

図 3 A.レプチンによるオレキシン神経の抑制は、JAK2 inhibitor である AG490 によって阻害された。B. レプチンによるオレキシン神経の抑制は PI3K inhibitor である LY294002 の存在かで消失した。C.オレキシン神経特異的 STAT3 欠損マウスにおいてもオレキシン神経のレプチンによる抑制は認められた。

## ノックアウト・マウスを使った摂食調節ペプチドの機能解析

分担研究者 児島 将康 久留米大学分子生命科学研究所遺伝情報研究部門 教授

**研究要旨** 強力な摂食亢進作用を示すグレリンの、視床下部での分子フォームを明らかにした。視床下部グレリンは、胃と同じくオクタン酸で修飾されたものが活性型で、その他に脂肪酸の修飾のないデス・アシル・グレリンが存在した。視床下部グレリンの mRNA 発現は絶食や 2-DG 投与によって減少した。胃のグレリン mRNA は絶食によって増加することから、視床下部グレリンの調節は、末梢とは別の機構であると示唆された。

### 研究目的

①グレリンはオーファン受容体 GHS-R (growth-hormone secretagogue receptor: 成長ホルモン分泌促進因子受容体) の内因性リガンドとして、胃から精製され、構造決定されたペプチド・ホルモンである。グレリンの特徴的な構造は3番目のアミノ酸であるセリン残基の側鎖が、脂肪酸である n-オクタン酸の修飾を受けていることで、しかもこの修飾基がグレリンの活性発現に必須である。しかも、グレリンはほ乳類だけでなく、両生類、鳥類、魚類と脊椎動物すべてに存在しており、グレリンは全ての種で脂肪酸の修飾を受けている。このように、グレリンの脂肪酸修飾は進化の過程でよく保存されており、グレリンの活性発現に重要である。

一方、視床下部の摂食調節領域にもグレリンが存在することが免疫組織染色から示されているが、それがどのような分子フォームであるのか、またどのような生合成・分泌調節を受けているのかは明らかではない。本研究では、これらの点を解明することを試みた。

②グレリンの欠損が生体にどのような影響を与えるのか明らかにするため、グレリン欠損マウスを作製し、その表現型を解析した。

### 研究方法

①ラット視床下部からペプチド画分を抽出し、HPLC にて展開した。グレリンの N 末端、C 末端を認識する2種類の RIA 系を用いて、その分子フォームを検討した。

②絶食によって視床下部グレリンの濃度と分子フォームがどのように変化するかを調べた。同時に胃と血中グレリンの変化も調べ、比較検討した。

③グルコース消費を阻害する 2-DG (2-deoxy-D-

glucose) を投与すると、摂食が刺激されるが、このときに視床下部グレリンや他の摂食調節ペプチドがどのように変化するかを調べた。同時に胃と血中グレリンの変化も調べ、比較検討した。

④グレリン・ノックアウト・マウスを作製し、その表現系を調べた。

### 研究結果

①視床下部グレリンの分子フォームについて(図1)

ラット視床下部を取り出し、沸騰水中でボイルすることによって、内因性プロテアーゼによるペプチド分解を防止した。抽出したペプチド画分を HPLC によって展開し、RIA によって分子フォームを調べると、おもに2種類の分子フォームで存在していた。一つは胃でのグレリンの主要な分子フォームであるオクタン酸で修飾されたグレリンで、もう一つは脂肪酸修飾のないデス・アシル型のグレリンであった。これまで、免疫組織染色によって視床下部でのグレリンの存在が示唆されていたが、われわれの実験から視床下部には確かにグレリンが存在し、胃と同じくオクタン酸修飾のグレリンがメインの活性型分子フォームであることがわかった。また視床下部においても、脂肪酸が付いていない非活性型のデス・アシル・グレリンも存在することがわかった。

②絶食による視床下部グレリンの変化(図2)

胃においては絶食によってグレリン mRNA の発現量は増加するが、視床下部においては絶食によってグレリン mRNA 量は逆に減少した。実験系に間違いがないか、NPY、AgRP、MCH などの絶食によって増加する神経ペプチドの mRNA 発現を調べたが、これらは文献どおり絶食によ

て増加した。従って、確かに絶食によって視床下部グレリン mRNA が減少することが確認された。

次に、視床下部グレリンのペプチドレベルでの変化を調べた。これまでの研究で、絶食によって胃でのグレリン・ペプチド量は減少する。これはグレリンの分泌量が多くなるためと考えられてきた。視床下部においても、グレリン・ペプチド量は絶食によって減少した。

以上、絶食によって視床下部グレリンは mRNA、ペプチド・レベルでも減少することがわかった。

### ③2-DG による摂食刺激時の視床下部グレリンの変化 (図3)

2-DG はグルコース消費を抑制して、摂食を刺激する。この 2-DG を投与して、ラットが過食状態になっているときに、視床下部グレリンがどう変化しているか調べた。2-DG 投与によって摂食量は増加した。2-DG 投与によって視床下部グレリンの mRNA は減少した。一方、胃のグレリン mRNA は 2-DG 投与によっても変化がなかった。視床下部の NPY, AgRP, MCH などの摂食亢進性のペプチドは 2-DG 投与によって mRNA が増加した。

次に 2-DG 投与によってグレリンがペプチドレベルでどのように変化するかを調べた。視床下部グレリンのペプチド量は 2-DG 投与によって減少した。また胃でも有意差はないがグレリンのペプチド量の減少傾向が見られた。

このように視床下部において、グレリンと他の摂食亢進性ペプチドとの動きは異なっていることがわかった。

### ④グレリン・ノックアウト・マウスの解析

作製したグレリン・ノックアウト・マウスは野生型マウスと比較して、成長・発育に変化はなく、生殖能力にも異常はなかった。そのほか、摂食量、体重、体温、血圧、心拍数、血中の栄養学的マーカーなども、まったく野生型マウスと差がなかった。

### 考察

視床下部には確かにグレリンがペプチドとして存在し、視床下部の活性型グレリンは胃と同じくオクタン酸で修飾されたものだった。このことから脳の視床下部においてもグレリンが合成され、分泌されることがわかった。

視床下部のグレリンは、胃のグレリンとはことなった合成・分泌の調節機構をもっているらしい。絶食によって胃のグレリン mRNA は増加するが、視床下部グレリン mRNA は逆に減少した。これは他の視床下部性の摂食亢進ペプチドとは逆の変化である。このメカニズムは残念ながらまだ不明である。

また視床下部グレリンのペプチドレベルは絶食や 2-DG

投与によって減少する。このことは絶食や 2-DG 投与によるグルコース欠乏状態では、視床下部グレリンの分泌が盛んになって、グレリン含量が減少するのではないかと考えている。

グレリン・ノックアウト・マウスは、これまで調べた限りでは、目立った表現系を示さない。摂食量や体重にも野生型に比べて変化はない。このことから、グレリン欠損状態では、他の摂食亢進性ペプチドがバックアップしているのではないかと考えられた。

### 結論

視床下部に確かにグレリンが存在し、視床下部グレリンもオクタン酸で修飾された分子フォームがメインの活性型であることを明らかにした。また視床下部グレリンは他の摂食亢進性ペプチドとは異なった生合成・分泌機構によって調節されていると考えられた。

### 健康危険情報

特になし。

### 研究発表

#### 論文発表

1. Shousha S, Nakahara K, Kojima M, Miyazato M, Hosoda H, Kangawa K, Murakami N. Different effects of peripheral and central ghrelin on regulation of food intake in the Japanese quail. *Gen Comp Endocrinol* 141(2):178-83, 2005.
2. Sato T, Fukue Y, Teranishi H, Yoshida Y, Kojima M. Molecular forms of hypothalamic ghrelin and its regulation by fasting and 2-deoxy-d-glucose administration. *Endocrinology* 146(6):2510-6, 2005.
3. Nishi Y, Hiejima H, Hosoda H, Kaiya H, Mori K, Fukue Y, Yanase T, Nawata H, Kangawa K, Kojima M. Ingested medium-chain fatty acids are directly utilized for the acyl modification of ghrelin. *Endocrinology* 146(5):2255-64, 2005.
4. Nishi Y, Hiejima H, Mifune H, Sato T, Kangawa K, Kojima M. Developmental changes in the pattern of ghrelin's acyl modification and the levels of acyl-modified ghrelins in murine stomach. *Endocrinology* 146(6):2709-15, 2005.
5. Moriyama M, Sato T, Inoue H, Fukuyama S, Teranishi H, Kangawa K, Kano T, Yoshimura A, Kojima M. The neuropeptide neuromedin U promotes inflammation by direct activation of mast cells. *J Exp Med*

- 202(2):217-24, 2005.
6. Kurose Y, Iqbal J, Rao A, Murata Y, Hasegawa Y, Terashima Y, Kojima M, Kangawa K, Clarke IJ. Changes in expression of the genes for the leptin receptor and the growth hormone-releasing peptide/ghrelin receptor in the hypothalamic arcuate nucleus with long-term manipulation of adiposity by dietary means. *J Neuroendocrinol* 17(6):331-40, 2005.
  7. Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev* 85(2):495-522, 2005.
  8. Iwakura H, Hosoda K, Son C, Fujikura J, Tomita T, Noguchi M, Ariyasu H, Takaya K, Masuzaki H, Ogawa Y, Hayashi T, Inoue G, Akamizu T, Hosoda H, Kojima M, Itoh H, Toyokuni S, Kangawa K, Nakao K. Analysis of rat insulin II promoter-ghrelin transgenic mice and rat glucagon promoter-ghrelin transgenic mice. *J Biol Chem* 280(15):15247-56, 2005.
  9. Fukushima N, Hanada R, Teranishi H, Fukue Y, Tachibana T, Ishikawa H, Takeda S, Takeuchi Y, Fukumoto S, Kangawa K, Nagata K, Kojima M. Ghrelin directly regulates bone formation. *J Bone Miner Res* 20(5):790-8, 2005.

