

糖尿病ラット末梢神経障害発症因子としての
アルドースリダクターゼに関する薬理学的研究

2013

下重 幸則

目次

緒言	1
第1章 Zenarestat の aldose reductase 阻害様式と streptozotocin 誘発糖尿病ラットにおける糖尿病性神経障害に対する作用	4
実験方法	6
実験結果	11
考察	20
第2章 Zucker diabetic fatty ラットの末梢神経機能障害に対する zenarestat の作用	24
実験方法	25
実験結果	28
考察	32
第3章 慢性 STZ 誘発糖尿病ラットの後根神経節形態異常に対する zenarestat の作用	34
実験方法	35
実験結果	38
考察	41
総括	43
謝辞	45
発表論文目録	46
引用文献	47

緒言

現在世界で糖尿病患者は1.7億人存在すると考えられている(1)。さらにこれまで先進国において多く認められていた糖尿病患者は、今後新興国を中心にさらに増加の一途をたどることが予想されている(1)。糖尿病に長期罹患した場合、インスリンおよび経口血糖降下薬を用いた強化療法を施しても正常レベルまで血糖値を下げることはできないこと、合併症の発症進展を完全に抑制できないことが欧米における臨床調査により判明しており、臨床上の治療手段としてまた医療経済学的観点からも新規血糖降下薬のみならず糖尿病合併症治療薬が求められている(2, 3)。

糖尿病合併症のうち糖尿病性神経障害は高頻度に認められる合併症の一つであり、新規糖尿病患者の7%、長期糖尿病罹患患者の50%に出現することが報告されている(4)。糖尿病性神経障害は消化管障害、起立性低血圧、発汗異常などの自律神経機能異常、知覚鈍磨、疼痛、痺れなどの感覚神経障害などとしておもにあらわれ、循環器障害、糖尿病性足病変、四肢切断の原因疾患となり患者のQOLを著しく損なう疾患である。本疾患に対して血糖管理を前提としてaldose reductase阻害剤、血小板凝集阻害剤/末梢血流改善剤、抗酸化剤が末梢神経障害を治療する目的で用いられており、さらにそのほかの症状にあわせてさまざまな薬剤が対症療法として用いられている。しかしながら発症頻度、病態進展を十分に抑制しているとは言いがたく、さらなる病態の理解に基づいた治療手段が求められている。

糖尿病性神経障害の発症メカニズムにはポリオール代謝経路活性亢進、protein kinase C活性亢進、最終糖化産物生成、酸化ストレスの亢進、神経栄養因子類の機能異常などの報告がなされ、精力的な研究が行われている(5)。なかでもポリオール代謝経路活性亢進に関する研究は1960年代より行われており、本疾患の大きな発症メカニズムのひとつとして軽視できないものと考えられている(6)。ポリオール代謝経路とはグルコースを、ソルビトールを介してフルクトースへ代謝する経路であり、律速酵素はグルコースをソルビトールへ変換するaldose reductaseである。高血糖下では本代謝経路で代謝されるグルコースが増加し、細胞内へのソルビトールの蓄積、補酵素であるNADPH/NADP⁺のバランスの崩壊などが惹起され末梢神経障害

発症の一因になると考えられている。

上述した臨床ニーズから糖尿病性末梢神経障害治療薬の創出をめざし多くの aldose reductase inhibitor が発見されている (6)。それらのうち zenarestat は臨床および前臨床において有効性が認められたキナゾリン骨格を有する特異的 aldose reductase inhibitor である (7, 8)。本研究では zenarestat を用いて糖尿病性神経障害の aldose reductase を介した発症メカニズムを検討した。すなわち第1章において、zenarestat のリコンビナントヒト AR に対する阻害活性および阻害様式を検討するとともに、糖尿病動物の後根神経節 (dorsal root ganglia, DRG) における遺伝子発現異常を神経栄養因子受容体および神経細胞骨格タンパク質に着目し解析した。第2章では臨床において2型糖尿病患者が多くを占めているにもかかわらず、前臨床モデル動物を用いた研究では1型糖尿病動物を用いた報告が多数を占めていることから、2型糖尿病モデル動物を用いて末梢神経障害の存在および aldose reductase の関与の有無を検討した。第3章では、糖尿病罹病期間が延長すると病変部位が末梢神経線維のみならず、脊柱内に存在する DRG にまで及ぶことから、慢性糖尿病ラットの DRG 病変に対するポリオール代謝経路活性亢進の関与の有無を検討した。

なお、本文中に使用した略号は以下の通りである。

AR	aldose reductase
ARI	aldose reductase inhibitor
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
DRG	dorsal root ganglia
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
DMSO	dimethylsulfoxide
FML	F-wave minimal latency
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
MC	methylcellulose

MNCV	motor nerve conduction velocity
NADPH	β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NF-H	heavy neurofilament
NF-L	light neurofilament
NF-M	medium neurofilament
NGF	nerve growth factor
NT-3	neurotrophin-3
ODS	octadecylsilane
SD	Sprague-Dawley
STZ	streptozotocin
ZDF	Zucker diabetic fatty

第1章 Zenarestat の aldose reductase 阻害様式と streptozotocin 誘発糖尿病

ラットにおける糖尿病性神経障害に対する作用

Zenarestat は藤沢薬品工業（現アステラス製薬）において見出されたキナゾリン骨格を有する aldose reductase inhibitor (ARI) である。本化合物は streptozotocin 誘発糖尿病ラット (STZ ラット) における末梢神経障害および臨床における糖尿病性末梢神経障害を改善することが報告されている (7-9)。しかしながら本化合物の AR 阻害様式検討はラット、ウサギおよびウシ由来の AR を用いて報告されているのみであり、ヒト AR に対する阻害様式は不明である (8)。さらに酵素阻害特異性について報告が乏しく、得られた知見が AR 阻害に基づくものと考えするには根拠に欠けるものと思われる。

一方、糖尿病性末梢神経障害の病態形成メカニズムには不明な点が多く残されているが、精力的な研究が行われ明らかにされつつある。なかでも神経栄養因子を介したシグナル伝達異常に関する報告は多く、病態形成・進展の大きな原因として捉えられている (10, 11)。Nerve growth factor (NGF) や neurotrophin-3 (NT-3) は末梢組織で生成され、末梢神経終末に存在するそれぞれの受容体 (Trk-A および Trk-C) に結合後、逆行性軸索流により運搬され神経細胞体へ到達するとされている。糖尿病動物ではこれら神経栄養因子の逆行性輸送能が低下していることが報告されており、recombinant NGF の投与により糖尿病性神経障害が寛解することが動物実験および臨床試験により確認されている (12-16)。一方 NT-3 は糖尿病動物の DRG における neurofilament の蓄積およびミトコンドリア機能異常を是正し、神経伝導速度遅延を改善する報告がなされており、糖尿病性神経障害との密接な関与が指摘されている (17-19)。

末梢神経軸索萎縮は糖尿病性末梢神経障害において顕著に認められる病理像であり、神経伝導速度遅延の一因と考えられている (20, 21)。神経軸索径は神経細胞骨格タンパク質の重合の程度と密接に相関しており、糖尿病性神経障害病態下において神経細胞骨格タンパク質の発現異常、軸索輸送異常およびリン酸化異常が報告されている (22-29)。

本章では zenarestat の ARI としてのポテンシャルを種差、酵素阻害様式、選択性および臓器中ソルビトール蓄積抑制の観点から見極めるとともに、薬効メカニズム解析を目的として

DRG における神経栄養因子受容体および神経細胞骨格タンパク質 mRNA 発現量に対する作用を検討した。

実験方法

(1) 実験動物

雄性 Sprague-Dawley (SD) ラットを日本チャールスリバー (Yokohama, Japan) より購入した。動物は、12 時間の明暗サイクルの人工照明下、室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ および湿度 $55 \pm 5\%$ で飼育し自由飲水下で固形飼料を与えた。

すべての実験操作は、藤沢薬品工業 (現アステラス製薬)・動物実験委員会およびアステラス製薬・動物実験委員会のガイドラインにしたがって実施した。

(2) 使用薬物および投与条件

Zenarestat は藤沢薬品工業 (現アステラス製薬) にて合成した。動物に投与する場合は 0.5% methylcellulose (以下 MC) に懸濁し、 5 ml/kg の容量で経口投与した。

(3) AR 調整

8 週齢雄性 SD ラットをエーテル麻酔下で腹部大動脈より脱血致死させ、坐骨神経および水晶体を採取した。5 倍量の 5 mM dithiothreitol 含有氷冷生理的食塩水でホモジナイズし、 $105,000 \times g$ 、1 時間の遠心分離を行った。得られた上清に ammonium sulfate を添加して 50% 飽和とした後、1 時間攪拌後 $10,000 \times g$ 、30 分間の遠心分離を行った。このときの上清にさらに ammonium sulfate を添加して 75% とした後、1 時間攪拌後 $10,000 \times g$ 、30 分間の遠心分離を行った。このときの沈殿を 5 mM dithiothreitol を含む 50 mM NaCl 溶液にて懸濁して同緩衝液に対して十分に透析した後、 $10,000 \times g$ 、30 分間の遠心分離を行い得られた上清を AR 酵素活性測定へ供した。すべての操作は 4°C にて行った。

ヒト AR はリコンビナント酵素 (rhAR) を用いた (Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan)。

(4) AR 酵素活性測定

反応液中には 100 mM sodium phosphate、 400 mM lithium sulfate、 10 mM *dl*-glyceraldehyde、 $150 \mu\text{M}$ β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)、各濃度の zenarestat お

よび適量の AR を含み全量を 2 ml として測定を行った。なお rhAR の酵素反応では lithium sulfate を含まない反応液を用いた。反応は 25°C にて NADPH の添加により開始し、340 nm における吸光度の減少を UV-2200 あるいは UV2100PC 分光光度計 (SHIMAZU, Kyoto, Japan) を用いて測定した。酵素活性 1 unit は 25°C、1 分間に 1 μ mole の NADPH を酸化する酵素量とした。Zenarestat は dimethylsulfoxide (DMSO) に 1 mM の濃度で溶解し、蒸留水で希釈し用いた。IC₅₀ 値は直線回帰式よりもとめ、rhAR を用いた酵素阻害様式検討は基質 *d*l-glyceraldehyde、補酵素 NADPH を用いて Lineweaver-Bulk プロットにより行った。

(5) 酵素特異性検討

酵素阻害検討に用いた各種酵素を表 1-3 に示した。Hexokinase (30)、phosphofructokinase (31)、pyruvate kinase (32)、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (33)、lactate dehydrogenase (34)、glucose-6-phosphate dehydrogenase (35)、6-phosphogluconate dehydrogenase (36)、sorbitol dehydrogenase (37)、alcohol dehydrogenase (38)、glutathione reductase (39)、aldehyde reductase (40)、 α -D-glucosidase (41) および α -amylase (ネオ・アマラーゼテスト「第一」、第一化学薬品, Tokyo, Japan) の酵素活性はそれぞれ U1100 分光光度計 (HITACHI, Tokyo, Japan)、UV-2200 あるいは UV2100PC 分光光度計 (SHIMAZU, Kyoto, Japan) を用いて分光学的分析により検討した。Nitric oxide synthase (NOS) 活性は TCI-Nox 1000m (Visible detector/S-3250, GASTORR GT102, Tokyo Kasei, Tokyo, Japan) を用いて検討した。Zenarestat はそれぞれの反応液に溶解し 0.1 mM における阻害率を算出した。Aldehyde reductase に関しては同濃度で 50 %以上の阻害が認められたため、IC₅₀ 値を直線回帰式よりもとめた。

ウシ心臓 hexokinase、ヒト赤血球 glucose-6-phosphate dehydrogenase、ウサギ筋 phosphofructokinase、ヒト赤血球 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、ウマ肝 alcohol dehydrogenase、ヒト赤血球 6-phosphogluconate dehydrogenase、ヒツジ肝 sorbitol dehydrogenase、ウシ小腸粘膜 glutathione reductase、パン酵母 α -D-glucosidase およびヒト唾液 α -amylase は Sigma (St. Louis, USA) より入手した。ウサギ筋 pyruvate kinase および

ヒト筋 lactate dehydrogenase はそれぞれ Wako pure chemicals (Osaka, Japan) および ICN Biochemicals (Irvine, USA) より入手した。α-D-glucosidase はラット小腸粘膜より (42)、sorbitol dehydrogenase はラットおよびウサギ水晶体より (43)、それぞれ粗抽出した。Aldehyde reductase はラット腎より部分精製した (40)。NOS はラット小脳より抽出した (44)。

(6) 動物実験

7 週齢時に一晩絶食後 STZ (Sigma, St. Louis, USA) を尾静注した (60 mg/kg)。正常ラットには溶媒であるクエン酸緩衝液 (pH 4.5) のみ投与した。

STZ 投与 2 週間後、体重および血糖値を測定し、これらの値をもとに STZ ラットを 2-5 群に分けた (それぞれ STZ 対照、3.2 mg/kg、10 mg/kg、32 mg/kg および 100 mg/kg zenarestat 群)。群分け後より薬物処置群には zenarestat を、正常対照および STZ 対照群には溶媒である 0.5 % MC を 1 日 1 回反復経口投与を 2 週間にわたって行った。

