Studies on the Glucose and Lipid Metabolism and Their Related Hormones in Hereditary Obese-hyperglycemic Mice

3. Effect of Some Hormones on Nonesterified Fatty Acid (NEFA) Release from Liver, Diaphragm and Epididymal Adipose Tissue

Toshiharu KAMIOKA

Department of Physiology, Wakayama Medical College (Director : Prof. Hiroshi Matsushita)

The effects of some hormones upon NEFA release from liver slice, diaphragm and epididymal adipose tissue were investigated. Each tissue of the Hereditary Obese-hyperglycemic Mice (C57/6J-ob, OH) and New Zealand Obese Mice (NZO) were incubated with hormones in the medium of Krebs-Ringer Bicarbonate buffer containing 3% bovine albumin and 5% Ediol (Emulsion of 50% coconut oil).

The results obtained are as follow :

- 1) Effects of epinephrine and norepinephrine on NEFA release from liver slice and diaphragm were similar to those of their control mice.
- 2) Epididymal adipose tissue from OH mice exhibited an impairment in its ability to release NEFA when incubated with epinephrine, norepinephrine and ACTH. The inhibitory action of insulin and glucose on NEFA release was also less marked in epididymal adipose tissue from OH mice than in their control mice. However, this abnormality was not found in tissue from NZO mice.

Decrease sensitivity to those hormones on NEFA release from OH mice in vitro may be one of the metabolic abnormalities in this type of hyperglycemic obesity.

(pp. 154~158)

遺伝性肥満高血糖マウスによる糖、脂質代謝と その関連ホルモンの研究

III. C57BL/6J-ob Mice 及び New Zealand Obese Mice の脂肪酸動員に及ぼすホルモンの影響について

和歌山県立医科大学第二生理学教室 (指導 松下 宏教授)

上 岡 利 春

末梢組織、特に脂肪組織の非エステル型脂肪酸 (NEFA) 動員は絶食や寒冷に曝す事により著明に増加する¹⁾²⁾。

然しながら、この研究報告の第1編³⁾に於て著者が報告した如く、肥満高血糖突然変異系マウス、C57BL/6J-ob (OH) の脂肪組織は対照マウスに比べて低い測定値を示した。OHマウスの NEFA 動員の低下は肝及び横隔膜に比べて脂肪組織に於てより早期に認められ、この系統動物の最も著明な代謝異常の一つである事が示された。OHマウスの脂肪組織のこのような異常性は lipolytic enzyme の減少、lipolytic enzyme の促進因子に対する感受性の低下、lipolytic enzyme の抑制因子の存在等種々の因子が考えられるが、この報告では lipolytic enzyme に対する種々の促進因子又は抑制因子の作用の異常性について検討した。

実験方法及び材料

実験動物

C57BL/6J-ob mice (OH) 及び New Zealand Obese mice (NZO) を実験動物とし、前者の対照には同腹正常マウスを、後者の対照には同月令の Swiss albino mice を用いた。又 OH マウスは生後3—6カ月の個体を、NZO マウスは生後5—7カ月の個体を使用した。

実験方法

肝切片、横隔膜及び脂肪組織の調製法はすでに述べた方法³⁾によつた。3% Bovine albumine, 5% Ediol 含有の Krebs-Ringer bicarbonate 緩衝液 (pH7.4) をインキュベーションメヂウムとし、これに種々の濃度の薬剤を添加して37℃で2時間インキュベートした。インキュベーション前後のメヂウム中の NEFA 量 ($\mu\text{Eq/g. L}$) 及びグリセロール量 ($\mu\text{mole/g}$) を測定した。NEFA 測定は Dole 法⁵⁾により、又グリセロールは Korn 法⁴⁾によつた。尚エピネフリン、ノルエピネフリン、ACTH、インスリン等の製剤は市販品を供した。

