

Table 1. Open field test

MCH	ambulation	rearing	latency
6 nmol (n=10)	4.2±5.5*	0.4±0.8*	168.6±96.5*
1.5 nmol (n=10)	93.8±26.8*	13.3±4.7	6.7±3.8
0.3 nmol (n=10)	71.3±14.4	8.6±5.8	6.0±8.6
Saline (n=12)	54.8±26.6	9.3±7.4	8.2±10.9

Values are mean±S.D.

*p < .05 vs. Control

Table 2. Open field test after 24hr

MCH	ambulation	rearing	latency
6 nmol (n=10)	35.9±16.0	3.3±1.3	25.3±20.4*
1.5 nmol (n=10)	35.3±12.4	3.9±1.0	2.0±2.2
0.3 nmol (n=10)	39.8±12.9	4.0±2.7	2.1±1.9
Saline (n=12)	30.9±22.6	3.7±4.4	4.4±10.2

Values are mean±S.D.

*p < .05 vs. Control

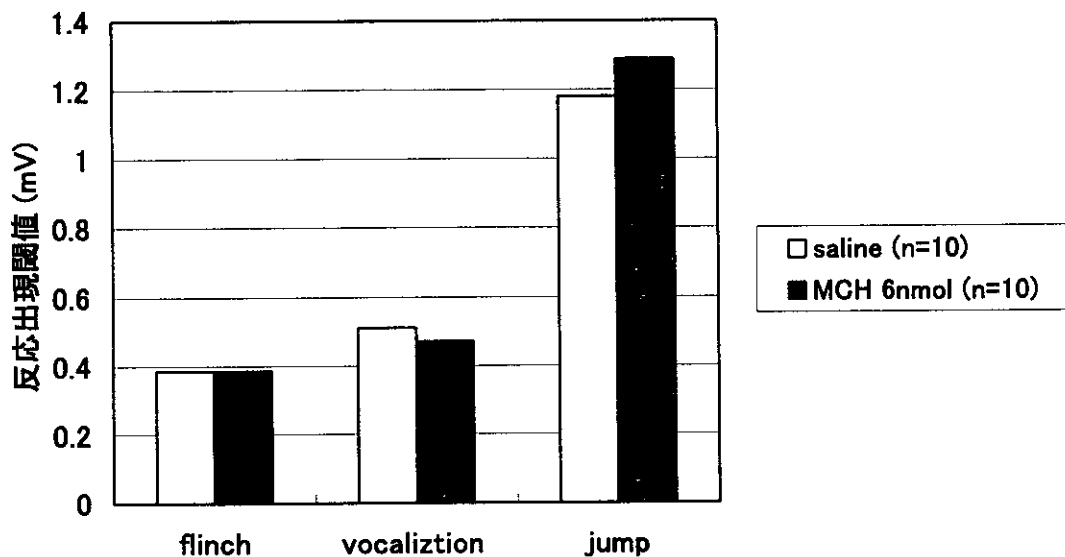


Fig.1 Flinch-vocal test

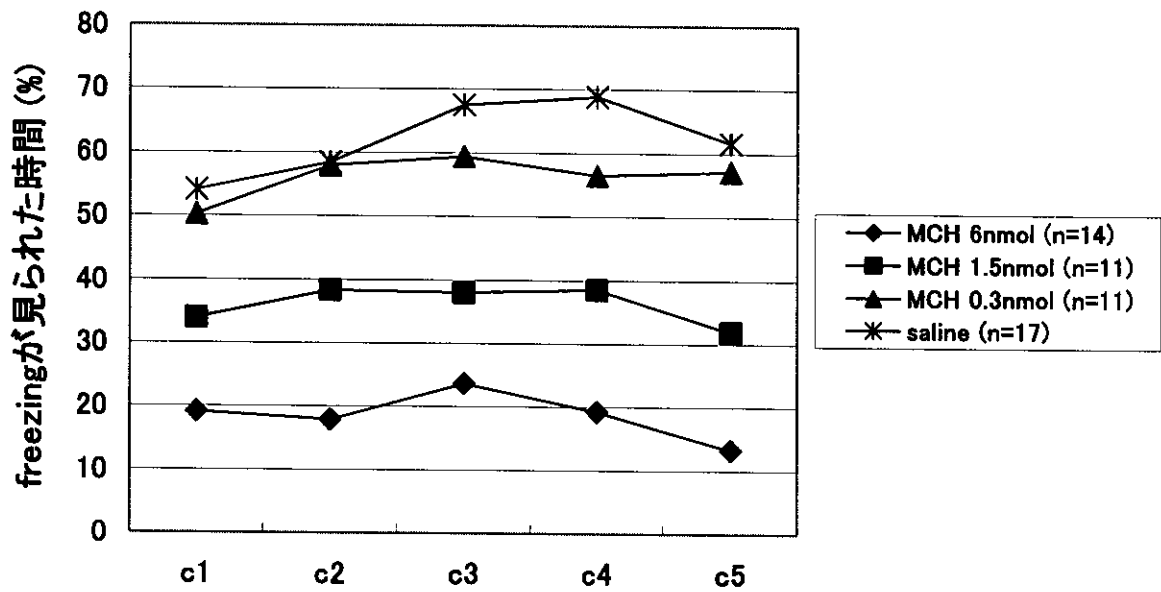


Fig.2 context fear conditioning
c1-5 = context刺激に対する観察時間1~5分

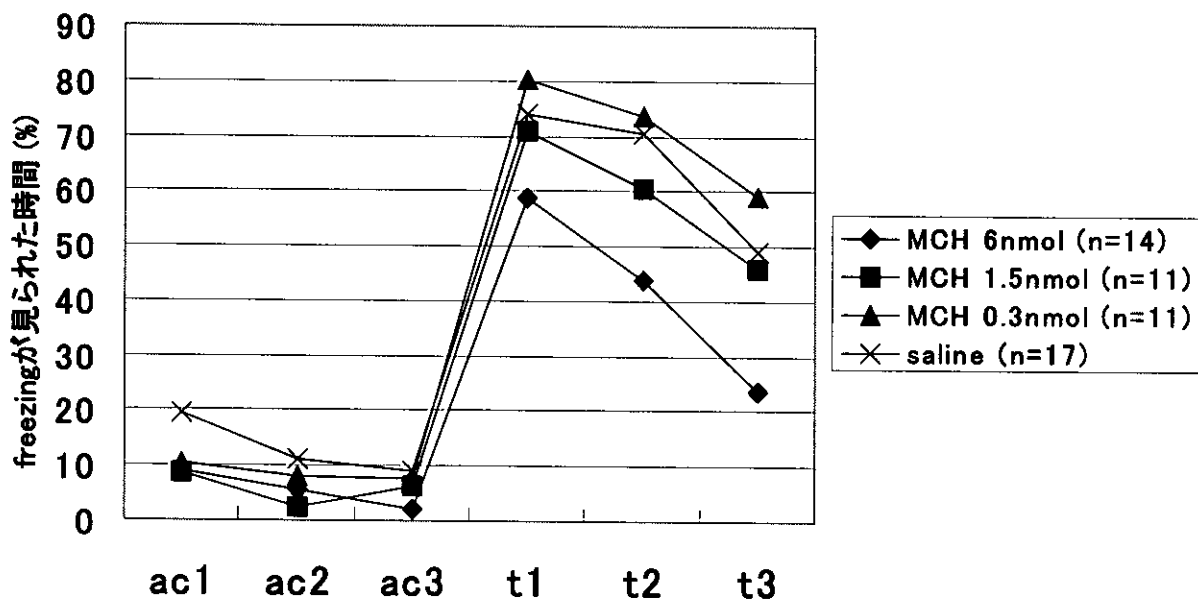


Fig.3 tone fear conditioning
t1-3 = tone刺激に対する観察時間1~3分

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

神経ヒスタミンとアディポネクチンの抗肥満作用

分担研究者	坂田 利家	中村学園大学大学院栄養科学研究科	教授
	吉松 博信	大分医科大学医学部生体分子構造機能制御講座 第一内科	
	正木 孝幸	大分医科大学医学部生体分子構造機能制御講座 第一内科	
	千葉 政一	大分医科大学医学部生体分子構造機能制御講座 第一内科	
	穴井 学	大分医科大学医学部生体分子構造機能制御講座 第一内科	

研究要旨 神経性食欲不振症では、視床下部に存在する神経ヒスタミンや脂肪組織から分泌されるアディポネクチンが変動していることが報告されており、アディポネクチンや神経ヒスタミンが神経性食欲不振症においては重要な因子であることが推察される。そこで中枢性および末梢性エネルギー代謝調節物質の抗肥満作用を比較検討する目的で視床下部に存在する神経ヒスタミンと脂肪組織から分泌されるアディポネクチンの摂食行動、体重、脂肪蓄積、エネルギー消費機能への作用を解析した。ヒスタミンを Ay/a obese mice に慢性中枢性投与した結果、Ay/a obese mice における、摂食抑制、体重増加抑制、内臓脂肪、とくに肝臓周囲である大網、後腹膜脂肪量の有意な低下を認めた。また白色脂肪の中性脂肪含量、ob mRNA の発現の有意な低下を認めた。組織学的にも特に白色脂肪、褐色脂肪の脂肪滴沈着減少を認めた。そして褐色脂肪においては uncoupling protein (UCP)1 の発現の有意な上昇を認めた。更にヒスタミンを C57BL/6 mice に投与すると、視床下部領域の室傍核(PVH)、弓状核(ARC)における c-Fli1 の発現上昇を認めたが、Ay/a obese mice においても同様であった。以上の結果より、神経ヒスタミンは Ay/a obese mice において信号伝達が障害されている POMC-MC4R 系とは独立して、摂食、体重変化などを中枢性に調節しており、その作用部位としては室傍核、弓状核が重要と考えられた。アディポネクチンを Ay/a obese mice に慢性末梢性投与した結果、Ay/a obese mice の、生理的体重増加の抑制、内臓脂肪、とくに肝臓周囲である大網、後腹膜脂肪量の有意な低下を認めた。白色脂肪、肝臓、骨格筋中性脂肪含量の有意な低下も認めた。組織学的には特に肝臓、褐色脂肪の脂肪滴沈着減少が認められた。また褐色脂肪交感神経の活動、褐色脂肪 UCP の発現、直腸温の有意な上昇を認めた。上記効果はアディポネクチンの通常量の中枢投与では認められなかった。以上よりアディポネクチンは褐色脂肪交感神経の活動、UCP 発現の上昇などエネルギー代謝調節にも関与しており内臓蓄積脂肪を減少させる効果があることがわかった。またその効果は中枢投与では認められなかったことより、アディポネクチンは末梢性に、エネルギー代謝を調節する新規因子と考えられた。

