

Streptozotocin 糖尿病ラットにおけるラ氏島の経時変化

東京医科大学内科学第三講座 (指導: 林 徹主任教授)

聞 智 鳴

【要旨】 streptozotocin (STZ) 糖尿病ラットの糖尿病発症機序を明らかにする目的で実験を行った。

Wistar ラットを用い、STZ 50 mg/kg 1~3 回、80 mg/kg 1 回投与により 71.8% から 94.6% の糖尿病ラットが得られた。ラット脾の組織標本は H-E, AZAN, インスリンおよびグルカゴンの免疫組織化学染色を行い観察した。脾ラ氏島の細胞浸潤、ラ氏島炎は STZ 投与翌日より 21 日目まで持続してみられ、STZ 80 mg/kg 1 回投与群で最も強かった。ラ氏島の空泡形成は STZ 投与 3 日目から 11 日目後に最も強くみられ、これも STZ 80 mg/kg 1 回投与群で最も強かった。ラ氏島の線維増生も STZ 80 mg/kg 1 回投与群で最も強かった。ラ氏島の平均面積の縮小は STZ 投与翌日よりみられ、7 日後より 16 日後に著しく、STZ 80 mg/kg 1 回投与群で最も著しかった。抗インスリン抗体で染色された平均面積も STZ 投与翌日よりコントロール群に比較して有意な縮小がみられ、抗インスリン抗体で染色された平均面積とラ氏島の平均面積との比率も STZ 投与群のいずれでも有意に減少し、STZ 80 mg/kg 1 回投与群、STZ 50 mg/kg 3 回投与群で面積比の減少が著しかった。抗グルカゴン抗体で染色された平均面積は STZ 投与翌日よりコントロール群と比較して有意な増大がみられ、抗グルカゴン抗体で染色された平均面積とラ氏島の平均面積との比率も STZ 投与群で有意な増大がみられた。

以上の観察から STZ による糖尿病の発症は STZ 投与によってラ氏島炎が惹起され、それによりラ氏島 B 細胞が破壊され、インスリン分泌が持続的に減少することによるものと考えられた。

はじめに

1976 年、Like ら¹⁾が CD-1 成熟マウスに体重 1 kg 当たり 40 mg, 1 日 1 回, 5 日間の頻回の streptozotocin (STZ) の静脈内または腹腔内投与により糖尿病動物モデルを作成して以来、この方法は糖尿病の研究に広く使用されている。STZ による糖尿病発症機序としては、Like ら¹⁻⁵⁾は (1) STZ が特異的に直接ラ氏島の beta 細胞を破壊する、すなわち直接的な化学毒性作用である。(2) STZ が動物体内に免疫異常、特に細胞性免疫異常を惹起し、細胞性免疫異常により、ラ氏島炎を起こし、beta 細胞が破壊される。(3) ラ氏島の beta 細胞内に C 型ウイルスが増殖し、beta 細胞を傷害するという 3 つの説を挙げている。また、STZ 投与によって脾ラ氏島の nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) 含有量が減少することから、STZ の催糖尿病作用が NAD

合成の阻害に基づく beta 細胞の壊死によるとされている⁶⁻¹⁰⁾。ただし、細胞性免疫異常によりラ氏島炎が惹起され、beta 細胞が破壊されるとの説には異論が少なくない³⁾。そこで筆者は STZ による糖尿病発症原因を更に明らかにする目的で、ラットに STZ の用量を変えて投与し、ラ氏島の組織学的所見および抗インスリン抗体、抗グルカゴン抗体を用いた免疫組織化学的染色を行い、その変化について経時的に検討した。

対象および実験方法

1. STZ 糖尿病ラットおよび組織標本の作成

実験動物は Wistar 系ラット (雄, 8 週齢, 体重 220~260 g) を使用した。ラットは 5 つの群に分けた。即ち健康無処置の対照群, STZ 50 mg/kg 体重を 1 回腹腔内に注射した群 (A 群), STZ 50 mg/kg 体重/日を 1 日 1 回, 2 日間連続で腹腔内に注射した

1996 年 1 月 9 日受付, 1996 年 1 月 25 日受理

キーワード: 糖尿病ラット, streptozotocin (STZ), 免疫組織化学染色。

(別刷請求先: 〒160 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学内科学第三講座 聞智鳴)

群(B群), STZ 50 mg/kg 体重/日を1日1回, 3日間連続で腹腔内に注射した群(C群), STZ 80 mg/kg 体重を1回腹腔内に注射した群(D群)であった。STZ (SIGMA社, 米国)は使用5分前にクエン酸 buffer (pH 4.2) 液中に溶解して, 使用した。ラットは実験期間中自由に食餌および水を与えた。STZを投与した翌日血糖値を Celapaper (栄研化学(株), 東京)でラット尾静脈から採血し測定, 血糖値が 200 mg/dl 以上の場合糖尿病ラットとした。STZ 注射後 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11, 16 および 21 日目に, ペントバルビタール (Nembutal) の麻酔下で各群のラット 5 匹ずつを屠殺して, 膵臓を摘出し, 10%中性 formalin 液で固定した。パラフィンの連続切片標本を作成し, ヘマトキエリン・エオシオン (H-E) 染色, ASAN 染色および抗インスリン抗体ならびに抗グルカゴン抗体を用いて免疫組織化学的染色を行った。ラ氏島の組織所見はラ氏島内細胞浸潤, 空泡形成および線維形成を組織学的に検討し, 三つの項目を点数化して比較した。

