

《原 著》

アロキサン処理ラットにおけるラジオレスピロメトリック
パターンの解析

小島 周二* 浜 幸江* 広川 幸雄** 醍醐 公彦**
志気 保子** 久保寺昭子**

要旨 アロキサン処理したラットの $[U-^{14}C]$ glucose を基質としたラジオレスピロメトリックパターンを肝糖代謝酵素活性変化と関連付け検討し、以下の結果を得た。

- 1) 初期高血糖期におけるラジオレスピロメトリックパラメーターの変化は、肝解糖系酵素活性変化と良い相関が認められた。peak time (PT) は、アロキサン投与後 10~20 分では早まる傾向にあるが、その後 24 時間まではやや遅れた。peak height (PH), yield value (YV) は共に投与後 30~40 分でコントロール値の 1/2 に低下するが、24 時間後には回復した。一方肝解糖系酵素、特に hexokinase (HK) は 30~40 分後にコントロール値の約 50% まで抑制された。
- 2) 初期高血糖期における血糖値の上昇は、肝 HK の不活性化によることが示唆された。
- 3) ラジオレスピロメトリーが、傷害肝における糖代謝を検索する有益な手段となり得ることがより明らかとなった。

I. 緒 言

ラジオレスピロメトリー (以下 RRM)¹⁻⁶⁾ は、適切な生体内燃焼基質を選択することにより、様々な生化学的、生理的情報を得る一手段として有効である。先に CCl_4 や 3'-Me-DAB 等の肝に傷害を与える物質を投与したラットについて、 $[U-^{14}C]$ glucose の生体内燃焼パターンを RRM 法を用いて検索した結果、肝における解糖系酵素活性と RRM 法による解析パターンとの間に密接な関係があることを報告した⁷⁻¹⁰⁾。本実験では、アロキサン投与ラットの血糖値の変動と RRM パターンの解析および解糖系酵素活性の関連について、in vivo, in vitro の実験を試み、アロキサン投与初期に認められる初期高血糖期の $[U-^{14}C]$ glucose

燃焼呼気パターンと肝解糖系酵素活性の間に一応の見解を得たので報告する。

II. 実験材料および方法

1) 実験動物 Donryu 系雄ラット (日本ラットおよび三協ラボ) 体重約 200 g をあらかじめ 1 週間固型飼料 (CE-2, 日本クレア) と水を自由に与えて予備飼育したのち、体重増加の順調なものを選び実験に供した。

2) アロキサンの投与 アロキサン (和光純薬工業) 100 mg を生理食塩水 1 ml に溶解し注射液とし、100 mg/kg 体重を皮下投与した。

3) 血糖の測定 オルトトルイジン・ホウ酸法 (O-TB 法)¹¹⁾ により測定した。あらかじめ本法による測定値に及ぼす血清保存部、反応温度、呈色時放置時間および食餌の影響を検討し、以下の条件で測定を行なった。すなわち、ネブター麻酔下のラットの頸動脈切断により採血し室温で 10~15 分放置後、遠心分離 (3,200 rpm) して血清を得る。その 0.05 ml (4°C 以下保存、採血時から 5 時間以内に使用) にオルトトルイジン・ホ

* 帝京大学薬学部放射薬品学教室

** 東京理科大学薬学部放射薬品学教室

受付: 55 年 2 月 25 日

最終稿受付: 55 年 4 月 3 日

別刷請求先: 神奈川県津久井郡相模湖町寸沢嵐 1091-1

(☎199-01) 帝京大学薬学部放射薬品学教室

小島 周二

ウ酸呈色試液 5 ml を加え、80°C で 10 分間加温後、直ちに流水で 5 分間冷却し、さらに 5 分間放置後精製水を対照に 640 nm における吸光度を測定し、検量線より血糖値を求めた。なお、測定値の再現性は 99% 以上であった。

4) ラジオレスピロメトリー 既報^{7,8)} の装置を用い、D-[U-¹⁴C]-glucose (比放射能: 1.72 mCi/mg, 投与量: 2.5 μ Ci/0.25 ml) を燃焼基質として RRM を行ない、呼気 ¹⁴CO₂ の微分曲線を得た。解析は従来どおり行なった。すなわち、peak height (PH), peak time (PT), yield value (YV: 2 時間呼気 ¹⁴CO₂ 量/投与量) の 3 つのパラメータを用いた。

