

## 時間栄養学的なアプローチが成獣ラット飼育の 摂食効率に及ぼす影響

野口梨依子<sup>1) #</sup>・山下紗也加<sup>2) #</sup>・川俣幸一<sup>2)</sup>

The Influence of Timing on Meals of Laboratory Adult Rats

Rieko NOGUCHI<sup>1) #</sup>, Sayaka YAMASHITA<sup>2) #</sup> and Koichi KAWAMATA<sup>2)</sup>

**Abstract** : The purpose of this study is to clarify how eating patterns affect laboratory adult rats.

We performed two sets of experiment with ten-week old adult rats. The rats' eating pattern was determined for twelve hours from 8:00am to 8:00pm. Each set of experiments had six rats and were divided into two groups with three rats each. Three rats of one of the groups were fed from 8:00am to 8:00pm in the darkness with a black-out curtain closed, which was opened from 8:00pm to 8:00am to provide a photo period under lights. Three rats of the other group were fed from 8:00am to 8:00pm with a black-out curtain open, which was closed from 8:00pm to 8:00am to provide darkness. We fed a standard diet to six rats of one of the sets for three weeks and a high-fat diet to six rats of the other set for three weeks.

Our results suggested that the different timing of darkness and lighting periods did not affect the rats' growth specifically. We may, however, reconsider short-term experiments with rats since we detected some changes of eating efficiency in their behavior.

**Key words** : chrono-nutrition (時間栄養学), physiology (生理学), eating efficiency (摂食効率), rat (ラット), leptin (レプチン)

### 緒 言

これまで多く報告されているラット飼育実験による摂食タイミングを変化させた研究では、ラットの睡眠期(明期)における摂食はコントロールと比して体重を増加させる事を明らかとし<sup>1-5)</sup>、そのメカニズムについてもコルチゾールの増加や時計遺伝子の発現などで説明されるようになった<sup>6,7)</sup>。この知見は時間栄養学的な見地から朝食欠食や夜型の食事、中年男性の不規則な生活からくる肥満を説明してきている<sup>8)</sup>。

一方で、動物飼育の見地からは、そのような研究は幼若ラットから開始する長期飼育が慣習的に行われてきており<sup>2-4,9)</sup>、成獣ラットに対して明暗や摂食時間を変化させることにより短期的な挙動を追いかけた報告となると少なくなる。特に雄の成獣ラットにおける短期的な飼育実験は、中年男性の一過性の不規則な生活(出張や残業など)と結びつく点もあるため、時間栄養学的にも興味深いところである。他方、動物飼育に関する短期的な変化として実際に考えられるものとして、空輸などにより実験動物が輸送されるケースや、

2014年1月29日受付; 2014年3月11日受理

<sup>1)</sup>...宮田村役場 <sup>2)</sup>...家政学科食物栄養専攻 #...equal contribution

論文責任者 家政学科 食物栄養専攻 川俣幸一 E-mail: kawamata@iidawj.ac.jp

照明不十分な馴化飼育などがあるが、これらは同一時間軸であっても照明時間のズレが間接的に摂食行動のズレを引き起こす可能性を示唆している。しかしながら、そのような検討をした報告は見当たらず、動物飼育に関して利用できる資料が殆ど無いのが現状である。

今回我々は成獣ラット飼育実験の一資料を作成する目的で、10週齢の雄ラットを用いて、24時間の同一時間軸において明暗を逆転させた上で、時間栄養学的な観点から摂食変化を観察した。その結果、睡眠期（明期）の摂食効率に関するいくつかの知見が得られたので報告する。

## 方 法

本研究の動物実験は「動物の保護（愛護）及び管理に関する法律」（昭和48年法律第105号）および「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」（昭和55年総理府告示第6号）に基づいて行い、飯田女子短期大学動物実験倫理委員会の承認を経て実施した。2013年11～12月にかけて実施した。

