

食塩の摂取が寒冷刺激による体温低下に及ぼす影響

長谷川 和哉

盛岡大学栄養科学部栄養科学科

概要 塩分摂取量には地域性があることが知られており、温暖な気候の地方に比べて寒冷地では多くの塩分を摂取している。また、同じ地域であっても気温が低くなるほど塩分の摂取量が増加することも報告されている。マウスにおいても寒冷刺激を与えると塩分摂取量が増加することが報告されており、寒さ自体が塩分の摂取量を増加させる原因である可能性が示唆されている。しかしながら、なぜ寒さによって塩分摂取量が増加するのか、過剰に摂取された塩分が生体内でどのように作用するかについては十分に明らかになっていない。ヒトを含む恒温動物は、寒冷に暴露されると体温の低下を防ぐために交感神経系を介して末梢血管の収縮による放熱量の減少と、褐色脂肪や骨格筋の“非ふるえ熱産生”によって発熱量を増加させることで体温の低下を防いでいる。一方、塩分摂取量の増加は交感神経系を亢進させる。そこで本研究では熱産生に着目し、塩分が寒冷暴露による体温低下に与える影響について明らかにすることを目的とした。マウスを Control 群と NaCl 群に分け、Control 群には蒸留水を、NaCl 群には 0.9% NaCl 水を自由飲水にて与えた。室温環境下で 7 日間飼育した後、1 日 6 時間(暗期)の寒冷刺激(5°C)を 6 日間負荷した。その結果、1 日 6 時間の寒冷刺激によって両群ともに直腸温の低下が認められたが、Control 群と比較して NaCl 群では直腸温の低下が有意に抑制されていた。この寒冷による直腸温の低下の抑制は寒冷刺激開始後 1 日目から認められ、実験終了時点まで維持されていた。血圧および心拍数は塩分摂取を増加させても変化しなかった。褐色脂肪組織における熱産生関連遺伝子および褐色脂肪マーカーの発現に有意な差は認められなかった。また、脂質代謝関連遺伝子の発現量も変化がなかったが、糖代謝関連遺伝子の発現は有意に高値を示した。皮下脂肪組織および骨格筋における熱産生、ミトコンドリア生合成、糖および脂質代謝に関連する遺伝子の発現は、塩分摂取量の増加によって変化しなかった。以上の結果から、塩分摂取の増加は寒冷下における体温低下を抑制する作用があることが示唆された。また、この作用には褐色脂肪組織の糖代謝系の亢進が関与している可能性が示唆された。今後は褐色脂肪組織の糖代謝に着目して解析を行う予定である。

1. 研究目的

塩分摂取量には地域性があることが知られており、温暖な気候の地方に比べて寒冷地では多くの塩分を摂取している¹⁾。また、同じ地域であっても気温が低くなるほど塩分の摂取量が増加することも報告されている²⁾。これらの現象は、冬季では保存用食料として漬物などの塩漬けにした食品を食べる量が増加するため、いわば二次的に塩分摂取量が増加しているとされていた。一方、ヒト以外の哺乳類においても寒さによって塩分摂取量が増加する。これまでに、マウスに寒冷刺激を与えると塩分摂取量が増加することが報告されており^{3,4)}、寒さ自体が塩分の摂取

量を増加させる原因である可能性が示唆されている。しかしながら、なぜ寒さによって塩分摂取量が増加するのか、過剰に摂取された塩分が生体内でどのように作用するかについては十分に明らかになっていない。

ヒトを含む恒温動物は、寒冷環境においても体温を維持する機能を有している。恒温動物は寒冷に暴露されると体温の低下を防ぐために交感神経系を介して末梢血管の収縮による放熱量の減少と、褐色脂肪や骨格筋の“非ふるえ熱産生”によって発熱量を増加させることで体温の低下を防いでいる⁵⁻⁷⁾。また高塩分摂取は、血圧の上昇と交感神経系を亢進させる^{8,9)}。そこで本研究では、熱産生

