

概日リズム(体内時計)に基づくイヌの最適な食事時間および食事回数の 検討

Investigation of circadian rhythms-based adequate time and frequency of food intake in dogs

東京農工大学農学部共同獣医学科 大森 啓太郎
Keitaro Ohmori, Tokyo University of Agriculture and Technology

キーワード: 犬、概日リズム、食事、時計遺伝子

keywords: Dog, Circadian rhythms, Food, Clock gene

1. 序論

概日リズム(サーカディアンリズム)とは、約24時間周期で変動する生理現象で、地球上の全ての生物に存在している言わば体内時計である¹⁾。動物の生命機能は、生体内に存在する概日リズムによって厳密に制御されている。概日リズムの存在は、紀元前から既に知られていたが、近年の研究から、生物の概日リズムは、約20個の時計遺伝子により制御されていることが明らかになった²⁾。概日リズムの特徴の1つとして、生体内の自律的リズムが、副腎由来グルココルチコイドなどの内因性因子や、環境における明暗サイクルや温度サイクルなどの外因性因子に同調することが挙げられる。これら様々な概日リズム同調化因子の中で、食事も重要な同調化因子である。ヒトにおいては、1日3回(朝、昼、晩)の適切な食事時間と食事回数によって、正常な概日リズムが刻まれ生体を健康に維持することができることが明らかになっている³⁾。しかしながら、ヒトと生活を共にするイヌにおいては、朝晩2回の食事や朝1回だけの食事など、飼い主のライフスタイルに合わせて食事時間および食事回数が個別に設定されているのが現状である。

ヒトにおいては、概日リズムの乱れがメタボリックシンドローム、癌、アレルギーなどの発症において重要な役割を果たしていることが明らかとなっている^{1,2)}。深夜の食事や頻回の食事を継続すると、概日リズムが大きく乱れることから、これら様々な疾病の発症要因になると考

えられている³⁾。イヌにおいても、ヒトと同じ疾患が発症することから、適切な食事のリズムに基づいて正常な概日リズムを刻むことは、イヌの健康を維持し疾病を予防していく上で極めて重要であると考えられる。しかしながら、これまでイヌにおいて概日リズムに基づいた適切な食事時間および食事回数の検討は全く行われておらず、これらの策定が急務であると考えられる。

我々はこれまでにイヌの概日リズムに関する研究を行い、末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cells: PBMC)における時計遺伝子 *Period1 (Per1)* の発現がイヌの概日リズムをモニターする分子マーカーとなることを明らかにした⁴⁾。本研究の目的は、PBMCにおける時計遺伝子 *Per1* 発現の概日リズムを指標に、これまで明らかにされていなかったイヌの適正な食事時間および食事回数を検証することである。

2. 材料と方法

2. 1. 健常犬

健常な雄のビーグル犬6頭を用いた。これらの犬は個別のケージ内で飼育した。市販のドッグフード(サイエンス・ダイエットアダルト; 日本ヒルズ・コルゲート株式会社)を給餌し、自由飲水とした。健常犬に与えるドッグフードの量は、健常犬毎に算出した1日に必要なエネルギー量(daily energy requirement: DER)に基づいて決定した。室温は $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ で維持した。朝7時に室内灯が自動的に点灯し、夜19時に自動

的に消灯した（明暗 12 時間のサイクル）。

2. 2. 体温および血中コルチゾール値の測定

1 週間に渡り 1 日 1 回朝 10 時に飼育者が給餌した健常犬の直腸温を、朝 9 時から開始して 6 時間毎に 24 間に渡り測定した。また、血中コルチゾール値を測定するため、体温測定と同じ時刻に健常犬から採血した。血液から血清を分離し、コルチゾール測定まで -30°C で保存した。血中コルチゾール値は検査会社（株式会社モノリス）に測定を依頼した。

2. 3. 食事条件

健常犬 6 頭のうち、犬用自動給餌器（オートペットフィーダー）に興奮しない 3 頭を選別した。これら 3 頭の犬のケージ内に犬用自動給餌器を設置し、それぞれ 1 週間に渡り、① 1 日 1 回、深夜の食事（0 時のみ）、② 1 日 1 回、朝の食事（7 時のみ）、③ 1 日 1 回、夜の食事（19 時のみ）、④ 1 日 2 回、朝および夜の食事（7 時および 19 時）、⑤ 1 日 3 回、朝、昼および夜の食事（7 時、12 時、19 時）を与えた。

