

＝原著論文＝

## ラット褐色脂肪組織に対する後肢ギプス固定の影響

辻本 尚 弥<sup>1)</sup> 鈴木 英 樹<sup>2)</sup>

### Effects of Cast Immobilization on Brown Adipose Tissues in Rats.

Hisaya TSUJIMOTO<sup>1)</sup> and Hideki SUZUKI<sup>2)</sup>

#### Abstract

We studied the effects of hind limb cast immobilization on brown adipose tissues in 14 male mature Sprague-Dawley rats (8-weeks-old). The animals were divided into the following two groups: sedentary control (S; n = 7) and cast-immobilized (CAS; n = 7) groups. Animals in the CAS group were immobilized at the knee and foot joints for 10 days. Interscapular brown adipose tissue (IBAT) was isolated after 10 days of immobilization and weighed. In addition, IBAT lipid and protein content were measured.

IBAT weight and relative IBAT weight in the CAS group were not significantly different from those in the S group. No statistical differences were found between the two groups for protein concentration or protein content of IBAT. However, significant correlations were observed among IBAT weight, protein concentration (negative,  $r = -0.702$ ) and protein content (positive,  $r = 0.863$ ). IBAT lipid concentration did not differ significantly between the two groups. However, IBAT lipid content was significantly lower in the CAS group than in the S group. A significant positive correlation was observed between IBAT weight and the lipid content ( $r = 0.904$ ).

These results indicate that the amount of lipid decreased in IBAT independent of protein content during cast immobilization.

**Key words** : Sprague-Dawley rat, Interscapular brown adipose tissue, Lipid content, Protein content

#### 緒 言

褐色脂肪組織 (Brown Adipose Tissue : BAT) は、非ふるえ熱産生や食餌誘発性体熱産生の主要な熱産生器官で、体内の余剰エネルギーを消費する役割を持っており、肥満を考える上で重要な器官である<sup>1)-4)</sup>。BATは多房性の脂肪小滴とミトコンドリアや鉄分に富む組織で<sup>5)</sup>、内因性や外因性の脂肪および糖を分解して熱産生を行う<sup>1)-4)</sup>。そのためBATの熱産生量の変化は、組織を構成している物質の量的変化をとまなう。BATの熱産生を亢進させるため寒冷刺激をした場合、BATの中性脂肪含量の低下やグルコースおよび脂肪酸の取り込み増加が報告され

ている<sup>6)7)8)</sup>。

これまで我々は、肩甲骨間BAT (Interscapular BAT ; IBAT) に対する後肢ギプス固定による影響を報告してきた<sup>9)-11)</sup>。その結果、IBATの組織重量は対照群に比べて低値を示した。これは後肢ギプス固定により引き起こされた不活動やストレス状態が、IBATの熱産生あるいは代謝に影響したことにより、組織を構成している物質量が変化したためと考えられる。しかし、先の研究ではIBAT構成物質の量的変化については検討していない。

そこで本研究では、ラットのIBATを用いて、構成物質であるタンパク質と脂質の量に着目し、それに対する後肢ギプス固定の影響について明らかにす

1) 久留米大学 健康・スポーツ科学センター  
2) 愛知教育大学 保健体育講座

ることを目的とした。

## 方 法

実験動物には、生後8週齢のSprague-Dawley系雄性ラットを用いた(日本SLC)。実験群として対照群(Sedentary control; S群, n=7)とギプス固定群(Cast-immobilization; CAS群, n=7)の2群を設けた。ラットはステンレス製ワイヤーケージにて、昼夜逆転した12時間の明暗サイクルで室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 5\%$ の環境下で飼育した。飲水は自由摂取とした。摂餌についてはCAS群を持続的な自由給餌とし、S群はpair-feedingとした(餌, CE-2:日本クレア)。CAS群には8週齢時に麻酔下にて、後肢を弛緩させた状態で、膝関節および足関節を包帯式ギプス(スコッチキャスト; 住友スリーエム社)で10日間固定した<sup>12)</sup>。固定終了後、ラットを麻酔下にて頸動脈より放血し屠殺した。その後、IBATを摘出し重量を測定した後、液体窒素により冷却したインペタン中でただちに凍結し、生化学的分析を行うまで $-60^\circ\text{C}$ の冷凍庫で保存した。生化学分析では、まずIBATを二分し一方をタンパク定量に、他方を脂質定量に用いた。タンパク定量には市販のタンパク抽出試薬(PRO-PREP; コスモバイオ)を用いてホモジナイズした後、タンパク定量キット(プロテインアッセイ; バイオ・ラッド)を用いて、Bradford法によりタンパク質の濃度を測定した。タンパク質の濃度測定後、IBATの重量を乗じてタンパク含量を求めた。IBAT中の脂質含量指標として、本実験ではIBAT中トリグリセライド量を定量した。まずFolchらの方法<sup>13)</sup>によりIBATより脂質を抽出した後、測定キット(トリグリセライド E テストワコー; 和光純薬)を用いて定量した。IBAT

