

糖尿病犬における運動の有用性および

食事と運動の時間的關係性について

(Usefulness of exercise in diabetic dogs and  
temporal relationship between exercise and meals)

佐伯 香織

日本獣医生命科学大学大学院 獣医生命科学研究科

(指導教授：左向 敏紀)

平成 26 年 3 月

## 目次

第1章 序論	1
第2章 速度の異なる運動時における血中乳酸濃度、心拍数および歩数変動	
緒言	8
材料と方法	
供試動物	10
運動方法	11
血中乳酸濃度測定	11
心拍数測定	11
歩数測定	11
統計解析	12
結果	13
考察	14
小括	18
図および表	19
第3章 糖尿病犬に対する運動効果	
緒言	24
第1節 糖尿病犬に対する運動実施が血糖変動および血液生化学パラメーターに及ぼす影響	
材料と方法	
供試動物	25
実験プロトコル	25
フード	25
インスリン	26
サンプル採取	26
測定項目と測定方法	26
統計処理	28
結果	29
考察	31

## 第2節 運動実施前後におけるインスリンシグナリングおよび糖・脂質代謝 関連遺伝子の発現量の変化

緒言	37
材料と方法	
供試動物	39
サンプル採取	39
定量 PCR プライマー作製	40
クローニングおよびシークエンス	41
定量的リアルタイム PCR 解析	42
統計解析	43
結果	44
考察	45
小括	49
図および表	51

## 第4章 運動と食事の時間的關係性について

緒言	59
----	----

### 第1節 健常犬における糖給与試験下の運動が糖脂質代謝に及ぼす影響

材料と方法	
供試動物	61
試験プロトコル	61
運動方法	62
経口糖給与試験(OGTT)およびサンプル採取	62
測定項目および測定方法	63
血中乳酸濃度測定、心拍数測定および歩数測定	64
統計解析	64
結果	65
考察	67

### 第2節 健常犬における食後経過時間の異なる運動実施が運動時の 糖脂質代謝に与える影響

緒言	70
材料と方法	
試験プロトコル	71
フード	72
運動方法	72

測定項目および測定方法	72
血中乳酸濃度測定、心拍数測定および歩数測定	73
統計解析	73
結果	73
考察	76
第3節 糖尿病犬における食後の運動が血糖コントロールに及ぼす影響	
緒言	79
材料と方法	
供試動物	80
試験プロトコル	80
フード	81
インスリン	81
サンプル採取	81
測定項目と測定法、統計解析	82
結果	82
考察	84
小括	88
図と表	89
総括	102
謝辞	112
参考文献	113

# 第 1 章

## 序論

糖尿病(diabetes mellitus, DM)は、インスリン作用不足と慢性高血糖を主徴とする代謝性疾患であり、犬で最も多くみられる内分泌疾患の1つである【38】。犬の糖尿病は、そのほとんどがインスリン依存性糖尿病(1型糖尿病)であり、遺伝的素因や自己免疫性の原因により膵臓 $\beta$ 細胞が疲弊され、膵臓からのインスリン合成・分泌能が低下している状態といえる【17, 25, 48】。犬の糖尿病は根治が困難なため、インスリン不足による糖尿病性代謝異常を可能な限り正常に近づけるようにコントロールすることが治療の目的となる。その方法として、現在ではインスリン療法と食事療法が主に行われており、両治療を併用して行うことが基本治療として推奨されている【23, 28, 45】。

インスリンの生体内における作用は、細胞内へのグルコース取り込みやグリコーゲン合成などの糖代謝の他に、脂質代謝、蛋白質合成および細胞の分化・増殖など多彩である。インスリンの三大標的器官は筋肉、肝臓、脂肪組織であり、これらの細胞表面に存在するインスリン受容体にインスリンが結合することでチロシンキナーゼ活性を上昇させ、インスリン受容体基質(insulin receptor substrate , IRS)をチロシンリン酸化し、脂質リン酸化酵素であるphosphatidylinositol 3-kinase(PI3-K)と結合することでPI3-Kが活性化し、様々なリン酸化脂質が産生され、これらがセカンドメッセンジャーとなり種々の細胞内情報伝達分子が活性化される。また、筋肉や脂肪では、これらの活性化により、細胞内に存在する糖輸送体である glucose transporter 4(GLUT4)が細胞膜表面に移動し、グルコースが細胞内に取り込まれることで血糖値の低下をもたらす

ことがわかっている【8, 16】。

食事療法の目的は、食後高血糖を是正し、血糖値の変動をなるべく小さくすることで体内のインスリン必要量を節約することにある。食後の血糖値上昇に最も影響を与えている要因として炭水化物が挙げられる。また繊維は食物の吸収を緩やかにする作用を持ち、食後高血糖の是正に寄与する。そのため現在では低炭水化物かつ高繊維の食事が糖尿病療法食として一般的に使用されている。

ヒトの糖尿病患者ではこれらインスリン療法や食事療法に加え、治療の1つとして運動療法の有用性が示されている。運動療法の目的は、運動刺激により体内での糖代謝を活発にし、糖質の利用を増大させることでインスリンの節約を行うことである。元来、運動療法は肥満患者やインスリン非依存性糖尿病(2型糖尿病)患者に向けた治療法であるとされてきた。これは、1型糖尿病に対する運動療法の効果が両者に比べ顕著ではなく、特に直接的な血糖是正効果がほとんどないと考えられていたからである。しかし現在では、1型糖尿病患者においても運動を行うことで血糖コントロールやインスリン感受性の改善および糖・脂質・蛋白代謝改善など様々な効果が示され、合併症予防や余命延長に繋がるということが明らかとなっている【23, 28, 45】。また、重度の網膜症や腎症および神経障害などの進行した合併症がなく、空腹時血糖値が 250mg/dl 以下の良好な血糖コントロール下であればインスリン量や食事を調整することにより、いかなる運動も可能であるといわれており、健康な人と変わらない日常生活の質(QOL)の維持に寄与している【33】。

エネルギー供給に関しては、安静時の筋肉では脂肪組織より動員された遊離脂肪酸(free fatty acid , FFA)が主なエネルギー源であるのに対し、運動時のエネルギー源は①筋肉内グリコーゲン、②血中グルコース(ブドウ糖)、③肝臓での糖新生および④脂肪分解による FFA の供給と変化し、またこれらのエネルギー源は、運動の強度、種類、持続時間、回数、インスリン投与および栄養状態により決定されることが知られている【15, 27, 50, 63, 67】。

運動は、有酸素運動と無酸素運動の大きく二つに分類することができ、糖尿病予防や管理としての運動の場合は有酸素運動を行うことが推奨されている。これは有酸素運動では糖質と遊離脂肪酸がエネルギー源であるため、高血糖の是正や肥満解消などの効果が得られるからである【61, 71】。一方、無酸素運動は筋肉量の増加や筋力増強に有効的であり、インスリン感受性の改善や基礎代謝の増加をもたらすが、有酸素運動と比較して運動強度が高く、糖質のみをエネルギー源とすることから、解糖によって生じた乳酸の蓄積や肝臓での糖放出亢進により血糖値の上昇を引き起こす危険性がある【24】。また無酸素運動はコントロールが良好な糖尿病患者でさえもケトン体産生リスクの増大が報告されており【3, 41, 56】、糖尿病治療の運動強度としてはあまり適さないと考えられている。

ヒトでは有酸素運動を行う際の運動時間や運動頻度に関しては、筋肉において NFFA を効率良く利用させるため、1回の運動は10分以上が望ましく、また頻度は1週間に3-5回行うことが推奨されている。これは骨格筋における糖取



り込み速度や骨格筋内 GLUT4 含量が、一過性運動後 2 日以後低下するという報告に基づいている【34】。また、栄養状態は両運動効果を反映する最も重要な要因の一つである。ヒトの 2 型糖尿病患者では、運動実施は食後 1-3 時間程度に行うことが適切であると報告されている。これは、食物摂取により高くなった血中グルコースの筋肉内取り込みを亢進させることで食後の高血糖是正を目的としているほか、低血糖のリスクを最小限に抑えるためである。一方、インスリン治療を必須とする 1 型糖尿病患者においては、運動を実施する最適な時間帯においては様々な意見がある。例えば、インスリン療法中の 1 型糖尿病患者においては早朝空腹時に運動を行うことが最も低血糖が少ないとの報告もあるが【51】朝食後に行うことで食後の血糖コントロールが改善するとの報告もある【71】。このように運動による血糖の変化はそのときの血糖値やインスリン投与などに影響を受けるため、運動による血糖変化を把握し食物摂取やインスリン療法の調整および運動内容の変更を検討しなければならない。疾患に関わらず、食事内容や食事時間によっては運動中に低血糖や消化吸収遅延など、様々な弊害を引き起こすことも報告されており【56】、食事と運動の時間的關係性を把握することは重要と考えられる。しかし、このような研究報告はそのほとんどがヒトの糖尿病患者を対象としたものであり、犬の糖尿病患者での効果は十分解明されていない。

そこで本研究では、糖尿病犬に対する運動療法の適応を目的とし以下の構成で研究を進め糖尿病犬に対する運動実施の有用性と食事との関連性を検討した。

## 第2章 犬における運動指標の検討

健康犬における異なる運動速度時の血中乳酸濃度、心拍数および歩数変動

## 第3章 糖尿病犬に対する運動の効果

第1節 糖尿病犬に対する1ヶ月間の継続運動実施が血糖変動および

血液生化学パラメーターに及ぼす影響

第2節 糖尿病犬に対する運動実施が糖・脂質代謝関連遺伝子の発現量に

及ぼす影響

## 第4章 健康犬と糖尿病犬における運動と食事の時間的關係性について

第1節 経口的糖給与後の運動実施が健康犬の糖脂質代謝に及ぼす影響

第2節 健康犬に対する食後経過時間の異なる運動実施が運動時の

糖脂質代謝に与える影響

第3節 糖尿病犬に対する食後経過時間の異なる運動実施が運動時の

糖脂質代謝に与える影響

## 第 2 章

健常犬における異なる運動速度時の血中乳酸濃度、  
心拍数および歩数変動

## 緒言

序論にて述べた通り、糖尿病患者に対する運動は、糖質と脂肪の両者をエネルギー源とし、高血糖の是正や肥満予防、インスリン感受性の改善効果が得られる有酸素運動を行うことが推奨されている【61, 71】。

有酸素運動により得られるエネルギー代謝経路の亢進、体力の向上および肥満や糖尿病予防・改善などの様々な効果は、適切な運動強度や運動量の把握およびそれが日常的に維持されることで発揮される【53】。ヒトでは、その目安を知るために様々な指標を用い、個々に合った運動実施を行っている。ヒトで用いられている運動指標として代表的なものに、最大酸素摂取量(maximal oxygen intake :  $VO_2\text{max}$ )、心拍数、血中乳酸濃度および歩数が挙げられる。 $VO_2\text{max}$  は、高強度運動時に摂取する酸素量の最大値のことである。ヒトでは、トレッドミルや自転車エルゴメーターを使用し、負荷漸増法にてガス分析装置を用い求める方法が一般的である。 $VO_{2\text{max}}$  は個人の体力がそれぞれ異なっていることを考えた場合、運動の強度を示す指標として最も相応しいと考えられているが、大型の機械や測定器を必要とするため容易な測定や臨床応用が困難とされている【2】。そのためヒトでは、 $VO_2\text{max}$  との間に高い相関関係があると報告されている心拍数を指標として使用している【66】。 $VO_{2\text{max}}$  は肺による換気能力ではなく最大心拍出量によって規定されているという点からも、心拍数は  $VO_{2\text{max}}$  に代わる運動指標と言える。

運動時には解糖が促進され、血中乳酸濃度が上昇することが知られている

【49】。通常、安静時や低強度の運動時では産生された乳酸は、ミトコンドリアで酸化され、エネルギー源として利用されるため、増加することなく平常状態を保っている。しかし運動強度を上げていくと、①ある一定の強度から急に血中乳酸濃度の上昇が起こり、②さらに運動を続けることで筋収縮が困難となる。両者はそれぞれ①乳酸性作業閾値(Lactate Threshold: LT)と②血中乳酸蓄積開始点(onset of blood lactate accumulation: OBLA)と言われ、LTの血中濃度は2 mmol/L、OBLAの血中濃度は4 mmol/Lであると報告されている【75】【Fig.1】。ヒトでは、運動中の血中乳酸濃度により有酸素系や無酸素系などを判別でき、運動強度や個体ごとのトレーニング度を示す指標となっている。糖尿病患者では、健常人と比較して運動時の血中乳酸濃度上昇は大きく、血糖コントロールや合併症の有無により血中乳酸濃度に差異が認められることが知られている。そのため、運動実施中の乳酸濃度の変動は乳酸アシドーシスをはじめ乳酸代謝異常の判別に繋がることから、臨床的にも測定意義があると言われている【38】。犬においても、安静時の血中乳酸濃度は健常犬と比較して糖尿病犬では高値を示すことが分っており、糖尿病犬への運動実施が血中乳酸濃度の大幅な上昇を招き得る可能性を示している。

ヒトにおいて歩数は運動量を把握する際の指標として用いられ、比較的安価で測定可能であることや通常の身体活動そのものを拘束しない非侵襲的かつ客観的な測定法として利用価値が期待されている。ヒトの糖尿病患者では、1日の歩数とインスリン感受性には正の相関関係があることが報告されており、健

康を維持するための望ましい運動量の具体的な目安（8,000-10,000 歩/日）が設定されている。犬においても、測定原理として 3D 加速度センサーと犬の前脚の動きを検知し前脚の動く速さや脚の長さ(体高)をベースに歩数測定する動作推定技術を適用した犬専用の歩数計(犬専用活動測定デバイス わんダント(製造販売元 富士通(株) (FUJITSU LIMITED)、東京、日本：以下わんダント))が発売された。わんダントは、犬の首輪に装着するだけで測定可能であり、装着時の歩数や震えおよび温度変化が 10 分毎に記録されることから、より詳細な測定が可能とされている。

そこで本章では、速度の異なる運動時における心拍数、血中乳酸濃度および歩数を測定し、犬における運動指標としての有用性やその変動を検討した。

## 材料と方法

### 供試動物

日本獣医生命科学大学 獣医学部 獣医保健看護学科 看護臨床部門で飼育されている健常ビーグル犬 5 頭(去勢雄、1-5 歳、体重 10.9-12.7 kg)を供試した【Table. 2】。

### 運動方法

運動機器には犬用トレッドミル(PR730, PETRUN)を用いた。予め、全ての供

試験動物はトレッドミルを用いたトレーニングを行い、問題なく走行できることを確認した。運動試験は30分間とし、時速は0 km/h(運動開始前)、6 km/h、8 km/h、13 km/hおよび16 km/hの5速度と設定し、各速度での血中乳酸濃度、心拍数および歩数を測定した。また運動試験は1日1試験をランダムな順序で行い、試験後は3日間の間隔を設け、次試験とした。

#### 血中乳酸濃度測定

乳酸測定機器には、簡易血中乳酸測定器ラクテートプロ(製造販売元(株)アークレイファクトリー、京都、日本：以下ラクテートプロ)を用いた。ラクテートプロは測定原理に酵素比色法を用いており、犬において血液ガス分析装置との高い相関関係が報告されている【60】。測定は、運動開始直前(0分)、運動開始10分、20分、30分、60分の計5回行い、全て外側伏在症脈より採取した全血を用いた。

#### 心拍数測定

心拍数は聴診器にて運動開始直前と運動直後の15秒間の心拍を測定し、その値を4倍したものを1分間の心拍数とした。

#### 歩数測定

歩数測定機器にはわんダントを用い、運動開始直前に犬の首に装着し、30分

の運動終了後は直ちに外し 10 分間静置した後、解析を行った。

#### 統計解析

結果は、平均±標準偏差(SD)で示した。統計解析は One way repeated measures ANOVA および Two way repeated measures ANOVA(Graphpad Prism software5)を用い、有意差( $p<0.05$ )が認められた場合は Post hoc test として Bonferroni's Multiple Comparison Test を行った。なお、相関検討は、各速度の運動後平均心拍数と運動時平均乳酸濃度を用い行った。



## 結果

各速度における平均心拍数は、運動開始前が  $94.2 \pm 11.6$  回/min、時速 6 km/h 運動直後が  $118.8 \pm 10.7$  回/min、8 km/h 運動直後が  $121.2 \pm 7.8$  回/min、13 km/h 運動直後が  $133.2 \pm 9.8$  回/min および 16 km/h 運動直後が  $144 \pm 12$  回/min となり、運動時速が速くなるにつれて上昇した。また運動開始前と比較して時速 6, 8, 13, 16 km/h では有意に高値を示し、時速 6, 8 km/h と比較して、16 km/h では有意に高値を示した【Fig2-A】。また、速度と平均心拍数には正の相関関係が認められた(相関係数  $r=0.99$ )【Fig2-B】。

平均血中乳酸濃度は、運動開始前、時速 6 km/h および時速 8 km/h では運動中の変動は認められず、 $0.77 \pm 0.12$  -  $0.98 \pm 0.23$  mmol/L の間を推移した。時速 13 km/h 運動時の血中乳酸濃度は、運動開始前が  $0.78 \pm 0.1$  mmol/L、運動開始 10 分後が  $1.32 \pm 0.35$  mmol/L、20 分後が  $1.53 \pm 0.49$  mmol/L および 30 分後が  $1.27 \pm 0.47$  mmol/L となり運動開始 10 分後で上昇し、運動開始 30 分後では低下した。また、運動終了後 30 分(運動開始 60 分後)には運動開始前の値に戻った。一方、時速 16 km/h 運動時の血中乳酸濃度は、運動開始前が  $0.88 \pm 0.1$  mmol/L、運動開始 10 分後が  $1.45 \pm 0.33$  mmol/L、運動開始 20 分後が  $1.74 \pm 0.24$  mmol/L および運動開始 30 分後が  $1.97 \pm 0.57$  mmol/L となり運動経過時間が長くなるほど乳酸濃度は上昇した。運動終了後 30 分(運動開始 60 分後)では、運動開始前の値に戻った【Fig2-C】。また、速度と平均血中乳酸濃度変動には正の相関関係が認められた(相関係数  $r=0.94$ )【Fig2-D】。

運動開始前および運動後の平均心拍数と平均血中乳酸濃度には、正の相関関係が認められた(相関係数  $r=0.98$ )【Fig2-E】。

平均歩数は、時速 6 km/h では  $8159\pm387$  歩、8 km/h では  $8801\pm233$  歩、13 km/h では  $8028\pm1434$  歩および 16 km/h では  $7928\pm1116$  歩となり、時速 8 km/h と比較して時速 13 km/h および 16 km/h では有意な低下が認められた【Fig3-A】。また、時速と平均歩数には相関関係は認められなかった(相関係数  $r=-0.73$ )【Fig3-B】。

## 考察

本章では、運動実施が犬の心拍数、血中乳酸濃度および歩数変動に与える影響を検討した。結果より、各時速における平均心拍数は、運動開始前が  $94.2\pm11.6$  回/min に対し時速 6 km/h 運動直後が  $118.8\pm10.7$  回/min、時速 8 km/h 運動直後が  $121.2\pm7.8$  回/min、時速 13 km/h 運動直後が  $133.2\pm9.8$  回/min および時速 16 km/h 運動直後が  $144\pm12$  回/min と時速が速くなるほど上昇しており、運動負荷の増大を意味すると考えられた。

平均血中乳酸濃度変動は、全ての時速において 2 mmol/L 以下となったことから、ヒトでの報告を参考に照らし合わせ、本実験で行った運動時速はすべて有酸素運動に相当すると考えられた。しかし、運動開始前、時速 6 km/h 運動後および時速 8 km/h 運動後では血中乳酸濃度に変動は認められなかったものの、時速 13 km/h 運動後および時速 16 km/h 運動後では、運動開始前と比較して血中

乳酸濃度は有意に上昇した。通常、運動刺激が加わると筋肉内に貯蔵されているグリコーゲンや血中グルコースの分解が起こり、ピルビン酸へと変換され、ミトコンドリア内に存在する TCA 回路へ取り込まれることで ATP が産生される。これら糖分解は運動強度に応じて増加することから、高強度の運動や急激な運動時では多く分解される【7】。また、ミトコンドリア内での酸化量は常に一定にコントロールされているため、糖分解にて産生されたピルビン酸の量とミトコンドリアへの酸化量との差分は乳酸として細胞質内へ貯蔵される【57】。産生された乳酸の一部は全ての体組織においてピルビン酸に再変換され酸化的に代謝される経路と、主に肝臓でグルコースに再び変換され、筋肉内のグリコーゲン貯蔵を補充する経路(Cori 回路)の 2 つの方法で除去される【76】。本実験で行った運動時速は全て有酸素運動に相当されるため、時速 13 km/h および時速 16 km/h 運動後での血中乳酸濃度上昇は、ミトコンドリア内での酸化量に対し、グリコーゲン分解量が上回った可能性が考えられた。しかし、時速 13 km/h 運動後では、運動開始 30 分において血中乳酸濃度の低下が認められたことから、産生された乳酸の再変換が行われ、エネルギー源として利用されたと考えられる。一方、時速 16 km/h 運動後では、運動中全ての観察時間において血中乳酸濃度は上昇しており、他の時速と比較して糖分解量が多く、乳酸の再変換が追いついていない可能性が考えられた。しかしながら、本実験は運動時間が 30 分間と比較的短い時間であったため、正確な乳酸濃度変動の観察に至らなかったかもしれない。そのため、運動時間を延ばした再検討が必要であると考えら

れた。また、緒言でも述べた通り、糖尿病患者では、健常人と比較して運動時の血中乳酸濃度上昇は大きいことが知られている。糖尿病犬においても健常犬と比較して安静時の血中乳酸濃度は高値を示すことが分っており、これは糖尿病犬への運動実施が血中乳酸濃度の大幅な上昇を招き得る可能性を示している。したがって、糖尿病患者へ向けた運動実施は血中乳酸濃度が上昇しない強度で行うことが適切であると考えられる。このことから、本実験結果より糖尿病犬への運動実施は、血中乳酸濃度の上昇が認められなかった時速 8 km/h 以下の負荷で行うことが望ましいと示された。

心拍数と血中乳酸濃度には正の相関関係(相関係数  $r=0.98$ )が認められ、心拍数または血中乳酸濃度を測定することで個体毎の運動強度の把握が可能であると考えられた。本実験結果より、時速 6, 8 km/h といった血中乳酸濃度が上昇しない程度の運動は、平均心拍数  $121.2 \pm 7.8$  回/min 以下であり、時速 13, 16 km/h といった血中乳酸濃度が上昇する程度の運動は、平均心拍数  $133.2 \pm 9.8$  回/min -  $144 \pm 12$  回/min であると算出することができ、また心拍数が  $144 \pm 12$  回/min 以下の運動は、有酸素運動に相当する強度であることが算出できた。

平均歩数は速度との間に相関関係は認められなかった。これは、異なる速度における歩様の違いが影響したと考えられる。イヌの歩様には常足、側対歩、速足、駆足、襲補の 5 種類あり、それぞれ足の動きが異なる。今回用いた歩数計は前脚の動きを感知し計測するため、歩様の違いが大きく影響したと考えられた。ヒトでも歩行動態には歩行者の特性(年齢、体格、性別など)、歩行路条

件(路面の状態、勾配、路の形状など)および歩くスピードなど多くの要因が影響を及ぼすことが知られている。そのため、犬種ごとに体高や体重が大きく異なる犬では、様々な要因が関与することから歩数を運動指標として使用することは適さないと考えられた。

以上のことから、心拍数および血中乳酸濃度変動は犬の運動指標として利用可能であることが示された。また両者には正の相関関係が認められ、心拍数または血中乳酸濃度を測定することで個体毎の運動強度の把握が可能であると考えられた。

## 小括

本章では、異なる速度(0 km/h、6 km/h、8 km/h、13 kmh および 16 km/h)下での 30 分間の運動が、心拍数、血中乳酸濃度および歩数変動に与える影響を調査し、犬の運動指標について検討した。

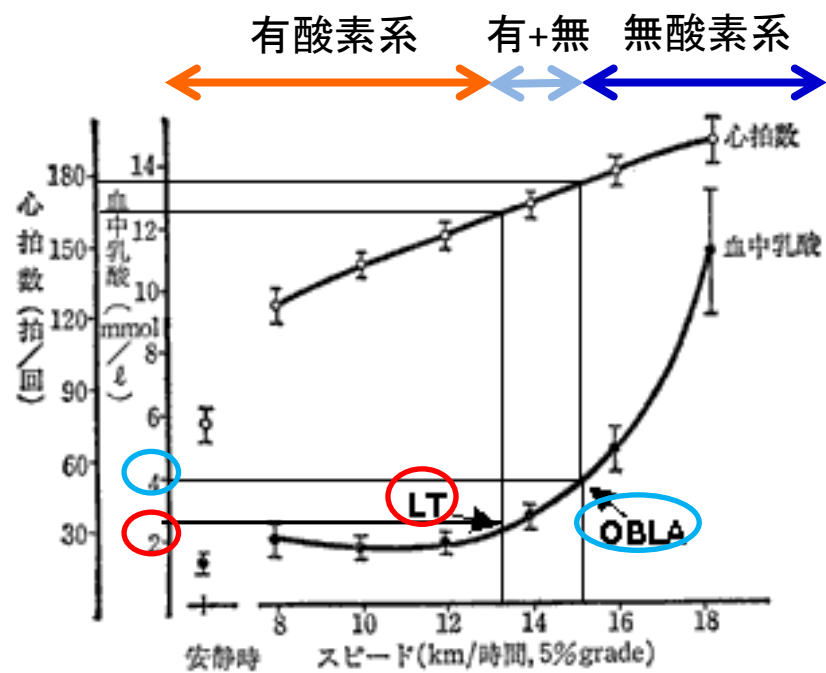
結果より、心拍数は運動速度が速くなるほど増加しており、運動負荷の増大を意味すると考えられた。

平均血中乳酸濃度は全ての速度において 2 mmol/L 以下となったことから、ヒトでの報告を参考に照らし合わせ、本実験で行った時速 16 km/h 以下の運動時速はすべて有酸素運動に相当すると考えられた。

心拍数と血中乳酸濃度の間には高い正の相関関係が認められ、心拍数または血中乳酸濃度を測定することで個体毎の運動強度の把握が可能であると考えられたことから、血中乳酸濃度が上昇しない程度の運動は心拍数  $121.2 \pm 7.8$  回/min 以下、血中乳酸濃度が上昇する程度の運動は心拍数  $133.2 \pm 9.8$  回/min -  $144 \pm 12$  回/min 以上であると算出することが出来た。

