
疾患モデル動物による糖尿病発生病序の解明

研究課題番号 00548172

昭和56年度科学研究費補助金（一般研究B）研究成果報告書

昭和57年3月

研究代表者 建部高明

（旭川医科大学医学部助教授）

糖尿病という clinical entity のなかには、その発症に関与する素因や環境因子の異なるいくつかの病態が含まれている。近年では、膵島における臓器特異的な自己免疫反応あるいはウィルス感染に対して感受性の高い素因を有する type I と、これと異なる素因の推定される type II とに、分類されている。この分類は発症年齢とは無関係であり、しかも type I は従来 of インスリン依存性糖尿病に、type II はインスリン非依存性糖尿病に、おおむね該当する。

type I の発症に関与する自己免疫機序を示唆する現象としては、type I 患者の血清における抗膵島細胞抗体 (islet cell antibody) の存在や、膵島へのリンパ球の浸潤 (insulinitis) があげられるが、いずれも発症早期に出現することが多い。

さて、旭川医科大学生物化学教室には本邦最大の Chinese hamster の closed colony が存在し、この colony で近交化を目的とした兄妹交配の継続中に、1979 年になって糖尿病動物の自然発症が観察された。そこで、われわれは生物化学教室との連携のもとに糖尿病頻発家系の作出をはかるとともに、耐糖能の推移や膵島の組織像から糖尿病の発症に至る経過を観察した。また代謝バランス、膵島ホルモンの分泌動態、血中脂質、肝内糖質代謝の面から、糖尿病状態の characterization を試みた。以下、これまでの研究成果を報告する。

研究組織

研究代表者 : 建部高明 (旭川医科大学医学部助教授)
研究分担者 : 渡辺清 (旭川医科大学医学部助手)
舟木賢治 (旭川医科大学医学部教務職員)

研究経費

昭和 55 年度	6,900	千円
昭和 56 年度	800	千円
計	7,700	千円

研究発表

口頭発表

- 1) 舟木賢治、他3名：チャイニーズハムスターにおける糖尿病頻発家系の確立、第23回日本糖尿病学会総会、昭和55年7月17日
- 2) 渡辺 清、他5名：自然発症糖尿病チャイニーズハムスター（旭川コロニー）の病態（第1報）、第23回日本糖尿病学会総会、昭和55年7月17日
- 3) 酒井芳紀、他5名：自然発症糖尿病チャイニーズハムスター（旭川コロニー）の病態（第2報）、第23回日本糖尿病学会総会、昭和55年7月17日
- 4) 衛藤雅昭、他5名：自然発症糖尿病チャイニーズハムスター（旭川コロニー）の病態（第3報）、第14回日本糖尿病学会北海道地方会、昭和55年11月8日
- 5) 衛藤雅昭、他4名：自然発症糖尿病チャイニーズハムスター（旭川コロニー）の病態（第4報）、第24回日本糖尿病学会総会、昭和56年4月16日
- 6) 衛藤雅昭、他7名：自然発症糖尿病チャイニーズハムスター（旭川コロニー）の病態（第5報）、第15回日本糖尿病学会北海道地方会、昭和56年11月7日
- 7) 渡辺 清、他2名：The characterization of the diabetic Chinese hamsters in the Asahikawa colony、糖尿病性細小血管症の疫学に関する国際シンポジウム、昭和57年3月20日

研究成果

1. 対象と方法

旭川医科大学生物化学教室および第二内科教室の closed colony で飼育されている Chinese hamster のなかから、研究対象を選択した。これらの動物は標準固型飼料（MF、オリエンタル酵母）で飼育され、また一定時間（AM 5:00 ~ PM 7:00）照明され、 $23 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ に保たれた飼育室あるいは飼育ボックス（日本クレア EBA-2L）のなかで飼育された。

研究方法：

1)、糖尿病発生頻度の人為的制禦システムの確立

最初に糖尿病の発症が確認された subline の F10 の2腹について兄妹交配を開始し、F17までこれを継続した。糖尿病発症の判定にはテストテープを用い、糖尿病

動物の繁殖にあたっては、性周期の安定、妊娠の維持、哺乳の継続などの目的で、適時インスリンを皮下注射した。また、正常動物についても兄妹交配を継続し、糖尿病無発症の *subline* を作出した。