2. 組織の観察方法

1) ラ氏島の組織学的検討, H-E 染色, ASAN 染色組織標本を用い, ラ氏島の endocrinic cell の数は 20 個以下の場合, ラ氏島が小さいということで除外した。

(1) 1 個のラ氏島内の細胞浸潤度は, 浸潤細胞数が 10 個以下を '±', 浸潤細胞数が 11~20 個の場合を '+', 21~31 個の場合を '++', 31 個以上を '+++ とした。

(2) ラ氏島の空泡形成度は, 空泡が 1~3 個の場合が '±' で, 空泡のサイズは beta 細胞より大きい場合が '+' で, ラ氏島の組織が空泡形成のために, 二分の一以下となった場合を '++ とした。

(3) ラ氏島の線維形成度は, 線維形成がやや増加した場合が '±' で, 著しい増生の場合が '++' であった。二者の間の場合を '+' とした。

細胞浸潤, 空泡形成, 線維形成を試みに数量化し, 平均点数の統一算式を下記の方法で行った。

それぞれ '±'=0.5 点,

'+'=1 点,

'++'=2 点,

'+++'=3 点とし,

$$\begin{aligned} \text{1 枚の組織標本の点数} &= ('0.5' \times \text{ラ氏島数} \\ &+ '1' \times \text{ラ氏島数} \\ &+ '2' \times \text{ラ氏島数} \\ &+ '3' \times \text{ラ氏島数}) \\ &\div \text{全ラ氏島数} \end{aligned}$$

2) 抗インスリン抗体染色面積および抗グルカゴン抗体染色面積の検討

抗インスリン抗体および抗グルカゴン抗体で免疫組織化学染色した標本を用い, 光学顕微鏡撮影を行い (各標本のラ氏島数を 10 個ずつ撮影した), 一定倍率で焼き付けした。ラットのラ氏島の計測にはマイクロコンピューター (PC-9801RX NEC社) およびデジタイザー (Degitaizn-5A GTCO社, 米国) を使用し, 上記の焼き付けした写真を用いて, ラ氏島面積を測定した。ただし, ラ氏島面積が 2.5 mm² 以下の場合には除外した。

統計学的な検討は Fisher 多重間の有意差の推定を行い, 危険率 5% 以下を有意とした。

結 果

1. 糖尿病の発症率

STZ 注射終了後の各群の糖尿病発症率を表 1 に示す。A 群は 71.8% (71 匹中 51 匹) であった。B 群は 94.6% (56 匹中 53 匹) であった。ただし, 一回目注射後翌日の糖尿病発症率は 76.8% であった。C 群は 92.6% (54 匹中 50 匹) であった。一回目注射後翌日の糖尿病発症率は 72.2%, 二回目注射後翌日の糖尿病発症率は 92.6% であった。D 群は 91.7% (60 匹中 55 匹) であった。STZ 投与によるラットの

Table 1 The relation of STZ injection to developing hyperglycemia in rats

group	after 1st STZ injection developing diabetes		after 2nd STZ injection developing diabetes		after 3rd STZ injection developing diabetes	
	number (N)	%	number (N)	%	number (N)	%
A	51 (71)	71.8				
B	43 (56)	76.8	53 (56)	94.6		
C	39 (54)	72.2	50 (54)	92.6	50 (54)	92.6
D	55 (60)	91.7				

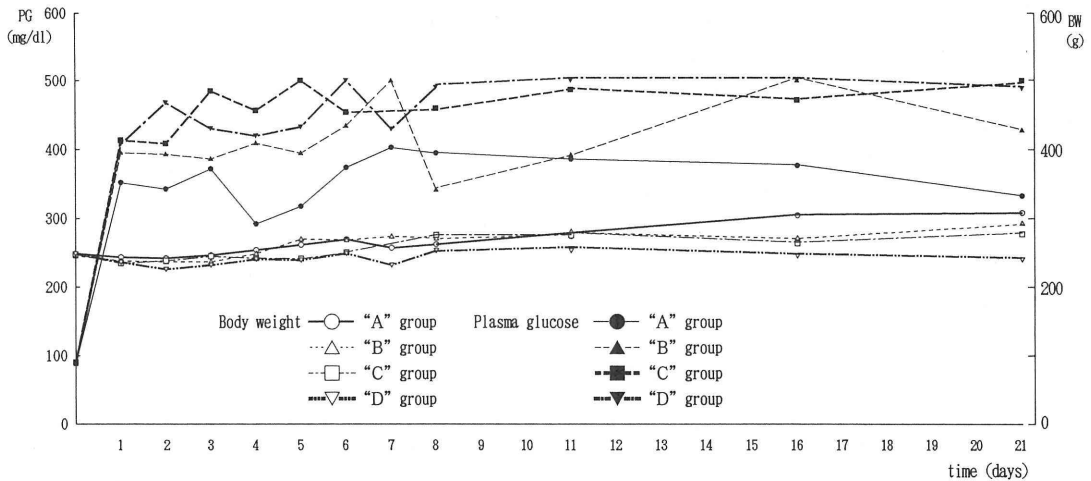


Fig. 1 The change of body weight (BW) and plasma glucose (PG) in diabetic rats induced with STZ

