

KK マウスの繁殖と糖尿病発生に及ぼす蔗糖 ならびに anthranilic acid (o-aminobenzoic acid, vitaminL₁) の影響

宮崎幸恵・奥村ミサヲ
荒蒔義知

The reproduction of KK-mice and the effects
of sugar and anthranilic acid on the onset of
diabetes in the mice

Yukie Miyazaki, Misao Okumura
and Yoshitomo Aramaki

序 言

糖尿病には、インシュリン欠乏による若年型糖尿病とインシュリンが作用し難くなった成人型糖尿病とがある。最近では中老年に後者の型が増加し問題視されてきているのは周知のことである。KKマウスは^{1), 2)}加齢とともに成人型に類似した糖尿病を自然発症する動物として知られ、この動物の高血糖現象は如何なる飼料を与えても起こり得るほど遺伝的によく control されているが、飼育環境によって早期あるいは遅延または発現しない場合があり、遺伝的によく control されていても高血糖になる要素は飼育環境によって左右される表現型マウスといえると言われている。

West³⁾の調査によれば、人が蔗糖を多量摂取すると糖尿病発症率が高いといわれ、一方催乳ビタミン L₁ (anthranilic acid, 以下 VL₁ と略記) を糖尿病患者に投与したところ症状が軽減したとの情報⁴⁾がある。そこで我々は、KKマウス繁殖のための一般条件を整備させた本研究室でまずその繁殖を試み、その可能性を見い出した。さらに得られたKKマウスを使用し、飼料に蔗糖を多量に添加して糖尿病発生の加速現象を観察した。また VL₁ を併せて添加し、その予防効果についても検討した。以下その結果の詳細を報告する。

実験材料及び方法

a) 供試動物：武田薬品工業株式会社中央研究所より分与されたKKマウスの雌雄各3匹を種親として、本研究室で自家繁殖を行なった。

b) 試薬：血糖定量用にはベーリンガー・マンハイム社製の新ブラッドシュガーテスト用試薬 (9.1mg glucose/100ml, 100 mM phosphate buffer, 20 μg POD/ml^{1*}, 180 μg GOD/ml^{2*}, 1.0 mg ABTS/ml^{3*}) を使用した。なお、0.3N-Ba(OH)₂ 溶液ならびに 5% ZnSO₄ 溶

1* POD: Peroxidase 2* GOD: Glucose oxidase

3* ABTS:2-2'-Azino-di-[3-ethyl benzthiazoline sulfonate(6)]

液は片山化学工業株式会社の製品を使用して調製した。クリニスティックスは小野薬品製のものを用い、VL₁ は和光純薬工業株式会社製のアントラニール酸を使用した。

c) 飼料：日本クレア製 CE-2 マウス・ラット繁殖用固型飼料ならびに粉末飼料を使用した。なお小麦粉は日清製粉株式会社製の無漂白強力粉を、蔗糖は日新製糖株式会社製の白砂糖を用いた。

(1) 繁殖方法

繁殖方法は武田薬品工業株式会社・生物学研究所において改良された方法⁵⁾に準じて行なった。すなわち、動物室は室温 24±2°C 湿度 50% 前後とし、飼育 cage は金属製で、中に巢材料として木屑を入れて使用した。飼料は固型飼料と KK マウスの歯が弱いという点を考慮して粉末飼料に水と小麦粉を添加してだんご状にしたものを併せて与えた。水は滅菌水を自由に摂取させた。なお、動物室内は無窓とし、80Wの照明で夜間には自動的に消灯するように調整し、飼育管理にあたっては病原菌がはいらないように動物に触れるものはすべて乾熱滅菌または蒸気滅菌して使用した。繁殖用雌親として40日令以上のものを初交配し、雄1匹に対し雌1～3匹を7日間同居させる断続交配方式を採用し、雌親は約45日の間隔をあけて次の交配に供した。

新生仔の飼料摂取を助長するため、哺乳期の後半約 12～13 日目（開眼の頃）から粉末飼料を与えた。繁殖用親の選択は、雌雄とも近交系の中から一腹の仔の数 (litter size) が大きく、しかも離乳時体重の大きな新生仔より選び、特に生理的要素による選択は行なわなかった。交配回数は雌については4～5回行ない、不妊、新生仔の喰殺を2～3回くり返す親は適宜除外した。以上の方式で得られた雌雄30匹を以下の実験に供した。

(2) 実験群の飼育

(1) で得られた F₂12 匹を表1のごとく4群に分けて第1回実験に供した。

表1 糖尿発生に及ぼす蔗糖の影響

実験群	動物(匹)	蔗糖(g/飼料100g)	VL ₁ (mg/飼料100g)
A (標準食)	3	—	—
B (A + VL ₁)	3	—	20
C (A + 蔗糖)	3	10	—
D (A + 蔗糖 + VL ₁)	3	10	20

