

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18790383

研究課題名 (和文) 生体リズム制御による肥満予防法の探索

研究課題名 (英文) Control of obese by modifying biological rhythms

研究代表者

河合 洋

城西国際大学・薬学部・講師

研究者番号：20321854

研究成果の概要：エネルギー代謝器官である肝臓を研究対象とし、肝臓リズム測定方法を確立した。尿中胆汁酸 (urinary bile acid, UBA) 量は肝機能を反映し、非侵襲的な肝機能指標となることを明らかにした。UBA は日内変動し、肝臓リズム指標としても有用である。また、肝硬変を起こしたラットを解析し、行動量・リズム、情動、知的機能の障害といった肝性脳症様の症状を検出した。生体リズム異常と肝性脳症発症の関連を示唆する結果である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	1,400,000	0	1,400,000
2008 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	180,000	3,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会薬学・衛生学

キーワード：生体リズム、肝臓、胆汁酸、肝障害、チオアセトアミド

1. 研究開始当初の背景

生体機能は、24 時間周期の昼夜サイクルに効率よく適応するように体内時計によって制御されており、エネルギー代謝・脂質代謝も日内変動を示す。脂肪蓄積経路はエネルギー需要の少ない夜間に強く働くよう制御されているため、夜間の摂食は脂肪蓄積 (肥満) を起こしやすい。不規則な生活習慣は生体リズムを乱し、生体機能発現リズムの最適化機構を十分に活用しないことになる。不適当なタイミングでの機能発現を強いられる状態が慢性的に続くと (慢性的リズム異常)、必要以上の脂肪蓄積が起こり肥満のリスク

が高まると考えられる。

シフトワーカーに肥満傾向が認められる (通常勤務者と比較して BMI \geq 30 の年齢・社会階級調整オッズ比が 1.4)、夜間摂食症候群の肥満者は通常の肥満者に比べ食事療法による減量効果が 40% 小さいといった結果が報告されており、昼夜逆転生活、不規則な食習慣が肥満の危険因子になることを示唆している。高照度の光に曝露して生体リズムを調節するといったリズム治療も試みられているが、より効果的な治療・予防のためには、肥満における生体リズムの変化、および肥満促進に寄与するリズム変化を明らかにする

ことが必要である。

時計遺伝子 *Clock* の変異マウスはリズム異常を示すと同時に、体脂肪増加、血中脂質濃度上昇といった肥満症状を呈する。体内時計の発振に関わる *BMAL1* は培養細胞の脂質代謝の制御に関与しており、通常とは異なるタイミングの摂食が効率よく脂肪蓄積に働く（肥満を導く）ことが示唆される。これらの知見は時計遺伝子の異常による肥満促進を示唆しており興味深い、ヒトのリズム異常では *Clock* 変異のような遺伝素因よりも活動時刻や食習慣といった環境要因の寄与が大きい。遺伝的に正常な個体に、環境変化によりリズム異常を誘発した時の肥満症状を *in vivo* で検討することが期待されている。

生体リズムによる生体機能制御について、環境変化への効率よい適応には機能発現の場である末梢器官の役割が大きいと考えられる。肥満はエネルギー出納のバランスが崩れた結果生じるが、生体のエネルギー代謝調節には脂肪組織とともに肝臓が主要な働きをしている。エネルギー代謝に関わる肝臓の酵素活性は日内変動しており、生活リズム（摂食タイミング）と肝臓機能リズムの乖離は、脂肪蓄積を必要以上に充進して肥満を促進する危険性があると考えられる。

肝臓の時計システムは、脳から発振されるリズム情報に従って機能調節をしつつ、摂食条件等の環境変化に応じて柔軟にリズムを変化させることが知られている。現代社会の夜型化生活（就寝・起床時刻の後退、夜間摂食の増加）が肝臓のリズムを変化させ、リズム異常が肥満等の生活習慣病の発症に寄与していることも考えられるが、肝臓におけるリズム変化とエネルギー代謝、疾病の関連については不明な点が多く、研究の進展が望まれる分野である。

2. 研究の目的

本研究は、生活習慣が生体リズムを変化させ、この変化が肥満の発生・進行に寄与するとの仮説のもと、生活習慣が生体リズムに及ぼす影響、生体リズム変化が肥満に及ぼす影響を明らかにし、生体リズムの矯正（リズム調節）により肥満予防法を探索することを目的とした。

生体リズム研究を生体機能障害へ応用する際には、作用発現の場である末梢器官における生体リズム、および機能制御の解明が必要である。エネルギー代謝における重要性から肝臓における生体リズムを研究対象とした。

