

卵巣摘出ラットの脂肪蓄積に及ぼすカフェイン長期摂取の影響

韓 立坤,* 甲斐美美, 奥田拓道

Effects of Long-Term Administration of Caffeine on Fat Storage in Ovariectomized Rats

Li-Kun HAN,* Fumi KAI, and Hiromichi OKUDA

*Department of Environmental and Symbiotic Sciences, Prefectural University of Kumamoto,
3-1-100 Tsukide, Kumamoto 862-8502, Japan*

(Received June 30, 2004; Accepted August 20, 2004)

It is well known that obesity occurs in women with climacteric disorders. The aim of this study was to examine whether caffeine prevents obesity and bone loss in ovariectomized rats (ovx). Eight-week-old female Wistar rat were assigned to 4 groups: a sham-operated group fed the control diet (CE-2); an ovx-c group fed the control diet; an ovx-caf 0.15% group fed the control diet containing 1.5 g/kg of caffeine; and an ovx-caf 0.3% group fed the control diet containing 3 g/kg of caffeine. Body weights at 2–9 weeks and the final parametrial adipose tissue weights were significantly lower in the ovx-caf 0.3% group than in the ovx-c group. Food intakes were significantly lower in the ovx-caf 0.3% group than in the ovx-c group. After 9 weeks, the rats were killed and adipose tissues were sampled immediately. Basal lipolysis was increased in the ovx-caf 0.3% group fed the control diet containing 3 g/kg of caffeine than in the ovx-c group fed the control diet. The relative content of calcium (g/100 g body weight) in the ovx-caf 0.3% group was significantly increased compared with that in the ovx-c group. These results show a new possible role for caffeine in the prevention of lifestyle-related diseases.

Key words—caffeine; basal lipolysis; ovariectomized-rats

はじめに

女性は50歳前後に閉経を迎える。そして、この閉経期を境に肥満者の頻度が明らかに増加する。この時期は卵巣機能が低下し、卵巣からの女性ホルモンの産生が途絶え、頭痛やめまい、のぼせ、肩こり、高血圧など数々の女性ホルモン欠落症状、いわゆる更年期障害と言われる症状が現れてくる。更年期に入ると、急激に全身の骨量が減少するとともに、血中コレステロール値や中性脂肪値が上昇し、肥満になり易くなる。¹⁾ 閉経後に起きる肥満の原因は、エストロゲン（卵巣ホルモン）の消退であり、それはこれまで数々の臨床研究により明らかとされてきている。²⁾ ラットやマウスにおいても卵巣摘出による肥満が見られ、エストロゲンの投与によりこの肥満は抑制される。³⁾ ほかにも、エストロゲンはノルエピネフリンによる脂肪分解の増進作用も有し

ており、閉経によりこの働きがなくなり、体内に脂肪が蓄積され易い状態に陥るため肥満になり易いともされている。^{4,5)}

また、更年期を迎えることで危険とされているのが骨粗鬆症である。この主因はやはりエストロゲン欠乏である。エストロゲンは破骨細胞の働きを抑え、骨の形成を促進する方向に働いている。そのため閉経によってエストロゲンが欠乏すると骨破壊が再生を上回るようになり骨量が減少してくる。⁶⁾

近年、コーヒーやお茶などに多量に含まれているカフェインが、脂肪細胞での脂肪分解作用に対し、脂肪分解促進ホルモンであるノルエピネフリンの働きを増強させるという報告が出されており、⁷⁾ ほかにもカフェインの血清脂質改善効果⁸⁾ や体脂肪率低下作用⁹⁾ などが発表されている。そこで、本研究では、卵巣摘出ラットを用いて、脂肪分解促進作用のあるカフェインが卵巣摘出による肥満を改善するかどうかを検討した。またカフェインによる骨の強度及びカルシウム含量への影響についても検討を行った。

