

体脂肪減少速度とリバウンド現象の関係 —中枢性摂食調節因子からの検討—

共立薬科大学	木村真規
(共同研究者) 同	柴崎敏昭
同	吉江文彦
東京慈恵会医科大学	鈴木政登
同	山内秀樹

Relationship between the Rate of Fat Mass Reduction and the Rebound Phenomenon

— The Study about the Central Regulation of Eating Behavior —

by

Masaki Kimura, Toshiaki Shibasaki, Fumihiko Yoshie,
Kyoritsu University of Pharmacy
Masato Suzuki, Hideki Yamauchi,
The Jikei University School of Medicine

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the optimal weight reduction program for the dietary and exercise therapy. We tested about the rate of weight reduction arranged by the food restriction or voluntary wheel running protocol that will effect on the central regulation of eating behavior.

Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats, an animal model of hyperphagia and obesity, was used in this study (19-week-old at the end of experiment). The rats were randomly assigned to either the food restriction (in the duration of 1w, 2w or 4w), exercise (in the duration of 2w or 4w) or control group.

The food volume or exercise frequency were arranged, and all rats weighed about 80% of control rats at the end of experiment.

Compared to chronic exercise, acute food restriction promoted the reduction in the value of the blood leptin concentration divided by the total abdominal fat mass (i.e. the ability of leptin secretion in adipose tissue). Food restriction, compared to exercise, provided the higher expression of neuropeptide Y mRNA in the arcuate nucleus of the hypothalamus that might induce the orexigenic behavior.

These results suggested that the exercise therapy may be more effective for weight reduction and it's maintenance compared to the dietary therapy.

要 旨

本研究では、食事療法および運動療法を、その程度や頻度を調節することによって実施し、体脂肪量の減少速度を調節することによって、減量後の脳内の摂食行動調節因子の変化から至適な減量方法についての検討を行った。その結果、短期間の急激な食事療法では、長期間の運動療法と比較して腹部総脂肪重量あたりの血中レプチン濃度が低値となり、レプチン分泌機能の抑制が示唆された。また、食事療法では視床下部弓状核における摂食亢進物質であるニューロペプチドYの遺伝子発現が、運動療法と比較して有意な高値であったことから、過度の摂食亢進が生じている可能性が示唆された。

以上の結果から、体重減少を目的とした介入においては、食事療法よりも運動療法が有効である可能性が示唆された。

緒 言

今日、生活習慣病の罹患率は増加の一途を辿っており、その根底には飽食の時代を背景とする肥満の蔓延が存在している。肥満は現代の深刻な疫病ともいわれ、結果として生命を脅かす重大な疾患を誘引する危険因子と考えられている^{2, 6, 8)}。しかし、人類史上において飢餓はそれ以上に深刻

な問題であり、生体は体重の減少を生命維持に対して危機的な状態と判断して摂食行動を惹起する¹⁾。運動療法や食事療法は肥満を改善する方法として広く知られているが、現実には長期間に渡って肥満を克服できる者は少なく、その95%は再びもとの体重へと戻るといわれている^{14, 16)}。

近年、食事制限によって視床下部領域における摂食調節ホルモンやそのレセプターが著明に変化し、過度の摂食行動を惹起する可能性が明らかとなった¹⁵⁾。中でも脂肪細胞から分泌されるレプチンは、末梢の脂肪組織量を摂食中枢に伝え、多くの摂食調節ホルモンの上流に位置することによって、体脂肪量を一定に保つように摂食行動を調節することが知られている¹⁵⁾。しかし、体脂肪量と血中のレプチン濃度の関係や視床下部領域のレプチンレセプターを介する摂食行動調節は、減量方法の相違や体脂肪量の減少速度によって変化する可能性が示唆されており^{5, 9, 10)}、肥満改善を目的とした各種の介入において、至適な減量方法や体脂肪減少速度が存在する可能性が考えられる。

そこで本研究では、食事療法および運動療法をその程度や頻度を調節することによって実施し、体脂肪量の減少速度を調節することによって、減量後の脳内の摂食行動調節因子の変化から至適な減量方法についての検討を行った。

1. 研究方法

本研究では、過食性に肥満を呈する Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラット¹¹⁾ (♂, 47匹) を対象に、食事療法と運動療法を実施し、体重減少後の同一体重において各種パラメーターの比較を行った。実験中は全ての群において飲水を自由とし、食事療法群以外では摂餌も自由とした。また、血液や各種臓器のサンプリングは、全ての群において19週齢時に行った。

