

28. 軽度高気圧酸素によるメタボリックシンドロームの予防・改善

石原 昭彦

Key words : メタボリックシンドローム, モデル動物,
骨格筋, 軽度高気圧酸素, 有酸素代謝

京都大学 大学院人間・環境学研究科
認知・行動科学講座
細胞生物学・生命科学研究室

緒 言

過食, 運動不足など生活習慣の悪化は肥満を引き起こし, メタボリックシンドロームを誘発する. メタボリックシンドロームでは高脂血症, 高血糖, 高血圧を発症して, そのまま放置すると糖尿病や高血圧症などの生活習慣病へと移行する. 生活習慣病を発症すると, 進行を抑えたり, 改善することはきわめて難しい. 生活習慣病では動脈硬化が進行して, 心臓病 (心筋梗塞や狭心症), 脳血管疾患 (脳出血や脳血栓), 腎機能低下 (腎不全), 失明や末梢での神経障害など様々な合併症を引き起こす. メタボリックシンドロームのうち高脂血症, 高血糖, 高血圧を改善して, 生活習慣病への移行を防ぐ必要がある.

メタボリックシンドローム, 糖尿病や高血圧症を発症するモデル動物が開発されている¹⁾. これらのモデル動物では, 出生直後は普通の動物と違いは認められないが, 発育にともなってそれぞれの症状を発症していく. メタボリックシンドロームを発症するラットを用いて, 走運動や高脂肪食摂取の影響が研究されている. 自発的な走運動は, メタボリックシンドロームによる中性脂肪の増加を抑制できること, アディポネクチンレベルの減少を抑制できること, 骨格筋での酸化系酵素活性の低下を抑制できることが報告されている²⁾. 一方, メタボリックシンドロームを発症するラットに高脂肪食を与えたところ, 普通食を与えたメタボリックシンドロームのラットに対して, 空腹時血糖, 中性脂肪, 総コレステロール, レプチンレベルが高値を示し, 骨格筋での酸化系酵素活性が低下したことが報告されている³⁾. これらの研究成果^{2,3)}は, 運動による代謝の向上がメタボリックシンドロームの発症を抑制できること, 一方, 過剰なカロリー摂取がメタボリックシンドロームの悪化を促進することを意味している.

研究室では, 軽度高気圧と高濃度酸素 (軽度高気圧酸素) の環境に滞在できる軽度高気圧酸素チャンバーを開発した (特許: 第 5076067 号, 発明者: 石原昭彦, 登録日: 2012 年 9 月 7 日). 軽度高気圧酸素の環境に滞在することによって, 血流と酸素 (とくに血液中に溶け込む溶解酸素) を増大させることができる⁴⁾. その結果, 代謝を向上することが可能になる. 軽度高気圧酸素の環境への滞在によって, 2 型糖尿病^{5,6)}, 糖尿病性白内障⁷⁾, 高血圧⁸⁾, II 型コラーゲン誘発関節炎⁹⁾の発症を予防したり, 改善できることが動物実験から明らかにされている.

本研究では, メタボリックシンドロームを発症するラットを軽度高気圧酸素の環境に滞在させて, メタボリックシンドロームを予防できるかどうかを検証した.

方 法

本研究については, 京都大学大学院人間・環境学研究科動物実験倫理委員会で審議され, 実験を実施することの承認を受けた.

メタボリックシンドロームを発症する生後 5 週齢の雄ラット (SHR/NDmcr-cp, cp/cp) 10 匹を軽度高気圧酸素の環境に滞在させる CP-H 群 (5 匹) と軽度高気圧酸素の環境に滞在させずに普通飼育する CP 群 (5 匹) に分けた. また, メタボリックシンドロームを示さない普通飼育の雄 Wistar ラット 5 匹を対照 (WR) 群とした.

CP-H 群を 1.25 気圧, 36%酸素の環境を維持できる軽度高気圧酸素チャンバーに 1 日 1 回, 1 回あたり 3 時間, 16 週間にわたって滞在させた. すべての群は, 餌 (固形飼料) と水を自由に摂取できるようにした. 飼育室と軽度高気圧酸素チャンバー内の温度は, 22±2℃とした.

