
＝原著論文＝

ラットの臓器及び脂肪組織に対する 後肢ギプス固定除去の影響

辻本 尚 弥¹⁾ 鈴木 英 樹²⁾

Effects of Recovery after Casted-immobilization and Removal on Visceral Organs and Adipose Tissue in the Rat.

Hisaya TSUJIMOTO¹⁾ Hideki SUZUKI²⁾

Abstract

We studied the effects of cast immobilization on the weight of visceral organs and adipose tissue in mature male Sprague-Dawley rats (8 weeks old). The animals were divided into four groups: 10 weeks sedentary control (10S; n = 7), 10 days cast-immobilized (CAS; n = 7), 10 weeks sedentary control + 1 week sedentary recovery corresponding to the recovery period of the casted groups (11S; n = 4), and 1 week recovery after cast removal (RCAS; n = 6). In the CAS and RCAS groups, the cast immobilized the knee and foot joints. For the RCAS group, the casts were removed after 10 days, and the animals were allowed to move freely during 7 days. Groups 10S and CAS were introduced in this study after 10 days of cast immobilization. Groups 11S and RCAS were introduced in this study after 7 days after cast removal. The visceral organs (heart, liver, spleen, adrenal gland, and kidney) and adipose tissue [intracapsular brown adipose tissue (IBAT) as well as perirenal, epididymal and subcutaneous tissues of the groin] were isolated and weighed. The lipid and protein contents of IBAT were also measured.

At the end of the treatment periods, heart weight was significantly lower in the RCAS group than in the CAS group. There was no statistical difference between the groups for the weights of the other visceral organs and IBAT. The mean and relative weights of epididymal white adipose tissue were significantly higher in the 11S group than in the CAS group. The IBAT composition was not significantly different between the groups.

Collectively, these data indicate that the effects of cast immobilization and removal differ between visceral organs or adipose tissues.

Key words : Sprague-Dawley rat, Interscapular brown adipose tissue Visceral tissue weight, Adipose tissue weight,

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

結 言

実験動物を用いた後肢ギプス固定は、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¹⁾²⁾これまで多くの研究で用いられてきた¹⁾⁹⁾。ギプスによる後肢の固定は、活動量低下と活動制限によるストレス状態を引き起こし、生体内のホルモン分泌や交感神経活性、エネルギー需要に影響する¹⁰⁾¹³⁾。我々はこれまで、後肢ギプス固定により、臓器重量および脂肪組織重量、脂肪分解や熱産生に関与した受容体に、どのような影響がみられるかについて検討してきた¹⁴⁾¹⁷⁾。その結果、肝臓や肩甲骨間褐色脂肪組織(Interscapular brown adipose tissue ; IBAT)重量の変化や、脂肪組織RNA総量、脂肪分解及び熱産生に関与したタンパク質のmRNA発現量の変化を観察した¹⁴⁾¹⁷⁾。これらのことは、骨格筋のみならず他の臓器組織、特に熱産生器官のひとつであるIBATに対して後肢ギプス固定が影響することを示している。

骨格筋では後肢ギプス固定により、筋量や筋細胞サイズ、筋線維タイプなどの変化が短期間で引き起こされ¹⁾⁹⁾、後肢ギプス固定し通常飼育に戻した場合、ギプス固定以前の状態に回復することが報告されている¹⁸⁾¹⁹⁾。しかしギプス固定の影響をうけるIBATや臓器・組織において、ギプス固定を除去し通常飼育に戻した場合に、どのような影響を受けるのかについては不明な部分がある。

本研究では、実験動物のラットを用いて、後肢ギプス固定とその除去による臓器および脂肪組織、IBATの脂肪量・タンパク量に対する影響について明らかにする事を目的とした。

