

肥満 2 型糖尿病モデル SDT fatty ラットにおけるメトホルミンの作用解析
および血行動態の病態解析

2020 年

村井 康高

新潟大学大学院自然科学研究科博士後期課程

生命・食料科学専攻

略 語

ADA (American Diabetes Association ; 米国糖尿病学会)
AHA (American Heart Association ; 米国心臓協会)
ACC (American College of Cardiology ; 米国心臓病学会)
ABI (Ankle brachial pressure index ; 足関節/上腕血圧比)
ASO (Arteriosclerosis obliterans ; 閉塞性動脈硬化症)
APTT (Activated partial thromboplastin time ; 活性化部分トロンボプラスチン時間)
AMP (Adenosine monophosphate ; アデノシン一リン酸)
AMPK (AMP-activated protein kinase : AMP 活性化プロテインキナーゼ)
Bpm (Beats per minute ; 一分間の拍数)
Canag (canagliflozin ; カナグリフロジン)
DPP-4 (Dipeptidyl Peptidase-4 ; ジペプチジルペプチダーゼ 4)
Glu (Glucose ; グルコース)
eNOS (endothelial Nitric Oxide Synthase ; 内皮型一酸化窒素合成酵素)
MC (Methylcellulose ; メチルセルロース)
MNCV (Motor nerve conduction velocity ; 運動神経伝導速度)
TAO (Thromboangitis obliterans ; 閉塞性血栓血管炎)
PAD (Peripheral artery disease : 末梢動脈疾患)
p-eNOS (phosphorylated-eNOS ; リン酸化 eNOS)
PDE (Phosphodiesterase ; ホスホジエステラーゼ)
PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ ; ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ)
PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride ; フッ化フェニルメチルスルホニル)
SNCV (Sensory nerve conduction velocity ; 感覚神経伝導速度)
TASC II (The Trans-Atlantic Inter-Society Consensus Document on Management of Peripheral Arterial Disease II)
LVAW (Left ventricular anterior wall ; 左室前壁)
LVDd (Left ventricular end-diastolic dimension ; 左室拡張末期径)
LVDs (Left ventricular end-systolic dimension ; 左室収縮末期径)
LVPW (Left ventricular posterior wall ; 左室後壁)
LVEF (Left ventricle ejection fraction ; 左室駆出率)
LVEDV (Left ventricular end diastolic volume ; 左室拡張末期容積)
LVESV (Left ventricular end systolic volume ; 左室収縮末期容積)
mRNA (messenger RNA ; メッセンジャーRNA)
NOx (Nitrogen oxides ; 窒素酸化物)

O/N (Overnight ; 終夜)

PBS (Phosphate Buffered Saline ; リン酸緩衝食塩水)

Pio (Pioglitazone ; ピオグリタゾン)

PPP (Platelet-poor plasma ; 乏血小板血漿)

PRP (Platelet-rich plasma ; 多血小板血漿)

PT (Prothrombin time ; プロトロンビン時間)

PVDF (Poly Vinylidene Di-Fluoride ; ポリフッ化ビニリデン)

QOL (Quality of Life ; 生活の質)

RIPA buffer (Radio-Immunoprecipitation Assay buffer ; 放射性免疫アッセイ緩衝液)

ROS (Reactive Oxygen Species ; 活性酸素種)

STZ (Streptozotocin ; ストレプトゾトシン)

SD (Sprague-Dawley)

SDT (Spontaneously Diabetic Torii)

SGLT (Sodium glucose cotransporter ; ナトリウム・グルコース共役輸送体)

Ser (Serine ; セリン)

SU (Sulfonylurea ; スルホニルウレア)

TBST (Tris Buffered Saline with Tween 20 ; Tween 20 含有トリス緩衝食塩水)

TC (Total cholesterol ; 総コレステロール)

TG (Triglyceride ; トリグリセリド)

T-eNOS (Total-eNOS ; 総 eNOS)

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor ; 血管内皮増殖因子)

VWF (von Willebrand factor ; フォン・ヴィレブランド因子)

ZF (Zucker fatty)

目 次

第1章 緒 論	6
第2章 SDT fatty ラットに対するメトホルミンの作用解析	16
第1節 緒 言	
第2節 材料および方法	
第3節 結 果	
第4節 考 察	
第5節 要 約	
第3章 SDT fatty ラットの非虚血時の血行動態解析	30
第1節 緒 言	
第2節 材料および方法	
第3節 結 果	
第4節 考 察	
第5節 要 約	
第4章 SDT fatty ラットの下肢虚血時の血行動態解析	48
第1節 緒 言	
第2節 材料および方法	
第3節 結 果	
第4節 考 察	

第 5 節 要 約

第 5 章 総 括	57
-----------	----

謝辞	61
----	----

引用文献	62
------	----

SUMMARY	69
---------	----

第1章 緒 論

近年の食生活の欧米化や IT 技術の発展の代償による運動不足といった生活習慣の著しい変化により、糖尿病や肥満症、脂質異常症といったメタボリックシンドロームを発症する患者数が急速に増加しており、このことは世界的な問題となっている (King et al., 1998; Szoke et al., 2008; Yoon et al., 2006)。特に 2 型糖尿病患者の増加は、糖尿病性腎障害や糖尿病性網膜症、糖尿病性神経障害といった細小血管合併症を増加させることに繋がり (Cortez et al., 2014; Hall et al., 2003; Ritz and Stefanski, 1996)、また、2 型糖尿病は PAD の危険因子としても知られている (Norgren et al., 2007)。2 型糖尿病患者では細小血管合併症や PAD の発症により QOL が悪化することに加えて、その患者数の増加が医療経済費の増加に繋がることも大きな問題である (Calcutt et al., 2009)。従って、2 型糖尿病の発症および進展を予防することは極めて重要である。

2 型糖尿病では複数のメカニズムが複数の臓器に影響を与えるため、その病態は非常に複雑であるが、その中でも末梢のインスリン抵抗性とその結果生じるインスリン分泌不全が 2 型糖尿病の代表的な病態である (Brown et al., 2017)。

2 型糖尿病発症には遺伝的要因や環境的要因、複雑な病態等が関与するが、各々の寄与は患者ごとに異なることから、これまでに様々なメカニズムの糖尿病治療薬が開発されてきた (Bohannon, 2002)。ADA が策定したガイドラインでは、経口薬の第一選択薬としてはメトホルミンが推奨されている (American Diabetes Association, 2019)

(図 1-1)。メトホルミンは糖尿病治療薬として 60 年以上使用され続け、その有効性面と価格面の観点から、毎年 1 億 5 千万人もの患者に投薬されている (An and He, 2016)。メトホルミンの作用機序としては、主に肝臓での糖新生を抑制することで高血糖を改

善させることが報告されている(An and He, 2016) (図 1-2)。しかし、メトホルミンやその他既存薬によっても十分な血糖コントロールを達成できていない患者も存在することから、依然として新たな糖尿病治療薬が求められている。そのため、糖尿病モデル動物を用いてその病態を把握することや薬剤の有効性を評価することは、新たな治療薬を開発する上で今後も非常に重要となってくる。

PAD とは、本来冠動脈以外の末梢動脈の様々な疾患を指す用語であるが、各国/地域のガイドラインによって PAD に含まれる疾患の種類が異なっている。一方で、ASO が下肢動脈に由来する PAD の 95%を占め(日本循環器学会, 末梢閉塞性動脈疾患の治療ガイドライン (2015 年改訂版)), ガイドラインによっては PAD と ASO は同義とすることも多い。また ASO は PAD の中でも主な治療対象とされている。以上のことを踏まえて、PAD の疾患の定義は一般に、下肢主幹動脈に発症するアテローム性動脈硬化症を原因とした狭窄または閉塞による下肢、下腿筋群の血流障害とされる。PAD では、病態の進展により虚血による歩行障害(間欠性跛行)が起こり、最終的には下肢壊死に陥ることから、病期の広範にわたり日常生活を制限するような身体機能の低下が認められる。更に、PAD は下肢の疾患に限局されず、加齢や脂質異常症、糖尿病などの生活習慣病を背景とした動脈硬化により心臓や脳、下肢など全身の血管に閉塞が起こり、その結果「虚血」として表現される疾患であることから、全身的な動脈硬化性疾患の一部分症と認識される(図 1-3)。従って、PAD 患者では冠動脈疾患や脳血管疾患を伴うことが多く(Norgren et al., 2007; Ohman et al., 2006) (図 1-4)、予後は非常に悪い(Norgren et al., 2007) (図 1-5)。そのため本疾患では早期発見、早期治療を行うことが非常に重要となる。

PAD の危険因子として加齢、喫煙、高血圧症、糖尿病、脂質異常症などが挙げられる。また、人種差に関しては白人よりもアジア人／ヒスパニック人／黒人において罹患リスクが高く、性差に関しては女性よりも男性で罹患リスクが高いとされている

(Norgren et al., 2007) (図 1-6)。

全世界における PAD の有病率は約 3~10%とされ、70 歳以上では 15~20%に及ぶ (Norgren et al., 2007)。更に今後の社会的高齢化、危険因子である高血圧、糖尿病、および脂質異常症の増加により、患者数の更なる増加が予想されている。

PAD 治療の目標は、心血管イベントの予防および QOL の改善（間欠性跛行症状の改善、安静時疼痛の改善、救肢など）である。心血管イベントの予防を目的とした治療は、下肢症状の有無によらず薬物によるリスクファクターの管理（抗血小板薬、脂質低下薬、降圧薬、血糖降下薬）が中心となる。特に抗血小板薬としては、アスピリンやクロピドグレルの使用が強く推奨されている (Norgren et al., 2007)。一方、QOL の改善を目的とした治療には、病態の重症度や病変部位に応じて薬物治療や運動療法、血行再建術（血管内治療、バイパス術）が適用される (Gerhard-Herman et al., 2017; Stewart et al., 2002) (表 1-1)。しかし、薬物療法には副作用、運動療法には身体的・経済的負担や実施施設の制限、血行再建術には身体的・経済的負担や再狭窄リスク等の問題点があり、いずれの治療法も満足度の高いものではないことから、QOL の改善を目的とした新たな治療法が求められている。

PAD の非臨床研究においては、PAD モデル動物として下肢虚血マウスまたはラットが広く利用されているが、その多くは正常マウスまたはラットの大腿動脈を結紮することで作製されている。一方、上述のように PAD 患者の多くは糖尿病や脂質異常症、高血圧症といった生活習慣病を背景疾患として有し (Norgren et al., 2007)、血管内皮機能が低下していることから (Sanada et al., 2005)、非臨床研究においても高血糖や脂質異常、高血圧を示す動物を用いた下肢虚血モデルでの評価が重要である。

SDT fatty ラットは、非肥満型 2 型糖尿病モデル SDT ラットに ZF ラットの *Lepr^{fa}* 遺伝子をスピードコンジェニック法により導入し、確立されたコンジェニックラットである (Masuyama et al., 2005)。本ラットは新規の肥満 2 型糖尿病モデル動物であり、

若週齢から過食, 肥満, 高血糖および脂質異常を呈することが報告されている (Katsuda et al., 2014; Masuyama et al., 2005; Toriniwa et al., 2018) (図 1-7)。更に, 本ラットでは糖尿病性の合併症 (腎症, 網膜症, 神経障害) も発症することが報告されている (Matsui et al., 2008)。しかし, SDT fatty ラットに対するメトホルミンの作用や SDT fatty ラットの血行動態については未だ検討がなされていない。

そこで本博士論文では, まず第 2 章において SDT fatty ラットの糖尿病モデルとしての特徴を把握するために, SDT fatty ラットに対するメトホルミンの作用について検討した。その結果, メトホルミンは雌雄いずれの SDT fatty ラットに対しても血糖値を低下させるがその作用には雌雄差があること, およびメトホルミンが雌性 SDT fatty ラットで認められた感覚神経伝導速度の低下を抑制することを明らかにした。次に第 3 章では, SDT fatty ラットの基礎的な血行動態を解析するために, 非虚血時における下肢血流量を評価し, SDT fatty ラットでは正常対照である SD ラットよりも下肢血流量が低下していることを示した。更に同章では, SDT fatty ラットにおける下肢血流量低下のメカニズムについても検討し, 酸化ストレスや血管内皮機能, 血小板凝集, 血液凝固が下肢血流量の低下に影響を与えている可能性を示した。最後に第 4 章では, 下肢虚血を誘発させた SDT fatty ラットにおける下肢血流量の変化や血管新生応答について検討し, SDT fatty ラットでは SD ラットよりも虚血後の血流量の回復が悪化していることや血管新生応答が障害されていることを示した。以上のことから, SDT fatty ラットは新たな糖尿病および PAD 治療薬を開発する上で有用なモデルであることが示唆された。

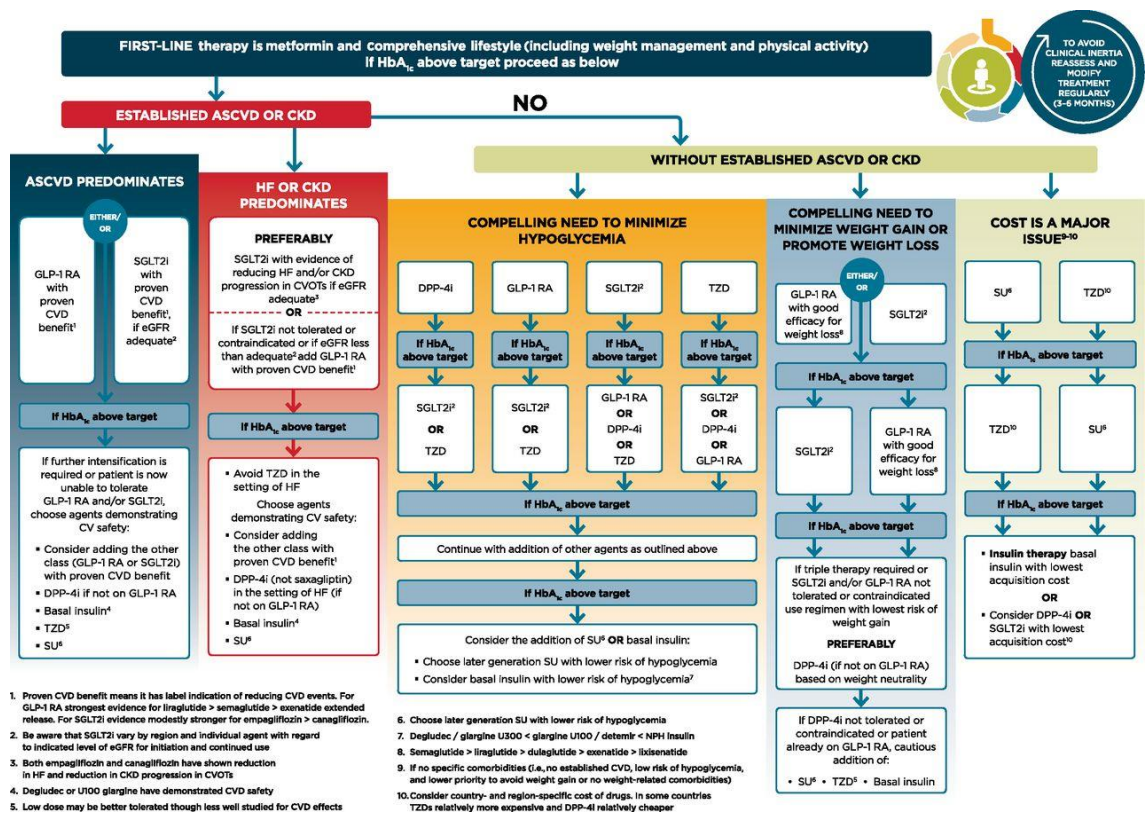


図 1-1. 既存の糖尿病治療薬 (ADA., 2019)

既存の糖尿病治療薬には、メトホルミン、SU 薬、チアゾリジン系薬 (TZD)、DPP-4 阻害薬、GLP-1 作動薬、SGLT2 阻害薬、インスリン製剤がある。その中で、メトホルミンが第一選択薬として推奨されている。

