

第Ⅲ章 肥満男児における β_3 -AR遺伝子のTrp64Arg変異と体脂肪分布

Ⅲ-1 目的

第Ⅱ章の研究結果をふまえて、肝機能障害の精査が行われた肥満男児を対象に、

- 1) β_3 -AR遺伝子Trp64Arg変異の有無と、体脂肪分布との関連
 - 2) β_3 -AR遺伝子Trp64Arg変異の有無と、肥満合併症との関連
- について検討することを、目的とした。

Ⅲ-2 対象と方法

Ⅲ-2-1 対象

1995年から1997年の3年間に、つくば市及びその周辺の3病院を、肥満を主訴に受診した男児のうち、輸血と肝疾患の既往がなく、血清ALT値が40IU/l以上の肝機能障害¹³⁰⁾が認められ、本人と保護者の、文書によるインフォームドコンセントが得られた肥満児を対象とした。

Ⅲ-2-2 身体計測と血液を用いた検索項目の測定方法

身長と体重を測定し、肥満度とBMIを算出した。同時に、腰囲、胴囲を測定し、ウェスト・ヒップ比 (WHR) を算出した。血圧は坐位で5分間の安静後、手動血圧計で測定した。体脂肪は早朝空腹時の採血時にバイオインピーダンス法 (オムロン社、HBF-300) で測定した。経口ブドウ糖負荷試験の負荷糖量は、厚生省心身障害研究班の診断基準¹³¹⁾に基づき、1.75g/標準体重kg (最大75g) とした。同時に血清AST、ALT、TC、HDL-C、TGの値を測定した。

PCR-RFLP法による β_3 -AR遺伝子Trp64Arg変異の検出は、Ⅱ-2-3に記載した方法で行った。

Ⅲ-2-3 腹部CTスキャン撮影による脂肪面積の計測と、肝臓・脾臓のCT値測定

経口ブドウ糖負荷試験と同じ日の午前中に、腹部CTスキャン撮影を行った。松沢らの方法^{13)、15)、58)}に準じ、臥位でまず臍部断面像1枚を撮影した。その後、肝臓と脾臓が同じ画面にはいる位置で2~3枚の断面像を撮影した(図5)。臍部断面像をCTの画像解析装置に入力し、脂肪組織のCT値を示す範囲を識別した。その範囲を、皮下脂肪面積と内臓脂肪面積に分類して描画ペンで囲み、平方cm単位で面積を求め、皮下脂肪面積(S)と内臓脂肪面積(V)を算出した。次に、肝・脾断面像において、断面像1枚あたり肝臓と脾臓それぞれ2~3カ所ずつCT値を計測した。各5カ所の平均をとり、肝CT値、脾CT値とした。

Ⅲ-2-4 統計学的解析

第Ⅱ章と同様に、統計パッケージソフトStatView 5.0とSPSS6.1を用いて解析を行った。それぞれの項目について、はじめに分散の検定を行い、正規分布を示した項目についてはStudent-t検定を、そうでない項目についてはMann-WhitneyのU検定を用いて比較した。 β_3 -AR遺伝子変異、腹部脂肪面積、脂肪肝の各サブグループ間における、各検査項目の平均値の比較には、一元配置分散分析(ANOVA)のFisher's-PSLD検定を用いた。

Ⅲ-3 結果

Ⅲ-3-1 対象者における β_3 -AR遺伝子Trp64Arg変異の出現頻度

対象者は肥満男児61人であった。表には示さなかったが、対象者の特性は、年齢 11.7 ± 2.2 歳、身長 150.8 ± 14.4 cm、体重 68.2 ± 19.2 kg、肥満度 $62.7 \pm 19.2\%$ 、BMI 29.4 ± 3.8 (それぞれ平均 \pm 標準偏差)であった。

表8に、 β_3 -AR遺伝子Trp64Arg変異の出現頻度を示した。遺伝子型の頻度は、Arg/Arg5人(8.2%)、Arg/Trp24人(39.3%)、Trp/Trp32人

