

表 題 糖尿病網膜症、脈絡膜症のモデル動物の開発と薬剤による糖尿病網膜症抑制効果の検討

論文の区分 論文博士

著 者 名 豊田 文彦

所 属 自治医科大学附属さいたま医療センター眼科

2016年 2月 12日申請の学位論文

紹介教員 自治医科大学大学院医学研究科  
地域医療学専攻 外科系総合医学  
職名・氏名 教授 梯 彰弘

## 目次

1 はじめに	3 頁
2 目的と方法	16 頁
3 結果	21 頁
4 考察	43 頁
5 おわりに	49 頁
6 引用文献	50 頁

## 1 はじめに

2001年～2004年にかけて本邦で行われた疫学調査によると、失明原因の第一位は緑内障(20.9%)で、以下糖尿病網膜症(19.0%)、網膜色素変性(13.5%)、黄斑変性(9.3%)と続く。一方1988年に行われた疫学調査では第一位は糖尿病網膜症(18.0%)で、以下白内障(15.9%)、先天性視覚障害(14.8%)、緑内障(14.6%)であった[1]。眼科治療技術の進歩と糖尿病薬の新規開発にはめざましいものがあるが、依然として糖尿病網膜症は日本人の失明原因の脅威であり続けている。

糖尿病網膜症は単純糖尿病網膜症、増殖前糖尿病網膜症、増殖糖尿病網膜症に分類される。糖尿病網膜症は突然発症、進展するものではなく約10年の糖尿病罹患期間の後単純糖尿病網膜症が発症し、その後増殖前糖尿病網膜症、増殖糖尿病網膜症を経て失明に至る。単純糖尿病網膜症は網膜毛細血管の血管壁が障害されることにより、毛細血管瘤が形成され、眼底に点状出血斑と硬生白斑が認められる(Figure 1)。さらに進行すると、網膜毛細血管の閉塞により網膜が虚血に陥る部位が出現し、軟性白斑や蛍光眼底造影検査で無血管野や血管透過性の亢進といった状態が確認できるようになる(増殖前糖尿病網膜症、Figure 2)。さらに進行すると、Vasucular Endothelial Growth Factor (VEGF)などの血管増殖因子が網膜から産生され、網膜新生血管が発生し、新生血管周囲に線維性増殖膜が形成される(増殖糖尿病網膜症、Figure 3)。この3つの病期すべてにおいて出現するのが糖尿病黄斑浮腫である。網膜の中心部(中心窩)から半径2視神経乳頭径(3000 $\mu$ m)の領域を黄斑部と定義されているが[2]、この領域に網膜浮腫や硬性白斑といった所見が認められる(Figure 4)。黄斑部には視細胞が密に集まり、視力に最も重要な部位の網膜で、この部位が浮腫などにより障害を受けると視力低下の原因となり得る。また、糖尿病は眼内の炎症性疾患とも関連しており、ぶどう膜炎の原因疾患として糖尿病が1.7%あると報告されており[3]、注意が必要である。

糖尿病網膜症は突然発症、進展するものではなく糖尿病発症後約10年の経過の後に発症、進展し、最終的に増殖糖尿病網膜症となって失明に至る。故に、糖尿病網膜症の発症を予防するか、もしくは増殖前糖尿病網膜症の早い段階での治療が有効である。それには血糖コントロールの改善[4-6]、網膜光凝固術[7]が有効である。増殖糖尿病網膜症に進んだ段階では硝子体手術が最後の治療手段として施行されるが、その視力予後は決して良好とは言えない[8]。しかし、これらの治療により失明を防ぐことができたとしても、糖尿病黄斑浮腫により黄斑部の機能が障害を受ければ視力は低下する。糖尿病黄斑浮腫は増殖前糖尿病網膜症、増殖糖尿病網膜症はもちろんであるが、単純糖尿病網膜症のような軽度の網膜症においても発生し注意が必要である。糖尿病黄斑浮腫のみで

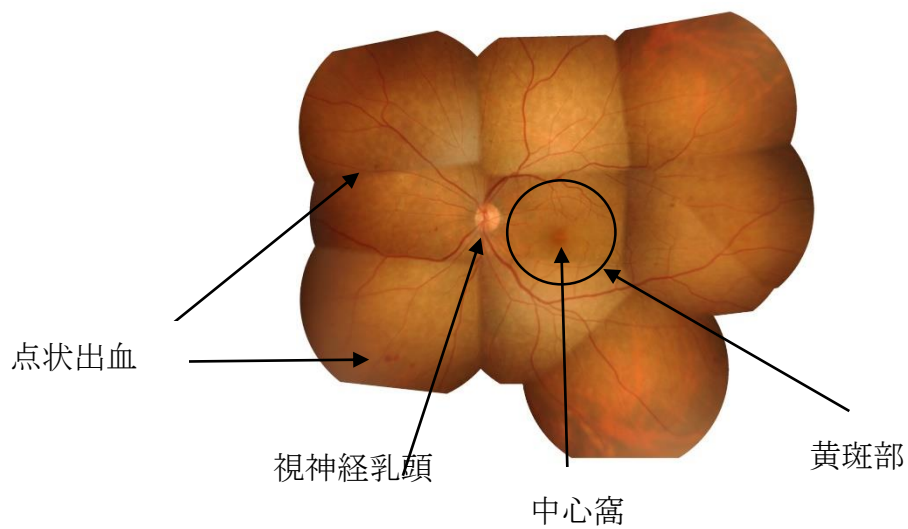
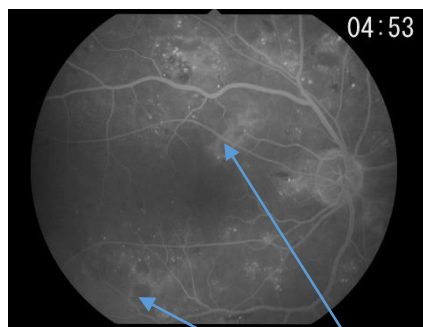


Figure 1. 単純糖尿病網膜症(左眼)。視神経乳頭、中心窩、黄斑部を示す。

軟性白斑



網膜無血管野

Figure 2. 増殖前糖尿病網膜症(右眼)。左；眼底写真。右；蛍光眼底造影写真。軟性白斑、網膜無血管野を示す。

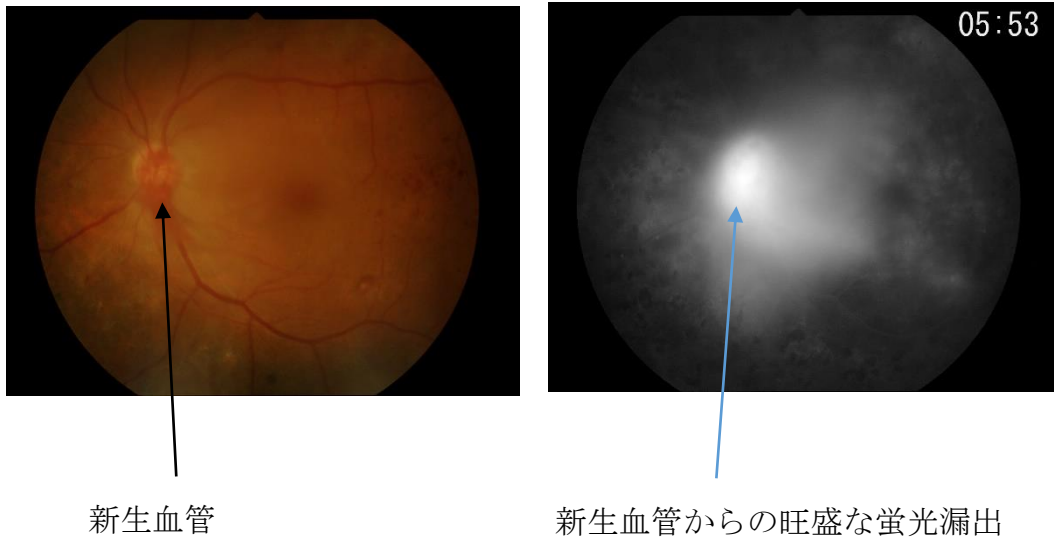


Figure 3. 増殖糖尿病網膜症(左眼)。左；眼底写真。右；蛍光造影眼底写真。新生血管及び新生血管からの旺盛な蛍光漏出を示す。

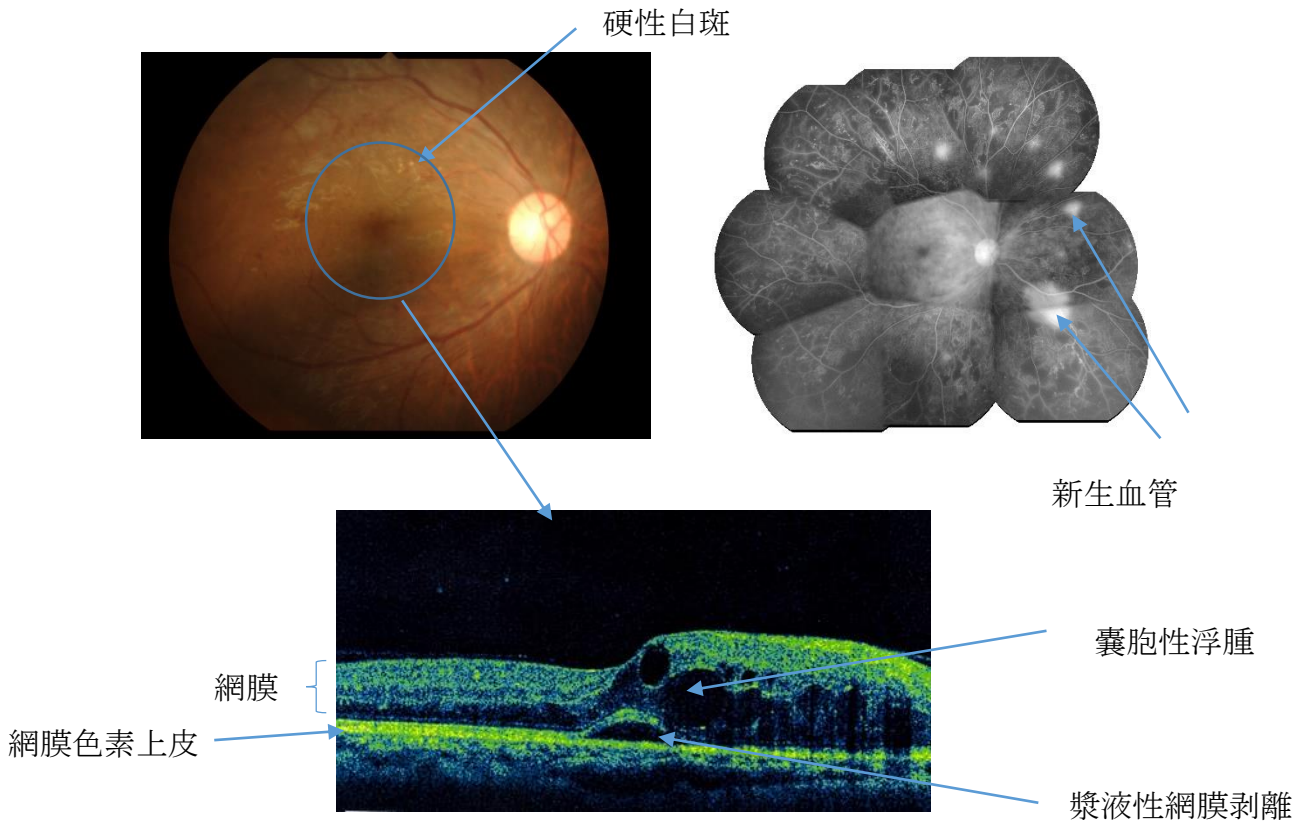


Figure 4. 増殖糖尿病網膜症に黄斑浮腫を合併した症例。左上；眼底写真。硬性白斑を示す。右上；蛍光造影眼底写真。新生血管を示す。下；Optical Coherence Tomography (OCT)所見。嚢胞様黄斑浮腫、漿液性網膜剥離を示す。

は失明はしないが、運転免許更新を不可能にするなど、患者の **Quality of Life** を著しく低下させる。

現在糖尿病黄斑浮腫に対してはいくつかの治療法がある。網膜光凝固術[9]、硝子体手術[10]、抗 VEGF 薬硝子体注射[11]が糖尿病黄斑浮腫に有効であったと報告されている。これらの治療法は重要であるが、糖尿病黄斑浮腫発症前の視力に回復させることは非常に困難である。故に、糖尿病網膜症の発生それ自体を予防することが重要であるが、これまで血糖コントロールしか方法がなかった。血糖コントロールは糖尿病網膜症治療に不可欠であるが、全ての患者で理想通りにいかないのが現実である。そこで血糖コントロールとは独立した糖尿病網膜症を予防する治療法が望まれる。

治療法を開発するためには理想的な糖尿病モデル動物が必要で、特にヒト糖尿病網膜症に類似した網膜症を発症する糖尿病モデル動物の開発が望まれる。これまで数々の糖尿病モデル動物が報告され、糖尿病網膜症の評価に利用されてきた。Énzsöly らは streptozotocin (STZ)誘発糖尿病ラットにおいて、視細胞及び網膜色素上皮に変性をきたすことを報告した[12]。彼らはこの実験で雄の Wistar ラットと Sprague-Dawley (SD)ラットを用いた。しかし、糖尿病ラットと正常ラットの間で網膜厚に有意差はなく、網膜浮腫は認められなかった。

Long-Evans Tokushima Lean ラットは 1 型糖尿病のモデル動物として使用されている [13,14]。これらの論文では膵臓の変化と遺伝子解析が行われているが、糖尿病眼合併症については述べられていない。Otsuka-Long-Evans-Tokushima-Fatty(OLETF)ラットは 2 型糖尿病モデル動物として知られている。Yang らは、OLETF ラットでは正常 Long-Evans Tokushima Otsuka ラットに比べ有意に網膜が薄くなっており、その傾向は網膜神経線維層で顕著であったことを報告している[15]。彼らは spectral-domain optical coherence tomography (OCT)を用いて網膜厚を解析したが、この網膜の菲薄化はヒト糖尿病網膜症では一般的に認められる所見ではない。これらの糖尿病モデル動物は、糖尿病眼合併症を理解する上で重要であるが、ヒト糖尿病網膜症の初期変化である網膜血管の透過性亢進に伴う網膜浮腫を認めないため、糖尿病患者の眼合併症とはかけ離れていると言わざるを得ない。

1988 年に正常 Sprague-Dawley (SD)ラットの非近交系群の中から偶然に尿糖、高血糖をきたすラットが発見された。鳥居薬品株式会社研究所にてこれらのラットは飼育され、近交交配を繰り返すことで 1997 年に系統確立された。そして 2000 年に重症糖尿病眼合併症を持つ自然発症 2 型糖尿病モデル動物ラット、Spontaneously Diabetic Torii(SDT)ラットが我々の施設を含めたグループから報告された[16]。その特徴として雄 SDT ラットは雌 SDT ラットより糖尿病の発症率が高く、生後 25 週までに非空腹時血糖値が  $700 \pm 103 \text{mg/dl}$  まで

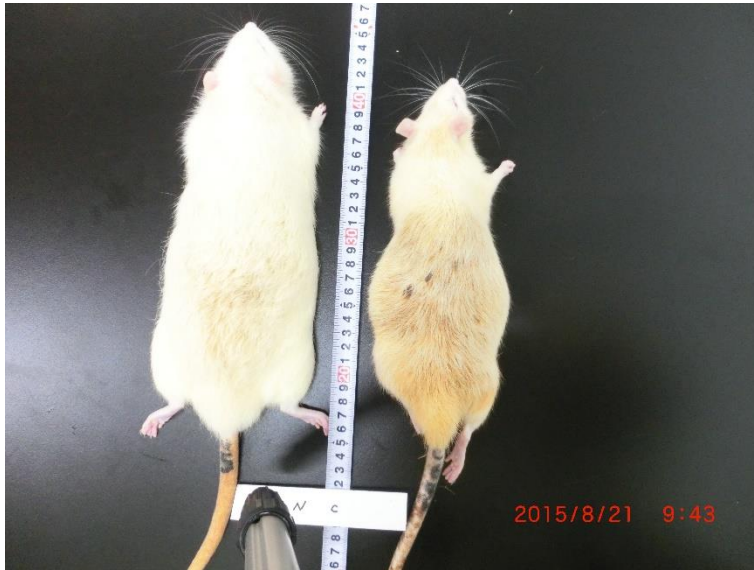


Figure 5. 正常 Sprague-Dawley (SD)ラット(左)と Spontaneously Diabetic Torii (SDT)ラット(右)。両方とも生後 39 週齢だが、SDT ラットは糖尿病発症後 20 週経過している。糖尿発症後体の大きさは徐々に差が生じてくる。



Figure 6. SDT ラットにおける成熟白内障 (左) と蛍光造影眼底写真 (右)。水晶体の混濁は強く眼底は観察できない。蛍光造影眼底写真では視神経乳頭からの旺盛な造影剤の漏出が認められる。





Figure 7. SDT ラットにおける増殖糖尿病網膜症[16]。視神経乳頭に増殖組織による隆起が認められる。

上昇していた。尿糖を Multstix™ (Bayer-Sankyo Co., Tokyo, Japan)で測定し、3+もしくはそれ以上で糖尿病発症と定義すると、雄 SDT ラットの場合、生後 40 週齢以上では 100%糖尿病を発症していた。さらに雄 SDT ラットでは生後 40 週齢以上で、糖尿病性白内障が確認され、生後 70 週齢で網膜の視神経乳頭周囲の増殖性変化と肥厚が確認された。Figure 5～7 に SDT ラットの眼合併症を呈示した。糖尿病患者で失明原因となる増殖糖尿病網膜症に類似した状態が確認できたのである。

