

| | |
|---------|--|
| 氏名(本籍) | 河野 一 弥 (徳島県) |
| 学位の種類 | 獣医学博士 |
| 学位記番号 | 乙第338号 |
| 学位授与の番号 | 学位規則第3条第2項該当 |
| 学位論文の要件 | ヒト糖尿病に類似した病態を示す糖尿病モデルラット“OLETF”の開発 |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 野村靖夫 (副査) 教授 小林好作 教授 二宮博義 教授 石橋政彦 助教授 代田欣二 |

論文内容の要旨

1. 開発の経緯

1982年, Charles River Canada Inc. より Long-Evans 系ラットを導入しクローズドコロニーで飼育繁殖していた中に, 肥満を伴い多食, 多飲, 多尿, 糖尿を呈するものの経過が極めて緩徐で, ヒトのインスリン非依存性糖尿病 (Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus; NIDDM) の病態に類似したラットを発見した。この形質を保持する目的で糖尿と経口ブドウ糖負荷試験 (Oral Glucose Tolerance Test; OGTT) の成績を指標にして選抜交配を重ね, 1991年, 肥満を伴い高血糖を長期間持続し糖尿病性腎症を併発するラット OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) を作出した。また1983年に同じクローズドコロニーの Long-Evans 系ラットの中に多食, 多飲, 多尿, 糖尿を呈し, 急激な体重減少を伴って死亡するヒトのインスリン依存性糖尿病 (Insulin Dependent Diabetes Mellitus; IDDM) の病態に類似した糖尿病ラットを発見し, そこから糖尿を指標に選抜交配を重ね, 糖尿病好発系の LETL ラット (Long-Evans Tokushima Lean) を1989年に近交化した。LETL ラットの病態の特徴は, 生後8から15週齢にかけて突然多食, 多飲, 多尿, 糖尿が発現し, インスリンで治療しない限り2週間以内で死亡するが, 糖尿病発症にはTリンパ球減少症を必ずしも伴わないという点にある。さらに糖尿病を全く発症しないコントロールラットで, 遺伝的にも近縁である LETO (Long-Evans Tokushima Otsuka) ラットを得た。

本論文においては OLETF ラットの病態を遺伝的, 臨床病理学のおよび病理学的に解析し, 本ラットの糖尿病モデル動物としての有用性について明らかにした。

2. 臨床経過とその病理組織像

OLETF 雄ラットは若週齢より肥満を呈し, 25週齢で高インスリン血症, 高血糖を示す糖尿病の発症がほぼ全例にみられた。豚ラ島では発病初期にB細胞が増生・肥大し, 生後40週齢ごろより豚ラ島の萎縮が顕著となった。多食, 多飲, 多尿, 体重減少, 低インスリン血症などの症状がこの豚ラ島の疲弊・萎縮に伴って徐々に発現した。高インスリン血症から低インスリン血症に移行する病像は OLETF ラットの特徴でもあった。この病像と豚ラ島の病理組織学的変化とは非常に密接な関係があった。すなわち豚ラ島が

肥大する増生期では血漿インスリン値が高く、線維化などによって膵ラ島の疲弊・萎縮が進行した病期には逆に低くなっていた。一方、OLETF 雌ラットは生後25週齢では糖尿病および耐糖能障害の発症は認められず、生後40週を過ぎると徐々に血漿グルコース値は上昇し、糖尿病の発症基準を満たすようになり、生後65週齢になると糖尿病が発症した。膵は生後40週齢ごろより雄と同様に膵ラ島の肥大、線維化による膵ラ島の分断・置換が種々の程度でほとんどの個体にみられたが、全く変化が認められない個体もあった。生後60週齢を過ぎる頃より雌では雄と同様に膵ラ島の大きさおよび数の減少を来していたが、概してその病変の拡がり、重症度とも雄に比して軽度であった。

OLETF ラットの膵に認められた膵ラ島の肥大、膵ラ島の線維化、外分泌部の膵炎、膵ラ島周囲炎および膵ラ島近傍のヘモジドリン沈着について OLETF ラットと LETO ラットならびに F344/Ducrj ラットとの交雑試験群の膵組織を用いて糖尿病発症との関連性についてロジスティックモデルに当てはめて解析したところ、膵ラ島の肥大と線維化が糖尿病発症に重要な要因であり、膵ラ島周囲炎、膵炎およびヘモジドリン沈着は糖尿病発症と直接的な関連性のないことが明らかとなった。