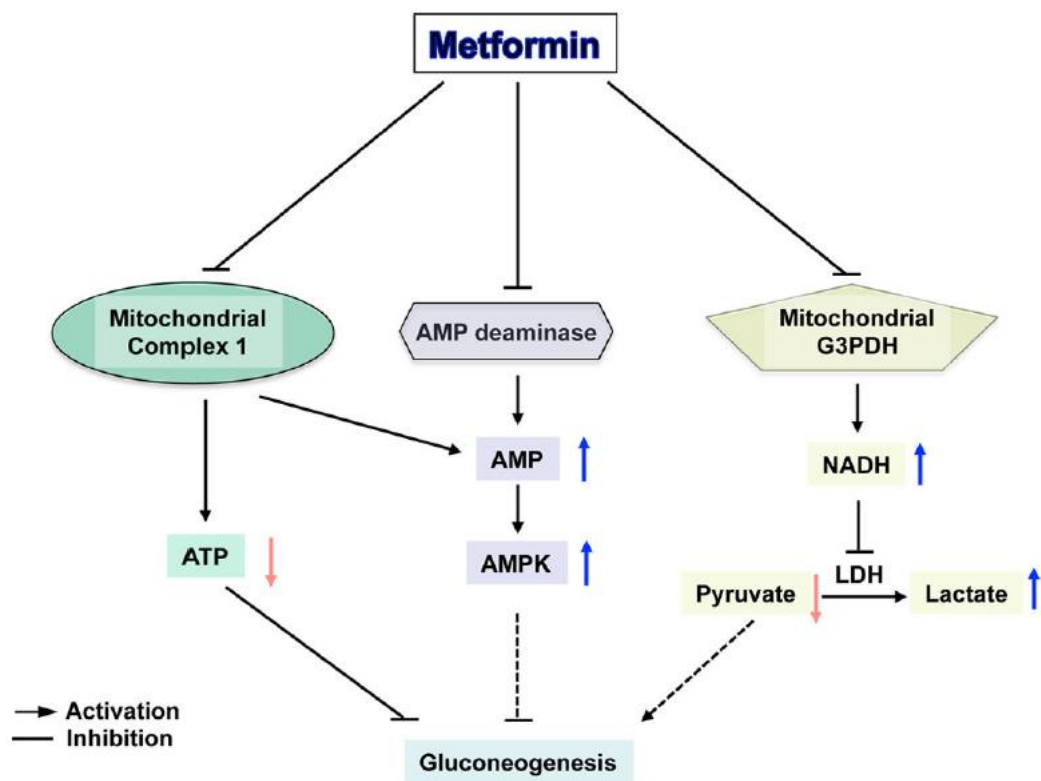


Figure 2. Direct Suppression of Hepatic Glucose Production by Metformin through the Inhibition of Mitochondrial Respiratory Chain Complex 1, AMP Deaminase, and Mitochondrial Glycerol 3-Phosphate Dehydrogenase

図 1-2. メトホルミンの作用機序 (An H et al., 2016)

メトホルミンはミトコンドリア複合体 1 や AMP デアミナーゼを阻害することで AMPK を活性化し、肝臓での糖新生を抑制する。

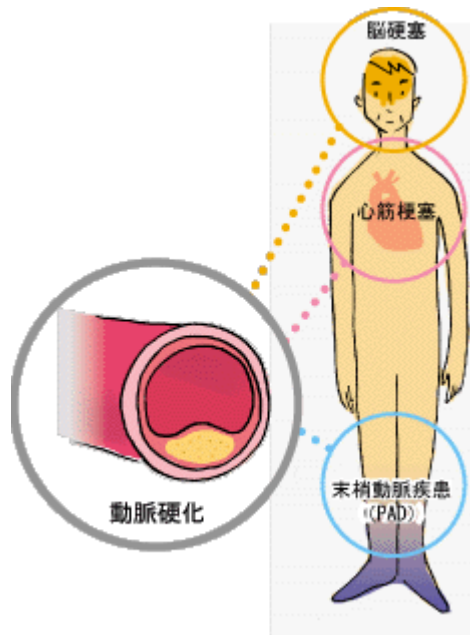
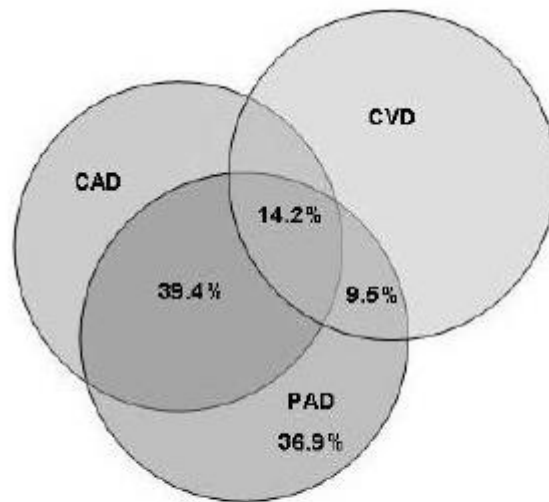


図 1-3. PAD の概略

(<https://www.otsuka.co.jp/health-and-illness/peripheral-artery-disease/about/>)

PAD とは主にアテローム性動脈硬化を原因とした下肢主要動脈の狭窄または閉塞に基づく下肢の血流障害である。PAD では、病態の進展により虚血による歩行障害（間欠性跛行）や下肢壊死が起こる。



Conclusions: Patients with symptomatic PAD have multiple risk factors for atherothrombosis, including prediabetes and undiagnosed diabetes, and have a high prevalence of polyvascular disease. Appropriate medications to treat cardiovascular risk in PAD patients are underutilized throughout the world.

図 1-4. PAD 患者の冠動脈疾患及び脳血管疾患の合併率 (Norgren et al., 2007)

PAD は全身性の動脈硬化の一部であることから、冠動脈疾患や脳血管疾患を合併する割合が高い。

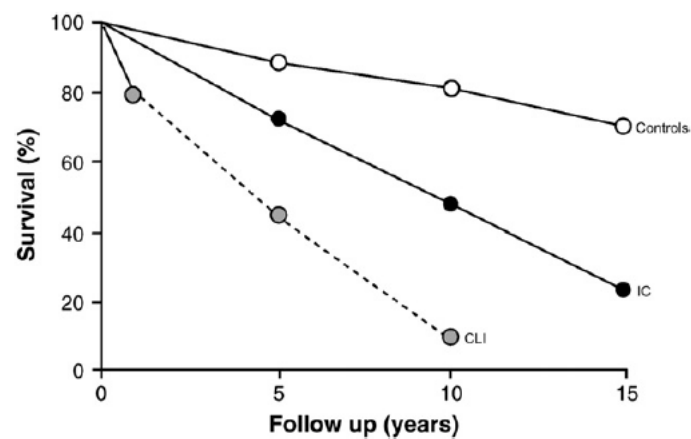


Fig. A8. Survival of patients with peripheral arterial disease. IC – intermittent claudication; CLI – critical limb ischemia.

図 1-5. PAD 患者の生存率 (Norgren et al., 2007)

PAD は冠動脈疾患や脳血管疾患の合併率が高いことから、予後が悪い。

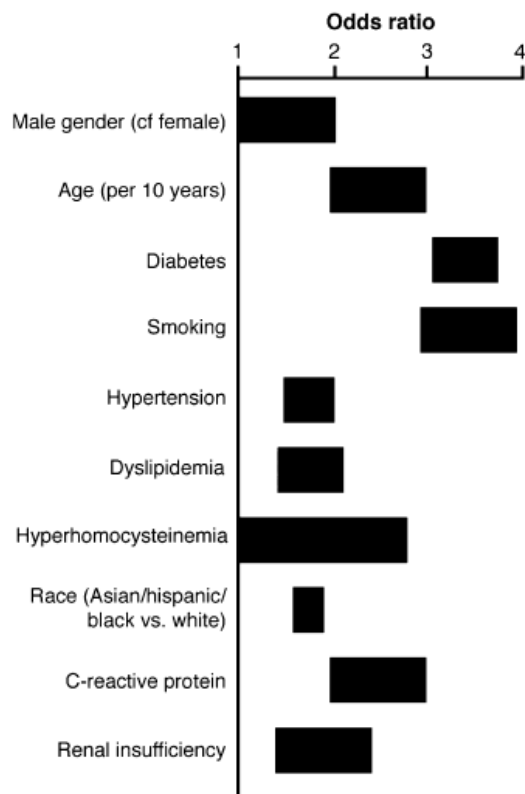


Fig. A2. Approximate range of odds ratios for risk factors for symptomatic peripheral arterial disease. Treatment of risk factors and the effect on the outcomes of PAD are described in Chapter B.

図 1-6. PAD の危険因子 (Norgren et al., 2007)

PAD の危険因子として、性別、加齢、糖尿病、喫煙、高血圧症、脂質異常症、高ホモシステイン血症、人種、C 反応性蛋白、腎不全が報告されている。

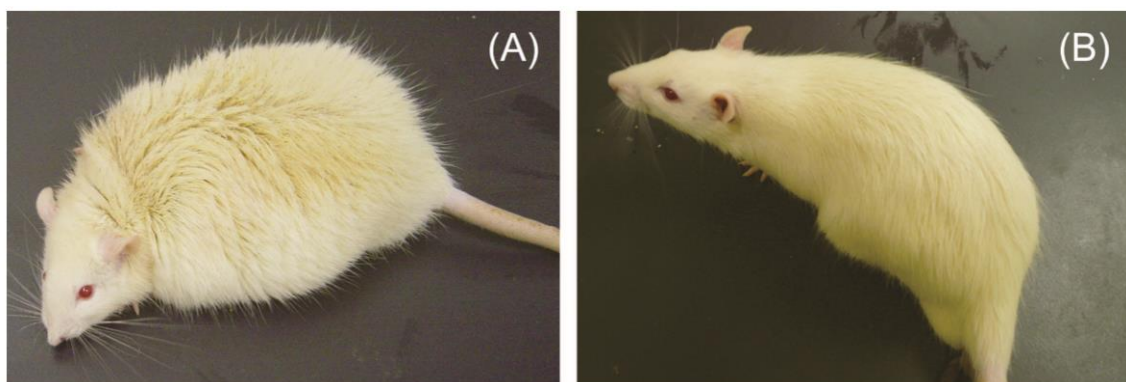


図 1-7. 16 週齢における SDT fatty ラット (A) および SD ラット (B)

SDT fatty ラットは、同一週齢の SD ラットに比べて、過食であり肥満を呈する。

表 1-1. PAD 治療の現状

Fontaine 分類		対策
I 度：無症状		● リスクファクターの管理
II 度：間欠性跛行		● 監視下運動療法 ● 薬物治療（シロスタゾールが第一選択） ● 血行再建術
III 度：安静時疼痛 IV 度：潰瘍・壊疽	重症虚 血肢	● 血行再建術（積極的に優先） ● 非適応時には静注・動注薬物療法（国内）

無症状では心血管イベントの予防を目的として、抗血小板薬、脂質低下薬、降圧薬、血糖降下薬によるリスクファクターの管理が主な治療となる。間欠性跛行症状に対しては、監視下運動療法、薬物療法及び血行再建術が主な治療法である。重症虚血肢に対しては、血行再建術が積極的に施術される。

第2章 SDT fatty ラットに対するメトホルミンの作用解析

第1節 緒言

第1章で述べた通り，2型糖尿病発症には遺伝的要因や環境的要因，複雑な病態等が関与するが，各々の寄与度は患者ごとに異なることから，これまでに様々なメカニズムの糖尿病治療薬が開発されてきた。しかし，これら薬剤によっても十分な血糖コントロールを達成できない患者も存在することから，依然として新たな糖尿病治療薬が求められている。従って，糖尿病モデル動物を用いてその病態を把握することや薬剤の有効性を評価することは，新たな治療薬を開発する上で非常に重要である。

メトホルミンは主に肝臓での糖新生を抑制することにより高血糖を改善することが知られており，ADA が策定したガイドラインでは経口薬の第一選択薬として推奨されている。しかし，篠原，益山らによって確立された新規の肥満2型糖尿病モデル動物である SDT fatty ラットにおけるメトホルミンの作用は未だ検討されていない。そこで本章では，SDT fatty ラットの糖尿病モデルとしての特徴を把握するために，メトホルミンの雌雄 SDT fatty ラットの血液生化学パラメータ（血糖値，インスリン値，TG 値，TC 値）に対する作用について検討した。更に糖尿病合併症の一つである糖尿病性神経障害に対するメトホルミンの作用についても検討した。

第2節 材料および方法

試験には日本クレア社から購入した雌性・雄性 SDT fatty ラット，および正常対照として雌性・雄性 SD ラットを供した。飼料にはオリエンタル酵母社の CRF-1 を用いた。動物は紫外線照射された水道水および上記飼料を自由摂取させ，12 時間の明暗周期（明期：8～20 時，暗期：20 時～8 時），温度 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ，湿度 $55 \pm 15\%$ に環境統御された飼育室で維持した。

雌性 SDT fatty ラットについては 5 週齢時の体重および血液生化学パラメータ（グルコース，インスリン，TG，TC）を基に対照群，メトホルミン塩酸塩（メトホルミン）100mg/kg 群，メトホルミン 300 mg/kg 群の計 3 群（N=5）に群分けし，試験を開始した。雄性 SDT fatty ラットでは 6 週齢時の体重および血液生化学パラメータ（グルコース，インスリン，TG，TC）を基に対照群，メトホルミン 300 mg/kg 群の計 2 群（N=5）に群分けし，試験を開始した。メトホルミンは混餌投与し，試験期間を通じてメトホルミンは 100 mg/kg/day または 300 mg/kg/day となるように各時点における動物の体重と摂餌量に合わせて 2 週間ごとに調製した。なお対照群および正常群には CRF-1 を給餌した。雌性 SDT fatty ラットについては，10 週齢時に神経伝導速度を測定した。

各動物の体重，血液生化学パラメータ（グルコース，インスリン，TG，TC）を雌性ラットについては 5，7，9 週齢時に，雄性ラットについては 6，8，10 週齢時に測定した。非絶食下のラット尾静脈より採血後，遠心分離（ $16,000 \times g$ ，5 分間， 4°C ）にて血漿を採取し，血漿中グルコース値，TG 値，TC 値を自動分析器である HITACHI 7180（日立ハイテクノロジーズ）を用いて測定した。血漿中インスリン値については，インスリン測定 ELISA キット（森永生化学研究所）を用いて測定した。

5 週齢より 300 mg/kg メトホルミンを 5 週間混餌投与した雌性 SDT fatty ラットを試験に供した。ラットにペントバルビタールを 37.5 mg/kg の用量で腹腔内投与した後、ジアゼパムを 0.6 mL/kg の容量で腹腔内投与することで麻酔した。麻酔後、横臥位に寝かせ背部皮下及び足裏に不閉電極、足背部に記録電極、アキレス腱及び坐骨切痕に刺激電極をそれぞれ穿入した（図 2-1）。運動神経線維を介して興奮が順行性に伝播し生じる波（M 波）及び興奮が感覚神経を逆行性に伝播して脊髓前角細胞を介し再び順行性に伝播し生じる波（H 波）をそれぞれ測定した（図 2-2）。持続時間 0.2 ミリ秒の矩形波を用いて電気刺激を与え、その直後より 15 ミリ秒間に出現する筋活動電位の変化をオシロスコープ上に描出した。M 波及び H 波の波形強度がそれぞれ最大となるよう刺激電圧を調整し、その電圧の 120%の電圧を刺激電圧として設定した。解析ソフトを用いて波形をコンピュータに取り込んだ後、刺激後潜時を記録した。続いて刺激電極を坐骨切痕付近に穿刺し、同様に M 波及び H 波をそれぞれ測定した。アキレス腱及び坐骨切痕の刺激電極間の距離を、ノギスを用いて測定した。坐骨切痕付近の体温を測定し体温が 36° C 付近であることを確認した。以下の式により、坐骨神経における運動神経伝導速度及び感覚神経伝導速度を算出した (Naruse et al., 2011; Tomlinson et al., 1984)。

運動神経伝導速度 (m/s) = 刺激電極間の距離 (mm) / (A-B)

坐骨切痕における M 波潜時 (A), アキレス腱における M 波潜時 (B) (ms)

感覚神経伝導速度 (m/s) = 刺激電極間の距離 (mm) / (C-D)

アキレス腱における H 波潜時 (C), 坐骨切痕における H 波潜時 (D) (ms)。

統計学的解析については、SD ラットと SDT fatty ラットの比較では、Student の t

検定または Aspin-Welch の t 検定を実施し、 $P < 0.05$ を有意とした。また、SDT fatty ラットにおける薬剤の作用比較においては、Dunnett 検定または Steel 検定を実施し、 $P < 0.05$ を有意とした。結果は、平均値±標準偏差で示した。

