

食事摂取タイミングおよび栄養バランスが
食事中および食事後のエネルギー代謝に及ぼす影響

平良拓也 藤井久雄

キーワード: エネルギー消費量, 肥満, 食事摂取タイミング, 栄養バランス, 時計遺伝子.

The effect of different meal timing and different nutritional balance
on energy metabolism during and after ingestion of meal

Takuya Taira and Hisao Fujii

Abstract

For indicate eating habits and exercise for prevention of obesity, the purpose of this study was to clarify the effect of difference in meal timing and nutritional balance on energy metabolism during and after ingestion of meal.

The purpose of experimental 1 was to compare changes in energy expenditure (EE) at breakfast, lunch, and supper using the human calorimeter (HC) for 24 hours in order to clarify the effect of difference in meal timing on postprandial EE. Thirteen healthy adult men were measured EE using the HC for 24 hours. As a Results, postprandial EE at supper time was significantly higher than that at breakfast time during the first 60 minutes after ingestion ($p<0.05$) and that at lunch time during the first 50 minutes after ingestion ($p<0.05$). However, preprandial EE was also significantly higher at supper time than those at breakfast time and lunch time ($p<0.05$).

The purpose of experimental 2 was to effect of different nutritional balance on EE; compared a normal (N) meal or a high-fat (HF) meal. Seven healthy adult men were measured EE using the HC for 36 hours. Subjects were served a N (P:F:C=16:22:62) meal or a HF (P:F:C=16:53:31) meal on 2 different days at random. As a Results, total EE was tend lower HF meal than N meal ($p=0.12$). EE at breakfast time was significantly lower HF meal than N meal during 120 minutes ($p<0.05$). EE at supper time was significantly lower HF meal than N meal at periods of 18:30-18:40 ($p<0.05$). Respiratory quotient (RQ) and glucose oxidation rate (GOR) at supper time were significantly lower HF meal than N meal during 120 minutes ($p<0.05$).

The purpose of experimental 3 was to effect of endurance training on clock gene expression in rat liver under high-fat fed condition. 30 male Sprague-Dawley rats were divided into three groups; 1) control group (CON), 2) high-fat feeding group (HF), 3) high-fat feeding and endurance training group (HF+Tr). HF+Tr group was endurance trained, with a constant workload of 90 min/day, 5 days/week, with a running speed of 20 m/min. After 8 weeks, rats were sacrificed to obtain liver at following ZT2 or 14. Body weight and visceral fat were significantly increased HF group than other group ($p<0.05$). The gene expression of *Bmal1* in liver at ZT2 was significantly lower HF group than other group ($p<0.05$).

These results suggest that irregular eating habits maybe contribute to obesity.

Keywords: energy expenditure, obesity, meal timing, nutritional balance, clock gene.

1. 緒言

H19年度国民健康・栄養調査結果の概要³⁾によると、男性の肥満者は年々増加している一方で、エネルギー摂取量 (Energy Intake: EI)は減少傾向にある³⁾と報告している。また、朝食欠食や遅い時刻の夕食、脂肪エネルギー比率増加などの食生活習慣の乱れが報告されている。近年では、朝食欠食⁴⁾やそれに伴い夜食摂取をする夜型生活⁵⁾が食事誘発性体熱産生(Diet-Induced Thermogenesis: DIT)を低下させると報告しており、それによる EE 減少が体重増加の一因となっている可能性がある。

DIT は自律神経と関連しており、交感神経系の主な神経伝達物質であるノルエピネフリンをプロプラノロール(β -アドレナリン受容体遮断薬)で薬理的にブロックすると DIT が低下したことから、DIT は自律神経系を介してエネルギー消費量(Energy Expenditure: EE)を亢進することが明らかとなっている⁶⁾。一方、自律神経系活動には概日リズムが存在するため⁷⁾、朝食、昼食および夕食のような食事摂取タイミングは自律神経系の活動度により DIT に影響を及ぼす可能性が考えられる。

また、DIT の熱産生の度合いは摂取した栄養素により異

なり、タンパク質で摂取エネルギーの 20-30%と最も高く、糖質で 5-10%、脂質で 0-3%程度であると考えられている⁸⁾。これらより、高脂肪食摂取が EE を減少させ肥満の一因となっている可能性がある。

ところで、体温や摂食行動、睡眠覚醒サイクル、エネルギー代謝などの生理学的現象は内生的な体内時計のコントロール下にある。体内時計は、視床下部の視交叉上核に位置する主時計により概日プログラムを組織化している⁹⁾。

主時計の一つである CLOCK の遺伝子を変異させたマウスは、摂食行動の日内リズムをととも弱め、食欲過剰や肥満となり、高脂血症や高レプチン血症、脂肪肝、高血糖、高インスリン血症などのメタボリックシンドロームを発症した¹⁰⁾。体内時計は哺乳類のエネルギーバランスにおいて重要な役割を果たしていることを示唆している¹⁰⁾。さらに、マウスに高脂肪食を継続摂取させると、時計遺伝子発現を変化させたと報告されている¹¹⁾。一方、Froy et al.¹²⁾は、マウスに α MUPA という遺伝子を入れたところ、マウスの寿命が延び、時計遺伝子発現の振幅が大きくなったと報告している。

