

平成 25 年度 学位論文

肥満と性差についての研究

指導教員 宮坂京子

東京家政大学大学院

家政学研究科

人間生活学専攻

関目綾子

肥満と性差に関する研究

家政学研究科 人間生活学専攻 関目 綾子

現在の日本では、肥満やメタボリックシンドローム該当者割合は、男性の方が女性より高率であり、メタボリックシンドローム及び予備軍該当者数は平成 23 年で男性 50.2%、女性 17.6%である。メタボリックシンドロームの増加の理由には脂質の摂取割合の増加が考えられる。昭和 22 年には脂質からのエネルギー摂取割合は 7%であったが、平成 22 年には 26%に増加した。一方で、日常の脂肪の摂取比率は、男性の方が女性より多いわけではなく、男性の方が肥満やメタボリックシンドロームの発生頻度が高い理由は不明である。研究は肥満・メタボリックシンドロームの発現における『生物学的な性差』の重要性について検討した。また、コレステロール胆石は戦後の 50 年で急激に発生頻度が増加したが、これもまた脂肪摂取の増加、肥満、脂質代謝異常の結果と考えられている。胆嚢収縮機能異常を呈するコレシストキニン 1 受容体ノックアウト型(CCK-1RKO)マウスを用いて、野生型と比較することで胆石発生頻度の変化もあわせて検討した。

本研究は第 I 章から第 IV 章までの構成となっている。第 I 章は、研究に使用する実験動物である CCK-1RKO マウスについて、および同マウスの遺伝子型確認の方法について記述した。第 II 章は、第 I

章のマウスを用いて、飼料の栄養バランスの変化により、肥満や脂質異常症、胆砂および胆石発生が引き起こされるか、またそれらの発現に性差が見られるか、検討を行った。第Ⅲ章は、Ⅱ章の実験で見られた雄マウスの食餌誘導性肥満・脂質異常症発症のメカニズムを解明するため、精巣除去手術を行った雄マウスで実験を行った。第Ⅳ章では、糖尿病に食餌誘導性の発現増加がみられるか、さらに発現増加に精巣（テストステロン）が関与するかどうか検討を行った。

第Ⅰ章は、研究に使用する実験動物である CCK-1RKO マウスについて、および同マウスの遺伝子型確認の方法について記述した。

CCK とはペプチドホルモンの一種で、古典的な消化管ホルモンであるとともに、神経ペプチドとしての働きもある。消化管において CCK は上部小腸の I 細胞から分泌され、膵臓からの消化酵素分泌促進、胆嚢を収縮させ胆汁を分泌させる、脳に満腹感を伝える等の作用がある。

CCK の受容体には 1 と 2 の 2 種類が知られており、マウスでは CCK-1R は膵臓・胆嚢などに存在し、CCK-2R は主に胃や脳に存在する。

本研究で使用する CCK-1RKO マウスは遺伝子操作により、CCK-1R を作る遺伝子配列の一部を LacZ という関係のない遺伝子配列に置き替えている。このマウスでは CCK-1R が存在しないため、CCK の働きがあらわれず、胆嚢収縮不全がみられ、胆石が発現しやすい。CCK-1RKO ヘテロ型マウス同士の交配で得られたマウスに PCR 法による遺伝子型確認を行い、野生型(wild)、CCK-1RKO 型、

ヘテロ型に分け、次章の実験に使用した。

第Ⅱ章は、第Ⅰ章のマウスを用いて、飼料の栄養バランスの変化により、肥満や脂質異常症、胆石が引き起こされるか、またそれらの発現に性差が見られるか、検討を行った。戦後の日本人の栄養バランスの変化を再現した飼料、すなわち総カロリーは普通食と同じであるが、たんぱく質と脂質の割合を数%ずつ高く（たんぱく質 22.6%→27.6%、脂肪 5.6%→7.9%）し、代わりに糖質の割合を減らした（炭水化物 53.8%→43.8%）飼料(高たんぱく質-高脂肪食)を実験に使用した。

雌雄 wild および CCK-1RKO 型マウスに、普通食または高たんぱく質-高脂肪食を 3 ヶ月齢から 12 ヶ月齢までの 9 ヶ月間投与し、体重、血漿総コレステロール、血漿中性脂肪を測定し、胆嚢所見を観察した。

雄マウスでは、どちらの遺伝子型でも普通食投与群より高たんぱく質-高脂肪食投与群で有意に体重が重く、血漿脂質も高たんぱく質-高脂肪食投与群が高値であった。雌では、体重、血漿脂質ともに飼料による差はみられなかった。胆嚢所見は、雌雄ともに CCK-1RKO マウスの方が wild マウスよりも、有意に（胆嚢混濁などの）所見有りが多かった。しかし、飼料の違いによる有意の影響は、みとめられなかった。一方、雄 wild マウスでは、普通食では胆嚢に所見が認められなかったが、高たんぱく質-高脂肪食投与群では胆嚢の混濁等の所見が 9 匹中 2 匹に認められた。

食餌誘導性肥満・脂質異常症の発現には性差が見られ、雄マウスの方が雌マウスよりも高率であった。

第Ⅲ章は、Ⅱ章の実験で見られた食餌誘導性肥満・脂質異常症発現における性差のメカニズムを解明するため、性ホルモンに注目した。精巣除去手術を行うことで、精巣(テストステロン)の影響を減らした雄マウスで実験を行った。

精巣除去手術または偽手術を行った雄 CCK-1RKO マウスに高たんぱく質-高脂肪食を3ヶ月齢から12ヶ月齢まで投与し、体重、血漿総コレステロール、血漿中性脂肪を測定し、胆嚢所見を観察した。

精巣除去マウスは偽手術マウスよりも体重・血漿脂質が有意に低値であり、食餌誘導性肥満・脂質異常症の発現が抑制された。胆嚢所見には差がみられなかった。

食餌誘導性肥満・脂質異常症の発現が雌マウスより雄マウスの方が高率である理由には、精巣の働き(テストステロン)が関与していると考えられる。

第Ⅳ章では、糖尿病に、食餌誘導性の発現増加がみられるか、さらに発現増加に精巣の働きが関与するかどうか検討を行った。雄 CCK-1RKO マウスおよび精巣除去雄 CCK-1RKO マウスに高たんぱく質-高脂肪食を投与し、糖尿病判定検査を行った。

高たんぱく質-高脂肪食投与群は、普通食投与群より血糖値が高く、精巣を除去すると血糖値上昇が抑えられる傾向であった。従って、糖尿病にも食餌誘導性の発現増加が見られ、発現には精巣の働きが関与することが示唆された。

本研究にて肥満やメタボリックシンドロームの発現における『生物学的な性差』の重要性について検討した結果、雄マウスの方が、

食餌によって、肥満や脂質代謝異常、糖代謝異常が生じやすいこと、
発現に精巣の働きが関与している可能性がある、という知見が得ら
れた。

Sex difference in diet-induced obesity and metabolic syndrome

The frequency of Japanese subjects with metabolic syndrome and obesity is higher in men than in women. According to a recent report by the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan, daily fat intake has increased markedly in Japanese subjects (from 9% to 25% during the past 50 years). However, the percentage of daily energy intake from dietary fat is not higher in men than in women. It remains unknown why Japanese males are more susceptible to metabolic syndrome than females. In addition, cholesterol cholelithiasis is one of the digestive diseases that has increased most rapidly over the past 50 years due not only to changing lifestyles but also to nutritional status, specifically, a higher intake of fat and protein among the Japanese.

The object of this study was to examine whether a potential sex-related risk factor exists in the manifestations of metabolic syndrome, obesity, and sludge and/or gallstone formation. We examined the effect of a diet containing slightly higher fat and protein compared with a standard diet on body weight, plasma lipid concentrations and the frequency of sludge and/or gallstone formation in wild-type and cholecystokinin 1 receptor knockout (CCK-1RKO) mice.

In Chapter I, we present the characteristics of CCK, CCK receptors (Rs), and CCK-1RKO mice, and describe the method of genotyping the mice. CCK is a classical gastrointestinal hormone and is also a neurotransmitter peptide in the brain. It is secreted from I cells of the small intestine and promotes enzyme secretion from the pancreas, and induces gallbladder contraction and

satiety. Two types of CCK-Rs (CCK-1R, CCK-2R) have been identified. In mice, CCK-1R is distributed in the pancreas and gallbladder, and CCK-2R is distributed primarily in the stomach and brain. Gallbladder contraction is not induced by the administration of CCK in CCK-1RKO mice, and the frequency of sludge and gallstone formation is higher in CCK-1RKO mice than in wild-type mice.

In Chapter II, the effects of the fat- and protein-enriched diet on body weight, plasma lipid concentrations, and the frequency of sludge and/or gallstone formation are examined and compared between wild-type and CCK-1RKO male and female mice. The fat- and protein-enriched diet contains slightly higher protein and fat (7.9% fat and 27.6% protein) compared with a standard diet (CRF-1; 5.6% fat and 22.6% protein) and lower non-fibrous carbohydrates instead. The total calories of the fat- and protein-enriched diet were the same as those of the standard diet.

After weaning, CRF-1 was provided until 3 months of age in all animals. Administration of the fat- and protein-enriched diet was initiated when age-matched CCK-1R(-/-) and wild-type male and female mice reached maturity, at 3 months of age. Administration of CRF-1 was continued in the rest of the animals. Body weight, plasma lipid concentrations, and the frequency of sludge and/or gallstone formation were examined at 12 months of age. The male mice that received the fat- and protein-enriched diet regardless of genotype showed higher body weight and higher plasma lipid concentrations than CRF-1-fed male mice, while no significant differences were observed in female mice. Additionally, wild-type male mice that

received the fat- and protein-enriched diet showed a higher frequency of sludge and/or gallstone formation than CRF-1-fed wild-type male mice. In conclusion, male mice were found to be more susceptible to fat- and protein-enriched diet-induced obesity and hyperlipidemia than female mice.

In Chapter III, we examine the mechanism involved in the obesity and hyperlipidemia observed in male mice (but not in female mice) on a fat- and protein-enriched diet. Male CCK-1RKO mice were castrated at 3 months of age and age-matched sham-operated CCK-1RKO mice were prepared as controls. The fat- and protein-enriched diet was fed until 12 months of age in both groups. Castration slightly decreased body weight and significantly decreased plasma lipid concentrations, but did not affect the frequency of sludge and/or gallstone formation. These results suggest that the testis (testosterone) may be involved in fat- and protein-enriched diet-induced obesity and hyperlipidemia.

In Chapter IV, we examine the involvement of the testis in fat- and protein-enriched diet-induced diabetes. CCK-1RKO male mice with or without castration and fed the fat- and protein-enriched diet underwent an oral glucose tolerance test at 10 months of age. Increases in blood glucose levels were enhanced in the fat- and protein-enriched diet-fed CCK-1R male mice, and castration was found to decrease blood glucose levels. In conclusion, the fat- and protein-enriched diet promoted the induction of diabetes, and the testis may be involved in the manifestation of diabetes.

The results of the present study suggest that a potential sex-related risk factor exists in the manifestation of obesity and metabolic syndrome. Male mice were more susceptible than female mice to obesity, hyperlipemia, and diabetes induced by a fat- and protein-enriched diet. The testis (testosterone) may be involved in the manifestation of these diseases.

目次

序章

1.戦後の日本人の生活環境の変化	1
2.生活習慣病の増加	2
3.コレステロール胆石	5
4.メタボリックシンドローム	6
5.研究の背景と目的	11

第 I 章 コレシストキニン(CCK)とコレシストキニン受容体(CCK-R)およびコレシストキニン 1 受容体ノックアウト(CCK-1RKO)マウス

1.CCK と CCK-R	13
(1) CCK について	13
(2) CCK-1 受容体	14
(3) CCK-1RKO マウス	15
2. CCK-1RKO マウスの繁殖と飼育	17
3. CCK-1RKO マウスの遺伝子型確認	18
(1) Polymerase Chain Reaction(PCR)法について	18
(2)PCR 法の原理	18
(3)電気泳動法	20
(4)方法	21

第Ⅱ章 食餌誘導性肥満・脂質異常症および胆石形成における性差の関与

1.はじめに	27
2.実験方法	27
(1)実験動物	27
(2)飼育環境	27
(3)飼料・水	28
(4)実験群	28
(5)実験プロトコル	29
(6)測定項目	30
(7)統計学的解析	31
3.結果	32
(1)体重	32
(2)血漿総コレステロール	33
(3)血漿中性脂肪	34
(4)胆嚢所見	35
4.考察	36

第Ⅲ章 食餌誘導性肥満・脂質異常症への性ホルモンの影響

1.はじめに	38
2.実験方法	39
(1)実験動物	39
(2)飼育環境	39
(3)飼料・水	40

(4)実験群	40
(5)実験プロトコル	40
(6)Castration 手順	41
(7)測定項目	43
(8)統計学的解析	43
3.結果	44
(1)体重	44
(2)摂食量	44
(3)血漿総コレステロール・血漿中性脂肪	45
(4)胆嚢所見	47
4.考察	48

第IV章 食餌誘導性糖尿病における男性ホルモンの関与

1.はじめに	50
2.実験方法	50
(1)実験動物	50
(2)飼育環境	50
(3)飼料・水	50
(4)実験群	51
(5)実験プロトコル	51
(6)測定項目	51
(7)経口ブドウ糖負荷試験(OGTT)	51
(8)統計学的解析	53
3.結果	54
(1)体重	54

(2)OGTT	55
(3)血漿総コレステロール・血漿中性脂肪	57
(4)胆嚢所見	59
4.考察	60
総括	61
参考文献	63
謝辞	69

序章

1.戦後の日本人の生活環境・栄養状態の変化

終戦直後の日本は食糧難の時代であった。食事内容は米や雑穀を中心としており、栄養バランスは糖質の割合が高く脂質の割合は低かった。当時の国民の栄養学的問題点は摂取エネルギーや各種栄養素が足りないこと(飢餓)であった。

しかし、その後の高度経済成長に伴い、日本人の生活環境は大きく変化した。ファーストフードやスナック菓子などの高脂肪の食品が普及し、脂肪の摂取割合が大きく増加した。

栄養バランスの指標のひとつとして PFC エネルギー比率がある。摂取した栄養素のうち通常エネルギーとなるのは、たんぱく質 (protein P)、脂質 (fat F)、糖質 (carbohydrate C)、の 3 種である。この 3 栄養素の摂取割合を総摂取エネルギーに対する % で示したものが PFC エネルギー比率である。

