

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560043

研究課題名(和文)肥満予防基礎研究のための新たな視点でのモデル動物の探索

研究課題名(英文) Search of model animals with a new standpoint for basic research on prevention of obesity

研究代表者

池田 郁男 (Ikeda, Ikuo)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40136544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：食餌脂肪と炭水化物量の違いが内臓脂肪蓄積に影響するかを調べるため、等カロリーで食餌脂肪と炭水化物量を変化させたとき内臓脂肪の蓄積や体重が変化するモデル動物を探索した。その結果、db/dbマウスでは高脂肪食では低脂肪食に比較し摂取カロリーが少ないにもかかわらず、体重が増加した。しかし、内臓脂肪蓄積に有意差がなく、肥満を誘導するかは明確ではなかった。db/dbマウスでは高脂肪食摂取時の脂肪燃焼応答が極めて低いことが明確に示され、等カロリー条件でも肥満を誘発する可能性が示唆された。このことから、db/dbマウスが等カロリーでも高脂肪食で内臓脂肪蓄積が誘発されるモデルとして利用できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：To study if differential levels of dietary fat and carbohydrate change the deposition of visceral fat in experimental animals, I explored several model animals in which isocaloric high fat-low carbohydrate and low fat-high carbohydrate diets influence the deposition of visceral fats. Measurement of energy metabolism revealed that db/db mice have a low ability to consume dietary fat. However, the other animal strains I examined had relatively higher ability to consume dietary fat compared with db/db mice. As a result, growth of db/db mice fed a high fat-low carbohydrate diet was higher than that fed a low fat-high carbohydrate diet. However, visceral fat weight was not significantly increased in the feeding of a high fat-low carbohydrate diet. Therefore, it is thought that dietary fat should be increased to get clear results in studies of db/db mice. This study suggest that db/db mice can be utilized as a model to reveal mechanisms of obesity induced by isocaloric high fat diet.

研究分野：農学

キーワード：visceral fat high fat diet low fat diet triacylglycerol db/db mouse C57BL/6J mouse SD rat

## 1. 研究開始当初の背景

肥満は血糖上昇や高血圧などを引き起こし、これらが合併すると冠動脈硬化性心疾患の危険率を飛躍的に高めることが知られ、その予防は重要な課題となっている。過食で肥満することは疑いの余地がない。一方で、高脂肪、特に高飽和脂肪酸や高蔗糖食などの食事成分の違いも肥満発症を引き起こすと考えられているが、ほとんどの研究では摂取エネルギー量の変動しており、食事成分の肥満発症への影響が厳密に証明されているとは言い難い。ヒトを含めて哺乳動物がある一定の体重を保っている状態では、エネルギーは摂取と消費のバランスがとれていると考えられる。過食ではこのバランスが崩れ、摂取 > 消費となれば肥満することとなる。もし、摂取エネルギー量が同等の状態、内臓脂肪が蓄積し肥満する食事条件があると仮定するならば、なんらかの代謝的破綻が起こっており、摂取エネルギーが内臓脂肪へシフトすると考えられ、また、体重が増えるためには消費エネルギー量が減少しているはずである。ヒトでこの種の試験をする場合、食事成分を変化させた上、摂取カロリー量を同等に合わせることが極めて難しいため、高脂肪食と高糖食でどちらが太るのかは結論が出ていない。実験動物を用いた多くの肥満研究でも、食事からの摂取カロリー量が同等でなく、得られた結果がカロリー摂取量の違いのせい、食事成分の違いのせいかが明確でない場合がほとんどである。等カロリーで試験した研究もあるが、摂食量の多い群を摂食制限して無理に等カロリーに調整しており、この条件では体内のエネルギー代謝が大きく異なってくるため、正確な情報が得られるかは疑問である。このような問題点を解決し、食事成分の違いによる影響を正確に把握することは、肥満の成因を知る上で重要である。

## 2. 研究の目的

食事成分の違いにより肥満が発症するかどうかは、遺伝因子が影響すると考えられる。従って、動物種や系統の違いにより、食事の影響は異なる可能性がある。多くの肥満モデル動物は、過食で肥満するものがほとんどであり、等カロリー条件下において、食事成分の違いにより肥満しやすい、あるいは、肥満しにくい動物系統は知られていない。もしこのようなモデル動物を見いだすことができれば、肥満発症にどのような遺伝因子が関わるのかを明らかに出来る可能性がある。