#### 学会発表

1. 児島将康、摂食促進ホルモン“グレリン”の生理作用

と分泌調節、日本睡眠学会第30回定期学術総会、宇都宮

2. 佐藤貴弘、福江善彦、寺西仁志、吉田弥生、児島将康 ラット視床下部におけるグレリンの同定と合成・分泌動態の検討、第78回日本内分泌学会学術総会、2005年、横浜
3. 福江善彦、寺西仁志、佐藤貴弘、花田礼子、児島将康 ニューロメジン U ノックアウトマウスにおける性腺刺激ホルモンの発現量の変化、第78回日本内分泌学会学術総会、2005年、横浜
4. 西芳寛、比江嶋啓至、御船弘治、細田洋司、佐藤貴弘、柳瀬敏彦、名和田新、寒川賢治、児島将康 哺乳・離乳移行期に認められるグレリンの脂肪酸修飾の変動に関する検討、第78回日本内分泌学会学術総会、2005年、横浜

#### 知的財産権の出願・登録状況

- 1, 特許出願  
 発明名称 グレリンを使った骨粗鬆症、骨折の治療応用  
 出願年月日 平成17年3月4日  
 出願国 日本  
 出願番号 特番2005-60837  
 発明者(所属) 児島将康、福嶋信広、永田見成(久留米大学)

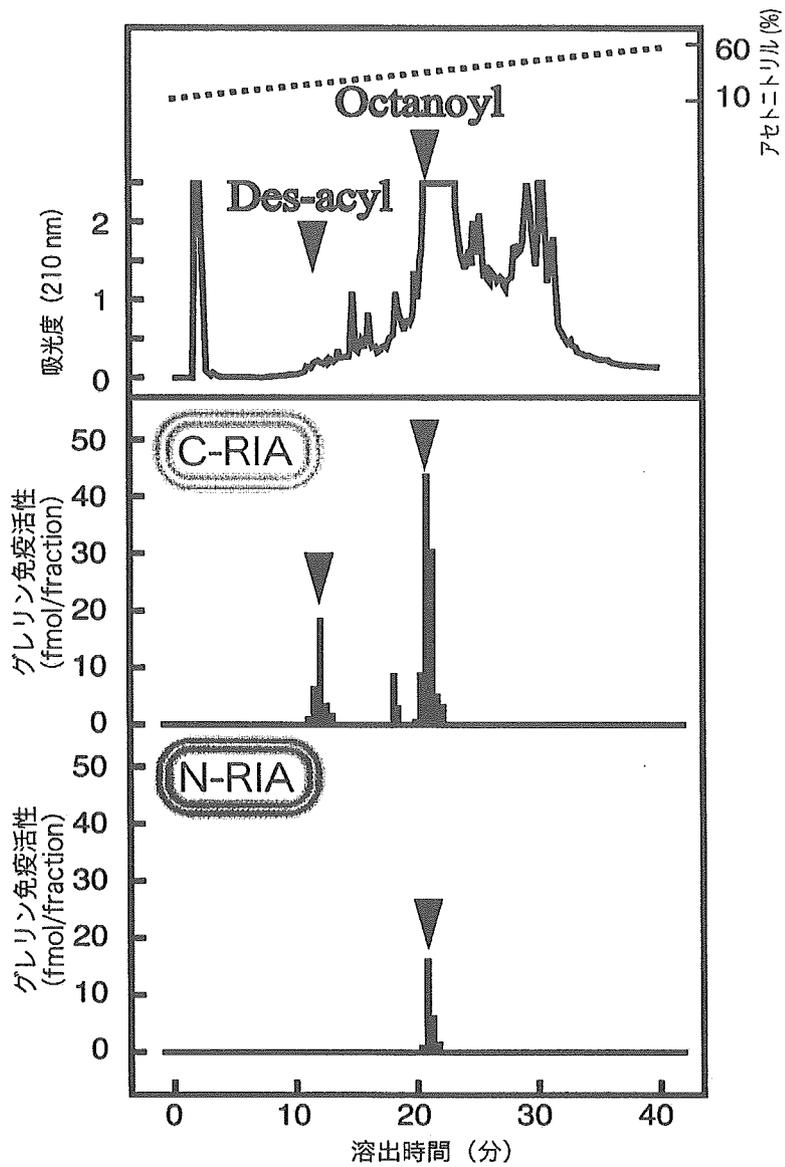
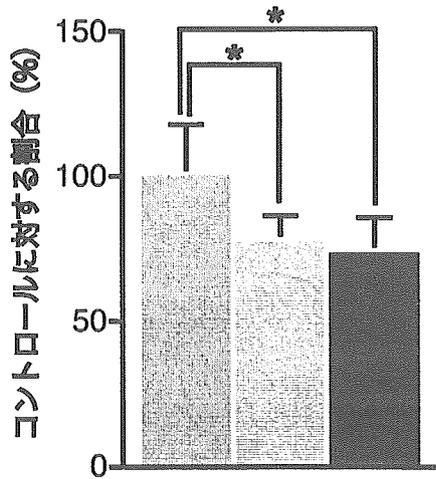


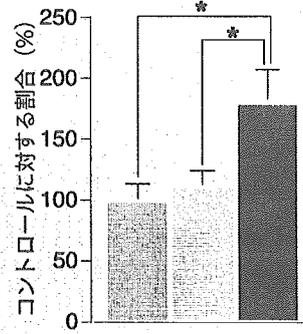
図1 ラット視床下部グレリンの分子ファームの解析

視床下部

グレリンのmRNA発現量



胃

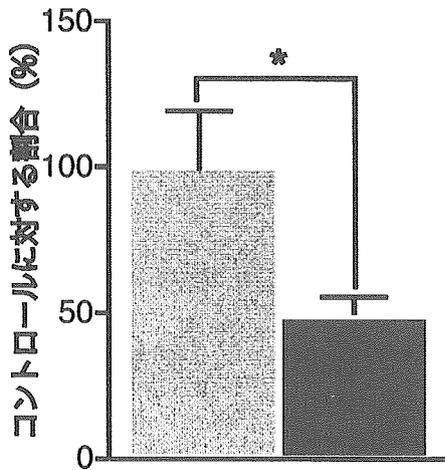


■ : コントロール, ■ : 絶食 24 時間, ■ : 絶食 48 時間

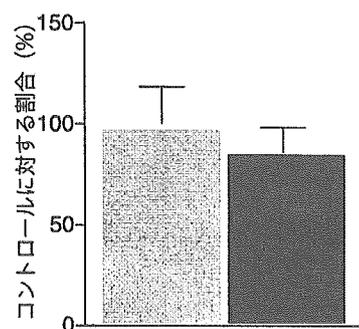
図2 絶食に伴うグレリン合成の変化

視床下部

グレリンのmRNA発現量



胃



■ : コントロール, ■ : 2-デオキシ-D-グルコース

図3 2-DG投与に伴うグレリンmRNA発現の変化

## カロリー制限とリバウンドにおける生体反応の網羅的解析

分担研究者 小川 佳宏 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子代謝医学分野 教授  
菅波 孝祥 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子代謝医学分野  
加藤 浩嗣 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子代謝医学分野

**研究要旨** カロリー制限による体重減少とリバウンドにおける脂肪組織の変化を明らかにするために、マウスのカロリー制限と自由摂食のモデルを作製し、DNA マイクロアレイ法にて内臓脂肪組織における遺伝子発現プロフィールを検討した。カロリー制限により体重は徐々に減少した後にプラトーに達し、自由摂食により速やかに回復した。カロリー制限により内臓脂肪組織において脂肪合成と脂肪燃焼に関与する遺伝子発現がいずれも亢進し、自由摂食による体重の回復とともにほぼ前値に復することが明らかになった。以上より、カロリー制限による体重減少とリバウンドにおける脂肪組織において脂肪合成と燃焼が大きく変化することが示唆された。

