

ハタネズミにおける実験的ケトosisに関する研究

誌名	日本獣医畜産大学研究報告 = The bulletin of the Nippon Veterinary and Zootechnical College
ISSN	03738361
著者	菅原, 盛幸 大木, 与志雄
巻/号	31号
掲載ページ	p. 9-12
発行年月	1982年12月

ハタネズミにおける実験的ケトosisに関する研究

菅原 盛幸・大木与志雄

日本獣医畜産大学 獣医生理化学教室

Experimentally Induced Ketosis in *Microtus Montebelli*

Moriyuki SUGAWARA and Yoshio OKI

Department of Physiological Chemistry,
Nippon Veterinary and Zootechnical College

牛のケトosisは臨床的に大きな問題となっているが、実験的な誘発が難しく、その機序についてもなお不明な点が多く残されている。今回我々は、小型の草食性ハタネズミ (*Microtus montebelli*) が食道のうと盲腸において、揮発性脂肪酸 (VFA) を産生利用している点^{6,8,9)}に注目し、反すう動物の疾患モデルとしての利用性を検討するために、実験的なケトosisの誘発を試みるとともに、体内代謝産物の変化について検討を行なった。

実験材料および方法

1. 供試動物

当教室で維持繁殖しているハタネズミ *Microtus montebelli* (体重 40.7 ± 11.4 g) を用いた。供試動物の標準飼料は、ヘイキューブおよび草食動物用ペレット (ZC; オリエンタル社製) を用い、自由採食・自由飲水で飼育した。飼育条件は、14時間点燈 (午前7時～午後9時)、室温 $20 \sim 27^\circ\text{C}$ とした。供試動物の屠殺は、午後6時～午後9時の間に行なった。

2. 飢餓ケトosisの誘発法

上記の標準飼料を給餌したハタネズミについて、24時間あるいは48時間絶食を行ない、飢餓ケトosisを誘発した。

3. 酪酸ケトosisの誘発法

標準飼料を給餌したハタネズミ個体に、1.5% (W/V) 酪酸ナトリウム水溶液を給水ビンに入れ、自由給水した。投与期間は一週間とし、酪酸ケトosisの誘発について検討した。

4. 血糖の測定法

ハタネズミを断頭採血し、一部をトリクロロ酢酸で除蛋白後、 -20°C で凍結保存し、血糖測定用サンプルと

した。血糖は Glucose oxidase 法¹⁾ によって測定した。

5. 血漿遊離脂肪酸 (FFA) 測定法

採血後直ちに血漿を分離し、 -20°C で凍結保存し、FFA 測定用サンプルとした。FFA は NEFA テストワコー (和光純薬工業) を使用して測定した。

6. 肝グリコーゲン測定法

肝臓は採取後直ちにドライアイス・メタノールで凍結した後、 -20°C で凍結保存し、肝グリコーゲン含量を測定した。

7. 血液および尿中ケトン体測定法

血中アセトン²⁾は、全血を蒸留水で5倍稀釈した後、25% (W/V) メタリン酸含有 5 N- H_2SO_4 で除蛋白し、氷室中に密栓をして保存した。尿中ケトン体は、氷冷試験管に採尿後、ケトスティックス (三共製薬) によってケトン体を半定量した後、密栓をして氷室に保存した。血中アセトン並びに尿中アセトンはガスクロマトグラフ (GC-6 AM, FID, shimazu) で測定した。内部標準物質はプロパノールとし、カラムは silicone-OV-17 (日本クロマト工業) を用いた。

実験結果

1. 絶食によるケトosisの誘発と体内代謝産物の変化

絶食後、18～48時間のハタネズミの新鮮尿のケトン体を、シノテストにより判定した結果を Fig. 1 に示した。対照の標準飼料給与例では、何れもほとんど陰性であり、判定 $- \sim +$ を示した。18時間絶食で、1/4の例においてケトン体が++以上を示すようになり、24時間絶食では++が54%、+++が16%とケトン体排泄が急増した。さらに48時間絶食時には、++が58%、+++が33%と、ほとんどの例においてケトン体を大量に排泄するの

が観察された。

この時の血中アセトン量, 尿中アセトン量を Table 1 に示した。血中アセトン量は正常時には 2.2 mg/dl であるが, 24 時間絶食時には約 7 倍に, 48 時間絶食時には約 10 倍にも増加した。尿中アセトン量も血中アセトン量に比例して増加し, 24 時間絶食時には約 7 倍, 48 時間絶食時には約 9 倍に増加した。尿 pH 値は, 正常時には弱アルカリ性であるが, 絶食につれて酸性となった。

絶食による血糖値, 肝グリコーゲン含量および血漿 FFA 値への影響を Table 2 に示した。血糖値は 24 時間絶食により 55 mg/dl にまで低下し, 48 時間絶食ではさらに低下した。肝グリコーゲンは, 絶食後 24 時間でほとんど消費された。血漿 FFA レベルは, 24 時間絶食後で 2 倍以上に増加し, 48 時間絶食後では 3 倍以上に増加した。

