

# 炭素磁気共鳴分光法による肝臓の グリコーゲン評価方法の確立及び日内変動の検討

国立スポーツ 岩山海渡  
科学センター  
(共同研究者) 同 高橋英幸

## Diurnal Variation in the Glycogen Content of Human Liver Using $^{13}\text{C}$ -MRS

by

Kaito Iwayama, Hideyuki Takahashi  
*Japan Institute of Sport Sciences*

### ABSTRACT

Carbohydrate is stored as glycogen in the liver and muscle, and it is an important energy source for endurance exercise. The roles of liver and muscle glycogen were different: the former contributes to maintain whole body blood glucose while the latter provides energy to contract muscle fiber. Our previous study demonstrated that the diurnal variation of the glycogen content in human thigh muscle was relatively small. On the other hand, there were few studies that addressed the diurnal variation of the liver glycogen. Since the liver glycogen continues to supply glucose even while sleeping, there is the possibility that the liver glycogen shows larger diurnal variation than the muscle. The purpose of this study was to investigate and compare the diurnal variation in the glycogen content of the liver and muscle using carbon magnetic resonance spectroscopy ( $^{13}\text{C}$ -MRS). Five healthy male were recruited to the present study after providing written informed consent. They were instructed to maintain sedentary and to refrain from performing exercise during experiment. Three meals prior to first measurement and two meals during study were individually standardized according to the estimated energy requirement for Japanese. The liver and calf muscle

(gastrocnemius + soleus muscles) glycogen content were determined noninvasively by  $^{13}\text{C}$ -MRS using a clinical MR system at 3-T.  $^{13}\text{C}$ -MRS was performed after supper on the first day, and every 3 hours from 0700 h to 1900 h on the second day. The changes in the muscle glycogen concentration were small through an experimental period. The larger diurnal variation of the liver glycogen content was shown: the lowest value was observed early in the morning (at 0700 h). The reason for it is thought to be that the turnover rate of glycogen metabolism in the liver is faster than that in the muscle, and that a relatively long time has passed from the last meal (supper) to the next morning. The present study reveals the different diurnal variation in the glycogen content between the liver and muscle in human using  $^{13}\text{C}$ -MRS.

## 要 旨

本研究は肝臓のグリコーゲン濃度を評価する方法を確立し、座位中心の通常生活下における肝臓グリコーゲンが1日の中でどのように変動するか検討することを目的とした。測定方法を検討するため直径10cmおよび15cmの表面コイルを用い、繰り返し時間、積算回数、フリップ角の条件を変えた測定を繰り返し、肝臓のグリコーゲンのスペクトルを得る最適と思われる条件を検討した。その結果、直径10cmのコイルを用い、繰り返し時間160ms、積算回数6000回の条件に決定し、1回のスペクトルを得るために要する時間は約16分となった。この条件にて、健常な成人男性5名を対象に、食事を統制した通常生活における肝臓のグリコーゲン濃度を3時間毎に測定した。骨格筋とは異なり肝臓のグリコーゲンは起床後朝食前がもっとも低く、夜に向けて徐々に高くなっていくことが明らかとなった。

## 緒 言

糖質のエネルギー源であるグリコーゲンは主に骨格筋や肝臓に貯蔵されており、持久性運動能力に関連していることが知られている。競技現場では一時的に体内のグリコーゲン量を高める食事方

法（グリコーゲンローディング）が実践されていることから、グリコーゲンの増減を把握することは重要な情報となる。骨格筋のグリコーゲンを評価する方法には、筋組織を直接採取する筋生検法がある。しかし筋生検法は侵襲的で強い痛みを伴うことから、短い時間間隔での測定は生体への負担が大きく容易ではない。また、肝臓の組織を採取することは骨格筋以上に困難であり、肝臓のグリコーゲンに関するヒトの知見は限定的である。