1. 1 自発走運動による運動療法

まず始めに、17週齢のラット (EX-2w群, n=8) を対象に、2週間の自発走運動を実施した。運動開始の2週間前から回転かご付の個別ケージにて予備飼育を実施し、運動開始時より回転かごへのアクセスを可能にすることによって自発走運動を開始した。本研究では、EX-2w群の運動療法後の体重を全ての食事療法群および運動療法群の目標体重に設定した。

次に、15週齢のラット (EX-4w群, n=8) を対象に、4週間の制限付自発走運動を実施した。運動量の調節は、回転かごへのアクセスを制限することによって行い、おおむね2日に1回、1昼夜の運動制限を実施した。運動の制限はラットの体重をモニターし、目標体重を維持するように適宜調節を行った。

1. 2 摂食制限による食事療法

運動療法群と同一の個別ケージ (回転かごなし) を用いて2週間以上の予備飼育を行った後、摂餌量の制限を実施した。食事療法群では、1週間 (FR-1w群, 18週齢, n=8)、2週間 (FR-2w群, 17週齢, n=8) および4週間 (FR-4w群, 15週齢, n=8) の摂食制限を実施し、19週齢時に目標体重に達するように摂餌量の調節を行った。なお、各群の摂餌制限は、*ad lib* 摂餌飼育を行った対照群

(CON群, n=7) のそれぞれおおむね50.8%, 58.9%および76.3%であった。

1. 3 脳組織のサンプリングおよび測定

エーテル前処置後、ネンブタール (50mg/kg, i.p.) による全身麻酔を実施し、右総頸動脈からの全血採血を行った。続いて、生理食塩水 (約50ml) を腹部大静脈から灌流し、脳の摘出を行った。脳サンプルは、視床下部領域を含む前額面スライスを2mm厚で作成し¹³⁾、RNA安定化剤 (RNAlater, TaKaRa) に一晩浸漬後、-80℃で一時的に保存した。

後日、凍結保存した脳スライスを室温で融解し、14ゲージ注射針を用いて視床下部弓状核領域の組織片を切り出した。得られた組織サンプルからグアニジン-チオシアネート法⁷⁾にてtotal RNAを抽出し (ISOGEN, 日本ジーン)、逆転写酵素を用いてmRNAのcDNAを作成した (Omniscript RT Kit, QIAGEN)。

ラットのニューロペプチドY (NPY) 遺伝子のmRNA配列からプライマーを作成し (Sense: ggg gct gtg tgg act gac cct, Antisense: gat gtagtg tcg cag agc gga g, 149 bp)¹⁷⁾、ポリメラーゼ連鎖反応法を用いてNPY mRNAフラグメントの増幅を行った (Taq PCR Core Kit, QIAGEN)。これらの結果は全て β -actin mRNAとの比を算出して半定量的に評価した。

1. 4 その他のサンプリングおよび測定

採取した血液は遠心分離後、-80℃にて凍結保存した。後日、室温にて解凍し、血中レプチン濃度 (ラットレプチンELISAキット, 矢内原) の測定を行った。

心臓、下肢筋組織 (前脛骨筋, 長指伸筋, 腓腹筋, ヒラメ筋, 足底筋) および腹部脂肪組織 (副睾丸周囲脂肪, 後腹膜脂肪, 腸管膜脂肪, 大網周囲脂肪, 皮下脂肪) は、摘出後、速やかに秤量し、

内臓脂肪重量 (=副睪丸周囲脂肪重量+後腹膜脂肪重量+腸管膜脂肪重量+大網周囲脂肪重量) および腹部総脂肪重量 (=内臓脂肪重量+皮下脂肪重量) を算出した。

1. 5 統計解析

本研究で得られた結果は、平均±SD (本文中) または平均±SE (図中) で表した。各パラメーターの平均値の比較にはANOVAを用い、各群間の比較にはLSD法を用いた。また、NPY遺伝子発現量の各群間の比較にはPlanned-t-test法を用いた。有意水準は $p<0.05$ とした。