第3節 結 果

摂餌量については、評価期間を通じて雌雄いずれにおいても SDT fatty ラットでは SD ラットよりも有意に高値を示した (図 2-3A, 2-4A)。雌性 SDT fatty ラットでは、メトホルミンによる摂餌量の変化は認められなかったが、雄性 SDT fatty ラットでは、300 mg/kg メトホルミンにより 10 週齢において有意な摂餌量の低下が認められた (図 2-3A, 2-4A)。体重については、評価期間を通じて雌雄どちらにおいても SDT fatty ラットでは SD ラットよりも有意に高値を示したが、メトホルミンによる変化は認められなかった (図 2-3B, 2-4B)。血糖値については、評価期間を通じて雌雄いずれにおいても SDT fatty ラットでは SD ラットよりも有意に高値を示した (図 2-3C, 2-4C)。雌性 SDT fatty ラットでは、300 mg/kg メトホルミンにより 7 週齢および 9 週齢において有意な血糖値の低下が認められ、雄性 SDT fatty ラットでは、300 mg/kg メトホルミンにより 10 週齢において有意な血糖値の低下が認められた (図 2-3C, 2-4C)。血漿中インスリン値については、雌性 SDT fatty ラットでは評価期間を通じて SD ラットよりも有意に高値を示した (図 2-3D)。一方、雄性 SDT fatty ラットでは 6 週齢および 8 週齢において SD ラットよりも有意に高値を示したが、10 週齢においては有意な差は認められなかった (図 2-4D)。雌雄いずれの SDT fatty ラットにおいても、メトホルミンによる影響は認められなかった (図 2-3D, 2-4D)。血漿中 TG 値については、評価期間を通じて雌雄いずれにおいても SDT fatty ラットでは SD ラットよりも有意に高値を示した (図 2-3E, 2-4E)。雌性 SDT fatty ラットでは、メトホルミンによる血漿中 TG 値の変化は認められなかったが、雄性 SDT fatty ラットでは、300 mg/kg メトホルミンにより 10 週齢において有意な血漿中 TG 値の増加が認められた (図 2-3E, 2-4E)。血漿中 TC 値については、評価期間を通じて雌雄いずれにおいても SDT fatty ラットで

はSDラットよりも有意に高値を示した(図 2-3F, 2-4F)。雌性 SDT fatty ラットでは、メトホルミンによる血漿中 TC 値の変化は認められなかったが、雄性 SDT fatty ラットでは、300 mg/kg メトホルミンにより 8 週齢および 10 週齢において有意な血漿中 TC 値の増加が認められた(図 2-3F, 2-4F)。

感覚神経伝導速度については、10 週齢時において雌性 SDT fatty ラットではSDラットよりも有意に低値を示し、300 mg/kg メトホルミンによりその低下は有意に抑制された(図 2-5 左)。一方、運動神経伝導速度については、雌性 SDT fatty ラットではSDラットとの違いは認められず、メトホルミンによる変化も認められなかった(図 2-5 右)。

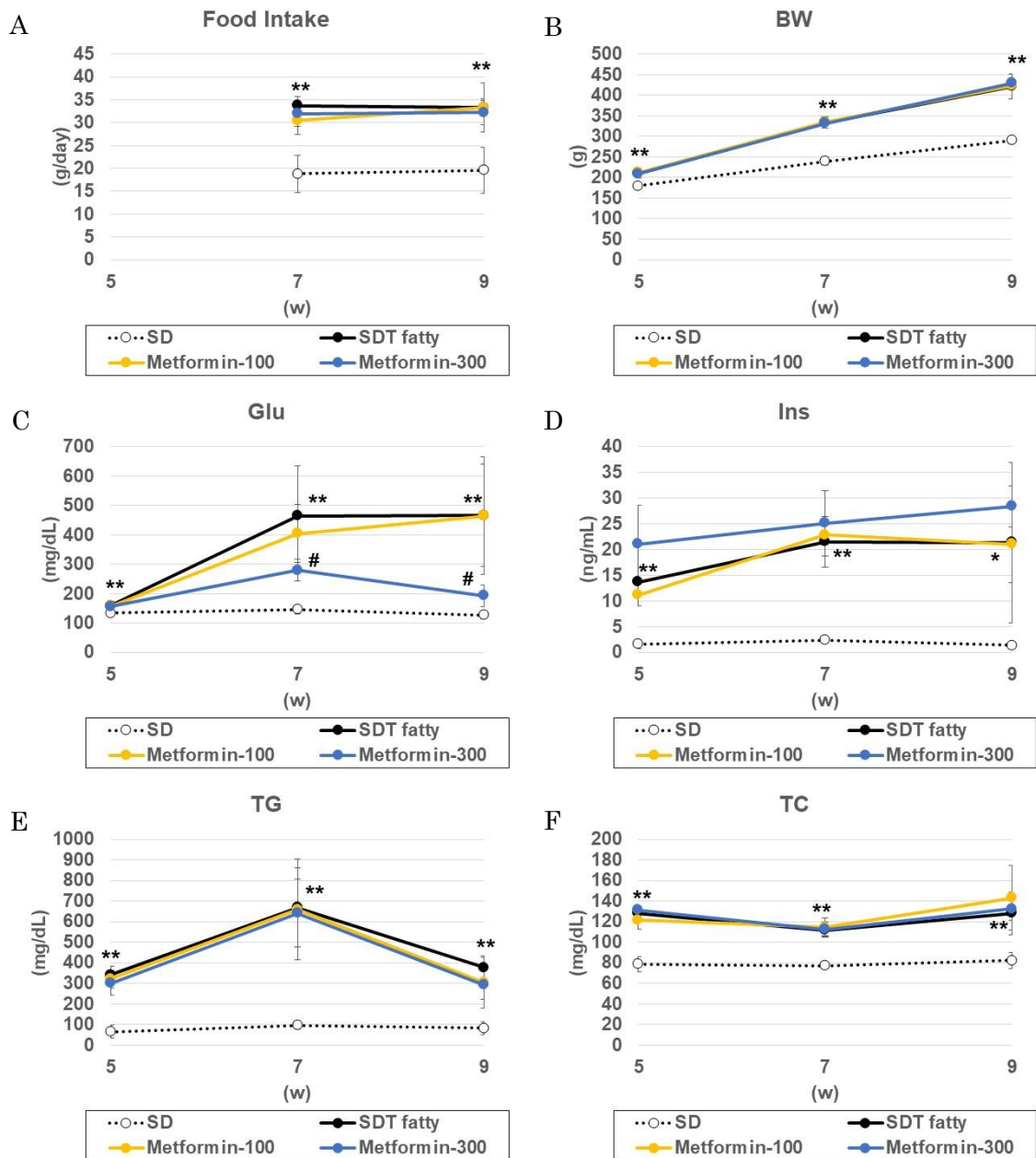


図 2-3A ~ 3F. 雌性 SDT fatty ラットにおけるメトホルミンによる体重、摂餌量および糖脂質代謝に関連する血液生化学パラメータの経時変化

A: 摂餌量 (Food Intake), B: 体重 (BW), C: 血糖値 (Glu), D: 血漿中インスリン値 (Ins), E: 血漿中 TG 値 (TG), F: 血漿中 TC 値 (TC)

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (SD ラットと SDT fatty ラットの比較)

#: $p < 0.05$ (SDT fatty ラットとメトホルミン群の比較)

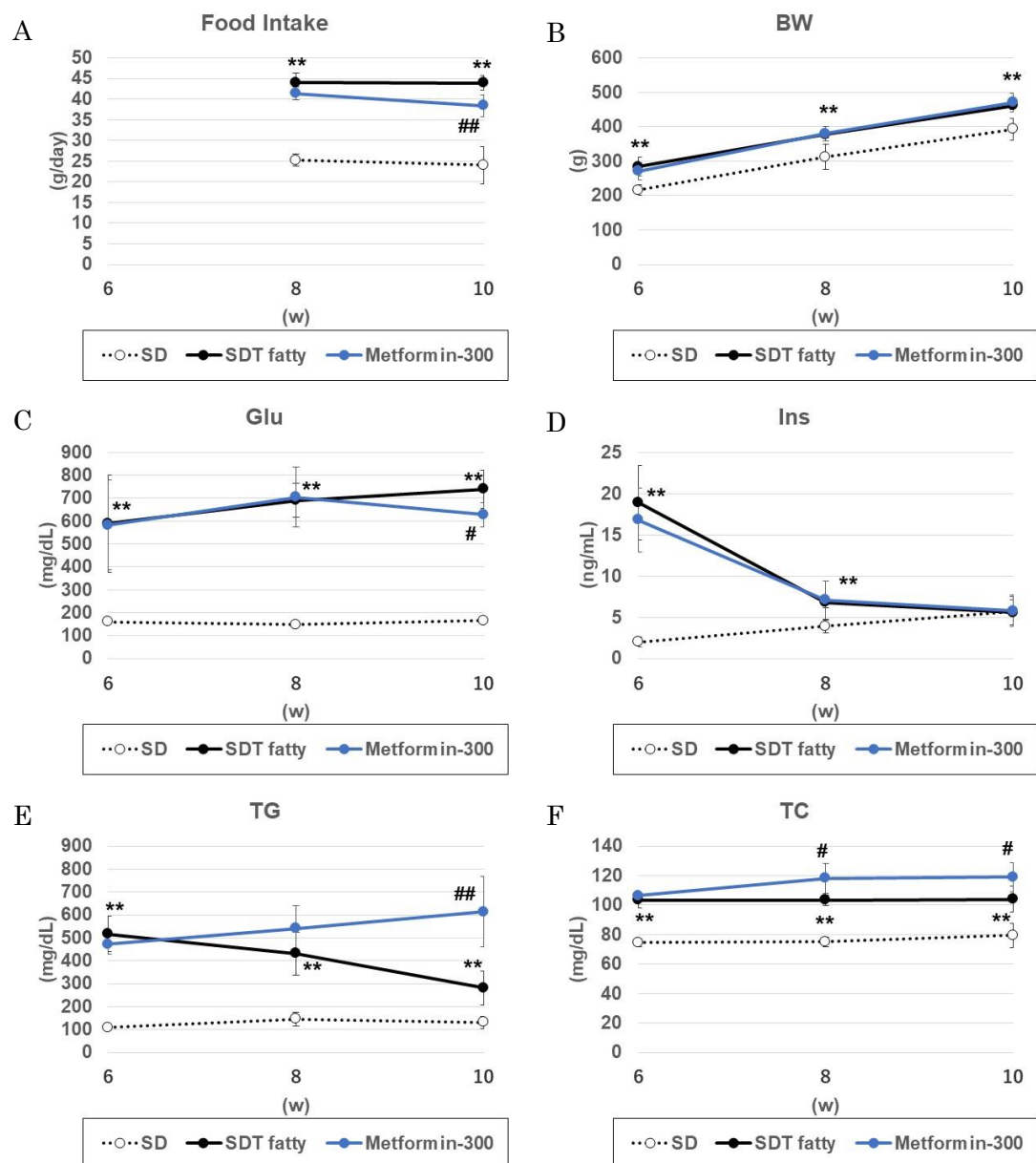


図 2-4A ~ 4F. 雄性 SDT fatty ラットにおけるメトホルミンによる体重，摂餌量および糖脂質代謝に関連する血液生化学パラメータの経時変化

A：摂餌量 (Food Intake)，B：体重 (BW)，C：血糖値 (Glu)，D：血漿中インスリン値 (Ins)，E：血漿中 TG 値 (TG)，F：血漿中 TC 値 (TC)

**： $p < 0.01$ (SD ラットと SDT fatty ラットの比較)

#： $p < 0.05$ ，##： $p < 0.01$ (SDT fatty ラットとメトホルミン群の比較)

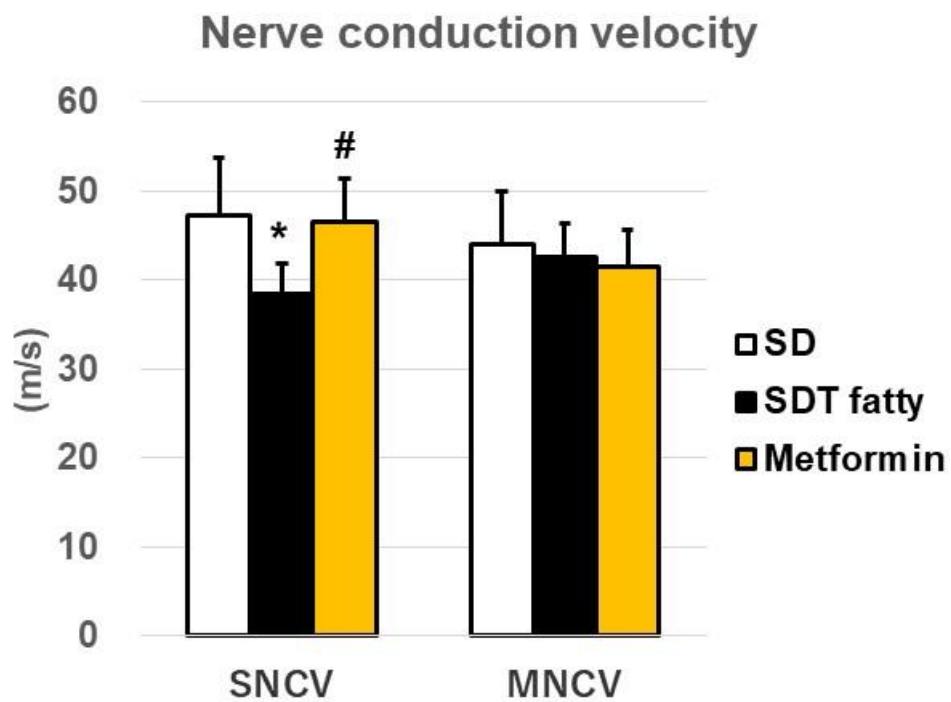


図 2-5. 雌性 SDT fatty ラットにおけるメトホルミンの神経伝導速度に対する作用

SNCV : 感覚神経伝導速度, MNCV : 運動神経伝導速度

*: $p < 0.05$ (SD ラットと SDT fatty ラットの比較)

#: $p < 0.05$ (SDT fatty ラットとメトホルミン群の比較)

第4節 考 察

メトホルミンは ADA が策定したガイドラインにおいて経口薬の第一選択薬としては推奨され、糖尿病治療薬として 60 年以上使用され続けてきた。メトホルミンの作用機序としては、主に肝臓での糖新生を抑制することで高血糖を改善させることが報告されている (An and He, 2016)。しかし、メトホルミンやその他既存薬によっても十分な血糖コントロールを達成できていない患者も存在することから、依然として新たな糖尿病治療薬が求められている。そのため、糖尿病モデル動物を用いてその病態を把握することや薬剤の有効性を評価することは、新たな治療薬を開発する上で今後も非常に重要となってくる。そこで本章では、新規の肥満 2 型糖尿病モデルである SDT fatty ラットにおけるメトホルミンの作用について検討した。

雌性 SDT fatty ラットにおいては、300 mg/kg メトホルミン投与により有意な血糖低下が認められ、その効果は投薬期間中継続した。また、雌性 SDT fatty ラットでは感覚神経伝導速度の低下が認められ、300 mg/kg メトホルミン投与によって感覚神経伝導速度の低下は抑制された。以上のことから、雌性 SDT fatty ラットで認められた感覚神経の障害の要因の一つとして高血糖が考えられ、メトホルミンはその高血糖を是正させることで、感覚神経伝導速度の低下を抑制することが示唆された。

本研究において、10 週齢の雌性 SDT fatty ラットは感覚神経伝導速度の低下を示したが、運動神経伝導速度については明確な変化は認められなかった。図 2-6 に示すように感覚神経は運動神経より細いことが知られており、また細い神経ほど障害を受けやすいことから、10 週齢の雌性 SDT fatty ラットでは感覚神経のみ障害を受けていた可能性が考えられる。29 週齢の雌性 SDT fatty ラットでは感覚神経伝導速度に加えて運動神経伝導速度も低下しており、SGLT 阻害薬がそのどちらも改善することが報告されている (Katsuda et al., 2015)。

以上のことから、雌性 SDT fatty ラットは抗糖尿病薬の血糖低下作用の評価のみならず、糖尿病合併症に対する作用の評価においても有用なモデルである可能性がある。