5) 酵素活性の測定 1 群 5 匹のラットを用いアロキサン投与後一定時刻にそれぞれのラットを撲殺し、冷生理食塩水で灌流した肝の一部を 0.25% sucrose でホモジナイズし 10% ホモジネートを作製後直ちに冷却遠心分離 (30,000 g, 1 時間) して得た上清を酵素活性測定検体とした。測定した酵素および反応系 1 ml 中の組成は以下に示すとおりである。結果は基質を除いた各反応系で 37°C, 2 分間プレインキューベート後、基質を加えて 340 nm における吸光度の増減から酵素単位を求めた。比活性は肝 1 g 当たりの酵素単位量とした。

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH):
Glycylglycine Buffer (pH 7.6) 22.5 μ mole, MgCl₂ 4 μ mole, NADP 0.11 μ mole, Glucose-6-phosphate 1.4 μ mole

Hexokinase (HK): Triethanolamine Buffer (pH 7.6) 80 μ mole, Glucose 220 μ mole, MgCl₂ 6 μ mole, ATP 2.4 μ mole, NADP 0.11 μ mole, G-6-PDH 0.28 U

Pyruvate kinase (PK): Triethanolamine Buffer (pH 7.6) 90 μ mole, Phosphoenol pyruvate 0.525 μ mole, ADP 4.7 μ mole, KCl 10.0 μ mole, MgSO₄ 0.025 μ mole, NADH 0.12 μ mole, Lactate dehydrogenase 4.5 U

6-Phosphogluconate dehydrogenase (6-PDH): Triethanolamine Buffer (pH 7.6) 80 μ mole, MgCl₂

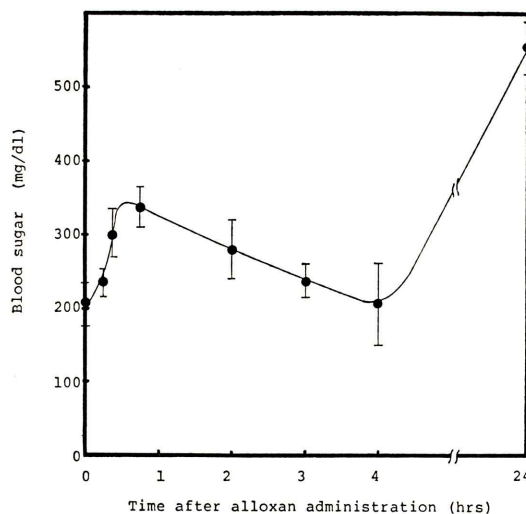


Fig. 1 Blood sugar levels of the alloxan treated rats. 100 mg of the alloxan per Kg body weight was injected subcutaneously into the rats. Vertical lines indicate standard deviation (n=5).

5 μ mole, NADP 0.11 μ mole, 6-phosphogluconate 5.3 μ mole

6) アロキサンの各酵素に対する効果 (in vitro test) 基質を除いた酵素反応系内にアロキサン溶液を加え、37°C, 2 分間反応させた後、基質を加えて、340 nm における吸光度の増減より酵素活性を求めた。

III. 結 果

1. 血糖値

アロキサン投与24時間後の血糖値の変動を Fig. 1 に示した。100 mg/kg 体重のアロキサン投与後 30~40 分で、1.7 倍の血糖値となり (初期高血糖期) その後、徐々に正常値にもどるが (4~8 hr), 投与後 8 時間を過ぎるころから再び上昇し、24 時間後には正常値の 2.7 倍の血糖値を示した (持続性高血糖期)。

2. ラジオレスピロメトリー

アロキサン投与後24時間までの RRM パラメーターの変化を Fig. 2 に示した。Fig. 2 より明らかなように、投与後 10~20 分では PT の早まりがわずかにみられるが、その後 PT は遅れる傾向に