実験結果

副睾丸脂肪組織による実験成績を Table 1, 2 及び 3 に示した。Table 1 及び 2 は OH マウスによるものであり、Table 3 は NZO マウスのものである。Table 1 は NEFA の遊離量を示したものであるが、エピネフリン 10^{-2}mg/cc 添加による NEFA 動員の増加は対照マウスの 143% に対し OHマウスでは30.9%に過ぎず増加率は甚少ない。ノルエピネフリン 10^{-2}mg/cc 添加による NEFA 動員の増加も対照マウス 116% に対し OHマウスは58%でエピネフリンと同様 OH マウスの増加率は非常に低い。同様に ACTH 0.1U/cc 添加の際もかなり低い NEFA 動員の増加率が示された。NEFA 動員抑制因子であるインスリン 0.4U/cc 添加による影響は対照マウス60%に対し、OHマウスでは46%であつた。グルコース 200mg/dl 添加の場合は対照マウス52%、OHマウス33%の NEFA 動員抑制率を示した。

Table 1. Effect of epinephrine, norepinephrine, ACTH, insulin and glucose on NEFA release from epididymal adipose tissue of OH and their control mice

Values are expressed as μ Eq per gram per 1000cc. of NEFA release in 120 minutes Number in parenthese indictes number of experiments
The mice employed were ranged in 4 to 6 months of age

Animals	Epinephrine		Norepinephrine		ACTH		Insulin		Glucose	
	None	10^{-2} mg/cc	None	10^{-2} mg/cc	None	0.1U/cc	None	0.4U/cc	None	0.20mg%
Control mice	466 $\pm$ 62 (7)	1131 $\pm$ 22 (7)	482 $\pm$ 57 (7)	1051 $\pm$ 152 (7)	536 $\pm$ 56 (8)	665 $\pm$ 76 (8)	440 $\pm$ 126 (8)	176 $\pm$ 43 (8)	494 $\pm$ 60 (8)	237 $\pm$ 44 (8)
OH mice	321 $\pm$ 46 (7)	440 $\pm$ 52 (7)	301 $\pm$ 39 (7)	477 $\pm$ 54 (6)	313 $\pm$ 53 (7)	334 $\pm$ 45 (8)	324 $\pm$ 49 (7)	176 $\pm$ 33 (8)	328 $\pm$ 18 (8)	220 $\pm$ 38 (6)

Table 2. Effect of epinephrine, norepinephrine, ACTH and insulin on glycerol release from epididymal adipose tissue of OH and their control mice.

Values are expressed as μ mol per gram per 2 hours of glycerol release.
Number in parentheses indicates number of experiment.
The mice employed in 3 to 6 months of age.

Animals	Epinephrine		Norepinephrine		ACTH		Insulin	
	None	10^{-2} mg/cc	None	10^{-2} mg/cc	None	0.1U/cc	None	0.4U/cc
Control mice	3.50 $\pm$ 0.4 (8)	6.02 $\pm$ 0.8 (7)	3.50 $\pm$ 0.4 (8)	5.44 $\pm$ 0.7 (8)	3.50 $\pm$ 0.4 (9)	3.91 $\pm$ 0.5 (9)	4.25 $\pm$ 0.6 (6)	0.20 $\pm$ 0.3 (8)
OH mice	2.51 $\pm$ 0.4 (7)	3.91 $\pm$ 0.5 (7)	2.51 $\pm$ 0.5 (6)	3.45 $\pm$ 0.5 (6)	2.5 $\pm$ 0.2 (7)	3.00 $\pm$ 0.4 (6)	2.92 $\pm$ 0.3 (8)	1.61 $\pm$ 0.3 (6)

Table 3. Effect of epinephrine, norepinephrine, insulin and glucose on NEFA release from epididymal adipose tissue of NZO mice and their control mice.

