

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500673

研究課題名（和文） 卵巣摘出ラットに生じる肥満の成立機序について

研究課題名（英文） The mechanism of obesity establishment in the ovariectomized rat

研究代表者

篠田 元扶（SHINODA MOTOO）

獨協医科大学・教授

研究者番号：70084605

研究成果の概要（和文）：

卵巣摘出（OVX）動物は肥満を示すため、閉経期以降の女性の肥満症モデルとされるが、肥満成立の機序については十分解明されていないことから、この原因について雌ラットを用いて追究した。

OVX 群の体重は術後より 3 カ月間の観察期間を通して対照（Sham）群と比べて著明な増加を示した。一方、OVX 群の摂食量は術後 2 ヶ月間有意な高値を示したが、その後は Sham 群とほぼ同量となった。このため、摂食量の増加だけが肥満の原因ではないと考えられる。また OVX 群の体温は Sham 群と比較して有意に低値を示したことから、OVX 群の基礎代謝は Sham 群より低いことが示唆された。

以上の結果から、OVX ラットの肥満症は OVX 後初期の摂食量の増加に加え、基礎代謝が減少することによって惹起されるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

It is well known that ovariectomized (OVX) rats gain the body fat after OVX. However, the mechanism of obesity establishment is still unknown enough yet. The aim of this study is to reveal about it. The body weight of OVX group increased remarkably through 3 months observation period. The food intake volume of OVX group increased remarkably at the first 2 months, but it became almost the same as the Sham groups after that. Therefore we cannot assert that only increase of the food consumption brings obesity. Then, we measured the body temperature as an index of the energy metabolism. The OVX group showed significant lower body temperature compared with the Sham group. This phenomenon means that the energy metabolism of the OVX group is lower than the Sham group. These results suggest that the cause of obesity in the OVX rats is a decrease in energy metabolism in addition to the increase of the food consumed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	200,000	60,000	260,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学、応用健康科学

キーワード：肥満、卵巣ホルモン、摂食、基礎代謝、運動

1. 研究開始当初の背景

更年期以降の女性や卵巣摘出 (OVX) した雌性動物において食欲が亢進し体重が増加する現象がみられるが、摂食量を増加させる原因については未解明であった。食欲調節には leptin、orexin 等種々の因子が関与するが、その一つである Peptide YY3-36 (PYY) は食欲抑制作用をもつことで最近注目されているホルモンである。OVX 後における PYY の動態については知られておらず興味を持たれるところであった。

また、筆者は対照群の摂食量と同量の飼料を OVX ラットに給餌するペアーフィーディングを行った場合でも OVX ラットの体重が有意に増加することを確認しており、摂食量だけでは体重増加の説明をすることはできなかった。摂食量以外で OVX ラットの体重を増加させる要因としては基礎代謝率の低下や運動活性の低下等が考えられるので、これらについての追究が必要であると思われた。

雌ラットの自発運動活性は OVX により減少し、E2 の投与により増加することを筆者は既に報告している。OVX による自発運動活性の低下は E2 欠如に起因するが、E2 の中枢への作用については未解明であった。このため、自発運動活性に関与すると考えられる脳内 dopamine (DA)、norepinephrine (NE)、および serotonin (5-HT) を指標として OVX に伴う雌ラットの行動活性低下のメカニズムを明らかにする必要がある。

さらに、OVX による E2 欠如雌性動物の運動能力および筋力の変化については詳細な報告はなかった。骨格筋の状態は基礎代謝とも関連することから、対照動物と比較することに興味を持たれた。

OVX に伴う肥満症の病態生理についての詳細な報告がなかったため、この点についての追究も必要であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、OVX ラットにおける肥満成立の機序について解明し、OVX により惹起された肥満症の病態生理を明らかにすることである。本目的達成のために下記につき追究した。

(1) E2 欠如状態における食欲調節機序の解明

食欲調節には種々の因子が関与することが知られている。今回は食欲抑制作用をもつ PYY に注目し、摂食量が増加している OVX ラットの血中 PYY について追究した。また、従来より知られている食欲調節物質であるレプチンの OVX 後の変化についても追究