3. 糖尿病の発症率

OGTT の成績を基に以下の三つのタイプに分けた。1) 糖尿病 (Diabetes Mellitus; DM) : 血漿グルコースの頂値が300mg/dl以上で、120分値が200mg/dl以上のもの。2) 耐糖能障害 (Impaired Glucose Tolerance; IGT) : 血漿グルコースの頂値と120分値のどちらか一方が糖尿病の基準を満たしているもの。3) 正常 (Normal) : 血漿グルコースの頂値と120分値の両者がともに糖尿病の基準を満たしていないもの。以上の診断基準による F20世代以降における生後25週齢雄の糖尿病発症率は87.8% (341/388)、耐糖能障害が7.2% (28/388)、正常が4.8% (19/388) であった。

一方雌では生後25週齢では発症せず、生後65週齢で糖尿病発症率は33.5% (5/15)、耐糖能障害が20.0% (3/15)、正常が46.7% (7/15) であった。

4. 催糖尿病遺伝子の解析

OLETF ラットの糖尿病発症の遺伝解析をおこなう目的で OLETF ラットと LETO ラットならびに OLETF ラットと血縁関係のない F344/Ducrj ラットとの交雑試験をおこなった結果、催糖尿病遺伝子は雌雄ともに劣性で複数存在し、コントロールラットである LETO もそのいくつかを共有していた。さらに X染色体上にその一つが存在している可能性が示唆された。また OLETF ラットの糖尿病発症と RT1 (ラットの主要組織適合遺伝子複合体) との関連はなかった。

現在、ヒトで NIDDM の発症に遺伝要因が強く関与していることは周知の事実であるが、まだ候補遺伝子を特定するに至っていない。今回 OLETF ラットの X染色体上に催糖尿病遺伝子の一つが存在する可能性が示唆され、このことが OLETF ラット固有の現象なのか、それともヒトの NIDDM と共通したことなのか非常に興味深い、X染色体上の位置とその機能の検討は今後の課題である。

5. 糖尿病発症に関与する性ホルモン

OLETF ラットの糖尿病は雄に多く発症をみるという性差が存在するが、この性差が OLETF ラットの糖尿病発症要因にどのように関わっているのか、精巣あるいは卵巣を摘出した群、さらにそれらの処置後テストステロンを投与した群を設けて調べた。その結果、精巣を摘出した雄では糖尿病や耐糖能障害の発現が抑制あるいは遅延する傾向が、卵巣を摘出した雌では逆に糖尿病が発現した。また、同様の処置を

おこなった OLETF ラットにテストステロンを投与することにより、雌雄 OLETF ラットのどちらにも糖尿病が発症したが、OLETF 雄ラットにエストロジェンを投与すると糖尿病あるいは耐糖能障害どちらも発症しなかった。これらのことから老齢雌における糖尿病の発症には加齢に伴う卵巣からのエストロジェン分泌が減少し、相対的に精巣外からのテストステロン量が増加することで糖尿病が発症するのではないかと考えられた。また、雌雄の OLETF ラットにテストステロンを投与すると糖尿病の発症が認められたが、LETO ラットと F344/Ducrj ラットにテストステロンを投与しても糖尿病は発症しないこと、OLETF ラット、LETO ラット、F344/Ducrj ラットの血漿中のテストステロン濃度に差がみられなかったことなどから、テストステロンは催糖尿病遺伝子の存在下で作用し糖尿病発症に一翼をになっていると考えられた。

6. 糖尿病性腎症

OLETF ラットの糖尿病は緩徐な発症で、しかも長期間にわたって徐々に増悪する特徴をもっているため糖尿病性合併症がみられた。とくに腎症の指標である尿蛋白値は LETO ラットに比較して27週齢より顕著に上昇、47週齢では800mg/dl以上となった。OLETF ラットの早期の腎糸球体病変として23週齢でメサンギウムの拡大と増殖がみられた。LETO ラットの腎糸球体と比較して腎糸球体の肥大も認めた。29週齢で fibrin cap を伴う滲出性病変が少数例みられ、55週齢になると多数認められるようになり、滲出性病変が腎糸球体全体に及びつつあるものもあった。その他、55週齢では結節性病変と腎糸球体の毛細血管が毛細血管瘤様に拡張した像も認めた。またヒトの糖尿病性腎症と比較的特異性が高いと言われている capsular drop もみられた。96週齢ではほとんどの腎糸球体が萎縮硬化を示し、尿細管は萎縮消失したり、PAS 陽性の貯留物のうっ滞などを呈していた。また間質は拡大し炎症性細胞浸潤が伴う、いわゆる終末腎に近い像が認められた。