熊本県立大学環境共生学部環境共生学科食健康環境学科

e-mail: hanlikun@hotmail.com

実験材料及び実験方法

1. 実験材料

1-1. 実験動物及び飼料 7週齢 Kud: Wistar系雌性ラット（九動株, 熊本）を1週間の予備飼育ののち、卵巣摘出手術を行い実験に供した。1群7匹の計4群に分け、3群は腹部より卵巣を摘出し、1群は偽手術を施した。3日間の観察飼育ののち、卵巣摘出の3群は固形飼育用飼料 CE-2 投与（ovx-C）群、カフェイン0.15%投与（ovx-caf 0.15%）群及びカフェイン0.3%投与（ovx-caf 0.3%）群とした。偽手術（sham-C）群については、ovx-C群と同様に固形飼育用飼料 CE-2 投与群とした。なお、飼育は室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、12時間毎の明暗サイクル（明：7:00 am—暗：7:00 pm）の環境で行い、飼料並び水は自由摂取させた。飼料摂取量は毎週1回測定し、そのつど飼料を交換した。体重も1週間毎に測定した。

2. 実験方法

2-1. 卵巣摘出ラットの体重、摂食量、子宮傍脂肪組織重量、肝臓重量に対するカフェインの長期摂取による影響 卵巣摘出手術を行ったのち、3日間予備飼育して平均体重が等しくなるよう1群7匹の3群に分け2ヵ月間飼育した。飼育期間中、体重と摂食量は週1回測定し、飼料は測定毎に新しく入れ替えた。平均摂取エネルギーは飼育期間中の平均摂食量から算出した。

飼育終了後、ラットをエーテル麻酔下で開腹し、腹部下大静脈より採血した。その後、速やかに子宮傍脂肪組織及び肝臓を摘出し、重量を測定した。血液は 4°C 、3000 rpm で10分間遠心分離し、血清中の中性脂肪及び総コレステロールはトリグリセライド-E-テストワコー及び総コレステロール-E-テストワコーにて測定した。肝臓を -80°C 保存し、後日の分析に供した。肝臓の中性脂肪及び総コレステロール含量については約0.3 mgの肝臓を5 mlの水冷クロロホルム・メタノールの混合液（2:1）でホモジネートし、遠心分離したのち、上清を採取した。上清を N_2 気流下で蒸発乾固して、血清脂質と同様の方法で測定した。

2-2. 卵巣摘出ラットの基礎脂肪分解能に対するカフェインの長期摂取による影響 基礎脂肪分解能とは、カテコールアミンなどの脂肪分解促進ホル

モン非存在下での脂肪分解能を示す。取り出した子宮傍脂肪組織の血管などを除去し、脂肪組織切片を調製した。0.25 mlの2.5%牛血清アルブミン溶液に0.05 mlの脂肪組織切片を加え、 37°C で1時間反応したのち遊離した脂肪酸を銅試薬法¹⁰⁾によって測定した。

2-3. 卵巣摘出ラットの骨強度、カルシウム含量に対するカフェインの長期摂取による影響 膝関節部と骨盤ヒンジ部から大腿骨を脱離させ、筋肉及び骨膜を剥離し、その湿重量を測定。その後、強度はオートグラフ（骨破断用）AGS-D形を用いて大腿骨の破断力を測定した。骨強度測定後の大腿骨を用い、クロロホルム・メタノール（2:1）混合液に5日間浸漬し、 120°C で1時間乾燥後脱脂乾燥重量を測定する。ろつぼを用いて 550°C で48時間灰化後重量を測定する。灰化した大腿骨を塩酸処理したのち50 mlに定容し、カルシウム分析に供した。カルシウム分析はカルシウムCテストワコーを用いて測定した。

3. 統計処理

各測定値は、平均値±標準誤差で表した。有意差検定にはSuper ANOVAソフトを用い、Fisher's protected LSD testを用いて検定し、 $p < 0.05$ で有意とした。