した。

(2) E2 欠如状態における基礎代謝の観察

OVX ラットの体重を増加させる要因としては摂食量以外に基礎代謝率の低下が考えられるため、OVX ラットの基礎代謝を測定した。基礎代謝の観察にあたり、基礎代謝を間接的に表現する発熱量 (体温) を指標とした。

(3) E2 の自発運動中枢への作用の解明

OVX による自発運動活性の低下は E2 欠如に起因するが、E2 の中枢への作用については未解明であるため、E2 欠如により脳内活性物質にどのような変化が生じているのかを行動活性に関与すると思われる dopamine (DA)、norepinephrine (NE) 及び serotonin (5-HT) を指標として測定した。

(4) OVX ラットの運動能力の観察

骨格筋の機能は基礎代謝率にも大きな影響を及ぼすものと思われるため、E2 欠如を示す OVX ラットの骨格筋能力について追究した。

(5) 経口耐糖能試験 (OGTT)

OVX 後の糖代謝について調べるために OGTT を実施した。

(6) OVX ラットの病態生理学的検査

OVX ラットの血液生化学値の測定および主要臓器 (含脂肪組織) の病理組織学的検査を実施した。

3. 研究の方法

(1) 使用動物

本研究には雌性 Wistar-Imamichi ラット (財団法人動物繁殖研究所) を用いた。

(2) 実験群

実験群としては、卵巣摘出 (OVX) 群、偽手術対照 (Sham) 群、および OVX ラットに Sham 群と同量の飼料を給与する Paired Feeding (OVX-PF) 群の 3 群を設けた。

(3) OVX 手術

OVX 手術はラットが 70 日齢に達した時点で常法に基づき全身麻酔下で両側の卵巣を摘出した。

(4) 体重および摂食量の測定

OVX 後毎日体重を測定し、摂食量については食べこぼした飼料もすべて回収して算出した。OVX-PF 群には前日の Sham 群の摂食量と同量を与えた。

(5) 摂食調節物質の測定

摂食調節物質としては末梢血中の PYY およびレプチンを測定した。ラットを一晩絶食させ、翌朝再給餌後 1 時間目に採血した。

(6) 体温測定

基礎代謝を間接的に表現する指標として体温測定をした。体温は赤外線カメラおよび高精度温度計を用いてそれぞれ体表面温度および腔温を測定した。

- (7) 自発運動に関する脳内活性物質の測定
行動活性に関与すると思われる脳内活性物質として dopamine (DA)、norepinephrine (NE) 及び serotonin (5-HT) を測定した。
- (8) OVX ラットの運動能力測定
OVX ラットの運動能力(骨格筋力)を測定するために、rotor rod test (回転棒の上をバランスを保ちながら歩き続ける持久力)、pole climbing test (垂直の棒にしがみついていられる筋力)、grip test (握力測定)、および wheel running test (新規環境における自発運動活性) を行った。
- (9) 剖検所見
90 日間の観察終了時に解剖を行い、主要臓器重量(心臓、肺、肝臓、腎臓、膵臓、副腎、皮下脂肪、腸間膜脂肪)の測定を行った。
- (10) 血液生化学的所見
90 日間の観察終了時の解剖と同時に全採血を行い、ドライケム(富士フィルム社)を用いて血中のブドウ糖、中性脂肪、総コレステロール、GOT (AST)、GPT (ALT) を測定した。
- (11) 組織学的検査
剖検時に採取した臓器について光学顕微鏡および電子顕微鏡により組織学的に検査した。

4. 研究成果

OVX 後の体重の変化は図-1 のように、OVX 群が Sham 群と比較して有意に増加した。また、OVX-PF 群は Sham 群とほぼ同量の摂食量であったにもかかわらず、Sham 群より有意な体重増加が認められた。体重の増加および 3 群間の有意差は観察終了時まで持続した。

摂食量について 10 日間ごとにまとめてみた場合、図-2 に示すように、術後 20 日目までは 3 群間に差は認められなかったが、30 日目以降 70 日目までは OVX 群の摂食量は Sham 群および OVX-PF 群と比較して有意に増加していた。Sham 群と OVX-PF 群はほぼ同量の摂食量であった。

