

原 著

非肥満ヒトII型糖尿病の動物モデルNONマウスの耐糖能異常の成因に関する研究

森岡 尚夫, 大角 誠治, 沢 丞, 矢野 三郎

富山医科薬科大学内科学第1教室

The etiology of glucose intolerance in the NON mouse, an animal model of human non-obese NIDDM

Hisao MORIOKA, Seiji OHGAKU, Tasuku SAWA and Saburo YANO

First Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama 930-01, Japan

Key words : NON mouse, animal model, NIDDM, insulin binding, glucose transport, proinsulin mRNA

要 旨

我々はヒトII型糖尿病に一般的に認められる特徴である末梢組織のインスリン抵抗性や膵B細胞の機能異常がNONマウスの耐糖能異常の成立にどの程度貢献しているかについて調べた。まず、末梢脂肪細胞受容体へのインスリン結合動態と、脂肪細胞への¹⁴C-D-glucoseの取り込みを指標としたインスリン作用から末梢でのインスリン抵抗性の有無を調べた。NONマウス及び対照ICRマウス由来の脂肪細胞に対するインスリン結合は、トレーサー濃度から100ng/mlまでほぼ同じ結合率であり、Scatchard解析(two site model)によって各脂肪細胞のレセプター数、結合親和性を求めても、ICRマウス $2.08 \times 10^5 \pm 5.80 \times 10^4/\text{cell}$, $1.36 \times 10^{11} \pm 4.30 \times 10^{10}(\text{M}^{-1})$ (mean \pm SD, n=7), NONマウス $1.96 \times 10^5 \pm 3.20 \times 10^4/\text{cell}$, $1.42 \times 10^{11} \pm 7.10 \times 10^{10}(\text{M}^{-1})$ (mean \pm SD, n=8)といずれも差を認めなかった。他方、両種マウス脂肪細胞へのトレーサー濃度での¹⁴C-D-glucoseの糖取り込みは、インスリン最大刺激時(50ng/ml)で各々インスリン無添加時の約2倍まで増加し、インスリンのED₅₀もICRマウスが6.8ng/ml, NONマウスが6.6ng/mlとほぼ同じであった。従って、両種マウス細胞でのインスリンの受容体への結合やそれに続く糖代謝の促進作用に有意の差はないと考えてよい。NONマウスの低インスリン血症と膵インスリン含量の低下から、NONマウスの膵B細胞の機能、特にインスリン合成能の異常が示唆されているので、膵のインスリンmRNA含量を調べた。その結果、NONマウスの膵総RNA画分中のインスリンmRNAの含量は、ICRマウスの33%と明らかに減少していた。

これらの観察結果は、NONマウスが示す耐糖能異常は末梢のインスリン抵抗性によると考えるより、むしろ転写の障害を含むインスリンmRNA代謝回転の異常が第一義的原因であることを示す。換言すれば、NONマウスにおいて膵B細胞の機能異常が、膵インスリン含量の低下、さらに低インスリン血症を引き起こし、その結果として耐糖能異常が観察されると判断された。

はじめに

糖尿病はインスリンの作用不足に基づく糖や脂質の代謝異常を共通点とするが、この疾患の成因は多岐にわたる。糖尿病は、現在 WHO の勧告に従うと以下のように分類される¹⁾。原因不明のものを生命を維持する上でインスリンが必須か否かという臨床的観点からインスリン依存型糖尿病(IDDM)とインスリン非依存型糖尿病(NIDDM)に分け、NIDDMをさらに non-obese と obese に細分している。また原因が明らかなものを栄養不良関連性糖尿病(MRDM, 栄養状態の不良が原因)と other type (膵疾患, 薬剤, 内分泌疾患, 異常インスリン血症が原因等)としている。また WHO では従来の病因論的分類の I 型, II 型糖尿病 (即ち, 膵ランゲルハンス氏島の insulinitis 像や自己免疫の関与を示唆する I 型, 及びそれらを伴わない II 型) の名称を、混乱を避けるため病因論的意味をもたせず、各々 IDDM (I 型), NIDDM (II 型) と同義語として用いるように勧告している¹⁾。原因が不明なものの中で I 型糖尿病の成因解明については、免疫学的アプローチにより次第に進展がみられているが²⁾, II 型糖尿病は濃厚な遺伝的背景が示唆され^{3, 4)}, 糖尿病患者の大部分を占めるにもかかわらず、成因は未だ不明である。従って、II 型糖尿病類似の症状を示す自然発症糖尿病動物モデルがあれば成因を解明するための有力な研究材料になるものと思われる。