Values are expressed as μ Eq per gram per 1000cc. of NEFA release in 120 minutes.
Number in parentheses indicates number of experiment.
The mice employed were ranged in 5 to 7 months of age

Animals	Epinephrine		Norepinephrine		Insulin		Glucose	
	None	10^{-2} mg/cc	None	10^{-2} mg/cc.	None	0.4U/cc.	None	200mg%
Control mice	477 $\pm$ 64 (9)	1245 $\pm$ 180 (9)	550 $\pm$ 57 (7)	1300 $\pm$ 180 (9)	510 $\pm$ 52 (8)	201 $\pm$ 30 (8)	540 $\pm$ 66 (8)	279 $\pm$ 44 (8)
NZO mice	450 $\pm$ 57 (9)	1011 $\pm$ 170 (9)	499 $\pm$ 57 (9)	1092 $\pm$ 150 (9)	477 $\pm$ 56 (8)	250 $\pm$ 32 (8)	470 $\pm$ 52 (9)	262 $\pm$ 36 (8)

Table 2 は上の成績を確認する為にグリセロール遊出を全く同様な系による方式で測定した結果である。この表の成績は Table 1 の NEF 動員のそれと全く同一の傾向を示した。OH マウスの副腎丸脂肪組織に於て

はかくの如く著明な脂肪分解促進及び抑制ホルモン等に対する感受性の低下がみられたが、肝及び横隔膜組織ではこの様な傾向は認められなかつた。

Table 3 の NZO マウスの脂肪組織の NEFA 動員はエピネフリン、ノルエピネフリン及びインスリンに良く反応し、その感受性は対照マウスとの間に差異を認めなかつた。NZOマウスの肝及び横隔膜組織でも OH マウスと同様対照マウスとの間に差異を全く認めなかつた。

脂肪代謝に於けるグルコースの存在意義は非常に重要である。そこでメヂウムにグルコース 200mg/dl を共存させてエピネフリン、ノルエピネフリン、ACTH 及びインスリンの影響を観察し、その成績を Table 4

Table 4. Effect of some hormones on NEFA release from epididymal adipose tissue incubated with glucose.

Values are expressed as μEq per gram per 1000cc. of NEFA release. Number in parentheses indicates number of experiment. The mice employed were 4 to 6 months of age. Medium contained 200mg% of glucose.

Animals	Epinephrine		Norepinephrine		ACTH		Insulin	
	None	10^{-2}mg/cc.	None	10^{-2}mg/cc.	None	0.1U/cc.	None	0.4U/cc.
Control mice	194 ± 49 (5)	592 ± 96 (5)	140 ± 39 (4)	410 ± 65 (4)	125 ± 35 (5)	195 ± 33 (5)	195 ± 50 (6)	31 ± 13 (6)
OH mice	175 ± 41 (5)	207 ± 52 (5)	146 ± 42 (4)	200 ± 51 (4)	122 ± 22 (4)	147 ± 28 (4)	170 ± 40 (6)	103 ± 25 (6)

に示した。Table 1 に示した如く OH マウスの NEFA 動員は対照マウスに比べて通常著しく低い値を示すが、グルコース 200mg/dl の存在下では、これが殆んど同程度になつた。エピネフリン、ノルエピネフリン及び ACTH の添加は対照マウスの NEFA 動員を著明に増加せしめたが、OH マウスのそれは僅少であつた。又インスリン添加も対照マウスに対しては著明な NEFA 動員抑制を示したのに反し、OH マウスに於ける抑制率は対照マウスに比べ極めて僅かであつた。即ち OH マウスの NEFA 動員はグルコース存在下でもこれらのホルモンに対して低い感受性を示した。

Table 5 は Table 1, Table 2 及び Table 3 の結果を併せて、各種ホルモンの NEFA 動員促進率及び抑制率(一)を%で示したものである。これより明らかな如く、グルコースの存在下ではインスリンの抑制率は

Table 5. Effect of some hormones and glucose on NEFA release from epididymal adipose tissue of OH and their control mice

Hormones added	No glucose		Glucose	
	Control mice	OH mice	Control mice	OH mice
None	0 %	0 %	-52.2%	-39.1%
Insulin (0.4U/cc.)	-64.5 (-59)	-51.5 (-38)	-93.8	-71.6
Epinephrine (10^{-2}mg/cc.)	76.6 (107)	8.6 (70)	19.6	-25.4
Norepinephrine (10^{-2}mg/cc.)	110.7 (72)	3.7 (35)	-17.2	-44.7
ACTH (0.1U/cc.)	34.3 (43)	7.7 (11)	-60.6	-59.4

Table 6. Effect of epinephrine and insulin on NEFA release from epididymal adipose tissue of OH mice and their control mice.

