

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患実用化研究事業）
分担研究報告書

糖尿病マイクロミニピッグの開発

研究分担者 谷本昭英 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 分子細胞病理学分野 教授

【目的】マイクロミニピグに糖尿病を誘発し、心血管系にトリグリセリドの蓄積が起る中性脂肪蓄積心筋血管症（TGCV）モデルを作製する。

【方法】マイクロミニピグに STZ を 150～250mg/kg BW あるいは ALX 88～150mg/kg BW を投与した。投与直後より普通食による飼育を行った。また、化学物質による誘発以外の方法として、膵全摘による糖尿病モデルの作成を試みた。

【結果】STZ 投与により、高血糖状態に加えて高トリグリセリド血症を誘導することができたが、2 週間から 2 ヶ月の間に、著明な衰弱、体重減少が見られたため、動物愛護の観点から試験を中止し、安楽死させた。また、アロキサン投与では糖尿病はできなかった。膵全摘モデルでは、術後より高血糖を来とし、食事後のインスリン投与により 200 mg/dL 程度の高血糖を維持することが可能であった。

【考察】STZ 投与で著明な高血糖が観察されたが、糖尿病の悪化と考えられる衰弱のため、長期の飼育は困難であった。インスリンによる血糖管理の必要性が示唆された。アロキサンについては、投与量の検討が必要であると考えられた。膵全摘は薬剤投与に比べて簡便ではないが、術後の状態は STZ 投与より良好でインスリン投与で血糖の維持も可能であった。

【結論】膵全摘モデルにおいて、短期観察ながら糖尿病モデルの作成に成功した。今後の研究で、心血管系にトリグリセリドの蓄積が確認出来れば、TGCV のモデル動物として、治療戦略の構築に重要なツールのひとつになることが予想される。

A. 研究目的

マイクロミニピグにストレプトゾトシン（STZ）あるいはアロキサン（ALX）を単回投与することで糖尿病を誘発し、高トリグリセリド血症に基づいて、心血管系にトリグリセリドの蓄積が起る中性脂肪蓄積心筋血管症（TGCV）モデルを作製する。これらの薬剤投与によるラ氏島破壊は、投与量決定の困難さ、副作用の問題があり、安定した糖尿病の誘導と維持が簡単ではないことが前年度に推察されたため、今年度は、STZ の濃度の変更、ALX によるラ氏島破壊の検討および膵全摘モデルの検討を行い、前年度の結果と比較検討することで、TGCV の病態にもっとも近いモデルの作成を試みる。

B. 研究方法

実験には 9 ヶ月齢の雄性マイクロミニピグ

を用いた。STZ は濃度 100 mg/mL で 100 mL クエン酸緩衝液（pH4.5）に溶解し、インフュージョンポンプを用いて、2 mL/min の速度で耳介静脈内に投与した。総量 150～250mg/kg BW とした。ALX は濃度 200 mg/mL になるように 1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液及び生理食塩液に溶解させ pH7.0 に調整した。インフュージョンポンプを用いて、2 min の速度で耳介静脈内に投与した。投与直後から連日、簡易血糖値測定器を用いて、耳介静脈を一部注射針で傷つけて血液を 1～2 滴得て、血糖値を測定した。食餌は投与日から通常飼料を体重の 3%/body 与えた。今回の実験では、高コレステロール・高脂肪食負荷は行わなかった。

膵全摘手術は以下の手順で行った。アトロピン筋肉内投与および鎮痛処置のための塩酸ブプレノルフィン投与を術前に行い、塩酸メドト

ミジン水溶液（ドミツール）、塩酸ケタミン水溶液およびミダゾラムの筋肉内投与とイソフルランにて全身麻酔を施した。皮膚切開時の鎮痛薬としてキシロカイン 2%注射液を皮下投与し、開腹・膵臓を全摘出し、離脱部位を縫合・結紮した。手術翌日より3日間は1日1回、マイシリンゾル明治を筋肉内に0.05 mL/kgで投与する。また術後はケトプロフェンを1回筋肉内投与し、以降2日間、1日1回、同様に鎮痛処置を行った。また、急性膵炎対策としてFOY投与を手術日に行った。手術翌日より、体重の2~3%量を目安に1日1回給餌し、直後に0.1U/kgのインスリンを投与した。膵外分泌酵素の補充のために、リパクレオン製剤を混餌で与えた。

（倫理面への配慮）

所属する研究機関で定めた倫理規定等を遵守し研究を遂行した。

C. 研究結果

STZ投与後はいずれの実験条件でも、2日目より、空腹時血糖値が約200~400mg/dLに上昇した。STZ投与後の2週間から2ヶ月の間に、著明な体重減少と発動の低下、衰弱が見られ、動物愛護の観点から、実験を中止し安楽死させた。ALXの投与では、今のところ明瞭な高血糖状態は確認されていない。

膵全摘動物では、術後順調に経過している。食後の血糖は約500mg/dLにおよび、インスリン1回投与により、血糖値は約200mg/dLに低下、維持された。全身状態は約1ヶ月経過時点では問題ない。術創部の感染や解離などは観察されていない。軟便や脂肪便は見られない。

D. 考察

STZ 150mg/kg BWでも十分に高血糖を誘導することができたが、この間の健康状態良好ではない。STZ 300mg/kg BW投与の動物と比較してかなり良好であったが、STZの副作用あるいは糖尿病による衰弱のコントロールが困難であった。投与量が少ないにもかかわらず、前年度のように、安定したモデルの作成には至らず、モデルの再現性には大きな疑問が残る。

個体差の影響も考えられたが、詳細は不明である。また、ALX投与で高血糖が誘導されないことは、マイクロミニピッグにおいては、化学的なラ氏島破壊が十分ではなく、モデル作成法としては適切ではない可能性の考えられた。

膵全摘モデルは、手術操作に加えて術前処置、術後管理を必要とし、STZやALX投与に比べて煩雑であるが、術後は良好に経過し、いまのところは高血糖を維持しながら著明な体重減少や衰弱も観察されていない。膵酵素の補充により、脂肪便の出現も完全に抑制されている。化学物質によるラ氏島の破壊は簡便であるが、効果のばらつきや副作用、衰弱による脱落などが頻繁であり、マイクロミニピッグにおいては膵全摘によるモデル作成のほうが有効であるかも知れない。

TGCVは高コレステロール血症を伴わないトリグリセリドの蓄積が心・血管系に見られる病態であり、膵全摘による糖尿病の長期観察で著明なトリグリセリドの蓄積が見られるようであれば、有用なモデル動物になり得ることが示唆された。

E. 結論

マイクロミニブタにSTZ単回投与により、糖尿病を誘発することに成功したが、病態の維持と再現性には問題があった。一方、膵全摘モデルの作出は比較的煩雑であったが、今のところ高血糖状態の維持と再現性は確認できた。今後の研究で、心血管系にトリグリセリドの蓄積が確認出来れば、TGCVのモデル動物として、治療戦略の構築に重要なツールのひとつになることが予想される。

F. 健康危険情報 該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし