ラット肝組織酸素消費量の日変動リズムと明暗交替との関係

Relationship between Daily Rhythm in Oxygen Consumption of Rat Liver Tissue and Light-dark Cycle

順天堂大学医学部衛生学教室

菊池 正一・細見 韶子
吉田 淳・沢 辺 安 正

Masakazu Kikuchi, Akiko Hosomi, Atsushi Yoshida and Yasumasa Sawabe

Department of Hygiene, Juntendo University School of Medicine, Tokyo

Oxygen consumption of liver slices from male Wistar rats was determined three times a day, morning, early afternoon and evening, by means of the Warburg manometric method.

Under the lighting regimen of LD 12:12, light from 7:00 to 19:00, there was observed a circadian rhythm, with a trough at the onset of light and a peak just prior to the onset of darkness. After the inversion of the lighting regimen, i. e. light from 19:00 to 7:00, the phase of Q_{O_2} and Q_{O_2} (N) shifted gradually and reached eventually to 180° reversal by four weeks after the inversion of lighting.

Our results suggest that there exists an endogenous periodicity in oxygen consumption of the liver tissue, which is entrained to a light-dark cycle as Zeitgeber and consequently appears as a circadian rhythm.

I 緒 言

生物学的現象を時間の関数としてとらえる見方に対し、最近特に注意がむけられるようになってきている。なかでも周期的変動に関して深い関心が払われつつあり、ある種の生理機能は、約24時間の周期をもって変動を続けることが明らかにされている^{1)~3)}。

Kikuchi u. Weihe⁴⁾ は純酸素中におけるラット肝組織切片の酸素消費 (Q_{O_2}) も、早朝に低く、夕刻に高い日変動を示すことを報告した。これは肝のになっている多様な機能を支えるエネルギー代謝の面において、1日の時刻による変動が存在することを示唆するもので、注目すべき現象といわねばならない。

衛生学に関連ある領域においても、肝の熱産生、グリコーゲン代謝、解毒等の諸機能は極めて重要な対象であり、馴化、昼夜動、飛行機による東西方向への急速な位置の移動等の問題とも関連して、基礎的検討を要するものと考えられる。

一体約24時間の周期を示す生理機能の変動 (circadian rhythm) においては、変動を誘発する要因 (synchronizer, Zeitgeber) として、明暗交替が主役を演ずる場合が極

めて多いので⁵⁾⁶⁾、著者らは人工的に明暗交替を制御して12時間づつの明暗交替の下に動物を飼育し、1日のうちの時刻による Q_{O_2} の変動のあることを確認し、ついで12時間宛の明暗を逆転して、期間をおって Q_{O_2} の日変動のパターンの変化を追跡した。この際明暗逆転は、毎日の明暗交替時刻を漸次ずらして逆の位相にもち来すのではなく、24時間明を継続してその後12時間づつの暗・明を繰返す方法を採用した。即ち動物はある時点を境に1日の明暗交替が全く逆転した環境下におかれるわけである。

本研究の概略については、第36回日本衛生学会に報告した。

II 実験方法

150g 前後の Wistar 系雄性ラットを用いた。動物は気温 25℃、気湿60%の人工気候室内で固型飼料と水を自由に摂取させて飼育した。明暗交替は正常時で7:00-19:00 点燈, 19:00-7:00 消燈の明暗12時間交替 (LD 12:12), 明暗逆転は12時間の点燈時間を更に12時間延長した後 7:00-19:00 消燈, 19:00-7:00 点燈の逆転した12時間交替 (DL 12:12) に切換えた。実験は明暗正常下1群と

明暗逆転後1週, 3週, 4週の3群について行なった。各群とも1系列の実験は, 朝 7:30, 昼 14:00, 夕 17:00 の3時刻について行った。但しこの3時刻の実験を同日に行なうのは技術的に不可能なので, 1日1時刻の実験とした。1系列の実験即ち1回分の朝・昼・夕の一連の測定には, 必ず同一日生れであって, 同一日に購入し, 同一条件下で飼育した動物のみを使用した。1回の実験につきラット4匹を軽度の ether 麻酔下に屠殺し, 肝臓を取出し一部は肝組織呼吸測定, 一部は乾燥重量測定, 一部は肝 glycogen 含有量測定, 残りの一部でN量測定を行なった。各群1時刻あたり計8匹宛の動物を使用した, 明暗逆転7日目のみは4匹宛であった。

