

## 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5月12日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580355

研究課題名（和文） なぜクマは肥満でも脂肪肝にならないのか？-冬眠前時期の体脂肪蓄積メカニズムの解明

研究課題名（英文） Why do not obese bears suffer fatty liver? - Study on mechanism for accumulation of body fat during pre-hibernation period

研究代表者

坪田 敏男（TSUBOTA TOSHIO）

北海道大学・大学院獣医学研究科・教授

研究者番号：10207441

研究成果の概要（和文）：本研究は、なぜクマは体脂肪率 30～40%の肥満状態でも脂肪肝や高脂血症を発症しないのか、その特徴的な体脂肪蓄積メカニズムを明らかにすることを目的に、秋田県北秋田市マタギの里阿仁クマ牧場において、ツキノワグマを用いて行われた。麻酔下で血中糖および脂肪濃度測定、静注糖負荷試験ならびに脂肪組織バイオプシー等の実験を行った。その結果、ツキノワグマにおける冬眠前時期の体脂肪蓄積の増大は、単に摂食量だけでなく、生理・代謝機構によっても調節されていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：This study was conducted in Ani Mataginosato Bear Park, Kitaakita-shi, Akita Prefecture in order to know why obese bears do not suffer fatty liver even though they get 30-40% fat of body weight and to investigate a feature mechanism for accumulation of body fat. Under anesthetized condition, measurements of blood concentrations of carbohydrate and fat, intravenous glucose tolerance tests and adipose tissue biopsies were performed for this study. As results, it is concluded that increase of body fat accumulation during pre-hibernation period is controlled by physiological and metabolic mechanism as well as hyperphagia in Japanese black bears.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：クマ、冬眠、肥満、体脂肪、グルコース、静注糖負荷試験、インスリン、脂肪肝

## 1. 研究開始当初の背景

クマは、活動期（およそ5～11月）と冬眠期（およそ12～翌4月）の2相を交互に繰り返して、周年サイクルを営む。生理学的にみると、活動期には平常の生理機構を有しているのが、いったん冬眠期に入ると生体内の生理機構は一変する。例えば、体温は活動時の

37～38℃から30～33℃に低下し、心拍数や呼吸数も平常時の20%程度に減少する。血中の尿素／クレアチニン濃度比は、活動時には30～50なのが冬眠時には10以下に低下する（Nelson et al. 1984 Science 226: 841）。クマの冬眠中の呼吸商が0.7であったことより、冬眠中のエネルギー源は脂肪であること

が判明している (Nelson et al. 1973 Am J Physiol 224: 491)。

クマは、冬眠に関連して特徴的な繁殖生理を有する。ツキノワグマであれば、6~7月が交尾期であるが受精後胚はすぐに着床せず、4~5ヶ月後の冬眠開始時期に一致して着床が起こる(着床遅延現象: Tsubota et al. 2001 Reproduction 121: 587)。着床後は約2ヶ月で胎子発育が完了し、冬眠中の1月下旬~2月上旬に出産がみられる(坪田 1998 冬眠する哺乳類 213)。その後、高脂肪高蛋白質およびクマ特有のオリゴ糖を含む乳汁によって新生子を哺育する (Urashima et al. 2004 Comp Biochem Physiol B 138: 587)。このようにクマは冬眠前時期に冬眠に必要な基礎代謝ならびに妊娠・出産・哺育の一連の繁殖行動に必要なエネルギーを体脂肪として蓄えなければならない。

冬眠前時期におけるクマの主要な食物は堅果類(ブナ、ミズナラ、クリなど)ならびに漿果類(サルナシ、ヤマブドウ、マタタビなど)である。それらの多くは炭水化物(糖)を多く含む。したがって、クマは糖から脂肪を合成する機能を発達させていると考えられる。すなわち、この時期クマは堅果・漿果類を飽食することにより多量の糖分を摂取し、それを肝臓および脂肪組織(一部筋肉)で脂肪に変換合成し、余分なエネルギーはすべて体脂肪として蓄えている。