に着目し、塩分が寒冷暴露による体温低下に与える影響について明らかにすることを目的とした。

2. 研究方法

2.1 実験動物

5週齢の C57BL/6J 系統雄マウスを用い、12時間の明暗期サイクルにてケージで個別に飼育した。動物実験は盛岡大学動物実験委員会の承認を受け実施した。

2.2 寒冷刺激実験

マウスを無作為に Control 群と NaCl 群に分け、Control 群には蒸留水を、NaCl 群には 0.9% NaCl 水を自由飲水にて与えた。室温環境下で 7 日間飼育した後、1 日 6 時間(暗期)の寒冷刺激(5°C)を 6 日間負荷した。実験開始から終了まで、寒冷刺激直後に体温を測定した。体温は小動物用体温計(MT-1)を用い、センサーチップを直腸に挿入して測定した。また、非観血血圧測定装置(ソフトロン)を用いて室温環境下(明期)における尾部血圧を測定した。血圧の測定は無麻酔拘束下において保温をしながら実施した。最終日の寒冷刺激直後に、全てのマウスを屠殺し、褐色脂肪、皮下脂肪、骨格筋を採取した。

2.3 qRT-PCR

褐色脂肪、皮下脂肪および骨格筋の総 RNA は、グアニジンチオシアネート法を用いて抽出した。cDNA の合成は、逆転写酵素 PrimeScript™ RT Master Mix (TAKARA)を用いて行った。合成された cDNA サンプルを用い、Step One System (Applied Biosystems)によって定量的リアルタイム PCR を行った。また、目的 mRNA 発現量を補正するため、内部標準遺伝子として ribosomal protein 36B4 の mRNA 発現量を用いた。

2.4 統計解析

全ての実験データは、GraphPad Prism で解析して、各実験群間の比較には、スチューデントの t 検定を用いて評価した。得られた結果は、平均±標準誤差で提示し、 $P < 0.05$ をもって統計的に有意と判断した。

3. 研究結果

3.1 体温

室温条件下における 7 日間の飼育後の Control 群と NaCl 群の直腸温に有意な差は認められなかった (Fig. 1)。1 日 6 時間の寒冷刺激によって両群ともに直腸温の低下が認められたが、Control 群と比較して NaCl 群では直腸温の低下が有意に抑制されていた。この寒冷による直腸温の低下の抑制は寒冷刺激開始 1 日目から認められ、実験終了時点まで維持されていた。

3.2 血圧

塩分摂取量の増加によって血圧が上昇することから、本研究においても血圧を測定した。血圧は寒冷刺激開始 5 日目の室温環境下(明期)に測定した。塩分摂取を増加させても血圧は有意に変化しなかった (Fig. 2)。また、心拍数も塩分摂取量の増加によって変化しなかった。

