

論 文 要 旨

Long-term voluntary exercise, representing habitual exercise, lowers visceral fat and alters plasma amino acid levels in mice.

〔 長期の自発的運動（習慣的運動）が
マウスの内蔵脂肪低下および血漿アミノ酸レベルを変化させる 〕

竹 下 温 子

【序論および目的】

運動が生活習慣病のリスクを減らすことによって平均寿命を改善することがいくつかの疫学的研究で示されている。不活発な行動は、加齢に伴う慢性的な病気の罹患率や死亡率を高める危険因子である。また、American College of Sports Medicine は、肥満や糖尿病などの生活習慣病を予防するために、毎日少なくとも 30 分以上の運動を行うことを推奨している。これらのことは長期の自発的運動（習慣的運動）が健康増進に必要であることを示しており、長期の運動の効果についての生体影響を分析する意味があるだろう。

運動の効果については、多くの研究がなされているが、長期の運動効果についてヒトで検討するためには様々な制限もあり、難しい。そこで我々は、ストレスの少ない運動負荷のモデルマウスを確立し、6 か月間にわたる飼育後、糖質・脂質・アミノ酸代謝などの生体指標を測定し、長期の自発的運動（習慣的運動）が生体に及ぼす影響をマウスモデルで調べた。

【材料および方法】

動物；実験動物は、A/J マウスのメス 6 週齢を 24 匹用いた。A/J マウスのメスはオスと比較して、運動量が多い（長い距離を走る）ため、運動の効果をより顕著に見出すことができると考えた。

飼育；A/J マウスは日本 SLC（静岡）から 5 週齢で購入し、1 週間の順化を行った。その後、ベースライン群（8 匹）、運動群（8 匹）不活動群（8 匹）の 3 群に分けた。ベースライン群は 6 週齢にて、絶食後解剖した。運動群は回転車つきケージに、不活動群は中央に金属の仕切りを入れた普通ケージに分け、24 週間の飼育を行った。

飼育中の環境は、室温 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、7-19 時の 12 時間照明とし、水・食餌は自由摂食とした。毎週、8 時～10 時の間に、体重、摂食量を測定し、運動群については運動量（km/day）を計測した。

運動負荷；我々は、夏目製作所と共同で開発した回転車装着型ケージを用いて運動負荷を行った。ケージはプラスチック製で、木くずを敷いており、回転車の周径は 0.7m で、マウスはいつでも自由に運動を行える環境にした。

実験方法；6 週齢（8 匹）、30 週齢（16 匹）のマウスを 6 時間絶食後、ペントバビタールを腹腔投与し、心臓より採血した。採血後 3000rpm で 5 分遠心分離し血清を -80°C で保存した。頸椎脱臼後、各臓器（心臓、肝臓、卵巣周囲脂肪組織、副腎、ヒラメ筋）を摘出し重量を測定した後、ただちに液体

窒素中で凍結し、-80度で保存した。血中のグルコース、遊離脂肪酸、総コレステロール、HDL コレステロール、中性脂肪(TG)は Wako 社のキットを用い、インスリン (森永製薬)、レプチン (R&D)、アディポネクチン(大塚製薬)、インスリン様成長因子;IGF-1 (R&D)、コルチコステロン (Assay Designs) は ELISA キットを使用し測定した。血中アミノ酸はスルホサルチル酸による除蛋白後、アミノ酸分析装置 (日本電子 JL500) にて測定を行った。肝臓中の脂質含量は、WAKO 社のキットを用い、副腎中のビタミン C 量は R-Biopharm AG 社のキットを用いて測定した。最後に、脂肪細胞および肝臓中の RNA は Invitrogen 社の TRIzol を用いて抽出し、cDNA を調製した。TAKARA detection system を用い、各種遺伝子発現量 (mRNA レベル) を Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA レベルを基準にして、相対定量法にて測定した。脂肪細胞は、Fatty acid synthase (FAS), Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), lipoprotein lipase (LPL), hormone-sensitive lipase (HSL), adipocyte triglyceride lipase (ATGL), Adipsin, fatty acid-binding protein 4 (FABP4), Leptin, Adiponectin, insulin-like growth factor (IGF-1)、肝臓は FAS, G6PD, glucose transporter 2 (Gult2), glucokinase (GK), phosphoenol pyruvate carboxy kinase (PEPCK), IGF-1 を測定した。

