4. NSY マウス： その病態，とくに腎病変について

柴 田 昌 雄

掛川市立総合病院内科

Spontaneous Diabetic NSY Mice: Pathophysiology and Renal Lesion

Masao SHIBATA

Department of Internal Medicine, Kakegawa General Hospital, Kakegawa

Summary

Spontaneous diabetic mice (NSY: Nagoya Shibata Yasuda mice) used in the present experiment were selective breeding of JCL/ICR mice (supplied by Shionogi Pharmaceutical Co., Abrahi Laboratories). They are of the same origin as NOD mice. The C-band chromosome analysis made by Dr. Moriwaki, however, shows that NSY mice are clearly different from NOD mice in the genetic background. This NSY mice are considered the model animals for NIDDM (non insulin dependent diabetes mellitus) from some endocrinological viewpoint.

Results: 1. Histologic findings of kidney in NSY mice: We found that about the glomerular tissue under a light microscope in NSY mice, an increase in mesangial cell and matrix is observed. This finding was corroborated by electron microscopic observations. And an increase of basement membrane-like material in the mesangial area was seen. The fluorescent pattern with FITC labelled rabbit anti-mouse IgG was observed mainly in the mesangial pattern and partially in the capillary pattern. Fluorescent patterns similar to those with IgG were obtained with IgA and IgM as well. These fluorescent patterns increased in intensity with aging.

Since immune globulin settles in the glomerulus as mentioned earlier, electron microscopic observations were made in more details. As a result, the massive dense deposits were noted in mesangial area. 2. Immunological study: 1) Lymphocyte subset of splenocyte was determined in NSY mice, NOD mice and C57BL mice by the complement dependent cytotoxicity test. As a result, acceleration of the helper/inducer system was shown in NSY mice. 2) IgG circulating immune complex (IgG-CIC) was determined in three groups mice by polyethylenglycol technique. With NSY mice, IgG-CIC significantly increased to be contrasted with control group. 3) The glomerulus of NSY mice was stained with fluorescent gp70 antibody in cooperation with Dr. Tomino (Tokai University School of Medicine). A pattern of deposition was seen mainly along the capillary wall. This findings suggest the presence of retro-virus. This suggests a possibility of the immune complex being formed with an antibody against retro-virus.

緒 言

ヒトの疾患の成因を解明するには、実験動物はなくてはならないものである。なかんずく、その疾患に対するモデル動物が存在すれば、解明は飛躍的に進むものである。このような背景から、近年わが国において糖尿病に対する疾患モデル動物の開発および、その利用研究が急速に高まってきた。たとえばⅠ型糖尿病(IDDM)に対するNOD mice, Ⅱ型糖尿病(NIDDM)に対するKK miceなどに代表されるものなどが開発されている。これらのモデル動物は、ヒト糖尿病とま

ったく相似とはいえないが、基本的な糖尿病発症機構のある部分を示していることは事実である。

一方、現在の糖尿病の臨床において、最も重要な課題は合併症に関してである。とくに糖尿病性細小血管症(diabetic microangiopathy)は、網膜症は失明に、腎症は尿毒症に至るものであり、その予後は miserable である。それゆえ、これらに対する発症防止ないしは進展阻止は最大の問題である。しかしながら、これらの合併症の疾患モデルの適切なものはまだない。われわれはこのような現状を考えて、糖尿病性腎症の

疾患モデル動物の開発にとりくんだのである。約 10 年の年月をかけて、ようやく NSY (Nagoya Shibata Yasuda) mice という腎症モデル動物の作製に成功した。本シンポジウムではこの NSY mice の開発の経緯と現在までの研究の結果について報告する。

実験材料

1) NSY mice の開発

本研究の実験対象である NSY mice の開発の経緯について述べる。

1962 年中村¹⁾によって KK mice が自然発症糖尿病マウスであることが発見された。われわれ²⁾もこの KK mice の腎病変につき研究を進め、KK mice の腎病変および、その病態がヒト糖尿病性腎症の病態に類似していることを報告した。この研究の過程において、新しい自然発症糖尿病マウスの必要性にせまれ、その作製に着手した。

われわれは JCL/ICR マウス (以下 ICR mice) をシオノギ製薬 KK、油日ラボラトリーズより供与をうけた。この ICR mice に streptozotocin 80 mg/kg を尾静脈より投与して実験的糖尿病マウスを作製した。Fig.1 に示すごとく、後になってわれわれが供与をうけた ICR mice と NOD mice とは同一の origin であることが判明した。この事実は大変に興味ある点であると考え、この ICR 糖尿病マウスの雌雄を交配して F₁ mice をえた。以後 GTT を指標として各世代ごとに選抜交配を実施した。現在 F₃₄ まで進んでいる。その間において、Fig.2 に示すごとく、F₆ より耐糖能異常が出現してきた。それゆえわれわれ³⁾は本マウスを NSY mice と命名した。

2) NSY mice の发育および遺伝

NSY mice の体重曲線を Fig.3 に示した。生後 70 日までの发育状態は図のごとくであり、対照 ICR mice と体重曲線については大差を認めなかった。なお NSY mice では顕著な肥満傾向も認められなかった。

Fig. 1. The pedigree of spontaneous diabetic mice.

