Prevention of Congenital Malformations in the Offspring of Alloxan-diabetic Mice by the Insulin Treatment

Kin-ichi HORII

Department of Hygiene, University of Niigata School of Medicine
(Director : Prof. Gen-ichi Watanabe)

Unpedigreed virgin white mice of the Watanabe colony bred in this laboratory for a year and a half were used as experimental animals. Eighty mg of alloxan per kg body weight was given intravenously to the test group as well as the control on the 11th day of gestation. The test group was treated 7 times with 0.4 units of "lente insulin" at 12-hour intervals from 36 hours after the alloxan injection, up to the 15th day of gestation. The dose of insulin incurred no risk of hypoglycemia in diabetic mice, but was not necessarily enough to lower the elevated blood sugar levels to normal, in about half of all instances. Pregnant mice of both groups were sacrificed on the 19th day post coitum, and fetuses were removed by laparotomy and examined for externally visible defects.

No fetus with gross anomalies existed in 407 born to 40 successful pregnant mice in the test group. In the control group treated by alloxan alone, on the other hand, there were 9 pregnancies which had more than one malformed fetus out of 40 successful ones (22.5 per cent) and 25 fetuses with cleft palate out of 369 live-born (6.8 per cent). The term, "successful pregnancy", is regarded as a pregnant mother having more than one live fetus found at laparotomy on the 19th day of gestation.

An increase of the body weight due to pregnancy was less in mothers with malformed fetuses than in those with normal fetuses; this difference being statistically significant by means of the chi-square test with the probability level of 0.02, whereas no appreciable difference was found between blood sugar levels in the two categories of mothers.

(pp. 988~995)

糖尿病奇形の予防に関する実験的研究

新潟大学医学部衛生学教室 (指導 渡辺巖一教授)

堀 井 欣 一

(昭和38年6月20日受付)

緒 言

糖尿病の母親からは、しばしば奇形児が生まれる¹⁾。すなわち、Joslin Clinic の報告²⁾によると、糖尿病の母親から生まれた子供の80%が奇形児であつたという驚くべき事実がある。最近 Driscoll ら³⁾は、糖尿病の母からの生産児95例の死後剖検所見を記載し、20%に外見上認めうる奇形があつたと報じている。糖尿病の催奇形効果はひとり真性糖尿病にかぎらない。Hoet⁴⁾が、原因不明の奇形児を生んだ母親の糖負荷血糖曲線を調べたところ、奇形児の30%の母親はそれが糖尿病前期状態の範疇に入るものであつたという。

最近 Watanabe と Ingalls⁵⁾は、妊娠ハツカネズミをアロキサン糖尿病にかけ各種の奇形仔をえることができた。この研究での特に重要な知見は妊娠の経過中アロキサンを投与する時期により、現れる奇形の種類や頻度が異なり、ことに口蓋裂にあつて一定の法則をみいだしたことである。

妊娠初期、いまだ形態形成の行なわれている時期に母親へ侮辱を与えると、奇形仔を生むという実験奇形学的提示は多い⁶⁾。しかし、これら侮辱に加うるに、それに対抗すべきなんらかの手段を講ずることにより、奇形仔発生を予防しえた知見はいまだみることができない。実験的に奇形発生の予防ができるならば、それは第1に遺伝説と環境説の錯綜する奇形の原因論に有力な拠点を与えることになり、第2には予防医学上の大きな寄与となるであろう。

著者は妊娠ハツカネズミにアロキサンを与えて糖尿病にし、さらにインシュリンを投与して、先天性奇形発生の有様をみたのでここに報告する。

方 法

動物は実験動物中央研究所から入手し、さらに吾々の研究室で1年半飼育繁殖せしめた近交系処女ハツカネズミである。

予備実験としてアロキサン糖尿病ハツカネズミに対する“lente-insulin”の血糖低下作用を調べた。生後12週以上、体重25gm.以上の雄ハツカネズミ10匹に尾静脈よりアロキサン80mg/kg. B. wt. を静注し、糖尿病をおこさせた。そして、24, 36, 48, 72時間後の血糖変化を観察した。ついで別群に同様アロキサン80mg/kg. B. wt. を静注、36時間後血糖を測定し直ちに“lente-insulin”を個体当たり、それぞれ1.2, 0.8, 0.6, 0.4単位を12時間おきに皮下に注射し、かくして4, 8, 12時間後の血糖を観察した。アロキサンによる過血糖の様子と、それに対抗すべき有効インシュリン量を決定したのち本実験を行なつた。