図-1 OVX 後の体重変化

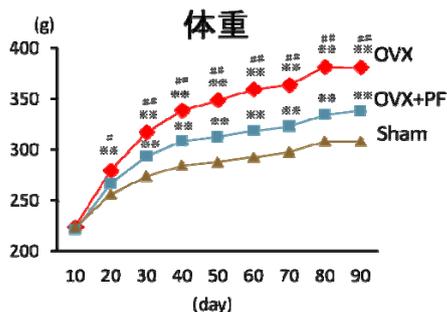
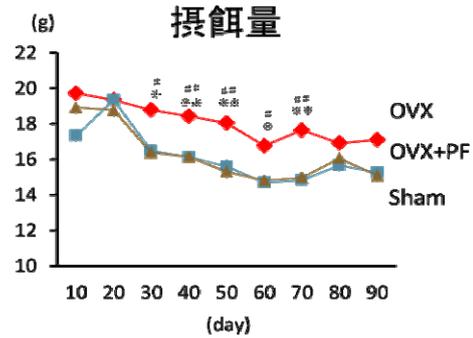


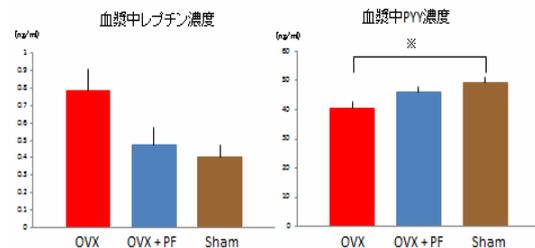
図-2 OVX 後の摂食量の変化



(1) E2 欠如状態における食欲調節機序の解明

OVX 後に OVX 群で Sham 群より摂食量が増加する機序を追究する目的で、OVX 群および Sham 群を用い摂食調節因子の血中レベルを比較した。食欲調節には種々の因子が関与することが知られているが、今回は食欲抑制作用をもつ PYY およびレプチンについて追究した。実験には摂食量の有意な増加がみられる OVX 後 60 日目のラットを用いた。検査前夜の 19:00 より 14 時間絶食させ、翌朝 9:00 の再給餌後 1 時間目に採血し、末梢血中の PYY およびレプチン濃度を ELISA 法により測定した。この結果、OVX 群における PYY の血中レベルは Sham 群より低値であったことから、OVX 群では摂食抑制が生じにくくなっていることが示唆された(図-3)。一方、血中レプチンレベルは脂肪沈着量の多い OVX 群で Sham 群より高値であるにもかかわらず摂食抑制がみられないことから、レプチン抵抗性が生じていることが示唆された。以上の結果から、OVX 群では PYY などの摂食抑制物質が減少する一方、レプチン抵抗性が生じるため摂食量が増加し、肥満が生じるものと考えられた。

図-3 OVX 後の血中レプチン及び PYY 濃度

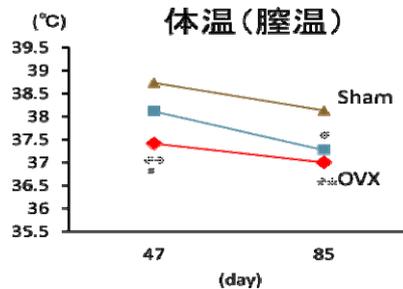


(2) E2 欠如状態における基礎代謝の観察

摂食量の増加以外で体重増加に影響を及ぼす因子として基礎代謝率の低下が推測されるため、基礎代謝率を間接的に表現する安静時体温を測定した。OVX群、Sham群および

OVX-PF群の休息期(明期13:00)における体温を測定した結果、OVX群の体温はSham群より低値を示し、OVX-PF群は両者の中間値を示した(図-4)。このことから、OVXにより基礎代謝率が低下することにより脂肪沈着が生じやすくなることが示唆された。