我々が成因を研究していく上で着眼したのは、II 型糖尿病の膵 B 細胞機能である。膵 B 細胞よりインスリンが合成・分泌され、末梢標的細胞で作用を発揮するまで、どの段階の障害でも糖尿病は起こりうる。一方、II 型糖尿病のうち、肥満型と非肥満型では成因が異なるとされている⁵⁾。通常肥満 II 型糖尿病は、肥満による末梢脂肪組織でのインスリン抵抗性がまずおこり、それを代償するために高インスリン血症を伴ってくる。よって、肥満 II 型糖尿病ではインスリン合成の異常が第一義的病因とはなり得ない。これに対し、非肥満 II 型糖尿病患者の多くは空腹時血中インスリンレベルが、正常もしくは低下している。また、臨床的に耐糖能に全く異常が認められなくても、糖負荷時に膵 B 細胞のインスリン分泌反応が低下している“非糖尿病健常人”においては、

将来糖尿病を発症する危険性が高いとされ、このような一群の人々は“low insulin responder”として経過観察が必要とされている^{6, 7)}。よって、ヒトの非肥満 II 型糖尿病患者はインスリン合成量が先天的に低下しており、これに後天的な因子が負荷され糖尿病の発症に至ると考えることができる。従ってこの型の糖尿病の発症機構を調べるために必要な動物モデルは、①糖尿病発症の主因は末梢組織におけるインスリン抵抗性ではない、②膵 B 細胞に病理組織学的な異常がない、という 2 点を満たしなければならない。この点に関しては、GK ラットやチャイニーズハムスターが非肥満 II 型糖尿病のモデル動物として既に報告されているが⁸⁾, これらの動物の膵ランゲルハンス氏島に病理変化が認められ、我々が必要とする動物モデルの条件を満たさない。

NON マウスは、I 型糖尿病の動物モデルとして NOD マウス株^{9, 10)}を確立する過程で、同時に分離されたが、この系のマウスは、非肥満で耐糖能異常(軽度の糖尿病)と、低インスリン血症があり、しかも膵ランゲルハンス氏島に病理学的異常を全く認めず、ヒトの非肥満 II 型糖尿病の特徴を多くもっているマウスであることを、我々が既に報告している¹¹⁾。これらの点から、NON マウスを使ってその耐糖能異常を生じる機構を調べることは、ヒトの非肥満 II 型糖尿病の初期の病態とその発生機構の研究の最初のステップになりうるものと考えた。

ヒト非肥満 II 型糖尿病患者の主要な特徴は膵 B 細胞の機能異常と末梢組織でのインスリン抵抗性である^{12, 13)}。今回我々は、NON マウスが示す耐糖能異常の成立にこの 2 つの因子のいずれが主要な役割を果たしているかを知る目的で、単離脂肪細胞のインスリン受容体へのインスリンの結合動態を調べた。また、一方で脂肪細胞への¹⁴C-D-glucose の取り込みのインスリンによる促進を指標としてインスリン作用を調べ、これらの検索により NON マウスの末梢標的細胞におけるインスリン抵抗性の有無を判定した。また NON マウスでは低インスリン血症と膵インスリン含量の低下が観察されることから¹¹⁾, 我々はインスリン合成過程の何らかの異常を推定している。この点を明らかにする目的で膵のインスリン mRNA 含量を調べ、膵 B 細胞機能の異常の有無についても検討した。

材料および方法

1) 実験動物

NON マウスは、これを純系化、確立したシオノギ研究所より搬入。また対照の J-cl-ICR マウスは、NON マウスの分離に使われた系である日本クレアのもを購入した。いずれも 8~11週令の雄マウスを使用した。

2) 材 料

豚の single component insulin は清水製薬より譲渡を受け、牛血清アルブミン (Fraction V), N-Lauroylsarcosine, sodium salt は Sigma, collagenase は和光純薬, [U-¹⁴C]-D-glucose は New England Nuclear, [α -³²P] dCTP (137-141 TBp/mmol) は ICN-chemical, Guanidinium thiocyanate は Fluka, DNase I と DNA polymerase I は Pharmacia, ニトロセルロースフィルターは Schlicher & Schuell のものを用いた。¹²⁵I-monoiodo-insulin (豚, 3.7~5.6MBq/ μ g) は、滋賀医科大学の小林正博士がブタインスリンを Na [¹²⁵I] を用いて Freychet ら¹⁴⁾ のクロラミン変法にて標識したものを提供して頂いた。また、ラットプレプロインスリン cDNA は、東北大学岡本 宏博士がクローニングされ、塩基配列が確認されたものを提供して頂いた (unpublished data)。

3) 緩衝液の作成

インスリン結合測定用の緩衝液として、Gambhir ら¹⁵⁾ が至適条件を決定して、ヒト赤血球やラット脂肪細胞で良好なインスリン結合の結果が得られている Hepes-Tris 緩衝液 (HEPES 50mM, Tris 50mM, NaCl 50mM, MgCl₂ 10mM, KCl 5mM, CaCl₂ 10mM, EDTA 2mM, 10mg/ml BSA, pH 8.0) を用い、糖取り込み測定用の緩衝液として、Whitesell ら¹⁶⁾ が 3-O-methylglucose の取り込みにはじめて用い、以後糖取り込みで一般的に用いられる Krebs-Ringer Phosphate Hepes 緩衝液 (NaCl 131.2mM, KCl 4.71mM, CaCl₂ 2.47mM, MgSO₄ 1.24mM, Na-H₂PO₄ 2.48mM, HEPES 10mM, 10mg/ml BSA, pH 7.4) を用いた。

4) マウス脂肪細胞の単離

8~11週令の雄マウスを屠殺後、すばやく開腹し、精巣上体上の fat pads より脂肪組織を細かく切り

落とし Rodbell の方法¹⁷⁾ により Krebs-Ringer bicarbonate buffer 中で 2mg/ml のコラゲナーゼ、40 mg/ml の牛血清アルブミン (Fraction V) とともに 37°C, 20分間振盪孵置し、250 μ m のナイロンメッシュで濾過後、緩衝液で 2 回洗浄し実験に供した。脂肪細胞数は、Hirsh と Gallian の方法¹⁸⁾ に準じて、蒸留水にとかした 2% osmium tetroxide 溶液中でアッセイ系に用いた単離脂肪細胞浮遊液を 24時間、室温にて固定後、コールターカウンターモデル ZB にて、その細胞数を計測した。

5) インスリン結合能の測定

単離脂肪細胞を Hepes-Tris 緩衝液にて希釈後プラスチックバイアル中で ¹²⁵I-insulin (0.2ng/ml) と各種濃度の非標識インスリン (0, 1, 5, 10, 25, 50, 100 ng/ml 最終濃度) とともに、24°C, 90分間孵置後、各細胞浮遊液をシリコンオイル添加マイクロチューブに分取し、Beckmann microfuge で細胞層を分離し、この画分中の放射活性を γ -カウンターで測定した。なお、測定値は 20 μ g/ml のインスリン存在下での結合を非特異的結合として差し引き、脂肪細胞数 2x10⁵ 個あたりに補正した。

6) 糖取り込みの測定

糖取り込みは柏木らによる方法¹⁹⁾ にて検討した。単離脂肪細胞を Krebs-Ringer Phosphate Hepes 緩衝液で希釈し、各種濃度のインスリン (0, 0.1, 0.3, 0.5, 1, 5, 50ng/ml) とともに、37°C 30分間前孵置後、1.48KBq の ¹⁴C-D-glucose を加え、37°C, 120分間孵置した。シリコンオイルを加え細胞層を遠心分離し、液体シンチレーションカウンターにて細胞への ¹⁴C-D-glucose の取り込みを測定した。インスリン濃度 0ng/ml で ¹⁴C-D-glucose を加えた直後に遠心分離した細胞層の測定値を非特異的取り込みとして差し引き、総カウントのうち 1 秒間に細胞 1 個当たり加えたトレーサーがどれだけ取り込まれたかを glucose transport clearance (fl/s-cell) として表現した。

7) 総臓 RNA 画分の調製とインスリン mRNA の同定

マウスを屠殺後ただちに臓を摘出し、guanidinium thiocyanate 溶液中でポリトロンでホモゲナイズした。ついで 60°C 加温 phenol, phenol/chloroform 中で RNA を抽出した。(Guanidinium/Hot phenol

法)²⁰⁾。水層の RNA をエタノール沈澱にて回収し、総 RNA を得た。アガロース電気泳動では総 RNA 量として 5 μ g または 10 μ g を用い、ラット B 細胞腫瘍より得た poly (A)⁺ RNA を positive control, ラット肝 RNA を negative control とした。ニトロセルロースフィルターに固定後, Nick-translation により標識したラットプレプロインスリン I cDNA をプローブとしてマウスインスリン mRNA を検出し, インスリン mRNA の比較定量のために, そのオートラジオグラム上の陽性バンドに一致するフィルター部分を切り抜き, 各々の ³²P 放射活性を測定した。

8) 統計学的検定

測定値は, 二元配置分散分析または, Student's t-test により検定した。

結 果

1) インスリン結合

マウス単離脂肪細胞へのインスリン結合の結果を Fig. 1A に示した。NON マウス由来脂肪細胞へのインスリン結合は, 0.2ng/ml のトレーサー濃度より 100ng/ml までの各点において, コントロールの ICR マウスのそれに比して, 有意差はなくほぼ同様の結合曲線を示した。

このインスリン結合の測定値を, Scatchard plot にて解析したのが, Fig. 1B である。さらに ICR マウスと NON マウスについて, インスリンレセプターの解析法の 1 つである two site model²¹⁾ によりレセプター数 (Ro) と結合親和性 (Ke) を求めたところ, ICR マウスでは $Ro = 2.08 \times 10^5 \pm 5.80 \times 10^4 / \text{cell}$, $Ke = 1.36 \times 10^{11} \pm 4.30 \times 10^{10} (\text{M}^{-1})$ (mean \pm SD, n = 7) であり, NON マウスでも $Ro = 1.96 \times 10^5 \pm 3.20 \times 10^4 / \text{cell}$, $Ke = 1.42 \times 10^{11} \pm 7.10 \times 10^{10} (\text{M}^{-1})$ (mean \pm SD, n = 8) とインスリンの受容体への結合性は両種マウス間で有意差を認めなかった。