これらより、高脂肪食摂取による時計遺伝子発現リズムの減衰、乱れが肥満の一因になっている可能性がある。時計遺伝子のリズムを回復もしくは増強することは肥満やメタボリックシンドロームの予防が期待出来ると考えられる。

近年では、ミトコンドリア系酵素の発現調節に関する研究が進み、PGC-1 α と呼ばれる核内タンパク質がミトコンドリア新生において重要な役割を果たしていると報告されている¹³⁾。この PGC-1 α は様々な転写因子の活性を制御することにより、多彩な生物学的作用を発揮すると報告されているが、中でも生体のエネルギー代謝の制御における作用が注目されている¹³⁾。

近年、この PGC-1 α に日内リズムの存在が報告された¹⁴⁾。筋肉細胞に PGC-1 α を入れると BMAL1 が 4 倍も増加し、PGC-1 α の遺伝子を除去したマウスでは代謝や体温のリズムが失われ、PGC-1 α は ROR α に結合することにより *Bmal1* の発現を調整していると報告された¹⁴⁾。さらに PGC-1 α は持久性トレーニングにより、骨格筋において発現量が増加すると報告されている¹⁵⁾。また、PGC-1 α や転写因子 PPAR δ の過剰発現マウスでは遅筋線維が著しく増加して持久力が増強するとともに、脂肪酸の β -酸化能も高くなるため、高脂肪食誘発性の肥満に耐性を示すと報告されている¹⁶⁾。従って、持久性トレーニングによる PGC-1 α の増加が時計遺伝子発現を誘発し、リズムの是正や増強することで肥満予防につながる可能性が考えられる。

II. 研究の目的

本研究では生理学的手法および分子生物学的手法を用いて、次の3つの試験を行い、食事摂取タイミングおよび栄養バランスが食事中および食事後のエネルギー代謝に及ぼす影響を比較検討し、肥満予防のための食生活習慣ならびに運動処方を示すことを目的とした。

試験 1

ヒューマンカロリーメーターを用いた朝食、昼食および夕食の食後におけるエネルギー消費量の推移の比較検討

試験 1 では、DIT と自律神経系活動の関連に着目し、HC を用いて、24 時間にわたり朝食、昼食および夕食の EE の推移を比較検討し、朝食、昼食および夕食のような異なる食事摂取タイミングにより、食後の EE にどのような影響を与えるかを明らかにすることを目的とした。

試験 2

異なる栄養バランスの食事がエネルギー消費量に及ぼす影響

試験 2 では、DIT と脂肪摂取時の熱産生との関連に着目し、HC を用いて、実験的に 1 日 3 食全てを高脂肪食として負荷し、食事の栄養バランスが食事中および食後の EE に及ぼす影響について比較検討することを目的とした。

試験 3

持久性トレーニングが高脂肪食摂取ラットの肝臓の時計遺伝子発現に及ぼす影響

試験 3 では、高脂肪食摂取による体内時計の乱れと持久性トレーニングに着目し、高脂肪食摂取しているラットに持久性トレーニングを行わせ、肝臓の時計遺伝子発現に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。

III. 方法

試験 1

1. 被験者

Table.1 に被験者の身体的特徴を示した。本試験の被験者は、21.0 \pm 0.3 歳の健常成人男性 13 名である。

Table. 1 Physical characteristics of the subjects in Experimental 1

	n=13
Age(year)	21.0 \pm 0.3
Height(cm)	173.2 \pm 1.8
Body Weight(kg)	67.2 \pm 1.6
BMI(kg/m ²) [†]	22.4 \pm 0.2
Body Fat(%)	14.8 \pm 0.9
Body Fat Mass(kg)	9.9 \pm 0.5
Lean Body Mass(kg)	57.8 \pm 2.0
[†] BMI=Body Mass Index	mean \pm SE

本研究は仙台大学倫理委員会の承認のもとに行われ、ヘルシンキ宣言の主旨に従い、被験者に対して本試験への参加にあたり十分な説明を行い、本人の自由意志による文書同意が得られたものを試験に参加させた。

2. 被験者管理

HC 入室当日における朝食から規定食を提供し、HC による測定も含めて翌日の昼食までの計5回すべての食事内容を同一とし、被験者の食事管理を行った。規定食は日本人の食事摂取基準(2005 年度版)¹⁷⁾を基に、被験者と同年代の一般的な健康成人男性の値となるように設定した。本試験で使用した規定食は、調理による食事間の誤差を小さくするため冷凍食品を中心とした食事とし、1食当たり828kcal(P:F:C=18:26:55)、1日のEIは2,484kcalとした。全ての被験者に対し同一のものを提供した。また規定食以外は水のみ摂取可能とし自由飲水とした。