【結果および考察】

運動は主に暗期に偏って行われ、その1日の運動量は4週(10週齢)でピークを迎え(7.2±0.4km/day)、その後12週(18週齢)まで緩やかに減少し、12週(18週齢)~24週(30週齢)までほぼ一定を示した(4.9±0.2km/day)。

次にストレスの指標となる副腎重量およびビタミンC含量については、運動群と不活動群で有意差を認めなかった。さらに、運動群と不活動群において、心臓重量も有意な差を認めなかったことから、この運動が循環器系に負担を与えるような強い負荷ではなく、ストレスの小さい運動であると考えられた。

体重あたりの摂食量は、運動群が不活動群に比べ有意に多いにも関わらず、体重は運動群が不活動群に比べ有意に低値を示した。運動群は骨格筋重量が不活動群に比べ有意に高かった。また血中レプチン濃度および肝臓のTG含量が運動群は、不活動群に比べて低値を示し、内臓脂肪重量と肝臓重量も、運動群は、不活動群に比べて低値を示した。これらのことは、自発的運動を長期に行うことによって、エネルギー消費量が増大し、内臓脂肪蓄積に影響を与えた結果と考えられた。

次に血漿アミノ酸の分析では、フェニールアラニン、チロシンおよびグルタミンのレベルが、不活動群に比べ、運動群は有意に高かった。また、肝障害時などに用いられる意識レベルの指標であるフィッシャー比が運動群は不活動群に比べ有意に低い値を示し、長期運動が脳内神経伝達物質代謝に変化を与えることが示唆された。その他、遺伝子発現量は脂肪細胞中のレプチンが運動群で有意に低く、その他の遺伝子において有意な差はみられなかった。

【結論】

長期に自発的運動を行うマウスモデルを用いてストレスの小さい環境下での実験を行った。摂食量の増加に関わらず、肝臓TGおよび内臓脂肪レベルの低下を伴い体重の増加は抑制された。このことより体重コントロールのために長期の習慣的運動が重要であることが示唆された。また長期の習慣的運動により、血中のレプチン低下や、血中フェニールアラニン、チロシンの増加がみられるため、長期の習慣的運動が食欲や行動に関連する病態に影響を及ぼす可能性も示唆された。

これらのことは、健康増進のために、自発的に運動できるような環境を人々に提供することの重要性も示している。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 157 号		学位申請者	竹下 温子
審査委員	主査	嶽崎 俊郎	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	桑木 共之	副査	橋口 照人
	副査	浅川 明弘	副査	池田 聡

Long-term voluntary exercise, representing habitual exercise, lowers visceral fat and alters plasma amino acid levels in mice

「長期の自発的運動(習慣的運動)がマウスの内臓脂肪低下および血漿アミノ酸レベルを変化させる」

身体活動(運動+生活活動)の指標となる歩行距離と死亡率の関係はV字型を示し、死亡率が最も低くなるのは、1日1万歩に相当する48~53 km(1週間)の歩行距離であることが報告されている。しかし、平成21年度の国民栄養調査による1日1万歩達成率は成人男女で20%に満たなかった。1万歩達成率の低い理由として、社会環境により身体活動が制限されることが多い現状に加え、運動の科学的根拠が充分でないことが挙げられる。申請者らは、運動の科学的根拠を明らかにするために、長期の自発運動が可能な動物モデルの作成を行った。6~30週令(ヒトでは15~35歳に相当する)のマウスを、運動群と不活動群に分け飼育し、糖質・脂質・アミノ酸代謝関連指標について解析を行った。その結果、本研究で以下の知見が得られた。

