

アロキサン誘発糖尿病高発症系・低発症系マウスの選抜育種と両系統における膵臓ランゲルハンス島の計量形態学的検討

猪 貴義^{a)}・佐藤勝紀・橋谷かおり

(家畜機能調節学講座)

Received June 15, 1992

Selection of Mouse Strains Showing High and Low-incidences of Alloxan-induced Diabetes and Quantitative Morphological Analysis of Langerhan's Islands in Two Strains

Takayoshi INO^{a)}, Katsunori SATO and Kaori HASHITANI

(Department of Animal Science and Technology)

To produce a disease model for humans, especially an experimental model of diabetes in animals, ICR mice were inbred until the 20th generation by two-way selection to produce high- and low-incidences of alloxan-induced diabetes. Alloxan-induced diabetes is known to be a representative form of experimental diabetes. The results obtained were summarized as follows.

1. The incidence of alloxan-induced diabetes in F_{20} was 98.9% in the high-incidence strain and 0% in the low-incidence strain. Changes in successive generations in the incidence of diabetes were studied. In the high-incidence strain, it was 98.7% in F_{13} and in the low-incidence strain, it reached 0% in F_7 , remaining near that level in later generations. The values of ED_{50} used in this study seemed to reach the selection limit in both strains. Both strains were established as new inbred strains by consecutive full-sib mating, showing a 98.6% inbreeding coefficient at the 20th generation.

2. The blood glucose level in F_{20} was 455mg/dl in the high-incidence strain and 127mg/dl in the low-incidence strain. Changes in successive generations in blood glucose levels were studied. In the high-incidence strain, it was 395mg/dl in F_8 , ranging thereafter between 350 and 400mg/dl, and in the low-incidence strain, it was 128mg/dl in F_{12} , then varying from 120 to 140mg/dl in following generations.

3. In the high and low-incidence strains, quantitative morphological analysis was done in the area of Langerhan's island (islets) in the pancreatic area (100cm²), no. of islets and no. of β cells in an islet. In a non-treated control, any measurements were significantly higher in the low-incidence strain than in the high-incidence strain. Similar trends were observed in the alloxan-treated experiment. These results indicate that the high and low-incidence strains with successive two-way selection toward sensitivity to alloxan have constituted a characteristic feature of quantitative morphological peculiarity in pancreatic tissue.

a) 麻布大学客員教授 (Visiting Professor, Azabu University)

緒 言

医学研究は人道上的立場から、人体実験を禁止している。もしも、ヒト疾患モデル動物が開発され、ヒト疾患モデル動物の病態の解明から、ヒト疾患の原因、発病機構、治療、予防についての研究が可能であるとすれば、ヒト疾患モデル動物の果たす役割は大きい。

本研究は、マウスを用いて、古くから実験的糖尿病として知られているアロキサン(alloxan)誘発糖尿病の高発症系・低発症系の選抜育種の可能性と、分系育種された両系統の糖代謝調節機能の差異を明らかにするために行った。

アロキサン誘発糖尿病はアロキサンの投与によって膵臓のランゲルハンス氏島(以下ラ氏島)の β 細胞が選択的に障害されることによって誘発される代表的な実験的糖尿病として知られている。アロキサン誘発糖尿病ラットの発症率は、投与方法及び栄養条件などの環境要因によって異なるほか⁶⁾、動物の種及び系統によって異なることが知られており^{4,5,8,9)}、その発症に遺伝要因の関与が示唆されている。しかしながら、アロキサン糖尿病発症率を指標として選抜された近交系動物は、現在までのところ、報告されていない。

本研究は、ICR系マウスを選抜基礎集団とし、アロキサン誘発糖尿病高発症系・低発症系への選抜育種を20代まで継続し、両系統が近交系として確立するまでの発症率を調べた。また、選抜世代に伴う、アロキサン投与後の血糖値の変化を調べ、さらに、選抜10代目の両系統を用い、糖代謝の調節に重要な役割を果たしているとみられるラ氏島の個数、膵臓単位面積に占めるラ氏島面積、ラ氏島全細胞に占める β 細胞数について比較検討を行った。

材 料 と 方 法

本研究に使用した選抜基礎無団のマウスは、1980年日本チャールスリバー社より購入したICR(CD-1)系マウスである。選抜基準はED₅₀値(♀47mg/kg, ♂45mg/kg)のアロキサン投与後における7日目の家系発症率を指標として高発症系、低発症系の2方向に選抜を加えた。

