Studies on the Pathogenesis of the Disturbance of the Carbohydrate Metabolism in the Alcohol fed rats

Kazuo KATSUMATA and Kozo YAMADA

Third Department of Internal Medicine, Nagoya University

Authors fed male albino rats for 210 days with the standard diet with alcohol or with glucose solution isocaloric to alcohol.

Following findings were obtained in alcohol fed rats.

i) GTT, PGTT and IST showed the disturbance of the carbohydrate metabolism.
ii) The incorporation of alanine-U-C¹⁴ and glucose-U-C¹⁴ into liver glycogen was lower than that of the control, that is, glycogenesis in alcohol fed group was apparently impaired.

iii) The incorporation of alanine-U-C¹⁴ into blood glucose was higher than that of the control.

iv) In epididymal fat pad, glucose uptake and insulin effect on the incorporation of glucose-U-C¹⁴ into expired CO₂ were also disturbed. As above mention, the results suggest that alcohol feeding can induce the disturbance of carbohydrate metabolism, and that neither alcoholic fatty liver nor the increment of calory intake is responsible for this carbohydrate disturbance.

(See pp. 1109~1114)

アルコール長期投与白鼠にみられる 糖代謝異常に関する研究

名古屋大学医学部第三内科

勝 又 一 夫, 山 田 弘 三

(昭和45年9月24日受付)

雄性白鼠を210日間、標準食に alcohol を添加して飼育すると、標準食に alcohol と等カロリーの glucose 液を加えて飼育した場合に比し、耐糖能の異常、インスリン感性の低下が出現する。

かかる糖代謝の異常の成因には alanine-U- 14 C より血糖へのとりこみ増加、fat pad における glucose uptake 及びインスリン感性の低下ならびに alanine-U- 14 C 及び glucose-U- 14 C より肝 glycogen へのとりこみ低下などが関与すると思われる。これら糖代謝異常の成因を alcohol hypoglycemia との関連で論じた。

緒 言

Alcohol (ethanol) の飲用で、ときに低血糖がくることはよく知られているが、糖代謝異常が惹起されることもまた事実である²⁾。Alcohol hypoglycemia は飢餓あるいは low calory の摂取時に alcohol が飲用された場合に発生する¹⁾。

Alcohol による糖代謝異常は、GTT の異常、インスリン感性の低下などが特徴的であり²⁾、alcohol を連続投与した白鼠で見られる。また慢性 alcohol 中毒患者でもしばしば GTT の異常が報告されている³⁾。Alcohol 長期投与白鼠に見られる糖代謝異常の成因については、肝が重要な役割を果たしていると思われるが、なおその詳細は不明である。

そこで本実験では、alcohol 投与白鼠の肝、fat pad、diaphragm の糖代謝を2、3の面より検討した。その結果、肝の glycogenesis は抑制され、肝の gluconeogenesis は増加し、脂肪組織では glucose uptake とインスリン感性の低下が存在した。本論文は、alcohol の摂取が単にカロリーの増加と脂肪肝を来たすのみではなく、大量の摂取が長期にわたれば肝及び脂肪組織の糖代謝にかなりの影響を与える事実を明らかにした。

材 料 と 方 法

雄性 Wister 系白鼠40匹を20匹ずつの2群に分け、それに 10% alcohol 水溶液を自由に飲ませ、合成食で210日間飼育した。対照群は等カロリーの glucose 液を飲用せしめ、できるだけ alcohol 群と等カロリーとなるように留意した。なお合成食及び vitamin 液の組成は既報によった²⁾。

飼育200日目に GTT, 201日目に PGTT を施行した。GTT は 20% glucose 水溶液を体重 100g あたり 1ml あて胃管で経口投与し、投与前及び投与後 30', 60', 90', 120', 180 分後に尾静脈より 0.05ml ずつ採血し、Hagedorn-Jensen 氏法で血糖を測定した。なお PGTT については glucose の投与2時間前及び8時間前に predonisolone 0.4mg を体重 100g あたりに腹腔内へ注射し、次いで GTT を前述の如くに行なった。飼育202日目にはインスリン感性 test を施行した。インスリン感性 test (IST) は regular インスリン 0.04unit を体重 100g あたり腹腔内へ注射し、腹注前と腹注 20', 30', 60', 90', 120 分後に尾静脈より

