

早稲田大学審査学位論文  
博士（スポーツ科学）

朝と夕の中等度強度運動実施時間帯の相違が  
マウス体重増加およびヒト脂質酸化量に及ぼす影響  
Effects of morning and evening moderate exercises on body  
weight control in mice and on fat oxidation in human

2016年1月

早稲田大学大学院 スポーツ科学研究科

安藤 加里菜

ANDO, Karina

研究指導教員： 坂本 静男 教授

## 目次

第 1 章 序論 .....	1
1-1. 研究の背景 .....	1
第 2 章 文献研究 .....	5
2-1. 時間（時間帯）を意識した学問の台頭 .....	5
2-2. 時間運動学 .....	6
2-3. 時間運動学の現状と課題 .....	8
2-3-1. 生体リズムと運動代謝 —マウスでの検討— .....	8
2-3-2. 運動負荷試験における実施時間帯とクロノタイプが各種 測定項目に及ぼす影響 —ヒトの検討— .....	9
2-3-3. 運動実施時間帯と脂質酸化量 —ヒトの検討— .....	11
2-4. 研究の目的 .....	13
第 3 章 運動実施時間帯の相違が体重増加の抑制に及ぼす影響 （検討課題 I） .....	14
3-1. 緒言 .....	14
3-2. 方法 .....	15
3-3. 結果 .....	22
3-4. 考察 .....	26
3-5. 結論 .....	28
3-6. 今後の展望 .....	28

第 4 章	運動実施時間帯の相違が脂質酸化量に及ぼす影響 .....	30
第 1 節	運動負荷試験における測定項目の日内変動一朝と夕の比較— (検討課題Ⅱ) .....	30
4-1-1.	緒言 .....	30
4-1-2.	方法 .....	32
4-1-3.	結果 .....	35
4-1-4.	考察 .....	39
4-1-5.	結論 .....	42
4-1-6.	今後の展望 .....	42
第 2 節	朝と夕の一過性中等度強度運動が脂質酸化量に及ぼす影響 (検討課題Ⅲ) .....	43
4-2-1.	緒言 .....	43
4-2-2.	方法 .....	46
4-2-3.	結果 .....	50
4-2-4.	考察 .....	60
4-2-5.	結論 .....	62
4-2-6.	今後の展望 .....	62
第 5 章	総合討論 .....	63
5-1.	本研究の目的と成果 .....	63
5-2.	今後の課題 .....	65
第 6 章	結論 .....	68
第 7 章	参考文献 .....	71

## 第1章 序論

### 1-1. 研究の背景

少子高齢化の状況にある我が国では、今後医療費の増大が見込まれる。肥満や生活習慣病といった慢性疾患の予防や改善は、将来的に増える医療費に対して、抑制効果を期待できる。日本人を対象とした約10年間の追跡調査において、医療費は肥満と有意な正の相関が認められている(1)。厚生労働省の国民健康・栄養調査(平成25年)によると、日本人成人における肥満者(body mass index: BMI 25kg/m<sup>2</sup>以上)の割合は男性28.6%、女性20.3%である。男性肥満者の割合はこの15年間にほぼ全ての年齢で増加している(2)。また、肥満によって合併症(メタボリックシンドローム, metabolic syndrome: MetS等)のリスクは増大することが報告されている(2,3)。医療費の増加抑制や健康の維持増進にとって、肥満の予防および改善は早急に解決すべき課題である。

肥満の予防や改善は死亡リスクの抑制に繋がる。2011年には日本人を対象に、肥満が死因別・男女別死亡リスクに及ぼす影響の調査が行われた。40歳以上を対象とした7つのコホート調査より5万人以上のデータをプール解析した結果、男女ともに肥満によって死亡リスクの有意な上昇(男性1.36倍、女性1.37倍)が認められた(4)。健康リスクや死亡率と深く関係することから、現在、肥満は1つの大きな社会問題となっている(4)。

遺伝的要因よりも環境的要因(生活習慣)が肥満には強く影響すると考えられるようになってきている(5)。環境的要因とは、エネルギー摂取量とエネルギー消費量の不均衡に代表される。そのため、肥満の予防や改善にはエネルギー消費量の適切な増大とエネルギー摂取量の適切な縮小といったエネルギー消費量とエネルギー摂取量の不均衡を是正するこ

とが有効である。肥満には運動療法や食事療法、両者の併用が効果的であるとされ(6,7)、肥満の予防や改善に向けて運動の担う役割は大きい。

1日の中で人々が運動を行う時間帯（早朝、朝、夕方、深夜）の割合は運動習慣の有無や性別に関わらず、午後～夕方でも高く、次いで朝～午前中に高い(8)。また、厚生労働省の国民健康・栄養調査（平成25年）によると、運動習慣（1回30分以上の運動を週2回以上実施し、1年以上継続していること）のある成人の割合は、男性33.8%、女性27.2%である(9)。運動習慣を持つ成人の割合を年代別にみると、男女ともに30歳代で最も低く、次いで20代が低くなっている。就労層である若年期（20～40歳）の運動習慣は中高齢期の運動習慣に影響を及ぼす可能性がある。若年期から薬に頼らずに運動を通して肥満の予防や改善に取り組むことは、人々の Quality of life (QOL) の向上や健康寿命の延伸および医療費増大の抑制といった観点から、我が国における重要な課題である。

2013年から2022年まで、国民の総合的な健康増進の推進を図る基本的な方針となる健康日本21（第二次）が厚生労働省より施行されている(10)。2000年から2010年までに施行された健康日本21（第一次）では、9分野（栄養・食生活、身体活動・運動、休養・心の健康づくり、タバコ、アルコール、歯の健康、糖尿病、循環器病、がん）には2010年を達成予定とする具体的な数値目標の設定がなされていた。しかし、身体活動量や歩数に関する目標は未達成に終わった(10)。健康日本21（第二次）の施行が終わる2022年に向けて、肥満の予防や改善により効果的な運動処方確立することおよびその普及が望まれている。

現在、肥満の予防や改善に向けた運動処方に関する研究は数多く行われている(11-14)。特に臨床現場での応用に向けて運動条件を探索した研究は多い。例えば、中高齢者を対象に運動強度や運動継続時間、運動を

行う季節といった検討が行われている(15-17)。しかし運動を行う時間帯に着目した研究はほとんど認められない。人々は朝または夕に運動を実施してきている(8)ことが多いので、運動が肥満の予防や改善に及ぼす効果を朝と夕で比較検討することは意義がある。

運動は、概日リズムにおいて光をともしない外的同調因子の1つである(18)。また、生物の生理活動や代謝には、一定の周期性をもつ各種のリズム(生体リズム)が存在する。その基本となるリズムは、ほぼ24時間を周期とする日内変動(概日リズム)である(19,20)。交感神経系の活性を高める等、代謝に大きな影響を及ぼすアドレナリンの分泌には日中に高く、夜に低いという日内変動がある(21)。生体リズムが代謝調節に及ぼす影響は2000年頃から徐々に研究が行われている。概日リズムを司る視床下部視交叉上核(suprachiasmatic nucleus: SCN)にエネルギー代謝を調節するニューロンが存在し(22)、糖代謝に日内変動が認められた(22)。肥満の予防や改善に有効な運動条件を考える上で、脂質酸化の日内変動を検討することは重要である。しかし、我々の知る限り、朝または夕といった運動実施時間帯の観点から肥満の予防や改善に向けてより効果的な運動条件を探索した研究はほとんど行われていない。

代謝は生体リズムの影響を受ける。朝に高値、夕に低値を示す代謝関連遺伝子の発現量とエネルギー消費量には正の相関関係が認められる(23,24)。また代謝関連遺伝子の発現量を調節する因子の1つは、生体リズムを制御するSCNであることが報告されている(25,26)。そのため、運動が脂質代謝に及ぼす影響は、運動実施時間帯によって異なる可能性がある。

肥満の予防や改善に有効な運動条件を考える上で、1日の中での運動実施時間帯の違いが脂質代謝に及ぼす影響を検討することは重要である。

本研究では「朝と夕どちらの運動が肥満の予防や改善に効果的か」に関する基礎的な研究としてマウスおよびヒトを対象に検討した。

本研究でまず、マウスを対象として、太りやすい環境下において朝と夕どちらの長期的運動介入がより体重増加を抑制し、体脂肪を減少させるかを検討した。続いて、ヒトを対象として、臨床現場において、運動処方を作成する際に実施される運動負荷試験における測定項目の日内変動や一過性中等度強度運動における脂質酸化量の日内変動を、朝と夕で比較検討することを目的とした。

## 第2章 文献研究

## 2-1. 時間（時間帯）を意識した学問の台頭

生物には約 24 時間の変動を示すサーカディアンリズム（概日リズム）が内在的に存在する。これはバクテリアから哺乳類まで様々な種で保存された共通の機構である。哺乳動物において概日リズムを形成する中枢は脳の SCN である。SCN が作り出している概日リズムは *Period (Per)*, *Clock*, *Bmal1*, *Cry* といった時計遺伝子と呼ばれる遺伝子群によって形成される。SCN の出力する自律振動リズムにあわせて、睡眠-覚醒、体温変動、メラトニンやコルチゾール、副腎皮質ホルモン放出ホルモン (corticotropin-releasing hormone: CRH) や副腎皮質刺激ホルモン (adrenocorticotrophic hormone: ACTH) をはじめとしたホルモン分泌等の生理的リズムは引き起こされる。一方で、SCN 破壊によって、これらのリズムは消失する(19,20)。

ヒト時計遺伝子のスニップス〔SNPs: single nucleotide polymorphisms (一塩基多型)〕解析結果やヒトの種々の疾病発症時刻にはリズム性が認められている。例えば、虚血性心疾患の発症は明け方に多く、皮膚のかゆみは夜に出現しやすい(27)。このことから、疾病の管理に時間帯を考慮した治療が有効であることが明らかとなってきた。このような研究領域を「時間治療学」と呼ぶ。時間治療学の中で時刻やタイミングを考慮した薬物治療は「時間薬理学」と呼ばれ、臨床現場で実践されるようになってきた。夜食を摂取すると太りやすくなるというように、食事に関しても薬物治療と同様に、時間の側面を考慮する考え方が重要となっている(27)。このような考えのもと近年になって「時間栄養学」が台頭してきた(27)。最近ではさらに、運動が代謝応答に及ぼす影響に関して時間の側面を考慮する「時間運動学」という考え方が注目され始めている。



## 2-2. 時間運動学

時間運動学とは、運動の影響を体内の時計遺伝子のはたらきと関連付けて調べ、“いつ運動するか”という新しい視点で運動生理学を知ることである。先の時間薬理学および時間栄養学の考え方をもとにした時間運動学には、i)体内時計のリセットや周期の変化に運動が及ぼす影響を考える「体内時計作用運動学」、ii)体内時計が運動応答や代謝に及ぼす影響を考える「時間運動学」といった2つがある(28)。広義の時間運動学には体内時計作用運動学と狭義の時間運動学の両方が含まれる。時間運動学は英語では **Chrono-exercise** と表記される(28)。

代謝制御には時計遺伝子が関与する。脂肪細胞から分泌される遊離脂肪酸やレプチンの血中濃度に概日リズムが認められることは以前より報告されており、脂肪細胞に体内時計が存在することは古くから示唆されていた(29)。しかし代謝制御と時計遺伝子との間に関連が認められるようになったのは2005年以降のことである(29)(表1)。

時計遺伝子の発現異常は肥満のリスクとなる(30-32)。脂質代謝や糖代謝に関わる因子の多くは体内時計の制御を受けている。時計遺伝子の変異によって代謝制御に異常が生じることが、明らかにされるようになった(30,32-34)。

表 1. 時計遺伝子と代謝制御の関連

遺伝子	代謝制御
<i>Bmall</i>	高血圧、2型糖尿病 MetS患者内臓脂肪での活性低下 膵臓β細胞の数ならびに大きさの低下 脂肪細胞分化
<i>Clock</i>	肥満 脂質代謝異常
<i>Per2</i>	肥満 <i>Pparγ2</i> 活性の抑制
<i>Cry1, Cry2</i>	膵臓からのインスリン分泌 肝臓における糖新生調節
<i>Rev-erba</i>	コレステロールならびに胆汁酸代謝

ヒトを対象に時計遺伝子と代謝制御の関連を検討した研究は私の知る限りほとんどないが、ヒト以外の動物を使用した研究は近年、時計遺伝子の代謝制御への関与を示唆する報告は相次いでなされている(33,35–37)。例えば、脂肪組織中の時計遺伝子 *Bmall* 発現量と LDL コレステロール値、血中グルコース濃度、体脂肪量との間には正の相関が報告されている(35,38)。しかし、ヒトを対象として前述の項目を調べた研究はほとんど認められない。現在、アメリカスポーツ医学会 (American College of Sports Medicine: ACSM) が推奨する標準化された国際的な運動ガイドラインの中に、生体リズムの観点は含まれていない。ただし、2013 年には ACSM より時間運動学的な観点より以下の追加コメントが発表されている(39)。

- (1)運動に対する生体応答の日内変動は朝8時～夕20時に関しては考慮する必要がある。
- (2)現状では運動実施時間帯で最大酸素摂取量や有酸素能力、運動パフォーマンスに有意な変動が認められるという論文は少ない。

運動ガイドラインに生体リズムに関する項目を含む必要があるか否か、今後さらなる検討を重ねていく必要がある。

### 2-3. 時間運動学の現状と課題

#### 2-3-1. 生体リズムと運動代謝 —マウスでの検討—

最近のマウスにおける研究では、朝に高値、夕に低値を示す *PPARs* や *UCP-3* は代謝関連の遺伝子であり、SCN の制御を受けた生体の概日リズムを形成する時計遺伝子の影響をも受けることが知られている(25,26)。網羅的遺伝子発現解析によって、*PPARδ* の活性化により脂肪酸トランスファー、脂肪酸β酸化、エネルギーを熱として放出する脱共役タンパク(*UCP*)等は骨格筋細胞で誘導されることが明らかとなった(40)。高脂肪食条件下において *PPARδ* の作動薬を投与した研究では、貯蔵されていた中性脂肪が白色脂肪細胞において主に分解され、肥満や耐糖能、インスリン感受性に劇的な改善が認められた。これは、たとえ飽食下であっても *PPARδ* を刺激することで脂肪蓄積ではなく脂肪燃焼のために遺伝子発現が誘導され、その結果として細胞に蓄積された脂肪が消費されたことを示唆している(40)。

運動実施時間帯によって代謝関連遺伝子の発現量や脂質代謝が異なるか否かを検討する必要がある。運動は内臓脂肪や筋において核内受容体の1つである *PPARs* や *UCP* といった代謝関連遺伝子の発現量に影響

を及ぼすことが報告されている。また、代謝関連遺伝子の発現量とエネルギー消費量には正の相関関係が認められている(23,24)。そのため、概日リズム形成に重要な役割を果たす時計遺伝子発現リズムの影響を受けた *PPARs* や *UCP-3* といった代謝に関連した遺伝子発現に対しても、運動が及ぼす影響は実施時間帯によって異なる可能性がある。しかしながら、運動の実施時間帯の相違が体重コントロールや脂質代謝、代謝関連遺伝子の発現量に及ぼす影響は不明な点が多い。

そのため、運動実施時間帯の相違が体重コントロールや脂質代謝、代謝関連遺伝子の発現量に及ぼす影響を検討していく必要がある。

### 2-3-2. 運動負荷試験における実施時間帯とクロノタイプが各種測定項目に及ぼす影響 —ヒトの検討—

臨床現場において運動処方を作成には運動負荷試験が必須である。運動処方において運動強度は運動負荷試験の結果に基づいて決定される。運動強度は主に最高酸素摂取量(peak oxygen uptake:  $\dot{V}O_{2peak}$ )に対する割合 ( $\% \dot{V}O_{2peak}$ ) で示される。あるいは、運動中に最も脂質酸化量が高値を示す強度である最大脂質酸化量時運動強度(Fatmax)を運動負荷試験により求め、肥満の予防や改善の際に用いられることがある(41)。これらの指標を正確に評価することは適切な運動処方の作成に重要である。

しかしながら、運動負荷試験を行う時間帯の相違が  $\dot{V}O_{2peak}$  および Fatmax に及ぼす影響は明らかでない。また、現在は運動処方の作成のために行う運動負荷試験の実施時間帯に決まりはなく、ガイドライン等において実施時間の標準化は行われていない。

ヒトの生体リズム位相には個人差がみられ、睡眠覚醒パターンや気力、気分の日内変動には大きな個人差がある(42)。この代表的な個人特性が

クロノタイプ(日周指向性)、いわゆる朝型や夜型と言われる尺度である。クロノタイプ(朝型、中間型、夜型)とは、個人が1日の中で示す活動の時間的指向性である。これまでの疫学調査および遺伝子研究の知見から、クロノタイプは個人がもつ生物時計機能特性の表現型と考えられている(42)。クロノタイプは国際的に標準化された朝型夜型質問紙(Morningness-Eveningness Questionnaire: MEQ)の得点によって評価される。

クロノタイプの相違は生理学的指標の日内変動に影響を及ぼす。Duffyらは一連の研究の中で、MEQの得点と直腸温の $\tau$ (周期)との間に次のような相関を報告した(43,44)。それは、朝型ほど直腸温の周期は短く、夜型ほど直腸温の周期は長いという有意な相関である。さらにBrownら(45)もクロノタイプと時計遺伝子の発現周期について次のことを認めている。それは、皮膚線維芽細胞における時計遺伝子 *Bmal1* の mRNA 発現周期は、朝型で短く、夜型で長くなるという有意な相関である(45)。ヒトにおいて概日リズムの代表的な指標である血漿コルチゾール(46)や血漿メラトニン(47-50)、深部体温(46,48-53)の位相には、クロノタイプ間に明瞭な差が認められ、朝型に対して夜型で約2時間の遅れが認められている。

$\dot{V}O_{2peak}$  や運動中の脂質酸化量には、いくつかの論文で日内変動が認められていない(54-57)。一方で  $\dot{V}O_{2peak}$  は朝と比較して夕で4.2%程度高いといった日内変動を報告している論文もある(58-61)。現状では  $\dot{V}O_{2peak}$  および Fatmax に関する日内変動の有無について統一した見解は得られていない。先行研究で統一した見解が得られていない理由にはクロノタイプの統制がなされていないことが考えられる。水泳における最大運動パフォーマンスは体温位相に沿うことが報告されている(62)こ

