

非ふるえ熱産生能発現の個体発生に関する研究

(研究課題番号：62570070)

昭和63年度科学研究費補助金（一般研究C）

研究成果報告書

昭和63年10月

研究代表者 八幡剛浩

(旭川医科大学医学部 助手)

は し が き

ヒトを含めた恒温動物にとって、温度適応とくに寒冷に対する適応は生体維持のために重要な基本的機能である。寒冷適応のための代謝性機序として非ふるえ熱産生という特異的な熱産生の方法が存在し、その主要な発現部位は褐色脂肪組織であることが示されているが、その調節機序については多くの研究が発表されているものの未だ十分に明らかにされてはいない。本研究ではこの非ふるえ熱産生の調節機序を明らかにする目的で、褐色脂肪組織細片を用いて非ふるえ熱産生能の個体発生過程が調べられた。その結果、非ふるえ熱産生能は出生前より発現しており、出生直後に著しく亢進することが示された。また、本研究で用いた組織細片を用いる実験法は褐色脂肪組織の機能を調べるための有効な方法であることが示され、今後の研究に大いに役立つものと考えられる。

研究代表者 八 幡 剛 浩

研究組織

研究代表者： 八 幡 剛 浩 （旭川医科大学医学部助手）

研究経費

| | | |
|--------|-------|----|
| 昭和62年度 | 1,800 | 千円 |
| 昭和63年度 | 400 | 千円 |
| 計 | 2,200 | 千円 |

研究発表

口頭発表

- 八幡剛浩，黒島晨汎：新生ラットの非ふるえ熱産生能とその調節機構、日本生理誌，50(8.9):633, 1988（第65回日本生理学会大会、1988年4月5日，和歌山）
- 八幡剛浩，黒島晨汎：褐色脂肪組織(BAT)細片の酸素電極による酸素消費測定法の検討、日本生理誌，50(11):722, 1988（第68回北海道医学大会生理系分科会、1988年9月10日，札幌）
- Takehiro Yahata and Akihiro Kuroshima: Development of nonshivering thermogenic capacity in neonatal rats. 2nd European Congress on Obesity, Oxford, England, 30 March - 2 April, 1989（発表予定）
- Takehiro Yahata, Tomie Ohno and Akihiro Kuroshima: Role of glucagon on brown adipose tissue activity. Thermal Physiology Symposium, Tromsø, Norway, 16th - 21th July, 1989（発表予定）

研究成果

1. 緒 言

ヒトをはじめとする恒温成体にとって環境温度、とくに寒冷に対する体温調節能は基本的生理機能と言える。寒冷に適応するための代謝性機序として特徴的なのは非ふるえ熱産生の亢進であり(Janský, 1973)、その主要発現部位は熱産生を主な機能として持つ褐色脂肪組織であることが知られている(Foster & Frydman, 1979)。この組織の機能は主として交感神経末端から放出されるノルアドレナリンによって調節されている(Janský, 1973)が、グルカゴンをはじめとするそれ以外の内分泌性因子もまた多因子的に関与していると報告されている(Doi & Kuroshima, 1984)。

新生期は寒冷適応時と同様に非ふるえ熱産生が亢進している時期であることが知られているから、非ふるえ熱産生能の個体発生を調べることにより褐色脂肪組織の非ふるえ熱産生能発現機序を解明する上で大きな手懸りが得られるものと考えられる。そこで、本研究ではラットの非ふるえ熱産生能の発現状況および、この組織のノルアドレナリンとグルカゴンに対する細胞内セカンドメッセンジャーの反応性の生後変化を検討した。

2. 研究方法

- 1) 褐色脂肪組織内ノルアドレナリンおよびグルカゴン含量測定
妊娠20日の胎仔(-2日令)から離乳期(21日令)迄の各日令の個体の背頸部および肩甲骨間褐色脂肪組織を取り出し、筋肉、白色脂肪組織等を除去した後液体窒素で凍結して-70℃で保存した。測定に先立ち、ノルアドレナリンの測定のためには組織を0.4 Nの過塩素酸4mlでホモジェナイズし、4℃、3000 rpmで遠心分離して得た抽出液をMurazumi et al. (1987)によって前処理し、HPLCによるカテコールアミンアナライザー(BAS社、West Lafayette)で分析した。グルカゴンの測定には、組織をEDTAおよびアンタゴサンを含む5-15容の0.01N塩酸・生理食塩水でホモジェナイズし、同様に遠心分離して得た抽出サ

ンプルを測定迄 -30°C で凍結保存した。測定はグルカゴン RIA キット (NEN 社、Boston) により行った。

2) 酸素電極法による褐色脂肪組織の酸素消費量測定

実験には同じく - 2 日令から 21 日令迄の個体を用いた。一辺 $0.5 \sim 1\text{mm}$ の小片に細切した褐色脂肪組織細片 $50 \sim 100\text{mg}$ を 5mM のグルコースを添加した 4% アルブミン含有 Krebs-Ringer リン酸緩衝液 ($\text{pH}7.4$) 8ml に入れ、 37°C 下で 100% 酸素または 95% 酸素 - 5% 炭酸ガスでゆっくりバブリングしながら 2 - 3 時間 プレインキュベーションを行った。その後 $20 \sim 40\text{mg}$ の組織細片を取り出し、重量測定の後、Rank Brothers 社のオキシジェンエレクトロードシステムの測定チャンバーの上記緩衝液 2ml 中へ入れ、基礎代謝が得られる迄 37°C 下で約 20 分間 インキュベーションを続けた後、ノルアドレナリンまたはグルカゴンを添加してこれらホルモンによる酸素消費量の増加度を 20 分間に亘って測定した。装置のキャリブレーションは、ラット肝より調整したミトコンドリアを用い、これに種々濃度 NADH を添加した時の酸素消費量により行った (図 1)。

3) 細胞内セカンドメッセンジャーレベル測定

2 日、14 日および 21 日令の褐色脂肪組織細片を、前記の酸素消費量測定実験同様に 2 時間 プレインキュベーションを行った後、 $30 \sim 40\text{mg}$ の 5 グループに小分けし、前記の条件下で更に 20 分間 インキュベーションを続けた。その後 1 群は直ちに、他の 2 群についてはノルアドレナリン ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) を、また残りの 2 群にはグルカゴン ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) を夫々添加し、5 分後にサンプルを液体窒素で凍結し、測定時迄 -70°C で保存した。

サイクリック AMP の測定には、凍結サンプルを 1ml の EDTA 含有 6% トリクロール酢酸でホモジェナイズし、 5°C 下、 $3,400\text{rpm}$ で 15 分間遠心分離で得られた抽出液を 10 倍量の水飽和ジエチルエーテルで 2 回洗浄しトリクロール酢酸を除去した。サイクリック AMP の測定はサイクリック AMP キット「ヤマサ」により行った。

イノシトール 3 リン酸の測定には、凍結サンプルを 5% 過塩

素酸でホモジェナイズし、5°C、3,000 rpmで30分間遠心分離して得た抽出液をKOHで中和し、IP₃ RIA キット (Amersham, UK) により測定した。

3. 研究結果

1) 体重、褐色脂肪組織及び組織ホルモン含量の変化

図2に体重及び褐色脂肪組織重量の変化を示してある。

出生2日前に 3.4 ± 0.05 gであった体重は、出生日(出生後)には 4.7 ± 0.10 g、生後3日目以降急速に増重して2週目で 24.0 ± 0.51 gになったが、離乳期である3週目では成長の抑制が見られ 28.0 ± 1.07 gであった。

出生前及び出生直後の褐色脂肪組織は脂肪の蓄積が少なく、周囲の他組織と類似の色調を示しているが、摂乳後急速に脂肪を蓄積して大きく且つ褐色脂肪組織特有の色調、形態を示す様になる。出生2日前の、体重100g当りの組織重量は、背頸部褐色脂肪組織が 207 ± 12.9 mg、肩甲骨間褐色脂肪組織が 418 ± 17.8 mgであったが、出生日には両部位共大きくなっており、前者が 240 ± 5.4 mg、後者が 593 ± 23.0 mgであった。その後単位体重当りの重量は両部位組織共著しく低下し、生後1週目から離乳期迄はほぼ同じレベルを維持した。離乳期には背頸部褐色脂肪組織が 90 ± 6.1 mg、肩甲骨間褐色脂肪組織が 325 ± 18.6 mgであった。又、背頸部褐色脂肪組織と肩甲骨間褐色脂肪組織の重量比は、出生2日前には約1:2であったのが出生日には約1:2.5となり、その後次第に後者の割合が増加して離乳期には両者の比は約1:3.5となっていた。

図3及び4に褐色脂肪組織のノルアドレナリンとグルカゴンの含量の変化を示してある。

出生当日の褐色脂肪組織のノルアドレナリン含量は極めて低く、mg組織当り背頸部褐色脂肪組織で 264 ± 26.9 pg、肩甲骨間褐色脂肪組織で 270 ± 29.3 pgであった。ノルアドレナリン含量はその後急激に増加して生後8日目には夫々 $1,800 \pm 90.6$ pg、 $1,644 \pm 62.7$ pgとほぼ成体のレベルに達していた。両部位の差

