

—総説—

糖尿病性神経障害抑制薬に関する 薬理学的研究

水野邦治

要約：糖尿病性神経障害は高血糖に起因する末梢神経内ポリオール経路の亢進によって引き起こされると推定されている。ポリオール経路の律速酵素はアルドース還元酵素 (AR) であり、AR 阻害剤は糖尿病性神経障害に対して有効であると考えられている。本研究では新規な AR 阻害剤、フィダレスタットの糖尿病性神経障害に対する有効性を明らかにする目的で、種々の薬理学的検討を行った。各種酵素に対する作用の検討により、フィダレスタットは AR を強力かつ選択的に阻害することが明らかとなった。また、ストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病ラットを用いた薬効評価試験の結果、フィダレスタットは低用量で末梢神経内ポリオール経路の亢進を持続的に抑制し、知覚神経および運動神経の伝導機能障害を他の AR 阻害剤よりも強力に改善することが明確になった。さらにフィダレスタットを STZ 誘発糖尿病ラットに 15 ヶ月間投与することにより、末梢神経において代謝異常を長期間是正し、伝導機能障害だけでなく神経変性に対しても効果が認められた。これらのことから、フィダレスタットは糖尿病性神経障害に対する有効性を示すと考えられ、有用な糖尿病性神経障害治療薬として発展の可能性が示唆された。

索引用語：糖尿病性神経障害治療薬、フィダレスタット、アルドース還元酵素阻害剤、ポリオール経路、高血糖

Pharmacological Studies on Drug Suppressing Diabetic Neuropathy

Kuniharu MIZUNO

Abstract: Diabetic neuropathy is assumed to be caused by the acceleration of the polyol pathway in peripheral nerves due to hyperglycemia. The rate-limiting enzyme in the pathway is aldose reductase (AR), and AR inhibitors are considered to be effective against diabetic neuropathy. In the present study, many pharmacological investigations were performed for the purpose of clarifying the effectiveness of a novel AR inhibitor, fidarestat against diabetic neuropathy. The study about the effects on many enzymes revealed that fidarestat inhibits AR potently and selectively. In a study to investigate effectiveness in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats, fidarestat was found to suppress the accelerated polyol pathway in peripheral nerves continuously at a low dose and to improve the dysfunction in sensory and motor nerve conduction more potently than other AR inhibitors. Furthermore, a 15-month treatment of STZ-induced diabetic rats with fidarestat showed long-term correction of metabolic abnormality in peripheral nerves and the effect on nerve degeneration as well as on the dysfunction of conduction. From these results, fidarestat is presumed to show effectiveness against diabetic neuropathy, suggesting the possibility for development of fidarestat as a useful medicine for diabetic neuropathy.

Keyphrases: medicine for diabetic neuropathy, fidarestat, aldose reductase inhibitor, polyol pathway, hyperglycemia

1. 緒言

近年、糖尿病疾患は増加の一途をたどり、食生活の管理と同時に薬物治療の重要性が指摘されている。さらに

Diabetic Control and Complications Trial (DCCT)、United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) や Kumamoto Study 等の臨床試験の成績から、糖尿病患者の血糖を厳格に管理しても、糖尿病性神経障害を含む糖尿病合併症の発症・進展を完全には阻止できない一方、厳格な血糖管理により危険な低血糖を起こす頻度が高まることが明らかとなっている¹⁻³⁾。また、血糖管理が厳格に実施されている糖尿病患者は治療を受けている患者全体の50%に満たず、いずれかの糖尿病合併症が発症してから診察を受ける患者も多いことから、血糖管理に加えて糖尿病合併症の発症・進展を抑制する治療法が望まれている。

一方、糖尿病合併症の成因として高血糖によるポリオール経路 (Fig. 1) の亢進が挙げられる⁴⁾。ポリオール経路はアルドース還元酵素 (aldose reductase; AR, EC 1.1.1.21) を律速酵素とするグルコース代謝の側副路であり、正常血糖状態ではグルコース代謝にわずかに関与するに過ぎない。しかし高血糖時、末梢神経、網膜、腎臓、水晶体等のインスリン非依存性組織では、解糖系により代謝しきれなかった多量のグルコースがポリオール経路に流入し、本経路は亢進することが知られている。従ってARを阻害して本経路を正常化することは、糖尿病合併症の発症・進展を抑制する上で有効な手段と考えられており⁵⁾、数多くの知見から、特に三大合併症の一つである糖尿病性神経障害に対する治療薬としての開発が活発に行われてきた。

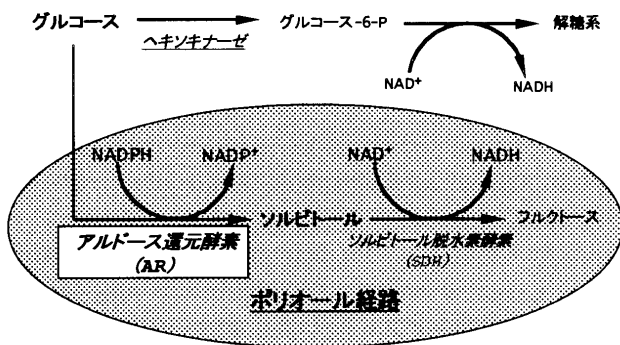
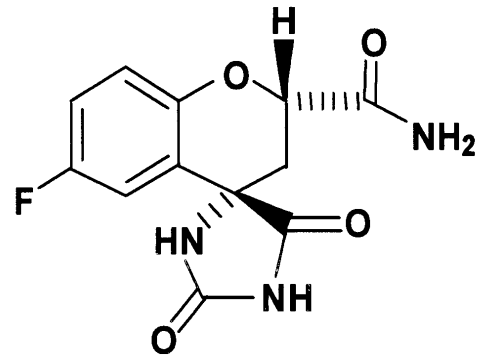


Fig. 1 Glucose metabolism and polyol pathway⁶⁾.

ARを阻害する薬剤は、構造的にカルボン酸基を有するものとヒダントイン骨格を持つものに大別されている⁷⁾が、これまで国際的に認知された医薬品は無い。カルボン酸系のAR阻害剤では蛋白結合率が高く、代謝を受けやすいことから有効用量が高く、効果も不十分であった^{8,9)}。一方、ヒダントイン系のAR阻害剤では強い有効性を認めるものの、重篤な副作用の頻度が高い欠点があった^{10,11)}。これらの背景から、優れた有効性と高い安全性を併せ持ったAR阻害剤の創薬を企画し、ヒダントイン系AR阻害剤のフィダレスタットを開発した¹²⁾(Fig. 2)。

本総説では、フィダレスタットの糖尿病性神経障害に対する作用を明らかにすることを目的として行った種々の薬理学的検討の成績について述べる。



(+)-(2*S*,4*S*)-6-fluoro-2',5',-dioxospiro[chroman-4,4'-imidazolidine]-2-carboxamide

Fig. 2 The chemical structure of fidarestat.

2. アルドース還元酵素に対する阻害作用の選択性¹³⁾

ARは生体内に広く分布しており、広い基質特異性を持つが、ポリオール経路以外の生体内アルデヒド化合物の代謝系においてはARの他にもアルデヒド還元酵素 (aldehyde reductase; AHR, EC 1.1.1.2) をはじめとした多数の酵素が関与しており、ARの阻害作用が直接重篤な副作用につながる可能性は低いと考えられている。一方、ARの類縁酵素であるAHRは、脂肪族および芳香族のアルデヒドをアルコールに変換する主要な酵素であることから、AHRを阻害することにより生体に好ましくない作用が現れる可能性がある¹⁴⁾。従って、AR阻害剤のAHRに対する阻害作用を評価してAR阻害作用の選択性を検討する必要があり、フィダレスタットの両酵素に対する阻害作用を比較検討した。

Table 1に示すラット組織由来のARを用いた成績から、フィダレスタットは末梢神経の1つである坐骨神経由来のARに対して28nMの50%阻害濃度(IC₅₀値)を示し、低濃度で明らかな阻害作用が認められたことから、末梢神経におけるポリオール経路の亢進を抑制することが示唆された。また、各組織由来のAR活性に対するIC₅₀値はほぼ同等であったことから、組織への特異性はそれほど無く、いずれの組織のAR活性も阻害することが示された。これらのことから、フィダレスタットは末梢神経以外の糖尿病合併症を発症する組織においてもポリオール経路の亢進を抑制し、種々の糖尿病合併症の発症・進展に対して効果を示すことが示唆された。

Table 1 The IC₅₀ of fidarestat against AR activity from rat sciatic nerve, lens and kidney

	Sciatic nerve	Lens	Kidney
Fidarestat	28	18	29

Each IC₅₀ value represents as nM.
D,L-Glyceraldehyde was used as substrate.