とから、朝と夕で  $\dot{V}O_2\text{peak}$  および Fatmax の日内変動を比較検討するためにはクロノタイプを統制し、対象者の体温位相を揃える必要がある。若年者においてクロノタイプの相違は最大酸素摂取量に影響を及ぼすことが知られている。夜型に限って、朝と比較して夜で、最大酸素摂取量は4%向上することが報告されている(58)。しかし、クロノタイプに着目して最大酸素摂取量を検討した研究は、私の知る限り、わずかしかない。そのため、運動負荷試験を行う時間帯の相違が  $\dot{V}O_2\text{peak}$  および Fatmax に及ぼす影響はクロノタイプを考慮した上で検討する必要がある。

最近の研究では、2011年に Mohebbi らが非肥満者や肥満者を対象として運動負荷試験を行い、異なる運動強度における MFO の日内変動を朝と夕で比較検討した。その結果、運動強度や体脂肪量とは独立して、朝よりも夕の運動で MFO は高値を示した(63)。肥満の予防や改善に向けた体脂肪量の減少や脂質酸化という減量目的においては朝よりも夕の運動がより好ましい可能性がある。しかし、先行研究(63)では朝よりも夕の運動で MFO がより高値を示したメカニズムはまだ解明されていない。時間運動学という分野はまだ歴史が浅く、現在はまだ現象を追っている状況である。今後は朝と夕で運動代謝やパフォーマンスに相違が認められる要因に迫っていく必要がある。さらに、先行研究(63)では対象者のクロノタイプは統制されていない。今後はクロノタイプを統制した条件下で、さらに MFO の日内変動を朝と夕で比較検討する必要がある。

### 2-3-3. 運動実施時間帯と脂質酸化量 —ヒトの検討—

臨床現場では、運動負荷試験により求めた  $\dot{V}O_2\text{peak}$  を用いて運動強度を設定し、運動処方をおこなう。例えば、肥満症の運動処方では1回に1時間の中等度強度(40-60% $\dot{V}O_2\text{peak}$ )運動が用いられる(64)。しかしな

から、同じ1時間の40-60% $\dot{V}O_2$ peak強度運動でも、運動を実施する時間帯によって運動中および運動終了後の脂質酸化量は異なる可能性がある。最大心拍数(maximal heart rate: HRmax)の45%強度における1時間の一過性運動では、朝よりも夕の運動で運動後のエネルギー消費量が高値を示すと報告されている(65)。脂質酸化量は心拍数や酸素摂取量、体温、コルチゾールといった生理的指標の日内変動に影響される可能性がある(66)。しかし、現在、夕の運動後のエネルギー消費量が増加したメカニズムはまだ明らかでなく、運動が脂質酸化量やエネルギー消費量に及ぼす影響を朝と夕で比較検討した研究において、統一した見解は得られていない。例えば、1時間のジョギングでは夕よりも朝の運動でエネルギー消費量は有意に増大するという報告もある(67)。さらに、朝や夕で運動に対する代謝・ホルモン応答は変わらないという報告もある(68,69)。運動が減量および体重増加を抑制する最適な運動実施時間帯に関して、今後は基質酸化やエネルギー消費量の観点から検討することが望まれる。

運動中の脂質酸化量は食事のタイミングの影響を受ける。空腹では脂質酸化量が亢進することが報告されている(70)。同一運動条件下であっても、絶食時間の相違によって運動中の脂質酸化量は異なることが報告されている(71)。先行研究(63,66)では、朝試行は12時間空腹、夕試行は5時間空腹と食事のタイミングが統制されていない。先行研究において朝と夕で運動中の脂質酸化量に相違が認められた理由として、運動の実施時間帯の相違でなく、運動実施時間と食事摂取時間とのタイミングの相違である可能性が推測される。

運動実施時間帯の相違による脂質酸化量の相違を検討した先行研究では、クロノタイプや食事条件の統制がなされていない。また、非運動群の設定もなされていない。そのため、脂質酸化量の相違は運動それ自

体の影響であるのか、運動実施時間帯の影響であるかが明らかでない。クロノタイプや食事条件を統制した上で、非運動群を設定し、運動実施時間帯の相違が脂質酸化量に及ぼす影響を検討する必要がある。

#### 2-4. 研究の目的

本研究では、朝と夕の運動実施時間帯の相違が脂質代謝に及ぼす影響をマウスおよびヒトで検討した。まず、マウスにおいて、朝と夕の長期的中等度強度運動介入が体重コントロールに及ぼす影響を高脂肪食負荷下で比較検討した。続いて、ヒトにおいて、次の2つを検討した。1つ目は朝と夕の運動負荷試験における測定項目の日内変動の比較、2つ目は朝と夕の一過性中等度強度運動が脂質酸化量に及ぼす影響の比較である。

時間運動学的な観点から運動処方に有効な運動プログラムを開発するためには長期的運動介入が必要である。そこで本研究ではまず、肥満になりやすい環境下において、運動処方に有効であると認められている(72)中等度強度運動の長期的介入がマウス体重コントロールに及ぼす影響を朝と夕で比較検討した。さらに、臨床現場においては運動処方の作成には運動負荷試験が必須である。運動処方において運動強度は運動負荷試験の結果に基づいて決定される。そこで本研究では、マウスでの検討に続いて、ヒトで運動負荷試験における測定項目の日内変動を朝と夕で比較検討した。次に、一過性中等度強度運動が脂質酸化量に及ぼす影響を朝と夕で比較検討した。



第3章 運動実施時間帯の相違が体重増加の抑制に及ぼす影響  
(検討課題 I)

3-1. 緒言

生物の生理活動や代謝には、一定の周期性をもつ各種のリズム（生体リズム）が存在する。その基本となるリズムは、ほぼ24時間を周期とする日内リズム（概日リズム）である(19,20)。交感神経系の活性を高める等、代謝に大きな影響を及ぼすアドレナリンの分泌は日中に高く、夜に低いという日内変動が認められている(21)。現在、肥満の予防や改善は生活習慣病の予防に有効であるとされ、減量について多くの研究が行われている(11-14)。減量に運動が有用であることから、先行研究では減量に関する運動処方について、運動強度や運動継続時間、運動を行う季節といった観点で検討している(15-17)。しかし我々の知る限り生体リズムの観点から検討された研究は少なく、1日の中での運動実施時間帯に関する検討はまだなされていない。運動が時計遺伝子の発現リズムの影響を受けたPPARsやUCP-3へ及ぼす影響は運動実施時間帯によって異なる可能性がある。そのため、肥満の予防や改善に有効な運動処方を考える上で、運動実施時間帯が減量に及ぼす効果を検討することは重要である。しかしながら朝夕の運動実施時間帯に着目し、体重コントロールに対する運動の影響を朝と夕で比較検討した研究はほとんどない。また一過性運動における効果の差異は、運動の長期継続によって増幅し、有意な差を認める可能性が考えられる。

減量に対する運動実施時間帯の影響を朝と夕で比較する上では、一過性の運動だけでなく慢性的な運動の影響を考慮する必要がある。しかし朝または夕という運動実施時間帯の相違が、肥満になりやすい環境下に

において体重増加の抑制に及ぼす影響はいまだ検討されていない。そのため、非運動群を設定した上で、運動実施時間帯の相違が体重コントロールに及ぼす影響を検討する必要がある。

本研究では、高脂肪食負荷下における朝または夕の長期的な輪回し運動介入が体重増加の抑制に及ぼす影響を朝と夕で比較検討することを目的とした（検討課題 I）。

#### 3-2. 方法

##### (1) 使用動物および飼育環境

本研究では 6 週齢の雄性 ICR マウス 43 匹（東京実験動物株式会社）を使用した。実験開始日までに普通食下（固形飼料）で 1 週間飼育し、飼育環境に同調させた。実験中の外的環境は、温度  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $60 \pm 5\%$  とし、1 日 12 時間照明（08:00-20:00）とした。実験開始後は飼料に脂質 40% の高脂肪食（ラード 15% 添加固形飼料，フナバシファーム社，日本）を加え、マウスにこの飼料および水を自由に摂取させた。

実験開始日前日に体重測定等を行い、体重が軽すぎるまたは重すぎるものについては除外し、体重を均一化したうえで群分けを行った。

マウスは 1 匹ずつにケージに分け、外部の影響を遮るためにロッカーボックスで飼育した。ロッカーボックスは柵によって上下 4 段に区切り、1 段につき 2 ケージを収納した。同じ段上の隣り合った 2 ケージは、仕切り板で区切ることで互いに影響が及ばないようにした。ロッカーボックス内には蛍光灯を設置し、およそ 400lux の光を照射することが可能とした。外的環境は、通常飼育条件と同様に温度  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $60 \pm 5\%$  で、明暗条件は常に 12-h light - 12-h dark cycle (LD12:12) を保った。明期開始時刻は 8:00 とし、暗期開始時刻は 20:00 とした。以後の実験ス

ケジュールで時刻表記に用いる ZT (Zeitgeber Time) については、明期開始時刻を ZT0、暗期開始時刻を ZT12 と定義し、1 時間ごとに ZT0 から ZT23 まで時間を振り分けた。

(2) 実験方法および運動条件

本研究では 43 匹のマウスを朝運動群 (n = 12)、夕運動群 (n = 15)、非運動群 (n = 16) の 3 群に分け、4 週間観察した。朝運動群および夕運動群の運動は直径 13 cm の輪回しによる自発的運動とし、運動期間は 4 週間とした。輪回しにはタイマー式装置を用いて運動可能時間を制御した。朝運動群では 20 : 00-20 : 30、夕運動群では 7 : 30-8 : 00 を運動可能時間帯とした。1 日 30 分、4 週間の運動を継続的に行い、これらの運動を慢性運動とした。マウスは夜行性であるため実時刻の朝における運動を夕運動、そして実時刻の夕における運動を朝運動とした。非運動群には動かないように固定をした輪回しを設置し、輪回しによる運動を 4 週間制限した (図 1)。

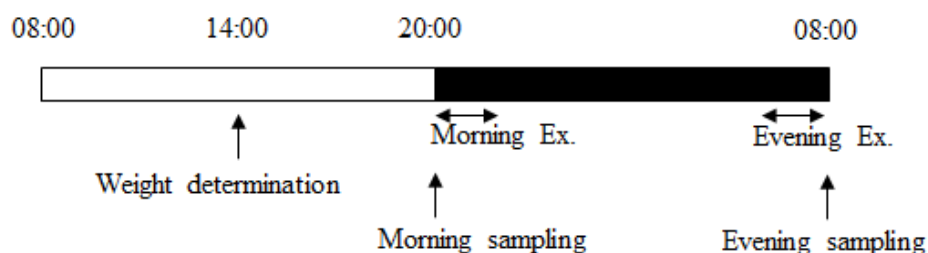


図 1. 実験デザイン

The morning exercise group (Morning Ex.) performed wheel-running at 20:00–20:30, whereas the evening exercise group (Evening Ex.) performed wheel-running at 7:30–8:00 for 4 weeks. Weights were measured at 14:00 once a week. Samples were taken in the morning at 20:00 and evening at 8:00.

内臓脂肪、体脂肪、腓腹筋のサンプリングは4週間の運動課題終了後に行った。運動群のサンプリングは最後の運動課題より24時間経過後に行った。サンプリングのポイント数は各群とも8時（ZT0、夕）および20時（ZT12、朝）の2ポイントとした。

#### (3) 測定方法

体重、摂食量の測定は非活動期である14時（ZT6）に体重計（ELECTRONIC BALANCE, TYPE, sefi, IB-1KH, No D470900050, アズワン社, 日本）を用いて週1回、計4回測定した。体重は実験開始前を1とした体重変化を相対値で比較した。また実験期間全4週間終了後の内臓脂肪量、皮下脂肪量、褐色脂肪量をそれぞれ測定し、体脂肪量とした。内臓脂肪量は精巣周囲および腎臓・腸間膜周囲の合計脂肪量とした。自発的運動量は輪回し1回転を1カウントとし、連続的に行動解析システム（Actimetrics社, 米国）で記録測定した。記録したデータは活動リズム解析プログラム；Clock Lab（Actimetrics社, 米国）を用いて分析し、アクトグラムとして示した。

本研究ではエネルギー代謝と関連のある内臓脂肪の *mPPAR $\delta$* 、*mPPAR $\gamma$* 、*mAdiponectin*、腓腹筋の *mUCP-3* をリアルタイム RT-PCR 法を用いて測定した。

リアルタイム RT-PCR 法は分光光度計を用いて、各サンプルの RNA 濃度を測定した後、DEPC 処理水を使用し、濃度が 50ng/ $\mu$ l になるように調整した。その後、One Step SYBR RT-PCR Kit（タカラバイオ社, 日本）、Step One Plus リアルタイム PCR 解析システム（applied biosystems, 米国）を用いて、リアルタイム RT-PCR を行った。プライマーの配列、RT-PCR の

設定条件は、以下に示した通りである。また本研究では rRNA 18s をハウスキーピング遺伝子とした。

プライマー配列

rRNA 18s      F:GGGGAGTATGGTTGCAAAGC  
                  R:TGTCAATCCTGTCCGTGTCC

PPAR $\delta$         F: ACAGTGACCTGGCGCTCTTC  
                  R: TGGTGTCCCTGGATGGCTTCT

PPAR $\gamma$         F:CAGGCTTGCTGAACGTGAAG  
                  R:GGAGCACCTTGGCGAACA

Adiponectin   F:GGAGTCTGAAAGGGCCAAAC  
                  R:AATTCTGTCCGCGTTGTGTC

UCP-3         F:CCGGTGGATGTGGTAAAGAC  
                  R:AGAAAGGAGGGCACAAATCC

RT-PCR の設定条件

逆転写反応 (1repeat)

reverse transcript (42°C、5分)

pre-PCR (95°C、10秒)

PCR 反応 (40repeat)

Denaturing (95°C、5秒)

primer annealing, extension (60°C、30秒)

Dissociation Protocol (75repeat) (+0.5°C、10秒)

#### (4) 統計

測定値は全て平均 ± 標準誤差で示した。体重の比較には群・時間を要因とした 2 元配置分散分析を用いた。2 元配置分散分析で交互作用が認められたものに関しては、群ごとに時間を要因とした 1 元配置分散分析を用いて多重比較検定を行った。朝と夕運動群における運動量の比較には Student's T-test を用いた。内臓脂肪量、皮下脂肪量、摂食量、代謝関連遺伝子の発現量の比較には、一元配置分散分析を用いた。統計ソフトには統計処理ソフトウェア StatView 5.0 日本語版 (SAS 社, 米国) を使用した。統計学的有意水準を 5%未満に設定した。

#### (5) その他、運動条件に関する詳細および補足

##### 5-1. 運動内容

運動は輪回しを用いた自発的運動とした。本研究では直径 13cm の輪回しを使用した。各ケージ内に輪回しを 1 つ設置し、マウスはケージ内で運動を行った。先行研究で輪回しによって体内時計の周期が変化すること、直径の大きな輪は変化を起こしやすいことが知られている(73)。本実験では輪回し運動が生体リズムに及ぼす影響を調べるため、影響が見やすいように直径の大きい輪を使用した。

##### 5-2. 運動装置

輪回し運動時間の制御は、電磁制御を用いたタイマー式装置を用いて行った。タイマー設定時間内は電流が流れ、輪回しのロックが磁石に引き上げられる形で解除され、マウスは自由に運動を行うことができた。時間外では輪回しにロックが掛かりマウスは運動を行うことができない状態であった。

5-3. 運動量測定

マウスの自発的行動量は輪回し1回転を1カウントとし、行動解析システム（Actimetrics社，米国）で連続的に記録した。記録したデータは活動リズム解析プログラム；Clock Lab（Actimetrics社，米国）を用いて、6分ごとのカウント数をブロックでグラフ化し繋ぎ合わせた。これをアクトグラムとして示した（図2）。

第3章 運動実施時間帯の相違が体重増加の抑制に及ぼす影響

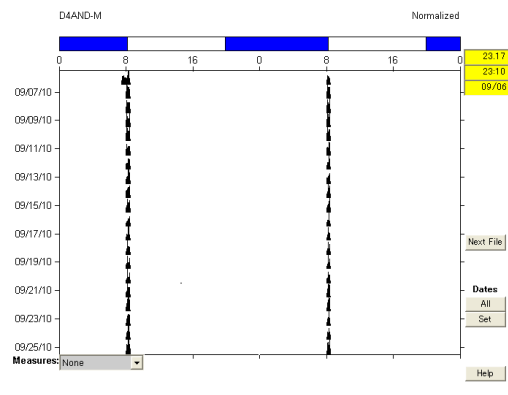
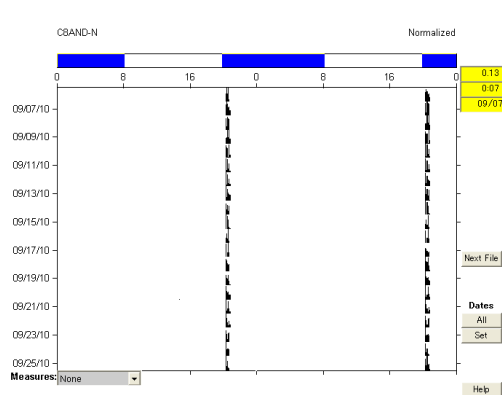
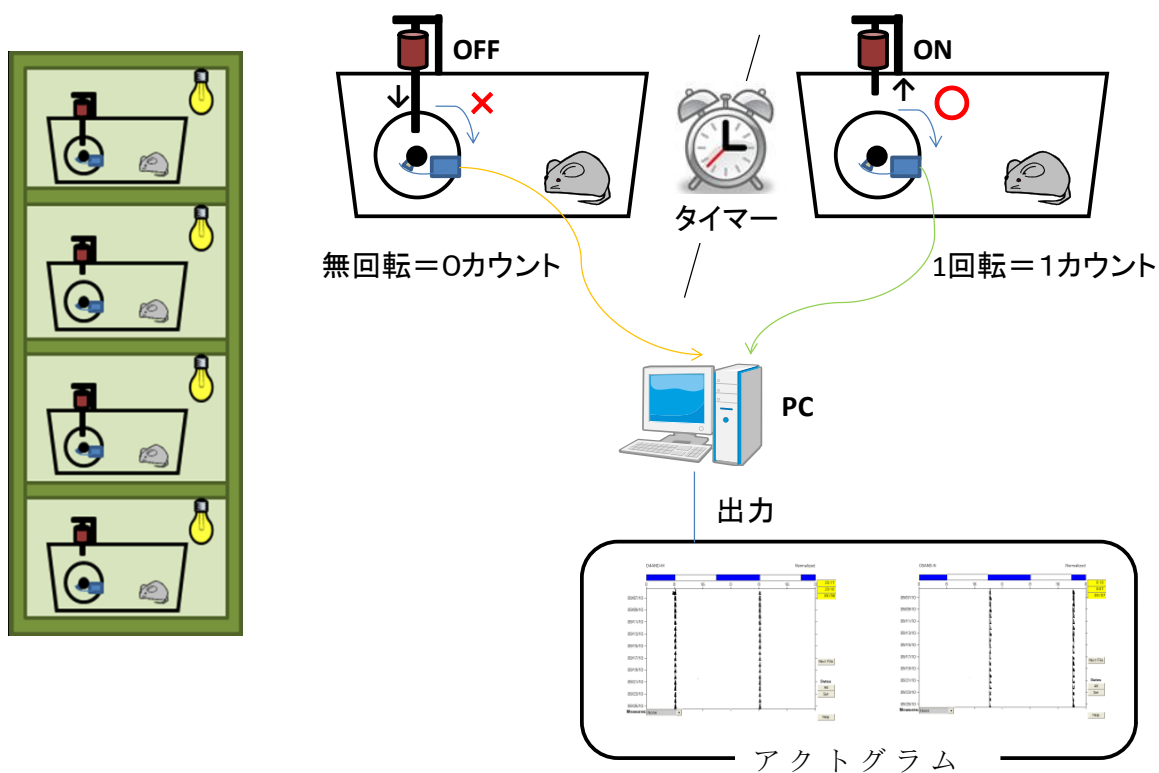