膵高部断面像

肝臓・脾臓断面像

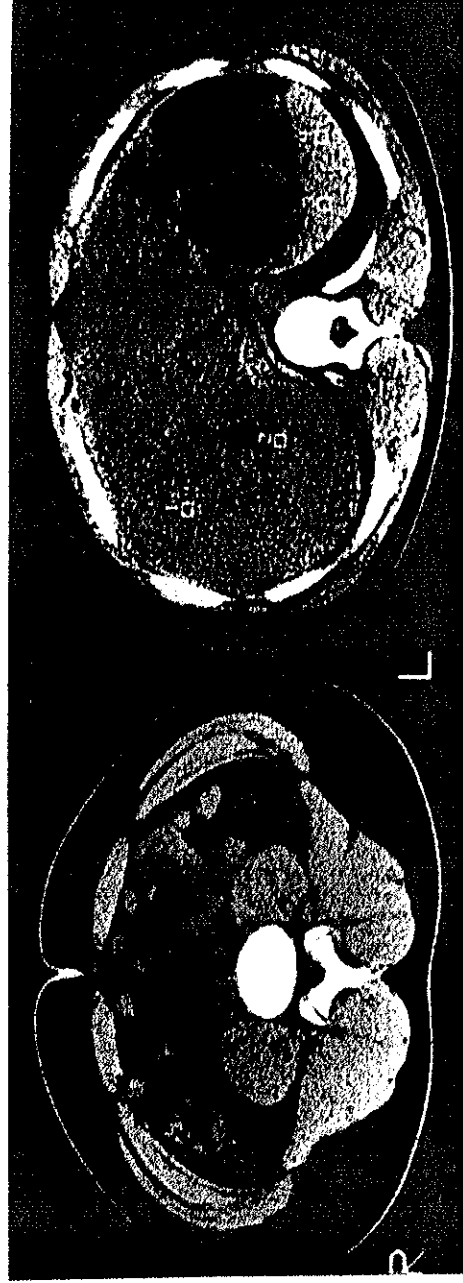


図5 腹部CTスキャン画像

表8 肝機能障害を有する肥満男児における、 β_3 -AR遺伝子Trp64Arg変異の出現頻度

遺伝子型			対立遺伝子 Arg64の出現 頻度 (分散)
Arg/Arg 人数 (%)	Arg/Trp 人数 (%)	Trp/Trp 人数 (%)	
5 (8.2)	24 (39.3)	32 (52.5)	0.278 (0.002)

(52.5%)であった。この観察値は、Hardy-Weinbergの法則に基づく遺伝子頻度の推定値と、一致していた。対立遺伝子Arg64の頻度は0.278であった。この結果から、本章では以後、Arg/Arg、Arg/Trpの計29人を変異あり群、Trp/Trp32人を変異なし群と定義し、解析を行った。

Ⅲ-3-2 β_3 -AR遺伝子Trp64Arg変異と身体測定値、血液検査項目との関連
表9に、2群の年齢と身体測定と血液検査の各項目の平均値を示した。年齢、身長、体重、肥満度、BMIについては、2群間に差が見られなかった。WHRは、変異あり群の 0.97 ± 0.03 に比べてなし群は 0.94 ± 0.03 と、変異あり群で有意に高かった ($p=0.0027$ 、年齢と肥満度で調整後 $p=0.0020$)。体脂肪率は、変異あり群の $30.5 \pm 5.0\%$ に対しなし群は $34.1 \pm 4.7\%$ であり、変異なし群が有意に高い値であった ($p=0.0072$ 、年齢と肥満度で調整後 $p=0.0058$)。血圧、血清脂質、AST、ALTについては、2群間で有意な差が見られなかった。