研究目的

神経性食欲不振症では、視床下部に存在する神経ヒスタミンや脂肪組織から分泌されるアディポネクチンが変動していることが報告されており、アディポネクチンや神経ヒスタミンが神経性食欲不振症においてのエネルギー代謝に重要な因子であることが推察される。ヒスタミンは免疫作用、胃酸分泌、神経内分泌作用など様々な働きを持つと考えられている。しかし神経ヒスタミンのエネルギー代謝調節効果に関しては未だ不明点が多い。そこで今回、ヒスタミンを肥満モデルである Agouti yellow (Ay/a) obese mice へ中枢性に慢性投与しその時の摂食、体重変化、褐色脂肪組織 UCP1 発現などを解析した。一方、アディポ

ネクチンは内臓脂肪組織の遺伝子スクリーニングによりクローニングされた物質であり、レプチンなどと併せてアディポサイトカインの一つと考えられている。またアディポネクチンは肥満、糖尿病になると減少し、モデル動物に外因性にアディポネクチンを投与すると肥満や糖尿病が改善する。この事はアディポネクチンが抗肥満、抗糖尿病をもつことを示している。しかしアディポネクチンの摂食調節、エネルギー消費作用に関しては未だ不明点が多い。そこで今回、アディポネクチンを Ay/a obese mice へ末梢性、中枢性に慢性投与しその時の摂食、体重変化、褐色脂肪組織 UCP1 発現を解析した。

研究方法

(実験動物)

動物は Agouti yellow (Ay/a) obese mice (BW35-45g) を用いた。照明条件を朝7時から19時とする12時間明暗周期の恒温、恒湿の防音室内で実験を行った。室温 21 ± 1、湿度 55 ± 5% の恒温恒湿の防音室で飼料はクレア飼料を用い自由飲水で飼育した。手術として Ay/a obese mice は側脳室に慢性に 30G のステンレス製カニューラを留置した。実験は術後 7 日後術前の体重の回復を待って行った。

(実験方法)

体重、条件を揃えた Ay/a obese mice を用いた。試薬は Wako 社製品のヒスタミン(10 μg/μl)、アディポネクチン(1 μg/μl)を用いた。群分けはヒスタミン(10 μg/μl, 1 μl)を側脳室に1週間投与する群(n=6)、アディポネクチン(0.5 μg/μl, 1 μl)を側脳室に1週間投与する群(n=6)、アディポネクチン(0.5 μg/μl, 100 μl)を皮下に1週間投与する群(n=6)、Phosphate buffer saline (PBS)を側脳室に1週間投与する群(n=6)、PBSを皮下に投与する群(n=6)に分けた。試薬は1分間 0.1 μl の速度で10分間投与した。投与期間の摂食量、体重変化について検討した。投与終了後 HE 法などで脂肪量、脂肪組織を解析した。あわせて褐色脂肪 (BAT)UCP1 の発現を northern blotting 法で解析した。また BAT 交感神経活動記録を電気生理学的に行った。視床下部においては c-fos の発現を解析した。結果の有意差検定は分散分析を用い、群間の有意差検定には Fisher の PLSD による多重比較法を用いた。またすべての実験は National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals を元に作成した Oita Medical University Guideline に沿って行われた。

研究結果

ヒスタミンのエネルギー代謝調節機構

- 1) ヒスタミンを Ay/a obese mice に慢性末梢性投与した結果、摂食抑制、体重増加抑制 ($p < 0.01$) (図1)、内臓脂肪、とくに肝臓周囲である大網、後腹膜脂肪量の有意な低下が認められた(図2)。また白色脂肪の中性脂肪含量、ob mRNA の発現、血中レプチンの有意な低下を認めた($p < 0.05$) (図2)。
- 2) 組織学的には白色脂肪、褐色脂肪の脂肪滴沈着減少を認めた(図3)。
- 3) 褐色脂肪においては UCP1 の発現の有意な上昇を認めた($p < 0.01$) (図4)。

- 4) 更にヒスタミンを C57BL/6 mice に投与すると、視床下部領域の PVN, ARC における c-FLI の発現上昇を認めたが($p < 0.01$)、Ay/a obese mice においても同様であった。($p < 0.01$) (図5, 図6)。

アディポネクチンのエネルギー代謝調節機構

- 1) アディポネクチンを Ay/a obese mice に慢性末梢性投与した結果、Ay/a obese mice における、生理的体重増加の抑制、内臓脂肪、とくに肝臓周囲である大網、後腹膜脂肪量の有意な低下が認められた。($p < 0.05$, $p < 0.01$) (図7)。
- 2) 白色脂肪、肝臓、骨格筋 TG content の有意な低下を認めた($p < 0.01$) (図7)。
- 3) 組織学的に肝臓、褐色脂肪の脂肪滴沈着減少を認めた(図8)。
- 4) 褐色脂肪 UCP1 の有意な上昇を認めた($p < 0.01$) (図9)。
- 5) 上記効果は側脳室投与では変化を認めなかった。(図10)。

考察

今回、神経ヒスタミンは中枢性にアディポネクチンは末梢性に抗肥満作用を示すことが明らかになった。これまで神経ヒスタミンはレプチンによって駆動され中枢性に摂食抑制作用、脂肪分解作用、エネルギー消費亢進作用を示すことを報告してきた。それらの作用はヒスタミン H1 受容体を介しており、同受容体の欠損マウスでは抗肥満作用が減弱する。Ay/a obese mice は agouti 蛋白の異所性発現により POMC-MC4R 信号伝達系が障害された肥満モデルである。この Ay/a obese mice においてもヒスタミン作用が発現することから、神経ヒスタミン-H1 受容体による制御系と POMC-MC4R による制御系は互いに独立して機能していることが考えられる。さらに今回神経ヒスタミンによる摂食行動調節および末梢エネルギー代謝調節に重要な視床下部中枢として PVH と ARC が同定された。両者ともにレプチン受容体が豊富な部位で、CRH、NPY、POMC、AGRP、CART ニューロンなど摂食調節系の神経ペプチドが数多く存在する部位でもある。今回の実験結果は神経ヒスタミンとこれらの神経ペプチドの間に機能関連が存在することを示唆するものである。また今回、アディポネクチンが摂食抑制作用を介さずに体重減少作用を示すことが明らかになった。この体重減少作用の一つは白色脂肪の蓄積脂肪を減少させる効果によるもので、低の一つは BATUCP1 発現亢進などエネルギー消費亢進作

用によるものと思われる。さらにアディポネクチンの中枢投与では効果がなく、これらの作用は末梢性のものであることが分かった。BAT の交感神経活動がアディポネクチンの投与で増加することから、BATUCPI 発現亢進には交感神経活動亢進が関与していると考えられるが、これもアディポネクチンの中枢投与では効果がない。したがってアディポネクチンは脊髄レベルあるいは交感神経節レベルで神経活動に影響を与えている可能性が強い。

神経ヒスタミン、アディポネクチンともに抗肥満作用を示すことを明らかにした。両者は飢餓状態などによる体重減少とともに増加する。すなわち、神経性食欲不振症患者の体重減少時に脂肪蓄積抑制因子として働くことが予想され、体重減少あるいはその治療に悪影響をもたらす可能性がある。今後の研究課題である。

結論

今回の研究の結果より、アディポネクチンは UCP 発現の上昇などエネルギー代謝にも関与し脂肪蓄積を減少させる効果を有することが明らかになった。またその効果は中枢性投与では認められなかったことより、アディポネクチンは末梢性に、エネルギー代謝を調節する新規因子と考えられた。神経ヒスタミンは POMC-MC4R 系とは独立して、摂食、体重変化など中枢性エネルギー代謝調節に機能しており、その作用部位としては PVN, ARC が重要と考えられた。

健康危険情報

今回の研究で特に人体の健康に有害な事象は発生しなかった。

研究発表

論文発表

1. Yoshimatsu H, Chiba S, Tajima D, Akehi Y, Sakata T : Histidine Suppresses Food Intake through Its Conversion into Neuronal Histamine. *Exp. Biol. Med.* 227: 63-68, 2002
2. Hidaka S, Yoshimatsu H, Kondou S, Tsuruta Y, Oka K, Noguchi H, Okamoto K, Sakino H, Teshima Y, Okeda

T, Sakata T : Chronic central leptin infusion restores hyperglycemia independently of food intake and insulin level in streptozotocin-induced diabetic rats. *FASEB J.* 16: 509-518, 2002

3. Tuda K, Yoshimatsu H, Nijima A, Chiba S, Sakata T: Hypothalamic histamine neurons activate lipolysis in rat adipose tissue. *Exp. Biol. Med.* 227: 208-213, 2002
4. Yoshimatsu H, Tsuda K, Nijima A, Tatsukawa M, Chiba S, Sakata T: Histidine induces lipolysis through sympathetic nerve in white adipose tissue. *Eur. J. Clin. Invest.* 32: 236-241, 2002
5. Tsuruta Y, Yoshimatsu H, Hidaka S, Kondou S, Okamoto K, Sakata T: Hyperleptinemia in Ay/a mice upregulates arcuate cocaine- and amphetamine-regulated transcript expression. *Am. J. Physiol.* 282: E967-E973, 2002.