り 0.05ml ずつ採血し, 血糖を測定した. GTT, PGTT, IST は各群とも同一の白鼠を用いて 5 例ずつ行ない, 血糖値は $\text{mean} \pm \text{SE}$ で表わした. Diaphragm, fat pad の glucose uptake は 203 日目に各群 5 例ずつ白鼠を断頭屠殺し, 以下の如き方法で測定された. Diaphragm, epididymal fat pad をとり出し氷冷した Krebs ringer bicarbonate buffer を含むビーカーに入れて diaphragm muscle 及び fat pad の distal part を速やかに分離した. 次いで diaphragm, epididymal fat pad を 100mg 当てとり出し, それを 200mg% の glucose を含有する Krebs ringer bicarbonate buffer 2ml を含むフラスコへ入れ, ゴム栓をし, 95% O_2 , 5% CO_2 の混合気相にして 37°C で 120 分間振盪 incubation した. Incubation 終了後, medium の glucose 濃度を測定し, incubation 前の glucose 濃度より glucose uptake を計算した.

なお一部の実験では 0.5 μC glucose-U- C^{14} をフラスコへ入れ, 前述と同様に fat pad, diaphragm とともに 95% O_2 , 5% CO_2 の気相で振盪 incubation した. Incubation 終了後, 10N H_2SO_4 0.4ml を medium に入れて反応を止め, CO_2 を発生せしめ, 次いでゴム栓よりつるした容器の中へ 1.8N NaOH 0.2ml を入れ, さらに 1 時間 incubation した. 次いで NaOH をとり出し, BaSO_4 を加えて BaCO_3 にし, gas flow counter で C^{14} の incorporation を測定した. なお自己吸収による補正を加え, さらに BaCO_3 を入れる前後の重量より CO_2 の mg を出した. C^{14} の incorporation は cpm/mg CO_2 として表わした. 205 日目には各群 10 匹ずつに glucose-U- C^{14} 10 μC を体重当 100g なりに腹注し, 30 分後に 5 匹を断頭屠殺して肝をとり出した. 次いで肝 glycogen を Montgomery 法⁴⁾で抽出し, その半分を gas flow counter で count し, 残りで肝 glycogen を M. Dubois⁵⁾法で測定して cpm/mg glycogen として肝 glycogen への C^{14} のとりこみを検討した. 肝 protein, 肝 lipid へのとりこみは, それぞれ Manchester 法⁶⁾と Folch 法⁷⁾により抽出して測定した. また isotope を腹注 4 時間後にも各群 5 例ずつ断頭屠殺し, glucose-U- C^{14} より肝 glycogen, 蛋白, 脂肪への C^{14} のとりこみを同様に検討した. なお断頭時に血液を集め, 血液中に残存している glucose-U- C^{14} を Somogyi 法⁸⁾及び Osazon 法⁹⁾により測定した. なお肝脂肪は Bragdon 法¹⁰⁾, 肝蛋白は Biuret 法¹¹⁾でそれぞれ測定し, 肝脂肪, 肝蛋白への isotope のとりこみは cpm/mg lipid, cpm/mg protein で表わした. なお 210 日目には残りの各群 5 匹ずつに alanine-U- C^{14} 10 μC を腹注し, 4 時間後に断頭屠殺して肝をとり出し血液を集め, 肝 glycogen, 血糖への C^{14} のとりこみと前述の如く検討した.

実 験 成 績

1. GTT, PGTT, IST について

飼育 200 日目に行なわれた GTT の成績は table 1 に示す如く, alcohol 群では対照群に比して明白な異常が存在した.

PGTT は table 1 の如く, 両群とも GTT の成績よりも悪く, 異常を示した. Alcohol 群の PGTT の異常は対照群よりも明白で, 糖尿病型を示した. また PGTT 施行時に alcohol 群の一部に尿糖の排出をみる白鼠があつた.

IST についても table 1 に示したが, alcohol 群で明らかなインスリン感性の低下が存在した. 即ち, alcohol 群ではインスリンによる血糖の低下が対照に比して少なかった. なお alcohol 群の 201 日目の平均体重は 270g で対照群の体重は 274g であり, 両群ともほぼ等しい体重の増加を示した.

2. Diaphragm, fat pad における glucose uptake と glucose-U- C^{14} より CO_2 へのとりこみについて

Table 2 の如く diaphragm の glucose uptake は対照及び alcohol の両群に差異がない. Glucose uptake に及ぼす 1m unit のインスリン作用も同様であつた. ところが epididymal fat pad の成績では table 2 の如く alcohol 群の glucose uptake は対照より明白に低下していた. Alcohol 群の glucose uptake の低下は 1m unit のインスリンを加えた場合にも明らかで, glucose uptake に対するインスリンの効果の障害が示された. Glucose uptake は 5 例ずつの $\text{mean} \pm \text{SE}$ で表わした.