- (1) 運動は暗期に偏って行われ、経時的な運動量の推移は2相性を示した。1日の運動量は10週令でピークを迎え(7.2 ± 0.4 km/日)、その後18週令まで減少し、18~30週令はほぼ一定を示した(4.9 ± 0.2 km/日)。
- (2) ストレスの指標となる副腎重量およびビタミンC含量については、運動群と不活動群で有意差を認めなかった。さらに、心臓重量も有意な差を認めなかった。
- (3) 体重あたりの摂食量は、運動群が不活動群に比べ有意に多いにも関わらず、体重は運動群が不活動群に比べ有意に低値を示した。運動群では、血中レプチン濃度および肝臓のtriglyceride (TG)含量が、不活動群に比べて低値を示し、内臓脂肪重量と肝臓重量も有意に低値を示した。
- (4) 血漿アミノ酸の分析では、運動群のフェニールアラニン、チロシンおよびグルタミンのレベルが、不活動群に比べ有意に高かった。また、フィッシャー比は運動群で有意に低値を示した。

申請者らは、ストレス負荷の少ない長期自発運動のマウスモデルを確立した。運動群では、摂食量の増加に関わらず、肝臓TGおよび内臓脂肪量の低下を伴い、体重の増加は抑制された。このことより、体重調節のために長期の習慣的運動が重要であることが示唆された。血中レプチン低下や、血中フェニールアラニン、チロシンの増加、フィッシャー比の低下がみられるため、長期の習慣的運動が食欲や行動に関連する病態に影響を及ぼす可能性も示唆された。これらのことは、健康増進のために、自発的に運動できるような環境を人々に提供することの重要性も示している。社会医学の研究として、「食育」ならぬ「運育」を幅広く普及させるための科学的根拠の1つが得られた。

本研究は、長期の習慣的運動の生体影響を申請者らが確立したマウスモデルを用いて検討したものである。結果として、長期の習慣的運動は、摂食量の増加にもかかわらず、体重増加抑制や内臓脂肪の減少が見出され、長期の習慣的運動の有用性を明らかにした。また、脂質代謝のみならず、血中アミノ酸レベルの変化を確認できたことは、習慣的な運動が単純な減量効果だけでなく、中枢神経系を介した食欲や行動に影響を与える可能性が示唆された点において、非常に興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第157号		学位申請者	竹下 温子
審査委員	主査	嶽崎 俊郎	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	桑木 共之	副査	橋口 照人
	副査	浅川 明弘	副査	池田 聡

主査および副査の5名は、平成23年12月15日、学位申請者 竹下 温子 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 論文要旨中に記載されている「老化にともなう慢性的な病気・・・」の老化という表現は適切ではない。今回の実験を考えると「加齢」という表現が適切ではないか？

(回答) その通りです。要旨を訂正いたします。

質問2) 論文要旨中に記載されている回転車の大きさの記載について質問します。「直径0.7 m」と記載されているが、「周径0.7 m」ではないか？

(回答) その通りです。要旨を訂正いたします。

質問3) 飼育の方法について質問します。1匹ごとの飼育(個別飼育)より、複数匹のマウスを1ケースで飼育する(群飼育)場合が記憶力や寿命が延びるという報告があります。本実験では、個別飼育でしたが、群飼育を用いて、運動の影響を評価しても良かったのではないのでしょうか？高価ではあるが、テレメトリー器具を埋め込んで、どのマウスが回転車にアクセスしたかを評価することが可能で、群飼育を用いても、個々のマウスの運動評価も可能と考えます。今後検討するとよいと思います。