2) 、 *natural history* の観察

月令1～12ヵ月で尿糖陰性の487匹の動物を選択した。これらに体重kg 当り2gのブドウ糖を経口投与し、投与前、投与後30分および120分に眼窩静脈叢から採血し、血漿グルコースおよびIRIを、それぞれブドウ糖酸化法およびradio-immunoassay (RIA) によって測定した。この耐糖能成績から糖尿病型、境界型、正常型の3群に分類した。その後、各群について経時的に尿糖の出現を観察し、また一部の動物については耐糖能を検討した。6ヵ月経過後に屠殺し、膵島を光顕的に観察し、その直径を計測した。

3) 、糖尿病状態の *characterization*

糖尿病状態の *characterization* のためには、月令6～9ヵ月の56匹の動物を選択し、空腹時血糖の程度によって、5群(A～E群)に分別し(表1)、以下の検討を行なった。

A. 代謝バランス；重症糖尿病群(A群)および正常対照群(E群)のなかからそれぞれ8匹を選択し、代謝ケージで飼育しながら、摂餌量、飲水量、尿量、糞量および尿糖排泄量を、5日間にわたり連日測定した。

B. 血漿および膵のインスリンとグルカゴン

上述の5群について血漿インスリンおよびグルカゴンをそれぞれRIAによって測定した。また、屠殺後膵を摘出し、その重量を測定した後に、kenny法によってインスリンおよびグルカゴンを抽出し、それぞれRIAによって測定した。

C. 肝内糖質代謝の各種酵素活性

各群の動物を非麻酔下で開腹し、10秒以内に肝を部分切除した。切除肝の一部を液体窒素中で速やかに凍結し、 -70°C に保存し、glucose-6-phosphatase (G-6-Pase)、glucose-6-phosphate (G-6-P) およびglycogenの測定に供した。切除肝の残余は速やかに $104,000 \times \text{g}$ で60分間遠心し、その上清についてhexokinase (HK)、pyruvate kinase (PK)、fructose-1,6-diphosphatase (F-1,6-D Pase) およびphosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) を測定した。これらの酵素活性および糖質代謝中間

体の測定法の詳細は、表2に示すとおりである。なお、屠殺時には、肝、腎、膵の重量を測定した。

2. 成績

1) 糖尿病頻発 subline における発症頻度

F 11 から F 17 へと兄妹交配が進行するにつれて、糖尿病の発症頻度は 50 % から次第に上昇し、F 15 以降には 80 % 以上と高率である (表 3)。この subline では糖尿病の発症は生後 45 ~ 300 日の間にみられたが、その大部分は成熟期 (日令 120 日) 以前に発症した。発症動物には体毛の汚れ、著明な腹部膨満がみられ、重症のものでは糖尿とともにケトン尿も認められたが、インスリンの投与によって病状が改善した。一方、F 14 に達した正常 subline には、糖尿病の発症はみえていない。

2) 、 natural history

A、耐糖能の推移； closed colony から選別された 487 匹の尿糖陰性動物の O G T T 成績をみると、糖尿病型は 27 ~ 32 % に、境界型は 42 ~ 44 % に、正常型は 25 ~ 31 % にみられたが、各型の間には性比の相違はなかった。1 ~ 2 ヶ月の経過中における糖負荷時の I R I 反応をみると、正常型群では負荷前に 27、負荷後 30 分で 51、120 で $36\mu\text{U}/\text{ml}$ であったが、糖尿病型群の軽症のものや境界型群では糖負荷前後の I R I はより高値を示す傾向がみられた。しかし糖尿病型群の重症のものでは I R I 反応は著しく低下していた。

3 ヶ月以後には耐糖能の増悪するものや改善するもの (remission) など一様でなく、4 ヶ月以後には空腹時血糖 $200\text{mg}/\text{dl}$ 以上の重症例も出現したが、6 ヶ月以後の耐糖能はほぼ固定した。

B、膵島の組織像； 1 ~ 14 ヶ月令の動物の膵島の組織像は、表 4 に示すようである。すなわち、屠殺直前の空腹時血糖によって動物を 3 群に分けた場合、膵島周囲や膵島内の単核細胞の浸潤 (insulitis) (図 1) は、軽症糖尿病群、非糖尿病群の順に多くみられたが、重症糖尿病群にはみられず、その代りこの群では膵島の偽腔形成 (vacuolation) が高率に観察された。しかし、各群における膵島の平均直径には有意の差はなく、また膵外分泌組織には異常所見がみられなかった。