結 果

1. 体重、摂食量及び子宮傍脂肪組織重量 飼育期間中の体重変動をFig. 1に示した。Sham-C群に比べてovx-C群は有意に増加していた。また、ovx-C群と比べてovx-caf 0.3%群では有意な体重減少が認められた。Ovx-caf 0.15%群では有意な変化が認められなかった。

飼育期間中の摂取エネルギー平均をTable 1に示した。Ovx-C群と比較してsham-C群は有意に低かった。また、ovx-caf 0.3%群もovx-C群と比較して有意に低い値を示した。

子宮傍脂肪組織重量についてはovx-C群に比べsham-C群が有意に減少しており、またovx-caf 0.3%群も有意に減少していた。Ovx-caf 0.15%群については有意な変化は認められなかった(Fig. 2)。

2. 基礎脂肪分解能 カテコールアミンなどの脂肪分解促進ホルモン非存在下での脂肪分解を測定し、その結果をFig. 3に示した。Ovx-C群と比較

して sham-C 群は有意に低い値を示し、また ovx-caf 0.3% 群においては有意に高い値を示した。Ovx-C 群と比較して ovx-caf 0.15% 群では有意な変化

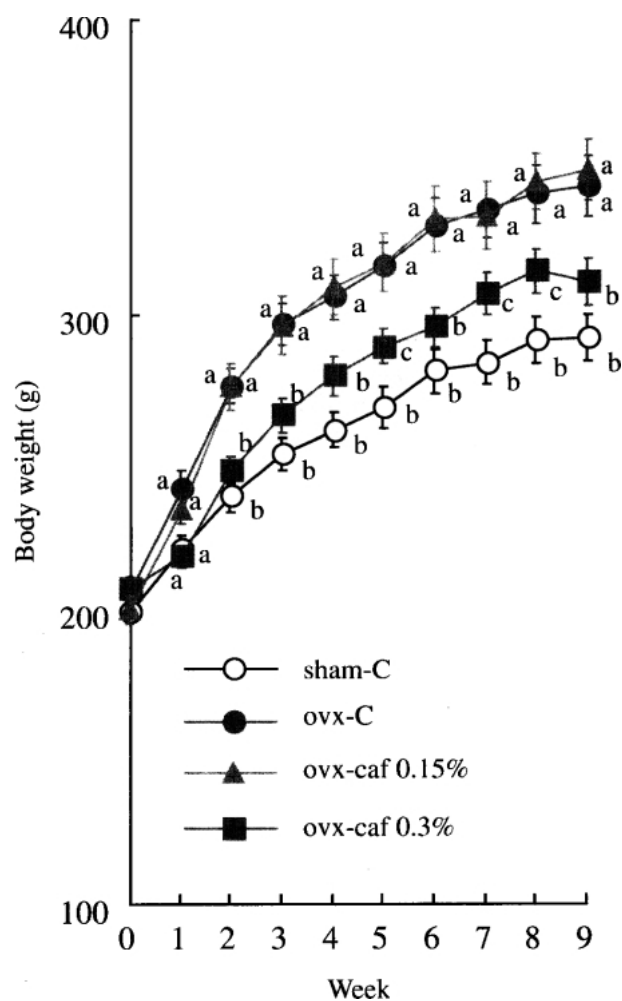


Fig. 1. Effect of Caffeine on Body Weight in Ovariectomized Rats

Values are means \pm S.E. in each group. Those not sharing a letter differ, $p < 0.05$.

