
抗アジアロGM1抗体によるstreptozotocin 少量頻回投与マウスの糖尿病発症抑制

社会保険埼玉中央病院内科 丸山 太郎・鈴木・裕也
慶應義塾大学内科 渡辺 賢治・柳川 達生・笠谷 知宏
武井 泉・片岡 邦三・猿田 享男

糖尿病動物 第4巻 1990 別刷

抗アジアロ GM 1 抗体による streptozotocin 少量頻回投与マウスの糖尿病発症抑制

丸山太郎・鈴木裕也（社会保険埼玉中央病院内科）・渡辺賢治・柳川達生・笠谷知宏・武井 泉・片岡邦三・猿田享男（慶應義塾大学内科）

1. はじめに

Streptozotocin 少量頻回投与マウスの膵島炎，糖尿病の発症には細胞性免疫，主にT細胞が重要な役割を果たしており，マクロファージやFc-receptor 保有細胞の関与も考えられている^{1)~8)}。一方，NK細胞は免疫系において細胞障害機構の重要な担い手の一つであるが，本モデルにおいては浸潤細胞の一部を占めることが報告されているもの⁹⁾，その意義の解明は十分ではない。今回，私たちは，streptozotocin 少量頻回投与マウスにおけるNK細胞の役割を明らかにする目的で，streptozotocin 少量頻回投与マウスに抗アジアロ GM 1 抗体を投与し，糖尿病発症に対する影響を調べた。

2. 対象と方法

9週齢，雄性CD-1マウスを用いた。マウスを3群に分けアジアロGM 1投与群，ウサギ免疫グロブリン投与群，生理食塩水投与群とした。各群ともstreptozotocin (Sigma Chemical Co.) 40mg/kgを5日間連日，腹腔内に投与した。Streptozotocinは0.05mol/l citrate buffer (pH4.5, 4℃)に溶解し，10分以内に注射に用いた。アジアロGM 1投与群にはstreptozotocin投与の3日前より21日後まで1週間に2~3回の頻度で抗アジアロGM 1抗体(和光純薬)を腹腔内に投与した。抗アジアロGM 1抗体は1 vial (タンパク量10μg)を注射用蒸留水3 mlに溶解して用い，1回の注射量は200μlとした(図1)。ウサギ免疫グロブリン投与群には同濃度，同量のウサギ免疫グロブリン(Sigma Chemical Co.)を，生理食塩水投与群は同量の生理食塩水を抗アジアロGM 1抗体の代わりに投与した。

各群のマウスについて血糖を56日目まで経時的に観察し，実験終了時に膵島のリンパ球浸潤の程度を調べた。一部のマウスについては10日目に脾細胞のサブセットを調べた。血糖値は随時血糖とし，眼窩静脈叢よりヘマトクリット管を用いて採血し，酵素法で測定した。この血糖

値が250mg/dl 以上を持続するものを糖尿病とした。脾細胞サブセットは摘出した脾臓を機械的に破碎し、遊離脾細胞浮遊液を得て、蛍光標識モノクローナル抗体 (Thy 1.2, L3T4, Lyt 2, sIg: いずれも Beckton Dickinson 製) を用いて Two color flowcytometry にて調べた。脾臓は Bouin 固定, パラフィン包埋し, H. E. 染色にて光学顕微鏡で観察した。