図 2. 運動量測定



### 3-3. 結果

#### 1. 体重、体脂肪量

いずれの群においても時間の経過とともに有意な体重増加が認められた ( $P < 0.01$ ) (表 2)。また体重に有意な交互作用が認められた ( $P < 0.05$ )。多重比較検定により 1 週目以降の体重は、非運動群および朝運動群と比較して夕運動群で有意な低値を示した ( $P < 0.01$  vs. 非運動群、 $P < 0.05$  vs. 朝運動群)。さらに 3 週目以降の体重は、非運動群と比較して朝運動群で有意な低値が示された ( $P < 0.05$ )。4 週目の体重は、朝運動群と比較して夕運動群で有意な低値を示した ( $P < 0.05$ ) (図 3)。運動開始 4 週間後における内臓脂肪量は、朝運動群と比較して夕運動群で有意に低値を示した ( $P < 0.05$ )。また、運動群における内臓脂肪量は非運動群と比較して夕運動群のみで有意な低値を示していた ( $P < 0.01$  vs. 夕運動群) (図 4)。皮下脂肪量も朝運動群と比較して夕運動群で有意に低値を示した ( $P < 0.05$ )。また、運動群における皮下脂肪量は非運動群と比較して有意に低値であった ( $P < 0.01$  vs. 朝運動群、 $P < 0.01$  vs. 夕運動群) (図 5)。

#### 2. 運動量、摂食量

朝運動群と夕運動群の 1 日の平均回転数に有意差は認められなかった (朝運動群  $1221 \pm 61$  回 vs. 夕運動群  $1261 \pm 68$  回)。非運動群と朝運動群、夕運動群の 1 日の当たりの摂食量に、有意差は認められなかった (非運動群  $4.5 \pm 0.2$ g vs. 朝運動群  $4.3 \pm 0.2$ g vs. 夕運動群  $4.5 \pm 0.2$ g)。

3. 代謝関連遺伝子の発現量

i) 内臓脂肪

非運動群、朝運動群、夕運動群との比較において、*mPPAR $\delta$* 、*mPPAR $\gamma$* 、*mAdiponectin* の発現量に有意差は認められなかった(表 3)。

ii) 腓腹筋

非運動群と朝運動群および夕運動群との比較において、*mUCP-3* の発現量に有意差は認められなかった(表 3)。

表 2. 群間における 4 週間の体重変動

	Con.	Morning Ex.	Evening Ex.
0 week	31.5 ± 0.4	31.3 ± 1.1	32.8 ± 1.1
1 week	37.0 ± 0.5	35.2 ± 0.9	35.4 ± 0.9
2 weeks	40.0 ± 0.7	37.3 ± 0.9	37.0 ± 0.7
3 weeks	42.6 ± 1.0	39.1 ± 1.1	37.7 ± 0.5
4 weeks	45.3 ± 1.2	41.0 ± 1.3	38.6 ± 0.6

Data show mean ±SE. Con., non-exercise group; Morning Ex., morning exercise group; Evening Ex., evening exercise group

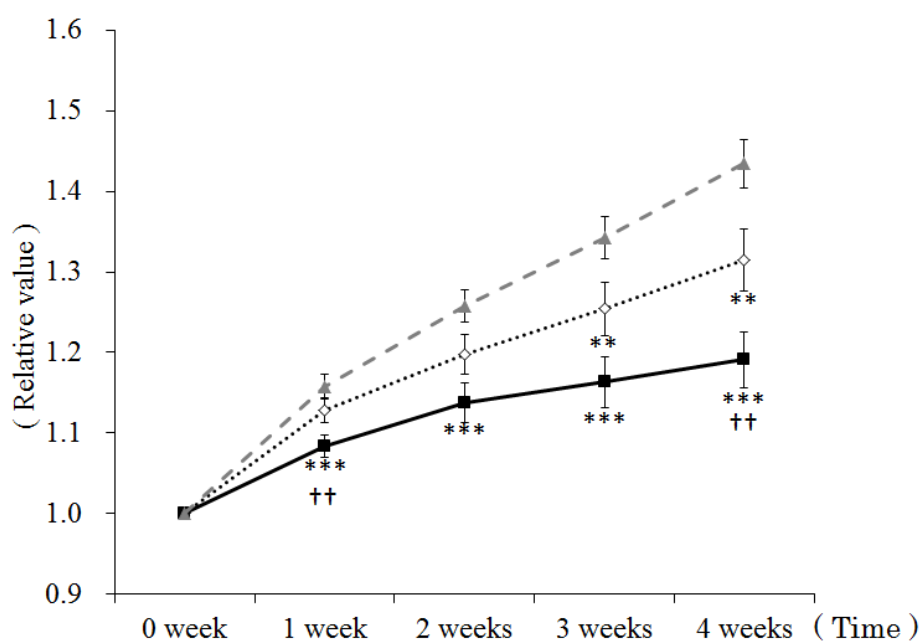


図 3. 群間における 4 週間の体重増加率 (相対値)

▲, non-exercise group (Con); ◇, Morning Ex. group; ■, Evening Ex. group.

\*\*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.01$  vs. Con; ††  $P < 0.05$  vs. Morning Ex. group.

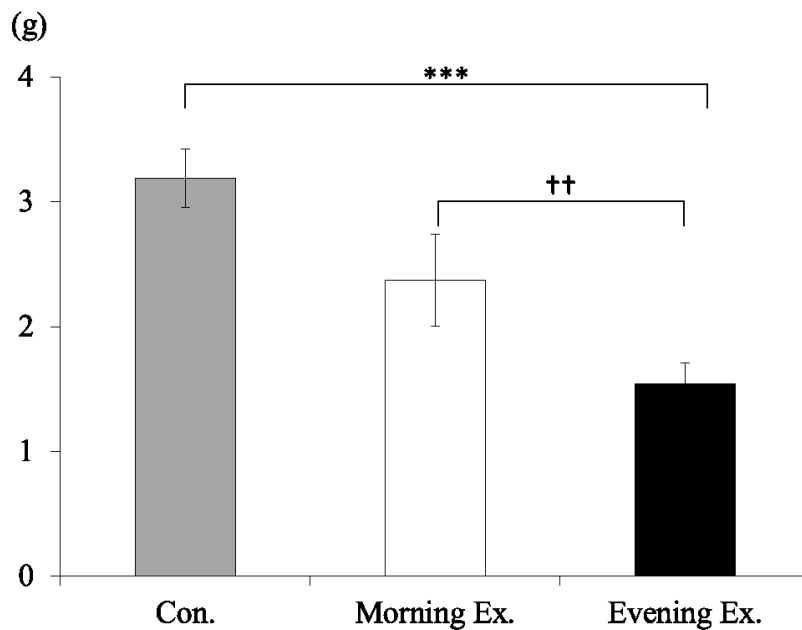


図 4. 内臓脂肪量

The Evening Ex. group had significantly lesser fat than the Morning Ex. and Con. groups. \*\*\*  $P < 0.01$  vs. Con group; ††  $P < 0.05$  vs. Morning Ex. group.

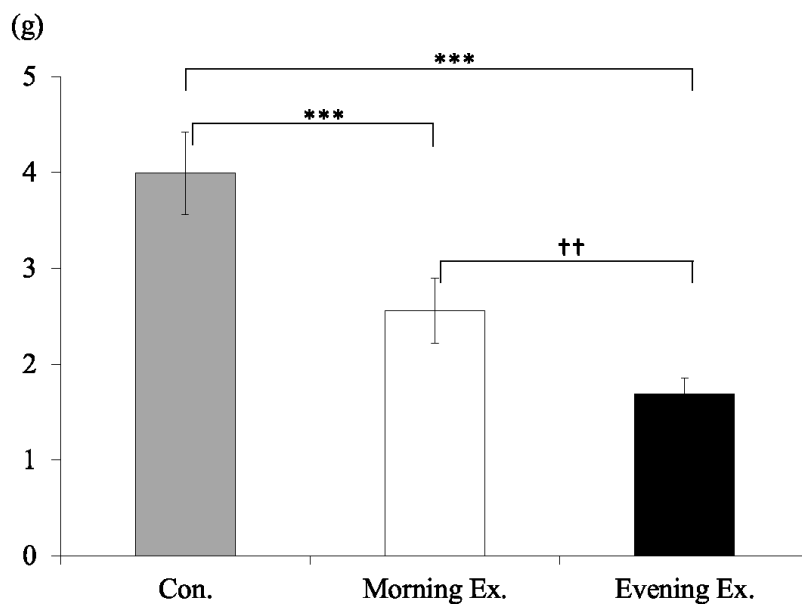


図 5. 皮下脂肪量.

The Evening Ex. group has significantly lesser fat than the Morning Ex. and Con. groups. \*\*\*  $P < 0.01$  vs. Con group; ††  $P < 0.05$  vs. Morning Ex. group.

表 3. 内蔵脂肪および皮下脂肪における代謝関連遺伝子の発現量

Region	Gene	Sampling	Con.	Morning Ex.	Evening Ex.
		time			
WAT	<i>mPPAR<math>\gamma</math></i>	Morning	2.25 ± 0.3	1.56 ± 0.4	3.12 ± 1.0
		Evening	2.66 ± 0.5	1.56 ± 0.5	11.69 ± 6.6
	<i>mPPAR<math>\delta</math></i>	Morning	4.62 ± 0.8	5.93 ± 0.4	7.46 ± 2.7
		Evening	4.57 ± 1.2	3.90 ± 0.8	11.45 ± 3.8
	<i>mAdiponectin</i>	Morning	5.20 ± 2.0	13.28 ± 4.3	14.30 ± 4.5
		Evening	6.24 ± 1.3	6.92 ± 1.0	10.64 ± 7.5
Gastrocnemius	<i>mUCP-3</i>	Morning	1.89 ± 0.2	4.90 ± 1.7	6.95 ± 2.2
		Evening	2.50 ± 0.7	3.83 ± 1.0	5.70 ± 0.7

RNA expression level by group. Data show mean ± SE.

No significant differences were noted.

### 3-4. 考察

本研究では、高脂肪食負荷下における朝または夕の長期的な輪回し運動介入が体重増加の抑制に及ぼす影響を朝と夕で比較検討した。その結果、同じ運動量、摂食量において、朝よりも夕の運動で有意に体重増加が抑制された。内臓脂肪量および皮下脂肪量は、朝運動群よりも夕運動群で有意に減少していた。運動量や摂食量に有意差が認められないことから、脂質酸化の割合が増えただけでなく、先行研究(65)と同様に朝よりも夕でエネルギー消費量が高くなり、その結果として朝よりも夕で脂肪の蓄積は抑制された可能性がある。

本研究では、朝運動群は運動後も暗期が続き、夕運動群は運動後明期となっていた。しかし、暗期(12時間)を前半と後半に分け、6時間ずつ輪回し運動が可能な環境の中で同一マウスをそれぞれ2週間以上飼育し行動量を比較検討した先行研究において、運動中もその後の活動量にも有意差が認められないことが報告されている(74)。

高脂肪食環境下において、夕の運動は朝の運動よりも体重増加を抑制する可能性が示唆された。最近の研究によると PPARs や UCP-3 を高発現させたマウスでは体重が減少することが報告され、PPARs や UCP-3 の発現量がエネルギー消費量と正の関連があると報告されている(20)。本研究では *mPPAR $\gamma$* 、*mPPAR $\delta$* 、*mAdiponectin*、*mUCP-3* 等の代謝関連遺伝子の発現量は総じて夕運動群で最も高値を示していたが、朝と夕といったサンプリング時間に関わらず群間で有意差は認められなかった。ただし、以下のような有意傾向は認められていた。*mPPAR $\delta$*  の発現量は夕方サンプリングにおいて、非運動群よりも夕運動群で高い傾向が認められた ( $P = 0.06$ )。同様に *mPPAR $\gamma$*  についても夕サンプリングにおいて、非運動群と比較して夕運動群で高い傾向が認められた ( $P = 0.08$ )。また、*mAdiponectin* については朝サンプリングにおいて、非運動群と比較して運動群で高い傾向が認められた ( $P = 0.08$ ; Con vs. 朝運動群,  $P = 0.06$ ; Con vs. 夕運動群)。また、腓腹筋での熱産生を促進する *mUCP-3* の発現量は、朝・夕両方のサンプリングにおいて非運動群よりも夕運動群で高い傾向が認められた ( $P = 0.05$ : 朝サンプリング,  $P = 0.09$ : 夕サンプリング)。

先行研究では、PPARs や UCP-3 の遺伝子発現には時計遺伝子の制御を介した概日リズムが存在していることが報告されている。特に、時計遺伝子 CLOCK は PPAR $\alpha$  遺伝子の日周リズム発現を直接制御し、PPAR $\alpha$  によって転写される下流遺伝子の発現を間接的に制御し、脂肪酸代謝系全般の概日リズムを統括するとされている(75)。最近の研究では、内臓脂肪における PPARs や腓腹筋における UCP-3 の発現量は朝に高く、夕に低くなることが報告されている(25,26)。本研究では、朝運動群と比較して夕運動群で PPARs や UCP-3 の発現量が高いために夕運動群で脂質酸化が

亢進し、その結果内臓脂肪で脂肪合成が抑制され、脂肪蓄積も抑制された可能性がある。本仮説の検証には今後呼気ガス分析による脂質酸化量の検討が必要である。本研究において、群間で代謝関連遺伝子の発現量に有意差が認められなかった要因の1つには発現量における個体間のばらつきが大きさが考えられる。今後はサンプル数やサンプリングのポイント数を増やし、体重増加の抑制と代謝関連遺伝子の発現量の関連をさらに検討していく必要がある。

ヒトを対象とした先行研究では、同程度の一過性運動であれば朝よりも夕で運動後のエネルギー消費量が大きくなることも報告されている(65)。それゆえ運動が減量および体重増加を抑制する最適な運動実施時間帯について、今後はヒトにおいて検討を行うことも必要である。

#### 3-5. 結論

本研究では、高脂肪食負荷下において夕 30 分の自発的な長期的中等度強度運動は、朝の同程度の運動と比較して体重増加をより抑制することを明らかにした。

#### 3-6. 今後の展望

本研究では高脂肪食（カロリーの40%が脂質）負荷下において朝よりも夕の運動で有意な体重増加の抑制が認められた。また内臓脂肪および皮下脂肪の蓄積についても朝よりも夕の運動で有意に抑制された。この要因として、夕の運動でより脂質酸化が亢進し、その結果内臓脂肪における脂肪合成が抑制され、脂肪蓄積の抑制が起こった可能性がある。本仮説の検証には呼気ガス分析による脂質酸化量の検討が必要となる。またヒトを対象とした先行研究において、同程度の一過性運動であれば朝

### 第3章 運動実施時間帯の相違が体重増加の抑制に及ぼす影響

よりも夕で運動後のエネルギー消費量が増加することが報告されている(67)。運動が減量および体重増加を抑制する最適な運動実施時間帯に関して、今後はヒトを対象に検討することが望まれる。



## 第4章 運動実施時間帯の相違が脂質酸化量に及ぼす影響

本章では朝と夕の運動実施時間帯の相違が脂質代謝に及ぼす影響を、次の2つの観点から検討した。まず検討課題Ⅱでは、運動負荷試験をおこなう時間帯の日内変動を朝と夕で比較検討した。次に検討課題Ⅲでは、一過性中等度強度運動が脂質酸化量に及ぼす影響を朝と夕で比較検討した。検討課題Ⅱの実験に参加した対象者13名のうち10名が検討課題Ⅲの実験にも参加した。

### 第1節 運動負荷試験における測定項目の日内変動—朝と夕の比較— (検討課題Ⅱ)

#### 4-1-1. 緒言

臨床現場において運動処方を作成するには運動負荷試験が必須である。 $\dot{V}O_2\text{peak}$  は運動処方において運動強度を決定する1つの指標として用いられる。個人の脂質酸化量の最大値と定義されるMFOおよびFatmaxは脂質酸化能を評価する1つの指標であり、 $\dot{V}O_2\text{peak}$  と合わせて運動処方において至適強度の決定に用いられる(76)。運動強度を決定する $\dot{V}O_2\text{peak}$  やFatmaxを正確に評価することは、効果的な運動処方を作成する上での基本であり、重要なことである。しかし $\dot{V}O_2\text{peak}$  やMFOおよびFatmaxは測定時間帯の影響を受ける可能性がある。

Hillらは、夜型クロノタイプの者のみ夜で $\dot{V}O_2\text{peak}$  が4%高くなることを明らかにした(58)。Tammらは、夜型クロノタイプの者のみ最大筋力は朝よりも夕で増大することを明らかにした(77)。これらクロノタイプで認められる特異的な影響は、皮質脊髄路活動の日内変動によって起こっている可能性がある。皮質脊髄路活動は運動機能に関与するため、他の運動課題でも朝と夕で日内変動が認められると考えられている(77)。