以上、OLETF ラットは肥満を伴い高インスリン血症から低インスリン血症に移行する特徴を有し、現在社会的問題となっている糖尿病性合併症、とくにヒトの腎症の特徴とされている腎糸球体の滲出性病変や結節性病変が出現したことから、糖尿病の成立機構の研究のみならず、糖尿病性合併症の予防や治療の研究に多いに貢献出来るモデル動物と期待される。さらに遺伝解析においても催糖尿病遺伝子の一つがX染色体上にあることが示唆されたことは今後の NIDDM の遺伝解析に貴重なデータを提供することとなるであろう。

論文審査の結果の要旨

糖尿病は単一疾患ではなく、原因を異にする疾患群であると理解されている。糖尿病の発症には遺伝要因と環境要因が極めて複雑に絡み合っていると考えられ、ヒトの糖尿病により一層近い病態を示す自然発症モデル動物の開発が期待されている。著者らは1982年に Charles River Canada Inc.より導入し、クローズドコロニーで維持していた Long-Evans ラットから、Tリンパ球減少症を伴わずインスリン依存性糖尿病を発症する LETL (Long-Evans Tokushima Lean) ラット、糖尿病の見られない LETO (Long-Evans Tokushima Otsuka) ラットおよび肥満を伴い糖尿病発症後の経過が緩徐で、糖尿病性腎症を併発する OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) ラットを得た。

本論文は、これらの内で特に OLETF ラットについて焦点をあて、これまでに得た知見を述べ、疾患モ

デル動物としての有用性を考察したもので、大要は以下の通りである。

1. 開発の経緯

1982年、Charles River Canada Inc. より Long-Evans ラットを導入し、クローズドコロニーで飼育、繁殖していたところ、肥満を伴い、多食、多飲、多尿、糖尿を呈するものの、経過が極めて緩徐で、ヒトのインスリン非依存性糖尿病類似の病態を示すラットを発見した。糖尿と経口ブドウ糖負荷試験を指標に選抜交配を重ね、1991年までに肥満を伴い、高血糖を長期間持続し、糖尿病性腎症を併発するラットの系統 OLETF を確立した。

2. 臨床経過とその病理組織像

OLETF 雄ラットは若齢時より肥満を呈し、25週齢ではほぼ全例に高インスリン血症と高血糖が発現した。発症初期に膵臓ランゲルハンス島（膵ラ島）はB細胞増生のため肥大したが、40週齢ごろから萎縮が顕著となった。この膵ラ島の疲弊・萎縮の進行につれて多食、多飲、多尿、体重減少、低インスリン血症などの症状が、徐々に発現した。高インスリン血症から低インスリン血症への移行は OLETF ラットの糖尿病の特徴で、膵ラ島が肥大する増生期では血漿インスリン値が高く、膵ラ島の疲弊・萎縮が進行した病期には血漿インスリン値が低くなり、病態と膵ラ島の病理組織学的変化は密接に関係していた。一方、OLETF 雌ラットは、雄と異なり、25週齢では糖尿病および耐糖能障害を示さなかったが、40週齢を過ぎると徐々に血漿グルコース値が上昇し、糖尿病の判定基準を満たすようになり、65週齢になると明かな糖尿病が発現した。膵臓では、40週齢ごろから雄と同様に、膵ラ島の肥大～線維化による膵ラ島の分割・置換に至る変化が種々の程度にみられたが、全く変化が認められない個体もあった。60週齢を過ぎる頃から雌でも雄と同様に膵ラ島の萎縮、数の減少を来したが、病変の広がり、程度とも雄に比して軽度であった。

OLETF ラットの膵ラ島の肥大から線維化にいたる変化、外分泌部の膵炎、膵ラ島周囲炎および膵ラ島近傍のヘモジデリン沈着について OLETF ラットと LETO ラットならびに Fischer 344/Ducrj ラットとの交雑試験群の膵臓組織を用いて糖尿病発症との関連性についてロジスティックモデルに当てはめて解析したところ、膵ラ島の肥大から線維化にいたる変化は糖尿病発症に重要な要因であるが、膵ラ島周囲炎、膵炎および膵ラ島近傍のヘモジデリン沈着は糖尿病発症と直接的関連のないことが明らかとなった。