3. 試験デザイン

各被験者には、実験前日よりカフェイン、香辛料、油の多い食事、運動を避けることを依頼した。HC 入室当日は規定食を朝食 7:00、昼食 13:00 に自宅にて食べてもらった。被験者は 16:00 に研究室に入室し、身長、血圧、体温のほか、体重、体脂肪率、体脂肪量および除脂肪体重は高精度体成分分析装置(Body composition Analyzer In Body3.2, バイオスペース社、韓国)を用いて測定した。17:00 に HC 室に入室し、約 24 時間連続して滞在させた。試験中の EI と EE のバランスを整えるために、食事摂取基準の「身体活動レベル別の活動内容と活動時間の代表例」¹⁷⁾を参考にして HC 内の活動を設定した。1日3回の食事(夕食時; 18:00、朝食時; 7:00、昼食時; 13:00)と睡眠(23:00-翌朝 6:30)、エルゴメーター(エアロバイク 75XL II, コンビウエルネス^株)での運動(9:30 と 15:30 から 50% $\dot{V}O_2$ max の運動強度で1時間ずつ)については決められた時間に行わせ、それ以外は座位安静とした。それぞれの食事時間は20分で食べ終わるように指示をした。被験者の運動強度は、事前にエアロバイク 75XL II のプログラム「体力テスト」にて、測定中の脈拍推移から推定の最大酸素摂取量($\dot{V}O_2$ max)を測定し、その結果を基に 50% $\dot{V}O_2$ max の強度となるように設定した。

4. 測定項目

1) エネルギー代謝測定

エネルギー代謝測定には、HC(FHC-15S, 富士医科産業^株, 千葉)を用いた。

本試験では、被験者のストレスを考慮し座位安静を保つことが出来る各食事開始から 120 分間を食後エネルギー代謝の測定時間とした。食前 EE は、食事摂取 20 分前から 10 分間の座位安静状態の EE の平均値とした。

2) 心拍数

被験者には心拍送信機(フクダ電子^株, 東京)を正電極は左下位肋骨に、負電極は右鎖骨下に、アースを右下位肋骨に装着させ、近似肢誘導とした。心拍ゆらぎリアルタイム解析システム MemCalc/Tarawa^(株)ジー・エム・エス、東京)は取り込んだ ECG 波形から周波数解析により心拍ゆらぎの様相を解析・表示し、自律神経系活動の指標とされる LF(Low Frequency, 0.04~0.15Hz), HF(High Frequency, 0.15~0.40Hz)など、各周波数帯のパワーの絶対値をリアルタイムに示す。この解析から心拍数と同時に交感神経系活動の指標として LF/HF を、副交感神経系活動の指標として HF を得た。

5. 統計処理

データは平均値±標準誤差で表わした。統計処理には SPSS ver. 17.0 for Windows (エスピーエスエス^株, 東京)を用いた。時系列データでは食事摂取タイミング、経過時間を要因とした反復測定による二元配置分散分析を行い、有意な交互作用が認められた場合には Bonferroni の方法による多重比較検定を行った。統計的有意水準は危険率 5% 未満とした。

試験 2

1. 被験者の身体的特性

Table.2 に被験者の身体的特徴を示した。本試験の被験者は、21.6±0.6 歳の健康成人男性 7 名である。

本研究は仙台大学倫理委員会の承認のもとに行われ、ヘルシンキ宣言の主旨に従い、被験者に対して本試験への参加にあたり十分な説明を行い、本人の自由意志による文書同意が得られた者を試験に参加させた。

Table 2. Physical characteristics of the subjects in Experimental 2

	n=7	
	Control	High Fat
Age(year)	21.6 ± 0.6	
Height(cm)	170.5 ± 2.7	
Body Weight(kg)	65.7 ± 1.7	66.6 ± 1.5
BMI(kg/m ²) [†]	22.6 ± 0.2	22.9 ± 0.3
Body Fat(%)	13.4 ± 1.4	14.4 ± 1.0
Body Fat Mass(kg)	8.7 ± 0.7	9.5 ± 0.5
Lean Body Mass(kg)	56.9 ± 2.3	57.1 ± 2.0

[†] BMI=Body Mass Index

mean ± S.E.

2. 被験者管理

被験者の食事および生活習慣は試験 1 に準じた。規定食は 1 食当たり約 900kcal とし 1 日の EI は 2,700kcal とした。HC 入室 2 日目の朝食から通常(N; P:F:C=16:22:62)食または高脂肪(HF; P:F:C=16:53:31)食をランダムに負荷するクロスオーバー試験とした。HF 食は食事摂取基準¹⁷⁾で推奨されている脂肪エネルギー比率よりも上回る値に設定をした。全ての被験者に対し同一のものを提供した。また規定食以外は水のみ摂取可能とし自由飲水とした。