Values are expressed as μ Eq per gram per 1000cc. of NEFA release. The mice employed are about 5 months of age.

Animals	No. of Animals	None	Epinephrine (10mg/cc.) and Insulin (0.4U/cc.)
Control mice	8	582 $\pm$ 66 (8)	1001 $\pm$ 151 (8)
OH mice	6	400 $\pm$ 42 (8)	582 $\pm$ 62 (7)

が確認された。

考 察

この報告の第1編に示した如く、OHマウスの脂肪組織の NEFA 動員は摂食時対照マウスより高い値を示すのに反し、絶食時に於ける NEFA 動員促進率は対照マウスに比べて極めて低い。このような現象はOHマウスの脂肪組織に於ける脂肪酸分解酵素が所謂その促進ホルモン⁸⁾⁷⁾に対しより低い感受性を示す事によるものと想像される。

この仮定に基づき、著者は *in vitro* の NEFA 動員に及ぼすエピネフリン、ノルエピネフリン及び ACTH の所謂脂肪分解促進ホルモンの影響を実験した。その結果推察通りにOHマウスの副睾丸脂肪組織の NEFA 動員はこれらのホルモンに対する感受性が対照マウスに比べて異常に低い事が確認された。これらの結果は Mayer ら⁸⁾⁹⁾の報告と一致するものである。然し肝及び横隔膜組織ではこのような成績はみられず、又 NZO マウスではいずれの組織でも対照マウスとの間に差異を見出し得なかつた。NEFA 動員抑制剤としてインスリン及びグルコースの影響も同時に検討したが結果は NEFA 動員促進ホルモンと全く同様に、OHマウスの副睾丸脂肪組織に於てのみ対照マウスとの差異、即ちインスリン及びグルコースの抑制作用の感受性の低下を認めた。このような脂肪代謝の異常性はOHマウスの脂肪組織に於てのみ見られ、OHマウスと同様肥満高血糖症状を示すNZOマウスでこのような異常が全く認められなかつた。このような成績はOHマウスの脂肪組織に於ける異常性は肥満高血糖の一次的因子ではなく、むしろOHマウスの脂肪組織で早期より見られる蓄積脂肪の異常増加に基づく脂肪組織細胞の機能低下による二次的現象である事を示すものと考えられる。

脂肪組織には Glycerokinase が存在しないから¹⁰⁾トリグリセライドから分解されたグリセロールは可逆的に再利用され得ない。従つてトリグリセライドの合成に必要なグリセロホスフェートはグルコースの投与に待たねばならない。この事は Table 5 に於いて単にグルコースのみの存在で NEFA の動員が対照マウスで -52.2%, OHマウスで -39.1%の抑制が見られた事から明らかな如く、グルコースは動員された NEFA の再エステル化に役立つものと考えられる。Table 5 は又各種ホルモンの影響をグルコースの存在の有無について比較したものである。既に述べた如くグルコースの有無にかかわらず用いたホルモンに関しては、いずれも OH マウスは対照マウスに比べて感受性の低い事が確認された。インスリン作用はグルコースの存在により著明に増強されるのがみられ、インスリンの NEFA の再エステル化作用をグルコースに由来するグリセロホスフェートが助長している事を示している。ACTH 作用及びOHマウスに於けるノルエピネフリン作用はグルコースの添加により抑制される如き成績を得た。然しエピネフリン作用は若干の抑制はみられたが尚可成りの程度に残存しており、Buckle¹¹⁾のラットの脂肪組織による実験成績と全く一致している。Jurgas

極めて増加し、逆に ACTH の NEFA 動員促進作用は殆んど認められなかつた。然しエピネフリンのみは依然としてその作用が認められた。ノルエピネフリンの NEFA 動員促進作用はグルコースによつて減少が認められた。

