

# 研究成果報告書

事業名（補助金名）： 基盤的研究開発育成事業（共同研究補助金）  
研究開発テーマ名： ホタテガイ貝殻に含まれる脂肪分解促進因子の健康食品としての開発  
研究代表者名： 長谷川 靖【室蘭工業大学・応用化学科／助教授】  
共同研究者名： 島津 昌光【室蘭工業大学・応用化学科／助手】  
外部協力者名： 長谷川 順一【はせがわクリニック／医師】

## 研究の背景

生物が作り出す鉱物化は、バイオミネラリゼーションと呼ばれ骨、歯、貝殻、真珠、コッコリス（円石藻が作る殻）など多くの生物種において見られる現象である。骨、歯などがリン酸カルシウム結晶で構築されているのに対し、貝殻は炭酸カルシウム結晶で構築される。貝殻の組成は95%以上が炭酸カルシウム、残り数%がタンパク質、糖などの有機化合物、そして微量の金属イオンが含まれている。貝殻に含まれる炭酸カルシウム結晶は2種類の結晶構造（ホタテガイ貝殻などに見られるカルサイト構造、および真珠に代表されるアラゴナイト構造）からなり、種によって異なっている。炭酸カルシウムの結晶構造、そして様々な貝の形は含まれているタンパク質によって制御されているものと考えられている。ここ数年、貝殻に含まれるタンパク質が次々にクローニングされ、炭酸カルシウムの結晶化の制御が報告されてきているが、その詳細は明らかになっていない(1, 2)。

ホタテガイ貝殻は北海道で年間約30万トンが産業廃棄物として産出されており、その処理時におけるコストの増大や埋め立て処分時の悪臭等多数の問題を抱えている。産出された貝殻の一部は、高温で焼成された後、ホルムアルデヒドを消去する壁材、土壌改良剤、脱硫剤、抗菌剤などとして再利用されている。再利用の多くは、炭酸カルシウム、高温での焼成によって生じる酸化カルシウムに着目したものであるが、大部分はなお廃棄処理されているのが現状である。貝殻の粉碎、焼成などの過程はコストが高くつくという面から、安価な炭酸カルシウム原料と差別化できる付加価値の高い再利用が望まれている。

一方、貝殻と同じ機構で生み出される真珠は、装飾物としてのみならず古くから中国において漢方薬として利用されており、大変珍重されてきた。真珠に含まれる数%のコンキオリンと呼ばれるタンパク質成分には、皮膚細胞を活性化する能力があるといわれており、化粧品素材としても利用されている。しかし、細胞に対する作用、作用する成分、作用機構など科学的根拠はほとんど明らかにはなっていない。ここ数年、真珠粉末を骨に移植することにより骨再生が促進されたとの報告がなされ(3)、真珠抽出成分が骨細胞の分化に及ぼす効果が細胞培養系を用いた *in vitro* 評価によってなされてきた(4, 5)。しかしながら、その作用、生理活性物質については明らかにはされていないままである。

本論文において真珠と同じ機構によって構築されるホタテガイ貝殻を用い、有機成分が有する生理活性作用の探索を行った。

本研究では、ホタテガイ貝殻より抽出した有機成分が有する生理活性作用、特に脂肪分解促進作用について、その検討結果を報告する。

肥満は現代人の多くが悩んでおり、欧米においては成人のおよそ50%近くが肥満と診断されている。肥満は、糖尿病、高血圧、心臓病などの疾病を引き起こす重要な因子であることが知られていることから、肥満の予防、治療に関する様々な研究が行われている。ここ数年、脂肪組織が単に脂質を蓄積するだけの臓器ではなく、レプチン、アディポネクチンなどのサイトカインを分泌することが明らかになり、これら因子の生理学的意義、病態との関連などの解明が強く望まれている。このような現状において、抗肥満薬、健康食品の開発も非常に盛んになってきている。特に、脂肪を分解、促進する健康食品は280億を超える非常に大きな市場が日本において存在していることから新たな機構を有する新規物質の開発が望まれている状況にある。

## 1、ホタテガイ貝殻に含まれる成分によるラット脂肪分解促進効果 (*in vivo*)

*in vitro* において貝殻抽出成分には、脂肪細胞に蓄積した中性脂肪の分解を促進する効果があることを明らかにした。そこで、*In vivo* においても同様な効果が認められるかどうか Wistar ラットを用い、*in vivo* 評価を行った。

### ・ 実験方法

#### 【1】AIN93 基準食（ラット餌）の調製

##### AIN93 基準食成分

| AIN93 基準食            | Control (%) | 貝殻粉末 (%) | CaCO <sub>3</sub> |
|----------------------|-------------|----------|-------------------|
| casein               | 20          | 20       | 20                |
| Corn starch          | 15          | 15       | 15                |
| cellulose            | 5           | 5        | 5                 |
| Mineral mixture      | 3.5         | 3.5      | 3.5               |
| Vitamin mixture      | 1           | 1        | 1                 |
| Free base L-cysteine | 0.3         | 0.3      | 0.3               |
| Choline bitartrate   | 0.2         | 0.2      | 0.2               |
| Corn oil             | 5           | 5        | 5                 |
| 貝殻粉末                 | 0           | 3.3      | 0                 |
| CaCO <sub>3</sub>    | 0           | 0        | 3.3               |
| sucrose              | 100%にする     | 100%にする  | 100%にする           |

本実験において貝殻粉末を用いた理由として、実験を行うには大量の抽出成分を必要とすることから、炭酸カルシウムを除いた有機成分のみを使用することが困難であるためである。また貝殻に含まれる有機成分の効果を確認するため、control として貝殻粉末と同量の炭酸カルシウムを添加した餌を使用し、検討を行った。

#### 【2】Wistar ラットの購入

6週齢の Wistar ラット(オス)15匹をホクドーより購入した。

#### 【3】ラット体重および脂肪組織の測定

6週齢の Wistar ラットを5匹ずつ3グループにわけた。(control、貝殻粉末、CaCO<sub>3</sub> グループ)

1週間、室温(21-25℃)で、市販ラット餌を与えて、馴化させた。

AIN93 基準食は1匹あたり1日10gを与えて、5週間飼育した。

1週間に1回ラット体重を測定し、記録した。

5週間飼育後、ラットを屠殺し、以下に示した各脂肪組織および各器官組織を摘出した。

- ・ 白色脂肪組織(径部脂肪、腸間脂肪、後腹膜後脂肪、腎臓周囲脂肪、精巣周囲脂肪)
- ・ 褐色脂肪組織
- ・ 器官組織(肝臓、腎臓、脾臓、睾丸)各脂肪組織を60℃で3日間乾燥させた後、重量を測定した。

【4】 Bligh-Dyer 法を用いて各脂肪組織中の脂質含有量を測定した。

＊Bligh-Dyer 法：

- ・ クロロホルム：メタノール：水（1:2:0.8） の溶液を粉碎した脂肪組織に添加した。
- ・ 室温で 30 分以上攪拌した。
- ・ 水を加え、クロロホルム：メタノール：水 （1：1：1）の溶液中で抽出を行った。
- ・ 500× g、5 分間遠心を行った。
- ・ 2 層に分離した下層を回収し、室温（20 度以上）で乾燥させた。
- ・ 回収した脂質重量を測定した。

【5】 ラット血中グリセロール濃度の測定

F キット グリセロール（ロシュ・ダイアグノスティック株式会社）を使用し測定を行った。

【6】 ラット血中レプチンの測定

市販ラットレプチン ELISA キットを用い、測定した。

【7】 ラット血中  $\gamma$ -GTP の測定

市販キット（和光純薬株式会社）を用いて測定した。

【8】 ラット血中尿素窒素の測定

市販キット（和光純薬株式会社）を用いて測定した。

## ・実験結果

ホタテガイ貝殻に含まれる脂肪分解促進因子の *in vivo* での効果を明らかにするため、Wistar ラットを用い実験を行った。本実験においては、食事量を制限し、10 g/日として毎日、餌を食餌させた。次の日に必ず餌を完全に食べていることを確認した後、餌をさらに与えるようにし、各ラットのエネルギー摂取量が一定になるように実験を実施した。