表10に、変異あり群となし群の、経口ブドウ糖負荷試験における検査項目の平均値を示した。血糖 (BS)、インスリン (IRI)、 $\Sigma BS / \Sigma IRI$ の各値は、年齢と肥満度で調整した後の比較でも、2群間に差が見られなかった。

Ⅲ-3-3 β_3 -AR遺伝子Trp64Arg変異とCT検査項目との関連

表11に、肥満度と体脂肪率、腹部CTスキャンの臍高部画像から得られた皮下脂肪面積 (S) と内臓脂肪面積 (V)、肝・脾断面像から得られた内臓・皮下脂肪面積比 (V/S)、肝臓・脾臓CT値比の各平均値を、 β_3 -AR遺伝子Trp64Arg変異の有無別に表した。肝臓・脾臓CT値比のみ、変異あり群の 0.623 ± 0.310 に対し、変異なし群では 0.804 ± 0.302 と、変異あり群で有意な低下が認められた ($p=0.0285$)。この結果は、年齢、肥満度、空腹時インスリンで調整後も同様であった ($p=0.0225$)。

表9 肝機能障害を有する肥満男児における、 β_3 -AR遺伝子Trp64Arg変異の有無と臨床所見との関連

		β_3 -AR遺伝子のTrp64Arg変異		p値	
		あり群 (n=29)	なし群 (n=32)	調整前	調整後*
年齢	(歳)	12.0±2.1	11.5±2.3	NS	—
身長	(cm)	151.2±14.9	150.4±14.1	NS	—
体重	(kg)	66.3±16.7	69.9±21.3	NS	—
肥満度	(%)	60.0±19.0	65.1±19.3	NS	—
BMI	(kg/m ²)	28.6±3.4	30.2±4.1	NS	—
ウエスト・ヒップ比		0.97±0.03	0.94±0.03	0.0027	0.0020
体脂肪率	(%)	30.5±5.0	34.1±4.7	0.0072	0.0058
収縮期血圧	(mmHg)	123.6±14.8	119.1±16.1	NS	NS
拡張期血圧	(mmHg)	70.8±11.1	65.6±12.3	NS	NS
TC	(mg/dl)	189.4±39.5	190.4±35.1	NS	NS
HDL-C	(mg/dl)	47.3±8.5	48.4±11.8	NS	NS
TG	(mg/dl)	124.8±58.9	122.1±60.3	NS	NS
AST	(IU/l)	50.8±21.7	51.9±25.7	NS	NS
ALT	(IU/l)	98.0±47.0	92.6±56.7	NS	NS

平均値±SDで表示

* ; 年齢と肥満度で調整

表10 肝機能障害を有する肥満男児における、 β_3 -AR遺伝子Trp64Arg変異の有無と経口ブドウ糖負荷試験結果との関連

	β_3 -AR遺伝子のTrp64Arg変異		p値	
	あり群 (n=29)	なし群 (n=32)	調整前	調整後*
血糖；BS (mg/dl)				
空腹時	91.5±7.1	92.8±7.5	NS	NS
60分血糖	125.9±26.9	133.7±35.9	NS	NS
120分血糖	112.8±19.5	117.8±24.5	NS	NS
インスリン；IRI (μ g/ml)				
空腹時	17.6±7.8	15.8±6.7	NS	NS
60分インスリン	71.3±48.2	55.1±44.8	NS	NS
120分インスリン	74.6±46.1	55.9±37.4	NS	NS
Σ BS/ Σ IRI	3.08±2.06	3.47±1.64	NS	NS

平均値±SDで表示

*；年齢と肥満度で調整

表11 肝機能障害を有する肥満男児における、 β_3 -AR遺伝子Trp64Arg変異の有無と腹部CTスキャン検査結果との関連

	β_3 -AR遺伝子のTrp64Arg変異		p値	
	あり群 (n=29)	なし群 (n=32)	調整前	調整後*
皮下脂肪面積；S (cm ²)	251.7±60.2	251.5±70.2	NS	NS
内臓脂肪面積；V (cm ²)	71.2±24.4	71.5±32.0	NS	NS
V/S	0.290±0.096	0.288±0.119	NS	NS
肝臓CT値 (HU)	35.7±18.7	43.7±15.9	NS	NS
脾臓CT値 (HU)	56.2±6.0	55.0±6.7	NS	NS
肝・脾CT値比	0.623±0.310	0.804±0.302	0.0285	0.0225