色脂肪組織間に差は見られなかった（図3）。

一方、褐色脂肪組織のグルカゴン含量は、図4に示してある様に、出生2日前には背頸部褐色脂肪組織でg組織当り $1,180 \pm 125.0$ pg、肩甲骨間褐色脂肪組織で 490 ± 57.5 pgと既に極めて高い値を示して居り、出生日には両部位含量共著しく減少するものの背頸部及び肩甲骨間褐色脂肪組織で夫々 758 ± 25.0 pg、 258 ± 21.3 pgと成体のレベルを維持していた。その後、背頸部褐色脂肪組織では離乳期迄変化なく、肩甲骨間褐色脂肪組織では10日目をピークとする増加が認められた。又、全期間を通じ背頸部褐色脂肪組織の方が肩甲骨間褐色脂肪組織より高いグルカゴン含量を示していた。

2) 酸素電極システムによる褐色脂肪組織細片の酸素消費量測定条件の検討

イ. 装置のキャリブレーション

ラット肝より常法により調整したミトコンドリアを測定メディウムに入れNADHを添加した際の酸素消費量の変化をプロットすると添加NADHと電位変化の間に図1の様な直線関係が得られる。この標準直線を毎回作製し、これを基に組織細片の酸素消費量を求めた。

ロ. ブレインキューベーションの効果

褐色脂肪組織の細切片を用いた際、細切した標本ですぐ酸素消費量を測定しても低い反応しか得られなかった。しかしこの細切片を 37°C 下の測定メディウム中で酸素を添加しつつゆっくり振盪してブレインキューベーションを行うと、ノルアドレナリン、グルカゴン共に反応性が改善された(図5)。ブレインキューベーションの効果はほぼ2時間で最大に達する様であった。

ハ. ブレインキューベーションにおける炭酸ガスの効果

100%酸素と95%酸素-5%炭酸ガスを用いたブレインキューベーションの効果を比較してみると、ノルアドレナリン、グルカゴン共反応性には差が見られなかった(図6及び7)。

ニ. アルブミン透析の効果

メEDIUMに未透析アルブミンと透析アルブミンを使用してブレインキューベーションを行った際の褐色脂肪組織の反応性を比較してみると、ノルアドレナリンに対しては差が無かったがグルカゴンに対する反応性は未透析アルブミンでは著しく低かった(図8及び9)。

ホ. 用量反応関係

図10に新生ラット褐色脂肪組織でのノルアドレナリン及びグルカゴンの累積的用量反応の例を示してある。ノルアドレナリン、グルカゴン共用量の増加に応じて酸素消費量が高まっており、いずれも $1\mu\text{g/ml}$ の濃度で最大反応が得られた。図11には成体ラットで、単一ホルモン濃度を使用した場合の用量反応関係をまとめてある。こちらもノルアドレナリン、グルカゴン共用量と反応に相関が見られやはり $1\mu\text{g/ml}$ 濃度で最大反応が得られ、更に高濃度では反応の抑制が見られた。ノルアドレナリンとグルカゴンに対する反応性は全く同じであった。

ヘ. 設定測定条件

以上の結果を基に、以後の実験では、メEDIUMには透析アルブミンを使用し、褐色脂肪組織細片を100%酸素供給下で2~3時間ブレインキューベーションを行った後に $1\mu\text{g/ml}$ 濃度のノルアドレナリン及びグルカゴンに対する酸素消費量の増加を測定することにより非ふるえ熱産生能を比較検討した。

3) 新生ラットの非ふるえ熱産生能の変化

図12に各日令ラットの褐色脂肪組織のノルアドレナリン及びグルカゴンに対する反応の例を示し、又、表1にその結果をまとめてある。

出生2日前には既に褐色脂肪組織はノルアドレナリン、グルカゴンに対し反応性を有しており、ノルアドレナリンによる最大酸素消費量は出生後倍増した後10日令迄は漸増しその後低下した。一方、グルカゴンによる最大酸素消費量は出生後約2.4倍の増加を示し5日令迄その状態を維持しその後減少した。し

かし基礎酸素消費量レベルも生後急増し、その後変動を示しながら減少して行くので、基礎レベルからの最大増加の程度を比較してみると、ノルアドレナリン、グルカゴン共出生2日前と出生当日の反応性は同じであったが、2日令で著しく増加していた。ノルアドレナリンに対する反応性は15日令迄ほぼ同レベルを維持し21日令で激減していた。一方グルカゴンに対しては2日令でノルアドレナリンと同程度の反応性の増加を示したものの5日令では早くも減少しており、その為5日令から15日令ラットの褐色脂肪組織の反応性はノルアドレナリンより低くなっていた(図13)。

4) 褐色脂肪組織内セカンドメッセンジャーの変化

ノルアドレナリン及びグルカゴン投与5分後の褐色脂肪組織内サイクリックAMPの変化を図14に、イノシトール・トリフォスフェート(IP₃)の変化を図15に示してある。

ホルモン投与前のサイクリックAMP含量はg組織当り2日令で 453 ± 20.0 pmole、14日令で 410 ± 37.8 pmole、21日令で 255 ± 25.9 pmoleと離乳期には著しく低かった。ノルアドレナリンは2日令で約50%、14日令で約90%、21日令では約200%と加令に応じた増加を起した。一方グルカゴンによる増加は12~24%の間と低くしかも加令による反応の差は無かった。

基礎状態の褐色脂肪組織内IP₃は、2日令では 98 pmol/mgであったが14日令、21日令では夫々 19 ± 7.5 pmole、 14 ± 3.0 pmoleと著しく低かった。ノルアドレナリン及びグルカゴン投与後のIP₃の変化は非常に変動が大きい、増加率の平均値を見るとノルアドレナリンとグルカゴンで夫々2日令で104%と64%、14日令で48%と50%、21日令では35%と24%といずれに対しても加令に従って低下していた。

4. 考 察

褐色脂肪組織における非ふるえ熱産生の主要な調節因子は交感神経末端より分泌されるノルアドレナリンであるとされている(Janský, 1973)が、これ以外にも多くの因子がこの組織の機能の

調節に関与しており (Doi and Kuroshima, 1984)、とりわけグルカゴンはノルアドレナリンと同様高レベルで褐色脂肪組織内に存在し (Yahata and Kuroshima, 1987) 且つ高い熱産生能を有しており (Kuroshima and Yahata, 1979; Doi and Kuroshima, 1982)、ノルアドレナリンに匹敵する因子として褐色脂肪組織機能の亢進に関する (Yahata et al., 1981) 事が示されている。

一方、出生直後のラットでは、ノルアドレナリンを投与しても酸素消費量は消費しない (Moore and Underwood, 1963) のに寒冷曝露では酸素消費量が上昇する (Tompson and Moore, 1968) 事が報告されており、新生期にはノルアドレナリン以外の因子が非ふるえ熱産生の発現に重要な役割を果たす事が示唆されている。事実、出生直後の褐色脂肪組織のノルアドレナリン含量は極めて低く、その後急激に増加してほぼ1週間で成体レベルに達する事が本研究で示され、又、同組織のノルアドレナリンのターンオーバーは生後2日目では明らかでなく生後7日目で見られる様になると報告されている (西岡他、1985) ところから、交感神経系の未発達である出生直後の個体においては、ノルアドレナリンが非ふるえ熱産生の発現に強く関係しているとは考え難い。

他方、血中のグルカゴンレベルは出生直前より高レベルを示し (McEvoy and Madson, 1980)、特に出生直後には急増する (Mayer and Cuezva, 1985) 事が報告されている。本研究でも、褐色脂肪組織のグルカゴン含量は出生前より高い値を示し出生後も高レベルを維持する事が示されており、この時期における非ふるえ熱産生の発現にグルカゴンが関与し得る事が示されている。そこで、この時期に褐色脂肪組織が非ふるえ熱産生を起し得るか否か、又、褐色脂肪組織にグルカゴンが実際に作用し得るか否かを酸素消費量の増加度から見てみると、褐色脂肪組織は少なくとも出生2日前には既に非ふるえ熱産生能を有しており、この能力は生後著しく高まる事、更にノルアドレナリンとグルカゴンは同程度の非ふるえ熱産生を起す事が明らかになった。ラットでは褐色脂肪組織の特徴は妊娠17日目 (出生5日前) に明らかとなる事 (Nnodim and Lever, 1985)、又、褐色脂肪組織ミトコンドリアの活性の生化学

的示標であるチトクロームCオキシデースサクシネート・デヒドロゲナーズの活性等は生後5日目にピークとなり(Skála et al., 1970)、更にこの組織の非ふるえ熱産生の示標であるミトコンドリアへのGDP結合能は出生前2日より顕著になり(Houšťek et al., 1988)、生後4日目に最大となる(Sundin and Cannon, 1979)事が報告されており、本研究の出生前後の反応の結果を裏付けている。