### 研究目的

食事療法(カロリー制限)による体重減少は、インスリン抵抗性の改善、抗炎症作用、抗酸化作用、寿命の延長をもたらすことが知られている。一方、急激なカロリー制限後にはしばしば体重増加(リバウンド現象)を生じるが、その分子機構は不明である。カロリー制限による減量後の体重の維持に伴う全身のエネルギー消費低下には、脂肪組織におけるレプチン産生低下による骨格筋のエネルギー利用効率の増加、交感神経活動の低下や神経内分泌機能変化が関与する可能性があり、脂肪組織における変化の重要性が示唆されている。以上の背景を踏まえて、本研究では、カロリー制限と再摂食後の脂肪組織における遺伝子発現プロフィールを網羅的に解析した。

### 研究方法

動物は、8週齢の雄性 C57BL6/J マウスを使用し、飼料には CLEA Rodent Diet CL-2 (3.426 kcal/g) を用いた。カロリー制限群は自由摂食群の前日の摂食量の 70% を与えた。1週間の予備飼育の後に2週間カロリー制限を施行し、1週間の再摂食(自由摂食)の前後に解析した。摂食量、体重、組織重量を測定し、DNA マイクロアレイ解析により内臓脂肪組織における遺伝子発現プロフィールを検討した。

(倫理面への配慮)

実験に用いた動物に対しては、動物愛護上の配慮として、長時間にわたり強い苦痛をもたらす方法を適用する時には、しかるべき鎮痛、鎮痛剤、または麻酔剤を獣医学

的に認められた方法を用い、あるいは適切な麻酔剤を用いて安楽死させた。

### 研究結果

#### 1. カロリー制限と再摂食における体重変化、摂食量、組織重量:

カロリー制限群では対照である自由摂食群と比較して体重は徐々に低下し、2週間後にはプラトーとなり、このときの体重は自由摂食群の約 70% 程度に減少した。この体重減少は再摂食により急速に上昇した。

カロリー制限群では対照群と比較して 70% の摂食量を維持した。カロリー制限後の自由再摂食では、急速な体重増加に伴い、摂食量に一過性の上昇が認められた。

カロリー制限により、皮下、精巣上体、内臓脂肪組織の重量はいずれも有意に減少した。同様に、肝臓、ヒラメ筋、大腿四頭筋の重量にも有意な減少が認められた。再摂食により減少した組織重量は対照群と同程度に回復していた。

#### 2. 内臓脂肪組織における遺伝子発現プロフィール:

DNA マイクロアレイによりカロリー制限後及び再摂食後の内臓脂肪組織における遺伝子発現プロフィールを解析した。カロリー制限により、内臓脂肪組織において発現が検出された約 14000 個の遺伝子の約 17% に有意な変化が認められ、このうち 10% は低下し、7% は増加した。更に、カロリー制限により有意に発現が増加した遺伝子 933 個のうち 32% は、再摂食により有意に低下し、変化しなかった 67% についてもその 94% に上昇傾向が認められた。

なし

## 研究発表

## 論文発表

又、カロリー制限により有意に発現が低下した遺伝子 1350 個は再摂食により 61% が有意に増加し、変化の認められない 39% の全てが上昇傾向を示した。以上より、カロリー制限により変化する遺伝子は再摂食により回復することが明らかになった。

カロリー制限により増加する遺伝子の多くは糖脂質代謝に関与するものであり、カロリー制限により 3 倍以上に発現が変化したもののうち 4 割以上が脂質代謝に関与する遺伝子であった。例えば、カロリー制限により長鎖脂肪酸がアシル CoA に分解される  $\beta$  酸化経路と脂肪酸合成に関与する酵素群の遺伝子発現が有意に亢進していた。レプチンや UCP の遺伝子発現はカロリー制限により有意に低下していたが、PPAR $\gamma$  や SREBP1 の発現はカロリー制限により増加していた。

## 考察

カロリー制限により体重と脂肪組織、肝臓、骨格筋の重量は低下し、再摂食により速やかに回復した。カロリー制限により、内臓脂肪組織において脂肪燃焼と脂肪合成に関与する遺伝子発現がいずれも亢進しており、再摂食によりこれらの回復傾向が認められた。特に、カロリー制限時の脂肪組織においては  $\beta$  酸化経路と脂肪酸合成経路の活性化が示唆されました。カロリー制限により脂肪組織における脂肪酸合成経路の活性化は、肥満治療におけるカロリー制限後のリバウンドの分子基盤になる可能性があり、脂肪組織における代謝変化の重要性が示唆された。

## 結論

本研究において確立したカロリー制限/再摂食のモデルは、カロリー制限とリバウンドにおける生体反応の分子機構を検討する上で有用なモデルであり、脂肪組織における脂肪合成と分解の変化の機能的意義が示唆された。

## 参考文献

1. L. Bordone, L. Guarente. Calorie restriction, SIRT1 and Metabolism: Understanding longevity. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 6:298-305, 2005
2. M. Rosenbaum, R. Goldsmith, D. Bloomfield, A. Magnano, L. Weimer, S. Heymsfield, D. Gallagher, L. Mayer, E. Murphy, R.L. Leibel. Low-dose leptin reverses skeletal muscle, autonomic, and neuroendocrine adaptations to maintenance of reduced weight. **J. Clin. Invest.** 115:3579-3586, 2005

1. T. Suganami, M. Mukoyama, K. Mori, H. Yokoi, M. Koshikawa, K. Sawai, S. Hidaka, K. Ebihara, T. Tanaka, A. Sugawara, H. Kawachi, C. Vinson, Y. Ogawa, K. Nakao. Prevention and reversal of renal injury by leptin in a new mouse model of diabetic nephropathy. **FASEB J.** 19: 127-129, 2005.
2. H. Iwakura, K. Hosoda, C. Son, J. Fujikura, T. Tomita, M. Noguchi, H. Ariyasu, K. Takaya, H. Masuzaki, Y. Ogawa, T. Hayashi, G. Inoue, T. Akamizu, H. Hosoda, M. Kojima, H. Itoh, S. Toyokuni, K. Kangawa, K. Nakao. Analysis of rat insulin II promoter-ghrelin transgenic mice and rat glucagon promoter-ghrelin transgenic mice. **J. Biol. Chem.** 280: 15247-15256, 2005.
3. Y. Oike, M. Akao, K. Yasunaga, T. Yamauchi, T. Morisada, Y. Ito, T. Urano, Y. Kimura, Y. Kubota, H. Maekawa, T. Miyamoto, K. Miyata, S. Matsumoto, J. Sakai, N. Nakagata, M. Takeya, H. Koseki, Y. Ogawa, T. Kadowaki, T. Suda. Angiopoietin-related growth factor antagonizes obesity and insulin resistance. **Nat. Med.** 11: 400-408, 2005.
4. S. Yura, H. Itoh, N. Sagawa, H. Yamamoto, H. Masuzaki, K. Nakao, M. Kawamura, M. Takemura, K. Kakui, Y. Ogawa, S. Fujii. Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine undernutrition. **Cell Metab.** 1: 371-378, 2005.
5. R. Kouyama, T. Suganami, J. Nishida, M. Tanaka, T. Toyoda, M. Kiso, T. Chiwata, Y. Miyamoto, Y. Yoshimasa, A. Fukamizu, M. Horiuchi, Y. Hirata, Y. Ogawa. Attenuation of diet-induced weight gain and adiposity through increased energy expenditure in mice lacking angiotensin II type 1a receptor. **Endocrinology** 146: 3481-3489, 2005.
6. T. Tanaka, S. Hidaka, H. Masuzaki, S. Yasue, Y. Minokoshi, K. Ebihara, H. Chusho, Y. Ogawa, T. Toyoda, K. Sato, F. Miyanaga, M. Fujimoto, T. Tomita, T. Kusakabe, N. Kobayashi, H. Tanioka, T. Hayashi, K. Hosoda, H. Yoshimatsu, T. Sakata, K. Nakao. Skeletal muscle AMPK phosphorylation parallels metabolic phenotypes in leptin transgenic

mice under dietary modification. **Diabetes** 54: 2365-2374, 2005.

7. T. Suganami, J. Nishida, Y. Ogawa. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor  $\alpha$ . **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 25: 2062-2068, 2005.

