

自然発症糖尿病ラットの網膜電図に関する研究 食餌制限の効果

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/4556

自然発症糖尿病ラットの網膜電図に関する研究

—食餌制限の効果

金沢大学大学院医学系研究科脳医科学専攻光情報伝達学
(旧講座名：眼科学)
(主任：河崎一夫教授)

山 田 陽 久

自然発症インスリン非依存型糖尿病ラット (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty, OLETF) における網膜電図 (electroretinogram, ERG) の経時的变化を、同系であつてかつ糖尿病を発症しないLong-Evans Tokushima Otsuka (LETO) ラットおよび食餌制限下で飼育し血糖値を正常化したOLETFと比較した。また、自由摂食下で飼育し糖尿病発病後長期を経過した55週齢OLETFの体重、血糖値、血清ヘモグロビンA_{1c}値、血清トリグリセリド、総コレステロール、高比重リポ蛋白 (high density lipoprotein, HDL) コレステロール値、網膜ドーパミン、ジヒドロキシフェニル酢酸 (dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC)、ホモバニリン酸 (homovanillic acid, HVA)、ERG所見を同週齢のLETOおよび食餌制限OLETFと比較した。更に、55週齢OLETFにおけるERG所見と、体重および各検査値との相関を調べた。従来の報告に反し、自由摂食 (すなわち高血糖) OLETFではLETOと比較して糖尿病状態にある35週齢以後においてもO₂、O₃、O₄振幅は有意に大きく、網膜ドーパミン、DOPAC含量は有意に高く、OLETFのERG変化には高血糖以外のOLETFに特有な因子が関与していると考えられた。一方、自由摂食OLETFでは食餌制限OLETFと比べ耐糖能障害を来し始める15、20週齢においてO₂頂点潜時は有意に短縮し、35週齢よりO₂およびO₃の頂点潜時延長と振幅低下が認められた。55週齢のOLETFでは血糖値および血清ヘモグロビンA_{1c}値はO₁、O₂およびO₃頂点潜時と正の相関を示した。55週齢のOLETFでは血清総コレステロール、HDLコレステロール値および血清トリグリセリド値はO₁、O₂、O₃およびO₄の頂点潜時と正の相関を示した。自由摂食OLETFではDOPACおよびHVAは食餌制限OLETFに比べ有意に低く、O₁、O₂およびO₃の頂点潜時とDOPACおよびHVAは負の相関を示した。OLETFラットにおける脂質代謝異常および網膜内ドーパミン代謝異常が律動様小波の異常に相関したことは、OLETFラットは高血糖によって網膜の失調を来し、その失調には眼底血管・血流の異常および網膜内神経伝達の異常の少なくとも一方が関与する可能性を示唆する。

Key words diabetes mellitus, electroretinogram, dopamine, retinopathy, caloric restriction

日本において糖尿病の有病者は690万人に達すると推定されている¹⁾。糖尿病の3大合併症の1つである糖尿病網膜症は日本を含む先進国における成人失明の主因となっており、その病態解明、治療法開発は眼科医にとって急務である。

疾患の研究においては疾患のモデル動物があれば極めて有用であるが、形態学的に歴然とした糖尿病網膜症を実験動物に発症させることは至難であり、仮にそれを発症させ得たとしても発症するまでに年余の長期間を要したり飼育に多大な労力を要したりすれば、研究上極めて不都合である。例えば、Kobayashiら²⁾はビーグル犬にガラクトースを過剰に与え続けて糖尿病網膜症類似の形態学的変化を作ることに成功したが、糖尿病網膜症発症までに約2年を要しており、統計処理が可能などの個体数を飼育し続けることは厳しい。

一方、成長が早く飼育も容易なラットのごとき小動物にストレプトゾトシン (streptozotocin, STZ) で糖尿病を惹起したとし

てもSTZ誘発糖尿病ラットには次のような欠点がある。第一に、STZは人工的に膵ランゲルハンス島を破壊してインスリン分泌をなくすため基本的にはインスリン依存型糖尿病モデルと考えられ、糖尿病患者の約95%を占めるインスリン非依存型糖尿病とは病態が異なること、第二に、糖尿病発病早期から著明な体重減少を来し短命であり、慢性的疾患であるヒト糖尿病の進行の過程を正しく反映していない可能性があること、第三に、白内障にもなりやすく長期にわたる眼底の観察および網膜電図 (electroretinogram, ERG) による評価 (後記) が困難であること、第四に、得られた異常所見が糖尿病に起因するのか薬物毒性によるのかの判定が必ずしも容易ではないことである。上記のように、薬物誘発糖尿病モデル動物における種々の問題点を回避するには、自然発症糖尿病モデル動物が必要である。

Otsuka Long-Evans Tokushima Fattyラット (OLETF) は、1989年に開発樹立された自然発症のインスリン非依存型糖尿病

平成13年11月29日受付、平成13年12月28日受理

Abbreviations : AGE, advanced glycation endproduct; CCK, cholecystokinin; DAG, diacylglycerol; DOPA, 3,4-dihydroxyphenylalanine; DOPAC, dihydroxyphenylacetic acid; ERG, electroretinogram; HDL, high density

モデル動物である³⁾。上記の薬物誘発糖尿病モデル動物における種々の問題点を回避でき、また腎などではヒト糖尿病に極めて近い病態の糖尿病合併症を呈することから近年注目を集め、OLETFに関して各分野での研究が現在進められている。OLETFが形態学的糖尿病網膜症を発症することは既に証明されている⁴⁾が、従来ではその証明に病理組織検査という破壊検査が必要であった。破壊検査の最大の欠点は、経過観察や治療効果の判定に膨大な数の母集団が必要とされることである。

それに反し、ERGは網膜機能の非破壊検査であり、かつ当教室で命名されたERG律動様小波 (oscillatory potential, OP)⁵⁾⁶⁾が糖尿病網膜症の最も鋭敏な指標であることは広く承認されるに至っている⁵⁾⁷⁾。したがって、OLETFにおいてERG、特にOPを指標として糖尿病網膜症の発症、進展、治療効果などを判定できれば、ヒト糖尿病網膜症の解明、治療に寄与すること大である。

本研究では検眼鏡的糖尿病網膜症を呈しないとされるOLETFラットにおいて機能的糖尿病網膜症が存在するのかを調べることを目的として経時的にERGを測定し、対照であるLong-Evans Tokushima Otsukaラット (LETO) および食餌制限下で飼育したOLETFと比較した。併せて、OLETFにおけるERG変化の成因を調べるため、ERG変化と糖代謝や脂質代謝に関わる全身的因子や網膜内ドーパミン代謝との関係についても検討した。

材料および方法

I. 実験材料

1. 実験動物

大塚製薬徳島研究所より提供された5週齢のOLETFラット雄とOLETFラットと同系であってかつ糖尿病を発病しないLETOラット雄を金沢大学医学部附属動物実験施設で飼育した。ラットは温度 $22 \pm 3^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、12時間毎の明暗サイクル (8時30分点灯、20時30分消灯) の飼育室で床敷 (イワクラ、苫小牧) を敷いたラット用ケージ (エコノPCケージ、 $35 \times 30 \times 17.5\text{cm}$ 、三基化学工業、川崎) に1~3匹ずつ収容して飼育された。飼料には固形飼料CRF-1 (356 kcal/100g、日本チャールス・リバー、横浜) を用い、水道水を自由に摂取させた。

2. 実験群の構成

自由に摂食させたOLETF、食餌制限をして体重を対照LETOと同程度に抑えたOLETF、および自由に摂食させたLETOの3群を用いた。さらに3群を5週齢から45週齢まで5週毎および55週齢に経時的にERGを測定したグループ1と、経時的なERG測定を行わずに飼育し55週齢にERG測定の後、57週齢に解体し血清トリグリセリド、総コレステロール、高比重リポ蛋白 (high density lipoprotein, HDL) コレステロール値、網膜ドーパミン、ジヒドロキシフェニル酢酸 (dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC)、ホモバニリン酸 (homovanillic acid, HVA) の測定を施行したグループ2に分けた。