Table 2 The change of cell infiltration, vacuolization and fibrosis in Langerhans' islet of diabetic rats induced with STZ (mean±SD) (point)

group		before	1st	2nd	3rd	4th	5th	6th	7th	11th	16th	21th day
A	cell infiltration		0.46±0.04	0.36±0.15	0.33±0.14	0.42±0.03	0.36±0.07	0.37±0.06	0.46±0.03	0.41±0.05	0.43±0.09	0.50±0.00
	vacuolization		0.40±0.22	0.38±0.04	0.48±0.23	0.46±0.04	0.48±0.13	0.34±0.11	0.50±0.02	0.56±0.10	0.34±0.05	0.49±0.11
	fibrosis								0.05±0.04	0.08±0.12	0.02±0.03	0.04±0.01
B	cell infiltration		0.51±0.03	0.50±0.00	0.50±0.00	0.50±0.00	0.49±0.02	0.49±0.03	0.50±0.00	0.49±0.03	0.50±0.00	0.45±0.10
	vacuolization		0.17±0.11	0.18±0.15	0.40±0.14	0.44±0.12	0.43±0.13	0.55±0.21	0.57±0.15	0.53±0.09	0.46±0.11	0.56±0.11
	fibrosis								0.03±0.04	0.02±0.03	0.04±0.08	0.02±0.04
C	cell infiltration		0.42±0.07	0.50±0.00	0.38±0.17	0.38±0.09	0.41±0.07	0.45±0.07	0.46±0.05	0.46±0.04	0.46±0.07	0.38±0.16
	vacuolization		0.32±0.13	0.32±0.09	0.44±0.17	0.36±0.13	0.44±0.14	0.54±0.12	0.56±0.12	0.60±0.05	0.30±0.14	0.56±0.26
	fibrosis								0.02±0.04	0.07±0.05	0.04±0.05	0.05±0.11
D	cell infiltration		1.51±0.39	1.00±0.30	0.74±0.16	0.78±0.24	0.82±0.16	1.04±0.38	0.71±0.16	0.58±0.16	0.65±0.20	0.65±0.21
	vacuolization		0.61±0.26	0.43±0.14	0.48±0.23	0.34±0.11	0.43±0.15	0.44±0.14	0.22±0.21	0.40±0.16	0.66±0.25	0.49±0.14
	fibrosis								0.44±0.13	0.18±0.10	0.22±0.17	0.30±0.13
Control	cell infiltration	0.01±0.01										
	vacuolization	0.02±0.02										
	fibrosis	0.00±0.00										

死亡例は全くなかった。

2. 各群の体重および血糖値の経時的な変化

1) 体重の経時的変化 (図 1)

A および B 群の体重は STZ 注射後 1 日目, 2 日目にやや減少したが, 3 日目および 4 日目から徐々に回復し, その後増加した。C 群の体重は STZ 注射後減少し, 6 日目に回復し, その後増加した。D 群の体重は 1 日目に減少し, その後増加の傾向がなかった。

2) 血糖の経時的変化 (図 1)

STZ 注射翌日に各群共に血糖値は急速に上昇し

351.9±51.8~413.4±59.7 mg/dl を示し, 以後 21 日目まで高い値を維持した。各群の血糖値を比較すると, A 群の血糖値は他の群の血糖値より低い値を示した。B 群の血糖値は C および D 群より低かった。C と D 群の血糖値の間にはあまり大差がなかった。

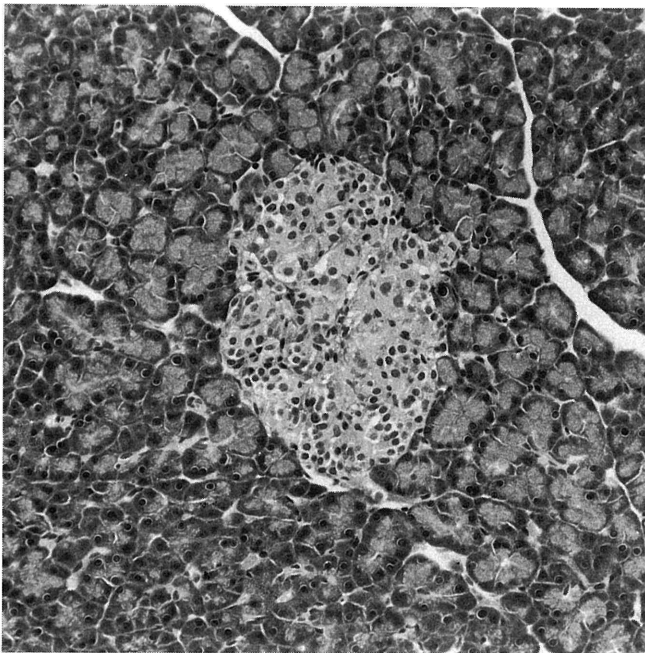
3. ラ氏島の組織所見

1) ラ氏島細胞浸潤の経時的変化 (表 2)

対照群では細胞浸潤はほとんどみられないが, 他の群は STZ 注射終了後, 1 日目からラ氏島に細胞浸潤がみられた。A 群では 1 日目 0.46±0.04 を示し,