学会発表

1. Y. Ogawa. Leptin and the metabolic syndrome. 3rd AOASO Conference on Obesity (TAIPEI, TAIWAN). 2005.2.25-2.26
2. Y. Ogawa & T. Suganami. Dysregulation of adipocytokine function and production in the metabolic syndrome. The 14th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages. 2005.6.3-4
3. 小川佳宏 メタボリックシンドロームとアディポサイトカイン 第 10 回日本更年期医学会ワークショップ 2005.2.27 東京
4. 小川佳宏 レプチンと肥満・糖尿病トランスレーショナルリサーチ 第 139 回日本獣医学会学術集会チュートリアルセミナー 2005.3.31 埼玉

5. 小川佳宏 メタボリックシンドロームにおけるレプチンの病態生理的意義 第 125 年会日本薬学会シンポジウム 2005.3.30 東京
6. 小川佳宏、菅波孝祥 代謝障害と血管障害の接点: 脂肪組織リモデリング 第 13 回日本血管生物医学会シンポジウム 2005.10.25 仙台
7. 菅波孝祥、小川佳宏 脂肪細胞とマクロファージのパラクリン調節 第 9 回日本心血管内分泌代謝学会総会シンポジウム 2005.11.18 東京
8. 小川佳宏 メタボリックシンドロームの分子基盤: 脂肪組織で一体何が起きているのか? 平成 17 年度九州大学生生活習慣病 COE 国際シンポジウム 2005.11.26 福岡

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  
なし

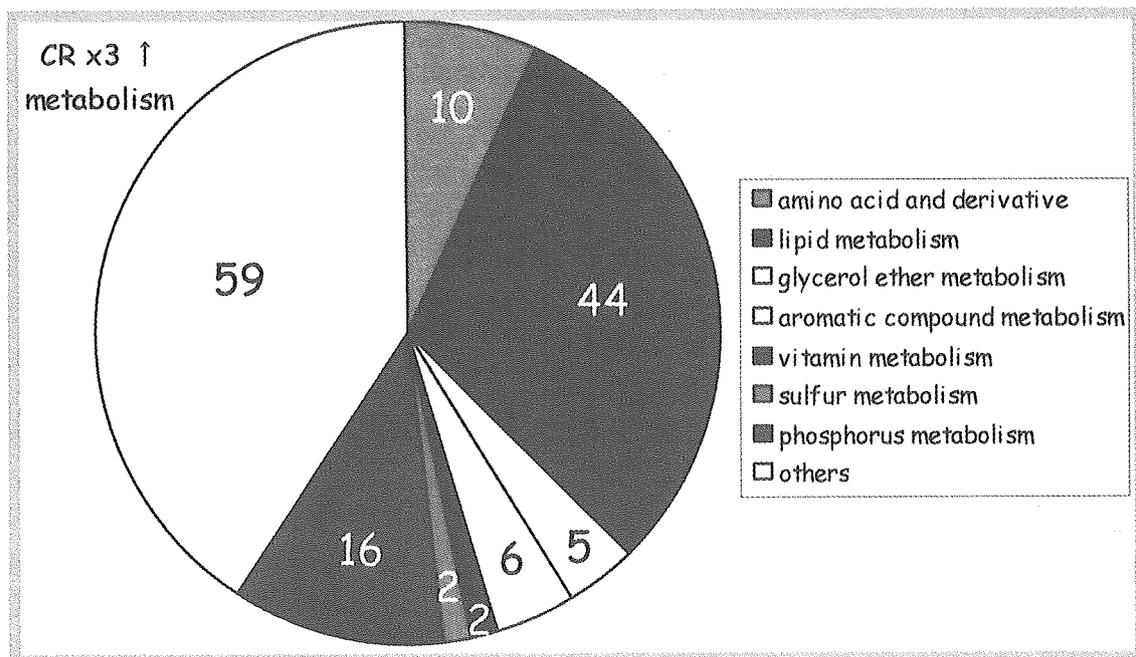


図 カロリー制限により 3 倍以上発現が亢進した遺伝子

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

中枢性摂食異常症が女性に多いことの神経内分泌学的基盤の解明

主任研究者 芝崎 保 日本医科大学大学院医学研究科 生体統御科学 教授  
関野 あずさ 日本医科大学生理学第二  
大畠 久 幸 日本医科大学生理学第二  
眞野 あすか 日本医科大学生理学第二  
根本 崇 宏 日本医科大学生理学第二

**研究要旨** 中枢性摂食異常症患者の殆どが女性であるが、その生物学的機序の詳細は明らかにされていない。神経性食欲不振症の発症には心理ストレスの関与例が多く、本症の病態にはストレス伝達物質である corticotropin releasing factor (CRF) の過剰分泌が強く関与していると考えられる。視床下部室傍核 (PVN) と扁桃体中心核 (CeA) は様々なストレス反応の出現に重要な役割を果たしている。本研究では、中枢性摂食異常症患者の殆どが女性である生物学的機序の詳細の解明のために、雌ラットの非ストレス、ストレス時の PVN と CeA の CRF 遺伝子発現に対する性周期及び ACTH とコルチコステロン分泌に対する性差の有無を検討した。非ストレスでの PVN と CeA における CRF mRNA 発現量及び血漿コルチコステロン基礎値は発情後期よりも血中エストロゲン値の高い発情前期で高値であった。PVN の CRF mRNA 発現のフットショック下での有意な増加反応と心理ストレスに対する発現頂値は発情後期よりも発情前期で速やかに認められた。CeA の CRF mRNA 発現のフットショック及び心理ストレスに対する増加反応は発情後期よりも発情前期で速やかに出現した。血漿 ACTH およびコルチコステロンの両ストレスに対する上昇は雄よりも雌で大きく且つ速やかに出現したが、発情前期と後期では差が認められなかった。以上の結果は、非ストレス及びストレス下での CRF 遺伝子発現や ACTH、コルチコステロン分泌の変化にエストロジェンが影響することを示すものであり、中枢性摂食異常症が女性に多く発症する生物学的基盤にエストロジェンが関与していると考えられる。

**研究目的**

中枢性摂食異常症患者の殆どが女性であるが、その生物学的機序は不明である。以前、我々はその生物学的機序の解明を目的に、ストレスによる摂食抑制への雌雄差や性周期の影響を検討し、心理ストレスによる摂食抑制が、雄ラットに比べ雌ラットで有意に強いこと、雌ラットでは発情後期に比べ血中エストロジェン値の高い発情前期で最も強く、両側卵巣摘除で減弱し、エストロジェン補充で強まることを明らかにした。これらの結果は心理ストレスに対する摂食行動の反応性は雌で強く、その機序にエストロジェンが関与していることを示しており、神経性食欲不振症が女性に多く発症する生物学的基盤の一部が明らかにされたと考えられる。そこで本研究では中枢性摂食異常症が女性に多く発症する生物学的基盤をさらに解明するために、非ストレス下及びストレス下において、ストレス伝達物質であり本症の病因・病態に強く関与していると考えられている視床下部室傍核 (PVN) と扁桃体中心核 (CeA) に

における CRF の遺伝子発現に対する性周期の影響の有無と、ストレスに対する副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) とコルチコステロン分泌の性差の有無をラットにおいて明らかにすることを目的とした。

**研究方法**

性周期が確認された 9-10 週齢の Wistar 系雌ラットを用い、発情前期または発情後期にコミュニケーションボックスを用いて 60 分間のフットショックまたは心理ストレスを負荷した。ストレス負荷開始から 30 分、ストレス終了時、ストレス終了後 30 分、60 分後のラットおよびストレス非負荷群ラットの脳を還流固定し、厚さ 20  $\mu$  m の連続切片を作製し、in situ hybridization 法により PVN および CeA のそれぞれの全長に渡り CRF mRNA 発現量の定量を行い比較検討した。また、同ストレス負荷時の血漿 ACTH とコルチコステロンの変化を雌雄ラットで比較した。

## 研究結果

非ストレス下でのPVNとCeAにおけるCRF mRNA発現量は発情後期よりも発情前期で有意に大であった。PVNのCRF mRNA発現は、フットショック負荷後60分にかけて発情前期も発情後期も増加し続けたのに対し、心理ストレス負荷時には発情前期群は負荷開始60分後で、発情後期群は負荷終了後30分でピークを示した(図1)。CeAにおけるCRF mRNA発現は、発情前期群はフットショック負荷終了30分後でのみ有意な増加を示したのに対し、発情後期群では負荷終了30分後から60分後まで増加し続けた(図2)。心理ストレス負荷時の同CRF mRNA発現は、発情前期群は負荷終了時にのみ有意に増加したのに対し、発情後期群は負荷終了60分後に初めて有意に増加した。フットショック及び心理ストレス負荷時の発情前期群が負荷終了60分後を除いて発情後期群よりも有意に高いCeAのCRF mRNA発現を示した。

血漿ACTHの基礎値は雌の発情前期と発情後期で差はなく、両者とも雄より高く、血漿コルチコステロンの基礎値は発情前期が発情後期よりも高く、いずれも雄よりも高かった。フットショック負荷時の有意な血漿ACTHおよびコルチコステロンの上昇は、雌雄ラットで同時に認められたが、ACTHの頂値の出現は雄よりも雌で早期に認められた。心理ストレス負荷時の血漿ACTHおよびコルチコステロンの有意な上昇と頂値の出現時間は雄よりも雌において速やかに認められ、さらにそれぞれの頂値も雌が雄より明らかに大であった(図3、4)。発情前期と発情後期との間で両ストレスに対するACTH及びコルチコステロンの反応性はほぼ同じ傾向を示した。