3. 成 績

アシアロ GM1 投与群は12例中 3例 (25%) が糖尿病を発症した (図2)。一方, 対照とし

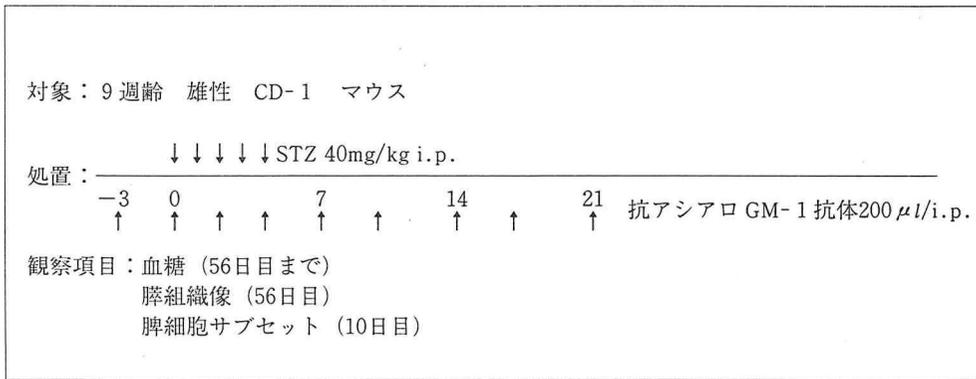


図1 対象と方法

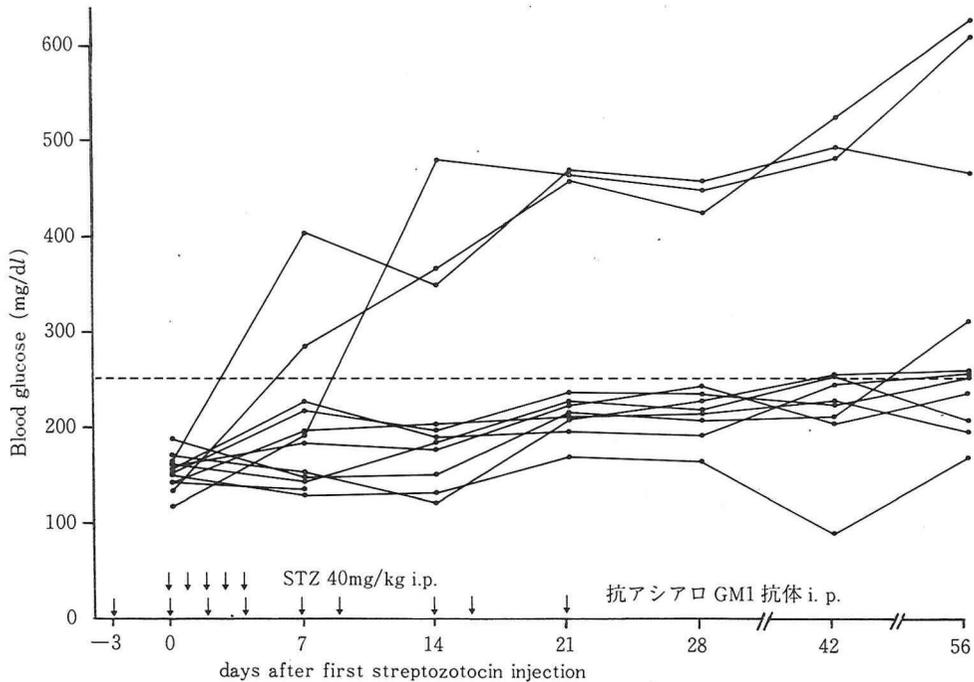


図2 アシアロ GM1投与群の血糖値の経過

たウサギ免疫グロブリン投与群，生理食塩水投与群の糖尿病発症率はそれぞれ8例中8例（100%），23例中20例（87%）で（図3，図4），アシアロGM1投与群の糖尿病発症率は両群に比し有意に低率であった（それぞれ $\chi^2=8.1$ ， $p<0.01$ ， $\chi^2=10.8$ ， $p<0.01$ ； χ^2 test