Brown らは、運動パフォーマンスにおけるクロノタイプと日内変動の関連にはまだ同定されていない様々な要素が関与していることを示唆している(78)。また運動パフォーマンスについて新しく日内変動を調べるにあたっては、クロノタイプの考慮が重要であると述べている。Burgoon らは、最大下運動負荷試験における測定項目はクロノタイプの影響を受ける可能性があることを報告している(79)。このように、いくつかの先行研究によって  $\dot{V}O_2\text{peak}$  や MFO および Fatmax はクロノタイプでの特異的な影響を受ける可能性が示されている。Drust らは運動パフォーマンスに関連した単位時間あたりの換気量や心拍数、血圧、体温、酸素消費量や二酸化炭素排泄量といった様々な生理学的指標に日内変動があることを報告している(80)。Drust らは夜型クロノタイプの成人では生理学的指標の日内変動によって、水泳やサイクリングにおける高強度運動では朝よりも夕でパフォーマンスが高値を示したと報告している(80)。他の研究者は朝と夕で心拍数、運動中の主観的運動強度 (ratings of perceived exertion: RPE)、疲労や乳酸値、運動継続時間が異なることを報告している(81,82)。これらの項目は  $\dot{V}O_2\text{peak}$  等に関連がある(81)。そのため  $\dot{V}O_2\text{peak}$  や MFO および Fatmax を測定する際には時間帯を考慮する必要があると考えられる。運動負荷試験の測定時間を標準化していく上での難しさは、ヒト生体リズムおよび位相に大きな個人差が存在することである(83)。ヒトにおいて代表的な概日リズムの指標である血漿メラトニン(47-50)や血漿コルチゾール(46)、深部体温(46,48-53)の位相には、クロノタイプ間に明瞭な差が認められる。クロノタイプは個人の睡眠-覚醒パターンや時間的指向によって定義される。先行研究は、体温によって安静時の  $\dot{V}O_2$  が調節されていることを示した(54,55)。また、水泳における最大運動パフォーマンスは体温位相に沿うことが報告されている(62)。

それゆえ、 $\dot{V}O_2\text{peak}$  や MFO および Fatmax を朝と夕で比較する際には、対象者のクロノタイプをも考慮する必要がある。

運動負荷試験実施の際には、クロノタイプに加えて食事内容も考慮する必要がある。運動中の脂質酸化量は、直前の食事から MFO や Fatmax 測定までの絶食時間の影響を受ける。先行研究によれば、MFO や Fatmax を測定する場合には絶食時間を統一することが必要とされている(71)。また運動前の糖質摂取は最大負荷運動中の脂質酸化を抑制し(84,85)、その抑制は少なくとも食後 4 時間は持続することが報告されている(86)。そのため、食事摂取タイミングの違いによって起こる筋や肝臓でのグルコース量の差異が、 $\dot{V}O_2\text{peak}$  や MFO および Fatmax の測定に影響を及ぼす可能性がある。

これまでの研究で  $\dot{V}O_2\text{peak}$  や MFO および Fatmax の日内変動に統一した見解が得られていない要因として、クロノタイプや絶食期間が統制されていないことが考えられる。そこで本研究では、中間型クロノタイプを対象に食事の内容やタイミングを揃え、 $\dot{V}O_2\text{peak}$  や MFO および Fatmax を朝と夕で比較検討することを目的とした。

### 4-1-2. 方法

#### (1) 対象者および実験プロトコル

本研究の対象者は若年男性 13 名(年齢:  $26 \pm 1$  歳、身長:  $177.8 \pm 2.1$  cm、体重:  $68.9 \pm 2.3$  kg)であった。対象者は糖尿病や高血圧症、虚血性心疾患のない、非喫煙者とし、服薬のない者とした。また MEQ を用いてクロノタイプが朝および夕に偏っていない中間型の者を対象とした。本研究における対象者の MEQ スコアの平均値は  $52.9 \pm 2.0$  であった。無作為化交叉試験を用いて、朝 9 時または夕 18 時に運動負荷試験を実施した。

朝および夕の試行は少なくとも1週間以上の間隔をあけて行った。対象者には実験2日前から激しい運動の実施、アルコール類およびカフェイン類の摂取を禁止するよう指示した。食事摂取は各試行の4時間前までとした。実験デザインは図6に示した通りである。

本研究は早稲田大学倫理委員会「人を対象とする研究等倫理委員会」の承認(2012-262)を得て実施した。

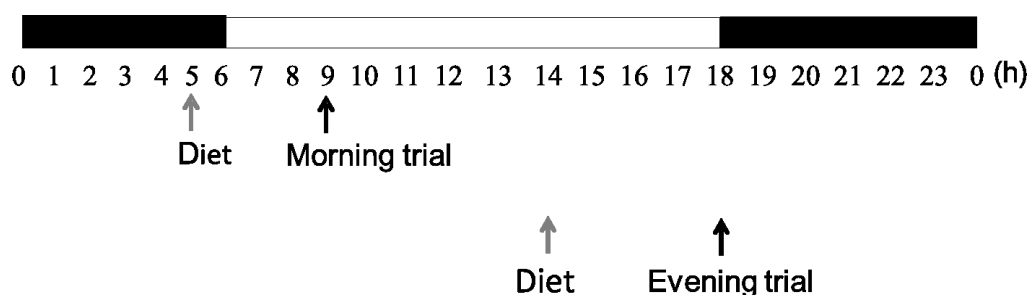


図 6. 実験デザイン

## (2) 運動負荷試験および呼気ガス分析

漸増式心肺運動負荷試験はトレッドミル (MAT - 2700, FUKUDA 電子社, 日本) を用いて、3 分毎に傾斜と速度を増加させるブルース法(87)により実施した。 $\dot{V}O_2\text{peak}$  や MFO および Fatmax は 15 分以内に測定した。運動負荷試験中は呼気ガス分析器 (AERO MONITOR AE300S, ミナト医科学社, 日本) を用いて、酸素摂取量 ( $\dot{V}O_2$ )、二酸化炭素排出量 ( $\dot{V}CO_2$ ) を breath-by-breath 法により 30 秒ごとの平均値で算出した。Ventilatory threshold (VT) は V-slope 法によって決定した(88)。運動負荷心電図装置 (STRESS TEST SYSTEM ML-6500, フクダ電子社, 日本) を用いて Mason-Likar 誘導法により 12 誘導心電図を記録し、運動負荷試験中の心拍数を測定した(89)。

$\dot{V}O_{2peak}$  の定義は  $\dot{V}O_2$  がプラトーに到達すること、または次の3条件のうち2条件を満たすことを条件とした; 1)呼吸交換比 (respiratory exchange ratio: RER) が1.1以上、2)心拍数が年齢別予測最高心拍数 (220-年齢) に到達すること、3)主観的運動強度 (rating of perceived exertion: RPE) が18以上に達すること(90)。ただし本人が走行継続不可能を訴えた場合には即座に運動負荷試験を中止した。

安静時の心拍数や  $\dot{V}O_2$  は5分間の安静状態 (座位) にて測定した。座位に引き続き、30秒間の立位を保ち運動負荷を開始した。安静時における心拍数、 $\dot{V}O_2$  の値は運動負荷試験前の座位安静状態での5分間経過時の値とし、運動時における心拍数、 $\dot{V}O_2$  の値は運動負荷試験中のステージ毎に開始2分30秒~3分時の平均値とした。安静時および運動中におけるRERは運動負荷試験前の座位安静時5分間および運動負荷中について30秒毎に平均値で求めた。RPEは運動開始後1分毎に記録した。

### (3) 脂質酸化量測定

脂質酸化量は Frayn の式から算出した(91)。

$$\cdot \text{脂質酸化量 (mg/min)} = 1.67 \times \dot{V}O_2 \text{ (L)} - 1.67 \times \dot{V}CO_2 \text{ (L)}$$

算出された脂質酸化量曲線をデジタルフィルタ (40秒) で smoothing 後、観察される脂質酸化量の最大値を MFO と決定し、この得られた強度を Fatmax と決定し、 $\% \dot{V}O_{2peak}$  で示した。

(4) クロノタイプの評価

Horne & Ostberg(92)の Morningness-Eveningness Questionnaire (MEQ) の質問紙を用いて、合計得点で朝型や夜型を 5 段階で評価した。16-30 点を明らかな夜型、31-41 点をやや夜型、42-58 点を中間型、59-69 点をやや朝型、70-86 点を朝型と分類した。本研究ではこの質問紙の回答結果より 42-58 点の中間型を示す対象者のみを選定した。

(5) 統計

測定値は全て平均値 ± 標準誤差で示した。朝と夕における  $\dot{V}O_2\text{peak}$  や MFO および Fatmax、HRmax の比較には対応のある Student's t-test を用いた。RPE は 3 分毎のステージにおいて全対象者が運動を継続した 9 分までを、試行（朝・夕）と時間を要因とした 2 要因分散分析にて解析した。Post hoc テストには Bonferroni 法を用いた。統計処理ソフトウェア SPSS statistics21 日本語版（IBM 社、日本）を使用して、統計処理を実施した。統計学的有意水準は 5%未満に設定した。

4-1-3. 結果

対象者の特徴は表 4 に示す通りであった。

1. 安静時の心拍数、酸素摂取量、RER

安静時の心拍数は朝よりも夕で有意に高値を示した（朝試行  $66.5 \pm 2.6$  拍/分 vs. 夕試行  $70.8 \pm 2.4$  拍/分,  $P < 0.05$ ）。酸素摂取量や RER は朝と夕で有意差は認められなかった（酸素摂取量：朝試行  $3.4 \pm 0.1\text{ml/kg/min}$  vs. 夕試行  $3.9 \pm 0.2\text{ ml/kg/min}$ ; RER: 朝試行  $0.89 \pm 0.02$  vs. 夕試行  $0.90 \pm 0.01$ ）。

2.  $\dot{V}O_{2peak}$ 、Fatmax、MFO

表5に $\dot{V}O_{2peak}$ やMFOおよびFatmax、HRmax、運動継続時間、RER、VE、 $\dot{V}O_2$ 、 $\dot{V}CO_2$ を示した。 $\dot{V}O_{2peak}$ やMFOおよびFatmax、HRmaxに朝と夕で有意差は認められなかった。またRERや運動継続時間に朝と夕で有意差は認められなかった。

3. 運動中のRPE、 $\dot{V}O_2$ 、HR

表6と表7に運動中のRPEや $\dot{V}O_2$ およびHRを示した。1分毎のRPEに朝と夕で有意差は認められなかった(表6)。また、1分毎の $\dot{V}O_2$ 、HRに朝と夕で有意差は認められなかった(表7)。

表 4. 対象者の特徴

N	Age (y)	Height(cm)	Weight(kg)	BMI (kg/ m <sup>2</sup> )	%Fat	MEQ
13	26 ± 1	176.8 ± 1.7	68.9 ± 2.3	22.0 ± 0.6	14.3 ± 1.2	52.9 ± 2.0

Note: BMI, body mass index; %Fat, body fat;

MEQ, Morningness-eveningness questionnaire

表 5. 朝と夕における測定項目の日内変動

	Morning	Evening
$\dot{V}O_{2peak}$ (ml/kg/min)	47.4 ± 1.4	47.3 ± 1.4
HR <sub>max</sub> (beats/min)	193.9 ± 2.7	191.7 ± 2.4
Fatmax (%)	35.9 ± 1.2	34.9 ± 2.5
MFO (mg/min)	405.1 ± 26.3	372.9 ± 22.5
RER	1.27 ± 0.03	1.26 ± 0.02
VT (l/min)	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1

Notes:  $\dot{V}O_{2peak}$ , peak oxygen uptake; HR<sub>max</sub>, maximum heart rate; MFO, maximum fat oxidation rate; RER, respiratory exchange ratio; VT, ventilatory threshold.



表 6. 朝と夕における 3 分毎の Rating of perceived exertion (RPE)

RPE		
min	Morning	Evening
3	9.5 ± 0.5	10.3 ± 0.5
6	12.8 ± 0.4	12.6 ± 0.5
9	14.5 ± 0.6	14.5 ± 0.6

Notes: RPE, rating of perceived exertion

表 7. 朝と夕における 3 分毎の心拍数(HR)および酸素摂取量 ( $\dot{V}O_2$ )

min	HR (beats/min)		$\dot{V}O_2$ (ml/min)	
	Morning	Evening	Morning	Evening
3	93.5 ± 2.7	97.3 ± 3.2	962.7 ± 56.9	1023.3 ± 43.6
6	116.1 ± 3.9	116.6 ± 3.8	1480.1 ± 64.4	1487.2 ± 61.3
9	149.8 ± 4.7	151.4 ± 4.2	2230.6 ± 90.5	2266.0 ± 64.2

Notes: HR, heart rate;  $\dot{V}O_2$ , oxygen uptake

#### 4-1-4. 考察

本研究の目的は、中間型クロノタイプを対象に食事の内容やタイミングをそろえ、 $\dot{V}O_2\text{peak}$  や MFO および Fatmax を朝と夕で比較検討することであった。その結果、朝と夕で  $\dot{V}O_2\text{peak}$  や MFO および Fatmax、HRmax、RPE に有意差は認められなかった。本研究より中間型クロノタイプでは、運動処方の際に運動強度の決定に用いられる  $\dot{V}O_2\text{peak}$  や MFO および Fatmax に朝と夕といった測定時間帯の影響は認められないことが示された。また主観的な指標である RPE も朝と夕で差を認めないことが示唆された。それゆえ、主観的運動強度に基づいて決定される運動強度は朝と夕で同程度の強度を確保できると考えられた。

本研究で重要な視点は、対象者を中間型クロノタイプに揃え、食事を統制したことである。これまでに  $\dot{V}O_2\text{peak}$  は夕で有意に高いという報告(93-95)や MFO および Fatmax は夕で有意に高いという報告がある(63,66)。これらの先行研究は、本研究と同様に若年者を対象としているが、中間型クロノタイプを対象に行われた研究は1つもない。 $\dot{V}O_2\text{peak}$  や MFO および Fatmax に朝と夕で有意差が認められた要因として対象者のクロノタイプの相違が考えられる。先行研究では夜型クロノタイプにおいて  $\dot{V}O_2\text{peak}$  は朝(6時から8時30分)よりも夕(15時30分から18時)で有意に4%高くなることが報告されている。先行研究(93-95)において、朝と夕で  $\dot{V}O_2\text{peak}$  に有意差が認められた要因には対象者のクロノタイプが夜型であった可能性が挙げられる。一般的に、米国内では人口における朝型・中間型・夜型を示す者の割合は順に12%・61%・27%と報告されている(96)。一方で朝よりも夕で  $\dot{V}O_2\text{peak}$  は有意に7%高いと報告(95)している研究グループは、米国内では人口における朝型・中間型・夜型を示す者の割合は順に34%・22%・44%としている(93)。先行研究(95)に

において対象者のクロノタイプは言及されていないが、44%と、夜型を示す者の割合が一般的な分布よりも多い環境であったために対象者が夜型に偏った結果、朝よりも夕で  $\dot{V}O_{2peak}$  は有意に高値を示した可能性がある。同研究グループは対象者を夜型および中間型に限定した実験(93)を行っている。その結果、漸増運動負荷試験において  $\dot{V}O_{2peak}$  に朝と夕で有意差は認められなかった。ただし、運動継続時間が短く、スポーツパフォーマンスにより特化した課題である定常運動負荷試験において  $\dot{V}O_{2peak}$  は朝よりも夕で有意に高値を示していた。この対象者を夜型および中間型に限定した実験(93)では対象者の MEQ の平均値は 49 であった。本研究における対象者の MEQ の平均値は 52.9 であり、対象者を夜型および中間型に限定した実験(93)における対象者の MEQ の平均値に近い値であった。本研究では対象者を中間型クロノタイプに統一したために、朝と夕で  $\dot{V}O_{2peak}$  に有意差が認められなかった可能性がある。

クロノタイプが  $\dot{V}O_{2peak}$  に関連するメカニズムはまだ解明されていない。現在はクロノタイプの相違によって変化する体温位相が  $\dot{V}O_{2peak}$  や MFO および Fatmax の日内変動に影響を及ぼすと考えられている(63,81,93)。水泳における最大運動パフォーマンスは体温位相に沿って日内変動を示す(81)。光刺激を統制した暗条件下で行われたこの研究(81)では1日を8の時間帯(1-3時、4-6時、7-9時、10-12時、13-15時、16-18時、19-21時、22-24時)に区切り、25名を対象に水泳のタイムトライアルをのべ147試行行った。その結果、最大運動の記録は深部の体温位相を反映した。深部体温が 36.5℃を示した朝9時よりも、36.8℃とより体温の高い夕6時で記録が向上していた。クロノタイプ間では体温や体温位相が異なる(63,91)。朝型では体温は午前中に上昇し、その後19時30分の体温ピークまではほとんど僅かしか増加していない(94)。一方で、

夜型では朝から 20 時 30 分の体温ピークまで着実に上昇していく (94)。朝と夕の体温差は夜型で大きくなるために、朝と夕における  $\dot{V}O_{2peak}$  や MFO および Fatmax の日内変動は夜型で現れやすい可能性がある。MFO および Fatmax は朝よりも夕で有意に高いという先行研究では (63,66)、クロノタイプの考察が行われていない。 $\dot{V}O_{2peak}$  や MFO および Fatmax の日内変動にクロノタイプの相違が及ぼす影響とそのメカニズムの解明を今後さらに検討していく必要がある。