飼育期間中は、2週間に1回の割合で体重、食餌量、空腹時血糖を測定した。飼育期間終了後、ネンブタール麻酔（体重1 kgあたり50 mg）を施して心臓から採血した。常時血糖の測定を行い、遠心分離後の血清から総コレステロール、中性脂肪、インスリン、レプチン、アディポネクチンを測定した。両後肢からヒラメ筋を摘出して湿重量を測定した。その後、ヒラメ筋を急速凍結して、右側の筋については、生化学的に酸化系酵素 (succinate dehydrogenase, SDH) 活性を測定した。さらに、*proliferator-activated receptor a (Ppar a)*, *Ppar δ/β* , *proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (Pgc-1 α)* の mRNA 発現量を解析した¹⁾。左側の筋については、クリオスタットを用いて厚さ15 μ m の連続切片を作製して、ATPase 染色から筋線維を type I, type IIA, type IIC に分類した。その後、筋線維タイプ構成比、筋線維タイプ別の横断面積と SDH 活性を測定した¹⁾。

データは、平均 \pm 標準偏差で示した。一元配置の分散分析 (ANOVA) を行い、 $p < 0.05$ で統計的に有意差が認められると判断した。

結 果

体重については、生後5週齢から17週齢まではWR, CP, CP-Hの3群間で有意な差は認められなかった（図1）。一方、生後19週齢と21週齢ではCP = CP-H > WRであった。

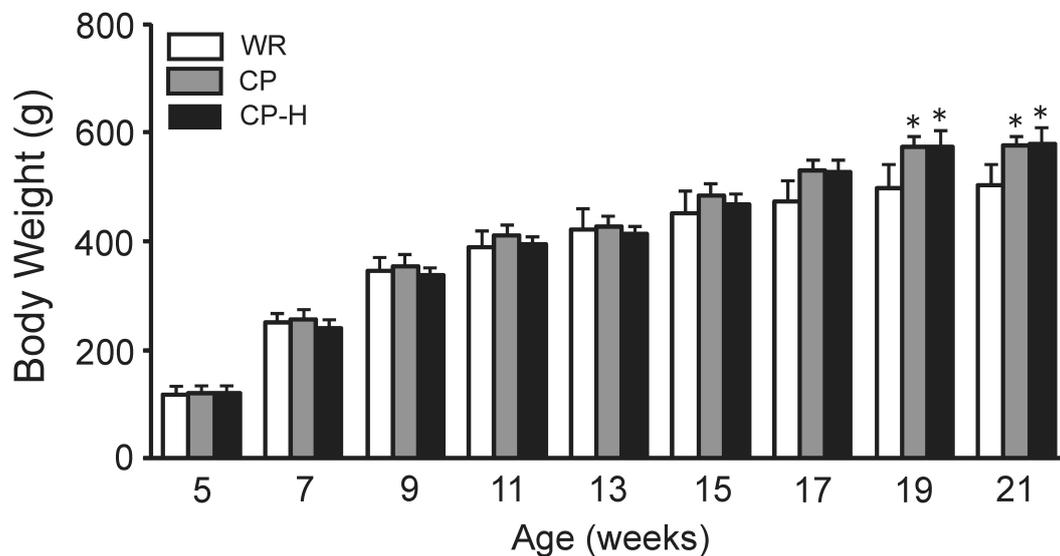


図1. 発育にともなう体重の変化。

WR: 対照となる Wistar ラット, CP: メタボリックシンドロームを発症するラット, CP-H: 軽度高気圧酸素の環境に滞在させたメタボリックシンドロームを発症するラット. * $p < 0.05$ (WR に対して, ANOVA).

食餌量については、生後7週齢から11週齢まではCP = CP-H > WRであり、生後13週齢と15週齢ではCP > WR = CP-Hであった（図2）。その他の週齢では、WR, CP, CP-Hの3群間で有意な差は認められなかった。

