

表 題 糖尿病網膜症モデル動物の開発とその定量評価方法の検討

論文の区分 論文博士

著 者 名 田中 克明

所 属 自治医科大学附属さいたま医療センター  
総合医学第2 眼科

2020年4月15日申請の学位論文

紹介教員 地域医療学系 専攻 皮膚・感覚器疾患学眼科  
職名・氏名 教授 梯 彰弘

## 目次

1 はじめに	1 頁
2 目的と方法	14 頁
3 結果	20 頁
4 考察	45 頁
5 おわりに	49 頁
6 引用文献	50 頁

## 1 はじめに

糖尿病患者は、世界中のあらゆる地域において増加傾向にあり、国際糖尿病連合(International Diabetes Federation: IDF)によると、2015年で成人に11人に一人が糖尿病患者であると推計されている。[1]

日本国内においても同様で、2018年度調査では、糖尿病が強く疑われる患者の割合は男性18.7%、女性9.3%であった。[2]

本邦で1988年度の疫学調査結果では視覚障害の原因疾患第1位は糖尿病網膜症(18.3%)であった。2位は白内障(15.6%)、3位は緑内障(14.5%)、4位は網膜色素変性(12.2%)、5位は高度近視(10.7%)であった[3]。一方、2015年度～2016年度調査では、視覚障害の原因疾患の第1位は緑内障(28.6%)であった。2位は網膜色素変性(14.0%)、3位は糖尿病網膜症(12.8%)、4位は黄斑変性(8.0%)であった[4]。新規糖尿病薬の開発や眼科治療技術の進歩はめざましく、視覚障害の原因に占める糖尿病網膜症の割合は減少しつつある。しかし糖尿病患者が網膜症を発症する割合は15.0~23.0%[5,6]のため、約150~230万人が網膜症を発症していると推定されており、依然として糖尿病網膜症は日本人の視覚障害の脅威であり続けている。

ここで糖尿病網膜症の進行過程を確認しておく。糖尿病網膜症は突然発症、進展するものではなく、慢性的な高血糖により網膜の微小血管が傷害を受けて徐々に発症、進行する。糖尿病歴が5~10年以上になると網膜症の発症率が増加する。網膜症は初期の単純糖尿病網膜症(軽症~中等症非増殖網膜症)、中期の増殖前糖尿病網膜症(重症非増殖網膜症)、末期の増殖糖尿病網膜症に分類され、最終的には失明に至る。初期段階の単純糖尿病網膜症で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と硬性白斑が認められる(Figure 1)。中期段階の、増殖前糖尿病網膜症では、網膜毛細血管が閉塞して網膜に虚血領域が出現し、網膜出血の増加、軟性白斑、静脈の数珠状拡張や網膜内細小血管異常(Intraretinal Microvascular Abnormality: IRMA)が認められるようになる。この段階で蛍光眼底造影検査を行うと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(Figure 2)。さらに進行すると、Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)などの血管増殖因子が網膜から産生され、これにより網膜新生血管が発生し、さらにその周囲に線維性増殖膜が形成される。線維性増殖膜が発生してから後部硝子体剥離が起これば、硝子体出血や牽引性網膜剥離を起これば、最終的に失明に至る。これが末期段階の増殖糖尿病網膜症である(Figure 3)。また初期から末期に至る全ての病期において出現するのが糖尿病黄斑浮腫である。黄斑部とは網膜の中心部(中心窩)から半径2視神経乳径(3000 $\mu$ m)の領域と定義される[7]、この部位には視細胞

が密に集まり、網膜の中でも視力に最も重要な部位である。したがって、網膜血管の透過性亢進などによって糖尿病黄斑浮腫が生じ、黄斑部が障害を受けると視力低下に至る(Figure 4)。糖尿病黄斑浮腫のみでは失明はしないが、運転免許更新ができなくなるなど、患者の Quality of Life を著しく低下させる。

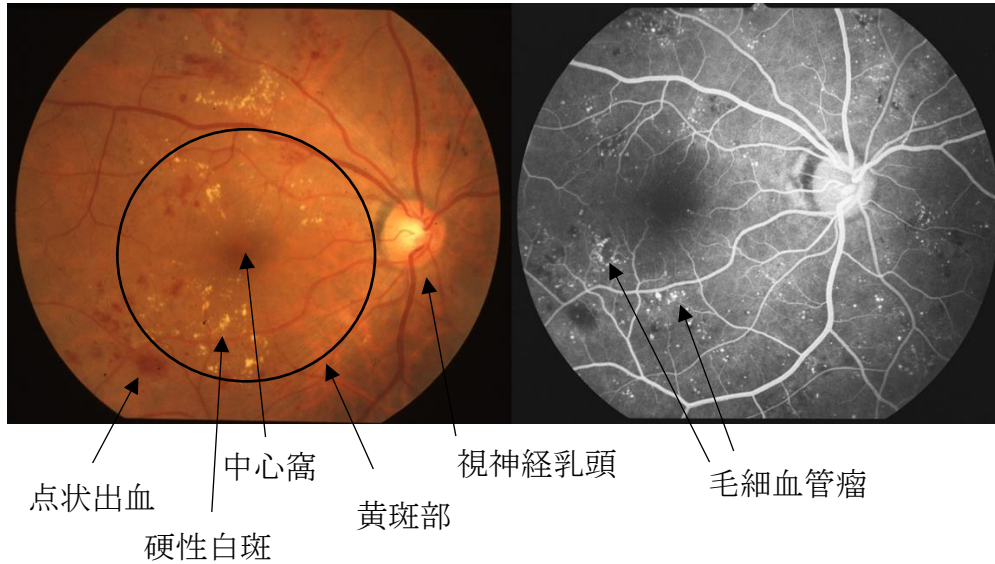
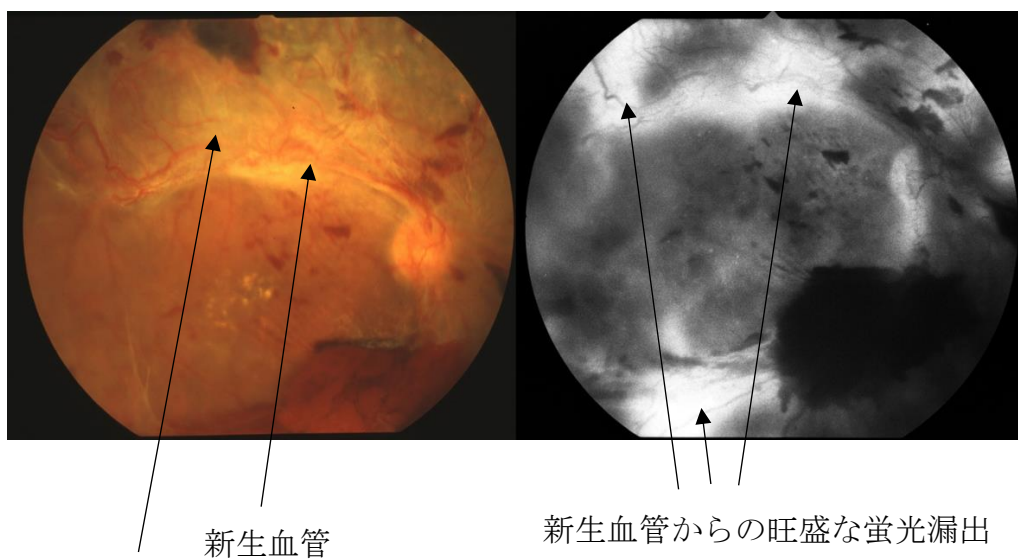


Figure 1. 単純糖尿病網膜症(右眼)。左；眼底写真。中心窩、黄斑部、視神経乳頭、点状出血、硬性白斑を示す。右；蛍光眼底造影写真。毛細血管瘤を示す。

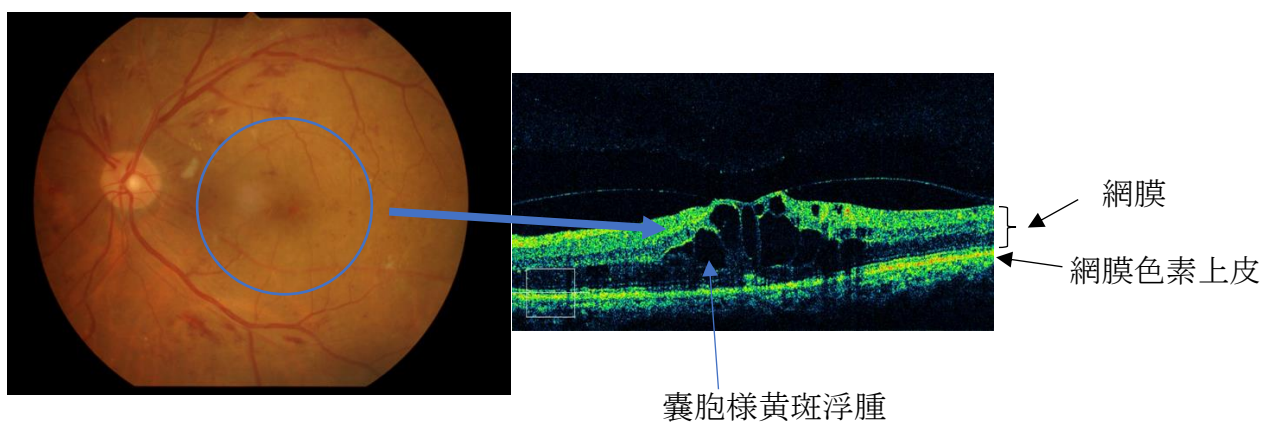


Figure 2. 増殖前糖尿病網膜症(左眼)。左；眼底写真。軟性白斑を示す。右；蛍光眼底造影写真。網膜無血管野を示す。



線維性増殖膜による牽引性網膜剥離

**Figure 3.** 増殖糖尿病網膜症(右眼)。左；眼底写真。新生血管、線維性増殖膜による牽引性網膜剥離を示す。右；蛍光眼底造影写真。新生血管からの旺盛な蛍光漏出を示す。



**Figure 4.** 増殖前糖尿病網膜症に黄斑浮腫を合併した症例(左眼)。左；眼底写真。右；Optical Coherence Tomography (OCT)所見。嚢胞様黄斑浮腫を示す。

現在、臨床において糖尿病網膜症を完治させる治療法はなく、その加療のポイントは、網膜症の発症・進行をいかに予防するかにある。網膜症の最重症段階である増殖性糖尿病網膜症においては網膜光凝固術と硝子体手術がその標準治療である。網膜光凝固術はレーザーにより虚血網膜を熱凝固、すなわち「間引き」することで、新生血管の発生を抑えたり、すでに生じた新生血管を退縮させたりすることができ(Figure 5)、網膜症進展抑止に有用である[8-10]。しかし視力改善が目的ではなく、むしろ光凝固による暗点を感じて視野が狭くなったり、黄斑浮腫が生じて視力が低下したりすることがある。硝子体手術は最後の治療手段として行われ、硝子体出血や線維性増殖膜を除去、新生血管の増殖の足場となる硝子体も切除し、さらに術中、虚血網膜に網膜光凝固を行うことで、新たな新生血管の発生を予防する(Figure 6)。すなわち硝子体手術は、硝子体出血や牽引性網膜剥離などの視力障害の原因となっている病変を除去することを目的としており、進行した増殖網膜症に対する視力維持という点での有用性が確認されている[11,12]。だが、すでに障害された網膜が再生するわけではないので、その視力予後は決して良好とは言えない。また糖尿病黄斑浮腫に対しては、網膜光凝固術[13]、硝子体手術[14]、抗 VEGF 薬硝子体注射[15-20]などの治療が行われるが、その中でも近年、抗 VEGF 薬硝子体注射が標準治療として定着してきている(Figure 7)。特にラニビズマブの有効性は第Ⅱ/Ⅲ相ランダム化比較試験で明らかにされ、網膜光凝固術より視力改善効果が強いことが示されている[16,17]。アフリベルセプトにおいても網膜光凝固術より矯正視力が有意に改善し、視力悪化群ではラニビズマブよりも視力改善効果が強いことが報告されている[19,20]。しかし、実際の臨床においては薬効が切れる数カ月おきに1回10万円を超える高い薬価の抗 VEGF 硝子体注射を生涯打ち続けることになり、患者に大きな経済的負担がかかる上、我が国の限りある医療財政上も大きな問題である。注射の回数が増えれば注射後の眼内炎のリスクも高くなる。また抗 VEGF 薬硝子体注射の効果が得られない症例も当然存在する。このように眼科治療には限界がある。

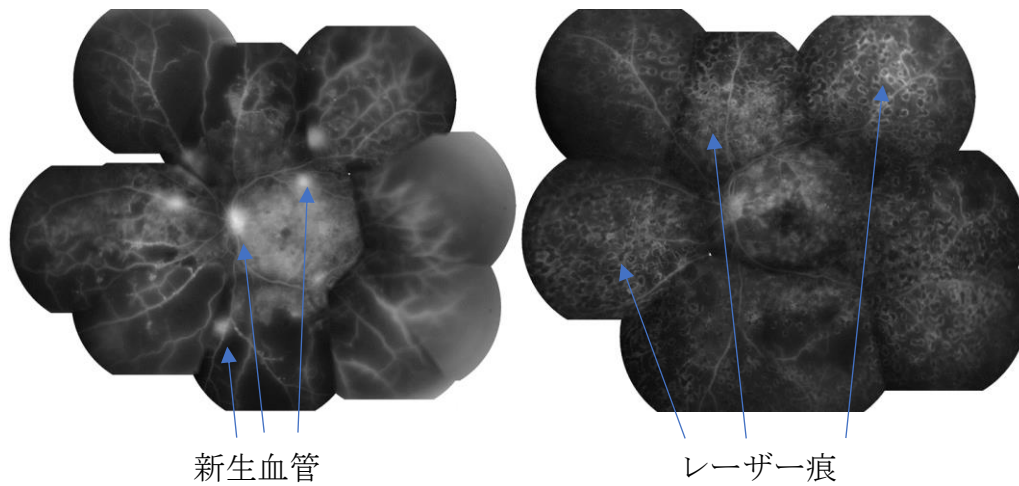


Figure 5. 増殖糖尿病網膜症に対して汎網膜光凝固術を施行した症例(左眼)。左；光凝固前の蛍光眼底造影写真。新生血管を示す。右；光凝固後の蛍光眼底造影写真。レーザー痕を示す。光凝固による新生血管の退縮を認める。

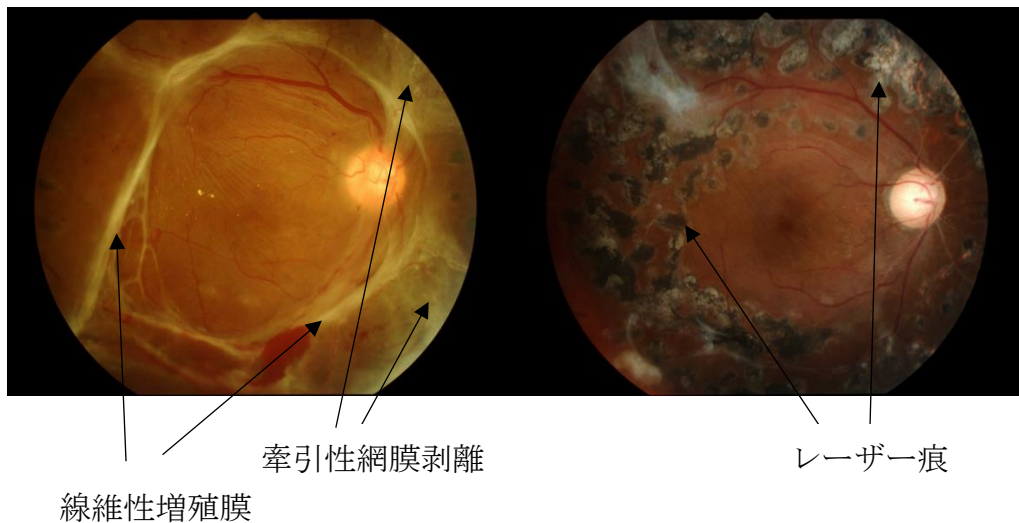


Figure 6. 線維性増殖膜による牽引性網膜剥離を生じた増殖糖尿病網膜症に対して硝子体手術を施行した症例(右眼)。左；硝子体手術前の眼底写真。線維性増殖膜、牽引性網膜剥離を示す。右；硝子体手術後の眼底写真。硝子体手術により増殖膜の除去・光凝固を行い、網膜症の沈静化が得られた。