## 実験動物

10週齢のSprague-Dawley系の成獣の雄ラッ

トを業者より購入し、飯田女子短期大学動物飼育室内のアルミ製の個別ゲージの中で搬入より19日間の飼育を行った。飼育開始時に体重の平均値が群間でほぼ均等になるように振り分けた。飼育は2013年11～12月にかけて実施し、日本時間を基準とした。飼育室のエアコン温度は23℃に設定した。実際の飼育期間中の温度は15±5℃、湿度は29±2%であった。最終日に解剖を行うまで終日自由摂水としたが、摂食ならびに明暗サイクルについては後述の制限を行った。体重は給餌直前の朝8時に、摂食量、摂水量は給餌直後の夜8時に1日1回それぞれ測定した。採糞は解剖3日前より開始し、具体的にはラット毎に床敷シートを交換、3日間の平均値として求めた。なお摂食効率は(体重増加量÷摂食量)×100の式より百分率として求めた。

## 飼育プロトコール

全ての実験（2シリーズ）において共通で、ラットの摂食時間は朝8時から夜8時までの12時間とし照明は24時間の完全点灯とした（図1）。シリーズごとに6匹のラットを3匹ずつの2群に分け、それぞれ活動期摂食群、睡眠期摂食群と区分した。具体的には、活動

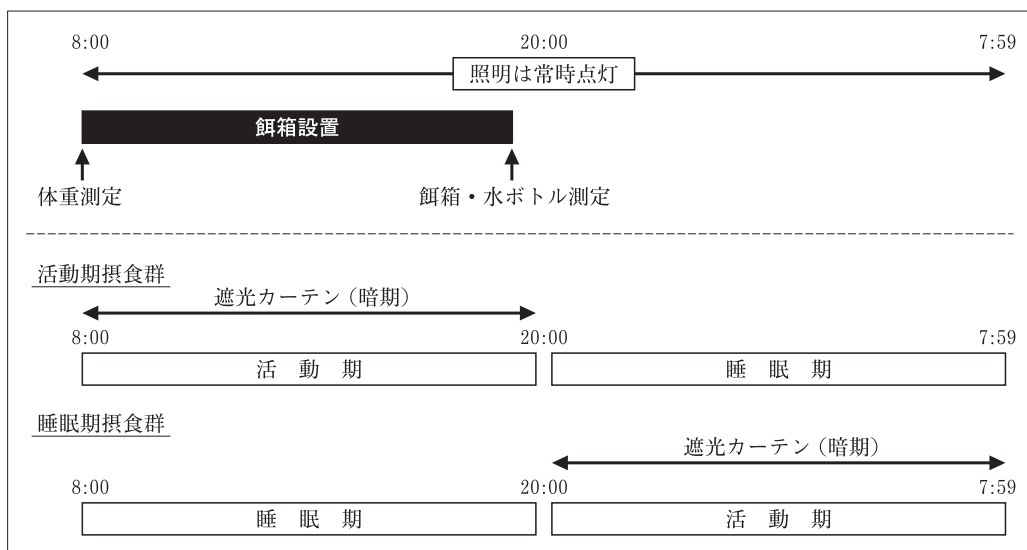


図1 飼育実験のプロトコール

期摂食群においては朝8時から夜8時まで遮光カーテンを閉めることによる人工的な暗期下にて、(すなわち夜行性のラットを活動期の状態とし) 同時間帯において自由摂食させた。夜8時から明朝8時まで遮光カーテンを開け明期とし、餌箱は取り外した。この群のラットは活動期に餌を食べることになるので、ヒトに当てはめて考え便宜上、活動期摂食群と名づけた。もう一方は睡眠期摂食群と名づけ、朝8時から夜8時まで遮光カーテンを閉めないためこの時間がラットにとっての明期(睡眠期)となり、その時間内に自由摂食させた。この群では夜8時から明朝8時まで遮光カーテンを閉め暗期とし、餌箱は活動期摂食群と同じく取り外した。この群のラットは睡眠期に餌を食べることになるので、ヒトに当てはめて考え便宜上、睡眠期摂食群と名づけた。

