

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

河野 一 弥
大塚製薬(株) 徳島研究所

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

河野一弥

大塚製薬（株）徳島研究所

目次

要約	4
第1章 緒言	6
第2章 実験材料及び方法	9
動物飼育環境	9
遺伝モニタリング	9
血液生化学検査	9
経口ブドウ糖負荷試験	10
病理組織学的検査	10
外来性インスリンの投与実験	10
催糖尿病尿遺伝子の解析	11
糖尿病発症に關与する性ホルモン実験	11
尿検査	11
糖尿病および糖尿病性腎症に対する食餌制限の効果	11
統計学的処理	12
第3章 糖尿病ラットの発見と系統の確立	13
糖尿病ラットの発見	13
OLETFラットの系統確立の経緯と成績	13
第4章 臨床経過およびその病理組織像	16
臨床経過	16
糖尿病の発症率	17
臨床生化学的特性	17
経口ブドウ糖負荷試験	19
病理組織学的検査	21
小括	26
第5章 催糖尿病遺伝子の解析	27
小括	30
第6章 糖尿病発症に關与する性ホルモン	31
小括	33
第7章 糖尿病性腎症	34
小括	38
第8章 糖尿病および糖尿病性腎症に対する食餌制限の効果	39
糖尿病発症率	39
血漿トリグリセライドとコレステロール値	39

尿蛋白値	40
腎重量	40
病理組織学的検査	42
小括	43
第9章 総括ならびに考察	44
結論	49
謝辞	50
文献	51

要 約

Charles River Canada Inc.よりLong-Evans系ラットを導入し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(OGTT; Oral Glucose Tolerance Test)の成績を指標にして選抜交配を重ね、1991年にF20世代に達し系統として確立しOtsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF)と命名した。遺伝学的モニタリング成績においても22種類の生化学的標識遺伝子座はすべてホモ接合体であり、皮膚移植試験においても同一系統内はすべて生着が認められたため、遺伝的均一性が保証された。

本研究においてOLETFラットの病態の特徴を以下のごとく明らかにした。1) OGTTの血漿グルコース値が生後8週齢より高くなり、24週齢では血漿グルコース値と共に血漿インスリン値も高くなりOGTTによって糖尿病と診断された。その後、血漿グルコース値は55週齢、65週齢と顕著に上昇したが、血漿インスリン値は生後65週齢では逆に低値を示した。このようにOLETFラットの糖尿病は高インスリン血症から低インスリン血症になり多食、多飲、多尿、体重減少等の症状を呈することを特徴とした。2) OGTTによって診断したF20世代以降の雄の生後25週齢での糖尿病および耐糖能障害の発症率はそれぞれ87.8%(341/388)、7.2%(28/388)であり、雌では生後65週齢で糖尿病および耐糖能障害は33.3%(5/15)、20.0%(3/15)であった。3) 飽食時の血漿グルコース値、トリグリセライド値およびコレステロール値は加齢と共に上昇し、生後40週齢では血漿グルコース値はコントロールのLETO (Long-Evans Tokushima Otsuka) ラットと比較して2倍、トリグリセライド値は5倍およびコレステロール値は1.5倍となった。4) 生後4週齢頃より著明な体重の増加がみられ加齢と共により顕著になり、糖尿がみられると徐々に減少した。5) 遺伝解析の結果、催糖尿病遺伝子は雌雄ともに劣性で複数存在し、その一つがX染色体上に存在している可能性が示唆された。コントロールである糖尿病を発症しないLETOラットも催糖尿病遺伝子のうち、そのいくつかを共有していた。6) 催糖尿病遺伝子の存在下でテストステロンが糖尿病の発症の要因の一つであることが明かとなった。7) 糖尿病発症とRT1(主要組織適合遺伝子複合体)との関連性はなかった。8) 膵ランゲルハンス島(以下、膵ラ島)の病理組織学的変化を次の3つのステージに分けることができた。I) 初期(4~9週齢): 膵ラ島近傍に炎症性細胞浸潤がみられたが、膵ラ島細胞の組織構築は正常で抗インスリン抗体を用いた免疫組織染色でもインスリンは十分に含有されていた。II) 増生期(10~40週齢): 膵ラ島は広範な結合組織の増生のため島状に分割され、さらに膵ラ島近傍と外分泌部には新生されたと思われる膵ラ島も認められた。III) 疲弊期(40週齢以上): 膵ラ島の大きさおよび数が著明に減少した。これらのOLETFラットの自然経過の中でみられた膵ラ島の肥大と線維化、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の5つの病変について、糖尿病発症との関連性を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各世代の合計700例についてロジスティックモデ

ルにデータを当てはめrisk factorを推定したところ、臍ラ島の肥大と線維化が有意であり、糖尿病発症に関して重要な要因であることが統計学的に証明された。9) 腎重量はLETOラットに比較して全週齢とも約1.5倍増加していた。尿蛋白値は生後27週齢よりLETOラットに比較して増加し、その後顕著に上昇、生後47週齢では800mg/dlを越えた。尿蛋白量の推移と相関して腎糸球体の器質的変化も認められ、23週齢より少数の腎糸球体にメサンギウムの軽度増殖性変化と、これに加えて一部の腎糸球体の毛細血管にfibrin cap、ボーマン嚢上皮下にcapsular dropが現れ、この変化はヒトの糖尿病性腎症でみられる滲出性病変に相当すると思われた。40週齢以降から腎糸球体のメサンギウム領域の拡大と基底膜の肥厚がみられ、55週齢になると結節性病変(Kimmelstiel-Wilson lesion)に非常に類似した病変がみられた。70週以上になると尿細管の萎縮、間質線維化を伴う腎糸球体の萎縮、硬化が現れ、90週を越えると腎糸球体の荒廃はさらに高度となり、いわゆる終末腎に近い像となっていた。

以上のごとくOLETFラットは高血糖状態が長期間持続するため、糖尿病の発症機序の解明や治療薬の開発のみならず、糖尿病性合併症の予防や治療の研究におおいに貢献できると考えられる。

緒言

糖尿病は単一な疾患ではなく、原因を異にする疾患群の総称と考えるべきで、古くからそれぞれの病態を分類しようとする努力が払われてきた。一次性糖尿病に対する二次性糖尿病、そして一次性糖尿病は若年性あるいはやせ型糖尿病に、二次性糖尿病は成人型あるいは肥満型糖尿病といった分類が最近まで用いられていた。しかし急速に進歩した糖尿病の成因論や病態生理・生化学・免疫学などを基盤に国際的に通用しうる病型分類がなされた。この分類は世界保健機構の専門委員会が世界に向けて勧告したものである(51)。この勧告では糖尿病をa) インスリン依存性糖尿病 (Insulin Dependent Diabetes Mellitus; IDDM) とb) インスリン非依存性糖尿病 (Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus; NIDDM) に大別し、後者を肥満を伴うものと、伴わないものに分類し、さらにc) 栄養障害関連糖尿病とd) 特定の疾患・症候群に伴うその他の糖尿病 (膵疾患、内分泌疾患、薬剤または化学物質によるもの、インスリンまたはインスリン受容体の異常、遺伝性疾患、その他) に分けている。

IDDMの根本は極度な膵ランゲルハンス島 (以下膵ラ島) B細胞の破壊、荒廃に基づく、インスリン分泌の絶対的な欠乏にある。このインスリンの枯渇は急激な糖代謝異常のみならず、脂質代謝・蛋白代謝異常を引き起こす。すなわち肝からのグルコース放出が増大するとともに、多くの組織でグルコースの取り込みが低下して高血糖状態をもたらす。その結果、滲透圧利尿 (多尿) ・多食・多飲・やせなどの症状をあらわす。そのため、IDDM患者の生命を維持するにはインスリン注射が不可欠である。近年IDDMの発症に遺伝的背景が重要であることが明らかになり、特定のHLA (ヒト主要組織適合遺伝子複合体) との間に高い相関を有している (43)。また、その発症にCoxsackie B4 (3) や Encephalomyocarditis (EMC) (8) などのウイルス感染を認めている報告もある。さらにIDDM患者では他の免疫疾患と合併する率が高く、また種々の自己抗体が検出されるなど、その発症に自己免疫の関与が認められている。IDDMと強い関連のある自己抗体としては膵ラ島抗体 (Islet Cell Antibody; ICA)、膵ラ島細胞膜抗体 (Islet Cell Surface Antibody; ICSA)、インスリン自己抗体 (Insulin Auto-Antibody; IAA) がある。これらの抗体は直接膵ラ島B細胞の破壊に関与するというよりも、破壊の過程で放出される抗原に対する抗体である可能性が強い。現在、IDDMの成因に関する研究はウイルスあるいは自己免疫を介する膵ラ島破壊機構の解明を中心に進められている。この研究のために糖尿病発症の特徴がヒトのそれに類似しているモデル動物としてWistarラットから分離されたBBラット、ICRマウスから分離されたNODマウスなどが用いられている。これらの動物の糖尿病症状は急激に高血糖・多食・多飲・多尿・ケトン尿など典型的な糖尿病症状が起き、数日でインスリン欠乏状態になり、インスリン注射をしない限り一ヶ月以内に死亡する特徴を有している。

一方、NIDDMは一卵性双生児における発症の一致率がIDDMよりも高いため、遺伝素因

の関与はNIDDMの方が濃厚と考えられている(2)。しかし、NIDDMの発症遺伝子は現在なお全く不明である。催糖尿病遺伝子を同定することが出来れば、NIDDMの遺伝性素因の実態を明らかにすることが出来るため、多くの研究者がこの分野の研究に取り組んでいる。しかし、NIDDMにみられる次のような特徴が催糖尿病遺伝子を同定する障害になっている。1) NIDDMは多くの場合、複数の遺伝子が関与する多因子遺伝疾患(polygenic disease)の可能性がある。2) 多因子疾患(multifactorial disease)であるため発症には加齢・肥満・ストレスなどの環境因子も影響する。3) NIDDMは疾患全体として遺伝的に単一でなく、多様(genetically heterogeneous)である。これはNIDDMが多彩な臨床像を示すことから推測され、このような理由からNIDDMの催糖尿病遺伝子を同定する研究は、現在なお困難を極めている。

糖尿病は世界的に激増し、わが国でもその患者は600万人を越えており、40歳以上の人口についてみれば、その10%は糖尿病を持っているといわれる。糖尿病の治療面では、近年経口血糖下降剤や強化インスリン療法などの進歩が目覚ましく、患者の予後は著しく良くなったとはいえ、なお十分ではなく、神経障害、網膜症、腎症などの合併症が激増している。とくに腎症のために透析療法に入る患者の数が年々増加し、1990年の透析療法導入患者16,543例のうち、糖尿病性腎症患者は4,326例で、その比率は26.2%に達している。これは1980年に比べると、例数で5.5倍、比率で2.75倍に及んでいる(37)。しかも半数に近い患者は重篤な網膜症のために視力障害が強く、闘病意欲に大きな問題を投げかけている。したがって合併症対策は社会的な問題であり、現時点では糖尿病治療における最大目標となっている。

糖尿病の研究に目を向けると、ストレプトゾトシンやアロキサンを投与して人為的に糖尿病を惹起された実験動物が、その発症原因の研究や薬剤の開発に多く利用されている。しかしヒトの場合糖尿病の原因が薬物中毒による場合は稀であり、さらに糖尿病の研究にはヒトの糖尿病に近い自然発症のモデル動物が望まれている。

こういった社会的状況下で、著者らは1982年Charles River Canada Inc.(CRL)より導入したLong-Evansラット(Canadian Breeding Farm & LaboratoriesからCRLに1978年導入、CRLでクローズドコロニーによって生産)から次の3種類のモデル動物を開発した。第1は糖尿病病態の経過が緩徐で、糖尿病性腎症がみられるOLETF(Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty)ラット(21-22)、第2はTリンパ球減少症を伴わずIDDMが発症するLETL(Long-Evans Tokushima Lean)ラット(23-24)、第3は糖尿病を全く発症しないコントロールラットで、遺伝的にも前2者と近縁であるLETO(Long-Evans Tokushima Otsuka)ラットである(Fig.1)。

本論文では糖尿ラットの発見とOLETFラットの系統確立の経緯ならびにOLETFラットの病態を解析し、本ラットの糖尿病モデルとしての有用性を述べ考察する。



Fig.1 生後25週齢のOLETFラット（上段）とコントロールであるLETOラット（下段） OLETFラットは肥満を呈し、OGTTにより糖尿病と診断されている。

第2章 実験材料および方法

動物飼育環境

動物の飼育は以下の病原微生物；*Bordetella bronchiseptica*, *Corynebacterium kitchneri*, *Salmonella spp.*, *Mycoplasma pulmonis*, Tyzzer's organism, *Mouse adenovirus(MAV)*, *Mouse hepatitis virus(MHV)*, *Sendai virus(HVJ)*、および*Giardia muris*, *Spironucleus muris*, *Syphacia spp.*などの寄生虫を認めず、温度(23±2℃)、湿度(55±5%)、換気回数13～15回/時間、照度300～500Luxおよび照明時間(7:00～19:00)にコントロールされた閉鎖環境下の施設で飼育した。餌は実験動物用固形飼料CRF-1(オリエンタル酵母株式会社、東京)で、水は水道水を自由に与えた。ケージは日本クレア株式会社製(東京)エココンTPX(31×36×17cm)を用い、最大2匹を収容し、床敷にはベータチップ(日本チャールズリバー株式会社、横浜)を用いた。

遺伝モニタリング

肺、肝、腎、精巣、精嚢、十二指腸をホモジナイズした上清を、タイタンⅢやポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、目的とするバンドの有無や易動度の違いによって決定する方法を用いた(15)。ラットのMHC(主要組織適合遺伝子複合体)であるRT1のclass Iとclass IIの抗原型の検索は名取(36)、大橋(40)、城石(45)の方法により行った。また皮膚移植試験は藤井らの方法に従って行ない、動物数は各々の組み合わせ、3～6匹を用いた(19)。

血液生化学検査

血液は尾動脈より吸引チューブ(フナコシ株式会社、東京)とヘパリナイズされた微量採血管(テルモ株式会社、東京)を用いておよそ50 μ l(インスリン測定の場合はおよそ200 μ l)を採取し、3,000rpmで20分間遠心し、グルコースBテストワコー(和光純薬、大阪)を用いてグルコースオキシダーゼ法で血漿グルコースの測定を行った。

血漿インスリン値(以下IRI値; Immunoreactive Insulin)の測定はラットインスリン測定キット(INCSTAR, Co., Stillwater, MN, USA)によった。その方法の要点は以下の通りである。血漿0.05mlにモルモット抗ラットインスリン血清0.1mlおよび牛血清アルブミン(Sigma, St. Louis, MO, USA)0.25%を含む硼酸緩衝液(0.1M, pH8.5)0.2mlを加え、4℃ 24時間反応させた。次いで¹²⁵I Insulin(牛血清アルブミンを含む硼酸緩衝液で2倍希釈した溶液)0.1mlを加え、4℃でさらに72時間反応させた。この反応液にウサギ抗モルモット血清0.5mlを加えて室温で25分間放置した後、4℃3,000rpmで30分間遠心した。この上清を除き、結合した反応物の放射線量を γ -線カウンター(ARC-N-5384、アロカ株式会社、東京)で測定した。次に精製されたラットインスリンを緩衝液で97.7倍から25,000倍まで倍希釈して標準曲線を作製し、この標準曲線と個々の検体より得られた数値とを対応させてインスリン量を算出した。

血漿トリグリセライドはトリグリセライド G-テストワコーキット(和光純薬工業、大

版) を使用してGPD-P-クロルフェノール発色法で、コレステロールはモノテスト®コレステロールキット (Boehringer・Mannheim, Mannheim, Germany) を使用してEnd point 法でそれぞれ測定した。

経口ブドウ糖負荷試験(OGTT; Oral Glucose Tolerance Test)

16時間絶食後、50%グルコース溶液を体重100g当たり0.4ml(2g/kg)の割合で強制経口投与した。血漿グルコース値はグルコース負荷前、負荷後30分、60分、90分、120分、インスリン値はグルコース負荷前、負荷後60分、120分に、尾動脈血より得られた血漿を用いて測定した。OGTTの成績を3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、かつ、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。これらの診断基準の根拠は1982年小坂らによって報告された糖尿病の診断に関する委員会報告で示されている75gOGTTにおける判定区分と判定基準を参考にした(28)。さらにこの委員会報告にはない頂値300mg/dlについては本ラットの特徴である肥満と関連しており、肥満を伴う糖尿病モデルを開発する目的から新たに追加基準とした。

病理組織学的検査

動物はエーテル麻酔下で放血致死せしめた後剖検した。膵、肝、腎などの臓器は10%中性緩衝ホルマリンで固定し、通常の方法によりパラフィン切片を作製してH-E染色を施した。さらに肝はOil Red O染色、腎はPAS染色も実施し、病理組織学的に観察した。膵ランゲルハンス島(以下膵ラ島)のインスリンはヒストスキャンキット(Biomed Co., Fullerton, CA, USA)で、グルカゴンとソマトスタチンはVECTASTAIN®ABCキット(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)によりそれぞれ免疫組織染色をおこなった。脱パラフィンした膵の切片にそれぞれguinea pig anti-human insulin, rabbit anti-porcine glucagonおよび rabbit anti-somatostatin-28(合成)の1次抗体を加え2~6時間反応させた。次いでPBSで洗浄後、ビオチン化したrabbit anti-guinea pig IgGもしくはanti-rabbit IgGの2次抗体を加え、1時間反応させPBSで洗浄後、ペルオキシダーゼ-アヴィジン-試薬(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)を加え同じく1時間反応させた。その後発色液(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochlorideもしくはchromogen)で発色させた。対照として1次抗体の代わりにPBSを加えたnegative controlも同時に作製した。

外来性インスリンの投与実験

インスリン(結晶性インスリン亜鉛水性懸濁注射液ノボ・ウルトラレンテMC、ノボ薬品株式会社、東京)を多食、多尿、糖尿、体重減少およびIRI値500pg/ml以下を呈した生後65週齢以上のOLETF雄ラットの背部皮下に1日当たり4単位を21日間毎日投与し、体重は毎日、血漿グルコースは投与前、投与後1、5、8、12、15、19、および21日目で尾動脈採

血し測定した。

催糖尿病遺伝子の解析

催糖尿病遺伝子を解析するために交雑試験をおこなった。動物は大塚製薬徳島研究所で維持しているF29世代のOLETFラットとLETOラットを、F344/Ducrjラットは日本チャールズリバー株式会社（横浜）より購入したものを使用した。F1およびF2世代はOLETFラットとLETOラットならびにF344/Ducrjラットを正逆交配によって得た。戻し交配はそれぞれのF1世代とOLETFラット、LETOラットもしくはF344/Ducrjラットを正逆交配した。糖尿病の診断は生後25と30週齢でOGTTを行ない判定した。なお、OGTTは雄のみでおこなった。生後32週齢でエーテル麻酔下で放血致死せしめ、臍を病理学的検査をおこなうために、10%中性緩衝ホルマリンで固定し、常法により得られた組織切片にH-E染色を施し鏡検した。

糖尿病発症に關与する性ホルモン実験

雌雄それぞれを精巢あるいは卵巢を摘出处置した群、雌雄を処置後さらにテストステロンを投与した群、および無処置で背部に生理食塩水を投与する対照群を設けて調べた。

1) 雄性ラット実験群；対照群、精巢摘出群および精巢摘出に加えてエナント酸テストステロン注射液（帝国臓器、東京）を投与した群の3群を設定し、各群8匹づつ動物を配した。精巢摘出は4週齢の時点においてエーテル麻酔下で腹部を剃毛後に陰茎前方の腹部正中線を切開して精巢と精巢上体を摘出した。また、エナント酸テストステロン注射液は35mg/kg/weekを6週齢から50週齢まで1週間に1度の割合で背部皮下に投与した。

2) 雌性ラット実験群；対照群、卵巢摘出群および卵巢摘出に加えてエナント酸テストステロン注射液を投与した群の3群を設定し、各群8匹づつを配した。卵巢摘出は4週齢の時点においてエーテル麻酔下で背部を剃毛後に正中線の皮膚および左右背筋を切開して卵巢を摘出した。また、エナント酸テストステロン注射液35mg/kg/weekを6週齢から50週齢まで1週間に1度の割合で背部皮下に投与した。

3) テストステロン濃度の測定；生後40週齢のOLETF雄ラット、LETO雄ラット、ならびにF344/Ducrj雄ラットの腹部大静脈より採血し、3,000rpmで20分間遠心分離して得た血漿を用い、チューブ固相法によるテストステロン測定RIAキット（³H-トータルテストステロン、日本DPC Co.、東京）を使用して測定した。なお、測定は大塚アッセイ研究所（徳島）に依頼した。

尿検査

尿中グルコースおよび尿蛋白はUri-sticks II（マイルス三共株式会社、東京）でモニターした。また、尿蛋白の定量はプロテインアッセイキット（Bio-Rad, CA, U.S.A.）を用いて色素結合法でおこなった。

糖尿病および糖尿病性腎症に対する食餌制限の効果

雄OLETFラット40匹とLETOラット10匹を使用した。餌は他の実験と同様にオリエンタル酵母社から市販されている一般飼育用固形飼料CRF1を給餌した。実験群としてA群は6

から80週齢まで通常摂餌量の30%を制限した群、B群は6から30週まで通常摂餌量の30%を制限し、その後飽食にした群、C群は6から30週まで飽食にした後、80週まで通常摂餌量の30%を制限した群、対照として80週まで飽食で飼育したOLETFラットとLETOラットの飽食群の5群を設けた。各群それぞれ10匹を配した。測定項目は体重、OGTT、非絶食時のトリグリセライド、コレステロール値で、解剖は80週で行ない腎重量を測定した。また、膵と腎は10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、常法により得られた組織切片にH-EとPAS染色を施し鏡検した。さらに腎糸球体の障害を半定量化するために、腎糸球体障害度(Glomerular Lesion Score 以下、GLS)を求めた。すなわち1検体につき可能な限り血管極のみられる腎糸球体を50個鏡検し、以下の0.5から4.0の基準で半定量化し、その平均をその個体の障害度とした。