そこで新たなグリコーゲンの評価方法として炭素の磁気共鳴分光装置（ $^{13}\text{C}$ -MRS）を用いる方法が考案された。この方法の最大の利点は非侵襲的であり被験者の負担が少ないことである。そのため骨格筋のみならず肝臓のグリコーゲンを評価することが可能であり、短期間に繰り返し測定することも可能である。我々はこれまでに $^{13}\text{C}$ -MRSを用いた骨格筋のグリコーゲンの評価方法を確立し、座位中心の生活における外側広筋のグリコーゲン濃度は1日を通してほとんど変化がないことを明らかにした<sup>1)</sup>。しかし、肝臓のグリコーゲンを評価する方法は検討されていない。そこで本研究は $^{13}\text{C}$ -MRSを用いた肝臓のグリコーゲン濃度を評価する方法を確立し、座位中心の生活における肝臓グリコーゲンの変化を検討すること目的と

して実施した。

## 1. 方法

本研究は国立スポーツ科学センターの研究倫理審査委員会の審議を経て、承認を得た後に実施した。

### 1. 1 肝臓グリコーゲン濃度の測定条件に関する検討

グリコーゲンのスペクトルを得るために直径10cm および15cm の<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C コイルを用意し、健康男性またはグリコーゲンの基準溶液（100～200mmol/L）から得るスペクトルが認識できる形で100.5ppmに確認できる条件を検討した。繰り返し時間を150ms～300ms、積算回数を4500～6000回の範囲で変更しながら検討した。基準溶液との比較を繰り返して検討した結果、直径10cmのコイルを用い、繰り返し時間160ms、積算回数6000回の設定にて肝臓のグリコーゲン濃度測定を行うこととし、1回のスペクトルを得るために要する時間は約16分（160ms×6000回）となった。

### 1. 2 肝臓グリコーゲン濃度の日内変動に関する検討

#### 1. 2. 1 被験者

健康で喫煙習慣のない若年男性5名（年齢23.2±1.4歳、身長171.7±2.3cm、体重64.0±4.5kg、体脂肪率14.4±2.2%、BMI 21.8±1.2）を対象に、座位中心の生活における肝臓グリコーゲン濃度の変動を検討した。すべての被験者は日常的に医薬品を服用していないことを確認し、研究の目的および方法、起こりうる危険性について十分に説明し、同意書への署名を得た上で実験に参加した。

#### 1. 2. 2 実験スケジュール

各被験者は2日間の測定に参加し、その間は腰に活動量計（アクチグラフリンクGT9X、

Actigraph, 米国）を装着して生活した。1日目は自宅にて起床し、事前に配布した規定の食事を、朝食は7:30～9:30、昼食は12:30～14:30に摂取した。被験者には特別な運動をしないよう指示した。17:00に国立スポーツ科学センターに到着し、身長および体組成の測定を行った後、18:30に夕食を摂取した。20:00にグリコーゲン濃度の測定を行い、23:00に国立スポーツ科学センター内の宿泊施設にて就寝とした。2日目は6:00に起床し、朝食を8:30、昼食を13:30に摂取した。グリコーゲン濃度の測定は7:00、10:00、13:00、16:00、19:00に測定を行い、それ以外の時間は座位での作業のみ可とした。グリコーゲン濃度は骨格筋（下腿）と肝臓の2部位の測定を行い、測定の順序はランダムとした。

#### 1. 2. 3 食事条件

被験者には1日目の朝食から2日目の昼食までの計5食を規定し、提供した。食事のエネルギー量は日本人の食事摂取基準（2015年版）に定められている基礎代謝基準値を用い、身体活動指数（PAL）を1日目1.5、2日目1.3として算出した。食事の摂取エネルギーに対するたんぱく質:脂質:炭水化物の比（PFC比）は日本人の一般的な食事とされる15:25:60に設定した<sup>2)</sup>。

#### 1. 2. 4 グリコーゲン濃度測定

骨格筋のグリコーゲン濃度測定には3テスラのMRI装置（Magnetom Verio, シーメンス, ドイツ）を用い、右下腿（腓腹筋およびヒラメ筋）よりグリコーゲン濃度を測定した。被験者はMRI装置内で仰臥位になり、直径10cmのコイルを右下腿中央部に装着し、グリコーゲンのスペクトルを収集した。<sup>13</sup>C-MRSの条件は、繰り返し時間200ms、積算回数4500回、1回の測定時間は約15分であった。収集したスペクトルデータは120mmol/Lの基準溶液のスペクトルと比較し、筋グリコーゲン濃度を算出した。基準溶液の容器の大きさは初回の測定時に下腿の周径を測定し、