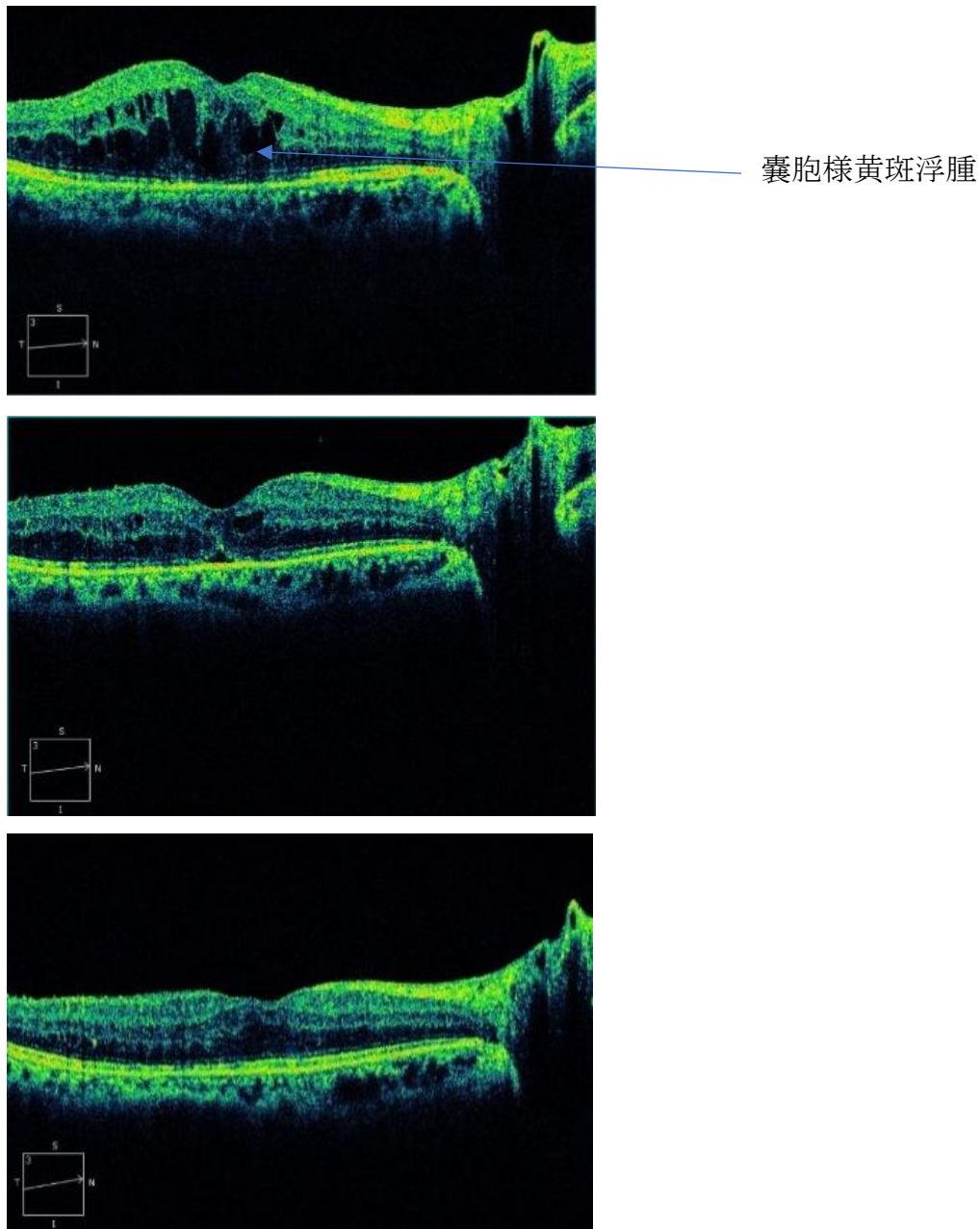


Figure 7. 糖尿病黄斑浮腫に対して抗 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)薬硝子体注射を施行した症例。上；注射前の Optical Coherence Tomography (OCT)所見、視力(0.4)。嚢胞様黄斑浮腫を示す。中；注射 1 回目施行後の OCT 所見、視力(0.6)。下；注射 2 回目施行後の OCT 所見、視力(0.7)。抗 VEGF 薬硝子体注射により黄斑浮腫の改善が得られた。



そこで眼科治療以外に目を向けてみるとやはり大切なのは内科治療である。なかでも、網膜症の発症前段階から網膜症発症後の全てのステージにおいて、その発症・進展の予防に血糖コントロールが最も重要であることは言うまでもない[21-23]。しかし実際には血糖コントロールが難しい症例も多く、全ての患者で理想通りにいかないのが現実である。血糖コントロール以外の内科的治療としては、血圧コントロールが2型糖尿病患者の糖尿病網膜症の発症・進展を抑制するうえで有用とされている [24,25]が、そのメカニズムは不明であり、これまで、どのような系統の降圧薬が最も糖尿病網膜症の抑制効果を有するかについて結論は出ていない。一方、脂質コントロールについても脂質異常症治療薬のひとつであるフェノフィブラートが糖尿病網膜症の進展を阻止する可能性が示唆されている[26,27]が、いまだに糖尿病網膜症の発症・進展との明確な関連性は示されていない。このように血糖コントロールをはじめとする内科治療にも限界がある。結局、糖尿病網膜症の加療は現在のところ、その発症・進行をいかに予防するかがポイントであり、糖尿病及び糖尿病網膜症の早期発見、内科治療、定期的な眼科受診、必要に応じた眼科治療が大切となる。

このような現状に対し、糖尿病網膜症の発症・進展メカニズムの解明が急がれる。メカニズムが解明されれば、それが新規薬剤の開発や、既存の糖尿病薬と降圧薬及び脂質異常症治療薬の有効な組み合わせ方の解明 (**Drug Repositioning**)に結び付き、糖尿病網膜症抑制のために有効かつ新たな戦略になると我々は考えている。だが、糖尿病患者から得られる研究材料には倫理上の大きな制約があり、直接ヒトから得られる情報には限界がある。この問題点の解決に実験モデル動物の存在は必要不可欠で、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てきた[28]。Goto-Kakizaki (GK) ラットは非肥満2型糖尿病モデル動物で糖尿病は軽度である[29,30]。GK ラットは4週齢から網膜電図の異常を示すが[31]、網膜動静脈径には有意差は認めなかった[32]。streptozotocin (STZ)誘発糖尿病ラットにおいては、視細胞及び網膜色素上皮に変性をきたすことが報告されている[33]。この実験で雄のWistar ラットとSprague-Dawley (SD)ラットが用いられた。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認められなかった。Long-Evans Tokushima Learn ラットは1型糖尿病モデル動物として使用されている [34,35]。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、spectral-domain optical

coherence tomography (OCT)を用いた網膜厚の解析を行ったところ、OLETF ラットでは正常 Long-Evans Tokushima Otsuka ラットに比べ網膜が有意に薄くなっており、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[36]。

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、特に網膜の菲薄化は、ヒト糖尿病網膜症では末期の増殖糖尿病網膜症や網膜光凝固術後などに認められる所見である。むしろ、ヒト糖尿病網膜症では初期から末期に至る全ての病期において網膜血管の透過性亢進に伴う網膜浮腫が生じ得るが、これらの糖尿病モデル動物では、網膜肥厚所見を認めなかったため、ヒト糖尿病網膜症とはかけ離れていると言わざるを得なかった。

そのような中で1988年、鳥居薬品株式会社研究所において、日本チャールズリバー由来の正常 Sprague-Dawley (SD)ラットの非近交系群の中から偶然に非肥満、多飲、多食、多尿、尿糖を示す糖尿病ラットが発見された。これらのラットで近交交配を繰り返すことで1997年に新たな自然発症非肥満2型糖尿病系統が確立され、Spontaneously Diabetic Torii(SDT)ラットと命名された(Figure 8)。

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、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が発症したと定義すると、雄SDTラットの場合、20週齢頃から糖尿病の発症が認められ、生後40週齢までの累積発症率は100%であった[37]。また空腹時および随時血糖値は20週齢頃より上昇し、30週齢で700mg/dl以上の値を示していた。SDTラットにおける高血糖の発症はインスリン抵抗性よりもインスリン分泌の減少に強く依存していると考えられている。血中インスリン濃度は糖尿病発症前から正常SDラットに比べて低い傾向にあり、高血糖発症後は著明な低インスリン血症を呈する。耐糖能は臨床的に2型糖尿病では糖尿病の発症前に低下することが知られているが、SDTラットの経口ブドウ糖負荷試験においては、高血糖が顕在化する2ヵ月以上前の14週齢頃から明らかな耐糖能低下がみられ、加齢とともに糖負荷後の血糖曲線の上昇が認められる。雄ラットにおける糖尿病発症前の耐糖能低下の重症度は糖尿病発症週齢と強く相関する[38]。SDTラットの糖尿病発症は遺伝的に規定されており、耐糖能低下に関与する7つの量的形質遺伝子座(GTL)がラットゲノム上にマップされている。中でも第3染色体上に同定された*Dmsdt1*はSDTラットの膵病変を誘発する主要遺伝子座であることが明らかになっている[39-41]。さらに腎障害[42]や末梢神経障害[43]についても報告されている。

眼科領域に関しては、我々の施設を含めたグループから、このSDTラットが重症糖尿病眼合併症を持つことが報告された[37,44-48]。雄SDTラットでは

生後 40 週齢以上ではほぼ 100%の糖尿病性白内障が確認された[37,47] (Figure 9)。また 51~60 週齢の 80%で糖尿病網膜症の発症を認めた[44]。蛍光眼底造影検査では網膜血管の蛇行や狭細化、そして血管の透過性亢進といった所見が認められた[44,46] (Figure 10)。トリプシン消化標本による血管構造の評価では、毛細血管瘤は、ほとんど認められないが、毛細血管の狭小化、周皮細胞の脱落などが認められた[44,45] (Figure 11)。網膜電図では、律動様小波ならびに a 波、b 波の出現時間の遅延が認められた[45]。特に注目すべき点は生後 70 週齢で網膜の視神経乳頭周囲の増殖性変化とそれに伴う牽引性・隆起性変化が確認されたことである[37,46](Figure 12)。ヒト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。ただし、増殖性変化を用いて新規薬剤などの治療効果を判定する場合、検査者の主観で判定せざるを得ず、客観的な評価が難しかった。そこで我々のグループでは SDT ラットにおける定量評価項目の作成を目指し、まず網膜厚に着目した。その結果、SDT ラットは SD ラットよりも網膜が肥厚していることが分かり[48]、ラット糖尿病網膜症の定量評価に網膜厚が有用であると考えられた。そして、これをもとにアルドース還元酵素阻害薬である Ranirestat の SDT ラット網膜肥厚抑制効果を報告した[49]。さらに、SDT ラット糖尿病発症後から sodium glucose cotransporter 2(SGLT2)阻害薬 tofogliflozin (0.005%) の 20 週間混餌投与により、網膜肥厚抑制効果を示したことを報告した[50]。一方、VEGF を内因性かつ特異的に阻害する VEGF 受容体 Flt-1 (sFlt-1) は、血管新生の抑制について注目を集めているが、この sflt-1 を遺伝子導入するアデノ随伴ウイルスベクターを SDT ラットの網膜下に注入し、フルオレセイン血管造影によって評価したところ、網膜無血管野の抑制など有効性が示された [51]。

このように糖尿病網膜症治療法の研究に大変有用と思われる SDT ラットであるが、問題点もあった。雄 SDT ラットの 65 週齢での生存率は 92.9%である[37]が、増殖性変化が現れる始める約 50 週齢以上まで飼育するとなると、実験期間が長くなることや実験コストがかさむ点である。だが、この問題点を解決する新たなモデル動物が登場した。それが今回の研究テーマである SDT fatty ラットである。

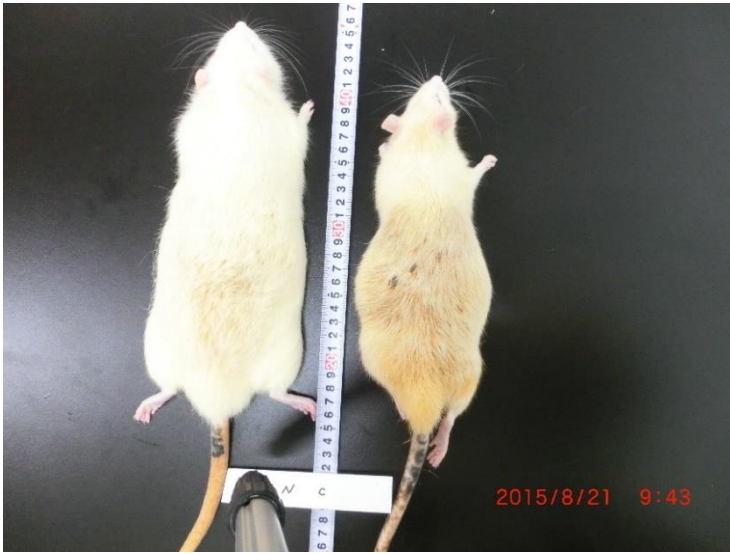


Figure 8. 正常 Sprague-Dawley (SD)ラット(左)と Spontaneously Diabetic Torii (SDT)ラット(右)。どちらのラットも生後 39 週齢だが、SDT ラットは糖尿病発症後 20 週経過している。糖尿発症後体の大きさは徐々に差が生じてくる。

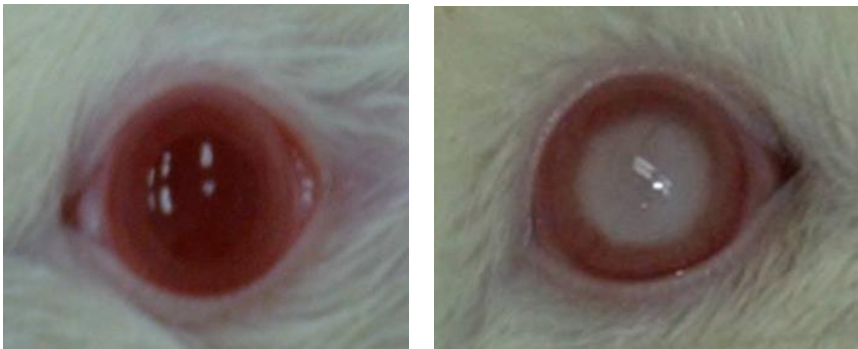


Figure 9. 55 週齢における SD ラット (左) と SDT ラット(右)の前眼部写真。SDT ラットにおいては成熟白内障を認める。水晶体混濁が強く眼底は観察できない。

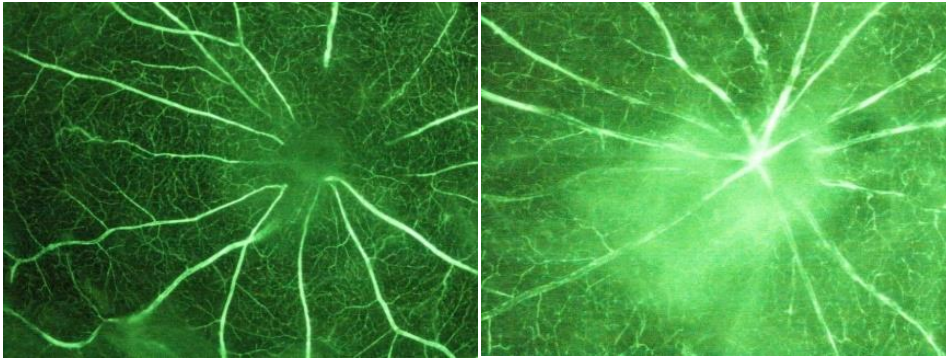
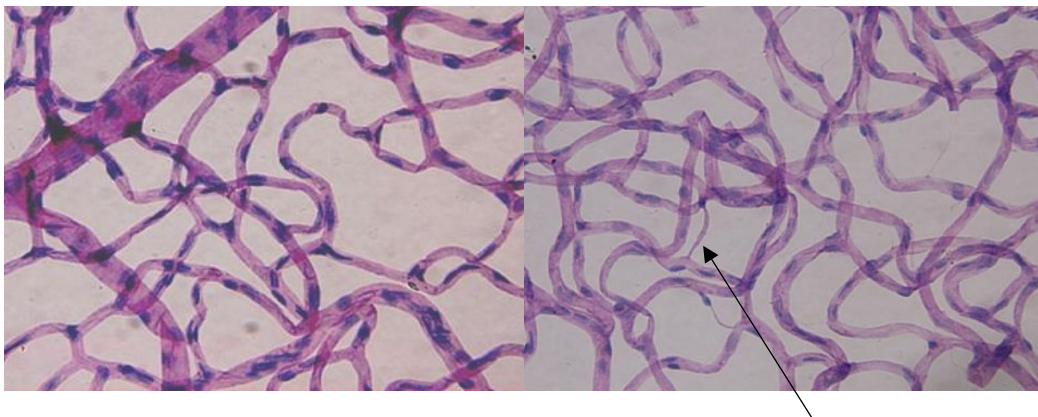
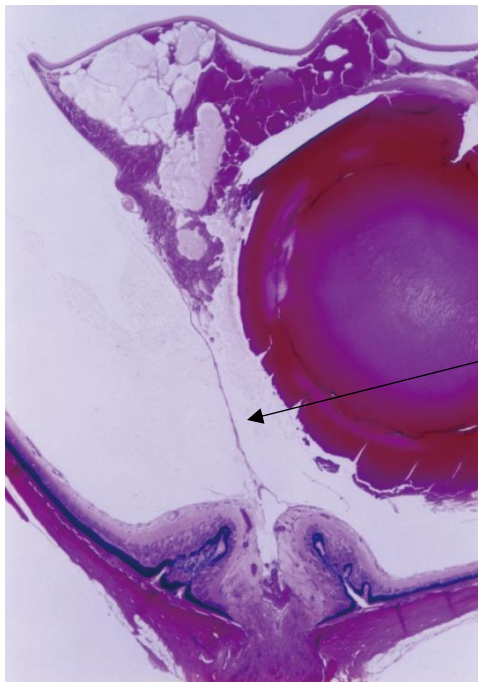


Figure 10. 68 週齢における SD ラット (左) と SDT ラット (右) の蛍光造影眼底写真。SDT ラットにおいて視神経乳頭からの旺盛な造影剤の漏出を認める。



周皮細胞の脱落

Figure 11. 50 週齢における SD ラット (左) と SDT ラット (右) の網膜トリプシン消化標本。SDT ラットにおいて毛細血管の狭小化、周皮細胞の脱落を認める。



線維性増殖膜

Figure 12. SDT ラットにおける増殖糖尿病網膜症。線維性増殖膜とそれに伴う視神経乳頭の牽引性・隆起性変化が認められる。

SDT fatty コンジェニックラットとは、SDT ラットの遺伝的背景に、Zucker fatty ラットの肥満遺伝子であるレプチン受容体変異 (*Lepr<sup>fa</sup>*) を導入した肥満 2 型糖尿病モデルで、2004 年に作成された(Figure 13)。これまでに多くの基礎データの集積が進められている。SDT fatty ラットはレプチン作用の消失により過食に関連した肥満、脂質化、およびインスリン抵抗性を呈し、雄 SDT fatty ラットでは生後 5 週齢から高血糖を認め 8 週齢で約 600mg/dl、16 週齢で 100%糖尿病を発症する。雌 SDT fatty ラットでも 8 週齢から高血糖を示し、32 週齢までに 73%が糖尿病を発症する[52,53]。つまり SDT fatty ラットは SDT ラットよりも早期に糖尿病を発症するのである。雄の SDT fatty ラットは若齢期に高インスリン血症を認めるが、加齢とともに血漿インスリン濃度並びに糖負荷に対するインスリン分泌反応は明らかに低下する。SDT fatty ラットでは血圧上昇を認める[54]。また SDT ラットより合併症（腎障害[53]、末梢神経障害[55]、骨密度低下[56]）が早期化・重篤化することも報告されている。

したがって、SDT ラットでは約 1 年以上の経過で糖尿病網膜症が発症していたが、SDT fatty ラットでは、より早期に発症し、かつ重症化することが予測された。しかし、SDT fatty ラットにおける眼合併症に関する報告はまだ多くない。そこで、今回の研究で我々は、まず SDT fatty ラットに発症する糖尿病網膜症を病理学的に検討し、さらにそれを定量解析・評価することにより、



SDT fatty ラットが SDT ラットよりも有用な糖尿病網膜症モデル動物であることを示す。(実験 1)

