

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

河越尚幸より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 555 号

学位申請者 : かわ 河 ごえ 越 なお 尚 ゆき 幸

学位審査論文 : Investigation of metabolism of exogenous glucose at the early stage and onset of diabetes mellitus in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats using [1, 2, 3-¹³C]glucose breath tests

([1, 2, 3-¹³C]グルコース呼気試験を用いた OLETF ラットにおける糖尿病発症前段階および糖尿病早期での外因性糖代謝の研究)

著 者 : Naoyuki Kawagoe, Osamu Kano, Sho Kijima, Hideki Tanaka, Masaaki Takayanagi, Yoshihisa Urita

公 表 誌 : PLoS One 11 (8) : e0160177, 2016

論文内容の要旨 :

(背景)

糖代謝を評価するにはグルコースクランプ法がゴールドスタンダードであるが、前糖尿病段階の患者は米国だけでも 3,000 万人以上いるため全員に施行するのは難しい。

また、糖尿病は早期の兆候がない段階から治療が必要な段階まで広く存在する。そのため、非侵襲的で早期の変化がとらえられる検査が望まれる。今回我々は ¹³C-グルコースをラットに経口投与し、呼気試験を用いてその糖代謝の変化を評価した。¹³C-グルコースをラットに経口投与すると、胃から小腸へ排出し、小腸で吸収され、血流より肝臓に取り込まれる。そして、呼気試験で得られた ¹³CO₂ 排出曲線は糖代謝を反映する。本研究では糖代謝のどこに異常があるのか、同一個体を使用し、経時的変化を検討した。

(方法)

対象は OLETF ラット 8 匹とコントロールラットである、Long-Evans Tokushima Otsuka (以下、LETO) ラット 8 匹を使用した。これらは 1984 年に徳島で開発され、2 型糖尿病モデルとして使われている。遅発性に 18 週頃より高血糖が出現し、25 週齢でほ

ほぼ100%が糖尿病を発症、65週頃インスリン欠乏状態となる。

餌はフリーアクセスとした。気温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度は $55 \pm 5\%$ の飼育室で個々にケージへ入れ飼育した。明暗サイクルは12時間ごとである。

離乳直後4週齢からラットを飼育しハンドリング後、5週齢より経時的に、 $[1-^{13}\text{C}]$ glucose、 $[2-^{13}\text{C}]$ glucose、 $[3-^{13}\text{C}]$ glucose 3種の呼気試験を順番で試行した。

ラットは24時間絶食後に呼気試験を施行し、呼気1.3Lを採取した。

その後、 ^{13}C -glucose 100 mg/kg を溶液としてゾンデを用いて、ラットの胃内に投与し、10分間隔で180分まで、90秒間に呼気150ml採取を繰り返した。

そして、呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ を赤外線分光法により測定し、呼気排出曲線を作成した。

統計学的有意性は P 値が0.05未満とした。

(結果)

5週から25週までを5週から13週の前半、14週から19週の中盤、20週から25週の後半、これら3群に分けて比較検討した。 $[1-^{13}\text{C}]$ glucose 呼気試験の結果は AUC_{180} は前半、中盤、後半ともOLETFラット、LETOラットの2群間で有意差を認めなかった。 $[2-^{13}\text{C}]$ -glucose 呼気試験の結果は、 AUC_{180} を比較したところ、最も前半の週数のOLETFラットで、有意に低値($P < 0.01$)であった。 $[3-^{13}\text{C}]$ -glucose 呼気試験の結果は、 AUC_{180} を比較したところ、22-25週でOLETFラットの方が有意に高値($P < 0.01$)であった。 T_{max} は全期間を通してOLETFラットで有意に低値であった。

(考察)

糖代謝は腸管より吸収され、肝細胞への糖の取り込み、ミトコンドリアでのTCA回路を用いた好氣的解糖を行いATP合成される経路と、糖を肝細胞で取り込み、嫌氣的解糖を経てATP合成される経路とがある。また、糖は糖新生やその他の側副路へと回ることもある。

一生涯を通して、糖尿病発症前より同一ラットで経時的に2型糖尿病の病態を、呼気試験を用いて検討した報告はまだない。そこで、今回我々は、糖尿病発症までの前糖尿病状態の糖代謝について、ラットを呼気試験の手法を用いて検討した。

$[1-^{13}\text{C}]$ glucose はグルコースの酸化およびグルコースのuptakeを反映するが、 $[1-^{13}\text{C}]$ glucose 呼気試験の結果より AUC_{180} は有意差を認めない。 T_{max} は全期間を通してOLETFラットにおいて遅れている。これより、糖代謝障害は早期より糖取り込みの障害をきたしていることが示唆される。