被験者毎に決定した。

肝臓のグリコーゲン濃度測定には3テスラのMRI装置(Magnetom Skyra, シーメンス, ドイツ)を用い, 右側腹部(肝臓直上)よりグリコーゲン濃度を測定した。被験者はMRI装置内で仰臥位になり, 直径10cmのコイルを右側腹部に装着し, グリコーゲンのスペクトルを収集した。<sup>13</sup>C-MRSの条件は, 繰り返し時間160ms, 積算回数6000回, 1回の測定時間は約16分であった。収集したスペクトルデータは200mmol/Lの基準溶液のスペクトルと比較し, 肝臓のグリコーゲン濃度を算出した。基準溶液は, 内径12.4cm, 高さ20cmの円柱状容器で統一した。

### 1. 2. 5 統計処理

結果はすべて平均値 ± 標準誤差で示した。統計解析はSPSS (IBM SPSS Statics 22)を用いた。骨格筋および肝臓のグリコーゲン濃度は一元配置分散分析を行い, 有意な差が認められた場合はBonferroniの方法を用いて多重比較検定を行った。いずれも有意水準は5%未満とした。

## 2. 結果

### 2. 1 規定食

被験者が摂取した規定食のエネルギーは, 1日目 2327 ± 80kcal, 2日目 1321 ± 43kcal (朝食: 637 ± 19, 昼食: 682 ± 28kcal)であった。1日目の食事のPFC比は, たんぱく質 13.4 ± 0.2%, 脂質 25.5 ± 0.2%, 炭水化物 61.1 ± 0.2%であった。2日目の食事のPFC比は, たんぱく質 13.4 ± 0.2%, 脂質 25.6 ± 0.1%, 炭水化物 61.0 ± 0.1% (朝食: たんぱく質 14.2 ± 0.4%, 脂質 25.1 ± 0.4%, 炭水化物 60.7 ± 0.4%。昼食: たんぱく質 12.7 ± 0.1%, 脂質 26.1 ± 0.3%, 炭水化物 61.2 ± 0.4%)であった。

### 2. 2 骨格筋のグリコーゲン濃度

下腿の骨格筋グリコーゲン濃度はいずれの時点でも有意な差は認められず, 1日を通して変動し

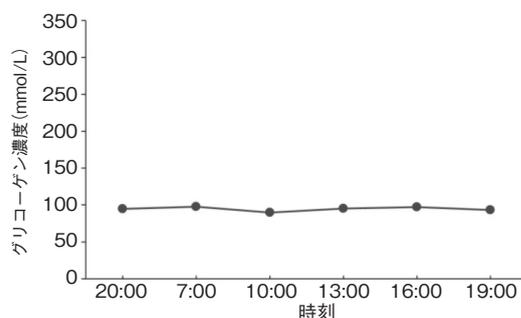


図1 下腿のグリコーゲン濃度の変動

なかった(図1)。

### 2. 3 肝臓のグリコーゲン濃度

肝臓のグリコーゲン濃度はいずれの時点でも有意な差は認められなかった。しかし骨格筋グリコーゲンと比べて変動の幅が大きかった(骨格筋: 9%, 肝臓: 30%, 図2)。

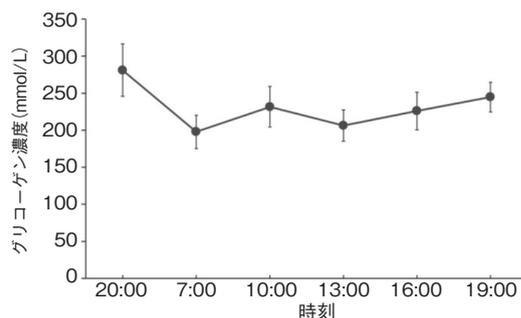


図2 肝臓のグリコーゲン濃度の変動

### 2. 4 活動量

腰に装着した活動量計による活動量は, 1日目(0:00 ~ 24:00)が 296 ± 62counts/分, 2日目(0:00 ~ 18:30)が 192 ± 45counts/分であった。歩数は1日目(0:00 ~ 24:00)が 7674 ± 1097歩, 2日目(0:00 ~ 18:30)が 1651 ± 151歩であった。