まず、生後12週以上、体重25gm.以上の処女ハツカネズミを同系の雄と交配せしめ、毎朝交尾栓を調べた。そして、もしこれをみたならば妊娠第1日目とし、11日目にアロキサン80mg/kg. B. wt. を静注した。その36時間後より12時間毎に7回、すなわち15日目の夜まで“lente-insulin”0.4単位を皮下注射した。この群を実験群、同様の要領でアロキサンのみを投与した群を対照群とした。不妊子宮、死亡例があつたため、両群とも成功妊娠(19日目の開腹で、1匹以上生存胎仔をみたものをいう)40例をうるに、前者で59匹、後者で76匹を要した。

実験群ではアロキサン注射36時間後、および第2回目“lente-insulin”注射4時間後、また対照群ではアロキサン注射36時間後、それぞれ血糖値を測定した。この間妊娠第1日、11日、15日、19日目に全動物の体重計測を行なつた。

母親が出産した奇形仔を食い殺すことを予防するために、出産予定の前日、すなわち、妊娠第19日目に開腹して胎仔を取りだし、外見的奇形の有無を検した。

血糖測定は尾末端より0.05mlを血糖測定用ピペットで採血し、Somogyi-Nelsonの微量法⁷⁾を用いて行なった。

アロキサンは注射直前、そのつど2.0%水溶液を作り使用した。インシュリンは米国 Eli Lilly 社製“lente-insulin”を注射直前蒸留水で4倍に希釈して用いた。

骨奇形の検査はつぎの要領で行なつた。肉眼的奇形観察の後、70%アルコール漬けにした胎仔が十分硬化するをまつて内臓を除去し、1% KOH 溶液中に入れる。24時間後、骨格が透視できるようになつてから、0.5% alizarin-red S 溶液を KOH 10cc に対し、1滴の割合で加えたものの中に投入し、24時間～36時間染色後水洗観察した。

結 果

血糖値の観察：

アロキサン 80mg/kg. B. wt. 注射後の血糖変化は Fig.1 に示すとおりである。投与後36時間で血糖値は頂上に達し、以後これを持続した。標本平均値を中心としての斜線部分は母集団平均値95%の信頼限界を示すものである。

Fig. 1. Change of the Blood Sugar Level in Mice After Intravenous Injection of Alloxan (80mg per kg. B. Wt.).

Fig. 2. はアロキサン過血糖に対する0.4～1.2単位/個体のインシュリン投与による血糖変化の模様を示したものである。アロキサン投与36時間後の血糖値95%信頼限界の幅は、 325 ± 122 mg/100ml であつた。“lente-insulin”注射の血糖値におよぼす効果はつぎのとおりである。第2回目1.2単位/個体を注射し、4、8、12時間後の平均血糖値の変化をみると、それぞれ 86 ± 70 mg/100ml., 317 ± 127 mg/100ml., 393 ± 136 mg/100ml. であつた。4時間後の血糖値で、50mg/100ml. 以下を示すものが10例中5例あり、うち1例は死亡した。ついで第4回目のインシュリン注射、0.8単位/個体の場合には4時間後が 166 ± 99 mg/100ml であつた。この場合も9例中50mg/100ml 前後のものが3例あり、低血糖を生ずる危険がある。第6回インシュリン注射で0.4単位/個体を使用した場合、4時間後の95%信頼限界の幅は 195 ± 76 mg/100ml であり、最低98

mg/100ml, 最高354mg/100mlであつた。Fig. 2 で興味あることは、インシュリン注射の効果が消失した後を示す高血糖はインシュリン投与毎に次第に上昇することである。この間、アロキサン過血糖とインシュリンによる血糖低下の間には認むべき関連がなかつた。これは血糖値の高低よりむしろインシュリン感受性の個体差にもとづくものかもしれない。

Fig. 2. Effect of Insulin Treatment against Alloxan Hyperglycemia

以上の血糖観察から案ずるに、アロキサン 80mg/kg. B. wt. 静注による糖尿病に対して、インシュリン 0.4~0.5単位/個体が本実験の目的に沿うと判断される。