国民健康栄養調査を始めた当時の昭和 22 年は食糧難の時代であり、糖質からのエネルギー摂取は約 81%、脂質からのエネルギー摂取は約 7%、たんぱく質からエネルギー摂取は約 12% であったが時代が進むにつれ脂質からのエネルギー摂取が増加し、たんぱく質からのエネルギー摂取もやや増加し、代わりに糖質の摂取割合は減少した。平成 22 年の PFC エネルギー比率は糖質が約 59%、脂質約が 26%、たんぱく質が約 15% である (Fig.1)¹⁾。

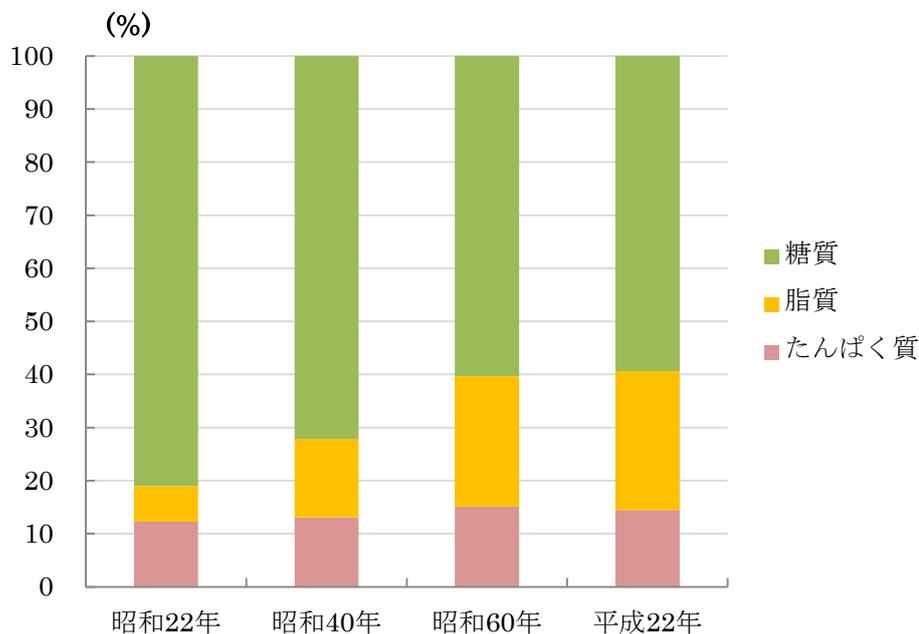


Fig.1 PFC エネルギー比率の推移

図の説明：戦後の日本人の栄養摂取バランスは変化し、脂質の割合が増加し、糖質の割合が減少している。たんぱく質はやや増加した。(厚生労働省 国民健康栄養調査のデータを基にグラフ作成)

さらに、自動車の普及やオフィスで座ったままの労働環境が増えるなどの理由により運動量は減少した。現在は以前とは逆で消費するエネルギーに対し、摂取エネルギーが過多であることが問題となっている。

2.生活習慣病の増加

生活環境の変化に伴い、高度経済成長期に増加した疾患が生活習慣病である。生活習慣病とは、運動不足・偏った食生

活・喫煙・飲酒・ストレスなどの不適切な日常生活積み重ねが発症に関与する病気の総称である。2型糖尿病、脂質異常症、高血圧、虚血性心疾患、脳血管疾患、痛風、骨粗鬆症、歯周病、コレステロール胆石、アルコール性肝障害、一部のガンなどが生活習慣病に当てはまる。

これらの病気は、40歳以降に多いことから、以前は「成人病」と呼ばれていた。しかし、若年層でも発症する例が増えてきたことや、成人病は加齢が主原因であるという誤った認識を与えかねない、という理由から、新たに「生活習慣病」という名称および概念が提唱された。生活習慣病という名称は、正しい生活習慣をすれば防げる病気、という意味が込められている^{2),3)}。

糖尿病は患者数の多い生活習慣病で、平成19年の国民健康・栄養調査によると、「糖尿病が強く疑われる人」の890万人と「糖尿病の可能性を否定できない人」の1,320万人を合わせると、全国に2,210万人いると推定されている。糖尿病は糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、神経障害、動脈硬化など様々な合併症を引き起こし、脳血管疾患、虚血性心疾患(心血管病)など命にかかわる疾患の原因となる³⁾。

日本糖尿病学会の定めた糖尿病の診断基準は以下のとおりである⁴⁾。

糖尿病診断基準

1. 空腹時血糖値 $\geq 126\text{mg/dL}$ 、75g ブドウ糖負荷試験 (OGTT) 2 時間値 $\geq 200\text{mg/dL}$ 、随時血糖値 $\geq 200\text{mg/dL}$ のいずれか (静脈血漿値) が、別の日に行った検査で 2 回以上確認できれば糖尿病と診断してよい。血糖値がこれらの基準値を超えても 1 回だけの場合は糖尿病型と呼ぶ。
2. 糖尿病型を示し、かつ次のいずれかの条件がみたされた場合は、1 回だけの検査でも糖尿病と診断できる。
 - (1) 糖尿病の典型的症状 (口渇、多飲、多尿、体重減少) の存在。
 - (2) ヘモグロビン (Hb) A1c $\geq 6.5\%$ 。
 - (3) 確実な糖尿病網膜症の存在。

糖尿病以外にも動脈硬化を引き起こす生活習慣病は複数あり、脂質異常症や高血圧が代表的である。

脂質異常症は血液中の脂質が多すぎる状態である。脂質異常症には高 LDL コレステロール血症、高中性脂肪血症、低 HDL コレステロール血症、およびこれらを組み合わせたタイプがある。過剰な血中コレステロールは血管壁に蓄積し動脈硬化を引き起こす。HDL は血管壁のコレステロールを回収する働きをもっているため、HDL コレステロールが低すぎる場合も動脈硬化の一因となる。

高血圧は血管に圧力がかかり過ぎている状態であり、血管への負担が動脈硬化へつながる (Table 1)。

Table 1 様々な生活習慣病

病名	診断基準
糖尿病	空腹時血糖値 $\geq 126\text{mg/dL}$ など
脂質異常症	LDL コレステロール $\geq 140\text{mg/dL}$ HDL コレステロール $< 40\text{mg/dL}$ 中性脂肪 $\geq 150\text{mg/dL}$
高血圧	収縮期血圧 $\geq 140\text{mmHg}$ または 拡張期血圧 $\geq 90\text{mmHg}$
高尿酸血症	血清尿酸 $> 7.0\text{mg/dL}$

(日本動脈硬化学会「動脈硬化性疾患予防ガイドライン 2007年版」、日本高血圧学会「高血圧治療ガイドライン」、日本痛風・核酸代謝学会「高尿酸血症・痛風の治療ガイドライン」より)

3. コレステロール胆石

コレステロール胆石は、見落とされがちであるが戦後の食事内容の変化に伴い急増した疾患である。胆石とは胆嚢や胆管に結石ができる病気である。結石の成分によってコレステロール胆石やビリルビン胆石などの種類があり、現在の日本ではコレステロール胆石が多い。

ビリルビン胆石は細菌感染などが原因であるの対し、コレステロール胆石はリスクファクターとして肥満、高コレステロール血症などがあげられる。血液中のコレステロールが過剰だと、コレステロールの排出経路である胆汁中のコレステロールも増加する。過飽和となった胆汁中コレステロールは

結晶となって析出し、コレステロール胆石となる。さらに、胆嚢収縮不全も胆石形成の要因となる^{5),6),7)}。

欧米ではコレステロール胆石の発現に性別による差(性差)があることが知られており、患者の男女比は男性 1 に対し女性 2 程度と言われているが、日本の患者比は男性 1 に対し女性 1.2 程度で性差ははっきりしていない⁸⁾。

4.メタボリックシンドローム

生活習慣病の増加に伴い脳血管疾患、虚血性心疾患による死亡が急増した。虚血性心疾患の対策としてこれまでは、高コレステロール血症の治療が優先され、ある程度効果を上げてきた。しかし、動脈硬化のリスクファクターとしては前述のとおり高コレステロール血症だけではなく、高血糖(インスリン抵抗性)、高血圧、高トリグリセロール血症なども存在する。

1980 年代からの研究で、複数の動脈硬化リスクファクターが一個人に集積している状態は、動脈硬化性疾患の大きな背景を占めることが確認された。複数のリスクファクターが重なった状態を表現する言葉として Reaven のシンドローム X⁹⁾、Kaplan の死の四重奏¹⁰⁾、DeFronzo のインスリン抵抗性症候群¹¹⁾、WHO, National Cholesterol Education Program (NCEP) のメタボリックシンドローム¹²⁾などが提唱された。それぞれベースとして重視する疾患が異なるなど差があるが概念は共通であり、統一した診断基準が検討されている。

また、高コレステロール血症、高血糖、高血圧などのリス

クファクターは肥満を共通の背景として発現することも解明された。肥満を解消することで、高血糖など他の動脈硬化リスクファクターを同時に改善できる。

さらに、肥満のなかでも脂肪が蓄積する部位により動脈硬化リスクが異なり、内臓脂肪型がハイリスクであることがわかっている^{13),14)}。

この基本概念を踏まえ、日本肥満学会、日本動脈硬化学会、日本糖尿病学会、日本高血圧学会、日本循環器学会、日本腎臓病学会、日本血栓止血学会、日本内科学会の8学会が参加したメタボリックシンドローム診断基準委員会が組織され、日本独自の診断基準を作成した。

日本の診断基準の特徴は内臓脂肪型肥満に重点を置いている事である。おなか周りの長さを基準にした内臓脂肪型肥満を必須項目とし、選択項目として脂質異常症、高血圧、高血糖がある。選択項目は個別の病気の診断基準より厳しくなっており「ちょっと高め」という状態の人もメタボリックシンドロームに含まれるようになっている (Fig.2)。

必須項目と選択項目2つ以上を満たすものをメタボリックシンドロームとし、必須項目のみ、または必須項目と選択項目1つを満たす場合をメタボリックシンドローム予備軍とする^{15),16)}。

メタボリックシンドロームの診断基準

必須項目

内臓脂肪蓄積
ウエスト周囲径 男性 $\geq 85\text{cm}$
女性 $\geq 90\text{cm}$
(内臓脂肪面積 男女とも $\geq 100\text{cm}^2$ に相当)



選択項目

これらの項目のうち2項目以上

高トリグリセライド血症 $\geq 150\text{mg/dL}$
かつ/または
低HDLコレステロール血症 $< 40\text{mg/dL}$

収縮期 (最大) 血圧 $\geq 130\text{mmHg}$
かつ/または
拡張期 (最小) 血圧 $\geq 85\text{mmHg}$

空腹時高血糖 $\geq 110\text{mg/dL}$

- *CTスキャンなどで内臓脂肪量測定を行うことが望ましい。
- *ウエスト周囲径は立ったまま、軽く息をはいた状態でへそまわりを測定する。
- *高トリグリセライド血症、低HDLコレステロール血症、高血圧、糖尿病に対する薬剤治療を受けている場合は、それぞれの項目に含める。

日本内科学会雑誌 94(4),188,2005

Fig.2 日本のメタボリックシンドローム診断基準

メタボリックシンドロームの日本での診断基準が発表され、統計をとり始めた平成16年度からの基準該当者数を Fig.3 に示した。対策や宣伝活動が行われているにも関わらず、該当者数は増加傾向で H16 年度は 28.2%、H23 年度は 31.1% となっている。

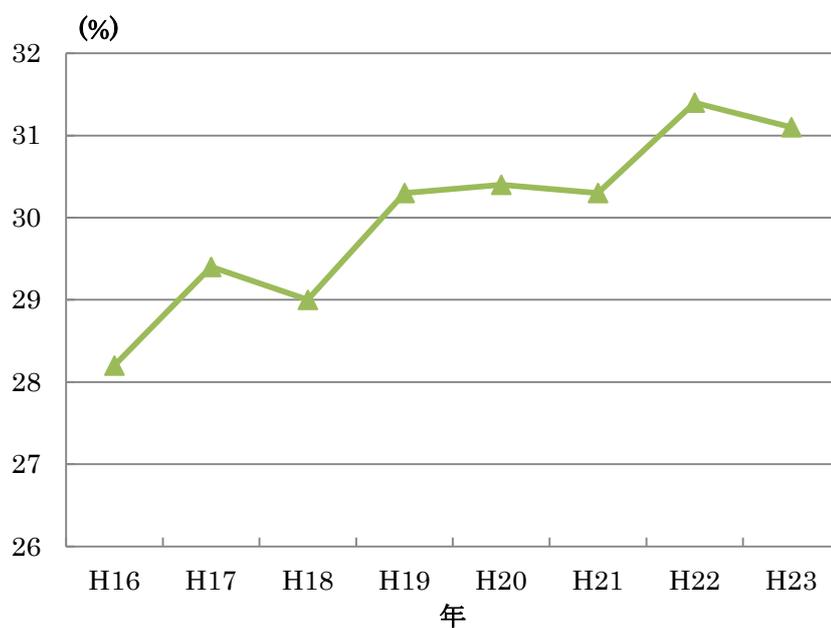


Fig.3 メタボリックシンドローム該当者割合の推移(厚生労働省 国民健康栄養調査のデータを基にグラフ作成)

図の説明：メタボリックシンドローム該当者(予備軍含む)割合は増加している。

しかし、男女別にメタボリックシンドローム該当者数をみると違う状況がみられた。Fig.4は男女別メタボリックシンドローム該当割合推移のグラフである。男女で差があるように感じられ、女性該当者割合は殆ど増加していないのに対し、男性該当者割合は明らかに増加している。

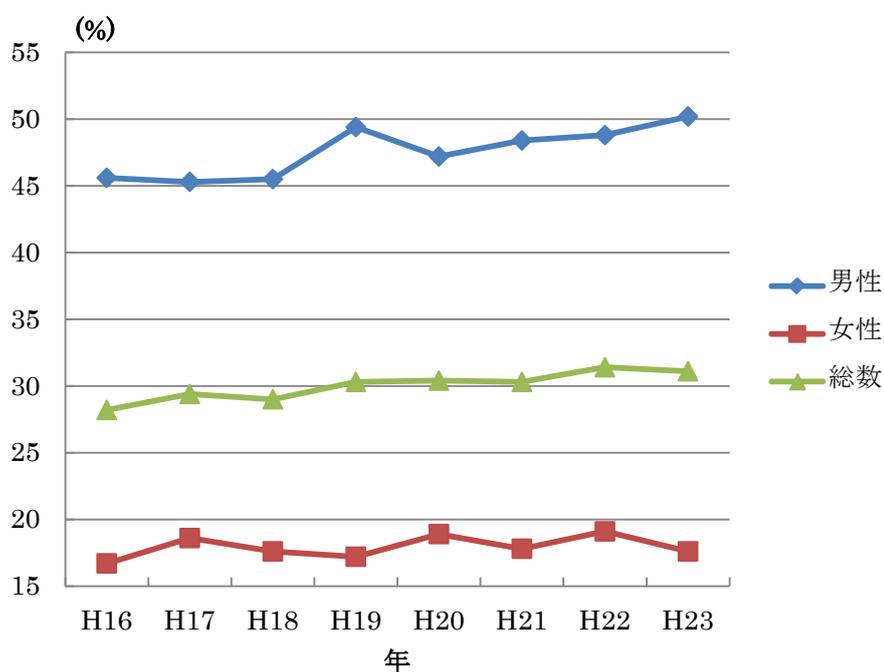


Fig.4 男女別メタボリックシンドローム該当者の推移(厚生労働省 国民健康栄養調査のデータを基にグラフ作成)