しかし、この SDT ラットを糖尿病網膜症治療法の研究に用いようとする、いくつか問題点があった。雄 SDT ラットの 65 週齢での生存率は 92.9%で[16]、増殖性変化が現れる週齢まで待っていたら、相当数のラットの喪失を覚悟しなければならず、実験コストがかさむ点である。また、増殖性変化や病理所見で治療効果を判断しようとしても、最終的には検者の印象で判断せざるを得ず、客観的な評価という点では限界がある。SDT ラットの糖尿病網膜症を評価する方法として、数値化できる何かを利用する必要がある。これに対し、筆者は SDT ラットにおける網膜厚に着目した。SDT ラットにおける網膜浮腫や脈絡膜の状態についてはこれまでに報告がなかった。仮に SDT ラットにおいて糖尿病黄斑浮腫患者と同様に網膜厚が厚くなっていけば、定量的に解析することが可能となり、糖尿病網膜症のモデル動物としてさらに利用しやすいものになると考えられる。

近年糖尿病脈絡膜症については様々な報告がある。Unsal らは増殖糖尿病網



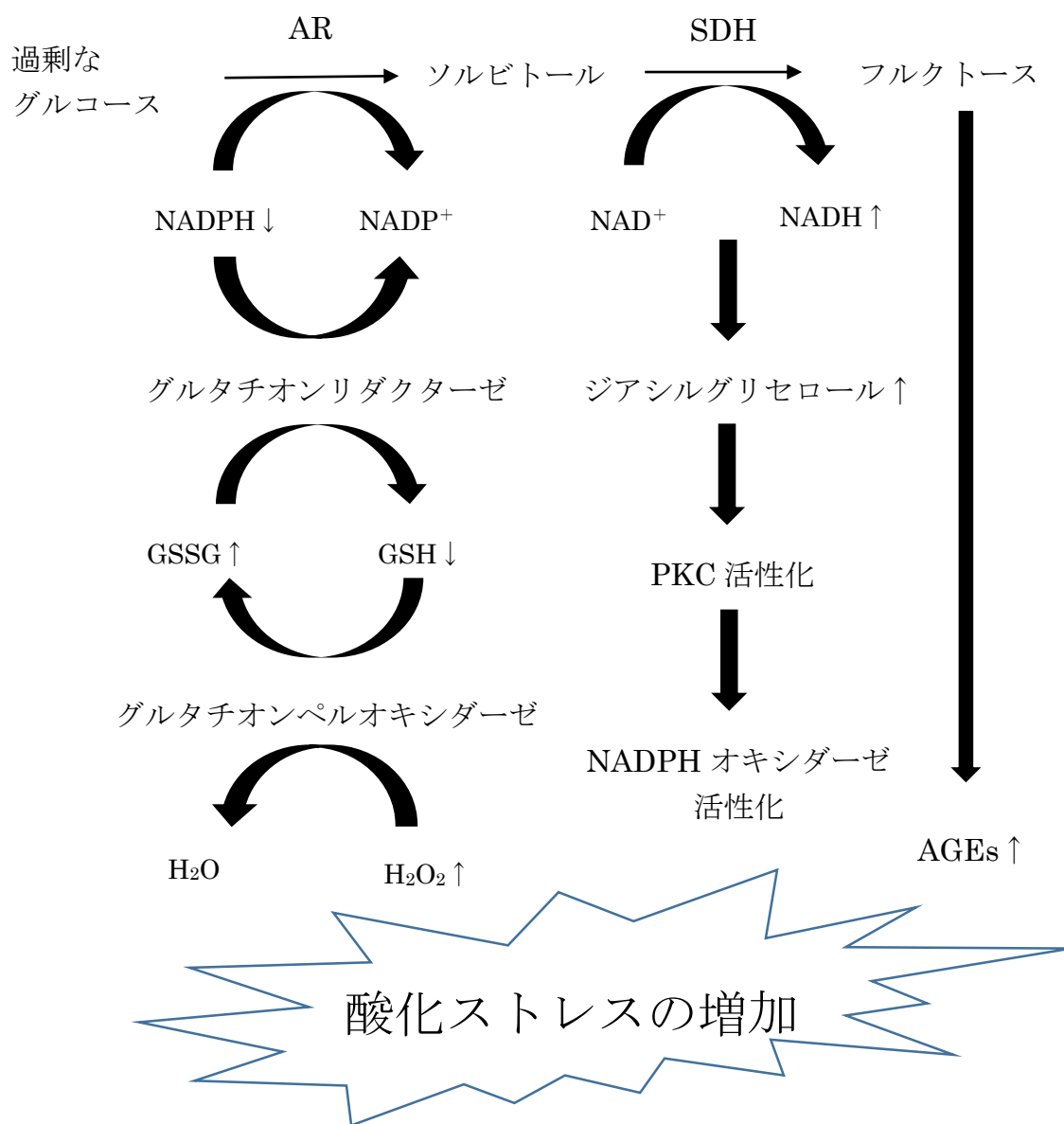


Figure 8. Polyol 代謝と酸化ストレス。AR; aldose reductase. SDH; sorbitol dehydrogenase. GSSG; glutathione disulfide. GSH; reduced glutathione. PKC; protein kinase C. [24]

膜症で糖尿病黄斑浮腫を合併している患者の脈絡膜厚は健常人に比べ優位に減少していたと報告した[17]。しかし、この study では糖尿病網膜症患者は汎網膜光凝固術を受けていた。Kim らは非増殖糖尿病網膜症から増殖糖尿病網膜症と悪化するにつれて脈絡膜の厚みは増加していくが、汎網膜光凝固術を受けた患者では逆に薄くなると報告している[18]。糖尿病網膜症患者の糖尿病脈絡膜症の指標として脈絡膜厚を調べるためには同じ条件を持つことが重要である。例えば長期間に渡る血糖コントロール、糖尿病の罹病機関、年齢、眼治療歴などであるが、それらを等しく臨床研究は不可能である。糖尿病患者においてはしばしば自分がいつから糖尿病にかかっているのか分からない患者もいる。故に糖尿病網膜症患者において脈絡膜厚が厚くなっているのか薄くなっているのかについては一概に断言することは困難である。そこでこの問題を解決するために条件がほぼ同じである SDT ラットにおいて脈絡膜厚を調べてみる必要がある。

糖尿病眼合併症を予防、治療することが我々の最終的な目的であるが、そのためには眼合併症をきたすメカニズムの解明が必要である。高血糖による代謝変化として Polyol 代謝経路の亢進[19]、プロテインキナーゼ C の活性化[20]、酸化ストレスの増大[21]、白血球の血管内皮細胞への付着[22]、advanced glycation end products (AGEs) の蓄積[23] が発生することが報告されている。これらの変化の中で、特に筆者は Polyol 代謝経路の亢進と AGEs に着目した。Polyol 代謝経路は糖代謝の副経路として知られているが、アルドース還元酵素 (aldose reductase: AR) とソルビトール脱水素酵素 (sorbitol dehydrogenase: SDH) がこの糖代謝回路の促進酵素となっている。(Figure 8)[24]。また、それぞれのステップで NADPH から NADP<sup>+</sup>、NAD<sup>+</sup> から NADH への変換を伴い、高血糖に起因するこの酸化ストレスの増加が糖尿病合併症の発症メカニズムとして重要であると考えられている。また高血糖状態では細胞内にソルビトールが蓄積し、細胞・組織機能異常、組織変性が発生すると考えられる[25]。Polyol 経路の活性亢進によってソルビトールとともにフルクトース産生が増加するが、フルクトース自身及びその代謝産物が強力な糖化作用を持つことから、Polyol 経路の活性亢進は AGEs 産生の増加につながると考えられる。アルドース還元酵素は網膜、水晶体、抹消神経の Schwann 細胞で存在することが報告されており[26]、糖尿病眼合併症において、亢進した Polyol 代謝経路が糖尿病眼合併症に大きく関係していると考えられる。AGEs は糖と蛋白質が結合(糖化反応)し、生成される最終物である。この糖化反応の過程で活性酸素(reactive oxygen species ; ROS)が発生し酸化ストレスが生じる。また AGE と AGE 受容体の結合により ROS が発生し、さらに酸化ストレスが生じる。(Figure 9)[24]。AGEs としてこれまでに多くの物質が報告されて

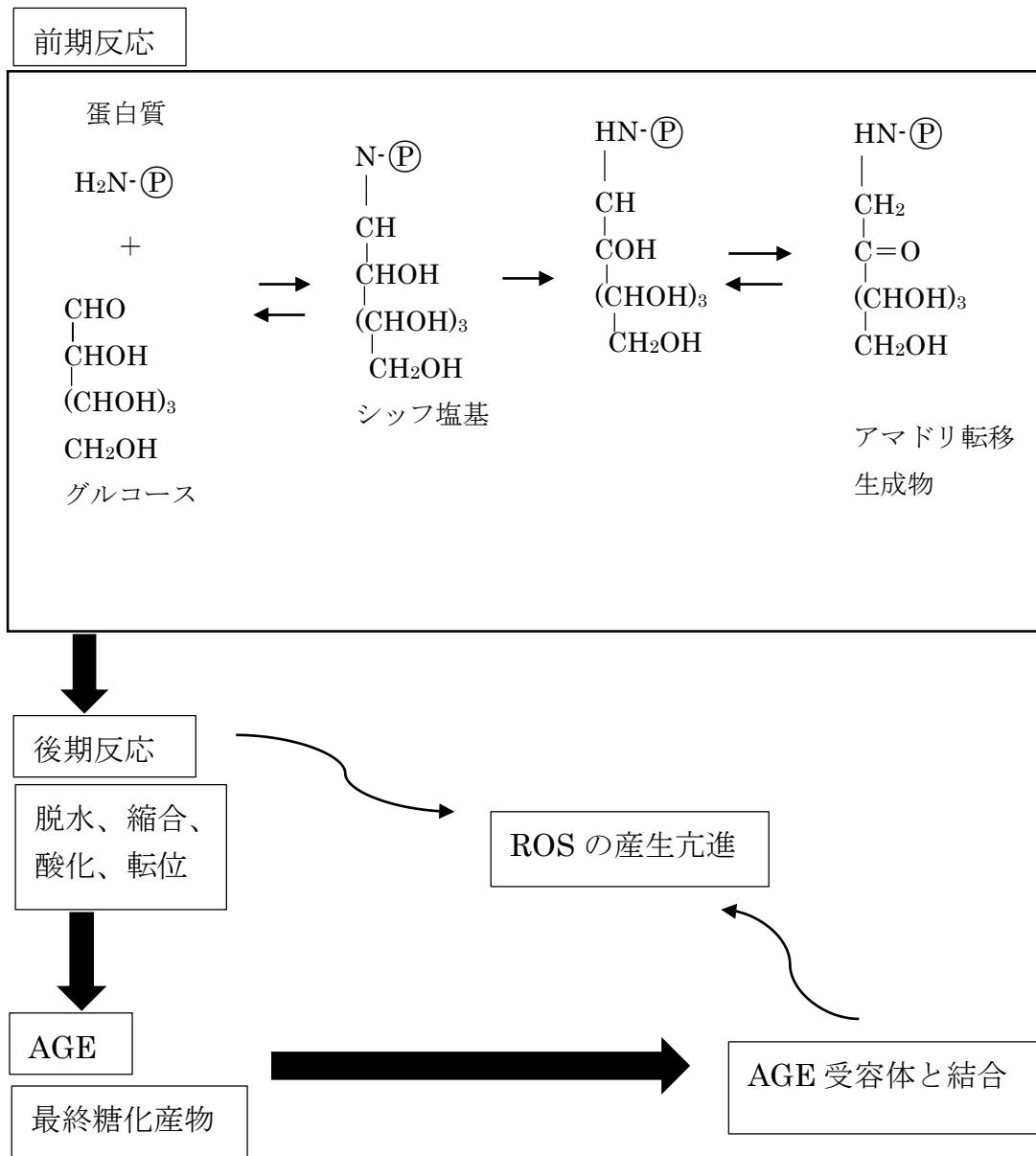


Figure 9. 糖化と酸化ストレス [24]。AGE; Advanced Glycation End Products. ROS; Reactive Oxygen Species. 糖化反応の過程及び AGE が AGE 受容体と結合する過程で ROS が発生し酸化ストレスが生じる。

いるが、とりわけ眼合併症と関係が深いものとして N(epsilon)-carboxymethyl-lysine (CML)がある[27-30]。Hammes らは(STZ)誘発糖尿病ラットや人間の増殖糖尿病患者の網膜において CML が顕著に確認でき、しかも糖尿病網膜症の進行に従って増加することを報告している[29,30]。故にこの CML の眼内における蓄積自体が、糖尿病網膜症の増悪因子となっている可能性がある。血糖コントロールとは独立した糖尿病網膜症抑制薬として Polyol 経路を抑制することと、AGEs の産生を抑えることが標的となると考えられる。

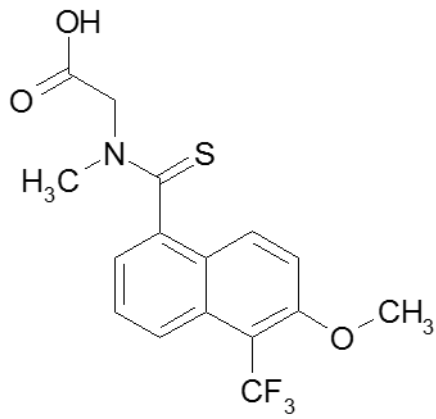
アルドース還元酵素阻害薬は糖尿病合併症治療薬として期待されている。アルドース還元酵素阻害薬の **Epalrestat** は本邦において糖尿病性末梢神経障害に対して保険適応が認められている。しかし、糖尿病網膜症に対してはどのアルドース還元酵素阻害薬も臨床応用がされていないのが現状である。

**Sorbinil** はアルドース還元酵素阻害薬の 1 つであるが、糖尿病モデルラットの網膜最小血管基底膜の肥厚を抑制することが報告された[31]。しかしながら、**Sorbinil** の糖尿病網膜症に対する臨床試験では明らかな効果を証明できなかった[32]。糖尿病網膜症に対する網膜血管基底膜の肥厚は糖尿病網膜症の電顕レベルでの初期変化として認められるが、現実の糖尿病網膜症患者で問題となるのは、電顕レベルの初期変化ではなく糖尿病黄斑浮腫、増殖糖尿病網膜症である。これらの合併症を抑制できることが証明されなければ、糖尿病網膜症への有効性は疑問視せざるを得ない。

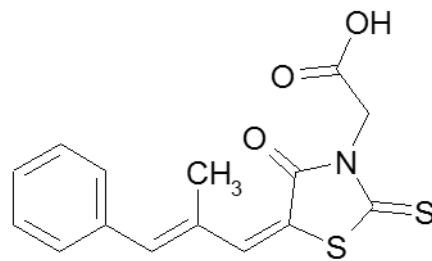
**Ranirestat** は新しいアルドース還元酵素阻害薬として紹介された。その特徴としては従来のアルドース還元酵素阻害薬にはない新しい骨格(ピロロピラジン骨格)を有していることである(Figure 10)。さらに **Streptozotocin (STZ)** 誘発糖尿病ラットにおいて、坐骨神経のソルビトール蓄積抑制効果を検討したところ、**Ranirestat** の ED<sub>50</sub> は 0.18mg/kg/day と **Ponalrestat**(11.0mg/kg/day)、**Tolestat**(26.7mg/kg/day)と比べ効果が強いことが示唆された[33]。また糖尿病性末梢神経障害患者に対する臨床試験ではプラセボ投与患者よりも **Ranirestat** (40mg/day, 80mg/day) 投与患者において有意に腓骨運動神経伝達速度が改善していることが報告されているが、その差は 1.2m/s 以内と小さかった[34]。我々は以前この **Ranirestat** が SDT ラットにおいて糖尿病性末梢神経障害と糖尿病性白内障を抑制したことを報告している[35]が、この新しいアルドース還元酵素阻害薬が糖尿病網膜症を抑制することが証明されれば、糖尿病合併症治療に有効な治療法となり得る。

**Aminoguanidine** はヒドラジン化合物で、AGEs の生成を阻害する(Figure 10)。特に糖化反応の早期の生成物であるアマドリ転移生成物は **Aminoguanidine** と強い親和性を持ち、それ以後の糖化反応を不活化させる[36]。この糖化抑制効果を利用した糖尿病合併症抑制効果について種々の報告がある。**Yagihashi** らは

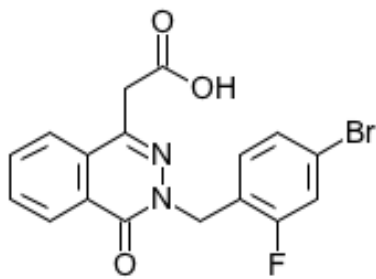
STZ 誘発糖尿病ラットにおいて神経伝導速度の改善や軸索萎縮を予防する効果を持つことを報告した[37]。また Aminoguanidine の糖尿病腎症、網膜症の抑制効果を検討した臨床試験では尿中蛋白質排泄の有意な減少、腎機能障害の有意な抑制、網膜症の有意な抑制を示した[38]。これ以降は副作用の問題などもあり、Aminoguanidine が実際の糖尿病合併症治療薬として実用化されていないのが現状である。しかしながら、ヒト糖尿病網膜症患者に類似した SDT ラットにおいて AGE 阻害薬の糖尿病網膜症抑制効果を検討してみたいと考える。Pyridomamine はビタミン B<sub>6</sub> の 1 つであり、AGEs の合成を阻害することが報告されている。特に後期糖化産物のカルボニル基を有効に捕捉し、AGEs の合成を阻害することが報告されている[39]。Stitt らは STZ 誘発糖尿病ラットにおいて Pyridoxamine が糖尿病網膜症の進行を抑制したと報告した[40]。しかしながら、STZ 誘発糖尿病ラット網膜は網膜毛細血管基底膜の肥厚や毛細血管瘤がいくらか見られるが、ヒト糖尿病網膜症のような網膜浮腫や増殖性変化はきたさない。そこで、ヒト糖尿病網膜症に類似した SDT ラットを使用して Pyridoxamine の糖尿病網膜症抑制効果について検討してみたいと考える。この論文では糖尿病網膜症モデル動物である SDT ラットの網膜症の病理学的特徴[41,42]と SDT ラットを利用した Aminoguanidine[43]、Pyridoxamine[43]、Ranirestat[44]の糖尿病網膜症抑制効果について検討したい。