また、糖尿病患者への運動実施は血中乳酸濃度が上昇しない強度として時速 8 km/h 以下が適していることが示唆された。

Fig. 1 血中乳酸濃度および心拍数変動



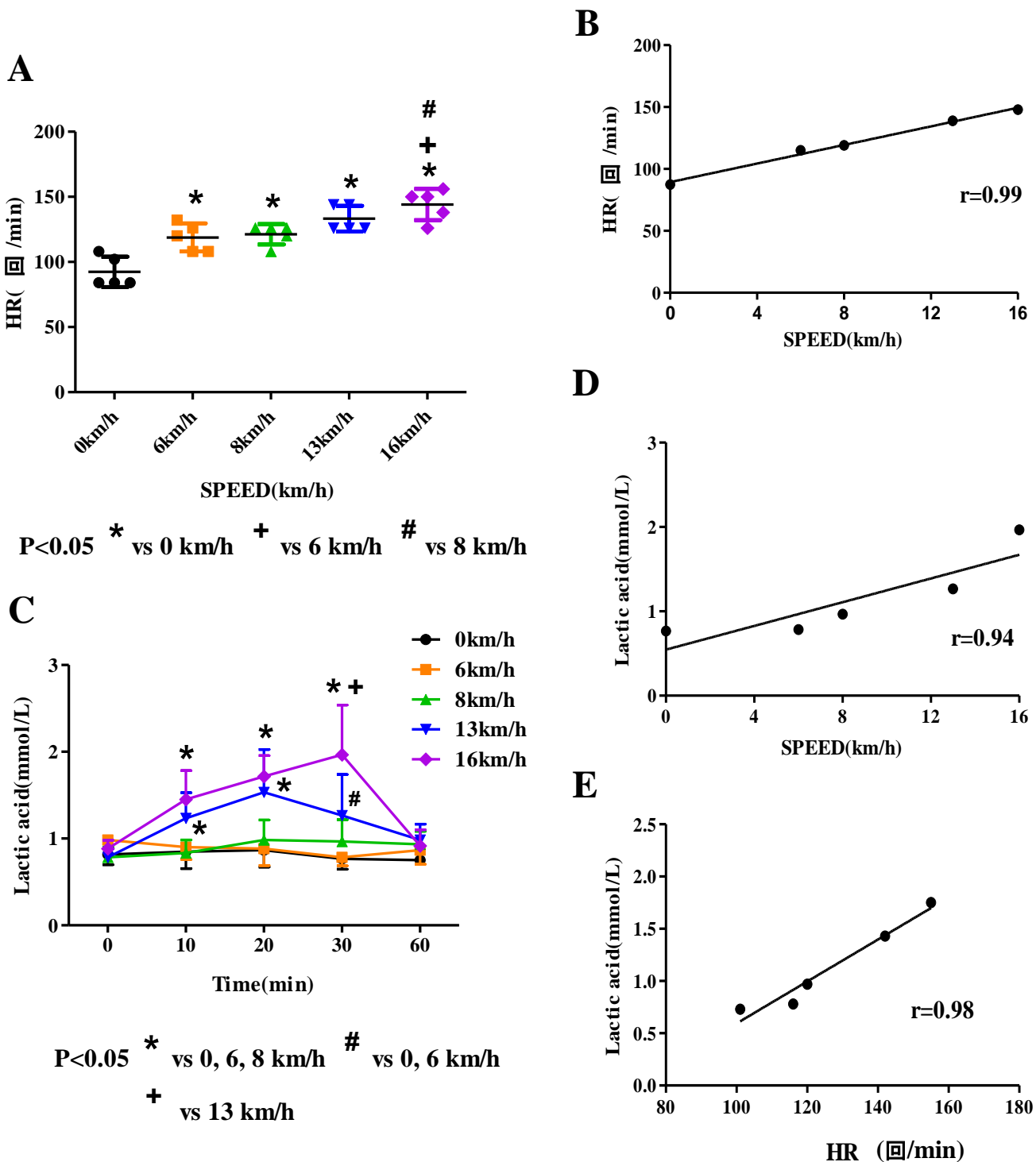
山地啓司、運動処方のための心拍数の科学、大修館書店、1994

**Table. 1** 供試動物プロフィール

No.	犬種	性別	年齢	体重 (kg)	RER × 1.6 (kcal/day)
1	ビーグル	去勢雄	1	10.9	672
2	ビーグル	去勢雄	1	12.3	736
3	ビーグル	去勢雄	1	12.7	753
4	ビーグル	去勢雄	5	12.26	734
5	ビーグル	去勢雄	5	10.8	667

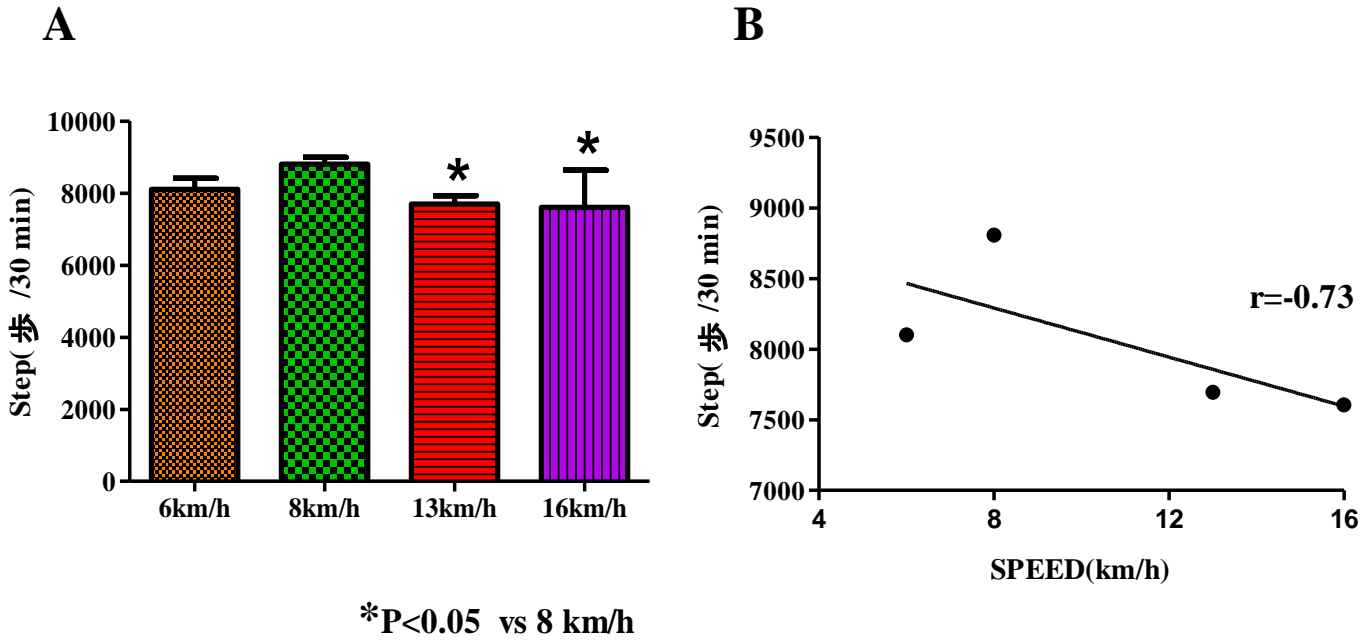
resting energy requirement(RER): 安静時エネルギー要求量





**Fig. 2** 時速の異なる運動時における運動後の心拍数(Heart Rate: HR)と血中乳酸濃度 (Lactate acid: LA)変動 (n=5)

時速0 km/h、時速6 km/h、時速8 km/h、時速13 km/hおよび時速16 km/hの運動後における平均心拍数(HR)(A)、時速と運動後の心拍数との相関関係(B)、運動時の平均乳酸値変動(Lactate acid)(C)、運動後の平均HRと運動時の平均Lactate acid変動の値相関関係(D)および運動後の平均心拍数と運動時のLactate acid変動の相関関係(E)を示す。有意差( $P < 0.05$ , One way repeated measures ANOVA)が認められた場合は、post hoc test としてBonferroni's Multiple Comparison Testを行った。なお、乳酸変動は各時間毎の統計結果を示す。



**Fig. 3 時速の異なる運動時における歩数(Step)変動 (n=5)**

時速6 km/h、時速8 km/h、時速13 km/hおよび時速16 km/hにおける運動時の平均歩数変動 (Step/30min)(A)、時速と平均歩数の相関関係(B)を示す。

平均歩数変動値はMean±SDで示し、有意差(P<0.05,One way repeated measures ANOVA)が認められた場合は、post hoc test としてBonferroni's Multiple Comparison Testを行った。

## 第 3 章

### 糖尿病犬に対する運動の効果

## 第1節 糖尿病犬に対する1ヶ月間の継続運動実施が 血糖変動および血液生化学パラメーターに及ぼす影響

### 緒言

医学領域において、運動療法は食事療法と共に糖尿病の基本治療であり、その効果には血糖コントロールや脂質代謝の改善、インスリン感受性の増加など様々なものが報告されている【21, 56】。実際にヒトの1型糖尿病患者では、食後の軽いウォーキング運動により、食後高血糖が是正され、血糖コントロールの改善が認められた例や定期的な有酸素運動実施により糖尿病の長期血糖コントロールマーカーである糖化蛋白(ヘモグロビン A<sub>1c</sub>: HbA<sub>1c</sub>)の改善が認められた例が報告されている【61】。また、2型糖尿病患者では、人工膵臓を用いたインスリン感受性評価において1ヶ月間、4ヶ月間、12ヶ月間と運動を継続することで、インスリン感受性が有意に増加したという結果が得られており、継続して運動を実施する意義も示唆されている【53】。1型糖尿病患者に対する運動処方では2型糖尿病患者を対象とした場合と比較して本質的に差があるわけではない。しかし、運動に伴う低血糖などの代謝の乱れが起こる危険性が高く、このような状況をいかに防ぐかが管理上の重要なポイントとなるため、運動実施に伴う血糖変動の把握は最も重要であると言える【21】。しかし、ヒトの1型糖尿病と同様にインスリン療法を必須とする犬の糖尿病での運動実施に関する報告はなく、その有用性や効果は十分解明されていない。

そこで本研究では、糖尿病犬に対する継続運動が血糖変動および血液生化学パラメーターにどのような影響を及ぼすか検討した。

## 材料および方法

### 供試動物

日本獣医生命科学大学獣医学部獣医保健看護学科看護臨床部門で飼育管理しているインスリン依存性糖尿病犬3頭(Dog1:4歳齢未避妊雌、Dog2:6歳齢去勢雄、Dog3:8歳齢未去勢雄)を使用した【Table. 2】。

### 試験プロトコル

運動実施期間は1ヶ月間とした。試験開始1ヶ月前よりインスリン投与量を一定にし、糖尿病の血糖コントロールマーカーである糖化アルブミン(Glycated albumin: 以下 GA)が一定値を継続して示した時点から実験開始とした。運動は1日1回、20分間の歩行運動を1ヶ月間継続して行った。なお運動強度は、第2章の結果を元に、血中乳酸濃度が上昇しない時速の中でも最も低速度である時速6 km/hと設定した。

### フード

フードは総合栄養食であるセレクトプロテイン(ROYAL CANIN

JAPON, Inc) を各供試動物の体重から算出した基礎代謝エネルギー要求量 (RER:体重<sup>0.75</sup>×70kcal)と一日当たりの必要カロリー要求量(DER:RER×2.0 kcal)をもとに決定し、1日2回(8:00 および 20:00)給与した。

## インスリン

インスリン製剤は、中間作用型インスリンである NPH インスリン(販売名：ノボリン N 注 100, ノボノルディスクファーマ株式会社, 東京, 日本)を用い、食後に1日2回、8:00 および 20:00 に頸部に皮下投与した。インスリン投与量は、Dog1 が 0.96 IU/kg/day、Dog2 が 1.36 IU/kg/day および Dog3 が 1.34 IU/kg/day であり、実験期間前後4週間のインスリン投与量の変更は行わなかった。

## サンプル採取

血液サンプル採取は、運動開始前、運動開始1週間後、2週間後、3週間後および4週間後の計5回、空腹時に行った。空腹時血液サンプルは血液生化学検査に用い、また血液サンプル採取時にインスリン投与前からインスリン投与後12時間後まで2時間間隔で血液を採取し、血糖値変動を観察した。得られた血液サンプルは直ちに真空採血管に分注したのち室温保存下にて凝固させ、その後3,500 rpm、10分で遠心分離し、測定まで-80 °Cにて凍結保存した。

## 測定項目と測定法

測定項目は、一週間毎の体重測定および血液生化学検査として血清グルコース (Glucose)、トリグリセリド (TG)、総コレステロール (T-CHO)、遊離脂肪酸 (NEFA)、クレアチンキナーゼ (CK)、乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH)、3 ヒドロキシ酪酸 (3-HB) 糖化アルブミン (GA)、を測定した。

以上の測定項目は、グルコキナーゼ法 (イアトロ LQ GLU (三菱化学メディエンス、東京、日本)、コレステスト® TG (積水メディカル、東京、日本)、イアトロテック NEFA (三菱化学メディエンス、東京、日本)、シグナスオート CK (シノテスト、神奈川、日本)、ピュアオート® S LD (積水メディカル、東京、日本)、N-アッセイ 3-HB (ニッポー、福島、日本)) を用い、自動生化学分析装置 (日立自動分析装置 7180、日立ハイテクノロジーズ株式会社、東京、日本) にて行った。また血糖値日内変動は、ムタロターゼ・GOD 法であるグルコース C-テスト (和光純薬工業株式会社、東京、日本) を用いて、分光光度計 (Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences、東京、日本) にて血中グルコース濃度の測定を行った。さらに 0week および 4week の血清アディポネクチン濃度 (Adiponectin) を測定した。測定には、酵素免疫定法 (enzyme linked immunoassay: ELISA) にて市販のアディポネクチン測定キット ((マウス/ラットアディポネクチン ELISA キット (大塚製薬株式会社、東京、日本)) を用いて以下の手順で測定した。なお、本キットはイヌの Adiponectin 測定と利用ができる

ことが確かめられている【73】。まず始めに、血液サンプル、抗体個相化プレート、アディポネクチン標準品および検体希釈液を室温に戻した。次に、アディポネクチン標準曲線用溶液を作成するため、標準品(8.0 ng/mL)を検体希釈液にて2倍希釈し、4.0 ng/mL、2.0 ng/mL、1.0 ng/mL、0.5 ng/mL、0.25 ng/mLの標準溶液を作成した。なお、0 ng/mLは検体希釈液を用いた。また、検体は過去の報告を参考に全て50000倍希釈を行った。始めに各ウェルに洗浄液を350  $\mu$ Lずつ添加し洗浄を1回行った。その後、検体希釈液を100  $\mu$ Lと検体もしくはインスリン標準溶液をプレートにアレンジメントに従って100  $\mu$ Lずつ添加して室温で1時間静置した。その後、各ウェルあたり350  $\mu$ Lずつの洗浄液で3回洗浄し、各ウェルにビオチン標識抗体溶液を100  $\mu$ Lずつ添加し、室温で60分静置した。そして再び、350  $\mu$ Lずつの洗浄液で3回洗浄し、各ウェルに酵素標識ストレプトアビジン溶液を100  $\mu$ Lずつ添加し、室温で60分間静置した。そして再び、350  $\mu$ Lずつの洗浄液で3回洗浄し、各ウェルに基質溶液を100  $\mu$ Lずつ添加し、室温で15分間静置した。15分後、直ちに反応停止液を各ウェル100 $\mu$ Lずつ添加し、酵素反応を停止させた。最後に、プレートリーダーにて波長450nm条件で吸光度を測定し、スタンダード曲線から血中アディポネクチン濃度を算出した。

## 統計解析

統計解析は、One way repeated measures ANOVA および Student's



t-test(Graphpad Prism software)を用いて評価した。なお、One way repeated measures ANOVA にて、有意差( $p<0.05$ )が認められた場合は、Post hoc 試験として Bonferroni's Multiple Comparison Test を行った。

## 結果

食後 12 時間までの血糖値日内変動は、各測定時間の平均変動曲線および曲線下面積 AUC(以下 Glucose AUC)共に有意差は認められなかったが、運動開始 4 週間後では、運動開始前と比較して低下傾向が認められた【Fig4-A, Fig4-B】。

GA は、運動開始前が  $27.2 \pm 1.47\%$  に対し運動開始 3 週間後では  $25.2 \pm 1.97\%$ 、4 週間後では  $24.7 \pm 1.81\%$  と有意な低下が認められた ( $P<0.05$ , Bonferroni's Multiple Comparison Test)【Fig5-A】。

空腹時の血液生化学パラメーター変動では GLU、TG および T-CHO では運動前後で有意な変動は認められなかった【Fig5-B、Fig5-C、Fig5-D】。

NEFA は、運動開始前( $0.702 \pm 0.281$  mEq/L)に対し、運動開始 3 週間後( $0.353 \pm 0.097$  mEq/L)では有意な低下が認められた ( $P<0.05$ , Bonferroni's Multiple Comparison Test)【Fig5-E】。

3-HB は運動前後において有意な変動は認められなかった

【Fig5-F】。

Adiponectin は、運動前後で有意差はみられなかったものの、運動後に上昇傾向が認められた【Fig6-G】。

CK は、運動開始前( $155.3 \pm 28$  IU/L) に対し、運動開始 1 週間後( $187 \pm 49.3$  IU/L)では上昇したが、運動開始 2 週間後( $139.6 \pm 30.7$  IU/L)、運動開始 3 週間後( $137 \pm 40.1$  IU/L)および運動開始 4 週間後( $140.6 \pm 45.5$  IU/L)では運動開始 1 週間後と比較して有意に低下し、上昇が抑制されていた( $P < 0.05$ , Bonferroni's Multiple Comparison Test)【Fig6-H】。

LDH は、運動開始前( $148.22 \pm 57.74$  IU/L)に対し、運動開始 1 週間後( $167 \pm 46.63$  IU/L)では上昇が認められたが、運動開始 2 週間後( $84 \pm 17.86$  IU/L)、3 週間後( $73.3 \pm 19.12$  IU/L)および 4 週間後( $73.3 \pm 16.13$  IU/L)では低下し、有意な変動が認められたが(One way repeated measures ANOVA、 $P = 0.0138$ )週ごとの比較では有意差は認められなかった【Fig6-I】。

体重は 1 ヶ月間を通し変動は認められなかった【Fig6-J】。

## 考察

本章では、インスリン依存性糖尿病犬に対し 1 ヶ月間の継続運動を行うことで血糖値日内変動および血液生化学パラメーターにどのような変動が認められるか検討した。実験結果より、運動開始 3 週間後、4 週間後では GA の有意な低下が認められ、血糖値変動では運動開始 4 週間後にて低下傾向が認められた。GA とは、アルブミンがグリケーションをうけた糖結合蛋白であり、過去 1-2 週間の血糖変動を反映する糖尿病の長期血糖コントロールマーカーである【31, 52, 58, 59】。血糖値が高い場合、血中にグルコースが多量に存在しアルブミンと結合するため、GA は高値を示す。つまり、GA の有意な低下は、高血糖状態の緩和を示し、血糖コントロールが改善されたことを示唆している。

また、GA が有意に低下したのに対し、血糖値日内変動には有意な変動は認められなかった。血糖変動はあくまで採血を行った 12 時間のみの変動を示すため、その日の状態(食事の吸収、飲水量、インスリンの吸収の違いなど)が大きく反映されと考えられる。そのため、血糖値日内変動では有意な変動を認めなかったと考えられた。

CK は、運動開始前と比較して運動開始 1 週間後では有意に上昇が認められたが、その後は有意に低下しており、上昇の抑制が認められた。CK は筋肉(骨格筋、心筋、平滑筋)、脳、神経に特異的に多

量に含まれており、クレアチンとクレアチンリン酸との間を触媒し、筋肉の収縮・弛緩に必要なエネルギー補給の役割を果たす酵素である。血清 CK 濃度は体重や性別、および食事などの生理的変動には影響を受けない。しかし、運動により、明らかな変動を示すことが報告されており、運動に伴う筋肉の低酸素状態や代謝障害に基づく筋膜の損傷、さらに一部筋線維の崩壊による血清中への CK の逸脱から高値を示すと考えられており、筋損傷の指標として利用されている【55】。CK は M(muscle)と B(brain)の 2 つのサブユニットからなる二量体であり、電気泳動により 3 つの分画(MM、MB、BB)に分けられる。CK-MM は筋疾患や激しい筋運動により、CK-MB は急性心筋梗塞などの心筋疾患時に血中に増加することが知られている。一方、CK-MB および CK-BB は胎児の筋や、懐死した筋の再生が起こる時期、また萎縮した筋が再生する時期に増加すると報告されている【9, 54】。ヒトでは、運動後の血中 CK 濃度は運動後 2 時間から 2 日後までに第 1 相目のピークがみられ、その後、2 日後から 7 日後に第 2 相目のピークが出現する 2 相性の変動を示すことが報告されている【19, 32】。また、第 1 相目の CK 分画のほとんどは CK-MM であるのに対し、第 2 相目の CK 分画では CK-MB、CK-BB 両分画の増加が認められる。これらは個体発生学的段階や筋損傷後の再生時に増加することから、第 2 相目のピークは運動後損傷した筋に再生

作用が起こっていると考えられている【54】。本実験では、運動開始 1 週間後に CK の有意な上昇が認められたことから、運動刺激に伴う筋膜損傷が生じ血清中へ一過性に CK の逸脱が起こったと考えられた。しかし、その後は上昇が抑制されており、これは運動により損傷した筋肉の再生作用と、継続運動に対する身体の馴化であると考えられた。

LDH は、運動開始 1 週間後に上昇したが、その後 2 週間、3 週間、4 週間と低下し、有意な変動が認められた ( $P=0.0138$ )。LDH は嫌氣的解糖系の最終段階に働く酵素であり、ピルビン酸と乳酸の間の反応を触媒する。LDH は、生態のほとんどすべての組織や体液に広く分布しており、様々な要因で変動すると報告されているとともに、犬では骨格筋において最も活性が高いことが知られている【19】。このため、CK と同様に運動刺激により大きく左右されると考えられる。しかし、身体が運動刺激に対し馴化すると血中 LDH 濃度は運動刺激に反応せず安定する【74】。したがって、運動後 1 週間目では上昇した LDH が 2、3、および 4 週間目と低下したのは、CK と同様に継続運動に対する身体の馴化であると考えられた。

NEFA は、運動開始前と比較して運動開始 3 週間後では有意な低下が認められた。NEFA は脂肪細胞に蓄えられた中性脂肪が分解され、グリセロールとともに血液中に放出されたものであり、体内の

各組織でエネルギー源として利用される。運動時にはまず、骨格筋のグリコーゲンがエネルギーの中心として利用され、さらに運動を続けると血中のグルコースと NEFA が中心となりエネルギーを補給する。さらにエネルギーを必要とする場合は、ホルモンや自立神経系の反応により、肝臓でのグルコース産生と脂肪組織からの NEFA が増加すると報告されている【37】。通常、無治療の糖尿病では、グルカゴン、アドレナリンの分泌上昇およびインスリン分泌低下のため、ホルモン感受性リパーゼが活性化し、脂肪組織からの脂肪酸動員が起こり、血中 NEFA 濃度は高値を示す。本実験では、運動開始前と比較して運動開始 1, 2 週間後では変動は認められなかったが、運動開始 3 週間後では血中 NEFA 濃度の有意な低下が認められ、継続運動によりインスリン感受性が改善した可能性が考えられた。

3-HB は、運動前後で変動は認められなかった。3-HB は、インスリンの作用不足により、糖質をエネルギー源として利用できなくなり、脂肪をエネルギー源として利用する際に分解産物として生じるケトン体の 1 つである。ケトン体は酸性物質であるため、高値になると血液が酸性状態となり、昏睡状態を引き起こすことがある。ヒトでは、インスリン欠乏状態(空腹時血糖値 250mg/dl 以上)では、運動後に血糖、FFA およびケトン体の高値を招く危険性があると報告されている。本実験結果より、運動前後で 3-HB に変動は認められ

なかった。NEFA 濃度変動と照らし合わせても、体内での過剰な脂肪分解はなかったと考えられる。

アディポネクチンは、運動前後で有意な変動は認められなかったものの、運動前と比較して運動後では上昇傾向が認められた。アディポネクチンは、脂肪細胞から分泌される蛋白であり、肝臓や骨格筋に存在する AMPK、PPAR $\alpha$ を活性化させ、骨格筋での脂肪燃焼、糖取り込みや糖利用の促進および肝臓での糖新生の抑制に寄与することが知られている【72】。肥満の2型糖尿病患者に対する運動実験では、1日40分間の運動を1週間に5日行い、血中アディポネクチン濃度の変動や HOMA-IR にてインスリン感受性の評価をおこなっている。その結果、運動後ではアディポネクチンの上昇およびインスリン感受性の亢進に加え、体重や体脂肪量の減少が認められたと報告されている【20】。アディポネクチンが脂肪細胞から分泌されるサイトカインであることから、体重や体脂肪の減少が大きく関与していると考えられる。本実験では、体重減少は認められなかったが、体脂肪量の測定を行っていないため、脂肪量の減少がアディポネクチンを上昇させたかは確認できなかった。しかし、運動後に血清アディポネクチン濃度の上昇傾向が認められたことは、体脂肪率の減少が起こっていた可能性がある。

以上の結果より、糖尿病犬に対する1ヶ月間の継続運動の実施は、

GA の有意な低下をもたらし、血糖コントロールを改善することが明らかとなった。また NEFA の有意な低下やアディポネクチンの上昇より、体脂肪率が減少した可能性が考えられ、細胞内へのグルコース取り込みがよりスムーズに行われている可能性が示唆された。さらに、運動開始初期では上昇した CK や LDH は運動期間が長くなるほどその上昇が抑制されており、継続的な運動がトレーニング効果となり、筋損傷の減少に繋がったと考えられた。