Fig. 2. GTT levels of NSY mice.

Fig. 3. Body weights of NSY mice.

次に NSY mice の遺伝学的背景について述べる。Fig.4 は国立遺伝研究所森脇和郎博士によりなされた染色体の C-band の分析結果を示したものである。その結果から NSY mice は ICR mice を origin とするものではあるが、遺伝学的にはまったく独立した系であることが判明した。

免疫学的検査法

1) Complement dependent cytotoxicity test⁴⁾ による脾細胞リンパ球サブセットの検索

剔出した脾臓を、ただちに RPMI 1640 に浮遊させ細胞に分離した。300×g にて 5 分間遠心し、細胞数を RPMI 1640 にて 4×10⁶ ml に調整した。これを 96

Subspecies & Local.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	X
NSY	±	+	+	+	⊕	+	+	+	+	⊕	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NOD	±	±	+	+	⊖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NON	±	+	+	+	⊕	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SL/Kh	±	+	+	+	⊕	+	+	+	+	⊕	+	+	+	⊖	+	+	+	+	+	+
SL/Stm	±	±	+	+	+	+	±	+	+	⊕	+	+	+	⊖	+	+	+	+	+	±
SL/QDJ	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Fig. 4. C-band profile of chromosome in several strain mice.

穴マイクロプレートに 50 μ l ずつ分注し、マウス抗マウス Lyt1, Lyt2 フロ抗体およびラット抗マウス Thy1,2 抗体 (500 倍, 腹水) を 10 μ l ずつ加え、室温にて 20 分 incubate した。次に正常家兎血清を 5 μ l ずつ加え、37°C にて 20 分間 incubate した。その後氷上にて tripan blue を 30 μ l 加え、ノイバウエル計算盤にて顕微鏡下で細胞数を 100 個数えた。染色された細胞を陽性とし、その陽性率を cytotoxicity index (以下 C.I.) として表現した。

C.I.

$$= \frac{(\text{antibody} + \text{complement}) - (\text{complement alone})}{100 - \text{complement alone}}$$

2) Polyethyleneglycol 法による IgG circulating immune complex の測定

安部の方法⁵⁾ に準じ、IgG circulating immune complex (以下 CIC) を測定した。8% polyethyleneglycol (Mw 8,000, Sigma USA) 0.1 ml と被検血清 0.1 ml を 4°C にて 60 分間 incubate させ、さらに 4°C にて 100 $\times$ g で 60 分間遠心した。沈降物に 0.1 ml の PBS を加え、その 5 μ l を IgG radial immunodiffusion plate (以下 RID プレート) に注ぎ、37°C にて 48 時間 incubate した後、反応輪の直径を測定した。一方、血清 IgG を同じ RID プレートにて測定し、IgG CIC を precipitation index (以下 %ppt) として表した。

$$\% \text{ppt} = \frac{\text{precipitated IgG}}{\text{serum IgG}} \times 100$$

成 績

1) 糖代謝異常

前述したごとく、NSY mice は F₈ より糖代謝異常が出現している。Fig. 5 は NSY mice の血中インスリンの動態をみたものである。飽食状態での値である。図に示されているごとく、NSY mice では対照 ICR mice に比し、血糖値は高いが血中インスリン値は低く、IRI/Blood sugar の ratio はきわめて低い。

次に NSY mice 脾ラ氏島の微細形態学について述べる。Fig. 6 は対照 ICR mice, Fig. 7 は NSY mice の脾ラ氏島 B 細胞の電顕写真である。ともにブドウ糖負荷後のものである。図にみられるごとく、NSY mice においては脱顆粒および顆粒の電子密度の変化などが認められている。なお光顕レベルの観察においては、NSY mice のラ氏島は加齢とともに顕著な肥大傾向を示した。

Fig. 5. Blood sugar and IRI of ICR and NSY mice.