雄性 SDT fatty ラットでは、300 mg/kg メトホルミン投与により 10 週齢時（投与 4 週間後）においてのみ有意な血糖低下が認められ、雌性 SDT fatty ラットでの効果よりも弱いものであった。この理由としては、雄性 SDT fatty ラットでは雌性 SDT fatty ラットよりも血糖値が高かったことから、雄性 SDT fatty ラットにおいてメトホルミンの明確な血糖低下作用を捉えるためには、より高用量の投与が必要であった可能性がある。我々の雄性 SDT-fatty ラットを用いた予備的な検討では、1000 mg/kg メトホルミンの単回投与では、投与 3 時間後において有意な血糖値の低下を確認している（対照群：537 ± 109 mg/dL, 1000 mg/kg メトホルミン群：310 ± 98 mg/dL）。雄性 SDT fatty ラットでは、300 mg/kg メトホルミン投与により血漿中 TG 値や TC 値の増加が認められたが、そのメカニズムについては明らかではなく、今後の検証が必要である。

線維の機能と太さによる分類				電気生理学的性質による分類	
機能	直径(μm)	髄鞘	名前 (役割)	伝導速度 (m/sec)	名前 (役割)
求心性 (感覚、 知覚)	12~20	有	Ia (筋紡錘から) Ib (腱受容器から)	70~120	A α
	5~12	有	II (筋紡錘から)	30~100	A β (皮膚触圧覚)
	1~5	有	III	5~30	A δ (部位が比較的明瞭な皮膚温痛覚)
	< 1	無	IV	0.5~2	C (dorsal root C、内臓痛、皮膚温鈍痛)
遠心性 (運動)	12~20	有	α (骨格筋へ)	70~120	A α
	2~7	有	γ (筋紡錘へ)	15~40	A γ
自律性	1~3	有		3~14	B (自律神経節前線維)
	0.2~1	無		0.2~2	C (自律神経節後線維、somatic C)

図 2-6. 神経線維の分類 (http://www.stnv.net/med/nerve_fiber.htm)

第5節 要 約

本章では雌雄 SDT fatty ラットの血液生化学パラメータに対するメトホルミンの作用について評価した。その結果、雌雄いずれにおいても 300 mg/kg メトホルミンにより有意な血糖低下が認められたが、その血糖低下作用は雄性 SDT fatty ラットよりも雌性 SDT fatty ラットの方が明確なものであった。また、雌性 SDT fatty ラットでは感覚神経の障害が認められ、その感覚神経の障害に対するメトホルミンの作用を検討したところ、300 mg/kg メトホルミンにより感覚神経伝導速度の低下が抑制された。以上のことから、雌性 SDT fatty ラットで認められた感覚神経障害の要因の一つとして高血糖が考えられ、メトホルミンはその高血糖を是正することで感覚神経の障害を改善することが示唆された。

第3章 SDT fatty ラットの非虚血時の血行動態解析

第1節 緒言

PAD の非臨床研究においては、PAD モデル動物として下肢虚血マウスまたはラットが広く利用されているが、その多くは正常マウスまたはラットの大腿動脈を結紮することで作製されている。一方、PAD 患者の多くは糖尿病や脂質異常症、高血圧症等の生活習慣病を背景疾患として有し (Norgren et al., 2007)、血管内皮機能が低下していることから (Sanada et al., 2005)、非臨床研究においても高血糖や脂質異常、高血圧を示す動物を用いた下肢虚血モデルでの評価が重要である。SDT fatty ラットは、過食による肥満、高脂血症、高血糖、高インスリン血症などの肥満 2 型糖尿病の特徴を有したモデル動物である。しかし、SDT fatty ラットの非虚血時及び虚血時の血行動態については未だ検討がなされていない。そこで本章では、まず非虚血時における SDT fatty ラットの下肢血流量を評価した。更に、SDT fatty ラットにおける下肢血流量の低下メカニズムを検証するために、酸化ストレスや血管内皮機能、血小板凝集、血液凝固、心拍出量など下肢血流量に影響を与える因子について SD ラットとの比較検討を行った。また、SDT fatty ラットが呈する高血糖状態が下肢血流量に与える影響について検討するために、各々異なるメカニズムで血糖降下作用を示すピオグリタゾン (PPAR γ アンタゴニスト) またはカナグリフロジン (SGLT2 阻害薬) により高血糖状態を是正した際の SDT fatty ラットの下肢血流量についても検討した。

第2節 材料および方法

使用動物および試験には日本クレア社から購入した雄性 SDT fatty ラット, および正常対照として雄性 SD ラットを供した。飼育条件は第2章の方法に準じた。

ピオグリタゾンまたはカナグリフロジン投薬試験では, SDT fatty ラットを5週齢時の体重および血液生化学パラメータ (グルコース, TG, TC) を基に対照群, ピオグリタゾン群, ピオグリタゾン群の計3群 (N=6) に群分けし, ピオグリタゾンまたはカナグリフロジンをそれぞれ 10 mg/kg の用量で1日1回6週間, 強制反復経口投与した。対照群には媒体として 0.5% MC を投与した。なお, 正常対照群として SD ラットを設定した。

各動物の体重, 血液生化学パラメータ (グルコース, TG, TC) および血漿中 NOx を薬剤非投与試験では 5, 15, 35 週齢時に, 薬剤投薬試験では 5, 7, 9, 11 週齢時に測定した。血液生化学パラメータの測定については, 第2章の方法に準じた。血漿中 NOx 濃度については, 第2章の方法に準じて得られた血漿を Amicon® Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices (Millipore Corporation, Massachusetts, USA) へ移して更に遠心分離し (16,000 × g, 20 分間, 4°C), 得られたフロースルー中の NOx 濃度を QuantiChrom™ Nitric Oxide Assay Kit (BioAssay Systems, Hayward, California, USA) を用いて測定した。

下肢血流量については, 非虚血時では 5, 15, 35 週齢時にレーザードップラー血流画像化装置 (Moor Instruments Limited, Axminster, UK) を用いて測定した。下肢血流量測定前にラットを 2% イソフルランにて麻酔した後, 保温プレート上に伏臥位で置き, 体温を維持させた。下肢血流量測定時では, ラットを 1.5% イソフルランで麻酔状態を維持した。

大動脈の eNOS およびリン酸化 eNOS については、5 週齢時および 35 週齢時にウェスタンブロッティング法にて測定した。ラットをイソフルラン麻酔下での放血致死にて屠殺し、胸部大動脈を採取した。胸部大動脈を 1 mM PMSF 及び cOmplete™ ULTRA Tablets, Mini, EASYpack Protease Inhibitor Cocktail (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland) 含有 RIPA buffer (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA) 0.3 mL でホモジネートした。ホモジネートサンプルを遠心分離し (10,000 × g, 10 分間, 4°C), その上清を組織溶解液として回収した。組織溶解液中の蛋白質濃度を DC™ プロテインアッセイ (BIO RAD) を用いて測定し、2 mg/mL となるように NuPAGE™ Sample Reducing Agent (Thermo Fisher Scientific K.K.) 含有 NuPAGE™ LDS Sample Buffer (Thermo Fisher Scientific K.K.) で希釈した。95°C で 5 分間インキュベートした後、4-12% SDS-PAGE gels (Thermo Fisher Scientific K.K.) にアプライし (20-40 µg/lane), 電気泳動を行った (200V, 60 分間)。iBlot 2 (Thermo Fisher Scientific K.K.) を用いて PVDF 膜へ転写させ、Blocking One (NACALAI TESQUE, INC) を用いて PVDF 膜をブロッキングした。PVDF 膜を TBS-T 溶液で洗浄後、10% Blocking One 含有 TBS-T 溶液で 1000 倍希釈した抗 eNOS 抗体 (Cell Signaling Technology, Inc.), 抗リン酸化 eNOS 抗体 (Ser1177) (Cell Signaling Technology, Inc.) または抗 β-アクチン抗体 (Cell Signaling Technology, Inc.) に浸し、4°C で 0/N インキュベーションした。なお、β-アクチンについては内部標準蛋白質として使用した。PVDF 膜を TBS-T 溶液で洗浄後、10% Blocking One 含有 TBS-T 溶液で 5000 倍希釈した HRP 結合抗ウサギ IgG 抗体 (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, Illinois, USA) に浸し、室温で 1 時間インキュベーションした。PVDF 膜を TBS-T 溶液で洗浄後、ECL Select Western Blotting Detection System (GE Healthcare Life Sciences) を用いて発色させ、Amersham Imager 680 (GE Healthcare Life Sciences) で目的の蛋白質を検出した。

血小板凝集反応については、19 週齢時に MCM ヘマトレーサー 712 (エルエムエス)

を用いて測定した。尾静脈から採取した血液をクエン酸ナトリウム溶液 (3.8% w/v) と 9 : 1 の割合で混合して、遠心分離 ($170 \times g$, 10 分間, 室温) を行い、得られた上清を PRP として回収した。残りの血液サンプルを更に遠心分離し ($1,000 \times g$, 15 分間, 室温), その上清を PPP として回収した。PPP の一部は血液凝固反応測定用に -80°C で保存した。PRP 中の血小板数を Sysmex KX-21NV (Sysmex Corporation) を用いて測定し、血小板数が $3.0 \times 10^4/\mu\text{L}$ となるように PPP で希釈した。希釈した PRP 溶液 0.29 mL をシリコナイズされたキュベットに添加し、MCM HAMA TRACER 712 内の PRP チャンバーへ挿入した。チャンバー内で 2 分間プレインキュベーション後、 $210 \mu\text{M}$ コラーゲン溶液を $10 \mu\text{L}$ 添加し (終濃度 : $7 \mu\text{M}$)、コラーゲンによる血小板凝集反応を 7 分間測定した。なお、バックグラウンドとして、PPP 溶液 0.30 mL をシリコナイズされたキュベットに添加し、MCM HAMA TRACER 712 内の PPP チャンバーへ挿入した。

血液凝固反応として PT および APTT を血液凝固自動測定機である ACL Elite PRO (アイエルジャパン) を用いて測定した。測定試料には、血小板凝集反応測定時に採取した PPP を使用した。

LVEF を測定するために、27 週齢時に超音波画像診断装置である Aplio300 TUS-A300 (東芝メディカルシステムズ) を用いて心エコー検査を実施した。検査中は 2% イソフルランで麻酔し、心拍数が約 320 bpm となるように維持した。LVAW, LVDd, LVDs および LVPW については、M-mode method を使用して左室の短軸像を画像化して測定した。LVEF については LVEDV echo と LVESV から自動的に計算された。

統計学的解析については、SD ラットと SDT fatty ラットの比較では、Student の t 検定または Aspin-Welch の t 検定を実施し、 $P < 0.05$ を有意とした。また、SDT fatty ラットにおける薬剤の作用比較においては、Dunnett 検定または Steel 検定を実施し、 $P < 0.05$ を有意とした。結果は、平均値 \pm 標準偏差で示した。

第3節 結 果

SDT fatty ラットと SD ラットの体重および血液生化学パラメータを表 3-1 に示す。SDT fatty ラットの体重は、SD ラットと比較して 5 週齢では有意に高値を示したが、15 週齢時では有意な差は認められず、35 週齢時では逆に有意に低値を示した。血糖値および血漿中 TC 値については、SDT fatty ラットでは SD ラットと比較して試験期間を通じて有意に高値を示した。血漿中 TG 値については、5 週齢時では SDT fatty ラットと SD ラットに有意な差は認められなかったが、15 週齢以降の SDT fatty ラットでは SD ラットと比較して有意に高値を示した。

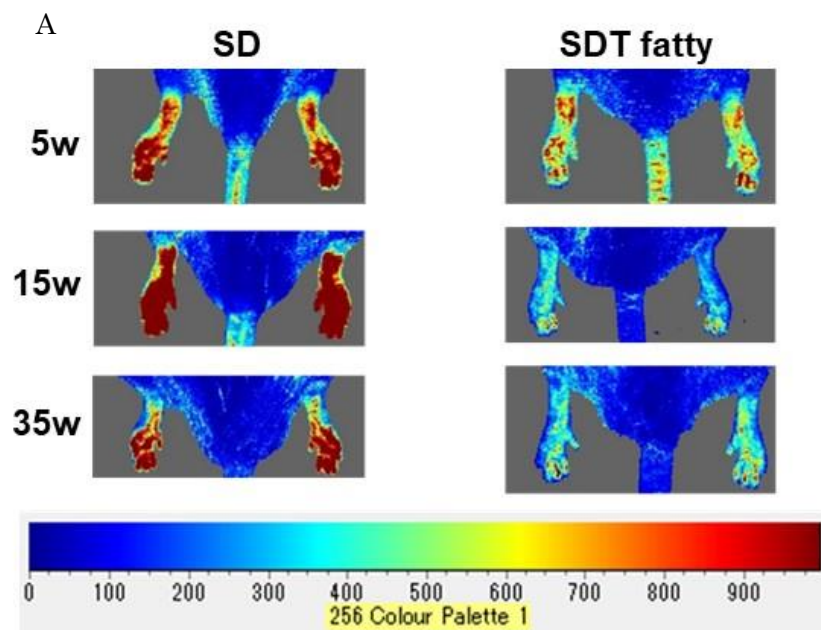
SDT fatty ラットの血行動態を検討するために下肢血流量を測定し、SD ラットと比較した。その結果、試験期間を通じて SDT fatty ラットの下肢血流量は SD ラットよりも有意に低値を示した（図 3-1A, B）。SDT fatty ラットの酸化ストレス状態を評価するために血漿中 NOx 値を測定したところ、評価期間を通じて SDT fatty ラットでは SD ラットと比較して有意に高値を示した（図 3-1C）。SDT fatty ラットの血管内皮機能を評価するために大動脈のリン酸化 eNOS（Ser1177）の発現量をウェスタンブロッティング法で測定したところ、5 週齢および 35 週齢の SDT fatty ラットでは SD ラットと比較してリン酸化 eNOS（Ser1177）の発現量の低下傾向が認められた（SD ラット： 1.90 ± 0.55 , 1.61 ± 0.72 , SDT fatty ラット： 1.49 ± 0.41 , 1.03 ± 0.23 ）（図 3-2A, B）。血液凝固パラメータとして外因性凝固の指標である PT および内因性凝固の指標である APPT を 19 週齢時に測定したところ、いずれのパラメータも SDT fatty ラットでは SD ラットと比較して有意な短縮が認められた（図 3-2C, D）。また、SDT fatty ラットのコラーゲンによる最大血小板凝集反応は SD ラットよりも増加傾向であった（SD ラット： $41.3 \pm 13.7\%$, SDT fatty ラット： $59.5 \pm 17.1\%$ ）（図 3-2E）。一方、

心拍出量については SDT fatty ラットと SD ラットの間に違いは認められなかった (図 3-2F)。

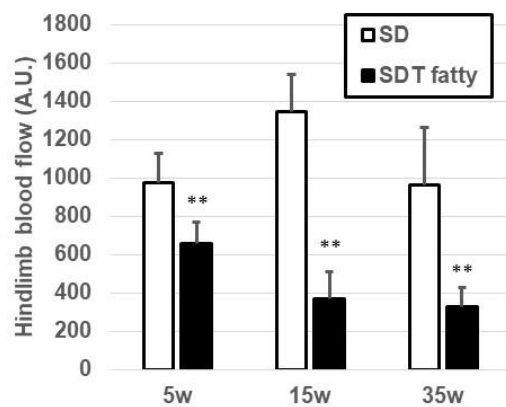
次に SDT fatty ラットが呈する高血糖状態が下肢血流量に与える影響について検討するために、ピオグリタゾン (PPAR γ アンタゴニスト) またはカナグリフロジン (SGLT2 阻害薬) により高血糖状態を是正した際の下肢血流量を検討した。体重については、評価期間を通じて SDT fatty ラットでは SD ラットよりも有意に高値を示した (図 3-3A)。ピオグリタゾン群では 7 週齢から、カナグリフロジン群では 11 週齢において対照群よりも有意な体重増加が認められた (図 3-3A)。血糖値については、評価期間を通じて SDT fatty ラットでは SD ラットよりも有意に高値を示し、ピオグリタゾン群およびカナグリフロジン群では有意な低下が認められた (図 3-3B)。血漿中 TG 値については、7 週齢以降の SDT fatty ラットでは SD ラットと比較して有意に高値を示した (図 3-3C)。ピオグリタゾン群では 7 週齢から、カナグリフロジン群では 7 週齢において対照群よりも有意な低下が認められた (図 3-3C)。血漿中 TC 値については、評価期間を通じて SDT fatty ラットでは SD ラットよりも有意に高値を示し、ピオグリタゾン群では 7 週齢および 11 週齢において、カナグリフロジン群では 11 週齢において有意な低下が認められた (図 3-3D)。NO_x 値については 5 週齢、7 週齢および 9 週齢時の SDT fatty ラットでは SD ラットよりも有意に高値を示した。ピオグリタゾン群では、11 週齢において対照群よりも有意に高値を示したが、カナグリフロジン群については、明らかな変化は認められなかった (図 3-3E)。下肢血流量については、評価期間を通じて SDT fatty ラットでは SD ラットよりも有意に低値を示したが、ピオグリタゾン群およびカナグリフロジン群では対照群と比較して下肢血流量に変化は認められなかった (図 3-3F, G)。

表 3-1. SD ラットおよび SDT fatty ラットの体重および血液生化学パラメータ

		5w			15w			35w		
BW (g)	SD	118.6	±	2.8	562.1	±	38.4	783.5	±	68.4
	SDT fatty	197.6	±	5.4**	531.1	±	20.6	500.9	±	25.0**
Glu (mg/dL)	SD	144.5	±	4.0	127.5	±	7.0	160.5	±	13.1
	SDT fatty	291.0	±	92.7*	797.0	±	43.8**	842.5	±	206.9**
TG (mg/dL)	SD	228.0	±	147.6	238.3	±	66.9	262.8	±	82.0
	SDT fatty	206.6	±	29.9	429.4	±	99.9**	446.3	±	103.5**
TC (mg/dL)	SD	83.9	±	11.6	75.7	±	10.0	103.8	±	13.0
	SDT fatty	121.9	±	4.9**	152.2	±	12.5**	167.4	±	32.4**



B



C

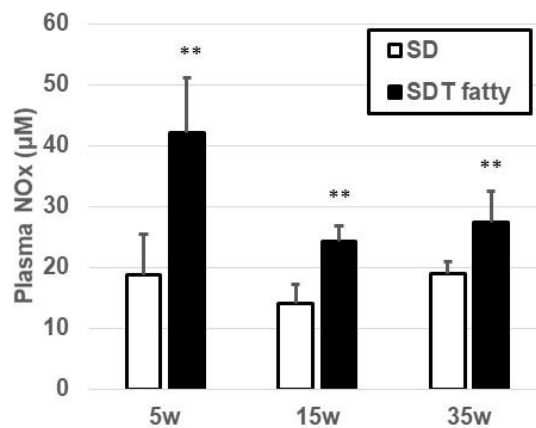
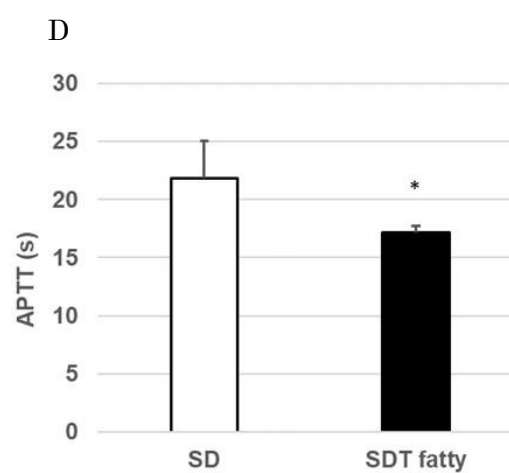
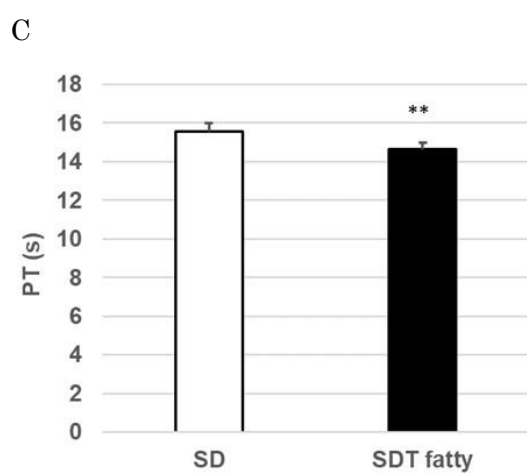
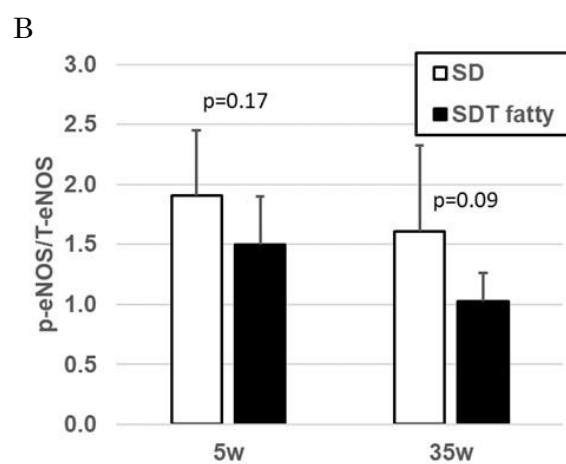


図 3-1A ~ 1C. SD ラットおよび SDT fatty ラットの下肢血流量および血漿中 NOx 値
 A: レーザードップラー血流画像化装置による下肢血流量, B: A の定量結果 (Hindlimb blood flow), C: 血漿中 NOx 値 (Plasma NOx)
 **: $p < 0.01$ (SD ラットと SDT fatty ラットの比較)



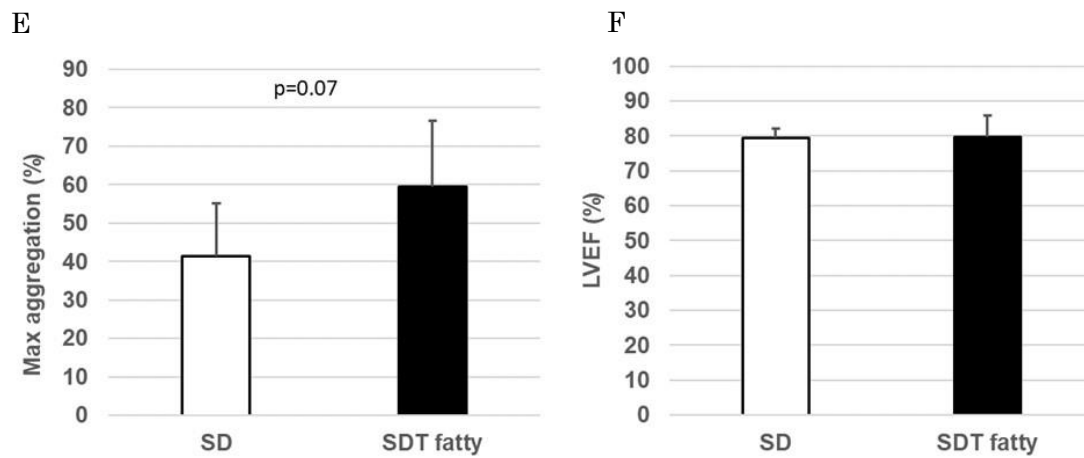
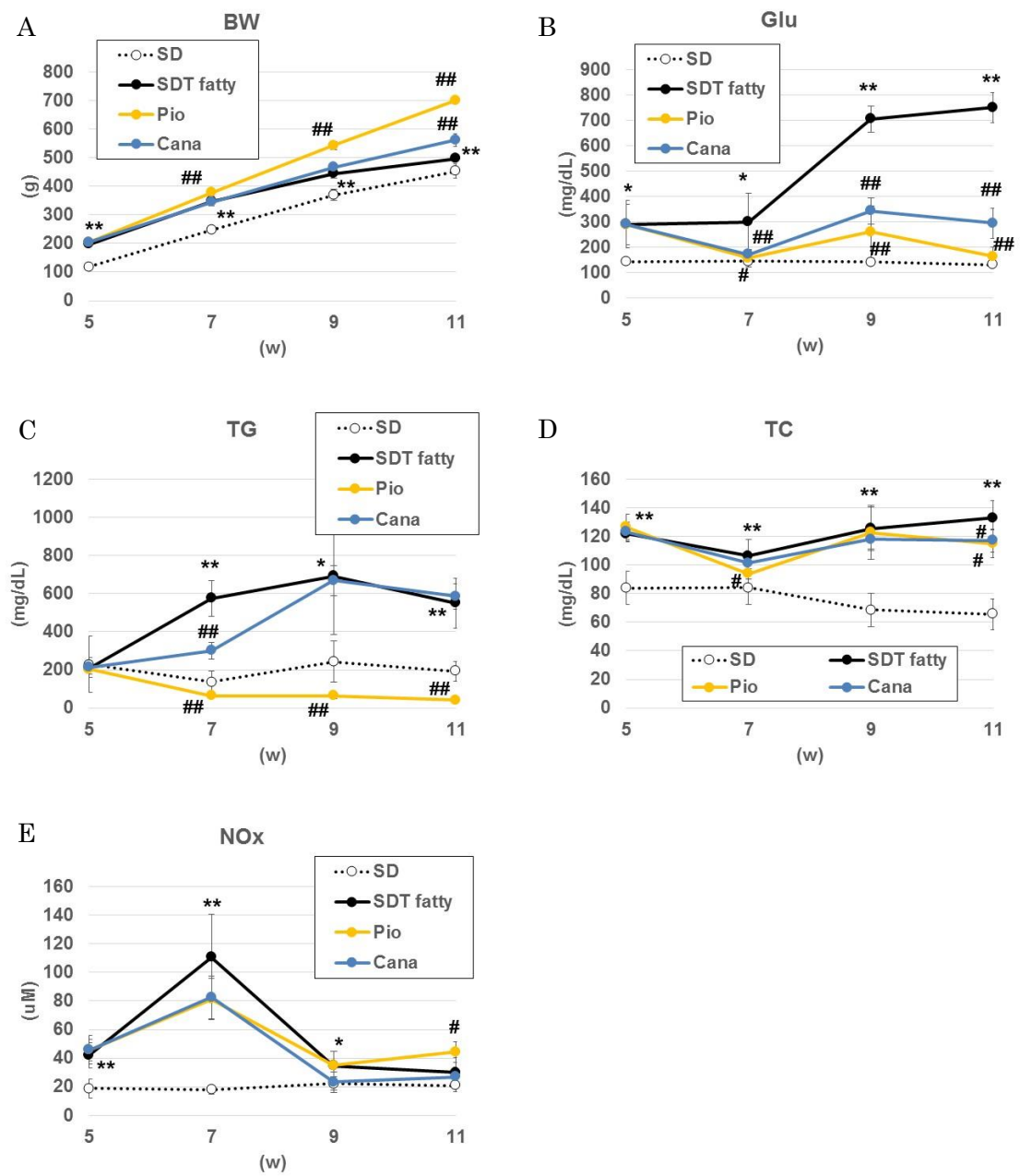


図 3-2A ～ 2F. SD ラットおよび SDT fatty ラットの血管内皮機能, 血液凝固パラメータ, 血小板凝集および心拍出量

A : Western blotting 法による大動脈におけるリン酸化 eNOS (p-eNOS) および eNOS (T-eNOS) の発現量測定, B : T-eNOS に対する p-eNOS の比率 (p-eNOS/T-eNOS), c : プロトロンビン時間 (PT), D : 活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT), E : 最大血小板凝集 (Max aggregation), F : 左室駆出率 (LVEF)

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (SD ラットと SDT fatty ラットの比較)



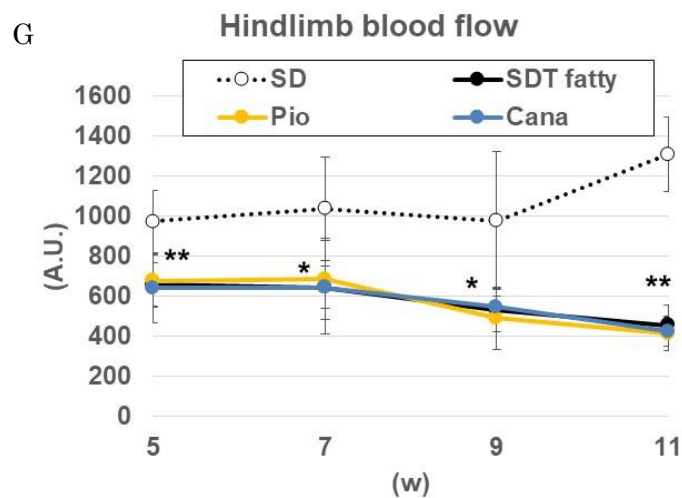
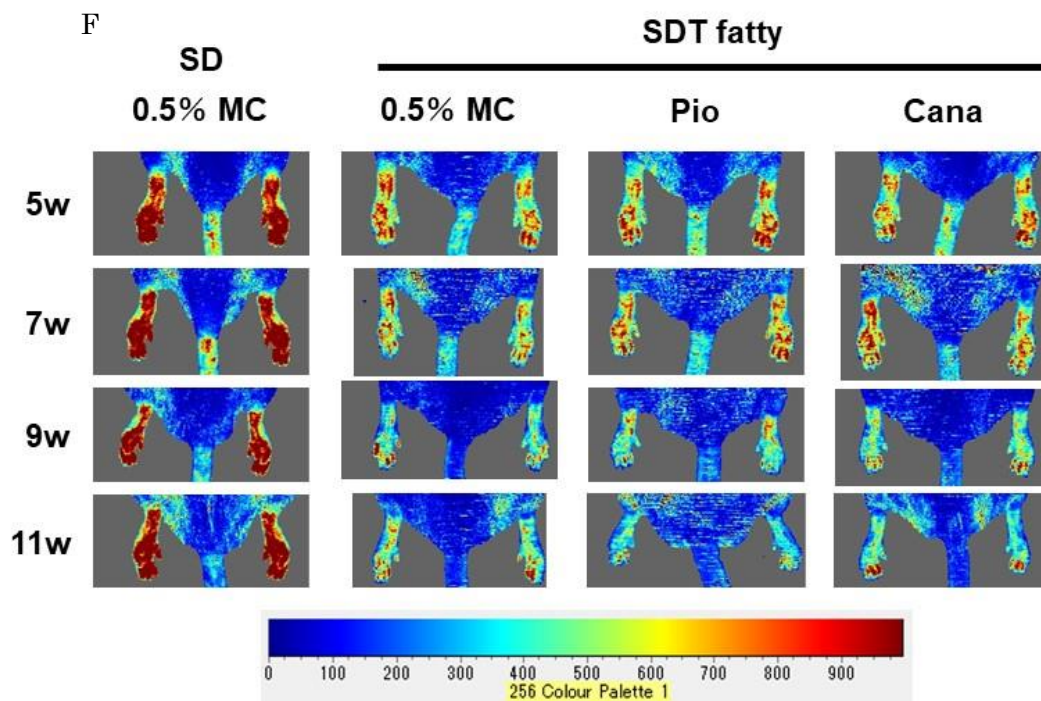


図 3-3A ～ 3G. ピオグリタゾンまたはカナグリフロジンによる体重，糖脂質代謝に関連する血液生化学パラメータ，血漿中 NOx および下肢血流量の経時変化

A : 体重 (BW), B : 血糖値 (Glu), C : 血漿中 TG 値 (TG), D : 血漿中 TC 値 (TC), E : 血漿中 NOx 値 (NOx), F : レーザードップラー血流画像化装置による下肢血流量, G : F の定量結果 (Hindlimb blood flow)

Pio : ピオグリタゾン群, Cana : カナグリフロジン群

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (SD ラットと SDT fatty ラットの比較)

#: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$ (SDT fatty ラットとピオグリタゾン群およびカナグリフロジン群の比較)