(7) 血糖値測定

切皮により尾静脈よりヘパリンコートキャピラリー中に血液を得た。遠心により血球を分離後血漿を得た。血漿中グルコース濃度測定はムタロターゼ・GOD 法 (Glucose CII-Test Wako, Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan) により行った。

(8) 組織中ソルビトール濃度測定

臓器別ソルビトール濃度測定実験では zenarestat 投与 2 週間後、ラットをエーテルで麻酔し、断頭放血屠殺した。速やかに坐骨神経、水晶体、網膜および腎皮質を採取し湿重量を測定後、ドライアイスで凍結しホモジナイズまで -80°C で保存した。それぞれの組織片へ蒸留水を 3 ml 加え、ホモジナイズを行った。

神経中ソルビトール濃度測定実験では zenarestat 投与 2 週間後、ラットを 50 mg/kg ペントバルビタール (i. p. : 大阪, 大日本製薬) で麻酔し、断頭放血屠殺した。速やかに全脳、脊髄、DRG (L4-6) および坐骨神経を採取し湿重量を測定後、ドライアイスで凍結しホモジナイズ

まで-80°Cで保存した。それぞれの神経組織片へ蒸留水を加え（全脳 10 ml、脊髄 3 ml、DRG 1 ml、坐骨神経 1.5 ml）、ホモジナイズを行った。

ホモジネート液 0.5 ml に内部標準として 20 µg/ml ダルシトール水溶液 0.1 ml をくわえ、1 M HCl (50 µl) およびジクロロメタン (4 ml) を添加した。室温で 10 分間攪拌後、900×g で 5 分間遠心した。得られた上清を 60°C で窒素乾固した。抽出された糖類を Björkqvist らの方法を改変して誘導体化した (45)。すなわち得られた残渣に 75 µL ピリジンおよび 25 µl フェニルイソシアネートを加え、60°C で 1 時間インキュベートした。室温へ戻した後 50 µl メタノールを加えた。検量線用ソルビトール水溶液も同様の操作を行った。フェニルイソシアネート化されたサンプルを高速液体クロマトグラフィーへ注入した。Octadecylsilane (ODS) カラム (Waters、Symmetry C-18) を 30°C に保ち、移動層 (水 : アセトニトリル : メタノール : テトラヒドロフラン = 550:700:760:20) を流速 1 ml/min で流した。240 nm における吸光度を指標にソルビトール濃度を定量し、組織湿重量で補正した。

(9) DRG における神経栄養因子受容体および神経細胞骨格タンパク質 mRNA 定量

Zenarestat 投与 2 週間後、ラットをエーテル麻酔下で断頭放血屠殺した。DRG (L3-6) を速やかに採取し、ドライアイスで凍結後 mRNA 抽出操作まで-80°C で保存した。RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて DRG より total RNA を抽出し、7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) を用いて real-time polymerase chain reaction (PCR) 法にて定量した。βIII tubulin、NF-L、NF-M および NF-H の定量には市販 (Applied Biosystems) の primer および probe のセットを用いた。他の遺伝子については市販ソフト (Primer Express 2.0) を用いて primer および probe のセットを設計し (表 1-1)、SIGMA genosys (St. Louis, USA) より入手した。PCR は TaqMan® EZ RT-PCR CORE REAGENTS あるいは TaqMan® Gene Expression Assays (いずれも Applied Biosystems) を用いて行った。NF-L、NF-M、NF-H、 α -tubulin、βIII tubulin および GAPDH の定量には total RNA より SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RNA (Invitrogen, Carlsbad, USA) を用いて cDNA を合成し行った。検量線には全脳あるいは DRG よりえられた total RNA を用いた。すべての遺伝子発

現量は GAPDH mRNA 発現量で補正し、正常対照群の平均値に対する相対比として求めた。

(10) 統計計算

すべての測定項目について平均値および標準誤差を算出した。

有意差検定は2群比較には Student's t-test または Aspin-Welch test を、多群比較には Dunnett の多重比較検定を用いた。いずれの検定とも有意水準は5%に設定した。

表 1-1 定量に用いた primer および probe のセット

Gene	Sequence (fore-primer, probe, reverse-primer)	Accession No.
Trk-A	tggagaacccacagtacttcag FAM-atacctgtgtccaccatatcaagcgc-TAMRA ctagctcccacttgagaatgat	NM_021589
Trk-B	gttggcgagacattccaa FAM-tttggcatgaaaggcccag-TAMRA tcatcgctgcttgctgatga	NM_012731
Trk-C	tggaccctggtgaatgtga FAM-agcgaagacaatggtttcaccctgac-TAMRA cacgttctctgcaatgca	NM_019248
p75	tctgtctattgctccatcttg FAM-tattgctttcaagaggtggaacagctgc-TAMRA ctggtggcgcccttgtttatt	NM_012610
T α 1	gggatgtttattctggtccaaca FAM-aaagttgtgggctgatca-TAMRA cagtaactgtatgaaagcacacattgc	NM_022298
GAPDH	gcacagtcaaggctgagaat FAM-catcaccatcttccaggagcgaga-TAMRA tcacccatttgatgttagc	NM_017008

実験結果

(1) Zenarestat の AR 阻害活性および阻害様式

Zenarestat の AR 阻害活性を表 1-2 に示した。Zenarestat の rhAR、ラット水晶体 AR およびラット坐骨神経 AR に対する IC_{50} 値はそれぞれ 44、7.5 および 9.0 nM であった。

Zenarestat の rhAR 阻害様式を検討した結果を図 1-1 に示した。補酵素である NADPH 濃度を 150 μ M に固定し、基質である *dl*-glyceraldehyde および zenarestat の濃度を変動させるとその X 軸切片は収束した ($K_i=63.5 \pm 7.9$ nM)。また、*dl*-glyceraldehyde 濃度を 10 mM に固定し NADPH および zenarestat の濃度を変動させてもすべての X 軸切片が収束した ($K_i=62.7 \pm 10.5$ nM)。

解糖系、ペントースリン酸経路、ポリオール代謝経路および NADPH を補酵素とする NOS などの酵素活性に対する zenarestat 阻害活性を表 1-3 に示した。0.1 mM zenarestat は aldehyde reductase を除き阻害活性を示さなかった。Zenarestat の aldehyde reductase に対する IC_{50} 値は 2.4 μ M であった。

(2) 体重および血糖値

各実験に用いたラットの体重および血糖値を表 1-4 に示した。

すべての実験において正常対照群の値と比べて STZ 対照群の体重は有意に低く、血糖値は有意に高かった。

STZ ラットのこれらの値に対し、zenarestat 処置は組織中ソルビトール濃度検討実験における最高用量処置群の血糖値をのぞき有意な影響を与えなかった。

表 1-2 zenarestat の AR に対する阻害活性

AR	IC ₅₀ (nM)
ヒト	44 (41-47)
ラット水晶体	7.5 (7.0-7.9)
ラット坐骨神経	9.0 (8.3-9.8)

rhAR、ラット水晶体および坐骨神経より抽出した AR に対する zenarestat の阻害活性を測定した。基質である *d*-glyceraldehyde は 10 mM の濃度で、補酵素である NADPH は 150 μM の濃度でアッセイを行った。IC₅₀ 値は直線回帰式よりもとめた。カッコ内の数字は 95 %信頼限界をしめす。

(3) 臓器別および神経中ソルビトール濃度

臓器別ソルビトール濃度を表 1-5 および図 1-2 に示した。

いずれの臓器においても正常対照群と比較し STZ 対照群ではソルビトール濃度の上昇が認められたが、水晶体において最も著しく、次いで坐骨神経、網膜および腎皮質の順に蓄積が認められた。また、いずれの部位においても zanarestat は用量依存的にソルビトール濃度を抑制したが、坐骨神経において最も低用量で抑制した。各臓器における ED₅₀ 値はそれぞれ、坐骨神経 ; 6.9 mg/kg、水晶体 ; 41.0 mg/kg、網膜 ; 37.6 mg/kg、腎皮質 ; >100 mg/kg であった。

神経中ソルビトール濃度測定の結果を図 1-3 に示した。

いずれの部位とも正常対照群と比較し STZ 対照群ではソルビトール濃度の有意な上昇が認められ、脊髄、DRG および坐骨神経では著しいものであった。

Zenarestat 処置により脊髄、DRG および坐骨神経中ソルビトール濃度は用量依存的に抑制され 32 mg/kg 処置群ではほぼ正常対照群の値に近いものであった。一方全脳では zenarestat 処置により有意な影響は認められなかった。

表 1-3 各種酵素に対する zenarestat の阻害活性

酵素	由来	Inhibition at 0.1 mM (%)
解糖系		
Hexokinase	ウシ心臓	0.0
Phosphofructokinase	ウサギ筋	-3.1
Pyruvate kinase	ウサギ筋	0.6
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	ヒト赤血球	7.4
Lactate dehydrogenase	ヒト筋	-5.5
ペントースリン酸経路		
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	ヒト赤血球	-2.2
6-phosphogluconate dehydrogenase	ヒト赤血球	0.3
ポリオール代謝経路		
Sorbitol dehydrogenase	ヒツジ肝	3.7
	ラット水晶体	1.8
	ウサギ水晶体	9.5
その他		
Glutathione reductase	ウシ小腸粘膜	3.9
NOS	ラット小脳	-2.9
Aldehyde reductase	ラット腎	IC ₅₀ =2.4 μM (2.1-2.8 μM)
α-D-glucosidase	パン酵母	10.0
	ラット小腸粘膜	1.8
Alcohol dehydrogenase	ウマ肝	5.1
α-amylase	ヒト唾液	2.5

酵素阻害活性は分光学的分析により検討した。ただし NOS に関しては TCI-Nox1000m を用いて検討した。いずれの酵素とも 0.1 mM zenarestat による阻害率を算出した。ただし aldehyde reductase は 0.1 mM の濃度で阻害活性が認められたため、IC₅₀ 値を直線回帰式よりもとめた。カッコ内の数字は 95 %信頼限界

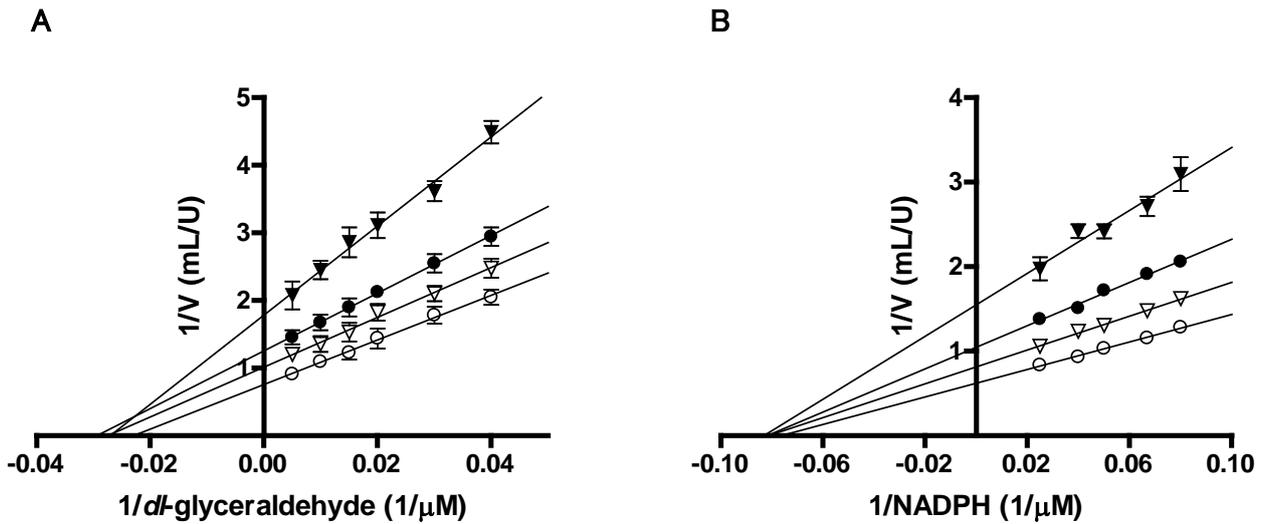


図 1-1 Zenarestat の rhAR 阻害様式

Zenarestat の rhAR に対する阻害様式に関する Lineweaver-Burk plot。○ : 0 M zenarestat、▽ : 25 nM zenarestat、● : 45 nM zenarestat、▼ : 65 nM zenarestat。A: 補酵素である NADPH 濃度を 150 μM に固定し基質である *dl*-glyceraldehyde の濃度依存性を検討した。B : *dl*-glyceraldehyde 濃度を 10 mM に固定し NADPH の濃度依存性を検討した。平均値 ± 標準誤差、n=3。

(4) 神経栄養因子受容体および神経細胞骨格タンパク質 mRNA 定量

STZ ラットの DRG における神経栄養因子受容体 mRNA 発現量検討結果を図 1-4 に示した。

STZ 対照群において、正常対照群の発現量と比較し有意な変動を示した神経栄養因子受容体 mRNA は Trk-C mRNA のみであり他の受容体 mRNA 発現量は有意な変動を認めなかった。一方 zenarestat 処置群の DRG における Trk-C mRNA 発現量は STZ 対照群の値と比較し有意な低値を示した。

