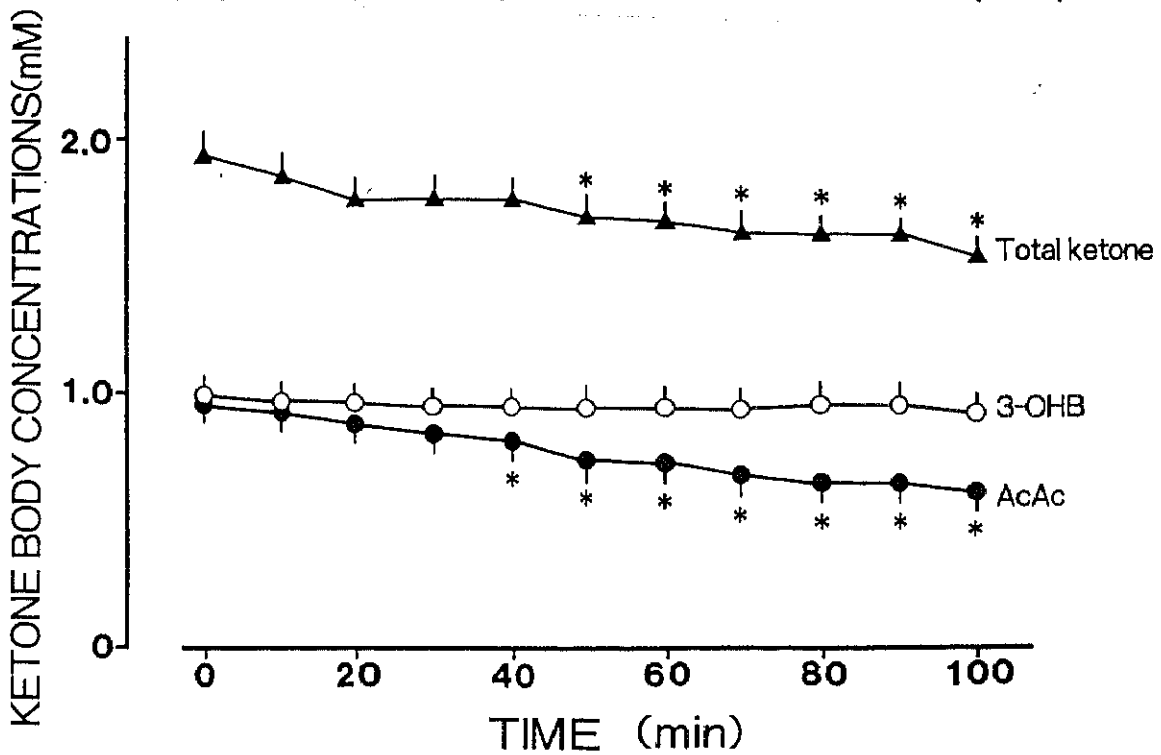


Fig. 14 Ketone body concentrations of perfusate in the perfused hindquarter of diabetic rat. mean $\pm$ SEM, N=5

\* p<0.05 significantly different from the basal value(0 min)