そこで本研究は、単位食事重量当たり等カロリーの高脂肪低炭水化物食あるいは低脂肪高炭水化物食をモデルの食事として摂食させた場合に、内臓脂肪蓄積量や体重に違いのする実験動物を探索する事を目的とする。実験動物としては、ラットおよびマウスを用いる。

本研究は、食事脂肪と炭水化物の量が肥満発症にどのように影響するかを、等カ

リ条件下で比較するという新たな視点からの研究である。そのためには、適切な実験動物の選択が必須であるが、今のところこの種の研究のための適切なモデル動物は明らかとなっていないことから、モデル動物の探索を行うものである。

## 3. 研究の方法

食餌は、実験動物の飼料として世界的に広く用いられている AIN93G 純化食を基準食として低脂肪高炭水化物食と定義した。この食事には脂肪が 7 重量% (16 カロリー%)、炭水化物が 65 重量% (64 カロリー%) 含まれる。この脂肪含量を 2 倍の 14 重量% (31 カロリー%) に増量し、等カロリーとなるように炭水化物量を 49 重量% (49 カロリー%) に減らした食事を高脂肪低炭水化物食とした。AIN93G 純化食には炭水化物としては、コーンスターチ、コーンスターチおよびショ糖が含まれる。高脂肪低炭水化物食では、炭水化物として最も多く含まれるコーンスターチを減らすことで調整した。なお、このままでは、高脂肪低炭水化物食は低脂肪高炭水化物食に比較し、単位重量当たりのカロリーが高くなることから、カロリーがゼロに近く肥満にほとんど影響しないと考えられるセルロースを増量することで等カロリーに調整した。食事脂肪は AIN93G 基準食で用いられる大豆油とした。

飼育期間は 4 週間あるいは 9 週間とした。飼育開始前後および飼育終了前にエネルギー代謝を測定し、脂肪および糖質の燃焼量への影響を調べた。

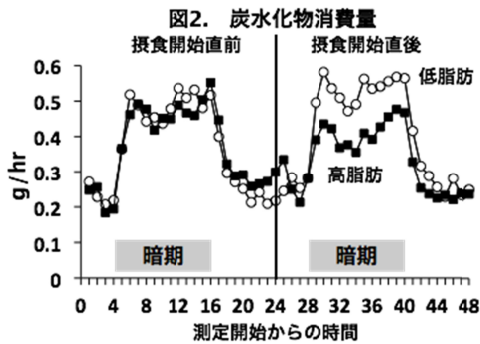
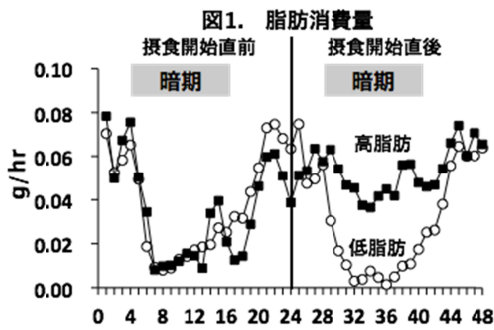
用いる動物種に対して、上記の低脂肪高炭水化物食あるいは高脂肪低炭水化物食を自由摂食で与えた。従って、各動物種間で実験結果の比較が可能となる。

飼育最終日に絶食せずに屠殺を行い、血清、肝臓、腹腔内脂肪組織、筋肉、褐色脂肪組織を採取した。血清以外はいずれも、脂質代謝、糖質代謝およびエネルギー代謝の主要な臓器、組織である。

## 4. 研究成果

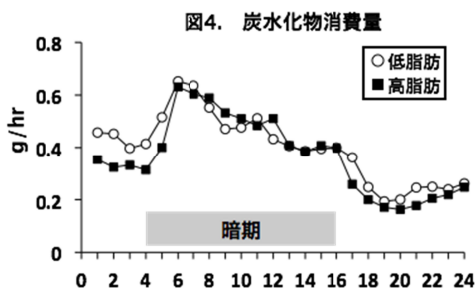
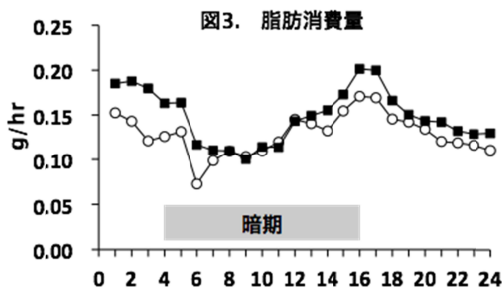
### (1) SD ラット試験