## 3. 考察

本研究は肝臓のグリコーゲン濃度を評価する方法を確立し, 1日の肝臓グリコーゲン濃度の変動

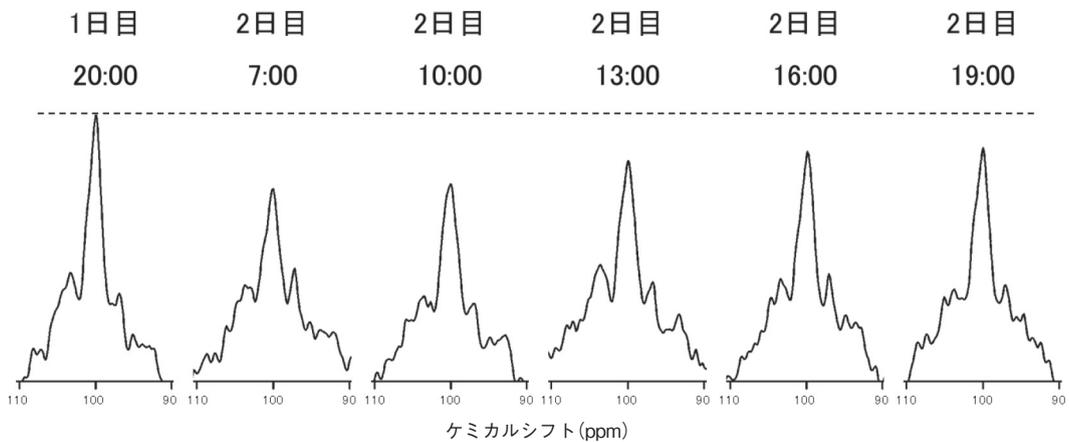


図3 肝臓のグリコーゲンスペクトルの比較(典型例)

を検討することが目的であった。

既知のグリコーゲン基準溶液を利用し、肝臓グリコーゲンのスペクトルを得るのに適したコイルの大きさ、繰り返し時間、積算回数を検討した。10cmのコイルを使用し、繰り返し時間：160ms、積算回数：6000回の条件にてグリコーゲン濃度に応じたスペクトルを得ることが出来た。決定した方法を用いて、座位中心の生活における肝臓グリコーゲンの変動を検討した。<sup>13</sup>C-MRSを用いたグリコーゲン濃度測定に関する総説<sup>3)</sup>によると、健康な成人男性の肝臓グリコーゲン濃度は、一晩絶食(Fasted)の条件では146～301mmol/L、食事摂取(Postprandial)の条件では173～375mmol/Lであると報告されている。本研究の肝臓グリコーゲンは一晩絶食条件(7:00:198±23mmol/L)、食事摂取条件(20:00:281±35mmol/L)ともに先行研究と同程度であった(図3)。以上のことから肝臓グリコーゲン濃度を評価する方法として利用可能な水準であると考えられる。

肝臓のグリコーゲンは主に血糖値を一定に維持するために利用されており、48時間の絶食によってほとんど枯渇する<sup>4)</sup>。一方で骨格筋のグリコーゲンは運動時に利用される。夜間の睡眠時であっても肝臓のグリコーゲンは血糖値を維持するために時々刻々と利用されていることがわかる。本研

究では2日目7:00の肝臓グリコーゲン濃度がもっとも低値を示した。これは1日目の夕食から約12時間、何も摂取しない時間が続いたためと考えられる。一方で骨格筋のグリコーゲンは1日を通してほとんど変化しなかった。これは先行研究とも一致する<sup>1)</sup>。座位中心の生活であったため骨格筋の活動が最小限であったためと考えられる。

一晩絶食状態で行う運動は食事をした後に行う運動と比べて、無酸素性運動能力の低下<sup>5)</sup>、運動時の脂質代謝亢進<sup>6)</sup>、24時間の脂質酸化量の増大<sup>7)</sup>、持久性運動トレーニングによって獲得する適応の違い<sup>8)</sup>などが報告されている。これらの違いが起こる背景にはグリコーゲン濃度の低下があると考えられているが、特に骨格筋ではなく肝臓のグリコーゲン濃度の低下による影響が大きいことが予想される。