STZ ラットの DRG における神経細胞骨格タンパク質 mRNA 発現量検討結果を図 1-5 に示した。

STZ 対照群において、正常対照群の発現量と比較し有意な変動を示した神経細胞骨格タンパク質 mRNA は NF-H および α -tubulin mRNA であり、それぞれ有意な低値および高値を示した。これらの変動は zenarestat 処置により影響を受けなかった。

表 1-4 STZ ラットの体重および血糖値（薬物処置後）

検討項目 群	体重 (g)		血糖値 (mg/dl)	
臓器別ソルビトール濃度測定群				
正常対照 (7)	398 ± 6		191 ± 5	
STZ 対照 (7)	253 ± 13	**	654 ± 35	**
3.2 mg/kg zenarestat (7)	258 ± 6		668 ± 43	
10 mg/kg zenarestat (7)	258 ± 8		584 ± 19	
32 mg/kg zenarestat (7)	244 ± 10		560 ± 26	
100 mg/kg zenarestat (7)	257 ± 6		542 ± 9	#
神経中ソルビトール濃度測定群				
正常対照 (7)	405 ± 12		123 ± 3	
STZ 対照 (8)	290 ± 9	**	535 ± 11	**
3.2 mg/kg zenarestat (8)	306 ± 7		537 ± 16	
32 mg/kg zenarestat (8)	302 ± 5		607 ± 31	#
DRG における mRNA 発現量測定群				
正常対照 (18)	420 ± 7		148 ± 7	
STZ 対照 (20)	274 ± 9	**	545 ± 29	**
32 mg/kg zenarestat (20)	280 ± 8		520 ± 24	

それぞれの実験に用いたラットの薬物処置 2 週間後の体重および血糖値を示した。Zenarestat 処置群の血糖値が STZ 対照群の血糖値と比較して有意な差が認められた実験があったが再現性が得られるものではなかった。平均値 ± 標準誤差、カッコ内の数字は例数。** ; $p < 0.01$ vs 正常対照群 (Student' s t-test or Aspin-Welch test)、# ; $p < 0.05$ vs STZ 対照群 (Dunnett の多重比較検定)

表 1-5 STZ ラットにおける臓器別ソルビトール濃度

部位	正常対照	STZ 対照
坐骨神経	89.4 ± 7.1	1577.3 ± 190 **
水晶体	87.8 ± 8.1	32586.0 ± 1510 **
網膜	64.8 ± 9.1	1312.5 ± 90.1 **
腎皮質	42.3 ± 5.1	182.8 ± 14.4 **

STZ 処置 4 週間後のラット組織よりジクロロメタンを用いてソルビトールを抽出し、フェニルイソシアネート化したソルビトールを ODS カラムにて分離後、分光学的に定量した。単位: nmol/g、平均値±標準誤差、n=7、**; $p < 0.01$ vs 正常対照群 (Student's t-test or Aspin-Welch test)

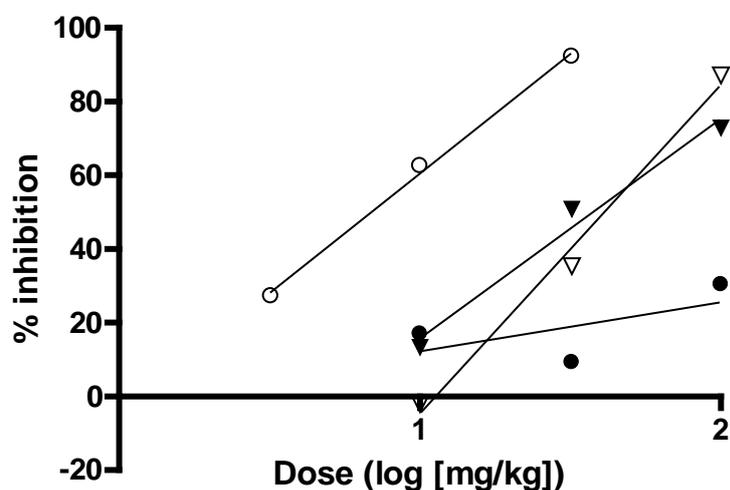


図 1-2 STZ ラットにおける臓器別ソルビトール濃度に対する zenarestat の作用

○: 坐骨神経、▽: 水晶体、●: 腎皮質、▼: 網膜。Zenarestat 処置 2 週間後のラットより各臓器を採取し、ソルビトール濃度を定量した。縦軸は正常対照群の平均値を 100 %、STZ 対照群の平均値を 0 %として算出した抑制率を示す。値は 7 例の平均値。

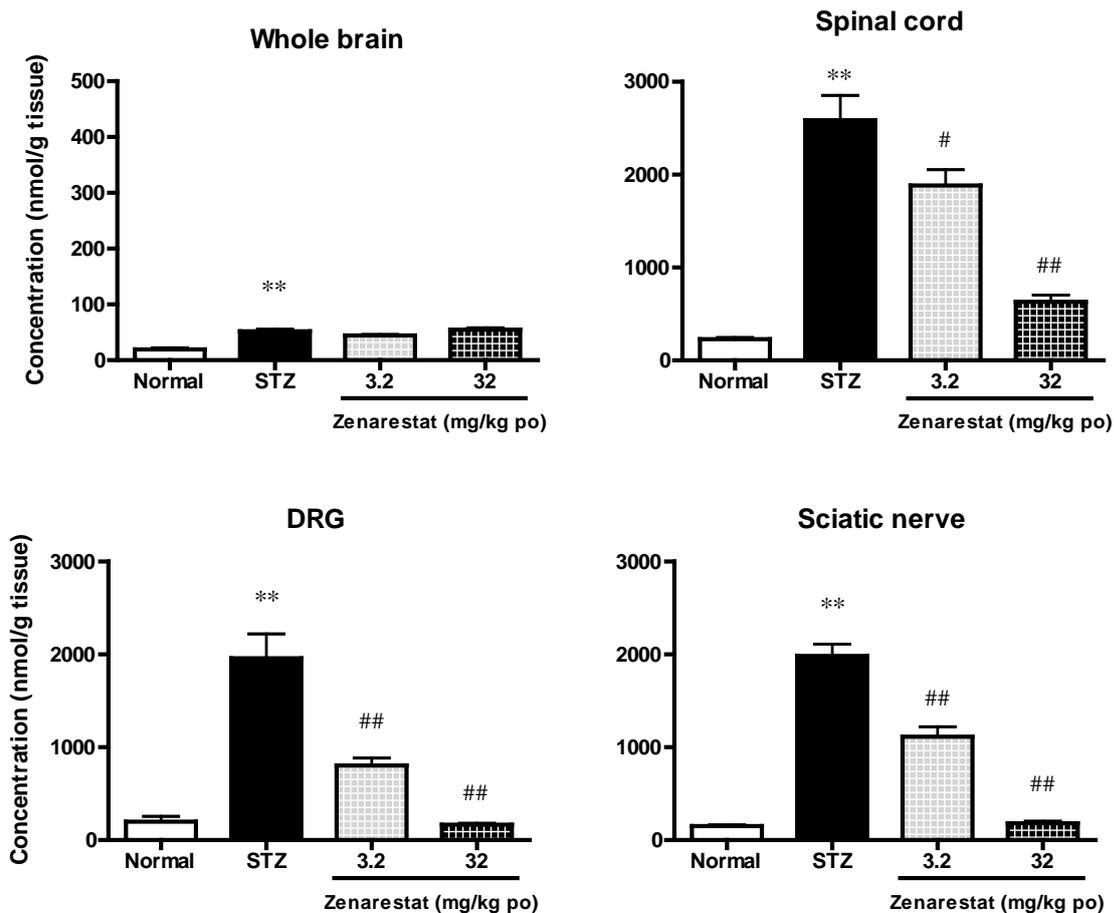


図 1-3 STZ ラットにおける神経中ソルビトール濃度に対する zenarestat の作用

Zenarestat 処置 2 週間後のラットより各神経組織を採取し、ソルビトール濃度を定量した。平均値+標準誤差、n=7-8、** ; $p < 0.01$ vs Normal (Student's t-test or Aspin-Welch test)、# ; $p < 0.05$, ## ; $p < 0.01$ vs STZ (Dunnett の多重比較検定)

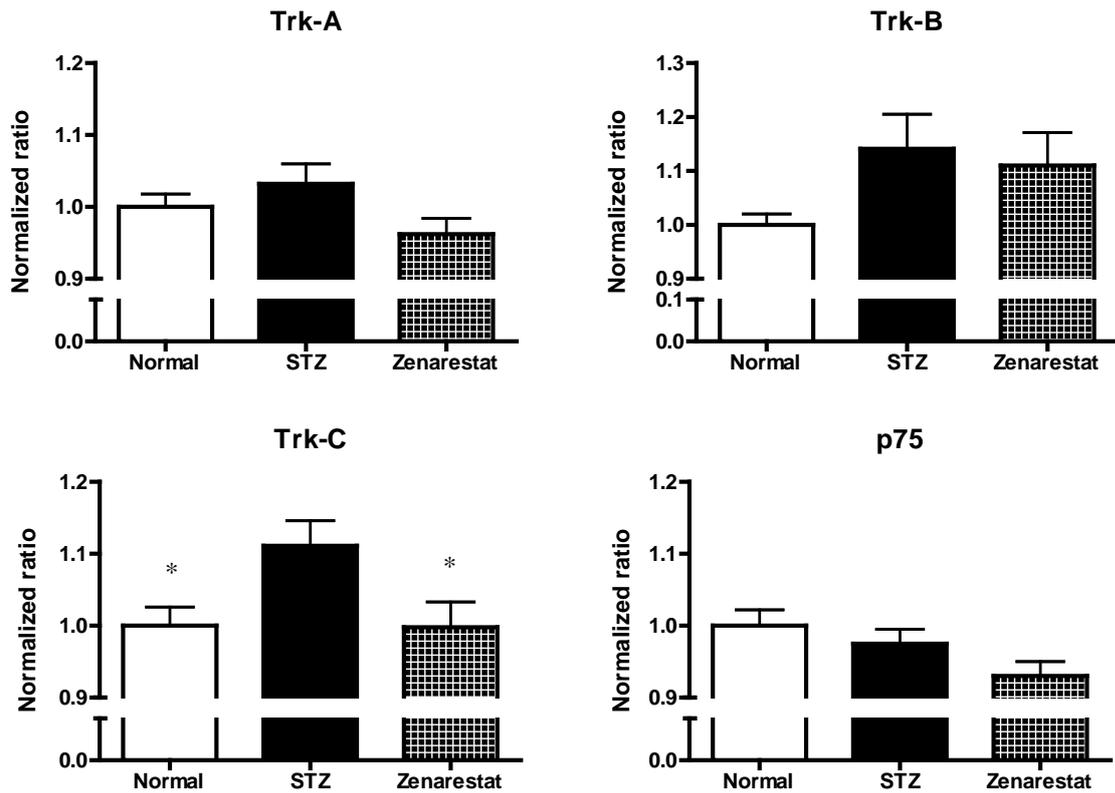


図 1-4 STZ ラットの DRG における神経栄養因子受容体 mRNA 発現量に対する zenarestat の作用

Zenarestat (32 mg/kg po) 処置 2 週間後のラットより DRG を採取し、神経栄養因子受容体 mRNA 発現量を real-time PCR 法により定量した。平均値+標準誤差、n=18-20、* ; $p < 0.05$ vs STZ (Dunnett の多重比較検定)