## 第2節 糖尿病犬に対する運動実施がインスリンシグナリング

### および糖脂質代謝関連遺伝子の発現量に及ぼす影響

#### 緒言

骨格筋での糖取り込み作用には、インスリン依存性とインスリン非依存性の2つの作用が存在する。インスリン依存性糖取り込み作用は、細胞外に存在する $\alpha$ サブユニットと細胞膜を貫通する $\beta$ サブユニットがS-S結合により2個ずつ会合した4量体構造のインスリン受容体を介す。①インスリンが $\alpha$ サブユニットに結合すると、 $\beta$ サブユニットのチロシンキナーゼ活性が刺激され、受容体自身のチロシン残基のリン酸化が生じる【8】。活性化したインスリン受容体は、インスリン作用の発現に最も重要な細胞内基質である②インスリンレセプター基質(IRS-1、IRS-2)をチロシンリン酸化し【1, 68, 69】、③phosphatidylinositol3'-kinase(PI3-K)の調節サブユニットであるp85が結合後、触媒サブユニットであるp110と結合する。その後、様々なインスリンシグナリングカスケードを介して、④GLUT4のトランスロケーションが起こり、細胞内へグルコースが取り込まれる。また、PI3-K活性は⑤Akt/PKBを介しAktの基質であるAS160をリン酸化することでもGLUT4のトランスロケーションを起こし、細胞内へグルコースを取り込む【22, 36, 39】。

一方、インスリン非依存性糖取り込み作用はエネルギー消費によって生じる運動筋内での生化学的変化(AMP/ATP比の上昇、クレアチン/クレアチンリン酸

化比の上昇)に反応して AMPK が活性化することで生じる【11】。活性化された AMPK は、①直接 GLUT4 のトランスロケーションを起こす経路と、②AS160 をリン酸化することで GLUT4 のトランスロケーションを起こす 2 つの経路により細胞内へグルコースを取り込む【29】。さらに、AMPK は acetyl-CoA から malonyl-CoA を合成する酵素である①アセチル CoA カルボキシラーゼ(ACC)をリン酸化し脂肪酸の $\beta$ 酸化を亢進させる働きや、骨格筋ミトコンドリア内膜に特異的に発現するキャリアー蛋白質のひとつである②脱共役蛋白 3(UCP3)の発現を誘導し、肥満の抑制やインスリン感受性の亢進にも寄与していることが報告されており【70】、運動実施の際のターゲット遺伝子として現在様々な研究が進められている【Fig. 7】。

以上のことから、本節では糖尿病犬に対する継続運動が運動実施前(Pre)と運動実施後(Post)のインスリンシグナリング(IRS-1、IRS-2、PI3-K、AKT2)および糖脂質代謝関連遺伝子(AMPK、GLUT4、UCP3、ACC)の発現にどのような影響を及ぼすか検討した。

## 材料および方法

### 供試動物

第 1 節で用いた糖尿病犬。

### サンプル採取

骨格筋サンプル採取は、運動実施前と 1 ヶ月間の運動実施後の計 2 回、12 時間以上絶食後に行った。ドロペリドール(ドロレプタン, 第一三共株式会社, 東京, 日本)を体重当たり、0.25 mg/kg で投与し前処置を行った後、プロポフォール(プロポフォール注射液, 富士製薬工業株式会社, 富山, 日本)を用い、体重当たり 7 mg/kg で麻酔導入後、イソフルラン(エスカイン吸入麻酔液, マイラン製薬株式会社, 大阪, 日本)にて吸入麻酔を行い、運動開始前の骨格筋を左大腿二頭筋より採取した。得られたサンプルは直ちに RNAlater(SIGMA, Saint Louis, Mo, USA)に入れ、4 °C にて一晩浸漬後 RNAlater を除去し、その後は解析まで -80 °C で凍結保存した。骨格筋サンプルは、TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用い、50 mg をホモジナイズし、トータル RNA を抽出した。TRIzol は組織 50 mg あたり 0.5 ml 使用し、以下の工程にて抽出作業を行った。ホモジナイズ後、①クロロホルム 100  $\mu$ l を加え、激しく混和した後、2 分間静置し、その後 1,700 g 15 分 4 °C で遠心 ②上清を回収し 500  $\mu$ l の 2-プロパノールを添加し混和後、室温にて 10 分間インキュベートし、そ

の後 1,700 g 10 分 4 °C で遠心 ③上清除去後、70 %エタノールを 1 ml 加え、1,700 g 5 分 4 °C で遠心し、その後、管壁のアルコールを完全に除去し乾燥 ④上清除去後、RNase free dH<sub>2</sub>O を 50 µl 加え、マイクロ吸光蛍光光度計 e-spect(BM 機器, 東京, 日本)を用いて 260 nm で濃度を測定し、260/280 比、および 230/260 比で 1.8 以上の純度の高い RNA のみを用いて、逆転写を行った。逆転写は、QuantiTect<sup>®</sup> Reverse Transcription(QIAGEN, 東京, 日本)を用いて、42 °C 2 分間のゲノム DNA 除去反応を行った後、42 °C 15 分の逆転写反応、95 °C 3 分の Quantiscript Reverse Transcriptase 不活性化を行い、cDNA を得た。

1 回目の骨格筋採取後は、抜糸や麻酔の影響を考慮し、骨格筋採取後から 1 ヶ月間、インスリン投与量およびフード給与量の変更は行わず、糖尿病管理を行った。その後、GA が安定した時点で 0week の血液サンプル採取を行い、1 ヶ月間の運動を開始した(第 2 章 第 1 節)。運動後の骨格筋サンプルは、1 ヶ月間の運動終了後、12 時間以上絶食し、上記と同様の麻酔条件で右大腿二頭筋より骨格筋を採取した。

#### 定量 PCR 用プライマーの作製

イヌの IRS-1(XM543274), IRS-2(XM542667), PI3-K p85 $\alpha$ (AB436616), Akt2(NM001012340), UCP3(AB022020), ACC(XM548250), AMPK(XM546691)および GLUT4(NM001159327)の塩基配列を

GenBank より入手し、ウェブ上ソフト

Primer3(<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>)を用いてそれぞれに対する特異的プライマー対を設計、合成した。定量のための内部コントロールには beta-actin(AF021873)のプライマー対を設計し、使用した。プライマー情報は【Table. 3】に示す。

#### クローニングおよびシーケンス

上記のプライマーが目的の遺伝子を検出しているか確認するため、クローニングおよびシーケンスを行った。PCR 反応は 5  $\mu$ l の 10 $\times$ PCR 緩衝液、4  $\mu$ l の dNTP、1  $\mu$ l のプライマー(Forward および Reverse)、0.25  $\mu$ l の Ex Taq DNA polymerase(TaKaRa, 滋賀, 日本)、1  $\mu$ l の cDNA、37.75  $\mu$ l の dH<sub>2</sub>O を含むトータル 50  $\mu$ l の反応液で増幅した。PCR 反応は、My Cyclor Thermal Cyclor(BIO RAD, CA, USA)を用いて行い、最初の熱変性(92  $^{\circ}$ C 2 分)後、94  $^{\circ}$ C 30 秒、55-60  $^{\circ}$ C 30 秒、72  $^{\circ}$ C 30 秒を 30 サイクル、A 付加反応を 72  $^{\circ}$ C 2 分で行った。得られた PCR 産物は、1.5 %アガロースゲルにて電気泳動を行い、予測したサイズに合致する PCR 産物を、アガロースゲルより切り出し、DNA Purification Kit, 15, UltraClean(MO BIO Laboratories, In, USA)を用いてプロトコールに従い目的断片を抽出し、e-spect にて濃度を測定した。得られた目的断片は、pGEM-T Vector System I (Promega

Corporation, USA)を用いて、クローニングを行った。クローニングしたプラスミドは、Competent Quick DH5 $\alpha$ (TOYOBO, 大阪, 日本)に以下の行程で導入した。氷上 5 分インキュベート、42 °C 30 秒ヒートショックを行った後に、LB 寒天培地にまき、37°C、一晚培養を行った。培養後、得られたコロニーより、インサートチェックを行い、目的の PCR 断片がプラスミドベクターに組み込まれていることを確認した。プラスミドのインサートが確認された大腸菌は、LB 液体培地にて培養し、Labo Pass Mini Plasmid DNA Purification Kit(北海道システム・サイエンス株式会社, 北海道, 日本)を用いプラスミドを精製した。シーケンスは、BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA)を用い、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)にて配列の解析を行った。

#### mRNA の定量的リアルタイム-PCR 解析

定量的 RT-PCR 反応には、Perfect Real Time SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa)を用い、ABI 7300 Real Time PCR system Sequence Detection System (Applied Biosystems)により行った。PCR 反応は、1  $\mu$ l のテンプレート cDNA、0.4  $\mu$ l の各プライマー(Forward および Reverse)、10  $\mu$ l の SYBR Premix Ex taq (TaKaRa)、0.4  $\mu$ l の ROX reference Dye (TaKaRa)および 6.8  $\mu$ l の H<sub>2</sub>O を含む合計 20  $\mu$ l の反応液を、95 °C 10 秒に続いて 95 °C 5 秒、60 °C 34 秒を 40 サイクルの条件で

行った。PCR 後、融解曲線は 95 °C まで PCR 反応液の温度を上げた後、60 °C まで温度を下げ、再び 95 °C まで徐々に温度を上げながら蛍光シグナルを解析することにより作成した。それぞれのプライマーで単一の蛍光シグナルのピークを確認した。また、1kb のプラスミド 1 µg には、 $9.1 \times 10^{11}$  個のプラスミドが含まれているため、下記の計算式により、コピー数が  $10^8$  になるように希釈した。

$$(9.1 \times 10^{11}) \times X / Y$$

※ここでは、プラスミド濃度(µg/µl)=X、ベクターの鎖長(kb)=Y で示す。

その後、この結果を元に、 $10^7$  から  $10^2$  までの希釈液を作り、それを用い標準直線を作製した。なお、反応には、同一サンプルを 3 回測定し、内部標準として beta-actin を用いた。

#### 統計解析

測定結果は、相対定量値±標準偏差(SD)で示した。統計解析は、Student's t-test を用いて評価し、検定は Graph Pad Prism(Vers.4.0, Graph Pad Software, San Diego, CA)を用いて行い、 $p < 0.05$  を有意水準とした。

## 結果

運動開始前および運動後の糖尿病犬の骨格筋における IRS-1、IRS-2、PI3-K、AKT2、UCP3、ACC、AMPK および GLUT4 の mRNA 発現量の比較を行った。全ての項目において有意差は認められなかったものの IRS-1 では運動後 1.52 倍、PI3-K では 1.73 倍、AKT2 では 1.5 倍、UCP3 では 1.62 倍、GLUT4 では 1.4 倍、AMPK では 1.54 倍の上昇が認められ、ACC は運動後 0.8 倍低下した。また、IRS-2 は運動前後で変動は認められなかった【Fig8、Fig9】。



## 考 察

第 2 節では、糖尿病犬に対し運動を実施することで、運動実施前後のインスリンシグナリングや糖脂質代謝関連遺伝子発現量にどのような影響を及ぼすのか検討した。

本実験結果より、インスリン作用とは異なる糖取り込み経路の主要シグナルである AMPK および GLUT4 の発現量は、運動後上昇傾向にあった。運動による GLUT4 のトランスロケーションの分子メカニズムは、1997 年に Merrill らによって報告された【Fig. 7】。それによると、骨格筋を灌流法により AMPK 活性化剤である 5-amino-4-imidazole carboxamide riboside(AICAR)で刺激すると、GLUT4 のトランスロケーションが起こり、糖取り込みを亢進させるというものである【65】。その後、1998 年に Hayashi らにより、単離したラットの滑車筋に電気刺激を加え、筋収縮を生じさせると、AMPK mRNA 発現量の上昇と GLUT4 のトランスロケーションによる糖取り込み亢進が認められたと報告された【10】。本実験結果からも、AMPK および GLUT4 の両者の発現量は運動後上昇傾向にあり、糖尿病犬においても運動刺激によりインスリン非依存性の経路での糖取り込みを亢進させる可能性が示唆された。

脂質代謝に関与する ACC は運動後低下した。ヒトやマウスにおいて AMPK 活性は ACC の活性を制御することが報告されている【30】。

通常、短時間の運動では、血中のグルコースと筋肉内に蓄積されているグリコーゲンによるグルコースからのアデノシン 3 リン酸(ATP)供給で運動時に必要なエネルギーを賄っている。また、運動を行っていない状態では、アセチル CoA から ACC の働きによって、マロニル CoA が合成され、このマロニル CoA は、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 1(CPT1)を阻害することによりアシル CoA(脂肪酸)がミトコンドリア内へ輸送されるのを阻害し、脂肪酸の酸化を抑制する。しかし、長時間の運動などでグルコースの供給が不十分になると、ATP が低下することで、アデノシン-5'-リン酸(ADP)から AMP ができ、AMPK 活性が亢進する。AMPK 活性は、ACC をリン酸化することにより ACC 活性を抑制し、その結果、アセチル CoA からのマロニル CoA 合成が低下し、CPT1 活性を亢進させ、脂肪酸のミトコンドリアへの輸送と酸化が高まり脂肪酸からの ATP 合成を亢進させる。運動による AMPK 活性は、エネルギー産生のもととなるグルコースや脂肪酸などの筋肉内細胞への取り込みを促進する。本実験結果より、運動後 ACC の mRNA 発現量は低下を示したことから、今回行った運動には、エネルギー産生のためグルコースと共に脂肪酸の利用も行われていたと考えられた。

エネルギー消費に関与する UCP3 は運動後上昇した。マウスを用いた運動実験では、30 分間の水泳を 1 日 4 回、2 週間継続しておこなったところ、骨格筋の UCP3 発現が有意に上昇したと報告している。この反応は運動刺激による糖脂質代謝の亢進や活性酵素産生

(ROS)に応答し UCP3 遺伝子の転写活性が亢進したためと考えられている【11】。本実験では、ROS の測定は行っていないが、運動後の UCP3 発現が上昇したことは、糖・脂質代謝が亢進した可能性を示している。

骨格筋の主要なインスリンシグナリングである IRS-1、PI3-K、Akt2 は運動後それぞれ 1.52 倍、1.73 倍、1.5 倍と上昇傾向を示した。ヒトでは、筋収縮はインスリン受容体 $\beta$ 鎖のリン酸化、IRS 蛋白のリン酸化、PI3-K および Akt などのインスリンシグナル伝達分子を活性化しないことが報告されている【6, 62】。本実験では、有意差は認められなかったものの、IRS-1、PI3-K、Akt2 は運動後上昇傾向にあり、運動刺激が糖取り込み作用のみならず、インスリンシグナル活性にも何らかの影響を与えている可能性を示している。糖尿病犬を対象とした研究において、厳格な血糖コントロールは、コントロール不良時と比較して白血球におけるインスリンシグナリング(IRS-2, PI3-K)を有意に上昇させることが報告されている【43】。第 1 節の結果からも、糖尿病犬に対する運動実施は、GA を有意に低下させることから血糖コントロールの改善に寄与していることが明らかとなっており、これらの結果が骨格筋インスリンシグナリングの上昇へ寄与した可能性が考えられた。

以上のことから、糖尿病犬への運動実施はヒトやマウスでの報告

と同様、骨格筋内遺伝子発現に良好な変動をもたらすことが明らかとなった。しかし、今回測定を行ったシグナルは、運動後に上昇および低下傾向は認められたものの、有意な変動ではなかった。この理由の一つとして、今回使用した供試動物数が3頭と少ないことが考えられた。そのため、今後は供試動物数を増やし再検討が必要である。また、本研究で得られた結果はあくまで骨格筋内 mRNA 発現であり、タンパク発現と同様な動きであるかについては検討できていないため、併せて検討が必要であると考えられる。

## 小括

本章では、糖尿病犬に対する運動実施が血糖変動、血液生化学パラメーターおよび骨格筋細胞内の遺伝子発現にどのような影響を及ぼすか検討した。

糖尿病犬に対する 1 ヶ月間の継続運動実施は、GA の有意な低下および血糖値日内変動の低下傾向を示し、糖尿病犬への運動実施は血糖コントロール改善に寄与することが示唆された。また、運動を継続することで CK、LDH の有意な低下が認められ、継続的な運動により身体が運動刺激に対し馴化するトレーニング効果が得られ、運動により損傷する筋肉量の低下や損傷した筋肉の再生作用が早まった可能性が示唆された。脂質代謝では、NEFA の有意な低下やアディポネクチンの上昇が認められ、継続的な運動により体脂肪率の減少や骨格筋内のグリコーゲン増加に伴い脂肪分解の減少が起こった可能性が考えられた。

第 2 節より、糖取り込み作用に関与する AMPK、GLUT4 は運動実施後それぞれ 1.54 倍、1.4 倍と上昇しており、糖尿病犬においても運動刺激そのものが糖取り込みを促進させる可能性を示唆している。また、AMPK 活性に伴い UCP3 の上昇や ACC の低下が認められた。これらの変動は、脂質代謝の亢進を示唆するものである。

筋収縮はインスリン受容体  $\beta$  鎖の自己リン酸化、IRS 蛋白のリン

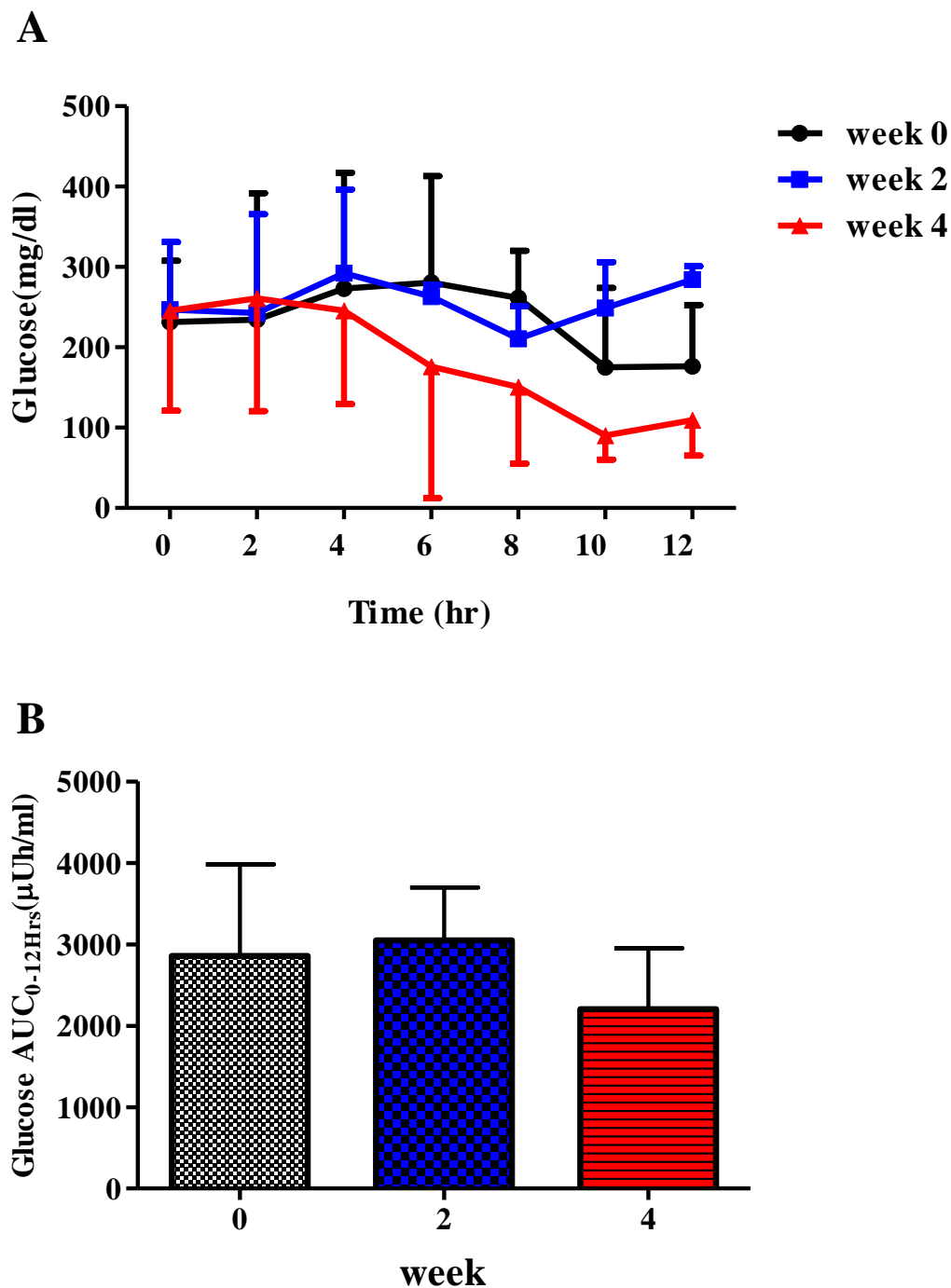
酸化、PI3 キナーゼ、AKT などのインスリンシグナル伝達分子を活性化しないことが報告されているが、本実験結果では骨格筋の主要なインスリンシグナリングである IRS-1、PI3-K、AKT2 は運動後それぞれ 1.52 倍、1.73 倍、1.5 倍と上昇する傾向にあり、運動刺激が糖取り込み作用のみならず、インスリンシグナル活性にも何らかの影響を与えている可能性が考えられた。

以上より、インスリン投与中である糖尿病犬に対する運動実施は血液レベルによる血糖コントロールおよび脂質代謝の改善や、骨格筋への糖取り込み作用および脂質代謝を亢進させる可能性が示唆された。

Table. 2 供試動物プロフィール

	犬種	性別	年齢	体重 (kg)	NPH Insulin 投与量 (IU/kg/day)	RER × 2.0 (kcal/day)
Dog1	ミニチュア・シュナウザー	未避妊雌	4	6.25	0.96	553
Dog2	ミニチュア・ダックスフント	去勢雄	6	5.92	1.36	531
Dog3	ビーグル	去勢雄	8	12.1	1.34	908

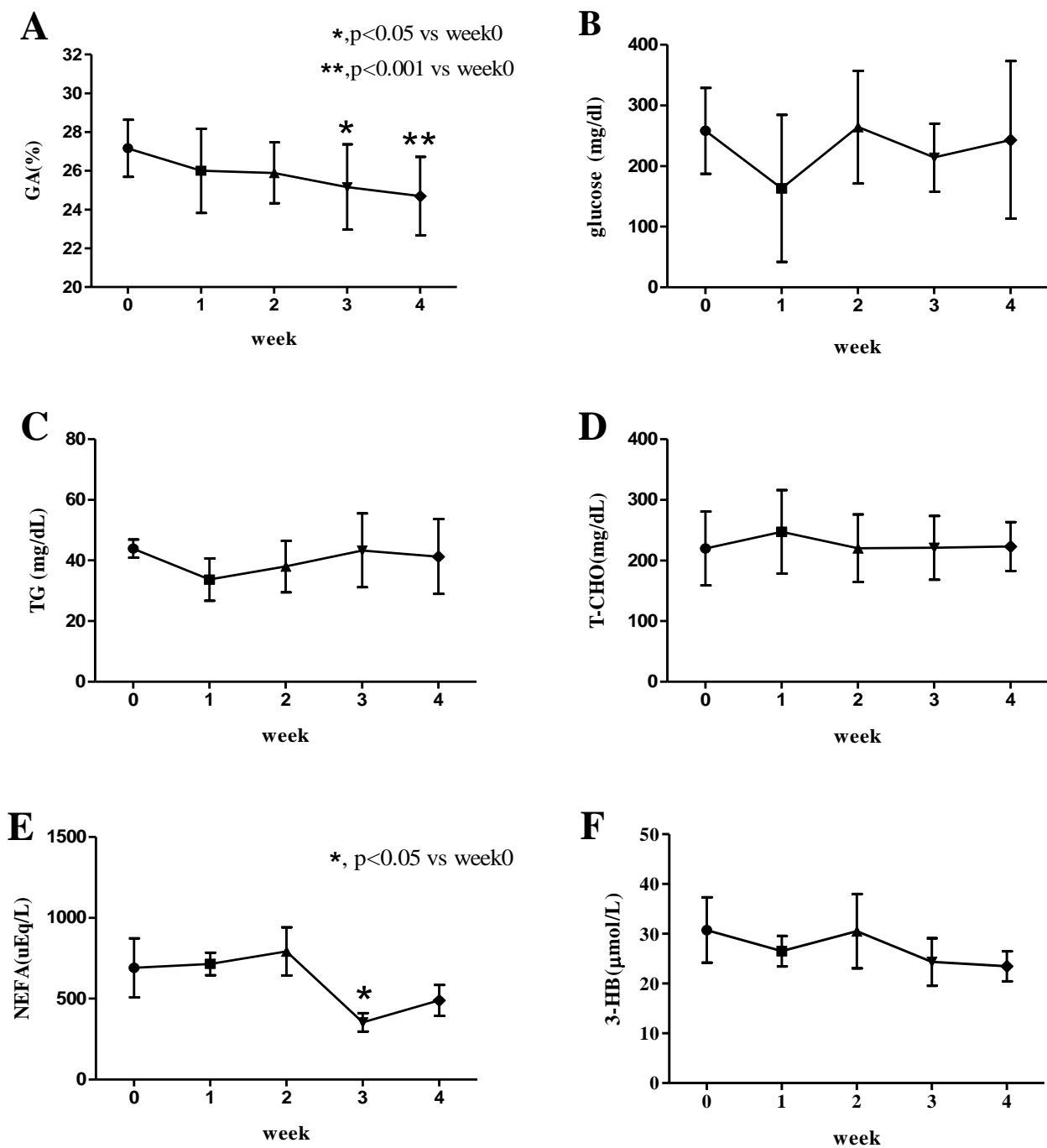
resting energy requirement(RER): 安静時エネルギー要求量



**Fig. 4 運動前後の血糖変動の推移 (n=3)**

(A)はインスリン投与前を0hrとし、その後12時間まで2時間間隔でサンプル採取を行い、運動開始前(week0)、運動開始2週間後(week2)および運動開始4週間後(week4)の3群間の比較した。  
 (B)はweek0、week2およびweek4のGlucose曲線下面積(Glucose AUC<sub>0-12h</sub>)を比較した。  
 値は、全てMean±SDで示す。

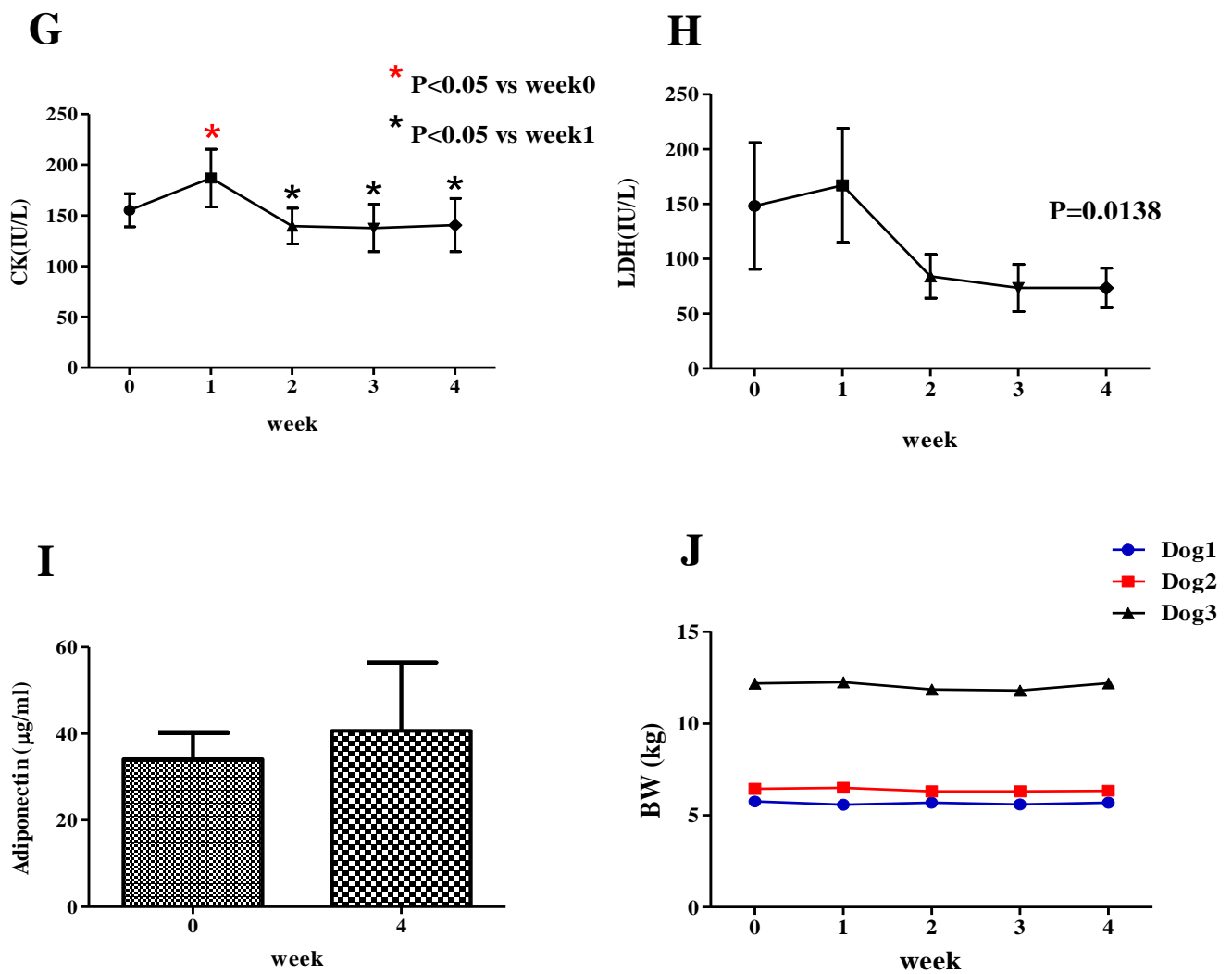




**Fig. 5 運動開始前後の 血液生化学パラメーター変動 (n=3)**

運動開始前(week0)、運動開始1週間後(week1)、運動開始2週間後(week2)、運動開始3週間後(week3)および運動開始4週間後(week4) の血中変動を示す。

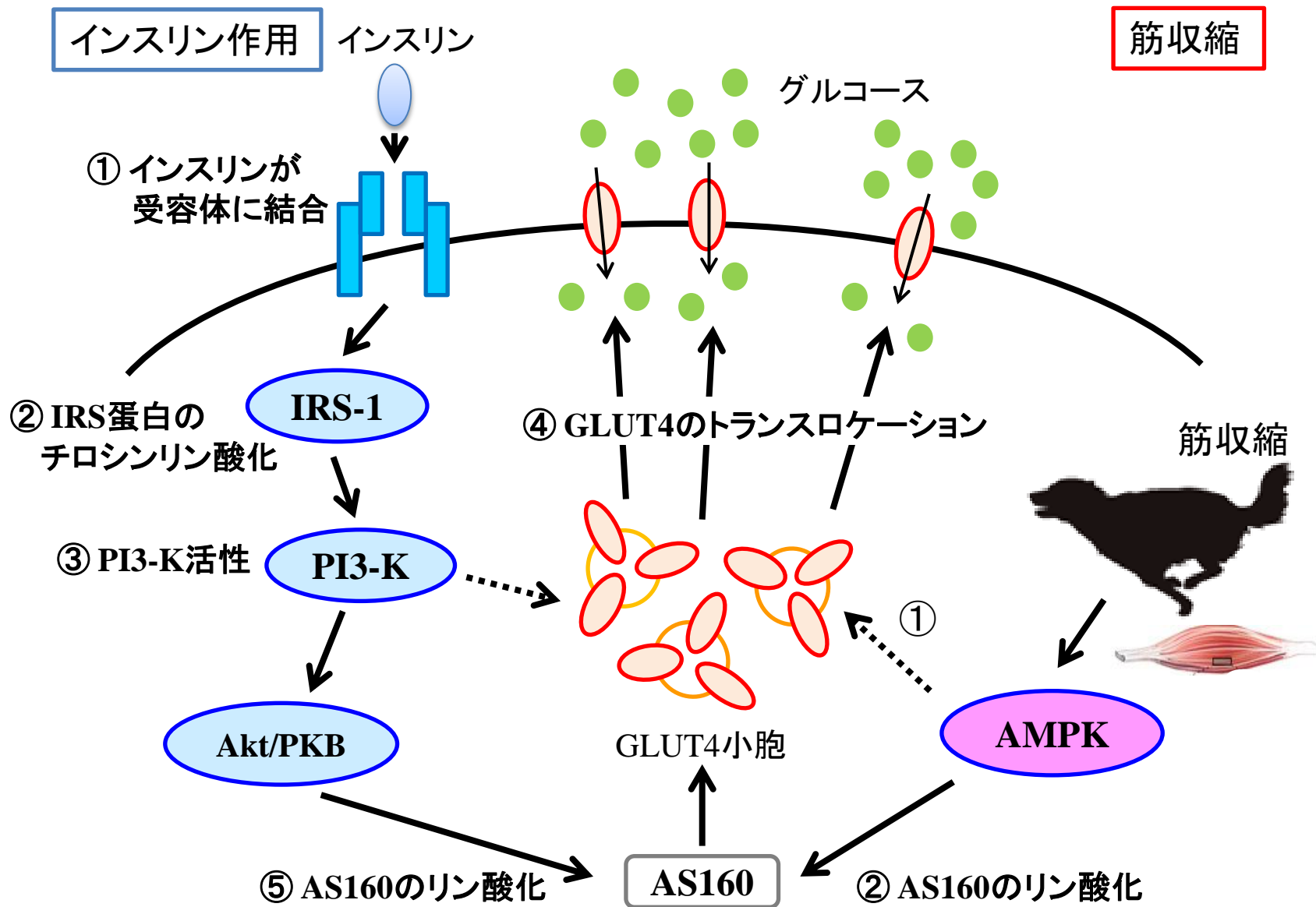
各項目は、(A) GA, (B) Glucose, (C) TG, (D) T-CHO, (E) NEFA, (H) 3-HBであり、値は全て Mean±SDで示す。有意差( $P < 0.05$ , One way repeated measures ANOVA) が認められた場合は、post hoc test としてBonferroni's Multiple Comparison Testを行った。



**Fig. 6 運動前後の 血液生化学パラメーターおよび体重変動 (n=3)**

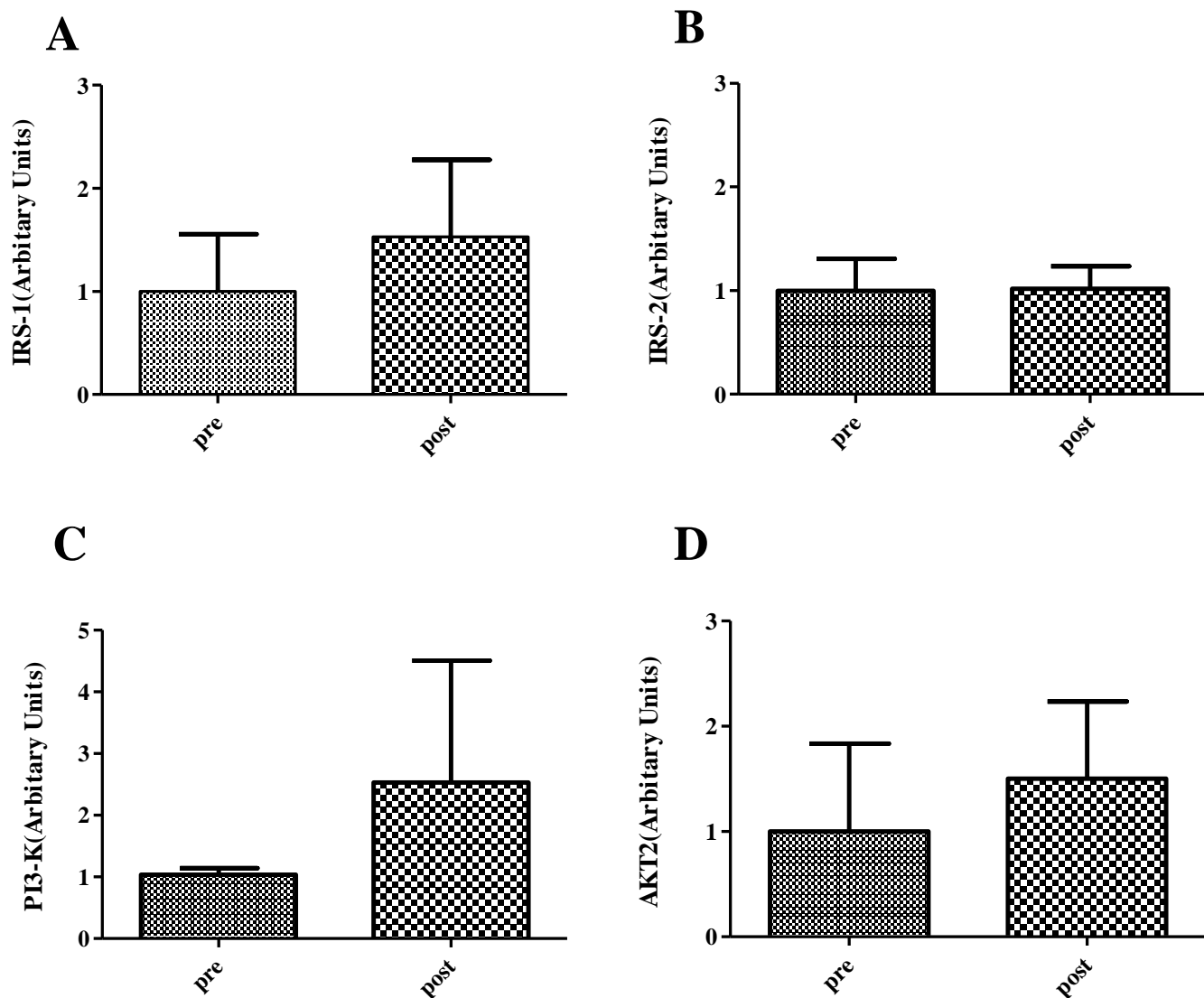
運動開始前(week0)、運動開始1週間後(week1)、運動開始2週間後(week2)、運動開始3週間後(week3)および運動開始4週間後(week4) の血中変動および体重変動を示す。各項目は、(G) Adiponectin , (H)CK, (I)LDH, (J)体重 であり、値はMean $\pm$ SDまたは各個体毎に示す。有意差( $P < 0.05$ , One way repeated measures ANOVA)が認められた場合は、post hoc test として Bonferroni's Multiple Comparison Testを行った。

Fig. 7 骨格筋GLUT4のトランスロケーション機構



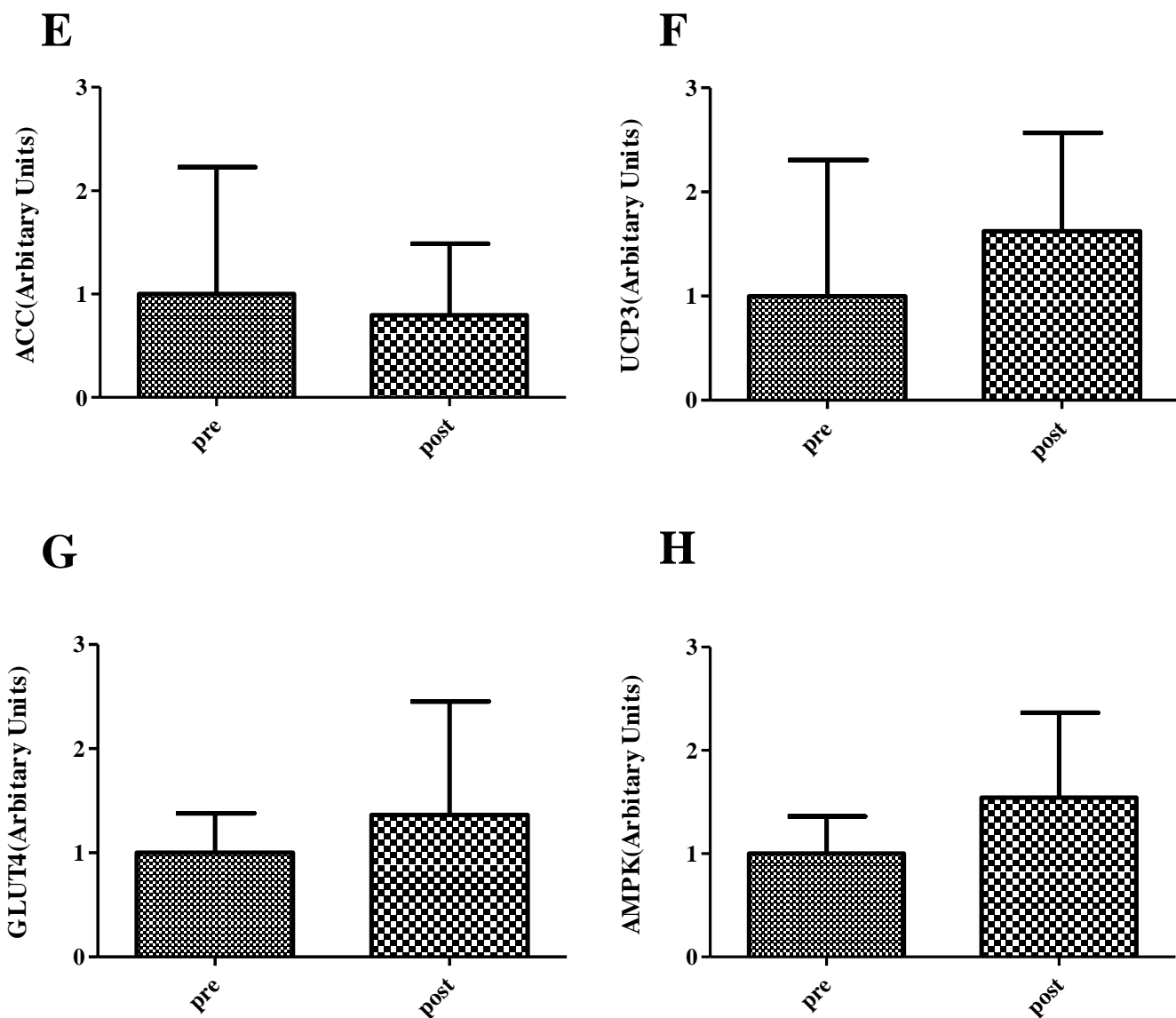
**Table. 3 real-time PCRに用いたPrimer**

probe	Expected sequencing length of PCR products (bp) in dog	Primer type	Primer Sequences (5'-3')	GenBank Acc.No.
IRS-1	81	Forward	acctgcgttcaaggaggtctg	XM543274
		Reverse	cggtagatgccaatcaggttc	
IRS-2	177	Forward	tggcaggtgaacctgaagc	XM542667
		Reverse	gaagaagaagctgtccgagtgg	
AKT2	90	Forward	ctcgagtatttcattcgag	NM001012340
		Reverse	acctggcacccgaggtgctg	
GLUT4	108	Forward	gacaagcaacttcattggc	NM001159327
		Reverse	aggaaggtgaagatgaagaagg	
UCP3	104	Forward	atcagaccactccagcatcac	AB022020
		Reverse	tgaaatcggaccttcaccac	
ACC	122	Forward	tgccctcgtttccagttag	XM548250
		Reverse	acttctgtgcccacctccac	
beta-actin	129	Forward	gccaaccgtgagaagatgact	AF021873
		Reverse	cccagagtccatgacaataccag	



**Fig. 8 運動開始前および運動後4週間の骨格筋細胞内におけるmRNA発現量の比較**

運動開始前(pre)および運動後(post)における骨格筋内IRS-1(A)、IRS-2(B)、PI3-K(C)およびAKT2(D)のmRNA 発現量の比較を行った。  
 それぞれの発現量はbeta-actin の発現量で除し、preを1とした相対値で示し、全ての値はMean±SDで示した。



**Fig. 9 運動開始前および運動後4週間の骨格筋細胞内におけるmRNA発現量の比較**

運動開始前(pre)および運動後(post)における骨格筋内ACC(E), UCP3(F), GLUT4(G)およびAMPK(H)のmRNA発現量の比較を行った。

それぞれの発現量はbeta-actinの発現量で除し、preを1とした相対値で示し、全ての値はMean±SDで示した。

## 第4章

### 健常犬と糖尿病犬における運動と食事の 時間的関係性について

## 第 1 節 経口糖負荷試験後の運動実施が健常犬の糖脂質代謝に及ぼす影響

### 緒言

運動は食事と組み合わせることで多彩な効果をもたらす。しかし、食事内容や食事時間によっては、運動時に低血糖症状や消化吸収不良などの弊害を引き起こすことが報告されている。運動中での筋グリコーゲンの枯渇、低血糖および消化吸収不良により引き起こされる腹痛や嘔吐などの症状は、運動パフォーマンスを制限する主な要因と言われており【4, 12, 13】、そのためヒトでは運動前や運動中に瞬時にエネルギー源として利用できる糖質を摂取することが推奨されている。糖質の摂取は、血糖値の低下抑制、糖質の酸化率維持【12, 26, 40】および筋グリコーゲンの節約【64】など運動パフォーマンスの向上に役立つことが一般に認められている。しかし Foster らは、運動前のグルコース摂取は急激な血糖値の低下に繋がり、運動パフォーマンスを抑制させる要因にもなることを明らかにしている【18】。また他の研究報告では、運動開始 45 分前にグルコース溶液を投与した群と、無投与群の 2 つの群で運動負荷を行ったところ、無投与群では血糖値変動は認められなかったのに対し、グルコース溶液投与群では運動後に急激な血糖値の低下を示した。これは、糖摂取による急激な血糖値の上昇とそれに伴う血中インスリン濃度の上昇が起因していると考えられる。イヌにおいても、糖摂取は血糖値の上昇とインスリン分泌の増大を引き起こすことが分っている。しかし、これらの変動と運動の関連性を検討した報告はな



く、その詳細は不明である。

そこで本章では、健常犬に対し経口糖負荷試験(OGTT)を行い、血糖値およびインスリン分泌上昇時での運動が、糖脂質代謝に及ぼす影響を検討した。なお、本節では有酸素運動として最大の運動量での効果を検討するため、第2章の結果を元に、軽度の血中乳酸濃度の上昇が認められ、産生した乳酸がエネルギー源として再変換された時速 13 km/h と設定した。

## 材料と方法

### 供試動物

日本獣医生命科学大学獣医学部獣医保健看護学科看護臨床部門で飼育されているビーグル犬4頭(去勢雄、1-5 歳齢、体重 10.9-12.7 kg)を供試した。

これらの犬は、温度および湿度を管理された施設内にて単独飼育されており、あらかじめ一般身体検査、血液生化学検査にて健常と判断した犬を用いた。各犬のプロフィールを [Table. 4] 示す。

### 試験プロトコル

試験条件は、①ブドウ糖負荷群(OGTT群)、②OGTT後運動を行った群(時速13 km/h : 以下OGTT+13Ex群)、および③OGTTを行わず運動を行った群(時速13 km/h : 以下Fast+13Ex群)の3条件とした(以下、②③を併せて運動群とする)。運動

は1日1試験とし、時間的影響がないようその試験順序はランダムに行った。なお、試験後は3日間の間隔を設け、次試験とした。

運動開始時間はイヌでの過去の報告を参考に、経口糖給与後最も血糖値が上昇する 30 分後とした【44】。運動終了後は直ちに心拍数の測定を行った。なお、結果の図に示す時間は運動開始時を 0 分とし、OGTT 開始時は-30 分となる。

## 運動方法

運動機器には犬用トレッドミル(PR730, PETRUN)を用いた。予め、全ての供試動物はトレッドミルを用いたトレーニングを行い、問題なく走行できることを確認した。運動は有酸素運動として時速 13 km/h の運動を 30 分間行った。

## OGTTおよびサンプル採取

グルコース投与は、前の食事より12時間後に行った。グルコース投与量は、50 %グルコース溶液を1 g/kgで60秒間かけて経口投与した。グルコース溶液の給与開始から30 秒後を糖給与開始時間とした。

血液サンプル採取は、空腹時(0分)、糖給与後10分、20分、30分、40分、50分、60分、90分、120分の合計9ポイントとし、全て頸静脈より採取した。なお、運動中のサンプリングは、10分毎にトレッドミルを停止し、その場で頸静脈より1分間以内に行った。得られた血液サンプルは直ちに真空採血管に分注したのち室温保存下にて凝固させ、その後3,500 rpm、10分で遠心分離し、測定まで一

80 °Cにて冷凍保存した。

#### 測定項目および測定方法

測定項目は、血清 Glucose、Insulin、NEFA、CK、LDH、LA、心拍数および歩数とした。なお、測定試薬および測定機器は第3章と同じである。Insulin は、酵素免疫定法(enzyme linked immunoassay: ELISA)にて市販のインスリン測定キット(モリナガ イヌインスリン測定キット(森永生科学研究所))を用いて以下の手順で測定した。まず始めに、血液サンプル、抗体個相化プレート、インスリン標準品および検体希釈液を室温に戻した。次に、インスリン標準曲線用溶液を作成するために、凍結乾燥されたインスリン標準に 100  $\mu$  の蒸留水を加えて溶解した。そしてこのインスリン標準溶液 50  $\mu$  と検体希釈液 150  $\mu$  を混和して、6.4 ng/mL のインスリン標準溶液を作成した。次に、6.4 ng/mL のインスリン標準溶液 100  $\mu$  と検体希釈液を 100  $\mu$  を混和して、3.2 ng/mL のインスリン標準溶液を作成した。以後、同じようにして、1.6 ng/mL、0.8 ng/mL、0.4 ng/mL、0.2 ng/mL、0.1 ng/mL のインスリン標準溶液を作成した。なお、0 ng/mL は検体希釈液を用いた。

各ウェルに検体希釈液を 95  $\mu$ L と検体もしくはインスリン標準溶液をプレートにアレンジメントに従って 5  $\mu$ L ずつ添加して 4°C で 2 時間静置した。その後、各ウェルあたり 300  $\mu$ L ずつの洗浄液で 5 回洗浄し、各ウェルに酵素標準抗インスリン抗体溶液を 100  $\mu$ L ずつ添加し、室温で 30 分静置した。そして再び、300  $\mu$ L

ずつの洗浄液で7回洗浄し、各ウェルに酵素基質溶液を100 $\mu$ Lずつ添加し、遮光下室温で30分間正確に静置した。30分後、直ちに反応停止液を各ウェル100 $\mu$ Lずつ添加し、酵素反応を停止させた。最後に、プレートリーダーにて波長450nm条件で吸光度を測定し、スタンダード曲線から血中インスリン濃度を算出した。

得られた結果を元に、各ポイントにおける平均値変動と曲線下面積(Total area under the curve during 0-120min : AUC<sub>0-120min</sub>)を算出し、比較検討した。

なお、曲線下面積の表示法は、例としてGlucoseの場合、Glucose AUC<sub>0-120min</sub>とした。

血中乳酸濃度測定、心拍数測定および歩数測定

第2章と同じ方法で行った。

統計解析

結果は、平均 $\pm$ 標準偏差(SD)で示した。統計解析は Paired t-test、One way repeated measures ANOVA および Two way repeated measures ANOVA(Graphpad Prism software5)を用い、有意差( $p < 0.05$ )が認められた場合は Post hoc test として Bonferroni's Multiple Comparison Test を行った。

## 結果

Fig10、Fig11 に示す結果は、運動開始時間を 0 分とし、OGTT 開始時は-30 分と表記した。なお、運動を行わない OGTT 群は、OGTT 開始後 30 分を 0 分とした。

血清グルコース濃度(Glucose)は、OGTT 群では 0 分で最高値を示しその後は緩やかに低下、60 分では負荷前の値に戻った。OGTT+13Ex 群では、Glucose は 0 分で最高値を示したが、運動後は急激に低下し運動開始 10 分、20 分において OGTT 群と比較して有意な低下が認められた。Fast+13Ex 群では変動は認められなかった。また、Glucose AUC は OGTT 群と比較して Fast+13Ex 群において有意に低い値であった。[Fig10-A, B]

血清インスリン濃度(Insulin)は、OGTT 群では 0 分で最高値を示し、90 分まで緩やかに低下した。また OGTT+13Ex 群では、0 分に最高値を示し OGTT 群と比較して運動開始 10 分で有意に低下し、その後は低値を推移した。Fast+13Ex 群では運動開始後も変動は認められず-10 分 - 20 分の間、OGTT 群より有意に低値を示した。また各群間の Insulin AUC に有意な差は認められなかった。[Fig10-C, D]

血清遊離脂肪酸濃度(NEFA)は、OGTT 群では-10 分(糖の経口給与後 20 分)で有意に低下し、30 分(糖給与後 60 分)まで低値を示した。また、60 分(糖給与 90 分)、90 分(糖給与 120 分)では上昇したが、糖

給与前値までは回復しなかった。しかし OGTT+13Ex 群では、10 分(糖  
給与後 40 分)まで低下したものの、運動開始 20 分より上昇し始め、  
運動開始 60 分では OGTT のみと比較して有意に高い値を示した。  
また、Fast+13Ex 群では、OGTT 群と比較して-10 分以降全ての観察  
時間で有意に高い値を示した。また、NEFA AUC は、OGTT 群と比  
較して運動群で有意な上昇が認められた。[Fig10-E, F]

血清クレアチンキナーゼ濃度(CK)は、群間全ての観察時間で有意  
差は認められなかった。また CK AUC では、OGTT 群と比較して  
Fast+13Ex 群で有意な上昇が認められた。[Fig11-G, H]

血清乳酸デヒドロゲナーゼ濃度(LDH)は、群間全ての観察時間で  
有意差は認められなかった。また、CK AUC においては、OGTT 群  
と比較して、運動群では有意な上昇が認められた。[Fig11-I, J]

血清乳酸濃度(LA)は、群間全ての観察時間で有意差は認められな  
かったが、LA AUC 共に運動群で上昇傾向にあった。[Fig12-K, L]

心拍数は、有意差は認められなかったものの運動後上昇傾向が認  
められた。また、各群間に差は認められなかった。

歩数も各運動群間に有意差は認められず、ほぼ同等の値を示した。  
[Fig12-M, N]

## 考 察

第3章より、糖尿病犬に対する運動実施は血糖コントロールの改善に寄与することが明らかとなった。しかし、運動による血糖変動はそのときの血糖値やインスリン投与だけでなく、食事内容や食事時間によっても低血糖や消化吸收遅延など、様々な弊害を引き起こすことが報告されている【56】。これは、犬の糖尿病管理を行ううえで欠かせない食事療法が血糖コントロールを調節すると同時に、運動効果を決定づける重要な因子であることを示している。そこで本章では、食事と運動の関係性を明らかにすることを目的とした。本節では、消化吸收の影響を受けず、短時間で糖脂質代謝の影響を検討できる OGTT を健常犬に行い、運動実施時の糖脂質代謝にどのような影響を及ぼすか検討した。

結果より、運動強度を示す HR および LA は共に運動中または運動後上昇しており設定した強度での運動がきちんと行えていると考えられた。

OGTT+13 Ex 群は、運動開始直後 Glucose および Ins は急激に低下した。これは、運動開始初期における活動筋での糖利用亢進と運動開始時点での血中インスリン濃度が上昇していることが合わさった作用であると考えられた。一方、Fast+13 Ex 群では Glucose に変動は認められなかった。これは、交感神経の賦活に伴うカテコールアミンの放出亢進や肝臓での糖新生を抑制するインスリン分泌が減少

しているためであると考えられた【46】。

NEFA は、糖給与群と比較して Fast+13Ex 群では著しい上昇を示しており、エネルギー源として脂肪の利用が最も促進されたと考えられた。一方、糖給与群では給与後すぐに血中濃度の低下が認められ、摂取した糖がエネルギー源として第一に利用されていること、またインスリン分泌亢進に伴う脂肪分解抑制が生じている可能性が示唆された。しかし OGTT+13 Ex 群では、運動開始 20 分より OGTT 群と比較して NEFA の上昇が認められた。これは、肝臓や筋肉に保存していたグリコーゲンが枯渇し、体脂肪をエネルギー源として使用し始めたため、NEFA が上昇したと考えられた。

CK、LDH は、観察時間全ての群で有意な変動は認められなかったが、CK AUC では OGTT 群と比較して Fast+13Ex 群で有意な上昇がみられ、LDH AUC は OGTT 群と比較して Fast+13Ex 群と OGTT+13Ex 群で有意に上昇した。CK、LDH は主に心臓、筋肉に含まれており、運動時や細胞破壊時に血液中に漏れ出てくる酵素である【9, 54, 55】。そのため日々の生活や個体差に大きく影響を受けるため日内変動にバラツキが生じる。本結果においても、糖給与前 (-30min) の値にバラツキが生じた。しかし、変化量の比較において有意差は認められなかったことから、今回行った運動刺激は CK、LDH の血中変動に大きな影響を及ぼすほどの運動強度ではなかつ



たとえられた。

これらの結果より、食後の高血糖および高インスリン分泌時の運動実施は、骨格筋への糖取り込みとインスリン作用とが合わさり血糖値を低下させることが分った。これは、インスリン治療により血中インスリン動態やグルコース濃度が大きく変動する糖尿病犬に対する運動実施が、高血糖もしくは低血糖などの代謝異常をより引き起こす可能性を示唆している。

しかし、これらの結果はあくまで糖質のみを摂取した場合の変動であり、通常 of 食物摂取時に同様の変化が起こるかは不明である。そこで次節では、食物摂取後の運動が糖脂質代謝にどのような影響を及ぼすか検討した。

## 第2節 健常犬に対する食後経過時間の異なる運動実施が

### 運動時の糖脂質代謝に与える影響

#### 緒言

前節より、Glucose が高値を示す時間帯での運動は血糖値の急激な低下や脂肪分解抑制に繋がることが明らかとなった。これは、Glucose の急激な上昇により分泌されたインスリン作用と、活動筋での糖利用亢進とが合わさった結果であり、両者が高値を示す時間帯での運動実施は避けるべきであると考えられる。しかし、これらの結果はあくまで糖質のみを摂取した場合での変動であり、実際の食事内容に基づくものではない。ヒトでは、運動実施は食後の過血糖を抑制する手段として推奨されており、特に有酸素運動を実施すると、活動筋でのグルコース取り込みや血流量の増加によるクリアランスの亢進により、血中グルコース濃度の速やかな低下が認められることが報告されている【14, 46】。このように食後における有酸素運動は、血中グルコース濃度をコントロールする上で有用である一方で、運動中または運動終了後には血中グルコース濃度の低下や急激な増加(リバウンド現象)が認められ、食事時間や内容によっては消化吸収不良を生じることも確認されている【12, 13, 14】。犬では、食後に狩を行った猟犬において低血糖と思われる意識障害が報告されているが、

その詳細は不明である。

そこで本節では、健常犬に対し糖質、蛋白質、脂質を総合的に含む総合栄養食を給与し、食後の異なる経過時間に運動を行う事で、その後の血糖値、Insulin、NEFA、CK、LDH、LA、心拍数および歩数変動を測定し、比較検討した。なお、運動強度は第 1 節と同様、時速 13 km/h と設定した。

## 材料と方法

### 供試動物

第 4 章 第 1 節と同じ【Table. 4】。

### 試験プロトコル

試験条件は、食後1時間に30分間の運動を行った群(FED1h)、食後2時間に30分間の運動を行った群(FED2h)、食後3時間に30分間の運動を行った群(FED3h)、食後4時間に30分間の運動を行った群(FED4h)および食後5時間に30分間の運動を行った群(FED5h)の5条件とした。なお、運動試験は1日1試験とし、時間的影響がないようその順序はランダムに行った。なお、試験後は3日間の間隔を設け、次試験とした。

血液サンプル採取は、空腹時(Pre)、運動開始 30 分前(-30)、運動開始直前(0)、

運動開始 10 分、20 分、30 分、60 分、90 分、120 分、240 分、360 分、480 分の計 12 ポイント行い、30 分間の運動中は 10 分毎に血液サンプルを頸静脈より採取した。

## フード

フードは総合栄養食であるセレクトスキンケア(ROYAL CANIN JAPON, Inc)を用いた。給与量は各供試動物の体重から算出した安静時代謝エネルギー要求量(RER:体重<sup>0.75</sup>×70kcal)と一日当たりの必要カロリー要求量(DER:RER×1.6kcal)をもとに決定した。各運動試験のフード量は全て統一し、運動試験当日は AM 8:00 に食事を給与(ドライの形状のまま)した。なお、運動開始 30 分前から運動終了後までの飲水は控え、その後は自由飲水とした。

## 運動方法

運動機器には犬用トレッドミル(PR730, PETRUN)を用いた。予め、全ての供試動物はトレッドミルを用いたトレーニングを行い、問題なく走行できることを確認した。運動試験は、有酸素運動として時速 13 km/h の速さで 30 分間行った。

## 測定項目および測定方法

測定項目は、Glucose、Ins、NEFA、CK、LDH、LA、心拍数および歩

数とした。第 1 節と同様、Glucose、NEFA、CK および LDH は酵素法により自動生化学分析装置にて測定し、Ins は酵素免疫定法にて市販のインスリン測定キットを用いて測定した。

血中乳酸濃度測定、心拍数測定および歩数測定

第 2 章と同じ

統計解析

結果は、平均±標準偏差(SD)で示した。統計解析は Paired t-test、One way repeated measures ANOVA および Two way repeated measures ANOVA(Graphpad Prism software5)を用い、有意差( $p<0.05$ )が認められた場合は Post hoc test として Bonferroni's Multiple Comparison Test を行った。

## 結果

運動開始直前の Glucose は、FED1h 群が平均  $117\pm 10$  mg/dL、FED2h 群が  $125\pm 5$  mg/dL、FED3h 群が  $104\pm 8$  mg/dL、FED4h 群が  $102\pm 9$  mg/dL および FED5h 群が  $97\pm 3$  mg/dL となり、FED2h 群が最高値を示した【Fig13-A】。また FED1h、2h、3h および 4h 群では、運動開

始 10 分で Glucose は低下した。その変化量は FED1h 群で  $-18 \pm 16$  mg/dL、FED2h 群で  $-49 \pm 7$  mg/dL、FED3h 群で  $-24 \pm 5$  mg/dL、FED4h 群で  $-27 \pm 31$  mg/dL および FED5h 群で  $-5 \pm 13$  mg/dL となり、FED2h 群で最も大きくなった。その後、運動開始 20 分では、FED1h、2h、3h および 4h 群は、運動開始 10 分で低下した Glucose は上昇し、その変化量は FED1h 群で  $14 \pm 13$  mg/L、FED2h 群で  $32 \pm 20$  mg/dL、FED3h 群で  $14 \pm 13$  mg/dL、FED4h 群で  $24 \pm 23$  mg/dL および FED5h 群で  $8 \pm 14$  mg/dL となり、FED2h 群で最も大きくなった。また、FED1h 群と FED2h 群では運動終了後 60-120 分にかけて Glucose の上昇が続いた。FED5h 群では運動前後の変動は認められなかった。Glucose AUC は、FED5h 群と比較して FED1h 群、FED2h 群で有意に高値を示した【Fig13-B】。

運動開始直前の Insulin は、FED1h 群が平均  $1.92 \pm 1.02$  ng/dL、FED2h 群が  $3.04 \pm 0.82$  ng/dL、FED3h 群が  $2.39 \pm 1.32$  ng/dL、FED4h 群が  $1.97 \pm 1.34$  ng/dL および FED5h 群が  $1.34 \pm 0.6$  ng/dL であった【Fig13-C】。また FED1h、2h、3h および 4h 群では、運動開始 10 分で Insulin は低下し、その変化量は FED1h 群で  $-0.74 \pm 0.15$  ng/dL、FED2h 群で  $-1.88 \pm 0.55$  ng/dL、FED3h 群で  $-1.26 \pm 1.1$  ng/dL、FED4h 群で  $-0.84 \pm 0.88$  ng/dL および FED5h 群で  $-0.24 \pm 0.26$  ng/dL となり、FED2h 群で最も大きくなった。その後 FED1h 群、FED2h 群の Insulin

は運動後 30 分-210 分まで高い値を示した。また、FED5h 群では運動前後の変動は認められなかった。Insulin AUC は、5 群間で有意差は認められなかったものの FED1h 群、FED2h 群は他の群と比較して高い傾向にあった【Fig13-D】。

NEFA は、全ての群で運動開始 10 分より上昇し始め 30 分後(運動終了時)には最高値を示し、その後低下した。しかし FED3h 群、FED4h 群および FED5h 群では、運動後 60 分より再び上昇し始め、90 分後には FED1h 群、FED2h 群と比較して FED4h 群、FED5h 群では有意に高値を示した【Fig13-E】。NEFA AUC では、 $P=0.0229$ (Two-way repeated measures ANOVA)と有意な変動が認められたが、各群間に差は認められなかった【Fig13-F】。

CK、LDH は、各群間で有意差は認められなかった。また CK AUC、LDH AUC においても有意差は認められなかった【Fig14-G, H, I, J】。

LA は、全ての群で運動開始 10 分より上昇し始め、運動終了後低下するといった変動を示した。また、各群間に差は認められず、LA AUC においても有意差は認められなかった【Fig15-K, L】。

心拍数は運動後上昇し、各群間に差は認められなかった。また、歩数においても各群間に差は認められなかった【Fig15-M, N】。

## 考察

運動強度を示す心拍数、血中乳酸濃度は共に全ての群で運動中または運動後上昇しており各群間に有意差は認められなかった。また、歩数変動においても各群間に有意差は認められなかった。このことから、本実験で行った運動は全ての群において同程度の運動量かつ運動負荷であったと考えられた。

Glucose は、FED1h、2h、3h および 4h 群では運動開始 10 分で低下し、血糖値が 60 mg/dL 以下の低値を示した個体も存在した。また、この変化量は、FED2h 群が最も大きく、 $-49 \pm 7.87$  mg/dL、次いで FED4h 群が  $-27.5 \pm 31.5$  mg/dL、FED3h 群が  $-24.75 \pm 5.73$  mg/dL、FED1h 群が  $-18 \pm 16.9$  mg/dL および FED5h 群が  $-5.75 \pm 13.5$  mg/dL の順となった。また FED1h、2h、3h および 4h 群では Glucose の低下後、反動的に上昇が認められた。これはヒトで言うリバウンド現象と同じものと考えられた【12, 13, 14】。また、この大きさは FED2h 群が最も大きく、 $32.7 \pm 20.2$  mg/dL、次いで FED4h 群が  $24.2 \pm 23.6$  mg/dL、FED3h 群が  $14.7 \pm 13.9$  mg/dL、FED1h 群が  $14.5 \pm 13.5$  mg/L および FED5h 群が  $8 \pm 14.2$  mg/dL の順となり、運動開始 10 分で Glucose が低下した変化量が大きいほどリバウンド現象は大きくなった。これら両者の反応は、運動開始直前の高い Glucose に対する Ins 分泌増加に起因しており、インスリン作用と骨格筋への糖取り込み作用と



が合わさり、Glucose が下がることでインスリン拮抗ホルモンの分泌が促進され、Glucose の上昇に繋がった可能性が考えられた【46】。

しかし、本実験ではアドレナリンや成長ホルモンなどのインスリン拮抗ホルモンの測定を行っていないため、確認は出来ていない。さらに FED1h、2h 群では、運動後 2 時間にかけて Glucose、Insulin の上昇と NEFA の低下が認められた。これらの変動は、運動終了後も消化吸収が続いていることを意味している。通常、食直後は消化作用のため血液が胃に集中する【5】。しかし食後すぐに運動を行うと、胃にいかなくてはならない血液のほとんどが骨格筋へ運ばれ利用されるため、消化吸収がうまくいかず、嘔吐などの消化器症状や胃痛、腹痛などの症状をきたすことが知られている【5】。そのためヒトでは、消化吸収時間を考慮し食後 1-1.5 時間は運動実施を避けるべきであると報告されている。本実験結果より運動中、嘔吐などの明らかな消化器症状は認められなかったが、Glucose、Insulin および NEFA の血中変動より、FED1h、2h 群では消化吸収遅延が生じている可能性が示され、犬では食後 2 時間以降の運動実施が適切な運動時間であると考えられた。

CK, LDH は全ての運動条件で変動は認められなかったことから、今回行った運動刺激は CK, LDH を上昇させるほどの運動負荷ではないと考えられた。

これらの結果より、食後 1-4 時間経過後の運動は血糖値の低下を引き起こすこと、また食後 1-2 時間経過後の運動では、運動後も Glucose、Insulin および NEFA の上昇が認められ、摂取した食物の消化吸収が続いていることが示され、これらの時間帯での運動実施は運動パフォーマンスの抑制に繋がることが明らかとなった。しかし、食後 5 時間経過後の運動では、運動開始前のグルコースおよびインスリン濃度変動は小さく、血糖値の低下も認められなかったことから、安全な運動実施時間であると考えられた。

### 第3節 糖尿病犬に対する食後経過時間の異なる運動実施が

#### 運動時の糖脂質代謝に与える影響

##### 緒言

インスリン治療を必須とする1型糖尿病患者は、運動に伴う低血糖などの代謝の乱れが起こる危険性が高く、そのため運動内容に合わせたインスリン量の調節や運動時間の調整、運動中の捕食など運動パフォーマンス向上のため様々な対策がなされている。しかし、1型糖尿病患者では、運動を実施する最適な時間帯については様々な意見があり、早朝空腹時に運動を行うことが最も低血糖が少ないとの報告もあれば、【51】、朝食後に行うことで食後の血糖コントロールが改善するとの報告もある【71】。運動による血糖の変化はそのときの血糖値やインスリン投与などに影響を受けるため、糖尿病犬における運動による血糖変化への影響を把握し食物摂取やインスリン療法との関係性を知る必要があると考えられる。

前節より、経口糖負荷試験後の血糖値およびインスリン濃度が共に高値を示す時間帯もしくは、食後1-4時間経過後での運動は、血糖値の急激な低下やリバウンド現象および消化吸收遅延を引き起こす可能性があることが分かった。これは、インスリン治療により血中グルコース濃度やインスリン動態が大きく変動する糖尿病犬に対して運動実施が高血糖や低血糖などの代謝異常をより引き起こす可能性を示している。

そこで本研究では、健常犬で得られた結果を元に食後 5 時間以降の運動として、食後 6 時間後の 30 分間の運動と食後 8 時間後の 30 分間の運動が糖尿病犬の糖代謝に及ぼす影響を検討した。なお、運動強度は第 2 章の結果を元に、血中乳酸濃度が上昇しない時速の中でも最も低速度である時速 6 km/h と設定した。

## 材料と方法

### 供試動物

日本獣医生命科学大学 獣医学部 獣医保健看護学科 看護臨床部門で飼育されているインスリン依存性糖尿病犬 2 頭(Dog1:8 歳齢 避妊雌、Dog2:5 歳齢 去勢雄)を実験に使用した【Table. 5】。

### 試験プロトコル

運動機器には犬用トレッドミル(PR730, PETRUN)を用いた。予め、全ての供試動物はトレッドミルを用いたトレーニングを行い、問題なく走行できることを確認した。

試験条件は、運動を行わず食事給与のみの群(Control)、食後6時間に30分間の運動を行った群(FED 6h)および食後8時間後に30分間の運動を行った群(FED 8h)の3条件で行った。また、運動試験は1日1試験とし、時間的影響がないようその順

序はランダムに行った。なお、試験後は3日間の間隔を設け、次試験とした。

運動試験は時速 6 km/h のスピード下で 30 分間の歩行運動を行い、各運動時間 2 回ずつ行いその平均値を算出した。

## フード

フードは総合栄養食であるセレクトプロテイン (ROYAL CANIN JAPON, Inc) を各供試動物の体重から算出した基礎代謝エネルギー要求量 (RER:  $\text{体重}^{0.75} \times 70 \text{kcal}$ ) と一日当たりの必要カロリー要求量 (DER:  $\text{RER} \times 2.0 \text{kcal}$ ) をもとに決定し、1 日 2 回 (8:00 および 20:00) 給与した。

## インスリン

インスリン製剤は、中間作用型インスリンである NPH インスリン (販売名：ノボリン N 注 100, ノボノルディスクファーマ株式会社, 東京) を用い、食後に 1 日 2 回、8:00 および 20:00 に頸部に皮下投与した。インスリン投与量は、Dog1 が 0.54 IU/kg/day、Dog2 が 0.71 IU/kg/day であり、実験期間中のインスリン投与量の変更は行わなかった。

## サンプル採取

血液サンプル採取は、食事およびインスリン投与前 (空腹時) を 0hr とし、その後は運動条件ごとに血液サンプル採取時間を設定 (FED 6h : 0, 2, 4, 6, 6.5, 7, 8, 10,

12時間、FED 8h : 0, 2, 4, 6, 8, 8.5, 9, 10, 12時間)し、頸静脈より血液を採取した。得られた血液サンプルは直ちに真空採血管に分注したのち室温保存下にて凝固させ、その後3,500 rpm、10分で遠心分離し、測定まで-80 °Cにて冷凍保存した。

#### 測定項目と測定法

第4章 2節と同じ方法で行った。

### 結果

FED6h 群では、血清グルコース濃度(Glucose)はコントロール群と比較して Dog1、Dog2 共に運動後低下した。また、運動開始直前と比較して Dog1 では 77 mg/dL、Dog2 では 181 mg/dL の低下が認められた。また Dog2 では、運動後 1.5-3.5 時間まで Glucose の上昇が認められた【Fig16-A, B】。

血清インスリン濃度(Insulin)は Dog1 および Dog2 共に運動後上昇し、その後低下した【Fig16-C, D】。

血清遊離脂肪酸濃度(NEFA)は Dog1 および Dog2 共に運動開始 30 分で上昇し、Dog 1 ではその後すぐさま低下した後、運動後 1 時間から上昇した。Dog 2 では運動開始 30 分後から 6 時間後(食後 12 時間)まで上昇した【Fig16-E, F】。

血清クレアチンキナーゼ濃度(CK)、血清乳酸デヒドロゲナーゼ濃度(LDH)は Dog1 および Dog2 共に運動後上昇する傾向にあった【Fig17-G, H, I, J】。

血中乳酸濃度(LA)は Dog1 では変動は認められなかったが Dog2 では運動後上昇した【Fig17-K, L】。

FED 8h 群においても、Glucose は Dog1 および Dog2 共に運動後低下したが、その低下量は FED 6h 群と比較して小さく、運動開始直前と比較して Dog1 では 54 mg/dL、Dog2 では 77 mg/dL の低下が認められた【Fig18-A, B】。

Insulin は、Dog1 では変動は認められなかったが、Dog2 では運動後上昇した後、低下しコントロール群と比較して低値を示した【Fig18-C, D】。

NEFA は、Dog1 では運動後上昇したが、Dog2 では変動は認められなかった【Fig18-E, F】。

CK、LDH は、Dog1 では運動後低下したが、Dog2 では運動後上昇した【Fig19-G, H, I, J】。

LA は、Dog1 では変動は認められなかったが Dog2 では運動後上昇した【Fig19-K, L】。

両運動時間を通して、心拍数は Dog1 および Dog2 共に運動後上昇しており、Dog1 では  $94 \pm 13.9$  回/分、Dog2 では  $108 \pm 10.4$  回/分とな

り、両者において低強度の運動であったと考えられた。また、歩数に差は認められなかったが、両群とも Dog2 で上昇傾向にあった【Fig20-A, B】。

## 考察

前節より、健常犬に対する食後 1-4 時間での運動は血糖値の急激な低下や消化吸収遅延を引き起こすことが明らかとなった。しかし、食後 5 時間を経過すると、血中グルコース、インスリン濃度共に変動が少なくなり、血糖値の低下や消化吸収遅延は認められなかった。このことから、食後に運動を行う際は、これらのリスクを考慮し、食後 5 時間以降に行うことが最も効果的であることが示唆された。

そこで本節では、前節より得られた結果を元に糖尿病犬に対し、食後 5 時間以降の運動として、FED 6h 運動および FED 8h 運動の 2 条件下で運動を実施し、運動中の糖脂質代謝にどのような影響が認められるか検討した。

結果より、FED 6h 運動では、Dog 1 および Dog 2 共に血糖値の低下を引き起こした。またその低下率は Dog 2 でより大きく、運動後の明らかなリバウンド現象が確認された【12, 13, 14】。健常犬では、食後 5 時間での運動は運動開始直前のグルコース、インスリン濃度



共に変動は少なく血糖値の低下は認められなかった。これは、健常犬では血糖値に反応してインスリン分泌を行うのに対し、糖尿病犬は外部からのインスリン投与により血糖値をコントロールしているためであると考えられた。FED 6h 運動での血中インスリン濃度は運動開始 30 分で両者ともに上昇が認められたことから、運動の刺激は毛細血管密度の増大や循環血液量を増加させ皮下からのインスリン吸収が促進され【35】、血糖値の低下に繋がった可能性が考えられる。また、本実験で使用したインスリンは中間型であり、その作用ピークは 4-6 時間であることから【42】、運動時間とインスリン作用時間とが合わさり、FED 6h 運動でより血糖降下作用が増強されたと考えられた。さらに犬種間では、Dog 2 でより血糖値の低下が認められリバウンド現象も明らかであった。これは Dog 1、Dog 2 の犬種がそれぞれミニチュア・シュナウザーとダックスフンドと体格差があることが影響していると考えられた【42】。運動強度を示す心拍数や血中乳酸濃度は、Dog 1 と比較して Dog 2 ではより上昇しており、運動負荷度の違いがインスリンの効き方に影響を与えている可能性が考えられた。

FED 6h 運動での血中 NEFA 濃度は、Dog 1 および Dog 2 共に運動開始 30 分で上昇しており、運動実施による一時的な脂肪分解亢進が生じたと考えられる。しかし、運動後は両者共にコントロール群よりも

高値を示しており、運動を行ったことによるエネルギー不足が生じた可能性が考えられた。

FED 6h 運動での血中 CK、LDH 濃度は、Dog 1 および Dog 2 共に運動後上昇を示したが、コントロールと比較して大きな差は無かったことから、今回行った運動の筋肉への損傷レベルは低いと考えられた。

FED 8h 運動においても、Dog 1 および Dog 2 共に血糖値の低下を引き起こしたが、FED 6h 運動と比較してその低下量は小さかった。FED 8h 運動は、NPH インスリンの作用ピーク時間を過ぎ、血糖値が上昇し始める時間帯である。運動開始直前の血中インスリン濃度はインスリン投与前の値と同等であった。また、Dog 1 では運動による上昇は認められず、Dog 2 では、運動後上昇したが、その後すぐに低下し、食後 10-12 時間では測定下限値にまで低下した。このことより、FED 8h 運動時では体内に残っているインスリン量は極めて少なく、血糖値の大きな低下は認められないと考えられた。

FED8h 運動での血中 NEFA 濃度は、FED 6h 運動と比較して上昇は小さく、Dog 2 では運動後、コントロール群と比較して低下した。Dog 2 では、運動後血中インスリン濃度の上昇が認められており、インスリン作用によるグルコースの取り込みが亢進したために脂肪分解抑制がかかり NEFA の低下に繋がったと考えられた。一方、Dog 1 では血中インスリン濃度の変動は認められなかったものの、血糖値および NEFA 濃度は低下しており、これはインスリンとは別の

AMPK-GLUT4 を介した糖取り込み作用が亢進したためであると考えられた。

FED 8h 運動での血中 CK, LDH 濃度は、FED 6h 運動と同様、Dog 1 および Dog 2 共に運動後上昇を示したが、コントロール群と比較して差は無く、筋肉への損傷レベルは低いと考えられた。

以上の結果より、糖尿病犬に対する運動実施は健常犬と異なり食後 5 時間以降の実施でも血糖値の低下を引き起こすことが明らかとなった。これは、インスリンの作用が大きく影響しており、インスリン作用時間内での運動は、皮下からのインスリン吸収を促進させることが明らかとなった。また、運動実施後の血糖変動やインスリン動態は個体毎に異なることから、体格差や通常の血糖変動等を考慮しなければならないと考えられた。本実験結果は、症例数 2 症例と少ないため、あくまで傾向としか言えない。そのため、今後は共試動物数を増やし再検討が必要である。

## 小括

第1節では、運動実施前の経口糖負荷試験が運動効果に及ぼす影響を検討した。結果より、血中グルコースおよびインスリン濃度の上昇時に運動を行うことは、血中グルコース濃度の低下を引き起こし、低血糖のリスクを増大させることが示唆された。

第2節では、食後開始時間の異なる運動が糖脂質代謝に及ぼす影響を検討した。結果より、FED1h、2h、3h および 4h 群での運動は、血中グルコース濃度の急激な低下を引き起こし、さらに大きく低下した後、反動的に急激な上昇が認められるリバウンド現象を引き起こすことが明らかとなった。また、FED1h、2h 群での運動は、NEFA の上昇が遅延することから、消化吸収遅延を引き起こしている可能性が示唆された。さらに、FED5h 群は、運動開始直前のグルコースおよびインスリン濃度共に変動は小さく、安全な運動時間であることが示唆された。

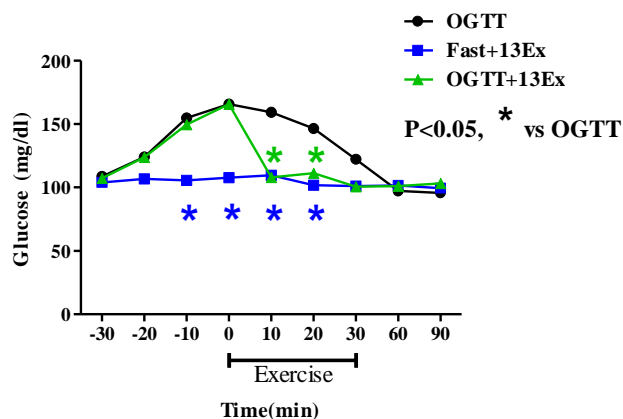
第3節では、糖尿病犬における食後6時間および8時間での運動の影響を調べた結果、健常犬と異なり、6時間でも血糖値の低下が認められた。そのため、糖尿病犬への運動療法は食事だけでなく、皮下から投与しているインスリンの作用にも大きく影響を受けることが明らかとなった。糖尿病犬では、血糖値の低下が小さく、また運動後のエネルギー供給も効率良く行っていたことから、食後8時間での運動が良い運動時間であると考えられた。

**Table. 4** 供試動物プロフィール

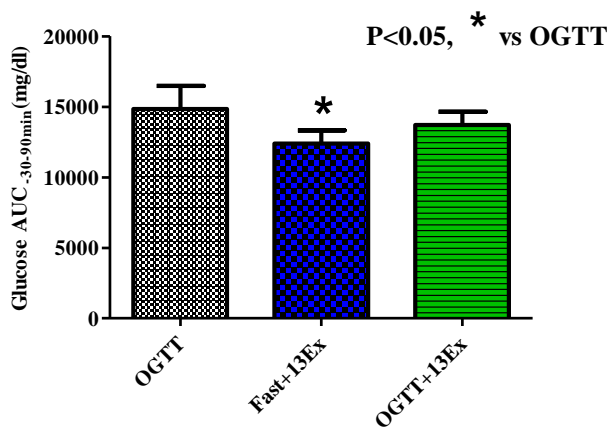
No.	犬種	性別	年齢	体重 (kg)	RER × 1.6 (kcal/day)
1	ビーグル	去勢雄	1	10.9	672
2	ビーグル	去勢雄	1	12.3	736
3	ビーグル	去勢雄	1	12.7	753
4	ビーグル	去勢雄	5	12.26	734

resting energy requirement(RER): 安静時エネルギー要求量

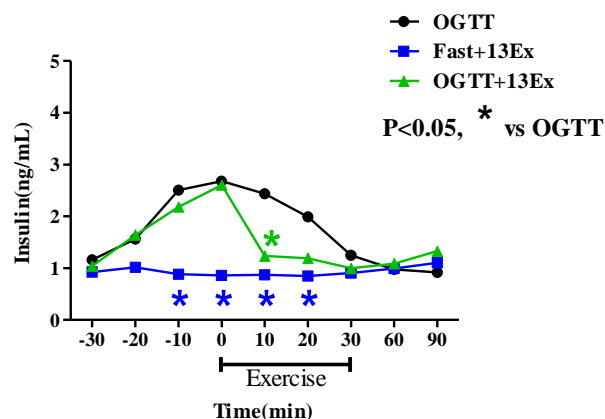
A



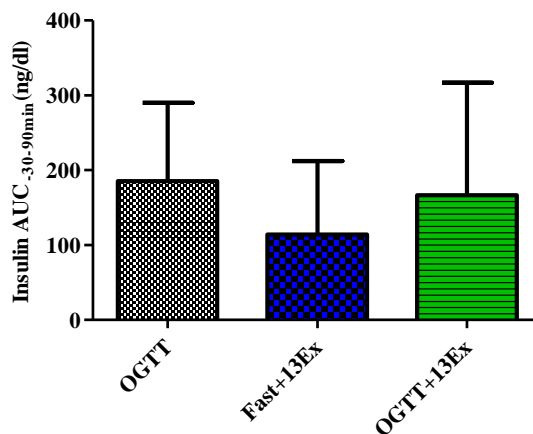
B



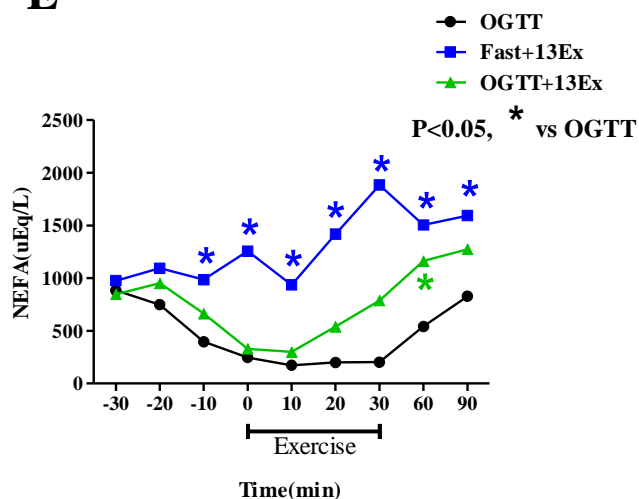
C



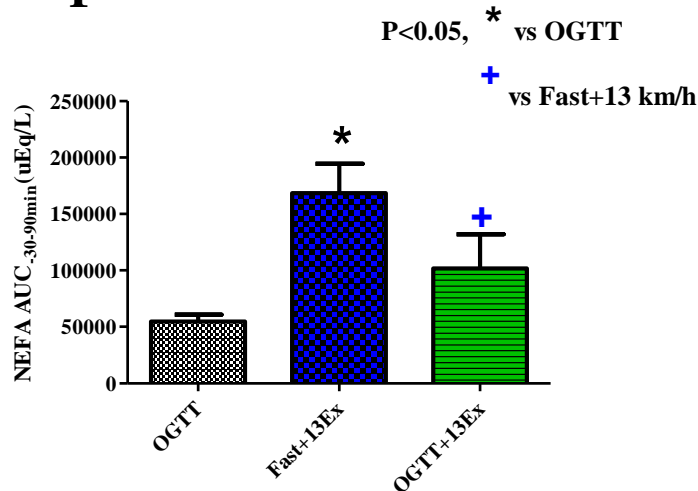
D



E



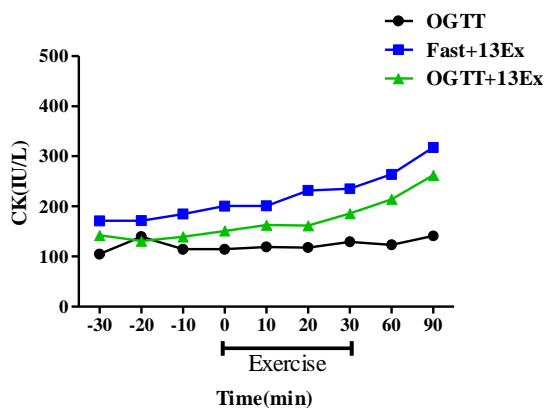
F



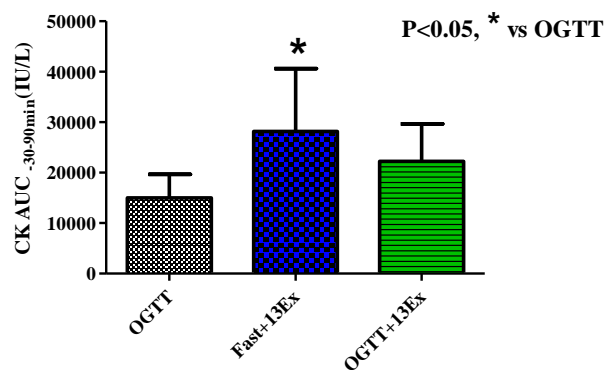
**Fig. 10 糖給与後の運動が健常犬の糖脂質代謝に及ぼす影響 (n=4)**

OGTT、OGTT+運動(時速13 km/h: 以下OGTT+13Ex)および空腹時運動(時速13 km/h: 以下Fast+13Ex)の3条件での血中変動を示す。各項目は、(A)Glucose、(B)Glucose AUC<sub>-30-90min</sub>、(C)Insulin、(D)Insulin AUC<sub>-30-90min</sub>、(E)NEFA、(F)NEFA AUC<sub>-30-90min</sub>であり、有意差( $P < 0.05$ , One way repeated measures ANOVA, Two way repeated measures ANOVA)が認められた場合は、post hoc testとしてBonferroni's Multiple Comparison Testを行った。

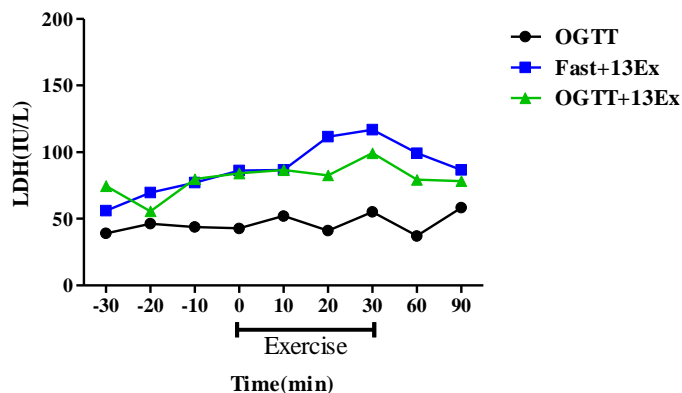
G



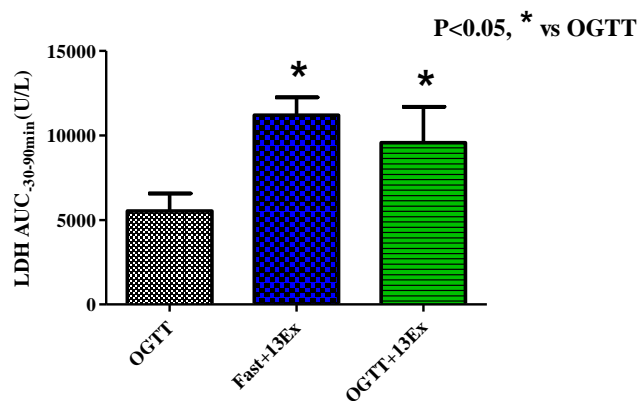
H



I



J

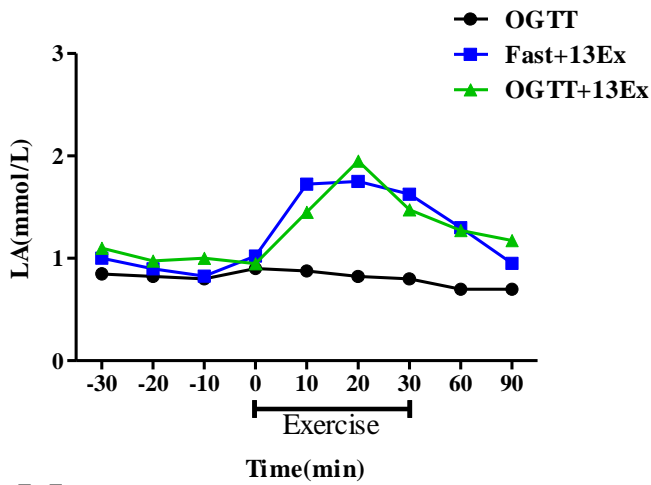


**Fig. 11 糖給与後の運動が健常犬のCK, LDHに及ぼす影響 (n=4)**

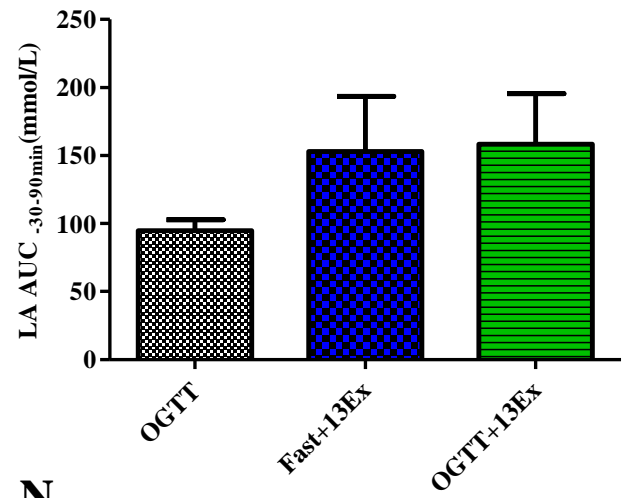
OGTT、OGTT+運動(時速13 km/h: 以下OGTT+13Ex)および空腹時運動(時速13 km/h: 以下Fast+13Ex)の3条件での血中変動を示す。

各項目は、(G)CK、(H)CK AUC\_{-30-90min}、(I)LDH、(J)LDH AUC\_{-30-90min}であり、有意差(P<0.05, One way repeated measures ANOVA, Tow way repeated measures ANOVA) が認められた場合は、post hoc test としてBonferroni's Multiple Comparison Testを行った。

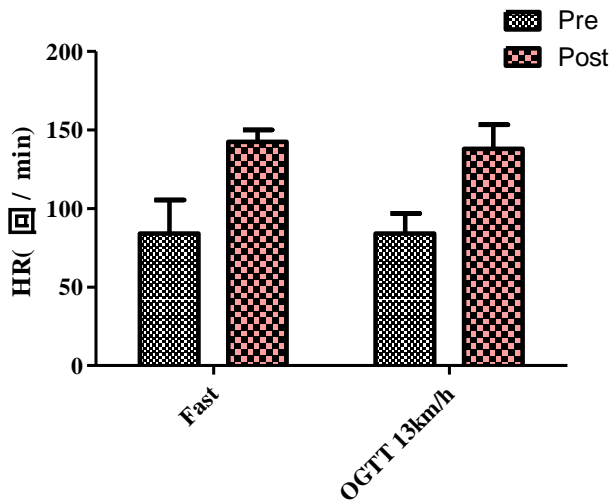
K



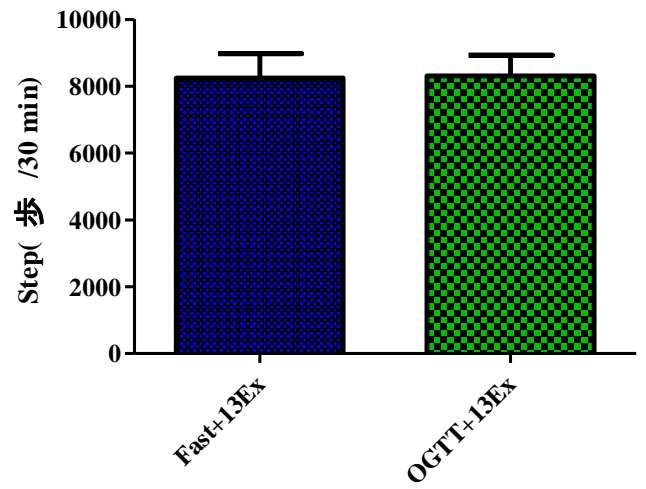
L



M



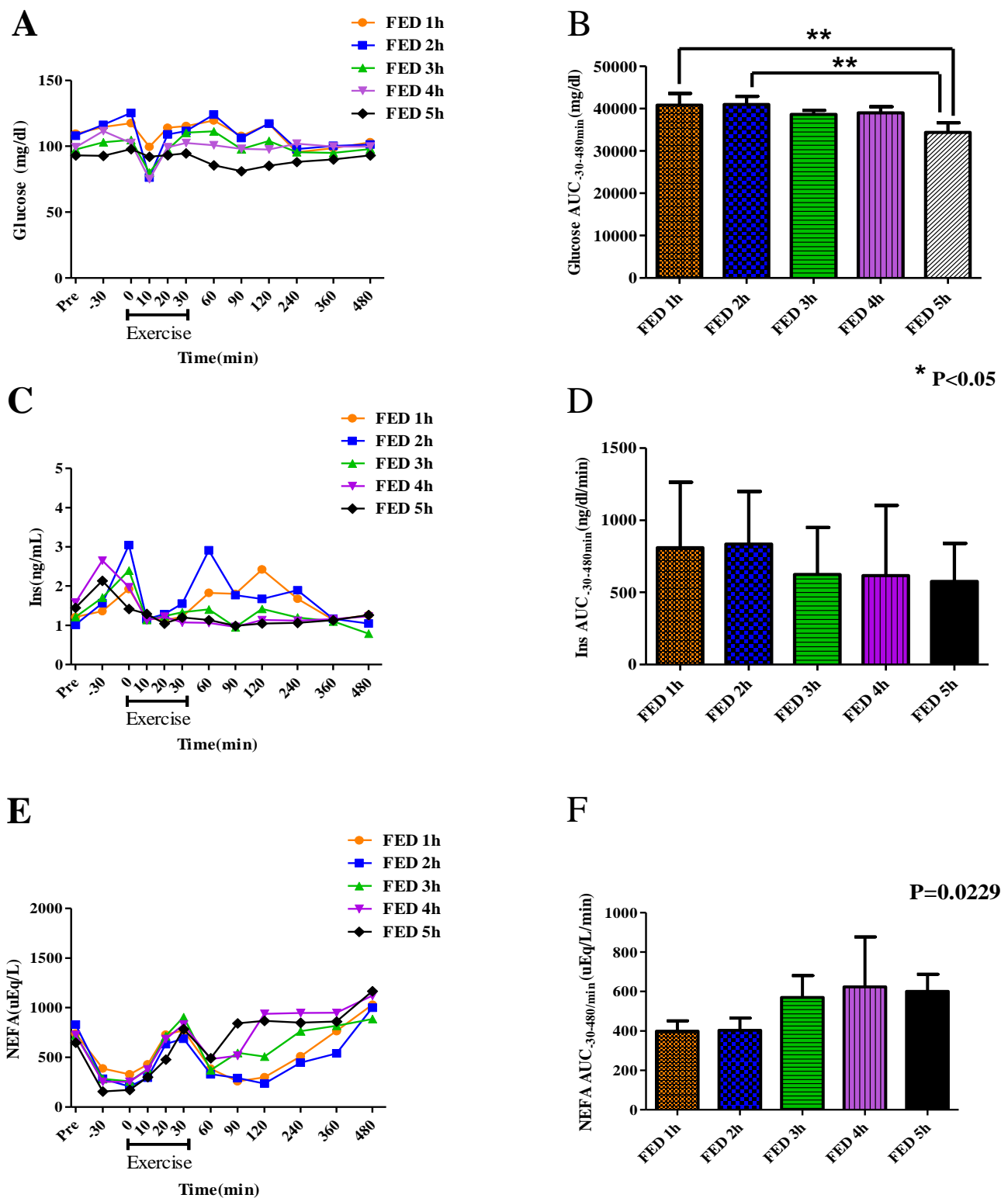
N



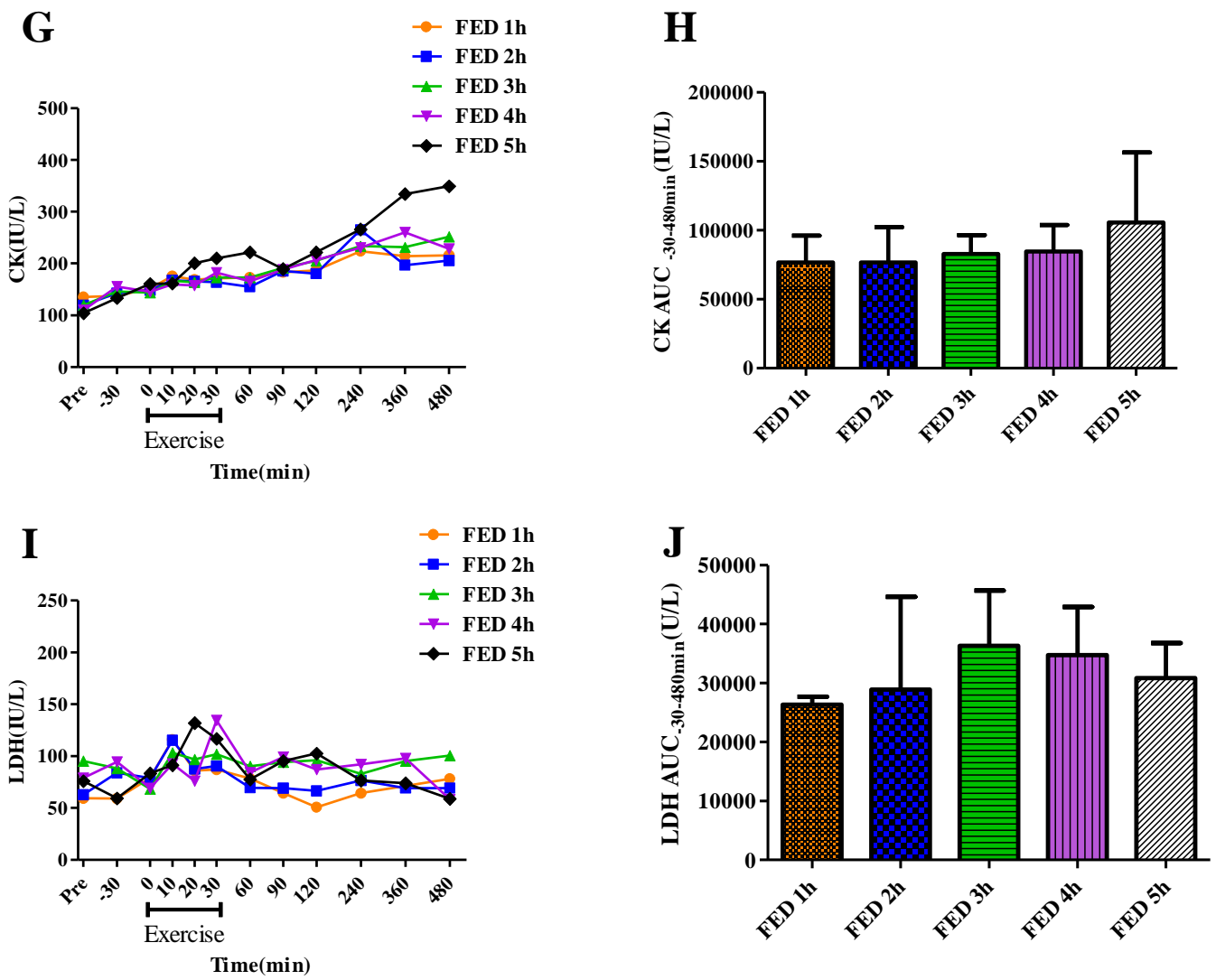
**Fig. 12 糖給与後の運動が健常犬のLA, HR, STEPに及ぼす影響 (n=4)**

OGTT、OGTT+運動(時速13 km/h: 以下OGTT+13Ex)および空腹時運動(時速13 km/h: 以下Fast+13Ex)の3条件での血中変動を示す。各項目は、(K) LA(Lactate acid)変動、(L)LA AUC-30-90min、(M)運動前後における心拍数(Heart Rate: HR)変動(N)歩数(Step)変動を示す。なお、心拍数で示すPreは運動開始直前、Postは運動直後を意味する。



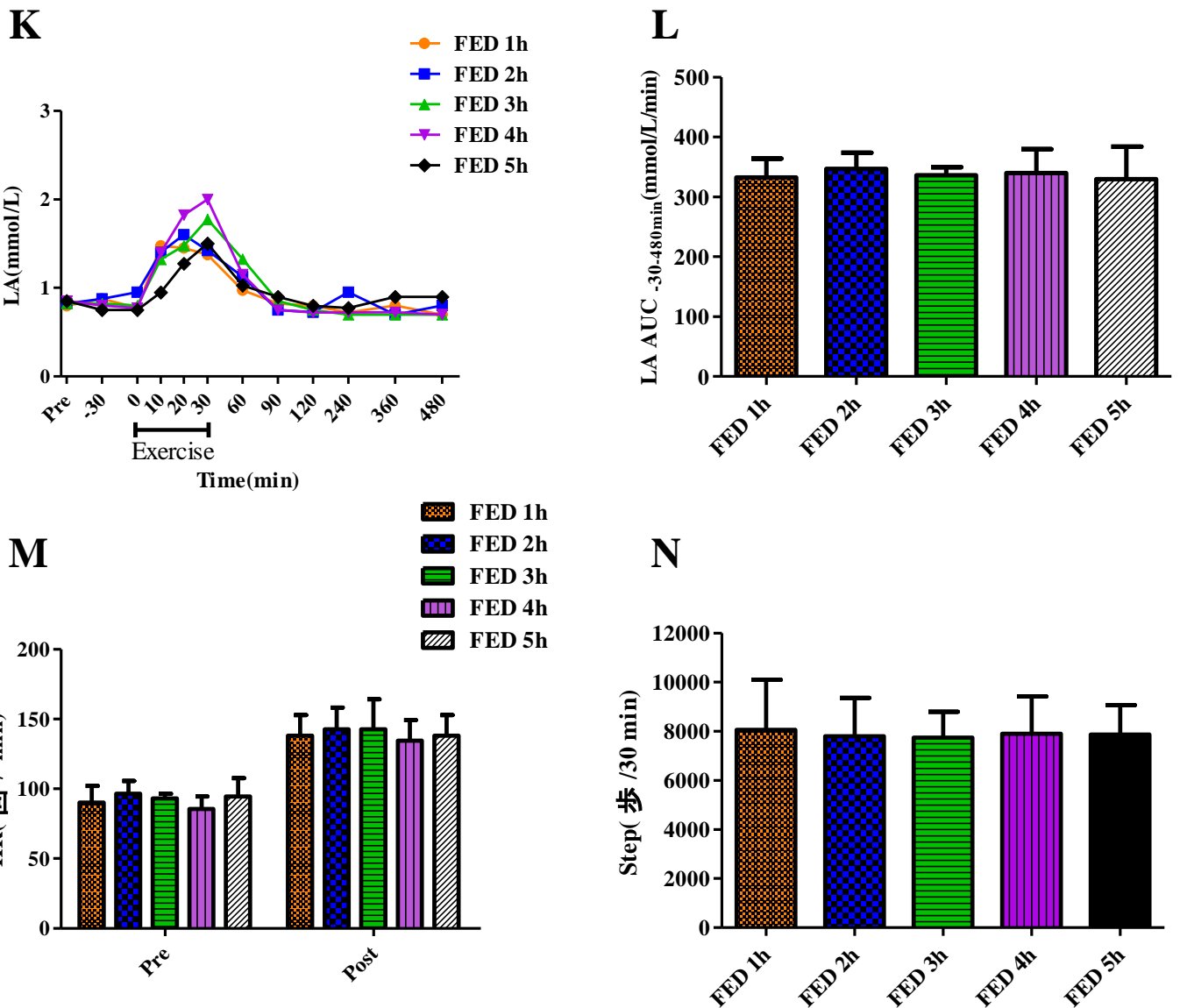


**Fig. 13 食事給与後異なる時間での運動が健常犬の糖脂質代謝に及ぼす影響 (n=4)**  
 食後1時間後に30分間の運動を行った群(FED1h)、食後2時間後群(FED2h)、食後3時間後群(FED3h)、食後4時間後群(FED4h)、食後5時間後群(FED5h)での血中変動を示す。各項目は、(A)Glucose、(B)Glucose AUC<sub>-30-480min</sub>、(C)Insulin、(D)Insulin AUC<sub>-30-480min</sub>、(E)NEFA、(F)NEFA AUC<sub>-30-480min</sub>であり、有意差(P<0.05, One way repeated measures ANOVA)が認められた場合は、post hoc test として Bonferroni's Multiple Comparison Testを行った。



**Fig. 14 食事給与後異なる時間での運動が健常犬のCK, LDHに及ぼす影響 (n=4)**

食後1時間後に30分間の運動を行った群(FED1h)、食後2時間後群(FED2h)、食後3時間後群(FED3h)、食後4時間後群(FED4h)、食後5時間後群(FED5h)の血中変動を示す。各項目は、(G)CK、(H) CK AUC<sub>-30-480min</sub>、(I)LDH、(J) LDH AUC<sub>-30-480min</sub> 変動を示す。



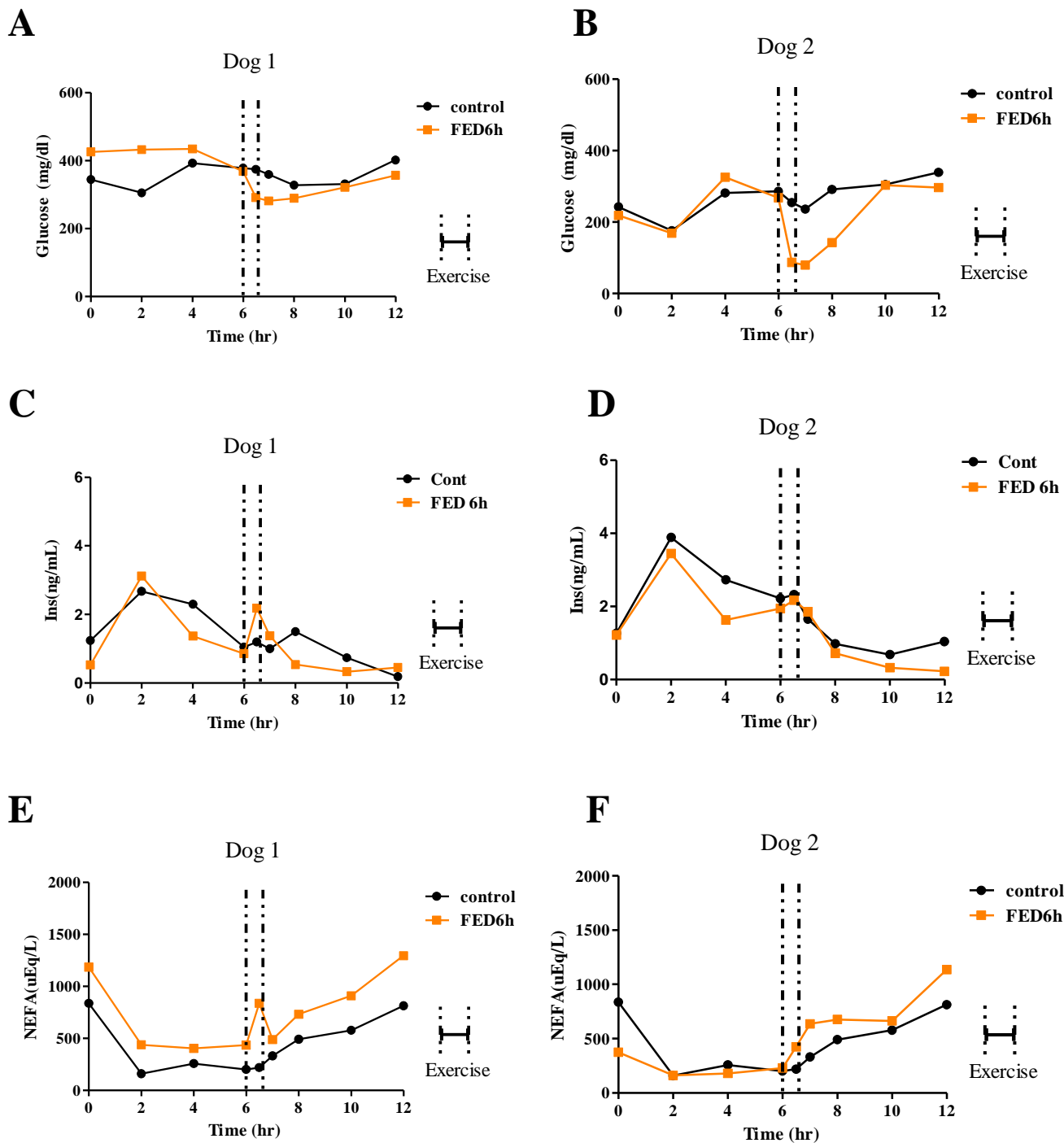
**Fig. 15 食事給与後異なる時間での運動が健常犬のLA, HR, Stepに及ぼす影響 (n=4)**

(食後1時間後に30分間の運動を行った群(FED1h)、食後2時間後群(FED2h)、食後3時間後群(FED3h)、食後4時間後群(FED4h)、食後5時間後群(FED5h)の血中変動を示す。  
各項目は、(K)LA、(L)LA AUC<sub>-30-480min</sub>、(M)心拍数(Heart Rate: HR)、(N)歩数(Step)を示す。  
なお、心拍数で示すPreは運動開始直前、Postは運動直後を意味する。

**Table. 5 供試動物プロフィール**

	犬種	性別	年齢	体重 (kg)	NPH Insulin 投与量 (IU/kg/day)	RER × 2.0 (kcal/day)
Dog1	ミニチュア・シュナウザー	避妊雌	8	6.2	0.54	550
Dog2	ミニチュア・ダックスフント	去勢雄	5	2.8	0.71	303

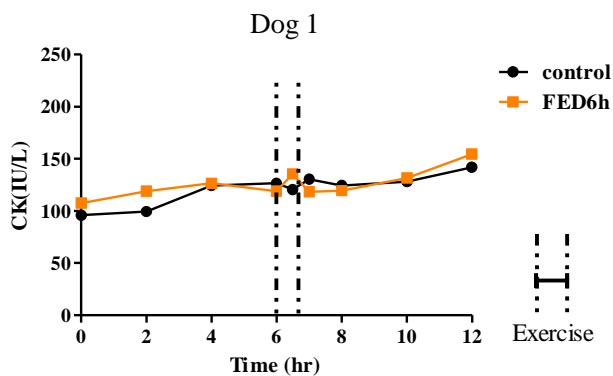
resting energy requirement(RER): 安静時エネルギー要求量



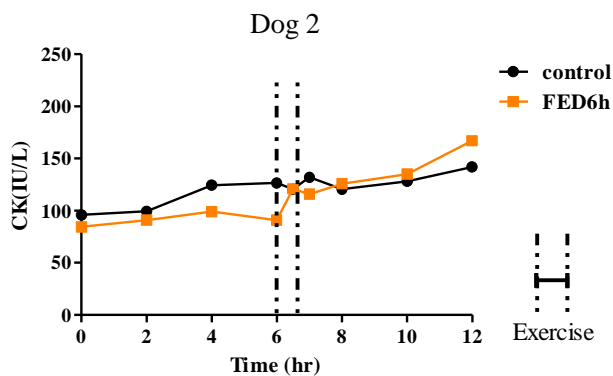
**Fig. 16 食後6時間後の30分間運動が糖尿犬の糖脂質代謝に与える影響**

食事給与試験群(Control)と食後6時間後に30分間の運動を行った群(FED6h)の血中変動を示す。各項目は、(A)Glucose(Dog1)、(B)Glucose(Dog2)、(C)Insulin(Dog1)、(D)Insulin(Dog2)、(E)NEFA(Dog1)、(F)NEFA(Dog2)を示す。なお、点線で囲われた時間帯は運動実施を示している。

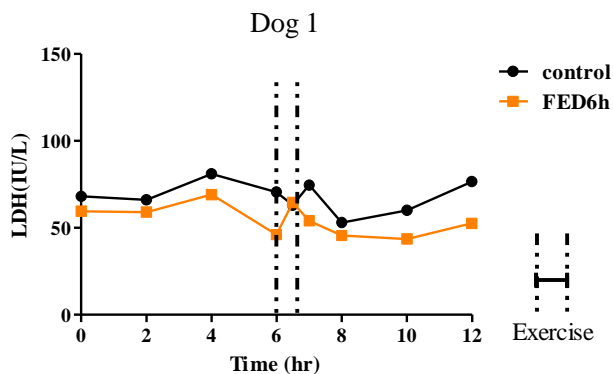
G



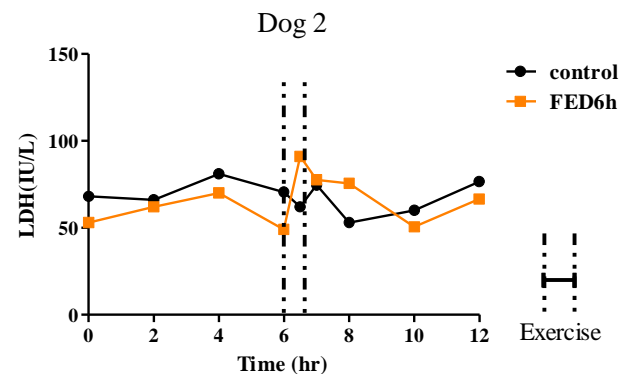
H



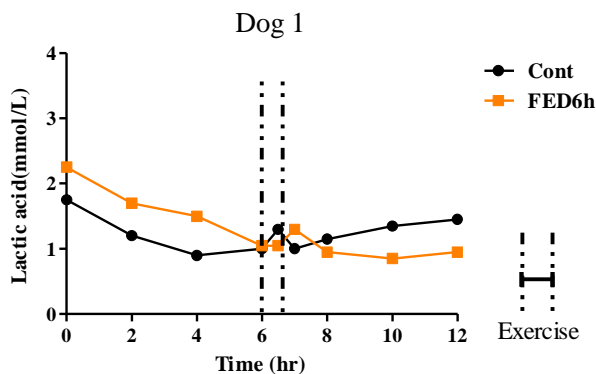
I



J



K



L

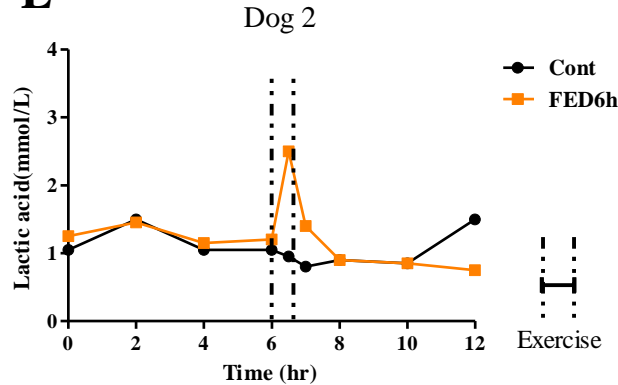
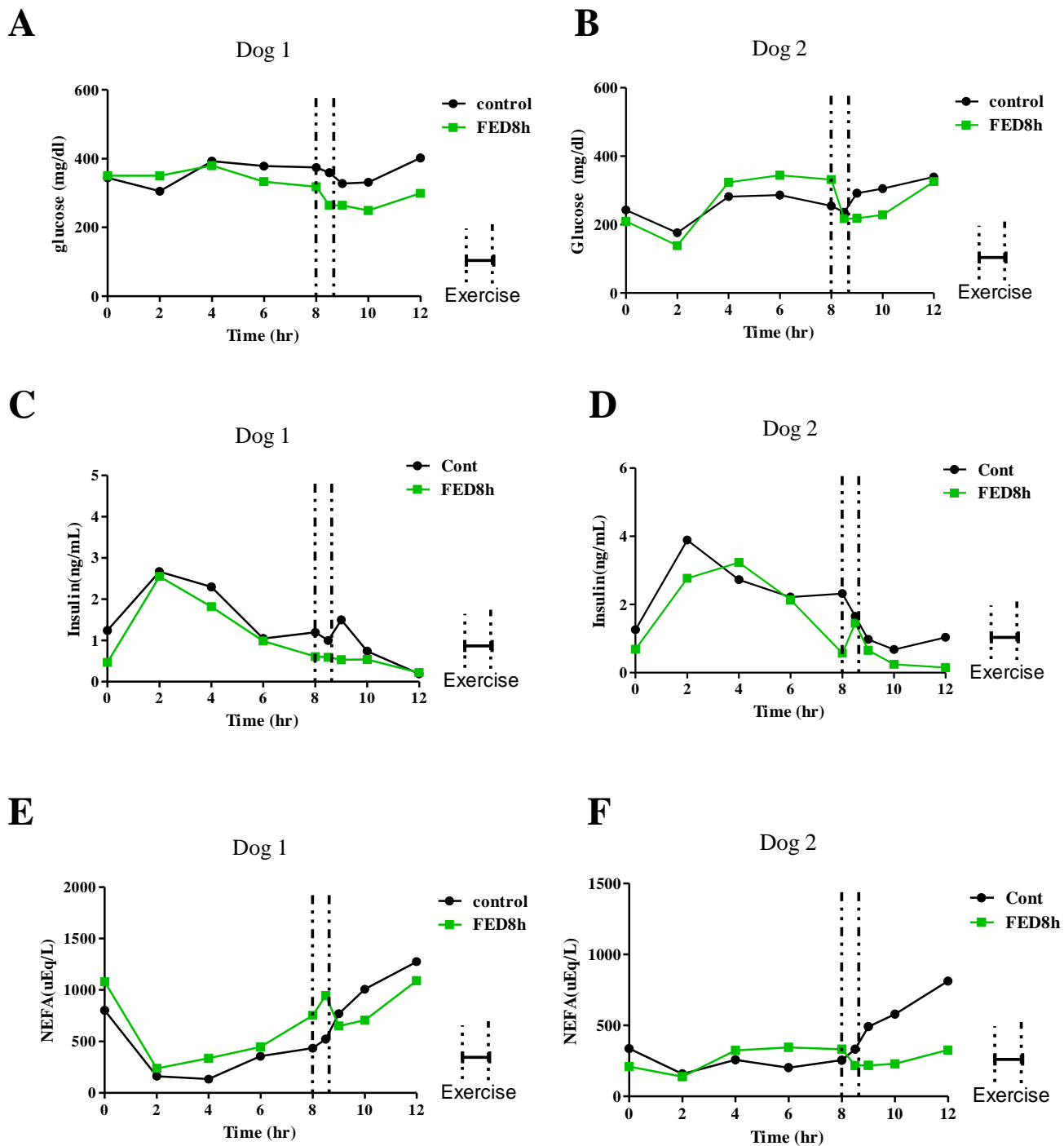


Fig. 17 食後6時間後の30分間運動が糖尿犬の糖脂質代謝に与える影響

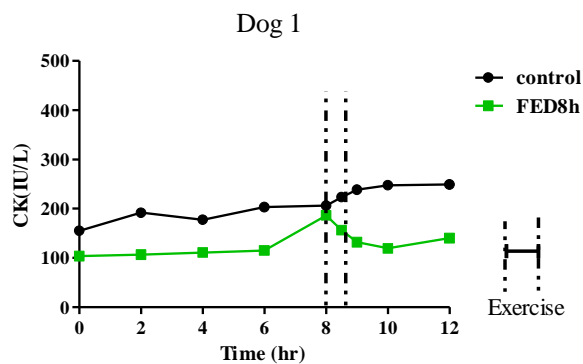
食事給与試験群(Control)と食後6時間後に30分間の運動を行った群(FED6h)の血中変動を示す。各項目は、(G)CK(Dog1)、(H)CK(Dog2)、(I)LDH(Dog1)、(J)LDH(Dog2)、(K)L動(Dog1)、(L)LA(Dog2)を示す。なお、点線で囲われた時間帯は運動実施を示している。



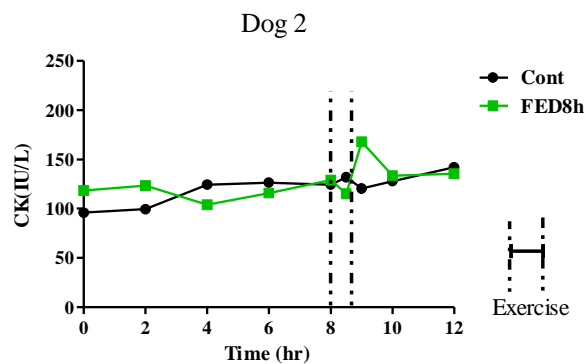
**Fig. 18 食後8時間後の30分間運動が糖尿犬の糖脂質代謝に与える影響**

食事給与試験群(Control)と食後6時間後に30分間の運動を行った群(FED6h)の血中変動を示す。各項目は、(A)Glucose(Dog1)、(B)Glucose(Dog2)、(C)Insulin(Dog1)、(D)Insulin(Dog2)、(E)NEFA(Dog1)、(F)NEFA(Dog2)を示す。なお、点線で囲われた時間帯は運動実施を示している。

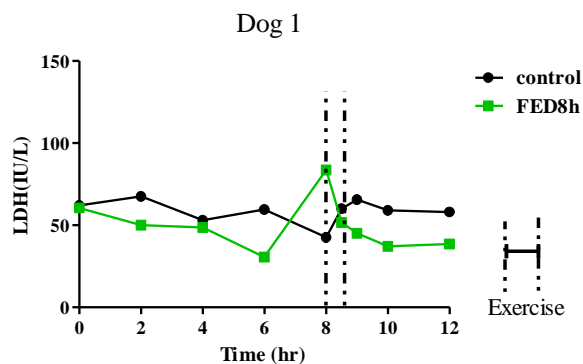
G



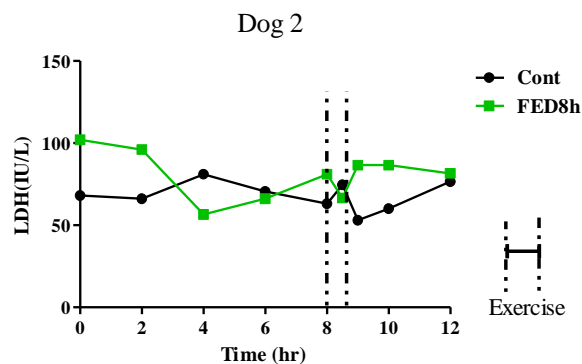
H



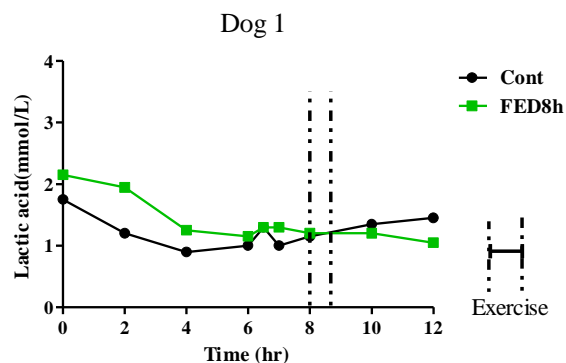
I



J



K



L

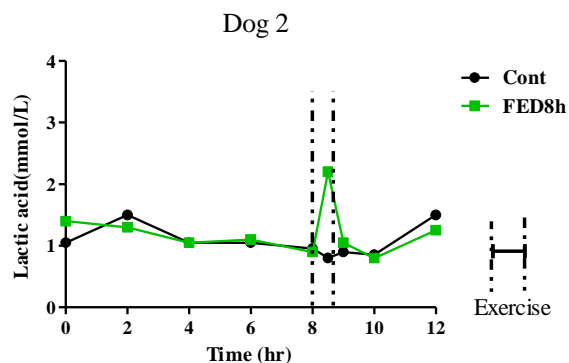
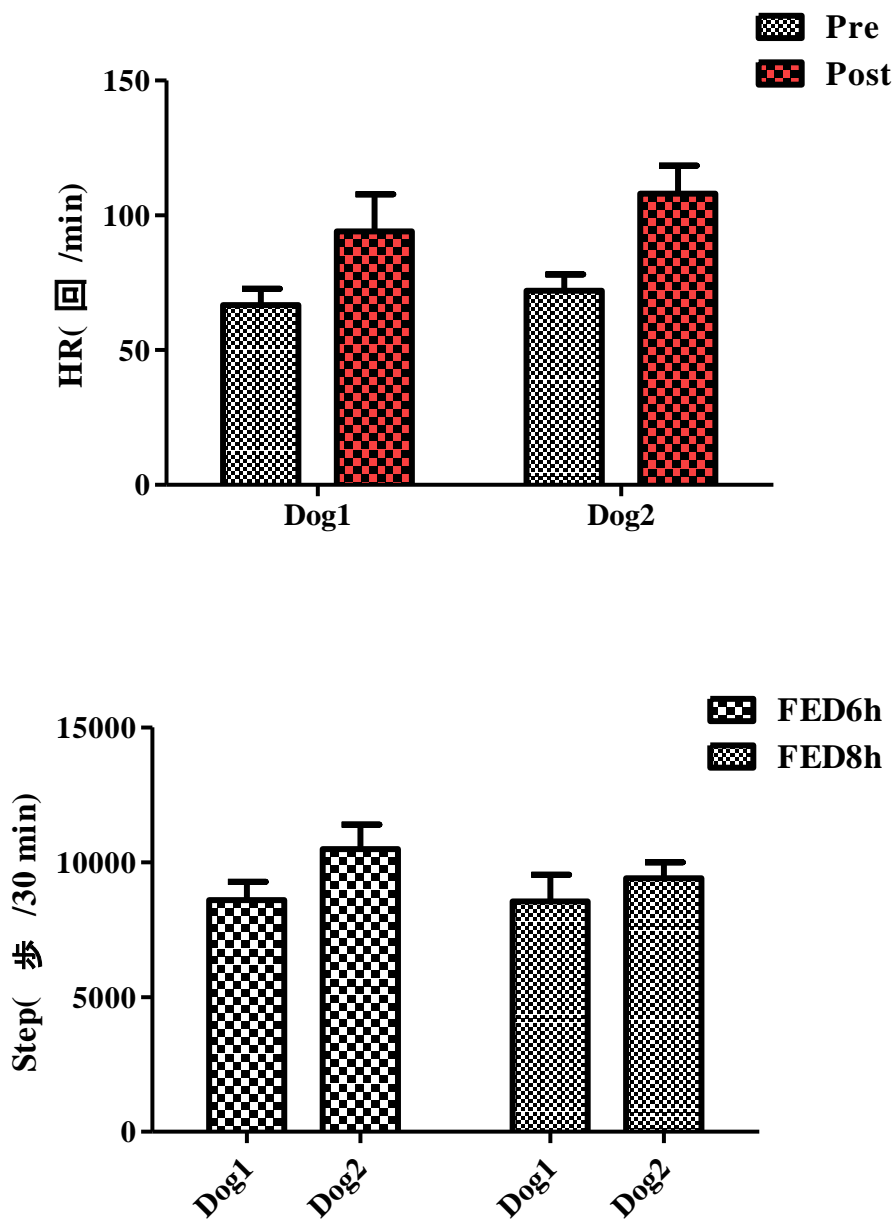


Fig. 19 食後8時間後の30分間運動が糖尿犬の糖脂質代謝に与える影響

食事給与試験群(Control)と食後6時間後に30分間の運動を行った群(FED6h)の血中変動を示す。各項目は、(G)CK(Dog1)、(H)CK(Dog2)、(I)LDH(Dog1)、(J)LDH(Dog2)、(K)LA(Dog1)、(L)LA(Dog2)を示す。なお、点線で囲われた時間帯は運動実施を示している。





**Fig. 20 運動前後のHRとStep変動**

食後6時間後に30分間の運動を行った群(FED6h)と食後8時間後に30分間の運動を行った群(FED8h)の(A)運動前後における心拍数(Heart Rate: HR)変動(N)と歩数(Step)変動を示す。

なお、心拍数で示すPreは運動開始直前、Postは運動直後を意味する。

## 総括

本研究は、糖尿病犬における運動実施の有用性を血液学的および遺伝子レベルで解析すると共に、運動と食事の時間的關係性を明らかにすることを目的とした。本論文は序論である第 1 章を含め、全 4 章で構成され、第 2 章では、犬における運動指標の設定を目的とし、速度の異なる運動時における血中乳酸濃度、心拍数および歩数変動について検討した。第 3 章では、糖尿病犬に対する運動実施の有用性を検討するため、1 ヶ月間の長期継続運動実施前後における血液生化学パラメーターおよび骨格筋内インスリンシグナリング、糖・脂質代謝関連遺伝子の発現量の変化を検討した。最後に第 4 章では、健常犬および糖尿病犬に対し食後経過時間の異なる運動を実施し、運動と食事の時間的關係性について検討した。