SDT fatty ラットに食塩負荷を行うことによって、著しい高血圧と腎障害を生じることが報告されているが[57]、さらに最近になって SDT fatty ラットに片腎摘出と食塩負荷を行ったモデル動物が作成された。食塩負荷に片腎摘出が追加されることにより、より早期にかつ著しい腎障害を生じることが期待される。そこで腎障害が糖尿病網膜症にもたらす影響について検討するために、このモデル動物の糖尿病網膜症について、実験 1 と同様の解析法を用いて評価する。(実験 2)

この論文では、まず実験 1 で SDT fatty ラット糖尿病網膜症の病理学的特徴とその定量解析について紹介したい。次に実験 2 で片腎摘出・0.3%食塩負荷を行った SDT fatty ラットの糖尿病網膜症について紹介したい。

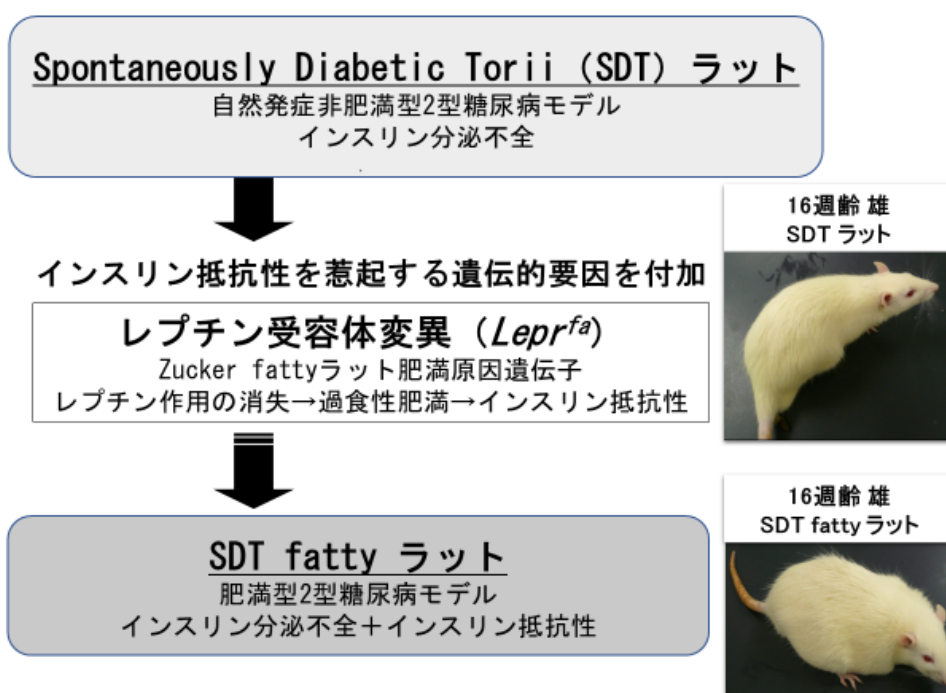


Figure 13. SDT ラットの遺伝的背景に、Zucker fatty ラットの肥満遺伝子であるレプチン受容体変異 (*Lepr<sup>fa</sup>*) を導入した、肥満2型糖尿病モデルである SDT fatty コンジェニックラットが 2004 年に作成された。これまでに多くの基礎データの集積が進められており、SDT fatty ラットはレプチン作用の消失により過食に関連した肥満、脂質化、およびインスリン抵抗性を呈し、SDT よりも早期の高血糖発症と合併症の早期化が確認されている。



## 2 目的と方法

この論文は2つの実験から成り立っているので順に述べていきたい。

実験1：SDT fatty ラット糖尿病網膜症の病理学的特徴とその定量評価(自治医科大学動物実験承認番号 17095-01)

[目的]

SDT fatty ラットに発症する糖尿病網膜症を病理学的に検討し、さらにそれを定量評価することにより、SDT fatty ラットがSDT ラットよりも有用な糖尿病網膜症モデル動物であることを示す。

[評価項目]

体重・血液データ (血清 Glucose、血清 Insulin、Triglyceride (TG)、Total Cholesterol (TC))

眼球標本における網膜厚、網膜皺壁の数、脈絡膜厚、免疫染色陽性面積率

[研究方法]

a. 実験動物：SDT fatty ラット n=30、SDT ラット n=30、SD ラット n=25

・SDT fatty ラット：8, 16, 24, 32, 40 週齢、各週齢 n=6

・SDT ラット：8, 16, 24, 32, 40 週齢、各週齢 n=6

・SD ラット：8, 16, 24, 32, 40 週齢、各週齢 n=5

この研究は、日本たばこ産業 医薬総合研究所、日本クレアとの共同研究である。日本クレアから提供を受けた雄SDT fatty ラット、雄SDT ラット(対照動物)、雄SD ラット(正常対照動物)を日本たばこ産業 医薬総合研究所で飼育し、8, 16, 24, 32, 40 週齢でそれぞれ上記の数、安楽死させ、各臓器の摘出を行った。腎臓・肝臓・骨などの臓器は糖尿病研究のために日本たばこ産業 医薬総合研究所で解析された。我々は得られた眼試料の提供を受け、その光顕標本について解析を行った。実験動物の取扱いについては Association for Research in Vision and Ophthalmology、自治医科大学及び日本たばこ産業 医薬総合研究所の動物実験規定に基づいて行われた。全てのSDT fatty ラット、SDT ラット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 fatty ラット、SDT ラット、SD ラットには標準的なラット用飼料

(CRF-1, Oriental Yeast, Inc., Tokyo, Japan)を与え、自由摂食とした。飼育・観察期間中は床敷の汚れを1日1回点検し、汚れが目立つ場合にはすみやかに交換し、ラットの感染予防に配慮した。また実験によって動物にもたらされる苦痛には最大限の配慮を行った。万が一、糖尿病合併症が重症化した場合などを想定し、次の通り人道的エンドポイントを設定した。摂餌・摂水困難、苦悶の症状(異常な姿勢、持続的な横たわり、呼吸速迫など)、回復の兆しが

ない長期の外見異常（下痢、潰瘍、感染、脱肛など）、急激な体重減少（7日間で20%以上）や体温低下、痙攣・麻痺などの中枢神経症状、腫瘍が発生しサイズが著しく増大（腫瘍径が40 mm以上）、外部刺激に反応しない、などの瀕死状態が認められた場合には、ペントバルビタール麻酔 135 mg/kg 腹腔内投与による安楽死の処置をとった。

b. 体重測定、採血：8,16,24,32,40 週齢において体重測定、採血を行った。採血については、下記 c 項目で述べるように安楽死前に十分な麻酔下にて尾静脈より注射筒で採血した。採取した血液より糖尿病評価として血清 Glucose、血清 Insulin、脂質評価として Triglyceride (TG)、Total Cholesterol (TC) を測定した。血清 Glucose、TG、および TC は市販のキット (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)、および自動分析装置 (Hitachi 7180, Hitachi High-Technologies Corp., Tokyo, Japan) で測定した。血清 Insulin はラットインスリン測定キット (Morinaga Institute of Biological Science, Yokohama, Japan) で測定した。

c. 眼組織標本の作製：8,16,24,32,40 週齢において病理学的検査のための麻酔下眼球摘出術を行った。体重測定した上で、ペントバルビタール 50mg/kg (Nembutal, Sumitomo Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd, Osaka, Japan) の腹腔内投与による麻酔導入後、isoflurane (Isoflurane inhalation solution, Pfizer Inc., New York, NY, USA) 麻酔下にて尾静脈より注射筒で採血した。さらにピンセットで眼球を眼窩から持ち上げ視神経などを切断し眼球摘出した。術後は覚醒なしにペントバルビタール 85mg/kg を腹腔内へ追加投与し、安楽死処置を行った。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。このパラフィンブロックの状態、我々は眼試料の提供を受けた。パラフィンブロックからマイクロームにて 4  $\mu$  m の切片を作成し、hematoxylin and eosin (HE) 染色を行った。

d. 網膜厚、網膜外層の鄒壁の数、脈絡膜厚の計測：4  $\mu$  m の眼球切片標本はデジタル顕微鏡 (BZ-X700, Keyence, Osaka, Japan) で観察し、画像は付属のデジタルカメラとソフトウェア (BZ-H3XD, Keyence, Osaka, Japan) で撮影・記録し、ダウンロードした。ダウンロードした HE 染色の標本画像を用いて網膜厚、網膜外層の鄒壁の数、脈絡膜厚を測定し定量比較した。網膜厚・脈絡膜厚は各標本の視神経乳頭から 500、1,000、1,500  $\mu$  m の距離で測定した。網膜鄒壁は視細胞層から網膜外顆粒層まで変形しているものと定義し、視神経乳頭か

ら 1,500  $\mu$  m までの範囲で数を測定した。

e. 免疫組織検査：免疫組織化学検査として、上記の組織切片に対し Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) の免疫染色を行った。それぞれ一次抗体として、GFAP mouse monoclonal antibody (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA)、rat VEGF antibody (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) を 1:100 の希釈率で使用した。次に Hybrid Cell Count Module/BZ-H3C software (Keyence) を用いて、視神経乳頭から 1,500  $\mu$  m の範囲でそれぞれの免疫染色陽性領域を定量解析し、面積率を計算した。この software においてはカラーコードは自由に選択することができ、この実験では陽性領域を濃い青色、陰性領域をマゼンタ色、境界線を水色で色分けした。これにより、それぞれの標本における免疫染色陽性面積率を計算した。

f. 統計解析：体重・血液データ (Glucose、Insulin、TG、TC)、網膜厚、網膜皺壁の数、脈絡膜厚、免疫染色陽性面積率 (GFAP、VEGF) について、各群間で有意差があるかの統計学的解析に The Mann-Whitney U-test 及び Scheffe'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。

実験 2：片腎摘出・0.3%食塩負荷 SDT fatty ラットの糖尿病網膜症(自治医科大学動物実験承認番号 18041-01)

[目的] 片腎摘出と食塩負荷が SDT fatty ラットの糖尿病網膜症にもたらす影響について実験 1 と同様の手法で病理学的に定量評価し、このモデル動物が SDT fatty ラットよりも進行した糖尿病網膜症を発症するか検討する。

[評価項目]

体重・血液データ (Glucose、hemoglobin (Hb) A1c、Insulin、blood urea nitrogen (BUN)、creatinine (CRE)、glomerular filtration rate (GFR))

眼球標本における網膜厚、網膜皺壁の数、脈絡膜厚、免疫染色陽性面積率

[研究方法] (Figure 14)

a. 実験動物：

- ・片腎摘出+0.3%食塩水 SDT fatty ラット：片腎摘出/0.3%食塩水、n=6
- ・SDT fatty ラット(対照動物)：腎摘出なし(sham 手術なし)/通常水、n=6

・SD ラット(正常対照動物)：腎摘出なし(sham 手術なし)/通常水、n=6

この研究は、スコヒアファーマ、日本クレアとの共同研究である。日本クレアから提供を受けた雄 SDT fatty ラットおよび雄 SD ラットをスコヒアファーマで、飼育・片腎摘出の外科的処置および術後管理・食塩負荷・体重測定・採血を行った上、23 週齢でそれぞれ安楽死させ、各臓器の摘出を行った。スコヒアファーマでは糖尿病性腎症の解析を行った。我々は得られた眼試料の提供を受け、その光顕標本について解析を行った。実験動物の取扱いについては Association for Research in Vision and Ophthalmology、自治医科大学、スコヒアファーマの動物実験規程に基づいて行われた。全ての SDT fatty ラット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 fatty ラットと SD ラットに標準的なラット用飼料 (CE-2, CLEA Japan Inc., Tokyo, Japan) を自由摂食にて与えた。飼育・観察期間中は床敷の汚れを 1 日 1 回点検し、汚れが目立つ場合にはすみやかに交換し、ラットの感染予防に配慮した。また実験によって動物にもたらされる苦痛には最大限の配慮を行った。実験 1 と同様に万が一、糖尿病合併症が重症化した場合などを想定し、人道的エンドポイントを設定した。

b. 片腎摘出(外科的処置)：片腎摘出+0.3%食塩水 SDT fatty ラット群作成のために、雄 SDT fatty ラット(n=6)について 9 週齢で片腎摘出を行った。ペントバルビタール 50mg/kg の腹腔内投与による十分な麻酔下で、背一腹方向 1-1.5 cm で左側腹部切開後、腎動静脈・尿管を結紮し、結紮部位の腎側で切断、左腎臓全摘出した。縫合は筋層 2 針、皮膚 2-3 針。(1 週間後に抜糸。)縫合終了後、覚醒(正向反射)までは 37°C に設定した保温台上に静置した。摘出手術は午後に行い、夕方に状態観察した。術後輸液はなし。ブプレノルフィン(レペタン注) 0.01mg/kg, 皮下注射を手術 30 分前、翌日及び 2 日後に投与して鎮痛を図った。感染防止措置としては、術前に術部剃毛後 0.5%ヘキサックアルコール液で清拭し消毒、さらに縫合時に腹腔内及び縫合部位にペニシリン G カリウム(2000 単位)を滴下した。

c. 食塩負荷：片腎摘出術後 1 週間の術後回復期を経て 10 週齢から 23 週齢まで 0.3%食塩水投与を行った。これを片腎摘出+0.3%食塩水 SDT fatty ラット群とした。対照動物として、腎摘出は行わず通常の水を与える SDT fatty ラット群を、また正常対照動物として、こちらも腎摘出は行わず通常の水を与える SD ラット群を飼育した(各群 n=6)。SDT fatty ラット群・SD ラット群ともに sham 手術は行っていない。食塩水及び通常水はそれぞれ給水ボトルで自由飲水により投与した。片腎摘出+0.3%食塩水 SDT fatty ラット群には水は与

えず食塩水のみを与えた。なお、ラット用飼料（CE-2, CLEA Japan Inc., Tokyo, Japan）は術前術後とも自由摂食とした。

d. 体重測定、採血：23 週齢において体重測定と採血を行った。採血は下記の e 項目で述べるように安楽死前に十分な麻酔下にて尾静脈より注射筒で採血した。採取した血液より糖尿病評価として Glucose、hemoglobin (Hb) A1c、Insulin、腎機能評価として blood urea nitrogen (BUN)、creatinine (CRE)、glomerular filtration rate (GFR) を測定した。

e. 眼組織標本の作製：すべてのラットを体重測定した上で、23 週齢において病理学的検査のための麻酔下眼球摘出術を行った。ペントバルビタール 50mg/kg の腹腔内投与による十分な麻酔下にて尾静脈より注射筒で採血した。糖尿病性腎症の研究ために、残った右腎臓全摘出した。この摘出腎はスコヒアファーマで解析した。さらにピンセットで眼球を眼窩から持ち上げ視神経などを切断し眼球摘出した。そのまま覚醒なしに脱血し、安楽死処置を行った。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。

f. 網膜厚、網膜外層の鄒壁の数、脈絡膜厚の計測：実験 1 の d 項目と同様に行った。実験 2 では脈絡膜厚に関しては各標本の視神経乳頭から 500  $\mu$  m の距離のみで測定した。

g. 免疫組織検査：実験 1 の e 項目と同様に行った。実験 2 では視神経乳頭から 1,000  $\mu$  m の範囲でそれぞれの免疫染色陽性面積率の定量解析を行った。

h. 統計解析：体重・血液データ（Glucose、HbA1c、Insulin、BUN、CRE、GFR）、網膜厚、網膜皺壁の数、脈絡膜厚、免疫染色陽性面積率（GFAP、VEGF）について、各群間で有意差があるかの統計学的解析に Steel-Dwass 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。

### 実験動物

- 片腎摘出+0.3%食塩水投与 SDT fattyラット :n=6
- 水投与 SDT fattyラット (対照動物) :n=6
- 水投与 SD (Sprague Dawley)ラット (正常対照動物) :n=6

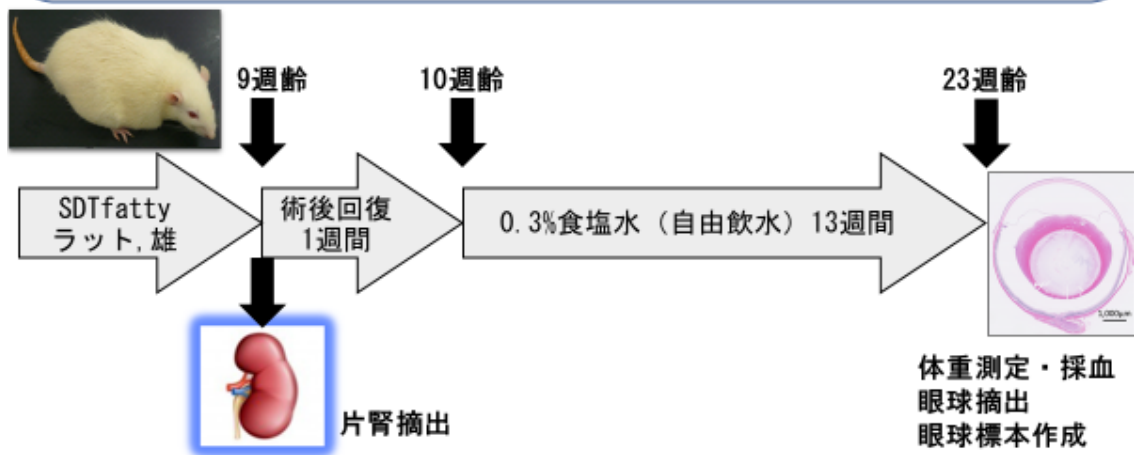


Figure 14. 実験 2 の実験方法。SDT fatty ラットの雄に対して 9 週齢で片腎摘出を行い、1 週間の術後回復期を経て 10 週齢から 23 週齢までの 13 週間、自由飲水での 0.3%食塩水投与を行った。これを片腎摘出+0.3%食塩水投与群とした。対照動物として、SDT fatty ラットに腎摘出せず通常の水を与えた SDT fatty 群を、また正常対照動物として SD ラットに腎摘出せず通常の水を与えた SD 群を飼育した。すべてのラットを 23 週齢で体重測定、及び採血をした上で安楽死させ、得られた眼試料から光顕標本作製した。

### 3 結果

実験 1 における結果

#### a. 体重・血液データ

体重の変化を Figure 15 に示す。SD ラットに比べ SDT ラットは体重が軽かった ( $p < 0.01$  at 16, 32, and 40 weeks of age;  $p < 0.001$  at 24 weeks of age by Scheffe's test)。また、SDT fatty ラットは SDT ラットよりも体重が重かった ( $p < 0.05$  at 16 and 40 weeks of age;  $p < 0.01$  at 8 and 24 weeks of age by Mann-Whitney U-test)。

Glucose、Insulin、TG、TC の推移を Figure 16 に示す。SDT ラットでは 16 週齢から、SDT fatty ラットでは 8 週齢からの高血糖を認めた。Insulin 値は 16 週齢以降で SDT fatty ラットが SDT ラットよりも有意に高かった ( $p < 0.01$  from 16 weeks of age by Mann-Whitney U-test)。TC 値については各週齢で SDT fatty ラットが SDT ラットよりも有意に高かった ( $p < 0.05$  at 16 and 32 weeks of age;  $p < 0.01$  at 8, 24 and 40 weeks of age by Mann-Whitney U-test)。

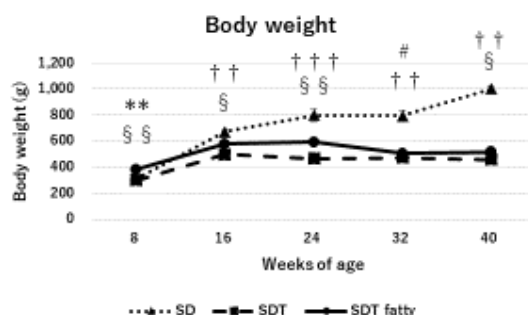


Figure 15. 実験 1 の各ラット体重変化。SD ラットに比べ SDT ラットは軽い。また、SDT fatty ラットは SDT ラットよりも重い。

\*\* $p < 0.01$ , SDT fatty rats vs. SDT rats; # $p < 0.05$ , SDT fatty rats vs. SD rats; †† $p < 0.01$ , ††† $p < 0.001$ , SDT rats vs. SD rats by Scheffe's test. § $p < 0.05$ , § § $p < 0.01$ , SDT fatty rats vs. SDT rats by Mann-Whitney U-test.