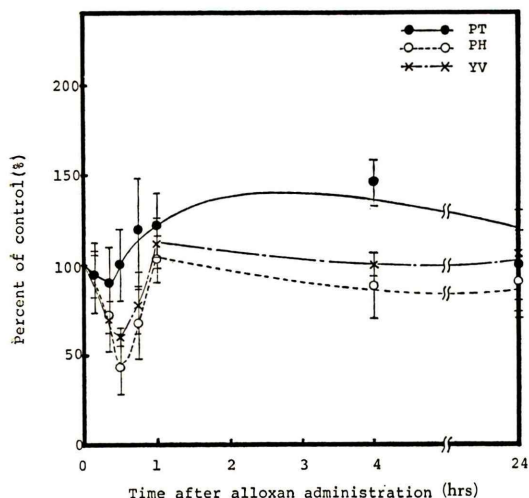


Fig. 2 Peak time (PT), peak height (PH) and yield value (YV) after a treatment of alloxan. Rats were injected alloxan subcutaneously at a dose of 100 mg per Kg body weight and prepared for radiorespirometry. [U-¹⁴C] glucose was used as a substrate in a dose of 2.5 μCi. Results were calculated as percent of control. The control was arbitrarily taken as 100%. Vertical lines indicate the standard deviation (n=5).

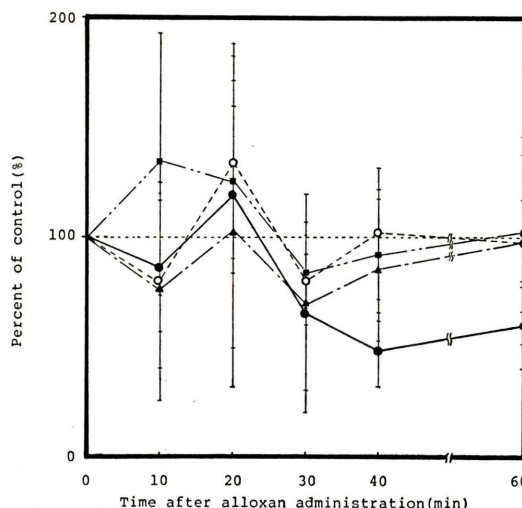


Fig. 3 Levels of the liver enzyme activities in alloxan treated rats. Results were calculated as percent of control. The control arbitrarily taken as 100%. Vertical lines indicate the standard deviation (n=5).
○····○ = G-6-PDH; ●—● = HK;
▲---▲ = PK, ■---■ = 6-PDH.

Table 1 Enzyme activities in the rat liver at 24 hrs after a treatment of alloxan (dose: 100 mg/kg)

| | Control | Alloxan |
|---------|------------|-----------|
| PK | 0.57±0.01* | 0.54±0.17 |
| HK | 1.11±0.19 | 1.13±0.10 |
| 6-PDH | 0.31±0.04 | 0.27±0.02 |
| G-6-PDH | 0.26±0.04 | 0.21±0.02 |

* Units/g liver. A unit of enzyme activity is defined as utilization of 1 μmole of substrate per minute at 37°. Each value is the mean ± standard deviation of 5 independent determinations.

[IU], PK: 1.07±0.069 [IU], G-6-PDH: 5.12±0.721 [IU], 6-PDH: 1.14±0.104 [IU] ただし数値は mean±standard deviation (n=5) を示す。

4. アロキサンの各酵素に対する効果 (in vitro test)

In vitro で, HK はアロキサンにより活性が抑制されることを Fig. 4 に示した. 6-PDH は, アロキサン濃度を 10³ 倍にすると活性抑制 (50% 抑制) が認められるが, PK, G-6-PDH はアロキサン濃度を上げてても顕著な抑制が観られなかった。

あった. また PH, YV はともに 30~40 分後で正常値の約 50% 前後に低下するが, 1 時間後にはほぼ正常値にもどった. なお, PT, PH, YV の正常値はそれぞれ 30.3±1.7 (min), 1,376±68 (cpm), 55.2±2.0 (%) であった.

3. 解糖系酵素活性変動

Fig. 3 にアロキサン投与後の G-6-PDH, HK, PK, 6-PDH 活性の経時変化を control 活性に対する%で示した. 10~20分では, バラツキが大きくはっきりした差があるとはいえないが, 五炭糖リン酸側路の酵素である G-6-PDH, 6-PDH 活性がわずかに上昇している傾向がみられる. しかし, 投与後30~40分経過すると, HK は明らかに活性低下し, 他の酵素もわずかに活性低下を示した. この活性低下も, 24時間後には, ほぼ正常値に回復した (Table 1). なお, 各酵素のアロキサン投与後40分における control 肝 1 g 当たりの酵素単位数は次に示すとおりである. HK : 2.52±0.680