2. 4. 末梢血単核球の分離

これまでの報告⁴⁾に基づき、1 週間同じ食事条件を続けた最終日の昼 12 時と夜 21 時に健常犬から採血した。ヘパリン添加した血液をリン酸緩衝生理食塩液（phosphate buffered saline: PBS）で 1: 1 に希釈した後、Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Biosciences) に重層し、室温で 30 分間、400g で遠心した。遠心後、PBS と Ficoll-Paque Plus の間に形成された PBMC の層をピペットを用いて採取した。採取した PBMC を PBS で洗浄後、RNA 安定化溶液である RNeasy Lysis Buffer (Qiagen) に懸濁し、RNeasy Spin Column (Qiagen) に PBMC を浸漬し、RNA を抽出するまでプロトコールに従い PBMC を保存した。

2. 5. RNA 抽出と Real-Time PCR 法による *Per1* mRNA の発現解析

保存した PBMC から FastPure RNA kit (Takara Bio) を用いてトータル RNA を抽出した後、PrimeScript RT reagent kit (Takara Bio) を用いて cDNA を合成した。標的遺伝子に特異的なプライマーを用い、SYBR Premix EX Taq™ II (Takara Bio) により Real-Time PCR を行った。Real-Time PCR は、ABI Prism 7000 (Applied Biosystems) において、 95°C (30 秒) の後、 95°C (5 秒) および 60°C (31 秒) を 40 サイクル、続いて 95°C (15

秒)、 60°C (1 分) および 95°C (15 秒) の条件で行った。*Per1* の mRNA 発現量は、*GAPDH* を内因性コントロールとして $2^{-\Delta\text{CT}}$ 法により定量化した。

2. 6. 統計解析

異なる食事条件における昼 12 時および夜 21 時の間の *Per1* mRNA 発現量の差は、対応のある *t* 検知により解析した。直腸温、血中コルチゾール値および各食事条件における *Per1* mRNA 発現量の群内の差は、反復測定一元配置分散分析および Bonferroni 法により解析した。全てのデータは平均 \pm 標準偏差 (SD) で表示した。 $P < 0.05$ の時、統計学的に有意な差であると判断した。全ての統計解析は、エクセル統計 2015 (株式会社社会情報サービス) を用いて行った。

3. 結果

3. 1. 健常犬の体温および血中コルチゾール値の概日リズム

本研究で用いた健常犬の概日リズムを評価するため、既存の報告⁴⁾と同様に、1 週間 1 日 1 回朝 10 時に食事を与え、最終日に体温および血中コルチゾール値の概日リズムを評価した。その結果、体温に概日リズムが認められ、朝 9 時と深夜 3 時の体温および午後 15 時と深夜 3 時の体温にそれぞれ有意差が検出された ($P < 0.05$)。また、血中コルチゾール値においても概日リズムが認められ、朝 9 時と午後 15 時の血中コルチゾール値および朝 9 時と午後 21 時の血中コルチゾール値にそれぞれ有意差が検出された ($P < 0.05$)。

3. 2. 食事時間および食事回数による時計遺伝子 *Per1* mRNA 発現量の変化

異なる食事条件が *Per1* mRNA 発現量の概日リズムに及ぼす影響を解析した。5 つの食事条件 [① 1 日 1 回、深夜の食事（0 時のみ）、② 1 日 1 回、朝の食事（7 時のみ）、③ 1 日 1 回、夜の食事（19 時のみ）、④ 1 日 2 回、朝および夜の食事（7 時および 19 時）、⑤ 1 日 3 回、朝、昼および夜の食事（7 時、12 時、19 時）] のいずれにおいても、昼 12 時と夜 21 時の *Per1* mRNA 発現量に有意差は検出されなかった ($P > 0.05$ 、図 1)。