Fat pad, diaphragm における glucose-U- C^{14} より CO_2 へのとりこみは table 2 の右側に示した.

Diaphragm においては glucose-U- C^{14} から CO_2 へのとりこみもそれに及ぼす 1m unit のインスリン

Table 1. GTT, PGTT and IST of rat in alcohol and control group

1) GTT						
	Before	30'	60'	90'	120'	180minutes
Alcohol group	118.3 ±9.4	178.6 ±13.7	184.2 ±19.1	161.5 ±15.1	138.9 ±10.3	134.6 ±8.3
Control group	92.1 ±8.3	134.4 ±18.9	126.7 ±13.4	104.6 ±9.4	103.9 ±7.9	92.4 ±7.4
2) PGTT						
	Before	30'	60'	90'	120'	180minutes
Alcohol group	123.5 ±9.9	209.6 ±15.3	214.7 ±13.3	203.4 ±10.4	167.1 ±9.8	149.0 ±7.9
Control group	103.4 ±7.8	179.6 ±14.7	166.3 ±12.1	154.1 ±10.3	121.7 ±9.4	104.5 ±5.7
3) IST						
	Before	30'	60'	90'	120'	180minutes
Alcohol group	115.3 ±10.3	104.4 ±9.7	99.4 ±7.7	89.6 ±8.3	96.2 ±7.1	108.3 ±4.9
Control group	102.4 ±9.6	64.3 ±9.4	63.2 ±8.1	63.2 ±8.1	69.1 ±5.9	104.3 ±5.3
1) GTT						
Glucose tolerance test was performed in both group on 200th day.						
2) PGTT						
Prednisolone glucose tolerance test was performed in both group on 201th day.						
3) IST						
Insulin sensitivity test was performed in both group on 202th day.						
Number in the table means the mean mg/dl of blood glucose ±S.E.						

Table 2. Glucose uptake and the incorporation of glucose-U-C¹⁴ into expired CO₂ at the diaphragm and fat pad in alcohol and control group.

	Glucose uptake				Glucose-U-C ¹⁴ →CO ₂			
	Diaphragm		Fat pad		Diaphragm		Fat pad	
	insulin (-)	insulin (+)	insulin (-)	insulin (+)	insulin (-)	insulin (+)	insulin (-)	insulin (+)
Alcohol group	8.13 ±0.76	13.01 ±1.65	2.96 ±0.5	5.89 ±0.76	3713.9 ±131.2	5970.6 ±365.3	4078.1 ±149.2	7900.4 ±893.4
Control group	7.96 ±1.03	12.93 ±1.74	4.08 ±0.41	13.16 ±0.70	3811.7 ±179.4	5760.4 ±234.3	3052.3 ±153.2	14100.3 ±854.6

Glucose uptake means the mean mg glucose/dl ±S.E. disappeared by 100mg of diaphragm or fat pad.

The incorporation of glucose-U-C¹⁴ into expired C¹⁴O₂ means the mean incorporated ¹⁴C radio-activity (cpm/mg CO₂) ±S.E. by 100mg fat pad or 100mg diaphragm.

effect もともに alcohol 群と対照群で差はなかつた。ところが fat pad では diaphragm と異り, alcohol 群で明白なインスリン effect の障害があつた。しかしながら, インスリン無添加の場合の glucose-U-C¹⁴ の CO₂ へのとりこみは glucose uptake と異り, 両群に差がみられなかつた。

3. Glucose-U-C¹⁴ より肝 glycogen, 肝 lipid, 肝 protein, 血糖へのとりこみについて

Table 3 の如く, alcohol 群では glucose-U-C¹⁴ の腹注30分後でも, 4時間後でもともに肝 glycogen

Table 3. The incorporation of glucose-U-C¹⁴ into liver glycogen, liver fat, liver protein and blood glucose of rats in alcohol and control group.

	After 30minutes			After 4 hours			
	Liver glycogen	Liver fat	Liver protein	Liver glycogen	Liver fat	Liver proteiu	Blood glucose
Alcohol group	51.3 ±9.2	29.6 ±7.3	50.3 ±9.6	597.1 ±73.4	139.6 ±16.4	209.6 ±14.6	48913.6 ±817.3
Control group	199.6 ±18.7	54.1 ±9.6	54.1 ±10.3	998.7 ±111.4	136.7 ±11.3	20.13 ±16.9	33914.6 ±864.9

Numbers in the table mean the mean incorporated C¹⁴ radio-activity ±S.E. into liver glycogen (cpm/mg glycogen), liver fat (cpm/mg lipid), liver protein (cpm/mg protein) and blood glucose (cpm/mg glucose per dl).