学会発表

1. 正木 孝幸 ヒスタミン中枢投与に伴う白色、褐色脂肪組織の変化—Agouti yellow obese マウスを用いた解析 第 23 回日本肥満学会学術集会 10.3-4, 2002 京都
2. 千葉 政一 グラフ化体重日記を用いた生活習慣の数値的評価および解析 第 23 回日本肥満学会学術集会 10.3-4, 2002 京都
3. 野口 仁志 パラバイオームモデルラットにおける Ghrelin の分泌調整 第 23 回日本肥満学会学術集会 10.3-4, 2002 京都
4. 安田 透神経ヒスタミン視床下部神経核微量注入による褐色脂肪組織交換神経活動制御様式の検討 第 23 回日本肥満学会学術集会 10.3-4, 2002 京都
5. 吉松 博信 エネルギー代謝調節神経ネットワークにおける神経ヒスタミン機能 第 23 回日本肥満学会学術集会 10.3-4, 2002 京都

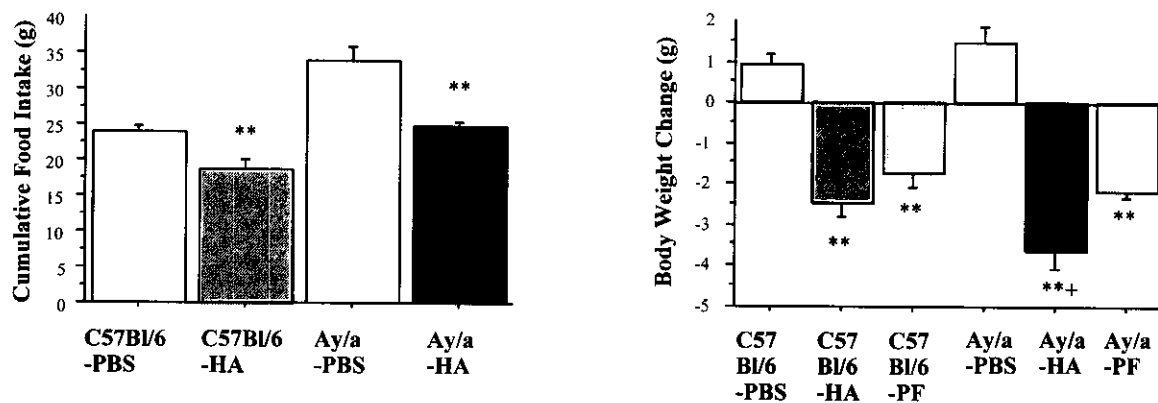


図1. ヒスタミンの慢性末梢投与による Ay/a obese mice の摂食量および体重変化

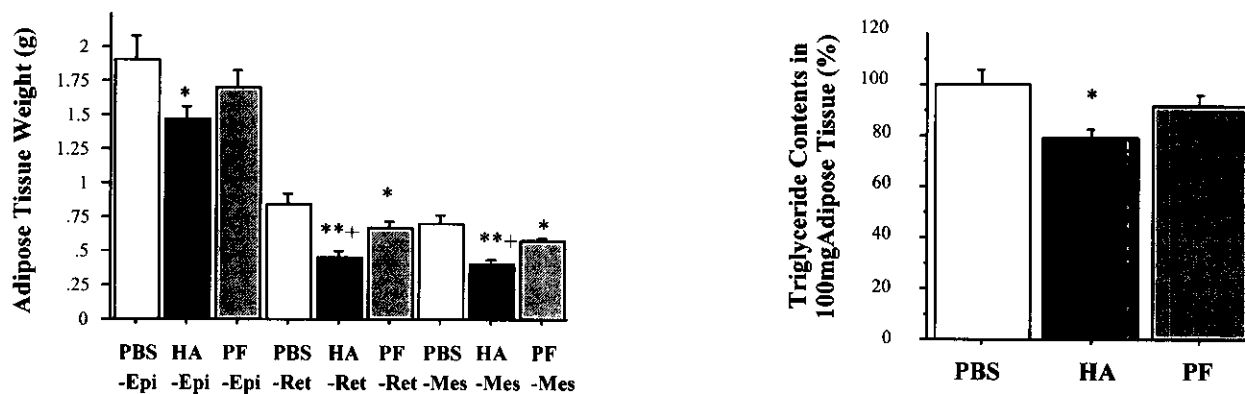


図2. ヒスタミンの慢性末梢投与による Ay/a obese mice の脂肪組織量および中性脂肪含量の変化

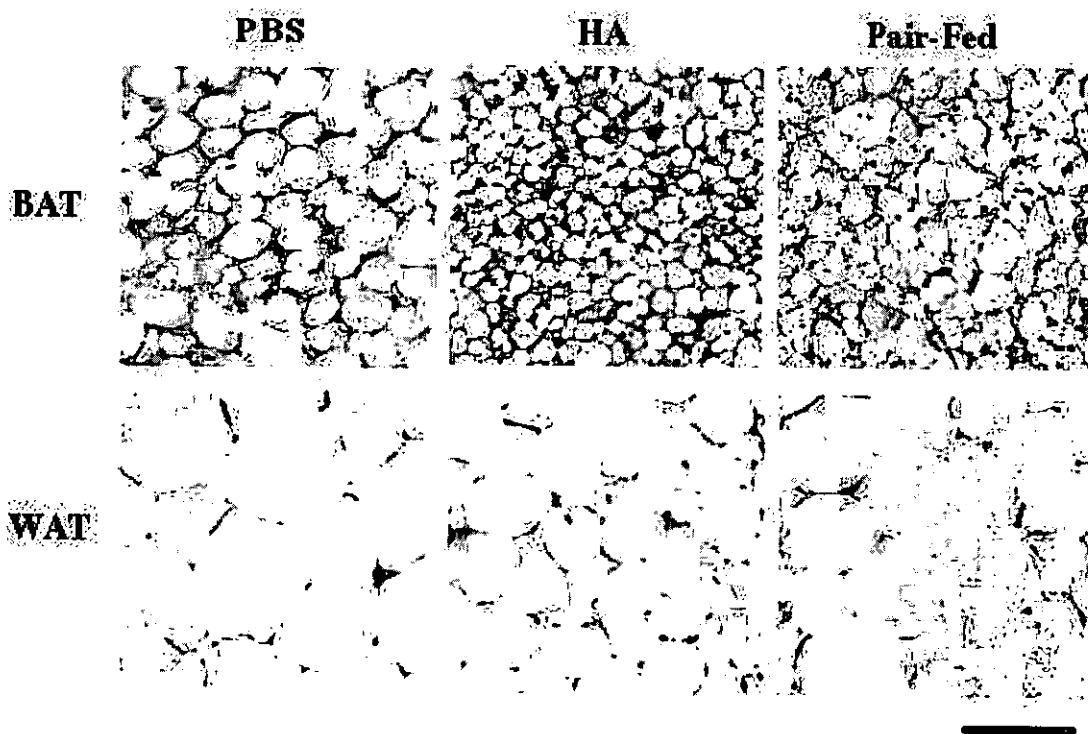


図3. ヒスタミンの慢性末梢投与による Ay/a obese mice の脂肪滴沈着

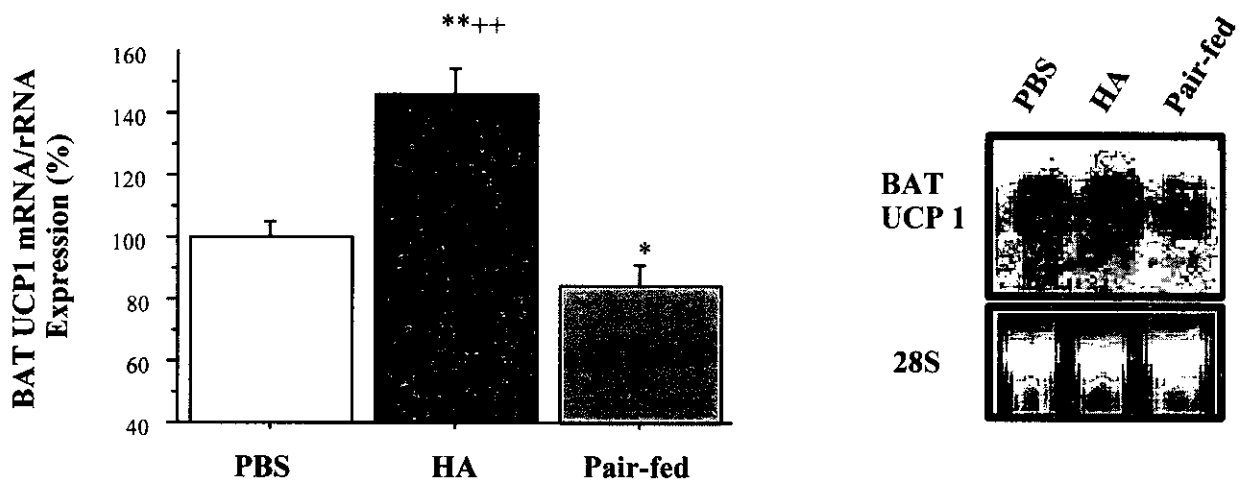


図4. ヒスタミンの慢性末梢投与による Ay/a obese mice の褐色脂肪の UCP1 発現

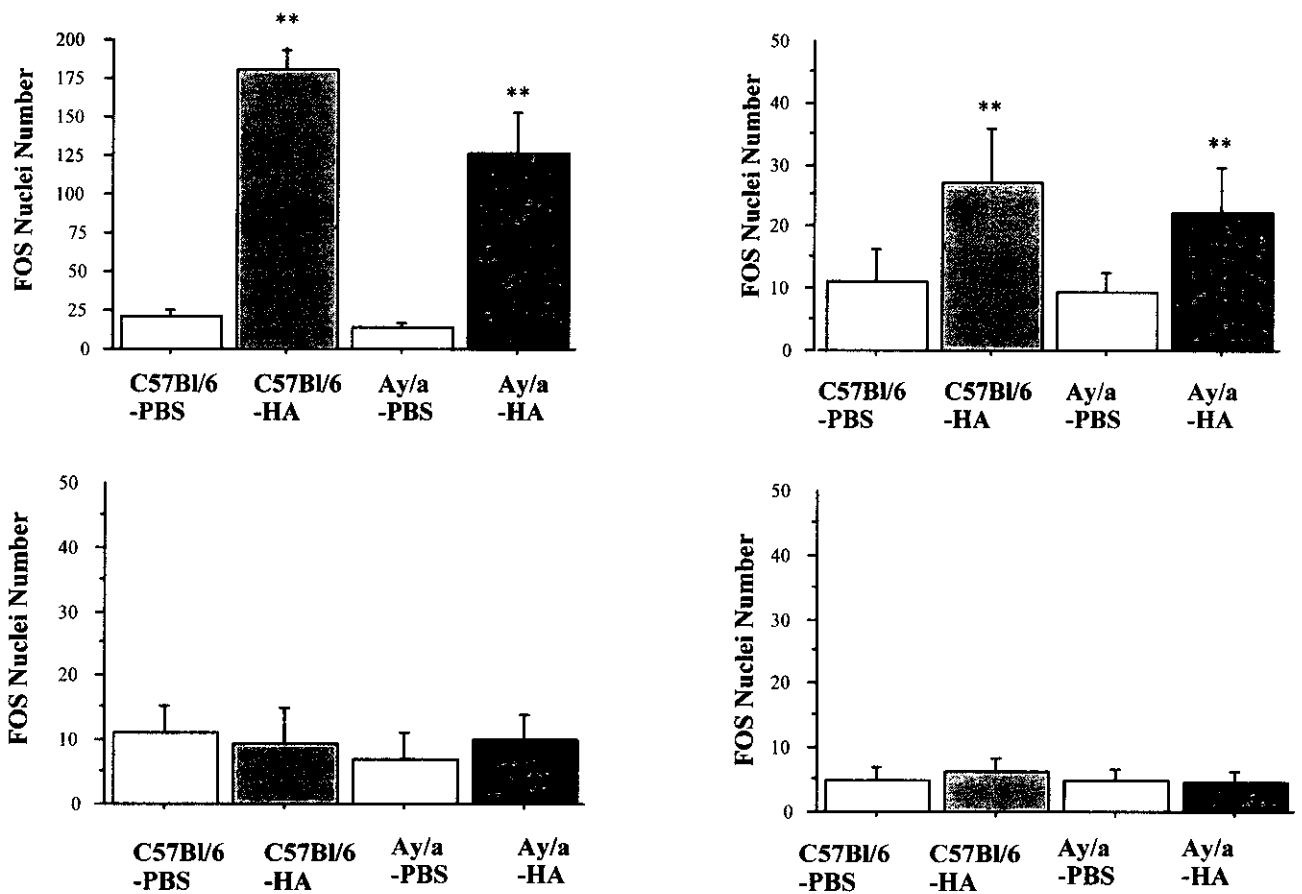


図5. ヒスタミンの慢性末梢投与による Ay/a obese mice の c-FLI 発現

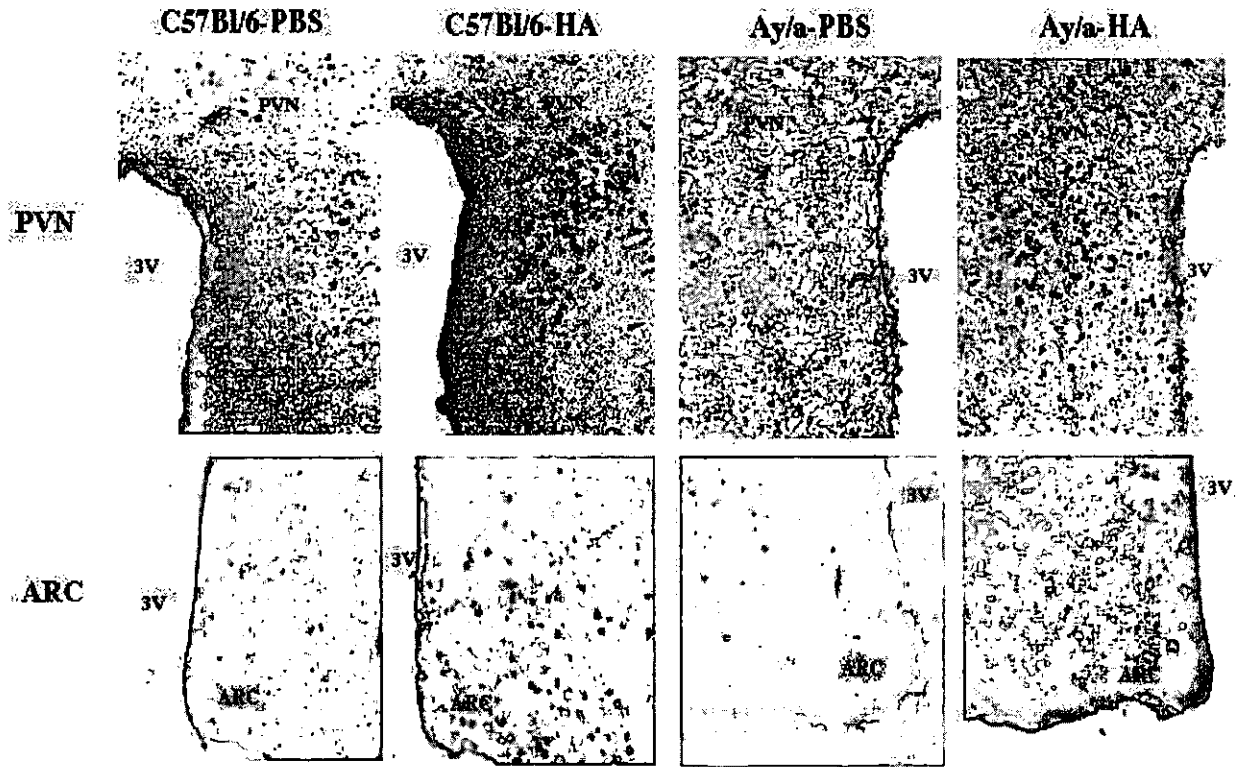


図6. ヒスタミンの慢性末梢投与による Ay/a obese mice の PVN と ARC における c-FLI 発現

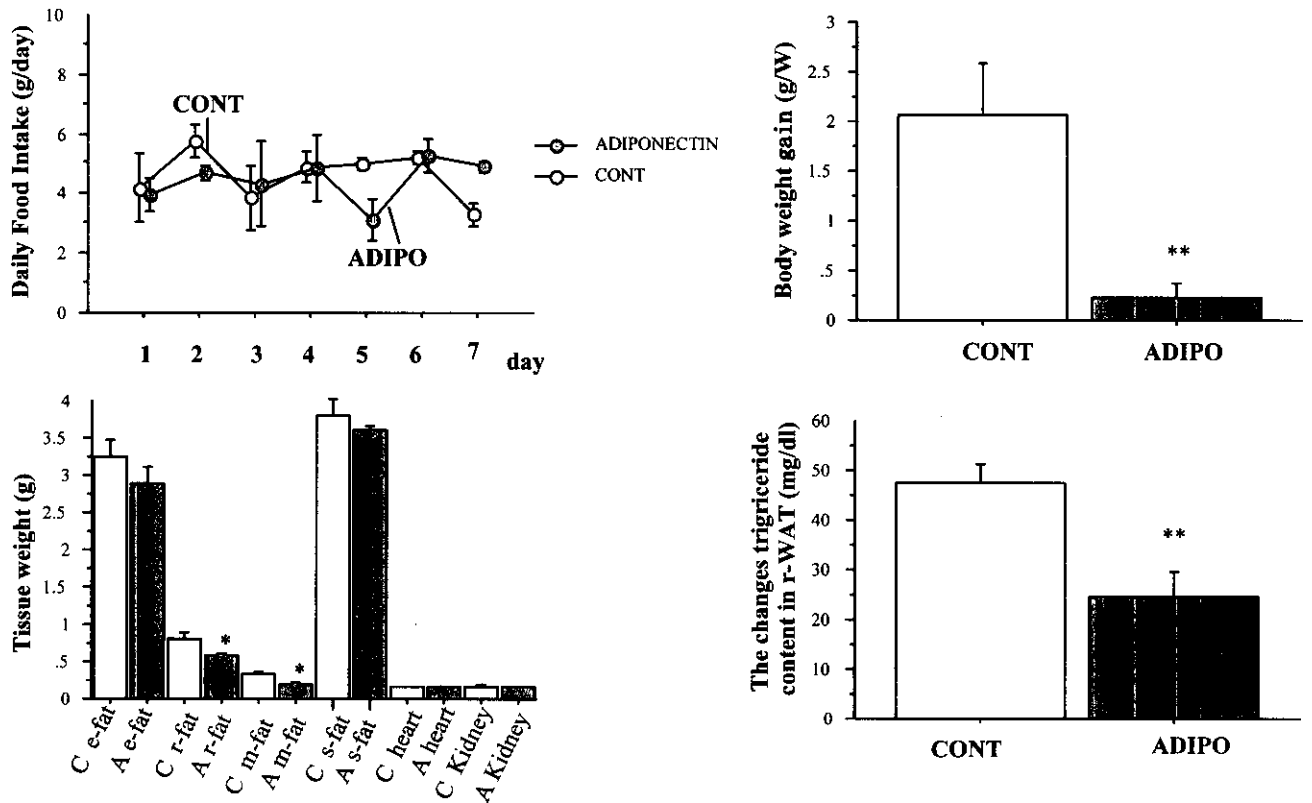


図7. アディポネクチンの慢性末梢投与による Ay/a obese mice の摂食量, 体重, 組織量および中性脂肪量の変化

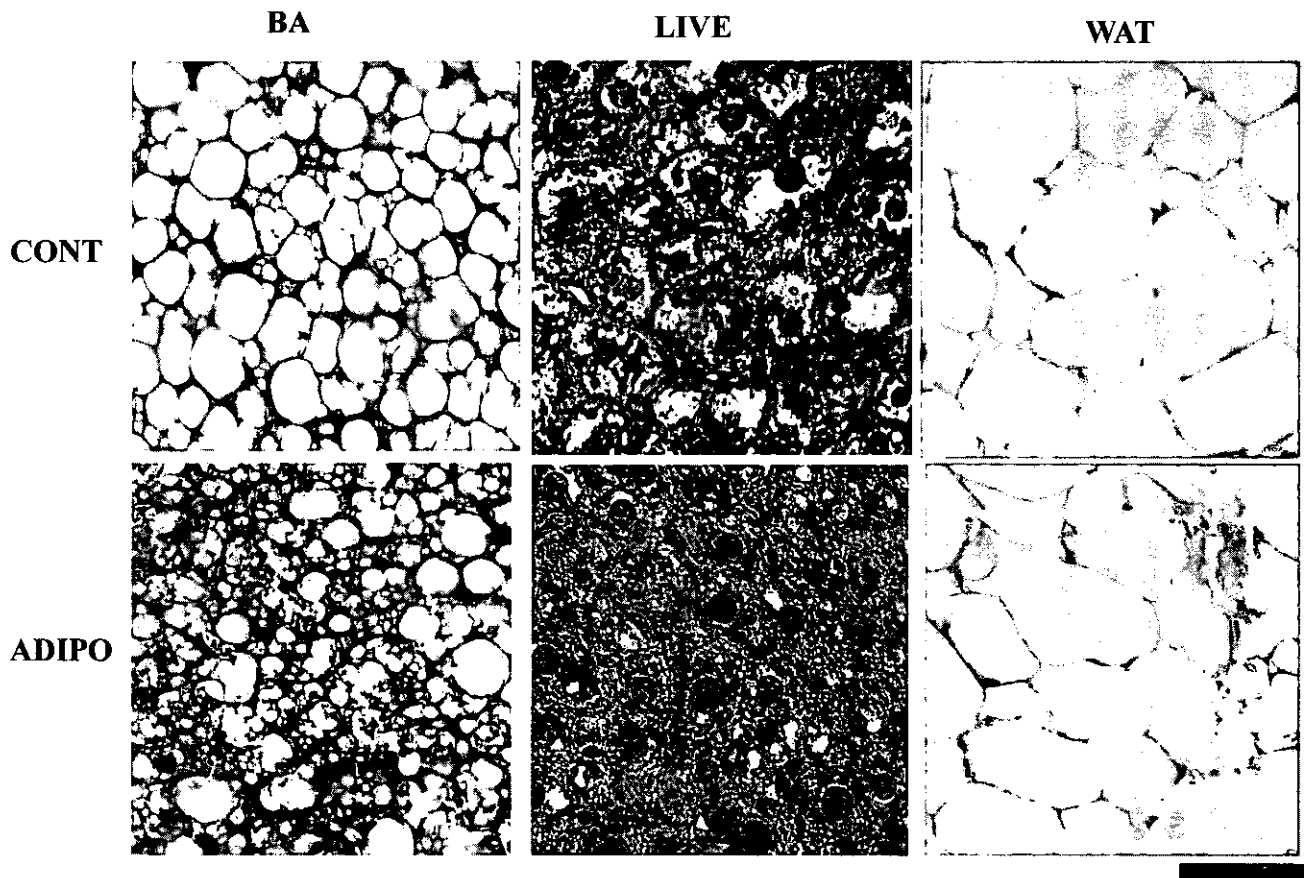


