

持久的トレーニングが正常ラットの血中アディポサイトカイン レベルに及ぼす影響

Effect of exercise training on serum adipokine levels in normal rats

中谷 昭¹⁾・森 健一²⁾・平野 直美³⁾・
椿 武⁴⁾

Akira NAKATANI, Kenichi MORI, Naomi HIRANO,
Takeshi TSUBAKI

要 旨

本研究では、持久的トレーニングが正常ラットの血中アディポサイトカインレベルに及ぼす影響について検討した。実験動物として5週齢のWistar系雄ラット14匹を用い、これらを、コントロール群（C群）とトレーニング群（T群）に分け5週間飼育した。持久的トレーニングは週5日の頻度で5週間にわたる水泳運動を負荷した。1週目は1日10～30分の水泳運動を負荷し、以後次第に運動時間を増加させ、最終的には45分の休憩をはさむ3時間の水泳運動を2セット、合計6時間行わせた。

その結果、トレーニング終了時のT群の体重、副睾丸脂肪組織重量及び腸間膜脂肪組織重量がC群と比較し有意（ $P<0.001$ ）に低い値となった。血中アディポネクチン及びTNF- α 濃度は両群間に有意な差が認められなかったが、血中レプチン濃度はC群と比較しT群で有意（ $P<0.001$ ）に低い値を示した。また血中レプチン濃度と副睾丸脂肪組織重量（ $r=0.900$ 、 $Y=1.615X-0.863$ 、 $P<0.001$ ）及び腸間膜脂肪組織重量（ $r=0.638$ 、 $Y=0.655X+0.156$ 、 $P<0.05$ ）との間には有意な相関関係が認められた

以上のことから、正常ラットにおける持久的トレーニングは、体重及び脂肪組織重量の減少と血中レプチン濃度の減少を引き起こしたが、血中アディポネクチン及びTNF- α 濃度には影響がなく、メタボリックシンドロームに対する運動の予防効果についてはさらに検討する必要があると考えられる。

キーワード：アディポサイトカイン、持久的トレーニング、ラット

1. 緒言

近年、わが国においても生活習慣の欧米化が進

み、肥満および肥満予備軍が増加している。平成27年厚生労働省が行った国民健康・栄養調査（厚

1) 本学発達教育学部ジュニアスポーツ教育学科非常勤講師

2) 武蔵大学基礎教育センター

3) 神戸女子短期大学食物栄養学科

4) 本学発達教育学部ジュニアスポーツ教育学科

生労働省、2016)によると、日本肥満学会(2011)の判定基準で肥満と判定される体格指数(BMI; Body Mass Index= 体重[kg]/身長[m]²) 25kg/m²以上の割合が男性は31.3%、女性は20.6%であることが報告されている。肥満による体脂肪量の異常な増大は高血圧症、高脂血症や耐糖能異常を引き起こし、これらの要因が重なった場合動脈硬化を発現することにより、虚血性心疾患や脳血管障害による死亡リスクを高めることから、これら一連の代謝異常をメタボリックシンドロームと呼んでいる(日本内科学会、2005)。また、厚生労働省ではメタボリックシンドロームの予防を目的に2007年に「特定健診・特定保健指導の実施に関する基準」を定め、2008年より40歳以上74歳以下の男女に対して腹囲やBMI、血圧、血中脂質及び血糖などの測定を行うことを義務化している(厚生労働省、2008)。