## 考察

我々は中枢性摂食異常症患者の殆どが女性であることの生物学的機序の解明を目的に、心理ストレスによる摂食抑制が雄ラットに比べ雌ラットで有意に強く、この雌ラットにおける抑制は発情後期、発情休止期に比べ発情前期で最も強いこと、さらに心理ストレスによる摂食抑制が両側卵巣摘除により減弱し、エストロゲン補充により回復することを明らかにした。これらの結果は、心理ストレスが発症に関与していると考えられる例が多くみられる中枢性摂食異常症患者が圧倒的に女性に多いことの生物学的機序へのエストロジェンの関与を示唆するものと考えられた<sup>1)</sup>。中枢神経系内でのストレス伝達に中心的役割を担っているCRFは、視床下部-下垂体-副腎系、自律神経系、情動、行動などのストレス反応発現機序に重要な役割を果たしている<sup>2)</sup>。雌ラットにおいてストレス下でのACTHやコルチコステロン分泌、行動、摂食の変化は性周期の影

響を受けることが明らかにされている<sup>1,3,4)</sup>。本研究では、ストレス反応の出現に関与しているPVNとCeAのCRF遺伝子の基礎発現及びフットショックや心理ストレス下での発現が性周期の影響を受けることを明らかにした。発情前期には血中エストロジェンが高値であることから、これらの差異にはエストロジェンが関与していると考えられる。

PVNのCRF mRNA発現と同様にコルチコステロンの基礎分泌は発情前期が発情後期よりも大きく、性周期の影響を受けることが明らかになった。しかしながらフットショック及び心理ストレスに対する血漿ACTH及びコルチコステロンは、雌が雄よりも大きな増加反応を示したが、発情前期群と発情後期群とでほぼ同じ反応パターンを示した。これらの結果から、PVNのCRFはACTH分泌の中心的促進物質であり、ストレス下での両者の分泌反応は発情前期と発情後期でほぼ同じと考えられるが、CRFのmRNAの発現増加反応は発情前期でより速やかに生じることが明らかになった。

ストレスによる摂食抑制がCRFの受容体サブタイプであるCRF1とCRF2の特異的拮抗薬で減弱することから、ストレスによる摂食抑制には脳内CRF系が関与していると考えられる<sup>5)</sup>。ストレスによる摂食抑制が性周期により影響を受ける機序には、エストロジェンによるCRF発現の変化が関与していると推測され、本研究ではストレス反応の出現に重要な役割を果たしている視床下部PVNとCeAのCRF遺伝子の基礎発現及びストレス下での発現増加が、エストロゲン分泌の高い発情前期でそれぞれ増加し、速やかになることを明らかにした。以上より、CRFの過剰分泌がその病態に強く関与していると考えられている中枢性摂食異常症の殆どが女性に発症する生物学的基盤に、CRF発現へのエストロジェンの促進的関与機構が存在していると考えられる。

## 結論

PVNとCeAのCRF遺伝子の基礎発現およびストレスによる発現増加やコルチコステロンの基礎分泌は発情前期において亢進し、性周期の影響を受けることが明らかになり、中枢性摂食異常症の殆どが女性に発症する生物学的基盤に、CRF発現へのエストロジェンの促進的関与機構が存在していると考えられる。

## 参考文献

1. Kuriyama H, Shibasaki T. Sexual differentiation of the effects of emotional stress on food intake in rats. *Neuroscience* 2004 124(2):459-465.
2. Dunn AJ, Berridge CW. Physiological and behavioral

responses to corticotrophin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? Brain Res Rev 1990 15:71-100.

3. Handa RJ, Burgess LH, Kerr JE, O'Keefe JA. Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. Hormones Behav 1994 28:464-476.
4. River C. Gender, sex steroids, corticotropin-releasing factor, nitric oxide, and the HPA response to stress. Pharmacol Biochem Behav 1999 64:769-751.
5. Sekino A, Ohata H, Mano-Otagiri A, Arai K, Shibasaki T Both corticotropin-releasing factor receptor type 1 and type 2 are involved in stress-induced inhibition of food intake in rats. Psychopharmacology 2004 176(1): 30-38.

健康危険情報

特になし。

研究発表

論文発表

1. Yamauchi N, Otagiri A, Nemoto T, Sekino A, Oono H, Yanaihara C, Shibasaki T Distribution of

urocortin 2 in various tissues of the rat. J Neuroendocrinol 2005 17:656-663.

2. 新井桂子, 芝崎 保 中枢神経におけるインスリン作用一食欲調節 内分泌糖尿病学 2005 20:143-149.
3. 大島久幸, 芝崎 保 CRF の中枢作用 内分泌・糖尿病科 2005 21(5):453-459.

学会発表

1. 関野あずさ, 眞野あすか, 稲田詩乃, 根本崇宏, 山内直子, 芝崎 保 性周期 (estrus cycle) に伴う corticotropin-releasing factor( CRF ) mRNA 発現の検討 第31回日本神経内分泌学会(弘前)
2. 芝崎 保, 大島久幸, 関野あずさ, 眞野あすか, 根本崇宏 CRF ファミリーペプチドから見た中枢性摂食異常症の神経内分泌学的病態 第31回日本神経内分泌学会(弘前)

知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む。)

なし

図1 フットショックまたは心理ストレスによる PVN CRF mRNA 発現の発情前期と発情後期の比較  
\*p<0.05 vs 発情後期群 #p<0.05 vs それぞれの非ストレス群

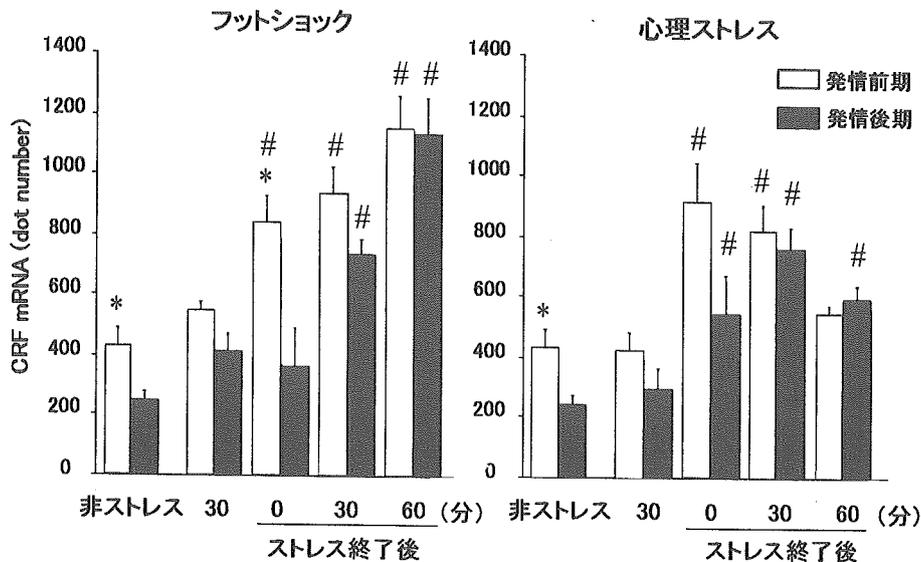


図2 フットショックまたは心理ストレスによる CeA CRF mRNA 発現の発情前期と発情後期の比較  
 \*p<0.05 vs 発情後期群 #p<0.05 vs それぞれの非ストレス群