3) 、糖尿病状態の characterization

A、代謝バランス；糖尿病状態が顕性化した重症群では、多食、多飲、多尿といった症状がみられた。すなわち、この群の 1 日当りの摂餌量、飲水量、尿量、糞量およ

び尿糖量は、正常対照群に比べて著しく増加していた。但し、両群の体重には差はなかった（図2）。

B、血漿および膵のインスリンとグルカゴン；空腹時血糖の程度によって分別した5群における血漿インスリンおよびグルカゴン濃度と膵内インスリンおよびグルカゴン含量は、表5に示すとおりである。すなわち、高血糖の重症度に従って、血漿インスリン濃度および膵内インスリン含量は減少し（血糖と血漿インスリン濃度との間には $r = 0.719$ 、 $p < 0.01$ 、血糖と膵インスリン含量との間には $r = 0.855$ 、 $p < 0.01$ の負の相関）、逆に血漿グルカゴン濃度および膵グルカゴン含量は増加した（血糖と血漿グルカゴン濃度との間には $r = 0.551$ 、 $p < 0.01$ 、血糖と膵グルカゴン含量との間には $r = 0.330$ 、 $p < 0.01$ の正の相関）。

C、血漿脂質；各群における血漿脂質濃度は表6に示した。これによると、血漿遊離脂肪酸、中性脂肪、総コレステロールおよび過酸化脂質は、いずれも高血糖の重症度とともに増加しており、これらと血糖との間には正の相関がみられた（それぞれ、 $r = 0.530$ 、 $r = 0.540$ 、 $r = 0.430$ 、 $r = 0.470$ 、いずれも $p < 0.01$ ）。

D、肝における糖質代謝；肝における糖新生系の律速酵素（G-6-Pase、F-1、6-D Pase およびPEPCK）の活性をみると、図3に示すように、G-6-PaseとPEPCKの活性は高血糖の重症度とともに増加する傾向を示した。これに対して、解糖系の律速酵素（HKとPK）は高血糖の重症度とともに減少する傾向を示した（図4）。すなわち、F-1、6-D Paseを除いた4酵素と血糖との間には、いずれも有意の相関がみられた（表7）。

また、糖質代謝中間体のglycogenとG-6-Pについて各群における肝内含量を比較すると、図5のように、重症糖尿病群ではいずれも減少しており、血糖と肝glycogenとの間には $r = 0.654$ 、 $p < 0.01$ で、また血糖と肝G-6-Pとの間には $r = 0.638$ 、 $p < 0.01$ で、ともに負の相関がみられた。

D、各種臓器の重量；屠殺時に摘出した肝、膵、腎の重量を各群間で比較すると、図6のようである。すなわち、重症糖尿病群では体重あたりの肝および腎重量の増加がみられた。

3. 考察

ヒトの疾患に酷似する病態が自然発症する実験動物は、その疾患の発生病理や病態生理を解明するための貴重なモデルとなる。旭川医科大学生物化学教室の closed

colonyで自然発症した糖尿病Chinese hamster はヒト糖尿病の研究に有用な疾患モデル動物であると考えられた。

そこで、この研究の第1の目的を糖尿病の頻発するsubline を作出することにおき、疾患動物間のinbreeding によって近交化を試みた。この作業の過程でF 15 前後に一時的な繁殖力の低下（近交退化）がみられたが、その後繁殖力は再び回復し、現在のところF 17 までinbreeding が進行している。このF 17 における糖尿病の発症頻度は84%と高率である。しかも成熟期以前に発症することから、素因の濃厚な遺伝性が推測される。一般に、近交系の確立はF 20 以降とされているので、今後もinbreeding を継続する予定である。

この研究の第2の目的はChinese hamster に出現する糖尿病の発生機序を明らかにすることである。このためには、糖尿病の顕性化する以前の動物について耐糖能やインスリン分泌能の推移を検討すること、種々の糖尿病状態における膵島の形態像を観察することが必要と考えられた。closed colonyにおける生後1年以内の動物の耐糖能は一様でなく、3ヵ月から6ヵ月の経過では耐糖能の不変なもの、障害が次第に進行するもの、障害が改善するものなどが観察されたが、6ヵ月以後の耐糖能はほぼ固定する傾向がみられた。一部の動物にみられた耐糖能障害の改善傾向（remission）から、糖尿病の発生には、素因の濃厚な遺伝子とともに、何らかの後天的な環境因子が関与するものと推測された。

膵島の組織学的所見のなかで注目されるのは、耐糖能の比較的良好に保持され、発症早期にあると考えられる動物にみられた膵島の細胞浸潤（insulitis）の存在である。このinsulitis はヒトのtype I糖尿病の発症早期においても観察されており、その機序としてはウィルス感染そのもの、あるいはウィルス感染に後続する自己免疫反応が想定されている。そこで、糖尿病hamster と非糖尿病hamster とについて、種々のウィルスに対する血中抗体価を検討してみたが、検索したウィルスに関する限り、両者間に抗体価の差はみられなかった（表8）。