平均値±SDで表示

*；年齢、肥満度、空腹時インスリンで調整

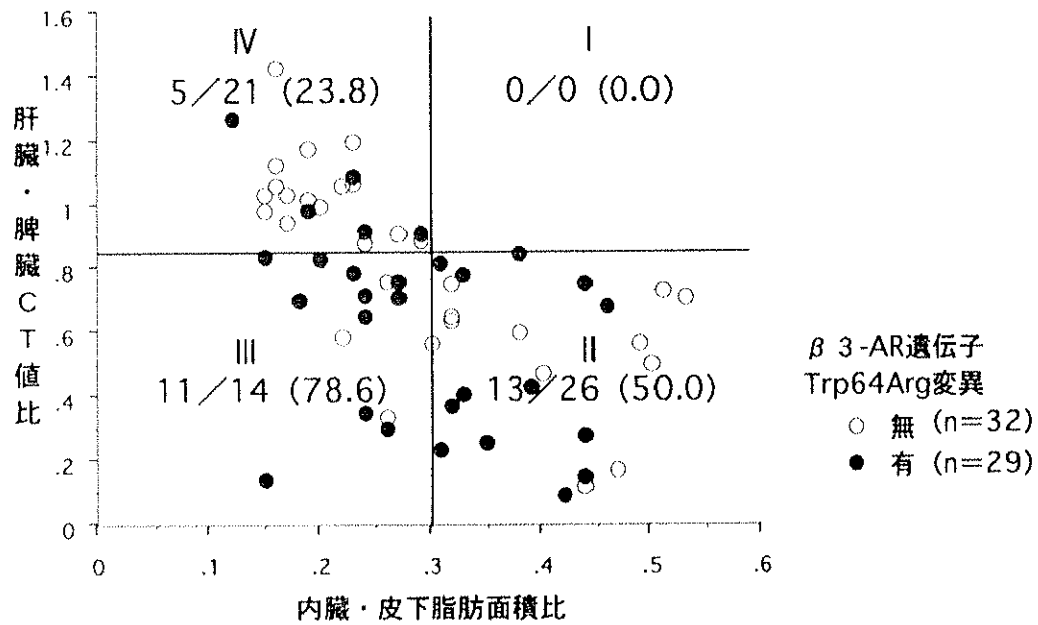
Ⅲ-3-4 脂肪肝の出現頻度からみた、内臓・皮下脂肪面積比のカットオフ値の検討

内臓・皮下脂肪面積比と、脂肪肝の出現頻度との関連について、全対象者61人を、内臓・皮下脂肪面積比が0.2から0.4まで、0.05刻みで、Fisherの直接法を用いて χ^2 -検定した。内臓・皮下脂肪面積比0.3で、それ未満とそれ以上に区切ったとき、最も高い χ^2 -値が得られ、偽陽性の判定割合が低かった。すなわち、内臓・皮下脂肪面積比が0.3未満の35人中、脂肪肝と判定された者は14人(39.0%)だったが、0.3以上では26人中、脂肪肝と判定されたのが25人(96.2%)であり、0.3以上で有意に高い出現頻度であった($\chi^2=18.076$, $p<0.0001$)。

