
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

慶應義塾大学医学部内科 笠谷 知宏・武井 泉・渡辺 賢治
片岡 邦三・猿田 享男
東京電力病院内科 浅葉 義明
社会保険埼玉中央病院内科 丸山 太郎

糖尿病動物 第4巻 1990 別刷

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

笠谷知宏・武井 泉・渡辺賢治・片岡邦三・猿田享男（慶應義塾
大学医学部内科）・浅葉義明（東京電力病院内科）・
丸山太郎（社会保険埼玉中央病院内科）

1. はじめに

ストレプトゾトシン（Streptozotocin, 以下 STZ）少量頻回投与マウス¹⁾は、I型糖尿病モデルの1つであるが、その糖尿病発症には、膵β細胞の直接傷害、細胞性免疫、ウイルスなどの関与が考えられている。

細胞性免疫の関与については、脾細胞移植による膵島炎の発現²⁾、抗リンパ球血清³⁾や抗H-2アロ血清⁴⁾による糖尿病発症の抑制、またL3T4やLyt2などT細胞の関与が報告されている⁵⁾。Oschilewskiら⁶⁾は、シリカ投与が膵島へのマクロファージ浸潤を抑制することにより、その糖尿病発症が抑制されることを報告しており、またKolb-Bachofenら⁷⁾は、マクロファージが糖尿病発症以前の膵島に存在することを確認している。

前回われわれは、マクロファージに持続感染することが知られている乳酸脱水素酵素ウイルス（Lactate dehydrogenase virus, 以下 LDV）⁸⁾が、NODマウスの糖尿病発症を抑制することを報告したが⁹⁾、今回はSTZ少量頻回投与マウスの糖尿病発症に対する影響について検討した。

2. 対象と方法

8週齢雄性CD-1マウスに、5日間連日STZ（Sigma）35mg/kg体重を腹腔内投与したものをSTZ群とし、STZ投与開始24時間前に、10⁸ID₅₀（50% infectious dose）/マウスのLDVを腹腔接種し同様にSTZを投与したものをLDV群とした。コントロール群は、クエン酸バッファーのみを5日間投与した。以上3群について、経時的に尿糖、血糖値を測定し、一部のマウスについては、血清LDH値および、酸エタノール抽出により膵インスリン含量を測定した。また膵をブアン固定して膵島炎の程度をグレーディングし比較した。グレーディングの方法は、膵島1個ずつについて、単核球浸潤の割合をスコア0（0%）、スコア1（0~25%）、スコア2（25~50%）、スコア3（50%以上）に分類し、スコアの総和を膵島の数で割ったものをグ

レードとした。

STZ 群, LDV 群について, LDV 接種後 8 日後, 径 $1.1 \mu\text{m}$ のラテックス粒子 (積水化学) 1×10^7 /マウスを腹腔内投与し, 72 時間後に腹腔マクロファージを分離し, ラテックスを貪食したマクロファージを鏡検した。

また, LDV 接種 20 時間後および 11 日後, 10% FCS (Fetal calf serum), 1% 重炭酸ナトリウムを加えた MEM (Minimum essential medium; Eagle) に, 腹腔洗浄液より得た細胞を浮遊させ, 5% 二酸化炭素 95% 空気, 37°C にて 3 時間培養した。PBS (Phosphate buffered saline) にて強く洗浄し, 吸着した状態でマクロファージと OX-6 (マウス I-A と交差反応を示す抗ラット Ia モノクローナル抗体) $10 \mu\text{g/ml}$ と 30 分間反応させた。さらに, PBS で洗浄後, FITC (Fluorescence isothiocyanate) でラベルしたヤギ抗マウス IgG (1/200) を 30 分間反応させた。PBS で洗浄後乾燥し, アセトンにて 10 分間固定し, 蛍光顕微鏡で, Ia 抗原陽性率を調べた。