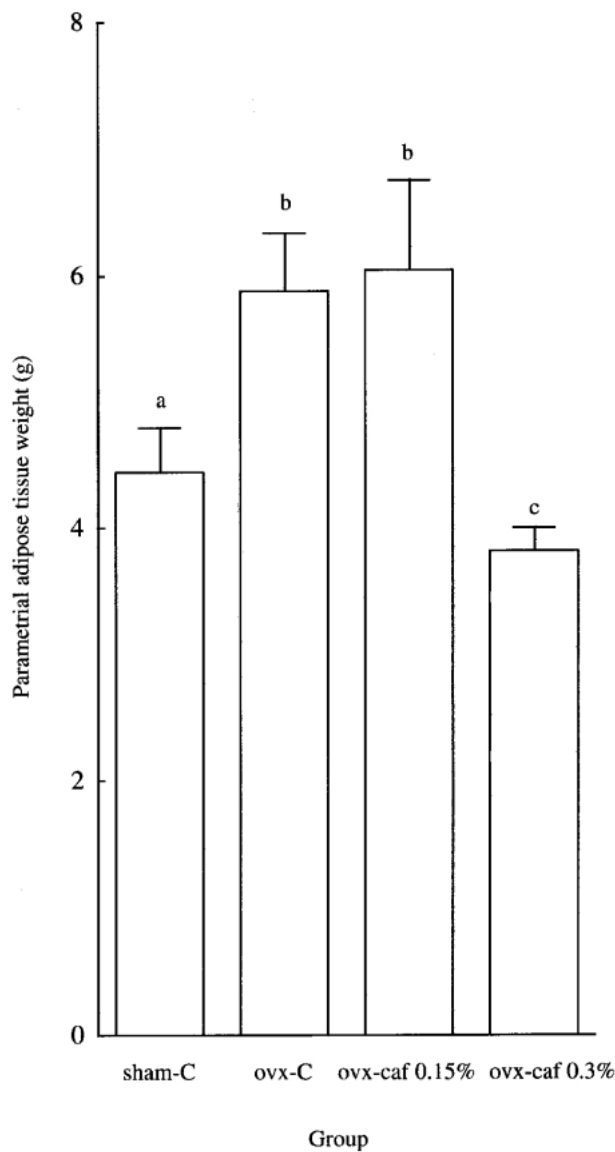


Fig. 2. Effect of Caffeine on Parametrial Adipose Tissue Weight in Ovariectomized Rats

Values are means \pm S.E. in each group. Those not sharing a letter differ, $p < 0.05$.

Table 1. Intakes of Energy and Caffeine

Week	Sham-C	Ovx-C	Ovx-caf 0.15%	Ovx-caf 0.3%
1	1609.3	1952.9	1990.2	1739.6
2	1586.4	1910.0	1838.4	1678.0
3	1552.0	1796.9	1859.9	1632.2
4	1540.6	1756.8	1752.5	1587.8
5	1539.1	1751.0	1729.6	1554.9
6	1544.9	1698.1	1712.4	1544.9
7	1490.5	1662.3	1649.4	1511.9
Energy intake (kJ/week/rat)	1551.8 \pm 14.3 ^{a)}	1789.7 \pm 40.3 ^{b)}	1790.3 \pm 43.1 ^{b)}	1619.3 \pm 28.8 ^{a)}
Caffeine intake (mg/day/kg)			89.51 \pm 2.17	177.18 \pm 3.14

Values are means \pm S.E. in each group. Those not sharing a letter differ, $p < 0.05$.

