

2019 年度 博士学位論文

一過性短期間の絶食が体組織に及ぼす難回復性の変化

**Changes in difficulty recovery that transient short-term fasting affects body
tissues**

久富裕子

2020 年 3 月 9 日

専攻分野 機能形態学
紹介教員 久木野 憲司

目次

第 I 章 序論	1
第 II 章 絶食による体重減少および主要臓器の萎縮と形態変化について	6
II-1 緒言	6
II-2 方法	7
II-3 結果	8
II-4 考察	10
第 III 章 絶食により遷移する体内貯蔵脂肪の分布と量	14
III-1 緒言	14
III-2 方法	15
III-3 結果	17
III-4 考察	20
第 IV 章 絶食による骨格筋組織の萎縮に誘導される体組成の変化	25
IV-1 緒言	25
IV-2 方法	25
IV-3 結果	28
IV-4 考察	30
第 V 章 絶食による骨量減少と骨質の変化	33
V-1 緒言	33
V-2 方法	34
V-2-a 実験 1 カルシウム出納と骨強度	34
V-2-b 実験 2 軟 X 線画像による骨解析	36
V-2-c 実験 3 CT 画像による骨解析	39
V-3 結果	42
V-3-a 実験 1 カルシウム出納と骨強度	42
V-3-b 実験 2 軟 X 線画像による骨解析	44
V-3-c 実験 3 CT 画像による骨解析	47
V-4 考察	50
第 VI 章 絶食による行動パターンの変化と脳組織の微小構造変化	61
VI-1 緒言	61
VI-2 方法	62

VI-3 結果	64
VI-4 考察	65
第Ⅶ章 一過性短期間の絶食が体組織に難回復性の変化をもたらす可能性に 関する考察	68
引用文献	76
謝辞	91
図表	92
第Ⅱ章の図表（ Figure 2-1～2-30 および Table 2-1 ）	92
第Ⅲ章の図表（ Figure 3-1～3-28 および Table 3-1 ）	117
第Ⅳ章の図表（ Figure 4-1～4-21 および Table 4-1 ）	133
第Ⅴ章の図表（ Figure 5-1～5-76 および Table 5-1～5-3 ）	144
第Ⅵ章の図表（ Figure 6-1～6-8 および Table 6-1 ）	186

以上、本文 96 枚 ただし、表紙・目次・引用文献・謝辞を含む。

図 163 点（ Figure 2-1 ～ Figure 6-8 ）

表 7 点（ Table 2-1 ～ Table 6-1 ）

略語表記一覧

ACC	; acetyl-CoA carboxylase
ACTH	; adrenocorticotrophic hormone
AGEs	; advanced glycation end products
AN	; anorexia nervosa
BMD	; bone minerals density
BMI	; body mass index
BRICs	; Brazil, Russia, India and China
CT	; computed tomography
CXD 法	; computed X-ray absorptiometry
DXA 法	; dual energy X-ray absorption
FAS	; fatty acid synthase
GBD	; global burden of disease
GCL	; granule cell layer
HE 染色	; hematoxylin and eosin stain
IHME	; the Institute for Health Metrics and Evaluation
KB 染色	; Kluver-Barrera's stain
LPL	; lipoprotein lipase
NIH	; National Institutes of Health
PTH	; parathyroid hormone
QCT	; quantitative computed tomography
ROI	; region of interest
SGZ	; subgranular zone
SREBP-1c	; sterol regulatory element binding protein-1c
TSH	; thyroid stimulating hormone
VEGF	; vascular endothelial growth factor
VFA	; visceral fat area
WHO	; World Health Organization
X 線 CT 装置	; X-ray computed tomograph equipment

第 I 章 序論

栄養学上の問題には摂取不足による「栄養の欠乏症」と、栄養過多による「栄養の過剰症」が存在する。近代までは人々の食糧不足による栄養の欠乏症、飢餓の対策が最も重要な国家の栄養問題であったが、経済の発展にともなって食糧需要を満たす供給が果たされるようになった最近の先進国においては、近代までとは異なる栄養の過剰症が大きくクローズアップされるようになってきた。栄養の過剰症の典型が肥満であり、肥満によって引き起こされる高血圧や糖尿病などの生活習慣病への対応が最も重要な国家の栄養問題となっている。また、肥満を予防あるいは改善することを意図した疑似的飢餓状態とも言える絶食を行う人々が多く出てきたことも近年の栄養学に生じた新たな課題と言える。絶食といえば、一定期間、全ての食物または特定の食物を絶つ「断食」とよばれる宗教的な行為が連想される。断食の起源や意義は宗教によって一様ではなく、習俗的に行われている断食もある。絶食が人体に及ぼす影響に関する研究も進んできたことから、絶食を肥満対策や食事療法のひとつとして活用しようとする動きも出てきた¹⁻³⁾。日本における絶食療法の適用例としては医師が必要と認めた消化器系の急性疾患、心身症や鬱病などの神経障害⁴⁾などである。絶食が及ぼす神経障害改善のメカニズムについては十分にその作用機序が解明されているわけではないが、精神療法の現場では「東北大学方式」¹⁾と呼ばれる絶食療法なども提案されている。最近ではこれらの医学的絶食療法とは別に民間療法的健康法としての絶食も注目されはじめている⁵⁾。絶食することで体内でのオートファジーが亢進し、体内に蓄積された老朽化した細胞や不要なタンパク質が分解され、新たなタンパク質や細胞が合成される新陳代謝の促進でアンチエイジング効果⁶⁾があるとした考えなどがその一例である。絶食を取り入れた健康方法は浸透しつつあり、肥満解消や瘦身目的、あるいは体質改善を望む人をターゲットとしてホテルなどの宿泊施設が断食道場やファスティング施設とうたい、様々な断食プランを提供する事業者なども出てきた。これらの断食プランでは、宿泊中に断食を行うだけでなく、健康講座や運動などを組み合わせて、専門家によるサポート体制を取り入れているのが一般的であり、精神的ストレスが軽減されるプログラムなども採用されたりしている。食事についても断食前後の食事内容や食事量に気を配り、身体への負担軽減や断食終了後のリバウンドにも配慮したプログラムである。このように新たな知見により絶食への考え方が変化し、一部の人々に健康法としての絶食が取り入れられるようになってきたものの、一方で、減量や瘦身を目的としたダイエット（以下、瘦身ダイエットと言う）の手段として自己流の絶食を行っている者が多数存在する⁷⁻⁹⁾。客観的調査研究の結果に寄らずとも、欧米先進国を始めとして、我が国においても自己流瘦身ダイエットが巷に蔓延していることは周知の事実である。しかし、一過性短期間

の栄養障害とみなされる絶食をともなった痩身ダイエットの生理学的作用については断片的知識として報告されている例^{1,10,11)}はあるものの、体系的に整理された例は見あたらない。

現在、欧米先進国や有力新興国（Brazil, Russia, India and China : BRICs）、いわゆる経済発展を遂げている諸国においては、肥満や過体重人口の増加が重大な社会問題となっており、世界的な統計で見ても、1980年に8億8,500万人だった過体重及び肥満者の数は、2015年時点で22億人にまで増加し、肥満に関連する疾患の死因が7.1%を占めていることが、米国ワシントン大学健康指標評価研究所（Institute for Health Metrics and Evaluation : IHME）によってまとめられたGBD（Global Burden of Disease）調査により報告された¹²⁾。日本でも肥満問題が取り上げられるようになり、平成28年「国民健康・栄養調査」において、体格指数（Body Mass Index; BMI）25以上の肥満者の割合は25.4%と日本人の4人にひとりが肥満あるいは過体重と判定される状況となってきた¹³⁾。我が国ではBMIが25を超えると肥満であるとみなされるが、WHO（World Health Organization）の国際基準ではBMI 30以上を肥満と定義しており、BMI 25以上30未満は過体重と規定している。国際基準でみると、日本におけるBMI 30以上の肥満者の割合は4.2%であるのに対し、アメリカでは35.5%、イギリスでは26.9%と欧米諸国に比べて日本の肥満者の割合は圧倒的に少ない。日本において肥満が問題視されるのは脂肪が好ましくない部位に蓄積される点にあり、生活習慣病と密接な関係を持つとされる内臓脂肪蓄積型の肥満が多いのではないかと危惧されている点である。日本人は欧米人に比べて高頻度で儉約遺伝子を持っているため内臓脂肪を蓄積しやすい。儉約遺伝子は肥満遺伝子とも呼ばれるエネルギー代謝関連の遺伝子であるが、現在までに $\beta 3$ アドレナリン受容体（ $\beta 3$ -Adrenergic receptor: $\beta 3$ AR）^{14,15)} や脱共役たんぱく質 1（Uncoupling protein 1: UCP1）^{16,17)} など多くの遺伝子が見出されており、日本人は高い割合でこれらの変異遺伝子を有していると言われている。そのため、過体重または軽度の肥満が、肥満に起因する生活習慣病を合併しやすいのではないかと考える研究者も多く¹⁸⁾、生活習慣病の予防のためには、単に減量をするだけでなく、いかに内臓脂肪を減少させるかを重要視している。そこで我が国では内臓脂肪蓄積に着目した特定健康診査を2008年より導入し、生活習慣病の発症のリスクを持つ者に早期介入することで健康増進を目指している。このような「栄養の過剰症」としての肥満が先進国において問題視される一方で、「栄養の欠乏症」も同時に先進国の問題として指摘されるようになってきた^{19,20)}。先進国の栄養の欠乏に関して、著者がとくに着目したのは若年女性におけるやせの問題である。肥満者の少ない我が国では、過度のやせ願望を持つものが多く^{9,21-23)}、これが若年者のやせを増加させているのかもしれない。平成28年「国民健康・栄養調査」の結果¹³⁾でも、20歳以上の女性の低体重者（BMI<18.5：やせ）の割合は11.6%であり、年代別に比較すると、20歳代女性の低体重者の割合は20.7%と高値であり、同様に15～19歳の若年女性でのやせの割合も20.7%であった。また、学校保健統計調査方式による肥満区分の報告では、女児のう

ち肥満度が -20% を超えてやせと判定された痩身傾向児の割合は、6~8歳で 0.2% 、9~11歳で 3.5% 、12~14歳で 5.0% であり、平成18年以降の痩身傾向児の出現率は全体的にみると緩やかな増加傾向にある²⁴⁻²⁶⁾。平成12年の調査以降、学齢期の平均身長に変化はないが平均体重は減少傾向にあり、やせの問題は低年齢者にまで及んでいる。WHOのGlobal Database on Body Mass Index²⁷⁾によると、欧米諸国をはじめとするほとんどの先進国ではBMI 18.5未満の女性の割合は 5% 前後であり、やせるために意識的な少食や欠食を行ってやせた者が増加するといった問題は先進国では希な現象だと考えられてきた。しかし、経済が発達し、食事が確保された先進国における栄養問題は個人個人の栄養摂取状況の偏りであり、「栄養の過剰症」と「栄養の欠乏症」の両極に課題が集中することが推測される。「栄養の過剰症」としての肥満者が欧米先進国に比べて少ない我が国において「栄養の欠乏症」としてのやせの問題が顕在化してきた。欧米先進国においても、肥満問題に隠されて注目されることが少なく発生例が我が国よりも少ないとしても、栄養問題としてのやせの問題が国民の一定割合に存在することは否定できない。他方、人々の食事が確保されているとは言いがたい発展途上国における栄養問題は先進国とは全く異なっている。食糧事情は未だ厳しく、栄養不良者は8億人にのぼると国際連合食糧農業機関(Food and Agriculture Organization: FAO)は報告²⁸⁾している。「飢餓の栄養学」が未だ世界的に重要な研究課題であり個人個人の栄養問題より平均的な栄養の充足が国家にとってより重要であることは多くの国にとって変わりはない。反面、廃棄される食料、「食品ロス」が社会的な課題として取り上げられる先進国においては「飽食の栄養学」が重要な研究課題となり、そこには主に個人個人の生活習慣や嗜好性を原因とした「栄養の過剰症」と「栄養の欠乏症」が存在する。食糧供給が足りている先進国における「栄養の欠乏症」は発展途上国における飢餓とは本質的に別の栄養問題であり、人類が初めて直面する種類の栄養問題であると考えられる。

先進国における「栄養の欠乏症」は、一面では、若年者の極端な痩身志向に誘導された食行動とみなすことができ、その極端な痩身志向の形成にはメディアが伝える美意識が重要な役割を果たしてきたと考えられる。日本文化の象徴的存在ともなってきたアニメやコミックに登場する女性の多くは極端にやせたシルエットで描かれ、実写版であるモデルや俳優もまた著しくやせた体型者が採用される傾向にある。また、購読者の多い女性誌においては痩身ダイエット(減量行動)の特集を頻繁に目にするのは周知の事実である。やせの体型が女性の見本体型のように喧伝され、やせている方が魅力的という美意識が我が国をはじめ先進国社会に広く定着している。自身の体型とボディイメージのギャップの認識に関しては、男性よりも女性で認知のずれが大きい。平成21年に実施した「国民健康・栄養調査」²⁹⁾における自身の「体型の自己認識」調査結果によると、15~19歳の女性で「太っている」と思う者の割合は 16.5% 、「少し太っている」と思う者の割合は 26.1% であり、この時のBMIの状況はやせの割合が 21.1% 、普通の割合が

73.3%であり、肥満の割合は 5.6%でしかなかった。20 歳代の女性も同様の傾向が見受けられ、体型に対する認知がずれている女性のほぼ全員にやせ願望があることが報告されている⁸⁾。国立がん研究センターがん予防・検診研究センターの BMI 値と死亡率の関係を調べた研究によるとやせすぎの人の死亡率は BMI30 以上の肥満の人々と同様のリスクを示した。これは、普通体型の人と比べると 2 倍のリスクであり、やせすぎも生活習慣病のリスクを高めることが明らかとなっている³⁰⁾。これらのことから、健康日本 21 (第二次)において、20 歳代女性のやせの者の割合を 20%以下にすることを目標に掲げるなどし、我が国ではやせ過ぎへの対策の重要性が認識されはじめている。こうした若年期のやせの栄養学的問題は、やせるための手段として自己流の極端な食事制限や栄養素が偏った食事を摂るなどの異常な食行動にある。痩身を目的としたダイエットの実態を調査した研究は多く、そのダイエットの方法として「食事量を減らす」や「欠食をする」という手段を 20 代のダイエット経験者の 8 割が実施していることが報告された⁸⁾。

痩身ダイエット経験者は不整月経や骨密度が低い傾向にあることや⁷⁾母親の栄養不足による胎児の低栄養は成人後の生活習慣病リスクを高める³¹⁾ことが報告されている。出生体重は子宮内での栄養状態を示すマーカーと考えられ、近年の低出生体重児の出生割合増加の原因に妊娠前の母親がやせている状態、または妊娠中に十分な栄養を取っていないことが一因と考えられている³²⁾。中高生を対象とした調査では「疲れやすい」「だるい」など不定愁訴の症状を訴える者が食事制限を伴う痩身ダイエット実施群で多く⁷⁾、日常生活に悪影響をもたらしていることが推測された。「下剤」や「ダイエット薬」の服用、中には、食事後の意図的な「嘔吐」などの手段を用いた痩身ダイエットを実施する者もあり、これらの不健康で過激な手段が摂食障害のリスクを高めることが懸念されている⁷⁾。最近、フランスにおいてはファッションモデルの摂食障害による死亡事件をきっかけにやせ過ぎモデルを規制する法律が可決されている。過度な食事制限は摂食障害のきっかけとなりやすく、平成 27 年度に厚労省の研究事業において実施された摂食障害の診療体制整備に関する研究における摂食障害の患者数は 25,954 人であり、1998 年の調査より 1 割以上増加していることが報告された³³⁾。この時の調査で摂食障害に関する相談と治療体制が整っていない実態も明らかとなり、顕在化していない患者も多いと推測されることから、実態は未だ明らかではない。痩身ダイエット実施者の特徴として生活の中で身体を動かすことへの意識が低い傾向にあることも報告されている⁸⁾。痩身ダイエット実施者の多くは日常的な運動もせず、絶食をとまなう摂食制限を行う傾向にあるが、このような絶食は身体にどのような影響を及ぼすのであろうか。絶食によって食事からのエネルギー供給が途絶えると、活動を維持するために肝臓に貯蔵されていたグリコーゲンを分解し利用しはじめる³⁴⁾。さらに絶食が続くと体脂肪や体タンパク質を分解して生命活動に必要なエネルギーを賄うため体重は減少する³⁴⁻³⁶⁾。体重減少のための方法や減量までにかかる日数あるいは運動との併用による身体への影響は一様で

なく、また臓器への影響もそれぞれ異なることが推測される。

食事制限が身体に及ぼす影響を調べた研究の中でも骨への影響はこれまで多くの報告がある。エネルギー制限群と運動群で生活をしてもらった過体重者の 1 年後の体重と骨密度を比較した研究において、エネルギー制限群では体重減少の大きい者ほど骨密度の低下が大きかったのに対し、運動によって体重減少した場合には骨密度の低下がほとんどみられなかったことが報告されている³⁷⁾。また、神経性やせ症(Anorexia nervosa:AN)のような極端な体重減少を伴う症例では骨粗鬆症の有病率は 40%と推定され、体重は短期および長期の両方において最も重要な予後因子であり、体重回復後の骨折発生率も健康な同年齢対照より2~7倍高いという報告³⁸⁾や、骨を脆弱化させたラットを用いた実験においては、骨塩量は回復するが骨形態の回復は困難であることが示唆されたという報告³⁹⁾がある。このことから、絶食による骨量減少は不整な構造に骨を脆弱化させたことにより、元のインタクトな構造を容易に回復しないことが推測される。さらには、標準体重者を体脂肪別に比較検討した報告⁴⁰⁾において、体脂肪率が高い者には痩身ダイエット行動が認められるとの結果から、食事制限による体重減少は体組成を変化させる可能性を示唆している。さらに、AN では脳の萎縮^{41,42)}や身体活動の亢進⁴³⁾が引き起こされるなどの報告もみられ、痩身ダイエットは身体に様々なネガティブな影響を与えると考えられている。一方で、肥満解消を目的とした絶食を取り入れた民間療法⁵⁾や医療的処置^{4,44)}も一部では肯定的に受け入れられており、絶食が人体にポジティブな影響を及ぼす効果を期待する人々が存在することも事実である。しかしながら、一過性の栄養障害である絶食が身体に対して広範にネガティブな影響を及ぼすことも間違いなく、さらには回復が容易でない組織学的変性を伴うこともあるのではないかと危惧される。

本研究では、一過性短期の栄養障害である絶食が身体組織にいかなる影響を及ぼすのかを明らかにするための一助となることを目的として、絶食および摂食再開後における組織学的変容に着目して、動物実験による検索を試みることにした。本実験の結果として、第II章では主要臓器の包括的マクロ組織観察による検索結果を示した。第III章から第VI章までは、身体に占める割合の大きな脂肪組織、筋組織、骨組織および第II章の実験結果において絶食の影響が最も小さいと思われた脳組織について、それぞれ絶食の影響を検索した。そして、第VII章では、本研究結果を踏まえて、一過性短期の栄養障害である絶食が身体組織にいかなる影響を及ぼすのか、とくに本研究結果から見出された知見の意義について考察した。

第II章 絶食による体重減少および主要臓器の萎縮と形態変化について

II-1 緒言

極端な痩身ダイエットが骨・筋肉・脂肪組織などの個々の機能と形態に種々の影響を及ぼすことについて様々な報告^{1,45-49)}があり、得られた知見も豊富である。しかし、上皮組織に着目した報告は少なく、神経組織への影響を観察した報告も多くはない。極端な痩身ダイエットが身体組織の機能と形態に総合的にどのような影響を与えるのかについて包括的に理解することはこれまでの報告では難しいと考えられる。

体重減少は主に身体の大部分を占める筋肉や脂肪や水分が減少することで進行し、体重が減少するにつれて一般的に起こる症状^{7,21,36,50,51)}としては貧血や血圧低下、免疫の低下などが挙げられる。女性では脂肪が女性ホルモンの生成に重要な働きをするため、痩身ダイエット経験者ややせの者が普通体重や痩身ダイエット未経験者に比べると不整月経や無月経^{7,21)}、不妊のリスクが高い⁵²⁾との報告や、骨密度が最も高くなる10～20代に痩身ダイエットを繰り返した者に骨密度が低い傾向にあることが報告³¹⁾されている。特に若年女性の痩身ダイエットには薬剤を用いる過激な手段もあり、健康リスクの高まりが懸念されている⁷⁾。摂食障害の中でも、やせ願望から発症したANの身体的症状としては、胸部X線で心陰影の縮小や心電図異常の所見⁵³⁾が認められている。そして、患者の脳CTスキャン像では脳溝および脳室の拡大が確認され、高度のろいそうが引き起こしたと考えられる脳萎縮が報告されている^{41,42)}。一方で、脳萎縮についてはANの患者の中でも脳萎縮を認めない症例や単なる飢餓では萎縮しないとの報告⁵⁴⁾もある。他方、過食症患者に脳萎縮が認められる⁵⁵⁾といった報告もあり、体重の増減と脳萎縮の関連性については一致した見解は得られていない。その上、低栄養下、または絶食下で萎縮した脳は栄養改善に伴いその萎縮は回復するといった報告⁴¹⁾がある一方で、短期間に高度に体重減少を起こした場合には脳萎縮の回復は認められなかったとの報告もあり⁴⁵⁾、その萎縮の可逆性に関しても明らかにされていないところが大きい⁵⁶⁾。

ラットをモデルとして体重減少を調べた実験において臓器の萎縮を観察したところ臓器によって減少程度は異なり、対照ラットと比べると肝臓は1/3まで重量が減ったのに対し、精嚢は1/19にまで減少していたとの報告⁵⁷⁾がある。また、重量変化だけでなく、肝臓においては脂肪の変性、精子形成不全、精嚢では上皮細胞においてアポトーシスも観察されている⁵⁷⁾。臓器自体の元々の重量や体内におけるその働きの重要性の違いにより減少の程度や減

少する時間に差があることが考えられる。臓器や組織が萎縮する際には、臓器を構成する細胞数の減少を原因とする場合と構成細胞自体の容積が萎縮することを原因とする場合、あるいはその両者が混在して原因する場合など、様々な様態が存在する。

本研究では、極端な痩身ダイエットとして短期一過性の絶食を設定し、絶食が身体組織に如何ほどの影響を与えるのかについて包括的に理解することを目的として動物を用いた検索を試みた。実験は、ラットの絶食時あるいはその後の回復期における主要臓器とその組織についてマクロ形態および顕微的な観察を行った。

II-2 方法

1. 動物

3日間の予備飼育の後、若齢 Wister 系雄ラット（体重 130g、(株)久動より購入）をランダム・サンプリング法により Control 群 10 匹、Fasting 群 10 匹の 2 群に分けた。Fasting 群には実験開始後 4 日間の絶食を負荷し、その後、10 日間の回復期を設定した。実験期間を通して自由摂水とし、Fasting 群の絶食期間を除いて飼料の摂取も自由摂取とした。飼育は 1 ケージにつき 1 匹とし、12 時間毎の明暗サイクルで飼育した。飼料は基礎飼料 MF（オリエンタル酵母社）を使用した。飼料の組成を Table2-1 に、実験デザインを Fig.2-1 に示した。

2. 体重および組織重量の測定

ラットの体重測定は、AM10:00-11:00 の間に、飼育開始日から終了日まで連日個体重量を測定した。組織重量の測定については実験開始 4 日目と飼育終了後に脱血屠殺し、脳、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、心臓を摘出して湿重量を測定した。

3. 組織観察

脱血屠殺後、各臓器の組織は Mildform®20NM 溶液（WAKO 社）にて固定し、パラフィン液にて包埋処理を行った。包埋した組織は 4 μ m の厚さで薄切し、ヘマトキシリン・エオジン（Hematoxylin-Eosin : HE）染色を行った後に光学顕微鏡による観察を行った。なお、脳組織については 7 μ m に薄切りし、クリューバー・バレラ（Kluver-Barrera : KB）染色を行い、光学顕微鏡による観察⁵⁸⁾を行った。さらに、透過型電子顕微鏡（JEM1400 型、日本電子社）による観察⁵⁹⁾も行った。

4. 統計処理

統計処理は SPSS 株式会社製 PASW Statistics17 を用いて Student の t 検定を行った。なお、全ての統計学的有意水準は $p < 0.05$ と定めた。

5. 実験動物の取扱い

本動物実験は、長崎県立大学動物実験委員会の審査で承認（承認番号 23-28）され、長崎県立大学および日本の動物の愛護及び管理に関する法律（法律第 105 号）と実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（告示第 6 号）の、動物実験ガイドラインに従って行われた。

II-3 結果

1. 体重の変化

飼育 14 日間における各群の体重の平均値を Fig.2-2 に示した。Control 群の体重は実験期間を通じて順調に増加し、平均値で見ると実験開始後 4 日目には $165.4 \pm 5.1\text{g}$ (n=5) となり実験開始時より 32.9g 増加していた。一方、絶食を負荷した Fasting 群の体重は急速に減少し、絶食 4 日目の体重は $93.4 \pm 5.7\text{g}$ (n=4) と実験開始時より 38.0g の体重減が認められた。その後の摂食再開により 3 日目には実験開始時の体重にまで回復し、実験終了時の体重は $201.5 \pm 10.3\text{g}$ (n=6) となったが、Control 群 (n=5) の体重 $250.0 \pm 15.4\text{g}$ と比べると実験期間を通して有意な差が認められた ($p < 0.001$)。

2. 主要臓器の萎縮および顕微形態に及ぼす影響

肝臓の各群の重量の平均値を Fig.2-3 (a) に、体重 100g 当たりの平均重量を Fig.2-3 (b) に示した。平均重量で比較すると、実験 4 日目において Control 群は $6.8 \pm 0.7\text{g}$ (n=5) であったのに対し、Fasting 群では $3.0 \pm 0.5\text{g}$ (n=4) と有意に低値を示し ($p < 0.0001$)、14 日目には Control 群が $10.9 \pm 1.0\text{g}$ (n=5) に対し、Fasting 群では $9.0 \pm 1.1\text{g}$ (n=6) と Fasting 群の肝臓重量が有意に低値であった ($P = 0.018$)。体重 100g 当たりの重量比較では、絶食 4 日目の Fasting 群の肝臓重量は $3.2 \pm 0.4\text{g}$ (n=5) であり、Control 群の $4.1 \pm 0.3\text{g}$ (n=4) に比べると有意に低値を示した ($P = 0.010$) が、実験終了時には Control 群で $4.4 \pm 0.1\text{g}$ (n=5)、Fasting 群では $4.5 \pm 0.4\text{g}$ (n=6) との有意な差はなく、体重相応にまで回復していたことを示していた。

HE 染色を施した肝臓組織の強拡大像を Fig.2-4 に示した。光学顕微鏡による観察において、絶食負荷後には肝細胞の縮小が視野全域において認められる所見を得た。また、一部の肝細胞には核の濃染がみられた。

腎臓の各群の重量の平均値を Fig.2-5 (a) に、体重 100g 当たりの平均重量を Fig.2-5 (b) に示した。実験 4 日目の Control 群では $0.76 \pm 0.06\text{g}$ であったが、Fasting 群では $0.50 \pm 0.03\text{g}$ と有意に低値を示した ($p < 0.0001$)。体重 100g 当たりで比較すると Control 群の $0.46 \pm 0.03\text{g}$ に比べ絶食負荷 4 日後の腎臓重量は $0.54 \pm 0.03\text{g}$ と有意に高値を示した ($p < 0.0001$)。また、14 日目についても Control 群では $1.02 \pm 0.07\text{g}$ に対し、Fasting 群では $0.88 \pm 0.08\text{g}$ と Fasting 群の腎臓重

量が有意に低値であった ($P=0.00022$) が、体重 100g 当たりで比較すると Fasting 群の腎重量の方が高値を示していた ($P=0.034$)。

HE 染色を施した腎臓の組織切片の光学顕微鏡像を Fig.2-6 に、腎皮質の強拡大像を Fig.2-7 に、髄質の強拡大像を Fig.2-8 に示した。皮質、髄質ともに両群間における違いは認められなかった。

副腎の各群の重量の平均値を Fig.2-9 (a) に、体重 100g 当たりの平均重量を Fig.2-9 (b) に示した。実験開始 4 日目の副腎湿重量は Control 群が $0.0223\pm 0.0049\text{g}$ 、Fasting 群は $0.0218\pm 0.0019\text{g}$ と両群間に差はないが、14 日目には Control 群の $0.0230\pm 0.0028\text{g}$ に比べ、Fasting 群は $0.0196\pm 0.0038\text{g}$ と低値を示した ($P=0.030$)。体重 100g 当たりの 4 日目の副腎重量では、Control 群の $0.0135\pm 0.0033\text{g}$ に比べて Fasting 群は $0.0233\pm 0.0022\text{g}$ と有意に高値を示した ($p<0.0001$) が、14 日目では Control 群は $0.0093\pm 0.0012\text{g}$ 、Fasting 群は $0.0097\pm 0.0015\text{g}$ と両群間に差はなく、Fasting 群の副腎重量は体重に相応した重量であった。

HE 染色を施した副腎の組織切片の光学顕微鏡像を Fig.2-10 に、副腎皮質の強拡大像を Fig.2-11 に示した。顕微鏡像より、絶食負荷 4 日目においても組織形態は維持されており、組織萎縮等目立った変化は観察されなかった。副腎皮質には両群間での違いは認められなかった。

心臓の各群の重量の平均値を Fig.2-12 (a) に、体重 100g 当たりの平均重量を Fig.2-12 (b) に示した。実験開始 4 日目の Control 群では $0.627\pm 0.030\text{g}$ 、Fasting 群では $0.386\pm 0.048\text{g}$ 、14 日目の Control 群では $0.838\pm 0.10\text{g}$ 、Fasting 群は $0.710\pm 0.057\text{g}$ と共に、Fasting 群の湿重量が有意に低値を示した ($p<0.0001$ 、 $P=0.025$) が、体重 100g 当たりの重量では両群間に有意差は認められなかった。

HE 染色を施した心臓の組織切片の光学顕微鏡像を Fig.2-13 に、強拡大像を Fig.2-14 に示した。心臓には両群間での違いは認められなかった。

脾臓の各群の重量の平均値を Fig.2-15 (a) に、体重 100g 当たりの平均重量を Fig.2-15 (b) に示した。4 日目の Fasting 群の湿重量は $0.156\pm 0.052\text{g}$ と Control 群の湿重量の $0.609\pm 0.029\text{g}$ に比べ有意に低値を示し ($p<0.0001$)、体重 100g 当たりの重量も Control 群 $0.368\pm 0.015\text{g}$ に対し、Fasting 群 $0.166\pm 0.049\text{g}$ と有意に低値を示した ($P=0.0040$)。14 日目の脾臓湿重量においては両群に差は認められなかったが、体重 100g あたりで比較すると、Control 群 $0.269\pm 0.029\text{g}$ に対し、Fasting 群 $0.330\pm 0.050\text{g}$ と高値を示した ($P=0.041$)。

HE 染色を施した脾臓の組織切片の光学顕微鏡像を Fig.2-16 に、強拡大像を Fig.2-17 に示した。絶食負荷 4 日目の顕微鏡像では脾臓全体の萎縮にともなう著しい白脾髄 (white pulp) の縮小が確認され、また、摂食再開後に脾臓全体の萎縮は回復したものの白脾髄の粒径は回復せず小径の

白脾髄が播種状に分布しているのが観察された。相対的に赤脾髄(red pulp)領域が拡張し、白脾髄と赤脾髄境界が不明瞭であった。

胸腺の各群の重量の平均値を Fig.2-18 (a) に、体重 100g 当たりの平均重量を Fig.2-18 (b) に示した。4 日目の Fasting 群の湿重量は $0.095 \pm 0.021\text{g}$ と Control 群の $0.570 \pm 0.088\text{g}$ に比べて有意に低値を示し ($p < 0.0001$)、また体重 100g 当たりの重量も Control 群では $0.344 \pm 0.052\text{g}$ 、Fasting 群では $0.102 \pm 0.018\text{g}$ と有意に低値 ($p < 0.0001$) を示した。14 日目には Control 群では $0.270 \pm 0.004\text{g}$ 、Fasting 群では $0.274 \pm 0.065\text{g}$ と有意な差はなく、体重相応に回復したことを示していた。

HE 染色を施した胸腺の組織切片の光学顕微鏡像を Fig.2-19 に、強拡大像を Fig.2-20 に示した。光学顕微鏡における観察像では絶食負荷 4 日目は Control 群に比べると、皮質と髄質の境界が不明瞭となった。さらに、絶食負荷後は観察できるリンパ球が少なく、細胞密度の低下が確認された。

脳重量を Fig.2-21 (a) に、体重 100g 当たりの平均重量を Fig.2-21 (b) に示した。4 日目の Control 群の湿重量は $1.726 \pm 0.041\text{g}$ 、Fasting 群では $1.729 \pm 0.053\text{g}$ であり、14 日目においても Control 群は $1.913 \pm 0.085\text{g}$ 、Fasting 群では $1.867 \pm 0.056\text{g}$ といずれも重量差は観察されなかった。体重 100g あたりで比較すると、いずれも Fasting 群が有意に高値を示し ($p < 0.0001$)、体重が減少しているにも関わらず、絶食による影響を受けなかったことを示した。

KB 染色を施した脳組織切片の各群の光学顕微鏡像を Fig.2-22、23、24、25 に示した。このうち、頭蓋骨における冠状縫合と矢状縫合の結合点である Bregma の後方 4.4mm 付近の光学顕微鏡像を Fig.2-26 に示した。この各群の海馬体を光学顕微鏡で観察したものを Fig.2-27 に示し、その強拡大像を Fig.2-28 に示した。これらより、海馬体の細胞体の大きさや形状に何らかの絶食の影響を認めることはできなかった。

また、各群の大脳皮質の電子顕微鏡像を Fig.2-29、30 に示した。絶食負荷後は、細胞質内に複数の小胞を認める細胞が多く観察された。小胞の内容は電子密度の高いものから低いものまで様々で、内部に細胞内小器官を含むものやミエリン様膜状物質を認めるもの、また限局性の高電子密度の溶解物も観察された。

II-4 考察

絶食期において、体重の減少に伴い湿重量が大きく減少した臓器は、肝臓、脾臓、胸腺であった。肝臓重量の減少は、絶食下においてグリコーゲンをはじめタンパク質などの肝臓貯蔵物質が動員されたためと思われる。脾臓の Fasting 群では Control 群に比べ、濾胞の縮小が

著しくみられ、赤脾髄と白脾髄の境界が不明瞭となり、リンパ球が少なくなっていた。胸腺は光顕的観察において、Fasting 群の皮質と髄質の境界が不明瞭であり、観察できるリンパ球が少なく、細胞密度が低くなっていた。胸腺は主に T 細胞の分化を行う 1 次リンパ組織と呼ばれ、脾臓は T 細胞や B 細胞の免疫反応の場である 2 次リンパ組織と呼ばれる。ヒトでは栄養不良などの激しい病気やストレスによる副腎皮質ホルモン（adrenocorticotrophic hormone : ACTH）の分泌促進が免疫システムに抑制的に作用することで、胸腺は大量のリンパ球の死を伴い退縮する⁶⁰⁾ことが報告されている。また、マクロファージの食食能は 4 日以上絶食で、T 細胞 mitogen に対する反応性は 3 日以上絶食で有意に低下するとの報告⁶¹⁾もあることから、本実験でも 4 日間の絶食負荷により胸腺でリンパ球の死を伴う退縮が起こり、リンパ球が減少したことや血液量が減少したことで脾臓の重量も減少したと考えられる。

一方、Fasting 群の副腎重量は絶食負荷による体重の急激な減少にも関わらず、絶食 4 日目では Control 群との有意な差は認められずに体重 100g 当たりの重量において有意に高値を示した。この結果は、マウスの副腎の機能状態を調べた実験において絶食 3 日目に体重当たりの副腎重量が最大値を示した報告⁶²⁾と一致する。さらに、この報告では皮質内の脂肪滴の分布とミトコンドリアを観察することで ACTH の分泌能が高まったという組織学的な解剖所見を示している。本実験でも絶食期での食本能の強制的否定というストレスと飢餓が下垂体-副腎系に作用し、ステロイドホルモンの産生と分泌を高めたことが推察され、飢餓状態に関わらず副腎機能を維持するために顕著な萎縮が生じなかったものと推測された。

Fasting 群の腎臓重量は絶食 4 日目に低値を示したが、体重 100g 当たりの重量においては Control 群よりも高値を示した。絶食直後における臓器の萎縮は体重減少の割合に比べると軽微であったことがうかがえる。糖新生は主に肝臓と腎臓で行われるが、飢餓状態が長期に渡ると腎臓での糖新生の比重が大きくなることと、絶食による臓器の水分減少の割合は肝臓よりも腎臓で著しい傾向があるという報告⁶³⁾から、絶食直後の腎臓では萎縮が軽微であったことが考えられる。しかし、腎臓は絶食 4 日目以降に被膜下の出血を認め、飢餓進行につれて細尿管上皮細胞の萎縮がみられたという報告⁶⁴⁾もあることから、腎臓が絶食の影響を受け始めるのは、他の臓器に比べると遅いことが推測され、本実験における絶食 4 日後の時点では顕著な影響が惹起されるまでには至っていなかった可能性が考えられる。

また、本実験では絶食が脳に及ぼす影響についても検索した。4 日間の絶食によって体重は約 60%まで減少したが脳組織重量の減少は観察できなかった。

絶食が身体組織に如何ほどの影響を与えるのかについて包括的に理解することを目的として動物を用いて検索した本実験結果において、大まかには、①体重減少以上の割合で萎縮減量する臓器、②体重減少と同割合で萎縮減量する臓器、③体重減少に比べて萎縮減量の少な

い臓器、④体重減少と関わりなく見かけ上の萎縮減量がまったく見られない臓器、の4通りの臓器に分かれることが示唆された。①体重減少以上の割合で萎縮減量する臓器には肝臓、脾臓、胸腺があったが、いずれも回復期には速やかに重量は増加して形態上の復元が認められた。中でも脾臓はリバウンド効果があるかのように絶食前よりも肥大していた。②体重減少と同割合で萎縮減量する臓器には心臓が、③体重減少に比べて萎縮減量の少ない臓器には腎臓と副腎があった。これらの臓器についても回復期には速やかに重量は増加して形態上の復元が認められた。唯一、脳組織だけは体重減少に関わりなく見かけ上の萎縮減量がまったく認められなかった。

これらの結果は、絶食時においては、個体の生命維持と正常機能を維持するためにより重要な臓器を保護する生体反応が惹起されることを表しているものと理解される。そうすると、肝臓、脾臓などにおいては、貯蔵脂肪などと同様に、より重要な臓器の機能を維持するために栄養障害時には重要臓器が守られ、比較的重要度の低い臓器を犠牲にする生体応答が起動するものと考えられる。心臓は骨格筋などと同様に身体活動を支えるために栄養障害時も比較的機能が保持される臓器と考えられるが、他の臓器から支援される保護されるべき対象としてはそれほど優先順位が高くないのであろう。体内環境を保持して生命活動を維持するために重要な役割を果たす臓器である腎臓や副腎などは栄養障害時においてもその機能を維持するために肝臓、脾臓などに支援される対象となっていることが合理的に推認される。そして最高位の身体調整機能を担った中枢神経については、栄養障害時にも他の全ての臓器に優先して機能を維持するように身体が対応することが読み取れる。脳組織を光顕的に観察した結果においても、海馬組織の細胞体の大きさや形状に何らかの絶食の影響を認めることはできなかった。しかしながら、電子顕微鏡における観察では Fasting 群で細胞質内に複数の小胞を認める細胞が多く観察された。小胞の内容は電子密度の高いものから低いものまで様々で、内部に細胞内小器官を含むものやミエリン様膜状物質を認めるもの、また限局性の高電子密度の溶解物も観察された。一般に、飢餓のストレスは自食とも呼ばれるオートファジーを亢進して自らの細胞の一部を分解して栄養素を調達し、細胞の延命を図るともいわれている⁶⁵⁾。本実験で観察された所見も、このような機序による絶食への細胞の対応の一部ではないかと考えられる。

一方で、絶食時に身体内の臓器に認められる形態面での保持に優先順位はあるものの、いずれの臓器も回復期には速やかに重量が増加して形態上の復元が認められた。したがって、一過性の栄養障害である絶食は、一過性に臓器のマクロ形態に見かけの影響を与えるものの、回復不能あるいは難回復性の影響を臓器に与えることはないようにも見える。しかしながら、臓器の機能面での検索を抜きにそのような結論を得ることは早計であるとの批判は免れないであろう。そのため、第III章から第VI章では、絶食が個別の臓器に対して及ぼす影響を多面

的にできるだけ詳しく検索することとした。

第三章 絶食により遷移する体内貯蔵脂肪の分布と量

III-1 緒言

近年、先進諸国およびBRICsなどの経済的発展を遂げた諸国において急激な肥満者の増加が社会問題となっている⁶⁶⁾。我が国においても食生活や生活習慣の変化に伴って肥満者が増加傾向にあると指摘されている⁶⁷⁾。先進諸国の中で唯一肥満者の増加が抑えられている我が国においても、他の先進諸国において肥満者が増えているとの報告⁶⁶⁾が多いことから、肥満の問題は取り上げられている。我が国において肥満問題としてクローズアップされるのは、生活習慣病と密接な関係にあると考えられている内臓脂肪蓄積型の肥満が増加傾向にある点である。エネルギーの過剰摂取と運動不足による消費エネルギーの減少により、余剰エネルギーは脂肪に変換されて体脂肪となり体内に蓄積される。内臓器官の周辺に蓄積される脂肪を内臓脂肪、皮膚の下に蓄積される脂肪を皮下脂肪と呼ぶ。内臓脂肪組織内の脂肪細胞は皮下脂肪に比べて小さいが、脂肪合成の活性が高いため過栄養下では内臓脂肪の方が早期に肥大しやすい⁶⁸⁾。しかし、脂肪分解活性も高いため縮小しやすい⁶⁹⁾のが特徴である。一方で、皮下脂肪細胞の活性は内臓脂肪と比べて低いため過栄養下でも脂肪細胞の肥大は遅く、また、一度脂肪が蓄積してしまうと分解し難い^{70,71)}。我が国では、肥満の定義に対する人々の認知も深まっており、以前のように単純に身長に対しての過剰な体重量を問題視するのではなく、体脂肪率や蓄積脂肪の分布などより健康との関連が疑われる問題について人々の関心が高まっている^{72,73)}と考えられる。

平成28年「国民健康・栄養調査」においてもBMIが25以上の肥満である者は、男性の50歳代が36.5%と最も高い¹³⁾。その上、BMIが25以上で更に内臓脂肪型肥満の可能性が高い上半身肥満（ウエスト周囲径が男性：85cm以上、女性：90cm以上）の疑いがある者は男性で29.9%、女性で14.4%と報告¹³⁾された。BMI30以上を肥満と定義している国際基準と比べると我が国の肥満基準は厳しいが、これは日本人が欧米人に比べて高頻度で儉約遺伝子を持ち、内臓脂肪を蓄積しやすいことに基づくものである。脂肪組織はヒトの身体において生理活性物質の産生や分泌を担う重要な組織であり、食欲抑制作用をもつレプチン（leptin）や血圧降下やインスリン効果を高めるアディポネクチン（adiponectin）などの生理活性物質を分泌する。しかし、過剰に内臓脂肪が蓄積されるとインスリン抵抗性を高める腫瘍壊死因子（Tumor Necrosis Factor : TNF）や血栓を形成しやすくするプラスミノゲン活性化因子インヒビター1（Plasminogen activator inhibitor-1 ; PAI-1）、血圧を上昇させるアンジオテンシノーグ

ン (angiotensinogen) など身体にとってマイナスに働く生理活性物質の分泌が多くなる。そのため過体重または軽度の肥満は生理活性物質の産生と分泌のバランスを崩し、肥満に起因する生活習慣病を合併しやすいことが問題¹⁸⁾であり、生活習慣病の予防のためには、単なる減量ではなく、いかに内臓脂肪を減少させるかが重要と考えられている。適切な減量方法はメタボリックシンドロームの予防にもつながる⁷⁴⁾と指摘されていることから社会的な関心を集めているが、適切な減量を実施せずに極端な食事制限を行う若年者の食生活が問題視されている^{9, 46)}。

過度な食事制限や絶食を行うと急激に体重は減少する^{11, 36)}ことが知られている。これは、体脂肪、特に分解しやすい内臓脂肪が減少することが大きな要因と考えられるが、食事を再開した時には食事制限する前またはそれ以上に体重が増加してしまう、いわゆるリバウンドと呼ばれる現象が度々観察される。ヒトの研究では成長期における痩身ダイエットは骨や筋肉の発達を著しく阻害し、体組成にも影響を与えることを示唆した報告が多い⁷⁾。しかしながら、測定方法の困難さもあり、痩身ダイエットの脂肪に及ぼす影響、特に短期的な影響について個体毎に追跡調査した実験や食事再開に伴う脂肪蓄積に関して経時的に詳細な挙動を調べた報告はほとんど見当たらない。

本研究では、極端な痩身ダイエットとして短期一過性の絶食を設定し、絶食が体脂肪の消長とその後の体組成にどのような影響を与えるのかを理解することを目的として動物を用いた検索を試みた。実験は、ラットの絶食時と摂食再開後における内臓脂肪と皮下脂肪の脂肪量や分布について X 線 CT 画像による検索を行った。

III-2 方法

1. 動物

3 日間の予備飼育の後、若齢 Wister 系雄ラット (体重 130g、(株) 久動より購入) をランダム・サンプリング法によって Control 群 5 匹、Fasting 群 6 匹の 2 群に分けた。Fasting 群には実験開始後 4 日間の絶食を負荷し、その後、10 日間の回復期を設定した。実験期間を通して自由摂水とし、Fasting 群の絶食期間を除いて飼料の摂取も自由摂取とした。体重、摂食量、摂水量は毎日測定を行い、X 線 CT 撮影は Fig.3-1 に▲で示したように、全飼育実験期間を通して 2 日毎、すなわち、実験開始日、2 日目、4 日目、6 日目、8 日目、10 日目、12 日目、14 日目に行った。

ラットは 1 ケージにつき 1 匹、12 時間毎の明暗サイクルで飼育し、飼料は基礎飼料 MF (オリエンタル酵母社) を使用した。飼料の組成は Table 3-1 に各実験の実験デザインを Fig.3-

1 に示した。

2. X線 CT 撮影時のラットの麻酔処置

ラットの麻酔処置にはシナノ製作所社の SN-487 型麻酔装置(Fig.3-2)を用いた。装置の動作は、面積式浮遊型、使用気体 Air、流量 0.5~5L/min、精度±5%、吸入麻酔剤イソフルランの設定にて行った。ラットは麻酔ボックスに入れて 3%イソフルラン、流量 2L/min にて導入麻酔を施した。X線 CT 装置の X線照射ボックス(Fig.3-3)内での 30 分間の撮影中には 2%イソフルラン、流量 0.2L/min で麻酔を維持した。

3. X線 CT 装置による撮影と画像解析

X線 CT 撮影は日立アロカメディカル社（東京、日本）LCT-100 型 X線 CT 装置(Fig.3-3)を用いた。撮影は、X線管形式 IHR-50PC、管電圧 35.50kv、感電流 1mA の設定にて実施した。ラットは仰臥位にて撮影を行い、横隔膜から大腿骨の付け根までの胸部（Fig.3-4）を 2mm 間隔で撮影し、1 回の撮影で約 20 枚の断層画像を得た。

X線 CT 撮影により得られた断面画像データはラシータソフトウェア Ver.3.0（日立アロカメディカル社製）を用いて画像解析を行った。画像解析処理を終えたラットの断層画像を(Fig.3-5)に示した。赤いエリアが内臓脂肪、黄色のエリアが皮下脂肪、水色のエリアがその他の臓器部位を示している。X線 CT 撮影によって得られた全ての断面画像をソフトウェアにて自動認識させた後、断面画像毎に誤認識されている ROI（Region of Interest）を解剖学的構造に符合するよう手入力で修正し、内臓脂肪、皮下脂肪、臓器の三部を特定した。部位分けを完成した各断面画像を三次元的に構築し、三部の体積と重量、体脂肪率を次のように算定した。

① 内臓脂肪組織重量、皮下脂肪組織重量、推定臓器重量の算定

各部位の組織重量を次式より求めた。

$$\text{組織重量(g)} = \text{体積(cm}^3\text{)} \times \text{組織密度(g/cm}^3\text{)}$$

なお、体積については次式により求めた。

$$\begin{aligned}\text{体積(cm}^3\text{)} &= \text{エリア面積の合計} \times \text{断層画像の間隔} \\ &= \sum S(i) \times d = d \sum S(i)\end{aligned}$$

ただし、組織密度については、脂肪の場合は 0.92、筋肉の場合は 1.06 とし、筋肉を含む臓器全ての組織密度として 1.06 を採用し、推定臓器重量を算出した。

② 体脂肪率の算定

体脂肪率は体内で脂肪が占める割合を重量比で示す質量脂肪率（%）として次式より求めた。

$$\text{質量脂肪率 (\%)} = \{ (V_f \times 0.92) / (V_f \times 0.92 + V_l \times 1.06) \} \times 100$$

ただし、Vf は脂肪体積(cm³)、V1 は臓器体積(cm³)、0.92 は脂肪密度(g/cm³)とし、1.06 は筋肉密度(g/cm³)として算出した。

4. 統計処理

統計処理は JMP 14 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を用いて Student の t 検定を行った。また、散布図を作成しピアソンの相関係数を求め、相関の有意検定を行った。測定値の推移の平行性の判定には反復測定分散分析を行い、交互作用項の有意性により判断した。なお、全ての統計学的有意水準は $p < 0.05$ と定めた。

5. 実験動物の取扱い

本動物実験は、長崎県立大学動物実験委員会に承認（承認番号 23-28）されて、長崎県立大学および日本の動物の愛護及び管理に関する法律（法律第 105 号）と実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（告示第 6 号）の、動物実験ガイドラインに従って行われた。

III-3 結果

1. 体重の変化

飼育 14 日間における各個体の体重を Fig.3-6、平均値を Fig.3-7 に示した。Control 群では実験開始時 $132.5 \pm 4.9\text{g}$ であった体重が 4 日目に $166.9 \pm 8.0\text{g}$ と 34.4g 増加し、実験終了時には $249.0 \pm 15.4\text{g}$ と、回帰直線より求めた飼育実験期間を通じての体重増加率は 8.4g/day と直線的に増加した。一方、Fasting 群の体重は実験開始時 $131.4 \pm 4.5\text{g}$ であったが、絶食 4 日目には $90.6 \pm 3.6\text{g}$ と 40.5g の体重減が認められ、その後の摂食再開により体重は急速に回復した。摂食を再開させた 5 日から実験終了時までの回帰直線より求めた体重増加率は 10.5g/day と直線的に増加し、実験終了時の体重は $201.5 \pm 11.3\text{g}$ となった。5 日目から 14 日における体重の平均変化量は Control 群では $74.7 \pm 6.2\text{g}$ 、Fasting 群では $96.4 \pm 14.8\text{g}$ であり、Fasting 群の方が有意に増加した ($P=0.014$)。

2. 摂食量

飼育 14 日間における各個体の摂食量を Fig.3-8、平均値を Fig.3-9 に、各個体の総摂食量を Fig.3-10 に示した。Control 群の摂食量は 6 日目まで緩やかな上昇傾向であった。一方、Fasting 群は 4 日間の絶食の後、摂食再開により増加傾向を示し、回復期 3 日目にあたる 7 日目からは Control 群と有意な差が見られなくなった。回復期 6 日目にあたる 10 日目からは Control 群の摂食量よりも Fasting 群の摂食量の方が多い傾向にあり、11 日目の摂食量は有意に高かった ($P=0.020$)。また、回復期における合計摂取量は Control 群では $193.8 \pm 12.3\text{g}$ 、Fasting 群では

190.9±10.5g と有意な差はなかった。また、Control 群の 4 日間の絶食期間における平均摂取量の合計は 71.1g であったことから、絶食負荷中の Fasting 群の栄養量の欠乏は熱量で 256.0kcal、タンパク質で 16.8g と推定された。

3. 摂水量

飼育 14 日間における各個体の摂水量を Fig.3-11、平均値を Fig.3-12、各個体の総摂水量を Fig.3-13 に示した。Control 群の摂水量は、飼育実験期間を通して 21.0~40.0ml/day であった。一方、Fasting 群の摂水量は絶食負荷 1 日目に 20.0±6.5ml と Control 群の 32.0±2.4ml に比べて有意に少なく(P=0.0065)、その後急速に減少し、絶食 4 日目には 4.2±9.3ml まで減少し(P=0.00082)、Control 群と比べると絶食期間中は常に有意に少なかった。回復期 1 日目にあたる 5 日目には急激に増加して 40.8±6.1ml となり Control 群の 30.0±3.2ml を上回った(P=0.0087)が、6 日目以降の摂水量は 22.5~32.5ml/day で推移し、Control 群との有意な差は認められなかった。

4. CT 画像による解析

CT 画像解析結果から脂肪量および推定臓器重量の経時変化を調べた。飼育 14 日間における各個体の脂肪率を Fig.3-14、平均値を Fig.3-15 に示した。回帰直線より求めた実験期間を通じての Control 群の脂肪率の平均増加率は 0.5%/day であり、実験開始時の 5.8±0.5%から実験終了時の 14 日目には 12.2±2.1%に増加した。一方、Fasting 群では、実験開始時には平均で 5.6±1.5%だった脂肪率が絶食負荷 4 日目には 0.9±0.7%まで減少した。回帰直線より求めた摂食再開後の脂肪率の平均増加率は 1.1%/day であり、脂肪率は急速に回復し、実験終了時には 11.1±2.8%になった。回復期 4~6 日目にあたる 8~10 日目には絶食前とほぼ同等にまで回復した。実験 10 日目以降の両群間の値に統計的な有意な差は認められなくなったが、再摂食 2 日目にあたる 6 日目から実験終了時の 14 日目までの体脂肪率の変化量を比較したところ、Control 群は 3.2±1.5%、Fasting 群は 8.8±2.6%と有意に Fasting 群の変化量が大きかった(P=0.00224)。回復期の脂肪率の推移については著しい個体差が認められた。

飼育 14 日間における各個体の体重 100g 当たりの内臓脂肪量を Fig.3-16、平均値を Fig.3-17 に示した。回帰直線より求めた実験期間を通じての Control 群の内臓脂肪量の平均増加率は 0.14g/100g body weight/day であり、実験開始時には 0.89±0.13g/100g body weight、実験終了時の 14 日目には 2.81±0.53g/100g body weight と順調に増加した。一方、Fasting 群における体重 100g 当たりの内臓脂肪量は絶食によって急激に減少し、絶食 2 日目には 0.22±0.11g/100g body weight となり、4 日目には 0.20±0.17g /100g body weight となった。回帰直線より求めた摂食再開後の内臓脂肪量の平均増加率は 0.23g/100g body weight/day であり、回復期 4~6 日目にあたる 8~10 日目には絶食前とほぼ同等にまで回復した。実験終了時の平均内臓脂肪量は

2.3±0.6g /100g body weight となり、Control 群と同じレベルにまで増加した。実験終了時において両群間の内臓脂肪量に有意差は認められず、再摂食 2 日目にあたる 6 日目から実験終了時の 14 日目までの体重 100g 当たりの内臓脂肪量の変化量においても、Control 群は 1.10±0.33g/100g body weight、Fasting 群は 1.73±0.62 g/100g body weight と有意な差は認められなかった。回復期の内臓脂肪量の推移については著しい個体差が認められた。

飼育 14 日間における各個体の体重 100g 当たりの皮下脂肪量を Fig.3-18、平均値を Fig.3-19 に示した。Control 群では実験開始時に 1.10±0.13g/100g body weight だった皮下脂肪量は 8 日目まで平均増加率 0.08g/100g body weight/day で増加し、1.69±0.31g/100g body weight となったが、その後は横ばいで、実験終了時には 1.79±0.34g/100g body weight に増加した。一方、Fasting 群における体重 100g 当たりの皮下脂肪量は、実験開始時には 1.03±0.39g/100g body weight だったが絶食 4 日目には 0.08±0.13g/100g body weight となった。摂食再開による 6 日目以降の平均増加率は 0.20g/100g body weight/day で増加し、1.88±0.54g/100g body weight に達した。再摂食 2 日目にあたる 6 日目から実験終了時の 14 日目までの体重 100g 当たりの皮下脂肪量の変化量においては、Control 群は 0.28±0.22g/100g body weight、Fasting 群は 1.52±0.61 g/100g body weight と有意に Fasting 群の変化量が大きく (P=0.0028)、実験終了時の体重当たりの皮下脂肪量に両群における有意な差は認められなかった。なお、回復期の皮下脂肪量の推移については著しい個体差が認められた。

飼育 14 日間における各個体の体重 100g 当たりの推定臓器重量を Fig.3-20、平均値を Fig.3-21 に示した。Control 群の体重 100g 当たりの推定臓器重量は実験開始時に 32.1±1.5g/100g body weight だったものが、14 日目は 33.4±1.1g/100g body weight と実験期間を通してほとんど変動しなかった。一方、Fasting 群の体重 100g 当たりの推定臓器重量は絶食負荷により減少し、絶食 2 日目で 30.4±1.9 g/100g body weight、絶食 4 日目に 29.5±1.1g/100g body weight まで減少し、Control 群の 33.1±1.3g/100g body weight に比べ有意に低値を示した (P=0.00077)。摂食再開により、回復期 2 日目には 38.2±2.4g/100g body weight まで増加したが、その後の体重当たりの推定臓器重量は減少し、回復期 10 日目には 33.4±1.1g/100g body weight となり、Control 群と有意な差は認められなくなった。

実験期間の脂肪量の関係を Fig.3-22~24 に示した。Control 群においては、実験開始時の脂肪量と実験終了時の脂肪量の関係を調べ、Fasting 群においては絶食による脂肪の減少量と再摂食期間の脂肪の増加量の関係を調べた。Control 群において、実験開始時の内臓脂肪量と実験終了時の内臓脂肪量との間に有意な正の相関 (R=0.883, p=0.047) が認められた (Fig.3-23a)。しかし、皮下脂肪量 (Fig.3-24 a) については正の相関傾向 (R=0.764) が見受けられはしたが、有意な相関は認められなかった (P=0.134)。そのため、脂肪率についても弱い正の相関傾向が

認められた ($R=0.823$, $P=0.085$) もの統計的に有意な相関には至らなかった。総じて、Control 群では、実験開始時の脂肪量と実験終了時の脂肪量との間には、一定程度の正の相関関係があるものと評価された。一方、Fasting 群は脂肪率、内臓脂肪量、皮下脂肪量(Fig.3-22b、23b、24b)の全てにおいては何らの相関傾向を認めることができなかった。各群における脂肪率、内臓脂肪量、皮下脂肪量の推移を Fig.3-25、Fig.3-26、Fig.3-27 に示した。図中に時系列の測定値がわかるように経時的推移に矢印を付した。絶食負荷によって、Fasting 群の脂肪量の測定値プロットは Control 群よりも下方を推移後、摂食再開によって増加した。Fig.3-25 に示したように、体脂肪率においては、特に実験開始 8 日目以降の Fasting 群の推移の傾きが大きく、回帰直線より求めた増加率は、 $11.6\%/100\text{g body weight}$ であった。同実験期間の Control 群の増加率は $4.6\%/100\text{g body weight}$ であり、8 日目以降の体脂肪率の変化量を比較すると、Control 群が $2.0 \pm 1.5\%$ に対し、Fasting 群は $7.2 \pm 2.0\%$ と Fasting 群の変化量は有意に大きかった ($P=0.0010$)。Fig.3-26 に示した内臓脂肪の推移においては、実験開始 8 日以降に Fasting 群は増加を示したが、回帰直線より求めた増加率は $5.9\%/100\text{g body weight}$ であり、同実験期間の Control 群の増加率は $6.4\%/100\text{g body weight}$ であった。8 日目以降の内臓脂肪量の変化量は、Control 群で $2.84 \pm 0.89\text{g}$ 、Fasting 群では $3.65 \pm 1.29\text{g}$ と有意な差は認められなかった。Fig.3-27 に示した皮下脂肪の推移においては、実験 6 日目の回復期以降に Fasting 群の推移の傾きが大きく、回帰直線より求めた増加率は $4.2\%/100\text{g body weight}$ であった。同実験期間の Control 群の増加率は $2.4\%/100\text{g body weight}$ であり、6 日目以降の皮下脂肪の変化量は、Control 群で $1.66 \pm 0.53\text{g}$ 、Fasting 群では $3.35 \pm 1.02\text{g}$ と Fasting 群の変化量が有意に大きかった ($P=0.0090$)。Fig.3-28 は体重に占める推定臓器重量を示している。Fasting 群の再摂食直後の体重に占める推定臓器重量は Control 群よりも高値を推移したが、回帰直線より求めた 8 日以降の Fasting 群の推定臓器重量の増加率は $27.5\%/100\text{g body weight}$ 、Control 群の $33.7\%/100\text{g body weight}$ と有意な差は認められず、飼育終了時点の体重に占める推定臓器重量は Control 群と同じ重量を示した。

III-4 考察

ヒトの身体は飢餓に備え過剰に摂取したエネルギーを中性脂肪として内臓や皮下に蓄積する。日本人が高頻度で保有し肥満の成因に関与するとされる UCP1 遺伝子多型⁷⁵⁾は、標準体重でありながら体脂肪量が高値である、いわゆる隠れ肥満の形成の一因になることも報告されている⁷⁶⁾。内臓脂肪は短期的に蓄積しやすい脂肪であり、過剰に蓄積されると脂肪細胞が肥大・増殖し、脂肪細胞から分泌される生理活性物質に異常が生じ、生活習慣病発症のリスクを高める原因になると言われている⁷⁷⁾。以前は、青年期までに増殖^{78,79)}した肥満細胞の数が成人期の肥

満のリスクを高めるとされていたが、最近では、どの年齢においても肥満細胞が増殖するとの研究例^{80,81)}もあり、過食や生活習慣の乱れが内臓脂肪の過剰蓄積、肥満につながるリスクは生涯つきまとうと考えるべきかもしれない。しかし、飢餓状況下におかれると生命活動を維持するために貯蓄エネルギーである脂肪を分解して利用するため、体脂肪は減少する。飢餓時に脂肪が利用されるメカニズムとしては、脂肪組織から遊離脂肪酸とグリセロールが血中に放出され、グリセロールは主に肝臓でグリセロール 3-リン酸へと転換された後に糖新生によって血糖の維持に利用される。一方、遊離脂肪酸は肝臓、筋肉、心臓等といった各組織に取り込まれた後、 β -酸化を経てエネルギーとして利用される。ラットに 3 日間の絶食を負荷した実験では、腹腔内脂肪組織と形態的に類似する乳腺の脂肪組織において脂肪滴の消失がみられ、この脂質が絶食中の主要なエネルギー源として動員されたと報告⁸²⁾されている。本実験においても、ラットに課した 4 日間の絶食中において体内で動員された主要なエネルギー源は脂肪であったろうと考えられる。また、絶食期間中に多量の脂肪が動員された結果、生成されたアセチル-CoA を TCA 回路で処理しきれなくなり、ケトン体の生成が行われるようになる。このケトン体は肝臓では利用されず、肝外組織でアセチル-CoA に変換されてエネルギーとして利用され、通常は血糖をエネルギー源とする脳もケトン体を利用ようになる。マウスを対象に飢餓抵抗性を調べた実験では、絶食 4 日目で餓死した個体が観察されはじめ 8 日目まで生存が観察されていた報告^{62,83)}と、ヒトを対象とした観察においては肝臓貯蔵グリコーゲンが 1 日でほとんど消費され、ケトン体総量は 20 日以上絶食でピークを示すとの報告⁸⁴⁾から推測して、本実験における絶食 2 日目ではすでに脂肪とケトン体をエネルギー源としていたことが推察される。

今回の実験では脂肪が利用される過程と摂食を再開させた回復期の過程を追跡し、脂肪量増減の推移を観察した。まず、100g 体重当たりの推定臓器重量の推移を見ると、Control 群では実験飼育期間を通じて一定の値であった。つまり、体重増加に応じて一定の割合で増加したことを示していた。Fasting 群は絶食期間を通して減少したものが回復時期に入ると一転して Control 群よりも高い値にまで上昇し、その後、Control 群と同レベルにまで低下して安定するという経過をたどった。画像解析の方法からすると、この推定臓器重量に同定されるエリアは内臓脂肪と皮下脂肪以外のエリアとして計算されていることから、骨格筋、内臓器、消化管内容物などとして同定されたものである。絶食によりこのエリア値が減少したのは、消化管内容物の消失のみならず、内臓器など実質臓器の萎縮が生じたことが原因であることは体重減少の程度から明らかであろう。一方、摂食再開直後にこのエリア値が急上昇したのは消化管内容物の増加と絶食に伴う脱水状態の急速な解消による体水分増加が主な原因であったと考えられる。そのため、この推定臓器重量の急上昇は一過性に消失し、体重の増加に

伴って回復期 6 日目には、Control 群と同レベルに落ち着いたものと推測される。

回復期の過剰な脂肪蓄積のその他の原因として、食欲調節に関わるホルモンの影響が考えられる。10 週間の食事制限を実施した肥満患者の食事制限前と後及び 1 年後のホルモンの変化を調べた実験において、食欲刺激ホルモンであるグレリンは食事制限実施前に比べ血清濃度の上昇を示した報告⁸⁵⁾からも、痩身ダイエット後のリバウンドといわれる体重増加にはホルモン作用による摂食亢進が関与していると考えられる。このことは本実験の回復期における摂食量の増加とその結果として引き起こされた脂肪量の急速な増加に符合する。また、ヒトでは 1 週間以上の食事制限や減量ダイエットを経験すると体熱産生に関与する交感神経活動が著しく低下するとの報告や⁸⁶⁾、減量前後とその後の自由摂食において、減量により低下した消費エネルギー量は自由摂食再開後も減少したままであったとの報告⁸⁷⁾がある。これらは減量に付随した除脂肪体重の減少に伴う消費エネルギーの低下、あるいは脂質の利用率の低下に伴う持続的なエネルギー不足がエネルギー代謝の変化をもたらしたことを示すものと推定される。本実験においても絶食負荷による臓器の萎縮や体重減少に伴う骨格筋萎縮を考慮すると、回復期間の Fasting 群の消費エネルギー量は Control 群の消費エネルギー量より低かったであろうことは推測され、Fasting 群の急激な体重増加の一因に寄与していることが考えられる。本実験では摂食再開後の脂肪蓄積に大きな個体差があることが示されたことから、減量後の消費エネルギーの減少や脂質の利用率の低下といったエネルギー代謝の変化に、遺伝因子などの個体に由来する因子が大きく関わっている可能性が推測される。

本実験では、実験開始前、ラットの体脂肪の約 6 割が内臓脂肪で、約 4 割が皮下脂肪で占められていた。Fasting 群は絶食により、絶食 2 日目の内臓脂肪量は $0.25\text{g} \pm 0.13\text{g}$ 、4 日目に $0.18 \pm 0.14\text{g}$ であったのに対して、皮下脂肪量は 2 日目に $0.54 \pm 0.34\text{g}$ 、4 日目に $0.08 \pm 0.12\text{g}$ と消失するのに 4 日間を要した。また、摂食再開による Fasting 群の内臓脂肪量の経時的変化については Control 群との差は認められなかったが、回復期間の皮下脂肪量の増加は Control 群に比べ、より高いレベルで推移していることを示していた。皮下脂肪が急速に蓄積されることを示したことから、絶食を経験することで脂肪量の多い体組成に変化する可能性を示唆した。非肥満の若年女性の食事制限後による減量後のリバウンドの影響を調べた研究において、体脂肪量は減量前の状態に戻ったのに対し除脂肪量は回復しなかった⁸⁸⁾との報告からも、リバウンドにより回復した体重に占める体脂肪の割合は高いことと、減量前とリバウンド後では脂肪の組成比に変化が生じる可能性が示された。また、Fig 3-25 から Fig3-27 に示すように摂食再開後の体重と脂肪量の関係を検討したところ、摂食再開後の Fasting 群の体脂肪率・内臓脂肪量・皮下脂肪量の増加は体重増加よりも速やかであり、結果として、実験終了時における Fasting 群の体脂肪率・内臓脂肪量・皮下脂肪量は Control 群が同体重であった時に示すそれよりも高

い値となっていた。今回の実験では、最終日における Control 群と Fasting 群の同体重個体における脂肪量の違いに有意な差は示されなかったが、一方で、回復期間における体脂肪率と皮下脂肪量の変化量は Fasting 群で有意に大きかったことから、回復期間の延長に伴って脂肪量は Control 群と Fasting 群の間で乖離が生じる可能性を示唆するものと考えられた。より長い実験期間を設定した今後の検討が望まれる。

本実験において絶食によるラットの体脂肪量の減少を、脂肪率 (Fig.3-14)、内臓脂肪量 (Fig.3-16)、皮下脂肪量 (Fig.3-18) それぞれについて個体毎に見ると、いずれの値も絶食開始時の脂肪量の多寡に従って絶食中の脂肪量減少が認められた。しかしながら、摂食再開後の脂肪量増加の推移では、どれも非常に個体差が大きく、また、摂食再開によって増加する脂肪量が絶食開始時に持っていた脂肪の多寡に関係なく蓄積されことを示唆する結果が見受けられた。Fig.3-22~24 の結果より、Control 群では実験開始時に脂肪量が多い個体は実験終了時の脂肪量も多い傾向にあることが認められた。Fasting 群においては、絶食負荷による脂肪の減少量と摂食再開による脂肪の増加量を算出し、その変化量について関係性をみたところ何らの関係性も認められなかった。摂食再開によって増加する脂肪量の本結果の特筆すべき点は、絶食を境にしてそれまでの体脂肪量とは関わりなく摂食再開後の脂肪蓄積が行われることが明らかになったことである。さらに、摂食量と摂食再開後の脂肪蓄積量との関係を個体別に見ると、摂食量が多いが脂肪蓄積量はそれほど多くない個体、また、摂食量が少ないのに脂肪蓄積量が多い個体などが散見された。すなわち、回復期における脂肪蓄積量は、必ずしも摂食量に比例しないことが示唆された。狭いエコンケージ内で飼育されたラットの運動量にそれほど大きな個体差が生じることはないことを考え合わせると、本実験結果は、生まれて初めて体験した絶食という劇的な環境変化が体内脂質代謝の制御系の賦活化に係わる何らかの遺伝子発現を誘導し、脂質代謝に関する個体の特性を変化させた可能性を示唆するものと考えられる。摂食や絶食に応答する遺伝的素因に関してはいくつかの報告がみられ、中性脂肪合成系遺伝子であるアセチル CoA カルボキシラーゼ (acetyl-CoA carboxylase : ACC) や FAS (fatty acid synthase) は摂食により遺伝子の発現が励起され⁸⁹⁾、絶食においては脂肪酸・中性脂肪合成系酵素関連遺伝子の転写を促進する SREBP-1c(sterol regulatory element binding protein-1c)自身の発現が抑制する⁹⁰⁾ことが知られている。本実験でも、絶食に刺激された何らかの脂質代謝関連遺伝子が発現された個体において、摂食再開後の回復期に効率的な脂肪蓄積が進んだのかもしれない。脂肪組織の増殖に伴って組織内血管内皮細胞が増えること⁹¹⁾、脂肪組織増加のメカニズムに脂肪細胞が分泌する血管内皮増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor : VEGF) が関与していること⁹²⁾、などから脂肪細胞増殖と血管新生の間には深い関係性があると考えられている。これらの脂肪組織増殖因子の誘導とその遺伝

子発現の多寡には多くの内的外的要因が関与していると思われるが、絶食がこれら脂肪組織増殖因子の誘導に関わる遺伝子発現に対して一つの重要な刺激となっている可能性がある。そして、これら脂肪組織増殖因子が誘導される程度が遺伝的素因のために個体毎に大きく異なっており、そのことにより脂肪蓄積における新たな個性が発揮されたのではなかろうかと考える。

本研究により、絶食による体重減少と摂食再開後の体重回復の過程において脂肪の蓄積が引き起こされ、絶食前よりも体脂肪率が高い体組成に変化する、すなわち肥満が促進される可能性が示された。また、摂食再開後の体脂肪率の上昇には大きな個体差があり、絶食前の体脂肪率は摂食再開後の体脂肪率上昇とは必ずしも相関しないという現象が観察された。これは、ラットが生まれて初めて体験した絶食により引き起こされた急激な体内環境変化が、体内脂質代謝制御系の賦活化に係わる何らかの因子を誘導する遺伝子発現を刺激する原因となったことを示唆していると考えられる。そして、賦活化された脂肪組織増殖因子などの働きにより摂食再開後の摂餌行動と体内脂質代謝の働きによって過剰な脂肪蓄積が進んだと推測できる。絶食前後において体内貯蔵脂肪の分布と量に変化するという本研究の知見は、一過性の栄養障害である絶食は個体の体脂肪の体内蓄積に関して一過性の影響のみならず長期間回復されない影響をラットに残すであろうことが推察される。このような絶食を契機とした体組成の変化は、絶食によって引き起こされる長く回復困難となる組織学的変容として注目されるべき現象であると考えられる。おそらくはヒトにおいても、強度の絶食をともなう痩身ダイエットは摂食再開時の体脂肪蓄積を促進して体脂肪率の上昇を引き起こして肥満を誘導すること、また、誘導される肥満の程度には遺伝的素因に基づいた大きな個体差があることが推測される。

第IV章 絶食による骨格筋組織の萎縮に誘導される体組成の変化

IV-1 緒言

平成28年「国民健康・栄養調査」の結果において、我が国の20歳代女性におけるBMI 18.5未満の者は20.7%と5人に1人が低BMIに陥っている¹³⁾。それにも関わらず、その多くが自己の体型を肥満傾向と受け止め、よりスリムな体型を自己の望ましい体型であると考えていることが指摘されている^{7, 21, 59, 93)}。とくに若い女性に強く見られるこのような瘦身願望は若齢期から始まり、二次性徴の発現により異性への関心が高まって外見へのこだわりを持つ小学生高学年から始まるとの報告もある⁹⁴⁾。危惧される点は瘦身を実現する方法として、身体活動量を増やすことなく食事量を減らすことでエネルギー収支をマイナスにする行為である。その結果、体格に対して筋肉量が少なく、また体脂肪率が比較的多い体組成が誘導されることである。体重減少のための摂食制限とその後の過食を繰り返すことで、外見上は平均的体重者であっても、筋肉量（除脂肪体重）が少なく、低い除脂肪体重を示す女性は少なくない⁴⁰⁾。筋肉量は20歳代をピークに加齢に伴い減少していく⁹⁵⁾が、身体活動量の低い生活者が食事制限することにより過度に筋肉量を減少させることは将来においてサルコペニアを発症するリスクを高める。

極端な摂食制限である絶食が繰り返された場合、筋肉量（除脂肪体重）が少なく極端に低い除脂肪体重を示す体組成が誘導され、いわゆる隠れ肥満を進行させると考えられるが、絶食による実質筋組織重量の減少と食事再開時における筋組織の増成を個体毎に詳しく追跡評価した報告は、その実験方法の困難さもあって、見当たらない。

そこで本研究では、本来は骨などの硬組織を評価する目的で開発された軟X線照射装置を用いて、撮影されたラットの体組織X線像の筋組織を画像解析することで骨格筋組織を定量的に評価する方法を考案し、絶食による骨格筋組織の萎縮に誘導される体組成の変化を調べるために利用した。この方法によって絶食中およびその後の摂食再開期における筋組織量の推移を個体毎に追跡評価して、体重の変化と筋組織重量の変化がどのような時相のズレを持って推移するのかを検索した。

IV-2 方法

1. 動物

3日間の予備飼育の後、若齢 Wister 系雌ラット（体重 110g、(株) 久動より購入）をランダム・サンプリング法によって Control 群 6 匹、Fasting 群 6 匹の 2 群に分けた。Fasting 群には実験開始後 4 日間の絶食を負荷し、その後、6 日間の回復期を設定した。実験期間を通して自由摂水とし、Fasting 群の絶食期間を除いて飼料の摂取も自由摂取とした。体重、摂食量、摂水量の測定は実験開始日、実験開始 2 日目、4 日目、7 日目、10 日目に行い、X 線写真撮影は実験開始日、実験開始 4 日目、7 日目、10 日目に行い、飼育終了後は脱血屠殺した。ラットは 1 ケージにつき 1 匹、12 時間毎の明暗サイクルで飼育し、飼料は基礎飼料 MF（オリエンタル酵母社）を使用した。飼料の組成は Table4-1 に、実験デザインを Fig.4-1 に示した。

2. 軟 X 線装置による撮影

エーテルによる導入麻酔後にペントバルビタールナトリウムをラットの体重 100g あたり 0.7ml 投与し、浅い麻酔下にて撮影を実施した。X 線照射にインバーター式 X 線照射装置（SOFRON 社製 SRO-M50 型）を用い、電圧 35V、電流 0.4A、照射時間 1min の設定にて実施した。X 線フィルムには Industrial X-Ray Film IX FR（富士フィルム社）を用いた。X 線照射中、ラットは仰臥位にてビニールテープで足首の位置を一定に保ち、下肢を伸展させた状態に固定して大腿骨に対する X 線の照射角度が一定となるように行った。撮影時には X 線の限弱に関して骨と非常によく似た性質を示すアルミステージをラットの横に並べて設置し、同時に撮影した。X 線フィルムの現像は、X 線フィルム現像用セーフライトグラス No.5（キング社）を付けた安全灯照明下の暗室内にて行った。現像は X 線フィルム用のレンドール現像液（富士フィルム社）に 20°C で 5 分間浸漬した。その後、X 線フィルム用酸性硬膜定着剤のレンフィックス（富士フィルム社）に 20 分間浸漬し、流水で洗った後、界面活性剤のドライウェル（富士フィルム社）水溶液に 1 分浸漬し自然乾燥させた。

3. 画像処理

画像解析をするにあたりラットの軟 X 線写真を透過フィルム用フラットベッドスキャナ GT-X900（EPSON 社）にて解像度 2000dpi で読み取り、TIFF 形式で保存した（Fig.4-2）。

濃度校正には、アルミステージを参照体として用いた。アルミステージはそれぞれの段階を 80×80pixel の正方形領域に含まれる画像の平均画素値を濃度の薄い方から順に測定し（Fig.4-3）、保存した画像と統合し、近似カーブを指数にした後、基準をフレームにして正規化を行った（Fig.4-4）。その後、画像を画像処理ソフト Photoshop（Adobe 社）で展開し、8 ビット、グレースケールに変換した。Photoshop 処理された画像は画像処理ソフト IPLab（ソリューションズシステム社）を用いて解析した（Fig.4-5）。IPLab での解析後、画像は ImageJ（National Institutes of Health, NIH の提供するフリーソフト）を用いて次のような手順で解析し、グラフ化を行った。

4. 測定位置と画像密度曲線の作成

測定は左足の大腿部と下腿部の特定部位について実施した。

左足大腿部の測定は、画像処理した大腿骨の外側を垂直にし、内側の皮質骨上部に対して水平線 A を引いた。その水平線 A の上に 50pixel、横に 2200pixel の長方形を作成し、その領域に含まれる画像濃度を測定した (Fig.4-6)。

左足下腿部の測定は、脛骨の内側顆の頂点 A と外側顆の頂点 B を直線で結び、その線の下に 100pixel、横に適度な長さの長方形を作成した。その長方形から下に 50pixel、横に 1500pixel の長方形を作成し、その領域に含まれる画像濃度を測定した (Fig.4-7)。

筋組織パラメータの算出は、一般的に臨床でよく用いられている MD (Microdensitometry) 法⁹⁶⁾を骨以外の組織に適応して行った。すなわち、上述のように測定した各部位の画像濃度を行列プロットによってグラフ化し、表示形式を Q グラフとした。Y 軸の最小値を 0 に、最大値を 10 にして Photoshop に貼り付け、画像密度曲線を作成した (Fig.4-8)。これらを ImageJ (NIH) で展開し、次の手順で筋組織パラメータを算出した。まず、骨に由来する画像密度を除くためにグラフ上の直線になっている部分 (バックグラウンド) から直線 A を引いた。これより上が筋組織となる。グラフの立ち上がり部分が骨であり、その左右のそれぞれより延長線を引いて交点を作った。その交点から直線 A まで垂線を下ろし、その幅の長さを骨幅 D とした。また、2つの交点を直線で結び、骨幅 D と垂線で囲まれた部分を面積 ΣGS とした (Fig.4-9)。この骨幅 D と面積 ΣGS を用いて筋組織パラメータを次の式により算出した。この時、面積 ΣGS は骨の上下に付着した軟部組織 (大部分は筋組織) が X 線を遮蔽した電子密度の総量に相当し、筋肉量を表す指標となる。

$$\text{筋組織パラメータ} = \Sigma GS / D$$

上記のように求めた筋組織パラメータは筋組織のみを含んでいるわけではなく、皮下脂肪などが若干ながら寄与した数値であるが、その寄与割合は解剖学的に考えて小さいと判断されることから下肢の筋組織を評価する指標として妥当であると判断し、以下、本論文ではこの筋組織パラメータを「下肢の筋組織重量」という。

5. 統計処理

統計処理は JMP 14 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を用いて以下の検定を行った。群間の差の検定には student の t 検定を行った。測定値の推移の平行性の判定には反復測定分散分析を行い、交互作用項の有意性により判断した。なお、統計学的有意水準は $p < 0.05$ と定めた。

6. 実験動物の取扱い

本動物実験は、日本の動物の愛護及び管理に関する法律 (法律第 105 号) と実験動物の飼

養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（告示第 6 号）の、動物実験ガイドラインに従って行われた。

IV-3 結果

1. 体重の変化

飼育 10 日間における各個体の体重推移を Fig.4-10 に、各群の平均体重推移を Fig.4-11 に示した。Control 群の実験開始日の平均体重は $118.5 \pm 7.7\text{g}$ 、2 日目は $129.0 \pm 4.2\text{g}$ 、4 日目は $139.8 \pm 5.0\text{g}$ と徐々に増加していき、実験終了時には $163.7 \pm 9.2\text{g}$ となった。一方、実験開始日に $124.7 \pm 4.9\text{g}$ であった Fasting 群の平均体重は、絶食 2 日目には $107.4 \pm 4.1\text{g}$ ($p < 0.0001$)、絶食 4 日目は $92.1 \pm 5.5\text{g}$ ($p < 0.0001$) と急激に減少し Control 群に比べ有意に低い値となった。その後の回復期で Fasting 群の体重は急激に回復したものの回復期 6 日目にあたる実験終了時の体重は $140.4 \pm 11.9\text{g}$ であり、実験終了時まで有意な差を示したままだった ($P = 0.0036$)。実験開始 4 日目から実験終了時にあたる 10 日目までの平均の体重変化量は Fasting 群では $48.3 \pm 7.1\text{g}$ ($p < 0.0001$) だったのに対し、Control 群は $23.9 \pm 6.3\text{g}$ であった。

2. 摂食量

各群の 1 日当たりの平均摂食量を体重 100g あたりで算出し、個体別のものを Fig.4-12、平均摂食量を Fig.4-13 に示した。Control 群の実験開始 2 日間の平均摂食量は $9.4 \pm 2.0\text{g}$ 、3-4 日間の平均摂食量は $10.2 \pm 0.6\text{g}$ 、5-7 日間の平均摂食量は $9.8 \pm 0.9\text{g}$ 、8-10 日間の平均摂食量は $9.4 \pm 1.9\text{g}$ となった。一方、Fasting 群の回復期の最初の 3 日間の平均摂食量 $9.3 \pm 2.5\text{g}$ 、次の 3 日間の平均摂食量は $10.7 \pm 0.8\text{g}$ となり、両群における有意な差は認められなかった。