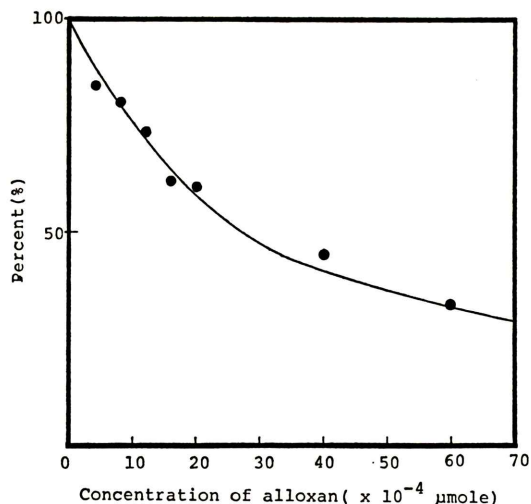


Fig. 4 The effect of alloxan on rat liver HK activity *in vitro*.

The values are expressed as percentage of the control value. Concentrations are expressed as $\mu\text{mole}/\text{reaction mixture}$.

HK は他の解糖系酵素より低濃度のアロキサンによって強く抑制された。

IV. 考 案

著者らはこれまで種々の肝臓毒を用いたラットに実験的肝傷害を作成し、これら傷害時、あるいは回復過程での標識グルコースを基質とした RRM パターンを糖代謝酵素活性変化と関連付け報告してきた⁷⁻¹⁰⁾。この種の報告はまれで、DaCosta¹²⁾らにより小児性肝疾患を RRM 法で診断した報告がわずかにあるのみである。本実験においてはアロキサン投与による初期高血糖期および持続性高血糖初期について $[U-^{14}\text{C}]$ glucose を基質とした RRM 法による $^{14}\text{CO}_2$ の呼気排泄パターンを糖代謝酵素活性と関連づけ検討した。

血糖値はアロキサン投与後直ちに上昇し始め 30~40分後に最高値を示した。その後、血糖値は減少し、4時間後にはほぼコントロール値を示した。投与後24時間後には 550 mg/dl の値を示し、持続性高血糖期に移行したと思われる。これまでアロキサンの作用機序は必ずしも明確でないが、

初期高血糖は副交感神経を介したブドウ糖の動員により起こり、その後ランゲルハンス島 β 細胞破壊がすすみ、インスリン欠乏により持続性糖尿病が発症すると考えられている¹³⁾。初期高血糖は本実験結果 Fig. 3, 4 に示すようにアロキサン自体がきわめて低濃度で肝 HK 活性を著しく抑制すること、またアロキサン投与後の肝アロキサン濃度が45分で最高値を示すという報告¹⁴⁾から、アロキサンの肝 HK 活性阻害に基づくことも十分考えられる。Houssay ら¹⁵⁾の肝剔出によって初期高血糖が防がれた実験結果からも著者らの推論が裏付けられる。一方アロキサン投与後の RRM パターンの変化を経時的に観察すると、初期高血糖期に著しい変化がみられ、持続性高血糖初期(24時間後)にはその変化は認められない。すなわちアロキサン投与後ただちに PH, YV 共に減少し、30分前後で最低値を示し、24時間後にはほぼコントロール値を示した。この間 PT は20分まで早まる傾向を示すが、その後やや遅れ、24時間後にはやはりほぼコントロール値を示した。これら初期高血糖期における著しい変化は、肝 HK 活性と良い相関が認められ、アロキサンの肝への直接作用が $[U-^{14}\text{C}]$ -glucose 基質とした $^{14}\text{CO}_2$ 呼気排泄パターンに反映されたものと考えられる。

以上、今回は肝 HK 活性の抑制と RRM パターン変化をアロキサン投与後の初期高血糖期をモデルに示した。これまで、種々の肝傷害時における糖代謝酵素活性と RRM パターンの変化を検索し、これらの糖代謝に関するおのおのの律速酵素活性がそれぞれの肝傷害により異なり、それぞれ異なった RRM パラメーターを得ることができた。今後さらに、種々の肝疾患における酵素活性と RRM パターンを得ることにより、RRM が肝の生理的あるいは生化学的变化を知る有効な手段となるとと思われる。

V. 結 論

1) アロキサン投与後における初期高血糖期を RRM 法を用い、肝糖代謝酵素と関連付け解析した。

2) 初期高血糖期に見られた RRM パラメータの変動は、肝糖代謝酵素活性変化によく反映していた。

3) これまで著者らが報告してきた種々の肝傷害時における結果とから、RRM 法が肝の生理的、生化学的変化をよく反映し、肝疾患の診断に有効な手段となることが示唆された。