生体リズムの解析には、行動や体温の日内変動を測定する方法、対象とする臓器の時計遺伝子の変動を測定する方法がとられている。肝臓のリズムを反映する行動指標は報告

されておらず、肝臓リズムは時計遺伝子の定量により測定されている。しかし、時計遺伝子を測定するには組織の採取が必要であるため、動物個体への傷害が大きく、同一個体での反復測定は困難である。肝臓リズムと行動の相関を研究するに際し、簡便で連続測定可能な指標の開発が望まれる。本研究では、非侵襲的に測定可能な肝臓機能指標を探索し、肝臓リズム指標測定方法を確立することを第一の目標とした。

3. 研究の方法

(1) 肝機能障害モデルラットの作成

チオアセトアミドを用いて肝障害を誘発した。100~500 mg/kg を単回腹腔内投与したものを急性障害のモデルとし、0.3~0.5 g/L チオアセトアミド含有した飲料水を4週間以上自由摂取させたものを慢性障害のモデルとした。

(2) 肝機能測定

①尿中胆汁酸定量

ラットを代謝ケージに入れ、24時間尿を採取した。酵素法（total bile acid assay kit, DIAZYME）により尿中胆汁酸（UBA）量を測定した。Jaffe法（クレアチニンテストワコー、和光）により尿中クレアチニン量を測定し、クレアチニン量で補正した値（UBA/Cre）を指標として用いた。

②血中肝障害指標

ラットを麻酔下開腹し、腹部大静脈より採血した。ALP, γ GTP, ALT, AST, 総ビリルビン, アルブミン（Alb）, 分岐鎖アミノ酸/チロシン比（BTR）, アンモニア量を定法により測定した。

③組織染色

肝臓を還流、採取し、ホルマリンにより固定、5 μ m切片をhematoxylin-eosin（HE）染色した。

(3) 行動試験

①行動量・行動リズム

赤外線行動解析装置（Supermex, 室町機械）にてラットの行動量を測定した。探索行動量の測定の際には10分間の行動量を測定した。行動リズム測定の際には48時間以上連続測定した。

②ロータロッド試験

ロータロッドトレッドミル（Ugobasile）にラットを乗せ、回転ロッドから落下するまでの時間を測定した。ロッドの回転は初期設定4 rpm から5分間で40 rpmまで加速する条件とし、5分を測定上限とした。

③攻撃行動

ラットを入れたケージに5mm角の木製の棒を差し入れ、棒に対する2分間の咬みつつき回数を測定した。

④強制水泳試験

水を張った水槽（φ25cm×50cm、水深30cm）にラットを入れ、5分間の行動を観察した。行動は、無動（immobile）、水槽を水平方向に移動する swimming、壁面を登ろうとする climbing のいずれかとして測定した。

⑤新奇物体認識試験

2つの物体を置いたフィールド（φ80cm）に、ラットを入れ、物体に対する探索行動時間を測定した。初回の試行の24時間後に一方の物体を新奇物体に変えて再試行した。再試行時に、新奇物体に対して探索行動をする時間の割合（novel object recognition, NOR）を記憶力の指標とした。

4. 研究成果

(1) 尿中胆汁酸量（UBA）の肝機能指標としての応用

チオアセトアミド誘発肝障害モデルラットにおいて、UBAの顕著な上昇が認められた。血中肝障害マーカーとの相関を検討すると、UBA上昇はALT、ASTなど肝細胞障害を示す指標との相関は低いものの、ALP、γGTP、Albなどとよい相関を示し、特にALPと高い相関を示した。

表 4-1 チオアセトアミド(TAA)誘発肝障害におけるUBAおよび血中肝障害指標の変化

	UBA ($\mu\text{mol/g Cre}$)	ALP (IU/l)	Alb (mg/dl)	BTR
Control (n = 4)	2.1 (1.2 - 4.3)	300.7 (246 - 352)	4.17 (4.0 - 4.4)	3.58 (3.2 - 3.8)
TAA0.3 (n = 4)	6.5 (1.1 - 18.6)	665.6* (481 - 841)	3.60 (3.5 - 3.8)	2.27* (2.0 - 2.6)
TAA0.5 (n = 4)	23.4* (8.8 - 61.9)	993.5* (843 - 1263)	2.83* (2.1 - 3.2)	2.11* (1.9 - 2.5)

値は平均値（最小値-最大値）を示す

* p < 0.05 vs control by Steel's test

UBAは胆汁鬱滞の指標としてALPを代替する肝機能指標となりうると考えられる。UBAは非侵襲的に測定でき、血液採取のようにラットに対して障害を与えることがないため、経時的な連続測定が可能である。生体リズムの測定には1日あたり複数回の測定が必須であるため、血中成分を指標として用いることは難しい。連続測定が可能なUBAはリズム測定に適した指標と考えられる。

(2) UBAの日内変動

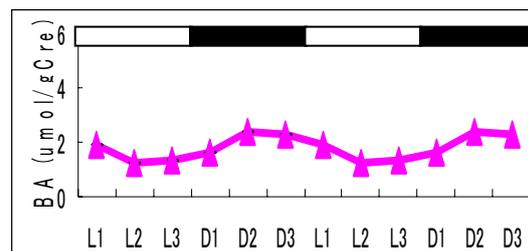
ラット尿を4時間毎に採取し、UBAを測定したところ、日中低値をとり夜間高値をとる日内変動が認められた。