肝組織呼吸の測定は, Deutsch⁷⁾ の free-hand 法によって肝組織切片を作成し, 水中においた pH7.2~7.3 の Krebs-Ringer-Phosphate 液に浮遊させ, その液中で厚さ約 0.5mm, 重量 20-30mg の小切片を作成した。その切片 50-60mg を Krebs-Riger-Phosphate 液 2cc を浮遊液として Warburg の容器に入れ, 副室には 10% KOH 0.2cc を入れ気相は純酸素とし 37.5°C の恒温水槽中で振盪を行なって80分間の酸素の消費を読み取り, 直線の部分から1時間当りの酸素消費量を求めた。この値について乾燥重量当り, 及びN量当りの酸素消費量を計算した。乾燥重量は 110°C 8時間以上乾燥させた重量を用い, N量については micro-Kjeldahl 法により測定を行なった。肝 glycogen 含有量との関係については別に報告する予定である。

III 結 果

Wistar 系ラット肝組織呼吸について, 異なる明暗交替条件下で, 1日3時刻において得られた値は次の通りであった。いずれも酸素消費量平均値±標準誤差を示し, 単位は肝組織乾燥重量当り酸素消費量 (Q_{O_2}) は $\text{mm}^3\text{O}_2/\text{mg}$ 乾燥重量/時, N量当り酸素消費量 ($Q_{O_2}(N)$) は $\text{mm}^3\text{O}_2/\text{mg}$ N量/時である。

1) 明暗正常時: 乾燥重量当りでは朝 6.83 ± 0.08 , 昼 8.07 ± 0.15 , 夕 8.76 ± 0.19 , N量当りでは朝 48.36 ± 0.97 , 昼 54.30 ± 1.12 , 夕 54.91 ± 1.25 であった。いずれも朝に低く夕刻に高い日変動を示している (図1)。

乾燥重量当りの日変動はかなり振幅が大きく, 3時刻の各値のいずれの間にも有意差が認められる (p は朝一昼間 0.1% 以下, 朝一夕間 0.1% 以下, 昼一夕間 1% 以下)。一方N量当りに換算するとこの日変動は前者に比して弱くなるが, なお朝と夕刻の測定値の間には $p < 0.1\%$ の有意差が認められる。

Fig. 1. 24 hour patterns in Q_{O_2} ($\text{mm}^3\text{O}_2/\text{mg}$ dry weight/hr) and $Q_{O_2}(N)$ ($\text{mm}^3\text{O}_2/\text{mg}$ N/hr) under normal lighting regimen (light from 0700-1900). Mean values with standard errors and extreme values.

2) 明暗逆転1週後: 乾燥重量当りでは, 朝 7.24 ± 0.23 , 昼 6.99 ± 0.22 , 夕 7.11 ± 0.41 と殆んど平坦な経過をたどり, 時刻による著明な変動は認められない。これに対しN量当りでは, 朝 40.05 ± 1.02 , 昼 42.87 ± 1.58 , 夕 50.82 ± 2.17 と朝低く夕刻に高い明暗正常時と同様の型を示している (図2)。

3) 明暗逆転3週後: 明暗正常時および明暗逆転4週後と同様実験を2回くり返し, 従って2系列の測定結果が得られたが, 逆転3週後の結果は他の時期と異り, 1回目(系列1)と2回目(系列2)との実験結果が同一のパターンを示さなかった。まずこの2つの系列の測定結果を1つにまとめて図示すると図3の如くで, 乾燥重量当り朝 8.15 ± 0.22 , 昼 8.77 ± 0.21 , 夕 7.23 ± 0.25 , N量当り朝 45.43 ± 1.03 , 昼 48.12 ± 1.78 , 夕 54.17 ± 1.57 であった。即ち乾燥重量当りでは昼が朝よりやや高値を示すが, 夕刻の値は前2者より遙かに低く, 明暗正常時の型に比し殆ど逆転に近い様相である。しかしながらN量当りの日変動は, 朝よりも昼, 夕と次第に高まっており, 本質的には逆転前のパターンをのこしている。

次に明暗逆転3週後の実験結果を, 系列別にわけて観

Fig. 2. 1 week after inversion of lighting regimen (light from 1900-0700).