図8. アディポネクチンの慢性末梢投与による Ay/a obese mice の脂肪滴沈着

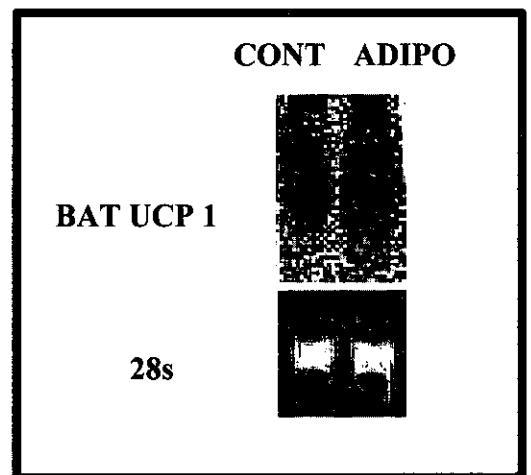
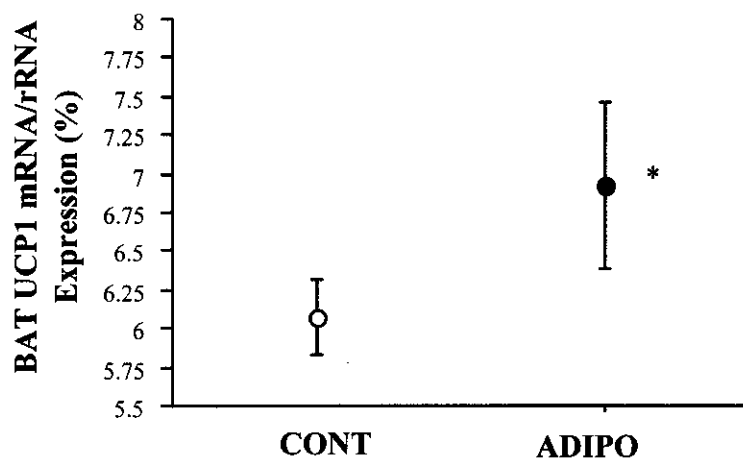


図9. アディポネクチンの慢性末梢投与による Ay/a obese mice の褐色脂肪の UCP1 発現

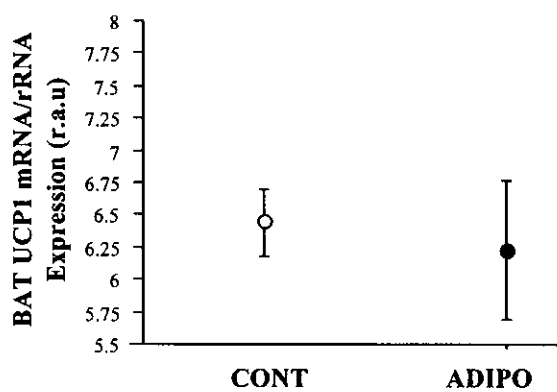
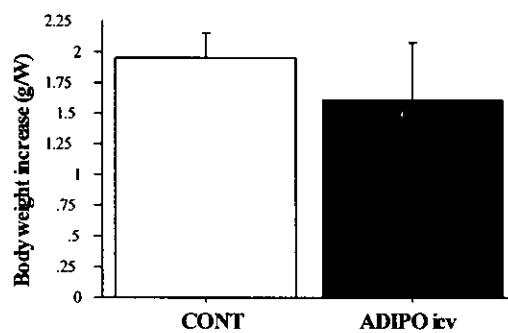
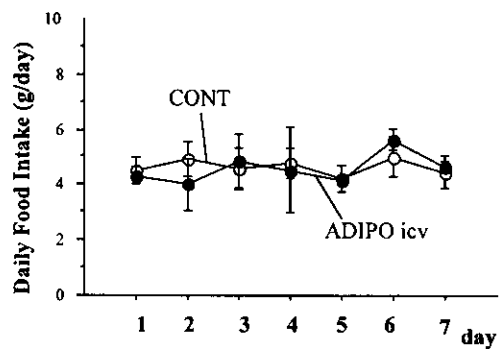


図 10. アディポネクチンの慢性側脳室投与による Ay/a obese mice の摂食量, 体重および褐色脂肪細胞 UCPI 発現

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

神経性食欲不振症患者における成長ホルモン分泌の機序

—グレリンとの関連—

分担研究者	久保 千春	九州大学大学院医学研究院心身医学	教授
	野崎 剛弘	九州大学大学院医学研究院心身医学	
	是枝 千賀子	九州大学大学院医学研究院心身医学	
	瀧井 正人	九州大学大学院医学研究院心身医学	
	河合 啓介	九州大学大学院医学研究院心身医学	

研究要旨 【目的】神経性食欲不振症(AN)患者で、成長ホルモン(GH)とグレリンその他のホルモンとの関連を調べた。【方法】当科で入院治療を行った女性AN患者20名(制限型11名、無茶食い/排出型9名)を対象に、入院時(低体重時)および退院時(体重増加後)の早朝空腹時に採血し、GH、IGF-1、ACTH、コルチゾールおよび活性型グレリンを測定した。【結果及び考察】GHとグレリンは、入院時有意な正の相関を認めたが、退院時には有意な相関はなかった。入院時 GH は、BMI、摂取カロリーおよび IGF-1 との間に逆相関関係を認めたが、有意ではなかった。重回帰分析の結果、GH の分泌にもっとも独立して影響を与える因子はグレリンであった。これらから AN の低体重で上昇したグレリンは GH 分泌に寄与したと考えられる。また、GH とグレリンの相関は制限型で強く、無茶食い/排出型でみられなかった。このことから過食嘔吐が存在すると、グレリン分泌の機序が異なることが示唆された。【結論】AN 患者の低体重時には GH 分泌に対して、活性型グレリンが独立して影響を及ぼす因子であると考えられた。体重回復時には GH と活性型グレリンの関連性を認めなかった。このことから、AN 患者の低体重時における GH 分泌には、グレリンの関与が示唆された。