第4節 考 察

SDT fatty ラットは新規肥満 2 型糖尿病モデル動物であり、若週齢から糖尿病を発症することが知られている (Katsuda et al., 2014; Masuyama et al., 2005; Toriniwa et al., 2018)。本研究においても表 3-1 で示したように、5, 15, 35 週齢の SDT fatty ラットは高血糖および脂質異常といったメタボリックシンドローム症状を示すことを確認した。しかし、SDT fatty ラットの血行動態については、これまで検討がなされていなかった。従って本章ではまず非虚血時における SDT fatty ラットの下肢血流量を評価したところ、いずれの週齢においても SDT fatty ラットでは正常対照である SD ラットと比較して顕著な下肢血流量の低下が認められた。また、いずれの週齢においても SDT fatty ラットでは酸化ストレスマーカーとして知られる NO の生体内安定代謝物である血漿中 NOx 値の顕著な増加が認められた。以上のことから、SDT fatty ラットでは酸化ストレスが亢進し、その結果として下肢血流量が低下した可能性が考えられた。一方、ピオグリタゾンまたはカナグリフロジンにより SDT fatty ラットの高血糖状態を是正しても血漿中 NOx 値および下肢血流量に明確な変化は認められなかった。この結果から、二つの可能性が考えられる。一つ目は、ピオグリタゾンやカナグリフロジンの血糖低下作用が血漿中 NOx 値や下肢血流量に対して改善効果を与えるためには、より長期間の投薬が必要であった可能性である。二つ目は、SDT fatty ラットの高血糖状態は酸化ストレスや下肢血流量に明確な影響を与えず、高血糖状態以外の現象（例えば脂質異常状態）が酸化ストレスや下肢血流量に影響を及ぼしている可能性である。これらを検証するためには、より長期間の血糖コントロールや脂質異常改善薬を用いた検討が必要であり、この点については今後の課題である。

動脈は、内側から内膜（内皮）、中膜（平滑筋）および外膜から構成される（図 3-4）。

特に内膜は血管内皮細胞で構成され、血管拡張作用や血小板凝集抑制作用、抗凝固作用などの血管保護的な作用を有し、正常な血管機能を維持するうえで重要な役割を担っている（血管内皮機能、図 3-5）。一方で、血管内皮機能は、高血糖、脂質異常、高血圧、喫煙、酸化ストレスによって障害を受けること知られている（図 3-6）。5 週齢および 35 週齢の SDT fatty ラットでは、血管内皮機能の指標である大動脈のリン酸化 eNOS の発現量が SD ラットと比較して低下傾向であった。この大動脈の血管内皮機能の低下は有意なものではなかったものの、血管内皮機能はより細い血管から障害を受けていくことから、SDT fatty ラットの下肢動脈では SD ラットよりも血管内皮機能が低下した状態となっている可能性があり、このことも下肢血流量の低下に関与していると考えられる。

更に、SDT fatty ラットでは PT および APTT の有意な短縮が認められたことから、内因性及び外因性血液凝固能の亢進が示唆された。脂質異常が血液凝固の亢進に関与するとの報告があることから (Andersen, 1992), SDT fatty ラットで認められた血液凝固能の亢進は脂質異常が関与する可能性がある。また、SDT fatty ラットではコラーゲンによる血小板凝集反応の亢進傾向が認められた。以上のことから、血液凝固能の亢進や血小板凝集反応の亢進も SDT fatty ラットの下肢血流量の低下に関与することが示唆された。

本研究では、酸化ストレスマーカーとして血漿中 NOx 値を使用した。しかし、血漿中 NOx 値は eNOS 由来の NO 産生のマーカー（血管内皮機能のマーカー）として用いられる場合もある (Loffredo et al., 2007)。血漿中 NOx は、 NO^{2-} と NO^{3-} を含んだ NO の生体内安定代謝物である。 NO^{2-} は空気中における産生と同様に自然酸化により産生されるが、 NO^{3-} は ROS の存在下で産生されるとの報告があることから (Ignarro et al., 1993), 血漿中 NOx 値が示す意味は病態によって異なる可能性がある。1 型糖尿病モデルである STZ マウスや糖尿病患者では、血漿中 NO^{3-} 値が増加し血管内皮機能が障害されてい

ることが報告されていることから (Jelic-Knezovic et al., 2019; Kobayashi, 2008), SDT fatty ラットで認められた血漿中 NO_x 値の増加は, 血漿中 NO^3 値の増加を反映している可能性が考えられる。SDT fatty ラットにおける血漿中 NO^2 および NO^3 を測定することは, SDT fatty ラットの病態を理解する上で重要な点であり, 今後取り組むべき課題である。

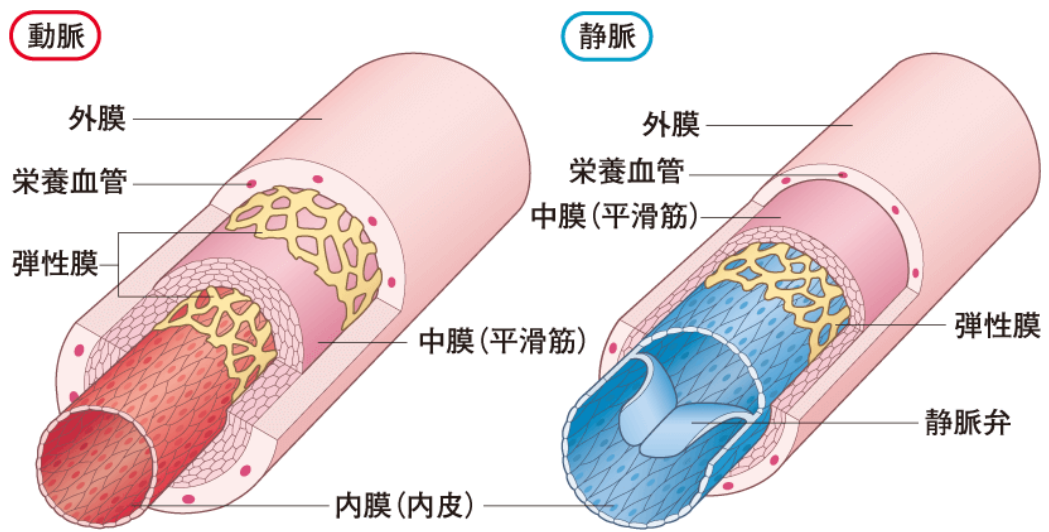


図 3-4. 血管の構造 (<https://www.kango-roo.com/sn/k/view/1840>)

動脈は、内側から内膜（内皮）、中膜（平滑筋）および外膜から構成される。

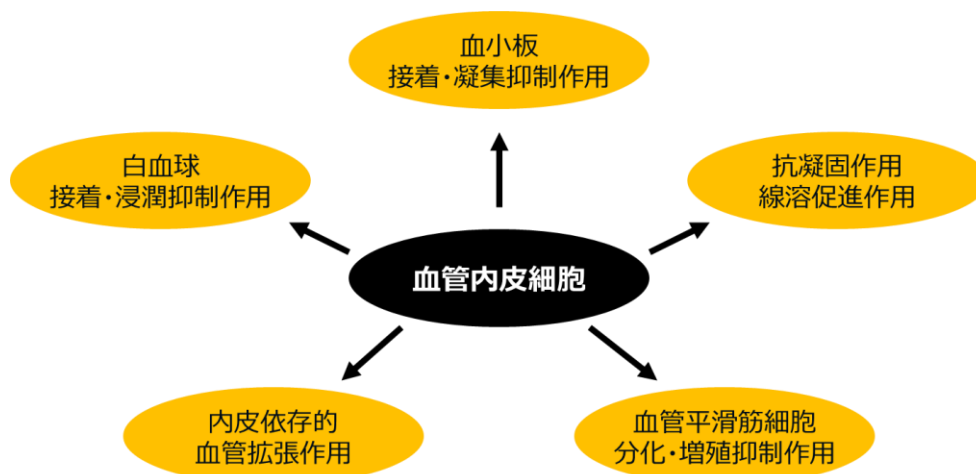


図 3-5. 血管内皮機能

血管内皮細胞は内皮依存的な血管拡張作用，血小板接着・凝集抑制作用，抗凝固作用・線溶促進作用，白血球接着・浸潤抑制作用，血管平滑筋細胞の分化・増殖抑制作用などの血管保護的な作用を有する。

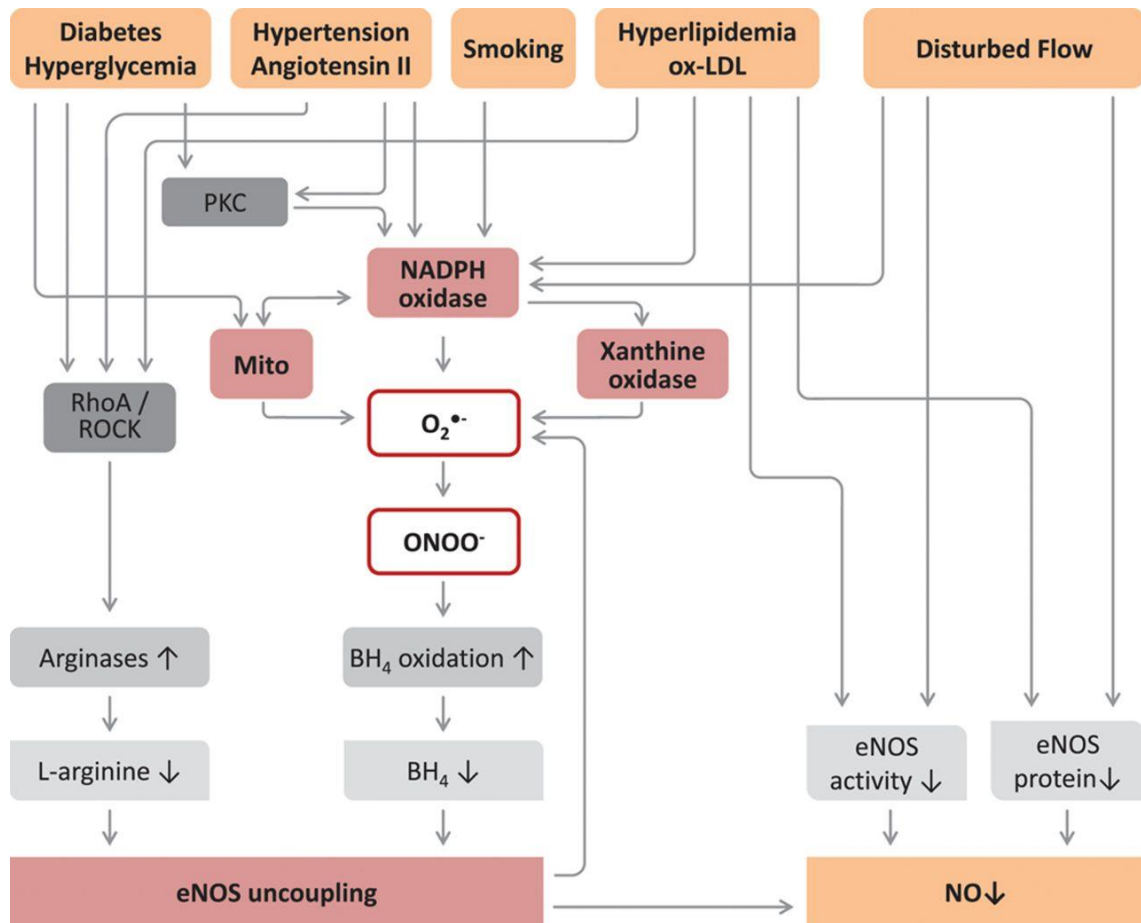


図 3-6. 血管内皮機能障害のメカニズム (Forstermann et al., 2017)

高血糖や高血圧，喫煙，脂質異常，酸化ストレスが eNOS のアンカップリング，eNOS 活性，eNOS 発現量の低下を介して血管内皮機能障害を引き起こす。

第5節 要 約

本章ではまず非虚血時における SDT fatty ラットの下肢血流量を評価したところ、SD ラットと比較して顕著な下肢血流量の低下が認められた。また、SDT fatty ラットでは、酸化ストレスの亢進や血液凝固能の亢進、血管内皮機能の低下傾向、血小板凝集反応の亢進傾向が認められたことから、これらの要因が SDT fatty ラットで認められた下肢血流量の低下に関与していることが示唆された。一方、血糖降下薬であるピオグリタゾンまたはカナグリフロジンにより SDT fatty ラットの高血糖状態を是正しても、下肢血流量に変化は認められなかった。

第4章 SDT fatty ラットの下肢虚血時の血行動態解析

第1節 緒言

PAD の非臨床研究においては、大腿動脈を物理的に結紮することで下肢虚血を誘発させた下肢虚血モデルが広く利用されているが、その多くは正常動物を基にして作製されている。一方、PAD 患者の多くは糖尿病や脂質異常症、高血圧症等の生活習慣病を背景疾患として有し(Norgren et al., 2007)、血管内皮機能が低下していることから(Sanada et al., 2005)、非臨床研究においても高血糖や脂質異常、高血圧を示す動物を用いた下肢虚血モデルでの評価が重要である。そこで本章では、5 週齢時または15 週齢時に SDT fatty ラットの大腿動脈を結紮することで下肢虚血モデルを作製し、虚血後の下肢血流量の変化や血管新生応答について検討した。

第2節 材料および方法

使用動物および飼育条件については第3章の方法に準じた。

5週齢または15週齢のラットを用いて、下肢虚血モデルを作製した。ラットを2% イソフルランで麻酔させた後、左肢鼠径部を切開し大腿動脈を露出させ、近位大腿動脈と遠位伏在動脈を糸で結紮させ切除することで左肢虚血を誘導した。右肢については、偽手術として鼠径部の切開のみ実施した。

下肢血流量については、虚血前、虚血直後、虚血7日後および14日後にレーザードップラー血流画像化装置を用いて測定した。なお、下肢血流量の測定については第2章の方法に準じた。

虚血肢腓腹筋内の血管内皮細胞を免疫染色するために、左大腿動脈結紮14日後に腓腹筋の採取を行った。ラットを2% イソフルラン麻酔下で開腹および開胸し、左心室に25G注射針を挿入した後、ヘパリン含有PBS (250 U/kg) を100 mL 灌流した。10% 中性緩衝ホルマリン液（富士フィルム和光純薬）200 mL で灌流固定後に、虚血肢腓腹筋を採取した。採取した腓腹筋をパラフィンに包埋し、5 μ m で薄切した後、400倍希釈した抗VWF抗体（Abcam plc., Cambridge, UK）で免疫染色した。BIOREVO BZ-9000（KEYENCE Corporation）を用いて染色組織画像を撮影した後、VWF陽性血管数を計測し、VWF陽性血管数を組織面積で除することでVWF陽性血管密度を算出した。

統計学的解析については、SDラットとSDT fattyラットの比較では、Studentの t 検定またはAspin-Welchの t 検定を実施し、 $P < 0.05$ を有意とした。結果は、平均値±標準偏差で示した。

第3節 結 果

5 週齢において下肢虚血モデルを作製した結果，SD ラット，SDT fatty ラット共に虚血前と比較して虚血直後では顕著な下肢血流量の低下が認められ，虚血 7 日後および虚血 14 日後では血流量の回復が認められた（図 4-1A, B）。SDT fatty ラットでは，SD ラットと比較して虚血前および虚血 14 日後の虚血肢血流量の有意な低下が認められた（図 4-1A, B）。虚血後の下肢血流の変化量について解析したところ，SDT fatty ラットと SD ラットとでは明確な違いは認められなかった（図 4-1C）。

15 週齢においても 5 週齢と同様に SD ラット，SDT fatty ラット共に虚血前と比較して虚血直後では顕著な下肢血流量の低下が認められ，虚血 7 日後および虚血 14 日後では血流量の回復が認められた（図 4-2A, B）。SDT fatty ラットでは，SD ラットと比較していずれの評価ポイントにおいても虚血肢血流量の有意な低下が認められた（図 4-2A, B）。更に虚血後の下肢血流の変化量について解析したところ，SDT fatty ラットでは虚血 7 日後において SD ラットより有意な下肢血流の変化量の低下を示した（図 4-2C）。また，SDT fatty ラットの腓腹筋内 VWF 陽性血管密度は SD ラットと比較して有意に低値を示した（図 4-2D, E）。