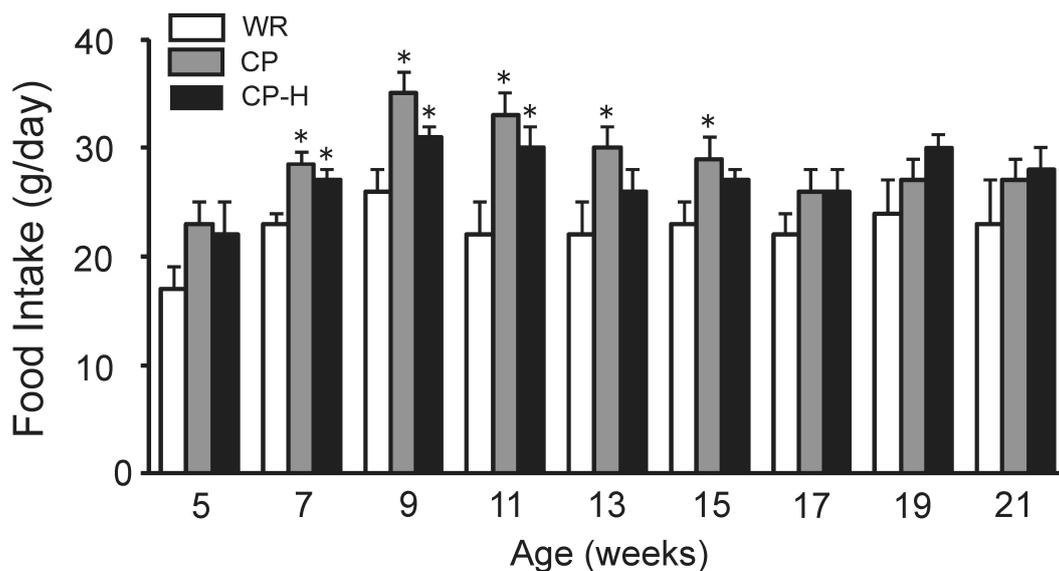


図2. 発育にともなう食餌量の変化.

WR: 対照となる Wistar ラット, CP: メタボリックシンドロームを発症するラット, CP-H: 軽度高気圧酸素の環境に滞在させたメタボリックシンドロームを発症するラット. * $p < 0.05$ (WR に対して, ANOVA).

空腹時血糖については, 生後5週齢と11週齢ではWR, CP, CP-Hの3群間で有意な差は認められなかった(図3). 一方, 生後15週齢から21週齢まではWR = CP > CP-Hであった.

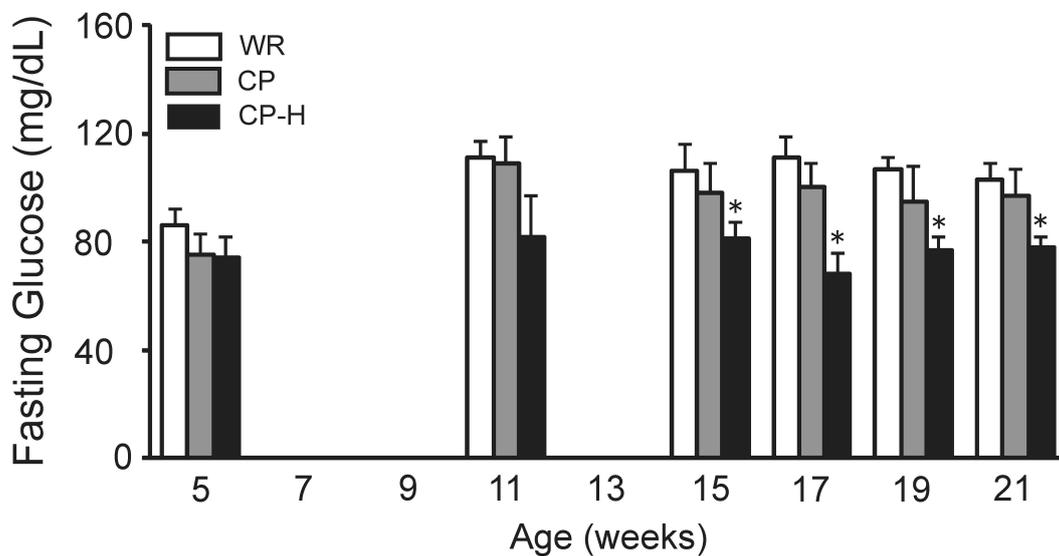


図3. 発育にともなう空腹時血糖の変化.

WR: 対照となる Wistar ラット, CP: メタボリックシンドロームを発症するラット, CP-H, 軽度高気圧酸素の環境に滞在させたメタボリックシンドロームを発症するラット. * $p < 0.05$ (WR に対して, ANOVA).