3. 糖尿病の発症率

経口ブドウ糖負荷試験に基づいて糖尿病（血漿グルコースの頂値が300mg/dl以上で、120分値が200mg/dl以上のもの）、耐糖能障害（血漿グルコースの頂値あるいは120分値のいずれかが糖尿病の判定基準を満たしているもの）、正常個体（血漿グルコースの頂値と120分値のいずれもが糖尿病の判定基準以下のもの）の3つに分類すると、選抜交配第20世代以降の OLETF ラット雄では、25週齢で、糖尿病37.8% (341/388)、耐糖能障害7.2% (28/388)、正常個体4.8% (19/388) であった。一方 OLETF ラット雌は、25週齢では発症せず、65週齢で糖尿病は33.5% (5/15)、耐糖能障害20.0% (3/15)、正常個体46.7% (7/15) であった。

4. 催糖尿病遺伝子

OLETF ラットと LETO ラット、Fischer 344/Ducrj ラットとの交雑試験の結果、OLETF ラットの糖尿病発症とラットの主要組織適合遺伝子複合体は直接関連して居らず、催糖尿病遺伝子は雌雄ともに劣

性で複数存在し、共通の祖先を持つ LETO ラットもそのいくつかを共有しており X 染色体上にその一つが存在する可能性が示唆された。このことが OLETF ラット固有の現象なのか、それともヒトのインスリン非依存性糖尿病と共通したことなのか非常に興味深い、X 染色体上の位置とその機能の検討は今後の課題である。

5. 糖尿病発症と性ホルモン

OLETF ラットの糖尿病は雄に多く、明らかな性差があるが、精巣を摘出した雄では糖尿病や耐糖能障害の発現が抑制されたり、遅延する傾向がみられ、卵巣を摘出した雌には糖尿病が発現した。同様の処置をおこなった OLETF ラットにテストステロンを投与すると雌雄ともに糖尿病が発症したが、雄ラットにエストロジェンを投与した場合には糖尿病も耐糖能障害も発現しなかった。老齢 OLETF ラット雌では、加齢に伴ってエストロジェン分泌が減少し、相対的にテストステロン量が増加し、糖尿病が発症するものと推察された。テストステロンを投与すると OLETF ラットでは雌雄ともに糖尿病の発症が認められたが、LETO ラットと Fischer 344/Ducrj ラットには糖尿病の発症が認められなかった。しかし、OLETF ラット、LETO ラット、Fischer 344/Ducrj ラットの血漿テストステロン濃度に差がみられず、テストステロンは催糖尿病遺伝子の存在下で糖尿病発症要因の一つになっているものと考えられた。

6. 糖尿病性腎症

OLETF ラットの糖尿病は発症が緩徐であること、長期間かけて次第に増悪することが特徴で、尿蛋白値は LETO ラットに比較して 27 週齢より顕著に上昇し、47 週齢では 800mg/dl 以上となった。23 週齢で早期病変とみられるメサンギウム細胞の増殖とメサンギウム領域の拡大が出現し、LETO ラットと比較すると糸球体も肥大していた。29 週齢になると少数にはあるが fibrin cap を伴う滲出性病変が出現し、55 週齢になると fibrin cap が多数認められるようになり、滲出性病変が糸球体全体に及ぶものもあり、結節性病変や糸球体毛細血管の血管瘤様拡張像も認められた。またヒトの糖尿病性腎症に比較的特異性が高いと言われている capsular drop もみられた。96 週齢では殆どの糸球体が萎縮・軟化し、尿細管の萎縮・消失、PAS 陽性物質の鬱滞貯留などが目立った。増幅拡大した間質には炎症性細胞浸潤があり、いわゆる終末腎に近い像となった。

著者はこのように OLETF ラットの糖尿病が、肥満を伴い、高インスリン血症から低インスリン血症に移行する特徴を有し、糖尿病性腎症の特徴特徴とされている糸球体の滲出性病変や結節性病変も出現することから、糖尿病の成立機構の研究のみならず、糖尿病性合併症の予防や治療の研究に多に貢献出来るものと期待しているほか、催糖尿病遺伝子の一つが X 染色体上にあることが示唆されることからヒトのインスリン非依存性糖尿病の遺伝解析にも貴重なデータを提供するモデル動物と考察している。

このような異常を有するモデル動物を長期間維持繁殖し、その特性を明らかにすることは、非常に困難であるにも関わらず、この OLETF ラットは、既に研究者にも供給され始めている。新しいインスリン非依存性糖尿病モデル動物の開発とその特徴の多面的解析は、本モデルを利用した様々な比較医学的研究に端緒を与え、糖尿病学の発展に多大の貢献をなすものと考えられ、博士(獣医学)の学位を授与するに相応しい業績であると評価する。