選抜開始時においては、選抜基礎集団より高発症率を示した3家系、低発症率を示した3家系を選抜した。選抜1代から3代にかけては、家系を単位として、高発症系では雌、雄とも発症したもの同士を、低発症系では雌、雄とも発症しないもの同士の家系を選抜し、兄妹交配によって継代した。しかし、この方法では、高発症系の3代において繁殖障害を起し、継代することが困難となったため、選抜第4代以降においては、高発症系・低発症系各10家系とし、各家系兄妹4ペアを基本に交配させ、先ず子を生産した後、親に対してアロキサンの投与を行い、高発症系では家系発症率の高い家系の子を選抜し、低発症系では家系発症率の低い家系の子を選抜し、世代を進めた。

アロキサンの投与方法は選抜3代までは、雌、雄ともに90日齢、選抜4代からは、雄は90日齢、雌は第1産の産子を離乳させた120日齢において、アロキサンを0.5%の生理的食塩溶液として、尾静脈に注射した。

糖尿発症の判定は、テストテープ(イーライリイ社製)を用い、アロキサン投与後7日目に陽性を示すものを発症個体とした。また、発症判定の補助手段として血糖値の測定、膵臓における病理学的所見について検討を行った。高発症系と低発症系のラ氏島についての定量学的検討としては、選抜10代目の両系統のマウスを用い、生理的食塩水のみを尾静脈より注入したコントロール区と、アロキサン投与後10日目における投与区の2群について、ラ氏島個数と面積、ラ氏島全細胞に占める β 細胞の割合について両系統間で比較検討した。ラ氏島面積は顕微鏡写真により、膵臓単位面積に占めるラ氏島面積を算出し、 β 細胞数については、

Table 1 Change of incidence in 0 to 20 generations in each selected line

Generation	High incidence line			Low incidence line		
	No. of mice	Affected mice	Incidence (%)	No. of mice	Affected mice	Incidence (%)
0	341	140	41.1	341	140	41.1
1	61	30	49.2	86	29	33.7
2	69	38	55.1	65	17	26.2
3	63	55	87.3	69	18	26.0
4	86	55	63.9	102	21	20.6
5	84	67	79.8	69	6	8.7
6	77	59	76.6	71	1	1.4
7	95	60	63.5	86	0	0.0
8	97	74	76.6	90	0	0.0
9	111	85	76.6	106	0	0.0
10	107	85	79.4	80	0	0.0
11	89	77	86.5	92	1	1.1
12	97	91	93.7	85	0	0.0
13	78	77	98.7	77	0	0.0
14	79	74	93.6	82	0	0.0
15	81	76	93.8	79	0	0.0
16	74	68	91.9	72	1	1.4
17	68	61	89.7	81	0	0.0
18	72	69	95.8	93	1	1.1
19	74	73	98.6	87	0	0.0
20	87	86	98.9	88	0	0.0

光学顕微鏡並びに電子顕微鏡下で測定した。本研究に用いたマウスは、温度 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ 及び14時間点灯、10時間消灯の環境調節室内において飼育され、飼育密度は6週齢まで1ケージ当たり8匹とし、それ以後は実験に使用するまで1ケージ当たり5匹で維持した。飼料はCRF-1（日本チャールスリバー社）を使用し、水と飼料は自由摂取とした。なお、本実験は日本実験動物学会による「動物実験に関する指針」にもとづいて実施された。

結 果

1. 選抜に伴う発症率の変化

アロキサン誘発糖尿病高発症系・低発症系への選抜育種による、世代ごとの発症率を Table 1 に示した。選抜20代における高発症系の発症率は、98.9% (86/87) を示し、低発症系の発症率は、0% (0/88) であった。高発症系の発症率は、選抜3代において87.3%に達した後、70%前後で推移していたものが、選抜9代から再び上昇し、選抜13代においては98.6%に達した。以後、選抜20代に至るまで90~99%で推移した。また、低発症系では、選抜7代において0%に達して以来、選抜11、16及び18代で、各々1例の発症が見られたのを除き、0%を示した。

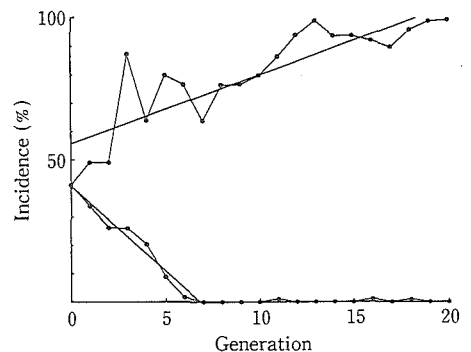


Fig. 1 Two way selection for alloxan-induced diabetes. The fitted regression lines have equations of: Upward, $y = 55.9 + 2.4x$; Downward, $y = 40.8 - 6.0x$.