中の脂質含量もタンパク質と同様に脂質濃度を測定した後、IBAT重量を乗じて求めた。なお飼育および屠殺でのラットの取り扱いについては、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」に沿って行った<sup>14)15)</sup>。ギプス固定群では、後肢固定部に異常な浮腫や壊死が観察されたものは、事前にサンプルより除外した。

各測定値は群ごとに平均値及び標準偏差を求め統計学的な検定を行った。体重では1要因に対応がある2要因の分散分析を用いた。IBATの組織重量、タンパク及び脂質それぞれの濃度と含量では、各群の比較に、分散の検定にはF検定法を用い、分散が等質であった場合はt検定法を、分散が等質でなかった場合はAspin-Welch法を用いた。またIBATの組織重量とタンパク質および脂質それぞれの濃度と含量について相関係数(r)を求めて有意性の検定をした。全ての検定において有意水準は $5\%$ ( $p < 0.05$ )とした<sup>16)</sup>。

## 結 果

表1には飼育開始時の初期体重と最終体重、IBAT重量および相対的IBAT重量を平均値と標準偏差により示した。ギプス固定開始時より体重は、S群では有意に増加したのに対し、CAS群では有意に減少し、そのためギプス固定期間終了後の最終体重で両群間に有意な差が認められた。IBAT重量および相対的IBAT重量では、CAS群がS群に比べ低値を示す傾向にあるものの、両群間で有意な差は認められなかった。

次に、IBATのタンパク濃度及びタンパク含量を平均値と標準偏差により図1に示した。IBATタンパク濃度は、CAS群がS群に比べ高値を示す傾向に

Table 1. Body weight, and brown adipose tissue weight of rat in each groups.

	Sedentary (n=7)	Cast-immobilization (n=7)
Initial body weight (g)	254 ± 6	254 ± 9
Final body weight (g)	265 ± 8 †	237 ± 20 * †
IBAT weight (mg)	147 ± 28	120 ± 24
Relative IBAT weight (mg/g BW)	0.55 ± 0.09	0.52 ± 0.13

Values are expressed as mean ± SD

IBAT; Interscapular brown adipose tissue BW; Body weight

\* : Significant difference from the value in sedentary group ( $p < 0.05$ )

† : Significant difference from the value in initial body weight ( $p < 0.05$ )

あったが有意な差は認められなかった。IBAT タンパク含量においては、CAS 群が S 群に比べ低値を示す傾向が見られたが、タンパク濃度と同様に有意な差は認められなかった。一方、IBAT 組織重量とタンパク質の濃度および含量との相関関係については、タンパク質濃度において有意な負の相関 ( $r = -0.702$ ) が、タンパク質含量においては有意な正の相関 ( $r = 0.863$ ) が認められた。

図 2 には IBAT の脂質濃度及び脂質含量を平均値と標準偏差により示した。IBAT 脂質濃度は、両群間で有意な差は認められなかった。一方、IBAT 脂質含量は、CAS 群が S 群に比べ有意に低値を示した。IBAT 組織重量と脂質の濃度および含量との相関関係については、脂質濃度において相関 ( $r = -0.027$ ) は認められなかった。一方、IBAT 組織重量と脂質含量においては、有意な正の相関 ( $r = 0.904$ ) が認められた。

