

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580438

研究課題名(和文) 糖尿病末梢神経症モデル動物を用いた神経症進行におよぼす高血圧の影響

研究課題名(英文) The effect of hypertension on diabetic peripheral neuropathy in diabetic animal model.

研究代表者

尾崎 清和 (Ozaki, Kiyokazu)

摂南大学・薬学部・准教授

研究者番号：40268496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：Deoxycorticosterone(DOCA)および食塩投与による高血圧付加処置の糖尿病性末梢神経病変への影響を検索するため、アロキサンにより糖尿病を誘発したWBNラットを用いて検討した。その結果、DOCAによる高血圧負荷では、血管病変を誘導できたが、神経病変形成を増悪する効果はなかった。しかし、食塩による高血圧負荷では、血管病変とともに神経病変を増悪した。このことから食塩による高血圧は、血管病変とともに糖尿病性末梢神経病変に影響することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To investigate the effects of hypertension by Deoxycorticosterone(DOCA) and saline on diabetic peripheral neuropathy, we examined the peripheral nerves of alloxan-induced diabetic WBN/Kob rats. Hypertension and vascular lesions of peripheral nerves were induced in DOCA group, but there was no effect on nerve lesions. However, in saline group, vascular and nerve lesions were deteriorated. These findings indicate that saline-induced hypertension have effect on diabetic peripheral neuropathy.

研究分野：病理学

キーワード：糖尿病 末梢神経 モデル動物 糖尿病末梢神経症 高血圧

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病はヒトおよび伴侶動物の高齢化に伴い飛躍的に増加している疾患である。本疾患には、末梢神経症をはじめ様々な合併症が出現することがよく知られている。そして、その発症および増悪には様々な因子が関与することも報告されている。多くの危険因子中でも高血糖がもっとも重要であることから、血糖のコントロールによる合併症に関する研究は多数行われている。血糖の良好なコントロールにより腎症、網膜症および神経症の発症や進展を抑制することが、UKPDS や DCCT スタディーをはじめ多くの臨床研究で明らかとなっている。そのメカニズムおよび治療研究のためには、動物モデルを用いた病態の再現が必要である。しかしながら、糖尿病性末梢神経症を発症するモデル動物が限られていることから基礎研究が進行していないのが現状である。われわれは、これまでに我々が見いだした糖尿病合併症を発症する糖尿病モデル動物 (WBN/Kob) を用いて、適切な血糖コントロールにより神経病変が形成されないことや遅延することを明らかにした。さらに、低血糖をとまなう血糖コントロール不良により神経病変が増悪することを明らかにした (Comp Med 60, 282-287, 2010)。これにより我々が用いた動物モデルが、糖尿病末梢神経症研究に有用であることが明確になった。我々は、このモデル動物を用いて糖尿病性神経症を増悪する別の因子である高血圧に注目した。臨床研究では、1型患者において遠位対称性多発性神経障害に高血圧が関連することが報告されている。しかしながら、基礎研究での報告は非常に少ないため、高血圧が糖尿病性神経症に影響する程度やそのメカニズムは十分に明らかにされていない。その第一段階として軽度の高血圧による影響を解析する目的で、片腎摘出による末梢神経病変への影響を検

討した結果、非常に軽微な影響を観察するにとどまった。軽微ではあるが高血圧により、神経症を増悪する可能性が見いだされたことから、今回より高度で持続的な高血圧の負荷により、末梢神経病変を増悪化することを着想した。

## 2. 研究の目的

我々が糖尿病性末梢神経症モデルとして確立した WBN/kob ラットを用いて、deoxycorticosterone および食塩投与による高血圧が糖尿病性末梢神経症に与える影響を形態学的、電気生理学的な手法により明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### **Deoxycorticosterone (DOCA) による高血圧症が糖尿病性末梢神経症に与える影響の解析**

#### **(1) DOCA による高血圧症 WBN/kob ラットの作製**

10 週齢の雄 WBN/Kob ラットにアロキササン (AL) を 1 回静脈内投与した後、滅菌水で飼育した AL 群、アロキササン投与 3 週後から週 1 回 DOCA を corn oil に溶かした溶液を皮下投与し、1% 食塩水で飼育した AL+DOCA+NaCl 群、13 週齢から週 1 回 DOCA を皮下投与し 1% 食塩水で飼育した DOCA+NaCl 群の計 3 群 (各群 10 頭) に分配した。実験開始前 (9 週齢)、実験開始後から 10 週おき (13, 23 週齢) に全てのラットの血糖、尿糖、血圧、尿蛋白および血中脂質を測定し、AL 群を 36 週齢、AL+DOCA+NaCl 群を 27 週齢、DOCA+NaCl 群を 31 週齢時に剖検した。