最近、AR との複合体のX線結晶構造解析から、フィダレスタットの AR 阻害作用を示す活性部位が明らかにされた¹⁵⁾ (Fig.3)。フィダレスタットはベンゾピラン環 2 位にカルバモイル基 (-CONH₂) を有する。カルバモイル基の無い AR 阻害剤であるソルビニルのラット水晶体 AR に対する IC₅₀ 値は、280nM とフィダレスタットの IC₅₀ 値の 15 倍以上であった。このことからカルバモイル基は、ソルビニルより強力な AR 阻害作用を示す上で不可欠な置換基であることが明確となった。すなわち、AR の 300 番目のアミノ酸であるロイシンとカルバモイル基との水素結合が、ソルビニルに比べて強力な AR 阻害作用を示す因子であることが明らかとなった。

AHR では 300 番目のアミノ酸はプロリンであり、プロリンの窒素原子は水素原子を持たないことから、フィダレスタットのカルバモイル基は 300 番目のアミノ酸と水素結合ができなくなり、AHR に対する阻害作用に関与しない。従って、カルバモイル基は AHR に比べて AR をより選択的に阻害する上でも不可欠な置換基であり、上記の成績は分子生物学的な解析によっても裏付けられている¹⁵⁾。

さらにフィダレスタットは他の糖代謝関連酵素に対して 10⁻⁵M の濃度においても影響を及ぼさないことを確認しており、フィダレスタットは低濃度で選択的にヒトの AR に対して阻害作用を示すことが明らかとなった。

3. 短期投与による糖尿病性神経障害に対する効果¹⁶⁾

前述のように、AR 阻害剤は糖尿病性神経障害の治療薬として期待されている。糖尿病性神経障害とポリオール経路の亢進との関連を検討する標準ツールとして用いられるソルビニル¹⁷⁾は、治験の段階で糖尿病性神経障害に対して有効性が認められたが¹⁸⁾、重篤な薬物アレルギーの発現により治療薬への応用は断念された¹⁹⁾。前項でフィダレスタットはソルビニルよりも強力かつ選択的な AR 阻害作用を有することを述べた。そこで、フィダレスタットの糖尿病性神経障害に対する作用を、臨床で繁用されている運動神経伝導速度 (motor nerve conduction velocity; MNCV) を指標としてソルビニルと比較検討した。また、末梢神経における高血糖時のポリオール経路に対する作用を調べる目的で、坐骨神経中のソルビトール量を測定した。すなわち、高血糖によりポリオール経路が亢進するとソルビトール産生が高まり、ソルビトールが細胞内に蓄積することが知られていることから²⁰⁾、この作用についても検討した。

糖尿病ラットモデル：体重約 250g の雄性 Sprague-Dawley (SD)系ラットの尾静脈内にストレプトゾトシン (streptozotocin; STZ) を 60mg/kg の割合で注射して膵臓のβ細胞を選択的に壊死させ、インスリン分泌不全を惹起して糖尿病を誘発した。血糖値を測定して高血糖状態を確認し、STZ 注射 2 週後から 2 週間フィダレスタットまたはソルビニルを 1 日 1 回強制経口投与した。

運動神経伝導速度 (MNCV) の測定：MNCV は STZ 注射前、注射 2 週後 (薬物投与前日) および 4 週後 (薬物投与翌日) の 3 回、三好および後藤の方法²¹⁾に準じて測定した。すなわち、Fig. 4 に示すように、ラットの腹腔内にペントバルビタールナトリウム 40mg/kg を注射して麻酔し、背位に固定した後、尾部神経の温度を一定に保つ為に、尾部を 5 分間 37℃の流動パラフィン槽に浸した。肛門から下方約 1 cm の尾部を第 1 刺激点とし、さらに 5 cm 下方を第 2 刺激点とした。持続時間 0.1msec の矩形波を用いて

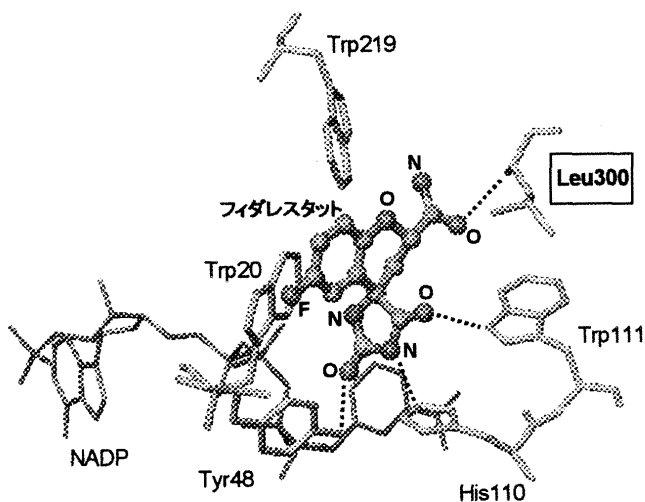


Fig. 3 Binding of fidarestat to AR.

The stereoview with atomic symbols in the center displays the structure of fidarestat.

The violet stereoview with numberings express amino acid residues of AR and their sequence numbers.

Leu: leucine, Trp: tryptophan, His: histidine, Tyr: tyrosine

The gray stereoview labeled NADP shows the coenzyme.

The dotted line between fidarestat and each of the amino acid residues of AR indicates hydrogen bond.

また、ヒト赤血球由来 AR および AHR を用いた成績から、AHR に対する IC₅₀ 値は、AR に対する IC₅₀ 値の 140 倍以上であり (Table 2)、フィダレスタットでは AHR 阻害作用は临床上問題にならないものと考えられた。

Table 2 The selectivity of fidarestat for human erythrocyte AR inhibition

	Fidarestat
IC ₅₀ against AHR	1,300
IC ₅₀ against AR	9
Selectivity	144

The IC₅₀ values against AHR and AR represent as nM.

D-Glucose was used as substrate.

The selectivity for AR inhibition is indicated as IC₅₀ against AHR / IC₅₀ against AR.

第1および第2刺激点で縦方向の神経を刺激した。刺激パルスはアイソレーターに接続した電気刺激装置由来の極大刺激を用いて発生させ、第2刺激点から4 cm 遠位の尾部筋肉内に刺入した同芯円電極から活動電位を導出した。筋活動電位は生体アンプと連結したデジタルストレージオシロスコープから得られ、X-Y レコーダーにより記録した。さらに2刺激点から発生する潜時、すなわち電気刺激から筋活動電位の立ち上がりまでの時間をオシロスコープ上で測定した。各潜時は3回の平均値を用い、刺激点間の距離はノギスを用いて測定した。MNCV は刺激点間の距離を潜時の平均値の差で除して算出した。

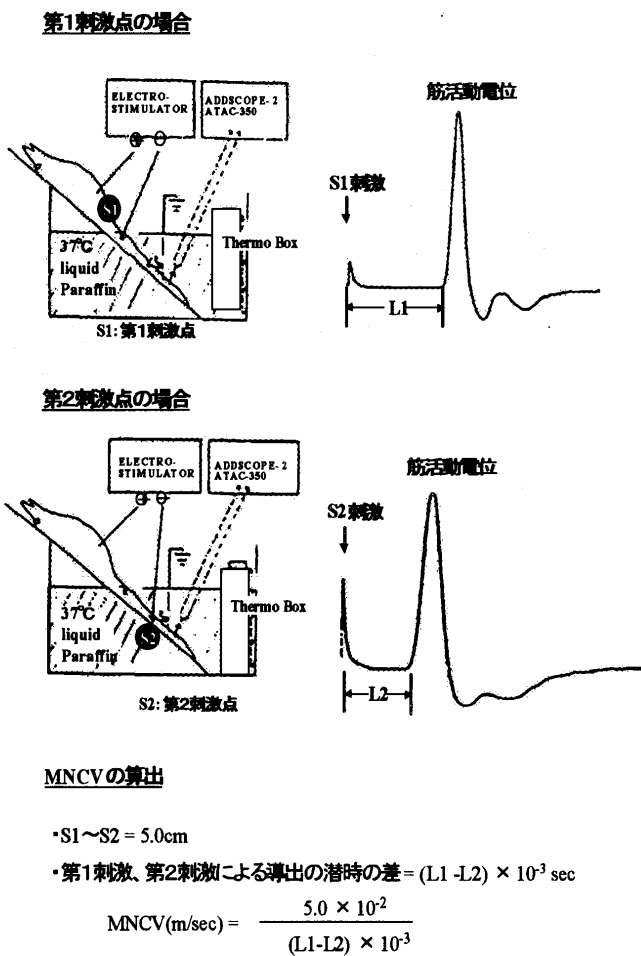


Fig. 4 Measurement of motor nerve conduction velocity (MNCV) in rat.

坐骨神経中生化学パラメーターの測定：STZ 注射4週後に MNCV を測定した後、両側の坐骨神経を摘出し、ソルビトール量およびミオイノシトール量測定用として-80℃で保存した。ソルビトール量およびミオイノシトール量は、各々 Bergmeyer らの方法²²⁾を改良した酵素法および Sweeley らの方法²³⁾を改良したクロマトグラフ法により測定した。また、薬物を同様に投与した別の糖尿病ラットの坐骨神経を摘出し、Das らの方法²⁴⁾に準じて坐骨神経中 Na⁺, K⁺-ATPase 活性を測定した。

運動神経伝導速度 (MNCV) 遅延に対する作用：各群の MNCV の成績を Table 3 および Fig. 5 に示す。正常群の MNCV は試験期間を通して上昇した。一方、糖尿病対照群の MNCV は STZ 静注2週後で正常群に比べて有意に遅延し、その差は4週後でさらに拡大した。これに対してフィダレスタットは MNCV の遅延を用量依存的に改善した。ソルビニル 20mg/kg も MNCV の遅延を改善し、その効果はフィダレスタット 1mg/kg と同等であった。

Table 3 Effect of fidarestat or sorbinil on the slowing of MNCV in STZ-induced diabetic rats

Group	Dose (mg/kg/day)	MNCV (m/s) at various times after STZ injection		
		0 week	2 weeks (Before treatment)	4 weeks (After treatment)
Nondiabetic	0	25.8 ± 0.2	29.6 ± 0.5	33.8 ± 0.6 ***
Diabetic	0	25.5 ± 0.7	25.9 ± 1.0 **	26.4 ± 1.0
Diabetic + Fidarestat	0.25	26.8 ± 0.8	27.0 ± 0.6 **	28.2 ± 0.6
	0.5	26.6 ± 1.0	26.4 ± 0.7 **	28.9 ± 0.6
	1.0	26.0 ± 0.5	26.4 ± 0.8 **	30.2 ± 0.8 **
	2.0	26.8 ± 0.5	26.6 ± 1.0 #	32.1 ± 0.8 ***
Diabetic + Sorbinil	20.0	26.3 ± 0.5	26.5 ± 0.6 ***	30.2 ± 0.5 ***

n = 7 to 8. Each value represents mean ± SEM.
 Diabetic: Diabetic control, Diabetic + Fidarestat :Fidarestat-treated diabetic group,
 Diabetic + Sorbinil : Sorbinil-treated diabetic group.
 # p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 vs. nondiabetic group.
 * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 vs. diabetic control group.