選抜世代に伴う発症率の変化を、Fig. 1 に示した。また、高発症系は選抜20代までの回帰直線を示し、低発症系は発症率が初めて0%に達した線を示した。各々の回帰式は、

$$\text{高発症系 (20代)} : Y = 55.9 + 2.4x$$

$$\text{低発症系 (7代)} : Y = 40.8 - 6.0x$$

であり、回帰定数、定数共、有意水準95%で有意であった。また、高発症系が、その選抜限界に近付いたと考えられる選抜13代までの回帰式は、

$$\text{高発症系 (13代)} : Y = 50.7 + 3.4x$$

であった。

Fig. 2 に近交係数に対する発症率の変化を示した。高発症系では、選抜による直接的な発症率の増加に加えて、近交係数90%あたりから特徴的な上昇が見られた。低発症系では、世代に伴う変化同様に直線的な減少が認められた。

アロキサン誘発糖尿病高発症系・低発症系への20代に渡る選抜育種の結果、両系は、近交系として確立し、各々、ALS系、ALR系と名付けられた。

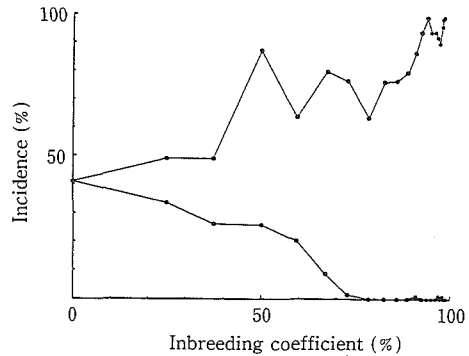


Fig. 2 Two way selection for alloxan-induced diabetes, plotted against coefficient of inbreeding.

2. 投与後血糖値

Table 2 に高発症系・低発症系各々について、選抜世代ごとの投与後7日目血糖値を示した。

Table 2 Change of blood glucose in 0 to 20 generations in each selected line

Generation	Blood glucose level (mg/dl)			
	High incidence line		Low incidence line	
	Mean	±S. E.	Mean	±S. E.
0	251	19	251	19
1	253	21	244	23
2	284	26	210	20
3	341	32	197	18
4	280	14	199	11
5	306	14	147	88
6	304	15	140	4
7	368	15	128	4
8	395	14	133	3
9	410	41	130	3
10	441	19	139	3
11	364	13	125	1
12	417	12	120	3
13	423	11	135	2
14	357	10	123	2
15	343	10	113	2
16	407	10	127	5
17	307	20	132	3
18	414	10	134	4
19	419	12	134	2
20	455	13	127	3

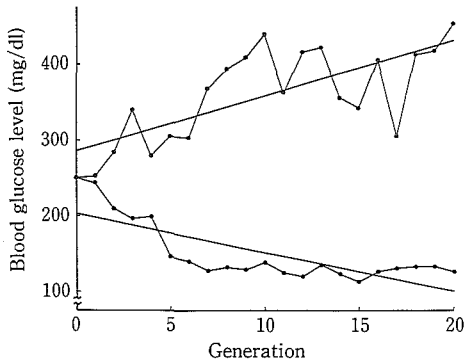


Fig. 3 Two way selection for alloxan-induced diabetes. Change of blood glucose level at 7 days after alloxan injection in each selected line.

選抜20代における血糖値は、高発症系で 455 ± 13 mg/dl、低発症系で 127 ± 3 mg/dlを示した。高発症系では、選抜10代において 441 ± 19 mg/dlに達するまで、血糖値は直線的に増加し、その後の世代は、ほぼ400 mg/dl前後で推移した。低発症系では、選抜7代において 128 ± 4 mg/dlを示して以来、一貫して正常血糖値域内で推移した。

Fig. 3に選抜世代に対する血糖値の回帰直線を示した。回帰式は、

$$\text{高発症系 (20代)}: y = 285.5 + 7.3x$$

$$\text{低発症系 (20代)}: y = 203.4 - 5.2x$$

であり、回帰係数、定数共に有意であった。また、高発症系10代及び低発症系7代に限った回帰式は、

$$\text{高発症系 (10代)}: y = 239.9 + 18.1x$$

$$\text{低発症系 (7代)}: y = 254.8 - 18.7x$$

であった。

3. ランゲルハンス氏島の定量形態学的検討

膵臓断面積 100cm^2 当たりのラ氏島数を算定した結果、コントロール区である 0mg/kg 区では、高発症系3,989個、低発症系14,170個、投与区である 40mg/kg 区では高発症系3,445個、低発症系7,542個、 80mg/kg 区では高発症系2,099個、低発症系で4,533個となり、いずれの区においても、高発症系が低発症系より少ないことが確認された。

