

肝臓の糖質代謝リズムに関する研究 (1)

～特に摂食時刻に関して～

出口佳奈絵・植田さつき・齋藤亜衣子
佐野 尚美・加藤 秀夫・西田 由香

緒 言

ライフスタイルの多様化する現代では、不規則な食生活や生活習慣の乱れが起こりやすく、心身の健康障害や体力の低下を誘発することが報告されている¹⁾。規則正しい食事の摂取によって発現される生体リズムの中でも、内分泌・代謝リズムや消化吸収のリズムなどが、身体の調和と健康維持に寄与している²⁻⁴⁾。生活環境における時々刻々の変化にすみやかに適応している生体リズムは、体調や健康管理だけでなく、病気の予防や治療にも応用されている⁵⁾。これまでのリズム形成においては、明暗のサイクルで代表される外界の自然変化が重視されていたが、最近の研究により、規則正しい食生活が、生体リズムの発現に関与していることが明らかになってきた⁶⁻⁹⁾。このことを踏まえ、体調と一次予防における健康管理を考えるうえで、いつ、何を、どのように食べるかを念頭にいた時間栄養学の観点から食生活の重要性を明らかにする必要がある。

本研究では、肝臓における栄養成分の代謝動態を明らかにするために、ラットの門脈と肝静脈から同時に採血した。特に肝臓に着目した糖質代謝リズムと摂食時刻がどのような相互関係にあるかを検討した。また、糖質のエネルギー代謝と密接に関係するアディポサイトカインのレプチンとアディポネクチンについても併せて検討した。

方 法

1. 実験動物の飼育条件と採血方法

実験動物は9週齢のWistar系雄ラット40匹を用いた。飼育条件は、暗期を9:00～21:00とした12時間の明暗サイクルの照明条件で、暗期の10:00～16:00に実験食(エネルギー組成比:蛋白質20%、脂肪20%、糖質60%)を摂食させた。約1カ月間飼育した後、8:00、13:00、18:00、23:00に10匹ずつ麻酔下で、門脈と肝静脈から同時に採血した。解剖時には、肝臓および2種類の筋肉(ヒラメ筋:赤筋、長指伸筋:白筋)を採取した。血液と肝臓および筋肉は、分析に用いるまで-80℃で凍結保存した。

2. 測定方法

1) 血糖

酵素法に基づいて、グルコースCII-テストワコー(和光純薬工業)で測定した。

2) 血中インスリン

ELISA法に基づいて、超高感度ラットインスリン測定キット(森永生科学研究所)を用いて測定した。

3) 肝臓グリコーゲン

グリコーゲン以外の肝臓成分を強アルカリで加水分解し、残ったグリコーゲンを塩酸に溶かして

沸騰湯中で加水分解した後、生成されたグルコースをグルコースCII-テストワコー（和光純薬工業）を用いて測定した。

4) 筋肉グリコーゲン

グリコーゲン以外の筋肉成分を強アルカリで加水分解し、残ったグリコーゲンはフェノール硫酸法で測定した。

5) 血中レプチン

EIAサンドイッチ法に基づいて、ラットレプチン測定キット（森永生科学研究所）を用いて測定した。

6) 血中アディポネクチン

ELISA法に基づいて、ラット・アディポネクチンELISAキット（医学生物学研究所）を用いて測定した。

3. 統計処理

実験結果は、平均値±標準誤差で示した。経時変化の比較には一元配置分散分析を行い、有意差を認めた場合にはTukey HSD法による多重比較検定を行った。統計解析には統計用ソフトウェア（PASW Statistics 18 for Windows ; SPSS Japan Inc.）を用い、有意水準を5%未満とした。

結 果

体重の経時変化を図1に示した。いずれのラットも順調に緩やかな成長が認められた。ラットの体重100gあたりで換算した摂取エネルギー量は、図2に示したように、実験期間中ほとんど同程度の摂取量であった。