2) 糖取り込み

インスリンの糖取り込み促進作用の容量反応曲線を Fig. 2 に示す。インスリン無添加から 1ng/ml のインスリン添加時まで NON マウス脂肪細胞が ICR マウスのそれに比べ, 約 1.5 倍高い糖取り込みの活性を示し, この傾向はより高濃度のインスリンを加

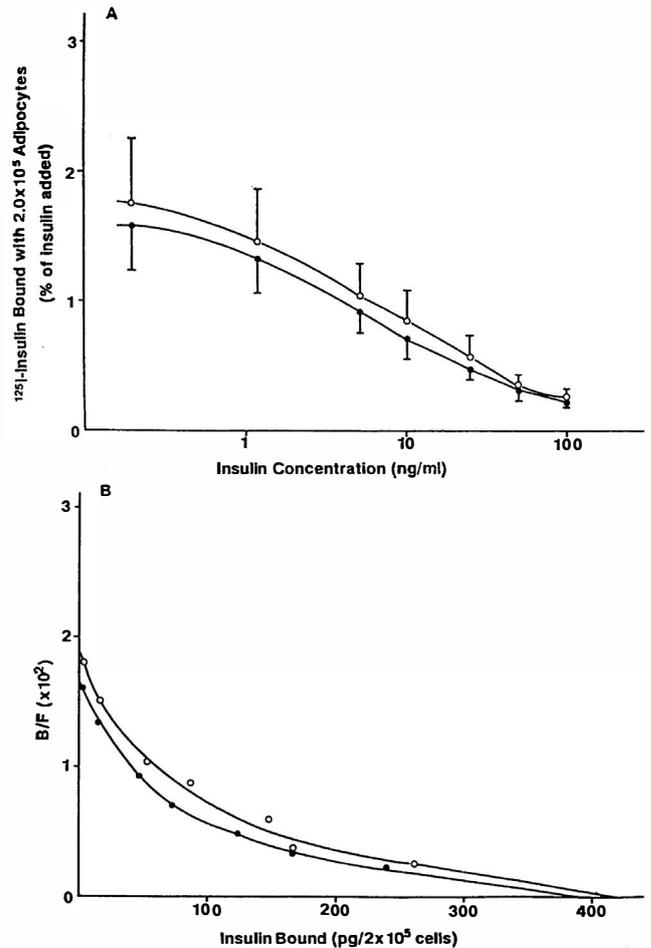


Fig. 1 A. Specific binding of ¹²⁵I-insulin in the adipocytes of ICR (n=7, ○—○) and NON (n=8, ●—●) mice. Data represent the mean \pm SD. Cells were incubated for 90 min at 24°C with 0.2ng/ml ¹²⁵I-insulin in the absence or presence of unlabeled insulin to give the total concentration indicated.

All data are corrected for nonspecific binding and are normalized to a cell concentration of 2x10⁵ cells/ml.

B. Scatchard plots of the insulin binding. Data from A are analyzed by two site model. The ratio of bound to free insulin (B/F) is plotted on the ordinate, and bound insulin is on the abscissa.

えても観察される。その結果に基づき LSD 法²²⁾ (Least Significant Difference) を用いて各インスリン濃度における有意差を検定すると, インスリン濃度が 0ng/ml と 0.3ng/ml の時の測定値では p < 0.05 で有意差を認めた。一方, インスリン濃度 50 ng/ml における最大反応では統計学的検定を行うと, 両種マウス細胞での糖取り込み活性には, 有意差が

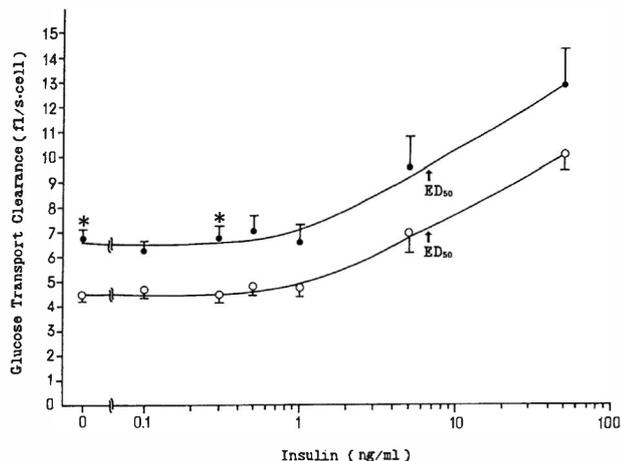


Fig.2 Effect of various concentrations of insulin in glucose transport into adipocytes from ICR (○) and NON (●) mice. Values are the mean \pm SE of eight separate experiments. Values of NON mice are significantly different from those of ICR mice indicated by * F-test $p < 0.05$. The ED_{50} of adipocytes from the ICR mice was 6.8 ng/ml, and that from NON mice was 6.6ng/ml.