貝殻粉末を 3.3% 含む餌を食餌させたラットの体重は第三週から、control と比べて有意な減少を示しており (Fig. 1)、5 週間後には、体重がそれぞれ 160 g および 125 g となり、約 20% 程度の減少を示した。また、頸部、後腹膜、腸間膜の各白色脂肪組織もまた、貝殻粉末を食餌させたラットにおいてコントロールのおよそ 50%~60% の脂肪組織重量を示した。(Fig. 2)。脂肪組織中の水分等の影響を避けるため、組織中の脂質を抽出し、脂質含量を測定したところ、各白色脂肪組織中の脂質含量もまた、貝殻粉末を食餌させたラットにおいて、有意な減少を示した (Fig. 2)。一方、各組織重量を比較したところ、肝臓、腎臓等の組織重量にはほとんど変化が認められなかったものの、各白色脂肪組織重量はすべて減少する傾向を示し、特に後腹膜の白色脂肪組織重量は有意な減少を示した。(Fig. 3)。これらの結果は、ホタテガイ貝殻中の成分には *in vivo* においても、脂肪分解を促進する作用があることを示している。

この脂肪組織重量の減少が貝殻の 95% 以上を占める炭酸カルシウムの影響ではないことを確認するため、貝殻粉末と同量 (3.3%) の炭酸カルシウムを含む餌を食餌させたラットをコントロールとして、同様の実験を行った。Fig. 4 に示されるように、貝殻粉末を食餌させたラットの白色脂肪組織重量は頸部、後腹膜、腸間膜の全ての白色脂肪組織において有意な減少を示しており、特に後腹膜組織においては 50% 以上もの減少を示した。この結果は、ホタテガイ貝殻中に含まれる有機成分が作用し、機能を果たすことによって、脂肪分解が促進していることを示唆している。一方、脂肪を分解し、熱を産生する褐色脂肪組織重量は、肝臓、腎臓などの他臓器と同様、いずれの実験においても有意な減少は認められなかった。

脂肪分解が促進されていることをさらに確かめるため、血中のグリセロール濃度、およびレプチン濃度の測定を行った。グリセロールは中性脂肪分解にともなって血中に遊離するため脂肪分解の指標として用いられている (6)。一方、レプチンは白色脂肪組織から分泌されるサイトカインであり、血中レプチン濃度は体脂肪量と正の相関があることが報告されている (7, 8)。Fig. 5 において示すように、*in vitro* における結果と同様、貝殻粉末を食べさせたラットの血液中のグリセロール濃度はコントロールと比べて有意な増加を示した。また、control と比べて貝殻粉末を食べさせたラットでは血中レプチン含有量が有意な減少を示していることも明らかになった。(Fig. 5)。貝殻粉末を食べさせたラットの血中グリセロール濃度の上昇は、貝殻粉末を食餌したラットでは脂肪分解が促進されていることを示している。また、血中レプチン濃度の減少は、貝殻粉末を食べさせたラットの白色脂肪組織重量が減少したという結果を示している。

この貝殻粉末を用いた *in vivo* 評価は、3 回の異なる実験すべてにおいて、同様の傾向を示したことから、ホタテガイ貝殻中に、脂肪分解を促進する因子が存在し、*in vitro* においても *in vivo* においても機能を果たすことを示している。

次に、ラット脂肪組織の減少が貝殻粉末を食べたことによる毒性によるものではないことを確認するため、ラットの肝臓と腎臓機能に關与する血清  $\gamma$ -GTP、尿素窒素の濃度の測定を行った。コントロール、貝殻粉末を食べさせたラットともにほぼ同じ値を示したことから、肝臓、および腎臓組織には大きな影響がないものと考えられた。(Fig. 6)。また、肝臓、腎臓の組織切片を比較した結果からも、貝殻粉末を食べたラットの両臓器ともに病的な異常は見られなかった。(Fig. 7)。これらの結果は、ラット脂肪組織の減少が貝殻粉末を食べたことによる毒性によるものではないことを示唆している。

以上、示してきたようにホタテガイ貝殻中に、脂肪分解を *in vivo* においても促進する因子が含まれていることが明らかになった。

## ・考察

脂肪分解を促進する物質として、現在、抗肥満薬としての開発が進められている $\beta 3$  アドレナリン受容体アゴニスト、健康食品として市販されている共役リノール酸がよく知られている(9)。 $\beta 3$  アドレナリン受容体アゴニストは、体重の減少に加え、白色脂肪組織重量の減少を引き起こす(10, 11, 12, 13, 14, 15)。一方、共役リノール酸は体重の減少をあまり引き起こさないことが報告されている(16, 17, 18, 19, 20)。ホタテガイ貝殻は、体重減少、白色脂肪組織重量減少ともに引き起こすことから、 $\beta 3$  アドレナリン受容体アゴニストに類似した機構で作用しているのかもしれない。

現在までの *in vitro*, および *in vivo* の結果から、白色脂肪組織中に蓄えられた中性脂肪（トリグリセリド）のグリセロール、脂肪酸への分解が貝殻中の成分によって促進されていることは明らかである。しかし、現状においては遊離した脂肪酸を分解する脂質代謝が亢進されているかどうかは明らかではない。当研究室の小林らは、C3H10T1/2 細胞を用い、脂肪酸代謝を行うミトコンドリア内の代謝活性が、貝殻抽出成分を添加することによって活性化されていることを報告している。おそらく、血中に遊離した脂肪酸の分解（肝臓、筋肉、脂肪組織において）もまた貝殻を食餌することによって活性化し、脂肪分解促進に寄与しているのではないかと推測している。

本実験においては、摂取する食事量を制限することによって、エネルギー摂取量を統一させ、実験を実施した。実験中の観察から、貝殻粉末を食餌させたラットにおいても食事の摂取量はコントロールとの間に顕著な差は認められなかった。しかし、貝殻粉末を食餌させたラットの血中レプチン濃度が有意な減少を示していることから、脳視床下部に存在する摂食中枢等が刺激されることが考えられ(21, 22, 23, 24)、自由摂取させたときに $\beta 3$  アドレナリン受容体アゴニストに見られるような食事の摂取量の減少(25, 26)、あるいは増加する可能性が推測される。今後、食事を自由摂取させ、その取り込み量を計測する必要があると考えられる。

また、本実験においては、6 週齢のラットを使用し、AIN93 基準食を餌として与え実験を行った。高脂肪食を与えたラットにおいて、あるいはさらに週齢のすすんだラットにおいても貝殻粉末が脂肪分解促進に作用するのか検討を加える必要がある。

## 2 ホタテガイ貝殻有機成分による脂肪分解促進メカニズムの検討

ラットを用いた *in vivo* 評価によって、ホタテガイ貝殻粉末を食餌することによって白色脂肪組織重量の有意な減少が引き起こされることを明らかにしてきた。この減少が、白色脂肪組織中の中性脂肪分解に加え、脂質代謝系の亢進も関与していることを確認するため更なる検討をおこなった。