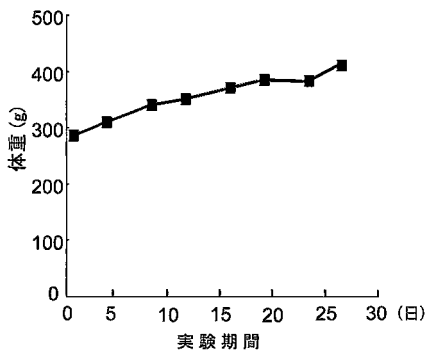


図1 体重の経時変化

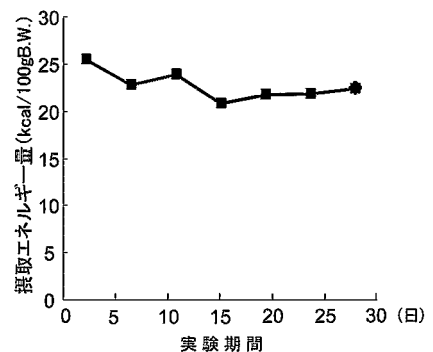


図2 摂取エネルギー量の経時変化

肝臓における糖質代謝

門脈と肝静脈中における血糖の日内変動は図3に示した。門脈中の血糖は、摂食前に低く、摂食により徐々に上昇し、その後減少する日内変動がみられた。一方、肝臓から放出された肝静脈の血糖は、門脈中の血糖と異なり、どの時間帯においても正常範囲内のレベルに調節されていた。

血糖調節における肝臓の機能を明白にするために、肝臓に入る前の門脈血糖から肝静脈血糖を差し

引いた値を図4に示した。摂食3時間後の13時と8時間後の18時は正の値（門脈血よりも肝静脈血の方が低い）であることから、肝臓への糖質取り込みが促進されたと考えられる。逆に、摂食開始から13時間後の23時と空腹時の8時には、血糖値差が負の値（門脈血よりも肝静脈血の方が高く、肝臓で糖が合成されて放出された）を示す日内変動が認められた。

食後の血糖上昇を抑制するインスリンは、摂食によって上昇し、その後低下する典型的な日内変動が認められた（図5）。インスリンの増減を調節する肝臓の役割を調べるために、門脈から肝静脈中のインスリン濃度を差し引いた値を図6に示した。摂食時には肝臓のインスリン処理量は減少し、空腹時には増大するリズムが認められた。このことから、血糖の日内変動は肝臓での糖質代謝だけでなく、血糖を調節するホルモン量のコントロールにも関与していると考えられる。

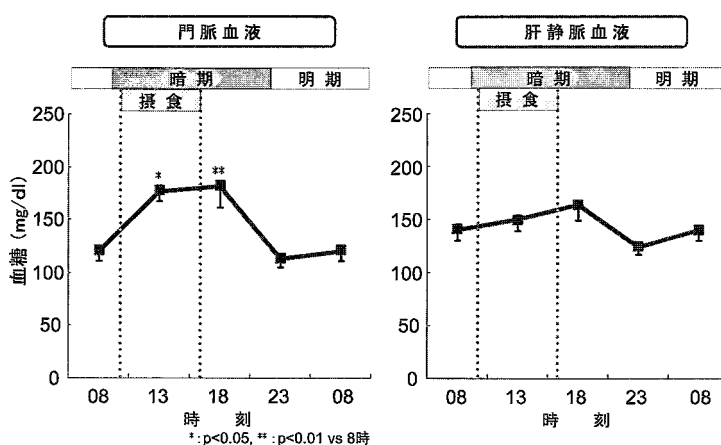


図3 血糖の日内リズムと摂食時刻

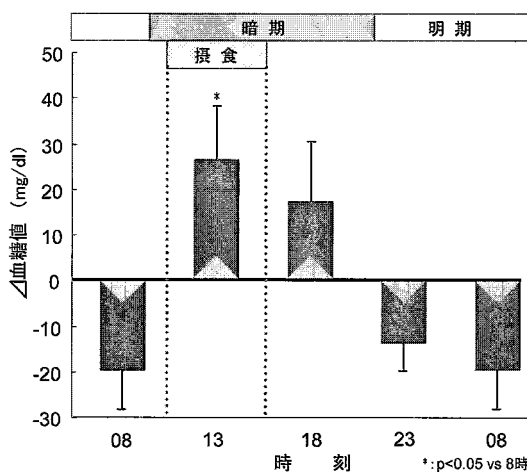


図4 肝臓における糖質代謝リズムと摂食時刻Δ(門脈-肝静脈)

