

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 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500777

研究課題名（和文）遺伝的背景の異なる高齢マウスを用いた栄養調節と運動の併用による健康増進効果の解析

研究課題名（英文）Health promotional effects of the combination of supplementation and exercise in old mice having various genetic backgrounds

研究代表者

澤下 仁子（SAWASHITA JINKO）

信州大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40359732

研究成果の概要（和文）：本研究は、遺伝的背景が異なる高齢マウスを用い、短期間の栄養素補給と運動の併用による健康増進効果を解析した基礎研究である。高齢マウスに食品由来のフラボノイドを継続摂取させると同時に、1回30分、1週間に4回のインターバル速歩運動を3週間実施すると、高血糖状態が改善し、肥満に対しては運動単独よりも効果が高いことが見いだされた。栄養素の摂取量、摂取期間やルート、作用機構等の詳細な解析が必要ではあるが、短期間の介入でも健康増進効果が示唆されたことから、高齢者の健康志向の促進に役立つ知見であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study is a basic medical research that analyzed health promotional effects of the short-term combination of nutrient supply and high-intensity interval walking exercise in old mice having various genetic backgrounds. We found that high-levels of fasting blood glucose in mice were improved after the intervention of supplementation with flavonoids and exercise for only three weeks, and that the combination of supplementation and exercise had a good effect for obesity compared with exercise alone. We have to investigate a dose of nutrient, an interventional period, an optimal route, and the molecular mechanism, but we believe that these findings and strategies are useful to help the health promotion for the elderly person.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医科学一般

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：健康と食生活

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会である現代日本では要介護者の増加と医療費増大が大きな社会問題となっており、予防医学の発展が必須かつ急務である。「健康日本21」（厚生省2000）は「適切

な栄養・食生活と適度の運動の継続」をスローガンに掲げ、「一次予防」を推進しているが、施行後の「国民健康・栄養調査」（厚生労働省2003、2006）では、十分な効果が報告されていない。また、2006年の同調査から、

70 歳以上では「運動に関する意識が非常に低い」ことも示されている。

研究代表者らは、これまでに、高齢者の健康増進を期待した臨床／非臨床研究を実施してきた。臨床研究として、軽・中程度肥満の日本人高齢者（男性（16 名）65.6 歳 / BMI 26.3、女性（47 名）60.4 歳 / BMI 26.2（いずれも平均値））に対し、インターバル速歩トレーニング（HIW、30 分/回、4 回以上/週）とフォーミュラ食品を用いた軽度栄養調節（MCR、男性 2,020 kcal/日、女性 1,675 kcal/日）を 16 週間実施し、HIW 単独群で得られた健康増進効果に加え、MCR 併用群では肥満、血圧や血液生化学的パラメータも改善し、さらに、介入期間を含む 6 ヶ月間の医療費が激減することを明らかにした¹⁾。また、非臨床研究としては、老化促進モデルマウス SAMP1 に還元型コエンザイム Q10 を継続摂取させると促進老化が遅延することを明らかにしている²⁾。これらの臨床／非臨床研究を踏まえ、健康志向の動機付けのための、特に「高齢者」をターゲットにした『短期健康増進プログラム』の確立が必要であると考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

遺伝的背景が異なる複数系統の高齢マウスに対し、栄養素の補給と運動を短期間実施し、健康増進効果を検証する。

3. 研究の方法

(1) マウス

① 系統・性別：遺伝的背景が全く異なる、老化促進モデルマウス SAMP1 と肥満モデルマウス C57BL/6J-A^y/+ のメスを使用した。

② 飼養：3 週齢のマウス（日本エスエルシー）を信州大学ヒト環境科学研究支援センター動物実験部門のマウス室（クリーン室）に搬入し、通常飼料（MF、オリエンタル酵母）と普通水を自由摂取させ、明暗調節は 12 時間おき、室温と湿度は 24 時間自動制御で多頭飼育した（5 匹/ケージ）。

③ 倫理的配慮：信州大学動物実験等実施規定により、信州大学動物実験委員会の審査を経て学長の承認を得（承認番号 220062）、上記規定に沿って実施した。

(2) 運動量の設定

14 月齢のマウスについて、トレッドミル（MK-680S、室町機械）を用いて各個体の最高走行速度を測定し、その 70%の速度を走行速度、30%を歩行速度に設定した。

