



# Effects of ketogenic diet on electroconvulsive threshold and brain contents of adenosine nucleotides

中澤, 道人

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1983-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0450

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000450>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



|         |   |
|---------|---|
| 氏名・（本籍） | なか ざわ みち ひと （兵庫県）   |
| 学位の種類   | 医学博士  |
| 学位記番号   | 医博い第 411 号  |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 5 条第 1 項該当  |
| 学位授与の日付 | 昭和 58 年 3 月 31 日  |
| 学位論文題目  | <b>Effects of Ketogenic Diet on Electroconvulsive Thres-<br/>hold and Brain Contents of Adenosine Nucleotides</b><br>(ケトン食療法の抗けいれん作用と脳内 Adenosine nucleotide<br>含量について) |

|      |                       |
|------|-----------------------|
| 審査委員 | 主査 教授 松 尾 保           |
|      | 教授 中 井 久 夫 教授 田 中 千賀子 |

## 論文内容の要旨

### 1. はじめに

てんかんに対する食事療法は古く 1921 年 Geyline により "Fasting as a method for treating epilepsy" として紹介され、飢餓がてんかん発作に有効であることが示唆され、その後 Wilder により飢餓により血中に増加したケトン体が抗けいれん作用をもつと考えられ、血中にケトン体を多量に産生するケトン食療法が導入されるようになった。この様にケトン食療法は 50 有余年の歴史を有し、その有効性が認められながらその作用機序については未だ十分に解明されていない現状である。そこで、著者はこの作用機序を解明する手段として DDY マウスを実験動物とし、Woodbury-Davenport 型の電撃刺激装置を用いてのけいれん発症率及び脳細胞の Stability の指標とされているマウス脳内における adenosine nucleotide 含量についてケトン食飼育マウス、普通食飼育マウスについて対比し解析を試みた。

### 2. 研究対象並びに方法

実験動物は、8～12 週齢の雌 DDY マウスを用いた。ケトン食療法に用いた試作ケトン乳末の主要組成は、100 g 中脂肪 70g { 中鎖脂肪酸 (MCT) 41.2g・バター脂肪 28.8g } 蛋白質 18.9g 及び炭水化物 6.0g であり、ケトン指数は 3.0 である。

#### 1) マウス血漿 $\beta$ -hydroxybutyrate の測定

絶食前及び絶食 24 時間・28 時間・32 時間・36 時間及び 48 時間後に各 4 匹ずつ、無麻酔下で開胸し心腔穿刺によりヘパリン加採血を行なった。一方 MCT 群では、24 時間絶食後 MCT 0.5ml を腹腔

内に注入し、注入後4時間・8時間・12時間及び24時間に各4匹ずつ同様に採血を行ない、絶食群とMCT群の血漿 $\beta$ -hydroxybutyrateの経時的変化を比較検討した。血漿 $\beta$ -hydroxybutyrateの測定はPerssonの方法により蛍光分光光度計にて測定した。

#### 2) MCT群・絶食群及び対照群の電撃刺激閾値の測定

マウス血漿 $\beta$ -hydroxybutyrateの測定により、MCT群ではMCT注入後12時間、絶食群では絶食後48時間に血漿 $\beta$ -hydroxybutyrateは最も高値を示したことより、MCT群ではMCT注入後12時間、絶食群では絶食後48時間に電撃刺激を加えた。電撃刺激は京都計測器工業製 Model ME 400を用い、電極を両眼球部に密着させておこなった。電撃刺激の強さは、対照群・絶食群では9 mAから1 mA毎に15 mAまでの7ポイント、MCT群では10 mAから15 mAまでの6ポイントとし、いずれのポイントにおいても各群それぞれ20匹ずつに電撃刺激をおこなった。痙攣の判定は、少なくとも下肢の一側に強直性伸展が認められるか否かにより判定した。痙攣閾値の変化の判定は痙攣誘発マウスの割合(%)をもって示し、全刺激の総和及び各刺激のポイント毎に検討した。

#### 3) ケトン乳飼育マウス(ケトン食群)の電撃刺激閾値の測定

DDYマウスを48時間絶食後に各ケージ5匹ずつに分け、試作ケトン乳末をad libitumに与え、2週間飼育した後に上述の方法により10 mAから15 mAまでの6ポイントで痙攣誘発率を測定し検討した。

#### 4) 脳内 nucleotide の測定

絶食群では絶食後48時間、ケトン食群では48時間の絶食後試作ケトン乳末で2週間飼育した後に断頭し直接液体窒素中に落下させ凍結し、頭蓋骨除去後、小脳を除いて坪量し、液体窒素で再冷却する。Freezing crusherを用いて破砕し、メタノールアイスバス中の試験管に移し、6%過塩素酸2 mlを加えてhomogenateし、メチールオレンジを指示薬として加え5 MK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>で滴定し、上清0.1 mlを検体として用いた。ATP・ADPの測定はLamprechtらの方法により蛍光分光光度計で測定した。

### 3. 研究成績

#### 1) 血漿 $\beta$ -hydroxybutyrateの濃度

血漿 $\beta$ -hydroxybutyrate値は、絶食前0.13, 絶食24時間後0.41, 28時間後0.81, 32時間後0.70, 36時間後0.89, 48時間後1.05  $\mu$ mole/mlであった。MCT群では24時間絶食後MCT腹腔内注入後4時間, 8時間, 12時間及び24時間目の値はそれぞれ0.69, 0.80, 1.34及び0.91  $\mu$ mole/mlを示した。即ち絶食群では絶食48時間後に、MCT群ではMCT注入12時間後に血漿 $\beta$ -hydroxybutyrateは最高値を示し、もっとも血中ケトン体の増量することを知った。