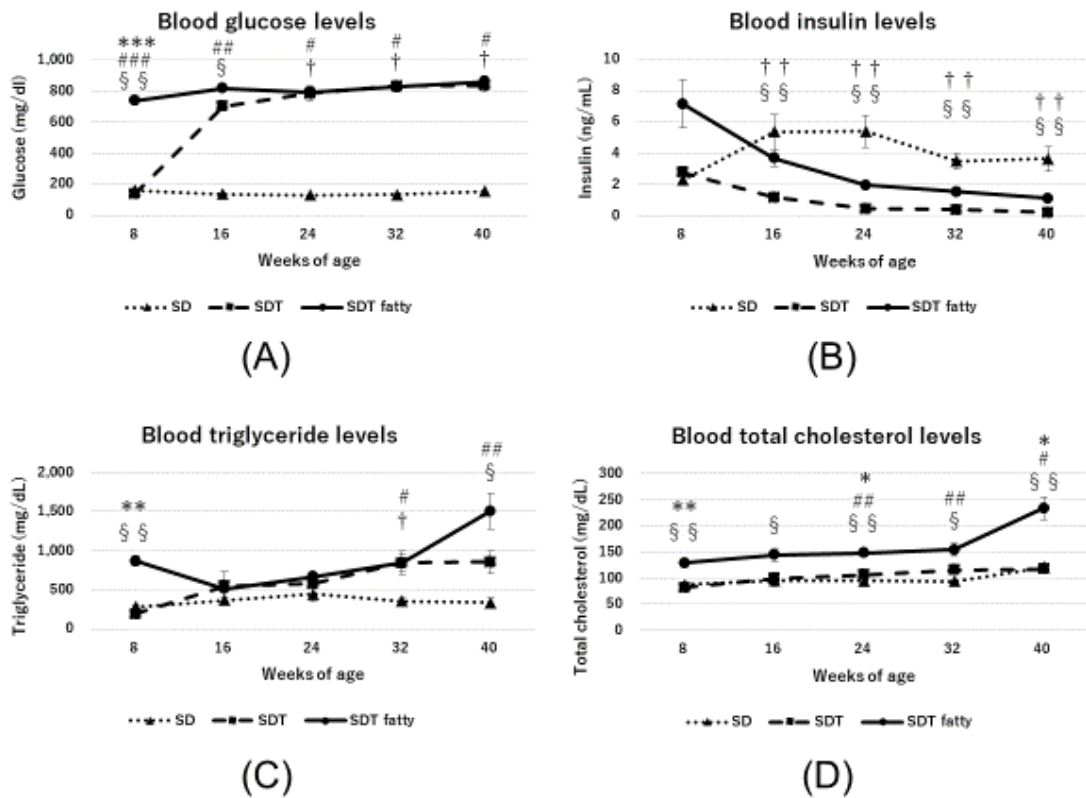


Figure 16. 実験 1 の各ラット血液データ (A, glucose; B, insulin; C, triglycerides; D, total cholesterol)。SDT ラットと比べ SDT fatty ラットの糖脂質代謝異常が目立つ。

\*\* $p < 0.01$ , SDT fatty rats vs. SDT rats; # $p < 0.05$ , SDT fatty rats vs. SD rats; †† $p < 0.01$ , ††† $p < 0.001$ , SDT rats vs. SD rats by Scheffe's test. § $p < 0.05$ , §§ $p < 0.01$ , SDT fatty rats vs. SDT rats by Mann-Whitney  $U$ -test.

b. 網膜厚、脈絡膜厚

網膜厚、脈絡膜厚に関するデータを Figure 17~20 に示す。

視神経乳頭から 500  $\mu\text{m}$  における 24 週齢の SDT fatty ラット、SDT ラット、SD ラットの平均網膜厚は、それぞれ  $244.5 \pm 6.7$ 、 $239.3 \pm 17.5$ 、 $165.0 \pm 3.5$   $\mu\text{m}$  (SDT fatty rats vs. SDT rats,  $p=0.90$ ; SDT fatty rats vs. SD rats,  $p<0.05$ ; and SDT rats vs. SD rats,  $p<0.05$  by Scheffe's test; SDT fatty rats vs. SDT rats,  $p=0.52$  by Mann-Whitney U-test)。SDT fatty ラットと SDT ラットは SD ラットよりも網膜が肥厚する傾向があった。SDT fatty ラットと SDT ラットの間には網膜厚の有意差は認められなかった。

視神経乳頭から 500  $\mu\text{m}$  における 24 週齢の SDT fatty ラット、SDT ラット、SD ラットの平均脈絡膜厚は、それぞれ  $13.8 \pm 0.2$ 、 $11.8 \pm 0.6$ 、 $5.9 \pm 0.5$  microns (SDT fatty rats vs. SDT rats,  $p=0.19$ ; SDT fatty rats vs. SD rats,  $p<0.01$ ; and SDT rats vs. SD rats,  $p=0.16$  by Scheffe's test; SDT fatty rats vs. SDT rats,  $p<0.05$  by Mann-Whitney U-test)。SDT fatty ラットは SD ラットよりも脈絡膜が肥厚する傾向があった。視神経乳頭から 500  $\mu\text{m}$  における 24 週齢と視神経乳頭から 1,000  $\mu\text{m}$  における 16 週齢の脈絡膜厚を除いて、SDT fatty ラットと SDT ラットの間には脈絡膜厚の有意差は認められなかった。

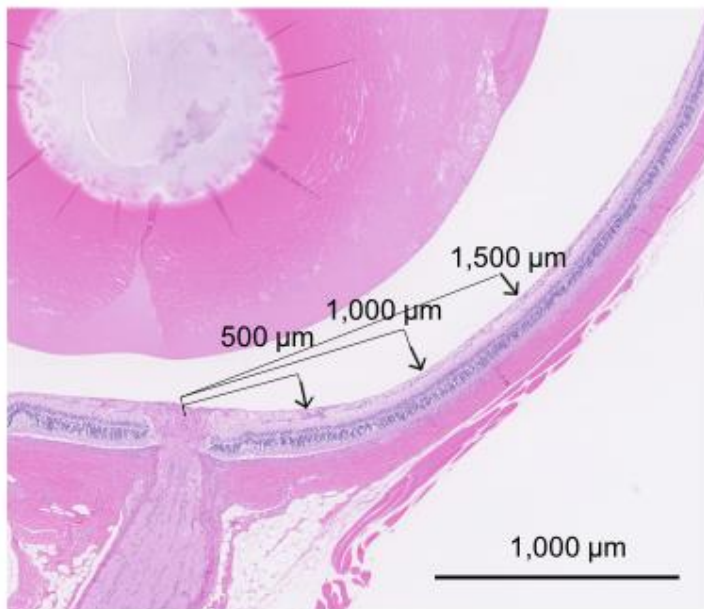


Figure 17. 実験 1 の眼球標本。網膜厚・脈絡膜厚は各標本の視神経乳頭から 500、1,000、1,500  $\mu\text{m}$  の距離で測定した。

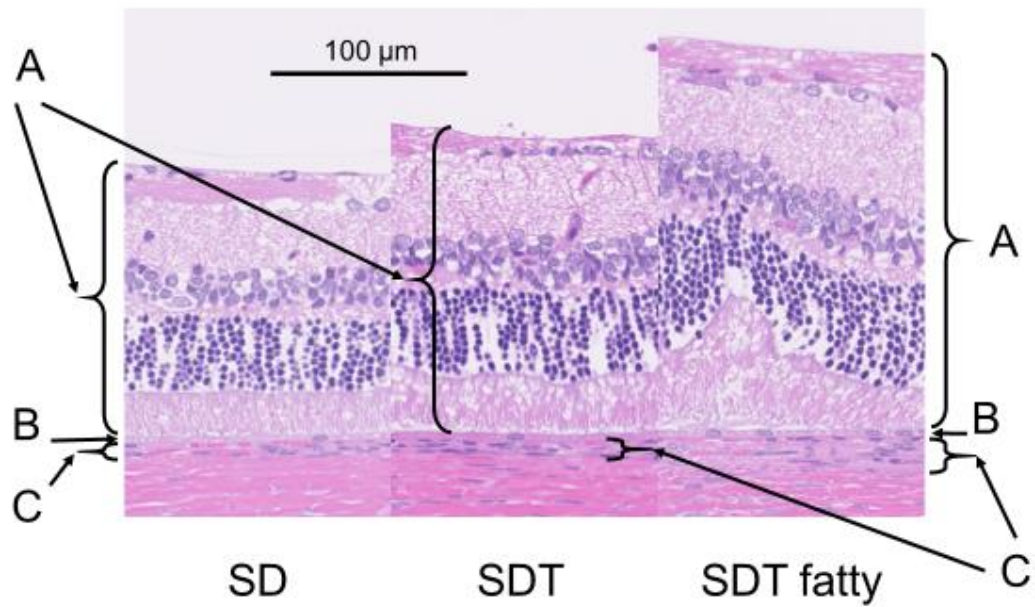


Figure 18. 実験 1 の網膜厚・脈絡膜厚比較(各ラットとも 40 週齢、視神経乳頭から 500 μ m の切片)。A, retina; B, retinal pigment epithelium; C, choroid

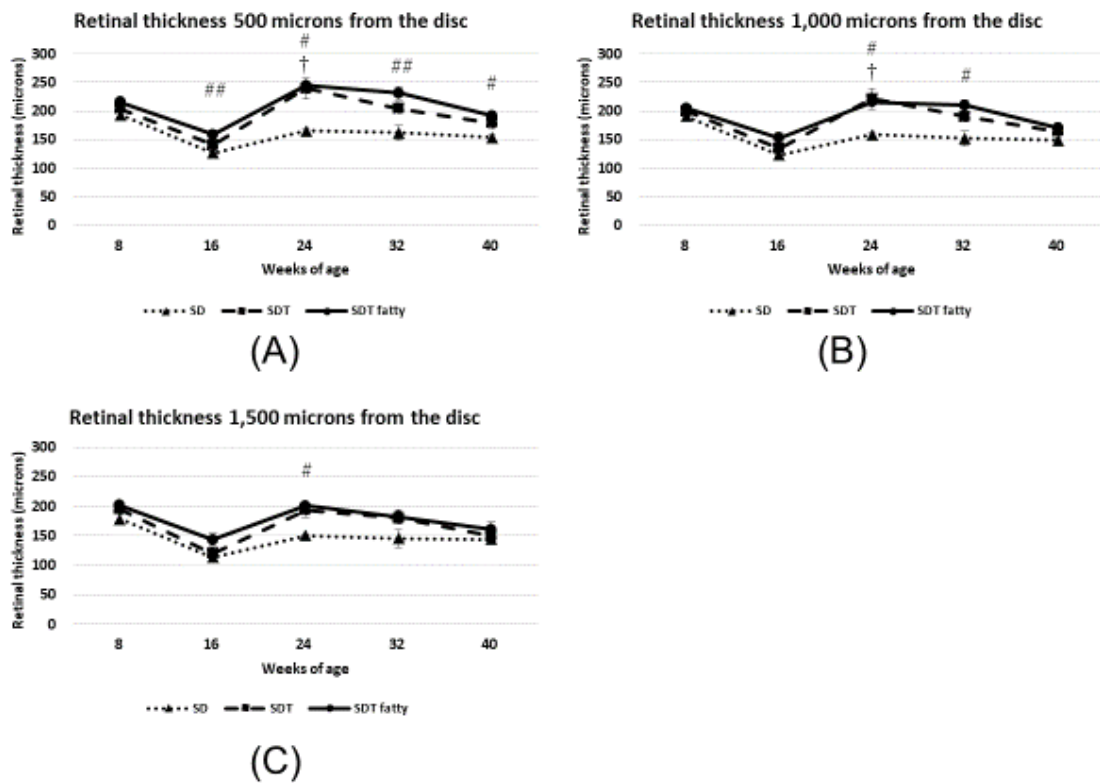


Figure 19. 実験 1 の各ラット網膜厚 (A, 視神経乳頭から  $500 \mu\text{m}$ ; B, 視神経乳頭から  $1,000 \mu\text{m}$ ; C, 視神経乳頭から  $1,500 \mu\text{m}$ )。SDT fatty ラットと SDT ラットは SD ラットよりも網膜が肥厚する傾向があった。  
 $\#p < 0.05$ ,  $\#\#p < 0.01$ , SDT fatty rats vs. SD rats;  $\dagger p < 0.05$ , SDT rats vs. SD rats by Scheffe's test.

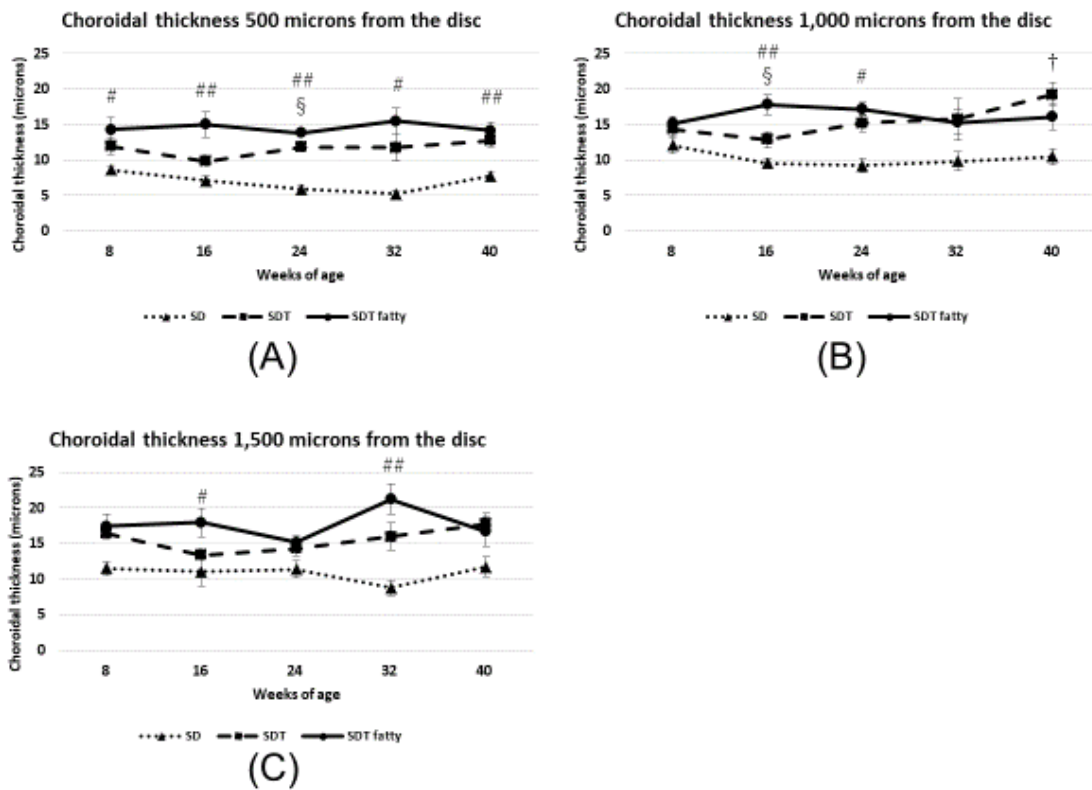


Figure 20. 実験 1 の各ラット脈絡膜厚 (A, 視神経乳頭から 500  $\mu$  m; B, 視神経乳頭から 1,000  $\mu$  m; C, 視神経乳頭から 1,500  $\mu$  m)。SDT fatty ラットは SD ラットよりも脈絡膜が肥厚する傾向があった。  
 $\#p<0.05$ ,  $\#\#p<0.01$ , SDT fatty rats vs. SD rats;  $\dagger p<0.05$ , SDT rats vs. SD rats by Scheffe's test.  $\S p<0.05$ , SDT fatty rats vs. SDT rats by Mann-Whitney *U*-test.