2. 脂肪酸投与によるケトosisの誘発と体内代謝産物の変化

ハタネズミに 1.5% (W/V) の濃度の酪酸ナトリウム溶液を一週間経口投与した。この間, 各個体は体重, 採食量には変化がなかった。飲水量は約 1.5~2 倍に増加

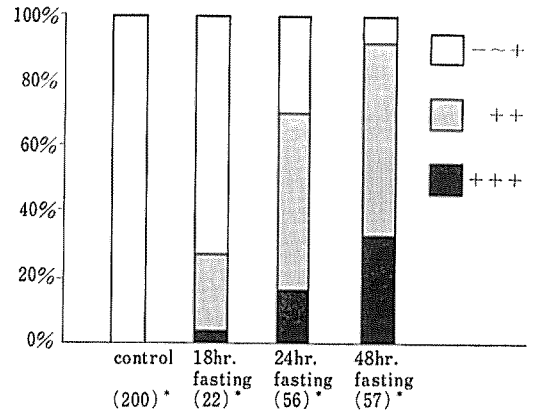


Fig. 1. Effects of fasting on keton-bodies in urine of voles.

* No. of animals in parenthesis.

した。この時の血中のアセトン量, 血糖値, 肝グリコーゲン含量および血漿 FFA 値を Table 3 に示した。血中アセトン量は, 対照群のアセトン体 2.2 mg/dl に対して, 実験群のアセトン体は 19.2 mg/dl と約 10 倍に増加が認められた。血糖値, 肝グリコーゲン含量にはほ

Table 1. Effects of fasting on acetone bodies in blood and urine of voles.

	control	24 hr. fasting	48 hr. fasting
Blood acetone mg/dl	2.2 ± 0.5# (8)	*15.0 ± 10.7 (8)	*23.7 ± 11.9 (13)
Urine acetone mg/dl	3.8 ± 1.4 (11)	*27.8 ± 12.7 (11)	*36.1 ± 20.6 (9)
Urine pH	8.0 ± 0.2 (24)	6.4 ± 0.9 (36)	5.9 ± 0.6 (38)

(Mean ± S.D.) * Significant at the one percent level.
No. of animals in parenthesis.

Table 2. Effects of fasting on blood glucose, hepatic glycogen and plasma free fatty acids in voles.

	control	24 hr. fasting	48 hr. fasting
Blood glucose mg/dl	81.0 ± 27.2# (20)	*55.2 ± 13.5 (20)	*47.2 ± 19.6 (9)
Hepatic glycogen mg/g wet weight	21.7 ± 11.4 (17)	*0.74 ± 0.38 (15)	*0.60 ± 0.35 (17)
Plasma FFA mEq/l	0.609 ± 0.189 (8)	*1.377 ± 0.103 (7)	*1.967 ± 0.304 (5)

(Mean ± S.D.) * Significant at the one percent level.
No. of animals in parenthesis.

Table 3. Effects of butyric acid on blood acetone bodies, glucose, hepatic glycogen and plasma free fatty acids in voles.

	control	butyric acid (1.5%, P.O. for 7 days)
Blood acetone mg/dl	2.2±0.5# (8)	*19.2±10.8 (25)
Blood glucose mg/dl	81.0±27.2 (20)	82.9±16.3 (25)
Hepatic glycogen mg/g wet weight	21.7±11.4 (17)	27.6±7.8 (16)
Plasma FFA mEq/l	0.609±0.189 (8)	0.976±0.285 (16)

(Mean ± S.D.) * Significant at the one percent level

No. of animals in parenthesis

Voles were given 1.5% butyrate water solution under free drinking for 7 days.

とんど変化が認められなかったが、血漿 FFA レベルは対照群のそれに対して、約 60% の増加を示した。尿中へのケトン体の排泄は著明ではなかった。

考 察

ハタネズミの尿中へのケトン体の出現例は、絶食 24 時間後で 70% 以上、絶食 48 時間後では 90% 以上に達した。この時の尿中アセトン量ならびに血中アセトン量を測定すると、いずれも正常時の 7~10 倍に増加しており、容易に飢餓性のケトーシスが誘発された。この時の血糖値は有意に減少し、絶食 48 時間後には、47 mg/dl と正常時の約半分に低下した。糖源予備量の肝グリコーゲンは、絶食 24 時間後には完全に消失した。また、このような血糖値の低下に伴ない、血漿 FFA の急激な上昇がみられ、FFA がグルコースに代ってエネルギー源として利用されていると考えられる。さらに、飢餓時にはケトン体も良いエネルギー源と成り得ることから、絶食ハタネズミにおいても、上昇したケトン体の一部はエネルギー源として利用されていると思われる。

マウスでは絶食させても死に至るまでケトン尿は認められなかった。めん羊では 20 日間に亘る絶食を行っても血中ケトン体が 2 倍程度にしか上昇せず、極めて飢餓ケトーシスを起こしにくい³⁾。このように、動物種によって飢餓ケトーシスの起きやすさが異なる。

一方、反芻家畜では、第一胃粘膜で酪酸から直接ケトン体を産生するという、栄養生理的な特性がある¹⁾。そのため、大量の酪酸を経口投与すると、第一胃粘膜および肝臓で大量のケトン体が産生され、酪酸ケトーシスを起こす²⁾。今回ハタネズミに酪酸を経口投与したところ、