5 週齢の雄性 SD ラットを用いた。研究方法で記述した等カロリーの高脂肪低炭水化物食と低脂肪高炭水化物食を 4 週間および 9 週間自由摂食させた。摂食開始直後と摂食開始から 3 週目および 7 週目にエネルギー代謝測定を行った。摂食開始直後は、高脂肪低炭水化物食では、脂肪消費量が大きく、炭水化物消費量は低かった (図 1、2)。一方、低脂肪高炭水化物食では、逆に脂肪消費量は低く、炭水化物消費量は高かった。これは、食餌の脂肪と炭水化物量に比例した動きであった。摂食開始 3 週間目では、この違いはある程度継続したものの、低脂肪高炭水化物食での脂肪消費量が相対的に上昇し、炭水化物消費量は



低下した。さらに、摂食開始7週目では、脂肪消費量と炭水化物消費量には両食餌間で有意な差が認められなかった(図3、4)。食餌中の脂肪および炭水化物量はかなり異なるにもかかわらず、低脂肪高炭水化物食の脂肪消費量が増加し、炭水化物消費量が増加したために、高脂肪低炭水化物食の場合とほとんど同様の脂肪および炭水化物消費量となることが示された。さらに、エネルギー消費量を計算したところ、食餌の影響は全く認められず、2群間で差はなかった。これらの結果から、食餌炭水化物量が多いと、ラットは摂食期間の長期化に伴い次第に適応し、炭水化物を脂肪に転換して消費、燃焼させていることが示唆されたが、エネルギー消費量には差が生じないことが示された。

平均摂食量は、2群間で差がなく、ほぼ等



カロリーで摂食したと考えられた。屠殺時の体重増加量および腹腔内脂肪組織重量は4週飼育では有意差がないものの高い傾向にあった。しかし、9週飼育ではどちらのパラメータも差がなかった。これらのことから、飼育期間が短いとラットは適応できず、体重および腹腔内脂肪の増加をきたす傾向にあるが、長期飼育では適応し、増加は見られなくなることが示唆された。従って、高脂肪食群で内臓脂肪重量が増加するとは必ずしも言えない結果となった。

肝臓トリアシルグリセロール濃度は、4週飼育では、高脂肪低炭水化物食群で、低脂肪高炭水化物食群よりも有意に高かったが、9週飼育では、この違いは逆転し、高脂肪低炭水化物食群で、低脂肪高炭水化物食群よりも有意に低かった。4週飼育と比較すると、9週飼育では、肝臓トリアシルグリセロール濃度は低脂肪食の場合は高くなったが、高脂肪食の場合は逆に低くなった。これらの結果から、興味あることに、高脂肪食での肝臓トリアシルグリセロール濃度の上昇は一過性であり、必ずしも脂肪肝が引き起こされるわけではないことが示された。

肝臓の酸化系酵素の活性は、4週飼育では、高脂肪食で有意に増加したが、9週飼育では2群間で差はなかった。一方、脂肪酸生合成系酵素では、4週、9週飼育で脂肪酸生合成酵素が高脂肪低炭水化物食で有意に低かった。このような酵素活性の応答は、食餌脂肪中の多価不飽和脂肪酸量と炭水化物量に依存していると考えられた。すなわち、高脂肪食では、大豆油量が2倍であるため、多価不飽和脂肪酸が多いことから、酸化系酵素の活性化と脂肪酸生合成系酵素の抑制が起こったと考えられた。一方、低脂肪食では、高炭水化物であるため、脂肪酸生合成系酵素の活性化が起こっていると考えられた。そのため、脂肪酸生合成系酵素は、低脂肪高炭水化物食で活性化されたと考えられる。