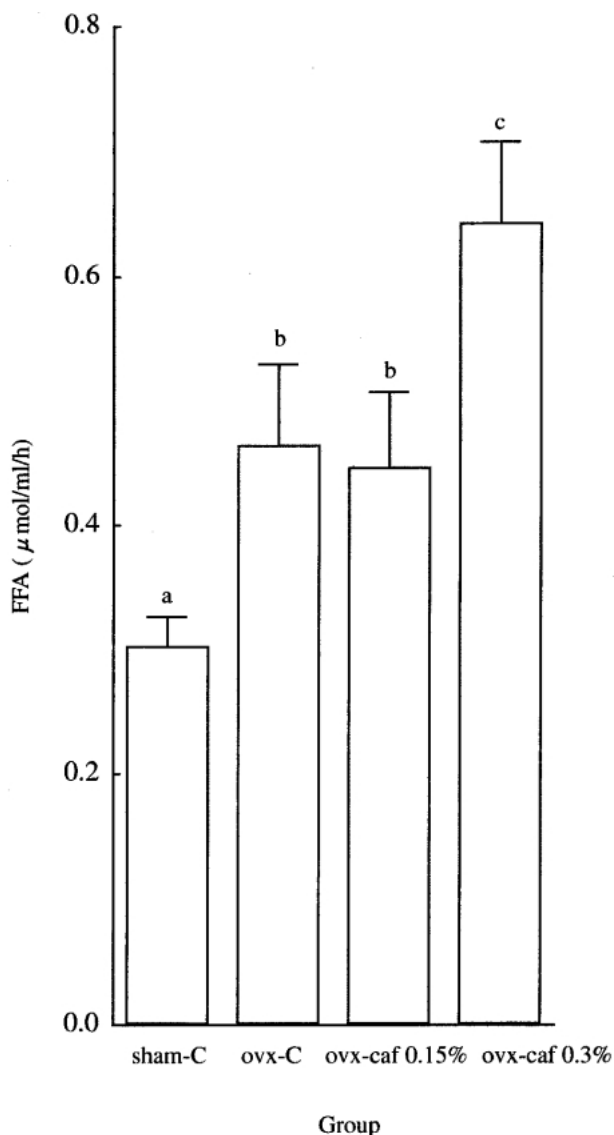


Fig. 3. Effect of Caffeine on Basal Lipolysis in Ovariectomized Rats

Values are means \pm S.E. in each group. Those not sharing a letter differ, $p < 0.05$.

が認められなかった。

3. 骨強度及びカルシウム含量 Table 2 に示すように、湿重量については、左右とも 4 群間で有意な差は認められなかった。

骨強度については、sham-C 群と比較して卵巣摘出の 3 群いずれも有意な低値を示した。Ovx-C 群に比べて ovx-caf 0.15% 群及び ovx-caf 0.3% 群においては有意な変化を示さなかった。

カルシウム含量については大腿骨灰化後重量当たりと体重 100 g 当たりの 2 種類の方法で算出した。大腿骨灰化後重量当たりのカルシウム含量は、4 群間に有意な差は認められなかったが、体重 100 g 当たりのカルシウム含量は、卵巣摘出によって有意に低下したが、ovx-caf 0.3% 群においては有意な増加が認められた。

考 察

肥満とは身体を構成する成分のうち、脂肪組織の占める割合が異常に増加した状態と定義される。その成因が判明しているものは症候性肥満と呼ばれ、臨床的には内分泌疾患でよく遭遇する。女性が閉経を迎えると同時に肥満になり易くなるという現象も、内分泌疾患によるものである。閉経を迎えるということは、女性ホルモンの分泌が消退することであり、摂食抑制や脂肪合成の抑制などエストロゲンによる働きがなくなり、また自発的な運動量も低下し、肥満になり易くなる。³⁾ 最近、倉智ら¹¹⁾はエストロゲンによる肥満抑制メカニズムとして、エストロゲンの直接的な作用以外に、エストロゲンの欠乏は成長因子を介して肥満を誘導するという機構も存在することを明らかにした。肥満は原因が何であれ、最終的に脂肪組織の脂肪細胞に脂肪が異常に多く蓄積する病態であり、脂肪細胞に貯蔵された脂肪

Table 2. Effect of Caffeine on Bone Weight, Bone Density and Calcium Content

		Sham-C	Ovx-C	Ovx-caf 0.15%	Ovx-caf 0.3%
Bone weight (wet g)	Right	0.950 \pm 0.035	0.970 \pm 0.035	0.924 \pm 0.047	0.914 \pm 0.027
	Left	1.010 \pm 0.037	0.990 \pm 0.021	0.926 \pm 0.043	0.919 \pm 0.020
Bone density (N/100 g body weight)		51.78 \pm 1.01 ^{a)}	44.37 \pm 0.99 ^{b)}	44.42 \pm 1.60 ^{b)}	44.81 \pm 1.41 ^{b)}
Ash weight (mg)		769.0 \pm 16.6	760.8 \pm 35.1	716.6 \pm 27.3	694.9 \pm 19.7
Calcium content (mg/g ash weight)		252.2 \pm 9.4	251.8 \pm 1.4	267.7 \pm 12.9	279.4 \pm 15.0
Calcium content (mg/100 g body weight)		101.8 \pm 2.2 ^{a)}	82.6 \pm 0.7 ^{b)}	86.1 \pm 2.6 ^{a)}	101.5 \pm 7.8 ^{a)}

Values are means \pm S.E. in each group. Those not sharing a letter differ, $p < 0.05$.