ところで、これまで脂肪組織の主な役割はエネルギー源である中性脂肪の貯蔵庫と考えられてきた。しかし、1994年に脂肪組織からホルモン様物質であるレプチンの分泌されることが発見されて以降(Zhangら、1994)、脂肪組織は様々な生理活性物質(アディポサイトカイン)を生産・分泌する内分泌細胞であることが明らかにされてきた(福原・下村、2005)。アディポサイトカインにはアディポネクチン、レプチン、TNF- α (Tumor Necrosis Factor-alpha)、PAI-1(Plasminogen Activator Inhibitor-1)などがあり、これらアディポサイトカインは脂肪組織の増減によって分泌量が変化することが知られている。アディポサイトカインは様々な役割をもっており、エネルギー消費亢進、摂食抑制、抗動脈硬化作用、抗糖尿病作用、血栓形成作用、インスリン抵抗性の亢進など、メタボリックシンドロームの病態形成に重要な役割を担っている(福原・下村、2005)。また、これらアディポサイトカインは皮下脂肪より内臓脂肪において多く分泌されることから(Funahashiら、1995)、食事制限や運動による内臓脂肪の減少がメタボリックシンドロームの発現の予防や改善につながるものと考えられる。

しかしこれまで、アディポサイトカインレベルについての研究は肥満者に対する研究がほとんどであり(Yu、2017)、正常者を対象とした長期にわたる持続的トレーニングが血中アディポサイトカインレベルに及ぼす影響についての研究はほとんどなされていない。そこで本研究では、長期の持続的トレーニングが正常ラットの血中アディポサイトカインレベルに及ぼす影響について検討する。

II. 方法

1. 実験動物

実験動物として、5週齢のWistar系雄ラット(日本エスエルシー株式会社)14匹を用いた。これらを、コントロール群(C群: n = 8)とトレーニング群(T群: n = 6)とに分け5週間飼育した。

実験動物の飼育は、室温22 \pm 1 $^{\circ}$ C、湿度55 \pm 5%、明期と暗期を12時間サイクルとする動物飼育室で行った。飼育期間中飼料及び水は自由摂取とした。

持続的トレーニングは骨格筋の酸化系酵素活性の増大が確認されている水泳運動(Nakataniら、1997)を用いた。具体的には、水泳運動は1週間に5日の頻度で水温35 \pm 1 $^{\circ}$ C、水深50cmに保った水槽で行わせた。1週目は1日10~30分の水泳運動を負荷し、以後次第に運動時間を増加させ、最終的には45分の休憩をはさむ3時間の水泳運動を2セット、合計6時間行わせた。

5週間の飼育期間終了後、Pentobarbital Sodium(5mg/100g体重)による麻酔下、副睾丸脂肪組織及び腸間膜脂肪組織を摘出した。血液は腹部大動脈より採取し、採血後血液を4 $^{\circ}$ Cで遠心分離(3000rpm、10分間)して得た血清を、血中アディポサイトカインの測定に用いた。

なお、本実験は「研究機関における動物実験等の実施に関する基本指針」(文部科学省告示第71号、平成18年6月1日)に従って行った。

2. 測定方法

1) 脂肪組織重量の測定

摘出した副睾丸脂肪組織及び腸間膜脂肪組織は室温の生理食塩水で数回洗浄した後、濾紙で水分を取り、重量を測定した。

2) 血中アディポサイトカインの測定

(1) 血中レプチン

血中レプチンの測定は、マウスレプチン測定用キット (Quantikine M : R & D system) を用い、ELISA により測定した。50 μ l の Assay Diluent RD 1 W をプレートの各 well に入れ、さらに50 μ l の standard もしくは sample を各 well に入れ、2時間室温で放置した。マイクロプレートウォッシャー (Auto Mini Washer AMW- 8 : パイオテック製) を用い、Wash Buffer で5回洗浄した後、100 μ l の mouse leptin conjugate を各 well に加え、再び2時間室温で放置した。再び Wash Buffer で5回洗浄し、100 μ l の Substrate Solution を各 well に加え、30分間室温の暗所で放置した。100 μ l の Stop Solution を各 well に加え、30分以内にマイクロプレートリーダー (イムノリーダー NJ-2300 : ナルジェヌンク インターナショナル製) を用い、波長450nm で吸光度を測定した。