3. 摂水量

各群の 1 日当たりの平均摂水量を体重 100g あたりで算出し、個体別のものを Fig.4-14、平均摂食量を Fig.4-15 に示した。Control 群の実験開始 2 日間の平均摂水量は $11.9 \pm 2.8\text{ml}$ 、3-4 日間の平均摂水量は $11.9 \pm 2.7\text{ml}$ 、5-7 日間の平均摂水量 $10.9 \pm 0.5\text{ml}$ 、8-10 日間の平均摂水量は $9.4 \pm 0.8\text{ml}$ であった。一方、Fasting 群の絶食 2 日間の平均摂水量は $10.9 \pm 1.0\text{ml}$ であり、絶食 3-4 日間の平均摂水量は $6.6 \pm 4.7\text{ml}$ ($P = 0.037$) と大幅に減少し、Control 群に比べ有意に低値を示したが、個体差が大きかった。摂食再開により摂水量は急激に増加し、回復期の最初の 3 日間では $14.6 \pm 1.8\text{ml}$ ($P = 0.0028$)、次の 3 日間の平均摂水量は $14.1 \pm 2.6\text{ml}$ ($P = 0.0054$) といずれも Control 群よりも有意に高値を示した。

4. 軟 X 線画像による解析

各個体の大腿部の筋組織パラメータを Fig.4-16 に、各個体における筋組織パラメータの平

均の推移を Fig.4-17 に示した。Control 群の実験開始時の平均筋組織パラメータは 29.7 ± 10.1 、実験開始 4 日目は 37.0 ± 9.2 、7 日目は 47.6 ± 10.1 、10 日目に 52.9 ± 7.3 とゆるやかに増加した。一方、Fasting 群においては実験開始時に 40.2 ± 24.8 であったパラメータが、絶食 4 日目には 9.2 ± 7.5 と急激な減少を示した。摂食を再開した回復期 3 日目では 9.5 ± 4.5 と変化はなく、実験終了時の回復期 6 日目には 16.8 ± 7.2 と推移した。絶食 4 日目時点から実験終了時の両群を比較すると実験開始時には有意な差は認められなかったが、その後のすべての測定時で有意な差が認められた ($p < 0.0001$)。実験開始 4 日目から実験終了時までの大腿部筋組織パラメータの平均変化量は、Control 群では 15.9 ± 3.4 、Fasting 群では 7.6 ± 9.0 と Fasting 群の方が低値を示したが、有意な差は認められなかった ($P = 0.060$)。しかし、体重 100g 増加当たりの筋パラメータの変化量を比較すると Control 群では平均で $68.3 \pm 14.2/100g \text{ weight}$ に対して、Fasting 群は $16.8 \pm 17.8/100g \text{ weight}$ と Fasting 群の変化量は有意に少なかった ($P = 0.00025$)。

各個体の下腿部の筋組織パラメータを Fig.4-18 に、各個体における筋組織パラメータの平均の推移を Fig.4-19 に示した。Control 群の実験開始時の平均筋組織パラメータは 34.7 ± 8.5 、実験開始 4 日目は 40.7 ± 10.3 、7 日目は 47.1 ± 7.1 、実験終了時に 10 日目には 52.0 ± 8.7 とゆるやかに増加した。一方、Fasting 群の実験開始時は 40.0 ± 11.8 、絶食 4 日目には 20.9 ± 7.5 と急激に減少した。回復実験における回復期 3 日目は 23.8 ± 5.1 と変化はなく、回復期 6 日目の実験終了時には 33.4 ± 8.2 と増加したが、Control 群と比べいづれも低値を示した。実験開始時の両群に有意な差は認められなかったが、その後のすべての測定時に有意な差が認められた (4 日目: $P = 0.0035$ 、7 日目: $p < 0.0001$ 、10 日目: $P = 0.0034$)。実験開始 4 日目から実験終了時までの下腿部筋組織パラメータの平均変化量は、Control 群では 11.3 ± 14.9 、Fasting 群では 12.5 ± 9.6 と有意な差は認められなかった。体重 100g 増加当たりの筋パラメータの変化量の比較においても、Control 群では平均で $38.4 \pm 65.9/100g \text{ weight}$ 、Fasting 群では $27.5 \pm 20.3/100g \text{ weight}$ と有意な差は認められなかった。

飼育日数別に Control 群と Fasting 群のパラメータと体重の平均値を算出し、大腿部の筋組織パラメータと体重の関係を Fig.4-20 に、下腿部の筋組織パラメータと体重の関係を Fig.4-21 に示した。Control 群は飼育期間とともに体重が増加し、それに伴い大腿部、下腿部のいづれの筋組織パラメータも増加し、ほぼ直線状に右上がりの推移を辿った。Fasting 群においては絶食負荷により体重と筋組織パラメータは直線的に減少し、摂食再開によりくの字を描いて右上がりの推移へ転じた。回帰直線より求めた実験開始 4 日目から 10 日における大腿部の筋パラメータの体重 100g 当たりの増加率は Control 群で $73.7/100g \text{ weight}$ 、Fasting 群では $14.9/100g \text{ weight}$ であった。実験終了時の Fasting 群の平均体重は $140.4 \pm 11.9g$ であり、その時点において $139.8 \pm 5.0g$ とほぼ同体重を示していた実験開始 4 日目の Control 群における

大腿部の筋パラメータを比較したところ、Control 群では 37.0 ± 9.2 、Fasting 群では 16.8 ± 7.2 と有意な差が認められた ($P=0.0017$)。一方、回帰直線より求めた実験開始 4 日目から 10 日における下腿部の筋パラメータの体重 100g 当たりの増加率は Control 群で 47.2、Fasting 群では 25.1 であった。大腿部と同様に、実験終了時の Fasting 群と実験開始 4 日目における下腿部の筋パラメータを比較したが、Control 群のパラメータは 40.7 ± 10.3 、Fasting 群は 33.4 ± 8.2 と有意な差は認められなかった。

IV-4 考察

絶食により、脳の機能の維持のために不可欠なグルコースが不足すると、まず始めに肝臓に貯えられたグリコーゲンがグルコースへと変換され、血液中に放出される。一方、筋肉に蓄えられたグリコーゲンは解糖系に入り、エネルギーの生産に使われる。ヒトにおける生体内の糖の大部分は肝臓と筋肉にグリコーゲンとして貯蔵されているが、絶食によって約 1 日でほとんどが消費されてしまうと言われている⁸⁴⁾。肝臓に貯蔵されていたグリコーゲンが減少してくると、脂肪組織のホルモン感受性リパーゼが活性化されて脂肪組織が分解され、生命活動維持のためのエネルギー源となる。肝臓貯蔵グリコーゲンがほとんど消費されてしまうと、体タンパク質を分解して、アミノ酸から糖新生で血糖を供給する反応が進むことになる。アミノ酸は、 α -ケト酸との可逆反応によって糖代謝や脂肪酸代謝とつながり、栄養状態に応じたアミノ酸プールのホメオスタシスを維持している。本実験では 4 日間の絶食によってラットの平均体重は 124.7g から 92.1g へ減少したが、この間に、貯蔵脂肪の多くは消費され、また体タンパク、主には筋タンパク質の一定割合についても異化作用によって消費されることで骨格筋組織の萎縮が進んでいたものと推測される。本実験での絶食負荷による大腿部と下腿部の筋組織パラメータの推移を比較すると、下腿部では大腿部に比べると絶食期間におけるパラメータの減少量が少なく、大腿部においては 4 日間の絶食負荷により平均のパラメーターは 40.2 から 9.2 へと急激な減少を示していた。所見として、下肢の顕著な痩せが認められていたことと、大腿部は解剖学的にも筋量が多く、その絶対数が大きいことから、より絶食の影響を受けたことが考えられた。

6 日間の自由摂食をさせる摂食再開期では、急激な体重量の回復が見られたが、この回復期間中の下肢の骨格筋量の回復は少なく、体重量の回復の多くは脂肪量の増加によって成されていることが推測された。非肥満の若年女性を対象に食事制限を実施し、リバウンドの影響を調べた研究において、痩身ダイエット後に 14 日間被験者には自由に生活をしてもらったところ体脂肪量は減量前の状態に戻ったのに対し除脂肪量は回復しなかったという報告⁸⁸⁾か

らも食事制限により減少した脂肪量と筋量の回復の推移は異なることが推測される。絶食による筋量の減少程度と回復過程を経過的に観察した今回の実験において、特に大腿部の筋量の回復は体重の増加割合に合致せず、単純には回復しないことを示唆していた。骨格筋は身体において全タンパク質の 50% を占め、骨格筋のタンパク質は細胞レベルにおいて常に合成と分解を進めている。ヒトの骨格筋組織量は飢餓やストレスなどによる異化作用と摂取された栄養素を材料に筋組織合成刺激を反映した同化作用のバランスによって一定に保たれている。成体ラットに 10 日間の絶食負荷と再給餌を 10 日間行った時の筋タンパク質分解と合成速度を調べた実験⁹⁷⁾では、絶食期間中の筋タンパク質合成速度は絶食 1 日目に急激に低下し、2 日目にはほぼ停止状態を示した。なお、分解速度については絶食 2 日目に上昇後、そのまま高レベルを維持し、絶食による筋肉タンパク質の分解亢進を示したが、絶食 8 日目以降には急激に減少したことから、体脂肪分解による糖新生が優位になったことを考察している。そして、摂食再開により合成は急激な上昇を示し、一方で分解は再摂食 3 日目まで抑制され、絶食前の水準に戻ったのは再摂食後 7 日目以降であったことを報告している。本実験結果は、再摂食により筋タンパク質合成が促進され、分解が抑制されているにも関わらず、筋肉タンパク質の回復には時間がかかることを示した。

また、体重と基礎代謝量には関係があり、エネルギー制限による減量では基礎代謝量が低下することは知られている⁹⁸⁾。また、食事制限を実施した肥満患者を対象とした研究で食欲刺激ホルモンであるグレリンは食事制限実施前に比べ血清濃度の上昇を示した報告⁸⁵⁾からも、痩身ダイエット後のリバウンドといわれる体重増加にはホルモン作用による摂食亢進が関与していると考えられる。本実験における摂食再開期の急激な体重の回復において、絶食を契機とした基礎代謝量の低下とグレリン分泌レベルの上昇が、体脂肪の急激な増加に寄与していると推測される。

本実験結果より下肢の筋組織量（筋組織パラメータ）と体重から体組成の変化を検討したところ、大腿部と下腿部ともに Control 群の筋組織パラメータは体重増加に伴い直線状に右上がりに推移するのに対し、Fasting 群においては絶食負荷による体重減少に伴いパラメータは直線的に減少した後、摂食再開によりくの字を描いて右上がりの推移へ転じた。実験開始日では Control 群の回帰直線よりも上に見られたが、絶食 4 日目ではその線を対称に下方へと推移し、体重の減少量に比べて筋組織量の減少の方が大きく見られた。特に大腿部においては、摂食再開後の 3 日目には体重が 27.7g 増加したにも関わらず、パラメータの増加量には変化がなく、同体重時の Control 群と筋組織パラメータを比較しても Control 群のパラメータが 37.0 ± 9.2 であるのに対し、Fasting 群は 16.8 ± 7.2 と差が大きく、体重が回復しても大腿部の筋量は依然として回復していないことを示した。同様に体重と下腿部の筋組織パラメータとの

関係性を検討したところ、両群とも大腿部と同じような推移を示したが、大腿部のように顕著な差ではなかった。下肢においては、絶食負荷後に体重が回復しても同体重における筋量は少ないことが示され、これらの検討からも絶食を行うと Control 群に比べて太りやすい体組成になっている可能性が示唆された。回復期における体重増加に伴うパラメータの推移は、下腿部では 25.1/100g weight であり、大腿部では 14.9/100g weight と、特に大腿部の筋量が Control 群と同様のレベルにまで推移するには、より時間が必要なことが推測された。

本実験により、絶食は骨格筋組織の萎縮を強力に推進し、また、摂食再開によって萎縮した筋組織は容易には回復されないこと、さらに、摂食再開期における体重回復は脂肪の過度の蓄積によってもたらされることが推測され、絶食前と後では多大な体組成の変化が引き起こされる可能性が示された。すなわち、絶食は体組成の変化を惹起して長期にわたる影響を及ぼす可能性を示唆した。

第V章 絶食による骨量減少と骨質の変化

V-1 緒言

思春期にある青少年、とくに女性において散見される体重減少を目的とした絶食を伴う食事制限は、身体機能に様々な影響を及ぼす。著者らが行った動物実験でも、若齢期における極端な食事制限（絶食）が骨・筋系や消化器系の機能にネガティブな影響を与えることが分かっている⁹⁹⁻¹⁰¹。近年、我が国を含めて高齢化の進んでいる先進諸国では寝たきり高齢者をつくる原因となる骨粗鬆症による骨折増加が大きな社会問題となっているが、骨の健康には体重の増減が大きく関わっており^{102,103}、体重減少を目的とした絶食は骨粗鬆症の発症と予防に大きな影響を与えているかもしれない。すでに骨量減少が進んだ骨粗鬆症患者に対して十分な骨量改善効果が期待できる薬学的・栄養学的・理学的治療方法がなかなか見いだせないでいるなか、骨粗鬆症の予防対策は若年期に到達する最大骨量（peak bone mass）をいかにして高いレベルに引き上げるのかにかかっている。DXA法による測定では、男女の骨塩量は思春期に著しく増大し^{104,105}、最大骨量に達する年齢はおよそ女性で15歳程度、男性で18歳程度であり^{104,106-108}、骨折によって重大な事態が生じる大腿骨頸部では16歳頃に最大骨量に達する¹⁰⁴。したがって、思春期までの間にいかにして最大骨量を高いレベルに引き上げるのが骨粗鬆症の予防に重要であると考えられるようになってきた。思春期におけるスポーツ活動は最大骨量を増加させ^{109,110}、小児期の活動度が若年成人の骨密度に反映する¹¹¹、ことが報告されている。十分なカルシウム摂取とタンパク質摂取が骨粗鬆症の予防に重要であることが疫学調査から示され¹¹²、日常生活の中で筋力を必要とする労働が減少したことが骨粗鬆症の増加の原因である¹¹³と指摘されていることから、思春期における最大骨量を増加させるためには「運動」と「栄養」が極めて重要であることが広く認知されてきた。その一方で、過度な痩身願望から行われる絶食を含んだ痩身ダイエットが思春期若者で多く実施されているのは周知のことである。痩身ダイエットを繰り返す者に腰痛を訴える者や骨折経験者も多い^{7,38,102}。骨粗鬆症の予防対策のためには思春期の「運動」と「栄養」が重要であることを考えると、若者の痩身ダイエットは見過ごすことの出来ない問題であろう。しかし、過度の痩身ダイエットが骨の成長にどのような影響を与えるのかについて、実験的に詳しく調べられた例は見あたらない。

著者らは、動物実験により、絶食が惹起するカルシウム出納の変化が大腿骨皮質骨の成長を阻害し、成熟個体となった後の骨密度の低下と骨強度の脆弱化に大きな影響を与えること、

そして、この絶食の影響は若齢期ほど重大であることを明らかにしてきた⁹⁹⁻¹⁰¹⁾。本研究では成長期の骨形成に及ぼす絶食の影響を明らかにするための一助として、若齢ラットを用いた動物実験によって運動時あるいは非運動時に絶食したときのカルシウム出納と成長後の骨強度について検索した。また、ANのような絶食が続いた後に症状が改善し、体重が回復した後においても、骨折率が健常女性と比較して約2~7倍高いという報告³⁸⁾や、思春期ラットの骨を脆弱化させ、その後長期に食餌療法を行った場合、骨塩量は回復するが、骨形態の回復は困難であることが示唆されたという報告³⁹⁾もあり、いったん不整な構造に脆弱化した骨が元のインタクトな骨構造状態に自然に回復されることは非常に難しいだろうことが推測された。そこで本研究では、「カルシウム出納と骨強度についての検索」に引き続き、骨強度を左右する骨量に関して、軟 X 線像の解析から骨量を測定する方法を用いて、「絶食したときの骨量(骨密度)についての検索」を実施した。さらに、本研究では、「骨量」とともに骨強度を決定する重要な因子である「骨質」の変化にも注目した。現在、骨強度を決定する因子には骨量や骨密度以外の骨強度因子があり、この骨強度因子を決定づけるものに「骨質」という概念が提唱されている。アメリカ国立衛生研究所(National Institute of Health : NIH)の医学的な公式声明、いわゆるコンセンサスパネル(Consensus Development Panel)では、「骨強度」は骨密度と骨質の両者と関連するとし、そして「骨質」とは種々の要素を総括した概念」としている¹¹⁴⁾。骨密度は骨強度のほぼ70%を説明するが¹¹⁵⁾、残りの30%については骨質という用語で説明されるものである。骨質を表す特性には、「構造特性」と「材料特性」があり、骨リモデリングが大きく関与して骨強度に影響を与える。「構造特性」には、マクロ的な骨構造や骨サイズ、ミクロ的な海綿骨梁構造と皮質骨多孔性が含まれ、「材料特性」には、ミネラル化度や結晶サイズ、コラーゲン、マイクロダメージが含まれる。本研究では、腰椎の X 線 CT 画像から三次元的骨構造に起因した骨の脆弱性に関するパラメータを「骨質」を評価する方法として用い、絶食期間中とその後の摂食再開期における骨質の変化を個体毎に経時観察することにした。

V-2 方法

V-2-a カルシウム出納と骨強度に関する実験

1. 動物

若齢 Wister 系雄ラット(体重 80g、(株)九動より購入)をランダム・サンプリング法によって、対照群(Control 群)、比較的早い段階の成長期に当たる飼育 10 日目と 24 日目の二回に 4 日間の絶食を行った早期成長期絶食群(Fasted-early 群)、これに運動を負荷した群(Fasted-early & exer 群)、成長期を終えつつある段階に当たる飼育 38 日目と 52 日目の二回に 4 日間の絶食を行った晚期成長期絶食群(Fasted-late 群)、これに運動を負荷した群(Fasted-late & exer 群)の

5群に分け、各群6匹の計30匹を実験に供した。水は自由摂取とし、絶食期間を除いて飼料の摂取も自由摂取とした。飼料組成はTable5-1に示した。

Fasted-early & exer 群と Fasted-late & exer 群は円周 1m の滑車が付属したケージにて飼育し常時自発的運動が可能とした飼育を行い、自発運動量を毎日記録した。Fasted-early 群と Fasted-early & exer 群は、飼育 10 日目と飼育 24 日目に 4 日間の絶食を 2 回行った。Fasted-late 群と Fasted-late & exer 群は、飼育 38 日目と飼育 52 日目に 4 日間の絶食を 2 回行った。

実験デザインを Fig.5-1 に示した。

2. 見かけのカルシウム吸収率と見かけのカルシウム貯留量の算出

飼育期間中は2日毎に2日間分の糞と尿を採取した。採取した糞を 100°C (24 時間) にて乾燥させた後、550°C (24 時間) で灰化させて、1%塩酸溶液に溶かしたものを試料液とし、原子吸光光度計 (島津 AA-646, 波長 422.7nm) にてカルシウム量を測定した。また、採取した尿を 1%塩酸に溶かした後に蒸留水で希釈し、これに 0.03%(W/V)塩化ストロンチウムと 1%(V/V)塩酸を加えて試料液とし、原子吸光光度計 (島津 AA-646, 波長 422.7nm) にてカルシウム量を測定した。

糞中と尿中のカルシウム量の測定値から、次式により「見かけのカルシウム吸収率 (apparent absorption ratio of calcium) A」と「見かけのカルシウム貯留量 (apparent body retention quantity of calcium)」D を算出¹¹⁶⁾した。

$$A = (B - C) / B \times 100$$

A: apparent absorption ratio of calcium (%)

B: calcium intake (mg)

(food intake x content rate of the calcium in experimental diet)

C: calcium excretion quantity in feces (mg)

$$D = B - E - C$$

D: apparent body retention quantity of calcium (mg)

B: calcium intake (mg)

(food intake x content rate of the calcium in experimental diet)

E: calcium excretion quantity in urine (mg)

C: calcium excretion quantity in feces (mg)

飼育終了後、動物を一夜絶食させ、エーテル麻酔下で開腹、下大静脈より採血してから脱

血屠殺した。

血液中の総タンパク量といくつかのミネラル含有量、大腿骨長、大腿骨重量、大腿骨破断強度、大腿骨カルシウム含有量について測定した。血液中の総タンパク量とミネラル含有量はオートアナライザー（富士産業株式会社、東京、日本）にて測定した。

大腿骨の破断強度は Kugino らの方法¹⁰⁾にしたがって 20 Kg ロードセルを装着した RE-3305 型レオメーター（山電社製）により、サンプル支持幅 18 mm で、くさび型プランジャー（山電社製 No.49 プランジャー）を用いた定速圧縮破断試験で測定した。

破断強度測定後の大腿骨は 105°C（24 時間）にて乾燥させた後 550°C（1 週間）にて灰化させ、1N の塩酸で挿り潰して蒸留水で希釈し、これに 0.03%(W/V)塩化ストロンチウムと 1%(V/V)塩酸を加えて試料液とし、原子吸光光度計（島津 AA-646, 波長 422.7nm）にてカルシウム量を測定した。

3. 統計処理

統計処理は JMP 14 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を用いて以下の検定を行った。群間の差の検定には Dunnett の多重比較検定を行った。なお、全ての統計学的有意水準は $p < 0.05$ と定めた。

4. 実験動物の取扱い

本動物実験は、日本の動物の愛護及び管理に関する法律（法律第 105 号）と実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（告示第 6 号）の、動物実験ガイドラインに従って行われた。

V-2-b. 軟 X 線画像による骨解析に関する実験

1. 動物

3 日間の予備飼育の後、若齢 Wister 系雌ラット（体重 110g、（株）久動より購入）を、ランダム・サンプリング法によって Control 群 6 匹、Fasting 群 5 匹の 2 群に分け、Fasting 群には 4 日間の絶食を負荷した後、6 日間 の自由摂食期間を設け、回復期間を設定した。水は自由摂水とし、絶食期間を除いて飼料の摂取も自由摂食とした。X 線写真撮影を実験開始日、絶食 4 日目にあたる実験 4 日目、回復期 3 日目にあたる 7 日目、回復期 6 日目にあたる 10 日目に行った。体重、摂食量、摂水量は実験開始日、実験 2 日目、4 日目、7 日目、10 日目に測定し、飼育終了後は脱血屠殺し、大腿骨を採取して大腿骨長、大腿骨湿重量を測定した。ラットは 1 ケージにつき 1 匹、12 時間毎の明暗サイクルで 飼育し、飼料は基礎飼料 MF（オリエンタル酵母社）を使用した。飼料の組成を Table 5-2 に各実験の実験デザインを Fig.5-2 に示した。

2. 軟 X 線装置による撮影と画像解析

エーテルによる導入麻酔後にペントバルビタールナトリウムをラットの体重 100g あたり 0.7ml 投与し、浅い麻酔下にて撮影を実施した。X 線照射にインバーター式 X 線照射装置 (SOFRON 社製 SRO-M50 型) を用い、電圧 35V、電流 0.4A、照射時間 1min の設定にて実施した。X 線フィルムには Industrial X-Ray Film IX FR (富士フィルム社) を用いた。X 線照射中、ラットは仰臥位にてビニールテープで足首の位置を一定に保ち、下肢を伸展させた状態に固定して大腿骨に対する X 線の照射角度が一定となるように行った。撮影時には X 線の限弱に関して骨と非常によく似た性質を示すアルミステージをラットの横に並べて設置し、同時に撮影した。X 線フィルムの現像は、X 線フィルム現像用セーフライトグラス No.5 (キング社) を付けた安全灯照明下の暗室内にて行った。現像は X 線フィルム用のレンドール現像液 (富士フィルム社) に 20°C で 5 分間浸漬した。その後、X 線フィルム用酸性硬膜定着剤のレンフィックス (富士フィルム社) に 20 分間浸漬し、流水で洗った後、界面活性剤のドライウエル (富士フィルム社) 水溶液に 1 分浸漬し自然乾燥させた。

3. 画像処理

X 線フィルムを透過フィルム用フラットベットスキャナ GT-X900 (EPSON 社) にて解像度 2000dpi で読み取り、TIFF 形式で保存し (Fig.5-3)、保存した画像を画像処理ソフト Photoshop (Adobe 社) にて、8 ビット、グレースケール画像に変換した。

Photoshop 処理された画像は画像処理ソフト IPLab (ソリューションズシステム社) を用いて解析した。参照体として用いたアルミステージは、それぞれの段階を四角形 ROI で 80×80pixel の領域 (Fig.5-4) に含まれる画像の平均画素値を濃度の薄い方から順に測定し、保存した画像と統合し、近似カーブを指数にした後、基準をフレームにして正規化を行った (Fig.5-5)。

IPLab を利用し濃度をグラフ化した後、グラフ画像は ImageJ (National Institutes of Health, NIH の提供するフリーソフト) を用いて解析し、骨関連パラメータを算出した。

得られたもののうち骨密度関連パラメータが ΣGS 、 $\Sigma GS/D$ であり、 ΣGS は骨組織が X 線を遮蔽した電子密度の総量に相当する骨量を表す指標に、これを皮質骨幅 D で除した $\Sigma GS/D$ は皮質骨密度の指標になる。また、 GS_{min} は皮質骨幅の厚さの 2 倍分と骨髄が X 線を遮蔽した電子密度の総量に概ね相当するため皮質骨幅の指標に、 GS_{max} は皮質骨量が最も X 線の遮蔽に貢献する値であるため皮質骨幅の指標に、 CTI (Cortical bone index) は皮質骨が X 線を遮蔽した電子密度の総量を皮質骨幅で除した値であるため皮質骨密度の指標になる。パラメータの算出は以下のように行った。

骨密度パラメータ $\Sigma GS / D$

$GS_{max} = (GS1 + GS2) / 2$

皮質骨指数 $CTI = (d1 + d2) / D$

なお、各画像部位の濃度のグラフ化及び解析方法⁶⁸⁾を以下に示した。

① 大腿骨頸部の測定

小転子部の右端 c を含む 60×1400 pixel の長方形の領域 (Fig.5-6) に含まれる画像濃度の行列プロットを行いグラフ化し、表示形式を Q グラフとして表示した。Y 軸の最小値を 0、最大値を 12 にし、そのグラフを Photoshop に貼り付けた (Fig.5-7)。

パラメータを算出するには、測定値のバックグラウンドを除くためグラフの立ち上がり部分に延長線を引き交わる点をそれぞれ a 、 b とし、直線 ab の中点を c とした。直線 cb の中心 $1/3$ を de としグラフで囲まれた部分を ΣGS とした。 d 、 e からそれぞれ垂線を下ろし、その間を D とし、 $\Sigma GS/D$ を算出した (Fig.5-8)。

② 大腿骨幹部中央の測定

大腿骨幹部中央上辺と下辺が水平になった部分を測定するために、大腿骨の下辺の突出した 2 つの部分 a 、 b の中央の 100×1000 pixel の長方形の領域 (Fig.5-9) に含まれる画像濃度の行列プロットを行いグラフ化し、表示形式を Q グラフとして表示した。Y 軸の最小値を 0、最大値を 12 にし、そのグラフを Photoshop に貼り付けた (Fig.5-10)。

パラメータを算出するには、測定値のバックグラウンドを除くために、ベースラインとグラフの立ち上がり部分の延長線を引き交わる点をそれぞれ a 、 b とし、直線 ab とグラフで囲まれた面積部分を ΣGS とした。 a 、 b からそれぞれ垂線を引き、その 2 本の垂線を結んだ直線の長さを D とした (Fig.5-11)。次にグラフの第 1 ピークと第 2 ピークから垂線を引き、直線 ab との交点までの長さをそれぞれ $GS1$ 及び $GS2$ とした。第 1 ピークと第 2 ピークの間で 1 番低い点からおろした垂線と直線 ab との交点までの長さを GS_{min} とした。直線 ab 上の a から第 1 ピークまでの投影長を $d1$ 、第 2 ピークから b までの投影長を $d2$ 、その間を $d3$ とし (Fig.5-12)、 $\Sigma GS/D$ 、並びに GS_{max} 、 CTI を算出した。

③ 大腿骨下端の測定

骨の測定部位として 150×150 pixel の円の領域、バックグラウンドの測定部位として 150×1000 pixel の長方形の領域 (Fig.13) に含まれる画像濃度の行列プロットを行いグラフ化し、表示形式を Q グラフとして表示した。Y 軸の最小値を 0、最大値を 12 にし、それぞれのグラフを Photoshop に貼り付けた。(Fig.5-14 (a) (b))

パラメータを算出するには、大腿骨下端の海綿骨部分には軟骨が隣接しているため、

上記の方法ではバックグラウンドを引くことができないため、大腿骨下端の海綿骨部分 (Fig.5-15 (a)) とバックグラントを算出するための部分 (Fig.5-15 (b)) の骨密度パラメータをそれぞれ算出し、Fig.5-15 (a) で得られた骨密度パラメータから Fig.5-15 (b) で得られた骨密度パラメータを引きそれを大腿骨下端の骨密度パラメータとした。まず、Fig.5-15 (a) のグラフの線の右端から垂線を下ろし、Y 軸との幅を D1 とし、グラフで囲まれた部分の面積を $\Sigma GS1$ とし、 $\Sigma GS/D1$ を算出した。そして、Fig.5-15 (b) のグラフの立ち上がり部分に延長線を引き、交わる点をそれぞれ a、b とし、垂線を下ろし、その幅を D2 とした。a、b とグラフで囲まれた部分を $\Sigma GS2$ とし、 $\Sigma GS/D2$ を算出した。そして、 $\Sigma GS/D1$ から $\Sigma GS/D2$ を引いたものを大腿骨下端の骨密度パラメータ $\Sigma GS/D$ とした。

④ 脛骨上端の測定

軟骨の下に 150×800pixel の長方形の領域 (Fig.5-16) に含まれる画像濃度の行列プロットを行いグラフ化し、表示形式を Q グラフとして表示した。Y 軸の最小値を 0、最大値を 12 にし、そのグラフを Photoshop に貼り付けた (Fig.5-17)。

パラメータを算出するには、バックグラウンドを除くためにグラフの立ち上がり部分を a、b としそれぞれ垂線を引いた。直線 ab の中点を c とし、そこから右へ 40pixel (骨幅 D) に含まれる部分の面積を ΣGS とし、 $\Sigma GS/D$ を算出した (Fig.5-18)。

4. 統計処理

統計処理は JMP 14 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を用いた。群間の差の検定には student の t 検定を、変化率の比較には Dunnet の多重比較検定を行った。測定値の推移の平行性の判定には反復測定分散分析を行い、交互作用項の有意性により判断した。なお、全ての統計学的有意水準は $p<0.05$ と定めた。

5. 実験動物の取扱い

本動物実験は、日本の動物の愛護及び管理に関する法律 (法律第 105 号) と実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準 (告示第 6 号) の、動物実験ガイドラインに従って行われた。

V-2-c CT 画像による骨解析に関する実験

1. 動物

3 日間の予備飼育の後、若齢 Wister 系雄ラット (体重 130g、(株)久動より購入) をランダム・サンプリング法によって Fasting 群 6 匹、Control 群 5 匹の 2 群に分けた。Fasting 群には実験開始後 4 日間の絶食を負荷し、その後、10 日間の回復期を設定した。実験期間を通して

自由摂水とし、Fasting 群の絶食期間を除いて飼料の摂取も自由摂取とした。飼育は1ケージにつき1匹とし、12時間毎の明暗サイクルで飼育した。飼料は基礎飼料 MF であり、飼料組成は Table 5-3 に示した。体重、摂食量、摂水量は毎日測定を行い、X 線 CT 撮影は Fig5-19 に ▲ で示したように、全飼育実験期間を通して2日毎、すなわち、実験開始日、2日目、4日目、6日目、8日目、10日目、12日目、14日目に行った。

2. X 線 CT 装置による撮影

ラットの麻酔処置にはシナノ製作所社の SN-487 型麻酔装置(Fig.5-20)を用いた。装置の動作は、面積式浮遊型、使用気体 Air、流量 0.5~5L/min、精度 $\pm 5\%$ 、吸入麻酔剤イソフルランの設定にて行った。ラットを麻酔ボックスに入れて 3%イソフルラン、流量 2L/min にて導入麻酔を施した。X 線照射ボックス内での 30 分間の撮影中は 2%イソフルラン、流量 0.2L/min で麻酔を維持した。X 線 CT 撮影は日立アロカメディカル社（東京、日本）LCT-100 型 X 線 CT 装置(Fig.5-21)を用いた。撮影は、X 線管形式 IHR-50PC、管電圧 35.50kV、感電流 1mA の設定にて実施した。ラットをプレスキャンしたスカウト画像を Fig.5-22 に示した。ラットは仰臥位にて撮影を行い、横隔膜から大腿骨の付け根までの胴部を 1mm 間隔で撮影し、第2腰椎から第4腰椎までを含むエリア（Fig.5-23）の約 18 枚の断層画像（Fig.5-24）を採用し、画像解析に用いた。

3. 体長及び腰椎の椎体高と椎体幅の計測

体長はスカウト画像における、頭蓋骨鼻骨先端から骨盤下端までを測定した（Fig.5-25）。また、腰椎の形態計測は X 線スカウト画像から second lumbar vertebra (L2)、third lumbar vertebra (L3)、fourth lumbar vertebra (L4) の椎体高 (vertebral body height) と椎体幅 (vertebral body diameter) を測定し、L2~L4 の平均値をその個体の腰椎高と腰椎幅として測定した (Fig.5-26)。

4. 画像解析

X 線 CT 撮影により得られた断層画像データはラシータソフトウェア Ver.3.0（日立アロカメディカル社製）を用いて画像解析^{114,117-121}を行った。画像処理を終えたラットの断層画像を Fig.5-27 に示した。青色エリアが皮質骨、黄色エリアが海綿骨を示している。X 線 CT 撮影によって得られた全ての断層画像をソフトウェアに自動認識させた後、断層画像毎に誤認識されている ROI (Region of Interest) を解剖学的構造に符合するよう手入力で修正し皮質骨と海綿骨を特定した。部位分けを完成した各断層画像を立体的に構築し、全骨密度 (mg/cm^3)、皮質骨密度 (mg/cm^3)、海綿骨密度 (mg/cm^3) を算出した。また、骨力学的指標として、曲げに対する強さを表す最小断面二次モーメント ($\text{mg} \cdot \text{cm}$) とねじれに対する強さを表す断面二次極モーメント ($\text{mg} \cdot \text{cm}$) を算出した。

骨塩量 (mg) の測定は、アルミをベースとした PHA-201 骨量ファントムを基準とし、X 線

透過率を測定した。ファントム内の炭酸カルシウム相当量と X 線透過率との回帰直線を作成し、測定した第二腰椎～第四腰椎までの皮質骨および海綿骨の X 線透過率から炭酸カルシウム相当量として骨塩量を求めた。

平面骨密度 (g/cm^2) の測定は、面積あたりの骨塩量すなわち骨密度 (bone mineral density : BMD)として表し、スカウト撮影方法 (X 線照射方向に沿った向き) から見た X 線画像に写された骨の粒子密度とした。DXA 法で示される平面骨密度に相当するものとした。

骨密度 (mg/cm^3) の測定は、体積あたりの骨塩量として表した。骨密度を算出するには、まず、断層画像で同定された海綿骨および皮質骨エリアを三次元的に構築してその組織の体積を求めた。体積は、“エリア面積 × スライス間隔”の積算値として求めた。

全骨密度、皮質骨密度、海綿骨密度は、固有の骨塩量を求められた体積で除して次式により算出した。

$$\begin{aligned} \text{体積 (cm}^3\text{)} &= \sum S(i) \times d = d \sum S(i) \\ \text{骨密度 (mg/cm}^3\text{)} &= \text{骨塩量 (mg)} \div \text{全骨体積 (cm}^3\text{)} \end{aligned}$$

皮質骨厚 (cm) の測定は、皮質骨の厚さを表し、次式により算出した。

$$\text{皮質骨厚 (cm)} = \text{皮質骨面積(cm}^2\text{)} / \text{皮質骨平均周囲長(cm)}$$

断面二次モーメントを算出した。断面二次モーメントは曲げに対する強さを示し、断面二次モーメントの値が大きいほど、曲げに対して強いことを表す。骨部の画素に対して骨部の重心を通る直線からの距離 (r') を算出し、演算結果をすべて積分し、次式により算出した。

$$\text{断面二次モーメント (mg} \cdot \text{cm)} = \iint (r') \times (r') \times \text{BMD} \, dx \, dy$$

BMD : 体積骨密度

r' : 重心を通る直線 (中立軸) からの距離

この時、骨部の重心を通る直径の傾きを変えて断面二次モーメントを求め、その最小値を最小断面二次モーメントとして表し (Fig.5-28)、次式により算出した。なお、 r' の算出は以下の式で求めた。重心を (X_g, Y_g) とした時、その骨部 (x_i, y_j) の r' は、重心を通る直線の角度 θ に依存した値であることを示す (Fig.5-29)。

$$r' = R_n = \frac{|(\tan \theta) \times x_i - y_j - \tan \theta \times X_g + Y_g|}{\sqrt{(\tan \theta)^2 + 1}} \quad (\text{cm})$$

断面二次極モーメントはねじれに対する強さを表し、値が大きいほど、ねじれに対して強いことを示す。骨部の一つの画素に対して一つの r を算出し、画素ごとの r に対する演算結果をすべて積分し、次式により算出した (Fig.5-30)。

$$\text{断面二次極モーメント (mg} \cdot \text{cm)} = \iint r \times r \times \text{BMD} \, dx dy$$

BMD : 体積骨密度

R : 重心からの距離

なお、 r の算出は、以下の式で求めた。骨部の重心を (X_g, Y_g) 、その骨部の r は (x, y) を示す。

$$r = \sqrt{(x_i - X_g)^2 + (y_i - Y_g)^2}$$

5. 統計処理

統計処理は JMP 14 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いた。群間の差の検定には student の t 検定を行った。測定値の推移の平行性の判定には反復測定分散分析を行い、交互作用項の有意性により判断した。なお、統計学的有意水準は $p < 0.05$ と定めた。

6. 実験動物の取扱い

本動物実験は、長崎県立大学動物実験委員会に承認 (承認番号 23-28) されて、長崎県立大学および日本の動物の愛護及び管理に関する法律 (法律第 105 号) と実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準 (告示第 6 号) の、動物実験ガイドラインに従って行われた。

V-3 結果

V-3-a カルシウム出納と骨強度に関する実験

1. 体重

飼育期間における摂食量の変化を Fig.5-31 に示した。常に運動群の摂食量が非運動群のそれよりも大きいのはこれまでの結果¹⁰¹⁾と一致していた。絶食の後は全ての群のラットで速やかに摂食量が増加することが認められ、数日間にはリバウンドとみられる摂食量の増加が持続することが認められた。体重変化を Fig.5-32 に示した。絶食中は体重が減少しているものの、摂食再開によって体重が回復していることが示された。飼育終了時点における体重は Control

群が $362.4 \pm 22.0\text{g}$ 、Fasted-early 群が $379.5 \pm 73.4\text{g}$ 、Fasted-late 群は $343.1 \pm 21.9\text{g}$ 、Fasted-early & exer 群 では $372.7 \pm 18.4\text{g}$ 、Fasted-late & exer 群では $355.3 \pm 13.0\text{g}$ であり、各群間に有意な体重差は認められなかった。

2. カルシウム出納

Control 群の見かけのカルシウム吸収率と見かけのカルシウム貯留量を Fig.5-33 に示した。飼育開始時に平均で $72.9 \pm 7.3\%$ であった見かけのカルシウム吸収率は成長とともに徐々に低下し、飼育終了時期には $51.8 \pm 6.1\%$ になった。見かけのカルシウム貯留量は飼育当初 $50.2 \pm 6.2\%$ であったものが、飼育期間とともに徐々に増加し、16 日目には $60.2 \pm 7.9\%$ になった。その後 36 日目までその値を維持したが徐々に減少していき、飼育終了時には $47.2 \pm 5.4\%$ となった。Fasted-early 群の見かけのカルシウム吸収率と見かけのカルシウム貯留量を Fig.5-34 に示した。見かけのカルシウム吸収率は成長とともに低下したが、第一回目の絶食後に $79.3 \pm 2.8\%$ 、第二回目の絶食後に $69.8 \pm 6.9\%$ と、一時的に上昇した。見かけのカルシウム貯留量については絶食中は負のバランスとなっていた。また、見かけのカルシウム吸収率と同様、絶食後のリバウンドがみられた。Fasted-late 群の見かけのカルシウム吸収率と見かけのカルシウム貯留量を Fig.5-35 に示した。見かけのカルシウム吸収率は飼育 36 日目までは Control 群と同様に推移し、絶食後にはリバウンドとみられる一時的な上昇が見られた。見かけのカルシウム貯留量においては絶食中は負のバランスとなり、絶食後の上昇が認められた。

運動群における運動量の変化を Fig.5-36 に示した。飼育期間の延長にともなって緩やかに運動量が増加する傾向が見られた。また、特徴的な点として、Fasted-early & exer 群と Fasted-late & exer 群のいずれも絶食の時期に大きく運動量が増加することが認められた。

Fasted-early & exer 群の見かけのカルシウム吸収率と見かけのカルシウム貯留量を Fig.5-37 に示した。Fasted-early 群と比較すると、飼育前半においての見かけのカルシウム吸収率は二群間でほぼ同様の値を示していたが、飼育 36 日目以降は Fasted-early & exer 群の値が Fasted-early 群の値よりも $5\% \sim 8\%$ ほど高い値を推移していた。また、見かけのカルシウム貯留量にも同様の結果が認められた。

Fasted-late & exer 群の見かけのカルシウム吸収率と見かけのカルシウム貯留量を Fig.5-38 に示した。見かけのカルシウム吸収率は全体に高いレベルで推移していた。飼育開始時より上昇し、8 日から 16 日目までは約 80% の値を示してより緩やかに低下し、飼育 36 日目では約 $65.7 \pm 3.8\%$ であった。絶食後のリバウンドも顕著であった。見かけのカルシウム貯留量も Fasted-late 群よりも常に高い値を推移していた。

3. 骨強度

大腿骨の長さや湿重量を Fig.5-39 に示した。いずれも各群間に違いを認めることはできな

かった。しかし、大腿骨中のカルシウム含有量については、Control 群の $151.3 \pm 18.6 \text{mg}$ に対し、Fasted-early 群は $116.4 \pm 21.2 \text{mg}$ と顕著な低下が認められた ($P=0.0038$)。なお、その他の群の大腿骨中のカルシウム含有量は、Fasted-early & exer 群では $131.3 \pm 14.6 \text{mg}$ 、Fasted-late 群は $136.1 \pm 12.2 \text{mg}$ 、Fasted-late & exer 群は $155.7 \pm 11.7 \text{mg}$ であり、Control 群との有意な差は認められなかった (Fig.5-40)。同様に、大腿骨の破断強度についても Control 群の $14.57 \pm 1.07 \text{kg}$ に対し、Fasted-early 群では $12.41 \pm 0.90 \text{kg}$ ($P=0.0036$) と有意な低下が認められた。その他の群の破断強度については、Fasted-early & exer 群では 13.25 ± 1.02 、Fasted-late 群では 13.35 ± 0.77 、Fasted-late & exer 群は 14.52 ± 1.18 であり、Control 群と有意な差は認められなかった (Fig.5-40)。

V-3-b 軟 X 線画像による骨解析に関する実験

1. 体重及び摂食量、摂水量

体重の測定結果の個体別の推移を Fig.5-41、平均値を Fig.5-42 に示した。Fasting 群の体重は絶食 2 日目、4 日目とも絶食の影響を受け減少し、摂食再開による体重の回復には個体差があった。平均値にて比較すると、Control 群は実験開始時に $118.5 \pm 7.7 \text{g}$ であり、2 日目には $129.0 \pm 4.2 \text{g}$ 、4 日目には $139.8 \pm 5.0 \text{g}$ と順調に増加し、10 日目には $163.7 \pm 9.2 \text{g}$ となった。一方、Fasting 群は実験開始時に $123.5 \pm 4.0 \text{g}$ と Control 群との体重差はみられなかったが、絶食負荷 2 日目には $106.1 \pm 2.7 \text{g}$ 、4 日目には $90.7 \pm 4.6 \text{g}$ と顕著に減少し、摂食再開により回復はみられたものの、回復期 6 日目にあたる 10 日目の体重も $138.5 \pm 12.3 \text{g}$ と Control 群に比べても有意に低く ($P=0.004$)、実験開始後の測定日のすべてにおいて Fasting 群の体重は有意に低値を示した。

各群の 1 日当たりの平均摂食量を体重 100g あたりで算出し、個体別のものを Fig.5-43、平均摂食量を Fig.5-44 に示した。平均値でみると、Control 群の実験開始 2 日間の平均摂食量は $9.4 \pm 2.0 \text{g}$ であり、3-4 日間の平均摂食量は $10.2 \pm 0.6 \text{g}$ 、5-7 日間の平均摂食量は $9.8 \pm 0.9 \text{g}$ 、8-10 日間の平均摂食量は $9.4 \pm 1.9 \text{g}$ と 10 日間の摂食量に変化はなかった。一方の Fasting 群では 4 日間の絶食を経て、回復期の最初の 3 日間の平均摂食量は $9.0 \pm 2.3 \text{g}$ 、次の 3 日間の平均摂食量は $10.9 \pm 0.9 \text{g}$ となり Control 群と有意な差を示すものではなかった。

各群の 1 日当たりの平均摂水量を体重 100g あたりで算出し、個体別のものを Fig.5-45、平均摂水量を Fig.5-46 に示した。Control 群の実験開始 2 日間の平均摂水量は $11.9 \pm 2.8 \text{ml}$ であり、以降の実験期間中に変化はなかった。一方、Fasting 群の絶食 2 日間の平均摂水量は $10.8 \pm 1.1 \text{ml}$ であり、絶食 3-4 日間では $6.0 \pm 4.9 \text{ml}$ と大幅に減少し、Control 群に比べ有意に低値を示した ($P=0.029$)。摂食再開により摂水量は急激に増加し、回復期の最初の 3 日間では $14.6 \pm 1.8 \text{ml}$ ($P=0.0043$)、次の 3 日間の平均摂水量は $14.1 \pm 2.6 \text{ml}$ ($P=0.0053$) といずれも Control 群よりも高値を示し、有意な差が認められた。

2. 飼育終了後の大腿骨長及び大腿骨湿重量

飼育終了後の大腿骨長の結果を個体ごとのものを Fig.5-47、平均値を Fig.5-48 に示した。平均値で比較すると Control 群の大腿骨長は $2.42\pm 0.06\text{cm}$ 、Fasting 群は $2.28\pm 0.02\text{cm}$ であり、Fasting 群が有意に低値を示した ($P=0.0014$)。

大腿骨湿重量の結果を個体ごとのものを Fig.5-49、平均値を Fig.5-50 に示した。平均値で比較すると、Control 群は $0.63\pm 0.04\text{g}$ 、Fasting 群は $0.57\pm 0.06\text{g}$ であり Fasting 群が 10%ほど低い値を示したが有意な差ではなかった ($P=0.082$)。

3. 皮質骨関連骨パラメータ

皮質骨関連パラメータである GSmax の結果を個体ごとのものを Fig.5-51、平均値を Fig.5-52 に示した。各群の各個体の推移に大きな変動は認められなかった。実験開始時の Control 群の GSmax の平均値は 113.4 ± 3.4 であり、4 日目に 115.4 ± 4.0 、回復期 3 日目にあたる 7 日目には 114.2 ± 5.0 、回復期 6 日目にあたる 10 日目には 114.6 ± 5.8 と実験期間を通して、ほとんど変化はみられなかった。一方、Fasting 群では実験開始時に 113.4 ± 5.8 、絶食 4 日目に 114.0 ± 7.1 、回復期 3 日目に 112.7 ± 4.5 、回復期 6 日目は 117.1 ± 7.0 と推移し、実験終了時に Control 群よりも高値を示したが、実験開始 4 日目から 10 日目の両群間の推移に有意な差はみられなかった。

GSmin の結果を個体ごとのものを Fig.5-53、平均値を Fig.5-54 に示した。各群の各個体の推移を比較すると、Control 群は増加傾向を示し、Fasting 群は絶食により低下傾向を示した。実験開始時の Control 群の平均値は 71.0 ± 7.4 であり、4 日目に 77.0 ± 7.0 、回復期 3 日目にあたる 7 日目には 79.8 ± 8.6 、回復期 6 日目にあたる 10 日目には 81.8 ± 8.3 とゆるやかな増加を示した。一方、Fasting 群は実験開始時に 73.0 ± 5.8 だった値が絶食 4 日目には 66.4 ± 8.2 と Control 群に比べて有意に低値を示した ($P=0.045$)。回復期 3 日目には 68.2 ± 5.8 と増加傾向を示し、回復期 6 日目には 74.4 ± 7.8 と Control 群より低値を示したが、実験開始 4 日目から 10 日目における GSmin の変化量及び両群間の推移に有意な差は認められなかった。

皮質骨指数の結果を個体ごとのものを Fig.5-55、平均値を Fig.5-56 に示した。個体別に比較すると、Fasting 群では絶食負荷により低下傾向を示し、摂食再開後も低値を推移する個体が観察された。Control 群の平均値は、実験開始時には 0.253 ± 0.025 であり、4 日目は 0.280 ± 0.016 、7 日目は 0.277 ± 0.024 、10 日目は 0.283 ± 0.020 と、飼育 4 日目以降は大きな増減なく推移した。一方、実験開始時に 0.270 ± 0.012 であった Fasting 群は絶食負荷 4 日目に 0.235 ± 0.025 、回復 3 日目にあたる 7 日目では 0.236 ± 0.015 、回復 6 日目にあたる 10 日目には 0.262 ± 0.009 と、絶食負荷により減少し摂食再開後も低値を推移し、再摂食 3 日目以降に回復傾向を示した。両群間で比較すると、絶食 4 日目 ($P=0.0058$) に Fasting 群が有意に低値を示

したが、以降の4日目から10日目における皮質骨指数の変化量及び両群間の推移に有意な差は認められなかった。

4. 骨密度パラメータ

実験開始時の骨密度パラメータを100としたときの変化率を Fig.5-57、Fig.5-58 に示した。実験期間を通して Control 群の大腿骨頸部は4日目に104%、7日目と10日に107%と推移した。大腿骨幹部中央は4日目に102%、7日目に105% (P=0.0052)、10日目に107% (P=0.0004) と実験開始時に比べ有意に増加した。大腿骨下端は実験開始4日目に112% (P=0.0065) と急激に増加し、7日目には117% (P=0.0002)、10日目には122% (p<0.0001) と増加し続けた。大腿骨上端では、4日は変化がなく、7日目に105%、10日目に107%と推移したが有意な差を示すものではなかった。一方、Fasting 群は測定部位ごとに絶食の影響のパターンは異なった。大腿骨幹部中央は絶食4日目に98%、回復期3日目に101%、回復期6日目には105%と推移し大きな変化は見られなかった。大腿骨頸部は絶食4日目に107%と増加を示したが、回復期3日目には103%、回復期6日目には95%に減少したが、有意な減少を示すものではなかった。大腿骨下端は絶食4日目に82%、回復3日目に97%、回復6日目に115%と推移した。脛骨上端は絶食4日目に88%、回復3日目に99%、回復6日目に107%と推移し、実験開始時に比べ有意な差を認めるものではなかった。

大腿骨頸部における骨密度パラメータの個体別の推移を Fig.5-59、平均値を Fig.5-60 に示した。個体別において、Fasting 群は Control 群と同じように絶食4日目まで増加するが、4日目以降に低下し始める個体やほとんど変化のない個体があった。Control 群の平均値は、実験開始時に 62.5 ± 5.7 であり、4日目には 64.8 ± 5.6 、7日目には 66.4 ± 3.0 、10日目に 66.9 ± 4.5 と緩やかに増加した。一方、Fasting 群は実験開始時に 64.0 ± 6.4 、絶食4日目には 68.1 ± 5.6 と増加したが、回復期3日目にあたる7日目には 65.7 ± 5.4 、回復期6日目にあたる10日目には 60.4 ± 4.5 と減少し、実験終了時には Control 群に比べて有意に低値を示した (P=0.041)。実験開始4日目から10日目におけるパラメータの変化量を比較したところ Control 群 2.1 ± 3.1 に対し、Fasting 群のパラメータは -7.7 ± 6.0 と有意に減少傾向を示した (P=0.0052)。

大腿骨幹部中央における骨密度パラメータの個体別の推移を Fig.5-61、平均値を Fig.5-62 に示した。Fasting 群の個体別においては絶食4日目で減少する個体がある一方で、回復期に入って減少する個体があるなど個体差がみられた。平均値で比較すると、Control 群は、実験開始時に 78.0 ± 2.8 であり、4日目には 79.4 ± 3.4 、回復期3日目にあたる7日目には 82.2 ± 4.7 、10日目には 83.4 ± 4.4 と実験期間を通して緩やかに増加した。一方、Fasting 群は実験開始時に 77.0 ± 3.8 、絶食4日目に 75.7 ± 6.7 と若干減少し、回復期3日目にあたる7日目には 77.7 ± 4.3 、回復期6日目にあたる10日目には 80.8 ± 4.9 と増加した。実験開始4日目から10日目にお

るパラメータの変化量を比較したところ、Control 群では 4.1 ± 1.7 、Fasting 群は 5.1 ± 3.9 であり、有意な差は認められなかった。

大腿骨下端における骨密度パラメーターの個体別の推移を Fig.5-63、平均値を Fig.5-64 に示した。Fasting 群の個体別においては絶食 4 日目で減少し、回復期 3 日目で実験開始時の数値まで回復した個体、回復まで 6 日間を要した個体が存在した一方で、絶食 4 日目で減少した後、実験終了時まで回復しない個体など個体による差がみられた。Control 群の平均値は、実験開始時に 82.5 ± 5.6 であり、4 日目に 92.1 ± 5.4 、回復期 3 日目にあたる 7 日目に 96.2 ± 4.3 、回復期 6 日目にあたる 10 日目に 100.4 ± 6.9 と緩やかに増加した。一方、Fasting 群は実験開始時に 85.3 ± 5.8 であったが、絶食 4 日目に 69.9 ± 4.3 と急激に減少し、Control 群に比べて有意に低い値となった ($p < 0.0001$)。回復期 3 日目にあたる 7 日目に 82.3 ± 10.9 と回復し、回復期 6 日目にあたる 10 日目には 97.5 ± 15.4 と増加した。実験開始 4 日目から 10 日目におけるパラメータの変化量を比較したところ Control 群 8.3 ± 7.3 に対し、Fasting 群では 27.6 ± 12.7 であり、Fasting 群のパラメータの変化量が有意に大きかった ($P = 0.0097$)。

脛骨上端における骨密度パラメーターの個体別の推移を Fig.5-65、平均値を Fig.5-66 に示した。Fasting 群の個体別においては絶食 4 日目で減少するが、摂食再開によって回復し始め、回復期 6 日目には Control 群と同等まで成長する個体や、回復期 3 日目にあたる 7 日目まで減少し続け、7 日目以降に回復し始める個体があった。Control 群の推移を平均値でみると、実験開始時に 76.6 ± 3.1 であり、4 日目にもほぼ変化はなく 76.7 ± 2.7 、7 日目に 80.3 ± 4.0 、10 日目に 81.6 ± 4.8 と増加した。一方、実験開始時に 72.4 ± 2.9 であった Fasting 群は、絶食 4 日目に 63.7 ± 4.1 と大幅に減少し、Control 群に比べ有意に低値を示した ($P = 0.00013$)。回復期 3 日目にあたる 7 日目に 71.4 ± 8.3 と回復し、実験終了時には 77.0 ± 7.1 と増加した。実験開始 4 日目から 10 日目におけるパラメータの変化量を比較したところ Control 群 6.4 ± 3.8 に対し、Fasting 群では 18.5 ± 10.4 であり、Fasting 群のパラメーターの変化量が有意に大きかった ($P = 0.037$)。

V-3- c CT 画像による骨解析に関する実験

1. 摂食量

飼育期間中における両群の摂食量と実験期間中の総摂食量を Fig.5-67 に示した。Fasting 群が摂食を再開した日の摂食量は Control 群が $18.7 \pm 1.4\text{g}$ であったのに対し、Fasting は $11.9 \pm 1.9\text{g}$ と有意に低い値であった ($p < 0.0001$)。しかし、その後徐々に増加し、回復期 6 日目以降には Control 群よりも多く摂食する傾向が見られた。全飼育期間における総摂食量は Control 群が $266.9 \pm 19.0\text{g}$ に対し、Fasting 群は $190.9 \pm 10.5\text{g}$ と有意に低い値を示した ($p < 0.0001$)。

2. 摂水量

各群の摂水量と全飼育期間を通しての総摂水量を Fig.5-68 に示した。Control 群の摂水量は飼育期間を通して 21.0~40.0ml/day であった。一方、Fasting 群の摂水量は、絶食期間中、徐々に減少し、絶食 3 日目 (P=0.00026) と 4 日目 (P=0.00049) には Control 群に比べて有意に低値を示した。しかし、摂食を開始した日の摂水量は Control 群よりも有意に高値を示した (P=0.0098)。全体的にみると、個体差が大きく、群ごとの摂水量に一定の傾向があるわけではなかった。全飼育期間を通しての総摂水量は Control 群で 432.0 ± 46.4 ml、Fasting 群が 340.8 ± 48.5 ml と Fasting 群の摂水量が有意に低値であった (P=0.0061)。

3. 体重

飼育 14 日間における各群の体重を Fig.5-69 に示した。Control 群の体重は実験開始時 132.0 ± 4.9 g、実験終了時には 249.0 ± 15.4 g と飼育実験期間を通じて順調に増加していた。一方、Fasting 群の絶食 4 日目の体重は実験開始時の 131.4 ± 4.5 g から 90.6 ± 3.6 g と急速に減少し、Control 群に比べ有意に低値を示した (p<0.0001)。その後の摂食再開により体重は急速に回復し、実験開始 6 日目から 14 日目における体重増加量は 83.3 ± 15.0 g であり、Control 群の 64.0 ± 5.7 g を上回ったものの、実験終了時における体重は 201.5 ± 11.3 g と有意に低値を示したままであった (p<0.001)。

4. 体長

体長の推移を Fig.5-70 に示した。Control 群は飼育期間を通して緩やかに増加した。一方、実験開始時に 13.80 ± 0.23 cm だった Fasting 群の体長は、絶食 2 日目には 13.86 ± 0.22 cm と変化がなかったものの 4 日目絶食期間において 13.42 ± 0.17 cm と低下した。実験開始 6 日目から 14 日目までの回復期における推移に有意な差は認められなかったが、実験終了時の体長は Control 群で 16.7 ± 0.5 cm、Fasting 群で 15.7 ± 0.3 cm と体長差が認められた (P=0.0015)。

5. 腰椎高と腰椎幅

第二腰椎高と第三腰椎高と第四腰椎高を測定し、その平均値を Fig.5-71 に示した。回帰直線より求めた飼育期間中の Control 群の腰椎高の増加率は 0.086 mm/day に対し、Fasting 群の腰椎高の増加率は 0.077 mm/day と有意に低かった (P=0.0050)。しかし、実験開始 6 日目から 14 日目までの回復期における変化量及び両群の推移に有意な差は認められず、実験終了時の両群の腰椎高の値にも差は認められなかった。

第二腰椎幅と第三腰椎幅と第四腰椎幅を測定し、その平均値を Fig.5-72 に示した。回帰直線より求めた飼育期間中の Control 群の腰椎幅の増加率は 0.020 mm/day、Fasting 群の腰椎幅の増加率は 0.017 mm/day と有意な差は認められず、実験開始 6 日目から 14 日目までの回復期における変化量及び両群の推移に有意な差は認められなかった。実験終了時の腰椎幅の値では Fasting 群の方が有意に低値を示した (P=0.041)。

6. 皮質骨厚

皮質骨厚の変化を Fig.5-73 に示した。皮質骨厚は両群ともほぼ一定の値を推移しており、両群の推移に差は認められなかった。

7. 骨密度

骨密度の変化を Fig.5-74 に示した。Fasting 群の絶食 2 日目の骨密度は $268.2 \pm 10.5 \text{ mg/cm}^3$ と Control 群の $297.5 \pm 10.0 \text{ mg/cm}^3$ に比べて有意に低値を示し ($P=0.0011$)、実験開始 6 日目から 14 日目までの回復期における変化量及び増加率に有意な差は認められなかった。

8. 最小断面二次モーメント

各群の最小断面二次モーメントを Fig.5-75 に示した。実験開始時に $0.513 \pm 0.058 \text{ mg}\cdot\text{cm}$ だった Control 群の最小断面二次モーメントは実験終了時に $1.496 \pm 0.061 \text{ mg}\cdot\text{cm}$ へ増加し、回帰直線より求めた最小断面二次モーメントの増加率は $0.070 \text{ mg}\cdot\text{cm} / \text{day}$ と直線的に増加した。一方、実験開始時に $0.550 \pm 0.054 \text{ mg}\cdot\text{cm}$ だった Fasting 群の最小断面二次モーメントは、絶食 2 日目に $0.646 \pm 0.021 \text{ mg}\cdot\text{cm}$ と Control 群と同様に増加したものの、絶食 4 日目に $0.621 \pm 0.024 \text{ mg}\cdot\text{cm}$ へ減少した。再摂食 2 日目にあたる 6 日目は $0.632 \pm 0.038 \text{ mg}\cdot\text{cm}$ と 2 日目との差はなく推移し、実験開始時から 6 日目までの増加率は $0.011 \text{ mg}\cdot\text{cm} / \text{day}$ であり、Control 群との推移に有意な差が認められた ($P=0.0010$)。実験終了時における Fasting 群の最小断面二次モーメントは $1.093 \pm 0.084 \text{ mg}\cdot\text{cm}$ であり、回復期にあたる実験開始 6 日目から 14 日目における変化量は Control 群で 0.608 ± 0.024 、Fasting 群では 0.462 ± 0.057 と有意に少なかった ($P<0.0001$)。

9. 断面二次極モーメント

断面二次極モーメントを Fig.5-76 に示した。実験開始時に $1.376 \pm 0.135 \text{ mg}\cdot\text{cm}$ だった Control 群の断面二次極モーメントは実験終了時に $3.750 \pm 0.127 \text{ mg}\cdot\text{cm}$ へ増加し、回帰直線より求めた断面二次極モーメントの増加率は $0.163 \text{ mg}\cdot\text{cm} / \text{day}$ と直線的に増加した。一方、実験開始時に $1.521 \pm 0.167 \text{ mg}\cdot\text{cm}$ だった Fasting 群の断面二次極モーメントは、絶食 2 日目に $1.655 \pm 0.049 \text{ mg}\cdot\text{cm}$ 、絶食 4 日目に $1.623 \pm 0.104 \text{ mg}\cdot\text{cm}$ 、再摂食 2 日目にあたる 6 日目は $1.614 \pm 0.075 \text{ mg}\cdot\text{cm}$ と推移し、実験開始時から変化が見られなかった。回帰直線より求めた Fasting 群の実験開始時から 6 日目までの増加率は $0.012 \text{ mg}\cdot\text{cm} / \text{day}$ であり、Control 群との推移に有意な差が認められた ($P<0.0001$)。実験終了時における Fasting 群の断面二次極モーメントは $2.808 \pm 0.237 \text{ mg}\cdot\text{cm}$ であり、回復期にあたる実験開始 6 日目から 14 日目における変化量は Control 群で $1.538 \pm 0.037 \text{ mg}\cdot\text{cm}$ 、Fasting 群では $1.194 \pm 0.202 \text{ mg}\cdot\text{cm}$ と有意に少なかった ($P=0.0080$)。

V-4 考察

骨は骨質、骨膜、骨髄から構成され、さらに骨質は皮質骨と海綿骨に大別される。海綿骨は体内の骨の約 20%を構成し、骨髄腔内の種々の細胞から放出されるサイトカインの影響を受けやすく、皮質骨に比べ血流が豊富であるため骨代謝の回転が速い。通常、女性では閉経に伴いさらに代謝回転が速まることで海綿骨の減少が始まるが、皮質骨の減少は海綿骨減少より遅れて生じることがわかっている¹²²⁾。一方で、皮質骨は全身の骨量の約 80%を占めており、海綿骨の 4 倍と多いが、海綿骨の骨表面積は皮質骨の骨表面積より約 8 倍大きく、身体全体の骨代謝への影響度は両者で差は存在しないとする報告¹²³⁾もある。ラットの低カルシウム食飼育により脛骨の海綿骨では飼育 6 日目までに急激な骨吸収と破骨細胞数の上昇が認められたが、皮質骨では飼育 6 日目で降だったという報告¹²⁴⁾において、皮質骨は年 4%と代謝速度が遅いが、海綿骨の新生骨置換は年 20%だったことが示された。ヒトでは一般的に皮質骨では約 5~7%、海綿骨では約 30%が年間に代謝されることが分かっており、表面積が大きく代謝回転が活発な海綿骨において、閉経による女性ホルモンの影響や薬剤による効果などが皮質骨より顕著に観察されることが知られている。本実験においても、皮質骨の指標となるパラメータに比べて、海綿骨をより多く含むと推定される骨パラメータにおいて絶食の影響が即座に現れていることから、海綿骨はより早期に減少するであろうことが推測され、1 日前後の短期間の絶食が海綿骨量に影響を与える可能性を否定できない。骨には破骨細胞、骨芽細胞、およびその前駆細胞などの細胞成分の他、ミネラルの結晶成分であるヒドロキシアパタイト（リン酸カルシウムの結晶）と線維成分のコラーゲンタンパク、非線維性タンパクのオステオカルシン等が含まれている。新しい骨をつくるために骨組織ではまず、休止期の古い骨基質を破壊（骨吸収）し、その骨の窪に新しい骨成分が埋められ（骨形成）、骨梁が再構築される。骨吸収作用を持つ破骨細胞が骨の表面に接着し、骨表面を融解し骨吸収窩をつくり、この窪（骨吸収窩）に骨芽細胞がライン状に広がって成熟した骨細胞となり窪を埋め戻すという仕組みである。骨吸収窩が骨で満たされるときは骨吸収と骨形成がスムーズに共役（カップリング）しており、良質な骨が新生される。この骨吸収が骨形成より多いと骨は減少し、骨粗鬆症などの骨疾患となる。新しい骨にさらに石灰沈着が起こると骨は硬化して強度を高めるが、石灰化が障害されると荷重に脆弱な異常な骨形成が起きる。骨代謝の目的は骨吸収、骨形成を繰り返しながら、整然とした骨構造を構築、維持し、荷重に抵抗できる骨強度を保ちつつ、生体内カルシウムバランスを保持することである。本実験において、曲げに対する強さを表す最小断面二次モーメントおよびねじれに対する強さを表す断面二次極モーメントが絶食後に減少したことは骨の強度に直結する骨構造の脆弱的变化を示しており、絶食中と再摂食後の骨形成時期を含めて、正常

な石灰化が障害されるなどの何らかの理由で荷重に脆弱な異常な骨形成が起きたことを示唆している。骨吸収により遊離するカルシウムは血中カルシウム濃度の維持に必要であり、骨はカルシウムを供給するための貯蔵庫としても機能している。本実験において、絶食後に骨に生じた変化は、骨吸収と骨形成のバランスを調節する各種ホルモンや骨より分泌されるサイトカインによる骨のリモデリングの変調に原因していることが考えられる。骨吸収と骨形成のバランスを調節しているのが、遠隔の内分泌臓器から分泌される各種のホルモンと、骨組織の細胞より分泌されるサイトカインである。骨代謝に関係するホルモンには副甲状腺ホルモン (PTH)、カルシトニン、ビタミン D、性ホルモン (エストロゲン、アンドロゲン)、グルココルチコイド、トリヨードサイロニンなどがあげられる。パラトルモン、カルシトニン、ビタミン D はカルシウム調節ホルモンで、血中カルシウム濃度のフィードバック調節によって相互に分泌が促進、抑制される。PTH 分泌は血清カルシウムの低下で促進され、血清カルシウムの上昇で抑制される。PTH は遠位尿細管でのカルシウム再吸収を促進し、また、活性型ビタミン D の産生を促進することで、血清カルシウムを上昇させる。PTH が骨に作用すると、破骨細胞の形成を促進し、成熟破骨細胞を活性化することにより骨吸収を促進させる。ビタミン D は肝臓と腎臓で代謝され、活性が高い 1,25 ジヒドロキシビタミン D に変化するので腎臓で産生されるホルモンとみなされている。ビタミン D は腸からのカルシウム吸収を促進し、血中カルシウム濃度を上昇させ、PTH の分泌を抑制する。一方、骨への直接作用として新生された骨に石灰沈着を促す。すなわち、骨吸収の抑制と骨形成の促進を調節する。ビタミン D 欠乏では石灰沈着を伴わない類骨が増加し、くる病、骨軟化症をきたすとされている。本実験において、絶食によって骨密度は低下するものの、6 日間または 10 日間の回復期間において、いずれも速やかに回復していることから、摂食再開後に新生される骨への石灰沈着は速やかに進行し、量的な石灰化は回復されるものと推測される。しかし、その石灰化の部位や分布などの骨構造を決定する何らかの骨形成に不具合を生じながら石灰化が進むことが推測される。

骨量の減少と骨質の変化を検索するために行った一連の本実験において、絶食により減少した体重は摂食再開によって著しく増加し、比較的短期間に体重量の回復が果たされることが示された。

カルシウム出納と骨強度を調べた実験においてカルシウムの見かけの吸収率は、Control 群で実験 16 日目までが最も高く、実験飼育期間につれて低くなる傾向が見られた。ラットにおける様々なカルシウム塩を用いたカルシウム吸収率の実験では、吸収率に幅はみられたもののその利用効率に差はなく、幼若ラットでは 50~90%¹²⁵⁻¹²⁷⁾、成熟ラットにおいては 10~30%^{128, 129)} という報告もあり、吸収率の傾向としては今回の結果と一致した。ヒトにおける見かけのカルシウム吸収率では民族差¹³⁰⁾があり、摂食量¹³¹⁾や食品、または栄養素の相互作用

によっても異なるが、女子の 11~14 歳で $38\pm 18\%$ ¹³²⁾、男子の 9~14 歳で 27%と報告¹³³⁾されている。また、年齢とともにカルシウム吸収率は低下することも知られており、高齢期には男性で 22~27%、女性で 9~14%¹³⁴⁾という報告がある。乳児でのカルシウム吸収率は $61\pm 22\%$ と高く¹³⁵⁾、ヒトとラットでは吸収率に差はあるものの今回の実験ではラットでも同じような推移を示した。見かけのカルシウム貯留量については飼育 16 日まで徐々に増加し約 60mg まで増加したものの、徐々に減少して飼育終了時には約 47mg となっていた。日本において推定されているヒトのカルシウム貯留量は、男女とも 12~14 歳をピークに減少するとしており、特に 20 代のカルシウム貯留量はピーク時の 1/4 に激減する¹³⁶⁾としている。これに比べ、本実験結果では、ラットのカルシウム貯留量は緩やかに減少していた。絶食を付加した **Fasted-early** 群と **Fasted-late & exer** 群の見かけのカルシウム吸収率も成長とともに低下したが、絶食後の再摂食時には見かけのカルシウム吸収率及び貯留量ともに一時的な上昇を示していた。この現象は絶食というカルシウム供給不足の状態に対応して体内カルシウムの損失を抑えようとする一時的緊急の生体防御反応が惹起された可能性を示唆している。ラットを用いた実験で、低カルシウム飼料を与えるとカルシウム吸収率が高まるとの報告¹²⁹⁾があり、今回、絶食後のカルシウム欠乏時に一時的に吸収率・貯留量が増加したことが考えられる。ヒトにおいても、成長、妊娠、授乳期などの生体のカルシウムに対する要求度が高まる時期や低カルシウム食ではカルシウムの吸収率は促進される^{7, 136)}。一方、カルシウム摂取量が十分である状態では、カルシウムの腸管吸収機構により、吸収率は減少するが、吸収される絶対量は多いことが分かっている¹³⁷⁾。本実験においても 1 回目の絶食直後に摂取量は低かったが、見かけのカルシウム吸収率は著しく高く、中期から後期にかけて摂取量が高まると吸収率は下がる傾向が見られ、腸管吸収機構を保っていることが伺えた。しかし、1 回目の絶食中に比べて 2 回目の絶食中では、貯留量の減少が抑えられる傾向を示した。このことから、絶食を繰り返す毎に、絶食というカルシウム供給不足により早く対応して体からのカルシウムの損失をできるだけ抑えようとする生体反応が惹起される可能性が示唆された。**Fasted-early & exer** 群と **Fasted-early** 群の見かけのカルシウム吸収率と見かけのカルシウム貯留量を比較すると、飼育前半においての見かけのカルシウム吸収率は 2 群間でほぼ同様の値を示していたが、飼育 36 日目以降は **Fasted-early & exer** 群の値が **Fasted-early** 群の値よりも 5%~8%ほど高い値を推移しており、見かけのカルシウム貯留量においても同様の結果が認められた。**Fasted-late** 群の見かけのカルシウム吸収率と見かけのカルシウム貯留量は飼育 36 日目までは **Control** 群と同様な推移を示したが、絶食後には一時的な吸収率の増加と貯留量の増加が認められた。**Fasted-late & exer** 群の見かけのカルシウム吸収率は全体に高いレベルで推移しており、ピーク時及び飼育 36 日目も他の群よりも高値を示した。絶食後のリバウンドも顕著であったが、見かけ

のカルシウム貯留量は **Fasted-late** 群よりも常に高い値を推移し、運動負荷により吸収率と貯留量が高まる傾向が示された。ヒトでは生活活動強度が高い者ほどカルシウム吸収率は良く¹³⁸⁾、また、ラットの運動効果を調べた実験における運動という力学的負荷が筋肉を増大させ、骨量及び骨量カルシウム含量を増加させたとの報告¹³⁹⁾と一致する。運動は、成人期や高齢期における見かけのカルシウム吸収率と貯留量の増加に影響していることが示唆されると共に、運動によりカルシウム貯留量を高密度に保っていることが推測された。さらに、**Fasted-early& exer** 群より **Fasted-late & exer** 群の方が、見かけのカルシウム吸収率と貯留量に対する影響が少なかったことから、定期的な運動によりカルシウム貯留量を維持することができても若年期に絶食を行うことは、貯留量を減少させる可能性が示唆された。力学的ストレス、運動は骨の成長に不可欠であり、高カルシウム食を摂取し続けても全く運動をしない場合は骨量の増加は認められないことや、骨の成長にはカルシウムやタンパク質などの適度な栄養補給が必要なことが分かっている。しかし、栄養補給のない状態での運動時における骨代謝に関する影響については報告が見あたらない。骨密度増加のメカニズムとしては微細骨折によるカルシウムの沈着促進が考えられている。これは、衝撃によって骨内部に微細な骨折が発生し、それを修復する伝達機構によってカルシウムの沈着が促進されて骨密度が増加するとする考え方である。その一方で、運動が負荷されると、骨吸収と骨形成はともに活性化されるが、絶食などのカルシウムの供給不足は骨形成に必要なカルシウム不足を引き起こし、骨中のカルシウム濃度は運動量に応じて減少する。

大腿骨の長さや湿重量においては、いずれも各群間に有意な違いを認めることはできなかったが、**exer** 群においては他の群に比べ若干、湿重量が重い傾向にあった。大腿骨中のカルシウム含有量については **Control** 群に比べて **Fasted-early** 群で顕著な低下を示した。**Fasted-late** 群には **Control** 群との差は認められなかったことから、若年期の絶食が成長後の骨密度に影響する可能性を示し、骨粗鬆症にかかりやすい状態を招くことを示唆している。これは、成長期のラットにエネルギー制限を行うと、十分量のカルシウム摂取下においても骨の成長に悪影響を及ぼし、成長期の骨量増加が抑制されるという報告に一致する¹⁴⁰⁾。また、若年および加齢ラットを用いた実験で、エネルギー制限することで骨代謝回転が亢進し、骨形成以上に骨吸収が促進され骨量減少を招くという報告¹⁴¹⁾からも、絶食が骨量増加の抑制に影響していることが示唆された。また、同時期に絶食を負荷した **Fasted-early & exer** 群の大腿骨中のカルシウム含有量については **Control** 群と有意な差はなく、運動負荷によりカルシウム含有量が高まったことが推測された。ヒトのベットレスト実験では、脊椎骨や踵骨から1週間に1%の割合で骨量が減少することが確認されており¹⁴²⁾、基本的に運動という負荷をかけた骨の骨量は増加することが分かっている¹⁴³⁾。ラットの場合も運動負荷をかけると皮質骨厚が増大する¹⁴⁴⁾

という報告があり、今回の実験でも運動負荷が骨量の増加に影響している可能性が示唆された。運動レベルと骨密度の関係に関しては、ヒトにおいては高強度レジスタンス運動を行った運動群でのみ骨密度が有意に増加したと報告^{145,146)}されており、骨密度を高めるためには、低・中強度より高強度の運動が有効であることを示していたが、今回の実験によりラットでは、軽度な自発的運動でも骨密度に影響を与える可能性が示唆された。同様に大腿骨の破断強度についても Fasted-early 群で顕著に低下が認められた。加齢に伴い骨に含有するカルシウム含有量が減少するとともに骨の弾力性も低下する事が明らかとなっており、骨強度は骨密度に依存する¹⁴⁷⁾ことから若年期の絶食による骨密度の低下が、高齢期に歩行障害や寝たきりの原因となる大腿骨骨折を引き起こすであろうことが推測された。絶食により体重は減少傾向を示したが、飼育終了時の 60 日目において Control 群と他群を比較すると体重量には有意な差は認められず、飼育終了後の解剖所見においても大腿骨長及び大腿骨湿重量に有意な差は認められなかった。しかし、絶食を負荷した群のカルシウム貯留量、大腿骨中のカルシウム含有量、破断強度に有意な低下が生じたことから、絶食は骨密度などの骨構造に大きな影響を及ぼすことを推測させる。特に若年期の絶食がより骨構造に大きな変化を与える可能性を示唆している。なお、本研究では、運動の負荷によりカルシウム貯留量を増加させることが確認され、しかも、絶食負荷により低下した破断強度、すなわち骨密度が運動をすることで改善される可能性が示唆された。現在の 10 代、20 代の女性には過度な痩身願望が認められ、減量的手段として安易な絶食を行う傾向があり、減量経験者の多い若年者の骨密度は低いという報告¹⁴⁸⁾からも、若年期の骨密度のレベルを引き上げるには適度な運動と食事が推奨されている¹⁴⁹⁾。本実験結果から、成長期の絶食は骨密度に影響を及ぼしており、骨の成長を抑制して骨の脆弱化を促進する可能性が示唆された。つまり、一番骨量を増加させなければならない成長期に過度な食事制限を行うことは、将来の骨粗鬆症を招くことが懸念される。また、カルシウム貯留量の増加に運動は大きな役割を果たしており、運動による骨密度増加も確認され、成長期からカルシウムに重点を置いた、十分な栄養の摂取と運動の継続が必要と思われる。

次に、本実験では絶食下における骨変化を個体毎に追跡評価するために、ラット大腿骨の単純 X 線像を撮影し、その画像解析によって骨状態を評価することを試みた。8 週間にわたり低カルシウム、低マグネシウム食の食事制限を行ったラットにおいて大腿骨の骨幹部の骨密度、骨面積、皮質骨幅が低下したという報告¹⁵⁰⁾や、3 週間にわたり 50% 食事制限を行ったラットにおいて大腿骨の骨密度が低下したという報告¹⁵¹⁾、また、本実験でのカルシウム出納実験においても絶食により骨強度や骨中カルシウム含量の低下したことなどから、長期間にわたるカルシウム不足による骨量減少については確認されている。

本研究では、絶食による骨の変化を調べるため、絶食期間を4日間、その後の再摂食期間を6日間に設定し、絶食群（Fasting 群）と自由摂食群（Control 群）の2群について、各個体を経時的に観察し、骨パラメータ（ Σ GS/D、GSmin、GSmax、CTI）を追跡評価した。飼育終了後の大腿骨長と大腿骨湿重量の比較では、Fasting 群の骨長が有意に低く、骨湿重量も Fasting 群の方が低値の傾向を示した。大腿骨長が低値を示した原因として甲状腺ホルモンの産生低下が考えられる。ヒトや他の哺乳類で甲状腺ホルモンは骨端軟骨の骨形成、骨の長軸方向への成長、骨端の骨成長中心の成熟を刺激し、特に、T3 は軟骨性成長板の軟骨細胞の成熟と活性を促進する¹⁵²⁾。絶食により TSH の分泌低下と、その結果としての甲状腺ホルモンの分泌の低下、また、体脂肪の減少によるレプチンの減少に伴う甲状腺ホルモンの産生低下によって、骨端の成長が阻害されたと考えられる。また、骨長と骨量獲得にはタイムラグがあり、特に成長期での骨長成長速度は骨密度増加に先行するという報告¹⁵³⁾や CXD 法で得た単位骨幅当たりの平均の骨塩量の増加のピークは身長増加のピークより 2~3 年遅れて発現したという報告¹⁵⁴⁾がある。今回の研究でも大腿骨湿重量は有意に低値を示さなかったにもかかわらず大腿骨長が有意に低値を示したのは、増加する場合と同様に減少についても大腿骨湿重量より大腿骨長への影響が早期に及んだためだと推測される。なお、ラットの骨変化はヒトでみられる変化と類似しているという報告¹⁵⁵⁾があることから、今回の結果はヒトでも同じような結果が得られる可能性が高いと推測する。骨パラメータを比較すると、GSmax については Control 群と Fasting 群ともに各個体の推移に大きな変動は認められず、両群ともほぼ同じ値を推移したが、GSmin は絶食により有意に低値を示し、再摂食3日目も低値を示していた。しかし、実験終了時には低値を示していたものの有意な差を示すものではなかった。CTI は絶食4日目に低値を示したものの有意な差ではなく、再摂食後、3日目に有意に低値を示した。GSmax は皮質骨のみの値を反映しているが、GSmin には皮質骨だけでなく、皮質骨の内側に存在する骨髄を含めた値が反映されていると考える。CTI は皮質骨指数を表し、骨幅に対する皮質骨の割合を表した指数である。海綿骨は皮質骨よりも骨代謝が早い傾向にあるため、今回の結果でも絶食により海綿骨が多いパラメータである GSmin が早期に影響を受けたことが伺えた。一方で、CTI においては皮質骨の骨代謝が遅いため、影響にタイムラグがあり、絶食期間ではなく、再摂食後に有意な低下をもたらしたと推測される。部位に対する絶食の影響を調べるために、大腿骨頸部、大腿骨幹部中央、脛骨上端、脛骨下端の骨密度を群間比較したところ、Fasting 群では大腿骨上端と下端において絶食負荷により有意に低値を示し、摂食再開3日まで有意な低値を示した。特に大腿骨下端において著しい骨密度の低下が確認された。幹部中央においては Fasting 群が Control 群に比べ低い傾向にあったが、有意な差を示すものではなく絶食の影響を確認できなかった。しかし、大腿骨頸部については、

Fasting 群において摂食再開後に低値を示しはじめ、実験終了時には有意に低値を示した。なお、骨密度について実験開始時の値を 100 とし、変化率に関して各部位で比較したところ、Control 群では順調に増加し、特に大腿骨下端が他の部位に比べ有意に増加したことが確認された。Fasting 群では絶食により、脛骨上端、脛骨下端が低値を示したが、摂食再開により順調に増加した。一方、大腿骨頸部は絶食の影響を受けずに増加を示していたが摂食再開後に低下が認められ、実験終了時まで低下し続けた。幹部中央は実験終了時まで変化が乏しく、見かけ上、絶食の影響を受けにくい可能性を示した。これには、代謝回転速度の早い海綿骨をより多く含んでいる部位が早期に絶食の影響を受けたことが推測される。皮質骨と海綿骨の構成比率を部位別にみると、大腿骨頸部は皮質骨 75%、海綿骨 25%であり、大腿骨幹部中央は皮質骨 95%以上、海綿骨 5%以下である。大腿骨下端や脛骨上端は骨端線に近い部位なので海綿骨の割合が大腿骨頸部や大腿骨幹部中央に比べ高いと考えられる。大腿骨頸部と大腿骨幹部中央が、大腿骨下端と脛骨上端が同じような骨密度パラメータの動きをしていたことは、その構成が類似していることが要因だと推測される。また、大腿骨下端が脛骨上端に比べ大きく変化していたことに関しては、Control 群の大腿骨下端と脛骨上端をみても大腿骨下端の方が大きく増加しているため、大腿骨下端は盛んに骨代謝が行われていることが伺えた。その要因として、骨代謝には力学的負荷が関係していることから、大腿骨下端は膝の上にあるため脛骨上端よりも力学的負荷がかかる可能性や、海綿骨の割合が大腿骨下端の方が高いという可能性なども推測される。本研究結果より、大腿骨のカルシウム貯留量の減少や大腿骨長の差は、海綿骨を多く含む骨端部の骨量減少による影響が大きいものと考えられる。そのため、海綿骨を多く含む骨端部から絶食によるカルシウム不足に起因した骨量減少が生じるものと推察された。

