

平成 26 年 4 月 24 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591500

研究課題名(和文) 脱髄疾患に対するケトン食療法の新たな応用 ケトン体の神経保護作用機序の解明

研究課題名(英文) Protective effects of Ketone-bodies against demyelinating disease

研究代表者

鈴木 由香 (Suzuki, Yuka)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座准教授

研究者番号：00304634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：ケトン体の脱髄進行抑制に体する影響を、experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) マウスモデルにおいて検討した。より生理的な合理的ケトン体の投与方法を開発するためケトンエステル(the ketone ester synthesized, R,S-1,3-butanediol acetoacetate diester BD-AcAc2)を合成し、経口摂取を試みた。血中濃度の上昇は確認されたが、アシドーシスによる死亡数が多く、安定した結果を得る事ができなかった。

研究成果の概要(英文)：We have analyzed ketone-bodies effect on experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mouse model. To design most physiological and stable administration method, we experimented several methods. We synthesized the ketone ester, R, S-1, 3-butanediol acetoacetate diester (BD-AcAc2). BD-AcAc2 was administered orally and blood Acetone and beta-hydroxybutylate level were increased. Extreme acidosis caused high mortality rate and we were unable to get stable results.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：ケトン体エステル 脱髄疾患 ケトン食療法 EAEマウスモデル

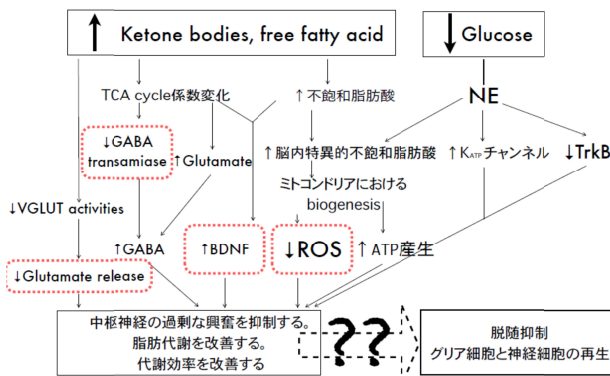
## 1. 研究開始当初の背景

中枢神経系細胞において消費されるエネルギーの大部分は脂質代謝によって供給されており、脂質代謝のコントロールは中枢神経疾患の治療戦略として注目されている。ケトン食療は過去 90 年間にわたり難治てんかんの治療法として用いられてきたが、近年アルツハイマー病の治療、脳酵素急性期の治療として注目されている。ケトン体は、グリア細胞初代培養系において脂質代謝を改善し、免疫抑制作用を有することが示唆されている。ケトン体の免疫抑制作用が脱髄疾患の進行予防に有効である可能性を検討する。

## 2. 研究の目的

多発性硬化症の疾患モデルとして汎用されている実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) マウスモデルを用いて、ケトン体投与が EAE マウスモデルの、臨床症状の軽快や改善を呈する過程と機序について検討する。脊髄における免疫組織学的に脱髄抑制効果や神経再生効果についての検討を加える。また brain slice を用いて大脳皮質での作用を個別に検討する。

ケトン食療法の効果(仮説)



## 3. 研究の方法

投与薬剤として、経口摂取が可能であり acetone、beta-hydroxybutylate の速やかな血中濃度の上昇が示されている BD-AcAc2 を用いた。BD-AcAc2 は R,S-1,3-butanediol と t-butylacetoacetate を用いて transesterification を行い精製し、不純物混入が最小抑えられていることを確認した。

BD-AcAc2 の安全な投与経路、投与量設定のため、腹腔内投与、静脈等よ、経口投与 (1 日一回投与、継続的な内服) をそれぞれ検討した。検討にはモデルマウスの発育、投与後の血中濃度を用いた。EAE モデルにおいても BD-AcAc2 投与後の血中ケトン体濃度測定を行った。(SRL 測定)

7~9 週齢の C57BL/6J マウスを以下の 3 群に分け、ケトン体エステル (BD-AcAc2) の EAE マウスモデルにおける脱髄抑制効果を確認する。

i) EAE マウスモデル群: 6 週齢時に MOG33-55 (300ng) の皮下注射と結核菌 (200ng) の皮下注射を行う。48 時間後にも同量の結核菌の皮下注射を行う。