2. 結果

実験飼育期間中、CON群の体重には成長に伴った増加が観察され、19週齢時には $538 \pm 35\text{g}$ に達した (図1)。EX-2w群の体重は自発走運動によって開始時 (17週齢) の体重 ($477 \pm 37\text{g}$) から有意に減少し、19週齢時には $435 \pm 25\text{g}$ に達し

た ($p<0.001$)。また、EX-2w群の実験飼育期間中の1日平均摂餌量は $14.9 \pm 5.2\text{g}$ であり、CONの約50.7%であった ($p<0.05$)。なお、この時の総走行距離は $39.0 \pm 6.9\text{km}$ 、1日あたりの平均走行距離は $2.40 \pm 0.99\text{km/day}$ であった。

EX-4w群の運動開始時 (15週齢) の体重は $442 \pm 22\text{g}$ であり、目標体重であるEX-2w群の19週齢時の体重とほぼ等しかったことから、開始時の体重を維持するように運動量を調節し、2日に1回程度の自発走運動を行わせた。なお、EX-4wの総走行距離は $34.9 \pm 8.6\text{km}$ 、1週間あたりの平均走行距離は $1.16 \pm 0.27\text{km}$ であった。また、飼育期間中の1日平均摂餌量は $23.5 \pm 5.6\text{g}$ であり、CONの約80.2%であった。

食事療法群の療法開始時の体重は、それぞれFR-1w: $510 \pm 27\text{g}$, FR-2w: $484 \pm 50\text{g}$ およびFR-4w: $442 \pm 31\text{g}$ であり、それぞれCONの総摂餌量のおおむね50.8%, 58.9% および76.3%の摂餌制限によって19週齢時に目標体重に達した。

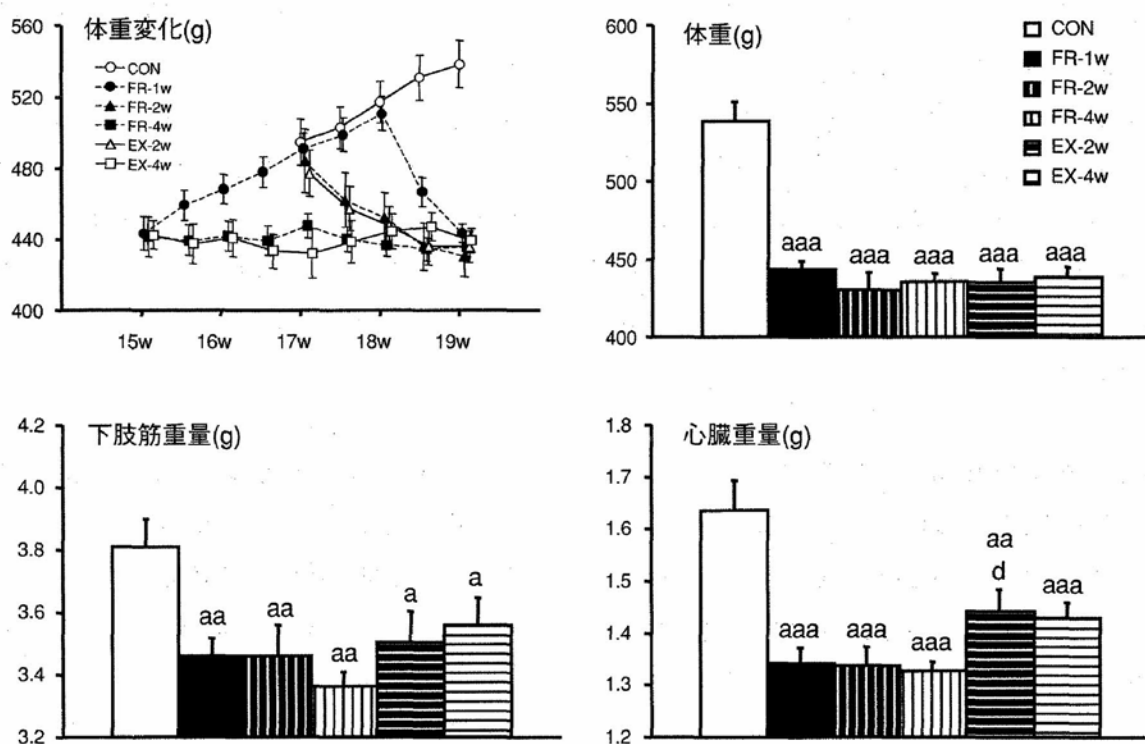


図1 体重、下肢筋重量および心臓重量の比較
a: $p<0.05$, aa: $p<0.01$, aaa: $p<0.001$ vs CON, d: $p<0.05$ vs FR-4w
略語は本文参照のこと