次に、膵臓断面積 100cm^2 当たりのラ氏島面積について測定した結果、コントロール区である 0mg/kg 区では高発症系 0.2431cm^2 、低発症系 1.8266cm^2 、投与区である 40mg/kg 区では高発症系 0.2499cm^2 、低発症系 0.7694cm^2 、 80mg/kg 区では、高発症系 0.1146cm^2 、低発症系 0.5141cm^2 となり、いずれの投与区においても膵臓単位面積当たりのラ氏島面積は高発症系が低発症系に比べて少ないことが確認された。

さらに、ラ氏島1個あたりに占める β 細胞数について算定した結果、コントロール区である 0mg/kg 区では高発症系38.81個、低発症系46.00個、投与区である 40mg/kg 区では高発症系24.78個、低発症系37.09個、 80mg/kg 区では高発症系0.86個、低発症系3.28個となり、いずれの区においても、ラ氏島1個当たりの β 細胞数は、高発症系が低発症系に比べて少ないことが認められた。 40mg/kg 区においては両系統間に有意差 ($P < 0.05$) が得られた。また、ラ氏島内に占める β 細胞数の割合について検討した結果、高発症系のほうが低発症系に比べて少なく、アロキサン投与量が増加するに伴い高発症系、低発症系ともに少なくなっていくことが確認された。

考 察

アロキサン誘発糖尿病高発症系・低発症系への20代にわたる選抜育種の結果、両系の発症率は、それぞれ、98.9%及び0%に達し、近交系として確立することができた。

マウス近交系間においてアロキサン誘発糖尿病の発症率が異なることは、以前より知られているが^{4,7)}、発症率に関与する遺伝要因についてはなお不明な点が多く、低発症率の優性遺伝であるという説と、ポリジーン (polygene) 支配であるという説が、これまでに提出されている^{1,2,3,5)}。

本研究において、ICR系マウスを基礎繁殖集団としてアロキサン誘発糖尿病高発症系・低発症系へと選抜育種を行うことによって、発症率の異なる両近交系が作出されたことから、発症率に遺伝要因が関与していることは明らかである。また、その選抜反応が高発症系・低発症系の両方向において累代的に見られた事実から、発症率の遺伝支配は単なるメンデル式の遺伝ではなく、ポリジーンによる遺伝支配であることが考えられる。

選抜世代に伴う発症率の変化が、高発症系では選抜13代において98.7%を示し、低発症系では選抜7代においてすでに0%であることから、本実験で用いたED₅₀値での選抜は、ほぼ選抜限界に達したものと見られる。以後の世代における選抜は、高発症系・低発症系の両系統がアロキサンに対する選抜反応について、なお遺伝的変異がどの程度残存しているかどうかを検討した上で、新たに、ED₅₀値を設定し、選抜を継続することが必要である。しかし、本実験で採用した兄妹交配では、選抜7代における近交係数は78.5%であり、すでに全遺伝子座の3/4がホモ化されていると考えられ、選抜13代における近交係数は94%に達していることから発症率に関する主要な遺伝子の多くが、両系統内においてほぼ固定されてきていると考えることが妥当だろう。

選抜に伴って見られたアロキサン投与後7日目の血糖値は、高発症系では選抜10代で一度453mg/dlのピークに達した後、ほぼ350~450mg/dlの範囲で変動し、低発症系では、発症率が0%に達した選抜7代以後130mg/dl前後の正常血糖値で安定した。この変化が発症率の変化に伴ったものであることは疑いない。なお、両系統の血糖値がそれぞれ限界をもって安定してきたことは、両系統の生存可能な範囲を示すものであり、当然のことと考えられる。

また、アロキサン誘発糖尿病高発症系・低発症系における膵臓単位面積当たりの膵臓面積、膵島数、膵島全細胞に占めるβ細胞数の割合など、定量形態学的検討を加えたが、コントロール区では低発症系が高発症系に比較して、いずれの測定値においても有意に多く、また、アロキサン投与区においても同様の傾向のあることが確認された。