次いで表2のごとく(1)で得られた F₃18 匹を5群に分けて第2回実験を行なった。

飼料の1日摂取量は体重の1/6量であることを考慮し、次のように調製した。すなわち、投与飼料と同量の水に10%の小麦粉を溶かして加温糊化し、それに投与飼料の90%の粉末飼料を混ぜてだんご状にし、シャーレにのせて投与した。また蔗糖投与群は粉末飼料の1/6量と蔗糖を

表2 糖尿病発生に及ぼす anthranilic acid (VL₁) の影響

実験群	動物(匹)	蔗糖(g/飼料100g)	VL ₁ (mg/飼料100g)
E (標準食)	4	—	—
F (E + VL ₁)	3	—	20
G (E + 蔗糖)	4	10	—
H (E + 蔗糖 + VL ₁)	3	10	20
I (E + 蔗糖 + VL ₁)	4	10	400

置き換えた。水は繁殖時と同様に滅菌水を自由に摂取させた。

(3) 尿糖ならびに血糖の定量

尿糖は、クリニスティックスを用いる定性試験法により行なった。すなわち、マウスの腹部を押して尿を採取し、試験紙を浸漬して比色表により判定した。血糖の定量は、ブドウ糖に特異的に作用する酵素—グルコースオキシダーゼ^{6), 7)}を利用して測定する Werner^{6), 7)}らによって開発された酵素的血糖測定法^{6), 7)}により行なった。すなわち 10 ml の共栓試験管に再蒸留水 0.2 ml, 0.3 N-Ba(OH)₂ 溶液 0.15 ml を入れて混合し、直ちに後眼窩静脈叢に毛細管を穿刺し、あふれ出る血液を 0.05 ml 採血してその混合液に加えて溶き、さらに 5% ZnSO₄ 溶液 0.15 ml を加えて激しく振盪の後遠心分離した。得られた上清 0.05 ml に酵素発色試薬〔GOD, POD, ABTS 混合液〕5 ml を加え、25°C 30分間 Incubator (ヤマト製 BT 21) にて振盪、反応させた。別に濃度検定用にブドウ糖標準液 (glucose 9.1 mg/100 ml) を 0.05 ml, 盲検として再蒸留水を 0.05 ml 採取し、同様に発色試薬を加えて反応させた。その後糖標準液を対照として被検液ならびに盲検液の吸光度 (波長 420 nm) を島津分光光度計 QV-50 により測定し、下記の計算式により血中のブドウ糖量を算出した。

$$\frac{E \text{ Sample}}{E \text{ Standard}} \times 100 = \text{血液中のブドウ糖 mg\% (E=吸光度)}$$

実験結果及び考察

(1) KKマウスの繁殖と成長

① 系代繁殖状態

14カ月にわたる繁殖成績を表3に示した。用いた親は68匹で151回の交配を行なった。この間の平均出産率は78.5%、哺乳率は65.8%で武田生物研究所で実施された結果を上まわる成績が得られた。また系代的に繁殖状態をみても、表に示すように⁸⁾経産回数によって哺乳率は低下せず、4回目でやや減少し、この傾向は武田研究所における結果と⁸⁾同じであった。これはKKマウスが4回以上の経産に成功することが少ないためと思われる。一般に雌親

表3 系代繁殖成績

世 代	1*	2	3	4	Total
♀ 親 総 数	3	16	18	31	68
交 配 回 数 a	13	52	55	31	151
出 産 時 出 産 回 数 b	10	39	43	26	118
全 部 喰 殺 した 回 数	3	11	14	12	40
出 産 し な か っ た 回 数	3	13	12	5	33
出 産 率 b/a (%)	77	75	78.2	83.9	78.5
出 産 仔 数 c	53	169	188	108	518
同 腹 仔 数 (匹/♀)	5.3	4.3	4.4	4.2	4.3
離 乳 時 哺 乳 に 成 功 した 回 数 d	7	28	29	14	79
哺 乳 率 d/b (%)	70.0	71.8	67.4	53.8	65.8
離 乳 仔 数 e	40	68	75	52	235
同 腹 仔 数	5.7	2.3	2.6	3.7	3.58
離 乳 率 e/c (%)	75.4	40.2	40	48.1	50.9
離乳時平均体重 (g)(21日令)	9.0	8.7	8.8	8.5	

* original KK マウス

の繁殖成績は経産回数に応じて繁殖効果が上昇するとされているが、KK マウスでは図1に示したように交配回数がふえると老令化が進み、交配5回目にはほとんど出産しなかった。したがって交配2～3回目までが出産率が良く実験用動物の作成に好適と思われる。