1 シリーズ目はオリエンタル酵母社の固形標準食(MF)により飼育した(A:通常食)。餌組成は360kcal/100g, PFC=26:13:61であった。2 シリーズ目は高脂肪食による飼育とした(B:高脂肪食)。餌組成はカゼイン30%, ラード16%, コーン油5%, スターチ19.7%, セルロース5%, AIN93(ビタミン)1%, AIN93M(ミネラル)3%, スクロース20%, メチオニン0.3%とし、460kcal/100g, PFC=26:39:35であった。両シリーズとも3週間飼育した。

## 解 剖

ラットは解剖前日の夜8時より13時間の絶食とし、朝9時より解剖を実施した。エーテル麻酔下にて腹壁皮膚を正中切開し、腹筋および腹膜を切開して臓器ならびに腹部大動脈を露出させ採血を行った。真空採血管に採取した血液は室温に15~20分静置し、スパーテルにて内壁に沿って血餅を剥がした後、同じく室温にて遠心分離(3000rpm, 15分)を行い、血清を分離した。血清は分析を行う約1ヵ月後まで冷凍庫に-18℃にて保管した。採血後、

左右の副睪丸を摘出し付着した脂肪の左右合計値を副睪丸脂肪重量とした。

## 血液検査

血糖値ならびに血清コレステロール値は、それぞれグルコースC-IIテストワコー、コレステロールE-テストワコー(和光純薬)のキットを、血清レプチン値はラットレプチンELISA分析キット(免疫生物研究所)を使用し、添付された説明書に従って測定した。

## 統計処理

結果は平均値±標準誤差にて示した。統計処理ソフトにはSPSS ver17.0を用い、有意水準は5%以下とした。活動期摂食群と睡眠期摂食群における2群間の比較には独立したサンプルのt検定を採用し、Leveneの検定を経た上で有意確率を求めた。また追加分析としてt検定において有意差の確認された項目を従属変数とし、独立変数を飼料内容、摂食タイミング、血糖値、血清コレステロール値、血清レプチン値、副睪丸脂肪重量、糞重量、累積飲水量としたステップワイズ重回帰分析を実施し、各項目における寄与率を求めた。その際には飼料内容は通常食1、高脂肪食2とし、摂取タイミングについては活動期摂食群1、睡眠期摂食群2とした。

## 結果および考察

### 1. 摂食タイミングの違いによるラット体重の変化

結果を図2に示した。Aの通常食においては活動期摂食群と睡眠期摂食群の両群とも搬入直後は体重の低下が見られ、その後は増加傾向を示していた。飼育日数にして10日前後から活動期摂食群の体重の伸びが良い(または睡眠期摂食群の体重の伸びが悪い)傾向が確認されたが、全ての日数で有意差は確認されなかった。Bの高脂肪食においても同様であった。

