

第7章 高浸透圧非ケトン性昏睡の原因

: 加齢に伴う肝ケトン体生成のグルカゴン不応

A: 目的

高浸透圧非ケトン性昏睡(Hyperosmolar nonketotic coma)は、ケトン体の増加を伴わずに著しい高浸透圧、脱水、昏睡を示す重篤な糖尿病状態である。しかしその発症機序については、まだ不明な点が多い⁶¹⁾。従来よりの仮説としては以下のものがあげられている。脂肪動員抑制説として、インスリンによる脂肪動員抑制説、脂肪動員ホルモン抑制説、高血糖高浸透圧による脂肪動員抑制説 また肝内ケトン体生成ブロック説などがある^{62) 63)}。しかし高令者のNIDDM患者に多いことより加齢に伴うケトン体代謝およびFFA、carnitineなど関連物質代謝の変化が関与する可能性が考えられる。しかし加齢のケトン体代謝への影響についての報告は少ない。そこで正常および軽症糖尿病ラットの8週令(若年群)、50週令(加齢群)を用い、血中ケトン体及びその関連物質濃度の比較あるいはグルカゴンの肝ケトン体生成刺激作用に関する比較を行った。

B: 方法

Wistar系正常雄ラット及び6週目にストレプトゾトシン(STZ)25mg/kgを300 μ lの citrate buffer (pH4.5)に溶解し24時間絶食ラットの尾静脈より静注し軽症糖尿病ラットを作成したものをを用いた。糖尿病ラットは全例尿ケトン陰性でインスリンを用いず飼育した。これらの8週令を若年群とし、50週令を加齢群とした。

in vivo実験: 飽食時あるいは絶食時(36時間絶食)に各々pentobarbital麻醉下、AM9時に頸静脈より1.5mlを10% EDTA + 500 KIU/ml aprotininを0.15ml含む試験管に採血後、遠心分離(3000rpm 15分)、 -20°C に保存し各種の測定に供した。血中 AcAc、3-OHBはジアゾニウム塩法²²⁾で、血糖はglucose oxidase法で測定した。インスリン(IRI)、グルカゴン(IRG)は各々の特異抗体を用いたRIAで、carnitine濃度は McGarryら²³⁾によるradioisotopic methodで測定した。

in vitro実験: in vivo実験の1週後、同じラットを飽食状態で実験に供した。肝灌流は前述したMortimoreら¹⁷⁾の方法に準じた¹⁸⁾非再灌流法で行った。灌流液は 20mM Krebs-Ringer-Tris buffer(pH7.4)にIntrafat[®] (10% soy bean oil emulsion, linoleic acid 52.2%, oleic acid 22.1%, palmitic acid 12.7%, linolenic acid 8.2%, stearic acid 4.8%)を添加し、その濃度が0.01%となるようにした。毎分20mlの灌流速度で30分間の前灌流後、次に0.2 μ Mのグルカゴンを添加した灌流液で10分間灌流し、その後の10分間は元の灌流液に戻した。灌流液中のAcAc、3-OHB濃度は前述したMellanby法²¹⁾にて測定した。glucoseはglucose oxidase法、cyclic AMP(cAMP)はRIAで測定した。

B: 成績

1) 血中ケトン体とその関連物質の正常ラットの若年および加齢群での比較 (Table 6)

飽食状態では、正常ラットの若年および加齢群で血中ケトン体濃度に有意差はみられなかった。加齢群のfree carnitine濃度は若年群よりも低値であった。一方、acylcarnitine濃度には両者で差はみられなかった。36時間絶食後、両群で血中ケトン体(AcAc、3-OHB)の有意な増加が得られたが、加齢群のAcAcの増加度は若年群に比し有意に低かった(1087±120% vs. 515±86%)。3-OHBの増加は飽食時に比し約8倍の増加を呈したが、両群で差はみられなかった。36時間絶食でacylcarnitineは両群とも上昇したが、両群で有意差はみられなかった。血中FFA濃度は若年、加齢群とも有意に上昇したが、その増加度は加齢群の方が有意に高値であった(