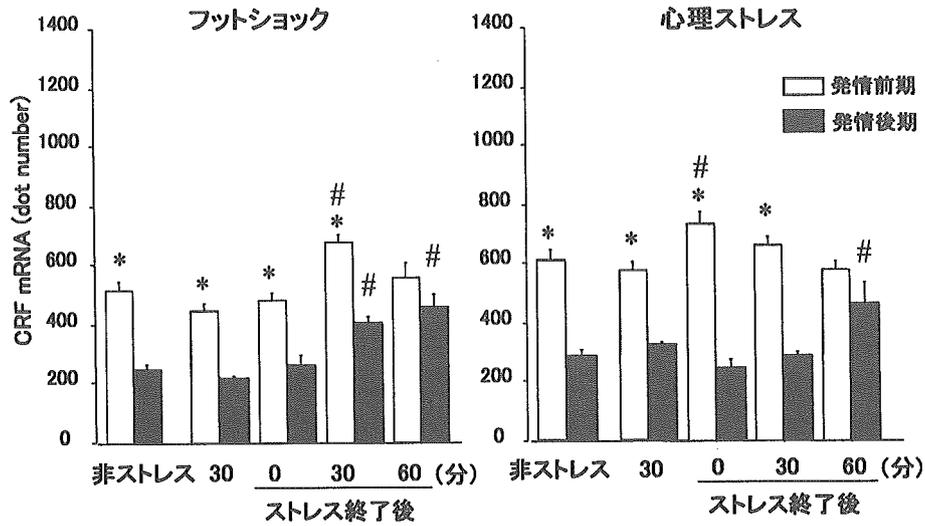


図3 雌雄ラットにおけるフットショックの血漿 ACTH およびコルチコステロンへの影響  
 \*p<0.05 vs 非ストレス群

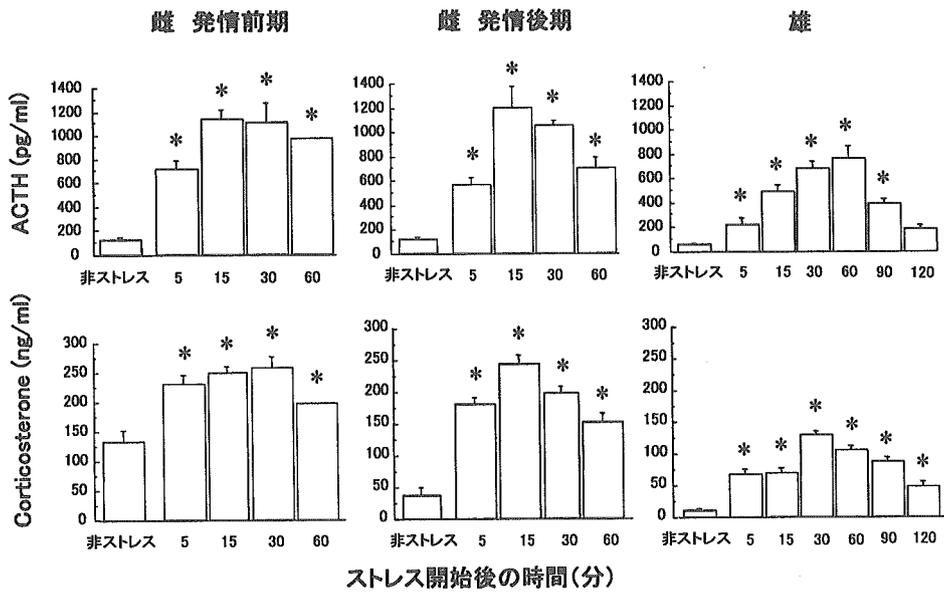
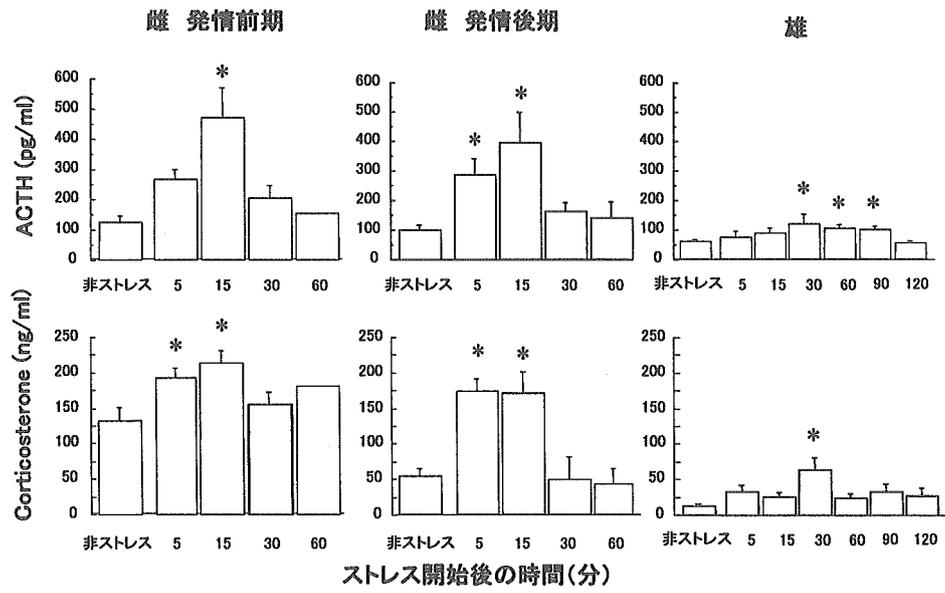


図4 雌雄ラットにおける心理ストレスの血漿 ACTH およびコルチコステロンへの影響

\*p<0.05 vs 非ストレス群



## デスアシルグレリンの食欲・体重調節に及ぼす影響に関する研究

分担研究者 乾 明夫 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 社会・行動医学講座(心身医療科) 教授

**研究要旨** グレリンにはN端側から3番目のセリンがアシル化を受ける分子型と受けない分子型(デスアシルグレリン)が存在する。デスアシルグレリンは従来不活性型と考えられてきたが、その作用に関しては十分な検討がなされていない。血中にはこのデスアシル型の方が多量に存在するところから、今回我々はこの分子型の食欲・体重調節及び消化管運動に及ぼす影響をマウス及びラットを用いて検討した。

デスアシルグレリン腹腔内及び脳室内投与はマウスの摂食行動や胃排泄能を抑制した。デスアシルグレリン静脈内及び脳室内投与はラットの摂食行動を抑制した。またアシルグレリンは空腹期運動を胃及び十二指腸に出現もしくは増強させるのに対し、デスアシルグレリンはその発現を抑制した。アシルグレリンの食欲、消化管運動促進作用は迷走神経求心線維を介するが、デスアシルグレリンの作用はカプサイシン処理によっても解除されず、脳内への直接作用と考えられた。デスアシルグレリンは視床下部ウロコルチン、CART の発現を増加し、その空腹期運動抑制作用は CRFtype2 受容体拮抗剤投与により解除された。またβアクチンプロモーターを用いて作製したデスアシルグレリン過剰発現マウスは、低下した胃排泄能及び痩せの表現型を示した。

以上より、アシル及びデスアシルグレリンは食欲・体重調節、消化管運動調節に相反する作用を営む可能性が考えられ、デスアシルグレリンも新たな消化管ペプチドとして考慮する必要があるものと思われた。

### 研究目的

グレリンにはN端側から3番目のセリンがアシル化を受ける分子型と受けない分子型(デスアシルグレリン)が存在する。デスアシルグレリンは従来不活性型と考えられてきたが、その作用に関しては十分な検討がなされていない。血中にはこのデスアシル型の方が多量に存在するところから、今回我々はこの分子型の食欲・体重調節及び消化管運動に及ぼす影響をマウス及びラットを用いて検討した。

### 研究方法

マウス及びラットの腹腔内/静脈内及び脳室内にアシル及びデスアシルグレリンを投与し、摂食行動や消化管運動の検討を行った<sup>1,2</sup>。消化管運動の詳細な解析はラットを用いて行ったが、この目的のためにバルーンカテーテルを胃及び十二指腸に挿入し、内圧法を用いて無麻酔下の条件で測定した<sup>2</sup>。迷走神経求心線維を遮断するために、一部のラットはカプサイシン前処理を行った。また、CRF type1 及び type2 受容体拮抗剤前投与の影響を検討した。

グレリン投与後の視床下部ペプチドの発現は

RT-PCR 法を用いて行い、一連の食欲促進系ペプチド(NPY, AgRP, orexin, MCH など)及び食欲抑制系ペプチド(CART, POMC, NMU, CRF, Urocortin など)の変化を測定した<sup>1</sup>。同時に c-fos の発現を免疫染色法を用いて検討した。

デスアシルグレリン過剰発現トランスジェニックマウスは、βアクチンプロモーター(pCAGGS ベクター、大阪大宮崎教授御提供)を用いて作製し<sup>3</sup>、血中アシルグレリン、デスアシルグレリンを測定(国立循環器病センター寒川教授の御好意)し、デスアシル型のみを過剰発現したマウスラインを選別した。

なお、実験は神戸大学および鹿児島大学動物実験倫理委員会の承認を受けて行われた。

### 研究結果

#### 1.正常マウス・ラットを用いた検討

アシルグレリン末梢投与は迷走神経求心線維を介して食欲を促進する<sup>1</sup>のに対し、デスアシルグレリンは食欲を抑制した(図1)。この食欲抑制作用はマウス及びラットの両方で認められ、カプサイシン前処理にて抑制を受けない。アシルグレリンは空腹期消化管運動を増強する<sup>4</sup>のに対し、

デスアシルグレリンはこれを抑制した(図 2)。この抑制作用は CRFtype2 受容体拮抗剤前投与により消失した。デスアシルグレリン投与により視床下部 CART 及びウロコルチンの発現が増加した(図3)。c-fos の発現は、アシルグレリン投与により視床下部弓状核、室傍核に加え、脳幹部の孤束核でも認められたが、デスアシルグレリン投与では弓状核、室傍核にその発現が認められた。