### ・実験方法

実験に用いたラットを屠殺後、ラット褐色脂肪、各白色脂肪を単離した。今回白色脂肪組織は精巣周囲脂肪組織を用いて実験した。

#### 褐色脂肪組織の mRNA

Amersham の mRNA purification キットを使用し調製した。

#### 白色脂肪組織 Total RNA の抽出精製

脂肪組織専用の RNA 抽出キット RNeasy rapid Tissue Mini Kit を用いて精製した。

## 【Ⅱ】使用した各プライマー

| protein                 | Length<br>bp | Sense primer (5'-3')    | Antisense<br>Primer (5' -3') |
|-------------------------|--------------|-------------------------|------------------------------|
| actin                   | 314          | TCTACAATGAGCTGCGTGTG    | GGTCAGGATCTTCATGAGGT         |
| UCP1                    | 180          | AGATATCATCACCTTCCC      | CAGCTGTTCAAAGCACAC           |
| UCP2                    | 471          | AACAGTTCTACACCAAGGGC    | AGCATGGTAAGGGCACAGTG         |
| UCP3                    | 212          | GGAAGTGGAGGCGAGAGGAA    | TTTGTAGAAGGCTGTGGGGC         |
| AcyCoA<br>dehydrogenase | 255          | CGTCAGAGGTGTTACTTTGATGG | CATGGACTCAGTCACATACTGC       |
| $\beta$ 3 receptor      | 430          | ATGGCTCCGTGGCCTCAC      | CTGGCTCATGATGGGCGG           |
| PPAR- $\gamma$          | 818          | CACTCGGATTCCTTTGACATC   | GGCATACTCTGTGATCTCTTG        |
| SCD                     | 577          | GCTCATCGCTTGTGGAGCCAC   | GGACCCCAGGGAAACCAGGAT        |
| FAS                     | 214          | GTCTGCAGCTACCCACCCGTG   | CTTCTCCAGGGTGGGGACCAG        |
| AP2                     | 140          | CATCCAGAAAGGAAGGACA     | TTTTCCCCAGTCATGGTCTC         |

UCP: uncoupling protein, PPAR: peroxysome proliferator activating receptor

SCD: steroyl-CoA desaturase, FAS: fatty acid synthase, AP2: fatty acid binding protein

## ・実験結果

白色脂肪組織中に蓄積した中性脂肪（トリグリセリド）が分解することによって生じる脂肪酸は血中に放出された後、筋肉組織、肝臓組織、脂肪組織において取り込まれ $\beta$ 酸化などの経路を介して分解される。余剰の（使用されなかった）脂肪酸は再度、白色脂肪組織に中性脂肪として蓄積されることから、脂肪酸の代謝は脂肪分解を促進するうえにおいて重要である。

*In vitro*, *in vivo* の実験結果より、ホタテガイ貝殻中に脂肪分解を促進する因子が存在していることを明らかにしてきた。そこで、貝殻粉末を食餌させたラットにおいて脂質代謝系が活性化されているかどうか、白色脂肪組織、褐色脂肪組織中の脂質代謝関連タンパク質の mRNA の発現レベルを RT-PCR 法を用いて比較、検討した。

RT-PCR 法を行うにあたり、内部標準としてアクチン遺伝子を用いて実験を行った。また、PCR 条件が至適条件であることを確認するため、鋳型量を変化させることによって増幅される遺伝子が増加することを確認した。

まず、褐色脂肪組織中の脂質代謝関連タンパク質の mRNA 発現量の変化について検討を行った (Fig. 8)。 $\beta$ 酸化にかかわる酵素、アシル CoA デヒドロゲナーゼ mRNA、およびホルモン感受性リパーゼの活性化を引き起こす $\beta 3$  アドレナリン受容体の発現レベルがそれぞれ、1.3 倍、1.7 倍と有意に増加していることがわかった。一方、褐色脂肪組織中において、ミトコンドリア内に存在し、酸化リン酸化によって生じたプロトンの濃度勾配を脱共役し、熱として産生する機能を有する脱共役タンパク質 (UCP) の発現量は、UCP1, UCP2, UCP3 いずれの mRNA においても発現量の増加を認めることができなかった。むしろ、UCP2 においては、その発現量が逆に減少した。

次に、白色脂肪組織中の脂質代謝関連タンパク質の mRNA 発現量の変化について検討を行った。白色脂肪組織においては、UCP1, UCP2 の発現量が貝殻粉末を食餌したラットにおいて有意に増加し、特に UCP1 の発現量はコントロールの餌 (AIN93) を食餌したラットにおいて、ほとんど検出できなかったのに対し、貝殻粉末を食餌させたラットにおいては顕著な発現量の増加が認められた (Fig. 9)。UCP2 の発現量においても、コントロールのおよそ 1.7 倍近くまで増加していることが明らかになった。一方、炭酸カルシウムをコントロールとして食餌させたラットにおいては、コントロール食 (AIN93) を食べさせたラットとほぼ同じ発現量を示した。褐色脂肪組織中において発現量の増加が認められた $\beta 3$  アドレナリン受容体、およびアシル CoA デヒドロゲナーゼ mRNA は、白色脂肪組織中においても有意な発現量の増加を示した (Fig. 10)。一方、脂肪酸の合成に関わる、脂肪酸合成酵素、およびステアロイル CoA デサチュラーゼの mRNA 発現レベルもまた増加を示した。しかし、炭酸カルシウムを食餌させたラットにおいても有意な増加を示していることから、貝殻中の有機成分が作用したことによるものではないものと考えられる。

一方、当研究室の小林によって、培養細胞 (C3H10T1/2) を用いた同様の実験が行われた。脂肪細胞に分化させた細胞に貝殻抽出成分を添加することにより、*in vivo* において認められた、アシル CoA デヒドロゲナーゼ、UCP1 の発現量が増加することを報告している。この結果は *in vivo* での結果に一致するものであり、貝殻抽出成分の *in vitro* での作用が *in vivo* においても、生じていることを提案する。

以上の結果から、ホタテガイ貝殻粉末を食餌したラットでは、白色脂肪組織、褐色脂肪組織中の脂質代謝系に関わるタンパク質の mRNA 発現レベルが上昇していることが明らかになった。

## ・考察

現在、脂肪分解を促進する因子の開発及び脂肪促進機構解明の研究が大変盛んであり、 $\beta 3$  アドレナリン受容体のアゴニストが抗肥満薬として開発され、共役リノール酸、カテキンなどが健康食品として市販さ

れている。

$\beta 3$  アドレナリン受容体アゴニストは受容体に結合し、細胞内 cAMP 濃度の上昇、ホルモン感受性リパーゼの活性化を引き起こし中性脂肪分解を促進する。さらに、脂肪組織中において UCP1 の発現量を有意に増加させ、脂肪燃焼に伴う熱産生を活性化することが知られている(10, 11, 12, 13, 14, 15)。一方、共役リノール酸の脂肪分解促進機構は明らかにはなっていないが、UCP2 の発現量を増加することによって、あるいはリポプロテインリパーゼの活性を阻害し脂肪細胞内への脂肪蓄積を阻害することによって脂肪分解を促進しているのではないかと考えられている(16, 17, 18, 19, 20)。

また、お茶に含まれるカテキンは、 $\beta$ 酸化に関わる酵素の mRNA 発現量を増加することが報告されており、 $\beta$ 酸化を活性化することによって脂肪分解を促進しているものと考えられている(27)。