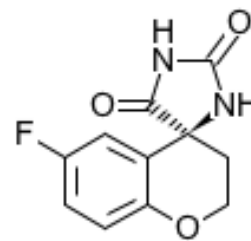
Tolrestat



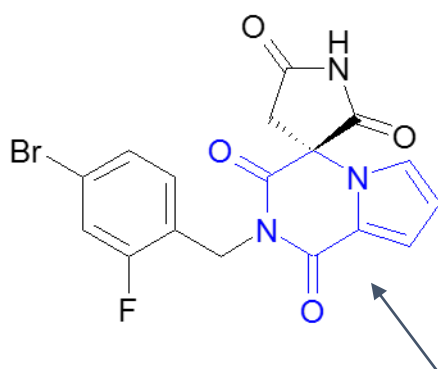
Epalrestat



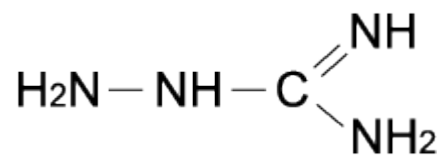
Ponalrestat



Sorbinil

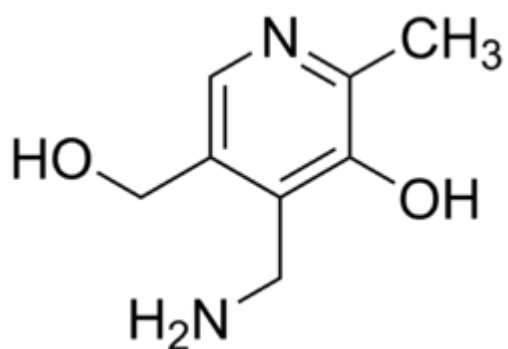


Ranirestat ピロロピラジン骨格



Aminoguanidine





Pyridoxamine

Figure 10. アルドース還元酵素阻害薬、及び Aminoguanidine、Pyridoxamine の構造式。Ranirestat は従来のアルドース還元酵素阻害薬にはない新しい骨格 (ピロロピラジン骨格) を有している。

## 2 目的と方法

この論文は5つの実験から成り立っているので①から⑤の順で述べていきたい。

### ①

#### 〈目的〉

糖尿病網膜症及び糖尿病脈絡膜症のモデル動物の確立をめざし、SDT ラットにおける糖尿病網膜浮腫、脈絡膜浮腫について検討する。

#### 〈方法〉

a 実験動物：実験動物の取扱いについては Association for Research in Vision and Ophthalmology 及び自治医科大学の動物実験規定に基づいて行われた。我々は雄 SDT ラットを日本クレア株式会社より購入した。全ての SDT ラット (n=8) は非絶食時血糖値が 350mg/dl 以上で糖尿病と診断した。全ての SDT ラットは標準的なラット用飼料(CRF-1, Oriental Yeast, Inc., Tokyo, Japan)を与えられた。その間同様に正常 SD ラット(n=9)においても同じ飼料を与えた。

b 眼組織標本の作製：SDT ラットが糖尿病を発症してから 40 週経過した後に眼球摘出を行った。正常 SD ラットにおいても同時期に眼球摘出を行った。全てのラットは週齢 50 週から 60 週の間で解剖を行った。眼球摘出は pentobarbital (25mg/kg, Nembutal, Sumitomo Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd, Osaka, Japan)の腹腔内投与により十分に麻酔を効かせた後に行い、摘出眼球はすぐに固定液(Super Fix, KY-500, Kurabo, Japan)にて固定した。固定された眼球は 0.1% mol/L cacodylate buffer で洗浄し、パラフィン包埋を行った。パラフィンブロックからマイクロトームにて 4 $\mu$ m の切片を作成し、hematoxylin and eosin (HE)染色を行った。

c 網膜・脈絡膜厚の計測：4 $\mu$ m の眼球切片標本は偏光顕微鏡(Olympus, BX-51, Olympus Corporation, Tokyo, Japan)で観察し、画像は附属のデジタルカメラとソフトウェア(Olympus DP 72, DP2-BSW, Olympus Corporation)で記録し、ダウンロードした。網膜厚は内境界膜(internal limiting membrane:ILM)から網膜色素上皮(retinal pigment epithelium:RPE)までの距離とした。脈絡膜厚は RPE から脈絡膜-強膜接合部までの距離とした。網膜ではさらに ILM から内顆粒層(inner nuclear layer:INL)までの厚さ、INL の厚さ、外顆粒層の厚さ(outer nuclear layer:ONL)、視細胞層(photoreceptor

layer:PL)の厚さに分けて測定した。網膜・脈絡膜厚は視神経乳頭から 500、1,000、1,500 $\mu\text{m}$  の距離で測定した。測定には画像解析ソフト ImageJ(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)を使用した。

d 統計解析：Mann-Whitney U test は 2 群間の差の検定に使用した。Spearman の順位相関係数は網膜厚と脈絡膜厚の相関を調べるために使用した。統計ソフトはエクセル統計 2006(The Social Survey Research Information Co., Ltd., Tokyo, Japan)を使用した。P 値は 0.05 未満で有意差ありとした。

## ②

〈目的〉SDT ラットの眼内において AGEs(CML, pyrraline、pentosidine)、VEGF の蓄積を検討する。

### 〈方法〉

a 実験動物：①と同様に正常 SD ラット及び SDT ラットを入手した。SDT ラットは非空腹時血糖値が 250mg/dl 以上で糖尿病と診断し、全例糖尿病発症を確認した。SD ラット(n=10)、SDT ラット(n=6)の飼料は①と同様に与えた。週齢 60 週を過ぎてから免疫組織検査を行った。

b 免疫組織検査：①と同様にパラフィンブロックから 4 $\mu\text{m}$  の組織切片を作成した。①で行った HE 染色に加えて VEGF 免疫染色、pyrraline 免疫染色、pentosidine 免疫染色 CML 免疫染色を行った。免疫染色は通常の avidin-biotin horseradish peroxidase 法で行い、peroxidase の発色基質として AEC Substrate-Chromogen (Dakocytomation, Carpinteria, CA, USA)を使用した。抗 VEGF 抗体は Mouse Monoclonal 抗体(Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd, Fujioka, Japan)を 1:25 で希釈して使用した。抗 CML、抗 pyrraline、抗 pentosidine 抗体は Mouse Monoclonal 抗体(Trans Genic Inc., Kumamoto, Japan)を 1:50 に希釈して使用した。

c 免疫染色の評価：標本を偏光顕微鏡で確認した後、免疫染色の grade を 3 段階に分類した。ほぼ免疫染色がない状態を Minimal staining、極淡く染色されている状態を Moderate staining、濃く染色されている状態を Severe staining と定義した。

d 統計解析：免疫染色の grade について SDT ラットと正常 SD ラットの間で有意差があるかについては Cochran-Armitage test 及び Fisher's exact test を

使用した。統計ソフトはエクセル統計 2006(The Social Survey Research Information Co., Ltd., Tokyo, Japan)を使用した。P 値は 0.05 未満で有意差ありとした。

③

〈目的〉SDT ラットにおいて AGE 合成阻害薬 Aminoguanidine の糖尿病性白内障、網膜症抑制効果を検討する。

〈方法〉

a 実験動物：①と同様に SDT ラットを入手した。SDT ラットは非空腹時血糖値が 250mg/dl 以上で糖尿病と診断し、全例糖尿病発症を確認した。SDT ラットの飼料は①と同様に与えた。SDT ラットは糖尿病と診断された後に Aminoguanidine 治療群(n=5)、及び Probucol 治療群(n=4)、未治療群(n=4)に分けた。Probucol は抗酸化作用を伴う高脂血症治療薬であるが、Aminoguanidine との比較を行うために使用した。Aminoguanidine 治療群には 0.5g/L の Aminoguanidine を飲水中に混注し、自由飲水とした。Probucol 治療群はラット用飼料の中に 1%混餌した。週齢 55 週を過ぎてから蛍光造影眼底検査及び免疫組織検査を行った。

b 蛍光造影眼底検査：造影剤は fluorescein isothiocyanate-dextran (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO)を使用した。pentobarbital sodium(25mg/kg)を腹腔内投与し、十分に麻酔を効かせた後に、リン酸緩衝生理食塩水 1ml に fluorescein isothiocyanate-dextran を 50mg 混注し、各ラットの左心室に注入した。注入して 5 分後に右眼を造影検査用に摘出し、左眼を免疫組織検査用に摘出した。網膜を眼球から剥ぎ、スライドガラス上にフラットマウントを作成した。網膜のフラットマウント観察には蛍光カメラ((Nikon SMZ1500 with P-FLA fluorescence attachment, Nikon, Tokyo, Japan)を使用した。蛍光造影検査)で視神経乳頭からの造影剤蛍光漏出が認められれば糖尿病網膜症ありと評価した。

c 免疫組織検査：①と同様にパラフィンブロックから 4 $\mu$ m の組織切片を作成した。①で行った HE 染色に加えて CML 免疫染色を行った。免疫染色は通常の avidin-biotin horseradish peroxidase 法で行い、peroxidase の発色基質として AEC Substrate-Chromogen (Dakocytomation, Carpinteria, CA, USA)を使用した。抗 CML 抗体は Mouse monoclonal 抗体(Trans Genic Inc., Kumamoto, Japan)を 1:50 で希釈して使用した。免疫組織染色標本を偏光顕微

鏡で観察した。

d 白内障の観察：眼球を摘出する前に、tropicamide 5% 及び phenylephrine hydrochloride 5%を含んだ点眼液で両眼を散瞳し、細隙灯顕微鏡で観察し、撮影した。

e 統計解析：糖尿病性白内障、糖尿病網膜症の発生率を Fisher's exact test で検定した。統計ソフトはエクセル統計 2006(The Social Survey Research Information Co., Ltd., Tokyo, Japan)を使用した。P 値は 0.05 未満で有意差ありとした。

#### ④

〈目的〉SDT ラットにおいてビタミン B<sub>6</sub>の 1 つである AGE 合成阻害薬ピリドキサミンの糖尿病性白内障、糖尿病網膜症抑制効果を検討する。

〈方法〉

a 実験動物：①と同様に SDT ラット、正常 SD ラットを入手した。SDT ラットは非空腹時血糖値が 250mg/dl 以上で糖尿病と診断し、全例糖尿病発症を確認した。SDT ラット及び SD ラットの飼料は①と同様に与えた。SDT ラットは糖尿病と診断された後に Pyridoxamine 治療 SDT ラット群(n=6)、無治療 SDT ラット群(n=6)、正常 SD ラット群(n=10)に分類した。Pyridoxamine 治療 SDT ラット群には飲水中に Pyridoxamine を 1g/L 混注し、自由飲水とした。週齢 60 週を過ぎてから蛍光造影検査及び免疫組織検査を行った。

b 蛍光造影眼底検査：③と同様に行った。

c 免疫組織検査：③と同様に行った。

d 白内障の観察：③と同様に行った。

e 統計解析：③と同様に行った。

#### ⑤

〈目的〉

SDT ラットにおいてアルドース還元酵素阻害薬 Ranirestat の糖尿病網膜症抑制効果を検討する。

〈方法〉

- a 実験動物：①と同様に SDT ラットと SD ラットを用いた。SDT ラットは①と同様に非空腹時血糖値が 350mg/dl 以上で糖尿病と診断した。SDT ラット、及び SD ラットの飼料は①と同様に与えた。SDT ラットは糖尿病発症後に以下のグループに分けた。無治療 SDT ラット群(n=8)、Ranirestat(0.1mg/kg/day)治療 SDT ラット群(n=7)、Ranirestat(1.0mg/kg/day)治療 SDT ラット群(n=8)、Ranirestat(10mg/kg/day)治療 SDT ラット群(n=6)、Epalrestat(100mg/kg/day)治療 SDT ラット群(n=7)である。各治療群は糖尿病発症後 40 週間 1 日 1 回強制経口投与を行った。これらの SDT ラットは糖尿病発症後 40 週で剖検を行った。またこれらの SDT ラットと週齢に近い正常 SD ラットも同時期に 40 週間 SDT ラットと同様の飼料を与えた後剖検を行った。全てのラットは週齢 50 週から 60 週の間で解剖を行った。途中経過をみるために無治療の 31 週齢 SDT ラット(n=4)と 33 週齢正常ラット(n=4)を剖検した。
- b 体重、血糖値、糖化ヘモグロビンの測定：体重、血糖値、糖化ヘモグロビン(HbA1c)は月 1 回測定した。採血は非絶食状態でラットの尾静脈より行った。血糖測定は hexokinase-G6-PDH 法(L type Wako Glu2, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)で行った。HbA1c は自動糖化ヘモグロビン解析機(HLC-723 GHb V, Tosoh Corporation, Tokyo, Japan)で行った。
- c 眼組織標本の作製：①と同様に行った。①で行った HE 染色に加えて Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)免疫染色を行った。GFAP 免疫染色は神経障害の程度を調べるために行った。免疫染色は通常の avidin-biotin horseradish peroxidase 法で行い、peroxidase の発色基質として AEC Substrate-Chromogen (Dakocytomation, Carpinteria, CA, USA)を使用した。抗 GFAP 抗体は Mouse monoclonal 抗体(Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA)を 1:50 で希釈して使用した。
- d 網膜厚・GFAP 染色面積の測定：網膜厚・GFAP 染色面積は視神経乳頭から 300~600 $\mu$ m の範囲で測定した。①と同様に測定には画像解析ソフト ImageJ(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)を使用した。
- e 統計解析：各群の差の検定には Mann-Whitney U test と Steel's test を使用した。統計ソフトはエクセル統計 2006(The Social Survey Research Information Co., Ltd., Tokyo, Japan)を使用した。P 値は 0.05 未満で有意差ありとした。



### 3 結果

#### 実験①における結果

##### a 網膜・脈絡膜厚

Table 1, 2 に SD ラットと SDT ラットにおける網膜・脈絡膜厚を示す。各値は視神経乳頭からの距離で示した。大部分の層は SDT ラットにおいて有意に肥厚していたが、距離 500 $\mu$ m では INL 厚、脈絡膜厚で有意差がでなかった。

Figure 11, 12 に SDT ラットと正常 SD ラットにおける網膜厚と脈絡膜厚との相関を示した。網膜厚、脈絡膜厚は 3 点での平均値を各ラットで求めグラフ上に表記した。両者とも網膜厚と脈絡膜厚は強く相関していた(SDT ラット :  $r_s=0.81$ 、 $P<0.05$ 、SD ラット :  $r_s=0.72$ 、 $P<0.05$ )。

##### b SDT ラットと SD ラットにおける網膜・脈絡膜の病理組織

Figure 13, 14, 15 は SDT ラットと SD ラットの網膜・脈絡膜を示している。SD ラットに比べ SDT ラットでは網膜、脈絡膜は肥厚している。特に SDT ラットにおいて ILM から神経節細胞近辺での浮腫は顕著である。網膜、脈絡膜とも細胞間のスペースは SDT ラットにおいて顕著であり、網膜・脈絡膜浮腫が出現している。SDT ラットの脈絡膜では 2 つのタイプの血管が認められる。1 つは RPE の外側にあり、choriocapillaris(脈絡膜毛細血管板)と考えられる。もう一つは強膜側の choroidal vessel(脈絡膜大血管)と考えられる。これらの血管壁は肥厚していることが確認できた。一方、正常 SD ラットではこれらの特徴は確認できなかった。

	500 $\mu$ m	1,000 $\mu$ m	1,500 $\mu$ m	Total
<b>Total Retinal Thickness (<math>\mu</math>m)</b>	<b>102.8</b> (73.8-127.3)	<b>81.7</b> (74.0-125.5)	<b>96.2</b> (61.3-153.4)	<b>99.2</b> (61.3-153.4)
<b>Thickness between ILM and INL (<math>\mu</math>m)</b>	<b>47.8</b> (29.3-67.7)	<b>47.1</b> (31.1-64.0)	<b>47.1</b> (31.2-65.6)	<b>47.1</b> (29.3-67.7)
<b>INL Thickness (<math>\mu</math>m)</b>	<b>18.0</b> (9.4-24.8)	<b>17.0</b> (8.4-25.9)	<b>16.2</b> (4.8-23.9)	<b>17.0</b> (4.8-25.9)
<b>ONL Thickness (<math>\mu</math>m)</b>	<b>19.4</b> (12.3-23.6)	<b>19.9</b> (10.9-26.7)	<b>20.2</b> (9.9-27.1)	<b>19.9</b> (9.9-27.1)
<b>PL Thickness (<math>\mu</math>m)</b>	<b>10.1</b> (7.8-14.0)	<b>10.0</b> (6.7-14.1)	<b>8.4</b> (5.1-14.6)	<b>9.9</b> (5.1-14.6)
<b>Choroidal Thickness (<math>\mu</math>m)</b>	<b>8.4</b> (4.9-14.1)	<b>8.4</b> (4.2-15.0)	<b>9.5</b> (3.3-19.1)	<b>8.4</b> (3.3-19.1)

Table 1. 正常 SD ラットにおける網膜・脈絡膜厚。各値は中央値(最小値—最大値)で示した。視神経乳頭からの距離(500, 1,000, 1,500 $\mu$ m)で分けて示し、さらに全ての測定値の中央値も示した。