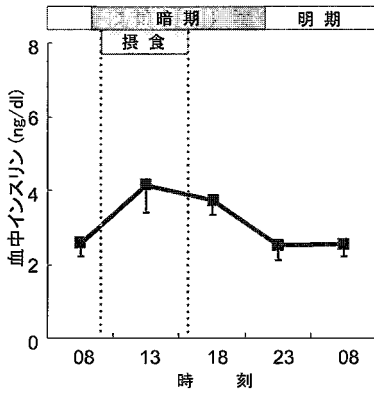


図5 肝静脈血中のインスリンリズムと摂食

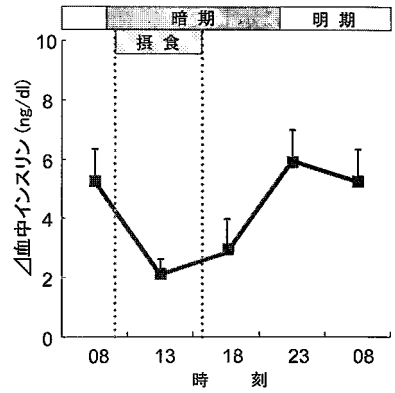


図6 肝臓におけるインスリンの分解リズムと摂食
Δ(門脈-肝静脈)

肝臓および筋肉グリコーゲンの日内リズムと摂食

糖質エネルギーの主な貯蔵庫である肝臓グリコーゲンの日内リズムと摂食との関係を図7に示した。肝臓グリコーゲンは、摂食前の空腹時だけでなく摂食直後も低いままで、摂食の8時間後を経過した18時から23時に上昇し、翌朝8時にかけて低下する日内変動が認められた。肝臓では、摂取した糖質をグリコーゲンとして貯え、血糖が低下するとグリコーゲンを利用して糖新生を行い、血糖を常に一定に維持している。

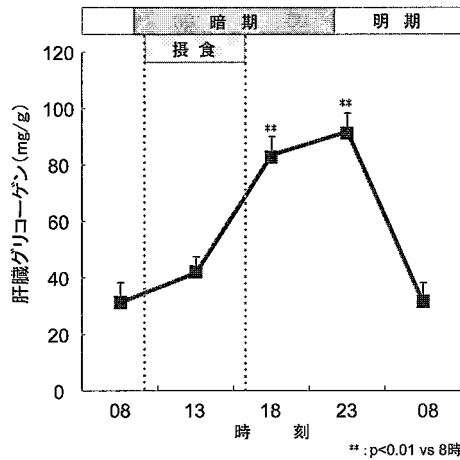


図7 肝臓グリコーゲンの日内リズムと摂食時刻

図8は、赤筋(ヒラメ筋)と白筋(長指伸筋)におけるグリコーゲンの日内リズムと摂食との関係を示した。赤筋グリコーゲンは、摂食3時間後(13時)には高値を示し、その後減少する日内リズムが認められた。一方、白筋グリコーゲンでは、明確な日内変動が認められなかった。このことから、筋肉グリコーゲンの日内変動は筋線維タイプによって異なり、白筋に比べて赤筋の方が摂食に伴う日内リズムが認められた。

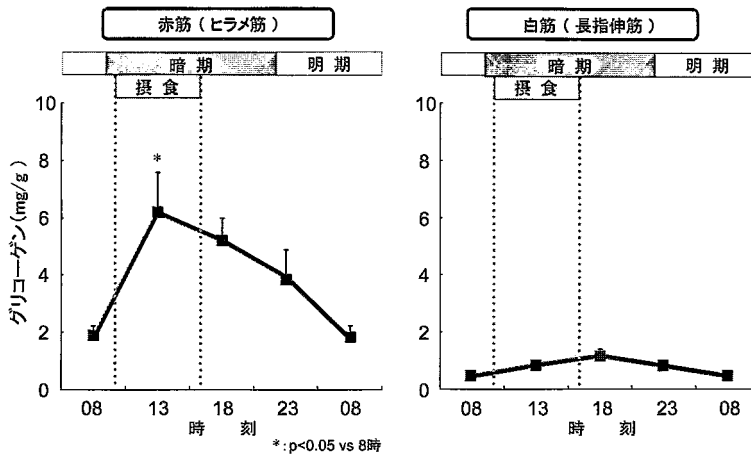


図8 筋肉グリコーゲンの日内リズムと摂食時刻

アディポサイトカインの日内リズムと摂食

摂食調節ホルモンであるレプチンの血中濃度と摂食に関しては図9に示した。摂食前の空腹時（8時）に低く、摂食によって増加する日内リズムが認められた。空腹時には摂食を抑制するレプチンの分泌が低下し、摂食と共にレプチンが増加したと考えられる。つまり、空腹時で血中レプチンが低くなるのは摂食を促し、摂食後に血中レプチンが増加するのは、食べすぎを防ぐことによると考えられる。