#### 2) MCT群・絶食群及び対照群の電撃刺激閾値

血中ケトン体のもっとも増量する時期における電撃刺激けいれん閾値について検討した。MCT群(10 mAから15 mA)・絶食群(9 mAから15 mA)それぞれについて普通食飼育群(対照群)と対比したところ、全刺激総数に対する痙攣誘発率は有意に低値を示した( $P < 0.05$ )。しかし各mAそれぞれのポイントについての比較ではとくに有意差は認められなかった。一方MCT群と絶食群との比較においては、いずれの痙攣誘発率も有意差を認めなかった。

### 3) ケトン食群の電撃刺激閾値

ケトン食群の痙攣誘発率を対照群と比較すると、全刺激総数のみでなく 10 mA から 15 mA のいずれの刺激ポイントでも有意に低く ( $P < 0.05 \sim 0.001$ )、絶食群との比較でも全刺激総数及び 10 mA・11 mA の 2 刺激ポイントで有意に低かった。 ( $P < 0.05 \sim 0.001$ )。

### 4) 脳内 nucleotide 含量

ケトン食群 DDY マウスの体重は、48 時間絶食にて 29.6 g から 24.2 g へと減少したが、ケトン乳末飼育により 2 週間後に 29.9 g と絶食前の体重に回復した。ケトン食群の脳内 ATP 含量は  $2.068 \pm 0.243 \mu\text{mole/wet g}$  と対照群  $1.756 \pm 0.127 \mu\text{mole/wet g}$  に比し有意に高値を認めたが ( $P < 0.01$ )、絶食群では  $1.883 \mu\text{mole/wet g}$  と対照群との間には有意差を認めなかった。次にケトン食群の ADP 含量は  $0.400 \pm 0.067 \mu\text{mole/wet g}$ 、絶食群  $0.376 \pm 0.067 \mu\text{mole/wet g}$  対照群  $0.377 \pm 0.065 \mu\text{mole/wet g}$  で各群の間にはとくに有意差を認めなかった。

## 4. ま と め

48 時間の絶食期間を終えた後、2 週間にわたり試作ケトン乳末で飼育したマウス群のけいれん閾値は対照マウス群、48 時間絶食マウス群より有意に低下しており、同時に脳内 ATP 含量は対照マウス群に比し有意に高値を示した。以上の結果よりケトン食療法の抗けいれん作用の機序としては、脳内 ATP 含量の増加によるニューロンの安定性の亢進が関与していることが考えられ、高エネルギー磷酸の関与がなんらかの役割を果たしているものと考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

飢餓がてんかん発作に有効であることは古くより提唱され、その作用は飢餓により血中に増加したケトン体が抗けいれん作用を示すのではないかと考えられ、血中ケトン体を多量に産生する高脂肪、低糖質食であるケトン食療法が導入される様になった。事実、てんかんに対するケトン食療法の有効性は明らかに認められながらその作用機序については未だ解明されていない現状である。

本研究者は教室の神経研究グループの一環としてこの問題を解明すべく、ラットを実験動物とし、血中ケトン体の増量、つまりケトosisの状態が脳内神経伝達物質とくに GABA・セロトニンにどのような影響を与えるかについて種々検討を行ったが、有意なる結果は得られなかった。

そこで、脳細胞内の stabilizer の指標とされる adenosine nucleotide の動態について検討を行った。実験方法としては 8～12 週令の雌 DDY マウスを実験動物とし、中鎖脂肪酸 (MCT) を主材料とするケトン食飼育群 (100 匹) 及び普通食飼育群 (100 匹) ずつの 2 群に分け、2 週間飼育後、Woodbury Davenport 型電撃刺激装置を用い、マウスの両眼球部に電極をあて、9 mA から 1 mA 毎に 15 mA まで各ポイントにおけるけいれん誘発マウスの割合をもってけいれん閾値を判定した。更に DDY マウス脳内における Nucleotide を測定するため、夫々飼育後、断頭、液体窒素にて凍結し、Lamprecht らの方法により蛍光分光光度計を用いて ATP・ADP の含量を測定した。

## 〔結 果〕

- 1) まず、基礎実験としてDDYマウスの腹腔内にMCTを注入すると、血中ケトン体の指標とされる $\beta$ -hydroxybutrate は12時間後に最高値に達し、血中ケトン体の増量することを認めた。
- 2) 電撃刺激に対するけいれん誘発率はケトン食飼育群は普通食飼育群に比し10 mA から15 mA の各ポイントにおいて、いずれも有意にけいれん誘発率の低い事を認めた。
- 3) ケトン食飼育群の脳内ATP含量は $2.068 \pm 0.243 \mu\text{mole/wet g}$  普通食飼育群では $1.756 \pm 0.127 \mu\text{mole/wet g}$  と有意に高値を認めた。一方、ADP含量は両者間にとくに有意差をみることが出来なかった。

以上の実験結果から、ケトン食飼育によりけいれん誘発率は明らかに低下し、同時に脳内ATP含量が普通食飼育群に比し、有意に高値を示したことはケトン食療法の抗けいれん作用の機序としては脳内ATP含量の増加に伴うニューロンの安定性の亢進が関与していることを裏付けるものであり、高エネルギー 磷酸の関与が抗けいれん作用になんらかの役割を果たしているものと考えられた。

この様に本研究は、小児の難治性てんかんの病態・治療の研究の上に価値ある知見を集積したものであり、よって本研究者は医学博士の学位を得る資格があると認めた。