ヒトtype I糖尿病の発症に関連する所見として、発症早期に血中に出現する抗膵島細胞抗体（ICA）が最近注目されている。この疾患モデルにおいてもICAが出現するかどうか、また出現するとすればinsulitis と関連する現象かどうかを明らかにすることは、もっとも魅力的な研究課題である。この課題については糖尿病発症subline の近交化の確立後にとりくむ予定であり、目下ICAの検出法について検討中である。

また、重症糖尿病動物ではむしろ insulinitis は消退し、これに代って膵島細胞、とくに B 細胞の脱落のためと考えられる偽腔形成が認められたが、膵島内における各種細胞分布の変化、脱落細胞の同定も今後の課題として残されている。

この研究の第 3 の目的を病態生理学的な観点から糖尿病状態の性格を明らかにすることにおいた。まず血中の膵島ホルモンを検討した結果、この動物では高血糖の重症度と並行して血漿インスリンは低下し、一方血漿グルカゴンは上昇する傾向がみられた。しかも膵内の両ホルモンの含量と高血糖の重症度との間にも同様の関係が認められた。すなわち、この動物に出現する糖尿病状態は膵島におけるインスリンの産生・分泌低下に起因すると考えられ、また同時にグルカゴンの産生・分泌亢進も随伴すると考えられた。糖尿病の有無を問わず膵島の大きさは不変であることは、その間接的な根拠となるが、直接的な根拠はやはり膵島内の A・B 細胞比に求めなければならない。

高血糖の重症度に並行してみられた血中脂質の増加傾向は、インスリン欠乏と高グルカゴン血症によっておこると考えられた。また、肝内の糖質代謝を検討した結果、糖尿病状態の重症度にしたがって、糖新生系酵素の活性増加と解糖系酵素の活性減少、glycogen と glucose-6-phosphate の減少といった糖質代謝の偏向がみられた。この現象もインスリン依存性糖尿病から由来すると考えられた。

糖尿病動物では屠殺時に肝重量の増加傾向がみられたが、その機序については目下検討中である。また、腎重量の増加も観察されており、この現象はヒト糖尿病の発症早期においても報告されている。しかもヒト糖尿病の主要に死因は血管合併症、とくに本邦では腎症が第 1 の要因とされている。したがって、糖尿病 hamster についても腎病変の機能面からあるいは形態面からの究明が急がれるところである。現在、glomerular volume や tuft size などについて形態計測的に検討しつつあり、その成績を昭和 57 年 3 月 20 日に開催される国際シンポジウムで報告する予定である。

4. 総括

旭川医科大学生物学教室の closed colony において発見された糖尿病 Chinese hamster を対象とし、昭和 55 ~ 56 年度に計画した研究項目に関して、次のような成果がえられた。

1) 、 inbreeding による糖尿病頻発 subline の作出は F 17 に達し、この世

代における糖尿病発症頻度は84%である。一方、糖尿病無発症 subline の近交化はF14に達した。

2)、closed colonyから選択した生後1年以内の尿糖陰性動物の耐糖能は、正常型、糖尿病型、あるいはその中間の型と一様でなく、その後6ヵ月までの耐糖能の経過をみても、不変のもの、次第に増悪するもの、あるいは改善するものがみられた。

3)、軽症糖尿病動物にはしばしばinsulinitisが観察されたが、その発生機序は現時点で不明である。また、重症糖尿病動物ではむしろinsulinitisは消退し、その代りに膵島細胞の脱落のためと考えられる偽腔形成が認められた。

4)、血漿インスリン、グルカゴン濃度および膵インスリン、グルカゴン含量を検討した結果、この動物にみられる糖尿病状態はインスリンの産生・分泌低下に起因し、同時にグルカゴンの産生・分泌亢進が随伴すると考えられた。

5)、高血糖の重症度と並行して血漿中の各種脂質が増加しており、この高脂質血症はインスリン欠乏と高グルカゴン血症によって出現すると推測された。

6)、肝内の糖質代謝に関しては、高血糖の重症度に並行して、糖新生系酵素活性の増加、解糖系酵素活性の減少といった糖質代謝の偏向がみられた。この現象もインスリン依存性糖尿病の反映であると考えられた。