### c. 網膜皺壁の数

網膜皺壁に関して Figure 21 と 22 を示す。

24 週齢の SDT fatty ラット、SDT ラット、SD ラットの網膜皺壁の平均数は、それぞれ  $2.8 \pm 0.5$ 、 $0.5 \pm 0.2$ 、 $0 \pm 0$  (SDT fatty rats vs. SDT rats,  $p < 0.05$ ; SDT fatty rats vs. SD rats,  $p < 0.01$ ; and SDT rats vs. SD rats,  $p = 0.58$  by Scheffe's test; SDT fatty rats vs. SDT rats,  $p < 0.01$  by Mann-Whitney U-test)。SDT ラットにおける網膜皺壁のピークは 32 週齢 ( $1.2 \pm 0.3$  個)、SDT fatty ラットにおける網膜皺壁のピークは 24 週齢 ( $2.8 \pm 0.5$  個) ( $p < 0.05$ , by Mann-Whitney U-test) だった。SDT ラットよりも SDT fatty ラットの方が早期に、かつ多くの網膜皺壁を認めた。一方で、SD ラットでは網膜皺壁はほとんど認められなかった。

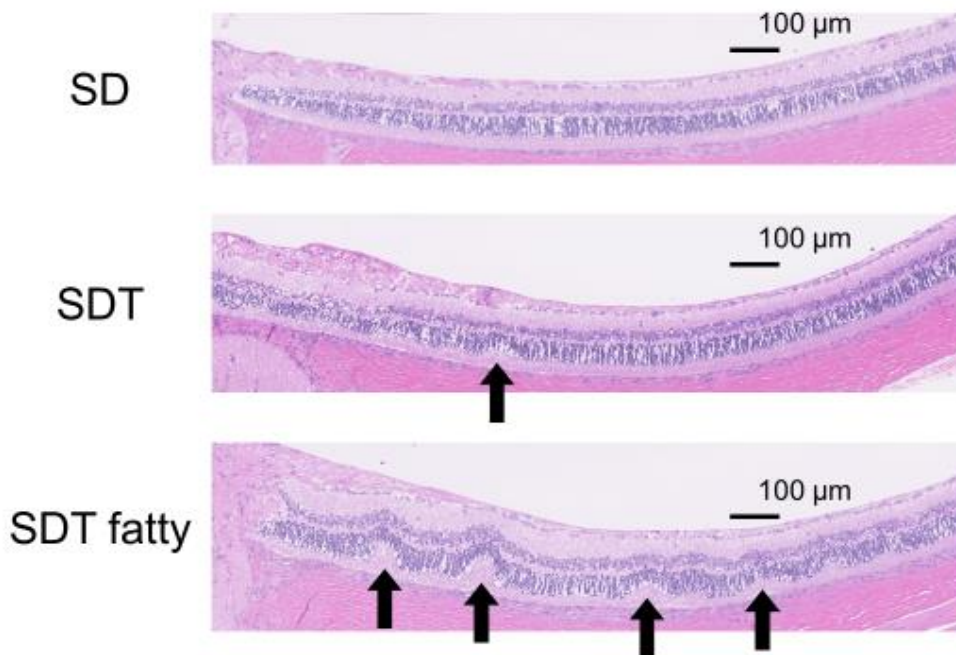


Figure 21. 実験 1 の網膜皺壁比較 (40 週齢)。網膜皺壁は視細胞層から網膜外顆粒層まで変形しているものと定義し、視神経乳頭から  $1,500 \mu\text{m}$  までの範囲で数を測定した。SDT ラットに比べ SDT fatty ラットでは網膜皺壁 (矢印) が目立つ。

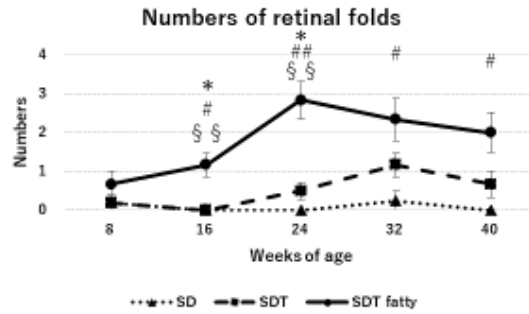


Figure 22. 実験 1 の各ラット網膜皺壁の数。SD ラットでは網膜皺壁はほとんど認められなかった。SDT ラットよりも SDT fatty ラットの方が早期に、かつ多くの網膜皺壁を認めた。

\* $p < 0.05$ , SDT fatty rats vs. SDT rats; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , SDT fatty rats vs. SD rats by Scheffe's test. § § $p < 0.01$ , SDT fatty rats vs. SDT rats by Mann-Whitney  $U$ -test.



d. 免疫染色陽性面積率

GFAP と VEGF の免疫染色の結果をそれぞれ Figure 23 と 24 に示す。また、それぞれ定量解析した免疫染色陽性面積率を Figure 25 に示す。

40 週齢の SDT fatty ラット、SDT ラット、SD ラットの平均 GFAP 陽性面積率は、それぞれ  $8.0 \pm 0.5\%$ 、 $5.7 \pm 0.5\%$ 、 $4.3 \pm 0.5\%$  (SDT fatty rats vs. SDT rats,  $p < 0.05$ ; SDT fatty rats vs. SD rats,  $p < 0.001$ ; and SDT rats vs. SD rats,  $p = 0.26$  by Scheffe's test; SDT fatty rats vs. SDT rats,  $p < 0.01$  by Mann-Whitney U-test)。40 週齢の SDT fatty ラット、SDT ラット、SD ラットの平均 VEGF 陽性面積率は、それぞれ  $8.2 \pm 1.4\%$ 、 $4.0 \pm 0.4\%$ 、 $1.5 \pm 0.2\%$  (SDT fatty rats vs. SDT rats,  $p = 0.29$ ; SDT fatty rats vs. SD rats,  $p < 0.0001$ ; and SDT rats vs. SD rats,  $p < 0.05$  by Scheffe's test; SDT fatty rats vs. SDT rats,  $p < 0.05$  by Mann-Whitney U-test)。

SDT ラットに比べて SDT fatty ラットは GFAP 及び VEGF 免疫染色陽性領域が広いことが定量解析によって示された。

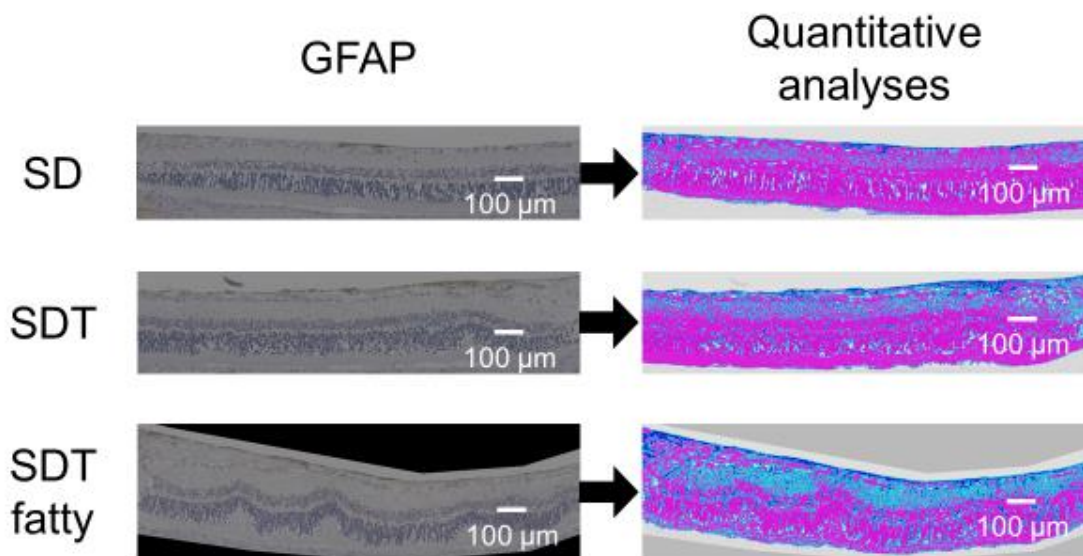


Figure 23. 実験 1 の GFAP 陽性領域の定量解析。Hybrid Cell Count Module/BZ-H3C software (Keyence)を用いて、視神経乳頭から  $1,500 \mu\text{m}$  の範囲で免疫染色陽性領域を定量解析し、面積率を計算した。陽性領域を濃い青色、陰性領域をマゼンタ色、境界線を水色で色分けした。

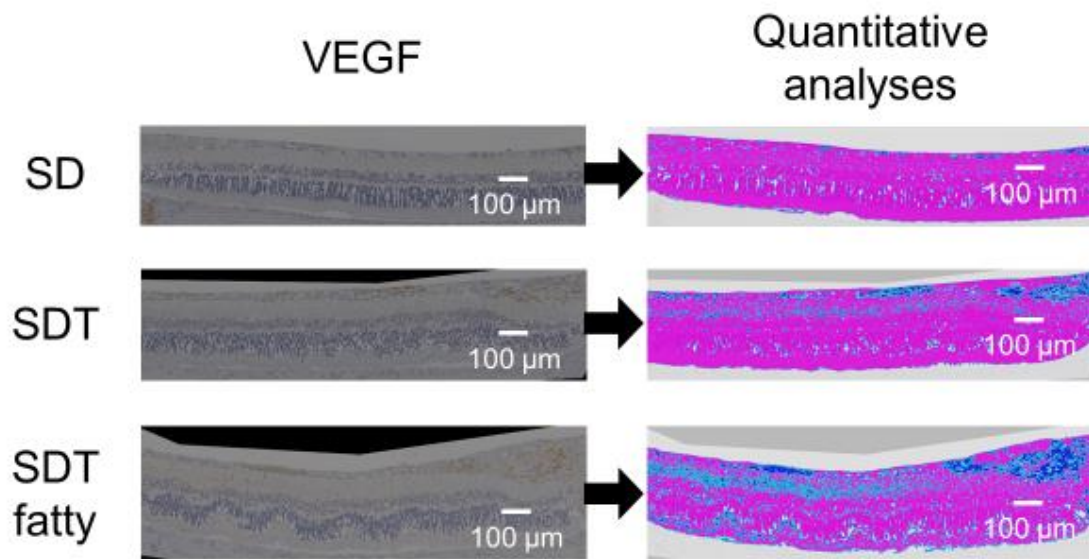


Figure 24. 実験 1 の VEGF 陽性領域の定量解析。Hybrid Cell Count Module/BZ-H3C software (Keyence)を用いて、視神経乳頭から 1,500  $\mu\text{m}$  の範囲で免疫染色陽性領域を定量解析し、面積率を計算した。陽性領域を濃い青色、陰性領域をマゼンタ色、境界線を水色で色分けした。

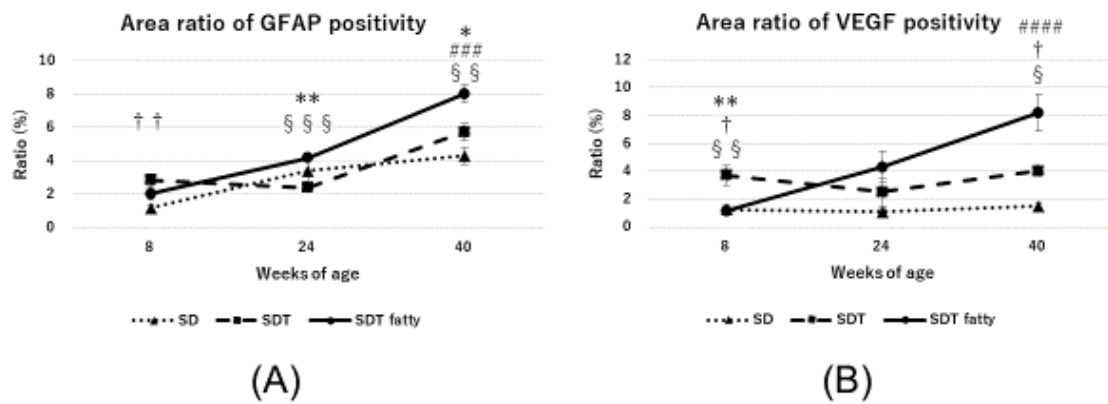


Figure 25. 実験 1 の GFAP と VEGF の陽性面積率 (A, GFAP; B, VEGF)。SDT ラットに比べて SDT fatty ラットは GFAP 及び VEGF 免疫染色陽性面積率が高い。

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , SDT fatty rats vs. SDT rats; #### $p < 0.001$ , ##### $p < 0.0001$ , SDT fatty rats vs. Sprague Dawley (SD) rats; † $p < 0.05$ , †† $p < 0.01$ , SDT rats vs. SD rats by Scheffe's test. § $p < 0.05$ , §§ $p < 0.01$ , §§§ $p < 0.001$ , SDT fatty rats vs. SDT rats by Mann-Whitney  $U$ -test.

## 実験 2 における結果

### a. 体重・血液データ

体重について Figure 26 に示す。各群の間に有意差は認めなかった。

血液データについて Glucose、HbA1c、Insulin を Figure 27 に示す。片腎摘出+0.3%食塩水 SDT fatty ラット群は SDT fatty ラット群よりも血糖値は改善した( $p<0.05$  by Steel-Dwass test)。BUN、CRE、GFR を Figure 28 に示す。片腎摘出+0.3%食塩水 SDT fatty ラット群は SDT fatty ラット群よりも腎障害の進行が認められた( $p<0.05$  by Steel-Dwass test)。

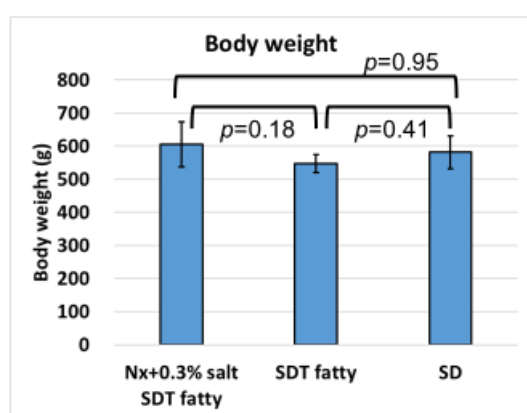


Figure 26. 実験 2 の各ラット体重。各群の間に有意差は認めなかった。  
Nx+0.3% salt SDT fatty : 片腎摘出+0.3%食塩水 SDT fatty ラット群、SDT fatty : SDT fatty ラット群、SD : SD ラット群。\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  by Steel-Dwass test.

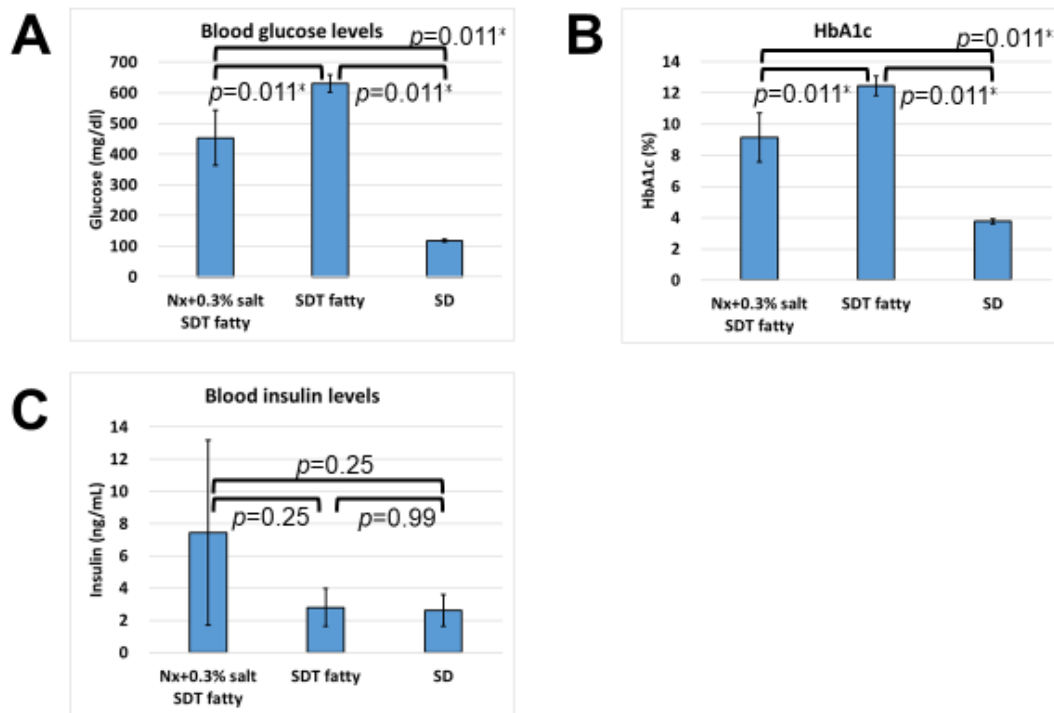


Figure 27. 実験 2 の各ラット血液データ (A, Glucose; B, HbA1c; C, Insulin)。片腎摘出+0.3%食塩水 SDT fatty ラット群は SDT fatty ラット群よりも血糖値は改善した ( $p < 0.05$  by Steel-Dwass test)。

Nx+0.3% salt SDT fatty : 片腎摘出+0.3%食塩水 SDT fatty ラット群、SDT fatty : SDT fatty ラット群、SD : SD ラット群。\*  $p < 0.05$  by Steel-Dwass test.