0.5:メザンギウム領域の軽度拡大と腎基底膜の肥厚がみられる。

1.0:メザンギウム領域が結節状あるいは橢円状に拡張もしくはfibrin capを含む滲出性病変が腎糸球体の約25%にみられる。

2.0:メザンギウム領域が結節状あるいは橢円状に拡張もしくはfibrin capを含む滲出性病変が腎糸球体の約50%にみられる。

3.0:メザンギウム領域が結節状あるいは橢円状に拡張もしくはfibrin capを含む滲出性病変が腎糸球体の約75%にみられる。

4.0:萎縮・硬化像が腎糸球体のほぼ全域にみられる。

統計学的処理

全ての値は平均と標準偏差(Mean±S.D.)で表し、有意差検定はLETOラットあるいはOLETFラットを対照群として各処置群の間でStudent's t-test(two-tailed)法で行った。

OLETFラットとLETOラットならびにF344/Ducrjラットとの交雑群の膵病変と糖尿病発症との関連性を調べるために、ロジスティックモデルにデータを当てはめ、risk factorの推定を行なった。

第3章 糖尿病ラットの発見と系統の確立

糖尿病ラットの発見

1982年Charles River Canada Inc.より導入したクローズドコロニーのLong-Evans系ラットから、肥満を伴い多食、多飲、糖尿および多尿を呈し、糖尿がみられても体重の減少が軽度で、病態の進行が非常に緩徐なラット (OLETF) を1984年に発見した。

OLETFラットの系統確立の経緯と成績

OLETFラットとLETOラットは、Charles River Canada Inc.より同一週齢で導入したLong Evansラットから分離された。OLETFラットはFig.2に示すように、購入したラットの2組 (#11×#1、#12 ×#2) の交配から生まれた子を3世代クローズドコロニーとして交配し維持していたところ、肥満と糖尿排泄が認められるが、体重の減少はほとんどなく、糖尿病の進行が緩徐なラット (#4236♂) を発見した。そこでその親をF0世代とし、生後10週齢で体重が重い雄 (出来るだけ400g以上) を選び兄妹交配させた。1世代は20組以上交配した。雄親は生後25週齢まで生存させOGTTを実施し、正常動物と耐糖能障害を示す動物、およびその子孫を排除した。

コントロール系であるLETOラットはF0世代の同腹仔の内、糖尿発症雌と糖尿非発症雄を交配しF1世代を得たが、いずれの動物においても糖尿病は発症しなかった。それ以降、F2からF20世代まで兄妹交配し、雄親は生後25週齢まで生存させOGTTを実施したが、F1からF20世代まで誕生した動物の中には糖尿病の発症はみられなかった。

OLETFラットおよびLETOラットの遺伝的均一性を調べる目的で、22種類の生化学的標識遺伝子座の検査を行ないその成績をTable 1 に示した。両系統とも対象とした遺伝子座はすべてホモ接合体であった。OLETFとLETOラットとの間には同じリンケージグループ (同一染色体) のEs-2,3,8,9,10に差がみられたのみであり、ラットの主要組織適合遺伝子複合体であるRT1のクラスI およびクラスIIは両系統ともにuハプロタイプであった。また皮膚移植試験は各系統内皮膚移植ではいずれも生着が認められたが、OLETFとLETOラット、さらにLETLとLETOラットの間で慢性拒絶がみられた。

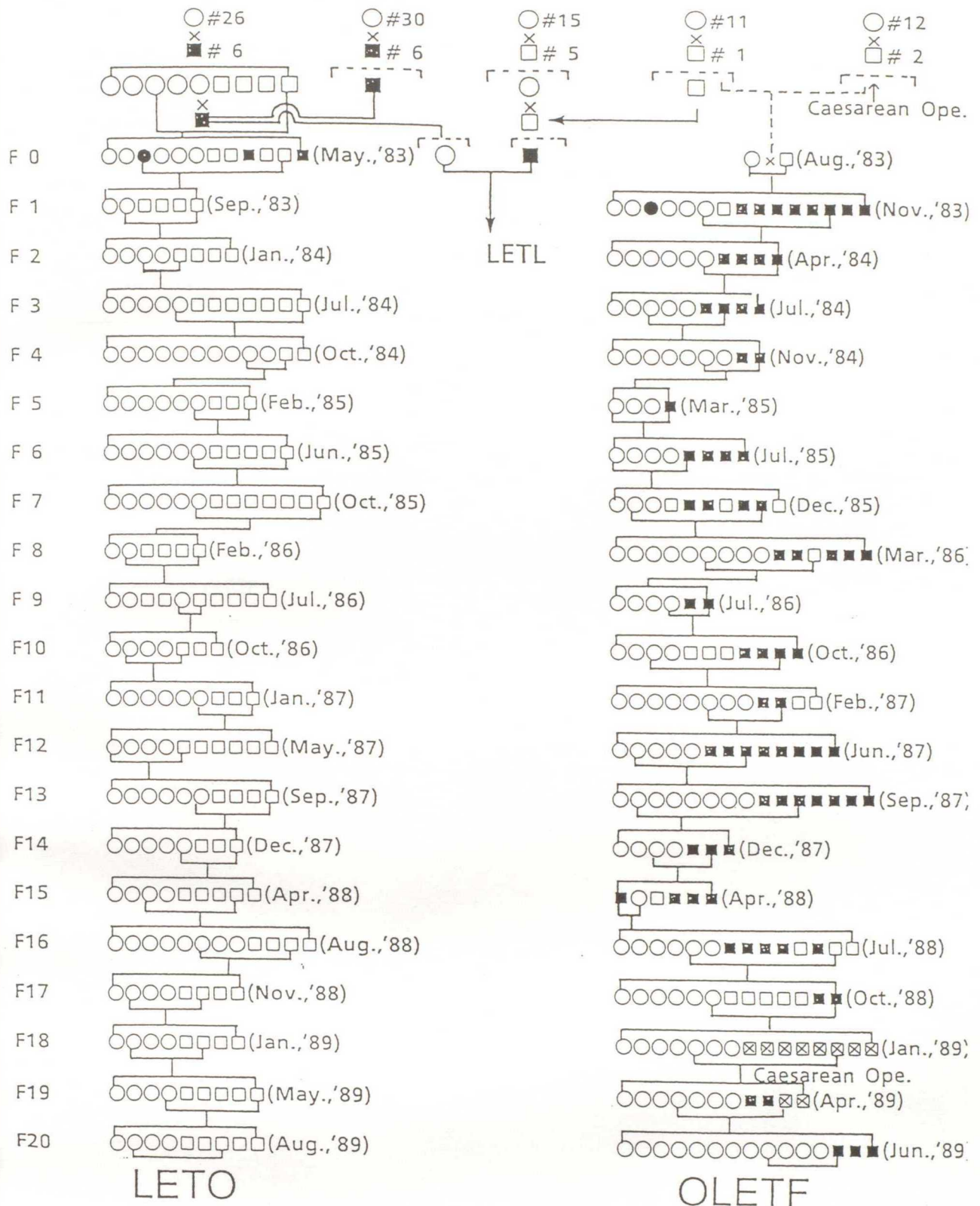


Fig.2 OLETFラットとLETOラットの系統図。■；雄の糖尿病発症例、□；雄の糖尿病非発症例、●；雌の糖尿病例、○；雌の糖尿病非発症例、糖尿病の発症はOGTTより診断した。⊠；OGTT未検査

Table 1 OLETF, LETL及びLETOラットの遺伝的プロファイル

a. Allelic distribution

Symbol	Acp-2	Ahd-2	Ahd-c	Cs-1	Es-1	Es-2	Es-3	Es-4	Es-6	Es-7	Es-8	Es-9	Es-10	Es-sj	Fh-1	Gc	Gdc-1	Hao-1	Hbb	Pg-1	Pgd	Syp-1	RT-1 _{class I}	RT-1 _{class II}
Linkage Group	-	-	x	II	V	V	V	V	-	V	V	V	V	V	X	VI	-	IV	I	-	-	IV	IX	IX
OLETF	a	c	a	b	b	d	c	b	a	b	a	c	b	a	b	b	a	a	b	a	b	a	u	u
LETO	a	c	a	b	b	a	a	b	a	b	b	a	a	a	b	b	a	a	b	a	b	a	u	u
LETL	a	c	a	b	b	a	a	b	a	b	b	a	a	a	b	b	a	a	b	a	b	a	u	u

b. Skin graft reaction

Donor	Recipient	Sex	No. of rats	Accepted	Rejected	Mean survival time (days)
OLETF	OLETF	M	5	5	0	—
OLETF	LETO	M	5	0	5	12.0±1.4
LETO	OLETF	M	5	0	5	11.8±1.6
LETL	LETL	M	6	6	0	—
LETL	LETO	M	3	0	3	11.3±3.5
LETO	LETL	M	4	0	4	11.0±0
LETO	LETO	M	6	6	0	—

臨床経過

OLETFラットの体重はFig.3に示したように、雄はLETOラットに比べて生後5週齢より高値を示し、生後25週齢くらいまでとくに増加が顕著であった。その差は加齢と共に徐々に拡がり生後40週齢ではおよそ200gの差を生じ、その後微増を続けた。しかしながら、Fig.13に示したように生後50週齢までは微増を続けるが、それ以降は徐々に減少し90週齢では逆にLETOラットより低値を示した。また、生後40週齢頃より糖尿が出現する個体が現れると、その個体は徐々に体重が減少し、摂餌量、摂水量および尿量は徐々に増加し、10カ月以上糖尿が継続すると多食、多飲そして多尿がみられた。これらの糖尿発症例は生後40週齢ころより加齢に伴い徐々に増し、生後90週を過ぎるとほとんどの個体でみられた。一方、OLETF雌ラットの体重はコントロールラットであるLETOラットに比較して離乳直後より高値を示し、その後徐々に差が拡がり、生後52週においてはおよそ450gに達し、その差は120gとなった。50週齢以降雌でも雄と同様糖尿が出現する個体が現れると、その個体は徐々に体重が減少し、摂餌量、摂水量および尿量は徐々に増加し、多食、多飲そして多尿がみられた。

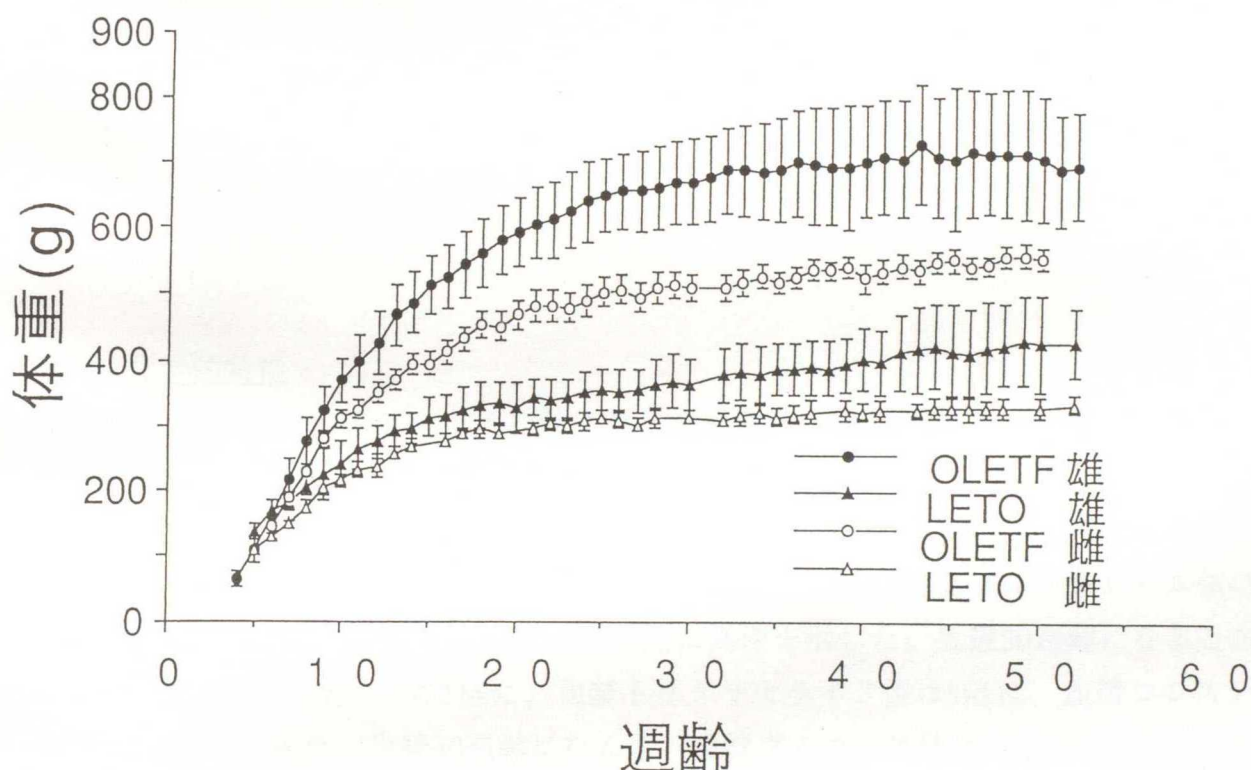


Fig.3 雌雄のOLETFラットとLETOラットの加齢に伴う体重の変化 (n=24)

糖尿病の発症率

F20世代以降の生後25週齢における糖尿病および耐糖能障害の累積発症率をTable 2に示した。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65週齢になると糖尿病発症率は33.3%(5/15)、耐糖能障害が20.0%(3/15)、正常が46.7%(7/15)であった。LETOラットの雌雄においては65週齢の時点でも糖尿病および耐糖能障害の発症はなかった。

Table 2 F20世代以降のOLETF雄ラットにおける糖尿病の発症率

	n	糖尿病	耐糖能障害	正常
OLETF	388	341 (87.8%)	28 (7.2%)	19 (4.8%)

OLETFラットをOGTTにより3つのカテゴリーに分けた。

糖尿病：血漿グルコースの頂値が300mg/dl以上、かつ2時間値が200mg/dl以上、耐糖能障害：上記条件のどちらか一方が合致するもの、正常：上記条件のどちらにも合致しないもの。

臨床生化学的特性

OLETF雄およびLETO雄ラットの加齢に伴う非絶食時の血漿グルコース値、血漿トリグリセライド値および血漿コレステロール値の経時的な変化をFig.4に示した。OLETF雄ラットの血漿グルコース値はLETOラットに比べて生後8、14および18週以降有意に高値であった。血漿トリグリセライド値は生後8週齢から高くなった。血漿コレステロール値は生後8週齢と21週齢以降LETOラットに比べて有意に高値を示した。生後30週齢になると血漿グルコース値はLETOラットの2倍に、血漿トリグリセライド値は5倍に、血漿コレステロール値は1.5倍になった。生後40週齢になると、血漿グルコース値はOLETFラットが 261.2 ± 129.7 mg/dl、LETOラットが 116.4 ± 6.1 mg/dl、血漿コレステロール値はOLETFラットが 181.9 ± 26.2 mg/dl、LETOラットが 104.3 ± 5.6 mg/dlで、血漿トリグリセライド値はOLETFラットが 570.5 ± 200.3 mg/dl、LETOラットが 115.5 ± 31.0 mg/dlであった。これらOLETFラットの値はLETOラットに比して有意に上昇していた($P < 0.001$)。

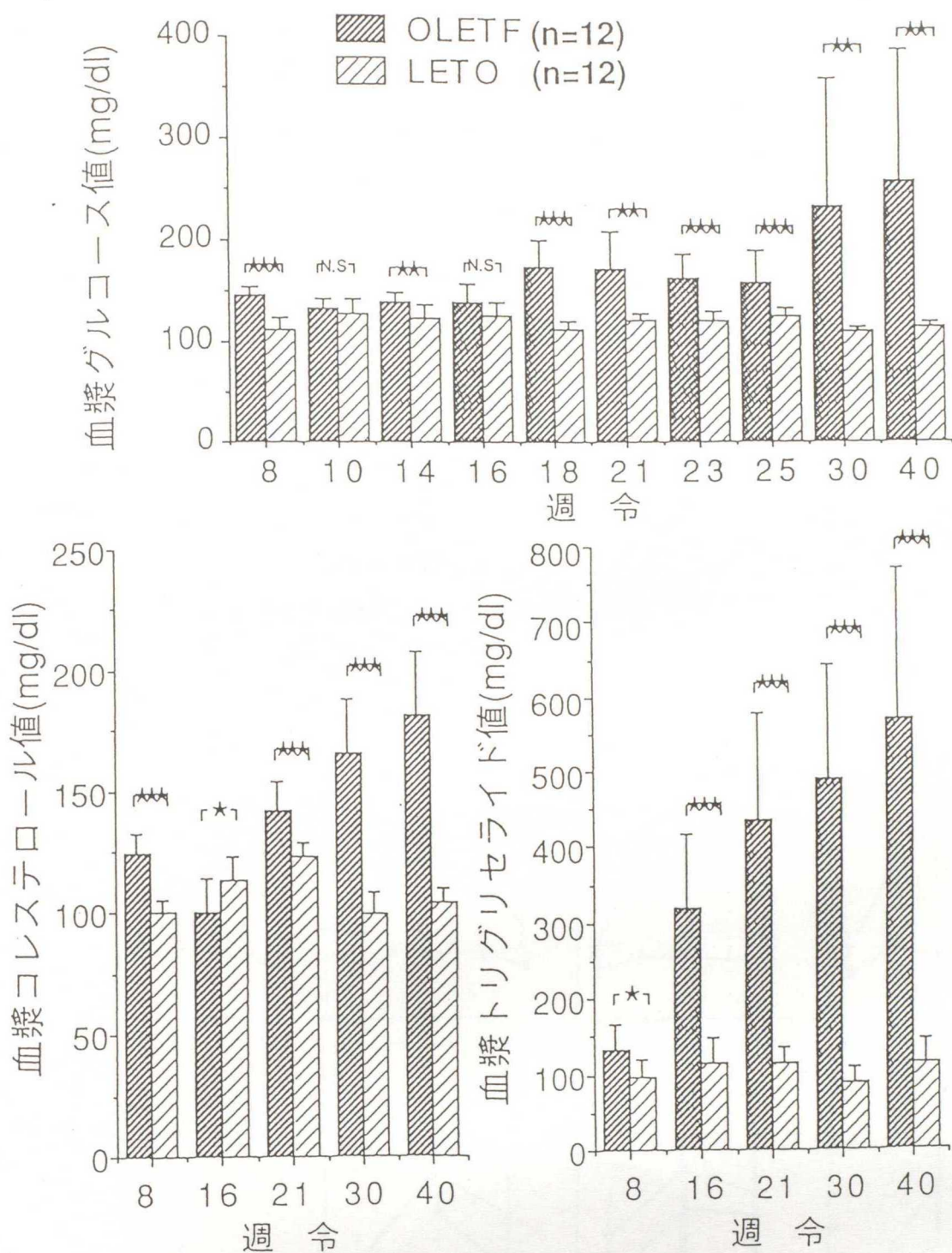


Fig.4 OLETF雄ラットとLETO雄ラットの加齢に伴う飽食下の血漿グルコース値、血漿コレステロール値および血漿トリグリセライド値 (n=12) ★★★; p<0.001、★★; p<0.01,★; p<0.05

経口ブドウ糖負荷試験

OGTTにおける血漿グルコース値の成績をFig.5に示した。OLETF雄ラットは8週齢においてグルコース負荷後60分と90分の血漿グルコース値がLETOラットと比較して有意に高かった($p < 0.001$, $p < 0.01$)。24週齢で血漿グルコース値の上昇は顕著になり糖尿病の基準を満たした。55および65週齢ではとくに120分値が顕著に上昇し、血漿グルコース値の下降が鈍り高血糖が持続した。一方、OLETF雌ラットは生後40週を過ぎると少数例ではグルコース負荷後60分もしくは90分で血漿グルコース値が300mg/d以上を呈し、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ったが、他の多くの動物ではOGTTはほぼ正常に推移した。

OLETF雄ラットのOGTTにおけるIRI値は生後24週齢になるとLETOラットにくらべ明らかに前値、60分、120分とも高値を示し、高インスリン血症を呈した。55週齢になると糖尿がみられた個体では逆にLETOラットより低値を示す動物もみられた。65週齢になるとOLETFラットのIRI値はLETOラットに比較して低値を示した(Fig.5)。これらの中で糖尿を呈し、しかもIRI値が顕著に減少した動物はインスリン治療によって血漿グルコース値が正常域に戻り、体重の増加もみられた(Fig.6)。