出生後3日目頃よりノルアドレナリンとグルカゴンによる反応には差が見られる様になる。即ちノルアドレナリンによる反応は離乳期前迄高いままであるのにグルカゴンに対するそれは生後5日目には低下しており、反応性は生後2週目迄ノルアドレナリンより有意に低くなっている。この理由は明らかでないが、新生ラット褐色脂肪組織のグルカゴンに対する反応は未透析アルブミンを使用した際には著しく低い事を考えると、或いは高い遊離脂肪酸のレベルがグルカゴンに対する反応を抑制するのかも知れない。この点については今後更に検討を要する。又、離乳期にはノルアドレナリンに対する反応も低下しているが、成体ラットにおいてはノルアドレナリン、グルカゴンいずれに対する反応も改善されているので、これは母乳より固型食への転換期の栄養状態の変化による一時的な現象であろうと考えられる。

褐色脂肪細胞内の非ふるえ熱産生発現に関わる主要経路のセカンドメッセンジャーはサイクリックAMPである。本研究でもノルアドレナリンによる刺激後に組織内サイクリックAMPレベルは上昇しており、しかもその上昇度は加齢に応じて高まっていた。一方、グルカゴンによる刺激では組織内サイクリックAMPレベルの上昇は極めて僅かであり、加齢による変化も見られなかった。最近、肝細胞でグルカゴンのリセプターにはサイクリックAMPをセカンドメッセンジャーとするGR2とイノシトールリン酸-Ca⁺⁺系を介するGR1の2型存在し、GR1の活性化はGR2の作用を抑制することが示されている(Wakelam et al., 1986; Petersen and Bear, 1986)。そこでノルアドレナリン及びグルカゴンによる刺激時の褐色脂肪組織のIP₃レベルの変化をみると、両ホルモンとも

IP₃を同程度に上昇させ、その上昇の程度は加齢に従って減少する傾向が認められた。これらの結果は、少なくともこの時期におけるグルカゴンの主要な非ふるえ熱産生発現経路はイノシトールリン酸-Ca⁺⁺系を介する経路である事を示唆している。又、ノルアドレナリンの作用経路も出生直後にはイノシトールリン酸-Ca⁺⁺系を介するα₁リセプター系路が主であり、次第にβリセプター系の役割が増して行く事を示唆している。羊胎児の褐色脂肪細胞でもβリセプターと共にα₁リセプター系が機能し得る事が示されており(Fain et al., 1984)、新生児期におけるα₁リセプター系の重要性が裏付けられているが、この点については今後の検討が必要である。

褐色脂肪細胞では Krebs-Ringer リン酸バッファーに CO₂ を添加すると細胞の反応性が高まる (Peterson, 1977) と報告されているが、組織細片を用いた本研究では CO₂ を添加しても反応性は改善されなかった。これは新生期の組織に特有の反応であるのかも知れないが、組織細片の場合には呼吸による CO₂ の排出が良くない事が逆に CO₂ 添加と同じ効果を与えられている為とも考えられる。更に、グルカゴンに対する反応は未透析アルブミンを使用した場合には反応性が低かった事は、透析によって他の抑制成分が取り除かれた可能性と同時に、メディウム中の遊離脂肪酸のレベルがグルカゴンに対する反応の調節に関っている事を示すものと思われる。これらの点についても今後更に検討して行かねばならない。

褐色脂肪組織の体重当り重量は成体ラット (Yahata and Kuroshima, 1987) に比べ新生ラットで著しく大きい。これは特に出生前後で顕著である。又、この時期には背頸部褐色脂肪組織の割合が大きい。この事はこの部位のグルカゴン含量が新生期を含めて常に肩甲骨間褐色脂肪組織より高い (Yahata and Kuroshima, 1987) 点とあわせて考えると、背頸部褐色脂肪組織の方がグルカゴンに対して感受性が高く、新生期とくに出生直後の非ふるえ熱産生にはこの部位がより大きな役割を果たす事を示しているものと思われる。

今後更に検討を重ねなければならぬ点もあるが、本研究の結果

は、新生期にはグルカゴンが主要な発現因子として褐色脂肪組織の非ふるえ熱産生発現に関する事、更にグルカゴンの細胞内作用経路はノルアドレナリンのそれとは違っている事を示唆している。

5. 要 約

- 1) 非ふるえ熱産生の発現機序を明らかにする為、出生前より離乳期迄のラットの褐色脂肪組織で非ふるえ熱産生発現能の個体発生過程を調べた。
- 2) 非ふるえ熱産生の主要因子とされているノルアドレナリンの褐色脂肪組織内含量は、出生直後には極めて低く、その後急増してほぼ生後1週間で成体レベルになった。一方、グルカゴンの含量は出生前より非常に高く、出生後も高レベルが維持された。
- 3) 褐色脂肪組織の非ふるえ熱産生能を調べる為、組織細片を用いてClark型オキシジェン・エレクトロードにより酸素消費量の測定条件を検討し、更にノルアドレナリンとグルカゴンに対する褐色脂肪組織の反応性を調べた。
- 4) その結果、褐色脂肪組織は出生前よりノルアドレナリン、グルカゴンのいずれにも反応する事、両ホルモンに対する反応性は出生後著しく高まる事、更にノルアドレナリンに対する反応性は離乳期前迄高いままであるのに対し、グルカゴンに対する反応性は生後5日目には低下する事が示された。
- 5) ノルアドレナリンによる非ふるえ熱産生促進時には、組織内サイクリックAMPレベルが著しく高まり、又、その増加の程度は加齢と共に大きくなった。グルカゴンによる促進時には組織内サイクリックAMPレベルの増加は少なく、加齢による変化も見られなかった。一方、組織内IP₃のレベルはノルアドレナリン、グルカゴンで同程度高まり、増加度は加齢と共に減少する傾向が見られた。
- 6) 以上の結果は新生期、とりわけ出生直後にはグルカゴンが主要な発現因子として非ふるえ熱産生を起している事、更にグルカ

ゴンが褐色脂肪細胞で非ふるえ熱産生を起す作用経路はノルアドレナリンの経路とは異っている事を示唆している。

文 献

- Doi, K. and Kuroshima, A. (1982)
Modified metabolic Responsiveness to glucagon in cold-acclimated and heat-acclimated rats. *Life Sci.* 30: 785-791.
- Doi, K. and Kuroshima, A. (1984)
Economy of hormonal requirement for metabolic temperature acclimation. *J. therm. Biol.* 9: 87-91.
- Fain, J.N., Mohell, N., Wallace, M.A. and Millis, I. (1984)
Metabolic effects of β , α_1 and α_2 adrenoceptor activation on brown adipocytes isolated from the perirenal adipose tissue of fetal lambs. *Metabolism* 33: 289-294.
- Foster, D.O. and Frydman, M.L. (1979)
Tissue distribution of cold-induced thermogenesis in conscious warm- and cold-acclimated rats reevaluated from changes in tissue blood flow: The dominant role of brown adipose tissue in the replacement of shivering by nonshivering thermogenesis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 57: 257-270.
- Houšťek, J., Kopecký, J., Rychter, Z. and Soukup, T. (1988)
Uncoupling protein in embryonic brown adipose tissue- existence of nonthermogenic and thermogenic mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 935: 19-25.
- Janský, L. (1973)
Nonshivering thermogenesis and its thermoregulatory significance. *Biol. Rev.* 48: 85-132.
- Kuroshima, A. and Yahata, T. (1979)
Thermogenic responses of brown adipocytes to noradrenaline and glucagon in heat-acclimated and cold-acclimated rats. *Jpn. J. Physiol.* 29: 683-690.
- Mayor, F. and Cuezva, J.M. (1985)
Hormonal and metabolic changes in the perinatal period. *Biol.*

Neonate 48: 185-196.

McEvoy, R. and Madson, K.L. (1980)

Pancreatic insulin-, glucagon-, and somatostatin-positive islet cell populations during the perinatal development of the rat.

II. Changes in hormone content and concentration. *Ibid.* 38: 255-259.

Moore, R.E. and Underwood, M.C. (1963)

The thermogenic effects of noradrenaline in new-born and infant kittens and other small mammals. A possible hormonal mechanism in the controls of heat production. *J. Physiol.* 168: 290-317.

西岡 均, 吉田俊秀, 繁田浩史, 森 裕, 中井雅彦, 狩野康之, 北川良裕, 梶山静夫, 金網隆弘, 近藤元治 (1985)

Norepinephrine turnover よりみたラット交感神経系の機能発達.
日本内分泌学会雑誌 61: 357.

Nnodim, J.O. and Lever, J.D. (1985)

The pre- and postnatal development and aging of interscapular brown adipose tissue in the rat. *Anat. Embryol.* 173: 215-223.

Petersen, O.H. and Bear, C. (1986)

Two glucagon transducing systems. *Nature* 323: 18.