Table 3 The change of an average area of Langerhans' island, the area stained with anti-insulin antibody and the area stained with anti-glucagon antibody in Langerhans' islet (mean±SD) (mm²)

group		before	1st	7th	16th	21th day
A	Langerhans' area		11.92±6.60	8.49±4.98	9.26±6.12	10.65±9.50
	insulin area		6.11±3.63	4.62±3.02	5.56±3.89	6.04±6.69
	glucagon area		6.32±3.86	4.36±2.85	4.41±3.17	5.98±4.50
B	Langerhans' area		10.14±7.05	9.82±7.23	6.96±4.14	8.37±6.78
	insulin area		5.61±3.99	5.98±5.21	3.29±2.34	4.48±4.20
	glucagon area		5.21±3.72	4.96±3.28	4.74±3.07	5.38±4.47
C	Langerhans' area		9.98±7.21	8.37±4.33	7.41±4.01	7.50±4.98
	insulin area		5.85±4.87	4.20±2.01	2.87±1.67	2.17±1.56
	glucagon area		5.49±3.30	5.39±3.72	5.42±3.23	5.83±4.07
D	Langerhans' area		8.78±5.76	6.02±3.02	6.03±3.35	7.46±5.12
	insulin area		3.65±3.26	1.87±1.12	2.11±1.58	2.36±2.06
	glucagon area		4.32±2.39	4.46±2.85	4.12±2.27	5.86±3.96
Control	Langerhans' area	12.38±8.95				
	insulin area	10.87±8.28				
	glucagon area	2.70±1.82				

**Photo. 1** Langerhans' islets of a diabetic group C rat killed on the sixth day of the experiment was stained with hematoxylin and eosin (×100). Many lymphocytes infiltrate Langerhans' islets.

21日目もなお、細胞浸潤を認めた。B群では1日目 0.51 ± 0.03 を示し、21日目までほとんど同様の数値を示した。C群では1日目 0.42 ± 0.07 を示し、21日目に軽減を示した。D群では1日目 1.51 ± 0.39 と、最も細胞浸潤が激しく、21日目にもなお、 0.65 ± 0.21 を示した。

写真1はC群6日目のH-E染色で細胞浸潤がみ

られたラ氏島を示す。

2) ラ氏島の空泡形成 (表2)

対照群では空泡形成は全くみられなかった。STZ投与1日目より空泡形成がみられた。ほとんどの群でSTZ注射後3日目から11日目にかけて空泡形成が最も激しかったが、群の間には有意の差はなかった。

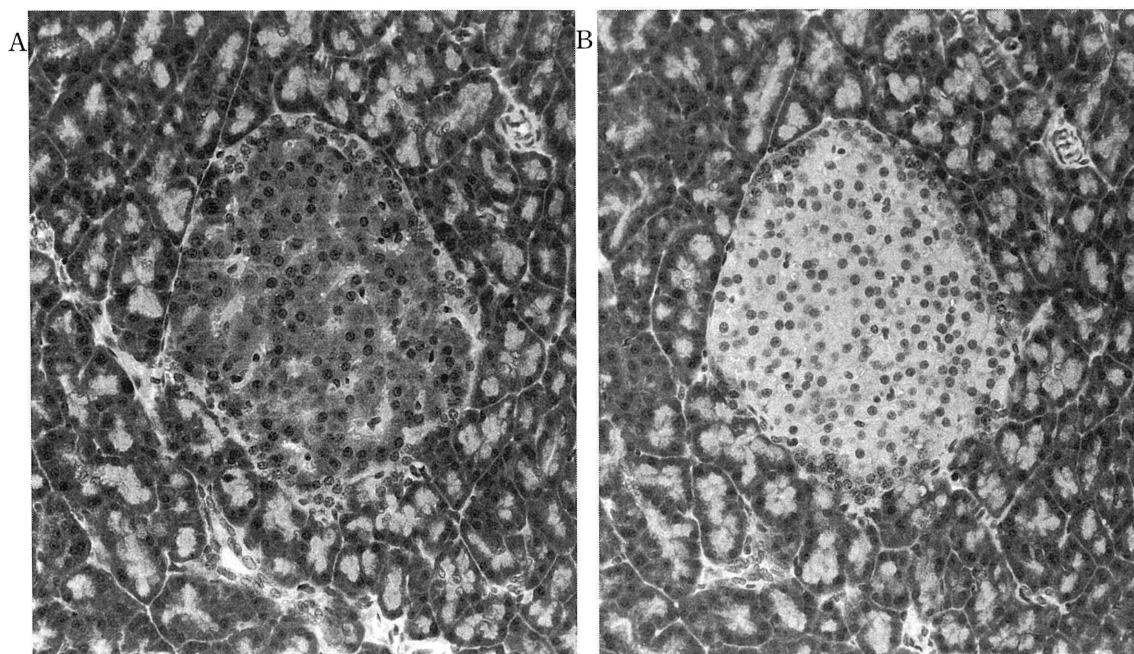


Photo. 2 Langerhans' islets of normal rat were magnified 100 times and stained with anti-insulin antibody and anti-glucagon antibody. A. The black area that covers almost the entire Langerhans' islets was stained with anti-insulin antibody. B. The black area that is only round Langerhans' islets was stained with anti-glucagon antibody.