本研究では食事の内容や絶食期間を揃えた結果、朝と夕で Fatmax や MFO に有意差は認められなかった。これは RPE、RER、 $\dot{V}O_2$  に朝と夕で有意差が認められなかったことと一致していた。本研究と同様にトレッドミル運動を用いて朝と夕で Fatmax や MFO を評価した先行研究 (63) では、RPE、RER、 $\dot{V}O_2$  に朝と夕で日内変動が認められ、朝よりも夕で有意に Fatmax や MFO が高値を示したと報告している。しかしながら先行研究 (63) では食事のタイミングを統制しておらず、朝試行では 12 時間絶食、夕試行では 5 時間絶食と絶食時間が異なる。先行研究で朝と夕で運動中の脂質酸化量に相違が認められた理由は、運動の実施時間帯でなく、運動実施時間と食事摂取時間とのタイミングの相違である可能性がある。空腹では脂質酸化量が亢進することが報告されている (70)。運動前の糖質摂取は運動中の脂質酸化を抑制することから (84,85)、先行研究 (63) では朝よりも夕で脂質酸化が抑制されることが推察される。しかし、先行研究 (63) では朝よりも夕で脂質酸化は亢進していた。先行研究 (63) では試行前の食事内容について記載されていないが、朝と夕で試行前の食事について炭水化物や脂質、タンパク質の比率や摂取エネルギーが異なっていた可能性がある。他の研究グループからも朝よりも夕で有意に Fatmax や MFO が高値を示したという報告がある (97)。しかし、この先行研究 (97)

では食事の内容やタイミングについて記載されていないため、朝よりも夕で有意に Fatmax や MFO が高値を示したという報告については食事の内容やタイミングを統制した上で再現性を検討していく必要がある。本研究では朝と夕で試行前の絶食時間を統一したために、筋や肝臓におけるグリコーゲン量が朝試行と夕試行で同条件であったと推測される。本研究のように試行前の絶食時間を4時間とした場合、Fatmax や MFO は朝と夕で有意差が認められない可能性がある。

### 4-1-5. 結論

本研究では中間型クロノタイプを対象にして、運動前の食事を揃えた条件下で検討したところ、 $\dot{V}O_2\text{peak}$  や MFO および Fatmax は朝と夕で同等になることが推測された。

### 4-1-6. 今後の展望

本研究ではトレッドミルを用いた運動負荷試験において中間型クロノタイプを対象に測定前の食事を統制した場合、 $\dot{V}O_2\text{peak}$  や MFO および Fatmax の日内変動には朝と夕で有意差は認められなかった。運動処方 of 臨床現場において、運動強度を決定するために必要な  $\dot{V}O_2\text{peak}$  や MFO および Fatmax の測定は運動負荷試験の実施時間帯の影響を受けない可能性が示唆された。また、RPE に基づいた運動強度の決定においても朝と夕で同程度の運動強度を確保できる可能性が示唆された。しかし、本研究の結果を一般化するためには、朝型および夜型のクロノタイプに対する検討や、運動実施時間と食事摂取時間とのタイミングを実際の生活に合わせた場合の検討が必要である。肥満の予防や改善に最適な運動強

度の決定という観点から、 $\dot{V}O_{2peak}$  や MFO および Fatmax の日内変動を多角的に検討することが望まれる。

### 第2節 朝と夕の一過性中等度強度運動が脂質酸化量に及ぼす影響 (検討課題Ⅲ)

#### 4-2-1. 緒言

生体の代謝や運動応答には日内変動が認められている。安静時の酸素摂取量や体温は夕で高値を示すことが報告されている(98)。また、安静時のエネルギー基質酸化は夕方に脂質酸化が促進し、日中に糖質酸化が促進することが知られている(99)。代謝に関連するコルチゾール(100)やアドレナリン(101)といったホルモンの分泌には、朝や日中に高く夜に低いという生体の日内変動が認められている。朝と夕で運動中の心拍数(heart rate: HR)、酸素摂取量、主観的運動強度(ratings of perceived exertion: RPE)、疲労や乳酸値、最大運動負荷時の運動継続時間は異なることが報告されている(66,81,82)。先行研究において、心拍数や酸素摂取量、体温、コルチゾールといった生理的指標やパフォーマンスの日内変動は脂質酸化量に影響を及ぼすのではないかと考えられている(66)。水泳やサイクリングのパフォーマンスは体温位相と高い関連が認められ、体温の高い夕方に最も高いパフォーマンスが発揮されることが知られている(80-82)。

最大心拍数(maximal heart rate: HRmax)の45%である中等度強度1時間の一過性トレッドミル運動では、朝よりも夕で運動後のエネルギー消費量が有意に高値を示すことが報告されている(65)。また、一過性の漸増負荷運動では朝よりも夕で運動中の脂質酸化量が有意に増加することが認められている(97)。脂質酸化が促進された要因には朝よりも夕で体

温が高いために $\dot{V}O_2$ が増大し、その結果エネルギー消費量が増加したことが関与していると推察されている(97)。しかし、夕の運動でエネルギー消費量や脂質酸化量が増加するメカニズムは、現在まだ明らかでなく、朝と夕で運動が脂質酸化量およびエネルギー消費量に及ぼす影響に統一した見解は得られていない。先行研究の中には朝の1時間のジョギング運動でエネルギー消費量は夕よりも有意に増大するという報告もある(67)。

脂質酸化量は心拍数や酸素摂取量、体温、コルチゾールといった生理的指標の日内変動に影響される可能性があるという報告されている(66)。しかし、先行研究では脂質酸化量およびエネルギー消費量は朝よりも夕の運動でより高値を示すという報告(65,97)と、朝よりも夕の運動でより高値を示す(67)という報告の両方がある。朝と夕の脂質酸化量に統一した見解が得られていない要因には、対象者のクロノタイプが統一されていないことが考えられる。ヒトにおいてコルチゾール(46)や深部体温(46,48-53)の位相はクロノタイプ間で明瞭な差が認められる。そのため、対象者のクロノタイプの相違によって体温やコルチゾールといった生理的指標の位相が異なったために、脂質酸化量に及ぼす影響の相違が認められた可能性がある。

朝と夕の一過性中等度運動が脂質酸化量に及ぼす影響を検討するためには、深部体温(46,48-53)や代謝に関連するホルモンであるコルチゾール(46)の位相に影響を及ぼすクロノタイプを考慮する必要がある。これまでに朝と夕の一過性中等度強度運動が脂質酸化量に及ぼす影響を朝と夕で比較した先行研究ではクロノタイプに関する記述がなく、クロノタイプが考慮されていない。また、これまでに中等度強度運動が脂質酸化量に及ぼす影響を朝と夕で調べた先行研究(63,66,97)では全て漸増負

荷を用いている。漸増負荷運動と定常負荷運動では運動中の体温上昇やエネルギー消費量が異なることが報告されている(102)。中等度強度運動が脂質酸化量に及ぼす影響を、定常負荷においても朝と夕で比較検討する必要がある。また、先行研究では非運動群の設定がなされていない。そのため、脂質酸化量の相違が運動それ自体の影響であるのか、時間帯の影響であるか非運動群を設定し、明らかにする必要がある。

運動中の脂質酸化量は食事のタイミングによっても異なる。同一運動条件下であっても、絶食時間によって運動中の脂質酸化量は異なることが報告されている(71)。先行研究(63,66)では、朝試行は12時間空腹、夕試行は5時間空腹と食事のタイミングが統制されていない。また運動前の糖質摂取は運動中の脂質酸化を抑制することが知られており(84,85)、その抑制は少なくとも食後4時間は持続することが報告されている(86)。そのため朝と夕で脂質酸化量を比較検討するためには、食事のタイミングを少なくとも試行4時間前に統一する必要がある。空腹では脂質酸化量が亢進することが報告されている(70)。先行研究で朝と夕で運動中の脂質酸化量に相違が認められた理由は、運動の実施時間帯でなく、運動実施時間と食事摂取時間とのタイミングの相違である可能性がある。安静時のエネルギー基質酸化は夕でより脂質酸化が促進する(99)ことが報告されており、先行研究(63,66)では空腹時間の短い夕でより脂質酸化が亢進していることから、今後その再現性を確認する必要がある。

これまでに一過性中等度強度運動における脂質酸化量を朝と夕で比較検討した先行研究では、クロノタイプや食事のタイミングが考慮されていない。そこで本研究では、生体リズムの位相が朝や夕に偏っていない中間型クロノタイプを対象にして、食事のタイミングを揃え、一過性



中等度強度運動が脂質酸化量に及ぼす影響を朝と夕で比較検討することを目的とした。

### 4-2-2. 方法

#### (1) 対象者

本研究では中間型クロノタイプの若年男性 10 名（年齢： $27 \pm 1$  歳、身長： $177.8 \pm 2.1$  cm、体重： $70.4 \pm 2.6$  kg、体脂肪率： $14.4 \pm 1.5\%$ ）を対象とした。本研究における対象者の MEQ スコアの平均値は  $54.4 \pm 2.0$  であった。体組成は体組成計（HBF - 361, オムロン社, 日本）を用いて測定した。なお、早稲田大学倫理委員会「人を対象とする研究等倫理委員会」の承認（2012-262）を得て実施した。第 1 節の実験に参加した対象者 13 名のうち 10 名が第 2 節の実験に参加した。

#### (2) 運動負荷試験および運動強度の決定

第 1 節で求めた  $\dot{V}O_2\text{peak}$  をもとに運動強度を決定した。本研究では朝試行における運動負荷試験の測定結果を用いた。

#### (3) 実験プロトコル

朝と夕に安静試行および運動試行を実施し、被験者内比較とした。運動試行では  $60\% \dot{V}O_2\text{peak}$  強度で 1 時間のトレッドミル歩行負荷を行った。運動強度の微調整は、負荷開始から 5～10 分間にトレッドミルの傾斜を調整することで行った。運動負荷終了後はそのまま 2 時間の座位安静を保ち、運動負荷終了後の回復期とした。安静試行では運動試行と同様の時間を座位安静で過ごした。運動実施時刻は朝試行では 9 時開始とし、夕試行では 18 時開始とした。また食事摂取は各試行開始 4 時間前までとし、規定食（693kcal; たんぱく質 8.7%、脂質 24.3%、炭水化物 66.5%）で

統一した(86)。対象者の実験前日および当日の食事・睡眠等の食行動習慣に関してはアンケート法で調査し、実験2日前からの激しい運動の実施、アルコール類およびカフェイン類の摂取を禁止するよう指示した。各試行は無作為化交叉試験とし、試行間は少なくとも1週間以上の間隔をあけた。実験デザインは図7に示した通りである。

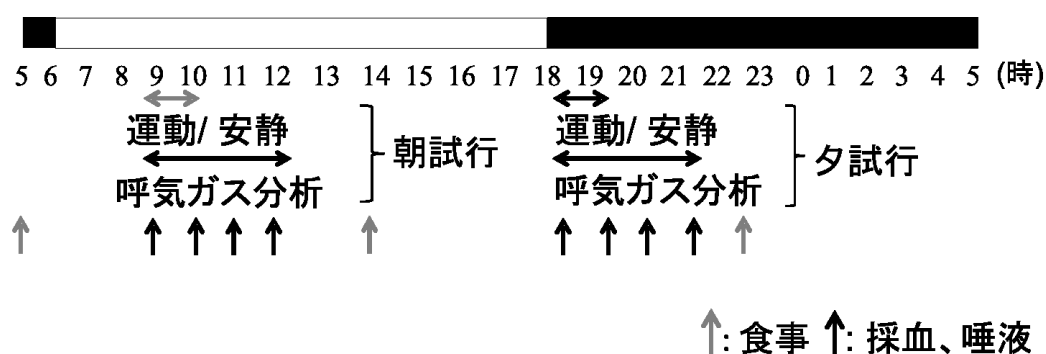


図7. 実験デザイン

#### (4) エネルギー消費量および基質酸化量測定

エネルギー消費量 (energy expenditure: EE) は Weir の式(103)より算出した。

各試行前の安静時5分間、安静または運動試行中の60分間、試行終了後の回復期(120分間)に呼気ガス分析および心拍数測定をおこない、 $\dot{V}O_2$ 、二酸化炭素排出量 ( $\dot{V}CO_2$ )、RER、脂質酸化量および糖質酸化量を算出した。呼気ガス分析は呼気ガス分析器 (AERO MONITOR AES 300S, ミナト医科学社, 日本) を用いて breath-by-breath 法で30秒ごとに  $\dot{V}O_2$  および ( $\dot{V}CO_2$ ) を測定した。運動負荷心電図装置 (STRESS TEST SYSTEM ML-6500, フクダ電子社, 日本) を用いて Mason-Likar 誘導法にて12誘導心電図記録を行い、それにより心拍数を求めた(104)。

朝試行および夕試行で、安静または運動負荷前の座位安静時 5 分間、安静または運動試行の 60 分間、試行終了後の回復期 120 分間における RER を 30 秒ごとの平均値で求めた。また毎分の脂質酸化量および糖質酸化量は下記の式から 30 秒ごとに算出した(91)。

$$\cdot \text{脂質酸化量 (mg/min)} = 1.67 \times \dot{V}O_2 \text{ (L)} - 1.67 \times \dot{V}CO_2 \text{ (L)}$$

$$\cdot \text{糖質酸化量 (mg/min)} = 4.55 \times \dot{V}CO_2 \text{ (L)} - 3.21 \times \dot{V}O_2 \text{ (L)}$$

本研究の脂質酸化量 (mg/min) および糖質酸化量 (mg/min) は、安静または運動負荷の試行中、試行終了後 1 時間、試行終了後 2 時間の 3 ポイントで検討した。毎分の脂質酸化量 (mg/min) および糖質酸化量 (mg/min) と時間 (試行中、試行終了後 1 時間、試行終了後 2 時間) で囲まれた面積を曲線下面積 (area under curve: AUC) として、台形公式(77)を用いて算出した値を総脂質酸化量 (g) および総糖質酸化量 (g) とした。各時間 (試行中、試行終了後 1 時間、試行終了後 2 時間) ポイントにおける脂質酸化量 (g) および糖質酸化量 (g) の合計を各試行における総脂質酸化量 (g) および総糖質酸化量 (g) とした。

##### (5) 体温、血糖値、乳酸の測定

各試行 (朝試行: 9 時、夕試行: 18 時) 前に電子基礎体温計 (テルモ社製, ET-W520ZZ) を用いて、口腔内温度を測定した。試行前、試行終了直後、試行終了 1 時間後、試行終了 2 時間後に指尖より採血を行い、ラクテートプロ (Arkray 社, 日本) により乳酸値を測定し、そしてフリースタイルフリーダム (ニプロ社, 日本) により血糖値を測定した。

(6) 唾液中コルチゾール濃度

唾液中コルチゾール濃度を測定するために、サリベットキット（サリメトリック社，米国）を用いて唾液の採取を行った。対象者の口の中に綿を入れ、1分間咀嚼してもらい唾液を含ませた。その後、綿を3000rpmで10分間遠心分離し、唾液を採取した。採取した唾液は別チューブに分注し、測定に使用するまで-60°Cで冷凍保存した。サリメトリック社のキット（3002）を用いて、唾液中コルチゾール濃度をELISA法にて分析した(105)。唾液採取中は呼気ガス分析を一時的に停止した。

(7) 主観的疲労度

Visual Analog Scale (VAS) を用いて、運動前、運動直後、運動1時間後、運動2時間後における主観的疲労度を測定した。

(8) 統計

測定値は全て平均値 ± 標準誤差で示した。被験者内比較とし、安静時の体温、心拍数および運動強度における朝と夕の比較には対応のあるStudent's t-testを用いた。その他の測定項目については、試行と時間を要因とする反復性の2元配置分散分析を行った。Post hocテストにはBonferroni法を用いた。統計ソフトには統計処理ソフトウェアSPSS statistics21日本語版（IBM社，米国）を使用した。統計学的有意水準を5%未満に設定した。

### 4-2-3. 結果

対象者の特徴は表 8 に示す通りであった。また、試行前日の被験者の平均睡眠時間および就寝-覚醒時間は表 9 の通り、試行間で有意差は認められなかった。

#### 1. 安静時体温、心拍数および運動強度

安静時体温は安静、運動の両試行において朝よりも夕で有意に高かった ( $P < 0.01$ )。安静時心拍数は安静、運動の両試行において朝よりも夕で有意に高かった ( $P < 0.05$ )。運動試行における運動強度 ( $\dot{V}O_2\text{peak}$ ) に朝と夕で有意差は認められなかった (表 10)。

#### 2. 運動中の RPE、HR、 $\dot{V}O_2$

RPE は試行・時間の 2 要因に有意な交互作用が認められた ( $P < 0.05$ )。Post hoc テストでは運動開始 20 分後に朝よりも夕で有意な低値を示した ( $P < 0.05$ ) (表 11)。HR は試行・時間の 2 要因に有意な交互作用は認められなかったが、時間に有意な主効果が認められた ( $P < 0.01$ )。 $\dot{V}O_2$  は試行・時間の 2 要因に有意な交互作用は認められず、主効果も認められなかった。

#### 3. 基質酸化量、HR、RER

総脂質酸化量は安静試行において、試行・時間の 2 要因に有意な交互作用は認められず、主効果も認められなかった (図 8)。運動試行においては試行・時間の 2 要因に有意な交互作用は認められなかったが、時間に有意な主効果が認められた ( $P < 0.05$ ) (図 9)。

糖質酸化量は安静試行において、試行・時間の2要因に有意な交互作用は認められなかった。運動試行においても試行・時間の2要因に有意な交互作用は認められなかったが、時間に有意な主効果が認められた ( $P < 0.05$ ) (表 12)。

HR は安静試行において試行・時間の2要因に有意な交互作用は認められなかった (表 12)。運動試行においては試行・時間の2要因に有意な交互作用が認められた ( $P < 0.01$ ) が、Post hoc テストにおいて有意差は認められなかった (表 12)。

RER は安静試行において試行・時間の2要因に有意な交互作用が認められた ( $P < 0.01$ )。Post hoc テストでは試行中において朝と比較して夕で有意な高値を示した ( $P < 0.05$ ) (表 12)。運動試行においては試行・時間の2要因に有意な交互作用は認められなかったが、時間に有意な主効果が認められた ( $P < 0.01$ ) (表 12)。

#### 4. 試行中の $\dot{V}O_2$ 、EE

試行中の  $\dot{V}O_2$  は、安静試行において試行・時間の2要因に有意な交互作用は認められなかった (表 13)。運動試行においても試行・時間の2要因に有意な交互作用は認められなかった (表 13)。

試行中の EE は安静試行において、試行・時間の2要因に有意な交互作用は認められなかった (表 13)。運動試行においても試行・時間の2要因に有意な交互作用は認められなかった (表 13)。

#### 5. 唾液コルチゾール、血糖値、乳酸値

唾液コルチゾールは安静試行において試行・時間の2要因に有意な交互作用は認められなかったが、試行および時間 ( $P < 0.01$ ) に主効果が認

められた（試行： $P < 0.01$ 、時間： $P < 0.01$ ）（表 14）。運動試行においても試行・時間の 2 要因に有意な交互作用は認められなかったが、試行および時間に主効果が認められた（試行： $P < 0.05$ 、時間： $P < 0.05$ ）（表 14）。

