

犬におけるインクレチン作用と
インクレチン製剤の糖代謝へおよぼす影響

(Incretin action and effect of the incretin preparation for glucose metabolism in dogs)

小田 民美

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
	○表および図	9
第 2 章	犬におけるインクレチン作用と インクレチン分泌細胞の RNA 発現解析	13
第 1 節	健常犬におけるインクレチン作用の検討	
	・ 緒言	14
	・ 材料および方法	15
	1. 供試動物	15
	2. 糖負荷試験	15
	3. 検体処理	16
	4. 測定項目および測定方法	17
	5. 統計	20
	・ 結果	21
	・ 考察	22
第 2 節	健常犬におけるインクレチン分泌細胞の分布解析	
	・ 緒言	26
	・ 材料および方法	27
	1. 材料	27
	2. 材料処理	27
	3. 統計	32
	・ 結果	33
	・ 考察	34
	○小括	35
	○表および図	36
第 3 章	犬のインクレチン日内変動と 栄養組成の違いがインクレチン分泌にあたえる影響	42
第 1 節	健常犬のインクレチン日内変動と昼夜でのホルモンリズムの違い	
	・ 緒言	43
	・ 材料および方法	45
	1. 供試動物	45
	2. 食事給与試験	45

3. 検体処理	46
4. 測定項目および測定方法	46
5. 統計	46
・ 結果	47
・ 考察	49
 第2節 栄養組成の違いが健常犬のインクレチン分泌にあたえる影響	
・ 緒言	51
・ 材料および方法	53
1. 供試動物	53
2. 食事給与試験	53
3. 検体処理	54
4. 測定項目および測定方法	54
5. 統計	54
・ 結果	55
・ 考察	57
○小括	60
○表および図	61
 第4章 インクレチン製剤が犬の糖代謝へおよぼす影響	71
第1節 GLP-1 受容体作動薬“リラグルチド”投与が健常犬の 糖代謝へおよぼす影響	
・ 緒言	72
・ 材料および方法	75
1. 供試動物	75
2. 薬剤投与	75
3. 試験プロトコール	75
4. 検体処理	76
5. 測定項目および測定方法	76
6. 統計	76
・ 結果	77
・ 考察	78
 第2節 リラグルチド投与が糖尿病犬の血糖変動へおよぼす影響	
・ 緒言	81
・ 材料および方法	82
1. 供試動物	82

2. 薬剤投与	82
3. 試験プロトコール	82
4. 検体処理	83
5. 測定項目および測定方法	83
6. 統計	83
・ 結果	84
・ 考察	86
○小括	88
○図	89
総括	94
謝辞	98
参考文献	99

第 1 章 序論

インクレチンは、グルコース恒常性の維持に関わる消化管ホルモンである。グルコースは経静脈投与するよりも経口投与した方がインスリンの分泌量が多くなり、血糖値が抑制されることが古くから知られている。これは食事摂食に伴い消化管からインクレチンが分泌され、血糖依存的にインスリン分泌を促進させるからである[20]。近年では、ヒトの 2 型糖尿病のインスリン分泌障害に対する新たな治療戦略としてインクレチンが注目されている。

インクレチンの歴史は Bayliss と Starling が腸管粘膜抽出物に膵外分泌腺刺激作用を持つ因子が含まれることを発見し、“セクレチン”と名付けたことから始まる[6]。1906 年、Moore らが腸管粘膜抽出物には膵内分泌腺刺激作用も存在するため、糖尿病を治療できるのではないかという仮説を立て、腸管粘膜抽出物の経口摂取が糖尿病患者の尿糖を劇的に改善することを示した[49]。その後、1929 年には Barre らが腸管粘膜抽出物中の血糖降下活性の分離に成功し[85]、この血糖降下活性を担う因子を“インクレチン (Interstine secretion insulin)”と名付けた。そして 1964 年に健常人に対するグルコースの経口投与が静脈投与に比べ、インスリン分泌をより効率的に促進することが報告されると[20,44]、世界各国でインクレチンの探索が始まった。

インクレチンの第一候補は、1971 年に Brown らが単離、命名した胃酸分泌抑制作用を有する消化管ホルモン、Gastric inhibitory polypeptide であった[10]。1973 年、Dupre と Brown らにより、健常人にグルコースと Gastric inhibitory polypeptide を静脈内投与した際、膵 B 細胞のインスリン分泌が顕著に促進され、耐糖能が改善されることが示された[16]。これを受け、Brown らは Gastric inhibitory polypeptide が腸管由来のインスリン分泌促進物質の本体であると考え、これを Glucose-dependent insulintropic peptide (GIP)

と改めた。しかし、GIP を免疫学的に除去した腸管粘膜抽出物に 50%以上のインスリン分泌促進作用が残存していたため[18]、GIP 以外に第 2 のインクレチンが存在することが想定された。その後、既知全ての消化管ホルモン (gastrin, cholecystokinin, secretin, motilin, vasoactive intestinal polypeptide など) に対して、インクレチン作用が検討されたが、生理的血中濃度ではいずれもインスリン分泌促進作用を示さず、第 2 のインクレチン探索は困難を極めた。

第 2 のインクレチン探索は、腸管グルカゴンに関する一連の研究から Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) が発見され、その生理活性が解明されることで終結した。1960 年代初頭、消化管上皮にグルカゴン様物質、すなわち腸管グルカゴンを分泌する L 細胞が存在することが示され、さらに腸管切除患者では L 細胞が最も多く存在する空腸の残存とインクレチン作用に強い相関関係が知られていた。1973 年、Holst らにより食後の反応性低血糖の問題を抱える患者で腸管グルカゴン分泌が亢進することが発表されると[33]、腸管グルカゴンがインスリン分泌を促進すると考えられるようになった。1983 年、Bell らがグルカゴン遺伝子の配列を決定すると[7]、膵 α 細胞においてグルカゴンの前駆体となるプレプログルカゴン蛋白が、腸管 L 細胞ではグルカゴン様のペプチド配列を持つ GLP-1 の前駆体となることがわかった。その後、1985 年には Schmidt らにより GLP-1 がラット膵島からインスリン分泌を促進することが示され[63]、1987 年、健常人にグルコースと GLP-1 を静脈投与した際、インスリン分泌が顕著に促進され、耐糖能が改善されることが示された[39]。この研究から、GLP-1 が第 2 のインクレチンであることが明確になった。さらに 1990 年代、GIP 受容体と GLP-1 受容体の遺伝子の単離、解析が報告され[65,68,72,81]、これらの受容体欠損マウスを作製、解析することで GIP と GLP-1 がインクレチンであることが証明された[48,64]。

これらのインクレチンは、共に血糖依存的にインスリン分泌を促進させる消化管ホルモンである。通常、グルコース刺激によるインスリン分泌のメカニズムは、①グルコースが膵β細胞膜上にある糖輸送担体（GLUT）を介して細胞内へ取り込まれると、②ミトコンドリアで酸化的リン酸化を受け、速やかにATPが産生される。そして、③細胞内のATP濃度が上昇することで、細胞膜上のATP感受性K⁺チャネルが閉鎖し、④細胞膜は脱分極を起こす。その後、⑤電位依存性Ca²⁺チャネルが活性化され、⑥Ca²⁺が細胞内へ流入すると、⑦インスリン分泌顆粒の開口放出が引き起こされる。一方、インクレチンはチャネル経路を介さず、①GIPもしくはGLP-1特異的受容体（7回膜貫通型G蛋白質共役型GIPR/GLP-1R）を介し、②アデニル酸シクラーゼを活性化させ、③細胞内サイクリックAMP（cAMP）濃度が上昇する。そして、④プロテインキナーゼA（PKA）やcAMP-GEFⅡ活性を亢進させることによって、⑤インスリン分泌を増強させる特別な経路を取る **Fig.1**。また、インクレチンによるインスリン分泌促進作用は、グルコース存在下においてのみ増強され、血中グルコース濃度が80 mg/dL以下ではその作用が見られないことが特徴である[80]。

GIP（Glucose-dependent insulintropic peptide）は、42個のアミノ酸からなるポリペプチドであり、炭水化物や脂肪などの栄養素の摂取に伴い、胃、十二指腸および小腸上部に存在するK細胞から分泌される。空腹時の総GIP（活性型GIP＋不活性型GIP）の血中濃度は、健常人で0-20 pmol/Lであり、食後30-60分で150-500 pmol/Lに達すると報告されている[56,77]。GIPは血中に分泌されたのち、全身に広範に発現している分解酵素であるDipeptidyl peptidase-4（DPP-4）により、速やかにN末端の2アミノ酸残基が切断され、不活化型となるため、血中半減期は約5分と報告されている **Fig.2** [47]。GIP受容体は7回膜貫通型G蛋白質共役型受容体で、その発現部位は膵α、β細胞、十二指腸、小腸、脂肪細胞、脳下垂体などの脳全般、副腎、骨芽細胞など多く

の臓器に分布している[72,83]。

GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) は、主に小腸下部 (回腸や大腸) に存在する L 細胞において、前駆体であるプログルカゴンの C 末端から Glicentin、Oxyntomodulin、GLP-2 とともに生成される。37 アミノ酸からなる GLP-1 (1-37) は、生成後 N 末端の 6 アミノ残基が切断され、活性型 GLP-1 である GLP-1 (7-36) あるいは GLP-1 (7-37) として分泌される。GLP-1 分泌も炭水化物および脂肪などの栄養素摂取により促進され、健常人の血中 GLP-1 濃度は、空腹時で 10-20 pmol/L、食後は 30-50 pmol/L まで上昇することが示されている[56,77]。また、GLP-1 は L 細胞からの分泌直後にすでに毛細血管内皮細胞に存在する DPP-4 により分解を受けるため、血中半減期は約 2 分と非常に短く **Fig.3** [76]、活性型 GLP-1 は門脈血中ですら分泌量の 25%程度になるとされている。さらに肝や血中での代謝により、膵島などの受容組織に到達する活性型 GLP-1 は分泌量の 10~15%と見積もられている[34]。

GLP-1 や GIP といったインクレチンは、血糖依存的インスリン分泌促進の他に、全身の様々な器官で多様な作用を持つことが分かっている。

GLP-1 は膵 α 細胞に作用してグルカゴン分泌を抑制させる働きを持つ。これは、① α 細胞内の cAMP シグナルの活性化による直接的な作用、② GLP-1 により刺激されたインスリン分泌による作用、③ ソマトスタチン分泌を介した抑制作用、④ 神経系を介する作用 の 4 つが考えられている[36,38]。GLP-1 は用量依存的に膵 α 細胞からのグルカゴン分泌を抑制し、GLP-1 持続投与により食後ばかりでなく空腹時のグルカゴン濃度も低下させる。この作用はグルコース濃度に依存し、低血糖時には消失する[55]。また、GLP-1 の消化管に対する作用としては胃排泄抑制作用があり、GLP-1 産生 L 細胞の分布が主に遠位回腸以後であることより、ileal brake(栄養素が遠位回腸に到達すると胃内容物排泄が遅延する現象)の介在因子とも考えられている。また GLP-1 投与は生理学的濃

度から用量依存的に胃排出を抑制することがげっ歯類やヒトで示されている[54]。糖尿病患者において GLP-1 受容体作動薬投与で見られる食後高血糖の改善は、インスリン分泌促進、グルカゴン分泌抑制、そして胃排出抑制作用に大きく依存しているとされ[79]、1 型糖尿病患者においても食後高血糖の低下をもたらす[26]。この作用は *in vivo* において、主に迷走神経を介する直接作用と考えられている[36]。さらに、GLP-1 に特徴的なのが、脳に作用し中枢性の食欲抑制作用を示すことである[1,5,45,67,71]。げっ歯類では GLP-1 の脳室内投与により用量依存的に摂食抑制が起こることが確認されており、この作用は GLP-1 拮抗薬である exendin(9-39)の投与で消失し、exendin(9-39)単独投与では摂食量が増えることから、脳内の GLP-1 が生理的な摂食抑制に働くことが示唆された[71]。2 型糖尿病患者に GLP-1 受容体作動薬を投与した臨床研究の結果では、プラセボ群と比較して HbA1C（ヒトの血糖コントロールマーカー）が 0.97%低下し、また体重も有意に低下させたとの報告がある[4]。しかし、門脈血中の GLP-1 濃度を上昇させる DPP-4 阻害薬ではその効果は明らかではない。これは中枢神経内の GLP-1 受容体への直接結合がより強い方が摂食抑制をもたらすためと考えられる。また、GLP-1 は胃排出を遅延させるため、その 2 次的影響として満腹感をもたらす可能性がある一方で、GLP-1 は空腹時の空腹感も抑制することから、胃排出抑制とは独立した作用と考えられている[34]。

一方、GIP は脂肪に対する直接的なエネルギー蓄積作用と、インスリン分泌促進を介した間接作用によって生体内で腸管から吸収したエネルギーを脂肪に効率よく吸収させる、“儉約ホルモン”として作用することが知られている。GIP はリポタンパクリパーゼを活性させ、血中のトリグリセリドを分解し、細胞内に遊離脂肪酸を取り込ませる働きを持つ。また、肥満状態における血糖維持のための代償的なインスリン分泌にも作用することが知られており[28]、GIP の催肥満作用は脂肪に対する直接的なエネルギー蓄積作用と、インスリン

分泌促進を介した間接作用によることが示唆され、肥満者や肥満マウスでの血中 GIP 濃度が高いことから証明されている[13,22,84]。また、 α 細胞に直接作用してグルカゴン分泌を促進させるという、GLP-1 とは反する作用を示すことが分かっている[1]。

そして、GLP-1 には膵 β 細胞の機能改善、膵 β 細胞容積の保持（アポトーシス抑制、細胞新生・複製促進）などの働きを持つことも分かっている[21,65,69]。2 型糖尿病患者の糖尿病発症後の追跡結果によると、インスリン分泌能は経年的に低下していくと考えられており[32]、これを食い止める可能性をもつ GLP-1 に期待が集まっている。

ヒトおよびげっ歯類において報告されている GIP、GLP-1 の作用を [Table.1](#) に示す。

このように GIP および GLP-1 はインスリン分泌作用以外にも様々な作用を有し、糖代謝活性を行っていることが分かる。しかしながら、ヒトの 2 型糖尿病患者においては、インクレチンの分泌異常や反応性の低下が報告されており、糖代謝異常の一因としてあげられている。

2 型糖尿病患者では、食後高血糖が 1 つの特徴であるが、この一因としてインクレチンの作用障害が考えられている。2 型糖尿病患者では、GIP 濃度はむしろ上昇しているが、GIP に対するインスリン分泌反応が顕著に低下しており、1 型糖尿病患者においても反応性の低下が報告されている[51,53]。この反応性の低下は GIP そのものの減少ではなく、GIP 特異的受容体（GIPR）の発現性の変化に関連していることが示唆されており、日本人の 2 型糖尿病患者においては GIPR の遺伝子変異がすでに同定されている[40]。また、2 型糖尿病患者における GLP-1 濃度は、健常人と比べて低下しているが、外因性 GLP-1 を投与するとインスリン分泌の促進が認められるため、2 型糖尿病の病態には GLP-1 分泌障害の関与も要因の 1 つと考えられている[57]。さらに、GLP-1 受容体(GLP-1R)

欠損マウスでは膵島の数やサイズが減少しており、GLP-1 は膵 β 細胞の増殖に重要な役割を果たしていることが示唆され、また、GLP-1 はインスリン遺伝子、グルコキナーゼ、GULT2 などの遺伝子を促進するなど、様々な作用を介してグルコース恒常性の維持に寄与している[64]。

以上より、インクレチンはインスリン分泌を促進させる働きをもつとともに、様々な形で糖代謝の調節を行っており、食事療法や薬剤治療のターゲットとして注目を浴びている。

しかしながら、これまでインクレチンに関する基礎的研究はマウスやラットでの報告がほとんどであり、小動物臨床で一般的な犬猫に関する研究報告は少ない。近年、小動物領域でも肥満が大きく問題とされている中で、インクレチンは、血糖正常化のみならず肥満、生活習慣病予防や糖代謝改善の重要な因子とされており、小動物臨床においてもその有用性は大きいと考える。

そこで本研究では、

第2章：犬のインクレチン作用とインクレチン分泌細胞の RNA 発現解析

第3章：犬のインクレチン日内変動と栄養組成の違いがインクレチン分泌にあたえる影響

第4章：インクレチン製剤が犬の糖代謝へおよぼす影響

以上3点について検討し、犬におけるインクレチンの基礎的研究を行った。

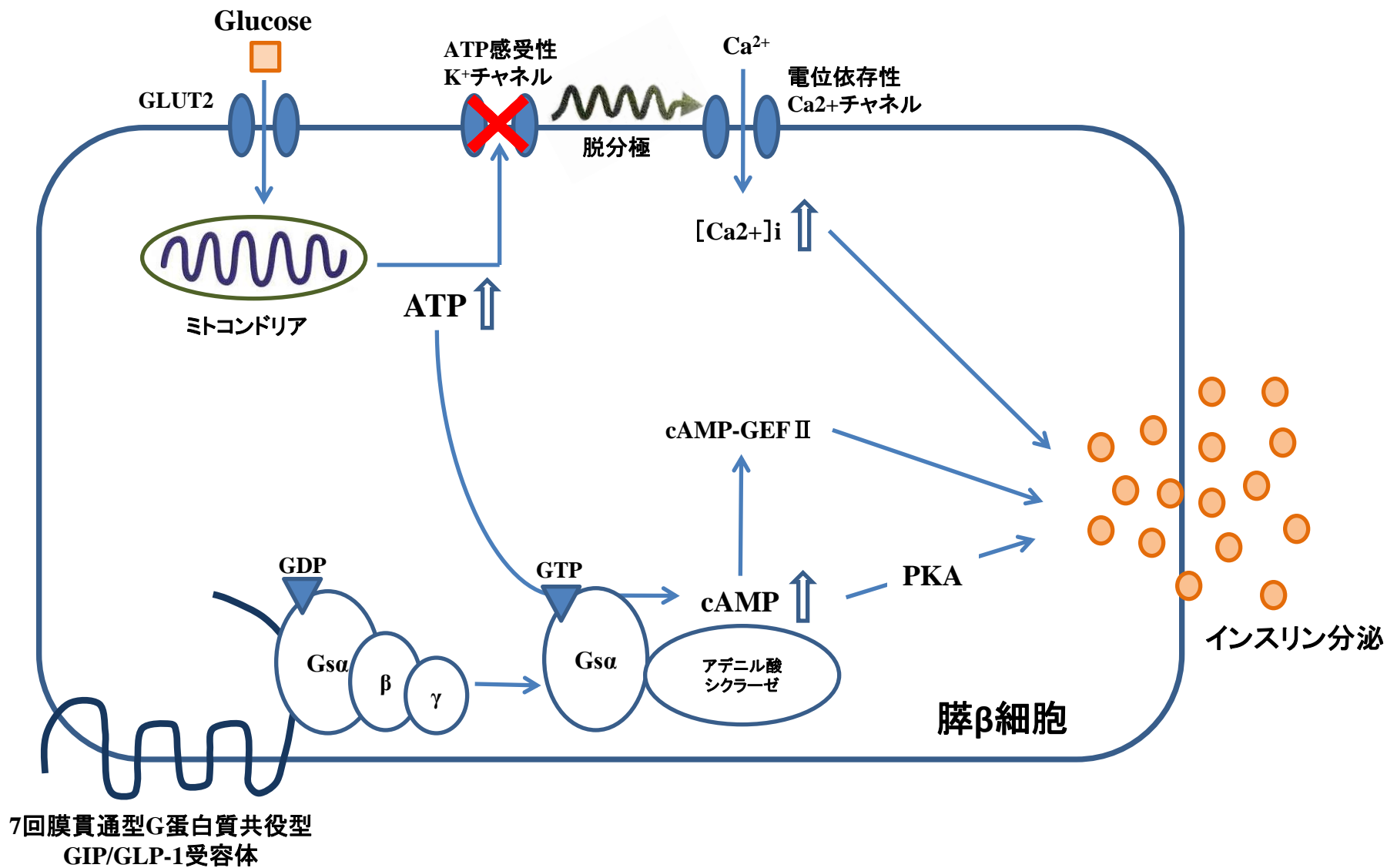


Fig.1 インスリン分泌作用機序

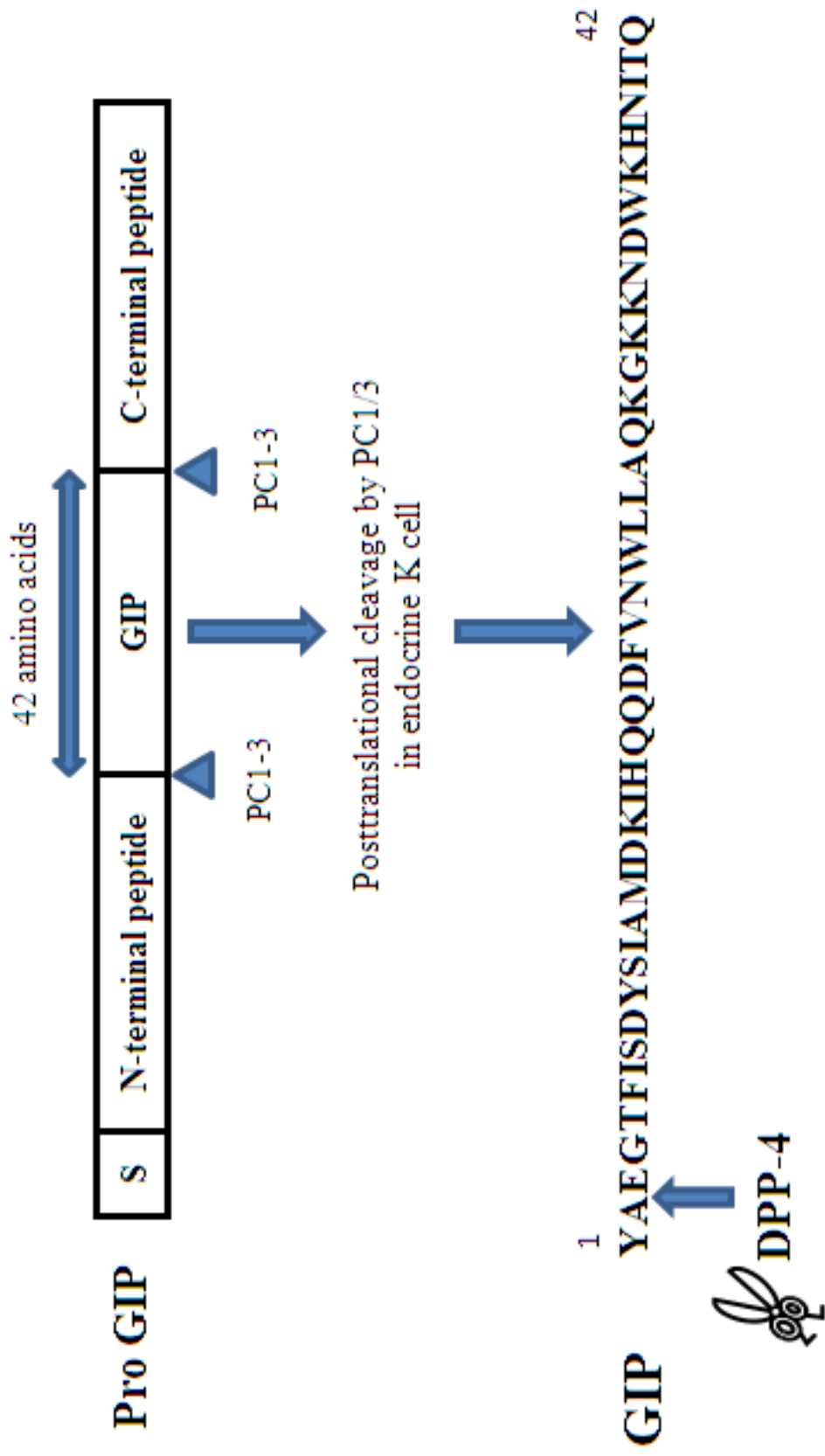


Fig.2 GIP Processing

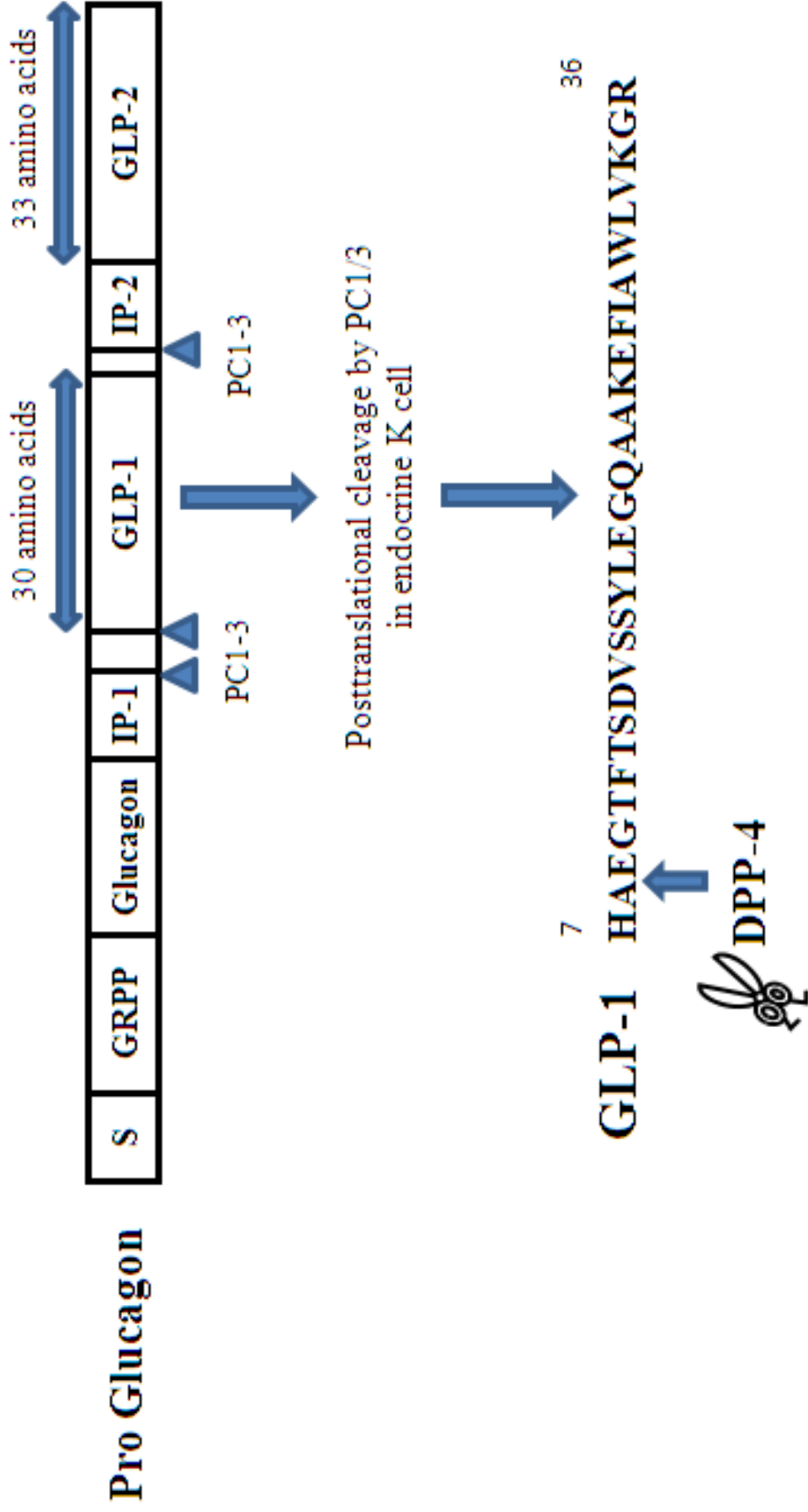


Fig.2 GLP-1 Processing

Table.1 Actions of GLP-1 and GIP .

	GIP	GLP-1
Insulin secretion	↑	↑
Glucagon secretion	↑	↓
Food intake of central nervous system	×	↓
Fat accumulation	↑	×
Gastrointestinal tract motility	×	↓
Gastric acid secretion	↓	↓
β cell apoptosis (in rodent)	↓	↓

第 2 章

犬のインクレチン作用とインクレチン分泌細胞の RNA 発現解析

第1節 健常犬におけるインクレチン作用の検討

緒言

グルコースを経口投与した場合、同程度の血糖上昇をきたすように経静脈投与した場合と比較して、経口投与の方がインスリン分泌反応は大きくなる。健常人における報告では、75g 経口糖負荷試験（Oral glucose tolerance test : OGTT）と静脈内糖負荷試験（Intravenous glucose tolerance test : IVGTT）を同じ血糖変動にしてインスリン分泌量を比較したところ、OGTTの方が約1.7倍分泌量が多くなったとの報告がある[51]。これは、グルコース恒常性に関わるインクレチンと呼ばれる消化管ホルモンが、血糖依存的にインスリン分泌を促進させる働きを持つためであるということがわかっている。以後、このような反応をインクレチン作用と呼ぶようになった。

本節では、健常犬におけるインクレチン作用の有無について検討するため、ヒトでのインクレチン作用の報告を参考に[51]、リアルタイムで血糖測定が行える人工膵臓装置を健常犬に設置し、グルコースを経口的に投与した場合と、経静脈投与した場合の血糖変動を同等にして、インスリン分泌反応の違いを確認した。また、犬におけるグルコース刺激による GIP、GLP-1 濃度変動について明らかにするために、同時に血中 GIP、GLP-1 濃度を測定し、ヒトとの反応性の違いについても考察した。

材料および方法

1. 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 臨床部門で健常犬として飼育されているビーグル犬 5 頭（3-6 歳齢：去勢雄 2 頭、避妊雌 3 頭）を用いた。これらの犬は、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されたものを用いた。また、ビーグル犬たちは温度、湿度、照明を管理された施設内でケージにて単独飼育していた。フードは成犬用総合栄養食(セレクトスキンケア (ROYAL CANIN JAPON、東京、日本)) を休息時エネルギー要求量 ($RER = B.W^{0.75} \times 70$) $\times 1.6$ kcal 量を 1 日 2 回に分けて与えられ、飲水は自由飲水で管理していた。各犬のプロフィールを **Table.2** に示す。

2. 糖負荷試験

まず始めに OGTT を行い、血糖値を記録した。次に記録した OGTT の血糖値と同等の変動になるよう IVGTT を行った。

OGTT は犬における経口糖負荷試験の報告を参考に[70]、50%グルコース溶液（ブドウ糖注 50%PL「フソー」（扶桑薬品工業株式会社、大阪、日本）を 1 g/kg 量、1 分間かけてシリンジにて経口的に投与した。なお、この試験ではリアルタイムで血糖値を確認できる人工臍臓装置を設置し、糖負荷試験中の血糖値を記録した。血液を持続的に採取するため 20DX”BD Insyte Autoguard Shielded IV Catheter（ベクトンデッキンソン、東京、日本）を右橈側皮静脈に設置し、Nikkiso STG-22 人工臍臓装置（日機装株式会社、東京、日本）と Nikkiso FS-D2G blood sampling tube（日機装）を用いて接続した。血糖値は、Nikkiso STG-22 人工臍臓装置を用いてグルコースオキシダーゼ法によりリアルタイムにて測定した。人工臍臓装置と健常犬をラインで接続後、30 分間無処置で安定状態に保った後、糖負荷前採血を行い、糖負荷試験を開始した。

次に、OGTT で記録された血糖変動曲線を、IVGTT で再現するために、留置針を左橈側皮静脈に、人工膵臓装置を右橈側皮静脈に設置した。人工膵臓装置に表示された血糖値を確認しながら、OGTT での血糖変動と同じになるよう左橈側皮静脈より持続点滴にて 30%に希釈したグルコース溶液を注入した。

試験は 12 時間以上絶食下にて行い、飲水は自由飲水とした。採血は糖負荷前を 0 分とし、負荷後 5、10、20、30、45、60、90、120 分の合計 9 ポイント、全て頸静脈より行った。

3. 検体処理

採取した血液は直ちにそれぞれの測定項目ごとに適した検体処理を行った。

血糖値および血清インスリン濃度測定用検体は、血液凝固促進剤添加血清分離管（インセンパック®Ⅱプラスチック真空採血管（積水メディカル株式会社、東京、日本））に移し、凝固させた後、400 g ×15 分間遠心して血清を分離しサンプルとした。

GLP-1 測定用検体は DPP-4 inhibitor 試薬（DPP-IV Inhibitor. Cat #DPP4-010（Millipore Headquarters, Missouri, USA））を 10 μ L 添加し、4℃で冷却しておいた EDTA 加採血管（ベノジェクト®Ⅱ真空採血管（テルモ株式会社、東京、日本））に、採取した血液を 1 mL 移して混和した。その後直ちに 1000 g ×10 分間 4℃条件下にて冷却遠心した後、血漿を分離し、血中 GLP-1 濃度測定検体とした。GIP 測定用検体は、EDTA 加採血管に採取した血液を 1 mL 移して混和した。その後直ちに 3000 g ×15 分間 4℃条件下にて冷却遠心した後、血漿を分離し、血中 GIP 濃度測定検体とした。

サンプルは測定まで-80℃にて凍結保存した。

4. 測定項目および測定方法

測定項目は血糖値、および血中インスリン濃度で、OGTT においてはインクレチンである血中 GIP (Total) 濃度、血中 GLP-1 (Active) 濃度も測定した。

血糖値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））を用い、自動分析装置（日立 7180（日立ハイテクノロジーズ、東京、日本））にて測定した。

血中インスリン濃度は酵素免疫測定法(enzyme linked immunoassay : ELISA)にて、市販のイヌインスリン測定 ELISA 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、神奈川、日本））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、抗体固相化プレート、インスリン標準品、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為に、凍結乾燥されたインスリン標準に 100 μ L 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 μ L と検体希釈液 150 μ L 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 μ L と検体希釈液を 100 μ L 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 μ L と血液サンプルもしくはインスリン標準溶液をプレートアレンジメントに従って 5 μ L ずつ添加して 4℃で 2 時間静置した。プレート内容を捨て、タオルで完全に水分を取り除いた後、洗浄液を各ウェル 300 μ L 添加し、アスピレーターで吸引した。この洗浄操作を 5 回行い、最後にタオルで完全に水分を取り除いた。その後、各ウェルに酵素標識抗インスリン抗体溶液を 100 μ L ずつ添加して室温で 30 分静置した。そして、先ほど

と同様の洗浄操作を 7 回行い、各ウェルに酵素基質溶液を 100 μ L ずつ添加してさらに遮光下室温で 30 分正確に静置した後、直ちに反応停止液を各ウェル 100 μ L ずつ添加して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 450 nm/620 nm 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。

血中 GIP 濃度、血中 GLP-1 濃度は以下の ELISA キットを用いてプロトコルに従って測定した【GIP 測定 ELISA キット (Rat/Mouse GIP (Total) 96-Well Plate. Cat #EZRMGIP-55K (Millipore))、GLP-1 測定 ELISA キット (Glucagon-like peptide-1 (Active) ELISA kit 96-Well Plate. Cat #EGLP-35K (Millipore))】。

ー血中 GIP 濃度測定ー

まず始めに血液サンプル、ELISA キット内容を室温にしたのち、96 穴プレートに洗浄液を 300 μ L ずつ添加し、室温で 5 分静置した。洗浄液を捨て、タオルで完全に水分を取り除いた後、プレートアレンジメントに従って、スタンダード試薬、陽性コントロール、陰性コントロールに使用するウェルに希釈液を 80 μ L ずつ、基質溶液を 10 μ L ずつウェルに添加し混和した。その後、スタンダード試薬、陽性コントロール、陰性コントロールを 10 μ L ずつ、計 100 μ L/ウェルになるように添加した。サンプル測定用ウェルには希釈液 90 μ L ずつ、サンプルを 10 μ L ずつ、計 100 μ L/ウェルになるように添加した。その後プレートミキサーにて室温で 1.5 時間、400-500 rpm 条件下にて攪拌した。プレート内容を捨て、タオルで完全に水分を取り除いた後、洗浄液を各ウェル 300 μ L 添加し、アスピレーターで吸引した。この洗浄操作を 3 回行い、最後にタオルで完全に水分を取り除いた。そして、直ちに Detection Antibody 試薬を各ウェル 100 μ L ずつ添加して、プレートミキサーにて室温で 1 時間、400-500 rpm

条件下にて攪拌した。先ほどと同様の洗浄操作を 3 回行い、各ウェル 200 μL ずつ酵素溶液を添加して、プレートミキサーにて室温で 30 分間、400-500 rpm 条件下にて攪拌した。同じく、先ほどと同様の洗浄操作を 3 回行い、各ウェル 100 μL ずつ基質溶液を添加して、プレートミキサーにて室温で 400-500 rpm 条件下にて攪拌した。攪拌はプレートリーダーを 370 nm 波長に設定して、スタンダード曲線の最高値 (2000 pg/mL) の吸光度が 1.2-1.8 になるまでおよそ 5-20 分間続けた。最後に各ウェルに反応停止液を 100 μL ずつ添加し、軽く攪拌させてホスファターゼ活性を停止し、プレートリーダーにて波長 450 nm/590 nm 条件で吸光度を測定し、スタンダード曲線から血中 GIP 濃度を算出した。

ー血中 GLP-1 濃度測定ー

まず始めに血液サンプル、ELISA キット内容を室温で融解した。次に、96 穴プレートに洗浄液を 300 μL ずつ添加し、室温で 5 分静置した。洗浄液を捨て、タオルで完全に水分を取り除いた後、プレートに希釈液を 200 μL ずつ添加し、各ウェルにスタンダード試薬、陽性コントロール、陰性コントロールまたは検体を 100 μL ずつ加えてプレートミキサーにて攪拌した。そして、シーラーでプレートを覆った後、4°C 冷蔵下で 20-24 時間インキュベートした。翌日、室温で 5 分静置してからプレート内容を捨て、タオルで完全に水分を取り除いた。その後、洗浄液を各ウェル 300 μL 添加し、アスピレーターで吸引した。この洗浄操作を 5 回行い、最後にタオルで完全に水分を取り除いた。そして、直ちに Conjugate 試薬を各ウェル 200 μL ずつ添加して室温で 2 時間静置した。先ほどと同様の洗浄操作を 3 回行い、各ウェル 200 μL ずつ酵素基質溶液を添加して室温遮光にて 20 分静置した。次に、スタンダード曲線の最小値 (2 pM) と最大値 (100 pM) をプレートリーダーでモニターしながらさらに遮光を続け、発光幅が最大になったところで反応停止液を各ウェル 50 μL ずつ添加し、室温遮光条件下にて 5 分静置し、ホスファターゼ活性を停止させた。

最後に、プレートリーダーにて波長 350 nm/460 nm 条件で発光度を測定し、スタンダード曲線から血中 GLP-1 濃度を算出した。

5. 統計

グループの間に有意性があるかを評価するために、Paired t-test、One-Way Repeated Measures ANOVA、および Post hoc test として Dunnett post test、Two-Way Repeated Measures ANOVA、および Post hoc test として Bonferroni post test を用いた。全ての解析は Graphpad Prism analysis software を用いて統計処理した。 $P < 0.05$ を統計学的に有意であるとみなした。なお、結果は全て平均±標準偏差 (Mean±SD) で示した。

結果

糖負荷試験 0 分から 120 分までの血糖値と血中インスリン濃度変動と曲線下面積 (Total area under the curve during 0-120min : AUC_{0-120min}) を **Fig.4**、OGTT 下での血中 GIP 濃度、血中 GLP-1 濃度変動を **Fig.5** に示した。

各ポイントの血糖値変動と Glu AUC_{0-120min} には有意差は認められなかった (Paired t-test)。以上より、IVGTT と OGTT の血糖変動は同等であったと考えた。そして、同程度の血糖変動条件下でインスリン分泌量を比較したところ、血中インスリン濃度の変動では有意差は認められなかったが、OGTT で若干上昇していた (Two-Way Repeated Measures ANOVA)。Ins AUC_{0-120min} は IVGTT に比べ OGTT で有意に上昇しており (Paired t-test, *P<0.05)、その上昇は IVGTT の約 1.3 倍であった。

血中 GIP 濃度変動は、糖負荷前 (0 分値) と比較して糖負荷後 15-90 分にかけて有意に上昇していた (One-Way Repeated Measures ANOVA and Dunnett post test, *P<0.05)。糖負荷前は 64.8 ± 42.24 pg/mL であったのに対して、最高値は糖負荷後 45 分で 293.9 ± 80.80 pg/mL まで上昇した。また、血中 GLP-1 濃度変動は、糖負荷前 (0 分値) と比較して糖負荷後 15、20 分で有意に上昇しており (One-Way Repeated Measures ANOVA and Dunnett post test, *P<0.05)、糖負荷前は 6.2 ± 1.00 pmol/L であったのに対して、最高値は糖負荷後 20 分で 12.1 ± 5.11 pmol/L まで上昇を示した。

考察

同じ血糖変動条件下で Ins AUC を比較したところ、IVGTT と比べて OGTTの方がインスリン分泌量が多くなったことから、健常人の報告と同様、健常犬においてもインクレチンによるインスリン分泌促進の可能性が考えられた。また、血中インスリン濃度は最も血糖値が上昇している糖負荷後 20-60 分にかけて、有意差は認められなかったが IVGTT と比較して OGTT で上昇が大きくなっており、血糖依存的なインスリン分泌促進作用が示唆された。また、OGTT 下での血中 GIP、GLP-1 濃度が糖負荷前（0 分値）と比較して糖負荷後 15 分以降に有意に上昇していたことから、グルコースの経口投与によってインクレチンが分泌されたことが明らかとなった。以上より、IVGTT と比較して OGTT でインスリン分泌の有意な上昇が認められたのは、GIP および GLP-1 の上昇が要因の 1 つであると考えられ、ヒトと同様に犬でもインクレチン作用が確認できた。

しかし今回の結果では、OGTT の Ins AUC は IVGTT の約 1.3 倍であり、1.7 倍増加したという健常人での報告に比べて[51]、健常犬ではインクレチン作用が小さいことが考えられた。

インクレチンは血糖依存的なインスリン分泌促進作用を持つために、インスリン分泌量は血糖値の上昇程度に大きく左右されると考えられるが、健常犬の血糖値のピーク値と、健常人の血糖値のピーク値はほぼ同じ値であった[51]。インクレチンによるインスリン分泌促進作用は、ヒトの報告においては血糖値が 80 mg/dL 以下では見られないことが特徴であるといわれているが[80]、今回の結果から全頭で一時、血糖値が 150 mg/dL を上回っていることから、インクレチン作用が認められるはずの血糖値上昇であったことが想定される。また、血糖値のピーク値は同等であったが、ヒトでは経口糖負荷後 180 分までかけてゆるやかに空腹時血糖に戻るのに対して、健常犬では糖負荷後 120 分には

空腹時血糖値まで低下していた。同様に血中インスリン濃度も、ヒトでは経口糖負荷後 180 分の血中インスリン濃度は空腹時の約 2 倍であったのに対して、健常犬では糖負荷後 120 分までに空腹時の血中インスリン濃度と同等の値まで低下していた。よって、健常犬では血中インスリン濃度の上昇に対する血糖値の低下がヒトより顕著であると考えられ、インスリンによる血糖降下作用が大きいために、インスリン分泌がそれほど大きくなかったと考えられた。犬は、一度の食事で大量に摂取し、しばらく食事を休止するというヒトとは異なる摂食方法をとるために[2]、犬には本来、栄養素を非常に効率よく代謝、蓄積する機能が備わっていることが示唆される。そのため、血中に存在するグルコースをより短時間で効率よく細胞内に取り込み、蓄積していく能力が犬では高く、少量のインスリンで十分に血糖値が低下するという結果に繋がったことが考えられた。

さらに、犬でインクレチン作用が小さいのは、グルコース刺激による GIP、GLP-1 分泌が小さいことが関連している可能性も考えられた。グルコース負荷量が異なるため、一概に比較はできないが、健常人での同様の研究報告[42,51]においては、ピーク時の血中 GLP-1 濃度は空腹時の約 2.3 倍であったのに対して、本研究の健常犬の血中 GLP-1 濃度ピークは糖負荷後 20 分で空腹時の約 1.95 倍 (6.2 ± 1.00 vs 12.1 ± 5.11) と、その上昇はヒトに比べて若干小さかった。また、血中 GLP-1 濃度変動は糖負荷後 30 分で半減期を迎えており、ヒトでの報告に比べると早期に半減していることがわかった。GLP-1 を産生する L 細胞は、小腸下部から大腸に多く発現しているが、GLP-1 分泌は食物が消化管に入ってごく初期（数分-15 分）に始まる。これは、栄養素の消化管への到達だけで GLP-1 分泌が刺激されるとは考えにくく、ホルモン、特に GIP を介する分泌経路や、自立神経系（迷走神経）を介する経路が存在すると考えられている。このホルモンや神経系を介した初期相の分泌は 15-30 分、腸管の栄養素

による直接刺激を介したものが後期（90-120 分）の分泌に関わっているとヒトでは報告されている[42,60]。本研究結果において、GLP-1 濃度が糖負荷後 10-30 分まで上昇しているのも、この初期分泌機構が働いているものと考ええる。そして、初期分泌以降、栄養素による直接刺激を介した GLP-1 分泌が犬ではほとんど認められなかったことが示唆された。健常人での 75g OGTT と、480 kcal の食事負荷試験（meal tolerance test : MTT）の血中 GLP-1 濃度を比較した研究において、OGTT の方がカロリー量が低いにも関わらず、血中 GLP-1 濃度が高値を示すことが報告されている[42]。この報告から、ヒトにおいてはグルコースが GLP-1 分泌の最大の刺激物質であることが分かる。一方、犬では通常食と高脂肪食を負荷した際の GLP-1 分泌量を比較した研究で、高脂肪食の方が血中 GLP-1 濃度が高値を示したと報告されている[73]。このことから、炭水化物や脂肪、蛋白質といった各栄養素に対する GLP-1 分泌反応には種差が存在する可能性が示唆され、犬はヒトと比較してグルコース刺激による GLP-1 分泌が小さいことが考えられた。

一方、GIP 濃度は GIP 測定 ELISA キットが Total 量測定であり、DPP-4 酵素による分解を受けたあとの不活化 GIP も測定されているため、活性型を測定している GLP-1 の結果と比較して長時間、高値を推移しているように見える。GIP 分泌細胞は GLP-1 よりも小腸上部に位置していることから、おそらく GLP-1 分泌ピークである糖負荷後 20 分よりも早期に GIP 分泌ピークを迎えることから、糖負荷後 5 分以降に GIP 分泌は上昇しはじめ、糖負荷後 10-15 分に活性型 GIP 濃度ピークを示すことが考えられる。ヒトの報告では、GIP は脂質の摂取により分泌が大きくなることが報告されているため[60,61]、犬でも脂質に対する GIP 分泌反応を明らかにするとともに、各種栄養素に対する GLP-1、GIP の分泌反応の詳細を検討する必要もある。

さらにはヒトと犬では、そもそも栄養素が小腸に到達するまでのスピードの

違い、GIP および GLP-1 分泌細胞である K 細胞、L 細胞や、各標的臓器の GLP-1 受容体の分布状態に違いがあり、それがグルコース刺激による GIP、GLP-1 分泌に影響を及ぼす可能性も考えられた。哺乳動物のインクレチン分泌細胞の分布解析について、これまでいくつか研究が行われているが、ブタ、ラット、ヒトを比較した研究によると、これら 3 つの動物種におけるインクレチン分泌細胞の分布は異なると報告されている[19]。しかしながら、健常犬におけるそれらの報告についてはほとんどなされていない。

そのため、続く第 2 節では、健常犬におけるインクレチン分泌細胞の分布解析を行うことにした。

第2節 健康犬におけるインクレチン分泌細胞のRNA発現解析

緒言

インクレチンには GIP と GLP-1 の 2 つがあるが、これらは食物を経口的に摂取した場合に小腸の上部より GIP、小腸の下部より GLP-1 がそれぞれ分泌される[56,77]。GIP を分泌する細胞は K 細胞と呼ばれ、主に十二指腸、空腸を中心とした小腸上部に局在するのに対し、GLP-1 を分泌する細胞は L 細胞と呼ばれ、主に小腸下部に局在するといわれている。K 細胞と L 細胞は小腸粘膜の基底膜上に存在し、いわゆる開放型内分泌細胞といわれ、その頭部は小腸管腔側に達している。その頭部は微絨毛で覆われており、管腔側の栄養素をセンシングするようになっている[58]。

哺乳動物のインクレチン分泌細胞の分布解析について、これまでいくつか研究が行われているが、ブタ、ラット、ヒトを比較した研究によると、これら 3 つの動物種におけるインクレチン分泌細胞の分布は異なると報告されている[19]。そして、分泌細胞の分布の違いは、GIP、GLP-1 それぞれの分泌パターンに影響を及ぼす因子となりうる。

第1節において、GIP および GLP-1 分泌細胞である K 細胞、L 細胞や、各標的臓器の GLP-1 受容体の分布状態の違いが、犬におけるインクレチン作用が小さいことと関連がある可能性が考えられた。しかしながら、犬におけるインクレチン分泌細胞の分布状態についての報告はほとんどなされていない。

本節では、本章では健康犬におけるインクレチン分泌細胞の分布解析を行い、ヒトやその他の哺乳動物での報告とどのように異なるかを明らかにする。

材料および方法

1. 材料

本学獣医学部獣医外科学教室より提供された 5 頭の健常ビーグル犬（1-2 歳 齢：雌 5 頭）の腸管 3 部位（小腸上部十二指腸領域、小腸中部空腸領域、小腸 下部回腸領域）を使用した。

12 時間絶食絶水下にてプロポフォール（「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 7 mg/kg 量で導入後、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、開腹後サンプル採取を行った。採取部位は、胃幽門部より下位 10 cm（小 腸上部）、盲腸より上位 10 cm（小腸下部）、およびその中間（小腸中部）で、 採取には生検用トレパン（「KAI 生検トレパン(φ 8 mm)」、貝印株式会社、東 京、日本）を用いた。

2. 材料処理

(1) cDNA 作製

採材された腸管を直ちに 1 mL の RNeasy Lysis Buffer (SIGMA, Saint Louis, Mo, USA)を入れた滅菌チューブに入れ、4℃にて一晩浸漬後、RNeasy Lysis Buffer を除去し、その後 TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いホモジナイズし、total RNA を抽出した。total RNA抽出はRNA抽出用キットである RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN、東京、日本)を用い、プロトコルに従って行った。抽出後の RNA 溶液を微量検体用の分光光度計 Nano Drop™ Technologies (株式会社エル・ エム・エス、東京、日本)を用いて純度および濃度を測定し、OD₂₆₀/OD₂₈₀ で 示される純度が 1.8 以上であるもののみを使用した。逆転写反応には QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN) を用いた。テンプレート RNA 量が 400 ng 量となる量と dH₂O あわせて 12 μL と、gDNA Wipeout Buffer

2 μ L を加えて 14 μ L のゲノム DNA 除去反応液を作成し、42°C で 2 分間インキュベートし、その後直ちに表情にて静置した。別に、0.2 mL チューブに逆転写反応マスターミックスとして Quantiscript Reverse Transcriptase を 1 μ L、Quantiscript RT Buffer を 4 μ L、RT Primer Mix を 1 μ L の計 6 μ L で調節した。このマスターミックスに氷上で整地しておいたゲノム DNA 除去反応液を全量加えて、42°C、15 分間インキュベートで逆転写反応を行い、cDNA を作製した。Quantiscript Reverse Transcriptase を不活化するために 95°C、3 分間インキュベートした後、作製した cDNA 定量まで -80°C にて冷凍保存した。

(2) 定量 PCR 用プライマーの作製

GIP (XM846197)、GLP-1 (AF308439) の塩基配列を Gene Bank より入手し、ウェブ上ソフトの 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。内部コントロール遺伝子として β -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 に示した。

(3) サブクローニング

上記のプライマー対が目的の領域を増幅しているか確認するとともに、遺伝子発現の定量に用いる標準プラスミドを作製するために、PCR Product のサブクローニングを行った。まず、PCR 反応液の作製には TaKaRa Ex TaqR (TaKaRa、滋賀、日本) を用い、TaKaRa Ex Taq (5units/ μ L) を 0.25 μ L、10 \times Ex Taq Buffer を 5 μ L、dNTP Mixture (2.5 mM each) を 4 μ L、dH₂O を 37.75 μ L、forward/reverse Primer (10 nM) を 1 μ L ずつ、およびテンプレート cDNA を 1 μ L 使用した。この PCR 反応液を MyCycler サーマルサイクラー (バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社、東京、日本) を用いて 94°C

2 分間の初期反応に続き、94℃ 30 秒間、60℃ 30 秒間、72℃ 30 秒間を 35 サイクルで PCR 反応を行った。PCR Product は 2%アガロースゲル電気泳動法を行い、目的の位置にシングルバンドのみが形成されていることを確認した **Fig.6**。この PCR Product を 1 μ L、dH₂O を 3 μ L、T-Vector pMD20 (TaKaRa) を 1 μ L 使用し、DNA 溶液を作製した。この DNA 溶液に 5 μ L の DNA Ligation Kit<Mighty Mix> (TaKaRa) を添加し、ライゲーションのために 16℃で 30 分間インキュベートした。この Ligation Product 10 μ L に対して Competent Quick DH5 α (TOYOBO CO.,LTD.、大阪、日本) を 100 μ L 誌湯し形成転換のために 30 分間の on ice に続き 42℃、30 秒間ヒートショックを加えた後、on ice にて 2 分間静置した。この大腸菌液をあらかじめ作製しておいたアンピシリン含有 LB 寒天培地に塗布し、37℃のエアーインキュベーション内にて一晩培養した。翌日、培地上に白色のコロニーが形成されるのを確認した。1.5 mL チューブに dH₂O を 76.5 μ L、10 \times Ex Buffer を 10 μ L、dNTP Mixture (2.5 mM each) を 8 μ L、T-Vectorno 内部配列である M13 Primer M4/M13 Primer RV (10 μ M) をそれぞれ 2.5 μ L、TaKaRa Ex Taq (5 units/ μ L) を 2.0 μ L 入れ、PCR 溶液を調節し、新しい PCR チューブに 10 μ L ずつ分注した。番号表を付けたレプリカ用プレート (アンピシリン含有) を用意し、培地上のチェックした白いコロニーを滅菌したクリスタルチップの先で採り、PCR 溶液に添加後、レプリカ用プレートに軽く触れて、植金した。チェックしたコロニーについて上記操作を繰り返し行った。94℃ 2 分間の初期反応に続き、94℃ 30 秒間、55℃ 30 秒間、72℃ 30 秒間を 30 サイクルで PCR 反応を行った。PCR 終了後、2%アガロースゲルで電気泳動し、得られたバンドサイズから目的とする標的遺伝子がインサートされていることを確認した (インサートチェック)。レプリカプレートは 37℃のエアーインキュベーション内で 6-8 時間程度培養した。遠心管に LB 基礎培地 (アンピシリン含有) を 5 mL 分注し、インサートチェックで

選ばれた番号のコロニーをレプリカプレートから滅菌クリスタルチップで採り、植菌して、37℃のエアーインキュベーション内で一晩振とう培養した。プラスミド DNA の抽出には LoboPass™ Plasmid Mini Kit（北海道システム・サイエンス株式会社、札幌、日本）を用いてプロトコルに従って実施した。抽出したプラスミド DNA は微量検体用の分光光度計 Nano Drop™ Technologies（株式会社エル・エム・エス）にて純度および濃度を測定した。

（4）塩基配列の確認

得られたプラスミド DNA が目的の塩基配列を有しているかを確認するために、BigDye® Terminator v3.1 cycle Sequencing Kit（ライフテクノロジーズジャパン株式会社、東京、日本）を用いたシーケンス解析を行った。反応液は BigDye Terminator Ready reaction mix を 4 µL、BigDye Terminator 5×シーケンス Buffer を 4 µL、作製したプライマーをそれぞれ 1 µL、プラスミド DNA を 300 ng 加え、Total 量が 20 µL になるよう dH₂O で調節した。サーマルサイクラーを使用し、96℃ 1 分間の初期反応に続き、94℃ 10 秒間、50℃ 5 秒間、60℃ 4 分間を 25 サイクルで一本鎖反応を行った。PCR 後のサンプル 20 µL に対して Xtermination 試薬（ライフテクノロジーズジャパン株式会社）を使用し、SAM™ 溶液を 90 µL、BigDye Xterminator™ 溶液を 20 µL 添加した。30 分間攪拌後、3300 rpm で 2 分間遠心した。上清を全量シーケンス用チューブに移し、シーケンサー（ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer、ライフテクノロジーズジャパン株式会社）を用いて塩基配列の解読を行った。

なお、本実験で得られた遺伝子情報は NCBI 上の遺伝子データベースに登録した（Accession No. は [Table.3](#) のプライマー情報とともに示した）。

(5) 定量 PCR 用標準プラスミドの調整

定量 PCR に用いる標準プラスミドの調整を行った。プラスミド DNA は 1 kbp、1 μg 中に 9.1×10^{11} コピーを有するので、プラスミド DNA の溶液量あたりのコピー数[copies/ μL]は $\{(9.1 \times 10^{11}) \times \text{プラスミド濃度}[\mu\text{g}/\mu\text{L}]\} / \text{ベクター鎖長[kbp]}$ で算出することができる。この値をもとに、 10^8 copies/ μL のプラスミド DNA を含む溶液を作製し、EASY Dilution (for Real Time PCR) (TaKaRa) を用いて、 $10^7 \sim 10^1$ copies/ μL まで段階希釈を行った。この希釈サンプルを用いて、以下のように希釈直線性の検討を行った。SYBR Premix Ex Taq™ II Perfect Real Time (TaKaRa) を用い、SYBR Premix Ex Taq™ II を 10 μL 、PCR forward/reverse Primer (10 μM) を 0.8 μL ずつ、ROX Reference Dye を 0.4 μL 、dH₂O を 7 μL 、希釈サンプル $10^7 \sim 10^1$ をそれぞれ 1 μL 使用し、Total 量を 20 μL とした。調整した反応液を、リアルタイム PRC 装置 (Applied Biosystems 7300 Real-time PCR system ; ライフテクノロジーズジャパン株式会社) を使用し、94℃ 30 秒間の初期変性に続き、95℃ 5 秒間、60℃ 30 秒間の 40 サイクルで PCR 反応を行った。この反応の後に、95℃ 15 秒間、60℃ 60 秒間、95℃ 15 秒間の反応を行い、融解曲線を得た。

(6) 標的遺伝子発現量の定量

調整した標準プラスミド DNA を使用し、実験検体である腸管由来 cDNA に含まれるインクレチン遺伝子の絶対定量を行った。それぞれの遺伝子の増幅を標準プラスミドと同様の方法で行い、標準プラスミドから得られた検量線を用いて定量した。

3. 統計

グループの間に有意性があるかを評価するために、One-Way Repeated Measures ANOVA、および Post hoc test として Bonferroni post test を用いた。全ての解析は Graphpad Prism analysis software を用いて統計処理した。P < 0.05 を統計学的に有意であるとみなした。結果は平均±標準偏差 (Mean±SD) で示した。

結果

健常ビーグル犬の腸管 3 部位（小腸上部十二指腸領域、小腸中部空腸領域、小腸下部回腸領域）における GIP および、GLP-1 遺伝子発現量の比較を **Fig.7** に示した。

GIP 発現は小腸中部空腸領域（GIP-c）および、小腸下部回腸領域（GIP-b）と比べて、小腸上部十二指腸領域（GIP-f）で有意に高値を示していた[GIP-f、GIP-C、GIP-b = 6873 ± 1905 、 2498 ± 1301 、 70.1 ± 71.19 ; **Fig.7-(a)**]（One-Way Repeated Measures ANOVA and Bonferroni post test, * $P < 0.05$ ）。

GLP-1 発現は小腸上部十二指腸領域（GLP-1-f）と比べて、小腸下部回腸領域（GIP-1-b）で有意に高値を示していた[GLP-1-f、GLP-1-C、GLP-1-b = 88.5 ± 83.08 、 6861 ± 6656 、 20271 ± 18227 ; **Fig.7-(b)**]（One-Way Repeated Measures ANOVA and Bonferroni post test, * $P < 0.05$ ）。

考察

哺乳動物の小腸における GLP-1 発現を解析した研究によると、ラットでは小腸上部十二指腸領域においても GLP-1 が発現している一方、ヒトおよびブタにおいてはほとんど発現していないと報告されている。また、ヒトとブタでは小腸中部空腸領域が最も GLP-1 発現が多く、次いで小腸下部回腸領域であった。ラットは小腸下部回腸領域で最も GLP-1 が発現しており、また、GLP-1 が小腸全体に発現していることが明らかとされている[19]。また、GIP 発現はサルにおいて十二指腸領域で最も高発現している一方で、ブタにおいては空腸で最も高発現しているという報告もある[11,50]。このように、哺乳動物においてインクレチン分泌細胞の分布状態は大きく異なっていることが既に明らかとなっている。

本研究結果より犬において、GIP は小腸上部で最も発現しており、次いで中部、そして小腸下部ではほとんど発現していないことがわかった。GLP-1 は小腸上部ではほとんど発現していないが、小腸中部、下部となるにつれて発現が高くなっていた。以上より、第 1 節において、特にグルコース刺激による GLP-1 分泌が犬で小さいのは、インクレチン分泌細胞の分布が異なることが要因の一つとして考えられ、グルコースのように吸収の早い栄養素では、小腸の下部で高発現している GLP-1 分泌細胞まで至らず、犬ではグルコース刺激による GLP-1 分泌が小さい可能性が示唆された。

小括

本章より、犬において経静脈投与するより経口投与した方がインスリンの分泌量が多くなることが示された。また、OGTT 下での血中 GIP、GLP-1 濃度が糖負荷後に有意に上昇していたことから、グルコースの経口投与によってインクレチンが分泌されたことが明らかとなった。以上より、IVGTT と比較して OGTT でインスリン分泌の有意な上昇が認められたのは、GIP および GLP-1 の上昇が要因の 1 つであると考えられ、ヒトと同様に犬でもインクレチン作用が確認できた。

しかし、今回の成績から、健常犬はヒトに比べてインスリン分泌量（インクレチン作用）が小さく、また GIP、GLP-1 分泌も小さいことが示唆された。これは、①グルコース刺激による GIP、GLP-1 分泌がヒトより小さい、②ヒトと比べて犬はインスリンによる血糖降下作用が強い、つまりはインスリンの効きがよいことから、インスリン分泌がそれほど上昇しなくとも血糖値が降下したためであると考えた。

さらに、第 2 節インクレチン分泌細胞の RNA 発現解析により、③ヒトの GLP-1 分泌細胞の分布と犬のそれは異なっており、このインクレチン分泌細胞の分布の違いもインクレチン分泌に影響を及ぼす可能性が示唆された。

Table.2 Profile of dogs used in the current study.

No.	Breeds	Age (years)	Sex	B.W (kg)	*RER \times 1.6 (kcal/day)
1	Beagle	3	castrated	12.94	764
2	Beagle	3	castrated	13.04	769
3	Beagle	6	spayed	9.25	594
4	Beagle	6	spayed	8.80	572
5	Beagle	5	spayed	6.16	438

$$*RER = B.W^{0.75}_{(kg)} \times 70$$

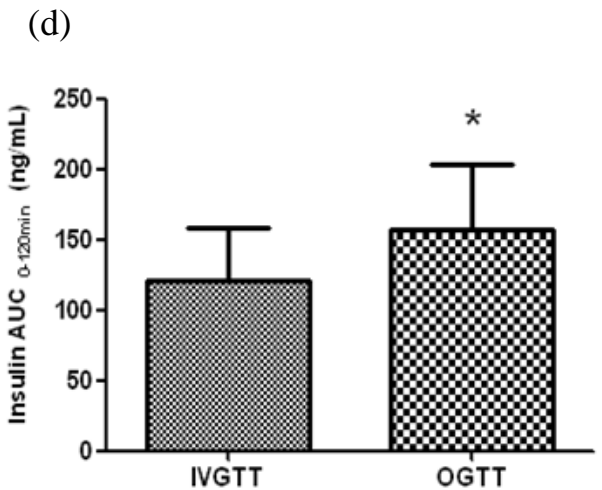
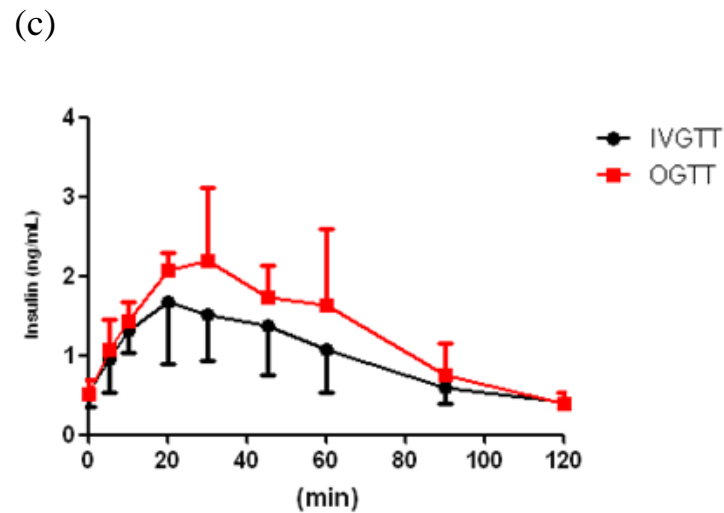
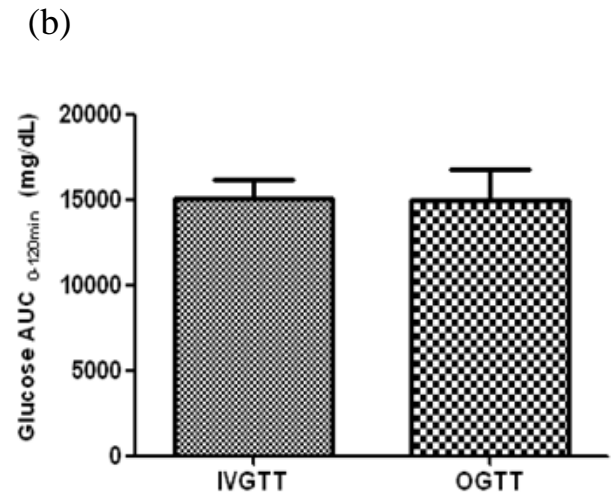
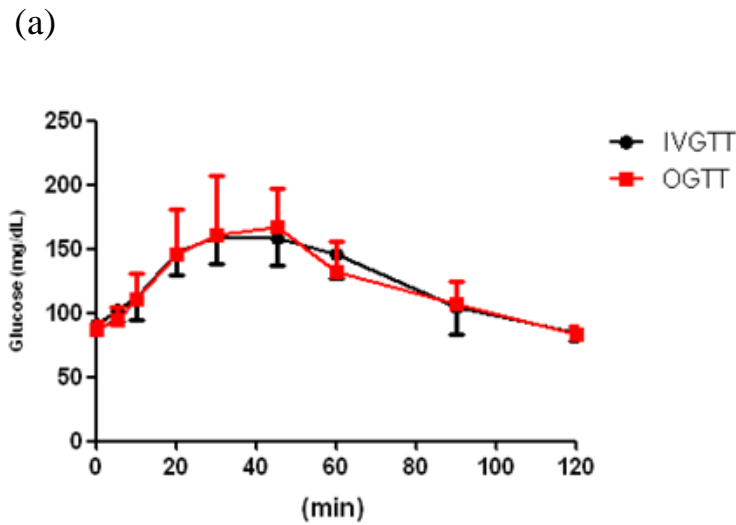
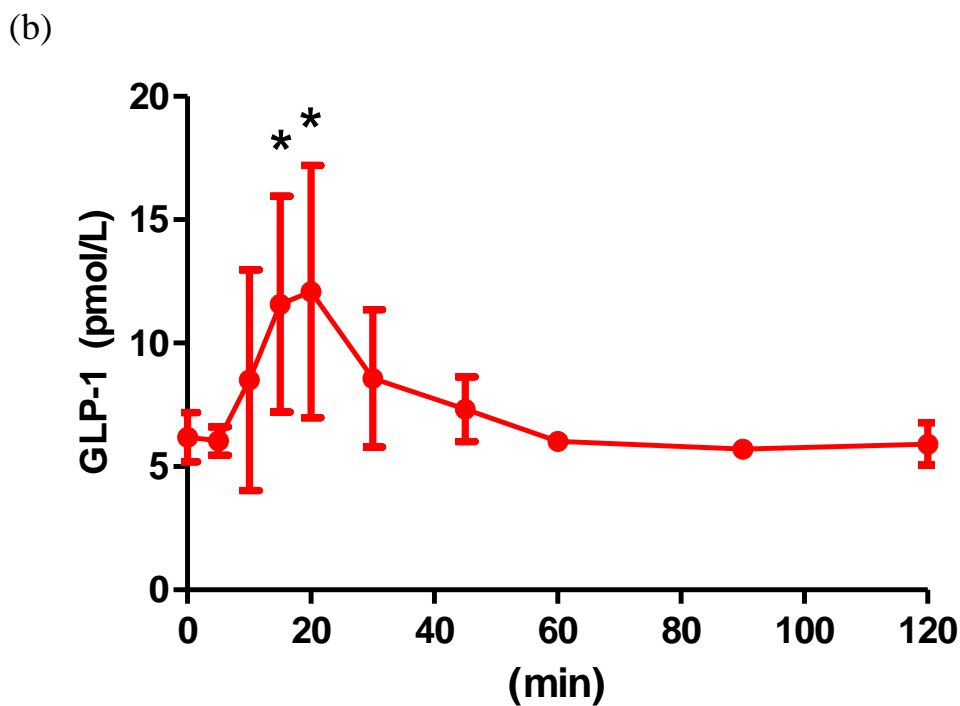
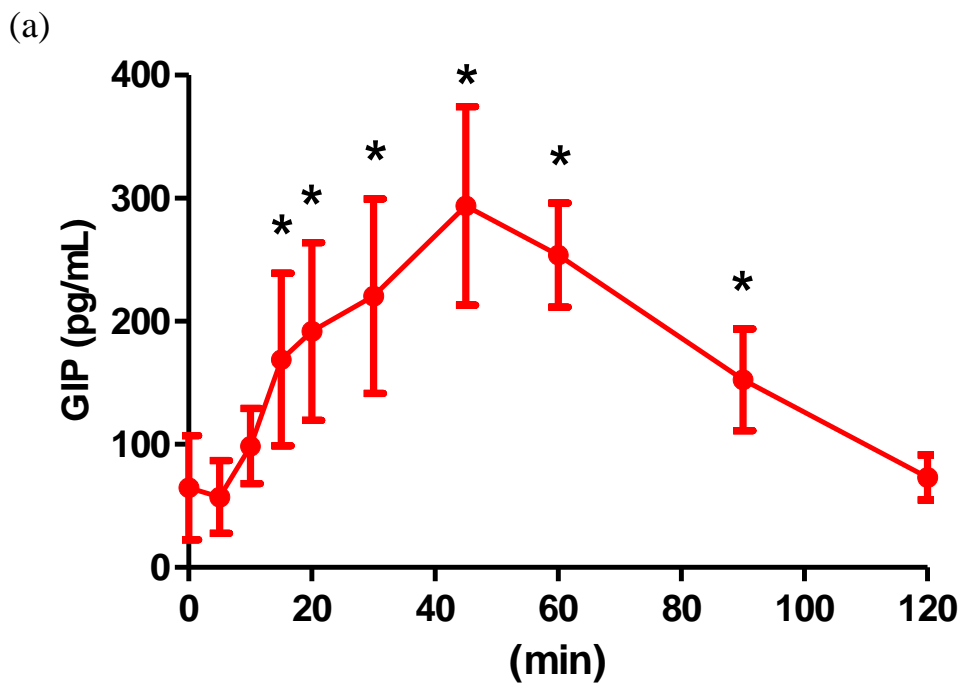


Fig.4 IVGTT と OGTT の比較

Mean±SD n=5
*P<0.05

静脈内糖負荷試験(IVGTT)と経口糖負荷試験(OGTT)における各測定項目の比較を示した。
 (a) 血糖値変動、(b) Glu AUC_{0-120min}、(c)血中インスリン濃度変動、(d) Ins AUC_{0-120min} であり、全て Mean±SDで示した。
 (a) (c) はTwo-Way Repeated Measures ANOVA、(b) (d) はPaired t-test を用いて統計解析を行い、P<0.05 を統計学的に有意であるとみなした。



Mean±SD n=5
*P<0.05 (vs 0min)

Fig.5 OGTT 下での血中GIP、GLP-1濃度変動

経口糖負荷試験(OGTT)における血中GIP、GLP-1濃度の変動を示した。

(a) 血中GIP濃度変動、(b) 血中GLP-1濃度変動であり、全てMean±SDで示した。

One -Way Repeated Measures ANOVA、およびPost hoc test としてDunnett post test を用いて統計解析を行い、P<0.05 を統計学的に有意であるとみなした。

Table.3 Primer sequences for Real-Time PCR

Target	Expected PCR product (bp)	Primertype	Sequence(5'-3')	Gene Bank Acc. No.
GIP	78	Forward	ccgaggggactttcatcagt	AB751500.1
		Reverse	ccagcagcccagttcacaaag	
GLP-1	50	Forward	cttatttggaaggccaagctg	AB751501.1
		Reverse	tttcaccagccaagcaatga	
β -actin	129	Forward	gccaaccgtgagaagatgact	AF021873
		Reverse	cccagagtccatgacaataccag	

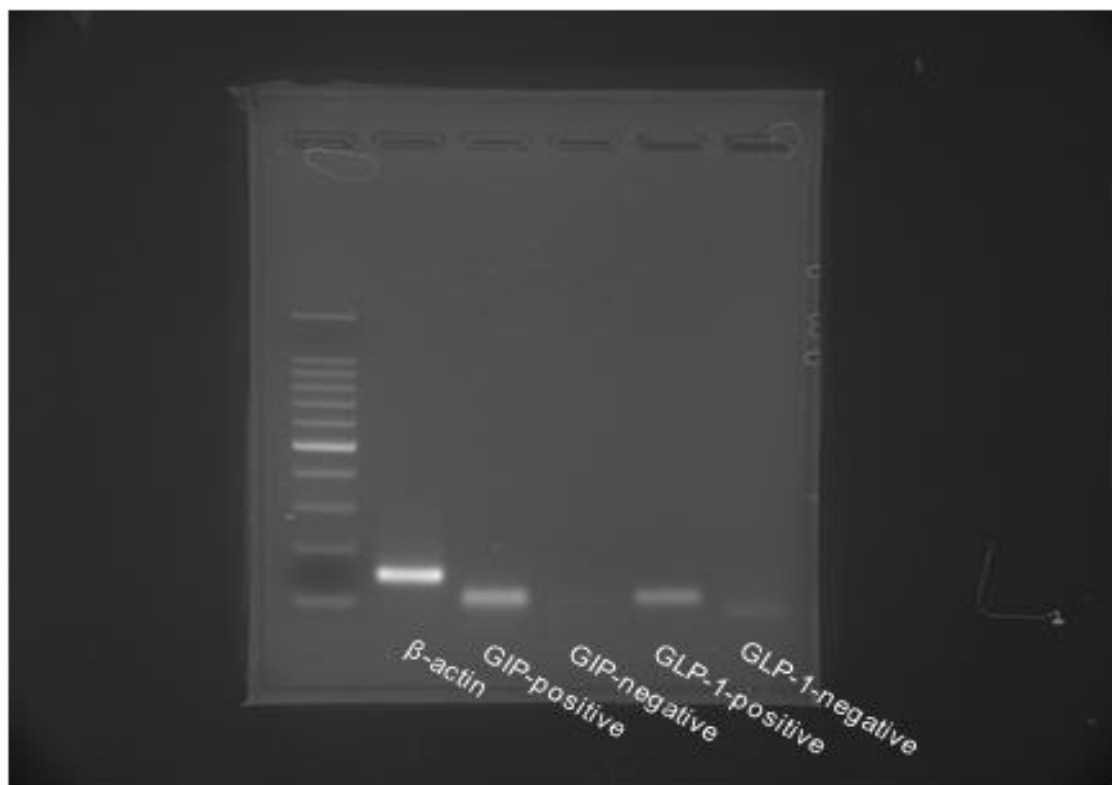
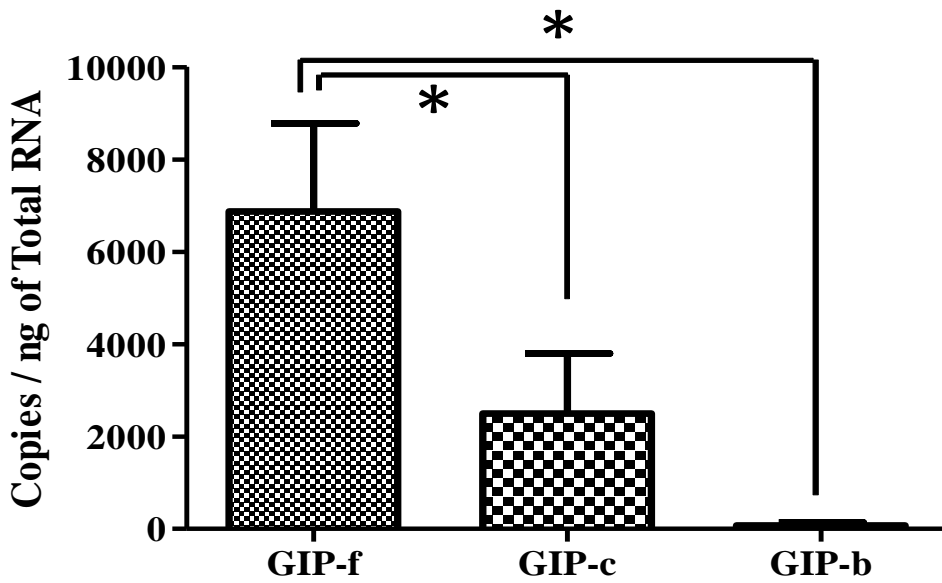


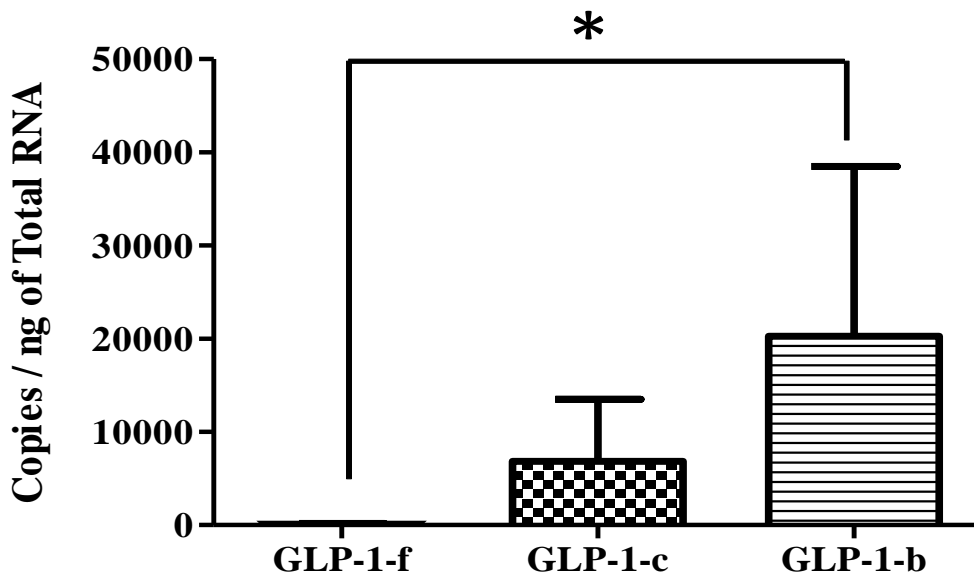
Fig.6 定量PCRプライマー対を用いたcDNA由来PCR産物の電気泳動象

腸管由来cDNAを鋳型として、Table.3 に示した定量PCR用プライマーを用いてPCRを実施した。いずれにおいても予想される一にバンドが形成されることを確認した。

(a)



(b)



Mean ± SD n=5

*P<0.05

Fig.7 GIP、GLP-1発現量

腸管由来細胞のGIP(a)、GLP-1(b) のmRNA 発現量を定量し、コピー数で比較した。

全ての結果はMean±SDで示した。

One-Way Repeated Measures ANOVA、および Post hoc test としてBonferroni post test を、用いて統計解析を行い、P<0.05 を統計学的に有意であるとみなした。

第 3 章

犬のインクレチン日内変動と

栄養組成の違いがインクレチン分泌に与える影響

第 1 節 健康犬のインクレチン日内変動と昼夜でのホルモンリズムの違い

緒言

GIP は小腸上部 K 細胞、GLP-1 は小腸下部 L 細胞からそれぞれ分泌され、膵 β 細胞膜上の特異的受容体を介してインスリン分泌を促進させる[13]。インクレチンによるインスリン分泌促進反応（インクレチン作用）は血糖依存的であり[22]、高血糖時のみインスリン分泌が促進されることが最大の特徴である。その他にも、GIP はグルカゴン分泌促進[1]、脂肪蓄積作用[28]、GLP-1 はグルカゴン分泌抑制[36,38]、胃ぜん動運動低下[54]、食欲抑制作用[1,5,45,67,71]を持つ。さらに、インクレチンは膵 β 細胞の分化・増殖・細胞保護にも関与していることが報告され、げっ歯類においては膵 β 細胞のアポトーシス抑制作用がすでに確認されている[21,65,69]。このように、インクレチンはインスリン分泌促進作用以外にも様々な形で糖代謝の調節を行っており、現在、ヒトの糖尿病患者に対する食事療法や肥満予防プログラムにて、内因性のインクレチン分泌に焦点を当てた研究が数多く行われている。

さらに、血糖変動およびホルモン変動には日周リズムが存在するという報告を受けて[35]、近年、「時間栄養学」と言われる新しい学問が注目をあびている。食事をすると血糖値は上昇し、膵 β 細胞から分泌されるインスリンによって細胞内へ取り込まれ、空腹時血糖値まで低下するのが通常の血糖変動である。しかし、ヒトでは糖質摂取による血糖上昇は朝 8 時から夜 8 時ごろまでは平均値以下を推移するが、夜 8 時以降は平均値以上を推移しやすくなり、血糖変動にも日周リズムが存在するという報告がある[35]。生体リズムとは、体温や血圧、睡眠やエネルギー代謝などの生命活動をはじめ、その日の体調、身体活動をコントロールしている健康管理の司令塔である。その中でも最も基本的な生体リズムが、約 24 時間の周期で変動する日周リズムである。この血糖値の日周リズ

ムには副腎皮質ホルモンやレプチンの日周リズムも関与している可能性が示唆されており、夜遅くの食事は血糖値が上昇しやすく、それが肥満を誘発することが知られている[35,43,74]。本研究分野は、ヒトでは「時間栄養学」と言われる新しい学問であり、これを応用した、糖尿病をはじめとする生活習慣病の制御は今後の医学分野の大きな課題であるとされている。

近年、小動物臨床においても肥満が問題視されている中、本節では食事内容のみでなく食事の時間に焦点を置き、インクレチンの日内変動と昼夜でのホルモンリズムの違い、そしてそれが血糖変動におよぼす影響や肥満を誘発する因子となり得るのかを検討した。

材料および方法

1. 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 臨床部門で健常犬として飼育されているビーグル犬 4 頭（2-6 歳齢：去勢雄 2 頭、避妊雌 2 頭）を用いた。これらの犬は、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されたものを用いた。また、ビーグル犬たちは温度、湿度、照明を管理された施設内でケージにて単独飼育していた。フードは成犬用総合栄養食(セレクトスキンケア（ROYAL CANIN JAPON））を休息時エネルギー要求量（ $RER = B.W^{0.75} \times 70$ ） $\times 1.6$ kcal 量を 1 日 2 回に分けて与えられ、飲水は自由飲水で管理していた。各犬のプロフィールを **Table.4** に示す。

2. 食事給与試験

24 時間の試験は犬に対する負担が大きいため、朝 7 時から夜 7 時までの「朝試験」と、夜 7 時から朝 7 時までの「夜試験」を別日程でそれぞれ 3 回ずつ、計 6 回試験を行い、インクレチンの日内変動を確認した。

フードは普段、供試犬に給与しているセレクトスキンケア（ROYAL CANIN JAPON）を用い、 $RER (B.W^{0.75} \times 70) \times 1.6$ kcal 量を 1 日 2 回に分けて、朝夜ともに 7 時に給与し、血液採取を行った。全ての試験間は 2 週間の休止期間を設け、消費カロリー量のばらつきを小さくするために、試験中の 12 時間は供試犬をケージレストにした（ケージサイズ 900×550×625mm）。

試験場は 25℃に室温管理された施設で、試験中は施設内照明を点けずに窓からの日照のみで管理し、夜間採血時には無影灯を犬の目に入らないように灯して採血を行った。

試験は 12 時間以上絶食下にて行い、飲水は自由飲水とした。血液採取は食事給与前を 0 時間とし、給与後 0.5、1、1.5、2、3、5、8、12 時間の合計 9 ポイン

ト、全て頸静脈より行った。採取された血液はそれぞれの測定項目ごとに適切な処理を行い（「3. 検体処理参照」）、測定に移った。

3. 検体処理

第2章 第1節と同様の方法で行った（「第2章 第1節 3. 検体処理」参照）。

4. 測定項目および測定方法

消費カロリーの指標として犬用歩数計（わんダント；富士通）を用い12時間の歩数を計測した。

血液測定項目は血糖値、血中インスリン濃度、血中 GIP 濃度、血中 GLP-1 濃度、血中遊離脂肪酸（NEFA）濃度の5項目とし、血糖値、インスリン濃度、血中 GIP 濃度、血中 GLP-1 濃度は第2章 第1節と同様の方法で測定を行った（「第2章 第1節 4. 測定項目および測定方法」参照）。NEFAは酵素法（イアトロテック NEFA（三菱化学メディエンス）を用い、自動分析装置（日立 7180（日立ハイテクノロジーズ））にて測定した。

5. 統計

グループの間に有意性があるかを評価するために、Paired t-test、Two-Way Repeated Measures ANOVA、および Post hoc test として Bonferroni post test を用いた。全ての解析は Graphpad Prism analysis software を用いて統計処理した。P<0.05 を統計学的に有意であるとみなした。なお、結果は全て平均±標準偏差（Mean±SD）で示した。

結果

血中 GIP、GLP-1 濃度の日内変動を [Fig.8](#) に示した。また、朝試験と夜試験の歩数計の結果および、血糖値、血中インスリン濃度、血中 GIP 濃度、血中 GLP-1 濃度、血中 NEFA 濃度変動と曲線下面積 (Total area under the curve during 0-120min : $AUC_{0-12hrs}$) を [Fig.9、10](#) に示した。

血中 GIP、GLP-1 日内変動は朝 7 時 (0 時間目) と夜 7 時 (12 時間目) の食事給与後から上昇し、血中 GIP 濃度は朝夜の食後 3 時間目 (3 時間目、15 時間目) に最高値 (AM : 386.2 ± 55.94 、PM : 335.8 ± 32.16) を示し、食前値 (空腹時 0 時間目) の約 8 倍であった。一方、血中 GLP-1 濃度は朝食後 1.5 時間目 (1.5 時間目) に最高値 (AM : 6.5 ± 2.31)、夜食後は食後 3 時間目 (15 時間目) に最高値 (PM : 7.2 ± 1.21) を示し、食前値 (空腹時 0 時間目) の約 1.5 倍上昇した。

次に、朝試験と夜試験での各測定項目を比較したところ、歩数計の変動結果は有意差はなかったが朝試験において、全ての時間で高値を示し、Step $AUC_{0-12hrs}$ は夜試験のおよそ 4 倍であった ([Fig.9-\(a,b\)](#) : Two-Way Repeated Measures ANOVA、および One-Way Repeated Measures ANOVA)。

血糖値変動および、Glu $AUC_{0-12hrs}$ は有意差は認められなかった ([Fig.9-\(c,d\)](#) : Two-Way Repeated Measures ANOVA、および One-Way Repeated Measures ANOVA)。一方、血中インスリン濃度変動は、食後 1 時間において朝試験に比べて夜試験で有意に高値を示した ([Fig.9-\(e\)](#) : Two-Way Repeated Measures ANOVA and Bonferroni post test * $P < 0.05$)。Ins $AUC_{0-12hrs}$ は有意な差は認められなかったが夜試験においてやや高値であった ([Fig.9-\(f\)](#) : One-Way Repeated Measures ANOVA)。

血中 GLP-1 濃度変動と血中 GIP 濃度変動は朝夜で有意な差は認められなかったが ([Fig.10-\(c,e\)](#) : Two-Way Repeated Measures ANOVA)、夜試験の血中 GLP-1 濃度は朝試験と比較して全ての時間で高値を示した。GLP-1 $AUC_{0-12hrs}$

は夜試験において有意に高値を示したが (Fig.10-(d) : One-Way Repeated Measures ANOVA and Bonferroni post test * $P < 0.05$)、GIP AUC_{0-12hrs} では有意差はなかった (Fig.10-(b) : One-Way Repeated Measures ANOVA)。また、朝試験の血中 NEFA 濃度変動は夜試験と比べて、食後 12 時間で有意に上昇していた (Fig.10-(e,f) : Two-Way Repeated Measures ANOVA and Bonferroni post test * $P < 0.05$)。

考察

血中 GIP、GLP-1 濃度は食事摂取にともない急激に上昇していき、食後 1.5-3 時間に最高値を迎え、その後緩やかに下降していくといった、食事摂取に依存する日内変動をとることがわかった。また、血中 GIP、GLP-1 濃度ともに朝 7 時からの 12 時間と夜 7 時からの 12 時間で異なる上昇スピードを示すこと、最高値も若干異なることが明らかとなった。

そのため、朝 7 時から 12 時間の「朝試験」と、夜 7 時から 12 時間の「夜試験」における各測定項目を比較検討した。血糖変動は差がなかったものの、インスリン濃度は夜試験で食後に高値を示したことから、同等の血糖値変動を維持するために必要なインスリン分泌が夜試験では上昇しており、昼間と比較して夜間は肥満を誘発しやすいことが考えられた。夜試験において、小腸上部から分泌される血中 GIP 濃度が食後 3 時間まで、若干ではあるが低値を示していることに加え、小腸下部から分泌される血中 GLP-1 濃度が高値を示しており、また最高値に達する時間が遅かったのは、夜間は消化管通過時間が遅延し、GLP-1 分泌細胞が存在する小腸下部への刺激が増加したためと考える。個別データから、GLP-1 分泌が夜間に上昇する個体の特徴として、夜間の歩数結果が低値であることがいえる。このことから、夜間の消化管通過時間の遅延に関しては、身体を動かしたり、ひねるなどの身体運動による消化管への物理的刺激が、夜間睡眠時間において減ることが関係すると考える。つまり、消化管運動には身体運動による消化管への物理的刺激も影響をおよぼす可能性が示唆された。また、朝試験の血中 NEFA 濃度が食後 12 時間で上昇したということは、脂肪組織からのエネルギー動員が行われており、活動エネルギー量に対して食物からのエネルギー供給が不足したためと考える。歩数計の変動結果においても、性格や年齢により大きな差が見られたために有意差はなかったが、朝試験で終始高値を推移しており、また Step AUC_{0-12hrs} は夜試験のおよそ 4 倍であっ

ため、夜間に比べて昼間の活動エネルギー量が高かったことが示唆される。夜間の血中 NEFA 濃度が朝試験のように上昇しなかったのは、夜間は消化管通過時間が遅延し、食物からのエネルギー供給が食後長時間持続したこと、また夜間は活動エネルギーによるエネルギー消費が小さいことが考えられた。

以上より、本節では健常犬のインクレチン日内変動を明らかにした。また、12 時間ごとに同じ食事を同じ量給与しても、昼夜のホルモンリズムは異なっていて、ヒトと同様、犬も夜間は肥満を誘発するホルモンリズムである可能性が示唆された。

そのため朝フードの内容として適切なのは、吸収の緩やかな水溶性繊維を含み、夜食前のエネルギー不足を補うこと、もしくは 12 時間毎ではなく夜食を多少早めの時間に給与することがよいと考える。夜用フードは炭水化物割合を落としてインスリン過剰分泌を防ぐことも考えられる。

第2節 栄養組成の違いが犬のインクレチン分泌にあたえる影響

緒言

GIP、および GLP-1 はインスリン分泌促進作用以外にも様々な形で糖代謝の調節を行っている。しかし、ヒトの糖尿病患者においては、これらインクレチンの分泌異常や反応性の低下が報告されており[53]、糖代謝異常の一因としてあげられている。そのため、現在ヒトの糖尿病患者においてはこれら2つのホルモンを治療ターゲットとしたインクレチン関連薬の研究が進められており、ヒトの2型糖尿病治療で主流である糖尿病治療薬と全く違うタイプの薬剤として現在、注目を浴びている。一方で、最近では、内因性インクレチン分泌を増加させ糖代謝活性を促すといったような、食事療法においてもインクレチンが期待されている。

インクレチンは小腸への物理的刺激によって分泌されるが、これは食物のサイズや栄養組成（炭水化物、タンパク質、脂肪の割合）、咀嚼回数などの違いによって大きく変動することがわかっている[12,42,77]。特に、栄養組成の違いはインクレチン分泌に加え、食後の血糖変動およびインスリン分泌に大きな影響を与える。すなわち、各栄養組成でのインクレチン分泌パターンを捉えることが、血糖変動に合わせた適切なインスリン分泌を促し、これが結果として肥満予防や糖尿病管理に対する効果的な食事療法に繋がると考えられ、現在、食事療法とインクレチン分泌に関する研究が盛んに行われている。

第2章において、犬にもインクレチン作用が存在することを確認し、その作用はヒトよりも若干小さいことを明らかにした。ヒトにおいては、OGTT とテストミール（Meal tolerance test, MTT）での GLP-1 分泌を比較した場合、同等のカロリー量を給与したにも関わらず、OGTTの方が GLP-1 分泌がより大きく上昇したことが報告されている[42]。これまで行われたヒトの研究では、インク

レチン分泌刺激因子として、特に、糖質と脂質があげられている[60,61]。しかしながら、元来、ヒトと犬では食性が異なることから、インクレチン分泌刺激因子は異なる可能性が考えられる。

インスリン分泌と肥満についてはこれまで多くの研究がなされている。インスリンはインスリン感受性リパーゼの活性を抑制し、中性脂肪の合成を促進することで体脂肪の増加に寄与すると考えられている。したがって、非効率的なインスリン分泌は脂肪をため込み肥満へと繋がるため、効率的なインスリン分泌（必要な時に必要な量を分泌させること）を促すためには、効率的なインクレチン分泌が必要だと考えられる。また、インクレチンは中枢性の食欲抑制作用を持つため、近年では摂食抑制の面からも注目されており、インクレチンの分泌パターンを捉えることは糖代謝活性、および肥満予防の観点から非常に重要である。

そこで本節では、栄養組成の違いが犬のインクレチン分泌に与える影響について検討し、肥満予防、糖尿病管理に適切な食事療法について考察することを目的とした。

材料および方法

1. 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 臨床部門で健常犬として飼育されているビーグル犬 6 頭（5-8 歳齢：去勢雄 1 頭、避妊雌 5 頭）を用いた。これらの犬は、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されたものを用いた。また、ビーグル犬たちは温度、湿度、照明を管理された施設内でケージにて単独飼育していた。フードは成犬用総合栄養食(セレクトスキンケア (ROYAL CANIN JAPON)) を休息時エネルギー要求量 ($RER = B.W^{0.75} \times 70$) $\times 1.6$ kcal 量を 1 日 2 回に分けて与えられ、飲水は自由飲水で管理していた。各犬のプロフィールを [Table.5](#) に示す。

2. 食事給与試験

異なる栄養組成を持つ市販のドライフード 5 種類を用いて、血糖値、血中インスリン濃度、血中 GLP-1 濃度および血中 GIP 濃度を測定し、各フードにおけるインクレチン分泌パターンとインスリン分泌、血糖変動の関係について検討した。供試フードは、供試犬に普段給与しているセレクトスキンケア (ROYAL CANIN JAPON) を通常食とした。このフードの特徴として、繊維量がそれほど多くなく、炭水化物、脂肪、タンパク質量は特に偏りが無い、総合栄養食ドライフードである。そして、通常食の栄養成分表示を基に以下の ROYAL CANIN 社のフード 4 種（高炭水化物食：消化器サポート（低脂肪）、高脂肪食：腎臓サポート、高繊維高タンパク食：減量サポート、高繊維高脂肪食：消化器サポート（高繊維））を対象フードに決定した [Table.6](#)。

各犬の試験前日体重をもとにフード量を決定した。フードは、 RER ($B.W^{0.75} \times 70$) $\times 1.6$ 量を 1 日 2 回に分けて朝夜ともに 7 時に給与し、それぞれのフード給与開始から 2 週間目に血液採取を行った。フード給与の順番はクロスオー

バー法を用い、フード変更はこれに従い血液採取日の翌日に行った。採取された血液はそれぞれの測定項目ごとに適切な処理を行い（「第2章 第1節 3. 検体処理」参照）、測定に移った。

試験は 12 時間以上絶食下にて行い、飲水は自由飲水とした。血液採取は食事給与前を 0 時間とし、給与後 0.5、1、2、3、4、6、8、10、12 時間の合計 10 ポイント、全て頸静脈より行った。

3. 検体処理

第2章 第1節と同様の方法で行った（「第2章 第1節、第2節 3. 検体処理」参照）。

4. 測定項目および測定方法

血液測定項目は血糖値、血中インスリン濃度、血中 GIP 濃度、血中 GLP-1 濃度とし、第2章 第1節と同様の方法で測定を行った（「第2章 第1節 4. 測定項目および測定方法」参照）。

5. 統計

グループの間に有意性があるかを評価するために、One-Way Repeated Measures ANOVA、および Post hoc test として Dunnett post test、Two-Way Repeated Measures ANOVA、および Post hoc test として Bonferroni post test を用いた。全ての解析は Graphpad Prism analysis software を用いて統計処理した。P<0.05 を統計学的に有意であるとみなした。なお、結果は全て平均±標準偏差（Mean±SD）で示した。

結果

血糖値、血中インスリン濃度、血中 GIP 濃度および血中 GLP-1 濃度変動と曲線下面積（Total area under the curve during 0-120min : AUC_{0-10hrs}）を Fig.11-14 に示した。

血糖値変動および Glu AUC_{0-12hrs} に有意な差は認められなかった Fig.11。

血中インスリン濃度変動では、通常食と比べて高炭水化物食で食後 1、1.5、2 時間に有意な上昇が認められたが、Ins AUC_{0-12hrs} では有意差はなかった Fig.12。

血中 GLP-1 濃度変動では通常食と比べて高繊維高タンパク食で食後 2、3 時間に有意に上昇していた。また、高繊維高脂肪食も食後に上昇していたが、通常食と比べて有意差は認められなかった。GLP-1 AUC_{0-12hrs} は通常食と比べて高繊維高タンパク食、高繊維高脂肪食で有意に高い値を示した。高繊維高タンパク食、高繊維高脂肪食間では GLP-1 AUC_{0-12hrs} に大きな差は認められなかった (Fig.13 : Mean±SD=79.71±18.04 vs 80.70±20.52)。通常食、高炭水化物食および高脂肪食の 3 食では、高脂肪食でやや高値を示したが、高繊維の 2 食ほどは上昇していなかった。

血中 GIP 濃度変動は、通常食と比べて高炭水化物食で食後 1.5、2、3 時間に有意に低値を、高脂肪食では食後 1 時間に有意に高値を示した。また高繊維高タンパク食では食後 1.5、2、3、4 時間に有意に低値を示した。GIP AUC_{0-12hrs} は、通常食と比べて高炭水化物食と高繊維高タンパク食で有意に低値を示したが、高炭水化物食、高繊維高タンパク質食間では GIP AUC_{0-12hrs} に差は認められなかった (Fig.14 : Mean±SD=1990±455.2 vs 1957±641.7)。GIP AUC_{0-12hrs} は高脂肪食において他の食事と比較して高値を示しており、食事の脂肪含量に影響を受ける傾向にあった (脂肪含量: 高脂肪食 (4.4 g/100 kcal)、通常食 (3.6 g/100 kcal)、高炭水化物食 (2.0 g/100 kcal)) (Fig.14 : Mean±SD=3003±593.9 vs 2598±673.5 vs 1990±455.2)。しかし、高繊維高脂肪食は脂肪含量が最も多いものの (4.8 g/100

kcal)、GIP AUC_{0-12hrs} はそれほど上昇しなかった (Fig.14: Mean±SD=2255±830.8)。

考察

本節では、食事中の栄養組成が異なる 5 種のフードを給与し、血糖値、インスリンおよび血中 GIP、GLP-1 濃度変動を比較した。

血糖変動の結果から、各フードで若干の違いはあるものの、およそ 100 ± 10 mg/dL の変動幅での変化にとどまっていた。

血中インスリン変動は、食後、生体内への血糖流入が比較的早期に行われる高炭水化物食では、食後 1~2 時間目までに食前値の約 5 倍まで上昇しており、その後は速やかに低下し、食後 3 時間目以降は他の食事とほぼ同等の変動を示した。Ins AUC_{0-12hrs} では他の食事と比較してやや高値を示しているものの有意差が認められなかったことから、高炭水化物食は食後 3 時間以内の食後高血糖が起こりやすく、インスリンの過剰分泌によって肥満を誘発しやすいことが示唆された。一方、繊維が多く含まれる高繊維高タンパク食、高繊維高脂肪食の 2 食では食物流入も緩やかになり、血中インスリン濃度は食後 1~2 時間目までに食前値の 3~4 倍まで上昇し、その後緩やかに低下してき、食後 8 時間目に食前値まで低下した。また、通常食と高脂肪食の繊維量は高炭水化物食より少ないにも関わらず、食後のインスリン分泌反応は大きくなかった。この結果から、食後早期のインスリン分泌反応は食事に含まれる炭水化物量に依存する傾向にあることが考えられた。また、犬はインスリン効果が強く、食事摂取による血糖上昇が小さい動物であることが第 2 章でも考えられており、血糖流入に対し、膵 β 細胞が敏感に反応してインスリンを分泌させ、厳密な血糖コントロールを行っていることが示唆された。

次に血中 GLP-1 濃度は、高繊維高タンパク食と高繊維高脂肪食の 2 食で上昇しており、またその上昇は食後 1.5~3 時間に食前値の約 1.5 倍を示し、食後 8 時間目に食前値まで低下した。これは、GLP-1 分泌細胞が小腸下部に存在するために、繊維を多く含む食事中栄養成分が小腸下部で多く吸収され、より GLP-1

濃度が上昇したと考えられる。また、高炭水化物食と高脂肪食では繊維量に大きな差はないが、血中 GLP-1 濃度は高脂肪食で上昇傾向にあった。高繊維高タンパク食と高繊維高脂肪食を比較すると差はなかったことから、GLP-1 分泌に大きく影響を及ぼすのは繊維量であることと、栄養組成では炭水化物に比べてタンパク質と脂肪が GLP-1 分泌を上昇させることが示唆された。この結果は、GLP-1 分泌最大の刺激因子は炭水化物であるというヒトでの報告[42]と異なるものであった。これには元来の食性が関わっており、ヒトと比べて犬は肉食性が強いために、炭水化物に対する GLP-1 分泌反応が小さいのではないかと考える。また、GLP-1 分泌細胞は小腸下部に多く存在すると言われているが、この分布状態は動物種によって多少異なることがラット、ブタなどでも報告されている[19,24,56]。第 2 章より、犬では小腸上部十二指腸領域には GLP-1 がほとんど発現しておらず、小腸中部空腸領域でもわずかであることから、高繊維食のように食物吸収が緩やかな食事ほど GLP-1 分泌が大きくなると考えられ、このインクレチン分泌細胞の分布の違いが、本節において高炭水化物食は GLP-1 分泌をそれほど刺激しないという、ヒトと異なる結果となった要因の一つであると考ええる。

血中 GIP 濃度の結果では、特に高脂肪食で食後 1 時間に大きく上昇しており、高繊維高タンパク食と高炭水化物食は他の食事と比べて食後 4 時間目まで低値を推移していた。GIP AUC_{0-12hrs} は高脂肪食において他の食事と比較して高値を示しており、食事時の脂肪含量に影響を受ける傾向にあることが示唆された。しかし、高繊維高脂肪食は脂肪含量が最も多いものの、GIP AUC_{0-12hrs} はそれほど上昇せず、高脂肪食、通常食に次いで 3 番目に高値を示した。GIP 分泌細胞は小腸上部に多く存在するため、繊維を多く含む食事の場合、食物吸収の遅延が起こり、繊維の少ない食事と比べると GIP 分泌反応は小さくなると考えられた。そのため、最も繊維量が少なく、脂肪が中程度含まれている通常食の方が、

高繊維高脂肪食と比べると $\text{GIP AUC}_{0-12\text{hrs}}$ は高値を示す結果となった。一方、脂肪含量が最も低い高炭水化物食では、繊維量が多くないにも関わらず GIP 濃度の上昇は小さかった。**Fig.14-(c)**は、フード 100 kcal 中に含まれる脂肪量を横軸に、 $\text{GIP AUC}_{0-12\text{hrs}}$ を縦軸にプロットしたグラフである。このグラフより、 $\text{GIP AUC}_{0-12\text{hrs}}$ は脂肪含量の増加にともない増加すること、そして繊維が多く含まれると GIP は低下することがわかった。ラットやヒトの報告でも、 GIP 分泌最大の刺激因子として脂肪があげられているが[60,61]、犬でも同じ反応が示された。以上より、 GIP 分泌の上昇は脂肪含量が大きく影響を及ぼしていること、繊維によって食物吸収が遅延し GIP 分泌は低値を示すこと、炭水化物とタンパク質は GIP 分泌にそれほど影響をおよぼさないことがわかった。

最近では、ヒトの糖尿病患者において、内因性インクレチン分泌と食事療法についての研究が盛んに行われている。栄養組成と GLP-1 、 GIP 分泌の関係についての研究[82]や、 GLP-1 の胃排泄抑制効果[54]、 GIP 分泌と BMI は正の相関を示す[29]といった報告があり、これらを総合すると、糖尿病患者の食事療法においては肥満予防および食後高血糖抑制の観点から、 GLP-1 分泌を促進、 GIP 分泌を抑制するような食事が良いとされる。本節より、犬においては高繊維食が GLP-1 分泌を促進させるためには効果的であり、また、低脂肪食が GIP 分泌を抑えることが示され、肥満予防、糖尿病管理に適切な食事療法としての有用な知見となることが期待された。

小括

本章では、犬のインクレチン日内変動と栄養組成の異なる食事が犬のインクレチン分泌におよぼす影響について検討した。

第1節では犬におけるインクレチン日内変動および糖代謝関連項目の朝夜での変動の違いについて明らかとなった。血中 GIP、GLP-1 濃度は食事摂取にともない急激に上昇していき、食後 1.5-3 時間に最高値を迎え、その後緩やかに下降していく日内変動をとることがわかった。朝 7 時からの 12 時間と夜 7 時間の 12 時間を比較すると、血中 GIP 濃度は朝でやや高値を示す傾向にあり、血中 GLP-1 濃度は夜において上昇スピードが遅く、そして最高値はやや高値を示した。また、夜は朝に比べてインスリン分泌が多いこと、朝は活動エネルギーに対して摂取エネルギーが不足していることが考えられた。一方、夜は活動エネルギーによるエネルギー消費が小さく、消化管通過時間が遅延している可能性も考えられた。以上より、犬において、1 日 2 回、同じ食事を同じ量給与しても昼夜のホルモンリズムは異なっており、夜間は肥満を誘発するホルモンリズムであることが示唆された。

第2節では栄養組成の異なる食事が犬のインクレチン分泌におよぼす影響について明らかとした。犬の GLP-1 分泌には栄養組成の違いはそれほど影響せず、むしろ繊維の量によって差が認められた。これは犬の GLP-1 分泌細胞が小腸下部に非常に多く、小腸上部にはほとんど発現していない為であることが示唆された。また、GIP 分泌は他動物種の報告と同様、フード中の脂肪含量の増加で上昇し、繊維を添加すると低下することがわかった。

Table.4 Profile of dogs used in the current study.

No.	Breeds	Age (years)	Sex	B.W (kg)	*RER \times 1.6 (kcal/day)
1	Beagle	2	castrated	12.8	758
2	Beagle	2	castrated	11.3	690
3	Beagle	6	spayed	8.8	572
4	Beagle	6	spayed	8.7	567

$$*RER = B.W^{0.75}_{(kg)} \times 70$$

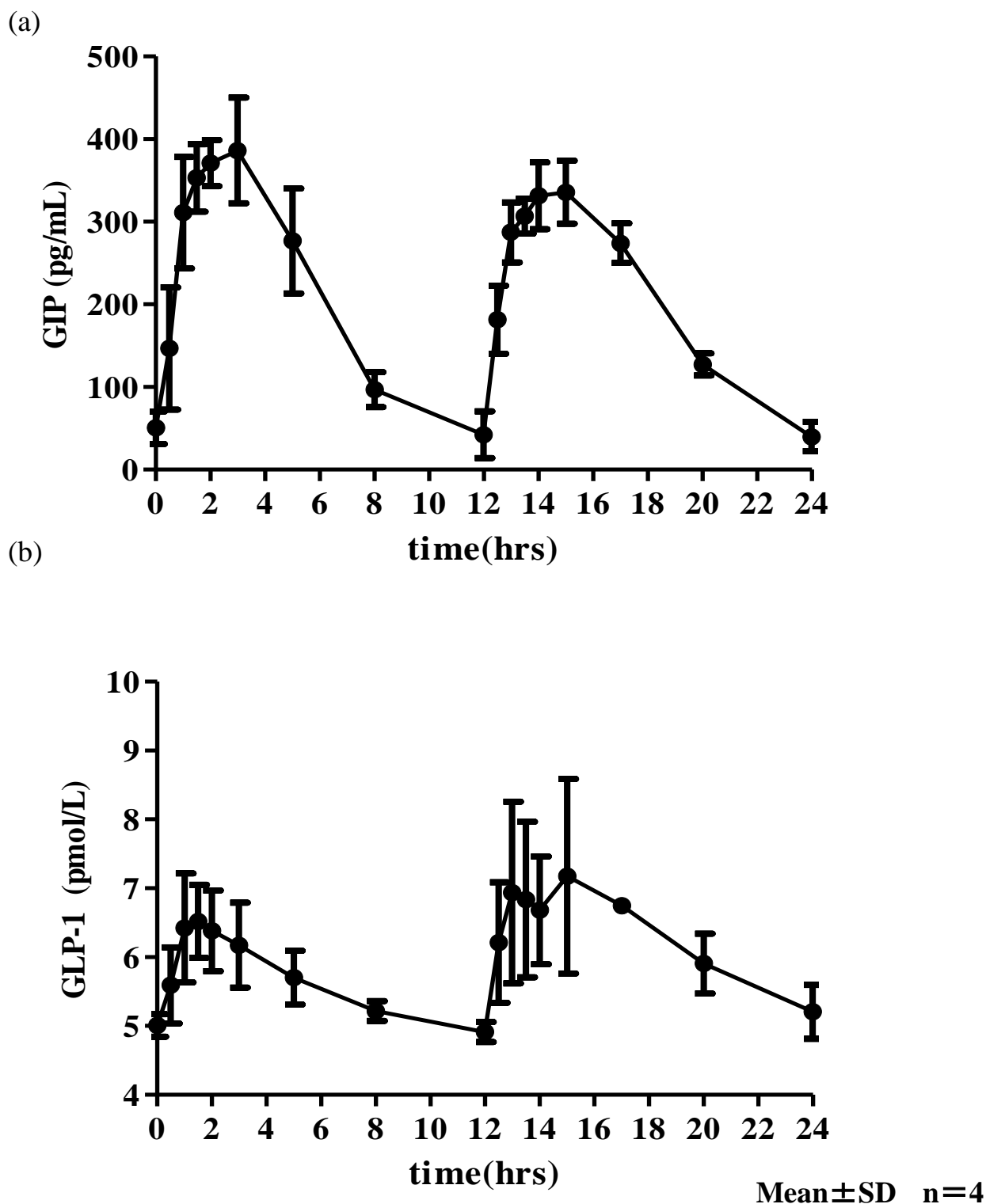
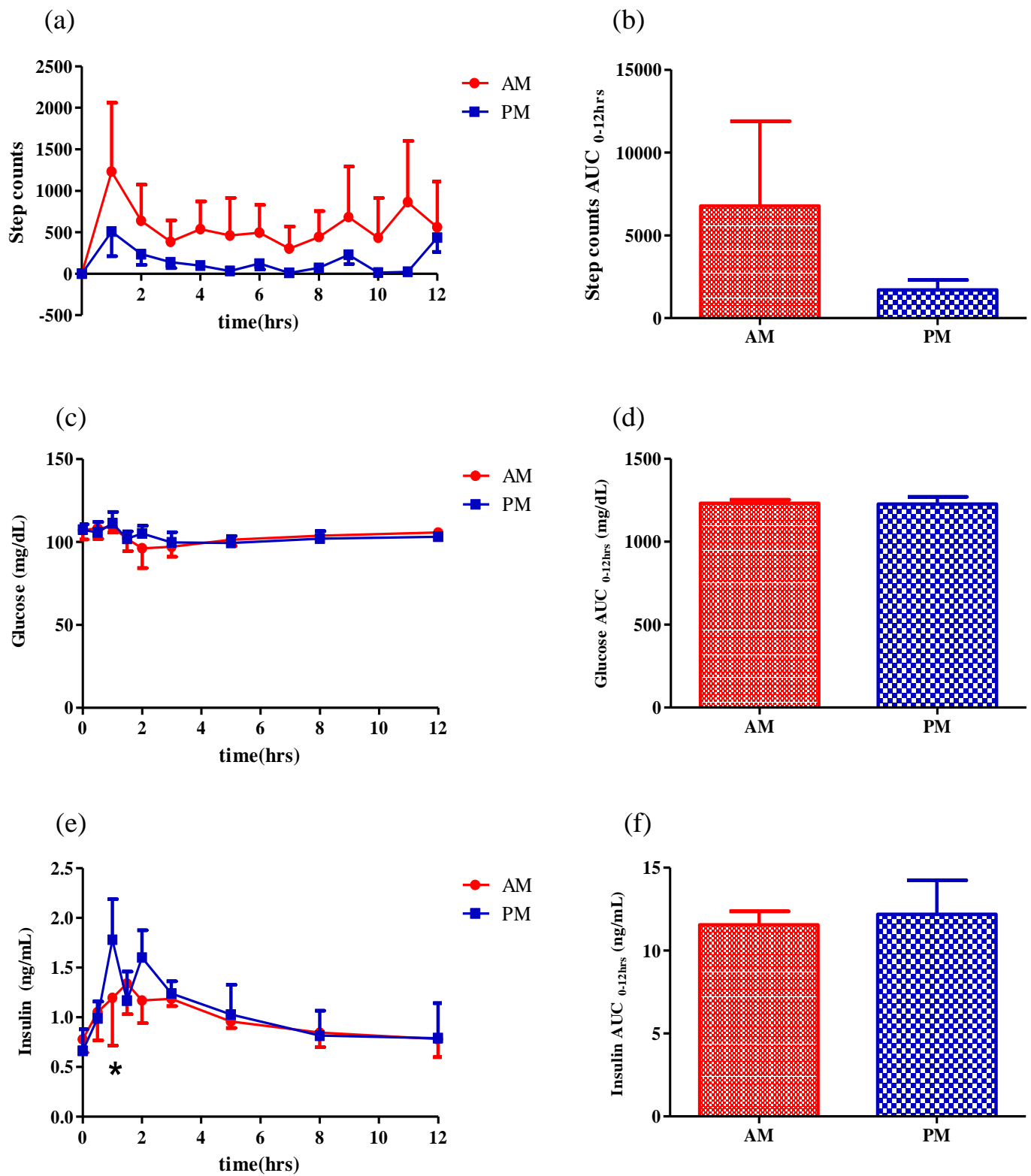


Fig.8 GIP、GLP-1日内変動

血中GIP、GLP-1濃度の24時間日内変動を示した。

(a) 血中GIP濃度変動、(b) 血中GLP-1濃度変動であり、全てMean \pm SD で示した。

食事は0時間目(朝7時)と12時間目(夜7時)に同じフードを同じ量給与した。

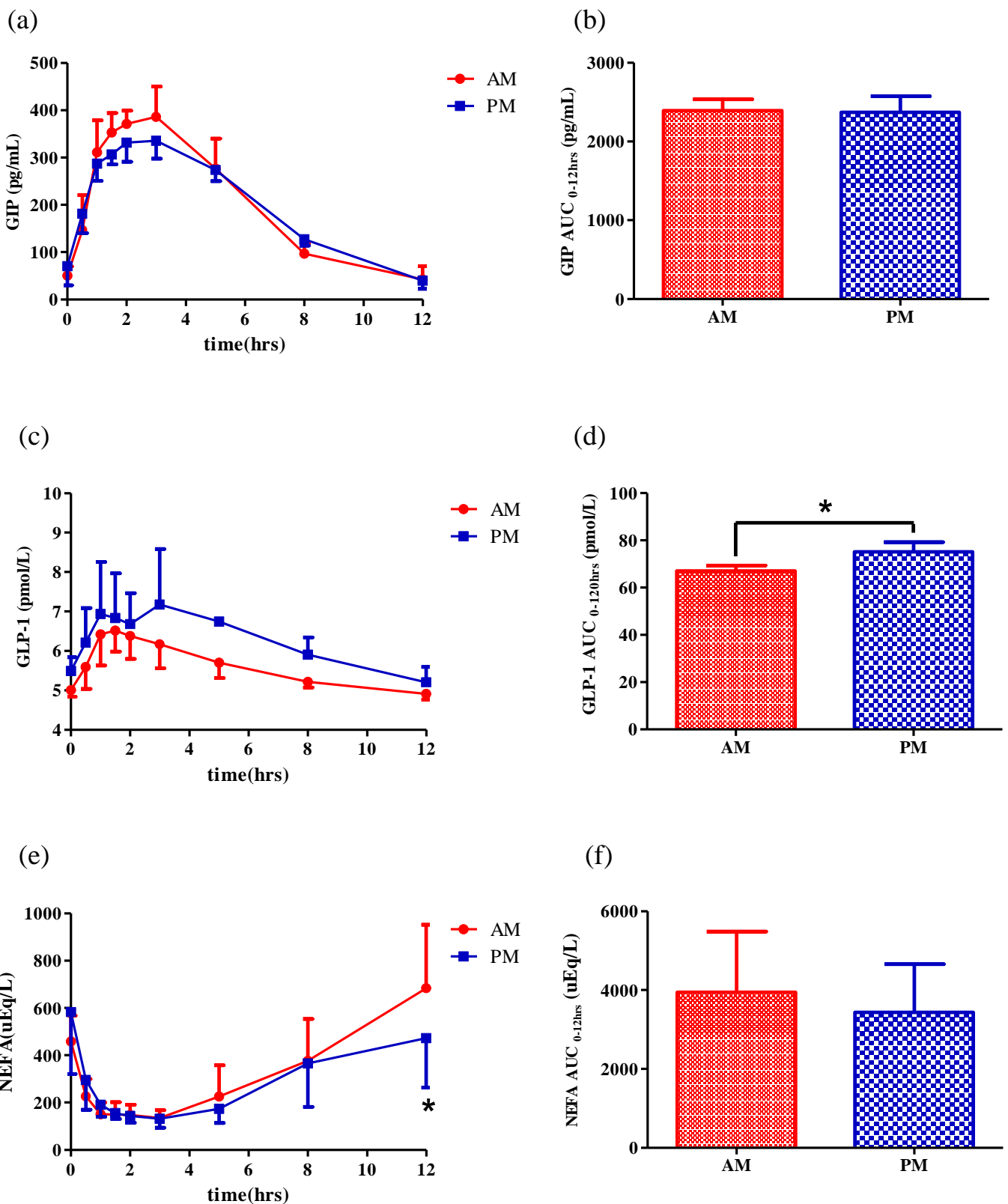


Mean±SD n=4 *P<0.05

Fig.9 朝試験、夜試験におけるインクレチンおよび糖代謝関連項目の違い
朝試験(赤)、夜試験(青)における各測定項目の比較を示した。

(a) Step counts変動、(b) Step counts AUC_{0-12hrs}、(c) 血糖値変動、(d) Glu AUC_{0-12hrs}、
(e) 血中Ins濃度変動、(f) Ins AUC_{0-12hrs} であり、全てMean±SD で示した。

(a) (c) (e) はTwo-Way Repeated Measures ANOVA、およびPost hoc test としてBonferroni post test を、
(b) (d) (f) はPaired t-test を用いて統計解析を行い、P<0.05 を統計学的に有意であるとみなした。



Mean ± SD n=4 *P<0.05

Fig.10 朝試験、夜試験におけるインクレチンおよび糖代謝関連項目の違い
朝試験(赤)、夜試験(青)における各測定項目の比較を示した。

(a) 血中GIP濃度変動、(b) GIP AUC_{0-12hrs}、(c) 血中GLP-1変動、(d) GLP-1 AUC_{0-12hrs}、
(e) 血中NEFA濃度変動、(f) NEFA AUC_{0-12hrs} であり、全てMean ± SDで示した。

(a) (c) (e) はTwo-Way Repeated Measures ANOVA、およびPost hoc test としてBonferroni post test を、
(b) (d) (f) はPaired t-test を用いて統計解析を行い、P<0.05 を統計学的に有意であるとみなした。

Table.5 Profile of dogs used in the current study.

No.	Breeds	Age (years)	Sex	B.W (kg)	*RER \times 1.6 (kcal/day)
1	Beagle	5	castrated	13.0	767
2	Beagle	8	spayed	9.1	587
3	Beagle	7	spayed	9.0	582
4	Beagle	6	spayed	9.2	592
5	Beagle	6	spayed	6.6	461
6	Beagle	6	spayed	6.1	435

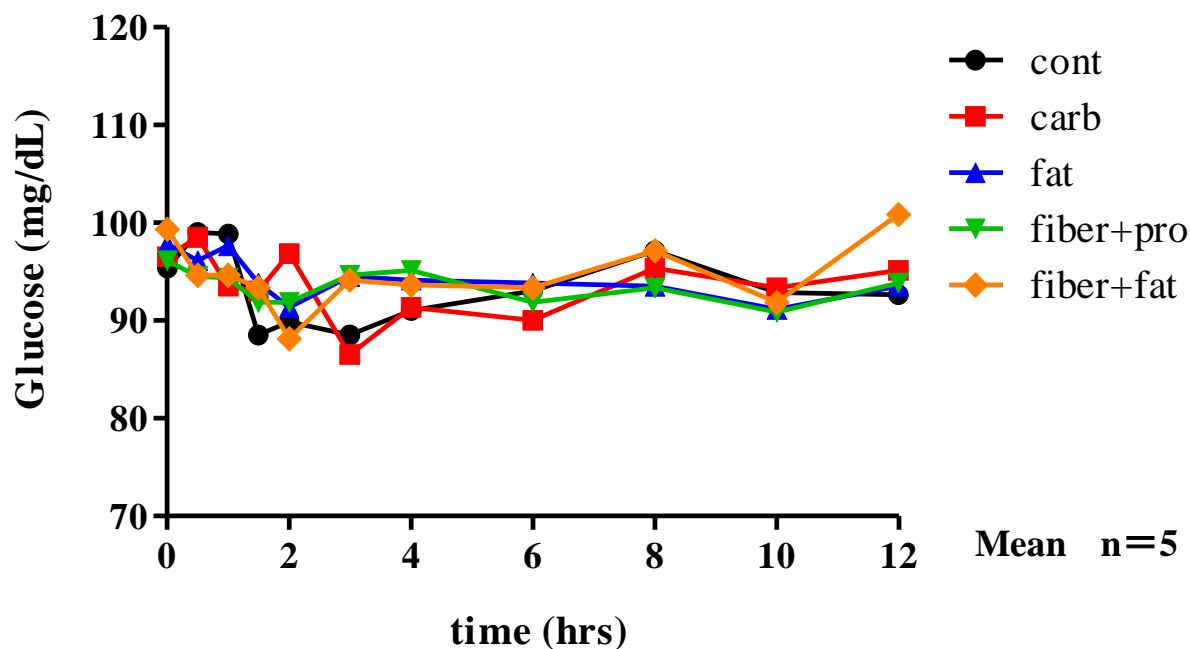
$$*\text{RER} = \text{B.W}_{(\text{kg})}^{0.75} \times 70$$

Table.6 Label of products used in the current study.



(g/100kcal)	control	High carb	High fat	High fiber High pro	High fiber High fat
Carb	12.4	15.2	12.2	9.5	10.0
Fat	3.6	2.0	4.4	3.1	4.8
Protein	5.6	6.3	3.9	10.5	6.9
Fiber	0.9	2.5	1.8	5.6	6.1
kcal/100g	392	349	409	324	333

(a)



(b)

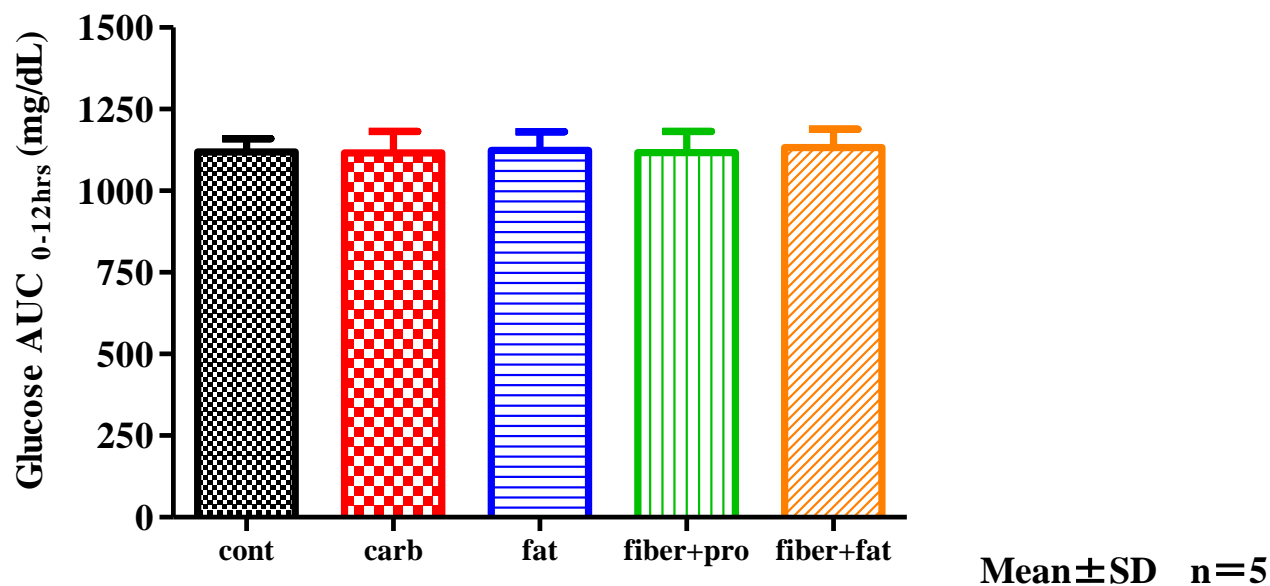


Fig.11 異なる栄養組成のフードでのインクレチン濃度の比較

異なる栄養組成のフードでの各測定項目の比較を示した。

(a) 血糖値変動、(b) Glu AUC_{0-12hrs} であり、(a) はMean のみで、(b) はMean±SD で示した。

(a) はTwo-Way Repeated Measures ANOVA、およびPost hoc test としてBonferroni post test を、
(b) はOne-Way Repeated Measures ANOVA、およびpost hoc test としてDunnnett post test を用いて
統計解析を行い、 $P < 0.05$ を統計学的に有意であるとみなした。

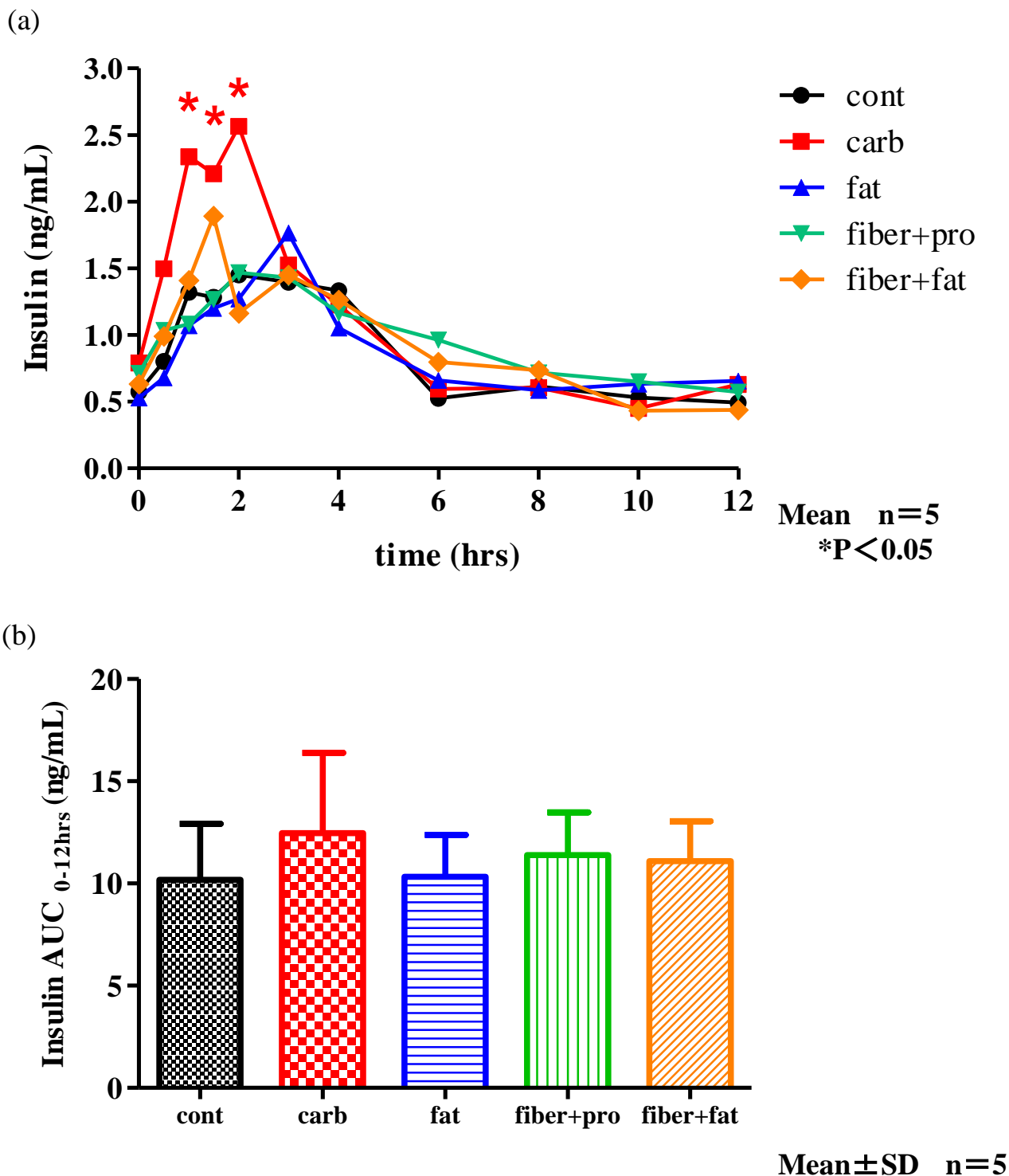
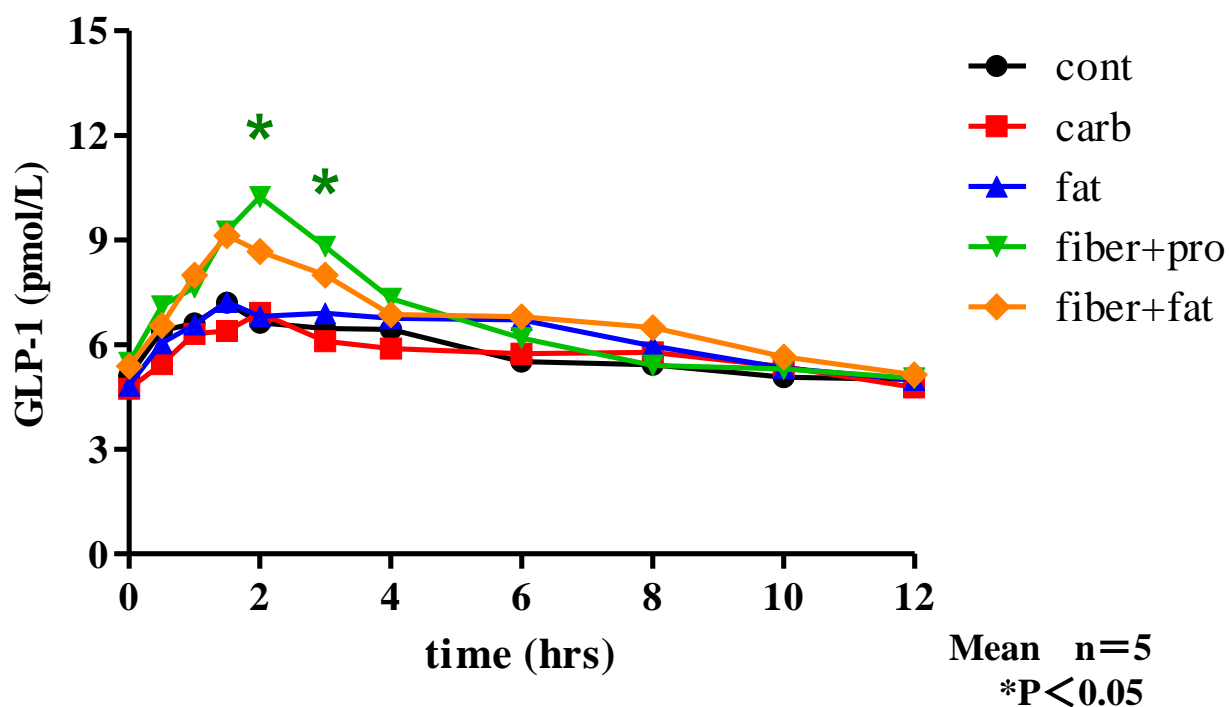


