

有酸素運動療法の高フルクトース負荷による
耐糖能異常モデルラットにおける改善効果と
セレノプロテインP誘導による抗酸化力促進効果

2019年度
宮 菜美華

本論文の基礎となる報文を以下に示す。

- 1) Namika Miya, Asuka Uratani, Keita Chikamoto, Yuki Naito, Keiji Terao, Yutaka Yoshikawa, Hiroyuki Yasui. Effects of exercise on biological trace element concentrations and selenoprotein P expression in rats with fructose-induced glucose intolerance. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2020**, 66(2), 124-131. [第 1 章]

- 2) Namika Miya, Yuki Naito, Keita Chikamoto, Keiji Terao, Yutaka Yoshikawa, Hiroyuki Yasui. Bright and dark sides of exercise effects on biological responses such as energy metabolism and renal function in rats with renal failure and fructose-induced glucose intolerance. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2020**, in press. [第 2 章]

目次

序 章 (研究の背景と目的)	1
第1章 通常食のラットおよび高フルクトース負荷による耐糖能異常モデルラットにおける運動療法の効果.....	10
1-1 緒言.....	10
1-2 実験材料および実験方法.....	12
1-3 結果.....	20
1-4 考察.....	33
第2章 腎不全を併発した通常食ラットおよび耐糖能異常ラットにおける運動療法の効果	39
2-1 緒言.....	39
2-2 実験材料および実験方法.....	40
2-3 結果.....	46
2-4 考察.....	58
総 括.....	62
参考文献.....	64
謝 辞.....	72

本論文で使用した略語一覧

ALT	: alanine transaminase
AMPK	: AMP-activated protein kinase
AST	: aspartate transaminase
AUC	: area under the curve
BCA	: bicinchoninic acid
BUN	: blood urea nitrogen
CA	: casein diet
CAT	: catalase
CPK	: creatine phosphokinase
CRE	: creatinine
DM	: diabetes mellitus
DPP4	: dipeptidyl peptidase 4
DTT	: dithiothreitol
EDI	: electric deionization
EDTA	: ethylene diamine tetra-acetic acid
ELISA	: enzyme-linked immunosorbent assay
FFA	: free fatty acid
GLP-1	: glucagon-like peptide 1
GLU	: glucose
GLUT4	: glucose transporter 4
GOD	: glucose oxidase
GPx1	: glutathione peroxidase 1
HDL-cho	: high-density lipoprotein
HE	: hematoxylin-eosin
HF	: high fructose diet
HOMA-IR	: homeostasis model assessment for insulin resistance
HbA1c	: hemoglobin A1c
ICP-MS	: inductively coupled plasma mass spectrometry
IDF	: International Diabetes Federation
IPE	: Interprofessional education
LDL	: low density lipoprotein
LOD	: lactose oxidase
LRP1	: low density lipoprotein receptor-related protein 1
MCT-1	: monocarboxylate transporter1
MPEC	: 2-methyl-6- <i>p</i> -methoxyphenylethynyl-imidazopyrazinone
MRSA	: methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>

NAFLD	: nonalcoholic fatty liver disease
NASH	: non-alcoholic steatohepatitis
NGT	: normal glucose tolerance
OYC	: Oriental Yeast Co. Ltd.
PCR	: polymerase chain reaction
PGC-1 α	: peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α
PVDF	: polyvinylidene fluoride
PYY	: peptide YY
QOL	: quality of life
RO	: reverse osmosis
ROS	: reactive oxygen species
SDS	: sodium dodecyl sulfate
SGLT2	: sodium glucose transporter 2
SOD	: superoxide dismutase
SU	: sulfonylurea
SeP	: selenoprotein P
T-cho	: total cholesterol
TBS	: tris-buffered saline
TG	: triglyceride
TNF- α	: tumor necrosis factor α
TP	: total protein
TR	: tioredoxin reductase
VCM	: vancomycin
VFA	: visceral fat area

序 章 (研究の背景と目的)

糖尿病 (DM) は、インスリン作用の不足による慢性の高血糖状態を主徴とし、種々の代謝異常を伴う疾患群と定義されている [1]。国際糖尿病連合 (IDF) の報告によると、2019 年における世界の成人人口あたり (20~79 歳) の DM 有病者数は 4.6 億人、DM 予備群としての耐糖能異常者数は 3.7 億人と発表されており、2045 年には DM 有病者数は 7 億人、DM 予備群としての耐糖能異常者数は 5.5 億人になると予測されている [2]。世界の DM 人口の爆発的な増加は深刻な問題となっている。

DM 患者の 90~95% は 2 型 DM が占めている。2 型 DM はインスリン分泌の低下、あるいはインスリン感受性の低下 (インスリン抵抗性) によりインスリン作用不足をきたし、慢性の高血糖状態に陥るとされている。DM の発症の初期は自覚症状に乏しいが、高血糖が持続し病状が進行すると 3 大合併症といわれている網膜症、腎症、神経障害を引き起こし、さらに脳卒中、虚血性心疾患といった心血管疾患の発症リスクを高めて患者の生活の質 (QOL) を著しく低下させる。そのため、治療により合併症の発症を阻止することは臨床的に非常に重要であることがよく知られている [3]。加えて、DM の病態は合併症により複雑化するため、個別対応した質の高い治療が必要となる。これを実現するには DM の治療として、基本となる食習慣を考慮した食事療法、生活習慣の改善を促す運動療法に加えて、複数の医薬品による薬物療法が実施される。薬物療法には、低血糖や乳酸アシドーシスなどの重篤な副作用もあるため、個々の患者の病態や合併症の進行に合わせた治療薬の選択が重要である。近年は新規作用機序をもつ治療薬も開発されてきており、ますます薬物療法の選択肢が増えると考えられる。

一般的に生活習慣病の治療の基本となるのは食事療法であり、継続的かつ合理的な食事療法の実践により疾病の発症さらには病態の進展を未然に防ぐことが可能であり、この点が食事療法の重要な意義とされている。DM の治療における食事療法を総括すると、①適正なエネルギーを摂取する、②三大栄養素 (炭水化物、タンパク質、脂質) のバランスを保つ、③食品の種類をできるだけ多くし、ビタミン、ミネラルを十分に摂る、④動物性脂肪の摂取を控えめにする、⑤食物繊維を多く含む食品を十分に摂る、⑥欠食をしないで 1 日 3 回、規則正しく、ゆっくりよく噛んで食べる、ということが大切な内容である。つまり、健康を保ちつつ DM といった生活習慣病を予防する上では、タンパク質やビタミン、ミネラルなどの栄養素を十分に取ることが大切であり、毎日の食事は、主食と主菜、副菜、汁物などをそろえ、摂取すべき食品類をバランス良く取ることが必要であるといえる。また、食塩の取り過ぎは、食欲を亢進させ、高血圧症ひいては脳卒中や心臓病、胃がんなどの原因になりやすいため、日本人の食事摂取基準 2020 年版では食塩摂取目標量を男性では 7.5 g/日、女性では 6.5 g/日未満としている [4]。加えて、動物性脂肪の取り過ぎは、肥満、動脈硬化症、心臓病、大腸がん、乳がんなどの原因になりやすいとされている。さらには、色の濃い野菜や果物を多く取っている人は、がんの罹患率が低いとされている [5, 6]、1 日に 350~400 g を目標に十分に取ることが推奨されている。毎日の食品の摂取の中でも特に、食物繊維は、血糖コン

トロールの改善に有用であり、血中脂質レベルを低下させることや [7]、日本人を対象に実施されたコホート研究によれば、食物繊維の摂取が多い集団ほど HbA1c レベルが低いことが示されており [8]、加えて、心血管疾患の発症率が低下することも明らかにされているため [9]、積極的な摂取が望まれている。

DM の薬物療法は多くの方法が提唱されており、医薬品によって血糖値をコントロールすることにより、血糖値の高い症状を改善し合併症の進行を予防することが目標となる。基本的な療法である食事療法と運動療法のみで血糖値をコントロールできない場合に、薬物療法を行う必要性が生じる。現在の DM 治療において薬物療法を受ける場合、患者が最初に十分意識しておくべきことは、食事療法や運動療法を正しく継続することである。過食や運動不足などの状況下で薬物療法を行っても有益な効果はあまり期待できず、食事療法や運動療法が正しく守られている条件下で、医薬品の投与を行うことで最大の治療効果がうまれる。具体的な医薬品としては、①超速攻型、速攻型、中間型、混合型など多種類のインスリン製剤、②膵臓からのインスリン分泌を促進して、血糖値を下げるスルホニル尿素 (SU) 薬、③SU 薬よりも速やかな短時間で、膵臓からのインスリン分泌を促進して、血糖値を下げる速効型インスリン分泌促進薬、④小腸からの糖の吸収を抑制して、食後の急激な血糖値上昇を抑える α グルコシダーゼ阻害薬、⑤肝臓が糖を作り出す糖新生の作用を抑制し、筋肉などに働きかけてインスリンの感受性を高め、血糖値を下げるビッグアナイド薬、⑥脂肪組織や筋肉、肝臓などに働きかけてインスリンの感受性を高めるチアゾリジン薬、⑦腎臓の尿細管からの糖の再吸収を抑え、尿中への糖の排出を促進する SGLT2 阻害薬、⑧腸から吸収されたブドウ糖の濃度に応じてインスリンの分泌を促すホルモンの働きを抑制する酵素を阻害する DPP4-阻害薬、などがあり、臨床医により患者の状況を鑑みながら投薬や治療が進められているが、低血糖などの重篤な副作用が生じることもあり、完璧な薬物療法はいまだ開発されていない。

そこで近年、2 型 DM の治療として食事療法や薬物療法のみならず、運動療法により重点を置いて生活の質を改善することの重要性がますます高まっている。運動療法とは、身体障害や疾患の治療および予防のために運動を活用する方法であり、脳卒中後の麻痺や骨折などの整形外科的疾患に対するリハビリテーションの他に、DM や高血圧、脂質異常症などの生活習慣病といった内科的疾患に対しても実施されている。全身持久力を養うウォーキングやエアロビクスなどの有酸素運動や、陸上競技の短距離走、ダンベルおよびマシンを用いて行う負荷の強い無酸素運動、筋力を増強させる筋力トレーニング、体を柔軟に保つためのストレッチといった様々な種類の運動療法があり、それぞれの運動の特性や運動を行う目的を見極めて個別に運動処方を設計することが重要となる。また、高齢者の加齢による筋力と活動量の低下から引き起こされるサルコペニアやフレイルの対策には、運動が非常に重要であるとされている。フレイルが進行し、身体機能に具体的な障害が生じると他者による介護が必要になる。しかし、フレイルの状態であるうちに適切な運動療法による介入を行うことで健康な状態へと改善し、健康寿命を延ばすことが可能である。そのため、高齢者のフレイルの予防・改善による健康寿命の延伸を目指して、市町村の地域社会をあげてフレイル対策に取り組む都道府県が増えている。厚生労働省による運動施策の推進として掲げられた、

健康づくりのための身体活動基準 2013 では、高齢者に対して身体活動不足を予防することに主眼を置き、強度を問わず横になったままや座ったままにならなければどんな動きでもよいので、身体活動を毎日 40 分行うことが推奨されている [10]。

様々な種類の運動療法のうち、従来からインスリン抵抗性を改善させることが知られている有酸素運動は、糖尿病治療ガイドラインにおいて糖尿病の予防と合併症の進展阻止のために定期的な継続が推奨されており、糖代謝および脂質代謝の促進や血圧低下など 2 型 DM とその合併症に対して多面的な改善効果を有することが報告されている [11]。また、運動は筋力向上や骨粗鬆症の予防に加えて、免疫機能の向上、自律神経機能を整えることによるストレス発散など様々な作用があり、健康づくりや生活習慣病予防、健康寿命の延伸のために、現在最も注目されているものの 1 つである。DM と有酸素運動の関係については、ヒト試験において、2 型 DM 患者が 8 週間以上の有酸素運動を行った研究では対照群と比較して運動群で最大酸素摂取量が 11.8%増加し、心肺機能と HbA1c の改善が認められたという報告がある [12]。しかし一方で、エネルギー産生経路の遺伝子変異によって運動不耐性、特に運動時の有酸素運動能力の低い患者が存在することも知られており [13]、2 型 DM 患者の 15~20% は定期的な運動を行っても血糖値の低下が乏しく、運動の効果が現れにくいということが報告されている [14]。運動の継続的な実施は筋肉量を増加させることで肥満を改善し、心肺機能を向上させ、インスリン感受性を増大させることにつながるといわれている [15, 16]。運動によるインスリン感受性の増大について、Hayashi らは、運動による筋収縮は AMPK を活性化させることで GLUT4 の膜輸送を促進し、インスリン非依存的な糖の取り込みを亢進させるということを報告している [17]。さらに、Hickey らは 2 型 DM 患者の骨格筋では非肥満者と比べて GLUT4 発現量やミトコンドリア量が豊富な筋線維である type I 線維の比率が少ないことを報告しており [18]、一般的に運動トレーニングは type I 線維を増加させることから、運動による骨格筋の形質変換がインスリン感受性の増大に寄与していると考えられる。

運動は、生体内に一定の濃度で存在する微量金属元素とも深く関わっている。鉄 (Fe) やマンガン (Mn)、銅 (Cu) といった必須微量金属元素は、抗酸化酵素や糖代謝酵素の構成成分として、酵素の活性を強める触媒として働くため、欠乏や過剰により機能障害が生じる。したがって、それらの微量金属元素の運動による変動を調べることは運動パフォーマンスや病態の評価につながることを示唆されている [19, 20]。例えば、スポーツ選手は発汗や運動性貧血により Fe の損失が大きい。そのため、通常より多い Fe の摂取が推奨されており [21]、運動により発生した過剰な活性酸素種 (ROS) の処理に関わる抗酸化酵素の構成成分である Cu や Mn、セレン (Se) などは酸化ストレスから組織を防御する上で生体に不可欠な存在である [22]。肥満ラットに運動トレーニングを行った実験では、運動により血中と脾臓中の亜鉛 (Zn) レベルが上昇したという報告 [23] や、肝臓組織の元素分布に変動があった [24] という報告がある。しかしながら、アルブミンやヘモグロビンなどのタンパク質合成や、全身でのエネルギー代謝といった様々な生理機能と強く関与している生体微量元素と運動との関係について評価している報告は未だ少ない。

このような背景の下、DM 発症と運動療法に関連する肝臓由来分泌タンパク質（ヘパトカイン）の1つとして、血漿中に存在して生体微量元素の Se を含有するタンパク質であるセレノプロテイン P (SeP) が報告された。一般に、Se を含有するタンパク質はセレノプロテインと総称され、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) や、チオレドキシシン還元酵素 (TR) などこれまでに 25 種類が同定されている (Table 1)。これらの中で機能が判明しているセレノプロテインは、すべてセレノール基 (R-SeH) を有し、ROS の除去や細胞内の酸化還元反応に関与していることが分かっており、酸化ストレスを介する細胞のアポトーシスやがん化などとの関連が調べられている [25]。これまでに明らかにされた 25 種類存在するセレノプロテインの中で、ヘパトカイン（肝臓で主に産生された後に血漿中に分泌される）であるセレノプロテイン P (SeP) は、摂食による Se 量によってその発現量が大きく依存しており、生体内における Se バランスのバイオマーカーとして機能している。

Table 1 Twenty-five selenoproteins are found in human.

No.		size	Characteristics
1	Glutathione peroxidase 1	22-25 kDa	Antioxidant enzyme in cell cytosol
2	Glutathione peroxidase 2	22-25 kDa	Antioxidant enzyme in gastrointestinal tract
3	Glutathione peroxidase 3	22-25 kDa	Antioxidant enzyme extracellular space and plasma
4	Glutathione peroxidase 4	20-22 kDa	Antioxidant enzyme in membrane
5	Glutathione peroxidase 6		Antioxidant enzyme
6	Selenoprotein P		Transport and storage of selenium
7	Thyroid hormone deiodinases 1		Thyroid hormone metabolism
8	Thyroid hormone deiodinases 2		Thyroid hormone metabolism
9	Thyroid hormone deiodinases 3		Thyroid hormone metabolism
10	Thioredoxin reductase 1	≤155 kDa	Multiple role, including dithiol-disulphide
11	Thioredoxin reductase 2	≤155 kDa	Detoxifies peroxides
12	Thioredoxin reductase 3	≤155 kDa	maintain redox state of transcription factors
13	Selenophosphate synthetase 2		selenocystein synthesis
14	Selenoprotein H		Redox responsive DNA-binding protein
15	Sep 15	15 k Da	Protein folding (potential)
16	Selenoprotein N	65 kDa	Protein folding (potential)
17	Selenoprotein W	9.5 kDa	Antioxidant enzymes
18	Selenoprotein R		Antioxidant enzymes
19	Selenoprotein M		Protein folding (potential)
20	Selenoprotein S		Protein folding (potential)
21	Selenoprotein K		Antioxidant cardiomyocytes
22	Selenoprotein O		Unknown function
23	Selenoprotein I		Unknown function
24	Selenoprotein T		Unknown function
25	Selenoprotein V		Unknown function

これら多くのセレノプロテインの中で、SePは必須微量元素のSeを肝臓から全身の各組織へ運搬する重要な生理機能を持ち、システインの硫黄(S)がSeに置き換わったセレノシステインとして1分子中に10残基を有している。複数のセレノシステインを持つセレノプロテインはSePのみが持つ特徴であり、SePのC末端側に存在する9残基のセレノシステインは各末梢組織にSeをセレノシステインの化学形態で運搬し、N末端側の1残基は組織のリン脂質ヒドロペルオキシドに対して直接的な還元作用を発揮する抗酸化性タンパク質として機能していることが分かっている (Fig. 1) [26, 27]。

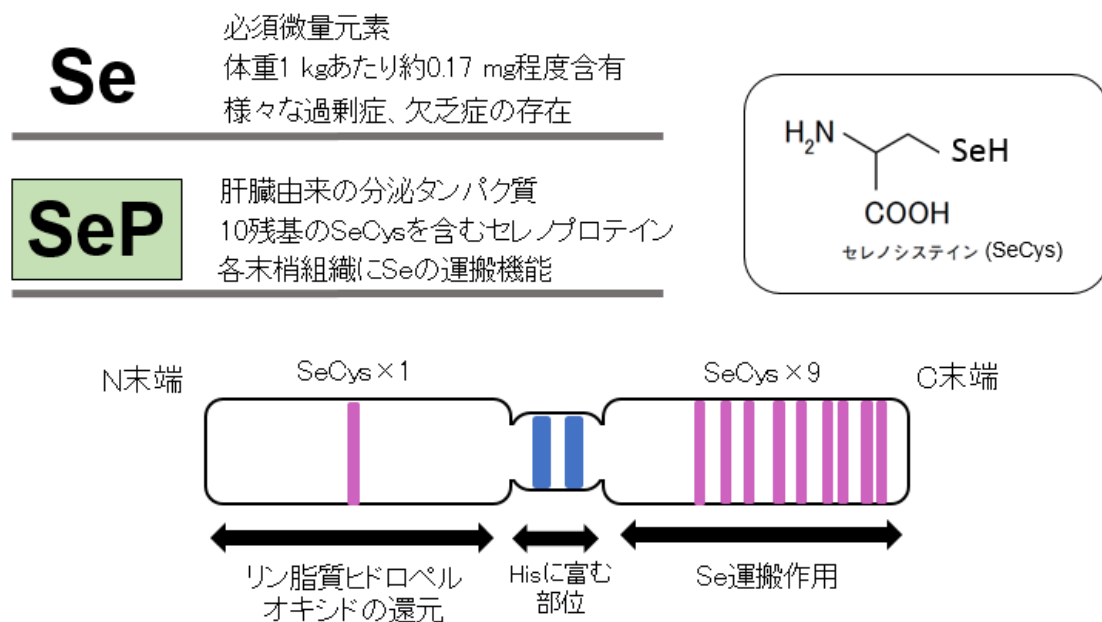


Fig. 1 Structure and function of selenoprotein P (SeP)

さらに、SePは組織中のセレノシステインの供給源であることから、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx1) の合成を促進して酸化ストレスからの細胞保護作用を示すことも知られている (Fig. 2) [28]。また、生体内におけるSeの代謝は肝臓が中心的な役割を果たしている。ヒトをはじめ多くの生物種にとってSeは生命維持に非常に重要な必須微量元素であるため、Se欠乏は免疫反応、神経変性、がんなどの欠乏症を引き起こし、一方でSe過剰になると有毒であるため神経系の障害や様々な内臓疾患に陥ることが知られている。そのため、生物は生体内においてSe量を厳密に制御しており、セレノプロテインの形で有効に利用している。食事由来のSeは、消化管から吸収され門脈を経由して肝臓に取り込まれるとメチル化、糖化された後に血液中に分泌され、循環血液から腎臓を介して尿中へ排泄される。また、一部のSeは、肝臓中のセレノプロテインの生合成に利用される。加えて、高血糖状態や高脂肪の食事はSePの分泌を増加させることが知られており、循環血液中のSePは血管や骨格筋、膵臓、その他の様々な臓器に作用している (Fig. 3)。

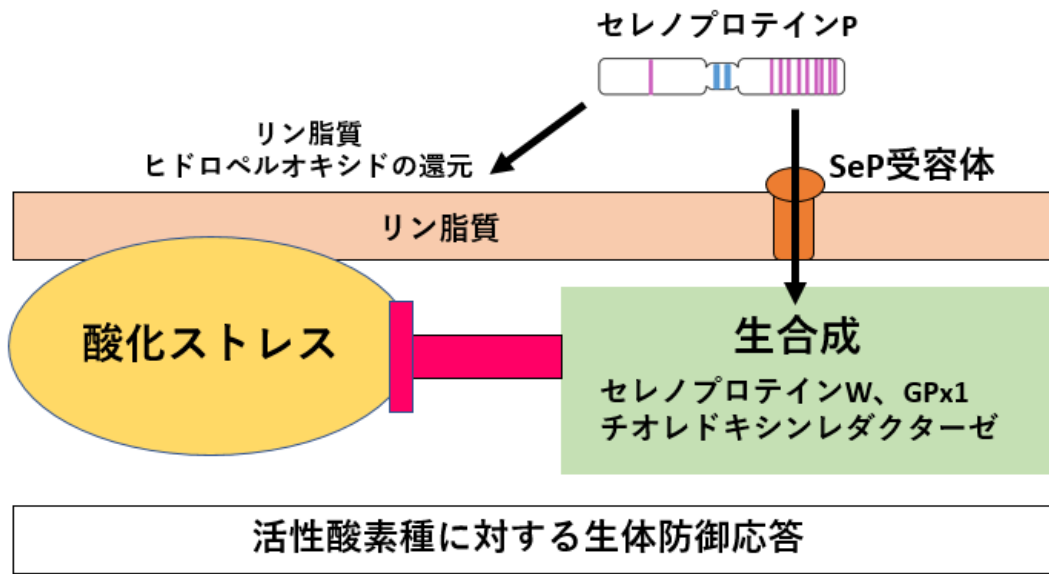


Fig. 2 Antioxidative actions of SeP

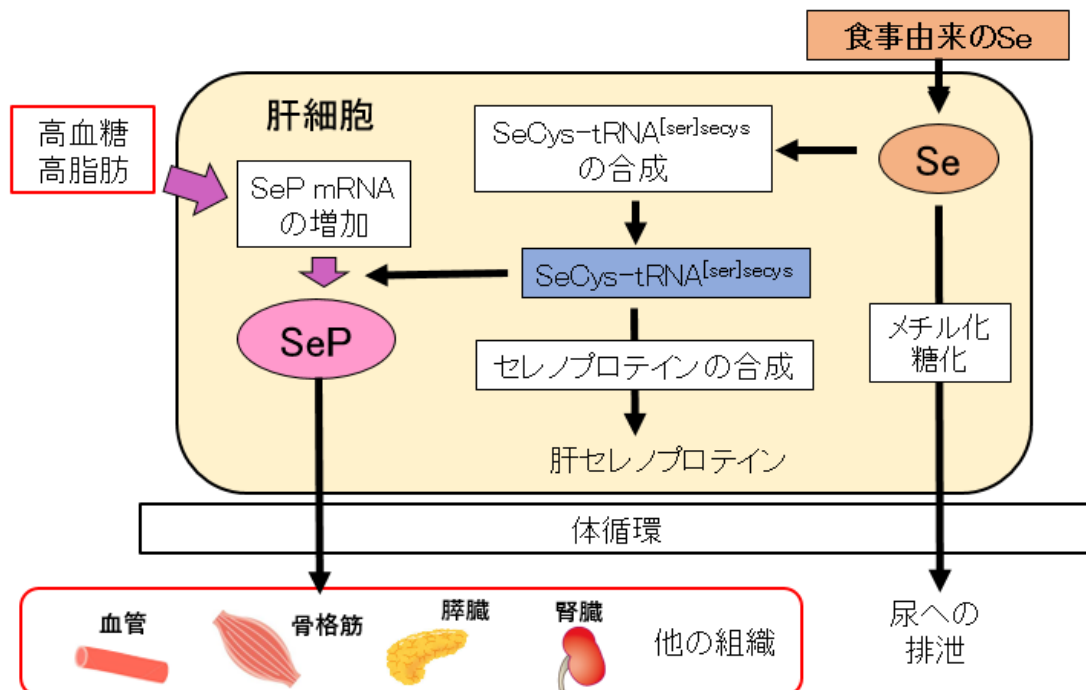


Fig. 3 Selenium (Se) metabolism in the liver and Se transportation to peripheral organs by SeP

SeP が酸化ストレスからの細胞保護作用を示す一方で、Misu らは治療効果が乏しい DM 患者の血中 SeP 濃度が増加していること、過剰に発現した SeP が肝臓や骨格筋に作用すると、その還元反応による還元ストレスが亢進して 2 型 DM の治療を妨げることを報告している [29]。また、健常者と比較した SeP 濃度の増加は内臓型肥満患者および NAFLD 患者で認められ、SeP 濃度は内臓脂肪面積 (VFA) と有意な正の相関があることや、血管新生作用にも密接に関与していることが報告されている [30, 31]。さらに、Misu らは、SeP が有酸素運動によって生じた ROS をほぼ完全に消去するケースでは、運動による健康増進効果を打ち消す負の作用である、いわゆる運動抵抗性に SeP が関与していることを明らかにした [32]。

肝臓は、ヘパトカインである SeP の分泌を介して、酸化ストレスからの細胞保護作用や DM および DM 関連疾患に関わっており、様々な働きを担っている臓器である。肝臓と DM は密接に関連しており、DM の基盤となる病態であるインスリン抵抗性状態では、インスリン感受性の低下によるインスリン作用の不足により、肝臓における糖産生の亢進と骨格筋における糖の取り込みが抑制され、高血糖状態に至る。肝臓は血糖コントロールを担う中心的な臓器であり、様々な分泌タンパク質の産生臓器でもある。肝臓に発現する遺伝子を網羅的に解析した研究では、2 型 DM 患者の肝臓では分泌タンパク質をコードする遺伝子が数多く発現していることが明らかとなり、その中でもミトコンドリアタンパク質をコードする遺伝子群の発現が健常者と比較して有意に亢進しており、この遺伝子群の発現の増加が 2 型 DM 患者の病態に関与していることが示唆された (Fig. 4) [33]。また、2 型 DM 患者の肝臓では健常者と比較して、血管新生因子発現、線維化促進因子発現、酸化ストレス関連因子発現が異なっていることも報告されている [34]。これらの報告より、肝臓は DM にとって重要な臓器であり、肝臓由来分泌タンパク質である SeP と 2 型 DM、および DM の運動療法として実施されている有酸素運動との関連を検討することは、DM の治療で実施される運動療法の新たな介入方法の模索につながると考えられる。

Cellular component	Type 2 DM	NGT
	Tags per million	Tags per million
Extracellular	123136	158322
<u>Mitochondria</u>	<u>165001</u>	<u>98013</u>
Nucleus	37241	33402
Cytoplasm	26997	25506
Membrane	20130	20454
Ribosome	16179	14810
Endoplasmic reticulum	15600	12683
Golgi apparatus	7017	4708
Others	229462	230814

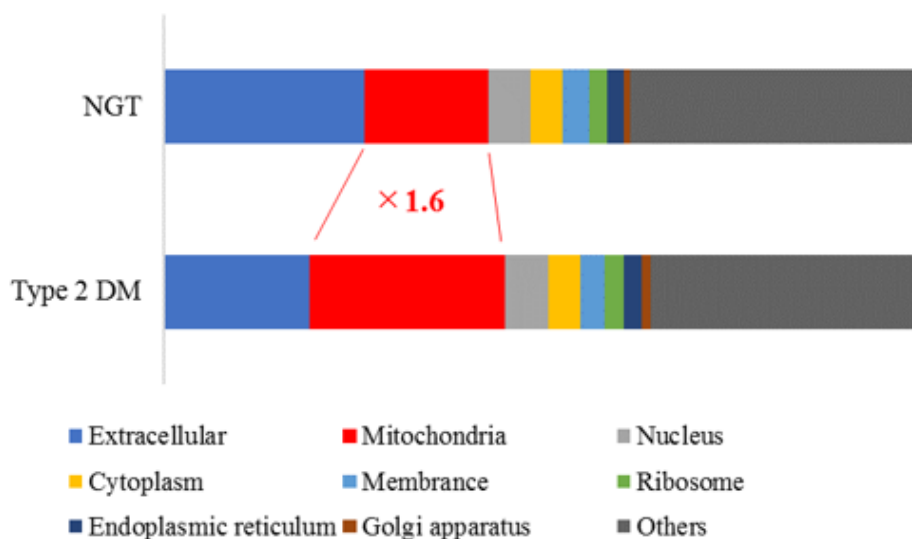


Fig. 4 Distribution of the cellular components in the type 2 DM and the NGT.