## 考 察

本研究では、IBAT を構成するタンパク質と脂質の濃度及び含量に対する後肢ギプス固定による影響について検討し、以下の主な結果を得た。タンパク質の濃度と含量に有意な差は認められなかったが、組織重量との関係では、タンパク濃度とは正の、タンパク含量とは負の有意な相関が認められた。脂質では、含量において、CAS 群で有意に低値を示し、組織重量との間に有意な正の相関が認められた。これらのことは、IBAT では後肢ギプス固定により、内在するタンパク量に変化が見られなかったものの、脂質含量が減少したことを示している。

これまで我々は、本研究と同様な 10 日間の後肢ギプス固定により IBAT 組織重量が低値を示す、あるいはその傾向にあることを報告してきた<sup>9)-11)</sup>。本研究の結果から、この一因は IBAT の脂質含量の減少であることが示された。BAT はその内部に多数の脂

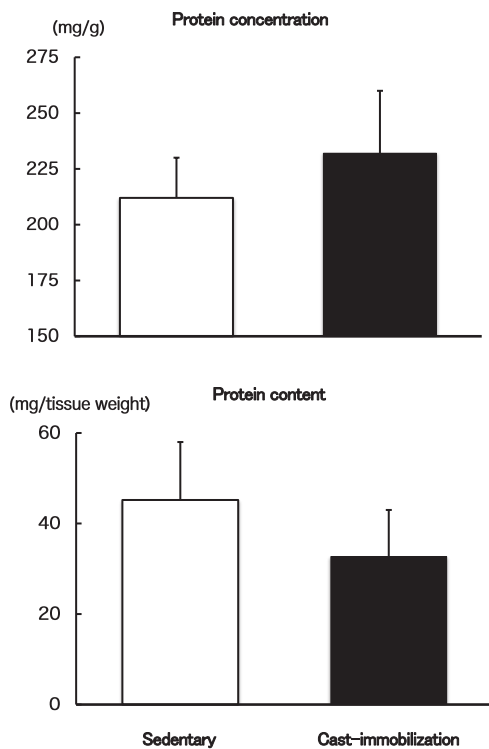


Fig. 1. Protein concentration and content of IBAT in each group.

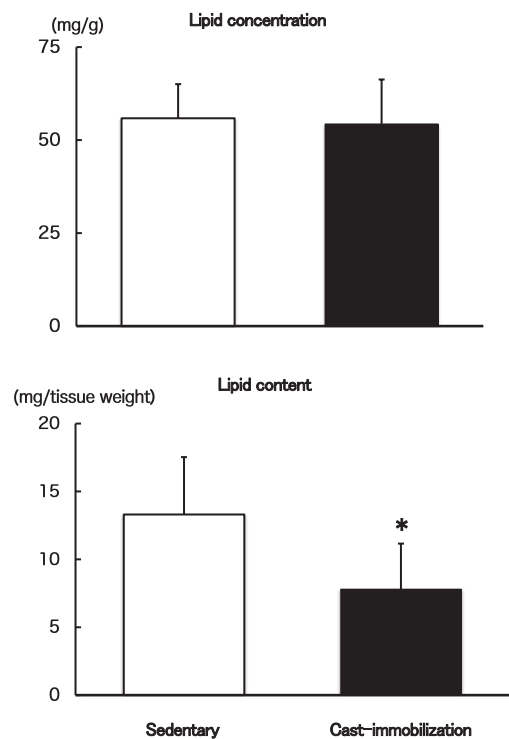


Fig. 2. Lipid concentration and content of IBAT in each group.

\* : Significant difference from the value in sedentary group ( $p < 0.05$ )

肪小滴やグリコーゲンを含み<sup>5)</sup>、外因性のグルコースおよび脂質とともに、食事誘発性や非ふるえによる体熱の産生時にエネルギー源となる<sup>1) - 8)17)</sup>。Senault ら<sup>7)</sup> および Porter ら<sup>8)</sup> は、非ふるえによる IBAT の熱産生が高まるようにラットを寒冷に暴露した場合、IBAT の脂質含量は低値を示したと報告している。これらのことから、BAT は熱産生が亢進する状況下では、エネルギー源のひとつとして内因性の脂質を用いて熱産生を行い、その結果として BAT の脂質含量が減少すると考えられる。本研究で IBAT の脂質含量が低値を示したことから、後肢ギプス固定時には、一時的あるいは慢性的であるか不明ではあるが、IBAT による体熱の産生が高まっていたと推察される。