Fig.12 異なる栄養組成のフードでのインクレチン濃度の比較

異なる栄養組成のフードでの各測定項目の比較を示した。

(a) 血中Ins濃度変動、(b) Ins AUC_{0-12hrs} であり、(a) はMeanのみで、(b) はMean±SD で示した。
 (a) はTwo-Way Repeated Measures ANOVA、およびPost hoc test としてBonferroni post test を、
 (b) はOne-Way Repeated Measures ANOVA、およびPost hoc test としてDunnnett post test を用いて
 統計解析を行い、P<0.05 を統計学的に有意であるとみなした。

(a)



(b)

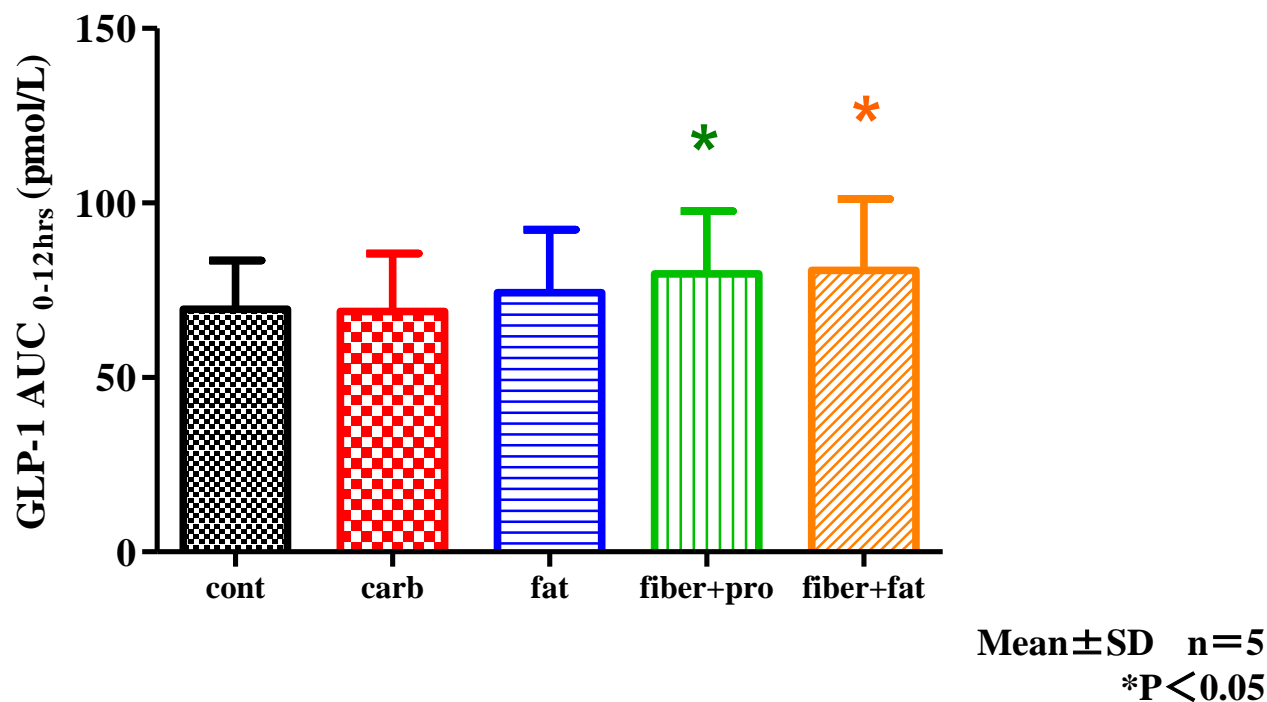
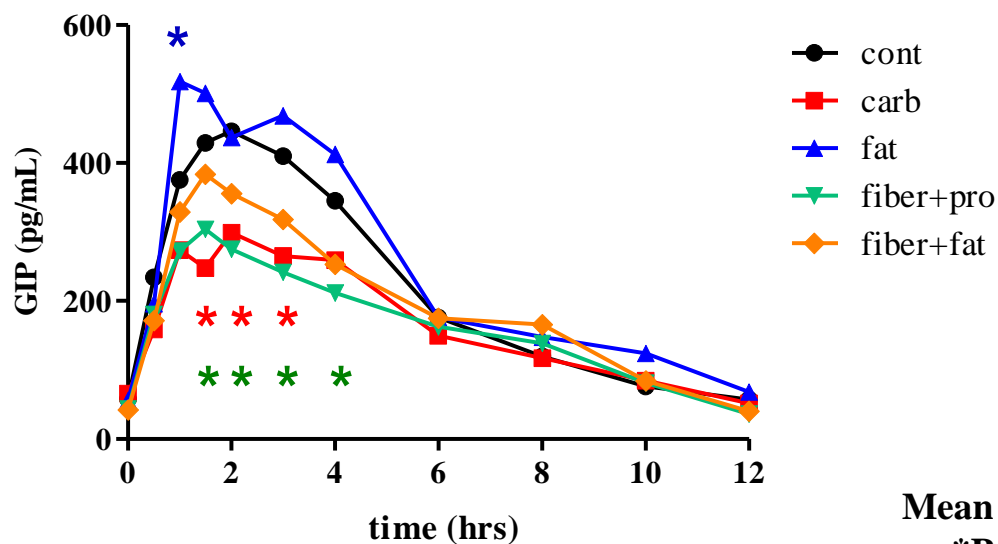


Fig.13 異なる栄養組成のフードでのインクレチン濃度の比較

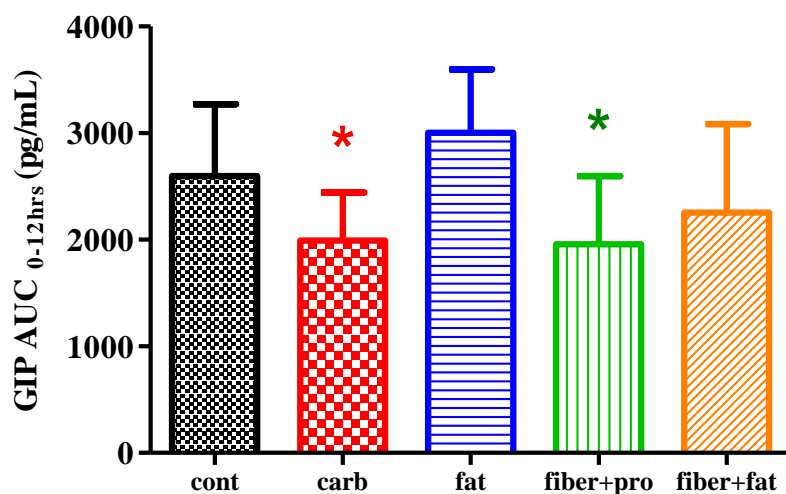
異なる栄養組成のフードでの各測定項目の比較を示した。

(a) 血中GLP-1濃度変動、(b) GLP-1 AUC_{0-12hrs} であり、(a) はMeanのみで、(b) はMean±SD で示した。
 (a) はTwo-Way Repeated Measures ANOVA、およびPost hoc test としてBonferroni post test を、
 (b) はOne-Way Repeated Measures ANOVA、およびpost hoc test としてDunnett post test を用いて
 統計解析を行い、P<0.05 を統計学的に有意であるとみなした。

(a)



(b)



(c)

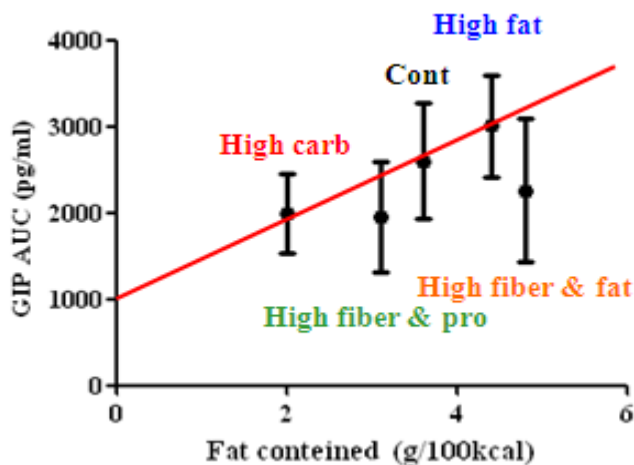


Fig.14 異なる栄養組成のフードでのインクレチン濃度の比較

異なる栄養組成のフードでの各測定項目の比較を示した。

(a) 血中GIP濃度変動、(b) GIP AUC_{0-120hrs}、(c)は各フード100 kcal 中に含まれる脂肪量を横軸に、GIP AUCを縦軸にプロットしたグラフである。(a) はMeanのみで、(b)(c) はMean±SD で示した。

(a) はTwo-Way Repeated Measures ANOVA、およびPost hoc test としてBonferroni post test を、
(b) はOne-Way Repeated Measures ANOVA、およびPost hoc test としてDunnnett post test を用いて統計解析を行い、P<0.05 を統計学的に有意であるとみなした。

第 4 章

インクレチン製剤が犬の糖代謝へおよぼす影響

第 1 節 GLP-1 受容体作動薬“リラグルチド”投与が健常犬の糖代謝へおよぼす影響

緒言

現在、ヒトの 2 型糖尿病患者に対してインクレチンを治療のターゲットとした研究が進められており、2009 年 12 月には日本でもインクレチン製剤が販売され注目をあびている。

dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) はポリペプチドの N 末端を切断して 2 アミノ酸を放出するセリンプロテアーゼであり、腎臓、腸絨毛、肝臓、血管内皮、T 細胞、B 細胞、natural killer 細胞などの細胞膜に存在する膜蛋白で、生体内に広範囲に存在している。標的となる蛋白の N 末端第 2 位にあるアラニン、もしくはプロリンを認識し、2 アミノ酸を切断することによって substance P、endomorphin、norphiceptin、NPY などの中枢系ペプチドや、RANTES、MCP-1.2.3、Exotaxin、SDF-1a/1b などの炎症や免疫に関与するペプチドの他に、グルカゴン、GLP-1、GLP-2、GIP、PACAP、GRH、PYY、VIP などのいわゆるグルカゴンファミリーに属する消化管ホルモンなど、多くのペプチドの活性、不活性化に関与している[27]。

GLP-1、GIP は共に DPP-4 により速やかに分解され不活化型となるため、血中半減期がそれぞれ 2 分、5 分と非常に短い[第 1 章 Fig2.3 参照] [47,76]。そこで、この DPP-4 に対するインクレチン製剤として、DPP-4 阻害薬と GLP-1 受容体作動薬が開発された。

DPP-4 阻害薬とは、分解酵素である DPP-4 を阻害し、生体内のインクレチン濃度を長時間維持することのできる薬剤である。2009 年 12 月に日本で初めてのインクレチン製剤として、選択的 DPP-4 阻害薬であるシタグリプチン（ジャヌビア® 萬有製薬（現在は MSD）、グラクティブ® 小野薬品工業）が発売

され、続いて4月にビルダグリプチン（エクア® ノバルティス ファーマ）、6月にアログリプチン（ネシーナ® 武田薬品工業）が発売された。その後もリナグリプチン（トラゼンタ® 日本ベーリンガーインゲルハイム、2011年9月）、ネリグリプチン（テネリア® 田辺三菱製薬、2012年8月）、アナグリプチン（スイニー® 三和化学研究所、2012年11月）、サキサグリプチン（オングリザ® 協和発酵キリン、2013年5月）など、数々のDPP-4阻害薬が発売されている。DPP-4阻害薬は経口薬であり、重篤な副作用の報告も少ないため[3]、治療コンプライアンスの問題は比較的少ないと思われるが、生体内のインクレチン濃度を飛躍的に上昇させることはその作用原理上不可能である。また、DPP-4はインクレチンだけでなく他の様々なペプチド基質を分解する酵素で、さらにはリンパ球細胞表面上のCD 26抗原としても知られており、T細胞の活性を修飾するほか、実験的炎症あるいは悪性新生物モデルにおける多様な作用が認められている[25]。したがって、DPP-4の分解活性を長期に、そして全身的に阻害した場合の効果、免疫関連でどのような影響を与えるのかは現時点では不明である。

GLP-1受容体作動薬とは、GLP-1のアミノ酸構造の一部を人工的に変化させることでDPP-4に対して抵抗性を持ち、GLP-1特異的受容体に結合して様々な作用を示す薬剤である。血中半減期が比較的長いため、1日1回の投与であることが多い。また、生理的濃度をはるかに超えた血中濃度を維持することができ、投与1日目からその効果を発揮する。しかし、GLP-1受容体作動薬は皮下投与であることに加え、強力なGLP-1作用を示すため、DPP-4に比べると胃腸障害などの副作用が発現しやすく、また、注射薬であることから、長期治療への受け入れや治療コンプライアンスが問題とされる。現在日本で販売されているGLP-1受容体作動薬は、2010年6月にリラグルチド（ビクトーザ® ノボノルディスクファーマ）、次いで12月にエキセナチド（バイエッタ® 日本イ

ーライリリー)、また、同じエキセナチドでも週に 1 回投与と非常に長時間効果を持続できるエキセナチド (ビデュリオン® アストラゼネカ) が 2013 年 2 月に発売された。また、最近ではリキシセナチド (リクスミア® サノフィ) が 2013 年 8 月に発売されるなど、GLP-1 受容体作動薬も新たな薬剤の開発、販売が続いている。

DPP-4 阻害薬と GLP-1 受容体作動薬の大きな違いは、DPP-4 阻害薬は分解酵素である DPP-4 を阻害するために、血中の GLP-1 濃度と共に GIP 濃度も維持し、その生理作用を最大限発揮する薬剤であるのに対して、GLP-1 受容体作動薬は GLP-1 濃度のみを大幅に上昇させ、インスリン分泌促進作用の他にも、グルカゴン分泌抑制や食欲抑制作用など GLP-1 特有の効果 (Table.1 参照) が期待できる薬剤である。また、双方の薬剤に発売直後調査として副作用の報告がいくつか認められるが、長期投与におけるデータは未だ十分に蓄積されていない。

以上のことから、インクレチン製剤はヒトの医学分野においても臨床応用が始まったばかりであり、これらの基礎的研究もマウスやラットでの報告がほとんどである。したがって、第 1 節ではリラグルチド投与が健常犬の糖代謝へおよぼす影響についてまとめた。

材料および方法

1. 供試動物

第2章 第1節と同様の犬を使用した。飼育管理も同条件下で行われていた。

各犬のプロフィールは第2章 Table.2 を参照。

2. 薬剤投与

GLP-1 受容体作動薬としてリラグルチド(ビクトーザ® ノボノルディスクファーマ)を本実験では用いた [Fig.15]。リラグルチドはヒト GLP-1 の 34 位をアルギニンに置換し、26 位のリジンの e-アミノ基に N-パルミトイル-グルタミン酸を結合させた構造を持ち、ヒト GLP-1 とのアミノ酸相同性が 97%である。血中ではアルブミンと結合していることが多く、DPP-4 による分解を受けにくい。ヒトにおける血中半減期は 12 時間と長く 1 日 1 回の皮下投与で有効である。リラグルチド投与量は、ヒトでの推奨量(成人 60 kg と換算し、0.9 mg を 1 日 1 回投与)を参考に 15 µg/kg 量と[37]、マウス、ラットでの報告を参考に[9]、60 µg/kg 量を糖負荷試験開始 1 時間前に皮下投与した。

3. 試験プロトコール

インクレチンは血糖依存的なインスリン分泌促進作用を持つことから、その作用を明確化するために健常犬に対して OGTT を行った。

まず始めに通常の OGTT を行い(コントロール群)、1 週間の休止期間を設けてその後リラグルチド投与下で OGTT を行った(リラグルチド群)。

リラグルチド投与は、薬剤の血中濃度安定のために、OGTT を実施する 1 時間前に各犬に皮下投与した。

OGTT は第2章と同様に、50%グルコース溶液を 1 g/kg 量、1 分間かけてシリンジにて経口的に投与した(「第2章 第2節 2. 糖負荷試験」参照)。

試験は 12 時間以上絶食下にて行い、飲水は自由飲水とした。採血はリラグルチド投与前を pre とし、糖負荷試験前(リラグルチド投与 1 時間後)を 0 分、負荷後 5、10、15、20、30、45、60、90、120 分の合計 12 ポイント、全て頸静脈より行った。

4. 検体処理

第 2 章 第 1 節と同様の方法で行った(「第 2 章 第 1 節 3. 検体処理」参照)。

5. 測定項目および測定方法

第 2 章 第 1 節と同様の方法で行った(「第 2 章 第 1 節 4. 測定項目および測定方法」参照)。

6. 統計

グループの間に有意性があるかを評価するために、Paired t-test、Two-Way Repeated Measures ANOVA、および Post hoc test として Bonferroni post test を用いた。全ての解析は Graphpad Prism analysis software を用いて統計処理した。P<0.05 を統計学的に有意であるとみなした。なお、結果は平均±標準偏差 (Mean±SD) で示した。

結果

60 $\mu\text{g/kg}$ 量投与試験においては、糖負荷試験中に消化器症状を呈した犬がいたため、全頭で試験を中止し、適切な治療を開始した。このため、以後は、全て 15 $\mu\text{g/kg}$ 量投与試験においての結果を示す。

OGTT におけるリラグルチド投与前後の血糖値、血中インスリン濃度、血中 GLP-1 濃度の変動と曲線下面積 ($\text{AUC}_{0-120\text{min}}$) の比較を **Fig.16** に示した。

血糖値変動は、コントロール群に比べリラグルチド群で糖負荷後 30 分、45 分で有意に低値を示しており (**Fig.16-(a)**: Two-Way Repeated Measures ANOVA and Bonferroni post test * $P < 0.05$)、Glu $\text{AUC}_{0-120\text{min}}$ もリラグルチド群で有意に低下していた (**Fig.16-(b)**: Paired t-test * $P < 0.05$)。血中インスリン濃度変動は、有意な変化は認められなかったが (**Fig.16-(c)**: Two-Way Repeated Measures ANOVA)、Ins $\text{AUC}_{0-120\text{min}}$ はコントロール群と比較してリラグルチド群で有意に上昇していた (**Fig.16-(d)**: Paired t-test * $P < 0.05$)。また、血中 GLP-1 濃度と GLP-1 $\text{AUC}_{0-120\text{min}}$ はリラグルチド群で有意に上昇していた (**Fig.16-(e,f)**: Two-Way Repeated Measures ANOVA and Bonferroni post test、および Paired t-test * $P < 0.05$)。また、リラグルチド群は糖負荷 0 分時 (糖負荷前、リラグルチド投与 1 時間後) において全頭で 10 pmol/L 以上の値を示し、糖負荷後 120 分には 40 pmol/L 前後まで上昇していた。

考察

インクレチン製剤のうち、単回投与でもその効果を発現する GLP-1 受容体作動薬 リラグルチド（ビクトーザ® ノボノルディスクファーマ）の投与が、血糖値、血中インスリン濃度および血中 GLP-1 濃度変動へおよぼす影響を検討した。リラグルチドは GLP-1 特異的受容体に結合し、生体の GLP-1 と同様の作用を様々な臓器で発現する。これにより、2 型糖尿病患者で障害されているグルコース応答性のインスリン分泌は健常人とほぼ同等まで回復することが報告されている[15,30,41]。また、リラグルチド投与により、食後高血糖改善とともに、グルカゴン分泌の有意な抑制、摂食量低下による体重減少も報告されている[8,15,66]。

血中 GLP-1 濃度変動が生理的 GLP-1 濃度をはるかに超えた濃度であったのは、リラグルチドのアミノ酸構造が内因性 GLP-1 に非常によく類似しており (Fig.15)、ELISA 測定では内因性 GLP-1 と同じものとして測定されてしまったと考える。この結果は、投与されたリラグルチドが血中に移行していたことを示すものであり、リラグルチド投与が適切に行われたと判断できる。

健常犬に対するリラグルチドの単回投与によって、糖負荷後も空腹時血糖値とほぼ変わらず 100 mg/dL 前後を推移する血糖変動を示し、Ins AUC_{0-120min} も有意に上昇していた。これは、リラグルチド投与によってインスリン分泌が上昇し、血糖上昇が抑制されたと考えられた。

一方で、リラグルチド投与によって認められた血糖降下作用に対して、インスリン分泌促進作用がそれほど大きくなかったことが考えられた。本節でのグルコース経口投与量は 1 g/kg であったが、この投与量では血糖上昇が 150 mg/dL 以下と上昇が小さかったため、明瞭なインスリン分泌促進作用は認められなかったことが要因の一つとしてあげられる。さらに、第 2 章において犬はインスリンによる血糖降下作用が強い（インスリンの効きが良い）ことが考え

られ、インスリン分泌反応は小さくとも十分に血糖降下作用を示したことが示唆された。

しかしながら、血糖降下が認められる糖負荷後 30-45 分と、インスリン分泌上昇がわずかに認められる時間（糖負荷後 60 分以降）では、血糖降下とインスリン分泌上昇のタイミングに時間差が生じており、リラグルチドによるインスリン分泌促進作用では、糖負荷後 30-45 分の血糖降下作用を説明できないと考えた。そこで、GLP-1 のインスリン分泌促進作用以外の作用による血糖降下への働きについて注目した。

リラグルチド群において、有意な血糖降下作用が示された糖負荷後 30-45 分よりもさらに遅れて、糖負荷後 60-90 分に軽度のインスリン濃度上昇が見られたのは、リラグルチド投与による消化管運動抑制作用によるものと考えられた。GLP-1 は胃酸分泌と胃のぜん動運動を低下させることで、食後高血糖を抑制することが分かっている[17,46,52,59,78]。そのため、リラグルチド投与によって、小腸、そして血中へのグルコース流入が緩やかになり、血中インスリン濃度の上昇も遅延したと考えられた。

また、リラグルチドによるグルカゴン分泌抑制作用も血糖上昇抑制に寄与した可能性が考えられた。GLP-1 は膵β細胞に対してだけでなく、膵α細胞に対する作用も注目されている。最近、GLP-1 によるインスリン分泌促進作用とグルカゴン分泌抑制作用は同等程度であると報告され[31]、リラグルチド投与においてもグルカゴン分泌が顕著に抑制される報告がある[15,66]。また、インスリンの自己分泌がないヒトの1型糖尿病患者においてもリラグルチド投与によって、食後高血糖抑制や血糖値日内変動幅の減少が認められており[14]、リラグルチド投与によるグルカゴン分泌抑制効果が血糖コントロール改善へ繋がることが裏付けられている。これは、インスリンの自己分泌がない糖尿病動物においても、ヒトの1型糖尿病患者と同様、グルカゴン分泌抑制効果により血

糖降下作用をもたらす可能性を示唆するものである。しかしながら、現在、犬の血中グルカゴン濃度は RIA による測定の結果が主であり[23,62,75]、測定が困難であるため本研究においては確認できていない。今後犬の血中グルカゴン測定の検討も必要である。

そして、全頭においてリラグルチド群の血糖変動が 100 mg/dL 前後を推移し続けたことから、血糖降下作用が血糖依存的効果であることも示唆された。このことから、リラグルチドは血糖上昇に合わせたインスリン分泌を促し、効率的に血糖値を是正することのできる糖尿病治療薬であることが示唆された。しかし、リラグルチドの高用量（60 µg/kg 量）投与試験において、消化器症状を呈した犬がいた。リラグルチド市販後調査では、投与開始初期に悪心や胃腸障害などの副作用が認められると報告されている。消化器症状は GLP-1 の消化管に対する作用（消化管の運動性低下、胃酸分泌抑制）として 2 型糖尿病患者においても、リラグルチド投与初期に特徴的に認められる症状であるが、これは低用量からの投与により緩和していくことが同時に報告されている。ヒトの 2 型糖尿病患者では投与量を 1 日 0.9mg 最大用量としており、投与開始は 0.3 mg から 1 週間以上間隔をあけて 0.3mg ずつ増量するように指導されていることから、健常犬も同様に低用量からの慎重投与が必要であると考えられる。また、本実験での用量はヒトでの用量（成人 60 kg と換算し、1 日 1 回 0.9 mg/kg 量投与）を参考に 15 µg/kg としたが、それでも十分に血糖降下作用が認められたため、より低用量でも効果が期待できるため、用量、用法のさらなる検討が必要と考える。

第2節 リラグルチド投与が糖尿病犬の血糖変動へおよぼす影響

緒言

第1節において、健常犬へのリラグルチド投与によって血糖降下が認められた。そして、これはリラグルチドによるインスリン分泌促進作用以外の作用も関与している可能性が示唆された。インスリン分泌促進作用以外の作用として、GLP-1によるグルカゴン分泌抑制作用が血糖降下に寄与した可能性が考えられた。GLP-1は β 細胞に対してだけでなく、 α 細胞に対する作用も注目されている。最近、GLP-1によるインスリン分泌促進作用とグルカゴン分泌抑制作用は同等程度であると報告され[31]、リラグルチド投与においてもグルカゴン分泌が顕著に抑制される報告がある[15,66]。また、インスリンの自己分泌がないヒトの1型糖尿病患者においてもリラグルチド投与によって、食後高血糖抑制や血糖値日内変動幅の減少が認められており[14]、リラグルチド投与によるグルカゴン分泌抑制効果が血糖コントロール改善へ繋がることが裏付けられている。これは、インスリンの自己分泌がない糖尿病動物においても、ヒトの1型糖尿病患者と同様、グルカゴン分泌抑制効果により血糖降下作用をもたらす可能性を示唆するものである。