LETOラットは実験期間中のOGTTにおいて血漿グルコース値、IRI値とも正常範囲内であった。

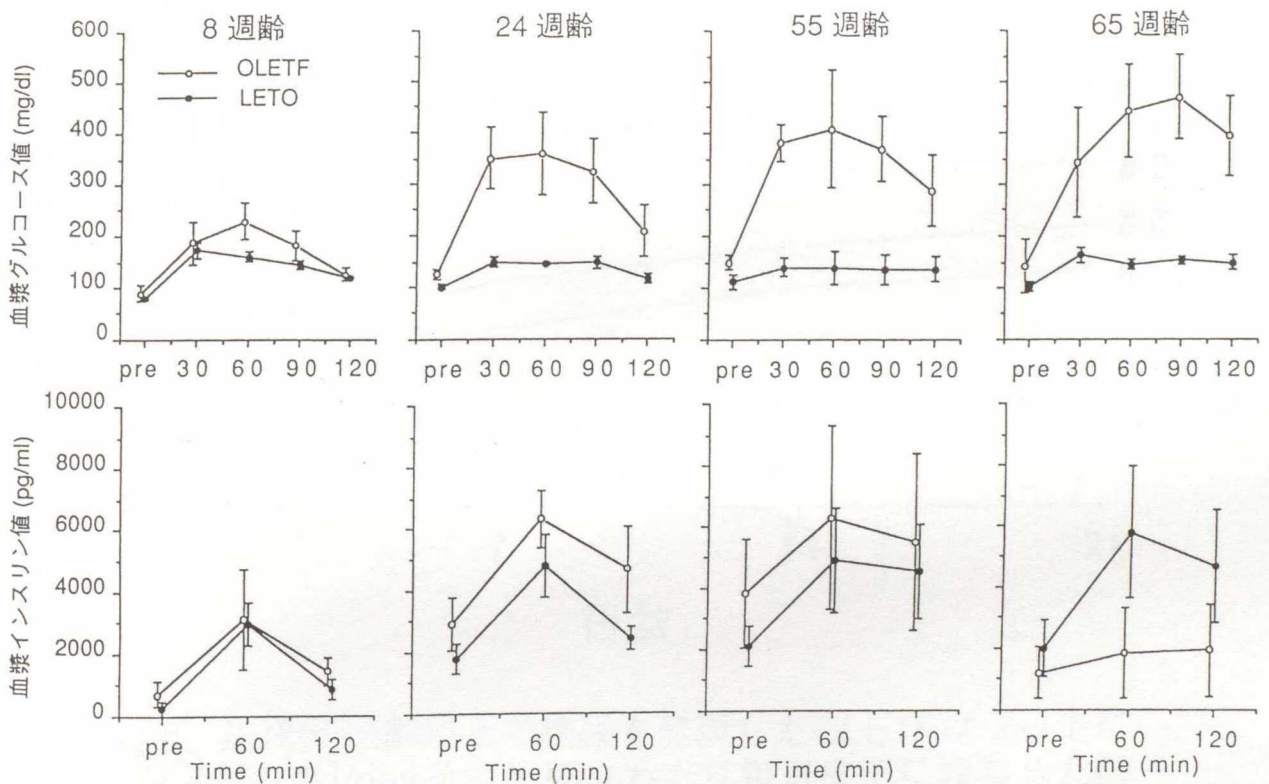


Fig.5 OLETF雄ラットとLETO雄ラットの加齢に伴うOGTTの血漿グルコース値と血漿インスリン値 (n=12)

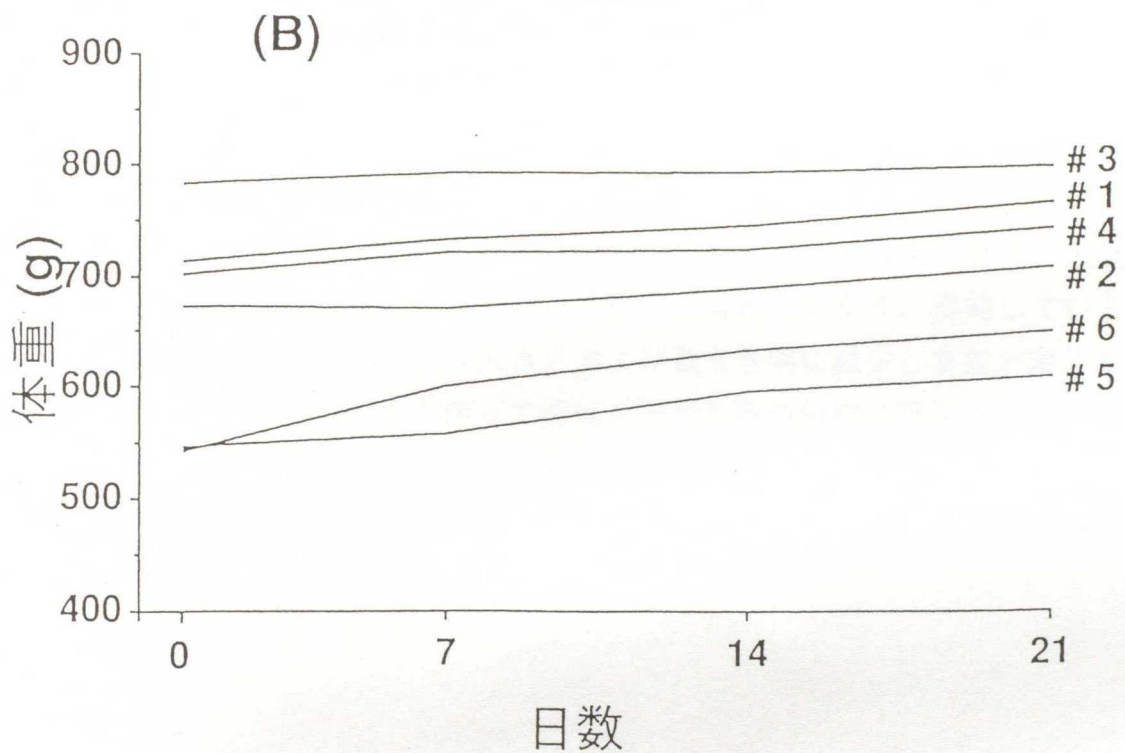
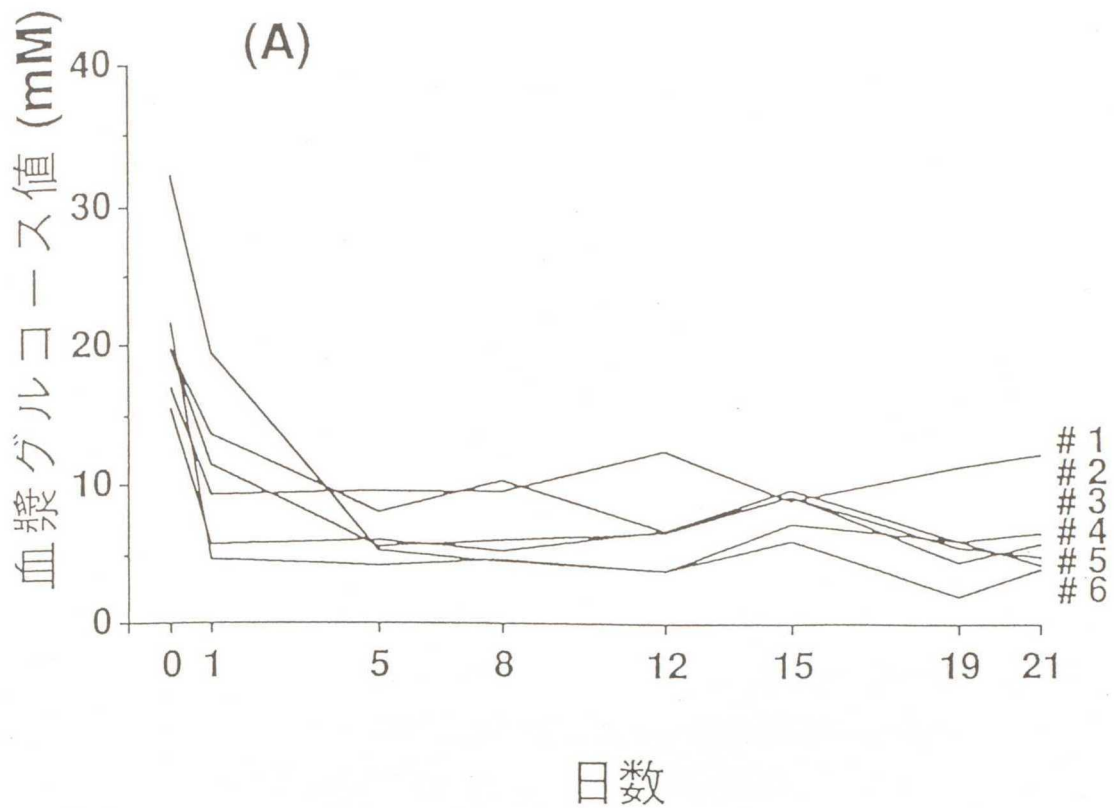


Fig.6 生後65週齢以上で糖尿を発現したOLETF雄ラットにインスリン4U/dayを21日間にわたり毎日皮下に投与した時の飽食下血漿グルコース値と体重の変化 #は動物番号を表す。

病理組織学的検査

膵：OLETF雄ラットの膵の組織学的変化を1)初期(6～9週齢)、2)増生期(10～40週齢)、3)疲弊期(40週齢以上)の3つのステージに分けることが出来た。各ステージの変化をFig. 7に示した。

初期；雌雄にリンパ球を主とする炎症性細胞浸潤が膵ラ島周囲（膵ラ島周囲炎）と膵管周囲および一部の外分泌部（膵炎）に見られた。しかしながらこのステージでは膵ラ島の組織構築は正常で抗インスリン抗体を用いた免疫組織染色でもインスリン顆粒は十分に含有されており異常を認めなかった。

増生期；10週齢以降になると、雄のみに膵ラ島は肥大（半数以上の膵ラ島が直径250～500 μ m以上）とヘモジデリン沈着がみられ、ときに中心部にも散見された。そして膵ラ島細胞とくにB細胞の過形成、空胞化、核小体の明瞭化がみられるとともに、膵ラ島内の内分泌細胞の分布の変化がみられた。すなわちA細胞は生後8週齢では膵ラ島の辺縁部に規則正しくみられるが、12週齢以降になると辺縁部にはみられず膵ラ島内部に散在し局在異常を示した。同時に膵ラ島には線維化がみられ、これらの膵ラ島の変化は徐々に広がった。25週齢頃になると膵ラ島の線維化は顕著になり、膵ラ島は線維組織によって島状に分割され、その形状を留めぬほどの線維組織による分断、置換が観察された。同時に新生したと思われる膵ラ島が膵ラ島近傍と外分泌部にみられた。さらに特徴的变化の一つに膵ラ島近傍に膵小管の増生があり、ときにはこの膵小管の上皮細胞には抗インスリン抗体を用いた免疫組織染色でインスリン顆粒を認める場合があった。腺房細胞はチモーゲン顆粒の消失を伴って萎縮を示す個体もあった。

疲弊期；週齢が進むにつれ膵ラ島内およびその周辺の線維化は著明となり、生後40週齢以降になると膵ラ島は線維組織による分断、置換が一層顕著になり、萎縮している膵ラ島もあった。生後70週齢以降、膵ラ島は大きさおよび数も著明に減少し萎縮が顕著であった。腺房細胞はチモーゲン顆粒の消失を伴って萎縮を来し脂肪組織に置換されている像もあった。

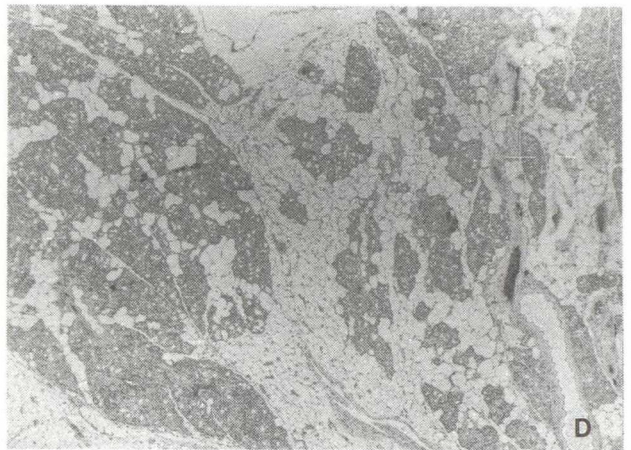
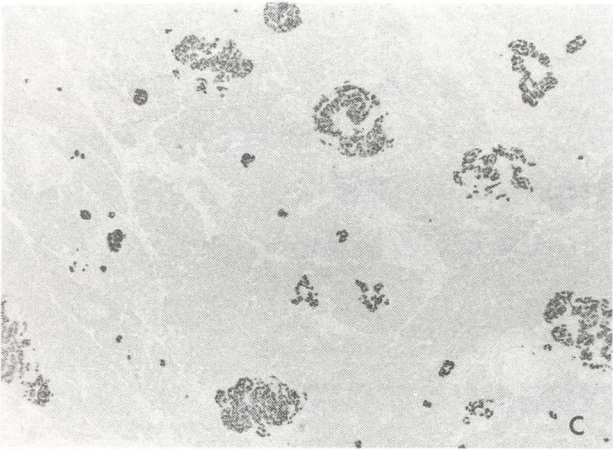
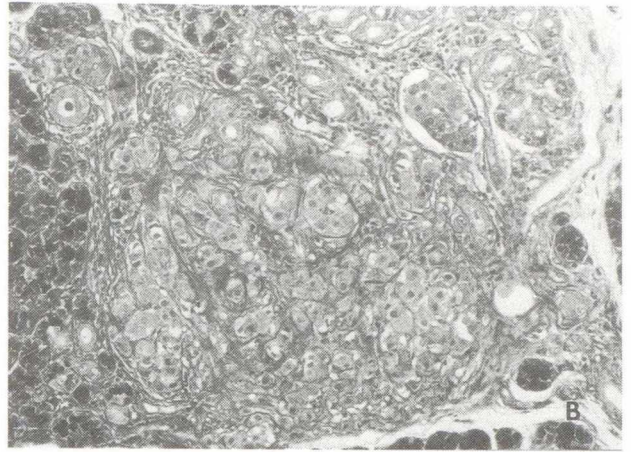
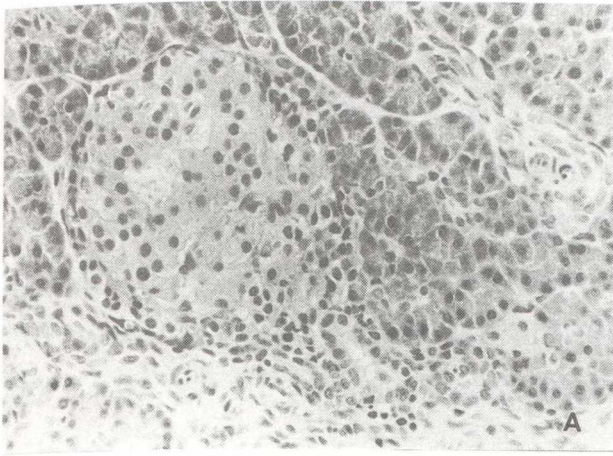


Fig.7 OLETF雄ラットの加齢に伴う膵の変化 A; 膵ラ島周囲にリンパ球浸潤がみられる(生後5週齢、H-E染色、 $\times 50$)。 B; 線維組織の増生が顕著で、膵ラ島は島状に分割され、また膵ラ島周囲には膵小管(↑)の増生も顕著にみられる(生後25週齢、AZAN染色、 $\times 50$)。 C; 膵ラ島は肥大し、B細胞の肥大と増生も認める(生後25週齢、インスリン染色、 $\times 10$)。 D; 膵ラ島は消失し、膵は脂肪によって置換されている(生後85週齢、インスリン染色、 $\times 10$)。

一方、雌は生後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少数例認められた。同時に雌では膵間質にリンパ球を主とする慢性炎症性細胞浸潤があり、間質結合組織の増生を伴う慢性膵炎の像を呈した。このため小葉構造は失われ、膵の実質細胞も目立って消失している像がほとんどの個体でみられた。同時に脂肪組織に置換されている領域もあった。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、その程度はごく軽微なものから雄とほぼ同程度にみられるものまで種々の程度があり、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ラットにみられた膵ラ島の肥大、膵ラ島の線維化、外分泌にみられた膵炎、膵ラ島周囲炎および膵ラ島近傍のヘモジデリン沈着の5つの病変と糖尿病発症との関連性について、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各世代の合計700例をロジスティックモデルに当てはめ解析したところ、Table 3 に示したようにオッズ比(Odds ratio)が膵ラ島の肥大は11.981(95%信頼区間、5.943±24.153)、膵ラ島の線維化が3.837(95%信頼区間、2.258±6.521)で有意であり、糖尿病発症に関して重要な要因であることが統計学的に証明された。なお、モデルの適合度に関しては最尤法あるいは対数尤度比カイ二乗の各種統計量の結果から、モデルの適合度を立証した。

Table.3 OLETFラットとLETOラット並びに F344/Ducrj ラットとの交雑試験群の700例における膵組織病変と糖尿病発症確率を用いての多変量解析

膵病変	オッズ比	95%信頼区間
α	0.092	(0.061 ~ 0.140)
膵ラ島の肥大	11.981	(5.943 ~ 24.153)
膵ラ島の線維化	3.837	(2.258 ~ 6.521)
膵炎	1.128	(0.716 ~ 1.778)
膵ラ島の周囲炎	1.454	(0.926 ~ 2.284)
ヘモジデリン沈着	1.009	(0.604 ~ 1.683)

最尤法あるいは対数尤度比カイ二乗の各種統計量の結果からモデルの適合度は立証された。

LETOラットは雌雄共に高週齢においてもOLETFラットでみられるような腓ラ島の肥大や線維化などの変化は認められなかった。さらに交雑試験に用いた雌雄F344/Ducrjラットも腓には何等病変を認めなかった。

肝：OLETFラットの肝は腓ほど明確ではないが、同様に組織学的変化を1)初期(6～9週齢)、2)増生期(10～40週齢)、3)疲弊期(40週齢以上)の3つのステージに分ける事が出来た。

初期；肝小葉に脂肪浸潤が漸慢性に軽度みられた。

増生期；10週齢以降、脂肪浸潤は徐々に増加し、生後20週齢ころになると肝小葉中心帯の肝細胞に大小のOil Red O染色陽性の顆粒がみられた。肝細胞の核は一端に圧排され、胞体は腫大していた。このため肝細胞索の構造は不明化し、全体として類洞も狭く不明瞭になっていた。ときにクッパー細胞内にも多量の脂肪滴がみられた。その後、糖尿病の重症度に比例して顕著になり、肝全体が脂肪に置換された像を呈した。

疲弊期；脂肪浸潤は逆に40週以降糖尿と低インスリン血症を呈するようになると徐々に少なくなった。これらの脂肪浸潤は雌雄ともにみられたが、明かに雄は雌に比して早期からみられ、しかもその拡がり、重症度とも顕著であった。しかしながらOLETFラットの肝には脂肪浸潤以外に肝細胞壊死などの変化は認められず、また血漿GPT、GOTなどの肝細胞からの逸脱酵素の上昇もなかった。

心：雄のみに生後50週より、乳頭部を中心に単球もしくはリンパ球を主体とした細胞浸潤がみられた。病巣内の心筋細胞にはしばしば変性ないし壊死を認めた。炎症部での線維芽細胞増生が進むと病巣は拡大するとともに膠原線維の増生が著しくなった。膠原線維は一箇所に巣状に認められることもあったが、萎縮した筋線維を取り囲み、枝状に、あるいは網目状に認める場合があった。

副腎：50週以上の雄のほぼ半数の個体の索状帯に結節性過形成がみられた。結節性過形成は被膜を有さずまわりの組織への圧迫は少なかった。

精巣：精子低形成、精細管萎縮と間質の水腫がほぼ全例に、また少数例ではあるが精細管の石灰化と巨細胞の出現がみられた。60週齢以上になると間細胞腫の発生 (Fig.8A) がみられ、腫瘍化の認められない個体においても間細胞の顕著な増生が間質全体に枝状に拡がっていた。間細胞腫は70週を過ぎるとほとんどの個体に認められた。

脳：50週以降とくに60週を過ぎた雄のほぼ全例の脳に種々の程度あるいは拡がりを持った石灰沈着が認められた。しかし沈着部位の場所の特定は出来なかった (Fig.8B)。小脳でも沈着部位の特定は出来なかったが、少数例に同様の病変を認めた。一方雌では脳に1例のみで、病変も非常に軽度であった。

水晶体：50週齢以上の雄の全個体の水晶体上皮下に種々の大きさの空胞形成と水晶体線維の断列 (Fig.8C) を認めた。とくに70週齢以上の個体では空胞の大きさ、拡がりとも顕著であった。

甲状腺：乳頭状腺癌 (Fig.8D) が雄の80週と100週齢に1例ずつ認められた。

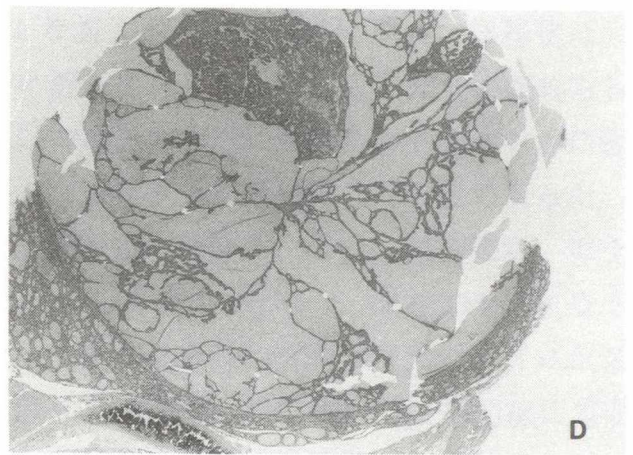
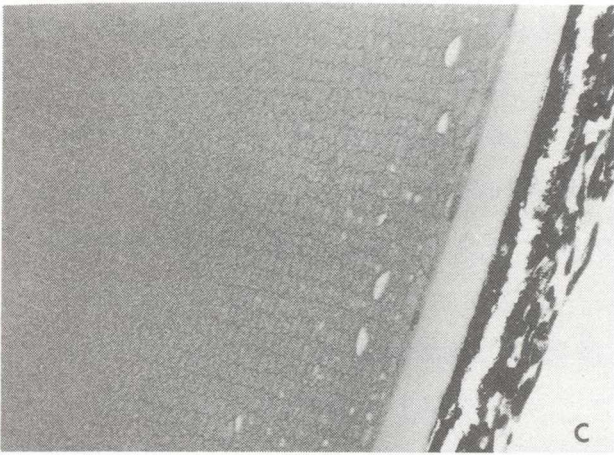
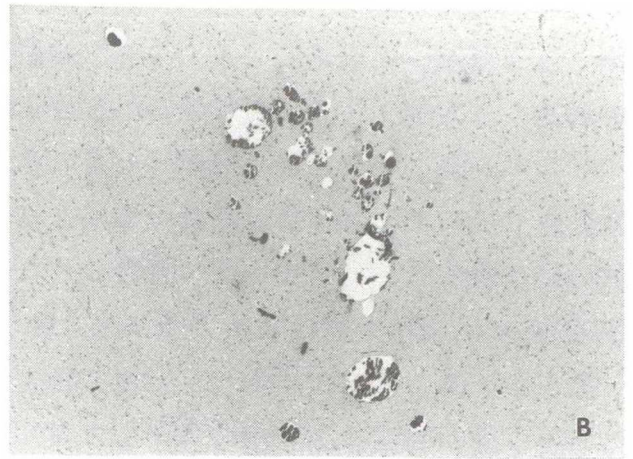