3. 試験デザイン

17:00 に HC 室に入室し、翌々日 8:00 までの約 36 時間連続して滞在させた。HC 入室前および入室後の活動は試験 1 に準じた。

4. 測定項目

測定項目は試験 1 に準じた。試験 2 では、得られた酸素摂取量と二酸化炭素排出量からブドウ糖酸化率(GOR)と脂肪酸酸化率(LOR)を算出した。GOR と LOR は以下の式を用いて算出した¹⁸⁾。

$$\text{GOR}=4.571 \times \dot{V}\text{CO}_2 - 3.231 \times \dot{V}\text{O}_2 - 2.826 \times \text{Nu}$$

$$\text{LOR}=1.689 \times (\dot{V}\text{O}_2 - \dot{V}\text{CO}_2) - 1.943 \times \text{Nu}$$

*Nu(尿中尿素窒素排泄量: g/min)=0.008 と仮定して算出

5. 統計処理

データは平均値±標準誤差で表わした。統計処理には SPSS ver. 17.0 for Windows (エスピーエスエス(株), 東京)を用いた。TEE および被験者の身体的特徴の比較では対応のある t 検定を行った。時系列データでは食事経過時間を要因とした反復測定による二元配置分散分析を行い、有意な交互作用が認められた場合には Bonferroni の方法による多重比較検定を行った。統計的有意水準は危険率 5%未満とした。

試験 3

1. 実験動物と試験デザイン

本実験では、体重が 90-110g の 4 週齢の Sprague-Dawley(SD)系雄ラット(日本クレア, 東京)30 匹を用いた。ラットは、室温 23°C、湿度 50%、9:00 から 21:00 を暗期に、21:00 から 9:00 を明期に設定した飼育室において、個別に飼育が可能なステンレス製ゲージを使用し、1 匹ずつ飼育した。予備飼育期間は 1 週間とし、飼料として市販の粉末飼料(AIN93G: オリエンタル酵母工業)と飲料として水

道水を自由摂取させた。

予備飼育終了後、ラットを 1)コントロール群(CON 群: n=10)、2)高脂肪食摂取群(HF 群: n=10)、3)高脂肪食摂取+持久性トレーニング群(HF+Tr 群: n=10)に、体重の平均値が等しくなるように 3 群に分けた。CON 群には予備飼育に引き続き AIN-93G を与えた。HF 群および HF+Tr 群には、60%の高脂肪食(HFD60: オリエンタル酵母工業)を与えた。ラットはそれぞれの飼料を ZT0 および 12 に 2 時間ずつのみ自由摂取させる 1 日 2 食の meal-fed 法を用いた。それぞれの飼料の残量から EI を求め、各群の EI が等しくなるよう飼料を与える pair-fed 法を用いた。飲料は水道水を用い、自由摂取とした。なお、体重は 2 日に 1 回の頻度で測定した。

HF+Tr 群のラットに 5 週齢より ZT10 から、週 5 回、1 日 90 分間の、トレッドミルによる持久性トレーニングを行わせた。尚、運動強度は 16m/min から徐々に負荷値を上げ、トレーニング開始 5 週目から 20m/min の負荷値で実験終了まで負荷させた。8 週間の持久性トレーニング終了後、運動の一過性の影響を除くため 26 時間安静後、ラットは ZT14 および 2 の 2 ポイントにおいて、体重 100g あたり 5mg のペントバルミタルナトリウム水溶液を腹腔内注射することによる完全麻酔下において、それぞれ一匹ずつ解剖された。解剖時には心臓から血液を脱血した後、肝臓を摘出し、液体窒素を用いてフリーズクランプ法により直ちに凍結させ、分析まで -80°C で保存した。なお、肝臓を摘出し、凍結するまでに要する時間は 30 秒以下であった。凍結した肝臓は液体窒素で冷やしたステンレス製鉢の中で粉末にし、そこから約 50mg を採取した。副腎丸脂肪、腹膜後脂肪、および腸間膜脂肪を摘出し、3 つの合計脂肪量を電子天秤で測定し、腹腔内脂肪量とした。なおマウスの飼育・維持、実験上の取り扱いについては、仙台大学動物実験倫理委員会の承認を得て行われた。

2. Total RNA 抽出とリアルタイム RT-PCR

Total RNA は ISOGEN(株)ニッポンジーン、東京)を用いて抽出した。得られた Total RNA のうち 2μg を High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(Applied Biosystems, Foster City, California, USA)を用いて逆転写反応(Reverse Transcription)に用いた。遺伝子発現は Applied Biosystems StepOne™ Real Time PCR System(Applied Biosystems, Foster City, California, USA)を用いて、Real-Time PCR 法により解析した。試薬には 2XSYBR Green Master Mix(Applied Biosystems, Foster City, California, USA)を用いた。解析対象遺伝子は *Bmal1*, *Clock* および *Per2* とした。GAPDH を内因性コントロール遺伝子とし、その遺伝子発現から解析対象

遺伝子発現を相対的に標準化した。得られたデータは Comparative Ct($\Delta\Delta C_t$)法を用いて解析した。

3. 統計処理

データは平均値 \pm 標準誤差で表わした。統計処理には SPSS ver. 17.0 for Windows (エスピーエスエス(株),東京)を用いた。時系列データではグループ、時間を要因とした対応のない二元配置分散分析を行い、有意な交互作用が認められた場合には Bonferroni の方法による多重比較検定を行った。腹腔内脂肪量の比較では対応のない一元配置分散分析を行い、その後の検定には Tukey の方法を用いた。統計的有意水準は危険率5%未満とした。