図の説明：男性の方が女性よりメタボリックシンドローム該当者割合が高い。また、女性該当者割合は変化していないのに対し、男性該当者割合は増加している。

BMI25以上の肥満者割合についても、Fig.5のように女性の肥満者の割合はそれほど変化していないが、男性の肥満者の割合は増加している。

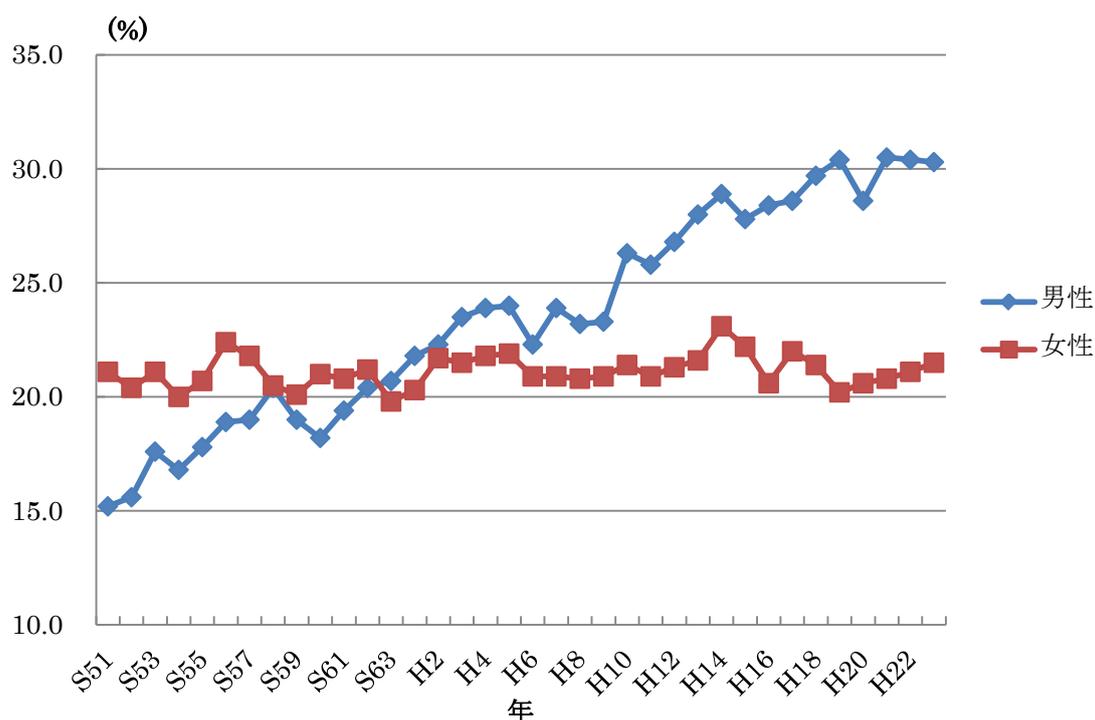


Fig.5 男女別肥満者割合の推移(厚生労働省 国民健康栄養調査のデータを基にグラフ作成)

図の説明：女性の肥満者の割合は変化していないが、男性の肥満者の割合は増加している。

5.研究の背景と目的

肥満やメタボリックシンドローム該当者割合に男女差が存在する理由は、男性の方が外食や飲酒の機会が多い、運動をする時間がないなど男性の置かれる環境や生活パターンによるものと考えられていた。しかし近年、仕事をもつ女性の割

合も高くなり、生活パターンの違いだけでは性差の存在する理由を説明しきれない。

そこで、肥満やメタボリックシンドロームの発現における『生物学的な性差』の重要性について検討することを計画した。

また、肥満と関わりをもち、戦後発生頻度が増加したコレステロール胆石形成に対しても、あわせて検討することにした。

肥満やメタボリックシンドローム、コレステロール胆石は長期間の生活習慣により形成されるため、ヒトを対象とした研究では非常に長い追跡が必要となる。さらに、ヒトの生活習慣は多様で個人差が大きく、性別のみを比較できるような条件を整えるには多くの労力が必要であり、被験者への負担も大きい。普段の生活を送っている人間についてのデータ収集および解析は重要であるが、困難である。

そこで、実験動物(マウス)を使用した実験を行うこととした。マウスは、飼育室内で統一した条件で飼育でき、寿命も2~3年程度のため、ヒトよりはるかに短い期間で観察が可能である。

マウスは当研究室で繁殖・飼育している C57BL という系統のマウスを背景に持つコレシストキニン 1 受容体ノックアウト (CCK-1RKO) マウスと野生型 (wild) マウス、ヘテロ型マウスを使用することにした。

次章で CCK および CCK 受容体、CCK-1RKO マウスについて記述する。

第 I 章 コレシストキニン(CCK)とコレシストキニン受容体(CCK-R)およびコレシストキニン 1 受容体ノックアウト(CCK-1RKO)マウス

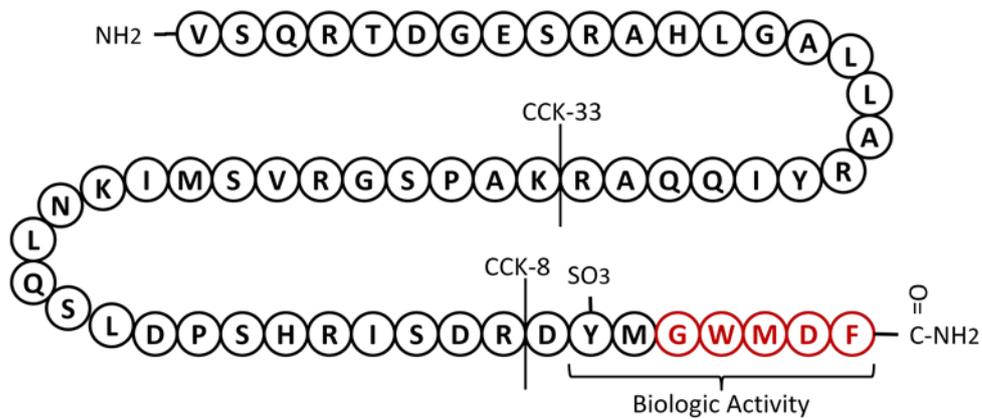
1.CCK と CCK-R

(1) CCK について

CCK とはペプチドホルモンの一種で、古典的な消化管ホルモンである。神経系にも CCK は存在し、神経ペプチドとしての働きもある。CCK の遺伝子はヒトでは 3 番染色体に存在し、115 アミノ酸のプレプロホルモンから 58、33、8 アミノ酸にプロセッシングされる。Fig.6¹⁷⁾は CCK とガストリンのアミノ酸配列の比較である。C 端の 5 つのアミノ酸はガストリンと同一である。

消化管において CCK は上部小腸の I 細胞から分泌される。CCK の作用は膵臓からの消化酵素分泌促進、胆嚢を収縮させ胆汁を分泌させる、脳に満腹感を伝える等である¹⁸⁾。

CCK-58 構造



ガストリン-17-II 構造



Fig.6 CCK とガストリンのアミノ酸配列

(2) CCK-1 受容体 (CCK-1R)

CCK の受容体には 1 と 2 の 2 種類が知られており、マウスでは CCK-1R は膵臓・胆嚢などに存在し、CCK-2R は主に胃や脳に存在する。また、CCK-2R はガストリン受容体と同一の遺伝子に由来するものである¹⁹⁾。

CCK-1R の遺伝子配列はマウスでは 6 番染色体²⁰⁾、ラットでは 14 番染色体²¹⁾、ヒトでは 4 番染色体に存在し²²⁾、いずれも 5 つの exon, 4 つの intron からなる (Fig.7, Fig.8)¹⁷⁾。

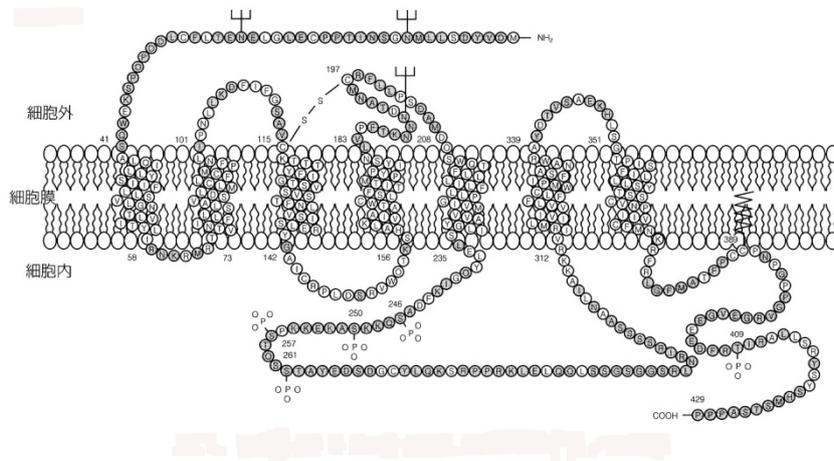


Fig.7 ヒト CCK-1R 構造

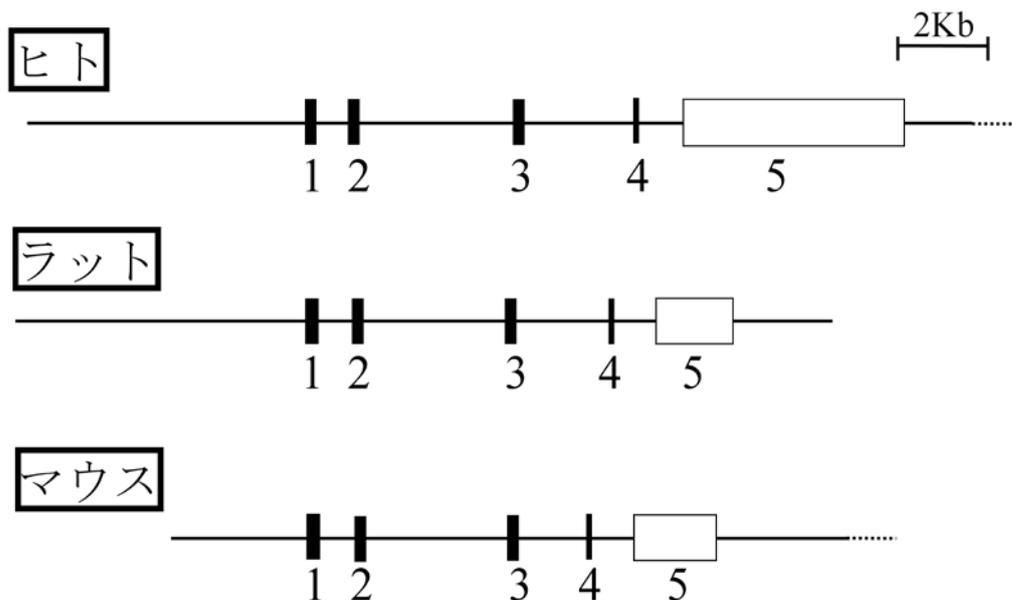


Fig.8 CCK-1R 遺伝子の構造比較

(3) CCK-1RKO マウス

本研究で使用する CCK-1RKO マウスは遺伝子操作により、CCK-1R を作る遺伝子配列の一部を LacZ 遺伝子配列に置き替えている²³⁾。このマウスでは CCK-1R が存在しないため、CCK

の働きがあらわれず、胆嚢収縮不全がみられ、12ヶ月齢で約30%に胆石が発現する。(6ヶ月齢では胆石や胆砂は発現しない。) ²⁴⁾

CCK-1RKO マウスは正常なマウスと同様に成長、繁殖可能で、特に致命的な異常は起こさず、外見の特徴もない (Fig.9)。また、普通食を与えている限りは、肥満や脂質異常症など、胆石以外の疾患の発現率も正常なマウスと差がない ²³⁾。



Fig.9 当研究室のマウス

実験には正常な遺伝子を持っている野生型 (wild) と CCK-1RKO 型を使用した。第II章に述べる実験では、ヘテロ同士を掛け合わせて生まれたマウスに遺伝子型確認を行い、wild と CCK-1RKO 型に分けたものを用いた。

2. CCK-1RKO マウスの繁殖と飼育

実験に使用したマウスは、東京家政大学 5 号館動物飼育室にて飼育した。飼育環境は、室温 $23^{\circ}\text{C} \pm 10\%$ 、湿度 $55\% \pm 10\%$ 、8:00~20:00 が明期の 12 時間明暗サイクルとした。木製滅菌フレーク(オリエンタル酵母社製 床敷きホワイトフレーク 92011)を敷いたプラスチック製ケージにて 1~5 匹/ケージで飼育した (Fig.10)。



Fig.10 マウス飼育ケージ

実験に使用するまでの飼料は CRF-1(オリエンタル酵母社)を投与し、飲料水は水道水を使用した。

繁殖については 12 週齢以降のヘテロ型マウスを雄 1 匹、雌 4 匹を同一ケージに入れ飼育した。妊娠が確認された雌は個別のケージに移した。出産後 4 週間で仔マウスを性別ごとに

母親と別のケージに移し、離乳させた。この際、必要のある個体に対しては血液を採取し、遺伝子型確認を行った。

3. CCK-1RKO マウスの遺伝子型確認(タイピング)

(1) Polymerase Chain Reaction(PCR)法について

PCR 法とは特定の DNA 配列のみを大量に複製する技術である。通常の状態では微量なため検出できない DNA を、PCR 法により検出可能な量に増やすことができる。好熱菌 (*Thermophilus aquaticus*)より単離された、耐熱性の DNA ポリメラーゼの導入により、幅広く応用されるようになった。

PCR による遺伝子検査では本研究のような実験動物の遺伝子型確認のほか、個人の体質をある程度推測する、犯罪捜査などの DNA 鑑定、遺伝子組み換え食物の検出、病原菌の特定など広くに用いられている^{25),26)}。