奇形の観察：

血糖値ならびに体重の変化は Table 1 にまとめてある。妊娠11日目にアロキサンを投与し、40例36時間後の95%信頼限界の幅は、実験群 540 ± 82 mg/100ml, 対照群 506 ± 62 mg/100mlであつた。また、前者のインシュリン投与4時間後のそれは 222 ± 54 mg/100mlで、最低値は 75mg/100ml, 最高値は 390mg/100mlであつた。

Table 1. Comparison of Blood Sugar Levels and Body Weights of Insulin-injected with -noninjected Groups of Alloxan-diabetic Pregnant Mice

	No. of Successful Pregnancies	Blood Sugar Levels (mg/100ml)		Body Weight Change during Pregnancy (gr)			
		36hrs. after All. Inj.	4 hrs. after Ins. Inj.	1st Day	11th Day	15th Day	19th Day
Alloxan-Insulin Group	40	540 ± 82	222 ± 54	25.1	29.4	31.9 ± 2.2	35.9 ± 3.8
Alloxan Group	40	506 ± 62		24.8	29.1	28.5 ± 2.2	33.5 ± 3.8
Significance						$P < 0.01$	$P > 0.05$

これら両群間の体重の変化はアロキサン投与後、実験群（アロキサン—インシュリン注射群）では、体重増加があり、対照群（アロキサン注射群）では、体重増加が少なかった。

なお15日目の両群の体重を、それぞれの11日目の体重に比較した増加率の差は有意であつた（ $P < 0.01$ ）。

胎仔に発生した奇形の種類と頻度は Table 2 に示すとおりである。実験群では40例の母親からの胎仔数407中、外見的奇形を有するものは1例もなかった。これに反し、対照群では母親40例、えた胎仔367で、1仔以上奇形仔をもつ母親9（22.5%）、胎仔数では25（6.8%）に口蓋裂をみた。この場合、他の外見的奇形はみられなかった。

Table 2. Comparison of Frequencies of Congenital Malformations between Insulin-injected and -noninjected Groups of Alloxan-diabetic Pregnant Mice

	No. of Successful Pregnancies	No. of Fetuses (Average Size of Litter)	Cleft Palate		Rib Abnormalities				
			No. & Percent of Mothers with Malformed Fetuses	No. & Percent of Malformed Fetuses	Frequency & Percent of 14 Ribs				Wavy Ribs
					total	r.	l.	both	
Alloxan-Insulin Group	40	407 (10.2)	0	0	150 (36.9%)	23	49	78	0
Alloxan Group	40	367 (9.2)	9 (22.5%)	25 (6.8%)	139 (37.8%)	21	52	66	1

Fig. 3. Body Weight Changes from 11th to 15th Days of Pregnancy in Alloxan-diabetic Mice with and without Malformed Fetuses.

Difference between both groups is statistically significant with the probability level of less than 0.02.

Photograph 1. Normal palate of nineteen-day-old pregnancy.

Photograph 2. Cleft palate of the first grade after alloxan treatment on the 11th day of gestation.

Photograph 3. Cleft palate of the second grade after alloxan treatment on the 11th day of gestation.

Photograph 4. Cleft palate of the third grade after alloxan treatment on the 11th day of gestation.

アロキサン注射群において高血糖の多寡と口蓋裂発生との間には、格別の相関をみながつた。一方、妊娠11日目アロキサン静注直前の母ネズミの体重に対し、妊娠15日目（アロキサン—インシュリン注射群では、7回の注射を終了した直後に相当する）の体重増減の分布を示すと、Fig. 3のとおりである。すなわちこの図から妊娠による体重増加がないのみならず、むしろ減少度の強い母ネズミに口蓋裂胎仔発生頻度の高いことを知る。いま体重8%減を界とし、 χ^2 -testを行なうに、0.02以下の危険率で上記傾向は有意であつた。写真1~4はそれぞれ本実験でえた正常口蓋、軽度口蓋裂、中等度口蓋裂、高度口蓋裂を示す。

骨異常に関し14本肋骨をもつものの出現頻度は、実験群、対照群ほぼ同様であつた。ただし、対照群に波状肋骨1例があつたほか、骨異常に特記すべきものはなかつた。

実験群で全母親59匹中、不妊子宮10匹（17.0%）、死亡9匹（15.3%）、対照群では全母親76匹中、不妊子宮7匹（9.2%）、死亡29匹（38.2%）があつた。死亡例は前者で開腹前2~3日が多く、後者ではアロキサン投与4~5日目から開腹前まではほぼ等しく散在していた。なお、念のため開腹直前に死亡した例について胎仔奇形を調べたところ、前者で母親2匹中、奇形胎仔はみられず、後者で母親4匹、えた胎仔33中、奇形仔1匹以上もつ母親3匹および15胎仔に口蓋裂をみた。