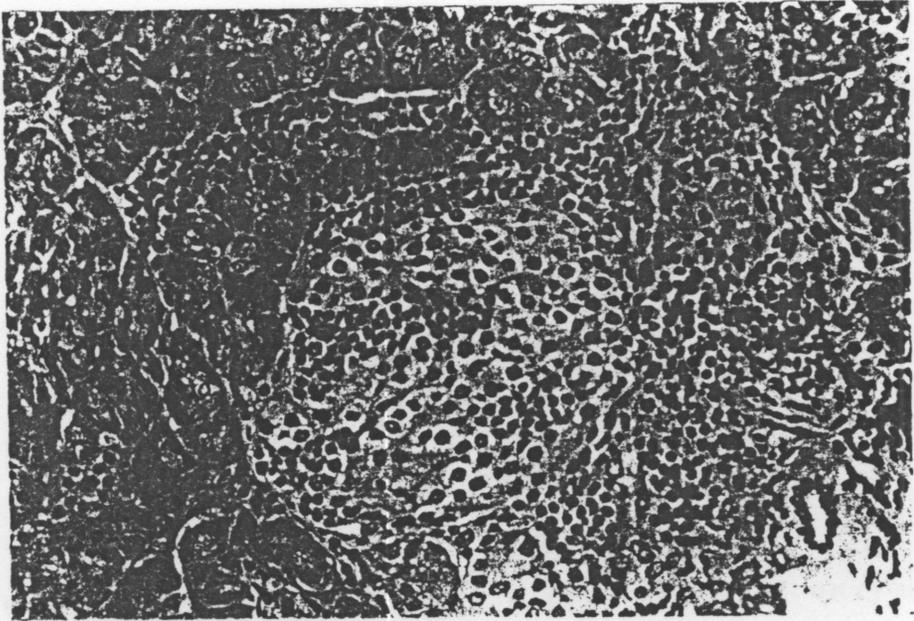


Fig. 1 Mononuclear cell infiltration around or
in the pancreatic islets (insulitis)

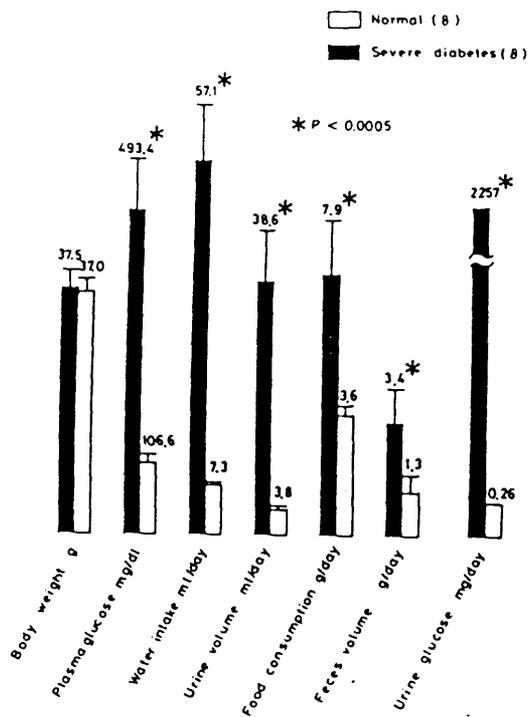


Fig. 2 Metabolic balance in severe diabetic group and normal group
 Values represent Mean \pm SE

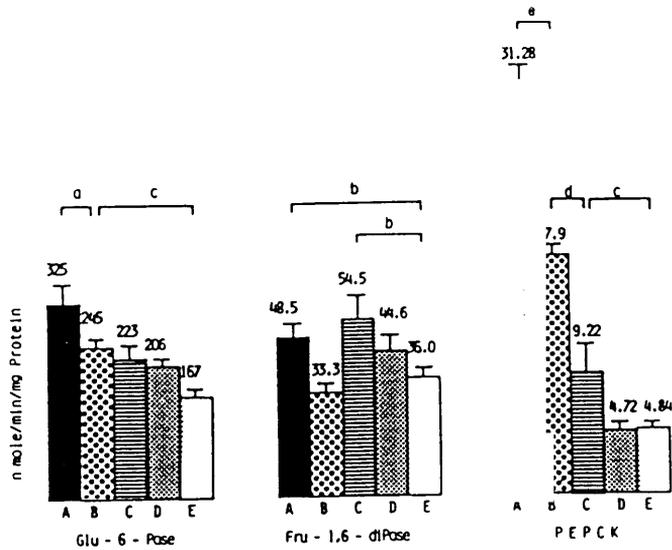


Fig. 3 Activities of hepatic gluconeogenic enzymes in various diabetic groups and normal group Values represent Mean \pm SE