(2)PCR 法の原理

PCR の反応は 3 つの段階に分けられる。各段階は温度を変化させることで進行していく。

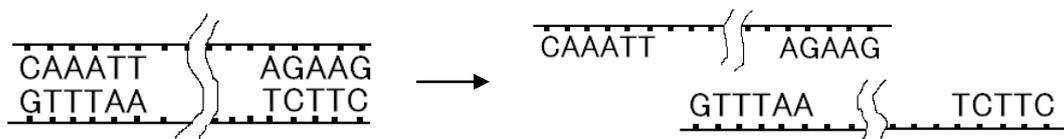
段階 1(98℃ 付近): DNA に熱を加え、2 本鎖を 1 本鎖に分離させる。DNA の塩基対は水素結合によるため、加熱により容易に切ることが出来る。

段階 2(55~60℃): 増やしたい塩基配列を認識するプライマーが DNA と結合する。プライマーの配列を変えることで、増幅させる DNA 配列を変えることができる。プライマーに合う DNA 配列がなければ増えることは無い。

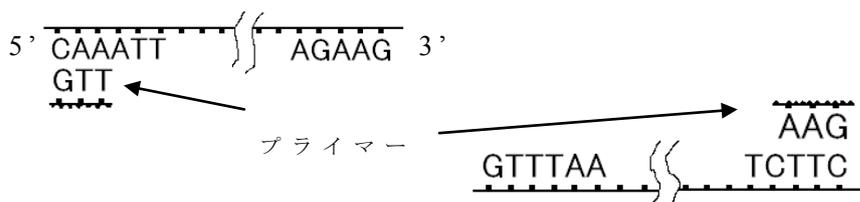
段階 3(73℃ 付近) : プライマーが結合した部分から、DNA ポリメラーゼが DNA 鎖を伸ばす。この段階が完了した時点で、目標 DNA 配列量は 2 倍になる。

このサイクルを n 回繰り返すと元の DNA が理論上 2^n 倍に増幅される。

ステップ 1 : DNA の 2 本鎖を 1 本鎖にほぐす。(98℃ 付近)



ステップ 2 : 増やしたい塩基配列を認識するプライマーが DNA と結合する。(55~60℃)



ステップ 3 : プライマーが結合した部分から、DNA ポリメラーゼが DNA 鎖を伸ばす。(72℃ 付近)

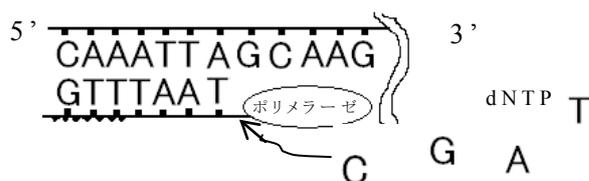


Fig.11 PCR 原理模式図

[PCRに必要な試料・試薬・機器]

- ・ 増やす元となる DNA
- ・ プライマー・・・DNA の増やしたい部分に結合する短い断片。
5'側と 3'側の 2 種を 1 組とする。
- ・ dNTP・・・アデニン、グアニン、シトシン、チミンの混合物。
増やす塩基配列の材料。
- ・ DNA ポリメラーゼ・・・複製する DNA 鎖を伸ばす酵素。高温
で失活しない特殊なもの。
- ・ サーマルサイクラー・・・PCR 反応の段階にあわせて温度を
変化させる機械。

(3)電気泳動法

PCR により目的とする DNA 配列が増幅されたか(存在するか)確認する方法として電気泳動がよく用いられる。

電気泳動とは電荷を持つ物体を表面電荷や分子量等の性質により分離する方法である。

アガロースゲルやポリアクリルアミドゲルなど網目状の構造をもつ担体に試料の DNA をのせ電場の中に置くと、DNA は-の電荷をもつため+極側へ移動していく。その際、担体の網目に移動を阻害されることで、分子量の大きいものは移動が遅く、分子量の小さいものは速く移動する。その結果、分子量ごとに DNA が分離されてゲルの中に存在するようになる。

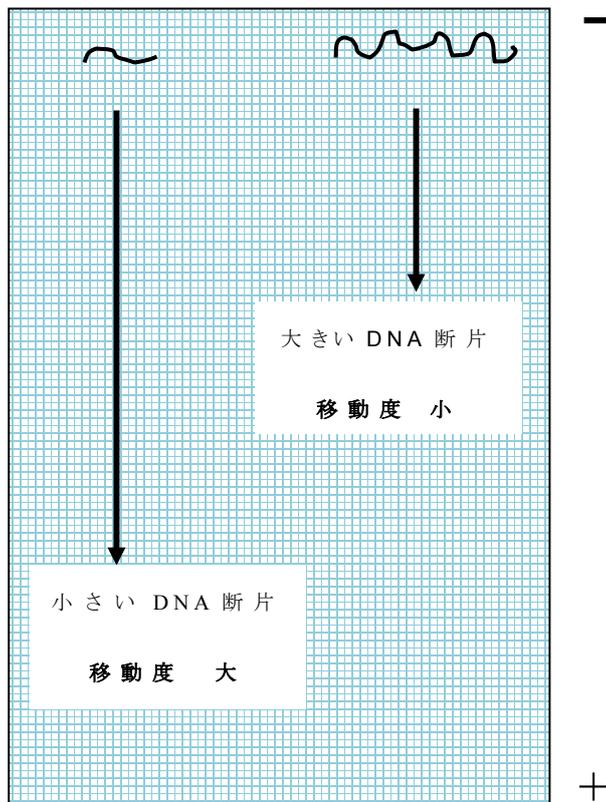


Fig.12 電気泳動模式図

エチジウムブロマイドなど DNA と結合して発色する試薬にて染色を行うことで、ゲル中のどの位置に DNA が存在するか目視できるようになる。

PCR で増幅させた DNA の大きさがわかっているので、所定の位置に DNA があるか確認すれば、目的の DNA が増幅されたと判断できる。

(4)方法

1)試料の調製

試料は血液を使用した。通常、血液や組織には酵素反応を阻害する物質が含まれているため、血液中 DNA を PCR に使用する際は、DNA を抽出する作業が必要である。しかし、本研究では PCR 阻害物質を抑制する作用のある Ampdirect® Plus(株式会社島津製作所製 241-08816)という緩衝液を使用することで、抽出を省いている。

生後 4 週齢のマウスの尾の先端をメスで切り、血液を少量マイクロチューブに採取し、50 μ L の滅菌水に溶解させ、試料液とした。

2)試薬・機器

プライマーは operon 社に製作を依頼した。野生型の CCK-1R 遺伝子配列検出系には 5'側として CCKA1 と 3'側として CCKA2 と命名したプライマーを使用した。組み換え遺伝子配列検出系には 5'側として CCKA1 と 3'側として LacZ と命名したプライマーを使用した。LacZ とは遺伝子配列に付けられた名前の一つで細菌の持つ酵素を作る遺伝子配列に由来している。CCK-1RKO 型マウスは、CCK-1R 遺伝子の一部を LacZ に置き換えられている。置き換えられた LacZ 自体は特に生理的作用を持たず、Cck-1R が発現できないようになっている。

また、遺伝子型確認の際は、LacZ 配列の存在の有無により、組み換え遺伝子が存在することを確認できる。

プライマーは 2pmol/mL に滅菌蒸留水(株式会社ニッポンジ

ーン社製 316-90101)で希釈して使用した。プライマーの配列は Fig.13 のとおりである

DNA ポリメラーゼは Nova TaqTM Hot Start DNA Polymerase (Novagen 社製 71091-3)を使用した。

dNTP は Ampdirect Plus に含まれている。

サーマルサイクラーは Applied Biosystem 社製 Gene AmpPCR System9700)を使用した。

CCKA1
AGT GAG CCA TTC ACC AGC TCG CCA G
CCKA2
GTT GCT ATA TCT CCC TTA CCT TGG TAG
LacZ
CGC TAT TAC GCC AGC TGG CGA AAG G

Fig.13 プライマー配列

3)PCR 操作

滅菌した 0.2mL チューブに以下の試薬をマイクロピペッターで入れた。

プライマー CCKA1	2.5 μ L / 検体
プライマー CCKA2 または LacZ	2.5 μ L / 検体
2 \times Ampdirect Plus	10 μ L / 検体
DNA ポリメラーゼ	0.1 μ L / 検体
試料液	4.9 μ L / 検体

タッピングによる混合、スピンドウン後サーマルサイクラーにかけた。

サーマルサイクラーの温度変化プログラムは以下のとおりである。

94°C	5 分	
94°C	30 秒	} 35 サイクル
55°C	30 秒	
72°C	60 秒	
72°C	3 分	
4°C	で保存	

4)電気泳動

TBE 緩衝液(BIO RAD 社製 10 \times TBE Buffer161-0733 を脱イオン水で 10 倍希釈したもの)にアガロース(タカラバイオ株式会社製 5003)を 3% 濃度で加熱溶解させた。専用の容器(コスモバイオ株式会社製 Mupid-21)に流し入れ室温で凝固させ

アガロースゲルを作製した。

アガロースゲルを電気泳動槽(コスモバイオ株式会社製 Mupid-21)にセットし、TBE 緩衝液を注ぎ入れた。Loading buffer(TaKaRa 製)1 μ L、PCR 産物試料 3 μ L、脱イオン水 7 μ L を混合し、ゲル中の穴に注入し 100V で 40 分泳動した。同時に、DNA 分子量マーカー(Roche 製 13184421)を泳動し分子量の目安とした。

5)染色・撮影

TBE 緩衝液にエチジウムブロマイド(BIO-RAD 製 161-0433)を添加し、アガロースゲルを浸し 20 分間染色した。

イルミネーター(株式会社アドバンス製 Mupid-Scope WD Transilluminator 100502)にゲルをのせ紫外線を照射し DNA を発光させ、写真を撮影した。

6)判定

Fig.14 は PCR で得られた結果の一例である。左から DNA 分子量マーカー、検体 1 の CCK-1R 遺伝子配列検出系、検体 2 の野 CCK-1R 遺伝子配列検出系、検体 3 の CCK-1R 遺伝子配列検出系、マーカー、検体 1 の組み換え遺伝子配列(LacZ)検出系、検体 2 の LacZ 検出系、検体 3 の LacZ 検出系、マーカーという順に並んでいる。

マーカーの DNA の長さは写真上から 587、540、504、458、434、267、234、213、192、184、124/123、104、89/80 bp となっている。250bp 付近に光るバンドが確認できる検体を+、

できないものを-とした。

検体 1 は CCK-1R 遺伝子配列検出系の結果が+、LacZ 検出系の結果が-なので遺伝子型判定は wild である。検体 2 は CCK-1R 遺伝子配列検出系の結果が-、LacZ 検出系の結果が+なので CCK-1RKO 型と判定し、検体 3 はどちらも+なのでヘテロ型である。

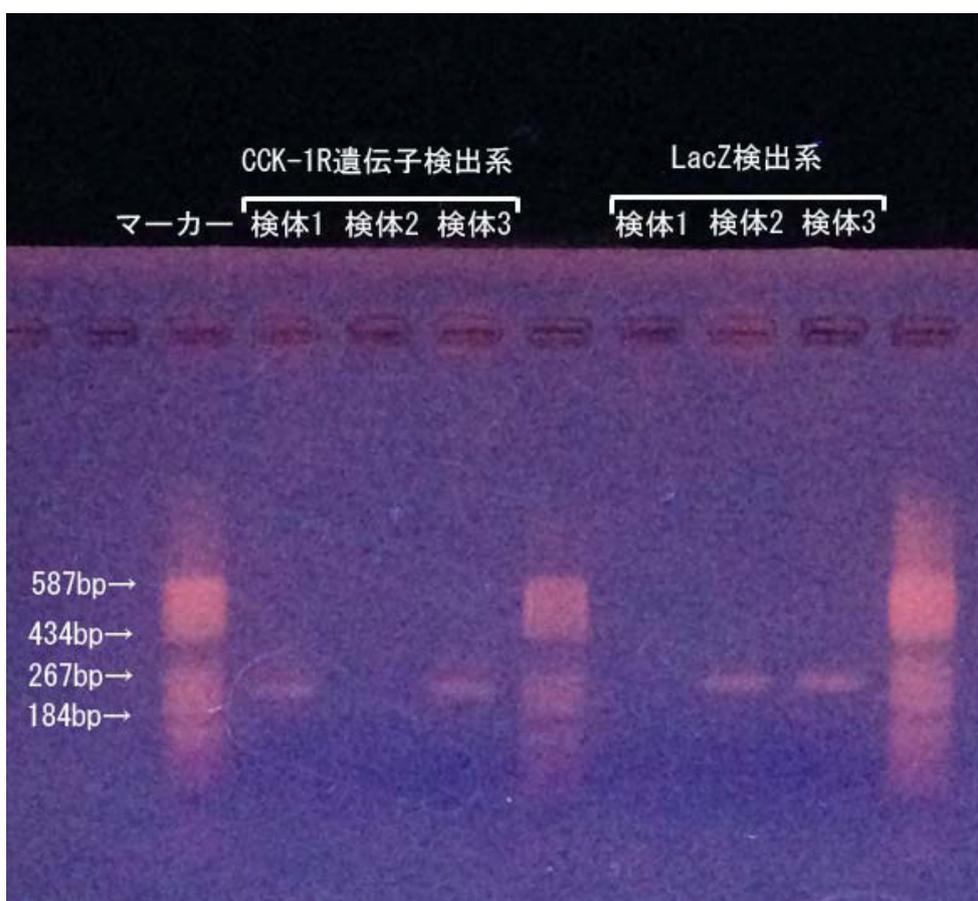


Fig.14 測定結果一例

第Ⅱ章 マウスにおける食餌誘導性肥満・脂質異常症および胆石形成における性差の関与

1.はじめに

日本人の肥満・メタボリックシンドローム該当者割合に性差が存在する(男性の方が高率である)理由を解明するため、マウスに栄養バランスの異なる飼料を与え、肥満・脂質異常症の発症に性差があらわれるか確認する実験を行った。

飼料は当研究室で通常の飼育に使用している CRF-1 を普通食とした。日本人の栄養バランスの変化を再現した飼料として、OA2(日本クレア株式会社製)を使用した。OA2 は CRF-1 と比較し、カロリーは同じであるが、脂肪とたんぱく質の割合が数%ずつ高く、代わりに糖質の割合が低い。

また、コレステロール胆石形成においても、発現率に性差が現れるか観察することとした。

2.実験方法

(1)実験動物

第Ⅰ章で説明した CCK-1R 遺伝子ノックアウトヘテロ型マウス同士を交配させて得た、wild および CCK-1RKO 型マウスを使用した。

(2)飼育環境

室温 23℃ ±10%、湿度 55% ±10%、8:00~20:00 が明期の 12 時間明暗サイクルとした。

(3)飼料・水

普通食として CRF-1、高たんぱく質-高脂肪食として OA2 を使用した (Table 2)。飲料水は水道水を使用した。飲料、飼料ともに自由摂食とした。

Table 2 飼料組成 (100g 当たり)