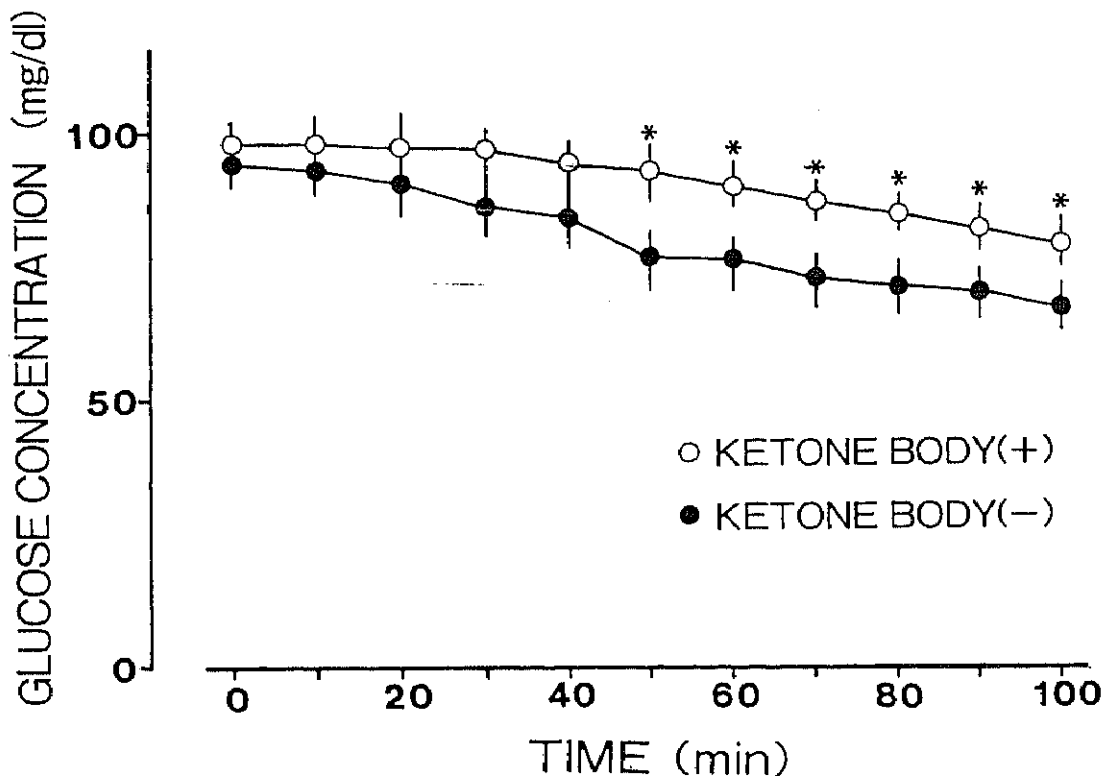


Fig. 15 Glucose concentration of perfusate in the perfused hind quarter of normal rat. mean  $\pm$  SEM, N=5

\*  $p < 0.05$  Ketone body (+) vs. Ketone body (-)