a: $p < 0.05$, b: $p < 0.025$, c: $p < 0.005$,
d: $p < 0.0025$, e: $p < 0.0005$

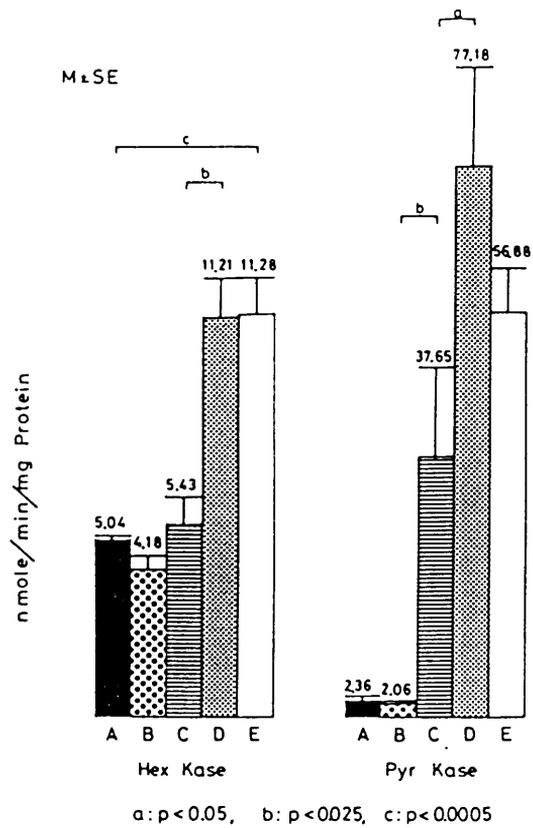


Fig. 4 Activities of hepatic glycolytic enzymes in various diabetic groups and normal group

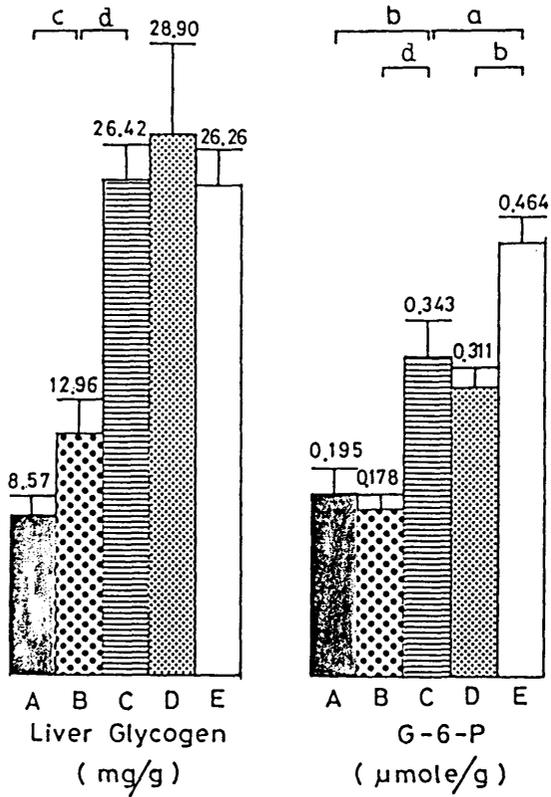


Fig. 5 Liver glycogen and glucose-6-phosphate in various diabetic groups and normal group

