

博士〈健康科学〉論文

プロピオン酸溶液の経口投与による
血中ケトン体濃度低下作用に関する研究

2021年3月

山口大貴

川崎医療福祉大学大学院

医療技術学研究科

健康科学専攻

博士論文目次

第1章 序論

- 1-1. 短鎖脂肪酸の代謝
- 1-2. ケトン体の代謝
- 1-3. プロピオン酸の生理作用
- 1-4. 研究の概要
- 1-5. 動物実験委員会の承認
- 1-6. 利益相反

第2章 プロピオン酸溶液の経口投与が血中ケトン体濃度および血糖値に及ぼす影響

- 2-1. 緒言
- 2-2. 実験方法
 - 2-2-1. 短鎖脂肪酸 (SCFAs) 溶液の調製
 - 2-2-2. 実験飼料
 - 2-2-3. 実験動物および飼育
 - 2-2-4. 血中ケトン体濃度および血糖値の測定
 - 2-2-5. 絶食による血中ケトン体濃度の経時的変化
 - 2-2-6. SCFAs 溶液の経口投与による血中ケトン体濃度と血糖値の変化
 - 2-2-7. プロピオン酸による血中ケトン体濃度低下作用の用量応答性
 - 2-2-8. 血漿アセト酢酸濃度の測定
 - 2-2-9. プロピオン酸の経口投与による血中ケトン体濃度と血糖値の経時的変化
 - 2-2-10. 統計処理
- 2-3. 結果
 - 2-3-1. 絶食による血中ケトン体濃度の経時的変化
 - 2-3-2. SCFAs 溶液の経口投与による血中ケトン体濃度と血糖値の変化
 - 2-3-3. プロピオン酸による血中ケトン体濃度低下作用の用量応答性
 - 2-3-4. 血漿アセト酢酸濃度の変化
 - 2-3-5. プロピオン酸の経口投与による血中ケトン体濃度と血糖値の経時的変化
- 2-4. 考察

第3章 プロピオン酸溶液投与が血中ホルモン濃度、交感神経および肝外組織でのケトン体代謝に及ぼす影響

- 3-1. 緒言
- 3-2. 実験方法
 - 3-2-1. プロピオン酸溶液投与が血漿 NEFA 濃度、血漿グルカゴン濃度および血漿インスリン濃度に及ぼす影響
 - 3-2-2. プロプラノロール投与下でのプロピオン酸溶液経口投与が血中ケトン体濃度低下作用に及ぼす影響
 - 3-2-3. プロピオン酸が肝外組織でのケトン体代謝に及ぼす影響
([¹³C] β-ヒドロキシ酪酸-呼気分析法を用いた検討)
 - (1) 呼気分析 (呼気 Δ¹³CO₂ ‰測定)
 - (2) 代謝率の概算方法
 - 3-2-4. 統計処理
- 3-3. 結果
 - 3-3-1. プロピオン酸溶液投与が血漿 NEFA 濃度、血漿グルカゴン濃度および血漿インスリン濃度に及ぼす影響
 - 3-3-2. プロプラノロール投与下でのプロピオン酸溶液経口投与が血中ケトン体濃度低下作用に及ぼす影響
 - 3-3-3. プロピオン酸が肝外組織でのケトン体代謝に及ぼす影響
([¹³C] β-ヒドロキシ酪酸-呼気分析法を用いた検討)
- 3-4. 考察

第4章 有機酸溶液投与ならびに糖新生抑制下におけるプロピオン酸溶液投与が血中ケトン体濃度および血糖値に及ぼす影響

- 4-1. 緒言
- 4-2. 実験方法
 - 4-2-1. 有機酸およびアミノ酸溶液の調製
 - 4-2-2. 有機酸溶液の経口投与による血中ケトン体濃度および血糖値の変化
 - 4-2-3. アミノ酸溶液経口投与による血中ケトン体濃度および血糖値の変化
 - 4-2-4. メトホルミン投与による糖新生抑制の確認
 - 4-2-5. メトホルミン投与下におけるプロピオン酸溶液投与による血中ケトン体濃度および血糖値の変化
 - 4-2-6. プロピオン酸溶液経口投与後の小腸上皮細胞中のグルコース量、門脈血および腹部下大静脈血のグルコース濃度の測定
 - 4-2-7. 統計処理
- 4-3. 結果

- 4-3-1. 有機酸溶液の経口投与による血中ケトン体濃度および血糖値の変化
 - 4-3-2. アミノ酸溶液経口投与による血中ケトン体濃度および血糖値の変化
 - 4-3-3. メトホルミン投与による糖新生抑制の確認
 - 4-3-4. メトホルミン投与下におけるプロピオン酸溶液投与による血中ケトン体濃度および血糖値の変化
 - 4-3-5. プロピオン酸溶液経口投与後の小腸上皮細胞中のグルコース量、門脈血および腹部下大静脈血のグルコース濃度の測定
- 4-4. 考察

第5章. プロピオン酸投与が *C. elegans* の持久力に及ぼす影響

- 5-1. 緒言
- 5-2. 実験方法
 - 5-2-1. 使用した大腸菌および培地
 - 5-2-2. 線虫の系統と培養方法
 - 5-2-3. 使用した試薬および溶液の調製
 - 5-2-4. *C. elegans* の同調化
 - 5-2-5. むち打ち運動の測定方法
 - 5-2-6. むち打ち運動に対するプロピオン酸投与量の用量応答
 - 5-2-7. プロピオン酸投与がむち打ち運動に及ぼす影響
 - 5-2-8. プロピオン酸投与が *C. elegans* のグリコーゲン蓄積に及ぼす影響（ヨウ素染色法による確認）
 - 5-2-9. プロピオン酸投与が *C. elegans* のグリコーゲン蓄積量に及ぼす影響
 - 5-2-10. *C. elegans* の培養条件、total RNA 抽出および cDNA 合成方法
 - 5-2-11. 半定量的遺伝子発現の解析
 - 5-2-12. プロピオン酸投与が糖質代謝酵素遺伝子および脂肪酸代謝酵素遺伝子の発現に及ぼす影響
 - 5-2-13. プロピオン酸投与が β 酸化酵素遺伝子の発現に及ぼす影響
 - 5-2-14. プロピオン酸投与が抗酸化遺伝子の発現に及ぼす影響
 - 5-2-15. 統計処理
- 5-3. 結果
 - 5-3-1. むち打ち運動に対するプロピオン酸投与量の用量応答
 - 5-3-2. プロピオン酸投与がむち打ち運動に及ぼす影響
 - 5-3-3. プロピオン酸投与が *C. elegans* のグリコーゲン蓄積に及ぼす影響（ヨウ素染色法による確認）
 - 5-3-4. プロピオン酸投与が *C. elegans* のグリコーゲン蓄積量に

及ぼす影響

5-3-5. プロピオン酸投与が糖質代謝酵素遺伝子の発現に及ぼす影響

5-3-6. プロピオン酸投与が脂肪酸代謝酵素遺伝子の発現に及ぼす影響

5-3-7. プロピオン酸投与が β 酸化酵素遺伝子の発現に及ぼす影響

5-3-8. プロピオン酸投与が抗酸化遺伝子の発現に及ぼす影響

5-4. 考察

第 6 章. プロピオン酸投与が *C. elegans* の抗酸化能ならびに寿命に及ぼす影響

6-1. 緒言

6-2. 実験方法

6-2-1. プロピオン酸投与が *C. elegans* の酸化ストレス耐性に及ぼす影響

6-2-2. プロピオン酸投与が *C. elegans* の寿命に及ぼす影響

6-2-3. 統計処理

6-3. 結果

6-3-1. プロピオン酸投与が *C. elegans* の酸化ストレス耐性に及ぼす影響

6-3-2. プロピオン酸投与が *C. elegans* の寿命に及ぼす影響

6-4. 考察

総括

文献

図表

投稿論文・学会発表

謝辞

第1章. 序論

1-1. 短鎖脂肪酸の代謝

酢酸やプロピオン酸、*n*-酪酸等の短鎖脂肪酸 (Short Chain Fatty Acids, SCFAs) は、ペクチンやグァーガム等の易分解性食物繊維あるいは難消化性糖質が大腸内の腸内細菌による発酵を受けて生成される¹⁾。生成された SCFAs は大腸から吸収され、*n*-酪酸は大腸上皮細胞のエネルギー源として、酢酸は肝臓で脂肪合成やエネルギー基質として利用される²⁾。これらに対して、プロピオン酸は代謝過程でスクシニル CoA (Coenzyme A) に変換されて TCA 回路 (Tricarboxylic acid cycle) に入り、糖新生の基質として利用される (図 1A)。一方、糖新生の過程で生じたホスホエノールピルビン酸からピルビン酸への変換も存在するので、一部はピルビン酸からアセチル CoA を経て TCA 回路で代謝される^{3,4)}。プロピオン酸の日常的な摂取はほとんどないが、プロピオン酸が糖新生に利用されるという代謝特性を考慮すると有用なエネルギー基質となる可能性が考えられる。例えば、運動時にプロピオン酸を摂取することで、血糖が供給され、結果的に肝臓グリコーゲンの消費を抑制し、持久力を向上させる可能性が考えられる。

1-2. ケトン体の代謝

ケトン体は、アセト酢酸、 β -ヒドロキシ酪酸 (D-3-ヒドロキシ酪酸) およびアセトンの総称であり、肝臓で遊離脂肪酸 (Non-esterified fatty acid, NEFA) の代謝によって生じたアセチル CoA の一部からケトン体が生成され、脳や骨格筋等へ運ばれ、エネルギー効率の良い代替エネルギー基質として利用される⁵⁾ (図 1A)。ケトン体は常時合成されているが、絶食や持久力運動等で糖質からのエネルギー供給が低下した時、脂肪からのエネルギー産生の増加に伴いケトン体合成が亢進し、血中のケトン体濃度は上昇する⁶⁾。ケトン体は、ピルビン酸に比べ1分子あたりの ATP 産生量が多いことから⁷⁾ 持久力が必要な運動において有益となる可能性が指摘されている⁸⁾。実際、ケトン体食を摂取させたラットは持久力が向上することが報告されている⁹⁾。肝外組織におけるケトン体の代謝経路を図 1B に示した。肝外組織においてケトン体が代謝される際、 β -

ヒドロキシ酪酸はアセト酢酸に変換され、アセト酢酸がスクシニル CoA-アセト酢酸 CoA トランスフェラーゼによりスクシニル CoA から CoA を転移されることでアセトアセチル CoA として活性化し、そのアセトアセチル CoA が分解されてアセチル CoA になり、エネルギー基質として TCA 回路で酸化される。ケトン体代謝ではスクシニル CoA を必要とする¹⁰⁾ので、スクシニル CoA を供給するプロピオン酸はケトン体代謝を亢進させ、持久力を向上させる可能性もある。

1-3. プロピオン酸の生理作用

プロピオン酸の経口投与によって誘導される生理作用は多数報告されている。例えば、血漿コレステロール低下作用^{11,12)}、GPCR (G Protein Coupling Receptor) を介した交感神経の亢進¹³⁾や脂肪蓄積の抑制¹⁴⁾、GLP-1 (Glucagon Like Peptide-1) あるいは PYY (Polypeptide YY) の分泌促進等の報告がある^{15,16)}。しかし、プロピオン酸がケトン体代謝に及ぼす影響を検討した研究はほとんどない。本研究では、プロピオン酸の摂取が血中ケトン体濃度ならびに持久力に及ぼす影響について検討した。

1-4. 研究の概要

第2章では、絶食時における血中ケトン体濃度の経時的変化を検討し、血中ケトン体濃度が測定可能になるまでの絶食時間を検討した。また、絶食させたラットにプロピオン酸溶液を経口投与し、血中ケトン体濃度および血糖値に及ぼす影響について検討した。

第3章では、プロピオン酸溶液投与後の血漿中の NEFA 濃度、インスリン濃度およびグルカゴン濃度の経時的変化を検討した。また、プロピオン酸は GPR41 を介して交感神経を亢進することから¹³⁾、交感神経刺激を介したアドレナリン分泌による血糖上昇も考えられる。そこで、交感神経抑制剤 (プロプラノロール) 投与下におけるプロピオン酸の血中ケトン体濃度と血糖値に及ぼす影響を検討した。また、プロピオン酸による血中ケトン体濃度低下作用に、肝外組織でのケトン体の取り込みあるいはケトン体代謝の亢

進が影響しているか否かを明らかにするために、 $[^{13}\text{C}] \beta$ -ヒドロキシ酪酸を用いて呼気分析を行った。

第4章では、プロピオン酸による血中ケトン体濃度低下作用と血糖値上昇作用に、TCA回路の中間体の供給、ならびに糖新生による血糖供給が関与しているか否かを明らかにすることを試みた。クエン酸、 α -ケトグルタル酸、コハク酸、リンゴ酸、オキサロ酢酸、ピルビン酸、乳酸、アラニン、グルタミン酸およびリジンの各溶液を経口投与し、血中ケトン体濃度と血糖値に及ぼす影響をプロピオン酸と比較した。また、糖新生抑制剤であるメトホルミンを用いて、プロピオン酸の作用に対する糖新生の関与を検討した。さらに、プロピオン酸が腸管糖新生の基質となることが報告されていることから¹⁷⁾、プロピオン酸投与後の門脈血と腹部下大静脈血の血糖値の比較、ならびに小腸粘膜上皮細胞での糖新生を検討した。

第5章では、運動時にプロピオン酸を摂取することで血糖が供給され、結果として肝グリコーゲン消費を抑制して持久力を向上させる可能性について、モデル生物として線虫 (*Caenorhabditis elegans*) を用いて検討した。プロピオン酸摂取による持久力への影響は、線虫のむち打ち運動で評価し、合わせて体内のグリコーゲン蓄積量を測定した。

第6章では、持久力が向上していれば、活動量の増加に伴いエネルギー代謝が亢進して体内で活性酸素が生成されることから、プロピオン酸投与による酸化ストレス耐性に及ぼす影響を検討した。さらに、活性酸素量の増加は老化を促進することから、プロピオン酸投与による寿命に及ぼす影響についても検討した。

1-5. 動物実験委員会の承認

ラットを用いた動物実験は、川崎医療福祉大学動物実験委員会の承認を受けて行った(承認番号: 16-003、16-008、17-002、17-003、18-003)。

1-6. 利益相反

本研究において開示すべき利益相反はない。

第2章. プロピオン酸溶液の経口投与が血中ケトン体濃度および血糖値に及ぼす影響

2-1. 緒言

絶食時のように脂肪分解が亢進するような生理状態では、肝臓で NEFA が代謝されて多量のアセチル CoA が生成され、結果的に生成されるケトン体量も多くなる。一方、消化管から吸収されたプロピオン酸は、門脈から肝臓に入り、その大部分が代謝過程でスクシニル CoA に変換されて TCA 回路に入る。それゆえ、プロピオン酸からの TCA 回路への中間体の供給によりアセチル CoA の分解が促進し、ケトン体合成量が低下すると考えられる。また、プロピオン酸は TCA 回路を介して糖新生の基質としても利用されるので、血糖供給に伴い血糖値が上昇すると考えられた。さらに、肝外組織におけるケトン体代謝ではスクシニル CoA を必要とするので、プロピオン酸はケトン体代謝を亢進して、血中ケトン体濃度を低下させることも考えられた。

本章では、プロピオン酸投与による血中ケトン体濃度および血糖値に及ぼす影響を検討するため、ラットを用いて絶食時における血中ケトン体濃度の経時的変化を検討し、血中ケトン体濃度が測定可能になるまでの絶食時間を確認した。次いで、絶食により血中ケトン体濃度を上昇させたラットに、酢酸、プロピオン酸および *n*-酪酸溶液を経口投与し、血中ケトン体濃度および血糖値に及ぼす影響について比較検討した。加えて、プロピオン酸溶液経口投与後の血中ケトン体濃度と血糖値の経時的変化についても検討した。

2-2. 実験方法

2-2-1. 短鎖脂肪酸 (SCFAs) 溶液の調製

SCFAs はすべて Na 塩を用いた。酢酸 Na、プロピオン酸 Na および *n*-酪酸 Na は、特級試薬(和光純薬工業株式会社製)を用いた。酢酸 Na 1.64 g、プロピオン酸 Na 1.92 g、*n*-酪酸 Na 2.20 g を純水で溶解し、それぞれ 20 mL に定容し、1 M 酢酸 Na 溶液 (以下 1 M 酢酸溶液、pH 8.3)、1 M プロピオン酸 Na 溶液 (以下 1 M プロピオン酸溶液、pH 8.4) および 1 M *n*-酪酸 Na 溶液 (以下 1 M 酪酸溶液、pH 7.7) を調製した。

2-2-2. 実験飼料

基本飼料として、AIN-93G に準拠した組成の精製飼料（ただし、酸化防止剤は加えてはいない）を用いた。 α -コーンスターチ、カゼイン、セルロース、AIN-93 ビタミン混合および AIN-93 ミネラル混合はオリエンタル酵母工業株式会社、L-シスチンおよび酒石酸コリンは和光純薬工業株式会社、スクロースは株式会社パールエス W、大豆油は日清オイリオグループ株式会社より購入したものを使用した（表 1）。以後のラットを用いたすべての実験において基本飼料を使用した。

2-2-3. 実験動物および飼育

実験動物は、Wistar 系雄ラット（体重 160～350 g、日本クレア）を用いた。飼料と水は自由に摂取させた。飲料水には水道水を与えた。飼料と飲料水は、毎日新鮮なものに取り換えた。ラットは、室温 23 ± 1 °C、12 時間明暗サイクル（明期：8:00～20:00、暗期：20:00～8:00）の環境下で、床面と前面がステンレス製メッシュの個別ケージで飼育した。以後、すべてのラットを用いた実験において同様の飼育を行った。

2-2-4. 血中ケトン体濃度および血糖値の測定

血中ケトン体濃度および血糖値の測定には、無麻酔下でラットを保定して尾静脈をカミソリ刃で切り、出血した血液（約 0.8 μ L）を用いた。血中ケトン体濃度は、ニプロスタッドストリップ XP3（ノバ・バイオメディカル株式会社）を使用し、 β -ヒドロキシ酪酸を指標として測定した。血中ケトン体濃度の変化率（%）は、投与前の血中ケトン体濃度を 100 %として算出した。血糖値は、自己検査用グルコース測定器グルテストエース R（株式会社アークレイファクトリー）を用いて測定した。血糖値の変化率（%）も投与前の血糖値を 100 %として算出した。

2-2-5. 絶食による血中ケトン体濃度の経時的変化

Wistar 系ラット（体重 250-270 g、 $n=6$ ）を絶食させ、測定開始（17:00）から 17、24、40 および 48 時間後ごとに、尾静脈より採血し、血中ケトン体濃度を測定した。

2-2-6. SCFAs 溶液の経口投与による血中ケトン体濃度および血糖値の変化

24 時間絶食させたラットを 4 群（体重 220-240 g、 $n=6$ /群）に分けた。投与前に尾静脈から採血し、血中ケトン体濃度と血糖値を測定した。生理食塩水、1 M 酢酸溶液、1 M プロピオン酸溶液あるいは 1 M n -酪酸溶液 2 mL を経口投与し、90 分後に血中ケトン体濃度および血糖値を測定した。経口投与には、経口ゾンデ（7206K シリーズ フレキシブルタイプ 有限会社フチガミ器械）を取り付けた 5 mL 用のシリンジ（テルモ株式会社）を用いた。

2-2-7. プロピオン酸による血中ケトン体濃度低下作用の用量応答性

プロピオン酸 0.19 g および 0.96 g をそれぞれ、純水で溶解した後 20 mL に定容して、0.1 M プロピオン酸溶液および 0.5 M プロピオン酸溶液を調製した。1 M プロピオン酸溶液は 2-2-1 で調製したものを使用した。24 時間絶食させた Wistar 系ラット（体重 220-230 g、 $n=6$ /群）に、プロピオン酸溶液（0.1 M、0.5 M および 1 M）をそれぞれ 2 mL 経口投与し、90 分後に血中ケトン体濃度を測定した。

2-2-8. 血漿アセト酢酸濃度の測定

Wistar 系ラットを 3 群（体重 310-350 g、 $n=6$ /群）に分けた。1 群はプロピオン酸投与前（プロピオン酸投与前群）、残りの 2 群は 1 M プロピオン酸溶液 2 mL を経口投与して 30 分後と 90 分後に、麻酔下で腹部下大静脈から採血管（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）を用いて採血し、10 分間放置後、遠心分離（3000 rpm、20 分間）して血漿を得た。血漿アセト酢酸濃度は、ケトレックス（株式会社三和化学研究所）を用いて測定した。吸光度計は、Ultrostec 2100 pro (Amersham Biosciences、USA) を用いた。麻酔薬は、ソムノペンチル（投与量 100 mg/kg BW、ペントバルビタールナトリウム 64.8 mg/mL、KS 共立製薬株式会社）を用いた。

2-2-9. プロピオン酸の経口投与による血中ケトン体濃度および血糖値の

経時的変化

24 時間絶食させたラットを 2 群（体重 260-300 g、 $n=6$ /群）に分けた。対照群には生理食塩水 2 mL を投与し、他の群には 1 M プロピオン酸溶液 2 mL を投与した。それぞれの群について、投与前、投与後 30 分毎に尾静脈より採血し、血中ケトン体濃度およ

び血糖値を測定した。プロピオン酸投与群では作用の持続性を確認するために投与 300 分後まで測定した。

2-2-10. 統計処理

結果は平均値±SE（標準誤差）で示した。各データの統計処理は、統計処理ソフト SPSS（Ver. 22）を用いた。対応のある実験データの場合は、対応のある t 検定を行い、投与前の値と比較した。対応のない場合は、一元配置分散分析（ANOVA）を行い、有意差がある場合には Tukey-Kramer 法を用いて群間で平均値を比較した。いずれの結果も、危険率が 5 %未満（ $p < 0.05$ ）を有意とみなした。

2-3. 結果

2-3-1. 絶食による血中ケトン体濃度の経時的変化

結果を図 2 に示した。Wistar 系ラットでは絶食 17 時間後で上昇傾向がみられ、以後は時間経過とともに上昇した。絶食 24 時間後には 1.2 mmol/L に達し、絶食 48 時間後には 2.4 mmol/L に上昇した。

2-3-2. SCFAs 溶液の経口投与による血中ケトン体濃度および血糖値の変化

結果を図 3A および 3B に示した。投与前の血中ケトン体濃度あるいは血糖値の個体間の差異を除外するため、溶液投与前の血中ケトン体濃度および血糖値を 100 %として投与後の値の変化率で比較した。血中ケトン体濃度の変化率は、酢酸投与群では 125 %、*n*-酪酸投与群では 238 %であった。一方、プロピオン酸投与群は投与前と比べて 74 %に低下した。血糖値の変化率は、酢酸投与群では 95 %、酪酸投与群では 100 %であった。一方、プロピオン酸投与群は投与前と比べて 125 %に上昇した。

2-3-3. プロピオン酸による血中ケトン体濃度低下作用の用量応答性

結果を図 4 に示した。0.1 M プロピオン酸溶液では、低下作用が認められなかった。0.5 M プロピオン酸溶液では、低下傾向がみられるが有意差は認められなかった（ $p = 0.06$ ）。1 M プロピオン酸溶液は有意な低下が認められ、投与前に比べて 26 %低下した。プロピオン酸溶液の経口投与により、用量依存的に血中ケトン体濃度が低下した。

2-3-4. 血漿アセト酢酸濃度の変化

血漿アセト酢酸の測定結果を図5に示した。プロピオン酸溶液投与前のアセト酢酸濃度は平均 235 $\mu\text{mol/L}$ であったが、プロピオン酸溶液投与 30 分後には 156 $\mu\text{mol/L}$ に低下していた。そして 90 分後でも 180 $\mu\text{mol/L}$ と低い状態が維持されていた。

2-3-5. プロピオン酸の経口投与による血中ケトン体濃度および血糖値の経時的変化

結果を図6および図7に示した。生理食塩水投与群では、血中ケトン体濃度は投与 90 分後でのみ有意に上昇した。血糖値は、投与 30 分後に約 20 mg/dL 上昇した。プロピオン酸溶液投与群では、投与 30 分後には血中ケトン体濃度は有意に低下し、60 分後以降も有意な低下が維持されていた。血糖値は投与 30 分後に有意に上昇し、以後 120 分まで維持していた。投与 300 分後には、血中ケトン体濃度は再び上昇し、血糖値は投与前の値まで低下した。

2-4. 考察

絶食時における血中ケトン体濃度の経時的変化を検討し、血中ケトン体濃度が測定可能になるまでの絶食時間を検討した。絶食 24 時間後の血中ケトン体濃度は、プロピオン酸溶液投与による影響を観察するのに十分にケトン体が生成されていた。以後の実験では、絶食開始時刻を実験前日の 10 : 00 とし、絶食時間を 24 時間と設定した。

絶食により血中ケトン体濃度が上昇したラットにプロピオン酸溶液を経口投与すると、血中ケトン体 (β -ヒドロキシ酪酸) 濃度が低下し、同時に血糖値が上昇することを見出した。ケトン体は、肝臓ミトコンドリアで、アセチル CoA の一部から β -ヒドロキシ- β メチルグルタリル CoA 合成酵素 (HMG-CoA synthetase) により合成される。酢酸投与群および酪酸投与群における血中ケトン体濃度の上昇は、投与した酢酸および n -酪酸より生成されたアセチル CoA の一部がケトン体に合成されたためと考えられる。また、血中ケトン体濃度の上昇率における酢酸投与群と n -酪酸投与群の比は、酢酸 (炭素数 2) と n -酪酸 (炭素数 4) の炭素数の比と一致している。一方、プロピオン酸投与群においては、血中ケトン体濃度が低下した。また、血中ケトン体濃度は、プロピオン

酸の投与量に対して用量依存的に低下した。肝臓では、プロピオン酸代謝の過程で TCA 回路の中間体が供給されるので、アセチル CoA の代謝が促進し、結果としてケトン体合成が抑制され、血中ケトン体濃度の低下に影響した可能性が考えられる。また、プロピオン酸溶液の経口投与により血糖値は上昇したことから、肝外組織への血糖供給に伴い、ケトン体代謝が亢進して血中ケトン体濃度を低下させたとも考えられる。肝外組織でのケトン体代謝ではスクシニル CoA が必要である¹⁰⁾。しかし、消化管から吸収されたプロピオン酸は門脈から肝臓に入ってほとんどが代謝されるため、末梢血液のプロピオン酸濃度は非常に低い¹⁸⁾。それゆえ、プロピオン酸による血中ケトン体濃度低下作用は肝臓でのケトン体合成の抑制ならびに糖新生による肝外組織への血糖供給の結果であると考えられる。

本章では、血中に存在するケトン体の大部分が β -ヒドロキシ酪酸であることから、血中ケトン体濃度の測定は β -ヒドロキシ酪酸を指標として行った。 β -ヒドロキシ酪酸は、体内ではアセト酢酸に変換される¹⁹⁾。プロピオン酸による血中ケトン体濃度低下は、 β -ヒドロキシ酪酸がアセト酢酸に変換されたことによる可能性も考えられた。しかしながら、プロピオン酸溶液投与後のアセト酢酸濃度は、プロピオン酸溶液投与 30 分後には低下し、90 分後も低い状態が維持されていた。プロピオン酸投与後にアセト酢酸濃度の上昇は認められないことから、プロピオン酸による血中ケトン体濃度の低下作用は、 β -ヒドロキシ酪酸がアセト酢酸に変換されたためではないと考えられる。

さらに、プロピオン酸溶液の経口投与後の血中ケトン体濃度と血糖値の経時的変化をみると、プロピオン酸溶液投与直後から血中ケトン体濃度の低下と血糖の上昇が同時に観察されたことから、プロピオン酸の血中ケトン体濃度低下作用には糖新生が関与していることが示唆された。プロピオン酸からの糖新生の過程で生じたホスホエノールピルビン酸がピルビン酸に変換され、TCA 回路で代謝されることが報告されている⁴⁾。また、菊池らは、絶食させたラットにピルビン酸を経口投与すると、肝臓ではグルコース放出の増加とケトン体産生率の低下、肝外組織ではケトン体とグルコースの利用効率が高まることを報告している²⁰⁾。投与したプロピオン酸がピルビン酸に変換されることにより、

肝臓でのケトン体産生の減少と肝外組織でのケトン体の利用が亢進し、血中ケトン体濃度低下作用に寄与している可能性が考えられる。絶食させたラットの肝臓を用いた灌流実験において、プロピオン酸がPDH (Pyruvate dehydrogenase) を活性化し、TCA回路を亢進させることが報告されている²¹⁾。PDHは糖質代謝の調節を担う重要な酵素であり、NAD⁺ (Nicotinamide Adenine Dinucleotide) 依存的にピルビン酸を酸化し、アセチルCoAに変換する²²⁾。プロピオン酸がPDHを活性化したことにより、TCA回路が亢進した結果としてケトン体合成を抑制している可能性も考えられる。

第3章. プロピオン酸溶液投与が血中ホルモン濃度、交感神経および肝外組織での ケトン体代謝に及ぼす影響

3-1. 緒言

第2章において、絶食させたラットにプロピオン酸溶液を経口投与すると、血中ケトン体濃度が低下し、血糖値が上昇することを見出した。プロピオン酸による作用が投与後に短時間で発現する作用であり、同時に血糖上昇も認められたことからホルモンの関与が考えられた。また、絶食により脂肪細胞での脂肪分解が亢進し、血漿 NEFA 濃度が上昇した時にケトン体合成が亢進する。よって、NEFA はプロピオン酸の脂肪分解に及ぼす関与を間接的に推定する指標となる。そこで、プロピオン酸溶液経口投与後の血漿 NEFA 濃度、血漿グルカゴン濃度と血漿インスリン濃度について検討した。

プロピオン酸は GPR41 を介して交感神経を亢進する¹³⁾。GPR41 は SCFA をリガンドする G タンパク質共役型受容体の1つであり、交感神経節、腸分泌細胞および脂肪細胞等に多く発現している。プロピオン酸による血糖上昇作用は交感神経を介したアドレナリン分泌等による作用も考えられる。そこで、プロプラノロールを用いて交感神経抑制下におけるプロピオン酸の作用に及ぼす影響についても検討した。プロプラノロールは β 受容体に結合し、アドレナリンが β 受容体に結合するのを阻害することで交感神経が活性化するのを阻害する²³⁾。