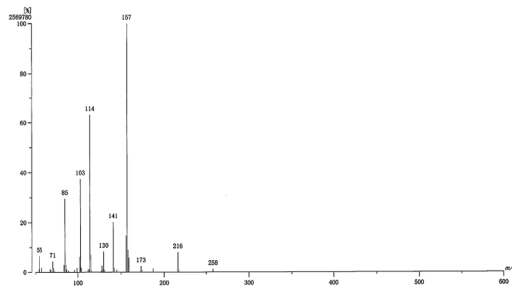
ii) EAE マウスモデル+ケトン体投与群: EAE ラットモデル群同様に 6 週齢で i) と同様の処置を行い EAE モデルを作成する。免疫後 4 日目より BD-AcAc2 10g/kg を 3ml H<sub>2</sub>O に溶解し経口投与を開始する。

iii) コントロール群: i), ii) 群と同様 6 週齢より飼育し、ii) 群と同時に BD-AcAc2 10g/kg を 3ml H<sub>2</sub>O に溶解し経口投与を開始する。

## 4. 研究成果

BD-AcAc2 は液体クロマトグラフィーを用

いて不純物の混入が最小限に押さえられており、98.5%の純度であることが示された。



BD-AcAc2 の効果的な投与方法を決定するため、腹腔内投与、静脈投与、経口投与（1日一回内服、継続的な内服）の投与方法について検討した。その結果、BD-AcAc2 は腹腔内投与、静脈投与において、急激なアシドーシスを呈するた0.5g/kgしか一回に投与することが可能にならなかった。同量では血中ケトン体値は規定値より上昇せず、また上昇後も速やかな代謝によりケトン体値が低下した。

一回内服量 10g/kg を 3ml/H<sub>2</sub>O に溶解し、内服を試みたが、全てのマウスが投与中または投与後 30 分以内に死亡した。BD-AcAc2 投与量を調節し、5g/kg を 1.5ml/H<sub>2</sub>O に溶解することで直後の死亡率は著減した。しかし、投与中に少量でも嘔吐症状が誘発されると、嘔吐後数分で死亡することを繰り返した。

1日投与量 BD-AcAc2 10g/kgBW、8g/kgBW、5g/kgBW を 6ml/H<sub>2</sub>O に溶解し 24 時間攪拌し給水瓶で飲水させた。10g/kgBW の BD-AcAc2 は 100% のモデルマウスで飲水量が低下し、4g/wk の体重減少を認めた。8g/kg では、70% のモデルマウスで同様の体重減少を認め、いずれも飲水しないことが明らかになった。5g/kgBW では、体重増加を 45% のマウスで体重増加を認めた。投与後 6 日目の平均血中総

ケトン体 169nmol/dl(161-430)、acetate 15nmol/dl(17-29)、beta-hydroxybutylate 154nmol/dl(141-441)であり軽度上昇を認めた。BD-AcAc2 5g/kgBW を 1ml/H<sub>2</sub>O に溶解し、一回で内服させたところ、投与後 1 時間後から 5 時間までは血中ケトン値が安定して上昇していた。

我々の用いた MOG による免疫方法において、80% のマウスに脱随症状の発症を確認した。免疫施行後（2 回目の結核菌投与後）平均 7 日目（6~12 日）で下肢脱力症状が出現し、以後 14 日間に渡って、神経症状が変動することを確認し、従来報告同様、寛解と再発を繰り返すモデルであることが示された。

i) 群では 80% の EAE マウスで尾の完全脱力から前肢脱力までの症状を呈した。症状は軽快することはあったが、寛解することはなかった。

ii) 群での脱随症状発率は 50-60% であった。しかし、ii)、iii) 群では飲水量（BD-AcAc2 内服量）に個体差が大きく、投与開始後、神経症状が発症するまでに 10% 以上の体重減少を示したマウスが約 28%、5-10% 以上の減少が約 39% であり、BD-AcAc2 投与量に個体差が大きく BD-AcAc2 による効果を判定するに至らなかった。10% 以上の体重減少を呈した EAE マウスモデルの 80% は何らかの神経脱随症状を呈し、体重減少というストレスの存在下でも発症することから、BD-AcAc2 の脱随抑制の可能性は示唆された。しかし、投与量設定が不安定であり、本研究期間中において断定的な結果を得る事はできなかった。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 由香 (Suzuki, Yuka)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・寄附講座  
准教授  
研究者番号：00304634

(2)研究分担者

福田 光成 (Fukuda, Mitsumasa)  
愛媛大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：80274330

田中 潤也 (Tanaka, Junya)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：70217040