常時血糖, 総コレステロール, 中性脂肪, インスリンについては, CP > CP-H > WR であった(図4). レプチンについては, CP = CP-H > WR であった.

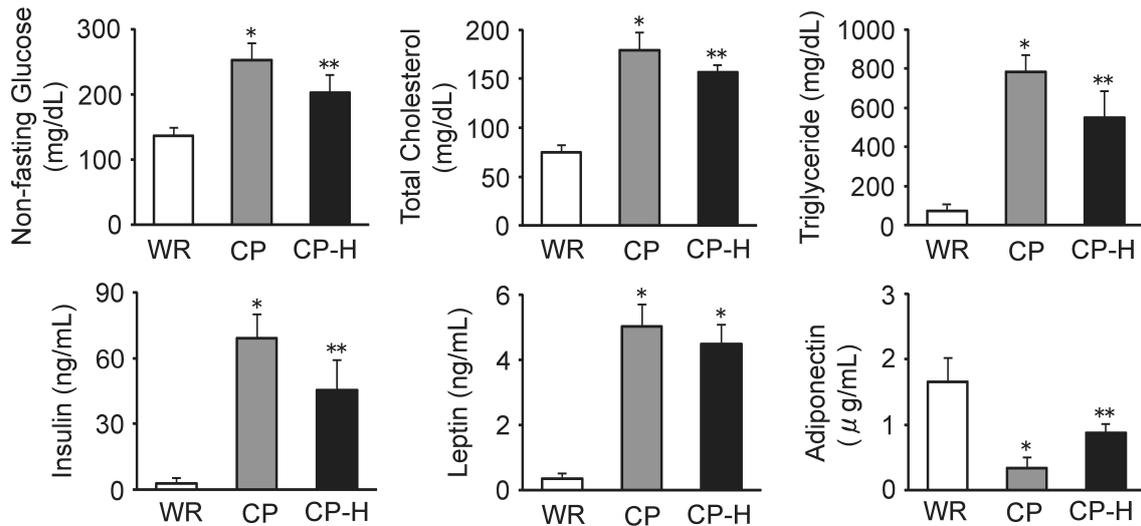


図4. 常時血糖, 総コレステロール, 中性脂肪, インスリン, レプチン, アディポネクチン.

WR: 対照となる Wistar ラット, CP: メタボリックシンドロームを発症するラット, CP-H: 軽度高気圧酸素の環境に滞在させたメタボリックシンドロームを発症するラット. * $p < 0.05$ (WR と CP-H に対して, ANOVA), ** $p < 0.05$ (WR に対して, ANOVA).

体重 100 g あたりのヒラメ筋重量については, WR, CP, CP-H の 3 群間で有意な差は認められなかった (図 5). ヒラメ筋の酸化系酵素 (SDH) 活性については, WR = CP-H > CP であった.

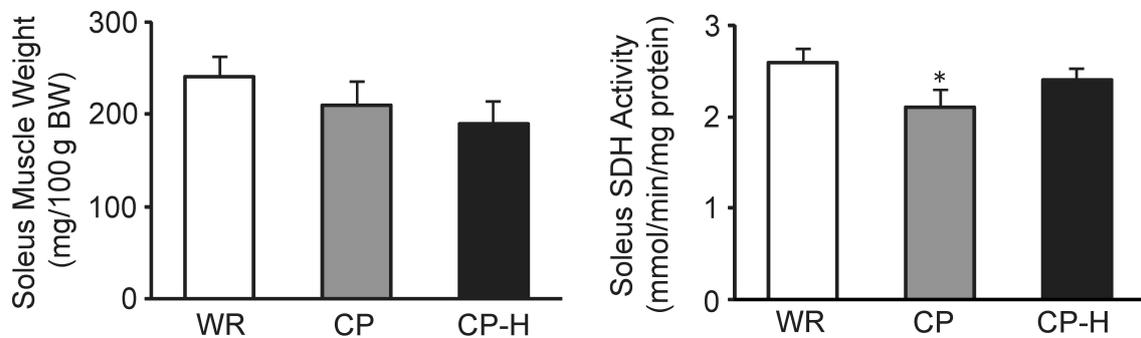


図5. ヒラメ筋重量と酸化系酵素活性.