項目	普通食 (CRF-1)	高たんぱく質-高脂肪食 (OA2)
水分 (g)	8.1	9
たんぱく質 (g)	22.6	<u>27.6</u>
脂質 (g)	5.6	<u>7.9</u>
ミネラル (g)	6.6	7.2
繊維 (g)	3.3	4.5
炭水化物 (g)	53.8	<u>43.8</u>
エネルギー (kcal)	356	356

CRF-1 は日本チャールズ・リバー (株)、OA2 は日本クレア (株) 発表のもの

(4)実験群

マウスのグループは・性別・飼料・遺伝子型でわけた。飼料は普通食 (CRF-1)、高たんぱく質-高脂肪食 (OA2) の 2 種とし、遺伝子型が wild と CCK-1RKO 型の 2 種として、計 8 群とした (Table 3)。

Table 3 第 II 章 実験群

性別	遺伝子型	飼料
雄	wild	CRF-1(普通食)
雄	wild	OA-2(高たんぱく質-高脂肪食)
雄	CCK-1RKO	CRF-1
雄	CCK-1RKO	OA-2
雌	wild	CRF-1
雌	wild	OA-2
雌	CCK-1RKO	CRF-1
雌	CCK-1RKO	OA-2

(5) 実験プロトコル

3ヶ月齢まですべての群で CRF-1 を投与し、以降は該当飼料を投与した。12ヶ月齢で絶食はせず断頭と殺し、血液の採取と胆嚢の観察を行った。

(6)測定項目

1)体重

と殺時に測定した。

2)血漿総コレステロール

と殺時に採血した血液に EDTA 添加後、4℃、3000rpm で 15 分遠心分離し得た血漿を測定に用いた。コレステロール脱水素酵素(UV)法により測定した。

3)血漿中性脂肪

血漿総コレステロールと同様、と殺時に採血した血液に EDTA 添加後、4℃、3000rpm で 15 分遠心分離し得た血漿を測定に用いた。酵素法(GK-GPO・遊離グリセロール消去)にて測定した。

4)胆嚢所見

と殺時に胆嚢を観察し、内容物に濁りがあるものや固形物があるものを所見ありとした。Fig.15 は胆嚢所見のある個体の一例である。中に胆石がすけて見える。Fig.16 は同じ胆嚢を切り、内容物を摘出したものである。○で囲まれた部分が胆石である。



Fig.15 摘出した胆嚢



Fig.16 胆嚢内の胆石。○で囲われた部分に胆石が確認できる。

(7)統計学的解析

体重、血漿総コレステロール、中性脂肪については一元配置分散分析後、フィッシャーの最小有意差法を用いて有意差の判定をした。

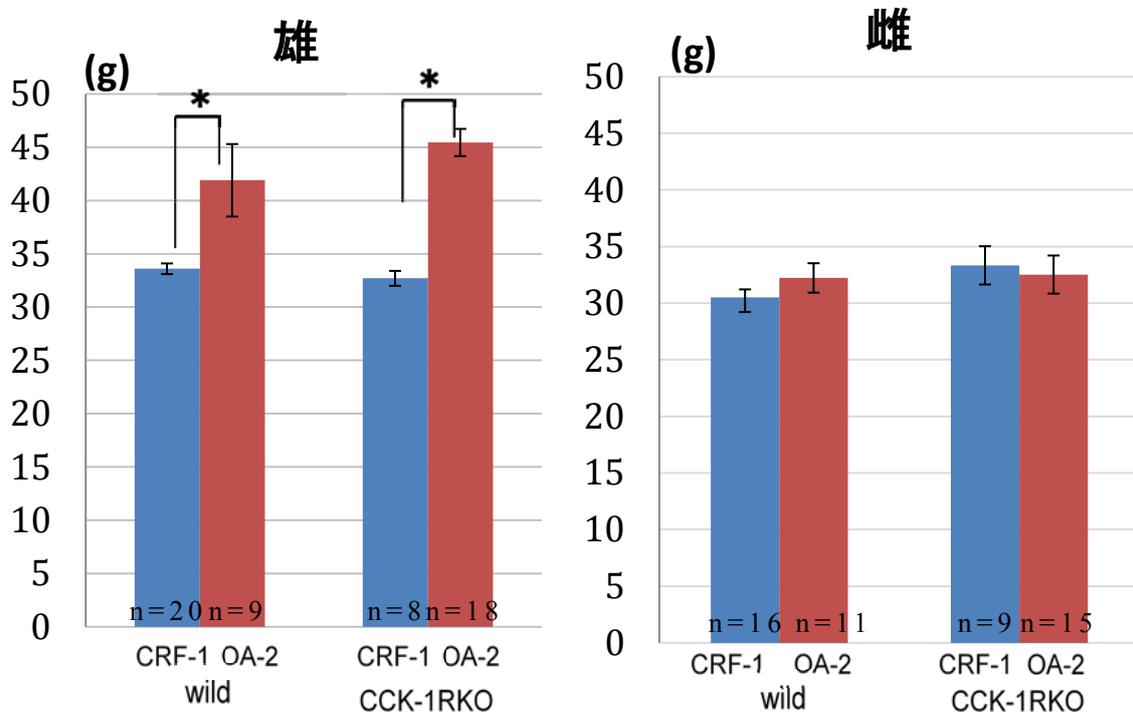
胆石所見の有意差については χ^2 検定を用いた。

3.結果

(1)体重

雄の wild、CCK-1RKO 型ともに CRF-1 投与群より OA2 投与群で有意に体重が重かった。

雄マウスで飼料による体重差があったのに対し、雌ではどちらの遺伝子型でも飼料による体重の差は見られなかった (Fig.17)。



* :有意差あり $p < 0.05$

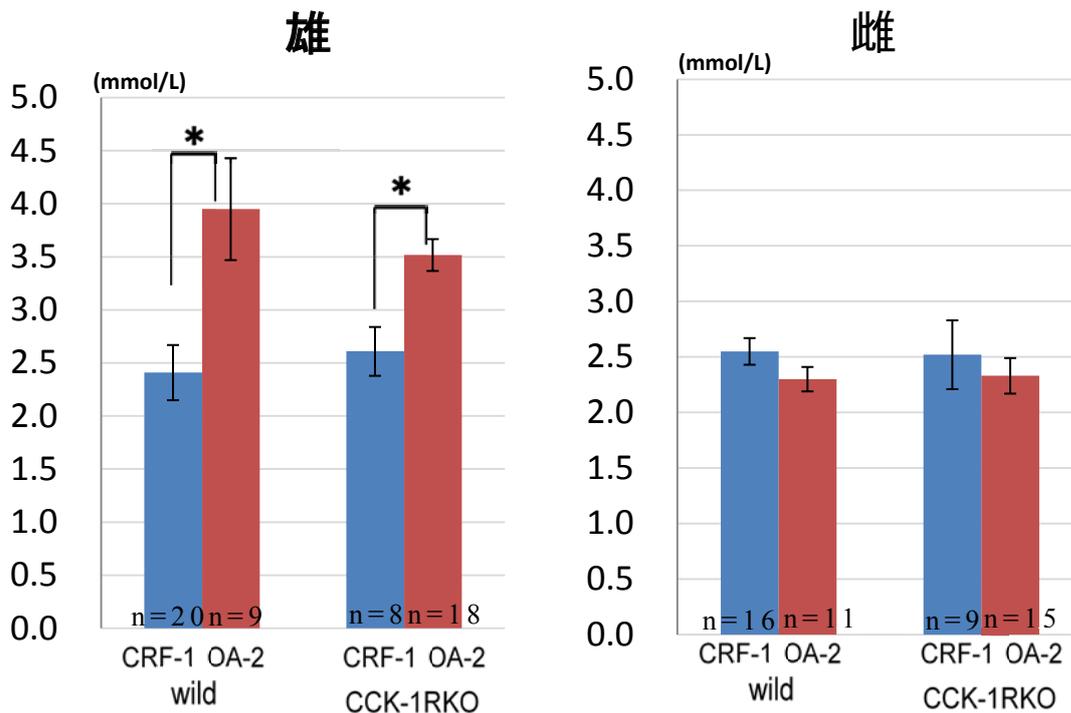
Fig.17 と殺時体重

図の説明：雄マウスでは wild、CCK-1RKO 型ともに CRF-1 投与群より OA2 投与群で体重が重くなった。雌マウスでは各群に有意差はみられなかった。

(2) 血漿総コレステロール

血漿総コレステロールも体重と傾向が似ており、wild、CCK-1RKO型ともにCRF-1投与群よりもOA2投与群で有意に高い値をしめした。

雌では各群に差は見られなかった (Fig.18)。



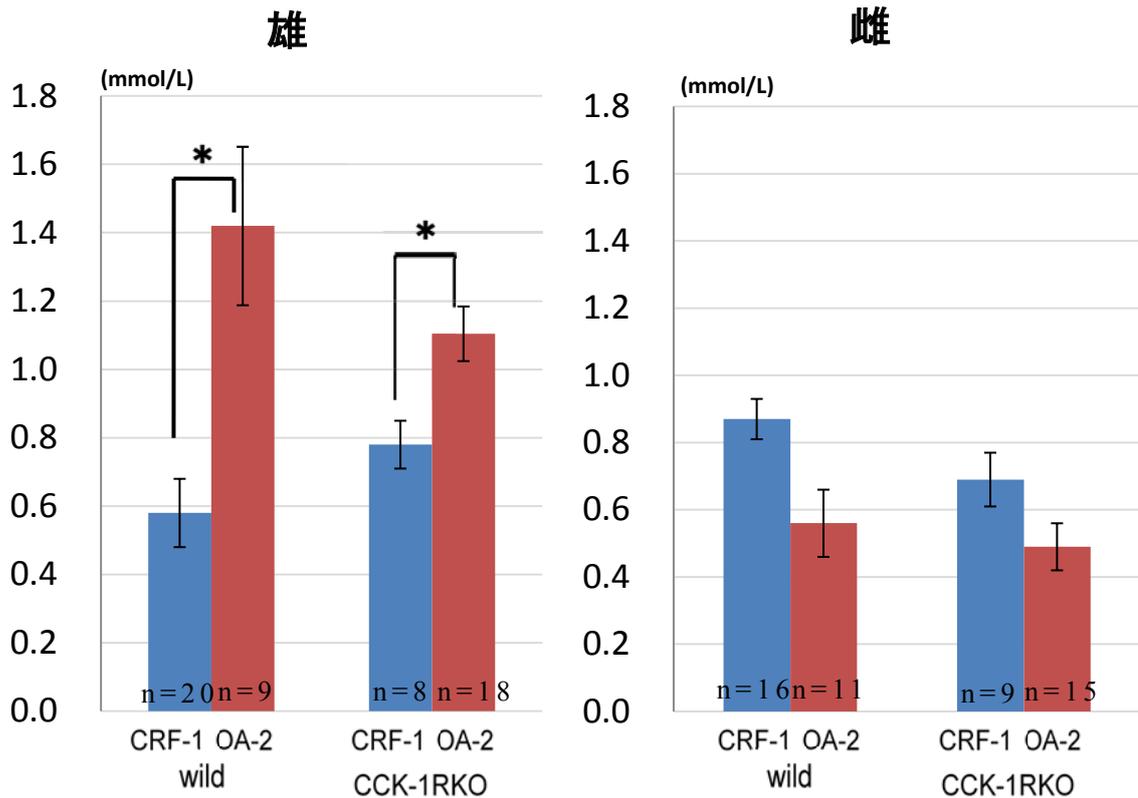
* : 有意差あり $p < 0.05$

Fig.18 血漿総コレステロール

図の説明：雄マウスでは wild、CCK-1RKO 型ともに CRF-1 投与群より OA2 投与群で血漿総コレステロールが高値であった。雌マウスでは各群に有意差はみられなかった。

(3) 血漿中性脂肪

血漿中性脂肪も同様に wild、CCK-1RKO 型ともに CRF-1 投与群よりも OA2 投与群で有意に高い値を示し、雌では各群に差は見られなかった (Fig.19)。



* : 有意差あり $p < 0.05$

Fig.19 血漿中性脂肪

図の説明：雄マウスでは wild、CCK-1RKO 型ともに CRF-1 投与群より OA2 投与群で血漿中性脂肪が高値であった。雌マウスでは各群に有意差はみられなかった。

(4)胆嚢所見

胆嚢所見について遺伝子型で比較すると、wild マウスより CCK-1RKO 型マウスの方が所見ありの割合が有意に多かった。遺伝子型による有意差は雄雌両方のマウスでみられた。

飼料の影響について、wild の雄マウスは、CRF-1 投与群では胆嚢所見のある個体が見られなかったのに対し、OA2 投与群では胆嚢所見が出現した。CCK-1RKO 型マウスでは、CRF-1 投与群よりも OA2 投与群で所見ありの頻度が高くなった。

雌マウスでは飼料による胆嚢所見の差はみられなかった。

(Table 4)

Table 4 胆嚢所見

性別	遺伝子型	CRF-1	OA2
雄	wild	0/20	2/9 †
雄	CCK-1RKO	3/8 *	13/18 *
雌	wild	1/16	1/11
雌	CCK-1RKO	4/9 *	9/15 *

所見あり/全体数 胆嚢に濁りのあるものを所見ありとした。

*:同性、同飼料の wild 群と有意差あり。

†:同性、同遺伝子型の CRF-1 投与群と有意差あり。

表の説明：雄雌ともに wild 群より、CCK-1RKO 型群の方が胆嚢所見ありの個体が高率であった。雄の wild 群では CRF-1 投与群より OA2 投与群で所見ありの個体が高率であった。

雌マウスでは投与飼料による有意差はみられなかった。

4. 考察

雄マウスでは wild、CCK-1RKO 型どちらの遺伝子型においても、OA2 投与群が CRF-1 投与群より体重が重くなった。OA2 の総カロリーは CRF-1 と同じであることから、雄マウスでは栄養バランスの変化により肥満が誘発されたことが示唆される。本章の実験では摂食量を測定していないため、OA2 投与群で摂食量が多いために CRF-1 投与群より体重が重くなった可能性も考えられる。次章の実験で確認することにした。また、6 ヶ月齢の段階では体重の増加や、血中脂質の増加は有意でないと過去に観察しているため、本実験は 12 ヶ月齢でのと殺とした²⁷⁾。