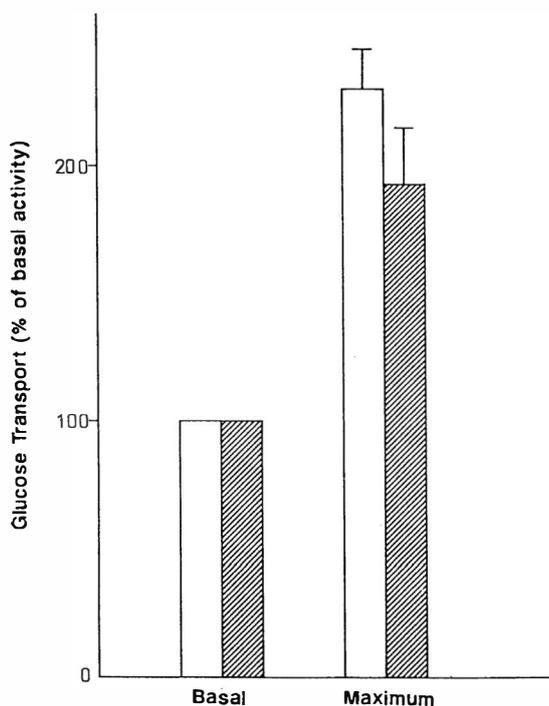


Fig.3 Stimulation of glucose transport in the adipocytes from ICR (open bar) and NON (hatched bar) mice in the presence of 50ng/ml insulin. Basal and maximum activities were measured with or without insulin. Values are the mean \pm SE (n=8) of the data from Fig. 2.

ない。また、各々のマウス細胞はインスリン無添加時に比べ、最大刺激時で約2倍程度、糖取り込み活性はインスリンにより促進された (Fig. 3)。この結果から、 ED_{50} を求めると ICR マウスで 6.8ng/ml, NON マウスで 6.6ng/ml とほぼ同じ値であった。つまり、インスリンに対する諸種の反応性に関しては、両種マウス間で特筆する程の差がないことを意味する。

3) 膵におけるインスリン mRNA の定量

総膵 RNA は膵湿重量 1mg あたり 8~12 μ g の収率で回収された。その一部を使って RNA プロットハイブリダイゼーションを行うと Fig. 4 に示したようにインスリンノーマ細胞に含まれる対照インスリン mRNA と同じ部位にあるバンドは、用いたマウスの中では、ICR に比べ NON マウスの方がいずれも弱い黒化度を示した。この結果から、NON マウス膵におけるインスリン mRNA 含量が対照に比し少ないことが示唆される。実際に、インスリン mRNA の陽性バンドのフィルター部分の 32 P を計測すると Table 1 に示したように、NON マウスのインスリン mRNA 含量は、コントロールの ICR マウスのそれに比し、平均約 33% へと有意かつ著明な減少を認めた。

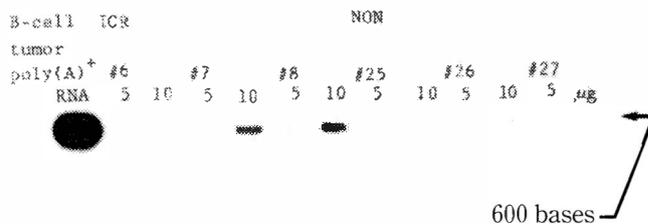


Fig. 4 Northern analysis for insulin mRNA in the pancreatic total RNA preparations from ICR and NON mice. Ten or five μ g of the pancreatic RNA fractions from ICR mice (#6, 7, and 8) and NON mice (#25, 26, and 27) were subjected to Northern analysis using the nick-translated insulin cDNA. The total RNA from a strain of B cell tumor that synthesizes insulin is also examined at the same time to confirm occurrence of insulin mRNA.

Table 1. Comparison of proinsulin-mRNA contents per 10 μ g of total RNA, isolated from the pancreas of ICR and NON mice.

	ICR	NON
Number	5	6
Count (cpm) (Mean \pm SE)	483 \pm 67	160 \pm 31 *
%	100	33(14~57)

* p < 0.01 by t-test

考 察

種々の原因があると考えられるII型糖尿病の成因を解明するためにその動物モデルを用いることができれば、糖尿病の成因研究にとって大きな意義がある。そこで、NONマウスの耐糖能異常の成立機序を明らかにすることにより、ヒト非肥満II型糖尿病の成因の少なくとも一つを推定できると考え、本研究を行った。

今回の研究結果より、NONマウスの末梢脂肪細胞の受容体のインスリン結合の性質や脂肪細胞への¹⁴C-D-glucoseの取り込みを指標としたインスリン作用については、対照のICRマウスとの間にNONマウスの耐糖能異常を説明しうるだけの有意の差を見い出せなかった。この事実はNONマウスの末梢脂肪細胞には検出できるほどのインスリン抵抗性が存在しないことを示唆する。