	500μm	1,000μm	1,500μm	Total
Total Retinal Thickness (μm)	159.1** (117.3-201.4)	148.0** (101.1-184.1)	153.7** (100.4-211.6)	153.4** (100.4-211.6)
Thickness between ILM and INL (μm)	72.6* (32.1-144.0)	64.1* (30.7-91.0)	71.2* (23.0-86.0)	69.7** (23.0-144.0)
INL Thickness (μm)	22.3 (18.7-32.0)	27.6* (13.6-33.6)	27.6* (12.6-36.0)	24.6** (12.6-36.0)
ONL Thickness (μm)	32.1** (20.0-40.1)	33.2** (25.2-41.3)	28.5** (20.1-40.6)	30.6** (20.0-41.3)
PL Thickness (μm)	21.9** (14.1-28.8)	23.4** (10.5-28.7)	19.5** (12.3-39.5)	22.7** (10.5-39.5)
Choroidal Thickness (μm)	11.9 (8.7-19.4)	18.2** (11.5-23.9)	19.7** (9.8-40.8)	16.8** (8.7-40.8)

Table 2. SDT ラットにおける網膜・脈絡膜厚。各値は中央値(最小値—最大値)で示した。視神経乳頭からの距離(500, 1,000, 1,500μm)で分けて示し、さらに全ての測定値の中央値も示した。大部分の層において SDT ラットの方が SD ラットに比べ有意に肥厚していた。しかし距離 500μm では INL 厚、脈絡膜厚で有意差はなかった。

\*P<0.05(正常 SD ラットと比較), \*\*P<0.01(正常 SD ラットと比較)

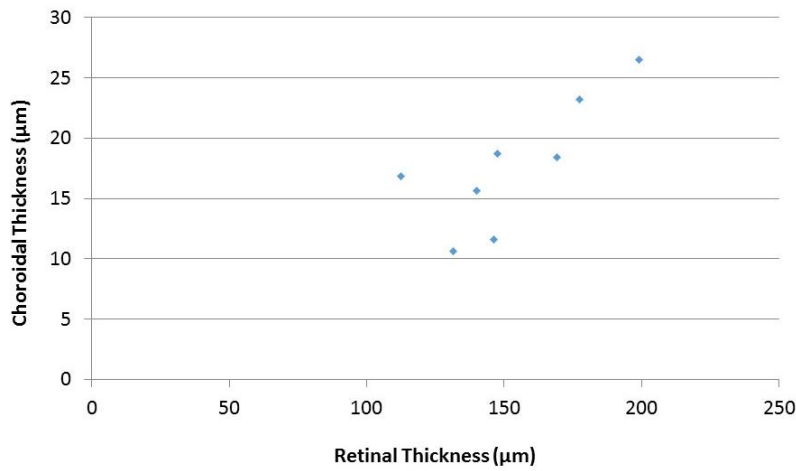


Figure 11. SDT ラットにおける網膜厚と脈絡膜厚との関係[41]。  $r_s = 0.81$ 、  $P < 0.05$ 。各値は 3 つの測定点での平均値を各ラット毎に求め、示した。

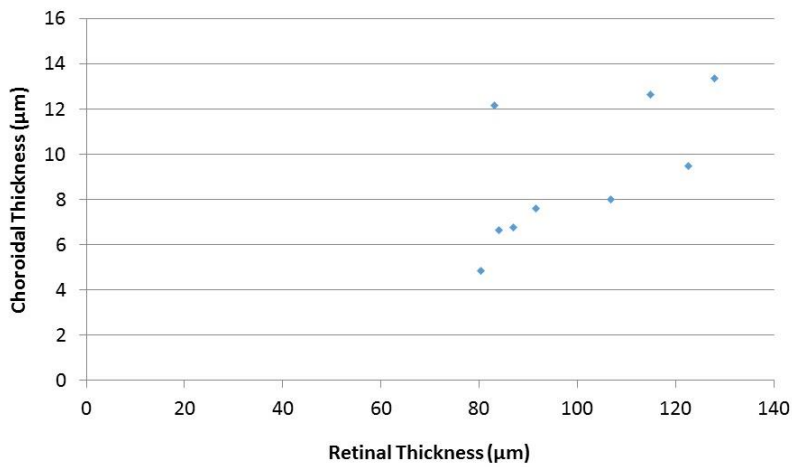


Figure 12. 正常 SD ラットにおける網膜厚と脈絡膜厚との関係[41]。  $r_s = 0.72$ 、  $P < 0.05$ 。各値は 3 つの測定点での平均値を各ラット毎に求め、示した。

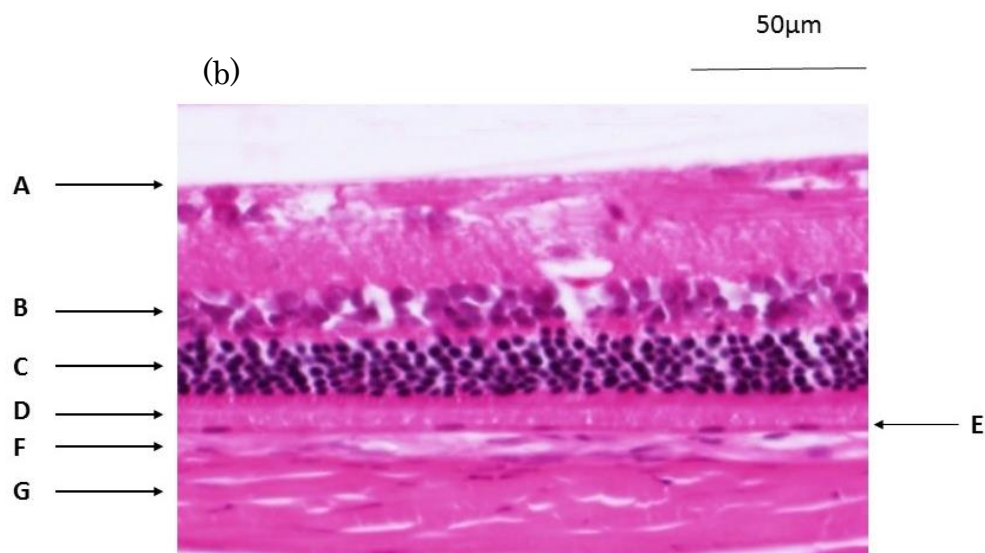
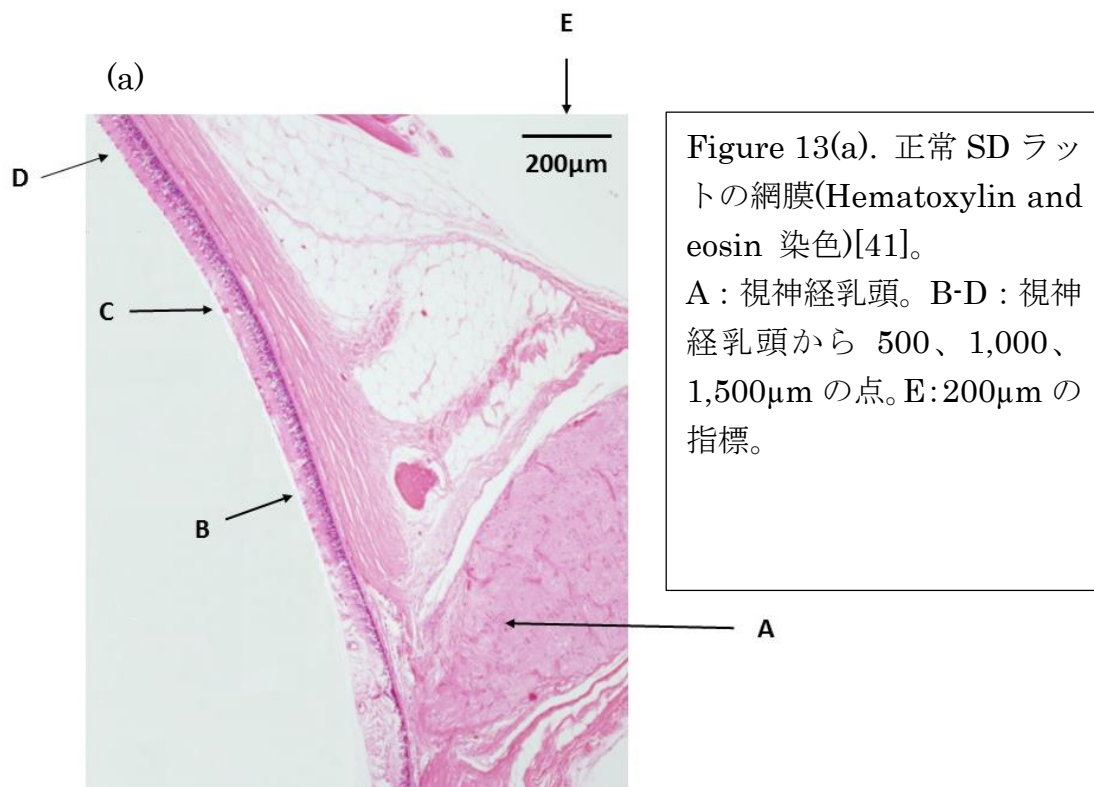


Figure 13(b). 正常 SD ラットの網膜・脈絡膜(視神経乳頭から 400~600 $\mu\text{m}$ )[41]。A : ILM、B : INL、C : ONL、D : PL、E : RPE、F : 脈絡膜、G : 強膜。

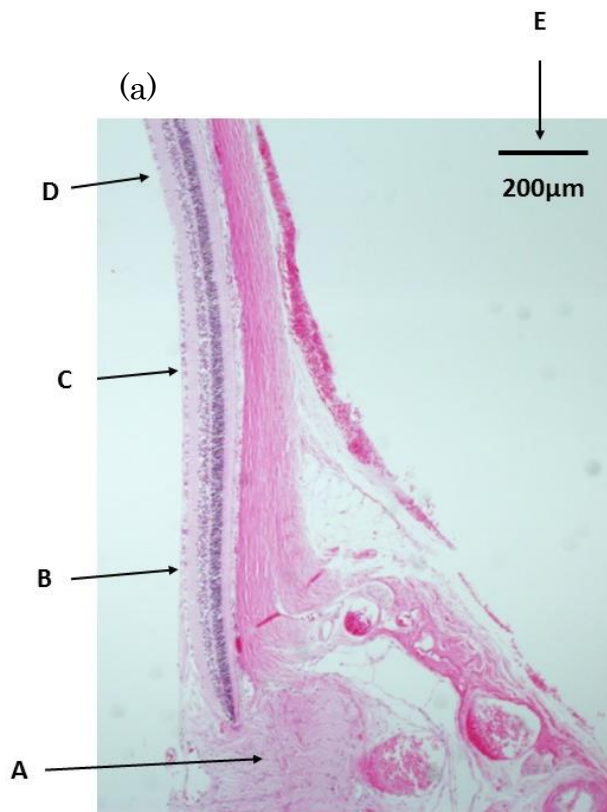


Figure 14(a). SDT ラットの網膜(Hematoxylin and eosin 染色)。A : 視神経乳頭。B-D : 視神経乳頭から 500、1,000、1,500µm の点。E : 200µm の指標[41]。

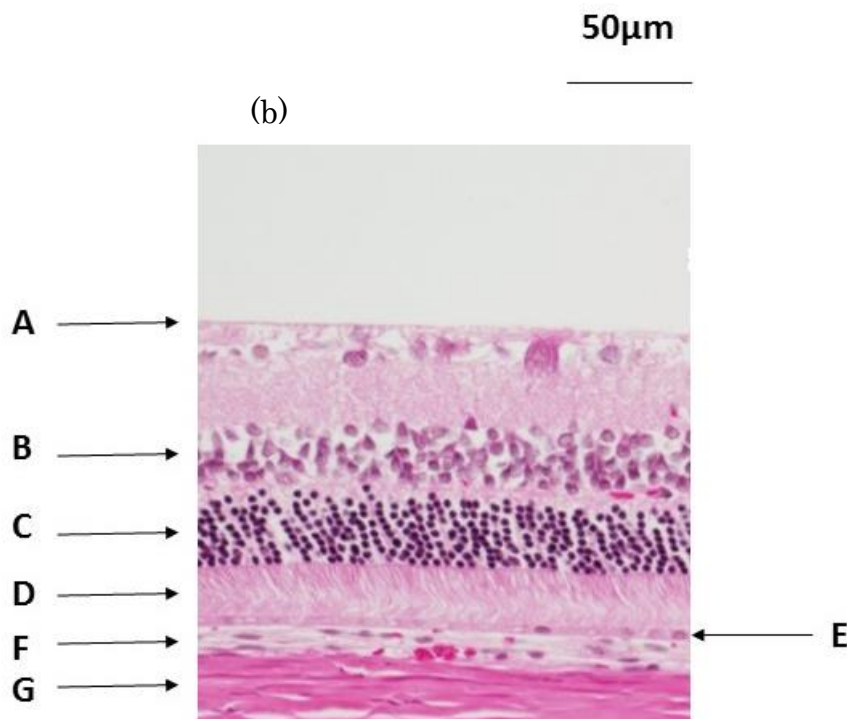


Figure 14(b). SDT ラットの網膜・脈絡膜(400~600µm)[41]。A : ILM、B : INL、C : ONL、D : PL、E : RPE、F : 脈絡膜、G : 強膜。



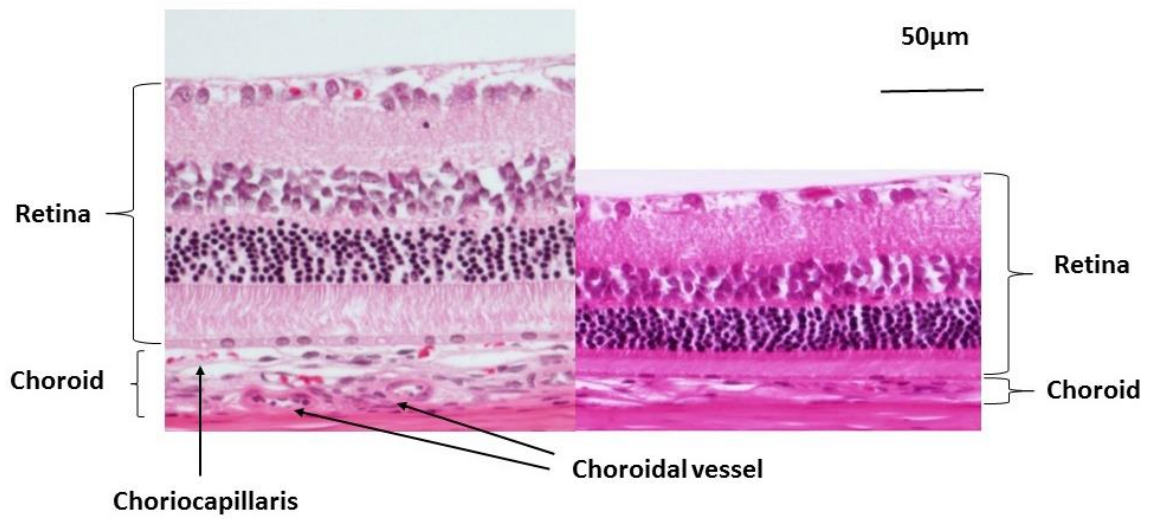


Figure 15. SDT ラット(左)と SD ラット(右)の網膜・脈絡膜の比較[41]。

## 実験②における結果

### a 免疫組織検査

Table 3、4に SDT ラット、正常 SD ラット網膜における CML、pyrraline、pentosidine、VEGF 免疫染色の grade を示す。Figure 16、17に SDT ラット、正常 SD ラット網膜における各免疫染色所見を示す。CML、VEGF 免疫染色は正常 SD ラットに比べ SDT ラットにおいて有意に強く染色されていた( $P < 0.05$ 、 $P < 0.001$ 、Cochran-Armitage test)。Pyrraline、pentosidine 免疫染色は SDT ラットと正常 SD ラットの間で有意差は認められなかった( $P=0.35$ 、 $P=0.38$ 、Fisher's exact test)。

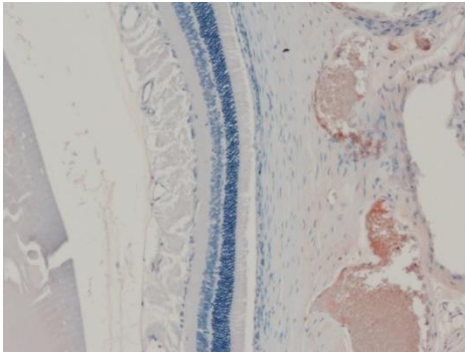
	CML	Pyrraline	Pentosidine	VEGF
Minimal	0	5	5	0
Moderate	1	1	1	3
Severe	5	0	0	3

Table 3. SDT ラット網膜における CML、pyrraline、pentosidine、VEGF 免疫染色の grade 分布。数字は各 grade にあてはまるラットの数を示す[42]。

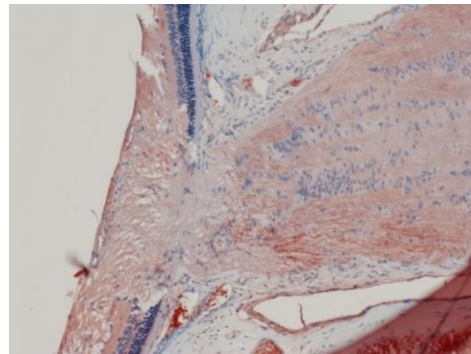
	CML	Pyrraline	Pentosidine	VEGF
Minimal	1	6	10	9
Moderate	7	4	0	1
Severe	2	0	0	0

Table 4. 正常 SD ラットにおける CML、pyrraline、pentosidine、VEGF 免疫染色の grade 分布。数字は各 grade にあてはまるラットの数を示す[42]。