(3) 栄養調節

食品由来のフラボノイド（薬剤 A、B、及び C）をジメチルスルホキシド（DMSO、和光純薬）に溶解し、滅菌水で薬剤濃度を 55.6 mg/mL（50% DMSO 溶液）に調製した。滅菌環境下、この溶液を浸透圧ポンプ（アルゼット

浸透圧ポンプ、#2004、DURECT）に封入した。14.5 月齢のマウスをソムノペンチル（共立製薬）で麻酔し、背部皮下に浸透圧ポンプを挿入して留置した。

(4) インターバル速歩運動（HIW）

トレッドミルを用いて、前項の(2)で決定した個体毎の設定速度で歩行と走行を 3 分間ずつ繰り返し、合計 30 分間の運動を 1 セットとして 1 日 1 セット、1 週間で 4 セットを 3 週間実施した。

(5) 生理学・血液生化学パラメータの解析

HIW 開始前と 3 週間の HIW 実施後に、体重、血圧、空腹時血糖値、血清脂質量、及び血清タンパク質量を測定した。血液は、8 時間以上絶食後に採取した。体重、血圧、空腹時血糖値は HIW 開始前後の増減を評価した。そのほかのパラメータは、HIW 実施後の数値について、HIW 単独群と栄養素併用群との間で比較した。

(6) 活動量の解析

HIW 開始前後に、トレッドミルで最高速度と持続走行量（距離）、回転式運動量測定器付きケージ（SN-450、シナノ製作所）で 24 時間自発運動量（距離）を測定し、HIW 開始前後の増減を HIW 単独群と栄養素併用群との間で比較した。

(7) 病理学的解析

ジエチルエーテルでマウスを深麻酔し、呼吸が止まったことを目視で確認後、横隔膜を切開し、心臓から脱血して屠殺した。直ちに主要臓器を摘出して中性ホルマリンに浸漬し、常法に従い、パラフィン包埋ブロックを作成した。組織切片を作成し、ヘマトキシリン・エオシン染色とコンゴレッド染色を行い、光学顕微鏡で染色像を観察し、評価した。

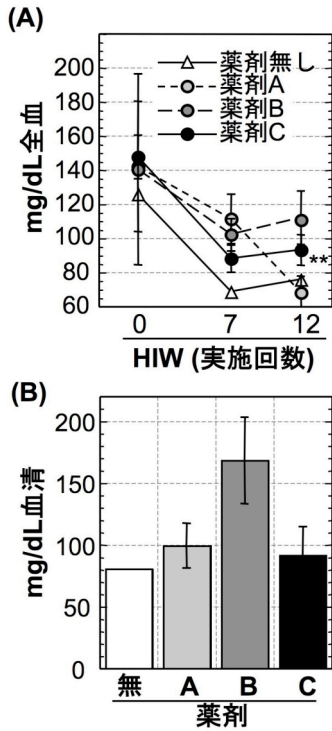
(8) 統計解析

病理学的解析の 1 項目として評価したアミロイドインデックスは *U* 検定（HIW 単独群に対する検定）を、そのほかは *t* 検定（対応が無い 2 群間比較、HIW 単独群に対する検定）を行い、有意水準は 5%とした。

4. 研究成果

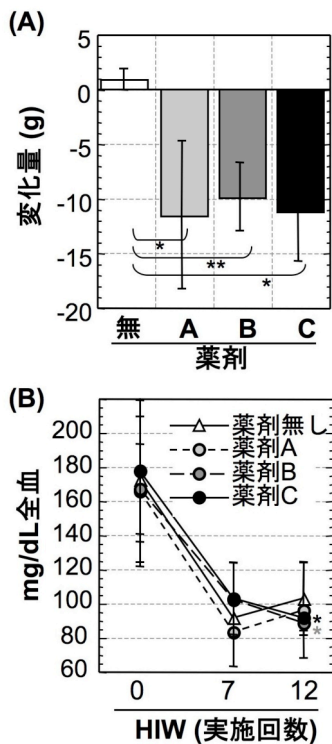
(1) 生理学・血液生化学パラメータ

① SAMP1：HIW 実施前と比較して、HIW 単独群、各種薬剤併用群のいずれも、HIW 実施後の体重や血圧は変化しなかった。SAMP1 は HIW 実施前も過体重ではなかったため、体重変化を示さなかったと考えられる。また、HIW 実施前は全個体が高血糖だったが、HIW 開始 10 日後（7 回実施）には顕著に改善し、3 週間の HIW 実施後も正常値（100 mg/dL 未満）に近似した数値を維持し、特に、薬剤 C の効果が高かった（図 1A）。HIW 実施後の血清脂質とタンパク質量は、HIW 単独群と各種薬剤併用群の間に有意差はなかったが、薬剤 B 群は中性脂肪が高値だった（図 1B）。