WR: 対照となる Wistar ラット, CP: メタボリックシンドロームを発症するラット, CP-H: 軽度高気圧酸素の環境に滞在させたメタボリックシンドロームを発症するラット. SDH: succinate dehydrogenase. * $p < 0.05$ (WR と CP-H に対して, ANOVA).

ヒラメ筋における *Ppar α* の mRNA 発現量については, CP = CP-H > WR であった (図 6). 一方, *Ppar δ/β* と *Pgc-1 α* の mRNA 発現量については, WR = CP-H > CP であった.

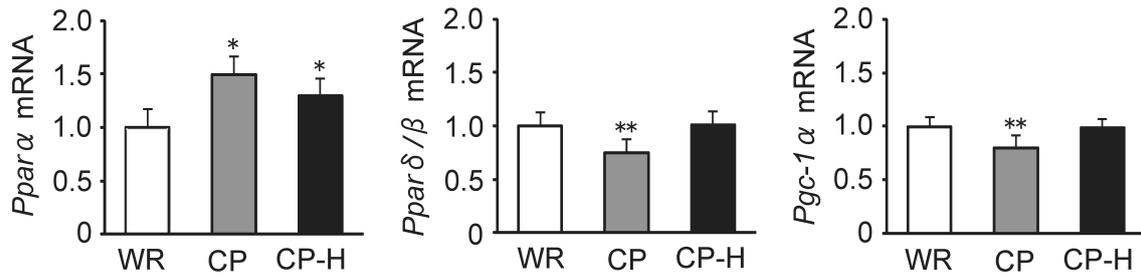


図6. ヒラメ筋における *Ppara*, *Ppar delta/beta*, *Pgc-1 alpha* の mRNA 発現量。

WR: 対照となる Wistar ラット, CP: メタボリックシンドロームを発症するラット, CP-H: 軽度高気圧酸素の環境に滞在させたメタボリックシンドロームを発症するラット. *Ppara*: proliferator-activated receptor α , *Ppar delta/beta*: proliferator-activated receptor δ/β , *Pgc-1 alpha*: proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α . * $p < 0.05$ (WR に対して, ANOVA), ** $p < 0.05$ (WR と CP-H に対して, ANOVA).

ヒラメ筋を構成する筋線維のタイプについては, WR 群と CP-H 群では type I, type IIA, type IIC の 3 タイプ, CP 群では type I と type IIC の 2 タイプを確認できた (図7).