前述したように末梢血中のプロピオン酸濃度は低い。しかしながら、プロピオン酸がスクシニル CoA を供給することで肝外組織でのケトン体代謝を亢進し、血中ケトン体濃度を低下させる可能性は否定できない。そこで、ケトン体の安定同位体である [^{13}C] β -ヒドロキシ酪酸を用いて呼気分析を行い、プロピオン酸のケトン体代謝に及ぼす影響を検討した。 β -ヒドロキシ酪酸は、肝外組織でアセチル CoA に変換され、TCA 回路で酸化されるので、ケトン体分子を構成する炭素由来の CO_2 が呼気へ排泄される。それゆえ、[^{13}C] β -ヒドロキシ酪酸の代謝が亢進している場合、呼気に排出される $^{13}\text{CO}_2$ は増加すると予想された。

3-2. 実験方法

3-2-1. プロピオン酸溶液投与が血漿 NEFA 濃度、血漿グルカゴン濃度および血漿インスリン濃度に及ぼす影響

24 時間絶食させた Wistar 系ラット（体重 240-270 g、 $n=6$ ）を用いた。投与前、1 M プロピオン酸溶液 2 mL を経口投与 30 分後および 90 分後に尾静脈より採血した。血漿 NEFA 濃度は、NEFA C テストワコー（和光純薬工業株式会社）を用いて測定した。吸光度計は、Ultrostec 2100 pro (Amersham Biosciences USA) を用いた。血漿グルカゴン濃度および血漿インスリン濃度は、栄養・病理学研究所（京都）に分析を依頼した。グルカゴンは、QuantikineR ELISA Glucagon (R&D)、インスリンはレビス R インスリン - ラット T（株式会社 シバヤギ）を用いて、それぞれ ELISA 法により測定した。

3-2-2. プロプラノロール投与下でのプロピオン酸溶液経口投与が血中ケトン体濃度低下作用に及ぼす影響

プロプラノロール投与量は、Kimura¹³⁾ らの方法に準じてラットの体重当たり 4 mg/kg とした。プロプラノロール 20 mg を生理食塩水（大塚製薬株式会社）で 10 mL に定容した。24 時間絶食させたラット（体重 170-200 g、 $n=12$ ）を 2 群（ $n=6$ /群）に分け、1 M プロピオン酸溶液 2 mL を経口投与する 10 分前に、プロプラノロール溶液 0.5 mL を腹腔内投与した。1 M プロピオン酸溶液 2 mL を経口投与し、30 分、60 分および 90 分後に血中ケトン体濃度および血糖値を測定した。

3-2-3. プロピオン酸が肝外組織でのケトン体代謝に及ぼす影響

（ $[^{13}\text{C}] \beta$ -ヒドロキシ酪酸-呼気分析法を用いた検討）

(1) 呼気分析（呼気 $\Delta^{13}\text{CO}_2$ ‰測定）

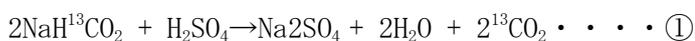
呼気ガス収集装置の構成は、Uchida²⁴⁾ らの機器の一部を変更した若狭ら²⁵⁾ の方法に準じた。側面に空気吸入口と呼気ガス吸引口を設けたデシケーターを用いた。呼気ガス吸引用チューブを、呼気ガス吸引口より外部の吸引ポンプに接続した。吸引速度は、 CO_2 濃度がほぼ一定となる 110 mL/分に設定した。吸引した呼気は、一定時間毎に約 150~200 mL を呼気採取バッグ 20（大塚製薬株式会社）に収集した。赤外線分光分析装置 POC

one (大塚製薬株式会社) を用いて、呼気中の $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ 比から、 $^{13}\text{CO}_2$ (%) の変化量 (以下、 $\Delta^{13}\text{CO}_2$ %) を測定した。基準 CO_2 ガスとして、市販の 95 % O_2 / 5 % CO_2 標準ガスを用いた。

[^{13}C] β -ヒドロキシ酪酸 Na (SODIUM D-3-HYDROXYBUTYRATE, $^{13}\text{C}_4$, 99 %, MW 130.06, $^*\text{C}_4\text{H}_7\text{NaO}_3$, Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) を用いた。24 時間絶食させたラット (体重 270-340 g, $n=6$) をデシケーターに入れて約 30 分間環境に順応させた後、デシケーターから取り出し、15 μmol の [^{13}C] β -ヒドロキシ酪酸溶液 0.1 mL を尾静脈内投与し、続けて 1 M プロピオン酸溶液 2 mL を経口投与した (プロピオン酸溶液投与群)。対照群 ($n=6$) は、 [^{13}C] β -ヒドロキシ酪酸溶液 0.1 mL を尾静脈内投与のみとした。投与後直ちにラットをデシケーター内に戻し、呼気の吸引を開始した。開始時、10 分、20 分、30 分、40 分、50 分、60 分、70 分、80 分、90 分、100 分、110 分、120 分、130 分、140 分、150 分、160 分、170 分、180 分、210 分、240 分、270 分、300 分および 330 分後に呼気を呼気採取バッグに収集し、 $\Delta^{13}\text{CO}_2$ % を測定した。0 分から 330 分間のラットが排出した $^{13}\text{CO}_2$ 出現パターンをグラフ化し、グラフ下面積 (Area under the curve : AUC) を台形法で算出して、 $^{13}\text{CO}_2$ の排出量 (AUC) とした。また、 $\Delta^{13}\text{CO}_2$ % の最大値を C-max とした。

(2) 代謝率の概算方法

代謝率の概算には、重炭酸 Na の中和反応①を利用した若狭の方法²⁶⁾を用いた。



15 μmol [^{13}C] 重炭酸 Na 0.2 mL を希硫酸 0.2 mL に添加した場合の $^{13}\text{CO}_2$ % 出現パターンを曲線としてグラフ化し、AUC を台形法で算出した。この AUC を代謝率 100 % とした。重炭酸 Na の回収率を基準にして以下の式から、 β -ヒドロキシ酪酸の代謝率を求めた。

$$\text{代謝率} = \frac{[\text{C}^{13}] \beta\text{-ヒドロキシ酪酸*の AUC}}{[\text{C}^{13}] \text{重炭酸 Na の AUC}} \times \frac{1}{4} \times 100$$

* : [^{13}C] β -ヒドロキシ酪酸 Na は、分子内の 4 つの炭素がすべて ^{13}C である

3-2-4. 統計処理

2-2-10と同様に各データの統計処理を行った。

3-3. 結果

3-3-1. プロピオン酸溶液投与が血漿 NEFA 濃度、血漿グルカゴン濃度および血漿インスリン濃度に及ぼす影響

結果を図 8 に示した。プロピオン酸溶液投与後の血漿 NEFA 濃度は、有意な差はなかったが減少傾向にあった ($p=0.06$)。血漿グルカゴン濃度および血漿インスリン濃度には、有意な変化は認められなかった。

3-3-2. プロプラノロール投与下でのプロピオン酸溶液経口投与が血中ケトン体濃度低下作用に及ぼす影響

プロピオン酸溶液投与前の血中ケトン体濃度および血糖値を 100 %として投与後の値の変化率で比較した結果を図 9A および 9B に示した。血中ケトン体濃度の経時的変化において、プロピオン酸溶液投与群において投与 30 分、60 分、90 分後に有意な低下が認められた。血糖値の経時的変化では、プロピオン酸溶液投与群において投与 0 分、60 分、90 分後に有意な上昇が認められた。

3-3-3. プロピオン酸が肝外組織でのケトン体代謝に及ぼす影響

($[^{13}\text{C}]$ β -ヒドロキシ酪酸尾静脈内投与による呼気分析法を用いた検討)

結果を図 10 に $[^{13}\text{C}]$ β -ヒドロキシ酪酸の $^{13}\text{CO}_2$ の出現パターンを示した。 $^{13}\text{CO}_2$ の排出パターンに有意な差は認められないが、対照群よりプロピオン酸溶液投与群の方が C-max が高い傾向にあった。また、120 分までの代謝率は増加傾向にあったが、有意差は認められなかった。

3-4. 考察

プロピオン酸の作用は、プロピオン酸溶液投与 30 分後には発現したことから、グルカゴンやインスリンが関与している可能性が考えられた。しかし、血漿グルカゴン濃度には変化がないことから、プロピオン酸溶液投与による血糖上昇は肝臓グリコーゲンの

分解による血糖供給によるものではないことが明らかになった。プロピオン酸により GPCR が刺激され GLP-1 や PYY の分泌が亢進することが報告^{15,16)} されているが、血漿インスリン濃度においても変化がなかった。一方、ラットの脂肪細胞を用いた研究では、プロピオン酸が脂肪分解を抑制することが報告されている²⁷⁾。血漿 NEFA 濃度は、プロピオン酸投与後に低下傾向にあった。この結果は、プロピオン酸投与後に脂肪組織の脂肪分解が低下することを示唆しており、血中ケトン体濃度が低下したことと関係している可能性が考えられる。

Kimura らはプロピオン酸が GPR41 を介して交感神経を亢進することを報告している¹³⁾。プロピオン酸の作用には、交感神経刺激を介したアドレナリン分泌が関与している可能性が考えられた。しかしながら、交感神経抑制下でもプロピオン酸による血中ケトン体濃度低下作用と血糖値上昇作用をともに確認できたことから、交感神経刺激を介した寄与は小さいことが明らかとなった。本研究では、血漿中のアドレナリン濃度は測定していないが、血漿 NEFA 濃度が低下傾向にあったことから、プロピオン酸投与によるアドレナリン分泌の亢進は生じていないと考えられる。それゆえ、プロピオン酸の血糖値上昇作用には、プロピオン酸が糖新生の基質として利用された結果として発現する可能性が高いと考えられる。

さらに、¹³C 呼気分析法によりプロピオン酸の肝外組織におけるケトン体代謝に及ぼす影響を検討した。プロピオン酸溶液投与後に C-max が高くなったことから、肝外組織において [¹³C] β-ヒドロキシ酪酸の代謝がわずかに亢進された可能性はあるが、対照群とプロピオン酸溶液投与群との間に ¹³CO₂ の代謝率 (AUC) の有意な差は認められなかった。この結果は、少なくとも肝外組織でのケトン体代謝に影響を及ぼすような亢進は生じていないことを示唆している。それゆえ、プロピオン酸による血中ケトン体濃度低下作用は、肝外組織でのケトン体代謝の亢進よりも、肝臓でのケトン体合成の抑制による寄与が大きいと考えられる。

第4章. 有機酸溶液投与ならびに糖新生抑制下におけるプロピオン酸溶液投与が 血中ケトン体濃度および血糖値に及ぼす影響

4-1. 緒言

これまでの章では、投与したプロピオン酸から TCA 回路の中間体が供給され、結果としてケトン体合成が抑制される可能性に注目してきた。一方、プロピオン酸溶液投与後には血中ケトン体濃度の低下と血糖上昇が同時に観察されたことから、プロピオン酸の作用には糖新生が関与していることが示唆された。Perry らは、一晩絶食させたラットにプロピオン酸を経口投与すると、肝臓の TCA 回路の中間体濃度が 2-3 倍に増加し、内因性のグルコース産生率が 20~100 %増加したことを報告している³⁾。よって、糖新生が関与していれば TCA 回路の中間体や糖新生の基質となる有機酸やアミノ酸も血中ケトン体濃度を低下させる可能性が考えられる。そこで、クエン酸、 α -ケトグルタル酸、コハク酸、リンゴ酸、オキサロ酢酸、ピルビン酸、乳酸、アラニン、グルタミン酸およびリジンの溶液を経口投与し、血中ケトン体濃度と血糖値に及ぼす影響をプロピオン酸と比較し、糖新生の関与について検討した。

さらに、プロピオン酸の血中ケトン体濃度低下作用と血糖上昇作用に対する糖新生の関与を検討するため、糖新生抑制剤であるメトホルミンを用いて、プロピオン酸の作用に及ぼす影響を検討した。メトホルミンは、乳酸からの糖新生の抑制や細胞での GLUT-4 を介したグルコースの取り込みを促進する糖新生抑制剤である²⁸⁾。

一方、プロピオン酸は、腸管上皮細胞においても糖新生に利用される（腸管糖新生）ことが報告されており¹⁷⁾、プロピオン酸の血糖値上昇作用には腸管糖新生が寄与している可能性が考えられた。そこで、プロピオン酸溶液経口投与後の腸管糖新生の関与についても検討した。

4-2. 実験方法

4-2-1. 有機酸およびアミノ酸溶液の調製

クエン酸 Na 5.16 g、 α -ケトグルタル酸 2.92 g、コハク酸 2.80 g、リンゴ酸 2.68 g、オキサロ酢酸 2.64 g、ピルビン酸 1.80 g、乳酸 2.94 g、アラニン 1.80 g、グルタミン酸 2.94 g およびリジン 2.92 g をそれぞれ純水で溶解し、20 mL に定容して、それぞれの有機酸の 1 M 溶液を調製した。24 時間絶食させたラット（体重 180-270 g、 $n=18$ ）を 3 群（ $n=6$ /群）に分け、1M 溶液を 2 mL ずつ経口投与して、90 分後に血中ケトン体濃度および血糖値を測定した。同じラットに別の試料を投与する場合は 2 日間の間隔を空けた。

4-2-2. 有機酸溶液の経口投与による血中ケトン体濃度および血糖値の変化

24 時間絶食させたラット（体重 180-270 g、 $n=18$ ）を 3 群（ $n=6$ /群）に分け、1M 有機酸溶液を 2 mL ずつ経口投与し、90 分後に血中ケトン体濃度および血糖値を測定した。同じラットに別の有機酸溶液を投与する場合は 2 日間の間隔を空けた。経口投与には、経口ゾンデを取り付けた 5 mL 用のシリンジを用いた。

4-2-3. アミノ酸溶液経口投与による血中ケトン体濃度および血糖値の変化

24 時間絶食させたラット（体重 160-180 g、 $n=12$ ）を 2 群（ $n=6$ /群）に分けた。3 種類（アラニン、グルタミン酸、リジン）の 1 M アミノ酸溶液 2 mL を経口投与して 90 分後に血中ケトン体濃度および血糖値を測定した。繰り返し投与する場合は 2 日間の間隔を空けた。

4-2-4. メトホルミン投与による糖新生抑制の確認

メトホルミン 400 mg を純水 10 mL に溶解した。メトホルミンの投与量は 40 mg に設定した²⁸⁾。メトホルミンの糖新生抑制作用を確認するために、絶食させたラット（体重 230-280 g、 $n=6$ ）に、メトホルミン溶液 (40 mg/mL) 1 mL を経口投与し、30、60 および 120 分後に尾静脈より採血し、血中乳酸濃度を測定した。血中乳酸濃度は、ラクテート・プロ 2（アークレイ株式会社）を用いて測定した。

4-2-5. メトホルミン投与下におけるプロピオン酸溶液投与による血中ケトン体濃度および血糖値の変化

メトホルミン 200 mg あるいは 400 mg を純水 10 mL に溶解した。絶食させたラット（体重 190-220 g、 $n=6$ ）に調製した 20 mg/mL あるいは 40 mg/mL メトホルミン溶液 1 mL を経口投与し、それぞれメトホルミン 20 mg 投与群とメトホルミン 40 mg 投与群とした。メトホルミン投与 10 分後に 1M プロピオン酸溶液 2 mL を経口投与し、投与 30 分および 60 分後に血中ケトン体濃度と血糖値を測定した。

4-2-6. プロピオン酸溶液経口投与後の小腸上皮細胞中のグルコース量、門脈血および腹部下大静脈血のグルコース濃度の測定

24 時間絶食させたラット（体重 260-310 g、 $n=6$ ）に、生理食塩水あるいは 1 M プロピオン酸溶液 2 mL を経口投与した。投与 60 分後、ペントバルビタール麻酔下で正中線に沿って開腹し、門脈および腹部下大静脈から採血管（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）を用いて採血し、10 分間放置後、遠心分離（3000 rpm、20 分間）して血漿を得た。さらに、小腸を摘出後に二等分して、小腸上部側末端から約 5 cm の断片を採取し、それを反転させた。カバーガラスを用いて反転小腸断片の粘膜上皮細胞を採取し、遠沈管に回収した。遠沈管に冷純水 3 mL を加えた後、ポリトロンで粉碎し、10 % TCA 溶液 2 mL を加え静置した。10 分後、遠心分離（3000 rpm、5 分間）して上清を得た。血漿および上清のグルコース濃度は、グルコース CII テストワコー（和光純薬工業株式会社）を用いて測定した。

4-2-7. 統計処理

2-2-10 と同様に各データの統計処理を行った。

4-3. 結果

4-3-1. 有機酸溶液の経口投与による血中ケトン体濃度および血糖値の変化

溶液投与前の血中ケトン体濃度および血糖値を 100 % として、投与後の値の変化率で比較した結果を図 11 に示した。TCA 回路の中間体のうち、クエン酸投与群および α -ケトグルタル酸投与群においては、血中ケトン体濃度の低下および血糖値の上昇は認められなかった。これに対し、コハク酸投与群、リンゴ酸投与群およびオキサロ酢酸投与

群では血中ケトン体濃度は有意に低下したが、血糖値の上昇は認められなかった。ピルビン酸投与群と乳酸投与群は、プロピオン酸と同様に血中ケトン体濃度の低下と血糖値の上昇が認められた。

4-3-2. アミノ酸溶液経口投与による血中ケトン体濃度および血糖値の変化

溶液投与前の血中ケトン体濃度および血糖値を 100 %として、投与後の値の変化率で比較した結果を図 12 に示した。糖原性のアラニン投与群では、血中ケトン体濃度は有意に低下し、血糖値は有意に上昇していた。これに対し、糖原性のグルタミン酸投与群では、血中ケトン体濃度と血糖値ともに有意な変化は認められなかった。ケト原性アミノ酸のリジン投与群では、投与後血中ケトン体濃度はわずかに低下し、血糖値は有意に低下した。

4-3-3. メトホルミン投与による糖新生抑制の確認

結果を図 13 に示した。メトホルミン 40 mg 投与後、血中乳酸濃度は時間経過とともに上昇し、投与 30 分以後は投与前と比べて、有意に上昇した。

4-3-4. メトホルミン投与下におけるプロピオン酸溶液投与による血中ケトン体濃度および血糖値の変化

プロピオン酸溶液投与前の血中ケトン体濃度および血糖値を 100 %として、投与後の値の変化率で比較した結果を図 14 に示した。メトホルミン 20 mg 投与群において、プロピオン酸溶液投与により血中ケトン体濃度は低下し、血糖値は上昇した。この変化は投与 60 分後も維持されていた。メトホルミン 40 mg 投与群では、プロピオン酸溶液投与 30 分後に血中ケトン体濃度は低下し、血糖値は上昇した。投与 60 分後には、血中ケトン体濃度の低下と血糖値の上昇が小さくなった。

4-3-5. プロピオン酸溶液経口投与後の小腸上皮細胞中のグルコース量、門脈血および腹部下大静脈血のグルコース濃度の測定

結果を図 15A および 15B に示した。小腸断片あたりの上皮細胞内のグルコース量は生理食塩水投与群とプロピオン酸投与群との間に有意な差は認められなかったが、門脈血

と腹部下大静脈血の血糖値は生理食塩水投与群とプロピオン酸投与群との間に有意な差が認められた。

4-4. 考察

4-3-1 および 4-3-2 の結果を一覧表にまとめて表 2 に示した。TCA 回路の中間体（クエン酸、 α -ケトグルタル酸、コハク酸、リンゴ酸、オキサロ酢酸）のうち、スクシニル CoA 以降の中間体であるコハク酸、リンゴ酸およびオキサロ酢酸には血中ケトン体濃度低下作用が確認されたことから、プロピオン酸による血中ケトン体濃度低下作用にはこれらの TCA 回路の中間体の供給が関与していると考えられる。しかしながら、本章で検討した有機酸の中では、プロピオン酸と同様に血中ケトン体濃度の低下と血糖値の上昇の両方が認められたのは、TCA 回路の中間体ではなく、糖新生に利用されて血糖を供給する乳酸とピルビン酸であった。また、ピルビン酸に変換するアラニンにもプロピオン酸と同様の作用が認められた。乳酸は Coli 回路、アラニンはグルコース-アラニン回路によりピルビン酸を介して糖新生に利用され、血糖を供給する。これら結果は、プロピオン酸の血中ケトン体濃度低下作用には糖新生が関与していることを強く示唆している。

しかし、疑問も残る。肝臓では、プロピオン酸がスクシニル CoA に変換された後にリンゴ酸となって細胞質に移動し、リンゴ酸を経てオキサロ酢酸となり、オキサロ酢酸が PEPCK (Phosphoenolpyruvate carboxykinase) によって脱炭酸されてホスホエノールピルビン酸に変換され、糖新生に利用される。よって、コハク酸、リンゴ酸およびオキサロ酢酸も糖新生の基質となりうるが、血糖上昇は認められなかった。コハク酸、リンゴ酸およびオキサロ酢酸は炭素数 4 (C4) の化合物であり、血糖上昇作用のあったピルビン酸、乳酸、アラニン、そしてプロピオン酸はいずれも炭素数 3 (C3) の化合物である。血糖上昇作用には C3 の有機酸であることが重要な要因である可能性がある。また、投与したクエン酸は α -ケトグルタル酸に変換され、アミノ酸分解に伴うアミノ基処理に利用された可能性も考えられる。絶食によりラットは飢餓状態であったため、筋

肉中のタンパク質分解によりアミノ酸からのエネルギー供給が増加していたと考えられる。筋肉では、タンパク質中の分岐鎖アミノ酸（バリン・ロイシン・イソロイシン）が分解されるが、アミノ基はアミノ基転移反応によってピルビン酸に移されてアラニンが生じる。アラニンは血中に放出されて肝臓に運ばれた後、糖新生のためにアミノ基転移反応を受ける。このとき、アラニンのアミノ基が ALT (Alanine transaminase) によって α -ケトグルタル酸に転移し、グルタミン酸が生成される。この α -ケトグルタル酸は TCA 回路から供給される。つまり、ラットに投与したクエン酸および α -ケトグルタル酸は、肝臓でのアミノ基処理に利用されたことで、血中ケトン体低下作用と血糖上昇作用がみられなかった可能性が考えられる。

プロピオン酸の作用と糖新生との関与を検討するために、糖新生抑制剤であるメトホルミン投与下におけるプロピオン酸の作用について検討した。なお、40 mg のメトホルミン投与により血中乳酸濃度が上昇したことから糖新生が抑制されていることを確認した。予備実験においても、24 時間絶食させたラットにメトホルミン 40 mg を投与すると、経時的な血糖値低下が観察され、糖新生抑制作用を確認している（データは示していない）。メトホルミン 40 mg 群では、プロピオン酸溶液投与により、血中ケトン体濃度の低下と血糖値の上昇が小さくなった。この結果は、糖新生が抑制されるとプロピオン酸の作用が小さくなることを示している。すなわち、プロピオン酸からの糖新生が抑制されて血糖の供給が減少したことにより、ケトン体合成に対する抑制が弱まったため血中ケトン体濃度低下作用が小さくなったと考えられる。

一方、プロピオン酸は腸管上皮細胞においても糖新生に利用される¹⁷⁾。そこで、投与したプロピオン酸が腸管上皮細胞で糖新生に利用され、血糖上昇に寄与している可能性について検討した。小腸断片あたりの上皮細胞のグルコース量に、プロピオン酸投与の影響は認められなかった。しかし、門脈血と腹部下大静脈血においてプロピオン酸投与群で血糖値が有意に上昇した。これは、腸管上皮細胞で糖新生により生成されたグルコースが血中に流入し、血糖値を上昇させたことを示唆している。また、プロピオン酸は腸管糖新生により、肝門部の上流に局在しているグルコースセンサーを活性化し^{29,30)}、

インスリン感受性を向上させ、耐糖能を改善することが報告されている¹⁷⁾。プロピオン酸による血中ケトン体濃度低下作用は、細胞への血糖取り込みが亢進し、結果としてケトン体代謝が亢進されていることが寄与している可能性も考えられる。

以上の結果より、プロピオン酸の血中ケトン体濃度低下作用には糖新生の亢進が関与していることが明らかになった。

第5章. プロピオン酸投与が *C. elegans* の持久力に及ぼす影響

5-1. 緒言

第4章において、プロピオン酸の血糖値上昇作用と血中ケトン体濃度低下作用には糖新生が関与することを明らかにした。このプロピオン酸の代謝特性から、運動時にプロピオン酸を摂取することで血糖が供給され、結果的に肝臓グリコーゲンの消費はもちろん筋グリコーゲンの消費も抑制すると考えられる。Jonathan らは、マウスにプロピオン酸を直腸投与すると持久力が向上することを報告している³¹⁾。彼らは、持久力を向上させるメカニズムについて、プロピオン酸がエネルギーとして利用されていること、あるいは運動により筋肉で発生する炎症をプロピオン酸が抑制していることによると指摘している。しかしながら、プロピオン酸が持久力を向上させるメカニズムについては、詳細には解明されていない。そこで、モデル実験動物として線虫 (*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*) を用いて、プロピオン酸が持久力に及ぼす影響について検討した。

線虫は、体長は約 1 mm ほどの透明な体をしており、筋肉、神経、表皮、消化管等、基本的な体制をもっている。横紋筋からなる体壁筋は、脊椎動物の骨格筋と同様に機能するため、運動を研究するためのモデル生物としても用いられている^{32,33)}。線虫の運動能力は、液体中あるいは寒天培地上でのむち打ち運動で評価することができる³²⁾。本研究では、むち打ち運動の頻度を持久力の評価に用いた。また、*C. elegans* の全ゲノムは既に解明されており³⁴⁾、その内の約 60 %がヒトと相同な遺伝子であることが明らかになっている。特に、*C. elegans* のエネルギー代謝酵素に関わる遺伝子は、ヒトと相同性が高く、ヒトのエネルギー代謝酵素と同様な機能を有することが報告されている³⁵⁾。そのため、哺乳類はもちろんヒトのエネルギー代謝メカニズムを検討するために、遺伝的解析が容易なモデル生物として利用されている。一方、プロピオン酸を投与した線虫では、TCA 回路の代謝亢進による酸化的リン酸化の増加、あるいはその両方によって活性酸素量が増加していると考えられる。それゆえ、プロピオン酸を投与された線虫は、抗酸化遺伝子の発現が上昇している可能性も考えられる。そこで、糖質代謝、脂肪酸代

謝およびβ酸化に関連する遺伝子の発現とともに、抗酸化遺伝子の発現についても検討した。

5-2. 実験方法

5-2-1. 使用した大腸菌および培地

線虫の飼料として、*E. coli* (*Escherichia. coli*) OP50 株を用いた。使用する際は LB 培地 (LB Broth Base) で一晚培養 (37°C) した。

(1) NGM (Nematode Growth Media)

塩化ナトリウム 3.0 g、ペプトン 2.5 g、寒天 17.0 g および脱イオン水 975 mL を三角フラスコに入れて混合し、オートクレーブで加熱滅菌した。滅菌後、1M 塩化カルシウム溶液 1.0 mL、1M 硫酸マグネシウム溶液 1.0 mL、1M リン酸緩衝液 (pH 6.0) 25 mL、コレステロール溶液 (5 mg/mL) 1 mL を加え攪拌した。そして、メスピペットで 10 mL ずつシャーレ (90 mm) に分注し、常温で静置した。

5-2-2. 線虫の系統と培養方法

Caenorhabditis Genetic Center (CGC、ミネソタ大学、アメリカ) から分与された *C. elegans* 野生型 N2 を使用した。*E. coli* OP50 を塗布した NGM (Nematode Growth Media) 培地で 20 °C で培養した。継代を行う場合は、線虫を培養した NGM 培地をマイクロスパーテルで 0.5-1 cm 角に切り取り、新しい NGM 培地に切り取った切片を移し 20 °C で培養して継代した。1 ヶ月以内に継代を行った。

5-2-3. 使用した試薬および溶液の調製

(1) M9 buffer

脱イオン水 985 mL にリン酸二ナトリウム 6.0 g、リン酸二水素カリウム 3.0 g および塩化ナトリウム 5.0 g を加えた。オートクレーブで加熱滅菌後、1M 硫酸マグネシウム溶液 1.0 mL を加えた。試薬は、特級試薬 (富士フィルム和光純薬株式会社製) を用いた。

(2) 同調化用次亜塩素酸ナトリウム溶液

5 % 次亜塩素酸ナトリウム溶液 40 mL、5 M 水酸化ナトリウム溶液 10 mL、脱イオン水 50 mL を混合した。

5-2-4. *C. elegans* の同調化

継代し NGM 培地で 3 日間培養した線虫を M9 buffer で遠心チューブ (15 mL) に回収した。2000 rpm で 1 分間遠心分離し、遠心チューブ内の残液が 1 mL になるように上清を捨て、同調化用次亜塩素酸ナトリウム溶液を 2.5 mL 加えた。5 分間、遠心チューブを振とうし、線虫を粉砕して体内の卵を分離した。次いで、2000 rpm で 1 分間遠心分離し、遠心チューブ内の残液が 1 mL になるように上清を捨て、M9 buffer を 5 mL 加え、再び 2000 rpm で 1 分間遠心分離した。この洗浄操作を 3 回繰り返す、次亜塩素酸ナトリウムを除去した。その後、遠心チューブ内の残液が 1 mL になるように上清を捨て、20°C で静置した。

5-2-5. むち打ち運動の測定方法

むち打ち運動の測定は、Lüersen らの方法に準じて行った³³⁾。1 匹の線虫を M9 buffer で満たしたシャーレ (60 mm) で 2 分間泳がせ、線虫に付着している *E. coli* OP50 を取り除いた。線虫を 30 μ L の M9 buffer とともに、ホールスライドガラス (ϕ 14~15 mm \times 0.6 mm) に移し、ホールスライドガラス上で順応させるために、線虫を 1 分間泳がせた。温水を還流させたシリコンチューブを巻き付けたプラスチック製の円筒でホールスライドガラス上の測定部分を囲んで 20°C に維持し、むち打ち運動への外気温度の影響を除外した。むち打ち運動は、SZX-7 顕微鏡 (OLYMPUS、日本) に取り付けられたオリンパス DP22 カメラ (OLYMPUS、日本) を使用して記録した。映像は毎秒 20 フレームで 1 分間記録した。線虫が 30 秒間連続してむち打ち運動をしている場面を抜粋し、むち打ち運動の回数を数えた。1 回のむち打ちは、線虫の頭の向きが正中線を境に右あるいは左側に向いた瞬間を 1 回とした。むち打ち運動は 1 秒間のむち打ち運動の回数 (回/秒) で比較した。

5-2-6. むち打ち運動に対するプロピオン酸投与量の用量応答

同調化後、孵化した L1 世代の幼虫 (L1 線虫、約 300 匹) を *E. coli* OP50 を塗布した NGM プレート上で 4 日間培養した。線虫が young adult (L4 世代から約 10 時間後の抱卵していない成虫期) に成長したのを確認し、線虫を M9 buffer で回収してから洗浄した。遠心チューブ内の残液が 1 mL になるように上清を捨て、プロピオン酸の最終濃度がそれぞれ、1、5、10、20、40 および 80 mM になるよう加え、全体液量が 5 mL になるように M9 buffer で調製した後、16 時間培養した。培養終了後に、M9 buffer を添加し、遠心分離 (2000 rpm、1 分間) した後、遠心チューブ内の残液が 1 mL になるように上清を捨てた。この操作を 3 回繰り返して線虫に付着したプロピオン酸を洗浄した。なお、線虫の回収および洗浄は、以後の実験操作においても同様に行った。その後、むち打ち運動を測定した。

5-2-7. プロピオン酸投与がむち打ち運動に及ぼす影響

5-2-6 と同様にして、線虫が young adult に成長したのを確認し、M9 buffer で線虫を遠心チューブ (15 mL) に回収してから洗浄した。遠心チューブ内の残液が 1 mL になるように上清を捨て、10 mM プロピオン酸溶液、*E. coli* OP50 懸濁液あるいは両方を加え、全体量が 5 mL になるように M9 buffer で調製した後、20 °C で 16 時間培養した。培養条件によって以下の 4 つの群に分けた。M9 buffer のみで培養した線虫を M9 群、プロピオン酸を含む M9 buffer で培養した線虫を PA 群、*E. coli* OP50 を含む M9 buffer で培養した線虫を OP50 群、プロピオン酸と *E. coli* OP50 を含む M9 buffer で培養した線虫を OP50+PA 群とした。培養終了後、M9 buffer で線虫を洗浄し、むち打ち運動を測定した。

5-2-8. プロピオン酸投与が *C. elegans* のグリコーゲン蓄積に及ぼす影響

(ヨウ素染色法による確認)

グリコーゲンの染色方法は、LaMacchia らの方法に準じて行った³⁶⁾。同調化後、孵化した L1 線虫 (500 匹) を *E. coli* OP50 を塗布した NGM 培地で培養した。3 日後、線虫が L4 世代に成長したのを確認し、M9 buffer で遠心チューブに回収した。回収した線虫を、M9 buffer のみで培養した群 (M9 群)、10 mM プロピオン酸を含む M9 buffer で

培養した群（10 mM PA 群）、40 mM プロピオン酸を含む M9 buffer で培養した群（40 mM PA 群）に分けた。さらに、ポジティブコントロールとして 5 % グルコース溶液で培養した群（Glc 群）を設けた。これらの 4 群をそれぞれの条件で 24 時間培養した後、グリコーゲン蓄積量をヨウ素染色法で比較した。それぞれの群の線虫をシャーレ（60 mm）に作成した NGM 培地（2 mL、*E. coli* OP50 は塗布していない）に移した。染色する際は、線虫が存在する部分を培地ごと切り出し、スライドガラスに移した。ヨウ素（和光純薬工業株式会社）の試薬ボトルの蓋を開け、蓋口にスライドガラスが被さるように置き、ヨウ素蒸気に 60 秒間曝露した。染色写真は、BX-50 顕微鏡（OLYMPUS、日本）に取り付けられたオリンパス DP22 カメラ（OLYMPUS、日本）を使用して、ヨウ素蒸気の曝露から 60 秒後に撮影した。

5-2-9. プロピオン酸投与が *C. elegans* のグリコーゲン蓄積量に及ぼす影響

同調化後、孵化した L1 線虫（500 匹）を *E. coli* OP50 を塗布した NGM 培地で培養した。3 日後、線虫が L4 世代に成長したのを確認し、M9 buffer で遠心チューブに回収した。回収した線虫を、M9 buffer のみで培養した群（M9 群）、10 mM プロピオン酸を含む M9 buffer で培養した群（10 mM PA 群）、40 mM プロピオン酸を含む M9 buffer で培養した群（40 mM PA 群）に分けた。さらに、ポジティブコントロールとして 5 % グルコース溶液で培養した群（Glc 群）を設けた。これらの 4 群をそれぞれの条件で 24 時間培養した後、グリコーゲン蓄積量を測定した。線虫を M9 buffer で洗浄し上清を捨てた後、チューブ（1.5 mL）に線虫を移し、超純水を加え、全体液量が 100 μ L になるように調製した。超音波処理機（CHO-ONPA KOGYO）で線虫を粉碎し、5 分間煮沸した後、13500 rpm で 5 分間遠心分離した。上清はグリコーゲン測定に用いた。沈殿物は M9 buffer で調製した 8 M 尿素溶液で溶解し、タンパク質測定に用いた。グリコーゲン量は Glycogen assay kit（SIGMA）を用いて測定し、タンパク質量は TaKaRa BCA protein assay kit（TaKaRa）を用いて測定した。

5-2-10. *C. elegans* の培養条件、total RNA 抽出および cDNA 合成方法

同調化した L1 幼虫を *E. coli* OP50 を塗布した NGM プレート上で培養した。3 日後、線虫が L4 世代に成長したのを確認し、M9 buffer を用いて線虫を遠心チューブに回収した。M9 buffer を用いて *E. coli* OP50 を洗浄し、遠心分離した後、遠心チューブ中の液量が 1 mL になるように上清を捨て、残液を RNA 抽出用線虫懸濁液とした。新しい遠心チューブ (15 mL) に RNA 抽出用線虫懸濁液を 200 μ L (約 300 匹)、100 mM プロピオン酸溶液を 100 μ L、あるいは 400 μ L を加え、M9 buffer で全体液量 1.0 mL になるように調製し、20°C で 16 時間培養した。M9 buffer のみで培養した線虫を対照群とした。培養終了後、M9 buffer でプロピオン酸を洗浄除去した。RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて、線虫懸濁液から Total RNA を抽出した。ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を用いて、抽出した RNA (200 μ g) を鋳型に cDNA 合成を行った。

5-2-11. 半定量的遺伝子発現の解析

PCR チューブに EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix (タカラバイオ株式会社) 12.5 μ L、Primer 混合液 2 μ L、5-2-10 に準じて調製した cDNA 3 μ L、および超純水 7.5 μ L を混合した。Primer 混合液は forward primer と reverse primer それぞれ 10 μ L と超純水 80 μ L を混合し調製した。サーマルサイクラーの温度サイクルは、94°C を 2 分間、その後、denaturation temperature として 94°C を 30 秒間、annealing temperature として 55°C を 30 秒間、elongation temperature として 72°C を 1 分間までを 1 サイクルとし、30 回繰り返した。

ゲル溶媒および泳動槽溶媒は 0.5×TBE (Tris-HCl/ホウ酸/EDTA) を用いた。ビーカーにアガロース 0.1 g に対し 0.5×TBE が 10 mL になるように混合し、加熱攪拌した。攪拌後、ゲルレッド 1 μ L/100 mL を寒天溶液に加え、コームを設置した型に流し込み 30 分間放置した。ゲル化したアガロースゲルを 0.5×TBE で満たした泳動槽に移し、試料溝に 100 bp DNA ladder (タカラバイオ株式会社) を 3 μ L、PCR 産物を 3 μ L を分注した。泳動は 135 V で 20 分間行った。泳動後、WSE-5300 プリントグラフ CMOS I (ATTO) でバンドの撮影を行った。バンドの濃淡を画像解析ソフト ImageJ により定量化した。

5-2-12. プロピオン酸投与が糖質代謝酵素遺伝子および脂肪酸代謝酵素遺伝子の

発現に及ぼす影響

5-2-10 と 5-2-11 に準じて、線虫の培養、total RNA 抽出および cDNA 合成を行い、半定量的 RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) 法により遺伝子発現を検討した。primer には、グルコース代謝酵素遺伝子 (*pfk-1.2*, *pck-1*, *gsy-1*, *pyg-1*)、トレハロース代謝関連遺伝子 (*tps-1*, *tps-2*, *gob-1*, *tre-1*, *tre-2*, *tre-3*)、脂肪酸合成に関わる酵素および脂肪酸分解に関わる酵素遺伝子 (*pod-2*, *fasn-1*, *atgl-1*, *cpt-1*, *cpt-5*, *acs-2*, *acs-22*, *nhr-49*) を用いた。

5-2-13. プロピオン酸投与が β 酸化酵素遺伝子の発現に及ぼす影響

5-2-10 と 5-2-11 の方法に準じて、線虫の培養、total RNA 抽出および cDNA 合成を行い、RT-PCR 法により遺伝子発現を検討した。primer には、 β 酸化関連酵素遺伝子 (*ech-1.1*, *hacd-1*, *acdh-1*) を用いた。

5-2-14. プロピオン酸投与が抗酸化遺伝子の発現に及ぼす影響

5-2-10 と 5-2-11 に準じて、線虫を培養し、total RNA 抽出および cDNA 合成を行い、RT-PCR 法により遺伝子発現を検討した。primer には抗酸化遺伝子 (*sod-1*, *sod-3*, *ctl-1*, *gst-4*, *gcs-1*, *gsk-3*, *ucp-4*) を用いた。

5-2-15. 統計処理

2-2-10 と同様に各データの統計処理を行った。いずれの結果も、危険率が 5 %未満 ($p < 0.05$) を有意とみなした。

5-3. 結果

5-3-1. むち打ち運動に対するプロピオン酸投与量の用量応答

M9 群に対するむち打ち運動回数の変化率で比較した結果を図 16 に示した。M9 群に比べて、すべてのプロピオン酸濃度で有意にむち打ち運動の頻度が多かった。プロピオン酸濃度に対して、むち打ち運動の頻度は用量応答的に増加した。

5-3-2. プロピオン酸投与がむち打ち運動に及ぼす影響

M9 群に対するむち打ち運動回数の変化率で比較した結果を図 17 に示した。PA 群、OP50 群および OP50+PA 群のむち打ち運動の頻度は、M9 群のむち打ち運動の頻度より有意に多かった。OP50 群のむち打ち運動の頻度が最も多くなった。

5-3-3. プロピオン酸投与が *C. elegans* のグリコーゲン蓄積に及ぼす影響

(ヨウ素染色法による確認)

ヨウ素染色後の写真を図 18 に示した。M9 群に比べて、PA 群では濃く染色された部分が多く観察され、特に 40mM PA 群の咽頭付近の筋組織では赤く濃い染色部分が観察された (図中に赤い矢印で示した)。

5-3-4. プロピオン酸投与が *C. elegans* のグリコーゲン蓄積量に及ぼす影響

結果を図 19 に示した。M9 群と比べて、10 mM PA 群ではグリコーゲン蓄積量に有意な差は認められなかったが、40 mM PA 群ではグリコーゲン蓄積量が有意に増加した。

5-3-5. プロピオン酸投与が糖質代謝酵素遺伝子の発現に及ぼす影響

M9 群の遺伝子発現に対する変化率で表した結果を、図 20A、図 20B、図 21A および図 21B に示した。10 mM PA 群において、*pfk-1.2* および *tre-2* の発現が有意に上昇した。一方で、*pck-1* の発現が有意に減少した。他の遺伝子には有意な変化は認められなかった。40 mM PA 群において、*pfk-1.2* の発現に減少傾向が認められた。*pyg-1* および *tre-2* は発現が有意に上昇し、*pck-1* および *tre-3* は発現が有意に低下した。他の遺伝子には有意な変化は認められなかった。

5-3-6. プロピオン酸投与が脂肪酸代謝酵素遺伝子の発現に及ぼす影響

M9 群の遺伝子発現に対する変化率で表した結果を、図 22A、図 22B および図 22C に示した。10 mM PA 群において、*atgl-1* の発現が有意に上昇した。40 mM PA 群においては、遺伝子発現の有意な変化は認められなかった。

5-3-7. プロピオン酸投与が β 酸化酵素遺伝子の発現に及ぼす影響

M9 群の遺伝子発現に対する変化率で表した結果を、図 23 に示した。10 mM PA 群において *ech-1.1* の発現が有意に低下したが、40 mM PA 群においては *hacd-1* の発現が有意に低下した。他の遺伝子には有意な変化は認められなかった。

5-3-8. プロピオン酸投与が *C. elegans* の抗酸化遺伝子の発現に及ぼす影響

M9 群の遺伝子発現に対する変化率で表した結果を図 24A、図 24B および図 24C に示した。M9 群の遺伝子発現に対する変化率でプロピオン酸投与群の発現を比較した。10 mM PA 群および 40 mM PA 群において、*sod-3* の発現が有意に上昇した。他の遺伝子には有意な変化は認められなかった。

5-4. 考察

本章では、プロピオン酸の投与が持久力に及ぼす影響を、線虫のむち打ち運動の頻度を指標に評価した。むち打ち運動の頻度が、プロピオン酸量に対して用量応答的に増加する傾向にあったことから、プロピオン酸が優先的にエネルギーに利用されたことが示唆された。プロピオン酸投与により、むち打ち運動の頻度は有意に増加した。この結果は、*E. coli* OP50 摂取による持久力の向上には劣るが、プロピオン酸の摂取により持久力が向上すること示唆している。

ほ乳類と同様に、*C. elegans* においても過剰な糖（グルコース）はグリコーゲンとして貯蔵される³⁷⁾。線虫は糖質をトレハロースとしても貯蔵するが³⁸⁾、通常その量はグリコーゲンの貯蔵量よりも少ない³⁹⁾。それゆえ、線虫においても、グリコーゲンは運動時および絶食時の主なエネルギー源となる。ヨウ素染色で線虫体内のグリコーゲンを染色すると、M9 群では染色部位はほとんど観察されなかったが、10 mM PA 群では染色部位が観察され、40 mM PA 群では咽頭付近の筋組織に濃い染色が観察された。この結果と一致して、測定されたグリコーゲン量は、M9 群に比べて 40 mM PA 群で有意に多かった。しかしながら、プロピオン酸の投与によるグリコーゲン合成酵素遺伝子 *gsy-1* の発現上昇は認められなかったことから、糖新生により供給されたグルコースがグリコーゲンの合成に利用された可能性は小さいと考えられる。これに対して、プロピオン酸を投与した線虫において、解糖系酵素遺伝子である *pfk-1.2* の発現が上昇した。*pfk-1.2* はヒトの PFK (Phosphofructokinase) のオルソログであり、フルクトース 6-リン酸のフルクトース 1,6-二リン酸へのリン酸化を触媒する解糖系代謝の律速酵素の一つである⁴⁰⁾。また、トレハロースの代謝酵素遺伝子である *tre-2* の発現も有意に上昇した。*tre-2*

はヒトの TREH (Trehalase) のオルソログであり、トレハロースを 2 分子のグルコースに分解する酵素である。線虫は糖新生の酵素であるグルコース 6-ホスファターゼを有していないため、糖新生ではトレハロースの分解を介してグルコースが生成される。これらの結果は、プロピオン酸によりトレハロースの分解が亢進してグルコースが生成され、結果的に解糖系が亢進することを示唆している。プロピオン酸によるむち打ち運動頻度の増加は、プロピオン酸が糖新生を介してグルコースを供給し、そのグルコースが体内に貯蔵されているグリコーゲンより優先的にエネルギーとして利用されることによるものであり、結果として体内のグリコーゲン蓄積量が維持されたことから持久力が向上したと考えられる。

C. elegans の脂質のほとんど (トリグリセリド、リン脂質、スフィンゴ脂質など) は大腸菌から吸収した脂肪酸で構成され⁴¹⁾、このうち乾燥体重の最大 35 % を占めるトリグリセリド (総脂質の約 40-55 %) が主要なエネルギー貯蔵分子となる⁴²⁾。そこで、プロピオン酸による脂肪酸代謝および β 酸化に関連する遺伝子発現に及ぼす影響についても検討した。10 mM PA 群では β 酸化酵素遺伝子の *ech-1.1*、40 mM PA 群では *hacd-1* の発現が有意に低下していた。これらの結果は、プロピオン酸が β 酸化系を抑制したことを示唆しており、脂肪酸分解が間接的に抑制されたと考えられる。Heimann らは、プロピオン酸が抗脂肪分解効果を持つことを報告している²⁷⁾。本実験の結果より、プロピオン酸が脂肪分解を抑制するように作用し、残存脂肪蓄積量が多くなることで、持久力が向上することも考えられる。プロピオン酸による脂肪蓄積量への影響については、今後の検討課題である。

脂肪酸からのエネルギー産生の低下は、グルコースからのエネルギー産生が亢進した結果として起こるので、プロピオン酸投与により解糖系酵素遺伝子である *pfk-1.2* の発現が上昇したと一致している。プロピオン酸による β 酸化酵素遺伝子 (*ech-1.1* および *hacd-1*) と解糖系酵素遺伝子の発現に対する作用は、プロピオン酸がエピジェネティックに作用した結果であり、プロピオン酸の作用機序を解明するうえで大変興味深い。本章の結果より、プロピオン酸が β 酸化酵素遺伝子の発現を抑制して脂肪酸分解に対し

て抑制的に作用することが明らかとなった。第2章から第4章までのラットにおける研究において、プロピオン酸の血中ケトン体濃度低下作用は肝臓でのケトン体合成の抑制と肝外組織への血糖供給によって生じており、いずれもプロピオン酸からの糖新生の関与が示唆された。すなわち、糖新生によってグルコースが供給されると肝臓での脂肪酸分解が抑制され、結果としてケトン体合成が抑制され、血中ケトン体濃度が低下する。線虫の遺伝子発現に対するプロピオン酸投与の効果は、ラットを用いた実験の結果と一致している。

ヒトにおいて、運動時の持久力向上方法としてグリコーゲンローディング法が用いられているが、肝臓と筋肉に貯蔵できるグリコーゲン量は限られているため、マラソンやトライアスロン等の持久性運動ではグリコーゲンが枯渇してしまう可能性がある⁴³⁾。そのため、持久性運動を持続させるためには、運動時のグルコース濃度を安静値に維持し、グリコーゲンの消費を抑制することが重要である⁴⁴⁾。本章では、プロピオン酸が糖新生によるグルコース供給を介してグリコーゲン消費を抑制することが明らかとなり、持久性運動においてパフォーマンスを向上させる可能性が考えられた。

C. elegans において、運動が体壁筋内のミトコンドリアの加齢に伴う形態変化を保護することが報告されている⁴⁵⁾。プロピオン酸は線虫のむち打ち運動の頻度を上昇させたことから、ミトコンドリア機能にも影響を及ぼすことが考えられる。また、プロピオン酸を投与した線虫では、活動量の増加、TCA回路の代謝亢進による酸化的リン酸化が増加、あるいはその両方によって活性酸素量が増加し、抗酸化遺伝子の発現上昇を誘導することが考えられた。抗酸化遺伝子においては、10 mM および 40 mM プロピオン酸により *sod-3* の発現が有意に上昇していた。*sod-3* はヒトの SOD-2 (Superoxide dismutase-2) のオルソログであり、ミトコンドリア内で活性酸素の除去を行う酵素の遺伝子である。*sod-3* の発現は、転写因子である DAF-16/FOXO により調節されている⁴⁶⁾。通常状態にある線虫では、DAF-16/FOXO はリン酸化されており、細胞質内に留まっている。これに対して、飢餓状態あるいは環境ストレス等により DAF-16 が脱リン酸化され、核内に移行して転写が促進されると、*sod-3* の発現が上昇することが報告されている^{47,48)}。M9 群は、

培養液中にエネルギー基質が含まれないため飢餓に近い状態であったと考えられる。M9 群より PA 群において *sod-3* の発現が有意に上昇していたのは、プロピオン酸がエネルギー基質として代謝されることにより、ミトコンドリア内で発生した活性酸素を除去するためと考えられる。この結果から、投与したプロピオン酸が抗酸化効果をもたらすことが示唆された。

第6章. プロピオン酸投与が *C. elegans* の抗酸化能ならびに寿命に及ぼす影響

6-1. 緒言

第5章では、プロピオン酸投与により、ミトコンドリア内で生じた活性酸素を除去する酵素の遺伝子である *sod-3* の発現が有意に上昇することを見出した。*sod-3* の発現上昇は、プロピオン酸を投与した線虫ではミトコンドリア内で活性酸素の生成量が増加するような代謝亢進が生じたことにより、その活性酸素を除去するための適応応答と考えられる。それゆえ、投与したプロピオン酸が抗酸化遺伝子の発現の上昇を誘導し、結果として酸化ストレス耐性が生じると考えられる。ジュグロン (5-hydroxynaphthoquinone) は NADH:ユビキノン還元酵素により還元され、活性酸素 (セミキノンラジカル) を生成する。線虫では、NGM 培地にジュグロンを添加することで食餌性の酸化ストレスを負荷できることから、プロピオン酸投与が線虫の酸化ストレス耐性に及ぼす影響を検討した。

一方、M9 buffer 中で水泳運動させた *C. elegans* の寿命が延長することが報告されている³²⁾。また、活性酸素等の酸化ストレスに誘導されて抗酸化遺伝子の発現が上昇すると *C. elegans* の寿命が延長することも報告されている^{49,50)}。そこで、プロピオン酸を投与した線虫の寿命についても検討した。

6-2. 実験方法

6-2-1. プロピオン酸投与が *C. elegans* の酸化ストレス耐性に及ぼす影響

(1) 酸化ストレス耐性試験用 NGM

塩化ナトリウム 0.3 g、ペプトン 0.25 g、寒天 1.7 g および脱イオン水 97.5 mL を三角フラスコに入れて混合し、オートクレーブで加熱滅菌した。その後、1M 塩化カルシウム溶液 0.1 mL、1M 硫酸マグネシウム溶液 0.1 mL、1M リン酸緩衝液 (pH 6.0) 2.5 mL、コレステロール溶液 (5 mg/mL) 0.1 mL を加えて攪拌した。さらに、12 mM ジュグロン溶液を 2.0 mL 加え攪拌し、メスピペットで 5 mL ずつシャーレ (60 mm) に分注して常温で静置した。

(2) 酸化ストレス耐性試験

同調化後、孵化した L1 線虫 (1000 匹) を *E. coli* OP50 を塗布した NGM 培地で培養した。3 日後、線虫が L4 世代に成長したのを確認し、M9 buffer で遠心チューブに回収した。遠心チューブ内の残液が 1 mL になるように上清を捨て、プロピオン酸の最終濃度がそれぞれ 10 mM あるいは 40 mM になるよう加え、全体液量が 5 mL になるように M9 buffer で調製した後、48 時間培養した。M9 buffer のみで培養した線虫を対照群とした。培養終了後に、M9 buffer で満たしたシャーレ (60 mm) で線虫を 1 時間静置した。静置後、約 20 匹の線虫を酸化ストレス耐性試験用 NGM に移し、顕微鏡を用いて目視で生死を確認し、2 時間後の生存頭数を計測した。

6-2-2. プロピオン酸投与が *C. elegans* の寿命に及ぼす影響

(1) 寿命測定用 NGM

塩化ナトリウム 0.3 g、ペプトン 0.25 g、寒天 1.7 g、脱イオン水 97.5 mL および 10 mg/mL FUDR (5-Fluorodeoxyuridine) 25 μ L を三角フラスコに入れて混合し、オートクレーブで加熱滅菌した。その後、1M 塩化カルシウム溶液 0.1 mL、1M 硫酸マグネシウム溶液 0.1 mL、1M リン酸緩衝液 (pH 6.0) 2.5 mL、コレステロール溶液 (5 mg/mL) 0.1 mL を加え攪拌した。そして、メスピペットで 5 mL ずつシャーレ (60 mm) に分注し、常温で静置した。

(2) 寿命測定

同調化後、遠心チューブ (15 mL) 中で孵化した L1 世代の線虫を含む懸濁液 (L1 懸濁液) を用いた。24-well plate に 1 well あたり L1 懸濁液 100 μ L および *E. coli* OP50 150 μ L を加えた。プロピオン酸投与群 (PA 群) は、10 mM プロピオン酸 Na 溶液を 50 μ L 加えた。最後に M9 buffer を加え、総量が 500 μ L/well になるように調製した。2 日後、各 well で線虫が L4 幼虫に成長していることを確認した後、約 20 匹を寿命測定用 NGM に移し、翌日から寿命測定を開始した。対照群には、M9 buffer のみで培養した線虫 (M9 群) を用いた。毎日、顕微鏡を用いて目視で生死を確認し、生存頭数を計測した。生死が不確かな線虫は白金線ピッカー (パスツールの先に白金線を付けたもの) で刺激し、生死を確認した。すべての線虫が死亡した時点で測定終了とした。

6-2-3. 統計処理

2-2-10と同様に各データの統計処理を行った。寿命の測定データの統計処理は、Kaplan-meier生存分析のLog-rank testを行った。いずれの結果も、危険率が5%未満($p < 0.05$)を有意とみなした。

6-3. 結果

6-3-1. プロピオン酸投与が *C. elegans* の酸化ストレス耐性に及ぼす影響

結果を図26に示した。M9群と比べ、PA群の生存率が高かった。各群の生存率は、M9群で6%、10 mM PA群で36%、40 mM PA群で63%であった。

6-3-2. プロピオン酸投与が *C. elegans* の寿命に及ぼす影響

結果を図27に示した。M9群およびPA群の生存日数を示したグラフには大きな差はなく、両群間で寿命の有意な差は認められなかった。

6-4. 考察

線虫において、酸化ストレスに対し適応能力があることが発見されている⁵¹⁾。例えば、幼虫期に低濃度のジュグロンを曝露することで、成虫期に致死量のジュグロンを曝露しても生存したことが報告されている⁵²⁾。本研究においても、ジュグロン曝露による酸化ストレス耐性試験では、M9群に比べ、プロピオン酸を添加した群で生存率が高くなり、さらに、プロピオン酸の投与量が増加するとともに生存率も高くなった。プロピオン酸がエネルギー基質として代謝される過程でミトコンドリア内に発生した活性酸素の増加により、*sod-3*の発現上昇が誘導されて結果的に抗酸化能が向上し、ジュグロンによる酸化ストレス負荷下においても生存率が上昇したと考えられる。また、第5章で明らかになったように、プロピオン酸は線虫のむち打ち運動の頻度を上昇させた。*C. elegans*において、運動がミトコンドリア毒性物質の曝露に対する耐性をもたらすことが報告されている⁴⁵⁾。プロピオン酸が線虫の運動性を高めることでミトコンドリア機能が維持され、それが抗酸化能の向上に寄与した可能性も考えられる。

抗酸化遺伝子の発現が上昇すると *C. elegans* の寿命が延長することが報告されている^{49,50)}。本章では、プロピオン酸により *sod-3* の発現が上昇したことに伴って寿命が延伸すると仮定し、プロピオン酸を添加した M9 buffer 中で培養した線虫の寿命を検討した。Watson らは、*C. elegans* におけるプロピオン酸の LD₅₀ (Lethal Dose 50 %) が 80 mM 以上であったと報告している⁵³⁾。本実験では、プロピオン酸が LD₅₀ の約 8 分の 1 の濃度であれば *C. elegans* に対して有毒とはならないと推定し、*sod-3* の発現上昇が最も誘導された 10 mM プロピオン酸を投与して線虫の寿命への影響を検討した。しかしながら、M9 群と PA 群で寿命の有意な延伸は認められなかった。本実験とほぼ同様の条件下において、7 mM のプロピオン酸を添加した *C. elegans* の寿命と対照群の寿命との間に有意な差が認められなかったことが報告されている⁵⁴⁾。寿命への影響が認められなかった理由は不明ではあるが、プロピオン酸の添加濃度が低濃度過ぎたのかもしれない。

抗酸化物質は、活性酸素種を直接的に無毒化する物質と活性酸素種を基質として代謝あるいは分解する酵素(オキシターゼ、グルタチオン等)に作用する物質に分類できる。食品由来の抗酸化物質はビタミン類、ポリフェノール、カロテノイド、植物ステロール等があり⁵⁵⁾、運動時に抗酸化物質を摂取することで筋疲労や損傷を抑制し、持久力が向上することは多数報告されている^{56,57)}。また、生活習慣病の予防や改善にも効果があることが報告されている^{58,59)}。しかし、抗酸化物質の過度な摂取は活性酸素の低下を招き、免疫機能の異常をきたす危険性がある⁶⁰⁾。これに対して、プロピオン酸による抗酸化効果は、酸化ストレスに対して抗酸化遺伝子の発現が誘導されるエピジェネティックな調節と考えられる。毒性のない低濃度のプロピオン酸を日常的に摂取することにより、運動に対する酸化ストレス耐性を得ることができ、筋疲労や損傷を抑制し持久力を向上させる可能性がある。

総括

SCFAs の一つであるプロピオン酸は代謝過程でスクシニル CoA に変換されて TCA 回路に入り、糖新生の基質として利用される。プロピオン酸の日常的な摂取はほとんどないが、プロピオン酸が糖新生に利用されるという代謝特性を考慮すると有用なエネルギー基質となる可能性が考えられた。一方、ケトン体は、肝臓での NEFA の代謝によって生じたアセチル CoA の一部から生成され、脳や骨格筋等でエネルギー効率の良いエネルギー基質として利用される^{5,7)}。ケトン体は持久力が必要とされる運動において有益となることから⁹⁾、スクシニル CoA を供給するプロピオン酸はケトン体代謝を亢進し、持久力を向上する可能性も考えられる。そこで、本研究ではプロピオン酸がケトン体代謝に及ぼす作用に注目し、その作用機序について検討した。さらに、プロピオン酸が持久力運動に及ぼす影響についても検討した。

第 2 章において、絶食により血中ケトン体濃度が上昇したラットにプロピオン酸溶液を経口投与すると、血中ケトン体 (β -ヒドロキシ酪酸) 濃度が低下し、同時に血糖値が上昇すること、ならびに投与したプロピオン酸溶液に対して用量依存的に血中ケトン体濃度が低下することを見出した。これらの作用は、投与 30 分後には発現した。肝臓では、プロピオン酸から TCA 回路の中間体が供給されるので、アセチル CoA の代謝が促進し、結果としてケトン体合成が低下し、血中ケトン体濃度の低下が生じた可能性が考えられた。また、プロピオン酸投与による血糖供給に伴い肝外組織でのケトン体代謝が亢進して、血中ケトン体濃度を低下させたことも考えられた。それゆえ、プロピオン酸による血中ケトン体濃度低下作用は、肝臓でのケトン体合成の抑制と糖新生による肝外組織への血糖供給の結果として発現すると考えられた。

第 3 章では、グルカゴンやインスリンの関与の有無について検討した。プロピオン酸溶液を投与しても血漿グルカゴン濃度には変化が見られないことから、血糖値上昇作用は肝臓グリコーゲンの分解によるものではないことが明らかになった。また、血漿インスリン濃度にも変化はなかった。一方、血漿 NEFA 濃度はプロピオン酸溶液投与後に低

下傾向にあったことから、プロピオン酸により脂肪組織の脂肪分解が低下したことが示唆され、これが血中ケトン体濃度の低下に関与している可能性が考えられた。

プロピオン酸は GPR41 を介して交感神経を亢進する¹³⁾ ことから、プロプラノロールによる交感神経抑制下におけるプロピオン酸の作用を検討したが、血中ケトン体濃度低下作用と血糖値上昇作用はともに確認でき、交感神経を介した寄与は小さいことが明らかとなった。さらに、¹³C β-ヒドロキシ酪酸を用いて呼気分析を行い、プロピオン酸がケトン体代謝に及ぼす影響を検討した。しかしながら、プロピオン酸溶液投与による β-ヒドロキシ酪酸の代謝率に有意な変化は認められず、血中ケトン体濃度低下作用に対して肝外組織でのケトン体代謝亢進の寄与は小さいことが明らかになった。

第 4 章では、プロピオン酸から TCA 回路の中間体が供給されて、ケトン体合成が抑制された可能性について明らかにするため、有機酸やアミノ酸を経口投与し、血中ケトン体濃度と血糖値に及ぼす影響を検討した。TCA 回路におけるスクシニル CoA 以降の中間体であるコハク酸、リンゴ酸およびオキサロ酢酸には血中ケトン体濃度低下作用が確認されたことから、プロピオン酸による血中ケトン体濃度低下作用にはこれらの TCA 回路の中間体の供給が関与していると考えられる。しかしながら、プロピオン酸と同様に血中ケトン体濃度の低下と血糖値の上昇の両方が認められたのは、糖新生に利用されて血糖を供給する乳酸とピルビン酸、ならびにアラニンであった。これらの結果より、プロピオン酸の血中ケトン体低下作用には糖新生が関与していることが強く示唆された。

メトホルミンによる糖新生抑制下では、血中ケトン体濃度の低下と血糖値の上昇がいずれも小さくなった。この結果は、プロピオン酸からの糖新生が抑制されると、血糖の供給が減少したことにより、ケトン体合成に対する抑制が弱まったためと考えられる。前述の有機酸投与実験の結果と合わせると、プロピオン酸の血中ケトン体低下作用には糖新生が関与していることが明らかとなった。また、プロピオン酸が腸管上皮細胞においても糖新生に利用されることが報告されていることから¹⁷⁾、プロピオン酸投与後の腸管糖新生の関与について検討した。プロピオン酸投与群で門脈血と腹部下大静脈血の血

糖値が有意に上昇し、プロピオン酸による血中ケトン体濃度低下作用には、プロピオン酸からの腸管糖新生が寄与している可能性もあることが明らかになった。

第5章では、ヒトと相同性が高いエネルギー代謝酵素に関わる遺伝子をもつ線虫 (*C. elegans*) を用いて、むち打ち運動の頻度を指標にしてプロピオン酸が持久力に及ぼす影響を明らかにすることを試みた。むち打ち運動の頻度がプロピオン酸量に対して用量応答的に増加する傾向にあったことから、プロピオン酸の摂取による持久力の向上が示唆された。糖新生で生成されたグルコースが持久力のためのエネルギー供給に消費されたとすると、グリコーゲン分解が抑制されていることが考えられた。これは、プロピオン酸によりグリコーゲン蓄積量が多くなった結果からも支持される。プロピオン酸を投与した線虫では解糖系律速酵素遺伝子である *pfk-1.2* の発現が上昇しており、解糖系が亢進していた。また、トレハロースの代謝酵素遺伝子である *tre-2* の発現も有意に上昇した。これらの結果から、プロピオン酸により解糖系が亢進されることを見出した。

さらに、10 mM プロピオン酸投与群では β -酸化酵素遺伝子の *ech-1.1*、40 mM プロピオン酸投与群では *hacd-1* の発現が有意に低下していた。この結果は、プロピオン酸が β 酸化系を抑制したことを示唆している。すなわち、プロピオン酸によって脂肪酸分解が抑制されたことを示しており、プロピオン酸投与により解糖系酵素遺伝子の発現が上昇したことと一致している。線虫における結果により、プロピオン酸から糖新生を介してグルコースが供給された後、解糖系代謝が亢進してグルコースが優先的にエネルギーとして利用されることによって、グリコーゲンや脂肪などのエネルギー貯蔵量が維持される可能性があることが明らかになった。すなわち、プロピオン酸が持久力を向上させることを示している。これらの結果は、ラットにおけるプロピオン酸の血中ケトン体濃度低下作用と血糖値上昇作用には、糖新生とそれに伴うケトン体合成抑制が関与しているという結果を支持している。さらに、プロピオン酸投与により抗酸化遺伝子である *sod-3* の発現が有意に上昇しており、プロピオン酸が抗酸化効果をもたらす可能性が示唆された。なお、プロピオン酸投与によって生じた遺伝子の発現の変化を、図 25A~図 25E にまとめた。

第6章では、プロピオン酸による酸化ストレス耐性ならびに寿命延伸作用について検討した。*sod-3*の発現上昇から酸化ストレス耐性が誘導された可能性が考えられた。線虫に酸化ストレスをもたらすジユグロンを投与したところ、酸化ストレス負荷下においてM9群と比べ、PA群では高い生存率を示し、プロピオン酸投与により酸化ストレス耐性が向上することが明らかになった。プロピオン酸を日常的に摂取することで、酸化ストレス耐性を得ることができると考えられる可能性がある。一方、毒性を生じない濃度である10 mMのプロピオン酸を投与して線虫の寿命への影響を検討したが、寿命の有意な延長は認められなかった。

本研究では、絶食により血中ケトン体濃度が上昇したラットにプロピオン酸溶液を経口投与すると、血中ケトン体濃度が低下するとともに血糖値が上昇することを見出し、これらの作用は肝臓でのケトン体合成の抑制と肝外組織への血糖供給によって生じており、どちらの作用もプロピオン酸からの糖新生が関与していることを明らかにした。また、プロピオン酸によって線虫の持久力が向上することが明らかになった。さらに、プロピオン酸には運動によって生じる酸化ストレスに対して抗酸化能を高める可能性があることを明らかにした。しかしながら、検討すべき点は依然として残っている。例えば、プロピオン酸投与後の末梢血中の微量のプロピオン酸が、肝外細胞でのケトン体の取り込みに働くMCT(モノカルボン酸トランスポーター)等の輸送体^{61,62)}に影響を及ぼす可能性がある。一方、プロピオン酸がエピゲノムの遺伝子制御をすることが多数報告されている^{53,63-68)}。本実験においても、プロピオン酸の投与により線虫の遺伝子発現に影響していたことを確認している。今後、これらの点を検討することでよりプロピオン酸による血中ケトン体濃度低下作用の詳細な作用機序が解明されることが期待される。本研究で得られた知見は、スポーツの現場で活用できる可能性があり、プロピオン酸はマラソンや水泳等の全身持久力運動のパフォーマンスを向上させるサプリメントとして活用できると考えている。

文献

- 1) 山下亀次郎：食物繊維研究の歴史と流れ。日本食物繊維学会編集委員会編，食物繊維－基礎と応用－，第三版，第一出版，東京，122-136，2008.
- 2) Sakata T : Effects of indigestible dietary bulk and short chain fatty acids on the tissue weight and epithelial cell proliferation rate of the digestive tract in rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, **32**(4), 355-362, 1986.
- 3) Perry RJ, Borders CB, Cline GW, Zhang XM, Alves TC, Petersen KF, Rothman DL, Kibbey RG and Shulman GI : Propionate increases hepatic pyruvate cycling and anaplerosis and alters mitochondrial metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, **291**(23), 12161-12170, 2016.
- 4) Fukushima M : Chemistry of short-chain fatty acids. In Cummings JH, Rombeau JL, Sakata T eds, *Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids*, Cambridge University Press, New York, 149-170, 1995.
- 5) Manninen AH : Metabolic effects of the very-low-carbohydrate diets : Misunderstood “villains” of human metabolism. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, **1**(2), 7-11, 2004.
- 6) Couturier K, Bélanger P, Latour MG, Lavoie JM : Evidence that a decrease in liver glycogen content stimulates FFA mobilization during exercise. *Canadian Journal of Applied Physiology*, **25**(3), 141-152, 2000.
- 7) Alberti KG, Zimmet P, Shaw J ; IDF Epidemiology Task Force Consensus Group : The metabolic syndrome : A new worldwide definition. *Lancet*, **366**(9501), 1059-1062, 2005.
- 8) American Diabetes Association, Wisdom K and Adams C : Nutrition recommendations and interventions for diabetes : A position statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care*, **30**(suppl 1), S48-S65, 2007.
- 9) Murray AJ, Knight NS, Cole MA, Cochlin LE, Carter E, Tchabanenko K, Pichulik T, Gulston MK, Atherton HJ, Schroeder MA, J Deacon RM, Kashiwaya Y, King MT, Pawlosky R, Rawlins JN, Tyler DJ, Griffin JL, Robertson J, Veech RL and Clarke K : Novel ketone diet enhances physical and cognitive performance. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, **30**(12), 4021-4032, 2016.

- 10) Fukao T, Song XQ, Mitchell GA, Yamaguchi S, Sukegawa K, Tadao Or II and Kondo N : Enzymes of ketone body utilization in human tissues : Protein and messenger RNA levels of succinyl-Coenzyme A (CoA) : 3-Ketoacid CoA transferase and mitochondrial and cytosolic acetoacetyl-CoA thiolases. *Pediatric Research*, **42**(4), 498-502, 1997.
- 11) Demigne C, Morand C, Levrat MA, Besson C, Moundras C and Remesy C : Effect of propionate on fatty acid and cholesterol synthesis and on acetate metabolism in isolated rat hepatocytes. *British Journal of Nutrition*, **74**(2), 209-219, 1995.
- 12) Berggren AM, Nyman EM, Lundquist I and Bjorck IM : Influence of orally and rectally administered propionate on cholesterol and glucose metabolism in obese rats. *British Journal of Nutrition*, **76**(2), 287-294, 1996.
- 13) Kimura I, Inoue D, Maeda T, Hara T, Ichimura A, Miyauchi S, Kobayashi M, Hirasawa A and Tsujimoto G : Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**(19), 8030-8035, 2011.
- 14) Kimura I, Ozawa K, Inoue D, Imamura T, Kimura K, Maeda T, Terasawa K, Kashihara D, Hirano K, Tani T, Takahashi T, Miyauchi S, Shioi G, Inoue H and Tsujimoto G : The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Nature Communications*, **4**, 1829, 2013.
- 15) Lin H, Frassetto A, Kowalik Jr E, Nawarocki A, lu M, Kosinski J, Hubert J, Szeto D, Yao X, Forrest G and Marsh D : Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms. *Plos One*, **7**(4), e35240, 2012.
- 16) Tolhurst G, Heffron H, Lam YS, Parker HE, Habib AM, Diakogiannaki E, Cameron J, Grosse J, Reimann F and Gribble FM : Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes*, **61**(2), 364-371, 2012.
- 17) De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Goncalves D, Vinera J, Zitoin C, Duchamp A, Bäckhed F and Mithieux G : Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell*, **156**, 84-96, 2014.

- 18) 塚原隆充：盲腸静脈血，門脈血，末梢血中濃度から予測する大腸内短鎖脂肪酸生成量。日本栄養・食糧学会監修，森田達也，園山慶，辻英明編，腸内細菌－宿主のクロストークと食事要因，建帛社，東京，97-115，2019.
- 19) Krebs HA, Hems R : Fatty acid metabolism in the perfused rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, **119**(3), 525-533, 1970.
- 20) 菊地晴久：運動中の糖質-たん白質混合液摂取と全身持久力。東北大学，博士論文，1994.
- 21) Patel TB, De Buysere MS, Olson MS : The effect of propionate on the regulation of the pyruvate dehydrogenase complex in the rat liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **220**(2), 405-414, 1983.
- 22) Korotchkina LG, Patel MS : Binding of pyruvate dehydrogenase to the core of the human pyruvate dehydrogenase complex. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, **582**(3), 468-472, 2008.
- 23) Hoffmann C, Leitz MR, Oberdorf-Maass S, Lohse MJ, Klotz KN : Comparative pharmacology of human beta-adrenergic receptor subtypes--characterization of stably transfected receptors in CHO cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **369**(2), 151-159, 2004.
- 24) Uchida T, Endo N, Shimizu K : Simple and Noninvasive Breath test Using ^{13}C -Acetic Acid to Evaluate Gastric Emptying in Conscious Rats and Its Validation by Metoclopramide. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **98**, 388-395, 2005.
- 25) 若狭麻未，三浦紀称嗣，宮田富弘： ^{13}C 呼気分析法によるラットの盲腸内に単独投与した酢酸，プロピオン酸，および n -酪酸の動態，日本食物繊維学会誌、**20**(1), 39-47, 2016
- 26) 若狭麻未：ラットにおける大腸からの短鎖脂肪酸の吸収と代謝 - ^{13}C 呼気分析法による検討-。川崎医療福祉大学大学院医療技術学研究科健康科学専攻 博士論文，2016.
- 27) Heimann E, Nyman M and Degerman E : Propionic acid and butyric acid inhibit lipolysis and de novo lipogenesis and increase insulin-stimulated glucose uptake in primary rat adipocytes. *Adipocyte*, **4**(2), 81-88, 2015.

- 28) 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構：医薬品に関する情報. <https://www.pmda.go.jp/safety/info-services/drugs/0001.html>, 2019. (2020.5.28 確認)
- 29) Christiansen MP, Linfoot PA, Neese RA, Hellerstein MK : Effect of dietary energy restriction on glucose production and substrate utilization in type 2 diabetes. *Diabetes*, **49**(10), 1691-1699, 2000.
- 30) Delaere F, Duchampt A, Mounien L, Seyer P, Duraffourd C, Zitoun C, Thorens B, Mithieux G : The role of sodium-coupled glucose co-transporter 3 in the satiety effect of portal glucose sensing. *Molecular Metabolism*, **2**(1), 47-53, 2012.
- 31) Scheiman J, Lubert JM, Chavkin TA, MacDonald T, Tung A, Pham L, Wibowo MC, Wurth RC, Punthambaker S, Tierney BT, Yang Z, Hattab MW, Avila-Pacheco J, Clish CB, Lessard S, Church GM and Kostic AD : Meta-omics analysis of elite athletes identifies a performance-enhancing microbe that functions via lactate metabolism. *Nature Medicine*, **25**, 1104-1109, 2019.
- 32) Pierce-Shimomura JT, Chen BL, Mun JJ, Ho R, Sarkis R, McIntire SL : Genetic analysis of crawling and swimming locomotory patterns in *C. elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**(52), 20982-20987, 2008.
- 33) Lüersen K, Faust U, Gottschling DC, Döring F. Gait-specific adaptation of locomotor activity in response to dietary restriction in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of experimental biology*, **217**(14), 2480-2488, 2014.
- 34) The *C. elegans* Sequencing Consortium : Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology, *Science*, Japan, **283**(5398), 2012-2018, 1999.
- 35) Hengartner MO, Horvitz HR : *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell*, **76**(4), 665-676, 1994.
- 36) LaMacchia JC, Roth MB : Aquaporins-2 and -4 regulate glycogen metabolism and survival during hyposmotic-anoxic stress in *Caenorhabditis elegans*. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, **309**(2), 92-96, 2015.
- 37) Leeh DL, Atkinson J : *Physiology of Nematodes*. Palgrave, London. 28-57, 1996.

- 38) Seo Y, Kingsley S, Walker G, Mondoux MA, Tissenbaum HA : Metabolic shift from glycogen to trehalose promotes lifespan and healthspan in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **115**(12), E2791–E2800, 2018.
- 39) Hanover JA, Forsythe ME, Hennessey PT, Brodigan TM, Love DC, Ashwell G, Krause MA : A *Caenorhabditis elegans* model of insulin resistance : altered macronutrient storage and dauer formation in an OGT-1 knockout. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **102**(32), 11266–11271, 2005.
- 40) Ros S, Schulze A. Balancing glycolytic flux : the role of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatases in cancer metabolism. *Cancer & metabolism*, **1**(1), 8, 2013.
- 41) Brooks KK, Liang B, Watts JL : The influence of bacterial diet on fat storage in *C. elegans*. *PLoS One*, **4**(10), e7545, 2009.
- 42) Penkov S, Kaptan D, Erkut C, Sarov M, Mende F, Kurzchalia TV : Integration of carbohydrate metabolism and redox state controls dauer larva formation in *Caenorhabditis elegans*. *Nature communications*, **6**(8060), 2015.
- 43) Ahlborg B, Bergstrom J, Ekelund LG, and Hultman E : Muscle glycogen and Muscle Electrolytes during Prolonged Physical Exercise. *Acta physiologica Scandinavica*, **70**, 129–142, 1967.
- 44) Sherman WM, Costill DL, Fink WJ, and Miller JM : Effect of exercise-diet manipulation on muscle glycogen and its subsequent utilization during performance. *International Journal of Sports Medicine*, **2**, 114–118, 1981.
- 45) Hartman JH, Smith LL, Gordon KL, Laranjeiro R, Driscoll M, Sherwood DR, Meyer JN : Swimming Exercise and Transient Food Deprivation in *Caenorhabditis elegans* Promote Mitochondrial Maintenance and Protect Against Chemical-Induced Mitotoxicity, *Scientific Reports*, **8**(1), 8359, 2018.
- 46) Baugh LR, Sternberg PW : DAF-16/FOXO regulates transcription of *cki-1/Cip* /Kip and repression of *lin-4* during *C. elegans* L1 arrest. *Current biology*, **16**(8) :780–785, 2006.
- 47) Zhang P, Judy M, Lee SJ, Kenyon C : Direct and indirect gene regulation by

a life-extending FOXO protein in *C. elegans*: roles for GATA factors and lipid gene regulators. *Cell Metabolism*, **17**(1):85-100, 2013.

48) Hibshman JD, Doan AE, Moore BT, Kaplan RE, Hung A, Webster AK, Bhatt DP, Chitrakar R, Hirschey MD and Baugh LR : *daf-16*/FoxO promotes gluconeogenesis and trehalose synthesis during starvation to support survival. *eLife*, **6**, e30057, 2017.

49) Urso ML, Clarkson PM : Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*. **189**(1-2), 41-54, 2003.

50) Henderson ST, Bonafè M, Johnson TE : *daf-16* protects the nematode *Caenorhabditis elegans* during food deprivation. *The journals of gerontology*, **61**(5), 444-460, 2006.

51) Darr D, Fridovich I : Adaptation to oxidative stress in young, but not in mature or old, *Caenorhabditis elegans*. *Free Radical Biology and Medicine*, **18**(2), 195-201, 1995.

52) Przybysz AJ, Choe KP, Roberts LJ, Strange K : Increased age reduces DAF-16 and SKN-1 signaling and the hormetic response of *Caenorhabditis elegans* to the xenobiotic juglone. *Mechanisms of ageing and development*, **130**(6), 357-369, 2009.

53) Watson E, Olin-Sandoval V, Hoy MJ, Li CH, Louisse T, Yao V, Mori A, Holdorf AD, Troyanskaya OG, Ralser M, Walhout AJ : Metabolic network rewiring of propionate flux compensates vitamin B12 deficiency in *C. elegans*. *Elife*, **5**(e17670), 2016.

54) Gao Chenfei : Fermentable Non-Digestible Dietary Fiber and Bioactive Compounds Affect Aging and Fat Deposition in *Caenorhabditis elegans*. *LSU Doctoral Dissertations*, 2424, 2015.

55) 津志田藤二郎 : 食品の抗酸化機能 老化抑制と食品. 食品総合研究所編集, アイピーシー, 東京, 10, 2002.

56) Simioni C, Zauli G, Martelli AM, Vitale M, Sacchetti G, Gonelli A, Neri LM : Oxidative stress: role of physical exercise and antioxidant nutraceuticals in adulthood and aging. *Oncotarget*, **9**(24), 17181-17198, 2018.

- 57) Ranchordas MK, Rogerson D, Soltani H, Costello JT. Antioxidants for preventing and reducing muscle soreness after exercise. Cochrane Database. *The Cochrane database of systematic reviews*, **12**(12), CD009789, 2017.
- 58) Haines DD, Lekli I, Teissier P, Bak I, Tosaki A : Role of haeme oxygenase-1 in resolution of oxidative stress-related pathologies: focus on cardiovascular, lung, neurological and kidney disorders. *Acta physiologica (Oxford, England)*, **204**(4), 487-501, 2012.
- 59) Yang JP, Shin JH, Seo SH, Kim SG, Lee SH, Shin EH : Effects of Antioxidants in Reducing Accumulation of Fat in Hepatocyte. *International journal of molecular sciences*, **19**(9), 2563, 2018.
- 60) Hara A, Sasazuki S, Inoue M, Shimazu T, Iwasaki M, Sawada N, Yamaji T, Ishihara J, Iso H, Tsugane S : Use of vitamin supplements and risk of total cancer and cardiovascular disease among the Japanese general population: a population-based survey. *BMC public health*. **11**(540), 2011.
- 61) Juel C and Halestrap AP : Lactate transport in skeletal muscle-role and regulation of the monocarboxylate transporter. *The Journal of Physiology*, **517**(3), 633-642, 1999.
- 62) Van Hasselt PM, Ferdinandusse S, Monroe GR, Ruiter JP, Turkenburg M, Geerlings MJ, Duran K, Harakalova M, Van der Zwaag B, Monavari AA, Okur I, Sharrard MJ, Cleary M, O Connell N, Walker V, Rubio-Gozalbo ME, de Vries MC, Visser G, Houwen RH, van der Smagt JJ, Verhoeven-Duif NM, Wanders RJ and van Haaften G : Monocarboxylate taransporter 1 deficiency and ketone utilization. *The New Journal of Medicine*, **371**(20), 1900-1907, 2014.
- 63) Luu M, Pautz S, Kohl V, Singh R, Romero R, Lucas S, Hofmann J, Raifer H, Vachharajani N, Carrascosa L, Lamp B, Nist A, Stiewe T, Shaul Y, Adhikary T, Zaiss M, Lauth M, Steinhoff U and Visekruna A : The short-chain fatty acid pentanoate suppresses autoimmunity by modulating the metabolic-epigenetic crosstalk in lymphocytes. *Nature Communication*, **10**(1), 760, 2019.
- 64) Corrêa-Oliveira R, Fachi JL, Vieira A, Sato FT, Vinolo MA : Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. *Clinical & translational immunology*. **5**(4), e73, 2016.

- 65) Natarajan N, Pluznick JL. From microbe to man: the role of microbial short chain fatty acid metabolites in host cell biology. *American journal of physiology. Cell physiology.* **307**(11), C979–C985, 2014.
- 66) Ciarlo E, Heinonen T, Herderschee J, Fenwick C, Mombelli M, Le Roy D, Roger T : Impact of the microbial derived short chain fatty acid propionate on host susceptibility to bacterial and fungal infections in vivo. *Scientific reports*, **6**, 37944, 2016.
- 67) Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly-Y M, Glickman JN, Garrett WS : The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science*, **341**(6145), 569–573, 2013.
- 68) Park J, Kim M, Kang SG, Jannasch AH, Cooper B, Patterson J, Kim CH : Short chain fatty acids induce both effector and regulatory T cells by suppression of histone deacetylases and regulation of the mTOR–S6K pathway. *Mucosal immunology*, **8**(1), 80–93, 2015.

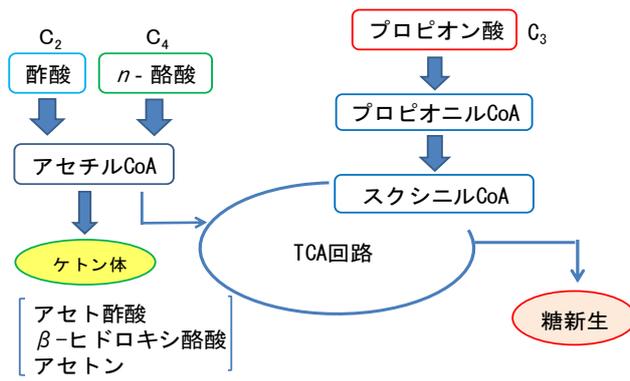


図 1A 肝臓における短鎖脂肪酸の代謝経路

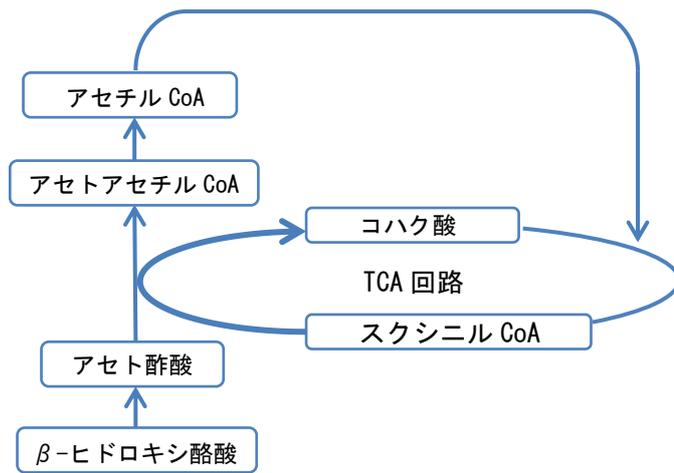


図 1B 肝外組織におけるケトン体の代謝経路

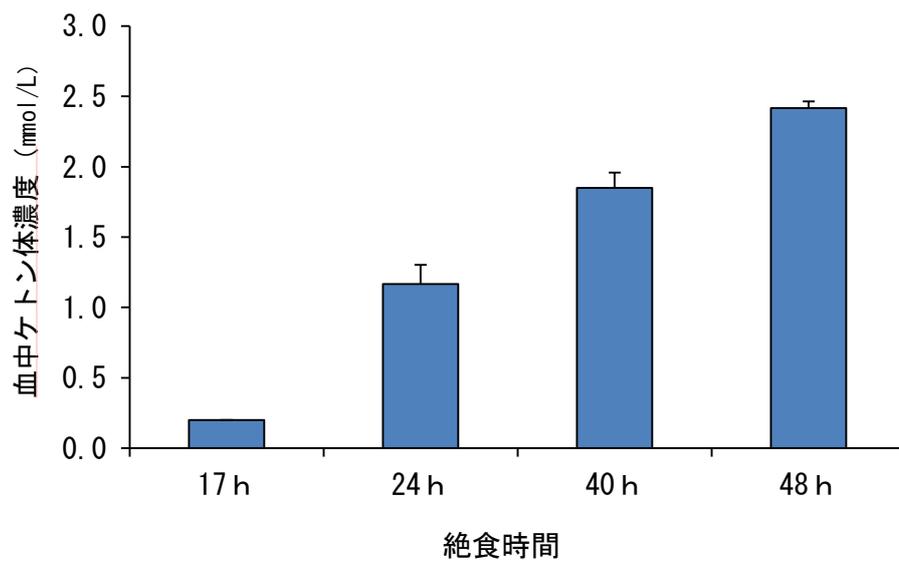


図2 絶食による血中ケトン体濃度の経時的変化
mean±SE (n=6)

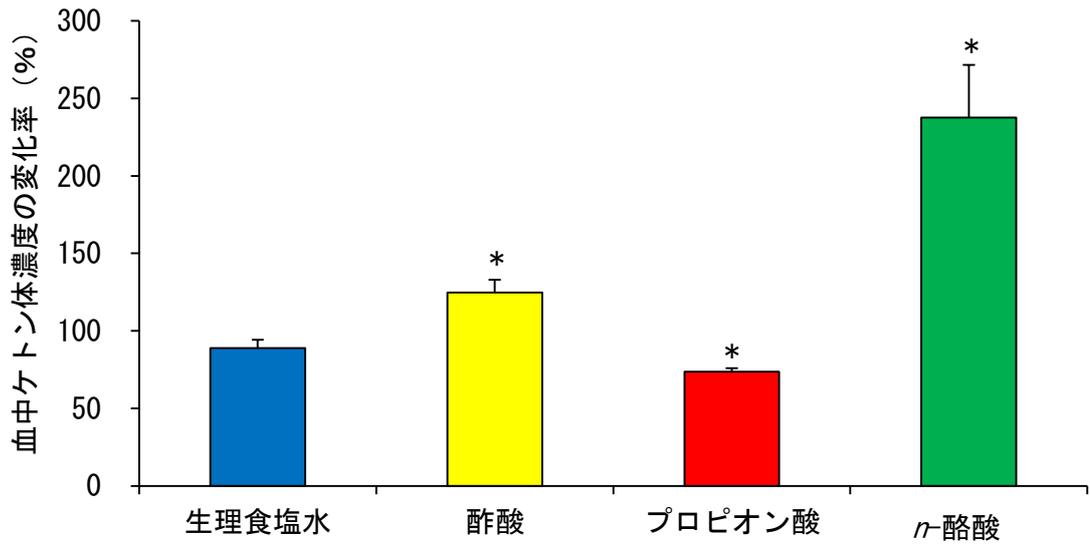


図 3A 短鎖脂肪酸 (SCFAs) の経口投与による血中ケトン体濃度の変化率

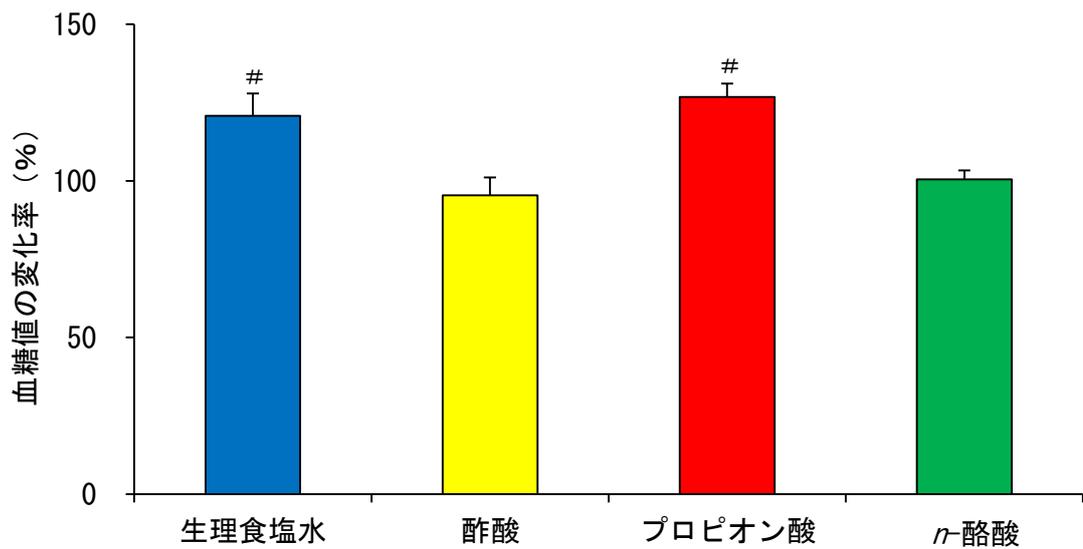


図 3B 短鎖脂肪酸 (SCFAs) の経口投与による血糖値の変化率

投与前の値を 100 %とした場合の変化率

mean±SE (n=6)

* : 投与前の血中ケトン体濃度に対して有意差あり ($p < 0.05$)

: 投与前の血糖値に対して有意差あり ($p < 0.05$)

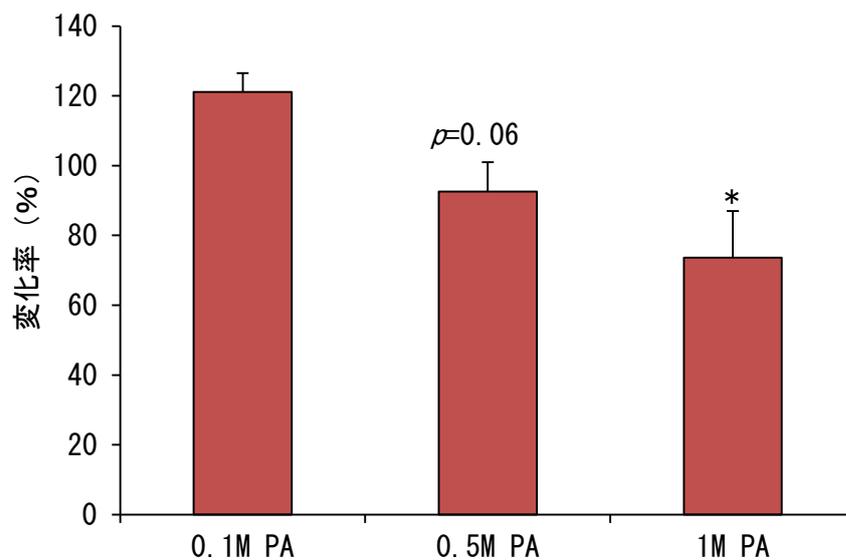


図4 プロピオン酸投与量に対する血中ケトン体濃度の用量応答

PA: プロピオン酸

投与前の値を100%とした場合の変化率

mean±SE (n=6)

*: 投与前の血中ケトン体濃度に対して有意差あり ($p<0.05$)

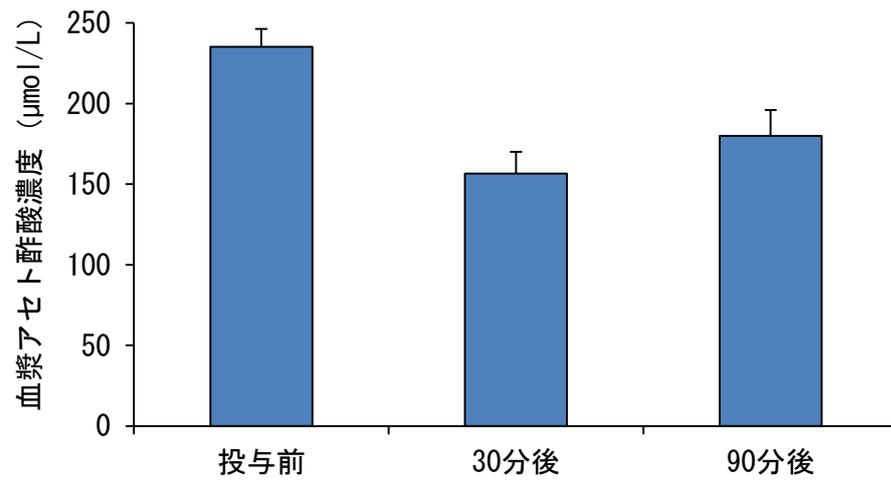


図5 プロピオン酸投与後の血漿アセト酢酸濃度の変化

mean±SE (n=6)

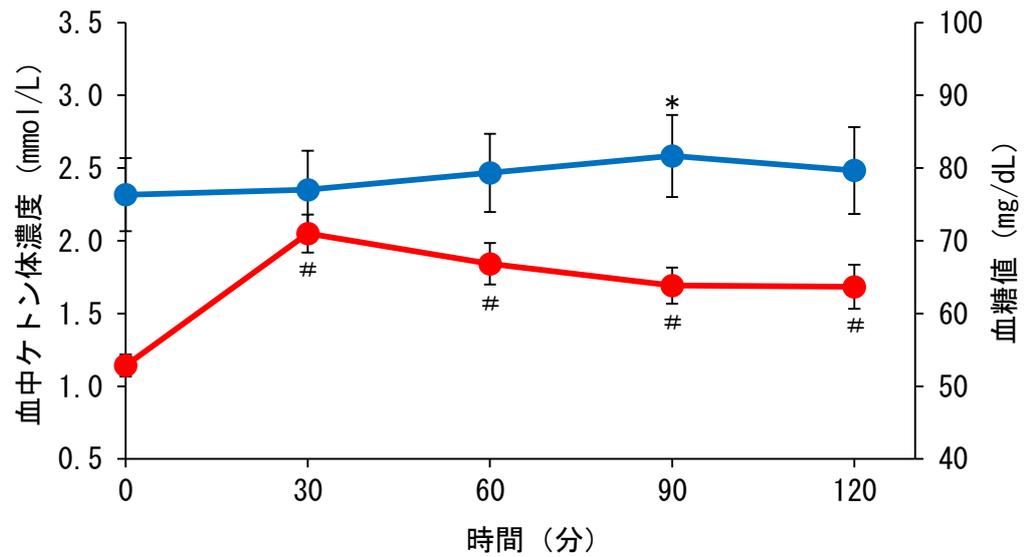


図6 生理食塩水投与時の血中ケトン体濃度および血糖値の経時的変化

● : 血中ケトン体濃度 ● : 血糖値 mean±SE (n=6)

* : 投与前 (0分) の血中ケトン体濃度に対して有意差あり ($p < 0.05$)

: 投与前 (0分) の血糖値に対して有意差あり ($p < 0.05$)

24時間絶食させたラットに、生理食塩水2 mLを投与した。

投与前および投与後30分毎に血中ケトン体濃度および血糖値を測定した。

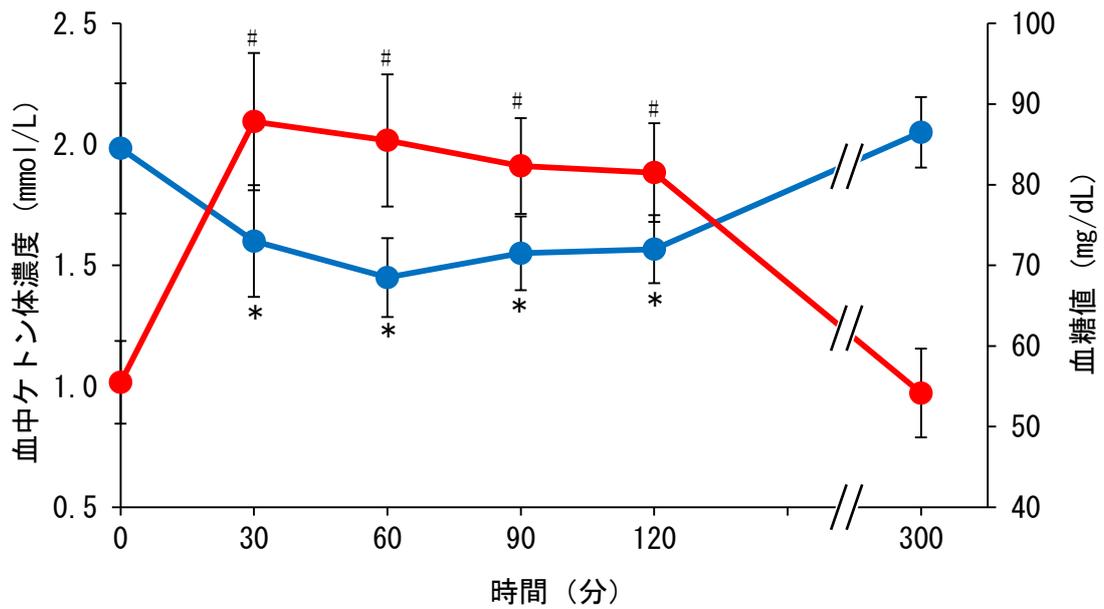


図7 プロピオン酸投与時の血中ケトン体および血糖値の経時的変化

● : 血中ケトン体濃度 ● : 血糖値

mean±SE (n=6)

* : 投与前 (0分) の血中ケトン体濃度に対して有意差あり ($p < 0.05$)

: 投与前 (0分) の血糖値に対して有意差あり ($p < 0.05$)

24時間絶食させたラットに、1 M プロピオン酸溶液 2 mL を投与した。
投与前および投与後 30 分毎に血中ケトン体濃度および血糖値を測定した。

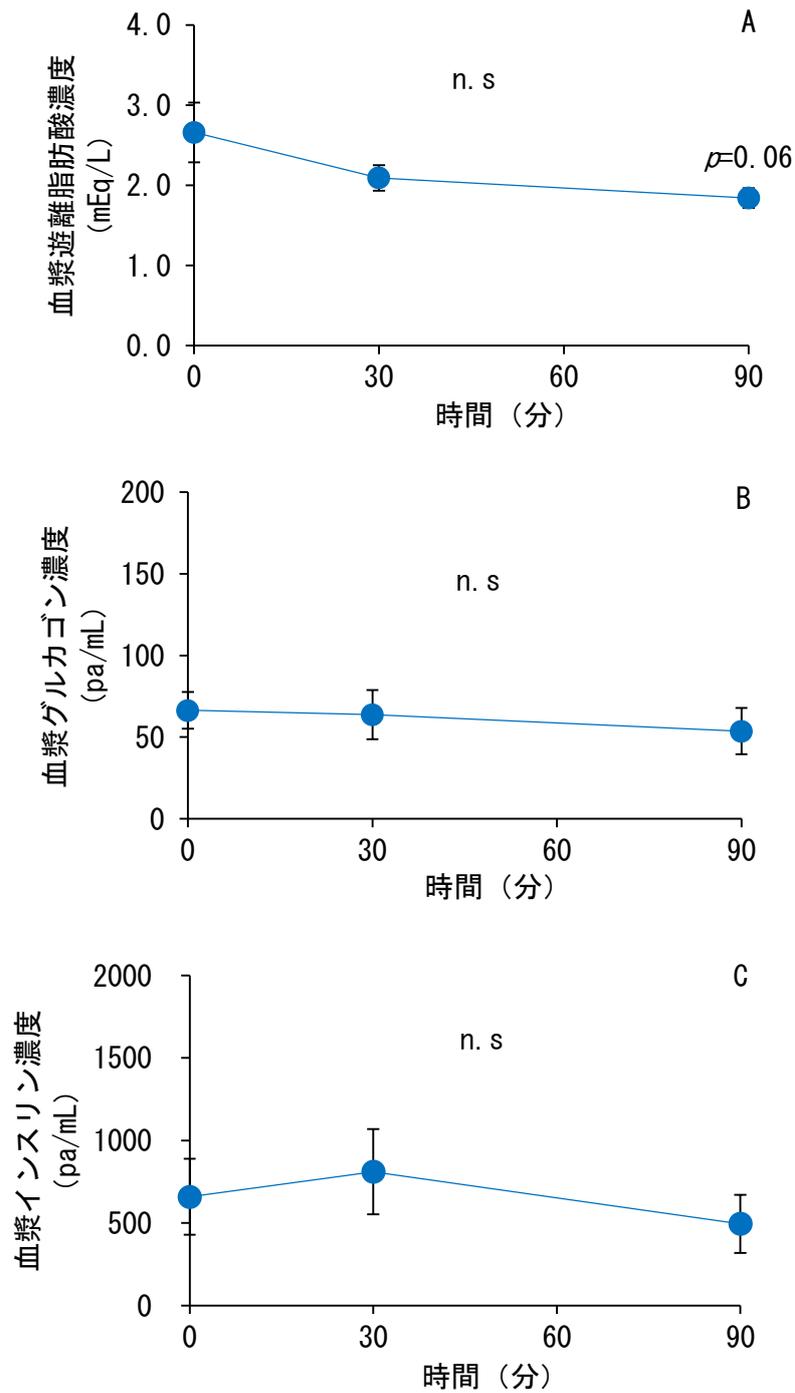


図 8 プロピオン酸経口投与後の血漿中の遊離脂肪酸濃度、グルカゴン濃度およびインスリン濃度

A : 血漿遊離脂肪酸, B : 血漿グルカゴン, C : 血漿インスリン
 mean±SE (n=6)、n. s. : 有意差なし

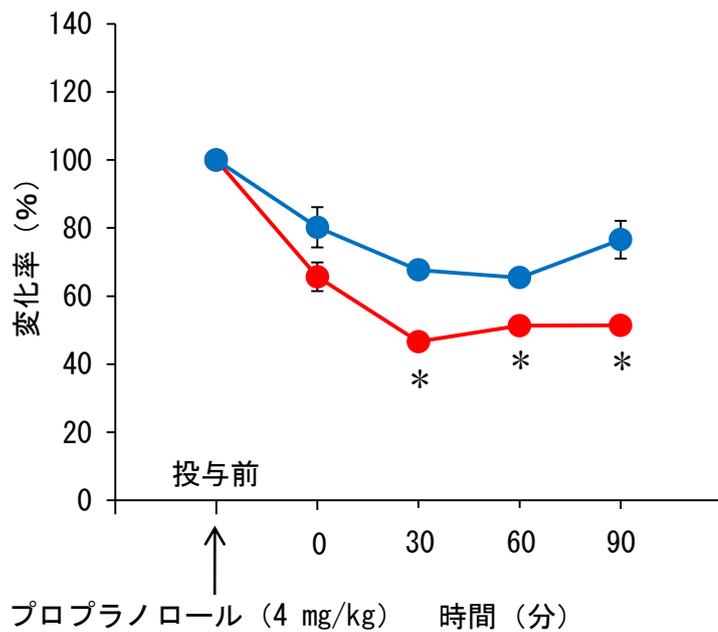


図 9A プロプラノロール投与下におけるプロピオン酸経口投与後の血中ケトン体の経時的変化

● : プロプラノロール + 生理食塩水 ● : プロプラノロール + PA

投与前の値を 100 %とした場合の変化率 mean±SE (n=6)

* : プロピオン酸投与 10 分前の血中ケトン体濃度に対して有意差あり ($p < 0.05$)

24 時間絶食させたラットに、1 M プロピオン酸溶液 2 mL を経口投与する 10 分前に、プロプラノロール溶液 0.5 mL を腹腔内投与した。プロピオン酸投与 30 分、60 分および 90 分後に血中ケトン体濃度および血糖値を測定した。

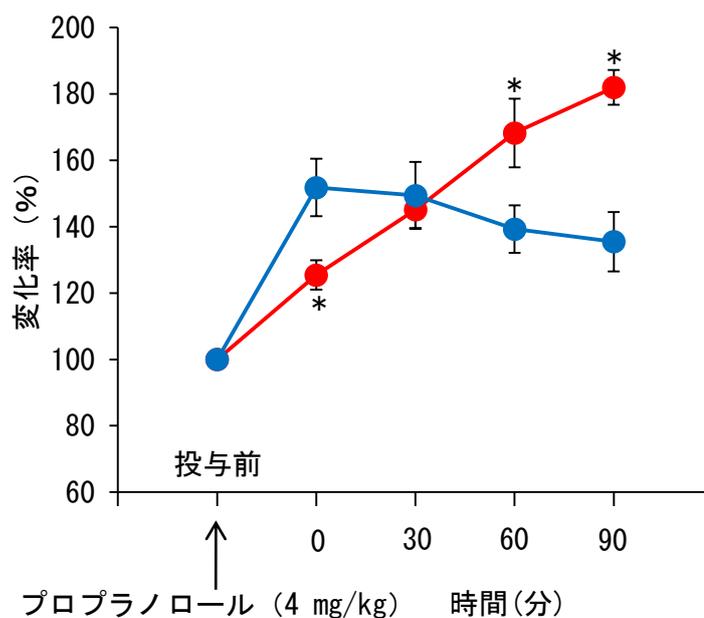


図 9B プロプラノロール投与下におけるプロピオン酸経口投与後の血糖値の経時的変化

- : プロプラノロール + 生理食塩水 ● : プロプラノロール + PA
 投与前の値を 100 %とした場合の変化率 mean±SE (n=6)
 * : プロピオン酸投与 10 分前の血糖値に対して有意差あり (p<0.05)

24 時間絶食させたラットに、1 M プロピオン酸溶液 2 mL を経口投与する 10 分前に、プロプラノロール溶液 0.5 mL を腹腔内投与した。プロピオン酸投与 30 分、60 分および 90 分後に血中ケトン体濃度および血糖値を測定した。

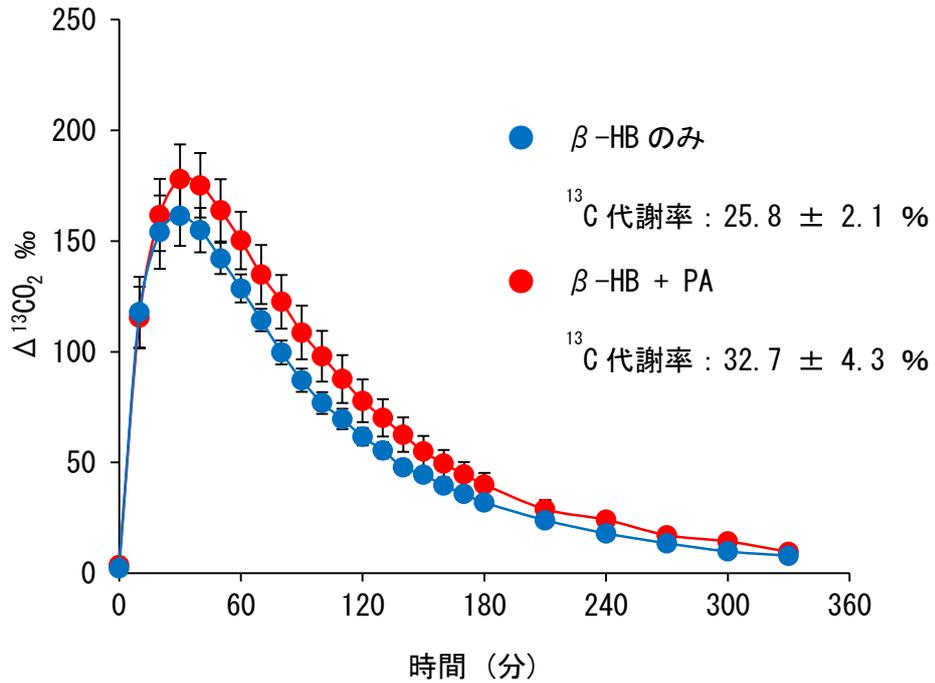


図 10 プロピオン酸 (PA) が ^{13}C β -ヒドロキシ酪酸 (β -HB) の代謝に及ぼす影響

● : β -HB ● : β -HB + PA
 mean \pm SE ($n=6$)

^{13}C β -ヒドロキシ酪酸 Na を用いた。24 時間絶食させたラットをデシケーターに入れて約 30 分間環境に順応させた後、デシケーターから取り出し、15 μmol の ^{13}C β -ヒドロキシ酪酸溶液 0.1 mL を尾静脈内投与し、続けて 1 M プロピオン酸溶液 2 mL を経口投与した (β -HB + PA 群)。対照群は、 ^{13}C β -ヒドロキシ酪酸溶液 0.1 mL を尾静脈内投与のみとした (β -HB 群)。投与後直ちにラットをデシケーター内に戻し、呼気の吸引 (110 mL/分) を開始した。赤外線分光分析装置を用いて、呼気ガス中の $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ 比から、 $^{13}\text{CO}_2$ (‰) の変化量 (以下、 $\Delta^{13}\text{CO}_2$ ‰) を測定した。基準 CO_2 ガスとして、市販の 95 % O_2 / 5 % CO_2 標準ガスを用いた。

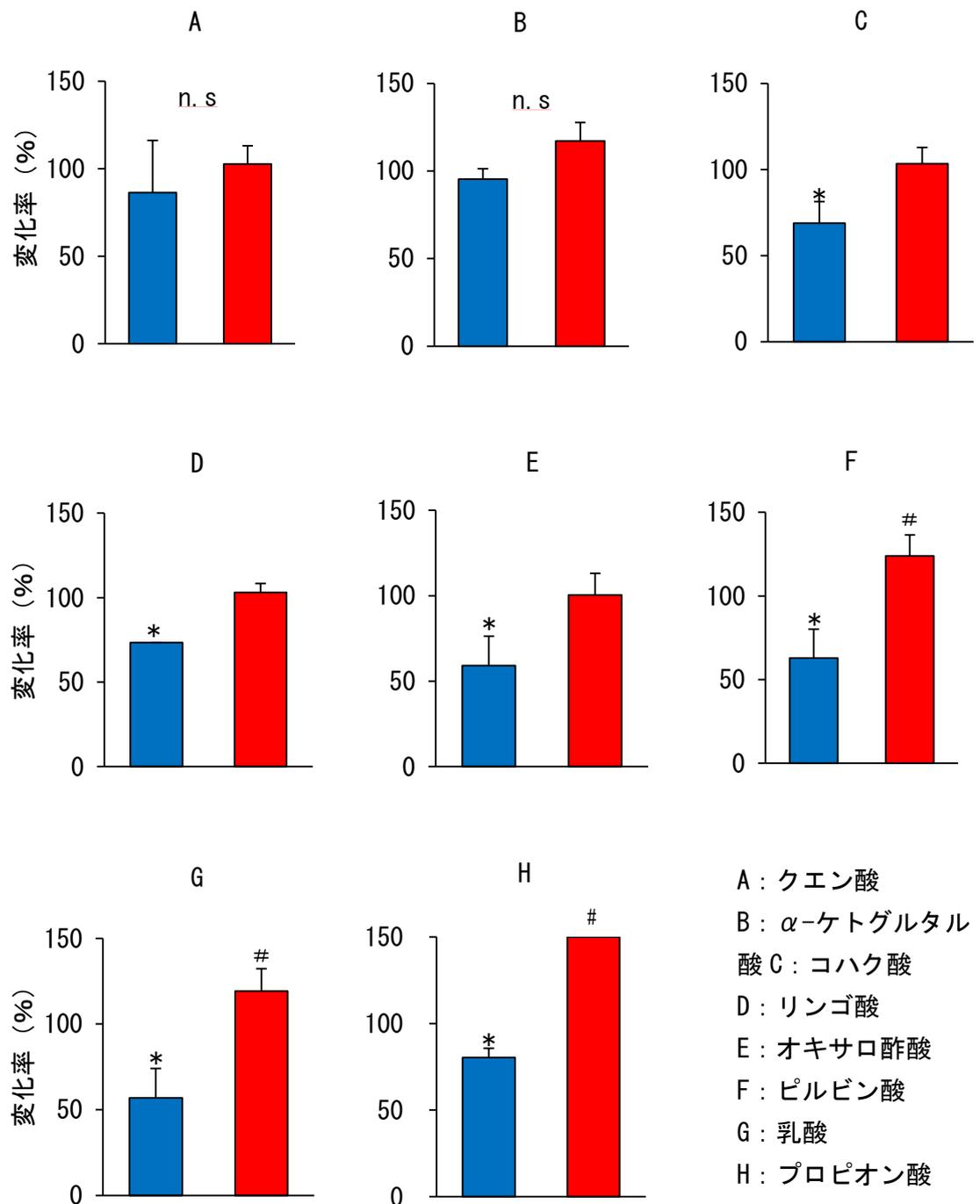


図 11 有機酸投与後の血中ケトン体濃度および血糖値の変化

■ : 血中ケトン体濃度、■ : 血糖値

投与前の値を 100 %とした場合の変化率 mean±SE (n=6)

n. s : 血中ケトン体濃度と血糖値ともに有意差なし

* : 投与前の血中ケトン体濃度に対して有意差あり ($p < 0.05$)

: 投与前の血糖値に対して有意差あり ($p < 0.05$)

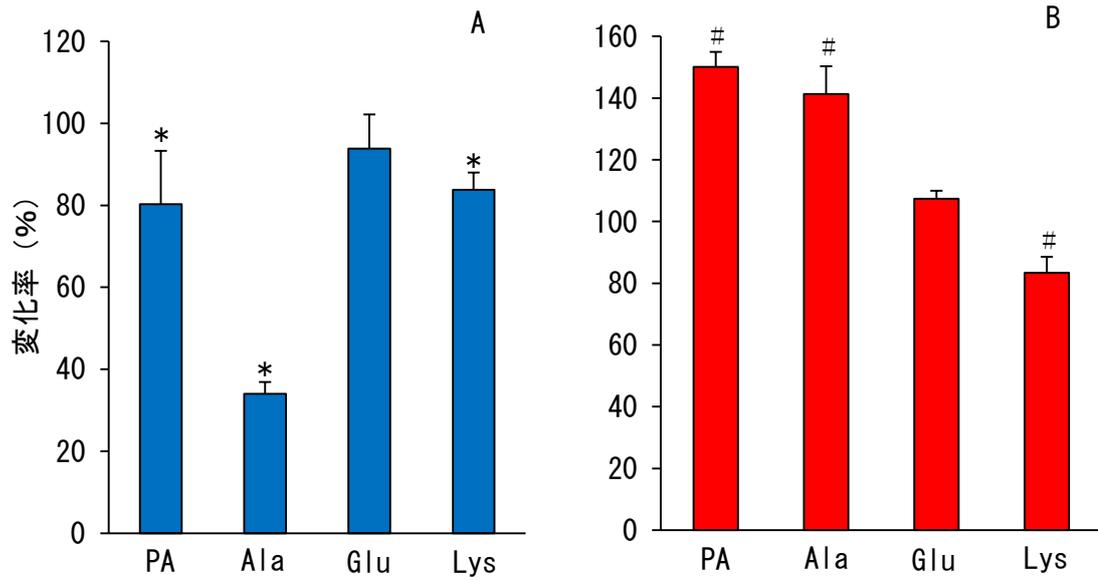


図 12 アミノ酸溶液投与による血中ケトン体濃度および血糖値の変化

A : 血中ケトン体濃度 B : 血糖値

PA : プロピオン酸, Ala : アラニン, Glu : グルタミン酸, Lys : リジン
 投与前の値を 100 %とした場合の変化率 mean±SE (n=6)

* : 投与前の血中ケトン体濃度に対して有意差あり ($p < 0.05$)

: 投与前の血糖値に対して有意差あり ($p < 0.05$)

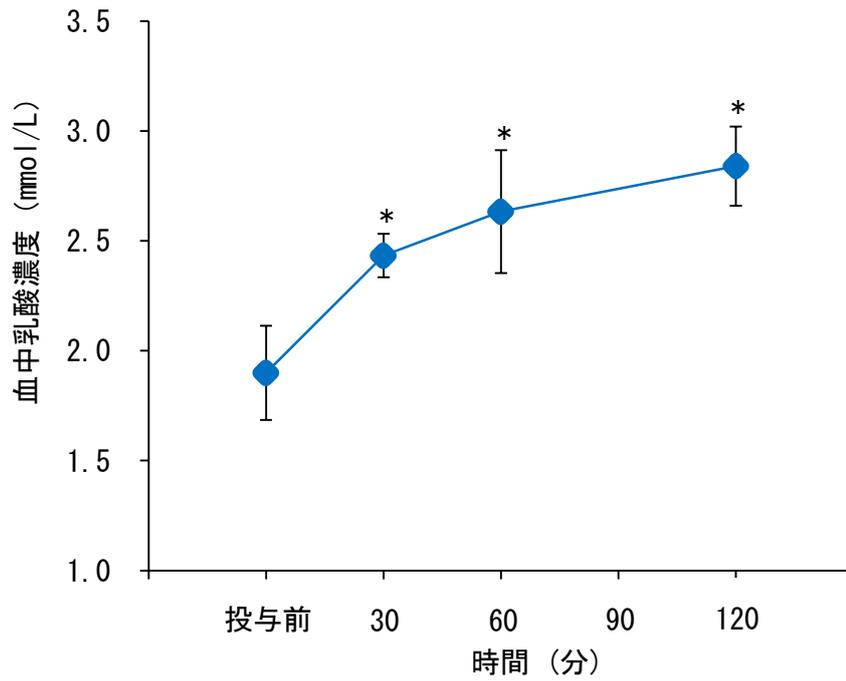


図 13 メトホルミン投与後の血中乳酸濃度の経時的変化

● : 血中乳酸濃度 mean±SE (n=6)

* : 投与前 (0分) の血中ケトン体濃度に対して有意差あり (p<0.05)

24時間絶食させたラットに、メトホルミン溶液(40 mg/mL) 1 mL を経口投与し、30、60 および 120 分後に、血中乳酸濃度を測定した。

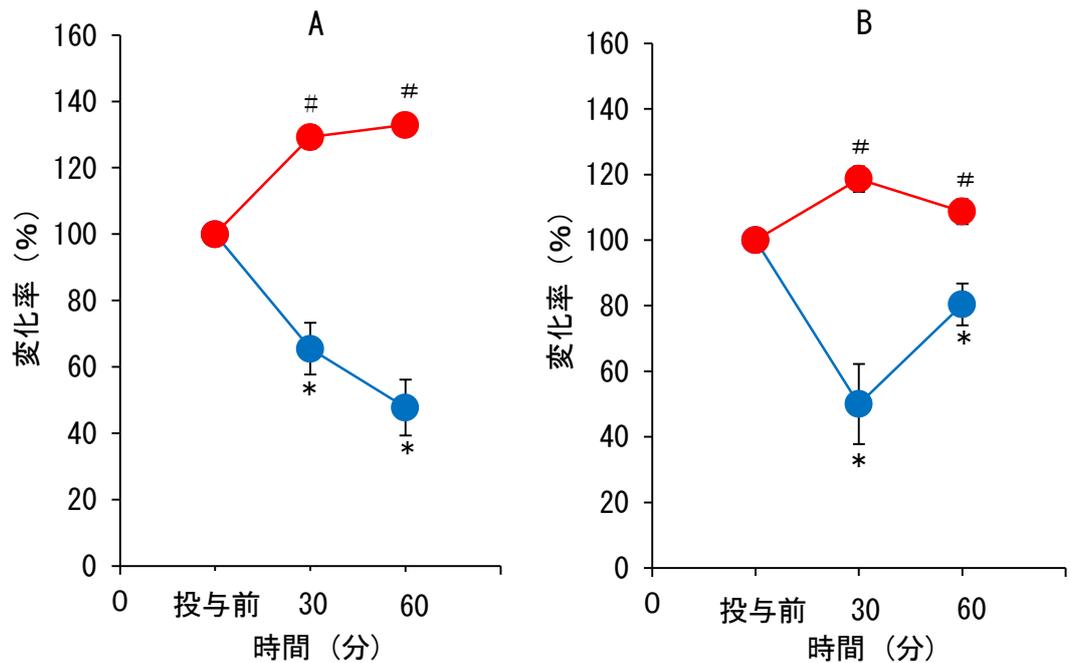


図 14 メトホルミン投与下でのプロピオン酸経口投与による血中ケトン体濃度および血糖値の経時的変化

● : 血中ケトン体濃度 ● : 血糖値

A : メトホルミン 20 mM 投与群, B : メトホルミン 40 mM 投与群

投与前の値を 100 %とした場合の変化率 mean±SE (n=6)

* : 投与前 (0 分) の血中ケトン体濃度に対して有意差あり ($p < 0.05$)

: 投与前の血糖値に対して有意差あり ($p < 0.05$)

24 時間絶食させたラットに、20 mg/mL あるいは 40 mg/mL メトホルミン溶液 1 mL を経口投与した。メトホルミン投与 10 分後に 1M プロピオン酸溶液 2 mL を経口投与し、投与 30 分および 60 分後に血中ケトン体濃度と血糖値を測定した。

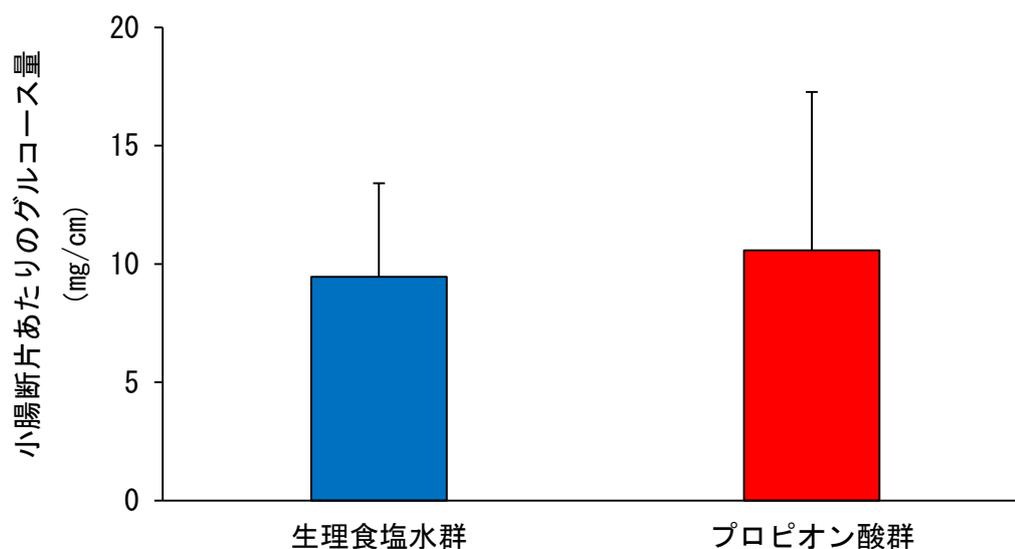


図 15A プロピオン酸経口投与による小腸断片あたりのグルコース量

プロピオン酸投与 60 分後、麻酔下で小腸を摘出し二等分して、小腸上部側末端から約 5 cmの断片を採取し、粘膜上皮細胞中のグルコース量を測定した。

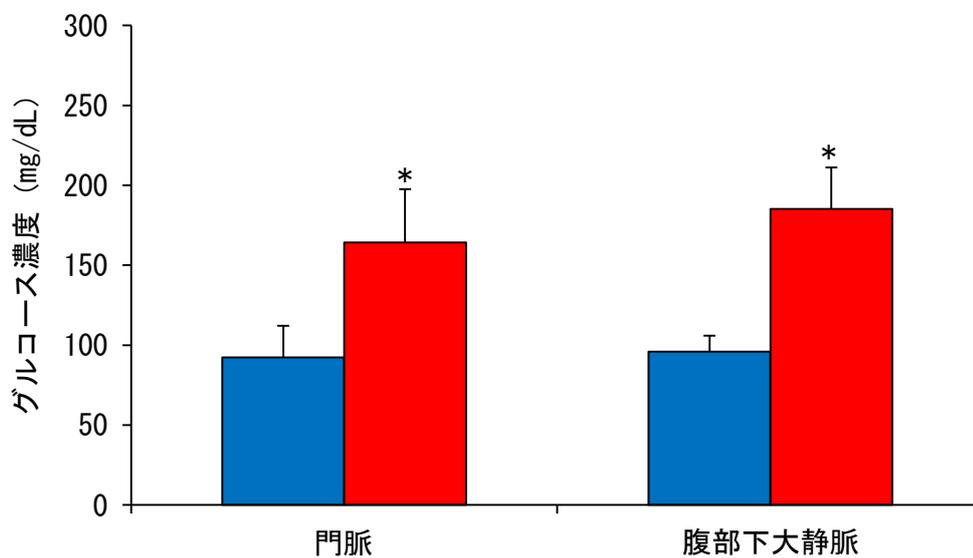


図 15B プロピオン酸経口投与による門脈血および腹部下大静脈血のグルコース濃度

■ : 生理食塩水投与群 ■ : PA 投与群 mean±SE (n=6) , * : 有意差あり (p<0.05)

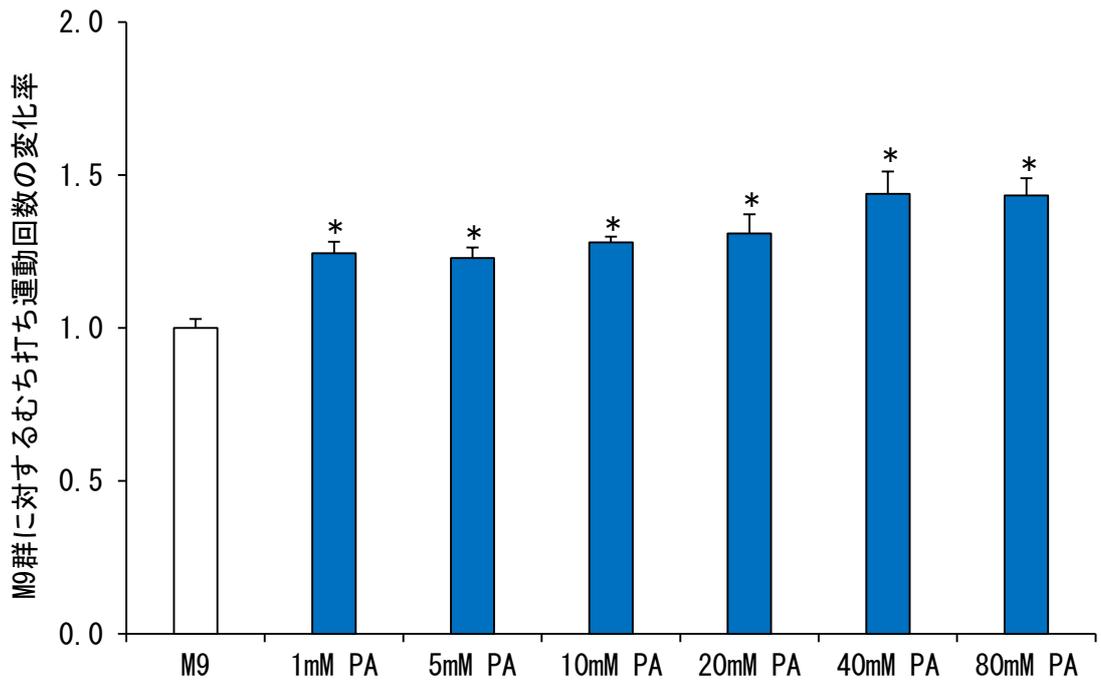


図 16 むち打ち運動に対するプロピオン酸 (PA) の用量応答性

同調化後、孵化した L1 線虫 (300 匹) を *E. coli* OP50 を塗布した NGM 培地で培養した。4 日後、線虫 (young adult) を M9 buffer で遠心チューブに回収して洗浄した。遠心チューブ 内の残液が 1 mL になるように上清を捨て、プロピオン酸の最終濃度がそれぞれ、1、5、10、20、40 および 80 mM になるよう加え、全体液量が 5 mL になるように M9 buffer で調製した後、20°C で 16 時間培養した。M9 buffer のみで培養した群を M9 群とした。培養終了後、線虫に付着したプロピオン酸を M9 buffer で洗浄し、むち打ち運動を測定した。

mean ± SE ($n=10$), *: M9 群に対して有意差あり ($p < 0.05$)

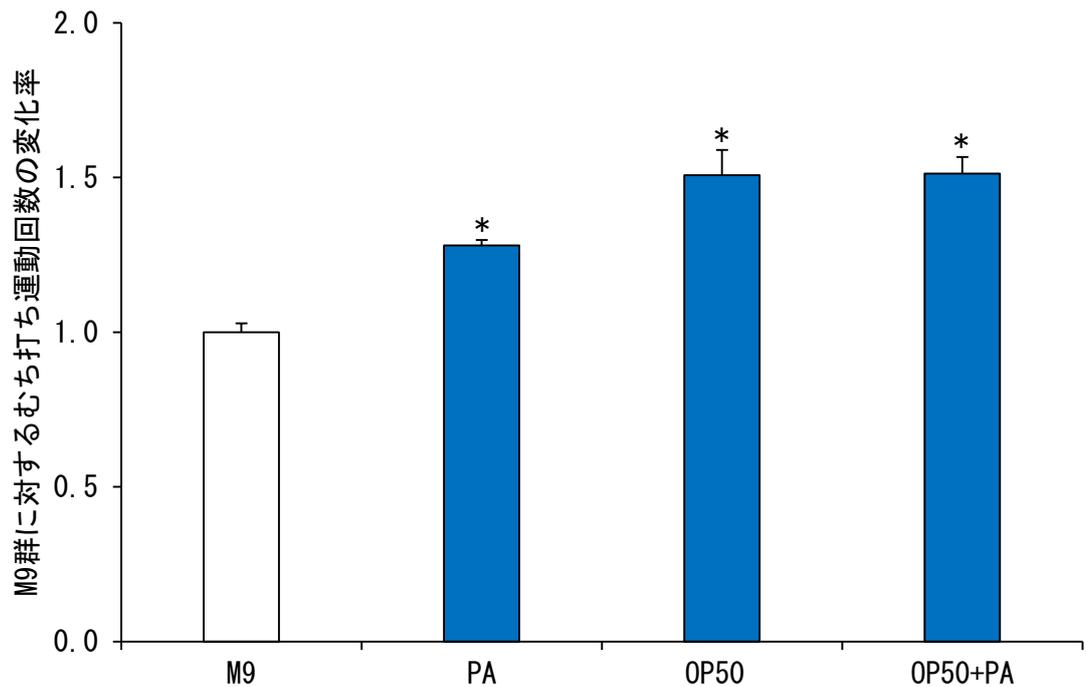


図 17 プロピオン酸投与によるむち打ち運動への影響

M9 : M9 buffer のみで培養した群, PA : 10 mM プロピオン酸投与群, OP50 : *E. coli* OP50 投与群, OP50+PA : *E. coli* OP50+プロピオン酸投与群
 mean±SE ($n=10$), * : M9 群に対して有意差あり ($p<0.05$)

1 匹の線虫を M9 buffer で満たしたシャーレ (60 mm) で 2 分間泳がせた後、線虫を M9 buffer とともに、ホールスライドガラスに移し、さらに 1 分間泳がせた。むち打ち運動は、顕微鏡に取り付けたカメラを使用して記録した。映像は每秒 20 フレームで 1 分間記録した。線虫が 30 秒間連続してむち打ち運動をしている場面を抜粋し、むち打ち運動を測定した。

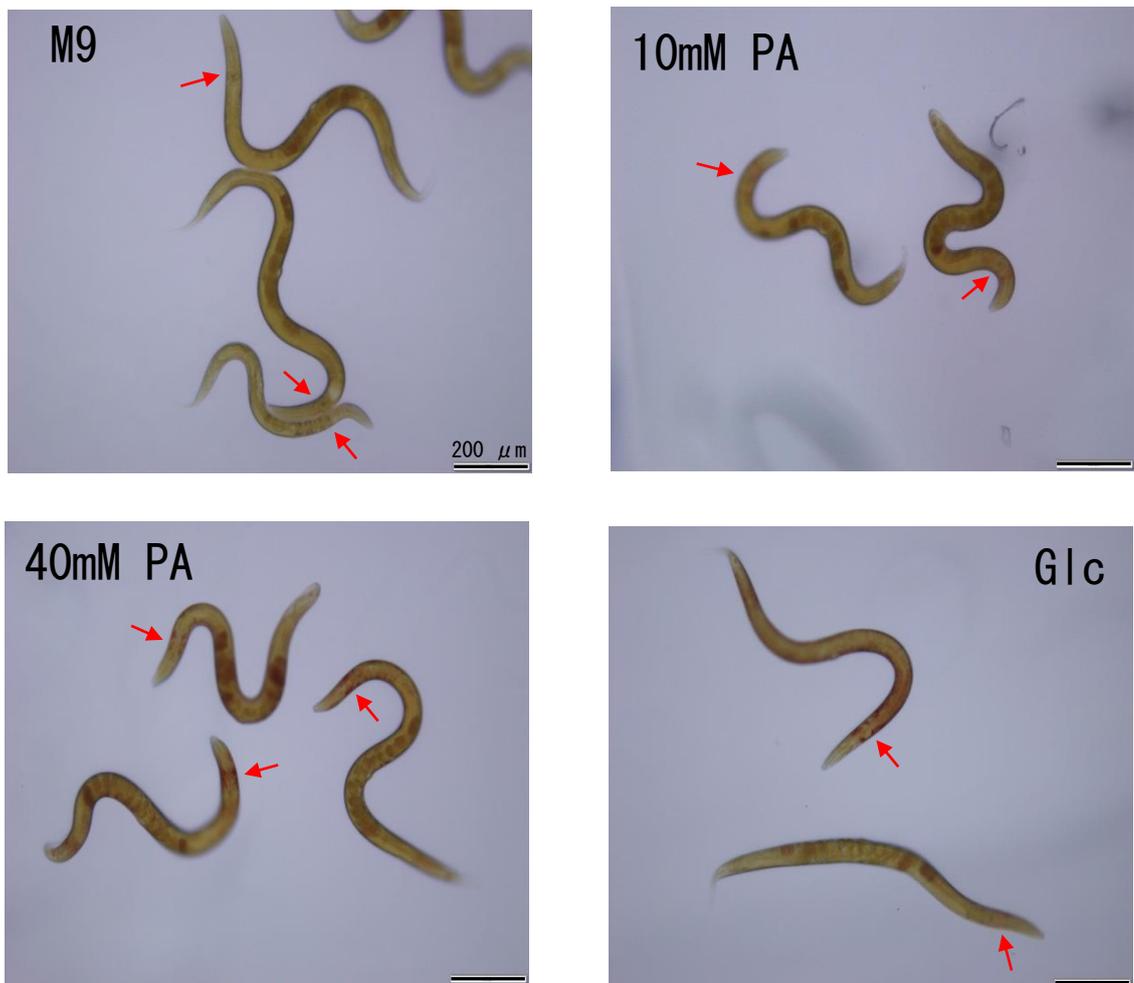


図18 プロピオン酸投与が *C. elegans* のグリコーゲン蓄積に及ぼす影響（ヨウ素染色）

M9 : M9 buffer のみで培養した群, 10 mM PA : 10 mM プロピオン酸投与群, 40 mM PA : 40 mM プロピオン酸投与群, Glc : 5 % グルコース投与群

同調化後、孵化した L1 線虫（300 匹）を *E. coli* OP50 を塗布した NGM 培地で培養した。ポジティブコントロールとして Glc 群を設けた。3 日後、線虫（L4 世代）を、M9 buffer で遠心チューブに回収した。M9 buffer で線虫を洗浄した後、培養条件によって 4 群に分けた。シャーレ（60 mm）に線虫を移し、線虫が存在する部分を培地ごと切り出し、スライドガラスに移した。ヨウ素蒸気に 60 秒間曝露し、顕微鏡に取り付けられたカメラを使用して、ヨウ素蒸気の曝露から 60 秒後に撮影した。矢印は、咽頭付近の濃く染色された部位を示している。

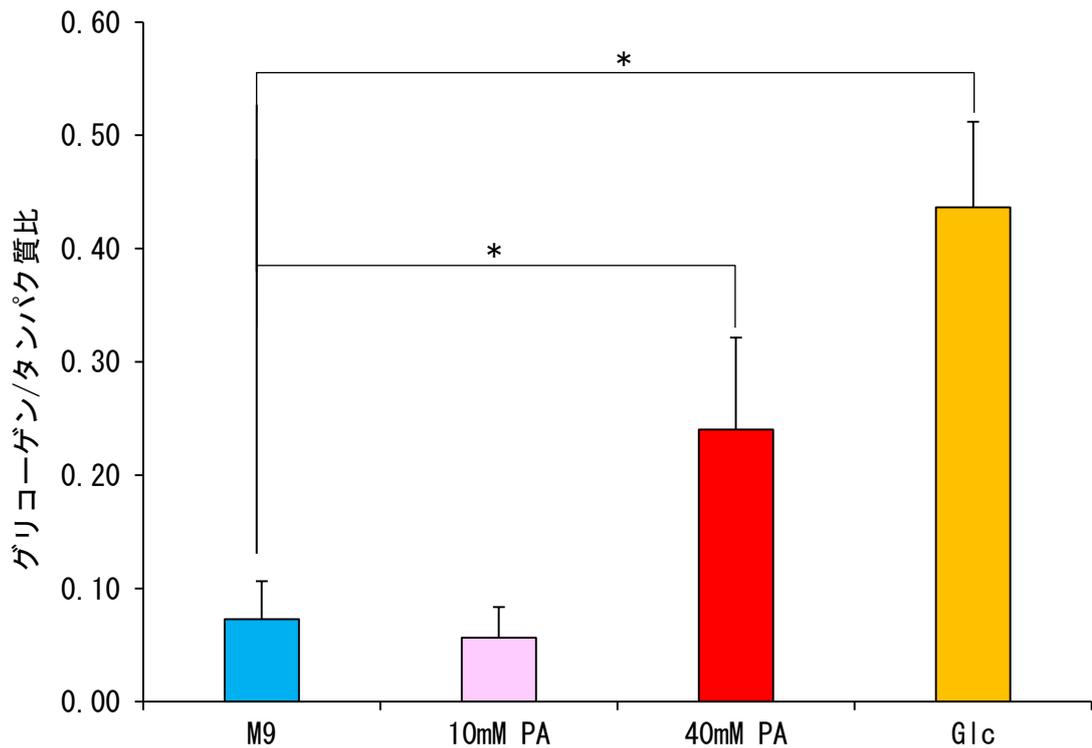


図 19 プロピオン酸投与が *C. elegans* のグリコーゲン蓄積に及ぼす影響

M9 : M9 buffer のみで培養した群, 10 mM PA : 10 mM プロピオン酸投与群,
 40 mM PA : 40 mM プロピオン酸投与群, Glc : 5 % グルコース投与群
 mean±SE ($n=4$), * : M9 群に対して有意差あり ($p<0.05$)

同調化後、孵化した L1 線虫 (500 匹) を *E. coli* OP50 を塗布した NGM 培地で培養した。3 日後、線虫が L4 世代に成長したのを確認し、M9 buffer で遠心チューブに回収した。M9 buffer で線虫を洗浄した後、培養条件によって 4 種の群に分けた。線虫を M9 buffer で洗浄し上清を捨てた後、チューブ (1.5 mL) に線虫を移し、超純水を加え、全液体量が 100 μ L になるように調製した。超音波処理で線虫を粉碎し、5 分間煮沸した後、13500 rpm で 5 分間遠心分離した。回収した上清からグリコーゲン量および沈殿物からタンパク質量を測定した。

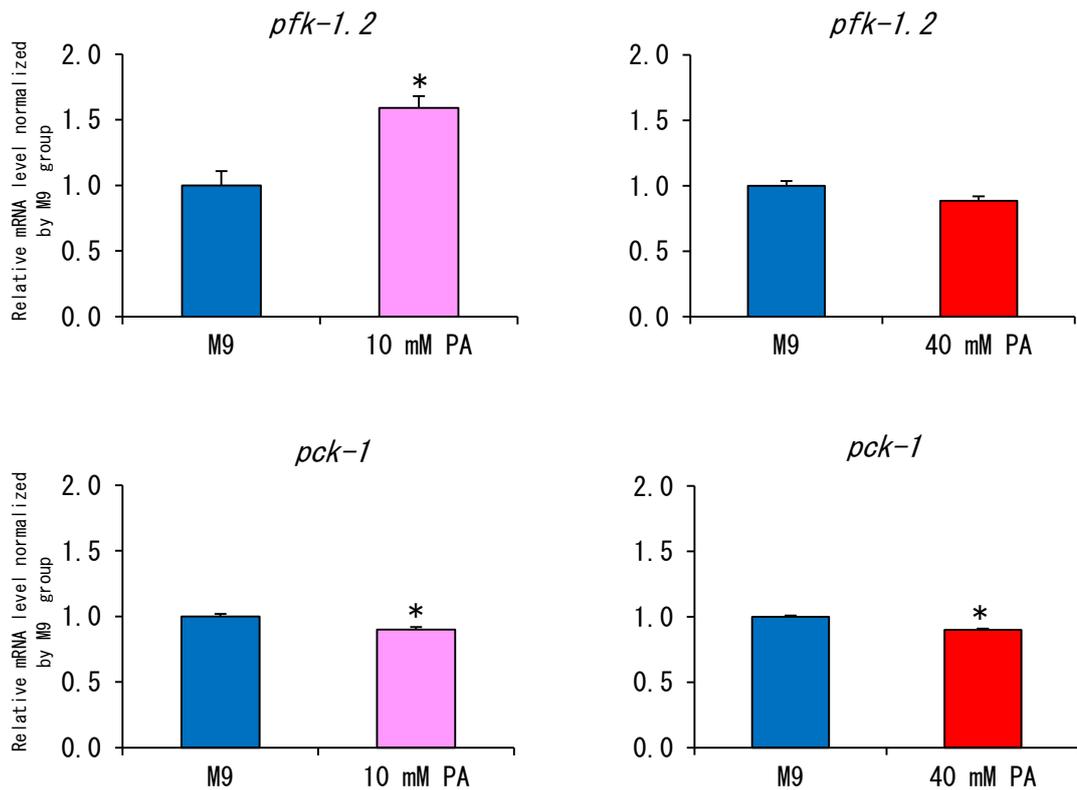


図 20A プロピオン酸投与が糖質代謝酵素遺伝子の発現に及ぼす影響

M9 : M9 のみで培養した群, 10 mM PA : 10 mM プロピオン酸投与群,

40 mM PA : 40 mM プロピオン酸投与群

mean±SE (n=5) , * : M9 群に対して有意差あり (p<0.05)

pfk-1.2 : ATP-dependent 6-phosphofructokinase 2

pck-1 : phosphoenolpyruvate carboxykinase 1

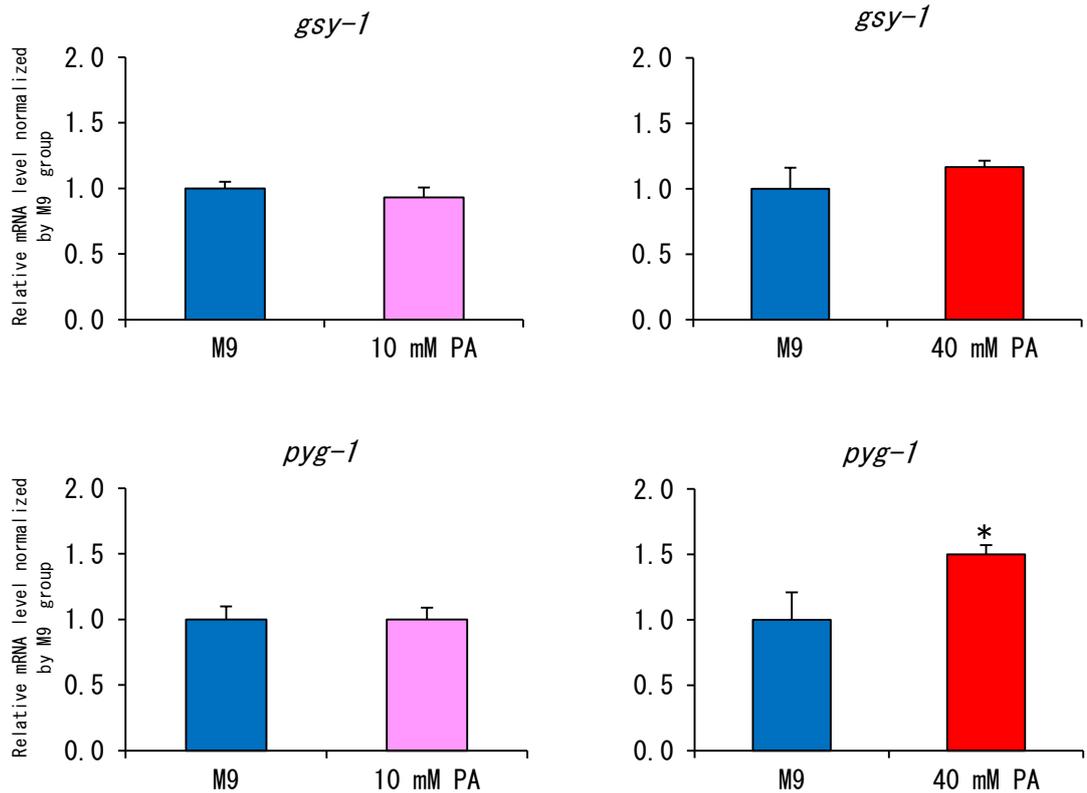


図 20B プロピオン酸投与が糖質代謝酵素遺伝子の発現に及ぼす影響

M9 : M9 のみで培養した群, 10 mM PA : 10 mM プロピオン酸投与群,

40 mM PA : 40 mM プロピオン酸投与群

mean±SE ($n=5$), * : M9 群に対して有意差あり ($p<0.05$)

gsy-1: glycogen synthase

pyg-1: glycogen phosphorylase

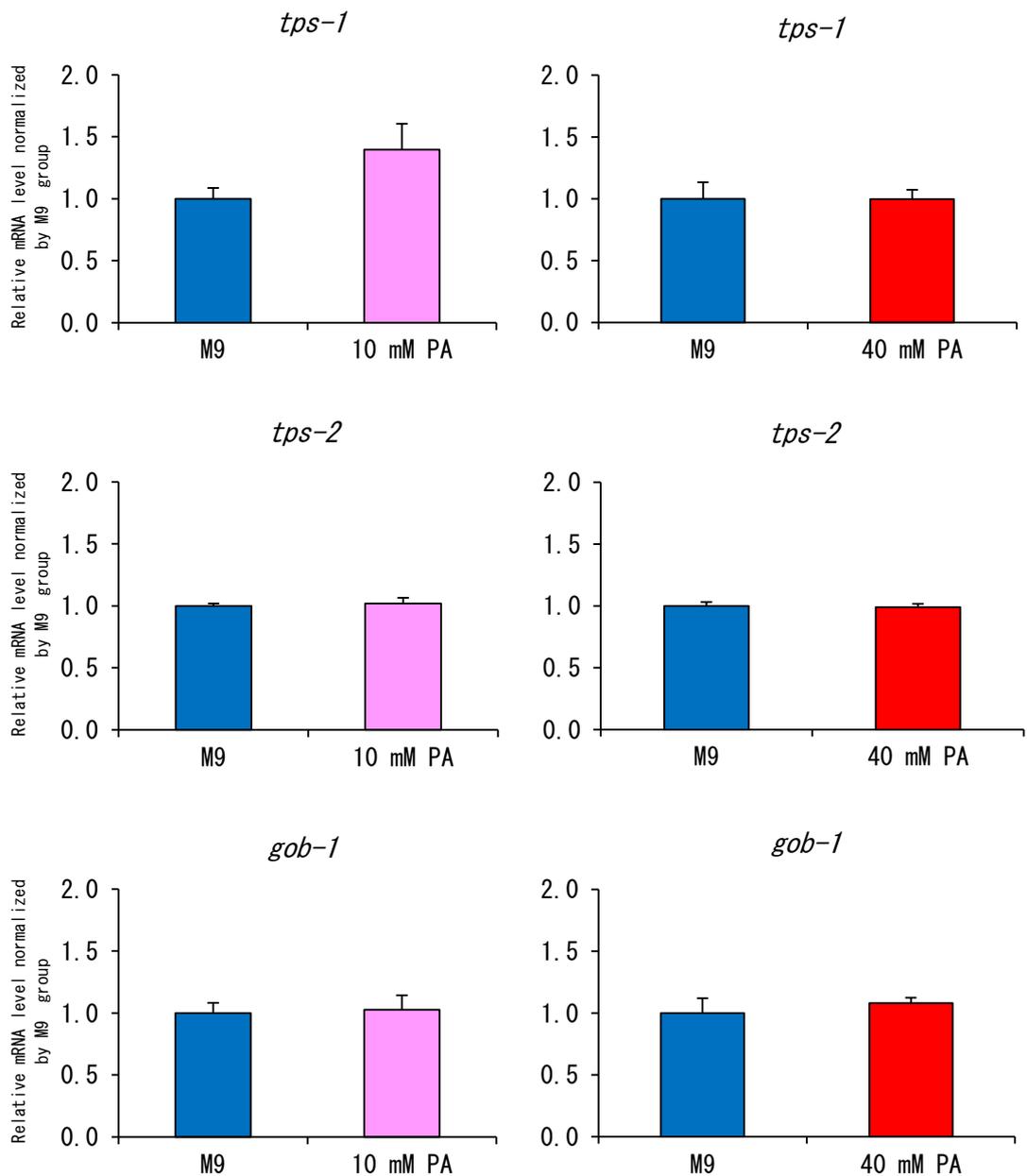


図 21A プロピオン酸投与が糖質代謝酵素遺伝子の発現に及ぼす影響

M9 : M9 のみで培養した群, 10 mM PA : 10 mM プロピオン酸投与群,

40 mM PA : 40 mM プロピオン酸投与群

mean ± SE ($n=5$)

tps-1 : alpha-trehalose phosphate synthase

tps-2 : alpha-trehalose phosphate synthase

gob-1 : trehalose phosphatase

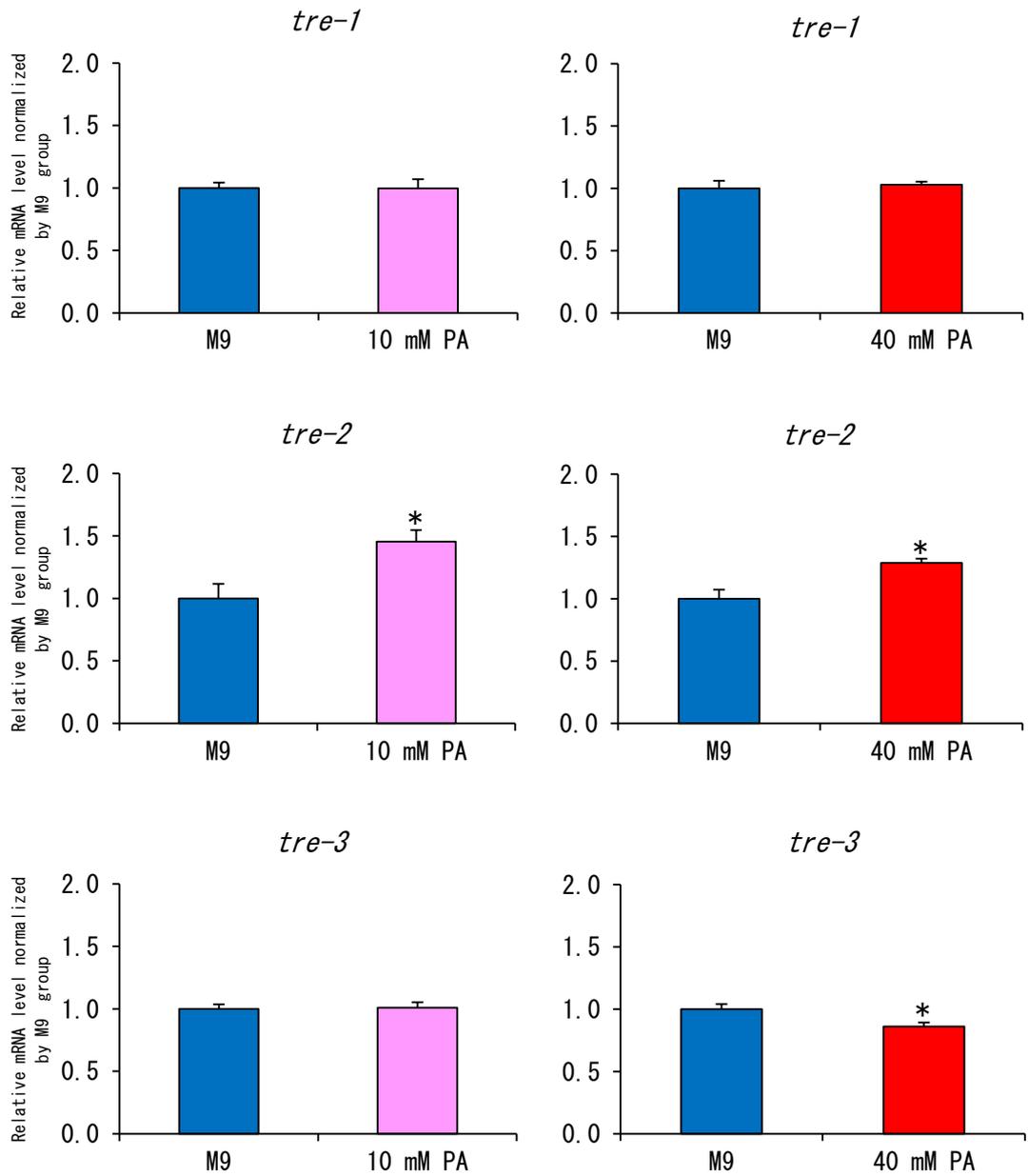


図 21B プロピオン酸投与が糖質代謝酵素遺伝子の発現に及ぼす影響

M9 : M9 のみで培養した群, 10 mM PA : 10 mM プロピオン酸投与群,

40 mM PA : 40 mM プロピオン酸投与群

mean±SE ($n=5$), * : M9 群に対して有意差あり ($p < 0.05$)

tre-1 : alpha-trehalase

tre-2 : alpha-trehalase

tre-3 : alpha-trehalase

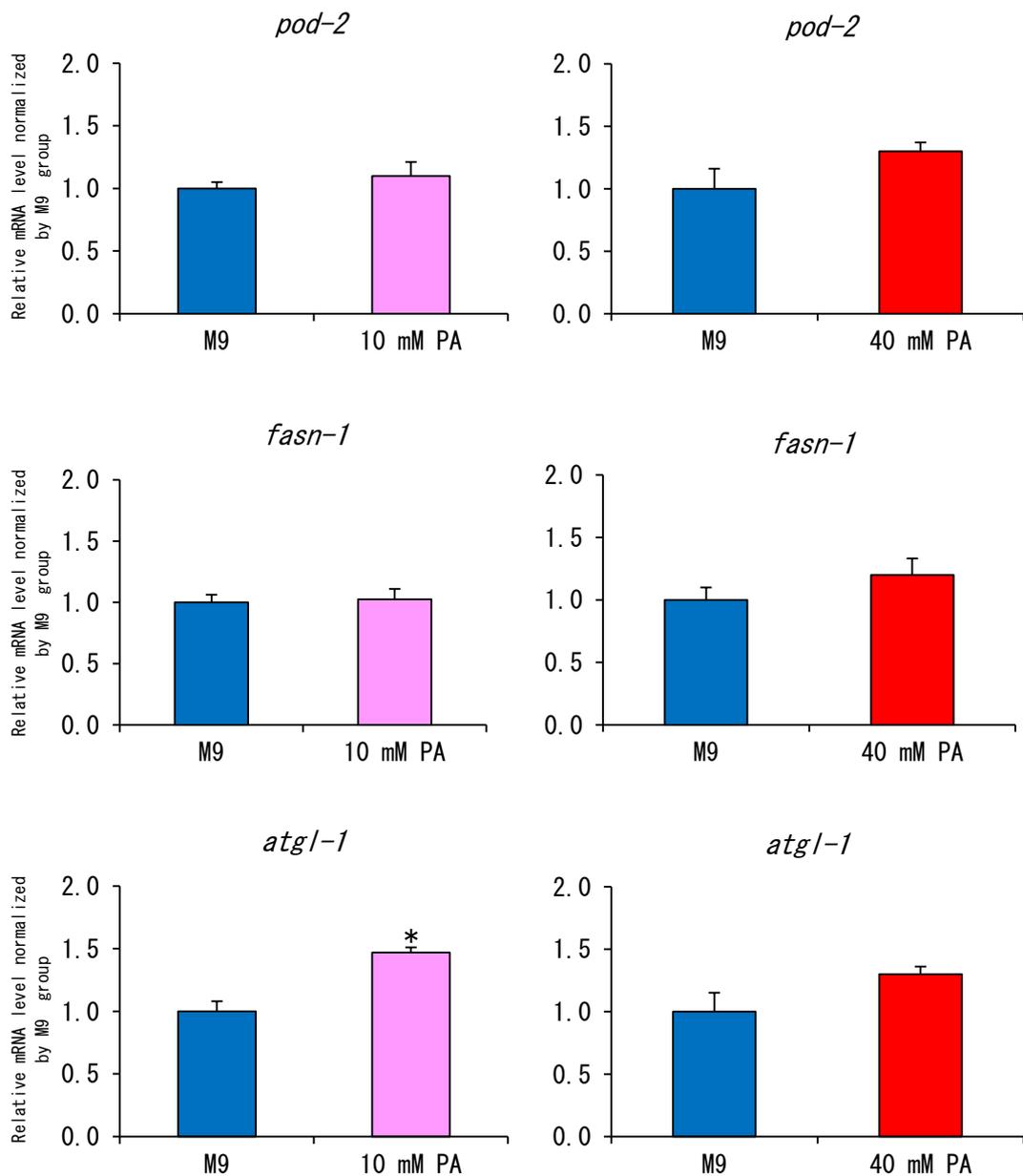


図 22A プロピオン酸投与が脂肪酸代謝酵素遺伝子の発現に及ぼす影響

M9 : M9 のみで培養した群, 10 mM PA : 10 mM プロピオン酸投与群,

40 mM PA : 40 mM プロピオン酸投与群

mean±SE (n=5) , * : M9 群に対して有意差あり (p<0.05)

pod-2 : acetyl-CoA carboxylase

fasn-1 : fatty acid synthase

atgl-1 : adipose triglyceride lipase

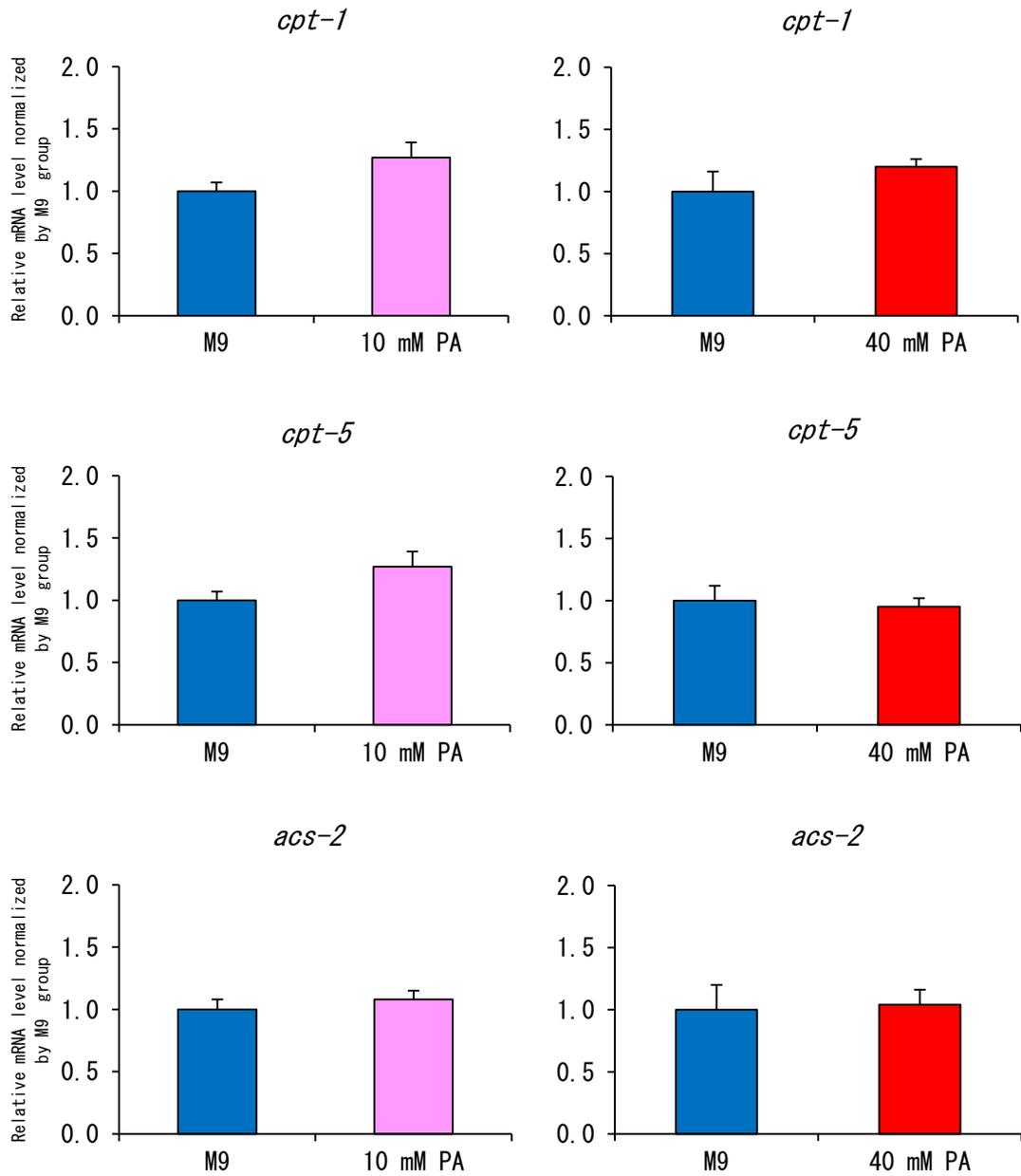


図 22B プロピオン酸投与が脂肪酸代謝酵素遺伝子の発現に及ぼす影響

M9 : M9 のみで培養した群, 10 mM PA : 10 mM プロピオン酸投与群,

40 mM PA : 40 mM プロピオン酸投与群

mean±SE (n=5)

cpt-1 : carnitine palmitoyl transferase 1

cpt-5 : carnitine palmitoyl transferase

acs-2 : fatty acid-CoA synthetase family

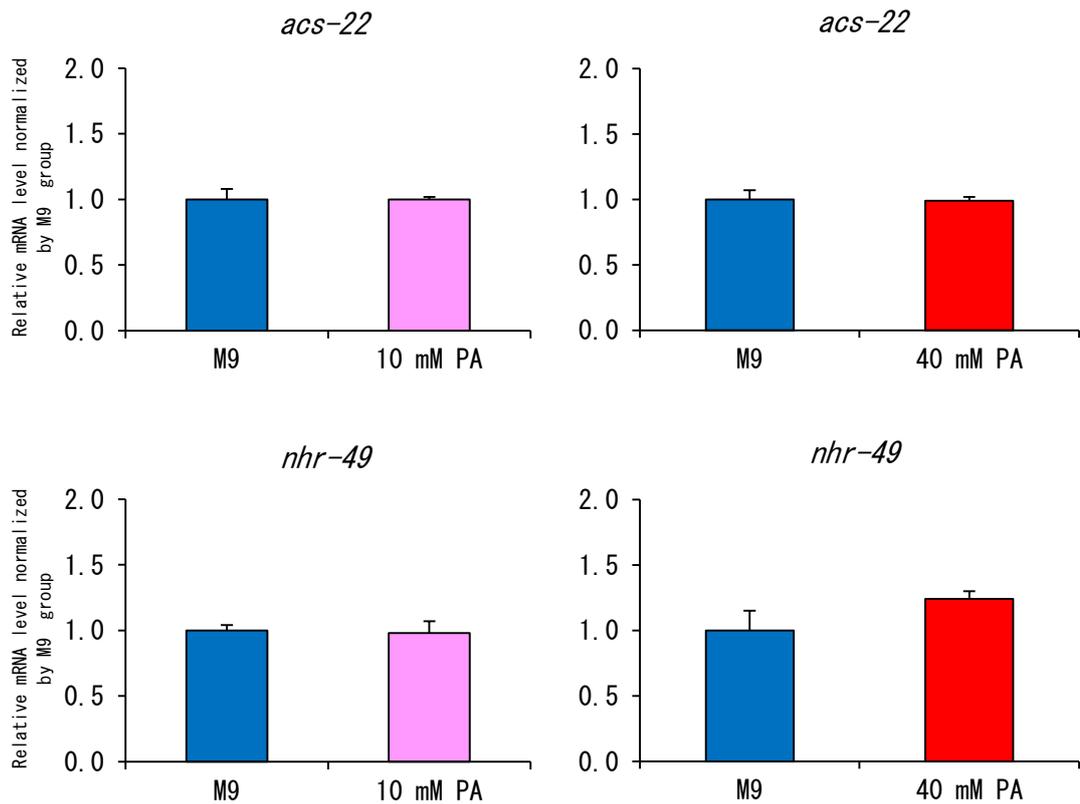


図 22C プロピオン酸投与が脂肪酸代謝酵素遺伝子の発現に及ぼす影響

M9 : M9 のみで培養した群, 10 mM PA : 10 mM プロピオン酸投与群,

40 mM PA : 40 mM プロピオン酸投与群

mean±SE ($n=5$)

acs-22: fatty acid-CoA synthetase family

nhr-49: nuclear hormone receptor family

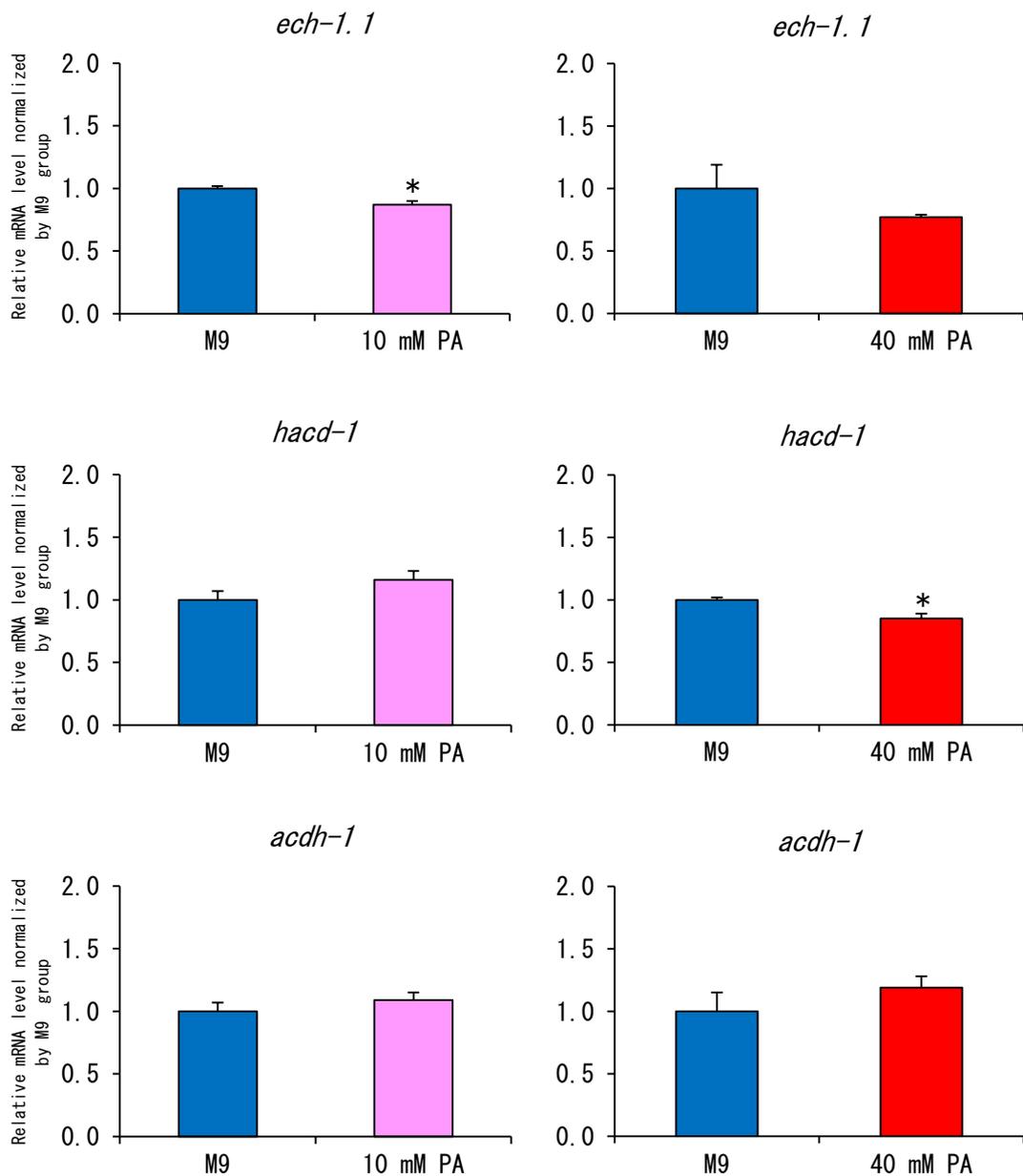


図 23 プロピオン酸投与が β 酸化酵素遺伝子の発現に及ぼす影響

M9 : M9 のみで培養した群, 10 mM PA : 10 mM プロピオン酸投与群,

40 mM PA : 40 mM プロピオン酸投与群

mean \pm SE ($n=5$), * : M9 群に対して有意差あり ($p<0.05$)

ech-1.1 : enoyl-CoA hydratase

hacd-1 : hydroxy-acyl-CoA dehydrogenase

acdh-1 : acyl-CoA dehydrogenase

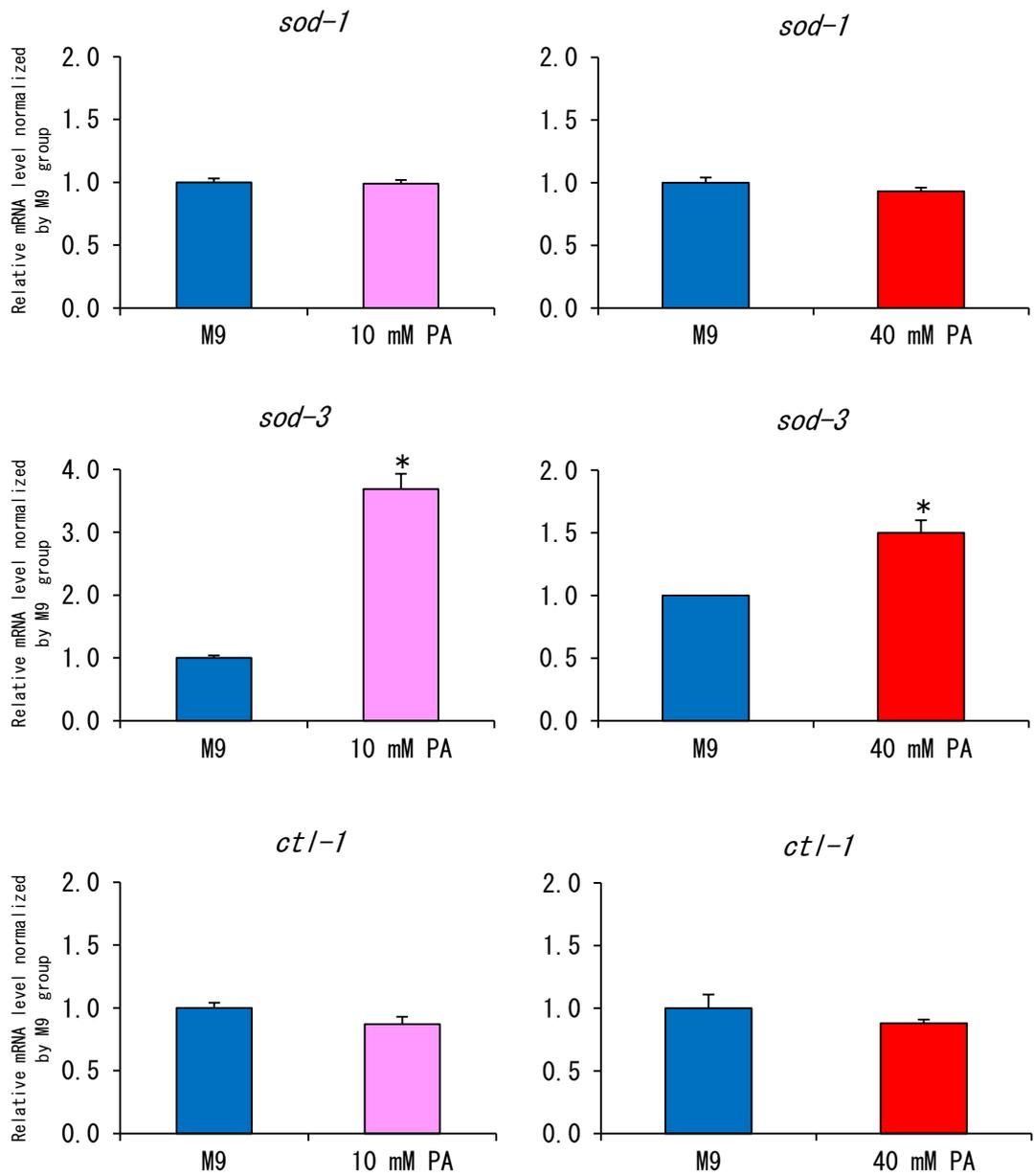


図 24A プロピオン酸投与が抗酸化遺伝子の発現に及ぼす影響

M9 : M9 のみで培養した群, 10 mM PA : 10 mM プロピオン酸投与群,

40 mM PA : 40 mM プロピオン酸投与群

mean±SE (n=5) , * : M9 群に対して有意差あり (p<0.05)

sod-1 : super oxide dismutase-1

sod-3 : super oxide dismutase-3

ct1-1 : catalase-1

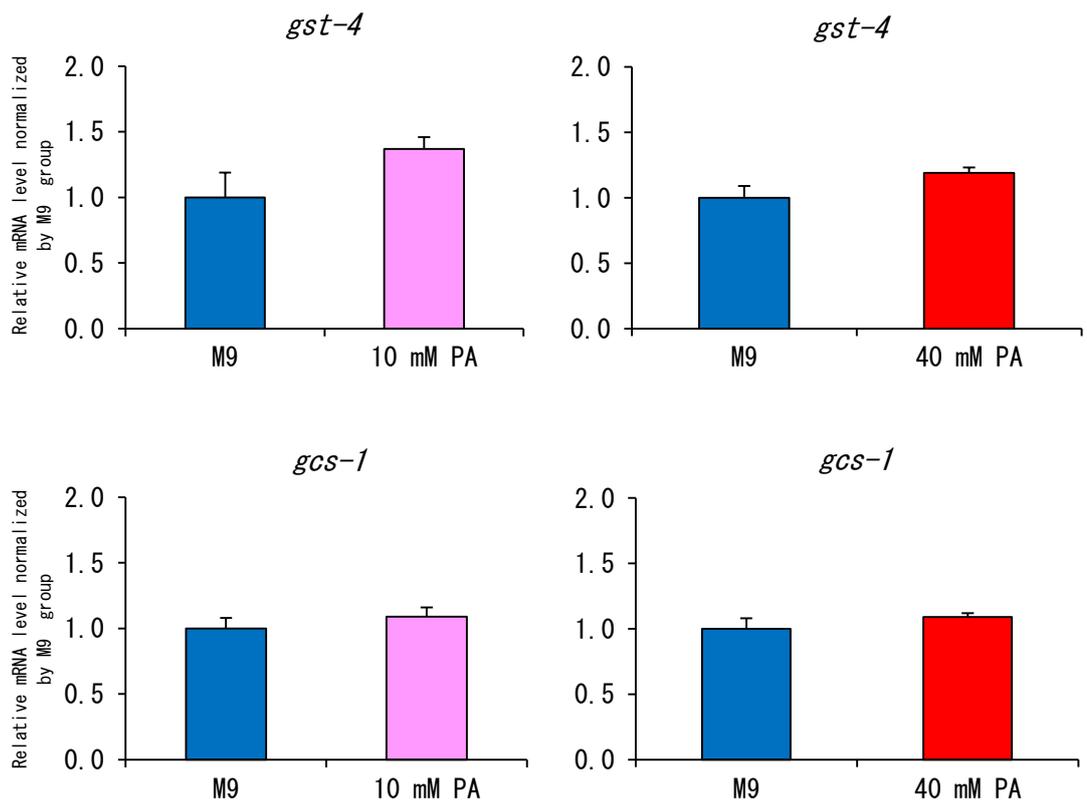


図 24B プロピオン酸投与が抗酸化遺伝子の発現に及ぼす影響

M9 : M9 のみで培養した群, 10 mM PA : 10 mM プロピオン酸投与群,
 40 mM PA : 40 mM プロピオン酸投与群
 mean±SE (n=5)

gst-4 : glutathione S-transferase-4
gcs-1 : glutamate cysteine ligase-1

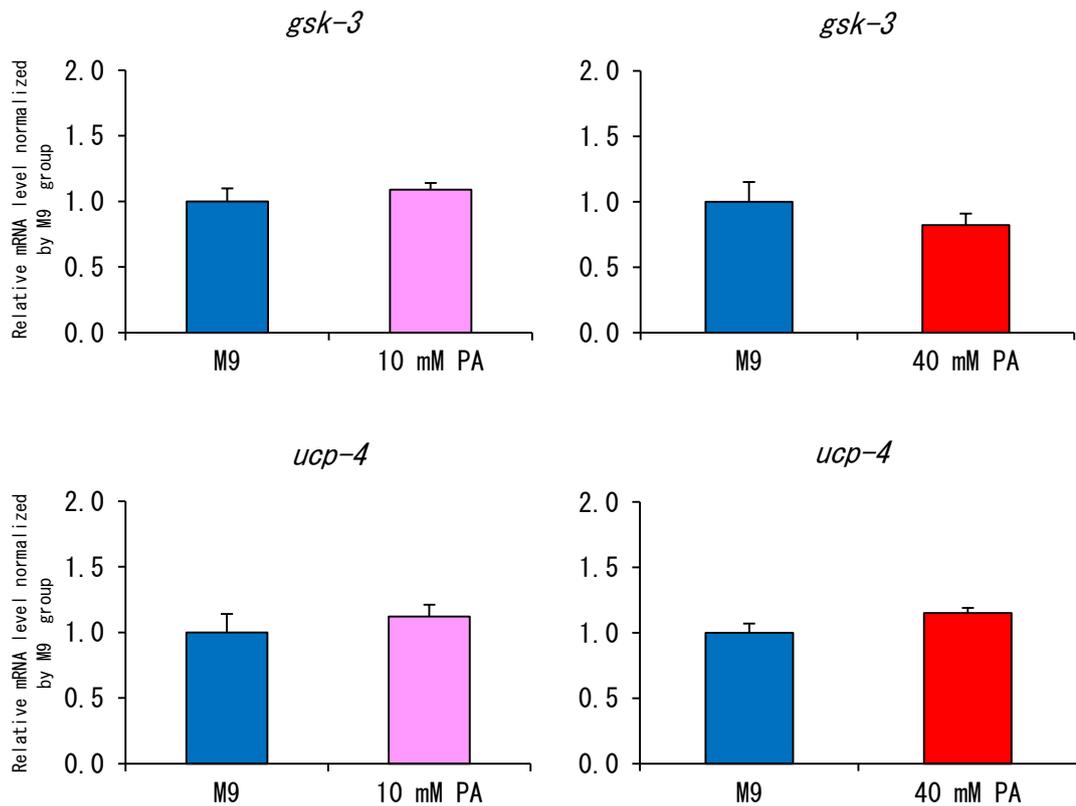


図 24C プロピオン酸投与が転写因子の制御に関わる酵素の遺伝子および脱共役タンパク質の遺伝子の発現に及ぼす影響

M9 : M9 のみで培養した群, 10 mM PA : 10 mM プロピオン酸投与群,
 40 mM PA : 40 mM プロピオン酸投与群
 mean±SE (n=5)