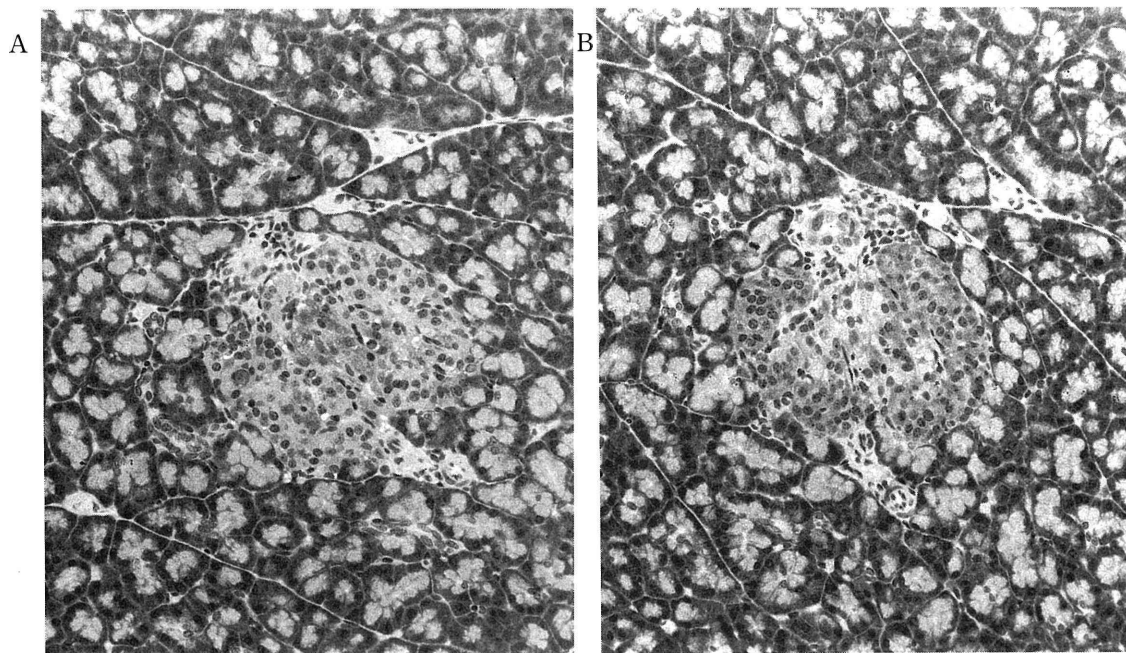


Photo. 3 Langerhans' islets of a diabetic group D rat killed on the 4th day of the experiment was stained with anti-insulin antibody and anti-glucagon antibody ($\times 100$). A. The black area only in the center of Langerhans' islets was stained with anti-insulin antibody. B. The black area round Langerhans' islets, except the centre of Langerhans' islets was stained with anti-glucagon antibody.

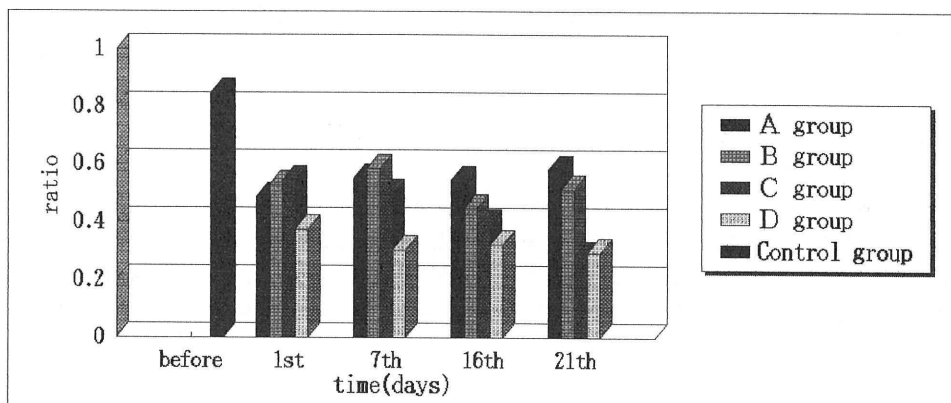


Fig. 2 The change of ratio of the area stained with anti-insulin antibody/the area of Langerhans' islet

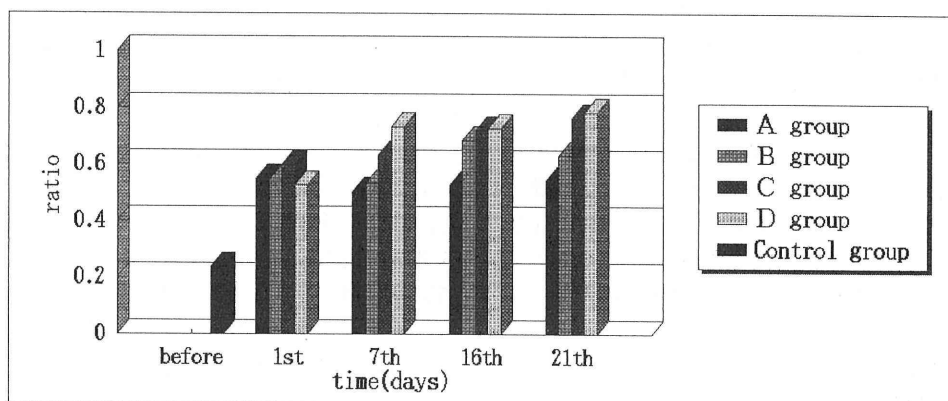


Fig. 3 The change of ratio of the area stained with anti-glucagon antibody/the area of Langerhans' islet