#### **(2) DOCA による高血圧症 WBN/kob ラットの解析**

##### **後肢末梢神経の運動神経伝導速度および感覚神経伝導速度の測定**

動物を麻酔後、ポリグラフ、神経刺激装置を用いて坐骨および脛骨神経の運動神経伝

導速度を測定した。

### **末梢神経病変の光学顕微鏡による定性的および半定量的解析**

動物を麻酔した後、血液を採取し放血殺した。血液は血糖、尿糖、血中トリグリセリド、LDL コレステロールの測定にもちいた。坐骨、脛骨、腓腹神経および後根神経節を採取した。これをグルタルアルデヒド、オスミウム酸で固定し、エポン処理後末梢神経のときほぐし標本を作製した。くわえて、エポン包埋光顕標本を作製した。定性解析にはときほぐし標本を用いて、髄鞘および軸索の変化を詳細に観察した。次にエポン包埋光顕標本にトルイジンブルー染色を施したものを使用し、神経線維、軸索周膜、神経線維の変化、神経内膜の肥厚の程度や血管の変化などについて詳細に観察し、その病変の頻度、程度を記録した。半定量的形態解析は同様の標本を用いて、高解像度デジタルカメラシステムで全断面を撮影し、デジタル画像解析装置により神経経繊維束の径、髄鞘の厚さ、軸索の径、神経内膜の面積などを形態計測し、病変を半定量的に解析した。

### **末梢神経病変の透過型電子顕微鏡による定性的、半定量的解析**

坐骨、脛骨および腓腹神経の透過型電気顕微鏡標本を作製し、透過型電子顕微鏡にて観察した。神経線維（髄鞘、軸索）シュワン細胞の変化を詳細に観察するとともに、病変の頻度、程度を半定量的に解析した。神経内膜内の血管に関しても同様に定性的に観察し、その病変を見いだすとともに、頻度、程度を半定量的に解析した。

### **食塩投与による高血圧症が糖尿病性末梢神経症に与える影響の解析**

#### **(1)食塩投与による高血圧症WBN/kob ラットの作製**

10 週齢の雄 WBN/Kob ラットにアロキ

サン(AL)を1回静脈内投与した後、滅菌水で飼育したAL群、アロキサン投与3週後から1%食塩水で飼育したAL+NaCl群、13週齢から1%食塩水で飼育したNaCl群の計3群(各群10頭)に分配した。実験開始前(9週齢)、実験開始後から10週おき(13,23週齢)に全てのラットの血糖、尿糖、血圧、尿蛋白および血中脂質を測定し、36週齢時に剖検した。

#### **(2)食塩投与による高血圧症WBN/kob ラットの解析**

後肢末梢神経の運動神経伝導速度および感覚神経伝導速度の測定

動物を麻酔後、ポリグラフ、神経刺激装置を用いて坐骨および脛骨神経の運動神経伝導速度、肢端部の感覚神経伝導速度を測定した。

末梢神経病変の光学顕微鏡による定性的および半定量的解析

動物を麻酔した後、血液を採取し放血殺した。血液は血糖、尿糖、血中トリグリセリド、LDL コレステロール、インスリン濃度の測定にもちいた。坐骨、脛骨、腓腹神経および後根神経節を採取した。これをグルタルアルデヒド、オスミウム酸で固定し、エポン処理後末梢神経のときほぐし標本を作製した。くわえて、エポン包埋光顕標本を作製した。定性解析にはときほぐし標本を用いて、髄鞘および軸索の変化を詳細に観察した。次にエポン包埋光顕標本にトルイジンブルー染色を施したものを使用し、神経繊維、軸索周膜、神経線維の変化、神経内膜の肥厚の程度や血管の変化などについて詳細に観察し、その病変の頻度、程度を記録した。半定量的形態解析は同様の標本を用いて、高解像度デジタルカメラシステムで全断面を撮影し、デジタル画像解析装置により神経経繊維束の径、髄鞘の厚さ、軸索の径、神経内膜の面積などを形態計測し、病変を半定量的に解析した。