271±53 vs. 199±33%)。血中IRI濃度は両群で差はなかったが、加齢群のグルカゴン濃度は、飽食、絶食ラットとも若年群より有意に高値であった。

2) 血中ケトン体とその関連物質のSTZ糖尿病ラットの若年および加齢群での比較 (Table 7)

糖尿病ラットの血糖値は飽食時、約400mg/dl、絶食時300mg/dlであった。血中ケトン体レベルは飽食時では、正常ラットに比し有意に高値であったが、若年、加齢群で有意差はなかった。36時間絶食後のAcAcと3-OHBの増加は、正常の増加に比し低値であった。加齢群糖尿病ラットの絶食時AcAc濃度は、若年群に比し有意に低値であったが、3-OHBには若年、加齢群で有意差はなかった。糖尿病若年ラットの血中acylcarnitine濃度は正常に比し有意に高値であった。糖尿病若年群のacyl/free carnitine比は正常のそれに比し有意に高値であった。(0.82±0.15 vs.

0.30±0.07)。飽食、絶食時とも若年、加齢群でこの比には有意差はなかった。血中FFA濃度は絶食にて有意な増加はなく加齢差もなかった。絶食時の加齢群ラットのグルカゴン濃度は若年群より有意に高値であったが、血中インスリン濃度には加齢差はみられなかった。

3) 灌流肝からのケトン体放出の加齢による影響

(1) ケトン体基礎放出量

Fig.26,27 に示すようにグルカゴン無添加時の10分間のAcAc,3-OHBレベルはIntrafat® 存在下では変化しなかった。この10分間の放出量の和を求めたところ

Table 6 Comparison of plasma ketone body and its related substances between young- and adult-normal rats (mean±SEM)

	<u>Fed</u>		<u>Fasted</u>	
	8 weeks	50 weeks	8 weeks	50 weeks
N	8	8	8	8
Body weight (g)	234±4	570±21**	214±6	541±22**
Plasma glucose (mg/dl)	123±3	118±4	95±7	97±6
Acetoacetic acid (µM)	76±15	84±19	827±90 (1087±120)	433±89** (515±86)
3-Hydroxybutyrate (µM)	129±15	110±24	980±62 (759±68)	954±91 (867±178)
Free fatty acids (µEq/l)	180±31	197±24	359±30 (199±33)	534±49* (271±53)
Free carnitine (µM)	49.7±5.2	37.7±4.3*	39.3±5.4 (80±6)	33.7±8.3 (90±5)
Acylcarnitine (µM)	15.3±2.3	16.4±6.7	19.1±2.1 (125±7)	19.8±7.0 (120±8)
Acyl/Free	0.30±0.07	0.43±0.08	0.48±0.11	0.58±0.12
Insulin (µU/ml)	25.6±4.2	24.7±4.9	19.9±7.0	16.0±4.0
Glucagon (pg/ml)	170±12	220±14*	193±16	268±17*

*p<0.05, **p<0.01, 8 W vs. 50 W rats.

The figures in parenthesis show the percent increase from the values in fed state.

Table 7 Comparison of plasma ketone body and its related substances between young- and adult-STZ (25mg/kg) rats. (mean±SEM)

	<u>Fed</u>		<u>Fasted</u>	
	8 weeks	50 weeks	8 weeks	50 weeks
N	8	8	8	8
Body weight (g)	209±18	439±25**	192±19	388±24**
Plasma glucose (mg/dl)	375±34	419±56	366±44	235±43
Acetoacetic acid (μM)	160±25	151±16	237±10 (148±19)	178±22* (117±11)
3-Hydroxybutyrate (μM)	344±98	303±55	453±61 (131±20)	367±72 (121±19)
Free fatty acids (μEq/l)	418±45	332±43	487±39 (116±7)	370±54 (111±8)
Free carnitine (μM)	34.0±4.7	41.4±5.6	42.4±6.3 (124±12)	42.6±5.1 (102±2)
Acylcarnitine (μM)	28.0±5.9	23.0±5.4	37.2±7.0 (132±16)	29.7±4.2 (129±18)
Acyl/Free	0.82±0.15*	0.55±0.14	0.87±0.16	0.69±0.17
Insulin (μU/ml)	14.7±7.6	16.4±3.4	12.0±4.1	12.1±5.7
Glucagon (pg/ml)	164±20	180±19	173±19	254±35*

*p<0.05, **p<0.01, 8 W vs. 50 W rats.