したがって、本節ではインスリン自己分泌能の欠如した糖尿病犬に対して、インスリンとリラグルチドの併用療法を行い血糖変動におよぼす影響を検討した。

材料および方法

1. 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 臨床部門でインスリンによる血糖管理を行っている糖尿病犬 4 頭（3-12 歳齢：去勢雄 3 頭、未去勢雄 1 頭）を用いた。これらの犬は、温度、湿度、照明を管理された施設内でケージにて単独飼育しており、また、あらかじめ IVGTT によってインスリンの自己分泌が認められないことが確認されていた。フードは成犬用総合栄養食(セレクトプロテイン（ダック&タピオカ）(ROYAL CANIN JAPON) を休息時エネルギー要求量 ($RER = B.W^{0.75} \times 70$) $\times 1.8$ kcal 量を 1 日 2 回に分けて、朝夜ともに 8 時に給与され、飲水は自由飲水で管理していた。インスリン投与は生合成ヒトイソフェンインスリン水性懸濁注射液(ノボリン N 注 100® ノボノルディスクファーマ) をそれぞれの糖尿病犬の血糖コントロールに合わせて 1 日 2 回 (0.35-0.70 単位/kg/回)、食後に頸部背側に皮下注射し、血糖管理を行っていた。なお、実験中のフード量およびインスリン投与量は変更しなかった。各糖尿病犬のプロフィールを **Table.7** に示す。

2. 薬剤投与

第 4 章 第 1 節の結果より、血糖降下作用が認められたリラグルチドを用い、インスリンの自己分泌がない糖尿病犬においても血糖降下作用が認められるかどうかを検討した。リラグルチド投与量は、第 1 節と同様に 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 量を、朝食後・インスリン投与後にインスリン注射部位から離れた臀部周囲に皮下注射した。リラグルチドは試験当日のみの単回投与であった。

3. 試験プロトコール

コントロール群は通常通り食事給与とインスリン注射を行い、血液採取を行っ

た（コントロール群：インスリン療法のみ）。リラグルチド群はコントロール群と同様に、食事給与とインスリン注射を行うのに加え、インスリン注射直後にリラグルチドを皮下投与し血液採取を行った（リラグルチド群：インスリン・リラグルチド併用療法）。なお、コントロール群とリラグルチド群それぞれの試験間は、2 週間の休止期間を設けた。

試験は 12 時間以上絶食下にて行い、飲水は自由飲水とした。血液採取は食前、インスリン投与前（およびリラグルチド投与前）を 0 時間とし、給与後 1 時間ごとに 12 時間目までの合計 13 ポイント、全て頸静脈より行った。

4. 検体処理

第 2 章 第 1 節と同様の方法で行った（「第 2 章 第 1 節 3. 検体処理」参照）。

5. 測定項目および測定方法

測定項目は血糖値のみで、測定方法は第 2 章 第 1 節と同様の方法で行った（「第 2 章 第 1 節 4. 測定項目および測定方法」参照）。血中インスリン濃度および血中 GLP-1 濃度は外来からの製剤投与が行われており、ELISA 測定で測りこみが起こる可能性があるため、今回は測定を行わなかった。

6. 統計

グループの間に有意性があるかを評価するために、Paired t-test、Two-Way Repeated Measures ANOVA、および Post hoc test として Bonferroni post test を用いた。全ての解析は Graphpad Prism anaLysis software を用いて統計処理した。P<0.05 を統計学的に有意であるとみなした。なお、結果は各糖尿病犬の結果と 4 頭の平均±標準偏差（Mean±SD）を分けて示した。

結果

各糖尿病犬ごとの血糖値変動を **Fig.17** に、4 頭の平均血糖値変動と曲線下面積 (AUC_{0-12hrs}) を **Fig.18** に示した。

Dog 1 **Fig.17-(a)**において、コントロール群では 0 時間（食前、インスリン投与前）が 105 mg/dL であり、食後 3 時間目に最高値を示し（394 mg/dL）、その後徐々に下降していき、12 時間目には 192 mg/dL となった。リラグルチド群では、0 時間（食前、インスリン・リラグルチド投与前）が 220 mg/dL で、食後 1 時間で約 326 mg/dL まで上昇したが、5 時間目まで徐々に下降していき 53 mg/dL となり、その後 7 時間目に最低値（43mg/dL）となった。その後は緩やかに上昇していき、12 時間目に 147 mg/dL となった。

Dog 2 **Fig.17-(b)**において、コントロール群では 0 時間が 166 mg/dL から食後 1 時間で約 390 mg/dL まで上昇し、その後徐々に低下していき、9 時間目に 93 mg/dL を示し、その後は上昇し、12 時間目には約 260 mg/dL となった。一方、リラグルチド群では、0 時間が 94 mg/dL であり、食後 10 時間目までは 131-67 mg/dL の間で緩やかに上昇下降を繰り返し、その後上昇していき、食後 12 時間目に 184 mg/dL となった。

Dog 3 **Fig.17-(c)**において、コントロール群では、0 時間が 99 mg/dL であり、食後 3 時間まで血糖値が上昇し、373 mg/dL となった。その後 10 時間まで血糖が減少し続け、62 mg/dL まで降下し、12 時間目まで 60 mg/dL 前後を推移した。対して、リラグルチド群で 0 時間が 79 mg/dL と低値から始まり、食後 2 時間目に 150 mg/dL まで上昇したが、その後低下し 4 時間目から 12 時間目まで 50 mg/dL 前後でほとんど変動せず、最低値も 45 mg/dL を下回らなかった。

Dog 4 **Fig.17-(d)**において、コントロール群では 0 時間が 195 mg/dL から開始し、2 時間目に 236mg/dL になり、4 時間目に 112 mg/dL となった。7 時間目まで上昇し、250 mg/dL となって、その後は 11 時間目まで 240 mg/dL 前後を推移、12

時間目に 188 mg/dL と低下していた。リラグルチド群では 0 時間が 176 mg/dL から開始し、食後 2 時間目まで急激に減少し、最低値 42 mg/dL を示し、その後は 8 時間目まで 70 mg/dL 前後を推移した。食後 9 時間目から上昇、12 時間目には 292 mg/dL となった。

全頭を通して、リラグルチド群は食後 1～4 時間の間に急激な血糖値の上昇は認められなかった。平均変動を比較すると、リラグルチド群はコントロール群と比較して全ての時間で低値を推移し、食後 2-7 時間は有意に低値であった (Fig.18-(a) : Two-way repeated measures ANOVA and Bonferroni post test * $P<0.05$)。Glu AUC_{0-12hrs} はコントロール群と比較してリラグルチド群で有意に低値を示した (Fig.18-(b) : Paired t-test * $P<0.05$)。

全頭において嘔吐、便秘や下痢などの消化器症状、明らかな低血糖症状といった、リラグルチド投与による副作用と思われる症状は認められなかった。

考察

糖尿病犬にインスリン・リラグルチド併用療法を行うことで、全頭を通して食後高血糖が抑えられ、日内変動幅が小さくなった。血糖値がインスリンのみ投与時よりも低く推移し、かつ全ての糖尿病犬で低血糖症状は認められなかった。GLP-1 による血糖降下作用は血糖依存的インスリン分泌促進作用を主とするが、本研究で用いた糖尿病犬には、インスリン分泌能が欠如していることが、静脈内糖負荷試験にてすでに確認されている (Table.7 参照)。このことから、GLP-1 によるインスリン分泌促進作用以外の作用が血糖降下に寄与した可能性が考えられ、ヒトの 1 型糖尿病患者の報告と同様、インスリン分泌能の欠如した糖尿病犬においてもリラグルチドは血糖コントロールを改善することが確認された。ヒトでは、リラグルチド投与によって、インスリン分泌促進およびグルカゴン分泌抑制作用は同等程度、血糖降下に寄与すると報告されており [31]、リラグルチド投与においてもグルカゴン分泌が顕著に抑制される報告がある [15,66]。第 1 節の健常犬に対するリラグルチド投与の研究においても、インスリン分泌促進以外に、グルカゴン分泌抑制が血糖降下に寄与していることが考えられた。このことから、糖尿病犬でも同様に、リラグルチド投与によるグルカゴン分泌抑制作用が血糖コントロール改善へと働いた可能性が示唆された。

また、全ての糖尿病犬において食後 1~2 時間の血糖上昇が抑制されたことから、リラグルチドによる消化管運動抑制の影響は高い確率で表れると考えられる。しかしながら、この作用は下痢や便秘、嘔吐等の消化器症状が比較的高頻度で現れる危険性があるということでもある。本研究においては、単回投与でありそのような症状は認められなかったが、連続投与下では注意しなければならないと考える。加えて、今回は明らかな低血糖症状を示した糖尿病犬は認められなかったが、血糖値が約 50mg/dl を推移した犬もいたことから、低血糖リスクはリラグルチド単剤療法よりも大きいと、インスリン・リラグルチド併

用療法においては血糖値の細かなモニタリングが必須である。しかし、この結果は同時にインスリン投与量減量の可能性も示唆するものであり、今後さらなる検討が必要と考えられた。

以上より、リラグルチドはインスリン分泌能の欠如した 1 型糖尿病の犬においても食後高血糖の抑止、日内血糖変動幅の減少などの効果があり、さらにインスリン投与量の減量など有益な可能性も示唆されたため、インスリンのみでは安定した血糖コントロールが難しい症例で、良好な血糖コントロールが期待できる薬剤であると考えられる。

今後の課題として、まず症例数が 4 症例と少なかったため、症例数を増やすこと、そして犬におけるグルカゴンの測定は未だ実現できていないため、実際にグルカゴンが抑制されていることを確認する必要がある。本研究では 12 時間の血糖変動のみの検討であるため、中~長期間で継続投与した場合の、用法や低血糖の頻度などの検討が必要であると考えられる。さらに本研究でのリラグルチド投与量はヒトでの推奨用量の上限から算出した量であるため、それ以下、もしくはそれ以上の用量での効果や副作用の有無を検討する必要がある。また、インスリンとリラグルチドはどちらも注射薬のため、併用する場合、飼い主は患者動物にインスリンとリラグルチドの 2 本を注射する必要があり、動物及び飼い主の手間や費用の負担も大きくなる。臨床応用するに当たり、治療コンプライアンスと治療コストについても今後の課題である。

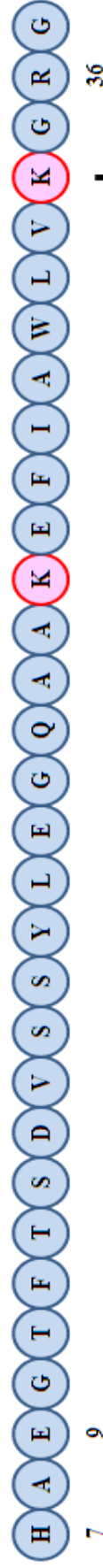
小括

健常犬におけるリラグルチド投与によって、インスリン分泌の上昇と血糖降下作用が認められた。しかし、血中インスリン濃度がそれほど大きく上昇していないにもかかわらず、血糖降下作用が十分認められたのは、①犬はインスリンによる血糖降下作用が強い（インスリンの効きが良い）ために、インスリン分泌反応は小さくとも十分に血糖降下作用を示した、②GLP-1の消化管運動機能抑制、グルカゴン分泌抑制作用が血糖降下に寄与したことが考えられた。

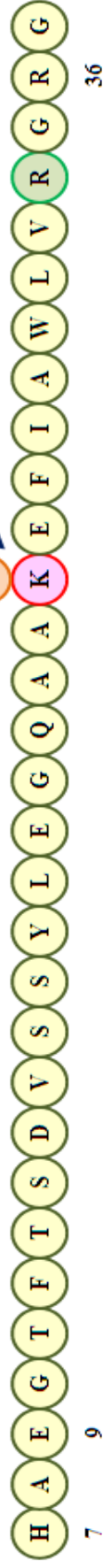
リラグルチドの高用量試験において消化器症状が認められた症例もいたが、これはリラグルチド投与による副作用であることが考えられた。ヒトにおいても同様の副作用が報告されているが、リラグルチド投与初期によく認められる副作用であり、徐々に緩和されていく症状であるとも同時に報告されている。よって犬でも低用量からの慎重投与が必要であると考えられる。

そして、インスリンの自己分泌がない糖尿病犬においてもインスリンとリラグルチドの併用療法によって、食後高血糖の抑制や血糖変動幅の顕著な減少が認められた。インスリン・リラグルチド併用療法により明らかな低血糖症状を呈した犬は認められなかったが、一時的に血糖値が 50 mg/dL 程度を示した犬もいたため、リラグルチド単剤に比べるとインスリン・リラグルチド併用療法では低血糖リスクが高いことが示唆され、血糖値の細かなモニタリングが必要であると考えられた。しかしながら、リラグルチド投与により血糖コントロール改善に加えて、インスリン投与量の減量も期待されたため、症例数の増加検討や継続投与、用量、用法のさらなる検討により、有用な糖尿病治療薬として利用できる可能性が考えられる。

ヒトGLP-1



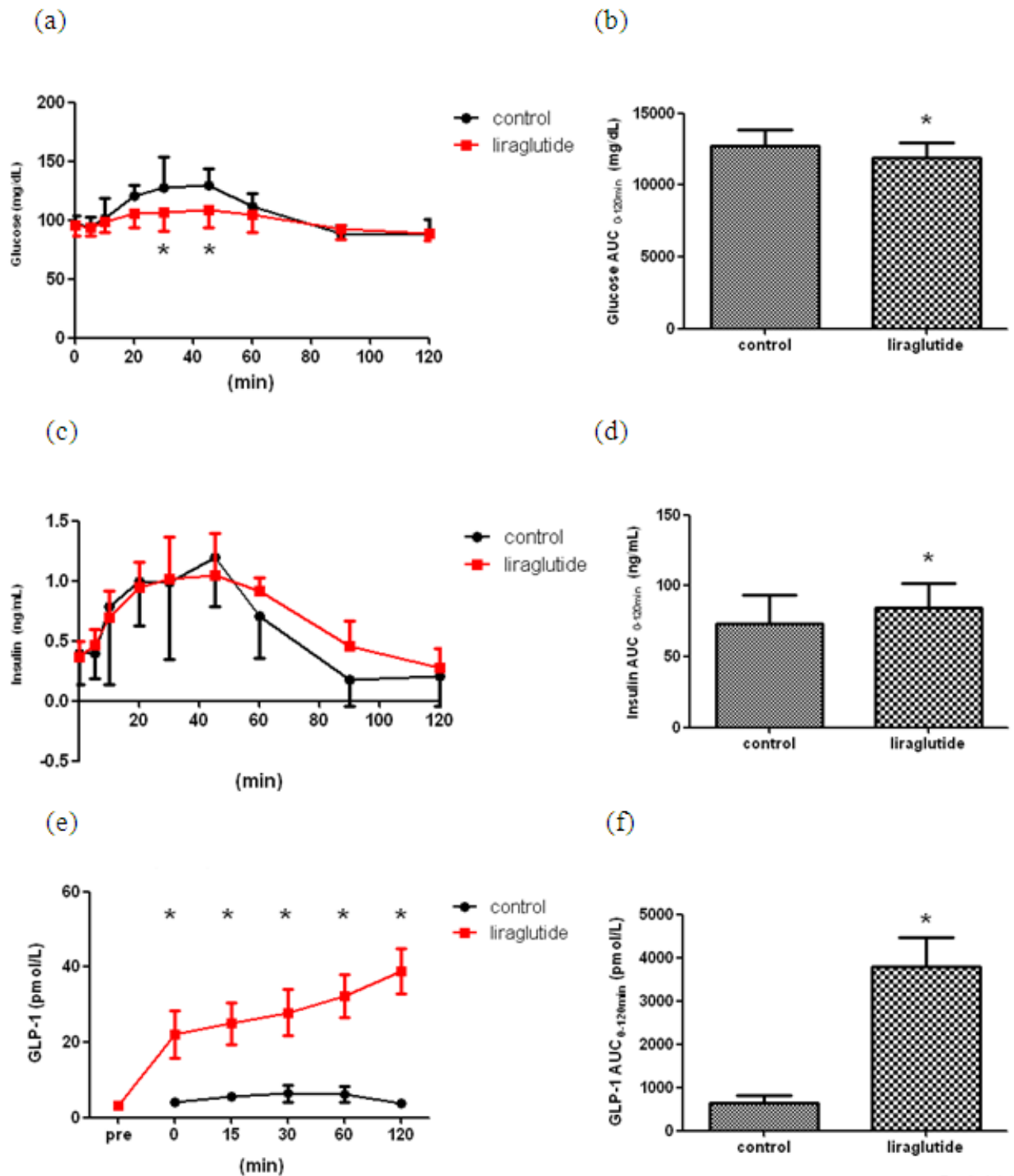
リラグルチド (遺伝子組み換え)



分子式: $C_{172}H_{265}N_{43}O_{51}$

分子量: 3751.20

Fig.15 内因性GLP-1とリラグルチドのアミノ酸構造



Mean±SD n=5 *P<0.05

Fig.16 リラグルチド投与が健常犬の糖代謝へおよぼす影響

経口糖負荷試験(OGTT)におけるリラグルチド投与有無での各測定項目の比較を示した。
control 群はリラグルチド投与無し(黒線)で、liraglutide 群はリラグルチド投与有り(赤線)である。

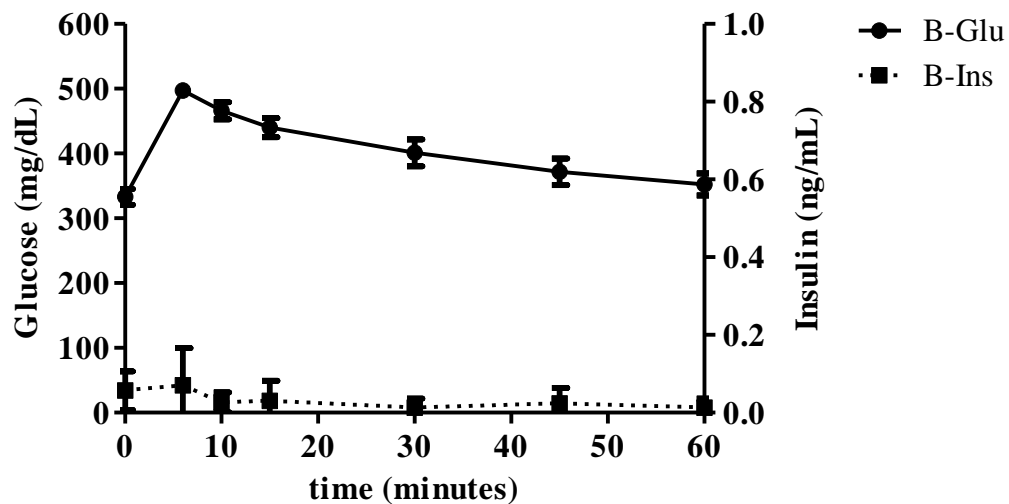
(a) 血糖値変動、(b) Glu AUC_{0-120min}、(c) 血中インスリン濃度変動、(d) Ins AUC_{0-120min}
(e) 血中GLP-1濃度変動、(f) GLP-1 AUC_{0-120min} であり、全てMean±SD で示した。

(a) (c) (e) はTwo-Way Repeated Measures ANOVA、およびPost hoc test としてBonferroni post test を、
(b) (d) (f) はPaired t-test を用いて統計解析を行い、P<0.05 を統計学的に有意であるとみなした。

Table.7 Profile of diabetic dogs used in the current study.

No.	Breeds	Age (years)	Sex	B.W (kg)	Insulin dose (U/kg)
1	Beagle	10	male	12.2	0.49
2	Beagle	10	castrated	12.1	0.70
3	Beagle	12	castrated	12.8	0.35
4	Miniature Dachshund	8	castrated	3.0	0.67

Mean temporal serum glucose and insulin concentration



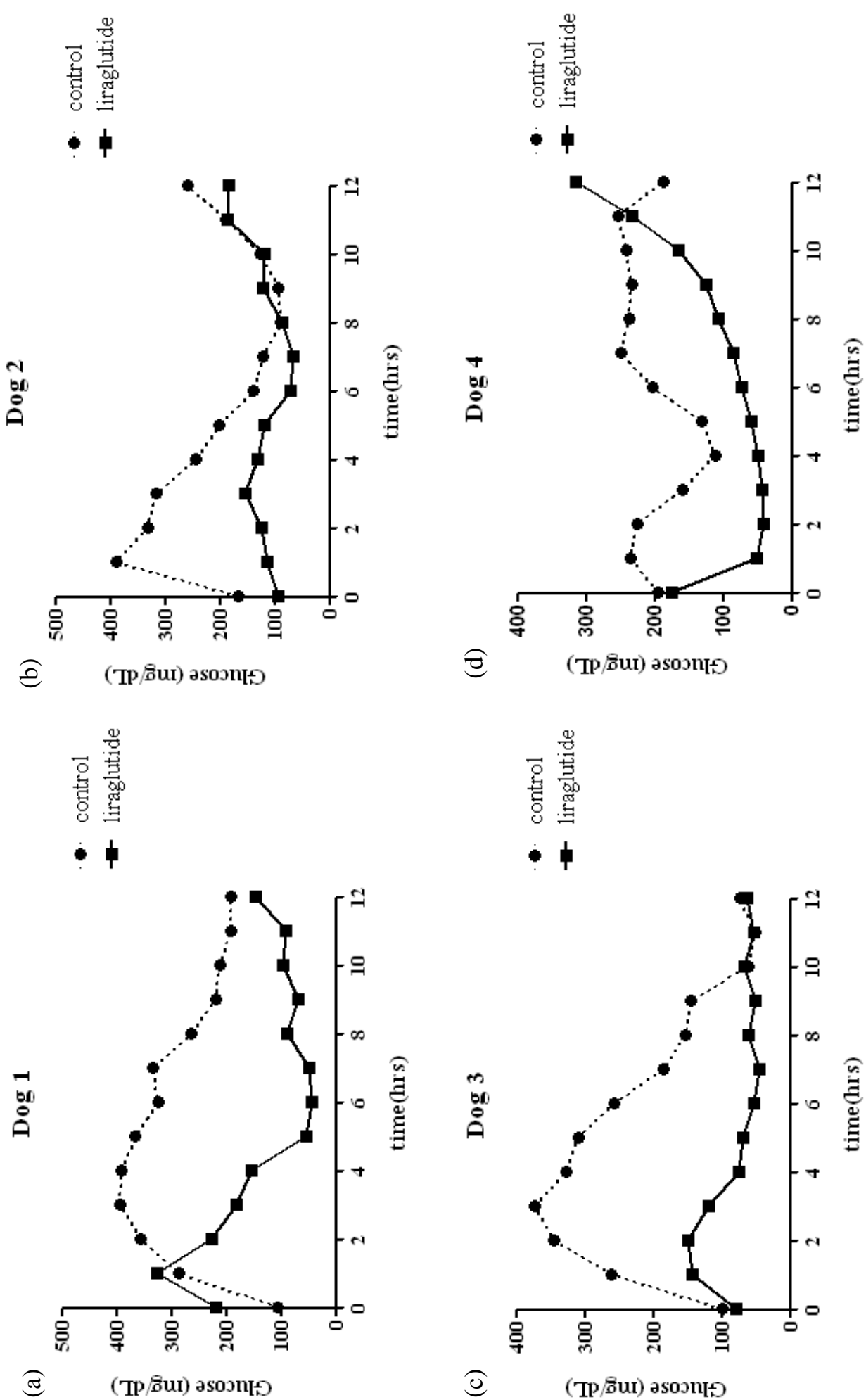


Fig.17 リラグルチド投与が糖尿病犬の血糖変動へおよぼす影響
control (点線)はインスリン療法のみ、liraglutide (実線)はインスリン・リラグルチド併用療法の結果である。

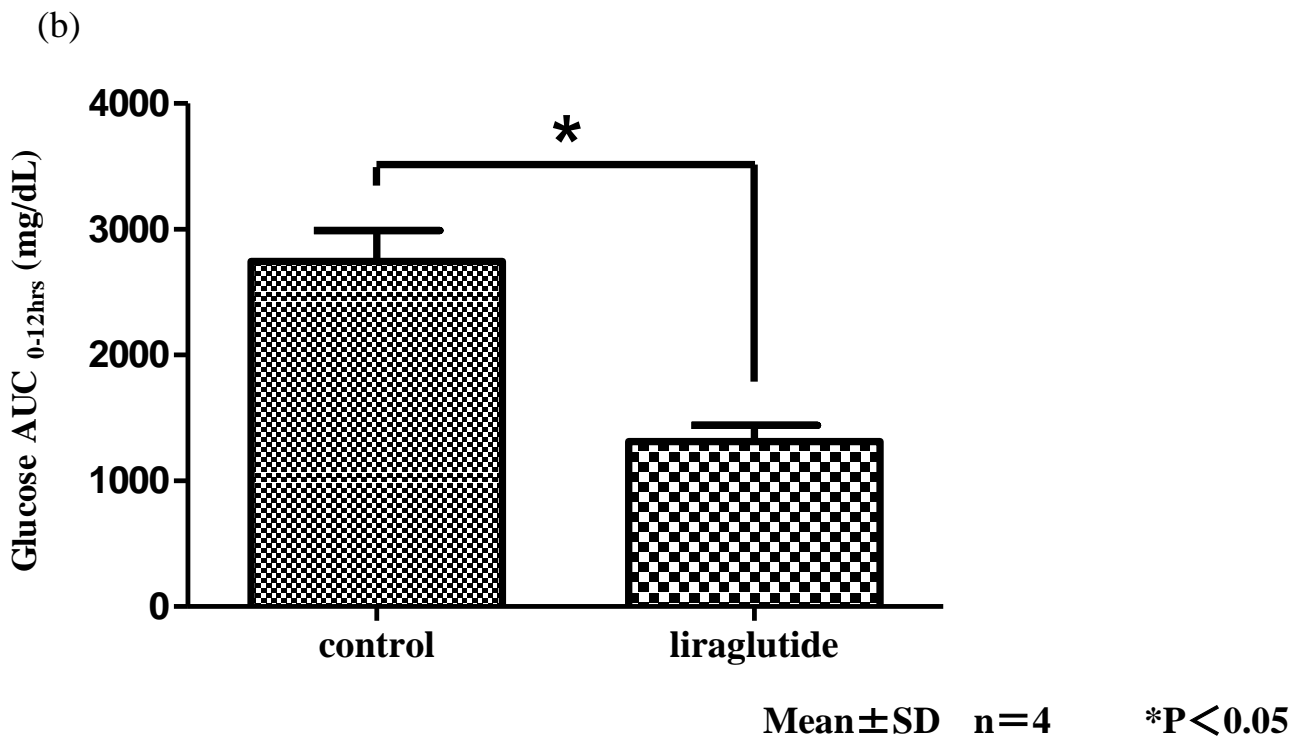
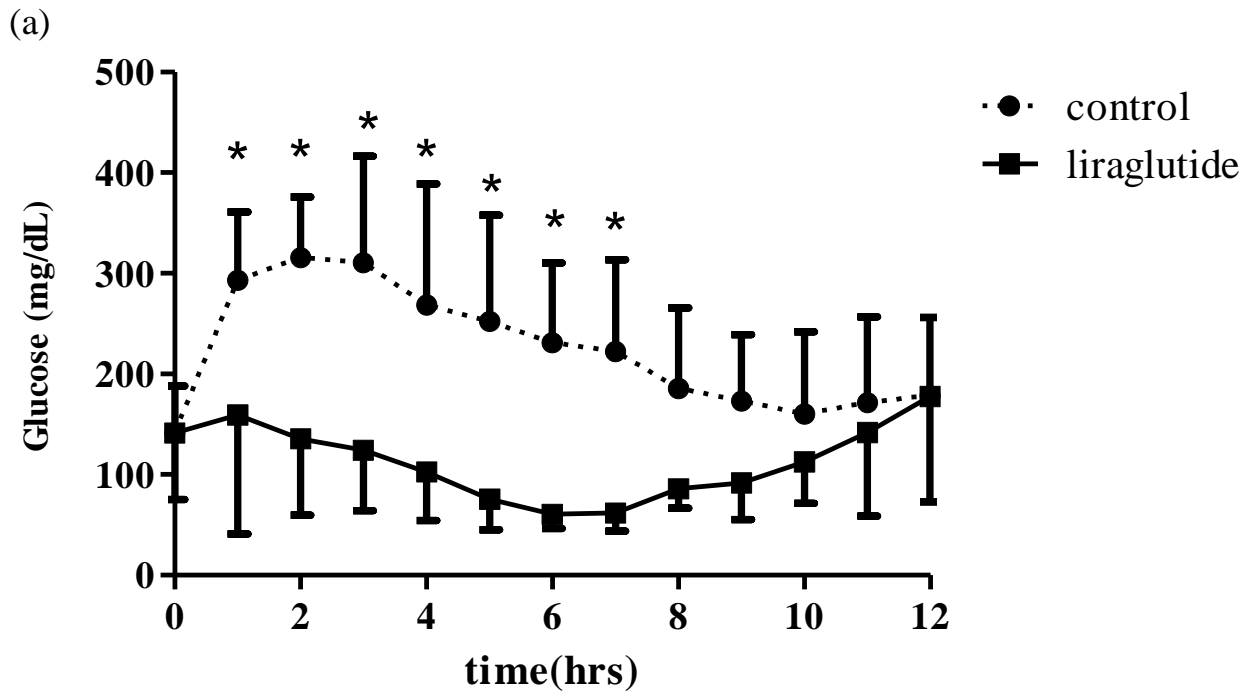