経時的变化では、 $[2-^{13}\text{C}]$ glucoseを投与することにより6-12週でOLETFラットに有意なAUC低下、 $[3-^{13}\text{C}]$ glucoseを投与することにより22-25週でOLETFラットに有意なAUCの増加がある。この結果から、 $[2-^{13}\text{C}]$ glucoseは速い酸化を、 $[3-^{13}\text{C}]$ glucoseはTCA回路へ入る前までの酸化を反映するが、肥満などをきたした段階では糖酸化は抑制され、その後血糖値を正常に保つため年齢が進むにつれて亢進していくことが示唆された。

$[3-^{13}\text{C}]$ -glucose 呼気試験の結果より糖尿病発症直前の段階(22-25週)では、 AUC_{180} はOLETFラットで上昇していて、血糖上昇による対応として解糖系を亢進していることが示唆された。

$[2-^{13}\text{C}]$ glucoseではOLETFラットで6-12週のAUCに低値を認めたことから、TCA回路の糖酸化に障害をきたしていると思われる。これは肥満などによりすでに前糖尿病初期段階より、糖酸化が障害されることに由来すると思われる。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 555 号	氏名	河越尚幸
学位審査担当者	主査	弘世貴久
	副査	龍野一郎
	副査	武城英明
	副査	杉山篤
	副査	東丸貴信

学位審査論文の審査結果の要旨：

学位審査会は平成 28 年 12 月 28 日午後 3 時より 4 時まで、医学部第 2 セミナー室にて、5 名の審査員の出席の下（書面による事前審査員含む）に開催された。

研究概要：世界の糖尿病人口は増加の一途をたどっており、これを食い止めるには早期の発見、早期の治療が極めて重要である。申請者は現在可能な糖尿病の診断方法であるブドウ糖負荷試験よりより早くより侵襲の少ない方法で糖尿病、あるいはその前段階を診断する方法の確立を目指して糖尿病モデルラットを用いた以下の研究を行った。実験はブドウ糖の 6 つの炭素別に安定同位体炭素をラベルした ^{13}C -グルコースをラットに経口投与し、呼気試験を用いてその糖代謝の変化を評価した。対象は 2 型糖尿病モデルである OLETF ラットとコントロールラット。OLETF ラットは遅発性に 18 週頃より高血糖が出現し、25 週齢でほぼ 100% が糖尿病を発症、65 週頃インスリン欠乏状態となる。 $[1-^{13}\text{C}]$ glucose、 $[2-^{13}\text{C}]$ glucose、 $[3-^{13}\text{C}]$ glucose 3 種の呼気試験を順番で 180 分ずつ試行し、呼気排出曲線を作成した。5 週から耐糖能異常を呈する 25 週までを 5 週から 13 週（耐糖能正常期）、14 週から 19 週（耐糖能前異常期）、20 週から 25 週（耐糖能異常期）の 3 群に分けて比較検討した。

$[1-^{13}\text{C}]$ glucose 呼気試験の結果 AUC_{180} は 3 期とも OLETF ラット、コントロールラットの 2 群間で有意差を認めなかった。 $[2-^{13}\text{C}]$ -glucose 呼気試験の結果は、 AUC_{180} を比較したところ、耐糖能正常期の OLETF ラットで、有意に低値 ($P < 0.01$) であった。 $[3-^{13}\text{C}]$ -glucose 呼気試験の結果は、 AUC_{180} を比較したところ、耐糖能異常期で OLETF ラットの方が有意に高値 ($P < 0.01$) であった。この結果より OLETF ラットでは耐糖能発症前の早期において TCA 回路の糖酸化過程に障害があることが推察された。

学位審査会では申請者より簡潔、明瞭に論文データの紹介と考察が行われた。その後、審査員より質疑応答がなされた。主な質問としては本実験系の実際的方法論について数々の質問がなされたが、すべての確に解答し、本申請者が真に本研究に中心的に関わったことが明らかとなった。さらに申請者が発表し、検討した 3 つの耐糖能の時期がヒトの糖尿病の進行、あるいはインスリン抵抗性の発症とどのような関係にあるのかといった質問にも自身の考え方を説明できた。最後にこれらの結果をどのように臨床へ translation するかとの質問に対しても具体的な方法論にまで言及できるレベルまで想定していることがわかる解答をすることができた。以上より本論文は糖尿病の早期発見につながりうる優れた臨床応用可能な研究であり、審査員全員一致で学位授与に相当すると判断し、学位審査会を終了した。