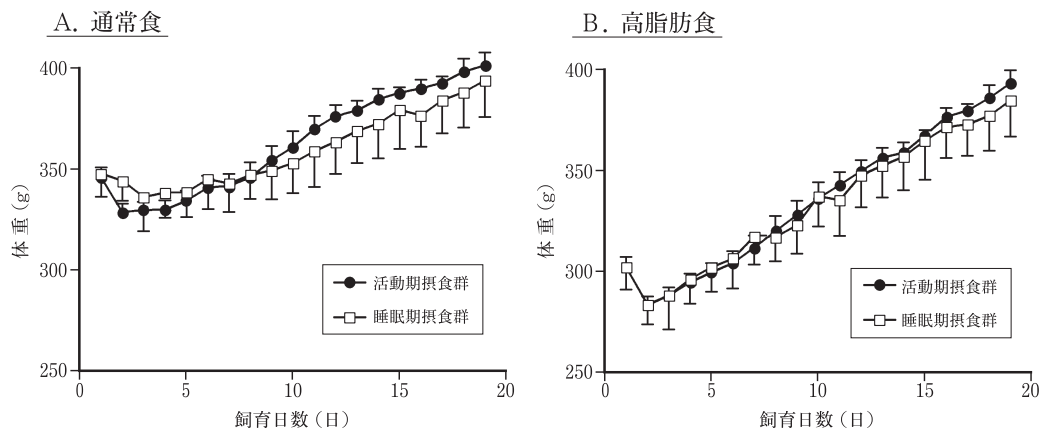


図2 摂食タイミングの違いによるラット体重の変化

表1 飼育実験の結果一覧

項目	(単位)	通常食			高脂肪食		
		活動期摂食群	睡眠期摂食群	p 値 <sup>1)</sup>	活動期摂食群	睡眠期摂食群	p 値 <sup>1)</sup>
摂食効率 <sup>2)</sup>	(%)	16.7 ± 0.1	14.6 ± 0.3	0.004	26.5 ± 0.5	24.3 ± 1.6	0.244
体重増加量 <sup>2)</sup>	(g)	58.2 ± 0.2	50.9 ± 4.3	0.230	78.9 ± 1.5	67.3 ± 5.7	0.119
	累積摂食量 <sup>2)</sup>	(g)	349.0 ± 2.6	348.9 ± 23.2	0.997	297.7 ± 10.2	277.0 ± 13.3
累積摂水量 <sup>2)</sup>	(g)	425.8 ± 41.3	436.7 ± 30.5	0.843	389.8 ± 15.1	380.7 ± 73.0	0.897
血糖値 <sup>3)</sup>	(mg/dL)	126.3 ± 15.3	145.3 ± 13.0	0.398	167.3 ± 8.2	145.3 ± 19.2	0.352
血清コレステロール値 <sup>3)</sup>	(mg/dL)	36.8 ± 4.8	41.5 ± 4.1	0.492	43.9 ± 4.8	55.9 ± 10.9	0.374
血清レプチン値 <sup>3)</sup>	(ng/mL)	4.0 ± 0.8	4.0 ± 0.2	0.943	2.6 ± 0.5	2.9 ± 0.3	0.615
副睪丸脂肪重量 <sup>3)</sup>	(g)	4.0 ± 0.5	4.1 ± 0.2	0.942	4.5 ± 0.7	4.3 ± 0.2	0.836
糞重量 <sup>4)</sup>	(g/日)	6.0 ± 0.2	6.2 ± 0.5	0.611	3.0 ± 0.3	3.1 ± 0.2	0.815

n = 12 (各群ともに n = 3)

1)…独立したサンプルの t 検定

2)…一週間の予備飼育後からカウントした12日間の累積

3)…採血は飼育最終日(解剖日)に実施した

4)…採糞は解剖3日前より実施した

一方で、通常食ならびに高脂肪食の実験で共通して、先行研究にもあるような搬入直後の体重低下が見られること<sup>1)</sup>、ならびに元の水準に回復するまでに一週間程度かかること、且つ概ね3～7日間程度の予備飼育は多くの先行研究でも実施されていることより<sup>2,10-12)</sup>、本研究においても搬入より7日間を馴化飼育(予備飼育)期間とし、以降の分析の参考とした。

## 2. 飼育実験の結果

表1に飼育実験の結果を示した。前項より

予備飼育を7日間に設定したため、摂食効率、体重増加量、累積摂食量、累積摂水量は全19日間の飼育のうち後半12日間における累積値とした。Aの通常食の摂食効率において、活動期摂食群と睡眠期摂食群の累積摂食量には殆ど差は見られなかったものの(p=0.997)、体重増加量においては図2のグラフでも確認された様に活動期摂食群の増加量が高かった(または睡眠期摂食群の増加量が低かった)。しかしながら結果的に両者により構成される摂食効率においては、明白に活動期摂食群(16.7±0.1%)と睡眠期摂食群(14.6±0.3%)

との間に有意差が確認された ( $-2.1\%$ ,  $p=0.004$ ). 活動期摂食群は通常群の生活と考えられるので, おそらくは睡眠期摂食群において摂食効率の低下が起きたと考えられた. またBの高脂肪食の摂食効率においても有意差は確認されなかったものの, 活動期摂食群 ( $26.5\pm 0.5\%$ ) と睡眠期摂食群 ( $24.3\pm 1.6\%$ ) との間に  $-2.2\%$  の低下傾向が見られた ( $p=0.244$ ).