本研究の食事療法および運動療法では、19週齢時のCON群の体重の全体平均 $81.2 \pm 1.4\%$ ($80.0 \sim 82.4\%$) までの体重減少に成功し、全ての群においてCON群との間に有意差が認められた (いずれも $p < 0.001$, 図1)。

下肢筋重量および心臓重量は、全ての食事療法および運動療法によって有意な減少が観察されたが、運動療法群では食事療法群と比較して高値を示す傾向がみられ、EX-2w群の心臓重量はFR-4wと比較して有意差が認められた (図1)。

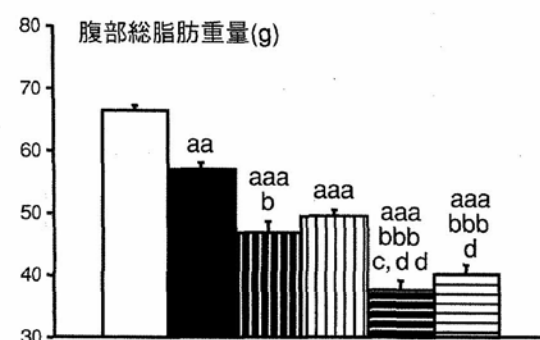
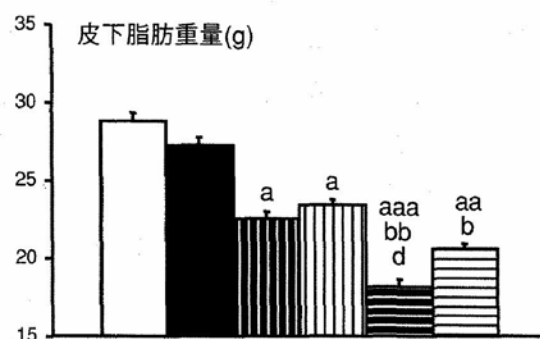
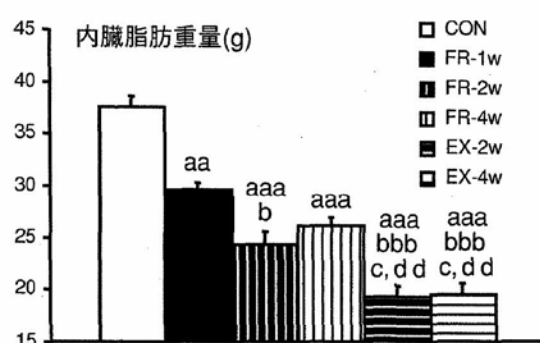


図2 各種脂肪重量の比較

a: $p < 0.05$, aa: $p < 0.01$, aaa: $p < 0.001$ vs CON, b: $p < 0.05$, bb: $p < 0.01$, bbb: $p < 0.001$ vs FR-1w, c: $p < 0.05$ vs FR-2w, d: $p < 0.05$, dd: $p < 0.01$ vs FR-4w
略語は本文参照のこと

腹部脂肪重量は、運動療法および食事療法によって顕著に減少する傾向が観察された (図2)。とくに運動療法では、療法期間によらず著明な減少が観察され、食事療法群との間に有意差が認められた。また、1週間の急速な摂餌制限では腹部脂肪重量の減少は緩徐であり、皮下脂肪重量はCON群との間に差はみられなかった。

血中のレプチン濃度は、食事療法および運動療法によって顕著に低下し、CONとの間に有意差が認められたが、各療法間に差はみられなかった (図3)。一方、脂肪組織のレプチン分泌機能を評価するために血中レプチン濃度を腹部総脂肪重量で除して比を求めたところ、運動療法では食事療法と比較して高値となる傾向が観察され、FR-1wとEX-4wの間に有意差が認められた。