現在、生体への運動療法による多面的な影響や、運動に関わる生体金属元素に関して多くの研究がなされている。一般的に運動療法において、運動条件の設定は個々の患者の病態や合併症の進行度合に合わせて調整し、最適な条件にするべきであるという意見がある [35,36]。また、DM 治療における運動療法の有益な効果については、DM が進行し腎臓機能に障害を持つ DM 患者においても、運動療法によって一定のレベルにまで病態が改善したという報告がある [37,38]。DM の病態は個人間で非常に多様であり、合併症の有無による個人差が大きい。そのため、同じ強度の運動療法を施しても病態の程度や進行度によって効果の大きさは様々であると推測される。そのため、治療のオーダーメイド化が進んでいる今日では、合併症の可能性を有する多様な病態の DM 患者における、個別化された運動療法の効果についても明らかにされるべきであると考えた。

そこで、DM 治療における食事療法、運動療法、および薬物療法をチーム医療として実践する際に想定される多職種連携（IPE）型医療を背景として、本研究では、有酸素運動による効果が DM の病態および治療にどのような影響を及ぼすのかを基礎的に検討することとした。その中で、2 型 DM の予防と合併症に多面的な改善効果を有するとされる有酸素運動は、DM 治療に対して具体的にどのような有益な効果を示し、一方で、改善や達成できないものが何かを明らかにすること、そして DM の重症度の違いにより運動療法の効果がどのような影響を受けるのかについて評価することを目的とした。

第1章 通常食のラットおよび高フルクトース負荷による耐糖能異常モデルラットにおける運動療法の効果

1-1 緒言

DM 治療ガイドラインにおいて DM の予防と合併症の進展阻止のために推奨されている運動療法は、血糖コントロールの改善やインスリン感受性の増加、心肺機能や脂質代謝の改善、血圧低下といった目的で実施されている [39]。また、DM の運動療法は、中等度の有酸素運動（最大酸素摂取量 40~60%のややきついと感じる程度の運動）を 1 回に 20~60 分間、少なくとも週に 3~5 回行うことが推奨されている [40]。

また、内臓の中で最も大きな臓器である肝臓は、再生能力および代償能力に優れ、代謝作用や解毒・排泄作用、胆汁の生成・分泌など様々な役割を担っている。その中でも肝臓における代謝作用、特に糖代謝は重要な働きの 1 つであり、肝臓と糖代謝および DM の関連に関して数多くの研究が進められている。DM と肝臓機能との関係については、以下のように考えられている。

食生活の欧米化で高脂肪食、高糖質食ばかりを続けていると内臓脂肪が増加し、インスリンシグナル伝達を阻害するサイトカイン等が分泌されることで、インスリン抵抗性となり、毎回の食後に血糖値が上昇し、これを是正するために膵臓からインスリンが大量に分泌されて血糖値をコントロールする状況、すなわち代償性高インスリン血症を引き起こす。さらに、代償機構が破綻すると、血糖値の上昇が始まる。肝臓機能が低下した状態では、より血糖値が上昇し、肝臓中へ糖が過剰に取り込まれ、脂肪に変換して蓄積され脂肪肝を引き起こされる。脂肪肝になった肝臓は、脂肪を利用して血液中にブドウ糖を放出する働きが活発になり、血糖値が急激に上昇する。血糖値が急上昇すると、さらにインスリンが過剰分泌される。この負のサイクルは、インスリンを分泌している膵臓を疲弊させ、本来の働きができない状態になり、必要な量のインスリンを分泌できなくなるために DM が悪化する [41]。

すなわち、生活習慣の乱れによるインスリン抵抗性の破綻により血糖値が上昇し、余分な糖が肝臓に蓄積され、脂肪肝が引き起こされ、さらに蓄積した糖が肝臓から再放出されるため血糖値が急激に上昇し、DM が悪化する。DM が悪化することによってインスリンがさらに過剰分泌することを繰り返し、次第に膵臓が疲弊するとインスリンの分泌が徐々に低下し、インスリンの作用不足によって血糖値が下がらず DM がさらに悪化するという悪循環のサイクルが進行する。

最終的には、肝臓そのものも機能不全となり、生体にとってより深刻な状態となっていく。このように、耐糖能異常が肝臓機能不全を引き起こすことになり、肝臓でのタンパク質合成や肝臓から分泌されるヘパトカインの分泌にも大きな影響を与える可能性が示唆される。そのため、DM に関連する肝臓機能の指標として SeP 発現への影響に注目をした。

そこで、DM における運動療法として推奨されている有酸素運動が生体へどのような有益な効果を及ぼし、一方で改善や達成できないものが何かを明らかにすることを目的とし、本研究ではフルクトース食誘発性耐糖能異常モデルラットを用いて、有酸素運動が生体内微量

金属元素やセレノプロテイン P (SeP) 発現量ならびに各種生体内のパラメータに及ぼす影響を、健常動物と耐糖能異常モデル動物で比較検討を行った。

本研究で作製した耐糖能異常モデルラットは、DM の発症は食習慣の乱れが一因であることから、清涼飲料水や果物、ジャムなどに多く含まれ、日常の食生活において摂取する機会が多い糖質の 1 つであるフルクトースを経口投与することで、食餌性の耐糖能異常モデルを作製した。フルクトースによる耐糖能異常の発生は、フルクトースがグルコースとは異なる代謝的特性を有し、インスリン作用を介さずに肝臓に素早く取り込まれて代謝されることで引き起こされる。フルクトースは肝臓での中性脂肪の合成と蓄積を促進させ、脂質異常症や LDL の増加をもたらす [42]、脂肪組織からは TNF- α やレジスチン、FFA など炎症性サイトカインや脂肪細胞由来の代謝産物が放出されて生体におけるインスリン抵抗性や耐糖能の異常を誘導する。そこで耐糖能異常モデルには 58%フルクトース (HF) 食を与え、健常モデルには標準の餌として 20%カゼイン (CA) 食を与えて実験を行った。

1-2 実験材料および実験方法

1-2-1 試薬

実験食の作成

ミルクカゼイン、OYC 配合ミネラル混合および OYC 配合ビタミン混合はオリエンタル酵母工業株式会社（東京）より購入した。大豆油は植田製油株式会社（兵庫）より提供された。セルロースは旭化成株式会社（東京）、スクロースは三井製糖株式会社（東京）、コーンスターチは株式会社若葉商会（兵庫）、およびフルクトースは富士フィルム和光純薬工業株式会社（大阪）より購入した。

糖負荷試験

グルコースは富士フィルム和光純薬工業株式会社（大阪）より購入した。

誘導結合プラズマ質量分析計（ICP-MS）による血漿中および組織中の生体金属の定量

硝酸（ HNO_3 、有害金属測定用）は関東化学株式会社（東京）、過塩素酸（ HClO_4 、有害金属測定用）および過酸化水素（ H_2O_2 、原子吸光分析用）はキシダ化学株式会社（大阪）より購入した。カルシウム（Ca）標準液、マグネシウム（Mg）標準液、Cu 標準液、Fe 標準液、Mn 標準液、Zn 標準液、クロム（Cr）標準液、Se 標準液および内部標準液として使用したインジウム（In）標準液（原子吸光分析用標準液、1000 ppm）は富士フィルム和光純薬工業株式会社（大阪）より購入した。

肝臓および腎臓の抗酸化力の評価

リン酸二水素ナトリウム・二水和物（ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）、リン酸水素二ナトリウム・十二水和物（ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ）、リン酸二水素カリウム（ KH_2PO_4 ）、水酸化ナトリウム（ NaOH ）およびヒポキサンチンは富士フィルム和光純薬工業株式会社（大阪）、エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物（ $\text{EDTA} \cdot 2\text{Na}$ ）およびキサンチンオキシダーゼはシグマアルドリッチ社（セントルイス、MO）より購入した。プロテアーゼインヒビター（complete protease inhibitor cocktail）は（ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社、バーゼル、スイス）より購入した。発光試薬の MPEC はアトー株式会社（東京）より購入した。

筋肉グリコーゲンの測定

水酸化カリウム（ KOH ）、エタノール、グリコーゲンは富士フィルム和光純薬工業株式会社（大阪）、硫酸ナトリウム（ NaSO_4 ）、フェノール試薬、濃硫酸はキシダ化学株式会社（大阪）より購入した。

血漿中インスリン値の測定

超高感度ラットインスリン測定キットを森永生科学研究所（横浜）より購入した。

肝臓におけるセレノプロテイン P mRNA 発現量の測定

肝臓組織から total RNA を抽出する際に使用した分子生物学用エタノールは富士フィルム和光純薬工業株式会社（大阪）より購入した。RNA later[®]-ICE frozen tissue transition solution はサーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社（ウォルサム、MA）、high pure RNA tissue kit はロシュ・ダイアグノスティクス株式会社（バーゼル、スイス）より購入した。

肝臓中 GPx1 の測定

グリシン、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、ジチオトレイトール (DTT)、塩化ナトリウム (NaCl)、オルトバナジウム酸ナトリウム (Na₃VO₄)、フッ化ナトリウム (NaF) および Tween 20 は富士フィルム和光純薬工業株式会社（大阪）より購入した。トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン (Tris) はナカライテスク株式会社（京都）、Leupeptin は株式会社ペプチド研究所（大阪）、メタノールは純正化学株式会社（東京）より購入した。Pierce BCA protein assay kit はサーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社（ウォルサム、MA）、抗 GPx1 抗体 (#ab22604) はアブカム社（ケンブリッジ、イギリス）、β-actin 抗体 (#4967) と HRP 標識抗ラビット IgG 抗体 (#7074) はセル・シグナリング・テクノロジー株式会社（ダンバース、MA）から、そして Immobilion[™] ウェスタン化学発光 HRP 基質はミリポア社（ビレリカ、MA）から購入した。

上記全ての有機溶媒、酸塩基試薬および無機試薬は一級ないし特級を用いた。なお、実験に用いたすべての純水は RO + EDI 式純水装置 Elix Advantage 3（日本ミリポア、東京）より調整されたエリックス水を使用した。

1-2-2 動物

4 週齢の Wistar 系雄性ラットを日本クレア株式会社（大阪）より購入した。動物は神戸女子大学動物飼育室で室温 22 ± 2°C、湿度 40~60%、点灯時間午前 7 時から午後 7 時の 12 時間周期の照明調節の下で飼育した。4 週齢から 1 週間、固形飼料 MF（オリエンタル酵母工業株式会社、東京）およびエリックス水を自由摂取させ、プラスチックケージ内で予備飼育した。5 週齢から 15 週齢の 10 週間の飼育期間中、体重は週に 2 回、摂食量は週に 1 回測定した。本動物実験は、神戸女子大学動物実験倫理委員会により承認され、神戸女子大学動物実験規定に従って実施した。（承認番号：A186）

1-2-3 動物の群分けおよび実験食の作成

予備飼育終了後、5週齢時にCA食またはHF食を開始した。標準食として20%CA食を与えた群と食餌性耐糖能異常モデルラットの作製のため58%HF食を与えた群をそれぞれ非運動群と運動群の4群に群分けした。各群の表記は以下の通りである。① 20%CA食 + 非運動 [CA (-)]; ② 20%CA食 + 運動 [CA (ex)]; ③ 58%HF食 + 非運動 [HF (-)]; ④ 58%HF食 + 運動 [HF (ex)]。実験食は5週齢から15週齢までの10週間与えた。15週齢時に、16時間絶食させたのち、イソフルラン吸入麻酔下で、ヘパリン処理したシリンジを用いて、腹部大動脈より採血した。血液試料を1,000g、4°Cで10分間遠心分離し、血漿を得た。また、採血後に肝臓、腎臓、膵臓、骨格筋（ヒラメ筋）および生殖器周囲の脂肪組織を摘出し重量を測定した。リアルタイムPCR法およびウェスタンブロッティング法で使用する肝臓組織は液体窒素で急速に凍結させた後、分析で使用するまで-80°Cで保存し、血漿およびその他の組織は測定時まで-30°Cで保存した。実験プロトコルをFig. 1-1に示す。また、実験食の組成はTable 1-1に示す通りである。

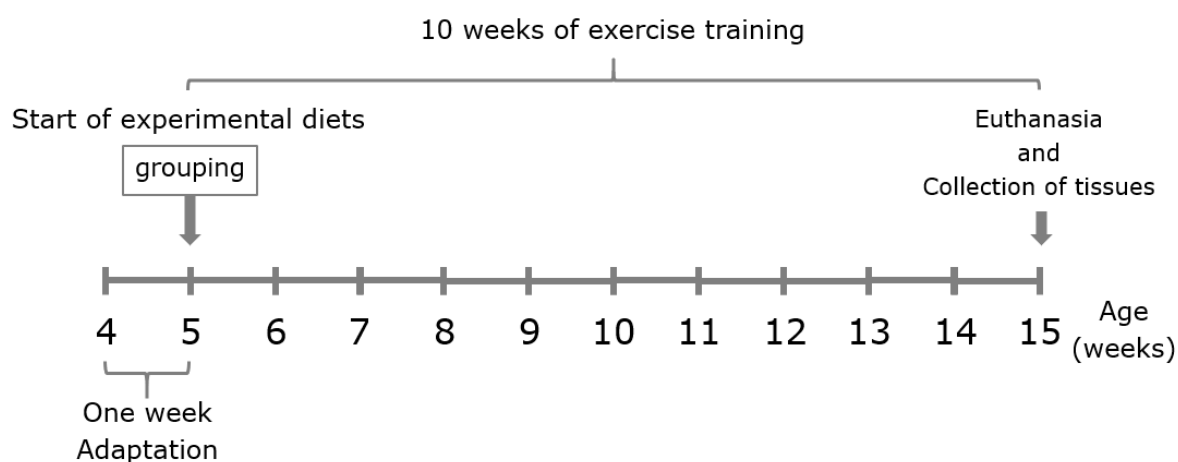


Fig. 1-1 Experimental protocol.

Table 1-1 Composition of experimental diets.

(Namika Miya, *et al. J. Clin. Biochem. Nutr.* **2020**, 66(2), 124-131., Table 1 より引用し一部改変した。)

Composition (g /100 g diet)	CA	HF
Casein	20	20
Soybean oil	6	6
OYC mineral mix	6	6
OYC vitamin mix	1	1
Cellulose	4	4
Cornstarch	48	5
Sucrose	15	-
Fructose	-	58
Calories (kcal /100 g)	358	362
Protein (%)	19.3	19.1
Carbohydrates (%)	62.9	68.8
Fat (%)	16.7	15.8

CA; 20% casein diet (containing 20% casein), HF; High-fructose diet (containing 58% fructose)

1-2-4 運動群における運動条件の設定

運動群には、小動物用トレッドミル MK-680（室町機械株式会社、東京）を用いた有酸素運動を実施した。運動条件は、0° の勾配で 30 m/分の強度の走行運動を 1 時間、週 6 日間行った。ラットが走行しない場合に備え、走路の最後部に動物の状態に影響を及ぼさない適切な電気刺激を与えることができる金属棒を設置した。運動期間は 5 週齢から 15 週齢の 10 週間実施した。

1-2-5 糖負荷試験

13 週齢に糖負荷試験を実施した。前日から 16 時間絶食させたのち、グルコース 2 g/kg BW を腹腔内投与し、空腹時（0 分、投与前）、投与後 15 分、30 分、60 分、90 分、120 分の血糖値を経時的に測定した。血糖値は、ラットの尾静脈から血液を採取し、グルコカード（アークレイ社、京都）を用いて GOD 酵素法により測定した。糖負荷試験中の 120 分間全体における耐糖能を評価するために、血中濃度－時間曲線下面積（AUC）を算出した。インスリン抵抗性の指標として、HOMA-IR は空腹時インスリン値と空腹時血糖値から以下の計算式を用いて算出した。

$$\text{HOMA-IR} = \text{空腹時インスリン値 (ng/mL)} \times \text{空腹時血糖値 (mg/dL)} / 405$$

1-2-6 血中乳酸値の測定

15 週齢の解剖前日に、運動群は運動実施直後、非運動群は運動群の測定と同時間帯の安静時に血中乳酸値の測定を実施した。乳酸値は、ラットの尾静脈から血液を採取し、ラクテート分析用センサー装置であるラクテートプロ 2（アークレイ社、京都）を用いて LOD 酵素電極法により測定した。

1-2-7 血漿中血液生化学パラメータの測定

得られた血漿中の HDL コレステロール（HDL-cho）、総コレステロール（T-cho）、中性脂肪（TG）、尿素窒素（BUN）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、総タンパク（TP）、クレアチンホスホキナーゼ（CPK）、クレアチニン（CRE）、グルコース（GLU）は動物用血液生化学自動ケミストリーである富士ドライケム 3500V（富士フィルムメディカル株式会社、東京）を用いて測定した。

1-2-8 血漿中インスリン値の測定

超高感度ラットインスリン測定キットを用いて、ELISA 法により測定した。

1-2-9 血漿中および組織中の生体金属の定量

運動による生体金属量の変動を調べるために ICP-MS を用いて、血漿中および組織中の生体金属の定量を行った。血漿 50 μ L もしくは肝臓、腎臓、膵臓 30 mg を 50 mL トールビ

ーカーに量りとり、150°Cのホットプレート上で湿式灰化した。組織中に含まれる有機物を除去するために、60% HNO₃を2 mL、60% HCl₄を2 mL、30% H₂O₂を2 mL 順次添加し、白色の残渣物が得られるまでこの作業を繰り返した。その後、室温において5% HNO₃を9 mL 添加し、3時間静置した後、白色残渣物を溶解させたものを測定溶液とした。検量線試料は濃度が0、1、5、50、100、500 ppbの溶液を作成し内標準の1 ppmのIn溶液を、測定溶液9 mLに対して、10 µLの液量で検量線試料と測定溶液にそれぞれ加えた。その後、血漿中および組織中のCa、Mg、Cu、Fe、Mn、Zn、CrおよびSe濃度をICP-MS 7700x（アジレントテクノロジー株式会社、サンタクララ、CA）を用いて定量した。なお、使用したビーカーなどの器具はすべてサンプルの金属汚染を防ぐため、1% HNO₃で酸処理したものを使用した。

1-2-10 肝臓および腎臓の抗酸化力の評価

ヒポキサンチン・キサンチンオキシダーゼ系の反応で人工的に発生させたスーパーオキシドアニオン(O₂^{•-})に対する組織ホモジネート液の消去能を確かめるために測定を行った。肝臓および腎臓 0.1 g に 500 µL のプロテアーゼインヒビター (complete protease inhibitor cocktail) を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.3) を加え、ホモジナイズした。その後、冷却遠心機で 4,000 rpm、4°C で 15 分間遠心分離した上清を粗酵素液とした。ヒポキサンチン・キサンチンオキシダーゼ系によって発生する O₂^{•-} と発光試薬 MPEC を反応させて以下のように測定した。300 µM MPEC 10 µL、0.1 M リン酸水素カリウム緩衝液 (pH 7.5) 170 µL、粗酵素液 60 µL および 100 µg/mL キサンチンオキシダーゼ溶液 60 µL の混合液に 3.6 mM ヒポキサンチン溶液 50 µL を分注し、その後生じた発光量を発光光度計 (Lumat3 LB9508、ベルトルドジャパン株式会社、東京) で測定した。

1-2-11 筋肉グリコーゲンの測定

運動による筋肉グリコーゲン貯蔵量の変動を調べるためにヒラメ筋を用いてフェノール硫酸法によるグリコーゲンの測定を行った。まず、筋肉グリコーゲンを抽出するため、ヒラメ筋 0.5 g に 30%水酸化カリウム飽和硫酸ナトリウム溶液 (30% KOH + Na₂SO₄) 3.0 mL を加え、沸騰水浴中で 30 分間加熱し溶解させた。冷却後、この溶液に 95%エタノールを 5.0 mL 加えてよく混合し、再び 30 分間冷却させた後、4,000 rpm、4°C で 30 分間遠心分離し、上清を取り除いた。この沈渣にエリックス水 5.0 mL を加えてよく溶解させた後、さらに全量が 10.0 mL になるように調整した。この溶液をグリコーゲン抽出液とした。次に、グリコーゲン抽出液 0.5 mL と 5%フェノール液 0.5 mL を混合させ、さらに濃硫酸 2.5 mL を加えてよく混和させた。25°Cの恒温槽で 20 分間反応させたのち、波長 490 nm における吸光度を紫外可視分光光度計 UV-1280 (株式会社島津製作所、京都) により測定した。検量線用として濃度 0、25、50、100 µg/mL のグリコーゲン標準溶液を作成し、同様に測定を行った。

1-2-12 肝臓におけるセレノプロテイン P の mRNA 発現量の測定

-80°Cで凍結保存した肝臓組織は-20°Cの条件下で RNA later[®]-ICE frozen tissue transition solution に 16 時間以上浸漬させ、total RNA の抽出に使用した。この操作は組織が融解する際の RNA の分解を防ぐために行った。total RNA は high pure RNA tissue kit を使用して抽出を行った。抽出した total RNA は使用するまで-80°Cで保存した。mRNA の定量にはリアルタイム PCR 法を用い、装置は LightCycler[®] Nano (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社、バーゼル、スイス) を使用した。反応は One Step SYBR[®] PrimeScript[®] Plus RT-PCR キット (タカラバイオ株式会社、滋賀) を用い、SeP および β アクチンの各プライマーの最終濃度が 0.4 μ M になるよう調整した。反応条件は 95°C、10 秒で初期変性させた後、1 サイクルが変性 95°C、5 秒、アニーリング 55°C、30 秒、伸張反応 72°C、3 秒になるよう設定し、40 サイクル反応させた。反応終了後、融解曲線分析から増幅産物は単一生成物であることを確認した。SeP mRNA 発現量は検量線法を用いて相対定量解析を行った。各プライマー配列は以下に示す。ラット SeP : R : TGTCACGACCAAATGTGGAG、L : GGAGAAAAGAGAGGGTGCAA [43]、ラット β -actin : R : GCGGCAGTGGCCATCTC、L : GGGAAATCGTGCGTGACATT。なお、ラット β -actin の R および L プライマー配列は Universal Probe Library Design Center (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社、バーゼル、スイス) を使用して設計した。

1-2-13 肝臓中 GPx1 の測定

抽出した肝臓組織 150 mg を 1.5 mL のバッファー I (20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、1 mM Na₃VO₄、5 mM NaF、1 mM PMSF および 5 μ g/mL leupeptin ; pH 7.4) 中に入れ、TissueLyser II (キアゲン、ノルトライン=ヴェストファーレン、ドイツ) を用いてホモジナイズし、ホモジネート液を 14,500 g、4°C で 20 分間遠心分離した。得られた上清は、Pierce BCA protein assay kit を用いて BCA 法によりタンパク質定量を行った。総タンパク質量として 10 μ g を含有するサンプル溶液を 8-16% ミニプロティアン[®] TGX[™] プレキャストゲル (バイオ・ラッド社、ハーキュリーズ、CA) により分離した。分離したタンパク質は PVDF 膜に転写し、0.1% Tween 20 含有 TBS (TBS/T) 溶液にスキムミルクを溶解し 3% スキムミルク-TBS/T 溶液としたものをブロッキング剤とし、20~25°C の室温で 1 時間ブロッキング処理を行った。その後、ブロッキング剤に溶解した一次抗体を 4°C 条件下において一晩振とうさせた。なお、一次抗体の希釈倍率は、抗 GPx1 抗体については 5,000 倍希釈、 β -actin 抗体については 1,000 倍希釈とした。その後、PVDF 膜を TBS/T で洗浄した後、2 次抗体 (希釈倍率 : 2,000 倍) を室温で 1 時間振とうさせた。特異的免疫反応は Immobilon[™] ウェスタン化学発光 HRP 基質を用いて化学発光処理を行い、ChemiDoc[™] Touch Imaging System (バイオ・ラッド社、ハーキュリーズ、CA) を用いて可視化した。得られたバンドの解析は ImageJ (ベセスダ、MD) を用いて行った。

なお、1 次抗体に抗 GPx1 抗体 (1:5,000 ; #ab22604) および β -actin 抗体 (1:1,000 ; #4967) を、2 次抗体には HRP 標識抗ラビット IgG 抗体 (1:2,000 ; #7074) を用いた。

1-2-14 統計処理

得られた全ての実験結果は平均値および標準偏差として表した。統計学的処理には、エクセル 2016 上で、エクセル統計（株式会社社会情報サービス、東京）を使用し、はずれ値検定であるスミルノフ・グラブス検定および 2 群間の比較には Student's t 検定を用いた。危険率が 5%未満をもって有意であると判断した。

1-3 結果

1-3-1 飼育期間における一般的特性の有酸素運動による変動の評価

解剖時の体重、飼育期間中の摂食量の平均値および、生殖器周囲脂肪量を示す (Table 1-2)。CA 群、HF 群ともに運動によって、体重、摂食量、生殖器周囲脂肪量は減少傾向を示し、特に HF 群で有意に減少した (それぞれ $p=0.004$ 、 $p=0.029$ 、 $p=0.004$)。

CA 群、HF 群ともに、有酸素運動は体重、摂食量および内臓脂肪量を減少させ、生体に有益な効果を及ぼすことが示された。

Table 1-2 General characteristics of animals.