Ⅲ-3-5 β_3 -AR遺伝子Trp64Arg変異の有無と肥満合併症との関連

図6は、全例の腹部CTスキャン検査の結果を、内臓・皮下脂肪面積比をx軸に、肝臓・脾臓CT値比をy軸にとった散布図である。変異あり群をクローズド・サークル、変異なし群をオープン・サークルで示した。内臓・脂肪面積比について0.3未満と0.3以上、肝臓・脾臓CT値比については0.85未満と0.85以上で、4つの象限に分類した。内臓・脂肪面積比が0.3未満のⅢ、Ⅳにおいては、変異あり群の脂肪肝出現頻度は、なし群に比べて有意に高かった($\chi^2=4.487$, $p=0.034$)。

表12に、内臓・皮下脂肪面積比と、各検査項目との相関係数を表した。内臓・脂肪面積比と、収縮期血圧、拡張期血圧との間には、全体ならびに変異あり群において、有意な正の相関が見られた(全体で収縮期; $r=0.430$, $p<0.05$ 、拡張期; $r=0.323$, $p<0.05$ 、変異あり群で収縮期; $r=0.430$, $p<0.05$ 、拡張期; $r=0.477$, $p<0.05$)。経口ブドウ糖負荷試験の結果では、全体で空腹時血糖、120分血糖との間に有意な正の相関(空腹時; $r=0.280$, $p<0.05$ 、120分; $r=0.328$, $p<0.05$)が、変異なし群で空腹時、60分、120分の各血糖値との間に有意な正の相関(各々、 $r=0.361$, 0.418 , 0.399 , $p<$



各象限中央の数字は、
変異あり群人数／各象限の人数（変異あり群％）

図6 肝機能障害を有する肥満男児の、腹部CTスキャン像による脂肪肝の判定と、 β_3 -AR遺伝子Trp64Arg変異の有無

表12 肝機能障害を有する肥満男児における、 β_3 -AR遺伝子Trp64Arg変異の有無別の内臓・皮下脂肪面積比と各検査項目との相関係数

	β_3 -AR遺伝子のTrp64Arg変異		
	全体 (n=61)	あり群 (n=29)	なし群 (n=32)
肥満度	0.068	0.038	0.148
体脂肪率	0.004	0.133	0.138
ウェスト・ヒップ比	0.042	0.090	0.159
血圧			
収縮期	0.430 *	0.430 *	0.241
拡張期	0.323 *	0.477 *	0.247
経口ブドウ糖負荷試験			
空腹時血糖	0.280 *	0.149	0.361 *
60分血糖	0.250	0.089	0.418 *
120分血糖	0.328 *	0.203	0.399 *
空腹時インスリン	0.176	0.002	0.330
60分インスリン	0.013	0.204	0.164
120分インスリン	0.195	0.066	0.348
腹部CTスキャン			
肝臓・脾臓CT値比	-0.579 †	-0.732 †	-0.854 †

* ; p<0.05、 † ; p<0.0001

0.05) が認められた。また、肝臓・脾臓CT値比との間には、全体、変異あり群、変異なし群のいずれも、有意な負の相関が認められた (全体; $r = -0.579$, $p < 0.0001$, 変異あり群; $r = -0.732$, $p < 0.0001$, 変異なし群 $r = -0.854$, $p < 0.0001$)。

図7に、経口ブドウ糖負荷試験における120分インスリンの平均値を、内臓・皮下脂肪面積比が0.3未満と0.3以上に分類し、さらに変異の有無別に示した。内臓・皮下脂肪面積比0.3未満群では、120分インスリン値が、変異あり群の $72.9 \pm 61.1 \mu\text{g/ml}$ に対し、変異なし群は $49.5 \pm 32.4 \mu\text{g/ml}$ と、変異あり群で高い傾向が見られたが、有意ではなかった。内臓・皮下脂肪面積比0.3以上群でも、変異あり群; $76.9 \pm 51.3 \mu\text{g/ml}$, 変異なし群; $64.7 \pm 43.2 \mu\text{g/ml}$ で、有意差はなかった。変異あり群、なし群それぞれにおける、内臓・皮下脂肪面積比の2群間でも、有意な差は見られなかった。