への isotope のとりこみは対照に比して著明に低下していた. 肝 protein, 肝 lipid へのとりこみは30分後, 4時間後でもともに両群で差がなかった. 一方, 4時間後の glucose-U-C¹⁴ より血糖へのとりこみは, alcohol 群は対照よりも高く glucose の利用障害がうかがわれた.

Alanine-U-C¹⁴ を腹注し, 4時間後の肝 glycogen へのとりこみは table 4 の如く alcohol 群では対照に比して明らかに低下していた. 一方, alanine-U-C¹⁴ より血糖へのとりこみは alcohol 群で増加した. この成績は alanine からの gluconeogenesis の増加を示唆する.

Table 4. The incorporation of Alanine-UC¹⁴ into liver glycogen and blood glucose of rats in alcohol and control group.

	After 4 hours	
	Liver glycogen	Blood glucose
Alcohol group	296.7+ 43.6	2916.7+516.4
Control group	768.9+112.4	1365.8+611.3

Number in the table means the mean incorporated C¹⁴ radio-activity ±S.E. into liver glycogen (cpm/mg glycogen) and blood glucose (cpm/mg glucose per dl).

考 案

Alcohol 投与白鼠で, diaphragm muscle における glucose の利用と insulin effect は対照と等しく正常であつたが, fat pad の成績で glucose uptake とインスリン効果が明白に低下した. Glucose-U-C¹⁴ より CO₂ へのとりこみは両群で差がなく, alcohol 群の fat pad でインスリン効果のみは低下していた. fat pad での glucose uptake の低下とインスリン作用の減弱の理由は不明であるが, isolate した fat pad, diaphragm の glucose uptake とインスリン効果は in vitro に alcohol を加えると nonmetabolic な alcohol 作用によつて低下する事実から¹²⁾ 脂肪組織の membrane が in vivo の alcohol の投与によつて in vitro と同様に何らかの障害を受けたためとも考えられる. Alcohol 群で glucose-U-C¹⁴ より血糖へのとりこみが増加していたことは GTT の異常とも一致しており, 白鼠に投与した glucose の利用が障害され, 糖代謝異常の存在を示す. Alcohol 群でみられる GTT, IST の異常は既報と一致し²⁾¹⁷⁾ 今回行なわれた PGTT の異常は明白に alcohol 群に於ける糖代謝異常の存在を示す.

ところで glucose-U-C¹⁴ 及び alanine-U-C¹⁴ よりの肝 glycogen へのとりこみは alcohol 群で著明に低下しており, glycogenesis の低下を示す.

一方, alanine-U-C¹⁴ より血糖へのとりこみは増加しており, alanine よりの gluconeogenesis の亢進を示す。すでに J.R. Williamson 等¹³⁾ は肝灌流の実験で alcohol が alanine からの糖新生を増やす事を報告しており, J. Ashmore 等は或る条件下で alcohol が G6 Pase を増加させると報告し, 共に我々の成績と一致した¹⁴⁾。一般に alcohol は hypoglycemia を惹起する事で知られており, alcohol hypoglycemia は $\frac{\text{NADH}}{\text{NAD}}$ の増加による肝での糖新生の抑制に起因するといわれているが, H.A. Krebs によれば alcohol による糖新生の抑制は種々の条件が必要である¹⁵⁾。又 TCA cycle が正常であれば糖新生は alcohol で亢進し, 低下していると抑制されるとの成績もあり¹⁶⁾。本実験条件では TCA cycle は正常である事と一致し²⁾興味深い。

以上要約すると, alcohol連続投与白鼠では fat pad で glucose の利用, insulin 効果の低下があり, さらに肝では glucose-U-C¹⁴ 及び alanine-U-C¹⁴ からの glycogen へのとりこみ低下が存在した。また alanine-U-C¹⁴ より血糖へのとりこみは, 明らかに増加していた。これらの成績は, alcohol 投与白鼠の糖代謝異常の成因に重要な役割を果たしていると思われる。ところでアルコール群にみられた肝 glycogen へのとりこみの低下は alcohol 性脂肪肝の一因を示すものと考えられ, 脂肪肝と糖代謝異常との関連を示す。なお alcohol 投与白鼠では sodium acetate-l-C¹⁴ より肝 lipid へのとりこみは著明に低下しており¹⁶⁾。肝 slice における glucose の oxidation は全く異常を認めなかった²⁾。以上の成績から, alcohol 投与白鼠の糖代謝の異常は飢餓, インスリン欠亡時にみられる糖代謝の異常と異質なものであり, また脂肪肝と関連するが, それのみでは説明できないことを示す。又この糖代謝異常は alcohol の代謝課程に伴う metabolic effect と alcohol 自体の nonmetabolic effect により若起されたと思われるが, 健全な脾がある限り代償され, 顕性糖尿病状態にはなり得ない。しかし, 過度の飲酒は, 糖尿病発症への誘因として, また糖尿病の食餌療法を考える上に注目すべきと思われる。今後さらにこの alcohol 作用を検討する予定である。