近年、犬や猫などの伴侶動物においても糖尿病をはじめとする内分泌疾患の発生は増加する傾向にある。犬の糖尿病は、そのほとんどがインスリン依存性糖尿病 (IDDM) であり、遺伝的素因や自己免疫性の原因により膵臓  $\beta$  細胞が疲弊され、膵臓からのインスリン合成・分泌能が低下している状態といえる。犬の糖尿病は根治が困難なため、インスリン作用不足による糖尿病性代謝異常を

可能な限り正常に近づけるようにコントロールすることが治療の目的となる。

その方法として現在では、インスリン療法と食事療法が主に行われており、両治療を併用して行うことが基本治療として推奨されている。またヒトでは、これらに加え、治療の1つとして運動療法の有用性が示されている。元来、運動療法は肥満患者や2型糖尿病患者に向けた治療法であるとされてきた。しかし現在では、1型糖尿病患者においても運動を行うことで血糖コントロールやインスリン感受性の改善および糖・脂質・蛋白代謝改善など様々な効果が示され、合併症予防や余命延長に繋がることが明らかとなっている。しかしヒトの1型糖尿病患者と同様に、インスリン投与を必須とする犬の糖尿病に対する運動療法の報告はなく、その効果は十分解明されていない。

そこで本研究では、糖尿病犬に対する運動実施の有用性と食事との関連性を明らかにすることを目的とした。

本論文において明らかとなった項目は以下のとおりである。

1、速度の異なる運動実施時における血中乳酸濃度、心拍数および歩数変動(第2章)

本章では、異なる時速(0 km/h(運動開始前)、6 km/h、8 km/h、13 km/h、16 km/h)下における 30 分間の運動が、心拍数、血中乳酸濃度および歩数変動に与える影響を調査し、犬の運動指標として有用性やその変動を検討した。結果より、心拍数は運動時速が速くなるほど増加しており、運動負荷の増大を意味した。血中乳酸濃度は全ての速度において 2 mmol/L 以下となったことから、ヒトでの報告を参考に照らし合わせ、本実験で行った運動時速はすべて有酸素運動に相当すると考えられた。しかし、時速 13 km/h 運動後および時速 16 km/h 運動後では血中乳酸濃度の有意な上昇が認められた。両者の上昇は、急激な運動に対するグリコーゲン分解量とミトコンドリア内での酸化量との差分である可能性が考えられた。しかし、時速 13 km/h 運動では、運動開始 30 分後に血中乳酸濃度の低下が認められ、乳酸の再変換が行われている可能性があり、有酸素運動として最大限にエネルギー供給が可能な運動強度であると考えられた。また、心拍数と血中乳酸濃度には高い正の相関関係(相関係数  $r=0.98$ )が認められ、心拍数または血中乳酸濃度を測定することで個体毎の運動強度の把握が可能であると考えられた。本実験結果より、時速 6, 8 km/h といった血中乳酸濃度が上昇しない程度の運動は、平均心拍数  $121.2 \pm 7.8$  回/min 以下であり、時速 13, 16 km/h

といった血中乳酸濃度が上昇する程度の運動は、平均心拍数  $133.2 \pm 9.8$  回/min -  $144 \pm 12$  回/min であると算出できた。

歩数は時速との間に相関関係は認められなかった。これは、歩様の違いが大きく影響していることが考えられ、犬種ごとに体高や体重が大きく異なる犬では、様々な要因が関与することから歩数を運動指標として使用することは不適であると考えられた。

以上のことより、犬の運動強度の指標には心拍数と血中乳酸濃度が使用でき、さらに両者は正の相関関係にあることから、心拍数または血中乳酸濃度を測定することで個体毎の運動強度の把握が可能であると考えられた。また、血中乳酸濃度が上昇しない 6, 8 km/h の運動は糖尿病患者への適性強度である可能性が示唆された。

## 2、糖尿病犬に対する運動の効果(第3章-第1節、第2節)

医学領域において運動療法は食事療法と共に糖尿病の基本治療であり、その効果には血糖コントロールや脂質代謝の改善、インスリン感受性の増加など様々報告されている。そこで本章では、糖尿病犬に対する1ヶ月間の継続運動

が血糖変動、血液生化学パラメーター、骨格筋内インスリンシグナリング  
および糖・脂質代謝関連遺伝子の発現量にどのような影響を及ぼすか検討した。結果より、糖尿病犬に対する 1 ヶ月間の継続運動実施は、インスリン投与後 12 時間の血糖値日内変動の低下や GA の有意な低下をもたらすことが明らかとなり、運動実施が糖尿病犬の血糖コントロール改善に寄与することが示唆された。また CK、LDH は有意に低下しており、継続的な運動によるトレーニング効果が運動により損傷する筋肉量の低下や損傷した筋肉の再生作用の短縮に寄与している可能性が示唆された。さらに脂質代謝では、NEFA の有意な低下やアディポネクチンの上昇が認められたことから、体脂肪率が減少した可能性が考えられた。また、骨格筋内遺伝子発現に関しては、糖取り込み作用に関与する AMPK、GLUT4 は運動実施後上昇しており、糖尿病犬においても運動刺激そのものが糖取り込みを促進させる可能性が示唆された。また運動実施後は UCP3 の上昇や ACC の低下が認められた。これらの変動は、NEFA やアディポネクチン変動と同様、脂質代謝の亢進を示唆するものであり、本実験で行った運

動が、糖と脂質の両者を利用していることが分子レベルでも明らかとなった。さらに、骨格筋の主要なインスリンシグナリングである IRS-1、PI3-K、AKT2 は運動後、上昇傾向にあった。これは、運動とインスリン作用とが合わさることで糖輸送活性が上昇する糖輸送の加算効果である可能性が考えられた。

以上より、インスリン投与が必須である糖尿病犬に対する運動実施は血糖コントロールや脂質代謝の改善だけでなく、骨格筋への糖取り込み作用をより亢進させる可能性が示唆された。

#### 4、運動と食事の時間的關係性について(第 4 章-第 1 節、2 節、3 節)

3 章より、糖尿病犬に対する運動実施は血糖コントロールの改善に寄与することが明らかとなった。しかし、運動による血糖変動はそのときの血糖値やインスリン投与だけでなく、食事内容や食事時間によっても低血糖や消化吸收遅延など、様々な弊害を引き起こすことが報告されている。犬でも、食後に猟を行った猟犬において低血糖と思われる意識障害が報告されている。これは、糖尿病管理を行ううえで欠かせない食事療法が血糖コントロールを支配する治



療法であると同時に、運動効果を決定づける重要な要因であることを示唆している。そこで本章では、運動と食事の関係性を明らかにすることを目的とした。第 1 節では、運動実施前の糖摂取が運動効果に及ぼす影響を検討した。結果より、血中グルコースおよびインスリン濃度上昇時の運動実施は、活動筋への糖取り込み作用とインスリン作用とが合わさり、血中グルコース濃度の急激な低下を引き起こし、低血糖のリスクを増大させることが示唆された。次に第 2 節では、食後経過時間の異なる運動実施が健常犬の糖脂質代謝に及ぼす影響を検討した。結果より、FED1h-4h 群での運動は、血中グルコース濃度の急激な低下やリバウンド現象を引き起こすことが明らかとなった。また、FED1h、2h 群での運動は、摂取した食物の消化吸收遅延を引き起こす可能性が示唆された。さらに FED5h 群は、運動開始直前のグルコース、インスリン濃度共に安静値を示しており、血糖値の低下や消化吸收遅延は認められなかった。このことから、食後の運動実施は 5 時間以降がより安全な運動時間であることが示唆された。最後に第 3 節では、これまでの結果を元に、糖尿病犬に対し食後 6 時間経過および 8 時間経過後に運動を実施し、糖脂質代謝に与える影響を検討した。結果より、健常犬では生じなかった血糖値の低下

が糖尿病犬では認められた。これは、健常犬が血糖値に反応してインスリン分泌を行う反応性であるに対し、糖尿病犬は外部からのインスリン投与により血糖値をコントロールしている違いであると考えられ、皮下から投与しているインスリンの作用に大きく影響を受けることが明らかとなった。そのため、これらを考慮した上で運動を実施しなければ、低血糖やリバウンド現象などの血糖コントロール悪化に繋がると考えられた。本研究結果では、血糖値の低下が小さく、また運動後のエネルギー供給も効率良く行っていたことから、食後 8 時間以降での運動が糖尿病犬にとって良い運動時間であると考えられた。

本研究は、糖尿病犬における運動実施の有用性を検討すると共に、運動と食事の時間的關係性を明らかにすることを目的に行った。

結果より、糖尿病犬への運動実施は GA を有意に低下させることから、血糖コントロールの改善に寄与することが明らかとなった。しかし、食物摂取やインスリン投与時間、インスリン製剤などを考慮しなければ低血糖や消化吸収遅延などを引き起こす危険性があるこ

とが示唆された。これらは今後、糖尿病犬に対する運動実施が糖尿病管理を行ううえで有用な補助療法の 1 つになり得る知見であると考えられた。

## 謝辞

稿を終わるに臨み、本研究に終始御指導助言を賜りました日本獣医生命科学大学 獣医保健看護学科臨床部門 左向敏紀教授、森昭博助教に心から深謝致します。

また、本研究において多大なるご支援、ご協力を賜りました日本獣医生命科学大学 獣医保健看護学科臨床部門 石岡克己准教授、牧野ゆき准教授、水越美奈准教授、松原孝子講師、百田豊講師、皆上大吾講師に厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究に多大なるご協力を賜りました日本獣医生命科学大学 獣医保健看護学科臨床部門 代謝栄養学班ならびに室員各位に心から感謝致します。

## 参考文献

- 【1】 Araki E, Lipes MA, Patti ME, Brüning JC, Haag B 3rd, Johnson RS, Kahn CR. 1994. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature*. **372**: 186-190
- 【2】 Astorino TA, White AC. 2010. Assessment of anaerobic power to verify VO<sub>2</sub>max attainment. *Clin Physiol Funct Imaging*. **30**: 294-300
- 【3】 Berger M, Berchtold P, Cuppers HJ. 1997. Metabolic and hormonal effects of muscular exercise in juvenile type diabetics. *Diabetologia* **13**: 355-365
- 【4】 Bergström J, Hultman E. 1967. A study of the glycogen metabolism during exercise in man. *Scand J Clin Lab Invest*. **19**: 218-228
- 【5】 Brouns F, Beckers E. 1993. Is the gut an athletic organ? Digestion, absorption and exercise. *Sports Med*. **15**: 242-257
- 【6】 Brozinick JT Jr, Birnbaum MJ. 1998. Insulin, but not contraction, activates Akt/PKB in isolated rat skeletal muscle. *J Biol Chem*. **273**: 14679-14682
- 【7】 Chasiotis D, Sahlin K, Hultman E. 1980. Regulation of glycogenolysis in human muscle at rest and during exercise. *J Appl Physiol*. **53**: 708-715
- 【8】 Cheatham B, Kahn CR. 1995. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev*. **16**: 117-142
- 【9】 Chen CF, Lien IN, Lu FJ. 1983. Serum creatine kinase activity and its isoenzymes in Duchenne muscular dystrophy. *Taiwan Yi Xue Hui Za Zhi*. **82**: 265-273
- 【10】 Christopher MJ, Chen ZP, Rantzau C, Kemp BE, Alford FP. 2003. Skeletal muscle basal AMP-activated protein kinase activity is chronically elevated in alloxan-diabetic dogs: impact of exercise. *J Appl Physiol*. **95**: 1523-1530
- 【11】 Christ-Roberts CY, Pratipanawatr T, Pratipanawatr W, Berria R, Belfort R, Kashyap S, Mandarino LJ. 2004. Exercise training increases glycogen synthase activity and GLUT4 expression but not insulin signaling in overweight nondiabetic and type 2 diabetic subjects. *Metabolism*. **53**: 1233-1242
- 【12】 Coggan AR, Coyle EF. 1989. Metabolism and performance following carbohydrate ingestion late in exercise. *Med Sci Sports Exerc*. **21**: 59-65

- 【13】 Coyle EF, Hagberg JM, Hurley BF, Martin WH, Ehsani AA, Holloszy JO. 1983. Carbohydrate feeding during prolonged strenuous exercise can delay fatigue. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* **55**: 230-235
- 【14】 Derave W, Mertens A, Muls E, Pardaens K, Hespel P. 2007. Effects of post-absorptive and postprandial exercise on glucoregulation in metabolic syndrome. *Obesity.* **15**: 704-711
- 【15】 Dube MC, Weisnagel SJ, Prudhomme D, Lavoie C. 2006. Is early and late post-meal exercise so different in type1 diabetic lispro users? *Diabetes Research and Clinical Practice* **72**: 128-134
- 【16】 Farese RV. 2001. Insulin-sensitive phospholipids signaling systems and glucose transport update II. *Exp Biol Med.* **226**: 283-295
- 【17】 Feldman EC, Nelson RW. 2004. Diabetes mellitus. In: Canine and Feline Endocrinology and Reproduction, 3rd ed. W.B. Saunders, Philadelphia. 486-538
- 【18】 Foster C, Costill DL, Fink WJ. 1979. Effects of preexercise feedings on endurance performance. *Med Sci Sports.* **11**: 1-5
- 【19】 Fridén J, Sjöström M, Ekblom B. 1981. A morphological study of delayed muscle soreness. *Experientia.* **37**: 506-507
- 【20】 Fritz T, Krämer DK, Karlsson HK, Galuska D, Engfeldt P, Zierath JR, Krook A. 2006. Low-intensity exercise increases skeletal muscle protein expression of PPARdelta and UCP3 in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab Res Rev.* **22**: 492-498
- 【21】 Galassetti P, Tate D, Neill RA, Morrey S, Wasserman DH, Davis SN. 2003. Effect of antecedent hypoglycemia on counterregulatory responses to subsequent euglycemic exercise in type 1 diabetes. *Diabetes.* **7**: 1761-1769
- 【22】 Goodyear LJ, Giorgino F, Balon TW, Condorelli G, Smith RJ. 1995. Effects of contractile activity on tyrosine phosphoproteins and PI3-kinase activity in rat skeletal muscle. *Am J Physiol.* **265**: 987-995
- 【23】 Graham PA, Maskell IE, Nash AS. 1994. Canned high fiber diet and postprandial glycemia in dogs with naturally occurring diabetes mellitus. *J Nutr.* **124**: 2712-2715
- 【24】 Guelf KJ, Jones TW, Fournier PA. 2005. Intermittent hight-intensity exercise does not increases the risk of early postexercise hypoglycemia in individuals with type1 diabetes. *Diabetes Care.* **28**: 416-418

- 【25】 Guptill L, Glickman L, Glickman N. 2003. Time trends and risk factors for diabetes mellitus in dogs: analysis of veterinary medical data base records. *Vet J.* **165**: 240-247
- 【26】 Hawley JA, Bosch AN, Weltan SM, Dennis SC, Noakes TD. 1994. Effects of glucose ingestion or glucose infusion on fuel substrate kinetics during prolonged exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* **68**: 381-389
- 【27】 Hayes C. 1997. Pattern management: a tool for improving blood glucose control with exercise. *J. Am. Diet. Assoc.* **97**: 167-171
- 【28】 Henry RR, Gumbiner B. 1991. Benefits and limitations of very-low-calorie diet therapy in obese NIDDM. *Diabetes Care.* **14**: 802-823
- 【 29 】 Holmes BF, Kurth-Kraczek EJ, Winder WW. 1999. Chronic activation of 5'-AMP-activated protein kinase increases GLUT-4, hexokinase, and glycogen in muscle. *J Appl Physiol.* **87**: 1990-1995
- 【30】 Hurst D, Taylor EB, Cline TD, Greenwood LJ, Compton CL, Lamb JD, Winder WW. 2005. AMP-activated protein kinase activity and phosphorylation of AMP-activated protein kinase in contracting muscle of sedentary and endurance-trained rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **289**: 710-715
- 【 31 】 Iberg N, Flückiger R. 1986. Nonenzymatic glycosylation of albumin in vivo. Identification of multiple glycosylated sites. *J Biol Chem.* **29**: 13542-13545.
- 【32】 Iiboshi A, Tokuda S, Nishimura T, Otsuji S. 1982. Biphasic changes of blood myoglobin level in weight training. *J Sports Med Phys Fitness.* **22**: 284-294
- 【33】 Inoue K, Nishikawa S, Kimura N, Hirota K. 1992. Effect of repeated exercise on muscle soreness creatine kinase activity and white blood cell count. *Japanese Journal of Physical Fitness and Sports Medicine.* **41**: 156-165
- 【34】 Kentaro K, Izumi T, Shigeru K, Mitsuru H. 1996. Changes in insulin-stimulated glucose transport and GLUT-4 protein in rat skeletal muscle after training. *Journal of Applied Physiology.* **83**: 2043-2047
- 【35】 Koivisto VA, Felig P. 1978. Effects of leg exercise on insulin absorption in diabetic patients. *N Engl J Med.* **298**: 79-83.
- 【36】 Lawlor MA, Alessi DR. 2001. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses?. *J Cell Sci.* **114**: 2903-2910

- 【37】 Libman IM, Pietropaolo M, Arslanian SA, LaPorte RE, Becker DJ. 2003. Changing prevalence of overweight children and adolescents at onset of insulin-treated diabetes. *Diabetes Care*. **26**: 2871-2875
- 【38】 Luft D, Schmölling RM, Eggstein M. 1987. Lactic acidosis in biguanide-treated diabetics: a review of 330 cases. *Diabetologia*. **14**: 75-87
- 【39】 Lund S, Pryor PR, Ostergaard S, Schmitz O, Pedersen O, Holman GD. 1998. Evidence against protein kinase B as a mediator of contraction-induced glucose transport and GLUT4 translocation in rat skeletal muscle. *FEBS Lett*. **425**: 472-474
- 【40】 Marliss EB, Vranic M. 2002. Intense exercise has unique effects on both insulin release and its roles in glucoregulation: implications for diabetes. *Diabetes*. **51**: 271-283
- 【41】 Mitchell YH, Abraham G, Shiffrin A, Leiter LA, Marliss EB. 1988. Hyperglycemia after intense exercise in IDDM subjects during continuous subcutaneous insulin infusion. *Diabetes Care*. **11**: 311-317
- 【42】 Mori A, Kurishima M, Oda H, Saeki K, Arai T Sako T. 2013. Comparison of glucose fluctuations between day and night-time measured using a continuous glucose monitoring system in diabetic dogs. *J Vet Med Sci*. **75**: 113-117
- 【43】 Mori A, Lee P, Sako T, Mizutani H, Arai T. 2009. Successful Intensive Insulin Treatment of Type 1 Diabetic Dogs Leads to Restoration of Peripheral Leukocyte Insulin Signaling Gene Expression and Enzyme Activities. *Internal Medicine*. **78**: 1017-1026
- 【44】 Oda H, Mori A, Lee P, Saeki K, Ishioka K, Arai T, Sako T. 2013. Characterization of the use of liraglutide for glycemic control in healthy and Type 1 diabetes mellitus suffering dogs. *Res Vet Sci*. **95**: 381-388
- 【45】 Okauchi N, Mizuno A, Yoshimoto S, Zhu M, Sano T, Shima K. 1995. Is caloric restriction effective in preventing diabetes mellitus in the Otsuka Long Evans Tokushima fatty rat, a model of spontaneous non-insulin-dependent diabetes mellitus?. *Diabetes Res Clin Pract*.. **27**: 97-106
- 【46】 Poirier P, Mawhinney S, Grondin L, Tremblay A, Broderick T, Cl  roux J, Catellier C, Tancr  de G, Nadeau A. 2001. Prior meal enhances the plasma glucose lowering effect of exercise in type 2 diabetes. *Med Sci Sports Exerc*. **33**: 1259-1264
- 【47】 Rand JS, Fleeman LM, Farrow HA, Appleton DJ, Lederer R. 2004. Canine and feline



diabetes mellitus: nature or nurture? *Journal of Nutrition*. **134**: 2072-2080

【48】 Rave K, Nosek L, Heinemann L, Frick A, Becker R. 2003. Time-action profile of the long-acting insulin analogue insulin glargine in comparison to NPH insulin in Japanese volunteers. *Diabetes Metab*. **29**: 430-431

【49】 Rovira S, Munoz A, Benito M. 2008. Effect of exercise on physiological, blood and endocrine parameters in search and rescue- trained dogs. *Vet.Med*. **53**: 333-346

【50】 Rowland TW, Swadba LA, Biggs DE, Burke EJ, Reiter EO. 1985. Glycemic control with physical training in insulin dependent diabetes mellitus. *Am. J. Dis. Child*. **139**:149-151

【51】 Ruegemer JJ, Squires RW, Marsh HM, Haymond MW, Cryer PE, Rizza RA, Miles JM. 1990. Differences between prebreakfast and late afternoon glycemic responses to exercise in IDDM patients. *Diabetes Care*.**13**: 104-110

【52】 Sako T, Mori A, Lee P, Takahashi T, Izawa T, Karasawa S, Furuuchi M, Azakami D, Mizukoshi M, Mizutani H, Kiyosawa Y, Arai T. 2008. Diagnostic significance of serum glycated albumin in diabetic dogs. *J Vet Diagn Invest*. **20**: 634-638

【53】 Sato Y, Nagasaki M, Nakai N, Fushimi T. 2003. Physical exercise improves glucose metabolism in lifestyle-related diseases. *Exp Biol Med (Maywood)*. **228**: 1208-1212

【54】 Schapira F,Dreyfus JC, Schapira G. 1970. Ontogenic evaluation and pathological modifications of molecular forms of some isoen-zymes. *FEBS Symposium*. **15**: 305-320

【55】 Schwane JA, Johnson SR, Vandenakker CB, Armstrong RB. 1983. Delayed-onset muscular soreness and plasma CPK and LDH activities after downhill running. *Med Sci Sports Exerc*. **15**: 51-56.

【56】 Sonia T, Maria FR, Federica B, Lorenzo L, Filippo F. 2006. Managing insulin therapy during exercise in Type 1 diabetes mellitus. *ACTA BIOMED*. **77**: 34-40

【57】 Spriet LL, Howlett RA, Heigenhauser GJF. 2000. An enzymatic approach to lactate production in human skeletal muscle during exercise. *Med Sci Sports Exer* **32**: 756-763

【58】 Tahara Y, Shima K. 1995. Kinetics of HbA1c, glycated albumin, and fructosamine and analysis of their weight functions against preceding plasma glucose level. *Diabetes Care*. **18**: 440-447

【59】Takahashi S, Uchino H, Shimizu T, Kanazawa A, Tamura Y, Sakai K, Watada H, Hirose T, Kawamori R, Tanaka Y. 2007. Comparison of glycated albumin (GA) and glycated

hemoglobin (HbA1c) in type 2 diabetic patients: usefulness of GA for evaluation of short-term changes in glycemic control. *Endocr J.* **54**: 139-144

【60】 Thorneloe C, Bédard C, Boysen S. 2007. Evaluation of a hand-held lactate analyzer in dogs. *Can Vet J.* **48**: 283-288

【61】 Tonoli C, Heyman E, Roelands B, Buyse L, Cheung SS, Berthoin S, Meeusen R. 2012. Effects of different types of acute and chronic (training) exercise on glycaemic control in type 1 diabetes mellitus: a meta-analysis. *Sports Med.* **12**. 1059-1080

【62】 Treadway JL, James DE, Burcel E, Ruderman NB. 1989. Effect of exercise on insulin receptor binding and kinase activity in skeletal muscle. *Jan.* **256**: 138-144.

【63】 Trovati M, Anfossis G, Vitali, E. Mularoni P, Massucco, R. De Facis. 1988. Prevention of exercise-induced hypoglycaemia in type 1(insulin-dependent) diabetic patients on conventional intensified insulintherapy: timing of exercise and role of counter-regulatory hormones, ann. *Med. Interne.* **139**:149-151

【64】 Tsintzas OK, Williams C, Singh R, Wilson W, Burrin J. 1995. Influence of carbohydrate-electrolyte drinks on marathon running performance. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* **70**: 154-160

【65】 Tsuboyama-Kasaoka N, Tsunoda N, Maruyama K, Takahashi M, Kim H, Ikemoto S, Ezaki O. 1998. Up-regulation of uncoupling protein 3 (UCP3) mRNA by exercise training and down-regulation of UCP3 by denervation in skeletal muscles. *Biochem Biophys Res Commun.* **247**: 498-503

【66】 Uth N. 2005. Gender difference in the proportionality factor between the mass specific VO<sub>2</sub>max and the ratio between HR (max) and HR(rest). *Int J Sports Med.* **26**:763-767.

【67】 V.A. Koivisto, R. Pelkonen,E.A. Nikkila, L.G. Heding, Human and porcine insulins are equally effective in the regulation of glucose kinetics of diabetic patients durind exercise, *Acta Endocrinol.(Copenh.)*107(1984)500-505.

【68】 Waterfield MD, Greenfield C. 1991. Expression and properties of epidermal growth factor receptor expressed from baculovirus vectors. *Methods Enzymol.* **200**: 627-645

【69】 White MF, Yenush L. 1998. The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action. *Curr Top Microbiol Immunol.* **228**: 179-208

【70】 Winder WW. 1998. Malonyl-CoA--regulator of fatty acid oxidation in muscle during

exercise. *Exerc Sport Sci Rev.* **26**: 117-132

【71】 Yamanouchi K, Abe R, Takeda A, Atsumi Y, Shichiri M, Sato Y. 2002. The effect of walking before and after breakfast on blood glucose levels in patients with type 1 diabetes treated with intensive insulin therapy. *Diabetes Res Clin Pract.* **58**:11-18

【72】 Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T. 2001. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med.* **7**: 941-946

【73】 大町麻子, 石岡克己, 木村和弘, 柴田治樹, 本庄勉, 斎藤昌之. 2004. ELISA 法によるアディポネクチン血中濃度の測定と肥満における変動. *獣医生化学.* **41**: 31-37

【74】 野口哲也, 春日雅人. 糖尿病の分類と病態. 2003. 糖尿病学基礎と臨床(門脇孝・石橋俊・佐倉宏・戸邊一之・野田光彦 監修). 242-247

【75】 八田秀雄. 2009. 乳酸と運動生理・生化学ーエネルギー代謝の仕組みー. 62-77

【76】 Arthur C. Guyton JEH. 2010. ガイトン生理学. 1124-1125