雄マウスの結果に対し、雌マウスでは飼料の栄養バランスの相違によって体重増加に差は表れなかった。

血漿総コレステロールおよび血漿中性脂肪でも体重変化と同様の傾向がみられた。雄マウスでは 2 つの遺伝子型ともに OA2 投与群で CRF-1 投与群より高値となった。しかし、雌マウスでは血漿コレステロールおよび血漿中性脂肪値に投与飼料による差が見られず、食餌誘導性脂質異常症発現にも性差があることが確認された。

胆嚢所見については、CCK-1RKO 型マウスは胆石が高率で発生することが報告されている²⁴⁾。今回の実験でも雄雌ともに wild マウスよりも CCK-1RKO 型マウスで胆嚢所見がある個体が有意に多かった。

雄の wild マウスの CRF-1 投与群では、胆嚢所見のある個体はみられなかったが、雄の wild マウスの、OA2 投与群は胆嚢

所見のある個体が現れた。肥満や脂質異常症が胆石出現に影響したのではないかと考えられる。

雌ではどちらの遺伝子型も飼料の違いによる胆嚢所見発現率に差はみられなかった。

以上のことから、食餌誘導性の肥満・脂質異常症・胆嚢所見の発現には性差が見られた。

次章ではこの性差のメカニズムを解明するため、男性ホルモンの影響に注目した実験を行うこととした。

第Ⅲ章 食餌誘導性肥満・脂質異常症への性ホルモンの影響

1.はじめに

第Ⅱ章の実験で食餌誘導性肥満・脂質異常症の発現頻度に性差があることがわかったので、そのメカニズムを調べるため、男性ホルモンに着目した。

男性ホルモンは主にテストステロンという物質で、精巣で作られる。男性らしい体つきの形成や、精子形成を促進する働きがある (Fig.20)。

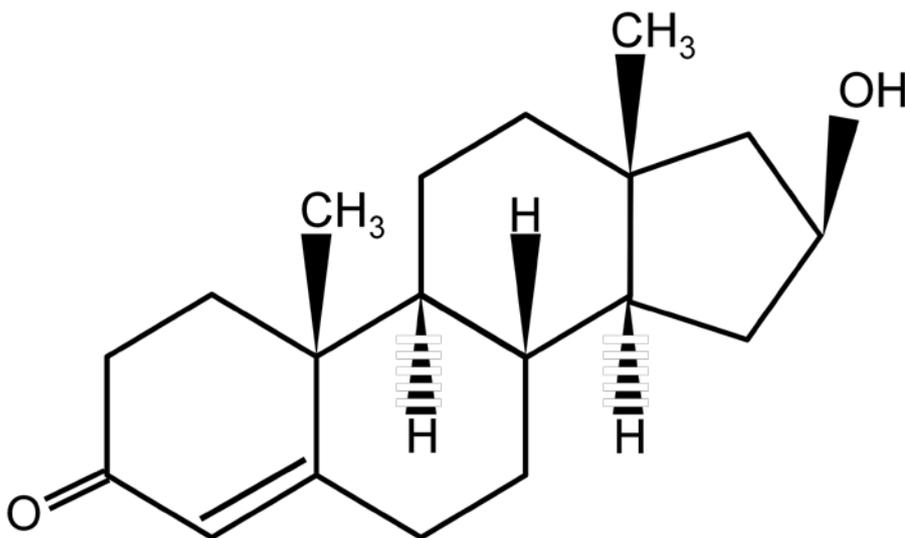


Fig.20 テストステロンの構造式

性ホルモンには男性らしさ女性らしさとは直接関係ない作用も知られており、例えば女性ホルモンに骨粗鬆症予防効果があることなど報告されている²⁸⁾。今回は男性ホルモンが食餌誘導性肥満・脂質異常症の発現に関わっているのではないかと仮説を立て、男性ホルモンの影響を減らした状態の雄マ

ウスで実験を行った。

男性ホルモンの影響を減らす手段として精巣を除去する手術 (castration) を行った。

また、castration の手術負荷により体重が減少することも考えられるため、麻酔や開腹は通常とおり行い、精巣の代わりに皮下組織の一部切除する偽手術 (sham-operation) を行ったマウスを対照とした。

2. 実験方法

(1) 実験動物

第 II 章の実験で wild 群と CCK-1RKO 型群間に体重などの差が見られなかったこと、および食餌誘導性肥満・脂質異常症の発現についても 2 遺伝子型間で同様の結果が得られたことから、本章の実験では CCK-1RKO 型マウスのみを使用した。

また、本実験で使用したマウスはヘテロ型の交配ではなく CCK-1RKO 型同士の交配で繁殖させた。CCK-1RKO 型同士の交配では生まれるマウスは、全て CCK-1RKO 型のため、遺伝子型確認の必要がない。遺伝子型確認のための血液採取はマウスに多少負担がかかること、本系統は 20 代以上の兄妹交配を続けており状態が安定している、という点からこのような繁殖法にした。

(2) 飼育環境

第 II 章と同様、室温 $23^{\circ}\text{C} \pm 10\%$ 、湿度 $55\% \pm 10\%$ 、8:00 ~ 20:00 が明期の 12 時間明暗サイクルとした。

(3) 飼料・水

第Ⅱ章と同様、普通食としてオリエンタル酵母工業株式会社製 CRF-1、高たんぱく質-高脂肪食として日本クレア株式会社製 OA2 を使用した(飼料組成は前述の Table 2)。飲料水は水道水を使用した。飲料、飼料ともに自由摂食とした。

(4) 実験群

飼料及び手術の内容によって 3 群に分け、各実験群を以下のように呼ぶこととした。

CRF-1 を投与:CRF-1 群

Sham-operation 後、OA2 を投与:sham-operation OA2 群

Castration 後、OA2 を投与:castration OA2 群

(5) 実験プロトコル

3~4 ヶ月齢で castration または sham-operation し、該当飼料の投与を開始した。12 ヶ月齢で絶食はせず断頭と殺し、血液の採取と胆嚢の観察を行った。

(6) castration 手順

- ① 麻酔として 250mg/mL カルバミド酸エチル(別名ウレタン、和光純薬製)を 0.5mL/100 g B.W.の割合で腹腔内投与した。
- ② 除毛後、下腹部を 1cm ほど正中切開した(Fig.21)。
- ③ 精巣を露出させ、2か所結紮後、精巣を切除(Fig.22) (Fig.23)。sham-operation の場合は皮下組織を結紮、除去した。
- ④ 抗生物質(ペニシリン 明治製菓株式会社)を投与し、縫合した(Fig.24)。



Fig.21 除毛

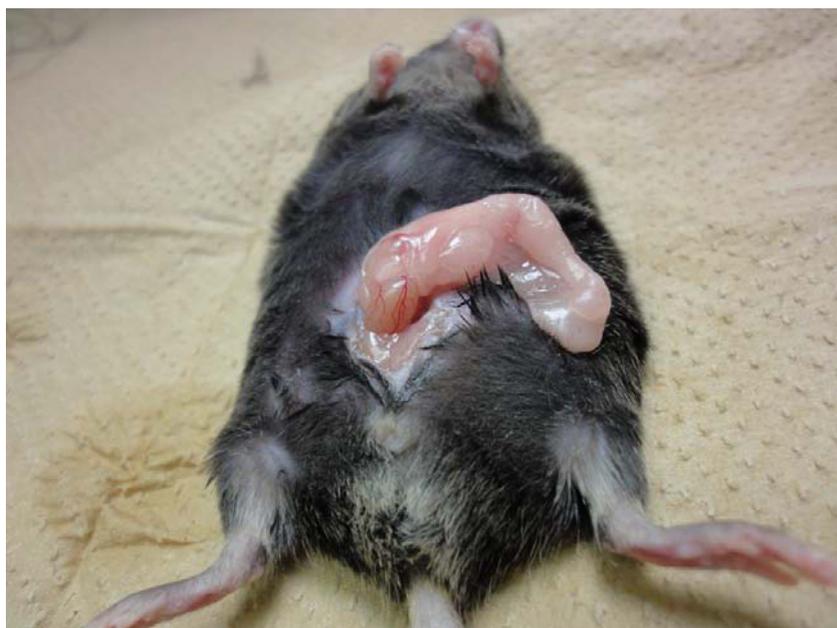


Fig.22 露出した精巣と脂肪組織



Fig.23 切除した精巣



Fig.24 縫合

(7)測定項目

第Ⅱ章と同様、体重、血漿総コレステロール・中性脂肪、胆嚢所見を測定した。

また摂食量に差がないことを確認するため、摂食量の測定を行った。飼料の重量を測定してから投与し、5日後に残量を測定し体重当たりの摂食量を算出した。

(8)統計学的解析

体重、血漿総コレステロール、中性脂肪については一元配置分散分析後、多重比較検定としてフィッシャーの最小有意差法を用いて有意差の判定をした。

胆嚢所見の有意差については χ^2 検定を用いた。

3.結果

(1)体重

体重は sham-operation OA2 群が CRF-1 群および castrationOA2 より体重が重い傾向であった有意ではなかった (Fig.25)。

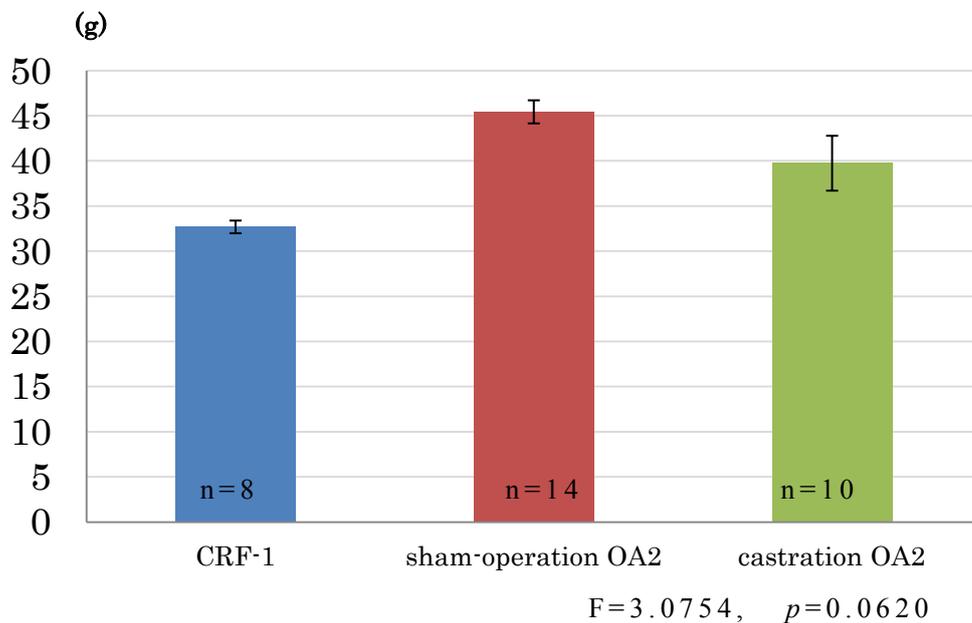


Fig.25 と殺時体重

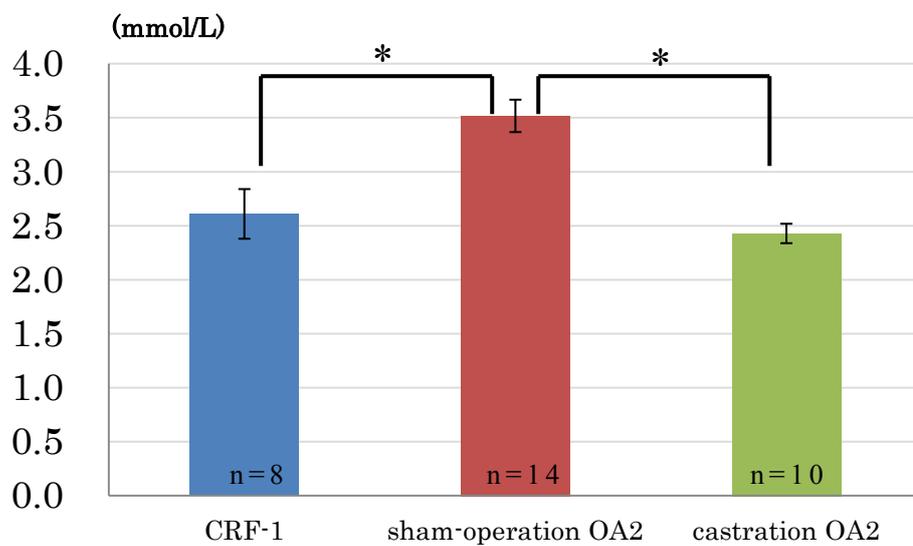
図の説明： Sham-operation OA2 群が CRF-1 群および castrationOA2 群より体重が重い傾向であった。

(2)摂食量

摂食量は、 sham-operation OA2 群は体重 10g あたり 0.75-1.10g、 castrationOA2 群は、体重 10g あたり 1.01-1.67g で、普通食投与群の摂食量 0.89-1.37g/10g B.W.(文献値²⁷⁾)と差はなかった。

(3) 血漿総コレステロール・血漿中性脂肪

血漿総コレステロールおよび血漿中性脂肪は、CRF-1 群と castration OA2 群に比べ sham-operation OA2 群で有意に高値を示した。CRF-1 群と castration OA2 群に差なかった (Fig.26,27)。