一方, Aの通常食とBの高脂肪食の両シリーズ共に, 活動期摂食群と睡眠期摂食群において血液検査値, 副睪丸脂肪重量, 糞重量について有意差が確認されなかった. この事は摂食タイミングの違いにより, 少なくとも今回の飼育期間において, これらパラメータに変化が見られなかったことを意味し, 具体的には高血糖や高脂血症, 摂食関連ホルモン<sup>13,14)</sup>, 脂肪蓄積, 便秘などの症状(変化)が, 少なくとも今回の飼育期間において明白には確認されなかったことを示唆している.

### 3. 摂食効率に影響を及ぼした要因の検討

続いて, 今回の摂食効率の変化がどのような要因により引き起こされたのかを明らかにするため, 従属変数を摂食効率, 独立変数を飼料内容, 摂食タイミング, 血糖値, 血清コレステロール値, 血清レブチン値, 副睪丸脂肪重量, 糞重量, 累積摂水量としたステップワイズ重回帰分析を実施した. その結果を表2に示した. 合計2モデルの重回帰式が求めら

れ, 2モデル目の式は全体の94.7%を説明していた. 具体的には飼料内容と摂食タイミングが, 今回の成獣雄ラットの飼育期間中の摂食効率の変化に関係した要因であった. 飼料内容については標準偏回帰係数 ( $\beta$ ) が0.950, 寄与率90.2%と, 強い正の関係にあり, 通常食から高脂肪食に変化すると摂食効率が増加することを示していた. このことは表1からも明白に読み取れ, 具体的には通常食活動期摂食群  $16.7\pm 0.1\%$  vs 高脂肪食活動期摂食群  $26.5\pm 0.5\%$  ( $p=0.002$ ), 通常食睡眠期摂食群  $14.6\pm 0.3\%$  vs 高脂肪食睡眠期摂食群  $24.3\pm 1.6\%$  ( $p=0.021$ ) であり, 通常食に比べて脂質エネルギー比率を3倍高めたことにより摂食効率が高まっていたことが当然の事象として確認された. 一方で, 摂食タイミングにおいては標準偏回帰係数 ( $\beta$ ) が  $-0.212$  と有意な負の関係にあった. この事は活動期摂食群から睡眠期摂食群に変化すると飼料内容に関わらず, 摂食効率が低下することを示している. その貢献度(寄与率)は4.5%と, 今回の実験シリーズ内で比較すると飼料内容の90.2%と比べて小さなものではあったが確実に有意性を示す要因であり, 成獣ラットの飼育を夜型(睡眠期を食事時間)とすることにより摂食効率が下がることが確認された.

### 4. 今後の課題

今回の我々の飼育研究の結論は, 同一の摂食時間(朝8時から夜8時)と飼料内容に関

表2 摂食効率を従属変数としたステップワイズ重回帰分析

重回帰式	要因	$\beta$	寄与率 (%)	p 値
モデル1	飼料内容 <sup>1)</sup>	0.950	90.2	<0.001
モデル2	飼料内容	0.950	90.2	<0.001
	摂食タイミング <sup>2)</sup>	-0.212	4.5	0.022