The figures in parenthesis show the percent increase from the values in fed state.

糖尿病ラットでは正常に比しAcAc, 3-OHBとも高値を示した(Table 8)。加齢による影響として、AcAcは正常、糖尿病ラットとも有意に加齢群で低値であったが、3-OHBには差がなかった。3-OHB/AcAc比は、正常、若年群 0.42 ± 0.02 、加齢群 0.46 ± 0.01 、糖尿病、若年群 1.08 ± 0.03 、加齢群 1.41 ± 0.04 とともに加齢群で有意に大きかった。

(2) グルカゴン添加時の変化

0.2 μ Mのグルカゴンを加えた灌流液を10分間灌流したところ、正常ラットの肝ケトン体放出はグルカゴン添加後緩徐に増加し、5分でAcAc, 3-OHBとも有意な上昇を示しグルカゴン添加中止後の10分間もほぼ一定の放出量を保った(Fig.26)。一方、Fig 27 のように糖尿病ラットにおいてはその増加はやや少なかった。

0.2 μ Mグルカゴンは正常ラットにてAcAc, 3-OHBとも有意($p < 0.05$)な増加をきたしたが、糖尿病ラットでは有意ではなかった。グルカゴンによる若年群よりのAcAcの放出は正常、糖尿病ラットとも加齢群のそれよりも有意($p < 0.05$)に高値であった。しかし3-OHBの放出量に関しては加齢差はみられなかった。

(3) グルカゴン添加時のcAMP、glucose放出量の変化

ケトン体と同時にcAMP、glucose放出量も測定し、各々のグルカゴンへの反応をケトン体のそれと比較した。時間経過はFig.26 に示す。cAMPの放出は添加後7分で最大に達しグルカゴン添加中止後は急速に減少した。glucose放出は1分目からほぼプラトーとなり、グルカゴン添加中止後は減少傾向を示した。そこでこの20分間の増加を比較した(Table 8)。20分間の糖尿病ラットのcAMPとglucoseの放出量は、正常に比し有意に低値であった。加齢群ラットでのcAMPの増加は正常、糖尿病ラットとも若年群より低下していたが、glucose放出量は正常と糖尿病ラットで有意差がなかった。

Table 8 Comparison of ketone body, cAMP and glucose output
between young- and adult-normal and STZ DM (25 mg/kg) rats. (mean±SEM)

	<u>Normal</u>		<u>STZ DM (25 mg/kg)</u>	
	8 weeks	50 weeks	8 weeks	50 weeks
1) Basal output				
AcAc	0.42±0.02	0.35±0.02*	1.06±0.04	0.76±0.03*
3-OHB (µmole/g liver/10 min)	0.18±0.01	0.16±0.02	1.15±0.04	1.07±0.04
2) 0.2 µM glucagon				
AcAc	1.14±0.09 (135±6)	0.80±0.08* (119±10)	2.43±0.24 (113±5)	1.67±0.18* (111±3)
3-OHB (µmole/g liver/20 min)	0.50±0.05 (136±6)	0.38±0.04 (120±6)	2.64±0.32 (115±5)	2.47±0.41 (115±4)
cAMP (nmole/g liver/20 min)	1.72±0.22	1.20±0.22*	1.05±0.27	0.60±0.12*
Glucose (µmole/g liver/20 min)	71±6	88±7	52±7	47±9

*p<0.05, 8 W vs 50 W aged rats.

The figures in parenthesis show the percent increase from the values of basal output.