(回答) 個々のマウスの運動量を簡便に知りたかったため、個別飼育を用いました。今後、群飼育により飼育したマウスについて、検討してみたいと思います。

質問4) A/Jマウスは他のストレインに比べて、長い距離を走るということだが、運動が本当に体に良いのであれば、A/Jマウスの寿命が長いとか、病気になるにくいということが考えられ、そのような報告があるのか？A/Jマウスは肺がん易発症マウスとのことだが、長い距離を走るマウスが肺がん易発症ということは、矛盾しないか？

(回答) A/Jマウスが、他のストレインのマウスに比べて、長寿命や病気になるにくいとする報告は、私たちが調べた限りでは、ありませんでした。運動嗜好性と寿命との関係は、これから検討すべき課題です。ちなみに、ラットで、長期の運動は、寿命には影響しなかったという報告がなされています。ただ、ラットは、数か月すると自発運動量が低下しますので、自発運動が持続するマウスで行う必要があるように思います。また、肺がんに関しては、A/Jマウスはがん遺伝子に変異を持つことが報告されており、運動嗜好性とがん易発症は直接には関係ないと考えています。

質問5) ストレスの指標となる副腎重量、血中コルチコステロン濃度、副腎ビタミンC含有量は、水泳やトレッドミルのような強制的運動においても、ストレスの指標として用いられているのか？

(回答) 副腎重量については、強制的な運動によって、有意に大きくなることが報告されています。また血中コルチコステロン濃度は、一般的なストレス指標として用いられています。副腎ビタミンC含量は、血中ACTH増加によって減少することが報告されており、ストレスの指標として用いました。

質問6) 有意に増加した血漿アミノ酸は、フェニールアラニン、チロシン、グルタミンの3つでしたが、論文のキーワードとして、グルタミンのみを記載したのはなぜですか？

(回答) キーワードとして、「Aromatic amino acids」を記載しています。

質問7) この運動は、マウスにとって本当に負荷がかかっていないのか？

(回答) 完全に負荷がかかっていないとは言えませんが、心臓重量の有意な増加を認めないことから、循環器系に強い負担をかけるような運動ではなかったと考えています。自発的に行なわれた運動であり、体に対する負担が強ければ運動をしなかったと考えられます。12週以降も4 km程度の走行が認められ、マウスにとっては、負荷の程度は小さかったと考えられます。

質問8) A/Jマウスはよく走り、速度も速いということだが、マウスの特性として知られたことなのか？

(回答) すでに、マウスのストレイン別の運動嗜好性や運動速度については、報告がなされており、マウスの特性として知られていることです。

質問9) 摂食量の測定方法を教えてください。こぼした分はどのように計算していますか？また解剖前に絶食していたが、そのときケージを交換しているのか？

(回答) こぼした分は一定と考え計算しています。通常は大きなかけらを拾うのですが、今回は、大きなかけらがこぼれていることはありませんでした。絶食前は、ケージの交換を行っております。

質問10) 今回、3群(ベースライン群、不活動群、運動群)に分けていますが、3群の中でどの群が最も健康だと考えているのか？その理由も教えてください。

(回答) 運動群だと考えています。理由の1つとして、摂食量が多いにも関わらず、内臓脂肪量が有意に低下していることが挙げられます。ヒトに外挿すると、長期の習慣的な運動を行う群は、肥満になりにくいと考えられます。

質問11) 今回の研究では、不活動群は、飼育ケージの中央に金属の仕切りを入れてあります。不活動群の設定として、別の方法は考えられないか？例えば、回転車を動かないように固定し装着したケージを用いる方法も考えられるが、どのように考えるのか？

(回答) マウスが行動する空間について考慮するとすれば、固定した回転車を装着したケージを用いるべきだったと考えます。今後の実験については、考慮したいと思います。

質問12) Glut4 mRNA レベル、血中アディポネクチンレベル、骨重量については、測定しているか？

(回答) Glut4 は、筋肉および肝臓で測定しました。筋肉において、不活動群と運動群で、有意な差は見られませんでした。肝臓では、いずれの群も発現量が低く、両群の比較はできませんでした。血中アディポネクチンは測定し、両群で有意な差を認めませんでした。また骨重量に関しては、測定していません。