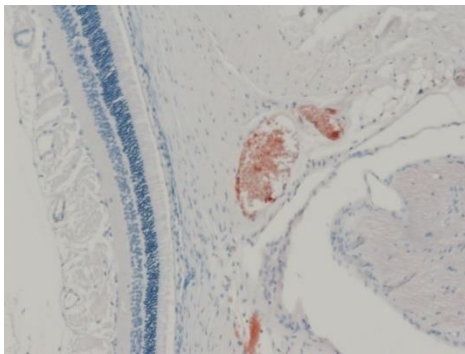
**Pyrraline, minimal**



**CML, severe**



**Pentosidine, minimal**



**VEGF, severe**

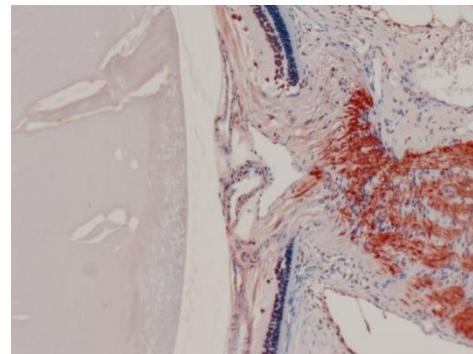
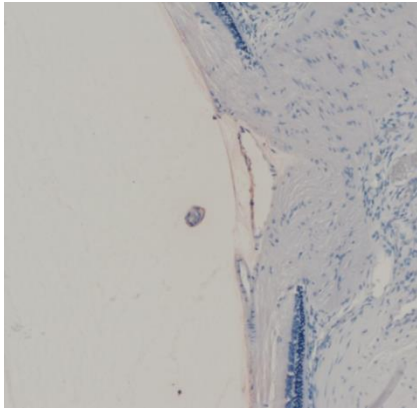
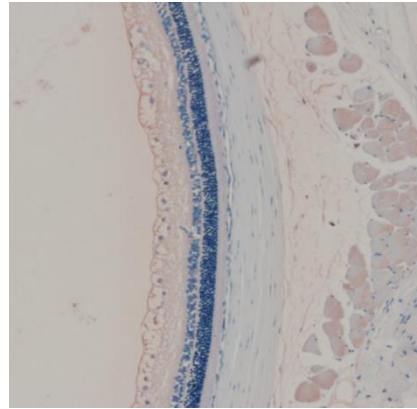


Figure 16. SDT ラット網膜における各 AGEs、VEGF 免疫染色所見。赤く染色されている部分が各 AGEs、VEGF の染色部分である。CML、VEGF は強く染色されているが、pyrraline、pentosidine の染色は弱い[42]。

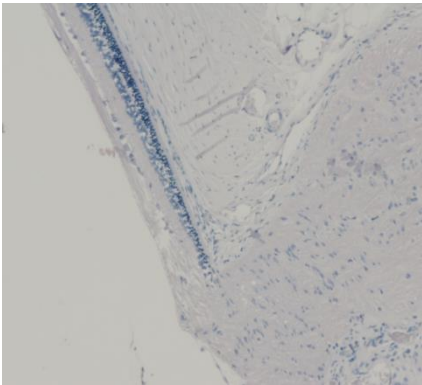
**Pyrraline, minimal**



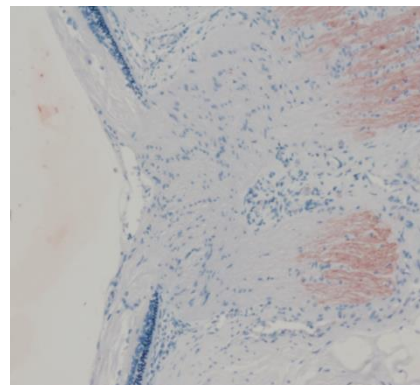
**CML, minimal**



**Pentosidine, minimal**



**VEGF, minimal**



**Figure 17.** 正常 SD ラット網膜における各 AGEs、VEGF 免疫染色所見。赤く染色されている部分が各 AGEs、VEGF の染色部位である。CML、VEGF 染色は SDT ラット網膜に比べ染色が弱い。Pyrraline、pentosidine については SDT ラットと同様に染色は弱い[42]。

### 実験③における結果

#### a 糖尿病性白内障、糖尿病網膜症の評価

成熟白内障及び糖尿病網膜症は全ての未治療 SDT ラットで確認された(4/4, 100%)が、Aminoguanidine 治療 SDT ラットにおいては確認されなかった(0/5, 0%)( $P < 0.05$ , Fisher's exact test)。Probucol 治療 SDT ラットにおいては全例で成熟白内障、糖尿病網膜症が確認された(4/4, 100%)(Figure 18)。未治療 SDT ラット、Probucol 治療 SDT ラットの蛍光造影網膜所見は、視神経乳頭からの造影剤漏出と視神経乳頭周囲血管の蛇行が確認された。

#### b 免疫組織所見

Figure 19 に Probucol 治療 SDT ラットと Aminoguanidine 治療 SDT ラットの網膜及び水晶体の免疫組織所見を示す。Probucol 治療 SDT ラットの水晶体嚢下及び網膜には CML が染色されていることが確認された。一方、Aminoguanidine 治療 SDT ラットでは水晶体には全く CML が染色されている所見はなく、網膜においてはごくわずかに染色されているのみであった。網膜は Probucol 治療 SDT ラットにおいて肥厚している印象であった。

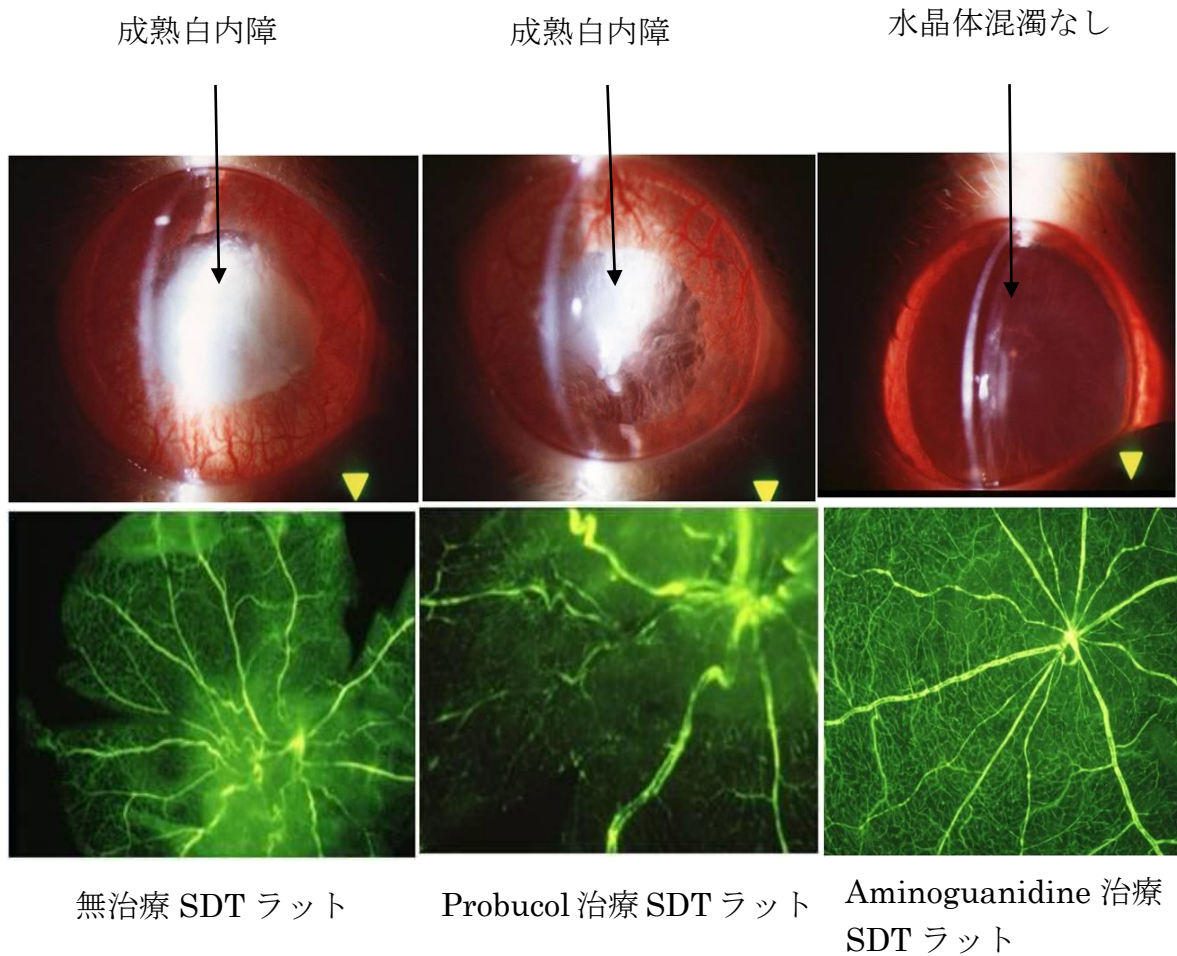
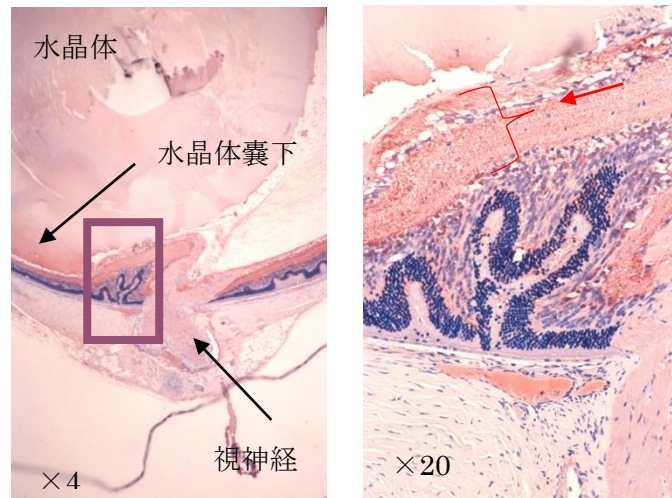
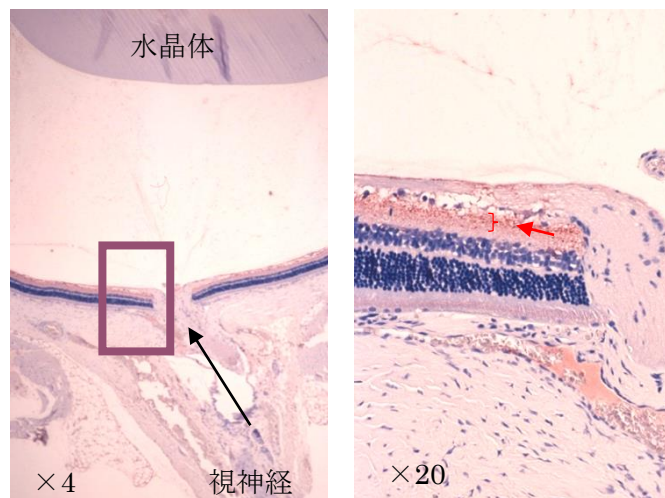


Figure 18. Aminoguanidine 及び Probutol の SDT ラットにおける糖尿病性白内障、糖尿病網膜症に対する抑制効果[43]。上段は水晶体の細隙灯顕微鏡所見である。無治療 SDT ラット、Probutol 治療 SDT ラットでは成熟白内障が認められる。一方 Aminoguanidine 治療 SDT ラットでは水晶体の混濁は認めない。下段は蛍光造影眼底写真である。無治療 SDT ラット及び Probutol 治療 SDT ラットでは視神経乳頭周囲からの造影剤漏出と網膜血管の蛇行が認められる。一方、Aminoguanidine 治療 SDT ラットではそのような所見は認めていない。





Probucol 治療 SDT ラット



Aminoguanidine 治療 SDT ラット

Figure 19. Probucol 治療 SDT ラット(上段)及び Aminoguanidine 治療 (SDT ラット)における水晶体及び網膜の CML 免疫染色所見[43]。赤く染色されている部分が CML の染色されている領域である。Probucol 治療 SDT ラットでは網膜の肥厚と水晶体囊下及び網膜の広範囲に渡る CML 染色が現れている(赤矢印)。一方、Aminoguanidine 治療 SDT ラットでは網膜の肥厚は抑制されており、水晶体に CML 染色は認めない。一方網膜にはごく限局された部位(赤矢印)に CML 免疫染色を認める。

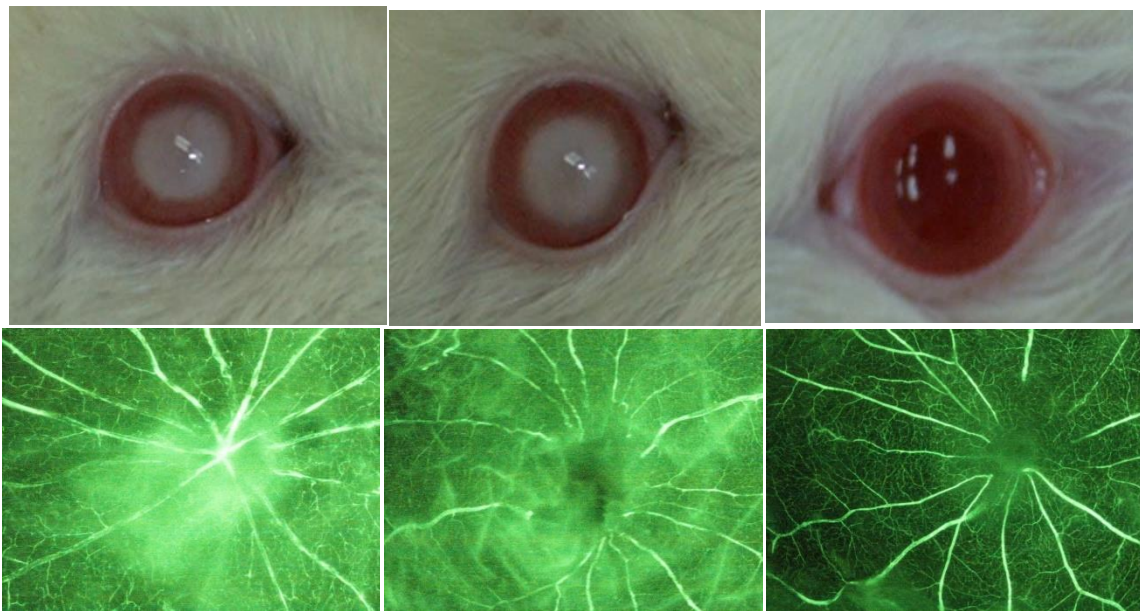
## 実験④における結果

### a 糖尿病性白内障、糖尿病網膜症の評価

成熟白内障は無治療 SDT ラットにおいて全例で確認された(6/6, 100%)。一方、正常 SD ラットでは白内障は全く確認されなかった(0/10, 0%)( $P < 0.001$ , Fisher's exact test)。糖尿病網膜症は無治療 SDT ラットにおいて4匹で確認された(4/6, 67%)。一方、正常 SD ラットでは糖尿病網膜症はまったく確認されなかった(0/10, 0%)( $P < 0.01$ , Fisher's exact test)。Pyridoxamine 治療 SDT ラットでは成熟白内障は全例(6/6, 100%)、糖尿病網膜症は4匹(4/6, 67%)で確認された。Pyridoxamine は SDT ラットにおいて成熟白内障、糖尿病網膜症を抑制していなかった(Figure 20)。

### b 免疫組織所見

Figure 21 に無治療 SDT ラット、Pyridoxamine 治療 SDT ラット、正常 SD ラットの網膜免疫組織所見を示す。正常 SD ラットでは水晶体、網膜に CML 染色は強く認められなかった。一方、無治療 SDT ラット、Pyridoxamine 治療 SDT ラットでは水晶体、網膜に強く CML 染色が出現しており、その強さはほぼ同等であった。



無治療 SDT ラット

Pyridoxamine 治療  
SDT ラット

正常 SD ラット

**Figure 20.** SDT ラットにおける Pyridoxamine の糖尿病性白内障、糖尿病網膜症に対する抑制効果。上段は水晶体所見を示す。正常 SD ラットにおいては水晶体の混濁はまったく認めない。一方で無治療 SDT ラット、Pyridoxamine 治療 SDT ラットでは成熟白内障が認められる。下段は蛍光造影眼底所見を示す。正常 SD ラットでは視神経乳頭からの造影剤蛍光漏出は認めないが、無治療 SDT ラット、Pyridoxamine 治療 SDT ラットでは視神経乳頭からの造影剤蛍光漏出が認められる[43]。