さらに、絶食による骨密度の変化を経時的に詳細に調べるため、摂食再開後 10 日間に渡って、麻酔下でラット大腿骨の CT 画像を撮影し、その画像解析によって骨状態を評価することを試みた。骨成長を反映する体長の経時的变化をみると、絶食負荷 2 日目より Fasting 群は Control 群に比べて低値を示し、実験終了時には Control 群と Fasting 群で 1cm の体長差を確認した。CT 画像の解析結果では、Control 群の腰椎高は緩やかに増加し、腰椎幅は緩やかに増加後、実験 10 日目以降には一定の値を推移しているのが確認された。一方、Fasting 群では腰椎高は絶食 4 日目から、腰椎幅は絶食 2 日目から骨成長が阻害され低値を示し始めた。その後、腰椎高・幅とも摂食再開 2 日目以降に緩やかに上昇し始めたが、Control 群に比べると有意に低値を示していた。実験終了時には腰椎高は Control 群と同レベルまで回復したが、腰椎幅は実験終了時まで有意に低値なままであった。また、Control 群の骨密度は実験期間を通して緩やかに増加したのに対し、Fasting 群は絶食負荷により増加が抑制され、摂食再開 2 日

目まで有意に低値を示した。その後、骨密度は急速に回復し、骨サイズに見合う骨量が回復することが確認され、皮質骨厚の測定結果では有意な差は認められなかった。カルシウムが不足すると、PTH 分泌亢進に伴い、骨吸収が促進され、骨からのカルシウム流出が増加するため、骨量減少が起きる。ラットを用いた実験で、低カルシウム飼料での飼育により PTH が上昇し、骨端部海綿骨及び皮質骨並びに骨塩量や皮質骨幅が減少するという報告¹⁵⁶⁾や低カルシウム飼料にて飼育した若齢ラットでは発育及び骨密度が低かったという報告¹⁵⁷⁾や発育期初期の骨形成が盛んな時期に低カルシウム食を与えることで成長による骨密度の上昇が阻害されたという報告¹⁵⁸⁾などカルシウムが骨に与える影響を調べた様々な動物を用いた栄養実験が行われており、最も極端な栄養欠乏である絶食を負荷した本実験でも、骨量と骨密度の低下にはカルシウム欠乏が主たる因子であると推測する。

ヒトを対象として骨量と身体組成の関連を調べた研究では 9 歳から 22 歳のいずれの年齢区分でも女性においては骨量と体重、BMI、除脂肪量、体脂肪率のすべての体格指数で有意な正の相関を認められたとの報告¹⁵⁹⁾がある。また、小児を対象とした研究においても女子では筋肉、内臓量、脂肪量は同程度で骨塩量の増加に関与すると報告¹⁶⁰⁾されている。さらに、体重が重い人の方が骨への物理的重量負荷が大きくなることにより骨量により影響を及ぼすという報告³¹⁾や、筋量を増やすような運動を実施することは腰椎の骨量を増加させるなどの報告¹⁶¹⁾もあり、体組成が骨量増加に及ぼす影響は大きいと考えられる。本実験でも、絶食による脂肪や筋肉の減少、その結果としての体重減少が、骨への物理的負荷を小さくしていたものと推測される。4 日間の絶食による体重減少に伴う骨量と骨密度の低下はカルシウムやタンパク質欠乏、すなわち骨成分量の減少を示すものであるが、同時に、体脂肪の減少、および、体重減少による骨への物理的重量負荷の減少など、インタクトな骨構造を構築する上で必要な何らかの骨への刺激が消失した状態で骨成分が骨から不整に失われるというメカニズムの存在を示唆しているものと考えられる。

絶食後、摂食を再開した再摂食期間では、Fasting 群の骨密度は Control 群と同レベルにまで回復する様子が確認される一方、骨強度を示すパラメータであり「曲げに対する強さ」を表す最小断面二次モーメントと「ねじれに対する強さ」を表す断面二次極モーメントは、一向に回復しないことが明らかになった。最小断面二次モーメントと断面二次極モーメントの値は、算定方法から明らかなように、ミネラル成分のマクロ的分布に依存した値であり、骨のマクロ構造を反映した骨質のパラメータの一つと考えられる。本実験結果から、4 日間の絶食は、腰椎の骨量を低下させるだけでなく骨質の変化を来し、これらが相まって骨を脆弱化させるものと推測される。そして摂食再開後、Fasting 群の骨密度は急速に回復して摂食再開後 4 日目以降では Control 群との差は認められなかったが、一方で、最小断面二次モーメン

トと断面二次極モーメントの値は再摂食 2 日目まで変化しなかった上、再摂食期間の推移の増加率は Fasting 群で有意に小さく、Control 群との差が飼育期間の延長とともに拡大したことを示した。すなわち、絶食によって低下した骨量は摂食再開後すみやかに回復するが、絶食によって変化した骨質は摂食再開後も容易に回復しないことが示唆された。構造物である骨の強度が骨量のみならず骨質にも依存することは明らかであることから、骨質の回復が進まないということは骨強度も回復しないことを推測させる。

骨強度に対して骨質が重要な役割を果たしていることが注目されはじめ、2 型糖尿病患者の骨密度が対照群より有意に高値であるにも関わらず、椎体骨折リスクは糖尿病群で有意に高いことが明らかとなり、その要因として骨質の劣化が指摘された¹⁶²⁾。なお、2 型糖尿病においては骨が脆弱化する主な要因として、コラーゲンの劣化による骨質の劣化が報告されている。これはコラーゲン同士を結合させている架橋において、酵素依存的な「生理的架橋」と高血糖により増加したペントシジンなどの終末糖化産物 (advanced glycation end products : AGEs) が形成する「AGEs 架橋」のうち、高血糖状態が AGEs の産生を亢進させ「AGEs 架橋」が増加することで骨強度が低下することを明らかにしたものである¹⁶³⁾。本研究で示された最小断面二次モーメントと断面二次極モーメントの低値が如何なる骨質を意味するのか、具体的な骨構造の変化を明確に説明することは難しい。少なくとも、本実験において絶食が惹起した骨質の変化は、コラーゲンの劣化という分子レベルの骨構造変化とは違ったものであると考えられる。ミネラル成分のマクロ的分布に依存した値である最小断面二次モーメントと断面二次極モーメントの低下は骨のマクロ形態変化に起因する骨強度の低下を示唆しており、よりミクロな形態変化と思われるコラーゲンの架橋構造の変化などに起因した骨の脆弱化とは別の骨質変化であろうことを示唆している。

骨強度に関連する研究として、骨吸収抑制剤による骨粗鬆症治療においては、プラセボ群と比較して骨密度増加が殆ど認められなくても骨折を 22%減少させ、8%の骨密度増加で骨折発生頻度を半分に抑制できることがメタアナリシスで認められた報告¹⁶⁴⁾、ラロキシフェン投与のプラセボ群に対する椎体骨密度増加率は 2~3%でも椎体骨折発生頻度が 30~60%減少したという報告^{165,166)}などがある。1990 年代には BMD の改善だけでは骨強度が改善されないことを示唆する臨床例や BMD は低くないのに骨折が発生する臨床例が報告されるようになり、骨折リスクの上昇は骨密度の低下のみでは説明できないことが明らかとなり、骨強度は「骨密度」と「骨質」の二つの要因から成り、骨強度の 70%を骨密度が、残りの 30%を骨質が担うとする考えが現在では提唱されている¹⁶⁷⁾。骨の病態生理の解明が進み、骨微細構造、骨代謝回転、骨微細損傷、石灰化などの骨構造が骨強度に深く関与することが分かってきた。骨の内部構造は複雑であり、観察する解像度のスケールによって階層的構造をもち、そのス

スケールごとに異なる骨質の関連因子が存在し、よりマイクロなスケールにおける因子は、よりマクロなスケールにおける因子に影響を与える。例えば、ミリ(mm)単位程度のスケールで見ると、骨質には骨全体の形態、すなわちサイズや形状、骨密度の空間的分布が関係するが、それ以下のミクロン(μm)単位でみてみると、骨梁の微細構造、多孔性、皮質骨の厚み、骨小腔の数や形態、リモデリングキャティの数またはサイズや分布が骨質に関与する。ミクロンからサブミクロン($>\mu\text{m}$)レベルでは石灰化とコラーゲンの分布やその配列、マイクロダメージのタイプや量・分布が骨質に関与する。さらに微細なナノ(nm)レベルではコラーゲンの架橋構造、石灰化のタイプや結晶の配向、コラーゲンと石灰における界面が骨質に関与し、これらは骨リモデリングによる制御を受け相互に連動しながら骨強度に寄与¹⁶⁸⁾。リモデリングの過剰は骨密度の減少を引き起こすが、逆にリモデリングの過度の抑制は石灰化を亢進させると同時に、古い骨がリモデリングされずに残り続けることにより、骨微細損傷の蓄積を増加させて、骨材質の劣化を引き起こす可能性がある。絶食により骨成分の供給不足が生じると、高骨代謝回転型の障害、すなわち、骨吸収で作られた骨吸収窩が骨形成で埋められる前に、次の骨吸収が行われるようになり、骨形成が間に合わなくなるという現象が生じる。骨力学特性を左右するのは、骨を構成する主要な無機成分であるヒドロキシアパタイトの結晶サイズ、およびその分布であると報告¹⁶⁹⁾されており、骨密度の分布特性により骨強度が変化すると考えるのが合理的である。カルシウム欠乏食を3週間与え虚弱骨を惹起した後、カルシウムを含有した標準食を3週間与えたときの走査電顕的所見では、Control群と比べて骨吸収が行われた面が増加し、不定形の骨小腔が多く、周囲基質との境界が不明瞭となっていたと報告¹⁷⁰⁾されており、本実験でも絶食による栄養不足で引き起こされた不整な骨吸収が進み、10日間の再摂食期間に骨量が回復したにも関わらず、骨の構造に関しては元の状態に回復することを阻害したものと推察された。また、思春期に相当する生後8週齢のラットをカルシウム摂取不足により骨を虚弱化させ、その後長期のカルシウム補給により食餌療法を行った場合、骨塩量に関しては十分に回復したが、骨形態の回復は困難であったという報告¹⁷¹⁾もあり、一度骨が虚弱化すると、骨密度と骨強度は必ずしも相伴って回復するものではないと考えられる。本実験において、絶食後の摂食再開により骨サイズに見合った骨量、すなわち骨密度が回復したにも関わらず、骨構造上は骨吸収でできた骨吸収窩がきれいに修復されずに、骨成分の分布が不整となりインタクトな骨構造が回復せず、骨強度が低下したのではないかと考えられた。また、同様な理由で、断面二次極モーメントも骨密度と同じような回復が見られなかったと考えられる。

骨粗鬆症とは易骨折性を呈する疾患で、これまでは骨量(骨密度)の低下がその主たる原因と考えられてきた。そのため、治療や予防においては骨密度を増加させることに主眼を置

きがちであるが、骨の強度は「骨量」に加えて「骨質」に大きく依存していることが明らかとなってきた。骨吸収抑制剤による骨粗鬆症治療において骨密度増加がほとんど認められなくても骨折発症率が減少するとの報告¹⁶⁴⁾は、骨微細構造、骨代謝回転、骨微細損傷、石灰化など種々の要因が関与したいわゆる「骨質」が骨強度を大きく左右していた可能性を示唆している。骨質を評価する事は容易ではない。骨代謝動態を非侵襲的に評価する方法で骨代謝マーカーによる測定があり、間接的ではあるが骨質評価にも利用される。ただし、骨代謝マーカーは全身の骨の総和を反映する指標であるため局所的な情報は得られない点や病態による骨代謝亢進とは区別ができないなどの問題点がある。骨質を反映する生化学マーカーは現在のところ存在が確認できておらず、AGEs 架橋の過形成を示すペントシジンやホモシステインをマーカーとした評価の試み¹⁷²⁾がなされている。骨の評価として一般的に用いられている骨密度の測定には二重エネルギーX線吸収測定法(DXA法)が広汎に普及しており骨粗鬆症の診断基準に利用されているが、直接的な骨質の評価は不可能である。一方で、CTによる画像解析を利用した微細構造解析法¹⁷³⁾である定量的コンピュータ断層法(QCT法)では、海綿骨と皮質骨を分離して測定でき体積密度や骨サイズも評価できるが、コストや被曝線量がDXA法に比べて大きいことが問題である。最近では、CT測定データをもとにした有限要素解析により骨強度を評価する手法¹⁷⁴⁾、DXAデータに基づき構造指標や骨密度指標を算出するHSA¹⁷⁵⁾などの評価法がある。本研究において、CT画像データより求めた二つの物理的性質、すなわち、曲げに対する強さの指標である最小断面二次モーメントとねじれに対する強さの指標である断面二次極モーメントの減少は「骨質」を構成する物理的特性の一つを捉えたものと考えられ、今後の「骨質」解明に向けた研究において有効な骨パラメータの一つとして利用できるかもしれないと著者は考えている。また、骨質に変化が生じた場合、これが完全に解消されていわゆるインタクた構造に回復するためには骨リモデリングの1サイクルを待つ必要がある。骨リモデリングサイクルの期間は動物によって異なるとはいえ、どの動物種に対しても十分に長期間に及ぶ組織傷害を残すことになる。

以上の4日間の絶食実験から、絶食により減少した骨量は摂食再開により速やかに回復するものの、絶食により変化した骨質は長期にわたって回復されない難回復性の傷害として残ることが明らかとなった。絶食が引き起こす骨質の変化は骨強度の低下をもたらすことから、骨粗鬆症の予防栄養学上で注目すべき知見であると考えられる。また、この現象は、我が国の青少年男女の多くが経験する痩身ダイエットが成人後の骨構造を脆弱化させ、中高年となった将来の骨粗鬆症発症の大きなリスクファクターとなる可能性を示唆しているのかもしれない。

第VI章 絶食による行動パターンの変化と脳組織の微小構造変化

VI-1 緒言

減量を目的とした絶食を含む極端なダイエットが骨・筋肉・貯蔵脂肪を始めとした広範な体組織の機能と形態に影響を及ぼすことは多くの研究者によって様々な報告^{1,46-49)}がなされている。しかしながら、脳機能に着目した報告は研究方法の困難さもあって例は少なく、脳の神経組織への影響を観察した報告もあまり見当たらない。絶食が脳の機能と構造に如何なる影響を与えるのかについて、得られている知見は僅かである。

現代において若年女性の多くは痩身願望が強く、標準体型もしくはやせ体型にも関わらず「自分は太っている」との認識から必要以上に減量を試み、自己流の痩身ダイエット行動に励む傾向がみられる⁹⁾。メディアに露出している多くの女性がやせている、またはやせすぎていることがこのような誤った体型認識を生じさせる一因を担い、「やせている方が魅力的」といった社会的な価値観の蔓延が痩身願望を助長していると考えられる。そして、自己流の痩身ダイエットとして安易に絶食を実行する者が多数存在することは様々な栄養調査の結果より指摘されている⁷⁻⁹⁾。過度な食事制限を行ったダイエット経験者ややせの者は、不整月経を生じ易く、骨密度が低い傾向にあるのみならず、将来的な生活習慣病発症のリスクを高める³⁰⁾ことが危惧されている。また、やせの母親が胎児に与える影響も多大であり、胎児への栄養不足は出生後の健康を左右し、胎児が成人後の生活習慣病発症のリスクをも高める^{31, 32, 52, 176)}ことが明らかとなっている。やせや栄養不良が将来的にもたらす身体的影響が明らかになってきた^{31, 32)}が、絶食といった極端な栄養不足状態が脳にどのような影響を及ぼすかの知見は乏しい。また、るいそうには到らない、一般女性の多くが経験する短期の絶食といった低栄養が、神経組織とくに中枢神経組織の萎縮や機能低下などを引き起こすかどうかについてもほとんど報告が無く、明らかにされていない。

過度な食事制限は制限開始直後に体重が減少しやすいため安易に行う傾向にあるが、自己流の痩身ダイエットは摂食障害のきっかけになりやすい^{9, 177, 178)}。摂食障害は主に神経性食欲不振症(anorexia nervosa)と神経性過食症(bulimia nervosa)に大別される。anorexia nervosaは強い痩身願望と肥満恐怖に根ざし、絶食をとまなう摂食制限が繰り返されることで体重が過度に減少することで発症し、重症化すると臓器の萎縮、脳萎縮、骨粗鬆症、無月経、低体温、除脈などの身体異常¹⁷⁹⁾や低栄養にも関わらず過活動を示すなどの行動異常⁴³⁾がみられる。脳に関して言えば、AN患者の脳CT画像において脳室の拡大や大脳皮質の萎縮が見られ

る場合がある^{41,42)}。これを脱水による可逆的萎縮^{41,42)}とみなす一方、患者の体重が回復しても脳萎縮のCT所見は正常化しない症例報告¹⁸⁰⁾もあり、絶食といった極端な栄養不足状態が脳にどのような影響を及ぼすのかは明らかとされていない⁵⁶⁾。

そこで、本研究では低栄養が脳機能に及ぼす影響を明らかにするために、短期の絶食といった低栄養を実験動物に負荷して脳機能の一表現としての摂食飲水行動と移動行動の変化および脳組織の構造の変化について検索した。なお、エストロゲン¹⁸¹⁾や黄体形成ホルモン¹⁸²⁾は摂食調整に関わって摂食パターンに影響することが知られていることから、実験動物には、性周期の影響を除外するために、雄性成熟マウスを使用した。

本研究では、極端な痩身ダイエットとして短期一過性の絶食を設定し、絶食が脳組織の機能と形態に及ぼす影響を及ぼすのかを解明する一助とすることを目的として動物を用いた検索を試みた。実験は、マウスの絶食時における行動変化及び脳組織構造についてマクロ形態および顕微的な観察を行った。

VI-2 方法

1. 動物

16週齢のC57BL/6J雄性成熟マウス(CLEA Japan社)計10匹をControl群5匹、Fasting群5匹の2群に分けた。飼育飼料はCE-2標準固形飼料(CLEA Rodent Diet CE-2飼育繁殖用、Table 6-1)とし、K2CABIN飼育中のみ同成分の粉末飼料を用いた。飲用水は水道水を用い自由摂取とした。通常の飼料摂取量を測定するため、実験開始前に粉末飼料摂取の馴化期間を1週間設定した。その後、単独飼育にて摂取量測定実験(第1実験期間)に移行した。単独飼育を継続したまま移動行動測定実験に移行(第2実験期間)し、続けて給餌制限実験(第3実験期間)に移行した。Fasting群における給餌制限実験は、飲水のみ自由摂取可能とし、飼料を除外する絶食負荷として絶食期間は3日間とした。実験デザインをFig6-1に示した。

飼育室は $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ の恒温防音室となっており、07:00–19:00を明期とする12時間明暗周期の照明環境とした。

2. 観察による行動解析

① 摂食飲水行動

飲水ボトルとCE-2粉末飼料を用いた自由摂取条件での摂取パターンを観測するために、K2CABINシステム(PhenotypeAnalyzing社、Fig.6-2-A)を用いた。K2CABINは単独飼育用の常駐型マウス飼育筐体となっており、筐体の一隅に井戸型の餌穴が設置してある。餌穴はマウスの頭蓋径より小さくなっているため、脱出不可能となっている。マウス

は固形飼料とは異なり、粉末飼料を持ち運ぶことができないため、正確な摂取量を算定することができる。飼育筐体の餌穴の下には餌皿を設置した秤量器が設置され、連続 10 回測定値の平均値を 3 分間隔で自動秤量するシステムとなっている。この計測値から摂取パターン、摂取リズム等の計測を行った¹⁸³⁾。

② 移動行動の量的変化及びリズム変化

常駐型マウス行動測定機器である KUROBOX システム (PhenotypeAnalyzing 社、Fig.6-2-B,C) を用いて、単独飼育下でのマウスの移動行動を計測した。赤外線センサーによる重心位置移動軌跡の測定から移動行動における移動距離、移動速度および移動角度を算出し、それぞれの経時変化を観察した¹⁸⁴⁻¹⁸⁶⁾。

3. 体重および脳組織摘出

マウスの体重測定は、明期の 13:00-15:00 の間に測定した。制限給餌期間を 3 日間とし連日個体重量を測定した。脳組織の摘出にあたっては、熟練者による頸椎脱臼でマウスを屠殺した後、死亡を確認してから脳組織の摘出を迅速に行った。

4. 脳組織の微細構造観察

① KB 染色⁵⁸⁾による観察

3 日間絶食させた Fasting 群と Control 群について、頸椎脱臼後直ちに開胸し、リン酸緩衝液 50ml を左心室より灌流した後、続けて 30ml の 5%パラホルムアルデヒドを灌流した。その後、断頭し、頭蓋骨の背側より脳組織を摘出した。脳組織標本は 2 日間浸漬固定を行い、パラフィンにて包埋処理を行った。包埋した組織は LEICASM2000R (Leica 社) を用いて 9 μ m に薄切した後、KB 染色を行って光学顕微鏡で観察した。

② 免疫抗体染色法⁵⁸⁾による観察

神経幹細胞マーカーであるネスチン抗体を用いて免疫染色¹⁸⁷⁾を行い、蛍光顕微鏡 (ZEISS 社) で観察した。観察部位は、脳室周囲および海馬歯状回とした。

5. 統計処理

統計処理は SPSS 株式会社製 PASW Statistics17 を用いた。群間の差の検定には student の t 検定を行った。なお、統計学的有意水準は $p < 0.05$ と定めた。

6. 実験動物の取扱い

本動物実験は、長崎県立大学動物実験委員会に承認 (承認番号 24-14) されて、長崎県立大学および日本の動物の愛護及び管理に関する法律 (法律第 105 号) と実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準 (告示第 6 号) の、動物実験ガイドラインに従って行われた。

VI-3 結果

1. 摂食飲水行動

マウスの摂食飲水行動結果を示した。マウスは通常夜間活動性であり、C57BL/6 マウスにおいても暗期での活動亢進が認められた。摂食行動、飲水行動ともに、暗期（19:00-07:00）に頻回の摂取行動が観察された。暗期直前に摂取活動は開始され、明期になると摂取行動は減衰しているのがわかった。摂取行動のピークは 22:00-24:00 付近にみられた。典型例を Fig.6-3-A に示した。

摂食量及び摂取量については個体ごとの差はみられなかった。実験に用いた 10 匹の摂食量と飲水量の測定量の平均値を Fig.6-3-B,C に示した。実験開始 1 日目の摂食量は $4.2\pm 0.8\text{g}$ 、飲水量は $4.1\pm 0.4\text{g}$ 、5 日目の摂食量は $4.7\pm 0.8\text{g}$ 、摂水量は $4.7\pm 0.8\text{g}$ であり日ごとの変化は少なかった。

2. 移動行動の量的変化及びリズム変化

マウスの自由摂食及び自由摂水下での移動行動を測定した。個体により差は認められなかったため、平均の測定結果を Fig.6-4 に示す。摂食飲水活動と同様に、暗期のほうが明期より活発であり、やはり夜行性であることが確認された (Fig.6-4-A)。KUROBOX 筐体単独飼育環境での 1 日あたりの平均移動行動は、暗期の 12 時間では $100\pm 34\text{m}$ 、明期の 12 時間では $32\pm 19\text{m}$ 移動していた。また、暗期の活動量は 1 日の 76% を占め明期の約 3 倍亢進していた (Fig.6-4-B)。

次に、Fasting 群における絶食負荷時のマウスの移動行動を測定した。典型的な行動パターンを Fig.6-5-A に示す。絶食負荷時のマウスでは移動行動が亢進し、行動リズムに狂いが生じていることが観察された。また、絶食負荷中の 1 日の平均移動距離を比較したところ、Control 群が $132\pm 44\text{m}$ に対し、Fasting 群では $1222\pm 490\text{m}$ となり有意に Fasting 群の活動が亢進した ($P=0.0077$) (Fig.6-5-B)。

次に、測定されたマウスの移動における速度ごとの出現頻度を示し、比較した (Fig.6-5-C)。Control 群と比べて、Fasting 群では高速移動及びその移動回数が頻発し、行動観察所見においても探索運動などの常同行動とは異なる瞬発的な移動や動作が観察され、絶食中における過活動が見いだされた。なお、このような過活動は絶食負荷中の 3 日間に急速に進行することが観察された。

3. 脳の構造観察

4 日間の絶食負荷後の摘出脳の組織観察によれば特記すべき所見は見いだされず、マクロ写真像による詳細な観察においても脳萎縮等の異常所見は観察されなかったものの、Fasting

群の脳においては、脳表面の光沢や脳組織表面のキメの細かさが失われている印象があった (Fig.6-6)。

4. KB 染色による観察

髄鞘形成や大脳皮質厚に差はなく、海馬、視床、視床下部組織の萎縮や脳室の拡大もみられなかった (Fig.6-7-A)。総じて絶食による変化は観察できなかった。

海馬組織周辺の顕微鏡画像においても、アンモン角の錐体細胞、歯状回の顆粒細胞、細胞体の大きさ、細胞核の性状に変化は認められなかった (Fig.6-7-B)。

5. 免疫抗体染色法による観察

通常飼育においては、脳室下帯領域で、一視野中に複数のネスチン陽性細胞を観察することができるが、絶食マウスでは同領域でのネスチン陽性細胞はほとんど観察できなかった (Fig.6-8-A)。

海馬歯状回領域においても、歯状回基底部に複数のネスチン陽性細胞を観察することが出来たが、絶食を負荷したマウスでは、同領域でのネスチン陽性細胞はほとんど観察できなかった (Fig.6-8-B)。絶食マウスで多数観察された数珠状の陽性細胞は赤血球細胞であり、絶食マウスにおいては、海馬歯状回と脳室下帯の神経新生細胞が消失していた。

VI-4 考察

本実験では、脳の機能と構造に及ぼす絶食の影響を調べるため、マウスを用いて絶食期間中の摂食飲水行動パターンと移動行動パターン、および絶食後の脳組織観察を行った。

夜行性であるマウスは昼間の活動低下と夜間の活動亢進という一定の活動リズムを持っている。ラットを用いた実験では、摂取エネルギーが不足すると脳の覚醒レベルが上昇し、自発運動量が増加することが報告¹⁸⁸⁾されているが、マウスに絶食を負荷した本実験においても絶食中のマウスには異常とも判断されるような行動が観察された。また、本実験では新たに開発した試験装置によって、絶食がマウスの移動行動やリズムに影響を与えるか否かについて詳細に検索した結果、絶食はマウスの活動リズムを変化させることを見いだした。絶食中、マウスの運動量は顕著に増加するとともに、活動内容の変化として、とくに俊敏（高速）な移動行動が頻発する現象が観察された。絶食はマウスの運動量を増加させるのみならず、俊敏な行動を頻発させ、いわゆる常同運動(Stereotyped behavior)を著しく亢進させることを明らかにした。生体リズムを制御する視床下部視交叉上核には摂食刺激と光刺激を感受する神経経路（いずれも視床下部諸核に存在する）が投射されており、マウスの活動リズムが変化したことは中枢である視床下部に機能異常が生じた可能性を示唆するものとする。

著しい栄養障害（栄養欠乏）は、脳組織構造に影響を及ぼし、病変像を示すことがある。ラットをビタミン B₂ 欠乏食で飼育すると、大脳および小脳においてミエリン膜の主要な構成成分であるセレブロシド、スフィンゴミエリン、フォスファチディルエタノールアミンの比率が著明に低下することが報告¹⁸⁹⁾されている。ヒトでは、拒食のために Wernicke 脳症を来した自閉症児例で、ビタミン剤の入らない点滴のみで 3 週間過ごしてビタミン B₁ 欠乏となった時、MRI での大脳所見では基底核に T2 強調画像と FLAIR 画像で高信号を認めるなどの大脳基底核病変が認められた¹⁹⁰⁾。また、透析患者の大脳白質病変を調べた研究では、低栄養状態を示す指標に該当する項目が多い者ほど大脳白質病変（white matter lesions : WMLs）のスコアが高くなる可能性が示された¹⁹¹⁾。本実験のマウスを用いた 3 日間の絶食負荷実験でも第 2 章でのラットを用いた実験結果と同様に脳重量の減量は観察されず、ある程度の栄養欠乏に対する脳の減量抵抗性が伺えた。しかし、肉眼的所見において、脳組織表面の光沢や精密さがやや失われていたことから、脳萎縮こそ認められなかったものの、絶食によって大脳皮質表層の糖鎖（glycochain）構造やリン脂質構成に何らかの変化が生じた可能性は否定できない。絶食により食事からの糖質供給が絶たれた場合、体内に蓄えられたグリコーゲンが分解され、ブドウ糖を脳に供給する。脳組織には主にグリア細胞にグリコーゲンが貯蔵されていることから、こうした脳グリコーゲンの分解が脳組織表面への変化を引き起こした可能性も考えられる。

脳組織を観察した本実験結果では、KB 染色された脳組織の光顕的観察において絶食に起因した明瞭な組織変化を認めることはできなかった。しかし、免疫染色で観察した脳組織の光顕的観察では、Control 群に認められた海馬歯状回と脳室下帯でのネスチン陽性細胞が Fasting 群では消失する現象が認められた。成体期においても側脳室前方上衣下層（SVZ）と海馬体の下位領域である歯状回では、新しいニューロンが産生され続けている。SVZ で産生された新生ニューロンは、分裂しながら rostral migratory stream (RMS) と呼ばれる長い経路をさらに前方の嗅球へと移動し、最終的に顆粒細胞および傍糸球体細胞に分化する¹⁹²⁾。歯状回では歯状回顆粒細胞層（GCL）と海馬歯状回門（hilus）の境界領域（Subgranularzone, SGZ）でニューロンが産生された後、GCL に移動・分化し¹⁹³⁻¹⁹⁶⁾、成熟した顆粒細胞は、海馬 CA3 領域で海馬錐体細胞とシナプスを形成することにより、機能的なニューロンとして海馬内の回路に組み込まれる^{197, 198)}。通常、神経幹細胞マーカーであるネスチン抗体を用いた免疫染色にて海馬歯状回領域では歯状回基底部に複数のネスチン陽性細胞を観察することが出来る。この抗体はニューロンへの分化の前段階のほとんどすべての細胞に結合して陽性を示すことが分かっている^{199, 200)}。本実験では、Control 群のマウスにおいて海馬周辺組織にニューロン新生を示すネスチン陽性反応を多く観察することができた。しかし、Fasting 群ではネスチン陽性細胞

は消退しており、海馬歯状回と脳室下帯での神経新生が阻害されている観察結果を得た。これは、絶食によりグリア細胞貯蔵のグリコーゲンが枯渇し、神経新生のためのエネルギー源が不足したことが一因となっているのかもしれない。原因の解明は今後の課題であるが、絶食がニューロン新生を阻害するとの本知見は、絶食が脳組織の構造を変化させる具体的可能性を示唆した最初であり、極めて興味深い。いまだ、絶食が脳に及ぼす影響についての知見が乏しい中、本実験結果は、短期の絶食が脳機能に大きな生理的ダメージを与えるとともに脳微細組織の構造変化を惹起することを明らかにしており、絶食が難回復性の影響を脳に及ぼす可能性が示された。

第Ⅶ章 一過性短期の絶食が体組成に及ぼす難回復性の変化をもたらす可能性に関する考察

近代、経済の発展にともなって食糧事情が豊かになった欧米先進国および BRICs（ブラジル・ロシア・インド・中国）など、経済が発展して食糧供給が潤沢となった国々では急速に国民の肥満割合が増加し、肥満に起因した生活習慣病の増加が重大な健康問題となった²⁰¹⁾ことから、その予防対策に注力するようになってきた。人類が長年悩まされてきた飢餓を始めとする「栄養欠乏症」に対する関心が乏しくなる反面、飽食によって引き起こされる「栄養過剰症」が大きくクローズアップされている。我が国においても戦後の高度経済成長を経て食糧事情は好転し、1970年代以降現在まで国民平均的には理想に近い栄養摂取状況が続き、世界の多くの国から近代日本食は健康食の代名詞のように受け止められるようになっている。国民の栄養状態が良好である反面、それを支える豊か過ぎる食糧事情に起因した食料問題までも発生するようになってきた。溢れるように流通する豊富な食料の内、一部が消費期限切れなどによって食用に供されることなく無駄に廃棄されるという食品ロスが社会問題化するなど、食料が溢れた飽食の時代と言える状況にある。一方で、急速に国民の肥満割合が増加する他の欧米先進国とは違って、我が国の栄養問題は肥満だけが問題ではない。我が国では、食糧が豊富な状況にありながら自らの食事制限に起因した食物摂取不足による「栄養欠乏症」が新たな栄養問題として注目されるようになってきた。

一般の動物ではありえない、ヒトに特有のこの特異的な「栄養欠乏症」は、とくに若年女性に集中していることが一つの特徴であり、性差の垣根が低くなってきた最近では男性にも広がりつつある栄養問題である。とくに若年女性の低栄養状態は骨密度の低下を招く要因であり将来における骨粗鬆症の発症リスクを高め、寝たきり老人の増加を引き起こす可能性もある。また、妊娠期の低栄養状態が胎児及び胎児が成人後の生活習慣病のリスクを高めることも報告されており、若年女性の「栄養欠乏症」の問題は本人の健康問題だけでなく、生まれてくる子供に対する影響も大きいことを認識しなければならない。一般に若年女性は過度に瘦身願望が強い傾向にある。この瘦身志向の構成概念として、やせのメリット感、自己体型への否定感、性的成熟への抵抗感、異性意識の4因子で成り立っていることが明らかにされている^{59, 202)}。この否定感と抵抗感は思春期において身体的成熟を機に自分の身体への注目が高まり、今まで慣れ親しんできた身体意識とは異なった感覚や理想とする体型と現在の自己体型とのギャップ、更に、やせが美しいとされる社会的背景において自分の体型への否定的感情が高まる要因となっている⁹³⁾。なお、ダイエットの実態を調査した研究において「食事量を減らす」や「欠食をする」という安易な瘦身手段を行っている者が多いことが報告さ

れており⁸⁾、自己流の痩身ダイエットが蔓延しているのが現状である。栄養調査などによってやせの者や痩身ダイエット経験者を対象として食習慣や栄養摂取状況を調べた研究は多く、それらによって日常的栄養摂取状況の不良に起因した身体への様々な悪影響については多くの報告がなされてきた。しかし、一過性急性の栄養障害とみなされる短期の絶食は、仮に身体に与える影響があったとしても摂食再開後に容易に回復するという認識が大勢である。しかし、実際に一過性急性の栄養障害とみなされる短期の絶食が身体にいかなる影響を及ぼすのかについて調べた研究は少ない。また、短期の絶食が骨や脂肪、筋肉、あるいは脳の組織学的構造に長期間残存する影響を及ぼすのかどうかについてはほとんど調べられていない。そこで、本研究では一過性の栄養障害である短期の絶食が身体組織に対してどのような影響を及ぼすのか、また、摂食再開後に速やかな可逆的回復が行われるのか否かについて、包括的に理解することを目的として、組織学的検索を中心的な手技として調べた。

実験は、まず、絶食による身体への包括的影響を知るために絶食前後における主要臓器の観察を行った。ヒトは飢餓状態におかれると生命活動を維持するために体内に貯蓄していたグリコーゲンや中性脂肪、ついで筋肉などをエネルギー源として分解利用するため、絶食が続くと体重が急激に減少する。本研究では、動物を用いて、体重減少にともなう体脂肪量や筋肉量の変化のみならず、主要各臓器重量の変化についても調べた。その結果、4日間の絶食において湿重量が大きく減少した臓器は肝臓、脾臓、胸腺であった。肝臓重量の減少は絶食によりグリコーゲンをはじめとする肝臓貯蔵物質の分解によるものであり、脾臓重量の減少は赤芽球細胞の減少によるものだと考えられる。栄養不良の状況下ではリンパ系組織の萎縮が見られ、T細胞が著しく減少するため、T細胞の分化を担う胸腺でも重量の減少が観察されたと考えられる。相対重量あたりで観察すると減少量が比較的少なかったのが副腎と腎臓であり、体重の減少割合に相応していたのが心臓だった。今回の結果において脳組織では、絶食後の重量の変化は観察できなかったことから他の臓器よりも強い飢餓への抵抗性が考えられた。絶食を負荷するとエネルギー源として利用可能な組織から優先的に分解利用され、実質組織が速やかに萎縮することが確認された。中長期的栄養欠乏によって免疫機能が低下することはよく知られていることだが、免疫機能や免疫細胞の合成に参与する微量栄養素が供給されなくなったことも免疫系臓器の萎縮を助長するのかもしれない。生命活動を維持するためにより重要な器官である心臓、さらには中枢神経系といった組織は他の臓器に比べると絶食の影響を受けにくいことが組織萎縮の観察から推察された。栄養供給が絶たれた状況において生命維持に必要な身体機能を保全するために優先順位を持って臓器が保護される身体対応が見て取れる。

本研究では、絶食による増減が最も大きい臓器である脂肪組織と筋組織に着目して調べた。

日本人の肥満は国際基準で比較すると多くは過体重に区分される軽微な肥満であり、BMI=30 を超える肥満者は 3.9%と欧米諸国と比べると圧倒的に少ない¹³⁾。しかし、日本人は遺伝的に内臓脂肪を蓄積しやすい上、この内臓脂肪蓄積に影響されて発症リスクが増加する各種生活習慣病が多いことから、我が国の肥満者の割合が少ないからといって肥満の問題は軽視すべきではないと指摘する者もいる。内臓脂肪は蓄積も早い分解も早い脂肪であり、過剰に蓄積されると脂肪細胞が肥大・増殖し、生理活性物質の分泌異常が現れ、生活習慣病発症のリスクを高める原因⁷⁾とされている。本実験においてラットに絶食を負荷し、絶食期間中の体脂肪の減少を経時的に観察したところ内臓脂肪が絶食 2 日で消失し、皮下脂肪が絶食 4 日で消失した。摂食再開により、内臓脂肪の方が先に増加し、続いて皮下脂肪の急激な増加が観察された。絶食中における脂肪減少は絶食開始時の脂肪蓄積量の多寡にしたがっており、脂肪蓄積量の多い個体ほど、体脂肪が消失されるのに時間を要した。なお、自由摂食下で飼育したラットでは、実験開始時に脂肪量が多いと実験期間中及び実験終了時も常に脂肪量が多く、明確な関係性が認められた。これに反して、絶食させたラットの摂食再開後の脂肪蓄積は、摂食量の個体差があまり無いにも関わらず、個体差が非常に大きく、また、個体毎に見ると絶食前の脂肪蓄積量と摂食再開後に蓄積される脂肪量との間には関係性が乏しいことが確認された。また、内臓脂肪と皮下脂肪について絶食前の蓄積量と摂食再開後に蓄積された脂肪量とを比較分析したところ、両者にも関係性がまったく認められなかった。しかし、ラットの脂肪量の変化について検討したところ、絶食群については特に回復期間の脂肪量の増加が大きく、特に皮下脂肪量においては回復期間の延長に伴ってますます増加する可能性を示唆した。一度飢餓状況下におかれた身体は次に訪れる飢餓に備え、エネルギー消費を抑制するように遺伝子の発現を基礎とした生体反応が惹起されることが考えられるが、おそらくその程度には遺伝的形質が強く影響し、摂食再開後の脂肪蓄積能に大きな個体差を生じさせたことが推測された。これは、ラットが生まれて初めて体験した絶食により引き起こされた急激な体内環境変化が、体内脂質代謝制御系の賦活化に係わる何らかの因子を誘導する遺伝子発現を刺激する原因となったことを示唆していると考ええる。絶食前後において体内貯蔵脂肪の分布と量が変化するという本研究の知見は、一過性の栄養障害である絶食は個体の体脂肪の体内蓄積に関して一過性の影響のみならず長期間回復されない影響をラットに与える可能性を明らかにした。このような絶食を契機とした体組成の変化は、絶食によって引き起こされる長く回復困難となる組織学的変容として注目されるべき現象であると考ええる。おそらくはヒトにおいても、急激な痩身ダイエット(絶食)は摂食再開時の体脂肪蓄積を促進して体脂肪率の上昇を引き起こして肥満を誘導すること、また、誘導される肥満の程度には遺伝的素因に基づいた大きな個体差があること、が推測される。さらに筋組織への絶食の影響を観

察したところ、特に大腿部における筋組織重量の減少量は体重の減少量に比べて大きく、回復期間中の回復量も回復スピードも遅いという結果を示した。回復後の筋組織重量は同体重の Control 群と比べると少なく、体重量が回復したとしても筋組織重量は簡単に回復しない可能性を示した。絶食を負荷すると減少する割合が大きいのが筋組織であり、通常の食事を再開すると脂肪を体内に蓄積し体重を回復していることが推測された。絶食を負荷すると優先して脂肪を蓄積するように応答が変化し、結果として筋組織が少ないことでより消費エネルギーが少なく、太りやすい体組成へと変化することが確認され、絶食が難回復性の体組成変化を引き起こす可能性を示唆した。

本研究では、筋組織と脂肪組織と並んで体重に占める割合が大きな骨組織に及ぼす絶食の影響を詳しく調べた。骨粗鬆症の予防対策には若年期に最大骨量を引き上げておくことが重要であり、骨量の増加には十分なカルシウム摂取とタンパク質摂取、適度な運動が必要である。まず、絶食下及び絶食時に運動を負荷した時のカルシウム出納量や骨強度について観察した。絶食時期の影響を観察するために、若年期を想定した Fasted-early 群と成長後に絶食を負荷した Fasted-late 群を設け、さらにこれらに自発運動を負荷した実験群を設定し、ラットを 60 日間飼育して見かけのカルシウム吸収率と見かけのカルシウム貯留量を算出した。いずれの群もカルシウム吸収率は成長とともに低下し、カルシウム貯留量は成長に伴い増加したが、一定時期を過ぎると停滞し、その後はゆるやかに減少した。この応答はヒトにおける加齢に伴う骨量の変化と一致している。また、絶食を負荷したラットでは摂食を開始した直後に一時的にカルシウム吸収率と貯留量がともに上昇し、リバウンドとみられる現象が観察されたが、Fasted-early 群では Control 群や Fasted-late 群に比べて実験終了時の吸収率と貯留量は低値を示した。しかし、Fasting 群に自発運動を負荷すると、吸収率ならびに貯留量は増加し、特に Fasted-late 群に自発運動を負荷した場合には Control 群よりも高値を推移した。このことは運動習慣がカルシウムの代謝に影響していることを示し、ラットの場合は絶食をしても自発運動を負荷すると見かけのカルシウム吸収率と貯留量が維持されることが示された。しかしながら、実験終了後の骨長や湿重量に有意差は認められなかったものの、大腿骨中のカルシウム含有量を比較したところ Fasted-early 群で顕著な低下を示し、破断強度も同様に有意に低下を示した。これらの応答は若年期に絶食を行うと最大カルシウム貯留量が低値となり、高齢期でのカルシウム吸収率や貯留量に多大な影響を及ぼす可能性を示唆している。絶食を負荷しても回復期を経た実験終了時には骨長や骨重量に大きな変化は認められなかったが、カルシウム貯留量や強度に差が認められたことから、再摂食を行い栄養状態が改善され見かけ上は回復したかのように見えるが、元のインタクトな骨構造状態へと回復しないことが示唆された。そこで、これらの骨内部の詳細な情報を得るために、軟 X 線画像と CT 画像より

絶食及び絶食後の回復期の骨パラメータの推移の過程を追跡し、検討した。皮質骨関連パラメータのうち絶食による影響を全く受けない指標と絶食によって急激に低下する指標とがあり、低下した指標も回復過程は一律ではなく、回復速度が異なるものであった。大腿骨において頸部と幹部中央、脛骨上端と下端の骨密度パラメータを比較したところ、部位により骨密度に違いが示された。Control 群の骨密度の推移を観察すると、成長するにつれてどの部位も増加したが、特に大腿骨下端の骨密度は大きく上昇した。絶食を負荷すると特に大腿骨下端及び上端が顕著に低値を示したが、回復期には速やかに回復し実験終了時には有意な差はみられなくなった。大腿骨頸部は絶食を負荷しても変化はみられなかったが、実験終了時において有意に低値を示した。一方で、大腿骨幹部中央は絶食を負荷しても Control 群と比べると低い傾向ではあったが、有意な差を認めるものではなかった。絶食を行うと骨代謝の回転が速い海綿骨が即座に影響を受け、海綿骨を多く含む大腿骨上端と下端の骨密度が減少したことが観察された。主に皮質骨で構成される大腿骨骨幹部では有意な変化が認められなかったことから皮質骨への絶食の影響は少ないとも考えられるが、骨密度は低値で推移していたことや大腿骨頸部への影響が絶食直後ではなく実験終了時であったことから、皮質骨への影響が遅れて現れた可能性が考えられる。なお、今回、大腿骨頸部は小転子部を含んだ部位を観察した。小転子部は股関節の屈曲に関与する筋肉があるため骨密度の低下をある程度防いでいたことも考えられる。特に、大腿骨頸部での骨密度の低下は骨折の要因となりやすい。さらに CT 画像により腰椎の高さと幅の観察を行った。腰椎高は絶食 4 日目に増加の抑制が確認されたが、実験終了時には Control 群との値に有意な差は認められなかった。腰椎幅は絶食負荷により増加が抑制され、実験終了時まで影響が残る結果となった。骨密度は Control 群に比べると、絶食期には有意に低値を示したが、回復期において速やかに増加し、実験終了時には有意な差がないほどに回復した。しかし、骨の強度を示すパラメータである最小断面二次モーメントや断面二次極モーメントは絶食によってその増加が抑制され、摂食を再開させてもその回復は緩慢で、実験期間の延長に伴い Control 群との差が大きく広がった結果となった。椎体骨は大部分が海綿骨であるため、絶食による影響が大きく現れた可能性が考えられる。摂食再開後、回復期間を経て骨密度は回復したが、絶食によって変化した骨質は容易に回復しなかったことが示唆された。絶食によって壊れた構造は元の状態へ再構築できない可能性が示唆され、特に若年期の絶食は骨構造を脆弱化させて骨強度の低下を招くことが推測された。本研究結果から、一過性短期間の栄養障害とされる絶食によって減少した骨量は摂食再開により速やかに回復するものの、絶食により変化した骨質は長期にわたって回復されない難回復性の変化として残る可能性が示唆された。絶食が引き起こす骨質の変化は骨強度の低下を来すことから、骨粗鬆症の予防栄養学上で注目すべき知見であると考えられる。また、

この現象は、我が国の青少年男女の多くが経験する痩身ダイエットが成人後の骨構造を脆弱化させ、中高年となった将来の骨粗鬆症発症の大きなリスクファクターとなる可能性を示唆しているのかもしれない。

本研究では、絶食による組織萎縮がほとんど認められなかった脳について絶食の影響を調べた。飢餓状態に陥ると体内ではインスリンの分泌が抑制され、細胞へのグルコースの取り込みを抑え優先的に脳へグルコースを供給するような仕組みが働くが、供給するグルコースが不足すると脳は栄養源を脂肪酸より生成されたケトン体へと切り替えて活動維持を図る。このような仕組みからも脳は他の臓器よりも飢餓への抵抗性があると推測され、絶食により体重が減少しても脳の湿重量に大きな変化が見られなかったことから脳の飢餓への耐性は強いと考えられる。しかし、ヒトにおける摂食障害患者やウサギを用いた低栄養あるいは絶食負荷実験において脳の萎縮が観察された報告^{203,204}もあることから、長期にわたって反復される絶食は、脳の重量変化を引き起こすであろうことは予想される。また、一連の絶食実験を通して、絶食期間の飼育中のマウスやラットには異常とも判断されるような行動がみられたことから、4日間の絶食を負荷したラットの脳組織を摘出し、海馬体と大脳皮質の運動野を光顕的及び電顕的に検索した。光学顕微鏡での観察では、海馬組織の細胞体の大きさや形状に何らかの絶食の影響を認めることはできなかったが、絶食させたラットの電子顕微鏡における観察では、Fasting 群で細胞質内に複数の小胞を認める細胞が多く観察された。栄養が十分に存在する状況でも恒常的にオートファジーは起こるが、低インスリン状態や低アミノ酸状態によりオートファジーが活性化する。本実験で観察された所見も、このような機序による絶食への細胞の応答ではないかと考えられる。このように脳の細胞内を観察した時に通常とは異なる様子が観察されたことから細胞レベルでは影響を受けており、長期の絶食がもたらしたこの現象が生命活動に与える影響については知見が乏しいと考える。体外からの栄養が絶たれた時に生じる脳の構造や細胞レベルの変化を調べるために絶食させたマウスの脳組織について免疫染色法を用いて詳細に観察した。その結果、Fasting 群ではネスチン陽性細胞は消退しており、海馬歯状回と脳室下帯での神経新生が阻害されている観察結果を得た。近年の研究では成体の海馬でもニューロンの新生が起こっていることが立証されている。Fasting 群で観察されたネスチン陽性細胞の喪失は、絶食によりグリア細胞貯蔵のグリコーゲンが枯渇し、神経新生のためのエネルギー源が不足したことが一因と考えられる。この海馬新生ニューロンは加齢や認知症、精神疾患の患者において減少するとされているが、絶食によるニューロン消失を確認した研究報告はなく、今回の実験ではじめて確認された。絶食がニューロン新生を阻害するとの本知見は、絶食が脳組織の構造を変化させる具体的可能性を示唆した最初であり、極めて興味深い。また、本実験結果から、絶食は個体の行動に著しい

変化を及ぼしている可能性が観察された。どの実験区においても Fasting 群の特徴的な点として、いずれも絶食時期に運動量が大きく増加することが認められていたが、行動パターンを詳細に調べたところ、昼夜の区別のない常同行動の亢進が観察され、活動リズムの変化が認められた。飢餓状態に陥った際にはエネルギー消費を抑制する反応とともに食物を摂食する行動や咀嚼を促進する仕組み²⁰⁵⁾が報告されているが、飢餓状態での生体リズムの変化は亢進された摂食行動の一種なのかもしれない。ヒトでの報告では、朝食の欠食により記憶力や学習成績の低下が認められるとされ²⁰⁶⁾、文部科学省が実施した「平成 20 年度全国学力・学習状況調査」においては朝食を毎日食べる子どもの平均正答率が高い傾向にあることが報告されている。また、大学生や社会人を対象とした調査では朝食摂取の習慣が希望大学への合格状況や年収に有意な差を認めたとし、その差は脳の発達に影響するものだと関連づけている。欠食、すなわち短時間の絶食が脳機能にネガティブな影響を及ぼすことを示唆する研究報告は散見されるものの、具体的に絶食が脳機能にどのような影響を及ぼすのかに関する実験的検証を行った報告はほとんど見当たらない。いまだ、絶食が脳に及ぼす影響についての知見が乏しい中、本研究結果は、短期の絶食が脳組織構造に与える生理的ダメージを光顕的・電顕的観察により示した点で意義が大きいと考える。

一般には、絶食は細胞レベルでアンチエイジングをもたらしたり、延命効果があるなどといった噂が先行し、断食ダイエットが一部のマスメディアで取り上げられているが、先行研究においてエネルギー制限により寿命が延びるとした動物実験例の報告²⁰⁷⁾はあるもののヒトにおいてそれを証明する明確なデータは見当たらない。特に断続した絶食負荷を施した実験は単細胞生物や昆虫類、齧歯類に限定され、ヒトにおける寿命延長の効果は推測の範疇にしかない。少なくとも本研究結果においては、上述のような一般的に言われている絶食の肯定的効果に一致する知見は見出せなかった。今回の一連の実験において、絶食がもたらす様々な影響を検討した結果として、一過性短期の栄養障害とみなされる絶食によって、様々な生体組織に難回復性の変化を及ぼす可能性が様々示唆された。従来は、単発で短期間の栄養欠乏にしか過ぎない絶食は回復が容易な一過性の栄養欠乏であり、大きな栄養問題ではないと多くの研究者に認識されていたが、本研究結果はこの認識に大きな疑問を提起することになったと考える。本研究で得られた最も重要な成果は、一過性短期間の絶食は、必ずしも軽微な一過性の栄養不足に止まらず、生体に対して難回復性の傷害を惹起する可能性を有した重大な栄養欠乏になり得る事を示した点にある。

スリムボディを獲得するためのダイエット方法が若年者を中心として氾濫している現代社会において、絶食をとまなう過度な食事制限が身体にもたらすかもしれないネガティブな影響に関する情報を発信することは予防医学上の大きな意義があると著者は考えている。我

が国の青少年男女の多くが経験する痩身ダイエットが身体に与えるかもしれない様々なネガティブな影響について、本研究が広く人々への認知を深めるための一助とならんことを願って本稿を閉じることとする。

引用文献

- 1) Tinsley GM, La Bounty PM. *Nutr Rev* 2015; 73(10): 661-674.
- 2) Johnstone A. Fasting for weight loss: an effective strategy or latest dieting trend? *Int J Obes* 2015; 39(5): 727-733.
- 3) Sutton EF, Beyl R, Early KS, Cefalu WT, Ravussin E, Peterson CM. Early time-restricted feeding improves insulin sensitivity, blood pressure, and oxidative stress even without weight loss in men with prediabetes. *Cell Metab* 2018; 27(6): 1212- 1221.
- 4) 鈴木仁一, 山内祐一, 堀川正敏, 玉淵嘉郎, 真壁道夫. 新しい絶食療法の方法と治療成績. *精神身体医学* 1972; 12: 290-295.
- 5) Sekizuka E, Sekizuka D, Zheng T. Fasting therapy, a medicine for human rescue: live a life with fasting, yoga and brown rice. *Glycative Stress Res* 2018; 5(4): 181-191.
- 6) 江崎淳二, 上野隆. オートファジー減弱と老化の関わり. *日本老年医学誌* 2011; 48(6): 606-612.
- 7) 金田英美, 菅野幸子, 佐野文美, 西田美佐, 吉池信男, 山本茂. 我が国の子供における「やせ」の現状:系統的レビュー. *栄養学雑誌* 2004; 62(6): 347-360.
- 8) 田中恵子, 池田順子, 東あかね, 中澤敦子, 中谷素子, 入江祐子, 松村淳子, 杉野成. 20歳代女性住民におけるやせ・普通体格のダイエット実践者の生活習慣 —平成10年度京都府民健康づくり・栄養調査より—. *栄養学雑誌* 2005; 63: 267-274.
- 9) Kaneko K, Kiriike N, Ikenaga K, Miyawaki D, Yamagami S. Weight and shape concerns and dieting behaviours among pre-adolescents and adolescents in Japan. *Psychiatry Clin Neurosci* 1999; 53(3): 365-371.
- 10) Cheng CW, Adams GB, Perin L, Wei M, Zhou X, Lam BS, Da Sacco S, Mirisola M, Quinn DI, Dorff TB, Kopchick JJ, Longo VD. Prolonged fasting reduces IGF-1/PKA to promote hematopoietic-stem-cell-based regeneration and reverse immunosuppression. *Cell Stem Cell* 2014; 14(6): 810-823.
- 11) Heilbronn LK, Smith SR, Martin CK, Anton SD, Ravussin E. Alternate-day fasting in nonobese subjects: effects on body weight, body composition, and energy metabolism. *Am J Clin Nutr* 2005; 81(1): 69-73.
- 12) The GBD 2015 Obesity Collaborators (Afshin et al.). Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years. *N Engl J Med* 2017; 377:13-27. DOI: 10.1056/NEJMoa1614362.

- 13) 厚生労働省. 平成 28 年国民健康・栄養調査報告.
<https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/eiyoudl/h28-houkoku.pdf>.(2019/6/30)
- 14) Walston J, Silver K, Bogardus C, Knowler WC, Celi FS, Austin S, Manning B, Strosberg AD, Stern MP, Raben N, Sorkin JD, Roth J, Shuldiner AR. Time of onset of non-insulin-dependent diabetes mellitus and genetic variation in the β 3-adrenergic-receptor gene. *N Engl J Med* 1995; 333(6): 343-347.
- 15) Shiwaku K, Nogi A, Anuurad E, Kitajima K, Enkhmaa B, Shimono K, Yamane Y. Difficulty in losing weight by behavioral intervention for women with Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenergic receptor gene. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27(9): 1028-1036.
- 16) Oppert JM, Vohl MC, Chagnon M, Dionne FT, Cassard-Doulcier AM, Ricquier D, Pérusse L, Bouchard C. DNA polymorphism in the uncoupling protein (UCP) gene and human body fat. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1994; 18(8): 526-531.
- 17) Nagai N, Sakane N, Ueno LM, Hamada T, Moritani T. The-3826A-->G variant of the uncoupling protein-1 gene diminishes postprandial thermogenesis after a high fat meal in healthy boys. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(12): 5661-5667.
- 18) WHO Expert Consultation. Appropriate body-mass index for Asian population and intervention strategies. *Lancet* 2004; 363: 157-163.
- 19) 水元芳. 国際的「持続可能な開発目標 (SDGs)」と日本の課題. *フードシステム* 2017; 24(2): 75-81.
- 20) 野村真利香, 石川みどり, 田中久子. 栄養と持続可能な開発目標 (Sustainable Development Goals: SDGs) –日本の公衆栄養の歴史からの学び– *保健医療科学* 2017; 66(4): 415-424.
- 21) 辻本宏美, 山田和子, 森岡郁晴. やせ願望のあるやせ・やせ傾向の女子中学生におけるダイエット経験とその関連因子. *日衛誌* 2013; 68: 197-206.
- 22) Wardle J, Haase AM, Steptoe A. Body image and weight control in young adults: international comparisons in university students from 22 countries. *Int J Obes* 2006; 30(4): 644-651.
- 23) 丸山千寿子, 伊藤桂子, 木地本礼子, 今村素子, 土井桂子, 田中たえ子, 阿部恒男, 江澤郁子. 女子学生における食行動異常に関する研究(第 1 報)–小学生高学年より大学生までのやせ願望とダイエットについて–. *思春期学* 1993; 11: 51-56.
- 24) 文部科学省. 平成 28 年度学校保健統計調査.
http://www.mext.go.jp/component/b_menu/other/_icsFiles/afieldfile/2017/03/27/1380548_03.pdf. (2019/6/30)

- 25) 小田切陽一, 内田博之, 小山勝弘. わが国の肥満傾向児と痩身傾向児の出現率に対する年齢一時代-コホート効果(1977-2006)と2007-2016年の出現率の推計. 日本公衛誌 2013; 60(6):356-369.
- 26) 生魚薫. 学校保健における新しい体格判定基準の検討-新基準と旧基準の比較、および新基準による肥満傾向児並びに痩身傾向児の出現頻度にみられる1980年度から2006年度にかけての年次推移について-. 小児保健研究 2010; 69(1): 6-13.
- 27) WHO. Global Database on Body Mass Index.
[https://www.who.int/nutrition/databases/\(2016/12/3\)](https://www.who.int/nutrition/databases/(2016/12/3))
- 28) FAO, IFAD, UNICEF, WFP, WHO. 2018. The state of food security and nutrition in the world 2018. Building climate resilience for food security and nutrition. Rome, FAO.
- 29) 厚生労働省. 平成21年国民健康・栄養調査報告.
<https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/eiyoudl/h21-houkoku-01.pdf>. (2019/6/30)
- 30) Sasazuki S, Inoue M, Tsuji I, Sugawara Y, Tamakoshi A, Matsuo K, Wakai K, Nagata C, Tanaka K, Mizoue T, Tsugane S. Body mass index and mortality from all causes and major causes in Japanese: results of a pooled analysis of 7 large-scale cohort studies. *J Epidemiol* 2011; 21(6): 417-430.
- 31) Barker D. The best start in life. 2003 Centry, London/福岡秀興監訳, 藤井留美訳. 胎内で成人病は始まっている. ソニーマガジン社, 東京, 2005.
- 32) 福岡秀興. 胎児期の低栄養と成人病(生活習慣病)の発症. 栄養学雑誌 2010; 68(1): 3-7.
- 33) 厚生労働科学研究費補助金障害者対策総合研究事業 摂食障害の診療体制整備に関する研究. 安藤哲也. 平成27年度研究報告書(厚生労働科学研究成果データベース閲覧システム)
<file://Downloads/201516024A0001.pdf>. (2019/7/7)
- 34) Vort D, Vort JG. 田宮信雄, 村松正實, 八木達彦, 遠藤斗志也(訳). ヴォート基礎生化学 第4版. 東京化学同人, 2014.
- 35) Izumida Y, Yahagi N, Takeuchi Y, Nishi M, Shikama A, Takarada A, Masuda Y, Kubota M, Matsuzaka T, Nakagawa Y, Iizuka Y, Itaka K, Kataoka K, Shioda S, Niiijima A, Yamada T, Katagiri H, Nagai R, Yamada N, Kadowaki T, Shimano H. Glycogen shortage during fasting triggers liver-brain-adipose neurocircuitry to facilitate fat utilization. *Nat Commun* 2013; doi: 10.1038/ncomms3316.
- 36) 中村丁次. 肥満の食事療法. 日健診誌 1990; 17(4): 372-375.
- 37) Dennis TV, Luigi F, Edward PW. Bone mineral density response to caloric restriction-induced weight loss or exercise-induced weight loss. *Arch Intern Med* 2006; 166(22): 2502-2510.

- 38) 前坂明子, 長谷川行洋. 神経性食思不全症における骨粗鬆症. *CLINICAL CALCIUM* 2003; 13(12): 1570-1576.
- 39) 塚本計昌. 思春期ラットの虚弱下顎骨に対する食餌療法に関する研究—形態計測及び骨塩量による評価—. *小児歯科誌* 2000; 3(5): 941-952.
- 40) 間瀬知紀, 宮脇千恵美, 甲田勝康, 藤田裕規, 沖田善光, 小原久未子, 見正富美子, 中村晴信. 女子学生における正常体重肥満と食行動との関連性. *日本公衛誌* 2012; 59(6): 371-379.
- 41) 喜多鈴江, 百溪陽三, 安井昌之, 東雄司. 神経性食欲不振症患者にみられた CT 上の可逆性脳萎縮像. *精神医学* 1981; 23(7): 697-705.
- 42) Artmann H, Grau H, Adelman M, Schleiffer R. Reversible and non-reversible enlargement of cerebrospinal fluid spaces in anorexia nervosa. *Neuroradiology* 1985; 27(4): 304-312.
- 43) Gull WW. Anorexia nervosa (apepsia hysterica, anorexia hysterica). *Tr Clin Soc London* 1873; 7: 22-28.
- 44) 川原健資, 山本晴義, 江花昭一, 津久井要, 秋庭篤代, 境洋二郎, 吉内一浩. 絶食療法の治療効果に影響する心身医学的要因. *心身医* 2000; 40(3): 237-246.
- 45) Nussbaum M, Shenker IR, Mark J, Klein M. Cerebral atrophy in anorexia nervosa. *J Pediatr* 1980; 96(5): 867-869.
- 46) 広田孝子, 城谷万希子, 中林明子, 藤木雅美, 木藤由紀子, 佐々木公子, 廣田憲二. 若年者のライフスタイルと骨密度. *Osteoporosis Jpn* 1994; 2: 117-119.
- 47) 江澤郁子. 間違ったダイエットの骨への影響. *日本家政誌* 2001; 52(10): 1029-1034.
- 48) Neumark-Sztainer D, Wall M, Story M, Standish AR. Dieting and unhealthy weight control behaviors during adolescence: associations with 10-year changes in body mass index. *J Adolescent Health* 2012; 50: 80-86.
- 49) Varady KA. Intermittent versus daily calorie restriction: which diet regimen is more effective for weight loss? *Obes Rev* 2011; 12(7): e593-601.
- 50) 宇野薫, 武見ゆかり, 林芙美, 細川モモ. 妊娠前 BMI 区分やせの妊婦の栄養状態・食物摂取状況の特徴. *日本公衛誌* 2016; 63(12): 738-749.
- 51) 小平洋子, 辻玲子, 太田徹, 八幡剛浩. 若年女性におけるやせが自律調節機能に及ぼす影響. *日本食生活誌* 2001; 12(3): 242-247.
- 52) 五十嵐隆. 出産・成育医療の課題と展望: 医学の視点から. *医療と社会* 2017; 27(1): 123-134.
- 53) 鈴木(堀田)真理. 摂食障害 —食べられない、あるいは、食べ過ぎてしまう病気—. *日本調理誌* 2012; 45(5): 372-377.

- 54) Stein J, Fenigsten H. Pathological anatomy of hunger disease. *Cur Concept Nurs* 1979; 7: 207-234.
- 55) 西脇新一, 切池信夫, 永田利彦, 井上佑一, 吉野祥一, 泉屋洋一, 川北幸男. 摂食障害と脳萎縮—anorexia nervosa, bulimia, 正常対照の頭部 CT 像の比較—. *精神医学* 1990; 32(3): 307-313.
- 56) Bomba M, Riva A, Morzenti S, Grimaldi M, Neri F, Nacinovich R. Global and regional brain volumes normalization in weight-recovered adolescents with anorexia nervosa: preliminary findings of a longitudinal voxel-based morphometry study. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2015; 11: 637-645.
- 57) Hashimoto PH, Goami Y, Yoneda K, Mori K, Shioyama M, Hasegawa E, Kikuchi T, Kawamoto Y, Ishimaru MJ. Fine structure of rat liver, adrenal, testis and seminal vesicle in experimental emaciation. *J Electron Microsc* 1998; 47(3): 251-262.
- 58) 黒川衛. マウスカラーアトラスと写真で見る脳実験マニュアル. 羊土社, 2005.
- 59) Sano A, Le DS, Tran MH, Pham HT, Kaneda M, Murai E, Kamiyama H, Oota Y, Yamamoto S. Study on factors of body image in Japanese and Vietnamese adolescents. *J Nutr Sci Vitaminol* 2008; 54: 169-75.
- 60) Barbara Y, Johon WH. Functional Histology. /山田英智 監訳. 機能を中心とした図説組織学. 第4版, 医学書院, 東京, 2001.
- 61) Kubo C. The Effects of Acute Starvation on the Function of Immune System. *心身医学* 1982; 22(3): 249-254.
- 62) 江口保暢, 橋本善之. 急性飢餓雄マウスの副腎皮質における組織学的変化. *日畜会報* 1957; 28(3): 152-156.
- 63) 杉崎速雄. 絶食負荷が生体に及ぼす影響 第3報 飢餓負荷時におけるラット、マウスの血液、肝および腎臓内水分量について. *防衛衛生* 1968; 15(11): 481-485.
- 64) 杉崎速雄. 絶食負荷が生体に及ぼす影響 第5報 飢餓経過時におけるラットの臓器変化について. *防衛衛生* 1969; 16(4): 245-248.
- 65) Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhiisa T, Mizushima N. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 2004; 432: 1032-1036.
- 66) NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC) (Bixby H et al.). Rising rural body-mass index is the main driver of the global obesity epidemic in adults. *Nature* 2019; 569: 260-264.
- 67) 渡辺毅. 食と病 —生活習慣病を例として—. *日本栄養・食糧* 2004; 57: 15-19.

- 68) Montague CT, O'Rahilly S. The perils of portliness: causes and consequences of visceral adiposity. *Diabetes* 2000; 49(6): 883-888.
- 69) Smith U, Hammarsten J, Bjorntorp P, Kral JG. Regional differences and effect of weight reduction on human fat cell metabolism. *Eur J Clin Invest* 1979; 9(5): 327-332.
- 70) 宮田富弘, 萩野浩伸, 中川貴子, 奥田拓道. ゴールドチオグルコース誘導性肥満マウスにおける脂肪組織 cellularity の経時的変化. *日本栄養食糧誌* 1988; 41(2): 109-114.
- 71) Hartman AD, Christ DW. Effect of cell size, age and anatomical location on the lipolytic response of adipocytes. *Life Sci* 1978; 22(12): 1087-1096.
- 72) 栗林勝, 月間紗也. 企業における健康経営の現状. *心身医* 2018; 58(3): 255-260.
- 73) 矢島潤平, 津田彰, 三原健吾. 健康補助食品の現状と健康心理学の研究法を用いた効果検証のアプローチ. *J Health Psychology Res* 2018; 30; 237-241.
- 74) Rippe JM, McInnis KJ, Melanson KJ. Physician involvement in the management of obesity as a primary medical condition. *Obes Res* 2001; 4: 302-331.
- 75) Dalgaard LT, Pedersen O. Uncoupling proteins: functional characteristics and role in the pathogenesis of obesity and Type II diabetes. *Diabetologia* 2001; 44(8): 946-965.
- 76) 永井成美, 坂根直樹, 西田美奈子, 森谷敏夫. 若年女性の正常体重肥満を形成しやすい遺伝的、生理学的要因の検討. *肥満研究* 2006; 12(2): 147-151.
- 77) Matsuzawa Y, Funahashi T, Kihara S, Shimomura I. Adiponectin and metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(1): 29-33.
- 78) Brook CG, Lloyd JK, Wolf OH. Relation between age of onset of obesity and size and number of adipose cells. *Br Med J* 1972; 2: 25-27.
- 79) Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, Blomqvist L, Hoffstedt J, Näslund E, Britton T, Concha H, Hassan M, Rydén M, Frisén J, Arner P. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 2008; 453: 783-787.
- 80) Klyde BJ, Hirsch J. Isotopic labeling of DNA in rat adipose tissue: evidence for proliferating cells associated with mature adipocytes. *J Lipid Res* 1979; 20(6): 691-704.
- 81) 杉原甫. 肥満の脂肪細胞診断 —肥満についての新しい分類の提唱. *内科* 2003; 92(2): 225-229.
- 82) 西中川駿, 鈴木秀作, 大塚閏一. マウスの乳腺組織とその血管分布におよぼす絶食の影響. *鹿大農学術報告*. 1980; 30: 79-86.
- 83) 山岸敏宏. マウスにおける飢餓抵抗能力の高および低への選抜. *日畜会報* 1975; 46(4): 219-224.

- 84) Cahill GF. Starvation in man. *N Engl J Med* 1970; 282: 668-675.
- 85) Priya S, Luke AP, Elizabeth D, Katrina P, Arthur S, Adamandia K, Joseph P. Long-term persistence of hormonal adaptations to weight loss. *N Engl J Med* 2011; 365: 1597-1604.
- 86) 小橋理代, 永井成美, 脇坂しおり, 林直樹, 坂根直樹, 森谷敏夫. ダイエット経験が若年女性の自律神経活動に及ぼす影響. *肥満研究 日本肥満誌* 2009; 15(2): 179-184.
- 87) Froidevaux F, Schutz Y, Christin L, Jéquier E. Energy expenditure in obese women before and during weight loss, after refeeding, and in the weight-relapse period. *Am J Clin Nutr* 1993; 57(1): 35-42.
- 88) Kajioaka T, Tsuzuku S, Shimokata H, Sato Y. Effects of intentional weight cycling on non-obese young women. *Metabolism* 2002; 51(2): 149-154.
- 89) Iritani N, Nagashima K, Fukuda H, Katsurada A, Tanaka T. Effects of dietary proteins on lipogenic enzymes in rat liver. *J Nutr* 1986; 116: 190-197.
- 90) Horton JD, Bashmakov Y, Shimomura I, Shimano H. Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 5987-5992.
- 91) 浦野貴之, 尾池雄一. 血管と脂肪組織. *脂肪細胞と脂肪組織* 2007; 16-20.
- 92) Hattori K, Sumi T, Yasui T, Morimura M, Nobeyama H. VEGF mRNA in adipocytes increase with rebound weight-gain after diet-restriction. *Int J Mol Med* 2004; 13(3): 395-399.
- 93) 池田かよ子. 思春期女子のやせ志向と自尊感情との関連. *思春期学* 2006; 24(3): 473-482.
- 94) 鈴木幹子, 伊藤裕子. 女子青年における女性性受容と摂食障害傾向—自尊感情、身体満足度、異性意識を媒介として—. *青年心理学研究* 2001; 13: 31-46.
- 95) 藤田聡. サルコペニア予防における運動と栄養摂取の役割. *基礎老化研究* 2011; 35(3): 23-27.
- 96) Inoue T, Kusida K, Miyamoto S, Sumi Y, Orimo H, Yamashita G. Quantitative assessment of bone density on X-ray picture. *日本生計誌* 1983; 57(12): 1923-1936.
- 97) Nishizawa N, Shimbo M, Noguchi T, Hareyama S, Funabiki R. Effect of starvation, refeeding and hydrocortisone administration on turnover of myofibrillar estimated by urinary excretion of N-methylhistidine in the rat. *Agric Biol Chem* 1978; 42(11): 2083-2089.
- 98) Blackburn GL, Wilson GT, Kanders BS, Stein LJ, Lavin PT, Adler J, Brownell KD. Weight cycling: the experience of human dieters. *Am J Clin Nutr* 1989; 49(5): 1105-1109.
- 99) Hisatomi Y, Asakura T, Nakata K, Sebe K, Kugino K. Can voluntary exercise mitigate the negative influence of fasting on calcium balance and bone strength in rats? *Medicine and Biology* 2013; 157: 346-357.

- 100) Kugino K, Kishino Y. Effect of voluntary exercise on the pancreatic function of rats. *Nutr Res* 1995; 11: 1273-1283.
- 101) Kugino K. Effect of dietary protein level on breaking force of femur in rats. *Recent Res Devel in Nutrition* 1995; 1: 93-98.
- 102) Hirota T, Nara M, Ohguri M, Manago E, Hirota K. Effect of diet and lifestyle on bone mass in Asian young women. *Am J Clin Nutr* 1992; 55(6): 1168-1173.
- 103) 中林朋子, 広田孝子. 骨密度上昇期、維持期、減少期における腰椎、大腿骨近位部・全身骨への影響因子の相違. *Osteoporosis Jpn* 1997; 5: 115-120.
- 104) Kroger H, Kotaniemi A, Kroger L, Alhava E. Development of bone mass and bone density of the spine and femoral neck—a prospective study of 65 children and adolescents. *Bone Miner* 1993; 23: 171-182.
- 105) Theintz G, Buchs B, Rizzoli R, Slosman D, Clavien H, Sizonenko PC, Bonjour JP. Longitudinal monitoring of bone mass accumulation in healthy adolescents: evidence for a marked reduction after 16 years of age at the levels of lumbar spine and femoral neck in female subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 1060-1065.
- 106) Bonjour JP, Theintz G, Buchs B, Slosman D, Rizzoli R. Critical years and stages of puberty for spinal and femoral bone mass accumulation during adolescence. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73: 555-563.
- 107) Glastre C, Braillon P, David L, Cochat P, Meunier PJ, Delmas PD. Measurement of bone mineral content of the lumbar spine by dual energy x-ray absorptiometry in normal children: correlations with growth parameters. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70: 1330-1333.
- 108) McCormick DP, Ponder SW, Fawcett HD, Palmer JL. Spinal bone mineral density in 335 normal and obese children and adolescents: evidence for ethnic and sex differences. *J Bone Miner Res* 1991; 6: 507-513.
- 109) Granhed H, Jonson R, Hansson T. The loads on the lumbar spine during extreme weight lifting. *Spine* 1987; 12: 146-149.
- 110) Jones HH, Priest JD, Hayes WC, Tichenor CC, Nagel DA. Humeral hypertrophy in response to exercise. *J Bone Joint Surg* 1977; 59: 204-208.
- 111) McCulloch RG, Bailey DA, Houston CS, Dodd BL. Effects of physical activity, dietary calcium intake and selected lifestyle factors on bone density in young women. *Can Med Assoc J* 1990; 142: 221-227.

- 112) Matkovic V, Kostial K, Simonovic I, Buzina R, Brodarec A, Nordin BE. Bone status and fracture rates in two regions of Yugoslavia. *Am J Clin Nutr* 1979; 32: 540-549.
- 113) Patel S, Coupland CA, Stone MD, Hosking DJ. Comparison of methods of assessing response of Paget's disease to bisphosphonate therapy. *Bone* 1995; 16: 193-197.
- 114) 伊東昌子. 骨質の定量評価と薬物による改善. 生体医工学 2006; 44(4): 496-502.
- 115) NIH consensus development panel on osteoporosis prevention, diagnosis, and Therapy (Klibanski et al.). Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. *JAMA* 2001; 285(6): 785-795.
- 116) 脇村智子, 西牟田守, 児玉直子, 吉岡(日達)やよい, 山田英明, 武山英麿. 補足のない実験食を摂取した場合のたんぱく質摂取量とミネラル(カルシウム・マグネシウム・リン)出納との関係. 栄養学雑誌 2008; 66(6): 277-285.
- 117) Goseki-Sone M, Maruyama R, Sogabe N, Hosoi T. Effects of dietary lactose on long-term high-fat-diet-induced obesity in rats. *Obesity* 2007; 15(11): 2605-2613.
- 118) Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldborg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res* 2010; 25(7): 1468-1486.
- 119) Kimura T. Cross-section of human lower leg bones viewed from strength of materials. *J Anthropol Soc Jpn* 1971; 79(4): 323-336.
- 120) 林達郎, 周向榮, 陳華岳, 原武史, 藤田広志, 横山龍二郎, 桐生拓司, 星博昭. X線CT像における脊椎椎体部の骨密度の調査. 生体医工学 2007; 45(4): 256-266.
- 121) 史常德, 西澤哲, 足立和隆, 木村賛. ヒト及び他の哺乳類における椎骨の形態の比較. 人類誌 1999; 107(1): 3-19.
- 122) 藤野英己, 武田功. 老年期女性における骨塩量の変化. 理学療法学 1991; 18(2): 131-136.
- 123) Eriksen GR. Bone Histomorphometry. Raven press. New York; 1994.
- 124) Aoki K. Differential response in the cortical and the cancellous regions of tibia to a low calcium feeding in rats. *J Oral boill* 1992; 34: 595-611.
- 125) Steenbock H, Hart EB, Sell MT, Jones JH. The availability of calcium salt. *J Biol Chem* 1923; 56: 375-387.
- 126) Tisdall FF, Drake TGH. The utilization of calcium. *J Nutr* 1938; 16: 613-620.
- 127) Buchowski MS, Miller DD. Lactose, calcium source and age affect calcium bioavailability in rats. *J Nutr* 1991; 121: 1746-1754.
- 128) Krieger CH, Bunkfeldt R, Steenbock H. Cereals and rickets. XI: calcium phytate as a source of calcium. *J Nutr* 1940; 20: 15-18.

- 129) Garcia-Lopez S, Miller DD. Bioavailability of calcium from four different sources. *Nutr Res* 1991; 11: 1187-1196.
- 130) Bryant RJ, Wastney ME, Martin BR. Racial differences in bone turnover and calcium metabolism in adolescent females. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 1043-1047.
- 131) Heaney RP, Recker RR, Stegman MR, Moy AJ. Calcium absorption in women: relationships to calcium intake, estrogen status, and age. *J Bone Miner Res* 1989; 4: 469-475.
- 132) Wastney ME, Ng J, Smith D, Martin BR, Peacock M, Weaver CM. Differences in calcium kinetics between adolescent girls and young women. *Am J Physiol* 1996; 271: R208-216.
- 133) Abrams SA, Grusak MA, Stuff J, O'Brien KO. Calcium and magnesium balance in 9-14-y-old children. *Am J Clin Nutr* 1997; 66: 1172-1177.
- 134) Uenishi K, Ishida H, Kamei A, Shiraki M, Ezawa I, Goto S, Fukuoka H, Hosoi T, Orimo H. Calcium requirement estimated by balance study in elderly Japanese people. *Osteoporosis Int* 2001; 12: 858-863.
- 135) Abrams SA, Wen J, Stuff JE. Absorption of calcium, zinc, and iron from breast milk by five-to seven-month-old infants. *Pediatr Res* 1997; 41: 384-390.
- 136) 厚生労働省. 「日本人の食事摂取基準(2015年版)策定検討会報告書」平成26年3月. http://www.koshu-eisei.net/upfile_free/20150623_29.pdf. (2019/7/14)
- 137) Spencer H, Kramer L. NIH Consensus Conference: Factors contributing to osteoporosis. *J Nutr* 1986; 116: 316-319.
- 138) Eisman JA, Kelly PJ, Sambrook PN, Pocock NA, Ward JJ, Eberl S, Yeates MG. Physical activity and bone mass, osteoporosis—physiological basis assessment and treatment. *Elsevier New York* 1990; 277-284.
- 139) Savill PD, Whyte MP. Muscle and bone hypertrophy —positive effect of running exercise in the rat—. *Clin Orthop Res* 1969; 65: 81-88.
- 140) Omi N, Nakamura T, Ezawa I. Modulation of bone mass and turnover in growing rats by voluntary weight-bearing exercise and glucose supplementation. *J Nutr Sci* 1998; 44: 409-421.
- 141) Shawn MT, Micheal MR, Sue AS. Dietary restriction of energy and calcium alters bone turnover and density in young and old female rats. *J Nutr* 1998; 128: 640-645.
- 142) Consensus conference : Osteoporosis. *JAMA* 1984; 252: 799-802.
- 143) Smith AL, Gilligan C. Physical activity effect on bone metabolism. *Calcif Tissue Int* 1991; 49: S50-54.

- 144) Matsumura A, Okada M. Cross-sectional properties along the diaphysis of the rat femur as influenced by forced running exercise. *J Anthropol Soc* 1987; 95(1): 5-18.
- 145) Nelson ME, Fiatarone MA, Morganti CM, Trice I, Greenberg RA, Evans WJ. Effects of high-intensity strength training on multiple risk factors for osteoporosis fractures. A randomized controlled trial. *JAMA* 1994; 272: 1909-1914.
- 146) Maddalozzo GF, Snow CM. High intensity resistance training: effect on bone in older men and women. *Calcif Tissue Int* 2000; 66: 399-404.
- 147) Eriksson SA, Isberg BO, Lindgren JU. Prediction of vertebral strength by dual photon absorptiometry and quantitative computed tomography. *Calcif Tissue Int* 1989; 44: 243-250.
- 148) Ali N, Siktberg L. Osteoporosis prevention in female adolescent: calcium intake and exercise participation. *Pediatr Nurs* 2001; 27(2): 132, 135-139.
- 149) DeBar LL, Ritenbaugh C, Vuckovic N, Stevens VJ, Aickin M, Elliot D, Moe E, Orwoll E, Ernst D, Irving LM. YOUTH: decision and challenges in designing an osteoporosis intervention for teen girls. *Prev Med* 2004; 39: 1047-1055.
- 150) 小林正敏, 原久仁子, 秋山康博. 低カルシウム・低マグネシウム飼料飼育ラットの骨量, 骨強度および軟部組織中カルシウム量の変化に対するビタミン K₂ (メナテレンオン) の効果. *日薬理誌* 2002; 120: 195-204.
- 151) 孫麗曼, 玉城一, 太田豊, 勝山直文, 知念功. 食餌制限したラットで誘発する低骨量症に対する運動の効果. *日本栄養・食糧学会誌* 2003; 56: 237-242.
- 152) 板東武彦, 小山省三. *バーンレヴィ生理学*. 西村書店, 703・787, 1996.
- 153) 三村寛一, 中塚喜義, 山本威久, 新井竜雄, 森井浩世. 若年齢層における骨密度の経年変化と形態および運動能力との関係. *Osteoporosis Jpn* 2003; 11: 421-424.
- 154) Hirota T, Kusu T, Hirota K. Improvement of nutrition stimulates bone mineral gain in Japanese school children and adolescents. *Osteoporosis Int* 2005; 16: 1057-1064.
- 155) Iida H, Fukuda S. Age-related change in bone mineral density, cross-sectional area and strength at different skeletal sites in male rats (laboratory animal science). *J Vet Med Sci* 2002; 64 (1): 29-34.
- 156) Thomas ML, Ibarra MJ, Solcher B, Wetzel S, Simmons DJ. The effect of low dietary calcium supplementation on calcium metabolism and bone in the immature, growing rat. *Bone Miner* 1988; 4: 73-82.
- 157) Williams DE, McDonald BB, Morrell E, Schofield FA, Macleod FL. Influence of mineral intake on bone density in humans and in rat. *J Nutr* 1957; 61: 489-505.