(2) 血中アディポネクチン

血中アディポネクチンの測定は、ラットアディポネクチン測定用キット (大塚製薬 : 6B76) を用い、ELISA により測定した。350 μ l の Wash Buffer を各 well に加え、マイクロプレートウォッシャーで吸引除去した。100 μ l の standard もしくは sample を各 well に加え、60分間室温で放置した後、マイクロプレートウォッシャーを用い、Wash Buffer で3回洗浄した。100 μ l のピオチン標識抗体液を各 well に加え、60分間室温で放置した後、再び Wash Buffer で3回洗浄した。100 μ l の酵素標識ストレプトアビジン液を各 well に加え、60分間室温で放置した後、再び Wash Buffer で3回洗浄した。100 μ l の基質液を各 well に加え、15分間室温で放置した後、100 μ l の反応停

止液を各 well に加え、マイクロプレートリーダーを用い、波長450nm で吸光度を測定した。

(3) 血中TNF- α

TNF- α の測定は、ラット TNF- α 測定用キット (BIOSOURCE Immunoassay Kit : KRC3014) を用い、ELISA により測定した。100 μ l の standard もしくは血液 sample を各 well に加え、続いて50 μ l の Biotinylated Anti-TNF- α を各 well に加えた。軽く振盪した後、2時間室温で放置した。マイクロプレートウォッシャーを用い、Wash Buffer で4回洗浄した後、100 μ l の Streptavidin-HRP を各 well に加え、30分間室温で放置した。再び Wash Buffer で4回洗浄した後、100 μ l の Stabilized Chromogen を各 well に加えた。30分間室温の暗所で放置した後、100 μ l の Stop Solution を各 well に加え、30分以内にマイクロプレートリーダーを用い、波長450nm で吸光度を測定した。

3. 統計処理

得られたデータは、平均値 \pm 標準偏差 (SD) で示した。C群とT群の比較は対応のないT検定により行い、有意水準は5%未満とした。

III. 結果

1. 摂食量

飼育期間中、各群の摂食量は2日または3日に1回の頻度で計測した。飼育期間全体の摂食量は両群間でほとんど差が見られなかった。

2. 体重、副睾丸脂肪組織重量及び腸間膜脂肪組織重量

サンプル摘出時のC群及びT群の体重、副睾丸脂肪組織重量及び腸間膜脂肪組織重量は表1に示した。体重、副睾丸脂肪組織重量及び腸間膜脂肪組織重量はいずれもC群と比較しT群で有意 ($P < 0.001$) に低い値が得られた。

表1 体重及び脂肪組織重量

	体重 (g)	副睪丸脂肪組織 (g)	腸間膜脂肪組織 (g)
コントロール群(n=8)	244±11	2.52±0.28	4.16±0.59
トレーニング群(n=6)	187±21***	1.08±0.26***	1.79±0.75***

*** P<0.001

3. 血中アディポサイトカインレベル

C群及びT群の血中アディポサイトカインレベルは図1～3に示した。

血中レプチン濃度は、C群3.19±1.01ng/mlに対してT群0.93±0.54ng/mlとT群が有意(P<0.001)に低い値を示した(図1)。血中アディポネクチン濃度は、C群2.98±0.68ng/mlに対してT群2.99±1.06ng/mlとほぼ同様な値を示した(図2)。血中TNF-α濃度はC群1.67±1.27pg/mlに対してT群1.07±1.41pg/mlとT群でやや低い値を示したが有意差は認められなかった(図3)。