Fig.8 高週齡OLETF雄ラットにみられた自然発生病変
 A：精巢間細胞腫；腫瘍細胞は多角形で淡明均一な円形核とエオジン好性あるいは小胞状にグリコーゲンに富む細胞質を示し、細胞境界はやや不鮮明で腫瘍細胞は索状配列の集族をなし周囲には結合組織がみられる（生後105週齡、H-E染色、 $\times 33$ ）。B：大脳髓質の石灰化（生後83週齡、H-E染色、 $\times 13.2$ ）。C：水晶体上皮下の小空胞と水晶体線維の断列（生後105週齡、H-E染色、 $\times 132$ ）、D：甲状腺の乳頭状腺癌；異形的上皮細胞が濾胞腔内に乳頭状に増殖している（生後83週齡、H-E染色、 $\times 133$ ）。

小括

OETF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。膵ラ島では発病初期にB細胞が増生・肥大し、生後40週齢ごろより膵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はこの膵ラ島の疲弊・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OETFラットの特徴であったが、これと膵ラ島の病理組織学的変化とは非常に密接な関係があり、膵ラ島の肥大あるいは増生期では血漿IRI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、OETF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の発症率は33.3%(5/15)、耐糖能障害が20.0%(3/15)、正常が46.7%(7/15)であった。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。

OETF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デリン沈着についてOETFラットとLETOラットならびにF344/Ducrjラットとの交雑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、膵炎およびヘモジデ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。

OETF雄ラットには肝に脂肪浸潤、心に線維化、副腎に結節性過形成、精巣に精子低形成、精細管萎縮、間質の水腫と間細胞腫、大脳に石灰沈着、水晶体上皮下に空胞変性と線維の断列および甲状腺に乳頭状腺癌などが自然発生病変として認められた。

第5章 催糖尿病遺伝子の解析

OLETFラットとF344/Ducrjラットの交雑試験の成績をTable 4に示した。OLETFラットとF344/Ducrjラットとの交雑試験のF1世代では、糖尿病や耐糖能障害はいづれの組み合わせでもみられなかった。F2世代では(OLETF×F344/Ducrj)の組み合わせで糖尿病が5.0%、耐糖能障害が6.8%に、一方(F344/Ducrj×OLETF)では糖尿病および耐糖能障害ともみられなかった。戻し交配世代(F344/Ducrj×OLETF)F1×OLETFでは糖尿病が66.7%、耐糖能障害が11.1%にみられた。(F344/Ducrj×OLETF)F1×F344/Ducrjでは糖尿病および耐糖能障害ともみられなかった。Table 5にOLETFラットとコントロールであるLETOラットの交雑試験の成績を示した。(OLETF×LETO)のF1世代では糖尿病が6.7%、耐糖能障害が50.0%に、一方の(LETO×OLETF)のF1世代では耐糖能障害が24例中1例(4.2%)にみられたのみであった。(OLETF×LETO)のF2世代では糖尿病と耐糖能障害がそれぞれ13.1%と22.2%にみられた。F2世代の逆の組み合わせのF2世代では糖尿病と耐糖能障害がそれぞれ7.1%と22.2%であった。戻し交配では(OLETF×LETO)F1×OLETFで糖尿病と耐糖能障害がそれぞれ44.4%と22.0%と高率であった。(OLETF×LETO)F1×LETOでは糖尿病と耐糖能障害がそれぞれ3.6%と17.9%と低率であった。OLETF×(LETO×OLETF)では糖尿病と耐糖能障害がそれぞれ37.8%と40.0%と高率であった。LETO×(LETO×OLETF)F1世代では糖尿病および耐糖能障害ともみられなかった。

Fig.9に各交雑群における性染色体の発現様式と糖尿病発症率の関係を示した。OLETFラットの雌にLETOラットの雄を交配すると、F1世代の雄のX染色体はOLETF由来、Y染色体はLETO由来となり、その逆の組み合わせではLETO由来のX染色体とOLETF由来のY染色体となる。また、戻し交配でもOLETFラットのX染色体が出現する(OLETF×LETO)×LETOでは糖尿病の発症がみられたが、OLETFラットのX染色体が出現しないLETO×(LETO×OLETF)では糖尿病は全く認められなかった。このようにOLETF由来のX染色体の有無によって糖尿病および耐糖能障害の発症に明らかな差を認めた。

糖尿病発症とRT1との関連をOLETFラットとF344/Ducrjラットとの交雑試験のF2世代で調べた結果、糖尿病と耐糖能障害はRT1がOLETFラット型(u/u)の場合は27.8%、OLETFラットとF344/Ducrjラットのヘテロタイプ型(u/l)では20%、およびF344/Ducrj型(l/l)では22.7%にみられ、RT1のハプロタイプの違いによる糖尿病発症率には差がなかった(Table 6)。

Table.4 OLETFとF344ラットの各交雑群におけるOGTT

雌	雄	N	糖尿病	耐糖能障害	正常
(OLETF×F344)F1		22	0(0%)	0(0%)	22(100%)
(F344×OLETF)F1		22	0(0%)	0(0%)	22(100%)
(OLETF×F344)F2		161	8(5.0%)	11(6.8%)	142(88.2%)
(F344×OLETF)F2		44	0(0%)	0(0%)	44(100%)
(F344×OLETF)F1×OLETF		18	12(66.7%)	2(11.1%)	4(22.2%)
(F344×OLETF)F1×F344		18	0(0%)	0(0%)	18(100%)

糖尿病：OGTTにおける血漿グルコースの頂値が300mg/dl以上、かつ2時間値が200mg/dl以上。耐糖能障害：上記の条件のどちらか一方に合致するもの。

Table.5 OLETFとLETOラットの各交雑群におけるOGTT

雌	雄	N	糖尿病	耐糖能障害	正常
(OLETF×LETO) F1		30	2 (6.7 %)	15 (50.0%)	13 (43.3%)
(LETO×OLETF) F1		24	0 (0 %)	1 (4.2 %)	23 (95.8%)
(OLETF×LETO) F2		99	13 (13.1%)	22 (22.2%)	64 (64.6%)
(LETO×OLETF) F2		127	9 (7.1 %)	28 (22.0%)	90 (70.9%)
(OLETF×LETO) F1×LETO		28	1 (3.6 %)	5 (17.9%)	22 (78.6%)
(OLETF×LETO) F1×OLETF		36	16 (44.4%)	8 (22.2%)	12 (33.3%)
OLETF×(LETO×OLETF) F1		45	17 (37.8%)	18 (40.0%)	10 (22.2%)
LETO ×(LETO×OLETF) F1		32	0 (0 %)	0 (0 %)	32 (100%)

糖尿病：OGTTにおける血漿グルコースの頂値が300mg/dl以上、かつ2時間値が200mg/dl以上。耐糖能障害：上記の条件のどちらか一方に合致するもの。

糖尿病と耐糖能障害の
発症率
雄の性染色体の核型

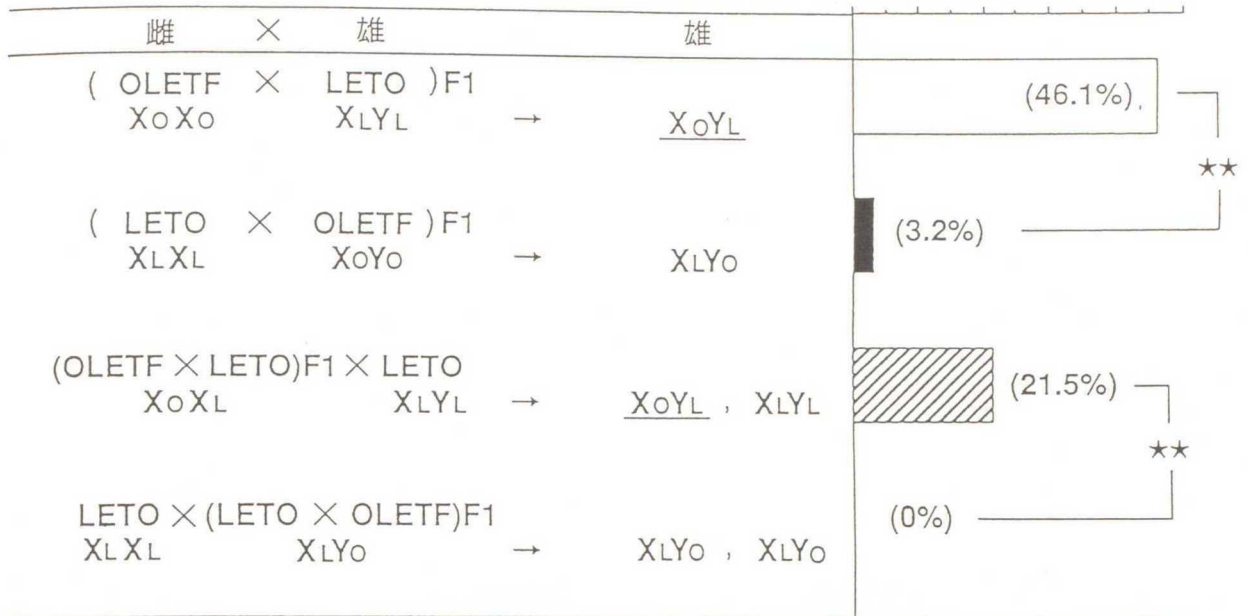


Fig.9 OLETFラットとLETOラットの交配から得たF1世代のOGTTによる糖尿病発症率と雄の性染色体の核型との関連性

[注] XOXO, XOYOはOLETFラットの性染色体の核型を、XLXL, XLYLはLETOラットの性染色体の核型を示した。★
★; p<0.01

Table.6 (OLETF×F344)F2世代における RT1タイプごとの糖尿病発症率

RT-1	N	糖尿病	耐糖能障害	正常
u/u	18	2 (11.1%)	3 (16.7%)	13 (72.2%)
l/l	22	2 (9.1%)	3 (13.6%)	17 (77.3%)
u/l	40	4 (10.0%)	4 (10.0%)	32 (80.0%)

小括

OETFラットの糖尿病発症の遺伝解析をおこなうため交雑試験を実施した。OETFラットとF344/DucrjラットとのF1世代では糖尿病および耐糖能障害は発現しなかった。F2世代では(OETF×F344/Ducrj)の組み合わせのみ糖尿病と耐糖能障害が認められた。戻し交配世代では(F344/Ducrj×OETF)F1×OETFでは糖尿病と耐糖能障害がみられたが、(F344/Ducrj×OETF)F1×F344/Ducrjでは糖尿病および耐糖能障害ともみられなかった。LETOラットとの交雑では(OETF×LETO)F1世代は糖尿病(6.7%)と耐糖能障害(50.0%)が高率に認められたが、一方の(LETO×OETF)のF1世代では耐糖能障害が4.2%にみられたのみであった。F2世代では(OETF×LETO)と(LETO×OETF)のいずれにおいても糖尿病と耐糖能障害が30%前後みられた。戻し交配では(OETF×LETO)F1×OETF、(OETF×LETO)F1×LETOおよびOETF×(LETO×OETF)F1世代では糖尿病と耐糖能障害が認められたが、LETO×(LETO×OETF)F1世代では糖尿病および耐糖能障害ともみられなかった。

各交雑群における性染色体の発現様式と糖尿病発症率の関係を調べた結果、OETF由来のX染色体の有無によって糖尿病および耐糖能障害の発症に明らかな差を認めた。

糖尿病発症とRT1との関連をOETFラットとF344/Ducrjラットとの交雑試験のF2世代で調べた結果、RT1のハプロタイプの違いによる糖尿病発症率には差がなかった。

第6章 糖尿病発症に關与する性ホルモン

OETFラットの糖尿病発症に性ホルモンがどのように關与しているか調べる目的で、精巢ないし卵巢摘出動物に対するテストステロンを投与し影響を検討した。OGTTの成績をFig.10に、体重をFig.11に示した。精巢摘出群のOGTTは正常を示したのに対し、対照群と雄テストステロン群はいずれも糖尿病を示した。雄テストステロン群の体重は対照群のそれと生後16週齡ぐらゐまではほぼ同様に増加したが、それ以降対照群に比べて増加は抑制された。精巢摘出群は他の2群に比べ明らかに増加が抑制されていた。一方、雌ではOGTTにおいて対照群は正常を示したのに対し、雌テストステロン群は糖尿病を示した。卵巢摘出群は対照群と雌テストステロン群の中間値、すなわち頂値が高く2時間値が正常範囲の耐糖能障害を示した。雌テストステロン群の体重は対照群に対して生後16週齡ぐらゐまで明らかに高値を示したが、その後増加抑制がみられた。卵巢摘出群の体重は生後20週齡ぐらゐまでは他の2群のほぼ中間値を示し、それ以降は雌テストステロン群を上回る伸びを示した。

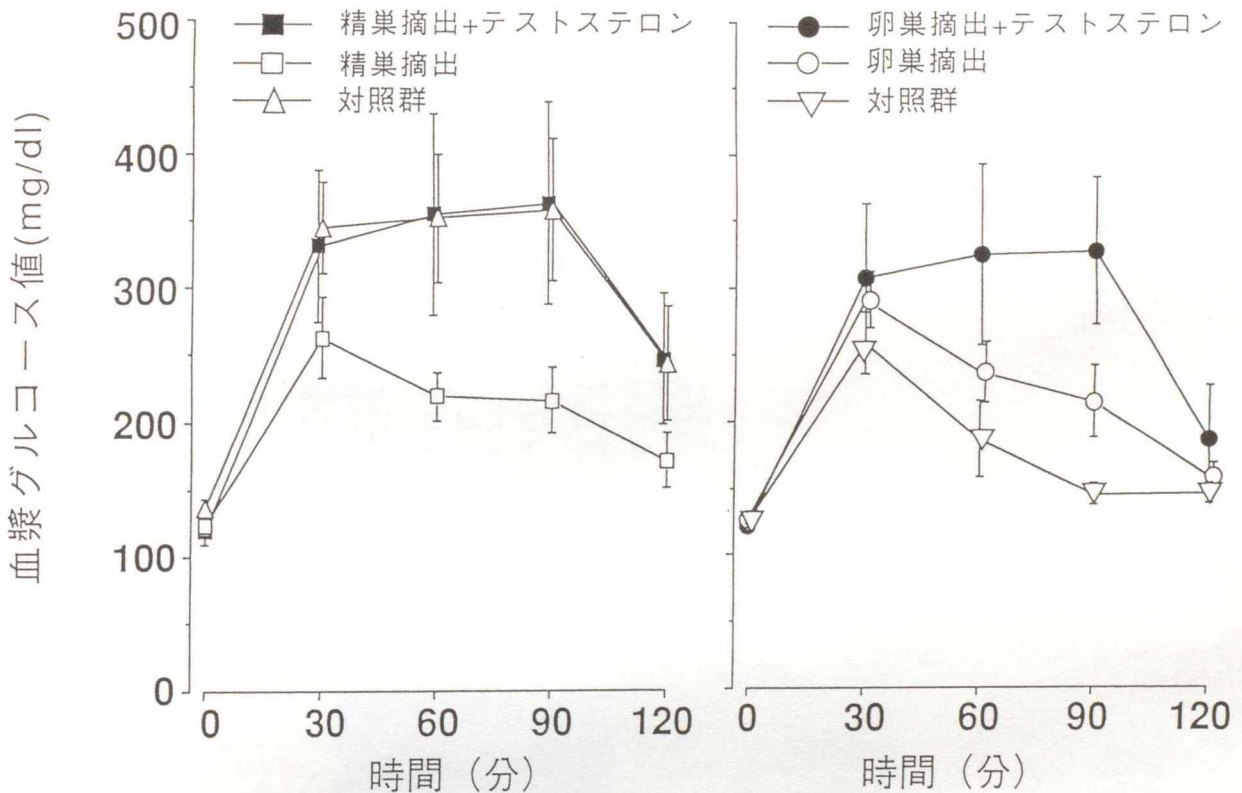


Fig.10 OETFラットの雌雄に生後4週齡で去勢した群、生後4週齡で去勢後テストステロンを投与した群および生理食塩水を投与した対照群の生後30週齡におけるOGTT

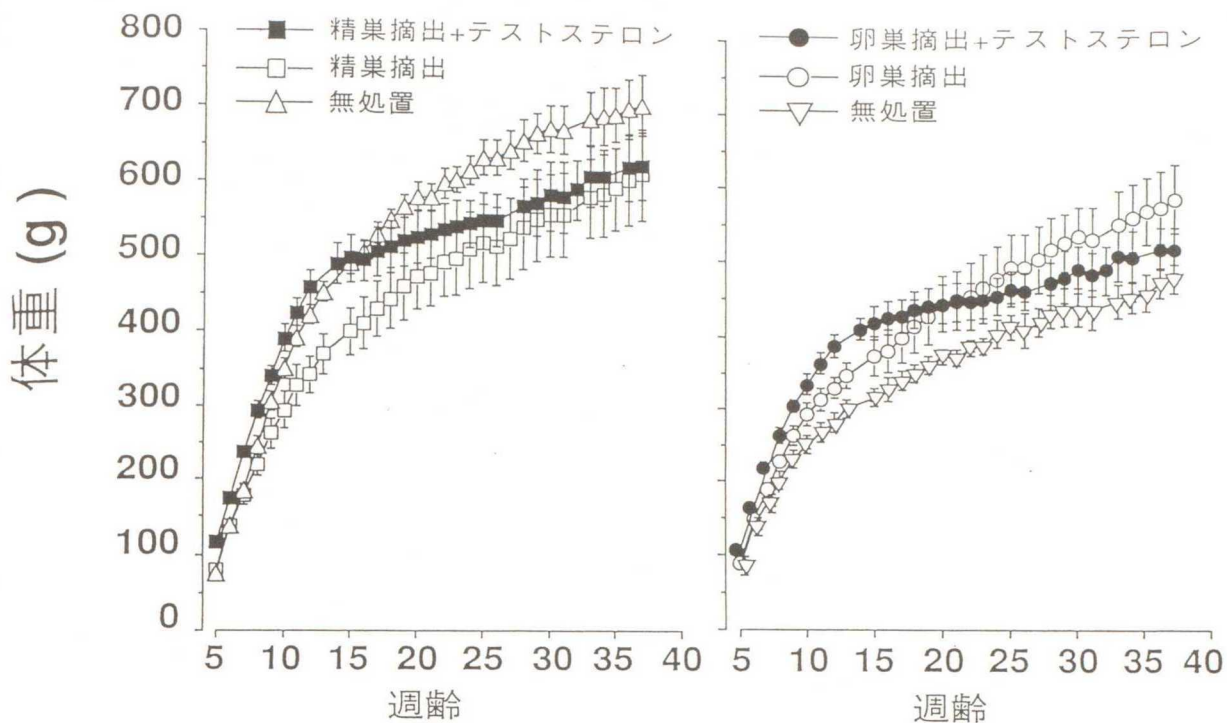


Fig.11 OLETFラットの雌雄に生後4週齢で去勢した群、去勢後テストステロンを投与した群および生理食塩水を投与した対照群の体重の変化

Fig.12に生後40週齢のOLETF、LETOおよびF344/Ducrj雄ラットのテストステロン濃度を示した。それぞれ 1.3 ± 0.5 、 1.5 ± 0.8 、および 1.0 ± 0.3 ng/mlであり、3系統間で有意差はなかった。

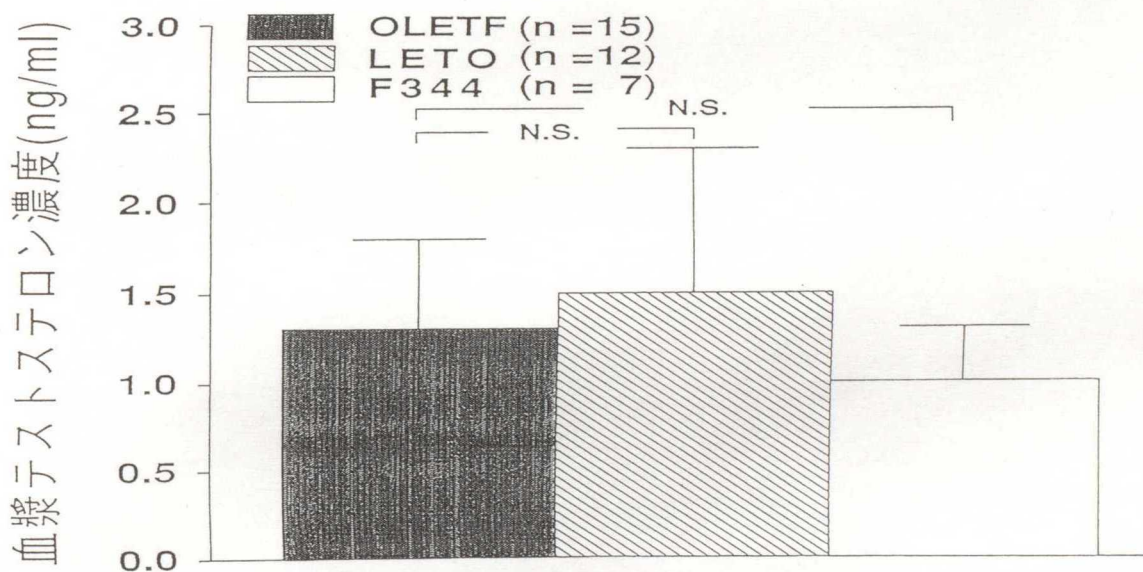


Fig.12 生後40週齢のOLETF、LETOおよびF344/Ducrj雄ラットのテストステロン濃度
N.S. ; 各群間で有意差なし

小括

OLETFラットの糖尿病は雄に多く発症し性差が存在するが、この性差に対して性ホルモンがどのように関わっているのか調べた。

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と耐糖能障害がみられた。また、同様の処置を行なったOLETFラットの雌雄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。