III-4 考察

III-4-1 β_3 -AR遺伝子のTrp64Arg変異と肥満男児の体脂肪分布

本変異と高インスリン血症、インスリン抵抗性、NIDDMの発症との関連については、体脂肪の分布状況が関与すると考えられる。I-4で述べたように、これら肥満合併症の発生と関連の深い肥満体型は上半身型肥満であり、その本態は内臓脂肪蓄積と考えられている^{8), 15), 58), 91)}。Perusseら²⁶⁾は、腹部CTスキャン画像から腹部脂肪を内臓脂肪と皮下脂肪に分類し、同時に体脂肪率を水中比重測定法で測定した結果から、特に内臓脂肪の蓄積状況は家系と関連があることを報告した。 β_3 -ARは内臓脂肪に多く分布する^{116) -119)}ことから、本変異と内臓脂肪蓄積との関連が推測されていたが、体脂肪分布の指標をWHRまたは皮下脂肪測定に求めた報告が多かった^{95) -97)}。

また、本研究の第III章では、対象を肥満男児に限定した。その理由として、体脂肪の分布状況には、人種と性差が関連することが挙げられる。Ellisら¹³²⁾

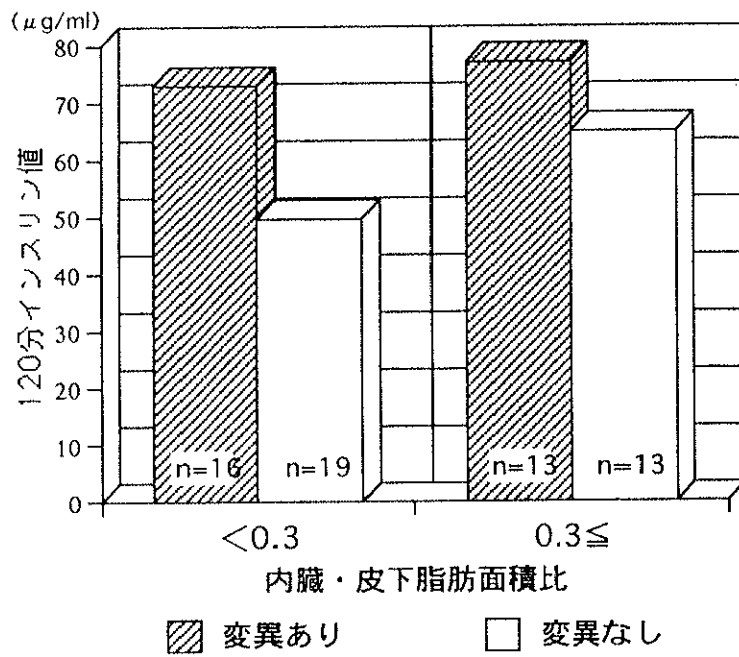


図7 肝機能障害を有する肥満男児における、 β_3 -AR遺伝子 Trp64Arg変異の有無別の、内臓・皮下脂肪面積比と経口ブドウ糖負荷試験のインスリン120分値との関連

は、DEXA法を用いて体脂肪分布を検討し、女兒では同年齢の男児に比較し全体脂肪が多いが、皮下脂肪の割合が高いこと、成人の男性は女性より内臓脂肪が多いこと、また、人種により体脂肪分布に差が認められたことを報告した。WHRを指標とした検討でも、同様に性差を指摘する報告は多く^{93)、97)、98)}、女兒ではとくに思春期前後で、性発達の度合いにより体脂肪の分布状況が変化する¹³³⁾。本研究の対象年齢は思春前期であることから、すでに性による体脂肪分布の相違が起こっていると思われ、性別に検討することが望ましいと考えられたため、対象を男児のみとした。