ホタテガイ貝殻に含まれる脂肪分解促進因子もまた、カテキンと同様に $\beta$ 酸化酵素、アシル CoA デヒドロゲナーゼ mRNA の発現量を増加させることから、 $\beta$ 酸化を活性化している可能性が考えられる。さらに、 $\beta 3$  アドレナリン受容体の発現量を増加させることにより、交感神経より分泌される神経伝達物質、ノルアドレナリンに対する感受性を増大させ、脂肪分解の促進を引き起こしているのではないかと推定される。また、白色脂肪組織中において、UCP1 の発現量が顕著に増加していることから、白色脂肪組織中でのエネルギー消費が活性化されている可能性が考えられる。UCP1 の発現量の増加は、トランスジェニックマウス等を用いた研究から、脂肪分解促進に働くという多くの研究成果が報告されていることから(28)、UCP1 発現量の増加が白色脂肪組織重量減少の引き金となっているのかもしれない。白色脂肪組織中での UCP1 発現量の増加は $\beta 3$  アドレナリン受容体アゴニスト、共役リノール酸においても認められている (Fig. 11)。この結果は、白色脂肪組織中において脂肪細胞の分化を変化させ、褐色脂肪細胞様に分化を誘導している可能性も考えられる(29)。

現在のところ、貝殻に含まれる脂肪分解促進因子が直接作用するターゲットは明らかではない。しかし、白色脂肪組織、褐色脂肪組織中の UCP mRNA 発現量の変化を $\beta 3$  アドレナリン受容体、共役リノール酸と比較すると、 $\beta 3$  アドレナリン受容体アゴニストで見られる褐色脂肪組織中の UCP1 の発現量の増加、共役リノール酸で見られる UCP2 の発現量の増加などは貝殻粉末を食餌させたラットでは検出されないことから、両者とは異なった機構によって作用していることが考えられる。

また、ホタテガイ貝殻に含まれる脂肪分解促進因子は、健康食品であるオリゴ糖に見られるように、生体内において分解、吸収されることなく、食事の脂質を吸着して生体外に放出するような成分ではなく、生体内に吸収され、脂肪組織中の脂質代謝関連タンパク質の mRNA 発現レベルを変化させ機能を果たしている成分と考えられる。

### 3 実用化に向けた今後の課題

現在、世界の肥満人口は11億人以上といわれている。肥満は糖尿病、高血圧、心臓病など引き起こすの大きな原因となっており、肥満の予防、治療についての研究及び脂肪分解を促進する健康食品の開発は大変重要な位置づけとなっている。日本においても、280 億円を超える健康食品の市場が存在し、特に脂肪分解を促進する健康食品の需要は非常に高く、新たな脂肪促進因子の開発が強く望まれている。

本研究をとおし、ホタテガイ貝殻中に脂肪分解を促進する因子、があることを見出した。これらの生理活性作用はホタテガイ貝殻の新規有効利用の可能性を提示する重要な知見であると考えられる。

今後、本研究を実用化していくためには、①脂肪分解促進因子の構造決定、及び生理活性を示す部位の同定、②ヒト脂肪細胞を用いての評価、③作用機構の解明、④肥満動物モデルでの検証などが必要であると考えられる。



## 参考文献

1. G. Falini, S. Albeck, S. Weiner, L. Addadi: Control of Aragonite or Calcite Polymorphism by Mollusk Shell Macromolecules Science, 271, 67 (1996)
2. A.M. Belcher, X.H. Wu, R.J. Christensen, P.K. Hansma, G.D. Stucky, D.E. Morse: Control of crystal phase switching and orientation by soluble mollusc-shell proteins Nature, 381, 56 (1996)
3. P. Pwestbroek, F. Marin: A marriage of bone and nacre Nature, 392, 861 (2000)
4. Rousseau M, Pereira-Mouries L, Almeida M, Milet C, Lopez E. The water soluble matrix fraction from the nacre of *Pinctada maxima* produces earlier mineralization of MC3T3-E1 mouse pre-osteoblasts. *Comp. Biochem. Physiol. PartB* 2003; 135: 1-7.
5. Lamghari M, Almeida MJ, Berland S, Huet H, Laurent A, Milet C, Lopez E. Stimulation of bone marrow cells and bone formation by nacre: in vitro and in vivo studies. *Bone* 1999; 25: 91S-94S.
6. Pamarthi Mohan and Sherman Bloom Lipolysis Is an Important Determinant of Isoproterenol-Induced Myocardial Necrosis *Cardiovascular Pathology*, Volume 8, Issue 5, 10 September 1999, Pages 255-261 Pamarthi Mohan and Sherman Bloom
7. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, et al: Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 334:292-295, 1996
8. M. Wauters, R. Considine, A. Löfgren, C. Van Broeckhoven, J.-C. Van der Auwera, I. De Leeuw and L. Van Gaal Associations of leptin with body fat distribution and metabolic parameters in non—insulin-dependent diabetic patients: No effect of apolipoprotein E polymorphism *Metabolism*, Volume 49, Issue 6, June 2000, Pages 724-730
9. Harada H, Hirokawa Y, Suzuki K, Hiyama Y, Oue M, Kawashima H, Kato H, Yoshida N, Furutani Y, Kato S. Discovery of a novel and potent human and rat beta3-adrenergic receptor agonist, [3-[(2R)-[(2R)-(3-chlorophenyl)-2-hydroxyethyl]amino]propyl]-1H-indol-7-yloxy]acetic acid. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2005 Feb;53(2):184-98.
10. T. Yoshida, N. Sakane, Y. Wakabayashi, T. Umekawa and M. Kondo. Anti-obesity effect of CL 316,243, a highly specific beta 3-adrenoceptor agonist, in mice with monosodium-L-glutamate-induced obesity. *Eur. J. Endocrinol.* 131 (1994), pp. 97–102.
11. T. Yoshida, N. Sakane, Y. Wakabayash, T. Umekawa and M. Kondo. Anti-obesity and anti-diabetic effects of CL 316,243, a highly specific beta 3-adrenoceptor agonist, in yellow KK mice. *Life Sci.* 54 (1994), pp. 491–498
12. J. Himms-Hagen, J. Cui, E. Danforth, Jr., D.J. Taatjes, S.S. Lang, B.L. Waters and T.H. Claus. Effect of CL-316,243, a thermogenic beta 3-agonist, on energy balance and brown and white adipose tissues in rats. *Am. J. Physiol.* 266 (1994), pp. R1371–R1382.
- I. Nagase, N. Sasaki, K. Tsukazaki, T. Yoshida, M. Morimatsu and M. Saito. *Jpn. Vet. Res.* 42 (1994), pp. 137–145.
13. S. Collins and R.S. Surwit. Pharmacologic manipulation of ob expression in a dietary model of obesity *J. Biol. Chem.* 271 (1996), pp. 9437–9440.
14. M. Ghorbani and J. Himms-Hagen. Treatment with CL 316,243, a beta 3-adrenoceptor agonist, reduces serum leptin in rats with diet- or aging-associated obesity, but not in Zucker rats with genetic (fa/fa) obesity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 22 (1998), pp. 63–65.
15. West, D. B., Delany, P. M., Camet, P. M., Blohm, F., Truett, A. A., and Scimeca, J., Effect of conjugated linoleic acid on body fat and energy metabolism in the mouse. *Am. J. Physiol.*, 275, 667-672 (1998).
16. Terpstra, A. H. M., Beynen, A. C., Everts, H., Kocsis, S., Katan, M.B., and Zock, P. L., The

decrease in body fat in mice fed conjugated linoleic acid is due to increases in energy expenditure and energy loss in the excreta. *J. Nutr.*, 32, 940-945 (2002).

