Effect of Androgen on the Onset of Diabetes in the KK Mice Treated with Monosodium Aspartate

Naoko HIGUCHI, Masashi SASAKI, Toshiro ARAI, and Yoshio OKI

Department of Veterinary Biochemistry, Nippon Veterinary and Zootechnical College, 1-7-1 Kyonancho, Musashino, Tokyo 180, Japan

(Received 29 March 1988/Accepted 15 July 1988)

Obese diabetes was induced by monosodium aspartate (MSA) administration in KK male mice and the diabetic KK mice were divided into two groups, younger (12-week-old) and older (35-week-old). The diabetic KK mice were castrated and administered with androgen and effect of androgen on glycosuria appearance was investigated. Androgen dependent tear proteins (Mtp-M) were detected by the method of polyacrylamide gel electrophoresis. Blood androgen level was estimated by observation of change of the pattern of Mtp-M. In the younger mice group, glycosuria disappeared temporarily after castration and then appeared naturally again. The Mtp-M declined with castration, but did not disappear in this experimental period. In the older mice group, glycosuria and Mtp-M disappeared completely and blood glucose level decreased considerably after castration. However, in the castrated older mice, the glycosuria and the Mtp-M appeared again after the administration of dehydroepiandrosterone (DHEA), and the increasing of blood glucose level was observed. These results strongly suggested that androgen had an important role in the onset of diabetes in the KK mice treated with MSA.

MSA 処理 KK マウスの糖尿病発症におよぼす 雄性ホルモンの影響

樋口直子・佐々木昌志・新井敏郎・大木与志雄

日本獣医畜産大学獣医生理化学教室

肥満性糖尿病を自然発症するKKマウスにGoldthio-glucoseやmonosodium glutamate (MSG), monosodium aspartate (MSA)などを投与すると、視床下部領域の障害によって無処置マウスと比べ強度の肥満となり、糖尿病の高率な発症が早期からみられる[2, 5, 11]。いっぽう、MSGおよびMSA処理を行ったKKマウスの肥満性糖尿病の発症率には雌雄差が認められ、これは、糖尿病の発症におけるテストステロンの関与によるものであることが報告されている[11]。

しかし、著者らがMSA処理KK雄マウスを用い、テ

ストステロンの影響について再検討したところ、去勢時のマウスの週齢の違いによってその後の尿糖陰転の経過が異なり、糖尿病の発症にはテストステロン以外の雄性ホルモンも関与する可能性が考えられた。

そこで、本実験ではMSA処理により作出した肥満性糖尿病KKマウスの雄を、若齢群(12週齢)と高齢群(35週齢)の2群に分けて去勢し、尿糖および血糖値の観察を行った。加えて、去勢後尿糖の消失したマウスに副腎アンドロゲン投与を実施し、糖尿病発症におよぼす雄性ホルモンの影響について若干の検討を行った。

材料および方法

1. 供試動物：当研究室で維持している KK マウスの雄38匹を用いた。これらの動物には肥満性糖尿病を高率に発症させるため、生後1日以内に monosodium-L-aspartate (MSA, 和光純薬) を4 mg/g 背部皮下に単回投与した[11]。離乳は4週齢時にいき、マウス用ペレット CMF (オリエンタル酵母) と水道水を自由摂取させて飼育した。ペレットは1個が3～4片になるようなハンマーで破碎してから給与した。

2. 尿糖および血糖値の測定：離乳後、毎週1回、Tes-Tape® (Eli Lilly Co, USA) を用いて尿糖を測定し、++(0.25%)以上を陽性と判定した。血糖値(飽食時)の測定は、グルコース・オキシダーゼ法[4]によって行った。

3. 去勢：動物を若齢群(19匹)と高齢群(19匹)の2群に分け、それぞれ12週齢および35週齢時に、エーテル麻酔下で常法に従って精巣を摘出した。去勢後の動物についても前述と同様な方法で飼育し、観察を行った。

4. ホルモン投与：高齢群19匹のうち7匹に対して、去勢後8週目からアンドロゲン投与を行った。ホルモンは dehydroepiandrosterone (DHEA, 和光純薬) を sesame oil に懸濁溶解し、1,000 µg/head を頸部皮下に毎日1回3週間投与した。