その結果、表9に示したとおり、変異の有無と、肥満度、BMIとの間には有意な関連が見られなかったにも関わらず、WHRは、変異あり群がなし群に比べて有意に高く、逆に体脂肪率は、変異なし群があり群より有意に高かった。すなわち、変異あり群では、なし群に比べて、腹部に脂肪がより蓄積すると考えられ、本変異が上半身肥満と関連することが確認された。

Ⅲ-4-2 β_5 -AR遺伝子Trp64Arg変異と肥満合併症

次に、変異の有無と、肥満合併症との関連について検討した。表11に示したとおり、肝臓の脂肪蓄積の程度を示す指標である肝臓・脾臓CT値比は、変異あり群がなし群に比べて有意に低下していた。さらに、図6に示したように、変異の有無別に、脂肪肝の出現頻度を比較したところ、変異あり群では脂肪肝と判定された者が29人中24人(82.8%)であり、なし群の32人中16人(50.0%)に対して有意に高率であった($\chi^2=8.120$, $p=0.004$)。以上から、本変異の存在は、肝臓に脂肪を蓄積しやすいという、質的な変化を引き起こすことが示唆された。

小児の、正常な肝臓の脂肪含有量は5%未満で、そのほとんどが中性脂肪である。肝臓の脂肪含有量が35%を越えると、肝機能障害の徴候が明らかになるとされる¹³⁴⁾。本研究においては、肝機能障害の定義を、血清ALT値40IU/l以上とした。健常な日本人小児における血清ALT値の97.5%上限が、本研究の対象

年齢では22~30であり、かつ日内変動が5%未満であることを参考とした基準設定である¹³⁰⁾。

小児肥満に見られる脂肪肝について、発症頻度に性差があること（男児>女児）¹³⁵⁾、肥満度と肝内脂肪浸潤の程度は必ずしも相関しないこと^{18)、110)、136)}、脂肪肝合併肥満児では、耐糖能異常や血清脂質異常が高率に認められることが知られている^{19)、70)}。本研究は、男児のみを対象としているため、性差については検討できなかった。

肥満に合併する、肝臓への脂肪蓄積の機序としては、以下の機序が推測される^{137)、138)}。まず、食事性の脂肪酸や炭水化物摂取増加により、脂肪酸や中性脂肪の肝臓への流入増加が起こる。次に、体脂肪の増加によるインスリン作用の低下が、脂肪細胞における脂肪分解の抑制不良と、脂肪分解の亢進をもたらす。血中の遊離脂肪酸レベルが上昇する。血中遊離脂肪酸レベルの上昇は、肝臓で脂肪酸の酸化を促し、アセチルCoAを介して糖新生率を高めることで、肝臓におけるインスリン抵抗性の発現に関与する。また、高インスリン血症の存在は、肝臓で脂肪酸合成能を促進し、中性脂肪の合成を増加させ、体脂肪の蓄積と肝臓への脂肪蓄積が起こる。これらが複合して、体脂肪蓄積とインスリン抵抗性の悪循環が発生する。

Matsuzawaらは、内臓脂肪が多いほど、肝臓内にも脂肪が蓄積する^{13)~15)}と報告した。しかし本研究においては、表11に示すとおり、内臓脂肪面積、内臓・皮下脂肪面積比のどちらも、変異の有無による明らかな相違が見られなかった。そこで、表12では、内臓・皮下脂肪面積比と各検査項目との相関を検討した。

まず、変異あり群では、内臓・皮下脂肪面積比と血圧との間に、有意な正の相関が認められた。第II章では、肥満群の中でも、変異あり群がなし群より、血圧が有意に高かった（表6）ので、本変異の存在は、内臓脂肪の蓄積を介して、血圧に作用すると考えられた。