Fig. 6. Electron micrograph in the B cell of ICR mice Langerhans islet after administration of glucose. ($\times 2,700$)

Fig. 8. The glomerulus of 7 months old NSY mice. The picture shows increased mesangial matrix. ($\times 125$)

Fig. 7. Electron micrograph in the B cell of NSY mice Langerhans islet after administration of glucose. ($\times 2,900$)

Fig. 9. The glomerulus of 12 months old NSY mice. The picture shows glomerulosclerosis. ($\times 110$)

2) 腎糸球体病変

(1) 組織学的所見

ヒト糖尿病性糸球体硬化症の疾患モデルは現在までのところ、形態学的に満足すべきものはない。NSY mice においても、生物種の差異の影響が大きく、ヒトとまったく類似の病変は出現していない。しかしながら、以下に示すとき、かなり顕著な腎糸球体病変が認められた。Fig. 8 は7カ月齢の NSY mouse の糸球体病変である。メサンギウム基質の増加が認められる。Fig. 9 はさらに進行した病変であり、糸球体硬化 (glomerular sclerosis) が認められる。

電顕レベルの所見としては Fig. 10 に示すとき、メサンギウム領域における basement membrane-like material の増加、および毛細管基底膜の肥厚が認められている。この基底膜肥厚については著明である。実際に肥厚の度合を計測した結果を Fig. 11 に示した。

Fig. 10. Electron micrograph in the mesangial area of NSY mice. The picture shows increased basement membrane-like material. ($\times 2,200$)

NSY mice の同腹の2群 (図には NSY (1), (2) と記してある) において、age match した対照 IRC mice に比して有意の肥厚を示した。

Fig. 11. Thickening of the glomerular basement membrane.

(2) 免疫組織学的所見

次にわれわれは NSY mice の腎糸球体病変に免疫組織学的な検討を行った。Fig. 12 は 3 カ月齢の NSY mice 糸球体の抗マウス IgG 家兎血清による蛍光像である。主として mesangial pattern に染色されている。Fig. 13 は NSY mice 6 カ月齢における IgG の蛍光像である。Fig. 12 に比しより強い蛍光像が mesangial pattern に、一部は毛細管壁にも認められている。このように免疫グロブリンの蛍光像が加齢とともに増強した。IgA, IgM についても IgG とまったく同様の蛍光染色像がえられた。

上記のごとく、免疫グロブリンが NSY mice の糸球体に沈着していることは、この変化の成因として免疫機序の関与が想定される。そこでわれわれはより詳

Fig. 12. Immunofluorescence micrograph showing the localization of anti-mouse IgG in 3 months old NSY mice. ($\times 120$)

Fig. 13. Immunofluorescence micrograph showing the localization of anti-mouse IgG in 6 months old NSY mice. ($\times 120$)

Fig. 14. Electron micrograph in the mesangial area of NSY mice. There are massive electron dense deposits. ($\times 2,700$)

細に電顕的に NSY mice の糸球体を検索した。その結果 Fig. 14 に示すとき massive electron dense deposits がメサンギウム領域に認められた。

3) 免疫学的検討

以上述べたごとく、NSY mice の腎病変の成立に免疫機序の関与が明らかになった。そこでわれわれは以下のごとき免疫学的検討を行った。この研究は主として名古屋大学分院内科橋本⁶⁾ によって行われたものである。

C57BL mice を正常対照とし、NSY mice と同一 origin である NOD mice との比較において検討した。Table 1 はこの対象マウスを示したものである。Group A は 1~2 カ月齢の幼若群、Group B は 3~4 カ月齢の成熟群、Group C は 5~6 カ月齢の初老群である。

(1) 脾細胞リンパ球サブセット

Fig. 15 はマウス脾細胞リンパ球サブセットを検討

Table 1 Material

Strain	Group A	Group B	Group C
NOD $n=1$	1-2 M mean 1.5 M	3-4 M mean 3.5 M	5-6 M mean 5.5 M
NSY $n=1$	1-2 M mean 1.5 M	3-4 M mean 3.5 M	5-6 M mean 5.5 M
C57BL $n=1$	1-2 M mean 1.5 M	3-4 M mean 3.5 M	5-6 M mean 5.5 M

M : month

Fig. 15. Percentage on Lyt1 and Lyt2 in the lymphocyte of various mice.

した結果である。Lyt1 陽性リンパ球については、NSY mice では Group A で $30.8 \pm 9.7\%$ (対照 18.3 ± 6.0)、Group B で $28.0 \pm 16.9\%$ (対照 14.2 ± 5.2) と有意な増加を示した ($p < 0.05$)。また NOD mice では Group A で $57.2 \pm 15.2\%$ 、Group B で $49.3 \pm 19.8\%$ 、Group C で $37.5 \pm 9.1\%$ といずれも有意の増加を認めた ($p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.05$)。