gsk-3: glycogen synthase kinase-3

ucp-4: mitochondrial uncoupling proteins-4

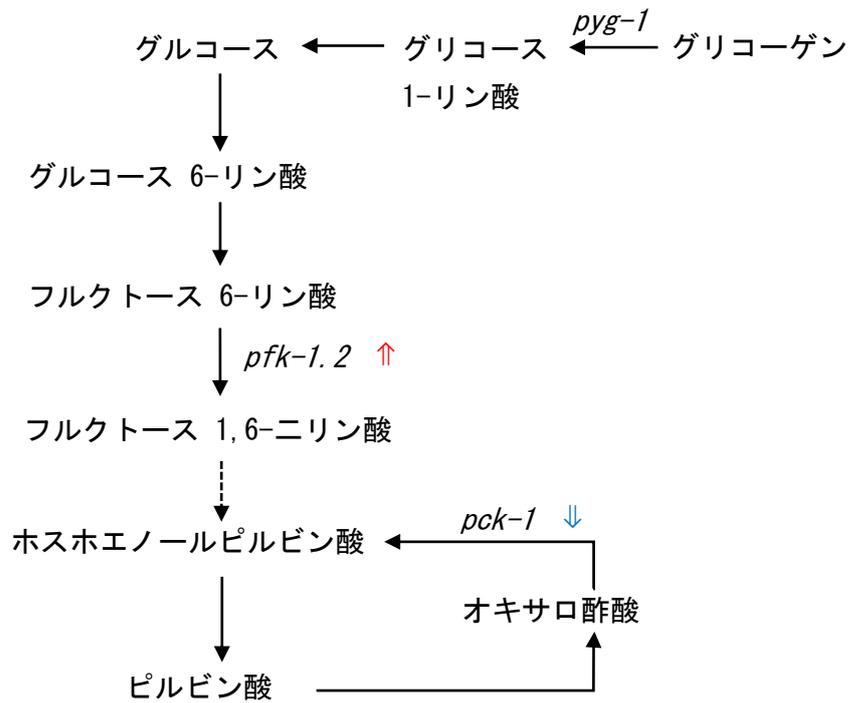


図 25A グルコースの代謝経路

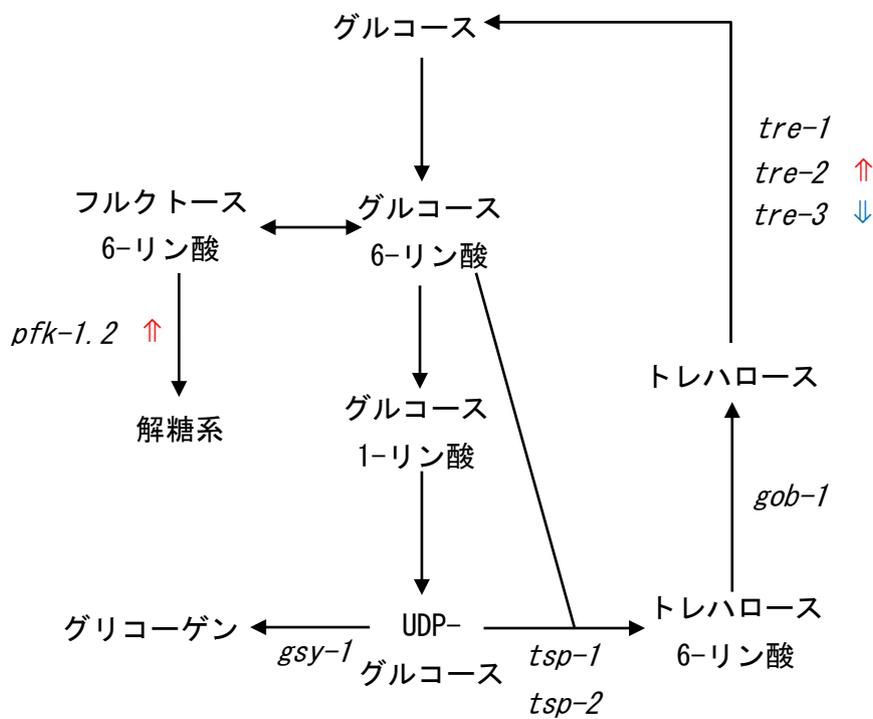


図 25B グルコースおよびトレハロースの代謝経路

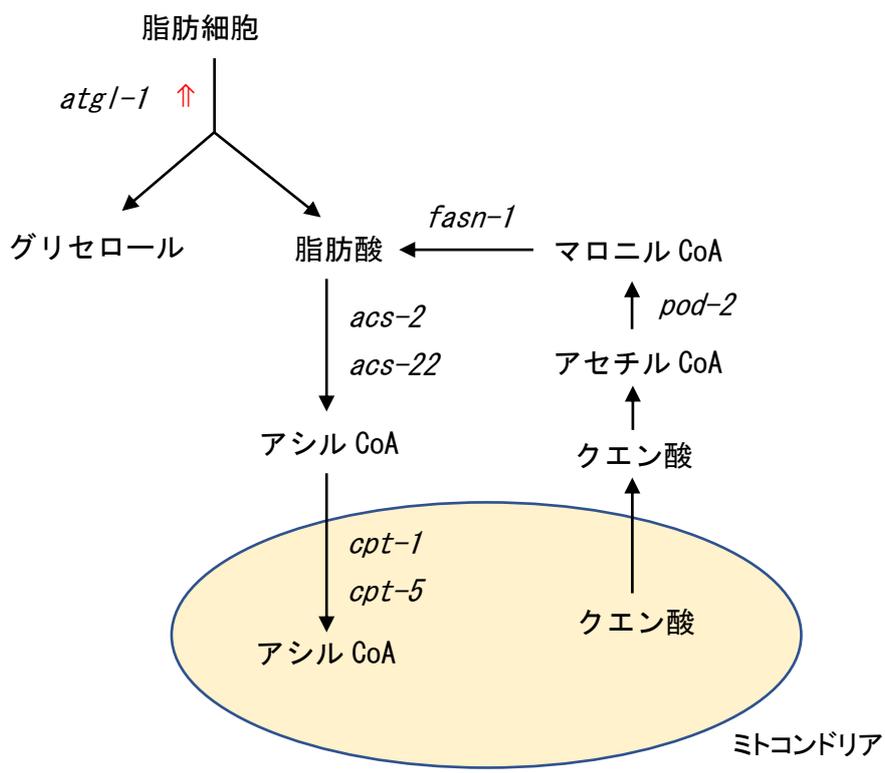


図 25C 脂肪酸の代謝経路

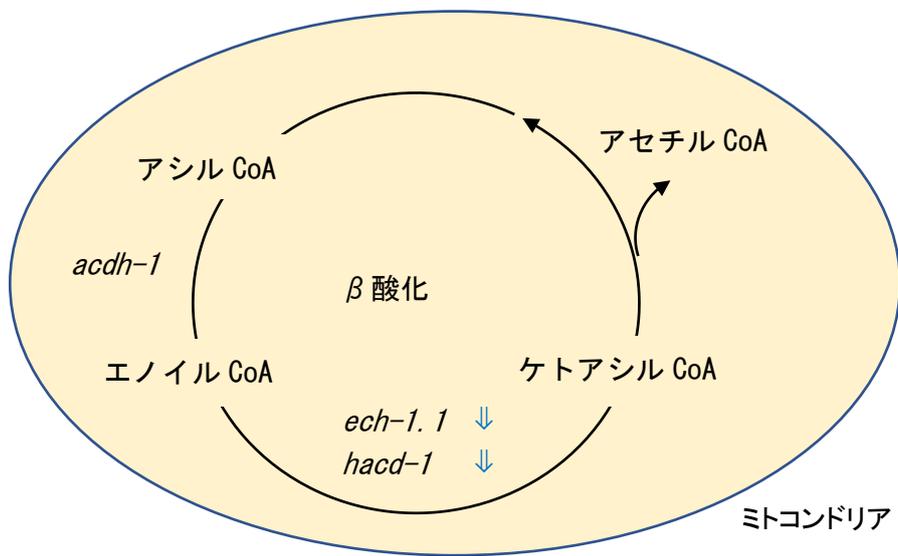


図 25D ミトコンドリア内でのβ酸化の代謝経路

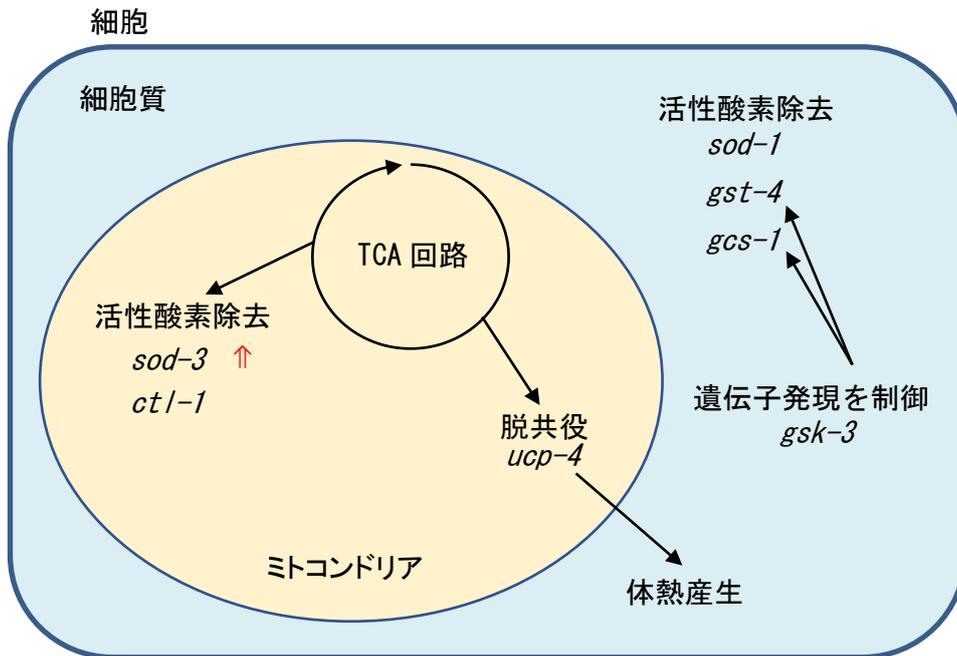


図 25E 細胞質およびミトコンドリア内の抗酸化経路

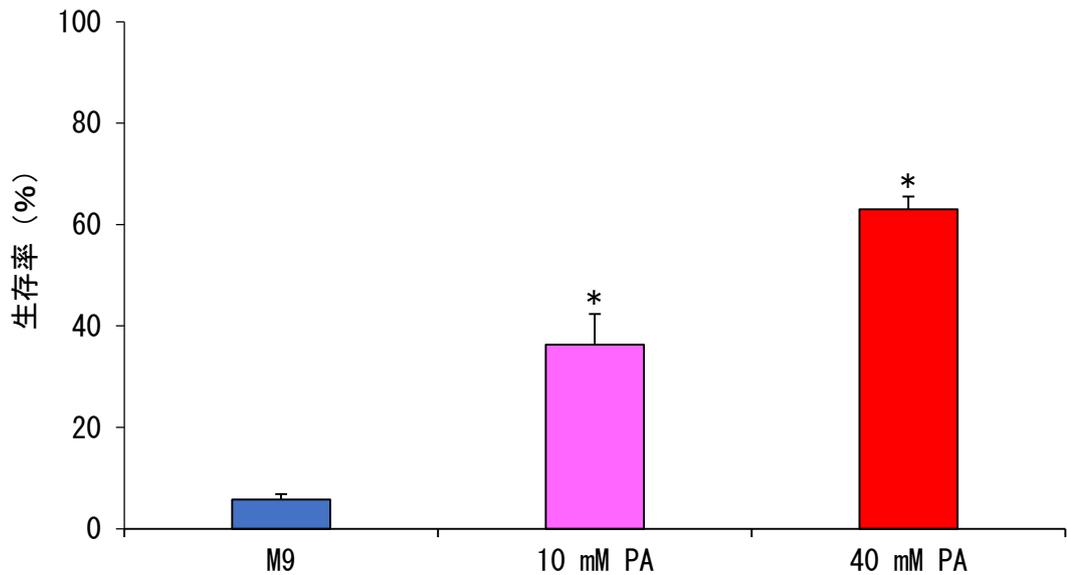


図 26 プロピオン酸投与が *C. elegans* の酸化ストレス耐性に及ぼす影響

M9 : M9 のみで培養した群, 10 mM PA : 10 mM プロピオン酸投与群,

40 mM PA : 40 mM プロピオン酸投与群

mean±SE ($n=5$), * : M9 群に対して有意差あり ($p<0.05$)

同調化後、孵化した L1 線虫 (1000 匹) を *E. coli* OP50 を塗布した NGM 培地で培養した。3 日後、線虫が L4 世代に成長したのを確認し、M9 buffer で遠心チューブに回収した。遠心チューブ内の残液が 1 mL になるように上清を捨て、プロピオン酸の最終濃度がそれぞれ、10 mM あるいは 40 mM になるよう加え、全体液量が 5 mL になるように M9 buffer で調製した後、48 時間培養した。NGM 培地 (100 mL) に 12 mM ジュグロン溶液を 2 mL 加え作成した 240 μ M ジュグロン添加 NGM 培地に約 20 匹の線虫を移し、2 時間後の生存頭数を顕微鏡を用いて目視で確認して計測した。

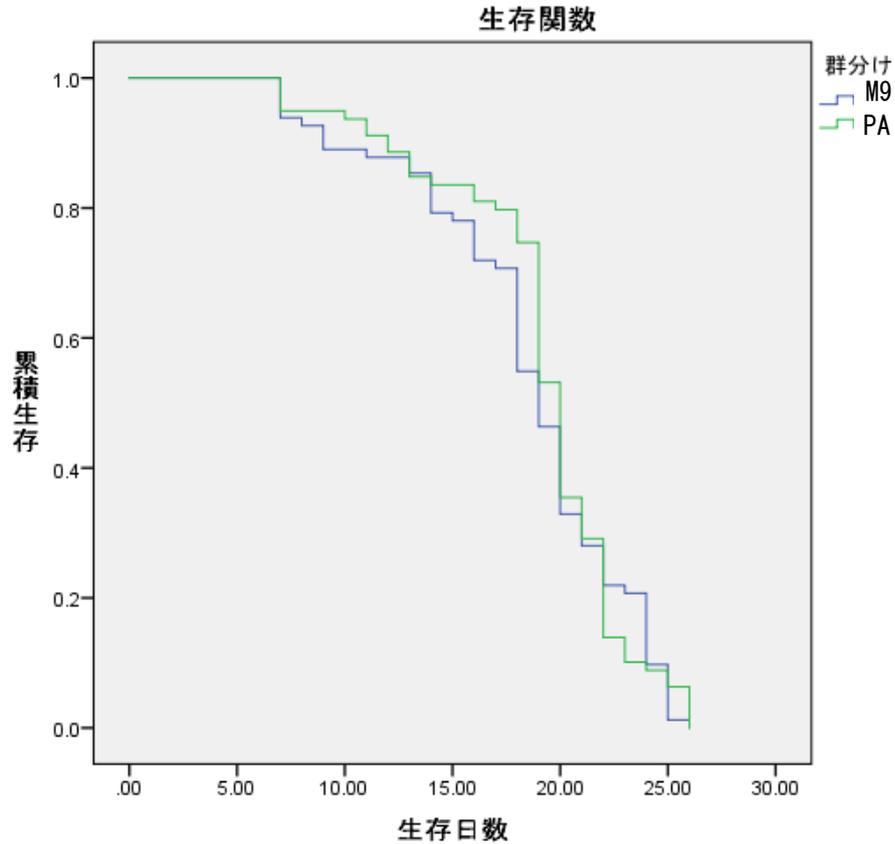


図 27 プロピオン酸投与が *C. elegans* の寿命に及ぼす影響

M9 : M9 buffer のみで培養した群, PA : プロピオン酸投与群

同調化後、孵化した L1 世代の線虫を含む懸濁液 (L1 懸濁液) を用いた。24-well plate に 1 well あたり L1 懸濁液 100 μ L および *E. coli* OP50 150 μ L を加えた。プロピオン酸投与群は、100 mM プロピオン酸 Na 溶液を 50 μ L 加えた。最後に M9 buffer を加え、総量が 500 μ L/well になるように調製した。2 日後、各 well で線虫が L4 幼虫に成長していることを確認した後、約 20 匹になるように寿命測定用 NGM に移し、翌日から寿命測定を開始した。

表 1 基本飼料 (C 飼料)

材料名	%	会社名
α -コーンスターチ	53	オリエンタル酵母工業株式会社
カゼイン	20	オリエンタル酵母工業株式会社
スクロース	10	株式会社パールエス W
大豆油	7	日清オイリオグループ株式会社
セルロース	5	オリエンタル酵母工業株式会社
AIN-93 ビタミン混合	1	オリエンタル酵母工業株式会社
AIN-93G ミネラル混合	3.5	オリエンタル酵母工業株式会社
L-シスチン	0.3	和光純薬工業株式会社
酒石酸コリン	0.25	和光純薬工業株式会社

表 2 有機酸およびアミノ酸溶液投与後の血中ケトン体濃度および血糖値の変化

	血中ケトン体濃度	血糖値
クエン酸	→	→
α -ケトグルタル酸	→	→
グルタミン酸	→	→
コハク酸	↓	→
リンゴ酸	↓	→
オキサロ酢酸	↓	→
乳酸	↓	↑
ピルビン酸	↓	↑
アラニン	↓	↑
プロピオン酸	↓	↑

↓：低下、↑：上昇、→：変化なし

■：血中ケトン体濃度のみ変化した有機酸群

■：血中ケトン体濃度および血糖値が変化した有機酸群

表 3 Primer sequence

gene	ID	5' to 3'
<i>snb-1</i>	NM_072287.4	Forward : TGGAGCGTGATCAGAAGTTGTC Reverse : TCCACCAATACTTGCCTTCAG
<i>pfk-1.2</i>	NM_073056.4	Forward : TCGGCAAGAAAGTGTGCTTC Reverse : TTGCTTCAACAAGGGGATGC
<i>pck-1</i>	NM_181906.4	Forward : TGCAGATCCAATGGCAATG Reverse : AAGATCTTTGGCGCCTTGTG
<i>gsy-1</i>	NM_064335.6	Forward : TTGTGTTCGAATGCGCTTGG Reverse : ACTTCAAGCCGCCATTTTCC
<i>pyg-1</i>	NM_001330794.2	Forward : ACACCAATCACACCTTGCTC Reverse : TGACGCGGCAACAAATTCTG
<i>tps-1</i>	NM_001047837.4	Forward : TCCAACCACCAGCAAACCTTC Reverse : TTGTGAATCGCAGCAATGCC
<i>tps-2</i>	NM_001377904.2	Forward : AACGTGCGATTTGTCTCGTG Reverse : TCGTGACATTTTGGGGTTTC
<i>gob-1</i>	NM_078159.5	Forward : AATTGGGCAGCTCTGTGAAC Reverse : TTCCAACCAACGGGAATTGC
<i>tre-1</i>	NM_059489.7	Forward : ATCCCAGCCGATTTAAACGC Reverse : TCACGCATTTCCGTTTTTGC
<i>tre-2</i>	NM_001380293.1	Forward : AAAATCCGGTGGCAAGTTGC Reverse : AAAGAGGCGAGCAGTTGAAG
<i>tre-3</i>	NM_001269433.3	Forward : TATGAAACCGGCCACATGTG Reverse : TCGTTGCTCCATCCAAATC
<i>pod-2</i>	NM_001267098.2	Forward : AAAAGCCACGTGGTTTTGAC Reverse : TTGACACGTGGCAACTTGTG
<i>fasn-1</i>	NM_060016.6	Forward : AATGGCAGCGTTGATTTGG Reverse : AACATTGGCTCCGATGCAAG
<i>atgl-1</i>	NM_171168.6	Forward : AGTTGCTGCAGAACGTTTCAG Reverse : TGCAAGTGCCATGTGCAATG
<i>cpt-1</i>	NM_064320.4	Forward : TCGTTCGTTCAATGCTCGAC Reverse : TGCTTGTGCGCATGCTTTACG
<i>cpt-5</i>	NM_171549.5	Forward : TGCATGGCTTTGGCATAAGC Reverse : ATCGCCCTGCATTGTAGATG
<i>acs-2</i>	NM_074468.6	Forward : TGCACCAAAGAGACACAAGC Reverse : ACGTGCATTTCTGGCATTG

<i>acs-22</i>	NM_001383618. 1	Forward : AGTCGACAATTCGTGGCTTG Reverse : TCGCCACTTTGTTTGGATGC
<i>nhr-49</i>	NM_181999. 5	Forward : ATTCTTCCGCCGAACAGTTC Reverse : ACAATAACGACACGGCATC
<i>ech-1. 1</i>	NM_074409. 5	Forward : ATAGTCGCTGCAATCATGGG Reverse : TTGTCGTTACAGCAATGCG
<i>hacd-1</i>	NM_071020. 9	Forward : AAACGGAAGCCCAAAAGCG Reverse : TTTGGCTTCCTTTCAGTGC
<i>acd-1</i>	NM_001038289. 6	Forward : ACACAGGCCAAAATGCATCG Reverse : TTGCGTGGCTGTATTGTGTG
<i>sod-1</i>	NM_001026786. 3	Forward : AAATCAAGCTCACCGACAGG Reverse : TCTTGTCCGGCATGAACAAC
<i>sod-3</i>	X77021. 1	Forward : AAAGCATCATGCCACCTACG Reverse : TGAATTCAGCGCTGGTTGG
<i>ct1-1</i>	NM_064578. 4	Forward : TTTTCAACGGTCGCTGGAG Reverse : AGTGGATTGCGTCACGAATG
<i>gst-4</i>	BX284604. 4	Forward : TTTGATGCTCGTGCTTTGC Reverse : AATGGGAAGCTGGCCAAATG
<i>gcs-1</i>	NM_063526. 5	Forward : AATGCGATGCTTGAACTGC Reverse : TGCCTCGACAATGTTGAAGC
<i>gsk-3</i>	AF159950. 1	Forward : TTCGCAATGAGCCAAACGTC Reverse : TTGTAGCGCCGAAAATGAGC
<i>ucp-4</i>	NM_073013. 6	Forward : TGCTGCTGCCATTGTATCAC Reverse : TGCATCATTTTGGCGTCCAG

表 4 プロピオン酸投与が *C. elegans* の遺伝子発現に及ぼす影響

糖質代謝	10 mM	40 mM	脂質代謝	10 mM	40 mM	β 酸化	10 mM	40 mM	抗酸化	10 mM	40 mM
	PA	PA		PA	PA		PA	PA			
<i>pfk-1.2</i>	↑	→	<i>pod-2</i>	→	→	<i>ech-1.1</i>	↓	→	<i>sod-1</i>	→	→
<i>pck-1</i>	↓	↓	<i>fasn-1</i>	→	→	<i>hacd-1</i>	→	↓	<i>sod-3</i>	↑	↑
<i>gsy-1</i>	→	→	<i>cpt-1</i>	→	→	<i>acdh-1</i>	→	→	<i>ctl-1</i>	→	→
<i>pygl-1</i>	→	↑	<i>nhr-49</i>	→	→				<i>gst-4</i>	→	→
<i>tps-1</i>	→	→	<i>atgl-1</i>	↑	→				<i>gcs-1</i>	→	→
<i>tps-2</i>	→	→	<i>cpt-5</i>	→	→				<i>gsk-3</i>	→	→
<i>gob-1</i>	→	→	<i>acs-2</i>	→	→				<i>ucp-4</i>	→	→
<i>tre-1</i>	→	→	<i>acs-22</i>	→	→						
<i>tre-2</i>	↑	↑									
<i>tre-3</i>	→	↓									

矢印はプロピオン酸 (PA) 投与による遺伝子発現の有意な変化 ($p < 0.05$) を示している。

↑ : 有意に上昇、↓ : 有意に低下、→ : 有意差なし

学術論文

1. ◎山口大貴、三浦紀称嗣、宮田富弘. ラットにおけるプロピオン酸経口投与による血中ケトン体濃度低下作用. 川崎医療福祉学会, **30**(1), 189-199, 2020

学会発表

本研究の一部については、下記の学会で報告した。

1. ◎山口大貴、大西夏季、宮田富弘. プロピオン酸の吸収と利用-プロピオン酸は血中ケトン体上昇を抑制する. 第70回日本栄養・食糧学会大会、兵庫、平成28年5月14日
2. ◎山口大貴、宮田富弘. プロピオン酸は血中ケトン体を上昇させない.
第12回日本栄養改善学会中国支部学術総会、岡山、平成28年6月25日
3. ◎山口大貴、宮田富弘. プロピオン酸は絶食により上昇した血中ケトン体濃度を低下させる. 日本食物繊維学会第21回学術集会、静岡、平成28年11月27日
4. ◎山口大貴、宮田富弘. 絶食時ラットにおけるプロピオン酸投与による血中ケトン体濃度への影響. 第71回日本栄養・食糧学会大会、沖縄、平成29年5月21日
5. ◎山口大貴、三浦紀称嗣、宮田富弘. プロピオン酸の血中ケトン体濃度低下作用における糖新生の関与. 日本食物繊維学会第22回学術集会、東京、平成29年11月26日
6. ◎山口大貴、宮田富弘. プロピオン酸の供給を目的とした体温感応ゲル化メチルセルロース剤. 日本栄養・食糧学会第72回学術集会、岡山、平成30年5月12日
7. ◎山口大貴、河野勇介、谷本彩、佐藤美穂、仲江綾衣梨、江草夏奈子、田中花奈子、宮田富弘. 必須アミノ酸補給のための体温感応ゲル化溶液の応用. 第14回日本栄養改善学会中国支部学術総会、岡山、平成30年6月10日
8. ◎三浦紀称嗣、若狭麻未、山口大貴、宮田富弘. フラクトオリゴ糖摂取ラットの明期・暗期における短鎖脂肪酸動態. 第14回日本栄養改善学会中国支部学術総会、岡山、平成30年6月10日

9. ◎四元晴輝、松本義信、片岡香菜子、山口大貴、内田仁、松本香二、小川祐介、梶井理恵、江島美乃里、河合茉南、小野章史、松枝秀二. トレーニング時及び試合時における高等学校男子サッカー部員のエネルギー・タンパク質必要量. 第14回日本栄養改善学会中国支部学術総会、岡山、平成30年6月10日
10. ◎片岡香菜子、四元晴輝、脇本敏裕、宮川健、山口大貴、小野章史、松枝秀二. 介入研究におけるエネルギー摂取量を考える(2). 第14回日本栄養改善学会中国支部学術総会、岡山、平成30年6月10日
11. ◎山口大貴、三浦紀称嗣、宮田富弘. 薬剤投与下におけるプロピオン酸によるケトン体代謝への影響. 日本食物繊維学会第23回学術集会、東京、平成30年11月25日
12. ◎山口大貴、藤原恵美子、宗近夏帆、中野有希、宮田富弘. プロピオニンのスポーツサプリメントとしての可能性. 日本栄養・食糧学会大会第73回学術集会、静岡、令和元年5月18日
13. ◎山口大貴、三浦紀称嗣、宮田恵多、宮田富弘. プロピオン酸とケトン体が *C. elegans* の寿命に及ぼす影響. 日本食物繊維学会第24回学術集会、北海道、令和元年11月2日
14. ◎三浦紀称嗣、山口大貴、宮田恵多、川崎靖子、奥和之、宮田富弘. 大麦若葉由来の脂溶性画分の抗細胞障害作用. 日本食物繊維学会第24回学術集会、北海道、令和元年11月3日
15. ◎宮田恵多、大森菜々穂、山下雄一郎、山口大貴、三浦紀称嗣、浜口昂大、長谷川浩一、松本義信、奥和之、宮田富弘. エゴマ油の抗酸化能を向上させる抽出法の検討およびその生理作用. 日本農芸化学会2020年度大会、福岡、令和2年3月27日
16. ◎三浦紀称嗣、山口大貴、宮田恵多、宮田富弘. 線虫 (*Caenorhabditis elegans*) を用いた短鎖脂肪酸の測定^{-13C} 呼気分析の応用. 日本栄養・食糧学会大会第74回学術集会、宮城、令和2年5月15~17日

17. ◎山口大貴、三浦紀称嗣、宮田恵多、宮田富弘. プロピオン酸投与が線虫 (*C. elegans*) の持久力に及ぼす影響. 日本食物繊維学会第 25 回学術集会、web 開催、令和 2 年 11 月 21 日
18. ◎三浦紀称嗣、山口大貴、宮田恵多、宮田富弘. ^{13}C 呼気分析を応用した線虫における短鎖脂肪酸代謝の測定. 日本食物繊維学会第 25 回学術集会、web 開催、令和 2 年 11 月 21 日

謝辞

本論文を査読して頂き、有益なご指導およびご助言を賜りました小野章史教授、奥 和之教授に深く感謝申し上げます。さらに、研究の遂行にあたり熱心なご指導およびご助言を賜りました、川崎医療福祉大学医療技術学部臨床栄養学科宮田恵多講師に厚く御礼申し上げます。また、研究の遂行にあたり様々な面でご協力頂きました健康科学専攻ならびに臨床栄養学科の先生方に感謝申し上げます。そして、学部の先輩であり、研究の遂行にご協力およびご助言をいただいた川崎医療福祉大学大学院医療技術学研究科健康科学専攻 三浦紀称嗣氏に厚く御礼申し上げます。そして、数々の実験で補助を頂いた研究室の同期生および後輩に深く感謝申し上げます。本研究を遂行するにあたり、終始適切な助言を賜り、学部生の頃から数々のご指導をして下さいました宮田富弘教授に心より感謝申し上げます。最後に、博士課程に進学する機会を与えてくださり、九年間温かく見守り続けてくれた両親に深く感謝し、謝辞と致します。