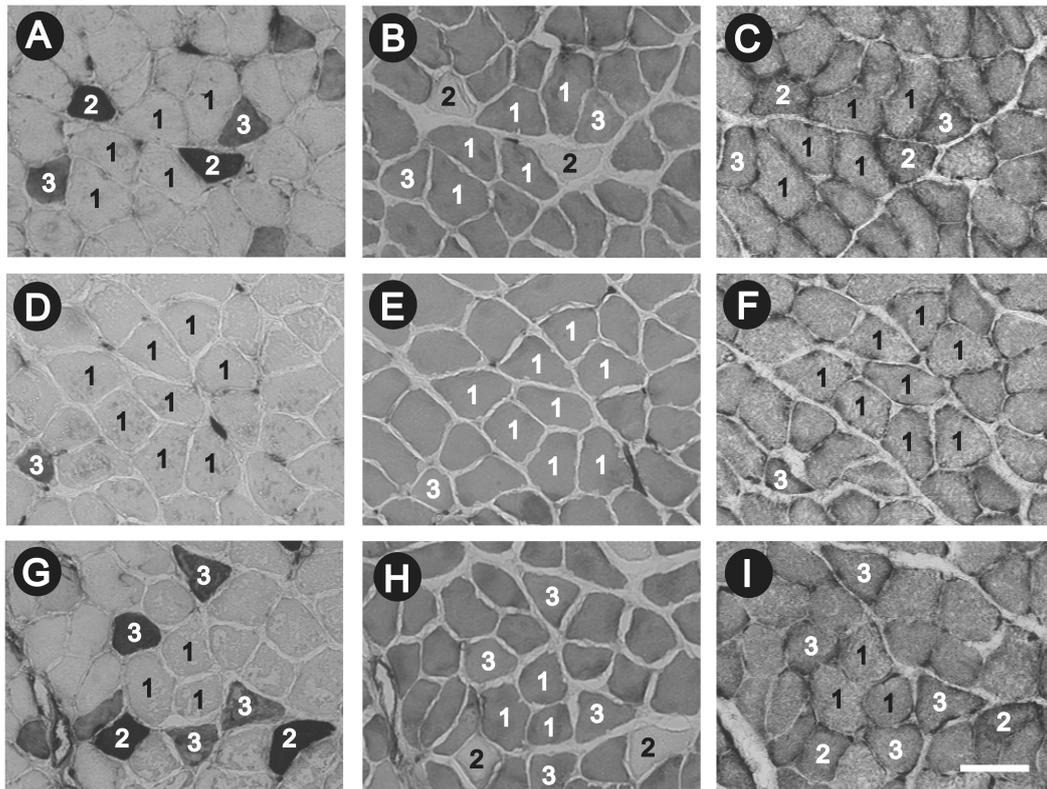


図7. ヒラメ筋の連続横断面。

A, B, C) 対照となる Wistar ラット, D, E, F) メタボリックシンドロームを発症するラット, G, H, I) 軽度高気圧酸素の環境に滞在させたメタボリックシンドロームを発症するラット. A, D, G) pH10.4 前処理の ATPase 染色, B, E, H) pH4.5 前処理の ATPase 染色, C, F, I) 酸化系酵素 (succinate dehydrogenase, SDH) 染色. 1: type I 線維, 2: type IIA 線維, 3: type IIC 線維. Scale bar: 50 μ m.

筋線維のタイプ構成比については、WR 群と CP-H 群の間に有意な差は認められなかった (図 8)。CP 群は WR 群と CP-H 群に対して type I 線維の割合が多く、type IIA 線維は存在しなかった。筋線維タイプ別にみた横断面積については、WR、CP、CP-H の 3 群間で有意な差は認められなかった。筋線維タイプ別にみた酸化系酵素 (SDH) 活性については、type I 線維と type IIC 線維において WR = CP-H > CP であった。