肝臓における胆汁酸合成の律速酵素であるCYP7A1の活性は夜間にピークを示す日内

変動を示すことが知られている。UBAの変化はCYP7A1の日内変動を反映しており、肝臓リズムの指標として有用であることが示唆される。

肝臓における生体リズム発現は体内時計研究において注目されているが、肝臓リズムの簡便な測定方法は報告されていない。本手法は尿を用いて簡便に測定可能であり、リズム指標として有用性が高いと考えられる。肝臓はエネルギー代謝の中心臓器であり、生活習慣病との関連も深い。生活習慣病と生体リズムの関係を明らかにする上で、UBAによる非侵襲的測定は有用性が高いと考えられる。

図 4-2 UBAの日内変動



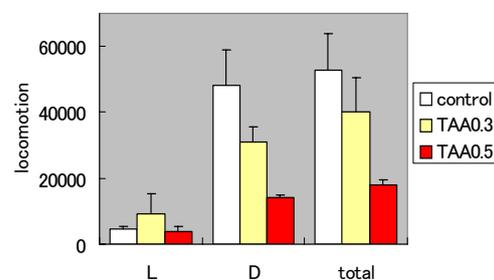
L1, 2, 3は昼間、D1, 2, 3は夜間を示す

(3) 肝障害誘発モデルラットにおける行動異常の発現

チオアセトアミド慢性投与（0.3~0.5 g/L 飲水）ラットにおいて、肝性脳症様の神経障害を検出した。

チオアセトアミド投与ラットにて日常活動量の低下が観察された。新奇環境下での探索行動量やロータロッド試験におけるスコアは対照群と差がなかったことから、チオアセトアミド投与ラットの運動機能には問題がないと考えられる。日常活動量の減少は行動意欲の低下を示す結果であり、脳神経系に異常が起こっていると考えられる。

図 4-3 チオアセトアミド慢性投与による飼育ケージ内行動量変化



L、Dはそれぞれ昼間、夜間の行動量を示す

活動量の減少は夜間後半に顕著であり、1日の行動リズムを解析すると、位相の前進が認められた。体内時計の異常が、行動異常の

発現に関与することが考えられる。

また、各種試験の結果、チオアセトアミド投与ラットでは、攻撃性の亢進、強制水泳試験における immobile の減少と swimming の増加、新奇物体認識試験における NOR の低下が認められた。情動反応の異常、知的能力の障害を示唆する結果である。

チオアセトアミドで観察された行動意欲の低下、情動異常、知的能力障害は、臨床において肝性脳症患者に認められる症状と類似している。また、チオアセトアミド慢性投与ラットでは肝組織の繊維化が観察され、肝性脳症の発症に寄与すると考えられる血中アンモニア値も高値を示していたことから、チオアセトアミド慢性投与ラットは肝硬変を発症し、さらに肝性脳症が発症したと考えられる。

臨床における肝性脳症は肝障害が進行した際に認められる病態であり、劇症肝炎のような急性肝障害や肝硬変のような慢性肝障害により発症することが知られている。実験動物の研究では急性的な劇症肝炎モデルが多く、慢性的肝障害における肝性脳症モデルはほとんど報告されていない。本研究で示したチオアセトアミド慢性投与ラットは肝硬変-肝性脳症モデルとして貴重である。

未だ不明点の多い肝性脳症の発症機構の解析、治療薬の解析・スクリーニングなどの研究に有用なモデルとなることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Hiroshi Kawai, Naomi Kudo, Yoichi Kawashima, Atsushi Mitsumoto, Efficacy of urine bile acid as a non-invasive indicator of liver damage in rats, Journal of Toxicological Sciences, 34, 27-38, 2009, 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① 河合 洋、光本篤史、チオアセトアミド誘発肝障害モデルラットにおける行動異常、第 82 回日本薬理学会年会、2009 年 3 月 17 日、横浜
- ② 河合 洋、光本篤史、薬物誘発肝障害モデルラットにおける血清マーカーと尿中胆汁酸量の相関の解析、フォーラム 2008 衛生薬学・環境トキシコロジー、2008 年 10 月 18 日、熊本
- ③ 河合 洋、光本篤史、薬物誘発肝障害モデルラットにおける尿中胆汁酸量の測定、日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月 27

日、横浜

- ④ 河合 洋、佐藤陽子、光本篤史：急性肝炎ラットにおける運動機能障害の定量的評価、第 34 回日本トキシコロジー学会学術年会、2007 年 6 月 28 日、船堀 (東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河合 洋 (KAWAI HIROSHI)
城西国際大学・薬学部・講師
研究者番号：20321854

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者