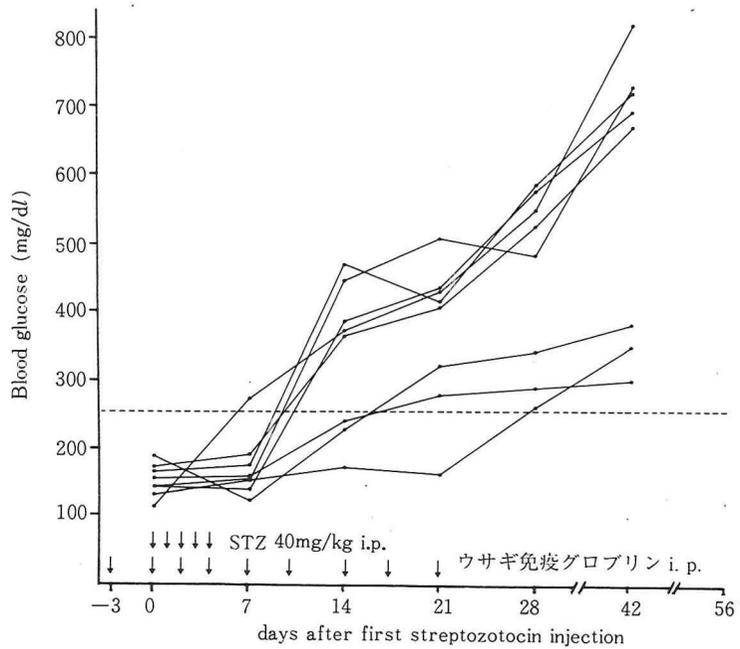


図3 ウサギ免疫グロブリン投与群の血糖値の経過

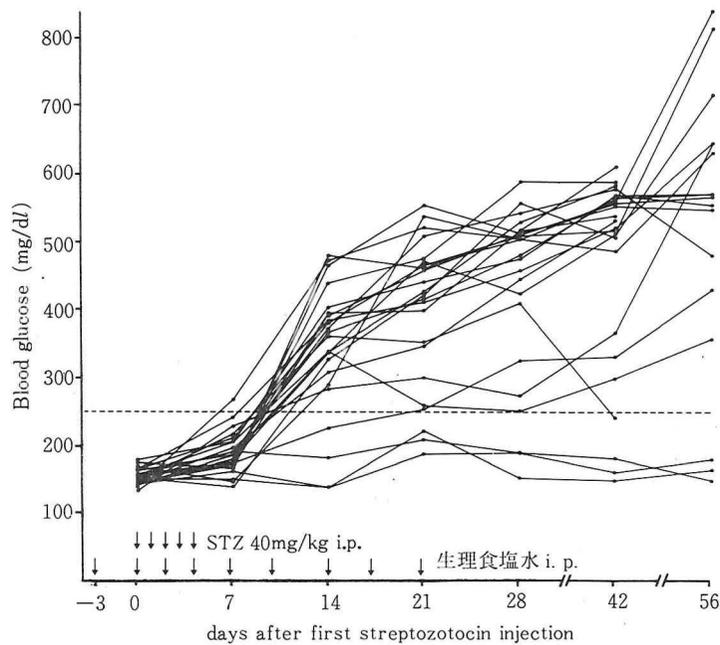


図4 生理食塩水投与群の血糖値の経過

ytes の変化) (表 1)。

脾細胞サブセットの解析ではアシアロ GM 1 投与群の脾細胞サブセットは Thy1.2, L3T4, Lyt 2, sIg のいずれも, ウサギ免疫グロブリン投与群, 生理食塩水投与群, 無処置対照と比べて抑制は認められなかった。図 5 に Lyt 2, L3T4 の two color flowcytometry の成績を示す。

膵島炎はいずれの群にも認められたが各群とも膵島は萎縮し, 数の減少も認められた。リンパ球浸潤は一部の膵島に残存しているにすぎなかったが, その範囲においては膵島炎の程度は 3 群間に有意と思える差異を認めなかった (図 6, 図 7)。

表 1 各グループの糖尿病発症率

STZ+Asialo GM 1	3 / 12 (25%)	} p<0.01 } p<0.01
STZ+rabbit Ig	8 / 8 (100%)	
STZ+saline	20 / 23 (87%)	