(Namika Miya, *et al. J. Clin. Biochem. Nutr.* **2020**, 66(2), 124-131., Table 2 より引用し一部改変した。)

Experimental diet Exercise training	Groups			
	CA		HF	
	(-)	(ex)	(-)	(ex)
Body weight (g)	397.3 ± 41.2	378.0 ± 9.6	409.4 ± 19.3	362.9 ± 9.0 **
Food intake (g/day)	22.2 ± 3.1	20.7 ± 0.4	21.7 ± 0.7	17.4 ± 0.7 *
Genital adipose tissue (g/100 g BW)	1.5 ± 0.2	1.4 ± 0.1	1.9 ± 0.2	1.5 ± 0.1 **

* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. each diet (-) group. [CA (-), n = 3; CA (ex), HF (-), and HF (ex), n = 4.]

1-3-2 血中乳酸値の測定による運動負荷の評価

運動の持久力に関連するパラメータとして、血中乳酸値による運動負荷の評価を行った。血中乳酸値は非運動群と比較して運動群で、CA 群では 70%に、HF 群では 50%に低下し (Fig. 1-2)、HF 群では有意な低下を示した ($p = 0.001$)。

この結果から、CA 群、HF 群ともに有酸素運動により生体内の乳酸利用率が上昇したことが示唆され、有酸素運動による運動負荷がかかっていることが示された。

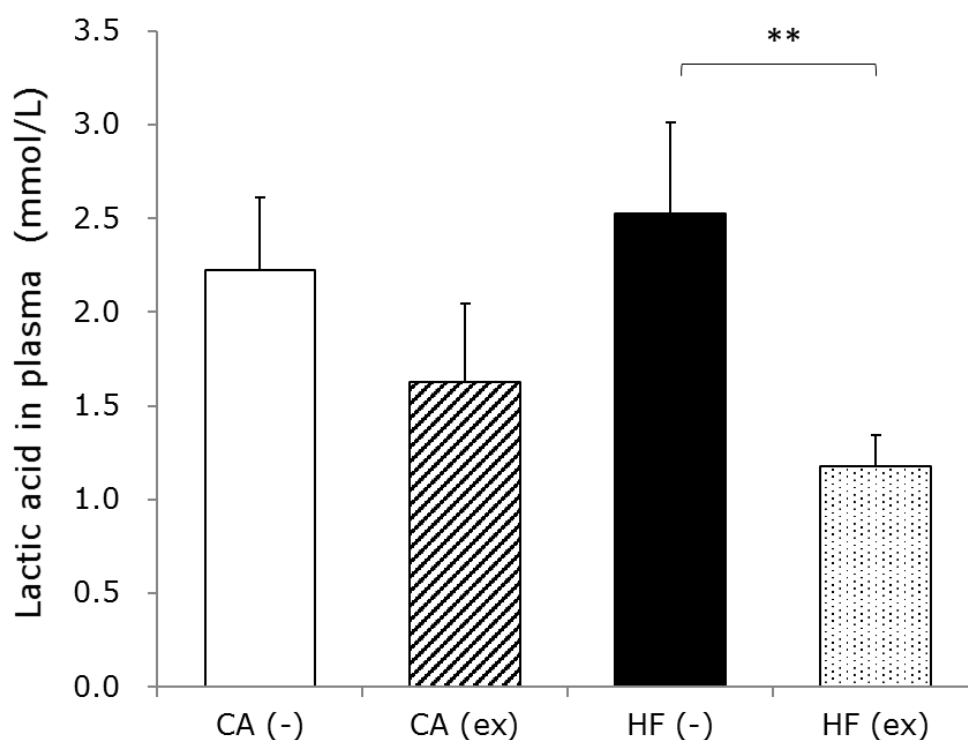


Fig. 1-2. Measurement of lactic acid level in plasma.

** $p < 0.01$ vs. each diet (-) group. [CA (-), $n = 3$; CA (ex), HF (-), and HF (ex), $n = 4$].

(Namika Miya, et al. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2020**, 66(2), 124-131., Fig. 3 より引用し一部改変した。)

1-3-3 HF 食投与における耐糖能異常モデルの評価および有酸素運動による糖代謝関連パラメータへの影響

HF 食投与による食餌性耐糖能異常モデルの評価を行うために、糖負荷試験および血漿中インスリン値の測定を行った。

糖負荷試験の結果、非運動群の場合、グルコース投与後の血糖値は CA 群より HF 群の方が投与後 30 分に有意に高くなり、60 分、90 分と高い値を推移した (Fig. 1-3 (A))。この時の AUC を算出すると CA 群と比較し HF 群で有意に高値を示した ($p=0.039$) (Fig. 1-3 (B))。この結果より、CA 群と比べ HF 群では食餌性の糖代謝異常状態であることが確認され、耐糖能異常モデルに相当すると評価した。

有酸素運動が糖代謝に関連するパラメータに及ぼす影響を調べるために、糖負荷試験の実施に加えて血漿中インスリン値の測定を行った。糖負荷試験では、耐糖能異常モデルである HF 群で、有酸素運動によってグルコース投与後 15 分以降の血糖値の下がり方が速くなっており、それに伴い AUC は HF 群で有酸素運動により低下傾向を示した (Fig. 1-3 (A, B))。血漿中インスリン値は、CA 群、HF 群ともに有酸素運動により約 30% に低下傾向を示した (Fig. 1-4)。その一方、CA 群と比較して HF 群で血漿中インスリン値は高値を示さず、代償性高インスリン血症が認められなかった。この理由としては、本研究の HF 食を与えた耐糖能異常モデルは代償性高インスリン血症を示すほどのモデルではなく、HF 食の配合や投与期間を考慮する必要があったことが考えられる。

また、インスリン抵抗性の指標である HOMA-IR を空腹時インスリン値と空腹時血糖値から算出したところ、CA 群では非運動群で 0.13 ± 0.06 、運動群で 0.04 ± 0.01 となり運動により HOMA-IR は減少したが有意な差ではなかった ($p=0.12$)。一方、HF 群では非運動群で 0.09 ± 0.05 、運動群で 0.02 ± 0.01 と運動により低値への変化を示したが、同様に有意な差ではなかった ($p=0.06$)。

これらの結果より、有酸素運動は耐糖能異常を改善させることが示された。

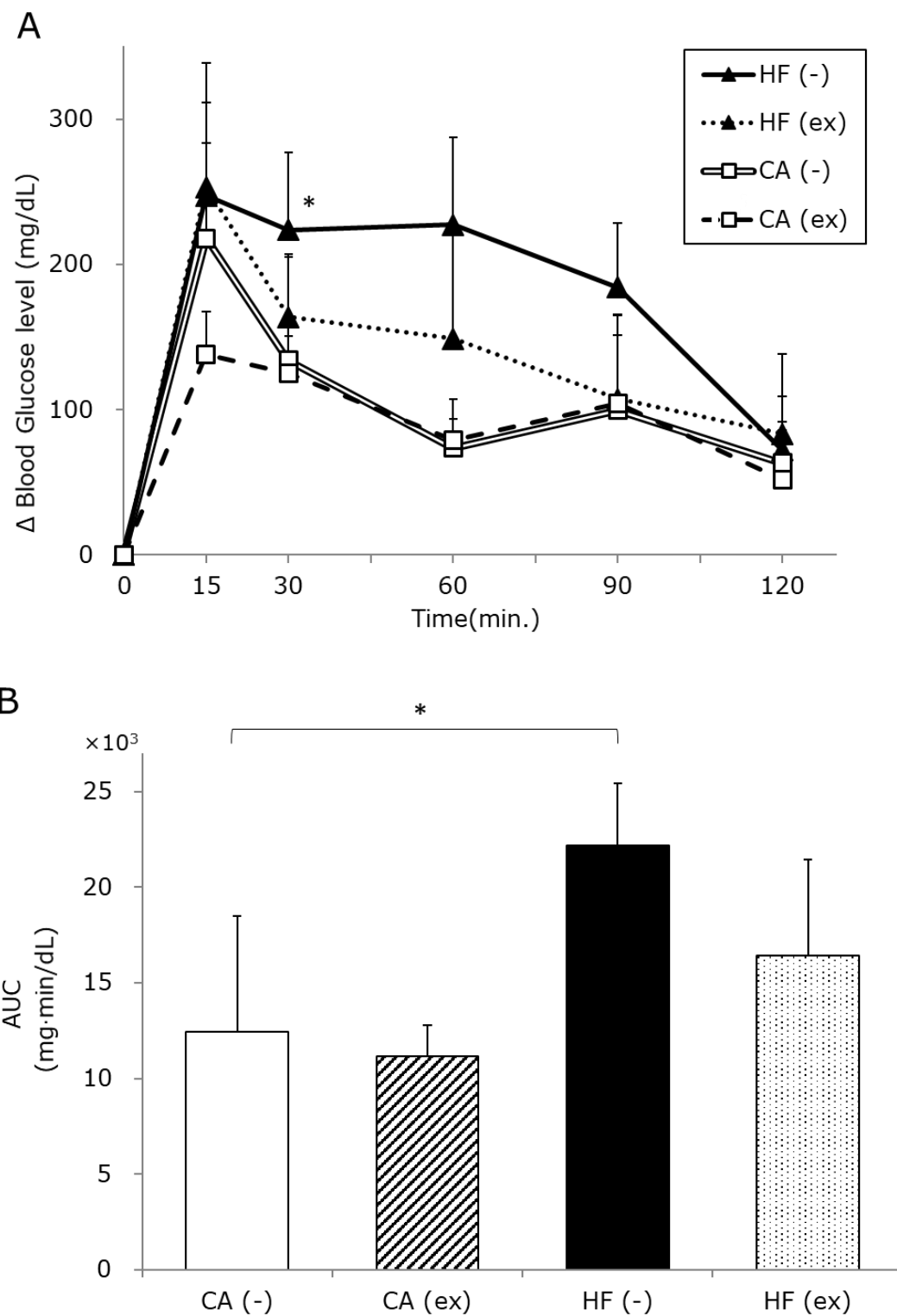


Fig. 1-3 Changes in blood glucose during glucose tolerance test (A) and AUC of blood glucose (B).

* $p < 0.05$ vs. CA (-) group. [CA (-), $n = 3$; CA (ex), HF (-), and HF (ex), $n = 4$].

(Namika Miya, et al. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2020**, 66(2), 124-131., Fig. 1 より引用し一部改変した。)

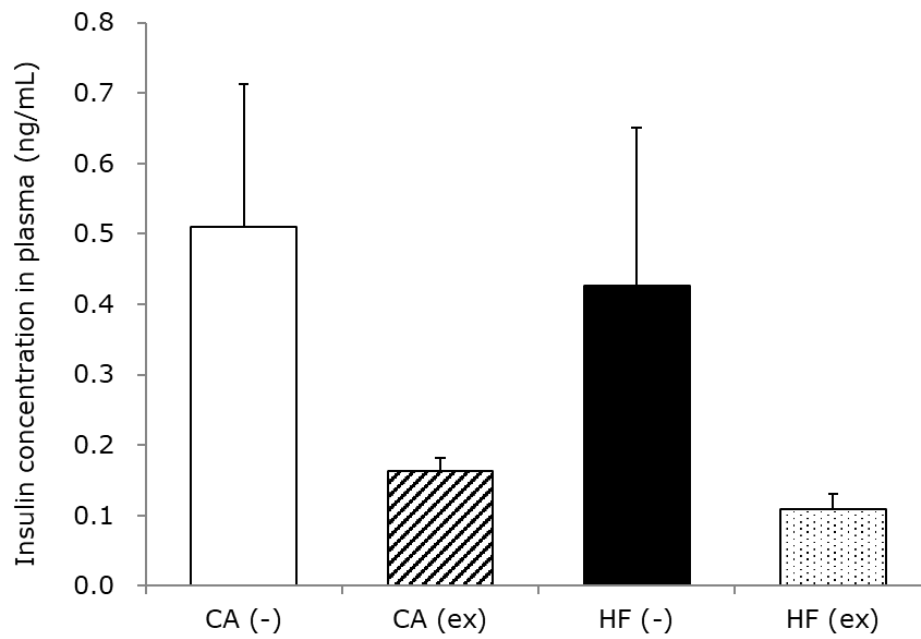


Fig. 1-4 Changes in plasma insulin concentration.

[CA (-), n = 3; CA (ex), HF (-), and HF (ex), n = 4].

(Namika Miya, *et al. J. Clin. Biochem. Nutr.* **2020**, 66(2), 124-131., Fig.2 より引用し一部改変した。)

1-3-4 有酸素運動による血漿中の血液生化学パラメータへの影響

運動による肝機能、脂質代謝、糖代謝等の血液生化学パラメータへの影響について、血漿サンプルを用いて測定した (Table 1-3)。

肝機能の指標となる AST、ALT は、CA 群、HF 群ともに非運動群と比較して運動群で上昇傾向を示した。TG は CA 群、HF 群ともに運動群で低下し、特に CA 群で有意に低下した (CA 群 : $p=0.043$ 、HF 群 : $p=0.054$)。GLU は HF 群で有酸素運動により有意な低下を示した ($p=0.006$)。これは、有酸素運動による HF 群の糖負荷試験結果と一致しており、HF 群の耐糖能異常の改善とつながる結果であった。

Table 1-3 Blood biochemical analysis.

(Namika Miya, *et al. J. Clin. Biochem. Nutr.* **2020**, 66(2), 124-131., Table 3 より引用し一部改変した。)

Experimental diet Exercise training	Groups			
	CA		HF	
	(-)	(ex)	(-)	(ex)
HDL-cho (mg/dL)	41 ± 9	37 ± 4	51 ± 10	49 ± 7
T-cho (mg/dL)	59 ± 8	58 ± 3	70 ± 8	67 ± 11
TG (mg/dL)	104 ± 24	64 ± 15 *	134 ± 41	73 ± 1
BUN (mg/dL)	14 ± 5	14 ± 1	16 ± 2	18 ± 2
AST (U/L)	62 ± 0	87 ± 27	60 ± 1	78 ± 18
ALT (U/L)	29 ± 6	34 ± 6	24 ± 3	39 ± 5
TP (g/dL)	6.2 ± 0.1	5.9 ± 0.2	5.9 ± 0.2	5.7 ± 0.2
CPK (U/L)	88 ± 25	80 ± 18	88 ± 10	106 ± 41
CRE (mg/dL)	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1
GLU (mg/dL)	175 ± 17	174 ± 6	178 ± 17	125 ± 20 **

* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. each diet (-) group. [CA (-), $n = 3$; CA (ex), HF (-), and HF (ex), $n = 4$.]

1-3-5 有酸素運動による筋肉グリコーゲン量への影響

有酸素運動が筋肉グリコーゲン貯蔵量へ及ぼす影響を調べるために、持久力に関わる骨格筋の1つであるヒラメ筋を用いて測定を行った (Fig. 1-5)。筋肉グリコーゲン量は、持続的な運動を継続させる際のエネルギー源となるため、持久力の指標とされている。

CA 群において、非運動群と比べて運動群で筋肉グリコーゲンの有意な増加がみられた ($p=0.045$)。しかし、HF 群では、有酸素運動による筋肉グリコーゲンの増加はみられなかった。

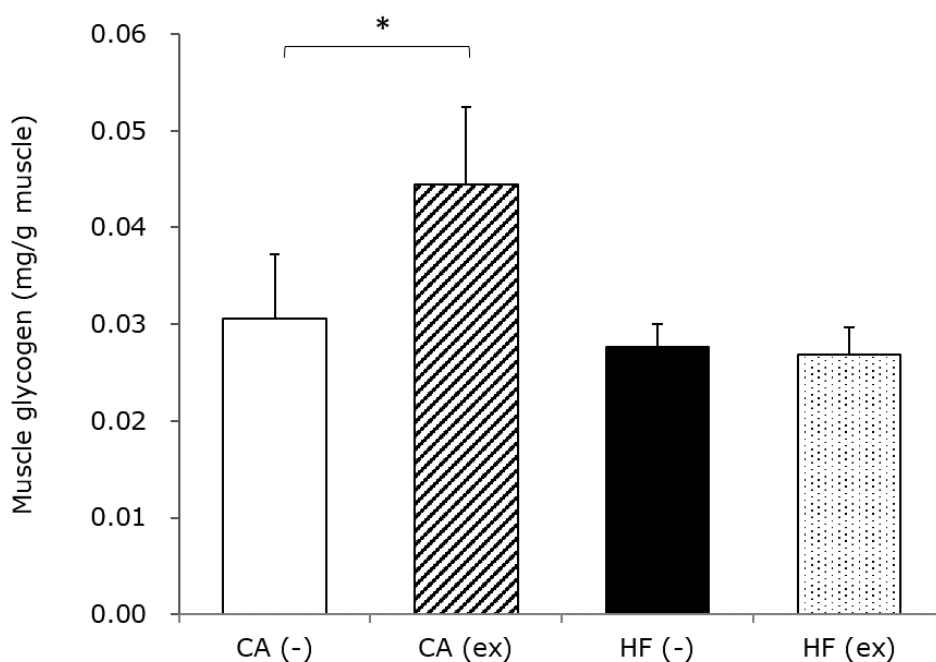


Fig. 1-5. Measurement of muscle glycogen levels.

* $p < 0.05$ vs. each diet (-) group. [CA (-), $n = 3$; CA (ex), HF (-), and HF (ex), $n = 4$].

(Namika Miya, et al. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2020**, 66(2), 124-131., Fig.4 より引用し一部改変した。)

1-3-6 有酸素運動による組織重量への影響

解剖時に摘出した肝臓および腎臓の重量を測定した (Table 1-4)。肝臓重量は CA 群、HF 群ともに有酸素運動により減少し、特に HF 群で有意な減少を示した ($p=0.04$)。腎臓重量は CA 群、HF 群ともに有酸素運動による変動は認められなかった。

Table 1-4 Effect of exercise on tissue weight.

(Namika Miya, *et al. J. Clin. Biochem. Nutr.* **2020**, 66(2), 124-131., Table 2 より引用し一部改変した。)

Experimental diet Exercise training	Groups			
	CA		HF	
	(-)	(ex)	(-)	(ex)
Liver (g/100 g BW)	2.9 ± 0.3	2.7 ± 0.1	3.0 ± 0.2	2.7 ± 0.1 *
Kidney (g/100 g BW)	0.3 ± 0.02	0.3 ± 0.01	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.03

* $p < 0.05$ vs. each diet (-) group. [CA (-), $n = 3$; CA (ex), HF (-), and HF (ex), $n = 4$.]

1-3-7 血漿中および組織中の生体金属の定量

有酸素運動が生体金属量へ及ぼす影響について調べるため ICP-MS を用いて、血漿中および肝臓、腎臓、膵臓の組織中における Ca、Mg、Cu、Fe、Mn、Zn、Cr および Se 濃度を定量した。

CA 群、HF 群ともに有酸素運動によって血漿中の Fe、Zn および Se は減少を示した (Table 1-5 (A))。また、肝臓中の Mg、Mn、Fe、Cu および Zn は CA 群、HF 群の両群ともに有酸素運動によって増加を示し (Table 1-5 (B))、腎臓中の Ca および Cr も両群で有酸素運動によって増加した (Table 1-5 (C))。肝臓においては、特に CA 群で有酸素運動によって有意な増加を示す生体金属が多く観察された。膵臓中では、特に HF 群で有酸素運動によって多くの生体金属が若干減少した (Table 1-5 (D))。

Table 1-5 Trace element concentrations in plasma (A), liver (B), kidney (C), and pancreas (D).

(Namika Miya, *et al. J. Clin. Biochem. Nutr.* 2020, 66(2), 124-131., Table 4 より引用し一部改変した。)

A	Plasma	CA ($\mu\text{g/mL}$)		HF ($\mu\text{g/mL}$)	
		(-)	(ex)	(-)	(ex)
	Mg	51.0 \pm 3.4	47.6 \pm 3.1	39.9 \pm 6.3	41.8 \pm 7.8
	Ca	210.1 \pm 7.5	196.3 \pm 18.1	195.4 \pm 18.9	194.2 \pm 13.1
	Cr	0.08 \pm 0.003	0.09 \pm 0.02	0.06 \pm 0.004	0.06 \pm 0.004
	Mn	0.02 \pm 0.02	0.05 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01
	Fe	5.4 \pm 0.6	4.6 \pm 0.1 *	4.6 \pm 0.7	3.8 \pm 0.4
	Cu	2.1 \pm 0.1	2.0 \pm 0.04	2.2 \pm 0.1	2.2 \pm 0.1
	Zn	0.9 \pm 0.4	0.7 \pm 0.07	1.1 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1
	Se	0.41 \pm 0.27	0.14 \pm 0.13	0.25 \pm 0.29	0.22 \pm 0.28

B	Liver	CA ($\mu\text{g/g}$ wet weight)		HF ($\mu\text{g/g}$ wet weight)	
		(-)	(ex)	(-)	(ex)
	Mg	204.1 \pm 8.7	234.5 \pm 12.1 *	231.4 \pm 15.5	234.1 \pm 3.4
	Ca	51.7 \pm 3.5	59.2 \pm 5.3	60.7 \pm 5.6	59.4 \pm 7.1
	Cr	0.17 \pm 0.004	0.17 \pm 0.01	0.15 \pm 0.01	0.18 \pm 0.03
	Mn	2.02 \pm 0.19	2.40 \pm 0.17 *	2.83 \pm 0.32	3.44 \pm 0.49
	Fe	183.5 \pm 33.8	229.8 \pm 22.5	189.1 \pm 28.2	196.3 \pm 26.5
	Cu	4.2 \pm 0.6	5.5 \pm 0.5 *	4.9 \pm 0.1	5.8 \pm 1.0
	Zn	30.0 \pm 0.9	35.3 \pm 1.2 **	31.4 \pm 0.9	36.4 \pm 4.8
	Se	0.31 \pm 0.14	0.22 \pm 0.19	0.30 \pm 0.10	0.34 \pm 0.14

C	Kidney	CA ($\mu\text{g/g}$ wet weight)		HF ($\mu\text{g/g}$ wet weight)	
		(-)	(ex)	(-)	(ex)
	Mg	197.3 \pm 31.5	187.5 \pm 7.2	189.9 \pm 19.3	197.5 \pm 6.9
	Ca	90.5 \pm 10.5	108.8 \pm 24.3	282.6 \pm 191.3	342.7 \pm 199.5
	Cr	0.13 \pm 0.04	0.17 \pm 0.01	0.12 \pm 0.03	0.13 \pm 0.02
	Mn	1.01 \pm 0.25	0.92 \pm 0.01	1.06 \pm 0.26	1.05 \pm 0.08
	Fe	82.9 \pm 90.6	70.3 \pm 6.2	68.8 \pm 12.7	67.5 \pm 4.7
	Cu	7.6 \pm 5.5	7.5 \pm 1.3	13.2 \pm 6.5	7.6 \pm 1.9
	Zn	23.2 \pm 15.7	33.6 \pm 4.3	33.9 \pm 8.2	34.4 \pm 5.6
	Se	ud	0.18 \pm 0.17	0.05 \pm 0.06	ud

D	Pancreas	CA ($\mu\text{g/g}$ wet weight)		HF ($\mu\text{g/g}$ wet weight)	
		(-)	(ex)	(-)	(ex)
	Mg	342.7 \pm 16.1	326.0 \pm 36.4	330.7 \pm 41.6	311.4 \pm 17.1
	Ca	102.4 \pm 25.3	97.7 \pm 21.9	107.2 \pm 21.2	104.6 \pm 12.7
	Cr	0.22 \pm 0.03	0.24 \pm 0.06	0.24 \pm 0.03	0.18 \pm 0.03
	Mn	2.18 \pm 0.04	2.01 \pm 0.20	2.52 \pm 0.22	2.47 \pm 0.20
	Fe	22.8 \pm 1.2	21.9 \pm 0.55	25.3 \pm 5.4	19.8 \pm 1.2
	Cu	1.5 \pm 0.09	1.6 \pm 0.1	1.5 \pm 0.2	1.3 \pm 0.1
	Zn	26.7 \pm 4.1	27.4 \pm 3.6	34.7 \pm 4.0	31.1 \pm 4.2
	Se	0.22 \pm 0.08	0.23 \pm 0.07	0.20 \pm 0.15	0.29 \pm 0.12

* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. each diet (-) group. [CA (-), $n = 3$; CA (ex), HF (-), and HF (ex), $n = 4$.]

ud: under determine.