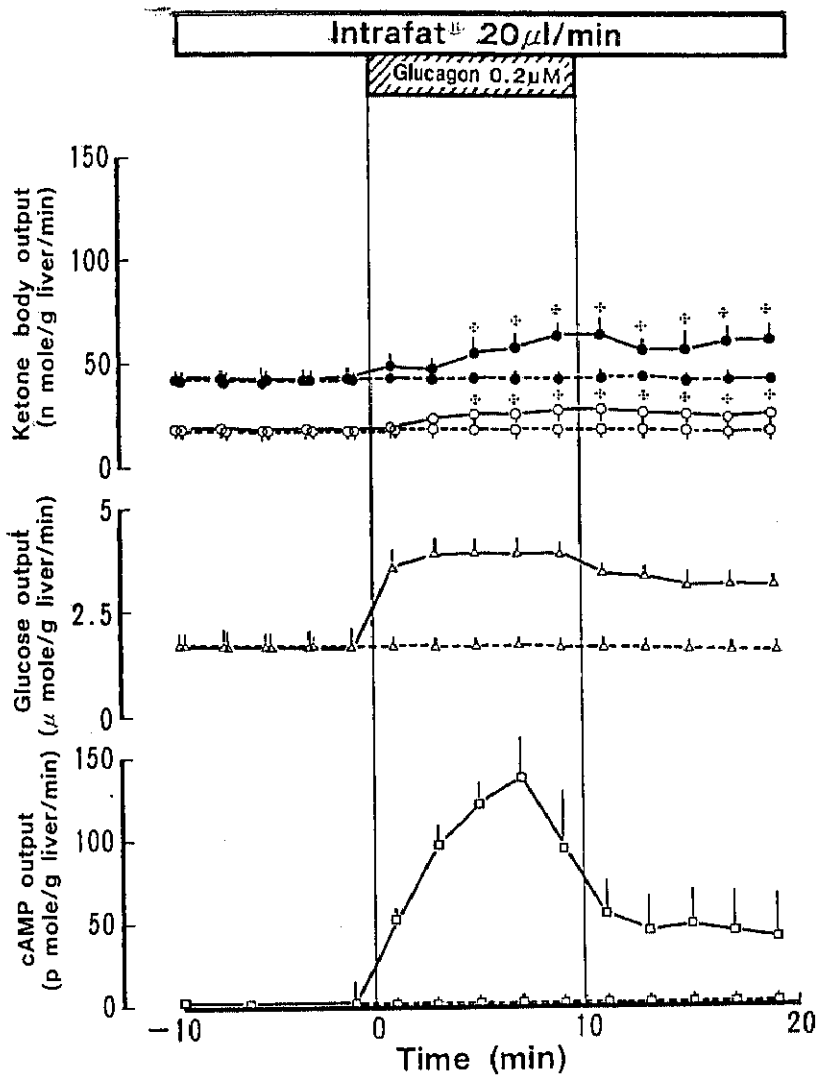


Fig. 26 Effects of $0.2 \mu\text{M}$ glucagon on ketone body, cAMP and glucose output in the isolated perfused fed young normal rat liver. The perfusate contained $20 \mu\text{l}/\text{min}$ of a soy bean emulsion. mean \pm SEM N=5, ● AcAc, ○ 3-OHB, ---- control (without addition of glucagon). * $p < 0.05$ Significantly different from the mean of basal values (1-9min).