考 案

アロキサン糖尿病による実験奇形の発生に関し納得すべき提示をしたのは、Watanabe と Ingalls⁹⁾が最初である。彼らはハツカネズミの妊娠9~14日目に100mg/kg. B. wt. のアロキサンを静注し、四肢奇形、口蓋裂、骨格奇形などをえている。このうち注射日と口蓋裂発生頻度との間には注目すべき関係があつた。すなわち成功妊娠15例中、妊娠9~11日にアロキサンを注射した群では30~45%が1仔以上口蓋裂をもつ胎仔を有し、以後漸減し14日目注射群ではすでに口蓋裂仔をえることができなかったという。

さらに Ingalls とその共同研究者⁹⁾は、妊娠2日目から18日目までのハツカネズミを各々1回5分間ずつ、それぞれ無酸素状態におき19日目に開腹して、生存胎仔を調べたところ、15日目に無酸素侮辱を与えたものに口蓋裂が多発したと報じている。

さらに Ingalls⁹⁾は、妊娠10日目から15日目までの母ネズミに hydrocortisone を与えている。この際口蓋裂の頻度は妊娠13日目に侮辱を与えた群に最も多く出現した。

このようにして胎仔に口蓋裂を発生せしめるためには、母へ与える侮辱の種類により臨界時が異なる。無酸素刺激は催奇形効果が一過性であり、hydrocortisone はそれよりやや長く、アロキサンの効果はさらに慢性、かつ蓄積的であるといえよう。ちなみにハツカネズミの口蓋閉鎖時期は株により多少異なるが妊娠16日目といわれている¹⁰⁾。

一方インシュリンに催奇形効果のあることは早くから判つていた。すなわち Duraiswami¹¹⁾ は孵化中の鶏卵に0.05~6単位のインシュリンを与え発生したヒナに骨奇形をみた。また Lichtenstein¹²⁾ らはシロネズミに“protamine-zinc-insulin”1回7~8単位を注射し同様骨奇形をえたと記載している。Ingalls¹³⁾ は、妊娠8~10日目のハツカネズミにインシュリンを投与したところ、頭蓋破裂、骨格奇形をもつ胎仔をえている。これら実験の奇形発生に対し、ヒトへのインシュリン投与が胎児へ奇形を誘発するという記載がある。Wickes¹⁴⁾ は、妊娠8週以前の精神分裂症患者に insulin-shock 療法を施したところ奇形児が生まれたと誌している。

以上の事実からアロキサンとインシュリンの両催奇剤を併用する場合、それぞれ投与の時期と量に対し慎重な注意が払われねばならぬことを知る。

本実験での血糖値はアロキサン投与36時間後おおむね頂上に達した。これはさきに行なつた Watanabe と Ingalls⁹⁾ の実験にはほぼ等しい。この高血糖に対処すべきインシュリン投与はアロキサン投与後36時間前後に開始されねばならない。ここに用いた“lente-insulin”は、速効性と緩効性の混合インシュリンである。ヒトに適用する場合高血糖抑制効果は24~30時間持続するといわれる¹⁵⁾。しかるにハツカネズミではFig. 2に示すとおり効果の持続時間短く、血糖値は注射後12時間にしてすでに注射前の高血糖にもどつてしまう。し

たがってこの研究では、胎仔口蓋閉鎖が終了するまで受胎後12日から12時間ごとに7回インシュリンを投与したのである。この間インシュリン低血糖を生ずるような量はそれ自体が催奇形効果を発するので好ましくない。すなわち、ここでは、高血糖を十分抑えるインシュリン量というよりは、むしろ低血糖をおこす危険のないインシュリン量を決めてそれを使用したのである。それが0.4単位/個体であつた。結果はすでに述べたように鮮かなものである。インシュリン投与群にあつては1例の奇形仔もえることはなかつたが、非投与群では生存胎仔367中25の口蓋裂胎仔をえたのである。