## 2. トランスジェニックマウスを用いた検討

血中アシルグレリン、デスアシルグレリン濃度を測定することにより、デスアシルグレリンのみを過剰発現した 2 系列のマウスラインの解析を行った。トランスジェニックマウスの身長(nose to tail length)に有意の差は認められなかったが、マウスは摂食量、体重、胃排泄能の低下を示し、痩せの表現型が認められた(図 4)。

## 考察

従来不活性型と考えられてきたデスアシルグレリンは、食欲や消化管運動に抑制性の作用を及ぼし、アシルグレリンの作用とは全く相反する。デスアシルグレリンは GHS 受容体には結合しないため、この作用は未同定の新たな受容体を介する作用と推測される。近年、デスアシル型が生物作用を有するとの報告も散見されるようになり、デスアシルグレリンを新たな活性ペプチドとして再評価する必要性が強く示唆された。

デスアシルグレリンの作用機構はアシルグレリンのそれとは異なり、迷走神経求心線維を介さない。デスアシルグレリンが迷走神経求心線維の電気活動に影響を及ぼさないこと<sup>6</sup>、迷走神経求心線維が投射する孤束核に c-fos の発現を生じないこと<sup>5</sup>、また迷走神経求心線維のプロクカーであるカプサイシン処理にても抑制を受けないことは<sup>5</sup>、デスアシルグレリンの作用が迷走神経を介さない脳内視床下部での直接作用であることを示唆している。デスアシルグレリン投与により、視床下部の CART、ウロコルチンの発現が増加し<sup>7</sup>、空腹期消化運動の抑制作用が CRF type2 受容体拮抗剤投与により消失することは<sup>5</sup>、CRF 系の関与を示唆している。

デスアシルグレリン過剰発現マウスが痩せの表現型を示したこと<sup>7</sup>や、低身長を示したという報告<sup>8</sup>は、デスアシル型の重要性を示唆している。しかし極く最近、グレリン遺伝子に由来し、グレリンの C 端側にコードされるオベスタチンが食欲・体重に抑制作用を示すことが証明された<sup>9</sup>。したがってこのモデルマウスにおいては、オベスタチンの発現も亢進している可能性があり、今後の検討が必要である。

## 結論

デスアシルグレリンは胃運動や食欲に抑制性の作用を発現し、これはアシルグレリンの作用と相反した。デスアシルグレリンはアシルグレリンとは異なる活性型ペプチドとして、その作用や病態生理学的意義に関して、詳細な検討を行う必要がある。血中でのアシル型とデスアシル型の比が、グレリンペプチドの摂食行動や消化管運動に及ぼす影響をみる上で、1つの指標となるものと考えられる。摂食障害におけるグレリンペプチドの意義を検討するに際しては、この両分子型、更にはオベスタチンの存在も考慮に入れて解析する必要がある。

## 参考文献

1. Asakawa A et al.: Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology*. 120:337-345, 2001
2. Fujimiya M et al: Neuropeptide Y induces fasted pattern of duodenal motility via Y2 receptors in conscious fed rats. *Am. J. Physiol.* 278:G32-G38, 2000
3. Ueno N et al: Decreased food intake and body weight in pancreatic polypeptide overexpressing mice. *Gastroenterology* 117:1427-1432, 1999
4. Fujino K et al: Ghrelin induces fasted motor activity of the gastrointestinal tract in conscious fed rats. *J. Physiol.* 550:227-240, 2003
5. Chen CY et al: Des-acyl ghrelin acts by CRF type 2 receptors to disrupt fasted stomach motility in conscious rats. *Gastroenterology*. 129:8-25, 2005
6. Date Y et al: The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology*. 123:1120-1128, 2002
7. Asakawa A et al: Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. *Gut*. 54:18-24, 2004
8. Ariyasu H et al: Transgenic mice overexpressing des-acyl ghrelin show small phenotype. *Endocrinology*. 146:355-364, 1999
9. Zhang J et al; Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* 310:996-999, 2005

## 健康危険情報

なし。

## 研究発表

### 論文発表

1. Chen CY, Inui A, Asakawa A, Fujino K, Kato I, Chen CC, Ueno N, Fujimiya M: Des-acyl ghrelin acts by CRF type 2 receptors to disrupt fasted stomach motility in conscious rats. *Gastroenterology* 129(1):8-25,2005
2. Asakawa A, Inui A, Fujimiya M, Sakamaki R, Shinfuku N, Ueta Y, Meguid MM, Kasuga M: Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. *Gut*.2005 54(1):18-24
3. 浅川明弘・乾明夫 Ghrelin の心身相関ペプチドとしての役割 *心身医学* 45;399-406,2005
4. 浅川明弘・藤宮峯子・乾明夫 グレリンの脳-腸相関—最近の知見— *G.I.Research* 13,181-187,2005

### 学会発表

1. 第 106 回米国消化器病学会(DDW) シンポジウム(2005.5.15 シカゴ) 「Interactive Role of Vagal Afferent Neurons in Meditating Satiety and Appetite Signals from the Gut」Akio Inui :Interactions between ghrelin, leptin, and pancreatic polypeptide in the control of appetite and gastrointestinal motility
2. 第 87 回米国内分泌学会 シンポジウム(2005.6.2 サンディエゴ) 「Neuroendocrinology of Cachexia」Akio Inui:Ghrelin and feeding-regulatory peptides in cancer anorexia-cachexia syndrome

3. 3rd Cachexia Conference(2005.12.10 イタリア ローマ)、シンポジウム(Anorexia and Appetite Stimulation) Akio Inui:Role of orexigenic peptides in the treatment of cancer anorexia
4. 第 1 回消化管学会総会シンポジウム (2005.1.28 名古屋) シンポジウム 乾明夫 「新しい時代に向けた消化管研究—他分野からの提案—」 脳腸ペプチドによる摂食行動、消化管運動調節
5. 第 78 回日本薬理学会年会 シンポジウム(2005.3.24 横浜) 乾明夫 「NPYの中枢摂食制御研究の進展」NPYの摂食制御と消化管運動調節—特にグレリンとの関係から—
6. 第 10 回日本内分泌学会東北地方会 特別講演 (2005.4.23 仙台) 乾明夫 消化管ホルモンによる食欲、消化管運動調節—グレリンを中心に—
7. 日本薬学会第 21 回創薬セミナー 招待講演 (2005.7.26 軽井沢) 乾明夫 食欲・体重調節ループとその異常