図-4 OVX後の体温



(3) E2の自発運動中枢への作用の解明

本研究に際し、先ず無処置雌ラットの性周期に伴う運動活性の変化と脳内アミンの関係を調べた。即ち自発運動活性が最も高い発情前期と自発運動活性が最も低い発情休止期における脳脊髄液中のMHPG、DOPAC、および5 HIAAを測定したが、各物質とも両性周期相間に有意差は認められなかった。この結果から、自発運動活性に影響を及ぼすと考えられるセロトニン、ドパミン(DA)、ノルエピネフリン(NE)の両性周期相における分泌レベルの差は脳脊髄液中には反映されない程度であることが示唆された。

次に、成熟雌ラットの卵巢を摘出し、4週間経過して体重が有意に増加した時点でラットを回転カゴ装置に収容した。OVXラット(OVX群)の自発運動活性は観察期間を通して低値を示したが、OVXラットに徐放性E2を投与(OVX+E2群)すると自発運動活性は有意に亢進した。両群の自発運動活性の差が最大になった時点でラットを安楽死させて脳を摘出し、青斑核中のNE、線条体および側坐核中のDAおよびその代謝物であるDOPACの濃度を測定した。この結果、青斑核中のNEはOVX群と比較してOVX+E2群において有意に増加していた。一方、線条体および側坐核中のDAおよびDOPACの濃度およびその比率には両群間に有意差は認められなかった。以上の結果から、OVXラットに認められる自発運動活性の低下は青斑核中のNEレベルの低下に伴うものであり、DAの関与は少ないことが推察された。

(4) OVXラットの運動能力の観察

骨格筋の機能は基礎代謝率に大きな影響を及ぼすものと思われるため、E2を欠如するOVXラットの骨格筋能力(運動能力)について rotor rod test (図-5)、pole climbing

test(図-6)、grip test、および wheel running test を用いて観察した。この結果、OVXラットの運動能力にはSham群との間に有意差が認められず、E2欠如に伴う肥満状態でも通常の筋力(運動能力)を示すことが確認された。このことから、OVXラットの骨格筋はE2欠如状態においても正常性が保たれており、OVXラットにみられた基礎代謝の低下は骨格筋の退行によるものではないことが示唆された。

図-5 rotor rod testの結果

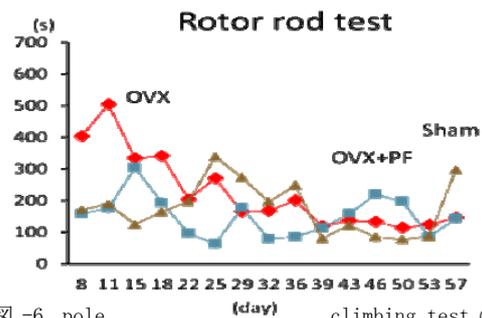
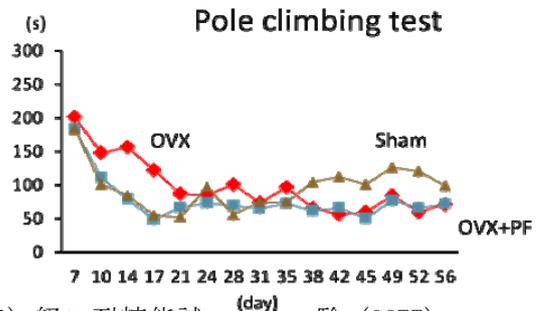


図-6 pole climbing testの結果

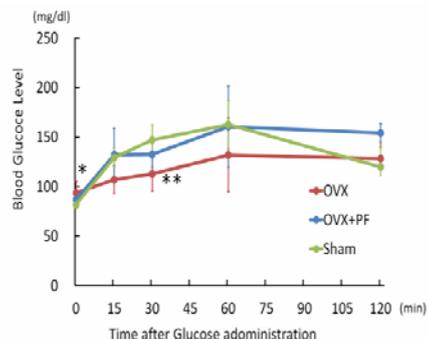


(5) 経口耐糖能試験 (OGTT)

OVX後60日目に2g/Kgのブドウ糖液を経口投与したところ、OVX群の血糖値は低値が持続し、投与後30分目ではSham対照群との間に有意差がみられた(図-7)。OVX群に見られたこのような特異な耐糖能については今後さらに検討する必要がある。