これまでにわれわれは、冬眠前時期のクマは体脂肪率 30~40%もの皮下脂肪を蓄えるにもかかわらず (Nakamura et al. 2008 Jpn J Zoo Wildl Med 13: 15)、血中中性脂肪、コレステロールおよび遊離脂肪酸濃度は平常時のレベルまたはそれ以下に保たれていることを報告した (Kamine et al. 2012 Jpn J Vet Res 60: 5)。また、体脂肪の脂肪細胞においてレプチンが合成され (Nakamura et al. 2008 Can J Zool 86: 1042)、血中レプチン濃度が 11月にピークをもつ周年変化を示すことを明らかにした (Tsubota et al. 2008 J Vet Med Sci 70: 1399)。以上により、クマは、冬眠前時期に効率よく糖を脂肪に変換し、無駄なく体脂肪を蓄積していると考えられる。また、その脂肪蓄積レベルをレプチンによりシグナル伝達していることが予想される。

## 2. 研究の目的

ツキノワグマは摂食、体重変動および繁殖の概念リズムを有し、それぞれが密接に関連している。ツキノワグマの生存および繁殖は体脂肪に大きく依存していることから、本研究では冬眠前の脂肪蓄積機構に焦点を当て、その代謝メカニズムを明らかにすることを目的とした。具体的には以下の3つの目的を掲げて研究を遂行した。

(1) ツキノワグマの麻酔に関する情報は乏しく、クマの糖・脂質代謝への麻酔薬の影響に注目した報告はほとんどない。したがって、安全で効果的な麻酔薬の組み合わせを確立するとともに、これらの麻酔薬が糖・脂肪代謝に及ぼす影響について検討する必要がある。そこで、クマにおいて安全で効果的、かつ、血液生化学値および静注糖負荷試験の結果に影響の少ない麻酔プロトコルを確立することを目的とした。本研究では、麻酔薬の組み合わせとして、チレタミン・ゾラゼバム (TZ) の単独投与および TZ と 3種類の麻酔前投薬の併用 (メドトミジン、アセプロマジンおよびブトルファノール) の4種類を用いた。

(2) 冬眠前におけるクマの主要な餌資源は堅果類および漿果類であり、それらに多く含まれる糖を脂肪へと変換していることが予想され、その代謝過程において、末梢組織における糖の取り込みおよび脂肪合成を促進するインスリンが重要な役割を果たしている可能性がある。そこで、「ツキノワグマは冬眠前の飽食期にインスリン感受性を変化させることで糖を効率よく脂質に変換する代謝機構へと移行する」という仮説を立てた。この仮説を検証するために、1) 血液生化学値および静注糖負荷試験における血中グルコースおよびインスリン濃度変化について、2) インスリン負荷試験により末梢におけるインスリン感受性変化について、検討した。

(3) ツキノワグマは冬眠前の過食期において摂取した食物を効率よく体脂肪へと変換する機構を活性化させており、また、冬眠中に蓄えた脂肪をエネルギーとして利用していると推測される。この仮説を検証するために、冬眠前と冬眠中における血液中の脂肪成分の生化学的分析および白色脂肪組織 (WAT) における脂質代謝関連酵素の遺伝子発現解析を行った。

## 3. 研究の方法

本研究は、秋田県北秋田市阿仁マタギの里クマ牧場(北緯 40 度、東経 140 度)で飼育されているツキノワグマを用いて行われた。この施設では、成獣雄、成獣雌および亜成獣を分けて、活動期(4~11月)には屋外の放飼場で、冬眠期(12~3月)には屋内で飼育している。活動期には主な餌として加熱圧ペントウモロコシ(東日本株式会社)を1頭当たり 1.5~2.0 kg、1日1回16時頃に与えており、飲水は自由にできる。10月および11月はクマの食欲が亢進するため、リンゴを1頭当たり 1、2個追加して与えている。11月中旬頃より徐々に給餌量を減らし、12月には

完全に給餌を止めて、4月中旬まで絶食状態に置いている。活動期に実験に用いた個体は屋内の放飼場(5m×4m)に隔離し、採材前日の16時に加熱圧ペントウモロコシ1.5kgを与え、その後採材まで18~24時間絶食状態に置いた。冬眠期に用いた個体は1頭ずつ冬眠室(2m×2m)に入れ、1月に超音波診断を行って妊娠していないことを確認してから採材を行った。以下に、(1)~(3)の研究方法を記す。