1-3-8 肝臓および腎臓の抗酸化力の評価

有酸素運動による肝臓および腎臓の抗酸化力への影響を評価するために、人工的な $O_2^{\cdot-}$ 発生量の測定を行い、組織ホモジネートの人工的 $O_2^{\cdot-}$ に対する消去能を調べた。

CA 群、HF 群ともに有酸素運動により肝臓および腎臓のホモジネート液中の人工的 $O_2^{\cdot-}$ 発生量は上昇傾向を認め (Fig. 1-6 (A, B))、腎ホモジネートでは CA (ex) 群で有意な差を認めた。この結果より、有酸素運動によって肝臓および腎臓中の抗酸化力は低下していることが示唆された。

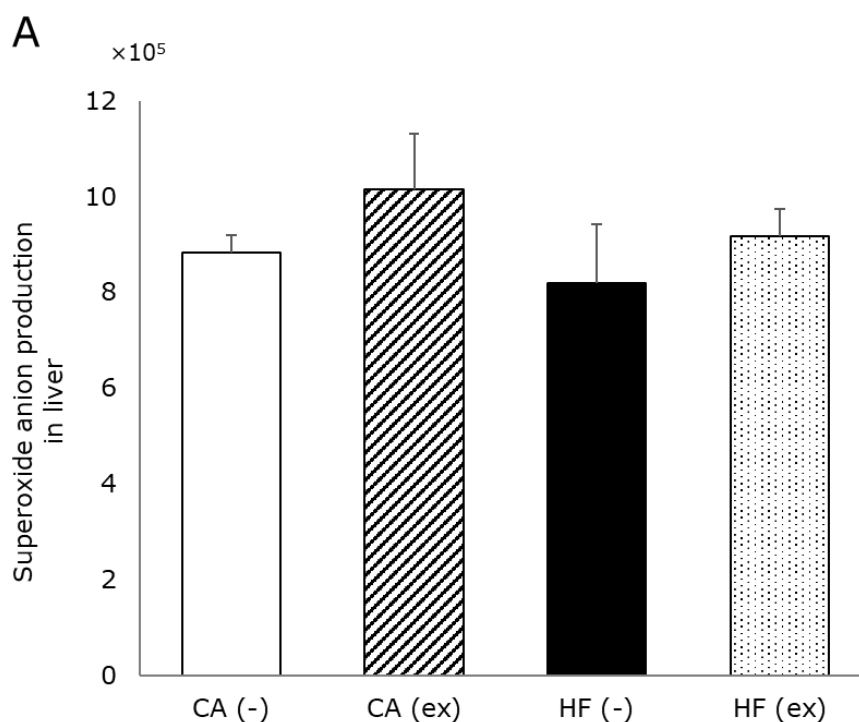


Fig. 1-6 Continued

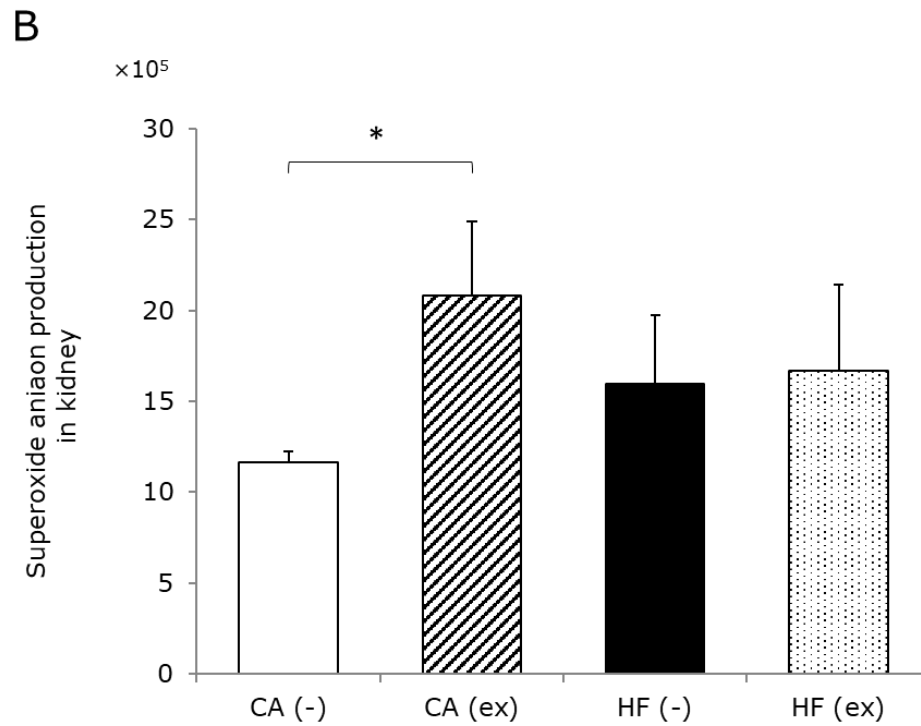


Fig. 1-6 Measurement of superoxide anion scavenging activity in liver (A) and kidney (B).

* $p < 0.05$ vs. each diet (-) group. [CA (-), $n = 3$; CA (ex), HF (-), and HF (ex), $n = 4$].

(Namika Miya, *et al. J. Clin. Biochem. Nutr.* **2020**, 66(2), 124-131., Fig.5 より引用し一部改変した。)

1-3-9 有酸素運動による肝臓中セレノプロテイン P の mRNA 発現量への影響

有酸素運動が肝臓中セレノプロテイン P の mRNA 発現量に与える影響を調べるため、リアルタイム PCR 法を用いて測定を行った。

CA 群、HF 群ともに有酸素運動によってセレノプロテイン P の mRNA は有意な増加を示した (Fig. 1-7)。HF 群は有酸素運動によって 1.4 倍に増加したのに対し ($p=0.002$)、CA 群では 8 倍に増加した ($p=0.045$)。よって、有酸素運動は肝臓中のセレノプロテイン P 発現量を増加させることが分かった。

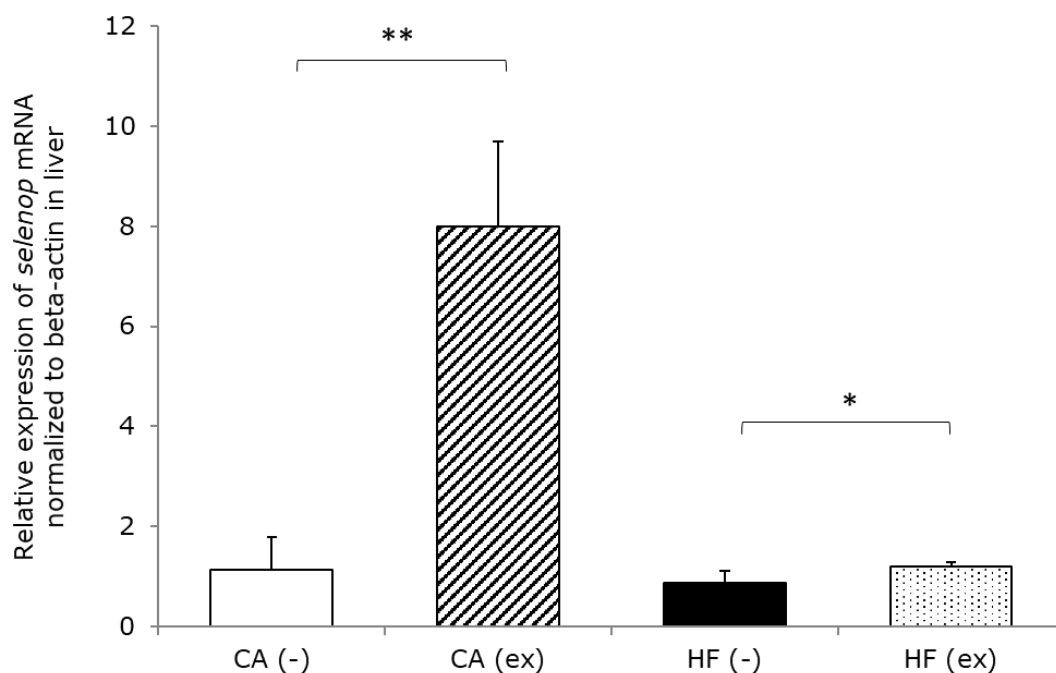


Fig. 1-7 Relative hepatic *selenoprotein P* expression levels.

* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. each diet (-) group. [CA (-), $n = 3$; CA (ex), HF (-), and HF (ex), $n = 4$].

(Namika Miya, et al. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2020**, 66(2), 124-131., Fig.6 より引用し一部改変した。)

1-3-10 有酸素運動による肝臓中 GPx1 への影響

有酸素運動が肝臓中 GPx1 に与える影響を調べるため、ウェスタンブロッティング法を用いて GPx1 のタンパク質発現量の測定を行った (Fig. 1-8)。

CA 群、HF 群ともに有酸素運動による肝臓中 GPx1 の有意な変動は観察されなかった。

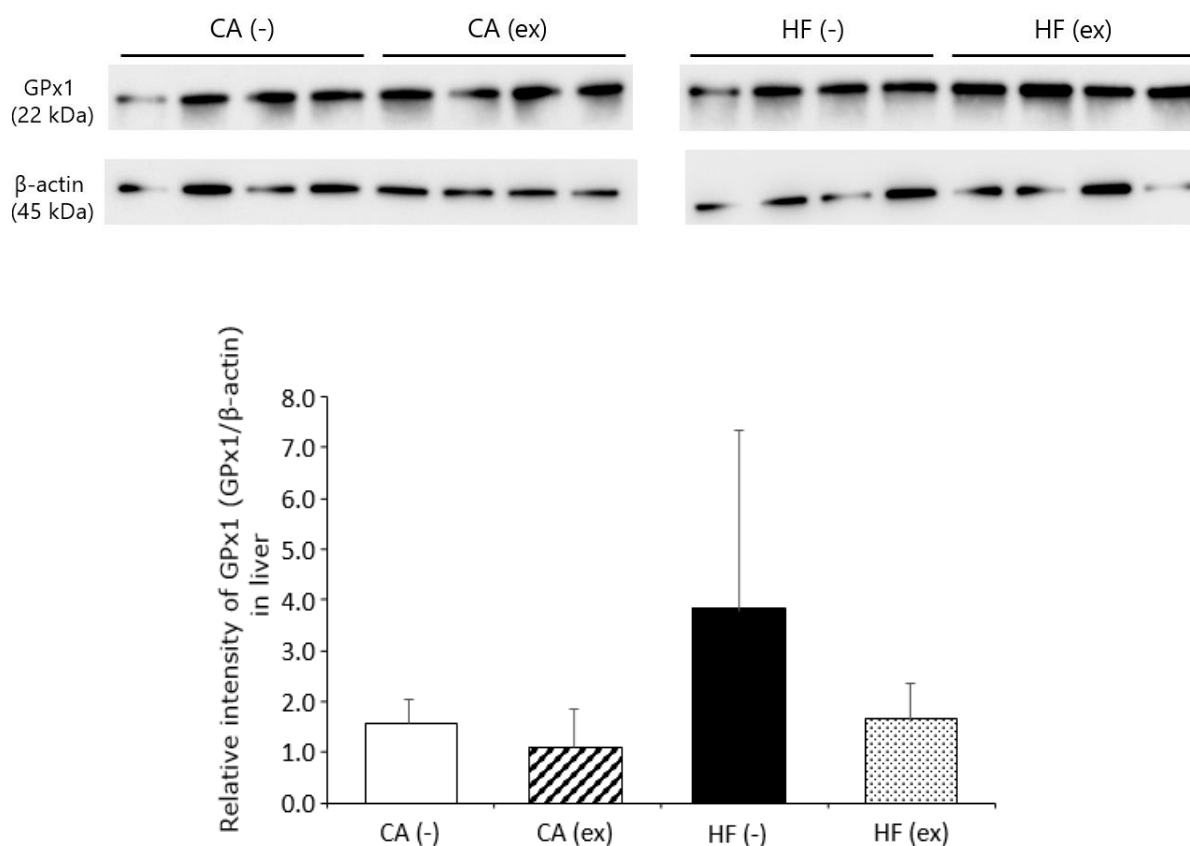


Fig. 1-8 Relative hepatic GPx1 intensities by western-blotting method.

[CA (-), n = 3; CA (ex), HF (-), and HF (ex), n = 4].

(Namika Miya, *et al. J. Clin. Biochem. Nutr.* **2020**, 66(2), 124-131., Supplemental Fig.1 より引用)

1-4 考察

DM の予防・改善のために実施される運動療法が、耐糖能異常状態の生体内金属元素やセレノプロテイン P の発現、各種生化学パラメータに及ぼす影響を比較検討するため、健常動物と 2 型 DM を想定した耐糖能異常モデル動物で週 6 日の走行運動を 10 週間負荷させた。

DM の運動療法の目標は、少なくとも週に 3~5 日間、最大酸素摂取量 40~60% の中等度の強度の有酸素運動を 20~60 分間行うことが推奨されている [40]。また、DM の一次予防のためには乳酸閾値レベルの最大酸素摂取量 50~70% の持久性運動が有効であるとも言われている [44]。そこで、運動群への運動強度として、DM の運動療法の目標強度よりもやや強い最大酸素摂取量約 70~80% に相当する条件 [45] (勾配 0°、運動速度 30 m/分のトレッドミルでの走行運動を、1 日 1 時間、週 6 日、10 週間) を負荷させることとした (Fig. 1-9)。

一方で、疾病モデルとして、2 型 DM の著名な病態の 1 つである耐糖能異常モデル作製のため、重量比 58% の高フルクトース食を与えた。フルクトースはグルコースとは異なった代謝的特性を有し、インスリン作用を介さずに肝臓に素早く取り込まれて代謝されることから、耐糖能異常や脂質代謝異常を惹起させることが知られており [46]、耐糖能異常や肥満・メタボリックシンドローム、NASH モデルなど糖質代謝や脂質代謝研究における動物モデルとして使用されている (Fig. 1-10)。

強度の割合 %VO ₂ max	強度の感じ方	1分間当たりの脈拍数				その他の感覚
		60歳代	50歳代	40歳代	30歳代	
100	最高にきつい	155	165	175	185	からだ全体がくるしい
90	非常にきつい	145	155	165	170	無理、100%と差がないと感じる、若干言葉が出る、息がつまる
80	きつい	135	145	150	160	続かない、やめたい、喉が渇く、頑張るのみ
70	ややきつい	125	135	140	145	どこまで続くか不安、緊張、汗びっしょり
60	やや楽である	120	125	130	135	いつまでも続く、充実感、汗が出る
50	楽である	110	110	115	120	汗が出るか出ないか、フォームが気になる
40	非常に楽である	100	100	105	110	楽しく気持ちがいいが物足りない
30	最高に楽である	90	90	90	90	動いたほうが楽、まるでもの足りない
20		80	80	75	75	

Fig. 1-9 Classification of exercise intensity.

Red frame: recommended exercise intensity for DM patient,

Blue frame: exercise intensity of this study

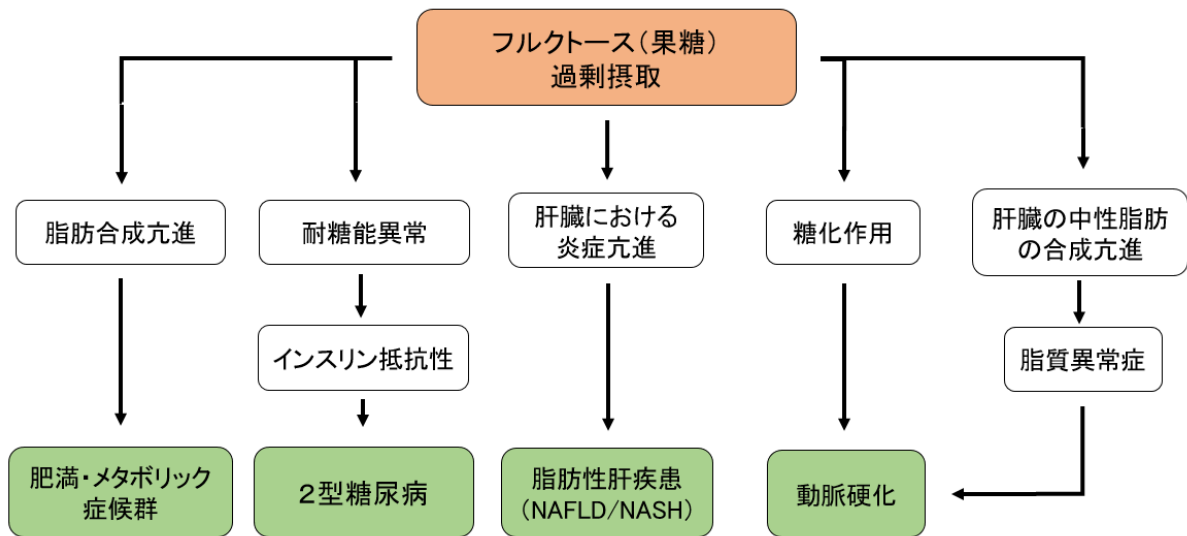


Fig. 1-10 Animal models induced by high fructose diet

研究における動物の運動負荷実験では、小動物用トレッドミルが汎用されている。小動物用トレッドミルは強制走行装置であり、電動式のベルトコンベアが設置された走行レーンに実験動物を入れて走行運動を負荷させる。操作が簡便であり、速度と傾斜を調整できるため、運動条件を細かく設定することができる。疲労度の評価や呼吸代謝研究、栄養学研究や持続的有酸素運動のパフォーマンス評価など様々な研究で使用されている。

本研究では、DM の運動療法として有酸素運動の評価を行うため、小動物用トレッドミルを用いた走行運動を実施した。走行運動に徐々に慣れてくる個体に対しては、走路の最後部に動物の状態に影響を及ぼさない適切な電気刺激を与えることができる金属棒を設置し、走行を促しながら 10 週間の運動を実施した。

飼育期間中、ラットの体重および摂食量は両食餌群ともに、有酸素運動により低値を示し、特に HF 群では有意な差があった (Table 1-2)。運動は摂食抑制に関わる PYY や GLP-1 といった消化ホルモンを増加させることによりエネルギー摂取を抑制することが報告されており [47]、さらに運動は酸化ストレス応答を引き起こし [48]、ストレス性の摂食抑制を生じさせる可能性が示唆されている。今回、有酸素運動とこれらのホルモンの関与および酸化ストレス応答が摂食量の低下を引き起こしたことに加え、有酸素運動の継続による生殖器周囲脂肪量の減少が体重の減少をもたらしたと考えられる (Table 1-2)。

今回設定した、小動物用トレッドミルでの運動条件が適切なもので、有酸素運動に対する生体の応答が生じているのか否かを評価するため、血中乳酸値の測定を行った (Fig. 1-2)。乳酸は激しい運動により筋肉で蓄えられたグリコーゲンが解糖系により代謝された結果、産生

される。乳酸の生体への取り込み量は乳酸輸送担体である MCT1 のタンパク質量と深く関わっており、MCT1 は酸化能力の高い心筋やヒラメ筋などに非常に多く発現し、持久的トレーニングによって増加することが報告されている [49]。乳酸の生体への取り込み量が増えると、運動によって産生された乳酸を効率よくエネルギーに変換することが可能になる。また、DM 患者では糖代謝が低下し乳酸の代謝も低下するため MCT1 の発現量は減少するが、運動トレーニングを行えば糖利用能力が高まり、同時に乳酸利用能力も高まるため MCT1 の発現量が増加するという報告もある [50]。これらの報告から、今回認められた有酸素運動による血中乳酸値の低下、特に耐糖能異常の HF 群での有意な低下は、運動によって生体内の乳酸利用効率が向上したためであると考えられ、実験で設定した運動条件は適切な有酸素運動の負荷がかかっている状態であると結論付けた。

HF 食投与による高フルクトース食負荷耐糖能異常モデルの評価および有酸素運動による糖代謝への影響を調べるために、糖負荷試験および血漿中インスリン値の測定を行った (Fig. 1-3, 1-4)。糖負荷試験において、CA 群と比較し HF 群は血糖値がピークを示した投与後 15 分から 120 分まで常に高い状態を推移し、AUC も CA 群と比較し有意に高かったことから、HF 群は食餌性の糖代謝異常状態であることが確認され、耐糖能異常モデルに相当すると評価できた。また、運動は筋肉量を増加させ、骨格筋細胞内のミトコンドリア量や GLUT4 が増えることで糖の取り込みが増強するといわれている [51]。糖負荷試験の AUC および血漿中インスリン値の結果は、有酸素運動によって耐糖能異常モデルの HF 群で低値傾向にあり、有酸素運動による糖代謝の改善効果を示した。また、内臓脂肪量の減少は TNF- α やレジスチンの分泌を減少させ、インスリン感受性を向上させるアディポネクチン量を増加させることで、耐糖能異常を改善すると報告されている [52, 53]。特に、HF 食を与えた耐糖能異常モデルで運動によって観察された生殖器周囲脂肪量の有意な減少が、糖負荷試験における HF 群のより顕著な耐糖能異常の改善につながったと推測される。

有酸素運動による血漿中の血液生化学パラメータへの影響は、脂質代謝に関わる T-cho および TG では減少傾向を示し、特に CA 群の TG と HF 群の GLU で有意な減少が認められたことから、有酸素運動による脂質代謝、および糖代謝の改善がみられた (Table 1-3)。これは有酸素運動による AMPK の活性化が肝臓の糖新生抑制作用や脂肪酸酸化促進作用を刺激すること、また骨格筋におけるミトコンドリア機能の活性化や脂肪酸の酸化作用を引き起こすことから [54]、糖代謝および脂質代謝が亢進した結果であると推測される。しかしながら、今回は AMPK の活性亢進やミトコンドリア量の増加に関与する PGC-1 α の発現上昇を測定できていないため、より詳細な解析や考察までには至っていない。

一方で、有酸素運動によって BUN、ALT は増加傾向を示した (Table 1-3)。BUN は腎機能を評価する指標であり、ALT は肝臓の細胞や心臓の筋肉細胞、骨格筋の細胞に多く含まれている酵素であるが、いずれも激しい運動によって臓器中から血中へ漏出して上昇するため、今回の結果は有酸素運動による影響が強いと考えられる。

持久的な運動を継続するためには、骨格筋は常に筋肉中のグリコーゲンを枯渇させずに利用してエネルギー源である ATP を再合成しなければならない。筋グリコーゲンの枯渇は筋疲

労を引き起こす原因の 1 つであり、運動前の筋グリコーゲンの含量を高めておくことは持久力の向上につながるとされている [55]。今回、筋グリコーゲン量の測定結果から、CA 群では有酸素運動により筋グリコーゲン貯蔵量が有意に増加し、トレーニングによる持久力の向上が示唆された (Fig. 1-5)。一方で耐糖能異常である HF 群では有酸素運動による筋グリコーゲン貯蔵量への変化は認めることができなかった。筋肉は血中のグルコースを取りこんで血糖値をコントロールするとともに、グリコーゲンとして貯蔵する重要な役割を担うが、耐糖能異常状態ではインスリンが分泌されても血液中のグルコースを取りこんで筋肉で糖の消費を行う本来の役割を十分に果たすことができないと考えられる。また、2 型 DM 患者は健常者よりも細胞内の Ca イオンの調節障害により骨格筋の筋力低下を招きやすいといわれていることから [56]、耐糖能異常状態では CA 群と比べて骨格筋の糖代謝が異なっていることが示唆される。

運動トレーニングを行うことで筋肉におけるミトコンドリア量の増加や、GLUT4 の発現量と細胞膜への移行量を増加させ、筋グリコーゲン貯蔵量を増やすことができるという報告がある [57, 58]。本研究で実施した運動条件では、耐糖能異常状態においては、有酸素運動で生じた骨格筋の GLUT4 タンパク質発現や機能低下を改善するのに最適な運動条件ではなかった可能性も考えられるが、骨格筋における PGC-1 α や GLUT4 の発現量を測定できていないため、これ以上の詳細な考察までには至っていない。ただし、CA 群と HF 群で同じ運動強度の負荷をかけても得られる結果が異なった事実から、疾病の予防や治療に対する運動療法 1 つをとっても、食事の影響も大きく関与するため、画一的な条件設定のみでは個々に効果的な対策にならないことを示した結果だと考えられる。

有酸素運動による血漿中および肝臓、腎臓、膵臓の組織中の生体金属への影響については、CA 群の肝臓中 Mn、Cu、Zn は有意に増加しており、Fe は増加傾向が認められた (Table 1-5 (B))。HF 群では有意に変動する元素は認められなかったが、CA 群と同様に抗酸化酵素に含まれる微量元素元素の Mn、Cu、Zn、Fe の増加傾向は認められた。これらの結果より、有酸素運動による肝臓の酸化ストレスが増大し、抗酸化酵素が誘導された可能性が示唆された。Kaptanoğlu らがラットに 30 分間の水泳運動を行った実験では、Fe は肝臓で有意に増加し、膵臓では有意に減少したことから、生体内の Fe は、運動によって様々な臓器で分布が変動する、と報告されている [59]。今回の結果からは、Fe の分布は肝臓では増加傾向を示したが、血漿中、腎臓中および膵臓中では運動により減少傾向を示し、Kaptanoğlu らの実験と一致する結果となった。Fe はカタラーゼの補因子であるため、有酸素運動で発生した ROS の消去のためにカタラーゼが誘導されたことや、肝臓内の炎症や肝障害に Fe が関与して増加したことが考えられる。

運動や DM と関連する微量元素元素は多く存在しており、例えば Mg は電解質のバランス制御や筋収縮、およびインスリンに関与する酵素活性と密接に関わっており、血中グルコースの調節を担う微量元素元素である。近年では、低 Mg 血症は 2 型 DM 患者で多く発症するという報告もある [60]。また、Cr は酸化ストレス下における炎症性サイトカインの TNF- α の分泌を抑制して過酸化脂質の産生を抑制させ、インスリンレセプターキナーゼ活性を高めて

インスリン感受性を増高させること [61] やインスリン抵抗性を改善させることなど、種々の DM の病態改善に有用であることが報告されている。運動時の筋肉の収縮と弛緩の調節や骨の成長には Ca や Mg が関わっている。しかし、今回、これらの金属元素の有意な変動は肝臓以外で観察することができなかった。