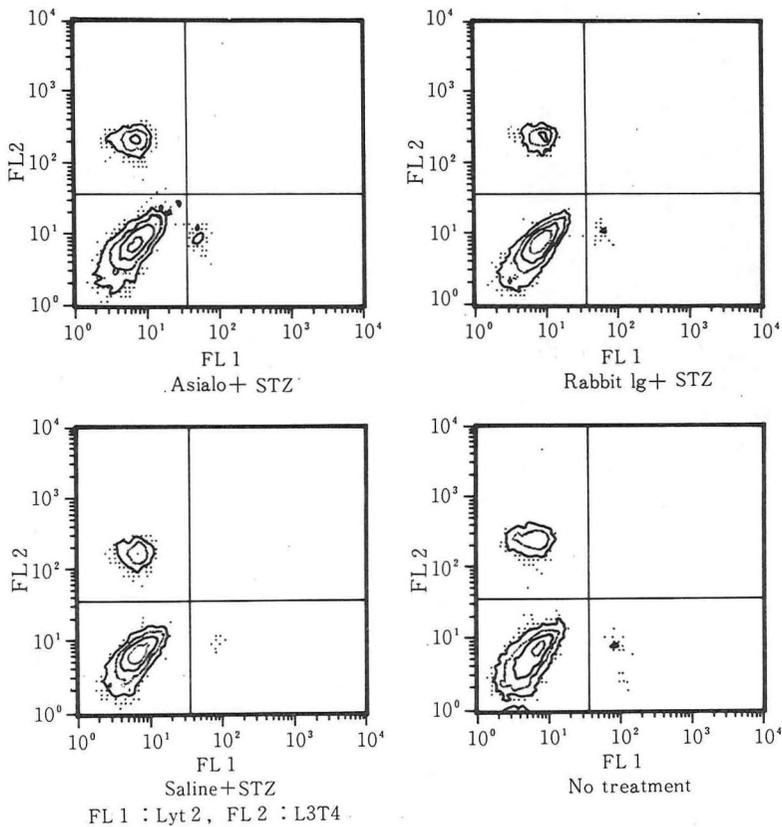


図 5 Two color flowcytometry による L3T4陽性細胞および Lyt2陽性細胞

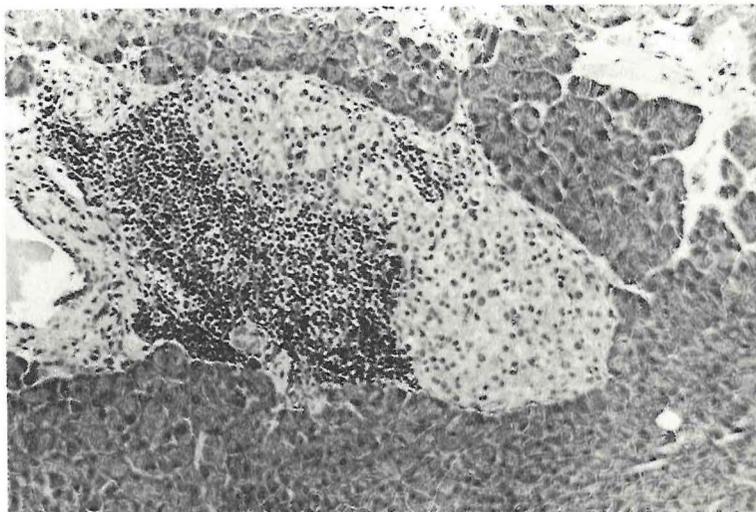


図6 アシアロ GM1投与群の膵島炎

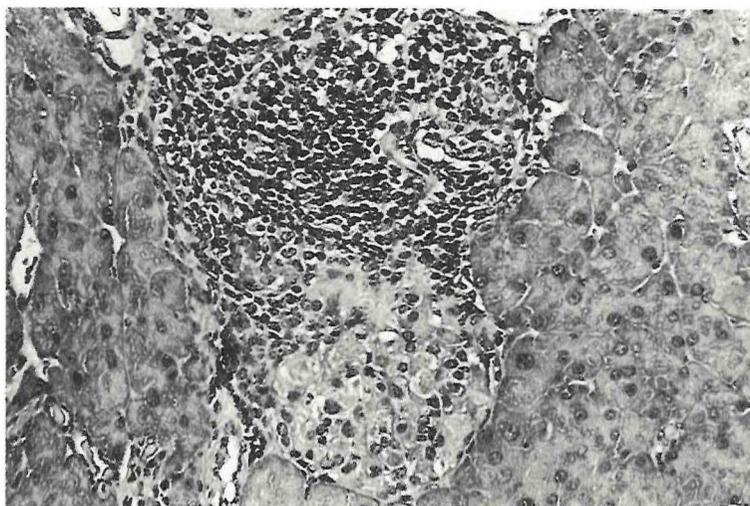


図7 生理食塩水投与群の膵島炎

4. 考 察

抗アシアロ GM1 抗体はマウス、ラットの NK 細胞と主に反応するポリクロナール抗体である^{10),11)}。今回、私たちは本抗体を streptozotocin 少量頻回投与マウスに投与し、NK 活性を抑制することにより糖尿病発症が抑制されるかどうか調べた。

本抗体の投与により streptozotocin 少量頻回投与マウスの糖尿病発症は有意に抑制された。成績には示さなかったがアシアロ GM1 投与群では脾臓の凍結切片で抗アシアロ GM1 陽性細胞はほとんど消失していた。また、抗アシアロ GM1 抗体投与により NK 活性はほとんど消失