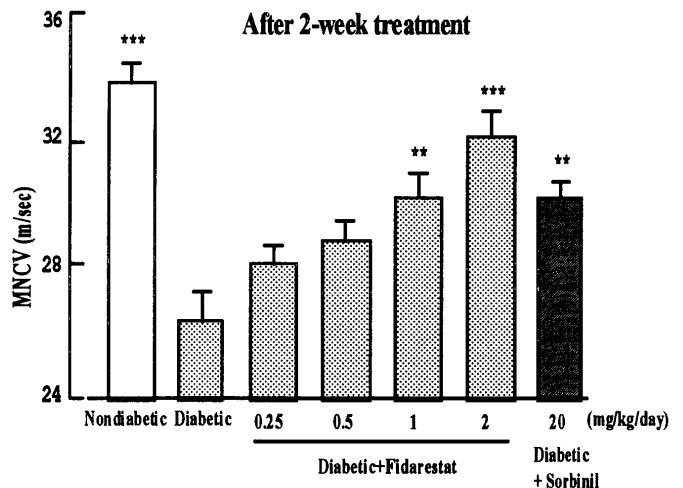


Fig. 5 Effect of fidarestat or sorbinil on the slowing of MNCV in STZ-induced diabetic rats.

Each column and vertical line represents the mean ± SEM of 7-8 rats. **P<0.01, ***P<0.001, compared with the diabetic control group.

坐骨神経中生化学パラメーターに対する作用：STZ 静注4週後の坐骨神経中ソルビトール量を Fig. 6 に示す。糖尿病対照群のソルビトール量は正常群の約3.5倍に上昇した。フィダレスタットは用量依存的に坐骨神経中ソルビトール量の増加を抑制した。ソルビニル 20mg/kg もフィダレスタット 1mg/kg とほぼ同等の抑制作用を示した。

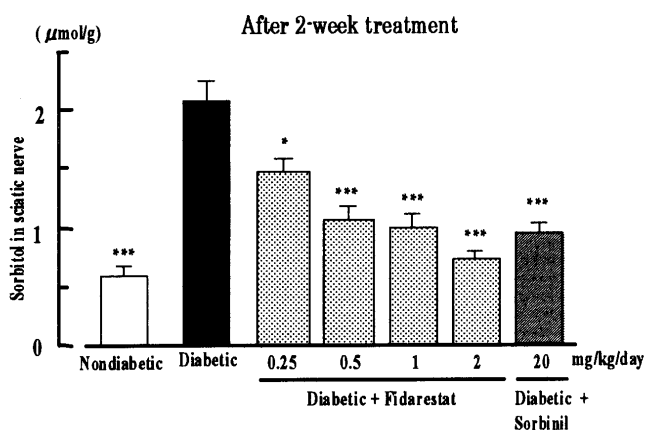


Fig. 6 Effects of fidarestat or sorbinil on sorbitol accumulation in sciatic nerve in STZ-induced diabetic rats. Each column and vertical line represents the mean \pm SEM of 7-8 rats. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, compared with the diabetic control group.

また、フィダレスタットは STZ 静注 4 週後の坐骨神経中のミオイノシトール量減少および Na^+, K^+ -ATPase 活性低下を用量依存的に抑制した (成績不掲載)。近年、実験的糖尿病動物における MNCV の遅延が多くの研究者により報告されている²⁵⁻²⁷⁾。さらに、これらの論文ではポリオール経路の亢進やミオイノシトール量の減少などの坐骨神経内代謝の異常も報告されている²⁶⁾。Fig. 7 に示すように、糖尿病急性期のラットにおいて MNCV の遅延は末梢神経中ミオイノシトール(MI)量の減少に続き、プロテインキナーゼ C (protein kinase C; PKC) を介して Na^+, K^+ -ATPase 活性の低下によって引き起こされるものと考えられてきた²⁸⁻³⁰⁾。

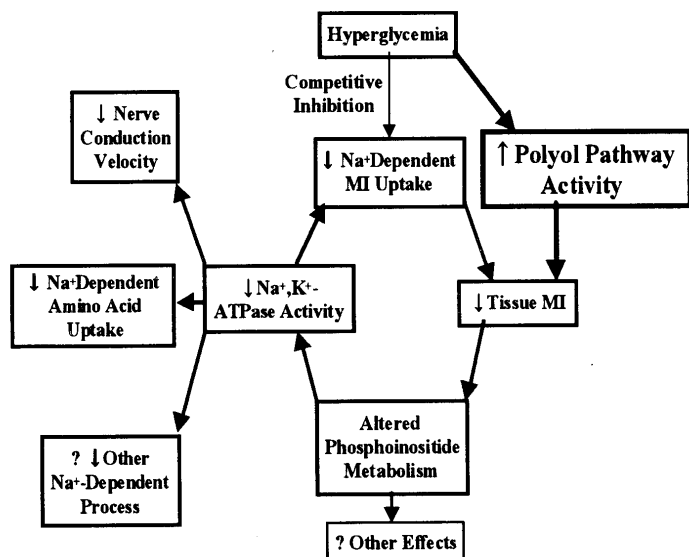


Fig. 7 Relationship between metabolic abnormalities and nervous dysfunction in peripheral nerve³⁰⁾.

糖尿病患者においても末梢神経中ソルビトール量の増加、ミオイノシトール量の減少および Na^+, K^+ -ATPase 活性の低下が認められており^{31,32)}、ヒト糖尿病性神経障害の成因も同様な機序が類推されている³⁰⁾。

一方、代表的な AR 阻害剤のソルビニル投与で糖尿病ラットの坐骨神経中ミオイノシトール量の減少、 Na^+, K^+ -ATPase 活性の低下および PKC の活性低下を回復することが報告されている³³⁾。従って、フィダレスタットの MNCV に対する効果も上記の末梢神経内代謝異常を改善する結果、生ずるものと推定される³⁴⁾。

末梢神経において AR が局在するシュワン細胞は末梢神経線維の支持および代謝に重要な役割を果たしている³⁵⁾。また、その細胞膜のリン脂質の成分であるミオイノシトールは末梢神経機能の維持と構造保持に重要な役割を担っている³⁶⁾。さらに、 Na^+, K^+ -ATPase は単に膜電位を生ずるだけでなく本質的な細胞機能を活性化する³⁷⁾。このような状況下に、末梢神経においてポリオール経路の亢進、ミオイノシトール量の減少および Na^+, K^+ -ATPase 活性の低下が長期間続くと、組織変化を来すことが予想される。糖尿病の患者や動物において、他の AR 阻害剤により上述の代謝異常を改善し、組織変化を修復することが報告されている^{38,39)}。フィダレスタットについてもこれらの代謝異常を是正する成績が得られ、糖尿病による末梢神経の組織学的損傷を修復することが期待される。

血糖値および体重に及ぼす影響：Table 4 に示すように、STZ 静注 4 週後の糖尿病対照群の体重は正常群の約 60% であった。また、糖尿病対照群の血糖値は正常群の約 3 倍であった。フィダレスタットおよびソルビニルは糖尿病による体重減少および血糖上昇に影響を及ぼさなかったことから、糖尿病そのものには影響しないことが示唆された。

Table 4 Effects of fidarestat or sorbinil on body weight and plasma glucose levels in diabetic rats

Group	Dose (mg/kg/day)	Body Weight(g)	Plasma Glucose (mg/dl)
Nondiabetic	0	380 \pm 8 ***	158 \pm 7 ***
Diabetic	0	233 \pm 7	495 \pm 29
Diabetic + Fidarestat	0.25	220 \pm 7	485 \pm 16
	0.5	224 \pm 8	515 \pm 26
	1.0	229 \pm 13	546 \pm 46
	2.0	230 \pm 5	449 \pm 12
Diabetic + Sorbinil	20.0	234 \pm 9	472 \pm 22

n= 7 to 8. Each value represents mean \pm SEM. Diabetic: Diabetic control, Diabetic + Fidarestat: Fidarestat-treated diabetic group, Diabetic + Sorbinil: Sorbinil-treated diabetic group. *** $p < 0.001$ vs. diabetic control group.