運動と酸化ストレスに関する研究は、さまざまな視点から検討がされている。急性運動は、活性酸素の生成を通じ生体のさまざまな分子と反応し、組織に酸化的な損傷を与える一方で、生体にはこの活性酸素ストレスに対抗する防御メカニズムが備わっている。特に SOD や GPx、CAT といった主要な抗酸化酵素は重要である [62]。一方、よく鍛錬された運動競技者や運動トレーニングをした動物では非鍛錬者（動物）と比べて、急性運動負荷後の脂質過酸化反応物の上昇が認められない、もしくは軽度のことが多いと報告されている [63]。また、Radák らは水泳トレーニングでは骨格筋のカルボニル化タンパク質レベルは増加しなかったと報告しており、さらに水泳トレーニングでラット脳のカルボニル化タンパク質は減少し、認識能力が高められるという知見を示している [64]。これらは、運動トレーニングが運動誘発性酸化ストレスに対する生体の抵抗性を改善することを示唆していると考えられる。

今回、有酸素運動による肝臓および腎臓中の抗酸化力への評価を行った結果、人工的 $O_2^{\cdot-}$ 発生量に対する組織ホモジネートの消去能をみると、有酸素運動によって肝臓、腎臓の抗酸化能は低下を示した (Fig. 1-6 (A, B))。腎臓では、CA 群において有酸素運動により抗酸化力は有意に低下したが、耐糖能異常モデルの HF 群ではその低下の程度は小さかった (Fig. 1-6 (B))。 $O_2^{\cdot-}$ は ROS の一種であり、急性運動は ROS の産生を増大させ、組織に損傷や炎症を生じるなど生体に様々な酸化的障害を引き起こすと考えられている。今回の結果からは、有酸素運動は CA 群と HF 群の両方で肝臓の抗酸化能を低下させたが、その程度はわずかであった。また、CA 群の腎臓では抗酸化能を有意に低下させ、一方で耐糖能異常モデルの HF 群の腎臓では抗酸化能の低下の程度は肝臓と同様にわずかであった。

そこで、これらの原因を考察するために、DM に関連するタンパク質として注目されているヘパトカインの 1 つであるセレノプロテイン P (SeP) の運動による影響について調べた。SeP は主に肝臓由来の分泌タンパク質であり、ヘパトサイトカインと呼ばれている。このタンパク質は、抗酸化能を有する必須微量元素の Se を多く含むことから、生体内の酸化還元反応に関わっていることが知られている [65]。SeP は酸化ストレスから生体を保護する抗酸化作用を有するが、その強力な還元力による過剰な抗酸化作用は糖尿病の惹起や運動抵抗性発症の原因になり得るとも報告されている [29, 32, 66]。一方、運動による肝臓中の SeP の mRNA 発現に対する影響は不明であるため、本研究では、継続的な有酸素運動による肝臓における SeP の mRNA 発現量について調べた。その結果、CA 群、HF 群ともに全身的な有酸素運動は肝臓中の SeP の mRNA 発現量を有意に増加させることが初めて明らかとなった (Fig. 1-7)。特に CA 群で、SeP の mRNA 発現量の増加が顕著であった。これは有酸素運動によって生じた ROS によって誘導された全身的な酸化ストレスを打ち消すために、各末梢組織へ Se の運搬作用を担う SeP が増加したためであると考えられる。ヒトにおける数少ない報告として、プロスポーツ選手を対象とした実験において、運動後に Se 要求量が増加するという報告があ

る [67]。また、運動後は抗酸化性の Se タンパク質の 1 つである血中 GPx の活性が上昇することで体内の Se が消費され、血中 Se 濃度が低下するとされている。有意な差ではないものの、今回測定した血中 Se 濃度は有酸素運動によって低下傾向を示していた (Table 1-5 (A))。これらの文献報告と今回の実験結果から、継続的な有酸素運動は SeP による全身組織への Se 運搬を促進し、血中のみならず組織中の GPx 活性を上昇させていることが考えられた。一方で、HF 群では有酸素運動による SeP の mRNA 発現量の促進効果は有意に認められたものの、CA 群と比べて顕著ではなかった。加えて、CA 群、HF 群ともに運動によって血漿中インスリン値は低下していた (Fig. 1-4)。SeP の mRNA 発現量とインスリンの分泌量は反比例する [29] ことが報告されており、今回の HF 食投与下の実験では、有酸素運動による効果に加えてインスリン分泌の変化が SeP 発現に影響している可能性が考えられる。

有酸素運動による SeP の mRNA 発現量の増加から、GPx 活性の変動を調べるために肝臓中の GPx1 の測定を行ったが、有酸素運動による有意な差はなかった (Fig. 1-8)。一般的に運動は GPx1 を誘導することが知られているが、今回は肝臓のみで検討しており、運動による肝臓中 GPx1 の誘導は観察されなかった。今後、骨格筋や腎臓等の GPx1 発現を測定し、有酸素運動との関係性を評価することが必要である。

以上の結果より、有酸素運動は体重、内臓脂肪量、脂質代謝、耐糖能の改善など有益な効果を及ぼすことが確認されたが、一方で肝臓および腎臓の抗酸化力の低下や耐糖能異常状態では筋肉グリコーゲン貯蔵量への影響がないことなど、個体の生理状態によって効果に差があることが観察された。DM の予防・改善のために実施される有酸素運動は、健康な状態と疾病状態では生体に及ぼす効果は全てが同じというわけではないことが推測され、同じ負荷ではなく運動条件を変える必要があるということが明らかになった。加えて、DM 治療に有効な効果を得るためには、運動療法を開始する前に食習慣や栄養状態の改善を行うことで、より運動の効果は高くなり、有益な作用が大きくなるという知見が得られた。また、セレノプロテイン P の mRNA 発現量は、有酸素運動で上昇すること、および全身的な酸化ストレスのマーカーになる可能性が示唆された。

第2章 腎不全を併発した通常食ラットおよび耐糖能異常ラットにおける運動療法の効果

2-1 緒言

第1章では、DMの運動療法で実施される有酸素運動が、病態およびその治療にどのような影響を及ぼすのか、そして有益な効果とともに何が負の影響としてあるのかを検討した。その結果の1つとして、DM治療に有効な運動療法の効果を得るためには、個別の病態に合わせた条件の運動を設定する必要があるという知見が得られた。しかし、病態の重症度による運動療法の効果についてはまだ不明なところが多く、十分な報告は得られていない状況である。また、セレノプロテインP (SeP) に関しては、有酸素運動により発現が増加することが新たに明らかとなった。

さらに、運動による腎機能への影響は、古くから多くの研究があり、特に急性の腎不全は問題視されている。運動誘発性の急性腎不全は大きく分けて2つあり、1つは著しい横紋筋融解による血中へのミオグロビン漏出に伴うミオグロビン尿性によるもの、また、もう1つは横紋筋融解が関与しない、非ミオグロビン尿性によるものである。

前者はマラソン、登山、ワンダーフォーゲル、ラグビー、アメリカンフットボールなどのような長時間の激しいかつ接触プレーの多い運動が原因で発症し、後者はトラック競技などの短距離の全力疾走や重量挙げなどが原因で発症すると考えられている。運動会後の数日間に散見される背腰痛などは腎機能への影響であるにもかかわらず、従来から医療機関で診断されずに見過ごされてきた上、自然治癒している症例が相当多いことも特徴であり、運動と腎臓の間には見過ごせない関係が多くある [68]。

そこで、第1章の結果をふまえ、さらには、DMの合併症には重篤な腎機能不全もあることから、第2章では、生活習慣病、全身的な有酸素運動、腎機能障害をキーワードとし、より重い疾病状態を想定した腎機能不全を耐糖能異常に併発させた動物モデルにおける運動療法の効果を評価することを目的として実験を行った。

腎不全を併発した腎障害モデルはバンコマイシン (VCM) 投与によって作製した。VCMはグラム陽性菌に対して抗菌作用を示すグリコペプチド系抗生物質の1つであり、MRSAやクロストリジウム・ディフィシルに対して強い抗菌力をもつ数少ない抗菌薬である。一方、有害作用として腎毒性を有することが知られているため、腎機能の低下した患者に対する投与には注意が必要とされている。

本実験では、腎障害を伴った耐糖能異常モデルを作製し、継続的な有酸素運動が生体内金属元素やSeP発現ならびに各種の生体パラメータに及ぼす影響について、腎障害の有無による健常状態の動物と耐糖能異常モデル動物を用いて比較検討を行った。

2-2 実験材料および実験方法

2-2-1 試薬

実験食の作成

ミルクカゼイン、OYC 配合ミネラル混合および OYC 配合ビタミン混合はオリエンタル酵母工業株式会社（東京）より購入した。大豆油は植田製油株式会社（兵庫）より提供された。セルロースは旭化成株式会社（東京）、スクロースは三井製糖株式会社（東京）、コーンスターチは株式会社若葉商会（兵庫）、およびフルクトースは富士フィルム和光純薬工業株式会社（大阪）より購入した。

誘導結合プラズマ質量分析計 (ICP-MS) による血漿中および組織中の生体金属の定量

硝酸 (HNO_3 、有害金属測定用) は関東化学株式会社（東京）、過塩素酸 (HClO_4 、有害金属測定用) および過酸化水素 (H_2O_2 、原子吸光分析用) はキシダ化学株式会社（大阪）より購入した。カルシウム (Ca) 標準液、マグネシウム (Mg) 標準液、Cu 標準液、Fe 標準液、Mn 標準液、Zn 標準液、クロム (Cr) 標準液、Se 標準液および内部標準液として使用したインジウム (In) 標準液（原子吸光分析用標準液、1000 ppm）は富士フィルム和光純薬工業株式会社（大阪）より購入した。

肝臓および腎臓の抗酸化力の評価

リン酸二水素ナトリウム・二水和物 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、リン酸水素二ナトリウム・十二水和物 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、リン酸二水素カリウム (KH_2PO_4)、水酸化ナトリウム (NaOH) およびヒポキサンチンは富士フィルム和光純薬工業株式会社（大阪）、エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物 ($\text{EDTA} \cdot 2\text{Na}$) およびキサンチンオキシダーゼはシグマアルドリッチ社（セントルイス、MO）より購入した。プロテアーゼインヒビター (complete protease inhibitor cocktail) は (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社、バーゼル、スイス) より購入した。発光試薬の MPEC はアトー株式会社（東京）より購入した。

筋肉グリコーゲンの測定

水酸化カリウム (KOH)、エタノール、グリコーゲンは富士フィルム和光純薬工業株式会社（大阪）、硫酸ナトリウム (NaSO_4)、フェノール試薬、濃硫酸はキシダ化学株式会社（大阪）より購入した。

血漿中インスリン値の測定

超高感度ラットインスリン測定キットを森永生科学研究所（横浜）より購入した。

肝臓におけるセレノプロテイン P mRNA 発現量の測定

肝臓組織から total RNA を抽出する際に使用した分子生物学用エタノールは富士フ

ルム和光純薬工業株式会社（大阪）より購入した。RNA later[®]-ICE frozen tissue transition solution はサーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社（ウォルサム、MA）、high pure RNA tissue kit はロシュ・ダイアグノスティックス株式会社（バーゼル、スイス）より購入した。

肝臓中 GPx1 の測定

グリシン、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、ジチオトレイトール (DTT)、塩化ナトリウム (NaCl)、オルトバナジウム酸ナトリウム (Na₃VO₄)、フッ化ナトリウム (NaF) および Tween 20 は富士フィルム和光純薬工業株式会社（大阪）より購入した。トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン (Tris) はナカライテスク株式会社（京都）、Leupeptin は株式会社ペプチド研究所（大阪）、メタノールは純正化学株式会社（東京）より購入した。Pierce BCA protein assay kit はサーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社（ウォルサム、MA）、抗 GPx1 抗体 (#ab22604) はアブカム社（ケンブリッジ、イギリス）、β-actin 抗体 (#4967) と HRP 標識抗ラビット IgG 抗体 (#7074) はセル・シグナリング・テクノロジー株式会社（ダンバース、MA）から、そして Immobilion[™] ウェスタン化学発光 HRP 基質はミリポア社（ビレリカ、MA）から購入した。

腎障害モデルの作成

薬剤性腎障害モデルの作製には、生化学用イソフルラン（富士フィルム和光純薬工業株式会社（大阪））および日本薬局方注射用バンコマイシン塩酸塩 (VCM)（塩野義製薬株式会社（大阪））を用いた。

上記全ての有機溶媒、酸塩基試薬および無機試薬は一級ないし特級を用いた。なお、実験に用いたすべての純水は RO + EDI 式純水装置 Elix Advantage 3（日本ミリポア、東京）より調整されたエリックス水を使用した。

2-2-2 動物

4 週齢の Wistar 系雄性ラットを日本クレア株式会社（大阪）より購入した。動物は神戸女子大学動物飼育室で室温 22 ± 2°C、湿度 40~60%、点灯時間午前 7時から午後 7時の 12 時間周期の照明調節の下で飼育した。4 週齢から 1 週間、固形飼料 MF（オリエンタル酵母工業株式会社、東京）およびエリックス水を自由摂取させ、プラスチックケージ内で予備飼育した。5 週齢から 15 週齢の 10 週間の飼育期間中、体重は週に 2 回、摂食量は週に 1 回測定した。本動物実験は、神戸女子大学動物実験倫理委員会により承認され、神戸女子大学動物実験規定に従って実施した。（承認番号：A208）

2-2-3 動物の群分けおよび実験食の作成

予備飼育終了後、5 週齢時に CA 食または HF 食による飼育を開始した。実験食は 5 週齢

から 15 週齢までの 10 週間与えた。11 週齢時に、VCM 投与により薬剤性腎障害モデルを作製した。群分けは、標準食として 20% CA 食を与えた腎障害がない非運動群をノーマル群とし、腎障害がある CA 群の非運動群と運動群、および 58% HF 食を与えた HF 群の非運動群と運動群の 5 群とした。各群の表記は以下の通りである。① 腎障害なし + 20% CA 食 + 非運動 [腎障害なし CA (-) : ノーマル群] ; ② 腎障害あり + 20% CA 食 + 非運動 [腎障害あり CA (-)] ; ③ 腎障害あり + 20% CA 食 + 運動 [腎障害あり CA (ex)] ; ④ 腎障害あり + 58% HF 食 + 非運動 [腎障害あり HF (-)] ; ⑤ 腎障害あり + 58% HF 食 + 運動 [腎障害あり HF (ex)]。15 週齢時に、16 時間絶食させたのち、イソフルラン吸入麻酔下で、ヘパリン処理したシリンジを用いて、腹部大動脈より採血した。血液試料を 1,000 g、4°C で 10 分間遠心分離し、血漿を得た。また、採血後に肝臓、腎臓、膵臓、骨格筋 (ヒラメ筋) および生殖器周囲の脂肪組織を摘出し重量を測定した。リアルタイム PCR 法およびウェスタンブロッティング法で使用する肝臓組織は液体窒素で急速に凍結させた後、分析で使用するまで -80°C で保存し、血漿およびその他の組織は各種測定まで -30°C で保存した。実験食の組成は 1 章の Table 1-1 に示した通りである。なお、実験プロトコルを Fig. 2-1 に示す。

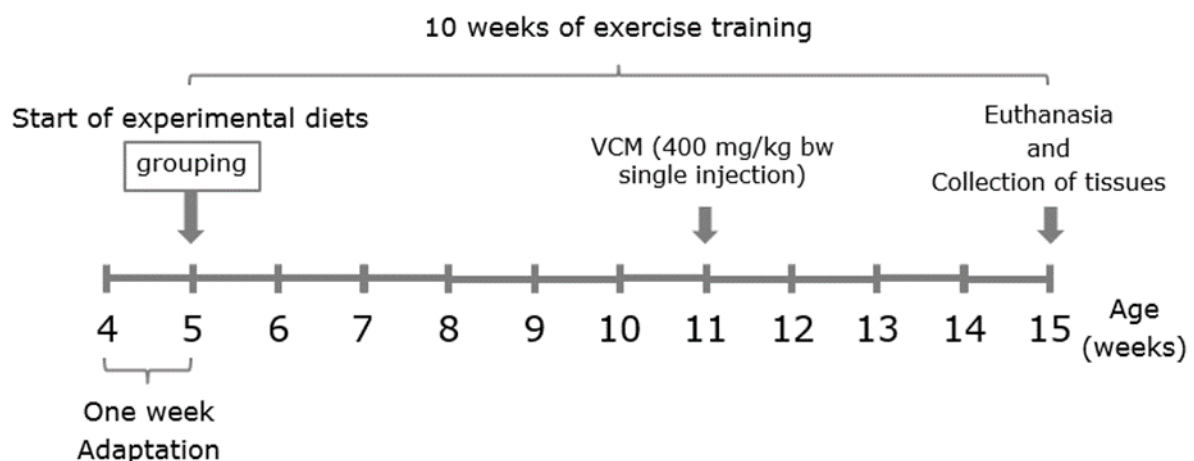


Fig. 2-1 Experimental protocol.

(Namika Miya, *et al. J. Clin. Biochem. Nutr.* 2020, in press., Fig.1 より引用)

2-2-4 腎障害モデルの作製

11 週齢時に、より重い疾病状態を想定した運動療法の効果を調べるために VCM 投与による薬剤性腎障害モデルを作製した。前日から 24 時間絶水させたのち、腎毒性発現量とされる 400 mg/kg BW に調製した VCM を静脈内へ単回投与した [69]。絶水は VCM 投与後 24 時間まで行った。

2-2-5 運動群における運動条件の設定

運動群には、小動物用トレッドミル MK-680（室町機械株式会社、東京）を用いた有酸素運動を実施した。運動条件は、0° の勾配で 30 m/分の強度の走行運動を 1 時間、週 6 日間行った。ラットが走行しない場合に備え、走路の最後部に動物の状態に影響を及ぼさない適切な電気刺激を与えることができる金属棒を設置した。運動期間は 5 週齢から 15 週齢の 10 週間実施した。

2-2-6 血中乳酸値の測定

15 週齢の解剖前日に、運動群は運動実施直後、非運動群は運動群の測定と同時間帯の安静時に血中乳酸値の測定を実施した。乳酸値は、ラットの尾静脈から血液を採取し、ラクテート分析用センサー装置であるラクテートプロ 2（アークレイ社、京都）を用いて LOD 酵素電極法により測定した。

2-2-7 血漿中血液生化学パラメータの測定

得られた血漿中の HDL コレステロール (HDL-cho)、総コレステロール (T-cho)、中性脂肪 (TG)、尿素窒素 (BUN)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、総タンパク (TP)、クレアチンホスホキナーゼ (CPK)、クレアチニン (CRE)、グルコース (GLU) は動物用血液生化学自動ケミストリーである富士ドライケム 3500V（富士フィルムメディカル株式会社、東京）を用いて測定した。

2-2-8 血漿中インスリン値の測定

超高感度ラットインスリン測定キットを用いて、ELISA 法により測定した。

2-2-9 血漿中および組織中の生体金属の定量

運動による生体金属量の変動を調べるために ICP-MS を用いて、血漿中および組織中の生体金属の定量を行った。血漿 50 μ L もしくは肝臓、腎臓、膵臓 30 mg を 50 mL トールビーカーに量りとり、150°C のホットプレート上で湿式灰化した。組織中に含まれる有機物を除去するために、60% HNO₃ を 2 mL、60% HCl₄ を 2 mL、30% H₂O₂ を 2 mL 順次添加し、白色の残渣物が得られるまでこの作業を繰り返した。その後、室温において 5% HNO₃ を 9 mL 添加し、3 時間静置した後、白色残渣物を溶解させたものを測定溶液とした。検量線試料は濃度が 0、1、5、50、100、500 ppb の溶液を作成し内標準の 1 ppm の In 溶液を、測定溶液 9 mL に対して、10 μ L の液量で検量線試料と測定溶液にそれぞれ加えた。その後、血漿中および組織中の Ca、Mg、Cu、Fe、Mn、Zn、Cr および Se 濃度を ICP-MS 7700x（アジレントテクノロジー株式会社、サンタクララ、CA）を用いて定量した。なお、使用したビーカーなどの器具はすべてサンプルの金属汚染を防ぐため、1% HNO₃ で酸処理したものを使用した。

2-2-10 肝臓および腎臓の抗酸化力の評価

ヒポキサンチン・キサンチンオキシダーゼ系の反応で人工的に発生させたスーパーオキシドアニオン ($O_2^{\cdot-}$) に対する組織ホモジネート液の消去能を確かめるために測定を行った。肝臓および腎臓 0.1 g に 500 μ L のプロテアーゼインヒビター (complete protease inhibitor cocktail) を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.3) を加え、ホモジナイズした。その後、冷却遠心機で 4,000 rpm、4°C で 15 分間遠心分離した上清を粗酵素液とした。ヒポキサンチン・キサンチンオキシダーゼ系によって発生する $O_2^{\cdot-}$ と発光試薬 MPEC を反応させて以下のように測定した。300 μ M MPEC 10 μ L、0.1 M リン酸水素カリウム緩衝液 (pH 7.5) 170 μ L、粗酵素液 60 μ L および 100 μ g/mL キサンチンオキシダーゼ溶液 60 μ L の混合液に 3.6 mM ヒポキサンチン溶液 50 μ L を分注し、その後生じた発光量を発光光度計 (Lumat3 LB9508、ベルトールドジャパン株式会社、東京) で測定した。

2-2-11 筋肉グリコーゲンの測定

運動による筋肉グリコーゲン貯蔵量の変動を調べるためにヒラメ筋を用いてフェノール硫酸法によるグリコーゲンの測定を行った。まず、筋肉グリコーゲンを抽出するため、ヒラメ筋 0.5 g に 30%水酸化カリウム飽和硫酸ナトリウム溶液 (30% KOH + Na₂SO₄) 3.0 mL を加え、沸騰水浴中で 30 分間加熱し溶解させた。冷却後、この溶液に 95%エタノールを 5.0 mL 加えてよく混合し、再び 30 分間冷却させた後、4,000 rpm、4°C で 30 分間遠心分離し、上清を取り除いた。この沈渣にエリックス水 5.0 mL を加えてよく溶解させた後、さらに全量が 10.0 mL になるように調整した。この溶液をグリコーゲン抽出液とした。次に、グリコーゲン抽出液 0.5 mL と 5%フェノール液 0.5 mL を混合させ、さらに濃硫酸 2.5 mL を加えてよく混和させた。25°C の恒温槽で 20 分間反応させたのち、波長 490 nm における吸光度を紫外可視分光光度計 UV-1280 (株式会社島津製作所、京都) により測定した。検量線用として濃度 0、25、50、100 μ g/mL のグリコーゲン標準溶液を作成し、同様に測定を行った。

2-2-12 肝臓におけるセレノプロテイン P の mRNA 発現量の測定

-80°C で凍結保存した肝臓組織は -20°C の条件下で RNA later[®]-ICE frozen tissue transition solution に 16 時間以上浸漬させ、total RNA の抽出に使用した。この操作は組織が融解する際の RNA の分解を防ぐために行った。total RNA は high pure RNA tissue kit を使用して抽出を行った。抽出した total RNA は使用するまで -80°C で保存した。mRNA の定量にはリアルタイム PCR 法を用い、装置は LightCycler[®] Nano (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社、バーゼル、スイス) を使用した。反応は One Step SYBR[®] PrimeScript[®] Plus RT-PCR キット (タカラバイオ株式会社、滋賀) を用い、SeP および β アクチンの各プライマーの最終濃度が 0.4 μ M になるよう調整した。反応条件は 95°C、10 秒で初期変性させた後、1 サイクルが変性 95°C、5 秒、アニーリング 55°C、30 秒、伸張反応 72°C、3 秒になるよう設定し、40 サイクル反応させた。反応終了後、融解曲線分析から増幅産物は単一生成物であることを確認した。SeP mRNA 発現量は検量線法を用いて相対定量解析を行った。各プライマー配

列は以下に示す。ラット SeP : R : TGTCACGACCAAATGTGGAG、L : GGAGAAAAGAGAGGGTGCAA [43]、ラット β -actin : R : GCGGCAGTGGCCATCTC、L : GGGAAATCGTGCGTGACATT。なお、ラット β -actin の R および L プライマー配列は Universal Probe Library Design Center (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社、バーゼル、スイス) を使用して設計した。

2-2-13 肝臓中 GPx1 の測定

摘出した肝臓組織 150 mg を 1.5 mL のバッファー I (20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、1 mM Na_3VO_4 、5 mM NaF、1 mM PMSF および 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin ; pH 7.4) 中に入れ、TissueLyser II (キアゲン、ノルトライン=ヴェストファーレン、ドイツ) を用いてホモジナイズし、ホモジネート液を 14,500 g、4°C で 20 分間遠心分離した。得られた上清は、Pierce BCA protein assay kit を用いて BCA 法によりタンパク質定量を行った。総タンパク質量として 10 μg を含有するサンプル溶液を 8-16% ミニプロテイン® TGX™ プレキャストゲル (バイオ・ラッド社、ハーキュリーズ、CA) により分離した。分離したタンパク質は PVDF 膜に転写し、0.1% Tween 20 含有 TBS (TBS/T) 溶液にスキムミルクを溶解し 3% スキムミルク-TBS/T 溶液としたものをブロッキング剤とし、20~25°C の室温で 1 時間ブロッキング処理を行った。その後、ブロッキング剤に溶解した一次抗体を 4°C 条件下において一晩振とうさせた。なお、一次抗体の希釈倍率は、抗 GPx1 抗体については 5,000 倍希釈、 β -actin 抗体については 1,000 倍希釈とした。その後、PVDF 膜を TBS/T で洗浄した後、2 次抗体 (希釈倍率 : 2,000 倍) を室温で 1 時間振とうさせた。特異的免疫反応は Immobilon™ ウェスタン化学発光 HRP 基質を用いて化学発光処理を行い、ChemiDoc™ Touch Imaging System (バイオ・ラッド社、ハーキュリーズ、CA) を用いて可視化した。得られたバンドの解析は ImageJ (アメリカ国立衛生研究所、ベセスタ、MD) を用いて行った。

なお、1 次抗体に抗 GPx1 抗体 (1:5,000 ; #ab22604) および β -actin 抗体 (1:1,000 ; #4967) を、2 次抗体には HRP 標識抗ラビット IgG 抗体 (1:2,000 ; #7074) を用いた。

2-2-7 統計処理

得られた全ての実験結果は平均値および標準偏差として表した。統計学的処理には、エクセル 2016 上で、エクセル統計 (株式会社社会情報サービス、東京) を使用し、はずれ値検定であるスミルノフ・グラブス検定分散を行った。多群間の比較では分散分析法に加えてチューキー・クレーマー法を用いた。危険率が 5% 未満をもって有意であると判断した。

2-3 結果

2-3-1 飼育期間の一般的特性における有酸素運動の効果

解剖時の体重、肝臓重量および生殖器周囲脂肪量を示す (Table 2-1)。体重はノーマル群と比較すると、腎障害によって減少傾向を示し、有酸素運動でさらに減少することが分かった。肝臓重量はノーマル群と比較して、腎障害がある CA (-)群で減少を示したが、有酸素運動を負荷すると CA (ex)群ではノーマル群の肝臓重量まで回復することが示唆された。また、腎障害のある HF 群の非運動群および運動群ともに、腎障害がある CA (-)群と比較して、肝臓重量は有意に増加することが観察された (それぞれ $p=0.002$ 、 $p=0.006$)。生殖器周囲脂肪量は、腎障害のある CA 群、HF 群ともに運動によって有意な減少を示した (それぞれ $p=0.014$ 、 $p=0.015$)。

Table 2-1 General characteristics of animals.

