

## 第8章 総括

糖尿病性ケトーシスの病態と治療に関し、基礎的および臨床的に検討し以下の結果を得た。

### 1: 肝ケトン体生成の調節

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がみられた。
- 4) 0.2  $\mu$ 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の有意な生成増加がみられた。また絶食肝で2  $\mu$ g/mlの成長ホルモン及び10  $\mu$ 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。

### 2: ケトン体の筋利用に関する基礎的検討

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。

### 3:— 正常者ならびに糖尿病患者の血中ケトン体

血中ケトン体の分別定量がジアゾニウム塩法により比較的簡単に行えるようになり臨床応用も可能となったので正常者および糖尿病患者で血中ケトン体およびその関連物質を測定し臨床での有用性につき検討した。

1) IDDM患者では、空腹時総ケトン体濃度は正常の約6倍と有意に高値で3-OHB優位であった。

2) NIDDM患者では空腹時総ケトン体濃度は正常の約2.5倍でやはり3-OHB優位であった。

3) 正常者では混合食400Kcal摂食後、血中ケトン体、carnitine濃度は有意な変化を示さなかった。

4) NIDDM患者では、混合食摂食後、血中ケトン体、特に3-OHB濃度の有意な低下がみられ、ほぼ正常者のレベルまで低下した。このことは食事によるインスリンの増加によりもたらされることが示唆された。また空腹時の総carnitine濃度、acyl/free比は正常に比し有意な差を認めなかった。SU剤内服治療群の空腹時のケトン体レベル、特に3-OHB濃度は他群に比し有意に低値であった。このことはSU剤の障外作用として肝でのケトン体生成抑制作用ならびに末梢での利用を促進する可能性が示唆された。

5) これらのNIDDM患者で血糖値がよくコントロールされている者( FBS<110, 2hr<140 mg/dl)に同様の混合食負荷検査を施行したところ空腹時血中ケトン体はコントロール改善前に比し低値であったが、食後に特に3-OHBが低下する傾向は消失しなかった。

以上より血中ケトン体濃度の変化(特に3-OHB)は血糖値の変化と異なっていることを示し、インスリン作用不足を鋭敏に反映することが判明した。それゆえ血中ケトン体の測定は糖尿病のコントロールの指標として極めて有用であることが示された。

#### 4: 糖尿病性ケトアシドーシスの初期治療に関する検討 : NaHCO<sub>3</sub>使用の影響

DKAの治療でNaHCO<sub>3</sub>の使用については議論が多い。そこでこの点について臨床的および基礎的検討を行った。

1) 臨床的検討; DKA入院患者の平均総ケトン体濃度は $7.5 \pm 1.5$  mMと高ケトン血症を呈していた。インスリン少量持続療法にて治療したがNaHCO<sub>3</sub>使用群では使用中AcAc濃度の増加があり、使用後は3-OHBの増加もみられケトーシスの改善は非使用群に比し6時間の遅延がみられた。一方、血糖値の改善には両者で有意差を認めなかった。

2) 基礎的検討; ラット肝灌流にてNaHCO<sub>3</sub>を添加すると直後にAcAcの増加、添加中止後は3-OHB、及び3-OHB/AcAc比の増加が生じ、肝ケトン体生成は約2倍と有意に増加した。従ってNaHCO<sub>3</sub>のケトーシスの増悪の機序として肝ケトン体生成の亢進によることが示された。

#### 5: 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おい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。

稿を終えるにあたり、御指導ならびに御校閲下さいました筑波大学臨床医学系山下亀次郎教授に深甚なる謝意を表します。また実験にあたって熱心な御協力を頂きました代謝内分泌グループの皆様には心からお礼を申し上げます。

内容の一部は第27,28,29回日本糖尿病学会総会、第58,59回日本内分泌学会学術総会、The second international symposium on treatment of diabetes mellitus、第23回日本臨床代謝学会総会シンポジウムにて発表し、Endocrinologia Japonica vol. 33, 1986.に掲載予定である。