4. 糖尿病性神経障害に対する他剤との有効性比較⁴⁰⁾

前項までの成績から、フィダレスタットは AR を選択的に阻害することにより、高血糖時の末梢神経内ポリオール経路の亢進を抑制することを明らかにした。また、フィダレスタットは対照薬として用いた AR 阻害剤のソルビニルよりも強力に MNCV の遅延を改善する成績を得た。

一方糖尿病性神経障害治療薬としてカルボン酸系の AR 阻害剤であるエパルレスタットが国内で市販され、ゼナレスタットは最近まで治験が行われていた。

そこで、フィダレスタットの有用性を検討する為に、STZ 誘発糖尿病ラットを用い、MNCV と同様に診断指標として繁用されている知覚神経伝導速度 (sensory nerve conduction velocity; SNCV) および再現性の高い糖尿病性神経障害の診断指標として臨床的に用いられている F 波 (Foot wave) の最小潜時⁴⁾を MNCV と併せて指標としてエパルレスタットおよびゼナレスタットと比較した。また、各 AR 阻害剤の坐骨神経中ソルビトール蓄積に対する抑制作用を経時的に調べ、末梢神経内ポリオール経路の亢進に対する是正作用の持続性を比較検討した。

糖尿病ラットモデル：前述と同様に糖尿病ラットを作製し、STZ 注射 2 週後に SNCV および MNCV を測定して各平均値に差が無いように糖尿病ラットを群分けした。その後 2 週間、臨床での用法に準じて^{42,43)}フィダレスタット、エパルレスタットおよびゼナレスタットを各々 1 日 1 回、3 回および 2 回強制経口投与した。

知覚神経伝導速度 (SNCV) および F 波の測定： Misumi⁴⁴⁾や Cavaletti ら⁴⁵⁾の方法を改良して SNCV の測定を行った。すなわち、ラットの腹腔内にペントバルビタールナトリウム 50mg/kg を注射して麻酔し、Fig. 8 に示すように、ラットを腹位に固定し、保温パッド上で暖めて尾部表面温度を 33-35°C に保った。その後、尾部先端から 3cm の位置に環状電極を装着して電気刺激し、得られる神経活動電位を 2 つの記録点から導出した。第 1 記録点での神経活動電位の導出記録の為に、陽極側の環状電極を肛門から 1cm の部位に、陰極側の環状電極を肛門から 2cm の部位に装着した。第 1 記録点での測定後、第 2 記録点での神経活動電位の導出記録の為に、各電極を 6cm 遠位に移動させた。陽極と陰極の間の距離は同様に 1cm とした。刺激矩形波はアイソレーターに接続した電気刺激装置由来の極大電圧 (最大神経活動電位を発生する電圧の約 1.3 倍の電圧) を 0.1ms の間持続することにより発生させた。また、神経活動電位は時定数 10ms, cut off filter 3kHz の条件下、生体アンプと連結したデジタルストレージオシロスコープに記録した。電気刺激から神経活動電位のピークの立ち上がりまでの時間をオシロスコープ上で測定することにより潜時を求めた。SNCV は 6cm (第 1 記録点と第 2 記録点の間の距離) を記録点間の潜時の差で除することにより算出した。

F 波最小潜時の測定は Wiethölter らの方法⁴⁶⁾に準じて行った。すなわち Fig. 9 に示すように、ラット後肢の表面温度を 33-35°C に保った後、くるぶしの中央で皮下に装着した針電極を介して脛骨神経を電気刺激し、得られる筋活動電位を足裏の表面の筋肉から導出した。電気刺激は筋活動電位 M 波を得るための極大矩形パルスで 0.1ms 持続させ

ることにより発生させた。また、表面電極をゼリーペーストで被覆し、足の裏の筋肉上に固定することにより筋活動電位を導出した。さらに、電気刺激から 2 つ目の筋活動電位のピークとして現れる F 波の立ち上がりまでの時間をオシロスコープ上で測定することにより潜時を求めた。F 波最小潜時は 1 ラットあたり 20 回測定して得られる潜時の最小のものとした。

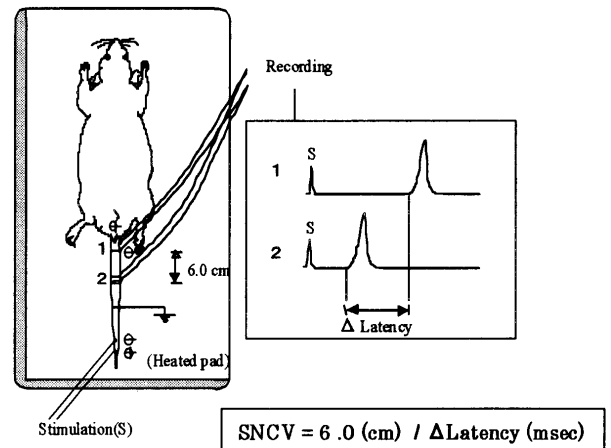


Fig. 8 Measurement of sensory nerve conduction velocity (SNCV) in rat.

Nerve action potentials, obtained with at least 40 repeated stimuli, were recorded both at point 1 (2.0 cm distal to the anus) and at point 2 (6.0 cm distal to the first point). Ring electrodes were used for stimulation and recording.

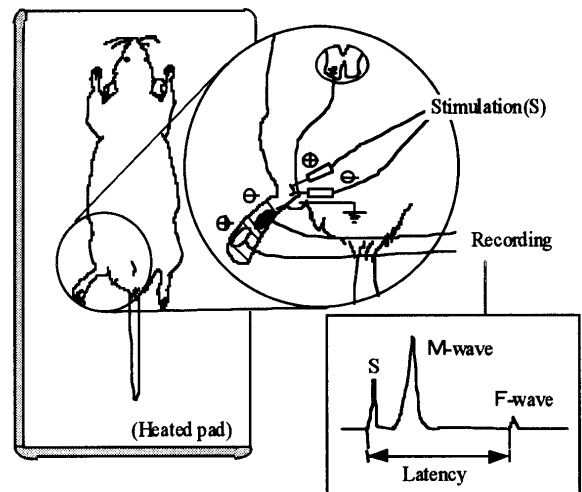


Fig. 9 Measurement of F-wave latency in rat.

F-wave was obtained from the small muscles of the planter surface of the hindfoot by stimulating the tibial nerve. The minimal F-wave latency was determined among 20 measurements per rat.

知覚神経伝導速度 (SNCV) 遅延に対する作用：糖尿病対照群の SNCV は、STZ 静注 2 週後で有意に遅延し、4 週後においても同様であった (成績不掲載)。これに対してフィダレスタット投与群では用量依存的な改善作用が認められた (Fig. 10)。ゼナレスタットも用量依存的に SNCV の遅延を改善し、最高用量の 40mg/kg/day の効果はフィダレスタット 0.5mg/kg/day と同等であった。一方、エパルレスタットは有意な作用を示さなかった。

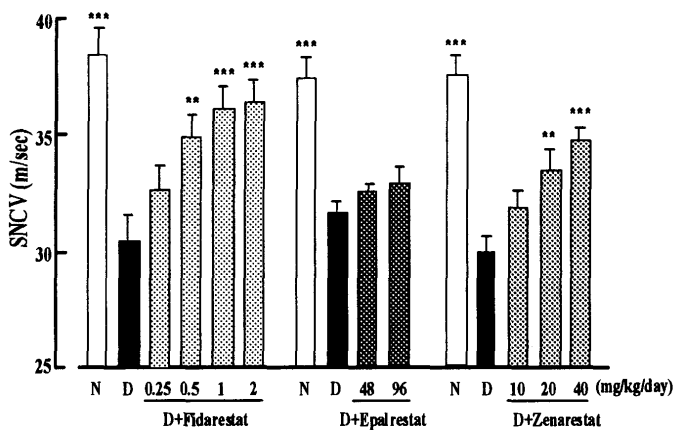


Fig. 10 Effects of fidarestat, epalrestat and zenarestat on the slowing of SNCV in STZ-induced diabetic rats.

Each value represents the mean \pm SEM of 7-10 rats.
 N: Nondiabetic, D: Diabetic control, D + Fidarestat :Fidarestat-treated diabetic group, D + Epalrestat : Epalrestat-treated diabetic group, D + Zenarestat : Zenarestat-treated diabetic group.
 *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, compared with the diabetic control group.

F 波最小潜時延長に対する作用 : Fig. 11 に示すように、STZ 静注 4 週後の糖尿病対照群の F 波最小潜時は正常群に比べて有意に延長した。これに対してフィダレストットは 0.5mg/kg/day の用量から F 波最小潜時の延長を抑制した。ゼナレストット投与群では最高用量の 40mg/kg/day においてのみ有意な抑制作用がみられた。しかし、エパルレストット投与群では有意な作用はみられなかった。

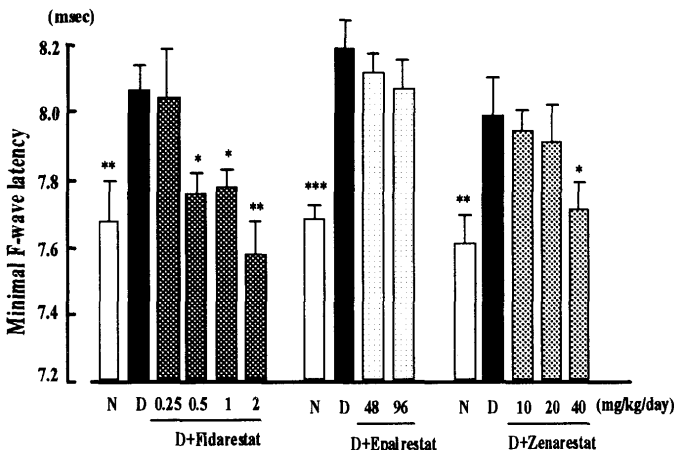


Fig. 11 Effects of fidarestat, epalrestat and zenarestat on the prolongation of minimal F-wave latency in STZ-induced diabetic rats.