5. 血中アンドロゲンレベルの推定：去勢およびホルモン投与後の血中アンドロゲンの動態を経時的に推定するため、マウス涙液中の雄性ホルモン依存性蛋白質[6, 7]の消長を指標として用いた。

a) 涙液採取：0.2%塩酸ピロカルピン(和光純薬)0.2 ml を腹腔内注射し、漏出する涙液を2×5 mm の濾紙片(東洋, No. 2)に吸着させて採取した。

b) 電気泳動：採取した涙液は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用い、その蛋白泳動パターンを観察した[13]。ゲルはT=4.5% (W/V), C=5% (W/W) となるよう調整し、ゲル用緩衝液としてトリス-EDTA-ホウ酸緩衝液(トリスアミノメタン: 42 mM, EDTA-2 Na: 1.8 mM, ホウ酸: 6.4 mM, pH 8.9), 電極用緩衝液としてホウ酸緩衝液(0.3 M, pH 8.0)を用いた。泳動はゲルの陰極側より2 cm のところに涙液付着濾紙片1枚を挿入し、170 V 定電圧で約80分行った後、アミドブラック10Bで染色した。

成 績

1. 去勢後の尿糖出現率および血糖値変化：MSA 処理により作出した糖尿病 KK マウスにおける、去勢後の尿糖出現率の変化を Fig. 1 に示した。若齢群(12週齢時去勢)では、去勢後4日目で尿糖出現率は42% (8/19例)に低下したが、その後再び上昇し、12日目には全例に尿糖の出現が認められた。14日目以降も尿糖出現率は70%以上の高率であった。いっぽう、高齢群(35週齢時去勢)では、去勢後4日目から全例で尿糖が陰転し、その状態が90日目まで持続した。

これらの動物における血糖値の変化を Fig. 2 に示した。若齢群においては、去勢前の血糖値は 253.6 ± 16.7 mg/dl (Mean $\pm$ SE) であったが、去勢後7日目では

Fig. 1. Incidence of glycosuria after castration in the diabetic KK male mice treated with MSA Younger : Castration at 12 weeks old Older : Castration at 35 weeks old

Fig. 2. Changes of blood glucose levels after castration in the diabetic KK male mice treated with MSA (Mean $\pm$ SE)

Fig. 3. Electrophoretic patterns of tear proteins after castration in the diabetic KK mice treated with MSA (a) : Younger (Castration at 12 weeks old) (b) : Older (Castration at 35 weeks old) f : normal adult female m : MSA-treated adult male (precastration). Other lanes show changes of electrophoretic patterns of tear proteins after castration, and numbers express weeks after castration. * : Mtp-M (Mouse tear protein-Male specific bands)

173.2 $\pm$ 34.1 mg/dl に低下した。しかし、その後150～200 mg/dl の比較的高い血糖値を持続し、90日目には240.0 $\pm$ 41.3 mg/dl と、去勢前とほぼ同程度の高血糖値を示した。これに対し、高齢群では去勢後7日目では247.5 $\pm$ 20.5 mg/dl から133.0 $\pm$ 21.2 mg/dl に低下し、以後100～120 mg/dl の低い値を持続して血糖値の再上昇はみられなかった。

2. 去勢後の雄性ホルモン依存性蛋白質の消長：去勢後の尿糖および血糖値の変化と対応して、涙液蛋白質の電気泳動パターンにも、若齢群と高齢群の間に差異がみ

Fig. 4. Effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on the incidence of glycosuria in the castrated KK older mice * : DHEA was injected subcutaneously in a dose of 1,000 μ g/head everyday.

Fig. 5. Electrophoretic patterns of tear proteins after administration of dehydroepiandrosterone (DHEA) in the castrated KK older mice m : MSA-treated older male (precastration) f : normal adult female c : castrated older male (8 weeks after castration). Other lanes show changes of electrophoretic patterns of tear proteins after DHEA administration, and numbers express weeks after DHEA administration. * : Mtp-M

られた (Fig. 3)。マウス涙液蛋白質の性差は最も陽極側に移動する分画に認められ、雄に特有の蛋白バンドが4本検出された。これらの蛋白バンドの出現は、テストステロンを初めとする蛋白同化ステロイドによって促進されることが報告されており[6, 7], これらを仮に Mtp-M (Mouse tear protein-Male specific bands) と名付けた。MSA 処理 KK マウスの若齢群では去勢後 Mtp-M の弱화가観察されたが、バンドの消失はみられず、去勢後9週目においても弱いながらも、去勢前と同様の蛋白泳動像を示した (Fig. 3-a)。いっぽう、高齢群では去勢後3週目から Mtp-M の一部消失がみられ、9週目には完全に消失して雌型の蛋白泳動像に転換した (Fig. 3-b)。