Pettersson, B. (1977)

CO₂-mediated control of fatty acid metabolism in isolated hamster brown-fat cells during norepinephrine stimulation.

Eur. J. Biochem. 72: 235-240.

Skála, J., Barnard, T. and Lindberg, O. (1970)

Changes in interscapular brown adipose tissue of the rat during perinatal and early postnatal development and after cold acclimation - II. Mitochondrial changes. *Comp. Biochem. Physiol.* 33: 509-528.

Sundin, U. and Cannon, B. (1979)

GDP-binding to the brown fat mitochondria of developing and cold-adapted rats. *Comp. Biochem. Physiol.* 65B: 463-471.

Thompson, G.E. and Moore, R.E. (1968)

A study of newborn rats exposed to the cold. *Can. J. Physiol.*

Pharmacol. 46: 865-871.

Wakelam, M.J., Murphy, G.J., Hruby, V.J. and Houslay, M.D. (1986)

Activation of two signal-transduction systems in hepatocytes
by glucagon. Nature 323: 68-71.

Yahata, T. and Kuroshima, A. (1987)

Cold-induced changes in glucagon of brown adipose tissue.

Jpn. J. Physiol. 37: 773-782.

Yahata, T., Ohno, T. and Kuroshima, A. (1981)

Improved cold tolerance in glucagon-treated rats. Life Sci.
28: 2603-2610.

表 1 . 出生前後のラット褐色脂肪組織細片のノルアドレナリン及びグルカゴンによる酸素消費量の変化

| | Respiration (nmole O ₂ /mg BAT/min) | | | | |
|-------------|--|-----------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| | Basal | Time after hormone administration | | | |
| | | NA | | Glucagon | |
| | | 5' | 20' | 5' | 20' |
| -2d-old (4) | 591 +41.3 [*] | 1,448 +112.6 ^{**} | 1,516 +111.9 ^{**} | 936 +28.1 ^{**} | 854 +22.4 ^{**} |
| 0d-old (5) | 1,380 +103.8 ⁽⁷⁾ | 3,053 +309.0 ^{**} | 3,085 +346.5 ^{**} | 2,370 +298.7 ⁺ | 2,091 +355.4 |
| 2d-old (5) | 600 +70.9 [*] | 2,783 +576.1 ^{**} | 3,117 +703.6 ^{**} | 2,016 +780.9 | 2,119 +696.0 ⁺ |
| 5d-old (5) | 1,048 +156.3 ⁽⁸⁾ | 3,730 +565.1 ^{**} | 3,765 +533.5 ^{**} | 2,361 +792.3 | 2,157 +571.2 |
| 10d-old (3) | 1,172 +105.9 ⁽⁶⁾ | 4,506 +113.8 ^{**} | 4,433 +77.4 ^{**} | 1,723 +302.8 ⁺ | 1,944 +191.2 ^{**} |
| 15d-old (4) | 563 +34.6 [*] | 2,319 +48.1 [*] | 2,220 +67.2 [*] | 759 +83.9 ^{**} | 918 +74.5 ^{**} |
| 21d-old (4) | 362 +19.7 ⁽⁸⁾ | 855 +139.5 ^{**} | 868 +144.1 ^{**} | 662 +75.1 ^{**} | 905 +118.5 ^{**} |

平均値±標準誤差。()内の数値は測定数を示す。BAT: 褐色脂肪組織。NA: ノルアドレナリン。*, ** : 夫々 p < 0.05, 0.01で出生当日との間に差のある事を示す。+, ** : 夫々 p < 0.05, 0.01で基礎レベルとの間に差のある事を示す。

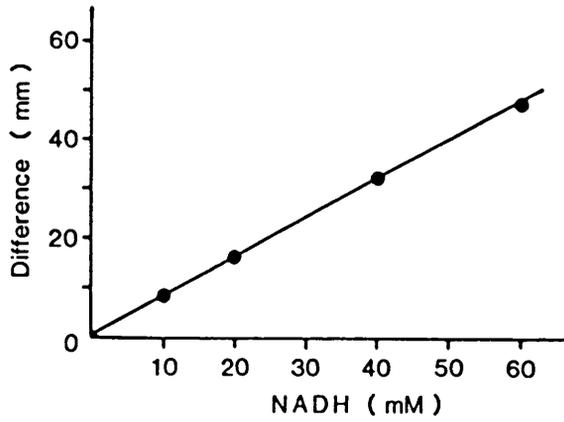
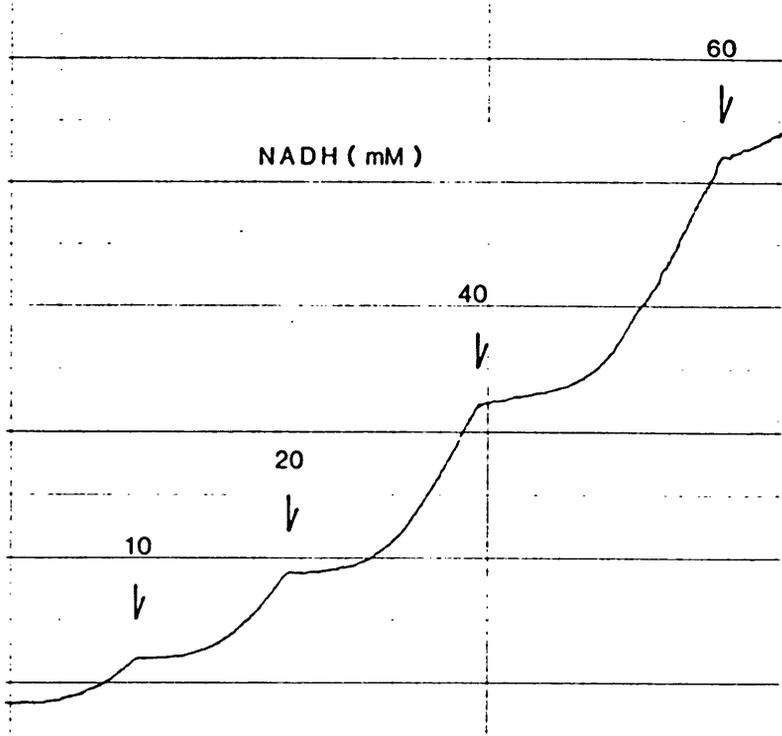


図1 ラット肝ミトコンドリアによる酸素消費量の変化と標準直線

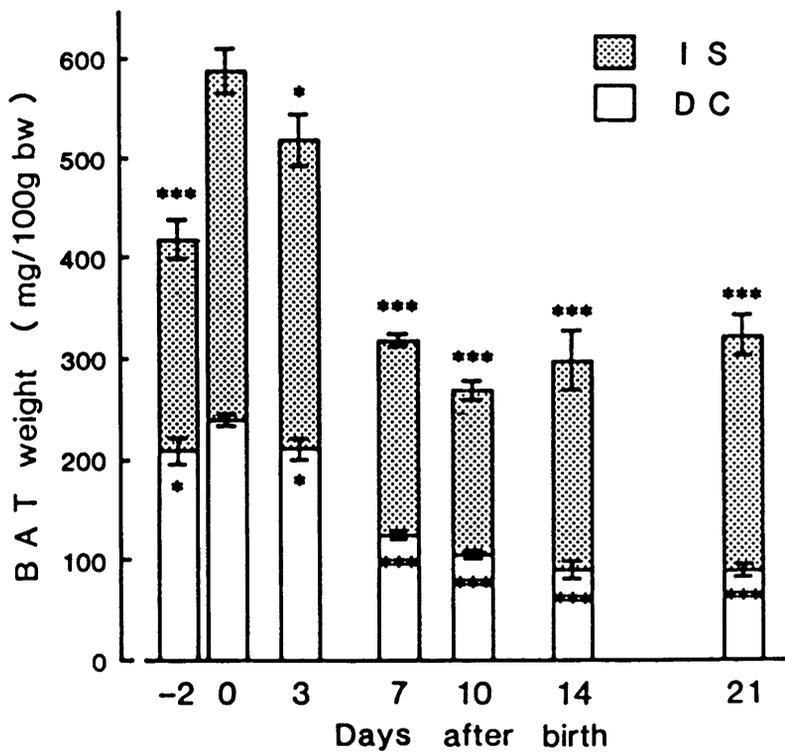
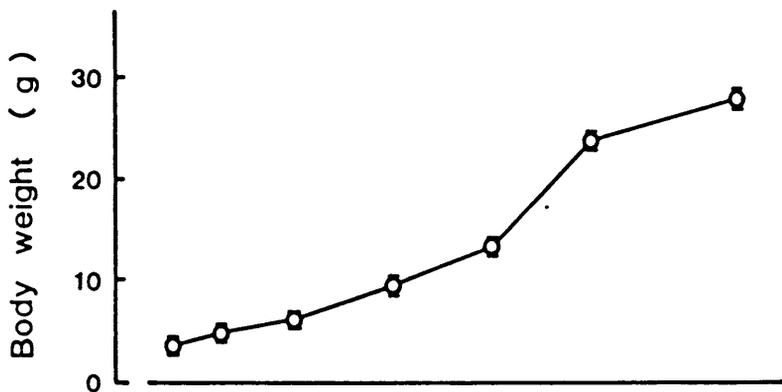