図10に示したように、エネルギー代謝を促進する血中アディポネクチンでは、摂食に伴う日内リズムが認められなかった。アディポサイトカインの日内変動の結果から、レプチンは食欲と摂食時のエネルギー代謝に関与し、アディポネクチンは摂食の有無に関係なく一定のレベルを維持していたと考えられる。

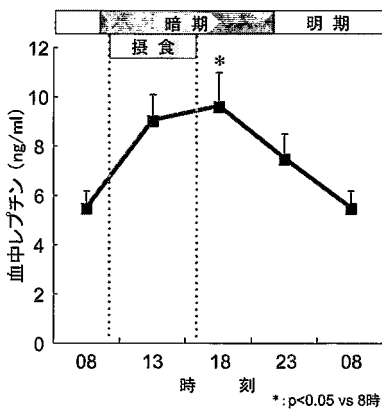


図9 肝静脈血中のレプチンリズムと摂食

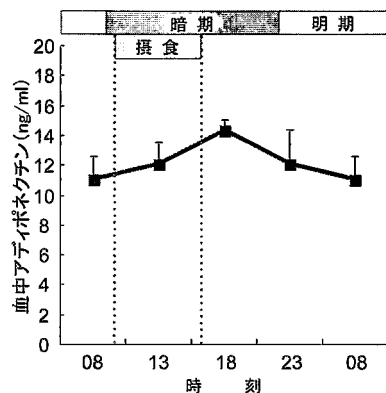


図10 肝静脈血中のアディポネクチンリズムと摂食

考 察

本研究は、肝臓での栄養素の代謝およびその調節をより直接的に観察するために、門脈と肝静脈から同時採血し、肝臓における糖質の代謝リズムと摂食との関係について検討した。門脈の血糖値は摂食時に高値を示したが、肝静脈中の血糖は摂食と空腹に関係なくほぼ一定に保たれていた。このことから、肝臓はグルコースの取り込みと貯蔵あるいは糖新生を連動させて血糖調節に関わっていることが示唆された。

また、肝臓グリコーゲンは摂食開始直後に増加せず、かなり遅れて上昇する日内リズムが認められ、高野ら¹⁰⁾、Leightonら¹¹⁾の報告と一致した。肝臓は、摂取した栄養素を優先的に利用しながら、空腹時に備えてグリコーゲンを蓄積していると考えられる。糖質摂取後の肝臓グリコーゲン合成は、グルコースがまずグルコキナーゼ作用でリン酸化され、グルコース6-リン酸、グルコース1-リン酸を介して行われると長く信じられていた。しかし、グルコースからのグリコーゲン合成において、糖新生系の関与が明らかになった^{12) 13)}。さらに、糖新生系酵素を阻害する3-メルカプトピコリン酸投与で、肝臓グリコーゲン合成がほぼ完全に抑制される¹⁴⁾。このことから、摂取したグルコースはまず肝外組織(筋肉、小腸)で乳酸まで代謝された後、グルコース・乳酸サイクルを介して肝臓に達し、糖新生系を経てグリコーゲンが合成されたと考えられる。

筋肉グリコーゲンの日内リズムと摂食との関係において、2種類の異なる筋線維(赤筋と白筋)で比較検討した。赤筋グリコーゲンは、白筋と異なり摂食に伴った顕著な日内リズムが認められた。収縮速度が遅く持久性のある遅筋線維(赤筋)は、収縮速度が速く瞬発力のある速筋線維(白筋)に比べて糖輸送担体(GLUT4)含量が多く、インスリン感受性も高い¹⁵⁾ことから、摂食後直ちに白筋よりも赤筋への糖の取り込みが促進され、赤筋のグリコーゲン貯蔵が著しく増加したと考えられる。