第7章 糖尿病性腎症

OETFとLETO雄ラットの体重と腎重量をFig.13に示した。OETF雄ラットの体重はLETO雄ラットに比較すると早期より増加するが、50週齢以降は減少し、90週齢ではLETO雄ラットより低くなった。OETF雄ラットの腎重量は各週齢いずれもLETO雄ラットのそれよりおよそ1.5倍あった。尿蛋白量の変化をFig.14に示した。OETFラットではLETOラットに比較して27週齢より顕著に上昇、それ以降顕著に増加し、47週齢ではおよそ800mg/dlとなり、その後徐々に低下したが、80週齢では再び1000mg/dl以上となった。

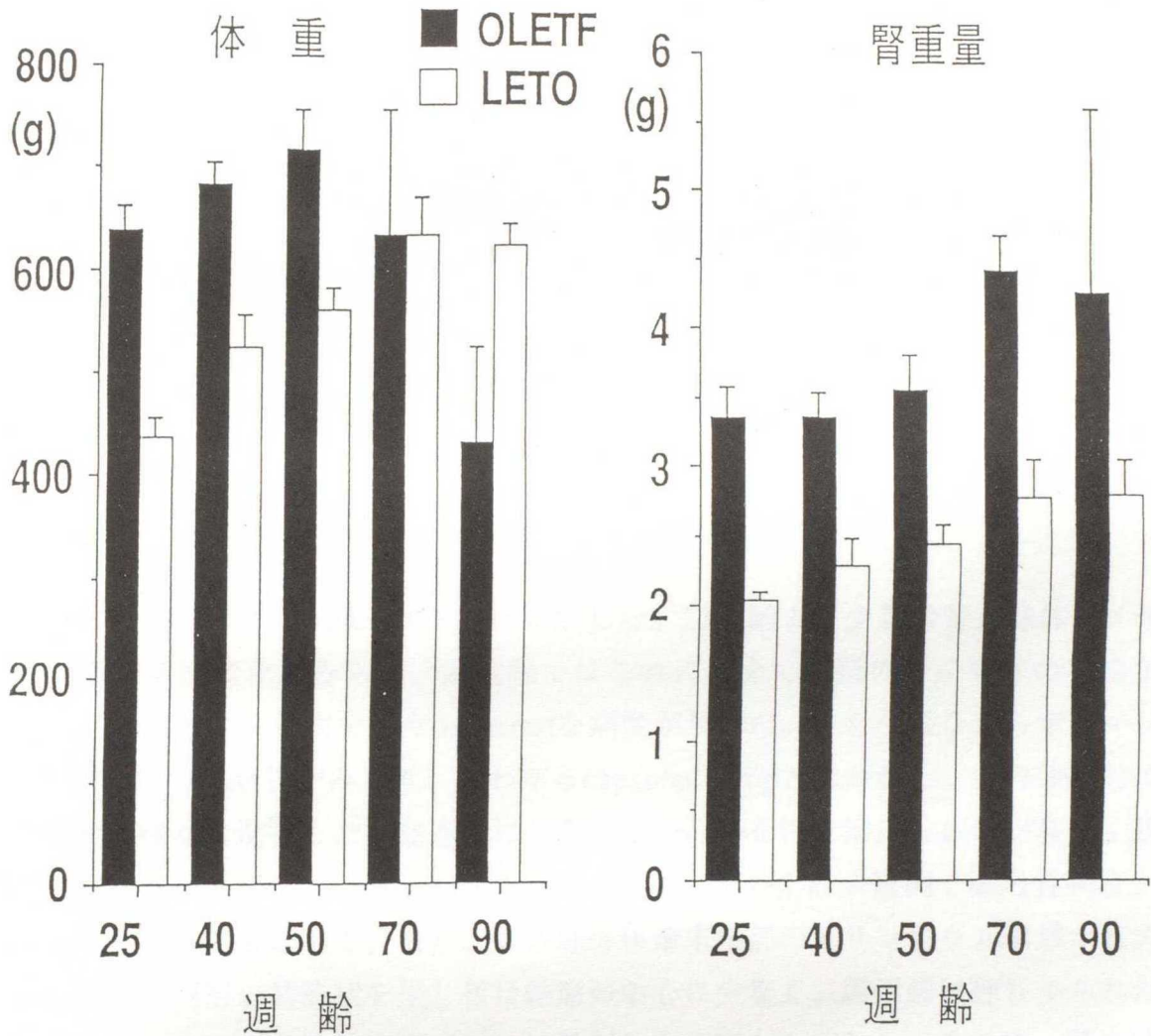


Fig.13 OETF雄ラットとLETO雄ラットの加齢に伴う体重と腎重量の変化 (n=12)

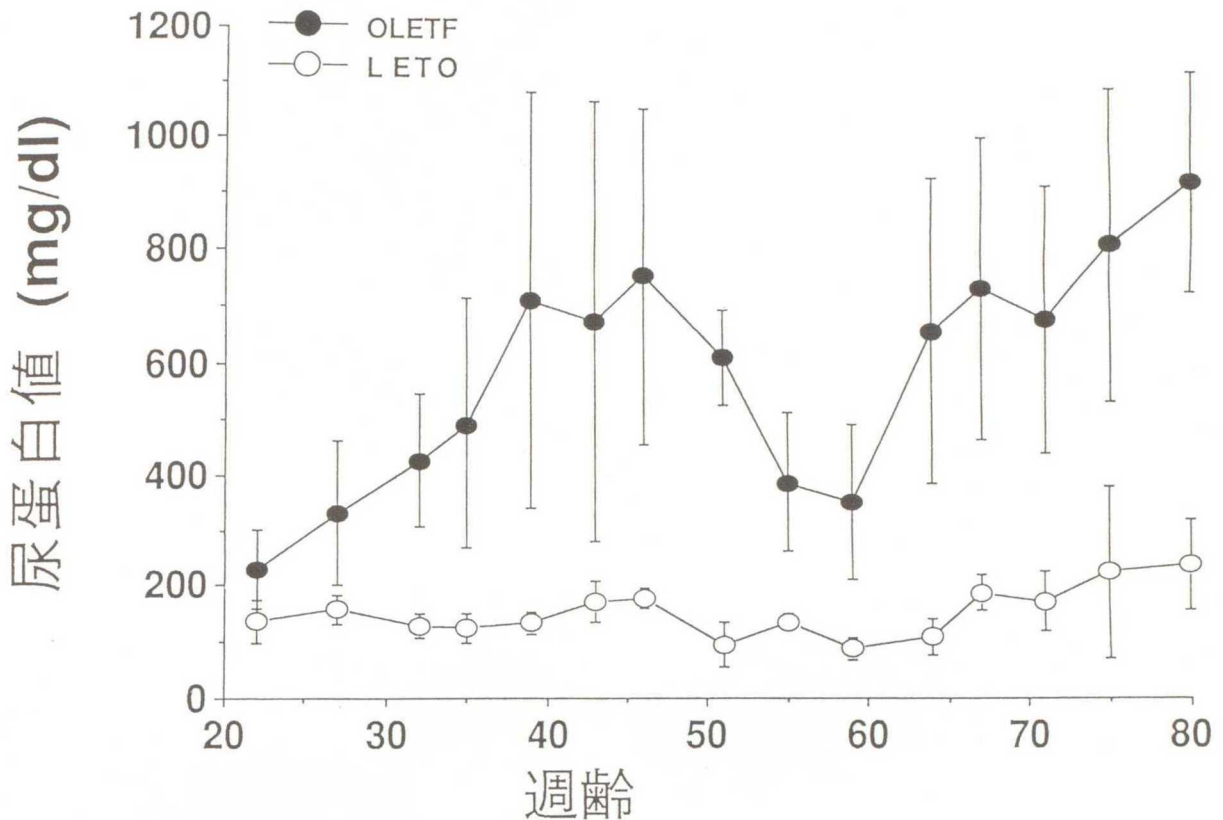


Fig.14 OLETF雄ラットとLETO雄ラットの加齢に伴う尿蛋白値の変化 (n=12)

腎糸球体の病理組織学的変化をFig.15に示した。23週齢より少数の腎糸球体にメサンギウムの軽度増殖性変化がみられ、29週齢ではこれに加えて一部の腎糸球体の毛細血管にfibrin cap, PAS濃染沈着物を伴うsegmentalな病変が現れた。また少数ながらボーマン嚢上皮下にPAS陽性の沈着物がみられ、いわゆるcapsular dropと思われた。その後加齢に伴い滲出性病変が徐々に進行した。55週齢になるとfibrin capを伴う滲出性病変が数多く認められるようになり、その多くはsegmentalで正常域を残していた。少数例で滲出性病変が腎糸球体全体に及ぶものも認めた。また、腎糸球体係蹄末梢部のメサンギウム領域が拡大し、円形もしくは楕円形の結節状を呈し核は結節の中心に少なく、周辺部に押しやられたように存在する、いわゆる結節性病変(26)に類似した病変もみられた。その他、腎糸球体の毛細血管が毛細血管瘤(microaneurysm)様に拡張した所見もみられた。細動脈硬化症(arteriolohyalinosis)はみられなかった。96週齢以降になるとほとんどの腎糸球体が萎縮・硬化(sclerosis)を示し、尿細管は萎縮・消失したり、残ったものは拡張して貯留物がうっ滞し、間質には炎症細胞浸潤も認められた。その後週齢を追って腎糸球体の荒廃は高度となり、いわゆる終末腎に近い像となっていた。

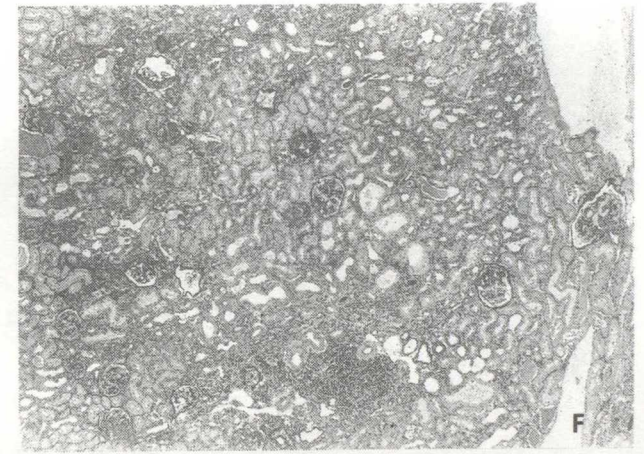
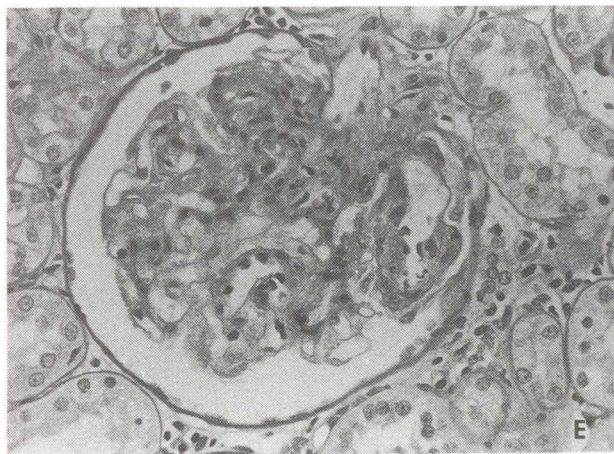
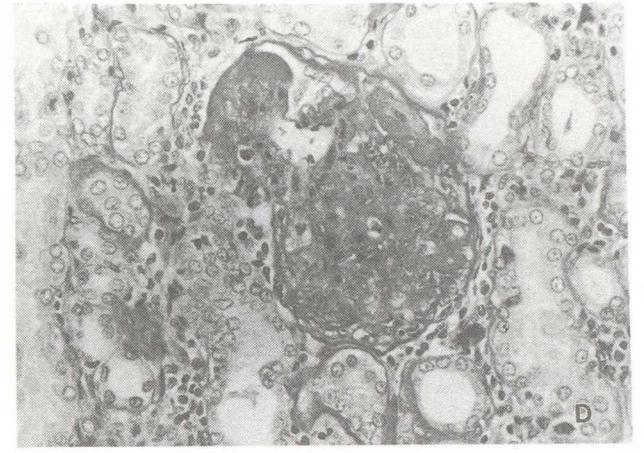
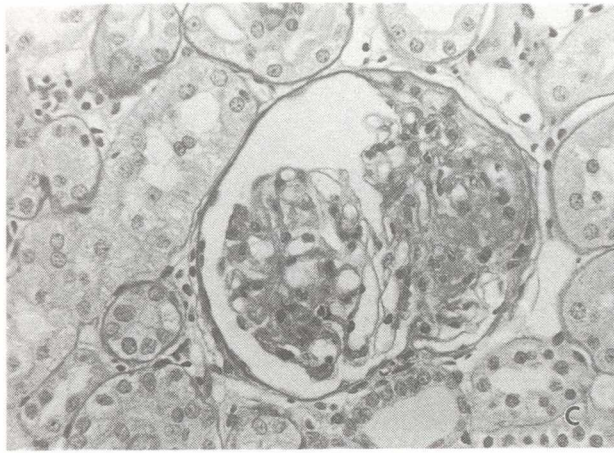
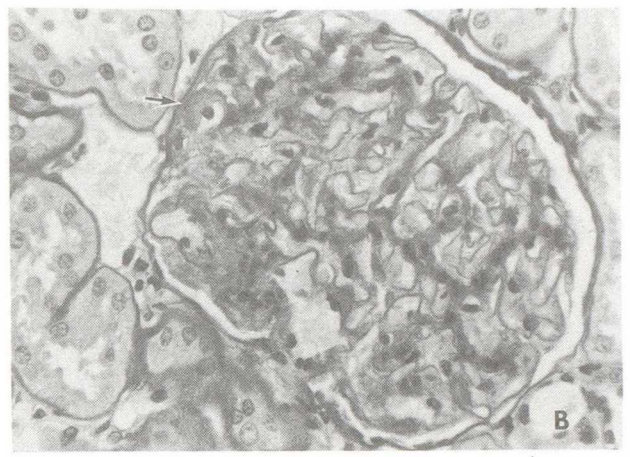


Fig.15 OLETF雄ラットの腎糸球体の病理組織学的変化
 A；腎糸球体のメザンギウム領域の拡大と基底膜の肥厚がみられる（生後25週齢、PAS染色、 $\times 100$ ）。B；↑のようなfibrin capを伴う滲出性病変が少数ながらみられた（生後29週齢、PAS染色、 $\times 132$ ）。C；fibrin capを伴う滲出性病変がsegmentalに現れるが、正常域も残している（生後55週齢、PAS染色、 $\times 100$ ）。D；fibrin capを伴う滲出性病変が腎糸球体にglobalに現れ、萎縮・硬化の像を呈している（生後65週齢、PAS染色、 $\times 100$ ）。E；腎糸球体の毛細血管が毛細血管瘤様に拡張している（生後65週齢、PAS染色、 $\times 100$ ）。F；生後96週になると腎糸球体は萎縮・硬化し、尿細管は萎縮・消失したり、残ったものは拡張して貯留物がうったいて、間質は炎症性細胞浸潤も伴い、いわゆる終末腎に近い像を呈した（生後96週齢、PAS染色、 $\times 13.2$ ）。

以上の生後23週齢から100週齢までのOLETF雄ラットでみられた経時的な腎病変をFig.16にまとめた。腎糸球体病変をメサンギウムの拡大増殖のみを示すもの、滲出性病変のみされるもの、萎縮・硬化に陥ったものの3種類に分け、全部の腎糸球体の中での割合として%で表した。生後23週齢ではメサンギウムの拡大増殖のみを示すものが16.5%、30週では26.2%にみられた。55週齢前後から滲出性病変の比率が16.7%まで高くなり、80週齢では最大52.7%に達した。萎縮・硬化に陥った腎糸球体が55週齢ころから現れ始め、80週齢では18.4%まで増加し、それらの病変が徐々に目立つようになり、100週では滲出性病変と萎縮・硬化を合わせると70%に達した。なお、生後6週から18週までは腎糸球体と尿細管には著変は認められなかった。

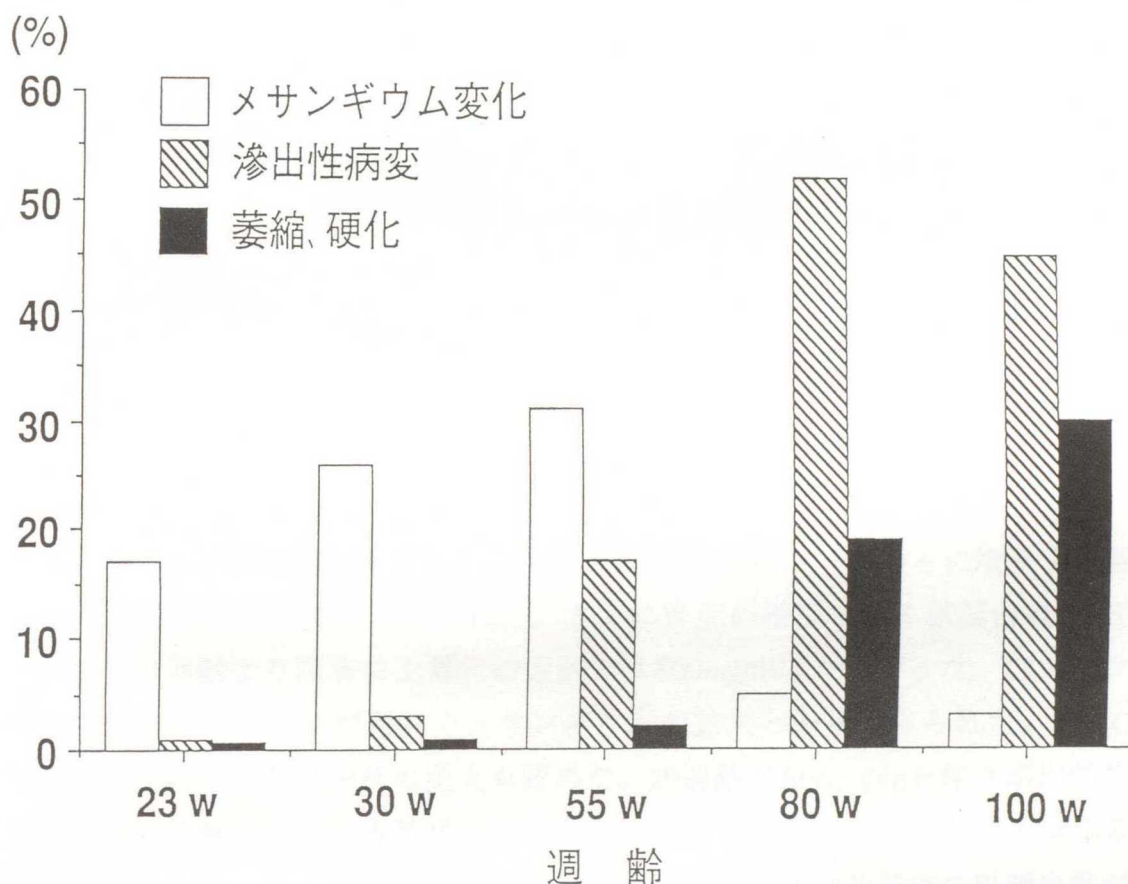


Fig.16 OLETF雄ラット120匹の生後23週齢から100週齢までの腎糸球体病変の推移

さらにOLETFラットの特徴として、生後15週齢ごろより腎糸球体上皮細胞にPAS陽性エオジン好性微小顆粒を認めた。この微小顆粒を電子顕微鏡で観察すると、Fig.17にみられるように腎糸球体上皮細胞内のsecondary lysosomeとして認められた。

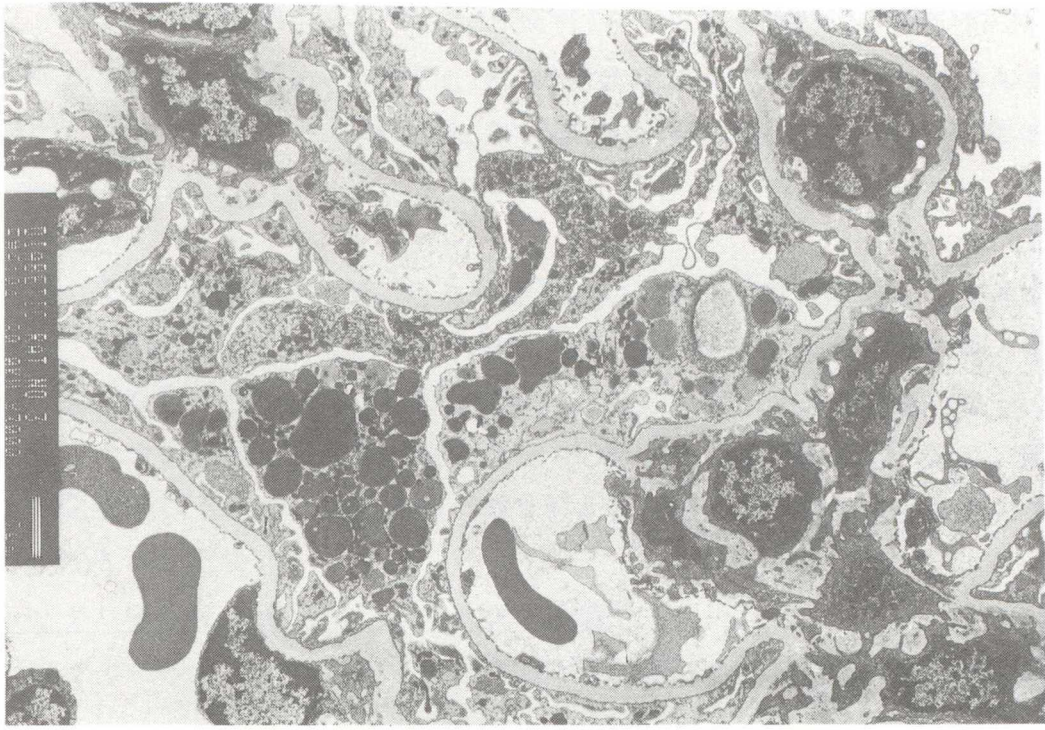


Fig.17 OLETF雄ラットの腎糸球体の電子顕微鏡写真
OLETF雄ラットでみられた微小顆粒は腎糸球体上皮細胞内にsecondary lysosome (→)として認めた(生後40週齢、酢酸ウラニールと鉛の二重染色、×3,000)。