NONマウス脂肪細胞でのインスリン結合は、対照のICRマウスと有意差がなかった。しかし、ストレプトゾトシン投与で膵B細胞を傷害して作成した実験的糖尿病ラットの脂肪細胞では²³⁾、低インスリン血症が原因となり、代償機能により脂肪細胞のインスリンレセプター数の増加(up regulation)が起こり、その結果インスリン結合量の増加が観察される。ただこの場合、脂肪細胞への2-deoxyglucoseの取り込みでみた糖尿病ラット細胞のインスリン作用は、著明に低下している。これに対して、¹⁴C-D-glucoseの取り込みでみたNONマウス細胞でのインスリン作用は対照のICRマウス細胞に比して有意差がなく、従ってNONマウスは、低インスリン血症を伴

うものの、日常の状態では脂肪細胞を含み、末梢細胞での代謝障害を起こしていないものと考えられた。

インスリン作用についてはトレーサー濃度の¹⁴C-D-glucoseを用いてマウス脂肪細胞への糖取り込みを検討した。ラットの脂肪細胞ではインスリン作用として糖の取り込みを検討するときには、2-deoxyglucoseの取り込み²³⁾や、rapid pulse techniqueを用いて真の糖輸送を表わすとされる3-O-methylglucoseの取り込み¹⁶⁾が測定されることが多い。一方、マウスの脂肪細胞ではモルモットでの報告²⁴⁾と同様に、ラットに比して糖輸送体の数が少ないためか、最大反応が低く、Youngら²⁵⁾の報告でも2-deoxyglucoseの取り込みでインスリン最大刺激時でもインスリン濃度0ng/mlでの取り込みの2倍にも達していない。そこでさらに鋭敏な測定方法が望まれるわけであるが、マウスの脂肪細胞と同様、in vitroでのインスリンに対する糖取り込みの反応が低い例にヒトの脂肪細胞がある。この点を考慮し、インスリンによる糖取り込みの促進活性が低いヒト脂肪細胞を用いた実験系のために柏木らが開発した方法¹⁹⁾が、トレーサー濃度における¹⁴C-D-glucoseを用いた糖取り込みの測定法であり、我々はこの方法をマウスの脂肪細胞に応用した。インスリン最大刺激時でインスリン濃度0ng/mlでの糖取り込みの2倍位の反応が得られ(Figs. 2, 3)、マウス脂肪細胞のインスリン作用を検討するのに極めて有用な方法であると思われた。

ヒトの脂肪細胞での¹⁴C-D-glucoseを用いての糖取り込みの検討によると¹⁹⁾、肥満II型糖尿病患者では、インスリン最大刺激時(50ng/ml)の糖取り込みと、そのインスリンに対する感受性(ED₅₀)が健常肥満者より低下するものもあることが報告されている。NONマウスでは、インスリン最大刺激時の糖取り込み、ED₅₀ともに、コントロールのICRマウスと同様であった。これはNONマウスに末梢のインスリン抵抗性が存在しないことを示していると考えてよい。

II型糖尿病のもう一つの大きな要因である膵B細胞の機能異常について、我々はNONマウスで低インスリン血症と膵インスリン含量の低下傾向を既に観察していることから¹¹⁾インスリン合成の異常を考え、膵のインスリン mRNAの定量によるインスリ

ン合成障害について検討した。NONマウスの膵のインスリン mRNA 含量はコントロールのICRマウスより著しく低下しており、NONマウスにおいてインスリン遺伝子の転写からはじまるインスリン mRNA の代謝回転に異常があることが示唆された。しかし、インスリン mRNA レベルの低下が転写活性の低下によるのか mRNA 自身の分解促進によるかについては、まだ結論が得られていない。次に、インスリン自身の合成の異常にも量の異常と質の異常がある。近年異常インスリンによる糖尿病症例が報告されているが^{26, 27, 28)}、我々はこの点に関しても検討した。マウスインスリン I, II とアミノ酸配列が同一であるラットインスリン I, II を標準物質として NONマウスの膵から抽出したインスリンをヒトの異常インスリン中の 1 残基のアミノ酸置換を識別できる条件で HPLC にて分析したところ、NONマウスでは、マウスインスリン I, II に相当する 2 つのメインピークを認め、かつ、スタンダードのラットインスリン I, II とピークが一致した (unpublished)。よって、NONマウスが合成、分泌しているインスリンは正常マウスインスリンであると推定され、NONマウスの耐糖能異常が異常インスリン血症によるインスリン作用の活性低下によって起こる可能性は否定してよいと結論した。

膵のインスリン mRNA については、Giddingsら^{29, 30)}による報告ではラットで絶食によって 18 時間で約 2/3 へ減少すること、また 3 日間絶食後、生理的食塩水静注群、ブドウ糖静注群、再摂食群でインスリン mRNA レベルを比較するとブドウ糖静注群で特異的にインスリン mRNA 量が増加している。このように膵のインスリン mRNA が、食事摂取とくにブドウ糖によって大きく変動することが示されているが、我々の実験でのマウスは自由摂食でありこのような食事摂取の制限による影響は除外しうると考えられた。