Values represent Mean \pm SE

a: $p < 0.05$, b: $p < 0.025$, c: $p < 0.01$,
d: $p < 0.0005$

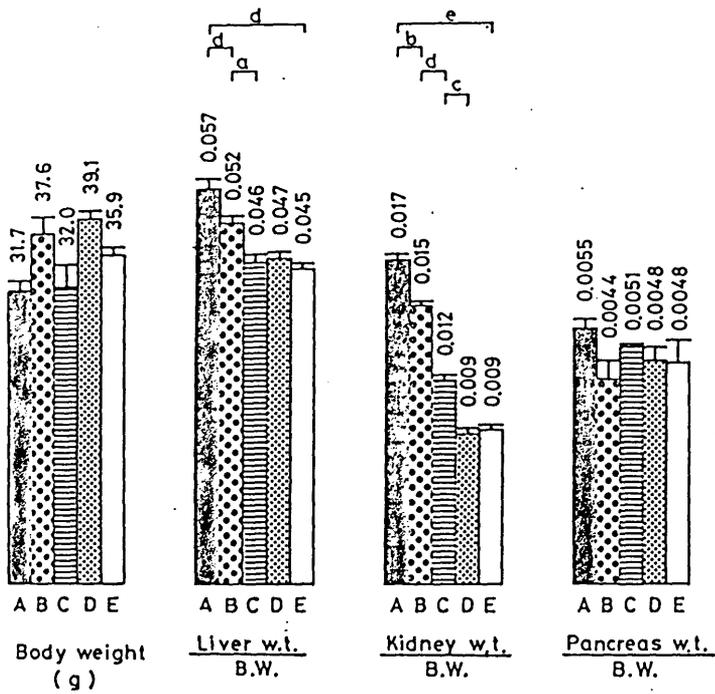


Fig. 6 Body weight and tissue weight in various diabetic groups and normal group

Values represent Mean \pm SE

a: $p < 0.05$, b: $p < 0.025$,

c: $p < 0.0125$, d: $p < 0.0025$,

e: $p < 0.0005$

Table 1. Plasma glucose levels of diabetic and non-diabetic Chinese hamsters

Group	No	Fasted Plasma Glucose(mg/dl)	Non-Fasted Plasma Glucose(mg/dl)
A	13	458 + 12.7	583 + 21.0
B	11	348 + 11.1	488 + 22.6
C	6	173 + 7.8	346 + 38.5
D	6	85 + 8.9	113 + 24.3
E	20	69 + 2.7	93 + 2.9

The value represents Mean \pm S.E

a): $P < 0.005$, b): $P < 0.025$, c): $P < 0.05$.

Table 2. Assay of hepatic enzymes and intermediate products in carbohydrate metabolism