Fig. 3. 3 weeks after inversion of lighting regimen (Series 1+Series 2).

すると次察のごとくである。系列1では乾燥重量当り朝 8.61 ± 0.20 , 昼 8.23 ± 0.20 , 夕 6.38 ± 0.14 であって, 朝一夕, 昼一夕の間にはともに $p < 0.1\%$ で有意差が認められ, 朝に高く夕に低い逆転の型が完成したものと判定される。一方N量当りで見ると, 朝 49.42 ± 1.02 , 昼 43.67 ± 1.16 , 夕 50.54 ± 1.50 で, 朝一昼, 昼一夕の間に $p < 0.5\%$ で有意差が認められる。すなわちN量当りでは昼が最も低い型を示し, 逆転に至る移行段階を思わせる (図4)。

系列2においては, 乾燥重量当り朝 7.79 ± 0.32 , 昼 9.50 ± 0.16 , 夕 8.08 ± 0.45 であって, 昼に最高値があり, 系列1のような完全な逆転型に到達していない。N量当りでは朝 44.68 ± 1.37 , 昼 54.05 ± 2.08 , 夕 57.80 ± 2.14 と朝低く夕刻高い明暗正常時の型がそのまま残存しているかたちである (図5)。

4) 明暗逆転4週後: 乾燥重量当り朝 7.47 ± 0.12 , 昼 6.50 ± 0.25 , 夕 6.00 ± 0.12 で, 朝一昼間 $p < 1\%$, 朝一夕間 $p < 0.1\%$ でそれぞれ有意差が認められた。この時期には完全に朝高く夕刻低い逆転型を示している。N量当りの日変動をみると, 朝 47.94 ± 1.09 , 昼 44.70 ± 0.89 , 夕 42.72 ± 0.88 で, 朝一夕間には $p < 0.5\%$ の有意差があり, これも明暗正常時と全く逆転した型を示すに至っ

Fig. 4. 3 weeks after inversion of lighting regimen (Series 1).

Fig. 6. 3 weeks after inversion of lighting regimen (Series 2).

Fig. 6. 4 weeks after inversion of lighting regimen.

ている (図6)。

IV 考 察

Wistar 系ラット肝組織切片の酸素消費を、12時間明暗交替の人工照明下で、朝、昼、夕の3時刻に測定した結果、暗から明にうつる直後の7:30に低値をとり、その後次第に高まって明から暗にうつる直前の17:00頃に最高値を示すことが確認された。

これはさきに Kikuchi u. Weihe⁴⁾ が Sprague-Dawley 系について見出した日変動と全く軌を一にするものである。

一方明暗の位相を逆転した状態で4週間飼育したラットについて、その肝組織切片酸素消費を同様に時刻別に測定した場合、朝に高く夕刻に低い日変動を示し、明暗正常時と全く逆の型となることは、さきに Kikuchi u. Hosomi⁵⁾ が発表したごとくである。

以上の事実から、*in vitro* の肝組織呼吸の日内リズムに対し、明暗交替が強い影響を与えていることが予想されるので、明暗の位相の逆転した照明条件下で1週後、および3週後の日変動リズムを観察し、明暗の位相逆転によるリズムの型の変化過程を時期をおって追究した。

明暗逆転下飼育1週後のラットの肝組織呼吸は、乾燥重量当りでは1日の時刻による変動は極めて小さく、殆ど平坦といえる経過をたどり、日内リズムは消失した状態を示している。しかしながらN量当りの酸素消費量は朝低く夕刻高い明暗正常時の型のままである。

明暗逆転3週後の結果は、既述の通り乾燥重量当りでは、朝よりも昼の値がやや高いけれども、夕刻の値は前2者より有意に低く、明暗正常時と逆の型にかなり近づいている。一方N量当りで見ると、朝の値よりも昼がやや高く、更に夕刻は高値を示して、なお明暗正常時の型が残っている。

この逆転3週後の実験2系列を別々に観察すると、系列1では乾燥重量当りで図4の通り朝に高値、昼、夕と次第に低下する型を示し、N量当りでは朝、夕に比して昼のみ低い型をとっている。この系列では、乾燥重量当りの日変動は既に明暗逆転に馴化後の型即ち明暗正常時と正反対の型にまで到達したものと見ることができ、N量当りでは逆転型に至る移行の途中にあると考えられる。系列2においては、乾燥重量当りでは昼にピークのある日変動曲線が見られ、N量当りではなお朝低夕高の正常時の型がそのまま残っている。前者は日変動リズム逆転経過の途中と見ることができよう。