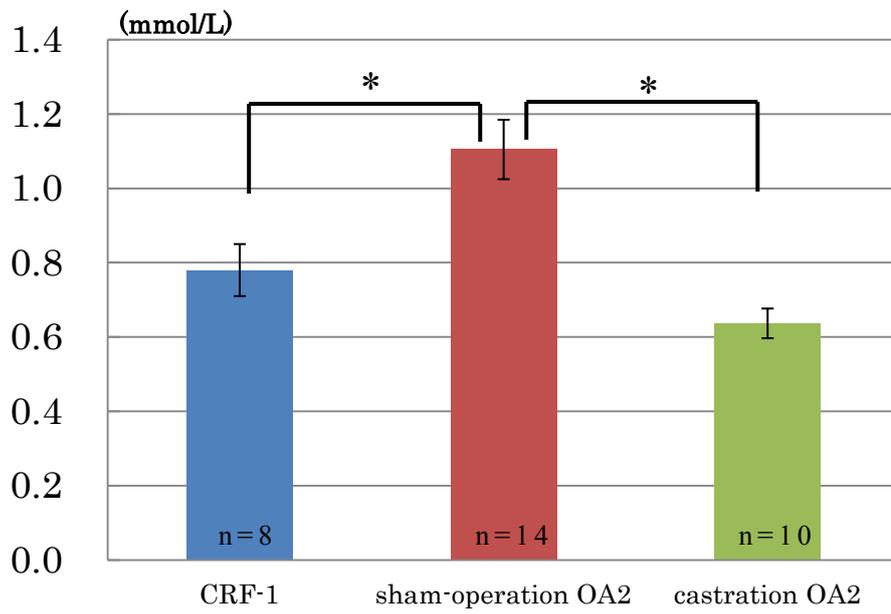


F=9.8865, $p=0.0006$

*:多重比較検定にて $p<0.05$

Fig.26 血漿総コレステロール

図の説明： Sham-operation OA2 群が CRF-1 群および castration OA2 群より血漿総コレステロールが有意に高値であった。



F=8.3114, $p=0.0015$

*:多重比較検定にて $p<0.05$

Fig.27 血漿中性脂肪

図の説明：Sham-operation OA2 群が CRF-1 群および castration OA2 群より血漿中性脂肪が有意に高値であった。

(4)胆嚢所見

胆嚢所見の頻度は3群間で差はみられなかった (Table 5)。

Table 5 第Ⅲ章胆嚢所見

群	胆嚢所見数
CFR-1	3/8
sham-operation OA2	2/14
castrationOA2	4/10

所見あり/全体数 胆嚢に濁りのあるものを所見ありとした。
表の説明：胆嚢所見ありの頻度は3群間で差はみられなかった。

4. 考察

第Ⅱ章の実験で観察された、雄マウスの高たんぱく質-高脂肪による体重の増加は、精巣除去により、抑えられる傾向であった。このことから、食餌誘導性肥満の発現には精巣の働きが関わっていることが示唆される。

血漿総コレステロール・血漿中性脂肪も精巣を除去することで有意に低くなり、食餌誘導性脂質異常症の発現に精巣が関連していると考えられる。

性ホルモンの肥満や動脈硬化におよぼす影響については諸説あり、更年期男性の血中テストステロン濃度と動脈硬化指標は負の相関があるという報告や²⁹⁾、男性更年期のテストステロン低下は、筋肉量の低下を招き、内臓脂肪型肥満ひいてはメタボリックシンドロームを引き起こす³⁰⁾など、男性ホルモンが動脈硬化を改善する傾向にあるとする文献も多い^{31),32)}。これらは本研究の結果とは逆の見解であるが、少なくともマウスの実験からは精巣の働きは肥満・メタボリックシンドローム発現を助長していると考えられた。

女性ホルモンであるエストロゲンにも動脈硬化の改善効果がみられるという報告があるが、ホルモン補充治療でかえって動脈硬化が進行したという研究結果もあり、動脈硬化予防の治療薬として、性ホルモンを投与することは今のところ勧められていない^{33),34),35)}。性ホルモンと肥満・メタボリックシンドロームの発現の関わりについては、これからも研究が必要と思われる。

胆嚢所見については、CRF-1 群、sham-operation OA2 群、

castrationOA2 群間の差はみられなかった。本章の実験からは食餌誘導性胆嚢所見の発現に対する精巣除去の影響はみられなかった。CCK-1RKO マウスの胆石形成は胆嚢収縮不全を背景にしているため²⁴⁾、飼料の栄養バランスの変化および精巣除去の影響が現れにくかったことも考えられた。

第Ⅳ章 食餌誘導性糖尿病における男性ホルモンの関与

1.はじめに

第Ⅱ章の実験で食餌誘導性肥満・脂質異常症の発現に性差がみられ、第Ⅲ章の実験で性差がみられる原因に精巣の働きが関与している可能性が示唆された。そこで糖尿病についても食餌誘導性の発現の増加がみられるか、また精巣除去手術が発現に関与するかどうか確認することにした。

2.実験方法

(1)実験動物

第Ⅲ章と同じ C57/BL 系 CCK-1RKO 型雄マウスを使用した。

(2)飼育環境

室温 23℃ ±10%、湿度 55% ±10%、8:00~20:00 が明期の 12 時間明暗サイクルとした。

(3)飼料・水

普通食とし CRF-1、高たんぱく質-高脂肪食として OA2 を使用した(飼料組成は前述の Table 2)。飲料水は水道水を使用した。飲料、飼料ともに自由摂食とした。

(4)実験群

飼料及び手術の内容によって3群に分け、各実験群を以下のように呼ぶこととした。

CRF-1を投与：CRF-1群

OA2を投与：OA2群

精巣除去手術後、OA2を投与：Castration OA2群

普通食(CRF-1)投与群はI・II章の実験ですでに測定している項目(血漿総コレステロール・中性脂肪、胆嚢所見)については測定を省略した。

(5)実験プロトコル

3～4ヶ月でcastrationし、該当飼料の投与を開始した。12ヶ月齢で絶食はせず断頭と殺し、血液の採取と胆嚢の観察を行った。

(6)測定項目

10ヶ月齢で体重測定および、経口ブドウ糖負荷試験(OGTT)を行った。12ヶ月齢で(と殺時に)血漿総コレステロール・中性脂肪、胆嚢所見を測定した。

(7) 経口ブドウ糖負荷試験(OGTT)

OGTTはヒトの糖尿病判定基準のひとつとなっている検査である。一晩の絶食の後、ブドウ糖(ヒトの場合は75g)を含む試験飲料を摂取し、摂取直後・30分・60分・120分後に血糖

値を測定し、その変動から糖尿病であるかを判定する、という方法である。

マウスにおける糖尿病の診断基準はヒトと違い基準値が定められているわけではない。今回は以下に示す Kawano らの方法にしたがって糖尿病であるかを判断した³⁶⁾。

Kawano らの基準

ピーク時 16.8mmol/L 120 分値 11.2mmol/L

両方満たす：糖尿病

片方満たす：耐糖能異常

どちらでもない：正常

- 1) マウスは前日から 16 時間以上絶食した。
- 2) 空腹時(0 分値)血糖値を測定した。測定にはメディセーフミニ GR-102(TERUMO)を使用した (Fig.28)。



Fig.28 血糖測定機

- 3) 60%ブドウ糖液(蒸留水に溶解)を体重 10g 当たり 0.05mL の

割合でゾンデにて投与した (Fig.29)。



Fig.29 ゾンデ

- 4) 30分、60分、120分後に血糖値測定した。
- 5) mg/dL から mmol/L へ単位を修正した。計算式は以下のとおり。

$$\text{mmol/L} = \text{血糖値 (mg/dL)} \div \text{グルコース分子量 (180)} \times 10$$

- 6) Kawano らの基準に従い、糖尿病であるか判定した。

(8)統計学的解析

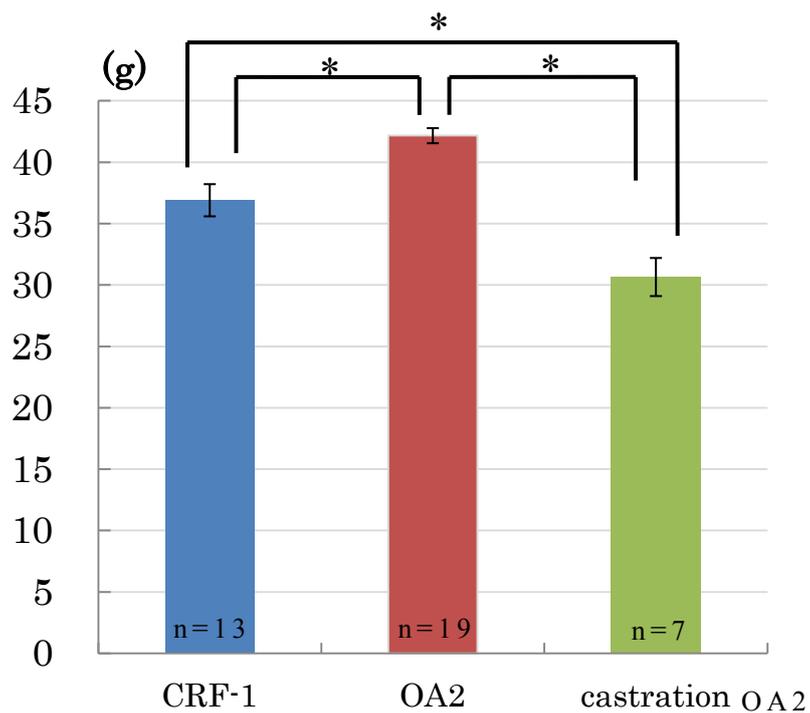
体重、血漿総コレステロール、中性脂肪、OGTT については一元配置散分析後、フィッシャーの最小有意差法を用いて有意差の判定をした。

胆嚢所見および OGTT の判定の有意差については χ^2 検定を用いた。

3.結果

(1)体重

体重は、すべての群間で有意差が見られ、OA2 群>CRF-1 群>castrationOA2 群という順であった(Fig.30)。



F=25.9691, $p=0.0000$

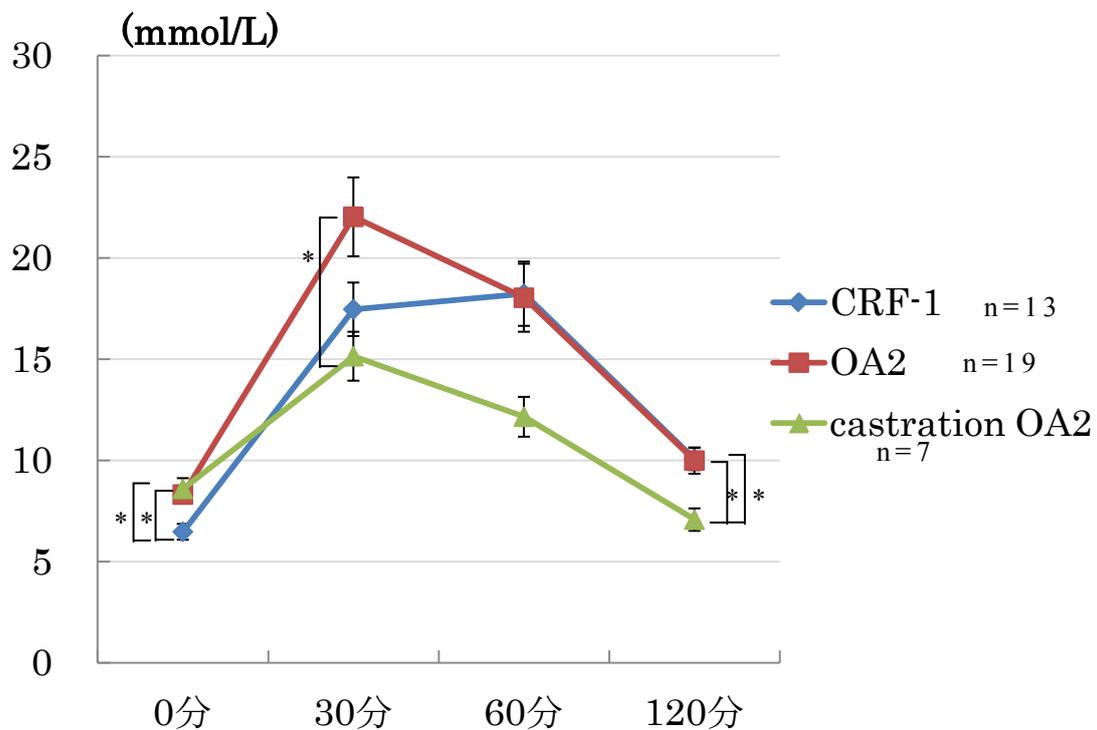
*:多重比較検定にて $p<0.05$

Fig.30 体重

図の説明：体重はすべての群間で有意差が見られ、OA2 群>CRF-1 群>castrationOA2 群という順であった。

(2)OGTT

各時間の血糖値を解析したところ、30分値で OA2 群が castrationOA2 群より高く、120分値では castrationOA2 群が他の 2 群より有意に低かった。空腹時血糖(0分値)は CRF-1 群が他の 2 群より有意に低かった (Fig.31)。



F=2.6312 ~ 5.5535, $p=0.0079 \sim 0.0858$

*: 多重比較検定にて $p < 0.05$

Fig.31 OGTT 血糖値推移

図の説明：0分値は CRF-1 群 < OA2 群・castrationOA2 群であり、30分値は castrationOA2 群 < OA2 群、120分値は castrationOA2 群 < CRF-1 群・OA2 群であった。

血糖値の推移を基準に照らし合わせた判定は、castration OA2 群のみ糖尿病判定の個体がないなど、精巣除去による糖尿病の改善傾向はみられたものの、 χ^2 検定による有意差はなかった (Table 6)。

Table 6 OGTT 判定

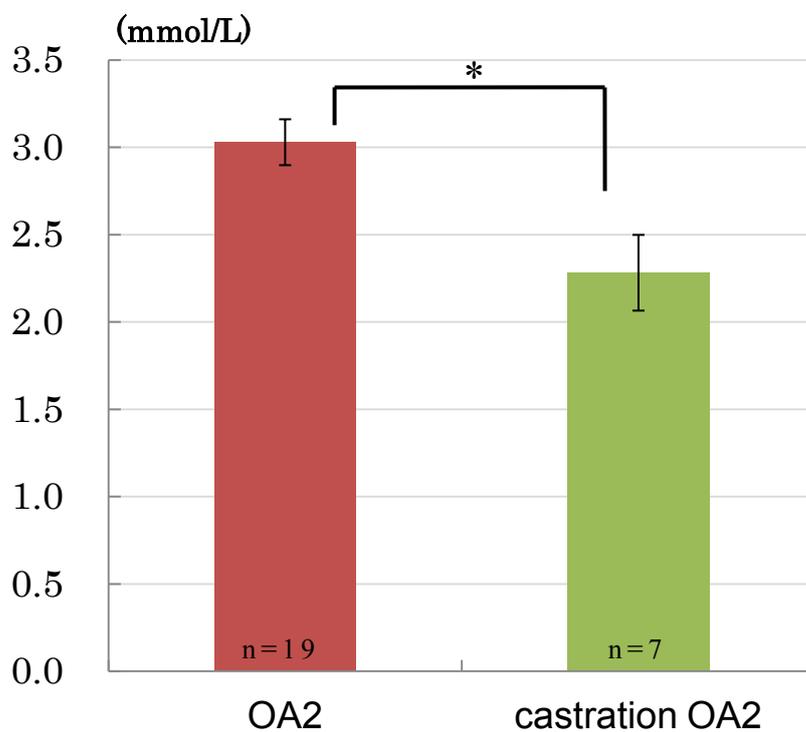
群	正常	耐糖能異常	糖尿病	合計
CRF-1	5	4	4	13
OA2	6	8	5	19
castration OA2	3	4	0	7