(Namika Miya, *et al. J. Clin. Biochem. Nutr.* 2020, in press., Table1 より引用し一部改変した。)

Renal function Experimental diet Exercise training	Groups				
	normal	renal failure			
	CA	CA		HF	
	(-)	(-)	(ex)	(-)	(ex)
Body weight (g)	385 ± 17	363 ± 26	357 ± 20	352 ± 17	341 ± 14 *
Liver (g/100 g of body weight)	3.0 ± 0.1	2.8 ± 0.1	2.9 ± 0.1	3.2 ± 0.2 ††	3.1 ± 0.2 ††
Genital adipose tissue (g/100 g of body weight)	1.9 ± 0.3	1.7 ± 0.2	1.2 ± 0.1 ** † #	1.7 ± 0.2	1.3 ± 0.1 ** † #

* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. CA (-) in normal group. † $p < 0.05$ and †† $p < 0.01$ vs. CA (-) with renal failure group. # $p < 0.05$ vs. HF (-) with renal failure group. [CA (-) in normal group, CA (-), CA (ex) and HF (-) with renal failure, n = 4; HF (ex) with renal failure, n = 5].

腎臓重量は、ノーマル群と比較すると腎障害によって増加を示し、特に HF 群の運動群では有意に増加していた ($p = 0.00001$ 、Fig. 2-2)。また、腎障害のある CA 群、HF 群ともに運動によって腎臓重量が増加傾向にあり、特に HF 群の運動群では、有酸素運動による有意な腎臓重量の増加が観察された ($p = 0.042$)。

これらの結果から、有酸素運動および腎障害と耐糖能異常の併発は腎臓に負荷をかけることが示唆された。

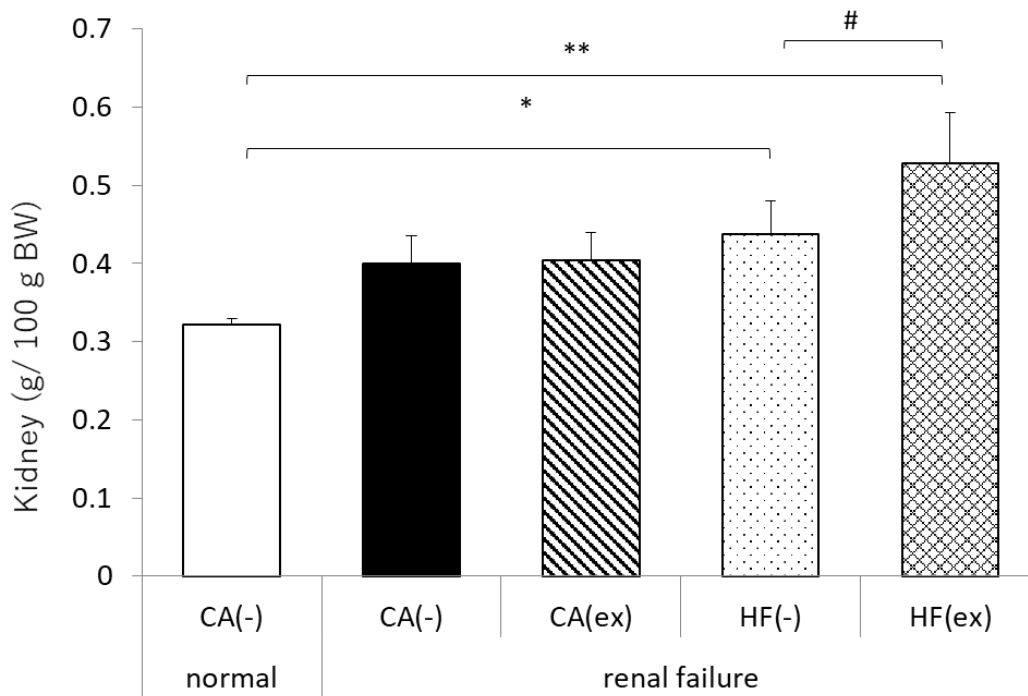


Fig. 2-2 Effect of exercise in kidney weight.

* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. CA (-) in normal group. # $p < 0.05$ vs. HF (-) with renal failure group. [CA (-) in normal group, CA (-), CA (ex) and HF (-) with renal failure, $n = 4$; HF (ex) with renal failure, $n = 5$].

2-3-2 血中乳酸値の測定による運動負荷の評価

有酸素運動に関連するパラメータとして、血中乳酸値の測定を行った (Fig. 2-3)。

血中乳酸値はCA群、HF群ともに運動によって、50%まで有意な低下を示した (それぞれ $p=0.003$ 、 $p=0.002$)。加えて、CA群、HF群の運動群は、ノーマル群より乳酸値が低下した状態であった。腎障害がある状態でも、有酸素運動により生体内の乳酸利用効率を上昇したことが示唆され、有酸素運動による運動負荷がかかっている状態であることが示された。

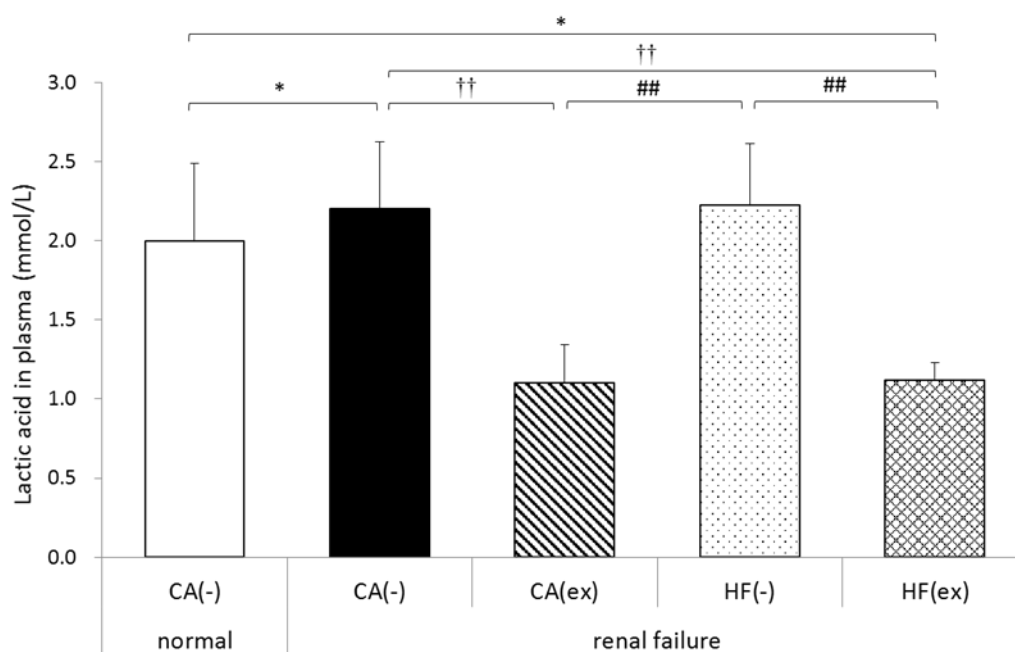


Fig. 2-3 Measurement of lactic acid level in plasma.

* $p < 0.05$ vs. CA (-) in normal group. †† $p < 0.01$ vs. CA (-) with renal failure group. ### $p < 0.01$ vs. HF (-) with renal failure group. [CA (-) in normal group, CA (-), CA (ex) and HF (-) with renal failure, $n = 4$; HF (ex) with renal failure, $n = 5$].

2-3-3 有酸素運動による血漿中インスリン値への影響

糖代謝に関わるパラメータとして血漿中インスリン値の測定を行った (Fig. 2-4)。

血漿中インスリン値は、腎障害がある群において、CA 群、HF 群ともに運動により低下した。特に腎障害のある HF (-)群において血漿インスリン値は最も高い値を示したが、有酸素運動によって有意に低下した ($p = 0.0003$)。

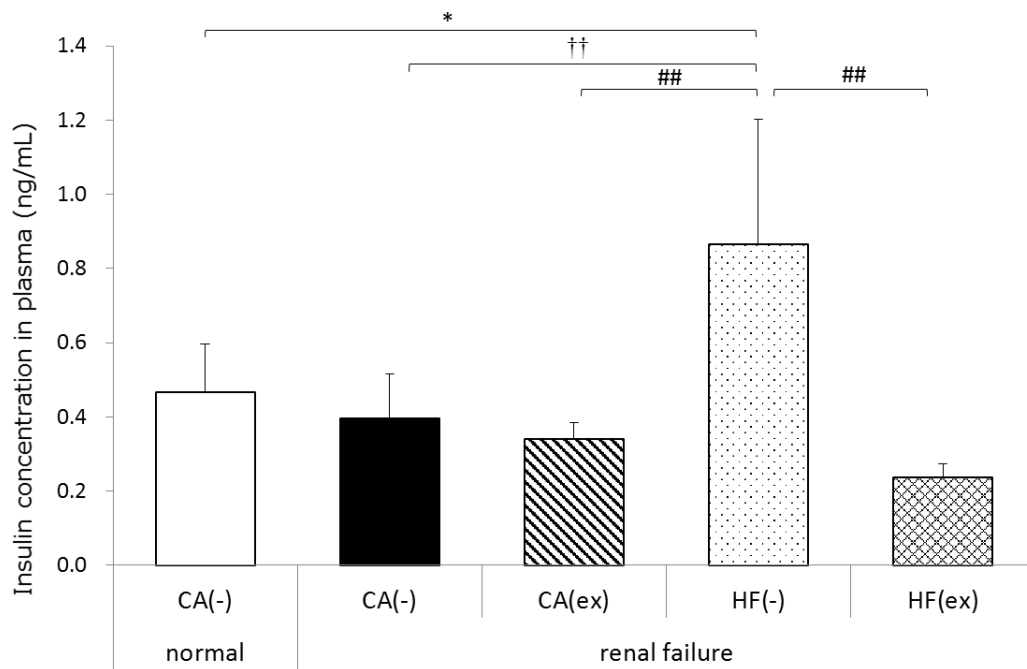


Fig. 2-4 Changes in plasma insulin concentration.

* $p < 0.05$ vs. CA (-) in normal group. †† $p < 0.01$ vs. CA (-) with renal failure group. ## $p < 0.01$ vs. HF (-) with renal failure group. [CA (-) in normal group, CA (-), CA (ex) and HF (-) with renal failure, $n = 4$; HF (ex) with renal failure, $n = 5$].

2-3-4 有酸素運動による筋肉グリコーゲン量への影響

有酸素運動が筋肉グリコーゲン貯蔵量へ及ぼす影響を調べるために、持久力に関わる骨格筋の1つであるヒラメ筋を用いて測定を行った (Fig. 2-5)。

腎障害のある群で、筋肉グリコーゲン貯蔵量の有意な変動、および有酸素運動による有意な変動は観察されなかった。

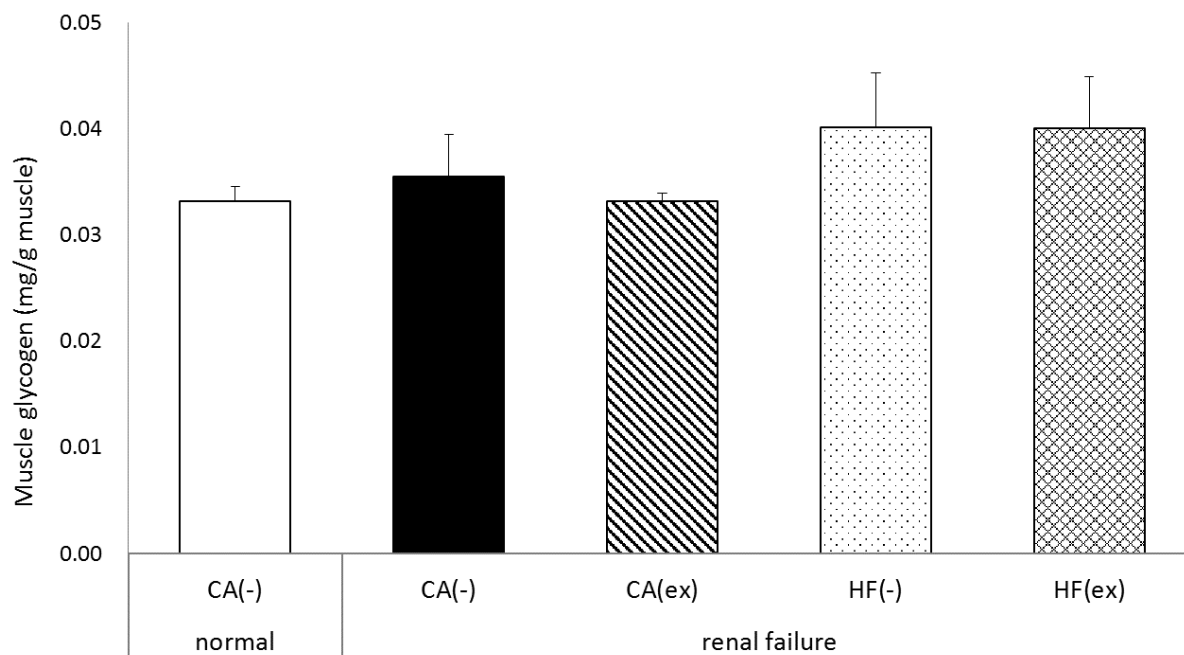


Fig. 2-5 Measurement of muscle glycogen levels.

[CA (-) in normal group, CA (-), CA (ex) and HF (-) with renal failure, n = 4; HF (ex) with renal failure, n = 5]

2-3-5 有酸素運動による血漿中の血液生化学パラメータへの影響

有酸素運動による脂質代謝、腎機能、糖代謝等の血液生化学パラメータへの影響について血漿サンプルを用いて測定した (Table 2-2)。

脂質代謝に関連する T-cho は、腎障害のある HF 群において、ノーマル群と比較して HF (-)群で増加を示し、その増加は有酸素運動によって HF (ex)群で減少した。また、TG は腎障害のある CA 群、HF 群でノーマル群と比較して低下を示し、特に HF 群では有酸素運動によって低下を示した。これらの結果より、有酸素運動により腎障害群で脂質代謝の改善がみられた。

一方、腎機能の指標である BUN をみると、ノーマル群と比較して腎障害で増加を示し、HF 群においては有酸素運動でさらに増加した。この結果は、有酸素運動は腎障害と耐糖能異常を併発している状態では腎臓機能を悪化させることを示唆している。同様に、有酸素運動が CRE を上昇させている可能性もあるが、CRE は腎障害のある HF (-)群以外のすべての群でノーマル群と比較して増加を示した。以上より、腎障害時における有酸素運動による腎機能への負の影響は明白である。

また、TP はノーマル群と比較して腎障害群で低下を示し、有酸素運動はノーマル群と比較して HF 群で TP を有意に減少させた ($p = 0.004$)。有酸素運動によって上昇することが知られている AST および CPK は、今回の有酸素運動の負荷によって増加を示した。

Table 2-2 Blood biochemical analysis.

(Namika Miya, *et al. J. Clin. Biochem. Nutr.* 2020, in press., Table. 2 より引用し一部改変した。)

Renal function Experimental diet Exercise training	Groups				
	normal	renal failure			
	CA	CA		HF	
	(-)	(-)	(ex)	(-)	(ex)
HDL-cho (mg/dl)	58 ± 2	60 ± 5	55 ± 9 #	71 ± 4	60 ± 8
T-cho (mg/dl)	86 ± 5	86 ± 8	80 ± 13 #	101 ± 6	85 ± 11
TG (mg/dl)	163 ± 60	75 ± 13 *	70 ± 9 *	103 ± 47	64 ± 22 **
BUN (mg/dl)	17 ± 3	26 ± 4	24 ± 8	26 ± 5	31 ± 8 *
AST (U/l)	57 ± 9	56 ± 4	63 ± 3	55 ± 0	66 ± 7
ALT (U/l)	26 ± 3	24 ± 2	25 ± 4	23 ± 0	24 ± 2
TP (g/dl)	6.8 ± 0.2	6.5 ± 0.2	6.2 ± 0.2	6.3 ± 0.5	6.0 ± 0.2 **
CPK (U/l)	89 ± 5	89 ± 17	106 ± 6 #	79 ± 10	92 ± 11
CRE (mg/dl)	0.23 ± 0.05	0.38 ± 0.05	0.43 ± 0.13	0.23 ± 0.05	0.32 ± 0.13

* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. CA (-) in normal group. # $p < 0.05$ vs. HF (-) with renal failure group. [CA (-) in normal group, CA (-), CA (ex) and HF (-) with renal failure, $n = 4$; HF (ex) with renal failure, $n = 5$].

2-3-6 血漿中および組織中の生体金属の定量

有酸素運動が生体金属量へ及ぼす影響について調べるため ICP-MS を用いて、血漿中および肝臓、腎臓、脾臓の組織中における Ca、Mg、Cu、Fe、Mn、Zn、Cr および Se 濃度を定量した (Table 2-3)。

血漿中および脾臓中の生体金属量は、有酸素運動によって有意に変動するものは観察されなかった (Table 2-3 (A, D))。

肝臓では、腎障害群において肝臓中の Cr、Mn がわずかに変動した (Table 2-3 (B))。

一方、腎障害のある CA 群、HF 群ともに、腎臓中の Ca はノーマル群と比較して増加していたが、腎臓中の Se は減少傾向であり (Table 2-3 (C))、特に CA (-)群では有意な低値を示した。加えて、腎障害のある HF 群における腎臓中 Cu は、ノーマル群と比較して有意に減少した。

Table 2-3 Trace element concentrations in plasma (A), liver (B), kidney (C), and pancreas (D).

(Namika Miya, *et al. J. Clin. Biochem. Nutr.* 2020, in press., Table 3 より引用し一部改変した。)

A	Plasma	normal		renal failure		
		CA (µg/ml)		CA (µg/ml)		HF (µg/ml)
		(-)	(-)	(ex)	(-)	(ex)
Mg	22.0 ± 3.7	23.8 ± 3.4	25.2 ± 3.5	21.5 ± 3.0	22.7 ± 3.7	
Ca	109.4 ± 10.8	112.1 ± 17.2	109.4 ± 11.6	105.4 ± 8.8	110.7 ± 6.2	
Cr	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	
Mn	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.01	
Fe	2.2 ± 0.2	3.0 ± 0.5	2.8 ± 0.7	2.3 ± 0.2	2.6 ± 0.4	
Cu	1.6 ± 0.3	1.6 ± 0.1	1.7 ± 0.3	1.4 ± 0.1	1.6 ± 0.2	
Zn	4.4 ± 2.3	1.9 ± 0.3	2.2 ± 0.7	1.8 ± 0.5	3.5 ± 1.7	
Se	0.15 ± 0.09	0.18 ± 0.16	0.31 ± 0.10	0.31 ± 0.08	0.17 ± 0.16	

B	Liver	normal		renal failure		
		CA (µg/g wet weight)		CA (µg/g wet weight)		HF (µg/g wet weight)
		(-)	(-)	(ex)	(-)	(ex)
Mg	243.0 ± 4.0	237.7 ± 7.0	234.8 ± 19.4	250.2 ± 8.2	246.9 ± 17.4	
Ca	53.4 ± 2.5	77.4 ± 14.2	55.5 ± 1.2	67.8 ± 11.0	69.7 ± 20.8	
Cr	0.13 ± 0.01	0.12 ± 0.03	0.17 ± 0.01 †##	0.10 ± 0.02	0.09 ± 0.01 §§	
Mn	2.13 ± 0.09	2.05 ± 0.10	1.90 ± 0.29 ##	2.50 ± 0.16 †	2.40 ± 0.15 §§	
Fe	200.0 ± 20.2	249.8 ± 22.7	236.7 ± 6.2	229.1 ± 30.3	203.7 ± 24.7	
Cu	5.2 ± 0.2	5.9 ± 0.9	5.8 ± 0.2	5.4 ± 0.1	6.8 ± 2.3	
Zn	39.3 ± 4.0	46.4 ± 6.9	39.9 ± 7.5	39.3 ± 2.7	39.4 ± 8.3	
Se	0.30 ± 0.19	0.35 ± 0.32	0.34 ± 0.27	0.41 ± 0.24	0.43 ± 0.31	

C	Kidney	normal		renal failure		
		CA (µg/g wet weight)		CA (µg/g wet weight)		HF (µg/g wet weight)
		(-)	(-)	(ex)	(-)	(ex)
Mg	190.9 ± 5.4	222.8 ± 36.5	216.6 ± 37.6	190.1 ± 11.6	210.1 ± 23.7	
Ca	132.6 ± 43.2	896.1 ± 599.0 *	374.2 ± 222.7	410.2 ± 188.6	952.9 ± 327.0 *	
Cr	0.12 ± 0.02	0.16 ± 0.04	0.18 ± 0.05	0.13 ± 0.01	0.12 ± 0.01	
Mn	0.79 ± 0.07	0.74 ± 0.17	0.67 ± 0.01	0.68 ± 0.07	0.74 ± 0.15	
Fe	80.2 ± 5.3	90.4 ± 16.1	82.5 ± 9.9	63.7 ± 14.7	59.9 ± 14.5 †	
Cu	11.0 ± 2.3	8.0 ± 2.2	8.1 ± 2.5	5.7 ± 1.5 *	5.9 ± 1.7 *	
Zn	41.4 ± 6.7	40.4 ± 5.5	42.7 ± 1.8	39.9 ± 8.3	38.0 ± 5.5	
Se	1.04 ± 0.01	0.25 ± 0.17 **	0.60 ± 0.15	0.63 ± 0.27	0.54 ± 0.31	

D	Pancreas	normal		renal failure		
		CA (µg/g wet weight)		CA (µg/g wet weight)		HF (µg/g wet weight)
		(-)	(-)	(ex)	(-)	(ex)
Mg	289.2 ± 26.8	335.7 ± 36.6	294.9 ± 28.4	303.5 ± 17.9	300.5 ± 24.3	
Ca	118.6 ± 30.0	152.5 ± 27.6	134.5 ± 25.3	132.0 ± 9.6	140.0 ± 14.5	
Cr	0.14 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.17 ± 0.03	0.15 ± 0.02	0.18 ± 0.04	
Mn	1.37 ± 0.17	1.43 ± 0.18	1.31 ± 0.07	1.52 ± 0.09	1.53 ± 0.11	
Fe	17.3 ± 2.6	21.4 ± 2.5	17.4 ± 0.8	19.2 ± 2.8	16.1 ± 1.0 †	
Cu	1.4 ± 0.1	1.6 ± 0.2	1.4 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.2	
Zn	40.4 ± 12.0	47.0 ± 8.8	45.3 ± 8.5	36.3 ± 5.7	44.8 ± 1.7	
Se	0.15 ± 0.11	ud	0.07 ± 0.07	ud	0.06 ± 0.03	

* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. CA (-) in normal group. † $p < 0.05$ vs. CA (-) with renal failure group. §§ $p < 0.01$ vs. CA (ex) with renal failure group. ## $p < 0.01$ vs. HF (-) with renal failure group. [CA (-) in normal group, CA (-), CA (ex) and HF (-) with renal failure, n = 4; HF (ex) with renal failure, n = 5].

ud: under determine.