II. 実験方法

1. ラットの食餌制限の方法

自由摂食下で飼育した7週齢から45週齢までのOLETF、およびLETOの1日当たり摂食量を測り、約7週齢より自由摂食OLETFが1日当たり摂取する量の70~80%をOLETFに与え、正常対照とされるLETOの体重と同程度の体重となるように食餌量を調節したOLETFを食餌制限OLETFとした。

2. ラットの体重および血糖の測定方法

体重は経時的にERGを測定したグループ1では5週齢から55週齢まで5週毎に、グループ2では7週齢、13週齢、16週齢、20週齢、25週齢、30週齢、34週齢、38週齢、42週齢、46週齢、50週齢、55週齢にYS式ラット自動秤 (KN-663、夏目、東京) にて測定した。血糖値はグループ1において5週齢から55週齢まで5週毎に、グループ2において7週齢、38週齢、55週齢に、無麻酔下で尾の先端を18 G針で少量出血させ小型血糖測定機 (グルテストE II、京都第一科学、京都) を用いて測定した。各群各週齢における測定値は平均値±標準偏差で表わした。群間の有意差検定には対応のないt検定を用い、危険率5%未満を有意差ありと判定した。

3. 経口ブドウ糖負荷試験の方法

経時的にERGを測定したグループ1の30週齢と45週齢において経口ブドウ糖負荷試験を施行した。16時間絶食したラットに体重1 kg当たり2 gのグルコースを経口投与し、0分、30分、60分、120分に無麻酔下で前記の方法で血糖値を測定した。測定値は平均値±標準偏差で表わした。

4. ラットのERG測定方法

ERGはグループ1においては5週齢から45週齢まで5週毎、および55週齢に、グループ2においては55週齢に測定した。

塩酸ケタミン (ケタラル®、三共、東京) 40 mg/kgおよびキシラジン (セラクタール®、日本バイエル、東京) 2.5 mg/kgの腹腔内注射により全身麻酔を施した。ラット右眼を0.5%トロピカミド、塩酸フェニレフリン (ミドリ®P、参天、大阪) 点眼により散瞳した。0.4%塩酸オキシプロコカイン (ペノキシール®、参天) を点眼後、ERG用電極を装着した。ERG用電極には双極コンタクトレンズ電極 (AE型、直径6.8 mm、京都コンタクトレンズ、京都) を使用した。実験室を暗室にし0分、5分、10分後に80 Jキセノン放電管を光源として全視野フラッシュ刺激を行った。導出したERG電位をa波、b波については時定数0.3秒、OPについては時定数3ミリ秒にて生体用前置増幅器 (AB-622M、日本光電、東京) により交流増幅して、16 bitアナログデジタル変換後、パーソナルコンピューター (2168-N61、日本アイ・ビー・エム、東京) のハードディスクに記録し、解析プログラムLabVIEW (日本ナショナルインスツルメンツ、東京) を用いて解析した。

時定数0.3秒にて増幅して得られた波形の基線からa波底までの振幅をa波振幅、a波底よりb波頂点までの振幅をb波振幅とした。刺激開始点よりa波底までの時間をa波頂点潜時、b波頂点までの時間をb波頂点潜時とした (図1A)。OP各波の命名および計測は当教室の方法⁸⁾に準じた。即ち、時定数3ミリ秒で記録したOPを頂点潜時の短い順にO₁、O₂、O₃、およびO₄とした。O₁頂点から、O₁直前、直後の下向きの振れの底を結んだ直線とO₁頂点よりおろした垂線との交点までの振幅をO₁

lipoprotein; HVA, homovanillic acid; LDL, low density lipoprotein; LETO, Long-Evans Tokushima Otsuka; NO, nitric oxide; OLETF Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty; OP, oscillatory potential; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; PKC, protein kinase C; STZ, streptozotocin; TH, tyrosine hydroxylase; VEGF, vascular endothelial growth factor

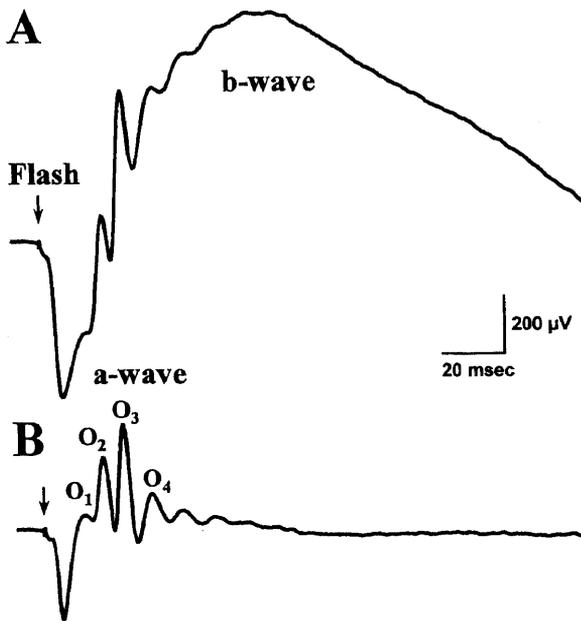


Fig. 1. Typical wave forms of the a-wave, the b-wave (A) and the oscillatory potentials (B) in rat. At each ERG measurement, rats were generally anesthetized with xylazine/ketamine hydrochloride, placed in a full-field dome, dark adapted for 10 min and then stimulated by a single flash from an 80-J xenon discharge lamp. The potentials were picked up by a bipolar contact lens electrode, amplified at a time constant of 0.3 sec (A) or 3 msec (B), and on-line digitized/stored in a personal computer.

振幅とし、 O_2 頂点から、 O_2 直前、直後の下向きの振れの底を結んだ直線と O_2 頂点よりおろした垂線との交点までの振幅を O_2 振幅とした。以下同様に O_3 、 O_4 の振幅を計測した。OP頂点潜時は刺激開始点よりOP各波頂点までの時間とした(図1B)。

群間でのa波、b波およびOP各波の頂点潜時、振幅の比較に際しては、各週齢毎にLETOおよび食餌制限OLETFの平均値を100%とした自由摂食OLETFの相対値を求めその経時の変化で評価した。測定値は平均値±標準偏差で表わした。群間の有意差検定には対応のないt検定を用い、危険率5%未満を有意差ありと判定した。

5. 血清ヘモグロビン A_{1c} 値の測定方法

グループ2の55週齢において血清ヘモグロビン A_{1c} 値を測定した。無麻酔下で尾の先端を18 G針で少量出血させ採取した血液を遠心分離機(KS - 5300C, 久保田, 東京)にて遠心分離(750 g, 5分間)して血清を得た。グリク・アフィン・GHb(生化学工業, 東京)を使用してアフィニティークロマトグラフィーによりヘモグロビン A_{1c} 値を測定した。アミノフェニルボロン酸とヘモグロビン A_{1c} の特異的な可逆的結合を利用し、検体をアフィニティークラムに添加し第一画分溶出液で非グリコヘモグロビンを溶出・採取し、続いてD - ソルビトールを含む第二画分溶出液でグリコヘモグロビンを溶出・採取し、第一画分、第二画分のヘモグロビンの吸光度を415 nmで測定して全ヘモグロビン中のヘモグロビン A_{1c} の比率を%で計算し測定値とした。吸光度の測定には分光光度計(UV - 1200, 島津, 京都)を使用した。測定値は平均値±標準偏差で表わした。群間の有意差検定には対応のないt検定を用い、危険率5%未満を有意差ありと判定した。

6. 網膜の分離および心臓からの採血の方法

グループ2の57週齢において眼球摘出および心臓からの採血を行った。ラットに苦痛を与えぬよう十分な麻酔を施すことを旨とした。塩酸ケタミン40 mg/kgおよびキシラジン2.5 mg/kgの腹腔内注射により全身麻酔を施した。ラット両眼を曲剪刀と挿子を用いて摘出した。摘出された眼球を実体顕微鏡(SMZ - 1B, ニコン, 東京)で観察しながら角膜輪部より約1 mm後方の強膜を全周で切開し網膜を露出, 分離した。一方で剪刀と挿子を用いて開胸し, 18 G針をつけた10 ccシリンジで心臓から採血した。

7. 血清トリグリセリド, 総コレステロール, HDLコレステロール値の測定

グループ2の57週齢において血清トリグリセリド, 総コレステロール, HDLコレステロール値の測定を行った。心臓から採取した血液を遠心分離機(KS - 5300C, 久保田)にて遠心分離(750 g, 5分間)して血清を得た。トリグリセリドは酵素法(遊離グリセロール消去法)にて, 総コレステロールは酵素法にて, HDLコレステロールは選択阻害法(直接法)にて測定した。測定値は平均値±標準偏差で表わした。群間の有意差検定には対応のないt検定を用い, 危険率5%未満を有意差ありと判定した。

8. 網膜ドーパミン, DOPAC, HVAの測定

グループ2の57週齢において網膜ドーパミン, DOPAC, HVAの測定を行った。摘出網膜に300 μ lの蒸留水と内部標準物質としてイソプロテレノール5 ngを加え超音波発生機(UR - 20P, トミー, 東京)にて20秒間細胞を破碎した。そのうち30 μ lを蛋白定量用として分取した後, 残りを蒸留水145 μ l, 1 M過塩素酸50 μ l, 0.5 M EDTA - 4Na 5 μ lを加え, 最終濃度がイソプロテレノール10 ng/ml, 過塩素酸0.1M, EDTA 5 mMとなるようにした。ホモジネートを1分間攪拌し, 遠心分離機(KR - 1500, 久保田)にて遠心分離(12000 g, 20分間, 4°C)した。その上清を0.45 μ mフィルター(ウルトラフリー, 日本ミリポア, 東京)にてろ過し, ろ液100 μ lを逆相カラム(ODS - 80Ts, 直径4.6 mm \times 15 cm, 東ソー, 東京)により分離した。溶解液には38 mM酢酸ナトリウム, 47 mMクエン酸(pH3.5), 1 mM 1 - オクタンスルホン酸ナトリウム, 13 μ M EDTA, 15%メタノールの溶液を用い, 流速1 ml/分, 室温下で行った。検出にはグラッシーカーボン電極を用いた電気化学検出器(EC - 8020, 東ソー)を用いた。標準物質のピークの面積より試料100 μ l中のカテコラミンを定量し, 銅 - フォーリン法により蛋白を定量し, 単位蛋白当たりのカテコラミンの重量を求めた。測定値は平均値±標準偏差で表わした。群間の有意差検定には対応のないt検定を用い, 危険率5%未満を有意差ありと判定した。

9. ERG所見と生化学的所見, 網膜ドーパミンとの相関

グループ1の15, 20, 25, 30および35週齢OLETF(自由摂食, 食餌制限を含む)における O_2 、 O_3 頂点潜時と血糖値, 35週齢OLETF(自由摂食, 食餌制限を含む)における O_2 、 O_3 振幅と血糖値の相互の関係を検討した。また, グループ2の55週齢OLETF(自由摂食, 食餌制限を含む)においてa波, b波, OPの頂点潜時, および振幅と体重, 血糖値, 血清ヘモグロビン A_{1c} 値, 血清脂質(トリグリセリド, 総コレステロール, HDLコレステロール値), および網膜ドーパミン, DOPAC, HVAの相互の関係を検討した。2因子間の相関を調べるに当たって危険

率5%未満を有意な相関があると判定した。

Ⅲ. 統計学的検討

2群間の平均値の比較には、まず比較対象の2群においてF検定を行い、危険率5%未満で2群の分散が等しいとみなされた場合はStudentのt検定を行い、2群の分散が異なるとみなされた場合はWelchのt検定を行った。相関関係については、Pearsonの相関係数を求めて検討した。いずれも危険率5%未満を統計学的に有意と判定した。また特に理由は判らないが著しく値が逸脱した標本は、Smirnovの棄却検定を行い、危険率5%未満で棄却可能とみなされたものはデータから除外した。

成 績

Ⅰ. 体重の変化

経時的にERGを測定したグループ1において、LETOの平均体重は5週齢(111±20g)より55週齢(600±34g)に至るまで増加した。自由摂食下で飼育したOLETFの平均体重も5週齢(132±21g)より55週齢(732±38g)に至るまで増加した。い

ずれの週齢においても自由摂食下で飼育したOLETFはLETOに比して有意に重かった(5週齢 $p<0.05$, 10週齢から55週齢 $p<0.01$)。また、いずれの週齢においても自由摂食下で飼育したOLETFは食餌制限を行ったOLETFに比して有意に重かった(10週齢から55週齢 $p<0.01$) (図2A)。

グループ2では、LETOの平均体重は7週齢(194±8g)より55週齢(615±33g)に至るまで増加したが、自由摂食下で飼育したOLETFの平均体重は7週齢(237±20g)より30週齢(708±15g)までは増加して、その後糖尿病状態の進行とともに減少傾向を示したので、7週齢から46週齢において自由摂食下で飼育したOLETFはLETOに比して有意に重かった($p<0.01$)が、50週齢以降では両群間に有意差がなくなった。また、いずれの週齢においても自由摂食下で飼育したOLETFは食餌制限を行ったOLETFに比して有意に重かった(13週齢から46週齢および55週齢 $p<0.01$, 50週齢 $p<0.05$) (図2B)。

Ⅱ. 血糖値の変化

経時的にERGを測定したグループ1において、各週齢毎の平

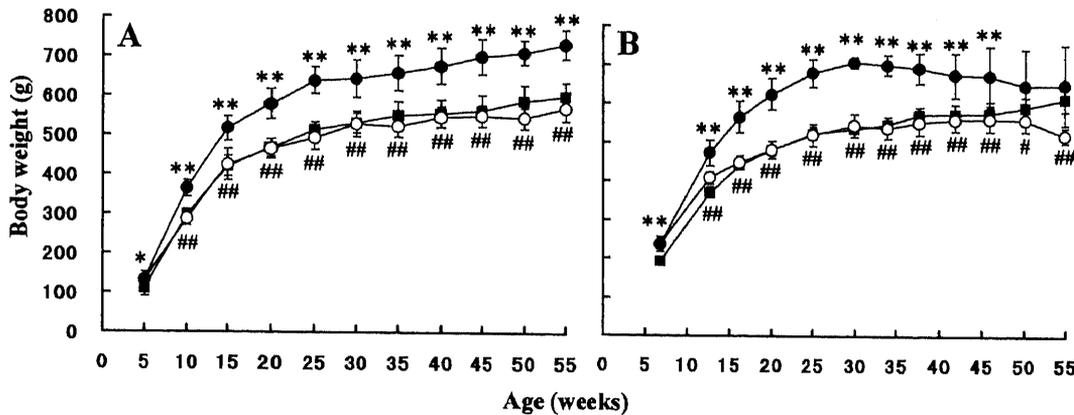


Fig. 2. Body weight of the well-fed OLETF, the diet OLETF, and the LETO rats. A, group 1; B, group 2; see below. Body weights were measured at 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, and 55 weeks of age in group 1; at 7, 13, 16, 20, 25, 30, 34, 38, 42, 46, 50, and 55 weeks of age in group 2. ●, well-fed OLETF rats (in group 1, n=14, 10, 13, 21, 15, 21, 21, 22, 9, 4, and 6, respectively; in group 2, n=9 at all weeks of age); ○, diet OLETF rats (in group 1, n=13, 13, 26, 23, 27, 24, 20, 16, 5, and 7, respectively; in group 2, n=10 at all weeks of age); ■, LETO rats (in group 1, n=14, 13, 14, 19, 15, 15, 15, 15, 10, 5, and 4, respectively; in group 2, n=11 at all weeks of age). * $p<0.05$; ** $p<0.01$. Unpaired t-test showed the differences between well-fed OLETF and LETO rats to be significant. # $p<0.05$; ## $p<0.01$. Unpaired t-test showed the differences between well-fed OLETF rats and diet OLETF rats to be significant.