図 2 体重及び褐色脂肪組織重量の変化
 BAT: 褐色脂肪組織 IS: 肩甲骨間褐色脂肪組織 DC: 背頸部褐色脂肪組織
 *, **, ***: 夫々 $p < 0.05, 0.01, 0.001$ で出生当日(0日)との間に差のある事を示す。

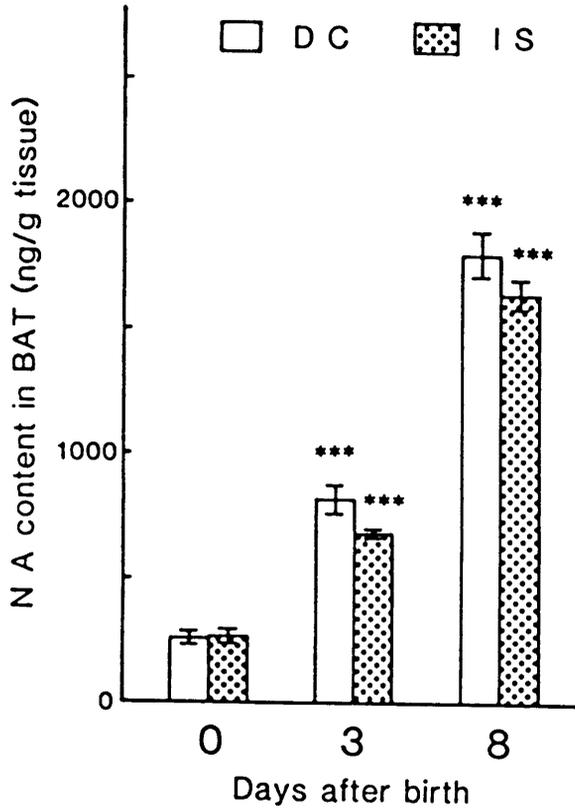


図 3 褐色脂肪組織内ノルアドレナリン
 含量の変化
 凡例は図 1 に同じ。
 NA:ノルアドレナリン

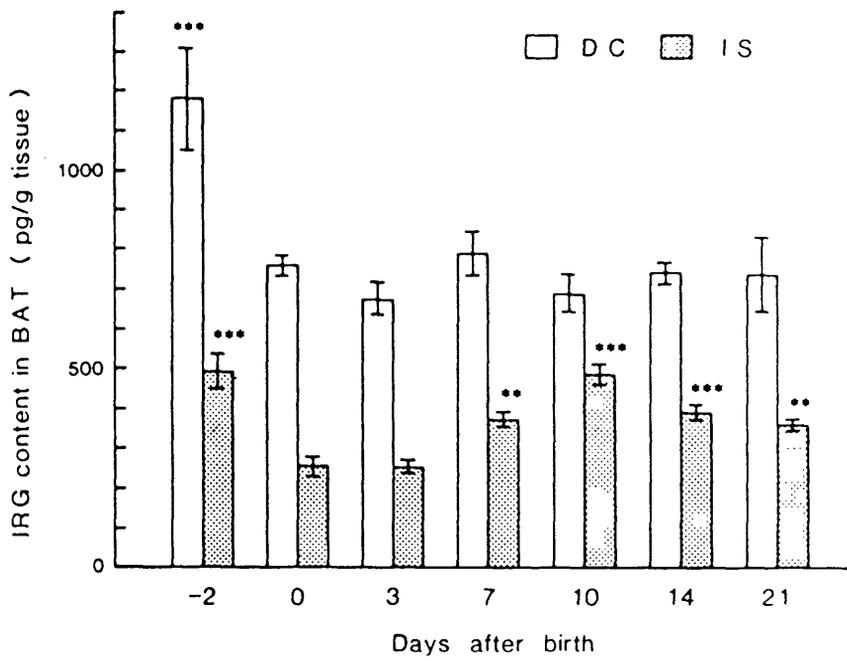


図4 褐色脂肪組織内グルカゴン含量の変化
凡例は図1に同じ。

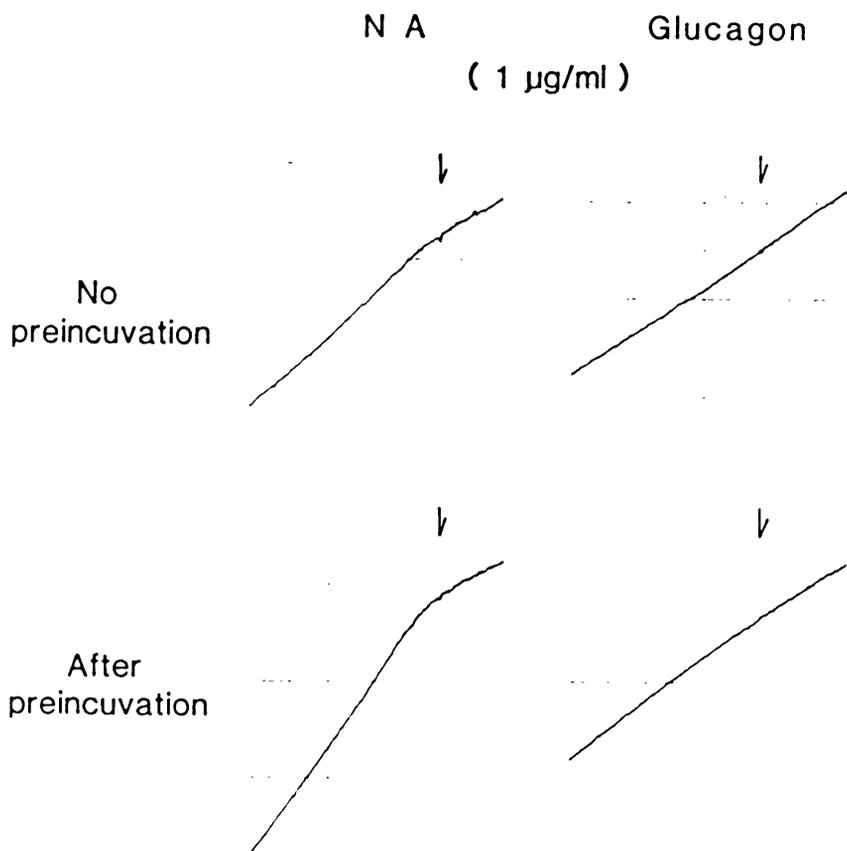