後肢ギプス固定により IBAT の熱産生が引き起こされる要因の一つとしては、固定およびそれに伴う不活動等のストレスが考えられる。ラットを用いた不活動の実験において、副腎重量の増加が報告されており<sup>18)</sup>。我々も先の研究で副腎重量の増加を報告している<sup>11)</sup>。副腎重量は、ストレスにより増加する事が知られている<sup>19)20)</sup> ことから、後肢ギプス固定による不活動は、ラットをストレス状態にしていると考えられる。これまで身体拘束などの方法によりラットをストレス状態に曝した場合、BAT の熱産生が上昇することが報告されている<sup>17)21)22)</sup>。Nozu ら<sup>22)</sup> は、ラットに拘束ストレスを負荷した場合、BAT の酸素消費量が増加し、さらにノルアドレナリンやグルカゴン刺激による BAT の熱産生が上昇していたことを報告している。このストレスによる熱産生の上昇には、BAT を支配する交感神経が関与していると報告されている<sup>1) - 5)17)23)</sup>。交感神経に対する刺激は、熱産生の亢進を引き起こすだけでなく、BAT 内の脂質分解と合成に対しても影響をする<sup>23)</sup>。これらのことから、本研究の結果は、後肢ギプス固定あるいはそれによる不活動のストレスにより、BAT を支配する交感神経活性が亢進し、脂質分解が促進され、それをエネルギー源とした熱産生の上昇が生じていた可能性が考えられる。

さらに BAT の熱産生が引き起こされる他の要因としては、ラットの活動期における相対的な体温低下が考えられる。ラットの体温は、活動期には高値を、休息期には低値の日内リズムを示す<sup>24)25)26)</sup>。ラットの活動期における体温上昇の一因としては、活動量増加の寄与が考えられる。また、ラットを含む小齧歯動物は、体重当たりの体表面積が大きく、体温

は外気温に影響を受ける。そのため、外気温を一定にした飼育条件であっても、活動量が減少し体温上昇が少ないと、活動期には相対的な体温低下を引き起こす。ラットの後肢ギプス固定モデルは、不活動あるいは不使用による骨格筋の萎縮を引き起こす動物モデルとして開発され<sup>27)</sup>、探索や摂餌、給水などの活動を、固定前に比べて制限してしまう。本研究で用いた後肢ギプス固定は、活動期の相対的な体温低下を誘発し、IBAT の熱産生を引き起こした可能性が考えられた。本研究では、IBAT の熱産生量を直接的あるいは間接的な方法で測定していない。またラット体温の経時変化についても計測していない。そのため、IBAT において、いつどの程度の熱産生が起こり、体温の変化がみられたかについては、今後さらに詳細に検討する必要があると考えられる。

#### 引用文献

- 1) Cinti S. Between brown and white: novel aspects of adipocyte differentiation. *Ann Med.* 2011; 43 (2): 104-15.
- 2) McCance RA, Widdowson EM. *Fat. Pediatr Res.* 1977; 11 (10 Pt 2): 1081-3.
- 3) Himms-Hagen J. Regulation of metabolic processes in brown adipose tissue in relation to non-shivering thermogenesis. *Adv Enzyme Regul.* 1970; 8: 131-51.
- 4) Himms-Hagen J. Brown adipose tissue metabolism and thermogenesis. *Annu Rev Nutr.* 1985; 5: 69-94.
- 5) Enerbäck S (2009). The origins of brown adipose tissue. *N Engl J Med* 360 (19): 2021-2023.
- 6) Ouellet V, Labbé SM, Blondin DP, Phoenix S, Guérin B, Haman F, Turcotte EE, Richard D, Carpentier AC. Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *J Clin Invest.* 2012; 122 (2): 545-52.
- 7) Senault C, Hlusko MT, Portet R. Effects of diet and cold acclimation on lipid composition of rat interscapular brown adipose tissue. *Ann Nutr Aliment.* 1975; 29 (2): 67-77.
- 8) Portet R, Beauvallet M, Solier M. Variations of rat brown adipose tissue composition during cold acclimatization. *Arch Int Physiol Biochim.* 1976;