Lukens¹⁶⁾ はアロキサシには“histotoxic”な作用と“diabetogenic”な作用があると云つた。このどちらに催奇形効果があるかを判断するのは困難である。Watanabe と Ingalls⁹⁾ はアロキサシの催奇形効果が前述のように持続的蓄積的であるところから“diabetogenic”な効果に催奇形作用があると思案している。本実験の結果からみて Watanabe と Ingalls⁹⁾ の考え方は正しいように思われる。それはインシュリンに抗アロキサシ細胞毒効果があるとは思えないからである。

この実験で用いたインシュリン量は前述のように高血糖を抑えるに必ずしも十分ではなかつた。インシュリン投与4時間後 300mg/100ml 以上の高血糖を示す例があつた。それにもかかわらず奇形仔は出現しなかつた。さらに Watanabe らが高血糖と奇形仔発生に格別の相関をみとめなかつたこと、そして高血糖のない糖尿病前期状態の母親から奇形児が生まれる疫学的事実などを勘案し、上述のことは納得ができるように思われる。糖尿病の催奇形効果は高血糖それ自体よりはむしろ母体の広範な代謝性 homeostasis の失調に基因するものであろう。アロキサシ糖尿病の重症度、ひいては催奇形強度は高血糖よりむしろ妊娠による体重増加のより少ないという点に相関が強かつたからである。

結 論

妊娠ハツカネズミをアロキサシ糖尿病にかけさらにインシュリンを投与して先天性奇形の出現頻度を非インシュリン投与群と比較した。

アロキサシ 80mg/kg. B. wt. 静注しておこる過血糖に対抗し、低血糖をおこす危険のない“lente-insulin”量は0.4~0.6単位/個体であつた。

妊娠11日目の動物にアロキサシ 80mg/kg. B. wt. を静注し、36時間後から12時間ごとに7回、“lente-insulin” 0.4単位皮下注射をした。妊娠19日目に開腹し胎仔を取出し外見的奇形と骨奇形の観察を行なつた。

インシュリン投与群の成功妊娠例(19日目開腹時、1仔以上の生存胎仔をもつもの)にあつてえた胎仔数407中、1例の奇形仔もみることにはなかつた。これに反し非インシュリン投与群では母ネズミ40、えた胎仔367、中奇形仔をもつ母親は9匹(22.5%)、胎仔数25(6.8%)に口蓋裂をみた。

これら奇形仔をもつ母親はしからざる母親に比べ、血糖値に格別の特徴はなかつたけれども妊娠による体重増加率が極めて低かつた。

おわりに恩師渡辺巖一先生の御指導を感謝します。

文 献

- 1) WATANABE, G.: Acta Medica et Biologica, 10: 1, (1962).
- 2) JOSLIN, E.P., H.F. ROOT, P. WHITE and A. MARBLE: Treatment of Diabetes Mellitus, 10th ed., Lea & Febiger, Philadelphia, (1959).
- 3) DRISCOLL, S.G., L. BENIRSCHKE and G.W. CURTIS: Am. J. Dis. Child, 100: 818, (1960).
- 4) HOET, J.J., A. GOMMERS and J.P. HOET: The Third Congress of International Diabetes Federation, Düsseldorf, July, 21-25th, (1958).
- 5) WATANABE, G. and T. H. INGALLS: Diabetes, 12: 66, (1963).
- 6) KALTER, H. and J. WARKANY: Physiol. Rev., 39: 69, (1959).
- 7) SOMOGYI, M.: J. Biol. Chem., 160: 61, (1945).
- 8) INGALLS, T.H., F.J. CURLEY and R.A. PRINDLE: New Engl. J. Med., 247: 753, (1952).
- 9) INGALLS, T.H. and F.J. CURLEY: New Engl. J. Med., 256: 1035, (1957).
- 10) FRASER, F.C., B.E.

- WALKER and D.G. TRASLER : Pediatrics, 19 : 782, (1957). 11) DURAIWAMI, P.K. :
 Brit. Med. J., II : 384, (1950). 12) LICHTENSTEIN, H., G.M. GUEST and J. WARKANY :
 Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 78 : 398, (1951). 13) INGALLS, T.H. and F.J. CURLEY :
 Unpublished Experiments. 14) WICKES, I.G. : Brit. Med. J., II : 1029, (1954). 15)
 DANOWSKI, T.S. : Diabetes Mellitus, 271, Williams & Wilkins Co. Baltimore, (1957). 16)
 LUKENS, F.D.W. : Physiol. Rev., 28 : 304, (1948).