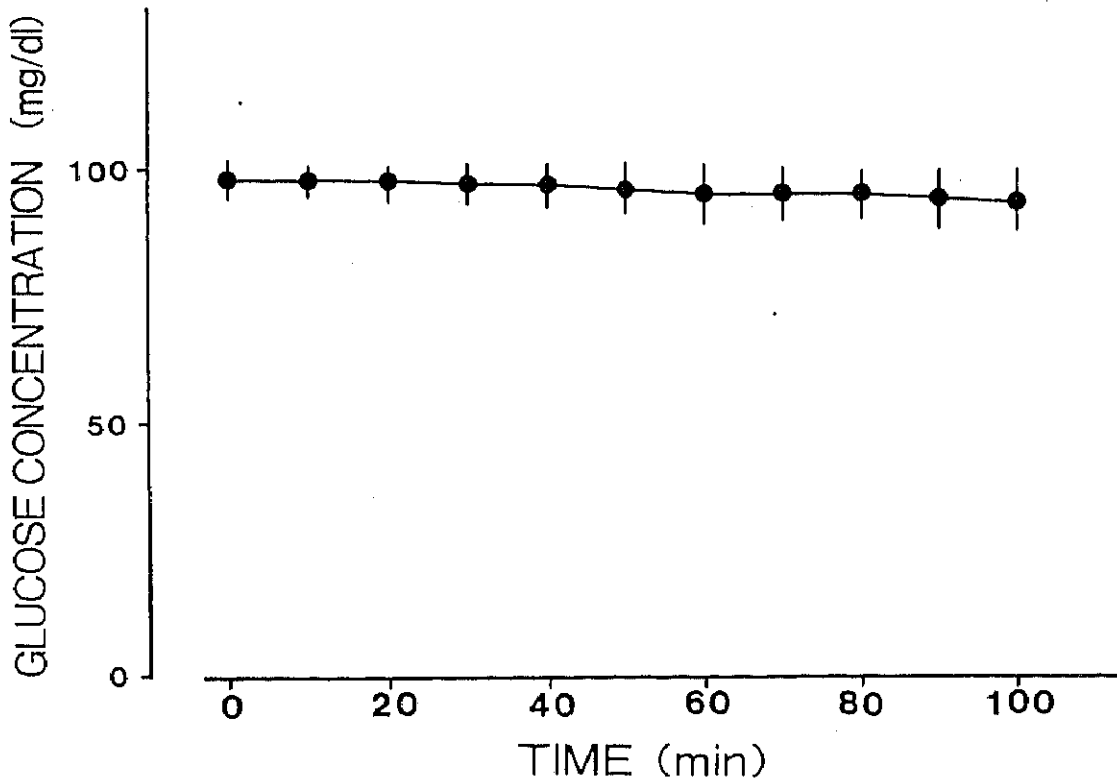


Fig. 16 Glucose concentration of perfusate in the perfused hindquarter of diabetic rat. mean  $\pm$  SEM, N=5

Table 2 正常およびSTZ糖尿病ラットのケトン体 uptake および glucose uptake

	N	ケトン体 uptake ( $\mu\text{mole}/100\text{min}/\text{g muscle}$ )			glucose uptake ( $\mu\text{mole}/100\text{min}/\text{g muscle}$ )	
		AcAc	3-OHB	総ケトン体		
正常ラット						
ケトン体添加群	5	1.31 $\pm$ 0.02	0.46 $\pm$ 0.11	1.75 $\pm$ 0.29	2.35 $\pm$ 0.48	] P<0.05
ケトン体無添加群	5	—	—	—	5.35 $\pm$ 1.04	
STZ糖尿病ラット						
ケトン体添加群	5	0.68 $\pm$ 0.01	0.32 $\pm$ 0.06	1.01 $\pm$ 0.11	1.75 $\pm$ 0.45	] P<0.05
			P<0.05	N.S	P<0.05	P<0.05

Table 3 正常およびSTZ糖尿病ラットの筋組織中の3-oxoacid CoA-transferase活性およびPFK活性

	N	3-oxoacid CoA-transferase活性 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{g tissue}$	PFK活性 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{g tissue}$
正常ラット			
ケトン体添加群	5	0.35 $\pm$ 0.06	10.1 $\pm$ 0.9
ケトン体無添加群	5	0.19 $\pm$ 0.02	14.2 $\pm$ 2.3
STZ糖尿病ラット			
ケトン体添加群	5	0.16 $\pm$ 0.02	5.0 $\pm$ 2.1
		P<0.05	P<0.05
			P<0.01

#### D: 考察

in situ のラット下肢筋灌流法を用いて、ケトン体の安静時の筋利用について検討した。24時間絶食状態での血中ケトン体濃度は正常、STZ糖尿病ラットで有意差はみられなかった。この状態でケトン体(AcAc, 3-OHB 各々1mM)を添加し灌流した場合、正常、STZ糖尿病ラットともAcAcの方が3-OHBに比し有意に多く利用されることが明らかになった。このことに関して末梢で3-OHBを利用するにはFig.3のように3-hydroxybutyrate dehydrogenaseが必要であるが、筋肉中ではこの活性が低いという報告<sup>44)</sup>があり、そのために同量添加してもAcAcの方が早く利用されたと考えられる。Rudermanら<sup>45)</sup>も同様に筋灌流にてケトン体の利用を観察しているが、やはりAcAcの利用の方が3-OHBに比し有意に高いと報告している。また彼等の報告では総ケトン体のuptakeは $9.46 \mu\text{mole}/100\text{min}/\text{g muscle}$ とこの研究の約5倍と高値であるがこれは彼等の用いたラットが48時間絶食であること、更に灌流液に添加したケトン体濃度が3.9mMと高濃度であることや灌流方法の違いによると考えられる。