は、一部合成され、一部分解されるという動的平衡の状態にある。このバランスが崩れて脂肪の分解能より合成能が増加してしまった状態が肥満ということになる。

今回は、コーヒーなどに含まれる脂肪分解促進作用のあるカフェインを用いて卵巣摘出ラットでの抗肥満作用があるかを検討した。Ovx-C群と比較してovx-caf 0.3%群において体重と子宮傍脂肪組織重量が有意に減少していたが、ovx-caf 0.15%投与群においては有意な変化が認められなかった。卵巣摘出による肥満が0.3%カフェインの添加によって改善された。飼育終了後、基礎脂肪分解能を測定したところ、ovx-C群はsham-C群に対して有意に高値を示した。またovx-C群に対しovx-caf 0.3%群が有意に高値を示した。これは卵巣を摘出することによってエストロゲンの欠乏が起こり、体内に脂肪が蓄積し、さらに脂肪細胞が肥大して内在性脂肪滴(LD)表面を覆っていたホスファチジルコリン(PC)に隙間が生じ、その隙間にホルモン感受性リパーゼ(HSL)が入り込むことにより、脂肪分解能が上昇したと考えられる。肥満による細胞容量の拡大、つまり中性脂肪(TG)の蓄積に伴いTGの増加に見合うホスファチジルコリン(PC)の増加がないため、結果的にはTG当たりのPC濃度は肥満に伴い減少する。脂肪細胞内でホルモン感受性リパーゼ(HSL)は常に活性型で存在している¹²⁾が、内在性脂肪滴(LD)表面のPCによりTGとの接触が妨げられており、カテコールアミンなどの脂肪動員ホルモンが存在しなければ脂肪分解は起こらない。肥満により脂肪細胞容量が拡大すると、それに伴いLD表面のPC濃度が減少し、TGとリパーゼとの接触が高まり、ホルモン非存在下でも脂肪分解が上昇する。¹³⁾0.3%のカフェイン投与では基礎脂肪分解能が高まり、脂肪分解促進作用のあるカフェインによりTGとリパーゼとの接触が高まったことが示唆される。

一方、摂食量については、カフェインの摂取により日を追う毎に量が減少していった。これはカフェインの抗肥満作用のもう1つの原因と考えられる。これについて詳細な検討が必要である。

今回は、カフェイン摂取と骨粗鬆症との関係についても検討した。骨強度は、sham-C群と比較して卵巣摘出の3群は低値を示した。Ovx-C群に比べ

てカフェイン投与群は有意な変化が認められなかった。卵巣摘出、つまり更年期になることで骨の強度が弱くなり骨粗鬆症になり易くなるということを示しているが、カフェインによる影響は認められなかった。灰分重量は卵巣摘出によって若干低値を示したが、カルシウム含量に関して、骨の乾燥重量当たりで比較するとsham群とovx群間に大きな差は認められなかった。現在、カフェインがカルシウム代謝に対して悪影響を及ぼすことや更年期になると骨粗鬆症になり易いためコーヒーの摂取は控えた方がいいなど、カフェインと骨代謝に関する悪い関係が言われてきた。¹⁴⁾これは、骨の乾燥重量当たりのカルシウム含量を測定した結果で比較されていたため、今回、われわれは体重当たりのカルシウム含量で比較してみた。その結果は、sham-C群に対してovx-C群とovx-caf 0.15%群は有意に減少していたが、ovx-C群に対してovx-caf 0.3%群が有意に増加していた。つまり、卵巣摘出によって骨のカルシウム含量は減少した。しかし、カフェイン0.3%の摂取によって骨のカルシウム減少に対して回復傾向が認められたということになる。またBarrett-Connorら¹⁵⁾は閉経後女性で、毎日ミルクを飲んでいるヒトはコーヒーを飲んでも骨量には影響がないが、ミルクを飲まずに1日2杯のコーヒーを飲み続けると骨量は低下することを報告している。今回の実験の飼料にはカルシウムが十分量含まれていたため、カフェイン添加による悪い影響は認められなかったと思われる。