***P* < 0.01

図 1 SAMP1 空腹時血糖値の変化(A)と HIW 後のトリグリセリド量(B)



P* < 0.05; *P* < 0.01

図 2 C57BL/6J-*A^{y/+}* HIW 後の体重変化(A)と空腹時血糖値の変化(B)

② C57BL/6J-*A^{y/+}*: HIW 実施前と比較して、HIW 単独群の体重は微増し、薬剤併用群は全群で減少した (図 2A)。この結果から、3 週間の HIW 単独では減量効果が小さいが、薬剤の併用によって高い減量効果が期待できると考えられる。また、HIW 実施前は全個体が 170 mg/dL 以上の高血糖だったが、SAMP1 と同様に、HIW 開始 10 日後 (7 回実施) には顕著に改善し、3 週間の HIW 実施後には正常値に近似した数値まで改善した (図 2B)。特に、薬剤 B 及び C の血糖値改善効果が高かった。HIW 実施後の血清脂質とタンパク質量は、HIW 単独群と各種薬剤併用群の間に有意差はなかったが、HDL-コレステロールに関しては、薬剤 B 群が HIW 単独群よりも有意に低値だった (HIW 単独群、72.01 ± 24.80 mg/dL; 薬剤 B 併用群、31.02 ± 8.57 mg/dL)。

(2) 活動量

① SAMP1: HIW 単独群は持続運動量が約 1500 m 増加し、1 分間に 3.5 m 速く走ることが可能になった (図 3)。最も活動量が増加した群は薬剤 B を併用した群で、自発運動量は約 3500 m 増加、持続運動量も約 1600 m 増加し、1 分間に 17.3 m 速く走ることが可能になった。薬剤 C 群も持続運動量と最高速度は増加した

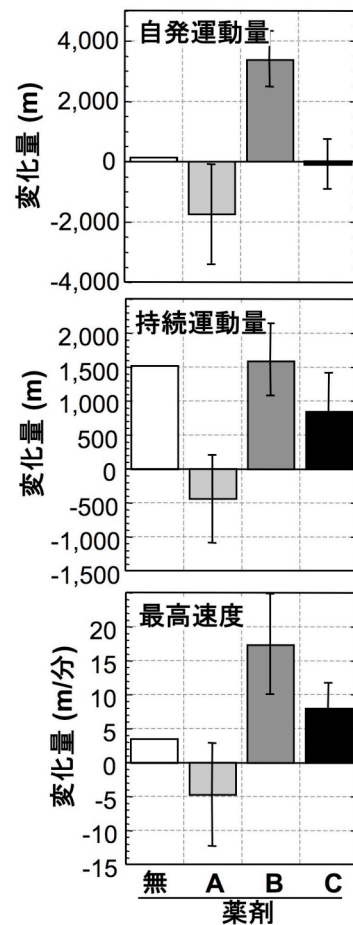


図 3 SAMP1 HIW 後の活動量変化

が、薬剤 A 群は HIW 実施前よりも活動量が低下していた。

② C57BL/6J- $A^{y/+}$: HIW 実施前と比較して、全群で自発運動量、持続運動量、最高速度が増加した (図 4)。

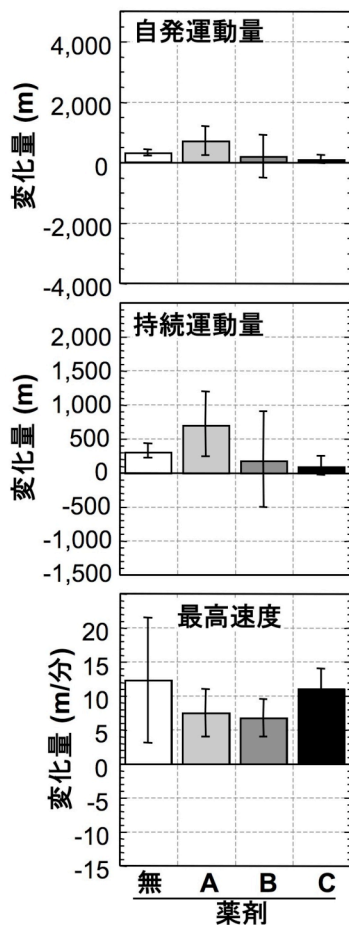


図 4 C57BL/6J- $A^{y/+}$ HIW 後の活動量変化

(3) 病理

① SAMP1: この系統の加齢に伴う重要な特徴のひとつに全身性老化アミロイドーシスを自然発症することが挙げられ³⁾、これまでの研究代表者らの評価では、13 月齢以降、ほぼ全個体が自然発症している。しかし、本研究で発症した個体は、薬剤 C 群の 1 匹のみだった。この結果から、HIW の新たな効果が期待される。