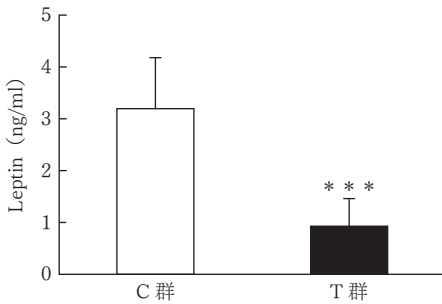


図1 持久的トレーニングが血中レプチン濃度に及ぼす影響 ***: P<0.001 C群との有意差

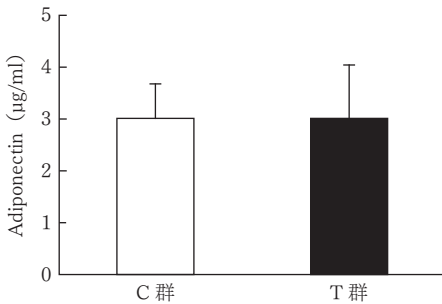


図2 持久的トレーニングが血中アディポネクチン濃度に及ぼす影響

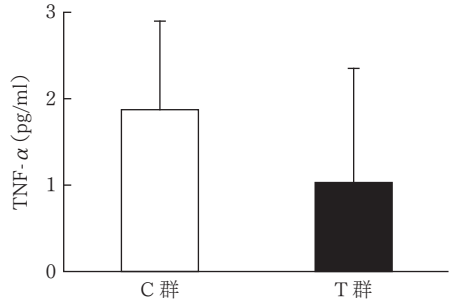


図3 持久的トレーニングが血中TNF-α濃度に及ぼす影響

4. 血中アディポサイトカインレベルと脂肪組織重量との関係

血中レプチン濃度と副睪丸脂肪組織重量の間には相関係数 $r = 0.900$ で有意 ($P < 0.001$) な正の相関が見られた ($Y = 1.615X - 0.863$) (図4 -A)。血中レプチン濃度と腸間膜脂肪組織重量の間には相関係数 $r = 0.638$ で有意 ($P < 0.05$) な正の相関が認められた ($Y = 0.655X + 0.156$) (図4 -B)。血中アディポネクチン濃度と副睪丸脂肪組織重量及び腸間膜脂肪組織重量の間には有意な相関が認められなかった(図5 -A、-B)。血中TNF-α濃度と副睪丸脂肪組織重量及び腸間膜脂肪組織重量の間には有意な相関が認められなかった(図6 -A、-B)。

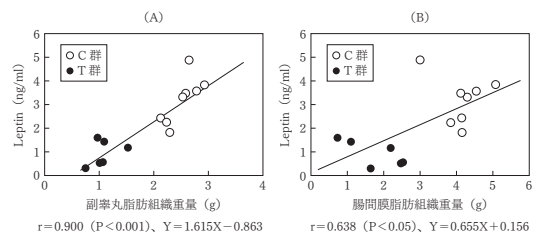


図4 脂肪組織重量と血中レプチン濃度との関係

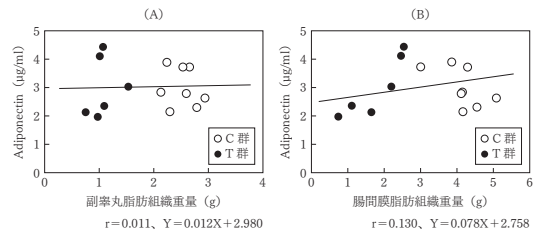


図5 脂肪組織重量と血中アディポネクチン濃度との関係

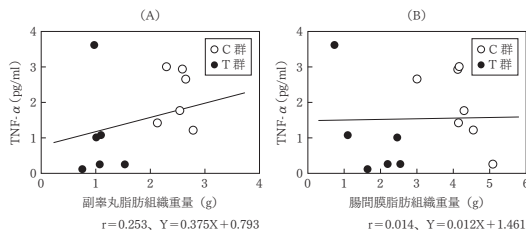


図6 脂肪組織重量と血中TNF- α 濃度との関係

IV. 考察

肥満に伴う耐糖能異常、高脂血症、高血圧症などは動脈硬化を発現し、虚血性心疾患や脳血管疾患などのリスクを高めることが知られている（日本内科学会、2005）。これまでに、肥満やインスリン抵抗性を基盤とし、虚血性心疾患を発症しやすい状態のことを Reaven (1988) がシンドローム X、Kaplan (1989) が死の四重奏 (deadly quartet)、DeFronzo & Ferrannini (1991) がインスリン抵抗性症候群として報告してきた。高脂血症や糖尿病などは個々に発症するよりも、お互いが重なり合い、肥満に伴う糖・脂質代謝異常に関連して発症することが多い疾患群であることから、WHO は糖尿病、高血圧症、高脂血症、動脈硬化などの病態を複数合わせもつ状態をメタボリックシンドローム (代謝異常症候群) と提唱した (Kassi ら、2011)。