また、カフェインによる成長ホルモン、甲状腺ホルモン及び甲状腺刺激ホルモンの急激な変化などが報告されている。¹⁶⁾一方、最近Sonら¹⁷⁾はカフェイン137 mg/day/kgの摂取で甲状腺ホルモンなどは有意に上昇していなかったことを報告している。今回、われわれは甲状腺ホルモン含量を測定していなかったが、今後、卵巣摘出ラットでの甲状腺ホルモン分泌に及ぼすカフェインの影響を検討する必要があると思われる。

本研究は社団法人全日本コーヒー協会の研究費助成金の助成により行われた。

REFERENCES

- 1) Nishida Y., Otani N., Takano Y., Kato H., Watanabe K., Ichikawa T., Suzuki I., *Jpn. J.*

- Nutr. Diet.*, **59** (Suppl. 5), 312 (2001).
- 2) Shimizu H., *Himankenkyuu*, **8** (3), 254–258 (2002).
 - 3) Mook D. G., Kenney N. J., Roberts S., Nussbaum A. I., Rodier W.I 3rd., *J. Comp. Physiol. Psychol.*, **81**(2), 198–211 (1972).
 - 4) Szkudelska K., Szkudelski T., Nogowski L., *Phytomedicine*, **9** (4), 338–345 (2002).
 - 5) Roy E. J., Wada G. N., *Horm. Behav.*, **8**, 265–274 (1977).
 - 6) Yoneda T., “New Bioscience of Bone,” Yodosha, Tokyo, 2002, pp. 114–130.
 - 7) Sayama K., Oguni I., “Health Science of Tea, Chap. 6,” eds. by Muramatsu K., Oguni I., Isemura M., Sugiyama I., Yamamoto-Maeda M., Center for Academic Publications Japan, Tokyo, 2002, pp. 205–209.
 - 8) Mogeiki A., Shimizu J., Wada M., Tatsuda M., *Nipponiyoukyokuryougakkai*, Ehime, 2002, p. 84.
 - 9) Greenway F. L., De Jonge L., Blanchard D., Frisard M., Smith S. R., *Obes. Res.*, **12** (7), 1152–1157 (2004).
 - 10) Tsujita T., Okuda H., *Eur. J. Biochem.*, **133**, 215–220 (1983).
 - 11) Kurachi H., *Himankenkyuu*, **8** (3), 291–295 (2002).
 - 12) Morimoto C., Kameda K., Tsujita T., Okuda H., *J. Lipid Res.*, **42**, 120–127 (2001).
 - 13) Morimoto C., Tsujita T., Okuda H., *Himankenkyuu*, **1** (2), 95–98 (1995).
 - 14) Kiel D. P., Felson D. T., Hannan M. T., Anderson J., Wilson P. W., *Am. J. Epidemiol.*, **132**, 675–684 (1990).
 - 15) Barrett-Connor E., Chang J. C., Edelstein S. L., *JAMA.*, **271** (4), 280–283 (1994).
 - 16) Spindel E., Arnold M., Cusack B., Wurtman R. J., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **214**, 58–62 (1980).
 - 17) Son H. Y., Nishikawa A., Kanki K., Okazaki K., Kitamura Y., Lee K. Y., Umemura T., Hirose M., *Cancer Sci.*, **94**, 334–337 (2003).