糖尿病と膵のインスリン mRNA 量との相関については、ストレプトゾトシン処理ラット³¹⁾や膵切除ラット³²⁾での報告があり、いずれも耐糖能異常と膵のインスリン mRNA 含量の低下が相関することを明らかにしているが、両者ともに膵臓への直接的傷害によって耐糖能異常を誘発しており、この点で NONマウスと同一に論じることはできない。一方、

他の自然発症糖尿病動物モデルの膵のインスリン mRNA 含量についての報告はなく、これらのモデル動物については今後のさらなる検討が必要と思われる。

膵 B 細胞からのインスリン分泌は *in vivo* でグルコースおよびアルギニン投与の刺激に反応して起こる。このインスリン分泌の不全もヒト II 型糖尿病に共通して認められる特徴である。一般にこの病型の患者ではグルコース刺激によるインスリンの初期分泌 (第 1 相) が低下消失したり³³⁾、さらには後期分泌 (第 2 相) も低下する。しかし、アルギニンによる刺激に対しては十分反応する。この点に関して NONマウスでは狩野ら³⁴⁾が単離ランゲルハンス氏島を用いた灌流実験で、ブドウ糖刺激によるインスリン分泌の第 1 相が消失し、アルギニン刺激に対するインスリン分泌が保たれていることを明らかにしており、この点も NONマウスの II 型糖尿病動物モデルとしての適切な特徴の 1 つといえよう。

今回我々は NONマウスが示す耐糖能異常は、末梢のインスリン抵抗性によると考えるより、むしろインスリン遺伝子から転写された mRNA の代謝回転の障害によりインスリン mRNA 含量が低下し、このことが既に明らかにしてきた膵インスリン含量の低下を起こす可能性が強いことを示唆した。さらに我々はこの結果起こる低インスリン血症が、NONマウスの耐糖能異常の成立に主要な役割を果たしている可能性が強いと考えている。このように NONマウス膵 B 細胞には明らかに機能の異常が発見されたが、インスリン分泌との関連を考えると、インスリン含量の低いことがグルコース刺激による第一相の低下を起こしているかも知れないし、あるいはインスリン分泌に至る血中グルコース濃度の膜を介してのシグナル伝達も B 細胞で障害されているのかも知れない。NONマウスでインスリン mRNA の翻訳がグルコースにより十分促進されているかどうかは現在不明である。しかし、既に述べたように膵のインスリン mRNA レベルが低下するという特定の原因に基づく糖尿病動物モデルの存在は、ヒト II 型糖尿病の病態や成因の解明に貢献するものと期待される。

ラットプレプロインスリン I cDNA を提供して頂きました東北大学医学部第 1 医化学・岡本宏教授, ^{125}I -insulin を提供して頂きました滋賀医科大学第 3 内科・小林正講師に深く感謝致します。

なお, 本研究の一部は文部省科学研究費 (一般 C, No. 60570524) によった。

文 献

- 1) World Health Organization, Report of a WHO Study Group. Technical Report Series **727**. Geneva : WHO, 1985.
- 2) Todd J. A., Bell J. I. and McDevitt H. O. : HLA-DQ β gene contributes to susceptibility and resistance to insulin dependent diabetes mellitus. *Nature* **329** : 599–604, 1987.
- 3) Barnett A. H., Eff C., Leslie R. D. G. and Pyke D. A. : Diabetes in identical twins. *Diabetologia* **20** : 87–93, 1981.
- 4) Knowler W. C., Pettitt D. J., Savage P. J. and Bennett P. H. : Diabetes incidence in Pima Indians. *Am. J. Epidemiol.* **113** : 144–156, 1981.
- 5) National Diabetes Data Group : Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* **28** : 1039–1057, 1979.
- 6) Cerasi E. and Luft R. : “What is inherited – what is added” hypothesis for the pathogenesis of diabetes mellitus. *Diabetes* **16** : 615–627, 1967.
- 7) Kosaka K., Hagura R. and Kuzuya T. : Insulin responses in equivocal and definite diabetes, with special reference to subjects who had mild glucose intolerance but later developed definite diabetes. *Diabetes* **26** : 944–952, 1977.
- 8) Mordes J. P. and Rossini A. A. : Animal models of diabetes mellitus. In : *Joslin’s Diabetes Mellitus* (Marble, A., Krall, L. P., Bradley, R. F., Christlieb, A. R., Soeldner, J. S. eds.) : 110–137. Lea & Febiger, Philadelphia, 1985.
- 9) Makino S., Kunimoto K., Muraoka Y., et al. : Breeding of a nonobese, diabetic strain of mice. *Exp. Anim.* **29** : 1–13, 1980.
- 10) Tochino Y. : Discovery and breeding of the NOD mouse. In : *Insulinitis and Type I Diabetes* (Tarui S. Tochino Y. NonaKa K. eds.) : 3–10. Tokyo : Academic Press, Japan, 1986.
- 11) 大角誠治, 森岡尚夫, 沢 丞ほか : ヒト II 型糖尿病の新しい動物モデル, NON マウスの研究. *糖尿病動物* **1** : 162–167, 1987.
- 12) De Fronzo R. A., Ferrannini E. and Koivisto V. : New concepts in the pathogenesis and treatment of noninsulin dependent diabetes mellitus. *Am. J. Med.* **74** : 52–81, 1983.
- 13) Reaven G. M., Berstein R., Davis B. and Olefsky J. M. : Non-ketotic diabetes mellitus : Insulin deficiency or insulin resistance ? *Am. J. Med.* **60** : 80–88, 1976.
- 14) Freychet P., Roth J. and Neville D. M., Jr. : Monoiodoinsulin : Demonstration of its biological activity and binding to fat cells and liver membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **43** : 400–408, 1971.
- 15) Gambhir K. K., Archer J. A. and Bradley C. J. : Characteristics of human erythrocyte insulin receptors. *Diabetes* **27** : 701–708, 1978.
- 16) Whitesell R. R. and Gliemann J. : Kinetic parameters of transport of 3-O-methylglucose and glucose in adipocytes. *J. Biol. Chem.* **254** : 5276–5283, 1979.
- 17) Rodbell M. : Metabolism of isolated fat cells I : Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J. Biol. Chem.* **239** : 375–380, 1964.
- 18) Hirsch J. and Gallian E. : Methods for the determination of adipose cell size in man and animals. *J. Lipid. Res.* **9** : 115–119, 1968.
- 19) Kashiwagi A., Verso M. A., Andrews J., et al. : In vitro insulin resistance of human adipocytes isolated from subjects with non-

- insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* **72** : 1246–1254, 1983.
- 20) Maniatis T. : Extraction, purification and analysis of mRNA from eukaryotic cells. In : *Molecular Cloning* (Maniatis, T. ed.) : 188–209. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
- 21) 小林 正 : インスリンレセプターの測定法。 *Diabetes Journal* **10** : 128–131, 1982.
- 22) スネデカー, コ克蘭 : 統計的方法。(畑村又好, 奥野忠一, 津村善郎共訳) : 293–295. 岩波書店, 東京, 1972.
- 23) Kobayashi M. and Olefsky J. M. : Effects of streptozotocin-induced diabetes on insulin binding, glucose transport, and intracellular glucose metabolism in isolated rat adipocytes. *Diabetes* **28** : 87–95, 1979.
- 24) Horuk R., Rodbell M., Cushman S. W. and Wardzala L. J. : Proposed mechanism of insulin-resistant glucose transport in the isolated guinea pig adipocyte. *J. Biol. Chem.* **258** : 7425–7429, 1983.
- 25) Young P., King L. and Cawthorne M. A. : Increased insulin binding and glucose transport in white adipocytes isolated from C57BL/6 ob/ob mice treated with the thermogenic β -adrenoceptor agonist BRL 26830. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **133** : 457–461, 1985.
- 26) Kwok S. C. M., Steiner D. F., Rubenstein A. H. and Tager H. S. : Identification of a point mutation in the human insulin gene giving rise to a structurally abnormal insulin (Insulin Chicago). *Diabetes* **32** : 872–875, 1983.
- 27) Haneda M., Chan S. J., Kwok S. C. M., et al. : Studies on mutant insulin genes : Identification and sequence analysis of a gene encoding [Ser^{B24}]insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80** : 6366–6370, 1983.
- 28) Nanjo K., Sanke T., Miyano M., et al. : Diabetes due to secretion of a structurally abnormal insulin (Insulin Wakayama). *J. Clin. Invest.* **77** : 514–519, 1986.
- 29) Giddings S. J., Chirgwin J. and Permutt M. A. : The effects of fasting and feeding on preproinsulin messenger RNA in rats. *J. Clin. Invest.* **67** : 952–960, 1981.
- 30) Giddings S. J., Chirgwin J. and Permutt M. A. : Effects of glucose on proinsulin messenger RNA in rats in vivo. *Diabetes* **31** : 624–629, 1982.
- 31) Permutt M. A., Kakita K., Malinas P., et al. : An in vivo analysis of pancreatic protein and insulin biosynthesis in a rat model for non-insulin-dependent diabetes. *J. Clin. Invest.* **73** : 1344–1350, 1984.
- 32) Orland M. J., Chun R. and Permutt M. A. : Modulation of proinsulin messenger RNA after partial pancreatectomy in rats. *J. Clin. Invest.* **75** : 2047–2055, 1985.
- 33) Pfeifer M. A., Halter J. B. and Porte D. : Insulin secretion in diabetes mellitus. *Am. J. Med.* **70** : 579–588, 1981.
- 34) Kano Y. : Insulin secretion in NOD and NON mouse. *J. Kyoto Pref. Univ. Med.* **97** : 295–308, 1988.