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、ギプス固定群(Cast-immobilization ; CAS群, n=6)、ギプス群に対する対照群(10weeks Sedentary control group to cast-immobilization; 10S群, n=5)、ギプス固定除去後の回復群(Recovery after Cast-immobilization off ; RCAS群, n=6)、ギプス固定除去後の回復群に対する対照群(11weeks Sedentary control group to Recovery after Cast-immobilization off; 11S群, n=4)の4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およびRCAS群を自由給餌とし、Sおよび11S群はそれぞれの群に対するpair-feedingとした(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²⁰⁾。RCAS群は10日間の固定終了後ギプスを除去し、通常飼育に戻した。10S群およびCAS群は固定終了後、11S群およびRCAS群はギプス固定を除去した7日後、ラットを麻酔下にて頸動脈より放血し屠殺した。その後、心臓、肝臓、腎臓、副腎および脾臓を摘出し重量を測定した。また脂肪組織としてIBAT、副辜丸脂肪、腎周囲脂肪と単径部皮下脂肪を摘出し重量を測定した。単径部の皮下脂肪はラット前肢の腋窩までを摘出した。IBATは摘出後に重量を測定し、液体窒素により冷却したイソペンタン中でただちに凍結し、生化学的分析を行うまで -60°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用に、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質抽出試薬(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法によりタンパク濃度を測定した。タンパク濃度測定後、IBAT重量を乗じてタンパク含量を求めた。IBAT中の脂質量指標として、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²¹⁾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重量を乗じて脂質量を求めた。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²²⁾²³⁾。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。体重では一要因に対応がある二要因の分散分析を用いた。組織重量及び相対的組織重量、IBAT重量、IBATタンパク量、IBAT脂質量では、一要因の分散分析をし、その後それぞれの群を比較した。全ての検定は、統計解析ソフトRを用い、有意水準は5% ($p < 0.05$) とした²⁴⁾²⁵⁾²⁶⁾。

Table 1. Body weight and tissue weights of rat in each group.

	10S (n=5)	CAS (n=6)	11S (n=4)	RCAS (n=6)
Body weight (initial)	256±9	254±7	254±7	251±7
(final)	261±10	244±33	274±13	267±23
Heart (mg)	734±34	707±79	761±27	722±73
Liver (mg)	9270±2561	8833±1140	9002±354	9796±1057
Spleen (mg)	506±44	532±94	498±74	523±45
Adrenal gland (mg)	25±2	23±2	26±4	24±3
Kidney (mg)	1039±145	990±103	993±28	959±50

Values are expressed as mean ± SD

10S ; sedentary control group to cast-immobilization , CAS ; cast-immobilization

11S ; sedentary control group to recovery after cast-immobilization off

RCAS ; recovery after cast-immobilization off

Table 2. Relative weight of heart, liver, spleen, adrenal gland and kidney in rat.

	10S (n=5)	CAS (n=6)	11S (n=4)	RCAS (n=6)
Heart (mg/g BW)	2.8±0.1	2.9±0.1	2.8±0.03	2.7±0.1 *
Liver (mg/g BW)	35.3±8.5	36.7±6.3	32.9±1.3	36.6±1.2
Spleen(mg/g BW)	1.9±0.2	2.2±0.3	1.8±0.2	2.0±0.2
Adrenal gland (mg/g BW)	0.10±0.01	0.10±0.02	0.09±0.01	0.09±0.02
Kidney(mg/g BW)	4.0±0.4	4.1±0.3	3.6±0.2	3.6±0.2

BW ; Body weight

* : Significant difference from the value in cast-immobilization group (p<0.05)

Other legends as same as table1.

結 果

表1にはギブス固定開始時と最終の体重および心臓、肝臓、脾臓、副腎、腎臓の各組織重量を平均値と標準偏差により示した。最終体重は、有意ではないもののCAS群では固定開始時の体重より減少し、10S群に比べ低値を示す傾向にあった。CSA-R群の体重は、CAS群とは異なり固定開始時の体重より高値を示し、10S群や11S群と同程度であった。各内臓組織の重量は、各群間で有意な差は認められなかった。心臓、肝臓、脾臓、副腎および腎臓の相対的組織重量を平均値と標準偏差により表2に示した。相対的組織重量は心臓でRCAS群がCAS群に比べて有意に低値を示した。心臓以外の他の内臓組織の相対的重量は、各群