摂食調節中枢として重要な役割を担っている視床下部弓状核におけるNPYの遺伝子発現を比較したところ、食事療法によって増加し、運動療法

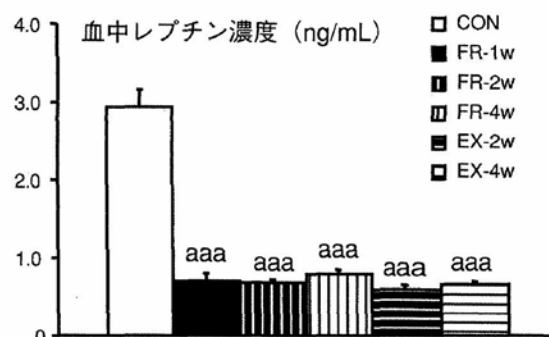


図3 血中レプチン濃度および腹部総脂肪重量との比の比較

レプチン/腹部総脂肪重量比
aaa: $p < 0.001$ vs CON, b: $p < 0.05$ vs FR-1w
略語は本文参照のこと

では減少する傾向が観察された。また各介入期間毎に食事療法と運動療法の比較を行ったところ、両介入期間とも運動療法では食事療法と比較してNPYの発現が抑制される傾向が認められた（両介入期間とも $p<0.05$ ）。

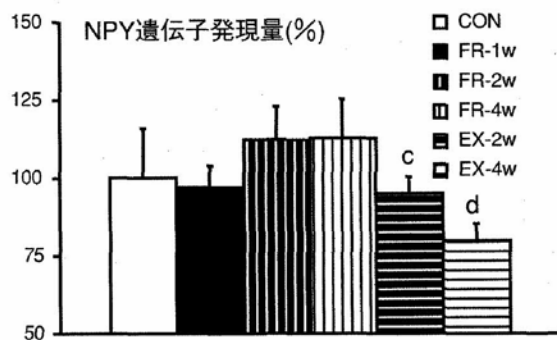


図4 ニューロペプチドY (NPY) 遺伝子発現量の比較
c: $p<0.05$ vs FR-2w, d: $p<0.05$ vs FR-4w
略語は本文参照のこと

3. 考 察

本研究は、食事療法や運動療法による体重減少後の、一般にリバウンドと呼ばれる過剰な体重増加現象の機序を解明し、肥満改善を目的とした各種の介入プログラム作成時における基礎的資料を得ることを目的とした。摂食行動は中枢における摂食調節因子によって惹起される¹⁵⁾と考えられるが、この因子の発現は減量方法の相違や体脂肪量の減少速度によって異なる可能性が示唆されており^{5, 9, 10)}、本研究ではより摂食行動を惹起しにくい減量方法についての検討を行った。

本研究では、17週齢より開始した2週間の自発走運動によって達成された体重減少を目標体重に設定し、各療法とも19週齢時に目標体重に到達するように摂餌制限の程度や運動の頻度を調節して体重減少速度の調節を行った（図1）。その結果、食事療法群および運動療法群の体重は19週齢時にCON群の約80%となり、各療法間に差はみれなかった。一方、腹部脂肪重量は全ての療法群において有意な減少が観察されたが、内臓脂

肪および皮下脂肪の両者とも運動群において顕著な減少が観察された（図2）。このとき、下肢筋重量および心臓重量は全ての療法群においてCON群と比較して有意な減少が観察されたが、運動療法群の減少は食事療法群と比較して緩徐なものであった（図1）。我々は先行研究¹⁹⁾において、本研究と同じOLETFラットを用いて22週齢から10週間の食事療法と運動療法を実施した結果、本研究とほぼ同様の体組成変化が観察され、同一体重減少時には運動療法群と比較して食事療法群で腹部脂肪重量が高値となる傾向が示された。これらの結果は、他の先行研究¹²⁾の結果とも一致しており、本研究における運動療法群では、顕著な体重減少に伴う筋量の減少が観察されたものの、運動トレーニングによる筋量の維持効果によって、全体重中に占める筋量の割合が増加し、結果として脂肪量が顕著に減少したと考えられた。

また、体重減少速度との関係では、1週間の摂餌制限による急速な体重減少では、体脂肪量の減少は緩徐であり、皮下脂肪重量においてはCON群との間に差は認められなかった（図2）。この理由は定かでないが、FR-1w群では肝臓の摘出重量が顕著に低値であったことから（データ未公開）、過度な食事制限による急速な体重減少時には、必要なエネルギー源を脂肪組織以外にも、一時的に肝臓などから多量に供給している可能性が示唆された。