### 参考文献

1. Foster, D.W. (1984). From glycogen to ketones and back. *Diabetes* 33, 1189-1199.
2. Mayes, P.A. (1985). Metabolism of lipids: II. Role of tissues. In: *Harper's review of biochemistry*. (Ed, by Martin, D.W., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. and Granner, D.K. ), Maruzen asian edition, Tokyo. p.232-256.
3. Liligenquist, J.E. (1981). Ketogenesis and its regulation. In: *Diabetes mellitus* (Ed, by Garland, B.M.), New York, vol 3, p.119-142
4. Schade, D.S., and Eaton, R.P. (1979). Pathogenesis of diabetic ketoacidosis : a reappraisal. *Diabetes care* 2, 296-306.
5. McGarry, J.D., Wright, D.H., and Foster, D.W. (1975). Hormonal control of ketogenesis. rapid activation of hepatic ketogenic capacity in fed rats by anti-insulin serum and glucagon. *J. Clin. Inv.* 55, 1202-1209.
6. Johnston, D.G., and Alberti, K.G.M.M. (1982). Hormonal control of ketone body metabolism in the normal and diabetic state. *Clin. Endocrinol. Metab.* 11, 329-361.
7. McGarry, J.D., and Foster, D.W. (1981). Ketogenesis. In: *Glucagon physiology, pathophysiology, and morphology of the pancreatic A-cells* (Ed, by Unger, R.H. and Orci, L.), Elsevier, New York. p. 273-295.
8. Burrin, J.M., Farrer, M., and Alberti, K.G.M.M. (1982). Effects of catecholamines on ketogenesis in isolated hepatocytes from fed or 48-hour-starved rats. *Biochem. Soc. Trans.* 10, 274-275.
9. Williamson, D.H., Bates, M.W., Page, M.A., and Krebs, H.A. (1971). Activities of enzymes involved in acetoacetate utilization in adult mamarian tissues. *Biochem. J.* 121, 41-47.
10. Owen, O.E., and Reichard, G.A.Jr. (1975). Ketone body metabolism in

- normal, obese and diabetic subjects. *Isr. J. Med. Sci.* 11, 560-570.
11. Balasse, E.O., and Havel, R.I. (1971). Evidence for an effect of insulin on the periferal utilization of ketone bodies in dogs. *J. Clin. Invest.* 50, 801-813.
  12. Sirek, A., Sirek, O.V., Niki, A., Niki, H., and Przybylska, K. (1969). The effect of dyhydroergotamine on growth hormone-induced lypolysis in dogs. *Horm. Metab. Res.* 1, 276-281.
  13. Sapir, D.G., and Owen, O.E. (1975). Renal concentration of ketone bodies during starvation. *Metabolism* 24, 23-33.
  14. Porte, J.D., and Halter, J.B. (1981). The endocrine pancreas and diabetes mellitus. In: *Williams textbook of endocrinology*. (Ed, by Williams, R.H.), Igaku-shoin/ Saunders, Tokyo. p.716-843.
  15. 坂本信夫, 小坂樹徳 (1981). 糖尿病とMacroangiopathy 1) わが国の現状-最近のアンケート調査から. *糖尿病* 24, 1146-1147.
  16. Alberti, K.G.M.M. (1977). Low-dose insulin in the treatment of diabetic ketoacidosis. *Arch. Inter. Med.* 137, 1367-1376.
  17. Mortimore, G.E., Tietze, T., and Stetten, D. (1959). Metabolism of insulin- $I^{131}$ ; Studies in isolated perfused rat liver and hind-limb preparations. *Diabetes* 8, 307-314.
  18. Okuda, Y., Kawai, K., Chiba, Y., and Yamashita, K. (1986). Effect of parenteral palatinose on glucose metabolism in normal and STZ diabetic rats. *Horm. Metab. Res.* 18, 361-364.
  19. 池田敏彦, 進藤英世 (1981). 臓器灌流実験法, ラジオアイソトープ 吉川春寿 編 薬物代謝実験法 12章, 丸善, 東京, p469-486.
  20. Chan, T.M., and Dehaye, J.P. (1981). Hormone regulation of glucose metabolism in the genetically obese-diabetic mouse (db/db). glucose metabolism in the perfused hindquarters of lean and obese mice. *Diabetes* 30, 211-218.
  21. Williamson, D.H., and Mellanby, J. (1974). D-(-)-3-hydroxybutyrate and acetoacetate. In: *Method of Enzymatic Analysis*. (Ed, by