質問13) 血中コレステロール、中性脂肪、グルコース、インスリンの値に不活動群と運動群に差はないが、肝臓や内臓脂肪の減少を認めるのはなぜか？

(回答) 血糖やインスリン値に違いはありませんでしたが、インスリン感受性に違いがないかは不明で、糖負荷試験や HbA1c 測定が必要と考えています。今回の結果では、血中指標よりも内臓指標の方が、運動の効果をより強く反映しており、詳細な理由は不明です。

質問14) オープンフィールドで測定した活動量や、糞の回数、グルーミング、リアリングの値はどうだったか？

(回答) 10分間の測定で、運動群が不活動群に比べて有意に高い活動量を示しました。糞の回数については測定しましたが、不活動群と運動群で有意な差はありませんでした。また、グルーミング、リアリングについては判断が難しく検討できませんでした。

質問15) 運動の効果という面からより走るメスを利用したのとことでしたが、30週令はまだ性周期中であり、探索行動に影響が出てきてしまいます。オスの利用は考えなかったのか？

(回答) 考えておりませんでした。今後検討して行きたいです。

質問16) 今回のマウスの自発的運動は、ヒトに外挿するとどのくらいの運動量に相当するのか？

(回答) 摂食量から考えますと、運動群は一日に0.13倍多く食事を摂取しています。成人女性の一日の摂取エネルギーが2000kcalと設定しますと、2260kcalとなり、260kcal分余分に摂取していることとなります。50kgの体重のヒトが分速70mで10分間(700m、1000歩)歩くと、5250mlの酸素を摂取することとなります。これに「酸素1リットル当たりのエネルギー消費量=5kcal」を当てはめますと消費エネルギーは26kcalとなります。よって今回260kcal分余分に摂取しているため、15~30代の50kgの女性であれば7km(1万歩)の運動に相当すると考えられます。

質問17) 運動の効果を検討するために、ひらめ筋を選んだ理由を教えてください。

(回答) 長期の習慣的運動の効果ということから、酸素消費効率の高い赤筋について検討することが妥当と考え、赤筋の代表であるひらめ筋を選びました。今回、白筋については測定をしませんでしたが、今後検討して行きたいです。

質問18) 運動群で血漿フェニールアラニンとチロシンが高値をしめす理由を教えてください。

(回答) 血漿中のアミノ酸濃度は、食事からの摂取、合成、分解、排泄のいくつかのステップによって調節されていると考えられます。それぞれのステップについての検討が必要ですが、芳香族アミノ酸は主に肝臓で分解され利用される点を特に考えています。運動群では、肝臓中の脂質量が低下しており、運動によって肝臓でのアミノ酸代謝にも影響が生じている可能性を考えています。

質問19) ヒトであれば、15歳から35歳の年齢に相当するマウスを用いた理由を教えてください。

(回答) 平成21年の国民栄養調査では、20歳を超えた男女の身体活動量が1日1万歩を超えたヒトの割合が20%を超えていません。特に30代女性では、5%前後と低値です。40代に入ると5人に1人がメタボリックシンドロームと診断されていることが、平成18年の国民栄養調査でわかっています。これらのことを踏まえたうえで、長期の習慣的運動の効果を若年期から中年期に設定して検討しました。

質問20) 運動が生活に順応してきたということは、生理学的にはどのような意味をもつのか？

(回答) 運動量のグラフから、12週以降は、ある一定の運動量を示すことがわかります。運動量が一定になったということが、生体の反応として、順応・適応したという意味を持つと考えています。

質問21) フィッシャー比が低下しているということだが、脳内のセロトニン量を測定しなかったのか？

(回答) 測定はしていません。脳のサンプルは保存してありますので、可能であれば、測定をしたいと考えています。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。