次に、摂食による肝臓と赤筋グリコーゲンのリズム形成における時間的な差異について検討した。赤筋へのグリコーゲン量のピーク時刻は、摂食開始直後であるのに対し、肝臓グリコーゲン貯蔵のピークは赤筋のピークより約5時間遅い摂食終了時であった。肝臓より早い時刻に摂食後の赤筋グリコーゲンが増加したことから、赤筋は食後の耐糖能に大きく関与していると考えられる。赤筋を増大させる有酸素運動は、糖尿病や肝硬変患者などの耐糖能低下の改善に有効である。肝臓はグルコースを自由に透過させるが、筋肉などの組織では透過性が低いために、グルコースの取り込みが律速段階になる。グルコースの膜透過性はインスリンによって調節されている。これまで、ヒト⁵⁾とラット²⁾の血中副腎皮質ホルモンは活動開始時に高く、インスリン作用を増強させ、その後、摂食と共に低くなる日内リズムが認められている。このことから、副腎皮質ホルモンの日内リズムと筋肉のグリコーゲン代謝に密接な関係があると考えられる。

私共は、肝臓に入る前の門脈と肝臓から放出される肝静脈中の血糖値の差から、肝臓における糖質代謝を追究した。摂食時には肝臓に十分な糖が取り込まれるが、空腹時である23時と8時では肝臓での糖新生によって血糖が調節されていると考えられる。このことは、肝臓グリコーゲンの減少時と一致しており、肝臓グリコーゲン分解によって糖新生が亢進したことを裏付けている。

インスリンには、肝臓グリコーゲンの合成系ならびに解糖系の酵素活性を高め、筋肉と脂肪組織のグルコース利用を促進して血糖値を元のレベルまで低下させる作用がある。また、血中インスリンは、摂食によるインスリンの分泌と、食餌摂取とは無関係に分泌される基礎分泌がある。血糖の調節にインスリン濃度差(門脈血-肝静脈血)が関与しているかを調べるために、肝臓におけるインスリン分解能を検討した。肝臓は空腹時でインスリン分解量が高く、摂食時には低値を示す日内リズムが認め

られた。肝臓は糖質代謝だけでなく、インスリンの分解を調節しながら、末梢組織に作用するインスリン調節機能に重要な役割を果たしていると考えられる。

エネルギー代謝や摂食調節に関わるアディポサイトカインを生体リズムの観点から検討した。視床下部の神経細胞に作用を及ぼして摂食を抑制するレプチンでは、空腹時の低下によって摂食行動を促し、摂食時の上昇によって食べ過ぎをコントロールする日内リズムを示した。このことは、高野ら¹⁰の報告と一致しており、摂食を調節する機能が正常に働いていたと考えられる。

糖質の代謝調節に関わるアディポネクチンでは、摂食による日内変動は認められなかった。これまで、摂食とアディポネクチンの分泌リズムに関する報告はほとんどない。今後は、糖質の摂取を増大させるなど食餌組成の違いによる日内リズムへの影響についても詳細に検討する。

肝臓が血糖調節を司る重要な役割を果たしながら、肝臓および筋肉でのグリコーゲン合成や糖新生の日内リズムを連動させていたことから、今回の知見は、規則正しい食生活の生理的意義に新しい方向性を与えている。肝臓における代謝調節には摂食時刻も大切であり、規則正しい食生活は健康維持に重要である。

今回の研究は、摂食と肝臓での代謝リズムの関係を、いつ、何を食べるかという時間栄養学の観点から食生活と生体リズムの大切さを浮き彫りにした。

要 約

本研究は、通常の摂食時刻が肝臓での糖質代謝リズムにどのような影響を与えるかを検討した。血糖は摂食時刻に関係なく、肝静脈血において一定に維持されていた。食後の耐糖能に重要なグリコーゲン貯蔵は、筋肉が肝臓よりも先行する日内リズムを示した。肝臓に連結する門脈と肝静脈中の血糖値差を算出し、摂食後には糖の利用、空腹時には糖新生が増加する日内変動を示した。肝臓におけるインスリンの分解量は、空腹時に高く、摂食時には低下する日内リズムを示した。これらの結果から、肝臓を中心とした糖質代謝は摂食と関連した日内リズムを形成することを明らかにした。肝臓における糖質の代謝調節には、摂食時刻も大切であり、規則正しい食生活は健康維持に重要である。