糖尿病の膵臓での膵島組織の減少は一般に知られていることであるが、アロキサン誘発糖尿病については岡本ら⁹⁾がウサギをもちいて、β細胞数が正常の1/3以下になると軽~中症の糖尿病状態を呈し、β細胞が正常の1/7になると重症の糖尿病状態になることを報告している。本研究において両系統間の比較において特徴的なことは、コントロール区で大きい差異が生じた測定項目は、膵臓単位面積当たりの膵島面積及び膵島数であるのに対し、アロキサン投与区では、これらに加えて、膵島全細胞に占めるβ細胞数の割合である。アロキサンに対する感受性の違いで、永年にわたり選抜淘汰がくりかえされてきた高発症系、低発症系は膵島面積、膵島数、膵島全細胞に占めるβ細胞数の割合など、定量形態学的特性によって特徴づけられてきていることが明らかとなった。

なお、高発症系・低発症系の成長能力についても検討を加えたが、高発症系は低発症系よりもすぐれた成長を示し、選抜の進行とともにその差は拡大する傾向が認められている。この差は、主に脂肪蓄積の差に起因し、遺伝的に決定されていると考えられている。このことから、アロキサン誘発糖尿病の発症率に関与する遺伝子群と成長及び代謝に関与する遺伝子群との間に遺伝相関がある可能性が示唆されるが、これらについては、今後の検討にゆだねたい。

摘 要

ヒト疾患モデル動物を開発する目的で、古くから実験的糖尿病として知られているアロキサン誘発糖尿病をとりあげ、ICR系マウスを選抜基礎集団として、高発症系、低発症系への選抜育種を20代まで継続し、近交系として確立することができた。得られた結果は以下の通

りである。

1. 選抜20代における発症率は、高発症系で98.9%、低発症系で0%であった。選抜世代に伴う発症率の変化は、高発症系では13代で98.7%、低発症系では7代で0%に達し、それ以後の世代においては一定の範囲内で推移した。本実験で用いたED₅₀値では、両系統とも、すでに選抜限界に達したものと考えられる。また、本実験で採用した兄妹交配法により、選抜20代における両系統の近交係数値は98.6%となり、両系統は近交系として確立された。

2. 選抜20代における血糖値は、高発症系で455mg/dl、低発症系で127mg/dlを示した。選抜世代に伴う血糖値の変化は、高発症系では8代で395mg/dlとなり、それ以後の世代では350~400mg/dl前後の値で推移した。低発症系では7代で128mg/dlとなり、それ以後の世代では120~130mg/dlの範囲内で推移した。

3. 近交系として確立された高発症系、低発症系について、膵臓単位面積に占める膵島面積、膵島数、膵島全細胞に占めるβ細胞数の割合などについて定量形態学的検討を加えたが、コントロール区では、低発症系が高発症系に比較して、いずれの測定値についても有意に多く、またアロキサン投与区においても同様の傾向にあることが確認された。以上の結果から、アロキサンに対する感受性の違いで選抜世代を進めてきた高発症系、低発症系が膵臓組織の定量形態学的特性によって特徴づけられてきていることが確認された。

謝 辞

この研究は、平成元年度から3年度までの3年間に亘る岡山大学学内特定研究「生物生産のための細胞選抜と細胞育種」を分担して行ったものである。

文 献

- 1) Goto, Y., M. Kakizaki, and N. Masaki : Spontaneous diabetes produced by selective breeding of normal rats. Proc. Japan. Acad., 51, 80 (1975)
- 2) Goto, Y., M. Kakizaki, T. Toyota, N. Masaki, A. Kitahara, S. Yagihashi, and K. Kimura : Spontaneous diabetes produced by repeated selective breeding of normal Wister rats. In : IXth congress of the International Diabetes Federation. Excerpta Medica Congr. Ser. No. 413, 730 (1977)
- 3) 後藤由夫編：糖尿病動物。医薬ジャーナル社，大阪（1987）
- 4) 猪 貴義・吉川早紀男：アロキサンに対するマウス系統間の糖尿病発症率の比較。実験動物，15，97—103（1966）
- 5) 猪 貴義：実験動物学。養賢堂，東京（1982）
- 6) 賀来昌義・平田幸平：高脂肪食及び高しよ糖食によるラットのアロキサン糖尿病発生の増強作用。糖尿病，9，371—375（1966）
- 7) Martines, C., F. Grand, and J. J. Bittner : Alloxan diabetes in different strain of mouse. Proc. Soc. Exp. Med., 87, 236—238 (1954)
- 8) Okamoto, K., O. Midorikawa, S. Mayama, E. Tashima, T. Saso, and Y. Yamamoto : On Wister rats descended from diabetic for successive generations, especially, on their Langerhans' islets and their spontaneous diabetization. Acta. Schol. Med. Univ. 36, 245—275 (1960)
- 9) 豊田隆謙・柿崎正栄・後藤由夫：自然発症糖尿病（ラット）。川俣順一・松下 宏編，疾患モデル動物ハンドブック，57—61（1979）