研究目的

神経性食欲不振症(AN)の患者において、成長ホルモン(GH)が高値を示すことは知られているが、その機序は明らかではない。一方、近年発見された GH 分泌促進因子であるグレリン¹⁾は、摂食調節に密接に関わっており、特にその血中の基礎値は体重と負の相関があることが知られている²⁾。健常人において、内因性グレリンが GH の分泌に直接関わっていることを示す報告は未だなく、通常血中濃度では GH の分泌を促進する作用は発揮しないと考えられている。今回我々は、低体重の状態が持続している AN 患者で、グレリンの GH 分泌への関与を調べ、GH 高値の機序を解明することを目的とした。

研究方法

当科で入院治療を行った女性 AN 患者 20 名(制限型 11 名、無茶食い/排出型 9 名、平均年齢 20.6±6.9 歳、

罹病期間 3.48±3.98 年)を対象とした。低体重時と体重回復時の早朝空腹時に採血し、GH、IGF-1、コルチゾール、ACTH およびグレリンを測定した。グレリンは、Linco 社の RIA キットを用いてその活性型を測定した。

(倫理面への配慮)

以上の検査については、事前に検査の趣旨とともに、その測定結果を研究に用いる可能性があることを十分説明し、患者もしくは家族の同意を得た上で行った。

研究結果

入院時に比し、退院時では、体重、BMI、摂取カロリー、および IGF-1 は有意に上昇し、コルチゾール、ACTH は有意に減少した。グレリン、GH は減少したが有意ではなかった(表1)。入院時の GH は、活性型グレリンと有意な正の相関を認めた(図 1)。とくに制限型では強い相関を認めた(図 2)。退院時の GH と活性型グレリンの間には、

有意な相関を認めなかった(図 3)。入院時 GH は、BMI、摂取カロリーおよび IGF-1 との間に逆相関関係を認めたが、有意ではなかった(表 2)。重回帰分析の結果、入院時において、GH の分泌にもっとも独立して影響を与える因子は活性型グレリンであった(表 3)。

考察

AN 患者では、入院時の GH とグレリンとの間には正の相関を認め、GH 分泌に最も影響を及ぼす因子はグレリンであった。しかし、体重増加後の GH とグレリンの間には相関は認められなかった。このことから、AN の低体重(慢性飢餓状態)で上昇したグレリンは GH 分泌に寄与するが、摂食状態が改善し体重が回復した後は、このシステムは働かなくなると考えられる。