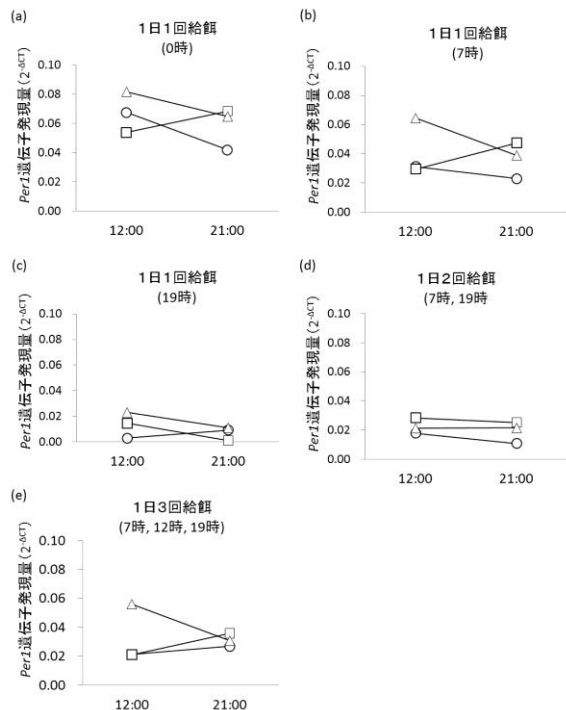


図 1. 末梢血単核球 (PBMC) における *Per1* mRNA 発現量の日内差に及ぼす食事条件の影響

次に、異なる食事条件が *Per1* mRNA 発現量に及ぼす影響を解析した。昼 12 時における *Per1* mRNA 発現量は食事条件により異なり、①の条件で食事を与えた時に最も高く、③の条件の時に最も低かった。5 つの食事条件を比較すると、①と③ ($P < 0.01$)、①と④ ($P < 0.01$)、①と⑤ ($P < 0.05$) の間に統計学的な有意差が認められた [図 2 (a)]。夜 21 時における *Per1* mRNA 発現量も食事条件により異なり、①の条件で食事を与えた時に最も高く、③の条件の時に最も低かった。5 つの食事条件を比較すると、①と③ ($P < 0.01$)、①と④ ($P < 0.01$)、①と⑤ ($P < 0.05$)、②と③ ($P < 0.05$)、③と⑤ ($P < 0.05$) の間に統計学的な有意差が認められた [図 2 (b)]。

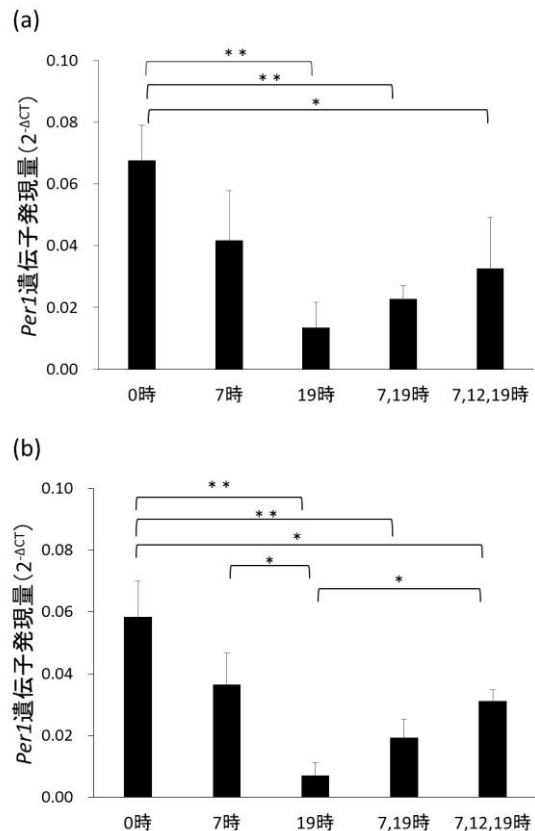


図 2. 末梢血単核球 (PBMC) における *Per1* mRNA 発現量に及ぼす食事条件の影響

4. 考察

本研究結果 [図 2 (a)および(b)] から、犬の PBMC における時計遺伝子 *Per1* mRNA の発現量が食事条件によって変化することが明らかとなった。これまでの報告では、血中コルチゾール値が犬の PBMC における *Per1* mRNA 発現量をコルチゾールの濃度および刺激時間依存性に変化させることが明らかになっている⁴⁾。食事条件によって PBMC における *Per1* mRNA 発現量が変化するメカニズムは不明であるが、*Per1* 遺伝子が犬の適切な食事条件を検索する上で重要なマーカーになると考えられた。

本研究においては、異なる食事条件が *Per1* mRNA 発現量の日内差に及ぼす影響を解析した。しかしながら、いずれの食事条件においても *Per1* mRNA 発現量の日内差に有意な変化は認められなかった。以前の研究⁴⁾では、1 日 1 回、朝 10 時に食事を与えた場合、PBMC における *Per1* mRNA 発現量に概日リズムが認められ、昼 12 時に最も高く深夜 0 時に最も低かった。同じ研究⁴⁾では、夜 21 時にも *Per1* mRNA 発現