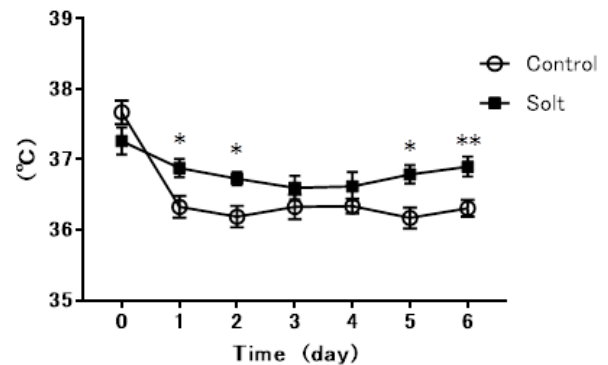


Fig.1. Changes in rectal temperature due to cold stimulation

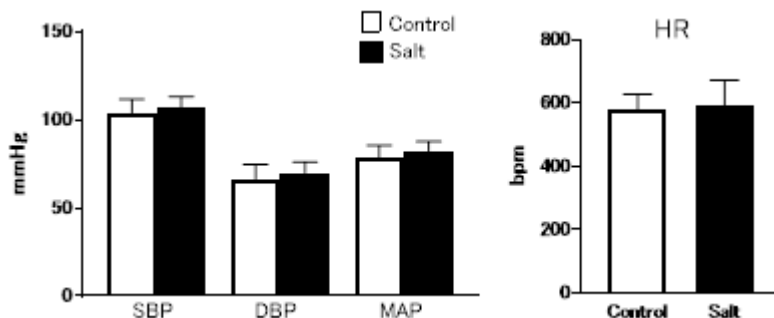


Fig. 2. Effects of increased salt intake on blood pressure and heart rate

3.3 褐色脂肪組織

褐色脂肪は寒冷下における熱産生を担う代表的な組織である。褐色脂肪の代表的な熱産生機構である Uncoupling protein 1 (UCP1) の mRNA 発現量は、両群で有意な差は認められなかった (Fig. 3A)。また、UCP1 非依存性熱産生機構である sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) 2a, SERCA2b および Ryanodine receptor 1 (RYR-1) mRNA 発現量も両群で有意な差は認められなかった (Fig. 3A)。褐色脂肪のマーカーである PR domain containing 16 (PRDM16), cell death-inducing DNA fragmentation factor alpha-like effector A (Cidea) お

よびミトコンドリア生合成に關与する Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α), Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR γ) mRNA 発現量も両群の間に有意な差は認められなかった (Fig. 3B)。脂質の β 酸化に關与する Carnitine palmitoyltransferase (CPT) の mRNA 発現量にも有意な差は認められなかった (Fig. 4)。解糖系に關わる Phosphofructokinase enzyme (Pfk) mRNA 発現量に有意な差は認められなかったが、Pyruvate kinase isozymes M2 (PKM2) mRNA 発現量は、Control 群と比較して NaCl 群で有意に上昇していた (Fig. 4)。