n = 12

1)…通常食を1, 高脂肪食を2とした

2)…活動期摂食群を1, 睡眠期摂食群を2とした

除外された要因: 血糖値, 血清コレステロール値, 血清レブチン値, 副睪丸脂肪重量, 糞重量, 累積摂水量



ならず、明暗の違いにより摂食効率に変化する可能性があることである。これまでの時間栄養学に関連する幼若ラットを用いた長期的な飼育実験では、睡眠期（明期）に行う食事は体重を増加させる可能性を示唆するものが多くあるが<sup>1-5)</sup>、今回の我々の研究においては逆の結果となった。その原因として短期的な飼育実験であったこと、飼育開始を10週齢の雄の成獣ラットから開始したことなどが考えられる。しかしながら先行研究のいくつかでは、鈴木らが1日2時間のみの給餌下で、夜1～3時に給餌したラット群では体重増加がマイナスとなったとする報告や<sup>15)</sup>、有意差検定は行っていないものの夜型の雌マウスでは体重低下の傾向が観察されたとする報告<sup>16)</sup>、食事タイミングの変化では日内リズム（視交叉上核）のリセットが起きなかったとするMendozaらによる報告などもあり<sup>17)</sup>、これらは我々の結果を支持するものである。一方で近年、ペプチド輸送体の日内リズム変動が明らかとなっているが<sup>18,19)</sup>、この短期的なたんぱく質吸収の攪乱が、今回の睡眠期摂食群における現象を引き起こしていた可能性も考えられる。今後は本飼育条件における長期的検討ならびに低下メカニズムの探究も必要となろう。

本研究結果は動物飼育における一資料となるものであるが、ヒトに置き換えて考えると不明な点（当てはまらない点）もある。ヒトにおける短期的に連続した日周リズム変化の研究には昼夜交代勤務者に肥満が多くなる事実や<sup>20)</sup>、起こりうる時差ボケに対して予め食事時間を前倒しにすることで対応させる研究などがよく知られているが<sup>21)</sup>、これらの研究で短期的な習慣の反復であっても時間栄養学的な変化が得られる可能性があることに言及している点では本報と共通である。

最後に本研究における限界は次の3点である。1つ目に短期的な飼育実験である事、2つ目に今回の測定項目以外の検討がないこと（コルチゾールなど）、3つ目に例数が各群と

も最小例（n=3）であること、重回帰分析により調整した結果であることである。しかしながら、短期間であっても摂食タイミングの変化により雄の成獣ラットの食事効率に変化することを明白に示した最初の報告であり、短期間の馴化飼育などにおいては場合によって注意を払う必要があるのかもしれない。

## まとめ

動物飼育実験の一資料を作成する目的で、成獣雄ラットの短期飼育に関して時間栄養学的なアプローチを実施した。24時間の同一時間軸内において明暗を逆転させた飼育は、通常食で飼育した場合において、明期（睡眠期）に給餌した群の摂食効率を有意に低下させる事が明らかとなった。

## 謝辞

本研究に際し多大なるご支援とご協力をいただいた飯田女子短期大学の友竹浩之先生に心より感謝申し上げます。

We also thank Mr. Carr Lance (Lecturer at California State University, Fullerton) and his wife for helping us edit the English text.

## 引用文献

- 1) Sitren HS and Stevenson NR : The effects of meal-feeding at different times of the day on daily changes in serum insulin, gastrin and liver enzymes in the rat. *The Journal of nutrition*, **108** (9), 1393-1401, 1978.
- 2) Suzuki M, Hashiba N and Kajuu T : Influence of timing of sucrose meal feeding and physical activity on plasma triacylglycerol levels in rat. *Journal of nutritional science and Vitaminology*, **28** (3), 295-310, 1982.