このように見ると、明暗位相逆転3週付近では実験系

列により馴化の程度に相違が見られ、恐らくは個体によりこの期間で既に逆転の完成するものと、未だその途中にあるものとが混在するのであろうと想像される。

明暗位相逆転4週後においては、乾燥重量当りも N 量当りもいずれも明暗正常時の反対の型即ち朝高く夕刻低い型を示すに至り、明暗逆転に対する馴化が完成したものと見られる。

明暗位相逆転後新たな明暗の交替に同調するまでに、従来知られている生理機能は大体14日以内であるとされるが⁹⁾、肝組織酸素消費では3~4週を要する結果が得られたことは、異例に長い期間を要する例といえる。

乾燥重量当り酸素消費量(Q_{O_2})は、その分母となる乾燥重量が、呼吸のための基質として用いられる成分をふくめた直接酸素消費を行なわない成分をも加えての重量である。従って乾燥重量当りの日変動は、直接酸素消費に関与しない成分の消長によってもかなり影響されている筈である。その点 N 量当りの値の変動の方がより直接的に組織自身の酸素消費能の消長をあらわすものといえよう。しかしながら組織呼吸測定の際最も普通に用いられている Q_{O_2} は、前記の如く測定の時点における被検組織の総乾燥重量に対する酸素消費量という内容をもつのであるから、そのレベルにおける酸素消費能の大小を論ずることはそれなりの意味があり、この値に明確な日変動リズムの認められることは注目すべき現象であって、特にこの分野での動物実験の実施及び成績判定の上で軽視しえぬものと考えらる。

ラット肝組織呼吸の日変動リズムに対するZeitgeberは、本実験の結果から、明暗の交替であることが推定される。この場合のリズムは、環境刺激である光の有無により直接ひきおこされるものでないことは、明暗逆転した後も直ちにリズムが逆転しないことからうかがうことができ、従ってこのリズムは完全にexogenousでないことは明らかである。一方肝組織呼吸の日変動リズムは、明暗交替の位相の変化に無関係でない。もしも外界の明暗の周期がいかに変化しても組織呼吸の日変動リズムは最初のまま持続するならば、これは環境刺激に影響されぬ体内時計に一義的に依存するリズムといえるが、肝組織呼吸のリズムはそうではない。従ってこのリズムは、他の多くの生理機能と同様に、本来endogenousのcircadian rhythmが存在し、これがZeitgeberとしての明暗交替に同調(entrain)して24時間周期のリズムとして観察されるものと推定される。ただ本実験からは、明暗による体動および食餌摂取の周期的変動と肝組織呼吸のそれとの関連は知ることができない。明暗周期の位

相の変化が、ラットの活動性ないし食事摂取の日内リズムに変化を与え、間接的に肝組織呼吸のリズムに影響している可能性については、目下のところ全く否定しすることはできない。

本研究と似た観点から行なわれたものに、Holmgren and Naumann⁹⁾の業績がある。これはラットの肝の組織呼吸をWarburg検圧計により午前2時、8時、午後2時、8時の4時刻に測定したのであるが、結局肝組織呼吸は1日の時刻による有意の変動が認められないとの結論に達している。われわれの観察結果と異なるので、実験の細部につき検討すると次の諸点が認められた。

第1に実験に使用した動物は、いずれも雄性のラットであるが、Holmgrenらの報告には系統の記載がない。あるいは雑系のラットであってリズムの位相や振幅に個体差が大であったため整一な成績がえられなかったことも考えられる。第2に明暗交替条件が不明であるが、恐らく自然の昼夜交替下での実験と想像される。この点われわれの明暗交替条件とは異っているが、われわれの経験では、19:00消燈の際、21:00の Q_{O_2} は既にピークを過ぎて下降にうつっているのを観察した。Holmgrenらの実験時刻は必ずしも適当でなかったおそれがある。第3に酸素消費量測定の際の器内の気相は特記されていないところからみて空気であったと思われる。われわれの場合は純酸素を用いたので、あるいは組織切片の酸素消費能が増幅されて明瞭な差となってあらわれたのかも知れない。