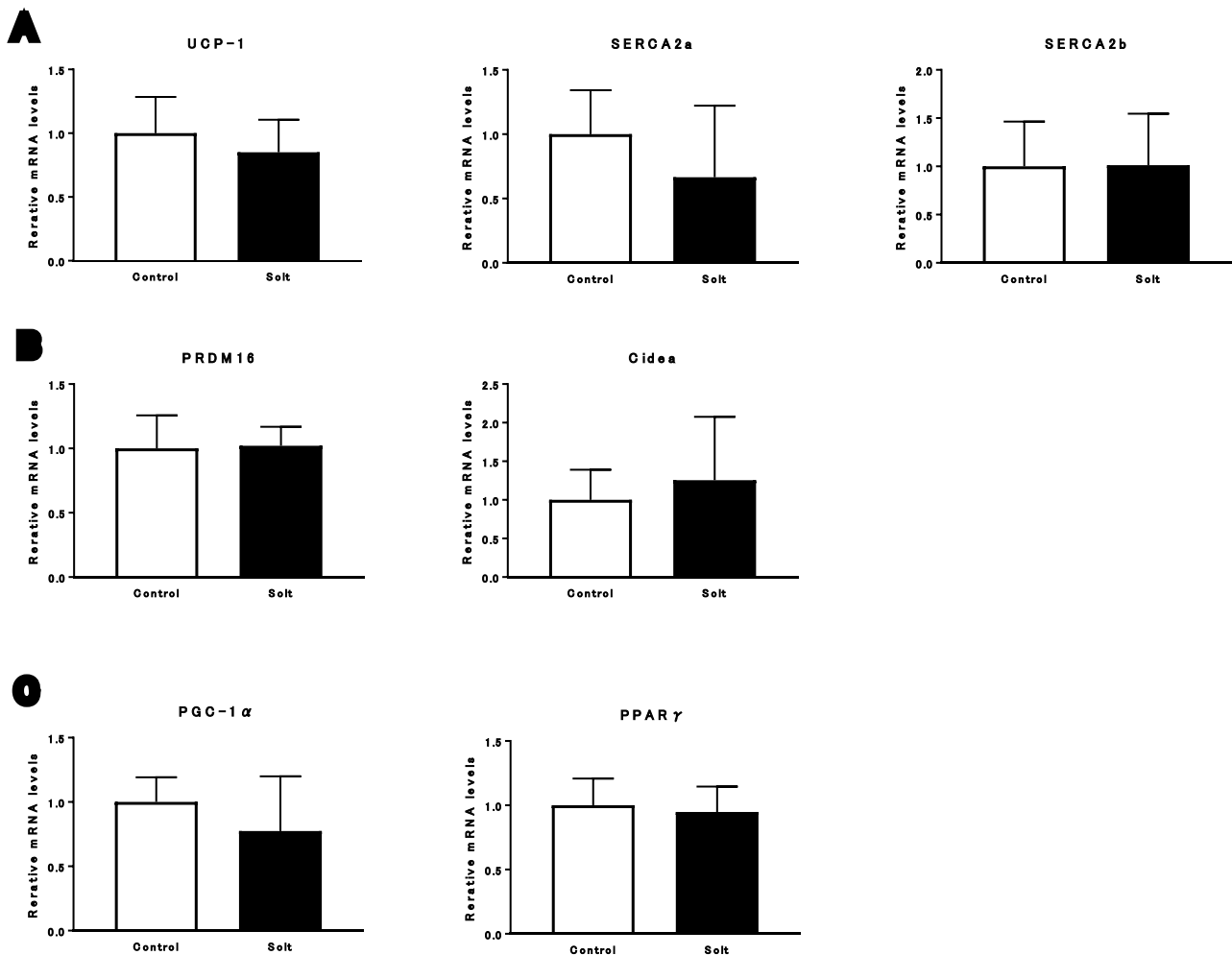


Fig. 3. mRNA expression level of brown adipose tissue

(A) Gene involved in heat production, (B) Brown fat marker, (C) Gene involved in mitochondrial biogenesis.

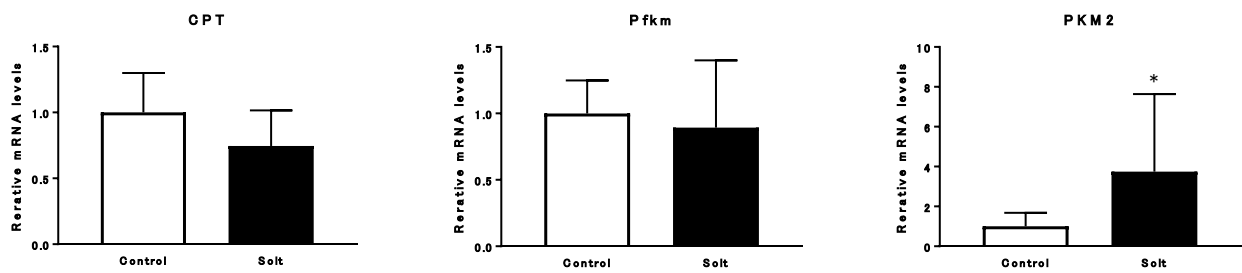


Fig. 4. mRNA expression levels of genes involved in lipid and glucose metabolism in brown adipose tissue

3. 4 皮下脂肪組織

皮下脂肪における SERCA2a, SERCA2b および RYR-1 mRNA 発現量の有意な差は認められなかった (Fig. 5A)。CPT, Pfk m および PKM2 mRNA 発現量に有意な差は認められなかった (Fig. 5B)。

3. 5 骨格筋

骨格筋の代表的な熱産生機構である SERCA1 および Ryr-1 の mRNA 発現量は、両群で有意な差は認められなかった (Fig. 6A)。PGC-1 α および PPAR γ の発現についても両群で有意な差は認められなかった (Fig. 6B)。脂質の β 酸化に關与する CPT と解糖系に關与する Pfk m および PKM2 mRNA 発現量に有意な差は認められなかった (Fig. 6C)。

4. 考 察

本研究では、寒冷下における塩分の生理的な作用について明らかにすることを目的とした。Control 群と比較して NaCl 群は、寒冷刺激による体温の低下が有意に抑制されていた。したがって塩分摂取量の増加は寒冷下における体温の保持に作用することが明らかになった。またこの現象は、寒冷刺激 1 日目には既に認められていたことから、体温の保持作用は寒冷環境に順化して獲得するものではない可能性が考えられた。一方、塩分摂取量の増加に伴って血圧が上昇することが報告されていることから血圧を測定したところ、本研究において両群に有意な差は認められなかった。血圧の測定は明期の室温環境下において実施している。したがって暗期における寒冷下では血圧の変動が異なっている可能性は否定できない。