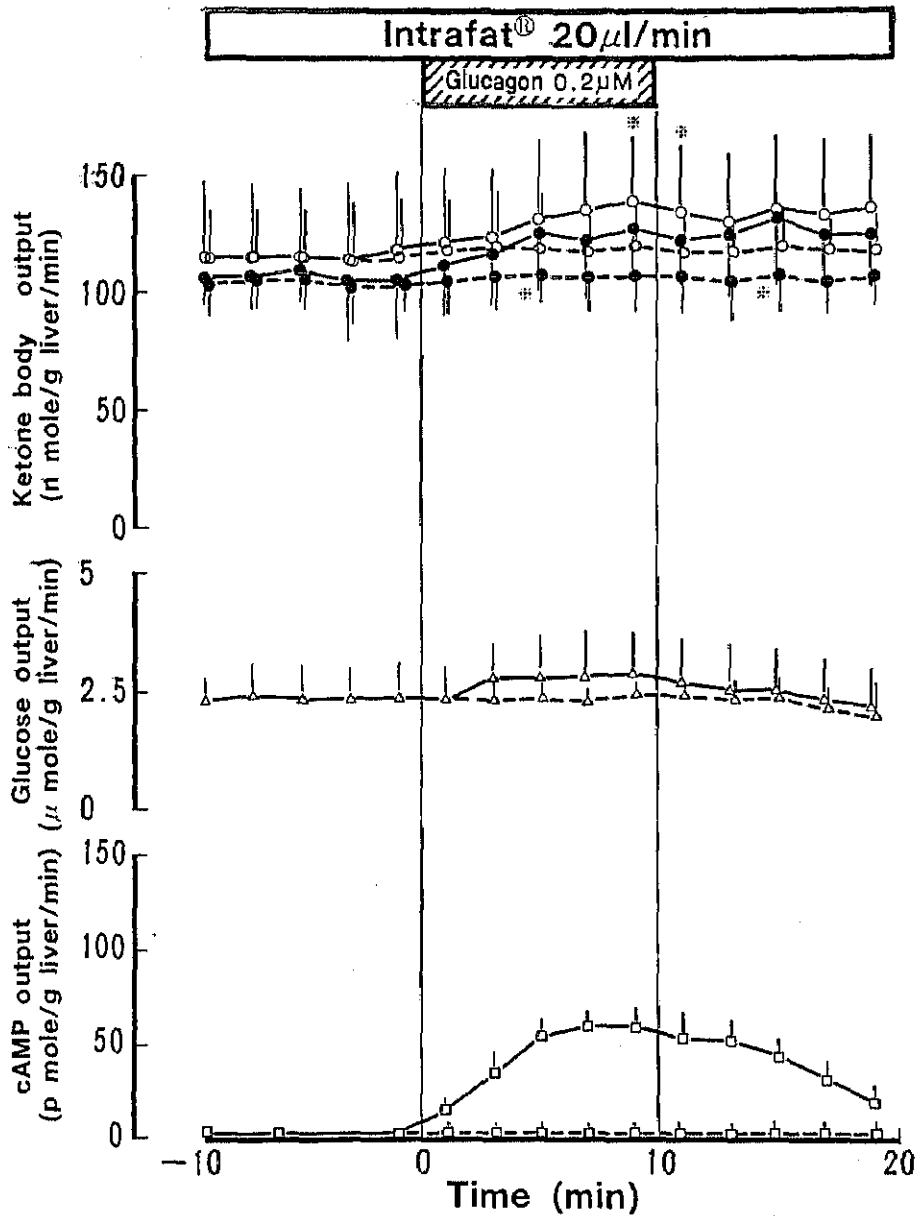


Fig. 27 Effects of 0.2 μ M glucagon on ketone body, cAMP and glucose output in the isolated perfused fed young STZ diabetic rat liver. The perfusate contained 20 μ l/min of a soy bean oil emulsion. mean \pm SEM, N=5, ● AcAc, ○ 3-OHB, ---- control (without addition of glucagon). * $p < 0.05$ Significantly different from the mean of basal values (1-9 min).

D: 考察

従来よりのラットの血中ケトン体についての報告を調べてみると、同じ酵素法^{64) 65)}で測定されているがその値は一定していない。その原因については、ラットの種差或いは血液のサンプリングに問題があるようにおもわれる。この研究で用いた方法は、従来よりの酵素法が血漿2mlを用いたのに対して、血液のサンプル量が200 μ lと少量ですむことと、その変動が少ないことがあげられる²²⁾。

糖尿病ラットでは、飽食時血中ケトン体、特に3-OHBは正常に比し有意に高値であった。しかしTable 6, 7に示すように絶食による増加は少なく、その値は正常ラットの値より低値であった。糖尿病ラットでは3-OHBは増加しているとの報告がいままで多くみられるが、絶食にてその増加が低下するという報告は初めてである。ヒトでは絶食によりAcAc, 3-OHBとも増加する。Table 6, 7に示すように、FFAはケトン体の基質であるが、絶食時の糖尿病ラットのFFAは正常ラットに比べるとやはり増加が少ない。この糖尿病ラットでの絶食後の血中ケトン体の増加が少ないのは、脂肪細胞の中性脂肪の含量の低下を示唆する。ケトン体は肝臓でつくられるが、その調節については、第3章で述べたように、まずFFAの肝への供給、またインスリン、グルカゴン、GH、カテコールアミンによってその生成が調節されている。この研究では、正常加齢ラットの絶食時FFAは若年群よりも有意に高値であったが、糖尿病ラットではその逆であった。また正常、糖尿病ラットとも加齢ラットの血中グルカゴン濃度は若年ラットより高値であった。加齢によるグルカゴンの増加は正常ラット⁶⁶⁾、ヒト⁶⁷⁾のみならず糖尿病の患者⁶⁸⁾においても報告されている。