表の説明：OGTT による糖尿病かどうかの判定は各群に有意差はなかった。

(3) 血漿総コレステロール・血漿中性脂肪

血漿総コレステロールは OA2 群が castrationOA2 群より有意に高値となった(Fig.32)。

血漿中性脂肪は、OA2 群の方が castrationOA2 群より高値であったが、有意ではなかった(Fig.33)。

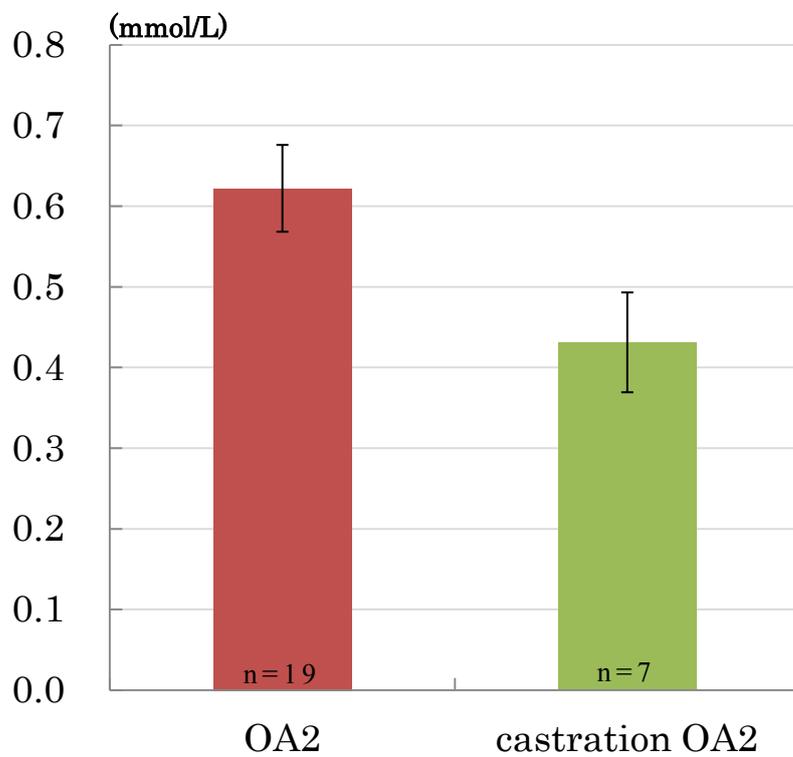


F=8.7056, $p=0.0070$

*:多重比較検定にて $p<0.05$

Fig.32 血漿総コレステロール

図の説明：血漿総コレステロールは OA2 群が castration OA2 群より有意に高値となった



F=3.8895 p=0.0602

Fig.33 血漿中性脂肪

図の説明：血漿中性脂肪は、OA2 群の方が castrationOA2 群より高値であったが、有意ではなかった。

(4)胆嚢所見

χ^2 検定による解析では、胆嚢所見発現頻度の差はなかった。

(Table 7)

Table 7 胆嚢所見

群	胆嚢所見数
OA2	12/19
castrationOA2	4/7

所見あり/全体数 胆嚢に濁りのあるものを所見ありとした

表の説明：胆石発現率の有意差はなかった。

4. 考察

体重、血漿総コレステロール・中性脂肪、胆嚢所見については第Ⅱ・Ⅲ章と同条件であるため、結果も同様であった。

糖尿病の食餌誘導性発現率の増加があるかという点については、OA2群がCRF-1群より血糖値が高い傾向であった。また、OA2群では血糖値が機器の測定限界(600mg/dL)以上になる個体があったが、他の群には測定限界以上の測定値は見られなかった。高脂肪-高たんぱく質食が血糖上昇を誘発している可能性が示唆された。

さらに castration により、血糖値は低下する傾向であった。食餌誘導性の糖尿病発症にも精巣の働きが関与していることが示唆される。

性ホルモンと糖尿病の関連についても、多くの報告がある。2型糖尿病モデルラットでは血中テストステロンの低下がみられるという報告があるが、テストステロンの低下により糖尿病が引き起こされたのではなく、糖尿病に先行して現れる、肥満が性腺機能を低下させたためとしている³⁷⁾。また、前立腺がんに対するアンドロゲン抑制療法中に糖尿病が増悪した症例も報告されている³⁸⁾など、性ホルモン(テストステロン)は高血糖に関しても改善作用があるとする報告が多い³⁹⁾。

高血糖の発現とテストステロンの関係についてはさらなる検証が必要と思われる。

総括

第Ⅱ章～第Ⅳ章の実験結果をまとめると次のようになる。

第Ⅱ章の実験で、マウスに高たんぱく質-高脂肪食を投与すると、雄マウスでは普通食投与群より体重が重くなるが、雌マウスでは飼料の違いによる体重の差はみられなかった。

血中脂質(血漿総コレステロール、血漿中性脂肪)も体重と同様の結果がみられ、雄マウスでは高たんぱく質-高脂肪食投与群で普通食投与群より血中脂質が高値となるが、雌マウス飼料の違いによる差はみられなかった。また、胆石・胆砂の発現頻度も雄マウスでは高たんぱく質-高脂肪食で高率になる傾向が見られた。

食餌誘導性肥満・脂質異常症の発現には性差が見られ、雄マウスの方が雌マウスよりも発現が高率であった。

第Ⅲ章の実験では、雄マウスの精巣を除去する手術を行い、高たんぱく質-高脂肪食を投与した。精巣除去マウスは精巣を除去しない群よりも食餌誘導性肥満・脂質異常症の発現が抑制された。

食餌誘導性肥満・脂質異常症の発現が雌マウスより雄マウスの方が高率である理由は、精巣の働きが発現に関与しているためと考えられる。

第Ⅳ章の実験では、雄マウスおよび精巣除去雄マウスに高たんぱく質-高脂肪食を投与し、糖尿病判定検査(経口ブドウ

糖負荷試験)を行った。

高たんぱく質-高脂肪食投与群は、普通食投与群より血糖値が高く、精巢除去高たんぱく質-高脂肪食投与群は血糖値上昇が抑えられる傾向であった。

糖尿病も食餌誘導性の発現増加が見られ、発現には精巢の働きが関与することが示唆された。

生活習慣病の発現以外にも性差の影響を無視できない現象も多い。筆者は本研究の遂行と並行してアルコールの影響についての性差を調べてきた。すなわち、アルコール飲料を摂取した際の胃排出速度が、男性では非アルコール飲料を摂取した時より遅くなるのに対し、女性ではアルコール飲料の胃排出速度への影響は少なかった⁴⁰⁾。今後も、様々な面から生物学的性差を考慮した研究を進める必要があると思われる。

本研究はマウスを対象としており、必ずしもヒトに当てはまるとは限らない。しかし、実験で用いた普通食と高たんぱく質-高脂肪食の差は、脂肪とたんぱく質の摂取割合が増え、糖質の摂取割合が減少するという戦後の日本人の食生活の変化と類似している。摂取カロリーは変わらなくても、栄養バランスが変化すると肥満・メタボリックシンドロームが発現しやすくなること、また発現に生物学的性差が存在するという結果は、現在の日本人の健康問題を解明する一端となりそうである。

参考文献

1. 厚生労働省：国民健康・栄養調査報告。
<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/eiyou/h23-houkoku.htm>
1
2. 日本成人病予防協会：生活習慣病の予防。
<http://www.japa.org/>
3. 財団法人 東京都老人総合研究所：生活習慣病としての糖尿病 第58回老年学公開講座。財団法人 東京都老人総合研究所，1999
4. 糖尿病診断基準検討委員会(葛谷健、中川昌一、佐藤譲ら)：糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告。糖尿病 42(5), 385-404, 1999
5. Small DM: Cholesterol nucleation and growth in gallstone formation. *New England Journal of Medicine* 302(23), 1305-1307, 1980
6. Wang DQ-H, Paigen B, Carey MC: Phenotypic characterization of Lith genes that determine susceptibility to cholesterol cholelithiasis in inbred mice: physical-chemistry of gallbladder bile. *Journal of Lipid Research* 38, 1385-1411, 1997
7. Lammert F, Carey MC, Paigen B: Chromosomal Organization of Candidate Genes Involved in Cholesterol Gallstone Formation: A Murine Gallstone Map. *Gastroenterology* 120, 221-238, 2001

8. 日本胆道学会胆石調査プロジェクト(谷村弘ら): 1997年度胆石全国調査報告. 胆道 12(3), 276-293, 1998
9. Reacen GM: Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. Diabates 37(12), 1595-1607, 1988
10. Kaplan NM: The deadly quartet Upper-bdy obesity, glucose intlerance, hypertriglyceridemia, and hypertension.. Archives of Internal Medicine 149(7), 1514-1520, 1989
11. DeFronzo RA, Ferrannini E: Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertention, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. Diabates Care 14(3), 173-194, 1991
12. World Health Organization. Definition, diagnosis and classification of diabetes and its complications: Repoprt of a WHO Consultation. Part1.
[HTTP://whqlibdoc.who.int/hp/1999/WHO_NCD_99.2.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hp/1999/WHO_NCD_99.2.pdf),
1999
13. Kissebahv AH, Vydelingum N, Murray R, Evans DJ, Kalkhoff RK, Adams PW: Relation of Body Fat Distribution to Metabolic Complications of Obesity. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 54(2), 254-260, 1982
14. Björmtorp P: Obesity and Risk of Cardiovascular Disease. Journal of Internal Medicine 218(2), 145-147, 1985
15. メタボリックシンドローム診断基準検討委員会(委員長松澤佑次): 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), 188-203, 2005

- 16.宮崎 滋：メタボリックシンドローム教室 Q&A でわかる療
養指導．中外医学社，2009
- 17.宮坂京子、船越 顕博：消化管生理活性ペプチドの最新知見
CCK. *G.I. Research* 16(4), 294-298, 2008
- 18.宮坂京子、船越 顕博：栄養代謝統御におけるコレシストキ
ニン(CCK)の役割．*臨床消化器内科* 28(6), 713-718, 2013
19. Williams JA: Gastrin and CCK Share a Common Receptor.
News In Physiological Sciences 8, 101 , 1993
20. Takata Y, Takiguchi S, Kataika K, Funakoshi A, Miyasaka K,
Kono A: Mouse cholecystinin type-A receptor gene:
Alternative splice acceptor site in exon 2. *Gene* 187, 267-271,
1997
21. Takiguchi S, Takata Y, Funakoshi A, Miyasaka K, Kataoka K,
Fujimura Y, Goto T, Kono A: Disrupted cholecystinin
type-A receptor (CCK-AR) gene in OLETF rats. *Gene* 197,
169-175, 1997
22. Funakoshi A, Miyasaka K, Yamamori S, Takata Y, Kataoka K,
Takiguchi S, Kono A, Shimokata H: Body fat content is
related to cholecystinin A receptor gene promoter
polymorphism. *FBRS Letters* 466, 264-266, 2000
23. Soichi Takiguchi, Shinji Suzuki, Yuko Sato, Setuko Kanai,
Kyoko Miyasaka, Atsuo Jimi, Hirotsugu Shinozaki, Yutaka
Takata, Akihiro Funakoshi, Akira Kano, Osamu Minowa,
Tomoko Kobayashi, Tetsuo Noba: Role of CCK-A Receptor for

- Pancreatic Function in Mice: A Study in CCK-A Receptor Knockout Mice. *Pancreas* 24(3), 276-283, 2002
24. Sato N, Miyasaka K, Suzuki S, Kanai S, Ohta M, Kawanami T, et al: Lack of cholecystinin-A receptor enhanced gallstone formation: a study in CCK-A receptor knockout mice. *Digestive Disease Science* 48, 1944-1947, 2003
25. 木元幸一, 宮坂京子, 林あつみ: 解剖生理学実験. 2013
26. 日本ジーン社ウェブサイト
<http://nippongene.com/pages/products/pcr/taq03.html>
27. Miyasaka K, Kanai S, Ohta M, et al: Age-associated gallstone formation in male and Female CCK-1(A) receptor-deficient mice. *Journal of Gastroenterology* 42, 493-496, 2007
28. 増田雅之, 水沼英樹, 本症一郎, 岡野浩哉, 伊吹令人: 退行期骨粗鬆症に対するエストロゲンとビタミンDの骨塩減少抑制効果に関する研究. *日本産婦人科科学会雑誌* 45(2), 106-112, 1993
29. 櫃本考志: 心血管疾患危険因子としての血中テストステロン濃度の臨床的意義: cardio-ankle vascular index を指標にした検討. *脈管学* 52, 169-173, 2012
30. 熊本悦明: 中高年男性における医学的問題点-そのQOLの問題点を中心-. *日本老年医学雑誌* 45, 266-269, 2008
31. Gordon GB, Bush DE, Weisman HF: Reduction of Atherosclerosis by Administration of Dehydroepiandrosterone. *The Journal of Clinical Investigation* 82, 712-720, 1988

32. Hanke H, Lenz C, Spindler K-D, Weidemann W: Effect of Testosterone on Plaque Development and Androgen Receptor Expression in the Arterial Vessel Wall. *Circulation* 103, 1382-1385, 2001
33. 秋下雅浩: 性差医学と脈管. *脈管学* 46, 137-141, 2006
34. Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E: Randomized Trial of Estrogen Plus Progestin for Secondary Prevention of Coronary Heart Disease in Postmenopausal Women. *Journal of American Medical Association* 280(7), 605-613, 1998
35. 秋下雅浩: ホルモン補充療法の将来性. *日本老年医学雑誌* 46, 327-329, 2009
36. Kawano K, Hirashima T, Mori T et al: Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. *Diabetes* 41, 1422-1428, 1992
37. 正木浩喜, 大野恭裕, 保城円, 山内考哲: 2型糖尿病モデル OLETF ラットにおける性ホルモン異常の研究. *近畿大医学雑誌* 30(3,4), 159-164, 2006
38. 関澤直子, 中野妙, 泉山肇, 土井賢, 平田結喜緒: 前立腺癌のアンドロゲン抑制療法中に耐糖能が増悪した2型糖尿病の3症例. *糖尿病* 51(6), 523-529, 2008
39. 庄野菜穂子, 熊谷秋三, 佐々木悠: 肥満, 糖・脂質代謝とステロイドホルモン. *Journal of health science* 18, 21-44, 1996
40. Sekime A, Horikoshi M, Funakoshi A, Miyasaka K: Sex difference in the effects of alcohol on gastric emptying in

healthy volunteers: A study using the ¹³C breath test.

Biomedical Research 34(6), 275-280, 2013

謝辞

東京家政大学 生理学研究室 宮坂京子教授には研究の遂行と論文の取りまとめに際し、大変丁寧な御指導・御鞭撻を賜りました。心より感謝申し上げます。

研究に際し、様々な方面から補助をしてくださった、生理学研究室 堀越美祐紀助手に御礼申し上げます。