最後に NEFA 動員に対するインスリン、エピネフリンの併用効果について検討した。実験結果は Table 6 に示す如く、エピネフリンとインスリンの共存は対照マウス及びOHマウスに対し NEFA 動員の促進的効果を示した。然しOHマウスは対照マウスに比べてその促進率は低く、感受性に乏しい事

ら¹²⁾はエピネフリンによつて脂肪の分解が促進されて生産された NEFA はグルコースがメデウムに添加されずともインスリンによつて減少する事を報告している。Table 6 の成績はこれを追試すると同時に OH マウスについても平行して実験した成績である。対照正常マウスに於いてエピネフリン 10^{-2} mg/cc 単独を用いた Table 1 の 143 % の増加に比べて、エピネフリン 10^{-2} mg/cc、インスリン 0.4 U/cc 添加の Table 6 ではその NEFA 動員促進率は 73 % であり、明らかにエピネフリンによつて動員された NEFA がインスリンにより再エステル化されている事がうかがえる。但し OH マウスでは Table 1 に於て 30.9 %, Table 6 では 45 % と大差なく正常マウス及びラットと著しく異なり、この点に於ても OH マウスの脂質代謝のホルモン感受性の異常性が強調せられる。

結 語

NZO マウス及び OH マウスの肝、横隔膜及び脂肪組織の NEFA 動員に及ぼす NEFA 動員促進因子及び抑制因子の影響を *in vitro* で観察し次の様な結果を得た。

1) NZO マウスの肝、横隔膜及び脂肪組織の NEFA 動員に対するエピネフリン、ノルエピネフリンの影響は対照マウスと同様であり、異常性は認めなかつた。脂肪組織の NEFA 動員に及ぼすグルコース及びインスリンの影響も正常であり異常性はみられなかつた。

2) OH マウスの肝及び横隔膜の NEFA 動員に対するエピネフリン、ノルエピネフリンの影響は正常であつた。

3) OH マウスの副睾丸脂肪組織の NEFA 動員に対するエピネフリン、ノルエピネフリン及び ACTH の影響は著明に低下していた。又インスリン及びグルコースに対する感受性の低下も認められた。

おわりに御指導を賜つた松下宏教授に深謝すると共に種々の御援助を頂いた教室員諸氏、殊に技術的な協力を頂いた河端啓子氏に厚く御礼申し上げます。

尚本研究費の一部は昭和 37 年度文部省科学研究費 (710221) によつた。又本論文の要旨は第 41 回日本生理学会及び第 37 回日本内分泌学会総会に於いて発表した。

文 献

- 1) SELLERS, E.A., J.W. SCOTT & N. THOMAS : Am. J. Physiol., 177 : 372, (1954).
- 2) MARTHA, VAUGHAN : J. Biol. Chem., 237 : 3354, (1962).
- 3) 上岡利春 : 日本内分泌学雑誌.
- 4) EDWARD D. KORN : J. Biol. Chem., 251 : 1, (1955).
- 5) DOL, V.P. : J. Clin. Invest., 35 : 150, (1956).
- 6) RIZAK, M.A. : J. Biol. Chem., 236 : 657, (1961).
- 7) HOLLENBERG, C.H., RABEN, M.S., & ASTWOOD, E.B. : Endocrinol., 68 : 589, (1961).
- 8) MOROBALL, N.B., & ENGEL, F.L. : J. Lipid Res. : 1, 339, (1960).
- 9) LEBOEUF, B., LOCHAYA, S., LEBOEUF, N., WOOD, JUN., F.C., MAYER, J., & CAHILL, JUN., G.F. : Am. J. Physiol., 201 : 19, (1961).
- 10) WIELAND, O., & SUYTER, M. : Biochem. Z., 329 : 320, (1957).
- 11) BUCKLE, R.M., RUBINSTEIN, D., MOGARY, E.E., & BEK, J.C. : Endocrinol., 69 : 1009, (1961).
- 12) JUNGAS, R.L., & BALL E.G. : Biochem., 2 : 383, (1963).