3. 高齢 KK マウスにおける尿糖および Mtp-M の発現におよぼす DHEA 投与の影響: 去勢後、尿糖および Mtp-M の消失した高齢 KK マウスに、DHEA 投与を行った結果を Fig. 4, 5に示した。DHEA の効果は投与2日目からみられ、軽度の尿糖 ($\pm \sim +$) の出現が観察されるようになり、投与開始1週目には、供試した7匹全例が尿糖陽性となった (Fig. 4)。血糖値は投与開始1週目で 140.0 ± 6.7 mg/dl, 2週目には 198.3 ± 5.0 mg/dl の値を示し、投与前(去勢後8週, 98.8 ± 7.2 mg/dl)と比べ約2倍に上昇した。また、涙液蛋白中の Mtp-M は、DHEA 投与1週目ではほとんど観察されなかったが、投与2週目から出現がみられるようになり、3週目には去勢前と同様の蛋白泳動像に転換した (Fig. 5)。

考 察

黄色致死遺伝子 (A^y) の導入や、MSG, MSA の過剰投与により肥満の程度を強くした KK マウスの糖尿病発症率は、雄ではほぼ100%であるのに対し、雌で約30%と著しい雌雄差が認められる[10, 11]。このような糖尿病発症率の雌雄差について、Nonaka and Oki [11] は MSG 処理により糖尿病を発症した27~29週齢の KK 雄マウスを用い、去勢によって尿糖が陰転し、テストステロンを投与すると再び尿糖陽性となることを観察して、テストステロンが KK マウスの糖尿病発症に関与することを明らかにしている。

今回、MSA 処理糖尿病 KK 雄マウスを用いて著者らが行った実験では、35週齢で去勢した高齢 KK マウスにおいては完全な尿糖の消失と血糖値の低下が観察され、Nonaka and Oki [11] の報告と一致した。しかしながら、12週齢で去勢した若齢 KK マウスでは、一時的に尿糖が消失した後、再び尿糖が出現し、同様な変化

は血糖値にも認められた。いっぽう、去勢によって高齢 KK マウス涙液中の雄性ホルモン依存性蛋白質 (Mtp-M) は完全に消失したが、若齢 KK マウスにおいては蛋白バンドの濃度が低下するものの、Mtp-M が存在し、両者の間に血中アンドロゲンレベルの差異のあることが推定された。これらの成績から、テストステロン以外の雄性ホルモンも糖尿病の発症に関与することが考えられた。

そこで、去勢後、尿糖および Mtp-M の消失した高齢 KK マウスに、主要な副腎アンドロゲンである DHEA を投与したところ、尿糖陽転と血糖値の上昇がみられ、Mtp-M が再び出現することが明らかとなった。副腎アンドロゲン分泌は、下垂体からの ACTH および副腎アンドロゲン刺激ホルモンなどによって調節され、性腺刺激ホルモン (LH, FSH) では調節されない[3, 12]。以上のことを考えあわせると、MSA 処理若齢 KK 雄マウスでは副腎アンドロゲンの分泌量が高齢 KK 雄マウスに比べて多く、これが去勢後の糖尿病再発に関与する可能性が推察された。

Appel, *et al.* [1]は肥満性糖尿 Yellow-KK 雄マウスにおいて、束状帯と網状帯を中心とする副腎肥大と血漿中コルチコステロン値の上昇が著明であり、光顕、電顕の観察からも副腎皮質機能亢進状態にあることを報告している。同様な所見は遺伝的高血糖肥満マウスについても認められており [9], 副腎摘除によって血糖値の低下がみられたとの報告もある[8, 14]。しかし、いずれも副腎アンドロゲンの分泌状態については触れられていない。今後、MSA 処理肥満性糖尿病 KK マウスにおける副腎アンドロゲンの分泌量と、その加齢との関連について、ホルモン定量や副腎の組織学的検索、下垂体機能などの検討を行うことが必要である。