図5 褐色脂肪組織細片の酸素消費に及ぼすプレインキュベーションの効果の例
 凡例は図3に同じ。
 矢印はホルモン添加時を示す。

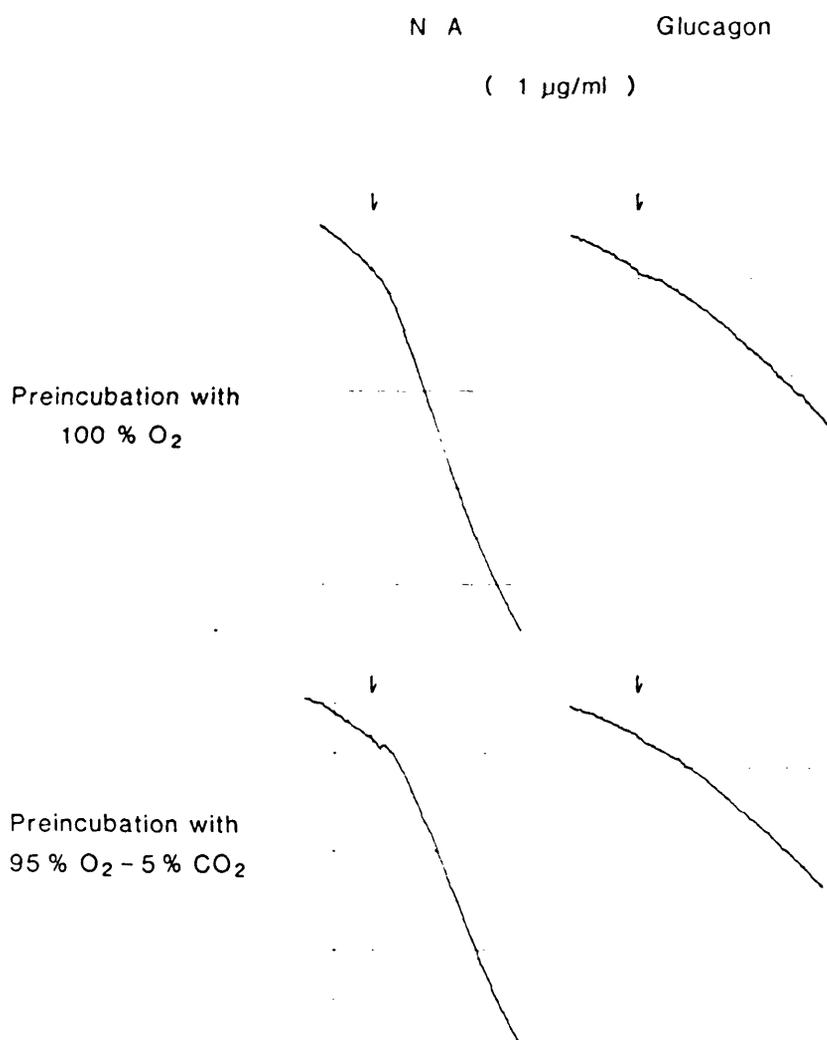


図 6 CO₂ 添加プレインキュベーションによる褐色脂肪組織細片の酸素消費反応例
凡例は図 5 に同じ。

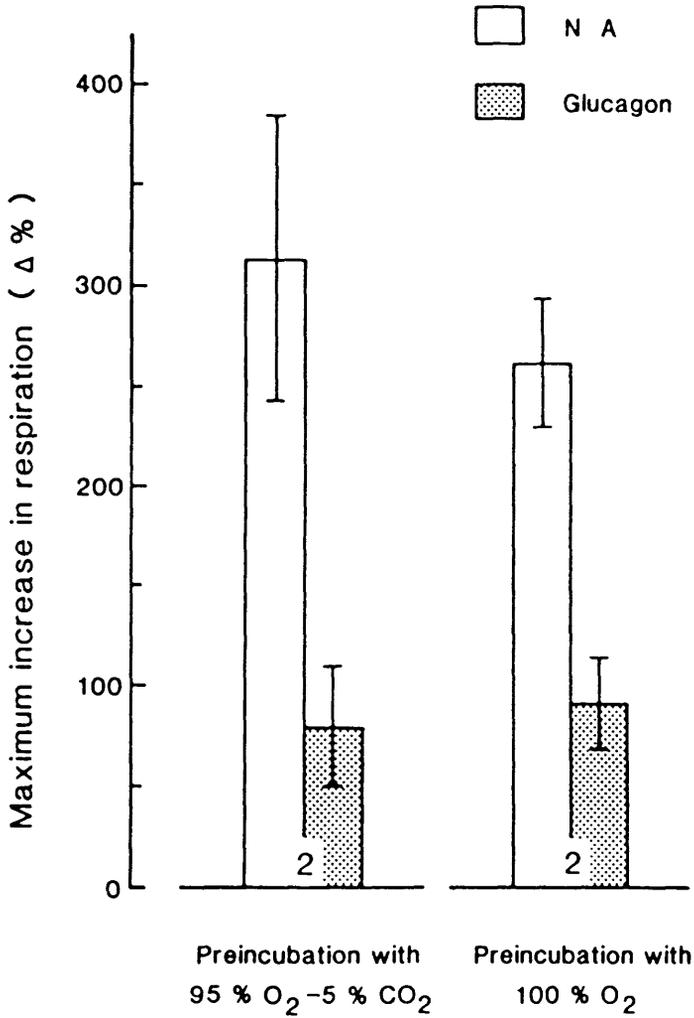


図7 褐色脂肪組織細片の酸素消費反応へのCO₂の効果
 凡例は図3に同じ。カラム内の数字はサンプル数を示す。各バーは標準誤差を示す。

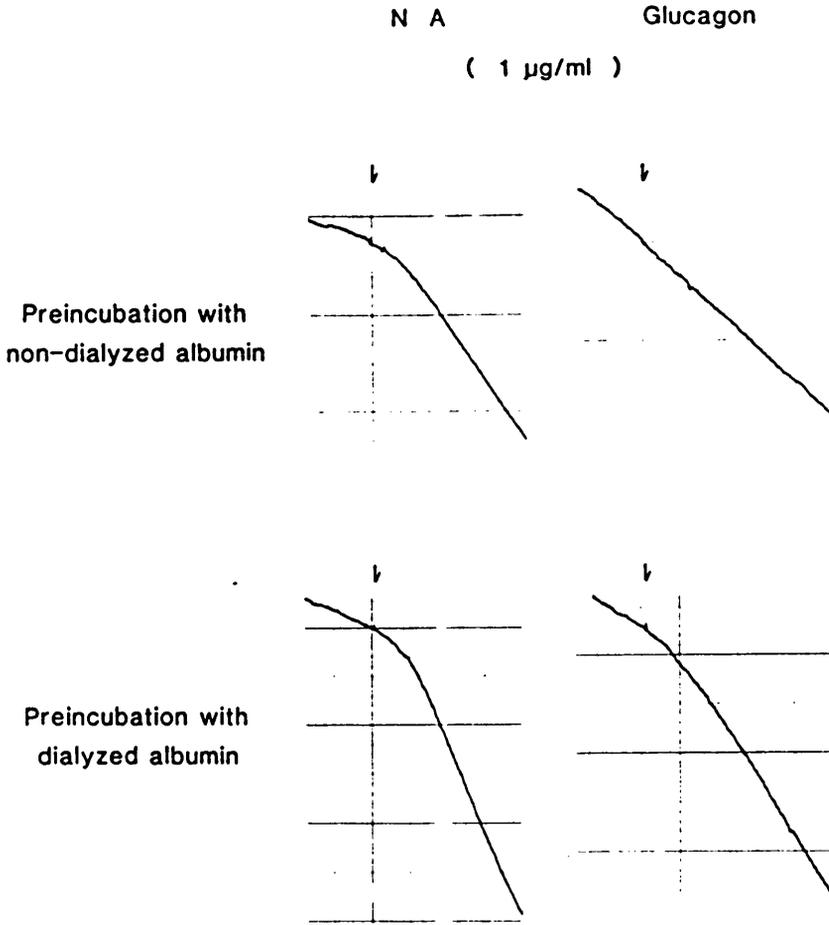


図 8 未透析アルブミンが褐色脂肪組織細片の酸素消費反応に及ぼす効果の例