次に、経口ブドウ糖負荷試験の結果、変異なし群では、内臓・皮下脂肪面積

比と血糖との間に有意な正の相関が、インスリンとの間に正の相関傾向が認められたが、変異あり群では相関が明らかでなかった（表12）。また、内臓・皮下脂肪面積比と、肝臓・脾臓CT値比との間には、変異あり群、なし群ともに、有意な正の相関が見られた（表12）。これらと、表11の結果から、変異の有無に関わらず、内臓・皮下脂肪面積比が増加することで、肝臓に脂肪は蓄積するが、特に、変異を有すると、内臓・皮下脂肪面積比が比較的低くても、インスリン抵抗性の存在を介して、より肝臓に脂肪を蓄積しやすいことが推測された。これを検証するためには、内臓・皮下脂肪面積比が低い群と高い群の2群に分け、その中でさらに変異の有無による差異を検討する必要がある。

成人では、内臓脂肪症候群の判定基準を、内臓・皮下脂肪面積比0.4以上としている^{5,7)}が、小児における内臓・皮下脂肪面積比のカットオフ値は定まっていない^{11,2)}。そこで、Ⅲ-3-4で、脂肪肝の出現頻度からみた、内臓・皮下脂肪面積比のカットオフ値の検討を行った。その結果、内臓・皮下脂肪面積比を0.3未満と0.3以上の2群に分類したとき、内臓・皮下脂肪面積比と脂肪肝の出現頻度の比較検定における最大の χ^2 値が得られた。従って、肝機能障害を有する肥満男児では、内臓・皮下脂肪面積比0.3以上の場合、脂肪肝の合併を念頭に置き、肥満の治療に当たるべきであると考えられた。さらに、図6では、変異の有無による差異を検討するため、内臓・皮下脂肪面積比が0.3未満であった35人について、変異の有無別に、脂肪肝の出現頻度を検討した。その結果、内臓・皮下脂肪面積比の低い群においても、変異を有すると、脂肪肝の合併頻度が明らかに高かった（ $\chi^2=8.120$ 、 $p=0.0044$ ）。

最後に、インスリン抵抗性の指標である、経口ブドウ糖負荷試験の120分インスリン値^{13,9)}を、内臓・皮下脂肪面積比と変異の有無について、各群別に検討した（図7）。内臓・皮下脂肪面積比0.3未満群においては、変異あり群のほうがインスリン値が高い傾向があるものの、有意ではなかった（ $72.9 \pm 61.1 \mu\text{g/ml}$ vs. $49.5 \pm 32.4 \mu\text{g/ml}$ ）。

以上から、変異の存在と、肝臓に脂肪を蓄積することとの関連は確認された

が、インスリン抵抗性の存在は確認できなかった。定量的にインスリン抵抗性を検討するためには、グルコースクランプ法、インスリン・ソマトスタチン・ブドウ糖持続注入試験 (SSPG ; steady state plasma glucose) 法などを用いる必要がある^{140) -142)}と思われた。

本変異が、肝内脂肪蓄積に関与する機序について、微小循環への影響を推測する報告もある^{128), 129), 143)}。動物モデルを用いた研究で、 β_3 -AR刺激薬の投与により、膵臓ランゲルハンス島の微小循環が改善した¹⁴³⁾。また、Sakaneらは、発症後10年以上のNIDDM日本人成人215人を対象とした調査で、本変異と増殖性糖尿病性網膜症との関係を明らかにし (OR=2.55, 95%CI=1.25~5.16)¹⁴⁴⁾、本変異がヒトにおいても、微小循環の悪化に関与することを支持した。これらの研究は、本変異の存在により、膵島微少循環の不良→インスリン分泌が血糖量に対して不十分→高血糖→膵島 β 細胞刺激→インスリン分泌の遅延反応→末梢や臓器への脂肪蓄積→インスリン抵抗性の発生→糖処理の遅延、と、悪循環を連鎖していく可能性を示唆している。

多くの研究者が報告した、本変異とNIDDMの早期発症との関連は、上記のような病態が小児期から継続した結果、膵 β 細胞の疲弊が早まったのであろうと考えられる。しかし、このような傾向が、他の地域のヒト集団や女兒にも見られるか否かについては、さらに検討が必要と考えられた。