正常ラットでケトン体を添加したものでは無添加群に比し有意に3-oxo acid CoA transferase活性は亢進していた。Williamsonら<sup>9)</sup>は、この酵素は基質であるケトン体濃度の増加に比例して活性が増加すると報告している。一方、STZ糖尿病ラットでは正常に比しケトン体(AcAc、総ケトン体)のuptakeは有意に低下していた。このことはSTZ糖尿病ラットの筋にて測定した3-oxo acid CoA-transferase活性が正常に比し有意に低下していたことが原因と考えられる。Rudermanら<sup>45)</sup>やBeatty<sup>46)</sup>も同様の報告をしており、STZ糖尿病ラットにてAcAcの利用が低下し、インスリンがAcAcの利用を亢進すると報告している。そして更にケトン体が高濃度の状態で長時間続いた場合、このケトン体の筋利用の低下がケトーシスに及ぼす影響は大きいと考えられる。

glucoseのuptakeに関してケトン体添加群と無添加群とでは有意にケトン体添加群でglucoseのuptakeが低下していた。このglucoseの利用が低下していた理由としてRandleら<sup>47)</sup>は筋肉でglucoseが細胞内に取り込まれglucose-6-phosphateを経て生じたpyruvateが酸化的に脱炭酸される過程をケトン体が阻害しglucoseの酸化を節約すると報告している。そして6)の結果から明らかのようにPFK活性はケトン体添加群で有意に低下していた。これはRandle<sup>47)</sup>, Goodman<sup>48)</sup>らのケトン体が酸化され



るとcitrate、あるいはNADHの細胞内濃度が増加しこれがPFK活性を阻害するという説を支持する結果となった。そしてこのことは筋組織での脂質代謝と糖質代謝の相互作用としてエネルギーの経済性を考える上で都合のよい調節と考えられる。またSTZ糖尿病ラットのPFK活性は正常に比し有意に低下していたが、この酵素は解糖において鍵となる位置を占めている。近年このPFK活性は、強力なアロステリック活性因子であるFructose-2,6-bisphosphate(F-2,6-P<sub>2</sub>)によって調節を受けていることが解明されているが、糖尿病状態ではinsulin/glucagon比の低下によりこのF-2,6-P<sub>2</sub>濃度が減少しPFK活性は低下する<sup>1)</sup>と報告されている。

以上より糖尿病状態ではケトン体およびglucoseの筋利用の低下がみられ、このことがケトーシスの進展におよぼす影響は大きいことが示唆された。

#### E: 小括

24時間絶食にした正常およびSTZ糖尿病ラットにてin situ下肢筋灌流を行いケトン体の安静時の筋利用について検討した。

1) 正常、STZ糖尿病ラットともケトン体(AcAc, 3-OHB 各々1mM)添加し灌流した場合、AcAcの方が3-OHBに比し有意にuptakeが高値であった。またSTZ糖尿病ラットのuptakeは正常に比し有意に低下していた。

2) 灌流後の筋組織の3-oxo acid CoA-transferase活性は、正常ラットのケトン体添加群では無添加群に比し有意に高値であった。またSTZ糖尿病ラットでは正常ラットに比しこの活性が有意に低下しており、このことがケトン体のuptakeが低下している原因と考えられた。

3) 正常ラットのglucose uptakeおよび筋組織中のPFK活性は、ケトン体添加群では無添加群に比し有意に低下していた。このことより解糖系の律速酵素であるPFK活性がケトン体酸化により阻害されることが示唆された。またSTZ糖尿病ラットのglucose uptakeおよび筋組織中のPFK活性は正常に比し有意に低下していた。

以上より糖尿病状態ではケトン体およびglucoseの筋利用の低下がみられ、ケトーシスの進展におよぼす影響は大きいと考えられた。