血糖値は安静試行において試行・時間の 2 要因に有意な交互作用は認められなかったが、試行に主効果が認められた（ $P < 0.01$ ）（表 14）。運動試行においては試行・時間の 2 要因に有意な交互作用は認められず、主効果も認められなかった（表 14）。

乳酸値は安静試行において試行・時間の 2 要因に有意な交互作用は認められず、主効果も認められなかった（表 14）。運動試行においては試行・時間の 2 要因に有意な交互作用は認められなかったが、時間に主効果が認められた（ $P < 0.01$ ）（表 14）。

#### 6. 主観的疲労度 (VAS)

主観的疲労度は安静試行において試行・時間の 2 要因に有意な交互作用は認められなかった（表 15）。運動試行においても試行・時間の 2 要因に有意な交互作用は認められなかったが、時間に主効果が認められた（ $P < 0.01$ ）（表 15）。

表 8. 対象者の特徴

N	Age (yr)	Height (cm)	Weight (kg)	BMI ( kg/ m <sup>2</sup> )	MEQ (score)	$\dot{V}O_2$ peak ( ml/kg/min )
10	27 ± 1	177.8 ± 2.1	70.4 ± 2.6	22.3 ± 0.7	54.4 ± 2.0	47.4 ± 1.7

BMI: body mass index, MEQ: morningness-eveningness questionnaire,

%  $\dot{V}O_2$ peak: %maximum oxygen uptake

表 9. 対象者の睡眠覚醒パターン

	Control trial		Exercise trial	
	Morning	Evening	Morning	Evening
Bed time(h)	23.2 ± 0.2	23.3 ± 0.2	23.3 ± 0.2	23.9 ± 0.3
Wake-up time(h)	5.6 ± 0.4	6.0 ± 0.6	5.7 ± 0.4	6.5 ± 0.5
Sleeping hours	6.4 ± 0.5	6.7 ± 0.6	6.4 ± 0.3	6.6 ± 0.4

表 10. 安静時体温、心拍数、運動中の運動強度

	Control trial		Exercise trial	
	Morning	Evening	Morning	Evening
Body temperature(°C)	36.2 ± 0.1	36.6 ± 0.0**	36.2 ± 0.1	36.5 ± 0.1*
HRrest(beats/min)	62.2 ± 2.8	65.6 ± 2.7*	62.8 ± 2.7	67.7 ± 2.8*
% $\dot{V}O_2$ peak			56.7 ± 2.1	57.5 ± 2.4

\* $P < 0.05$ ; morning VS. evening, \*\* $P < 0.01$ ; morning VS. evening

HR: heart rate, %  $\dot{V}O_2$ peak: %maximum oxygen uptake



表 11. 運動負荷中の主観的運動強度、心拍数、酸素摂取量

(Time)	RPE		HR (beats/min)		$\dot{V}O_2$ (ml/min)	
	Morning	Evening	Morning	Evening	Morning	Evening
10min	10.0 ± 0.6	9.9 ± 0.6	134.0 ± 3.5	132.8 ± 4.9	1804.2 ± 107.3	1829.1 ± 109.8
20min*	11.2 ± 0.7	10.3 ± 0.6	139.2 ± 3.8	137.2 ± 6.1	1877.7 ± 112.7	1855.4 ± 115.4
30min	11.9 ± 0.7	11.3 ± 0.7	144.3 ± 4.2	142.2 ± 5.8	1928.4 ± 120.7	1926.7 ± 116.5
40min	12.1 ± 0.7	12.0 ± 0.7	147.8 ± 4.2	145.9 ± 6.2	1941.1 ± 132.1	1960.8 ± 115.1
50min	12.6 ± 0.7	12.8 ± 0.7	151.6 ± 4.1	149.9 ± 6.1	1963.2 ± 121.2	1975.8 ± 107.7
60min	13.0 ± 0.6	13.0 ± 0.8	155.9 ± 5.1	151.4 ± 6.5	1989.9 ± 130.6	1821.0 ± 199.9

\* $P < 0.05$ ; post-hoc, morning VS. evening; RPE

RPE: ratings of perceived exertion, HR: heart rate,

%  $\dot{V}O_{2peak}$ : %maximum oxygen uptake

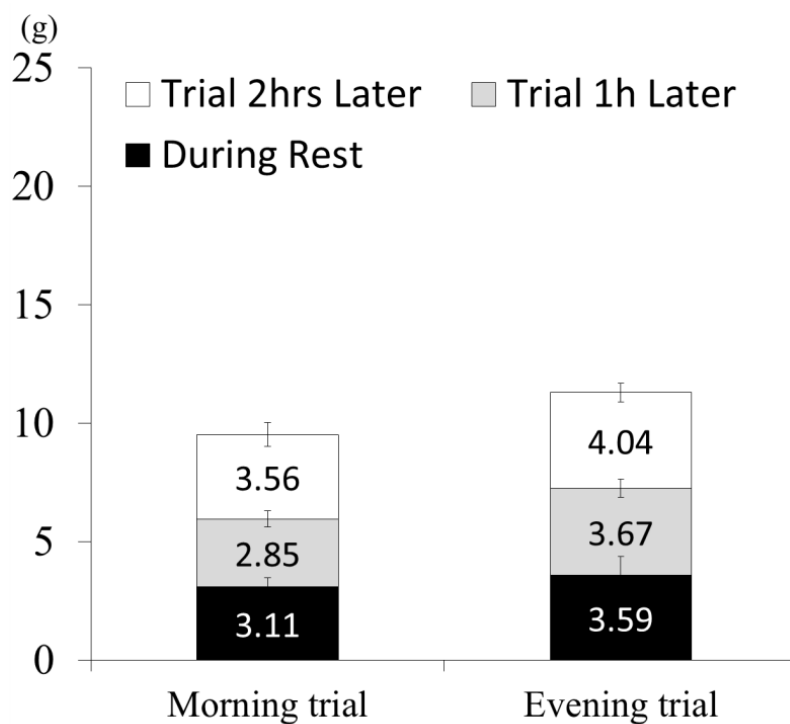


図 8. 安静試行における脂質酸化量

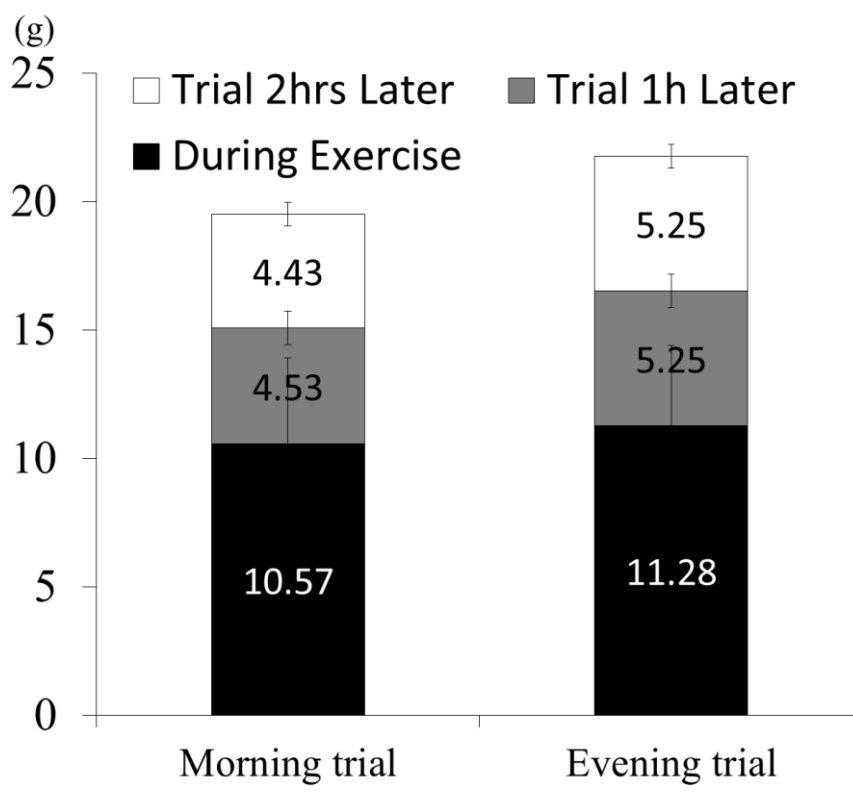


図 9. 運動試行における脂質酸化量

表 12. 試行中、回復期の糖質酸化量、呼吸交換比、心拍数

		Control trial		Exercise trial	
		Morning	Evening	Morning	Evening
Glucose oxidation (g/hour)	Under trial	11.2 ± 1.7	11.6 ± 1.9	133.0 ± 10.8	123.9 ± 4.1
	1h later	11.6 ± 1.6	9.3 ± 1.4	19.2 ± 1.2	7.9 ± 1.1
	2h later	11.1 ± 2.0	9.0 ± 1.2	7.6 ± 1.0	7.9 ± 0.6
HR (beats/min)	Under trial	63.4 ± 3.1	64.8 ± 3.3	142.8 ± 3.8	141.3 ± 5.4
	1h later	63.1 ± 3.2	64.1 ± 3.8	78.4 ± 4.1	82.6 ± 5.2
	2h later	66.1 ± 4.7	64.9 ± 3.7	72.3 ± 4.0	76.0 ± 5.2
RER	Under trial	0.86 ± 0.02	0.88 ± 0.02*	0.95 ± 0.01	0.95 ± 0.02
	1h later	0.87 ± 0.02	0.84 ± 0.01	0.82 ± 0.02	0.81 ± 0.02
	2h later	0.86 ± 0.02	0.83 ± 0.01	0.82 ± 0.01	0.81 ± 0.01

\* $P < 0.05$ ; post-hoc, morning VS. evening

HR: heart rate

RER : respiratory exchange ratio

表 13. 試行中、回復期の酸素摂取量、エネルギー消費量

		Control trial		Exercise trial	
		Morning	Evening	Morning	Evening
$\dot{V}O_2$ (l/min)	Under trial	13.8 ± 0.3	14.4 ± 0.6	115.1 ± 7.0	114.6 ± 6.4
	1h later	14.3 ± 0.5	14.2 ± 0.6	15.6 ± 0.7	16.5 ± 0.7
	2h later	14.8 ± 0.6	15.3 ± 0.6	14.8 ± 0.7	16.3 ± 0.7
EE (kcal)	Under trial	66.9 ± 1.4	70.2 ± 2.9	568.3 ± 34.0	566.0 ± 31.4
	1h later	69.5 ± 2.1	68.6 ± 2.8	74.9 ± 3.4	79.3 ± 3.2
	2h later	71.6 ± 2.9	72.0 ± 3.0	71.2 ± 3.4	77.9 ± 3.1

$\dot{V}O_2$ : oxygen uptake

EE : energy expenditure

表 14. 試行中、回復期の唾液中コルチゾール、血糖値、血中乳酸値

		Control trial		Exercise trial	
		Morning	Evening	Morning	Evening
Cortisol ( $\mu\text{g/dL}$ )	Pre trial	$0.18 \pm 0.02$	$0.07 \pm 0.01$	$0.17 \pm 0.03$	$0.07 \pm 0.00$
	Post trial	$0.19 \pm 0.03$	$0.06 \pm 0.01$	$0.29 \pm 0.05$	$0.19 \pm 0.07$
	1h later	$0.15 \pm 0.01$	$0.03 \pm 0.00$	$0.18 \pm 0.02$	$0.14 \pm 0.05$
	2h later	$0.13 \pm 0.02$	$0.03 \pm 0.01$	$0.20 \pm 0.04$	$0.08 \pm 0.02$
Glucose ( $\text{mg/dL}$ )	Pre trial	$91.7 \pm 2.6$	$88.7 \pm 3.1$	$89.4 \pm 2.2$	$93.0 \pm 3.0$
	Post trial	$96.2 \pm 2.8$	$89.3 \pm 2.7$	$85.5 \pm 1.8$	$89.6 \pm 2.9$
	1h later	$93.1 \pm 1.9$	$88.1 \pm 2.3$	$89.0 \pm 1.6$	$88.8 \pm 2.9$
	2h later	$92.3 \pm 3.7$	$84.2 \pm 2.3$	$86.7 \pm 2.0$	$83.8 \pm 2.9$
Lactate ( $\text{mmol/l}$ )	Pre trial	$1.0 \pm 0.1$	$1.2 \pm 0.1$	$0.9 \pm 0.0$	$1.4 \pm 0.2$
	Post trial	$1.1 \pm 0.1$	$1.1 \pm 0.1$	$1.6 \pm 0.1$	$1.6 \pm 0.3$
	1h later	$1.2 \pm 0.1$	$1.2 \pm 0.1$	$1.1 \pm 0.1$	$1.2 \pm 0.1$
	2h later	$1.2 \pm 0.1$	$1.3 \pm 0.1$	$1.3 \pm 0.1$	$1.4 \pm 0.1$

表 15. 主観的疲労度 (VAS)

Time	Control trial		Exercise trial	
	Morning	Evening	Morning	Evening
Pre	0.8 ± 0.3	1.2 ± 0.4	0.9 ± 0.3	1.8 ± 0.5
Post trial	0.9 ± 0.3	1.3 ± 0.5	4.2 ± 0.6	4.5 ± 0.5
1h later	0.8 ± 0.3	1.3 ± 0.4	2.6 ± 0.4	2.8 ± 0.4
2h later	1.0 ± 0.3	1.3 ± 0.5	1.8 ± 0.3	2.2 ± 0.5

VAS: visual analog scale

単位: cm

### 4-2-4. 考察

本研究では、睡眠-覚醒リズムが朝や夕に偏っていない中間型クロノタイプを対象に、食事の内容やタイミングを揃えた条件下において、一過性中等度強度運動が脂質酸化量に及ぼす影響を朝と夕で比較検討した。その結果、安静・運動の両試行下において朝と夕で脂質酸化量および糖質酸化量に有意差は認められなかった。安静・運動の両試行下において、試行中から試行後2時間のエネルギー消費量、血糖値、乳酸値といった代謝関連指標に朝と夕で有意差は認められなかった。これは朝と夕で脂質酸化量に有意差が認められなかったことと一致していた。

生体の運動応答に関して日内変動は認められなかった。先行研究(80-82,100)で報告されている通り、体温や心拍数、コルチゾール濃度、RERは安静・運動の両試行下において試行前の朝9時と夕18時で有意差が認められた。しかしながら、朝と夕で試行前に認められた心拍数やコルチゾール濃度、RERの有意差は、運動によって消失した。運動試行において $\dot{V}O_2$ および心拍数に有意差は認められなかったことから、運動が身体に与えた物理的負荷は朝と夕で同等であったと考えられる。運動試行において朝と夕で代表的なストレス指標であるコルチゾール濃度に有意な交互作用が認められなかったことも、運動に対する生体のストレス応答が朝と夕で同様であったことを示唆している。

RPEは朝と夕で同程度であったと考えられる。RPEは運動開始20分後に朝よりも夕で有意な低値を示した( $P < 0.05$ )が、RPEと高い相関が見られる(106,107)HRに $\dot{V}O_2$ は朝と夕で有意差は認められなかった。RPEは運動実施時間帯の影響を受けず、朝と夕で変化しない可能性が示唆された。

本研究において  $60\% \dot{V}O_{2peak}$  運動強度での1分当たりのエネルギー消費量は朝試行で 9.5 kcal、夕試行で 9.4 kcal であった。これは同強度である先行研究(7)と同様であった(朝試行: 9kcal、夕試行: 9kcal)。一方で、本研究において1分当たりの運動中の脂質酸化量は、朝試行で 176 mg、夕試行で 188 mg であった。これは朝試行、夕試行ともに 300 mg を超えている先行研究(7)と比較して低値を示した。空腹では脂質酸化量の亢進が認められている(70)。本研究では試行前の絶食時間が4時間であったのに対して、先行研究は5~12時間であったために脂質酸化量の亢進が認められていたと考えられた。

対象者を中間型クロノタイプとした本研究において、朝と夕で脂質酸化量に有意差は認められなかった。本研究では対象者を中間型クロノタイプに揃えたために、脂質酸化量に相違が認められなかった可能性がある。朝と夕において一過性中等度運動が脂質酸化量に及ぼす影響は異なるという先行研究(63,66)ではクロノタイプについての言及はなされていないが、夜型を対象とした場合には、一過性中等度運動が脂質酸化量に及ぼす影響は朝と夕で異なる可能性がある。先行研究において脂質酸化量の増加には朝よりも夕で体温が高いために  $\dot{V}O_2$  が増大し、その結果エネルギー消費量が増加することが関与していると推察されている(97)。クロノタイプ間では体温や体温位相が異なる(63,91)。中間型を対象とした本研究において朝と夕における運動前の体温差は  $0.3^{\circ}\text{C}$  であった(朝試行  $36.2 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$  vs 夕試  $36.5 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ )。朝型では体温は午前中に上昇し、その後19時30分の体温ピークまではほとんど僅かにしか増加しない(94)。一方で、夜型では朝から20時30分の体温ピークまで着実に上昇していく(94)。夜型では中間型よりも朝と夕の体温差がより大きくなる(94)のために、朝と夕における脂質酸化量の日内変動は夜型で現れやすい



可能性がある。夜型では中間型と比べて朝よりも夕で $\dot{V}O_2$ がより増大し、その結果夕でエネルギー消費量がより増加するために、脂質酸化量は夕でより促進する可能性がある。今後は朝型や夜型クロノタイプの対象者についても検討していく必要がある。

クロノタイプや食事の内容やタイミングを揃えた条件下において、朝と夕で脂質酸化量に有意差は認められなかった。中間型クロノタイプにおいて脂質酸化量は朝と夕で同等であると考えられた。

### 4-2-5. 結論

本研究では、中間型クロノタイプを対象にして食事の内容やタイミングを揃えた条件下で行った安静・運動の両試行下において、朝と夕で脂質酸化量に有意差は認められなかった。