 凡例は図 5 に同じ。

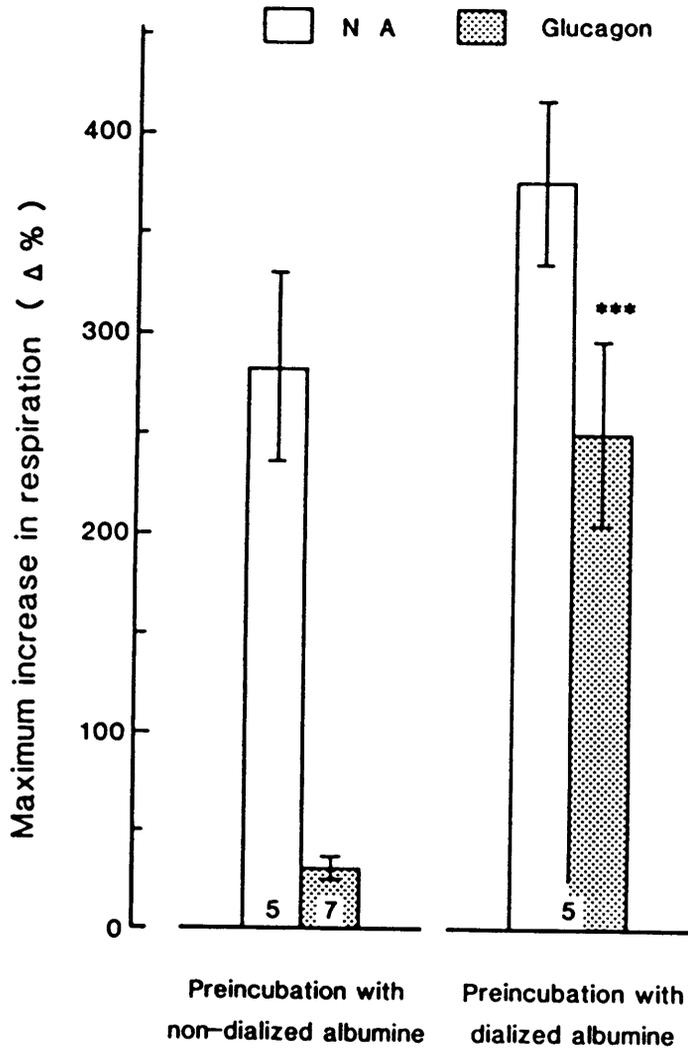


図 9 褐色脂肪組織細片の酸素消費反応に及ぼす未透析アルブミンの効果
凡例は図 7 に同じ。

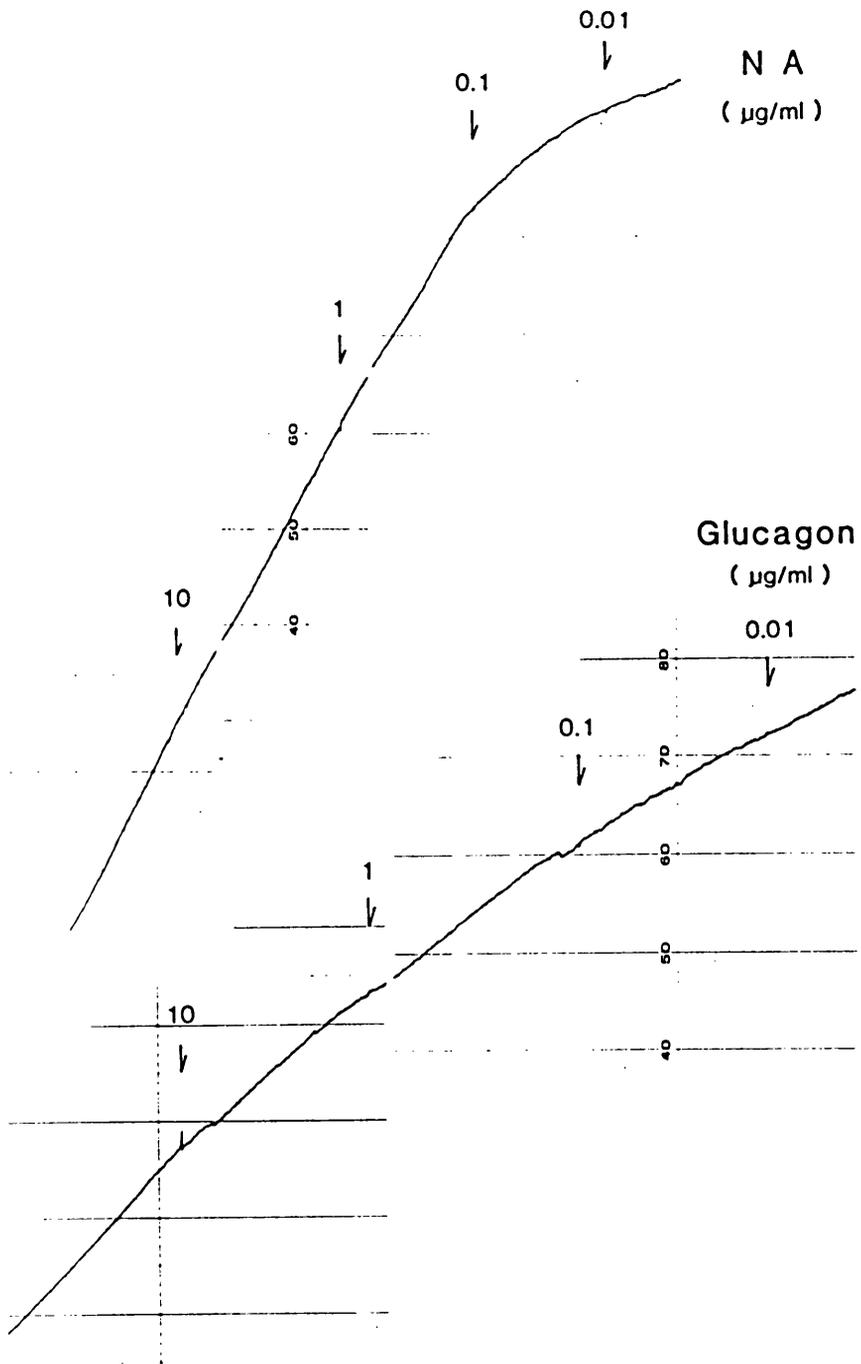


図 10 新生ラット褐色脂肪組織細片でのノルアドレナリン及びグルカゴンによる酸素消費量の累積的用量反応の例
凡例は図 5 に同じ。

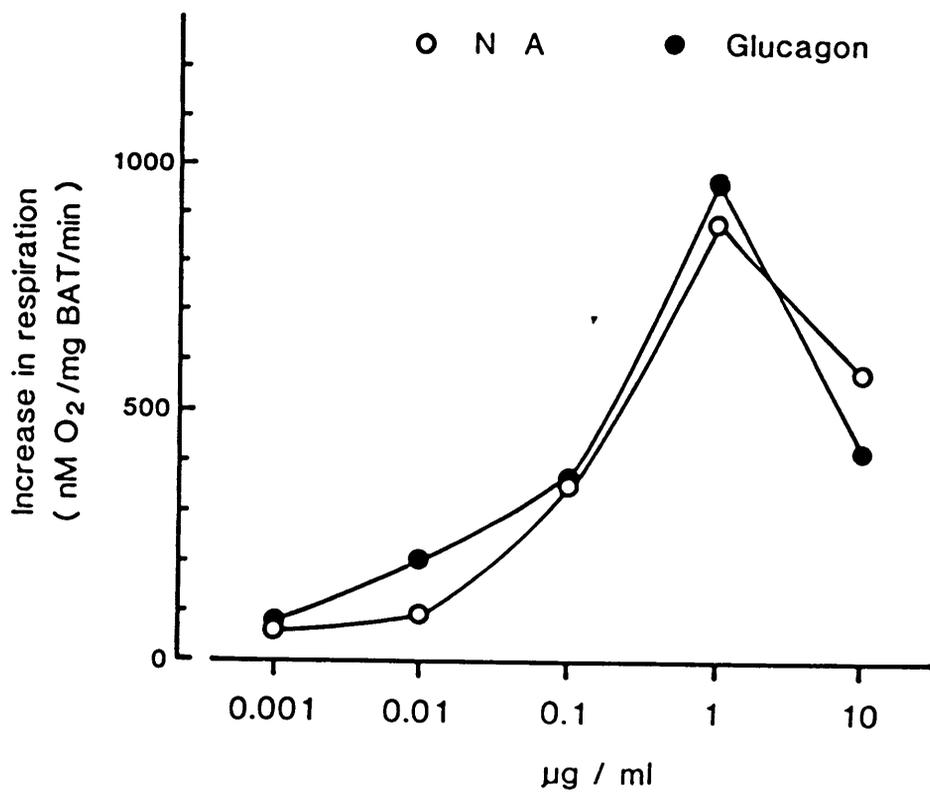


図 11 成体ラット褐色脂肪組織細片でのノルアドレナリン
 及びグルカゴンによる酸素消費量の用量反応
 凡例は図 5 に同じ。各ポイントは夫々 5 例の平均を
 示す。