3) ラ氏島に線維形成の経時的変化 (表2)

A, BおよびC群の線維形成は経時的に有意な変化はみられなかった。これに対して、D群の線維形成は7日目、11日目および21日目にA群より有意に強く ($p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.05$), 7日目および21日目ではC群より有意に強かった ($p < 0.01$, $p < 0.05$)。

4) ラ氏島面積および抗インスリン抗体染色面積, 抗グルカゴン抗体染色面積の変化 (表3)

A) ラ氏島面積の変化

いずれの群もSTZ投与1日目より、対照群に比較しラ氏島面積の縮小がみられ、D群のみ対照群より有意な縮小であった ($p < 0.01$)。A群のラ氏島面積は1日目の $11.92 \pm 6.60 \text{ mm}^2$ から7日目の $8.94 \pm 4.98 \text{ mm}^2$ まで有意な縮小が進行し ($p <$

0.01), 以降増大傾向をみた。B群のラ氏島面積は注射終了後から16日目まで縮小傾向がみられ、7日目の $9.82 \pm 7.23 \text{ mm}^2$ に比べ16日目で $6.96 \pm 4.14 \text{ mm}^2$ と有意な縮小があり ($p < 0.05$), 以降増大傾向をみた。C群のラ氏島面積は注射終了翌日の $9.98 \pm 7.21 \text{ mm}^2$ から7日目の $8.37 \pm 4.33 \text{ mm}^2$ まで有意な縮小を示し ($p < 0.05$), 21日目もなお縮小を示した。D群のラ氏島面積は注射翌日 $8.78 \pm 5.76 \text{ mm}^2$ と各群中最も縮小しており、7日目に $6.02 \pm 3.02 \text{ mm}^2$ と各群中最小を示し、21日目も 7.46 ± 5.12 と各群中最小を示した。

B) 抗インスリン抗体で染色された面積の変化

免疫組織化学染色で正常ラ氏島 (写真2. A, B) と糖尿病のラ氏島 (写真3. A, B) を示す。免疫組織化学染色標本では、計測上抗インスリン抗体と抗

グルカゴン抗体で染色された面積の和がラ氏島面積をやや上回っている。

A, B, C および D, 各群の抗インスリン抗体で染色された面積の大きさは STZ 投与翌日に、それぞれ $6.11 \pm 3.63 \text{ mm}^2$, $5.61 \pm 3.99 \text{ mm}^2$, $5.85 \pm 4.87 \text{ mm}^2$ および $3.65 \pm 3.26 \text{ mm}^2$ と対照群の $10.87 \pm 8.28 \text{ mm}^2$ に比べ有意な縮小を認めた (いずれも $p < 0.01$)。各々の抗インスリン抗体で染色された面積は A 群では 7 日目, B 群では 16 日目, C 群では 21 日目, D 群では 7 日目に最も縮小がみられた。

C) 抗インスリン抗体で染色された面積と同ラ氏島の面積との比率 (インスリン染色面積比) の経時的变化 (図 2)

各群の STZ 投与翌日インスリン面積比は対照群の 0.85 ± 0.11 より有意に減少を示した。(いずれも $p < 0.01$)。このうち, D および C 群では最もインスリン染色面積比が減少し, 21 日目まで有意な減少を示した。

D) 抗グルカゴン抗体で染色された面積の変化

各群共に抗グルカゴン抗体で染色された面積は STZ 投与翌日急激に有意な増大を示した (いずれも $p < 0.01$)。また, 7 日目および 16 日目にやや縮小するが, 21 日目に B, C および D 群で各々最大を示した。

E) 抗グルカゴン抗体で染色された面積と同ラ氏島の面積との比率 (グルカゴン染色面積比) の経時的变化 (図 3)

対照群のグルカゴン染色面積比は 0.24 ± 0.11 であったが, STZ 投与群ではいずれも STZ 投与翌日, A 群の 0.55 ± 0.13 , B 群の 0.54 ± 0.12 , C 群の 0.60 ± 0.13 , D 群の 0.53 ± 0.13 と有意に大きくなり, いずれの群も 21 日目に最も有意な増大を示した (いずれも $p < 0.01$)。

考 案

STZ 剤は抗細菌剤, 抗腫瘍剤特に白血病に対する薬剤として開発された。1963 年 Rakieten ら¹¹⁾ はラットに STZ 50 mg/kg 体重を静脈内投与し催糖尿病作用があることを報告した。また, 緒言でも述べたごとく, STZ の催糖尿病発症機序については三つの説が唱えられ, また前述のごとく, STZ の催糖尿病作用が NAD 合成の障害に基づく B 細胞の壊死によると考えられている。STZ の催糖尿病作用は STZ の投与量および投与方法によって著しく異な

る。更に, 動物の種類^{12~14)} と strain³⁾ によって著しく異なり, ラット, マウス, イヌでは糖尿病発症するが, モルモット, 家兎, ネコでは糖尿病発症しにくいことなどが報告されている。