Each value represents the mean \pm SEM of 7-10 rats.
 N: Nondiabetic, D: Diabetic control, D + Fidarestat :Fidarestat-treated diabetic group, D + Epalrestat : Epalrestat-treated diabetic group, D + Zenarestat : Zenarestat-treated diabetic group.
 *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, compared with the diabetic control group.

MNCV に対する作用 : 前項の成績と同様に、フィダレストットは 1mg/kg/day の用量から MNCV の遅延を有意に改善した。一方、エパルレストット投与群およびゼナレストット投与群では有意な作用はみられなかった(成績不掲

載)。

これらの神経伝導機能障害に対するフィダレストットの効果から、高血糖による末梢神経内ポリオール経路の亢進を是正することにより、運動神経のみならず知覚神経の障害に対しても効果を示すことが示された。また、MNCV が運動神経遠位部の伝導機能の指標であるのに対して、F 波潜時は運動神経近位部の障害の指標と考えられている⁴⁷⁾ことから、フィダレストットは末梢神経全体に有効性を示すことが示唆された。

さらに、フィダレストットはゼナレストットに比べてかなり少ない用量で、坐骨神経中ソルビトール蓄積に対する抑制作用および神経伝導機能障害に対する効果を示した。一方、フィダレストットの *in vitro* AR 阻害作用はゼナレストットと差が無いことが確認されている¹³⁾。この *in vitro* の成績と *in vivo* の成績との乖離の原因として、蛋白結合率の相違が考えられる。即ち、フィダレストットの血清蛋白結合率は 20% であるのに対して⁴⁸⁾、ゼナレストットでは 99% と非常に高い⁴⁹⁾ことから、血中における蛋白非結合のフィダレストット濃度はゼナレストットに比べてはるかに高いものと考えられる。また、細胞質中には AR 以外に多くの蛋白質が存在することから、他の蛋白と結合しないで AR と結合するフィダレストットの量はゼナレストットに比べて多くなり、結果としてフィダレストットは低用量で薬理作用を発揮すると推定された。

一方、エパルレストットは SNCV 遅延、MNCV 遅延および F 波最小潜時延長に対して有意な作用を示さなかった。これまでにエパルレストットは 50mg/kg/day で糖尿病ラットの MNCV 遅延に対して有効であることが報告されている^{50,51)}。本章ではエパルレストットの 1 日の投与回数を臨床の用法に合わせ、16mg/kg または 32mg/kg を 1 日 3 回投与した(48mg/kg/day または 96mg/kg/day)。さらに神経伝導機能障害に対する評価時期をラットの坐骨神経内エパルレストット濃度が最高となる投与 3 時間後⁵²⁾とした。また、他の報告と同様に⁵³⁾、エパルレストットは約 10^{-8} M の濃度で *in vitro* AR 活性阻害作用を示すことを確認している。しかし、エパルレストットは 96mg/kg/day の用量においても坐骨神経中ソルビトール蓄積に対して抑制作用を示さなかった。このことは他の研究者からも報告されており、種々の組織におけるソルビトール蓄積に対してエパルレストットが無効であったとしている⁵⁴⁾。さらに、Ao ら⁵⁵⁾はエパルレストットが坐骨神経中ソルビトール蓄積に対して抑制作用を示すには 200mg/kg/day 以上の用量が必要であると報告しており、今回の成績は用量が充分でなかったことにより、エパルレストットの効果がみられなかったものと考えられる。

坐骨神経中ソルビトール蓄積抑制作用の経時的変化 : 薬物最終投与 3,8,12 および 24 時間後の坐骨神経中ソルビトール蓄積抑制作用の成績を Fig. 12 に示す。各時間の糖

尿病対照群と正常群の坐骨神経中ソルビトール量の平均値の差を坐骨神経中ソルビトール蓄積量とした。糖尿病対照群ではどの時点においても著明な坐骨神経中ソルビトール蓄積が認められた（成績不掲載）。フィダレスタット 1mg/kg/day 投与群では最終投与 3 時間後において約 80% の坐骨神経中ソルビトール蓄積抑制作用が認められた。この抑制作用は減弱することなく 24 時間後まで持続した。ゼナレスタット投与群でも最終投与 3 時間後において約 75% の坐骨神経中ソルビトール蓄積抑制作用がみられたが、時間の経過と共に有意に減弱し、投与 8 時間後および 12 時間後において各々投与 3 時間後の抑制率の約 80% および約 60% に低下した。一方、エパルレスタット投与群では最終投与 3 および 8 時間後のいずれにおいても有意な作用はみられなかった。

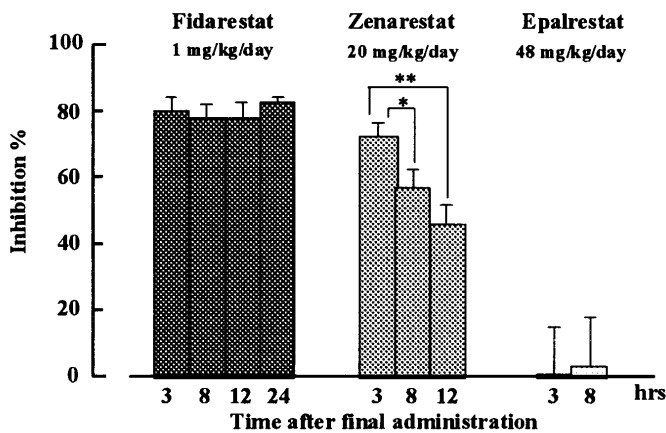


Fig. 12 Serial changes of the suppressive effects of fidarestat, zenarestat and epalrestat on sorbitol accumulation in the sciatic nerves of STZ-induced diabetic rats.

Each value represents the mean \pm SEM of 5 to 6 rats.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with 3-hr inhibition %.

坐骨神経におけるフィダレスタットの消失半減期は約 190 時間とゼナレスタットよりも長いことが明らかとなっている^{56,57}。従って、フィダレスタットはゼナレスタットよりも末梢神経内ポリオール経路の亢進を持続的に抑制した結果、末梢神経の伝導機能障害に対して強力な作用を示したものと考えられた。

5. 長期投与による糖尿病性神経障害に対する効果⁵⁸⁾

これまでに、フィダレスタットは末梢神経におけるポリオール経路の亢進をソルビニルやゼナレスタットよりも低用量で持続的に抑制することを明らかにした。また、末梢神経における長期的なポリオール経路の亢進および関連する代謝障害は組織変化を引き起こすと考えられ³⁹⁾、フィダレスタットには末梢神経病変を抑制する薬剤としての発展の可能性が示唆された。糖尿病による末梢神経の

組織学的変化はソルビニルやゼナレスタット等の AR 阻害剤の長期投与により是正されることが基礎研究および治験から明らかにされている^{38,39,43)}。従って、フィダレスタットについても長期投与による末梢神経病変に対する抑制作用が期待される。

一方、糖尿病性神経障害は原疾患である糖尿病が治癒しない限り発症・進展する。しかし、現状では糖尿病を完治させることは困難であることから、糖尿病性神経障害の治療薬は長期間服用される。

これらのことから、糖尿病ラットにフィダレスタットを糖尿病発症初期から長期間（15 ヶ月）投与し、末梢神経の神経伝導速度測定および病理組織学的評価を行った。また、長期糖尿病における末梢神経内代謝異常に対するフィダレスタットの作用についても併せて検討した。

糖尿病ラットモデル：雄性 SD 系ラットの尾静脈内に STZ を 40mg/kg の割合で注射して糖尿病を誘発した。血糖値を測定して高血糖状態を確認し、STZ 注射 4 日後から 15 ヶ月間フィダレスタットを 1 日 1 回経口投与した。

神経伝導速度の測定：フィダレスタット最終投与 3 時間後に、ペンタバルビタールによる麻酔下、血漿中グルコース濃度測定用として眼静脈採血した後、F 波伝導速度（F-wave conduction velocity; FWCV）、MNCV および SNCV を測定した。FWCV の測定は Wiethölter らの方法⁴⁰⁾に準じ、脛骨神経を用いて行った。即ち、前項で述べたように、脛骨神経を刺激して後肢足裏の表面の筋肉から筋電位の M 波および F 波を 20 回導出した。さらに F 波最小潜時およびそれに対応する M 波潜時を抽出した後、刺激したくぶしから脊髄根部までの脛骨神経の長さを計測した。FWCV の算出は木村らの方法⁵⁹⁾により行った。MNCV および SNCV の測定は尾部神経を用いた。伝導速度測定後、糖化ヘモグロビン測定用として腹部静脈より採血し、糖・糖アルコール量測定および病理組織学的評価の為に各々坐骨神経および腓腹神経を摘出した。

病理組織学的評価：八木橋らの方法⁶⁰⁾を改良し、摘出した腓腹神経を 2.5% グルタルアルデヒド含有 0.05M カコジル酸緩衝固定液 (pH 7.4) に入れ、マイクロウェーブ放射装置を用いて 5 秒間処理した後、4 時間同固定液で固定した。さらに 0.05M カコジル酸緩衝液を用いて神経を洗浄した後、1% 四酸化オスミウムに 3 時間入れて後固定した。ときほぐし線維評価に用いる為に、固定した神経の近位部を 45% グリセリン、66% グリセリン、100% グリセリンに各 6 時間浸した後、各ラット約 100 本の神経線維を無作為に抽出して線維の状態を Dyck の基準⁶¹⁾により分類した。なお、線維の各異常所見は Sima らの定義⁶²⁾により定量的に評価し、異常線維の頻度は評価線維数に対する百分率として表した。遠位部の神経は線維束の横断面評価に用いる為に脱水後、エポン包埋し重合した。さらに準薄切片 (0.5 μ m) を作製した後、1% トレイジンブルー溶液を用