- 158) 江澤郁子, 岡田玲子, 野崎幸久, 尾形悦郎. 発育期ラット大腿骨の破断特性および灰分量に及ぼす低カルシウム食の影響. *栄養と食糧* 1979; 32(5): 329-335.
- 159) 伊藤千夏, 小泉暁子, 田中絵里香, 金子佳代子. 成長期における骨量の年齢別推移および身体組成との関連. *日本栄養・食糧誌* 2006; 59(4): 221-227.
- 160) 西山宋六, 木脇弘二, 井本岳秋, 清野佳紀. 日本人小児の骨密度と体組成の年齢別推移. *日本小児科誌* 1999; 103(11): 1131-1138.
- 161) Davee AM, Rosen CJ, Adler RA. Exercise Patterns and trabecular bone density in college women. *J Bone Mineral Res* 1990; 5: 245-250
- 162) Vestergaard P. Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and 2 diabetes -a meta- analysis. *Osteoporos Int* 2007; 18: 427-444.
- 163) Saito M, Fujii K, Mori Y, Marumo K. Role of collagen enzymatic and glycation induced cross-links as a determinant of bone quality in the spontaneously diabetic WBN/Kob rats. *Osteoporos Int* 2006; 17: 1514-1523.
- 164) Wasnich RD, Miller PD. Antifracture efficacy of antiresorptive agents are related to changes in bone density. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(1): 231-236.
- 165) Ettinger B, Black DM, Mitlak BH, Knickerbocker RK, Nickelsen T, Genant HK, Christiansen C, Delmas PD, Zanchetta JR, Stakkestad J, Gluer CC, Krueger K, Cohen FJ, Eckert S, Ensrud KE, Avioli LV, Lips P, Cummings SR. Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: results from a 3-year randomized clinical trial. Multiple outcomes of raloxifene evaluation (MORE) investigators. *JAMA* 1999; 282(7): 621-625.
- 166) Sarkar S, Mitlak BH, Wong M, Stock JL, Black DM, Harper KD. Relationships between bone mineral density and incident vertebral fracture risk with raloxifene therapy. *Bone Miner Res* 2002; 17(1): 1-10.
- 167) 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン作成委員会. 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン 2015年版. 日本骨粗鬆症学会 2015.
- 168) McCreadie BR, Goulet RW, Feldkamp LA, Goldstein SA. Hierarchical structure of bone and micro-computed tomography. *Adv Exp Med Biol* 2001; 496: 67-83.
- 169) 中野貴由, 馬越佑吉. 骨組織における生体アパタイト結晶の配向性とその力学機能. *生体医工学* 2006; 44(4): 503-510.
- 170) 木村光孝, 西田郁子, 牧憲司. 虚弱骨に対する食餌の影響に関する実験的研究 -とくに下顎骨について-. *小児歯科誌* 1990; 28(4): 949-955.

- 171) 塚本計昌, 西田郁子, 牧憲司, 森本彰子, 西岡孝浩, 内上堀征人. 思春期ラットの虚弱下顎骨に対する食餌療法に関する研究 —形態計測及び骨塩量による評価—. *小児歯科誌* 2000; 38(5): 941-952.
- 172) Saito M, Fujii K, Marumo K. Degree of mineralization-related collagen crosslinking in the femoral neck cancellous bone in cases of hip fracture and controls. *Calcif Tissue Int* 2006; 79: 160-168.
- 173) Ito M, Ikeda K, Nishiguchi M, Shindo H, Uetani M, Hosoi T, Orimo H. Multi-detector row CT imaging of vertebral microstructure for evaluation of fracture risk. *J Bone Miner Res* 2005; 20: 1828-1836.
- 174) Matsumoto T, Ohnishi I, Bessho M, Imai K, Oohashi S, Nakamura K. Prediction of vertebral strength under loading conditions occurring in activities of daily living using a computed tomography-based nonlinear finite element method. *Spine* 2009; 34: 1464-1469.
- 175) Takada J, Beck TJ, Iba K, Yamashita T. Structural trends in the aging proximal femur in Japanese postmenopausal women. *Bone* 2007; 41: 97-102.
- 176) Barker DJ. Maternal nutrition, fetal nutrition, and disease in later life. *Nutrition* 1997; 13(9): 807-813.
- 177) 香月毅史. 拒食症(神経性食欲不振症)の病理と対応. *日本調理誌* 2012; 45(4): 307-312.
- 178) Patton GC, Selzer R, Coffey C, Carlin JB, Wolfe R. Onset of adolescent eating disorders: population based cohort study over 3 years. *BMJ* 1999; 318: 765-768.
- 179) Feighner JP, Robins E, Guze SB, Woodruff RA Jr, Winokur G, Munoz R. Diagnostic criteria for use in psychiatric research. *Arch Gen Psychiatry* 1972; 26(1): 57-63.
- 180) Krieg JC, Pirke KM, Lauer C, Backmund H. Endocrine, metabolic, and cranial computed tomographic findings in anorexia nervosa. *Biol Psychiatry* 1988; 23(4): 377-387.
- 181) Asarian L, Geary N. Modulation of appetite by gonadal steroid hormones. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006; 361: 1251-1263.
- 182) 治京玉記, 内山文昭. ラットの黄体形成ホルモン(LH)の律動性分泌リズムと摂食パターン. *日本生殖内分泌誌* 2013; 18: 35-38.
- 183) Kurokawa M, Akino K, Kanda K. A new apparatus for studying feeding and drinking in the mouse. *Physiol Behav* 2000; 70(1-2): 105-112.
- 184) Hanada R, Teranishi H, Pearson JT, Kurokawa M, Hosoda H, Fukushima N, Fukue Y, Serino R, Fujihara H, Ueta Y, Ikawa M, Okabe M, Murakami N, Shirai M, Yoshimatsu H, Kangawa K,

- Kojima M. Neuromedin U has a novel anorexigenic effect independent of the leptin signaling pathway. *Nat Med* 2004; 10: 1067-1073.
- 185) Kurokawa M, Fujimura K, Sakurai-Yamashita Y. A new-generation apparatus for studying memory-related performance in mice. *Cell Mol Neurobiol* 2003; 23(2): 121-129.
- 186) Nagai J, Kurokawa M, Takeshima H, Kieffer BL, Ueda H. Circadian-dependent learning and memory enhancement in nociceptin receptor-deficient mice with a novel KUROBOX apparatus using stress-free positive cue task. *J Pharm Exp Ther* 2007; 321(1): 195-201.
- 187) Matsuda M. Antisense attenuation of nestin accumulation causes neural tube deformation in rat embryo cultures. *Congenital Anomalies* 2000; 40: 14-23.
- 188) Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT, Hara J, Tsujino N, Mieda M, Tominaga M, Yagami K, Sugiyama F, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T. Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron* 2003; 38(5): 701-713.
- 189) Watanabe S, Yamakura S, Hirano K, Okumura Y, Aiba H. Case of infantile autism with pediatric Wernicke's encephalopathy due to severe eating disorder. *No To Hattatsu* 2009; 41(1): 43-46.
- 190) Ogunleye AJ, Odutuga AA. The effect of riboflavin deficiency on cerebrum and cerebellum of developing rat brain. *J Nutr Sci Vitaminol* 1989; 35(3): 193-197.
- 191) Mukai M, Mukai K, Ichikawa H, Wakasa M, Sanada D, Shibata T, Kawamura M, Akizawa T. Malnutrition and cerebral white matter lesions in dialysis patients. *J Jpn Soc Dial Ther* 2008; 41(7): 421-428.
- 192) Stanfield BB, Trice JE. Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections. *Exp Brain Res* 1998; 72: 399-406.
- 193) Cameron HA, Woolly CS, Gould E. Adrenal steroid receptor immunoreactivity in cells born in the adult rat dentate gyrus. *Brain Res* 1993; 611: 342-346.
- 194) Kaplan MA, Bell DH. Mitotic neuroblasts in the 9-days-old and 11-month-old rodent hippocampus. *J Neurosci* 1984; 4: 1429-1441.
- 195) Lassonde M, Sauerwein C. Neuropsychological outcome of corpus callosotomy in children and adolescent. *J Neurosurg Sci* 1997; 41: 67-73.
- 196) Seki T, Arai Y. Highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) is expressed by newly generated granule cells in the dentate gyrus of the adult rats. *J Neurosci* 1993; 13: 2351-2358.
- 197) Van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 2002; 415: 1030-1034.

- 198) Carlen M, Cassidy RM, Brismar H, Smith GA, Enquist LW, Frisen J. Functional integration adult born neurons. *Curr Biol* 2002; 12: 606-608.
- 199) Hockfield S, McKay RDG. Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci* 1985; 5: 3310-3328.
- 200) Frederiksen K, McKay RDG. Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo. *J Neurosci* 1988; 8: 1144-1151.
- 201) Prentice AM. The double burden of malnutrition in countries passing through the economic transition. *Ann Nutr Metab* 2018; 72(3): 47-54.
- 202) 伊藤裕子. 第 8 章 生まれながらにして男であり女であるのか. ベーシック現代心理学 青年の心理学, 有斐閣, 123-138, 2002.
- 203) 西脇新一. 摂食障害患者の臨床研究 ―頭部 CTscan による脳萎縮の検討―. 阪市医誌 1988; 37(2): 385-404.
- 204) 根岸鋼, 益田幸成. ウサギの低栄養実験 ―神経性食欲不振症における可逆性脳萎縮についての病理学的検討―. 心身医療 1992; 4(6): 80-86.
- 205) Nakamura Y, Yanagawa Y, Morisson SF, Nakamura K. Medullary reticular neurons mediate neuropeptide Y-induced metabolic inhibition and mastication. *Cell Metab* 2017; 25 (2): 322-334.
- 206) Benton D, Parker P. Breakfast, blood glucose, and cognition. *Am J Clin Nutr* 1998; 67: 772-778.
- 207) Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, Allison DB, Cruzen C, Simmons HA, Kemnitz JW, Weindruch R. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 2009; 325: 201-204.

謝辞

本稿を終えるにあたりまして、終始御指導を頂きました久木野憲司先生、難解な組織評価についてご助言を下さいました黒川衛先生、並びに共同で研究に携わって下さいました朝倉富子先生、田丸静香先生、舟木昌子先生、朝倉杏さん、中多啓子さん、瀬部和美さん、野中あゆみさん、坂口忠志さん、機能形態学研究室の卒論生の皆様に心より感謝を申し上げます。

また、データ解析的手法や解析につきましてご助言頂きました福岡女子大学の太田雅規先生、西九州大学の高橋忠夫先生、沖田千代先生に心より御礼を申し上げます。

Chapter 2

Table2-1 Composition of experimental diets (g/100g).

Moisture	7.7
Crude protein	23.6
Crude fat	5.3
Crude fiber	6.1
Crude ash	2.9
Nitrogen Free Extract (NFE)	54.4
Total energy (kcal/100g)	360

The analytical value is as follows. Vitamin content; VA 21690IU, VD₃ 158IU, VE 11.0mg, VK₁ 0.04mg, VB₁ 2.12mg, VB₂ 1.24g, VC 4mg, VB₆ 0.87, VB₁₂ 5.3mg, Inositol 578mg, Folic acid 0.20mg, Biotin 23.2μg, Pantothenic acid 2.73mg, Niacin 10.4mg, Colin 0.22g. Mineral content; Ca 1.12g, P 0.90g, Mg 0.26g, Na 0.21g, K 0.99g, Fe 10.9mg, Al 3.1mg, Cu 0.82mg, Zn 5.28mg, Mn 5.89mg. Amino acid content; Isoleucine 0.89g, Leucine 1.78g, Lysine 1.25g, Methionine 0.44g, Cystine 0.37g, Phenylalanine 1.02g, Tyrosine 0.69g, Threonine 0.92g, Tryptophan 0.29g, Valine 1.08g, Arginine 1.43g, Histiine 0.58g, Alanine 1.22g, Aspartic acid 2.14g, Glutamic acid 3.96g, Serine 1.11g, Glycine 1.16g, Proline 1.27g.

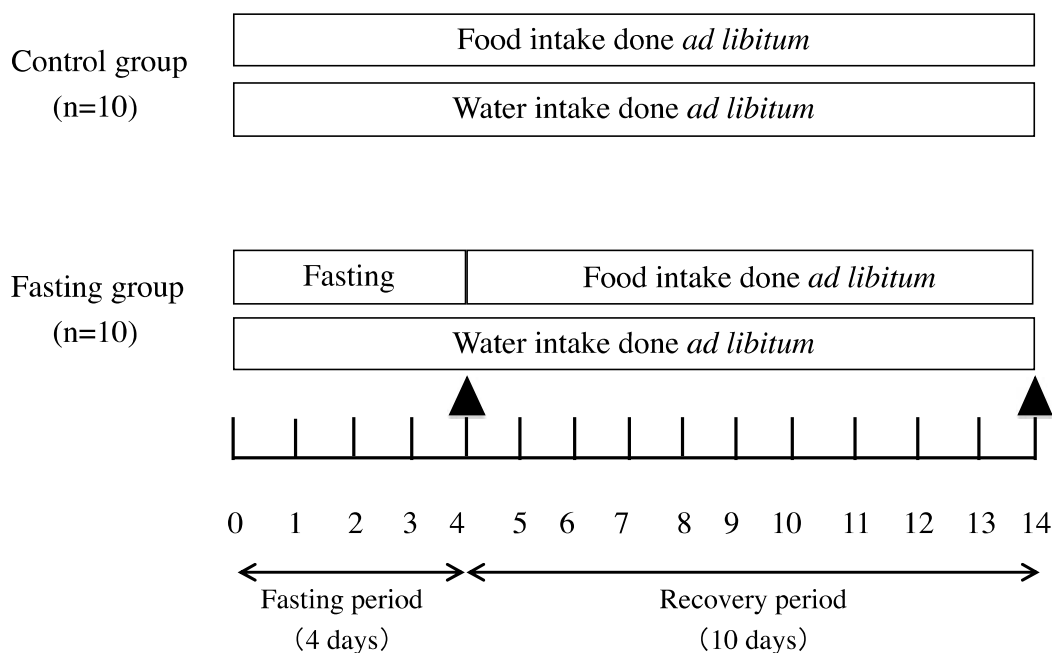


Fig.2-1 Experimental design. In the experimental period, body weight, food intake and water intake of the rats were measured daily. Organ weight was measured on day 4 and day 14 indicated by ▲.

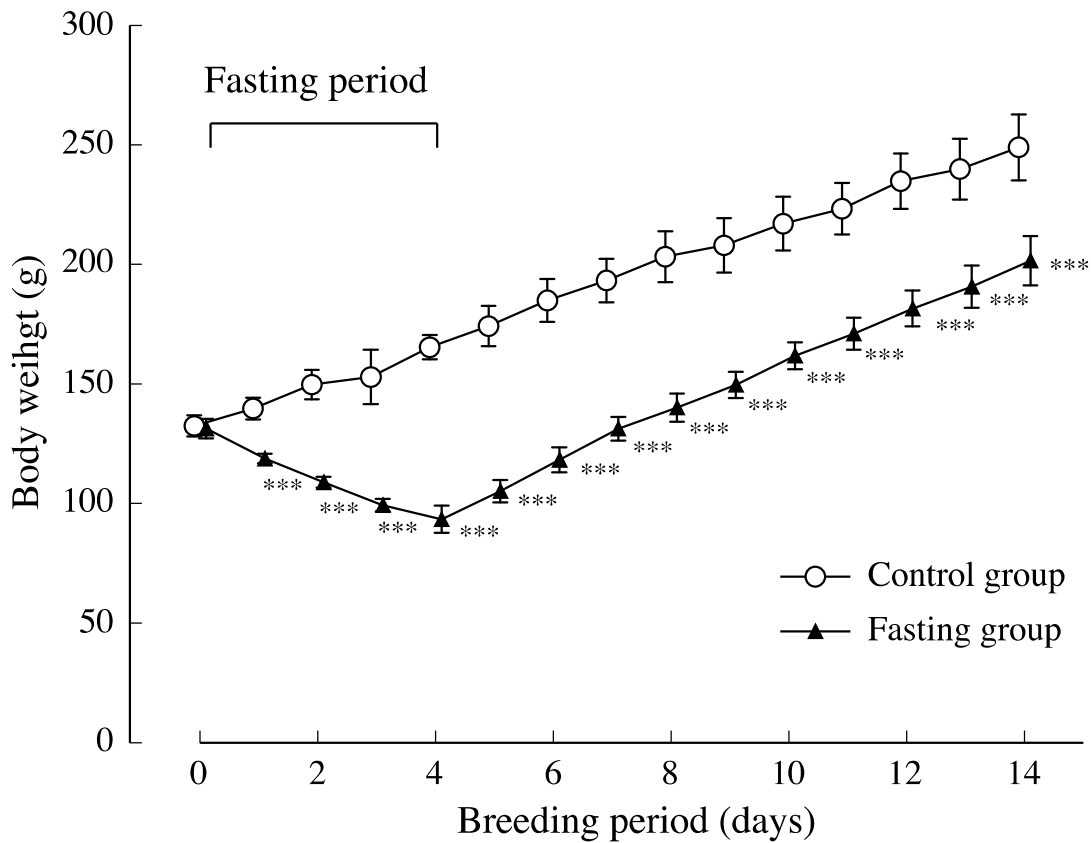


Fig.2-2 Growth curves of rats. Values are means \pm S.D. for groups. ***P<0.001, significantly different from the control value.

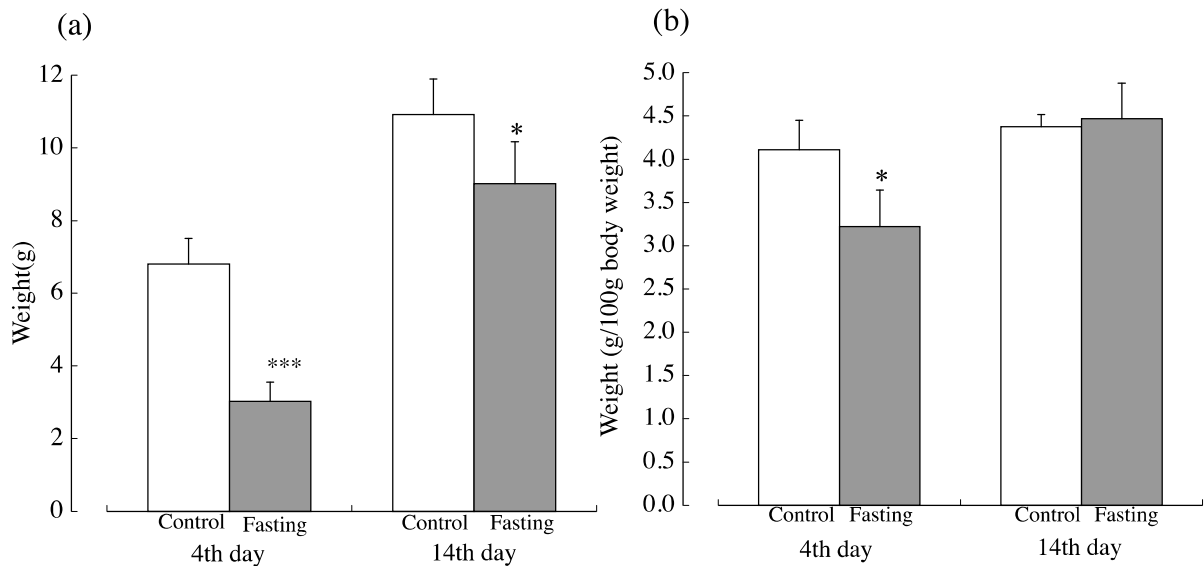


Fig.2-3 Liver weight. (a) The liver weights at day 4 and day 14 are shown. (b) The liver weights per 100g body weights at day 4 and day 14 are shown. Values are Means \pm S.D. for groups. ***P < 0.001, significantly different from the control value. *P < 0.05, ***P < 0.001, significantly different from the control value.

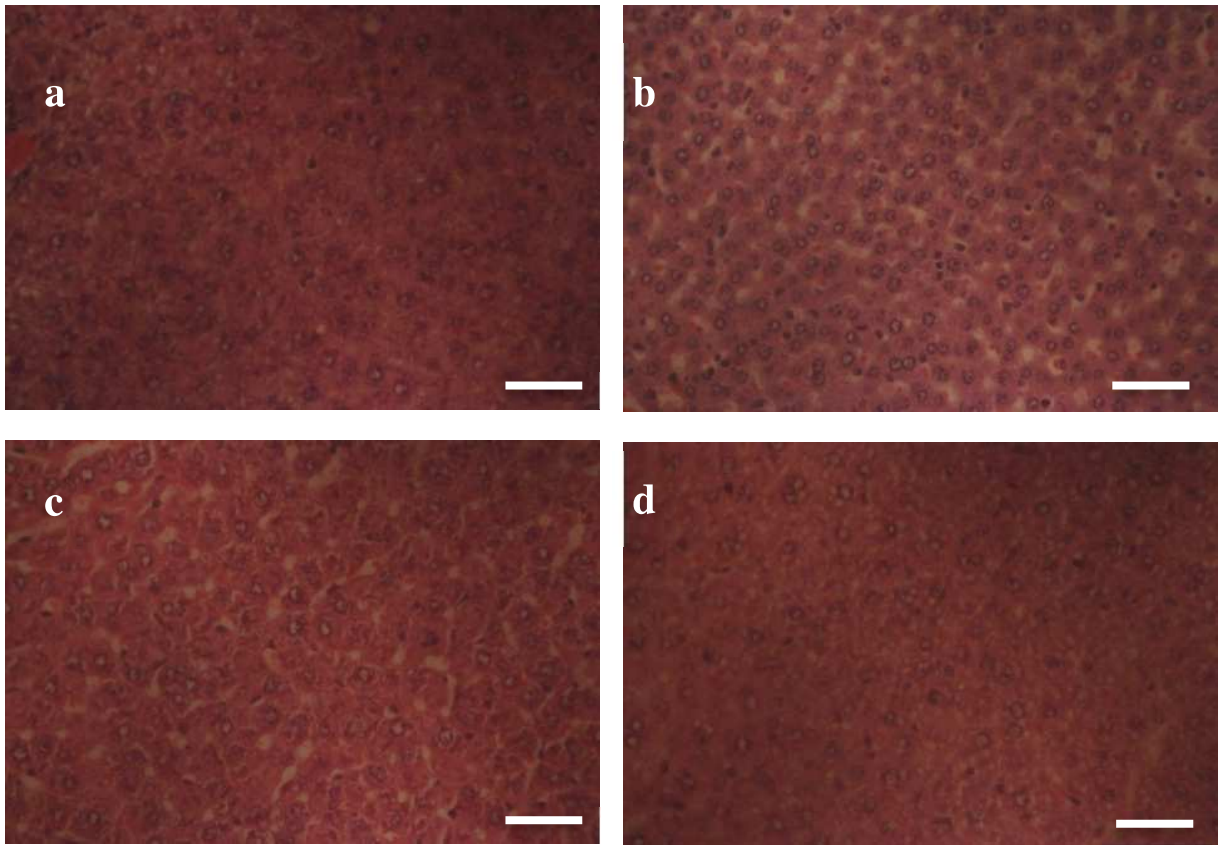


Fig.2-4 Optical microscopy images of liver. a; Control group on the 4th day. b; Fasting group of fasting to 4th day. c; Control group on the 14th day. d; Fasting group on the 14th day, which gave recovery period for 10 days after the fasting period. The bars represent 0.01mm.

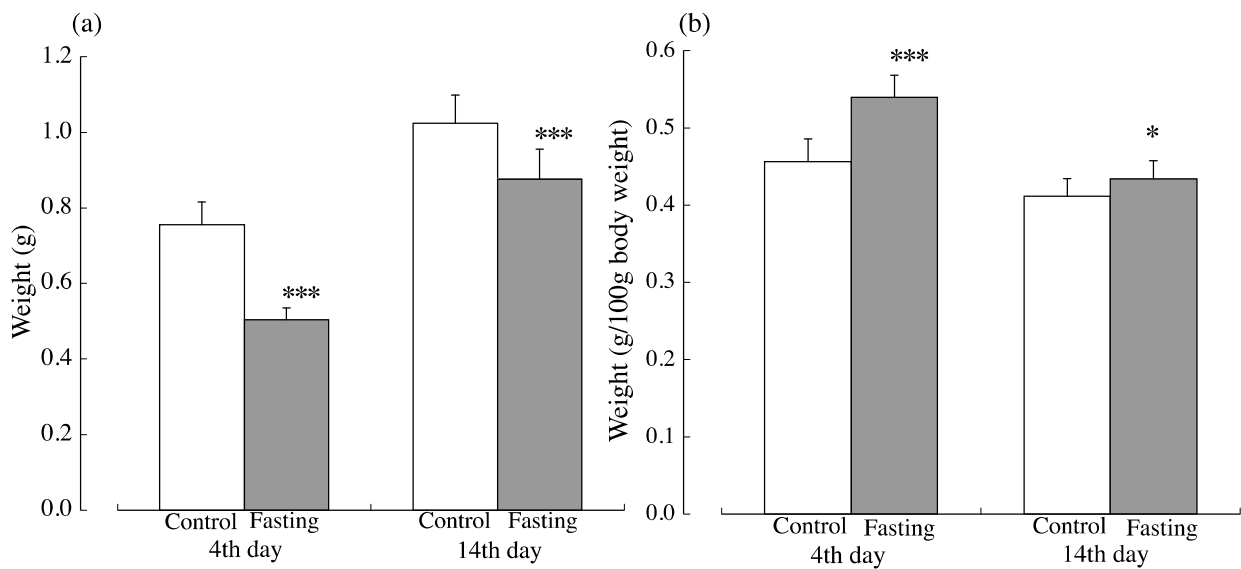


Fig.2-5 Kidney weight. (a) The kidney weights at day 4 and day 14 are shown. (b) The kidney weights per 100g body weights at day 4 and day 14 are shown. Values are Means \pm S.D. for groups. *P < 0.05, ***P < 0.001, significantly different from the control value.

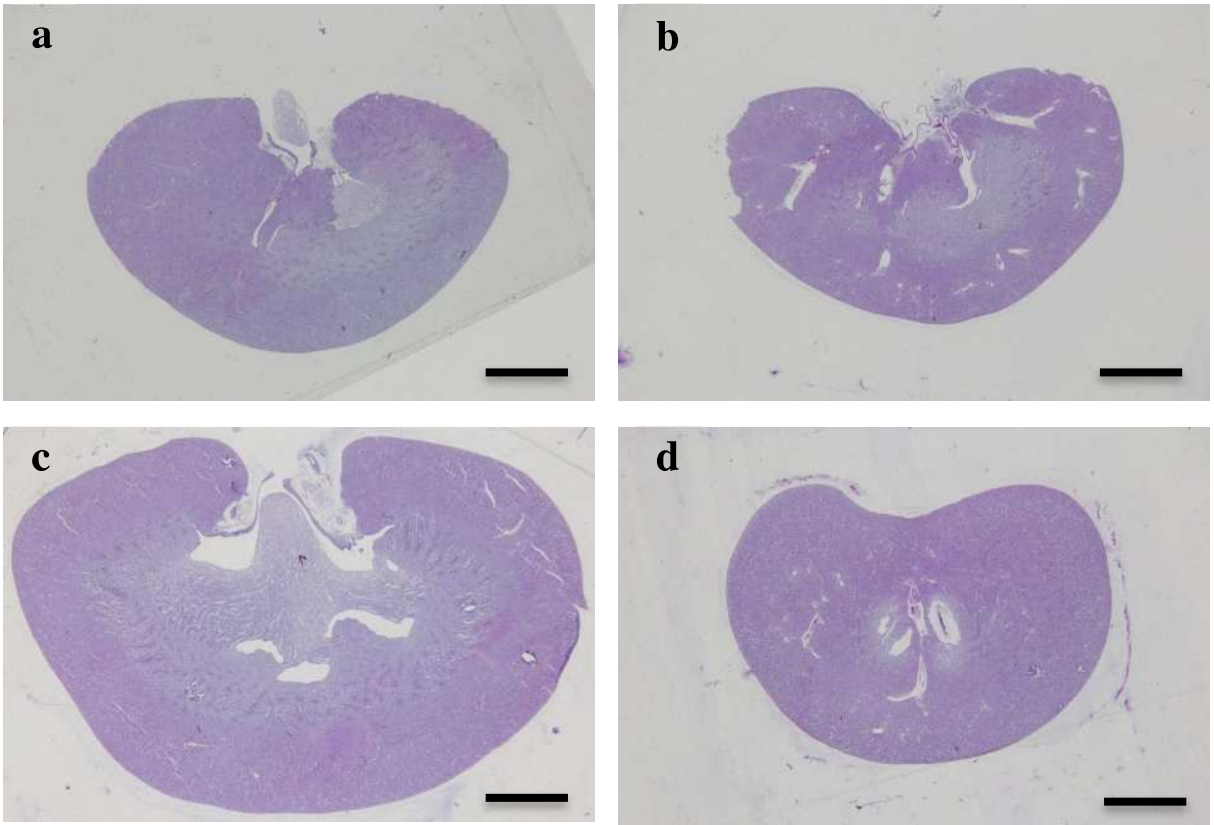


Fig.2-6 Macro observation of the kidney by a microscope. a; Control group on the 4th day. b; Fasting group of fasting to 4th day. c; Control group on the 14th day. d; Fasting group on the 14th day, which gave recovery period for 10 days after the fasting period. The bars represent 2mm.

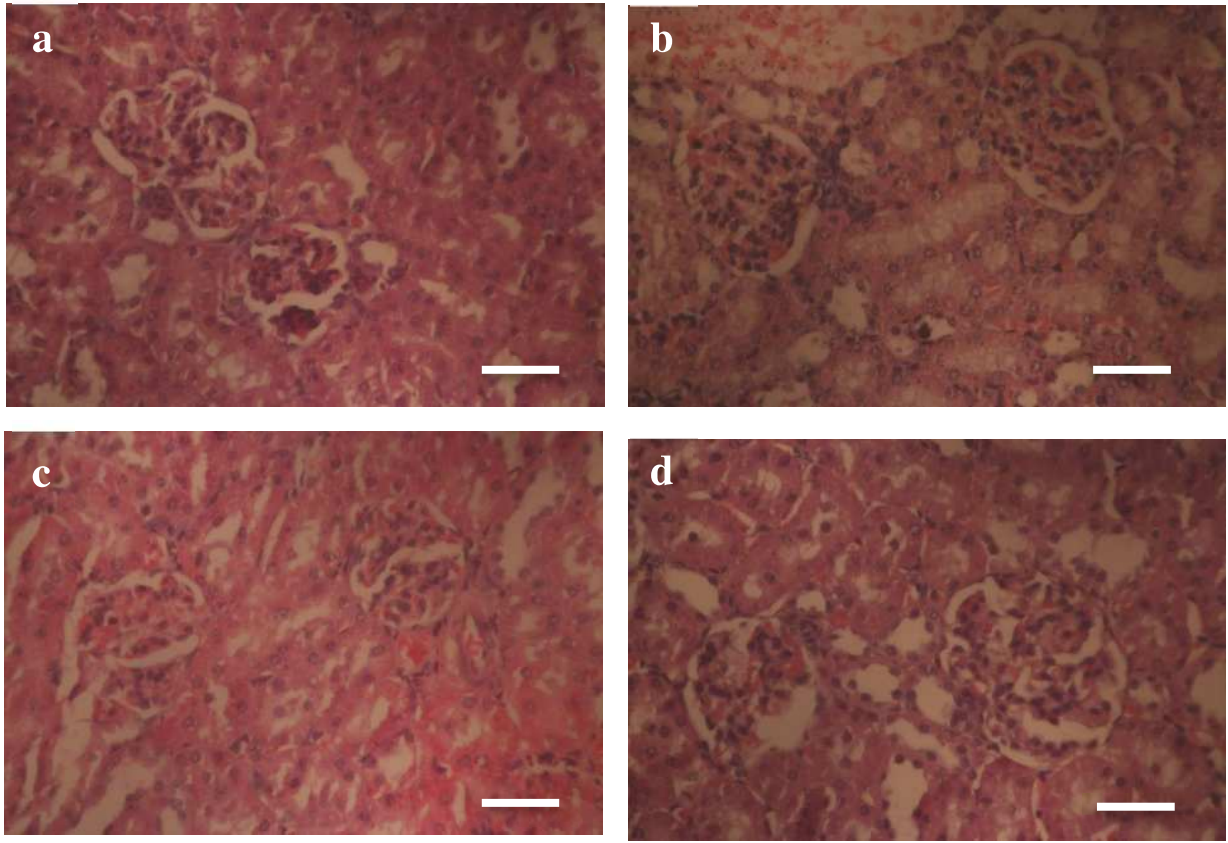


Fig.2-7 Optical microscope image of the renal cortex. a; Control group on the 4th day. b; Fasting group of fasting to 4th day. c; Control group on the 14th day. d; Fasting group on the 14th day, which gave recovery period for 10 days after the fasting period. The bars represent 0.01mm.

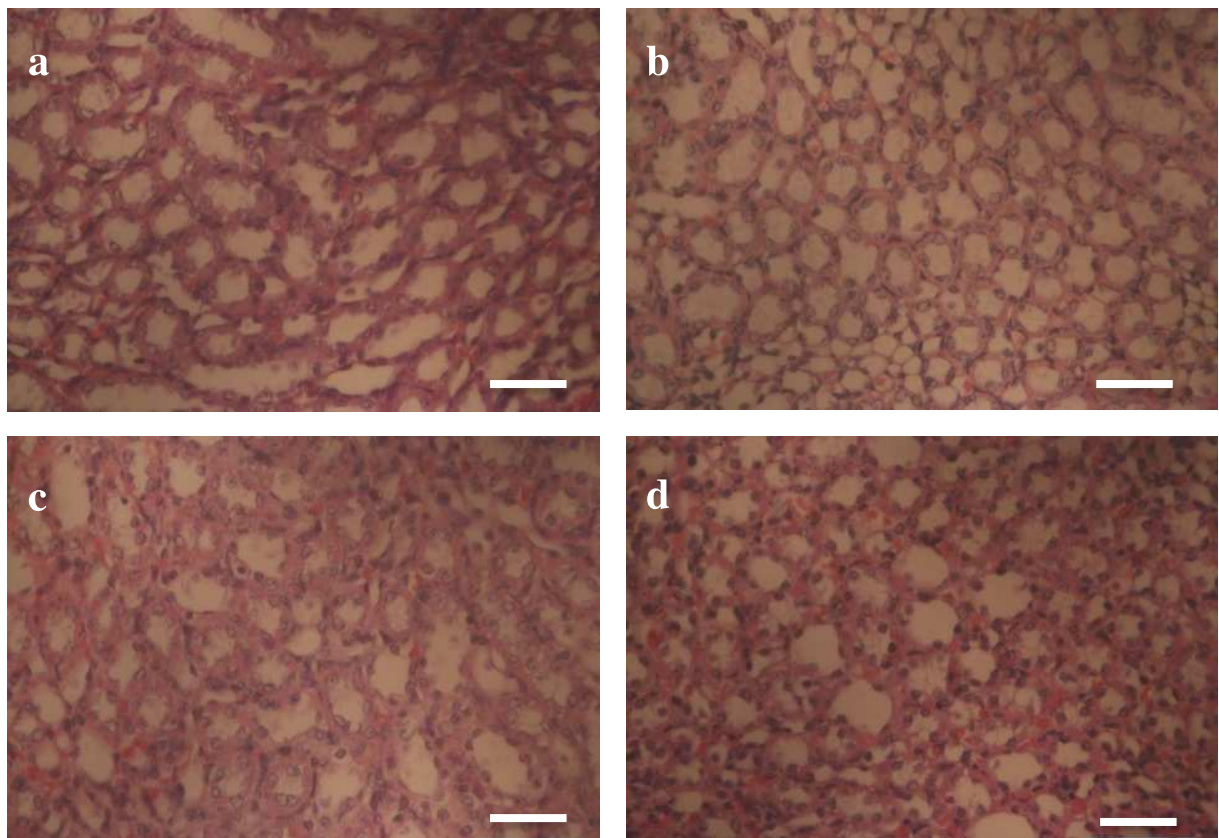


Fig.2-8 Optical microscope image of the renal medulla. a; Control group on the 4th day. b; Fasting group of fasting to 4th day. c; Control group on the 14th day. d; Fasting group on the 14th day, which gave recovery period for 10 days after the fasting period. The bars represent 0.01mm.

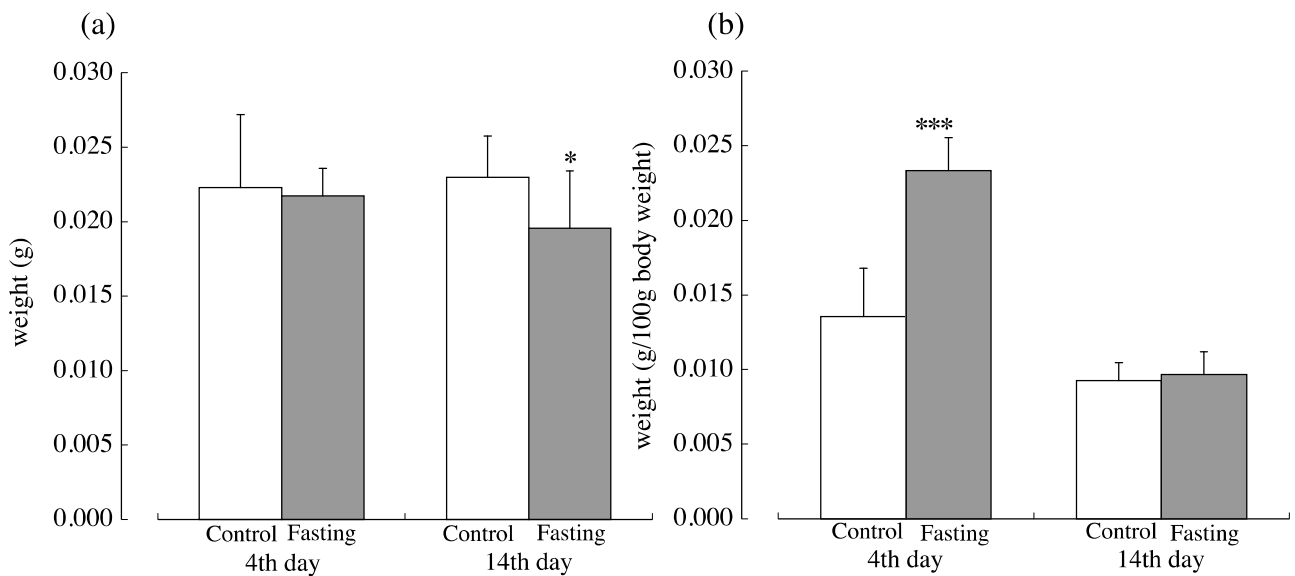


Fig.2-9 adrenal gland weight. (a) The adrenal cortex weights of each group on day 4 and day 14 are shown. (b) The adrenal cortex weights per 100g body weight of each group on the 4th and 14th experiment days are shown. Values are Means \pm S.D. for groups. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, significantly different from the control value.

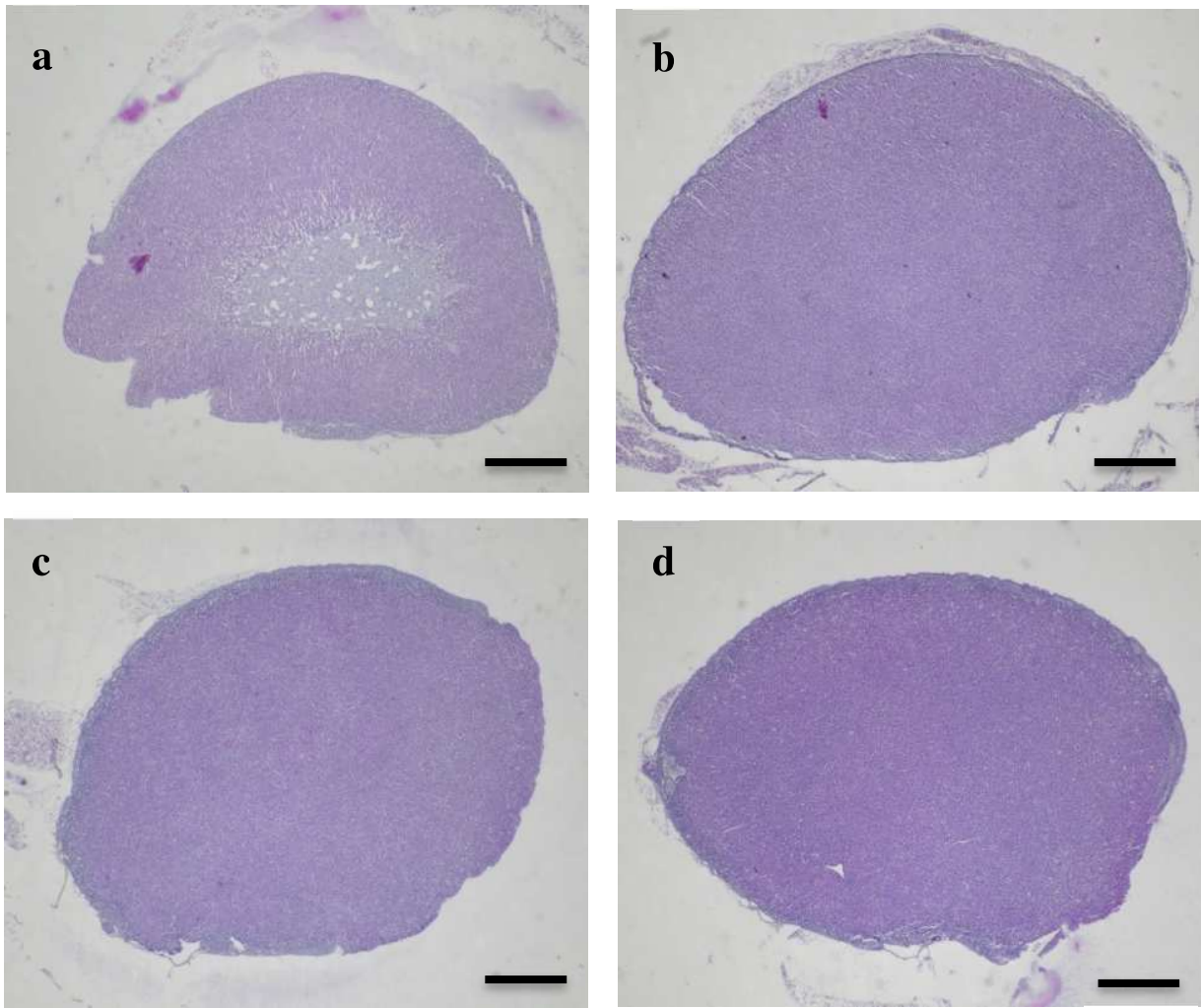


Fig.2-10 Macro observation of adrenal gland by a microscope. a; Control group on the 4th day. b; Fasting group of fasting to 4th day. c; Control group on the 14th day. d; Fasting group on the 14th day, which gave recovery period for 10 days after the fasting period. The bars represent 0.5mm.

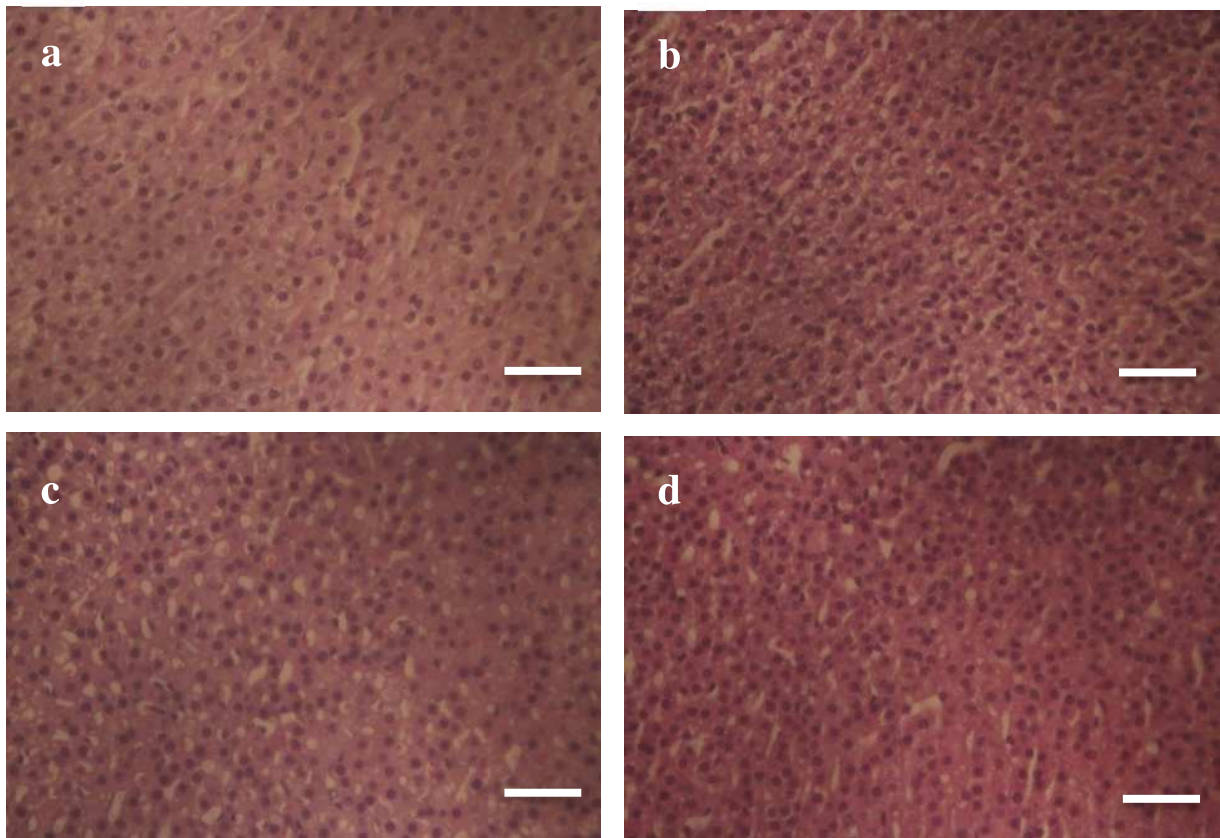


Fig.2-11 Optical microscopy images of adrenal cortex. a; Control group on the 4th day. b; Fasting group of fasting to 4th day. c; Control group on the 14th day. d; Fasting group on the 14th day, which gave recovery period for 10 days after the fasting period. The bars represent 0.01mm.

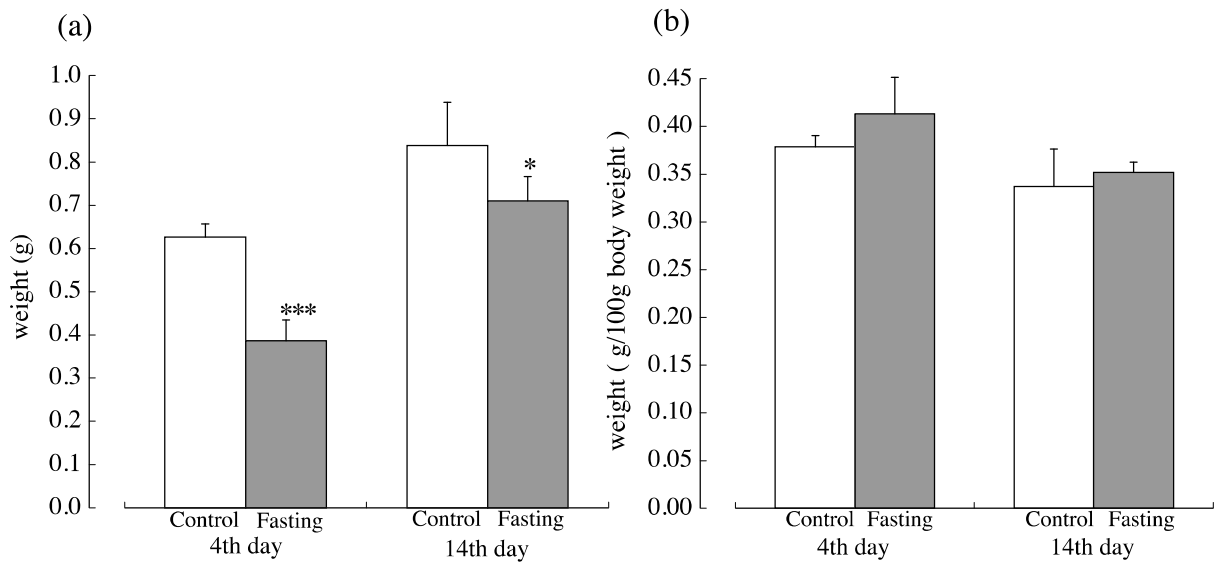


Fig.2-12 Heart weight. (a) The heart weights at day 4 and day 14 are shown. (b) The heart weights per 100g body weights at day 4 and day 14 are shown. Values are Means \pm S.D. for groups. *P < 0.05, ***P < 0.001, significantly different from the control value.

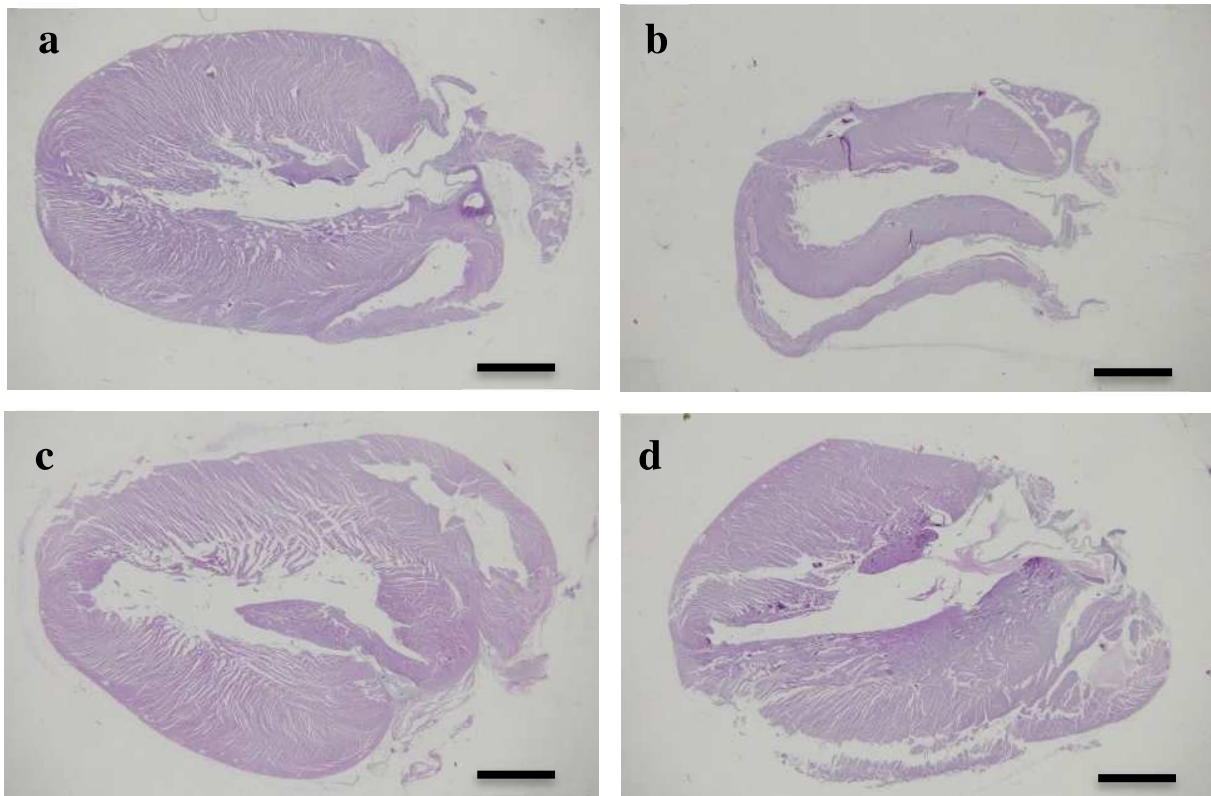


Fig.2-13 Macro observation of heart by a microscope. a; Control group on the 4th day. b; Fasting group of fasting to 4th day. c; Control group on the 14th day. d; Fasting group on the 14th day, which gave recovery period for 10 days after the fasting period. The bars represent 2mm.

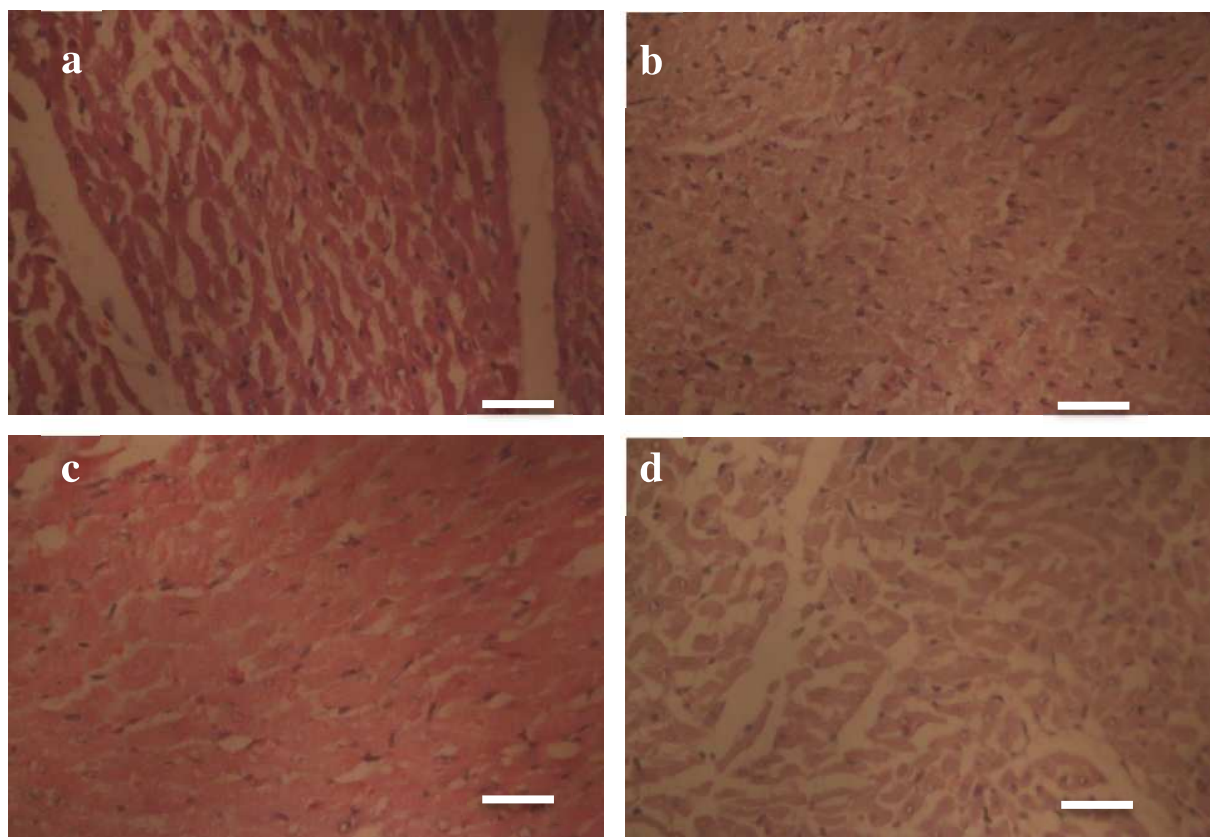


Fig.2-14 Optical microscopy images of heart. a; Control group on the 4th day. b; Fasting group of fasting to 4th day. c; Control group on the 14th day. d; Fasting group on the 14th day, which gave recovery period for 10 days after the fasting period. The bars represent 0.01mm.

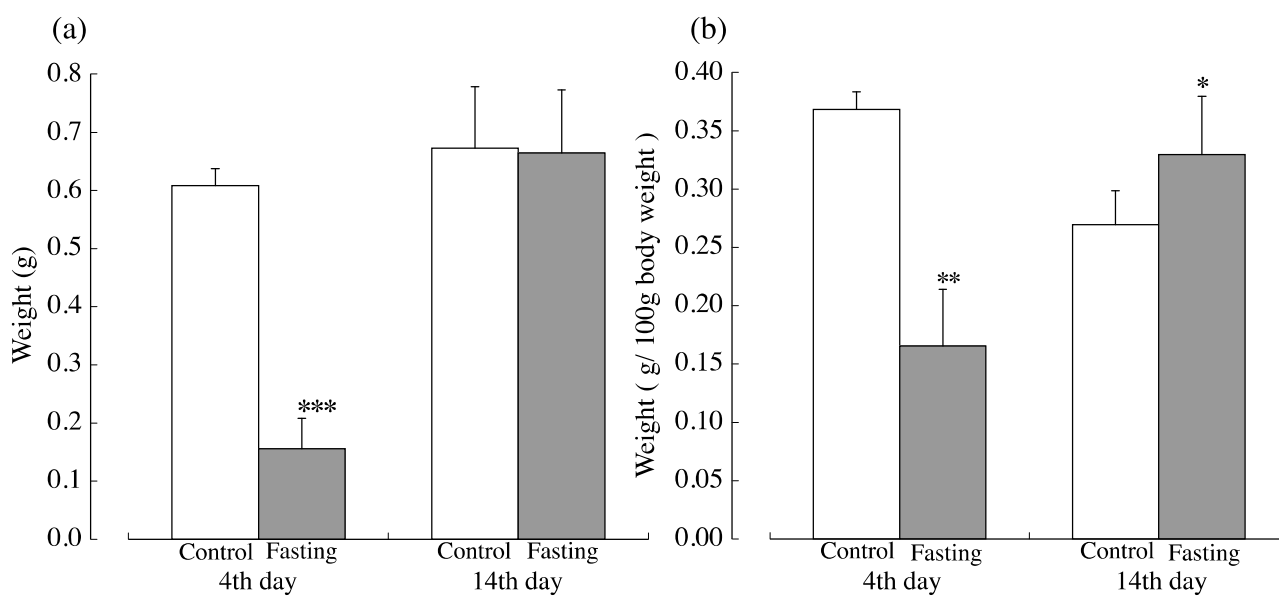


Fig.2-15 Spleen weight. (a) The spleen weights at day 4 and day 14 are shown. (b) The spleen weights per 100g body weights at day 4 and day 14 are shown. Values are Means \pm S.D. for groups. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, significantly different from the control value.

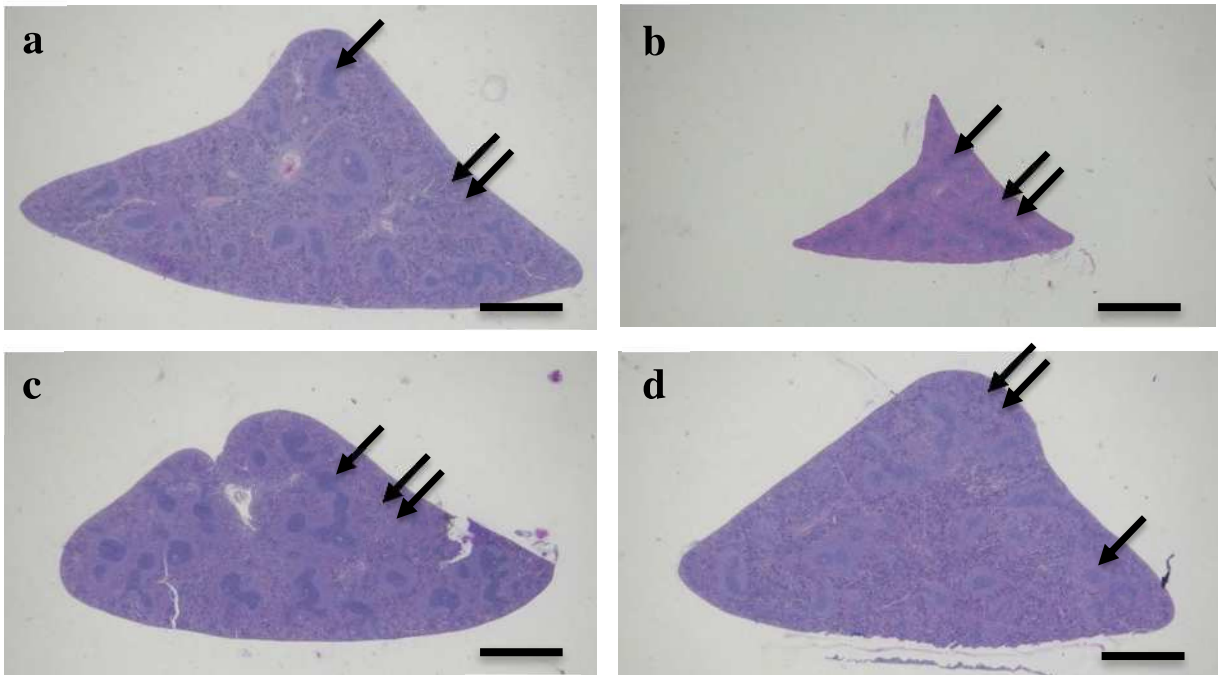


Fig.2-16 Macro observation of spleen by a microscope. a; Control group on the 4th day. b; Fasting group of fasting to 4th day. c; Control group on the 14th day. d; Fasting group on the 14th day, which gave recovery period for 10 days after the fasting period. The bars represent 1mm. Arrows: white pulp, Double arrow: red pulp.

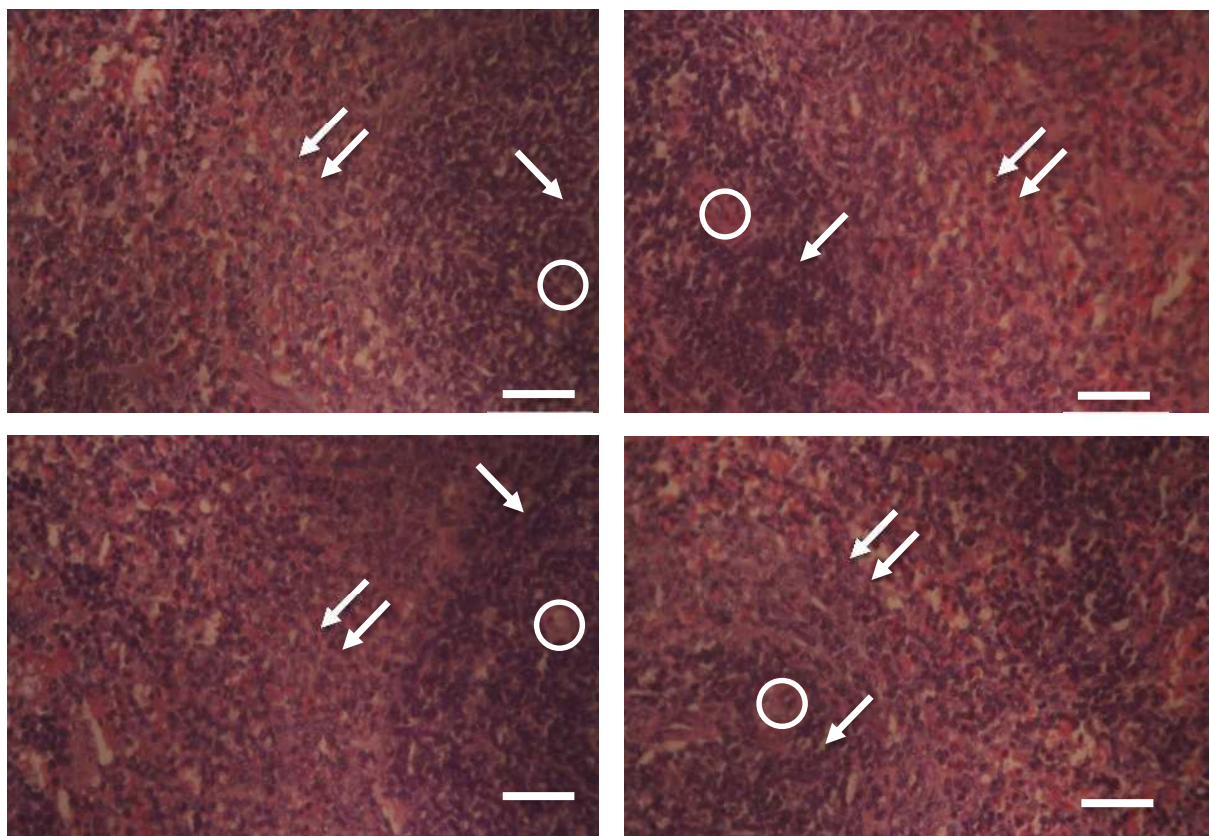


Fig.2-17 Optical microscopy images of spleen. a; Control group on the 4th day. b; Fasting group of fasting to 4th day. c; Control group on the 14th day. d; Fasting group on the 14th day, which gave recovery period for 10 days after the fasting period. The bars represent 0.01mm. Arrows: white pulp, Double arrow: red pulp, Circle: Central artery.

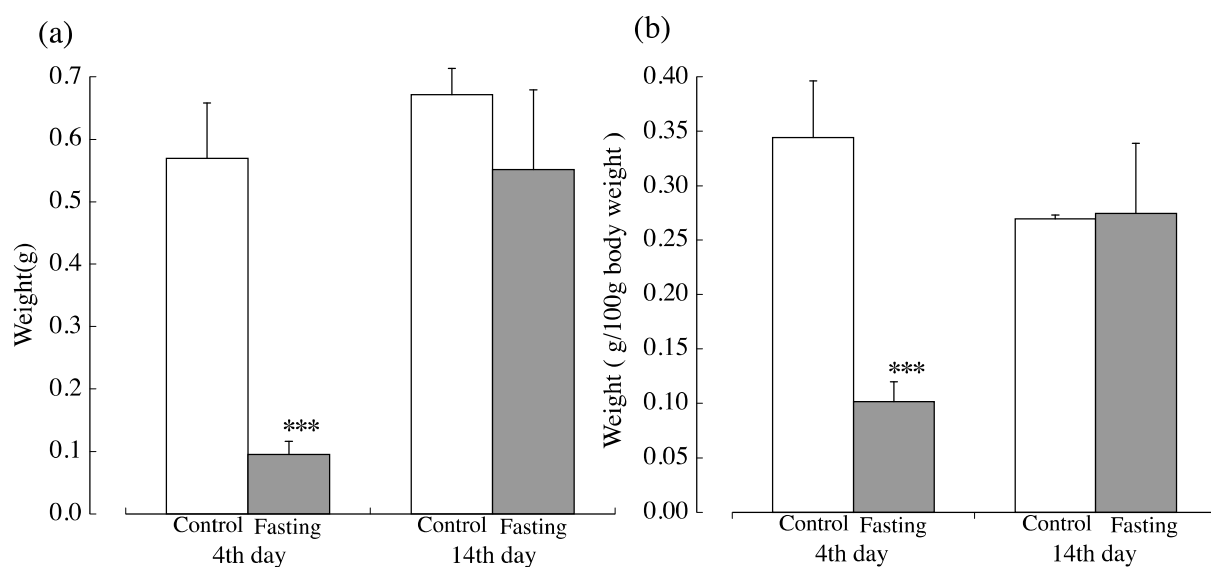


Fig.2-18 Thymus weight. (a) The thymus weights at day 4 and day 14 are shown. (b) The thymus weights per 100g body weights at day 4 and day 14 are shown. Values are Means \pm S.D. for groups. ***P < 0.001, significantly different from the control value.

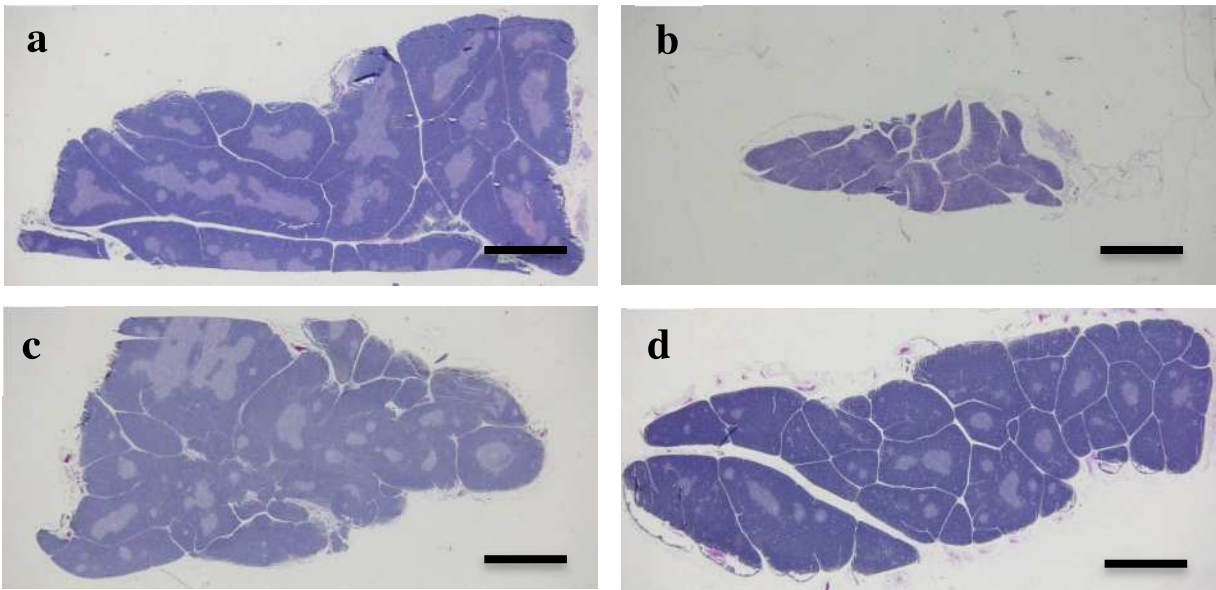


Fig.2-19 Macro observation of thymus by a microscope. a; Control group on the 4th day. b; Fasting group of fasting to 4th day. c; Control group on the 14th day. d; Fasting group on the 14th day, which gave recovery period for 10 days after the fasting period. The bars represent 1mm.

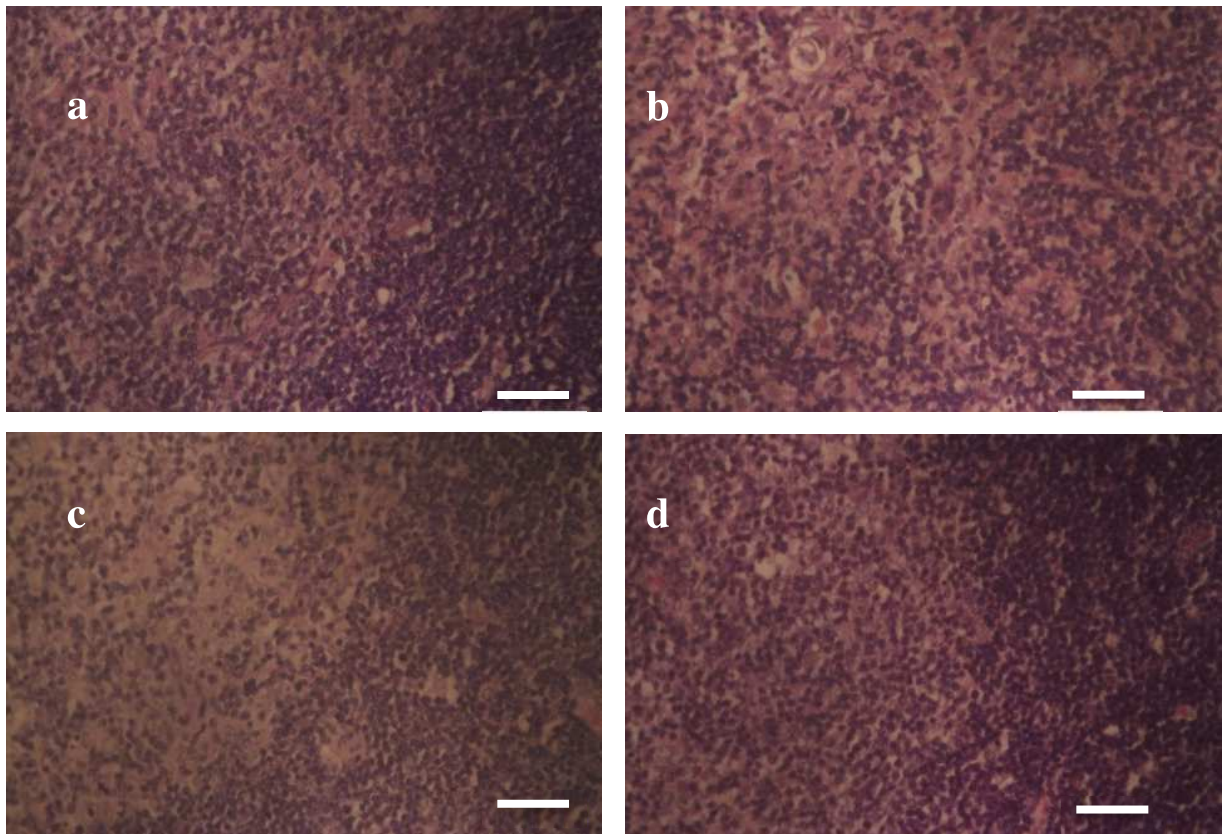


Fig.2-20 Optical microscopy images of thymus. a; Control group on the 4th day. b; Fasting group of fasting to 4th day. c; Control group on the 14th day. d; Fasting group on the 14th day, which gave recovery period for 10 days after the fasting period. The bars represent 0.01mm.

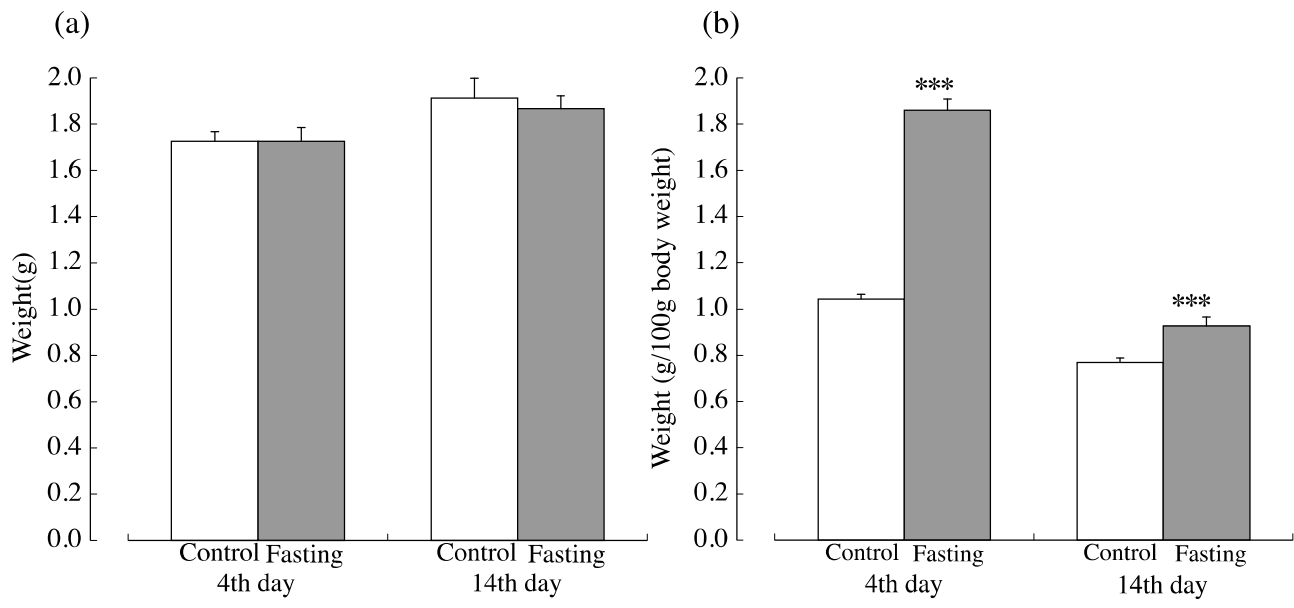


Fig.2-21 Brain weight. (a) The brain weights at day 4 and day 14 are shown. (b) The brain weights per 100g body weights at day 4 and day 14 are shown. Values are Means \pm S.D. for groups. ***P < 0.001, significantly different from the control value.



Fig.2-22 Macro observation of the encephalic coronal section in the fourth day of the control group. The P indicates distance more backward than Bregma, and A indicates distance more forward than Bregma.



Fig.2-23(a) Macro observation of the encephalic coronal section in the fourth day of the fasting group. The P indicates distance more backward than Bregma, and A indicates distance more forward than Bregma.

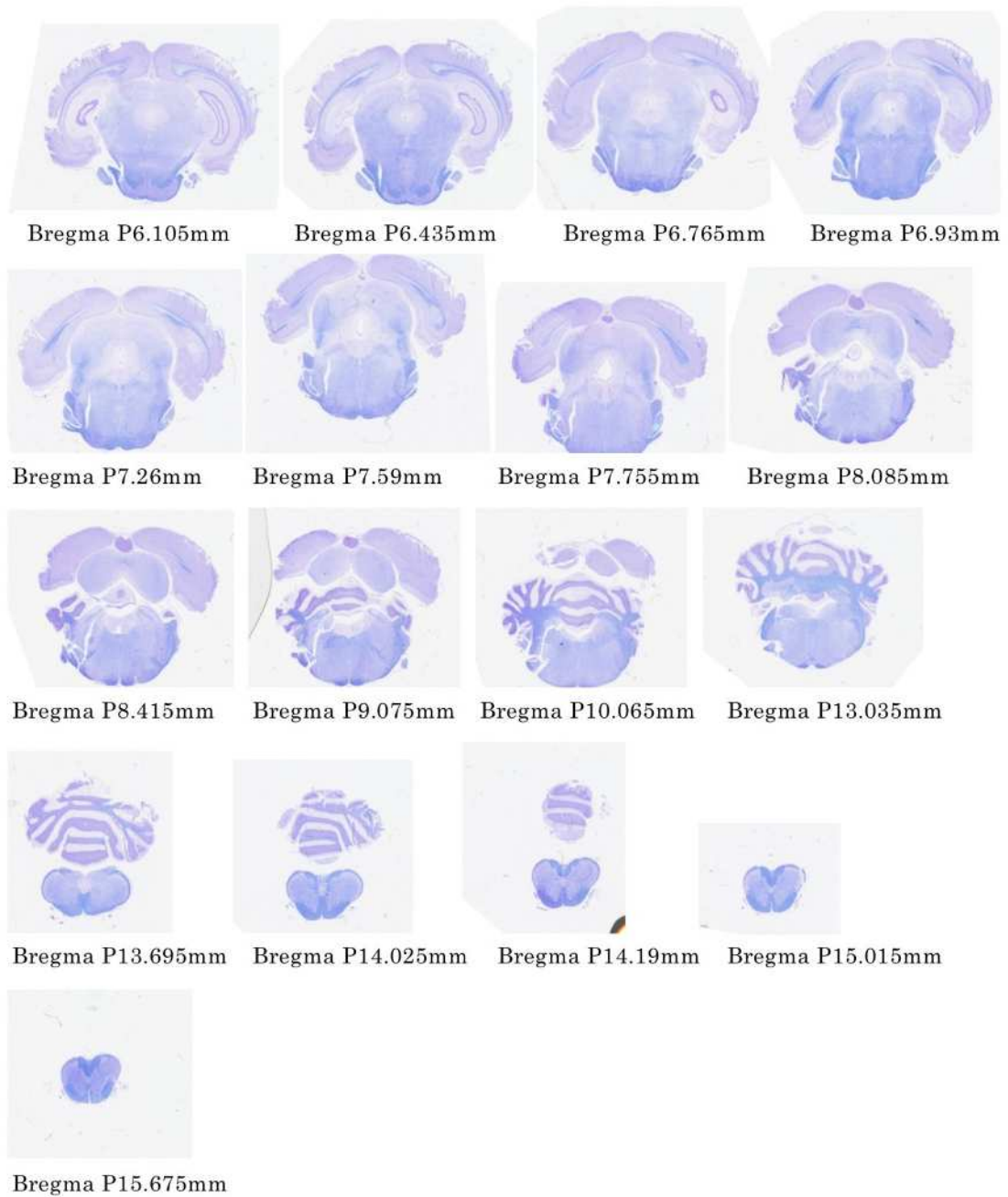


Fig.2-23(b) Macro observation of the encephalic coronal section in the fourth day of the fasting group. The P indicates distance more backward than Bregma, and A indicates distance more forward than Bregma.

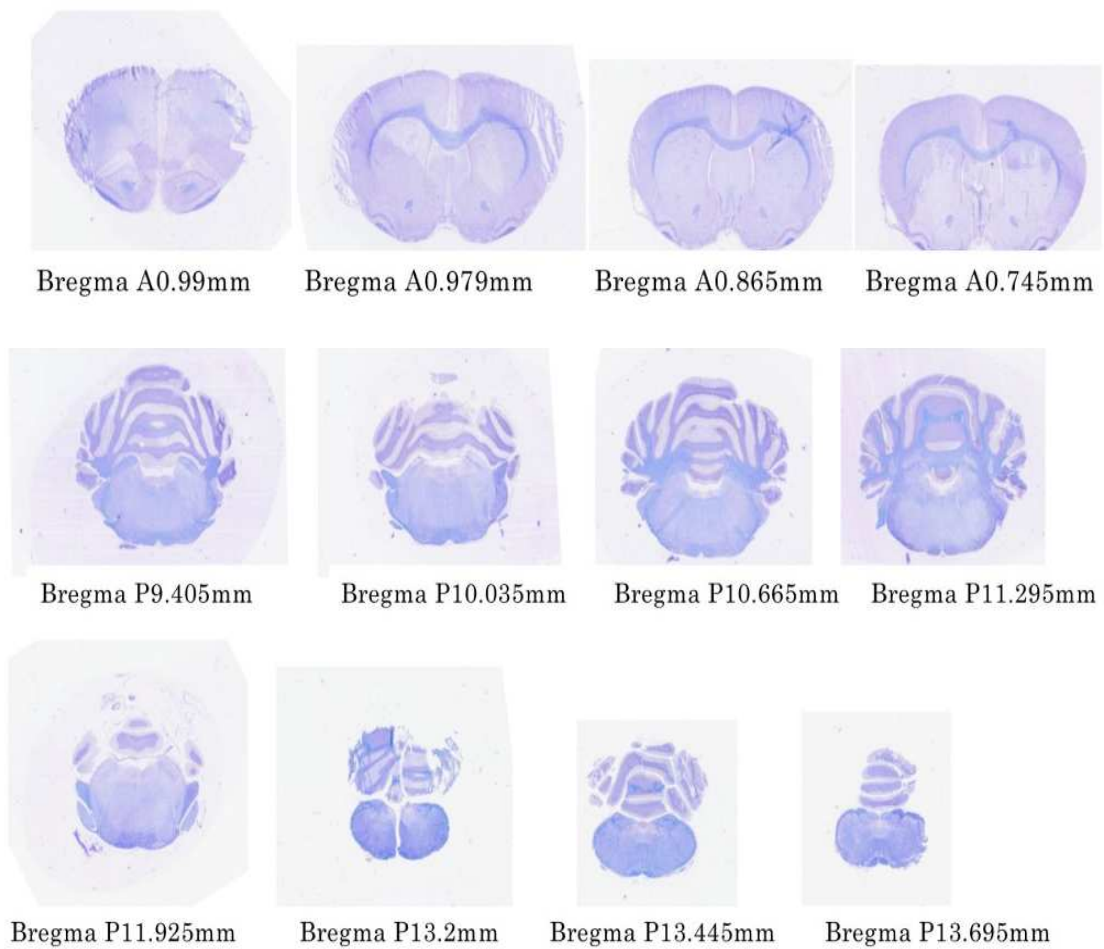


Fig.2-24(a) Macro observation of the encephalic coronal section in the 14th day of the control group. The P indicates distance more backward than Bregma, and A indicates distance more forward than Bregma.