小括

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認めた。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。

以上のOLETFラットの腎病変の推移をまとめると、25週齢前後の早期ではメサンギウムの変化のみの腎糸球体が多く、55週齢前後の中期では滲出性病変を示す比率が高くなった。この時期より萎縮硬化に陥った腎糸球体が現れ始め、加齢に伴いこれらの増加が徐々に目立つようになった。

第8章 糖尿病および糖尿病性腎症に対する食餌制限の効果

食餌制限した時の糖尿病発症率をFig.18、非絶食時における血漿トリグリセライド、コレステロール値をFig.19、腎重量をFig.20、尿蛋白値をFig.21、そして腎糸球体病変をFig.22に示した。

糖尿病発症率

長期制限したA群では生後40週ころから糖尿病と耐糖能障害が発現し、80週では約50%にみられた。制限から飽食に切り替えたB群では切り替え後、急激に糖尿病と耐糖能障害の発症率が高くなり、生後60週（切り替え後30週目）以降は全例が糖尿病もしくは耐糖能障害と診断された。飽食から制限に切り替えたC群では、切り替え後、徐々に糖尿病と耐糖能障害の発症率は下がり、生後80週（切り替え後50週）では糖尿病はみられず、耐糖能障害のみが20%みられた。

血漿トリグリセライドおよびコレステロール値

血漿トリグリセライド、コレステロール値は飽食群に対して3群とも有意に低値を示した。

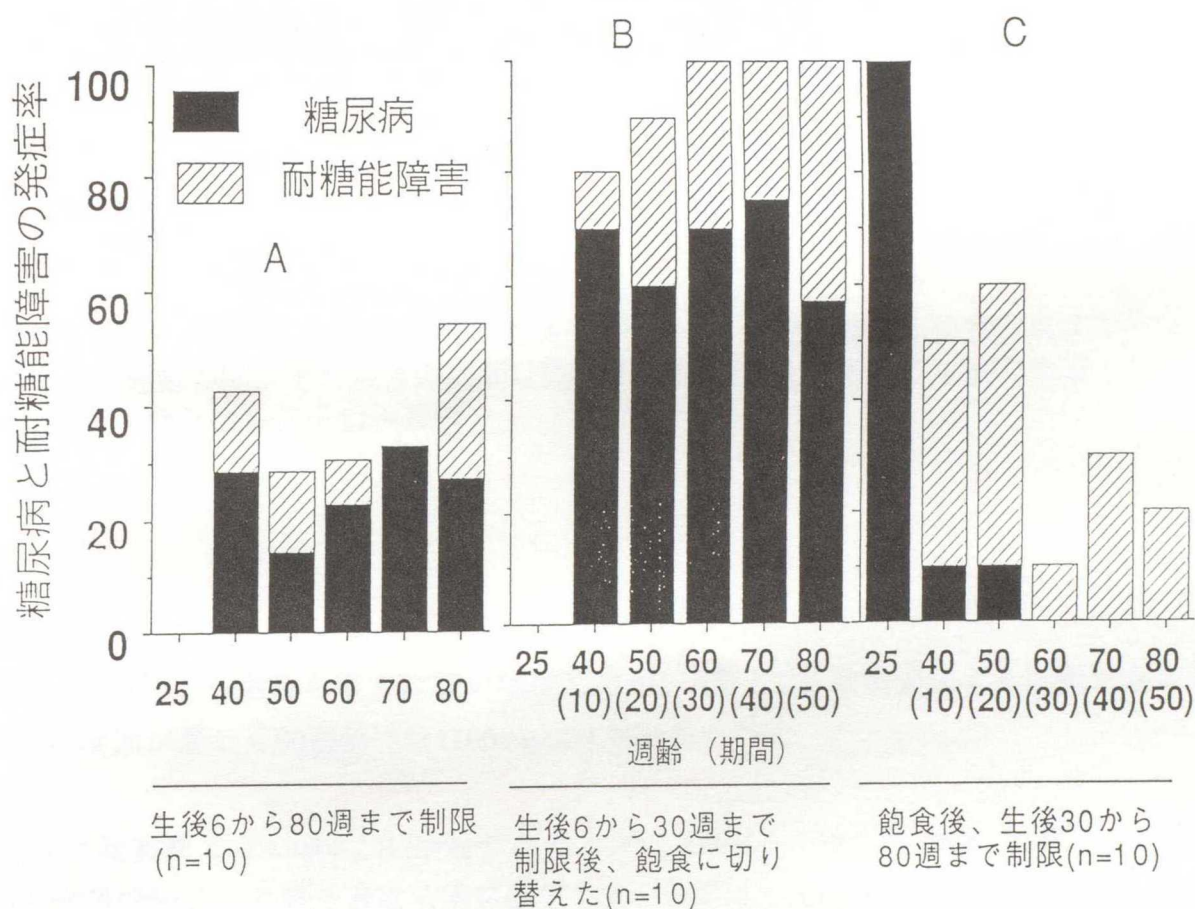


Fig.18 通常摂餌量の30%制限量を生後6から80週齢、生後6から30週齢および生後30から80週齢の間、それ以外の期間は飽食で飼育したOLETF雄ラットの糖尿病と耐糖能障害の発症率

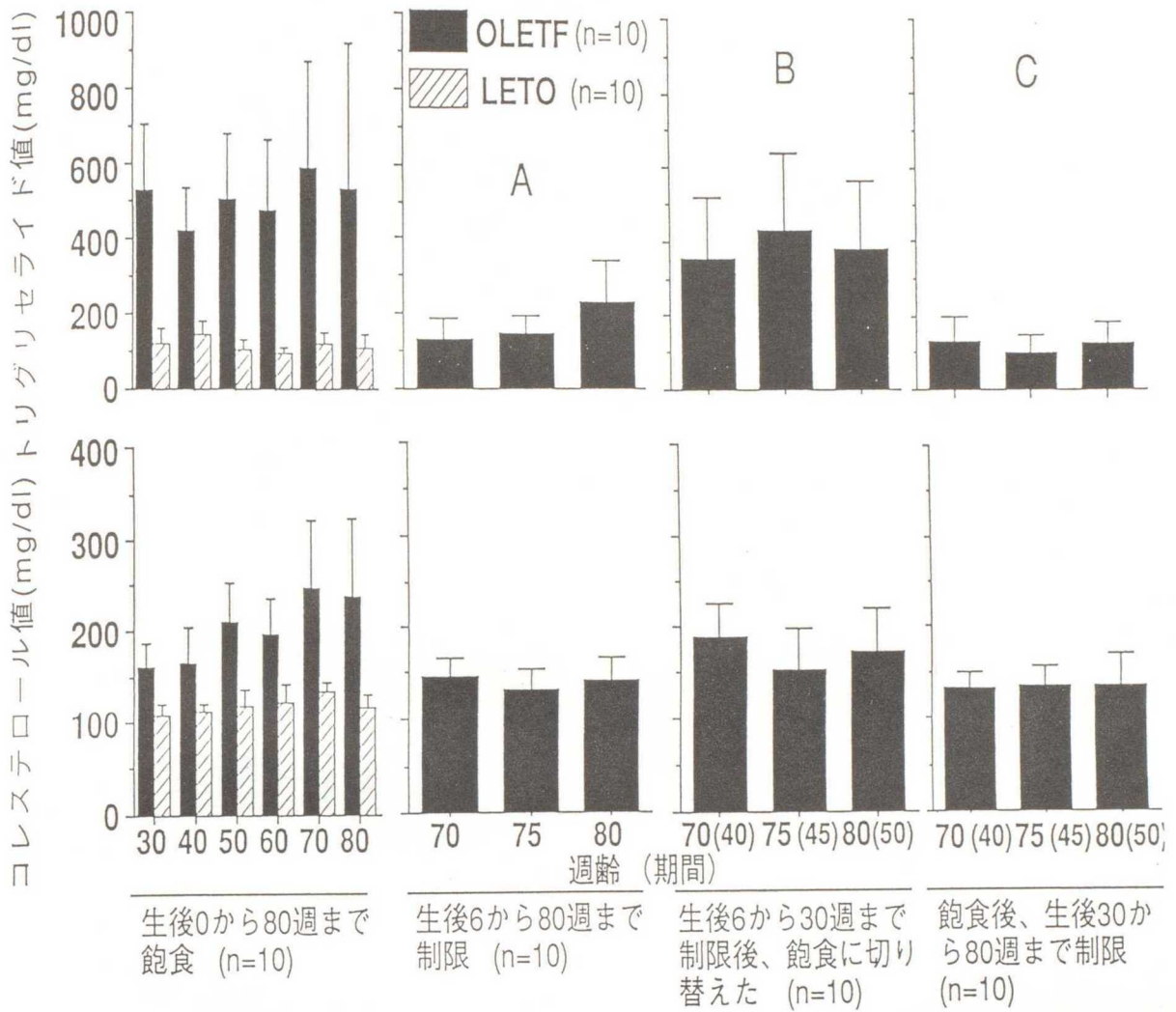


Fig.19 通常摂餌量の30%制限量を生後6から80週齢、生後6から30週齢および生後30から80週齢の間、それ以外の期間は飽食で飼育したOLETF雄ラットの血漿トリグリセライド値とコレステロール値

尿蛋白値

尿蛋白値は3群とも週齢を増すに従い増加したが、A群とC群は飽食群より低値であったが、B群は増加が著しく80週齢では1100mg/dlに達した。

腎重量

腎重量は飽食群では 4.680 ± 0.939 gであったが、A群は 3.139 ± 0.180 g、C群は 3.433 ± 0.183 gと食餌制限により腎重量は有意に低下した。B群は 3.717 ± 0.705 gと飽食群より低値であったが、A群・C群に比し有意に高値であった。

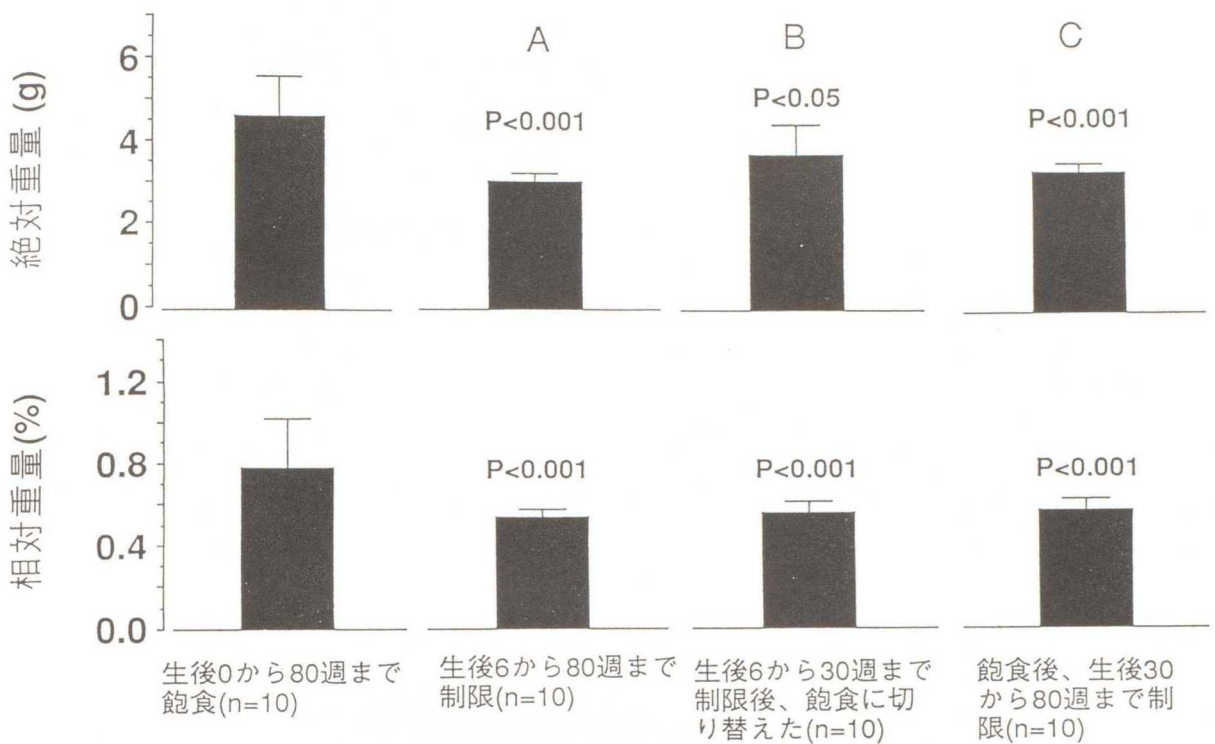


Fig.20 通常摂餌量の30%制限量を生後6から80週齢、生後6から30週齢および生後30から80週齢の間、それ以外の期間は飽食で飼育したOLETF雄ラットの生後80週齢における腎の絶対重量と相対重量

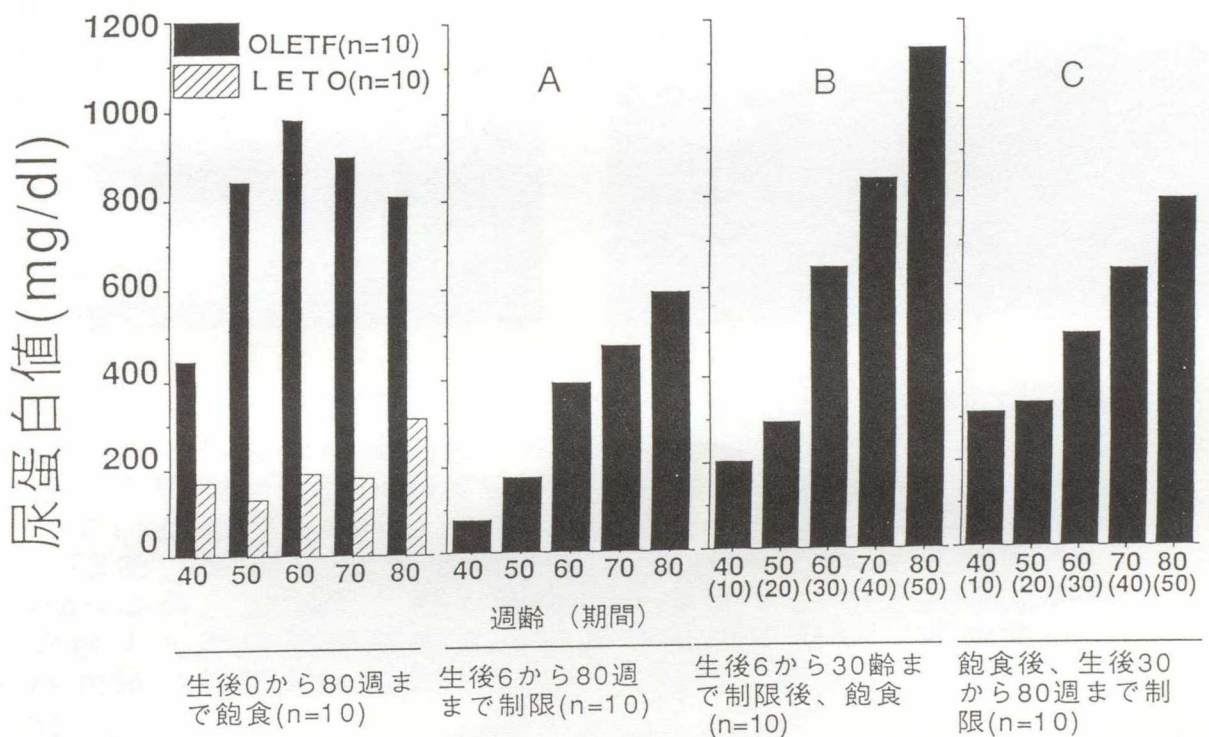


Fig.21 通常摂餌量の30%制限量を生後6から80週齢、生後6から30週齢および生後30から80週齢の間、それ以外の期間は飽食で飼育したOLETF雄ラットの尿蛋白値

病理組織学的検査

膵；飽食群の膵ラ島は線維化とともに顕著な萎縮がみられたが、A群・C群では線維化と膵小管の増生が主にみられ、顕著な萎縮像は認められず病変の進行は抑制されていた。B群も線維化と膵小管の増生が主にみられたが、顕著な萎縮像は認められなかった。B群はA群・C群と比較するとその病変はより飽食群に近かった。

腎；腎糸球体は飽食群では基底膜の肥厚やメサンギウム領域の拡張が瀰漫性に認められ、さらにfibrin cap やcapsular drop 等の滲出性病変もみられた。さらに腎糸球体全体に萎縮硬化像を認めるものもあった。A群・C群の腎糸球体では主にメサンギウム領域に細胞増生と拡張を認め、fibrin capを伴う滲出性病変もみられた。しかし、滲出性病変は飽食群に比べてその出現頻度、重症度とも軽度であった(Fig.22)。B群の病変は、飽食群より腎糸球体病変の拡がり、重症度とも軽度であったが、A群・C群に比べると重度であった。腎糸球体病変を半定量化したGLSにおいても飽食群では 0.93 ± 0.41 であったが、A群は $0.24 \pm 0.12g$ 、C群は 0.14 ± 0.08 と食餌制限により腎糸球体病変は軽減した。B群は 0.49 ± 0.22 で飽食群より低値であったが、A群・C群に比し有意に高値であった。

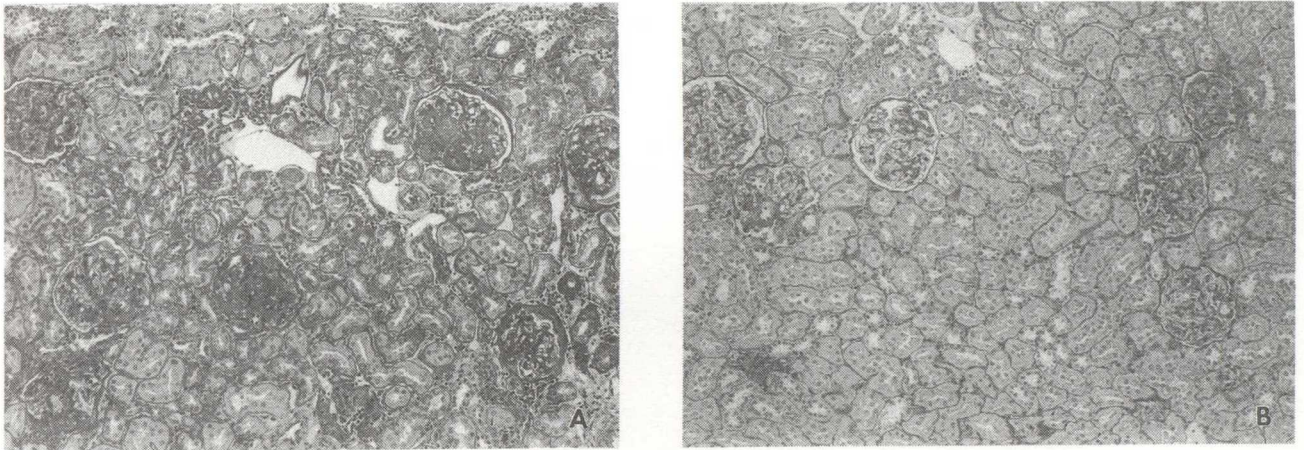


Fig.22 OLETF雄ラットを30%食餌制限した時の生後80週齢における腎糸球体病変 A；腎糸球体にはfibrin capを伴う滲出性病変がsegmentalからglobalに現れ、萎縮・硬化を呈しているものもある。一部の尿細管は萎縮し基底膜の肥厚を認め、間質には炎症性細胞浸潤がみられる（飽食群、PAS染色、 $\times 33$ ）。B；腎糸球体はメサンギウム領域の軽度拡大と基底膜の肥厚がみられるのみであり、尿細管および間質にも著変は認められない（30%制限A群、PAS染色、 $\times 33$ ）。

小括

NIDDMのモデル動物であるOLETFラットに食餌制限を行う事により、糖尿病の改善および腎症の進展抑制が可能であるか検討した。

糖尿病発症前の6週齢からと糖尿病と診断された30週齢から長期間食餌制限を行うことにより膵ラ島病変の進行遅延がみられた。すなわち、80週齢の飽食群の膵ラ島は萎縮していたが、A群およびC群では、線維化と膵小管の増生がみられるのみで顕著な萎縮像は認められなかった。腎症でもA群・C群では尿蛋白の増加が抑制され、腎糸球体病変も飽食群に比べ軽度であった。このように糖尿病状態の改善によりOLETFラットの腎糸球体病変の進展は明かに抑制された。

第9章 総括ならびに考察

Charles River Canada Inc. から導入したLong-Evans系ラットを飼育していたところ、肥満を伴い多食、多飲、多尿、糖尿を呈するラットが偶然発見された。この形質を保持する目的で糖尿と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OLETFラットを開発樹立した。

OLETFラットは若週齢より肥満を呈し、高インスリン血症を伴う高血糖が生後25週齢で雄のほぼ全例にみられ、膵ラ島ではB細胞が増生・肥大していた。その後、血糖値は徐々に上昇し、40週齢ごろより膵ラ島は少しずつ疲弊・萎縮を来すようになり、それに伴って多食、多飲、多尿、体重減少、低インスリン血症などの症状も長期にわたって徐々に増悪した。この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る。これらの病像はdb/dbマウスに類似していた(5)。しかしながらdb/dbマウスは若齢より非絶食時の血漿グルコース値が200から300mg/dlという著明な高血糖がみられる為、若齢期に糖尿病によって死亡するのに対して、OLETFラットは長期生存し症状の経過も非常に緩慢であった。