KK マウスにおける糖尿病の自然発症率は雄で約30%, 雌で約5~7%であり[10, 11], この雌雄差については現在なお明らかにされていない。今回得られた成績は、KK マウスの自然発症糖尿病における発症率の雌雄差の解明に、有効な情報を提供するものであろう。

以上のように、MSA 処理 KK マウスにおける糖尿病の発症には、既に報告されている肥満、テストステロンに加えて、副腎アンドロゲン等の雄性ホルモンも重要な役割を果たしていることが、強く示唆された。

要 約

MSA 投与により作出した肥満性糖尿病 KK 雄マウスを、若齢群 (12週齢) と高齢群 (35週齢) に分け、去勢

およびアンドロゲン投与を行い、糖尿病発症におよぼすアンドロゲンの影響を調べた。血中アンドロゲンレベルは、マウス涙液中の雄性ホルモン依存性蛋白質 (Mtp-M) の消長を、ゲル電気泳動法で観察することにより推定した。若齢マウスでは去勢後一時的に尿糖が消失したが、再び尿糖が出現した。Mtp-M は去勢により弱화가認められたが、消失はしなかった。これに対し、高齢マウスでは去勢後に尿糖が陰転し、血糖値は去勢前と比べ著しく低下した。また、Mtp-M は完全に消失した。いっぽう、去勢後、尿糖が陰転した高齢マウスに dehydroepiandrosterone (DHEA) を投与した結果、再び尿糖の陽転と血糖値の上昇 (98.8 mg/dl → 198.3 mg/dl) がみられ、これに伴って Mtp-M の出現が認められた。以上の結果から、MSA 処理 KK マウスの糖尿病発症には、アンドロゲンが重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

文 献

- [1] Appel, M. C., Schibly, B. A., Kamara, J. A., and Sorenson, R. L. (1979). Adrenal gland involvement in mice with hereditary obesity and diabetes mellitus. *Diabetologia*, **16**, 391-398.
- [2] Cameron, D. P., Poon, T. K.-Y., and Smith, G. C. (1976). Effects of monosodium glutamate administration in the neonatal period on the diabetic syndrome in KK mice. *Diabetologia*, **12**, 621-626.
- [3] Lewis, P. and Anderson, D. C. (1985). The adrenar-
che and adrenal hirsutism. In *Adrenal cortex*, pp. 96-119, Anderson, D. C. and Winter, J. S. D. (edit.), Butterworths, London.
- [4] Huggett, A. G., and Nixon, D. A. (1957). Enzymic determination of blood glucose. *Biochem. J.*, **66**, 12 P.
- [5] Matsuo, T. and Shino, A. (1972). Induction of diabetic alterations by goldthioglucose-obesity in KK, ICR and C 57 BL mice. *Diabetologia*, **8**, 391-397.
- [6] 松島芳文・池本卯典 (1981). マウス涙液蛋白の生化学的遺伝標識と性差. 日畜会報, **52**, 775-779.
- [7] Matsushima, Y. and Ikemoto, S. (1983). Genetic analysis of mouse tear protein system-1 (*Mtp-1*). *Jpn. J. Zootech. Sci.*, **54**, 269-274.
- [8] Naeser, P. (1973). Effects of adrenalectomy on the obese-hyperglycemic syndrome in mice (gene symbol *ob*). *Diabetologia*, **9**, 376-379.
- [9] Naeser, P. (1974). Function of the adrenal cortex in obese-hyperglycemic mice (gene symbol *ob*). *Diabetologia*, **10**, 449-453.
- [10] 西村正彦 (1972). 実験的糖尿病動物の代謝特性 1) 自然発病動物について. 糖尿病, **15**, 426-430.
- [11] Nonaka, T. and Oki, Y. (1987). Obese diabetes induced by over-dose of monosodium-L-glutamate and/or monosodium-L-aspartate in KK mice. *Bull. Nippon Vet. Zootech. Coll.*, **36**, 8-15.
- [12] Parker, L. N. and Odell, W. D. (1980). Control of adrenal androgen secretion. *Endocrine Rev.*, **1**, 392-410.
- [13] 佐々木昌志・大木与志雄 (1988). ハタネズミ (*Microtus arvalis*) における涙液蛋白質の特性. 実験動物, **37**, 97-99.
- [14] Solomon, J. and Mayer, J. (1973). The effect of adrenalectomy on the development of the obese-hyperglycemic syndrome in *ob/ob* mice. *Endocrinology*, **93**, 510-513.