筆者は Wistar 系ラットを用い, STZ を 50 mg/kg 体重 1 回のみ, 2 日間に亘り 2 回, 3 日間に亘り 3 回, 80 mg/kg 体重 1 回の 4 種類の投与方法で糖尿病の発症率を比較したが, 50 mg/kg 体重 1 回のみでの投与では注射した翌日の糖尿病発症は A, B, C 群間で差がなかったが, 80 mg/kg 体重注射した D 群では注射した翌日の糖尿病発症は最も高率であった。また, 50 mg/kg 体重注射の B, C 群の注射後 2 日目の糖尿病発症率は 94.6%, 92.6% と両群間で差がなかった。STZ による一般毒性はアロキサンなどに比べて弱いとされているが, これらのことよりラットの糖尿病モデルを得るには 50 mg/kg 体重 2 日間以上の投与か 80 mg/kg 体重 1 回のみでの投与が最も効果的であると考えられた。

次にラ氏島の組織学的変化につき細胞浸潤, 空泡変性, 線維増生の度合を検討し, この三つの所見を点数化して経時的に比較した。ラ氏島細胞浸潤は STZ 50 mg/kg 体重投与の A, B, C 群はいずれも STZ 投与翌日よりほぼ同程度に認められ, STZ 投与 21 日目にもなお同程度の細胞浸潤が認められた。また, 80 mg/kg 体重投与に D 群では投与翌日に 50 mg/kg 体重投与のいずれの群と比較しても最も強く認められ, STZ 投与 1 週間目頃から弱くなるが 21 日目でもなお認められた。この所見から, ラ氏島炎は STZ 投与翌日には最も強く, 3 週間を経てもなお認められた。

空泡変性はいずれの群でも STZ 投与翌日より認められ, 80 mg/kg 体重投与の D 群で最も強く, 各グループ共に投与 3 日目から 11 日目までが最も強いが, 3 週間後もなお認められた。

ラ氏島線維増生は 50 mg/kg 体重投与群ではほとんど認められず, 80 mg/kg 体重投与の D 群のみに 1 週間後最も強くみられ, 3 週間後もなお認められた。

諸家の報告^{12~14)} によるとラ氏島の障害は STZ 注射 1 時間後より認められ, 注射 7 時間から 8 時間後では A 細胞にはほとんど変化がないが, B 細胞の核は濃縮し, 細胞の広範な変性, 壊死がみられた。電顕的にも B 顆粒は一部の細胞で減少し, B 細胞核の濃縮, 変性, ミトコンドリアの膨化がみられると

いう。筆者の観察でも時間を経るにしたがってラ氏島のB細胞数は減少し、平均ラ氏島面積はSTZ投与翌日より縮小し、D群でこの縮小は最も甚だしく、対照群の約2/3までに縮小しており、16日目にはA群を除いて全群でほぼ半分に縮小し、膵臓のラ氏島数も極端に減少することが認められた。また、抗インスリン抗体で染色された範囲は1日目で対照群に比較して約半分となり、特にD群で縮小が著しく、16日目にはB、C、D群共に対照群の約1/3から1/5に縮小した。また、抗インスリン抗体で染色された範囲が縮小するのと逆に、抗グルカゴン抗体で染色された範囲は増大し、1日目にはいずれの群でも約2倍となり、3週間後もほぼ同様の増大を維持していた。

STZ投与7~8時間後よりIRIが減少する報告¹⁵⁾があるが、血液中のグルカゴンに関する報告は少なく、ラ氏島のA細胞もSTZによって減少するとの報告がある¹⁶⁾。筆者の抗インスリン抗体でラ氏島のインスリンを染色した結果でもSTZ投与翌日からインスリン抗体陽性細胞が極端に減少し、抗グルカゴン抗体で染色された陽性細胞割合が大幅に増加していることが明らかになった。しかし、膵臓中のラ氏島数が減少し、また平均ラ氏島面積も極端に縮小していることからインスリン分泌量は極端に減少しているが、グルカゴン分泌量は増加していないものと推定された。以上の組織学的所見、免疫組織学的所見より、STZによる糖尿病は膵臓のラ氏島破壊によるインスリンの持続的な分泌減少によることと考えられた。

結 語

1. Wistar系ラットにSTZ 50 mg/kg 体重1~3回、80 mg/kg 体重1回投与し、いずれの群にも1日目に71.8%から91.7%の糖尿病の発症をみた。
2. ラ氏島の細胞浸潤はSTZ投与翌日より3週間後まで持続してみられ、ラ氏島炎は持続していると考えられた。
3. ラ氏島の空泡変性はSTZ投与翌日よりみられ、いずれの群も投与3日目から11日目までが著明であった。
4. ラ氏島の線維増生はSTZ 80 mg/kg 体重を1回腹腔内に注射した群で最も著明であった。
5. ラ氏島の平均面積の縮小はSTZ投与翌日よりみられ、1週間後より16日後に著しかった。

6. ラ氏島の抗インスリン抗体で染色される範囲はSTZ投与翌日約半分に縮小し、16日目から3週間後には約1/3に縮小した。

7. ラ氏島の抗グルカゴン抗体で染色される範囲はSTZ投与翌日約2倍から3倍に拡大した。

8. ラ氏島数、ラ氏島の平均面積が減少していることからインスリン分泌は極端に減少しており、グルカゴン分泌は増加を示していないと考えられた。

終わりにあたり、本研究を御指導いただき、本稿を御校閲いただいた恩師伊藤久雄教授、林 徹教授に心から深く謝意を表します。また、御助言、御協力いただいた第三内科学教室の皆様へ感謝致します。また、御支援、御支持をいただいた日本の多数の友人に感謝致します。