ところで、脂肪組織の主な役割はこれまで、エネルギーの貯蔵庫、器官の保護、断熱作用などであると考えられてきた。しかし、脂肪組織から肥満と関連するホルモン用物質であるレプチンの分泌されることが報告されて以降 (Zhang ら、1994)、脂肪組織から分泌されるアディポサイトカインと呼ばれる生理活性物質が数多く発見され、脂肪組織は重要な臓器の一つと考えられるようになってきた。アディポサイトカインは脂肪組織の増加に伴い、分泌量が増加するものあるいは減少するものがあり、その働きは耐糖能異常、高血圧症、高脂血症の発現と密接に関連していることが知られている。また、アディポサイトカインは皮下脂肪よりも腸間膜脂肪組織をはじめとする内臓脂肪からの分泌量が多く (Funahashi ら、

1999)、肥満特に内臓脂肪量の増大がメタボリックシンドロームの発現に深くかかわっているものと考えられる。

従って、運動を行い脂肪組織重量を低いレベルに保つことにより血中アディポサイトカインレベルを正常範囲に保つことができればメタボリックシンドロームの発現を予防することが可能であると考えられる。しかしこれまで、運動が血中アディポサイトカインレベルに及ぼす影響についての研究は肥満者に対する研究 (Yu ら、2017) がほとんどであり、正常なヒトや動物に対する長期の持久的トレーニングが血中アディポサイトカインレベルに及ぼす影響についての研究はほとんどなされていない。そこで本研究では、正常ラットを用い長期の持久的トレーニングがアディポサイトカインレベルに及ぼす影響を検討するとともに、血中アディポサイトカインレベルと内臓脂肪組織重量との関係について検討した。

本研究において、トレーニングにより副睾丸脂肪組織重量及び腸間膜脂肪組織重量は有意に低下した (表1 参照)。摂食量は両群間で差がなかったことから、水泳トレーニングによりエネルギーの消費量が増大したため脂肪組織重量が低下したものと考えられる。

レプチンは脂肪組織から分泌された後、視床下部で中枢神経に作用し摂食抑制やエネルギー消費を亢進する働きを有している (Zhang ら、1994)。また、インスリン感受性の亢進による糖の取り込み増大 (Ogawa ら、1999) や血圧上昇作用 (Aizawa-Abe ら、2000) など生理機能の調節にも働いている。

Kawamura ら (2002) は高血圧症を自然発症する SHR ラットを対象に、分速20m、60分間のトレッドミル走行による持久的運動を週5日の頻度で16週間負荷させたところ、血中レプチンがコントロール群と比較してトレーニング群で有意 ($P < 0.05$) に低下したことを報告している。また、血中レプチンと副睾丸脂肪組織重量との間に有意な正の相関がみられたことから、トレーニングによる血中レプチンの低下は脂肪組織重量の減

少によるものであることを報告している。本研究においても血中レプチン濃度はC群に比較しT群で有意に低い値を示した(図1)。また、血中レプチン濃度は副睪丸脂肪組織重量及び腸間膜脂肪組織重量との間に有意な正の相関が認められたことから(図4-A、-B)、持久的トレーニングによる内臓脂肪量の低下が血中レプチン濃度を低下させたものと考えられる。