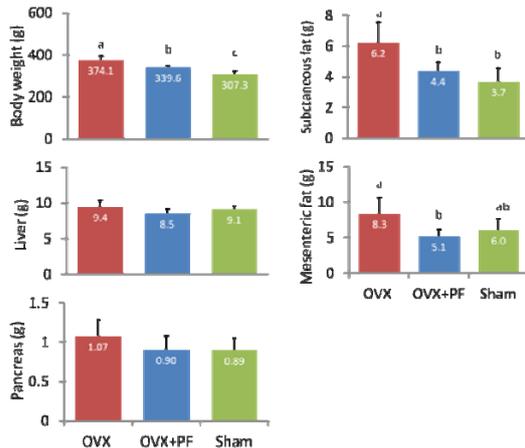
図-7 OGTT (2g/KgBWt)の結果

(6) 剖検所見



90 日の観察期間が終了した時点で剖検した結果、OVX 群および OVX-PF 群には Sham 群と比べて肉眼的な異常は認められず、また諸臓器重量 (図-8) においても 3 群間に差が認められなかった。一方、皮下脂肪重量は OVX 群で Sham 群および OVX-PF 群と比較して有意に増加し、腸間膜脂肪重量は OVX 群で OVX-PF 群よりも有意に増加していた。

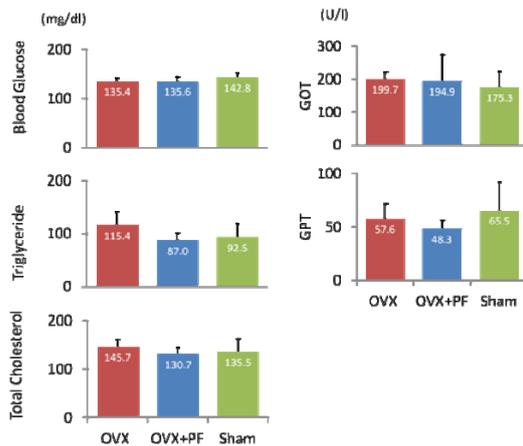
図-8 体重、主要臓器および脂肪重量



(7) 血液生化学的所見

剖検時に全採血し、血中のブドウ糖、中性脂肪、総コレステロール、GOT (AST)、GPT (ALT) を測定した結果、これらの値には 3 群間に差はなかった (図-9)。

図-9 剖検時における血液生化学値



(8) 組織学的所見

HE 染色およびマッソン染色を用いた光学顕微鏡所見において OVX 群および OVX-PF 群の心、肝、膵、腎等に異常は認められなかった (図-10)。一方、腸間膜脂肪組織には脂肪組織の壊死および白血球の浸潤が

認められ、慢性炎症が生じていることが示された (図-11)。また、腸間膜脂肪組織の電顕像においても膠原線維の存在が認められた (図-12) ことから、OVX ラットにおいて肥満に基づく脂肪組織の慢性炎症が生じていることが証明された。現在、肥満症でみられる脂肪組織における軽度慢性炎症とインスリン抵抗性やアディポサイトカイン分泌異常等との関連が問題視されている。OVX により惹起される肥満症ラットにおいてもこのような脂肪組織における炎症がみられたことから、OVX ラットはより有効に肥満症のモデルとして使用できるものと思われる。