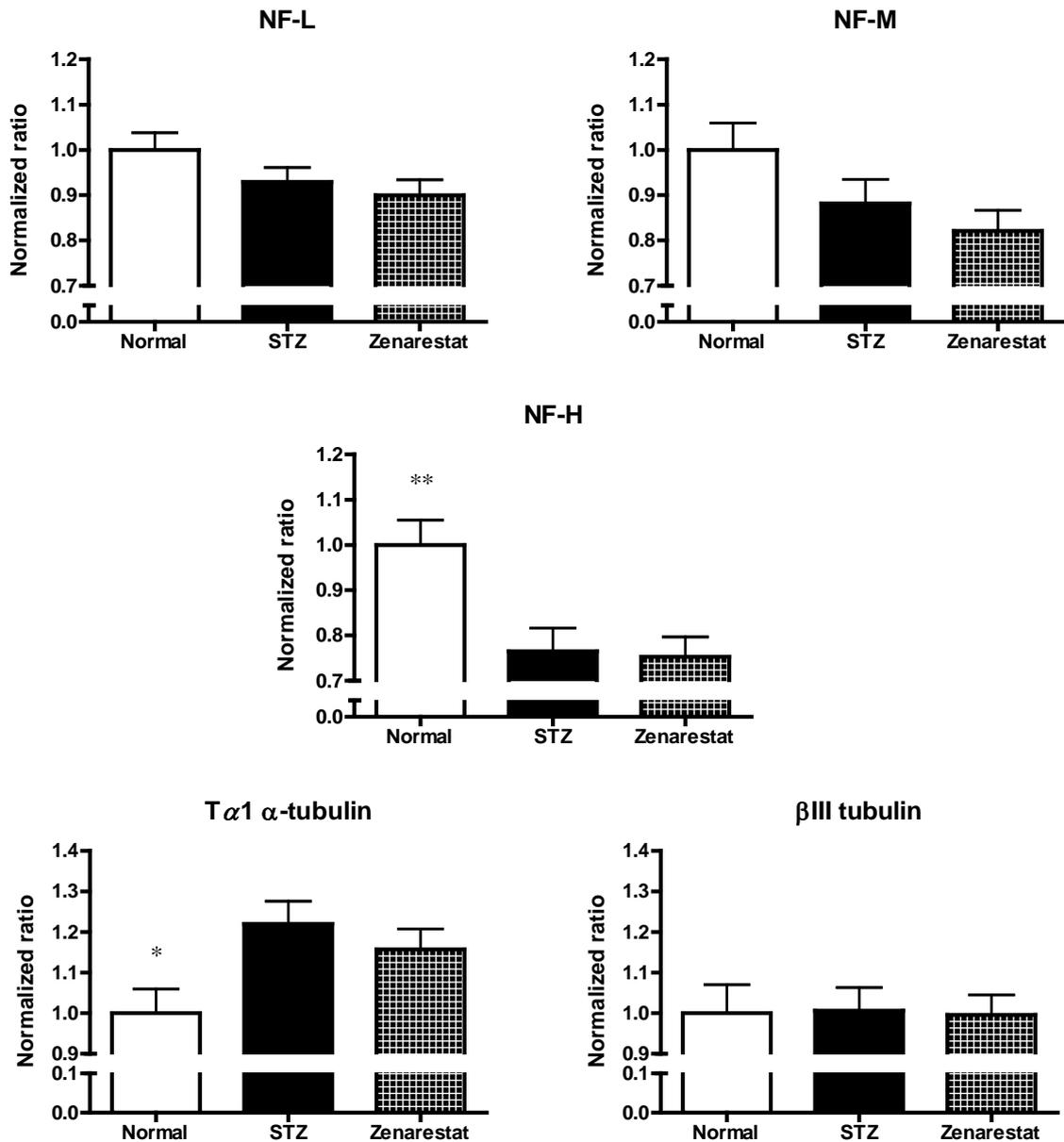


図 1-5 STZ ラットの DRG における神経細胞骨格タンパク質 mRNA 発現量に対する zenarestat の作用

Zenarestat (32 mg/kg po) 処置 2 週間後のラットより DRG を採取し、神経細胞骨格タンパク質 mRNA 発現量を real-time PCR 法により定量した。平均値±標準誤差、n=18-20、* ; $p < 0.05$, ** ; $p < 0.01$ vs STZ (Dunnett の多重比較検定)

考察

Zenarestat は ARI として Ao らによって報告されているが、用いられた AR はラット、ウサギおよびウシ由来でありヒト AR に対する阻害検討はされていなかった (8)。そこで今回 rhAR を用いて阻害活性を検討したところラット由来 AR と比較し 5 倍程度弱かった。また Ao らの報告では zanrestat はウサギ由来 AR に対して基質である *dl*-glyceraldehyde が低濃度のときは非競合阻害を示し、高濃度のときは非競合阻害を示すとされている。今回の rhAR を用いた検討では基質濃度に依存し阻害様式が異なる現象は認められずいずれの場合においても非競合阻害を示した。以上の結果から zenarestat は AR の阻害剤ではあるが阻害活性および阻害様式については種差が存在することが判明した。また zenarestat は解糖系酵素、ペントースリン酸経路酵素および NADPH を補酵素とする酵素に対しては阻害活性を示さなかった。一方で aldehyde reductase に対しては $IC_{50}=2.4 \mu\text{M}$ の阻害活性を有していた。Aldehyde reductase は AR と同様に aldo-keto reductase に属する酵素であることから他の酵素と異なり zenarestat に対して親和性を示すものと考えられる。しかしながら AR に対する阻害活性と比較して明らかに弱いことから、zenarestat は選択的 ARI と考えられた。

STZ ラットは糖尿病合併症研究において汎用される糖尿病動物である。末梢神経障害研究においても病態解析に良く用いられており、本章の研究に用いた zenarestat を含む ARI が病態改善・進行抑制を示すことが多く報告されている。AR およびポリオール代謝経路活性亢進は糖尿病合併症に深く関わるものと考えられているが、STZ ラットの臓器では腎皮質を除き著しいソルビトール蓄積が認められた。腎臓は他の合併症標的臓器と比較し AR 発現が少ないことが報告されており (46)、今回の結果も矛盾しないものと思われる。これら臓器中ソルビトール蓄積のうち、全身性に投与した zenarestat は坐骨神経において最も低用量でソルビトール蓄積を抑制した。これらの結果から zenarestat の糖尿病合併症発症・進展抑制作用は末梢神経において最も鋭敏に現れるものと考えられた。

本章の検討においても他の報告と同様に神経中ソルビトール蓄積をほぼ正常レベルまで抑制する用量で神経機能異常を是正することが確認された (9, 47-49)。しかしながら DRG においてもソルビトール蓄積が認められ、ARI 処置により抑制されることを示した研究結果は本研究

が初めてであり、DRG におけるポリオール代謝経路の活性亢進も糖尿病性神経障害発症の一因と考えられた。DRG は一次感覚神経の細胞体が存在する部位であるが髄鞘も豊富に存在しており、本研究で認められたソルビトール蓄積はこれら髄鞘を形成するシュワン細胞に蓄積したものであると考えられる。しかしながら近年 DRG における satellite cell および血管内皮細胞にも AR が存在することが報告されており、これらの細胞におけるソルビトール蓄積も ARI 処置により抑制され機能異常が是正されていることが想像される (50)。一方脊髄においても著しいソルビトール蓄積が認められ zenarestat により抑制された。本研究で検討した脊髄には脊髄神経も含まれていることおよび全脳には末梢神経のように著しいソルビトール蓄積が認められないことから同部位におけるソルビトール蓄積は脊髄神経におけるものと考えられる。脊髄神経におけるソルビトール蓄積が神経機能異常を惹起し、末梢神経障害を引き起こしているものと思われるが、事実神経機能検査において神経全長の機能を反映している F 波解析が糖尿病性神経障害の病態指標として用いられ AR が改善効果を示すこと、Sasaki らの報告にあるように STZ ラットでは脊髄神経においても形態異常が認められることから脊髄神経も標的臓器の一つとして考えられる (9, 51)。

糖尿病性神経障害の発症メカニズムのひとつとして神経栄養因子の機能異常は 20 年以上注目を集めているにもかかわらず高血糖がいかんにしてそれらの機能異常を誘発するのか不明なままである。本章ではそれぞれ NGF、brain-derived neurotrophic factor (BDNF) および NT-3 の受容体である Trk-A、-B および -C と、これらの内因性神経栄養因子に低親和性を示す p75 に着目し、AR との関係の有無を検討した。その結果 STZ ラットの DRG において mRNA 発現異常が認められ ARI 処置により是正された受容体として Trk-C が見出された。Trk-C は DRG において大径神経細胞に局在することが報告されていることと本研究結果と考え合わせると、ヒトの糖尿病性神経障害における触覚異常を ARI が改善しているメカニズムには Trk-C を介したシグナル伝達異常の改善作用があるのかもしれない (52, 53)。Mizisin らは Trk-C の内因性アゴニストである NT-3 の処置により STZ ラットにおける末梢神経線維の萎縮が改善されることなく伝導速度遅延が是正されることを報告している (19)。これまで STZ ラットにおける末梢神経線維の萎縮が神経伝導速度遅延の発症メカニズムのひとつと考えられたが、本章における研究結果が

らポリオール代謝経路の活性亢進が、Trk-C を介したシグナル伝達異常を誘発し神経伝導速度遅延を惹起している可能性も考えられる。

活動電位の伝導速度は神経軸索の直径に相関を示すことから、糖尿病性神経障害における神経伝導速度遅延を説明する目的で細胞骨格タンパク質の発現量異常、リン酸化異常および軸索輸送異常について多くの研究がなされている (22-29)。そこで本章ではポリオール代謝経路と細胞骨格タンパク質の mRNA 発現量異常について検討した。その結果本章における検討では他の報告と比較し急性期の STZ ラットであるにもかかわらず NF-H および T α 1 α -tubulin mRNA の有意な変動が認められた。特に NF-H は神経軸索径を規定するサブタイプであり、本研究結果は STZ ラットの末梢神経において神経軸索に萎縮が認められる有力な説明になる (23)。しかしながら ARI はこれらの細胞骨格タンパク質 mRNA の発現異常を改善しなかった。ARI が糖尿病性神経障害の末梢神経において神経軸索・線維萎縮を抑制することが多く報告されていることを考え合わせると、ポリオール代謝経路の活性亢進は細胞骨格タンパク質の発現量異常を誘発しているのではなく、リン酸化異常などの他のメカニズムに関与しているものと思われる。

本研究における細胞骨格タンパク質の mRNA 発現量検討では、STZ ラットの DRG において NF-H mRNA 発現低下および T α 1 α -tubulin mRNA 発現上昇が認められ、他の遺伝子に変動は認められなかった。Liuzzi らはこれらのほかに NF-L および β III tubulin mRNA の発現量も変化することを報告している (54)。これらの矛盾は糖尿病罹病期間が異なることが原因と思われる。糖尿病性神経障害は糖尿病罹病期間の延長に伴い重篤化していく疾患であり、NF-H および T α 1 α -tubulin は糖尿病罹病早期から変動する遺伝子と思われる。また NF の発現低下および tubulin の発現上昇は Liuzzi らが指摘しているように軸索離断が起こり軸索再生を行っている神経細胞に認められる発現変動と同様である。これら 2 遺伝子の発現変動に対して ARI は影響を与えなかったことから糖尿病は末梢神経に対して軸索離断を誘発するような物理的損傷と同様の影響を与え、この影響はポリオール代謝経路の活性亢進によって惹起されるものではないことが考えられる。

以上の本章における研究により、zenarestat は rhAR に対しては非競合的阻害を示す選択的 ARI であり、糖尿病合併症標的臓器のうち末梢神経に対して強い AR 阻害作用を有することが示

された。さらにその作用は坐骨神経のみならず、DRG および脊髄神経を含む脊髄にまで及ぶことが示され、その結果の一部として DRG における Trk-C mRNA 発現異常を是正していることが示された。

第2章 Zucker diabetic fatty ラットの末梢神経機能障害に対する zenarestat の作用

糖尿病は血中のインスリン依存性の有無によって2種類に分類されている。臨床ではインスリン依存性を示す1型糖尿病よりも、高インスリン血症および高脂血症を伴う2型糖尿病が多数を占めており末梢神経障害の病態も異なることが報告されている (55, 56, 57)。しかしながらこれまで糖尿病モデル動物としては1型糖尿病のモデル動物であるSTZラットが汎用されており、2型糖尿病モデル動物を用いた糖尿病性神経障害の解析はあまり行われていない。

Zucker diabetic fatty (ZDF) ラットは高血糖、高脂血症および高インスリン血症を示す2型糖尿病モデル動物であり、末梢神経障害が存在することが報告されている (58, 59)。STZラットにおける末梢神経障害に対するARの関与は多数報告されているが、極度の低インスリン血症を示すモデル動物では病態がヒトの場合と大きく異なることが考えられる。そこで糖尿病患者において多数を占める2型糖尿病によって誘発される末梢神経障害へのARの関与の有無を検討する目的でZDFラットにおける末梢神経障害に対するzenarestatの作用を検討した。

実験方法

(1) 実験動物

7 週齢雄性 ZDF ラット（以下 Fatty ラット）および lean ラットを日本チャールスリバーより購入した。動物は、12 時間の明暗サイクルの人工照明下、室温 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ および湿度 $55 \pm 5\%$ で飼育し自由飲水下で固形飼料（MF）を与えた。

すべての実験操作は、藤沢薬品工業（現アステラス製薬）・動物実験委員会のガイドラインにしたがって実施した。

(2) 使用薬物および投与条件

Zenarestat（藤沢薬品工業（現アステラス製薬）にて合成）を 0.5% MC に懸濁し、5 ml/kg の用量で経口投与した。

(3) 日程

8 週齢時より 10% sucrose 含有食（Oriental Yeast, Tokyo, Japan）の負荷を開始した。9 週齢時に Fatty ラットを体重および血糖値をもとに 3 群に分け、それぞれ 0.5% MC、3.2 あるいは 32 mg/kg zenarestat（それぞれ以下 Fatty 対照群、3.2 mg/kg Fatty 群あるいは 32 mg/kg Fatty 群）を 8 週間にわたって 1 日 1 回反復経口投与した。また lean ラットには 0.5% MC を投与した（Lean 対照群）。1 群 10 例のラットを用いた。

体重は 10% sucrose 含有食負荷前日より週 1 回測定した。血糖値は 10% sucrose 含有食負荷前日、薬物投与 4 週間および 8 週間後に、運動神経伝導速度（motor nerve conduction velocity; MNCV）および F 波測定は薬物投与 8 週間後にそれぞれ行った。

8 週間の薬物投与を終了した翌日 50 mg/kg ペントバルビタール（i. p. : 大日本製薬）麻酔下で屠殺し、坐骨神経を採取後ソルビトール含量定量操作まで -20°C で保存した。

(4) MNCV 測定

ラットをエーテル麻酔し、直腸温を $37.5 \sim 38.0^{\circ}\text{C}$ に保った。

筋電図の測定は、SYNAX 1200 (NEC Medical Systems, Tokyo, Japan) を用いて行い、測定を通じて参照電極を左前肢においた。はじめに、左後肢足首に刺入した刺激用電極により脛骨神経を 1 Hz で電気刺激し、同側後肢足底筋より M 波を導出した。最大上刺激により得られた M 波を連続 10 回加算平均し、刺激から M 波立ち上がりまでの潜時を記録した。次に刺激電極を sciatic notch 付近に刺入し、同様に M 波潜時を記録した。両測定 of 刺激電極間の距離を M 波潜時差で除して MNCV を算出した。

(5) F 波測定

F 波測定は、MNCV 測定と同様にエーテル麻酔下でラットの直腸温を 37.5°C 前後に維持し行った。

左後肢足首に刺入した刺激用電極により脛骨神経を 0.5 Hz で電気刺激し、同側後肢足底筋より F 波を導出した。M 波を指標に最大上刺激を設定し、この刺激により得られた F 波を連続 20 回記録した。刺激から F 波出現までの潜時のうち、最も小さいものを F 波最小潜時 (F-wave minimal latency ; FML) とした。

(6) 血糖値測定

切皮により尾静脈よりヘパリンコートキャピラリー中に血液を得た。遠心により血球を分離後血漿を得、グルコース濃度測定に供した。血漿中グルコース濃度測定はムタロターゼ・GOD 法 (Glucose CII-Test Wako, Wako Pure Chemicals) により行った。

(7) 坐骨神経中ソルビトール濃度測定

坐骨神経片の湿重量を秤量後、組織片あたり 1.5 ml の蒸留水を加え、ホモジナイズを行った。ホモジネート 0.5 ml に内部標準として 20 $\mu\text{g/ml}$ ダルシトール水溶液 0.1 ml および蒸留水 0.4 ml をくわえ、1 M HCl (50 μl) およびジクロロメタン (4 ml) を添加した。室温で 10 分間攪拌後、900 \times g で 5 分間遠心した。得られた上清を 60°C で窒素乾固後、残渣に 75 μL ピリジンおよび 25 μl フェニルイソシアネートを加え、60°C で 1 時間インキュベートした。室温

へ戻した後 50 μ l メタノールを加えた。検量線用ソルビトール水溶液も同様の操作を行った。フェニルイソシアネート化されたサンプルを高速液体クロマトグラフィーへ注入した。ODS カラム (Waters、Symmetry C-18) を 30°C に保ち、移動層 (水 : アセトニトリル : メタノール : テトラヒドロフラン = 550 : 700 : 760 : 20) を流速 1 ml/min で流した。240 nm における吸光度を指標にソルビトール濃度を定量し、組織湿重量で補正した。

(8) 統計計算

すべての測定項目について平均値および標準誤差を算出した。

有意差検定は Lean 対照および Fatty 対照群間は Student' s t-test または Aspin-Welch test を、Fatty ラットを用いた 3 群間は Dunnett の多重比較検定を用いておこない、有意水準を 5% に設定した。

実験結果

(1) 体重および血糖値

体重および血糖値の結果を表 2 に示した。

薬物投与開始前では Lean 対照群に対して Fatty 対照群の体重および血糖値は有意な高値を示した。薬物投与後では Lean 対照群と Fatty 対照群との間で体重に有意な差は認められなかった。

また zenarestat 処置群の体重および血糖値はいずれの測定時点とも Fatty 対照群と比較し有意な差は認められなかった。

なお F 波測定後麻酔による死亡例が発生したため Fatty 対照および 3.2 mg/kg Fatty 群において n=9 の値がある。

(2) MNCV

MNCV の結果を図 2-1 に示した。

薬物投与開始前では Lean 対照および Fatty 対照群間で差は認められなかったが、薬物投与後では Fatty 対照群の MNCV は Lean 対照群と比較して有意に低下していた。

この低下に対して zenarestat 処置は有意な改善作用を示した。

(3) FML

F 波典型例を図 2-2 に示した。M 波と比較し F 波は明らかに長い潜時をしめし、振幅も小さなものであった。また連続 20 回刺激により得られた F 波は潜時、振幅および波形にばらつきが認められた。

FML の結果を図 2-3 に示した。

Fatty 対照群の FML は Lean 対照群と比較して有意に延長していた。Zenarestat 処置群の FML は用量依存的に短縮し、32 mg/kg Fatty 群の FML は Fatty 対照群と比較して有意な差が認められた。

表 2 ZDF ラットの体重および血糖値に対する zenarestat の作用

	薬物処置前		薬物処置 8 週間後	
	体重 (g)	血糖値 (mg/dl)	体重 (g)	血糖値 (mg/dl)
Lean 対照	269.2±2.5	125.5±6.8	372.9±3.7	205.7±5.7
Fatty 対照	334.7±7.6 **	408.0±36.3 **	383.1±9.3 _a	591.0±11.7 ** _a
3.2 mg/kg Fatty	331.0±9.6	407.2±39.1	370.8±8.5 _a	606.8±34.4 _a
32 mg/kg Fatty	334.3±7.1	405.6±39.1	369.0±7.0	623.1±25.6

薬物処置前（群分け時）および薬物処置 8 週間後の体重および血糖値を示した。平均値±標準誤差、n=10 ただし a の値は n=9、** ; p<0.01 vs Lean 対照群 (Student' s t-test or Aspin-Welch test)

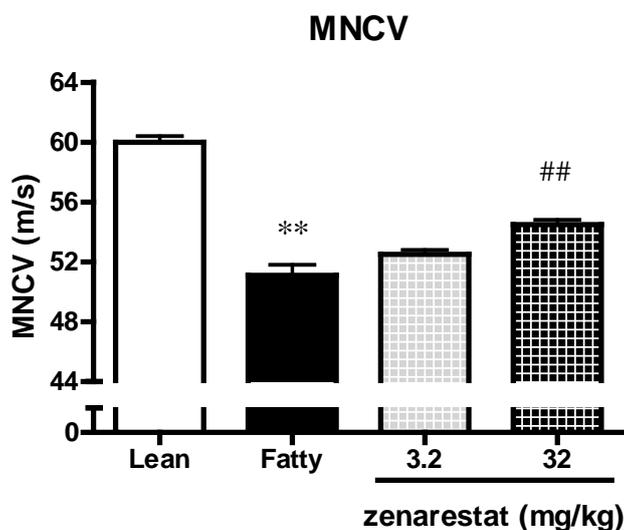


図 2-1 ZDF ラットにおける MNCV に対する zenarestat の作用

薬物処置 8 週間後の MNCV を示した。横軸の数字は経口投与量 (mg/kg) を示す。平均値±標準誤差、n=10、** ; p<0.01 vs Lean 対照群 (Student' s t-test or Aspin-Welch test)、## ; p<0.01 vs Fatty 対照群 (Dunnnett の多重比較検定)。

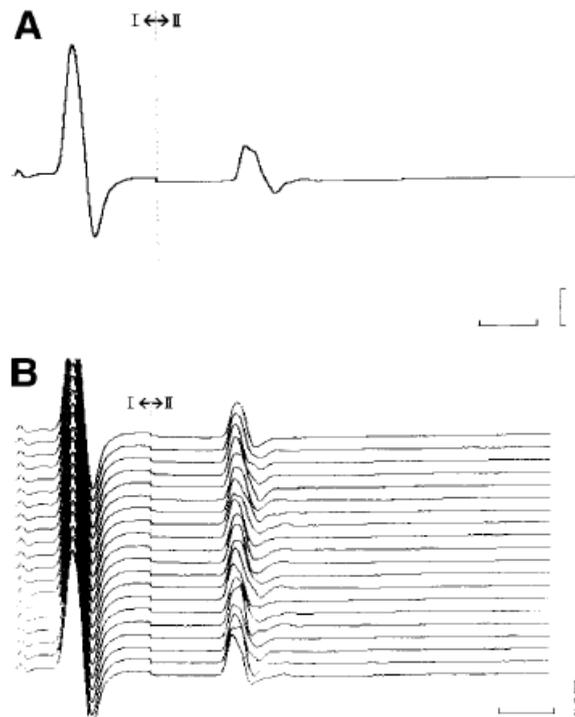


図 2-2 F 波典型例

A：単発刺激による波形。B：連続 20 回刺激による波形。いずれの波形とも大きな M 波に続き小さな F 波が認められた。これらの記録のうち、最も F 波潜時の短いものを FML とした。スケールバーは横：2 ミリ秒、縦：I 領域 2mV、II 領域 1 mV。

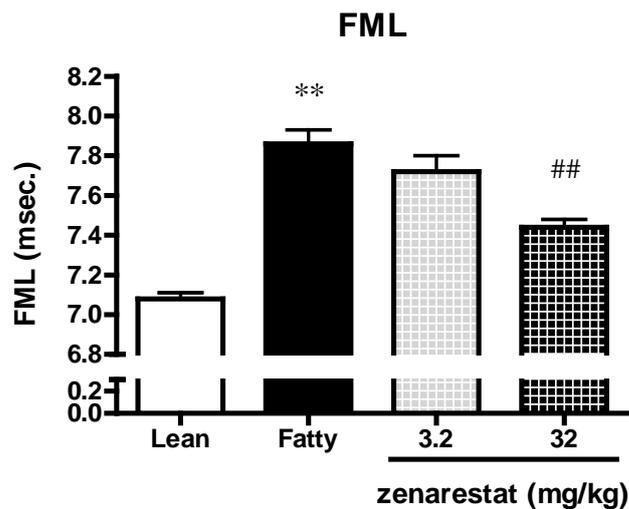


図 2-3 ZDF ラットにおける FML に対する zenarestat の作用

薬物処置 8 週間後の FML を示した。横軸の数字は経口投与量 (mg/kg) を示す。平均値 + 標準誤差、n=10、** ; p<0.01 vs Lean 対照群 (Student's t-test or Aspin-Welch test)、## ; p<0.01 vs Fatty 対照群 (Dunnett の多重比較検定)。

(4) 坐骨神経中ソルビトール濃度

坐骨神経中ソルビトール濃度の結果を図 2-4 に示した。

Fatty 対照群の坐骨神経中ソルビトール濃度は Lean 対照群と比較して著しい高値を示した。Zenarestat 処置群の坐骨神経中ソルビトール濃度は用量依存的かつ有意な低値を示した。

なお F 波測定後麻酔による死亡例が発生したため Fatty 対照および 3.2 mg/kg Fatty 群において n=9 の値がある。

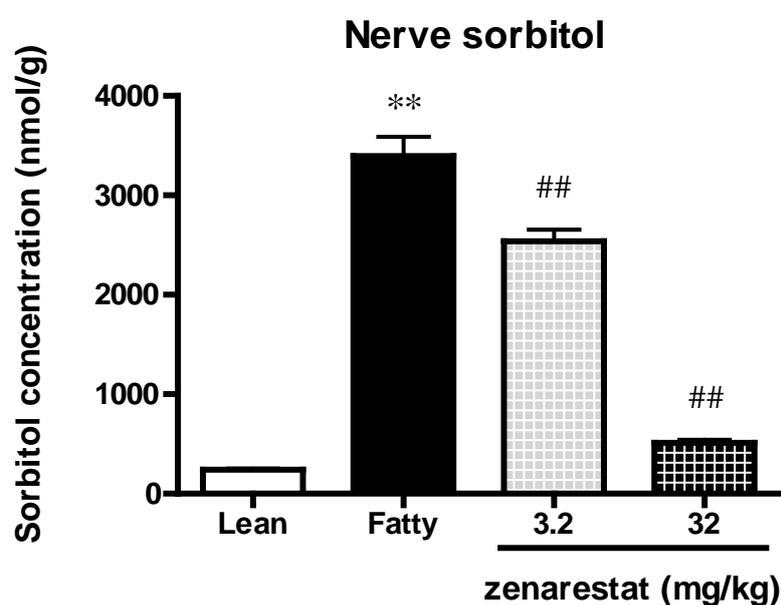


図 2-4 ZDF ラットにおける坐骨神経中ソルビトール濃度に対する zenarestat の作用

薬物処置 8 週間後の坐骨神経中ソルビトール濃度を示した。横軸の数字は経口投与量 (mg/kg) を示す。平均値 + 標準誤差、n=10 ただし Fatty 対照および 3.2 mg/kg zenarestat 群は n=9、** ; p<0.01 vs Lean 対照群 (Student's t-test or Aspin-Welch test)、## ; p<0.01 vs Fatty 対照群 (Dunnett の多重比較検定)。

考察

ヒトにおける疫学調査では全糖尿病患者のうち2型糖尿病患者がしめる割合は90%程度といわれている(1)。糖尿病性神経障害は高血糖が大きな原因であると考えられているが、1型糖尿病と2型糖尿病に合併する神経障害では、病型、重篤度および病態進行速度に違いが認められており、異なる発症メカニズムが存在することが示唆されている(55-57)。臨床において多数を占める糖尿病は2型であるにもかかわらずモデル動物を用いた検討は1型糖尿病動物が多数を占める。そこで糖尿病性神経障害に対するポリオール代謝経路の活性亢進が2型糖尿病における末梢神経障害にも関与をしているか検討を行なった。

ZDFラットは肥満、インスリン抵抗性および高血糖を示す2型糖尿病のモデル動物としてしばしば用いられ、食餌中にスクロースを負荷することによって脱髄/再髄鞘化、ワーラー変性および神経伝導速度の遅延などの糖尿病性神経障害様の病理像を示すことが報告されている(59)。これまで糖尿病性神経障害におけるARの関与を解析するためのモデル動物としてはインスリン分泌低下を示す1型糖尿病モデルであるSTZラットが高頻度に用いられており、本実験で用いたARIであるzenarestatについてもYamamotoらによって末梢神経障害改善作用を示すことが報告されている(9)。2型糖尿病モデル動物をもちいた末梢神経機能評価はOtsuka Long-Evans Tokushima Fattyラットにおいて報告されているが、本動物は血中インスリン濃度は正常値を示すことから比較的軽度の2型糖尿病であると考えられる(60)。高インスリン血症が報告されている2型糖尿病モデル動物を用いた報告は今回の結果が初めてであり、STZラットを用いた報告と同様にARIが動物の体重および血糖値に影響を与えることなく末梢神経中のソルビトール蓄積を90%以上抑制する投与量で有意な神経伝導速度の改善作用を示した。今回の結果とSTZラットを用いた報告とを考え合わせると、血中インスリン濃度の高低にかかわらず高血糖に基づくポリオール代謝経路の活性亢進およびそれに続く神経中ソルビトール蓄積が糖尿病性神経障害の発症・進展の一因となっているものと考えられる。

これまで末梢神経機能を電気生理学的に評価する場合、末梢神経を2点で刺激し誘起される骨格筋反応の潜時差と2点間の距離から導かれる伝導速度が用いられていた。この手法は刺激2点間の神経機能を定量的かつ再現性よく評価でき広く採用されている実験手法である。本研

究においても糖尿病動物のMNCV遅延およびそれに対するARIの改善作用を感度よく検出できている。しかしながら糖尿病は全身性の疾患であり、高血糖の影響はMNCV評価で反映される遠位の末梢神経のみならずより中枢側の神経にも影響を及ぼすことが考えられる。事実第1章で示したようにDRGおよび脊髄神経を含む脊髄にもソルビトール蓄積が認められていること、脊柱内に存在するDRGにおける8-OHdG陽性細胞の減少やp38 MAP kinaseの異常が糖尿病発症急性期の動物で報告されていること、さらに脊髄神経におけるmyelin splittingやDRG神経細胞体の萎縮などが長期飼育されたSTZラットを用いた検討で報告されていること(51, 61, 62)など、より上位中枢での機能異常が多数報告されている。F波は最大上刺激により誘発された逆行性の神経興奮が惹起した筋反応であり、末梢神経全長の機能を反映した指標である(63)。これまでの糖尿病性末梢神経障害研究は脊柱よりも遠位の末梢神経における検討が主であったが、ARI処置によりより中枢側の機能を反映したFMLの延長が改善されたことなどを考え合わせると、糖尿病により誘発されたポリオール代謝経路の活性亢進により脊柱内で惹起された障害も糖尿病性末梢神経障害のおもな発症原因となっていることが考えられる。

以上の本章における研究により、糖尿病性末梢神経障害には糖尿病の分類によらずポリオール代謝経路の活性亢進が末梢神経全長に渡って一定の関与を持っていることが示された。

第3章 慢性 STZ 誘発糖尿病ラットの後根神経節形態異常に対する zenarestat の作用

糖尿病性末梢神経障害は糖尿病罹病期間の延長に伴い、発症頻度が上昇するとともに症状も重篤化することが報告されている (4)。実験動物の場合も糖尿病罹病期間が比較的短期な場合は腓腹神経などの末梢神経のみに形態変化が認められるが、長期罹病させた場合一次感覚神経の細胞体が存在する DRG においても異常が観察されることが報告されている (64)。これまで糖尿病性末梢神経障害発症・進展機序解明は末梢神経軸索周辺の環境変化解析に注力されてきたが、近年 DRG における異常に関する報告が多数なされており、病変部位のひとつとして注目されている。

AR は髄鞘を形成するシュワン細胞に豊富に発現しているが神経細胞には比較的発現量が少ないとされている。しかしながら末梢神経はシュワン細胞から密接な影響を受けており、シュワン細胞に長期にわたってソルビトールが蓄積した場合、末梢神経の細胞体にも何らかの影響を与えることが考えられる。これまで慢性糖尿病動物を用いた ARI の作用を検討した報告は腓腹神経におけるもののみであり、DRG の形態異常に言及したものはない。そこで本章では ARI である zenarestat を慢性投与し糖尿病動物の DRG 形態異常に対する AR の関与の有無を検討した。

実験方法

(1) 実験動物

6 週齢雄性 SD ラットを日本チャールスリバー (Yokohama, Japan) より購入した。動物は、12 時間の明暗サイクルの人工照明下、室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ および湿度 $55 \pm 5\%$ で飼育し自由飲水下で固形飼料を与えた。

すべての実験操作は、藤沢薬品工業 (現アステラス製薬)・動物実験委員会のガイドラインにしたがって実施した。

(2) 使用薬物および投与条件

Zenarestat (藤沢薬品工業 (現アステラス製薬) にて合成) を 0.03% 含有する固形資料 (CRF-1, Oriental Yeast Co., Tokyo, Japan) を調製し与えた。

(3) 日程

7 週齢時に一晩絶食後 STZ (Sigma, St. Louis, USA) を尾静注した (60 mg/kg)。正常ラットには溶媒であるクエン酸緩衝液 (pH 4.5) のみ投与した。

STZ 投与 2 週間後、体重および血糖値を測定し、これらの値をもとに糖尿病ラットを 2 群に分けた (それぞれ STZ 対照および STZ zenarestat 群)。群分け後より zenarestat 投与群には 0.03 % zenarestat 含有飼料を与えた。なお、薬物投与開始時の各群の動物数は正常対照群は 16 例、STZ 対照および STZ zenarestat 群はいずれも 28 例を用いた。

体重測定は zenarestat 投与開始日および投与 51 週後まで行い、血糖値および HbA1c 測定は zenarestat 投与開始 2 日前および投与 52 週間後まで行った。

(4) 血糖値および HbA1c 測定

切皮により尾静脈よりヘパリンコートキャピラリー中に血液を得た。遠心により血球を分離後血漿および血球を分離した。血漿中グルコース濃度測定はムタロターゼ・GOD 法 (Glucose CII-Test Wako, Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan) により行った。HbA1c 測定は血球成分

に100U/mlヘパリン含有冷生理的食塩水を加え再懸濁しDCA2000システム(Bayer Medical Ltd., Tokyo, Japan)を用いて測定した。

(5) 神経形態計測

Zenarestat投与53-54週間後、ラットを50 mg/kg ペントバルビタール (i. p. : 大日本製薬) で麻酔し、左心室より固定液 (4% paraformaldehyde, 0.5% glutaraldehyde, 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4) を30分以上還流した。その後DRGおよび腓腹神経を採取し後固定液 (2.5% glutaraldehyde, 0.09 M cacodylate buffer, pH 7.4) 中で固定した。さらにオスミウム染色を施しエポン樹脂中に包埋した。準薄切切片 (0.8 μm) を作製し1% toluidine blue あるいは8% p-phenyldiamine で染色を行った。

腓腹神経形態観察では artifact が神経束の1/3を超える個体および総神経束面積が0.03 mm^2 以下の個体を削除したため各群6例を用いた。光学顕微鏡 (BX50, OLYMPUS, Tokyo, Japan) に CCD camera (HC300Z, FUJIFILM, Tokyo, Japan) を接続し1000倍下で腓腹神経横断切片を観察した。Adobe Photoshop version 5.0 (Adobe System Inc., USA) にて画像処理後、Mac Scope version 2.5 (Mitani Corp., Fukui, Japan) を用いて形態計測を行った。測定項目は神経束面積 (total fascicular area, TFA)、有髄神経線維密度 (fiber density)、有髄神経線維平均面積 (fiber size)、有髄神経軸索平均面積 (axon size)、G-ratio (有髄神経軸索平均半径/有髄神経線維平均半径) をそれぞれ算出した。

DRG形態観察では各群8例のラットより神経節の長軸中心より100 μm 以内の横断切片を作製した。細胞内の核が明瞭に同定可能な細胞のみを測定対象とし、腓腹神経形態観察の場合と同様の画像取得システムを用いた。200倍光顕観察下で細胞の横断面積 (cell area) を算出した。

(7) 統計計算

すべての測定項目について平均値および標準誤差を算出した。

有意差検定は Student's t-test または Aspin-Welch test を用いた。いずれの検定とも有

意水準は 5 %に設定した。

実験結果

(1) 形態計測に用いた動物数

薬物投与開始時には正常対照、STZ 対照および STZ zenarestat 群の例数はそれぞれ 16、28 および 28 例であった。薬物投与期間中にそれぞれ 2、8 および 11 例が死亡した。神経採取時点の血糖値が、STZ 対照および STZ zenarestat 群においてそれぞれ 8 および 2 例、400 mg/dL を下回ったため検討より除外した。残りのラットより、STZ 対照および STZ zenarestat 群間の体重の平均値がほぼ同じ値になるように 8 例を選び神経形態観察対象とした。

(2) 体重、血糖値および HbA1c

体重、血糖値および HbA1c の結果を表 3-1 に示した。

いずれの時点においても STZ 対照群の体重は正常対照群と比較し低い値を示し、血糖値および HbA1c は正常対照群のそれらの値より高い値を示した。

STZ ラットのこれらの値に対し、zenarestat 処置は有意な影響を与えなかった。

表 3-1 STZ ラットの体重、血糖値および HbA1c に対する zenarestat の作用

群 時点	体重 (g)	血糖値 (mg/dl)	HbA1c (%)
正常対照群			
2-week	347.8 ± 2.2	122.3 ± 2.2	2.8 ± 0.1 a
13-month	868.3 ± 27.7	123.1 ± 5.4	3.0 ± 0.1
STZ 対照群			
2-week	272.1 ± 8.2 **	593.8 ± 22.9 **	6.7 ± 0.1 **
13-month	319.1 ± 16.3 **	602.5 ± 35.3 **	8.9 ± 0.9 **
STZ zenarestat 群			
2-week	275.1 ± 4.2	559.4 ± 32.0	6.6 ± 0.2
13-month	318.9 ± 15.9	798.6 ± 90.1	9.3 ± 0.4

神経形態計測に用いたラットの群分け時および神経組織採取時の体重、血糖値および HbA1c を示した。平均値 ± 標準誤差、n=8 ただし a の値は n=7 (1 例検出限界以下、<2.5%)、** ; $p < 0.01$ vs 正常対照群 (Student' s t-test or Aspin-Welch test)。

(3) DRG 形態計測

形態計測に用いた DRG 光顕画像典型例を図 3-1 に示した。細胞体内の核が明瞭に判別でき、空胞が認められる細胞も観察された。

Cell area に関する結果を図 3-2 に示した。Cell area 算出に用いた細胞数は正常対照、STZ 対照および STZ zenarestat 群においてそれぞれ 72 ± 23 、 95 ± 36 および 90 ± 43 であった。STZ 対照群の cell area は正常対照群と比較し有意に低下していた。STZ zenarestat 群の cell area は STZ 対照群と比較し有意に上昇していた。

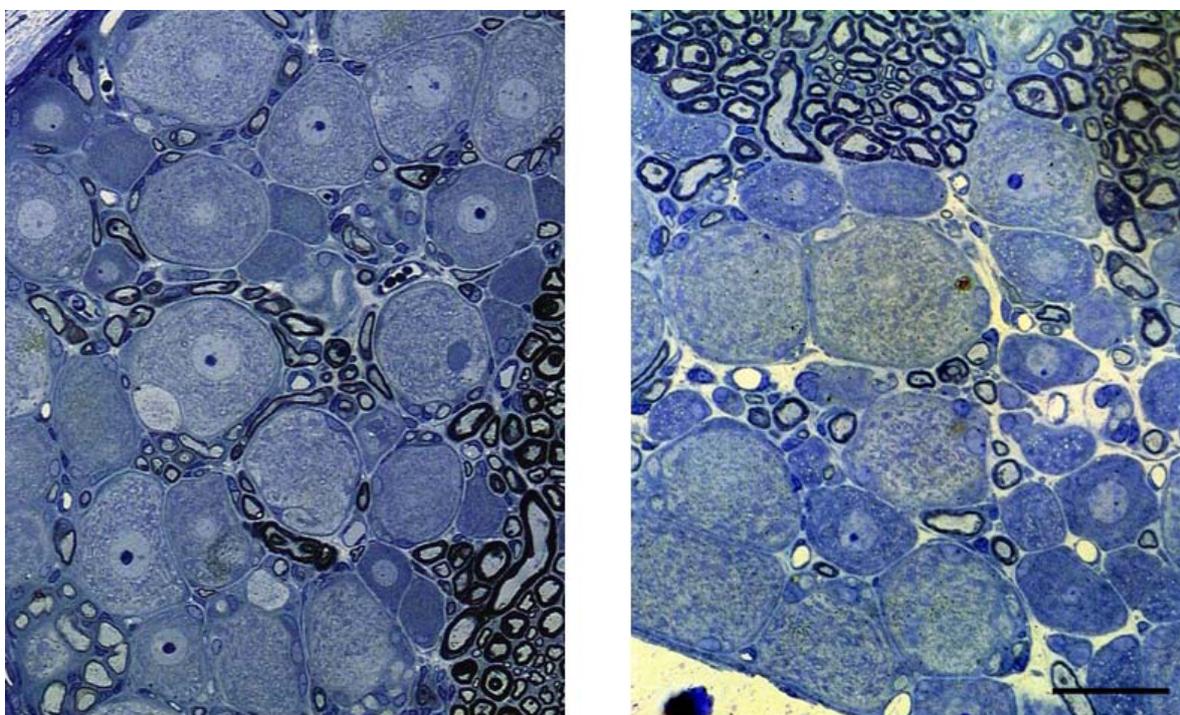


図 3-1 DRG 光顕画像典型例

DRG 光顕画像典型例を示す。左：正常対照群。右：STZ 対照群。核が明瞭に判別できる細胞を任意に選択し、細胞面積を算出した。拡大倍率は 200 倍。スケールバーは 40 μm を表す。

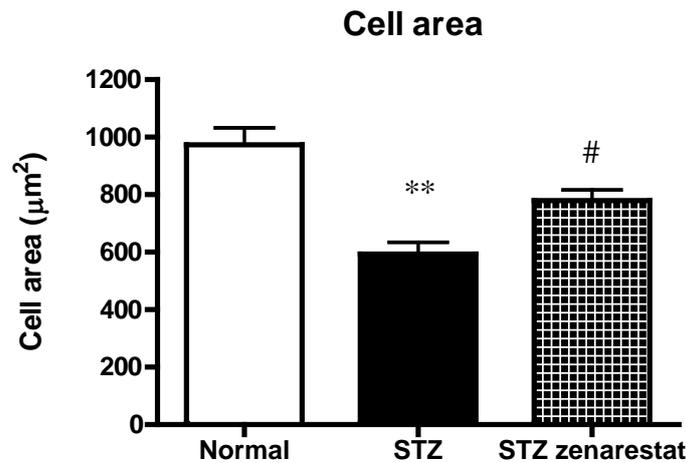


図 3-2 STZ ラットにおける DRG 形態変化に対する zenarestat の作用

薬物処置 53-53 週間後の DRG 細胞面積を示した。核が明瞭に判別できる細胞を任意に選択し、細胞面積を算出した。平均値±標準誤差、n=8、**； $p < 0.01$ vs Normal、#； $p < 0.05$ vs STZ (Student' s t-test or Aspin-Welch test)。

(4) 腓腹神経形態計測

腓腹神経形態計測結果を表 3-2 に示した。

正常対照群と比較し STZ 対照群の TFA および fiber size は有意に低下し、fiber density および G-ratio は有意に上昇していた。axon size は低下傾向を示したものの有意なものではなかった。

また STZ 対照群と比較し STZ zenarestat 群の fiber density は有意に低下し、fiber size は有意に上昇していた。

表 3-2 腓腹神経形態変化に対する zenarestat の作用

群	TFA (mm ²)	Fiber density (/mm ²)	Fiber size (μm ²)	Axon size (μm ²)	G-ratio
正常対照群	0.074 ± 0.006	9616 ± 704	47.6 ± 3.7	17.4 ± 1.4	0.61 ± 0.01
STZ 対照群	0.045 ± 0.006 **	14353 ± 558 **	33.3 ± 1.0 *	13.8 ± 0.4	0.64 ± 0.01 **
STZ zenarestat 群	0.068 ± 0.010 a	11282 ± 542 ###	42.3 ± 2.0 ##	15.2 ± 1.3	0.61 ± 0.02

薬物処置 53-53 週間後の腓腹神経形態計測結果を示した。平均値±標準誤差、n=6 ただし a の値は n=5 (1 例固定不良)、*； $p < 0.05$ 、**； $p < 0.01$ vs 正常対照群、###； $p < 0.01$ vs STZ 対照群 (Student' s t-test or Aspin-Welch test)。

考察

糖尿病性末梢神経障害は糖尿病罹病期間の延長に伴い、病態が進展・重症化することが判明している。実験動物の場合においても糖尿病誘発急性期には軸索が存在する末梢神経遠位部のみに形態変化が認められるが、糖尿病罹病期間を延長させることにより一次感覚神経の細胞体が存在する DRG にも形態異常がおよぶことが報告されている (64)。しかしながら実験動物を用いた病態解析には糖尿病発症急性期の動物を用いたものが多く、これらの検討から得られた知見が慢性糖尿病性神経障害に対してどの程度関与しているのか不明であった。この観点から慢性糖尿病ラットの末梢神経異常に対する ARI の予防効果が Kato らによって報告され、ポリオール代謝経路の活性化が病態慢性期にも一定の関与を持っていることが証明されている (20)。しかしながら彼らの報告は比較的早期から異常が認められる腓腹神経を用いたものであること、糖尿病性神経障害の末梢神経異常は末梢から中枢へ向かう (dying back 現象) こと、などを考え合わせるとより中枢側に位置する DRG を用いた検討に興味を持たれた。以上のことより STZ 誘発慢性糖尿病ラットにおける DRG 形態異常に対する ARI の作用の有無を明らかにする目的で本研究を行った。

本研究において STZ 処置により糖尿病を誘発し 1 年経過したラットでは腓腹神経に形態異常が認められるとともに、DRG にも異常が認められた。これらの異常は他の報告と同様であり糖尿病性神経障害が進行すると形態異常が末梢部のみならず中枢部においても存在することが確認された (51, 64)。また本研究よって ARI の慢性処置により腓腹神経の異常のみならず DRG の形態異常も軽度にとどまることが判明した。これらの結果より糖尿病性神経障害には高血糖により誘発されるポリオール代謝経路の活性亢進が持続的に関与しており、この経路の活性を抑制し続けることによって病態進行を抑制することが示された。糖尿病性末梢神経障害においてなぜ末梢神経線維や DRG 神経細胞の萎縮が起こり、これらの萎縮が ARI 処置により抑制されるのかは不明な点が多い。しかしながら末梢神経線維を構成する分子の多くは神経細胞体で合成され、神経軸索流により運搬されることを考えると DRG における障害が神経全長に影響を与えていることが想像される。

一方、AR はミエリンを形成する分化したシュワン細胞に発現しているとされているが、近

年 DRG における血管内皮細胞にも発現が認められることが報告されている (50)。第 1 章における検討では STZ ラットの DRG において明らかなソルビトール蓄積が認められたが、この蓄積にはシュワン細胞のみならず、血管内皮細胞における AR により産生されたソルビトールが含まれていることが考えられる。またこれらの報告に先立ち Sasaki らにより STZ 誘発慢性糖尿病ラットにおける DRG では血流量が低下していることも報告されている (51)。この DRG における神経血流低下に対する ARI の作用は報告されていないが、本研究でも用いた zenarestat が糖尿病動物における末梢神経血流低下を抑制することが報告されていることと考え合わせると、ポリオール代謝経路の活性亢進は末梢神経全長の血流量を低下させることにより病態を惹起しているのかもしれない (9, 51, 64)。

以上の本章における研究により、AR は糖尿病性神経障害急性期の病態形成のみならず、慢性期までの病態進行・維持にも大きな役割を占めていることが判明した。

総括

本研究において著者は、糖尿病ラットの末梢神経障害発症・病態進展における AR の役割について検討し、以下の知見を得た。

1 : zenarestat はラット、ウサギ、ウシ AR のみならずヒトリコンビナント AR をも阻害し、その阻害様式はウサギ AR に対するものとは異なり基質濃度に依存せず非競合阻害を示した。また zenarestat は解糖系およびペントースリン酸経路などに属する酵素群には阻害作用を示さない AR 選択的な阻害剤であった。さらに zenarestat は水晶体、腎皮質および網膜と比較し坐骨神経および DRG において最も低用量でソルビトール蓄積を抑制することが示され、糖尿病性末梢神経障害の発症・進展を他の合併症と比較し最もよく抑制することが推察された。一方糖尿病ラットの DRG では Trk-C 受容体、NF-H および α -tubulin mRNA の発現異常が認められ、これらのうち AR が関与しているものは Trk-C mRNA 発現上昇であった。このことは Trk-C が糖尿病性神経障害治療におけるあらたな標的分子であることを示唆している。

2 : ZDF ラットを用いた糖尿病性神経障害における AR の関与を検討した研究は本研究が初めてである。Zenarestat は STZ ラットとほぼ同様に坐骨神経中ソルビトール蓄積を抑制し、神経全長の機能を反映している FML 遅延を改善したことから、糖尿病性神経障害発症メカニズムには 1 型糖尿病および 2 型糖尿病を問わず神経全長にわたって AR が一定の関与を持つことが示唆された。

3 : 慢性糖尿病ラットにおける DRG では神経細胞体萎縮が認められ、この萎縮には AR が関与していることが証明された。このことはポリオール代謝経路活性亢進の影響が長期にわたって存在することにより神経線維が存在する末梢神経にのみならず、末梢神経神経細胞体へも及び異常をもたらしていることを示したはじめての知見である。

本研究は糖尿病性神経障害においてポリオール代謝経路活性亢進がもたらす末梢神経系異常の一部を明らかにしたものであり、同疾患を理解するための基礎的知見となるものと思われる。

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜り、かつ本研究の発表の機会を賜り御校閲いただきました京都大学大学院 生体機能解析学分野 金子 周司 教授に深甚なる謝意を表します。また、本論文の御校閲を賜りました京都大学大学院 病態機能分析学分野 佐治 英郎 教授ならびに京都大学大学院 生体情報制御学分野 中山 和久 教授に深謝いたします。

また本研究を遂行するにあたり、終始懇切なる御指導と御鞭撻をを賜りました中部労災病院 神経内科 上條 美樹子 博士に感謝いたします。

本研究の機会を与えていただき、終始御理解と御援助を賜りましたアステラス製薬株式会社 研究本部 本部長 塚本 伸一 博士、薬理研究所 所長 武藤 誠太郎 博士、安全性研究所 所長 関 二郎 博士、開発薬理研究所 応用薬理第一研究室 室長 高倉 昭治 博士、薬理研究所 神経科学研究室 室長 松岡 信也 博士、薬理研究所 泌尿器研究室 室長 増田 典之 博士に感謝いたします。

また本研究を遂行するにあたり、終始懇切なる御指導を賜りましたアステラス製薬株式会社 川村 郁夫 博士、青木 俊明 博士、ならびに終始御協力いただきました箕浦 秀明 博士、山本 正 研究員、箕浦 恭子 研究員、榎本 隆吾 研究員をはじめとした皆様に厚く御礼申し上げます。

発表論文目録

本研究の一部は以下の論文に公表した。

1. Shimoshige, Y., Ikuma, K., Yamamoto, T., Takakura, S., Kawamura, I., Seki, J., Mutoh, S. and Goto, T.
The effects of zenarestat, an aldose reductase inhibitor, on peripheral neuropathy in Zucker diabetic fatty rats
Metabolism, 49 (2000) 1395-1399
2. Takakura, S., Minoura, H., Shimoshige, Y., Minoura, K., Kawamura, I., Fujiwara, T., Saitoh, T., Shimojo, F., Seki, J. and Goto, T.
Enzyme specificity and tissue distribution of zenarestat, an aldose reductase inhibitor, and its relevance in the use of zenarestat as a therapeutic agent against diabetic neuropathy
Drug Dev. Res., 54 (2001) 27-34
3. Shimoshige, Y., Minoura, K., Matsuoka, N., Takakura, S., Mutoh, S. and Kamijo, M.
Thirteen-month inhibition of aldose reductase by zenarestat prevents morphological abnormalities in the dorsal root ganglia of streptozotocin-induced diabetic rats
Brain Res., 1247 (2009) 182-187
4. Shimoshige, Y., Enomoto, R., Aoki, T., Matsuoka, N. and Kaneko, S.
The involvement of aldose reductase in alterations to neurotrophin receptors and neuronal cytoskeletal protein mRNA levels in the dorsal root ganglion of streptozotocin-induced diabetic rats
Biol. Pharm. Bull., 33 (2010) 67-71

引用文献

1. Stumvoll, M., Goldstein, B. and van Haeften, T. W., Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy, *Lancet*, 365 (2005) 1333-1346.
2. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, The effect of intensive diabetes therapy on the development and progression of neuropathy, *Ann. Intern. Med.*, 122 (1995) 561-568.
3. UK Prospective Diabetes Study 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 (1998) 837-853.
4. Vinik, A. I., Holland, M. T., Le Beau, J. M., Liuzzi, F. J., Stansberry, K. B. and Colen, L. B., Diabetic neuropathies, *Diabetic Care*, 15 (1992) 1926-1975.
5. Obrosova, I. G., Diabetes and the peripheral nerve, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1792 (2009) 931-940.
6. Oates, P. J., Aldose reductase, Still a compelling target for diabetic neuropathy, *Curr. Drug Targets*, 9 (2008) 14-36.
7. Greene, D. A., Arezzo, J. C., Brown, M. B. and the zenarestat study group, Effect of aldose reductase inhibition on nerve conduction and morphometry in diabetic neuropathy, *Neurology*, 53 (1999) 580-591.
8. Ao, S., Shingu, Y., Kikuchi, C., Takano, Y., Nomura, K., Fujiwara, T., Ohkubo, Y., Notsu, Y. and

- Yamaguchi, I., Characterization of a novel aldose reductase inhibitor, FR74366, and its effects on diabetic cataract and neuropathy in the rat. *Metabolism* 40 (1991) 77–87.
9. Yamamoto, T., Takakura, S., Kawamura, I., Seki, J. and Goto, T., The effects of zenarestat, an aldose reductase inhibitor, on minimal F-wave latency and nerve blood flow in streptozotocin-induced diabetic rats, *Life Sci.*, 68 (2001) 1439–1448.
 10. Anand, P., Neurotrophic factors and their receptors in human sensory neuropathy, *Prog. Brain Res.*, 146 (2004) 477-492.
 11. Calcutt, N. A., Jolivald, C. G. and Fernyhough, P., Growth factors as therapeutics for diabetic neuropathy, *Curr. Drug Targets*, 9 (2008) 47-59.
 12. Delcroix, Jean-D., Tomlinson, D. T. and Fernyhough, P., Diabetes and axotomy-induced deficits in retrograde axonal transport of nerve growth factor correlate with decreased levels of p75^{LNTR} protein in lumbar dorsal root ganglia, *Mol. Brain Res.*, 51 (1997) 82-90.
 13. Fernyhough, P., Diemel, L. T. and Tomlinson, D. R., Target tissue production and axonal transport of neurotrophin-3 are reduced in streptozotocin-diabetic rats, *Diabetologia*, 41 (1998) 300-306.
 14. Lee, Paek-G., Hohman, T. C., Cai, F., Regalia, J. and Helke, C. J., Streptozotocin-induced diabetes causes metabolic changes and alterations in neurotrophin content and retrograde transport in the cervical vagus nerve, *Exp. Neurol.*, 170 (2001) 149-161.
 15. Tomlinson, D. R., Fernyhough, P. and Diemel, L. T., Role of neurotrophins in diabetic neuropathy and treatment with nerve growth factors, *Diabetes*, 46 suppl 2, (1997) S43-49.