NIDDMの発症原因の一つに筋肉、脂肪組織などのインスリン抵抗性が上げられるが、OLETFラットでもグルコースクランプ法のグルコース注入速度(Glucose infusion rate; GIR)を指標にし、インスリン抵抗性の有無について中山(34、35、42、48)らが検討している。それによるとGIRは対照群のLETOラットに比べ6週齢では差はなく、12週齢で約40%、18週齢以降では約80%低下していることを報告している。他のNIDDMモデルとしてはob/obマウス(6)、KKマウス(33)、Zucker Fattyラット(52)などがあり、これらの動物では離乳直後より過食、高インスリン血症、肥満が著明であるが、多食、多飲、多尿、体重減少、低インスリン血症などの症状は示さない。GKラットは高インスリン血症と肥満を伴わず、糖尿病症状は比較的軽度であり、膵ラ島の変化もラ島周囲の不明瞭化と線維化のみであるという(12)。これらの動物とOLETFラットの病態を比較すると、OLETFラットは病初期からインスリン抵抗性状態にあることが明らかで(34、35、42、48)、肥満を伴ったNIDDMにおけるインスリン抵抗性や膵ラ島の肥大や増生の研究に有用と考えられた。

OLETFラットの膵にはラ島の肥大と線維化、外分泌部に慢性炎症性細胞浸潤がみられる膵炎、膵ラ島の周囲と近傍に軽度のリンパ球浸潤がみられる膵ラ島周囲炎および膵ラ島近傍にヘモジデリン沈着を認めた。これらの病変と糖尿病発症との関連性をOLETFラットとLETOラットならびにF344/Ducrjラットとの交雑群の各世代の合計700例についてロジスティックモデルに当てはめて解析し、膵ラ島の肥大と線維化が糖尿病発症に関して重要な要因であることが明らかとなった。雌雄のOLETFラットの膵ラ島周辺部、膵管周囲および一部の外分泌部に炎症性細胞の浸潤が見られたが、川崎(25)らの報告によれば、OLETFラットにおける細胞反応は膵島や膵島周囲よりも膵管周囲に多い傾向があり、20週以降でのこの浸潤細胞は好中球、単球、マクロファージと少数のCD4陽性T細胞だとしている。こ

の膵における炎症性細胞の浸潤はOLETFラットの催糖尿病遺伝子を解析するために行なったF344/Ducrjラットとの交雑試験のF2世代において、糖尿病が発症していないにもかかわらず認められたことから（第5章）、OLETFラットの糖尿病発症とは直接的な関連はないと考える。さらにOLETFラットでは本来の膵ラ島が萎縮する前に膵ラ島細胞の新生と増生をみる事が特徴的であった。寺園ら（47）によって、ラットの膵から再生遺伝子“reg”が分離されている。OLETFラットでも、米田ら（27）によって膵管上皮細胞に“reg”蛋白の存在が認めていることから、この“reg”蛋白の発現増強がインスリン分泌に結びついていることを証明できればインスリン分泌のgrowth factorとして疲弊した膵ラ島のB細胞を再生増殖させることが出来、自己の細胞で糖尿病を治療するという理想的な方法が可能となるかも知れない。

生後25週齢のOLETFラット雄はほぼ100%糖尿病を発症するが、雌では65週齢以上の高週齢にならないと発症しない。KKマウス（38）やWBN/Kobラット（41）などのNIDDMにおいてはテストステロンが糖尿病の発症を促進させていると報告されているが、森らは、OLETF雄ラットに4週齢から隔日に5および50mg/kgのエストロジェンを生後30週まで投与し、OGTTをおこなうと糖尿病および耐糖能障害は認められなかったとしている（未発表データ）。加齢に伴い雌のOLETFラットに糖尿病の発症がみられたことは、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してくるのではないかと考えられる。また、精巣あるいは卵巣を摘出した雌雄の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（森、未発表データ）、また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る。

OLETFラットの糖尿病発症に関する遺伝解析をおこなった結果、催糖尿病遺伝子は（OLETFXF344/Ducrj）のF1世代で糖尿病や耐糖能障害がみられなかったことから、雌雄ともに劣性であることが明らかとなった。OLETFラットの糖尿病が一個の劣性遺伝子によって発現していると仮定すれば、F2世代での糖尿病発症の期待値は25%、戻し交配世代では50%となるが、この期待値と実際の発症率を比較した場合、F2世代での発症率（糖尿病5.0%、耐糖能障害6.8%）は低く、戻し交配（糖尿病66.7%、耐糖能障害11.1%）では逆に高くなった。これらのことからOLETFラットの催糖尿病遺伝子は複数存在すると考えられた。つぎにOLETFラットとLETOラットとのF1世代で糖尿病や耐糖能障害がみられた。このことはOLETFラットとLETOラットが同じCharles River Canada Inc.由来のLong-Evansラットコロニーの中から開発樹立され、遺伝モニタリングの成績でも近縁な関係であるとされていることから、LETOラットもOLETFラットの催糖尿病遺伝子をいくつか共有している可能性が示唆された。さらにOLETFラットとLETOラットの間で正逆交配をおこなった

F1世代で糖尿病や耐糖能障害の発現頻度に差がみられた。つまり正逆交配したF1世代の常染色体はOLETFラットとLETOラットのヘテロ接合体で同じであるが、性染色体のみが異なる。Fig.9に各交雑群における性染色体の発現様式を示したように、OLETFラットの雌にLETOラットの雄を交配すると、F1世代の雄のX染色体はOLETF由来でY染色体はLETO由来となり、その逆の組み合わせではLETO由来のX染色体とOLETF由来のY染色体となる。また戻し交配でもOLETFラットのX染色体が出現する(OLETF×LETO)×LETOでは糖尿病の発症がみられ、OLETFラットのX染色体が出現しないLETO×(LETO×OLETF)では糖尿病は全く認められなかった。このようにOLETFラットのX染色体の有無によって糖尿病および耐糖能障害の発症に明らかな差がみられたことから、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考えられた。平島らはラットのX染色体上のマイクロサテライト領域を含むマーカーであるAR(Androgen receptor)とPRPS II(Phosphoribosylpyrophosphate synthetase subunit II)を用いて交雑群のX染色体のタイピングをおこない、その結果とOGTTにおける血漿グルコース値をMAPMAKER programを用いてOLETFラットの催糖尿病遺伝子のマッピングを試みた。そして、OGTTにおける120分の血漿グルコース値に關与する遺伝子がOLETFラットのX染色体のAR遺伝子から14cMのところにマッピングされ、この催糖尿病遺伝子を*ODB-1*と命名している(16-18)。現在、NIDDMの発症に遺伝要因が強く關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は至っていない。今回の実験から、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考えられ、この事がOLETFラット特有なのか、あるいはヒトのNIDDMと共通したことか非常に興味深く、今後X染色体上の位置とその機能について検討を進めたい。

IDDMはヒト(43)を含めNODマウス(14)やBBラット(7)等のモデル動物においてもMHCと強く相関があることが報告されており、OLETFラットと起源が同じであるLETLラットでも糖尿病の主因とされている膵ラ島炎とRT1のuハプロタイプとは相関があることはすでに報告した(24)。しかしながら、OLETFラットは糖尿病発症とRT1との関連はなく、ヒトのNIDDMにおいてもそれは否定されていることから、OLETFラットはヒトのNIDDMに類似しているといえよう。

OLETFラットは糖尿病態が長期間持続し糖尿病性腎症の発現も認められた。尿蛋白値は生後27週ころよりLETOラットより顕著に増加し、その後加速度的に増加した。腎糸球体は尿蛋白が増加する前の、生後23週齡からメサンギウムの軽度な増殖性変化がみられ、29週からはヒトの糖尿病性腎症の一つであるfibrin capとヒトでは糖尿病性腎症以外ではみられないとされているcapsular dropを伴う滲出性病変が出現し、加齡とともに増加し、やがて腎糸球体は萎縮・硬化に陥った。55週齡になると結節性病変に非常に類似した病変がみられた。これらOLETFラットの腎病変とヒトの糖尿病性腎症と比較してみると、滲出性病変はOLETFラットとヒトでは基本的には同様な変化であった。結節性病変はメサンギウム

の拡大はよく見られるが、その中で結節を呈するのは少数に留まり、一つの腎糸球体の中での多発もなく、matrixの硬化性変化も非常に軽度である点で差異があった。しかしながら、この結節性病変は現在までに報告されている動物モデルのものより発現頻度と重症度において顕著であった(10、11、30、44、49、50)。また、水本らによると(31)OLETFラットは生後4~5月で著明なアルブミン尿がみられ、腎糸球体は3カ月で大きくなり、5~6カ月でメサンギウム領域の拡張と滲出性病変に進展するが、同時に腎基底膜の肥厚がみられ、Polyethyleneimine(PEI)染色によって腎糸球体基底膜の陰性荷電がLETOラットに比較し減少する。この結果からアルブミン尿の原因として腎糸球体基底膜のcharge-barrierの異常が想定されている。さらに腎の血管病変として腎糸球体内に毛細血管瘤が認められたが、ヒトでしばしば認められる細小動脈硬化症は稀であった。OLETFラットの腎糸球体にみられたPAS染色の微小顆粒の存在意義には現在のところ不明であるが、糖尿病発症との関連性は強いと思われた。

高週齢OLETF雄ラットにみられた大脳髄質の石灰沈着は糖尿病と骨量の減少、Ca代謝異常(低Ca血症、小腸からのCa吸収の減少、Ca結合蛋白の減少)、血中副甲状腺ホルモンの増加、血中カルシトニンの低下、ビタミンD代謝異常などとの関連が想定されるが、現在のところ血中Ca濃度の異常は認めておらず、今後骨量の減少、Ca代謝異常について検討したい。精巣に間細胞腫を認めたが、第6章において糖尿病発症にテストステロンが一翼をになっていることが示唆され(32)、腫瘍細胞の分泌するホルモンとの関連が注目される。眼球では水晶体上皮の空胞形成と線維の断列などを認めたが、加齢に伴って病変の程度と頻度が増しており、さらに同様の病変が糖尿病患者においても高頻度に見られる(1、4、9)ことから、これらは糖尿病による合併症の可能性が高い。この他、甲状腺の乳頭状腺癌を含め内分泌系臓器に種々の腫瘍がみられた。以上、高週齢OLETF雄ラットにみられた病変のうち腎以外は糖尿病との関連は現在のところ不明である。

インスリン非依存性糖尿病(NIDDM)の発症には、遺伝因子と環境因子が関与していると言われており、環境因子としては肥満、過食、運動不足、ストレスなどが重要な因子であると推定されている。ヒトの糖尿病の治療において食事療法は、最も基礎的な治療方法であり、これは単に代謝の是正だけではなく糖尿病に伴う合併症の進展を抑制するためにも重要である。ヒトのNIDDMにおける食事療法の基本的な考え方は、インスリンの需要(抵抗性)を増大する最大の因子である過食と肥満を取り除き、インスリン需要を出来るだけ節減することである。それによって膵B細胞を庇護し機能の回復あるいは残存機能を保持することである(53)。したがって、インスリンの需要節減の為には、摂取エネルギー量を制限し肥満を解消する必要がある。今回、NIDDMのモデル動物であるOLETFラットに食餌制限を行う事により、糖尿病の改善および腎症の進展抑制が可能であるか検討した。その結果、OLETF糖尿病発症前の6週齢からと、糖尿病と診断された30週齢から長期間食餌制限を行ったところ、膵ラ島病変の進行遅延がみられた。すなわち、80週齢の飽食群の

膵ラ島は疲弊・萎縮していたが、食餌制限群では線維化と膵小管の増生がみられるのみで顕著な萎縮像は認められなかった。ラットの視床下部腹内側核を破壊すると過食が起これ高インスリン血症となることが報告されているが(13,20)、OLETFラットの過食が摂食中枢の異常によって起きているか否かは不明である。本研究で行った30%の制限量は糖尿病非発症系コントロールであるLETOラットの摂餌量とほぼ同じである。したがって、6週齢より長期間食餌制限を行った群では、過食の影響は除かれているものと思われるが、40週齢以降では30~50%の割合で糖尿病発症が認められた。これはOLETFラットの糖尿病発症には過食以外にも重要な遺伝的要因の存在することを示唆しているものと思われる。一方、食餌制限群では尿蛋白値の増加が抑制され、腎糸球体病変も飽食群に比べ軽度で、糖尿病状態の改善によりOLETFラットの腎糸球体病変の進展は明かに抑制された。ヒトの糖尿病性腎糸球体硬化症も糖代謝異常により2次的に引き起こされていると報告されており(46)、食事療法は腎症の進展を防止する為に重要であると言われている。また、KKマウスでは経口血糖降下剤投与あるいは食餌制限による糖尿病状態のコントロールにより血糖・耐糖能に改善がみられ、腎糸球体病変の進展が抑制されたとの報告(29)や、STZ糖尿病ラットにおいて食餌制限を行い高血糖を改善すると尿アルブミンの排泄が抑制され、食餌制限を中止し再び高血糖状態になると尿アルブミンの排泄も増加したとの報告もある(39)。このように腎糸球体病変の進展には高血糖状態の持続が重要な要因となっている。OLETFラットにおいても糖尿病状態が改善すると腎糸球体病変の進展も抑制されたことから、本ラットの腎症も高血糖状態の持続と密接な関係のあることが示唆された。

以上、OLETFラットの病態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、とくに腎糸球体にヒトと同様な腎症が出現することで、本ラットが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ことが明らかとなった。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。

結 論

Charles River Canada Inc.からLong-Evans系ラットを導入後、選抜交配によって肥満を伴うNIDDMモデルラット“OLETF”を確立し、以下のような病態の特徴を明らかにした。

1) 若齢より肥満を呈し、高インスリン血症を伴う高血糖が生後25週齢で雄のほぼ全例にみられ、糖尿病の進展に伴い多食、多飲、多尿、糖尿など症状が徐々に増悪化した。2) 膵ラ島は病初期においてはB細胞の増生・肥大と線維化がほぼ同時に起こり、生後40週齢ごろより膵ラ島は疲弊・萎縮が進んだ。なお、ロジスティックモデルで膵ラ島の肥大と線維化が糖尿病発症と関連している重要な要因であることが裏付けられた。3) 遺伝解析の結果、催糖尿病遺伝子は雌雄ともに劣性で複数存在し、そのうちのひとつがX染色体上に存在する可能性が示唆された。また、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。4) 糖尿病の発症は雄では生後25週齢でほぼ100%にみられるが、雌では65週齢以上にならないと発症しないという性差が存在した。5) 糖尿病発症には催糖尿病遺伝子の存在下でテストステロンがその発症に一翼をにっていることが明らかになった。6) OLETFラットの滲出性病変は全例で必発し、ヒトの糖尿病性腎症でみられるものと同じと思われた。7) 通常給餌量の30%を制限すると糖尿病の発症は遅延し、糖尿病を発症した動物でも給餌制限することによって糖尿病の病態を改善することができた。

これらのOLETFラットの特性はヒトのNIDDMに近似しており、糖尿病の発症原因の解明のみならず、糖尿病性合併症の予防や治療の研究、さらには糖尿病発症遺伝子の解析においても多いに貢献出来るモデル動物と期待される。

謝辞

稿を終えるにあたり研究の御指導ならびに論文の御校閲を賜りました麻布大学獣医学部病理学第 I 講座の野村靖夫教授、代田欣二助教授、また論文の御校閲を戴きました同内科学第二講座小林好作教授、同実験動物学講座二宮博義教授、同生物科学総合研究所石橋正彦教授に心から謝意を表します。さらに、本研究に対して研究の場と機会を与えて戴きました大塚製薬株式会社常務取締役薮内洋一徳島研究所長に深謝致します。最後に、当初より研究を協力して進めて戴いた大塚製薬株式会社徳島研究所 平島 司研究員、森 茂人研究員ならびに実験の補助、動物の飼育管理等において御協力戴いた徳島研究所実験動物管理室の皆様は厚くお礼申し上げます。

文献

- 1, 阿部正和、尾前照雄、河合忠一：糖尿病. 9: 220-222, 金原出版. 1979
- 2, Barnett AH, Eff C, Leslie RDG and Pyke DA: Diabetes in identical twins. *Diabetologia* 20: 87-93, 1981
- 3 Burch GE, Tsui CY, Harb JM, Colcolough HL: Pathologic findings in the pancreas of mice infected with coxsackievirus B4. *Arch Intern Med* 128: 40-47, 1971
- 4, Caidl FI: *Diabetes & the Eye*. Bluckwell. 1969
- 5, Coleman DL, Hummel KP : Hyperinsulinemia in pre-weaning diabetes (db) mice. *Diabetologia* 10: 607-610, 1974
- 6, Coleman DL, Hummel KP : The influence of genetic background on the expression of the obese (ob) gene in the mouse. *Diabetologia* 9: 287-293 ,1973
- 7, Colle E, Guttman RD, Seemayer T : Spontaneous diabetes mellitus syndrome in the rat. I Association with the major histocompatibility complex. *J Exp Med* 154 : 1237-42, 1981
- 8, Craighead JE, McLane MF : Diabetes mellitus: Induction in mice by encephalomyocarditis virus. *Science* 162: 913-14, 1968
- 9, 福田雅俊：眼と糖尿病、金原出版. 1968
- 10, Foglia VG, Mancini RE, Cardeza AF : Glomerular lesions in the diabetic rat. *Arch Pathol* 150: 75-83 , 1950
- 11, Funakawa S, Ogawa M, Ito H, Tochino Y : Rapid development of renal complications in non-obese diabetic (NOD) mice. *Biomed Res* 5 : 291-294 , 1984
- 12, Goto Y, Kakizaki M, Masaki N : Spontaneous diabetes produced by selective breeding of normal Wistar rats. *Proc Japan Acad* 51: 80-85, 1975
- 13, Han CN, Kennedy GC: Plasma glucose, non-esterified fatty acid and insulin concentrations in hypothalamic-hyperphagic rats. *Biochem J* 90: 620-624, 1964
- 14, Hattori M, Buse JB, and Jackson RA, Climcher L, Dorf ME, Minami M, Makino S, Moriwaki K, Kuzuya H, Imura H, Strauss WM, Seidman JG, Eisenbarth GS : The NOD mouse: Recessive diabetogenic gene in the major histocompatibility complex. *Science* 231: 733-35, 1988
- 15, Hedrich H : Genetic monitoring of inbred strains of rats. Gustav Fischer Verlag Stuttgart, New York , 129-239, 1990
- 16, 平島司、河野一弥、森茂人、名取孝：OLETFラットの糖尿病発症要因の解析；遺伝因子および性ホルモンの関与、第8回糖尿病動物研究会、1994
- 17, 平島司、河野一弥、森茂人、名取孝：NIDDMのモデル動物であるOLETFラットの催糖尿病遺伝子の解析、第37回日本糖尿病学会、1994

- 18, Hirashima T, Kawano K, Mori S, Matsumoto K, Natori T: A diabetogenic gene (ODB-1) assigned to the X-chromosome in OLETF rats. *Diabetes Res Clin Pract*, in press
- 19, 藤井源七郎、鈴木正明：皮膚移植の手技と成績判定、移植 1 (1) : 43-55、1966
- 20, Inoue S, Mullen S, Bray A : Hyperinsulinemia in rats with hypothalamic obesity; effects of autonomic drugs and glucose. *Am J Physiol* 245: 372-378, 1983
- 21, Kawano K, Hirashima T, Mori S, Kurosumi M, Saitoh Y : A new rat strain with non-insulin dependent diabetes mellitus, "OLETF". *Rat News Lett* 25: 24-26, 1991
- 22, Kawano K, Hirashima T, Mori S, Kurosumi M, Saitoh Y, Natori T : Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty(OLETF) strain. *Diabetes* 41: 1422-1428, 1992
- 23, Kawano K, Hirashima T, Mori S, Abe F, Kurosumi M, Saitoh Y : A new rat strain with insulin-dependent diabetes mellitus, "LETL". *Rat News Lett* 22 : 14-15, 1989
- 24, Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saitoh Y, Kurosumi M Natori T : A new inbred strain rats, "LETL" with insulin-dependent diabetes mellitus without lymphopenia. *Diabetes* 41:1375-1381,1991
- 25, 川崎克俊、矢尾板永信、山本格、木原達: インスリン非依存性糖尿病(NIDDM)モデルのOLETFラット腎病変の特徴、第15回日本炎症学会抄録、1994
- 26, Kimmelstiel P, Wilson C : Intercapillary lesions in the glomeruli of the kidney. *Am J Pathol* 12: 83-97, 1936
- 27, 米田嘉重朗、野田光彦、大野富男、石井主税、河津捷二、葛谷信明、金澤康徳: OLETFラットの臍におけるreg蛋白の発現増強. 第36回日本糖尿病学会抄録、160, 1993
- 28, 小坂樹徳、赤沼安夫、後藤由夫、羽倉稜子、平田幸正、川手亮三、葛谷健、三村悟郎、中山秀隆、坂本信夫、繁田幸男：糖尿病の診断に関する委員会報告. *糖尿病* 25 : 859、1982
- 29, 小林孝好：給餌制限により糖尿病状態をコントロールしたKKマウスにおける病理組織学的研究. *糖尿病* 28 : 33-43、1985
- 30, Lee SM : The effect of a high fiber diet on diabetic nephropathy in the db/db mouse. *Diabetologia* 22 : 349-353, 1982
- 31, Mizumoto D, Fukuzawa Y, Hotta N, Watanabe Y: Development of nephropathy in OLETF rat strain which has spontaneous long-term hyperglycemia. The American society of nephrology, 26th Annual meeting, 1993
- 32, 森茂人、平島司、河野一弥：OLETFラットの糖尿病発症に対する性ホルモンの影響. 日本疾患モデル学会記録、10 : 34、1994
- 33, Nakamura M : A diabetic strain of the mouse. *Proc Japan Acad* 38: 348-352, 1962