#### 4. 研究成果

##### DOCA による高血圧症が糖尿病性末梢神経症に与える影響の解析

AL+DOCA+NaCl 群の血糖および尿糖値は高値を持続したが、DN 群では血糖は正常範囲内であり、尿糖は陰性を示した。

ADN および DOCA+NaCl 群の血圧は AL 群と比較し 23 週齢以降有意に上昇し 140mmHg 以上となった。組織学的に、坐骨、脛骨および腓腹神経の神経束内を走行する血管周囲の浮腫及び内皮細胞の肥大を伴う血管腔の狭窄が ADN および DOCA+NaCl 群でみられたが、神経線維の変化は軽微で 3 群間に差は認められなかった。超微形態的に全群で血管基底板の重層化が観察され、AL および AL+DOCA+NaCl 群では DOCA+NaCl 群より重度であった。血管周囲の浮腫が AL+DOCA+NaCl および DOCA+NaCl 群でみられ、さらに AL+DOCA+NaCl 群では基底板が疎開していた。脛骨神経において、神経内膜の線維化を反映して、DOCA+NaCl 群の神経線維占拠率 (Fiber occupancy) が ADN 群と比較して僅かに低下した。DOCA+NaCl 群の神経線維密度 (fiber density) も、AL+DOCA+NaCl 群と比較して有意に低下した。しかし、腓腹神経では 3 群間に差異は認めなかった。

神経線維・軸索・髄鞘面積のヒストグラムでは、AL+DOCA+NaCl 群の腓腹および脛骨神経で小径線維の割合が増加し、脛骨神経では、線維、髄鞘および軸索が小型化し、腓腹神経では線維と軸索が小型化していた。以上の結果から、糖尿病と DOCA による高血圧の合併では、神経束内の血管病変が増悪化するにもかかわらず、神経病変は悪化していないことが明らかとなった。血圧の上昇の程度が弱く、また罹患期間も短いことが神経病変を形成できなかつ

た原因と考えられた。

##### 食塩投与による高血圧症が糖尿病性末梢神経症に与える影響の解析

AL 群と AL+NaCl 群は糖尿病誘発後高血糖状態(血糖値 400 mg/dL 以上)を持続し、尿糖も 1000 mg/dL 以上の状態を維持した。AL+NaCl 群の血圧は他の 2 群と比較し 22 週以降有意に上昇し 200 mmHg 以上となったが、AL および NaCl 群においては血圧の変動は見られなかった。AL+NaCl および AL 群の MNCV は、NaCl 群と比較し有意に低下したが、両群間に差はなかった。AL+NaCl および AL 群において、坐骨、腓腹および脛骨神経の軸索萎縮および神経内膜の線維化がみられ、AL+NaCl 群で高度であった。AL+NaCl 群では神経内膜内を走行する血管壁の肥厚も加わった。

これらの病変は近位側の坐骨神経よりも遠位側の脛骨および腓腹神経で強かった。さらに、感覚神経の腓腹神経と運動神経の脛骨神経を比較すると、脛骨神経で高度となっていた。これは、WBN/Kob ラットが運動神経優位に糖尿病神経症を発症することに起因していると考えられた。糖尿病および食塩誘発による高血圧の合併では、血管病変形成とともに、末梢神経病変が増悪することが明らかとなった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 2 件)

アロキサン誘発糖尿病ラットの末梢神経症に対する高血圧の影響 濱野紘子、松浦哲郎、奈良間功、尾崎清和 第 103 回病理学会、広島国際会議場(広島県・広島市) 2014 年 4 月 25 日

アロキサン誘発糖尿病ラットの末梢神経症に対する食塩水投与による高血圧の影響

尾崎清和、奥澤文敏、濱野紘子、三橋由依、  
中垣綾乃、奈良間功、松浦哲郎 第 104 回  
病理学会、名古屋国際会議場（愛知県・名  
古屋市）、2015 年 4 月 30 日

6 . 研究組織

(1)研究代表者

尾崎 清和 ( OZAKI KIYOKAZU )

摂南大学・薬学部・准教授

研究者番号：40268496

(2)研究分担者

松浦 哲郎 ( MATSUURA TETSURO )

摂南大学・薬学部・教授

研究者番号：20268494

児玉 安史 ( KODAMA YASUSHI )

広島国際大学・薬学部・講師

研究者番号：40389119