ラットでは、内因性のグレリンは通常では GH 分泌促進作用を発揮しない³⁴⁾とされているが、外因性のグレリン投与では低濃度より GH 分泌促進が認められている¹⁾。ヒトにおいても、ラットと同様グレリンの静脈内や皮下への投与によって GH 分泌が促進されることが知られている⁵⁾。しかし、内因性グレリンが GH 分泌に直接関与しているという報告は未だない。一方、AN 患者では GH 高値がしばしば認められる。その機序として、低栄養状態により IGF-1 が生成されないことにより通常のフィードバック機構が働かないことや、ソマトスタチンの GH 分泌抑制の調節機構が破綻している可能性などが云われているが、詳細は明らかでない。以上の点を踏まえて、我々はグレリンの基礎値が長期間上昇していると考えられる低体重状態の AN 患者において、内因性グレリンが外因性グレリン投与と同様に GH 分泌促進作用を発揮しているのではないかとの仮説を立てた。今回の結果はこの仮定に即した結果であり、低体重でのグレリン高値が GH 分泌促進をもたらし、AN での GH 高値を引き起こしている可能性が示唆された。迷走神経求心路にグレリン受容体の存在が確認されており、迷走神経切断により、GH 分泌が著明に抑制されたとする報告⁶⁾から、AN での GH の上昇に、グレリンが胃の迷走神経を賦活する経路の存在も考えられる。

また、Tanaka ら⁷⁾は制限型よりも無茶食い/排出型でグレリンの平均値が高く、また無茶食い/排出型の患者で、血清アミラーゼとグレリンに正の相関を認め、グレリンと自己誘発性嘔吐の関連性が示唆されたと報告している。体重減少のない、神経性過食症(BN)でも、グレリンは上昇する⁸⁾ことが分かっている。今回、GH とグレリンの相関が制限型でみられ、無茶食い/排出型でみられなかったことから、低体重による長期的なグレリンの分泌亢進と、過食嘔吐といった食行動異常による短期的なグレリン分泌に

は異なる機序が働いていることが示唆される。

結論

AN 患者の低体重時には GH 分泌に対して、活性型グレリンが独立して影響を及ぼす因子であると考えられた。体重回復時には GH と活性型グレリンの関連性を認めなかった。このことから、AN 患者の低体重時における GH 分泌には、グレリンの関与が示唆された。

参考文献

1. Kojima M, Hosoda H, Date Y et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402:656,1999.
2. Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, et al: Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 4753,2001.
3. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, et al.: Ghrelin and des-acyl ghrelin :two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem. Biophysiol Res Commun* 279:909, 2000.
4. Yamazaki M, Nakamura K, Kobayashi H, et al.: Regulatory effect of ghrelin on growth hormone secretion from perfused rat anterior pituitary cells. *J Neuroendocrinol* 14:156,2002.
5. Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, et al.: Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 85:4908,2000.
6. Date Y, Murakami N, Toshinai K, et al.:The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 123:1120,2002
7. Tanaka M, Naruo T, Nagai N, et al.: Habitual binge/purge behavior influences circulating ghrelin levels in eating disorders. *J Psychiatr Res* 37:17, 2003.
8. Tanaka M, Naruo T, Muranaga T, et al.:Increased fasting plasma ghrelin levels in patients with bulimia nervosa. *Eur J Endocrinol* 146: R1-R3.2002.

健康危険情報

特になし

研究発表

論文発表

1. Kawai K, Nozaki T, Nishikata H, Aou S, Takii M, Kubo C. Aggressive Behavior and Serum Testosterone Concentration during the Maturation Process of Male Mice: The Effects of Fetal Exposure to Bisphenol A. *Environ Health Perspect.* 111: 175-8, 2003
2. Takii M, Uchigata Y, Nozaki T, Nishikata H, Kawai K, Komaki G, Iwamoto Y, Kubo C. Classification of type 1 diabetic females with bulimia nervosa into subgroups according to purging behavior. *Diabetes Care* 25: 1571-1575, 2002
3. Takii M, Uchigata Y, Komaki G, Nozaki T, Kawai K, Nishikata H, Kawai H, Morioka K, Iwamoto Y, Kubo C.: A cognitive/behavioral approach to type 1 diabetic females recurrent binge eating: a 3-year follow-up study. *International Congress Series* 1241: 291-296, 2002
4. 有村達之、小牧元、村上修二、玉川恵一、西方宏昭、河合啓介、野崎剛弘、瀧井正人、久保千春: アレキシサイミア評価のための日本語版 Beth Israel Hospital Psychosomatic Questionnaire 構造化面接法(SIBIQ) 開発の試み. *心身医学* 42: 259-269, 2002
5. 野崎剛弘、吉村隆之、菅原英世、他: 心療内科を受診したうつ病患者のプロスペクティブ・スタディ(第1報) -病型と治療成績との関係-. *心身医* 42: 575-584, 2002

学会発表

- 1) The 10th Congress of the Asian College of Psychosomatic Medicine, Taipei, Taiwan, September 27-28, 2002
 1. Nozaki T, Kawai H, Koreeda C, et al: Psychological characteristics of patients with anorexia nervosa and a history of stealing.
- 2) The 10th Congress of the Asian College of Psychosomatic Medicine, Taipei, Taiwan, September 27-28, 2002
 2. Takii M, Takakura S, Hiromi Kawai, et al: Eating Disorders in Females with Type 1 Diabetes in Japan.
- 3) The 10th Congress of the Asian College of

Psychosomatic Medicine, Taipei, Taiwan, September 27-28, 2002

3. Nishikata H, Nozaki T, Hiromi Kawai, et al: "Three-Cats" Dialogue Notebook: Nonverbal Communicative Intervention for a Case of Anorexia Nervosa with Selective Mutism.
- 4) The 10th Congress of the Asian College of Psychosomatic Medicine, Taipei, Taiwan, September 27-28, 2002
 4. Kawai K, Nozaki T, Hiromi Kawai, Koreeda C, et al: The Effects of Fetal Exposure to Bisphenol A on Aggressive Behavior in Pubescent Male Mice.
- 5) 第43回日本心身医学会総会 2002.5.23-24 東京
 5. 野崎剛弘、瀧井正人、河合啓介、西方宏昭、河合宏美、久保千春: 外来治療のみで体重を増加できた神経性食欲不振症例の検討.
- 6) 第43回日本心身医学会総会 2002.5.23-24 東京
 6. 河合啓介、野崎剛弘、西方宏昭、河合宏美、瀧井正人、久保千春: 摂食障害患者の初期治療におけるフルボキサミン・スルピリド併用投与の効果
 7. 河合宏美、西方宏昭、河合啓介、野崎剛弘、瀧井正人、久保千春: 当科で経験した神経性食欲不振症の男性例.
- 7) 第43回日本心身医学会総会 2002.5.23-24 東京
 8. 西方宏昭、野崎剛弘、河合宏美、河合啓介、瀧井正人、久保千春: 当院の摂食障害症例における緊急入院について.
- 8) 第43回日本心身医学会総会 2002.5.23-24 東京
 9. 瀧井正人、野崎剛弘、河合宏美、西方宏昭、河合啓介、久保千春: パネルディスカッション IV 身体医療と心身医療の境界と総合. 心身医学が糖尿病臨床において果たすべき役割-当科における実践と今後の展望-.

知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 :なし
2. 実用新案登録 :なし
3. その他 :未定

表1:入院時と退院時の比較

	入院時	退院時	P
BW(kg)	31.79±4.99	42.31±4.83	<0.0001
BMI(kg/m ²)	13.1±1.63	17.5±1.63	<0.0001
摂取量(kcal)	1280±588	1812±306	0.0042
GH(ng/ml)	6.24±9.75	3.25±3.11	0.243
IGF-I(ng/ml)	133.1±94.9	276.8±121.3	<0.0001
Ghrelin(pg/ml)	160.0±109.8	119.4±37.9	0.131
Cortisol(μ l/dl)	21.50±11.48	13.25±4.33	0.002
ACTH (pg/ml)	31.1±13.5	23.6±7.84	0.056

