

平成 21 年 3 月 13 日現在

研究種目：基盤研究(c)

研究期間：2006～2008 年度

課題番号：1850335

研究課題名（和文）自然発症糖尿病ラット(WBN/Kob)の糖尿病網膜症に関する研究

研究課題名（英文）A study on diabetic retinopathy in spontaneously diabetic rats (WBN/Kob)

研究代表者 松浦 哲郎 摂南大学・薬学部・准教授

研究者番号 20268494

研究成果の概要：

長期に糖尿病状態を継続した雄 WBN/Kob ラットでは毛細血管の基底膜の変化を主とする超微形態変化が生じていることが明らかになるとともに、血管への白血球接着がこの変化に関与している可能性が明らかになった。またこの糖尿病ラットの虹彩では明らかに微小血管瘤が増加しており、本モデルには糖尿病性のルビオース様の変化も誘発されていることが明らかとなった。したがって、本 WBN/Kob ラットはヒトの糖尿病網膜症のモデルとして有用性が高いことが判明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,900,000	0	1,900,000
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	510,000	4,110,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・病態モデル

キーワード：糖尿病・網膜症・動物モデル・病理

1. 研究開始当初の背景

ヒトの糖尿病網膜症では、網膜内の微小血管に機能的および形態的にさまざまな障害が生じることが知られており、重度な場合には硝子体側にも血管新生を伴う増殖性の変化が生じ、失明の要因にもなる。しかしながらラットをはじめとする様々な糖尿病モデル動物では自然発生あるいは薬物誘

発生のいずれにおいてもヒトの典型的な微小血管障害は誘発されがたく、網膜症に関しても周皮細胞のゴースト化は報告されているが、更なる病態の進行はなく形態学的にも重度な変化は認められない。

2. 研究の目的

我々は長期に糖尿病状態を継続した雄 WBN/Kob ラットのトリプシン消化網膜内

血管標本において、ヒトと酷似する微小血管瘤が明らかに増加していることを見だし、ヒトと一致する増殖性変化がこの系統に発生する可能性を示した。また、このラットの末梢神経を検索した結果、末梢神経の病変形成に糖尿病性の微小血管障害が関与していると思われる像も確認された。そこで、本研究では WBN/Kob ラットの糖尿病網膜症の病変形成について、微小血管症の果たす病理発生学的な役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 先ず、糖尿病を発症した18カ月齢および24カ月齢のWBN/Kobの雄とその対照として18カ月齢および24同月齢のWBN/Kobの雌および12カ月(発症前)のWBN/Kobの雄および雌を用い、長期の高血糖が網膜内血管の基底膜に与える影響を調べた。10ヶ月齢から血糖および尿糖を測定し、血糖値が200mg/dl尿糖が陽性となり、この状態が継続したものを糖尿病動物として用いた。動物を麻酔した後グルタルアルデヒド、パラホルムアルデヒド混合固定液で全身灌流固定し、眼球組織を採取しエポン包埋光顕、透過型電顕標本を作製した。トルイジンブルー染色を施した光顕標本を詳細に観察し、その病変の頻度、程度を判定した後に、電顕的に透過型電子顕微鏡を用いて網膜各層の血管を定性的に観察し、病変を見いだすとともに頻度・程度を記録した。

(2) 次に上記の年齢の動物に対し、網膜内血管のコンカナバリンAを用いた血管内皮の3次元解析と白血球接着およびトリプシン消化網膜血管および免疫組織を用いた内皮細胞および周皮細胞数の解析を実施した。白血球接着に関してはラットを麻酔した後、コンカナバリンAを尾静脈から静脈内投与し、網膜を3時間固定後、スライド上で伸展し、蛍光実体鏡下で血管内皮の走行状態、口径を注意深く観察した。また片眼の網膜を低濃度トリプシンで消化し、網膜内毛細血管の伸展標本を作製し、光学顕微鏡下で観察した。

(3) さらに同時期の動物に対しFITCデキストランを用いた虹彩組織の3次元解析と色素漏出試験も実施した。動物を麻酔した後、分子量4000のFITCデキストランを尾静脈から静脈内投与し、投与5分後にエーテル過麻酔で致死させた後、虹彩を採取し、4%パラホルムにて3時間固定し、蛍光実体鏡により、網膜内および虹彩における血管の状態と色素漏出を詳細に観察した。