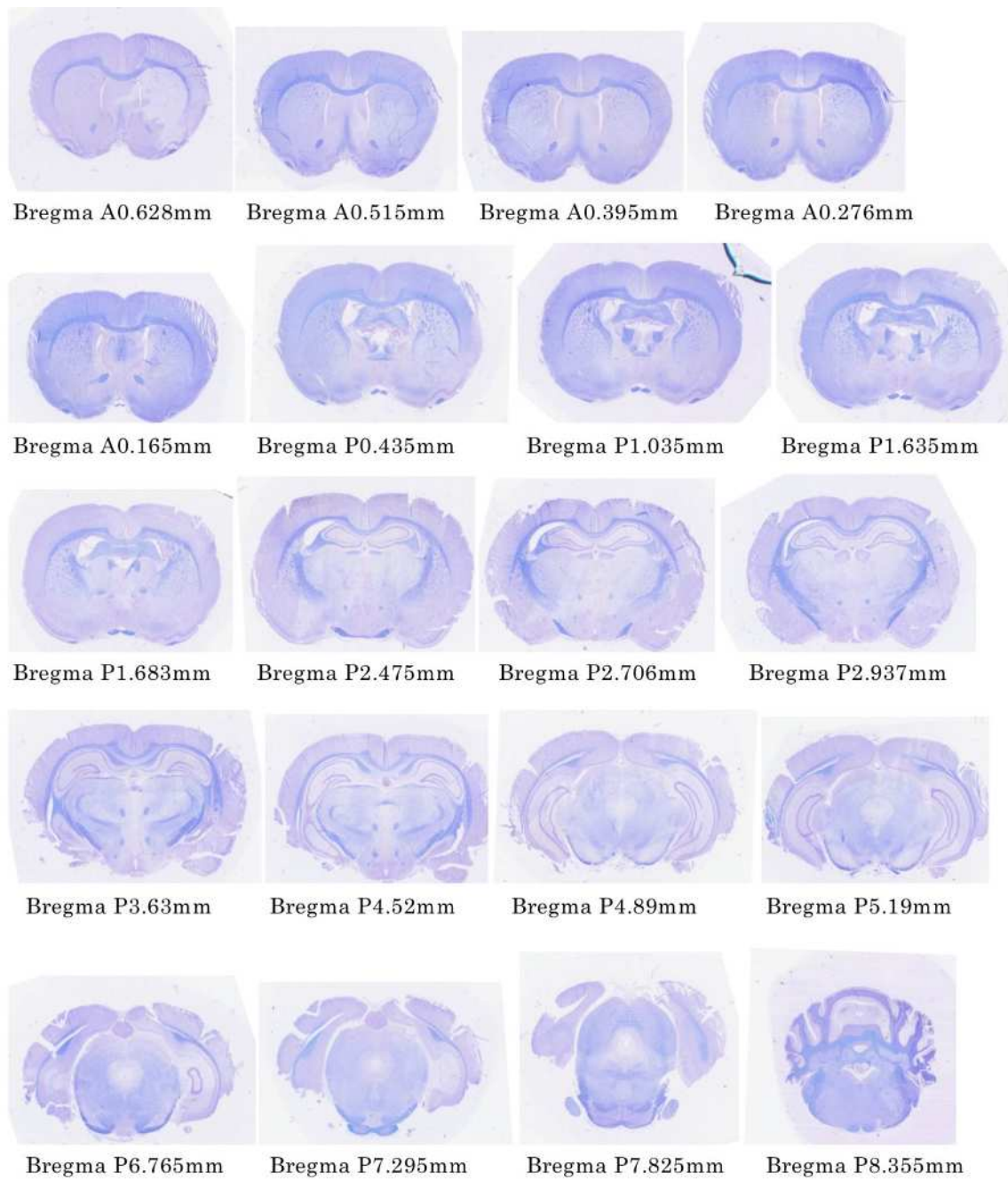


Fig.2-24(b) Macro observation of the encephalic coronal section in the 14th day of the control group. The P indicates distance more backward than Bregma, and A indicates distance more forward than Bregma.



Fig.2-25(a) Macro observation of the encephalic coronal section in the 14th day (the tenth day of the rebound period) of the fasting group. The P indicates distance more backward than Bregma, and A indicates distance more forward than Bregma.

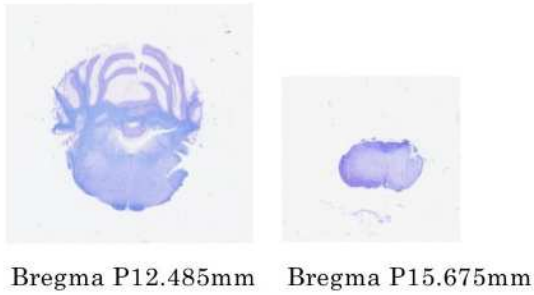


Fig.2-25(b) Macro observation of the encephalic coronal section in the 14th day (the tenth day of the rebound period) of the fasting group. The P indicates distance more backward than Bregma, and A indicates distance more forward than Bregma.

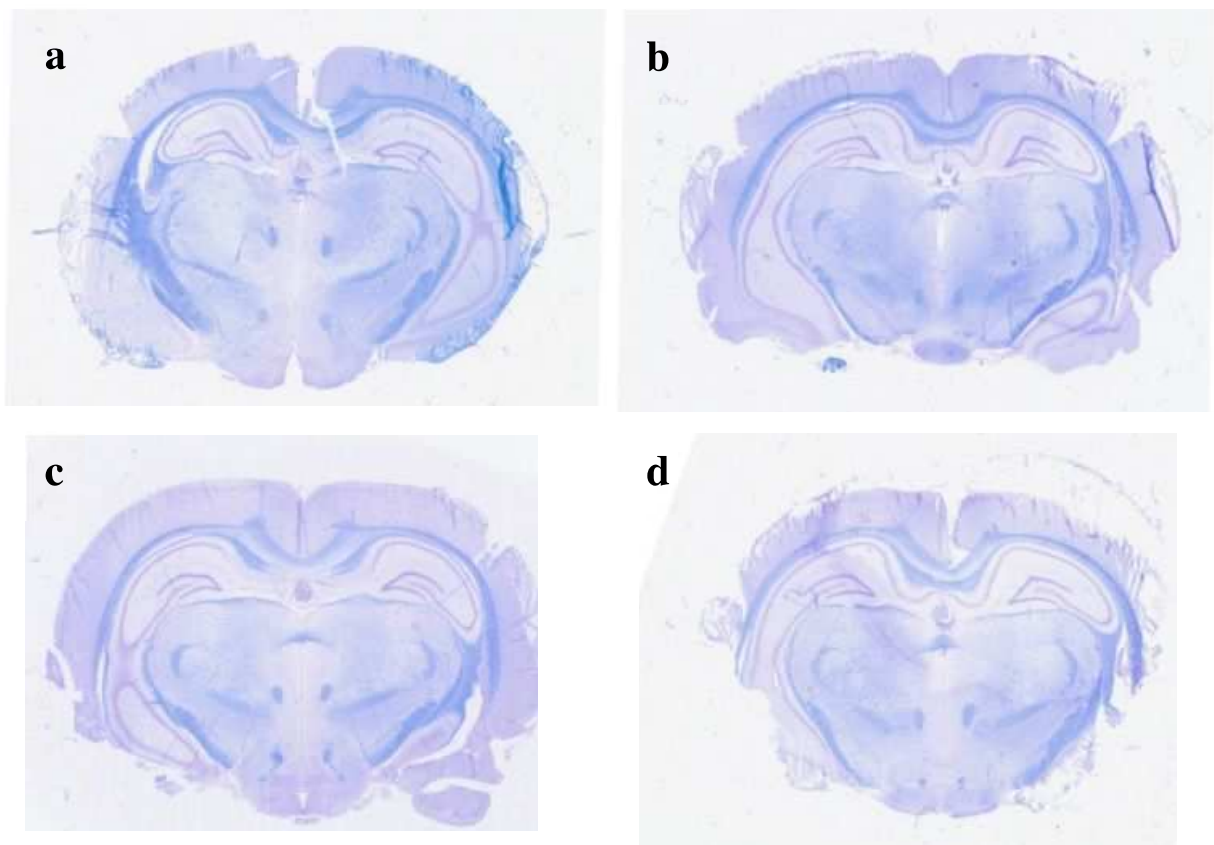


Fig.2-26 Macro observation of the brain coronal plane in the bregma P4.4mm. a; Control group on the 4th day. b; Fasting group of fasting to 4th day. c; Control group on the 14th day. d; Fasting group on the 14th day, which gave recovery period for 10 days after the fasting period.

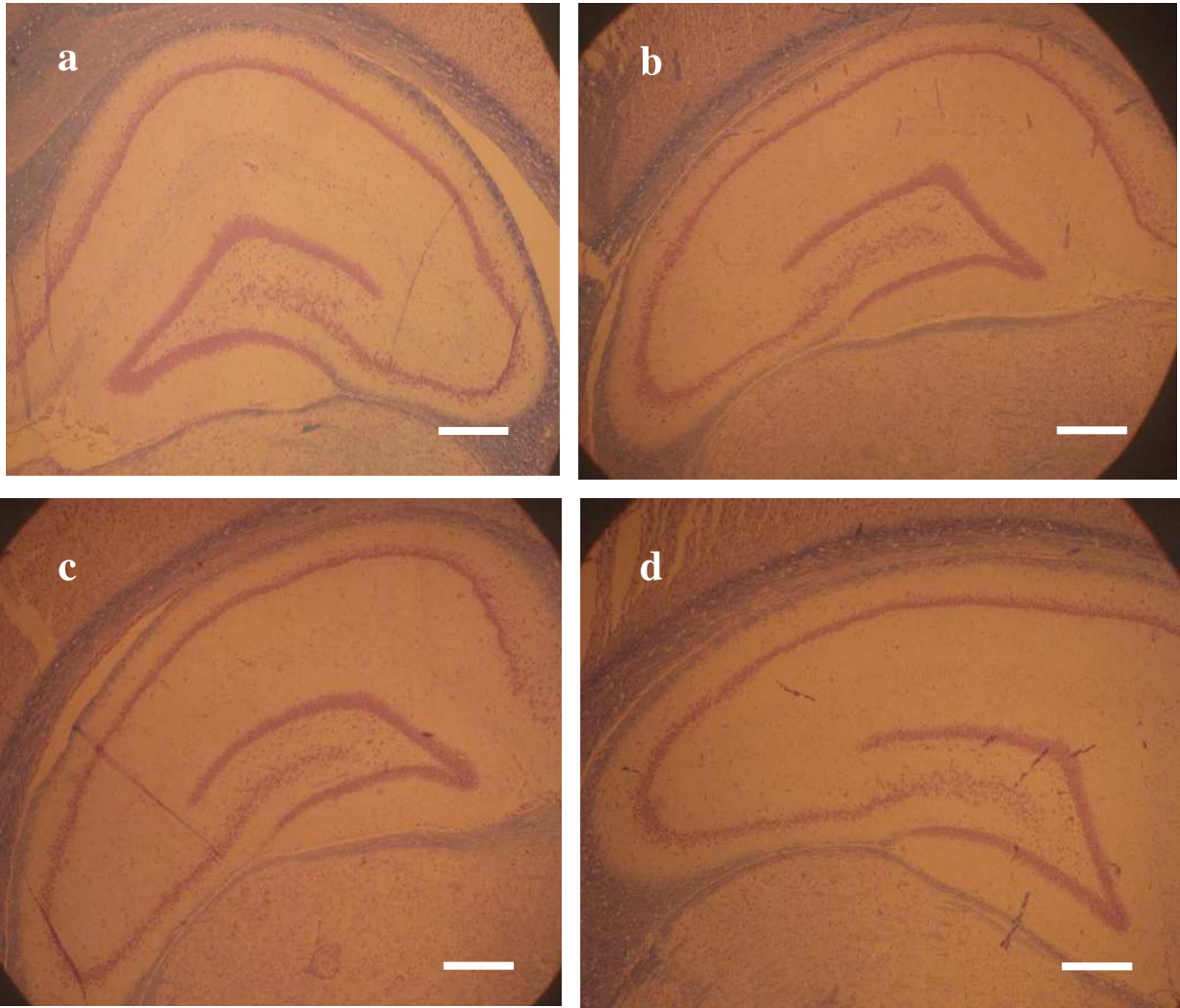


Fig.2-27 Optical microscopy images of the hippocampal formation in the bregma P4.4mm. a; Control group on the 4th day. b; Fasting group of fasting to 4th day. c; Control group on the 14th day. d; Fasting group on the 14th day, which gave recovery period for 10 days after the fasting period. The bars represent 1mm.

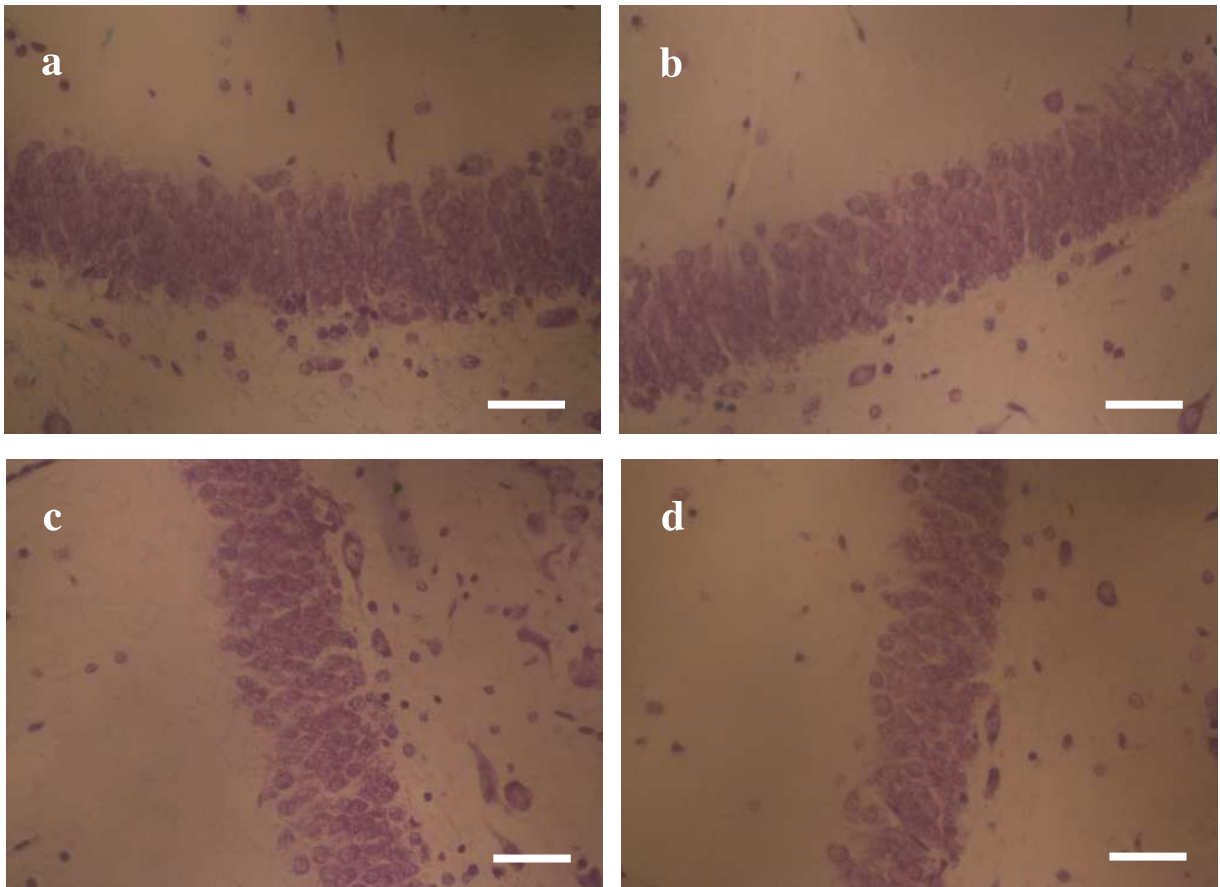


Fig.2-28 Optical microscopy images of the hippocampal pyramidal cells. a; Control group on the 4th day. b; Fasting group of fasting to 4th day. c; Control group on the 14th day. d; Fasting group on the 14th day, which gave recovery period for 10 days after the fasting period. The bars represent 0.01mm.

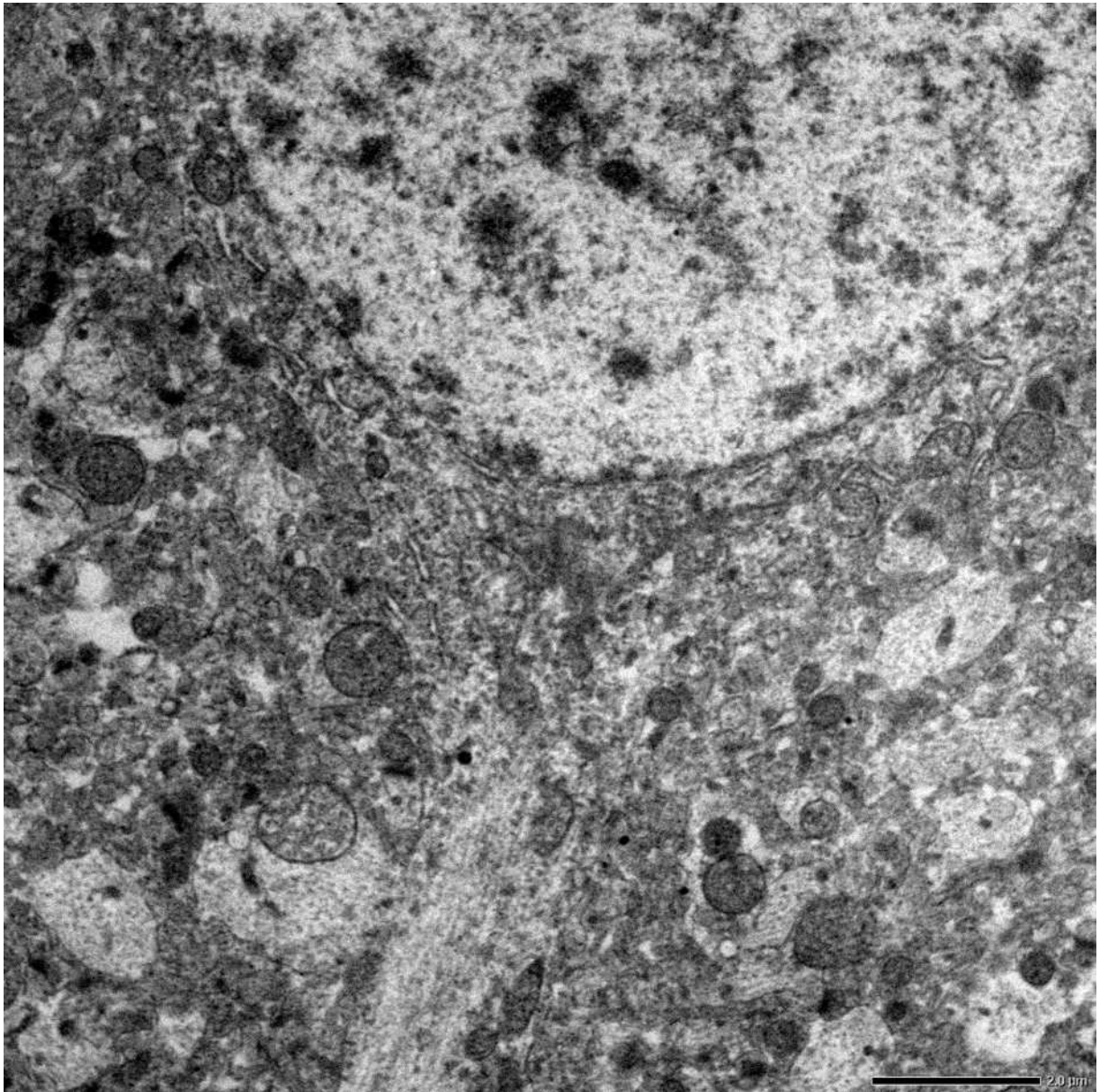


Fig.2-29 Electron microscope image of the cerebral cortex of control group rat. The bars represent $2\mu\text{m}$.

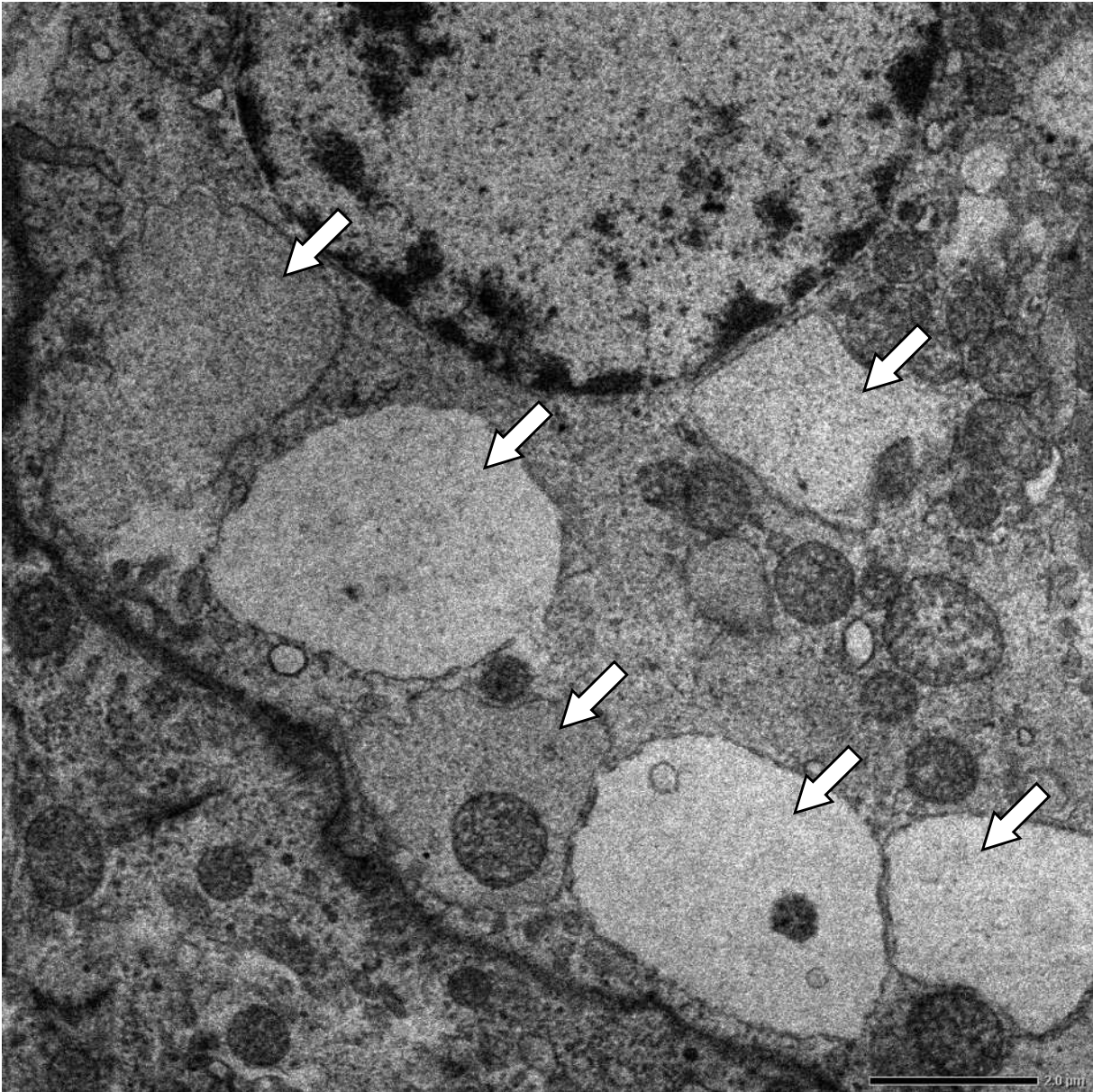


Fig.2-30 Electron microscope image of the cerebral cortex in the fast fourth day. The bars represent $2\mu\text{m}$. Arrows: Intracellular vesicle.

Chapter 3

Table3-1 Composition of experimental diets (g/100g).

Moisture	7.7
Crude protein	23.6
Crude fat	5.3
Crude fiber	6.1
Crude ash	2.9
NFE	54.4
Total energy (kcal/100g)	360

The analytical value is as follows. Vitamin content; VA 21690IU, VD₃ 158IU, VE 11.0mg, VK₁ 0.04mg, VB₁ 2.12mg, VB₂ 1.24g, VC 4mg, VB₆ 0.87, VB₁₂ 5.3mg, Inositol 578mg, Folic acid 0.20mg, Biotin 23.2μg, Pantothenic acid 2.73mg, Niacin 10.4mg, Colin 0.22g. Mineral content; Ca 1.12g, P 0.90g, Mg 0.26g, Na 0.21g, K 0.99g, Fe 10.9mg, Al 3.1mg, Cu 0.82mg, Zn 5.28mg, Mn 5.89mg. Amino acid content; Isoleucine 0.89g, Leucine 1.78g, Lysine 1.25g, Methionine 0.44g, Cystine 0.37g, Phenylalanine 1.02g, Tyrosine 0.69g, Threonine 0.92g, Tryptophan 0.29g, Valine 1.08g, Arginine 1.43g, Histidine 0.58g, Alanine 1.22g, Aspartic acid 2.14g, Glutamic acid 3.96g, Serine 1.11g, Glycine 1.16g, Proline 1.27g.

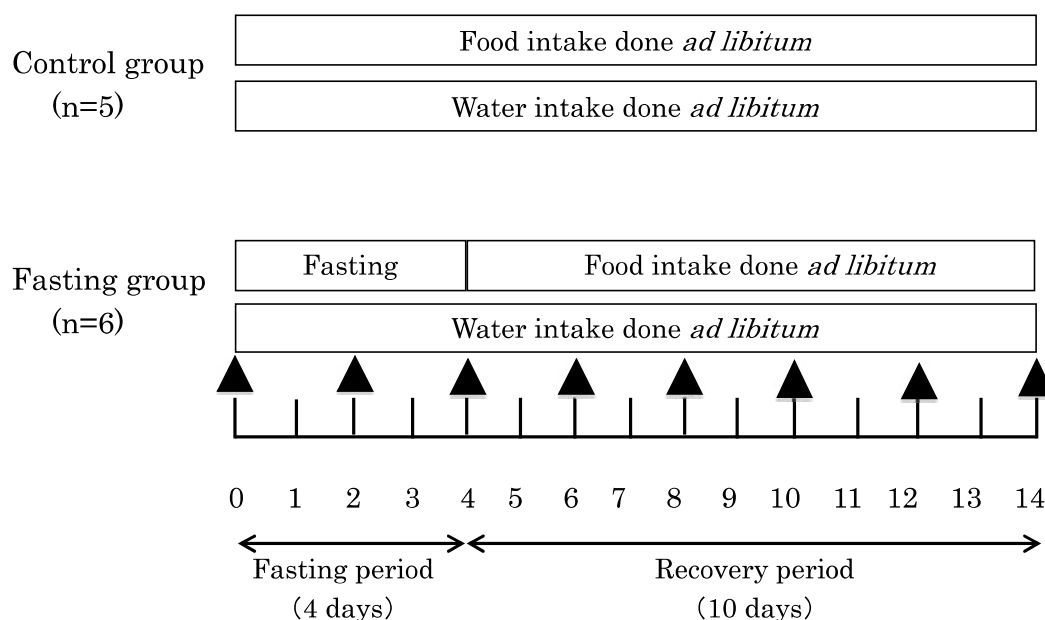


Fig.3-1 Experimental design. In the experimental period, body weight, food intake and water intake of the rats were measured daily. X-ray computed tomograph equipment imaging was performed every other day during the experiment period as indicated by ▲ in the figure.



Fig.3-2 Anesthesia system for small animals. Rats were anesthetized using the SN-487 type anesthesia system manufactured by Shinano Co., Ltd.



Fig.3-3 X-ray computed tomograph imaging system. X-ray CT imaging of rats was performed using LCT-100 type manufactured by Hitachi-Aloka Medical Co., Ltd.

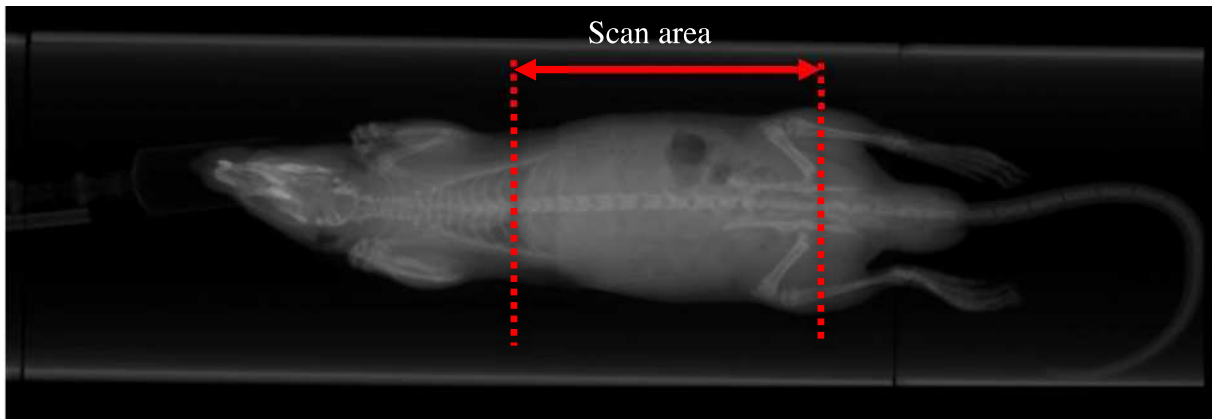


Fig.3-4 Scout image of rats. Scan area is in the range of arrow. Anesthetized rats were placed in a supine position, and an area from the diaphragm region to the femoral head part was X-ray CT photographed.

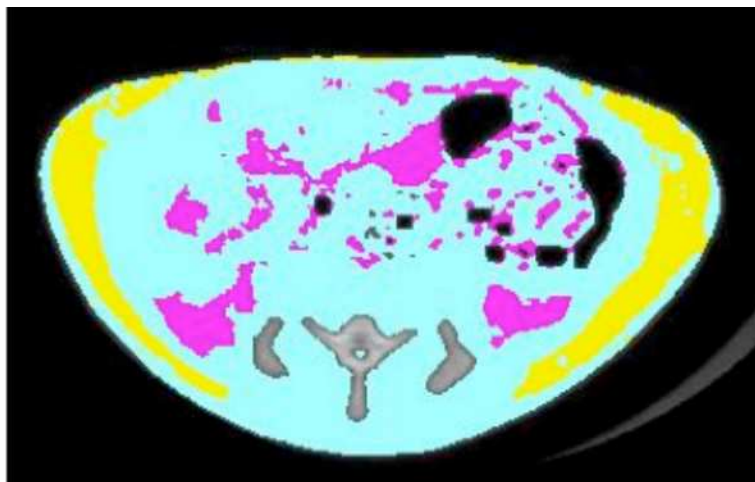


Fig.3-5 Abdominal tomographic image identified a certain area. The pink area shows visceral fat, the yellow area shows subcutaneous fat, the gray area shows bone, and the light blue area shows other organs.

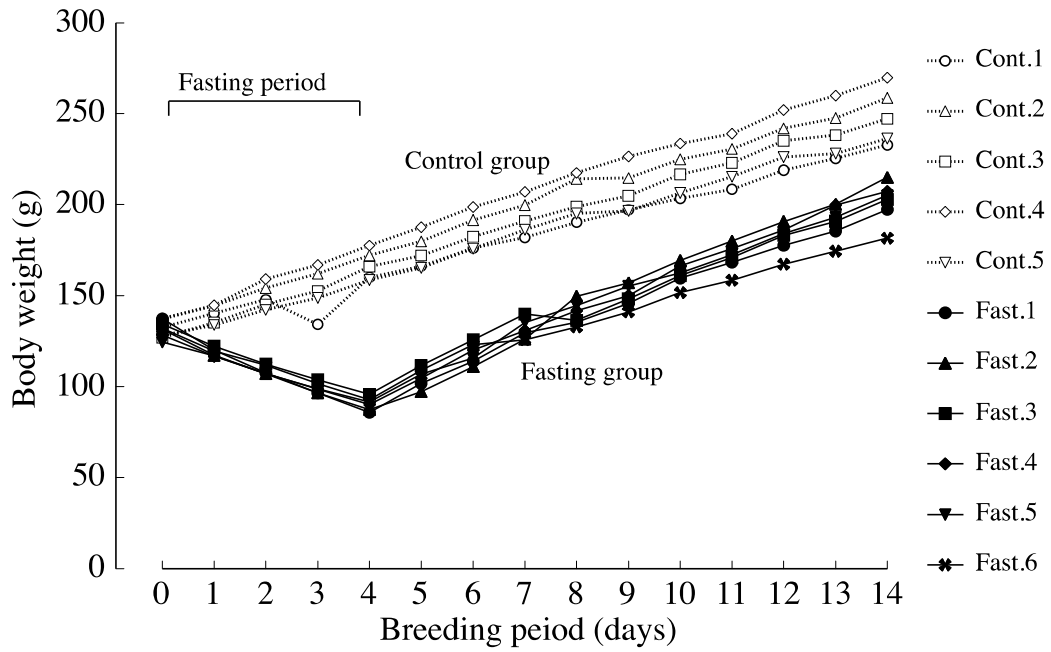


Fig.3-6 Growth curves of each individual.

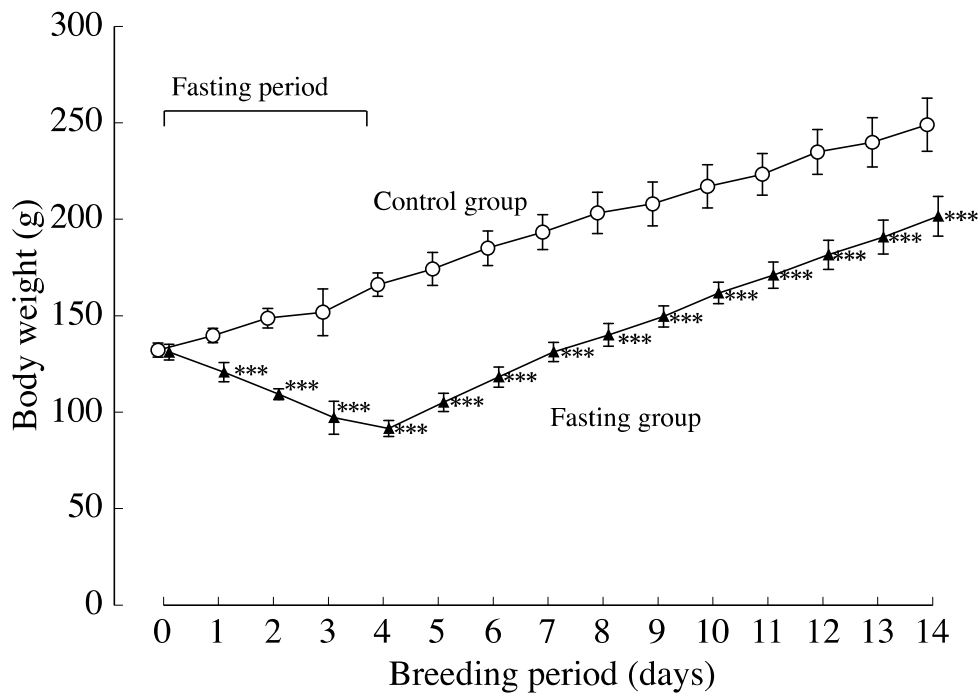


Fig.3-7 Growth curves of rats. Values are Means \pm S.D. for groups. ***P<0.001, significantly different from the control value.

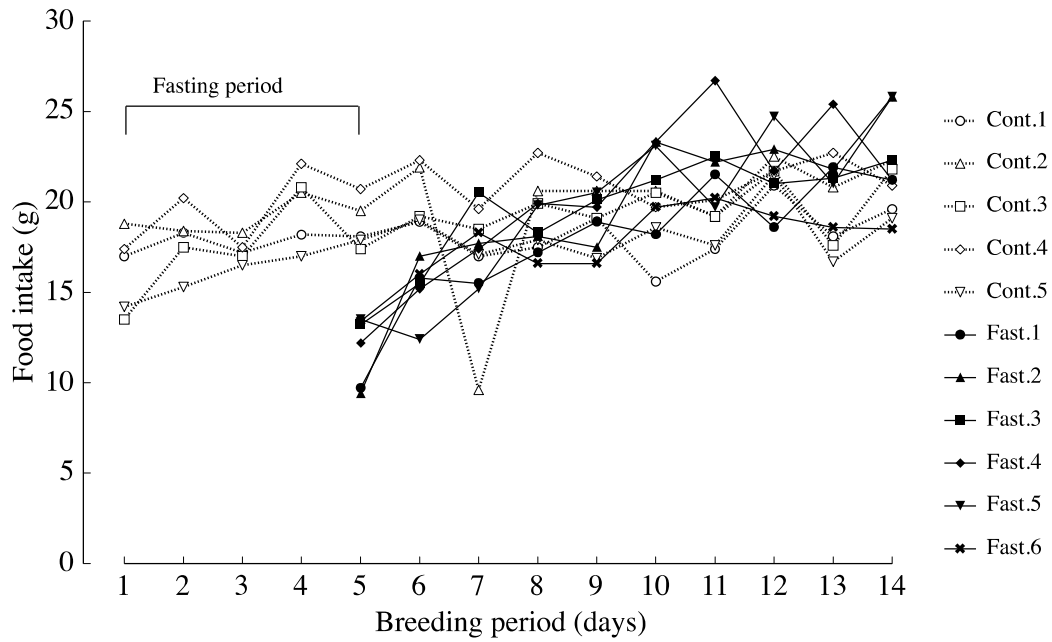


Fig.3-8 Changes in food intake of each individual.

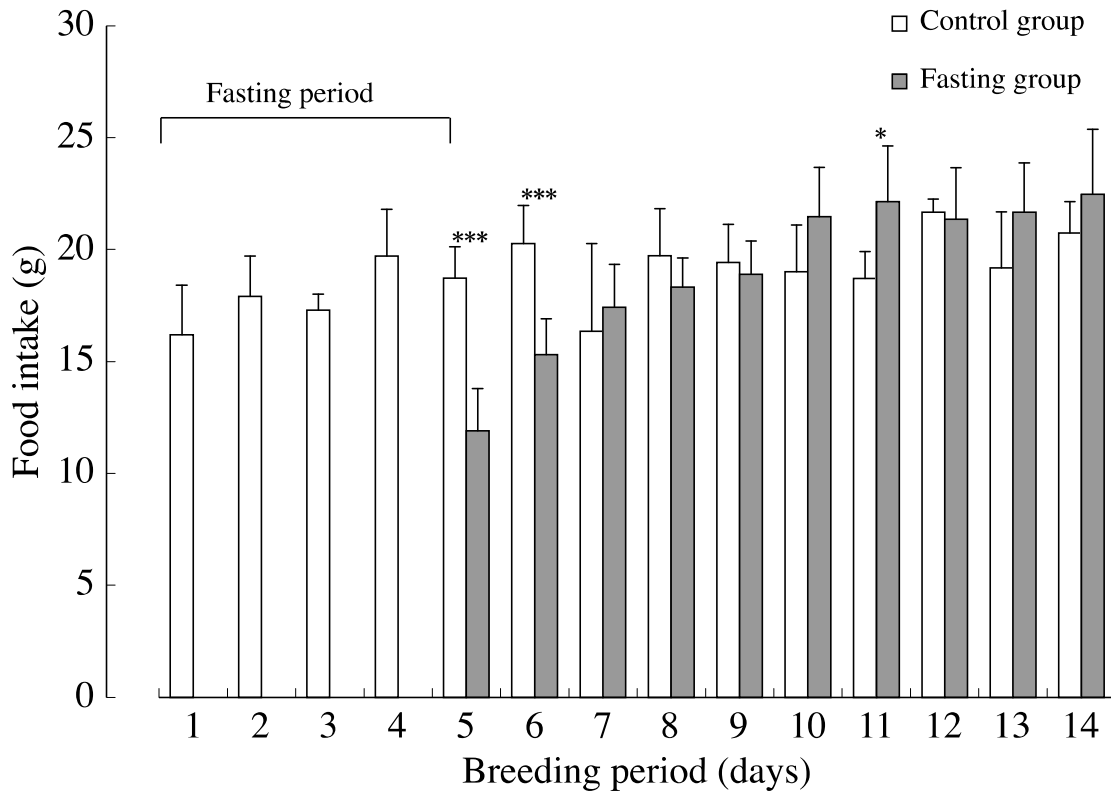


Fig.3-9 Changes in food intake. Changes of the rat food consumption during the experimental period. Values are Means \pm S.D. for groups. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, significantly different from the control value.

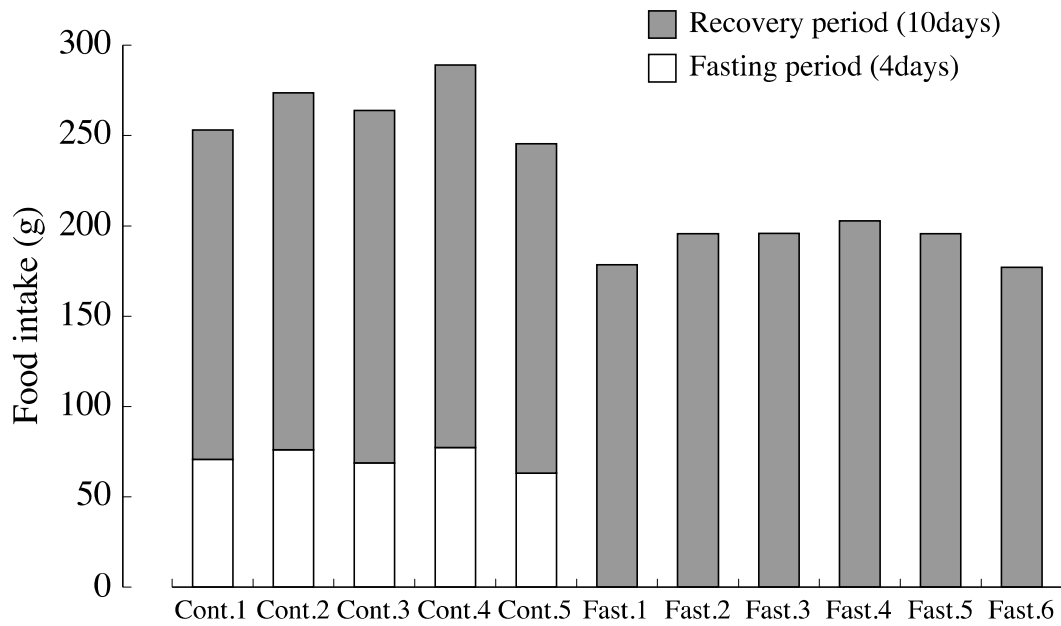


Fig.3-10 Total amount of food intake of each individual.

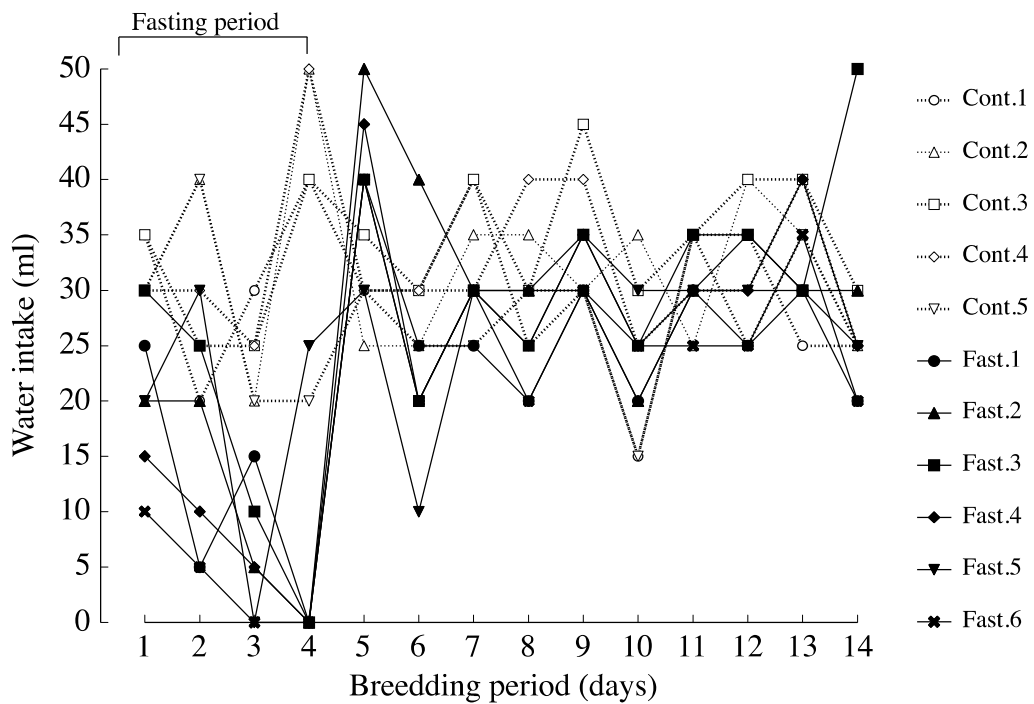


Fig.3-11 Changes in the water consumption of each individual.

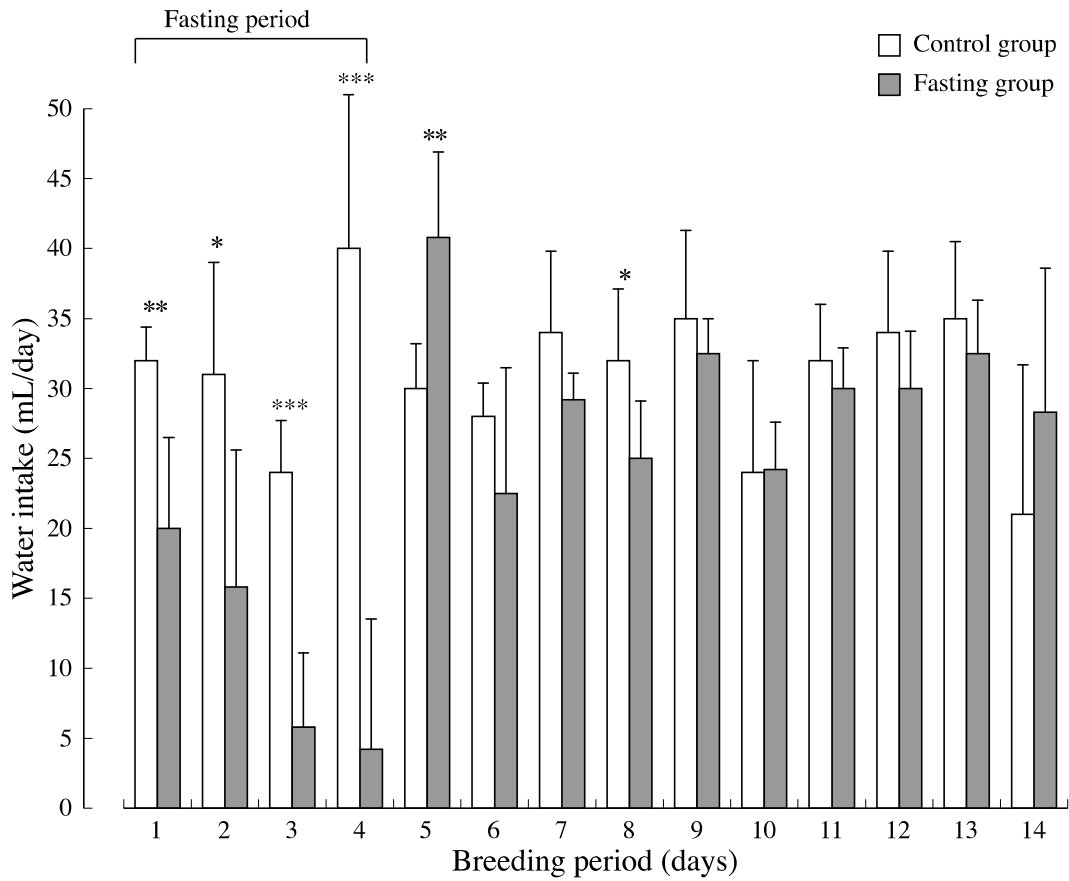


Fig.3-12 Changes in the water consumption. Changes of the rat water consumption during the experimental period. Values are Means \pm S.D. for groups. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, significantly different from the control value.

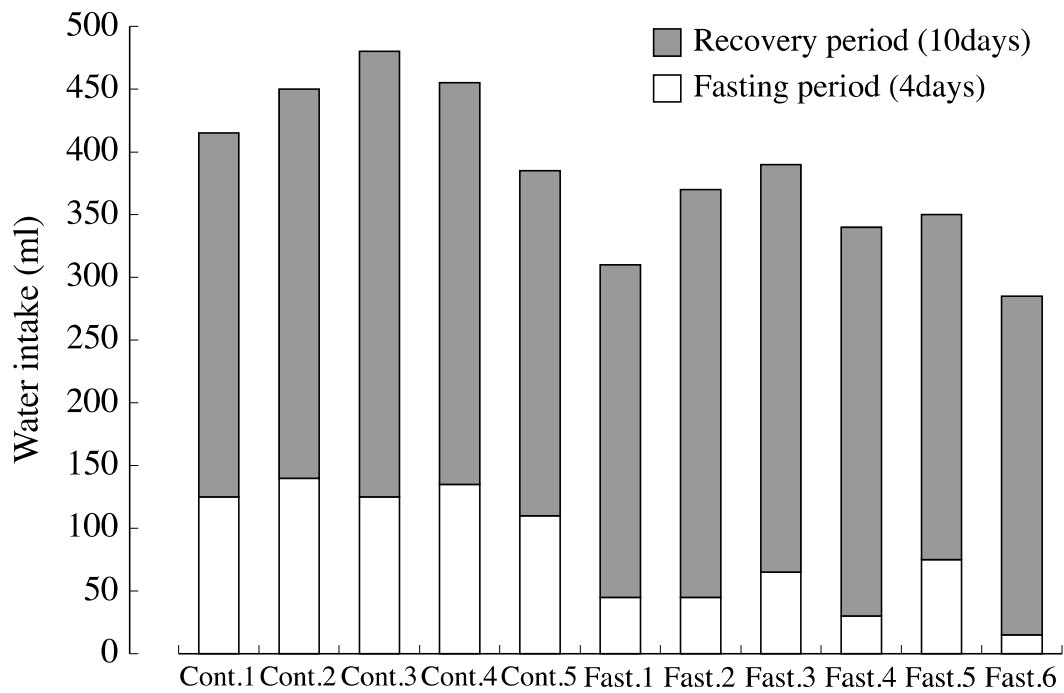


Fig.3-13 The total water consumption of each individual.

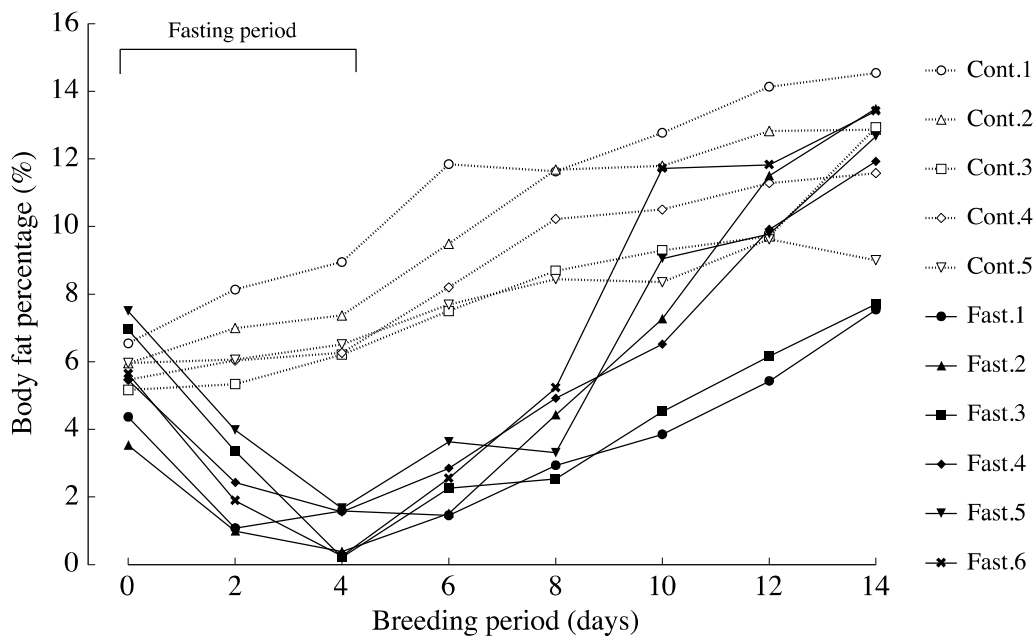


Fig.3-14 Changes in the body fat percentage of each individual.

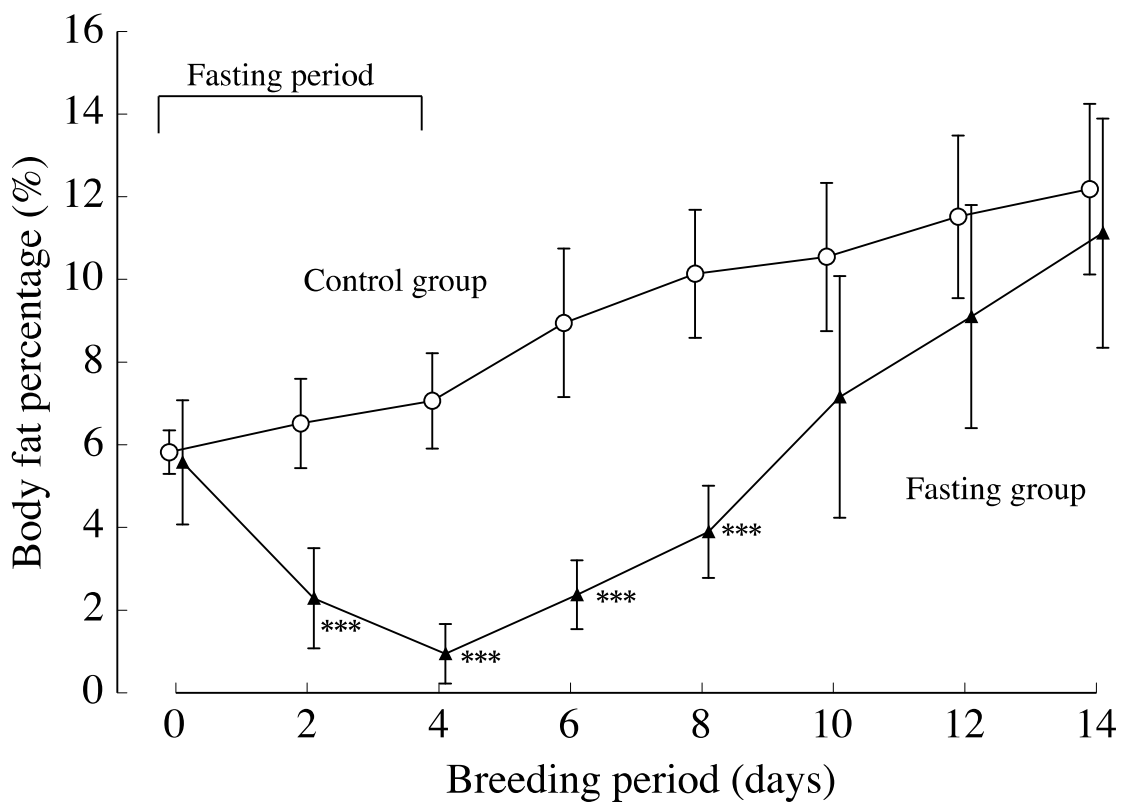


Fig.3-15 Changes of the body fat percentage. Values are Means \pm S.D. for groups. *P<0.05, ***P<0.001, significantly different from the control value.

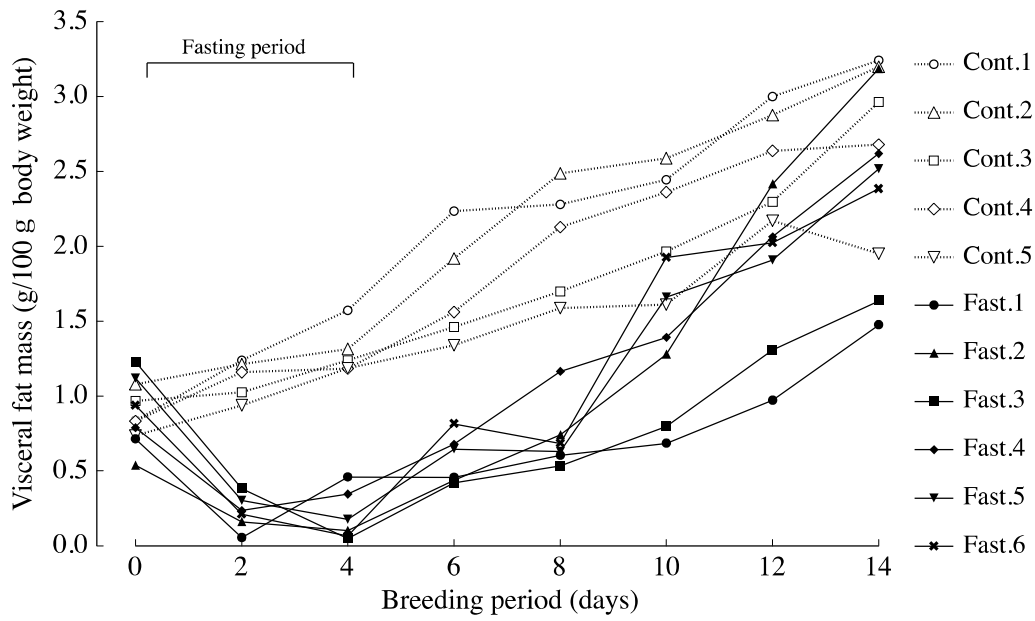


Fig.3-16 Changes in the visceral fat mass of each individual.

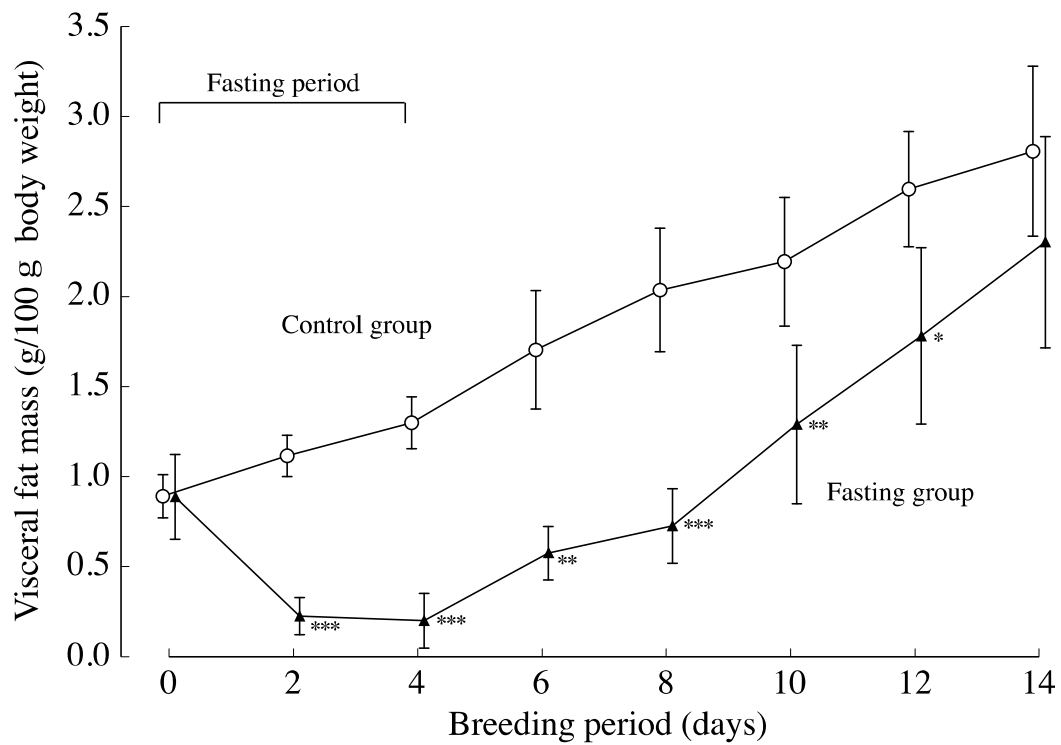


Fig.3-17 Changes of visceral fat mass. Values are Means \pm S.D. for groups. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, significantly different from the control value.

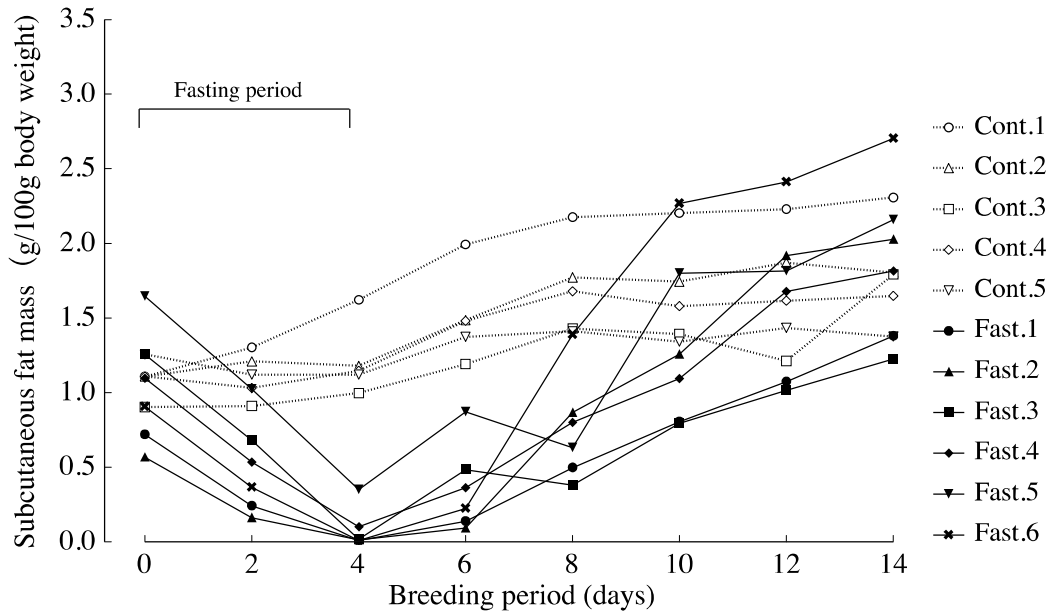


Fig.3-18 Changes in the subcutaneous fat mass of each individual.

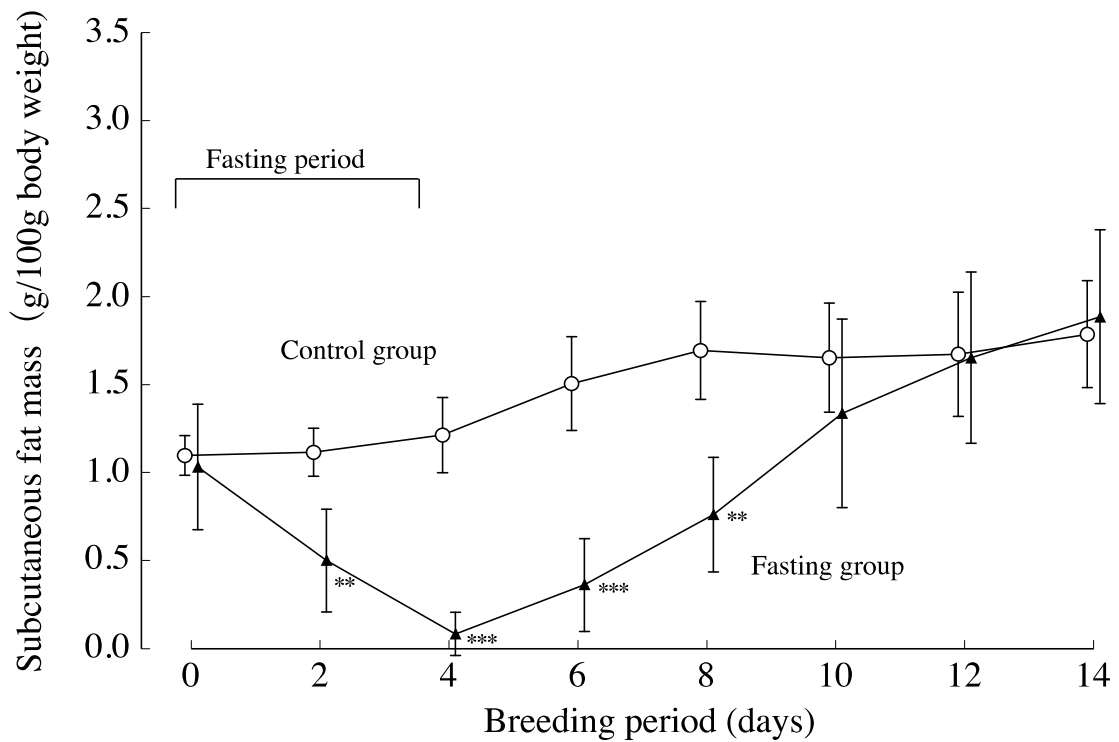


Fig.3-19 Changes of the subcutaneous fat mass. Values are Means \pm S.D. for groups. **P < 0.01, ***P < 0.001, significantly different from the control value.

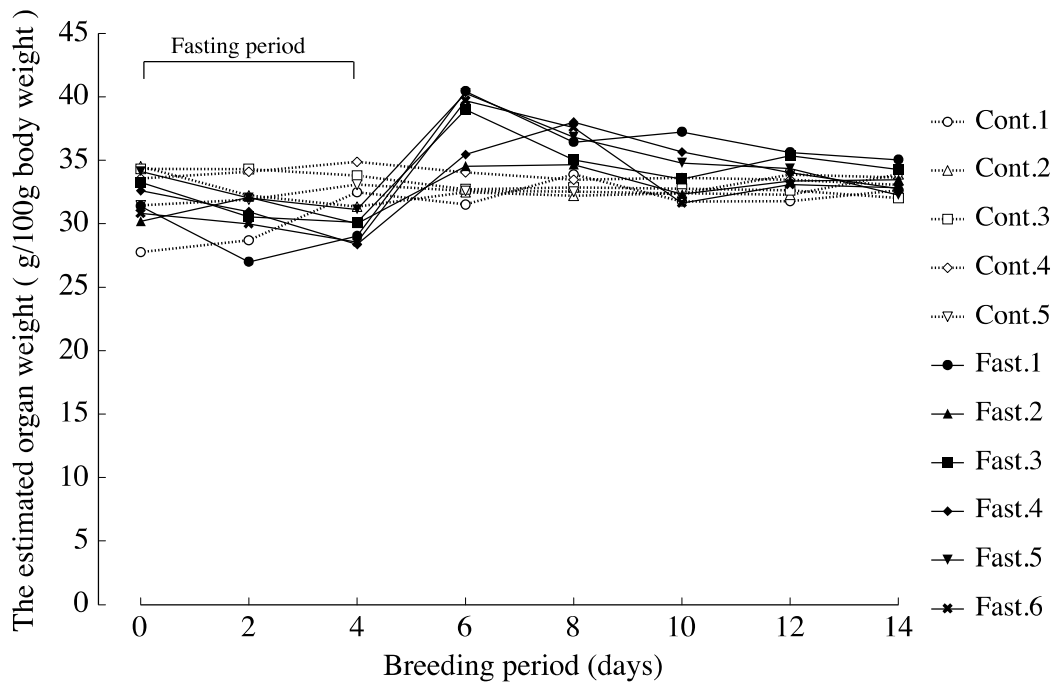


Fig.3-20 Changes in the estimated organ weight of each individual.

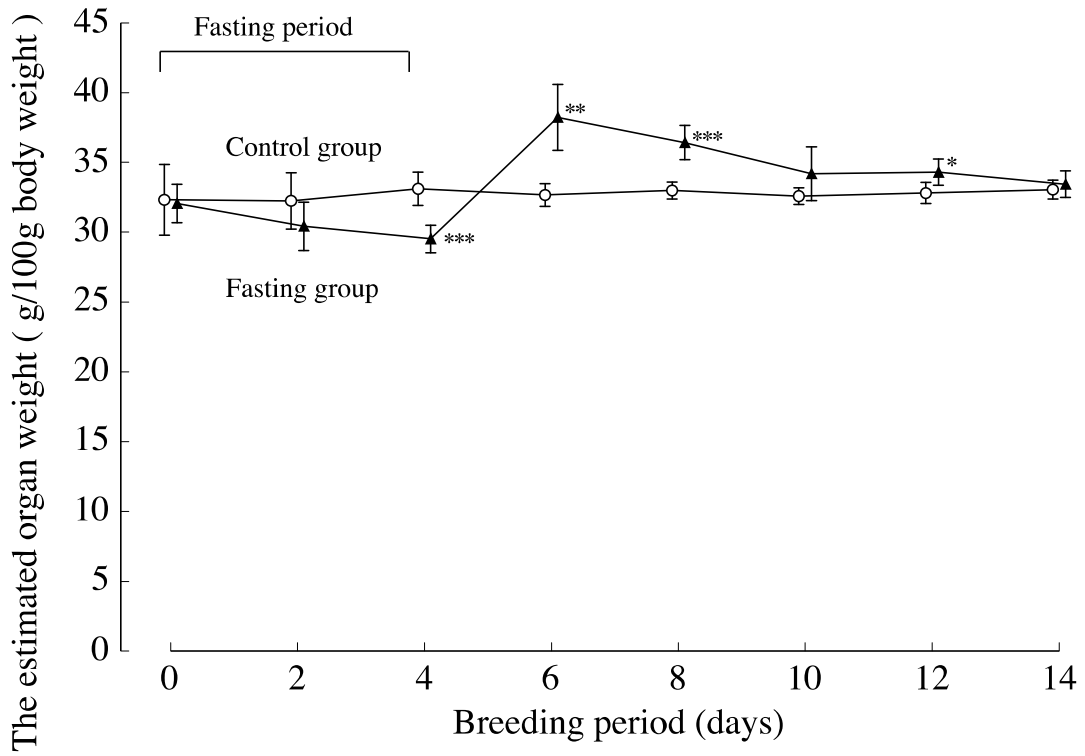


Fig.3-21 Change of the estimated organ weight. Values are Means \pm S.D. for groups.

P < 0.01, *P < 0.001, significantly different from the control value.

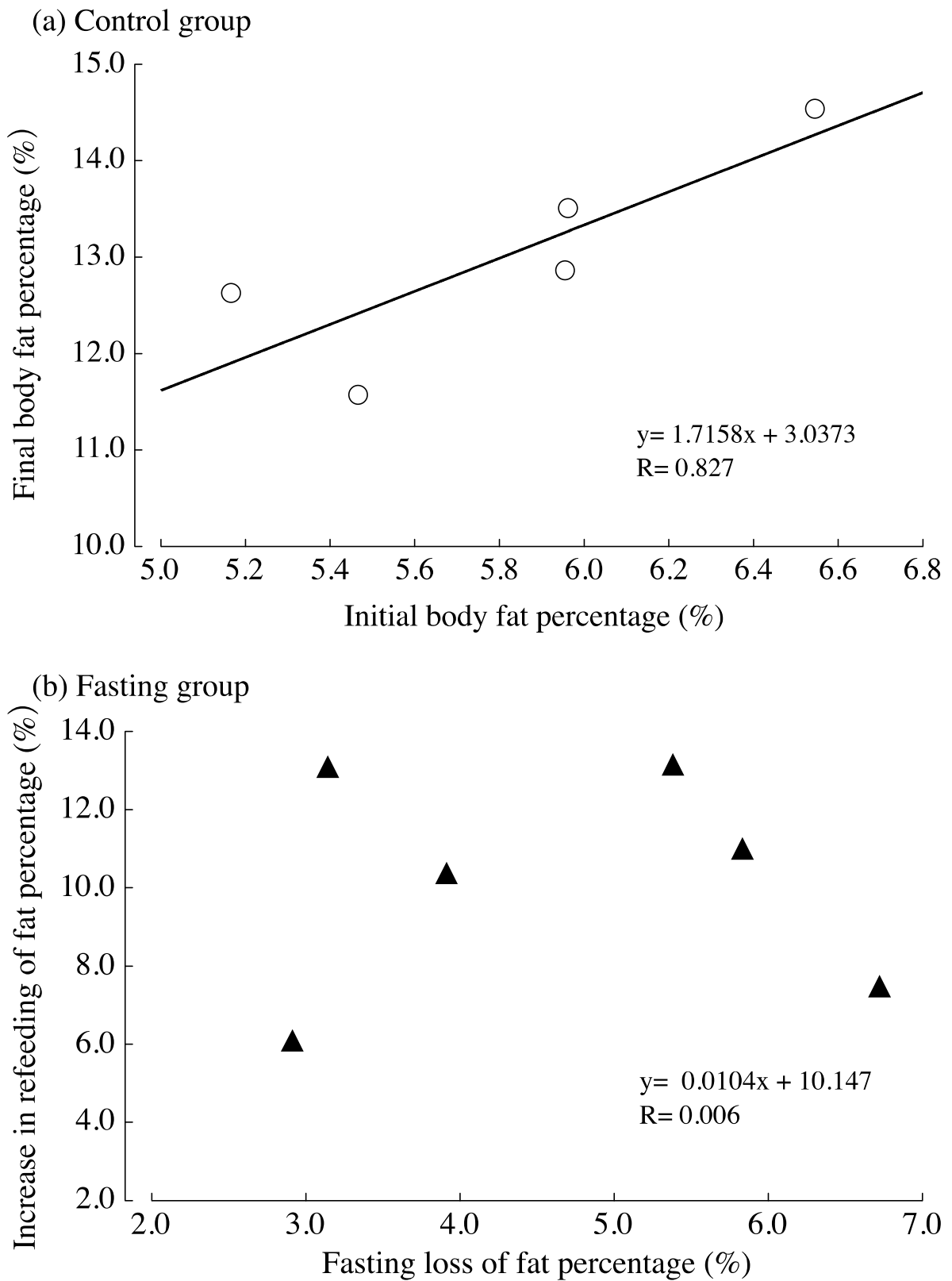


Fig.3-22 Relationship between increased body fat percentage during the experiment.

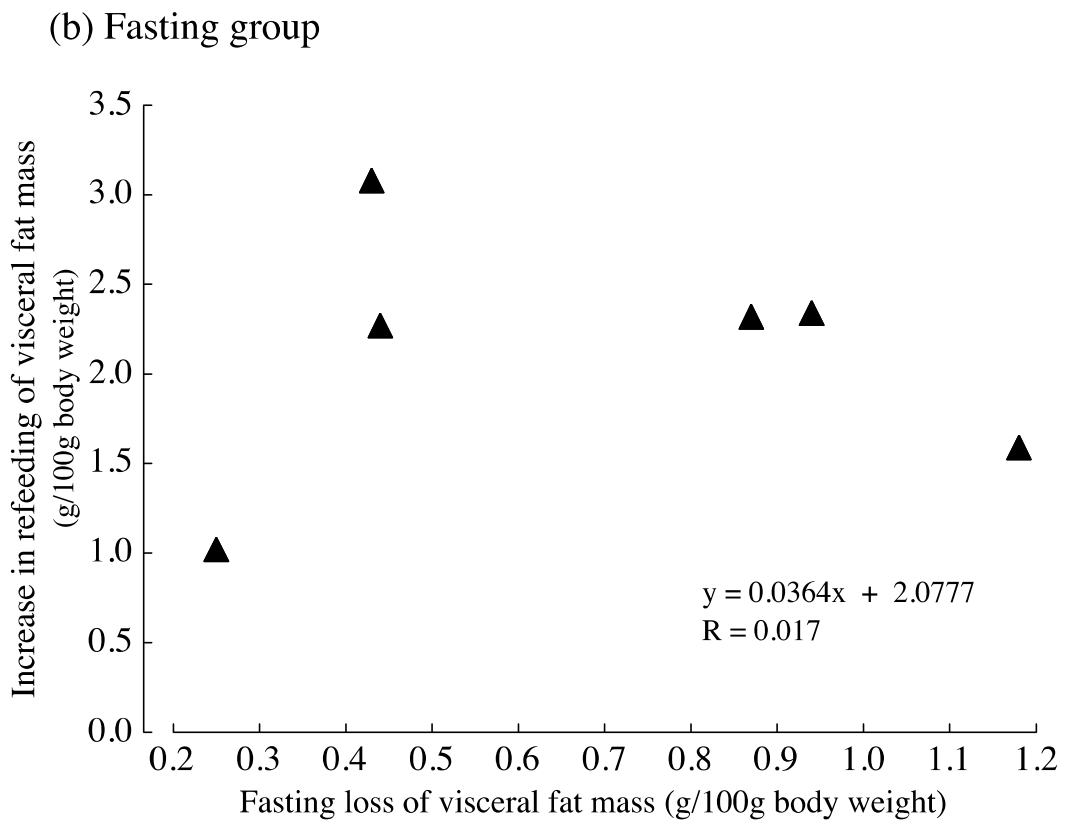
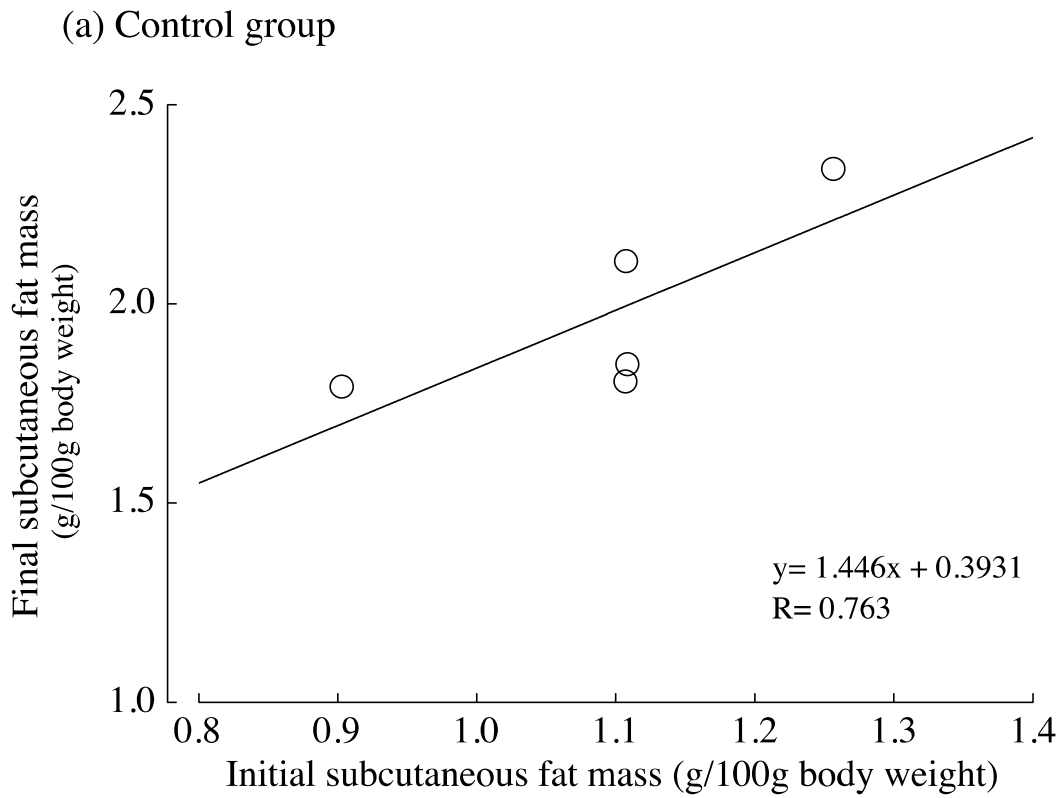


Fig.3-23 Relationship between increased visceral fat mass during the experiment.

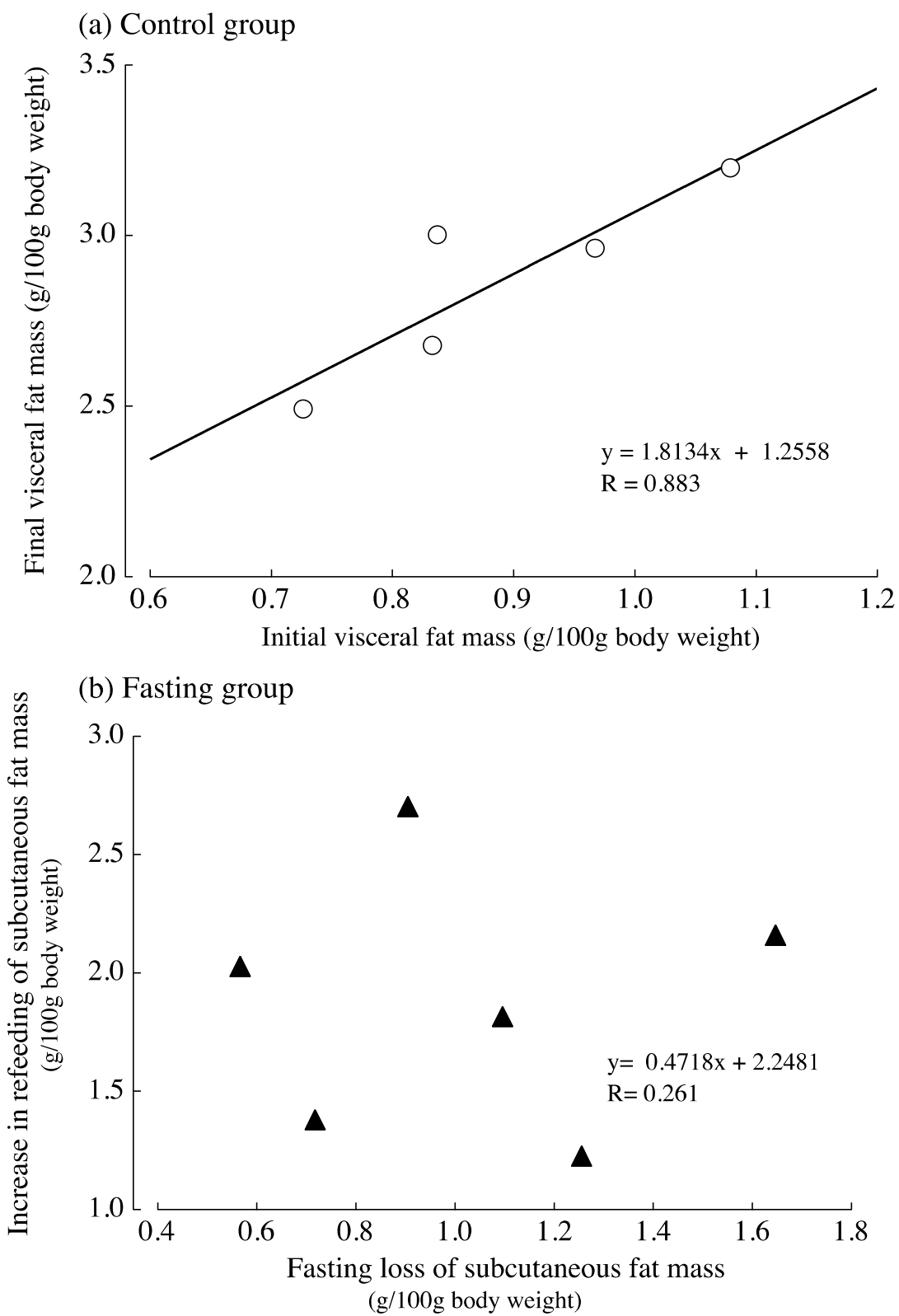


Fig.3-24 Relationship between increased subcutaneous fat mass during the experiment.