図-10 OVX ラットの主要臓器光顕像

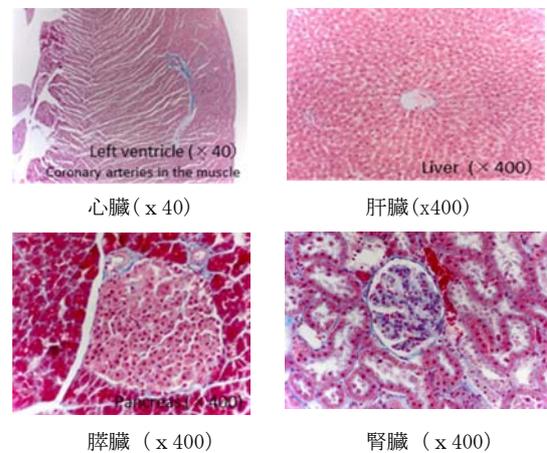


図-11 OVX ラットの脂肪組織光顕像

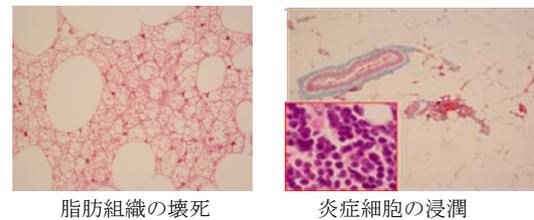
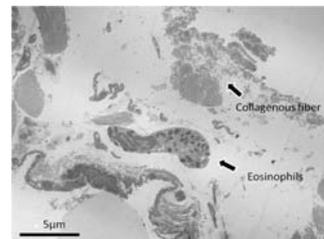


図-12 脂肪組織の電顕像



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計10件)

- ① 寺田節、今弘枝、篠田元扶：卵巣摘出ラットにおける肥満症成立機序について。第60回日本実験動物学会総会。2013年5月16日。つくば国際会議場(茨城)
- ② 今弘枝、金井孝夫、寺田節、篠田元扶：卵巣摘出後のラットにみられる肥満症の病態生理について。第60回日本実験動物学会総会。2013年5月15日。つくば国際会議場(茨城)
- ③ 三上隼人、藤平篤志、小玉千奈美、佐々木敬幸、外尾亮治、篠田元扶、天尾弘実：雄TSODマウスにおける肥満とインスリン抵抗性へのPair-feedingの効果。第59回日本実験動物学会総会、別府国際コンベンションセンター(大分)2012年5月25日
- ④ 藤平篤志、天尾弘実、渡辺岬平、篠田元扶：無菌マウスで認められる摂食後のペプチドYY分泌反応の抑制。第59回日本実験動物学会総会、別府国際コンベンションセンター(大分)2012年5月26日
- ⑤ 藤平篤志、三上隼人、佐々木敬幸、外尾亮治、篠田元扶、天尾弘実：TSOD雄マウスにおける視床下部レプチン受容体の発現とレプチン分泌に対するPair-feedingの効果。第8回TSOD(肥満・糖尿病)マウス研究会情報交換会(総評会館)、2012年11月2日
- ⑥ 三上隼人、藤平篤志、児嶋修一、篠田元扶、佐々木敬幸、外尾亮治、天尾弘実：雄TSODマウスに認められる過食とpair-feedingの効果。第83回実験動物コンファレンス。2011年11月12日。日本獣医生命科学大学(東京)
- ⑦ 藤平篤志、三上隼人、児嶋修一、天尾弘実、佐々木敬幸、外尾亮治、篠田元扶：幼若および成熟雄TSODマウスにおける摂食関連ホルモンの分泌およびレプチン抵抗性。第7回TSOD(肥満・糖尿病)マウス研究会情報交換会。2011年11月11日。総評会館(東京)

⑧ 藤平篤志、三上隼人、児嶋修一、天尾弘実、佐々木敬幸、外尾亮治、篠田元扶：幼若および成熟雄TSODマウスにおける摂食抑制ホルモンの分泌。第152回日本獣医学学会学術集会。2011年9月19日。大阪府立大学(大阪)

⑨ 藤平篤志、三上隼人、児嶋修一、天尾弘実、佐々木敬幸、外尾亮治、篠田元扶：幼若および成熟雄TSODマウスにおけるペプチドYYの血中濃度および結腸中含有量。第58回日本実験動物学会総会。2011年5月26日。タワーホール船堀(東京都)

⑩ 藤平篤志、天尾弘実、長孝一郎、渡辺岬平、弦巻沙央梨、児嶋修一、上川雄一郎、池田雅志、篠田元扶：雄IQTマウスにおいて腸内細菌叢はペプチドYYおよびセロトニンの分泌を調節する。第57回日本実験動物学会総会。2010年5月12日。京都テルサ(京都市)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠田元扶 (SHINODA MOTOO)

獨協医科大学・教授

研究者番号：70084605