(1)麻酔薬の組み合わせとして以下の4種類を用いた: TZ (9 mg/kg 体重)の単独投与、TZ (6 mg/kg 体重)およびアセプロマジン (0.1 mg/kg 体重)、TZ (6 mg/kg 体重)およびブトルファノール (0.3 mg/kg 体重)、TZ (3 mg/kg 体重)およびメドトミジン (40 μg/kg 体重)。図2-1は本研究におけるタイムスケジュールを示している。麻酔薬の投与量は推定体重に基づいて決定した。クマを不動化した後、左右頸静脈を留置針で確保し、一方から麻酔薬の点滴静注およびグルコース静注を行い、もう一方から採血を行った。実験中の維持麻酔薬として、酢酸リンゲル液500 mlにTZを溶解し1 mg/mlの濃度に調整したものを使用し、点滴静注 (1-3 mg/kg/hr)を行った。

#### 麻酔状態のモニタリング

麻酔の導入時間をTZ投与後横臥位もしくは伏臥位になり、音などの刺激に反応しなくなるまでの時間と定義した。実験中は、15分間隔で体温、心拍数および呼吸数を記録した。

#### 静注糖負荷試験およびサンプリング

TZ投与後60分、90分および120分(糖投与前70分、40分および10分)に基礎値測定のための採血を行った。TZ投与後130分に、滅菌50%ブドウ糖液を1~3分間で頸静脈に投与した。投与完了時を0分とし、投与後0、10、30、60、90、120、150および180分に採血を行った。採血後、血漿は10分以内、血清は30分以内に1880×gで10分間遠心分離した。分離した血漿および血清は、分析まで-30°Cで凍結保存した。

#### 血液生化学検査

血漿グルコース、TG、TCHO、ALTおよびAST濃度の測定には、自動生化学分析装置(富士ドライケム7000、富士フィルム、東京)を用いた。血清中遊離脂肪酸(NEFA)濃度測定は、市販キットを用いて行った。インスリン濃度測定は、イヌ用に市販されているELISAキット(イヌインスリン測定キット、森永生科学研究所、神奈川)を用いて行い、イヌインスリンを標準品として使用した。なお、アッセイ内およびアッセイ間変動係数は、それぞれ3.6%および8.0%であった。

#### (2)麻酔の導入及び維持

麻酔薬は、TZ 7 mg/kgとアセプロマジン 0.1 mg/kgおよびTZ 3 mg/kg体重と塩酸メドトミジン 40 μg/kg体重を組み合わせ用いた。実験中の維持麻酔薬として、酢酸リンゲル液500 mlにTZを溶解し1 mg/mlの濃度に調整したものを使用し、点滴静注 (0.3~2.2 mg/kg/hr)を行った。

#### 静注糖負荷試験および採血

まず基礎血液サンプルを採取し、その10分後に滅菌50%ブドウ糖液(グルコース0.5 g/kg体重)を1~3分間で頸静脈内に投与した。投与完了時を0分とし、投与後0、5、10、20、30、40、60、90、120および150分に採血を行った。採血後、血漿は10分以内、血清は30分以内に1880×gで10分間遠心分離し、分離した血漿および血清は、分析まで-30°Cで凍結保存した。

#### 頻回採血静注糖負荷・インスリン負荷試験

Bergmanら(1979)により開発されたミニマルモデル法の手技に基づき、糖投与前15分、10分、5分および1分に基礎血液サンプルを採取した後、滅菌50%ブドウ糖液(グルコース0.3 g/kg体重)を2分間で頸静脈内に投与し、その20分後に体重(kg)あたり0.05 Uのインスリンを2分間で静脈内に投与した。ブドウ糖の投与開始時を0分とし、投与後3、4、5、6、7、8、10、12、14、16、19、22、24、25、27、30、40、50、60、70、80、90、100、120、140、160および180分に採血を行った。全ての血液サンプルを1880×gで10分間遠心分離し、分離した血漿は分析まで-30°Cで凍結保存した。

(3)麻酔薬に、TZ 3.0mg/kgと塩酸メドトミジン 40μg/kgを投与した。血液は頸静脈から約40ml採取し、直ちに3,000回転(1,050×g)にて10分間遠心後、血清および血漿を分離し-20°Cで保存した。また、外科的に臀部を3cm程切開して、約3×3cm<sup>2</sup>の白色脂肪組織片を採取した。組織を細かく裁断した状態でRNAlater® Soln (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) 1.5mlに入れ、RNA抽出まで-20°Cで保存した。

#### 血液中の糖・脂質成分の測定

前述のとおり

#### リポタンパク質分画の測定

6月および3月の2個体の血漿を用いてリポタンパク質の主要分画カイロミクロン(CM)、超低密度リポタンパク質(VLDL)、低密度リポタンパク質(LDL: low density lipoprotein)および高密度リポタンパク質