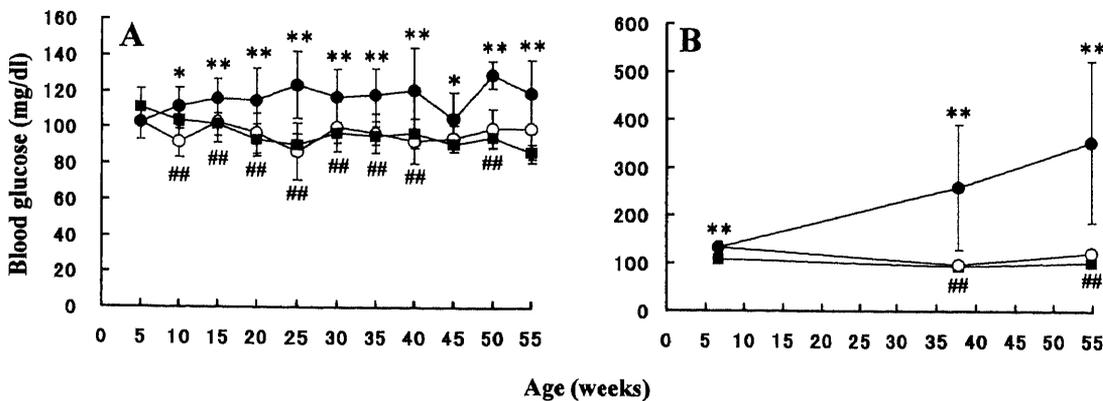


Fig. 3. Blood glucose of the well-fed OLETF, the diet OLETF, and the LETO rats. Some experiments were repeated using 2 groups of rats, group 1 (A) and group 2 (B). Blood glucose levels were measured at 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, and 55 weeks of age, in group 1; at 7, 38, and 55 weeks of age, in group 2. ●, well-fed OLETF rats (in group 1, n=8, 10, 13, 21, 15, 21, 21, 22, 9, 4, and 6, respectively; in group 2, n=9 at all weeks of age); ○, diet OLETF rats (in group 1, n=13, 13, 26, 23, 27, 24, 20, 16, 5, and 7, respectively; in group 2, n=10 at all weeks of age); ■, LETO rats (in group 1, n=9, 13, 14, 19, 15, 15, 15, 15, 10, 5, and 4, respectively; in group 2, n=11 at all weeks of age). * $p<0.05$; ** $p<0.01$. Unpaired t-test showed the differences between well-fed OLETF and LETO rats to be significant. # $p<0.05$; ## $p<0.01$. Unpaired t-test showed the differences between well-fed OLETF rats and diet OLETF rats to be significant.

均血糖値は自由摂食下で飼育したOLETFでは最小 103 ± 10 mg/dl (5週齢), 最大 130 ± 8 mg/dl (50週齢), LETOでは最小 87 ± 4 mg/dl (55週齢), 最大 111 ± 10 mg/dl (5週齢), 食餌制限を行ったOLETFでは最小 87 ± 16 mg/dl (25週齢), 最大 103 ± 11 mg/dl (15週齢)であった。10週齢以降自由摂食下で飼育したOLETFではLETOに比して血糖値は有意に高かった (10週齢および45週齢 $p < 0.05$, 15週齢から40週齢, 50週齢および55週齢 $p < 0.01$)。45週齢, 55週齢を除いて自由摂食下で飼育したOLETFでは食餌制限を行ったOLETFに比して血糖値は有意に高かった (10週齢から40週齢および50週齢 $p < 0.01$) (図3A)。

自由摂食下で飼育したOLETFの平均血糖値は, グループ2においては経時的にERGを測定したグループ1に比べ, 38週齢で 260 ± 131 mg/dl, 55週齢で 355 ± 168 mg/dlと高値を示した。平均血糖値はLETOでは7週齢で 110 ± 9 mg/dl, 38週齢で 94 ± 7 mg/dl, 55週齢で 102 ± 6 mg/dl, 食餌制限を行ったOLETFでは38週齢で 98 ± 9 mg/dl, 55週齢で 123 ± 8 mg/dlであった。自由摂食下で飼育したOLETFは, 7週齢, 38週齢, 55週齢のいずれの週齢においても, LETOに比して有意に血糖値が高く ($p < 0.01$), 食餌制限開始後の38週齢, 55週齢では食餌制限を行ったOLETFに比して有意に血糖値が高かった ($p < 0.01$) (図3B)。

Ⅲ. 経口ブドウ糖負荷試験

経時的にERGを測定したグループ1の30週齢において, 平均血糖値はLETOでは負荷前で 86 ± 6 mg/dl, 最高値で 152 ± 21 mg/dl, 自由摂食下で飼育したOLETFでは負荷前で 98 ± 12 mg/dl, 最高値で 242 ± 61 mg/dl, 食餌制限を行ったOLETFでは負荷前で 89 ± 2 mg/dl, 最高値で 187 ± 31 mg/dlであった (図4A)。45週齢においては, LETOでは負荷前で 98 ± 3 mg/dl, 最高値で 117 ± 13 mg/dl, 自由摂食下で飼育したOLETFでは負荷前で 96 ± 6 mg/dl, 最高値で 242 ± 24 mg/dl, 食餌制限を行ったOLETFでは負荷前で 95 ± 17 mg/dl, 最高値で 159 ± 32 mg/dlであった (図4B)。いずれの週齢でも自由摂食下で飼育したOLETFでは最高値が240 mg/dlを超えており, 耐糖能障害を来したのに対し, 食餌制限を行ったOLETFでは最高値が190 mg/dl未満にとどまり, 耐糖能障害がより軽度であった。

Ⅳ. LETOと自由摂食下で飼育したOLETFとの比較

1. LETOの平均値を100%とした自由摂食OLETFのERG相対値の経時変化

1) a波

頂点潜時は15週齢 ($103.0 \pm 2.8\%$), 20週齢 ($102.0 \pm 2.8\%$), 35週齢 ($101.9 \pm 2.2\%$), 40週齢 ($104.4 \pm 2.6\%$) および45週齢 ($103.8 \pm 2.6\%$) において自由摂食OLETFではLETOに比べ有意に長かった (15週齢, 20週齢および35週齢 $p < 0.05$, 40週齢

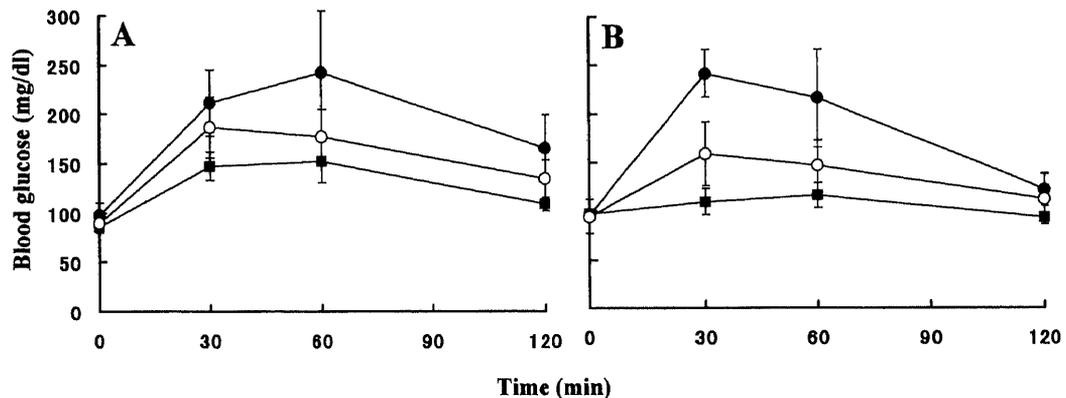


Fig. 4. Glucose tolerance test in the well-fed OLETF, the diet OLETF, and the LETO rats in group 1 at 30 (A) and 45 (B) weeks of age. Blood samples from the tail were obtained at 0, 30, 60, and 120 min after oral administration of 2 g/kg of body weight of glucose. ●, well-fed OLETF rats ($n=16$ in A, $n=5$ in B); ○, diet OLETF rats ($n=5$ in A, $n=11$ in B); ■, LETO rats ($n=5$ in A, $n=6$ in B).