② KK マウスの成長

死産、喰殺仔がなく離乳率 100% の 10 litter 62 匹について新生仔の litter size, 新生仔の哺乳期の体重を表4に示した。一般に litter size の大きいほど哺乳期の発育も不良であるが、表からもその傾向が伺われる。また離乳時(21日令)の体重が9g以上のマウスは成長が良好であるが、6g前後で離乳したマウスは成長が悪く繁殖能力もみられなかった。また群飼の数による成長をみると図2に示すごとく、群飼の数が5匹までは成長にあまり変化がみられないが8匹以上になると明らかに成長抑制がみられるので、個別飼育の方が良いと思われる。しかし、個別飼育の場合では運動量が劣るためか肥満発生の危険性もあるので1 cage あたり2～4匹が適当と思われる。

(2) 蔗糖投与による糖尿病発生促進と VL₁ の影響

表5に示すごとく蔗糖を投与飼料の10%に置換して投与すると糖尿が発生することが判明した(C群)。KKマウスでは蔗糖投与後2～3週目に血糖値が高くなるといわれているが、

図1 KKマウスの繁殖状態と交配回数

親 NO.	交 配 回 数				
	1	2	3	4	5
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					

: 哺乳に成功 : 全新生仔を喰殺
 : 出産しない場合

表4 KKマウスの生下時体重と哺乳期の体重

litter No.	litter size 匹/♀	哺 乳 期 の 体 重 g/匹/日				
		0	7	14	21	28*
1	3	1.7	4.2	—	13.0	20.5
2	5	1.5	3.6	—	9.2	18.1
3	5	1.5	3.5	6.0	9.4	17.0
4	5	1.6	3.5	—	9.5	18.3
5	6	1.4	3.3	—	9.1	14.8
6	6	1.3	3.7	5.2	8.3	12.3
7	7	1.3	3.3	—	8.4	12.8
8	8	1.2	3.4	5.0	6.7	12.5
9	8	1.3	3.4	5.0	6.3	13.0
10	9	1.1	3.0	—	6.6	10.1

* 離乳後（1週間目）の体重

図2 群飼による成長度の比較

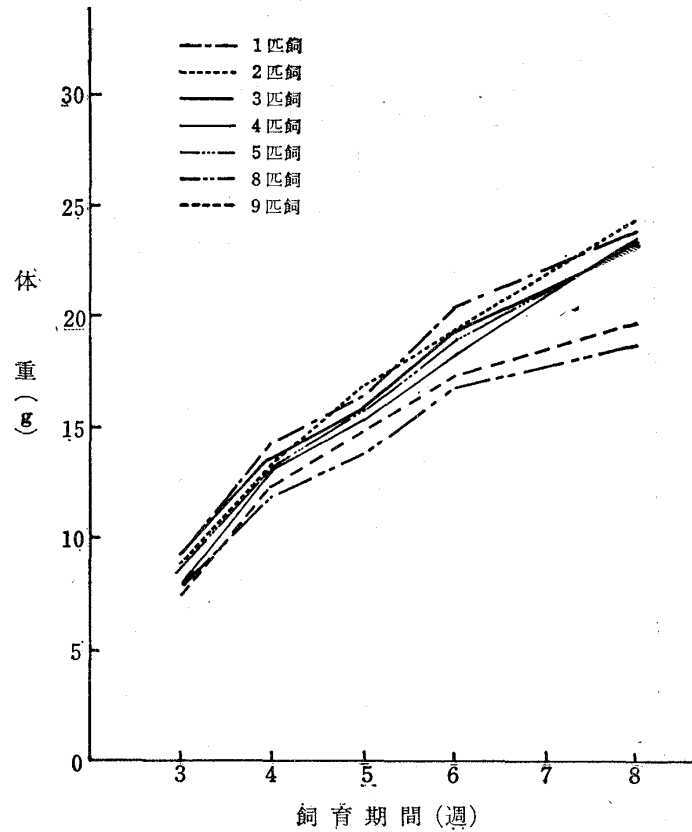


表5 蔗糖投与による尿糖の変化

実験群	初体重 (g)	1 週		2 週		3 週		4 週	
		体重 (g)	尿* 糖	体重 (g)	尿* 糖	体重 (g)	尿* 糖	体重 (g)	尿* 糖
A	1 ♂	18.0	—	23.8	±	24.1	—	24.4	—
	2 ♂	20.5	—	24.0	+	25.0	—	26.1	—
	3 ♀	17.2	—	23.2	—	23.8	—	24.2	—
B	1 ♂	16.8	—	20.5	—	22.9	—	24.0	—
	2 ♀	17.0	—	21.4	±	24.1	—	25.3	—
	3 ♀	17.3	—	22.0	—	24.0	—	27.0	—
C	1 ♂	17.4	+	23.8	+	24.8	—	26.0	—
	2 ♂	18.1	—	23.5	+	25.3	+	26.3	—
	3 ♀	18.0	—	22.4	±	25.0	—	24.8	—
D	1 ♂	18.8	—	23.8	+	25.5	+	26.0	—
	2 ♂	17.3	+	22.5	+	24.0	+	25.8	+
	3 ♀	18.4	—	23.0	—	23.8	—	25.0	—