次に、塩分摂取量の増加が寒冷下における体温低下を抑制することが認められたため、この現象がどのような

機構を介して機能しているのか明らかにすることとし、褐色脂肪、白色脂肪、骨格筋について検討を行った。褐色脂肪組織は寒冷下における熱産生の代表的な臓器である。白色脂肪が余剰なエネルギーをトリアシルグリセリドとして細胞内に貯蔵するのに対し、褐色脂肪は脂肪酸を利用してミトコンドリア内膜に存在する UCP1 を介した脱共役によって熱産生を行う¹⁰⁻¹³。また、UCP1 非依存性の熱産生機構として SERCA2a, SERCA2b および Ryr1 を介する機構が存在する¹³。しかしながら、これらの熱産生に關連する遺伝子の発現は、塩分摂取量を増加させても変化しなかった。また、褐色脂肪組織マーカーである PRDM16, Cidea, PGC-1 α , PPAR γ の発現量にも塩分摂取量の増加による影響は認められなかった。次に脂質代謝および糖代謝に關与する遺伝子の発現を検討したところ PKM2 の発現の亢進が認められた。PKM2 は解糖系においてホスホエノールピルビン酸から ADP へとリン酸を転移することによってピルビン酸を生成させる¹⁴。この反応は解糖系の代謝速度を調節する重要な律速段階の 1 つである。したがって塩分の摂取は褐色脂肪組織の解糖系の反応を亢進させる作用を有する可能性が考えられる。

白色脂肪組織は脂肪酸を貯蔵する脂肪であるが、慢性的な寒冷刺激や運動刺激によって褐色脂肪同様に熱産生に機能するベージュ脂肪に変化する¹³。しかしながら本研究では、白色脂肪組織の熱産生機構、脂質および糖代謝機構に關連する遺伝子発現は両群で差が認められなかった。本研究における塩分の体温低下の抑制は寒冷刺激 1 日目から認められることから、ベージュ化にある程度の寒冷刺激期間を必要とする白色脂肪の関与は低いだろうと推察される。

骨格筋は、褐色脂肪と並び寒冷下における熱産生に

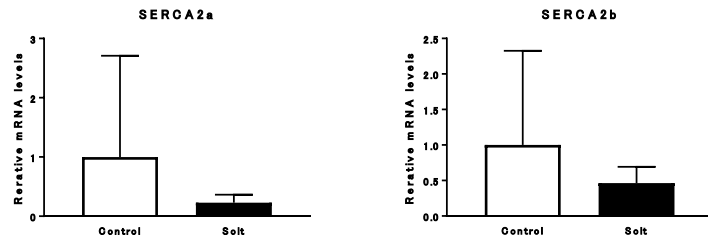
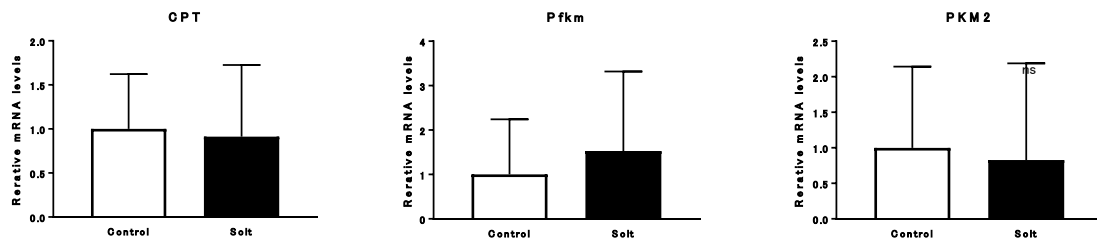
A**B**

Fig. 5. mRNA expression level in subcutaneous adipose tissue
(A) Thermogenesis-related gene, (B) Lipid and glucose metabolism related gene