Fig.18 糖尿病犬におけるリラグルチド併用療法の効果

control 群(インスリン療法のみ(点線))と liraglutide 群(インスリン・リラグルチド併用療法(実線))の血糖変動の比較を示した。

(a) 血中グルコース濃度変動、(b) Glu AUC_{0-12hrs} であり、全てMean±SD で示した。

(a) はTwo-Way Repeated Measures ANOVA、およびPost hoc testとしてBonferroni post test を、

(b) はPaired t-test を用いて統計解析を行い、P<0.05 を統計学的に有意であるとみなした。

総括

本研究では、医学領域で近年注目されているインクレチン作用と、これを応用した新たな2型糖尿病治療薬であるインクレチン製剤の糖代謝に及ぼす影響を健常犬において検討してきた。本研究で明らかになったのは以下の通りである。

1. ヒトと同様犬においても、インクレチン作用が確認できた。
2. ヒトと比べて犬ではグルコース刺激によるインクレチン分泌反応とインクレチン作用が小さいことが考えられた。
3. ヒトの GLP-1 分泌細胞の分布と犬のそれは異なっており、このインクレチン分泌細胞の分布の違いがインクレチン分泌に影響を及ぼす可能性が示唆された。
4. 血中 GIP、GLP-1 濃度は食事摂取にともない急激に上昇していき、食後 1.5-3 時間にピーク値を迎え、その後緩やかに下降していく日内変動をとることがわかった。
5. GIP、GLP-1 とともに朝 7 時からの 12 時間と夜 7 時からの 12 時間で異なる上昇スピードを示すこと、最高値も若干異なることが明らかとなり、1 日 2 回、12 時間ごとに同じ量の食事を給与した場合でも、インクレチン変動は昼夜で異なることが示された。
6. 朝は活動エネルギーに対して摂取エネルギーが不足していること、一方、夜

は朝に比べて活動エネルギーが小さく、また消化管通過時間が遅延していることが考えられた。

7. 夜は朝に比べるとインスリン分泌が大きく、朝と比べて夜の方が肥満しやすいことが示唆された。

8. 犬の GLP-1 分泌には栄養組成の違いはそれほど影響せず、むしろ繊維の量によって差が認められた。

9. 犬の GIP 分泌は他動物種の報告と同様、フード中の脂肪含量の増加で上昇し、繊維を添加すると低下することがわかった。

10. 健常犬におけるリラグルチド投与によって、インスリン分泌の上昇と血糖降下作用が認められた。

11. インスリンの自己分泌がない糖尿病犬においても、インスリンとリラグルチドの併用療法によって、食後高血糖の抑制や血糖変動幅の顕著な減少が認められた。

本研究では犬におけるインクレチン作用とインクレチン製剤の糖代謝へおよぼす影響について明らかとした。

現在、ヒトの糖尿病患者に対する食事療法や肥満予防プログラムにて、インクレチンに焦点を当てた研究が数多く行われている。その中でインクレチンは、血糖正常化のみならず肥満、生活習慣病予防や糖代謝改善の重要な因子とされており、小動物臨床においてもその有用性は大きいと考える。これらは今後、

インクレチン製剤の獣医療への臨床応用を検討するための有用な知見となりえ、また、糖代謝改善、肥満予防に対するより効果的なフードの開発や栄養指導への応用が期待される。

謝辞

本稿を終わるに臨み、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、皆上大吾講師、百田豊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] Abbott C.R., Monteiro M., Small C.J., Sajedi A., Smith K.L., Parkinson J.R., Ghatei M.A., and Bloom S.R. The inhibitory effects of peripheral administration of peptide YY(3-36) and glucagon-like peptide-1 on food intake are attenuated by ablation of the vagal-brainstem-hypothalamic pathway. *Brain Res.*, 2005, 1044:127-131.
- [2] 阿部又信. 食性、嗜好、食餌の摂取量など（イヌ・ネコの基礎栄養）. ペット栄養学会誌, 1999, 2:70-77.
- [3] Åhrén B., Landin-Olsson M., Jansson P.A., Svensson M., Holmes D., and Schweizer A. Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 reduces glycemia, sustains insulin levels, and reduces glucagon levels in type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2004, 89:2078-2084.
- [4] Amori R.E., Lau J., and Pittas A.G. Efficacy and safety of incretin therapy in type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis. *J.A.M.A.*, 2007, 298:194-206.
- [5] Baggio L.L., Huang Q., Brown T.J., and Drucker D.J. Oxyntomodulin and glucagon-like peptide-1 differentially regulate murine food intake and energy expenditure. *Gastroenterology*, 2004, 127:546-558.
- [6] Bayliss W.M., and Starling E.H. The mechanism of pancreatic secretion. *J. Physiol.*, 1902, 28:325-353.
- [7] Bell G.I., Santerre R.F., and Mullenbach G.T. Hamster proglucagon contains the sequence of glucagon and two related peptides. *Nature*, 1983, 302:716-718.
- [8] Bode B.W., Testa M.A., Magwire M., Hale P.M., Hammer M., Blonde L., Garber A., and LEAD-3 Study Group. Patient-reported outcomes following treatment with the human GLP-1 analogue liraglutide or glimepiride in monotherapy: results from a randomized controlled trial in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes. Metab.*, 2010, 12:604-612.
- [9] Brand C.L., Galsgaard E.D., Tornehave D., Romer J., Gotfredsen C.F., Wassermann K., Knudsen L.B., Volund A., and Sturis J. Synergistic effect of the human GLP-1 analogue liraglutide and a dual PPARα/c agonist on glycaemic control in Zucker diabetic fatty rats. *Diabetes*, 2009, 11:795-803.
- [10] Brown J.C., and Dryburgh J.R. A gastric inhibitory polypeptide-2. The complete amino acid sequence. *Can. J. Biochem.*, 1971, 49:867-872.
- [11] Bryant M.G., and Bloom S.R. Distribution of the gut hormones in the primate intestinal tract. *Gut.*, 1979, 20:653-659.

- [12] Cassady B.A., Hollis J.H., Fulford A.D., Considine R.V., and Mattes R.D. Mastication of almonds: effects of lipid bioaccessibility, appetite, and hormone response. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2009, 89:794-800.
- [13] Creutzfeldt W., Ebert R., Willms B., Frerichs H., and Brown J.C. Gastric inhibitory polypeptide (GIP) and insulin in obesity: increased response to stimulation and defective feedback control of serum levels. *Diabetologia*, 1978, 14:15-24.
- [14] Creutzfeldt W., Kleine N., Willms B., Orskov C., Holst J.J., and Nauck M.A. Glucagonostatic actions and reduction of fasting hyperglycemia by exogenous glucagon-like peptide-I (7-36) amide in type I diabetic patients. *Diabetes Care*, 1996, 19:580-586.
- [15] Degn K.B., Juhl C.B., Sturis J., Jakobsen G., Brock B., Chandramouli V., Rungby J., Landau B.R., and Schmitz O. One week's treatment with the long-acting glucagon-like peptide 1 derivative liraglutide (NN2211) markedly improves 24-h glycemia and alpha- and beta-cell function and reduces endogenous glucose release in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*, 2004, 53:1187-1194.
- [16] Dupre J., Ross S.A., Watson D., and Brown J.C. Stimulation of insulin secretion by gastric inhibitory polypeptide in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1973, 37:826-828.
- [17] Dupre J., Behme M.T., Hramiak I.M., McFarlane P., Williamson M.P., Zabel P., and McDonald T.J. Glucagon-like peptide 1 reduces post prandial glycemic excursions in IDDM. *Diabetes*, 1995, 44:626-630.
- [18] Ebert R., Unger H., and Creutzfeldt W. Preservation of incretin activity after removal of gastric inhibitory polypeptide (GIP) from rat gut extracts by immunoabsorption. *Diabetologia*, 1983, 24:449-454.
- [19] Eissele R., Göke R., Willemer S., Harthus H.P., Vermeer H., Arnold R., and Göke B. Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *Eur. J. Clin. Invest.*, 1992, 22:283-291.
- [20] Elrick H., Stimmler L., Hlad C.J. Jr., and Arai Y. Plasma insulin response to oral and intravenous glucose administration. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1964, 24:1076-1082.
- [21] Farilla L., Hui H., Bertolotto C., Kang E., Bulotta A., Di Mario U., and Perfetti R. Glucagon-like peptide-1 promotes islet cell growth and inhibits apoptosis in Zucker diabetic rats. *Endocrinology*, 2002, 143:4397-4408.

- [22] Flatt P.R., Bailey C.J., Kwasowski P., Swanston-Flatt S.K., and Marks V. Abnormalities of GIP in spontaneous syndromes of obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, 1983, 32:433-435.
- [23] Freyse E.J., Knospe S., Becher T., El Hag O., Göke B., and Fischer U. Glucagon-like peptide-1 has no insulin-like effects in insulin-dependent diabetic dogs maintained normoglycemic and normoinsulinemic. *Metabolism*, 1999, 48:134-137.
- [24] Fujita Y., Chui J.W., King D.S., Zhang T., Seufert J., Pownall S., Cheung A.T., and Kieffer T.J. Pax6 and Pdx1 are required for production of glucose-dependent insulintropic polypeptide in proglucagon-expressing L cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2008, 295:E648-657.
- [25] Gorrell M.D., Gysbers V., and Mc Caughan G.W. CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scand. J. Immunol.*, 2001, 54:249-264.
- [26] Gutniak M., Orskov C., Holst J.J., Ahrén B., and Efendic S. Antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide-1 (7-36)amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.*, 1992, 326:1316-1322.
- [27] Hansen L., Deacon C.F., Orskov C., and Holst J.J. Glucagon-like peptide-1-(7-36) amide is transformed to glucagon-like peptide-1-(9-36) amide by dipeptidyl peptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the porcine intestine. *Endocrinology*, 1999, 140:5356-5363.
- [28] Harada N., Yamada Y., Tsukiyama K., Yamada C., Nakamura Y., Mukai E., Hamasaki A., Liu X., Toyoda K., Seino Y., and Inagaki N. A novel GIP receptor splice variant influences GIP sensitivity of pancreatic beta-cells in obese mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2008, 294:E61-68.
- [29] Harada N., Hamasaki A., Yamane S., Muraoka A., Joo E., Fujita K., and Inagaki N. Plasma gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1 levels after glucose loading are associated with different factors in Japanese subjects. *J. Diabetes Invest.*, 2011, 2:193-199.
- [30] Harder H., Nielsen L., Tu D.T., and Astrup A. The effect of liraglutide, a long-acting glucagon-like peptide 1 derivative, on glycemic control, body composition, and 24-h energy expenditure in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2004, 27:1915-1921.

- [31] Hare K.J., Vilsbøll T., Asmar M., Deacon C.F., Knop F.K., and Holst J.J. The glucagonostatic and insulinotropic effects of glucagon-like peptide 1 contribute equally to its glucose-lowering action. *Diabetes*, 2010, 59:1765-1770.
- [32] Holman R.R. Assessing the potential for alpha-glucosidase inhibitors in prediabetic states. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 1998, 40:S21-25.
- [33] Holst J.J., Hending L.G., and Rehfeld J.F. Gut glucagon and reactive hypoglycaemia. *Lancet*, 1973, 1:1008.
- [34] Holst J.J. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol. Rev.*, 2007, 87:1409-1439.
- [35] Hrushesky W.J. Circadian timing of cancer chemotherapy. *Science*, 1985, 228:73-75.
- [36] Imeryüz N., Yeğen B.C., Bozkurt A., Coşkun T., Villanueva-Peñacarrillo M.L., and Ulusoy N.B. Glucagon-like peptide-1 inhibits gastric emptying via vagal afferent-mediated central mechanisms. *Am. J. Physiol.*, 1997, 273:G920-927.
- [37] Kaku K., Rasmussen M.F., Clauson P., and Seino Y. Improved glycaemic control with minimal hypoglycaemia and no weight change with the once-daily human glucagon-like peptide-1 analogue liraglutide as add-on to sulphonylurea in Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes. Metab.*, 2010, 12:341-347.
- [38] Komatsu R., Matsuyama T., Namba M., Watanabe N., Itoh H., Kono N., and Tarui S. Glucagonostatic and insulinotropic action of glucagonlike peptide I-(7-36)-amide. *Diabetes*, 1989, 38:902-905.
- [39] Kreymann B., Williams G., Ghattei M.A., and Bloom S.R. Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet*, 1987, 2:1300-1304.
- [40] Kubota A., Yamada Y., Hayami T., Yasuda K., Someya Y., Ihara Y., Kagimoto S., Watanabe R., Taminato T., Tsuda K., and Seino Y. Identification of two missense mutations in the GIP receptor gene: a functional study and association analysis with NIDDM: no evidence of association with Japanese NIDDM subjects. *Diabetes*, 1996, 45:1701-1705.
- [41] Larsen P.J., Fledelius C., Knudsen L.B., and Tang-Christensen M. Systemic administration of the long-acting GLP-1 derivative NN2211 induces lasting and reversible weight loss in both normal and obese rats. *Diabetes*, 2001, 50:2530-2539.

- [42] Lee S., Yabe D., Nohtomi K., Takada M., Morita R., Seino Y., and Hirano T. Intact glucagon-like peptide-1 levels are not decreased in Japanese patients with type 2 diabetes. *Endocr. J.*, 2010, 57:119-126.
- [43] Ma Y., Bertone E.R., Stanek E.J. 3rd, Reed G.W., Hebert J.R., Cohen N.L., Merriam P.A., and Ockene I.S. Association between eating patterns and obesity in a free-living US adult population. *Am. J. Epidemiol.*, 2003, 158:85-92.
- [44] McIntyre N., Holdsworth C.D., and Turner D.S. New interpretation of oral glucose tolerance. *Lancet*, 1964, 2:20-21.
- [45] Meeran K., O'Shea D., Edwards C.M., Turton M.D., Heath M.M., Gunn I., Abusnana S., Rossi M., Small C.J., Goldstone A.P., Taylor G.M., Sunter D., Steere J., Choi S.J., Ghatei M.A., and Bloom S.R. Repeated intracerebroventricular administration of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide or exendin-(9-39) alters body weight in the rat. *Endocrinology*, 1999, 140:244-250.
- [46] Meier J.J., Gallwitz B., Salmen S., Goetze O., Holst J.J., Schmidt W.E., and Nauck M.A. Normalization of glucose concentrations and deceleration of gastric emptying after solid meals during intravenous glucagon-like peptide 1 in patients with type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2003, 88:2719-2725.
- [47] Meier J.J., Nauck M.A., Kranz D., Holst J.J., Deacon C.F., Gaeckler D., Schmidt W.E., and Gallwitz B. Secretion, degradation, and elimination of glucagon-like peptide 1 and gastric inhibitory polypeptide in patients with chronic renal insufficiency and healthy control subjects. *Diabetes*, 2004, 50:609-613.
- [48] Miyawaki K., Yamada Y., Yano H., Niwa H., Ban N., Ihara Y., Kubota A., Fujimoto S., Kajikawa M., Kuroe A., Tsuda K., Hashimoto H., Yamashita T., Jomori T., Tashiro F., Miyazaki J., and Seino Y. Glucose intolerance caused by a defect in the entero-insular axis: a study in gastric inhibitory polypeptide receptor knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1999, 96:14843-14847.
- [49] Moore B. On the treatment of Diabetes mellitus by acid extract of Duodenal Mucous Membrane. *Biochem. J.*, 1906, 1:28-38.
- [50] Mortensen K., Christensen L.L., Holst J.J., and Orskov C. GLP-1 and GIP are colocalized in a subset of endocrine cells in the small intestine. *Regul. Pept.*, 2003, 114:189-196.
- [51] Muscelli E., Mari A., Casolaro A., Camastra S., Seghieri G., Gastaldelli A., Holst J.J., and Ferrannini E. Separate impact of obesity and glucose tolerance on the incretin effect in normal subjects and type 2 diabetic patients. *Diabetes*, 2008,

57:1340-1348.

- [52] Nakagawa A., Satake H., Nakabayashi H., Nishizawa M., Furuya K., Nakano S., Kigoshi T., Nakayama K., and Uchida K.. Receptor gene expression of glucagon-like peptide-1, but not glucose-dependent insulintropic polypeptide, in rat nodose ganglion cells. *Auton. Neurosci.*, 2004, 110:36-43.
- [53] Nauck M.A., Heimesaat M.M., Orskov C., Holst J.J., Ebert R., and Creutzfeldt W. Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.*, 1993, 91:301-307.
- [54] Nauck M.A., Niedereichholz U., Ettler R., Holst J.J., Orskov C., Ritzel R., and Schmiegel W.H. Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulintropic effects in healthy humans. *Am. J. Physiol.*, 1997, 273:E981-988.
- [55] Nauck M.A., Heimesaat M.M., Behle K., Holst J.J., Nauck M.S., Ritzel R., Hübner M., and Schmiegel W.H. Effects of glucagon-like peptide 1 on counterregulatory hormone responses, cognitive functions, and insulin secretion during hyperinsulinemic, stepped hypoglycemic clamp experiments in healthy volunteers. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2002, 87:1239-1246.
- [56] Orskov C., Wettergren A., and Holst J.J. Secretion of the incretin hormones glucagon-like peptide-1 and gastric inhibitory polypeptide correlates with insulin secretion in normal man throughout the day. *Scand. J. Gastroenterol.*, 1996, 31:665-670.
- [57] Perfetti R., and Merkel P. Glucagon-like peptide-1: a major regulator of pancreatic beta-cell function. *Eur. J. Endocrinol.*, 2000, 143:717-725.
- [58] Polak J.M., Bloom S., Coulling I., and Pearse A.G. Immunofluorescent localization of enteroglucagon cells in the gastrointestinal tract of the dog. *Gut.*, 1971, 12:311-318.
- [59] Prigeon R.L., Quddusi S., Paty B., and D'Alessio D.A. Suppression of glucose production by GLP-1 independent of islet hormones: a novel extrapancreatic effect. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2003, 285:E701-707.
- [60] Rask E., Olsson T., Söderberg S., Johnson O., Seckl J., Holst J.J., and Ahrén B. Impaired incretin response after a mixed meal is associated with insulin resistance in nondiabetic men. *Diabetes Care*, 2001, 24:1640-1645.
- [61] Reimann F. Molecular mechanisms underlying nutrient detection by incretin-

secreting cells. *Int. Dairy J.*, 2010, 20: 236-242.

- [62] Sandhu H., Wiesenthal S.R., MacDonald P.E., McCall R.H., Tchipashvili V., Rashid S., Satkunarajah M., Irwin D.M., Shi Z.Q., Brubaker P.L., Wheeler M.B., Vranic M., Efendic S., and Giacca A. Glucagon-like peptide 1 increases insulin sensitivity in depancreatized dogs. *Diabetes*, 1999, 48:1045-1053.
- [63] Schmidt W.E., Siegel E.G., and Creutzfeldt W. Glucagon-like peptide-1 but not glucagon-like peptide-2 stimulates insulin release from isolated rat pancreatic islet. *Diabetologia*, 1985, 28:704-707.
- [64] Scrocchi L.A., Brown T.J., MaClusky N., Brubaker P.L., Auerbach A.B., Joyner A.L., and Drucker D.J. Glucose intolerance but normal satiety in mice with a null mutation in the glucagon-like peptide 1 receptor gene. *Nat. Med.*, 1996, 2:1254-1258.
- [65] Stoffers D.A., Kieffer T.J., Hussain M.A., Drucker D.J., Bonner-Weir S., Habener J.F., and Egan J.M. Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. *Diabetes*, 2000, 49:741-748.
- [66] Sturis J., Gotfredsen C.F., Rømer J., Rolin B., Ribel U., Brand C.L., Wilken M., Wassermann K., Deacon C.F., Carr R.D., and Knudsen L.B. GLP-1 derivative liraglutide in rats with beta-cell deficiencies: influence of metabolic state on beta-cell mass dynamics. *Br. J. Pharmacol.*, 2003, 140:123-132.
- [67] Tang-Christensen M., Larsen P.J., Göke R., Fink-Jensen A., Jessop D.S., Møller M., and Sheikh S.P. Central administration of GLP-1-(7-36) amide inhibits food and water intake in rats. *Am. J. Physiol.*, 1996, 271:R848-856.
- [68] Thorens B. Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1992, 89:8641-8645.
- [69] Trümper A., Trümper K., Trusheim H., Arnold R., Göke B., and Hörsch D. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide is a growth factor for beta (INS-1) cells by pleiotropic signaling. *Mol. Endocrinol.*, 2001, 15:1559-1570.
- [70] Tsunoda M., Kobayashi N., Ide T., Utsumi M., Nagasawa M., and Murakami K. A novel PPAR alpha agonist ameliorates insulin resistance in dogs fed a high-fat diet. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2008, 294:E833-840.
- [71] Turton M.D., O'Shea D., Gunn I., Beak S.A., Edwards C.M., Meeran K., Choi S.J., Taylor G.M., Heath M.M., Lambert P.D., Wilding J.P., Smith D.M., Ghatei M.A.,

- Herbert J., and Bloom S.R. A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature*, 1996, 379:69-72.
- [72] Usdin T.B., Mezey E., Button D.C., Brownstein M.J., and Bonner T.I. Gastric inhibitory polypeptide receptor, a member of the secretin-vasoactive intestinal peptide receptor family, is widely distributed in peripheral organs and the brain. *Endocrinology*, 1993, 133:2861-2870.
- [73] Van Citters G.W., Kabir M., Kim S.P., Mittelman S.D., Dea M.K., Brubaker P.L., Bergman R.N. Elevated glucagon-like peptide-1-(7-36)-amide, but not glucose, associated with hyperinsulinemic compensation for fat feeding. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2002, 87:5191-5198.
- [74] Vanitallie T.B. Sleep and energy balance: Interactive homeostatic systems. *Metabolism*, 2006, 55:S30-35.
- [75] Verchere C.B., Kowalyk S., Koerker D.J., Baskin D.G., and Taborsky G.J. Jr. Evidence that galanin is a parasympathetic, rather than a sympathetic, neurotransmitter in the baboon pancreas. *Regul. Pept.*, 1996, 67:93-101.
- [76] Visboll T., Krarup T., Deacon C.F., Madsbad S., and Holst J.J. Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes*, 2001, 50:609-613
- [77] Vollmer K., Holst J.J., Baller B., Ellrichmann M., Nauck M.A., Schmidt W.E., and Meier J.J. Predictors of incretin concentrations in subjects with normal, impaired, and diabetic glucose tolerance. *Diabetes*, 2008, 57:678-687.
- [78] Wettergren A., Wøjdemann M., and Holst J.J. Glucagon-like peptide-1 inhibits gastropancreatic function by inhibiting central parasympathetic outflow. *Am. J. Physiol.*, 1998, 275:G984-992.
- [79] Willms B., Werner J., Holst J.J., Orskov C., Creutzfeldt W., and Nauck M.A. Gastric emptying, glucose responses, and insulin secretion after a liquid test meal: effects of exogenous glucagon-like peptide-1 (GLP-1)-(7-36) amide in type 2 (noninsulin-dependent) diabetic patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1996, 81:327-332.
- [80] 山田千積・山田祐一郎 消化管ホルモンによるインスリン分泌機構. カラー一版糖尿病学 ―基礎と臨床― (門脇孝・石橋俊・佐倉宏・戸邊一之・野田光彦編). 西村書店, 2007, :56-60.

- [81] Yamada Y., Hayami T., Nakamura K., Kaisaki P.J., Someya Y., Wang C.Z., Seino S., and Seino Y. Human gastric inhibitory polypeptide receptor: cloning of the gene (GIPR) and cDNA. *Genomics*, 1995, 29:773-776.
- [82] Yamane S., Harada N., Hamasaki A., Muraoka A., Joo E., Suzuki K., Nasteska D., Tanaka D., Ogura M., Harashima S., and Inagaki N. Effects of glucose and meal ingestion on incretin secretion in Japanese subjects with normal glucose tolerance. *J. Diabetes Invest.*, 2012, 3:80-85.
- [83] Yasuda K., Inagaki N., Yamada Y., Kubota A., Seino S., and Seino Y. Hamster gastric inhibitory polypeptide receptor expressed in pancreatic islets and clonal insulin-secreting cells: its structure and functional properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994, 205:1556-1562.
- [84] Yip R.G., and Wolfe M.M. GIP biology and fat metabolism. *Life Sci.*, 2000, 66:91-103.
- [85] Zunz E., and La Barre J. Contributions a l'étude des variatins physiologiques de la sécrétion interne du pancréas: relations entre les sécrétions externe et interne du pancréas. *Arch. Int. Physiol.*, 1929, 31:20-44.