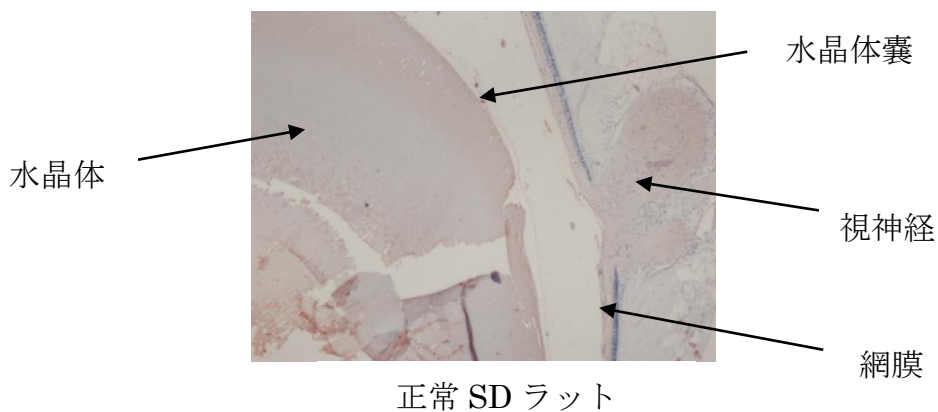
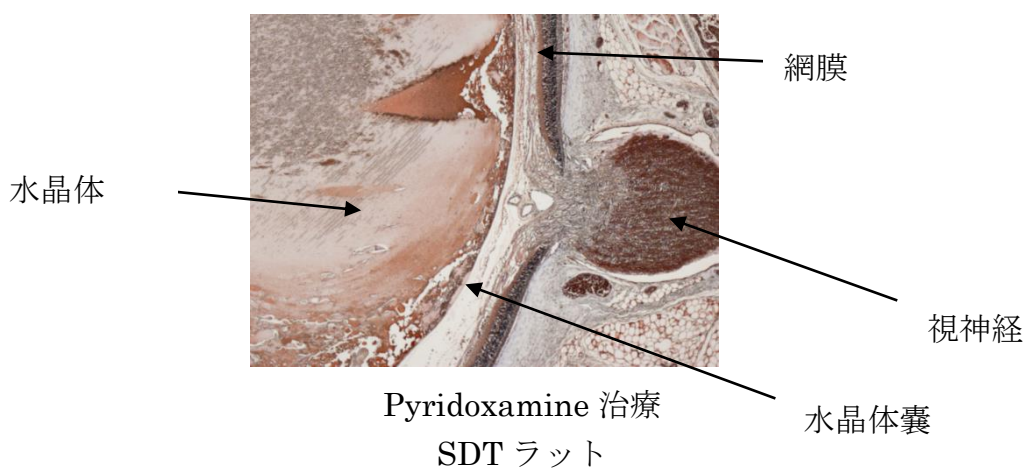
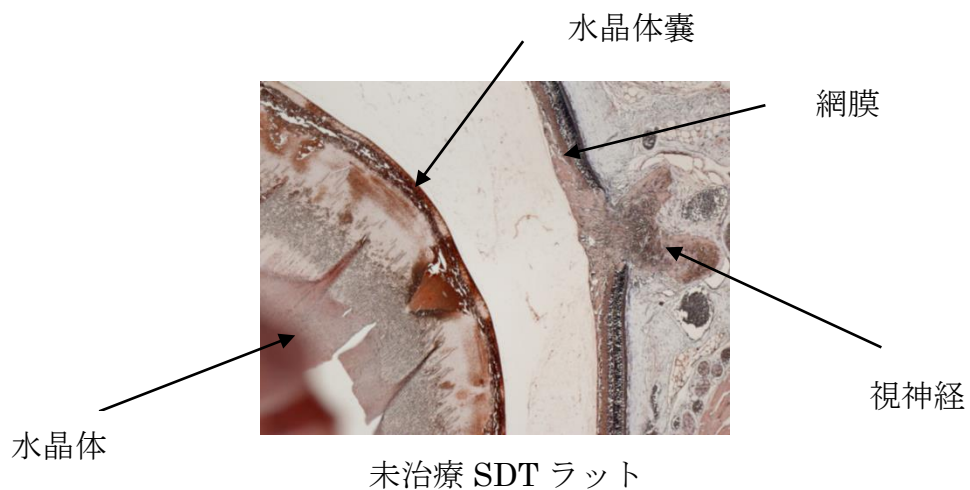


Figure 21. 未治療 SDT ラット、Pyridoxamine 治療 SDT ラット、正常 SD ラットにおける水晶体及び網膜の CML 免疫染色所見。赤く染色されている部分が染色された CML を示している。無治療 SDT ラット、Pyridoxamine 治療 SDT ラットの水晶体、網膜には CML 染色が認められる。一方、正常 SD ラットの水晶体、網膜には CML 染色はほとんど認められない[43]。

## 実験⑤における結果

a SDT ラット(無治療、Ranirestat 治療、Epalrestat 治療)及び正常 SD ラットにおける体重、血糖値、HbA1c

Figure 22, 23, 24 に SDT ラットと正常 SD ラットの平均体重、平均血糖値、平均 HbA1c 値の推移を示す。体重は SD ラットに比べ、SDT ラットにおいて有意に減少していた( $P < 0.01$ )。一方 Ranirestat 及び Epalrestat 治療の有無は体重に有意差を与えなかった。血糖値、HbA1c 値は SD ラットに比べ SDT ラットで有意に高かった( $P < 0.01$ )。しかし、Ranirestat 及び Epalrestat 治療の有無は血糖値、HbA1c 値に有意差を与えなかった。これらのアルドース還元酵素阻害剤は今回の実験において血糖コントロールに影響を与えないことが確認された。

b SDT ラット(無治療、Ranirestat 治療、Epalrestat 治療)及び正常 SD ラットにおける網膜厚と GFAP 染色面積

Table 5 に各群の網膜厚と GFAP 染色面積(視神経乳頭から距離 300~600 $\mu$ m の範囲)を示す。未治療 SDT ラットにおける網膜は正常 SD ラット、Ranirestat(0.1, 1.0, 10 mg/kg/day)治療 SDT ラットに比べ有意に( $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ 、Steel's test)肥厚していた。しかし未治療 SDT ラットと Epalrestat 治療 SDT ラットの間では網膜厚に有意差は認められなかった( $P > 0.05$ 、Steel's test)。未治療 SDT ラットにおける GFAP 染色面積は正常 SD ラット及び Ranirestat(1.0, 10 mg/kg/day)治療 SDT ラットに比べ有意に( $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ 、Steel's test)大きかった。一方、未治療 SDT ラットと Epalrestat 治療 SDT ラットの間では GFAP 染色面積に有意差は認めなかった( $P > 0.05$ 、Steel's test)。33 週齢 SD ラットの網膜は 50 週齢以上の SD ラットに比べ有意に( $P < 0.05$ 、Mann-Whitney U test)肥厚していた。一方 GFAP 染色面積は 33 週齢 SD ラットに比べ 50 週齢以上の SD ラットにおいて有意に( $P < 0.01$ 、Mann-Whitney U test)大きかった。50 週齢以上の未治療 SDT ラットにおける GFAP 染色面積は 31 週齢 SDT ラットに比べ有意に( $P < 0.01$ 、Mann-Whitney U test)大きかったが、網膜厚では有意差はなかった( $P > 0.05$ 、Mann-Whitney U test)。31 週齢 SDT ラットにおける網膜は 33 週齢 SD ラットに比べ有意に( $P < 0.05$ 、Mann-Whitney U test)に肥厚していたが GFAP 染色面積に有意差はなかった( $P > 0.05$ 、Mann-Whitney U test)。Figure 25, 26, 27 に各群の網膜写真を示す(GFAP 染色)。正常 SD ラットでは GFAP 染色領域は ILM 近辺に限局されているが、SDT ラットにおいては INL 近辺まで広がって染色されている。31 週齢 SDT ラットは既に網膜の肥

厚が始まっているが、その時点ではまだ GFAP 染色領域は増加していない。

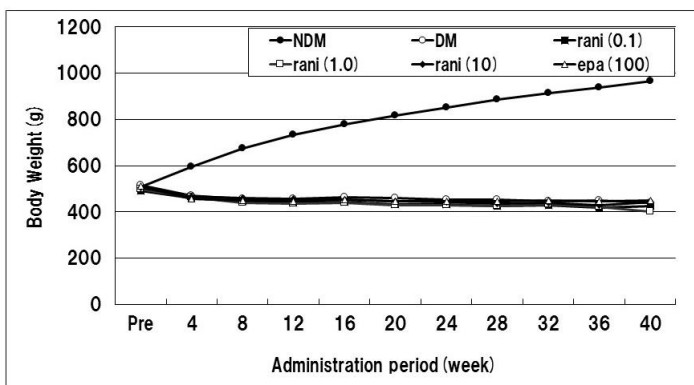


Figure 22. 正常 SD ラット及び SDT ラット各群の体重変化[44]。  
 NDM : 正常 SD ラット。正常 SD ラット及び SDT ラット各群の体重変化。体重は薬剤の投与の有無にかかわらず SD ラットのほうが大きい。  
 NDM: 正常 SD ラット。DM: 未治療 SDT ラット。rani(0.1): Ranirestat(0.1 mg/kg/day)治療 SDT ラット。rani(1.0) : Ranirestat(1.0 mg/kg/day)治療 SDT ラット。rani(10 mg/kg/day) : Ranirestat(10 mg/kg/day)治療 SDT ラット。epa(100) : Epalrestat(100 mg/kg/day)治療 SDT ラット。

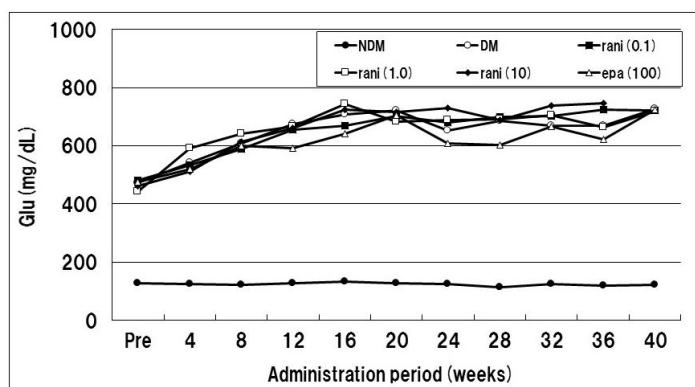


Figure 23. 正常 SD ラット及び SDT ラット各群の血糖値変化[44]。血糖値は薬剤の投与の有無にかかわらず SDT ラットのほうが高い。Ranirestat、Epalrestat は血糖値に影響を与えない。NDM : 正常 SD ラット。DM : 未治療 SDT ラット。rani(0.1) : Ranirestat(0.1 mg/kg/day)治療 SDT ラット。rani(1.0) : Ranirestat(1.0 mg/kg/day)治療 SDT ラット。rani(10 mg/kg/day) : Ranirestat(10 mg/kg/day)治療 SDT ラット。epa(100) : Epalrestat(100 mg/kg/day)治療 SDT ラット。



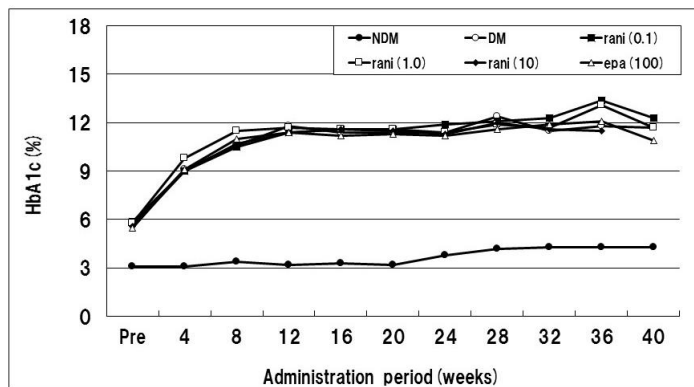


Figure 24. 正常 SD ラット及び SDT ラット各群の HbA1c 値の変化[44]。HbA1c 値は薬剤の投与の有無にかかわらず SDT ラットで高くなっている。Ranirestat、Epalrestat は HbA1c 値に影響を与えない。NDM: 正常 SD ラット。DM: 未治療 SDT ラット。rani(0.1): Ranirestat(0.1 mg/kg/day)治療 SDT ラット。rani(1.0): Ranirestat(1.0 mg/kg/day)治療 SDT ラット。rani(10 mg/kg/day): Ranirestat(10 mg/kg/day)治療 SDT ラット。epa(100): Epalrestat(100 mg/kg/day)治療 SDT ラット。

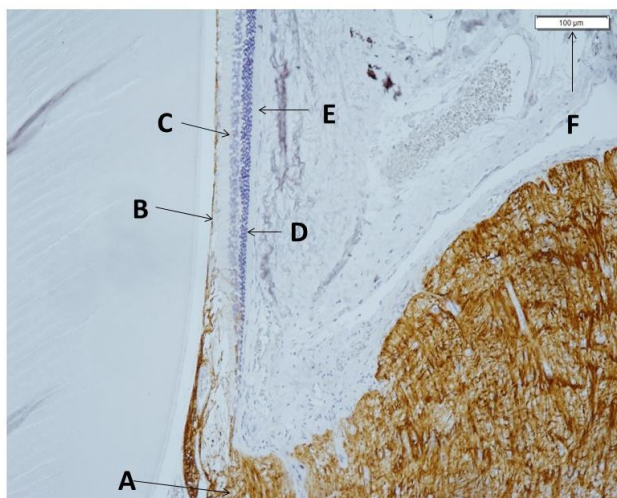


Figure 25. 50 週齢以上の正常 SD ラットにおける網膜[44]。茶色の領域が染色された GFAP である。A: 視神経乳頭。B: ILM。C: INL。D: ONL。E: RPE。F: 100µm の指標。GFAP 染色は ILM 近辺に限局されており、INL 近辺には認められない。

	31wDM	33wNDM	NDM	DM	rani (0.1)	rani (1.0)	rani (10)	epa (100)
Retinal thickness ( $\mu\text{m}$ )	151.7 (141.1-166.0)	128.5 (114.8-137.0)	89.8 (59.6-122.4)	167.1 (101.3-179.3)	118.0 (79.3-144.6)	93.4 (63.2-119.7)	96.8 (84.6-130.8)	130.5 (98.3-162.4)
P value	P>0.05 (compared with DM)  P<0.05 (compared with 33wNDM)	P<0.05 (compared with NDM)	P<0.01 (compared with DM)		P<0.05 (compared with DM)	P<0.01 (compared with DM)	P<0.05 (compared with DM)	P>0.05 (compared with DM)
Area of stained GFAP ( $\mu\text{m}^2$ )	217.2 (77.3-391.6)	117.8 (66.1-210.3)	1098.8 (420.0-1344.0)	2259.8 (1427.8-4116.7)	1415.7 (136.2-3297.2)	520.1 (136.7-1719.6)	456.7 (232.6-2368.5)	1593.7 (1033.1-2497.1)
P value	P<0.01 (compared with DM)  P>0.05 (compared with 33wNDM)	P<0.01 (compared with NDM)	P<0.01 (compared with DM)		P>0.05 (compared with DM)	P<0.01 (compared with DM)	P<0.05 (compared with DM)	P>0.05 (compared with DM)

Table 5. 各群の平均網膜厚、平均 GFAP 染色面積。各値は中央値(最小値—最大値)で示した。31wDM : 31 週齢 SDT ラット。33wNDM : 33 週齢 SD ラット。NDM: 正常 SD ラット。DM: 未治療 SDT ラット。rani(0.1): Ranirestat(0.1 mg/kg/day)治療 SDT ラット。rani(1.0) : Ranirestat(1.0 mg/kg/day)治療 SDT ラット。rani(10) : Ranirestat(10 mg/kg/day)治療 SDT ラット。epa(100) : Epalrestat(100 mg/kg/day)治療 SDT ラット。



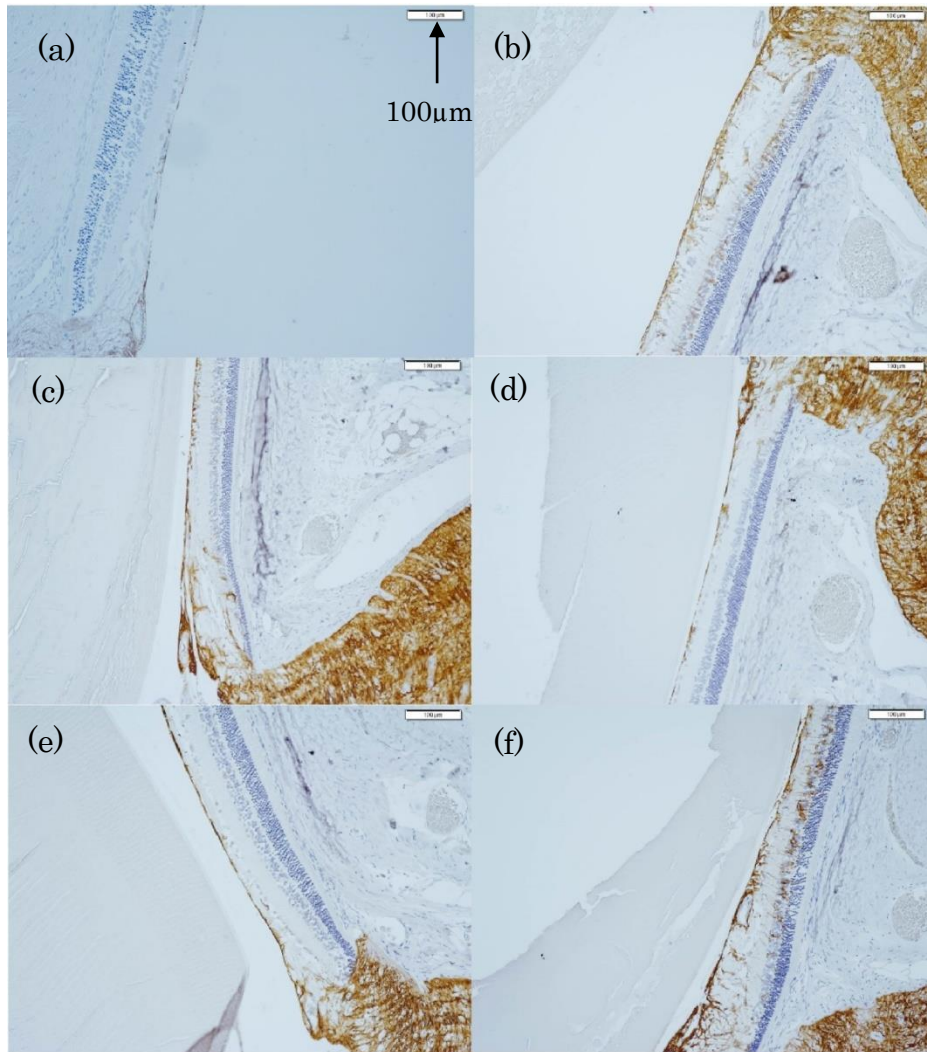


Figure 26. 各ラットの網膜[44]。(a)31 週齢 SDT ラットの網膜。GFAP 染色面積は 50 週齢以上の未治療 SDT ラットに比べ有意に小さいが、網膜厚は既に有意差がなくなっている。(b) : 50 週齢以上の未治療 SDT ラットの網膜。正常 SD ラットに比べ網膜厚、GFAP 染色面積が有意に大きくなっている。(c) : Ranirestat (0.1 mg/kg/day) 治療 SDT ラットの網膜。未治療 SDT ラットに比べ、網膜厚、GFAP 染色面積ともに減少している。(d) : Ranirestat (1.0 mg/kg/day) 治療 SDT ラットの網膜。網膜厚、GFAP 染色面積抑制効果はさらに強力になっている。(e) : Ranirestat(10 mg/kg/day)治療 SDT ラットの網膜。GFAP 染色面積は Ranirestat(0.1 mg/kg/day) 治療 SDT ラットに比べ、抑制効果が強いが、網膜厚については差が明らかではない。(f) : Epalrestat(100 mg/kg/day)治療 SDT ラットの網膜。網膜厚、GFAP 染色面積ともに抑制できていない。ILM から INL にかけて GFAP は強く染色されている。