アディポネクチンは脂肪組織に特異的に発現するアディポサイトカインであり、インスリン抵抗性を軽減し血糖低下作用を有するとともに動脈硬化や高血圧症を防ぐ働きを有していることが報告されている(前田、2004)。従って、血中アディポネクチンはBMIや内臓脂肪組織重量と負の相関を示し、肥満者において血中アディポネクチンが低下し、インスリン抵抗性や動脈硬化を引き起こすことが報告されている(Matsuzawa、2006)。逆に、トレーニングや食事によって体重や体脂肪量を減少させると血中アディポネクチンは増加し、インスリン感受性を増大させ、糖尿病の改善に効果があると言われている(Fatourosら、2005)。

Zengら(2007)は38週令のWistar系雄ラットを対象に、トレッドミルを用いて、1週間に2日もしくは5日の頻度で12週間、運動強度の異なるトレーニングを負荷したところ、週2日の高強度のトレーニングにおいてアディポネクチンが増加したものの、低強度のトレーニングでは変化が見られなかったことを報告している。本研究において、アディポネクチンはC群とT群でほぼ同じ値を示し、有意な差は見られなかった(図2)。従って、今回の水泳運動が低強度の運動であった可能性があり、さらに検討する必要がある。

TNF- α は単球・マクロファージなどの炎症細胞により分泌される炎症性サイトカインであると考えられてきたが、最近の研究で、TNF- α は骨格筋や脂肪細胞で合成され糖利用の亢進を抑制することによって、インスリン抵抗性を誘発することが知られている(Hotamisligilら、1994)。また、肥満に伴う脂肪組織の増大は血中TNF- α レベル

を増大すること、BMIと血中TNF- α との間に有意な相関がみられることが報告されている(Nilssonら、1998)。

本研究では持久的トレーニングにより体重や脂肪組織重量が低下したが、血中TNF- α レベルには有意な低下が認められなかった(図3)。Christiansenら(2010)は79名の肥満者を対象に1日60~75分の有酸素運動を週3回12週間行わせた時の脂肪組織におけるTNF- α の遺伝子発現について検討している。その結果体重及びBMIに有意な変化がなく、脂肪組織にけるTNF- α mRNAはやや低下したものの有意な低下ではなかったことを報告している。Christiansenら(2010)の結果は体重の減少が見られず本研究の結果と異なるが、TNF- α はBMIや体脂肪率とは相関しないという報告(河村ら、2003)もあり、正常ラットにおいては持久的トレーニングは血中TNF- α レベルに影響を及ぼさない可能性があり、今後さらに検討する必要がある。

以上のことから、正常ラットにおける持久的トレーニングは、体重及び脂肪組織重量の減少と血中レプチン濃度の減少を引き起こしたが、血中アディポネクチン及びTNF- α 濃度には影響がなく、メタボリックシンドロームに対する運動の予防効果についてはさらに検討する必要があると考えられる。

V. 参考文献

- Aizawa-Abe, M., Ogawa, Y., Masuzaki, H., Ebihara, K., Satoh, N., Iwai, H., Matsuoka, N., Hayashi, T., Hosoda, K., Inoue, G., Yoshimasa, Y., & Nakao, K. (2000) Pathophysiological role of leptin in obesity-related hypertension. *J.Clin.Invest.* 105:1243-1252.
- Christiansen, T., Paulsen, S.K., Bruun, J.M., Pedersen, S.B., & Richelsen, B. (2010) Exercise training versus diet-induced weight-loss on metabolic risk factors and inflammatory markers in obese subjects: a