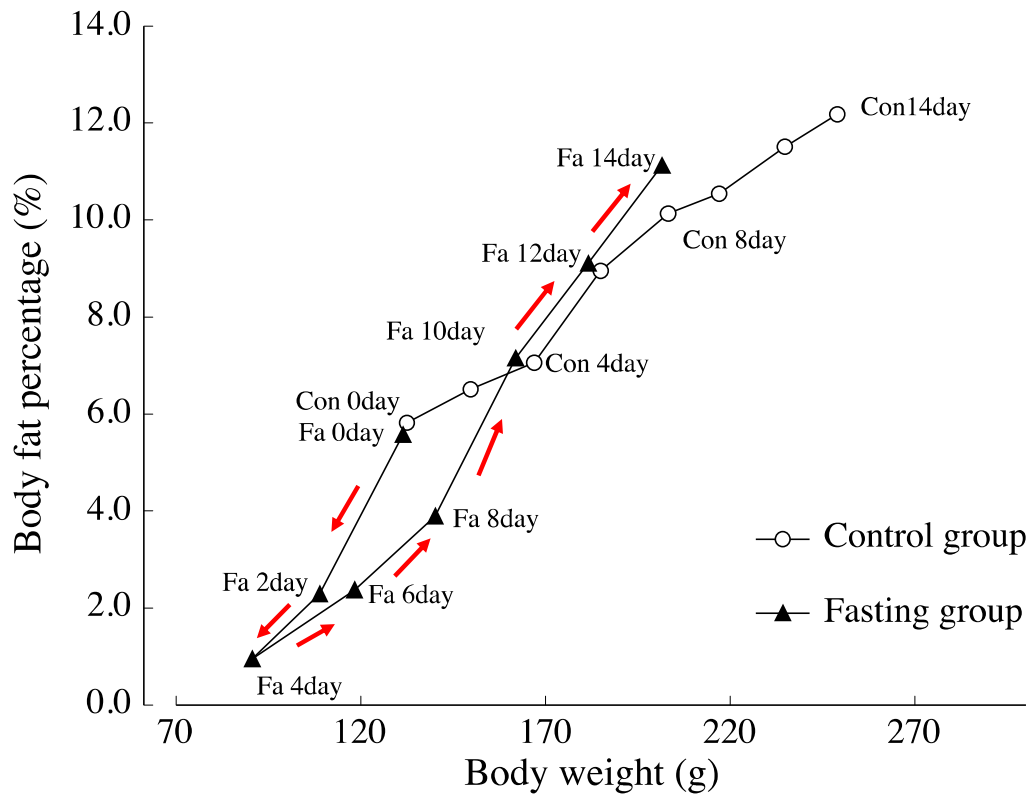


Fig.3-25 Changes over time in relation between body weight and body fat percentage.

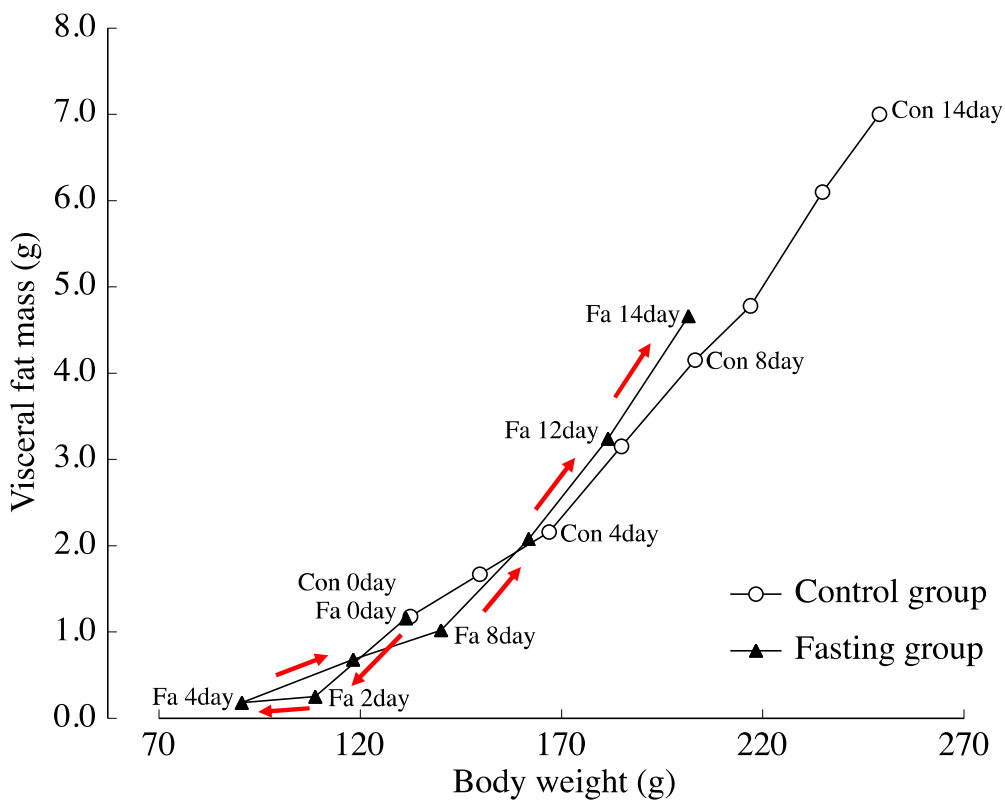


Fig.3-26 Changes over time in relation between body weight and visceral fat mass.

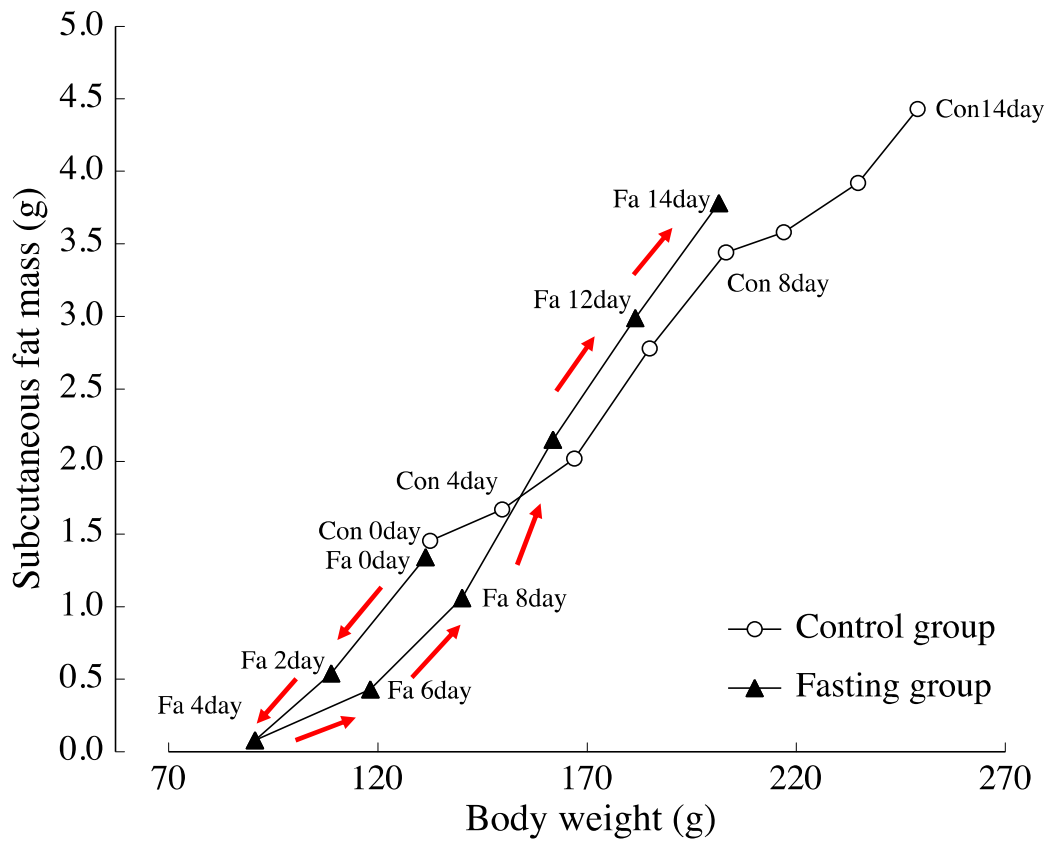


Fig.3-27 Changes over time in relation between body weight and subcutaneous fat mass.

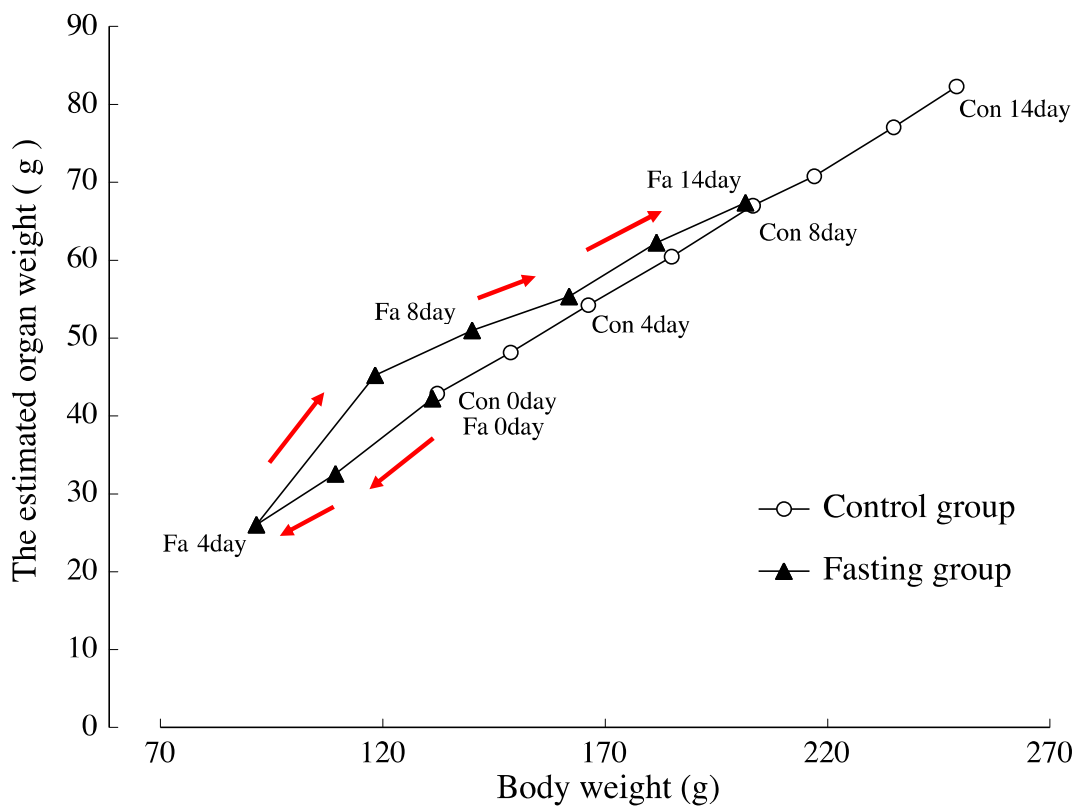


Fig.3-28 Changes over time in relation between body weight and the estimated organ weight.

Chapter 4

Table4-1 Composition of experimental diets (g/100g).

Moisture	7.7
Crude protein	23.6
Crude fat	5.3
Crude fiber	6.1
Crude ash	2.9
NFE	54.4
Total energy (kcal/100g)	360

The analytical value is as follows. Vitamin content; VA 21690IU, VD₃ 158IU, VE 11.0mg, VK₃ 0.04mg, VB₁ 2.12mg, VB₂ 1.24g, VC 4mg, VB₆ 0.87, VB₁₂ 5.3mg, Inositol 578mg, Folic acid 0.20mg, Biotin 23.2μg, Pantothenic acid 2.73mg, Niacin 10.4mg, Colin 0.22g. Mineral content; Ca 1.12g, P 0.90g, Mg 0.26g, Na 0.21g, K 0.99g, Fe 10.9mg, Al 3.1mg, Cu 0.82mg, Zn 5.28mg, Mn 5.89mg. Amino acid content; Isoleucine 0.89g, Leucine 1.78g, Lysine 1.25g, Methionine 0.44g, Cystine 0.37g, Phenylalanine 1.02g, Tyrosine 0.69g, Threonine 0.92g, Tryptophan 0.29g, Valine 1.08g, Arginine 1.43g, Histidine 0.58g, Alanine 1.22g, Aspartic acid 2.14g, Glutamic acid 3.96g, Serine 1.11g, Glycine 1.16g, Proline 1.27g.

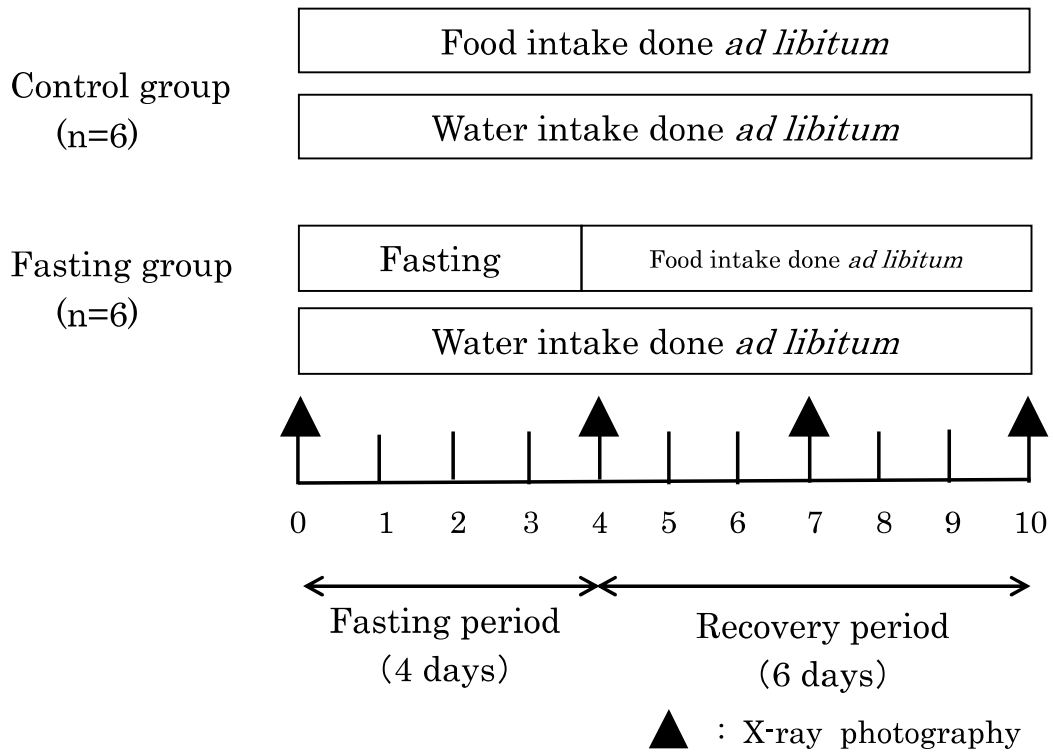


Fig.4-1 Experimental design.



Fig.4-2 Soft X-ray image captured by flatbed scanner.

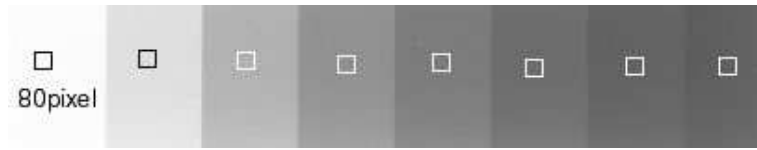


Fig.4-3 Measure region of aluminum stage. The density calibration, using an aluminum stage as a reference. In order from the thinner of the concentration, an average pixel value of an image contained in a square area of 80×80 pixel measured at each stage of the aluminum stage.



Fig.4-4 Image converted to grayscale using Photoshop which is image processing software.



Fig.4-5 Image with density calibration using IP Lab which is image analysis software.

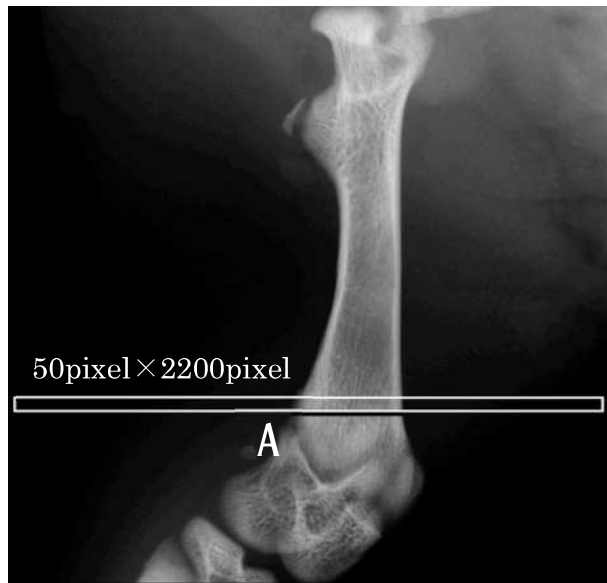


Fig.4-6 Measurement position of left foot femur. Cross sectional area was set at 50pixel width at the site of the distal femur end dense bone, and the image density thereof was measured.



Fig.4-7 Measurement position of left foot tibia. A cross sectional area was set at 50 pixel width below 100 picoseconds from the straight line connecting the vertex A of the medial tibial condyle and the vertex B of the lateral pedicle condyle, and the image density thereof was measured.

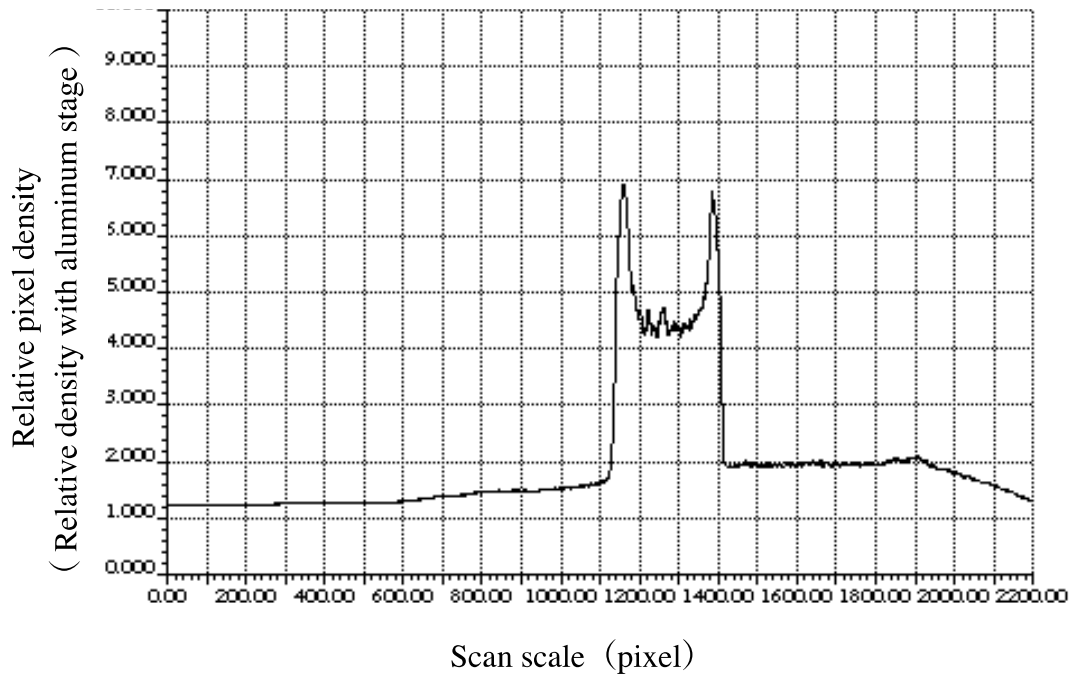


Fig.4-8 Image density curve created by image analysis.

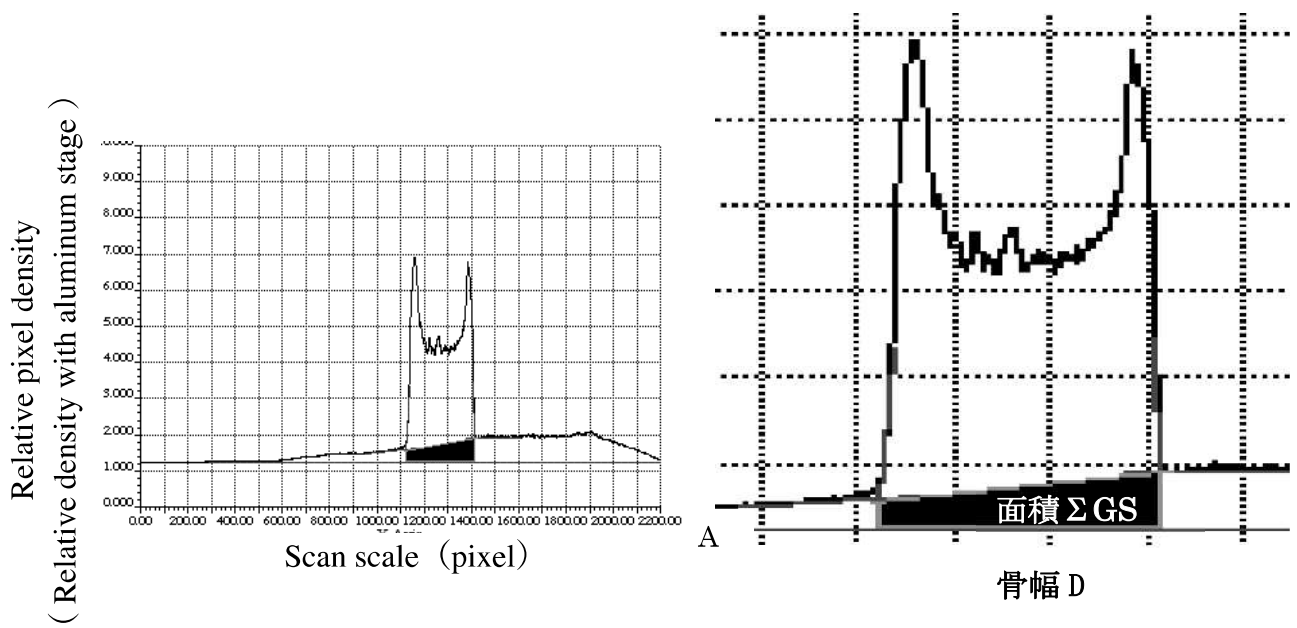


Fig.4-9 Integration site of image density evaluated as muscle tissue parameter.

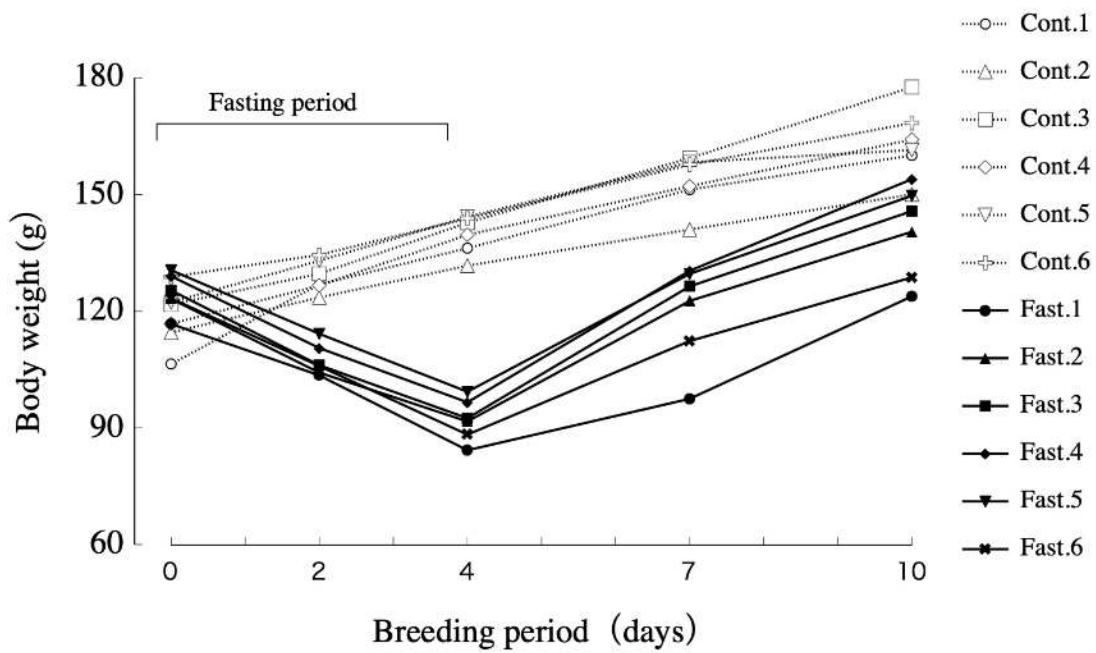


Fig.4-10 Growth curves of each individual.

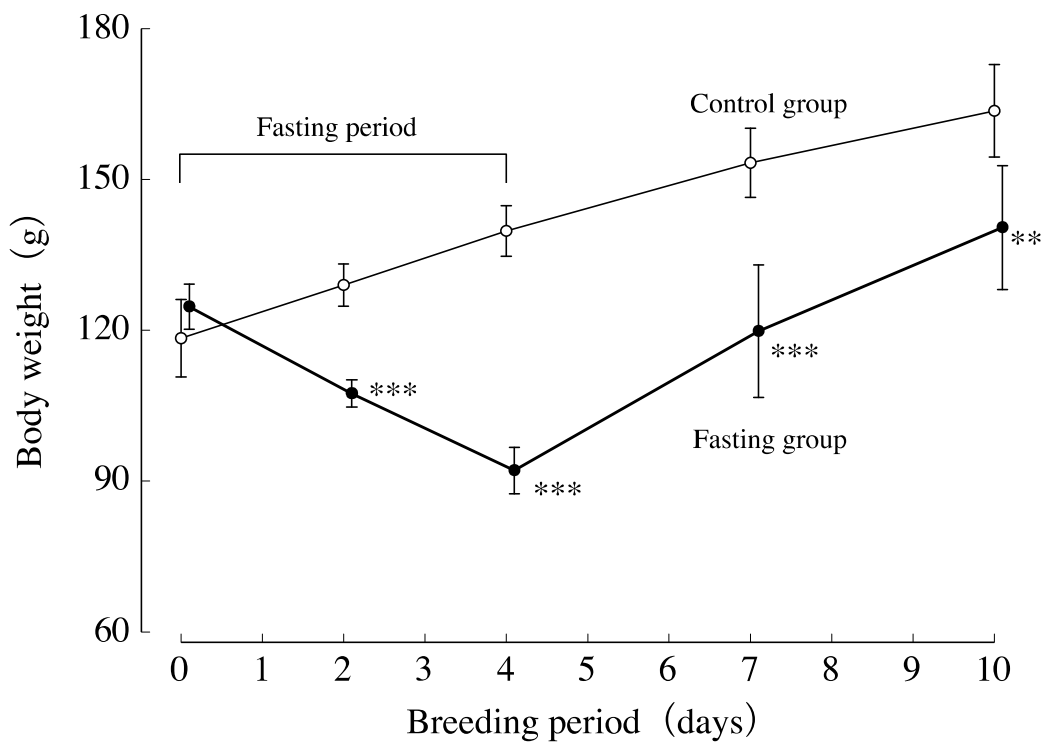


Fig.4-11 Growth curves of rats. Values are Means \pm SD for group. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, significantly different from control value.

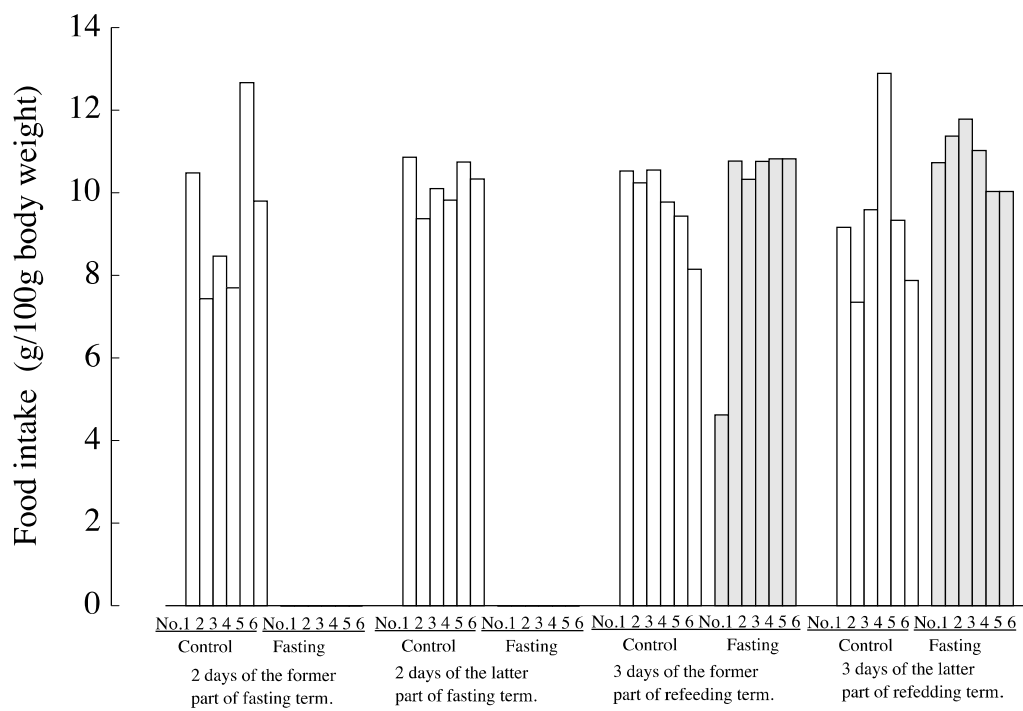


Fig.4-12 Food intake in the control group and fasting group.

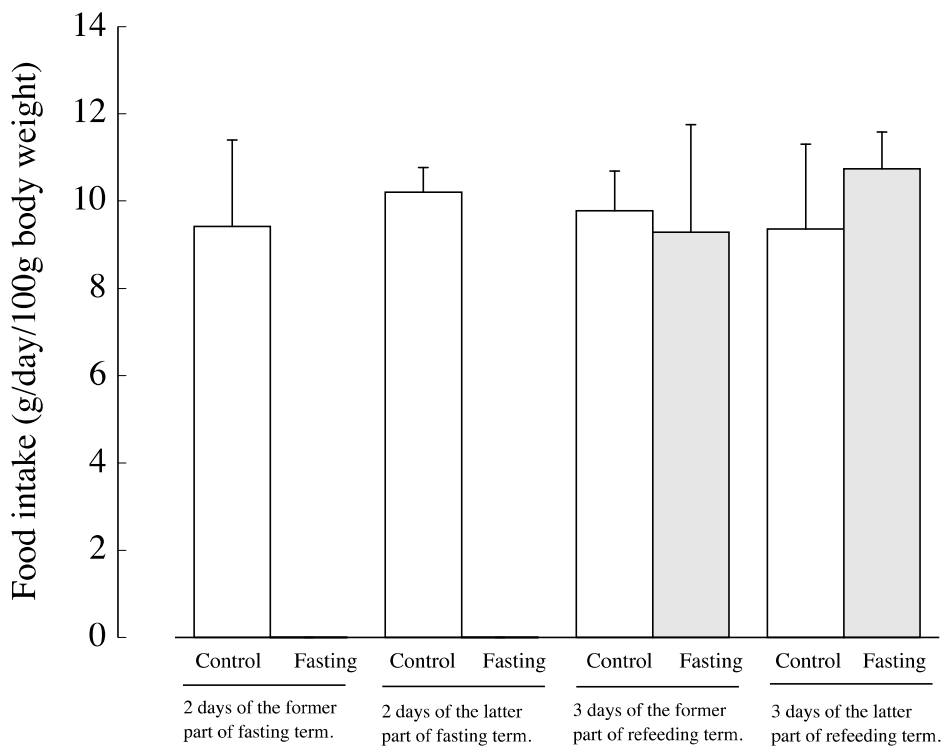


Fig.4-13 Average of food intake in control and fasting rats. Values are Means \pm SD for group.

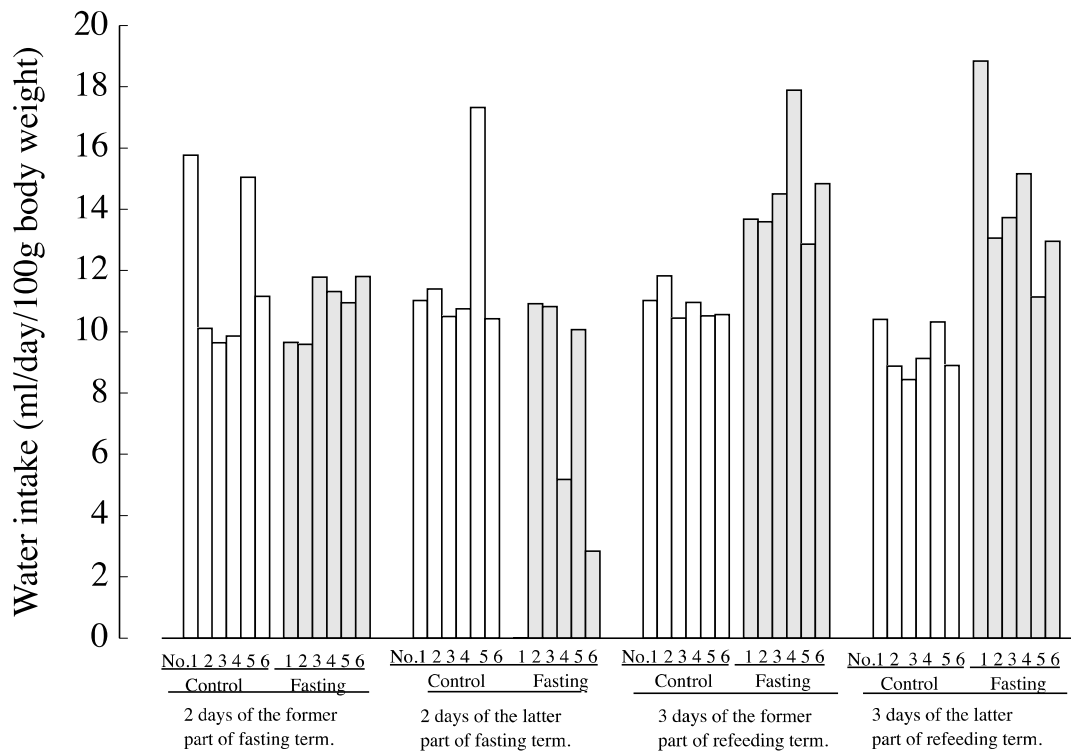


Fig.4-14 Water intake in the control group and fasting group.

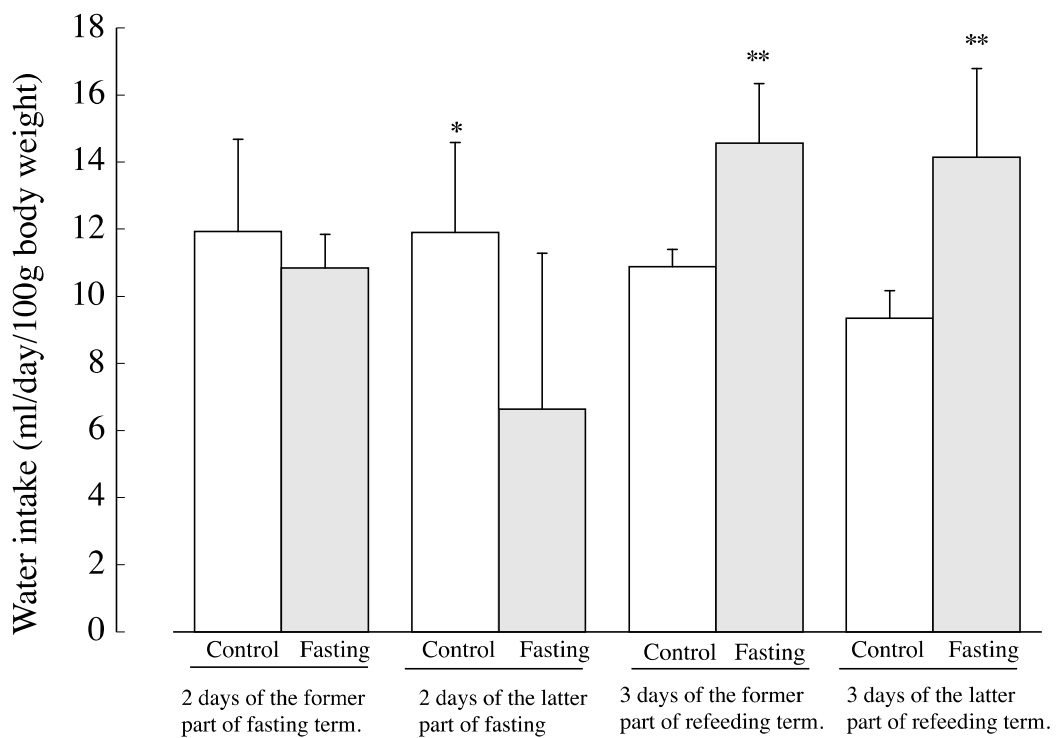


Fig.4-15 Average of water intake in control and fasting rats. Values are Means \pm SD for group of 12 rats. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from control value.

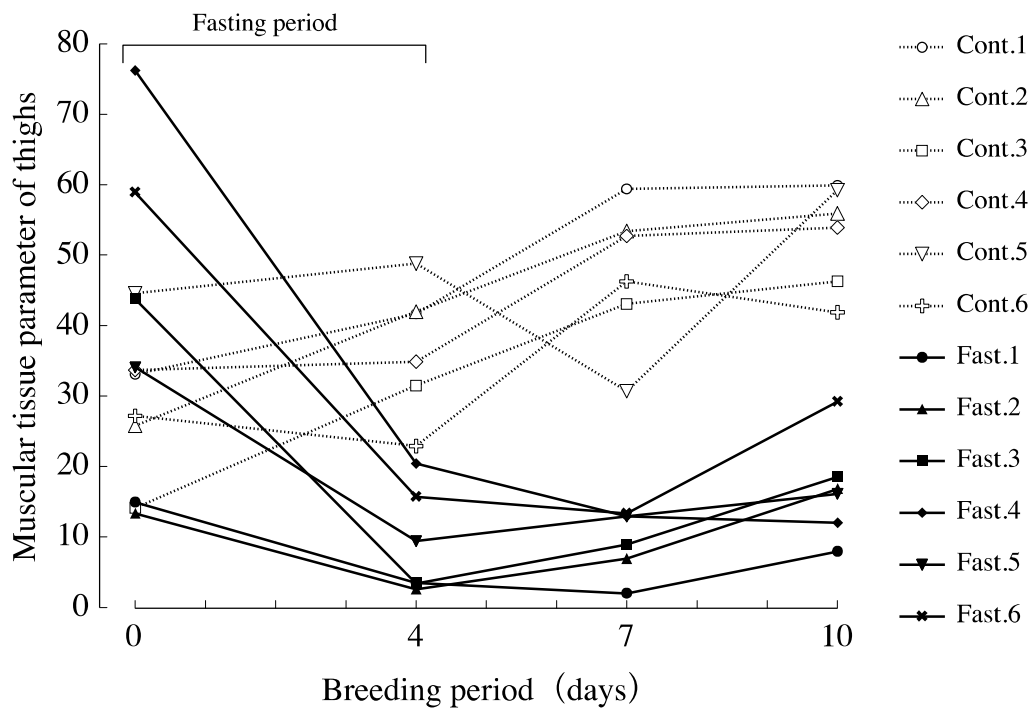


Fig.4-16 Changes in muscular tissue parameters of thighs in each individual.

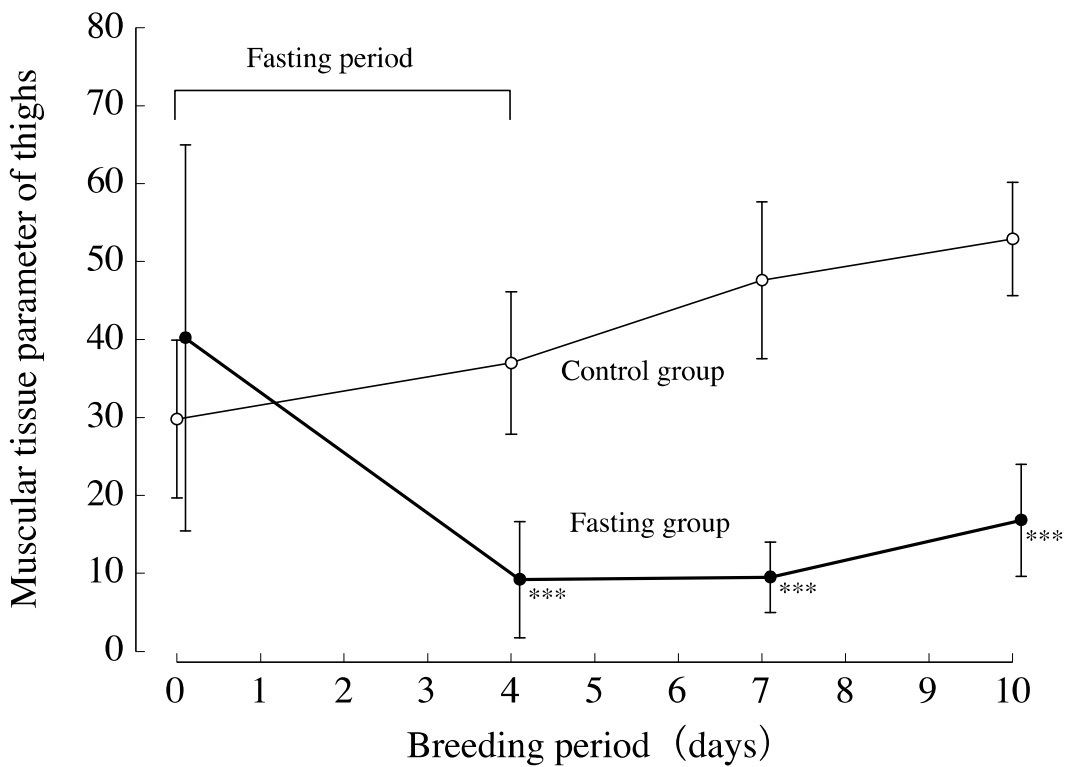


Fig.4-17 Changes in muscular tissue parameters of thighs in both groups. Values are Means \pm SD for group. ***P<0.001, significantly different from control value.

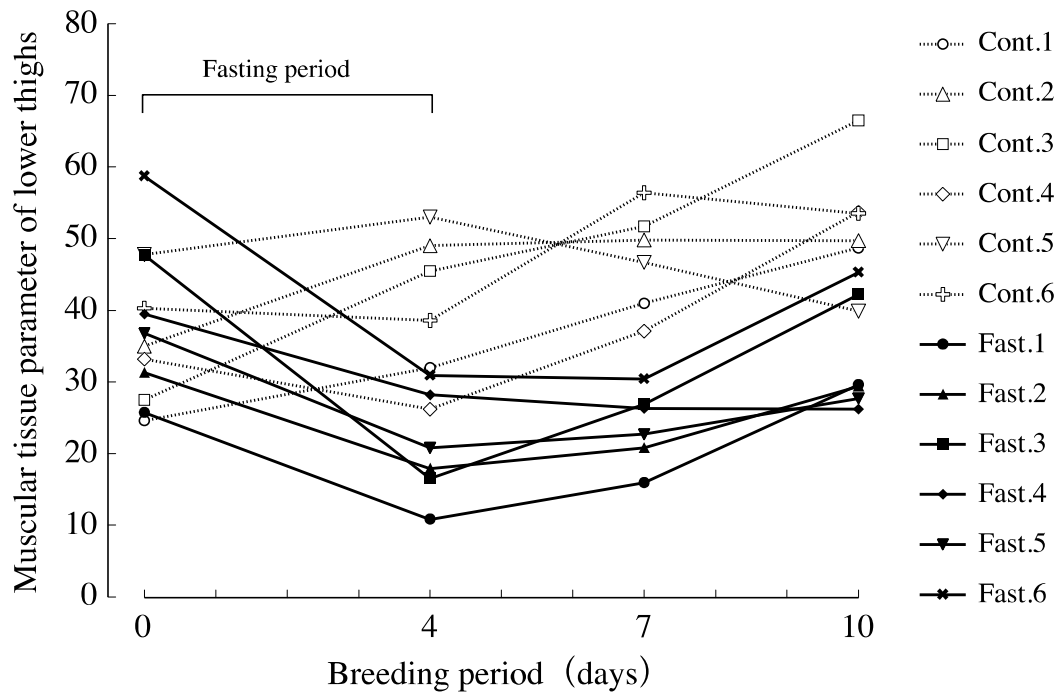


Fig.4-18 Changes in muscular tissue parameters of lower thighs in each individual.

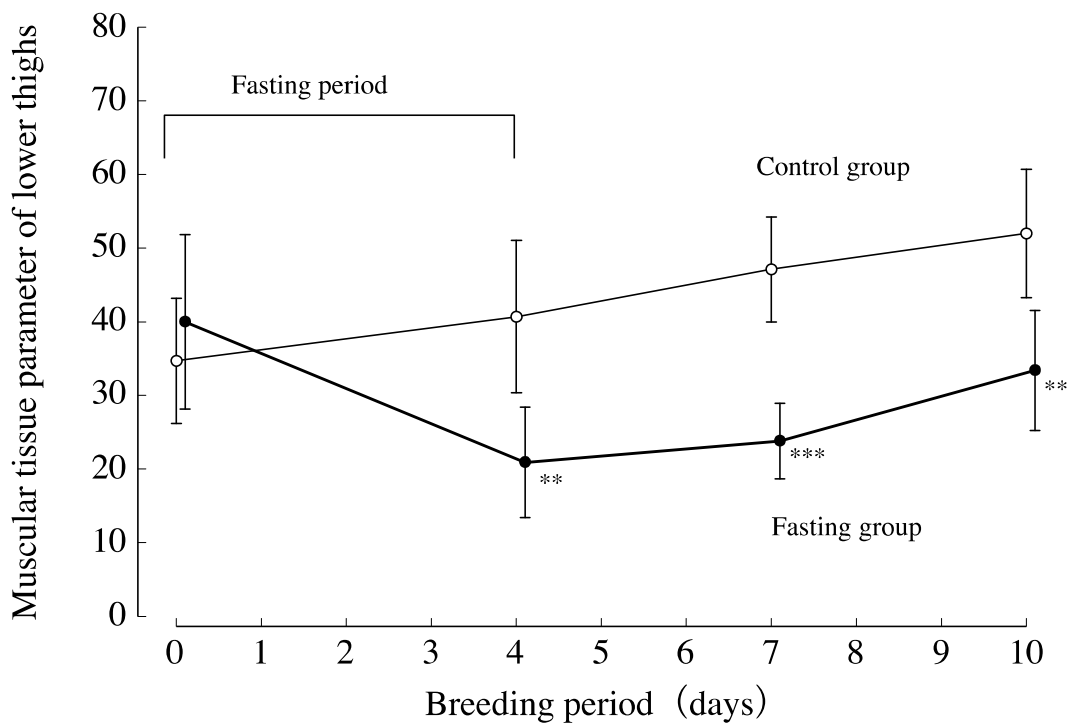


Fig.4-19 Changes in muscular tissue parameters of lower thighs in both groups. Values are Means \pm SD for groups. **P<0.01, ***P<0.001, significantly different from control value.

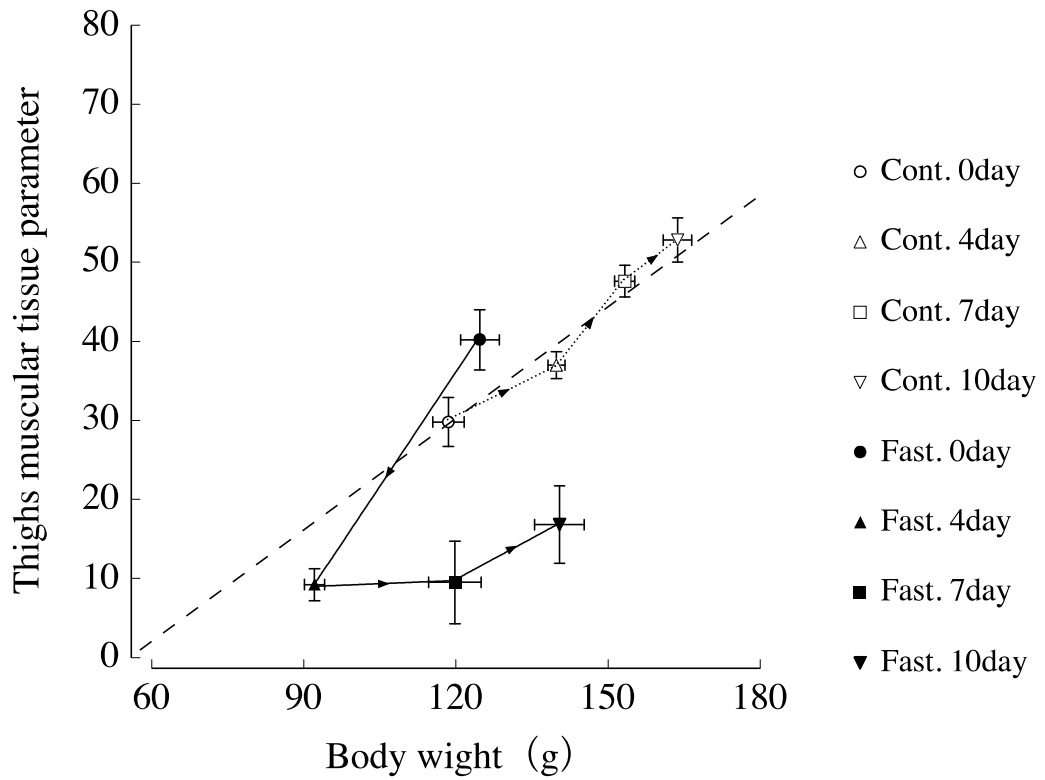


Fig.4-20 Changes over time in relation between body weight and thighs muscle tissue parameters.

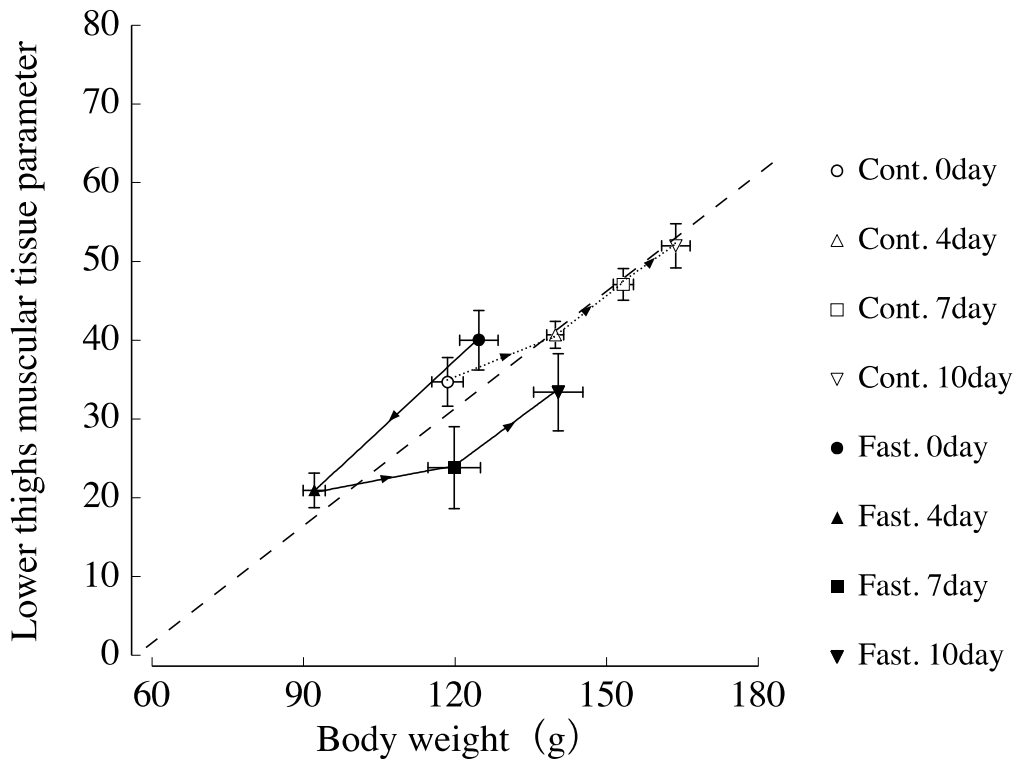


Fig.4-21 Changes over time in relation between body weight and lower thighs muscle tissue parameters.

Chapter 5

Table 5-1 Composition of experimental diets (g/100g).

Ingredient	Amount
Casein	16.0
Cornstarch	52.6
Sucrose	10.6
Corn oil	11.7
Salt mixture (AIN-76) *	4.0
Vitamin mixture (AIN-76) **	1.0
Choline chloride	0.1
Cellulose powder	4.0
Total energy (Kcal/100g)	422

Solt mixture and Vitamin mixture were Prepared on basis of the AIN-76.

* Contained (g/100g mix): CaHPO_4 50, NaCl 7.4, $\text{K}_3\text{C}_4\text{H}_5\text{O}_7/\text{H}_2\text{O}$ 22, K_2SO_4 5.2, MgO 2.4, MnCO_3 0.35, ferric citrate 0.6, ZnCO_3 0.16, $\text{CuCO}_3/\text{Cu}(\text{OH})_2/\text{H}_2\text{O}$ 0.03, $\text{NaSeO}_3/5\text{H}_2\text{O}$ 0.001, KIO_3 0.001, $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2/12\text{H}_2\text{O}$ 0.0055, cellulose powder to 100g.

** Contained (g/100g mix): retinyl acetate 0.1, cholecalciferol 0.00025, thiamin hydrochloride 0.12, riboflavin 0.4, pyridoxine hydrochloride 0.08, vitamin B₁₂ 0.00005, ascorbic acid 3, DL-tocopherol acetate 0.5, menadione 0.52, biotin 0.002, folic acid 0.02, calcium pantothenate 0.5, p-aminobenzoic acid,0.5, niacin 0.6, inositol 0.6, choline chloride 20, cellulose powder to 100g.

Table5-2 Chemical components of MF.

Chemical components (g/100g)	
Moisture	7.7
Crude protein	23.6
Crude fat	5.3
Crude ash	6.1
Crude fiber	2.9
For fusibility nothing nitrogen	54.4
Total(g)	100
Energy (kcal)	360

The analytical value is as follows. Vitamin content; VA 21690IU, VD₃ 158IU, VE 11.0mg, VK₃ 0.04mg, VB₁ 2.12mg, VB₂ 1.24g, VC 4mg, VB₆ 0.87, VB₁₂ 5.3mg, Inositol 578mg, Folic acid 0.20mg, Biotin 23.2µg, Pantothenic acid 2.73mg, Niacin 10.4mg, Colin 0.22g. Mineral content; Ca 1.12g, P 0.90g, Mg 0.26g, Na 0.21g, K 0.99g, Fe 10.9mg, Al 3.1mg, Cu 0.82mg, Zn 5.28mg, Mn 5.89mg. Amino acid content; Isoleucine 0.89g, Leucine 1.78g, Lysine 1.25g, Methionine 0.44g, Cystine 0.37g, Phenylalanine 1.02g, Tyrosine 0.69g, Threonine 0.92g, Tryptophan 0.29g, Valine 1.08g, Arginine 1.43g, Histidine 0.58g, Alanine 1.22g, Aspartic acid 2.14g, Glutamic acid 3.96g, Serine 1.11g, Glycine 1.16g, Proline 1.27g.

Table5-3 Chemical components of MF.

Chemical components (g/100g)	
Moisture	7.7
Crude protein	23.6
Crude fat	5.3
Crude ash	6.1
Crude fiber	2.9
For fusibility nothing nitrogen	54.4
Total(g)	100
Energy (kcal)	360

The analytical value is as follows. Vitamin content; VA 2160IU, VD₃ 158IU, VE 11.0mg, VK₃ 0.04mg, VB₁ 2.12mg, VB₂ 1.24mg, VC 4mg, VB₆ 0.87mg, VB₁₂ 5.3mg, Inositol 578mg, Folic acid 0.20mg, Biotin 23.2μg, Pantothenic acid 2.73mg, Niacin 10.4mg, Choline 0.22g. Mineral content; Ca 1.12g, P 0.90g, Mg 0.26g, Na 0.21g, K 0.99 g , Fe 10.9mg, Al 3.1mg, Cu 0.82mg, Zn 5.28mg, Mn 5.89mg. Amino acid content; Isoleucin 0.89g, Leucin 1.78g, Lysine 1.25g, Methionine 0.44g, Cystine 0.37g, Phenylalanine 1.02g, Tyrosine 0.69g, Threonine 0.92g, Tryptophan 0.29g, Valine 1.08g, Arginine 1.43g, Histidine 0.58g, Alanine 1.22g, Aspartic acid 2.14g, Glutaminic acid 3.96g, Serine 1.11g, Glycine 1.16g, Proline 1.27g.

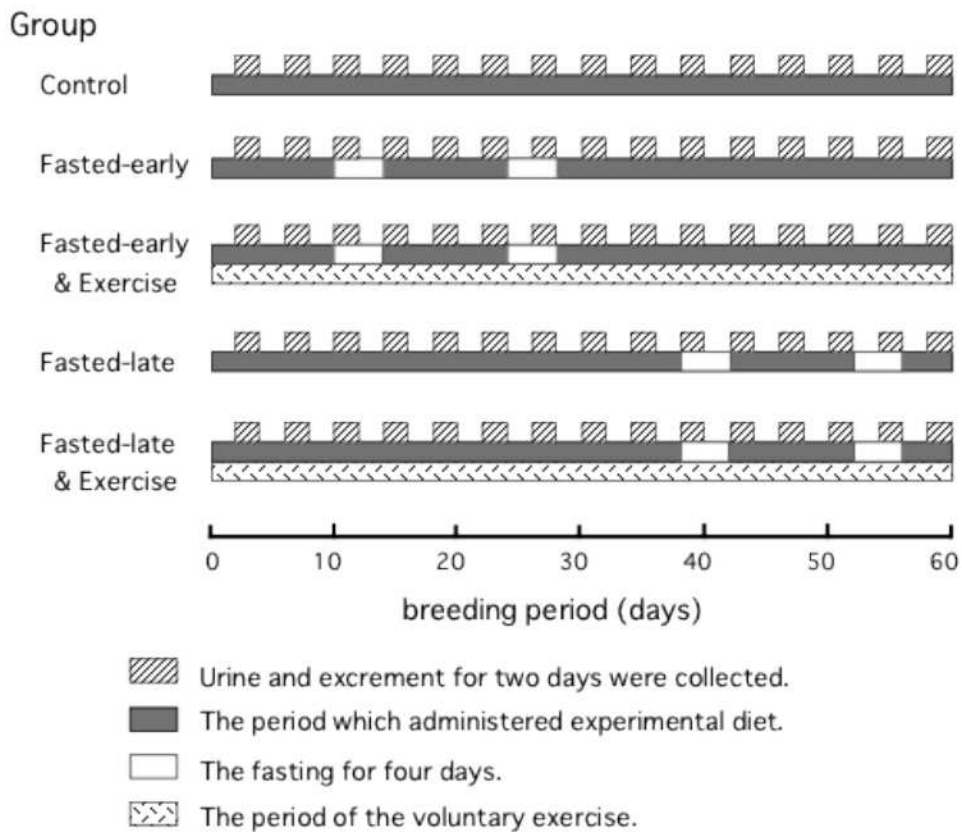


Fig.5-1 Experimental design on calcium payment and bone strength.

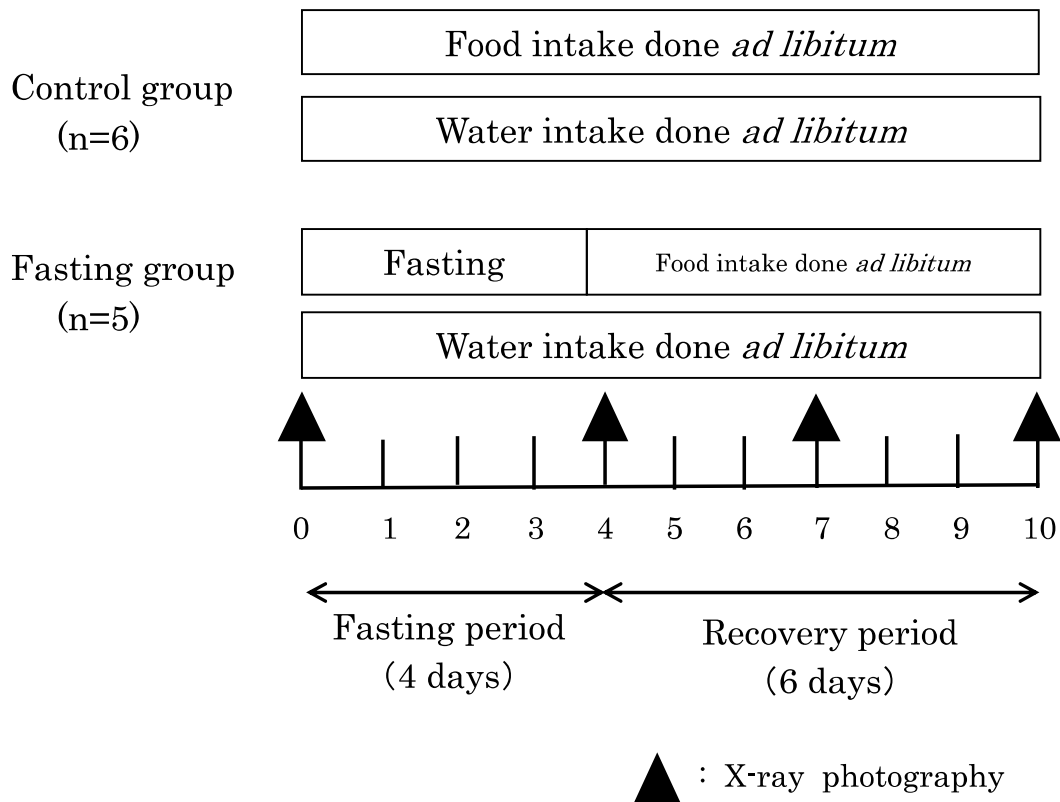


Fig.5-2 Experimental design on bone analysis by soft X-ray image.



Fig.5-3 Soft X-ray photograph of rats converted to electronic file by flat bed scanner.



Fig.5-4 Aluminum staircase stage used as image density control. The density calibration, using an aluminum stage as a reference. In order from the thinner of the concentration, an average pixel value of an image contained in a square area of 80×80 pixel measured at each stage of the aluminum stage.



Fig.5-5 X-ray photograph of lower limb of rat and aluminum stage.



Fig.5-6 Measurement position of left femoral neck. Cross sectional area was set at 60 pixel width at the right end C of the small trochanter part of the femoral neck, and the image density was measured.

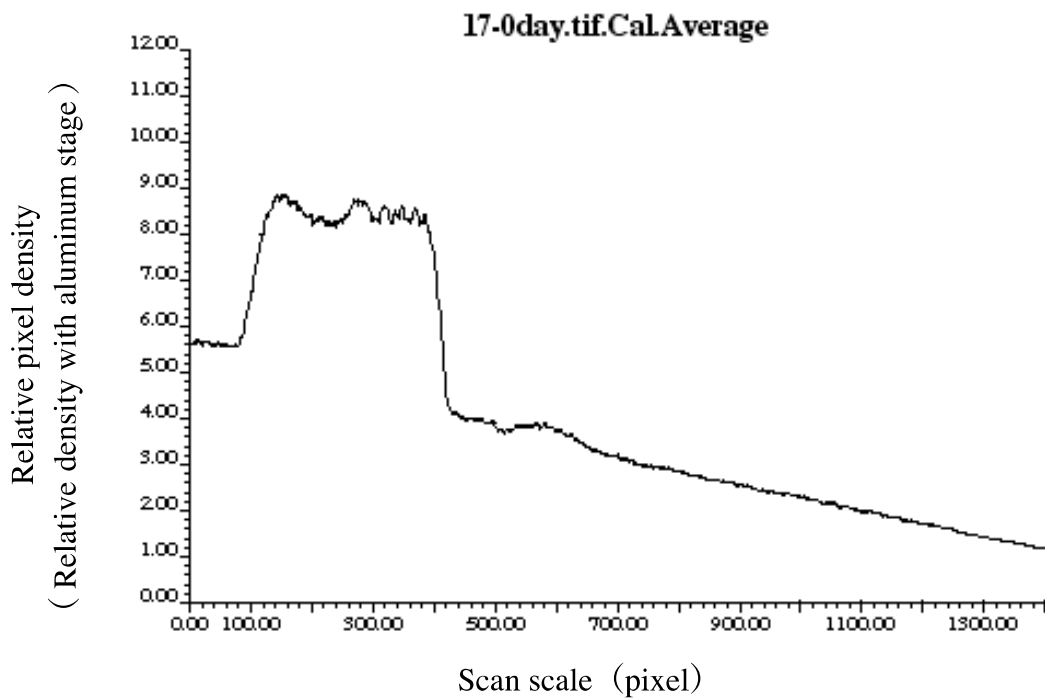


Fig.5-7 Image density curve created by image analysis of femoral neck image.

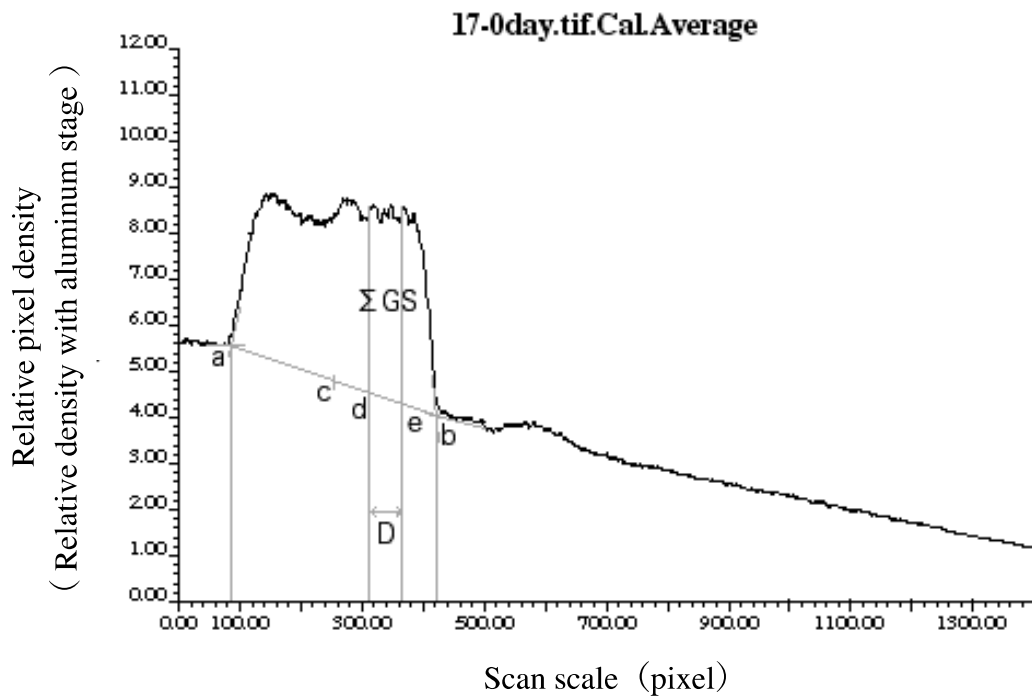


Fig.5-8 Measure way of the parameter of bone mineral density of the femoral neck. To calculate the parameters, in order to eliminate background readings, pull the extension line to the rising portion of the graph. Then, the intersection between the a, respectively, and b. The midpoint of the straight line ab was c. The portion surrounded by a graph and de the center 1/3 of the straight line cb was ΣGS . Each a perpendicular line is drawn from d and e, between them is D, was calculated $\Sigma GS / D$.

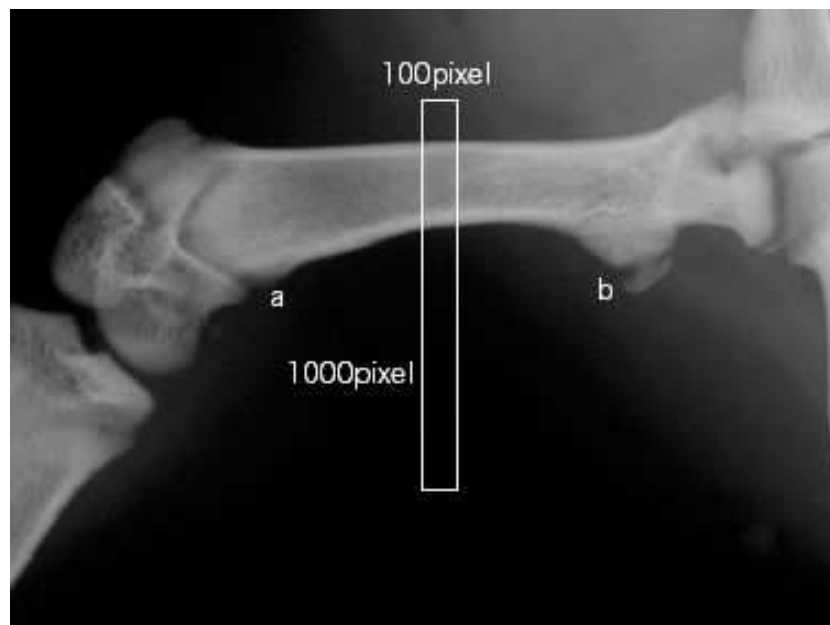


Fig.5-9 Measurement position of left femoral stem. Cross sectional area was set at 100 pixel width at the central part of the cortical bone end (a, b) of the femur, and the image density was measured.

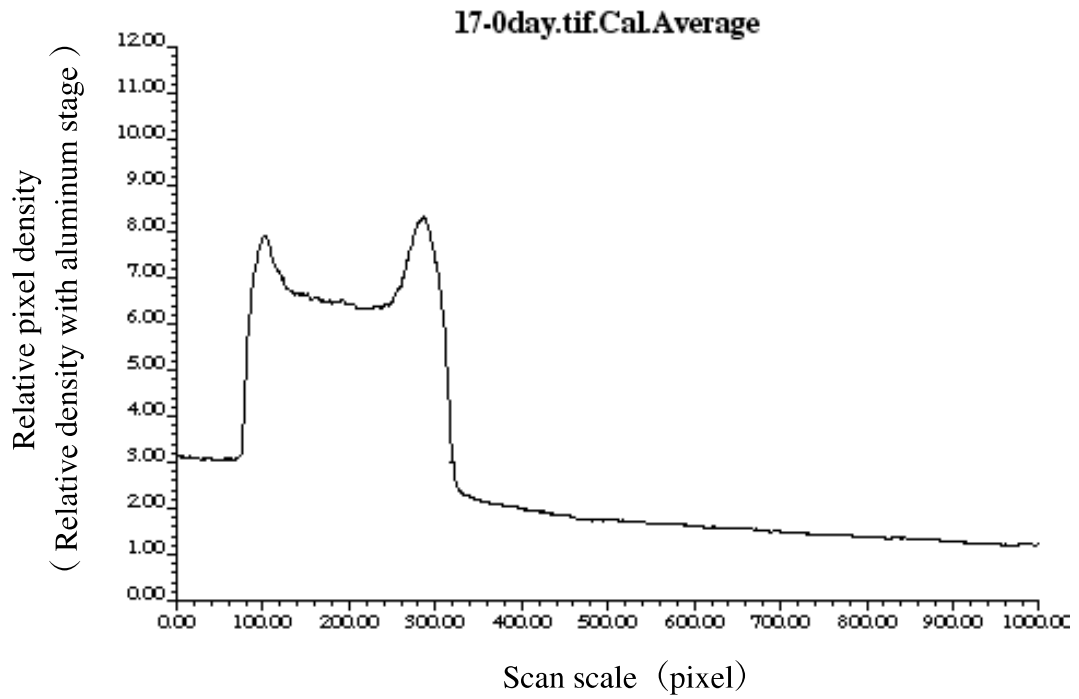


Fig.5-10 Image density curve created by image analysis of femoral stem image.

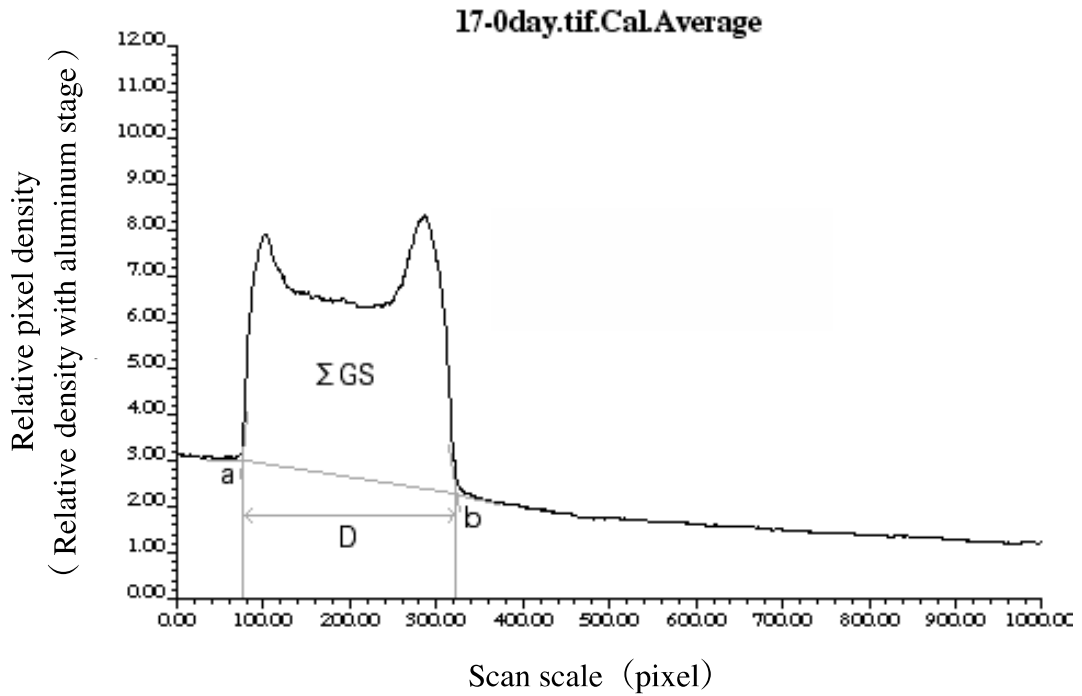


Fig.5-11 Set baseline except for background value to calculate bone parameters.

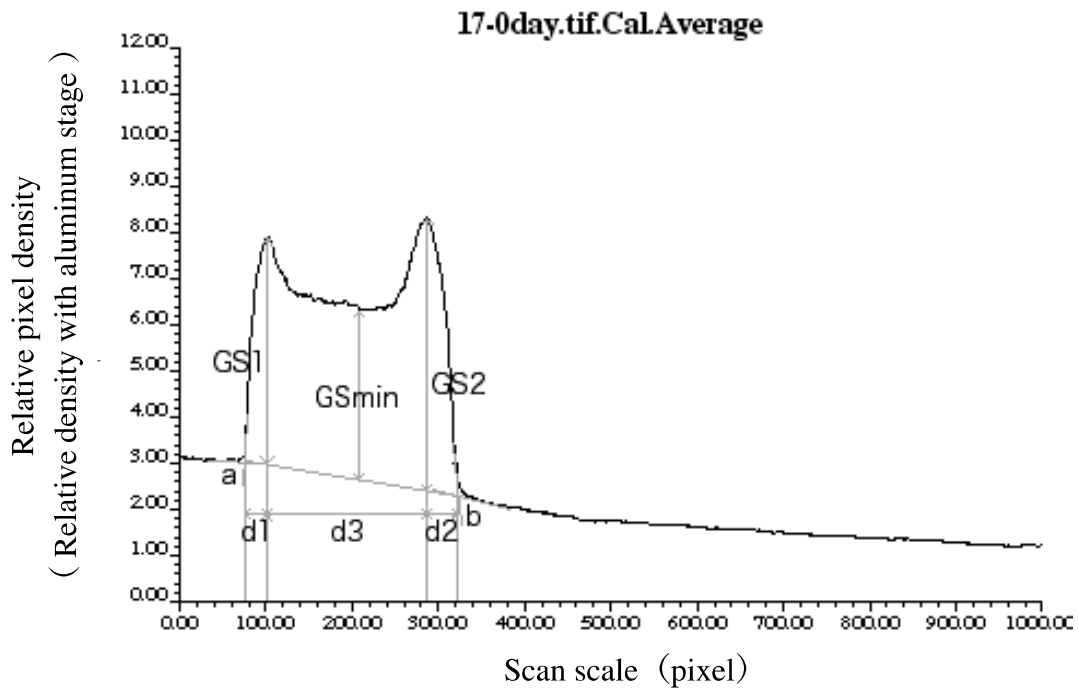


Fig.5-12 Measure way of the parameter of bone mineral density of the femoral stem. To calculate the parameters, in order to eliminate background readings, pull the extension line to the rising portion of the graph. Then draw a vertical line from the first and second peaks of the graph, was up to the intersection of the straight line ab lengths and each GS1 and GS2. Perpendicular line drawn from the lowest point in between the first and second peaks, and length of up to a point of intersection between the straight line ab was GSmin. The projection length from a on the line ab to the first peak d1, the projection length from the second peak to b d2, during which was used as a d3.

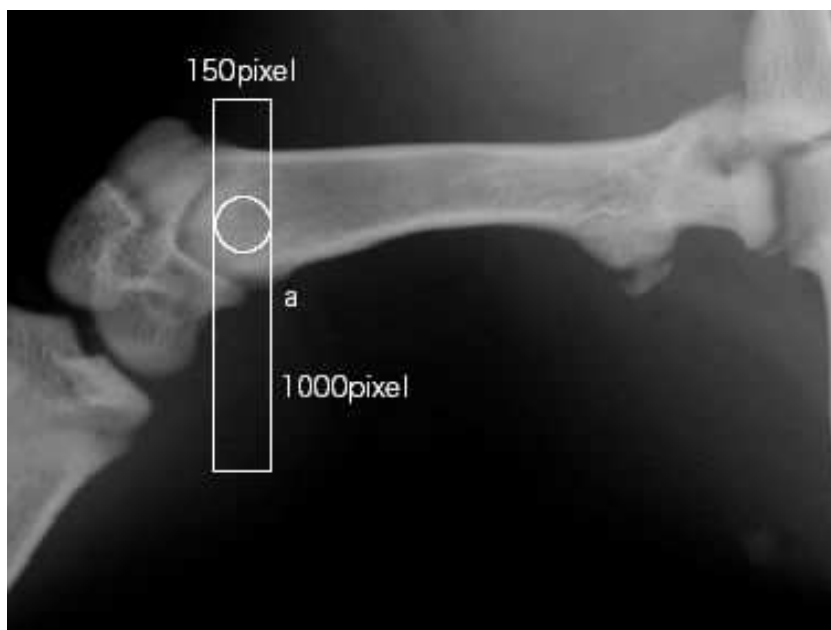


Fig.5-13 Measurement position of the lower end of the femur. A circle region with $r = 150$ pixels as the measurement site of bone density, and a transverse region with 150 pixel width as the background measurement site, and the image density was measured.

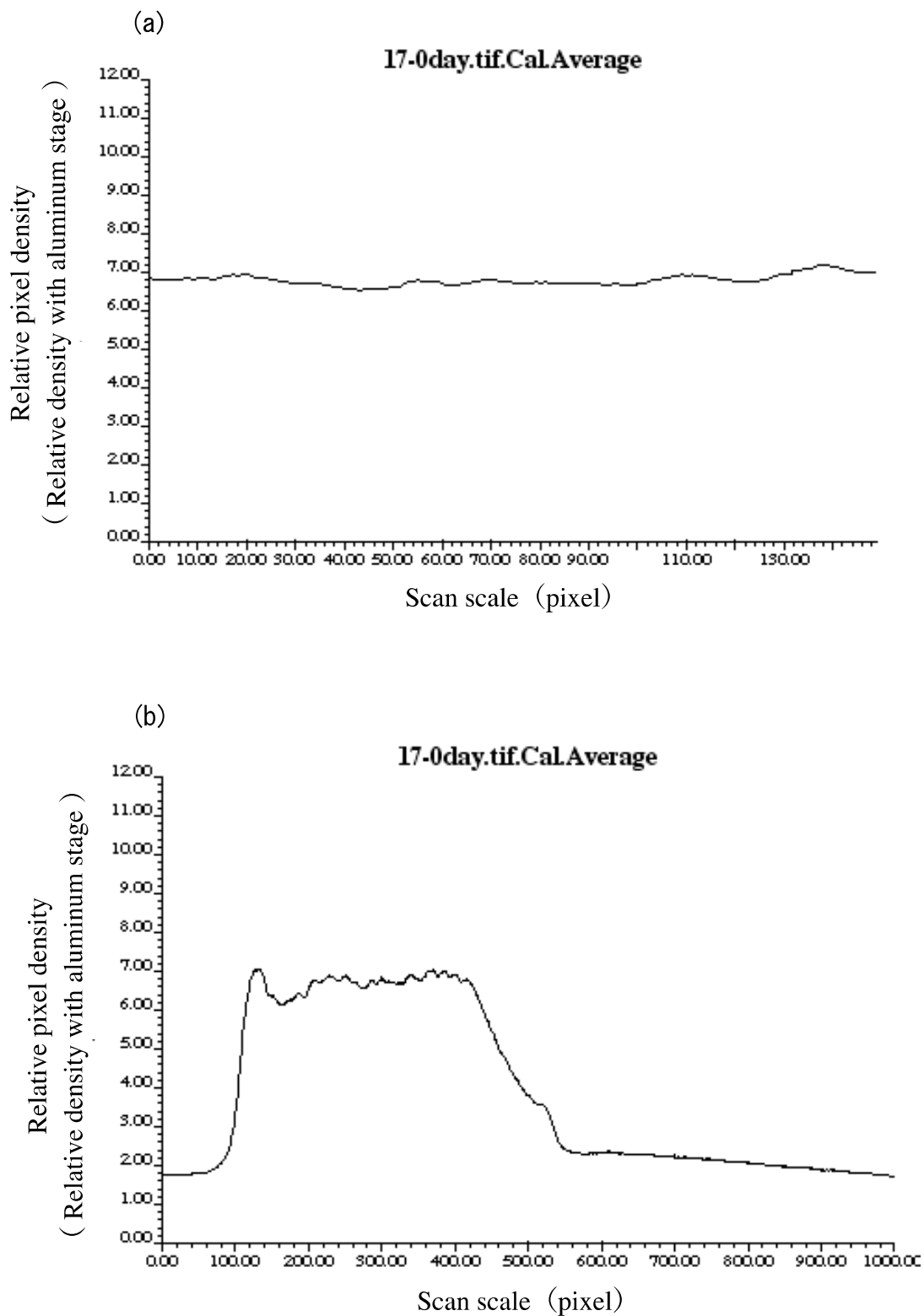


Fig.5-14 Image density curve created by image analysis of the lower end of the femur. (a) is the measurement result of the area of a circle of $r=150$ pixel at a lower end of the femur, (b) is the measurement result of the background area of 150pixel width.