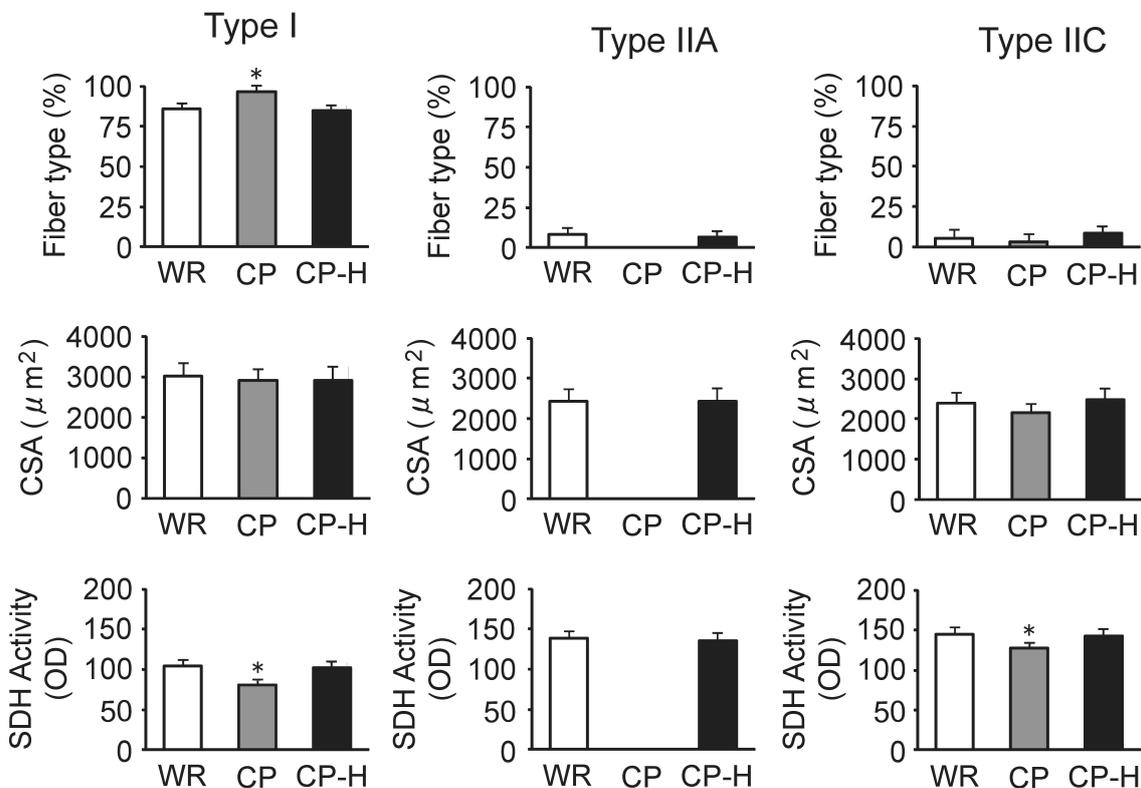


図 8. 筋線維タイプ構成比, 筋線維タイプ別にみた横断面積と酸化系酵素活性.

WR: 対照となる Wistar ラット, CP: メタボリックシンドロームを発症するラット, CP-H: 軽度高気圧酸素の環境に滞在させたメタボリックシンドロームを発症するラット. CSA: cross-sectional area, SDH: succinate dehydrogenase, OD: optical density. * $p < 0.05$ (WR と CP-H に対して, ANOVA).

考 察

気圧を高くして、さらに酸素濃度を高めた環境 (1.25 気圧, 36%酸素) に滞在することによって、体内の酸素 (とくに血液に溶ける溶存酸素) と血流を増大させることができる⁴⁾。これにより、安静時の代謝を改善させることが可能になる。先行研究では、2型糖尿病を発症するラット^{5,6)}、糖尿病性白内障を発症するマウス⁷⁾、高血圧を発症するラット⁸⁾、関節炎を発症するマウス⁹⁾を軽度高気圧酸素の環境に滞在させて、それぞれの症状の発症を予防したり、改善できたことを報告している。また、ヒトを用いた研究では、紫外線の照射で生じた皮膚の変色を軽度高気圧酸素の環境に滞在することによって効果的に改善できたことを報告している¹⁰⁾。

本研究では、軽度高気圧酸素の環境への滞在によって発育にともなう体重増加を抑制することはできなかった (図 1)。先行研究²⁾では、メタボリックシンドロームを発症するラットを回転車輪の付属した飼育装置で飼育して、自発的な走運動を行わせている。その結果、中性脂肪の増加は抑制できたが、体重の過剰な増大を抑制することはできなかったとしている。自発走運動や軽度高気圧酸素による代謝の向上は、体重増加を抑制するには十分ではないと考えられる。しかしながら、自発走運動と軽度高気圧酸素の相乗効果によって体重増加を効果的に抑制できると期待する。これについては、今後の検討課題としたい。

本研究では、軽度高気圧酸素の環境への滞在によってメタボリックシンドロームを発症するラットの空腹時血糖を減少できた(図3)。さらに、メタボリックシンドロームを発症するラットの常時血糖を改善できた(図4)。これは、軽度高気圧酸素の環境への滞在による高インスリン血症の改善(図4)に関係していると考えられる。本研究では、軽度高気圧酸素の環境への滞在は16週間であったが、滞在期間を長くすることによって空腹時血糖や常時血糖をより改善できるものと期待する。これについては、今後の検討課題としたい。

軽度高気圧酸素の環境に滞在させたメタボリックシンドロームを発症するラットの総コレステロール、中性脂肪は、対照(WR)群よりは高値を示したが、普通飼育したメタボリックシンドロームを発症するラットよりは低値を示した(図4)。これは、軽度高気圧酸素の環境に滞在することによって有酸素的な代謝が改善して、総コレステロール、中性脂肪の上昇が抑えられたことによるものと考えられる。軽度高気圧酸素の環境への滞在期間を長くすることによって対照(WR)群の値に近づくものと期待される。