- 84 (1): 89-98.
- 9) 辻本尚弥, 佐藤章悟, 鈴木英樹, 立屋敷かおる, 白土 健, 今泉和彦. ギプス固定によるラット褐色・白色脂肪組織における $\beta$ -アドレナリン受容体, グルココルチコイド受容体, 脱共役タンパク質発現の応答. 体力科学 2011; 60 (6): 104.
- 10) Sato S, Tsujimoto H, Suzuki H, Tachiyashiki K, Shirato K, Imaizumi K. Effects of casted-immobilization on the expressions of  $\beta$ -adrenergic receptors, glucocorticoid receptor and uncoupling proteins in brown and white adipose tissues of rats. The 7th Congress of Federation of Asia and Oceania Physiological Societies abstract. 2011; P31: 275.
- 11) 辻本尚弥, 鈴木英樹. ラットの臓器及び脂肪組織重量に対するギプス固定による不活動の影響. 久留米大学健康・スポーツ科学センター研究紀要 2011; 19 (1): 15-21.
- 12) 鈴木英樹, 辻本尚弥. ラットの後肢骨格筋における固定とサスペンションの影響. 愛知教育大学研究報告 芸術・保健体育・家政・技術科学・創作編 2010; 59: 43-6.
- 13) Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem. 1957; 226 (1): 497-509.
- 14) 総理府内閣総理大臣官房管理室. 実験動物飼育保管研究実験動物飼育及び保管等に関する基準の解説. 1版. 東京: ぎょうせい, 1980.
- 15) 前島一淑, 江崎考三郎, 篠田元扶, 山内忠平, 光岡知足, 菅野茂, 辻 茂, 土井邦雄. 新実験動物学. 1版. 東京: 朝倉書店, 1988.
- 16) 森敏昭, 吉田寿夫. 心理学のためのデータ解析テクニカルブック, 1版, 京都: 北大路書房, 1990.
- 17) Kuroshima A. Brown adipose tissue thermogenesis as physiological strategy for adaptation. Jpn J Physiol. 1993; 43 (2): 117-39.
- 18) Shirato K, Motohashi N, Tanihata J, Tachiyashiki K, Tomoda A, Imaizumi K. Effects of two types of inactivity on the number of white blood cells in rats. Eur J Appl Physiol. 2006; 98 (6): 590-600.
- 19) Yokogoshi H, Takase S, Goda T, Hoshi T. Effects of suspension hypokinesia/hypodynamia on the body weight and nitrogen balance in rats fed with various protein concentrations. Agric. Biol. chem. 1990; 54: 779-89.
- 20) Hayase K, Yokogoshi H. Effect of suspension hypokinesia/hypodynamia on tissue protein turnover in rats. Jpn J Physiol. 1991; 41 (3): 473-82.
- 21) Murazumi K, Yahata T, Kuroshima A. Effects of cold and immobilization stress on noradrenaline turnover in brown adipose tissue of rat. Jpn J Physiol. 1987; 37 (4): 601-7.
- 22) Nozu T, Okano S, Kikuchi K, Yahata T, Kuroshima A. Effect of immobilization stress on in vitro and in vivo thermogenesis of brown adipose tissue. Jpn J Physiol. 1992; 42 (2): 299-308.
- 23) Minokoshi Y, Saito M, Shimazu T. Sympathetic denervation impairs responses of brown adipose tissue to VMH stimulation. Am J Physiol. 1986; 251 (5 Pt. 2): R1005-8.
- 24) Fioretti MC, Riccardi C, Menconi E, Martini L. Control of the circadian rhythm of the body temperature in the rat. Life Sci. 1974; 14 (11): 2111-9.
- 25) Benstaali C, Mailloux A, Bogdan A, Auzéby A, Touitou Y. Circadian rhythms of body temperature and motor activity in rodents their relationships with the light-dark cycle. Life Sci. 2001 4; 68 (24): 2645-56.
- 26) Mailloux A, Benstaali C, Bogdan A, Auzéby A, Touitou Y. Body temperature and locomotor activity as marker rhythms of aging of the circadian system in rodents. Exp Gerontol. 1999; 34 (6): 733-40.
- 27) Booth FW, Kelso JR. Production of rat muscle atrophy by cast fixation. J Appl Physiol. 1973; 34 (3): 404-6.