図 1

## デスアシルグレリンは食欲を抑制する

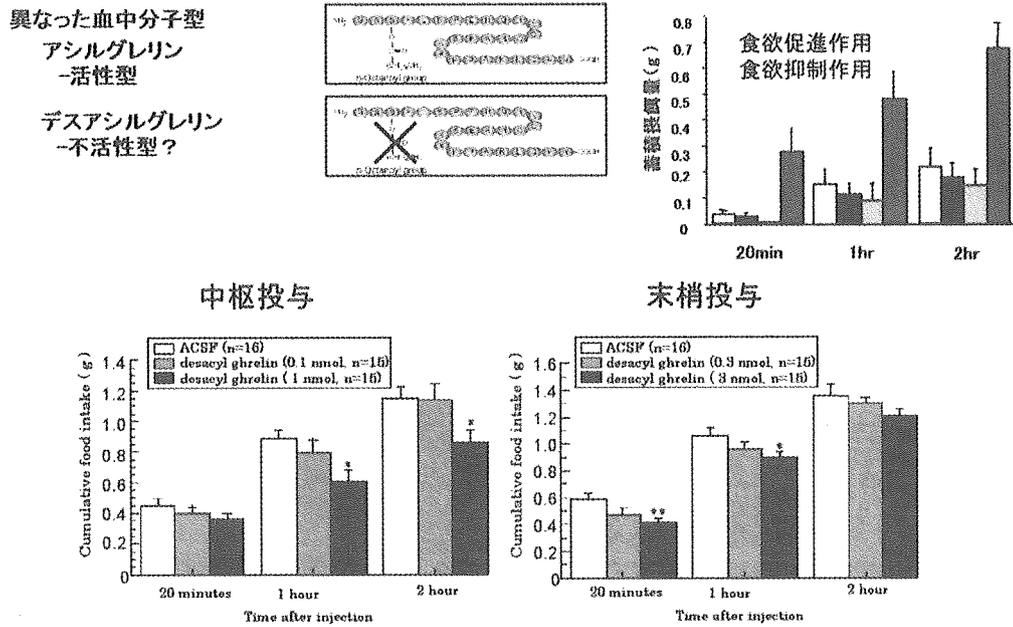


図 2

## デスアシルグレリンは空腹期運動を抑制する - 末梢投与

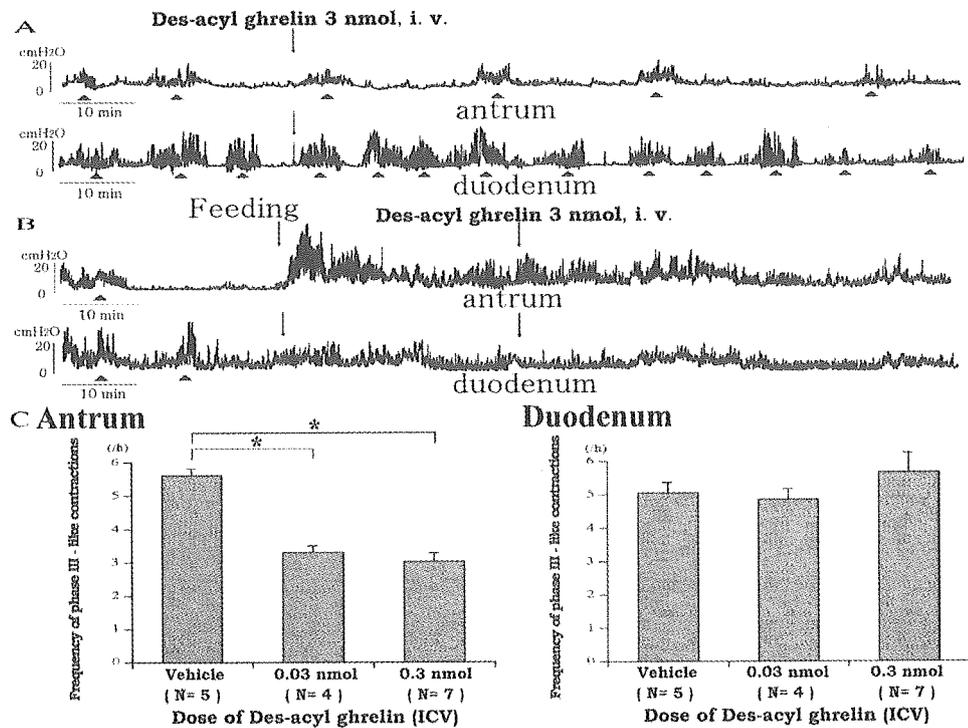
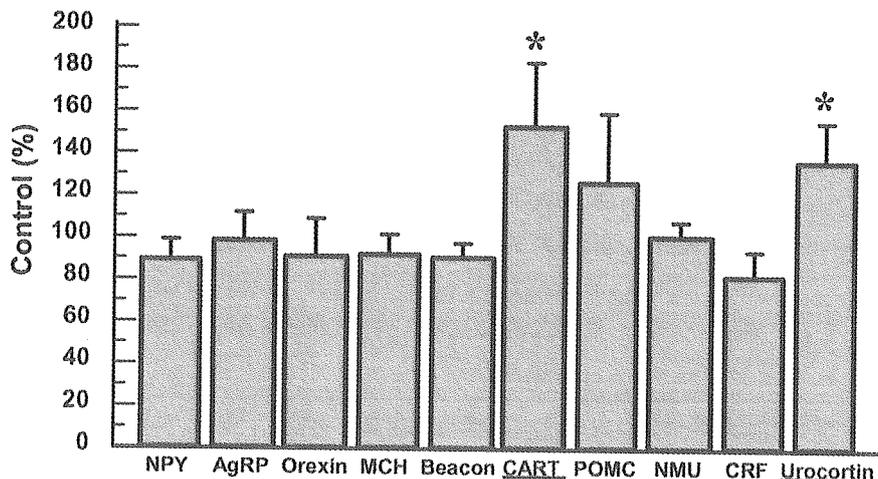


図3

### デアシルグレリンは、強力な食欲抑制系ペプチド Urocortin及びCARTの発現を促進する



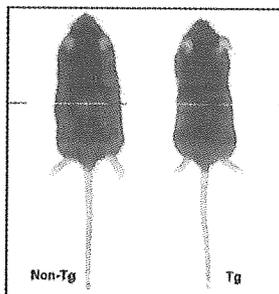
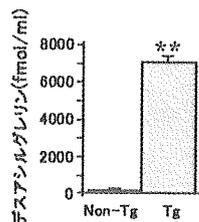
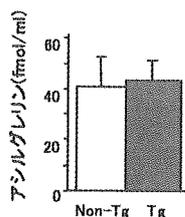
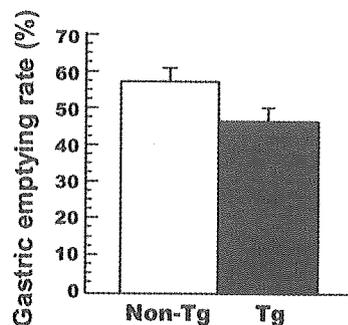
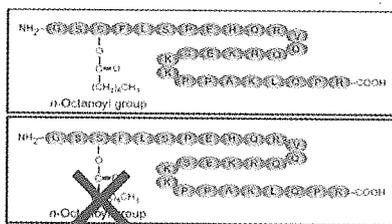
アシルグレリンは、強力な食欲促進系ペプチドNPY/AgRPの発現を促進する

図4

### デアシルグレリントランスジェニックマウス(TG)は痩せを呈する

異なった血中分子型  
アシルグレリン  
-活性型

デアシルグレリン  
-不活性型?



	コントロール	TG
摂食量(g/週)	29.2	27.6*
体重(g/週)	37.7	33.9*

## 脂肪萎縮症におけるレプチン治療の摂食、体重、体組成に及ぼす影響

分担研究者 中尾 一和 京都大学大学院医学研究科 内分泌・代謝内科学 教授  
海老原 健 京都大学大学院医学研究科 内分泌・代謝内科学  
益崎 裕章 京都大学大学院医学研究科 内分泌・代謝内科学  
日下部 徹 京都大学大学院医学研究科 内分泌・代謝内科学  
平田 雅一 京都大学大学院医学研究科 内分泌・代謝内科学  
宮永 史子 京都大学大学院医学研究科 内分泌・代謝内科学  
髭 英樹 京都大学大学院医学研究科 内分泌・代謝内科学  
藤澤 武 京都大学大学院医学研究科 内分泌・代謝内科学  
細田 公則 京都大学大学院医学研究科 内分泌・代謝内科学

**研究要旨** レプチン補償治療を施行した全身性脂肪萎縮症患者を対象に、食欲、体重および体組成変化に及ぼすレプチンの影響について検討した。レプチン治療により食欲の抑制が認められ、特に食後の満足感について顕著であった。またレプチン治療により体重減少が認められ、レプチン治療による体重減少は主に除脂肪重量の減少であり、脂肪重量変化の影響は軽度であった。除脂肪重量および脂肪重量の変化量は治療前の除脂肪重量および脂肪重量とそれぞれ相関が認められた。レプチン治療によりインスリン感受性の改善および空腹時インスリン値の低下が認められた。脂肪萎縮症では、高インスリン血症の是正とともに除脂肪重量を主とした体重減少が認められ、高インスリン血症と骨格筋肥大との関連が示唆された。レプチンはヒトにおいても食欲および体重の制御に関与していることが脂肪萎縮症症例において確認された。

### 研究目的

脂肪萎縮症では、脂肪組織の消失により低レプチン血症を示し、過食やインスリン抵抗性、高中性脂肪血症、脂肪肝が認められる。我々はこれまでに脂肪萎縮症患者を対象に、不足したレプチンを補うレプチン補償治療を行い、糖脂質代謝異常が著明に改善することを報告してきた<sup>1)</sup>。一方、レプチンは主に視床下部に作用して強力な摂食抑制とエネルギー消費亢進をもたらす体重増加抑制ホルモンとして知られている。また先天性レプチン欠損症例ではレプチン治療により著明な体重減少が認められ、その大部分は脂肪重量の減少であることが報告されている<sup>2)</sup>。

レプチン補償治療を施行した全身性脂肪萎縮症患者を対象に、食欲、体重および体組成変化に及ぼすレプチンの影響について検討した。

### 研究方法

全身性脂肪萎縮症症例を対象に生理量のレプチン(体脂肪率が男性で20%、女性で30%のときの血中レプチン濃度基準値に至ると考えられる用量を100%量とする)を一日

二回に分け皮下投与するレプチン補償治療を施行した。用量は50%量より開始し一か月毎に100%および200%量まで増量した。評価は入院中に行い、食事カロリーは個々の症例に合わせ固定した。

食欲については visual analogue scale を用いてスコア化し評価した。患者さんに0~10の目盛りの付いた数直線上に、非常におなかがすいた時(今までで一番おなかがすいた時)を「10」とし、満腹のとき(もうこれ以上食べれないと感じる時)を「0」として、毎食前、食後に印を記入してもらった。

体組成(脂肪重量、除脂肪重量)については、二種類のエネルギーレベルをもつ X 線が組織を通過し吸収、散乱によって減衰する際の透過率および質量減衰係数の比から体組成を推定する dual energy x-ray absorptiometry (DEXA)法を用いて測定した。また体重、脂肪重量、除脂肪重量はそれぞれ身長を用いて補正した body mass index (BMI)、fat mass index (FMI)、free fat mass index (FFMI)を算出し評価した。