IV. 結果

試験 1

1. エネルギー消費量

1日(17:30-翌 17:29)の EE は $2,842\pm 283\text{kcal/d}$ であった。Fig.1A に食後 120 分間の EE の推移を示した。二元配置分散分析の結果、有意な交互作用が認められたため各要因の単純主効果を検討した。夕食時の食後 EE は、昼食時と比較して食後 50 分まで有意に高い値を推移し($p<0.05$)、朝食時と比較して食後 60 分まで有意に高い値を推移した($p<0.05$)。しかしながら、夕食時の食前 EE ($1.42\pm 0.04\text{kcal/min}$)は、朝食時($1.23\pm 0.05\text{kcal/min}$)と昼食時($1.26\pm 0.03\text{kcal/min}$)と比較して有意に高い値を示した($p<0.05$)。

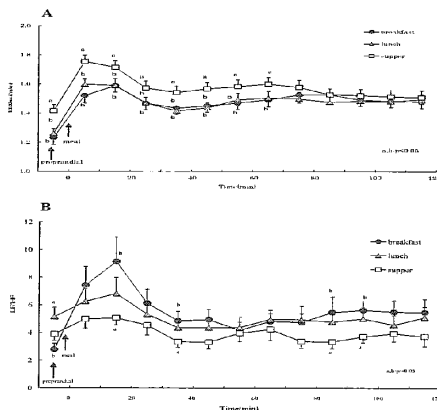


Fig. 1 Time course of pre- and post-prandial energy expenditure and LF/HF over 120 minutes at different meal timing.

The data are expressed as mean \pm S.E. Each point represents the mean of a 10-min period of continuous measurement. Time effect and timing effect were calculated by repeated ANOVA during 120 minutes. Different alphabets indicate a significant difference between timing at same time, $p<0.05$.

2. 自律神経系活動および心拍数

Fig.1B に食後 120 分間の LF/HF(交感神経系活動の指

標)の推移を示した。二元配置分散分析の結果、有意な交互作用が認められたため各要因の単純主効果を検討した。昼食時の食前 LF/HF は、朝食時と比較して有意に高い値を示した($p<0.05$)。食事摂取後は、夕食時の食後 LF/HF が他の食事摂取タイミングと比較して低く推移し、10,30,80-90 分において朝食時に対して有意に低い値を示した($p<0.05$)。

一方、朝食時の食前 HF(副交感神経系活動の指標)は他の食事摂取タイミングと比較して有意に高い値を示した($p<0.05$)。朝食時の食後 HF は夕食時と比較して食事摂取 20 分後に有意に低い値を示した($p<0.05$)。夕食時の食後 HF は他の食事と比較して高く推移する傾向を示した。

夕食時の食後心拍数は他の食事と比較して有意に低く推移をした($p<0.05$)。朝食時と昼食時の食後心拍数はほぼ同様に推移した。

試験 2

1. 1日のエネルギー消費量

Fig.2A に体重当たりの 1日(6:30-翌 6:29)の EE(kcal/kg BW/d)を示した。N 食の TEE($44.1\pm 3.2\text{ kcal/kg BW/d}$)は、HF 食($43.2\pm 2.2\text{ kcal/kg BW/d}$)に比べて高い傾向がみられた($p=0.12$)。

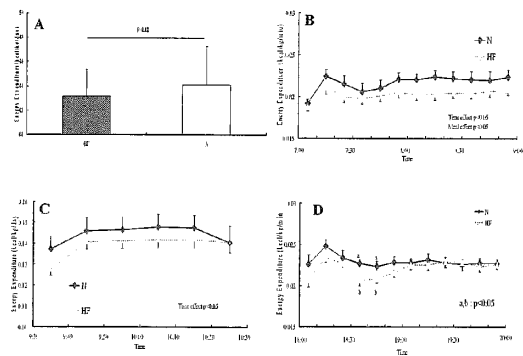


Fig.2 Compare a N meal or a HF meal on Total Energy Expenditure (A) and time course of EE at breakfast time (B; 7:00-9:00), morning exercise (C; 9:30-10:29) and supper time (18:00-20:00)

The data are expressed as mean \pm S.E. Each point represents the mean of 24h period of continuous measurement (A). Each point represents the mean of a 10-min period of continuous measurement (B, C and D). Time effect and meal effect were calculated by repeated ANOVA during 120 minutes. Different alphabets indicate a significant difference between timing at same time, $p<0.05$.