17. Tsuboyama-Kasaoka, N., Takahashi, M., Tanamura, K., Kim, H. J., Tange, T., Okuyama, H., Kasai, M., Ikemoto, S., and Ezaki, O., Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. *Diabetes*, 49, 1534-1542 (2000).
18. Park, Y., Albright, K. J., Liu, W., Storkson, J. M., Cook, M. E., and Pariza, M. W., Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids*, 32, 853-858 (1997).
19. Martin, J. C., Gregoire, S., Siess, M. H., Gentry, M., Chardigny, J. M., Berdeaux, O., Juaneda, P., and Sebedio, J. L., Effects of conjugated linoleic acid isomers on lipid-metabolizing enzymes in male rats. *Lipids*, 35, 91-98 (2000).
20. R.S. Ahima et al., Leptin regulation of neuroendocrine systems, *Frontiers of Neuroendocrinology* 21 (2000), pp. 263–307.
21. J.K. Elmquist et al., Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin, *Nat Neurosci* 1 (1998), pp. 445–450.
22. D.G. Baskin, D. Figlewicz-Lattemann, R.J. Seeley, S.C. Woods, D. Porte Jr. and M.W. Schwartz, Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight, *Brain Res* 848 (1999), pp. 114–123.
23. D. Niswender and M.W. Schwartz, Insulin and leptin revisited: adiposity signals with overlapping physiological and intracellular signaling capabilities, *Front Neuroendocrinol* 24 (2003) (1), pp. 1–10.
24. N. Atef, M. Lafontan, A. Double, C. Helary, A. Ktorza and L. Penicaud. A specific beta 3-adrenoceptor agonist induces increased pancreatic islet blood flow and insulin secretion in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 298 (1996), pp. 287–292.
25. X. Liu, F. Perusse and L.J. Bukowiecki. Mechanisms of the antidiabetic effects of the beta 3-adrenergic agonist CL-316243 in obese Zucker-ZDF rats. *Am. J. Physiol.* 274 (1998), pp. R1212–R1219.
26. Murase T, Nagasawa A, Suzuki J, Hase T, Tokimitsu I. Beneficial effects of tea catechins on diet-induced obesity: stimulation of lipid catabolism in the liver.
27. D. Grujic, V.S. Susulic, M.E. Harper, J. Himms-Hagen, B.A. Cunningham, B.E. Corkey and B.B. Lowell. Beta3-adrenergic receptors on white and brown adipocytes mediate beta3-selective agonist-induced effects on energy expenditure, insulin secretion, and food intake. A study using transgenic and gene knockout mice. *J. Biol. Chem.* 272 (1997), pp. 17686–17693.
28. M Ghorbani, T H Claus, J Himms-Hagen Hypertrophy of brown and white adipose tissues and reversal of diet induced obesity in rats treated with a beta adrenoceptor agonist *Biochem. Pharmacol* 54, 1 121-131 (1997)

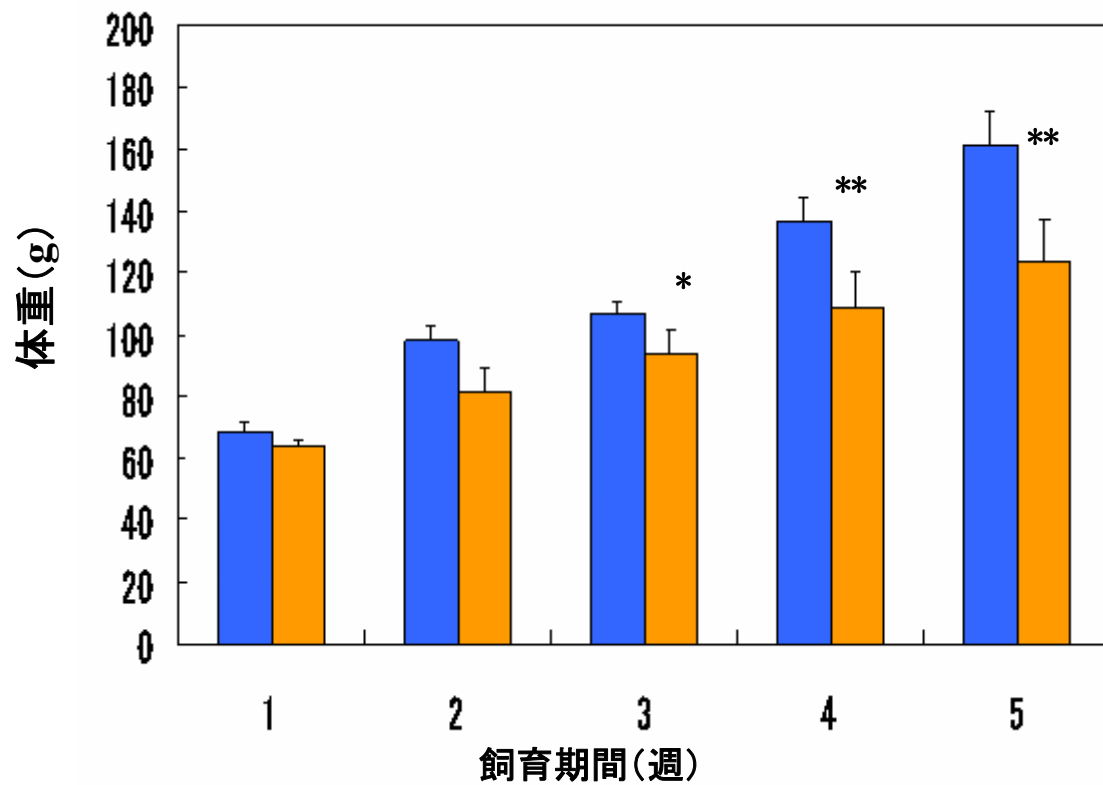


Fig. 1 貝殻粉末を食餌させることによる体重変化

ラット体重変化の結果を示したグラフである。縦軸は体重を示し、横軸は飼育期間を示す。(青) コントロールの餌を食餌させたラット、(赤) 貝殻粉末3.3%を含む餌を食餌させたラット。\* $P<0.05$  (student's  $t$ -test)、\*\* $P<0.01$  (student's  $t$ -test)