結 語

白鼠に alcohol (エタノール) を 210 日間連続投与し, 脂肪肝では説明できない。糖代謝の異常が惹起される事実を明らかにした。即ち, alcohol 群白鼠では

- 1) GTT, PGTT の異常を呈し, IST もインスリン作用の減弱を示した。
- 2) 肝では alanine-U-C¹⁴, glucose-U-C¹⁴ からの glycogen へのとりこみは低下し, glycogenesis の抑制を示した。
- 3) Alanine-U-C¹⁴より血糖へのとりこみは増加し, gluconeogenesis の亢進を示した。
- 4) Fat pad では glucose uptake 及びインスリン作用の低下があり, glucose-U-C¹⁴ より CO₂ へのとりこみに対するインスリン効果も減弱していた。

通常, 脾が健全である限り, alcohol の投与で糖尿病状態にはならないが, 糖尿病時の食餌療法, 栄養との関連から本報告は重要な知見と考える。

文 献

- 1) Freinkel N., Singer D.L., Arky R.L., Bleicher S.J. and J.B. Anderson : Alcohol hypoglycemia. J. Clin. Invest 42 : 1112, 1963
- 2) Katsumata K. : The effect of various diet on the disturbance of lipid and carbohydrate metabolism of rat fed with alcohol. Japan J. stud., Alcohol 3(3.4) : 124, 1968
- 3) Karlan S.C. and Cohn C. : Glucose tolerance test in chronic alcoholism. Am. J. Psychiatry 103 : 247, 1946
- 4) Montgomery R. : The determination of liver glycogen. Arch. Biochem. Biophys. 67 : 378, 1957
- 5) Dubois M. : Determination of polysaccharide. Analytical, chem 29 : 350, 1956
- 6) Manchester K.L. and Krah M.E. : Insulin on the incorporation of C¹⁴ from C¹⁴ labeled carboxylic acid and bicarbonate into the protein of isolated rat diaphragm. J. Biol. Chem., 234 : 2938, 1959
- 7) Folch J., Lees M. and Sloane Stanley G.H. : A simple method

- for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226 : 497, 1957
- 8) Somogyi M : A method for the preparation of blood filtrates for the determination of sugar. *J. Biol. chem.* 86 : 655, 1930
- 9) Sterm M., Wagll S.R. Swaney M.J. and Ashmore J. : Studies on experimental diabetes. *J. Biol. chem.* 238 : 12, 1963
- 10) Bragdon J.H. : Colorimetric determination of blood lipides. *J. Biol. chem.* 190 : 513, 1951
- 11) Gornali G., Bardawill J. and David M.M. : Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. chem.* 177 : 751. 1949
- 12) Unpublish data.
- 13) Williamson J.R., Olson M.S., Browning E.T. and Scholz R. : Control of citric acid cycle, p. 207 The energy level and metabolic control in mitochondria. *Adriatica Editrice, Bari* 1969. ed by Papa S., Tayer J.M., Quagliarello E. and Slatar E.C.
- 14) Nelson P., Wagle S.R., and Ashmore J. : Studies on ethanol-induced stimulation of glucose-6-phosphatase activity. *Metabolism* 19(5) : 349, 1970
- 15) Krebs H.A. : The effect of ethanol on the metabolic activities on the liver. *Advance in Enzyme regulation.* 6 : 467, 1968
- 16) 勝又一夫, 山田弘三 : アルコール脂肪肝の高脂肪食による促進と高蛋白質による抑制. *日消会誌*, 65 (1) : 69, 1968
- 17) 勝又一夫 : 糖尿病と alcohol に関する実験的並びに臨床的研究. *日本内分泌*, 38(10) : 1033, 1963.
- 18) Freinkel N., Cohen A.K., Arky R.A., Foster A.S. : Alcohol hypoglycemia. *J. Clinic. Invest* 25 : 76, 1965.