16. Apfel, S. C., Kessler, J. A., Adornato, B. T., Litchy, W. J., Sanders, C., Rask, C. A. and the NGF Study Group, Recombinant human nerve growth factor in the treatment of diabetic polyneuropathy, *Neurol.*, 51 (1998) 695-702.
17. Sayers, N. M., Beswick, L. J., Middlemas, A., Calcutt, N. A., Mizisin, A. P., Tomlinson, D. R. and Fernyhough, P., Neurotrophin-3 prevents the proximal accumulation of neurofilament proteins in sensory neurons of streptozocin-induced diabetic rats, *Diabetes*, 52 (2003) 2372-2380.
18. Huang, T. -J., Sayers, N. M., Verkhatsky, A. and Fernyhough, P., Neurotrophin-3 prevents mitochondrial dysfunction in sensory neurons of streptozotocin-diabetic rats, *Exp. Neurol.*, 194 (2005) 279-283.
19. Mizisin, A. P., Calcutt, N. A., Tomlinson, D. R., Gallagher, A. and Fernyhough, P., Neurotrophin-3 reverses nerve conduction velocity deficits in streptozotocin-diabetic rats, *J. Peripher.Nerv. Syst.*, 4 (1999) 211-221.
20. Kato, N., Mizuno, K., Makino, M., Suzuki, T. and Yagihashi, S., Effects of 15-month aldose reductase inhibition with fidarestat on the experimental diabetic neuropathy in rats, *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 50 (2000) 77-85.
21. Gasser, H. S. and Grundfest, H., Axon diameters in relation to the spike dimensions and the conduction velocity in mammalian A fibers, *Am. J. Physiol.*, 127 (1939) 393-414.
22. Hoffman, P. N., Cleveland D. W., Griffin, J. W., Landes, P. W., Cowan, N. J. and Price, D. L., Neurofilament gene expression: A major determinant of axonal caliber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 (1987) 3472-3476.

23. Marszalek, J. R., Williamson, T. L., Lee, M. K., Xu, Z., Hoffman, P. N., Becher, M. W., Crawford, T. O. and Cleveland, D. W., Neurofilament subunit NF-H modulates axonal diameter by selectively slowing neurofilament transport, *J. Cell Biol.*, 135 (1996) 711-724.
24. Yagihashi, S., Kamijo, M. and Watanabe, K., Reduced myelinated fiber size correlates with loss of axonal neurofilaments in peripheral nerve of chronically streptozotocin diabetic rats, *Am. J. Pathol.*, 136 (1990) 1365-1373.
25. Mohiuddin, L., Fernyhough, P. and Tomlinson, D. R., Reduced levels of mRNA encoding endoskeletal and growth-associated proteins in sensory ganglia in experimental diabetes, *Diabetes*, 44 (1995) 25-30.
26. Scott, J. N., Clark, A. W. and Zochodne, D. W., Neurofilament and tubulin gene expression in progressive experimental diabetes, *Brain*, 122 (1999) 2109-2117.
27. Medori, R., Autilio-Gambetti, L., Monaco, S. and Gambetti, P., Experimental diabetic neuropathy: Impairment of slow transport with changes in axon cross-sectional area, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82 (1985) 7716-7720.
28. McLean, W. G., Pekiner, C., Cullum, N. A. and Casson, I. F., Posttranslational modifications of nerve cytoskeletal proteins in experimental diabetes, *Mol. Neurobiol.*, 6 (1992) 225-237.
29. Fernyhough, P., Gallagher, A., Averill, S. A., Priestley, J. V., Hounsom, L., Patel, J. and Tomlinson, D. R., Aberrant neurofilament phosphorylation in sensory neurons of rats with diabetic neuropathy, *Diabetes*, 48 (1999) 881-889.

30. Easterby, J. S. and O'Brien, M. J., Purification and properties of pig-heart hexokinase, *Eur. J. Biochem.*, 38 (1973) 201-211.
31. Bergemyer, H. U, Fructose-6-phosphate kinase, in "Methods of Enzymatic Analysis 2nd ed.", Vol.1 (1974) 451.
32. Kayne, F. J., Pyruvate kinase, in "The Enzymes 3rd ed.", 8 (1973) 353-382.
33. Duggleby, R. G. and Dennis, D. T., Nicotinamide adenine dinucleotide-specific glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Pisum sativum*. Purification and characterization, *J. Biol. Chem.*, 249 (1974) 162-166.
34. Bergemyer, H. U. and Bernt, E., Lactate dehydrogenase, in "Methods of Enzymatic Analysis 2nd ed.", Vol.2 (1974) 574-579.
35. Löhr, G. W. and Waller, H. D., Glucose-6-phosphate dehydrogenase, in "Methods of Enzymatic Analysis 2nd ed.", Vol.2 (1974) 636-643.
36. King, J., 6-phosphogluconate dehydrogenase, in "Methods of Enzymatic Analysis 2nd ed.", Vol.2 (1974) 632-635.
37. Gerlach, U. and Hiby, W., Sorbitol dehydrogenase, in "Methods of Enzymatic Analysis 2nd ed.", Vol.2 (1974) 569-573.
38. Bergemyer, H. U, Alcohol dehydrogenase, in "Methods of Enzymatic Analysis 2nd ed.", Vol.1

- (1974) 428-429.
39. Bergemyer, H. U, Glutathione reductase, in “Methods of Enzymatic Analysis 2nd ed.”, Vol.1 (1974) 465-466.
40. Das, B. and Srivastava, S. K., Purification and properties of aldose reductase and aldehyde reductase II from human erythrocyte, *Arch Biochem. Biophys.*, 238 (1985) 670-679.
41. 篠原 兵庫, 臨床酵素ハンドブック, (1982) 268-270.
42. Dahlqvist, A., Disaccharidases, in “Methods of Enzymatic Analysis 2nd ed.”, vol.2 (1974) 916-922.
43. Srivastava, S. K., Ansari, N. H., Brown, J. H. and Petrash, J. M., Formation of sorbitol 6-phosphate by bovine and human lens aldose reductase, sorbitol dehydrogenase and sorbitol kinase, *Biochim. Biophys. Acta*, 717 (1982) 210-214.
44. Bredt, D. S. and Snyder, S. H., Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86 (1989) 9030-9033.
45. Björkqvist, B., Separation and determination of phenyl isocyanate-derivatized carbohydrates and sugar alcohols by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection, *J. Chromatogr.*, 218 (1981) 65-71.
46. Kenneth H., The sorbitol pathway and the complications of diabetes, *N. Eng. J. Med.*, 288 (1973) 831-836.

47. Tomlinson, D. R., Moriarty, R. J. and Mayer, J. H., Prevention and reversal of defective axonal transport and motor nerve conduction velocity in rats with experimental diabetes by treatment with the aldose reductase inhibitor sorbinil, *Diabetes*, 33 (1984) 470-476.
48. Raccach, D., Coste, T., Cameron, N. E., Dufayet, D., Vague, P. and Hohman, T. C., Effect of the aldose reductase inhibitor tolrestat on nerve conduction velocity, NA/K ATPase activity, and polyols in red blood cells, sciatic nerve, kidney cortex, and kidney medulla of diabetic rats, *J. Diabet. Comp.*, 12 (1998) 154-162.
49. Mizuno, K., Kato, N., Makino, M., Suzuki, T. and Shindo, M., Continuous inhibition of excessive polyol pathway flux in peripheral nerves by aldose reductase inhibitor fidarestat leads to improvement of diabetic neuropathy, *J. Diabet. Comp.*, 13 (1999) 141-150.
50. Jiang, Y., Calcutt, N.A., Rames, K.M. and Mizisin, A.P., Novel sites of aldose reductase immunolocalization in normal and streptozotocin-diabetic rats, *J. Peripher.Nerv. Syst.*, 11 (2006) 274–285.
51. Sasaki, H., Schmelzer, J.D., Zollman, P.J. and Low, P.A., Neuropathology and blood flow of nerve, spinal roots and dorsal root ganglia in longstanding diabetic rats, *Acta Neuropathol.*, 93 (1997) 118–128.
52. McMahon, S. B., Armanini, M. P., Ling, L. H. and Phillips, H. S., Expression and coexpression of Trk receptors in subpopulations of adult primary sensory neurons projecting to identified peripheral targets, *Neuron*, 12 (1994) 1161-1171.
53. Hotta, N., Toyota, T., Matsuoka, K., Shigeta, Y., Kikkawa, R., Kaneko, T., Takahashi, A., Sugimura,

- K., Koike, Y., Ishi, J., Sakamoto, N. and The SNK-860 Diabetic Neuropathy Study Group, Clinical efficacy of fidarestat, a novel aldose reductase inhibitor, for diabetic peripheral neuropathy, *Diabetes Care*, 24 (2001) 1776-1782.
54. Liuzzi, F. J., Bufton, S. M. and Vinil, A. I., Streptozotocin-induced diabetes mellitus causes changes in primary sensory neuronal cytoskeletal mRNA levels that mimic those caused by axotomy, *Exp. Neurol.*, 154 (1998) 381-388.
55. Sima, A. A. F., Pathological mechanisms involved in diabetic neuropathy: Can we slow the process?, *Curr. Opin. Invest. Drugs*, 7 (2006) 324-337.
56. Harati, Y., Diabetic neuropathies: Unanswered questions, *Neurol. Clin.*, 25 (2007) 303-317.
57. Edwards, J. L., Vincent, A. M., Cheng, H. T. and Feldman E. L., Diabetic neuropathy: Mechanisms to management, *Pharmacol. Ther.*, 120 (2008) 1-34.
58. Clark, J. B., Palmer, C. J. and Shaw, W. N., The diabetic Zucker fatty rat, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 173 (1983) 68-75.
59. Peterson, R. G., Neel, M-A, Little, L. A., Kincaid, J. C. and Eichberg, J., Neuropathic complications in the Zucker diabetic fatty rat (ZDF/Drf-fa), in *Frontiers in Diabetes Research*, (1990) 456-458.
60. Nakamura, J., Koh, N., Sakakibara, F., Hamada, Y., Wakao, T., Sasaki, H., Mori, K., Nakashima, E., Naruse, K. and Hotta, N., Diabetic neuropathy in sucrose-fed Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats: Effect of an aldose reductase inhibitor, TAT, *Life Sci.*, 60 (1997) 1847-1857.

61. Kuzumoto, Y., Kusunoki, S., Kato, N., Kihara, M. and Low, P.A., Effect of the aldose reductase inhibitor fidarestat on experimental diabetic neuropathy in the rat, *Diabetologia*, 49 (2006) 3085–3093.
62. Price, S.A., Agthong, S., Middlemas, A.B. and Tomlinson, D.R., Mitogen-activated protein kinase p38 mediates reduced nerve conduction velocity in experimental diabetic neuropathy, *Diabetes*, 53 (2004) 1851–1856.
63. Fierro, B., Modica, A., D’Arpa, A., Santangelo, R. and Raimondo, D., Analysis of F-wave in metabolic neuropathies: a comparative study in uremic and diabetic patients, *Acta Neurol. Scand.*, 75 (1987) 179-185.
64. Zochodne, D.W., Verge, V.M.K., Cheng, C., Sun, H. and Johnston, J., Does diabetes target ganglion neurones? Progressive sensory neurone involvement in long-term experimental diabetes, *Brain*, 124 (2001) 2319–2334.
65. Kihara, M., Mitsui, Y., Shioyama, M., Hasegawa, T., Takahashi, M., Takakura, S., Minoura, K. and Kawamura, I., Effect of zenarestat, an aldose reductase inhibitor, on endoneurial blood flow in experimental diabetic neuropathy of rat, *Neurosci. Lett.*, 310 (2001) 81–84.