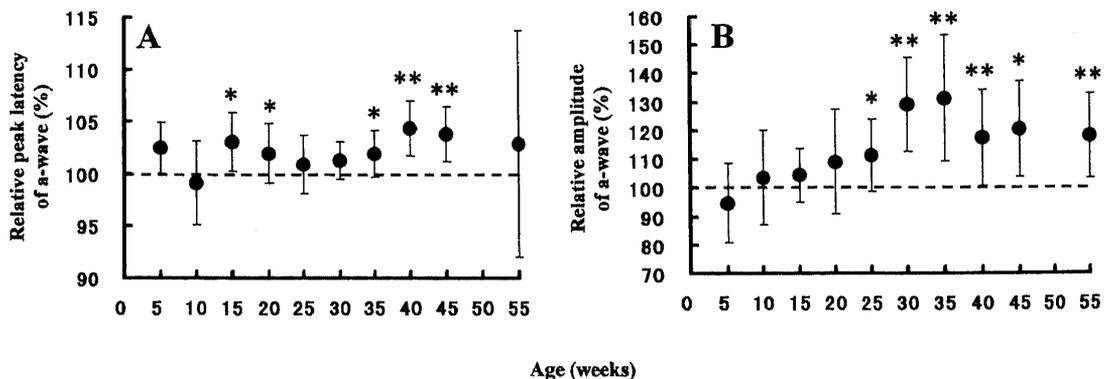


Fig. 5. Chronological changes of the percent peak latency (A) and the percent amplitude (B) of the a-wave of the well-fed OLETF rats to those of the LETO rats. ERG measurements were performed at 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, and 55 weeks of age (well-fed OLETF rats, $n=8, 10, 13, 21, 15, 21, 21, 22, 9$, and 15 , respectively; LETO rats, $n=9, 13, 14, 19, 15, 15, 15, 10$, and 15 , respectively). Ordinate, percent peak latency (A) and percent amplitude (B) of the well-fed OLETF rats to those of the LETO rats at the same age; abscissa, age in weeks. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

$p < 0.001$, 45週齢 $p < 0.01$) (図5A).

振幅は自由摂食OLETFではLETOに比べ、25週齢以降 (25週齢 $111.4 \pm 12.5\%$, 30週齢 $129.3 \pm 16.5\%$, 35週齢 $131.4 \pm 22.2\%$, 40週齢 $117.6 \pm 16.9\%$, 45週齢 $120.5 \pm 16.8\%$, 55週齢 $118.3 \pm 14.7\%$), 有意に大きかった (25週齢および45週齢 $p < 0.05$, 30週齢および35週齢 $p < 0.0001$, 40週齢および55週齢 $p < 0.01$) (図5B).

2) b波

頂点潜時は10週齢から40週齢 (10週齢 $90.2 \pm 5.5\%$, 15週齢 $94.4 \pm 4.9\%$, 20週齢 $89.4 \pm 4.9\%$, 25週齢 $88.3 \pm 4.5\%$, 30週齢 $91.2 \pm 4.2\%$, 35週齢 $91.3 \pm 5.0\%$, 40週齢 $93.9 \pm 3.0\%$) において自由摂食OLETFではLETOに比べ有意に短かった (10週齢および40週齢 $p < 0.01$, 15週齢 $p < 0.05$, 20週齢から35週齢 $p < 0.001$) が, 糖尿病状態の進行とともに延長し45週齢以降では両群間に有意差がなくなった (図6A).

振幅は自由摂食OLETFではLETOに比べ、15週齢以降 (15週齢 $116.8 \pm 11.7\%$, 20週齢 $125.3 \pm 19.4\%$, 25週齢 $135.1 \pm 14.1\%$, 30週齢 $155.4 \pm 19.1\%$, 35週齢 $156.4 \pm 29.0\%$, 40週齢 $144.4 \pm$

18.3% , 45週齢 $151.2 \pm 21.5\%$, 55週齢 $147.7 \pm 21.7\%$), 有意に大きかった (15週齢 $p < 0.05$, 20週齢から45週齢および55週齢 $p < 0.0001$) (図6B).

3) OP

O_1 頂点潜時は40週齢以降 (40週齢 $102.7 \pm 3.2\%$, 45週齢 $103.1 \pm 2.4\%$, 55週齢 $103.8 \pm 5.2\%$), 自由摂食OLETFではLETOに比べ有意に延長した ($p < 0.05$) (図7A). O_1 振幅は5週齢 ($80.3 \pm 27.5\%$) および20週齢 ($81.7 \pm 23.8\%$) で有意に小さかった ($p < 0.05$) が, その他の週齢で両群間に有意差はなかった (図7B).

O_2 頂点潜時は自由摂食OLETFではLETOに比べ35週齢以降 (35週齢 $102.1 \pm 2.5\%$, 40週齢 $103.7 \pm 2.4\%$, 45週齢 $104.5 \pm 3.6\%$, 55週齢 $104.8 \pm 5.2\%$), 糖尿病状態の進行とともに有意に延長した (35週齢, 45週齢および55週齢 $p < 0.01$, 40週齢 $p = 0.0001$) (図8A). O_2 振幅は5週齢 ($71.7 \pm 38.0\%$) で有意に小さく ($p < 0.05$), 15週齢 ($116.6 \pm 19.5\%$), 25週齢から35週齢 (25週齢 $119.9 \pm 19.3\%$, 30週齢 $123.8 \pm 18.8\%$, 35週齢 $122.4 \pm 23.5\%$) および55週齢 ($123.5 \pm 29.3\%$) で有意に大きかった (15週齢, 25週齢および

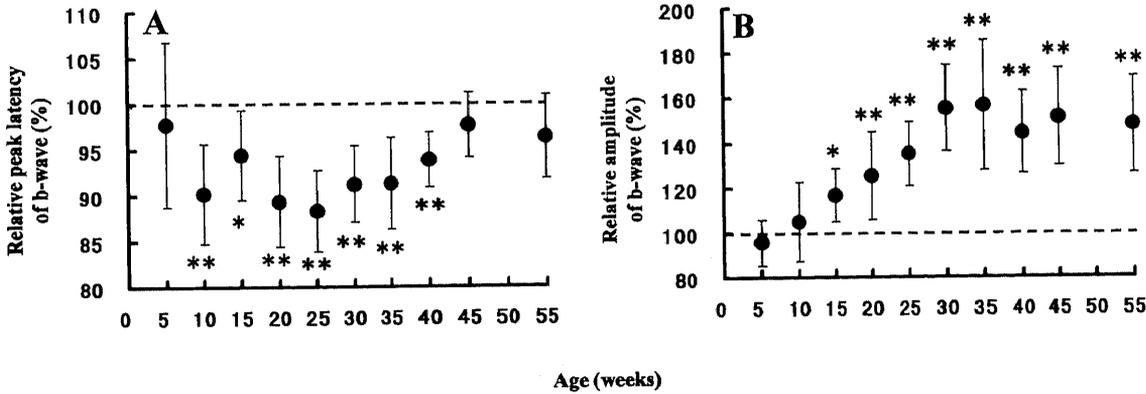


Fig. 6. Chronological changes of the percent peak latency (A) and the percent amplitude (B) of the b-wave of the well-fed OLETF rats to those of the LETO rats. ERG measurements were performed at 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, and 55 weeks of age (well-fed OLETF rats, $n=8, 10, 13, 21, 15, 21, 21, 22, 9$, and 15 , respectively; LETO rats, $n=9, 13, 14, 19, 15, 15, 15, 15, 10$, and 15 , respectively). Ordinate, percent peak latency (A) and percent amplitude (B) of the well-fed OLETF rats to those of the LETO rats at the same age; abscissa, age in weeks. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