血中アセトン体が対照群の約 10 倍にも急増した。この時、動物の採食量、体重には変化が無く、血糖値、肝グリコーゲン含量にもほとんど変化が認められなかった。この点が飢餓ケトーシスと異なる所見である。ハタネズミでは、消化管から吸収された酪酸が消化管粘膜でケトン体に変化するかどうかは不明であるが、経口投与した過剰の酪酸が肝臓でケトン体に代謝されて、血中のケトン体が増加したものと思われる。また、ストレプトゾシン投与による糖尿-ケトーシスの誘発も、ハタネズミではマウスよりも顕著であり^{5,7)}、血中ケトン体の上昇が起り易い動物種といえる。今回の実験でハタネズミは短期間の絶食でケトーシスを起こすばかりでなく、酪酸の経口投与により、容易にケトン体が増加することが明らかとなった。ハタネズミは反芻動物のケトーシスの実験モデルとして極めて有望であると考えられ、今後草食動物におけるケトーシスの発生機序について、本動物種を用いて詳細な解析を行いたいと考えている。

本研究は文部省科学研究費の補助を受けた。

要 約

ハタネズミにおける実験的ケトーシスの誘発を絶食と酪酸投与によって行ない、この時の体内代謝産物を調べた。絶食により、血中ケトン体および尿中ケトン体が著しく増加し、24 時間絶食で 70%、48 時間絶食で 91% がケトン尿症を呈し、典型的な飢餓性のケトーシスを示した。この時、血糖値は 47.2 mg/dl とほぼ半減し、肝グリコーゲンは完全に消失していた。血漿 FFA は絶食 24 時間で 1.377 mEq/l と倍増し、48 時間後には 1.967 mEq/l とさらに増加した。1.5% 酪酸ナトリウムを一週

間経口投与したハタネズミにおいては、血中アセトン 19.2 mg/dl と著しく増加した。この時血糖値、肝グリコーゲン含量は殆んど変化しなかった。血漿 FFA レベルは 0.976 mEq/l と若干増加した。

文 献

- 1) 安保佳一・瀬戸勝男・桜井雄一郎・梅津元昌 (1961) 反芻動物のケトーシスに関する研究。II. ケトン体の産生部位について, **23**, 265~273.
- 2) BLAXTER, K. L., LEWIS, D. (1961) Digestive Physiol. and Nutr. of Rumin., 183~197.
- 3) HIDARI, H., SANO, Y., and AMBO, K. (1968) Studies on volatile fatty acid oxidation and incorporation into the lipid of liver slices from alloxan diabetic and starved sheep. Tohoku J. Agric. Res. **19**, 106~115.
- 4) HUGGETT, A. G. and NIXON D. A. (1957) Enzymic Determination of Blood Glucose. Biochem. J. **66**, 12 p.
- 5) 工藤 博 (1980) 草食性ハタネズミにおける発酵生産物の産生, 利用および実験的糖尿病ケトン尿症に関する研究・栄養生理研究会報, **24**(1), 17~34.
- 6) KUDO, H. and OKI, Y. (1981) Fermentation and V. F. A. Production in the esophageal sac of *Microtus montebelli* fed on different rations. Jpn. J. Vet. Sci., **43**, 299~305.
- 7) 工藤 博, 大木与志雄 (1980) 実験動物としてのハタネズミ IV 各種薬剤 (アロキサン, ストレプトゾトン, フロリジン) 投与による実験的糖

尿病の誘発. 日獣畜大研究報告, **30**, 61~64.

- 8) 小原嘉昭・後藤信男 (1980) ハタネズミ Japanese Field vole (*Microtus montebelli*) 消化管における揮発性脂肪酸産生と消化管および肝組織におけるその消費. 日畜会報, **51**, 393~396.
- 9) 菅原盛幸・大木与志雄 (1982) ハタネズミの消化管内発酵生産物と体内代謝産物におよぼす飼料給与と絶食の影響. 日畜会報, **53**, 400~405.

SUMMARY

The voles, *Microtus montebelli*, were induced ketosis experimentally by fasting or administration of butyrate. Effects of fasting and administration of butyrate on the metabolites in blood were studied in the voles. The results obtained are summarized as follows.

(1) The concentration of keton-bodies in blood and urine rapidly increased after fasting. 70% of the animals after 24hr-fasting, and 91% of the animals after 48hr-fasting showed apparently ketosis followed by acidosis. After fasting, blood glucose concentrations decreased to 47.2 mg/dl and hepatic glycogen was almost all consumed. The plasma free fatty acid level increased to 1.377 mEq/l after 24hr-fasting and to 1.967 mEq/l after 48 hr-fasting.

(2) The concentration of acetone bodies in blood increased remarkably to 19.2 mg/dl after P. O. administration of 1.5% sodium butyrate for 7 days. The concentration of blood glucose and hepatic glycogen were not affected by the administration of the drug. The plasma free fatty acid level increased to 0.976 mEq/l after the treatment.