糞への脂肪酸の排泄量は、高脂肪食群で高かった。これは、食餌が高脂肪である点と、食餌にセルロースを多量添加したことが影響したと考えられた。カロリーとしては、高脂肪食群では低脂肪食群に比較し、摂取カロリーの約1%程度のロスと見積もられたが、成長量に大きく影響するとは考えられなかった。

## (2) C57BL/6J マウス試験

週齢は5週齢を用いた。このマウス試験でも、食餌はラット試験と全く同じものを用いた。飼育期間も、4週間および9週間であり、エネルギー代謝測定もラットと同様のスケジュールで行った。

摂食開始直後のエネルギー代謝は、ラットの場合と同様であり、食餌中の脂肪と炭水化物量に応答して、消費が起こった。3週目および7週目でのエネルギー代謝はラットの場合のように、低脂肪高炭水化物食で脂肪燃焼

が次第に上昇する傾向は見られたが、ラットに比べると顕著ではなくゆるやかな変動であった。ラットとの違いを考察すると、ラットの場合、飼育と共に大きく成長し腹腔内脂肪量も増加したが、マウスでは、成長量はわずかで、腹腔内脂肪量の増加も微々たる量であった。従って、マウスの場合はラットと異なり、炭水化物を脂肪に転換して燃焼するという代謝調節はあまり強く起こっていないことが示唆された。いずれにしても、エネルギー消費量は食餌の影響は見られなかった。

平均摂食量は、2群間で差がなく、ほぼ等カロリーで摂食したと考えられた。屠殺時の体重増加量は食餌の影響はなかった。腹腔内脂肪重量は4週飼育では、有意な増加が認められたが、9週飼育では増加傾向に留まった。従って、長期飼育では、適応する傾向がみられた。

肝臓トリアシルグリセロール濃度は、4週飼育では高脂肪食で高かったが、9週飼育では、有意差がなく適応が認められた。しかし、ラットの場合のように、高脂肪食で低下するまでは至らなかった。このようにマウスでも、高脂肪食で脂肪肝は一過性であった。

肝臓の酸化系酵素活性は、9週飼育では高脂肪食で有意に高かったが、4週飼育では差がなかった。脂肪酸合成系酵素では、4週、9週飼育共に、脂肪酸合成酵素およびグルコース6リン酸脱水素酵素では有意に低かった。このような変動は、ラットと同様に、多価不飽和脂肪酸量と炭水化物量で変動していると考えられた。

糞への脂肪酸の排泄量は、高脂肪低炭水化物食群で高く、ラットの場合に比べて、上昇率は高かった。2群のエネルギーロスの差としては1%程度となり、それほど影響があるとは思えなかった。

### (3) ICR マウス試験

5週齢を用いた。食餌条件はC57BL/6Jマウスと同じである。飼育期間は4週間とした。エネルギー代謝測定は3週目に行った。脂肪、炭水化物およびエネルギー消費量は、C57BL/6Jと類似した。

摂食量は、これまでの試験と異なり、特に摂食開始時に高脂肪低炭水化物食群で高く、摂取カロリーは高くなった。この差は飼育中に次第に減少し、平均摂食量に有意差はなかった。しかしながら、この点は大きな問題と考えられた。

体重増加量および腹腔内脂肪重量には2群間で差がなかった。また、肝臓トリアシルグリセロール濃度にも差は認められなかった。肝臓の酸化系および脂肪酸合成系酵素の活性は、C57BL/6Jマウスと類似した。

摂食パターンに2群間で違いが認められたことは正確な情報が得られない可能性がある。そこでICRマウスを用いた9週飼育試験は行わないこととした。

### (4) db/db マウス試験

5週齢を用いた。食餌条件やエネルギー代謝測定条件は、C57BL/6Jマウスと同様である。

摂食開始時のエネルギー代謝を測定したところ、高脂肪低炭水化物食と低脂肪高炭水化物食で脂肪および炭水化物消費量に全く差はなかった(図5、6)。特に、脂肪消費量は両群共に低く、このマウスは脂肪消費能力がかなり低いことが示唆された。3週目のエネルギー代謝測定時では、両群共に脂肪消費量が増加し、高脂肪食では低脂肪食群よりも高かった。一方、炭水化物消費量は低く、結果としてエネルギー消費量には2群間で差がなかった。このように、摂食開始から3週目では、ある程度食餌に应答したエネルギー代謝を示した。