- 3) 鈴木正成, 千葉啓子: ラットの食餌摂取量と体組成に及ぼす摂食様式の影響. 日本栄養食糧学会誌, 36 (3), 175-183, 1983.
- 4) 谷 健二, 山本 章, 国崎 弘: 摂食時刻が間欠給餌ラットの体重増と摂食量に及ぼす影響. 静岡大学教育学部研究報告 自然科学篇, 40, 37-44, 1989.
- 5) Patton DF and Mistlberger RE: Circadian adaptations to meal timing: neuroendocrine mechanisms. *Frontiers in Neuroscience*, 7, 1-14, 2013.
- 6) 加藤秀夫, 国信清香, 斉藤亜衣子, 出口佳奈絵, 西田由香, 加藤 悠: 時間栄養学と健康. 日本薬理学雑誌, 137 (3), 120-124, 2011.
- 7) 堀江修一: 食事で体内時計を制御する—肥満症の時間栄養学—. 日本栄養士会雑誌, 54 (5), 357-360, 2011.
- 8) 香川靖雄編著: 時間栄養学—時計遺伝子と食事のリズム, 女子栄養大学出版, 東京, pp1-158, 2009.
- 9) 山本 章, 稲垣正男, 谷 健二: 摂食様式の違いがラットの活動のエネルギー源に及ぼす影響. 静岡大学教育学部研究報告 自然科学篇, 36, 19-29, 1985.
- 10) 山本康晴, 堀川陽子, 松田広一, 坂田成子, 玉木七八: 亜鉛欠乏ラットにおける各種糖類含有飼料に対する嗜好性の検討. 日本栄養食糧学会誌, 63 (5), 237-246, 2010.
- 11) 伊藤俊輔, 神福寿子, 多田恵理子, 横山芽衣子, 小林ゆき子, 桑波田雅士, 木戸康博: インスリン誘導性内臓脂肪蓄積肥満モデル動物の作成. 日本栄養食糧学会誌, 64, 91-98, 2011.
- 12) 花村 学, 入江ひとみ, 篠田有希, 山口航, 山本万里, 平井 静, 江頭祐嘉合: ラットにおけるべにふうき茶葉とべにふうきエキスの高コレステロール食投与時の影響ならびに安全評価. 食と緑の科学, 66, 37-42, 2012.
- 13) Schroeder M, Gelber V, Moran TH and Weller A: Long term obesity levels in female OLETF rats following time-specific post-weaning food restriction. *Hormones and behavior*, 58 (5), 844-853, 2010.
- 14) Pico C, Zilkova ZM, Kus V, Palou A and Kopecky J: Perinatal programming of body weight control by leptin: putative roles of AMP kinase and muscle thermogenesis. *The American Journal of clinical nutrition*, 94 (6 suppl), 1830S-1837S, 2011.
- 15) 鈴木正成, 橋場直彦, 菅野住子: ラットの自発ランニング運動の日内リズムに及ぼす摂食様式の影響. 筑波大学体育科学系紀要, 4, 155-169, 1981.
- 16) 今村友美, 井上優美子, 岩島香織, 澤田佳織, 松本尚子, 脇本佳奈, 高橋志乃, 堀江登: 食習慣の乱れが健康状態に及ぼす影響について—実験動物モデルを用いての検討—. 日本健康体力栄養学会誌, 13 (3), 10-17, 2009.
- 17) Mendoza J, Drevet K, Pevet P and Challet E: Daily meal timing is not necessary for resetting the main circadian clock by calorie restriction. *Journal of neuroendocrinology*, 20 (2), 251-260, 2008.
- 18) Pan X, Terada T, Okuda M and Inui K: Altered diurnal of intestinal peptide transporter by fasting and its effects on the pharmacokinetics of ceftibuten. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 307 (2), 626-632, 2003.
- 19) Qandeel HG, Alonso F, Hernandez DJ, Duenes JA, Zheng Y, Scow JS and Sarr MG: Role of vagal inner-

- vation in diurnal rhythm of intestinal peptide transporter (PEPT1). *Journal of gastrointestinal surgery*, **13** (11), 1976-1985, 2009.
- 20) Fujino Y, Iso H, Tamakoshi A, Koizumi A, Kubo T and Yoshimura T: A prospective cohort study of shift work and risk of ischemic heart disease in Japanese male workers. *American journal of epidemiology*, **164** (2), 128-135, 2006.
- 21) 駒田陽子, 山崎勝男, 金本礼次郎, 小林強, 柴田重信: 東向き海外旅行における睡眠感悪化に対する出発前食事時間前進による軽減効果. *新薬と臨床*, **50** (8), 24-32, 2001.