一方、摂食行動の重要な調節因子であるレプチンは、食事療法および運動療法によって顕著に低下し、全ての療法群においてCON群との間に有意差がみられた（図3）。また、脂肪組織におけるレプチンの分泌機能を評価する目的で、血中レプチン濃度を腹部総脂肪重量で除した比を各療法間で比較したところ、食事療法群では療法期間の短縮に伴ってレプチンの分泌機能が抑制される傾向が観察された。一方、運動療法群では食事療法群と比較して比は高値となる傾向が観察され、

FR-1wとEX-4wの間に有意差が認められた。Biら⁵⁾は、Sprague-Dawleyラットを用いて2日間の絶食と14日間の摂餌制限を実施し、*ad lib*摂餌対照群と比較したところ、それぞれ82.1%および72.7%の体重減少に達したが、血漿レプチン濃度は体重減少がより僅少であった絶食群でより低値となり、本研究と同様に過度な摂餌制限による急速な体重減少時には、脂肪細胞からのレプチンの分泌機能が著明に抑制される可能性が示唆された。これらのことから、比較的急速な体重減少時には体脂肪量の減少を阻止するための反応として、脂肪細胞のレプチン分泌機能が抑制され、過度な摂食行動を惹起させる可能性が示唆された。

次に、摂食調節中枢として重要な役割を担っている視床下部弓状核におけるNPYの遺伝子発現量について検討を行ったところ、食事療法時に高値となり、運動療法時には低値となる傾向が観察された(図4)。NPYは視床下部弓状核に細胞体を持つNPY産生・分泌ニューロンで産生され、室傍核や外側野に投射して、摂食亢進を惹起する¹⁵⁾。OLETFラットでは、非過食性対照モデルのLETOラットと比較して視床下部弓状核でのNPYの遺伝子発現は低値であり、食事療法による体重減少によって高値となることが報告されている^{3, 4, 5)}。これらの報告は、本研究の食事療法時の結果と一致する内容であり、食事療法群では過度の摂食行動が惹起される可能性が示唆された。さらに体重減少速度に関する検討についてBiら⁵⁾は、視床下部弓状核のNPY遺伝子発現量は2日間の絶食および14日間の摂餌制限の両者とも*ad lib*摂餌対照群と比較して有意に増加したが、その程度は前者の方がより高値となったことから、急激な体重減少時にはより強い摂食行動が惹起される可能性について言及している。本研究の結果では、摂餌制限の程度に応じたNPY発現の変化は観察されなかったことから、今後、使用動物種や週齢などについて更なる検討の必要性が感じられた。

一方、運動療法群のNPY遺伝子発現量は、2週間および4週間の両療法期間とも食事療法群と比較して有意な低値となった。運動療法群の摂餌量はCON群と比較して有意に低値であったが、EX-4wのNPY遺伝子発現量はEX-2wと比較して低値であったにもかかわらず摂餌量はEX-2wよりもEX-4wで高値であり、一致した見解を得ることはできなかった。Lewisら¹⁰⁾は、非肥満ラットを対象に本研究と同様の自発走運動による運動療法を実施し、同一体重となるように摂餌制限を行った食事療法群と比較したところ、視床下部弓状核領域のNPY遺伝子発現量は両者とも有意に増加したと報告している。これらの結果は、本研究の結果と異なるものであったが、Shinら¹⁸⁾はSprague-Dawleyラットにストレプトゾトシンを投与して1型糖尿病モデルを作成したところ、視床下部弓状核におけるNPYの免疫反応が増加したと伴に過食行動が観察されたが、これらのラットに対してトレッドミルによる強制運動を実施したところ、NPY免疫反応の有意な低下が観察されたと報告している。Shinら¹⁸⁾の報告は、本研究の結果を支持するものであったが、動物種や肥満の程度などについて更なる検討の必要性が感じられた。

4. まとめ

本研究の結果から、過度な摂餌制限による短期間の食事療法では、長期間の運動療法に比較してレプチン分泌機能の低下や視床下部弓状核における摂食亢進物質であるNPY発現量の増加が示唆されたことから、体重減少を目的とした介入においては、食事療法よりも運動療法が有効である可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の遂行に多大なるご協力を頂きました篠崎智一氏に深謝いたします。