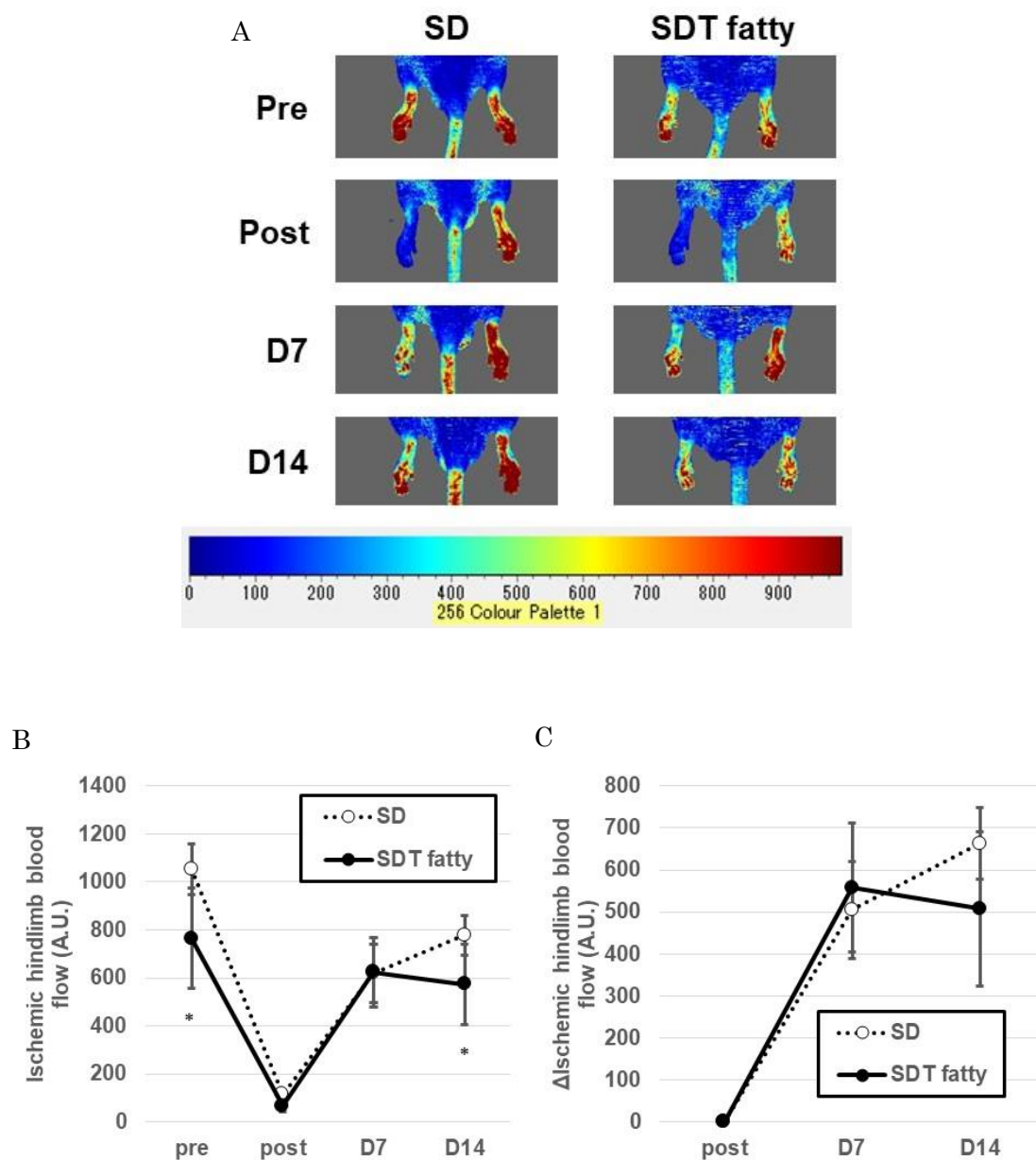
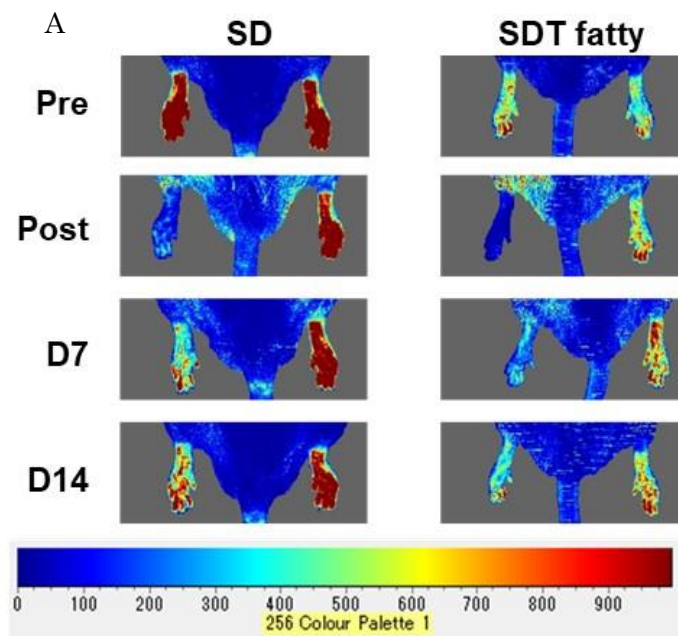


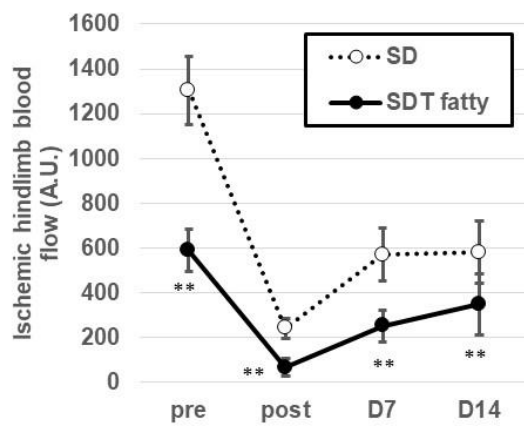
図 4-1A ～ 1C. 5 週齢時の下肢虚血後の SD ラットおよび SDT fatty ラットの下肢血流量

A: レーザードップラー血流画像化装置による下肢血流量, B: A の虚血肢定量結果 (Ischemic hindlimb blood flow), C: 虚血後の下肢血流量の変化量 (Δ Ischemic hindlimb blood flow)

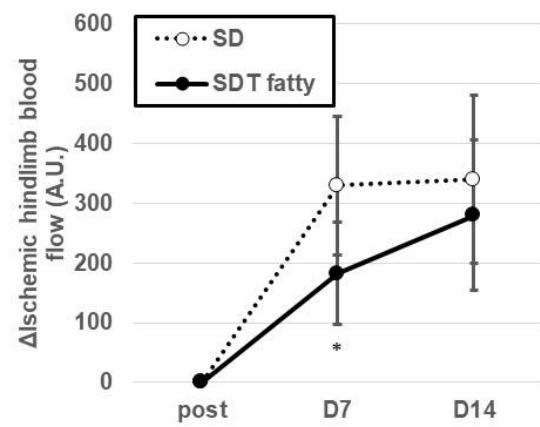
*: $p < 0.05$ (SD ラットと SDT fatty ラットの比較)



B



C



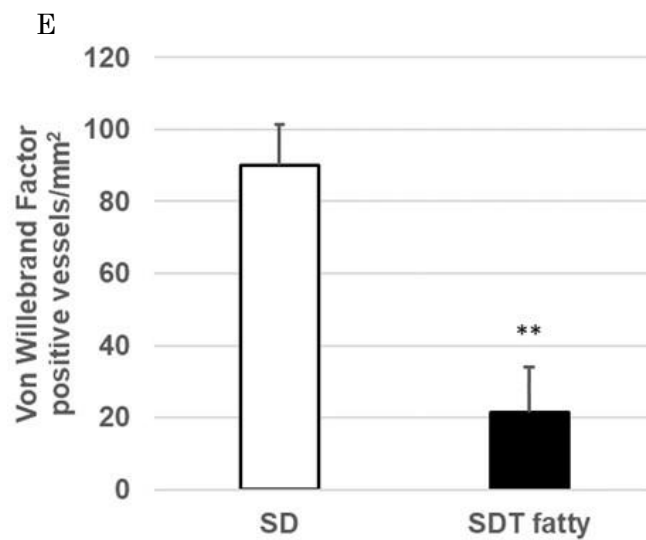
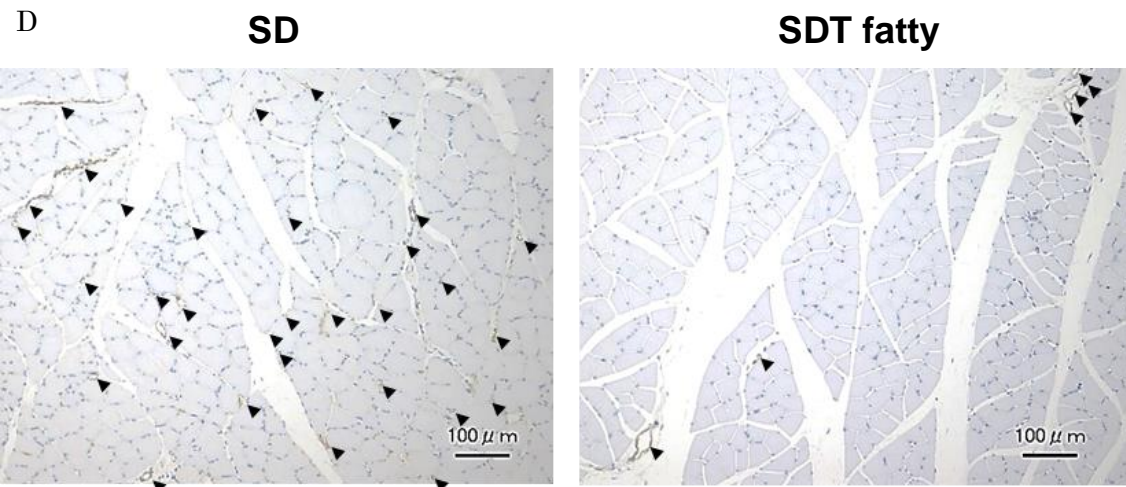


図 4-2A ～ 2E. 15 週齢時での下肢虚血後の SD ラットおよび SDT fatty ラットの下肢血流量および血管新生応答

A : レーザードップラー血流画像化装置による下肢血流量, B : A の虚血肢定量結果 (Ischemic hindlimb blood flow), C : 虚血後の下肢血流量の変化量 (Δ Ischemic hindlimb blood flow), D : 虚血肢腓腹筋の VWF 免疫染色画像, E : 虚血肢腓腹筋における VWF 陽性血管密度 (Von Willebrand Factor positive vessels/mm²)

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (SD ラットと SDT fatty ラットの比較)

第4節 考 察

本章では、5週齢時または15週齢時のSDT fatty ラットにおいて大腿動脈を結紮することで下肢虚血モデルを作製し、虚血後の下肢血流量の変化や血管新生応答について検討した。

下肢虚血モデルを使用した多くの報告では、虚血肢の血流は正常肢血流量に対する虚血肢血流量の割合として表現される。しかし、第3章で示した通りSDT fatty ラットではSD ラットよりも顕著な正常肢血流量の低下が認められた。従って、SDT fatty ラットを用いた下肢虚血モデルにおいては、正常肢血流量に対する虚血肢血流量の割合をSD ラットと比較することは困難であると考えられた。そこで下肢虚血後の血流量の変化を解析したところ、5週齢時に下肢虚血を誘導したSDT fatty ラットではSD ラットと明確な違いは認められなかったが、15週齢時に下肢虚血を誘導したSDT fatty ラットでは、虚血7日後において虚血肢血流量の変化量がSD ラットよりも有意に低値を示した。更に、15週齢時に下肢虚血を誘導したSDT fatty ラットではSD ラットよりも虚血肢腓腹筋中のVWF 陽性血管数が有意に低下していた。VWFは血管内皮細胞特異的に発現している蛋白質であることから血管内皮細胞マーカーとして使用され、このマーカーは血管新生応答の指標として利用される。従って、15週齢時に下肢虚血を誘導したSDT fatty ラットでは虚血肢において血管新生応答が低下していたことが示唆される。

Schiekofer らは、2型糖尿病モデルマウスである *db/db* マウスにおいて下肢虚血後の血流量の回復が障害され、虚血肢の大腿筋において血管新生応答が低下していることを報告している。更に彼らは、血管新生因子としてよく知られている VEGF-A の mRNA 発現量が *db/db* マウスにおいて正常マウスである C57BL/6J マウスよりも低下していることも示している (Schiekofer et al., 2005)。従って、15週齢時に下肢虚血を誘導

した SDT fatty ラットにおいても VEGF-A mRNA 発現量の低下及びそれに伴う虚血肢の血管新生応答の低下と関連している可能性が考えられる。一方，5 週齢時に下肢虚血を誘導した SDT fatty ラットでは，高血糖状態に曝された期間が短かったために VEGF-A mRNA 発現量が低下せず，血管新生応答が障害されていなかったため，虚血肢血流量の変化量が維持された可能性が考えられる。

第5節 要 約

本章では、5週齢時または15週齢時にSDT fatty ラットを用いて肢虚血モデルを作製し、虚血後の下肢血流量の変化や血管新生応答について検討した。その結果、虚血肢血流量の変化量は、5週齢時に下肢虚血を誘導したSDT fatty ラットではSD ラットと明確な違いは認められなかったが、15週齢時に下肢虚血を誘導したSDT fatty ラットではSD ラットよりも有意な低下が認められた。また、15週齢時に下肢虚血を誘導したSDT fatty ラットでは、虚血肢腓腹筋中のVWF 陽性血管数がSD ラットよりも有意に低下していたことから、SDT fatty ラットでは虚血後の血管新生応答が障害されていることが示唆された。

第5章 総 括

2 型糖尿病は、糖尿病性腎障害や糖尿病性網膜症、糖尿病性神経障害といった細小血管合併症に繋がることに加え、動脈硬化症や虚血性心疾患、PAD の危険因子としても挙げられていることから、2 型糖尿病の発症および進展を予防することは極めて重要である。これまでに様々なメカニズムの糖尿病治療薬が開発されてきたが、それらの薬剤によっても十分な血糖コントロールを達成できていない患者も存在することから、今後も新たな糖尿病治療薬の開発が必要な状況にある。また、PAD についても心血管イベントの発生のみならず、間欠性跛行や安静時疼痛、下肢壊死といった下肢症状による QOL の低下が問題となっているが、薬物治療や運動療法、血行再建術といった既存の治療法には何らかの問題点があり、現状では満足度の高い治療法がないことから、新たな治療法が求められている。従って、今後も糖尿病や PAD のいずれにおいても非臨床モデルでの評価が必要であり、そのモデルの病態を把握することも非常に重要な点である。

本研究で用いた SDT fatty ラットは、早期から肥満や高血糖、脂質異常といったメタボリックシンドローム症状を呈することで様々な合併症を発症し、近年注目を集めているモデルである。そこで、本研究ではまず SDT fatty ラットの糖尿病モデルとしての特徴を把握するために、糖尿病治療薬の第一選択薬となっているメトホルミンの作用について検討した。その結果、雌雄いずれの SDT fatty ラットにおいても 300 mg/kg メトホルミン投与によって血糖値の低下が認められた。その血糖降下作用は雌性 SDT fatty ラットの方が雄性 SDT fatty ラットよりも強かったが、これは雌性の方が雄性よりも病態が軽度であり、高血糖に対する肝臓からの糖新生の寄与度が大きかったためであると推測される。逆に、雄性では肝糖新生がより悪化し、また末梢のインスリ

ン抵抗性やインスリン分泌不全など肝糖新生以外の要因も更に悪化していたためにメトホルミンの作用が弱かったと考えられた。実際に臨床においても、糖尿病が悪化するとメトホルミンのみでは十分な血糖コントロールを達成することは困難であり、末梢のインスリン抵抗性やインスリン分泌不全を改善する薬剤が併用されている。従って、SDT fatty ラットは糖尿病患者の初期から後期まで反映したモデルである可能性がある。また、10 週齢の雌性 SDT fatty ラットでは感覚神経伝導速度の低下が認められたが、300 mg/kg メトホルミンを 5 週間投与することで感覚神経伝導速度低下の抑制が認められた。以上のことから、SDT fatty ラットは肝臓からの糖新生を抑制する新たな治療薬開発に有用であり、また糖尿病合併症の一つである神経障害を評価するためのツールにもなり得ると考えられた。

PAD は未だその病名の認知度は低いものの、動脈硬化症の一部分症であることや糖尿病がそのリスクファクターであることから、日本を含めた先進各国において今後その患者数が増加することが予測されている。PAD 患者の多くは下肢のみならず心臓や脳においても動脈硬化病変を有していることが多いことから、下肢症状に加えてそれら臓器での血管イベントも大きな問題となっている。血管イベントに対しては、近年新たな抗血小板薬や抗凝固薬が開発され、その治療満足度が高まってきているものの、下肢症状に対しては依然として満足度の高いものは存在せず、新たな治療法が求められている。