carnitineはFFAがMtの内膜を通過するのに重要な役割を演じている。そして血中acylcarnitine濃度は、肝のacylcarnitine含量と比例していることが報告されている⁵⁴⁾。この研究では、加齢ラットのcarnitine濃度は、正常、糖尿病とも若年ラットに比し低下していた。前橋ら⁶⁹⁾はfree carnitine濃度は加齢にて低下することを報告している。このようにin vivoの実験により加齢群の血中FFA、グルカゴン濃度は高値にも拘わらず血中ケトン体、carnitine濃度は若年群に比し低値であった。このことよりグルカゴンに対する肝での不応が示唆された。

in vitroの成績をみるとTable 8の如く、加齢群での灌流肝よりのAcAcの基礎放出およびグルカゴンによるAcAcの生成は若年群に比し有意に低下していた。グルカゴンの肝へのケトン体生成に及ぼす点について、McGarryら³⁷⁾はmalonyl CoA濃度

の低下を介してcarnitine acyltransferaseの活性を亢進させケトン体の生成を増加させると報告している。そしてこの効果はglucagonの receptor, adenylate cyclaseを介している。糖尿病ラット肝ではFFAの供給を正常ラットと同量にしておいてもケトン体生成が有意($p < 0.05$)に高値であった。これは糖尿病では肝の代謝がケトン体生成に傾いていることを示している。しかし山下ら⁷⁰⁾の報告のようにdown regulationのためかグルカゴンに対しては一層不応であった。

更にTable 8 に示すように加齢ラットのglucoseの放出は、cAMPは低下していたのにも拘わらず若年ラットと同程度であった。このことはketogenesisとglycogenolysisとは postreceptorレベルでの反応が異なることを意味しグルカゴンの受容体とする adenylate cyclase以外の機構が存在することを示唆する。また今回の研究で、加齢によりAcAcの方が 3-OHBよりも肝よりの放出量並びに血中でのレベルが低下していた。このことは in vitroの実験で Table 8 に示すようにAcAcの放出のみ加齢で低下していたことより、AcAcより 3-OHBが補酵素NADHを介して産生されるが、この反応が加齢にてあまり影響をうけないことを示唆している。

以上より加齢群では絶食により血中ケトン体、特にAcAcが減少すること及び加齢によるグルカゴンの肝での不応が確認された。このことが高浸透圧非ケトン性昏睡が高齢者に多くみられる原因の一つと考えられた。

E: 小括

加齢によるケトン体代謝の影響についてラットを用いて検討した。

- 1) in vivoの成績 正常ラットでは絶食後のケトン体の増加が加齢群で低下していた。糖尿病ラットでも加齢群の絶食後のケトン体、特にAcAc濃度は若年群に比し有意に低値であった。一方、正常、糖尿病ラットともIRG/IRI比は加齢群で高値であった。このことよりグルカゴンの加齢による肝での不応が示唆された。
- 2) in vitroの成績 肝灌流を用いたグルカゴンによるAcAcの生成は正常、糖尿病ラットとも加齢群で有意に低下していた。また糖尿病ラット肝ではFFAの供給を正常ラットと同量にしてもケトン体生成は有意に高値であった。以上より加齢による肝でのケトン体生成に及ぼすグルカゴンの不応が示されたが、同時に測定したcAMP放出が加齢群で低下していたことよりreceptor, adenylate cyclaseレベルでの不応が示唆された。一方、加齢群でのグルコース放出の低下に比べケトン体生成の低下度がより著明であったことより、post receptorレベルでの不応も考えられた。そしてこのことが高浸透圧非ケトン性昏睡が高令者に多く見られる原因の一つと考えられた。