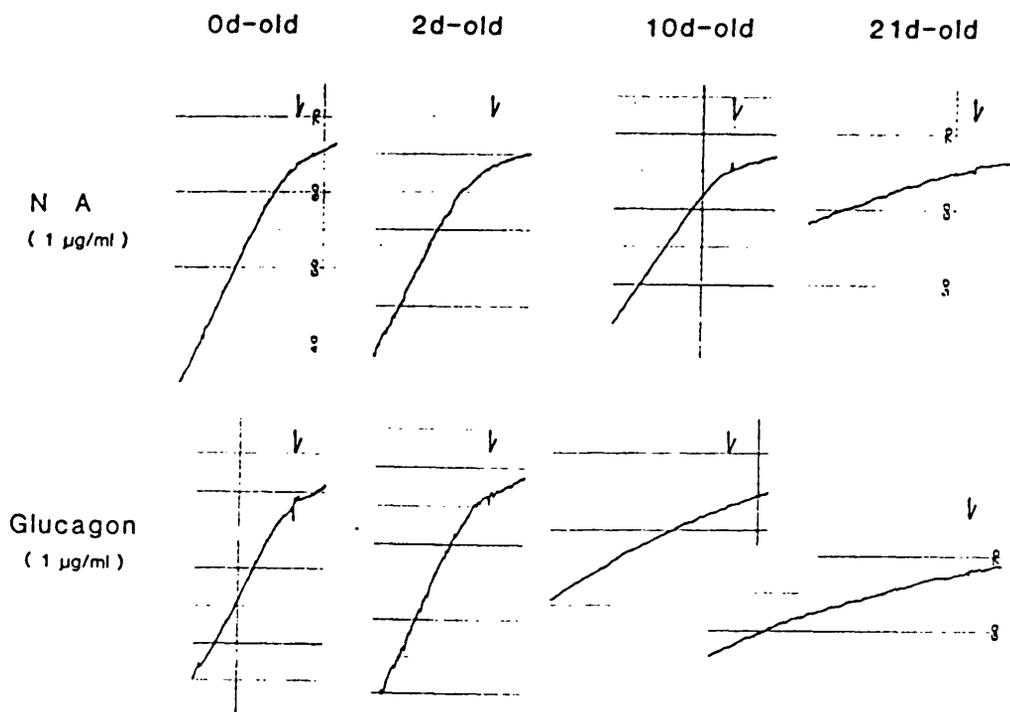


図 12 新生ラット褐色脂肪組織細片の酸素消費反応の生後変化の例
凡例は図 5 に同じ。

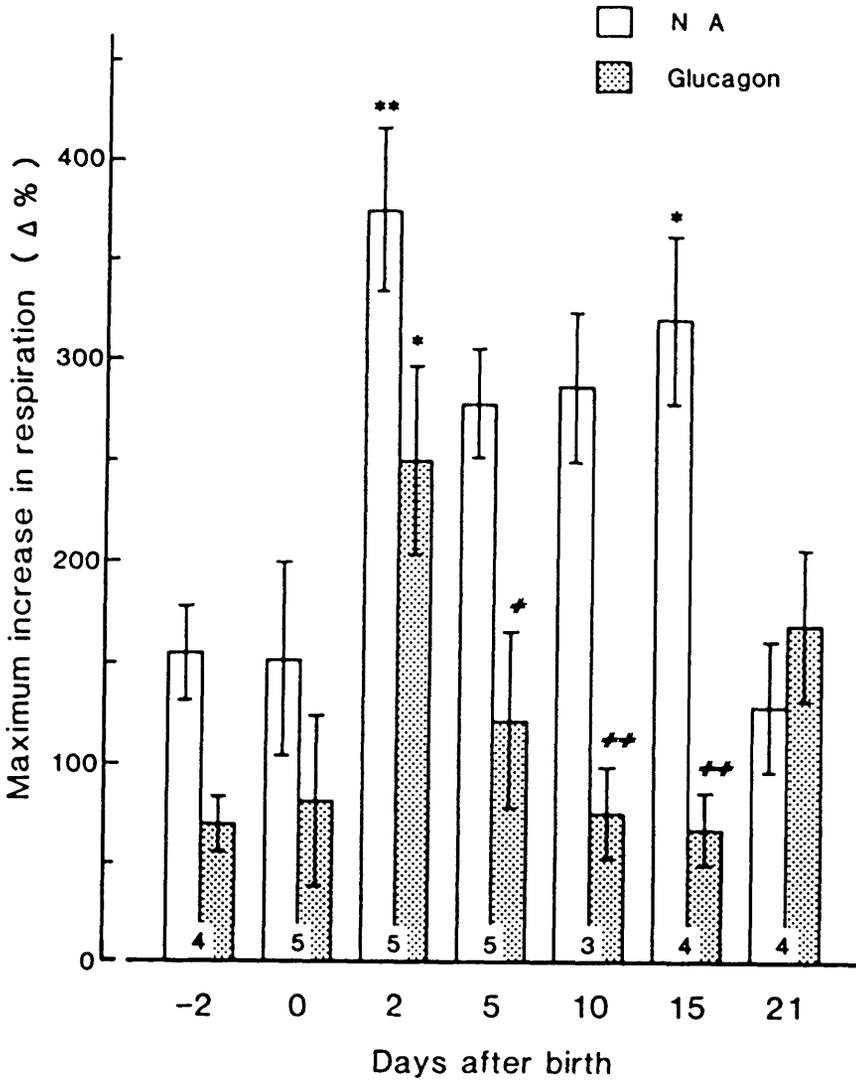


図 13 新生ラット褐色脂肪組織細片の最大酸素消費反応の変化
 凡例は図 7 に同じ。#, ##: 夫々 $p < 0.05, 0.01$ でノルアドレナリンによる反応との間に差のある事を示す。

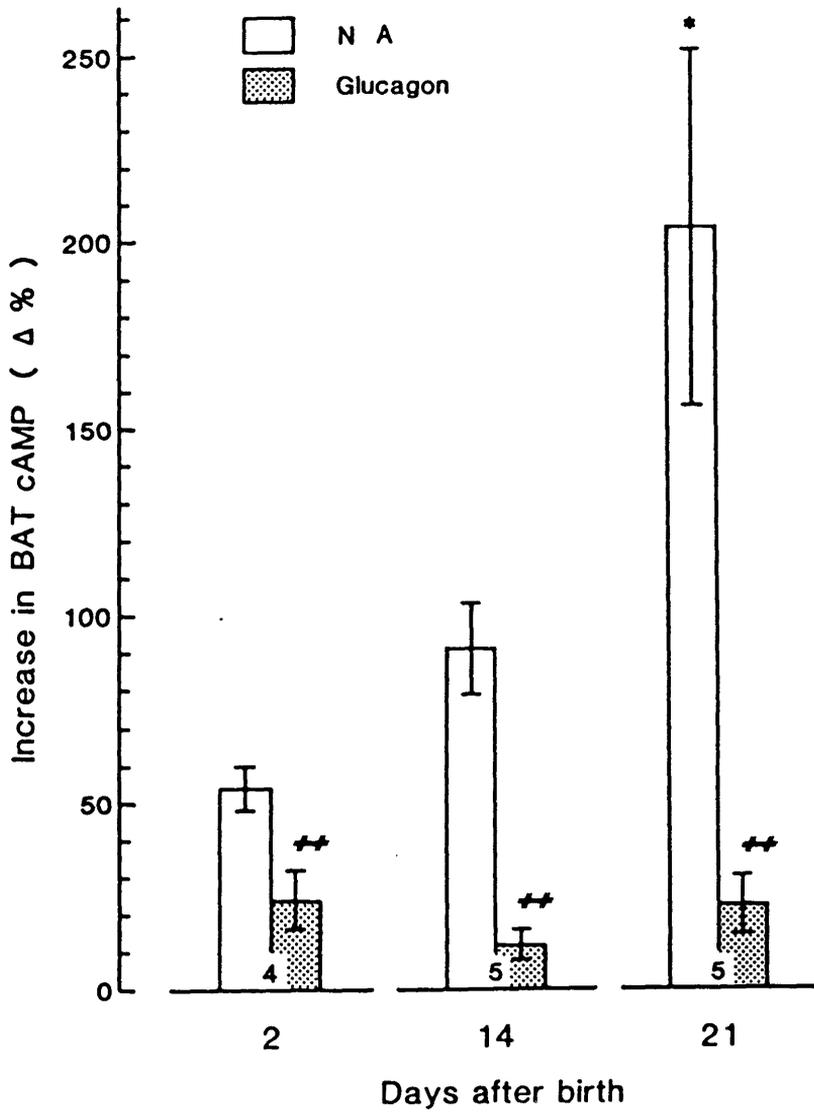


図 14 ノルアドレナリン及びグルカゴンによる褐色脂肪組織内サイクリックAMPの増加
凡例は図 13 に同じ。

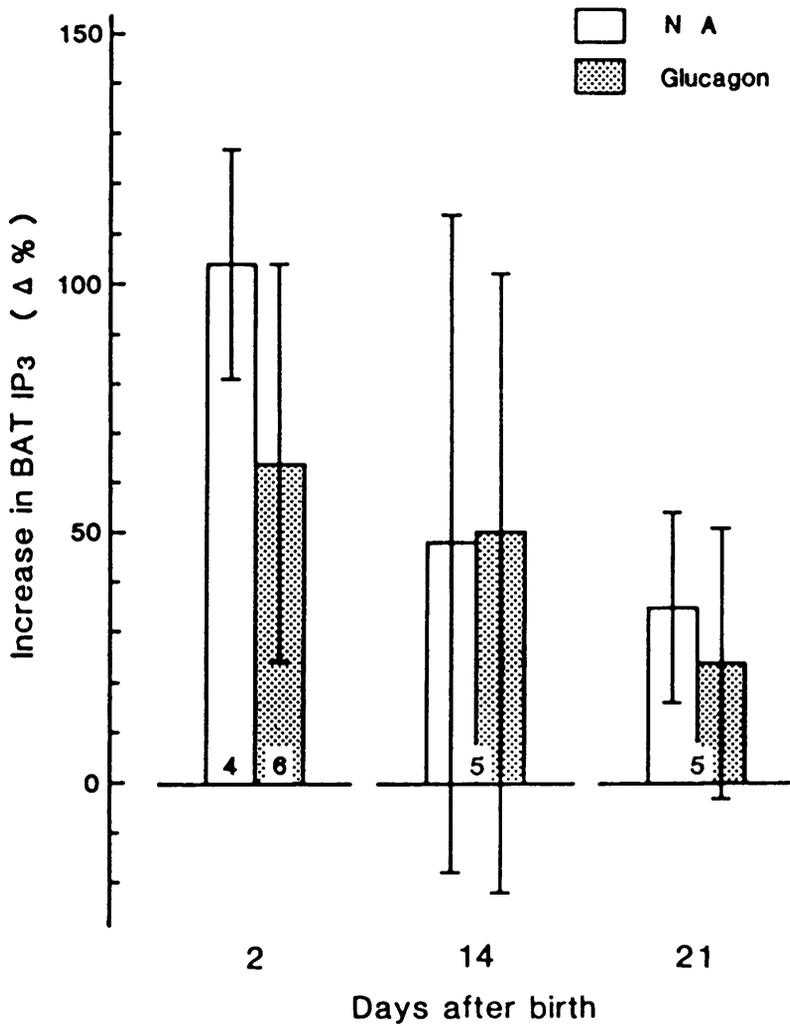


図 15 ノルアドレナリン及びグルカゴンによる褐色脂肪組織内イノシトール・トリフォスフェートの変化
凡例は図 7 に同じ。