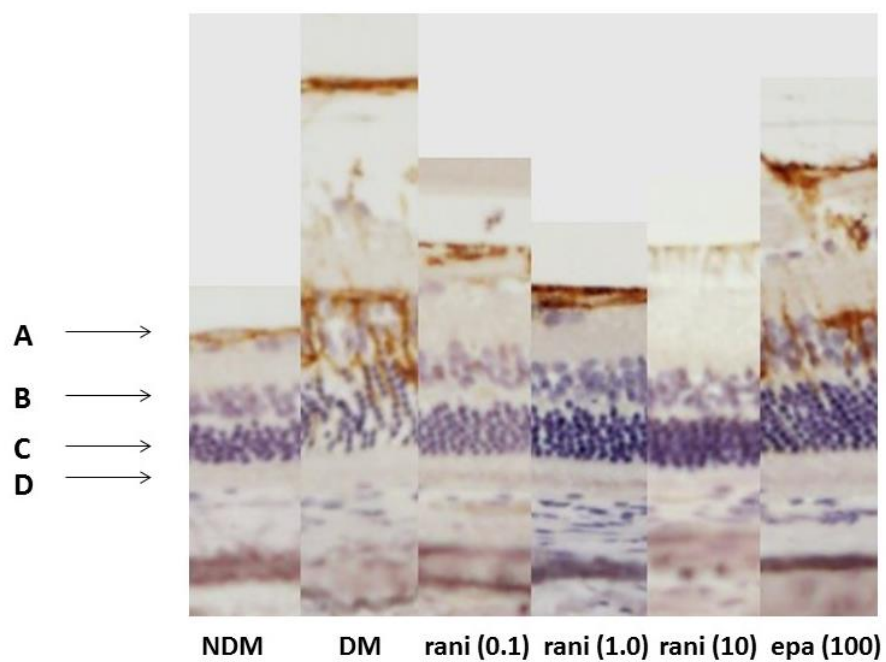


Figure 27. 各群の網膜の比較[44]。NDM：正常SDラット。DM：未治療SDTラット。rani(0.1)：Ranirestat(0.1 mg/kg/day)治療SDTラット。rani(1.0)：Ranirestat(1.0 mg/kg/day)治療SDTラット。rani(10 mg/kg/day)：Ranirestat(10 mg/kg/day)治療SDTラット。epa(100)：Epalrestat(100 mg/kg/day)治療SDTラット。

#### 4 考察

本研究で SDT ラットにおける網膜・脈絡膜浮腫を明らかにした。正常 SD ラット及び糖尿病モデル動物である SDT ラットでは網膜厚にばらつきが認められ、ある程度個体差があるものと推測された。これまでの報告[16]では、SDT ラットは 70 週齢で増殖糖尿病網膜症となり、視神経乳頭に増殖膜が発生する。本研究で解剖した SDT ラットの大部分は 70 週齢より若く、あと 10 週間程度経てば明らかな増殖性変化が起きていたかもしれない。網膜出血、網膜白斑、炎症細胞の浸潤など非増殖糖尿病網膜症を示唆する所見は確認できなかった。SDT ラットでは血糖値が著しく高く、さらに網膜には黄斑部がないなど、代謝異常や網膜の形態がヒトとは異なっている。それ故に、SDT ラットの糖尿病網膜症が糖尿病患者に似ていても、厳密にはヒトの糖尿病網膜症とは異なっていると思われる。

我々は本研究で SDT ラット網膜において VEGF の蓄積と視神経乳頭周囲からの蛍光造影剤の著しい漏出を示した。よって SDT ラットにおける網膜浮腫は VEGF の蓄積による網膜血管の透過性亢進が原因と考えられる。ヒトの糖尿病患者で観察できるような典型的な非増殖糖尿病網膜症は確認できなかったが、糖尿病網膜浮腫という形で糖尿病網膜症を観察することができた。

本研究での実験動物の数は限られており、糖尿病発症前の SDT ラットの網膜・脈絡膜厚は確認できていない。しかし Ranirestat の網膜厚抑制効果を検討してみると、正常 SD ラットと Ranirestat 治療 SDT ラットではそれほど差がないため、SDT ラットにおける網膜厚は糖尿病発症後段階的に浮腫が出現し、悪化していくと考えられる。SDT ラットの糖尿病発症前の体の大きさや体重は正常 SD ラットと変わらないため、おそらく網膜厚、脈絡膜厚においても変わらないと考えるが、今後更なる研究が必要であると考え。偏光顕微鏡では網膜層の ILM、神経節細胞、INL、ONL、PL、RPE を識別することができた。しかし、神経線維層、内網状層、外網状層については識別できなかった。より詳細な分析には電子顕微鏡が必要かもしれない。網膜浮腫は網膜各層に認められたが、ヒトの糖尿病網膜症のように嚢胞様浮腫や、漿液性網膜剥離は認められなかった。

本研究では SDT ラットにおいて有意に脈絡膜が肥厚していた。現在のところ糖尿病モデル動物で脈絡膜の厚さについて言及している報告は承知していない。糖尿病網膜症と脈絡膜との関係を知る上で有益な結果であるが、この結果を単純にヒトの糖尿病黄斑浮腫患者に当てはめるのは難しいと思われる。ラットの網膜には黄斑部はなく、SDT ラットの網膜浮腫は人の糖尿病網膜症とは異なっているからである。SDT ラットにおいては脈絡膜毛細血管版や脈絡膜大血管の血管壁が肥厚していた。これらの所見は長期間高血糖状態が続くと、脈絡

膜の構造に影響を及ぼす可能性を示唆している。SDT ラットにおける網膜浮腫については網膜血管の透過性亢進が原因と考えている。しかし、SDT ラットの脈絡膜浮腫については原因がはっきりとは分からない。

本研究では SDT ラット網膜における AGEs、VEGF の蓄積を明らかにした。各 AGEs、VEGF の染色の様子は GFAP とは違い面積を計りにくいという特徴がある。その理由として、GFAP はグリア系細胞(網膜においては大部分が Müller 細胞と考えられる)の増殖にそって増えていくのに対し、AGE や VEGF は網膜に広く拡散され分布するという特徴があるためと思われた。それ故に統計解析という手法を用いる際には染色の強さを検者が判断し、分類せざるを得ず、ある程度の主観が発生してしまうという難点がある。しかしながら、本研究で観察した限り、VEGF、CML は正常 SD ラットに比べ SDT ラットで有意に強く染色されている結果であった。

現在のところ VEGF は最も糖尿病網膜症に影響があるサイトカインと考えられている[45]。VEGF は当初血管透過性因子と考えられていたが、やがてその強力な血管内皮細胞増殖因子としての側面が明らかになった[46]。VEGF と糖尿病網膜症との関連についてはこれまで様々な報告がある。Mitamura らは増殖糖尿病網膜症患者の硝子体液中 VEGF 濃度は上昇しており、病気の活動性と相関があったと報告している[47]。さらに増殖糖尿病網膜症患者の網膜前膜には VEGF とそのレセプターが局在していたという報告もある[48-50]。

本研究では SDT ラット網膜において pentosidine は強く発現してはいなかった。過去の報告では pentosidine は糖尿病網膜症よりも腎症において強く関係しているとの報告があり[28,51]、本研究結果はそれを支持する結果であった。Aso らは糖尿病患者の尿中 pentosidine 濃度を測定したところ、アルブミン尿を合併している患者ではアルブミン尿を合併していない患者に比べ有意に増加していたと報告した[52]。この論文では尿中 pyrrole は進行した腎症患者の尿中ではむしろ有意に低下していたと報告している。一方、前年の平均 HbA1c 値と尿中 pyrrole は有意に正の相関関係にあり、一方尿中 pentosidine とはそのような関係を認めなかったと報告している。高血糖状態が続くと体内で pyrrole は増加すると考えられるが、本研究では SDT ラット網膜に pyrrole は増加していなかった。pyrrole と糖尿病網膜症との関連は少ないと考えられる。一方で正常 SD ラット網膜において pyrrole、CML もいくぶんか染色されており、例え糖尿病がなくても加齢現象により AGEs の網膜への沈着は起こり得ると考えられる。本研究においても SDT ラット網膜には CML が強く染色されており、糖尿病網膜症と CML の関連性は強く示唆された。

Aminoguanidine により SDT ラット網膜における CML 染色は抑制されていた。Aminoguanidine は AGE 合成を阻害することで網膜症に最も影響のある

CMLの網膜への沈着を抑え、糖尿病網膜症を抑制することが示唆された。

GFAPはastrocyteにおけるglial filamentの主要な構成要素である[53]。特に中枢神経においては外傷や種々の疾患により障害を受けると、astrocyteが活性化し、GFAPが急速に合成されることが報告されている。この1連の過程はastrogliosisと呼ばれている[54]。GFAPは眼疾患において眼局所で増加することが報告されている。Yangらは緑内障モデルラットにおける視神経でGFAPが増加することを報告した[55]。Rungger-Brändleらは糖尿病モデルラットの網膜においてMüller細胞とmicrogliaの密度が上昇し、Müller細胞からのGFAPの発現が亢進していることを報告した[56]。このように神経膠細胞やGFAPの発現は糖尿病網膜症の進展に関係していると考えられる。

AungらはOptoMotrysystem(Cerebral-Mechanics, Lethbridge, AB, Canada)を使用し、STZ誘発糖尿病ラットのコントラスト感度や視力、網膜電図を調べたところ、糖尿病による網膜血管変化が出現する前に既に異常を認めた[57]。特に網膜電図では律動用小波(OPs)の潜時の延長を認めた。OPsが網膜のどの部分から由来するののかについてはいくつかの報告がある。BrindleyはOPsの振幅はINLで最も大きいと報告した[58]。Ogdenは鳩、鶏、猿においてOPsの振幅を計測したところ、内網状層で最も大きいと報告した[59,60]。本研究においてはSDTラットの網膜ではILMからINLまで強くGFAPが染色されており、Ranirestat (1.0mg/kg/day, 10mg/kg/day)によりGFAP染色は抑制されていた。過去のOPsに関する報告と合わせて考えると、糖尿病の神経障害は網膜の内層から始まる可能性が示唆された。ただし、本研究ではGFAPは網膜浮腫が出現してから発現しており、Ranirestatは網膜浮腫を抑制することでGFAPの発現を抑制するのではないかと考えられる。

Epalrestat治療SDTラットの網膜では、無治療SDTラットに比べ、網膜厚とGFAP染色面積は減少していたものの、有意差は認めなかった。本研究では実験動物の数が限られており、EpalrestatがSDTラットの糖尿病網膜症に有効なのか否かは明らかにできなかった。Ranirestat (1.0 mg/kg/day)治療SDTラットとRanirestat (10 mg/kg/day)治療SDTラットとの間で明確な容量・反応関係は得られなかった。この結果も実験動物の数の少なさが原因である可能性があるが、容量・反応関係を詳しく調べるためにはもう少し実験動物の数を増やす必要があるかもしれない。しかし、本研究ではRanirestatのSDTラット網膜における神経保護効果が示唆されたと考えられる。RanirestatはSDTラットにおける網膜浮腫を抑制し、網膜における神経保護効果があることが示唆されたが、一方で血糖コントロールやSDTラットの体重変化には影響を与えなかった。これはRanirestatが血糖コントロールとは独立して糖尿病網膜症を抑制することを示唆している。

糖尿病発症前の SDT ラットと正常 SD ラットは体重がほぼ同じである。しかし、正常 SD ラットがそれ以降大きくなるのに対し、SDT ラットは体重がほぼ同じかむしろ若干減少する傾向にあった。しかも、Figure 5 に示した通り毛並みも悪化しており、正常 SD ラットと同じ週齢数とは思えない印象であった。このような体の変化もヒト糖尿病患者と類似している印象である。

本研究においては SDT ラットにおいて Ranirestat が網膜浮腫を抑制し、Aminoguanidine が蛍光造影眼底検査において視神経乳頭からの造影剤蛍光漏出を抑制していた。網膜浮腫や視神経乳頭周囲血管からの造影剤漏出は SDT ラットの眼内で蓄積された VEGF によって引き起こされていると考えられるので Ranirestat、Aminoguanidine とともに最終的には眼内における VEGF 産生を抑制するのではないかと考えられる。

糖尿病網膜症を発症していない段階で糖尿病を発見し、その後厳格な血糖コントロールを行うことが糖尿病網膜症を抑制するためには理想的である。しかし、糖尿病発見時にすでに網膜症が進行している場合はどうであろうか。Diabetes controle and complications trial (DCCT)[5]と Kumamoto Study[6]の報告では血糖コントロール開始時に網膜症がない場合厳格な血糖コントロールを行うことで網膜症進展のリスクを 76%低下させることができたと報告している。一方、血糖コントロール開始時にすでに網膜症がある場合では DCCT[5]で 54%、Kumamoto Study[6]で 56%のリスク低下にとどまった。血糖コントロール開始時に網膜症がある場合にはその後の血糖コントロールが良好だからといって、必ずしも安心できない面がある。故に、将来血糖コントロールと独立した網膜症抑制薬が使用されるならば、必ずしも血糖コントロール不良例のみならず、血糖コントロール開始時にすでに網膜症を合併している症例にも使用されるべきである。本研究で Ranirestat、Aminoguanidine はその可能性を示した。

Ranirestat、Aminoguanidine とともに現在のところ糖尿病合併症抑制薬としては臨床応用されていないが、Ranirestat は臨床試験の段階では安全性に問題はなかったと報告されており[34]、今後糖尿病性神経障害に対して適応になれば網膜症の進行予防に期待が持てる。一方 Aminoguanidine は臨床試験の段階で糸球体腎炎が報告されており[38]、もう少し安全性の高い AGE 合成阻害薬の誕生が望まれる。しかしながら、本研究から AGE 合成阻害薬の糖尿病網膜症抑制に対する有効性が示唆された。

Probucol は胆汁酸の肝臓から十二指腸への排泄を促進することで血中コレステロール値を下げる働きがあり、高脂血症治療薬として利用されている。同時に超酸化物不均化酵素(superoxide dismutase : SOD)などの抗酸化酵素を増加させ、脂質過酸化マーカーである malondialdehyde (MDA)を低下させるなど抗酸化作用を有していることが報告されている[61-63]。本研究では Probucol が SDT ラ

ットにおいて糖尿病性白内障、糖尿病網膜症に対し抑制効果に乏しいことが示唆された。糖尿病合併症発症機序には酸化ストレスの増大が重要であるが、Probucol による抗酸化作用のみでは糖尿病眼合併症を抑制することは不可能であると考えられる。

Probucol 治療 SDT ラットの水晶体囊下には CML の染色が確認された。Probucol 治療 SDT ラットでは全例成熟白内障が確認されており、CML と糖尿病性白内障との関連が示唆された。一方 Aminoguanidine 治療 SDT ラットでは全例白内障は抑制されていた。Aminoguanidine 治療 SDT ラットの水晶体には CML は染色されておらず、Aminoguanidine は CML の水晶体への沈着を抑えることで、白内障発症を抑制したと考えられる。糖尿病患者では白内障が進行することが報告されている[64]が、その機序として水晶体蛋白質の糖化が関与しているとの報告がある[65]。実際にヒトの白内障をきたした水晶体には pentosidine、CML、imidazolone が増加していたとの報告がある[66]が、水晶体での AGE 形成が糖尿病性白内障に大きく影響していると考えられる。

本研究では Ranirestat の白内障抑制効果は検討していないが、我々のグループが行った研究では Ranirestat が SDT ラットにおいて糖尿病性白内障発生を抑制したことを報告している[35]。その機序としては Polyol 代謝経路を抑制することで、細胞内のフルクトース形成を抑制し、結果として AGEs の形成を阻害するのではないかと推測する。

ビタミン B<sub>6</sub> は様々な食品の中に含まれている栄養素であり、Pyridoxamine はビタミン B<sub>6</sub> の 1 つである。SDT ラットを使用した本研究で Pyridoxamine は糖尿病性白内障、糖尿病網膜症に対する抑制効果を示さなかった。前述した通り、Pyridoxamine には AGE 合成阻害薬としての効果[39]や STZ 誘発糖尿病ラットにおける糖尿病網膜症抑制効果[40]が報告されているが、ヒト糖尿病眼合併症に類似した重症眼合併症を呈する SDT ラットにおいて、効果はあまり認めないと言わざるを得ない。

本研究では糖尿病網膜症抑制効果を調べるために①網膜厚の測定、②造影剤の視神経乳頭周囲からの漏出の確認という 2 つの方法を用いた。②の方法は網膜を眼球から剥がし、フラットマウントを作成せねばならず技術的にある程度の習熟を要する。また造影剤の漏出の程度は最終的には検者の印象によって評価されるため、客観性という点でやや難点がある。一方網膜厚の測定は数値で示せるためより評価がしやすいと考えられる。しかし、本研究で行った網膜厚測定は視神経乳頭から一定距離で検討を行ったが、視神経乳頭からの方向性の検討は行っていない。ラットの網膜には黄斑部がなく、視神経乳頭から血管が放射線状に均一に広がっているために、視神経乳頭からの方向により網膜厚に差が生じるとは考えにくいですが、今後更なる検討が必要と考える。本研究では SDT

ラットの糖尿病網膜症について検討を行ったが、糖尿病性ぶどう膜炎については検討を行っていない。SDT ラットは非肥満型糖尿病モデルであるが、肥満型糖尿病モデルである *Spontaneously Diabetic Torii Fatty Rat* において虹彩、毛様体、脈絡膜を含むぶどう膜全体に炎症性細胞(好中球、リンパ球、マクロファージ)を確認したという報告[67]があり、SDT ラットにおいてもそのような炎症所見が認められる可能性がある。今後は炎症という観点からも SDT ラットを使って調べていく必要があると考える。