グリコーゲンはAMPKなどエネルギー代謝に関わる因子を調節する働きがあると報告されており<sup>9)</sup>、単なるエネルギー源ではなく全身の代謝を調節する因子であると指摘されている。また、肝臓のグリコーゲン濃度減少が全身のエネルギー代謝を糖質から脂質に切り替えるきっかけになることが示唆されている<sup>10)</sup>。さらに持久性運動能力は骨格筋よりも肝臓のグリコーゲン濃度と関連が強いことが示唆されている<sup>11)</sup>。このようなこと

から、非侵襲的にグリコーゲンを評価すること、特に肝臓のグリコーゲンを評価することによって様々な現象との関連や生理的な役割を解明するのに役立つと考えられる。

#### 4. 結 論

肝臓のグリコーゲン濃度を約 16 分の時間分解能で評価可能となった。この方法によって、座位中心の生活におけるグリコーゲンの変動について検討したところ、下腿の骨格筋グリコーゲン濃度に比べて肝臓のグリコーゲン濃度は 1 日の中での変動が大きいことが示唆された。本研究の成果は今後の肝臓グリコーゲンに関する研究への応用が期待できる。

#### 謝 辞

本研究に対して助成を賜りました公益財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に心から感謝申し上げます。また、本研究にご協力頂いた皆さまに深く感謝申し上げます。

#### 文 献

- 1) Takahashi H., Kamei A., Osawa T et al.: <sup>13</sup>C MRS reveals a small diurnal variation in the glycogen content of human thigh muscle, *NMR Biomed.*, **28**: 650-655 (2015)
- 2) Tada N., Maruyama C., Koba S. et al.: Japanese dietary lifestyle and cardiovascular disease, *J. Atherosclerosis Thrombosis.*, **18**: 723-734 (2011)
- 3) Buehler T., Bally L., Dokumaci A.S. et al.: Methodological and physiological test-retest reliability of <sup>13</sup>C-MRS glycogen measurements in liver and in skeletal muscle of patients with type 1 diabetes and matched healthy controls, *NMR Biomed.*, **6**: 796-805 (2016)
- 4) Wahren J., Ekberg K., Splanchnic regulation of glucose production, *Annu. Rev. Nutr.*, **27**: 329-345 (2007)
- 5) Hulston C.J., Venables M.C., Mann C.H. et al.: Training with low muscle glycogen enhances fat metabolism in well-trained cyclists, *Med. Sci. Sports Exerc.*, **42**: 2046-2055 (2010)
- 6) Horowitz J.F., Rodriguez R.M., Byerley L.O. et al.: Lipolytic suppression following carbohydrate ingestion limits fat oxidation during exercise, *Am. J. Physiol.*, **273**: E768-E775 (1997)
- 7) Iwayama K., Kurihara R., Nabekura Y. et al.: Exercise increases 24-h fat oxidation only when it is performed before breakfast, *EBiomedicine.*, **2**: 2003-2009 (2015)
- 8) Proeyen K.V., Szlufcik K., Nielens H. et al.: Beneficial metabolic adaptations due to endurance exercise training in the fasted state, *J. Appl. Physiol.*, **110**: 236-245 (2011)
- 9) Philp A., Hargreaves M., Baar K.: More than a store: regulatory roles for glycogen in skeletal muscle adaptation to exercise, *Am. J. Physiol.*, **302**: E1343-E1351 (2012)
- 10) Izumida Y., Yahagi N., Takeuchi Y. et al.: Glycogen shortage during fasting triggers liver-brain-adipose neurocircuitry to facilitate fat utilization, *Nat. commun.*, **4**: 2316 (2013)
- 11) Casey A., Mann R., Banister K. et al.: Effect of carbohydrate ingestion on glycogen resynthesis in human liver and skeletal muscle, measured by <sup>13</sup>C MRS, *Am. J. Physiol.*, **278**: E65-E75 (2000)