2-3-7 肝臓および腎臓の抗酸化力の評価

有酸素運動における肝臓および腎臓の抗酸化力への影響を、人工的な $O_2\cdot^-$ 発生量の測定を行い評価した。

肝臓における人工的 $O_2\cdot^-$ 発生量は、ノーマル群と比較して腎障害群で増加傾向を示した (Fig. 2-6 (A))。腎障害のある HF (ex) 群では、 $O_2\cdot^-$ 発生量の増加は有意であった。

一方で、腎臓における人工的 $O_2\cdot^-$ 発生量は、ノーマル群と比較して腎障害のある HF (-) 群のみで有意に増加し、その増加は有酸素運動によって有意に抑制された (Fig. 2-6 (B))。

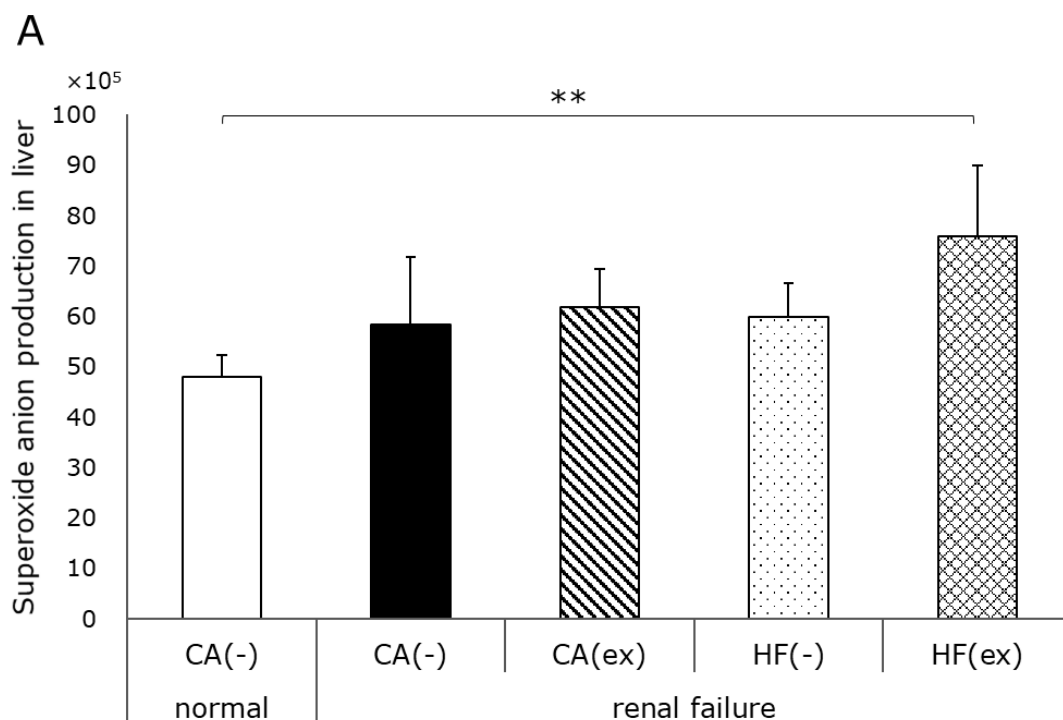


Fig. 2-6 Continued

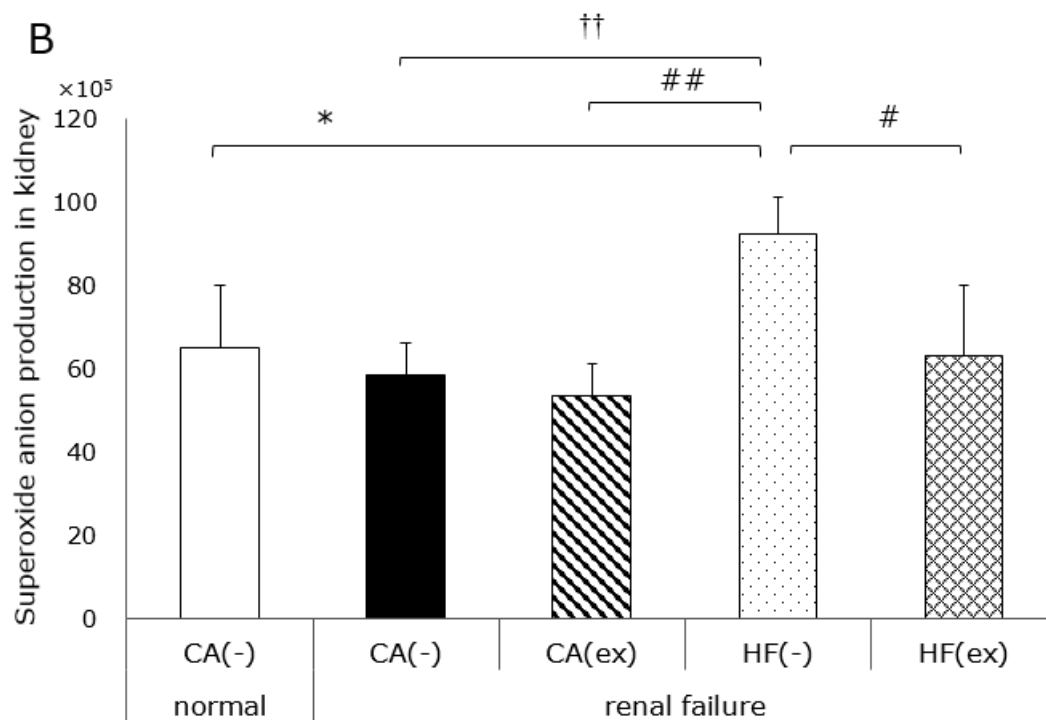


Fig. 2-6 Measurement of superoxide anion scavenging activity in liver (A) and kidney (B).

* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. CA (-) in normal group. †† $p < 0.01$ vs. CA (-) with renal failure group. # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ vs. HF (-) with renal failure group. [CA (-) in normal group, CA (-), CA (ex) and HF (-) with renal failure, $n = 4$; HF (ex) with renal failure, $n = 5$].

(Namika Miya, *et al. J. Clin. Biochem. Nutr.* **2020**, in press., Fig. 2 より引用)

2-3-8 有酸素運動による肝臓におけるセレノプロテイン P の mRNA 発現量への影響

有酸素運動が肝臓におけるセレノプロテイン P の mRNA 発現量に与える影響を調べるため、リアルタイム PCR 法を用いて測定を行った。

肝臓中セレノプロテイン P の mRNA 発現量はノーマル群と比較して、腎障害群で増加傾向を認めた (Fig. 2-7)。加えて、有酸素運動によって発現量は更なる増加を示し、特に CA 群で有酸素運動による変動が顕著であった。

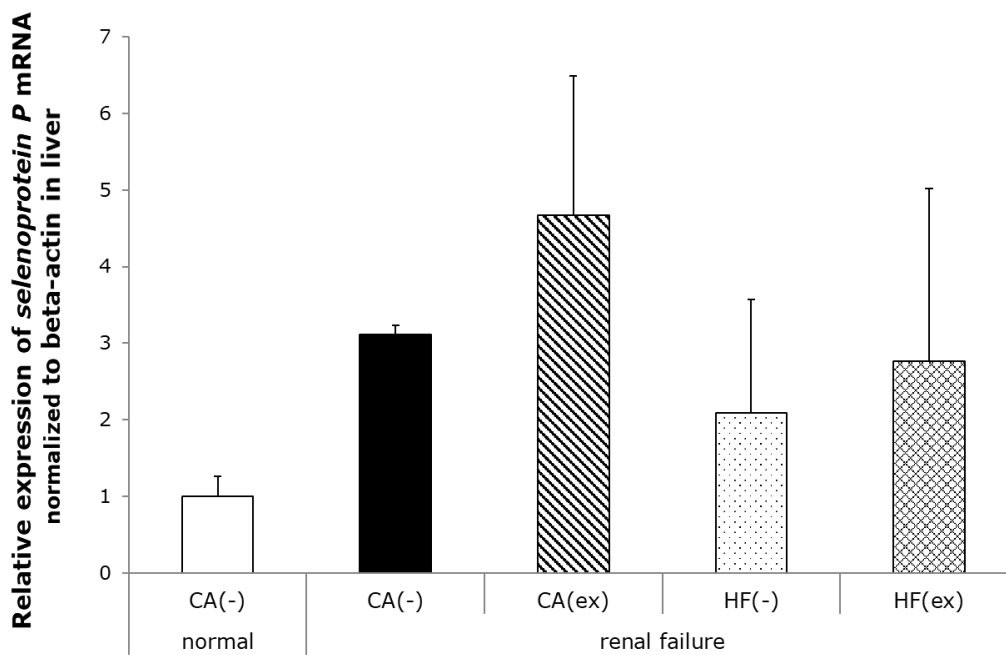


Fig. 2-7 Relative hepatic *selenoprotein P* expression levels by mRNA

[CA (-) in normal group, CA (-), CA (ex) and HF (-) with renal failure, n = 4; HF (ex) with renal failure, n = 5].

(Namika Miya, et al. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2020**, in press., Fig. 3 より引用)

2-3-9 有酸素運動による肝臓中 GPx1 への影響

肝臓中の GPx1 のタンパク質発現をウェスタンブロッティング法により測定した。

肝臓中 GPx1 はノーマル群と比較して、腎障害群で発現が低下した (Fig.2-8)。特に、腎障害のある CA (-)群と HF (ex)群で、ノーマル群と比較して発現量がより低下した。腎障害のある CA 群において、有酸素運動は GPx1 発現量を増加させる傾向がみられたが、腎障害のある HF 群では有酸素運動は GPx1 発現量をむしろ減少させる傾向にあった。

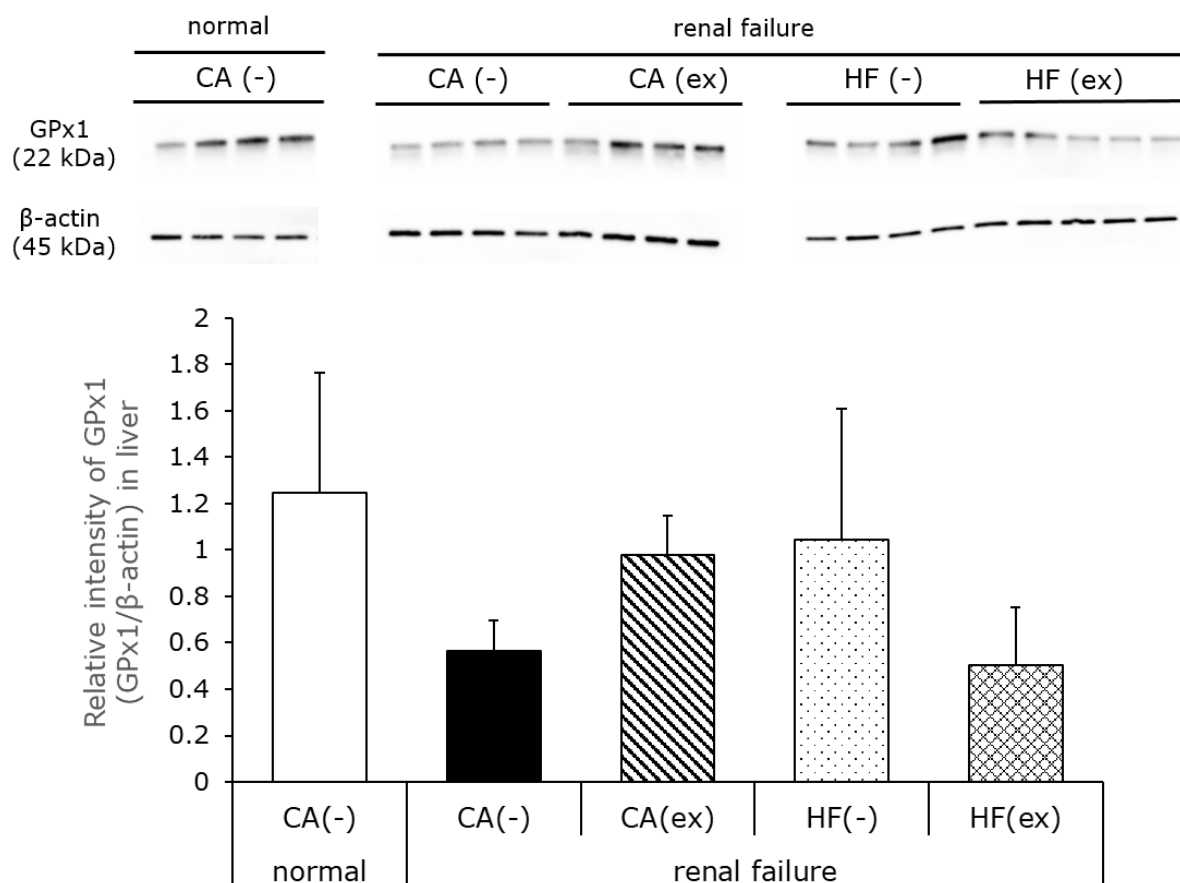


Fig. 2-8 Relative hepatic GPx1 intensities by western-blotting.

[CA (-) in normal group, CA (-), CA (ex) and HF (-) with renal failure, n = 4; HF (ex) with renal failure, n = 5].

(Namika Miya, *et al. J. Clin. Biochem. Nutr.* **2020**, in press., Fig. 4 より引用)

2-4 考察

DM の重症度の違いによる、つまり異なる病態生理学的状況における運動療法の影響を調べるために、より重い疾病状態を想定して DM と腎不全を併発したモデルを用いて実験を行った。実験期間、実験食および小動物用トレッドミルを用いた運動条件は 1 章と同じ条件を設定し、異なる点として 11 週齢時に VCM を投与することにより薬剤性の腎障害モデルを作製した。また、1 章と同様に有酸素運動の影響の評価として、肝臓および腎臓の組織の抗酸化力や生体内金属元素、セレノプロテイン P (SeP) の mRNA 発現量、および各種の生化学パラメータによる検討を行った。

本実験で、2 型 DM の主要な病態の 1 つである耐糖能異常のモデルは 58%HF 食投与により、また急性の腎障害モデルは VCM の腎毒性量であるとされる 400 mg/kg BW を単回静注することにより作製した。この高用量にて VCM を単回急速静注したラットの腎臓では、HE 染色による組織学的試験により明らかな腎組織の障害が観察されている [69]。すなわち、糸球体および腎尿細管の膨張、腎尿細管上皮細胞の変性や壊死、脱落した細胞塊の尿中への蓄積などであり、VCM によって引き起こされる腎障害は糸球体から尿細管までの広範囲で認められることが示されている [69]。これまでに、複数の研究者から VCM による腎毒性の機構について報告されており、血中から腎臓へ分布し近位尿細管の上皮細胞に蓄積した VCM によって尿細管の再吸収と分泌の機能が不調をきたし、近位尿細管を通過する尿の浸透圧が徐々に増加して障害を発症する機構などが提唱されてきた。しかし、近年では、VCM による腎毒性および腎機能障害はフリーラジカルによる損傷に基づくことが報告されており [66]、特に、腎臓の近位尿細管細胞に集積する体内動態特性を付与されたヘキサメチレンジアミン修飾型 SOD の前投与により、高投与量 VCM の急速投与による腎障害が 50%抑制された事実より、VCM による腎障害の発生には近位尿細管細胞における $O_2^{\cdot-}$ およびフリーラジカルの誘導産生が大きく関与していることが示唆された [70]。さらに、近位尿細管の培養細胞系である LLC-PK1 細胞を用いた詳細な検討から、VCM を作用させるとミトコンドリアに発現している complex I の機能が阻害され、これを起因として細胞にアポトーシスが誘導されることが見出された [71]。すなわち、ミトコンドリアの complex I は電子伝達系に関与する鍵タンパク質であり、これが阻害されるとエネルギー産生系においてアンカップリング反応が惹起されるため、電子が溶存酸素に受け渡されて $O_2^{\cdot-}$ が過剰に発生する。その結果、ミトコンドリア膜電位の脱分極が起り、膜抵抗の破綻によってミトコンドリア内に局在する酵素であるカスパーゼ 9 およびカスパーゼ 3/7 が細胞質へと漏出し、細胞にアポトーシスが誘導される。この一連の現象が、VCM 処理した LLC-PK1 細胞で見出された [71]。VCM 誘導性のアポトーシスが、ミトコンドリア由来の $O_2^{\cdot-}$ 過剰産生に由来することが明らかになったため、さらに詳しく調査された結果、局所で上昇した ROS によってミトコンドリア膜のリン脂質に特有な分子である cardiolipin が過酸化されると、VCM によって誘導される近位尿細管細胞のアポトーシスが生じることが報告された [72]。VCM による腎障害を防ぐには、腎尿細管のミトコンドリア膜を保護する方法が、現在では提唱されている。

有酸素運動はミトコンドリア内の酵素反応を活性化し、電子伝達系のアンカップリング反

応を促進することによってミトコンドリア内で $O_2\cdot^-$ を発生させることはよく知られている。そのため、有酸素運動によって起こりうる腎障害の発生機序との類似性から、今回の実験系では、VCM の高用量急速投与による腎障害モデルを選択した。また、DM の一次予防のためには乳酸閾値レベルの最大酸素摂取量 50~70% の持久性運動が有効で [44]、DM の運動療法では最大酸素摂取量約 70~80% に相当する条件で 20~60 分間の運動を週に 3~5 回実施することが推奨されている [40]。本実験の運動条件は、DM の運動療法の目標強度よりもやや強い、人でいうと最大酸素摂取量約 70~80% に相当する条件 [38] (勾配 0°、運動速度 30 m/分のトレッドミルでの走行運動を、1 日 1 時間、週 6 日間、10 週間) を負荷させた。したがって、VCM による腎障害を有する動物個体で、上記の条件設定で有酸素運動を実施すれば、ミトコンドリアからの過剰な $O_2\cdot^-$ 産生とそれに伴うミトコンドリア膜の過酸化反応により、腎臓の尿細管細胞や腎組織がより大きなダメージを受けると予測される。

実験結果として、まず、VCM を投与した腎障害モデルの評価において、ノーマル群と比較して腎臓重量の増加および腎機能の指標となる BUN の上昇が認められた (Fig. 2-2、Table 2-2)。腎障害モデルを作製するために本研究で投与した量と同じ VCM 400 mg/kg BW をラットに単回静注した実験において、BUN および腎臓重量がノーマル群と比較して顕著な増加を示し、組織像の観察では尿細管の拡張と管腔内に円柱および尿細管上皮の変性・壊死を伴う腎組織障害が認められたという報告や [73]、VCM 350 mg/kg BW をラットに 1 日 2 回 4 日間投与した実験において、腎臓重量の増加と BUN の上昇を示し、腎障害が認められたという報告がある [74]。これらの報告と今回示された腎臓重量の増加および BUN の上昇という結果は一致しており、今回作製した VCM を投与した腎障害モデルは、腎機能が低下した腎障害状態であると評価した。

一般的特性における有酸素運動の効果をみると、腎障害のある CA 群、HF 群ともに体重および内臓脂肪は運動により減少した (Table 2-1)。これらの減少は特に HF 群で顕著であり、運動群では運動や消化管ホルモン、酸化ストレス反応による摂食量の減少が起因していると考えられる。また、腎障害のある HF (ex) 群では、腎臓重量は有意に減少した (Fig. 2-2)。腎障害と DM が併発した状態において、激しい運動療法は酸化ストレスの亢進によって腎臓により負荷をかけていることが示唆された。同様に、腎障害群では腎機能を反映する BUN と CRE は上昇していた (Table 2-2)。さらに、運動負荷によりノーマル群と比較して BUN は HF 群で、CRE は CA 群および HF 群で上昇しており、これは腎障害と DM の併発した状態において、強度の強い運動は腎機能をさらに増悪させることを示している。

一方で、血漿中インスリン値は腎障害のある HF (-) 群で最も高い値を示し、HF 群では特に、ノーマル群と比べて、有酸素運動により有意に低下することがわかった (Fig. 2-4)。腎障害がある耐糖能異常状態においても運動はインスリン抵抗性状態を改善することが示唆された。

乳酸は激しい運動後の筋肉内で嫌気呼吸によってグリコーゲンが解糖系を経て分解されて生成される。本実験の CA 群および HF 群でみられた血中乳酸値の有意な低下は、腎障害がある状態においても生体内の乳酸の利用効率が上昇することを示した (Fig. 2-3)。加えて、腎障害と DM が併発した状態において、有酸素運動は脂質代謝に関連する T-cho および TG を減

少させたが、これらの血漿中の脂質代謝パラメータの減少は軽微であった (Table 2-2)。

有酸素運動と DM 治療が関連することはこれまで述べてきたとおりであるが、運動によって血中および膵臓中の Zn が増加することや [23]、肝臓中の元素分布が変動する [24] といった報告はあるが、今回の結果からは、運動群と非運動群で血漿中および組織中に有意な変動はほとんどみられなかった (Table 2-3)。腎障害のある腎臓中で Ca は増加し、抗酸化酵素に関係する Cu と Se は減少する傾向であった (Table 2-3 (C))。

有酸素運動は組織の酸化ストレスを上昇させ、 $O_2^{\cdot-}$ から細胞や組織、臓器を保護する SOD などの抗酸化酵素を誘導する [62]。今回、肝臓および腎臓の組織液中で人工的な $O_2^{\cdot-}$ 発生量の測定を行って評価したところ、有酸素運動は肝臓の抗酸化力を低下させ、一方では腎臓の抗酸化力を増加させた (Fig. 2-6 (A, B))。急性運動は $O_2^{\cdot-}$ といった ROS を増加させ、一般的に酸化的ダメージや炎症を惹起するとされている。それゆえ非運動群に対して運動群では、肝臓の酸化ストレスが増加したと考えられる (Fig. 2-6 (A))。一方、腎臓では、腎障害を併発した耐糖能異常の状態において、有酸素運動は腎臓の酸化ストレスに対して腎臓機能を維持させる方向に働いたと考えられる (Fig. 2-6 (B))。これらの結果は、有酸素運動が ROS の産生を介した SOD や GPx といった抗酸化酵素の誘導に関与している可能性があることを示している。しかしながら、今回は測定項目の限界から、肝臓や腎臓の SOD および GPx1 の発現量ならびに酵素活性については測定できていない。今後、特に、腎臓中の抗酸化酵素に関しては詳細な検討を実施する必要がある。

ヘパトカインである SeP は肝臓由来の分泌タンパク質であり、セレノシステインとして Se を各末梢組織に輸送する働きを持ち、末梢組織の GPx1 活性を亢進させ酸化ストレスから組織を保護する働きを有する。しかし、その抗酸化活性が SeP の過剰発現や分泌で過度になると、DM 治療の妨げや運動抵抗性を引き起こすことにつながる。運動による肝臓中の SeP 発現への作用機構ははっきりと分かっていないが、今回の結果より、SeP の増加は運動誘発性酸化ストレスに応答して引き起こされる可能性がある。本実験で、腎障害とさらなる有酸素運動が CA 群および HF 群における肝臓中 SeP を誘導すること、そしてその変動は CA 群で顕著であることが明らかとなった (Fig. 2-7)。これは、腎障害の発症によって、腎臓が抗酸化システムを誘導する Se といった抗酸化補因子を必要とし、腎臓へ Se を輸送する肝臓中の SeP を増加させたためであると考えられる。実際に、腎臓中の Se は腎臓のダメージによって大きく減少した (Table 2-3 (C))。これまでに SeP の受容体は骨格筋に多く存在する LRP1 であることが分かっており、SeP は細胞表面上の LRP1 に結合することで細胞内に取り込まれ、その抗酸化力が発揮される [28, 29]。

一方で、腎臓においては、SeP は正常腎において糸球体濾過を受けた後に、腎近位尿細管に発現しているメガリン受容体に結合してエンドサイトーシスによって取り込まれることが報告されている [75]。SeP の分子量は約 50,000 であるが、その分子構造と電荷的特性を持たない特徴から、循環血中より糸球体濾過を受けることが可能とされている。そのため、糸球体濾過された SeP が、尿細管管腔からメガリン受容体を介して近位尿細管細胞へと取り込まれて、腎臓において SeP が抗酸化作用を示すことは十分に考えられる。

また、肝臓中の GPx1 について測定したところ、腎障害に伴い肝臓中 GPx1 発現は低下することがわかった (Fig. 2-8)。これは、上記の腎障害に伴う肝臓中 SeP の発現誘導と併せて考えると、両者が必要とするセレノシステインの供給バランスの変動によるものと推測される。有酸素運動は末梢組織の GPx1 を誘導することは報告されているが、今回の測定結果からは、腎障害に伴って肝臓中 GPx1 は減少し、運動によって大きく回復することは見出されず、肝臓中 GPx1 の変動は肝臓の酸化ストレスの結果と一致していた (Fig. 2-6 (A))。

結論として、腎障害と DM の併発した状態では、継続的な有酸素運動の有益な効果としてインスリン感受性の改善、乳酸の利用効率の上昇、内臓脂肪量の減少、脂質代謝の改善がみられた。一方で、有酸素運動の負の効果としては、有益な効果の代償として腎臓により負担をかけていることがわかった。それゆえ、すでに低下している腎臓の機能を保護する観点から、運動強度の強い有酸素運動は避け、患者の病態に応じた運動条件へと厳密に調整した強度で運動療法を行うべきであることが明らかとなった。

加えて、有酸素運動と同時に、DM 状態に置かれた腎臓の保護に有効であると報告されているビタミン D 摂取などの栄養療法を取り入れる必要があることが示唆された [76]。

また、肝臓中の SeP については、腎障害を併発した DM 状態でも有酸素運動により発現が上昇することを初めて見出し、腎臓の抗酸化能を上昇させることに働くことが明らかとなった。

総 括

DMは食習慣、運動不足、ストレス、遺伝などを原因とし、高血糖状態に至る代謝疾患である。全世界におけるDM有病者数は急増しており、DMを発症した成人のうち半数以上は未だ適切な治療が開始できておらず、20～64歳の働き盛りの世代のDM人口は3.5億人以上に上っている状況である。また、日本においても、厚生労働省の「平成29年患者調査の概況」では、DM患者数は平成27年の調査から12.3万人増加し、過去最高の328.9万人となったことが発表されており、DM発症の予防、抑制が今後の重要な課題であることがわかる[77]。病態の進行を抑制し、合併症の発症を阻止するためにDMの治療として食事療法、運動療法、薬物療法が実施されている。その中で、近年、健康維持や生活習慣病予防、健康寿命の延伸のために実施される運動療法の有酸素運動に注目した。

運動療法是食事療法や薬物療法を補完できる治療方法であり、適切な負荷の運動を行うことは、生体にとって好ましい反応がでると想像できる。つまり、生体の健康状態によってDMの治療としての運動療法が生体にどのような影響を与えるのか、また、有益な効果と負の影響について詳細に研究し解明することは、患者個人の病態の重症度に対応した今後の的確なDMの治療方法の選択につながると考える。

また、運動は、生体内に一定の濃度で存在する微量金属元素と深く関わっており、DMと運動に関わる肝臓分泌性のタンパク質としてSe含有のSePが注目されている。SePは必須微量元素のSeを多く含み、生体内の抗酸化作用と各末梢組織へのSe運搬作用を担っている。SePについて、その働きや様々な組織への影響についての研究はなされているが、SePとDMの運動療法との関連についての報告はない。そこでDMと運動療法がSePに及ぼす影響について明らかにすることで、SePがDMや運動療法の評価およびバイオマーカーの候補になり得る可能性が考えられる。

そこで、本論文では、DM治療における食事療法、運動療法、および薬物療法をチーム医療として実践する際に想定される多職種連携型医療を背景として、有酸素運動による効果がDMの病態および治療にどのような影響を及ぼすのかを基礎的に検討した。その中で、2型DMの予防と合併症に多面的な改善効果を有するとされる有酸素運動は、治療においてどのような有益な効果を示し、一方で改善や達成できないものが何かを明らかにすること、そしてDMの重症度の違いによる運動療法の効果を評価することを目的とした。

第1章では、健常動物とDMを想定した耐糖能異常モデルで、継続的な有酸素運動が生体内金属元素やSeP発現ならびに各種生体内のパラメータに及ぼす影響を比較検討した。続いて、第2章では、病態の重症度による運動療法の効果について、第1章の結果をふまえ、より重い疾病状態を想定した腎不全を併発した耐糖能異常モデルにおける運動療法の効果を評価することを目的として実験を行った。

第1章では、ヒトにおける最大酸素摂取量の70～80%に相当する運動強度として、小動物用トレッドミルを用いた30 m/分の走行運動を1日1時間、週6日、10週間実施した。その結果、耐糖能異常の改善および乳酸利用効率の向上が認められる一方で、通常群で有意に増

加した筋肉中グリコーゲンの貯蔵量は耐糖能異常群では変化しなかった。加えて、肝臓中の SeP 発現量は、運動療法により有意な増加を示したが、耐糖能異常群と比べて通常群でより顕著であった。全身の酸化ストレスを亢進させる有酸素運動に対する生体防御の結果の 1 つとして、抗酸化酵素の活性に関わる Se を肝臓から末梢組織へ運搬する役割を担う SeP の発現はより高くなることが示唆された。しかし、通常群と耐糖能異常群を比較すると、同じ強度の有酸素運動による負荷では、筋肉中のグリコーゲン蓄積量や肝臓中 SeP の発現量に対する促進効果は大きく異なった。これは、糖尿病治療に有効な効果を運動療法で得るためには、個体ごとの病態に則した条件や強度を合理的に設定して運動トレーニングを行う必要があることを示唆した。