このように SDT ラットでは、糖尿病眼合併症が顕著に出現するため、新しい治療法の研究には理想的なモデル動物である。特に本研究で示した網膜浮腫、脈絡膜浮腫の特性を利用して糖尿病網膜症、脈絡膜症のモデル動物としてさらに利用しやすいものになったと考える。今後この SDT ラットが糖尿病網膜症に対する新しい治療法の開発に様々な施設で利用されることを期待する。



## 5 おわりに

糖尿病患者は今後も増加することが予想される。眼科医としては糖尿病による視力障害を防ぐことが重要な任務であるが、外科的な治療(網膜光凝固術、硝子体手術)のみでは十分とは言えない。治療の選択肢として、薬剤による網膜症の発症予防と進展抑制が望まれるところである。特に血糖コントロールとは独立した治療薬が望まれる。本研究ではアルドース還元酵素阻害薬 **Ranirestat**、AGE 阻害薬 **Aminoguanidine** の糖尿病網膜症抑制効果を糖尿病網膜症動物モデルの **SDT** ラットで明らかにしたが、本研究が今後の糖尿病網膜症治療の一助とさせていただければ幸いである。今後さらなる糖尿病網膜症治療薬の開発が期待されるが、その開発、研究には適切なモデル動物が必要になってくる。本研究で紹介した **SDT** ラットの糖尿病網膜症は治療効果の判定には非常に有用である。特に糖尿病網膜浮腫の特徴を生かし、網膜厚を測定することで治療効果を定量化し、より効果的に比較検討することが可能である。さらに本研究では糖尿病網膜症と脈絡膜厚との関係についても検討を行った。ヒトの糖尿病患者のみでは正確に判定しづらい情報も **SDT** ラットから得られる可能性があり、糖尿病網膜症の病態解明にも有用である可能性が示唆された。今後は糖尿病網膜症とその治療法の研究のために多くの施設でこの **SDT** ラットを使用していただきたいと考えている。

## 6 引用文献

- 1 中江公裕、増田寛次郎、石橋達朗：日本人の視覚障害の原因 15年前との比較： *医学のあゆみ* 225 巻 page 691-6、2008.
- 2 高橋寛二、石橋達朗、小椋祐一郎、湯澤美都子：加齢黄斑変性の分類と診断基準： *日本眼科学会雑誌* 112 巻 12 号 page 1076-1084、2008.
- 3 Kawashima H, Fujishiro T, Obata R, Mayama C, Ishii K, Kojima T: Statistical analyses of ocular inflammatory diseases at Saitama Red Cross Hospital (2003-2007). *Japanese Journal of Ophthalmology*;54:96-97, 2010.
- 4 Uk prospective diabetes study (ukpds) group: Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (ukpds 33). *Lancet*;352:837-853,1998.
- 5 Diabetes control and complications trial research group: Progression of retinopathy with intensive versus conventional treatment in the diabetes control and complications trial. *Ophthalmology*;102:647-661,1995.
- 6 Ohkubo Y, Kishikawa H, Araki E, Miyata T, Isami S, Motoyoshi S, Kojima Y, Furuyoshi N, Shichiri M: Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: A randomized prospective 6-year study. *Diabetes Res Clin Pract*;28:103-117,1995.
- 7 Early treatment diabetic retinopathy study research group: Early photocoagulation for diabetic retinopathy. Etdrs report number 9. *Ophthalmology*;98:766-785,1991.
- 8 The diabetic retinopathy vitrectomy study research group: Early vitrectomy for severe vitreous hemorrhage in diabetic retinopathy. Two-year results of a randomized trial. Diabetic retinopathy vitrectomy study report 2. *Arch Ophthalmol*;103:1644-1652,1985.
- 9 Early treatment diabetic retinopathy study research group: Photocoagulation for diabetic macular edema. Early treatment diabetic retinopathy study report number 1. *Arch Ophthalmol*;103:1796-1806,1985.
- 10 Stolba U, Binder S, Gruber D, Krebs I, Aggermann T, Neumaier B: Vitrectomy for persistent diffuse diabetic macular edema. *Am J Ophthalmol*;140:295-301,2005.
- 11 Schmidt-Erfurth U, Lang GE, Holz FG, Schlingemann RO, Lanzetta P, Massin P, Gerstner O, Bouazza AS, Shen H, Osborne A, Mitchell P, Group

- RES: Three-year outcomes of individualized ranibizumab treatment in patients with diabetic macular edema: The restore extension study. *Ophthalmology*;121:1045-1053,2014.
- 12 Énzsöly A, Szabó A, Kántor O, Dávid C, Szalay P, Szabó K, Szél Á, Németh J, Lukáts Á: Pathologic alterations of the outer retina in streptozotocin-induced diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*;55:3686-3699,2014.
- 13 Komeda K, Noda M, Terao K, Kuzuya N, Kanazawa M, Kanazawa Y: Establishment of two substrains, diabetes-prone and non-diabetic, from long-evans tokushima lean (*letl*) rats. *Endocr J*;45:737-744,1998.
- 14 Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saitoh Y, Kurosumi M, Natori T: New inbred strain of long-evans tokushima lean rats with iddm without lymphopenia. *Diabetes*;40:1375-1381,1991.
- 15 Yang JH, Kwak HW, Kim TG, Han J, Moon SW, Yu SY: Retinal neurodegeneration in type ii diabetic otsuka long-evans tokushima fatty rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*;54:3844-3851,2013.
- 16 Shinohara M, Masuyama T, Shoda T, Takahashi T, Katsuda Y, Komeda K, Kuroki M, Kakehashi A, Kanazawa Y: A new spontaneously diabetic non-obese torii rat strain with severe ocular complications. *Int J Exp Diabetes Res*;1:89-100,2000.
- 17 Unsal E, Eltutar K, Zirtiloğlu S, Dinçer N, Ozdoğan Erkul S, Güngel H: Choroidal thickness in patients with diabetic retinopathy. *Clin Ophthalmol*;8:637-642,2014.
- 18 Kim JT, Lee DH, Joe SG, Kim JG, Yoon YH: Changes in choroidal thickness in relation to the severity of retinopathy and macular edema in type 2 diabetic patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci*;54:3378-3384,2013.
- 19 Gabbay KH: The sorbitol pathway and the complications of diabetes. *N Engl J Med*;288:831-836,1973.
- 20 Liang HR, Takagaki T, Foltz RL, Bennett P: Quantitative determination of endogenous sorbitol and fructose in human erythrocytes by atmospheric-pressure chemical ionization lc tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*;824:36-44,2005.
- 21 Jennings PE, McLaren M, Scott NA, Saniabadi AR, Belch JJ: The relationship of oxidative stress to thrombotic tendency in type 1 diabetic patients with retinopathy. *Diabet Med*;8:860-865,1991.
- 22 Schröder S, Palinski W, Schmid-Schönbein GW: Activated monocytes and granulocytes, capillary nonperfusion, and neovascularization in diabetic

- retinopathy. *Am J Pathol*;139:81-100,1991.
- 23 Chibber R, Molinatti PA, Rosatto N, Lambourne B, Kohner EM: Toxic action of advanced glycation end products on cultured retinal capillary pericytes and endothelial cells: Relevance to diabetic retinopathy. *Diabetologia*;40:156-164,1997.
- 24 山岸昌一：糖尿病と酸化ストレス. 株式会社メディカルビュー社、2011.
- 25 Greene DA, Lattimer SA, Sima AA: Sorbitol, phosphoinositides, and sodium-potassium-atpase in the pathogenesis of diabetic complications. *N Engl J Med*;316:599-606,1987.
- 26 Kern TS, Engerman RL: Distribution of aldose reductase in ocular tissues. *Exp Eye Res*;33:175-182,1981.
- 27 Boehm BO, Schilling S, Rosinger S, Lang GE, Lang GK, Kientsch-Engel R, Stahl P: Elevated serum levels of n(epsilon)-carboxymethyl-lysine, an advanced glycation end product, are associated with proliferative diabetic retinopathy and macular oedema. *Diabetologia*;47:1376-1379,2004.
- 28 Hirata K, Kubo K: Relationship between blood levels of n-carboxymethyl-lysine and pentosidine and the severity of microangiopathy in type 2 diabetes. *Endocr J*;51:537-544,2004.
- 29 Hammes HP, Brownlee M, Lin J, Schleicher E, Bretzel RG: Diabetic retinopathy risk correlates with intracellular concentrations of the glycooxidation product n(epsilon)-(carboxymethyl) lysine independently of glycohaemoglobin concentrations. *Diabetologia*;42:603-607,1999.
- 30 Hammes HP, Alt A, Niwa T, Clausen JT, Bretzel RG, Brownlee M, Schleicher ED: Differential accumulation of advanced glycation end products in the course of diabetic retinopathy. *Diabetologia*;42:728-736,1999.
- 31 Robison WG, Kador PF, Kinoshita JH: Retinal capillaries: Basement membrane thickening by galactosemia prevented with aldose reductase inhibitor. *Science*;221:1177-1179,1983.
- 32 A randomized trial of sorbinil, an aldose reductase inhibitor, in diabetic retinopathy. Sorbinil retinopathy trial research group. *Arch Ophthalmol*;108:1234-1244,1990.
- 33 Negoro T, Murata M, Ueda S, Fujitani B, Ono Y, Kuromiya A, Komiya M, Suzuki K, Matsumoto J: Novel, highly potent aldose reductase inhibitors: (r)-(-)-2-(4-bromo-2-fluorobenzyl)-1,2,3,4- tetrahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine -4-spiro-3'-pyrrolidine-1,2',3,5'-tetrone (as-3201) and its congeners. *J Med Chem*;41:4118-4129,1998.

- 34 Polydefkis M, Arezzo J, Nash M, Bril V, Shaibani A, Gordon RJ, Bradshaw KL, Junor RW: Safety and efficacy of ranirestat in patients with mild-to-moderate diabetic sensorimotor polyneuropathy. *J Peripher Nerv Syst* ; 20:363-371,2015.
- 35 Ota A, Kakehashi A, Toyoda F, Kinoshita N, Shinmura M, Takano H, Obata H, Matsumoto T, Tsuji J, Dobashi Y, Fujimoto WY, Kawakami M, Kanazawa Y: Effects of long-term treatment with ranirestat, a potent aldose reductase inhibitor, on diabetic cataract and neuropathy in spontaneously diabetic torii rats. *Journal of Diabetes Research*; vol 2013, Article ID 175901, 8 Pages,2013.
- 36 Brownlee M, Vlassara H, Cerami A: Nonenzymatic glycosylation products on collagen covalently trap low-density lipoprotein. *Diabetes*;34:938-941, 1985.
- 37 Yagihashi S, Kamiyo M, Baba M, Yagihashi N, Nagai K: Effect of aminoguanidine on functional and structural abnormalities in peripheral nerve of stz-induced diabetic rats. *Diabetes*;41:47-52,1992.
- 38 Bolton WK, Cattran DC, Williams ME, Adler SG, Appel GB, Cartwright K, Foiles PG, Freedman BI, Raskin P, Ratner RE, Spinowitz BS, Whittier FC, Wuerth JP, Group AII: Randomized trial of an inhibitor of formation of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *Am J Nephrol*;24:32-40,2004.
- 39 Voziyan PA, Metz TO, Baynes JW, Hudson BG: A post-amadori inhibitor pyridoxamine also inhibits chemical modification of proteins by scavenging carbonyl intermediates of carbohydrate and lipid degradation. *J Biol Chem*;277:3397-3403,2002.
- 40 Stitt A, Gardiner TA, Alderson NL, Canning P, Frizzell N, Duffy N, Boyle C, Januszewski AS, Chachich M, Baynes JW, Thorpe SR, Anderson NL: The age inhibitor pyridoxamine inhibits development of retinopathy in experimental diabetes. *Diabetes*;51:2826-2832,2002.
- 41 Toyoda F, Tanaka Y, Shimmura M, Kinoshita N, Takano H, Kakehashi A: Diabetic Retinal and Choroidal Edema in SDT Rats. *Journal of Diabetes Research*; vol 2016, Article ID 2345141,6 pages,2015.
- 42 Toyoda F, Kakehashi A, Hashimoto K, Kinoshita N, Kambara C, Yamagami H, Tamemoto H, Ishikawa S, Dobashi Y, Mawakami M, Kanazawa Y: Accumulation of AGEs and VEGF in Eyes of SDT Rats. *The Open Diabetes Journal*;4:41-44,2011.

- 43 Toyoda F, Kakehashi A, Ota A, Kinoshita N, Kambara C, Yamagami H, Tamemoto H, Ueba H, Dobashi Y, Ishikawa S, Kawakami M, Kanazawa Y: Prevention of Proliferative Diabetic Retinopathy and Cataract in SDT Rats with Aminoguanidine, an Anti-Advanced Glycation End Product Agent. *The Open Diabetes Journal*;4:108-113,2011.
- 44 Toyoda F, Tanaka Y, Ota A, Shimmura M, Kinoshita N, Takano H, Matsumoto T, Tsuji J, Kakehashi A: Effect of Ranirestat, a New Aldose Reductase Inhibitor, on Diabetic Retinopathy in SDT Rats. *Journal of Diabetes Research*; vol 2014, Article ID 672590,7 pages,2014.
- 45 Mitamura Y, Harada C, Harada T: Role of cytokines and trophic factors in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev*;1:73-81,2005
- 46 Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N: Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to flt-1 but not to flk-1/kdr. *J Biol Chem*;269:25646-25654,1994.
- 47 Mitamura Y, Tashimo A, Nakamura Y, Tagawa H, Ohtsuka K, Mizue Y, Nishihira J: Vitreous levels of placenta growth factor and vascular endothelial growth factor in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Care*;25:2352,2002.
- 48 Ishida S, Shinoda K, Kawashima S, Oguchi Y, Okada Y, Ikeda E: Coexpression of vegf receptors vegf-r2 and neuropilin-1 in proliferative diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*;41:1649-1656,2000.
- 49 Armstrong D, Augustin AJ, Spengler R, Al-Jada A, Nickola T, Grus F, Koch F: Detection of vascular endothelial growth factor and tumor necrosis factor alpha in epiretinal membranes of proliferative diabetic retinopathy, proliferative vitrectomy and macular pucker. *Ophthalmologica*;212:410-414, 1998.
- 50 Chen YS, Hackett SF, Schoenfeld CL, Viores MA, Viores SA, Campochiaro PA: Localisation of vascular endothelial growth factor and its receptors to cells of vascular and avascular epiretinal membranes. *Br J Ophthalmol*;81:919-926,1997.
- 51 Tomé CC, De Rojas Silva MV, Rodríguez-García J, Rodríguez-Segade S, Sánchez-Salorio M: Levels of pentosidine in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy, proliferative vitreoretinopathy and retinal detachment. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*;243:1272-1276,2005.
- 52 Aso Y, Takanashi K, Sekine K, Yoshida N, Takebayashi K, Yoshihara K,

- Inukai T: Dissociation between urinary pyrroline and pentosidine concentrations in diabetic patients with advanced nephropathy. *J Lab Clin Med*;144:92-99,2004.
- 53 Jacque C, Baumann N: [neurochemical data concerning glial tumors. Contribution of the estimation of the g.F.A. Protein to the diagnosis and prognosis of gliomas (author's transl)]. *Neurochirurgie*;27:255-256,1981.
- 54 Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL: Glial fibrillary acidic protein: Gfap-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res*;25:1439-1451,2000.
- 55 Yang MH, Dibas A, Tyan YC: Changes in retinal aquaporin-9 (aqp9) expression in glaucoma. *Biosci Rep*;33,2013.
- 56 Rungger-Brändle E, Dosso AA, Leuenberger PM: Glial reactivity, an early feature of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*;41:1971-1980,2000.
- 57 Aung MH, Kim MK, Olson DE, Thule PM, Pardue MT: Early visual deficits in streptozotocin-induced diabetic long evans rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*;54:1370-1377,2013.
- 58 BRINDLEY GS: Responses to illumination recorded by microelectrodes from the frog's retina. *J Physiol*;134:360-384,1956.
- 59 Ogden TE, Ito H: Avian retina. Ii. An evaluation of retinal electrical anisotropy. *J Neurophysiol*;34:367-373,1971.
- 60 Ogden TE: The oscillatory waves of the primate electroretinogram. *Vision Res*;13:1059-1074,1973.
- 61 Li T, Danelisen I, Belló-Klein A, Singal PK: Effects of probucol on changes of antioxidant enzymes in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Cardiovasc Res*;46:523-530,2000.
- 62 Kuzuya M, Kuzuya F: Probucol as an antioxidant and antiatherogenic drug. *Free Radic Biol Med*;14:67-77,1993.
- 63 Siveski-Iliskovic N, Kaul N, Singal PK: Probucol promotes endogenous antioxidants and provides protection against adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Circulation*;89:2829-2835,1994.
- 64 Harding JJ, Egerton M, van Heyningen R, Harding RS: Diabetes, glaucoma, sex, and cataract: Analysis of combined data from two case control studies. *Br J Ophthalmol*;77:2-6,1993.
- 65 Beswick HT, Harding JJ: Conformational changes induced in lens alpha- and gamma-crystallins by modification with glucose 6-phosphate. Implications for cataract. *Biochem J*;246:761-769,1987.
- 66 Franke S, Dawczynski J, Strobel J, Niwa T, Stahl P, Stein G: Increased

levels of advanced glycation end products in human cataractous lenses. *J Cataract Refract Surg*;29:998-1004,2003.

67 Kemmochi Y, Miyajima K, Ohta T, Sasase T, Yasui Y, Toyoda K, Kakimoto K, Shoda T, Kakehashi A: Ocular inflammation in uveal tract in aged obese type 2 diabetic rats (spontaneously diabetic torii fatty rats). *Journal of Diabetes Research*; vol 2014, Article ID 629016, 5 pages, 2014.