PAD の非臨床研究に関しては、これまで正常マウスまたはラットの大腿動脈を結紮することで作製された下肢虚血モデルが主に用いられてきたが、PAD 患者の多くは糖尿病や脂質異常症といったメタボリックシンドロームを背景疾患として有していることから、非臨床研究においても同様の状態を示す動物を用いた評価が妥当と考えられる。実際に、いくつかのグループにおいては、2 型糖尿病モデルマウスである *db/db* マウスや 1 型糖尿病マウスである STZ マウスを用いた検討が実施されている

(Schiekofer et al., 2005; Yan et al., 2009)。これらの病態マウスでは、下肢虚血後の血流量の回復が正常マウスよりも悪化しており、この悪化には虚血部位での血管新生応答の障害が関与することが示唆されている。一方で、マウスと比較してラットを用いた検討の報告は少ない。そこで、本研究では SDT fatty ラットの基礎的な血行動態および下肢虚血後の血行動態について検討した。

まず SDT fatty ラットの通常状態における血行動態を検討するために、下肢血流量について検討した。その結果、SDT fatty ラットでは SD ラットよりも顕著な下肢血流量の低下が認められた。血流量を低下させる要因として、酸化ストレスや血管内皮機能の低下、血液凝固能の亢進、心拍出量の低下が想定されたため、それらについて SDT fatty ラットと SD ラットで比較検討を行った。その結果、酸化ストレスについては、SDT fatty ラットにおいて酸化ストレスマーカーの一つである血漿中 NOx 値の顕著な増加が認められた。血管内皮機能については、大動脈のリン酸化 eNOS を指標として検討を実施したところ、若週齢（5 週齢）および高週齢（35 週齢）いずれにおいても、SDT fatty ラットではリン酸化 eNOS の低下傾向が認められた。血管内皮機能はより細い血管から障害を受けていくことから、SDT fatty ラットの下肢動脈では血管内皮機能が低下した状態となっている可能性が考えられた。血液凝固能については、内因性血液凝固能の指標である PT、外因性血液凝固能の指標である APTT および血小板凝集能について検討したところ、SDT fatty ラットでは PT および APTT の有意な短縮が認められ、コラーゲンによる血小板凝集反応の亢進傾向も認められた。一方、心拍出量については SDT fatty ラットにおいて変化は認められなかった。以上のことから、SDT fatty ラットの下肢血流量の低下には、酸化ストレスや血液凝固能の亢進、血管内皮機能の低下が関与することが示唆された。これらの要因には、高血糖や脂質異常が関わっている可能性があり、この点については今後の検討課題である。

本研究では、PAD モデルとして汎用されている下肢虚血モデルを SDT fatty ラット

においても作製し、その病態について検討を行った。その結果、5 週齢時に下肢虚血を誘導した SDT fatty ラットでは、下肢虚血後の血流量の変化に SD ラットと明確な違いは認められなかったが、15 週齢時に下肢虚血を誘導した SDT fatty ラットでは、SD ラットよりも下肢血流量の回復が悪化していた。更に、15 週齢時に下肢虚血を誘導した SDT fatty ラットでは SD ラットよりも虚血肢腓腹筋中の VWF 陽性血管数が有意に低下しており、血管新生応答の低下が示唆された。

PAD 患者の 44.2%が糖尿病を、66.7%が脂質異常症を合併することや、PAD 患者では血管内皮機能が低下していることが報告されている (Sanada et al., 2005; Yates et al., 2019)。更に、PAD 患者では VEGF-A のスプライシングフォームであり血管新生を抑制する VEGF-A165b の発現が増加し、これが下肢血流量の低下に関与することも示唆されている (Kikuchi et al., 2014)。本研究において、SDT fatty ラットも PAD 患者と同様に下肢血流量が低下し、高血糖、脂質異常および血管内皮機能の低下を呈することを示し、虚血後の血管新生応答が悪化していることも示した。本研究では血管新生応答低下のメカニズム解明までには至らなかったが、SDT fatty ラットは PAD 患者と共通する点が多いことから、SDT fatty ラットにおいても VEGF-A165b 発現が増加している可能性があり、これが血管新生応答の低下に関与していることが考えられる。

以上、本研究の結果から SDT fatty ラットは新規の糖尿病治療薬や PAD 治療薬の開発において非常に有用な動物モデルであることが示された。今後、更なる病態解析や様々な薬剤評価を通じて本モデル動物の特徴をより詳細に把握することで、本モデルの有用性をより一層高め、新規薬剤開発に貢献できる病態モデルとして利用されることを期待したい。

謝辞

本研究を取りまとめるにあたり，終始懇切丁寧なご指導，ご鞭撻を賜りました本学
山田宜永教授に心より感謝致します。

また本論文をご精読頂き，貴重なご意見を頂戴しました本学 高田良三教授，中野優
教授，杉山稔恵教授，放送大学新潟学習センター 新村末雄所長，京都大学農学研究科
太田毅教授，日本たばこ産業(株)医薬総合研究所 笹瀬智彦主幹研究員に深謝致します。

最後に博士号取得に向けて背中を押し，常に支えてくれた妻に深く感謝します。

引用文献

- American Diabetes Association. (2019). 9. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes-2019. *Diabetes Care* **42**, S90-S102.
- An, H., and He, L. (2016). Current understanding of metformin effect on the control of hyperglycemia in diabetes. *J Endocrinol* **228**, R97-106.
- Andersen, P. (1992). Hypercoagulability and reduced fibrinolysis in hyperlipidemia: relationship to the metabolic cardiovascular syndrome. *J Cardiovasc Pharmacol* **20 Suppl 8**, S29-31.
- Bohannon, N. J. (2002). Treating dual defects in diabetes: insulin resistance and insulin secretion. *Am J Health Syst Pharm* **59 Suppl 9**, S9-13.
- Brown, A., Guess, N., Dornhorst, A., Taheri, S., and Frost, G. (2017). Insulin-associated weight gain in obese type 2 diabetes mellitus patients: What can be done? *Diabetes Obes Metab* **19**, 1655-1668.
- Calcutt, N. A., Cooper, M. E., Kern, T. S., and Schmidt, A. M. (2009). Therapies for hyperglycaemia-induced diabetic complications: from animal models to clinical trials. *Nat Rev Drug Discov* **8**, 417-29.

- Cortez, M., Singleton, J. R., and Smith, A. G. (2014). Glucose intolerance, metabolic syndrome, and neuropathy. *Handb Clin Neurol* **126**, 109–22.
- Forstermann, U., Xia, N., and Li, H. (2017). Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ Res* **120**, 713–735.
- Gerhard-Herman, M. D., Gornik, H. L., Barrett, C., Barshes, N. R., Corriere, M. A., Drachman, D. E., Fleisher, L. A., Fowkes, F. G. R., Hamburg, N. M., Kinlay, S., Lookstein, R., Misra, S., Mureebe, L., Olin, J. W., Patel, R. A. G., Regensteiner, J. G., Schanzer, A., Shishehbor, M. H., Stewart, K. J., Treat-Jacobson, D., and Walsh, M. E. (2017). 2016 AHA/ACC Guideline on the Management of Patients With Lower Extremity Peripheral Artery Disease: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* **69**, 1465–1508.
- Hall, J. E., Kuo, J. J., da Silva, A. A., de Paula, R. B., Liu, J., and Tallam, L. (2003). Obesity-associated hypertension and kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **12**, 195–200.
- Ignarro, L. J., Fukuto, J. M., Griscavage, J. M., Rogers, N. E., and Byrns, R.

- E. (1993). Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8103-7.
- Jelic-Knezovic, N., Galijasevic, S., Lovric, M., Vasilj, M., Selak, S., and Mikulic, I. (2019). Levels of Nitric Oxide Metabolites and Myeloperoxidase in Subjects with Type 2 Diabetes Mellitus on Metformin Therapy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **127**, 56-61.
- Katsuda, Y., Ohta, T., Miyajima, K., Kemmochi, Y., Sasase, T., Tong, B., Shinohara, M., and Yamada, T. (2014). Diabetic complications in obese type 2 diabetic rat models. *Exp Anim* **63**, 121-32.
- Katsuda, Y., Sasase, T., Tadaki, H., Mera, Y., Motohashi, Y., Kemmochi, Y., Toyoda, K., Kakimoto, K., Kume, S., and Ohta, T. (2015). Contribution of hyperglycemia on diabetic complications in obese type 2 diabetic SDT fatty rats: effects of SGLT inhibitor phlorizin. *Exp Anim* **64**, 161-9.
- Kikuchi, R., Nakamura, K., MacLauchlan, S., Ngo, D. T., Shimizu, I., Fuster, J. J., Katanasaka, Y., Yoshida, S., Qiu, Y., Yamaguchi, T. P., Matsushita, T., Murohara, T., Gokce, N., Bates, D. O., Hamburg, N. M., and Walsh, K. (2014). An antiangiogenic isoform of VEGF-A contributes to impaired

- vascularization in peripheral artery disease. *Nat Med* **20**, 1464–71.
- King, H., Aubert, R. E., and Herman, W. H. (1998). Global burden of diabetes, 1995–2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* **21**, 1414–31.
- Kobayashi, T. (2008). [Possible involvement of insulin and oxidative stress in vascular dysfunction of diabetic mellitus]. *Yakugaku Zasshi* **128**, 1013–21.
- Loffredo, L., Marcoccia, A., Pignatelli, P., Andreozzi, P., Borgia, M. C., Cangemi, R., Chiarotti, F., and Violi, F. (2007). Oxidative-stress-mediated arterial dysfunction in patients with peripheral arterial disease. *Eur Heart J* **28**, 608–12.
- Masuyama, T., Katsuda, Y., and Shinohara, M. (2005). 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.
- Matsui, K., Ohta, T., Oda, T., Sasase, T., Ueda, N., Miyajima, K., Masuyama, T., Shinohara, M., and Matsushita, M. (2008). Diabetes-associated complications in Spontaneously Diabetic Torii fatty rats. *Exp Anim* **57**, 111–21.

Naruse, K., Sato, J., Funakubo, M., Hata, M., Nakamura, N., Kobayashi, Y., Kamiya, H., Shibata, T., Kondo, M., Himeno, T., Matsubara, T., Oiso, Y., and Nakamura, J. (2011). Transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells improves mechanical hyperalgesia, cold allodynia and nerve function in diabetic neuropathy. *PLoS One* **6**, e27458.

Norgren, L., Hiatt, W. R., Dormandy, J. A., Nehler, M. R., Harris, K. A., Fowkes, F. G., and Group, T. I. W. (2007). Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg* **45 Suppl S**, S5-67.

Ohman, E. M., Bhatt, D. L., Steg, P. G., Goto, S., Hirsch, A. T., Liao, C. S., Mas, J. L., Richard, A. J., Rother, J., Wilson, P. W., and Investigators, R. R. (2006). The REduction of Atherothrombosis for Continued Health (REACH) Registry: an international, prospective, observational investigation in subjects at risk for atherothrombotic events—study design. *Am Heart J* **151**, 786 e1-10.

Ritz, E., and Stefanski, A. (1996). Diabetic nephropathy in type II diabetes. *Am J Kidney Dis* **27**, 167-94.

Sanada, H., Higashi, Y., Goto, C., Chayama, K., Yoshizumi, M., and Sueda, T.

- (2005). Vascular function in patients with lower extremity peripheral arterial disease: a comparison of functions in upper and lower extremities. *Atherosclerosis* **178**, 179–85.
- Schiekofer, S., Galasso, G., Sato, K., Kraus, B. J., and Walsh, K. (2005). Impaired revascularization in a mouse model of type 2 diabetes is associated with dysregulation of a complex angiogenic-regulatory network. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 1603–9.
- Stewart, K. J., Hiatt, W. R., Regensteiner, J. G., and Hirsch, A. T. (2002). Exercise training for claudication. *N Engl J Med* **347**, 1941–51.
- Szoke, E., Shrayyef, M. Z., Messing, S., Woerle, H. J., van Haeften, T. W., Meyer, C., Mitrakou, A., Pimenta, W., and Gerich, J. E. (2008). Effect of aging on glucose homeostasis: accelerated deterioration of beta-cell function in individuals with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* **31**, 539–43.
- Tomlinson, D. R., Moriarty, R. J., and Mayer, J. H. (1984). 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**, 470–6.
- Toriniwa, Y., Saito, T., Miyajima, K., Ishii, Y., Uno, K., Maekawa, T., Matsui,

T., Kume, S., Yamada, T., and Ohta, T. (2018). Investigation of pharmacological responses to anti-diabetic drugs in female Spontaneously Diabetic Torii (SDT) fatty rats, a new nonalcoholic steatohepatitis (NASH) model. *J Vet Med Sci* **80**, 878-885.

Yan, J., Tie, G., Park, B., Yan, Y., Nowicki, P. T., and Messina, L. M. (2009). Recovery from hind limb ischemia is less effective in type 2 than in type 1 diabetic mice: roles of endothelial nitric oxide synthase and endothelial progenitor cells. *J Vasc Surg* **50**, 1412-22.

Yates, K., Lang, U., Cederlof, M., Boland, F., Taylor, P., Cannon, M., McNicholas, F., DeVlyder, J., and Kelleher, I. (2019). Association of Psychotic Experiences With Subsequent Risk of Suicidal Ideation, Suicide Attempts, and Suicide Deaths: A Systematic Review and Meta-analysis of Longitudinal Population Studies. *JAMA Psychiatry* **76**, 180-189.

Yoon, K. H., Lee, J. H., Kim, J. W., Cho, J. H., Choi, Y. H., Ko, S. H., Zimmet, P., and Son, H. Y. (2006). Epidemic obesity and type 2 diabetes in Asia. *Lancet* **368**, 1681-8.

日本循環器学会. (2015). 末梢閉塞性動脈疾患の治療ガイドライン (2015 年改訂版).

Summary

The number of diabetic patients has recently been increasing worldwide, and numerous anti-diabetic drugs have been developed to control blood glucose level. In particular, metformin, which exhibits glucose-lowering effects by suppressing gluconeogenesis in the liver, is widely used as a first-line oral anti-diabetic drug for type 2 diabetes.

Diabetes is associated with pathogenesis of other diseases and is known as one of the risk factor of peripheral artery disease (PAD). PAD is defined as peripheral blood flow impairment, especially in legs, caused by atherosclerotic stenosis. The disease decreases the quality of life (QOL) due to intermittent claudication or necrosis in the leg.

In the first part of this study, the pharmacological effects of metformin were investigated using female and male Spontaneously Diabetic Torii (SDT) fatty rats, a new obese type 2 diabetic model. Two experiments were performed: an assessment of repeated treatment with metformin in female SDT fatty rats from 5 to 10 weeks of age, and an assessment of repeated treatment with metformin in male SDT fatty rats from 6 to 10 weeks of age. In female SDT fatty rats, metformin treatment achieved good glycemic control and prevented the development of sensory nerve dysfunction. In male SDT fatty rats, metformin also decreased blood glucose levels 4 weeks after treatment.

In non-clinical research regarding PAD, a hindlimb ischemic model induced by femoral artery ligation is often used as a PAD model. In this model, non-metabolic syndrome animals are mainly used. However, many PAD patients have metabolic

syndrome components such as hypertension, diabetes, and dyslipidemia in their background, and show endothelial dysfunction. Therefore, it is very important to establish a PAD model based on animals with metabolic syndrome.

In the second part of this study, the usefulness of SDT fatty rats as a new PAD animal model was investigated. It is revealed that the hindlimb blood flow in SDT fatty rats was significantly lower than that in Sprague-Dawley (SD) rats under non-ischemic conditions. Furthermore, SDT fatty rats showed significantly higher plasma nitrogen oxide (NOx) level, shorter prothrombin time (PT), and shorter activated partial thromboplastin time (APTT) than SD rats.

In the third part of this study, the hindlimb blood flow in SDT fatty rats after femoral artery ligation was evaluated. The change in blood flow at 7 days after induction of hindlimb ischemia was significantly decreased, and the number of Von Willebrand Factor (VWF)-positive vessels in gastrocnemius muscles was significantly decreased in the ligated SDT fatty rats.

Results from the second and the third experiments suggest that the excess production of reactive oxygen species (ROS) and activation of coagulation could be involved in the lower blood flow in non-ischemic rats, and decreased angiogenesis could be involved in the poor recovery of blood flow in SDT fatty rats with hindlimb ischemia.

Taken together, SDT fatty rats might be useful for the development of novel anti-diabetic agents that show potential to improve glucose metabolic disorders in the liver, and also useful as a new PAD model with metabolic syndrome.