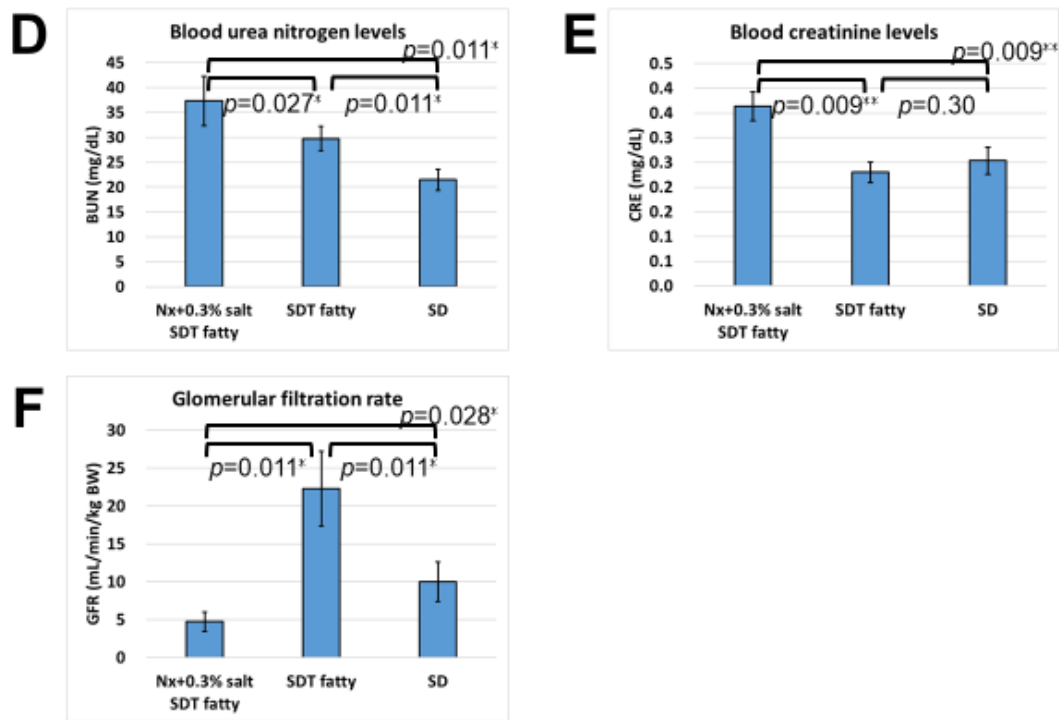


Figure 28. 実験 2 の各ラット血液データ (D, blood urea nitrogen; E, creatinine; F, glomerular filtration rate)。片腎摘出+0.3%食塩水 SDT fatty ラット群は SDT fatty ラット群よりも腎障害の進行が認められた ( $p < 0.05$  by Steel-Dwass test)。

Nx+0.3% salt SDT fatty : 片腎摘出+0.3%食塩水 SDT fatty ラット群、SDT fatty : SDT fatty ラット群、SD : SD ラット群。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  by Steel-Dwass test.

b. 網膜厚、脈絡膜厚

網膜厚、脈絡膜厚に関するデータを Figure 29~32 に示す。

視神経乳頭から 500  $\mu$  m における平均網膜厚は、それぞれ以下のとおりであった。

片腎摘出+0.3%食塩水 SDT fatty ラット群	: 205.7 $\pm$ 35.9 $\mu$ m
SDT fatty ラット群	: 201.1 $\pm$ 18.4 $\mu$ m
SD ラット群	: 155.6 $\pm$ 27.5 $\mu$ m

(Nx+0.3%salt SDT fatty rats vs. SDT fatty rats,  $p=0.99$ ;

Nx+0.3%salt SDT fatty rats vs. SD rats,  $p=0.064$ ;

SDT fatty rats vs. SD rats,  $p<0.05$  by Steel-Dwass test)

視神経乳頭から 500  $\mu$  m の網膜厚は、SDT fatty ラット群が SD ラット群よりも厚くなっていたが、片腎摘出+0.3%食塩水 SDT fatty ラット群と SDT fatty ラット群の間には有意差は認められなかった。

視神経乳頭から 500  $\mu$  m における平均脈絡膜厚は、それぞれ以下のとおりであった。

片腎摘出+0.3%食塩水 SDT fatty ラット群	: 18.5 $\pm$ 6.3 $\mu$ m
SDT fatty ラット群	: 17.8 $\pm$ 3.8 $\mu$ m
SD ラット群	: 9.5 $\pm$ 2.6 $\mu$ m

(Nx+0.3%salt SDT fatty rats vs. SDT fatty rats,  $p=0.95$ ;

Nx+0.3%salt SDT fatty rats vs. SD rats,  $p<0.05$ ;

SDT fatty rats vs. SD rats,  $p<0.05$  by Steel-Dwass test)

視神経乳頭から 500  $\mu$  m の脈絡膜厚は、片腎摘出+0.3%食塩水 SDT fatty ラット群と SDT fatty ラット群は、SD ラット群よりも厚くなっていた。片腎摘出+0.3%食塩水 SDT fatty ラット群と SDT fatty ラット群の間には有意差は認められなかった。

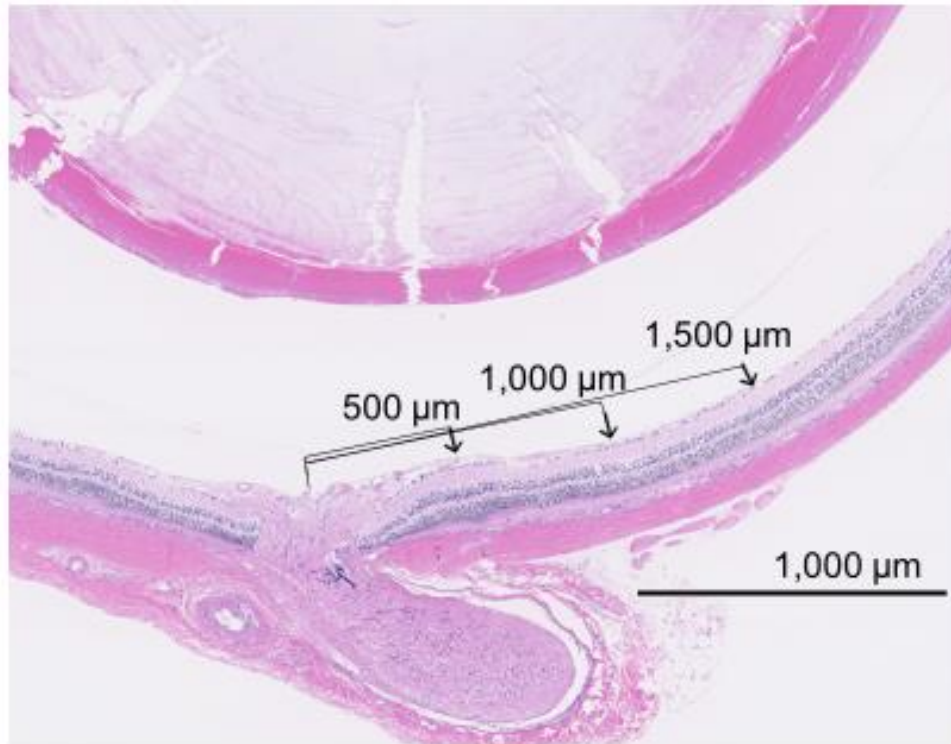


Figure 29. 実験 2 の眼球標本。網膜厚は各標本の視神経乳頭から 500、1,000、1,500  $\mu\text{m}$  の距離で測定した。脈絡膜厚は各標本の視神経乳頭から 500  $\mu\text{m}$  の距離で測定した。



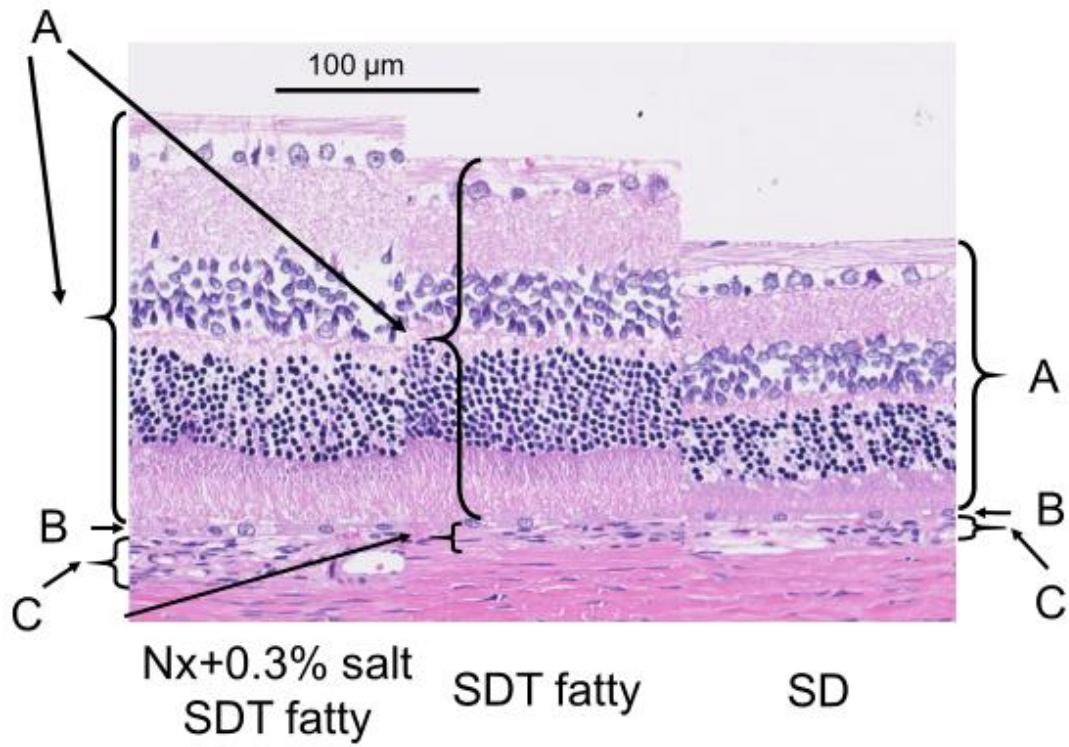


Figure 30. 実験2の網膜厚・脈絡膜厚比較(各ラットとも視神経乳頭から500  $\mu\text{m}$ の切片)。A, retina; B, retinal pigment epithelium; C, choroid

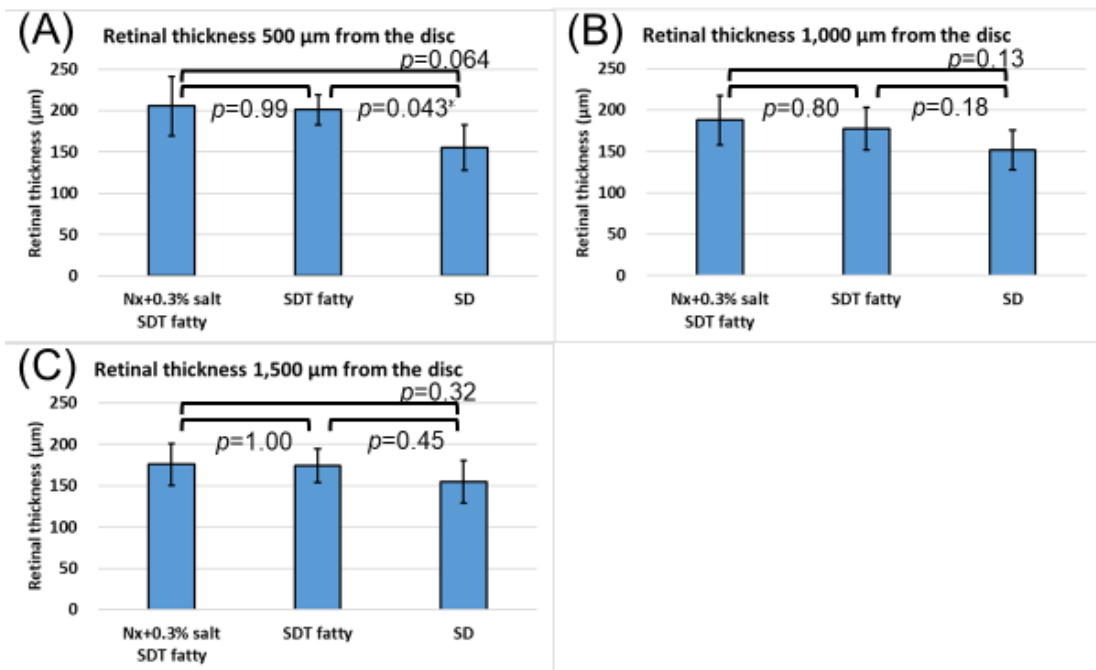


Figure 31. 実験 2 の各ラット網膜厚 (A, 視神経乳頭から  $500 \mu\text{m}$ ; B, 視神経乳頭から  $1,000 \mu\text{m}$ ; C, 視神経乳頭から  $1,500 \mu\text{m}$ )。SDT fatty ラット群が SD ラット群よりも厚くなっていたが、片腎摘出+0.3%食塩水 SDT fatty ラット群と SDT fatty ラット群の間には有意差は認められなかった。Nx+0.3% salt SDT fatty : 片腎摘出+0.3%食塩水 SDT fatty ラット群、SDT fatty : SDT fatty ラット群、SD : SD ラット群。\* $p < 0.05$  by Steel-Dwass test.

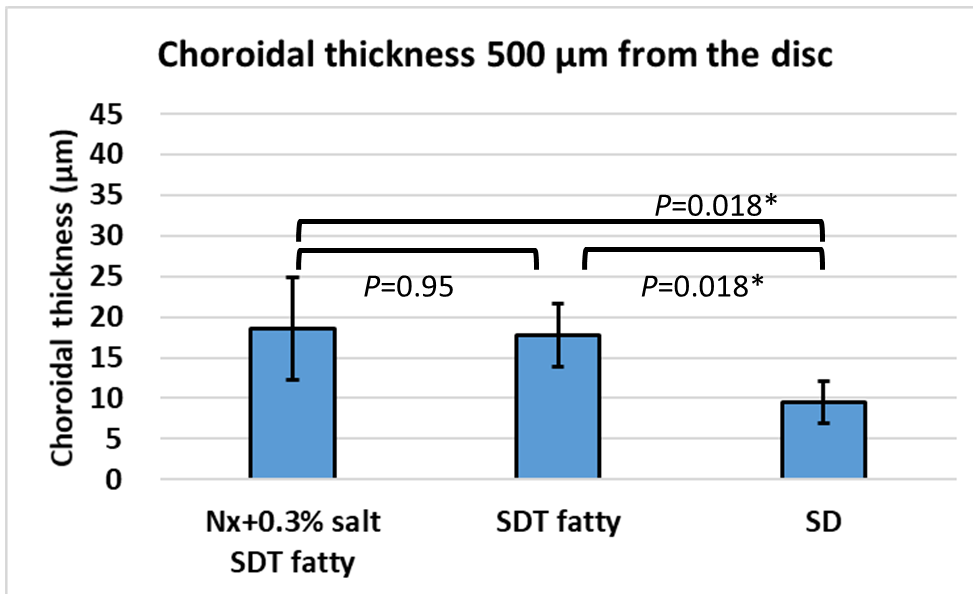


Figure 32. 実験 2 の各ラット脈絡膜厚 (視神経乳頭から 500 μ m)。片腎摘出+0.3%食塩水 SDT fatty ラット群と SDT fatty ラット群は、SD ラット群よりも厚くなっていた。片腎摘出+0.3%食塩水 SDT fatty ラット群と SDT fatty ラット群の間には有意差は認められなかった。

Nx+0.3% salt SDT fatty : 片腎摘出+0.3%食塩水 SDT fatty ラット群、SDT fatty : SDT fatty ラット群、SD : SD ラット群。\* $p < 0.05$  by Steel-Dwass test.

c. 網膜皺壁の数

網膜皺壁に関して Figure 33 と 34 を示す。

視神経乳頭から 1,500  $\mu$ m で網膜皺壁の平均数は、それぞれ以下のとおりであった。

片腎摘出+0.3%食塩水 SDT fatty ラット群 : 1.50 $\pm$ 0.84 個

SDT fatty ラット群 : 1.16 $\pm$ 0.52 個

SD ラット群 : 0.08 $\pm$ 0.20 個

(Nx+0.3%salt SDT fatty rats vs. SDT fatty rats,  $p=0.78$ ;

Nx+0.3%salt SDT fatty rats vs. SD rats,  $p<0.01$ ;

SDT fatty rats vs. SD rats,  $p<0.01$  by Steel-Dwass test)

網膜皺壁は SD ラット群ではほとんど認められなかった。

片腎摘出+0.3%食塩水 SDT fatty ラット群と SDT fatty ラット群の間には有意差は認められなかった。

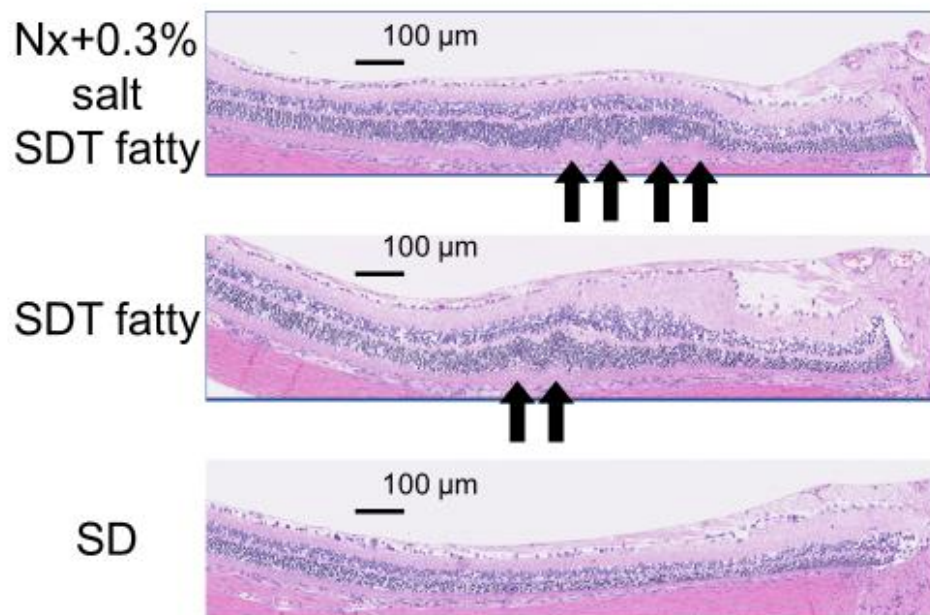


Figure 33. 実験 2 の網膜皺壁比較。網膜皺壁は視細胞層から網膜外顆粒層まで変形しているものと定義し、視神経乳頭から 1,500  $\mu$ m までの範囲で数を測定した。片腎摘出+0.3%食塩水 SDT fatty ラット群と SDT fatty ラット群では網膜皺壁 (矢印) を認めた。

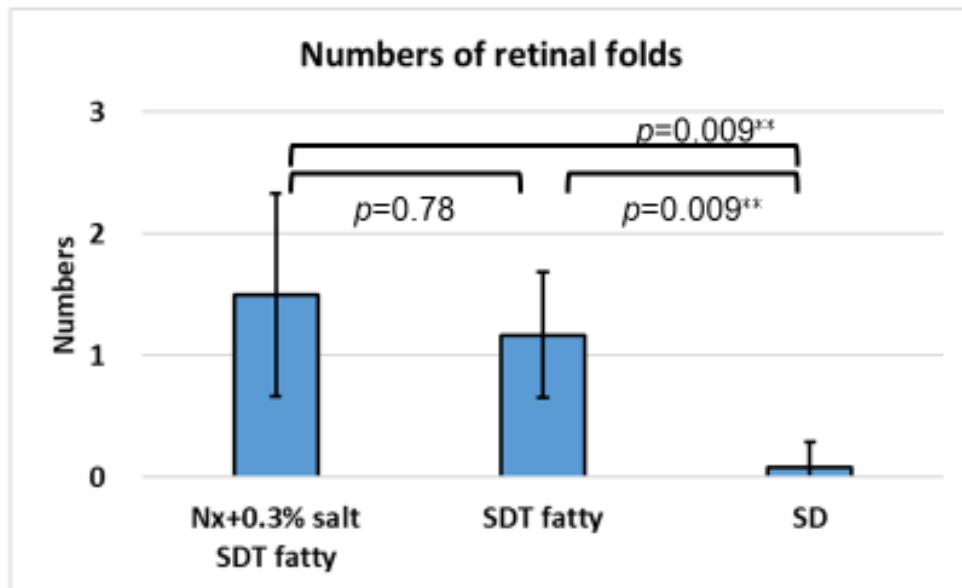


Figure 34. 実験 2 の各ラット網膜皺壁の数。網膜皺壁は SD ラット群ではほとんど認められなかった。片腎摘出+0.3%食塩水 SDT fatty ラット群と SDT fatty ラット群の間には有意差は認められなかった。