2. 各時間帯のエネルギー代謝およびエネルギー基質動態

Fig.2B に EE の朝食時 120 分間(7:00-9:00)の推移を示した。二元配置分散分析の結果、両要因に有意な主効果が認められた。多重比較検定の結果、HF 食の EE が N 食と比較して 120 分間有意に低値で推移した($p<0.05$)。一方、RQ, GOR, LOR では二元配置分散分析の結果、時間にこの

み有意な主効果が認められた($p<0.05$)

Fig.2CにEEの朝運動時60分間の推移を示した。全てのパラメーターにおいて、二元配置分散分析の結果、時間にも有意な主効果が認められた($p<0.05$)。

Fig.2DにEEの夕食時120分間(18:00-20:00)の推移をそれぞれ示した。EEにおいて二元配置分散分析の結果、有意な交互作用が認められたため各要因の単純主効果を検討した。HF食のEEはN食と比較して18:30と18:40に有意に低値を示した($p<0.05$)。一方、RQ、GORでは二元配置分散分析の結果、両要因に有意な主効果が認められた。HF食がN食と比較して120分間有意に低値で推移した($p<0.05$)。LORでは二元配置分散分析の結果、両要因に有意な主効果が認められた。HF食がN食と比較して120分間有意に高値で推移した($p<0.05$)。

試験3

1. 体重、腹腔内脂肪量および累積EI

体重の推移を二元配置分散分析した結果、有意な交互作用が認められたため各要因の単純主効果を検討した。HF群が他の2群と比較して6週齢から実験終了まで有意な増加を示した($p<0.05$)。HF群の腹腔内脂肪量は他の2群と比較して有意な増加を示した($p<0.001$)。一方、累積EIには3群間に有意な差は認められなかった。

2. 肝臓における時計遺伝子発現

Fig.4に肝臓における*Bmal1*の遺伝子発現を示した。二元配置分散分析の結果、有意な交互作用が認められたため各要因の単純主効果を検討した。ZT2においてHF群がCON群と比較して低値を示した($p<0.05$)。時間の要因においてはZT2と比較してZT14の遺伝子発現は3群全てにおいて有意に低値を示した($p<0.001$)。

肝臓における*Clock*および*Per2*遺伝子発現を、二元配置分散分析した結果、時間にも有意な主効果が認められた($p<0.001$)。

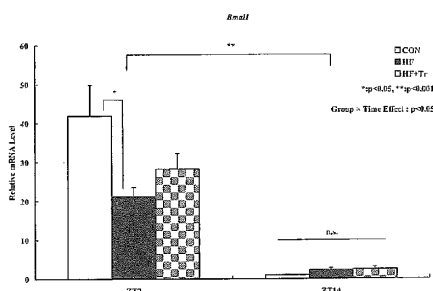


Fig. 3 The effect of High-fat feeding and endurance training on *Bmal1* in liver. The data are expressed as mean \pm S.E.; $n=5$ for each time point in each group. Time effect and group effect were calculated by non-repeated ANOVA. *, $p<0.05$; **, $p<0.001$

V. 考察

試験1

本試験では、食前EEは夕食・昼食・朝食の順で高く示された。EEには日内リズムがある¹⁹⁾ことが報告されている。Tataranni et al.²⁰⁾は、微小な活動(spontaneous physical activity: SPA)を排除した絶食状態では安静時代謝率は日内リズムが見られないと報告しており、食事摂取が日内リズムを引き起こす一要因であると考えられる。永井ら⁷⁾は、朝食欠食によりEEにリズムがみられなかったこと、朝食摂取により午前中のEEが高いレベルで維持されたために、朝食後のEEと比較して、昼食後はさらにEEが上昇すると報告している。本試験でも、朝食摂取や昼食摂取によるEEの亢進が、夕食前安静時EEを高めた可能性が示され、食事摂取が朝低く夕方にかけて高くなっていくようなEEの日内リズムの一要因である事が示唆された。

本試験では、夕食時の食後EEは食後70分以降では昼食と朝食と同様に推移した。また、夕食時の交感神経系活動(LF/HF)ならびに心拍数は他のタイミングと比較して低く推移していたこと、副交感神経系活動(HF)はやや高く推移していたことから、夕食摂取後のEEは低下していくと推察される。一方、朝食後のLF/HFや心拍数が夕食時と比較して高いことから、朝食摂取後のEEは上昇していくと推察される。朝食の果たす役割の一つとして、低い状態にあるエネルギー代謝と交感神経系活動を亢進する可能性が考えられる。朝食摂取によるEEの亢進はわずかであるが、1日あたり約100kcal前後の微量なEIの増加が体重増加をもたらす報告²¹⁾からも、これは、肥満予防のために習慣的な朝食の摂取を指導する際の貴重なデータであると考えられる。

試験2

本試験ではHF食の体重あたりTEE(kcal/kgBW/d)は、N食と比較して低下傾向がみられた。Hill et al.²²⁾は、食事構成の変化がEEに与える影響について8名の成人を対象に炭水化物のエネルギー比率が60%のHigh-Carbohydrate食(HC食)と脂質のエネルギー比率が60%のHigh-Fat食(HF食)を7日間ずつクロスオーバーで負荷し、さらに6名は脂質のエネルギー比率が45%のMix食を追加で負荷し、それぞれの負荷開始3日目と7日目にHCを用いてエネルギー代謝について検討したところ、TEEには差がみられなかったが、酸化基質に影響を与えたことを報告している。また、Westterp et al.²³⁾は、高タンパク質と炭水化物の組み合わせの食事(HP/C食; PFC=30:10:60)と高脂肪食(HF食; PFC=30:60:10)をそれぞれ3食ずつ負荷し、24時間にわたりHCと比較したところ、DITはHP/C食が有意に高かった。