一方、Lyt2 陽性リンパ球については、NSY mice では対照 C57BL mice と差を認めなかった。NOD mice では Group A で $30.4 \pm 14.9\%$ (対照 10.6 ± 6.0)、Group B では $23.1 \pm 9.6\%$ (対照 10.7 ± 5.0)、Group C では $20.3 \pm 10.9\%$ (対照 13.3 ± 3.4) といずれも有意の増加を認めた ($p < 0.01$)。

(2) IgG circulating immune complex (IgG-CIC)

マウス血清の IgG-CIC の結果は Fig. 16 に示すごとくである。NSY mice においては Group A で $28.5 \pm 17.2\%$ (対照 10.9 ± 9.1)、Group B で $34.6 \pm 9.8\%$ (対照 12.2 ± 2.8)、Group C で $46.0 \pm 5.0\%$ (対照 11.5 ± 10.4) といずれも有意な増加を認めた ($p < 0.05$, $p < 0.0$, $p < 0.01$)。NOD mice において

Fig. 16. IgG circulating immune complex (CIC) levels in the serum of various mice.

は、Group A で $16.2 \pm 3.3\%$ 、Group B で $20.5 \pm 6.4\%$ 、Group C で $25.8 \pm 10.8\%$ と増加傾向はみられたが、統計学的に有意な増加を認めたのは Group C のみであった ($p < 0.05$)。

考察およびまとめ

現在、ヒト II 型糖尿病 (NIDDM) のモデルは I 型糖

尿病 (IDDM) のモデルほど適切なものはない。その中でもわが国で開発された KK mice¹⁾, G.K. ラット²⁾ およびここに報告したわれわれの NSY mice³⁾ は、一応 II 型糖尿病モデルとして認められつつある。

NSY mice は開発の経緯で述べたごとく、I 型糖尿病モデルである NOD mice⁴⁾ と同一 origin である ICR mice より作製された点は、学問的にみても興味深いものがある。NSY mice における膵ラ氏島機能異常は、ヒト II 型糖尿病と類似の pattern を示しており、明らかに NOD mice とは異なっている。今後、この両者すなわち NSY mice と NOD mice との膵ラ氏島機能の分子遺伝学的な研究が展開されなければならないと考える。

さて、NSY mice の腎糸球体病変については、基本的には KK mice の病変⁵⁾ と類似している。すなわち、糸球体メサンギウム基質の増加と、毛細管基底膜の肥厚である。しかし、その病変の程度においては NSY mice のほうが、KK mice よりもより強いと考えている。さらに前述したごとく、NSY mice では下記に列記する免疫学的異常が存在している。

- 1) 蛍光所見にて IgG, IgA, IgM が mesangial pattern に著明に染色される。
- 2) 電顕的に electron dense deposits がメサンギウム領域に認められる。
- 3) 脾細胞リンパ球サブセットの検索において、Lyt1/Lyt2 の増大を認め、リンパ球の helper/inducer 系の亢進を認める。
- 4) IgG-CIC の増加を認める。

これらの諸事実の根本にある成因機序の解明こそが最も重要な問題点である。われわれはこの免疫異常に対してウィルスの関与を想定した。東海大学内科(現順天堂大学腎臓内科) 富野博士のご協力によって、gp70 抗体による蛍光所見につき検索した。Fig.17 はその蛍光像である。主として毛細管壁に沿って、一部はメサンギウム領域に gp70 の蛍光像が強く認められている。この事実は NSY mice においてはレトロウィ

Fig. 17. Immunofluorescence micrograph showing the localization of gp70 antibody in the glomerulus of NSY mice. ($\times 120$)

ルスの存在を示すものである。NSY mice の腎糸球体病変の成立に対して、レトロウィルスの関与が示唆されることを裏付けている。今後は NSY mice の腎病変の成因に対するウイルスと免疫異常との関連につき検討したいと考えている。

文 献

- 1) Nakamura, M.: *Proc. Jpn. Acad.*, **38**, 348 (1962)
- 2) 柴田昌雄, 安田文二, ほか: *糖尿病*, **16**, 412 (1973)
- 3) Shibata, M., Yasuda, B.: *Tohoku J. Exp. Med.*, **130**, 139 (1980)
- 4) Hudson, L., Hey, F.C.: *Complement Mediated Cytolysis "Practical Immunology"*, Brackwell, London, pp. 276-279 (1980)
- 5) 安部千之: *最新医学*, **33**, 1360 (1978)
- 6) 橋本敏博: *日腎誌*, **28**, 1015 (1986)
- 7) Goto, Y., Kakizaki, M. *et al.*: *Proc. Jpn. Acad.*, **51**, 80 (1975)
- 8) Makino, S., Kunimoto, K. *et al.*: *Exp. Anim.*, **29**, 1 (1980)
- 9) Treser, G., Oppermann, W. *et al.*: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **129**, 820 (1968)