軽度高気圧酸素の環境への滞在は、メタボリックシンドロームにより生じるヒラメ筋での有酸素的な代謝能力の減少を抑制した(図6)。酵素組織化学的分析からは、type I線維とtype IIA線維の酸化系酵素活性に改善が認められた(図8)。メタボリックシンドロームを発症するラットのヒラメ筋では、有酸素的な代謝に優れたtype IIA線維が存在しなかった(図7)。一方、軽度高気圧酸素の環境に滞在したメタボリックシンドロームを発症するラットのヒラメ筋では、有酸素的な代謝に優れたtype IIA線維が認められた。したがって、軽度高気圧酸素の環境への滞在が有酸素的な代謝能力の低いtype I線維から有酸素的な代謝能力の高いtype IIA線維へのタイプ移行を引き起こしたと考えられる。

軽度高気圧酸素の環境への滞在は、メタボリックシンドロームを発症するラットの空腹時および常時血糖、総コレステロール、中性脂肪の増加を抑制して、骨格筋での酸化系酵素活性の低下を抑制した。これは、軽度高気圧酸素の環境への滞在により有酸素的な代謝が改善されたことによるものと結論する。軽度高気圧酸素の環境への滞在は、運動の継続や薬物投与が困難な高齢者や身体障害者などに有用であると考えられる。

共同研究者

本研究の共同研究者は、京都大学大学院人間・環境学研究科の永友文子である。本研究に助成をいただきました上原記念生命科学財団に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Nagatomo, F., Gu, N., Fujino, H., Takeda, I., Tsuda, K. & Ishihara, A. : Skeletal muscle characteristics of rats with obesity, diabetes, hypertension, and hyperlipidemia. *J. Atheroscl. Thromb.*, **16** : 576-585, 2009.
- 2) Nagatomo, F., Fujino, H., Kondo, H., Kouzaki, K., Gu, N., Takeda, I., Tsuda, K. & Ishihara, A. : The effects of running exercise on oxidative capacity and PGC-1 α mRNA levels in the soleus muscle of rats with metabolic syndrome. *J. Physiol. Sci.*, **62** : 105-114, 2012.
- 3) Nagatomo, F., Fujino, H., Kondo, H., Takeda, I., Tsuda, K. & Ishihara, A. : High-fat diet-induced reduction of PGC-1 α mRNA levels and oxidative capacity in the soleus muscle of rats with metabolic syndrome. *Nutr. Res.*, **32** : 144-151, 2012.
- 4) Ishihara, A., Nagatomo, F., Fujino, H. & Kondo, H. : Exposure to mild hyperbaric oxygen increases blood flow and resting energy expenditure but not oxidative stress. *J. Sci. Res. Reports*, **3** : 1886-1896, 2014.
- 5) Yasuda, K., Aoki, N., Adachi, T., Tsujimoto, G., Gu, N., Matsunaga, T., Kikuchi, N., Tsuda, K. & Ishihara, A. : Hyperbaric exposure with high oxygen concentration inhibits growth-associated increase in the glucose level of diabetic Goto-Kakizaki rats. *Diabetes Obes. Metab.*, **8** : 714-715, 2006.
- 6) Gu, N., Nagatomo, F., Fujino, H., Takeda, I., Tsuda, K. & Ishihara, A. : Hyperbaric oxygen exposure improves blood glucose level and muscle oxidative capacity in rats with type 2 diabetes. *Diabetes Tech. Ther.*, **12** : 125-133, 2010.
- 7) Nagatomo, F., Roy, R. R., Takahashi, H., Edgerton, V. R. & Ishihara, A. : Effect of exposure to hyperbaric oxygen on diabetes-induced cataracts in mice. *J. Diabetes*, **3** : 301-308, 2011.
- 8) Nagatomo, F., Fujino, H., Takeda, I. & Ishihara, A. : Effects of hyperbaric oxygenation on blood pressure levels of spontaneously hypertensive rats. *Clin. Exp. Hypertens.*, **32** : 193-197, 2010.
- 9) Nagatomo, F., Gu, N., Fujino, H., Okiura, T., Morimatsu, F., Takeda, I. & Ishihara, A. : Effects of exposure to hyperbaric oxygen on oxidative stress in rats with type II collagen-induced arthritis. *Clin. Exp. Med.*, **10** : 7-13, 2010.

- 10) Nishizaka, T., Nomura, T., Sano, T., Higuchi, K., Nagatomo, F. & Ishihara, A. : Hyperbaric oxygen improves UVB irradiation-induced melanin pigmentation and diminishes senile spot size. *Skin Res. Tech.*, **17** : 332-338, 2011.