することが報告されている^{10),11)}。以上より本マウスの糖尿病発症にはNK細胞も何らかの役割を果たしていることが示唆された。

抗アシアロ GM 1 抗体はNK細胞のほかにも高濃度ではT細胞の一部と反応し、またマクロファージとも反応することが知られている^{10),11)}。今回の実験においてT細胞サブセットは対照に比べ有意な変化は認めなかった。また、streptozotocin 少量頻回投与マウスの糖尿病はT細胞に対する抗体の投与により抑制されることが報告されているが、これらの報告では膵島炎も軽減、消失をみている^{3),4)}。本研究では時期の問題はあるものの膵島炎の明らかな抑制は認められず、この所見も抗アシアロ GM 1 抗体による発症抑制がT細胞を介するものではなく、NK細胞の抑制による可能性を支持するものと考えられた。

抗アシアロ GM 1 抗体はポリクロナール抗体であり、今回の発症抑制をもってNK活性の意義を断定することはできないが、streptozotocin 少量頻回投与マウスの糖尿病におけるNK細胞の病因的意義について一層の検討が必要と考えられた。

文 献

- 1) Duhault, J. and Bure, J. : T-cell dependency of streptozotocin-induced diabetes. *IRCS Medical Science* **7**, 154 (1979)
- 2) Paik, S., Fleischer, N. and Shin, S. : Insulin-dependent diabetes mellitus induced by subdiabetogenic dose of streptozotocin, Obligatory role of cell-mediated autoimmune process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 6129-6133 (1980)
- 3) Herold, K. C., Montag, A. G. and Fitch, F. W. : Treatment with anti-T lymphocyte antibodies prevents induction of insulinitis in mice given multiple doses of streptozotocin. *Diabetes* **36**, 796-801 (1987)
- 4) Oschilewski, M., Schwab, E., Kiesel, U., Opitz, U., Stunkel, K., Kolb-Bachofen, V. and Kolb, H. : Administration of silica or monoclonal antibody to Thy-1 prevents low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice. *Immunology Letter* **12**, 289-294 (1986)
- 5) Yanagawa, T., Maruyama, T., Takei, I., Asaba, Y., Takahashi, T., Ishii, T., Kataoka, S., Saruta, T., Minoshima, S. and Shimizu, N. : The suppressive effect of cyclophosphamide on low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice. *Diabetes Research* **12**, 79-83 (1989)
- 6) 丸山太郎, 服部良之, 浅葉義明, 馬場良子, 池本久美子, 武井 泉, 谷山松雄, 片岡邦三 : streptozotocin 少量頻回投与糖尿病マウスのADCC活性. *糖尿病* **29**, 425-431 (1986)
- 7) Kolb-Bachofen, V., Epstein, S., Kiesel, U. and Kolb, H. : Low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice. Electron microscopy reveals single-cell insulinitis before diabetes onset. *Diabetes* **37**, 21-27 (1988)
- 8) 笠谷知宏, 武井 泉, 浅葉義明, 丸山太郎, 渡辺賢治, 片岡邦三, 猿田享男 : Lactate dehydrogenase virus による streptozotocin 少量頻回投与マウスの糖尿病発症抑制について. *糖尿病動物* **4**, 糖尿病動物研究会編, 医薬ジャーナル社, 大阪 (1990), p144-148
- 9) Cossel, L., Schneider, E., Kuttler, B., Schmidt, S., Wohlrab, F., Schade, J. and Bochmann, C. : Low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice. Metabolic, light microscopical, histochemical, immunofluorescence microscopical, electron microscopical and morphometrical findings. *Exp. Clin. Endocrinol* **85**, 7-26 (1985)

- 10) Kasai, M., Iwamori, M., Nagai, Y., Okumura, K. and Tada, T. : A glycolipid on surface of mouse natural killer cells. *Eur. J. Immunol* **10**, 175-180 (1980)
- 11) Habu, S., Fukui, H., Shimamura, K., Kasai, M., Nagai, Y., Okumura, K. and Tamaoki, N. : Reduction of NK activity and enhancement of transplanted tumor growth in nude mice. *J. Immunol* **127**, 34-38 (1981)