第 2 章では、より重い疾病状態にもかかわらず第 1 章と同じ強度の運動療法を実施した。その結果、腎障害の病態下においても耐糖能異常の改善および乳酸利用効率の向上は認められ、内臓脂肪量の減少や脂質関連パラメータの改善も認められた。しかし、腎障害により増加した腎臓重量、BUN や CRE は運動によってさらに上昇する傾向であり、有酸素運動によって腎臓の負担はより高まる負の側面も示された。一方、肝臓中の SeP 発現は、腎障害に伴い上昇する傾向を示し、ここに有酸素運動が加わると更に増加した。また、肝臓での抗酸化力は腎障害に伴い低下するのに対して、腎臓での抗酸化力は腎障害に伴い増加傾向を示し、運動療法により更に促進する傾向となった。これらの結果より、腎障害を併発している状態でも運動療法による肝臓中 SeP 発現の誘導効果は認められ、SeP が肝臓から腎臓へと Se を運搬することで腎臓における抗酸化酵素の活性が亢進する一因になる可能性が示された。

以上の結果から、DM の予防・改善のために実施される有酸素運動は、同じ強度のまま継続すると、健康な状態と疾病状態では生体に及ぼす効果の全てが同じというわけではないことが示唆された。全ての患者が同じ強度の負荷ではなく、患者個人に合わせた運動条件に調整する必要があることが明らかになった。加えて、DM 治療に有効な効果を得るためには、運動療法を開始する前にまず、食習慣や栄養状態の改善を行うことで、より有酸素運動の効果は高くなり、有益な作用が大きくなるという知見が得られた。また、DM と腎障害が併発している場合は、すでに低下している腎臓の機能を保護する観点から、通常より強度の強い有酸素運動は避け、患者の病態に応じて厳密に調整した強度で運動療法を行うべきであることが明らかとなった。運動と同時に、腎臓の保護に有効であるとされるビタミン D などの摂取といった栄養療法を取り入れる必要があることも示唆された。

SeP については、有酸素運動で肝臓中での発現が上昇することを初めて見出し、全身的な酸化ストレスのマーカーになる可能性を示唆した。腎障害を併発した DM 状態でも有酸素運動によって SeP の発現は上昇し、Se を肝臓から腎臓へ運搬することで腎臓の抗酸化能を上昇させる機構に働くことが明らかとなった。

参考文献

1. 糖尿病診断基準に関する調査検討委員会. 糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告 (国際標準化対応版). *糖尿病* **2012**, 55(7), 485-504.
2. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas 9th Edition. **2019**.
3. 日本糖尿病学会. “糖尿病治療ガイド 2016-2017” 文光堂 **2016**.
4. 佐々木敏 (監修). “日本人の食事摂取基準 2020 年版” 第一出版. **2019**.
5. Minatsu Kobayashi, Yoshitaka Tsubono, Shizuka Sasazuki, Satoshi Sasaki, Shoichiro Tsugane. Vegetables, fruit and risk of gastric cancer in Japan: a 10-year follow-up of the JPHC Study Cohort I. *Int J Cancer*. **2002**, 102(1), 1935-1940.
6. Taiki Yamaji, Manami Inoue, Shizuka Sasazuki, Motoki Iwasaki, Norie Kurahashi, Taichi Shimazu, Shoichiro Tsugane. Fruit and vegetable consumption and squamous cell carcinoma of the esophagus in Japan: the JPHC study. *Int J Cancer*. **2008**, 123(8), 39-44.
7. Manisha Chandalia, Abhimanyu Garg, Dieter Lutjohann, Klaus von Bergmann, Scott M. Grundy, Linda J. Brinkley. Beneficial effects of high dietary fiber intake in patients with type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med*. **2000**, 342(19), 1392-1398.
8. Hiroki Fujii, Masanori Iwase, Toshiaki Ohkuma, Shinako Ogata-Kaizu, Hitoshi Ide, Yohei Kikuchi, Yasuhiro Idewaki, Tamaki Joudai, Yoichiro Hirakawa, Kazuhiro Uchida, Satoshi Sasaki, Udai Nakamura, Takanari Kitazono. Impact of dietary fiber intake on glycemic control, cardiovascular risk factors and chronic kidney disease in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus: the Fukuoka Diabetes Registry. *Nutr J*. **2013**, 12, 159.
9. Shiro Tanaka, Yukio Yoshimura, Chiemi Kamada, Sachiko Tanaka, Chika Horikawa, Ryota Okumura, Hideki Ito, Yasuo Ohashi, Yasuo Akanuma, Nobuhiro Yamada, Hirohito Sone. Intakes of dietary fiber, vegetables, and fruits and incidence of cardiovascular disease in Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. **2013**, 36(12), 3916-3922.
10. 厚生労働省. 健康づくりのための身体活動基準 2013. **2013**.
11. 日本糖尿病学会. “糖尿病専門医研修治療ガイドブック” 診断と治療社 **2017**.
12. Normand G. Boulé, Glen P. Kenny, Elizabeth Haddad, George A. Wells, Ronald J. Sigal. Meta-analysis of the effect of structured exercise training on cardiorespiratory fitness in Type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*. **2003**, 46, 1071-1081.

13. Claude Bouchard, Tuomo Rankinen, James A. Timmons. Genomics and genetics in the biology of adaptation to exercise. *Compr Physiol.* **2011**; 1(3), 1603-1648.
14. Natalie A. Stephens, Lauren M. Sparks. Resistance to the beneficial effects of exercise in type 2 diabetes: are some individuals programmed to fail? *J Clin Endocrinol Metab.* **2015**, 100, 43-52.
15. Edmund Cauza, Ursula Hanusch-Enserer, Barbara Strasser, Bernhard Ludvik, Sylvia Metz-Schimmerl, Giovanni Pacini, Oswald Wagner, Petra Georg, Rudolf Prager, Karam Kostner, Attila Dunky, Paul Haber. The relative benefits of endurance and strength training on the metabolic factors and muscle function of people with type 2 diabetes mellitus. *Arch Phys Med Rehabil.* **2002**, 25, 2335-2341.
16. Darcy J. Cuff, Graydon S. Meneilly, Alan Martin, Andrew Ignaszewski, Hugh D. Tildesley, Jiri J. Frohlich. Effective exercise modality to reduce insulin resistance in women with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* **2003**, 26(11), 2977-2982.
17. Tatsuya Hayashi, Michael F. Hirshman, Emily J. Kurth, William W. Winder, Laurie J. Goodyear. Evidence for 5'AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport. *Diabetes.* **1998**, 47, 1369-1373.
18. Matthew S. Hickey, Julie O. Carey, John L. Azevedo Jr., Joseph A. Houmard, Walter J. Pories, Richard G. Israel, G. Lynis Dohm. Skeletal muscle fiber composition is related to adiposity and in vitro glucose transport rate in humans. *Am J Physiol.* **1995**, 268(3 Pt1), E453-E457.
19. Tae Ho Kim, Hee-Jin Hwang, Sang-Hwan Kim. Relationship between serum ferritin levels and sarcopenia in Korean females aged 60 years and older using the fourth Korea national health and nutrition examination survey (KNHANES IV-2, 3), 2008–2009. *PLoS One.* **2014**, 9: e90105.
20. Yuki Kokubo, Yukari Kawano, Kako Mori, Yuko Hasegawa, Mekata, Sakuko Ishizaki. Relationship between iron status and daily protein intakes in female collegiate rhythmic gymnasts. *J Phys Fitness Sports Med.* **2010**, 59, 475-484.
21. 樋口満. “スポーツ現場に生かす運動生理・生化学” 市村出版. **2014**, 132-141.
22. 鈴木敬一郎. “活性酸素の本当の姿” 有限会社ナップ. **2014**, 24-30.
23. Juraiporn Somboonwong, Supitchaya Traisaeng, Sompol Saganrungsirikul. Moderate-intensity exercise training elevates serum and pancreatic zinc levels and pancreatic ZnT8 expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci.* **2015**, 139, 46-51.
24. Mursel Bicer, Mohammed N. Akil, Abdulkerim K. Baltaci, Rasim Mogulkoc, Abdullah Sivrikaya,

- Harun Akkus. Effect of melatonin on element distribution in the liver tissue of diabetic rats subjected to forced exercise. *Bratisl Lek Listy*. **2015**, 116, 119-123.
25. Yoshiro Tsuji, Noriyuki Suzuki, Kazuo T. Suzuki, Yasumitsu Ogura. Selenium metabolism in rats with long-term injection of Se-methylselenocysteine using enriched stable isotopes. *J Toxicol Sci*. **2009**, 34(2), 191-200.
26. Yoshiro Saito. Function of selenoprotein P and relation to disease—Possibility as a disease biomarker. *Seikagaku*. **2019**, 91(5), 686-691.
27. Yoshiro Saito. Selenoprotein P as an *in vivo* redox regulator: disorders related to its deficiency and excess. *J Clin Biochem Nutr*. **2020**, 66(1), 1-7.
28. Holger Steinbrenner, Holger Steinbrenner, Esra Bilgic, Holger Steinbrenner, Esra Bilgic, Lirija Alili, Helmut Sies, Peter Brenneisen. Selenoprotein P protects endothelial cells from oxidative damage by stimulation of glutathione peroxidase expression and activity. *Free Radic Res*. **2006**, 40(9), 936-943.
29. Hirofumi Misu, Toshinari Takamura, Hiroaki Takayama, Hiroto Hayashi, Naoto Matsuzawa-Nagata, Seiichiro Kurita, Kazuhide Ishikura, Hitoshi Ando, Yumie Takeshita, Tsuguhito Ota, Masaru Sakurai, Tatsuya Yamashita, Eishiro Mizukoshi, Taro Yamashita, Masao Honda, Ken-ichi Miyamoto, Tetsuya Kubota, Naoto Kubota, Takashi Kadowaki, Han-Jong Kim, In-kyu Lee, Yasuhiko Minokoshi, Yoshiro Saito, Kazuhiko Takahashi, Yoshihiro Yamada, Nobuyuki Takakura, Shuichi Kaneko. A liver-derived secretory protein, selenoprotein P, causes insulin resistance. *Cell Metab*. **2010**, 12, 483-495.
30. Hae Yoon Choi, Soon Young Hwang, Chang Hee Lee, Ho Cheol Hong, Sae Jeong Yang, Hye Jin Yoo, Ji A Seo, Sin Gon Kim, Nan Hee Kim, Sei Hyun Baik, Dong Seop Choi, and Kyung Mook Choi. Increased selenoprotein P levels in subjects with visceral obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes Metab*. **2013**, 37, 63-71.
31. Kazuhide Ishikura, Hirofumi Misu, Masafumi Kumazaki, Hiroaki Takayama, Naoto Matsuzawa-Nagata, Natsumi Tajima, Keita Chikamoto, Fei Lan, Hitoshi Ando, Tsuguhito Ota, Masaru Sakurai, Yumie Takeshita, Kenichiro Kato, Akio Fujimura, Ken-ichi Miyamoto, Yoshiro Saito, Satomi Kameo, Yasuo Okamoto, Yoh Takuwa, Kazuhiko Takahashi, Hiroyasu Kidoya, Nobuyuki Takakura, Shuichi Kaneko, Toshinari Takamura. Selenoprotein P as a diabetes-associated hepatokine that impairs angiogenesis by inducing VEGF resistance in vascular endothelial cells. *Diabetologia*. **2014**, 57(9), 1968-1976.

32. Hirofumi Misu, Hiroaki Takayama, Yoshiro Saito, Yuichiro Mita, Akihiro Kikuchi, Kiyo-aki Ishii, Keita Chikamoto, Takehiro Kanamori, Natsumi Tajima, Fei Lan, Yumie Takeshita, Masao Honda, Mutsumi Tanaka, Seiji Kato, Naoto Matsuyama, Yuya Yoshioka, Kaito Iwayama, Kumpei Tokuyama, Nobuhiko Akazawa, Seiji Maeda, Kazuhiro Takekoshi, Seiichi Matsugo, Noriko Noguchi, Shuichi Kaneko, Toshinari Takamura. Deficiency of the hepatokine selenoprotein P increases responsiveness to exercise in mice through upregulation of reactive oxygen species and AMP-activated protein kinase in muscle. *Nature Med.* **2017**, 23, 508-516.
33. Hirofumi Misu, Toshinari Takamura, Naoto Matsuzawa, Akiko Shimizu, Tsuguhito Ota, Masaru Sakurai, Hitoshi Ando, Kuniaki Arai, Tatsuya Yamashita, Masao Honda, Taro Yamashita, Shuichi Kaneko. Genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately upregulated with fasting hyperglycaemia in livers of patients with type 2 diabetes. *Diabetologia.* **2007**, 50(2), 268-277.
34. Toshinari Takamura, Masaru Sakurai, Tsuguhito Ota, Hitoshi Ando, Masao Honda, Shuichi Kaneko. Genes for systemic vascular complications are differentially expressed in the livers of type 2 diabetic patients. *Diabetologia.* **2004**, 47(4), 638-647.
35. Eric S. Nylen, Shruti M. Gandhi, Raya Kheirbek, John P. Kokkinos. Enhanced fitness and renal function in type 2 diabetes. *Diabet Med.* **2015**, 32, 1342-1345.
36. Dominique Hansen, Paul Dendale, Karin Coninx, Luc Vanhees, Massimo F. Piepoli, Josef Niebauer, Veronique Cornelissen, Roberto Pedretti, Eva Geurts, Gustavo R Ruiz, Ugo Corrà, Jean-Paul Schmid, Eugenio Greco, Constantinos H. Davos, Frank Edelman, Ana Abreu, Bernhard Rauch, Marco Ambrosetti, Simona S Braga, Olga Barna, Paul Beckers, Maurizio Bussotti, Robert Fagard, Pompilio Faggiano, Esteban Garcia-Porrero, Evangelia Kouidi, Michel Lamotte, Daniel Neunhäuserer, Rona Reibis, Martijn A Spruit, Christoph Stettler, Tim Takken, Cajsja Tonoli, Carlo Vigorito, Heinz Völler, Patrick Doherty. The European association of preventive cardiology exercise prescription in everyday practice and rehabilitative training (EXPERT) tool: A digital training and decision support system for optimized exercise prescription in cardiovascular disease. Concept, definitions and construction methodology. *Eur J Prev Cardiol.* **2017**, 24, 1017-1031.
37. Zhenzhen Qiu, Kai Zheng, Haoxiang Zhang, Ji Feng, Lizhi Wang, Hao Zhou. Physical exercise and patients with chronic renal failure: A meta-analysis. *Biomed Res Int.* **2017**, 2017, 7191826.
38. Thomas J. Wilkinson, Natalie Shur, Alice C Smith. "Exercise as medicine" in chronic kidney disease. *Scand J Med Sci Sports.* **2016**, 26, 985-988.

39. Daniel Umpierre, Paula A. B. Ribeiro, Caroline K. Kramer, Cristiane B. Leitão, Alessandra T. N. Zucatti, Mirela J. Azevedo, Jorge L. Gross, Jorge P. Ribeiro, Beatriz D. Schaan. Physical activity advice only or structured exercise training and association with HbA(1c) levels in type 2 diabetes a systematic review and meta-analysis. *JAMA*, **2011**, 305, 1790-1799.
40. 日本糖尿病学会. “科学的根拠に基づく糖尿病診療ガイドライン 2013” 南江堂 **2013**, 43.
41. Shingo Takatori, Yoshito Zamami, Narumi Hashikawa- Hobara, Hiromu Kawasaki. Insulin resistance– induced hypertension and perivascular nerves–an approach to elucidate the mechanisms involved. *Folia Pharmacol. Jpn.* **2012**, 139, 70-74.
42. Miriam B. Vos, Michael I. Goran. Sugar, Sugar . . . Not So Sweet for the Liver. *Gastroenterology*. **2017**, 153(3), 642-645.
43. Elena Bravo, Simonetta Palleschi, Patricia Aspichueta, Xabier Buqué, Barbara Rossi, Ainara Cano, Mariarosaria Napolitano, Begoña Ochoa, Kathleen M. Botham. High fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in rats is associated with hyperhomocysteinemia caused by down regulation of the transsulphuration pathway. *Lipids Health and Disease*. **2011**, 10, 60.
44. Kentaro Kawanaka, Keiichi Koshinaka, Akiko Sano. Does high intensity intermittent exercise increase insulin sensitivity in epitrochlearis muscles of fasted rats? *Descente Sports Sci.* **2006**, 27, 23-31.
45. Raymond E. Shepherd, Philip D. Gollnick. Oxygen uptake of rats at different work intensities. *Pfluegers Arch.* **1976**, 362, 219-222.
46. Kimber L. Stanhope, Jean Marc Schwarz, Nancy L. Keim, Steven C. Griffen, Andrew A. Bremer, James L. Graham, Bonnie Hatcher, Chad L. Cox, Artem Dyachenko, Wei Zhang, John P. McGahan, Anthony Seibert, Ronald M. Krauss, Sally Chiu, Ernst J. Schaefer, Masumi Ai, Seiko Otokozawa, Katsuyuki Nakajima, Takamitsu Nakano, Carine Beysen, Marc K. Hellerstein, Lars Berglund, Peter J. Havel. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increase visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Invest.* **2009**, 119(5), 1322-1334.
47. Shin-ya Ueda, Takahiro Yoshikawa, Yoshihiro Katsura, Tatsuya Usui, Hayato Nakao Shigeo Fujimoto. Changes in gut hormone levels and negative energy balance during aerobic exercise in obese young males. *J Endocrinol.* **2009**, 201(1), 151-159.
48. Ricardo Vinícius Ledesma Contarteze, Fúlvia De Barros Manchado, Claudio Alexandre Gobatto,

- Maria Alice Rostom De Mello. Stress biomarkers in rats submitted to swimming and treadmill running exercises. *Comp Biochem Physiol.* **2008**, 151,415-422.
49. Steven K. Baker, Karl J. A. McCullagh, Arend Bonen. Training intensity-dependent and tissue-specific increases in lactate uptake and MCT-1 in heart and muscle. *J Appl Physiol.* **1998**, 84, 987-994.
 50. Taisuke Enoki, Yuko Yoshida, Hideo Hatta, Arend Bonen. A. Exercise training alleviates MCT1 and MCT4 reductions in heart and skeletal muscles of STZ-induced diabetic rats. *J Appl Physiol.* **2003**, 94, 2433-2438.
 51. William W. Winder, Burton F. Holmes, Dustin S. Rubink, Eva B. Vedel Jensen, May M. Chen, John O. Holloszy. Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle. *J Appl Physiol.* **2000**, 88, 2219-2226.
 52. Norikazu Maeda, Ichiro Shimomura. Obesity and adipocytokine. internal medicine. *Nihon Naika Gakkai Zasshi.* **2011**, 100, 911-916.
 53. Richard L. Bradley, Justin Y. Jeon, Fen-Fen Liu, Eleftheria Maratos-Flier. Voluntary exercise improves insulin sensitivity and adipose tissue inflammation in diet-induced obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **2008**, 295, E586–E594.
 54. Gary F. Merrill, Emily J. Kurth, Grahame Hardie., Winder WW. AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. *Am. J. Physiol.* **1997**, 273, E1107-E1112.
 55. Jonas Bergström, Lars Hermansen, Eric Hultman, Bengt Saltin. Diet, muscle glycogen and physical performance. *Acta Physiol Scand.* **1967**, 71, 140-150.
 56. Hiroaki Eshima, Yoshifumi Tamura, Saori Kakehi, Kyoko Nakamura, Nagomi Kurebayashi, Takashi Murayama, Ryo Kakigi, Takashi Sakurai, Ryuzo Kawamori, Hirotaka Watada. Dysfunction of muscle contraction with impaired intracellular Ca²⁺ handling in skeletal muscle and the effect of exercise training in male *db/db* mice. *J Appl Physiol.* **2019**, 126(1), 170-182.
 57. Gary A. Dudley, William M. Abraham, Ronald L. Terjung, Influence of exercise intensity and duration on biochemical adaptations in skeletal muscle. *J Appl Physiol.* **1982**, 53, 844-850.
 58. Jeffrey S. Greiwe, Robert C. Hickner, Polly A. Hansen, Susan B. Racette, May M. Chen, John O. Holloszy. Effect of endurance exercise training on muscle glycogen accumulation in humans. *J Appl Physiol.* **1999**, 87(1), 222-226.

59. Bünyamin Kaptanoğlu, Günfer Turgut, Osman O. Genc, Yaşar Enli, Ismail Karabulut, Mehmet Zencir, Sabahat Turgut. Effects of acute exercise on the levels of iron, magnesium, and uric acid on liver and spleen tissue. *Trace Elem Res.* **2003**, 91, 173-178.
60. Phuong-Chi T. Pham, Phuong-Mai T. Pham, Son V. Pham, Jeffrey M. Miller and Phuong-Thu T. Pham. Hypomagnesemia in patients with type 2 diabetes. *Clin J Am Soc Nephrol.* **2007**, 2, 366–373.
61. Hong Wang, Allison Kruszewski, David L. Brautigan, Cellular chromium enhances activation of insulin receptor kinase. *Biochemistry.* **2005**, 44, 8167-8175.
62. Syo-ji Oh-ishi. Exercise and oxidative stress. *IRYO.* **2015**, 69(7), 317-324.
63. Shuji Oh-ishi, Jay W. Heinecke, Takako Ookawara. Role of lipid and lipoprotein oxidation. In: Zsolt Radák, editor “Free radicals in exercise and aging” Champaign, IL : Human Kinetics **2000**. 211-258.
64. Zsolt Radák, Takao Kaneko, Shoichi Tahara, Hideko Nakamoto, Hideki Ohno, Mária Sasvári, Csaba Nyakas Sataro Goto. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Bio Med.* **1999**, 26, 1059-63.
65. Hiroshi Koyama, Rizky Abdulah, Chihiro Yamazaki. The role of selenium for cancer chemoprevention and anti-aging. *Biomed Res Trace Elements.* **2009**, 20(1), 19-29.
66. Holger Steinbrenner, Holger Steinbrenner, Esra Bilgic, Holger Steinbrenner, Esra Bilgic, Lirija Alili, Helmut Sies, Peter Brenneisen. Selenoprotein P protects endothelial cells from oxidative damage by stimulation of glutathione peroxidase expression and activity. *Free Radic Res.* **2006**, 40, 936–943.
67. Marcos Maynar, Francisco Llerena, Ignacio Bartolomé, Javier Alves, María-Concepción Robles, Francisco- Javier Grijota, Diego Muñoz. Seric concentrations of copper, chromium, manganese, nickel and selenium in aerobic, anaerobic and mixed professional sportsmen. *J Int Soc Sports Nutr.* **2018**,15, 8.
68. Isao Ishikawa. Exercise-induced acute renal failure. *Nihon Naika Gakkai Zasshi.* **2010**, 99, 970-976.
69. Naoko Hodoshima, Yoshihisa Nakano, Masaaki Izumi, Nayu Mitomi, Yukari Nakamura, Makoto Aoki, Akiko Gyobu, Shigeki Shibasaki, Toru Kurosawa. Protective effect of inactive ingredients against nephrotoxicity of vancomycin hydrochloride in rats. *Drug Metab Pharmacokinet.* **2004**, 19(1), 68-75.
70. Yoshihiro Nishino, Shigekazu Takemura, Yukiko Minamiyama, Kazuhiro Hirohashi, Tetsuya Ogino, Masayasu Inoue, Shigeru Okada, Hiroaki Kinoshita. Targeting superoxide dismutase to renal

- proximal tubule cells attenuates vancomycin-induced nephrotoxicity in rats. *Free Radic Res.* **2003**, 37, 373-379.
71. Yohei Arimura, Takahisa Yano, Megumi Hirano, Yuya Sakamoto, Nobuaki Egashira, Ryozo Oishi. Mitochondrial superoxide production contributes to vancomycin-induced renal tubular cell apoptosis. *Free Radic Biol Med.* **2012**, 52, 1865-1873.
72. Yuya Sakamoto, Takahisa Yano, Yuki Hanada, Aki Takeshita, Fumika Inagaki, Satohiro Masuda, Naoya Matsunaga, Satoru Koyanagi, Shigehiro Ohdo. Vancomycin induces reactive oxygen species-dependent apoptosis via mitochondrial cardiolipin peroxidation in renal tubular epithelial cells. *Eur J Pharmacol.* **2017**, 800, 48-56.
73. Tetsutarou Niizato, Masatoshi Ohnishi, Shoji Nishiyama, Hiroyasu Asaoka. A study on nephrotoxicity of arbekacin and vancomycin in rats. *Jpn J Antibiotics.* **1994**, 47(6), 664-675.
74. John S. Wold, Stanley A. Turnipseed. Toxicology of vancomycin in laboratory animals. *Rev Infect Dis.* **1981**, 3, S224-S229.
75. Gary E. Olson, Virginia P. Winfrey, Kristina E. Hill, Raymond F. Burk. Megalin mediates selenoprotein P uptake by kidney proximal tubule epithelial cells. *J Biol Chem.* **2008**, 283(11), 6854-6860.
76. Nashwa Eltablawy, Hend Ashour, Laila Ahmed Rashed, Wael Mostafa Hamza. Vitamin D protection from rat diabetic nephropathy is partly mediated through Klotho expression and renin-angiotensin inhibition. *Arch Physiol Biochem.* **2018**, 124, 461-467.
77. 厚生労働省. 平成 29 年患者調査の概況. **2017**.

謝 辞

本研究を行うにあたり終始ご指導とご鞭撻を賜りました 京都薬科大学 安井 裕之教授、および神戸女子大学 健康福祉学部 吉川 豊教授に謹んで深謝申し上げます。

ご助言およびご指導をいただきました京都薬科大学 臨床薬理学分野 中田 徹男教授、臨床薬学分野 西口 工司教授に謹んで感謝致します。

本実験にご協力いただきました、京都薬科大学 内藤 行喜助教、ならびに株式会社シクロケムバイオ 近本 啓太博士に感謝申し上げます。

本実験に協力していただいた、神戸女子大学大学院および神戸女子大学 食品機能分析学研究室の学生諸君に謝意を表します。

最後に、暖かく見守り続けてくれた両親に心から感謝いたします。