References

- 1) A.A. Like, A.A. Rossini: Streptozotocin-Induced Pancreatic Insulinitis: New Model of Diabetes Mellitus, *Science* **193**: 415~417, 1976.
- 2) A.A. Rossini, R.M. Williams, M.C. Appel & A.A. Like: Complete protection from low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice, *Nature* **276**: 182~184, 1978.
- 3) A.A. Rossini et al: Genetic Influence of the Streptozotocin-induced Insulinitis and Hyperglycemia, *Diabetes* **26**: 916~920, 1977.
- 4) J.I. Osuna, M. Castro, M.A. Martinez-Olmos, M. Garcia-Pacheco & J. Aneiros: Multiple Low Dose of Streptozotocin Induced Cell Mediated Immunereaction Against B-cell in wistar Rats, *Diabetologia* **33**: supplement p721, 1990.
- 5) 松尾隆夫, 小高裕之: 糖尿病の病態モデル, *代謝* **26**: 641~648, 1989.
- 6) A. Lazarow, J. Liambies and A.J. Tausch: Protection Against Diabetes with Nicotinamide, *J. Lab. Clin. Med.* **36**: 249~258, 1950.
- 7) P.S. Schein and S. Loftus: Streptozotocin: Depression of Mouse Liver Pyridine Nucleotides, *Cancer Res.* **28**: 1501~1506, 1968.
- 8) C.K. Ho and S.A. Hashim: Pyridine Nucleotide Depletion in Pancreatic Islets Associated with Streptozotocin-induced Diabetes, *Diabetes* **21**: 789~793, 1972.
- 9) A.Y. Chang: On the mechanism for the depression of liver NAD by streptozotocin, *Biochim. Biophys. Acta.* **261**: 78~84, 1972.
- 10) 岡本 宏: 膵β細胞破壊と防止についての岡本モデルとその展開, *糖尿病* **37**: 99~102, 1994.
- 11) N. Rakietyan, M.L. Rakietyan and M.V. Nadkarmi:

- Studies on the Diabetogenic Action of Streptozotocin (NSC-37917), *Cancer Chemother. Rep.* **29**: 91~98, 1963.
- 12) 土井邦紘: Streptozotocin 糖尿病の発症機序並びに発症阻止に関する実験的研究, *Folia endocrinol. Jap.* **51**: 129~147, 1975.
- 13) R.M. Pitkin and W.A. Raynolds: Diabetogenic Effects of Streptozotocin in Rhesus Monkeys, *Diabetes* **19**: 85~90, 1970.
- 14) S.S. Lazarus and S.H. Shairo: Streptozotocin-induced diabetes and islet cell alterations in rabbits, *Diabetes* **21**: 129~137, 1972.
- 15) 豊田隆謙, 工藤幹彦, 菊池宏明, 後藤由夫: ストレプトゾトシン糖尿病ラットのインスリン分泌, *糖尿病* **16**: 308~312, 1973.
- 16) 鹿住 敏, 内海正文: 化学物質による糖尿病の膵内分泌・代謝特性, *糖尿病* **23**: 1041~1045, 1980.

Chronological Change in Langerhans' Islets in STZ-induced Diabetes Mellitus Rats

Zhi Ming WEN

The Third Department of Internal Medicine, Tokyo Medical College
(Director: Prof. Tohru HAYASHI)

In order to investigate how Streptozotocin (STZ) influences alpha cells and beta cells in Langerhans' islets and induces insulinitis, we divided Wistar rats into five groups: controls (normal rats), group A (injected with 50 mg/kg/day STZ), group B (injected with 50 mg/kg/day STZ for two days), group C (injected with 50 mg/kg/day STZ for three days), and group D (injected with 80 mg/kg/day STZ). The body weight and plasma glucose concentration of rats were measured and specimens of paraffin embedded rat pancreas were observed by light microscopy after staining with hematoxylin and eosin, azan and immunohistochemical techniques. After STZ injection, the ratios of rats with diabetes mellitus in each group were 71.8%~94.6%. Body weight and plasma glucose significantly differed in each group. Insulinitis in each group was observed from the second day through the end of the experiment and it was significantly more severe in all experimental rats than in the control group. The vacuolization of Langerhans' islets was more marked on the third day and from the 11th day. The inflammation, vacuolization and fibrosis in Langerhans' islets in group D were more marked than in the other groups. The number of Langerhans' islets, the average area of Langerhans' islets, the area stained with anti-insulin antibody and the ratio of the area stained with anti-insulin antibody divided by the average area of Langerhans' islets in each group significantly decreased, especially in groups C and D, because many beta cells were destroyed by STZ. Conversely, the area stained with anti-glucagon antibody and the ratio of the area stained with anti-glucagon antibody divided by the average area of Langerhans' island in each group significantly increased.

The above results suggest that rats develop diabetes mellitus after injection of STZ as a result of damage to beta cells in Langerhans' islets, causing insulinitis and a reduction in insulin secretion.

<Key words> Diabetic rat, Streptozotocin, Immunohistochemical techniques.