- 12-week randomized intervention study. *Am.J.Physiol. Endocrinol.Metab.* 298: E824–E831.
- DeFronzo, R.A., & Ferrannini, E. (1991) Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 14 (3):173-194.
- Fatouros, I.G., Tournis, S., Leontsini, D., Jamurtas, A.Z., Sxina, M., Thomakos, P., Manousaki, M., Douroudos, I., Taxildaris, K. & Mitrakou, A. (2005) Leptin and adiponectin responses in overweight inactive elderly following resistance training and detraining are intensity related. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 90 (11):5970-5977.
- 福原淳範・下村伊一郎 (2005) メタボリックシンドロームとアディポサイトカイン最新医学 60(1):87-93.
- Funahashi, T., Nakamura, T., Shimomura, I., Maeda, K., Kuriyama, H., Takahashi, M., Arita, Y., Kihara, S., & Matsuzawa, Y. (1999) Role of adipocytokines on the pathogenesis of atherosclerosis in visceral obesity. *Intern. Med.* 38(2):202-206.
- Hotamisligil, G.S., & Spiegelman, B.M. (1994) Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 43(11):1271-1278.
- Kaplan, N.M. (1989) The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch. Intern.Med.* 149(7):1514-1520.
- Kassi, E., Pervanidou, P., Kaltsas, G., & Chrousos, G. (2011) Metabolic syndrome: definitions and controversies. *BMC Medicine* 9:48.
- Kawamura, T., Yoshida, K., Sugawara, A., Nagasaka, M., Mori, N., Takeuchi, K., & Kohzaki, M. (2002) Impact of exercise and angiotensin converting enzyme inhibition on tumor necrosis factor- α and leptin in fructose-fed hypertensive rats. *Hypertens. Res.* 25(6):919-926.
- 河村孝彦・茂木順子・中村清範・中井規隆・金井彰夫・佐野隆久 (2003) 死の四重奏と血中TNF- α レベル 日職災医誌 51:220-224.
- 厚生労働省令 (2008) 特定検査及び特定保健指導の実施に関する基準 平成20年4月1日施行厚生労働省令第157号.
- 厚生労働省 (2016) 平成28年国民健康・栄養調査結果の概要.
- 前田和久 (2004) 脂肪組織における遺伝子発現 *Adiposcience* 1 (3)、241-245.
- Matsuzawa, Y. (2006) The metabolic syndrome and adipocytokines. *FEBS Letters* 580 (12):2917-2921.
- メタボリックシンドローム診断基準委員会 (2005) メタボリックシンドロームの定義と診断基準 日本内科学会雑誌 94(4): 794-809.
- Nakatani, A., Han, D.-H., Hansen, P.A, Nolte, L.A., Host, H.H., Hickner,R.C., & Holloszy, J.O. (1997) Effect of endurance exercise training on muscle glycogen supercompensation in rats. *J. Appl.Physiol.* 82(2): 711–715.
- 日本肥満学会 肥満症診断基準検討委員会 (2011) 肥満診断基準2011肥満研究 臨時増刊号17.
- Nilsson, J., Jovinge, S., Niemann, A., Reneland, R., & Lithell, H. (1998) Relation between plasma tumor necrosis factor- α and insulin sensitivity in elderly men with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler. Thromb.Vasc.Biol.* 18(8): 1199-1202.
- Ogawa, Y., Masuzaki, H., Hosoda, K., Aizawa-Abe, M., Suga, J., Suda, M., Ebihara, K., Iwai, H., Matsuoka, N., Satoh, N., Odaka, H., Kasuga, H., Fujisawa, Y., Inoue, G., Nishimura, H., Yoshimasa, Y., & Nakao, K. (1999) Increased glucose metabolism and

insulin sensitivity in transgenic skinny mice overexpressing leptin. *Diabetes*. 48(9):1822-1829.

Reaven, G.M.. (1988) Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37(12):1595-1607.

Yu, N., Ruan, Y., Gao, X., & Sun, J. (2017) Systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials on the effect of exercise on serum leptin and adiponectin in overweight and obese individuals. *Horm Metab Res*. 49(3):164-173.

Zeng, Q., Isobe, K., Fu, L., Ohkoshi N., Ohmori, H., Takekoshi, K., & Kawakami, Y. (2007) Effects of exercise on adiponectin and adiponectin receptor levels in rats. *Life Sci*. 80(5):454-459.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J.M. (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432.