データは, Mean \pm SD で示し, 統計学的有意差は T 検定にて行った。

3. 成績

3.1 尿糖

LDV 接種 6 週後の尿糖陽性率は, STZ 群 6/15 (40%), LDV 群 0/15 (0%), コントロール群 0/6 (0%) であった。

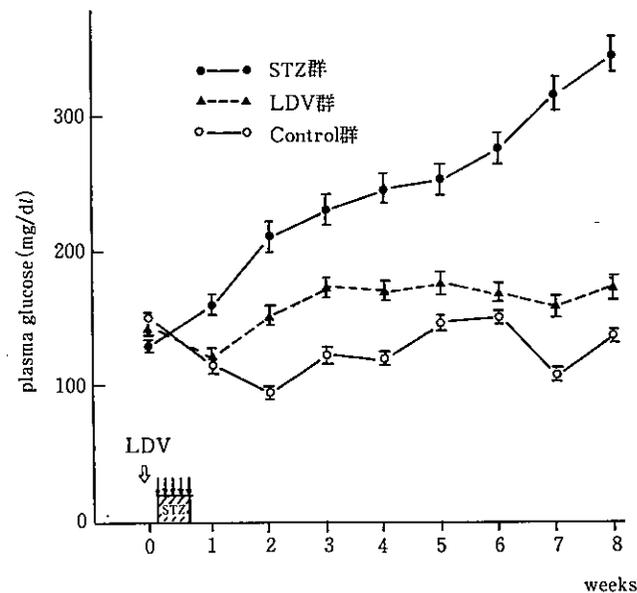


図1 Plasma glucose response after LDV and STZ injections

3.2 血糖値

図1は, 血糖値の推移である。STZ 群の血糖値は, 経時的に増加を示した。LDV 群の血糖値は, STZ 群に比べ低値であったが, コントロール群に比べると高値であった。血糖値 250mg/dl 以上を糖尿病発症とすると, 6 週後では STZ 群 6/15 (40%), LDV 群 1/15 (7%), コントロール群 0/6 (0%) であった。

3.3 血清 LDH 値

血清 LDH 値は, LDV 感染のよい指標となるが, 8 週後の血清 LDH は LDV 群で, $2,670 \pm 541\text{IU/l}$, STZ 群 $1,036 \pm 227\text{IU/l}$, コントロール群 $1,467 \pm 289\text{IU/l}$ であり, LDV 群が有意に高値であった ($p < 0.05$)。

3.4 膵インスリン含量

8 週後の膵インスリン含量は, 膵あたりでみると, STZ 群 $6.76 \pm 5.22 \times 10^{-3}\text{U}$, LDV 群 $8.59 \pm 4.45 \times 10^{-3}\text{U}$, コントロール群 $30.90 \pm 7.08 \times 10^{-3}\text{U}$ であった。

コントロール群の平均値に対する割合で, 10% 以下, 10~50%, 50% 以上に分類したのが表 1 である。LDV 群の方が, 膵インスリン含量の低下がより少ない傾向にあった。

3.5 膵島炎

図2は, STZ 群および LDV 群のヘマトキシリン-エオジン染色標本である。両群共に単核球浸潤が認められた。

STZ 群および LDV 群の 2 週後の膵島炎のグレードは, 0.89 および 0.31 であり, STZ 群の方がより膵島炎が強い傾向にあった。

3.6 ラテックス貪食能

ラテックス粒子に対する腹腔マクロファージの貪食能は, STZ 群 $74.4 \pm 2.0\%$, LDV 群 $76.4 \pm 3.8\%$ であり, 有意差はなかった。

3.7 Ia 抗原陽性率

Ia 抗原陽性率は, LDV 接種 20 時間後で, LDV 群 $6.6 \pm 1.2\%$, STZ 群 $14.3 \pm 2.8\%$, 11 日後で LDV 群 $6.9 \pm 1.3\%$, STZ 群 $10.1 \pm 2.4\%$ であった。

LDV 群で有意に Ia 抗原陽性率が低下しており ($p < 0.05$), 特に LDV 感染急性期で著明な低下が認められた。

表1 膵インスリン含量の分布

| | n | コントロール群の平均値に対する比率 | | |
|------|----|-------------------|--------|------|
| | | ~10% | 10~50% | 50%~ |
| STZ群 | 14 | 7 | 6 | 1 |
| LDV群 | 15 | 1 | 12 | 2 |

4. 考 察

LDV 感染により, 少量頻回投与マウスの膵島炎が軽減され, 糖尿病発症が抑制された。

STZ 少量頻回投与マウスの糖尿病発症には, 細胞性免疫, 特にマクロファージの関与が注目されており, Kolb ら⁶⁾は, シリカによる抑制実験で, マクロファージがその発症に重要であると報告しており, また Kolb-Bachofen ら⁷⁾は, “single-cell insulinitis” において, リンパ球浸潤に先行してマクロファージが存在するとしている。

LDV の持続感染は, マクロファージの総数および貪食能には変化をきたさず, Ia 抗原陽性率を低下させ, LDV 感染による STZ 少量頻回投与マウスの糖尿病発症の抑制機序としては, マクロファージの機能の低下によると推測された。

LDV 感染群でもある程度の膵島炎が存在したが, これに関しては, STZ による膵β細胞の直接傷害作用や, Ia 抗原陽性マクロファージは急性期を過ぎるとある程度存在し, それが十分抗原提示を行いうる可能性が考えられる。