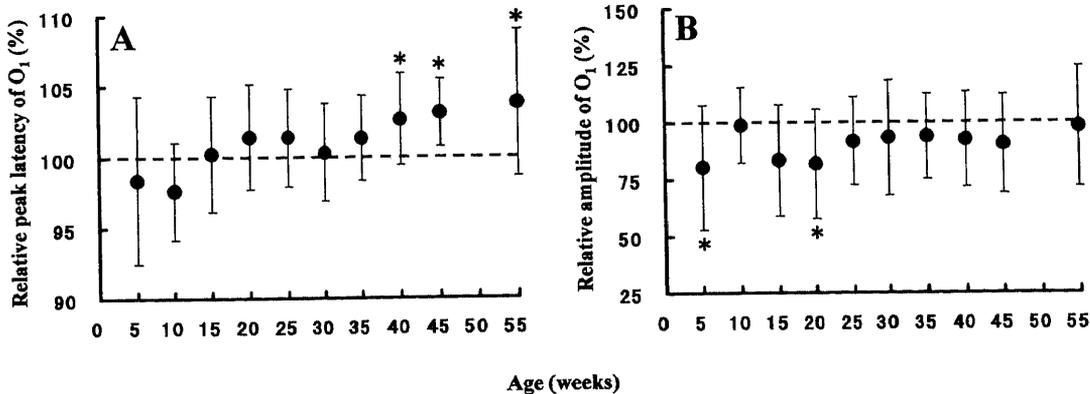


Fig. 7. Chronological changes of the percent peak latency (A) and the percent amplitude (B) of the O_1 of the well-fed OLETF rats to those of the LETO rats. ERG measurements were performed at 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, and 55 weeks of age (well-fed OLETF rats, $n=14, 10, 13, 21, 15, 21, 21, 22, 9$, and 15 , respectively; LETO rats, $n=14, 13, 14, 19, 15, 15, 15, 15, 10$, and 15 , respectively). Ordinate, percent peak latency (A) and percent amplitude (B) of the well-fed OLETF rats to those of the LETO rats at the same age; abscissa, age in weeks. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

び55週齢 $p<0.05$, 30週齢 $p<0.001$, 35週齢 $p<0.01$) (図8B).

O_3 頂点潜時は30週齢以降 (30週齢 $101.8 \pm 2.6\%$, 35週齢 $102.7 \pm 2.4\%$, 40週齢 $104.6 \pm 2.4\%$, 45週齢 $105.0 \pm 3.4\%$, 55週齢 $106.5 \pm 5.9\%$), 糖尿病状態の進行とともに自由摂食OLETFではLETOに比べ有意に延長した (30週齢 $p<0.05$, 35週齢および40週齢 $p<0.001$, 45週齢 $p<0.01$, 55週齢 $p=0.001$) (図9A). O_3 振幅は自由摂食OLETFでは10週齢以降 (10週齢 $133.5 \pm 21.6\%$, 15週齢 $149.7 \pm 27.4\%$, 20週齢 $142.2 \pm 31.3\%$, 25週齢 $164.1 \pm 24.7\%$, 30週齢 $170.0 \pm 25.2\%$, 35週齢 $157.7 \pm 34.5\%$, 40週齢 $136.9 \pm 24.9\%$, 45週齢 $164.5 \pm 49.6\%$, 55週齢 $166.7 \pm 33.2\%$), 有意に大きかった (10週齢および45週齢 $p<0.01$, 15週齢から40週齢および55週齢 $p<0.0001$) (図9B).

O_4 頂点潜時は10週齢から35週齢 (10週齢 $96.3 \pm 3.5\%$, 15週齢 $97.1 \pm 3.2\%$, 20週齢 $97.3 \pm 3.7\%$, 25週齢 $96.1 \pm 2.7\%$, 30週齢 $97.0 \pm 3.2\%$, 35週齢 $98.1 \pm 2.7\%$) において, 自由摂食OLETFではLETOに比べ有意に短かった (10週齢から20週齢および35週齢 $p<0.05$, 25週齢 $p=0.0001$, 30週齢 $p<0.01$) が, 糖尿病状態の進行とともに延長し40週齢以降においては両群間に有意差がなくなった (図10A). O_4 振幅は自由摂食OLETFでは10週齢

以降 (10週齢 $142.1 \pm 26.1\%$, 15週齢 $188.2 \pm 38.9\%$, 20週齢 $178.6 \pm 42.9\%$, 25週齢 $192.0 \pm 32.5\%$, 30週齢 $211.4 \pm 41.0\%$, 35週齢 $180.3 \pm 56.9\%$, 40週齢 $178.4 \pm 37.9\%$, 45週齢 $205.2 \pm 56.4\%$, 55週齢 $204.3 \pm 41.8\%$), 有意に大きかった ($p<0.0001$) (図10B).

2. グループ2の55週齢におけるLETOと自由摂食下で飼育したOLETFとの比較

1) 体重

体重は自由摂食OLETF ($652 \pm 104g$) とLETO ($615 \pm 33g$) との間で有意差を示さなかった (図11A).

2) 血糖値

血糖値は自由摂食OLETF ($355 \pm 169 mg/dl$) ではLETO ($102 \pm 6 mg/dl$) に比べ有意に高かった ($p=0.0021$) (図11B).

3) 血清ヘモグロビン A_{1c} 値

血清ヘモグロビン A_{1c} 値は自由摂食OLETF ($14.37 \pm 5.57\%$) ではLETO ($6.65 \pm 0.75\%$) に比べ有意に高かった ($p=0.0033$) (図11C).

4) 血清トリグリセリド, 総コレステロール, HDLコレステロール値

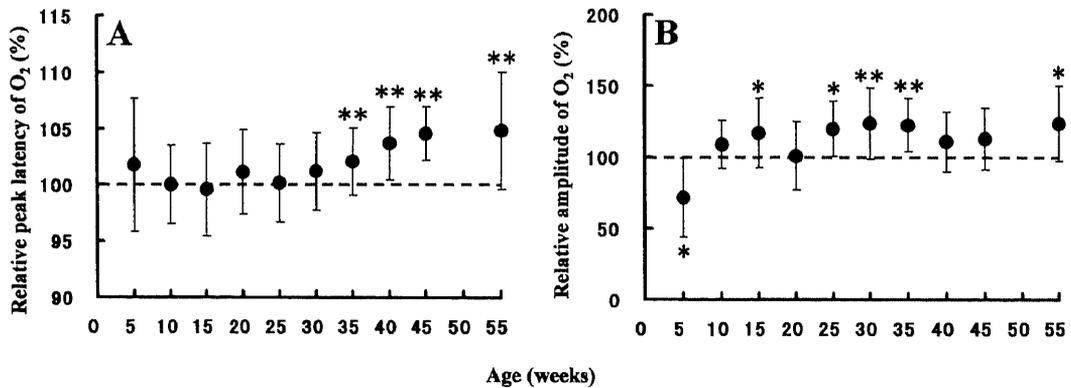


Fig. 8. Chronological changes of the percent peak latency (A) and the percent amplitude (B) of the O_2 of the well-fed OLETF rats to those of the LETO rats. ERG measurements were performed at 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, and 55 weeks of age (well-fed OLETF rats, $n=14, 10, 13, 21, 15, 21, 15, 21, 22, 9$, and 15 , respectively; LETO rats, $n=14, 13, 14, 19, 15, 15, 15, 15, 10$, and 15 , respectively). Ordinate, percent peak latency (A) and percent amplitude (B) of the well-fed OLETF rats to those of the LETO rats at the same age; abscissa, age in weeks. * $p<0.05$; ** $p<0.01$.