- Bergmeyer, H.V.), Academic Press, New York. p.1836-1843.
22. Harano, Y., Kosugi, K., Hyosu, T., Uso, S., Ichikawa, Y., and Shigeta, Y. (1983). Sensitive and simplified method for the differential determination of serum levels of ketone bodies. *Clin. Chim. Acta* 123, 327-336.
  23. McGarry, J.D., and Foster, D.W. (1976). An improved and simplified radioisotopic assay for the determination of free and esterified carnitine. *J. Lip. Res.* 17, 277-281.
  24. Herbert, V., Lau, K.S., Gottlieb, C.W., and Bleicher, S.J. (1965). Coated charcoal immunoassay of insulin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 25, 1375-1384.
  25. Fallona, G.R., and Unger, R.H. (1974). Glucagon. In: *Method of hormone radioimmunoassay.* (Ed, by Jaffe, B.M. and Behman, H.R.) Academic press, New York. p.273-295.
  26. Sconk, C.E., and Boxer, G.E. (1964). Enzyme patterns in human tissues. I. methods for the determination of glycolytic enzymes. *Cancer Res.* 24, 709-721.
  27. Krebs, H.A., and Hems, R. (1970). Fatty acid metabolism in the perfused rat liver. *Biochem. J.* 119, 525-533.
  28. Remmer, H. (1958). Die Beschleunigung des Evipanabbaues unter der Wirkung von Barbituratan. *Naturwissenschaften*, 45, 189.
  29. Remmer, H. (1964). Vermehrte Glucuronidierung von Sulfadimethoxin wahrend und nach Phenobarbital behandlung bei Ratten. *Arch. Exp. Path. Pharm.* 247, 461-468.
  30. Sugano, T., Suda, K., Shimada, M., and Oshino, N. (1978). Biochemical and ultrastructural evaluation of isolated rat liver systems perfused with a hemoglobin-free medium. *J. Biochem.* 83, 995-1007.
  31. Snowell, A.M., Triamble, R.P., Fishlock, R.C., Storer, G.B., and Topping, D.L. (1982). Metabolic effects of acetate in perfused rat liver studies on ketogenesis, glucose output, lactate uptake and