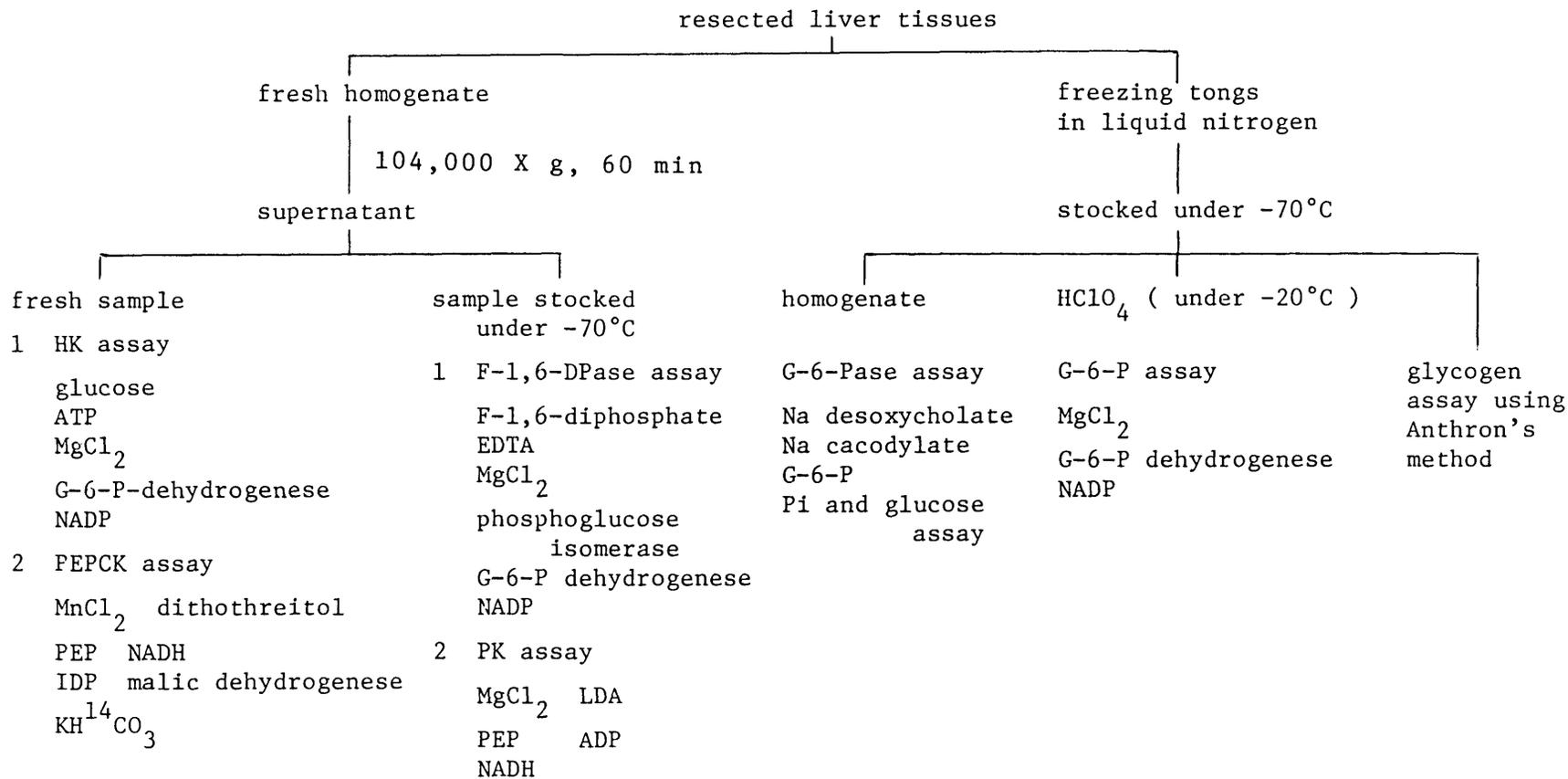


Table 3 . Incidence of diabetics in generations of brother-sister inbreeding

Generation	No. of Mating	No. of Progeny		Incidence of Diabetics (%)		
		Male	Female	Male	Female	Total
F 11	1	2	4	2(100)	1(25.0)	3(50.0)
F 12	4	12	13	8(66.7)	6(46.2)	14(56.0)
F 13	5	6	13	5(83.3)	10(76.9)	15(78.9)
F 14	2	5	3	5(100)	1(33.3)	6(75.0)
F 15	3	3	9	3(100)	7(77.8)	10(83.3)
F 16	5	10	12	10(100)	10(83.3)	20(90.9)
F 17	9	24	14	18(75.0)	14(100)	32(84.2)
Total	29	62	68	51(82.3)	49(72.1)	100(76.9)

Table 4. Incidence of insulinitis and vacuolation in the islets in severe diabetic(I), mild diabetic(II), and non-diabetic(III) Chinese hamsters

Group	No	Fasted Plasma Glucose (mg/dl)	Insulinitis (%)	Vacuolation in the Islets (%)
I	8	> 200	0	88
II	18	120 - 200	39	6
III	86	< 120	12	0
Total	112	49 - 542	15	7

Table 5. Plasma and pancreatic insulin levels, plasma and pancreatic glucagon levels of diabetic and non-diabetic Chinese hamsters

Group	No	Plasma Insulin(μ U/ml)	Pancreatic Insulin(U/g)	Plasma Glucagon(pg/ml)	Pancreatic Glucagon(μ g/g)
A	13	17.6 + 5.4	1.34 + 0.58	95 + 23.7	39.7 + 9.17
B	11	25.5 + 6.6	1.55 + 0.19	103 + 23.0	47.1 + 17.6
C	6	50.0 + 8.7	2.61 + 0.49	77 + 18.8	31.3 + 14.0
D	6	110.0 + 19.9	8.19 + 2.61	64 + 30.0	23.8 + 7.0
E	20	104.0 + 11.8	9.75 + 2.40	64 + 21.4	29.5 + 8.5

The value represents Mean \pm S.E

a): $P < 0.05$, b): $P < 0.01$, c): $P < 0.005$.

Table 6: Plasma lipids levels of diabetic and non-diabetic Chinese hamsters

Group	No	Non-Esterified Fatty Acid (mEq/l)	Triglyceride (mg/dl)	Total Cholesterol (mg/dl)	Lipoperoxide (nmole/ml)
A	13	11.4 + 2.23	1244 + 299	355 + 103	10.9 + 1.25
B	11	5.7 + 0.87	798 + 123	216 + 24	12.1 + 3.24
C	6	3.0 + 0.29	355 + 36	159 + 12	7.2 + 0.57
D	6	2.2 + 0.20	211 + 40	138 + 13	4.6 + 0.25
E	20	2.5 + 0.85	274 + 22	118 + 6	5.9 + 0.29

The value represents Mean ± S.E , a): P<0.05, b): P<0.005.

Table 7. Correlation of hepatic enzymes to plasma glucose level

	r	A#	B#
H K	0.6614*	- 0.0136	12.0707
P K	0.7285*	- 0.1243	72.6030
G-6-Pase	0.5480*	0.9895	537.8196
F-1,6-DPase	0.1637	0.0122	37.4712
PEPCK	0.8698*	0.0453	- 0.2378

*: $P < 0.01$, #: $Y = A X + B$

Table 8. Titer of antibodies to various viruses

Virus	Titer of Antibodies	
	Diabetic	Non-Diabetic
Mouse Hepatitis	-	-
Sendai	-	-
Rat virus	-	-
Coxsackie A9	LT 4	LT 4
Coxsackie B1 - B6	LT 4	LT 4
Reo AB	LT 4	LT 4
Cytomegalo	4	4
Adeno	LT 4	LT 4
Echo 4,7,11	LT 4	LT 4
Rubella	LT 4	LT 4
Measles	8	8

- : negative, LT : less than.