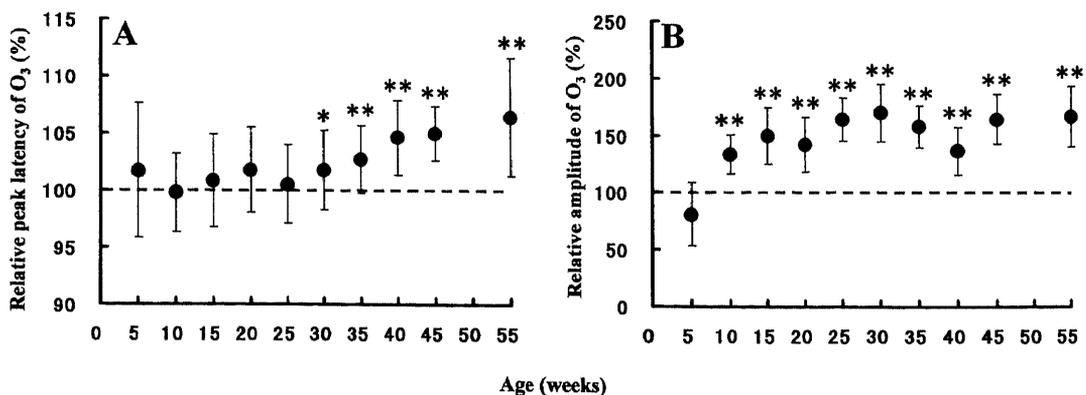


Fig. 9. Chronological changes of the percent peak latency (A) and the percent amplitude (B) of the O_3 of the well-fed OLETF rats to those of the LETO rats. ERG measurements were performed at 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, and 55 weeks of age (well-fed OLETF rats, $n=14, 10, 13, 21, 15, 21, 15, 21, 22, 9$, and 15 , respectively; LETO rats, $n=14, 13, 14, 19, 15, 15, 15, 15, 10$, and 15 , respectively). Ordinate, percent peak latency (A) and percent amplitude (B) of the well-fed OLETF rats to those of the LETO rats at the same age; abscissa, age in weeks. * $p<0.05$; ** $p<0.01$.

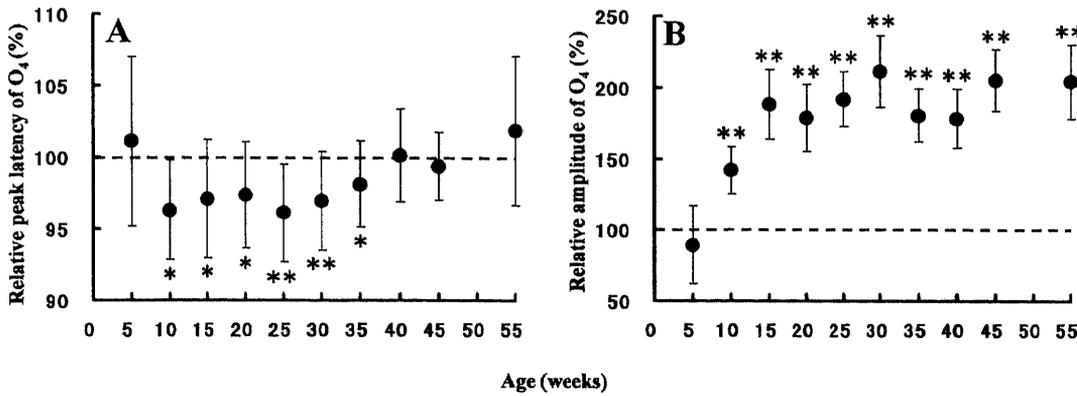


Fig. 10. Chronological changes of the percent peak latency (A) and the percent amplitude (B) of the O₁ of the well-fed OLETF rats to those of the LETO rats. ERG measurements were performed at 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, and 55 weeks of age (well-fed OLETF rats, n=14, 10, 13, 21, 15, 21, 21, 22, 9, and 15, respectively; LETO rats, n=14, 13, 14, 19, 15, 15, 15, 15, 10, and 15, respectively). Ordinate, percent peak latency (A) and percent amplitude (B) of the well-fed OLETF rats to those of the LETO rats at the same age; abscissa, age in weeks. *p<0.05; **p<0.01.

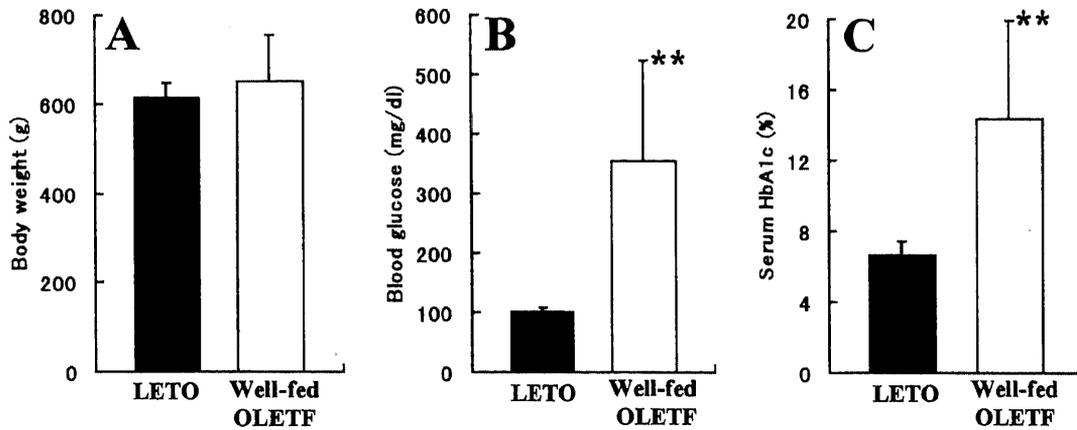


Fig. 11. Comparison of body weight (A), blood glucose (B) and serum HbA1c (C) between the LETO and well-fed OLETF rats at 55 weeks of age. Filled columns, LETO rats; open columns, well-fed OLETF rats. *p<0.05; **p<0.01.

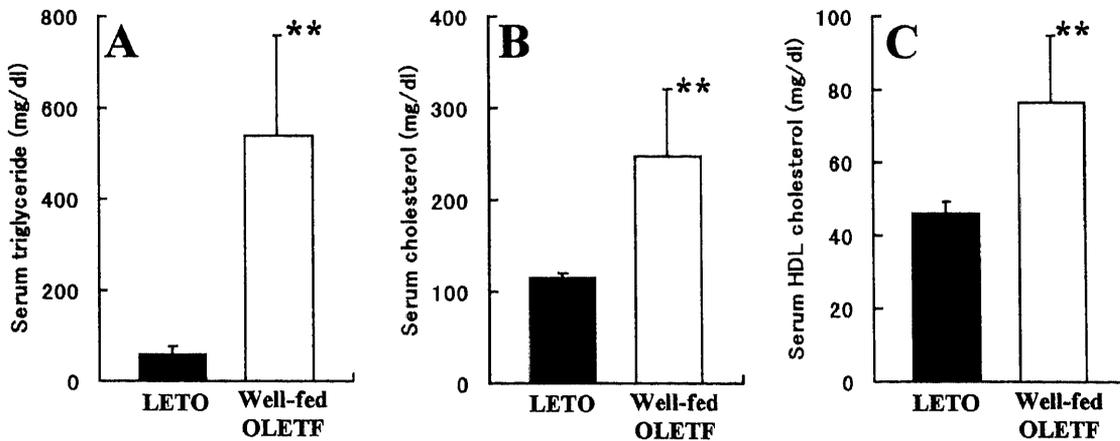


Fig. 12. Comparison of serum triglyceride (A), total cholesterol (B) and HDL cholesterol (C) levels between the LETO and well-fed OLETF rats at 55 weeks of age. Filled columns, LETO rats; open columns, well-fed OLETF rats. *p<0.05; **p<0.01.