以上, STZ 少量頻回投与マウスの糖尿病発症抑制には, LDV 感染によるマクロファージの Ia 抗原陽性率の低下が関与していると考えられた。

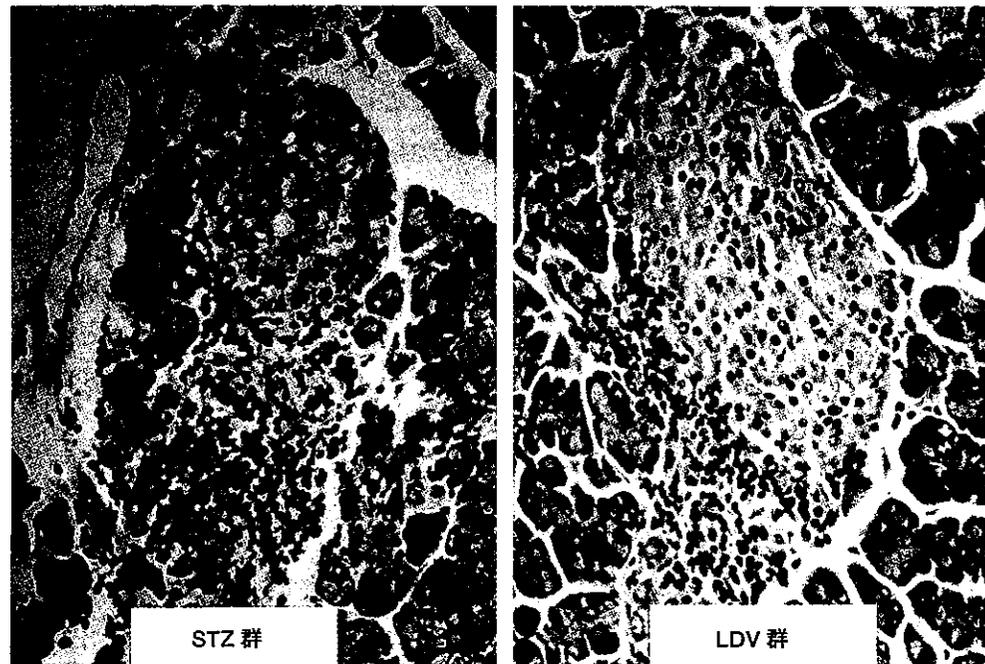


図2 STZ 投与4週後の膵島の HE 染色標本

文 献

- 1) Like, AA., Rossini, AA. : Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis, a new model of diabetes mellitus. *Science* **193**, 415-417 (1976)
- 2) Kiesel, U., Freytag, G., Biener, J., Kolb, H. : Transfer of experimental autoimmune insulinitis by spleen cells in mice. *Diabetologia* **19**, 516-520 (1980)
- 3) Rossini, AA., Like, AA., Chick, WL., Appel, MC., Cahill, GF. : Studies of streptozotocin-induced insulinitis and diabetes. *Cell Biology* **74**, 2485-2489 (1977)
- 4) Bonnevie-Nielsen, V., Lernmark, A. : An H-2 alloantiserum preserves β -cell function in mice made diabetic by low-dose streptozotocin. *Diabetes* **35**, 570-573 (1986)
- 5) Kantwerk, G., Cobbold, S., Waldmann, H., Kolb, H. : L3T4⁺ and Lyt2⁺ cells are both involved in the generation of low-dose streptozotocin-induced diabetes. *Clin Exp Immunol* **70**, 585-592 (1987)
- 6) Oschilewski, M., Schwab, E., Kiesel, U., Opitz, U., Stünkel, K., Kolb-Bachofen, V., Kolb, K. : Administration of silica or Thy-1 prevents low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice. *Immunol Lett.* **12**, 289-294 (1986)
- 7) Kolb-Bachofen, V., Epstein, S., Kiesel, U., Kolb, H. : Low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice. Electron microscopy reveals single-cell insulinitis before diabetes onset. *Diabetes* **37**, 21-27 (1988)
- 8) 稲田敏樹, 山崎修道 : 乳酸脱水素酵素ウイルス (LDV) の病原性と免疫. *ウイルス* **37** (2), 193-210 (1987)
- 9) 武井 泉, 浅葉義明, 笠谷知宏, 片岡邦三, 丸山太郎, 石井壽晴 : Lactate dehydrogenase virus 持続感染における NOD マウスの糖尿病発症抑制. *糖尿病動物* **3**, 糖尿病動物研究会編, 医薬ジャーナル社, 大阪 (1989), p294-298