### 4-2-6. 今後の展望

本研究では中間型クロノタイプを対象にした場合には、運動の有無に関わらず朝と夕で試行中、試行後1時間、試行後2時間の脂質酸化量に有意差は認められなかった。しかし、安静・運動の両試行において朝と夕の脂質酸化量における日内変動の相違は夜型で現れやすい可能性がある。本研究の結果を一般化するためには、朝型および夜型のクロノタイプに対する検討や、食事のタイミングを実際の生活に合わせた場合の検討が必要である。本研究の運動条件は一過性（急性）である。また、肥満者では非肥満者と比較して生体リズムの位相が異なり、絶対的な脂質酸化量が多いことが報告されている。それゆえ、今後は朝と夕の運動が脂質代謝に及ぼす影響に関して、長期的（慢性的）な介入の観点からクロノタイプ別に肥満者も含めた多角的な検討が望まれる。

## 第5章 総合討論

## 5-1. 本研究の目的と成果

時間運動学的な観点から運動処方に有効な運動プログラムを開発するためには長期的な運動介入が必要である。そこで、まず検討課題Ⅰでは高脂肪食負荷下における長期的中等度強度運動介入が体重増加の抑制に及ぼす影響を朝と夕で検討することを目的とし、条件を統制しやすいマウスを対象に、朝または夕1日30分の4週間にわたる輪回し運動介入が体重増加の抑制に及ぼす影響を朝と夕で比較検討した。その結果、高脂肪食（カロリーの40%が脂質）負荷下において夕30分の自発的な長期的中等度強度運動は、朝の同程度の運動と比較して体重増加をより抑制することを明らかにした。また内臓脂肪および皮下脂肪の蓄積についても朝よりも夕の運動で有意に抑制された。朝と比較して夕の運動でより脂質酸化が亢進し、その結果内臓脂肪における脂肪合成が抑制され、脂肪蓄積の抑制が起こった可能性が示唆された。検討課題Ⅰに続いて検討課題Ⅱではヒトを対象に検討を行った。

肥満の予防や改善を目的とする臨床現場において、運動処方の作成には運動負荷試験が必須である。運動処方において運動強度は運動負荷試験の結果に基づいて決定される。運動負荷試験において運動強度を決定する $\dot{V}O_{2peak}$ やFatmaxといった指標を正確に評価することは、適切な運動処方の作成に重要である。そこで、検討課題Ⅱでは運動負荷試験で測定される項目の日内変動を朝と夕で検討することを目的とし、中間型クロノタイプの若年男性13名を対象に運動前の食事の内容やタイミングを統制した条件下において、 $\dot{V}O_{2peak}$ やMFOおよびFatmaxを朝と夕で比較検討した。その結果、 $\dot{V}O_{2peak}$ やMFOおよびFatmaxに朝と夕で有意な日内変動は認められなかった。また、RPEは朝と夕で変化しない

可能性が示された。検討課題Ⅱの結果より、睡眠-覚醒サイクルが朝や夕に偏っていない中間型クロノタイプでは、運動処方で運動強度の決定に用いられる $\dot{V}O_2\text{peak}$ やMFOおよびFatmaxは朝または夕といった1日の中で運動負荷試験が行われる時間帯の影響を受けないことが示唆された。

臨床現場では、運動負荷試験により求めた $\dot{V}O_2\text{peak}$ を用いて運動強度を設定し、運動処方をおこなう。肥満の予防や改善を目的とした運動処方では中等度強度運動(40-60% $\dot{V}O_2\text{peak}$ )によって脂質酸化を促進させることが有効である(108)。肥満症の運動処方では1時間の中等度強度運動(40-60% $\dot{V}O_2\text{peak}$ )が用いられる(64)ことが多い。しかしながら、同じ1時間の40-60% $\dot{V}O_2\text{peak}$ 強度運動でも、運動を実施する時間帯によって運動中および運動終了後の脂質酸化量は異なる可能性がある。安静時体温は朝よりも夕で高値を示す。一過性の漸増負荷運動では朝よりも体温の高い夕では $\dot{V}O_2$ も高くなることが推察されている(97)。しかし中間型クロノタイプを対象にして、運動前の食事の内容や運動実施時間と食事摂取時間とのタイミングを統制した条件下で、定常負荷運動を朝と夕に実施させた場合、運動実施時間帯の相違が脂質酸化にどのように影響するかに関しては、いまだ解明されていない。脂質酸化量は心拍数や酸素摂取量、体温、コルチゾールといった生理的指標の日内変動に影響される可能性がある(66)。そこで、検討課題Ⅲでは一過性中等度強度運動が脂質酸化量に及ぼす影響を朝と夕で検討することを目的とした。中間型クロノタイプ若年男性10名を対象にして運動前の食事の内容やタイミングを統制した条件下において、一過性中等度強度運動が運動中、運動終了後1時間、運動終了後2時間の脂質酸化量に及ぼす影響を朝と夕で比較検討した。その結果、試行前に朝と夕で認められた心拍数やコルチゾール濃度、呼吸交換比の有意差は、運動後に消失した。中間型クロノ

タイプを対象に試行前の食事の内容やタイミングを統制した条件下では、安静および運動の両試行において脂質酸化量に朝と夕で有意差は認められなかった。検討課題Ⅲの結果は、睡眠-覚醒サイクルが朝や夕に偏っていない中間型クロノタイプでは、脂質酸化量は朝または夕といった1日の中で運動が行われる時間帯の影響を受けないことが示唆された。

検討課題Ⅰ～Ⅲの結果は、肥満の予防や改善のために作成される減量プログラムに有用なエビデンスとなる。検討課題Ⅰでは運動処方にも有効な運動プログラムを開発するため必要な長期的運動介入に関して新しく時間運動学的な観点から知見を示した。この知見は時間運動学を考慮した運動処方の標準的ガイドライン作成に向けたヒト研究に繋がるものと思われる。検討課題Ⅱは運動処方の作成に必要な運動負荷試験に関して新しく日内変動の観点から知見を示した。この知見は時間運動学を考慮した運動負荷試験実施の標準的ガイドライン作成に大いに役立つものと思われる。検討課題Ⅲは運動処方を作成する場合に”いつ運動させる”、という時間運動学的観点から脂質酸化量の日内変動を示した。この一過性中等度強度運動における知見は、運動処方への臨床応用に向けて今後、長期的な運動の介入研究を行う際に役立つと考えられる。

## 5-2. 今後の課題

肥満の予防や改善に向けた運動プログラムの開発は、運動処方において重要な役割を果たす。しかし、運動プログラムに関して”いつ運動するか”といった運動実施時間帯に着目した時間運動学的な検討はまだあまりなされていない。検討課題Ⅰ(109)では夕30分の長期的な中等度強度運動は、高脂肪食負荷下において朝の同程度の運動と比較して体重増加をより抑制し、内臓脂肪量、皮下脂肪量もより抑制された。一方で、検

討課題Ⅱでは生活リズムが朝や夕に偏っていない中間型クロノタイプの食事条件を統制した若年者では、朝と夕で $\dot{V}O_2\text{peak}$ やMFOおよびFatmaxといった心肺体力や脂質酸化能に有意差は認められなかった。さらに、検討課題Ⅲでは食事条件を統制した生活リズムが朝や夕に偏っていない中間型クロノタイプの若年者では、一過性中等度強度運動における脂質酸化量に朝と夕で有意差は認められなかった。

マウスおよびヒトで異なる結果が生じた要因の1つとしては、食事の内容や運動と食事のタイミングが関与している可能性がある。検討課題Ⅰのマウスにおける研究では朝と夕の両運動群において摂食量に有意差は認められなかった。マウスにおける研究では食事の内容を、普通食では脂質の割合がカロリーの10%であるのに対して、脂質の割合がカロリーの40%を占める高脂肪食とし、食事のタイミングは自由摂食とした。一方で、検討課題Ⅱ、Ⅲのヒトにおける研究では食事の内容をカロリーのコントロールされた規定食（脂質の割合：24.3%）とし、食事のタイミングを統制した。よって、高脂肪食という負荷や食事のタイミング、1日の摂食量に対する1回あたりの食事量の比率といった摂食パターンが脂質代謝に影響を及ぼした可能性がある。そのために、マウスでは朝と夕といった運動実施時間帯の相違で体重増加が異なり、ヒトでは朝と夕で脂質酸化量が同程度であった可能性がある。マウスにおける研究の後に同研究室で行われたマウスの追実験では、運動と食事の順番および摂食パターンは脂質酸化量や体重増加の抑制に影響を及ぼすことが報告されている(110)。マウスにおける研究では、朝運動群では食事摂取後に運動を行い、夕運動群では運動後に食事をしてきた可能性がある。またヒトにおける先行研究でも、運動と食事の順番が脂質酸化量に影響を及ぼ

すことが示されている(111)。しかしながら脂質酸化がより促進される運動と食事の順番に関して、いまだ統一した見解は得られていない。

肥満者では非肥満者と比較して生体リズムが乱れ、絶対的な脂質酸化量が多いことが報告されている。しかし、運動実施時間帯の相違が長期的な運動介入で肥満者の脂質酸化量や体重増加の抑制に及ぼす影響はいまだ明らかでない。8週間の長期的な介入では朝よりも夕の運動でより $\dot{V}O_2\text{peak}$ が向上することが報告されている(112)。そのため中等度強度運動の長期的運動介入が体重増加抑制や脂質代謝に及ぼす影響は、朝と夕で異なる可能性がある。今後は肥満者を対象として、クロノタイプ別に、朝と夕の中等度強度運動が脂質酸化量や体重増加の抑制に及ぼす影響を長期的な介入プログラムの観点から検討する必要がある。さらに本研究では、脂質酸化量は運動中、運動終了後1時間、運動終了後2時間を検討したが、運動処方への応用を考慮すると今後はより長期的な1日を通じた検討も必要と考えられる。

## 第6章 結論

本博士論文では、朝と夕の運動実施時間帯の相違が脂質代謝に及ぼす影響をマウスおよびヒトを対象に検討した。まず、検討課題Ⅰではマウスを対象として、太りやすい環境下において長期的中等度強度運動介入が体重増加に及ぼす影響を朝と夕で比較検討した。続いて、ヒトを対象として、次の2つの観点から検討した。まず検討課題Ⅱでは運動負荷試験で測定される項目の日内変動を朝と夕で比較検討した。次に検討課題Ⅲでは一過性中等度強度運動が脂質酸化量に及ぼす影響を朝と夕で比較検討した。なお、検討課題Ⅱの実験に参加した対象者のうち10名が検討課題Ⅲの実験に参加した。

朝と夕の運動実施時間帯の相違が脂質代謝に及ぼす影響を考察し、肥満の予防や改善に有用な運動条件の探索に必要な時間運動学的エビデンス解明の一端を担うことを目的とした。

(1) 太りやすい環境下にあるマウスにおいて、朝の同程度の運動と比較して夕の長期的な運動で、より体重増加の抑制が認められることを明らかにした。この結果は、肥満者において運動実施時間帯を夕にすることでより太りにくいという可能性を示している。

(2) 睡眠-覚醒サイクルが朝や夕に偏っていない中間型クロノタイプでは、試行前の食事摂取の内容や運動実施時間と食事摂取時間とのタイミングを統制した条件下において、運動処方作成時に運動強度の決定に必要な指標である  $\dot{V}O_2\text{peak}$  や MFO および Fatmax に朝と夕で有意な日内変動は認められないことが明らかとなった。この結果は、食事条件を統制した中間型クロノタイプの若年者では運動処方に必要な指標は運動

負荷試験を行う時間帯の影響を受けない可能性を示唆している。また運動処方において運動強度の決定に用いられる主観的運動強度に関しても、朝と夕で有意な日内変動は認められないことが明らかになった。この結果は、主観的運動強度に基づいて運動強度を決定した場合にも、朝と夕で同程度の運動強度を確保できる可能性が示唆された。

(3) 睡眠-覚醒サイクルが朝や夕に偏っていない中間型クロノタイプでは、試行前の食事摂取の内容や運動実施時間と食事摂取時間とのタイミングを統制した条件下において一過性中等度強度運動における脂質酸化量に朝と夕で有意な日内変動は認められないことを明らかにした。この結果は、食事条件を統制した中間型クロノタイプの若年者では脂質酸化量は運動を行う時間帯の影響を受けない可能性を示唆している。

本研究におけるマウスおよびヒトを対象とした結果は、肥満の予防や改善を目的とした運動処方の開発に向けて、一過性中等度強度運動が脂質酸化量に及ぼす影響や長期的中等度強度運動が体重増加の抑制に及ぼす影響を朝と夕で比較検討したものである。本研究は運動生理学的および予防医学的に意義があり、若年期の生活習慣病予防に関するエビデンスとして、時間運動学的観点から運動処方の開発に有用な知見を与えるものと考えられた。



## 謝辞

本学位論文は多くの方の御指導、御鞭撻を受けて作成されました。

まず、対象者として本研究に参加して下さった皆さんに心より感謝を表します。次に、早稲田大学の教員である先生方に心より感謝申し上げます。指導教員である坂本静男教授、本論文の副査である柴田重信教授、赤間高雄教授、鈴木克彦教授、樋口満教授ならびに内田直教授に厚く御礼申し上げます。特に、坂本先生からは研究者として、教育者として、人として、大切な心構えや生き方（モットー）を学ばせていただきました。坂本研究室で過ごした時間は私にとって貴重な財産です。また、柴田先生には研究とは何かということやマウス研究を一から丁寧に教えていただきました。柴田研究室で過ごした時間がなければ研究者としての今の私はありませんでした。また、内田直教授には生体リズムと運動をキーワードにしたスポーツ科学研究の楽しさを教えていただきました。学部時代に先生のゼミに所属していなければ、ここまで興味の持てる研究テーマに出会うことはなかったと思います。学部時代より大変お世話になりました。続いて、研究を進めていくにあたって、いつもの的確な助言や力添えをして下さった坂本研究室の皆さんに心より感謝いたします。特に、小西真幸助教や高橋将記助教、金鉉基氏には研究計画の立案から研究費の獲得、研究の遂行、論文の執筆に至るまで甚大なご協力をいただきました。公私にわたって大変お世話になりました。最後に、早稲田大学で出会った最高の仲間と家族に最大限の感謝と敬意を表します。学部時代より10年にわたって、私の進む道を応援してくれた皆さんの存在に支えられて今の私があります。特に、新井美穂氏、勝ひとみ氏、栗田信行氏、根岸香織氏、父・英男、母・裕子、妹・由花理にはいつも温かく見守っていただきました。皆さんからの励ましや金銭的なサポートがなければ、ここまで頑張ることはできなかったと思います。また、私の学位取得を誰よりも楽しみにしてくれた4人の祖父母にも感謝いたします。周囲の皆さんに守られて過ごした10年の学生生活でした。今後は、皆さんに恩返ししていきます。

2015年10月吉日 安藤加里菜

第7章 参考文献

1. Nakamura K, Okamura T, Kanda H, Hayakawa T, Okayama A, Ueshima H, et al. Medical costs of obese Japanese: A 10-year follow-up study of National Health Insurance in Shiga, Japan. *Eur J Public Health*. 2007;17(5):424-9.
2. 日本肥満学会肥満症診断基準検討委員会. 肥満症診断基準2011. 肥満研究. 2011;17:1-78.
3. 石垣泰, 片桐秀樹. I. 病態解明・診断・治療 10. 肥満症. 日本内科学会. 2013;102(4):895-901.
4. Sasazuki S, Inoue M, Tsuji I, Sugawara Y, Tamakoshi A, Matsuo K, et al. Body mass index and mortality from all causes and major causes in Japanese: results of a pooled analysis of 7 large-scale cohort studies. *J Epidemiol*. 2011;21(6):417-30.
5. 佐藤祐造. 肥満・肥満症の運動療法—理論と実際—. 肥満研究. 1998;4(3):211-6.
6. 中田由夫, 笹井浩行, 田中喜代次. メタボリックシンドローム改善における運動の役割と減量推奨値の設定. 肥満研究. 2010;16(2):90-4.
7. 大蔵倫博, 田中喜代次. 内臓脂肪と運動療法. 肥満研究. 2000;6(2):125-9.
8. Matsumoto, Daisuke, Uritani D, Asano Y, Koike T, Oshida Y. Relationship between exercise habits and health-related quality of life among “Tokuteikenshin” participants —comparison between exercise adherence and

- non-exercise adherence using Transtheoretical model—. Nagoya J Heal Phys Fitness, Sport. 2011;34(1):5-9.
9. 厚生労働省 平成25年国民健康・栄養調査報告書. 第2部 身体状況調査の結果.  
<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/eiyou/dl/h25-houkoku-05.pdf>. p. 163.
10. 厚生労働省 健康・医療ホームページ. 国民の健康の増進の総合的な推進を図るための基本的な方針 健康日本21(第二次).  
[http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryuu/kenkou/kenkou\\_nippon21.html](http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/kenkou/kenkou_nippon21.html).
11. Soeliman FA, Azadbakht L. Weight loss maintenance: A review on dietary related strategies. J Res Med Sci. 2014;19(3):268-75.
12. Ebbeling CB, Swain JF, Feldman HA, Wong WW, Hachey DL, Garcia-Lago E, et al. Effects of dietary composition on energy expenditure during weight-loss maintenance. JAMA. American Medical Association; 2012;307(24):2627-34.
13. Coughlin JW, Smith MT. Sleep, obesity, and weight loss in adults: Is there a rationale for providing sleep interventions in the treatment of obesity? Int Rev Psychiatry. 2014;26(2):177-88.
14. Bogers RP, Barte JCM, Schipper CMA, Vijgen SMC, de Hollander EL, Tariq L, et al. Relationship between costs of lifestyle interventions and weight loss in overweight adults. Obes Rev. 2010;11(1):51-61.
15. Proper and improper weight loss programs. Med Sci Sports Exerc. 1983;15(1):ix - xiii.

16. Denolin H. Guidelines for exercise testing and prescription. 4th ed. Clinical Cardiology. Philadelphia: American College of Sports Medicine; 1991. 139-140 p.
17. 島本英樹, 田中喜代次, 安達幸生. 減量プログラムの成果にみられる季節差. 体力科学. 日本体力医学会; 1998;47(5):509-16.
18. Back FA, Fortes FS, Henrique E, Santos R. Non-photic synchronization : the effect of aerobic physical exercise. Rev Bras Med Esporte. 2007;13(2):120-4.
19. Mouret J, Coindet J, Debilly G, Chouvet G. Suprachiasmatic nuclei lesions in the rat: alterations in sleep circadian rhythms. Electroencephalogr Clin Neurophysiol. 1978;45(3):402-8.
20. Szafarczyk A, Ixart G, Alonso G, Malaval F, Nougier-Soule J, Assenmacher I. Neural control of circadian rhythms in plasma ACTH, plasma corticosterone and motor activity. J Physiol (Paris). 1981;77(8):969-76.
21. Morris CJ, Yang JN, Scheer F a JL. Chapter 19—The impact of the circadian timing system on cardiovascular and metabolic function. Prog Brain Res. 2012;199:337-58.
22. 永井克也. これからの肥満研究の課題-運動とリズム-. 肥満研究. 2000;6(1):3.
23. Kamei Y, Ohizumi H, Fujitani Y, Nemoto T, Tanaka T, Takahashi N, et al. PPARgamma coactivator 1beta/ERR ligand 1 is an ERR protein ligand, whose expression induces a high-energy expenditure and antagonizes obesity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(21):12378-83.