- lipogenesis. *Biochem. Biophys. Acta* 716, 290-297.
32. Sakamoto, N., Hotta, N., Yoshida M., Sato, Y., Nagashima, M., Kakuta, H., Iguchi, A., and Nomura, R. (1974). Effects of starvation and liberal feeding against the action of tolbutamide and exogenous lactate on gluconeogenesis and ketogenesis in the isolated perfused rat livers. *J. Japan Diab. Soc.* 17, 126-132.
  33. Frederic, A.B., Sidney, S.C., and Robert, O.S. (1970). Effect of insulin and acute diabetes on plasma FFA and ketone bodies in the fasting rat. *J. Clin. Invest.* 49, 1685-1693.
  34. Haft, D.E., and Miller, L.L. (1958). Alloxan diabetes and demonstrated direct action of insulin on metabolism of isolated perfused rat liver. *Am. J. Physiol.* 192, 33-42.
  35. Woodside, W.F., and Heimberg, M. (1976). Effects of anti-insulin serum, insulin, and glucose on output of triglycerides and on ketogenesis by the perfused rat liver. *J. Biol. Chem.* 251, 13-23.
  36. Neufeld, H.A., Pace, J.A., and White, F.E. (1976). The effect of bacterial infections on ketone concentration in rat liver and blood and on free fatty acid concentration in rat blood. *Metabolism* 25, 877-884.
  37. McGarry, J.D., Mannarerts, G.P., and Foster, D.W. (1977). A possible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. *J. Clin. Invest.* 60, 265-270.
  38. McGarry, J.D., Leatherman, G.F., and Foster, D.W. (1978). Carnitine palmitoyltransferase. I. The site of inhibition of hepatic fatty acid oxidation by malonyl-CoA. *J. Biol. Chem.* 253, 4128-4136.
  39. Yamatani, K., Sato, N., Takahashi, K., Hara, M., and Sasaki H. (1983). A rise in cyclic AMP with a lack of glycogenolysis by secretin in the isolated perfused rat liver and its inhibition by epinephrine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115, 7432-7448.
  40. Penhos, J.C., Wu, C.H., Lemberg, A., Davnas, J., Brodoff, B., and



- Levine, R. (1966). The effect of growth hormone on the metabolism of lipids and urea formation by the perfused rat liver. *Metabolism* 15, 1109-1119.
41. Ruderman, N.D., and Goodman, M.N. (1974). Inhibition of muscle acetoacetate utilization during diabetic ketoacidosis. *Am. J. Physiol.* 226, 136-143.
42. Wool, I.G., and Krahl, M.E. (1959). Incorporation of <sup>14</sup>C-amino acids into protein of isolated diaphragms: an effect of insulin independent of glucose entry. *Am. J. Physiol.* 196, 961-964.
43. Chaudry, I.H., and Gould, M.K. (1969). Kinetics of glucose uptake in isolated soleus muscle. *Biochem. Biophys. Acta.* 177, 527-536.
44. Lehninger, A.L., Sudduth, H.C., and Wise, J.B. (1960). D- $\beta$ -hydroxybutyric dehydrogenase of mitochondria *J. Biol. Chem.* 235, 2450-2455.
45. Ruderman, N.B., Houghton, C.R.S., and Hem, R. (1971). Evaluation of the isolated perfused rat hindquarter for the study of muscle metabolism. *Biochem. J.* 124, 639-651.
46. Beatty, C.H., Marco, A., Peterson, R.D., Bocek, R.M., and West, E.S. (1960). Acetoacetic acid metabolism by skeletal muscle fibers from control and diabetic rats. *J. Biol. Chem.* 235, 2774-2777.
47. Randle, P.J., Garland, P.B., Hales, C.N., Newsholme, E.A., Denton, R.M., and Pogson, C.I. (1966). Interactions of metabolism and the physiological role of insulin. *Rec. Prog. Horm. Res.* 22, 1-44.
48. Goodman, M.N., Berger, M., and Ruderman, N.B. (1974). Glucose metabolism in rat skeletal muscle at rest. effect of starvation, diabetes, ketone bodies and free acids. *Diabetes* 23, 881-888.
49. Kuzuya, H., Blix, P.M., Horwitz, D.L., Steiner, D.F., and Rubenstein, A.H. (1977). Determination of free and total insulin and C-peptide in insulin-treated diabetes. *Diabetes* 26, 22-29.
50. Harano, Y., Kosugi, K., Hyosu, T., Suzuki, M., Hidaka, H.,