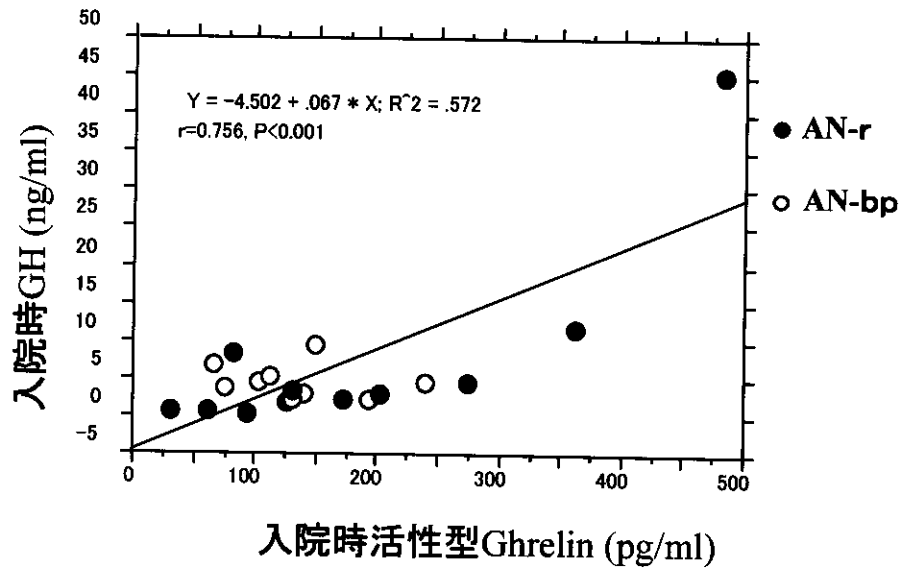


図1 入院時GHと活性型グレリンの相関

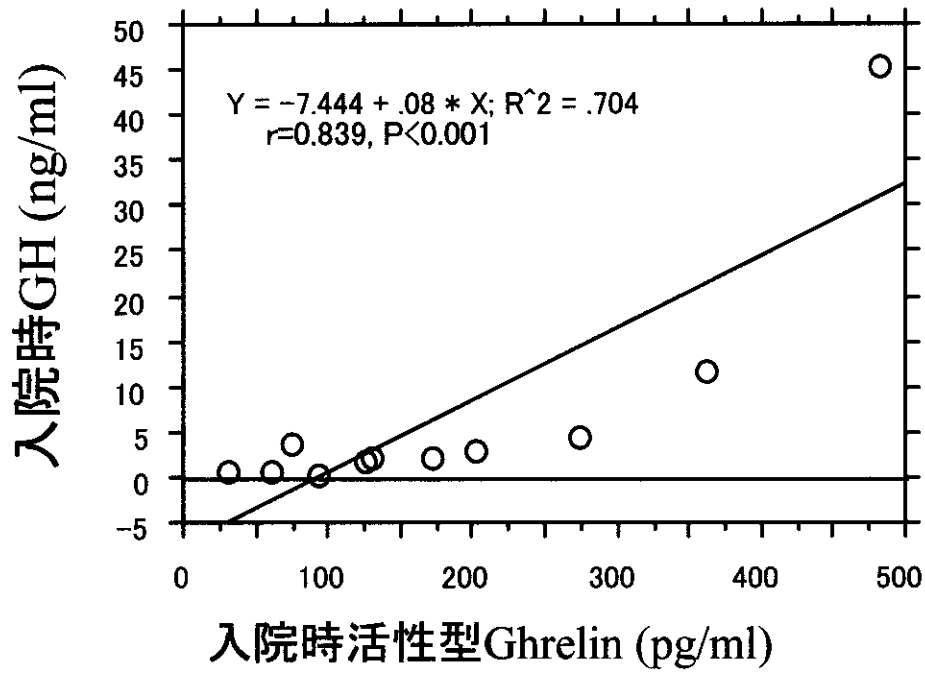


図2 制限型AN患者の入院時GHと活性型グレリンの相関

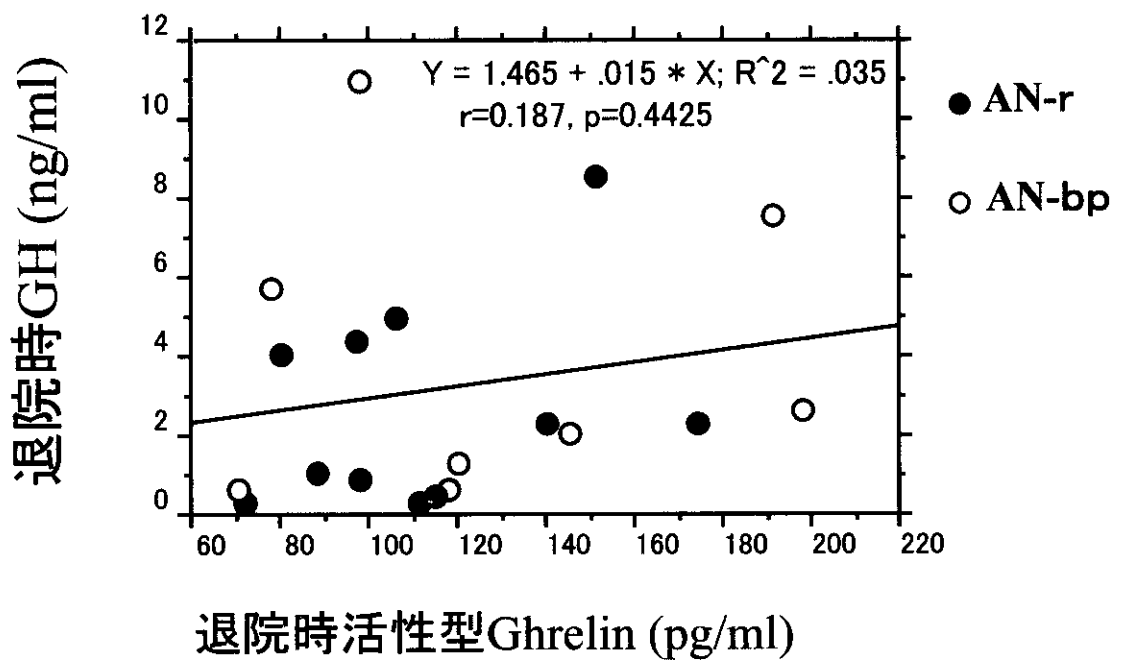


図3退院時GHと活性型グレリンの相関

表2 GHと他の因子との相関

	r	p
年齢	-0.034	0.917
罹病期間	0.030	0.903
BMI	-0.384	0.095
摂取カロリー	-0.319	0.173
活性型グレリン	0.756	<0.001
IGF-I	-0.317	0.175
ACTH	0.066	0.784
コルチゾール	0.362	0.118

表3 GHを従属変数とした重回帰分析

	β	t	p
Ghrelin	0.756	4.906	<0.001

神経性食欲不振症患者における血漿 ghrelin 値とその動態に関する研究

分担研究者 鈴木(堀田) 眞理 政策研究大学院大学 保健管理センター 教授

研究要旨 14名の神経性食欲不振症患者において、血漿 intact ghrelin 値とその degradation profile、および、血漿 ghrelin の糖負荷による変化を検討した。本症では、血漿 intact ghrelin 値は同年齢の健常人と比較して低下～同等であった。血漿 intact ghrelin は消化器症状を強く訴える患者で低い傾向を認め、胃粘膜病変による ghrelin 分泌の低下が示唆された。血漿 octanoyl ghrelin N-terminus や C-terminus ghrelin は健常人より有意に高く、degradation profile の健常人との差を認め、脱水による腎での ghrelin 残基のクリアランスが低下していることが推測された。さらに、血漿 intact ghrelin は糖負荷によって健常人と同様に迅速に抑制され、糖代謝による分泌調節は温存されていた。血漿 intact ghrelin 値が低下した本症患者では、ghrelin は治療薬になる可能性があると考えられた。

研究目的

Ghrelin は、内因性の Growth hormone secretagogues であるばかりでなく、強力な orexigenic effect も有する¹⁾。神経性食欲不振症患者では、血漿 C terminus ghrelin 値は健常人より高いことが報告されている²⁻⁴⁾。しかし、生物学的活性を有するのは 3 位の octanoyl 基を含む (1-28)ghrelin (intact ghrelin) である。我々は、intact ghrelin のアッセイを用いて本症患者において、血漿 intact ghrelin 値と degradation profile、血漿 ghrelin 値と GH-IGF-I axis の関係、および、血漿 Ghrelin の糖負荷による変化を検討することを目的とした。

研究方法

対象は 14名の DSM IV を満たす神経性食欲不振症患者で、年齢は 17～37 歳、BMI は 9.0～16.5 kg/m² で、7名が制限型、7名がむちゃ食い／排出型であった。6名の 23～30 歳、BMI は 18.4～21.5 kg/m² の健常女性を対照とした。

前夜 21 時以降の絶食を確認できた被験者から、午前 8～9 時に採血した。ghrelin 測定用の血液には EDTA-2Na と aprotinin を添加し、30 分以内に遠心して、得られた血漿に 1N HCl を加えて -80℃ で保存した。測定直前に 1N NaOH を加えて pH を補正した。intact ghrelin(1-28) は immuno complex transfer enzyme immunoassay にて測定した⁵⁾。これには高感度の抗ヒト ghrelin(1-28)-Cys 抗体と抗ラット ghrelin (1-11)-Cys 抗体を用いた。ghrelin の degradation profile の検討には、N-terminus ghrelin の測

定には octanoyl ghrelin(1-13) を認識する抗体を、C-terminus ghrelin の測定には ghrelin(14-28) を認識する抗体を用いた Linco 社のそれぞれの RIA キットを使用した。同時に得られた血液で血糖、GH、IGF-I およびインスリンを測定した。

糖負荷の検討は、被験者を前夜 21 時以降絶食にし、午前 8～9 時から 10%ブドウ糖液、あるいは生理食塩水を 500ml/2 時間で経静脈性に投与して、投与前、投与後 1 時間、2 時間に採血し、血糖、血漿 Ghrelin、GH、IGF-I、インスリンを測定した。被験者には検査について説明し、文書でインフォームドコンセントを得た。

研究結果

1) 血漿 ghrelin 値と degradation profile

健常女性の血漿 intact ghrelin 値は 346.8～660.4 pg/ml で、平均 485.8±31.4 pg/ml (mean±SEM) であった。一方、神経性食欲不振症患者の血漿 intact ghrelin 値は 142.9～593.7pg/ml に分布し、健康者に比較して同等か低下しており、その平均値は 343.9±34.0pg/ml で、健常女性より有意に低下していた。腹痛や食後のもたれなどの消化器症状を強く訴える患者で低い傾向を認めた。健常者と患者の血漿 N-terminus ghrelin は 404.0±66.7 と 994.8±190.1pg/ml で、患者が有意に上昇していた。同様に、健常者と患者の血漿 C-terminus ghrelin は 5.32±0.68 と 13.94±1.48pg/ml で、患者が有意に上昇していた。健常者と患者の血漿 intact ghrelin を 1 としたときの N-terminus および C-terminus ghrelin の比率はそれぞれ、

1:0.78:10.68と1:2.63:39.0であった。

2) 血漿 ghrelin 値と GH-IGF-I axis およびインスリンとの関係

健常者と患者の空腹時血糖、血漿 GH、血清 IGF-I、およびインスリン値は、それぞれ、 91.5 ± 1.7 と 69.8 ± 3.5 mg/dl、 2.99 ± 1.03 と 13.96 ± 4.44 ng/ml、 285.9 ± 16.5 と 103.6 ± 20.3 ng/ml、および 1.56 ± 0.31 と 5.64 ± 0.67 mU/ml で、すべてに有意差を認めた。患者群では血漿 GH と血清 IGF-I 値には高い負の相関 ($r = -0.718$, $p = 0.007$)があったが、血漿 ghrelin 値と血漿 GH や血清 IGF-I およびインスリン値に相関を認めなかった。

3) 血漿 Ghrelin の糖負荷による変化

200Cal/2時間の経静脈製の糖負荷によって、健常者と患者の血糖はそれぞれ前値の 199 と 432%に上昇した。このとき、健常者と患者の血漿 ghrelin 値は前値のそれぞれ 59 と 63%に抑制された。

考察

これまで、血漿 ghrelin の測定には C-terminus ghrelin を認識する抗体が使用され、本症患者における血漿 C-terminus ghrelin 値は健常者より高いと報告されていた。我々の結果でも C-terminus ghrelin 値は健常者より高かった。しかし、生理学的に活性を有する intact ghrelin 値は、患者では広く分布し、その平均値は健常者より低かった。また、消化器症状を強く訴える患者で血漿 ghrelin 値は低い傾向にあり、ghrelin の主たる産生臓器である胃粘膜の状態と関連があることが示唆された。