(HDL: high density lipoprotein) の測定を行った。測定は LipoSEARCH (Skylight Biotech) に委託した。

#### WATにおける脂質代謝関連酵素の mRNA 発現解析

##### RNA 抽出

RNeasy Lipid Tissue Mini Kit®を用いて白色脂肪組織約 80-100mg から total RNA を分離した。残留 DNA を取り除くため RNA 分離後に DNase I による DNA 分解処理を行った。次に SuperScript™ III Fast Strand cDNA Synthesis Kit を用いて、抽出した total RNA 800ng (RNA 収量が少なかったサンプルについては 400ng) より、Random hexamer をプライマーとして逆転写反応を行い、cDNA を合成した。

##### Real-time RT-PCR

Real-time RT-PCR により、25 種類の脂質代謝関連酵素遺伝子および 3 種類のコントロール遺伝子の mRNA 発現量を測定した。PCR 反応液は、cDNA テンプレート (total RNA 換算量 4ng/μl) を 1μl、プライマー各 10pmol/μl を 1μl (Forward Primer 0.5μl + Reverse Primer 0.5μl)、PowerSYBR® GREEN PCR Master Mix を 10μl、Molecular Biology Grade Water を 8μl 混合して、1 ウェルあたり計 20μl とした。反応は 95°C で 15 秒間、60°C で 20 秒間、95°C で 15 秒間を 40 サイクル行った。

#### 研究成果

(1) ツキノワグマにおけるアセプロマジンおよびブトルファノールの使用はこれまで報告されておらず、本研究が初めての報告であり、本研究の結果からアセプロマジン 0.1 mg/kg およびブトルファノール 0.3 mg/kg と組み合わせる場合、TZ の投与量としてそれぞれおよそ 7 mg/kg および 9 mg/kg が必要であることが分かった。麻酔薬の安全性については、4 種類全ての組み合わせにおいて心肺機能への悪影響は認められず、麻酔の導入および維持を安全に行うことができることを示した。ただし、TZA 群、TZB 群および TZM 群では軽度の低体温が認められたため、これらの麻酔薬を寒冷環境下で使用する場合には、適切な加温処置を行う必要があることが分かった。また、各群間で血中脂質 (TG、TCHO、NEFA) および肝酵素 (ALT、AST) の値に有意差が認められなかったことから、今回使用した麻酔薬の組み合わせのこれら血液生化学値への影響はほとんどないと考えられた。静注糖負荷試験への影響については、TZN、TZA および TZB の 3 種類はほとんど影響を与えなかったため、クマにおいて静注糖負荷試験を行う際の不動化薬として利用できると考え

られた。一方、TZM については、メドトミジンによる高血糖作用およびインスリン分泌抑制作用が認められたため、クマの糖代謝を研究する際にはメドトミジンを使用すべきでないことがわかった。

(2) 血液生化学値の変化として、体重の増加に伴って血中 TG 濃度の有意な減少が認められた。静注糖負荷試験では、11 月上旬において末梢インスリン感受性の増加および耐糖能の向上が示唆され、11 月下旬にはインスリン応答が増大し、インスリン抵抗性が示唆された。これらの結果から、活動期から飽食期へとクマの糖・脂質代謝が変化し、飽食期には脂肪蓄積に傾いた代謝状態を示すとともに、末梢組織におけるインスリン感受性が増加することによってグルコースの取り込みが促進されることが示唆された。さらに、阿仁クマ牧場で飼育されているクマにおいては、11 月中旬頃を境に代謝状態が飽食期から冬眠期へと切り替わり、11 月下旬にはインスリン抵抗性を示すことが示唆された。また、インスリン負荷試験では、インスリン投与後のグルコース消失速度に有意な変化は認められなかったものの、実験に供した 4 頭中 3 頭において、6 月、11 月上旬および 11 月下旬の 3 群間でグルコース消失速度にばらつきが認められ、11 月上旬にインスリン感受性が増加する傾向が認められた。