- Kashiwagi, A., Uno, S., and Shigeta, Y. (1984). Ketone bodies as markers for type I (insulin-dependent) diabetes and their value in the monitoring of diabetes control. *Diabetologia* 26, 343-348.
51. Sceen, A., Castillo, M., Jandrain, B., Krzentowski, G., Henrivaux, P., Luycky, A.S., and Lefebvre, P.J. (1984). Metabolic alternations after a two-hour noctual interruption of a continuous subcutaneous insulin infusion. *Diabetes Care* 7, 338-342.
52. Sakamoto, N., Hotta, N., Yoshida, M., Sato, Y., Nagashima, M., Kakuta, H., Iguchi, A. and Nomura, R. (1973). Studies on diabetic ketosis (2); Effect of tolbutamide in gluconeogenesis and ketosis in the isolated perfused rat liver. *J. Japan Diab. Soc.* 16, 275-280.
53. Boshell, B.R., Zahand, G.R., and Renold, A.E. (1960). An effect of tolbutamide on ketogenesis in vivo and in vitro. *Metabolism* 9, 21-29.
54. Bremer, J. (1977). Carnitine and its role in fatty acid metabolism. *Trends Biochem. Sci.* 2, 207-209.
55. Brass, E.P., and Hoppel, C.L. (1978). Carnitine metabolism in the fasting rat. *J. Biol. Chem.* 253, 2688-2693.
56. Genuth, S.M., and Hoppel, L.L. (1979). Plasma and urine carnitine in diabetic ketosis. *Diabetes* 28, 1083-1087.
57. Kaye, R. (1975). Diabetic ketoacidosis The bicarbonate controversy *J. Pediatr.* 87, 156-159.
58. Sperling, M.A. (1984). Diabetes Ketoacidosis. *Pediatrics Clinics of North America* 31, 591-610.
59. Gabow, P.A. (1980). Diagnostic importance of an increased serum anion gap. *N. Engl. J. Med.* 303, 854-858.
60. Hale, P.J., Grace, J., and Nattrass, M. (1984). Metabolic effects of bicarbonate in the treatment of diabetic ketoacidosis. *Br. Med. J.* 289, 1035-1038.

61. Gerich, J.E., Martin, M.M., and Recant, L. (1971). Clinical and metabolic characteristics of hyperosmolar nonketotic coma. *Diabetes* 20, 228-238.
62. Vinik, A., Seftel, H., and Joffe, B.I. (1970). Metabolic findings in hyperosmolar non-ketotic diabetic stupor. *Lancet* 797-798.
63. Johnson, R.D., Conn, J.W., Dykman, C.J., Pek, S., Starr, J.I., and Arbor, A. (1969). Mechanism and management of hyperosmolar coma without ketoacidosis in the diabetics. *Diabetes* 18, 111-116.
64. Berry, M.N., Williamson, D.H., and Wilson, M.B. (1965). Concentration of acetoacetate and D-(-)-3-hydroxybutyrate in rat liver and blood. *Biochem. J.* 94, 17-19.
65. Young, D.A.B., and Renald, A.E. (1966). A fluorimetric procedure for the determination of ketone bodies in very small quantities of blood. *Clin. Chim. Acta* 13, 791-793.
66. Masoro, E.J., Compton, C., Yu, B.P., and Bertrand, H. (1983). Temporal and compositional dietary restrictions modulate age-related changes in serum lipid. *J. Nutr.* 113, 880-892.
67. Marco, J., Hedo, J.A., and Villanueva, M.L. (1977). Hyperglucagonism in the elderly. *Diabetes* 26, 381.
68. Keller, U., Schnell, H., Sonnenberg, G.E., Gerber, P.P.G., and Stauffacher, W. (1983). Role of glucagon in enhancing ketone body production in ketonic diabetic man. *Diabetes* 32, 387-391.
69. Maebashi, M., Iwamura, A., and Yoshinaga, K. (1982). Effect of aging on lipid and carnitine metabolism. *Tohoku J. Exp. Med.* 138, 231-236.
70. Yamashita, K., Yamashita, S., Yasuda, H., Oka, Y., and Ogata, E. (1980). A decreased response of cyclic adenosine monophosphate concentrations to glucagon in liver slices from streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 29, 188-192.