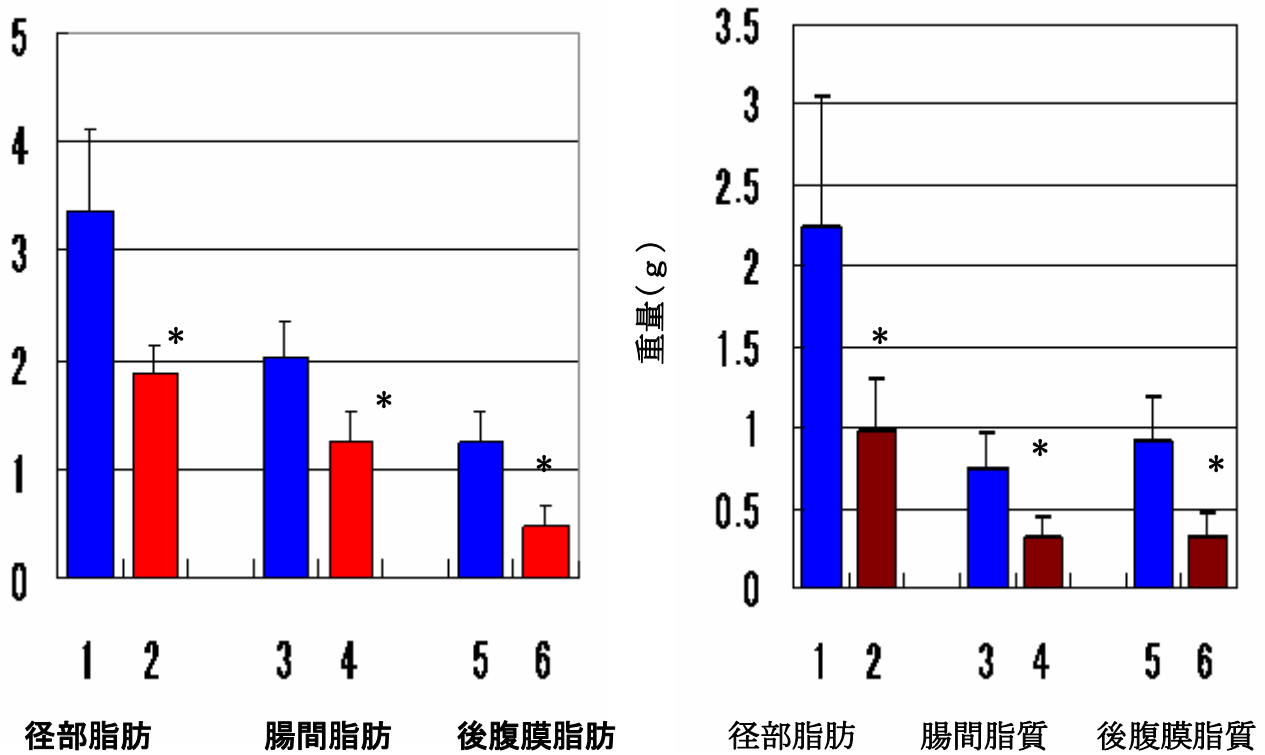


Fig. 2 貝殻粉末を食餌させたことによる脂肪組織重量、脂質含量変化

5週間後、各白色脂肪組織重量(左) および脂肪組織中の脂質含量(右) を測定したグラフ。ラットの径部脂肪、腸間脂肪、腹膜後脂肪について組織重量、および、組織中の脂質含量を測定した。(青) コントロールの餌を食餌させたラット、(赤) 貝殻粉末3.3%を食餌させたラット。 。 \* $P < 0.05$  (student's *t*-test)

|  | Control<br>グループ | 貝殻<br>グループ  |
|--|-----------------|-------------|
| <b>Organ Weights (g/ 100g body weight)</b>                               |                 |             |
| Liver (肝臓)   | 5.24±0.38       | 5.28±0.98   |
| Kidney (腎臓)  | 1.20±0.09       | 1.40±0.14   |
| Testis (睾丸)  | 1.85±0.15       | 2.35±0.22   |
| Spleen (脾臓)  | 0.44±0.04       | 0.42±0.10   |
| Pancreas (膵臓)  | 0.25±0.03       | 0.26±0.01   |
| <b>Adipose Weights (g/100g body weight)</b>                              |                 |             |
| Inguinal (径部)  | 1.16±0.48       | 1.00±0.22   |
| Mesenteric (腸間膜)   | 1.97±0.48       | 1.54±0.19   |
| Retroperitoneal (後腹膜)  | 0.77±0.18       | 0.39±0.15 * |
| Brown adipose (褐色)   | 0.16±0.04       | 0.19±0.02   |
| <b>Lipid contents of white adipose tissues<br/>(g/ 100g body weight)</b> |                 |             |
| Inguinal (径部)  | 1.39±0.51       | 0.83±0.25   |
| Mesenteric (腸間膜)   | 0.47±0.12       | 0.27±0.10 * |
| Retroperitoneal (後腹膜)  | 0.57±0.18       | 0.27±0.12 * |

Fig. 3 ラット体重100 gあたりの、各臓器重量の比較

(左) コントロールの餌を食餌させたラット、(右) 貝殻粉末を3.3%食餌させたラット。  
各値は平均値および標準偏差を示す。

\* $P < 0.05$  (student's *t*-test)

|   | CaCO <sub>3</sub><br>グループ | 貝殻粉末<br>グループ |
|---|---------------------------|--------------|
| Organ Weights<br>(g/100g body Weight)   |                           |              |
| Liver (肝臓)                              | 3.7±0.27                  | 4.11±0.66    |
| Kidney (腎臓)                             | 0.76±0.32                 | 0.95±0.06    |
| Testis (睾丸)                             | 2.37±0.10                 | 2.57±0.11    |
| Pancreas (膵臓)                           | 0.20±0.01                 | 0.26±0.01    |
| Adipose Weights<br>(g/100g body Weight) |                           |              |
| Inguinal (径部)                           | 1.24±0.39                 | 0.87±0.19 *  |
| Mesenteric (腸間膜)                        | 0.72±0.09                 | 0.50±0.18 *  |
| Retroperitoneal (後腹膜)                   | 0.38±0.22                 | 0.13±0.05 *  |
| 腎臓周囲                                    | 0.09±0.06                 | 0.03±0.02 *  |
| Brown adipose (褐色)                      | 0.12±0.03                 | 0.15±0.04    |

Fig. 4 ラット体重100 gあたりの、各臓器重量の比較

(左) コントロールの餌として3.3%の炭酸カルシウムを含む餌を食餌させたラット、  
(右) 貝殻粉末を3.3%食餌させたラット。各値は平均値および標準偏差を示す。

\* $P < 0.05$  (student's *t*-test)

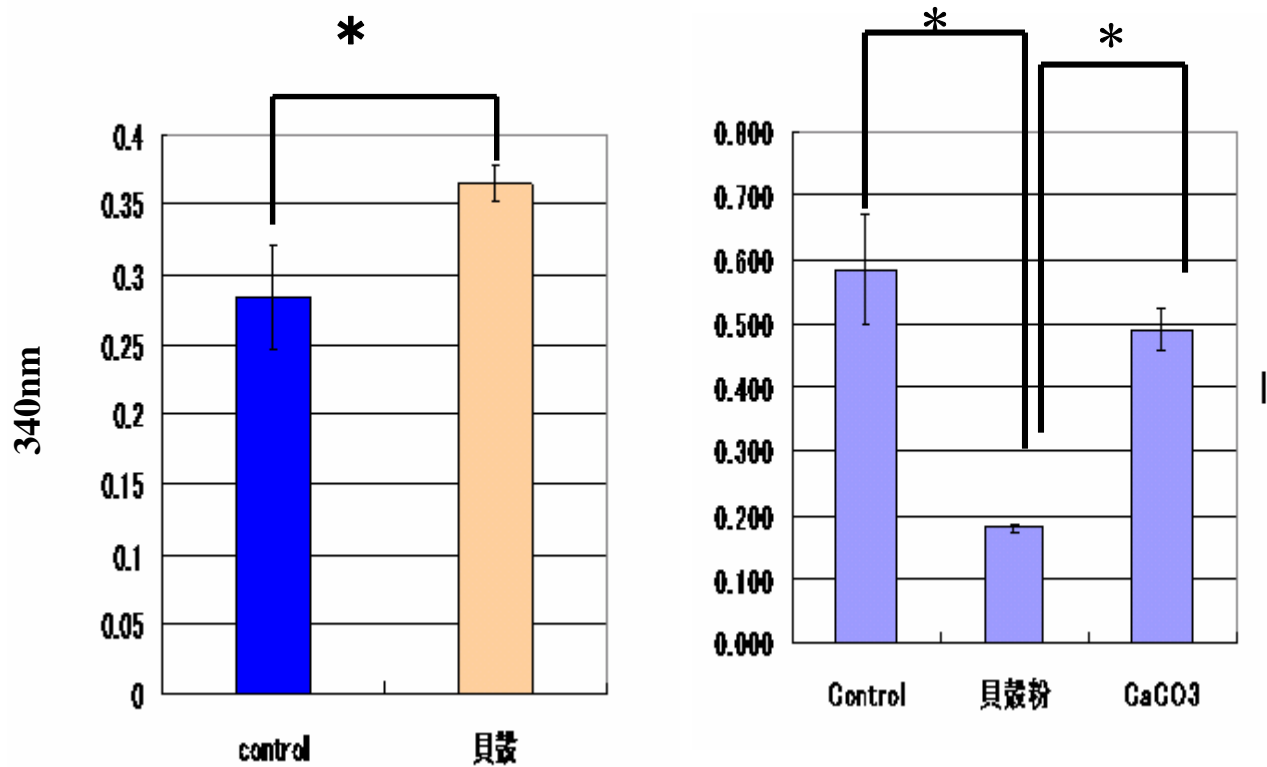
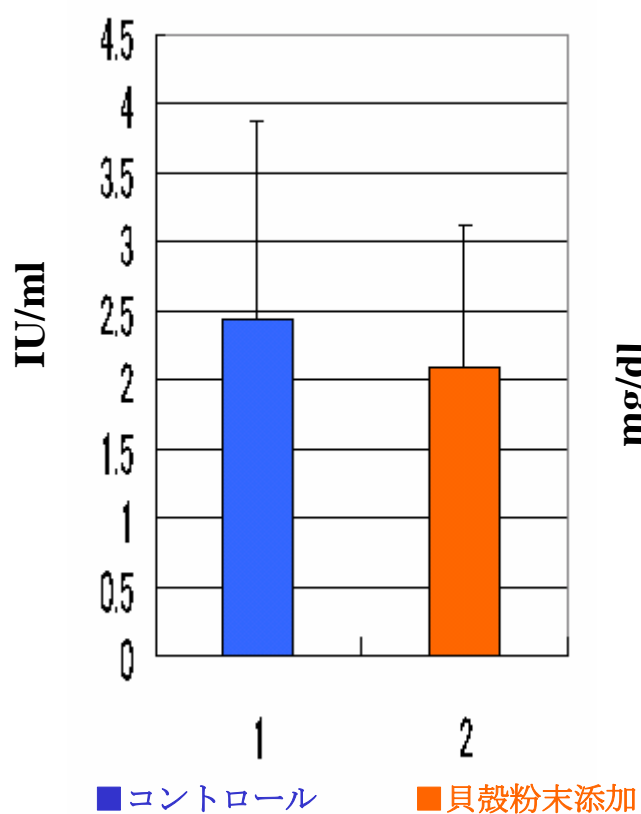