いて染色し、光学顕微鏡観察に供した (Fig. 13A)。測定項目のうち、神経線維、軸索および髄鞘 (Fig. 13B) の測定は線維束を 16 に分割し、8 分画について実施した³⁸⁾。神経線維束、線維数、線維密度を含む全ての測定はカラー画像解析装置を用いて行った (最終倍率 50-1,000 倍)。

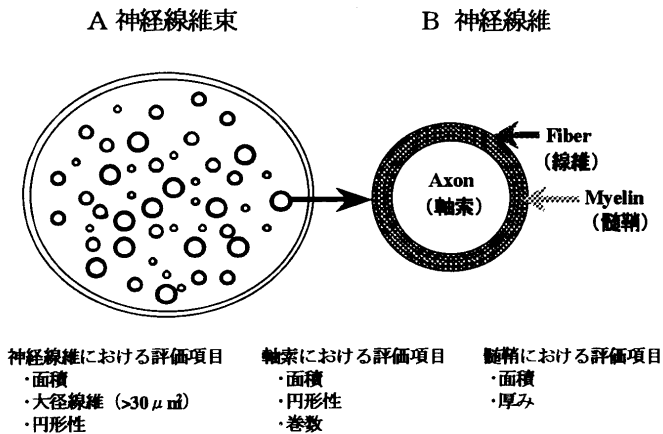


Fig. 13 Cross-sectioned fascicle and myelinated nerve fiber.

また、ウラン酢酸および硝酸鉛により染色された超薄切切片を用い、1 ラット当たり約 50 個の有髄神経線維を無作為に抽出後、電子顕微鏡下有髄神経線維を写真撮影した (最終倍率 10,000-55,000 倍)。さらに写真上の軸索面積および髄鞘の巻数を計測し、軸索萎縮に対する評価を行った。また、シュワン細胞質の軸索内伸張 (axonal sequestration, Fig. 14) を軸索変性として捉え⁶⁰⁾、その頻度を調べた。

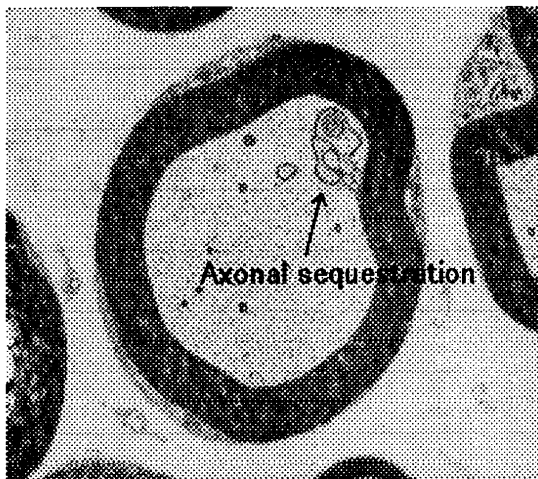


Fig. 14 Axonal sequestration of Schwann cell.

坐骨神経中糖および糖アルコール量、血液中糖化ヘモグロビン値の測定: 坐骨神経中糖および糖アルコール量の測定は Sweeley らの方法²³⁾を改良してクロマトグラフ法により測定した。また、アフィニティークロマトグラフィ⁶³⁾により糖化ヘモグロビン値を測定した。

坐骨神経中糖および糖アルコール量に対する作用: STZ 静注 15 ヶ月後の糖尿病対照群の坐骨神経中ソルビトール量は正常群の約 5 倍に上昇し、ミオイノシトール量は

60%に減少した。これに対してフィダレスタット投与群では 0.5mg/kg/day からソルビトール量を正常化し、糖尿病罹病期間を通して末梢神経内ポリオール経路の亢進を是正することを確認した。また、坐骨神経中ミオイノシトール量の減少に対しても 1mg/kg/day から抑制作用を示し、ミオイノシトール代謝異常も是正することが示唆された。一方、糖尿病対照群では坐骨神経中フルクトース量の著明な増加もみられた。末梢神経中フルクトース量の増加は、糖尿病性神経障害の増悪因子とされる最終糖化産物 (Advanced Glycation End-product; AGE)⁶⁴⁾を多量産生すると考えられている⁶⁵⁾。フィダレスタットは坐骨神経中フルクトース量の増加を用量依存的に抑制したことから、末梢神経内 AGE 量を減少させることが示唆された。

神経伝導機能障害に対する作用: Fig. 15 に示すように、糖尿病対照群の FWCV、MNCV および SNCV は STZ 静注 15 ヶ月後で正常群に比べて有意に低下した。これに対してフィダレスタット投与群では用量依存的な抑制作用がみられ、1mg/kg/day 以上ですべての神経伝導速度の低下に対して有意な効果が認められた。このことからフィダレスタットは長期間の投与によって近位部から遠位部まで運動神経、知覚神経いずれの伝導機能障害に対しても効果を示すことが明らかとなった。

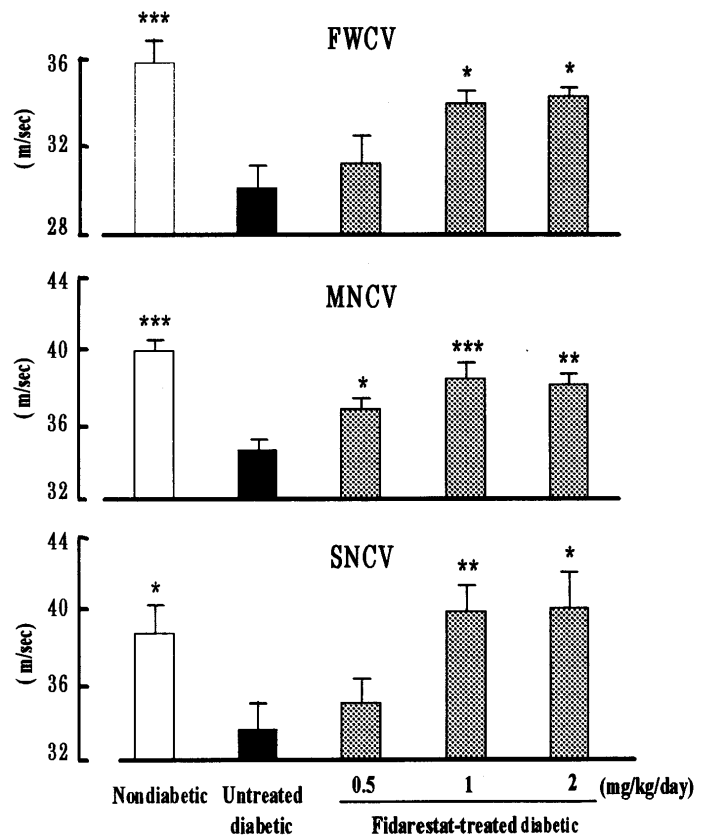


Fig. 15 Effects of fidarestat on the slowing of F-wave conduction velocity, motor nerve conduction velocity and sensory nerve conduction velocity in STZ-induced diabetic rats. Each column and vertical line represents the mean ± SEM of 6 to 9 rats. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. untreated diabetic group.

病理組織学的変化に対する作用：糖尿病状態が長期間持続したラットの末梢神経の伝導機能障害は組織変化に起因することが報告されており³⁸⁾、フィダレスタットの神経伝導機能障害に対する作用は末梢神経の組織学的変化に対する抑制作用に基づくものと考えられた。そこで、フィダレスタット 1mg/kg/day 投与群および 2mg/kg/day 投与群について末梢神経の病理組織学的検討を行った。

1) ときほぐし線維評価：ときほぐし線維の異常所見を Fig. 16 に示す。異常な神経線維の発現頻度は糖尿病対照群で正常群に比べて有意に高かった。特に、ランヴィエ絞輪部近傍の脱鞘所見 (コンディション分類 C) および線維上の脱鞘崩壊 (コンディション分類 E) を示す神経線維の頻度が高く、正常群の 2 倍および 5 倍の増加を示した。これに対してフィダレスタット投与群では 1mg/kg/day の用量からこれらの発現頻度の増加を有意に抑制した。

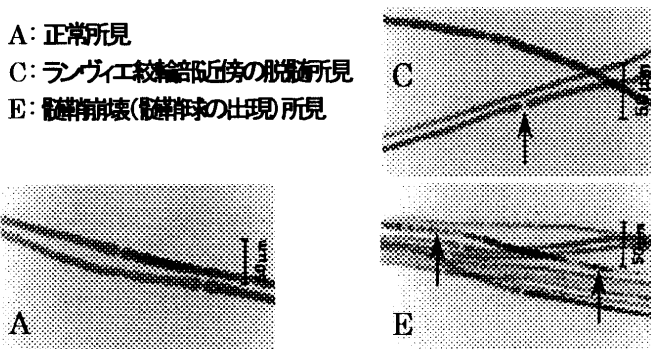


Fig. 16 Typical findings of teased nerve fibers.