量が有意に低下していたため、本研究では昼 12 時と夜 21 時の 2 点において *Per1* mRNA 発現量を解析した。本研究において *Per1* mRNA 発現量に日内差が検出されなかった原因の 1 つとして、用いた健常犬の数が少なかったことが影響している可能性が考えられる。本研究では健常犬を 6 頭用いた。これら 6 頭は、体温および血中コルチゾール値の結果から正常な概日リズムを刻んでいると考えられるが、異なる食事条件が *Per1* mRNA 発現量の日内差に及ぼす影響は 6 頭中 3 頭において検証した。本研究では、異なる食事条件をケージ内に設置した犬用自動給餌器により作り出したが、犬の性質上、自動給餌器に興奮する犬が 6 頭中 3 頭存在した。ケージ内で常に興奮状態になると概日リズムが乱れる可能性が考えられたため、本研究ではこれら 3 頭を除外し、残りの自動給餌器に興奮しなかった 3 頭を用いた。被験犬の数 $n = 3$ は、統計学的な解析をする場合の最低数であるため、より多くの犬を用いればさらに正確な検証が可能になると考えられた。本研究において *Per1* mRNA 発現量に日内差が検出されなかった他の原因として、解析した時間（昼 12 時および夜 21 時）の数が少なかった可能性も考えられる。24 時間のうち、さらに多くの時間で *Per1* mRNA 発現量を解析していれば、概日リズムをより正確に捉えられていたかもしれない。しかしながら、頻回の採血はそれ自体がストレスとなり、健常犬の概日リズムを乱す可能性もあるため、*Per1* mRNA 発現量を解析すべき時間については今後の条件検討が必要であると考えられる。

本研究では、PBMC における *Per1* mRNA 発現量の日内差ではなく、*Per1* mRNA 発現量自体で犬の最適な食事条件を検討した。昼 12 時および夜 21 時における *Per1* mRNA 発現量の解析から、1 日 1 回深夜 0 時の食事条件における *Per1* mRNA 発現量と、1 日 1 回夜 19 時の食事、1 日 2 回朝 7 時および夜 19 時の食事、1 日 3 回朝 7 時、昼 12 時、夜 19 時の食事条件における *Per1* mRNA 発現量には有意差が検出された [図 2 (a), (b)]。さらに、夜 21 時における *Per1* mRNA 発現量の解析から、1 日 1 回夜 19 時の食事条件における *Per1* mRNA 発現量と、1 日 1 回朝 7 時の食事、1 日 3 回朝 7 時、昼 12 時、夜 19 時の食事条件における *Per1* mRNA 発現量には有意差が検出された [図 2 (b)]。ヒトにおいては、1 日 3 回、朝、昼、晩の食事が推奨されており、深夜食は概日リズムを乱す要因の 1 つとして考え

られている。犬においても深夜食が概日リズムを乱す要因であると仮定すると、*Per1* mRNA 発現量の解析結果から、犬の最適な食事条件として、1 日 2 回朝 7 時および夜 19 時、または 1 日 3 回朝 7 時、昼 12 時、夜 19 時の食事が適している可能性が考えられた。

本研究では、食事条件を 1 週間継続して最終日に PBMC における *Per1* mRNA 発現量を解析した。今後は、より長期間同じ食事条件を続け、*Per1* mRNA 発現量に加え他の代謝・内分泌パラメーターを解析することで、犬の最適な食事条件に関する本研究成果をさらに正確に検証する必要があると考えられた。

引用及び参考文献

- 1) Huang, W., Ramsey, K.M., Marcheva, B., Bass, J., 2011. Circadian rhythms, sleep, and metabolism. *Journal of Clinical Investigation* 121, 2133-2141.
- 2) Ko, C.H., Takahashi, J.S., 2006. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human Molecular Genetics* 15, R271-277.
- 3) Tahara Y, Shibata S. 2013. Chronobiology and nutrition. *Neuroscience* 253, 78-88.
- 4) Ohmori, K., Nishikawa, S., Oku, K., Oida, K., Amagai, Y., Kajiwara, N., Jung, K., Matsuda, A., Tanaka, A., Matsuda, H., 2013. Circadian rhythms and the effect of glucocorticoids on expression of the clock gene period1 in canine peripheral blood mononuclear cells. *Veterinary Journal* 196, 402-407.