本研究で得られた肝組織切片酸素消費量の日変動リズムに近い型をとる他の生理機能のリズムを、既知のものの中から求めてみた。見出されたのは、Halbergら¹⁰⁾のマウス血清中、Guilleminら¹¹⁾のラット血漿中、Critchlowら¹²⁾、Holmquestら¹³⁾のラット血漿中並びに副腎皮質中およびWurtman and Axelrod¹⁴⁾のラット副腎皮質中のそれぞれcorticosterone量の日変動で、これらはいずれも暗から明に転ずる時刻付近で最低値、明から暗に転ずる直前の付近で最高値をとる型を示しており、われわれの肝組織呼吸について得られたのと殆ど一致するリズムであった。生理的範囲内における血中corticosterone量の変動が、組織呼吸に影響しうるものか否か、前者の量的変化が直ちに後者の変化をひきおこすか否かについては、更に解明を必要とするが、ここでは日変動リズムの型と位相の一致を指摘するにとどめる。

V 結 論

Wistar系雄性ラットを用い、1日の時刻をおって肝

組織切片酸素消費量を Warburg 検圧計により測定し、明暗交替との関連を追究した。

明暗12時間交替 (LD 12:12) の下では、肝組織酸素消費は暗から明にうつる前後の時刻に最低値、明から暗にうつる時刻直前に最高値を示す日変動リズムを示す。

明暗の位相を12時間ずらすと (DL 12:12)、次第に肝組織酸素消費のリズムは変型して、3週以上4週前後で明暗正常時と全く対称型のリズムを示し、逆転した新たな明暗交替に同調したことが知られる。

肝組織の酸素消費には endogenous の周期性が元来存在し、これが Zeitgeber としての明暗交替に同調して24時間周期の日変動リズムとなってあらわれるものと推定される。

文 献

- 1) Nelson, W. and F. Halberg : Phase relations of circadian rhythms : animals. In "Handbook of Environmental Biology", Federation of American Societies for Experimental Biology, pp.586-596 (1966)
- 2) Halberg, F. et A. Reinberg : Rythmes circadiens et rythmes de basses fréquences en physiologie humaine. J. Physiol. (Paris), 59, 117-200 (1967)
- 3) Mills, J. N. : Human circadian rhythms. Physiol. Rev. 46, 128-171 (1966)
- 4) Kikuchi, M. u. W. H. Weihe : Tagesperiodik des O₂-Umsatzes der Rattenleber. Experientia 20, 706 (1964)
- 5) Bünning, E. : Die physiologische Uhr. p. 60, Springer-Verlag, Berlin (1963)
- 6) Aschoff, J. : In "Die Umwelt der Versuchstiere" (Hrsg. W. H. Weihe) p. 47, Verlag Hans Huber, Bern (1964)
- 7) Deutsch, W. : An improvement of Warburgs method for cutting tissue slices for respiratory experiments. J. physiol. (Lond.) 87, 56 P (1936)
- 8) Kikuchi, M. u. A. Hosomi : Einfluss des Licht-Dunkel-Wechsels auf den O₂-Umsatz der Rattenleber. Experientia 23, 23 (1967)
- 9) Holmgren, H. and B. Naumann : The oxygen consumption of the liver, kidneys and pancreas at different times during the 24 hours. Acta Med. Scand. 128, 326-337 (1947)
- 10) Halberg, F., R. E. Peterson and R. H. Silber : Phase relations of 24 hour periodicities in blood corticosterone, mitoses in cortical adrenal parenchyma and total body activity. Endocrinology 64, 222-230 (1959)
- 11) Guillemin, R., W. E. Dear and R. A. Liebelt : Nychthemeral variations in plasma free corticosteroid levels of the rat. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 101, 394-395 (1959)
- 12) Critchlow, V., R. A. Liebelt, M. Bar-Sela, W. Mountcastle and H. S. Lipscomb : Sex difference in resting pituitary-adrenal function in the rat. Amer. J. Physiol. 205, 807-815 (1963)
- 13) Holmquest, D. L., K. Retiene and H. S. Lipscomb : Circadian rhythms in rats : Effects of random lighting. Science 152, 662-664 (1966)
- 14) Wurtman, R. J. and J. Axelrod : Daily rhythmic changes in tyrosine transaminase activity of the rat liver. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 57, 1594-1598 (1967)

(受付1968年9月4日)