- 34, Nakayama N, Sato T, Asahi Y, Toide K, Yabuuchi Y : The insulin resistance in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty(OLETF) A new spontaneous NIDDM model rat strain . Korea-Japan Symposium on Diabetes Mellitus 7 (Suppl) : 91,1993
- 35, 中山夏樹、佐藤隆、戸出清貴、朝日美彦 : NIDDMモデルであるOLETFにおけるインスリン抵抗性とインスリン分泌不全の発生経過. 第37回日本糖尿病学会、1994
- 36, Natori T, Iwabuchi K, Ohhashi T, Inomata T, Nakagawa H, Aizawa M : Phenotype for the RT1 subregions in the Japanese inbred strains of rats. *Transplant Proc* 13: 1333-1338,1981
- 37, 日本透析療法学会編 : わが国の慢性透析療法の現況、1991
- 38, Nonaka T, Higuchi N, Arai T, Oki Y : Effects of castration and androgen on glycosuria appearance in the diabetic KK mice induced by monosodium glutamate administration. *Jpn J Vet Sci* 50: 1121-23, 1988
- 39, 大内博美 : ストレプトゾトシン糖尿病ラットにおける腎糸球体障害の進展防止に関する研究. *糖尿病*、36 : 359-365、1993
- 40, Ohhashi T, Iwabuchi K, Natori T, Nakagawa H, Kikuchi Y, Aizawa M : The B region associated antigens and MLR phenotypes in the Japanese inbred strain of rats. *J Immunogenet* 8 : 191-206, 1981
- 41, Saegusa T, Kon H, Tsuchitani M, Narama I : Effect of sex hormones on the onset of diabetic syndrome in WBN/Kob rats. *Exp Anim* 41: 481-89, 1992
- 42, Sato T, Asahi Y, Toide K, Kawano K, Nakayama N : Insulin-resistance in Otsuka Long Evans Tokushima Fatty(OLETF). 8th International conference on second messengers and phosphoproteins 8 (Suppl) : A30T, 1992
- 43, Segall M : Perspectives in diabetes. HLA and genetics of IDDM: Holism vs. reductionism?. *Diabetes* 37: 1005-8, 1988
- 44, Shibata M : Microangiopathy in diabetic NSY mice. In *Diabetic Microangiopathy*. pp 457-466, University of Tokyo Press, 1983
- 45, Shiroishi T, Sagai T, Moriwaki K : A simplified micro-method for cytotoxicity testing using a flat- type titration plate for the detection of H-2 antigen. *Microbiol Immunol* 25: 1327-1334, 1981
- 46, 諏訪紀夫 : 糖尿病腎症の臨床所見と病理所見の対比. *糖尿病*、8 : 139-144、1965
- 47, Terazono K, Yamamoto H, Takasawa S, Shiga K, Yonemura T, Tochino Y, Okamoto H : A novel gene activated in regenerating islets. *J Biol Chem* 263 : 275-278, 1988
- 48, Toide K, Sato T, Asahi Y, Nakayama N : Glucose transporters isoforms in a spontaneously type- II diabetic rat of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty(OLETF) strain. *Am Diabetes Ass* 53 (Suppl) : 725, 1993
- 49, Velasquez M, Kimmel P, Michaelis O : Animal models of spontaneous diabetic kidney disease. *The FASEB Journal* 4 : 2850-2859, 1990

50, Wehner M, Hohn D, Schade UF, Huber H, Walzer D, Schade UF, Huber H, Walzer D :
Glomerular changes in mice with spontaneous hereditary diabetes. Lab Invest 27: 331-340, 1972

51, WHO Study Group: Diabetes Mellitus. WHO Technical Report Series : 727, WHO, Geneva,
1985

52, Zucker L, Antoniades H : Insulin obesity in Zucker genetically obese rat "Fatty". Endocrinology
90: 1320-1330, 1972

53, 山吹隆寛：食餌療法 ー糖尿病の臨床ー。 講談社

OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) Rat - a new NIDDM rat strain -

KAZUYA KAWANO

Tokushima Research Institute, Otsuka Pharmaceutical Co.,Ltd.

Abstract

The characteristic features of OLETF rats are 1) late onset of hyperglycemia (after 18 weeks of age), 2) a chronic course of disease, 3) mild obesity, 4) clinical onset of diabetes mellitus (DM) mostly in males, 5) hereditary trait a); multiple recessive genes are involved in the induction of DM, b); rat MHC, RT1 has no diabetogenic effect, c); control strain, LETO appears to share some of diabetogenic genes with OLETF rats, d); female OLETF rats also carry diabetogenic genes, and e); one of the diabetogenic genes, designated as *ODB-1*, is transmitted linked with the X-chromosome of OLETF rats, however testosterone is an important factor involved in developing diabetes. 6) the changes of pancreatic islets can be classified into three stages: (1) an early stage (at less than 9 weeks of age) mild lymphocyte infiltration, (2) a hyperplastic stage (10-40 weeks of age); hyperplastic change and fibrosis in or around islets, (3) a final stage (at more than 40 weeks of age) showing atrophy of islets. 7) Diabetic nephropathy; after wk 50, glomeruli of OLETF rat enlarged, diffuse glomerulosclerosis, nodular glomerulosclerosis, the fibrin cap lesion, capsular drop lesion.

These clinical and pathologic features of disease in OLETF rats resemble those of human NIDDM.

Introduction

We have reported a new inbred strain of Long-Evans Tokushima Lean (LETL) rats with IDDM without lymphopenia (1). This LETL strain was established in 1989 from an outbred colony of Long-Evans rats that had been purchased from Charles River Canada Inc. From the same colony of rats, we established another inbred strain of rats, Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF), that develops spontaneous persistent hyperglycemia(2). In this paper, we report here that pathophysiological characteristics and genetic profiles of the OLETF rats. The value of this strain as an animal model of human type 2 diabetes is discussed.

Clinical analysis

1) Fasting glucose level (mg/dl) OLETF rats (n=10) 180-250 (mean 200)

Establishment of OLETF strain

A spontaneously diabetic rat with polyuria, polydipsia and mild obesity was discovered in 1984 in an outbred colony of Long-Evans rats, which had been

purchased from Charles River Canada (St. Constant, Quebec, Canada) in 1982. A strain of rats developed from this rat by selective breeding has since been maintained at the Tokushima Research Institute (Otsuka Pharmaceutical, Tokushima, Japan) and named Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF). Selective brother-sister matings were then started using males of more than 400g and apparently normal females at 9-10 weeks old. The males used for mating were examined by the OGTT at 25 weeks old, and normal glucose tolerated rats and their offspring were killed.

The LETO line was obtained by different original matings from those for OLETF rats, but both strain originated from the same colony of Long-Evans rats. The LETO line has not shown the diabetic syndrome.

Clinical features

Male OLETF rats began to gain weight faster than LETO rats from 5 weeks and the difference gradually increased with age, being about 200g at 40 weeks of age. Then in the early stage of diabetes mellitus (DM) with glycosuria, the body weight decreased slightly, the decrease becoming more prominent with increase in severity of DM. After the onset of glycosuria at 40 weeks, water and food intakes and urine production increased gradually, and after persistent glycosuria for more than 10 months, the rats showed marked polyphagia, polydipsia and polyuria. However, they survived and death from diabetes was very rare.

Incidence of DM

The cumulative incidences of male rats with diabetic or IGT type were 86.0% (301/350) or 9.7% (34/350), respectively, after the 20th generation. However, incidence of DM in female OLETF was 33.3% at 65 wk-old.

Biochemical analysis

The plasma glucose level of male OLETF rats became higher than that of LETO rats from 18 weeks. The triglyceride level increased from 8 weeks. The plasma cholesterol level became slightly higher than that of control rats. At 30 weeks of age, the level of plasma glucose was twice that of controls, and the plasma

triglyceride level was 5 times that of controls, whereas the plasma cholesterol level was elevated only slightly. At 40 weeks of age, the plasma cholesterol level was 4.73 ± 0.68 mM in OLETF rats and 2.71 ± 0.15 mM in LETO rats and the plasma triglyceride level was 6.45 ± 2.26 mM in OLETF rats and 1.31 ± 0.35 mM in LETO rats, both differences being highly significant ($P < 0.001$).

Oral Glucose Tolerance Test (OGTT)

The results of OGTTs at various ages are shown in Fig. 1. After 24 weeks of age, elevation of plasma glucose in the OGTT became marked, indicating the development of DM. At 55 weeks, the peak values exceeded 400 mg/dl.

At 24 weeks, the basal value and the values of plasma IRI during the OGTT were increased in OLETF rats and these increases were more prominent at 55 weeks. When OLETF rats developed glycosuria, their plasma glucose levels increased, whereas their IRI values decreased. At 65 weeks of age, plasma glucose level elevated to over 450 mg/dl, and the IRI value became less than 3000 pg/ml, and these rats were rescued by insulin injection and their body weights increased gradually. The plasma glucose and IRI responses of LETO rats in the OGTT were within the normal ranges throughout the term of observation.

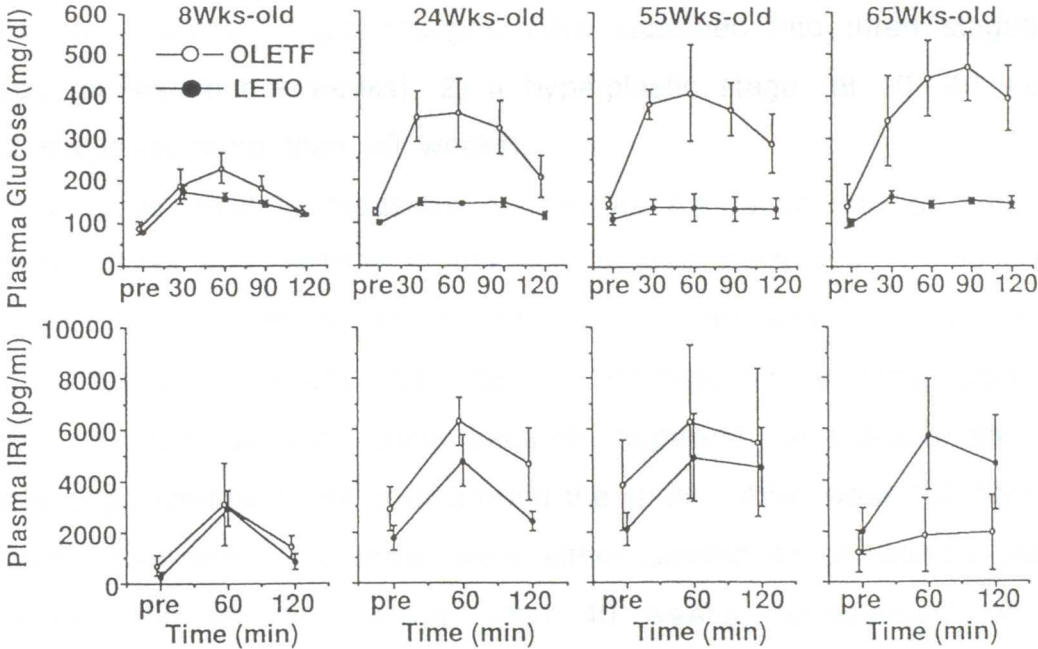


Fig.1 Plasma glucose and insulin responses in the OGTT (2g/kg, body wt.) in male OLETF (○, n=12) and LETO (●, n=12) rats. Rats were fasted for 16h before the test. means \pm S.D.

Hereditary trait

The mode of inheritance of DM in OLETF rats was examined by genetic segregation studies using F1, F2 and backcross male progenies. The results shown in Table 1 and Fig. 2 are summarized as follows : 1) no diabetic rat was found in reciprocal F1 hybrids of OLETF and F344/Ducrj rats, 2) approximately 46% of (OLETF X LETO)F1 hybrids were diabetic, whereas in the reverse combination only 2 of 63 F1 hybrids (3.2%) were diabetic, 3) approximately 12% of the (OLETF X F344)F2 hybrids were diabetic, whereas the approximately 29-35% of (OLETF X LETO)F2 and (LETO X OLETF)F2 rats were diabetic, 4) on backcross with OLETF rats, more than 60% of the progenies were diabetic, whereas those obtained by backcrosses with LETO or F344 developed no diabetes except those of (OLETF X LETO)F1 X LETO mating which showed a relatively high incidence of diabetes (21.5%). No association of diabetes with the RT1.A phenotype was observed (data not shown). These results clearly indicate that 1) more than two recessive genes are involved in the development of diabetes, 2) both male and female OLETF rats carry a set of diabetogenic genes, and 3) one of the diabetogenic genes designated as *ODB-1*, is transmitted linked with the X-chromosome of OLETF rats, and 4) LETO rats appear to share some diabetogenic genes with the OLETF strain.

Histopathological finding

Pancreas : Histopathologic changes were classified into three stages : 1) an early stage (at less than 9 weeks), 2) a hyperplastic stage (at 10 - 40 weeks) and 3) a final stage (at more than 40 weeks).

An early stage, mild to moderate lymphocyte infiltration into or around almost all pancreatic islets and partially in the acinus area were seen in both male and female OLETF rats. However, at this stage, the islet structure was normal and insulin granules were clearly identified by immunohistochemical staining. After week 12, fibrosis of the islets became apparent. A characteristic feature is hyperplasia of pancreatic ducts in or around the islets. After week 20, fibrosis of the islets became prominent ; the islets were either divided or completely replaced by fibrotic fibers. In the final stage, after 40 weeks, replacement of islets by connective tissues became more marked. After 70 weeks, the pancreas was extremely atrophic and the tissue was replaced by fatty and connective tissue.

Both the number and size of islets were significantly decreased. Loss of the islets was seen in the final stage.

Table 1 Incidence of diabetes mellitus(DM) in various generations of crosses of OLETF and F344/Ducrj or LETO rats

	N	DM	IGT	Normal
(OLETF×F344/Ducrj) F1	22	0(0%)	0(0%)	22(100%)
(F344/Ducrj×OLETF) F1	22	0(0%)	0(0%)	22(100%)
(OLETF×F344/Ducrj) F2	161	8(5.0%)	11(6.8%)	142(88.2%)
(F344/Ducrj×OLETF) F2	44	0(0%)	0(0%)	44(100%)
(F344/Ducrj×OLETF) F1×OLETF	18	12(66.7%)	2(11.1%)	4(22.2%)
(F344/Ducrj×OLETF) F1×F344/Ducrj	18	0(0%)	0(0%)	18(100%)
(OLETF×LETO) F1	63	2(3.2%)	27(42.9%)	34(54.0%)
(LETO×OLETF) F1	63	0(0%)	2(3.2%)	61(96.8%)
(OLETF×LETO) F2	99	13(13.1%)	22(22.2%)	64(64.6%)
(LETO×OLETF) F2	127	9(7.1%)	28(22.0%)	90(70.9%)
(OLETF×LETO) F1×OLETF	36	16(44.4%)	8(22.2%)	12(33.3%)
(OLETF×LETO)F1×LETO	28	1(3.6%)	5(17.9%)	22(78.6%)
OLETF×(LETO×OLETF) F1	45	17(37.8%)	18(40.0%)	10(22.2%)
LETO×(LETO×OLETF) F1	32	0(0%)	0(0%)	32(100%)

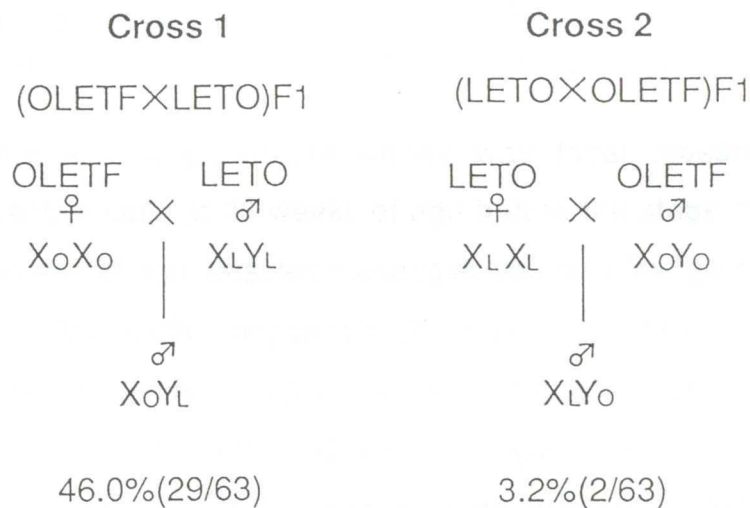


Fig. 2. Mode of transmission of sex chromosomes and incidence of diabetes mellitus determined by the OGTT. The two crosses differ in transmission of the sex chromosome. Males from cross 1 (OLETF X LETO)F1 received the OLETF X (X_o) and LETO Y chromosome (Y_L) whereas males from cross 2 (LETO X OLETF)F1 received the LETO X (X_L) and OLETF Y chromosome (Y_o).

Diabetic nephropathy

The results of urinary protein levels at various ages are shown in Fig. 3. Urinary protein levels in male OLETF rats began to increase more than LETO rats from 30 weeks and drastically increased thereafter, ultimately reached over 800 mg/day.

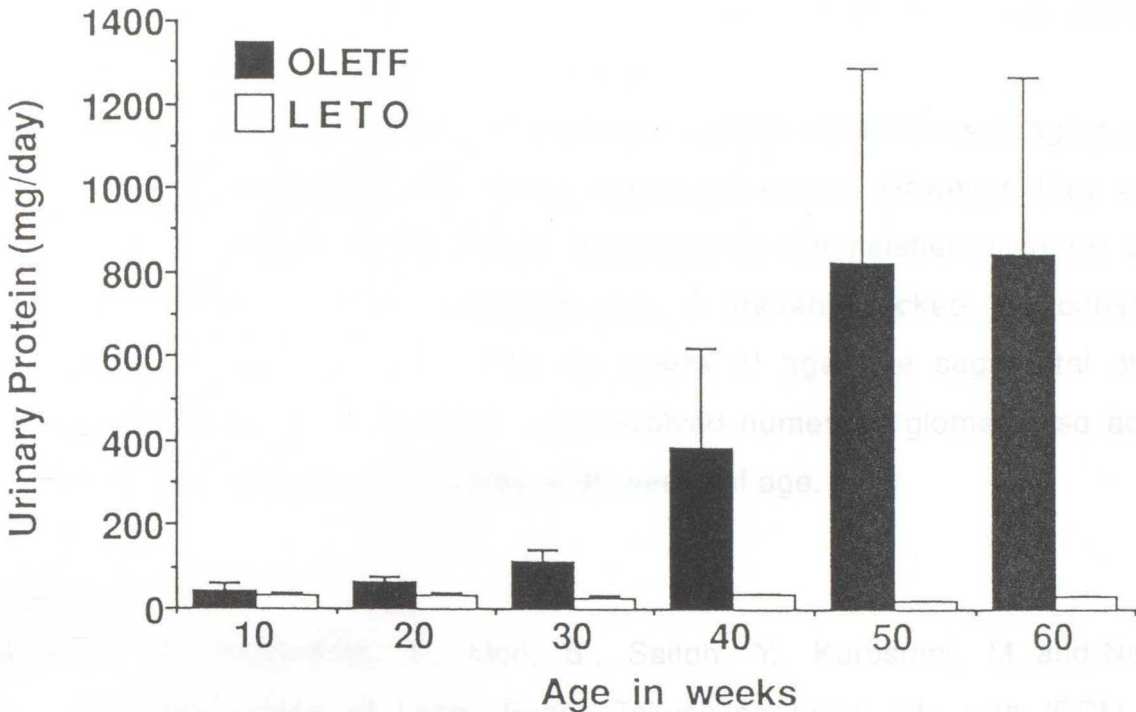


Fig.3 Urinary protein levels in male OLETF (■,n=12-40) and LETO (□,n=12-40) rats. Columns and bars show means \pm S.D.

The early histological change of the kidney was focal mesangial lesion with proliferation of mesangial cells at 23 weeks of age before the stage of clinical diabetic nephropathy. At 29 weeks of age, besides mesangial lesion, a few glomeruli showed the segmental lesion with PAS-positive deposits in the mesangium or capillary that seemed to be identical with the fibrin(hyalin) cap in the exudative lesion commonly observed in human diabetic glomerulopathy. After 50 week of age, the glomeruli showing the exudative lesion with prominent fibrin caps became numerous and more dominant finding than the mesangial lesion. Most of these lesions were characteristic in that they arose as the focal and segmental lesions in the early stage and showed the segmental obsolescence in the later stage. However, a few lesions of them advanced so much as to be the global exudative lesions. The similar deposits were often observed at inside of Bowmann's capsule which had same finestructure with fibrin cap and were located between the basement membrane and parietal epithelial cells of the capsule. This was

identical with the lesion called the capsular drop, one of characteristic findings for human diabetic glomerulopathy. On the other hand, the aneurysmal dilatation of intraglomerular vessels, another characteristic finding in glomerulus, was frequently observed. These dilated vessels were contoured with thickened wall of mesangial tissue. However, the vascular changes in the interstitium or vascular pole of the glomerulus such as the arteriolo-hyalinosis and -sclerosis were not seen.

Through all stages, the severity of mesangial lesions increased with aging, some of which showed nodular expansion of the mesangial matrix. However, they were not identical with the typical nodular lesion described by Kimmelstiel-Wilson(3) because they were at most a minor proportion and, if present, lacked the consolidated appearance with acellular core. After 55 weeks of age, the segmental or global obsolescence(sclerosis) of glomeruli and involved numerous glomeruli so advanced ultimately as to be the end stage kidney at 96 weeks of age.

References

1. Kawano, K., Hirashima, T., Mori, S., Saitoh, Y., Kurosumi, M. and Natori, T. (1991) New inbred strain of Long - Evans Tokushima Lean rats with IDDM without lymphopenia. *Diabetes* 40, 1375-1381.
2. Kawano, K., Hirashima, T., Mori, S., Kurosumi, M., Saitoh, Y. and Natori, T. (1991) Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. *Diabetes* 41, 1422-1428.
3. kimmelstiel P, Wilson C.(1936) Intercapillary lesions in the glomeruli of the kidney. *Am J Pathol* 12:83-97