文 献

- 1) 加藤秀夫, 森朝美:「早寝・早起き」で始まる食習慣, 児童心理, 61, 97-101 (2007)
- 2) Kato H, et al: Effect of starvation on the circadian adrenocortical rhythm in rats, *Endocrinology*, 106 (3), 918-921 (1980)
- 3) Saito M, Kato H, et al: Parenteral feeding abolishes the circadian adrenocortical rhythm in rats, *Experientia*, 37, 754-755 (1981)
- 4) Kato H, Saito M, Shimazu T: Attenuated blood corticosterone rhythm in rats with jejunal resection, *Life Sciences*, 34, 331-335 (1984)
- 5) 加藤秀夫, 三浦由紀子, 西田由香ほか: からだのリズムと生活習慣病, 日本体質学会誌, 63, 19-21 (2001)
- 6) Kato H, et al: Effects of cyclic and continuous total enteral nutrition on circadian cortical rhythm, *J Clin Biochem Nutr*, 2, 83-89 (1987)

- 7) Saito M, Kato H : Roles of glucocorticoid in circadian changes in the plasma insulin response to food intake in rats, *Biomedical Research*, 5, 323-328 (1987)
- 8) 加藤秀夫, 西村浩治, 斉藤昌之ほか : 経腸栄養投与方法に関する生体リズム学的検討(Ⅱ)～尿排泄と体温の日内リズムに及ぼす投与パターンの影響～, *外科と代謝・栄養*, 21, 79-85 (1987)
- 9) Saito M, Nishimura K, Kato H : modifications of circadian cortisol rhythm by cyclic and continuous total enteral nutrition, *J Nutr Sci Vitaminal*, 35, 639-647 (1989)
- 10) 高野優ほか : 肝臓グリコーゲンの代謝リズムと摂食, *県立広島大学生生活科学部紀要*, 8, 81-87 (2002)
- 11) Leighton B, et al : Circadian rhythm in sensitivity of glucose metabolism to insulin in rat soleus muscle, *Am J Physiol*, 255, E41-45 (1988)
- 12) Davidson AL, et al : Factors underlying significant underestimations of glucokinase activity in crude liver extracts, physiological implications of higher cellular activity, *Arch Biochem Biophys*, 253 (1), 156-167 (1987)
- 13) Pilkis SJ, et al : The sugar phosphate specificity of rat hepatic 6-phosphofructo -2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase, *J Biol Chem*, 260 (12), 7551-7556 (1985)
- 14) McGarry JD, et al : From dietary glucose to liver glycogen, the full circle round, *Annu Rev Nutr*, 7, 51-73 (1987)
- 15) Lillioja S, et al : Skeletal muscle capillary density and fiber type are possible determinants of in vivo insulin resistance in man, *J Clin Invest*, 80, 415-424 (1987)

Abstract

**Study on circadian rhythm of carbohydrate metabolism
in the liver of rats.
~ effect of feeding time ~**

Kanae IDEGUCHI, Satsuki UEDA, Aiko SAITO, Naomi SANO
Hideo KATO, Yuka NISHIDA

Circadian variations in the carbohydrate metabolism of liver, blood glucose responses to food intake were examined in rats kept on a 12-hr light-dark cycle and fed during a restricted time of day (10:00-16:00) for 4 weeks.

Blood glucose levels from a hepatic vein were maintained regardless of food intake to a specific time of day. The muscle glycogen rhythm appears when rats are allowed to eat, and maximal level is found immediately after the feeding time. On the other hand, the hepatic glucose increased slowly to high level.

Difference between blood glucose level in a portal vein and a hepatic vein showed daily changes corresponding to the rhythm of food intake in rats. When the blood glucose level in a portal vein was higher than that in a hepatic vein, the utility of the glucose in the postprandial was increased. In the contrary case, the gluconeogenesis was increased in the fasting time. The circadian rhythm of the insulin degradation in the liver showed increased in the fasting time, and decreased by feeding time.

From these results, carbohydrate metabolism in the liver showed circadian rhythm that was related to the food intake. We concluded that the regular eating habits were important for health maintenance because of a feeding time was also important for the metabolic control of carbohydrate in the liver.