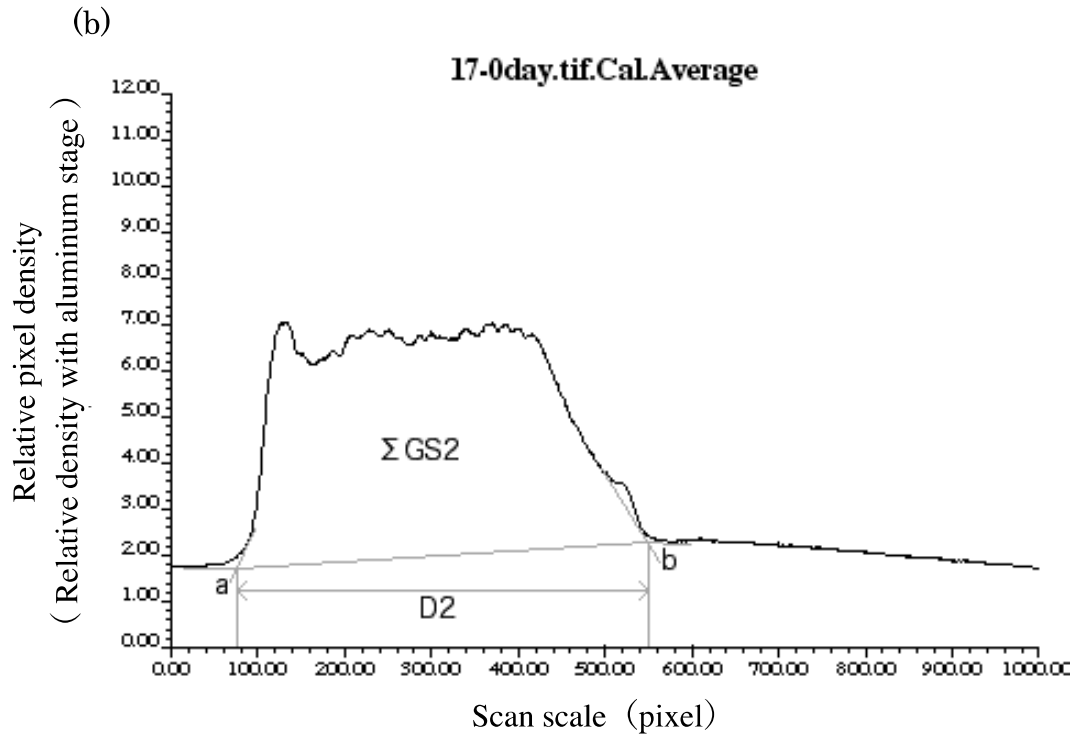
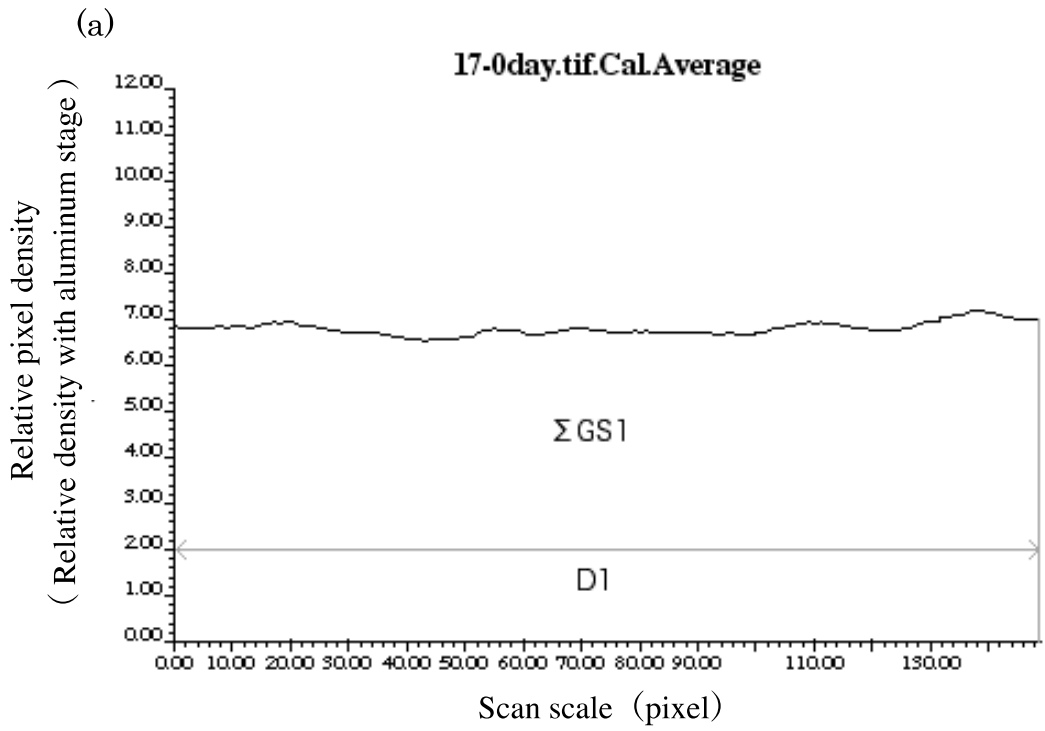


Fig.5-15 Measure way of the parameter of bone mineral density of the lower end of the femur.



Fig.5-16 Measurement position of the upper tibia. For measuring the bone density of the upper end of the tibia, a region of 150 pixel width was set just below the cartilage part, and the image density thereof was measured.

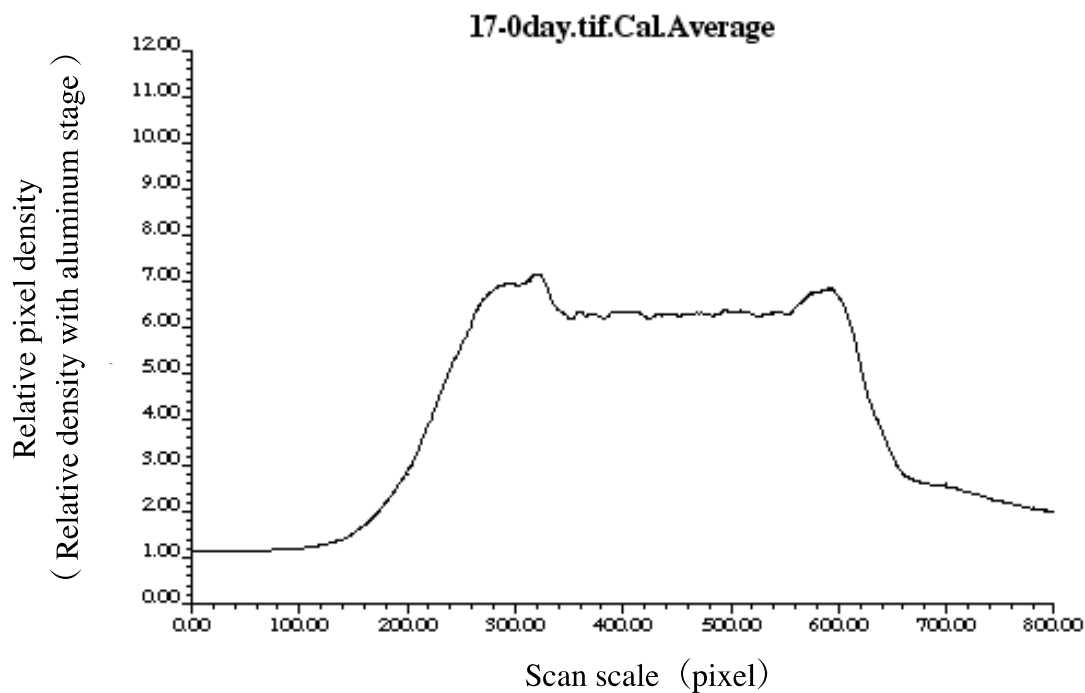


Fig.5-17 Image density curve created by image analysis of the upper tibia image.

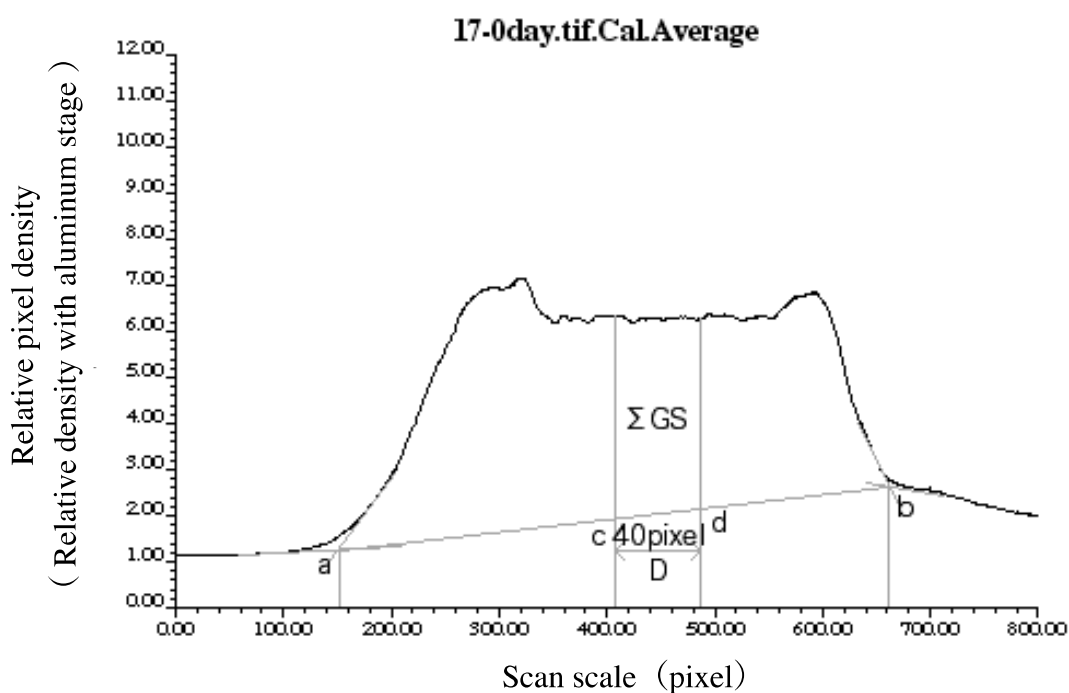


Fig.5-18 Measure way of the parameter of bone mineral density of the upper tibia. To calculate the parameters, in order to eliminate background readings, pull the extension of rising portion of the baseline and the graph intersects point was a, and b, respectively. The midpoint of the straight line ab is c, a line of 40pixel from there to the right and is bone width D. The area portion included in there was ΣGS .

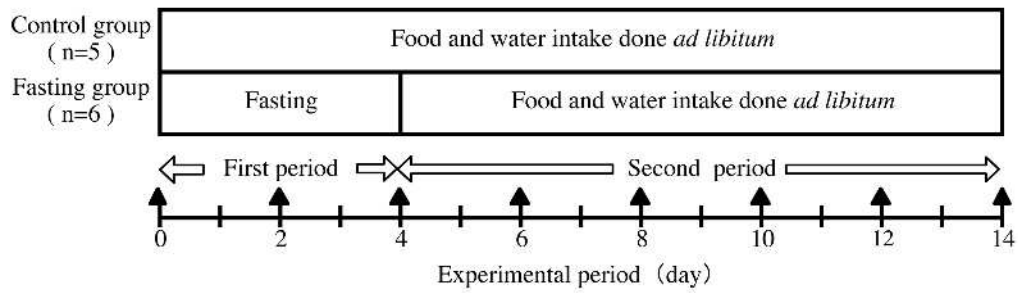


Fig.5-19 Experimental design on bone analysis by CT image. In the experimental period, body weight, food intake and water intake of the rats were measured daily. Contrast enhanced micro-CT (CECT) imaging was performed every other day during the experiment period as indicated by ▲ in the figure.

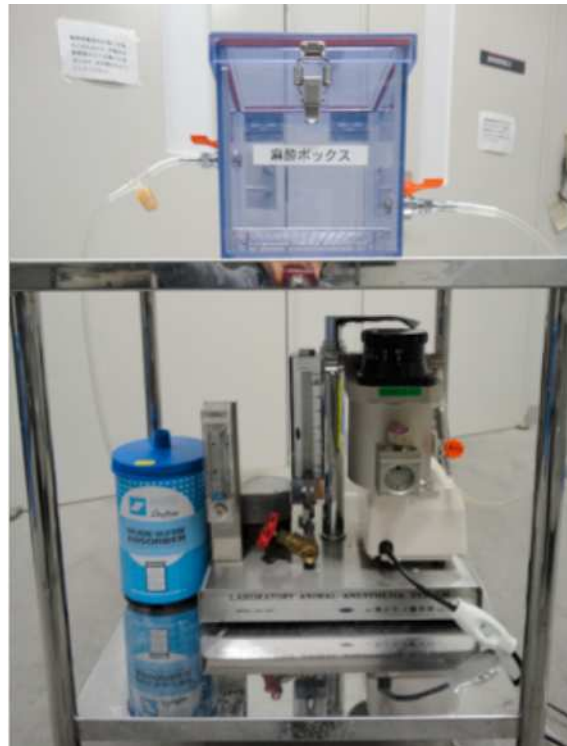


Fig.5-20 Anesthesia machine for small animals. For the anesthesia of rats, a SN-487 type anesthesia system manufactured by Shinano Co., Ltd. was used.



Fig.5-21 X-ray computed tomograph imaging system. X-ray CT imaging of rats was performed using LCT-100 type manufactured by Hitachi-Aloka Medical Co., Ltd.



Fig.5-22 CT scout image of rat.

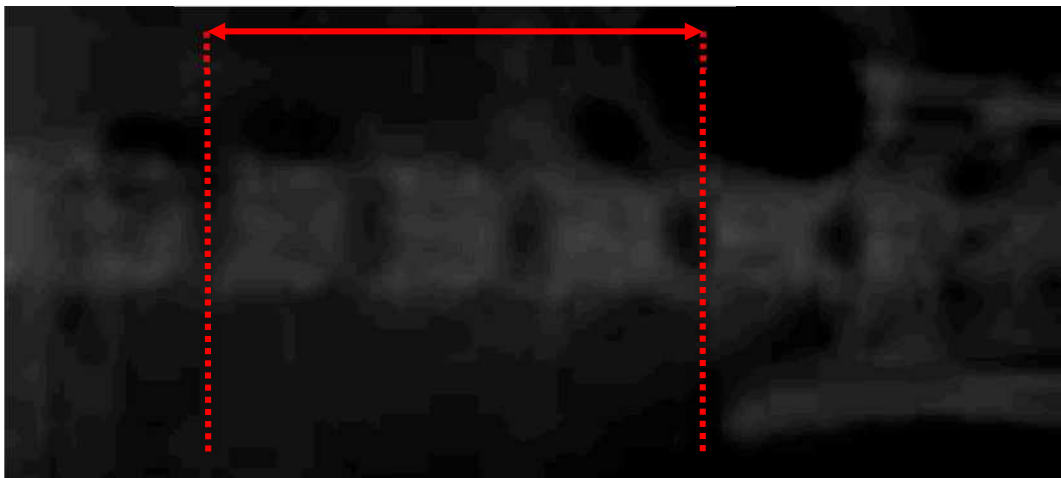


Fig.5-23 Measurement position of the vertebral. CT imaging was performed from the second lumbar spine to the fourth lumbar vertebra.

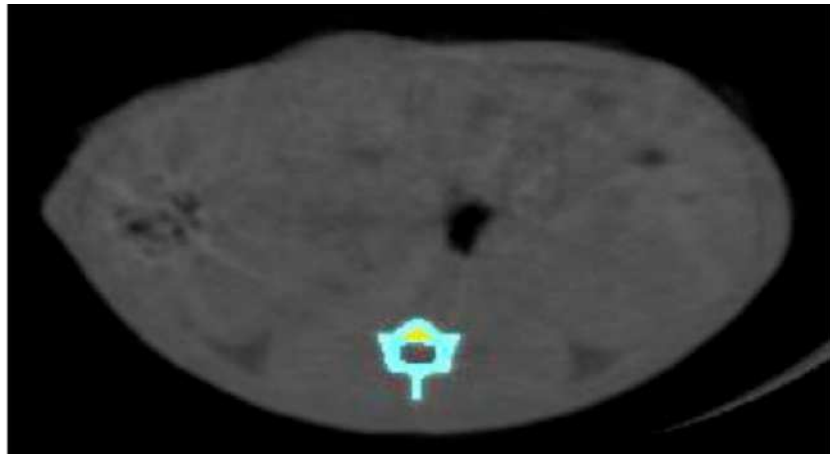


Fig.5-24 X-ray computerized tomogram. This is obtained by analyzing the tomographic image. Colored area indicates a lumbar vertebra bone.

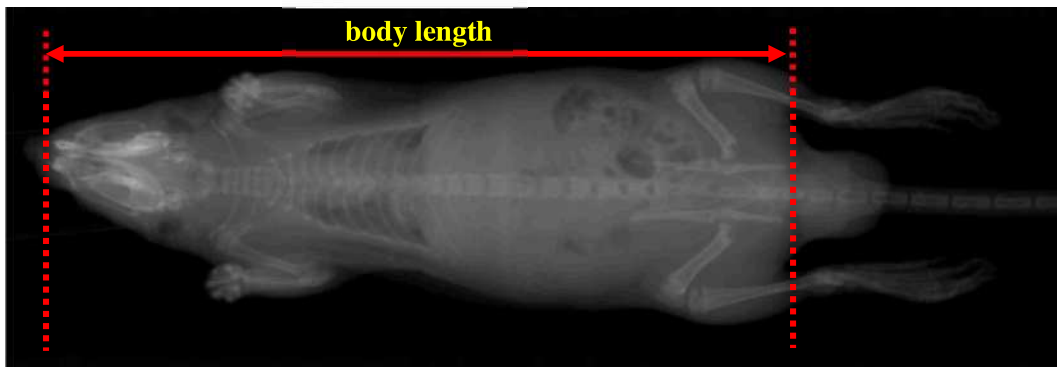


Fig.5-25 Measurement method of body length. The body length was from the tip of the skull nose bone to the lower end of the pelvis

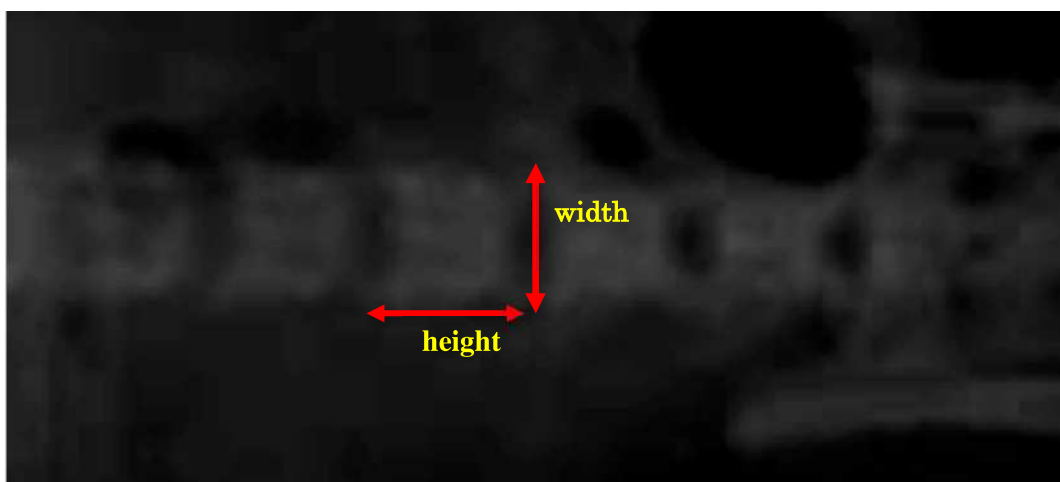


Fig.5-26 Measurement method of lumbar spine height and lumbar spine width. The length of the lumbar spine and the width of the lumbar vertebrae adopted the longest part from the X-ray scout image.

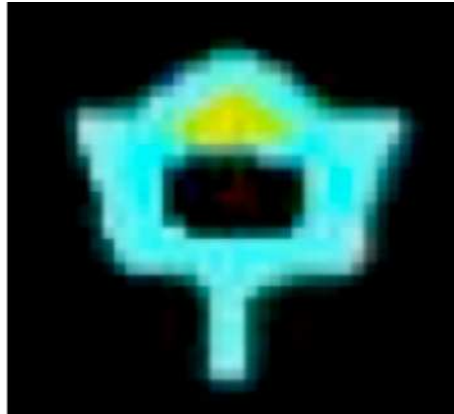


Fig.5-27 Cross-sectional image of lumbar spine after image processing. By image processing of the lumbar spine cross-sectional image, the cortical bone is recognized as blue and the cancellous bone as yellow.

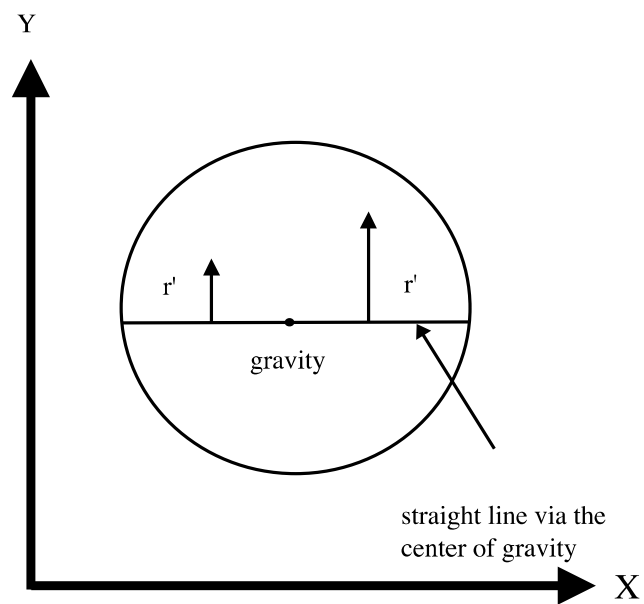


Fig.5-28 Minimum cross-sectional moment of inertia of area. It is calculated one r' for one pixel of the bone portion. It obtains moment of inertia of area by changing the inclination of the diameter passing through the center of gravity of the bone, and its minimum value is minimum moment of inertia of area.

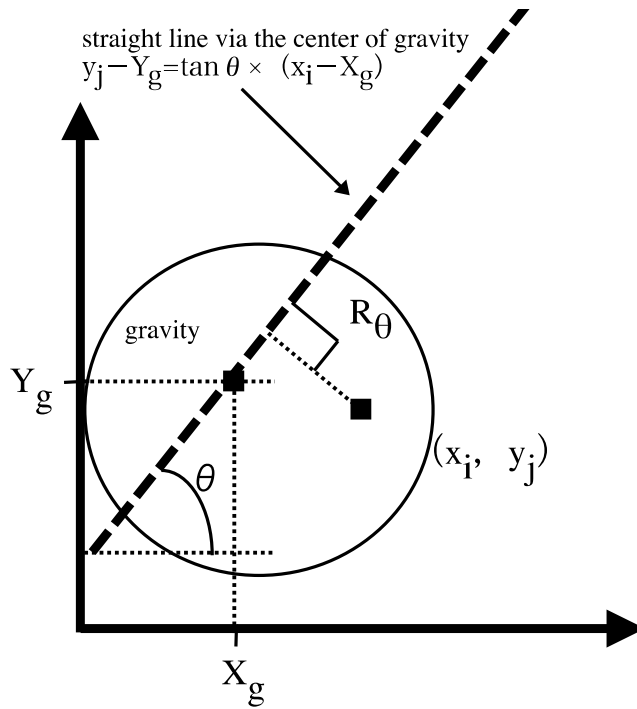


Fig.5-29 Calculation of r' . When the center of gravity is X_g and Y_g , and there bone part (x_i, y_j) of r' is a value that depends on the straight angle θ through the center of gravity.

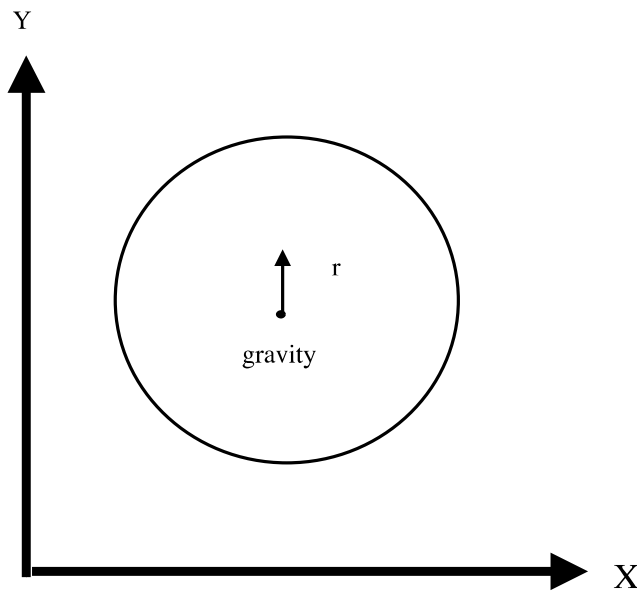


Fig.5-30 Polar moment of inertia of area. One r is calculated for one pixel of the bone part, and all computation results for r for each pixel are integrated.

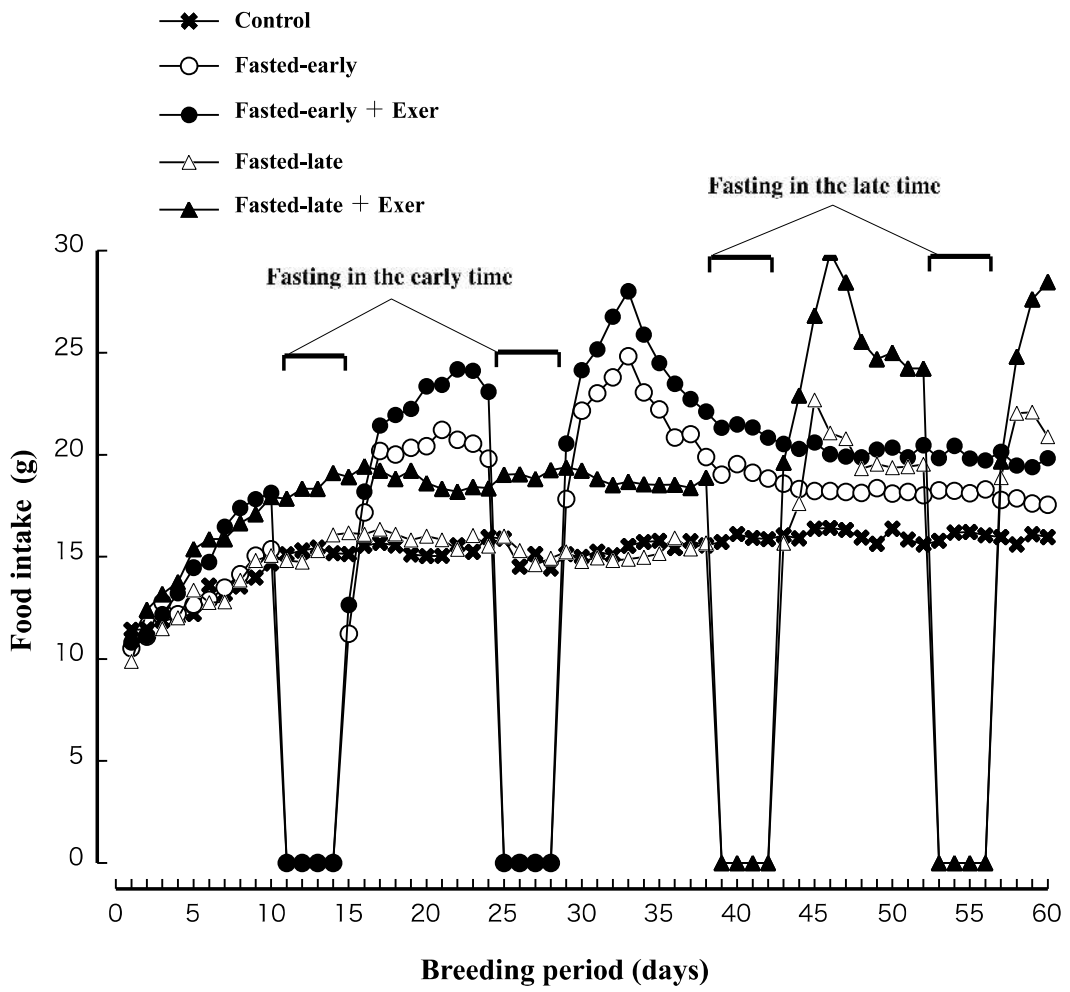


Fig. 5-31 Food intake. Values are mean for groups of 6 rats.

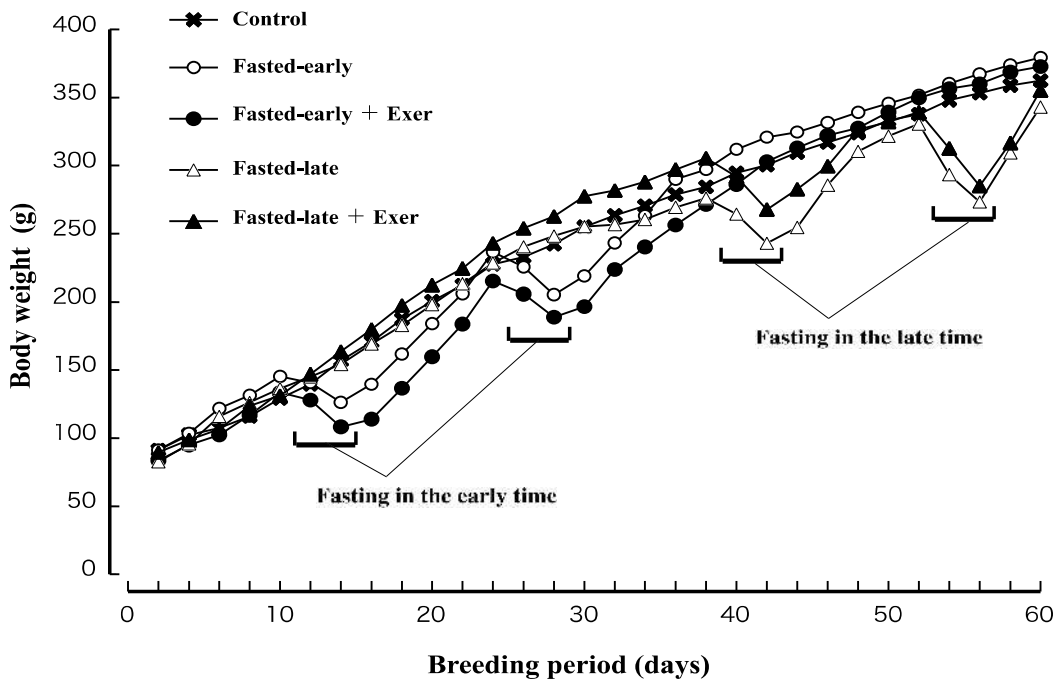


Fig. 5-32 Growth curves of rats. Values are mean for group.

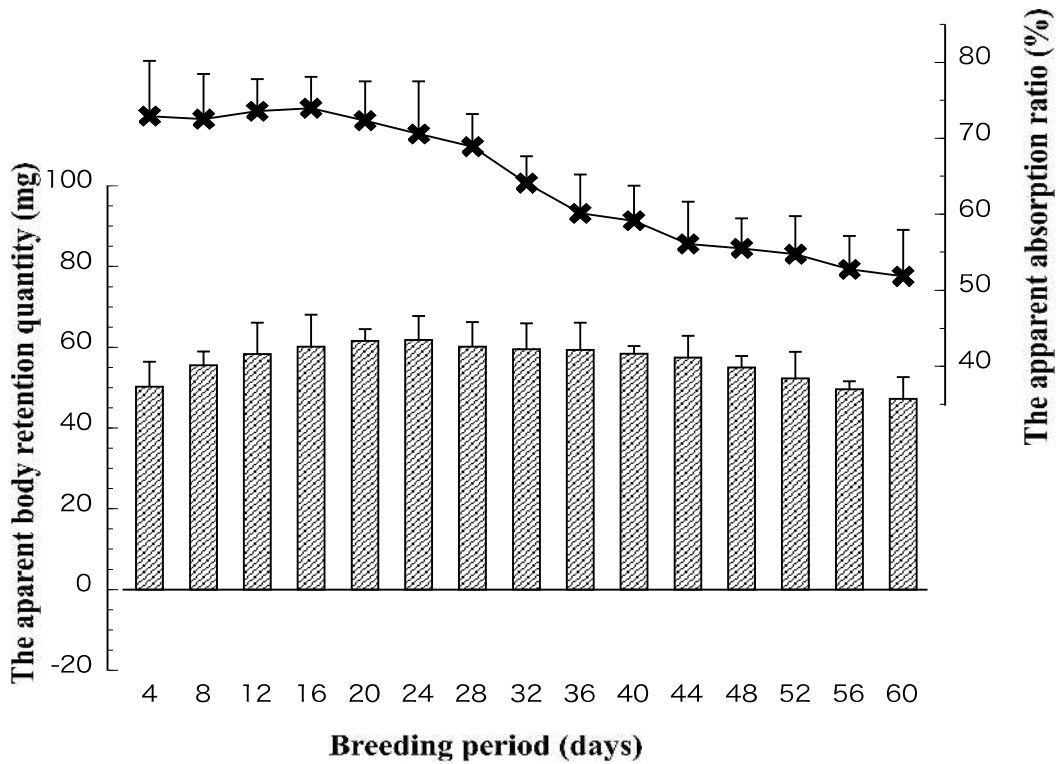


Fig. 5-33 Retention and absorption of the calcium on the control group. Values are mean \pm S.D. for groups.

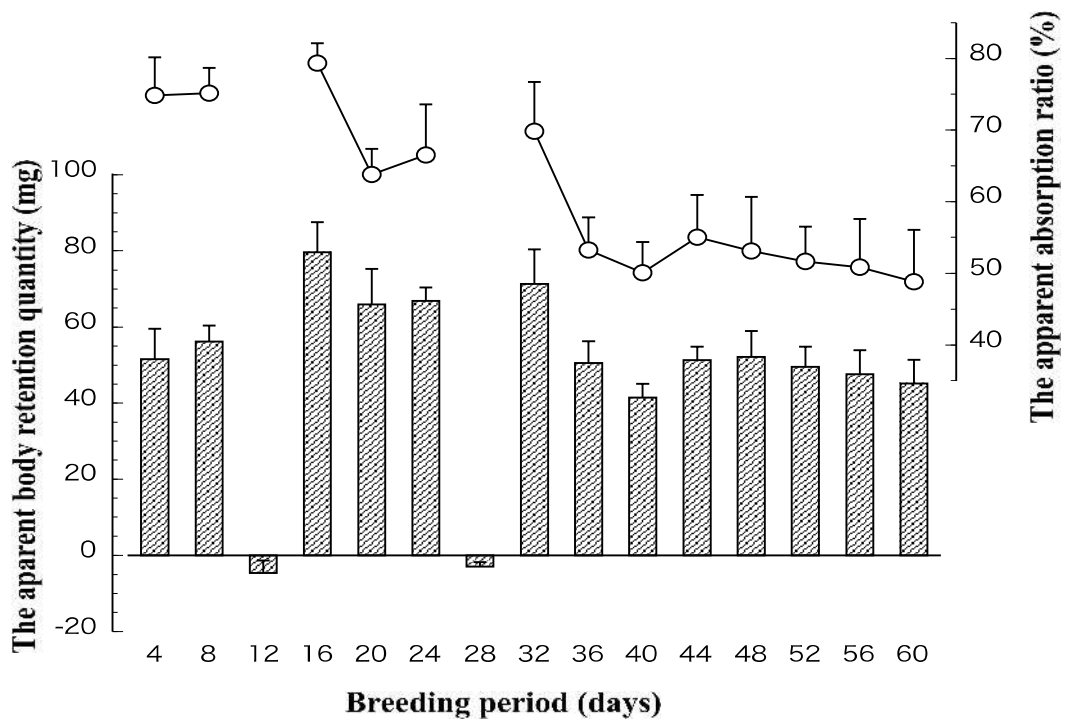


Fig. 5-34 Retention and absorption of the calcium on the fasted-early group. Values are mean \pm S.D. for groups.

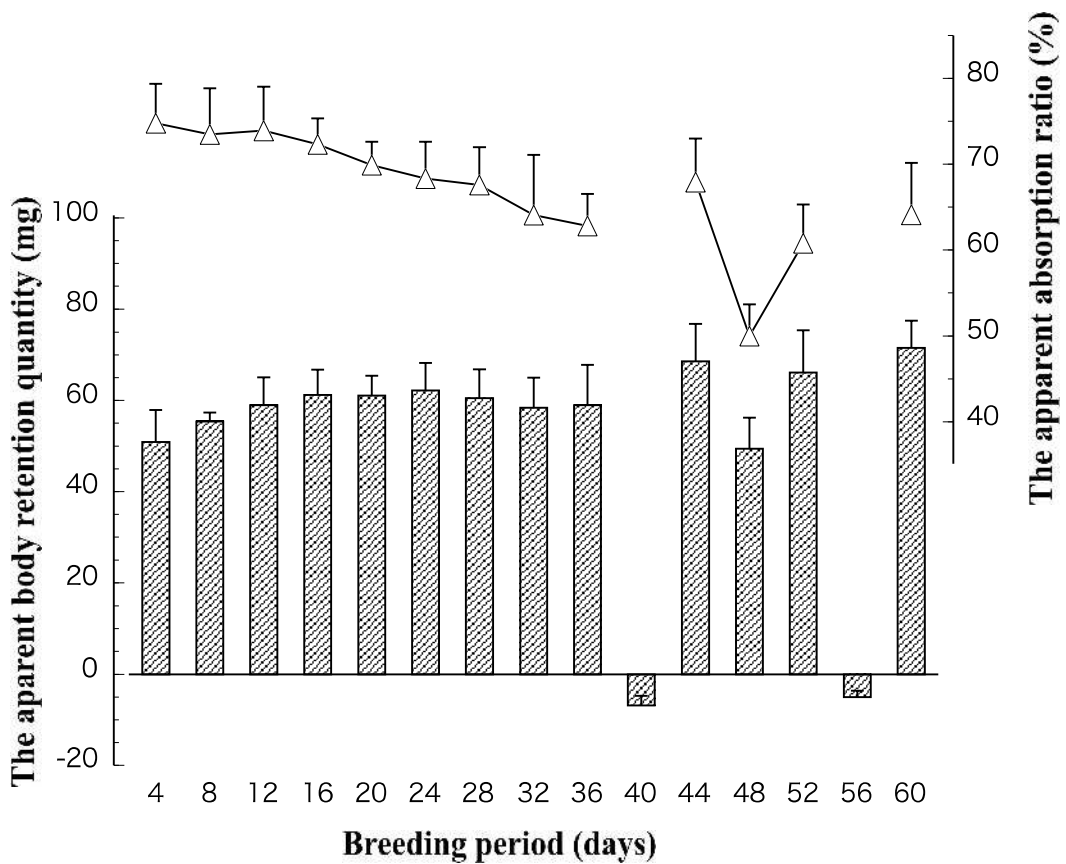


Fig. 5-35 Retention and absorption of the calcium on the fasted-late group. Values are mean \pm S.D. for groups.

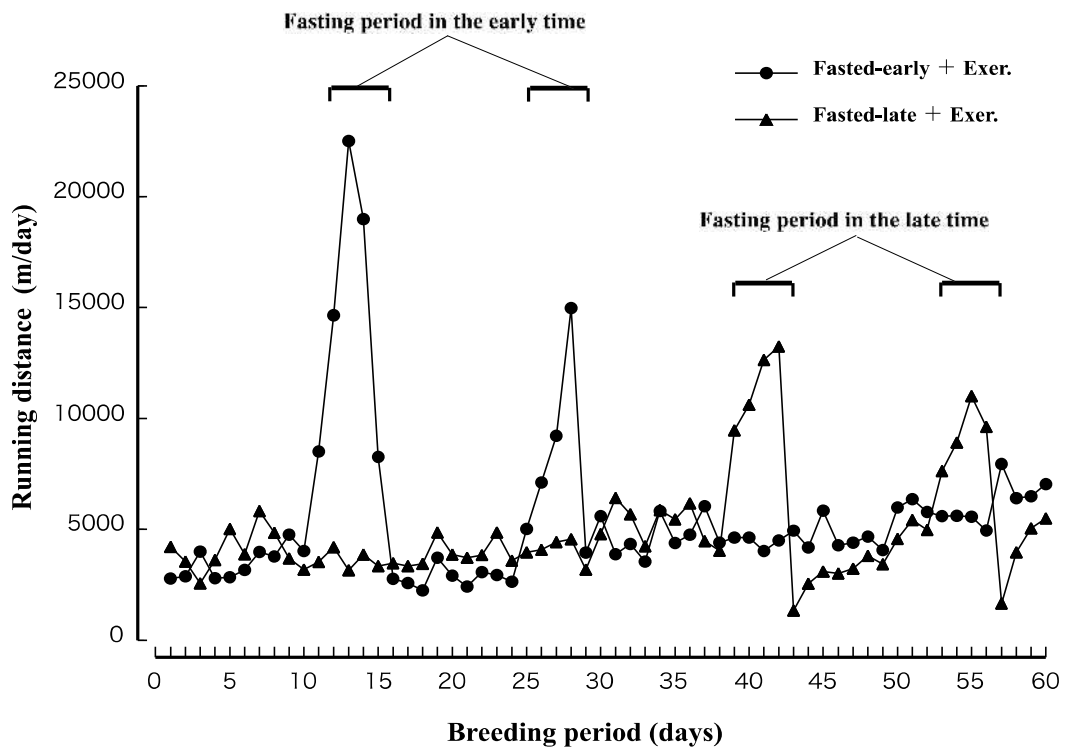


Fig.5-36 Running distance. Values are mean for groups.

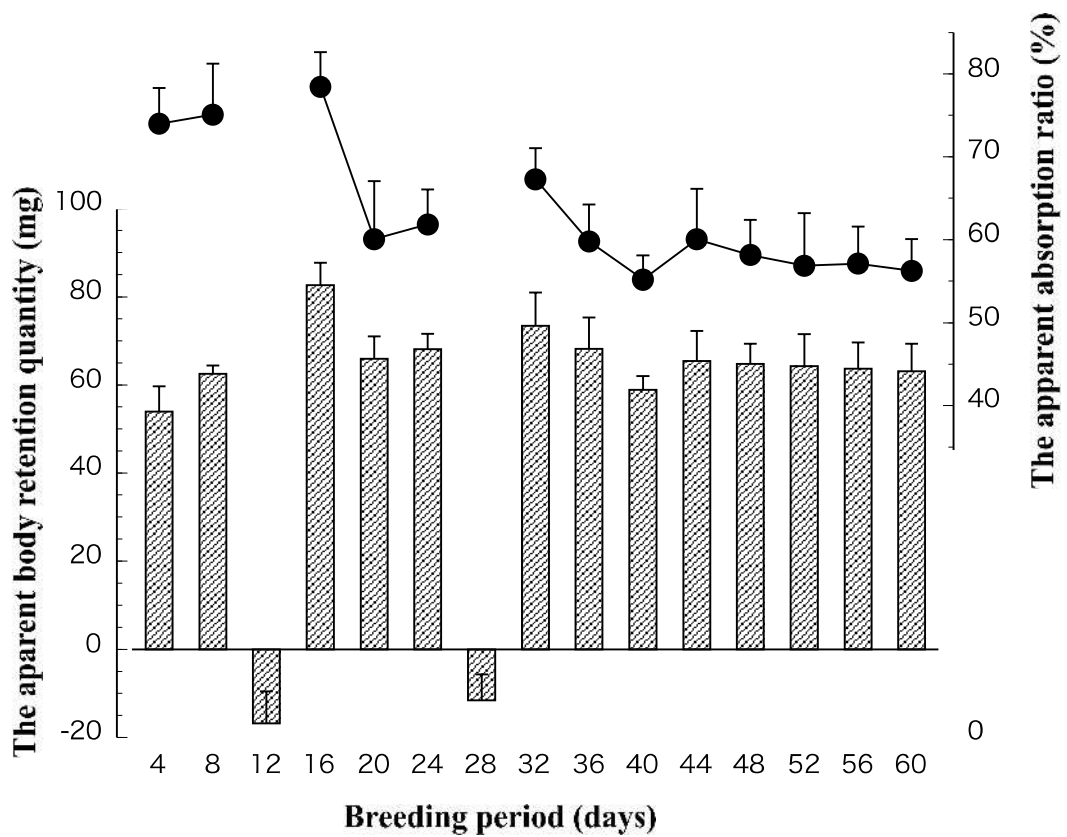


Fig.5-37 Retention and absorption of the calcium on the fasted-early + exercise group. Values are mean \pm S.D. for groups.

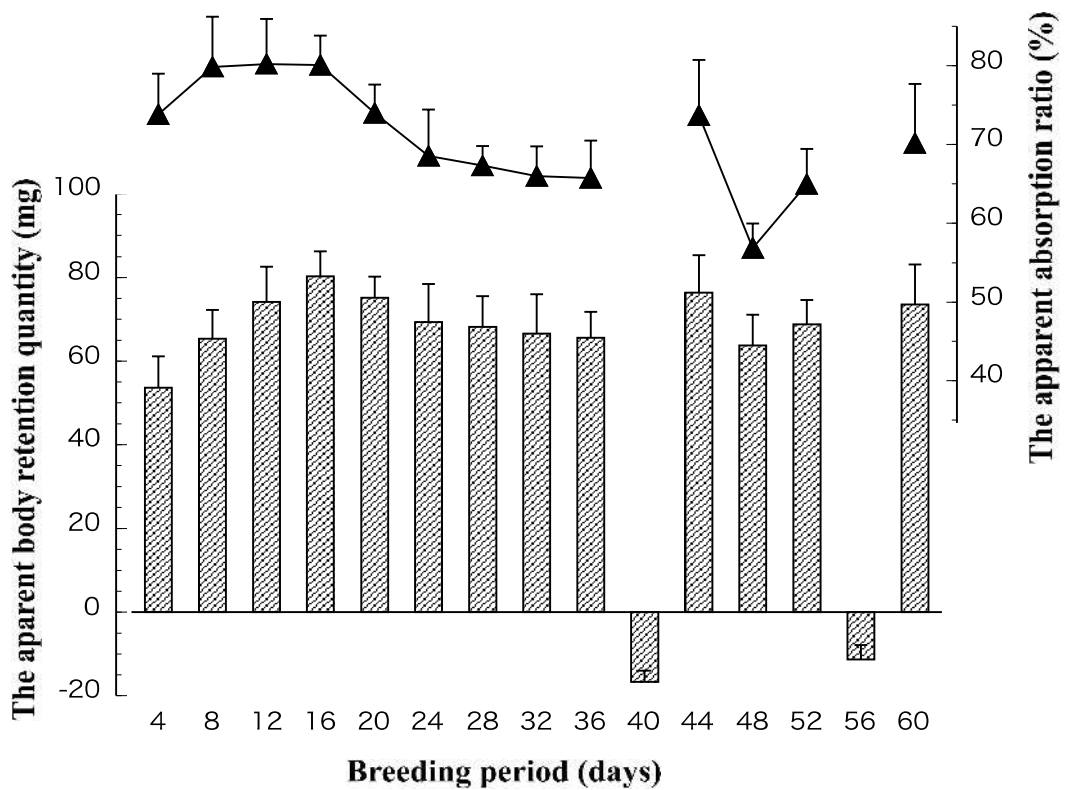


Fig.5-38 Retention and absorption of the calcium on the fasted-late + exercise group. Values are mean \pm S.D. for groups.

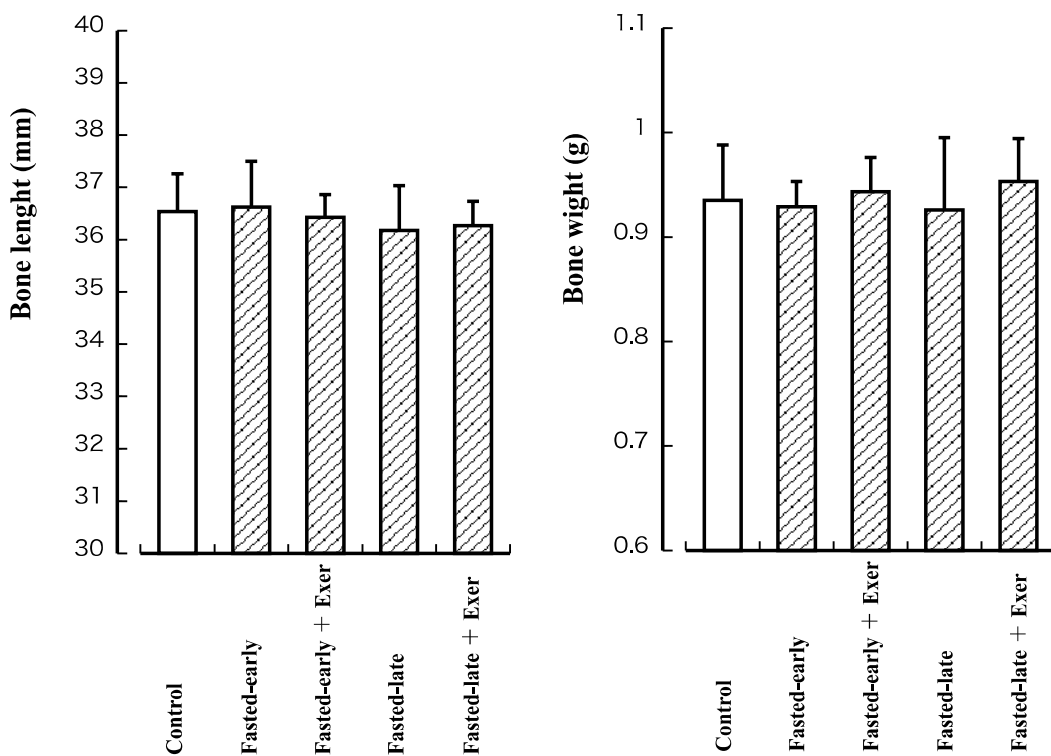


Fig.5-39 Length and weight of femur of the each experimental group rat. Columns and bars are Means \pm S.D. for groups.

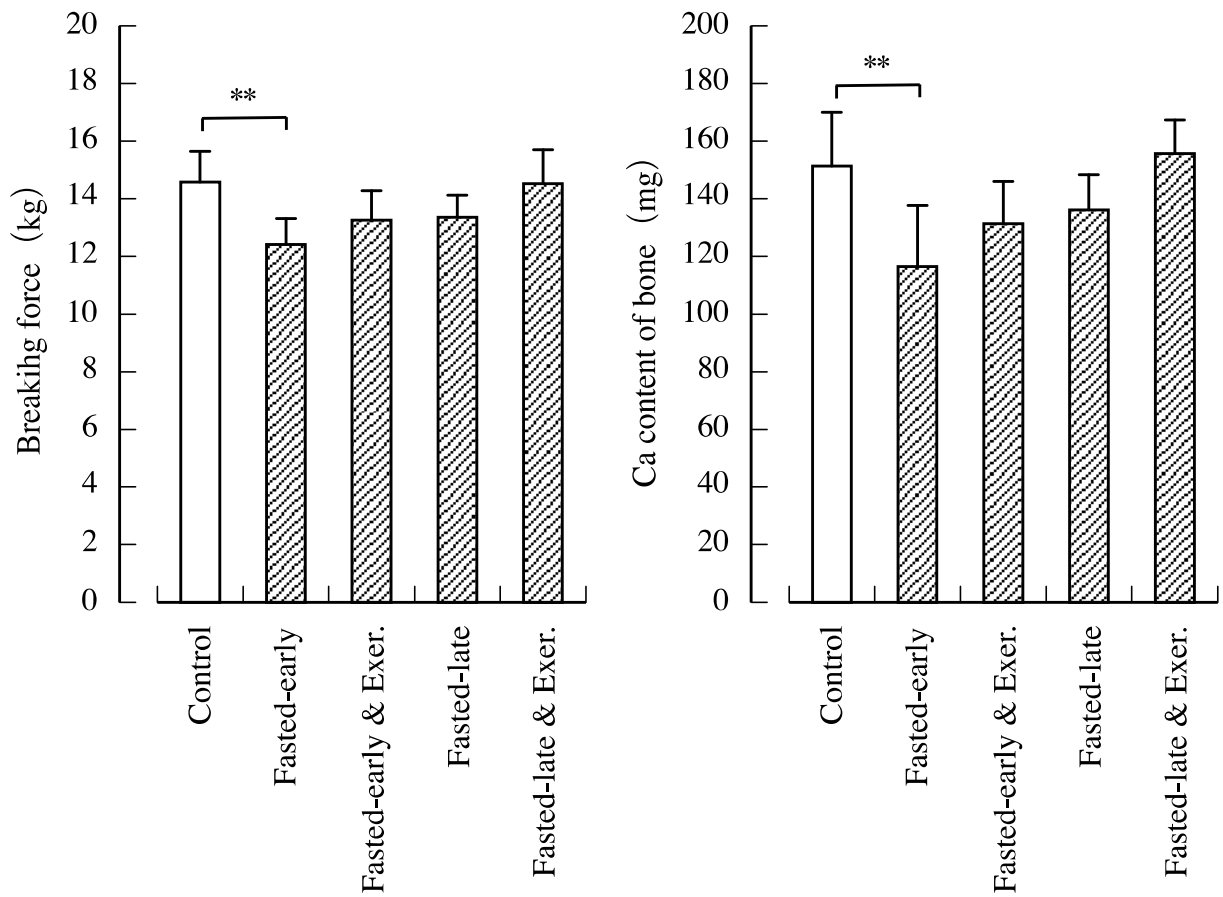


Fig.5-40 Calcium content and breaking force in the femur of the each experimental group rat. Columns and bars are Means \pm S.D. for groups. $P < 0.05$, $P < 0.01$, significantly different from controls value.

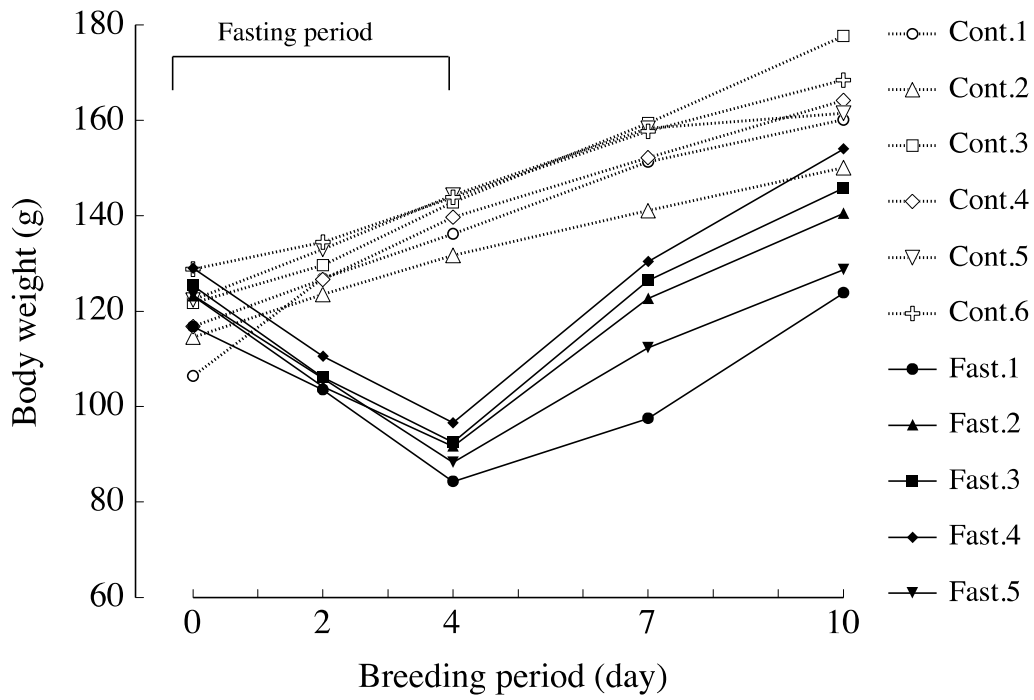


Fig.5-41 Growth curves of each individual

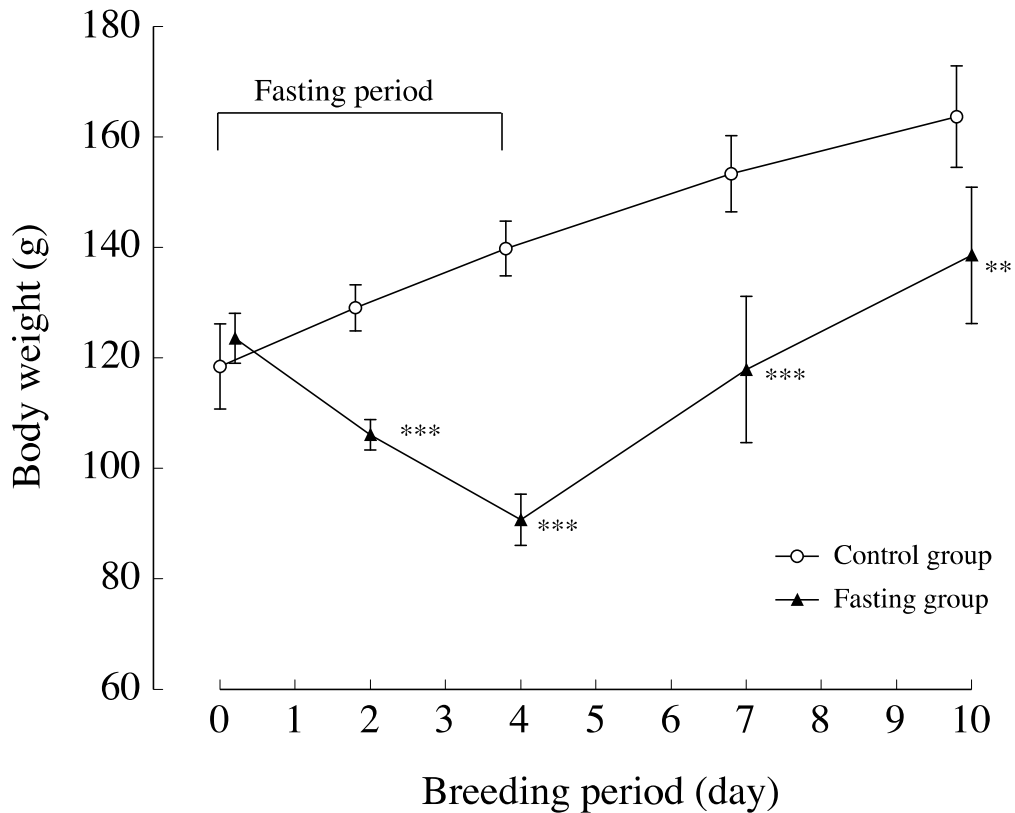


Fig.5-42 Growth curves of rats Values are Means \pm SD for group. **P<0.01, ***P<0.001, significantly different from control value.

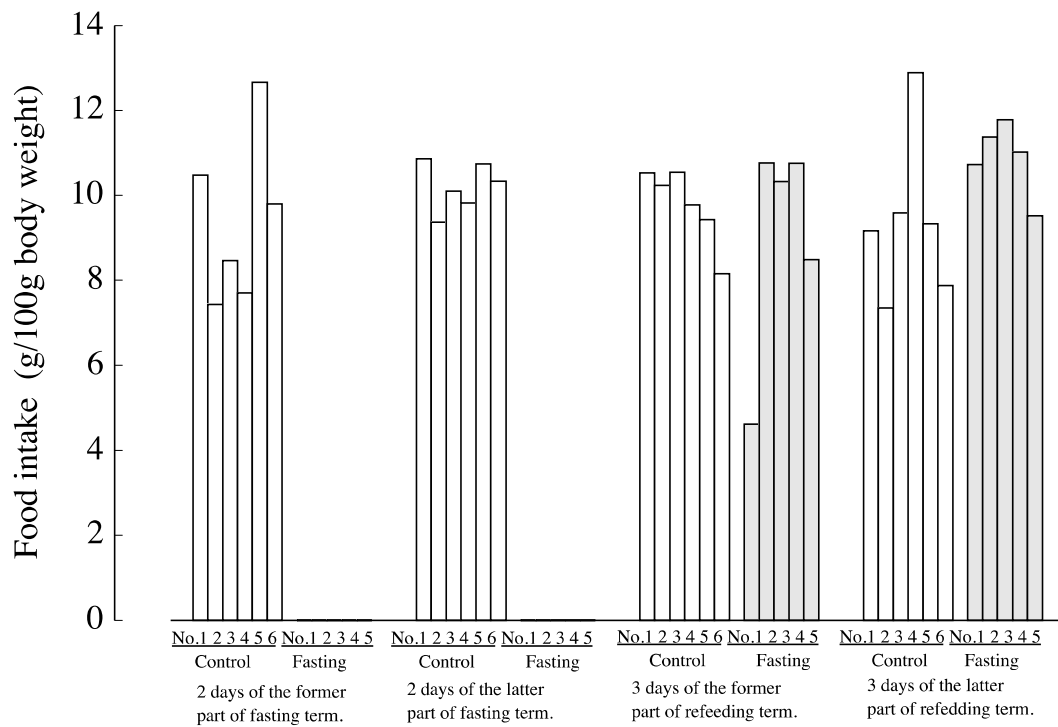


Fig.5-43 Food intake in control and fasting rats.

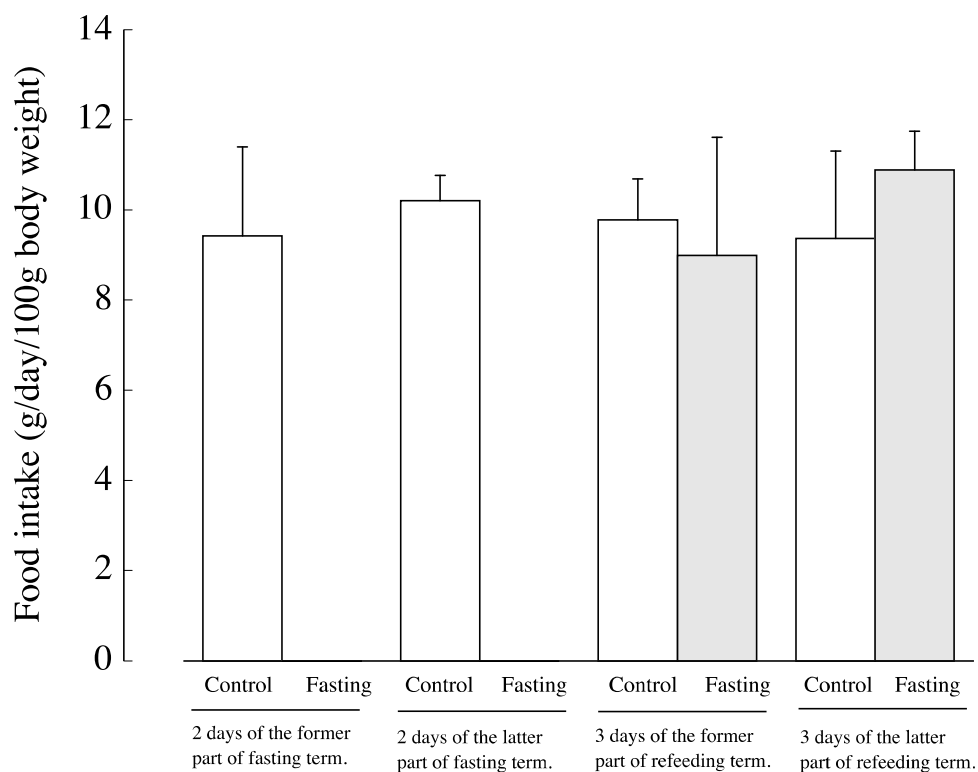


Fig.5-44 Average of food intake in control and fasting rats. Values are Means \pm SD for group.

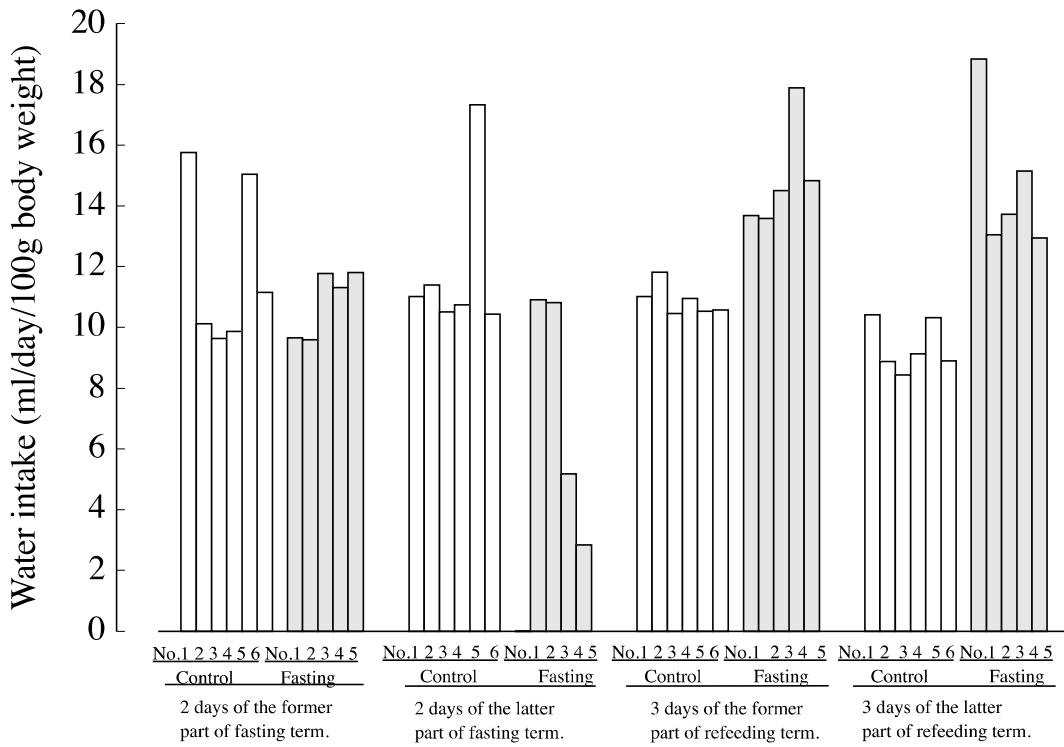


Fig.5-45 Water intake in control and fasting rats.

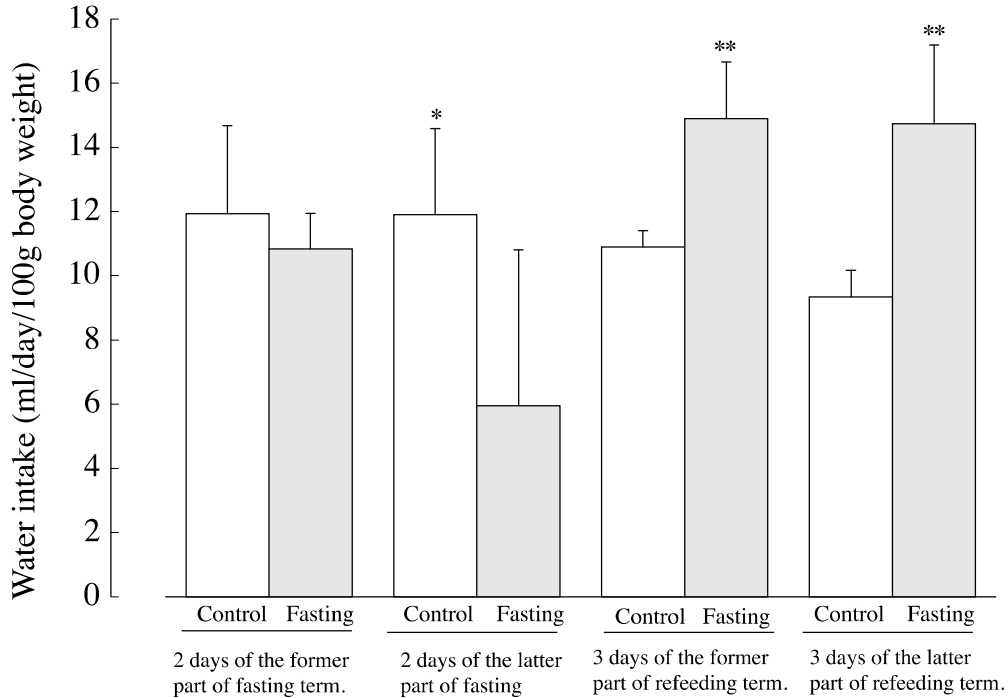


Fig.5-46 Average of water intake in control and fasting rats. Values are Means \pm SD for group. * P<0.05, ** P<0.01, significantly different from control value.

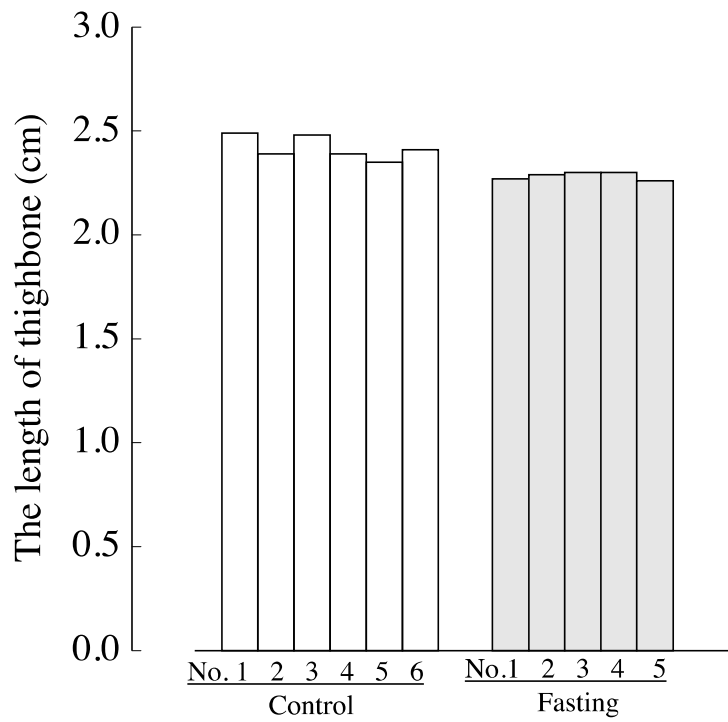


Fig.5-47 The length of thighbone after fasting term of 4 days and refeeding term

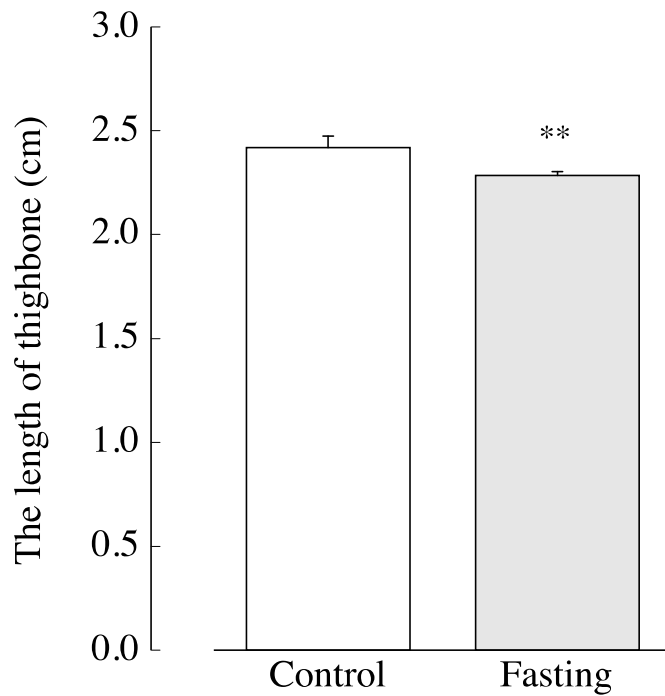


Fig.5-48 Average of the length of thighbone after fasting term of 4 days and refeeding term of 6 days in control and fasting rats. Values are Means \pm SD for groups. ** P<0.01, significantly different from control value.

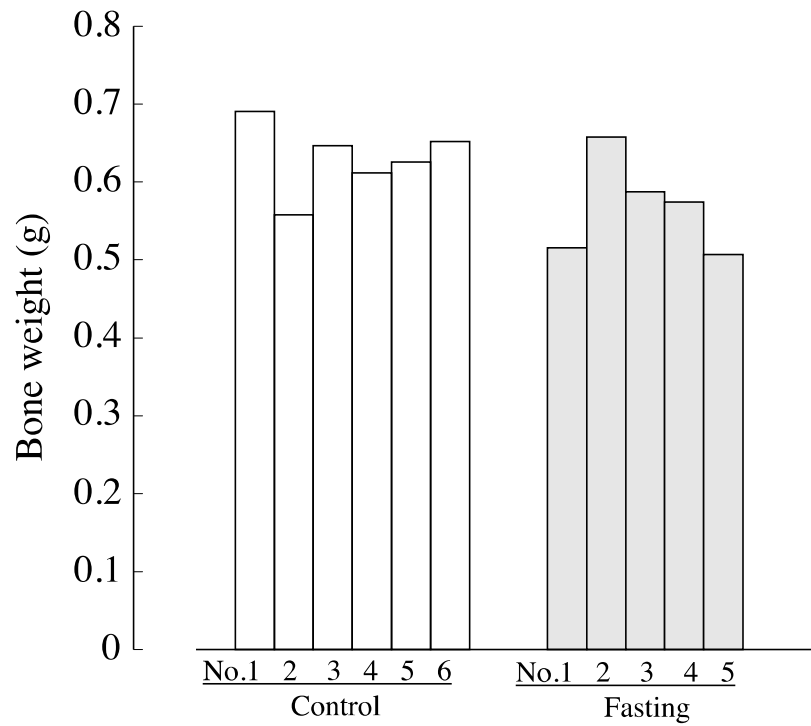


Fig.5-49 Bone weight of after fasting term of 4 days and refeeding term of 6 days in control and fasting rats.

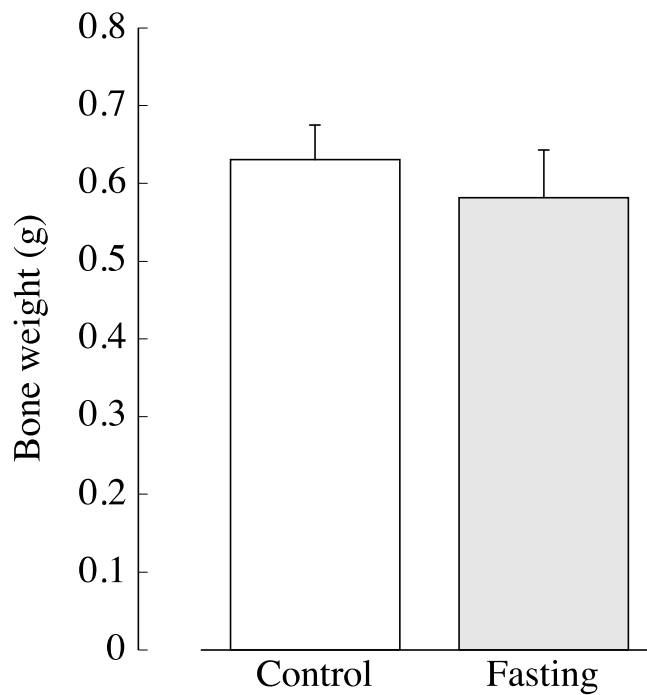


Fig.5-50 Average of bone weight of after fasting term of 4 days and refeeding term of 6 days in control and fasting rats. Values are Means \pm SD for group.

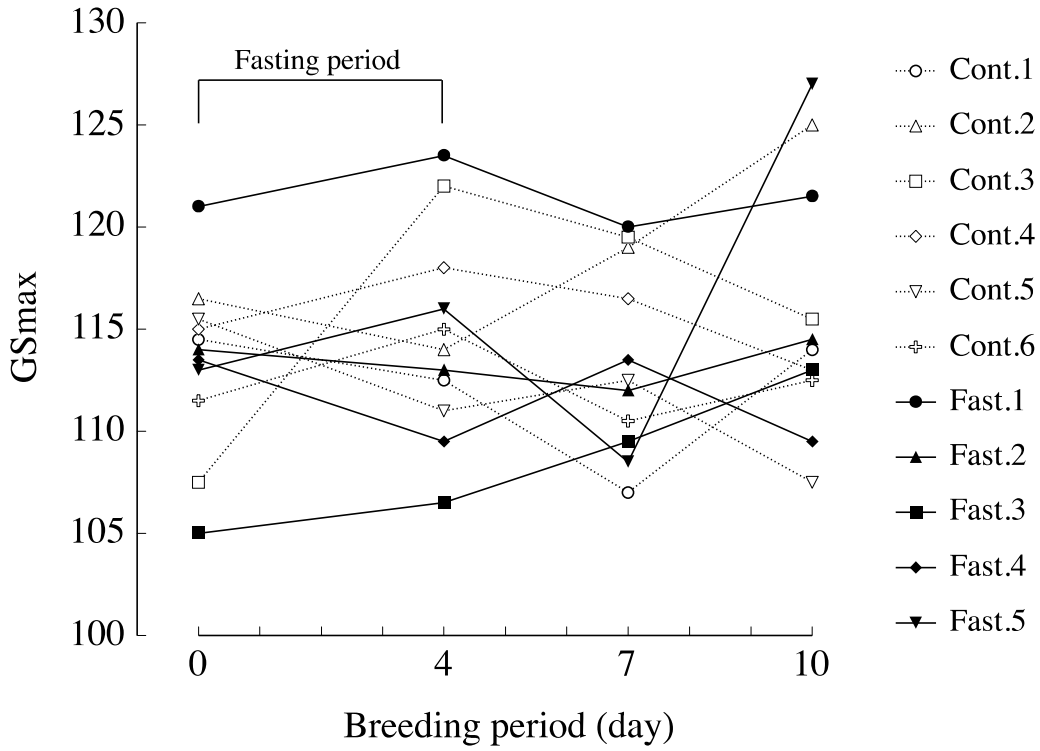


Fig.5-51 GSmax in control (○) and fasting (●) rats.

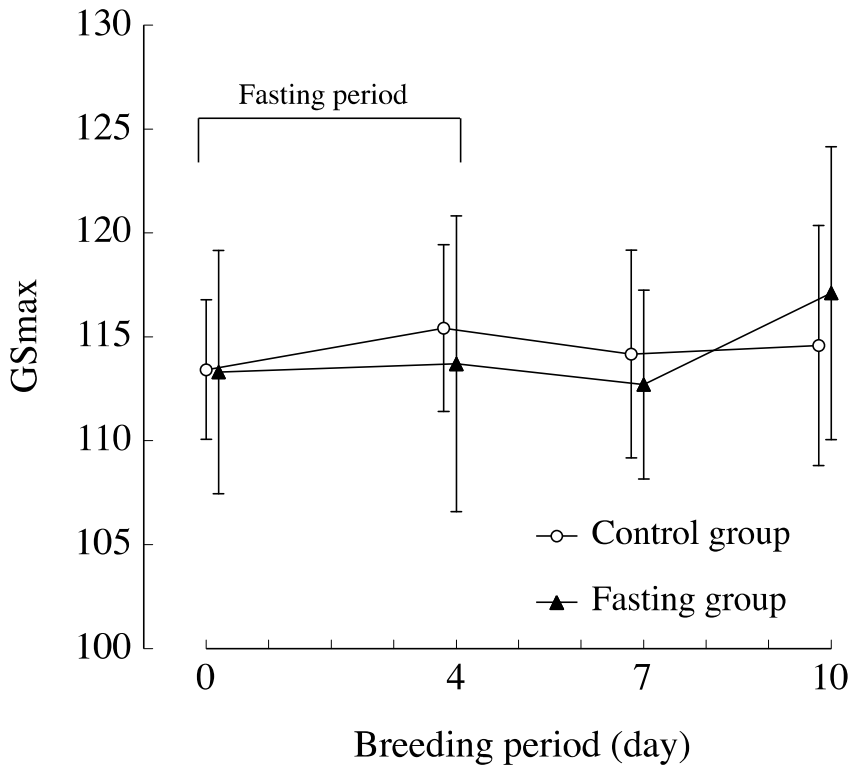


Fig.5-52 Average of GSmax in control (○) and fasting (▲) rats. Values are Means \pm SD for groups.

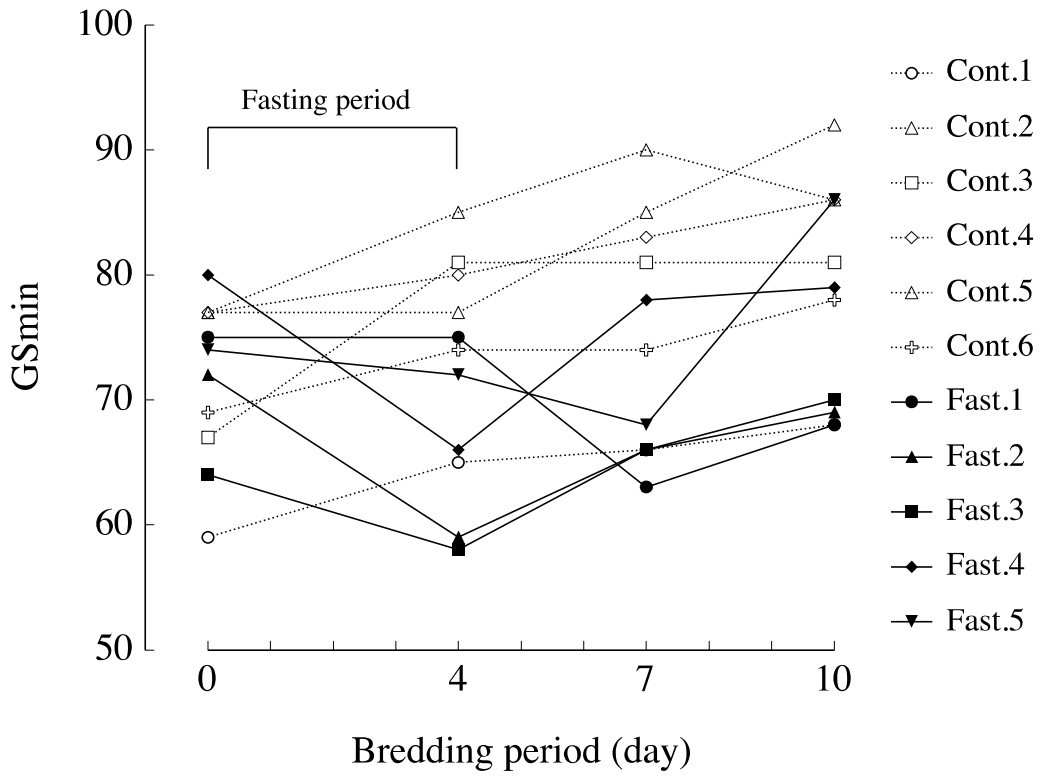


Fig.5-53 GSmin in control (○) and fasting (●) rats.

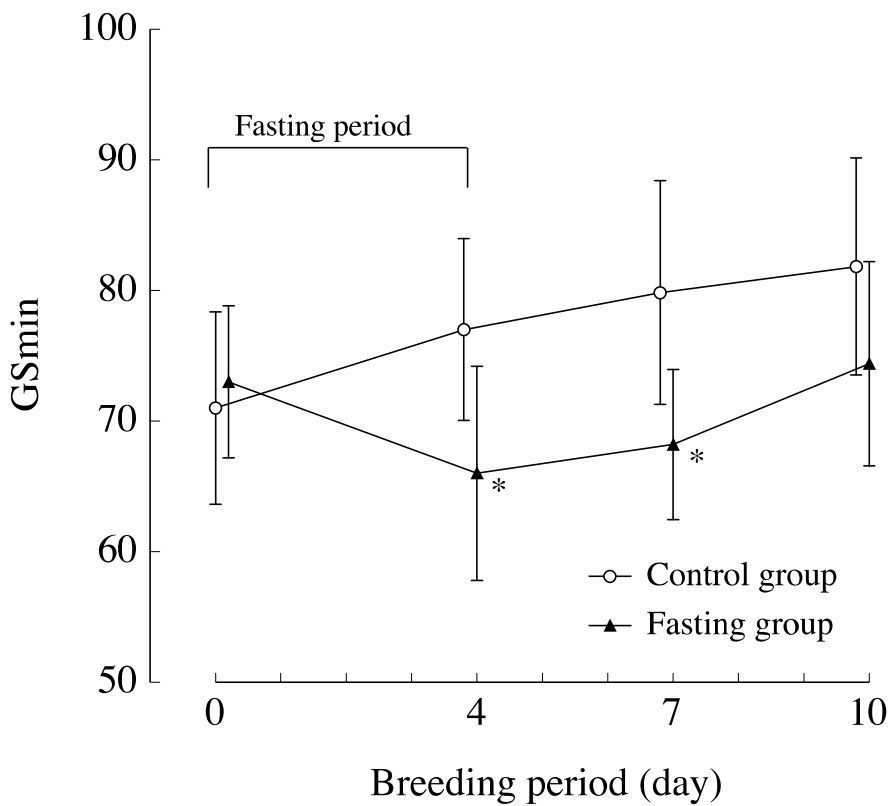


Fig.5-54 Average of GSmin in control (○) and fasting (▲) rats. Values are Means \pm SD for groups. *P<0.05, significantly different from control value.