4. 研究成果

(1) 電子顕微鏡による観察の結果、高血糖が持続した雄WBN/Kobラットの網膜内の血管の基底膜は明らかに肥厚していた。色素上皮細胞層には網膜最下層(外網状層)の毛細血管が侵入し、トリプシン伸展標本で観察された毛細血管瘤と一致すると思われる血管の集塊が観察された。毛細血管基底膜の肥厚は明らかであり、内皮細胞の菲薄化および周皮細胞の変性も観察された。

(2) 次に糖尿病を発症した雄のWBN/Kobラットでは非糖尿病の雌WBN/Kobラットと比較し、明らかに高い白血球の網膜内血管への接着が認められた。トリプシン消化伸展標本では、周皮細胞のゴースト化に雌雄の差は認められなかったが、雄の微小血管瘤数は雌よりも有意に高く、糖尿病が進行するとともに、雄の網膜内の細小血管(IRMA)は明らかに蛇行・変形し、その異常血管数は有意に上昇する結果も得られた。

(3) さらに実体蛍光顕微鏡下でFITCを注入した虹彩を観察した結果、糖尿病を発症した雄WBN/Kobラットでは細血管の走行状態、口径に異常が生じており、明らかな微小血管瘤の増加も認められた。

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)

[雑誌論文](計5件)

① Sano T, Ozaki K, Kodama Y, Matsuura T, Narama I. Paradoxical effects of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, etodolac, on proliferative changes of forestomach in alloxan-induced diabetic rats. *Exp Toxicol*

Pathology. (2009) In press

②Sano T, Ozaki K, Kodama Y, Matsuura T, Narama I. Prevention of proliferative changes of forestomach mucosa by blood glucose control with insulin in alloxan-induced diabetic rats. Cancer Science. (2009) In press

③Y. Fukuzato, T. Matsuura, K. Ozaki, I. Narama. Morphological study on dental caries induced in WBN/KobSlc rats (*Rattus norvegicus*) fed a standard laboratory diet. Laboratory Animals. (2009) In press

④Yamagishi S, Nakamura K, Matsui T, Inagaki Y, Takenaka K, Jinnouchi Y, Yoshida Y, Matsuura T, Narama I et al. Pigment epithelium-derived factor inhibits advanced glycation endproduct-induced retinal vascular hyperpermeability by blocking reactive oxygen species-mediated vascular endothelial growth factor expression. J Biol Chem 281, 20213-20220 (2006) 査読有

⑤ Kodama Y, Ozaki K, Sano T, Matsuura T, Akagi H, Narama I. Induction of squamous cell carcinoma of forestomach in diabetic rats by single alloxan treatment., Cancer Sci. 97, 1023-1030 (2006) 査読有

[学会発表] (計 6 件)

①T. Matsuura, K. Ozaki, I. Narama. Microangiopathy associated with drug-induced retinal degeneration in rats and mice. Society of Toxicologic Pathology 27th Annual Symposium (2008) San Francisco

②Ozaki K, Matsuura T, Narama I. Insulin-induced hypoglycemic peripheral neuropathy in spontaneous diabetic WBN/Kob rats. 25th European society of veterinary pathology (2007) Munich

③神原一太郎、松浦哲郎、尾崎清和、奈良間功 アロキササン誘発糖尿病ラットにおける網膜内血管の超微形態変化について 第13回日本糖尿病眼学会総会 (2007) 京都

④Matsuura T, Ozaki K, Narama I. Typical diabetic intraretinal angiopathy in spontaneously diabetic rats (WBN/Kob). 19th World Diabetes Congress (2006) Cape Town

⑤Kobara I., Matsuura T, Ozaki K, Narama I. Long-term hyperglycemia induces severe intraretinal angiopathy in alloxan-treated diabetic rats. 19th World Diabetes Congress (2006) Cape Town

⑥神原一太郎、松浦哲郎、尾崎清和、奈良間功。2型糖尿病モデル(db/db)マウスを用いた糖尿病網膜症研究。第21回日本糖尿病合併症学会 (2006) 弘前市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 哲郎(MATSUURA TETSURO)
摂南大学・薬学部・准教授
研究者番号：20268494

(2) 研究分担者

奈良間 功(NARAMA ISAO)
摂南大学・薬学部・教授
研究者番号：80268490

尾崎 清和(OZAKI KIYOKAZU)
摂南大学・薬学部・講師
研究者番号：40268496