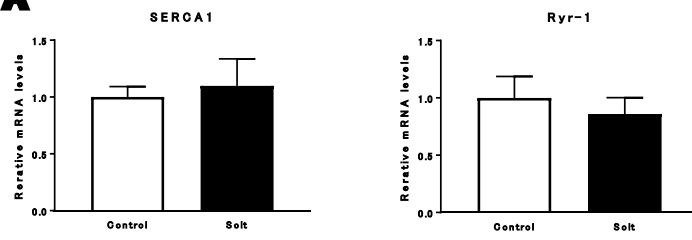
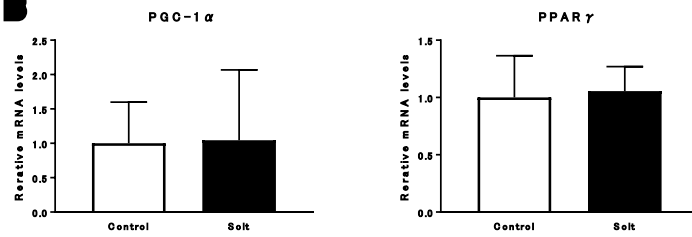
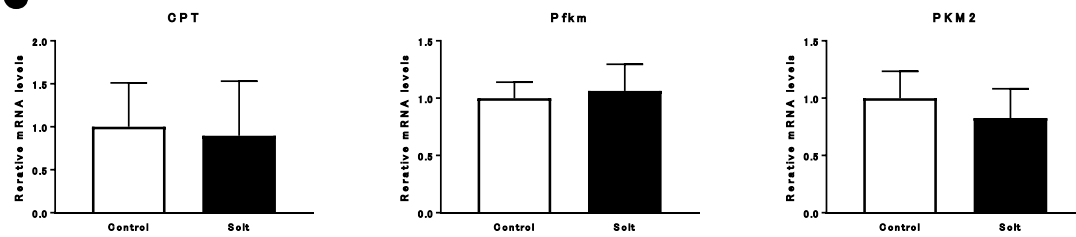
A**B****C**

Fig. 6. mRNA expression level in skeletal muscle tissue

関与する臓器である。骨格筋は筋肉をふるわせて熱を産生する“ふるえ熱産生”だけでなく、SERCA1 を介して“非ふるえ熱産生”によって寒冷下における体温の保持に関与している¹⁵⁻¹⁷⁾。しかしながら本研究では、骨格筋における熱産生機構、脂質および糖代謝機構に関連する遺伝子発現は両群で差が認められなかった。

本研究では、寒冷下における塩分の生理作用について検討した。その結果、塩分摂取の増加は寒冷下における体温の低下の抑制に作用することを明らかにした。また、この作用には褐色脂肪組織の糖代謝経路の亢進が関与している可能性が示唆された。今後は褐色脂肪組織の糖代謝に着目して解析を行う予定である。また血中の代謝産物を解析することで他臓器における関与についても改めて検討していく予定である。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団ならびに関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。