Nx+0.3% salt SDT fatty : 片腎摘出+0.3%食塩水 SDT fatty ラット群、SDT fatty : SDT fatty ラット群、SD : SD ラット群。 \*\* $p < 0.01$  by Steel-Dwass test.

d. 免疫染色陽性面積率

GFAP と VEGF の免疫染色の結果をそれぞれ Figure 35 と 36 に示す。また、それぞれ定量解析した免疫染色陽性面積率を Figure 37 に示す。

各群における GFAP 陽性面積率は、以下の通りであった。

片腎摘出+0.3%食塩水 SDT fatty ラット群	: 8.2±2.2%
SDT fatty ラット群	: 7.2±2.4%
SD ラット群	: 2.4±0.8%

(Nx+0.3%salt SDT fatty rats vs. SDT fatty rats,  $p=0.84$ ;

Nx+0.3%salt SDT fatty rats vs. SD rats,  $p<0.05$ ;

SDT fatty rats vs. SD rats,  $p<0.05$  by Steel-Dwass test)

各群における VEGF 陽性面積率は、以下の通りであった。

片腎摘出+0.3%食塩水 SDT fatty ラット群	: 6.3±2.3%
SDT fatty ラット群	: 4.5±1.8%
SD ラット群	: 3.7±1.7%

(Nx+0.3%salt SDT fatty rats vs. SDT fatty rats,  $p=0.32$ ;

Nx+0.3%salt SDT fatty rats vs. SD rats,  $p=0.13$ ;

SDT fatty rats vs. SD rats,  $p=0.80$  by Steel-Dwass test)

GFAP・VEGF 陽性面積率ともに片腎摘出+0.3%食塩水 SDT fatty ラット群と SDT fatty ラット群の間に有意差は認められなかった。

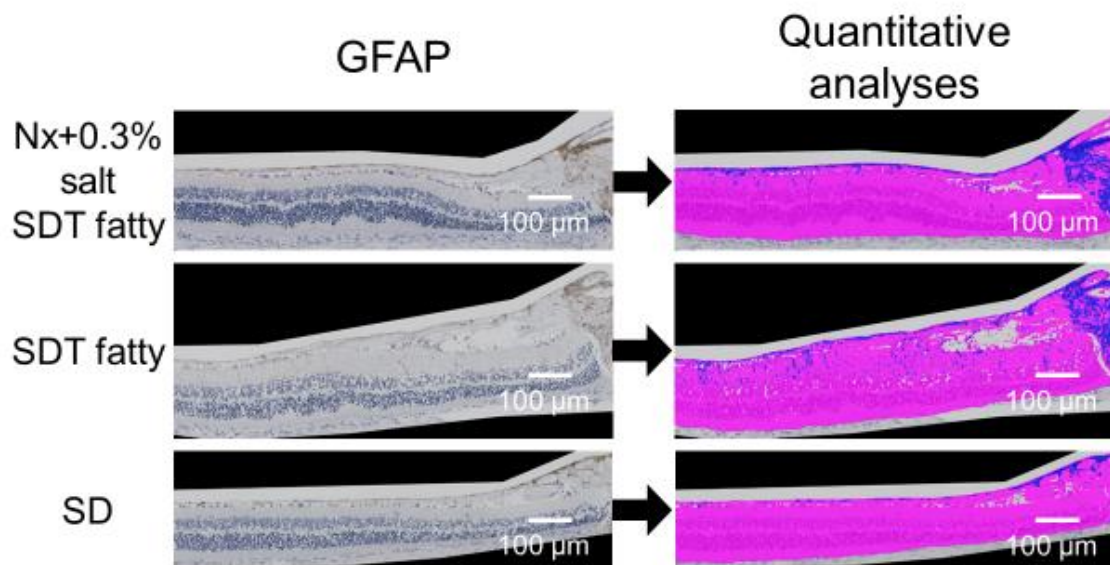


Figure 35. 実験 2 の GFAP 陽性領域の定量解析。Hybrid Cell Count Module/BZ-H3C software (Keyence)を用いて、視神経乳頭から 1,000  $\mu\text{m}$  の範囲で免疫染色陽性領域を定量解析し、面積率を計算した。陽性領域を青色、陰性領域をマゼンタ色で色分けした。



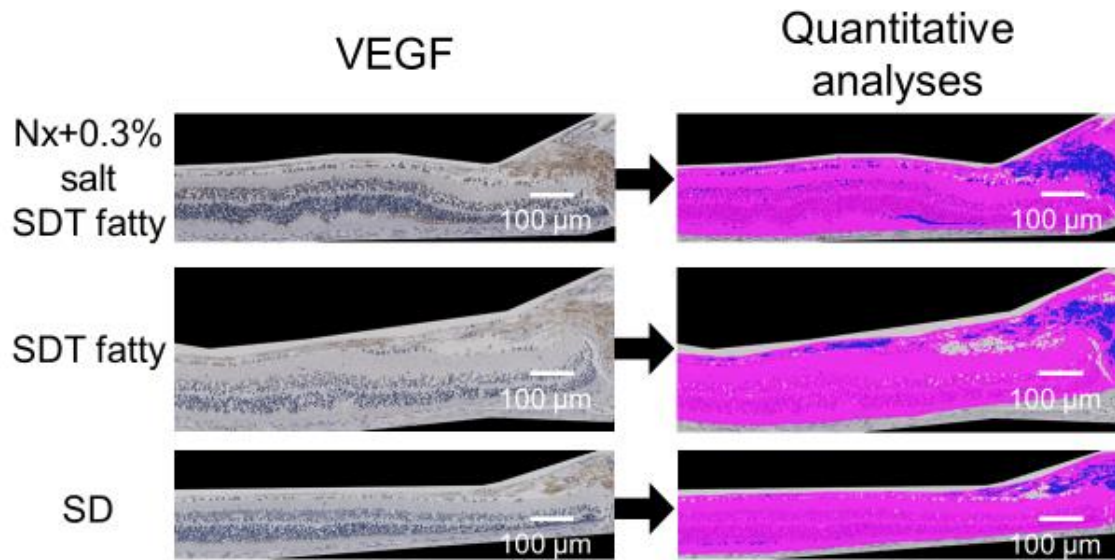


Figure 36. 実験 2 の VEGF 陽性領域の定量解析。Hybrid Cell Count Module/BZ-H3C software (Keyence)を用いて、視神経乳頭から 1,000  $\mu$ m の範囲で免疫染色陽性領域を定量解析し、面積率を計算した。陽性領域を青色、陰性領域をマゼンタ色で色分けした。

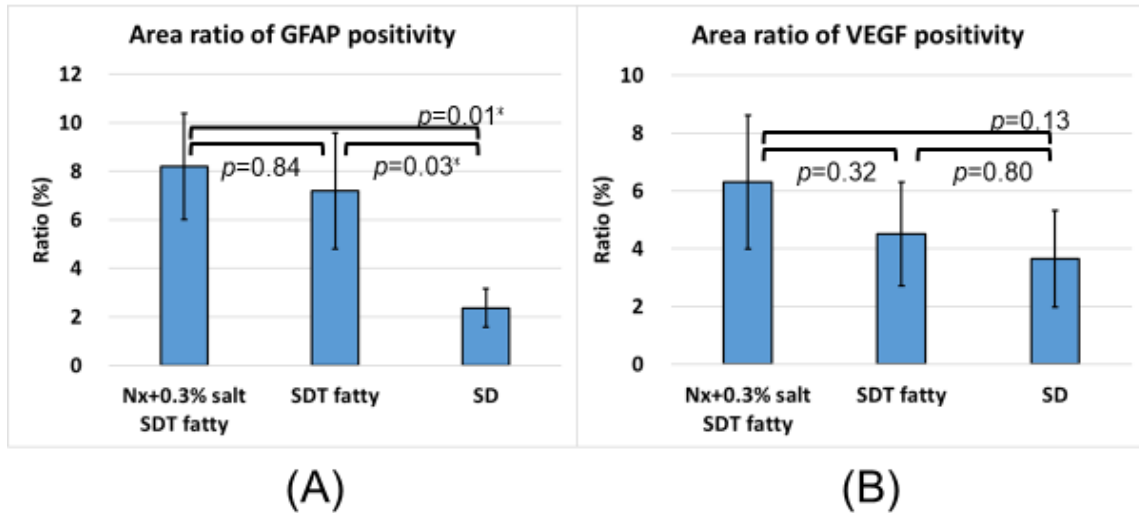


Figure 37. 実験 2 の GFAP と VEGF の陽性面積率 (A, GFAP; B, VEGF)。GFAP・VEGF 陽性面積率ともに片腎摘出+0.3%食塩水 SDT fatty ラット群と SDT fatty ラット群の間に有意差は認められなかった。Nx+0.3% salt SDT fatty : 片腎摘出+0.3%食塩水 SDT fatty ラット群、SDT fatty : SDT fatty ラット群、SD : SD ラット群。\* $p < 0.05$  by Steel-Dwass test.

#### 4 考察

糖尿病患者では、長年にわたる高血糖のもと、網膜血管異常（血管透過性亢進、灌流低下、血管新生など）が生じ、最終的には網膜ニューロンとグリア細胞の解剖学のおよび機能的変化につながる。この間に網膜および脈絡膜では代謝異常、酸化ストレス、細胞内シグナル伝達活性化などの複雑な分子イベントが進行すると考えられているが完全には解明されてはいない。これは、これまでの糖尿病モデル動物が初期糖尿病網膜症の限られた段階しか再現できないためでもある[58]。本研究はこれに挑戦するものである。

SDT fatty ラットの糖尿病網膜症については未開拓分野であり、我々の知る限りにおいて、SDT fatty ラットにおける血管透過性亢進や毛細血管瘤、毛細血管閉塞などの報告はまだない。SDT ラットにおける研究では、トリプシン消化標本による血管構造の評価では、毛細血管瘤は、ほとんど認められないが、蛍光眼底造影検査では血管透過性亢進所見が報告されている[45-46]。また VEGF を内因性かつ特異的に阻害する VEGF 受容体 Flt-1 (sFlt-1) を遺伝子導入するアデノ随伴ウイルスベクターを SDT ラットの網膜下に注入し、フルオレセイン血管造影によって評価したところ、網膜無血管野の抑制など有効性が示されている[51]。このことから、我々は SDT fatty ラットにおいても血管透過性亢進、毛細血管閉塞は生じると考えている。今後、SDT fatty ラットにおいてトリプシン消化標本や蛍光眼底造影検査の評価なども行っていきたいと考えている。

実験 1 の体重・血液データから、既報の通り SDT fatty ラットは肥満、脂質化、およびインスリン抵抗性を呈し、SDT ラットよりも早期の高血糖発症が確認された。

網膜および脈絡膜血管からの血液成分の漏出が生じると、網膜および脈絡膜の肥厚を引き起こす。こうした肥厚した網膜・脈絡膜は、臨床においては OCT を使用して頻繁に観察される。特に糖尿病黄斑浮腫は視力低下を引き起こし、この状態は抗 VEGF 療法の治療標的である。我々は SDT ラットにおけるこれまでの研究で、SDT ラットは正常な非糖尿病 SD ラットよりも網膜が肥厚していることを報告し[48]、アルドース還元酵素阻害薬である Ranirestat の SDT ラット網膜肥厚抑制効果を報告している[49]。さらに、SDT ラット糖尿病発症後から sodium glucose cotransporter 2(SGLT2)阻害薬 tofogliflozin

(0.005%) の 20 週間混餌投与により、網膜肥厚抑制効果を示したことを報告した[50]。これらの結果から網膜肥厚が糖尿病に起因する変化であることは間違いないと考えており、ヒト糖尿病網膜症における網膜浮腫に相当する所見と考えている。しかし、ラットには黄斑が存在しないため、ヒト糖尿病網膜症に

おける黄斑浮腫の状態とは異なる。SDT fatty ラットでは GFAP・VEGF 免疫染色陽性面積率が、週齢を重ねるにつれて上昇しているのに対し、網膜厚はこれと異なる推移をしており、網膜肥厚を GFAP と VEGF だけでは説明しにくいと考える。後述する網膜皺壁と同様、炎症性サイトカインが関係しているのではないかと推測する。

一方、糖尿病患者における脈絡膜厚については議論の余地がある。糖尿病患者は高血圧などの合併症を抱えることが多く、レーザー光凝固療法や高血圧薬などの多くの種類の治療が行われており、これら複数の要因が脈絡膜血管に影響を与えている可能性が報告されている[59-62]。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、糖尿病の罹病期間、年齢、眼治療歴などである。だが、臨床研究においてそれらを等しく揃えた上で大規模な母集団を集めることは困難である。この問題を解決するために条件がほぼ同じである糖尿病モデル動物において脈絡膜厚を調べてみる必要があった。そして、我々は以前に、SD ラットと比較して、SDT ラットでは脈絡膜が厚いことを報告している[48]。本研究実験 1 で使用した各種ラットもレーザー光凝固や薬物療法などの治療を行っておらず、脈絡膜厚を比較する価値があると考えられた。実験 1 の結果では、網膜と脈絡膜は共に、SD ラット（正常対照）よりも SDT fatty ラットの方が肥厚していた。これらは糖尿病網膜症・脈絡膜症に関連した変化と考えられる。言い換えれば糖尿病網膜症における網膜浮腫と同様に、無治療の糖尿病脈絡膜症においては脈絡膜の肥厚が生じ得ると考えられる。ただし、各種ラットとも週齢による脈絡膜厚変化は少なかったため、脈絡膜厚だけを用いて脈絡膜症の発症時期を評価することは難しいだろう。また網膜厚の週齢による変化については、正常 SD ラットを含む 3 種類のラット共に 8 週齢から 16 週齢にかけて一旦網膜厚が菲薄化し、24 週齢で網膜肥厚がピークを示し、その後徐々に菲薄化している。この結果から網膜厚変化には、糖尿病網膜症進行だけでなく、ラットの成長に伴う変化も大きく影響している可能性が考えられた。そうすると糖尿病網膜症の進行状況を評価するための指標として網膜厚だけを用いることは難しいかもしれない。これらについてはさらなる解析・検討を要する。

次に網膜皺壁の数について、SD ラットでは網膜皺壁はほとんど認められなかったが、SDT ラットと SDT fatty ラットでは網膜皺壁が観察され、SDT ラットよりも SDT fatty ラットの方が早期に、かつ多くの網膜皺壁を認めた。網膜皺壁の数は網膜厚に代わる糖尿病網膜症進展具合を定量評価する新たな指標になる可能性がある。ただし、網膜皺壁が何を表しているのかについては、さらなる解析が必要である。少なくとも SDT fatty ラットの網膜皺壁は、sodium

glucose co-transporter inhibitors である phlorizin および ipragliflozin で予防されたことが報告されており [63,64]、この網膜皺壁が糖尿病網膜症に関連する現象であることは確かである。前述の様に 70 週齢という高週齢の SDT ラットではヒトの増殖性糖尿病網膜症で見られるような、線維性増殖膜の発生と、それに伴う網膜全層の牽引性・隆起性変化が認められた [37,46]。(Figure 12) 一方で、本実験では低週齢から網膜皺壁を認めており、網膜皺壁の定義も視細胞層から網膜外顆粒層までの変形、すなわち網膜外層の変形とした。これら発症週齢や形状の点から両者は別のものと考えられる。免疫染色において、SDT fatty ラットは SDT・SD ラットに比べて、内網状層、外網状層で GFAP の発現亢進がみられた。また内網状層、視細胞層で VEGF の発現亢進が認められ、視細胞層の中でも特に網膜皺壁の部位に VEGF 陽性細胞が多くみられた。このことは、糖尿病網膜症による虚血で視細胞でも VEGF が産生されていることを示唆すると考える。一方、ぶどう膜炎のモデルマウスにおいて、同様の網膜外層に局限した皺壁が認められ、この網膜皺壁の数は、すでにぶどう膜炎の重症度評価に用いられている [65]。したがって、本モデルの網膜皺壁にも炎症性サイトカインに伴う炎症細胞の浸潤が関与していることが推測され、今後の研究では炎症細胞の免疫染色に加えてサイトカインの ELISA や mRNA 定量を予定している。網膜皺壁が脂質、代謝産物の残渣などによるものである可能性も十分考えられる。Optical Coherence Tomography (OCT)を用いたヒトの糖尿病網膜症の所見では、一般に網膜外層にこのような多数の網膜皺壁は認められないため、これはラットで固有のものである可能性がある。なお、OCT を用いて SDT fatty・SDT ラットの網膜皺壁を経時的に観察したいが、SDT fatty・SDT ラットは早期に白内障が進行し、眼底透見困難となる [39,43]ため現在のところ観察はできていない。今後、ラットに対して白内障手術を行うなどの手段が必要になる。

我々は以前に Image J ソフトウェア(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)を使用して、網膜における GFAP および VEGF 免疫陽性領域が、SD ラットよりも SDT ラットの方が広いことを報告 [49]しているが、実験 1 の眼球組織標本では、免疫染色陽性領域と陰性領域との間で色差が小さく Image J を用いた評価では限界があり、Hybrid Cell Count Module / BZ-H3C ソフトウェアを使用した。このソフトウェアを用いた評価方法で免疫染色陽性面積率を定量解析することは、病理学等の分野において、すでに確立された手技となっている [66]。また、サイトカインの定量解析は ELISA や mRNA 定量を用いるのが一般的だが、免疫染色の定量解析でも、ある程度の定量解析が可能と考えられている [67]。免疫染色ではタンパク質の発現の局在の変化をみることが出来るので、発現面積の増加はそのタンパク質の増加を意味すると

通常は考える[67]。したがって、実験1のSDT fatty ラットはSDT ラットよりも網膜のGFAPおよびVEGF免疫陽性領域が有意に広いという結果から、SDT fatty ラットはSDT ラットよりも早く、より重症の糖尿病網膜症を発症することが示唆される。さらにハイブリッドセルカウンターを用いた免疫染色陽性面積率による解析法は、糖尿病網膜症の評価に有用と考えられる。今後の創薬研究において治療効果判定に生かされることを期待する。しかし、サイトカインの眼内濃度と免疫染色陽性面積率の間に相関を認めるとする報告は見当たらない。したがって本当に眼内のサイトカイン濃度あるいはmRNA量と免疫染色陽性の面積に相関性があるのかは不明なため、これについては今後の研究で検討予定である。