Fig. 5 血中グリセロール濃度、レプチン濃度の比較

方法の項目において記した方法により、血液中のグリセロール濃度(左)、レプチン濃度(右)を測定した。\* $P < 0.05$  (student's  $t$ -test)

(A) 血清  $\gamma$ -GTP 測定結果



(B) 尿素窒素の測定結果

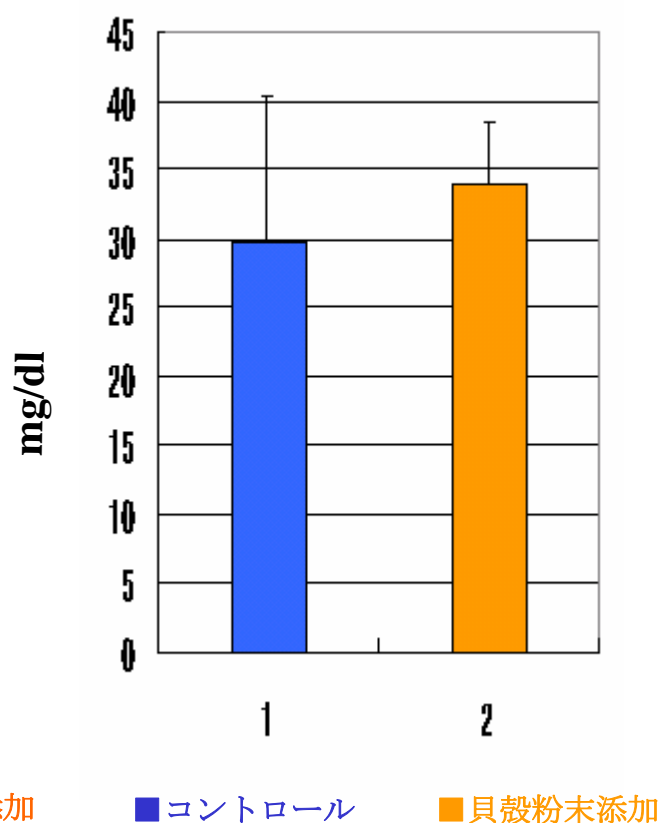
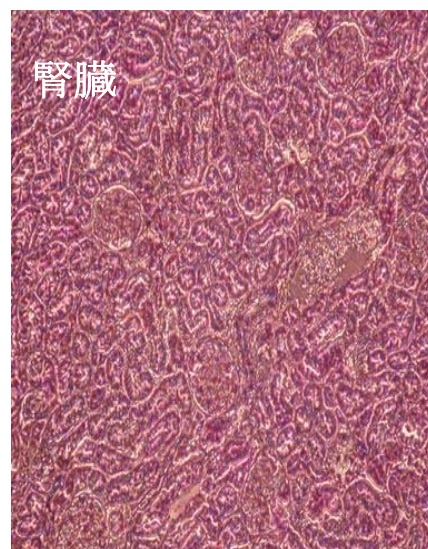
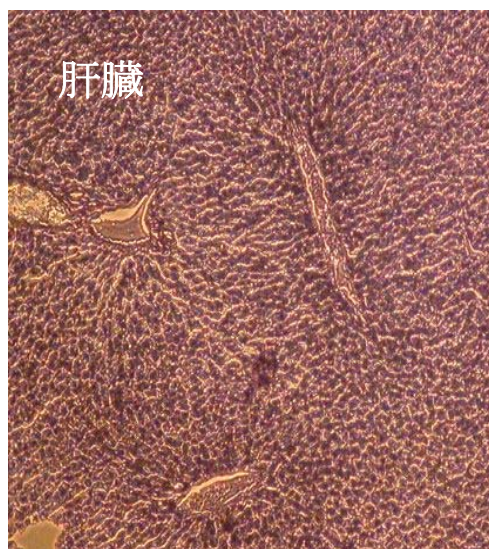


Fig. 6 ラット血清  $\gamma$ -GPT、尿素窒素の濃度の測定

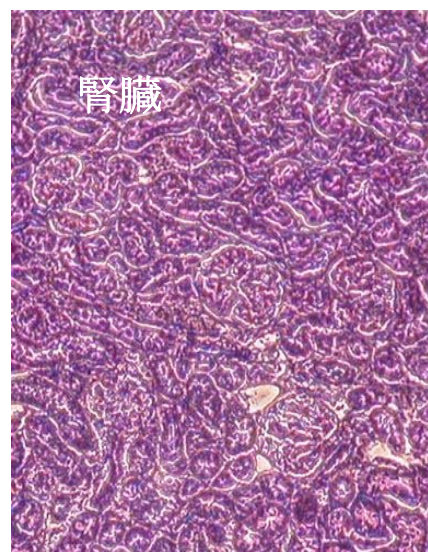
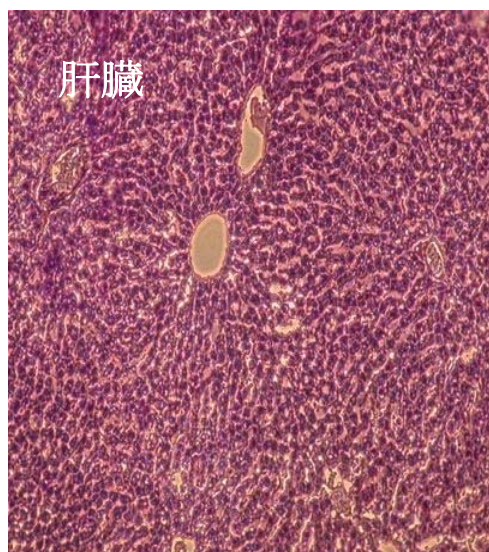
ラットの肝臓および腎臓機能に関与する血清  $\gamma$ -GPT (左)、尿素窒素の濃度 (右) の測定を行った。