文 献

- 1) Tolbert BM, Hughes AM, Kirk MR, et al: Effect of CoA on the metabolic oxidation of labeled fatty acid; Rate studies, Instrumentation and liver fractionation. University of California Radiation Laboratory Report UCRL-2849, April 1955
- 2) Tolbert BM, Kirk MR, Baker EM: Continuous $^{14}\text{CO}_2$ and CO_2 excretion studies in experimental animals. University of California Radiation Laboratory Report UCRL-2941, June 1955
- 3) Tolbert BM, Kirk MR, Baker EM: Continuous $^{14}\text{CO}_2$ and CO_2 excretion studies in experimental animals. Federation Proc **14**: 152, 1955
- 4) Wang CH: Radiorespirometry. Method of Biochemical analysis **15**: 311-368, 1971
- 5) Mathuoka O, Muramathu E: Continuous measurement of respiratory $^{14}\text{CO}_2$ and CO_2 pattern in mice. Radioisot **15**: 346-353, 1966
- 6) Shigemathu A: 液体シンチレーション計数技術(VI) 生体学研究における利用. Radioisto **24**(6): 67-77, 1975
- 7) 小島周二, 志気保子, 久保寺昭子: 四塩化炭素肝障害ラットにおけるラジオレスピロメトリック・パターンの解析. 核医学 **16**(2): 141-146, 1979
- 8) Kojima S, Shiki Y, Kubodera A: Radiorespirometric Analysis of glucose metabolism during the feeding with 3'-methyl-4-(dimethylamino)azobenzene in rats. Radioisot **28**(2): 78-83, 1979
- 9) Kojima S, Ishi N, Kubodera A, et al: Radiorespirometric analysis of glucose metabolism in the rat during feeding with 3'-methyl-4-(dimethylamino)azobenzene; Radiorespirometry using [^{14}C]glucose. Radioisot **28**(8): 489-493, 1979
- 10) Kojima S, Yamamoto M, Odate M, et al: Radiorespirometric analysis of glucose metabolism in the rat during feeding with 3'-methyl-4-(dimethylamino)azobenzene; Radiorespirometry after partial hepatectomy. Radioisot **28**(9): 546-550, 1979
- 11) 柴田 進, 佐々木匡秀: 日常臨床化学超微量定量法. 金芳堂, 1966, p. 160-167
- 12) DaCosta H, Shreeve WW, and Merchant S: Radiorespirometric study of carbohydrate metabolism in childhood liver disease. J Nucl Med **17**: 218-219, 1975
- 13) 島藺順雄: Alloxan 糖尿病症について. 日新医学 **36**: 281-287, 1949
- 14) Ralph GJ, Theodore W: Distribution of ^{14}C -labeled alloxan in the tissues of the rat and its mode of elimination. Proc Soc Exptl Biol Med **81**: 220-229, 1952
- 15) Houssay B, Orias O, Sara JG: The mechanism of action of alloxan on blood sugar. Science **102**, 209-210, 1945

Summary

Analysis of Radiorespirometric Pattern in the Rat Treated with Alloxan

Shuji KOJIMA*, Yukie HAMA*, Yukio HIROKAWA**, Kimihiko DAIGO**,
Yasuko SHIKI** and Akiko KUBODERA**

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University

**Faculty of Pharmaceutical Sciences, Science University of Tokyo

Radiorespirometric pattern using [U-¹⁴C]glucose as a substrate was analyzed in the rat treated with alloxan in connection with the liver glycolytic enzyme activities. The results were as follows:

(1) The radiorespirometric parameters at an early stage of hyperglycemia altered in connection with those of the liver enzyme activities. Peak time (PT) tended to hasten at 10–20 minutes after the treatment of alloxan, but thereafter delayed up to 24 hours. Both peak height (PH) and yield value (YV) decreased immediately after the treatment to half as much as those of control at 30–40 minutes. At 24 hours after, they recovered to the

control levels. On the other hand, the liver glycolytic enzyme, hexokinase (HK) activity in particular was inhibited to about 50% of the control at 30–40 minutes.

(2) The increase of blood sugar level at an early stage was probably due to the inactivation of liver HK by alloxan itself.

(3) The method of radiorespirometry is a useful technique for study of glucose metabolism in liver injury.

Key words: Radiorespirometry, Alloxan, Hexokinase