24. 齊藤昌之. 第2章 肥満のメカニズム 4. エネルギー代謝調節機構—UCPを中心に. 肥満の科学 第124回日本医学会シンポジウム. 2003.
25. Yang X, Downes M, Yu RT, Bookout AL, He W, Straume M, et al. Nuclear receptor expression links the circadian clock to metabolism. *Cell*. 2006;126(4):801–10.
26. Reznick J, Preston E, Wilks DL, Beale SM, Turner N, Cooney GJ. Altered feeding differentially regulates circadian rhythms and energy metabolism in liver and muscle of rats. *Biochim Biophys Acta*. Elsevier B.V.; 2013;1832(1):228–38.
27. 柴田重信, 青木菜摘. 時間栄養学. *G I Res*. 2012;20(5):29–32.
28. 柴田重信, 佐々木裕之, 池田祐子. 特集 概日リズムと疾患: 病態・診断・治療の最新知見 第3章. 特論 時間栄養学と時間運動学. *日本臨床*. 2013;71(12):2194–9.
29. 棒葉繁紀. 特集: 生体リズムから心血管病を探る 体内時計と肥満の関連性をみる. *Vasc Med*. 2009;5(4):290–4.
30. 柴田重信. 体内時計と栄養・食事の相互作用. *肥満研究*. 2012;18(1):8–14.
31. Sookoian S, Gemma C, Gianotti TF, Burgueño A, Castaño G, Pirola CJ. Genetic variants of Clock transcription factor are associated with individual susceptibility to obesity. *Am J Clin Nutr*. 2008;87(6):1606–15.
32. Scott EM, Carter AM, Grant PJ. Association between polymorphisms in the Clock gene, obesity and the metabolic syndrome in man. *Int J Obes*. 2008;32(4):658–62.

33. Shimba S, Ishii N, Ohta Y, Ohno T, Watabe Y, Hayashi M, et al. Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), a component of the molecular clock, regulates adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(34):12071–6.
34. Marcheva B, Ramsey KM, Buhr ED, Kobayashi Y, Su H, Ko CH, et al. Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature*. 2010 Jul 29;466(7306):627–31.
35. 棒葉繁紀. 体内時計と生活習慣病-時計遺伝子による代謝制御. *医学のあゆみ*. 2011;237(6):709–13.
36. Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, et al. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science*. 2005;308(5724):1043–5.
37. Ando H, Yanagihara H, Hayashi Y, Obi Y, Tsuruoka S, Takamura T, et al. Rhythmic messenger ribonucleic acid expression of clock genes and adipocytokines in mouse visceral adipose tissue. *Endocrinology*. 2005;146(12):5631–6.
38. Woon PY, Kaisaki PJ, Bragança J, Bihoreau M-T, Levy JC, Farrall M, et al. Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (BMAL1) is associated with susceptibility to hypertension and type 2 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(36):14412–7.
39. Michael R. Deschenes. Chronobiological Effects on Exercise—Current Comment—. *Am Coll Sport Med*. 2013;
40. Tanaka T, Yamamoto J, Iwasaki S, Asaba H, Hamura H, Ikeda Y, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty

- acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(26):15924-9.
41. 坂本静男, 平野清孝, 村永信吾, 鳥羽泰光. 最大脂質燃焼量を参考に  
にした運動処方の有効性の検討. 臨床スポーツ医学. 1995;12(7):47-50.
42. 北村真吾, 肥田昌子, 三島和夫. クロノタイプによる睡眠覚醒パタ  
ーン、気分調節の特徴. 時間生物学. 2012;18(2):68-75.
43. Duffy JF, Czeisler CA. Age-related change in the relationship between  
circadian period, circadian phase, and diurnal preference in humans.  
Neurosci Lett. 2002;318(3):117-20.
44. Duffy JF, Rimmer DW, Czeisler CA. Association of intrinsic circadian  
period with morningness-eveningness, usual wake time, and circadian phase.  
Behav Neurosci. 2001;115(4):895-9.
45. Brown SA, Kunz D, Dumas A, Westermarck PO, Vanselow K,  
Tilmann-Wahnschaffe A, et al. Molecular insights into human daily behavior.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(5):1602-7.
46. Bailey SL, Heitkemper MM. Circadian rhythmicity of cortisol and body  
temperature: morningness-eveningness effects. Chronobiol Int.  
2001;18(2):249-61.
47. Liu X, Uchiyama M, Shibui K, Kim K, Kudo Y, Tagaya H, et al. Diurnal  
preference, sleep habits, circadian sleep propensity and melatonin rhythm in  
healthy human subjects. Neurosci Lett. 2000;280(3):199-202.
48. Taillard J, Philip P, Claustrat B, Capelli A, Coste O, Chaumet G, et al.  
Time course of neurobehavioral alertness during extended wakefulness in

- morning- and evening-type healthy sleepers. *Chronobiol Int.* 2011;28(6):520-7.
49. Mongrain V, Lavoie S, Selmaoui B, Paquet J, Dumont M. Phase relationships between sleep-wake cycle and underlying circadian rhythms in Morningness-Eveningness. *J Biol Rhythms.* 2004;19(3):248-57.
50. Duffy JF, Dijk DJ, Hall EF, Czeisler CA. Relationship of endogenous circadian melatonin and temperature rhythms to self-reported preference for morning or evening activity in young and older people. *J Investig Med.* 1999;47(3):141-50.
51. Kerkhof GA, Van Dongen HP. Morning-type and evening-type individuals differ in the phase position of their endogenous circadian oscillator. *Neurosci Lett.* 1996;218(3):153-6.
52. Taillard J, Philip P, Coste O, Sagaspe P, Bioulac B. The circadian and homeostatic modulation of sleep pressure during wakefulness differs between morning and evening chronotypes. *J Sleep Res.* 2003;12(4):275-82.
53. Baehr EK, Revelle W, Eastman CI. Individual differences in the phase and amplitude of the human circadian temperature rhythm: with an emphasis on morningness-eveningness. *J Sleep Res.* 2000;9(2):117-27.
54. Reilly T, Brooks GA. Selective persistence of circadian rhythms in physiological responses to exercise. *Chronobiol Int.* 1990;7(1):59-67.
55. Reilly T, Brooks GA. Investigation of circadian rhythms in metabolic responses to exercise. *Ergonomics.* 1982;25(11):1093-107.



56. Faria IE, Drummond BJ. Circadian changes in resting heart rate and body temperature, maximal oxygen consumption and perceived exertion. *Ergonomics*. 1982;25(5):381-6.
57. Deschenes MR, Sharma J V, Brittingham KT, Casa DJ, Armstrong LE, Maresh CM. Chronobiological effects on exercise performance and selected physiological responses. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1998;77(3):249-56.
58. Hill DW, Cureton KJ, Collins MA, Grisham SC. Diurnal variations in responses to exercise of “morning types” and “evening types”. *J Sports Med Phys Fitness*. 1988;28(3):213-9.
59. Hill DW, Borden DO, Darnaby KM, Hendricks DN, Hill CM. Effect of time of day on aerobic and anaerobic responses to high-intensity exercise. *Can J Sport Sci*. 1992;17(4):316-9.
60. Yamaji K, Sakamoto H, Nakaguchi M, Kitamura K, Shephard RJ. Biological rhythms of PWC170 and maximal oxygen intake. *J Hum Ergol (Tokyo)*. 1981;10(2):213-9.
61. Winget CM, Derosha C, Holley DC. Circadian rhythms and athletic performance. *Med Sci Sports Exerc*. 1985;17(5):498-516.
62. Baxter C, Reilly T, Polytechnic L, Street B, Liverpool L. Influence of time of day on all-out swimming. *Brit J Sport Med*. 1983;17(2):122-7.
63. Mohebbi H, Azizi M. Maximal fat oxidation at the different exercise intensity in obese and normal weight men in the morning and evening. *J Hum Sport Exerc*. 2011;6(1):49-58.

64. Saris WHM, Blair SN, Van Baak M a., Eaton SB, Davies PSW, Di Pietro L, et al. How much physical activity is enough to prevent unhealthy weight gain? Outcome of the IASO 1st stock conference and consensus statement. *Obes Rev.* 2003;4:101-14.
65. 後藤健二, 藤井久雄. 運動実施時間帯の違いが運動中および運動後のエネルギー代謝に及ぼす影響. 仙台大学大学院スポーツ科学研究科論文集. 2009;10:103-11.
66. Mohebbi, Azizi M, Tabari E. Effect of time of day on MFO and FATMAX during exercise in obese and normal weight women. *Sci Sport.* 2011;9(1):69-79.
67. 豊岡示朗, 吉川潔, 足立哲司. 朝と夕方のジョギングにおける血中基質の動態と代謝特性. *体力科学.* 1995;44:419-30.
68. Galliven E a, Singh a, Michelson D, Bina S, Gold PW, Deuster P a. Hormonal and metabolic responses to exercise across time of day and menstrual cycle phase. *J Appl Physiol.* 1997;83(6):1822-31.
69. Kanaley J a, Weltman JY, Pieper KS, Weltman a, Hartman ML. Cortisol and growth hormone responses to exercise at different times of day. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(6):2881-9.
70. Knapik JJ, Meredith CN, Jones BH, Suek L, Young VR, Evans WJ. Influence of fasting on carbohydrate and fat metabolism during rest and exercise in men. *J Appl Physiol.* 1988;64(5):1923-9.
71. Achten J, Jeukendrup AE. Optimizing fat oxidation through exercise and diet. *Nutrition.* 2004;20:716-27.

72. 勝川史憲. 介入試験ほかのエビデンスからみた有効な減量法とは? .  
日本臨床スポーツ医学会. 2004;12(2):186-98.
73. Deboer T, Tobler I. Running wheel size influences circadian rhythm  
period and its phase shift in mice. *J Comp Physiol A*. 2000  
Oct;186(10):969-73.
74. Schroeder AM, Truong D, Loh DH, Jordan MC, Roos KP, Colwell CS.  
Voluntary scheduled exercise alters diurnal rhythms of behaviour, physiology  
and gene expression in wild-type and vasoactive intestinal peptide-deficient  
mice. *J Physiol*. 2012;590:6213-26.
75. Oishi K, Shirai H, Ishida N. CLOCK is involved in the circadian  
transactivation of peroxisome-proliferator-activated receptor alpha  
(PPARalpha) in mice. *Biochem J*. 2005;386:575-81.
76. Zakrzewski JK, Tolfrey K. Acute effect of fatmax exercise on the  
metabolism in overweight and nonoverweight girls. *Med Sci Sports Exerc*.  
2012;44(34):1698-705.
77. Tamm AS, Lagerquist O, Ley AL, Collins DF. Chronotype influences  
diurnal variations in the excitability of the human motor cortex and the  
ability to generate torque during a maximum voluntary contraction. *J Biol  
Rhythms*. 2009;24(3):211-24.
78. Brown FM, Neft EE, LaJambe CM. Collegiate rowing crew performance  
varies by morningness-eveningness. *J Strength Cond Res*.  
2008;22(6):1894-900.

79. Burgoon W, Holland P, J. G, Loy SF, Vincent WJ. A comparison of morning and evening “types” during maximum exercise. *J Strength Cond Res.* 1992;6(2):115–9.
80. Drust B, Waterhouse J, Atkinson G, Edwards B, Reilly T. Circadian rhythms in sports performance--an update. *Chronobiol Int.* 2005;22(1):21–44.
81. Kline CE, Durstine JL, Davis JM, Moore T a, Devlin TM, Zielinski MR, et al. Circadian variation in swim performance. *J Appl Physiol.* 2007;102:641–9.
82. Reilly T, DipPE, MIBiol., Claire BAXTER. Influence of time of day on reactions to cycling at a fixed high intensity. *Brit J Sport Med.* 1983;17(2):128–30.
83. Kitamura S, Hida A, Aritake S, Higuchi S, Enomoto M, Kato M, et al. Validity of the Japanese version of the munich chronotype questionnaire. *Chronobiol Int.* 2014;31(7):1–6.
84. Bøje O. Arbeitshypoglykämie nach Glukoseeingabe. *Skand Arch Physiol.* 1940;83:308–12.
85. Horowitz JF, Mora-Rodriguez R, Byerley LO, Coyle EF. Lipolytic suppression following carbohydrate ingestion limits fat oxidation during exercise. *Am J Physiol.* 1997;273:E768–75.
86. Montain SJ, Hopper MK, Coggan a R, Coyle EF. Exercise metabolism at different time intervals after a meal. *J Appl Physiol.* 1991;70:882–8.
87. Bruce RA, Blackmon JR, Jones JW, Strait G. Exercising testing in adult normal subjects and cardiac patients. *Pediatrics.* 1963;32(4):742–56.

88. Beaver WL, Wasserman K, Whipp BJ. A new method for detecting anaerobic threshold by gas exchange A new method for detecting threshold by gas exchange anaerobic. *J Appl Physiol*. 2012;60:2020–7.
89. Konishi M, Takagi S, Midorikawa T, Suzuki K, Sakamoto S. Effects of 20–min or 2-h nap after acute sleep deprivation on exercise tolerance and endocrine function. *Japanese Soc Clin Physiol*. 2009;39(2):113–9.
90. Midgley AW, McNaughton LR, Polman R, Marchant D. Criteria for determination of maximal oxygen uptake. *Sport Med*. 2007;37(12):1019–28.
91. Achten J, Jeukendrup AE. Maximal fat oxidation during exercise in trained men. *Int J Sports Med*. 2003;24(8):603–8.
92. Horne JA, Ostberg O. A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. *Int J Chronobiol*. 1976;4(2):97–110.
93. Hill DW. Morning – evening differences in response to exhaustive severe-intensity exercise. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2014;39:248–54.
94. Hill DW, Cureton KJ, Collins M a, Grisham SC. Diurnal variations in responses to exercise of “morning types” and “evening types”. *J Sport Med Phys Fit*. 1988;28(3):213–9.
95. Hill DW. Effect of time of day on aerobic power in exhaustive high-intensity exercise. *J Sports Med Phys Fitness*. 1996 Sep;36(3):155–60.
96. Baehr EK, Revelle W, Eastman CI. Individual differences in the phase and amplitude of the human circadian temperature rhythm: With an emphasis on morningness-eveningness. *J Sleep Res*. 2000;9(2):117–27.

97. Darvakh H, Nikbakht M, Shakerian S, Mousavian AS. Effect of circadian rhythm on peak of maximal fat oxidation on non-athletic men. *Zahedan J Res Med Sci.* 2014;16:8–11.
98. Weinert D, Waterhouse J. The circadian rhythm of core temperature: Effects of physical activity and aging. *Physiol Behav.* 2007;90:246–56.
99. Chwalibog A, Thorbek G. Energy expenditure and oxidation of carbohydrate and fat in humans during day and night. 2002;394:247–52.
100. Cauter, E V. Endocrine rhythms. Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism. KL B, editor. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1995. 41-50 p.
101. Stenvers DJ, Jonkers CF, Fliers E, Bisschop PHLT, Kalsbeek A. Chapter 20—Nutrition and the circadian timing system. *Prog Brain Res.* 2012;199:359–76.
102. Tabira K, Harada T, Yamamoto J, Okada A, Maemura Y, Yamamoto M. Characteristics of incremental and high intensity constant load exercise tests on exercise physiology from the view point of oxygen uptake. *J Japan Soc Respir Care Rehabil.* 2014;24(2):252–7.
103. JB W. New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. *Nutrition.* 1949;6:213–21.
104. Takagi S, Sakamoto S, Midorikawa T, Konishi M, Katsumura T. Determination of the exercise intensity that elicits maximal fat oxidation in short-time testing. *J Sports Sci.* 2014;32(2):175–82.

105. Izawa S, Saito K, Shiotsuki K, Sugaya N, Nomura S. Effects of prolonged stress on salivary cortisol and dehydroepiandrosterone: A study of a two-week teaching practice. *Psychoneuroendocrinology*. 2012;37:852–8.
106. Jakicic JM, Donnelly JE, Pronk NP, Jawad AF, Jacobsen DJ. Prescription of exercise intensity for the obese patient: the relationship between heart rate,  $VO_2$  and perceived exertion. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1995;19(6):382–7.
107. Habibi E, Dehghan H, Moghiseh M, Hasanzadeh A. Study of the relationship between the aerobic capacity (  $VO_2$  max ) and the rating of perceived exertion based on the measurement of heart beat in the metal industries Esfahan. *J Edu Heal Promot*. 2014;3:25–30.
108. American College of Sports Medicine Position Stand. The recommended quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory and muscular fitness, and flexibility in healthy adults. *Med Sci Sports Exerc*. 1998 Jun;30(6):975–91.
109. Ando K, Konishi M, Shibata S, Shizuo S. Effects of Wheel-running in Morning and Evening on Body Weight in Mice. *Japan Soc Clin Physiol*. 2014;44(3):149–55.
110. Sasaki H, Ohtsu T, Ikeda Y, Tsubosaka M, Shibata S. Combination of meal and exercise timing with a high-fat diet influences energy expenditure and obesity in mice. *Chronobiol Int*. 2014;31(9):959–75.

111. Iwayama K, Kawabuchi R, Park I, Kurihara R, Kobayashi M, Hibi M, et al. Transient energy deficit induced by exercise increases 24-h fat oxidation in young trained men. *J Appl Physiol*. 2015;118:80–5.
112. Gholamhasan J, Sajad A, Mehdi RG, Javad MS. The Effect of Exercise in the Morning and the Evening Times on Aerobic and Anaerobic Power of the Inactive Subjects Faculty Member of Behbahan Khatemolambia Technology University , Iran Young Researchers club , Islamic Azad University Aliabad Katoul Branc. 2013;22(8):1146–50.