② C57BL/6J- $A^{y/+}$: 解剖時の所見では、全個体で腹腔内のほか、胸腔内にも脂肪が多量に蓄積しており、前項(1)で記述したように、薬剤併用群は減量していたものの、脂肪の顕著な減少には至らなかった。このマウスは遺伝的背景が C57BL/6J であるため、老化アミロイドーシスは SAMP1 よりも軽症である⁴⁾と推察していたが、薬剤 B 群以外の群で発症個体が認められた (図 5)。肥満が老化アミロイドーシスの発症・頻度に関係するか、さらに検討が必要である。

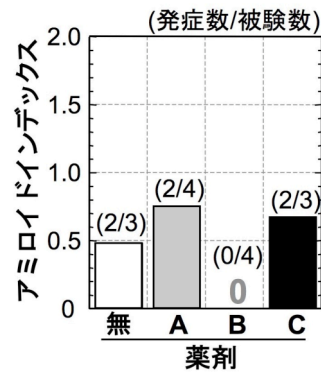


図 5 C57BL/6J- $A^{y/+}$ アミロイド沈着評価

参考文献

- 1) Sawashita J, Onitsuka S, Gen-no H, Ishikawa S, Iino F, Tateishi N, Murakami T, Seki Y, Nagaiwa T, Hanaoka M, Hama S, Nose H, Higuchi K. (2009) Effects of mild calorie restriction and high-intensity interval walking in middle-aged and older overweight Japanese. *Exp Gerontol* 44(10): 666-75.
- 2) Yan J, Fujii K, Yao J, Kishida H, Hosoe K, Sawashita J, Takeda T, Mori M, Higuchi K. (2006) Reduced coenzyme Q10 supplementation decelerates senescence in SAMP1 mice. *Exp Gerontol* 41(2): 130-40.
- 3) Higuchi K, Naiki H, Kitagawa K, Hosokawa M, Takeda T. (1991) Mouse senile amyloidosis. AS_{SAM} amyloidosis in mice presents universally as a systemic age-associated amyloidosis. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 60: 231-238.
- 4) Higuchi K, Kitagawa K, Naiki H, Hanada K, Hosokawa M, Takeda T. (1991) Polymorphism of apolipoprotein A-II (apoA-II) among inbred strains of mice. *Biochem J* 279: 427-433.

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)

[学会発表] (計 14 件)

- ① 澤下仁子、王 耀勇、田 耕、羅 宏敏、陳 磊、森 政之、樋口京一。マウス老化アミロイドタンパク質 (apolipoprotein A-II) トランスジェニックマウスは促進老化を示す? 第27回日本老年学会総会、東京、2011年6月15日。
- ② 澤下仁子、田 耕、久保博司、Constance Schmelzer、橋本繁成、森 政之、細江和典、北野光昭、Frank Döring、宇佐美真一、樋口京一。還元型コエンザイムQ₁₀は老化促進

モデルマウスSAMP1の促進老化を遅延する。
第8回日本コエンザイムQ協会研究会、東京、
2011年1月28日。

③ 梅澤真樹子、樋口京一、森 政之、松下隆
寿、細川昌則。SAMにおける食事脂肪と促
進老化について。第24回老化促進モデルマ
ウス(SAM)研究協議会、松本、2009年7月9
日。

④ 澤下仁子、久保博司、巖 景民、張 蓓茹、
森 政之、Constance Schmelzer、竹田俊男、
Frank Döring、樋口京一。還元型コエンザ
イムQ10の継続摂取による老化促進モデル
マウス(SAMP1)の促進老化遅延効果。第9
回日本抗加齢医学会総会、東京、2009年5
月29日。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤下 仁子 (SAWASHITA JINKO)
信州大学・医学系研究科・助教
研究者番号：4 0 3 5 9 7 3 2

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

樋口 京一 (HIGUCHI KEIICHI)
信州大学・医学系研究科・教授
研究者番号：2 0 1 7 3 1 5 6

森 政之 (MORI MASAYUKI)
信州大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：6 0 2 7 3 1 9 0