が、HP/C 食の TEE は HF 食と比較して高い傾向がみられたと報告している。

これらの先行研究^{22,23)}では、HC 内での活動は低かった、一方、試験 2 では HC 内での 1 日の身体活動レベル(PAL)を 1.75(ふつう)に設定して、高脂肪食摂取がエネルギー代謝について検討したにもかかわらず、高脂肪食摂取により TEE の低下傾向がみられ、一致した結果が得られた。N 食および HF 食それぞれの体重当たり TEE は 44.1±3.2 kcal/kg BW/d, 43.2±2.2 kcal/kg BW/d であった。これらをそれぞれの平均体重(N 食;65.7kg, HF 食;66.6kg)で乗ずると HF 食の TEE は約 65kcal 低下していると考えられる。1 日あたり約 100kcal 前後の微量な EI の増加が体重増加をもたらす報告²¹⁾からも、これは、習慣的な高脂肪食摂取は肥満につながる可能性が考えられる。また、身体活動レベルが 1.75(ふつう)の生活を送っていても TEE の低下傾向がみられたことは、身体活動量の減少による EE 減少だけでなく、食事の栄養素構成が EE 減少に大きく寄与している可能性を示唆している。

また、1 日の DIT は高脂肪食摂取により低く抑えられたと共に報告している^{22,23)}。本試験では、DIT は影響する要因の除去や評価方法が大変難しいこと²⁴⁾から、高脂肪食摂取の影響を EE により評価した。朝食時の EE は、HF 群が N 群と比較して有意な低下を示しており、朝食のみであるが一致した結果が得られた。さらに、高脂肪食摂取 7 日目には酸化基質の変化がみられ、脂肪酸酸化率が他の 2 群比べて高かったことを報告している。本試験では、夕食時において HF 食の RQ および GOR が有意に低く、一方で LOR が有意に高値を示しており、一致した結果が得られた。

Westerterp²⁵⁾は、24 時間の DIT とともに満腹感について調査したところ、高タンパク質/炭水化物食は DIT とともに高い満腹感を示し、満腹感と DIT は相関関係があると報告している。また、高脂肪食と脂肪を少なくした食事をそれぞれ 6 ヶ月間負荷させ追跡調査したところ、高脂肪食摂取群の体重および EI 量に有意な増加がみられた。脂質は満腹感が低い一方で、エネルギー密度が高いため量とそれに伴う EI の増加により体重増加になると推察される。

試験 3

8 週間の高脂肪食摂取により、HF 群は他の 2 群と比較して 6 週齢より有意に体重が増加した。その一方で累積 EI には差がみられなかったことから、脂肪エネルギー比率の高い食事の過剰摂取による影響である可能性が示唆された。さらに、腹腔内脂肪量は HF 群が他の 2 群と比較して有意に増加した。そのため、CON 群と比較して考えると、EI および身体活動量は同量であるため、EE が減少した可能

性が考えられる。

一方で、HF+Tr 群は高脂肪食を摂取したにもかかわらず、CON 群と比較して体重ならびに腹腔内脂肪量変化しなかった。そのため持久性トレーニング効果であると推察される。

ラットを用いた研究により、運動が内臓脂肪蓄積を抑制することが知られている²⁶⁾。本試験においても内臓脂肪蓄積が HF+Tr 群が HF 群と比較して有意に抑制されたため、一致する結果となった。

Clock および Per2 の肝臓における遺伝子発現は、統計学的に差はみられなかったが、HF 群の遺伝子発現は他の 2 群と比較して低下傾向がみられた。Bmal1 の肝臓における遺伝子発現は ZT2 において HF 群の遺伝子発現が CON 群と比較して有意な低下がみられた。一方、HF+Tr 群は CON 群と比較して低下傾向にとどまり、HF 食摂取による肝臓の時計遺伝子発現低下の抑制が示された。先行研究¹¹⁾では高脂肪食摂取により時計遺伝子発現の振幅が減衰したと報告しており、本試験の結果と一致する。また、HF+Tr 群では Bmal1 の発現低下抑制がみられた。持久性トレーニング¹⁶⁾は、骨格筋の PGC-1 α の発現量が増加すると報告している。さらに PGC-1 α は ROR α に結合することにより、Bmal1 の発現を調整しており、本試験では持久性トレーニングにより PGC-1 α が増加したため HF+Tr Bmal1 の発現量が HF 群と比較して高まった可能性が推察される。