患者の血漿 N および C-terminus ghrelin が健常者より著しく増加していたのは、本症に伴う腎血流量の減少によるクリアランスの低下が原因であると考えられた。

Ghrelin は GH 分泌刺激作用を有するが、本症においては血漿 ghrelin 値と GH-IGF-I axis およびインスリンとは有意な相関を認めず、GH 分泌との密接な関連はないと考えられた。

本症患者でも、血漿 intact ghrelin は糖負荷によって健常人と同様に⁴⁾迅速に抑制され、糖代謝による分泌調節は温存されていると考えられた。

結論

神経性食欲不振症患者における血漿 intact ghrelin 値は健常者と同等か低下しており、血糖変化によって調節されている。

健康危険情報

なし

参考文献

1. Kojima M, Hosoda H, Date Y et al. 1999 Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402: 656-660
2. Ariyasu H, Takaya K, Tagami T et al. 2001 Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 4753-4758
3. Otto B, Cuntz U, Fruehauf E et al. 2001 Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol* 145: R5-9
4. Shiya T, Nakazato M, Mizuta M et al. 2002 Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol metab* 87: 240-244
5. 片上秀喜、橋田誠一 免疫複合体転移法による超高感度測定の原理と応用 2002 年 ホルモンと臨床 50:847-860

研究発表

論文発表

1. Mari Hotta et al. A young female patient with anorexia nervosa complicated by mycobacterium szulgai pulmonary infection. *Int. J. Eat. Disorder* (in press) 2003
2. 地曳和子他 高感度エストラジオール測定キットを用いた神経性食欲不振症における性腺機能の検討 臨床病理 50, p824-829. 2002
3. 堀田眞理 栄養と成長ホルモン/インスリン様成長因子 内分泌・糖尿病科 15(suppl.1), p144-151, 2002
4. 堀田眞理他 神経性食欲不振症の骨代謝 内分泌・糖尿病科 14, p599-607, 2002
5. 堀田眞理他 神経性食欲不振症における骨粗鬆症の病態と治療 東京女子医科大学雑誌 72, p1-11, 2002

知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

摂食障害患者における食行動と血漿グレリンの検討に関する研究

分担研究者 野添 新一 鹿児島大学医学部附属病院心身医療科 教授
田中 宗毅 鹿児島大学医学部附属病院心身医療科
中原 敏博 鹿児島大学医学部附属病院心身医療科
中里 雅光 宮崎医科大学第三内科

研究要旨 近年胃から発見された消化管ホルモンのグレリンは、中枢神経系に作用して摂食の調節や自律神経系などの生体維持機構の中で重要な役割を担っていると考えられ、摂食障害患者の病態生理との関連も注目されるようになってきている。今回の臨床研究は、摂食障害患者における血漿グレリンと栄養状態、食行動との関連について調査研究することが目的である。

対象者は全て女性で、40名の神経性食欲不振症患者(AN)、31名の神経性過食症患者(BN)と15名の健常者(control)である。対象患者は、精神疾患の分類と診断の手引きに基づき、食行動の相違でそれぞれのサブタイプに分類した。AN患者は、21名の制限型(AN-R)と19名のむちゃ喰い/排出型(AN-BP)、BN患者は、18名の排出型(BN-P)と13名の非排出型(BN-NP)である。早朝の空腹状態にて、採血を行った。なお、全ての対象者において事前にインフォームド・コンセントを行い、文書による同意を得た。

全対象者における血漿グレリンは、栄養学的な指標とされる体容量指数(BMI)と体脂肪、血清コリンエステラーゼと有意な負の相関を示し、過食嘔吐の指標とされる血清アミラーゼと有意な正の相関を示した。BN-Pの平均血漿グレリンは、BMIに有意差のないBN-NP、control両群に対し有意な高値を示し、一方BMIに有意差のあるAN-R、AN-BP両群に対しては有意な差を認めなかった。習慣性の過食嘔吐行動が認められたAN-BPとBN-Pにおいて、血漿グレリン値は、一週間あたりの過食嘔吐回数、血清アミラーゼとの間で有意な正の相関を示した。しかしながら、習慣性の過食行動のみ有し、嘔吐がないBN-NPにおいて、血漿グレリン値は、過食回数、血清アミラーゼとの間で有意な相関が認められなかった。

以上の結果より、摂食障害患者においては低栄養状態だけではなく、習慣的な過食・嘔吐の程度や頻度などもグレリン分泌に関与することが示唆された。さらに、空腹時の血漿グレリン濃度を上昇させる作用は、異常な食行動の中で習慣的な過食行動のみではなく、過食後の嘔吐行動が習慣的に続くことに影響されることが推察された。

研究目的

近年胃から発見されたグレリンは、特徴的な3番目のエステル化されたセリン残基を側鎖にもつ28アミノ酸残基からなる消化管ホルモンである(Kojima et al., 1999)。このグレリンは、中枢神経系に作用し、成長ホルモン分泌、自律神経系や摂食調節などの生体維持機構の中で重要な役割を担っていると考えられている(Tschöp et al., 2000; Nakazato et al., 2001; Date et al., 2002)。

人においても血漿グレリン濃度は、体容量指数(BMI)と体脂肪という栄養学的な指標や、摂食抑制作用をもつレプチンなどと有意な負の相関関係を示すことなど種々の報告がある(Tschöp et al., 2001)。このことは末梢における血漿グレ

リン濃度の測定に意義があると証明された。

そこで我々は血漿グレリンが、慢性的でかつ異常な食行動と栄養状態にある摂食障害(ED)患者において、先行研究を行った。①AN患者は低体重でかつ低栄養状態であるが、その血漿グレリンにおいては、正常体重の健常者や単純性肥満の患者に対し高値を示した(Shiyya et al., 2002; 図1)。②AN患者を食行動の相違で2群に分けたところ、同等のBMIにもかかわらず、習慣性の過食嘔吐を伴うAN-BPがAN-Rよりも高い血漿グレリンを示した(Tanaka et al., in press; 図2)。③正常体重でありながら、習慣性の過食嘔吐という異常な食行動を行うBN患者の血漿グレリンも健常者に対し高値を示した(Tanaka et al., 2002; 図3)。以上より、ED

患者における血漿グレリンは、BMIなどの栄養状態だけでなく、過食・嘔吐といった異常な食行動の影響をうける可能性が示唆された。そこで我々は血漿グレリンが慢性的でかつ異常な食行動と栄養状態にある摂食障害(ED)患者において、その血漿グレリンと栄養状態、そして食行動との関連についてどのような関連があるのか調査研究することが今回の目的である。

研究方法

対象はすべて女性であり、ED患者71名と年齢を合わせた健常者(control)15名である。食行動の相違で精神疾患の分類と診断の手引き(DSM-IV)に基づき、ANとBNをサブタイプへ分けた。AN患者は制限型(AN-R)21名とむちゃ喰い/排出型(AN-BP)19名、BN患者は排出型(BN-P)18名と非排出型(BN-NP)13名である。排出型の患者はすべて嘔吐を行っていた。対象患者は外来患者であり、積極的な治療介入を行う前の状態である。5群の臨床的特徴は、表1に示す。

午前中(AM8:00-9:00)に絶食の状態にて採血を行った。栄養状態の指標として体重、体脂肪、血清Cholinesteraseを測定した。食行動、特に過食嘔吐に対し詳しく病歴を聴くと同時に、客観的な指標として血清のamylase, potassiumを測定した。我々は血漿グレリン(C末端)を測定し、controlを含めた5群で比較し、グレリンと栄養状態や食行動との関連について検討を加えた。なお、この研究に関しては、鹿児島大学医学部附属病院の第一回臨床研究倫理委員会にて承認されており、すべての対象者に対し事前にインフォームド・コンセントを行い、文書による同意を得た。

研究結果

全ての対象者において、空腹時の血漿グレリンは、測定時年齢や罹病期間、血清カリウムとは有意な相関を示さなかったが、BMIや体脂肪、血清Cholinesteraseの栄養学的な指標と負の相関を示し、過食嘔吐の指標である血清amylaseと正の相関を示した(表2)。

5群の平均血漿グレリン濃度を比較したところ、BN-P群は栄養学的に差のないBN-NPとcontrol両群に対して有意に高値を示した。一方、栄養学的差のあるAN-RとAN-BP両群に対しては有意な差を認めなかった。また、先行研究同様にAN-BPがAN-Rより高値を示したが、栄養学的に差のないBN-NPとcontrol両群においては、有意な差が認められなかった(図4)。

習慣性の過食嘔吐を行うAN-BPとBN-Pにおいて、血漿グレリンは1週間あたりの過食嘔吐回数(図5)、血清amylase(図6)の両者において有意な正の相関を示した。

また、嘔吐を伴わない習慣性の過食を行うBN-NPにおい

て、血漿グレリンは1週間あたりの過食の回数、血清amylaseの両者とも有意な相関関係を示さなかった(表なし)。

考察

1. AN患者の血漿グレリンは、低い体重と栄養状態に対し摂食を促しかつエネルギー保持を行うために分泌促進していると考えられる。
2. BN-P患者の血漿グレリンは、習慣性の過食嘔吐行動が栄養状態にも関わらずに影響したと考えられるが、このことは自律神経系など他の統制機構の関与が示唆された。
3. BN-NP患者の血漿グレリンが健常者と有意な差を認めなかったことより、習慣性の嘔吐を伴う過食行動の方が、より迷走神経系を求心性に活性化してグレリン分泌を促進させる可能性が考えられた。
4. AN-BP患者の血漿グレリンは、BN-Pと同様に過食嘔吐という異常な食行動による自律神経を介しての影響と、慢性的な低体重や低栄養状態の影響等と複雑に関与している可能性が考慮された。

結論

1. 摂食障害患者において、血漿グレリンはANのような慢性的な低栄養状態の影響をうけるが、過食嘔吐といった異常な食行動もより影響することが考えられた。
2. 嘔吐を伴う習慣性の過食行動の方が、嘔吐を伴わない過食行動よりも、グレリン分泌を促進させることが示唆された。
3. これらのことは治療という臨床の場で、我々が患者の摂食行動特に過食嘔吐の有無を評価するという客観的な指標となる可能性が示唆された。

参考文献

1. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K: Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402: 656-660, 1999.
2. Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML: Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407: 908-913, 2000.
3. Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S: A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409: 194-198, 2001.
4. Tschöp M, Weyer C, Tataranni AP, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML: Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 50: 707-709, 2001.
5. Date Y, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Nijima A,