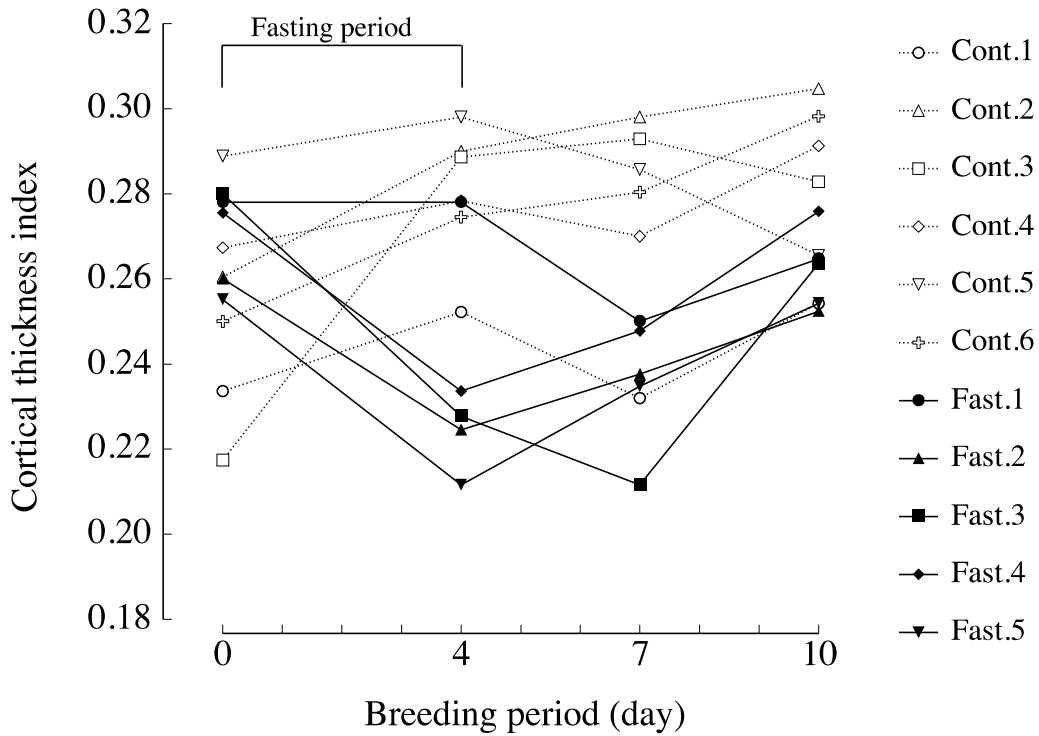


Fig.5-55 Cortical thickness index in control (○) and fasting (●)rats.

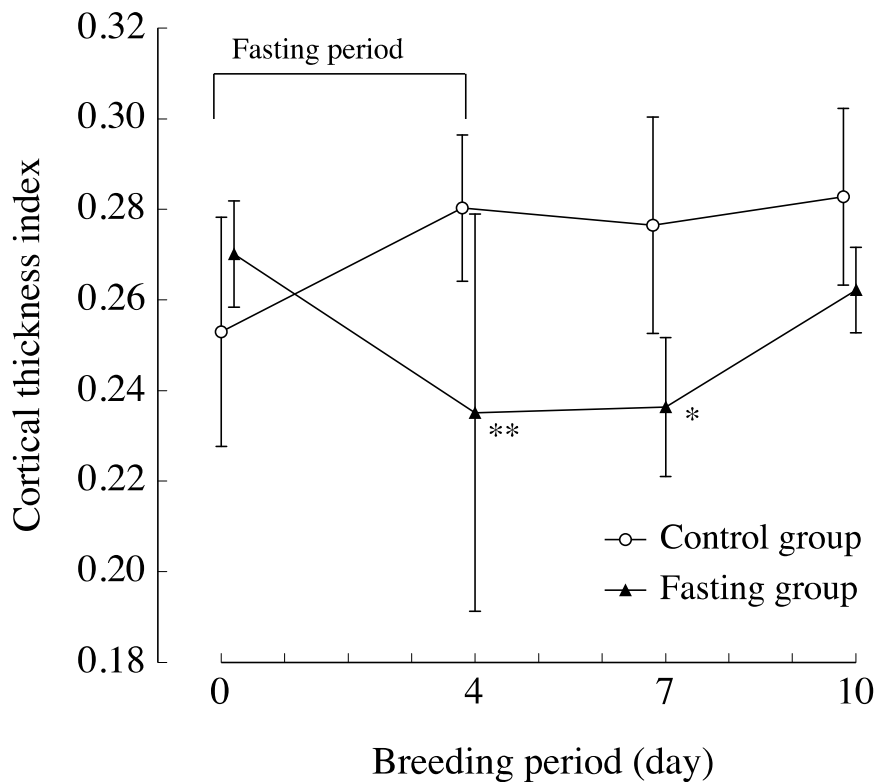


Fig.5-56 Average of cortical thickness index in control (○) and fasting (▲)rats. Values are Means \pm SD for groups. *P<0.05, **P<0.01, significantly different from control value.

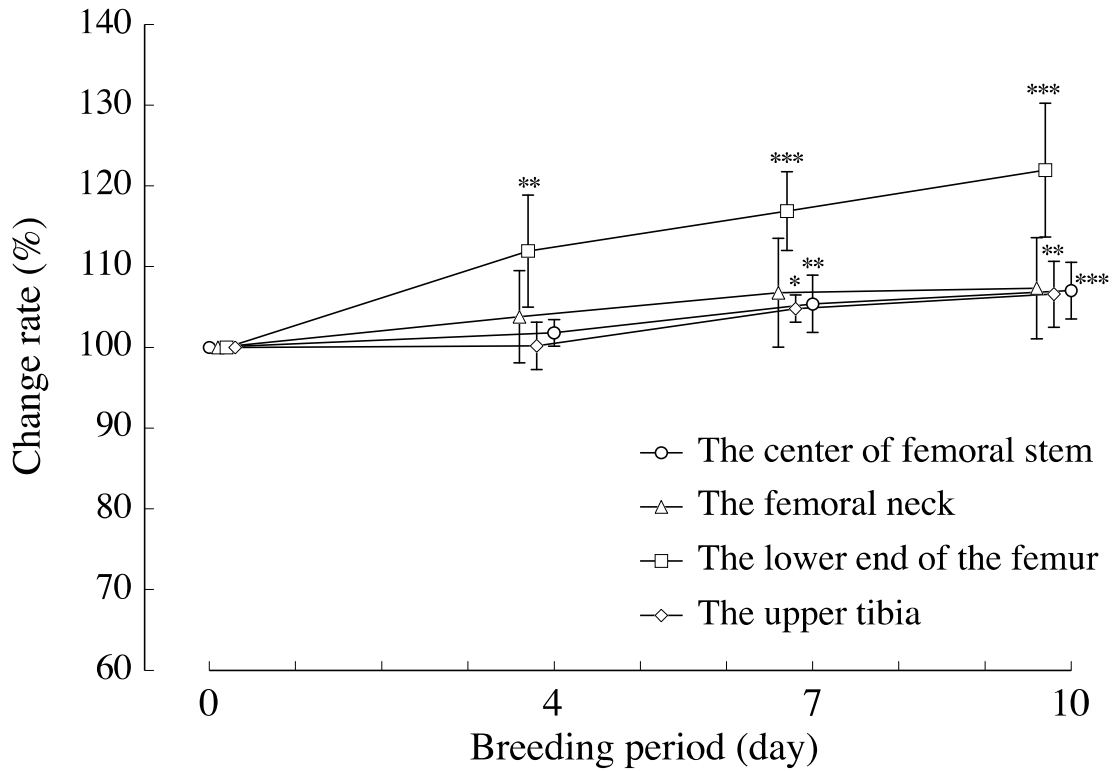


Fig.5-57 Change rate of the parameter of bone mineral density of every measure region of control group. Values are means \pm SD for groups. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, significantly different from control value.

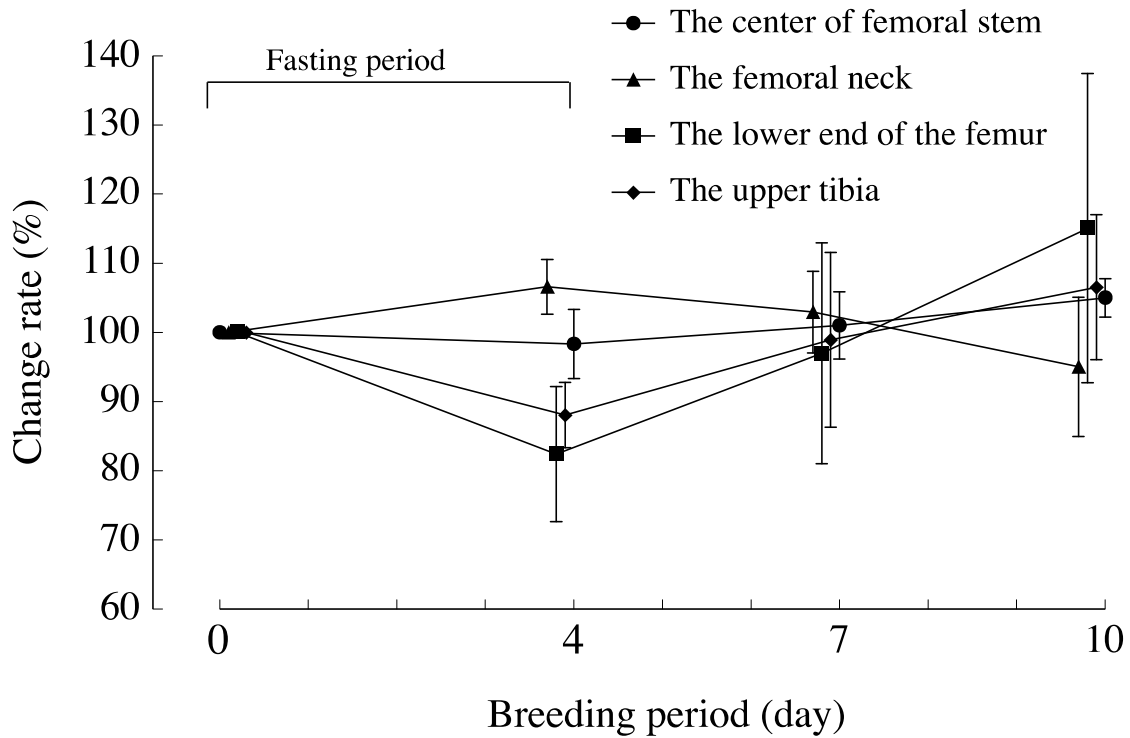


Fig.5-58 Change rate of the parameter of bone mineral density of every measure region of fasting group. Values are means \pm SD for groups. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, significantly different from control value.

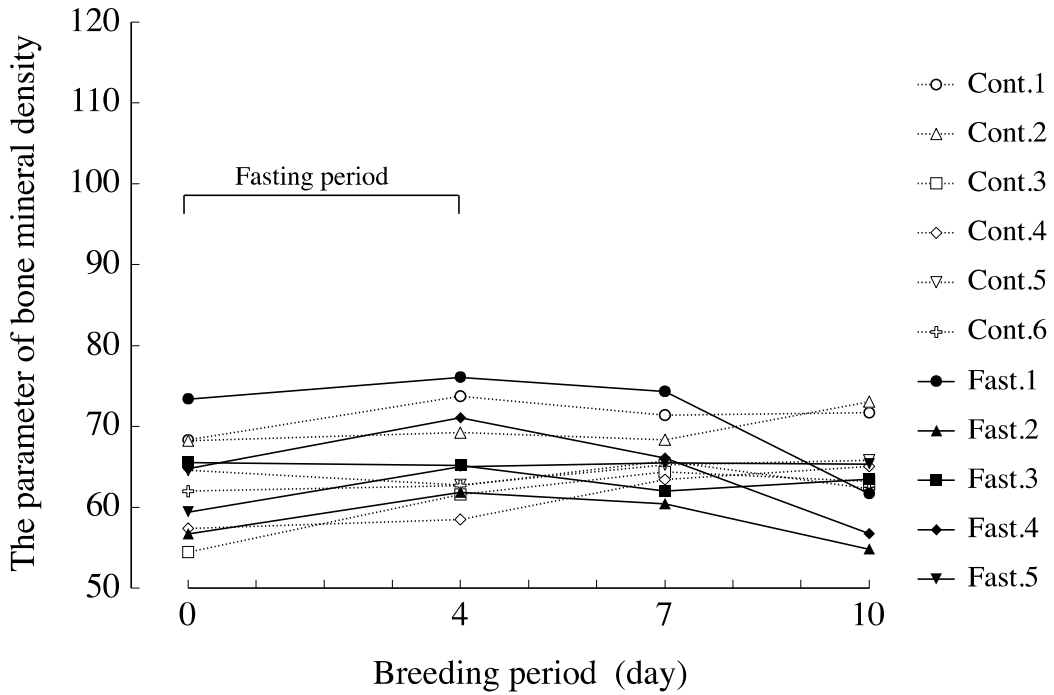


Fig.5-59 The parameter of bone mineral density of the femoral neck in control (○) and fasting (●) rats.

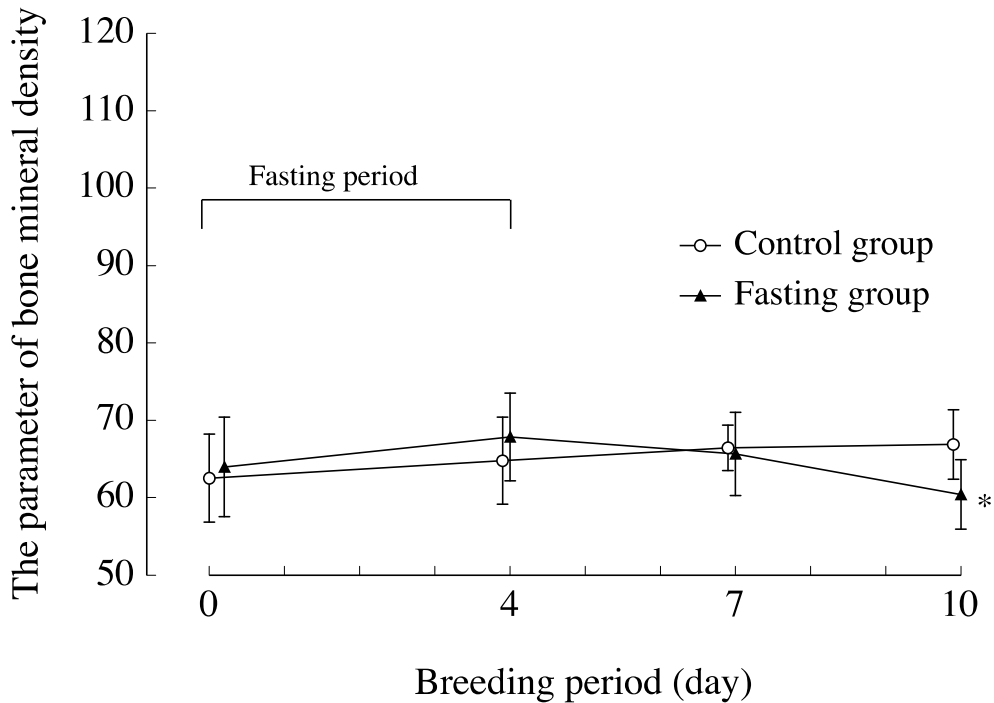


Fig.5-60 Average of the parameter of bone mineral density of the femoral neck in control (○) and fasting (▲) rats. Values are Means \pm SD for groups. *P<0.05, significantly different from control value.

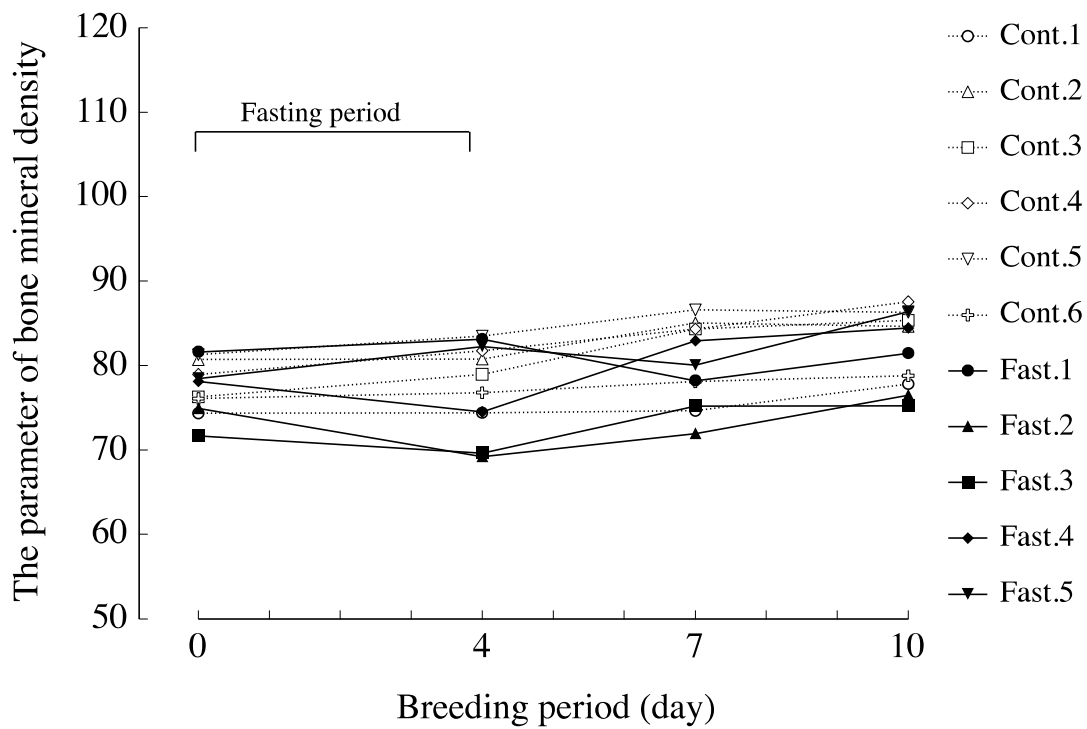


Fig.5-61 The parameter of bone mineral density of the center of femoral stem in control (○) and fasting (●) rats.

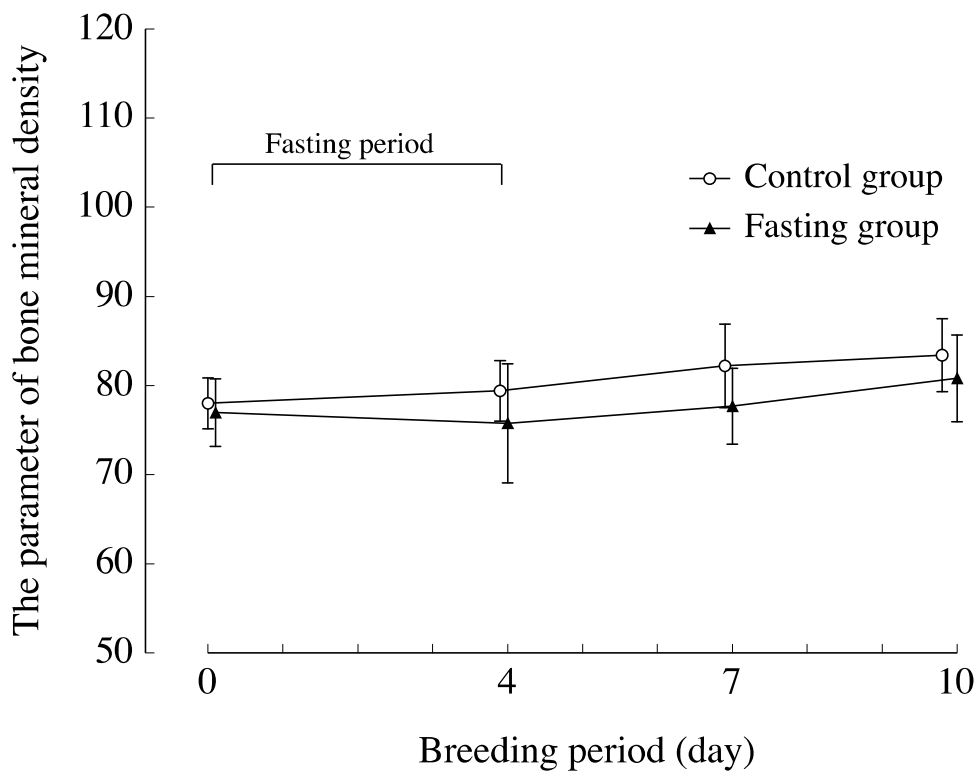


Fig.5-62 The parameter of bone mineral density of the center of femoral stem in control (○) and fasting (▲) rats. Values are Means \pm SD for group.

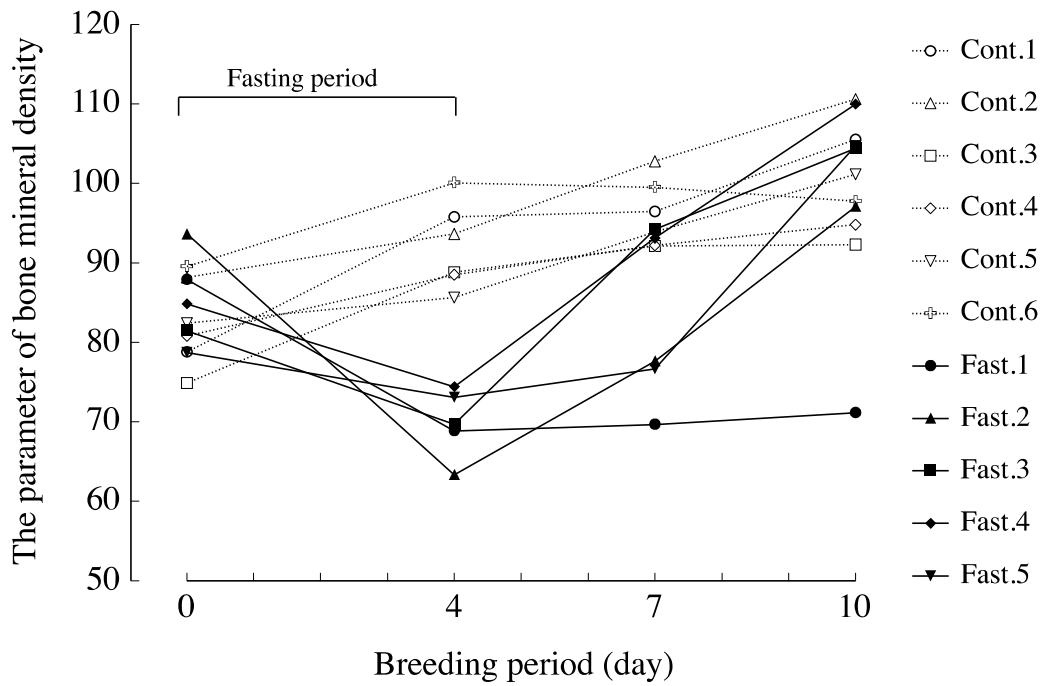


Fig.5-63 The parameter of bone mineral density of the lower end of the femur in control (○) and fasting (●) rats.

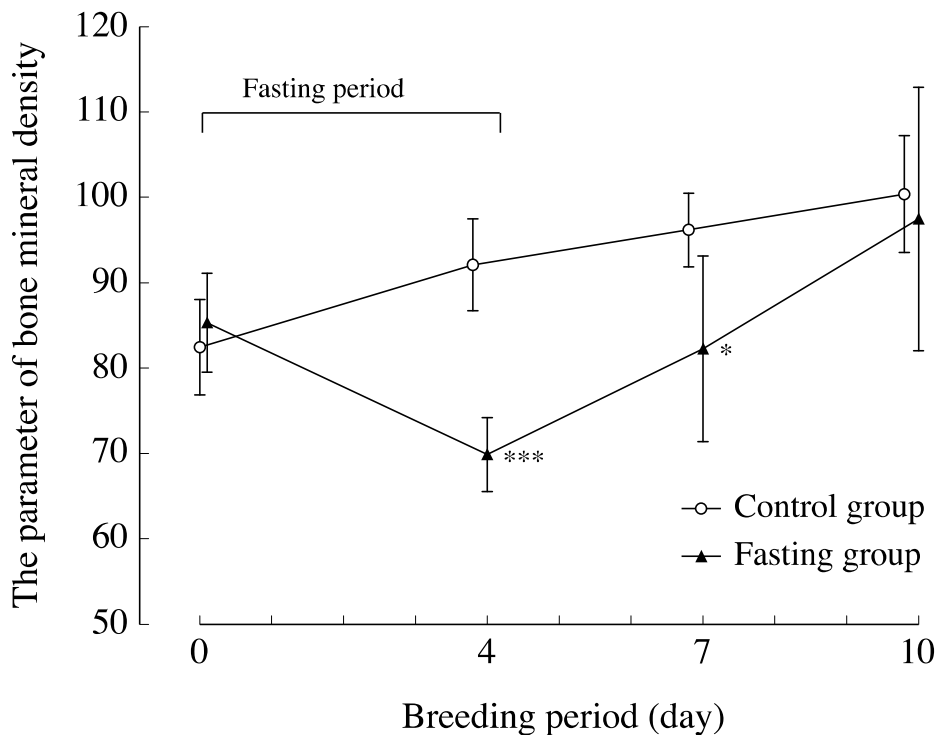


Fig.5-64 The the lower end of the femur in control (○) and fasting (▲) rats. Values are Means \pm SD for groups. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, significantly different from control value.

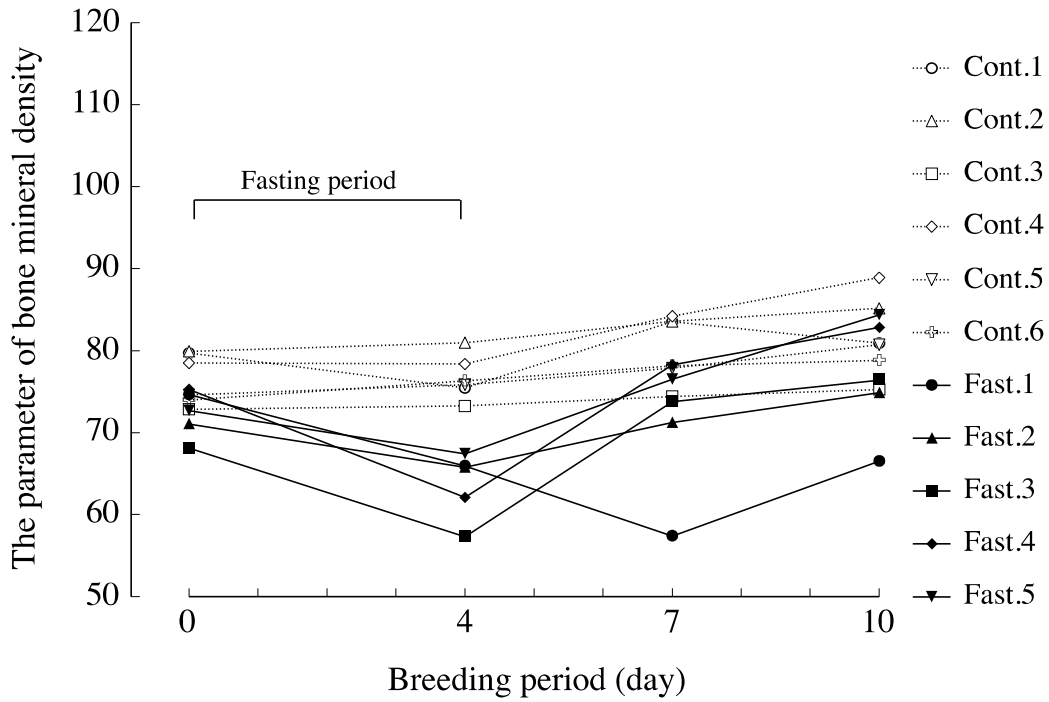


Fig.5-65 The parameter of bone mineral density of the upper tibia in control (○) and fasting (●) rats.

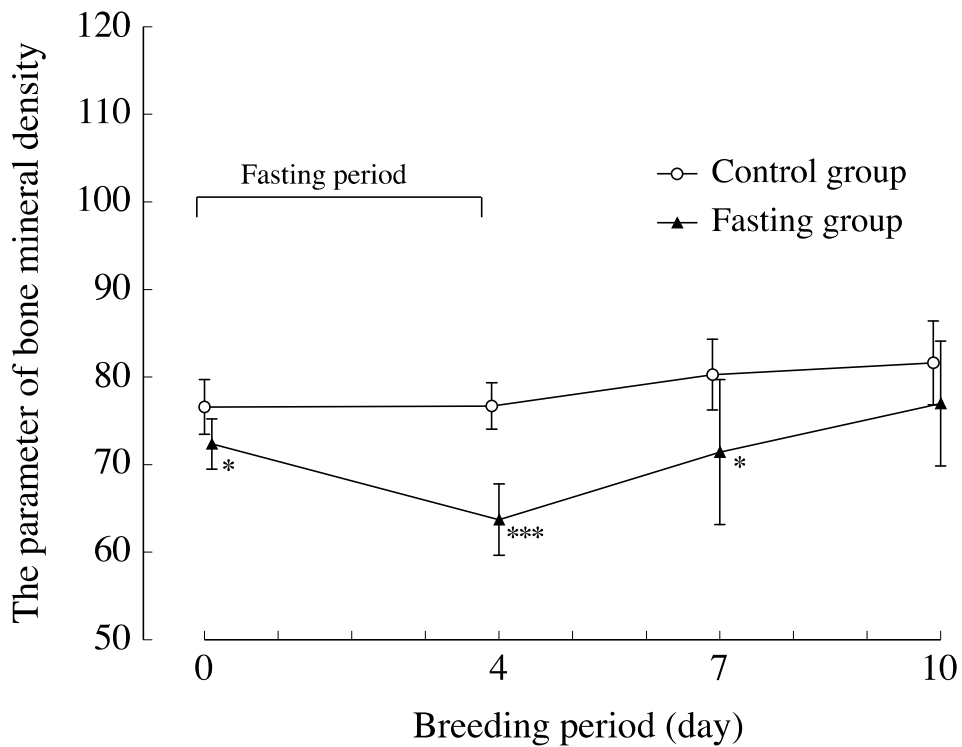


Fig.5-66 Average of the parameter of bone mineral density of the upper tibia in control (○) and fasting (▲) rats. Values are Means \pm S.D. for groups. *P<0.05, ***P<0.001, significantly different from control value.

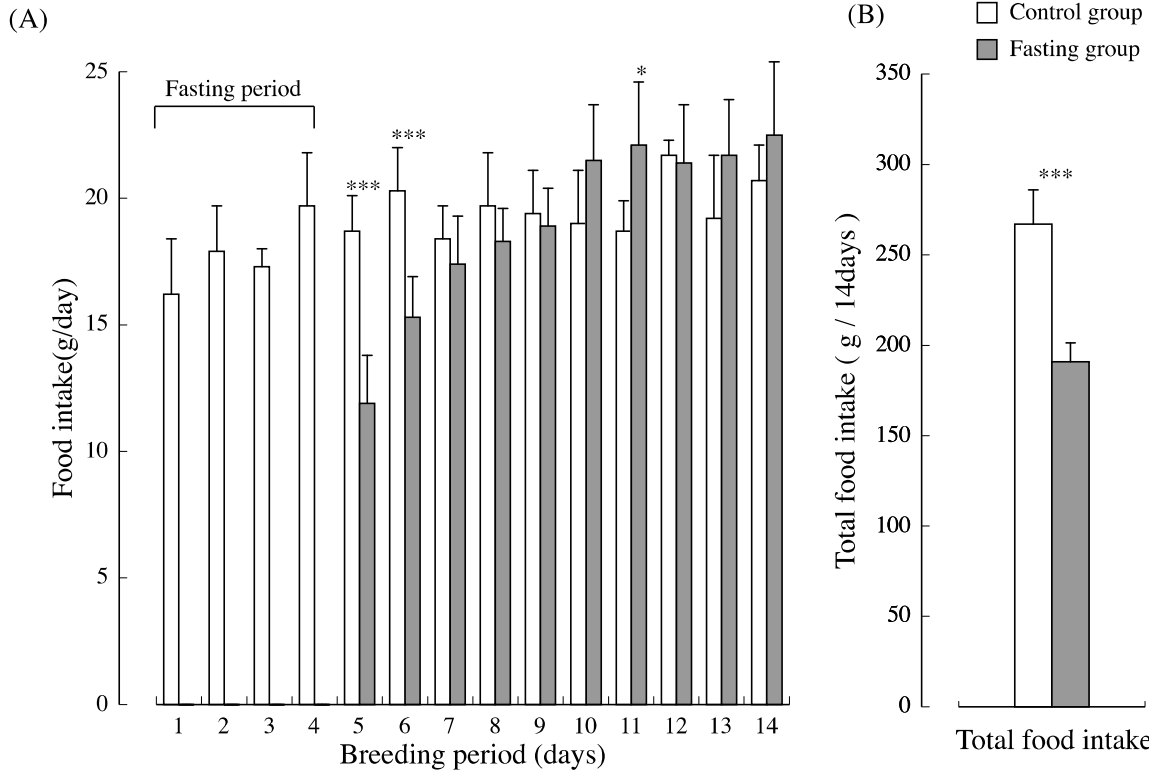


Fig. 5-67 Food intake of rats in the experimental period. (A) Changes of the rats food consumption during the experimental period (B) The total amount of food intake for 14 days. Values are Means \pm S.D. for groups. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, significantly different from the control value.

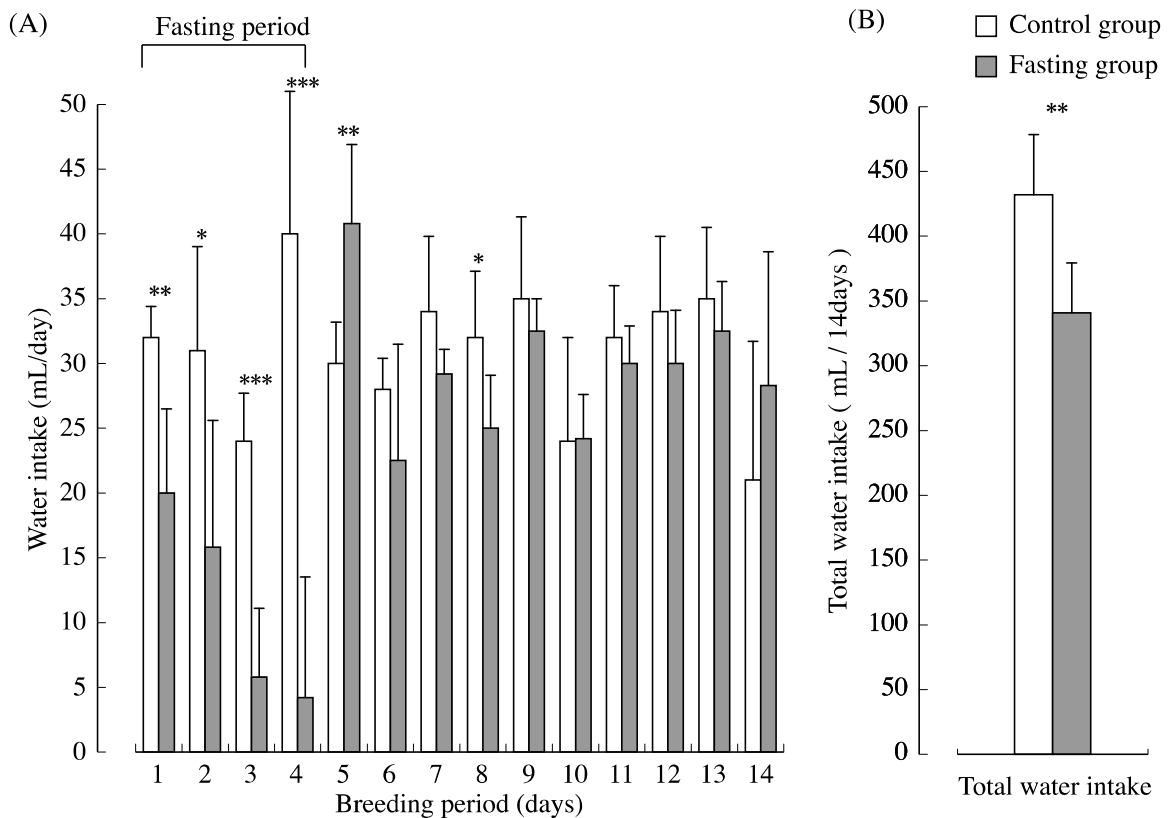


Fig.5-68 Water intake of rats in the experimental period. (A) Changes of the rats water consumption during the experimental period (B) The total amount of water intake for 14 days. Values are Means \pm S.D. for groups. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, significantly different from the control value.

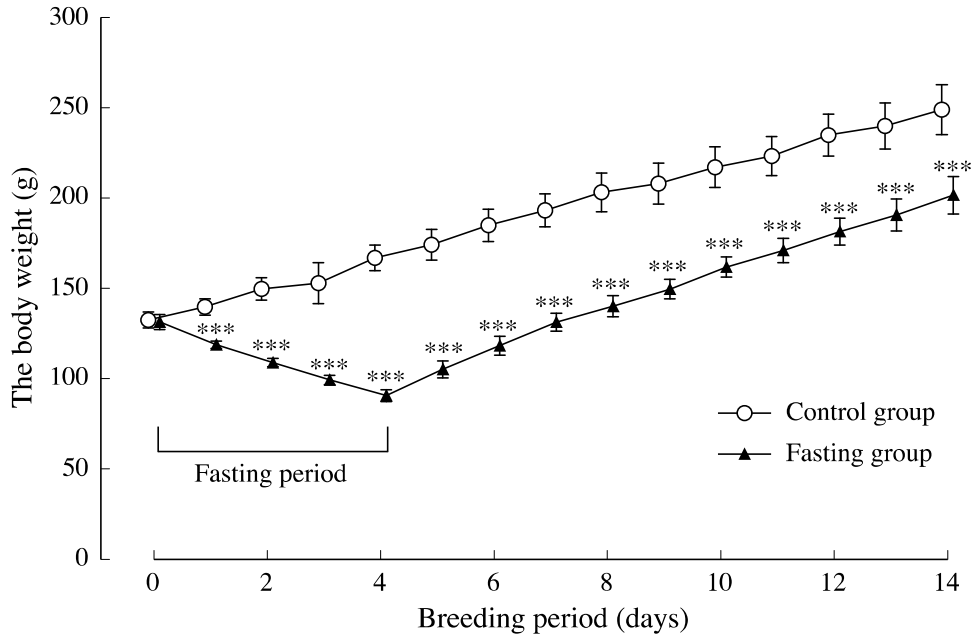


Fig.5-69 Body weight of rats in the experimental period. Values are Means \pm S.D. for groups. ***P < 0.001, significantly different from the control value.

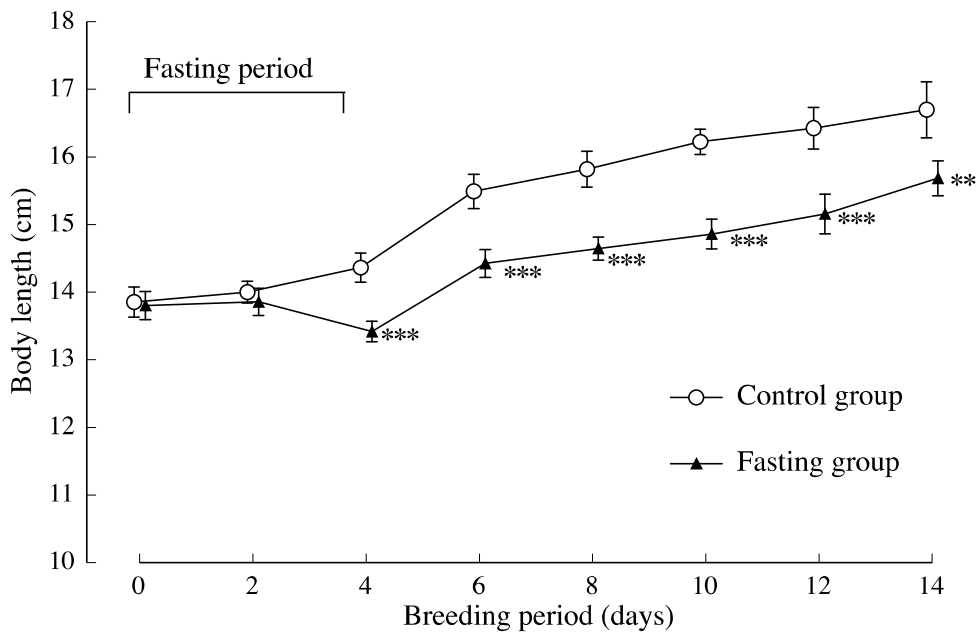


Fig.5-70 Body length of rats in the experimental period. Values are Means \pm S.D. for groups. ***P < 0.001, significantly different from the control value.

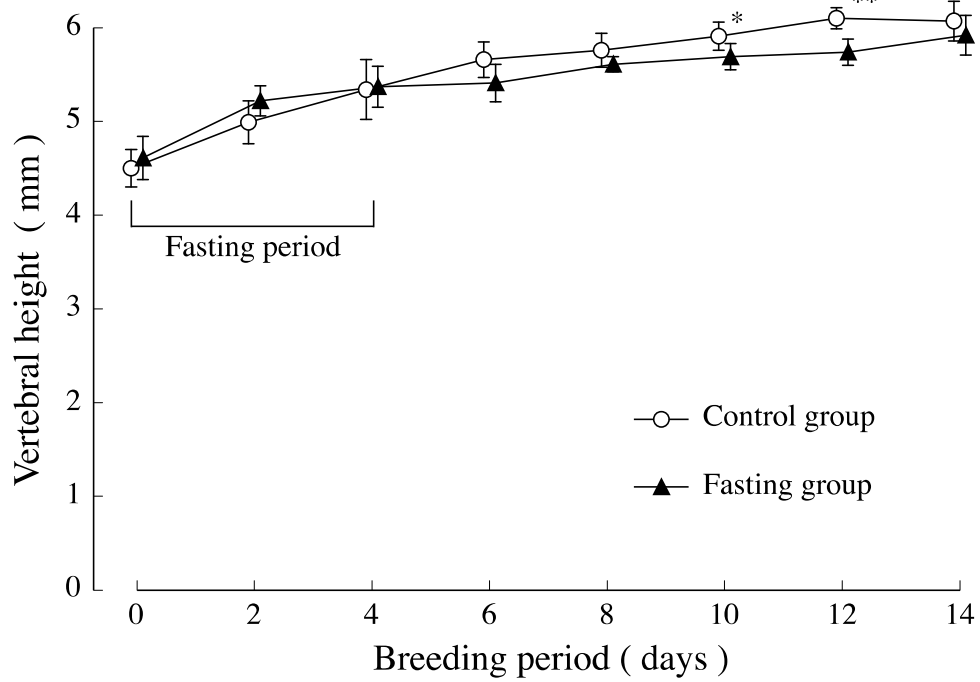


Fig.5-71 Vertebral body height of rats in the experimental period. Values are Means \pm S.D. for groups. *P < 0.05, **P < 0.01, significantly different from the control value.

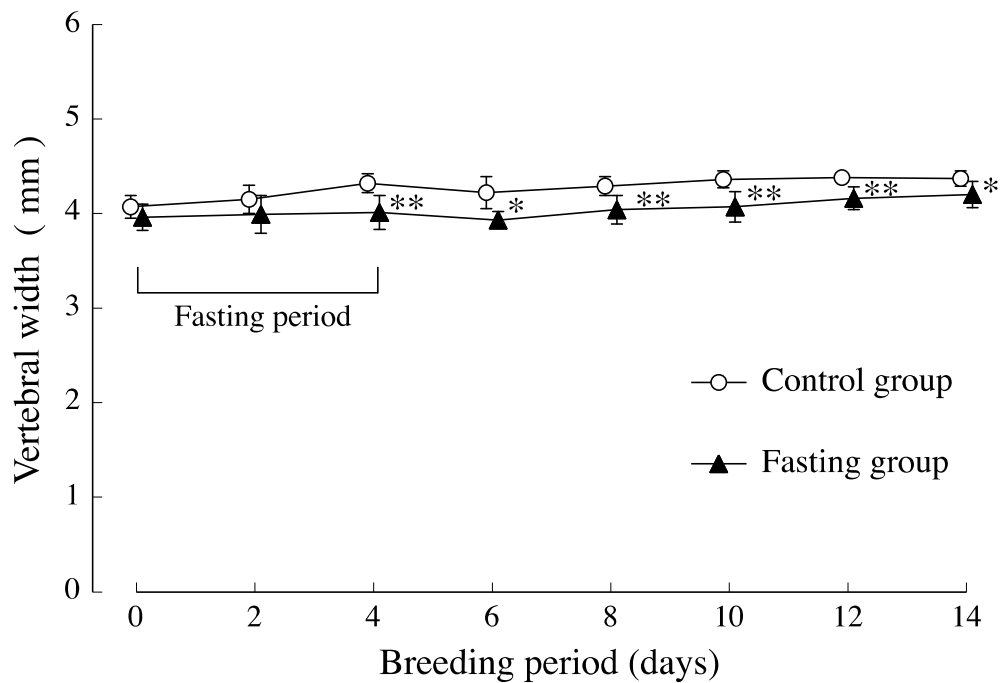


Fig.5-72 Vertebral body width of rats in the experimental period. Values are Means \pm S.D. for groups. *P < 0.05, **P < 0.01, significantly different from the control value.

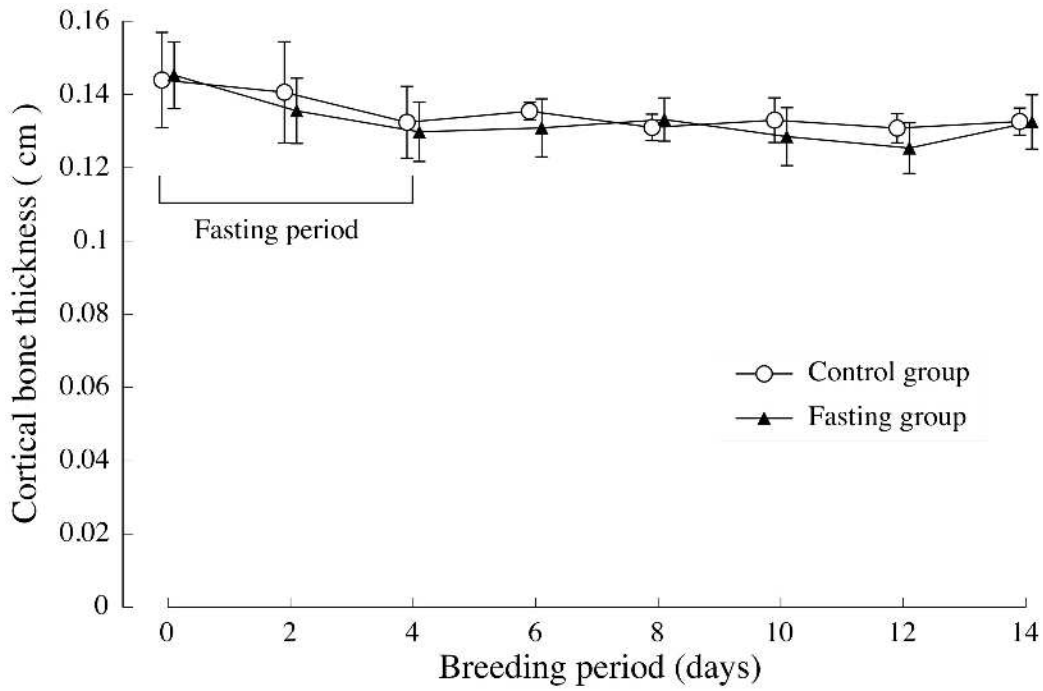


Fig.5-73 Cortical bone thickness of rats in the experimental period. Values are Means \pm S.D. for groups.

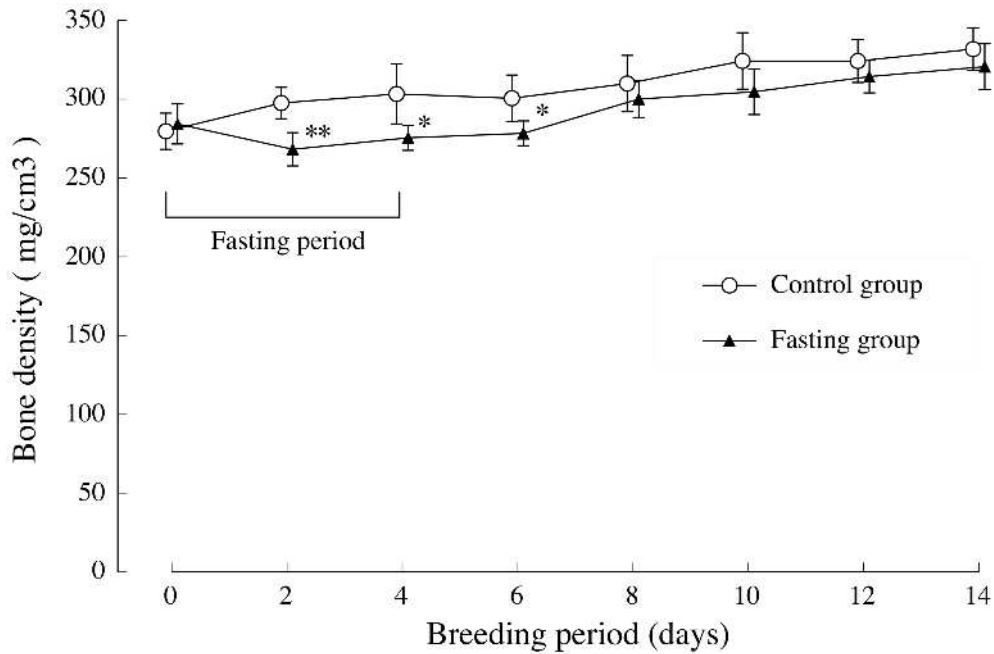


Fig.5-74 Lumbar vertebral bone density of rats in the experimental period. Values are Means \pm S.D. for groups. *P<0.05, **P<0.01, significantly different from the control value.

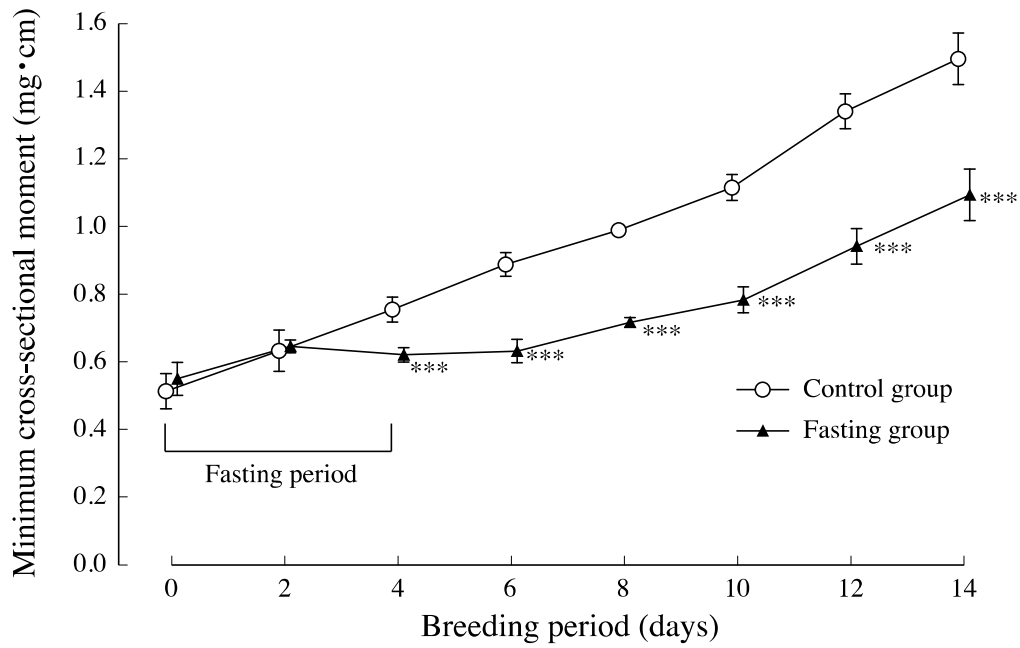


Fig.5-75 Minimum cross-sectional moment of rats in the experimental period. Values are Means \pm S.D. for groups. ***P<0.001, significantly different from the control value.

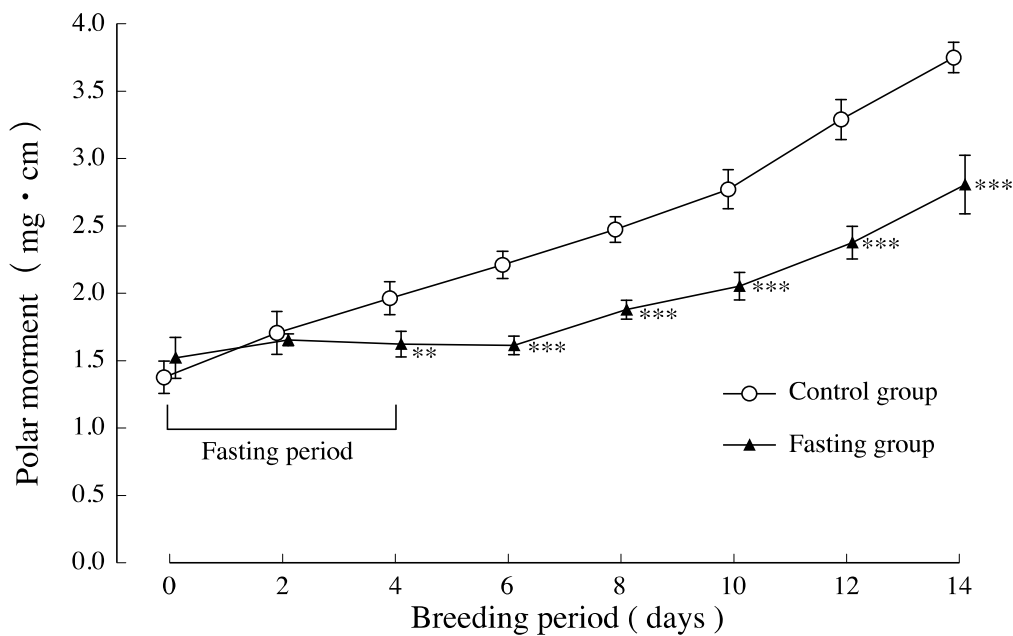


Fig.5-76 Polar moment of rats in the experimental period. Values are Means \pm S.D. for groups. **P<0.01, ***P<0.001, significantly different from the control value.

Chapter 6

Table 6-1 Composition of experimental diets (g/100g).

Ingredient	Amount
Moisture	8.9
Crude protein	24.9
Crude fat	4.6
Crude fiber	4.1
Crude ash	6.6
NFE	51.0
Total energy (Kcal/100g)	345

The analytical value is as follows. Vitamin content; Retinol 0.96mg, VE 6.2mg, VB₁ 1.70mg, VB₂ 1.33g, VC 13mg, VB₆ 1.25mg, VB₁₂ 6.3mg, Inositol 616mg, Folic acid 0.28mg, Biotin 41.6μg, Pantothenic acid 2.9mg, Niacin 16.9mg, Colin 0.21g. Mineral content; Ca 1.03g, P 0.97g, Mg 0.33g, Na 0.32g, K 1.05g, Fe 34.35mg, Cu 0.79mg, Mn 11.26mg, Zn 5.35mg.

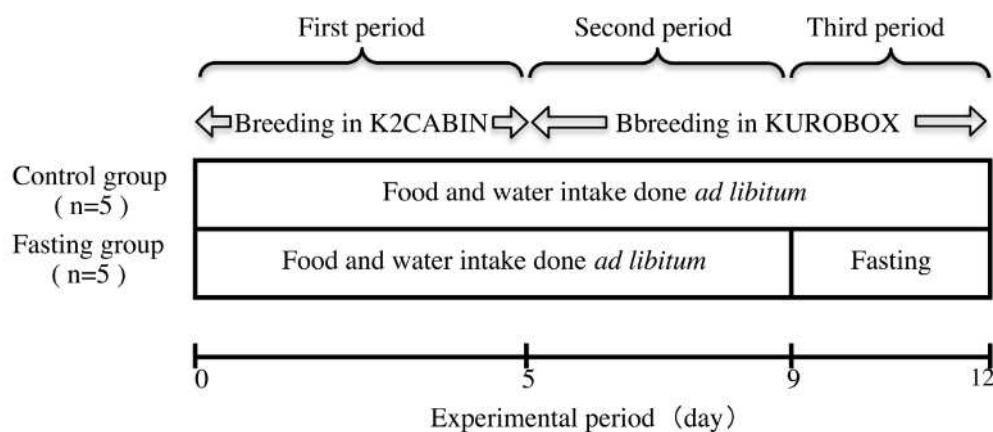


Fig.6-1 Experimental design. The mice were given CE-2 (CLEA Rodent Diet CE-2 for breeding) standard pellet chow. Tap water was used for drinking and was given *ad libitum*. Before the start of the experiment, mice were fed powder chow during a week-long acclimatization period in order to measure the feed intake in normal mice. In the first period, we measured food and water intake, and intake time using K2CABIN (Fig.6-2). In the second period, we measured the amount and rhythm of movement behavior using KUROBOX (Fig.6-2). In the third period, mice were fasted for 3 days, only drinking water was given *ad libitum*.

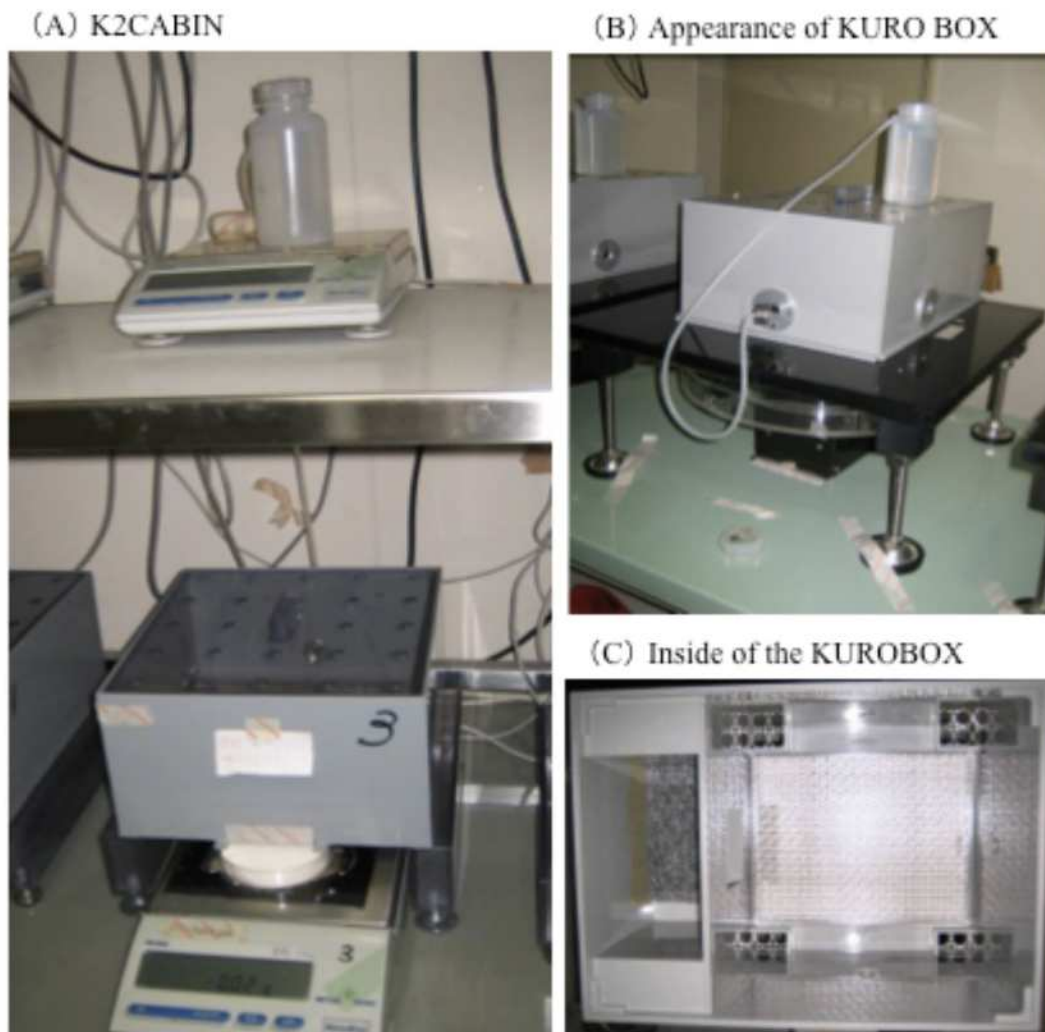
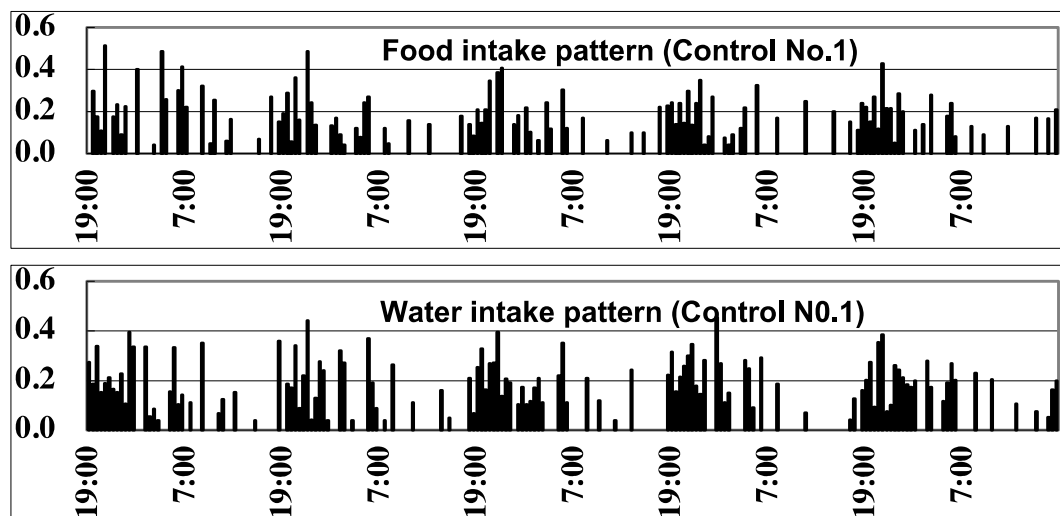
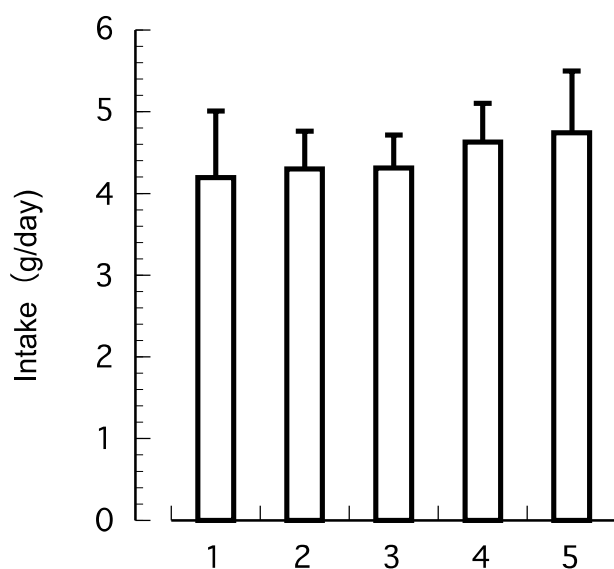


Fig.6-2 K2CABIN system and KURO BOX system. (A) K2CABIN system used to measure eating patterns and KUROBOX system used to measure movement patterns of behavior. (B), (C) KUROBOX; This measures the movement of mice by infrared sensors. We calculated the distance travelled by the mouse, the speed and the movement angle over time.

(A) Food and water intake patterns



(B) Food intake



(C) Water intake

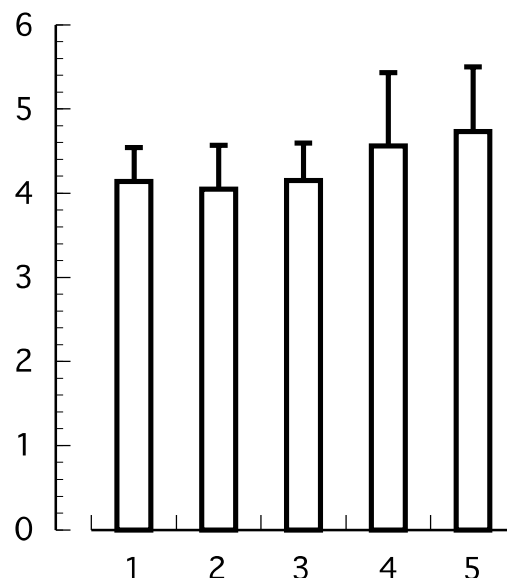
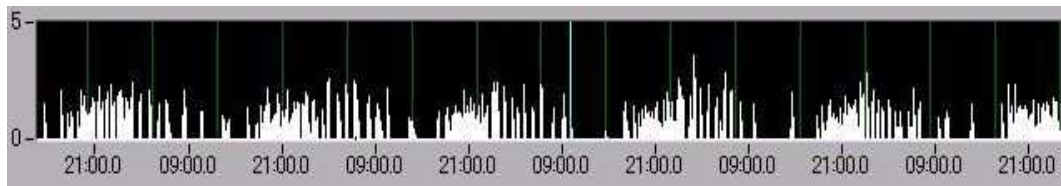


Fig.6-3 Food and water intake of mouse in the first period under ad libitum intake of water and diet. A similar pattern was found in all individuals of two groups. (A) An example of the food and water intake patterns of mouse. (B) Average of food intake. Values are Means \pm S.D. of 10 mice of two groups. (C) Average of water intake. Values are Means \pm S.D. of 10 mice of two groups.

(A) Movement behavioral pattern of mouse



(B) Running distance in a dark and light phase

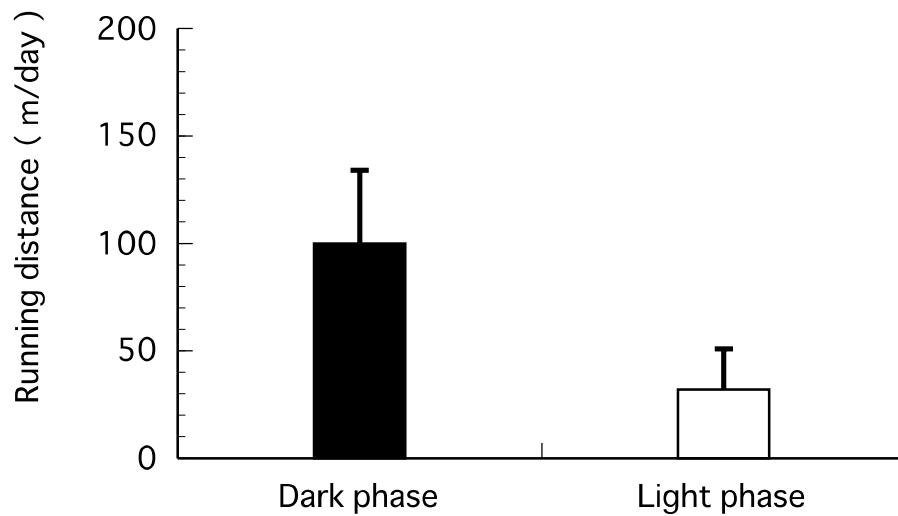


Fig. 6-4. Movement behavioral pattern and running distance of mice in the second period under ad libitum intake of water and diet. A similar pattern was found in all individuals of two groups. (A) An example of the movement Behavioral pattern of mouse in second period under ad libitum intake of water and diet. (B) Running distance in a dark and light phase in second period under ad libitum intake of water and diet. Values are Means \pm S.D. of 10 mice of two group.

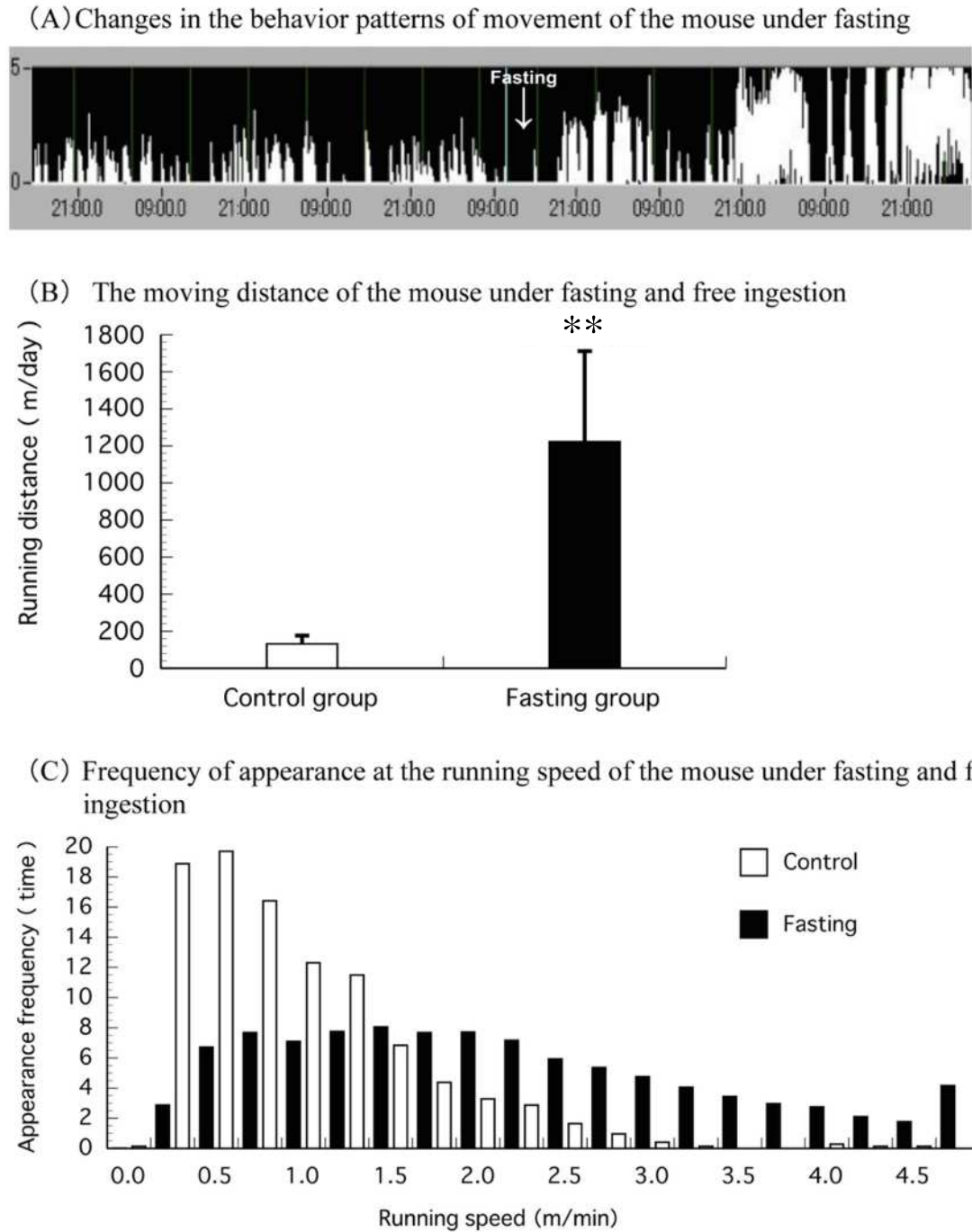


Fig.6-5 Movement behavioral pattern, running distance and frequency of appearance at the running speed of mice in the third period. (A) shows the movement of the mouse behavior under fasting in the third period. (B) shows the movement distance of the mouse under fasting and free ingestion. of 5 rats. Control is group under free ingestion. Fasting is group under fasting. Values are Means \pm S.D. of 5 mice. (C) is the frequency of appearance at the running speed in control (□) and fasting (■). The interval of the X-axis is every 0.25m. We observed that movement increased significantly and there was over-activity during fasting.

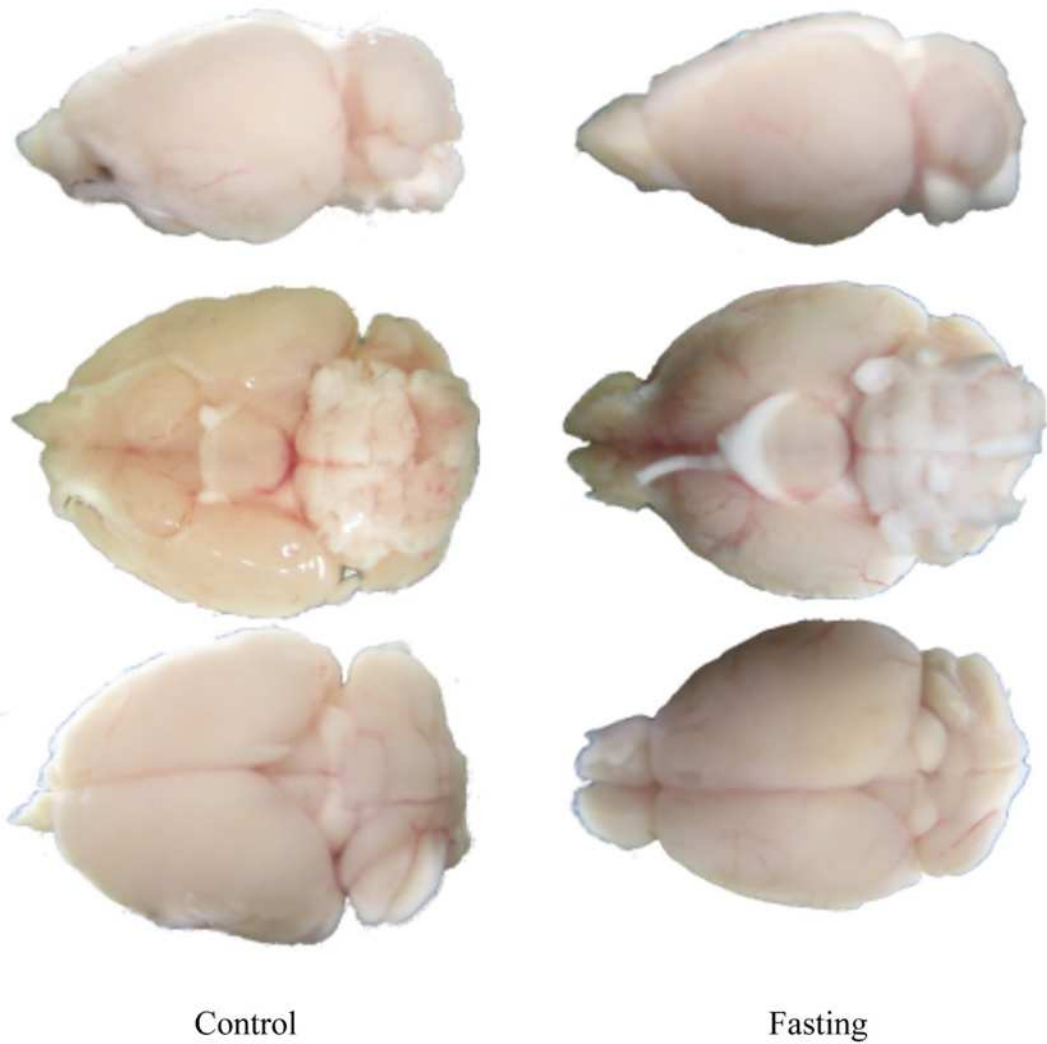
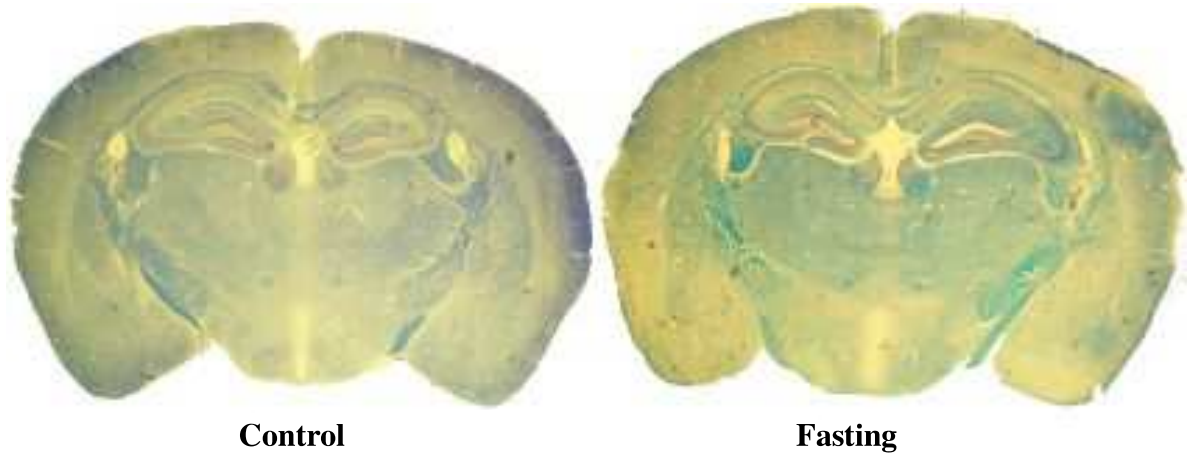


Fig.6-6 Macroscopic images of brain tissue. Macroscopically, upon dissection, we could not see any atrophy upon fasting and there was no change in wet weight of the brain. However, the surface of brain tissue appeared less glossy and seemed to have lost precision.

(A) Frontal cross-section of the brain (Wide-angle images)



(B) Around the hippocampus (Narrow-angle images)

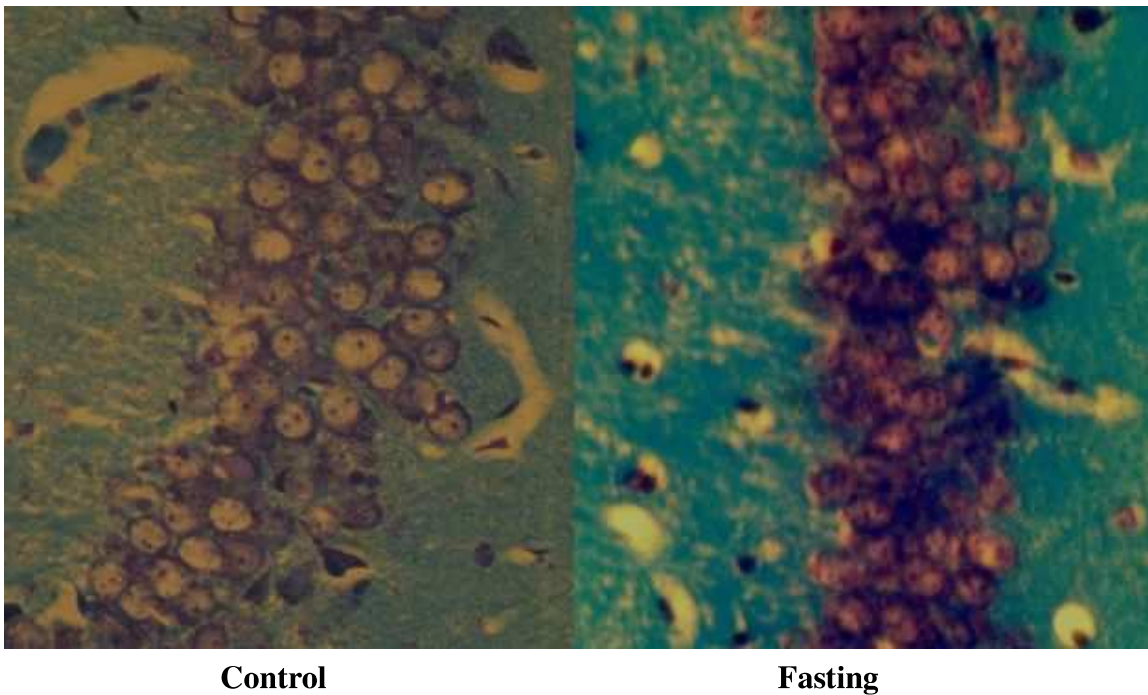
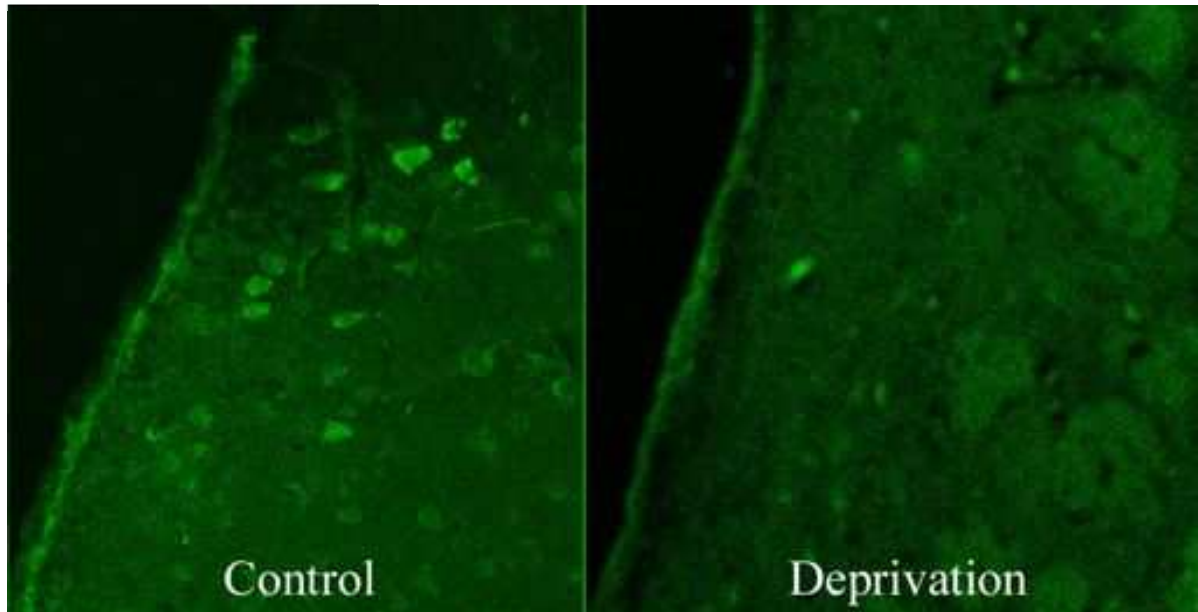


Fig.6-7 Optical microscopy images of brain tissue. Kluver–Barrera stained images of Frontal cross section of the brain (A) and the hippocampal region (B) No visible difference were observed in the size of the nerve cell body, the properties of the cell nucleus in the range of observation, such as the thickness of the cerebral cortex and myelination, thalamus, hypothalamus, and the striatum.

(A) Subventricular zone



(B) Around the hippocampus

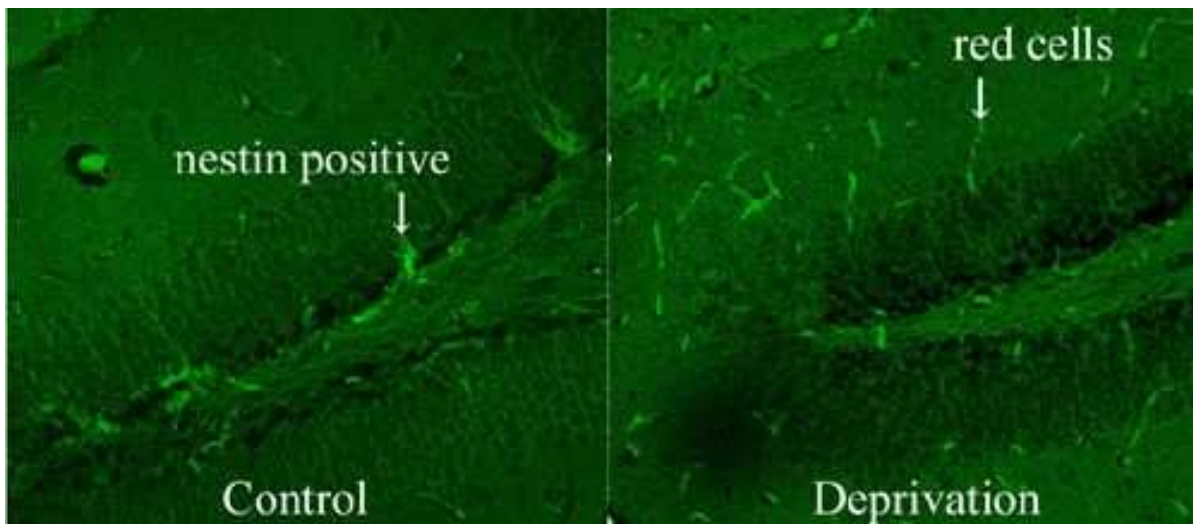


Fig.6-8 Fluorescent treponemal antibody image of the brain tissue. Brain sections of the ventricular zone (A) and hippocampus (B) were stained with immunostaining using nestin antibody. We observed the disappearance of nestin-positive cells in the fasting group.