⑥.まとめ

本研究で得られた知見は、①朝食時の EE は他の 2 食と比較して低いが、EE の亢進は最も高くなること。②高脂肪食摂取により TEE の低下傾向がみられること。③長期間の高脂肪食摂取は体重増加に寄与し、時計遺伝子発現を低下させる。④高脂肪食摂取させたラットに持久性トレーニングを行わせると時計遺伝子発現の低下抑制傾向がみられ、肥満予防効果が期待できる。

これらより、肥満には食生活習慣の乱れが大きく寄与しており、これを是正することにより肥満予防効果が得られると考えられた。また、身体活動も重要であり継続的な持久性トレーニングは体内時計を規則正しいリズムで振動させる可能性が示唆された。

VII.参考文献

- 1) 田村秀樹, 及川真一: 肥満のメカニズム, 血圧, 8(6), 619-624, (2001)
- 2) 富樫健二: 肥満者の DIT とトレーニング効果, 体育の科学, 54(10), 804-809, (2004)
- 3) 健康局総務課生活習慣病対策室: 平成 19 年国民健康・

- 栄養調査の概要, 厚生労働省, 2008, <http://www.mhlw.go.jp/houdou.html> (2008年12月25日)
- 4) 永井成美ら: 朝食欠食, マクロニュートリメントバランスが若年健常者の食後血糖値, 満腹感, EE および自律神経系活動に及ぼす影響, 糖尿病, **48**(11), 761-770, (2005)
 - 5) 関野由香ら: 食事時刻の変化が若年女子の食事誘発性熱産生に及ぼす影響, 日本栄養・食糧学会誌, **63**(3), 101-106, (2010)
 - 6) Diamond et al.: Role of autonomic nervous system in postprandial thermogenesis in dogs, *Am.J.Physiol.*, **252**, E719-E726, (1987)
 - 7) 大塚邦明: 自律神経とサーカディアンリズム, *JPN.J.Electrocardiol.*, **13**, 21-47, (1993)
 - 8) 田村俊世: エネルギー消費量の測定, 栄養評価と治療, **24**(4), 357-360, (2007)
 - 9) 宮崎充功: 生物時計による骨格筋機能制御, 体力科学, **59**, 233-242, (2010)
 - 10) Turek et al.: Obesity and Metabolic Syndrome in Circadian Clock Mutant Mice, *Science*, **308**, 1043-1045, (2005)
 - 11) Kohsaka A et al.: High-Fat Diet Disrupts Behavioral and Molecular Circadian Rhythms in Mice, *Cell Metabolism*, **6**(5), 414-421, (2007)
 - 12) Froy O et al: Long-lived α MUPA transgenic mice exhibit pronounced circadian rhythms. *Am J Endocrinol Metab*, **291**, E1017-E1024, (2006)
 - 13) Knutti D et al: PGC-1, a versatile coactivator, *Trends Endocrinol Metab*, **12**(8), 360-365, (2001)
 - 14) Liu C et al.: Transcriptional coactivator PGC-1 α integrates the mammalian clock and energy metabolism, *Nature*, **447**, 477-481, (2007)
 - 15) Taylor EB et al: Endurance training increases skeletal muscle LKB1 and PGC-1 α protein abundance: effects of time and intensity, *Am J Physiol Endocrinol metab*, **289**, E960-E968, (2005)
 - 16) Lin J et al.: Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres, *Nature*, **418**, 797-891, (2002)
 - 17) 厚生労働省策定: 日本人の食事摂取基準 2005 年度版, p28-31 (2005) 第一出版, 東京
 - 18) 藤井久雄ら: L-カルニチン配合飲料の単回摂取が運動時のエネルギー代謝に及ぼす効果, 体力・栄養・免疫学雑誌, **18**(2), 92-98, (2008)
 - 19) Eric, R et al: Determinants of 24-hour Energy Expenditure in Man, *J.Clin.Inves.*, **78**, 1568-1578, (1986)
 - 20) Tataranni, P.A et al: Thermic effect of food in humans: methods and results from use of a respiratory chamber, *Am.J.Clin.Nutr.*, **61**, 1013-1019, (1995)
 - 21) Hill, J.O et al: Obesity and the environment: where do we go from here?, *Science.*, **299**, 853-855, (2003)
 - 22) Hill JO et al: Nutrient balance in humans: effect of diet composition, *Am.J.Clin.Nutr.*, **54**, 10-17, (1991)
 - 23) Westerterp KR et al: Diet induced thermogenesis measured over 24h in a respiration chamber: effect of diet composition, *International Journal of obesity*, **23**, 287-292, (1999)
 - 24) DeJonge, L. et al.: The thermic effect of food and obesity: a critical review, *Obes Res*, **5**(6), 622-31 (1997)
 - 25) Westerterp KR: Satiety and 24h diet-induced thermogenesis as related to macronutrient composition, *Scandinavian Journal of Nutritional*, **44**, 104-107, (2000)
 - 26) Shimomura I: Marked reduction of combined with reduction of lipoprotein lipase and glucose transporter mRNA, in intra-abdominal visceral fat by physical exercise, *Am J Physiol* **265**, E44, (1993)