摂食量に有意差はないものの、高脂肪低炭

図5.脂肪消費量(mg/h)

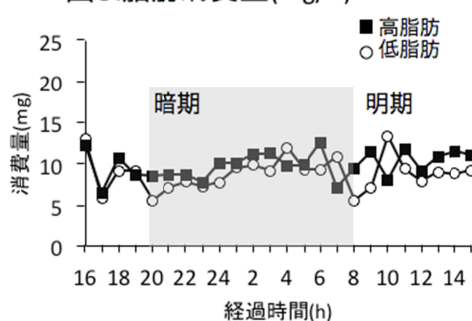
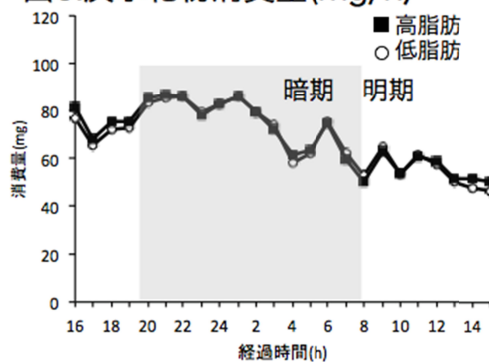


図6.炭水化物消費量(mg/h)



水化物群で1%程度低い傾向で推移した。体重増加量は、高脂肪食低炭水化物食群で有意に高かった。従って、高脂肪低炭水化物食では、成長の亢進が認められた。しかし、単位体重あたりの内臓脂肪重量には差がなかった。

肝臓トリアシルグリセロール濃度は2群間で差はなく、高脂肪食での脂肪肝は観察されなかった。

肝臓の脂肪酸合成系および酸化系酵素の活性は、C57BL/6Jマウスの場合と類似した。

糞への脂肪酸排泄量は、高脂肪低炭水化物食群で高かった。カロリーとしては、0.3%程度の排泄増加となったが、影響があるとは考えられなかった。



(5) モデルマウスとしての可能性

以上の結果を考えると、db/db マウスは高脂肪低炭水化物食の摂取により、摂食量が低い割には体重増加量が大きく、等カロリー条件下での肥満の研究に用いるモデルマウスとなり得ると考えられた。しかしながら、単位体重あたりでは、内臓脂肪重量は高くはなかったことから、食餌脂肪含量を高めてさらなる研究を行うことが必要と考えられた。

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0件)

〔学会発表〕(計5件)

池田英介、伊藤知美、滋田芽衣子、石田良衡、井上奈穂、池田郁男、等カロリーの低脂肪高炭水化物食と高脂肪低炭水化物食が db/db マウスのエネルギー代謝に与える影響、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 26-29 日、岡山大学(岡山県・岡山市)

池田郁男、石田良衡、滋田芽衣子、伊藤知美、井上奈穂、高脂肪低炭水化物食と低脂肪高炭水化物食のエネルギー代謝への影響 -SD ラットと C57BL/6J マウス-、第 35 回日本肥満学会、2014 年 10 月 24-25 日、シーガイアコンベンションセンター(宮崎県・宮崎市)

一井洋和、井上奈穂、池田郁男、低脂肪高炭水化物食と等カロリーの高脂肪低炭水化物食がエネルギーおよび脂質代謝に与える影響-高週齢 C57BL/6J マウス-第 68 回日本栄養・食糧学会大会、2014 年 5 月 30 日-6 月 1 日、酪農学園大学(北海道、江別市)

小川望美、井上奈穂、池田郁男、低脂肪高炭水化物食と等カロリーの高脂肪低炭水化物食がエネルギーおよび脂質代謝に与える影響-SD ラット-、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 27-30 日、明治大学生田キャンパス(神奈川県・川崎市)

一井洋和、井上奈穂、池田郁男、低脂肪高炭水化物食と等カロリーの高脂肪低炭水化物食がエネルギーおよび脂質代謝に与える影響 -C57BL/6J マウス-、日本農芸化学会東北支部大会、2013 年 10 月 26 日、岩手大学(岩手県・盛岡市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 郁男 (Ikeda, Ikuo)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号: 40136544