脱鞘は刺激のインパルスが跳躍伝導する際に不伝導体としてこれを助ける働きをするが、脱鞘が部分的にでも脱落すると跳躍伝導能が低下して神経の伝導機能障害を生ずる。また、横断面評価により糖尿病対照群で脱鞘厚の減少が認められており、この変化も神経伝導機能障害に関与すると考えられている⁶⁶⁾。フィダレスタットはこの組織変化に対しても 1mg/kg/day から有意な抑制作用を示した。これらのことから、末梢神経の伝導機能障害に対するフィダレスタットの効果は、末梢神経内ポリオール経路の亢進に起因する組織変化を抑制したことによるものと考えられた。

2) 横断面評価：有髄神経の線維面積のヒストグラムから正常群の神経線維は $30 \mu\text{m}^2$ を境に 2 相性となり、神経線維面積 $30 \mu\text{m}^2$ を境に小径線維と大径線維に分けてその割合を調べた結果、Fig. 17 に示すように糖尿病対照群の大径線維の割合は著明に減少した。これに対してフィダレスタット投与群では 1 mg/kg/day から大径線維の減少に対する抑制作用が認められ、2 mg/kg/day でさらに正常群の値に近づいた。

さらに、糖尿病対照群では正常群に比べて神経線維束面積の減少および線維密度の増加、神経線維、軸索および脱鞘の面積の減少、脱鞘厚の減少、神経線維および軸索の円

形性の低下が認められた。これに対しフィダレスタット投与群では 1 mg/kg/day で脱鞘厚の減少が抑制され、線維および軸索の円形性低下が有意に是正された。さらに、2 mg/kg/day 量で線維束面積、線維面積、軸索面積、脱鞘面積の減少および線維密度の増加が有意に抑制された。

これらの成績から、フィダレスタットは神経萎縮に対して抑制作用を示すものと思われた。また、糖尿病対照群では、軸索変性および軸索の円形性の低下が認められたことから、軸索の器質的な変化を生じたものと推測された。これに対しフィダレスタットはこれらの器質的な組織変化を有意に抑制した。末梢神経の構造的、器質的な変化は自覚症状につながると考えられている。従って、フィダレスタットは糖尿病性神経障害患者の自覚症状に対して効果を示すことが期待される。

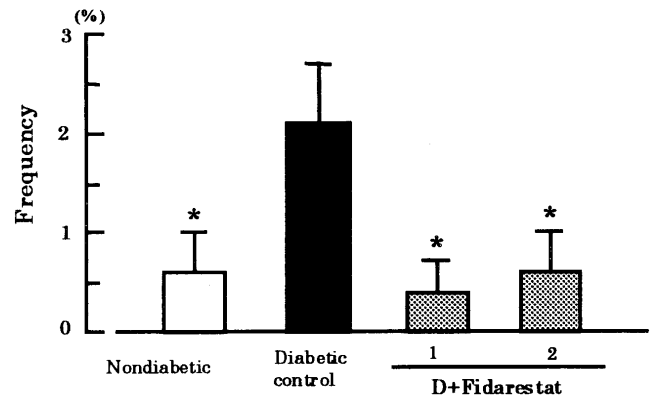


Fig. 17 Effect of fidarestat on the ratio of large fiber in STZ-induced diabetic rats.

D + Fidarestat: Fidarestat-treated diabetic group.

Each column and vertical line represents the mean \pm SEM of 6 to 9 rats. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. diabetic control group.

3) 電顕評価：糖尿病対照群でシュワン細胞質の軸索内伸張を指標とした軸索変性を有する神経線維 (Fig. 14) が高頻度にみられたが、フィダレスタット投与群では 1 mg/kg/day から軸索変性の増加を正常レベルに抑制した (Fig. 18)。

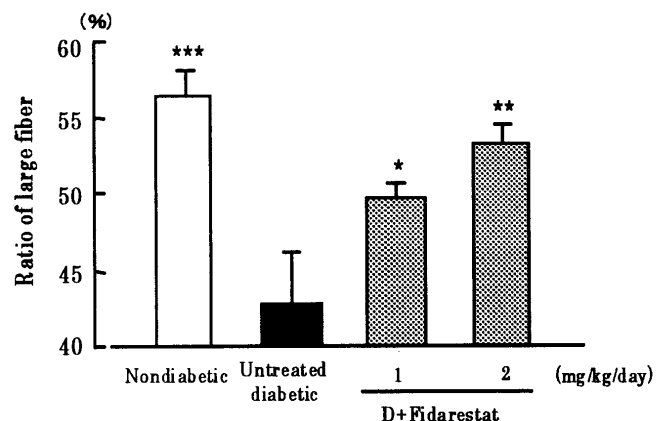


Fig. 18 The frequency of axonal sequestration of myelinated fibers.

Each column and vertical line represents the mean \pm SEM of 6 to 9 rats. * $P < 0.05$ vs. untreated diabetic control.

また、髄鞘の巻数と軸索面積との一次回帰分析の結果から糖尿病対照群で軸索萎縮が認められた。軸索萎縮は糖尿病性神経障害患者にみられる神経線維の脱落に関与していると報告されている⁶⁷⁾。フィダレスタットは2mg/kg/dayで軸索萎縮を完全に抑制したことから、神経線維の脱落を阻止することが期待された。糖尿病性神経障害患者では、神経線維の脱落は足の壊疽や切断につながる感覚鈍麻の原因と考えられており、フィダレスタットのこの作用は臨床的に非常に重要なものと考えられた。

一方、糖尿病では末梢神経の新陳代謝および構造維持に影響を及ぼす神経内血流量や軸索輸送能の低下も認められ、これらの低下にポリオール経路の亢進が関与する^{68,69)}。今後これらの変化に対するフィダレスタットの作用についても検討する必要があるものと思われる。

体重、血糖および糖化ヘモグロビンに対する作用：STZ静注15ヶ月後において、糖尿病対照群の体重は正常群の50%以下であった。また、糖尿病対照群の血糖値および糖化ヘモグロビン値は正常群に比べて3倍前後に上昇した。フィダレスタット投与群の体重、血糖値および糖化ヘモグロビン値は糖尿病対照群との間に差はみられず(成績不掲載)、フィダレスタットは長期間投与しても糖尿病状態に影響を及ぼさないものと考えられた。

6. 結論

フィダレスタットはAR、特にヒトのARを強力かつ選択的に阻害することが明らかとなった。また、AR阻害作用の組織特異性が低いことから、種々の糖尿病合併症に対する有効性が期待された。糖尿病ラットを用いた実験成績から、他のAR阻害剤よりも持続的に末梢神経内ポリオール経路の亢進を抑制し、低用量で神経伝導機能障害に対して強力な改善作用を示すことが明確となった。さらにフィダレスタットの長期間投与は、末梢神経内ポリオール経路の亢進を正常化して末梢神経内代謝異常を長期的に是正し、神経伝導機能障害だけでなく、末梢神経の組織変化を抑制した。従って、フィダレスタットは糖尿病性神経障害に対する有効性を示すと考えられ、糖尿病性神経障害治療薬として発展の可能性のあるものと考えられた。

7. 謝辞

本総説を終えるに際し、終始御指導ならびに御鞭撻を賜り、本総説提出の機会を与えて下さり、さらに有益なる御助言を頂きました岐阜薬科大学薬理学講座永井博式教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究に対して深い御理解と多大の御支援を頂きました株式会社三和化学

研究所 谷本慶二 顧問、寺尾敏 常務、栗谷寿一 取締役、佐藤誠 取締役、鈴木常正 部長、熊谷良洋 室長に深謝申し上げます。

さらに長年、本研究に協力頂いた株式会社三和化学研究所 総合研究所研究員各位に感謝致します。

8. 参考文献

- 1) Diabetes Control and Complications Trial Research Group, *N. Engl. J. Med.* **1993**, *329*, 977.
- 2) UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group, *Lancet* **1998**, *352*, 854.
- 3) Ohkubo, Y.; Kishikawa, H.; Araki, E.; Miyata, T.; Isami, S.; Motoyoshi, S.; Kojima, Y.; Furuyoshi, N.; Shichiri, M., *Diabetes Res. Clin. Pract.* **1998**, *28*, 103.
- 4) Raskin, P.; Rosenstock, J., *Am. J. Med.* **1987**, *83*, 298.
- 5) Kador, P.F.; Robison, W.G. Jr.; Kinoshita, J.H., *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1985**, *25*, 691.
- 6) Nishimura-Yabe, C., *Nippon Yakurigaku Zasshi* **1998**, *111*, 137.
- 7) Kador, P.F. In *Current Concepts of Aldose Reductase and Its Inhibitions*; Sakamoto, N., Kinoshita, J.H., Kador, P.F., Hotta, N., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 1990; pp 73-80.
- 8) Ziegler, D.; Mayer, P.; Rathmann, W.; Gries, F.A., *Diabetes Res. Clin. Pract.* **1991**, *14*, 63.
- 9) Giugliano, D.; Marfella, R.; Quatraro, A.; De Rosa N.; Salvatore, T.; Cozzolino, D.; Ceriello, A.; Torella, R., *Ann. Intern. Med.* **1993**, *118*, 7.
- 10) Hotta, N.; Sakamoto, N., *Nippon Rinsho* **1987**, *45*, 3010.
- 11) Park, Y.H.; Hudson, J.E.; Barker, R.C.; York, B.M.; Brazzell, R.K., *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1991**, *32*, 221.
- 12) Yamaguchi, T.; Miura, K.; Usui, T.; Unno, R.; Matsumoto, Y.; Fukushima, M.; Mizuno, K.; Kondo, Y.; Baba, Y.; Kurono, M., *Arzneimittelforschung* **1994**, *44*, 344.
- 13) Mizuno, K.; Suzuki, T.; Taniko, K.; Tanaka, T.; Suzuki, T., *Biol. Pharm. Bull.* **2000**, *23*, 244.
- 14) von Wartburg, J.P.; Wermuth, B. In *Methods Enzymol.*; Ginsburg, V., Ed.; Academic Press: London, New York, 1982; 89 Part D, pp. 506-513.
- 15) Oka, M.; Matsumoto, Y.; Sugiyama, S.; Tsuruta, N.; Matsushima, M., *J. Med. Chem.*, **2000**, *43*, 2479.
- 16) Mizuno, K.; Kato, N.; Matsubara, A.; Nakano, K.; Kurono, M., *Metabolism* **1992**, *41*, 1081.
- 17) Greene, D.A.; Sima, A.A.; Stevens, M.L.; Feldman, E.L.; Lattimar, S.A., *Diabetes Care* **1992**, *15*, 1902.
- 18) Jaspan, J.; Maselli, R.; Herold, K.; Bartkus, C., *Lancet* **1983**, *2*, 758.
- 19) Jaspan, J.B.; Towle, V.L.; Maselli, R.; Herold, K., *Metabolism* **1986**, *35* (4 suppl 1), 83.
- 20) Wick, A.N.; Drury, D.R., *Am. J. Physiol.* **1951**, *166*, 421.
- 21) Miyoshi, T.; Goto, I., *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* **1973**, *35*, 125.