(3) 血液中のグルコース濃度は 6 月 (活動期)、11 月 (冬眠前) および 3 月 (冬眠中) で変化を示さなかったのに対し、中性脂肪 (TG)、総コレステロール、遊離脂肪酸およびグリセロール濃度は、6 月と比較して 3 月に有意に上昇し、VLDL および LDL 濃度は 6 月と比較して 3 月に増加する傾向が見られた。また、TG 濃度は 6 月と比較して 11 月に有意に低下した。WAT において、脂肪酸合成や TG 合成に関連する FAS、G6PD、ME および DGAT2 の mRNA 発現量は、6 月と比較して 11 月に有意に増加し、3 月に有意に減少した。また、脂肪合成を抑制する酵素や、脂肪酸の運搬および異化に関連する酵素の mRNA 発現量は、6 月と比較して 3 月に有意に増加した。

今回の実験結果から、冬眠前は WAT における脂肪合成が亢進し TG が WAT に取り込まれるため、血液中の TG 濃度が低下すること、一方、冬眠中は脂肪分解および脂肪の利用が亢進し、血液中への脂質の放出が増加することが強く示唆された。また、季節毎の給餌量がほぼ一定であるにもかかわらず脂肪合成関連酵素の遺伝子発現が冬眠前に増加したことから、ツキノワグマの体脂肪蓄積は摂食量の増大以外の要因によっても調節されていることが明らかになった。

## 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4件)

①Kamine, A., Shimozuru, M., Shibata, H. & Tsubota, T.: Effects of tiletamine-zolazepam with and without premedications on blood chemistry and glucose tolerance tests in Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). Am. J. Vet. Res., in press.

②Kamine, A., Shimozuru, M., Shibata, H. & Tsubota, T.: Changes in blood glucose and insulin responses to intravenous glucose tolerance tests and blood biochemical values in adult female Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). Jpn. J. Vet. Res. 60(1): 5-13, 2012.

③加味根あかり・下鶴倫人・坪田敏男: ニホンツキノワグマにおける冬眠前の脂肪蓄積メカニズム. 獣医畜産新報 63(5): 367-370, 2010.

④Iibuchi, R., Nakano, N., Nakamura, T., Urashima, T., Shimozuru, M., Murase, T. & Tsubota, T.: Change in body weight of mothers and neonates and in milk composition during denning period in captive Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). Jpn. J. Vet. Res. 57: 13-22, 2009.

[学会発表] (計5件)

①Shimozuru, M., Kamine, A., & Tsubota, T.: Changes in expression of hepatic genes involved in energy metabolism during the hibernation period in Japanese black bears. 20<sup>th</sup> International Conference on Bear Research & Management, 2011. 6. 17-23 (Ottawa, Canada)

②Kamine, A., Iibuchi, R., Shimozuru, M. & Tsubota, T.: Changes in biochemical values of captive Japanese black bears during active and hibernation phases. 19<sup>th</sup> International Conference on Bear Research & Management, 2010. 5. 16-22 (Tbilisi, Georgia)

③Tsubota, T., Nakamura, S., Iibuchi, R.,

Kamine, A., Shimozuru, M.: Physiological and endocrinological mechanism for nutritional condition and reproduction related to hibernation in the Japanese black bear (*Ursus thibetanus japonicus*) International Symposium on Conservation of Asiatic Black Bear, 2009. 11. 21 (Taipei, Taiwan)

④Iibuchi, R., Kamine, A., Shimozuru, M. & Tsubota, T.: TPR profiles, and plasma glucose and fat concentrations of male Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*) during hibernation. The 3<sup>rd</sup> international Workshop of Asian Society of Zoo and Wildlife medicine & The 1<sup>st</sup> Meeting of Korean Society of Zoo and Wildlife Medicine, 2009. 8. 18-19 (Seoul, Korea)

⑤加味根あかり, 中村幸子, 飯渕り子, 山中淳史, 柴田治樹, 下鶴倫人, 坪田敏男: ニホンツキノワグマにおける冬眠前の脂肪蓄積に関する代謝メカニズムの解明. 第147回日本獣医学会学術集会, 2009年4月2-4日(栃木)

[図書] (計1件)

坪田敏男・山崎晃司編: 日本のクマ-ヒグマとツキノワグマの生物学-. 東京大学出版会, 2011.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.vetmed.hokudai.ac.jp/wildlifeBiology01.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

坪田 敏男 (TSUBOTA TOSHIO)

北海道大学・大学院獣医学研究科・教授

研究者番号: 10207441

(2) 研究分担者

下鶴 倫人 (SHIMOZURU MICHITO)

北海道大学・大学院獣医学研究科・助教

研究者番号: 50507168