* 糖濃度 (%)

♂ 雄 — 0
 ♀ 雌 ± 0.25
 + 0.5

本実験結果においても表に示したように同様の傾向がみられ、2～3週間目に尿糖、血糖ともに peak に達した。投与飼料の一部（10%）を蔗糖に置き換えることは飼料重量当たりのカロリーのわずかな増加があるにすぎない。しかし蔗糖はすみやかにブドウ糖、果糖となって吸収されるので血糖の急速な上昇をもたらす。この糖を処分するため、インシュリンの分泌が促進され、また、インシュリンは摂食中枢を刺激して、過食をもたらす。過食によりカロリー・蔗糖の摂取が増加する。このようにして生ずる悪循環により、蔗糖には糖尿病促進作用があるといえよう。さらに、それに VL₁ を段階的に投与して尿糖、血糖に影響があらわれるかどうか検討してみた。VL₁ は生体内でトリプトファン代謝の結果生ずる物質の1つとして知られており、その過不足が糖尿病発症に関与すると考えられている^{9), 10)}。表5, 6に示すごとく D・H 群（蔗糖+VL₁ 20 mg/飼料100 g）と I 群（蔗糖+VL₁ 400 mg/飼料 100 g）と比較すると

表6 蔗糖ならびに anthranilic acid (VL₁) 投与による尿糖・血糖の変化

実験群	初体重 (g)	2 週			3 週			4 週		
		体重 (g)	尿糖発生率 (%)	血糖値 (mg %)	体重 (g)	尿糖発生率 (%)	血糖値 (mg %)	体重 (g)	尿糖発生率 (%)	血糖値 (mg %)
E	25.3	28.3	0	115	—	—	—	—	—	—
F	25.5	28.1	0	114 (87-134)	30.7	80.0	298 (165-431)	33.8	60.0	158 (108-190)
G	22.7	26.0	0	82 (62-99)	31.9	100.0	240 (203-316)	36.1	80.0	184 (157-210)
H	27.1	30.3	0	210 (200-220)	33.2	80.0	189 (165-212)	35.0	80.0	192 (189-195)
I	25.8	28.3	60.0	108 (95-120)	30.1	40.0	125.5 (102-177)	32.1	40.0	145 (106-169)

(注) () 内は range

VL₁ を多量に投与した群の方が尿糖・血糖値が低くなっていることがわかった。また C・G 群（蔗糖）の場合は、蔗糖だけを投与しているので尿糖・血糖ともに高い値を示した。これは蔗糖による糖尿促進作用があらわれたものと思われる。なお、B・F 群（VL₁ 20 mg/飼料 100 g）については尿糖、血糖値が低くなることを期待したが低い値は得られなかった。以上の結果より、VL₁ 20 mg/飼料 100 g の添加ではその効果は期待できないものと思われる。しかし VL₁ を多量（400 mg/飼料100 g）に投与すると、I 群にみられるごとく血糖の上昇ならびに糖尿の発現をある程度抑制することができるようである。

要 約

1. KK マウスの繁殖を行ない、得られた動物を用いて蔗糖および anthranilic acid (o-aminobenzoic acid) 添加の糖尿発症に及ぼす影響を検討した。

2. 繁殖はやや困難であった。特に不妊，出産直後の喰殺，さらに脱毛を起こした仔の死亡をきたす等がみられ，離乳率は 65.8% であった。
3. 投与飼料の 10% を蔗糖に置換すると糖尿発症現象は加速された。
4. anthranilic acid の 400 mg/飼料100 g 添加は糖尿発症に防止の傾向をもたらした。

参 考 文 献

- 1) 近藤恭司, 姫野健太郎, 生駒博雄, 葛城俊松 (1953) 農業技術研究所報告 G, 7, 9
- 2) 近藤恭司, 野沢 謙, 富田 武, 江崎孝三郎 (1957) 実験動物 6, 107
- 3) West, K. M. (1972) Acta Diabetologia Latina, 9 (Suppl. 1), 405
- 4) 梶谷晴男 (1977) 未発表
- 5) 古野厚次 (1967) 未発表
- 6) Werner, W. H., Rey, G. und Wielinger, H. (1970) Zanalyt. Chem. 252, 224
- 7) 池辺正他 (1973) 臨床検査 17 (10), 1139
- 8) 古野厚次 (1972) 未発表
- 9) 高森藤敏 (1955) 和歌山医学 6 (1), 69
- 10) 宮本敬治 (1958) 和歌山医学 9 (2), 319