間においてそれぞれ有意な差は認められなかった。表3にはIBAT、腎周囲、副睾丸、単径部皮下の各脂肪組織重量を平均値と標準偏差により示した。IBATの重量はCAS群で10S群に比べ低値を示す傾向はあるものの有意な差は認められなかった。またRCAS群では有意ではないもののCAS群より高値を示す傾向が、また11S群との比較では低値を示す傾向にあった。副睾丸脂肪組織の重量は、11S群がCAS群に比べて有意に高値を示した。しかし、腎周囲と単径部皮下の脂肪組織は、各群間で有意な差は認められなかった。IBAT、腎周囲、副睾丸の各脂肪組織と単径部皮下脂肪組織の相対的重量を平均値と標準偏差により表4に示した。相対的重量でも、IBATでは組織重示す傾向が、RCAS群で11S群に比べ低値を示す傾向にあったが有意では

Table 3. Brown and white adipose tissue weight in rat.

	10S (n=5)	CAS (n=6)	11S (n=4)	RCAS (n=6)
IBAT (mg)	215±88	141±47	219±44	157±27
Perirenal (mg)	905±324	826±232	1107±233	790±235
Epididymal (mg)	2242±343	1635±518	2664±524*	1861±370
Subcutaneous of groin (mg)	1226±283	992±191	1271±131	968±168

IBAT : interscapula brown adipose tissue

* : Significant difference from the value in cast-immobilization group (p<0.05)

Other legends as same as table1.

Table 4. Brown and white adipose tissue relative weight in rat.

	10S (n=5)	CAS (n=6)	11S (n=4)	RCAS (n=6)
IBAT (mg/g BW)	0.83±0.35	0.58±0.16	0.71±0.17	0.59±0.07
Perirenal (mg/g BW)	3.5±1.2	3.4±0.8	4.0±0.7	2.9±0.7
Epididymal (mg/g BW)	8.6±1.2	6.7±1.8	9.7±1.8 *	7.0±1.1
Subcutaneous of groin (mg/g BW)	4.7±1.3	4.1±0.7	4.6±0.4	3.6±0.6

BW : Body weight

IBAT : interscapula brown adipose tissue

* : Significant difference from the value in cast-immobilization group (p<0.05)

Other legends as same as table1.

Table 5. Concentration and content of protein and lipid in interscapula brown adipose tissue of rat.

	10S (n=5)	CAS (n=6)	11S (n=4)	RCAS (n=6)
Protein concentration (mg/g)	203±40	240±28	208±11	245±12
Protein content (mg/tissue)	41±13	33±10	46±10	39±7
Lipid concentration (mg/g)	54±9	49±8	56±11	49±16
Lipid content (mg/tissue)	12±5	8±3	12±4	8±2

Other legends as same as table1.

なかった。また副睾丸脂肪組織の相対的重量は組織重量と同様に11S群がCAS群に比べて有意に高値を示した。他の脂肪組織の相対的重量は、各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と脂質濃度及び脂質含量を平均値と標準偏差により表5に示した。IBATタンパク濃度は、CAS群が10S群に比べ高値を示す傾向にあったが有意な差はみられなかった。またRCAS群も11S群に

比べ高値を示す傾向にあったが有意ではなかった。IBATタンパク含量においては、CAS群が10S群に比べRCAS群が11S群に比べそれぞれ低値を示す傾向がみられたが有意な差は認められなかった。IBAT脂質濃度と脂質含量はタンパク含量と同様に、CAS群が10S群に比べて、RCAS群が11S群に比べてそれぞれ低値を示す傾向がみられたが、各群間で有意な差は認められなかった。

考 察

本研究では、臓器および脂肪組織重量とIBAT脂肪量及びタンパク量に対する後肢ギプス固定とその除去による影響について検討し、以下の主な結果を得た。ひとつは、副睾丸脂肪組織重量について後肢ギプス固定の影響がみられたことである。ふたつめは後肢ギプス固定後の除去により、相対的心重量において有意な変化が観察されたことである。

臓器重量については各条件間で有意な差が認められず、後肢ギプス固定とその除去による影響は明確ではなかった。しかし相対的心重量ではCAS群に比べRCAS群が有意に低値を示し、後肢ギプス固定後の除去による影響が観察された。これは、後肢ギプス固定除去後の体重の増加に比して、心重量の回復が遅いという、いわば適応の時間差が生じた結果であると考えられる。また、後肢ギプス固定除去により、体重あたりで示した相対的重量では差が認められなかったが、肝臓の絶対重量は高値を示す傾向にあり、このことも適応の時間差を示していると考えられる。これらのことから、後肢ギプス固定除去による臓器組織の適応の速さには、それぞれ違いがみられることが示された。

次に脂肪組織重量では、副睾丸脂肪組織に後肢ギプス固定の影響がみられた。副睾丸および皮下の両脂肪組織重量では、後肢ギプス固定により、有意ではないものの10S群に比べCAS群で低値を示す傾向がみられた。後肢ギプス固定により白色脂肪組織重量が低値を示すのは、ギプス固定による不活動と活動制限によるストレスが、脂肪組織内の代謝あるいは脂肪酸の放出能に影響するためではないかと考えている。一方、後肢ギプス固定の除去により、副睾丸および皮下の両脂肪組織重量において、有意ではないものの、RCAS群がCAS群よりも高値を示す傾向がみられた。これは、後肢ギプス固定の除去により、脂肪組織での脂肪合成と分解の速度や脂肪酸放出能が、脂肪の貯蔵量を上める方向に変化したのではないかと推察される。しかし、本研究では、脂肪組織での細胞の大きさや形態、合成能・分解能あるいは脂肪酸の放出能については測定をしていない。そのため、脂肪細胞の形態的变化や脂肪代謝に関わる酵素活性等について、ギプス固定とその除去の影響についてさらに詳細に検討する必要がある。

IBAT重量は、後肢ギプス固定により有意ではない

ものの低値を示す傾向がみられた。我々は本研究と同様に10日間の後肢ギプス固定による不活動で、対照群に比べ低値を示す傾向にあることを報告している¹⁴⁾⁻¹⁷⁾。これは、ギプス固定のストレスによりIBAT組織内の脂肪滴をエネルギー源とした熱産生が上昇した結果、組織重量が低値を示すのではないかと推察している。BATはその内部に多数の脂肪小滴やグリコーゲンを含み²⁷⁾、それらは外因性のグルコースおよび脂質とともに体熱産生時にエネルギー源となる²⁸⁾⁻³¹⁾。Senaultら³⁰⁾およびPorterら³¹⁾は、ラットを寒気に暴露し非ふるえによる熱産生を高めた場合、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の脂質含量が減少し、組織重量が低値を示すと考えられる。本研究のIBAT脂肪含量も、有意ではないもののCAS群およびRCAS群において低値を示す傾向にあり、内因性脂肪のエネルギー源としての利用されたのではないかと考えられる。IBATのタンパク量については、タンパク含量で10S群および11S群に比べて、CASおよびRCASの両群で有意ではないが低値を示す傾向にあった。一方、IBATタンパク濃度については、CASおよびRCASの両群において有意ではないが対象群に比べて高値を示す傾向にあった。このタンパク濃度の変化はIBAT脂肪量の減少が、タンパク量の減少より大きいことによる変化、いわばみかけ上の変化ではないかと推察される。一方、IBAT組織重量や脂肪量およびタンパク量に対する後肢ギプス固定の除去による影響は明確ではなかった。CASおよびRCASの両群において、IBATタンパク濃度が有意ではないが高値を示す傾向にあることから、ギプス固定期間中は熱産生能や脂肪の代謝能はある程度は維持されていると推察される。しかし、ギプス固定除去後7日間という短期間では、IBATの脂肪合成が亢進し貯蔵脂肪量が増加し組織重量が対照群と同程度となるまでには回復していないと考えられる。

本研究では7日間という短期間の回復期間では、ギプス固定からの回復が明瞭には観察されなかった。これらについて明らかにするためにも、ギプス固定期間中のIBATの熱産生量および脂肪含量と脂肪合成と分解の経時的な変化について、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) Booth FW. Time course of muscular atrophy during immobilization of hindlimbs in rats. *J Appl Physiol.* 1977; 43(4): 656-61.
- 2) Booth FW, Giannetta CL. Effect of hindlimb immobilization upon skeleton muscle calcium in rat. *Calcif Tissue Res.* 1973; 13(4): 327-30.
- 3) Booth FW, Kelso JR. Effect of hind-limb immobilization on contractile and histochemical properties of skeletal muscle. *Pflugers Arch.* 1973; 342(3): 231-8.
- 4) Järvinen M. Immobilization effect on the tensile properties of striated muscle: an experimental study in the rat. *Arch Phys Med Rehabil.* 1977; 58(3): 123-7.
- 5) Goldspink DF. The influence of immobilization and stretch on protein turnover of rat skeletal muscle. *J Physiol.* 1977; 264(1): 267-82.
- 6) Herbison GJ, Jaweed MM, Ditunno JF. Muscle fiber atrophy after cast immobilization in the rat. *Arch Phys Med Rehabil.* 1978; 59(7): 301-5.
- 7) Booth FW. Effect of limb immobilization on skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 1982; 52(5): 1113-8.
- 8) Booth FW, Gollnick PD. Effects of disuse on the structure and function of skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc.* 1983; 15(5): 415-20.
- 9) Fitts RH, Metzger JM, Riley DA, Unsworth BR. Models of disuse: a comparison of hindlimb suspension and immobilization. *J Appl Physiol.* 1986; 60(6): 1946-53.
- 10) Hnik P, Vejsada R, Goldspink DF, Kasicki S, Krekule I. Quantitative evaluation of electromyogram activity in rat extensor and flexor muscles immobilized at different lengths. *Exp Neurol.* 1985; 88(3): 515-28.
- 11) Lindboe CF, Presthus J. Effects of denervation, immobilization and cachexia on fibre size in the anterior tibial muscle of the rat. *Acta Neuropathol.* 1985; 66(1): 42-51.
- 12) Steinberg ME, Trueta J. Effects of activity on bone growth and development in the rat. *Clin Orthop Relat Res.* 1981; (156): 52-60.
- 13) Szöör A, Rapcsák M, Hollösi G. Experimental investigations on the hypokinesia of skeletal muscles with different functions, VIII. Effect of plaster-cast immobilization on the contractile properties of rat skeletal muscles with different functions. *Acta Biol Acad Sci Hung.* 1981; 32(2): 129-35.
- 14) 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: 15-21.
- 15) 辻本尚弥, 鈴木英樹. ラット褐色脂肪組織に対する後肢ギプス固定の影響. 久留米大学健康・スポーツ科学センター研究紀要 2013; 20: 13-7.
- 16) 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 β -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.
- 17) Sato S, Tsujimoto H, Suzuki H, Tachiyashiki K, Shirato K, Imaizumi K. Effects of casted-immobilization on the expressions of b-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.
- 18) Machida S, Booth FW. Regrowth of skeletal muscle atrophied from inactivity. *Med Sci Sports Exerc.* 2004; 36(1): 52-9.
- 19) Morrison PR, Montgomery JA, Wong TS, Booth FW. Cytochrome c protein-synthesis rates and mRNA contents during atrophy and recovery in skeletal muscle. *Biochem J.* 1987; 241(1): 257-63.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) Ihaka, R., and R. Gentleman. 1996. R: a language for data analysis and graphics. *J. Comp. Graph. Stat.* 1996;5:299-314. Available via <http://www.R-project.org>.
- 25) R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org> 2005.
- 26) 山次 俊介, 鈴木 宏哉, 高橋 信二, 出村 慎一. 健康・スポーツ科学のためのRによる統計解析入門 1版. 東京: 杏林書院, 2013.
- 27) Enerbäck S. The origins of brown adipose tissue. *N Engl J Med* 2009;360 (19): 2021-23.
- 28) Himms-Hagen J. Brown adipose tissue metabolism and thermogenesis. *Annu Rev Nutr.* 1985; 5:69-94.
- 29) 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.
- 30) 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.
- 31) 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.