- 22) Bergmeyer, H.U.; Gruber, W.; Gutmann, I. In *Methods of Enzymatic Analysis*; Bergmeyer, H.U., Ed.; Academic: New York, 1974; pp 1323-1326.
- 23) Sweeley, C.C.; Bentley, R.; Makita, M.; Well, W.W., *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2497.
- 24) Das, P.K.; Bray, G.M.; Aguayo, A.J.; Rasminsky, M., *Exp. Neurol.* **1976**, *53*, 285.
- 25) Goto, I.; Peters, H.A., *J. Neurol. Sci.* **1974**, *22*, 177.
- 26) Sima, A.A.; Hay, K., *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **1981**, *7*, 341.
- 27) Yagihashi, S.; Tonosaki, A.; Yamada, K.; Kakizaki, M.; Goto, Y., *Tohoku J. Exp. Med.* **1982**, *138*, 39.
- 28) Greene, D.A.; Lattimer, S.A., *Diabetes* **1984**, *33*, 712.
- 29) Greene, D.A.; Lattimer, S.A., *Diabetes* **1986**, *35*, 242.
- 30) Greene, D.A., *Metabolism* **1986**, *35 (suppl 1)*, 60.
- 31) Scarpini, E.; Bianchi, R.; Moggio, M.; Sciacco, M.; Fiori, M.G.; Scarlato, G., *J. Neurol. Sci.* **1993**, *120*, 159.
- 32) Mayhew, J.A.; Gillon, K.R.; Hawthorne, J.N., *Diabetologia* **1983**, *24*, 13.
- 33) Clements, R.S. Jr., *Clin. Physiol.* **1985**, *5 (suppl 5)*, 90.
- 34) Greene, D.A., *Drugs* **1986**, *32 (suppl 2)*, 6.
- 35) Clemnts, R.S. Jr.; Bell-Daved, S.H. In *Diagnostic, Pathogenic, and Therapeutic Aspects of Diabetic Neuropathy*; Cohen, M.P., Ed.; Liss: New York, 1982; pp 1-43.
- 36) Holub, B.J., *Adv. Nutr. Res.* **1982**, *4*, 107.
- 37) Sweadner, K.J.; Goldin, S.M., *N. Engl. J. Med.* **1980**, *302*, 777.
- 38) Sima, A.A.; Prashar, A.; Zhang, W.X.; Chakrabarti, S.; Greene, D.A., *J. Clin. Invest.* **1990**, *85*, 1410.
- 39) Sima, A.A.; Bril, V.; Nathaniel, V.; McEwen, T.A.; Brown, M.B.; Lattimer, S.A.; Greene, D.A., *N. Engl. J. Med.* **1988**, *319*, 548.
- 40) Mizuno, K.; Kato, N.; Makino, M.; Suzuki, T.; Shindo, M., *J. Diabet. Comp.* **1999**, *13*, 141.
- 41) Andersen, H.; Stålberg, E.; Falck, B., *Muscle Nerve* **1997**, *20*, 1296.
- 42) Hotta, N.; Sakamoto, N.; Shigeta, Y.; Kikkawa, R.; Goto, Y.; the Diabetic Neuropathy Study Group in Japan, *J. Diabet. Complications* **1996**, *10*, 168.
- 43) Greene, D.A.; Arezzo, J.C.; Brown, M.B., *Neurology* **1999**, *53*, 580.
- 44) Misumi, J., *Kumamoto Med. J.* **1979**, *32*, 1.
- 45) Cavaletti, G.; Minoia, C.; Schieppati, M.; Tredici, G., *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* **1994**, *29*, 771.
- 46) Wiethölter, H.; Hülser, P.J.; Linington, C.; Meier, D.H.; Wessel, K., *J. Neurol. Sci.* **1988**, *83*, 1.
- 47) Panayiotopoulos, C.P.; Scarpalezos, S.; Nastas, P.E., *Muscle Nerve* **1978**, *1*, 181.
- 48) Sobajima, H.; Aoki, T.; Sassa, H.; Suzuki, T.; Taniko, K.; Makino, M.; Mizuno, K.; Suzuki, T. *Pharmacology* **2001**, *62*, 193.
- 49) Tanaka, Y.; Fujiwara, T.; Esumi, Y., *Xenobiotica* **1992**, *22*, 941.
- 50) Yoshida, T.; Nishioka, H.; Yashioka, K.; Nakano, K.; Kondo, M.; Terashima, H., *Diabetes* **1987**, *36*, 6.
- 51) Yasuda, H.; Sonobe, M.; Yamashita, M.; Terada, M.; Hatanaka, I.; Huitian, Z.; Shigeta, Y., *Diabetes* **1989**, *38*, 832.
- 52) Sawada, M.; Terashima, H.; Okegawa, T.; Kawasaki, A. In *Current Concepts of Aldose Reductase and Its Inhibitions*; Sakamoto, N., Kinoshita, J.H., Kador, P.F., Hotta, N., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 1990; pp. 111-118.
- 53) Terashima, H.; Hama, K.; Yamamoto, R.; Tsuboshima, M.; Kikkawa, R.; Hatanaka, I.; Shigeta, Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1983**, *229*, 226.
- 54) Horie, S.; Nagai, H.; Yuuki, T.; Narita, Y.; Tsuda, Y.; Nakajima, T.; Nakamura, N., *J. Diabet. Complications* **1998**, *12*, 163.
- 55) Ao, S.; Shintomi, Y.; Nomura, K.; Kikuchi, C.; Takano, S.; Nozu, K.; Yamaguchi I.; Mukosaka, M., *108th Annu. Meet. Pharm. Soc. Jpn.* **1988**, 4E11 4-4.
- 56) Ao, S.; Shingu, Y.; Kikuchi, C.; Takano, Y.; Nomura, K.; Fujiwara, T.; Ohkubo, Y.; Notsu, Y.; Yamaguchi, I., *Metabolism* **1991**, *40*, 77.
- 57) Mizuno, K.; Yamaguchi, T.; Inoue, A. *et al.* In *Current Concepts of Aldose Reductase and Its Inhibitions*; Sakamoto, N., Kinoshita, J.H., Kador, P.F., Hotta, N., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 1990; pp 89-96.
- 58) Kato, N.; Mizuno, K.; Makino, M.; Suzuki, T.; Yagihashi, S., *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2000**, *50*, 77.
- 59) Kimura, J. In *Peripheral Neuropathy 3rd Edition*; Dyck, P.J. Thomas, P.K., Griffin, J.W., Low, P.A., Poduslo, J.F., Eds.; Saunders: Philadelphia, 1993; pp 618-621.
- 60) Yagihashi, S.; Kamijo, M.; Ido, Y.; Mirrlees, D.J., *Diabetes* **1990**, *39*, 690.
- 61) Dyck, P.J.; Giannini, C.; Lais, A. In *Peripheral Neuropathy 3rd Edition*; Dyck, P.J., Thomas, P.K., Griffin, J.W., Low, P.A., Poduslo, J.F., Eds.; Saunders: Philadelphia, 1993; pp 528-544.
- 62) Sima, A.A.F.; Brown, M.B.; Prashar, A.; Chakrabarti, S.; Laudadio, C.; Greene, D.A., *Diabetologia* **1992**, *35*, 560.
- 63) Abraham, E.C.; Perry, R.E.; Stallings, M., *J. Lab. Clin. Med.* **1983**, *102*, 187.
- 64) Brownlee, M., *Diabetes Care* **1992**, *15*, 1835.
- 65) Suarez, G.; Maturana, J.; Oronsky, A.L.; Raventos-Suarez, C., *Biochim. Biophys. Acta.* **1991**, *1075*, 12.
- 66) Waxman, S.G., *Muscle Nerve* **1980**, *3*, 141.
- 67) Dyck, P.J.; Karnes, J.L.; O'Brien, P.; Okazaki, H.; Lais, A.; Engelstad, J., *Ann. Neurol.* **1986**, *19*, 440.
- 68) Cameron, N.E.; Cotter, M.A., *Diabetes* **1997**, *46 (suppl 2)*, S31.
- 69) Tomlinson, D.R.; Robinson, J.P.; Willars, G.B.; Keen, P., *Diabetes* **1988**, *37*, 488.

* 本総説は岐阜薬科大学博士論文（乙第 257 号）の内容を中心にまとめたものである。