また、本研究にご協力頂きました立石直人氏、依田絵美氏をはじめ、共立薬科大学薬物治療学講座の諸氏に感謝いたします。更に、本研究に対して助成を賜りました（財）石本記念デサントスポーツ科学振興財団に御礼申し上げます。

文 献

- 1) Ahima R.S., Prabakaran D., Mantzoros C., Qu D., Lowell B., Maratos-Flier E., Flier J.S., Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*. 382, 250-252 (1996)
- 2) Allison D.B., Fontaine K.R., Manson J.E., Stevens J., VanItallie T.B., Annual deaths attributable to obesity in the United States. *JAMA*. 282, 1530-1538 (1999)
- 3) Bi S., Ladenheim E.E., Schwartz G.J., Moran T.H., A role for NPY overexpression in the dorsomedial hypothalamus in the hyperphagia and obesity of OLETF rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 281, R254-R260 (2001)
- 4) Bi S., Moran T.H., Response to acute food deprivation in OLETF rats lacking CCK-A receptors. *Physiol. Behav.* 79, 655-661 (2003)
- 5) Bi S., Robinson B.M., Moran T.H., Acute food deprivation and chronic food restriction differentially affect hypothalamic NPY mRNA expression. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285, R1030-R1036 (2003)
- 6) Calle E.E., Thun M.J., Petrelli J.M., Rodriguez C., Heath C.W. Jr., Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults. *N. Engl. J. Med.* 341, 1097-105 (1999)
- 7) Chomczynski P., Sacchi N., Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162, 156-159 (1987)
- 8) Haffner S.M., Lehto S., Ronnema T., Pyorala K., Laakso M., Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 339, 229-234 (1998)
- 9) Kimura M., Tateishi N., Shiota T., Yoshie F., Yamauchi H., Suzuki M., Shibasaki T., Long-term exercise down-regulates leptin receptor mRNA in the arcuate nucleus. *Neuroreport*. 15, 713-716 (2004)
- 10) Lewis D.E., Shellard L., Koeslag D.G., Boer D.E., McCarthy H.D., McKibbin P.E., Russell J.C., Williams G., Intense exercise and food restriction cause similar hypothalamic neuropeptide Y increases in rats. *Am. J. Physiol.* 264, E279-E284 (1993)
- 11) Moran T.H., Katz L.F., Plata-Salaman C.R., Schwartz G.J., Disorderd food intake and obesity in rats lacking cholecystokinin A (CCK A) receptors. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 274, R618-625 (1998)
- 12) Oscai L.B., Spirakis C.N., Wolff C.A., Beck R.J., Effects of exercise and of food restriction on adipose tissue cellularity. *J. Lipid. Reseach.* 13, 588-592 (1972)
- 13) Paxinos G., Watson C., The rat brain in stereotaxic coordinates. 2nd edition, *Academic Press*, Sydney (1986.)
- 14) 齋藤 康. 薬で肥満症を治す. 日経サイエンス. 11, 40-45 (2002)
- 15) Schwartz M.W., Woods S.C., Porte D. Jr., Seeley R.J., Baskin D.G., Central nervous system control of food intake. *Nature*. 404, 661-671 (2000)
- 16) 嶋田充志, 中里雅光. 中枢作用性抗肥満薬. 内科. 92, 322-326 (2003)
- 17) Shimokawa I., Fukuyama T., Yanagihara-Outa K., Tomita M., Komatsu T., Higami Y., Tuchiya T., Chiba T., Yamaza Y., Effects of caloric restriction on gene expression in the arcuate nucleus. *Neurobiol. Aging*. 24, 117-123 (2003)
- 18) Shin M.S., Kim H., Chang H.K., Lee T.H., Jang M.H., Shin M.C., Lim B.V., Lee H.H., Kim Y.P., Yoon J.H., Jeong I.G., Kim C.J., Treadmill exercise suppresses diabetes-induced increment of neuropeptide Y expression in the hypothalamus of rats. *Neurosci. Lett.* 346, 157-160 (2003)
- 19) 鈴木政登, 穂積典子, 木村真規, 中家優幸, 清水桃子, 高尾匡, 真柄直郎, 森 豊, 町田勝彦. 腎の機能的・組織形態学的所見および糖・脂質代謝におよぼす運動と食事療法の比較—ヒト2型糖尿病モデル OLETF ラットを用いた研究—. 体力科学. 49, 403-418 (2000)