6. 文献

- 1) Uechi K, Asakura K, Masayasu , Sasaki. Within-country variation of salt intake assessed via urinary excretion in Japan: a multilevel analysis in all 47 prefectures. *Hypertens Res.* 2017; 40: 598-605.
- 2) Saeki K, Obayashi K, Tone N, Kurumatani N. Daytime cold exposure and salt intake based on nocturnal urinary sodium excretion: A cross-sectional analysis of the HEIJO-KYO study. *Physiol Behav.* 2015; 1: 300-6.
- 3) Dejima Y, Kim SW, Kashiwazaki H, Suzuki T. A spontaneous increase of salt intake and changes of colonic temperature in mice exposed to cold. *Appetite.* 1991; 16: 169-91.
- 4) Dejima Y, Fukuda S, Ichijoh Y, Takasaka K, Ohtsuka R. Cold-induced salt intake in mice and catecholamine, renin and thermogenesis mechanisms. *Appetite.* 1996; 26: 203-19.
- 5) Celi FS, Le TN, Ni B. Physiology and relevance of human adaptive thermogenesis response. *Trends Endocrinol Metab.* 2015; 26: 238-47.
- 6) Marlatt KL, Ravussin E. Brown Adipose Tissue: an Update on Recent Findings. *Curr Obes Rep.* 2017; 6: 389-396.
- 7) Tansey EA, Johnson CD. Recent advances in thermoregulation. *Adv Physiol Educ.* 2015; 39: 139-48.
- 8) Carillo BA, Beutel A, Mirandola DA, Vidonho AF Jr, Furukawa LN, Casarini D, Campos RR, Dolnikoff MS, Heimann JC, Bergamaschi CT. Differential sympathetic and angiotensinergic responses in rats submitted to low- or high-salt diet. *Regul Pept.* 2007; 140: 5-11.
- 9) Fujita T. Mechanism of salt-sensitive hypertension: focus on adrenal and sympathetic nervous systems. *J Am Soc Nephrol.* 2014; 25: 1148-55.
- 10) Chang SH, Song NJ, Choi JH, Yun UJ, Park KW. Mechanisms underlying UCP1 dependent and independent adipocyte thermogenesis. *Obes Rev.* 2019; 20: 241-251.
- 11) Chouchani ET, Kazak L, Spiegelman BM. New Advances in Adaptive Thermogenesis: UCP1 and Beyond. *Cell Metab.* 2019; 29: 27-37.
- 12) Ježek P, Jabůrek M, Porter RK. Uncoupling mechanism and redox regulation of mitochondrial uncoupling protein 1 (UCP1). *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2019; 1860: 259-269.
- 13) Ikeda K, Kang Q, Yoneshiro T, Camporez JP, Maki H, Homma M, Shinoda K, Chen Y, Lu X, Maretich P, Tajima K, Ajuwon KM, Soga, Kajimura S. UCP1-independent signaling involving SERCA2b-mediated calcium cycling regulates beige fat thermogenesis and systemic glucose homeostasis. *Nat Med.* 2017; 23: 1454-1465.
- 14) Yang W, Lu Z. Pyruvate kinase M2 at a glance. *J Cell Sci.* 2015; 128: 1655-60.
- 15) Autry JM, Thomas DD, Espinoza-Fonseca LM. Sarcoplipin Promotes Uncoupling of the SERCA Ca²⁺ Pump by Inducing a Structural Rearrangement in the Energy-Transduction Domain. *Biochemistry.* 2016; 55: 6083-6086.
- 16) Nowack J, Vetter SG, Stalder G, Painer J, Kral M,

Smith S, Le MH, Jurcevic P, Bieber C, Arnold W, Ruf T. Muscle nonshivering thermogenesis in a feral mammal. *Sci Rep.* 2019; 9: 6378.

17) Blondin DP, Haman F. Shivering and nonshivering thermogenesis in skeletal muscles. *Handb Clin Neurol.* 2018; 156: 153-173.

Effect of Salt Intake on Cold-Induced Body Temperature Decrease

Kazuya Hasegawa

Faculty of Nutritional Sciences, Morioka University

Summary

Salt intake in humans is known to vary depending on the area, and cold regions consume more salt than in warm climate regions. Also in mice, cold stimulation has been reported to increase salt intake, suggesting that cold may be the cause of increased salt intake. However, the mechanism by which salt intake increases due to cold, and the effect of excess salt intake is not well understood. This study, we focused on heat production and aimed to clarify the effect of salt on the decrease in body temperature due to cold. The mice were divided into Control group and NaCl group. Distilled water was given to the Control group and 0.9% NaCl water to the NaCl group with free drinking water. The mice were applied with 6 hours of cold stimulation (5 ° C.) for 6 days. As a result, a decrease in rectal temperature was observed in both groups due to cold stimulation. However, the decrease in rectal temperature was significantly suppressed in the NaCl group compared to the Control group. There was no significant difference in the expression of thermogenesis-related genes and brown fat markers in brown adipose tissue. In addition, the expression level of lipid metabolism related genes did not change, but the expression of glucose metabolism related genes showed a significant increase due to the increase in salt intake. The expression of genes associated with thermogenesis, mitochondrial biogenesis, glucose and lipid metabolism in subcutaneous adipose tissue and skeletal muscle did not change with increasing salt intake. From the above results, it has been suggested that the increase in salt intake has the effect of suppressing the decrease in body temperature under cold conditions. In addition, it has been suggested that this action may be related to the enhancement of brown adipose tissue glucose metabolism. In the future, we plan to analyze by focusing on sugar metabolism of brown adipose tissue.