次に実験2について、血液データから、片腎摘出+0.3%食塩水SDT fatty ラットの腎機能障害進行を認めた。しかし、血糖値はSDT fatty ラットよりも改善していた。さらなる解析が必要ではあるが、腎機能障害が進行したことで、インスリンクリアランス低下に伴う高インスリン血症が生じ、血糖値改善につながった可能性が考えられる。貧血によりHbA1cが低下していた可能性もあるが、貧血があったかどうかは測定しておらず不明である。

片腎摘出+0.3%食塩水SDT fatty ラット群は、SD ラット群よりも網膜・脈絡膜の肥厚や網膜外層皺壁の発生が有意に認められたが、一方で、片腎摘出+0.3%食塩水SDT fatty ラット群とSDT fatty ラット群の間には、網膜厚、脈絡膜厚はもとより、網膜外層の皺壁および免疫染色陽性面積率を含めた全ての評価項目において有意な差は認められなかった。片腎摘出+0.3%食塩水SDT fatty ラット群で血糖値が改善したことにより糖尿病網膜症が進行しなかった可能性が考えられる。これは腎機能障害よりも血糖値の方が糖尿病網膜症進展には影響が大きいとも考えられた。腎障害が糖尿病網膜症にもたらす影響について検討するためには、片腎摘出・食塩負荷を行ってもSDT fatty ラットと同等の高血糖が維持されるような調整が必要と考えられる。既報[57]ではSDT fatty ラットに対する食塩負荷で著しい高血圧と腎障害が報告されているが、実験2では血圧を測定していない。片腎摘出・食塩負荷後も高血糖が維持されるような調整を行い、そのうえで高血圧の評価を行えば、高血圧と腎障害が糖尿病網膜症増悪に関与するメカニズムを解明するために有用な動物モデルとなる可能性がある。また今後、片腎摘出せずに食塩負荷のみを行った場合の評価や片腎摘出後さらに長期間食塩負荷を行った場合の評価も必要と考えられる。

## 5 おわりに

糖尿病網膜症に対する薬剤開発や **Drug Repositioning** を促進するには、適切な動物モデルを作成して網膜症の発症・進展を客観的に評価することが重要である。しかし、ヒトの糖尿病網膜症を模倣する動物モデルと、その定量的評価方法がほとんどないため、このことが糖尿病性腎症や神経障害の研究分野と比べて糖尿病網膜症研究が遅れている原因となっている可能性がある。

実験 1 では、網膜厚、網膜外層の皺壁、および免疫陽性領域の面積率を測定することにより、**SDT fatty** ラットの糖尿病網膜症の病理学的特徴を定量的に分析した。これらは、糖尿病網膜症を客観的に評価するのに役立つ。特に網膜外層の皺壁、および免疫染色陽性面積率による定量評価法は糖尿病ラットにおける網膜症進行の新たな指標になると考えられる。これらの指標が薬剤などの治療効果判定に生かされることを期待する。また **SDT fatty** ラットは **SDT** ラットよりも早期により進行した糖尿病網膜症を発症することが示された。**SDT fatty** ラットは、糖尿病網膜症研究のための 2 型糖尿病動物モデルとして有用性が期待される。糖尿病網膜症研究のために多くの施設で **SDT fatty** ラットおよび **SDT** ラットを使用していただきたいと考えている。

実験 2 では、腎障害が糖尿病網膜症にもたらす影響について検討するために、片腎摘出+0.3%食塩水 **SDT fatty** ラットを作成し評価したが、**SDT fatty** ラットと比べて有意な糖尿病網膜症の進行所見は認められなかった。このラットを糖尿病網膜症研究に使用していくためには、片腎摘出・食塩負荷後も **SDT fatty** ラットと同等の高血糖が維持されるような調整が必要と考えられた。今後は、さらに高週齢あるいは適切な食塩負荷により、高血圧を伴う **SDT fatty** ラットを作成し、よりヒトに近い糖尿病網膜症発現モデルの確立を期待したい。



## 6 引用文献

1. Diabetes Atlas, Seventh Edition Committee: IDF Diabetes Atlas, 7th Edition. *International Diabetes Federation*, Brussels, 2015.
2. 厚生労働省 健康局健康課栄養指導室: 平成 30 年国民健康・栄養調査結果の概要. 厚生労働省, 東京, 1, 2020.  
[https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage\\_08789.html](https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage_08789.html). Accessed 2020 年 2 月 8 日.
3. 中江公裕、小暮文雄、長屋幸郎、三島濟一: わが国における視覚障害の現況. *厚生指標* 38: 13-22, 1991.
4. Morizane Y, Morimoto N, Fujiwara A, Kawasaki R, Yamashita H, Ogura Y, Shiraga F: Incidence and causes of visual impairment in Japan: the first nation-wide complete enumeration survey of newly certified visually impaired individuals. *Jpn J Ophthalmol* 63: 26-33, 2019.
5. 安田美穂: 久山町研究. *あたらしい眼科* 28: 25-29, 2011.
6. Kawasaki R, Wang JJ, Wong TY, Kayama T, Yamashita H: Impaired glucose tolerance, but not impaired fasting glucose, is associated with retinopathy in Japanese population: the Funagata study. *Diabetes Obes Metab* 10: 514-515, 2008.
7. 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: 1076-1084, 2008.
8. The Diabetic Retinopathy Study Research Group: Photocoagulation treatment of proliferative diabetic retinopathy: the second report of diabetic retinopathy study findings. *Ophthalmology* 85: 82-106, 1978.
9. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group: Early photocoagulation for diabetic retinopathy. ETDRS report number 9. *Ophthalmology* 98: 766-785, 1991.
10. Evans JR, Michelessi M, Virgili G: Laser photocoagulation for proliferative diabetic retinopathy. *Cochrane Database Syst Rev* 11: CD011234, 2014.
11. The Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study Research Group: Early vitrectomy for severe proliferative diabetic retinopathy in eyes with useful vision. Results of a randomized trial--Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study Report 3. *Ophthalmology* 95:1307-1320, 1988.
12. The Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study Research Group: Early vitrectomy for severe vitreous hemorrhage in diabetic retinopathy. Four-

- year results of a randomized trial: Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study Report 5. *Arch Ophthalmol* 108: 958-964, 1990.
13. 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.
  14. 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.
  15. Massin P, Bandello F, Garweg JG, Hansen LL, Harding SP, Larsen M, Mitchell P, Sharp D, Wolf-Schnurrbusch UE, Gekkieva M, Weichselberger A, Wolf S: Safety and efficacy of ranibizumab in diabetic macular edema (RESOLVE Study): a 12-month, randomized, controlled, double-masked, multicenter phase II study. *Diabetes Care* 33: 2399-2405, 2010.
  16. Mitchell P, Bandello F, Schmidt-Erfurth U, Lang GE, Massin P, Schlingemann RO, Sutter F, Simader C, Burian G, Gerstner O, Weichselberger A; RESTORE study group: The RESTORE study: ranibizumab monotherapy or combined with laser versus laser monotherapy for diabetic macular edema. *Ophthalmology* 118: 615-625, 2011.
  17. Wang H, Sun X, Liu K, Xu X: Intravitreal ranibizumab (lucentis) for the treatment of diabetic macular edema: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical control trials. *Curr Eye Res* 37: 661-670, 2012.
  18. Schmidt-Erfurth U, Lang GE, Holz FG, Schlingemann RO, Lanzetta P, Massin P, Gerstner O, Bouazza AS, Shen H, Osborne A, Mitchell P; RESTORE Extension Study Group: Three-year outcomes of individualized ranibizumab treatment in patients with diabetic macular edema: the RESTORE extension study. *Ophthalmology* 121: 1045-1053, 2014.
  19. Korobelnik JF, Do DV, Schmidt-Erfurth U, Boyer DS, Holz FG, Heier JS, Midena E, Kaiser PK, Terasaki H, Marcus DM, Nguyen QD, Jaffe GJ, Slakter JS, Simader C, Soo Y, Schmelter T, Yancopoulos GD, Stahl N, Vitti R, Berliner AJ, Zeitz O, Metz C, Brown DM: Intravitreal

- aflibercept for diabetic macular edema. *Ophthalmology* 121: 2247-2254, 2014.
20. Wells JA, Glassman AR, Ayala AR, Jampol LM, Aiello LP, Antoszyk AN, Arnold-Bush B, Baker CW, Bressler NM, Browning DJ, Elman MJ, Ferris FL, Friedman SM, Melia M, Pieramici DJ, Sun JK, Beck RW; Diabetic Retinopathy Clinical Research Network: Aflibercept, bevacizumab, or ranibizumab for diabetic macular edema. *N Engl J Med* 372: 1193-1203, 2015.
  21. 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.
  22. 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.
  23. 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.
  24. UK Prospective Diabetes Study Group: Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. *BMJ* 317: 703-713, 1998.
  25. Matthews DR, Stratton IM, Aldington SJ, Holman RR, Kohner EM; UK Prospective Diabetes Study Group: Risks of progression of retinopathy and vision loss related to tight blood pressure control in type 2 diabetes mellitus: UKPDS 69. *Arch Ophthalmol* 122: 1631-1640, 2004.
  26. Keech AC, Mitchell P, Summanen PA, O'Day J, Davis TM, Moffitt MS, Taskinen MR, Simes RJ, Tse D, Williamson E, Merrifield A, Laatikainen LT, d'Emden MC, Crimet DC, O'Connell RL, Colman PG; FIELD study investigators: Effect of fenofibrate on the need for laser treatment for diabetic retinopathy (FIELD study): a randomised controlled trial. *Lancet* 370: 1687-1697, 2007.
  27. Chew EY, Ambrosius WT, Davis MD, Danis RP, Gangaputra S, Greven CM, Hubbard L, Esser BA, Lovato JF, Perdue LH, Goff DC Jr, Cushman

- WC, Ginsberg HN, Elam MB, Genuth S, Gerstein HC, Schubart U, Fine LJ; ACCORD Eye Study Group: Effects of medical therapies on retinopathy progression in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 363: 233-244, 2010.
28. Lai AK, Lo AC: Animal models of diabetic retinopathy: summary and comparison. *J Diabetes Res* 2013: 106594, 2013.
  29. Goto Y, Kakizaki M, Masaki N: Spontaneous diabetes produced by selective breeding of normal Wistar rats. *Proc Jpn Acad* 51: 80-85, 1975.
  30. Östenson CG: The Goto-Kakizaki Rat. In: *Animal Models of Diabetes. Frontiers in Research. Second Edition*. Edited by E. Shafir, *CRC Press*, Boca Raton, 119-137, 2007.
  31. Matsubara H, Kuze M, Sasoh M, Ma N, Furuta M, Uji Y: Time-dependent course of electroretinograms in the spontaneous diabetic Goto-Kakizaki rat. *Jpn J Ophthalmol* 50: 211-216, 2006.
  32. Miyamoto K, Ogura Y, Nishiwaki H, Matsuda N, Honda Y, Kato S, Ishida H, Seino Y: Evaluation of retinal microcirculatory alterations in the Goto-Kakizaki rat. A spontaneous model of non-insulin-dependent diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 898-905, 1996.
  33. 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.
  34. Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saitoh Y, Kurosuni M, Natori T: New inbred strain of Long-Evans Tokushima lean rats with IDDM without lymphopenia. *Diabetes* 40: 1375-1381, 1991.
  35. 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.
  36. 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.
  37. 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.
  38. Masuyama T, Komeda K, Hara A, Noda M, Shinohara M, Oikawa T,

- Kanazawa Y, Taniguchi K: Chronological characterization of diabetes development in male Spontaneously Diabetic Torii rats. *Biochem Biophys Res Commun* 314: 870-877, 2004.
39. Masuyama T, Fuse M, Yokoi N, Shinohara M, Tsujii H, Kanazawa M, Kanazawa Y, Komeda K, Taniguchi K: Genetic analysis for diabetes in a new rat model of nonobese type 2 diabetes, Spontaneously Diabetic Torii rat. *Biochem Biophys Res Commun* 304: 196-206, 2003.
40. Fuse M, Yokoi N, Shinohara M, Masuyama T, Kitazawa R, Kitazawa S, Seino S: Identification of a major locus for islet inflammation and fibrosis in the Spontaneously Diabetic Torii rat. *Physiol Genomics* 35: 96-105, 2008.
41. Yokoi N, Fuse M, Seino S: Genetics of the Spontaneously Diabetic Torii rat. *The Open Diabetes J* 4: 21-25, 2011.
42. Ohta T, Matsui K, Miyajima K, Sasase T, Masuyama T, Shoda T, Koizumi H, Shinohara M, Matsushita M: Effect of insulin therapy on renal changes in spontaneously diabetic Torii rats. *Exp Anim* 56: 355-362, 2007.
43. Sasase T, Ohta T: Diabetic neuropathy in Spontaneously Diabetic Torii rat. *The Open Diabetes J* 4: 50-54, 2011.
44. Kakehashi A, Saito Y, Mori K, Sugi N, Ono R, Yamagami H, Shinohara M, Tamemoto H, Ishikawa SE, Kawakami M, Kanazawa Y: Characteristics of diabetic retinopathy in SDT rats. *Diabetes Metab Res Rev* 22: 455-461, 2006.
45. Sasase T, Ohta T, Ogawa N, Miyajima K, Ito M, Yamamoto H, Morinaga H, Matsushita M: Preventive effects of glycaemic control on ocular complications of Spontaneously Diabetic Torii rat. *Diabetes Obes Metab* 8: 501-507, 2006.
46. Sasase T, Morinaga H, Abe T, Miyajima K, Ohta T, Shinohara M, Matsushita M, Kakehashi A: Protein kinase C beta inhibitor prevents diabetic peripheral neuropathy, but not histopathological abnormalities of retina in Spontaneously Diabetic Torii rat. *Diabetes Obes Metab* 11: 1084-1087, 2009.
47. 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 J* 4: 108-113, 2011.
48. Toyoda F, Tanaka Y, Shimmura M, Kinoshita N, Takano H, Kakehashi A: Diabetic retinal and choroidal edema in SDT rats. *J Diabetes Res* 2016: 2345141, 2016.
  49. 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. *J Diabetes Res* 2014: 672590, 2014.
  50. Toyoda F, Kobayashi M, Takagi R, Tanaka Y, Shimmura M, Kinoshita N, Takano H, Yamada H, Kawakami M, Kakehashi A: Tofogliflozin, a SGLT2 inhibitor, improves diabetic ocular complications in Spontaneously Diabetic Torii rats. *Diabetes Updates* 5: DOI: 10.15761/DU.1000126, 2019.
  51. Ideno J, Mizukami H, Kakehashi A, Saito Y, Okada T, Urabe M, Kume A, Kuroki M, Kawakami M, Ishibashi S, Ozawa K: Prevention of diabetic retinopathy by intraocular soluble flt-1 gene transfer in a spontaneously diabetic rat model. *Int J Mol Med* 19: 75-79, 2007.
  52. Masuyama T, Katsuda Y, Shinohara M: A novel model of obesity-related diabetes: introgression of the Lepr(fa) allele of the Zucker fatty rat into nonobese Spontaneously Diabetic Torii (SDT) rats. *Exp Anim* 54: 13-20, 2005.
  53. Matsui K, Ohta T, Oda T, Sasase T, Ueda N, Miyajima K, Masuyama T, Shinohara M, Matsushita M: Diabetes-associated complications in Spontaneously Diabetic Torii fatty rats. *Exp Anim* 57: 111-121, 2008.
  54. Ishii Y, Maki M, Yamamoto H, Sasase T, Kakutani M, Ohta T: Evaluation of blood pressure in Spontaneously Diabetic Torii-Lepr(fa) rats. *Exp Anim* 59: 525-529, 2010.
  55. Yamaguchi T, Sasase T, Mera Y, Tomimoto D, Tadaki H, Kemmochi Y, Ohta T, Sato E, Matsushita M: Diabetic peripheral neuropathy in Spontaneously Diabetic Torii-Lepr(fa) (SDT fatty) rats. *J Vet Med Sci* 74: 1669-1673, 2012.
  56. Kimura S, Sasase T, Ohta T, Sato E, Matsushita M: Characteristics of bone turnover, bone mass and bone strength in Spontaneously Diabetic Torii-Lepr fa rats. *J Bone Miner Metab* 30: 312-320, 2012.
  57. Katsuda Y, Kemmochi Y, Maki M, Sano R, Ishii Y, Miyajima K, Kakimoto K, Ohta T: Physiological changes induced by salt intake in

- female Spontaneously Diabetic Torii-Lepr(fa) (SDT fatty) rat, a novel obese type 2 diabetic model. *Anim Sci J* 85: 588-594, 2014.
58. Kusuhara S, Fukushima Y, Ogura S, Inoue N, Uemura A: Pathophysiology of Diabetic Retinopathy: The Old and the New. *Diabetes Metab J* 42: 364-376, 2018.
  59. Nagaoka T, Kitaya N, Sugawara R, Yokota H, Mori F, Hikichi T, Fujio N, Yoshida A: Alteration of choroidal circulation in the foveal region in patients with type 2 diabetes. *Br J Ophthalmol* 88: 1060-1063, 2004.
  60. 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.
  61. 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.
  62. Jo Y, Ikuno Y, Iwamoto R, Okita K, Nishida K: Choroidal thickness changes after diabetes type 2 and blood pressure control in a hospitalized situation. *Retina* 34: 1190-1198, 2014.
  63. Katsuda Y, Sasase T, Tadaki H, Mera Y, Motohashi Y, Kemmochi Y, Toyoda K, Kakimoto K, Kume S, Ohta T: Contribution of hyperglycemia on diabetic complications in obese type 2 diabetic SDT fatty rats: effects of SGLT inhibitor phlorizin. *Exp Anim* 64: 161-169, 2015.
  64. Takakura S, Toyoshi T, Hayashizaki Y, Takasu T: Effect of ipragliflozin, an SGLT2 inhibitor, on progression of diabetic microvascular complications in spontaneously diabetic Torii fatty rats. *Life Sci* 147: 125-131, 2016.
  65. Caspi RR: Experimental autoimmune uveoretinitis in the rat and mouse. *Current Protocols in Immunology* 53: 15.6.1-15.6.20, 2003.
  66. Yokoyama T, Lee JK, Miwa K, Opthof T, Tomoyama S, Nakanishi H, Yoshida A, Yasui H, Iida T, Miyagawa S, Okabe S, Sawa Y, Sakata Y, Komuro I: Quantification of sympathetic hyperinnervation and denervation after myocardial infarction by three-dimensional assessment of the cardiac sympathetic network in cleared transparent murine hearts. *PLoS One* 12: e0182072, 2017.
  67. Taylor CR: Quantitative in situ proteomics; a proposed pathway for quantification of immunohistochemistry at the light-microscopic level.



*Cell Tissue Res* 360: 109–120, 2015.