(A) control



(B) 貝殻成分添加



**Fig. 7** ラット肝臓、腎臓組織切片の比較

(上段) コントロールの餌を食餌させたラット、(下段) 貝殻粉末を3.3%含む餌を食餌させたラット。(左) 肝臓組織切片、(右) 腎臓組織切片

## 相対強度

|           | Control (%) | 貝殻粉末 (%) |
|-----------|-------------|----------|
| UCP1      | 100         | 99       |
| UCP2      | 100         | 77 *     |
| UCP3      | 100         | 99       |
| AcylCoA   | 100         | 133 *    |
| $\beta$ 3 | 100         | 166 *    |
| PPAR      | 100         | 132      |
| LPL       | 100         | 113      |
| Ap2       | 100         | 108      |

Fig. 8 褐色脂肪組織中のmRNA発現量の変化

(左) コントロール食を食餌させたラット、(右) 貝殻粉末3.3%を含む餌を食餌させたラット  
コントロールにおいて増幅されたバンドの蛍光強度を100%とし、相対強度によって示した。

\* $P < 0.05$  (student's *T*-test)

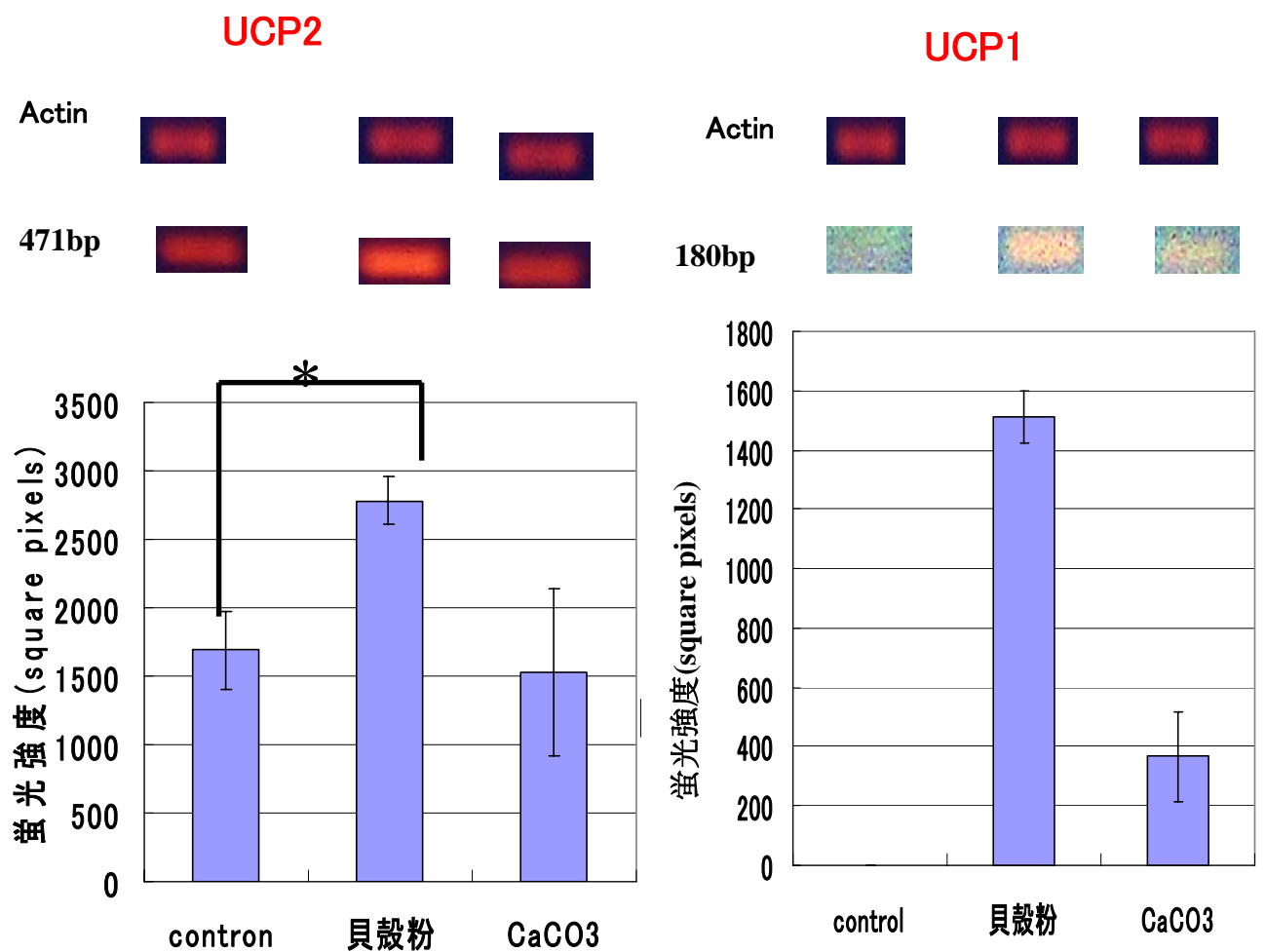
PPAR: Peroxisome proliferator-activated transcription factor

LPL: Lipoprotein lipase

Ap2: fatty acid binding protein

$\beta$ 3:  $\beta$ 3 adrenoceptor

AcylCoA: acylCoA dehydrogenase



**Fig. 9** ラット白色脂肪組織中のUCP1, UCP2発現量の比較

(左)UCP2発現量、(右)UCP1発現量

コントロール (AIN93基準食) を食餌させたラットから単離した白色脂肪組織

貝殻粉末を3.3%含む餌を食餌させたラットから単離した白色脂肪組織

炭酸カルシウムを3.3%含む餌を食餌させたラットから単離した白色脂肪組織

内部標準としてアクチン遺伝子を増幅 (上段)、縦軸は増幅されたバンドの蛍光強度を示す。

\* $P < 0.05$  (student's  $T$ -test)

|                                  | Control (%)    | 相対強度 (%)<br>(貝殻粉) |
|----------------------------------|----------------|-------------------|
| UCP1                             | (not detected) | +                 |
| UCP2                             | 100            | 165 *             |
| UCP3                             | not detected   | not detected      |
| $\beta$ 3アドレナリン受容体               | 100            | 144 *             |
| AcylCoAデヒドロゲナーゼ<br>( $\beta$ 酸化) | 100            | 213 *             |
| 脂肪酸結合タンパク(ap2)                   | 100            | 115               |
| ペルオキシソーム応答性受容体                   | 100            | 116               |
| FAS (脂肪酸合成酵素)                    | 100            | 144*              |
| SCD<br>(ステアロイルデサチュラーゼ)           | 100            | 157*              |

Fig. 10 白色脂肪組織中における脂質代謝関連タンパク質mRNAの発現量の変化

(左) コントロール食を食餌させたラット、(右) 貝殻粉末3.3%を含む餌を食餌させたラット  
 コントロールにおいて増幅されたバンドの蛍光強度を100%とし、相対強度によって示した。  
 \* $P < 0.05$  (student's *T*-test)

褐色脂肪組織

白色脂肪組織

|                | UCP<br>1  | UCP<br>2 | UCP<br>3 | UCP<br>1 | UCP<br>2 | UCP<br>3 |
|----------------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| $\beta$ 3アゴニスト | ↑         | →        | ↑        | ↑        | →        | →        |
| 共役リノール酸        | ↓ or<br>→ | ↑        | →        | ↑        | ↑        | ?        |
| ホタテ貝殻          | →         | ↓        | →        | ↑        | ↑        | —        |

Fig. 11 褐色脂肪組織、白色脂肪組織におけるUCPmRNA発現量の変化の比較

(上段)  $\beta$  3アドレナリン受容体アゴニスト、(中段) 共役リノール酸、(下段) ホタテガイ貝殻  
それぞれを食餌させた時の褐色脂肪組織、白色脂肪組織中のUCP mRNAの発現量の比較

↑：発現量の増加、→：発現量の変化なし、↓：発現量の減少を示す。