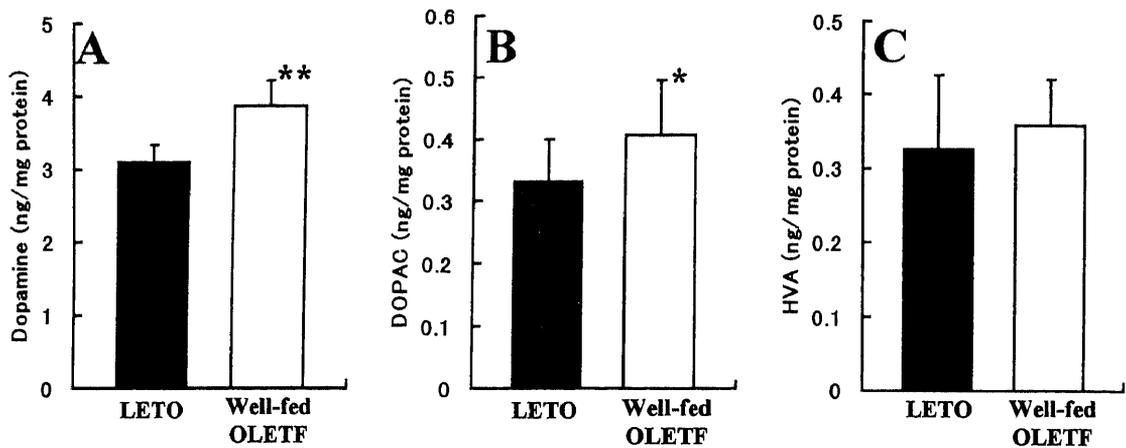


Fig. 13. Comparison of retinal dopamine (A), DOPAC (B) and HVA (C) contents between the LETO and well-fed OLETF rats at 55 weeks of age. Filled columns, LETO rats; open columns, well-fed OLETF rats. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

血清トリグリセリドは自由摂食 OLETF (538.5 ± 218.9 mg/dl) では LETO (59.5 ± 17.2 mg/dl) に比べ有意に高かった ($p = 0.0005$) (図 12A)。血清総コレステロールは自由摂食 OLETF (247.1 ± 74.2 mg/dl) では LETO (115.0 ± 4.3 mg/dl) に比べ有意に高かった ($p = 0.0015$) (図 12B)。血清 HDL コレステロールは自由摂食 OLETF (76.5 ± 18.1 mg/dl) では LETO (46.2 ± 3.1 mg/dl) に比べ有意に高かった ($p = 0.0022$) (図 12C)。

5) 網膜ドーパミン, DOPAC, HVA

網膜ドーパミンは自由摂食 OLETF (3.866 ± 0.353 ng/mg 蛋白) では LETO (3.102 ± 0.229 ng/mg 蛋白) に比べ有意に高かった ($p < 0.0001$) (図 13A)。網膜 DOPAC は自由摂食 OLETF (0.407 ± 0.088 ng/mg 蛋白) では LETO (0.332 ± 0.067 ng/mg 蛋白) に比べ有意に高かった ($p = 0.045$) (図 13B)。網膜 HVA は自由摂食 OLETF (0.358 ± 0.063 ng/mg 蛋白) と LETO (0.325 ± 0.101 ng/mg 蛋白) との間で有意差を示さなかった (図 13C)。

6) ERG 所見

a 波頂点潜時は自由摂食 OLETF (6.71 ± 0.94 ミリ秒) と LETO (6.56 ± 0.88 ミリ秒) との間で有意差を示さなかったが (図 14A), a 波振幅は自由摂食 OLETF (363.3 ± 43.4 μ V) では LETO (298.6 ± 41.8 μ V) に比べ有意に大きかった ($p = 0.0033$) (図 14B)。

b 波頂点潜時は自由摂食 OLETF (63.3 ± 3.5 ミリ秒) と LETO (64.8 ± 5.9 ミリ秒) との間で有意差を示さなかったが (図 14C), b 波振幅は自由摂食 OLETF (814.9 ± 115.6 μ V) では LETO (544.2 ± 93.4 μ V) に比べ有意に大きかった ($p < 0.0001$) (図 14D)。

O_1 頂点潜時は自由摂食 OLETF で 12.7 ± 0.8 ミリ秒, LETO では 12.2 ± 0.7 ミリ秒 (図 14E), O_1 振幅は自由摂食 OLETF では 29.4 ± 5.0 μ V, LETO では 26.7 ± 6.2 μ V でいずれも両群間に有意差はなかった (図 14F)。

O_2 頂点潜時は自由摂食 OLETF (18.8 ± 1.0 ミリ秒) では LETO (17.6 ± 0.7 ミリ秒) に比べ有意に延長していた ($p = 0.0064$) (図 14G)。 O_2 振幅は自由摂食 OLETF (176.9 ± 32.3 μ V) では LETO (127.2 ± 27.1 μ V) に比べ有意に大きかった ($p = 0.0064$) (図 14H)。

O_3 頂点潜時は自由摂食 OLETF (25.5 ± 1.6 ミリ秒) では LETO (23.6 ± 0.7 ミリ秒) の比で有意に延長していた ($p = 0.0086$) (図 14I)。 O_3 振幅は自由摂食 OLETF (321.0 ± 55.8 μ V) では LETO (176.9 ± 54.5 μ V) に比べ有意に大きかった ($p < 0.0001$) (図 14J)。

O_4 頂点潜時は自由摂食 OLETF (34.4 ± 2.6 ミリ秒) と LETO (32.9 ± 1.4 ミリ秒) との間で有意差はなかった (図 14K)。 O_4 振幅は自由摂食 OLETF (142.7 ± 34.0 μ V) では LETO (69.7 ± 19.6 μ V) に比べ有意に大きかった ($p < 0.0001$) (図 14L)。

V. 食餌制限 OLETF と自由摂食下で飼育した OLETF との比較

1. 食餌制限 OLETF の平均値を 100% とした自由摂食 OLETF の ERG 相対値の経時的変化

1) a 波

頂点潜時は自由摂食 OLETF では食餌制限 OLETF に比べ 30 週齢 ($97.8 \pm 1.8\%$) において有意に短く ($p < 0.01$), 40 週齢以降 (40 週齢 $102.3 \pm 2.5\%$, 45 週齢 $102.8 \pm 2.4\%$, 55 週齢 $107.4 \pm 12.1\%$), 糖尿病状態の進行とともに有意に延長した (40 週齢および 45 週齢 $p < 0.01$, 55 週齢 $p < 0.05$) (図 15A)。

振幅は自由摂食 OLETF では食餌制限 OLETF に比べ 35 週齢以降 (35 週齢 $89.9 \pm 14.0\%$, 40 週齢 $89.4 \pm 13.8\%$, 45 週齢 $85.6 \pm 9.1\%$, 55 週齢 $84.7 \pm 11.1\%$), 糖尿病状態の進行とともに有意に減弱した (35 週齢および 40 週齢 $p < 0.01$, 45 週齢および 55 週齢 $p < 0.001$) (図 15B)。

2) b 波

頂点潜時は自由摂食 OLETF では食餌制限 OLETF に比べ 35 週齢以降 (35 週齢 $103.4 \pm 6.0\%$, 40 週齢 $103.0 \pm 3.4\%$, 45 週齢 $105.5 \pm 3.8\%$, 55 週齢 $107.7 \pm 6.2\%$), 糖尿病状態の進行とともに有意に延長した (35 週齢および 45 週齢 $p < 0.05$, 40 週齢および 55 週齢 $p < 0.01$) (図 16A)。

振幅は自由摂食 OLETF では食餌制限 OLETF に比べ 35 週齢以降 (35 週齢 $90.4 \pm 15.2\%$, 40 週齢 $89.1 \pm 11.4\%$, 45 週齢 $86.7 \pm 7.8\%$, 55 週齢 $84.2 \pm 13.7\%$), 糖尿病状態の進行とともに有意に減弱した (35 週齢 $p < 0.05$, 40 週齢および 45 週齢 $p < 0.01$, 55 週齢 $p < 0.001$) (図 16B)。

3) OP

O_1 頂点潜時は自由摂食 OLETF では食餌制限 OLETF に比べ 30 週齢 ($97.6 \pm 3.3\%$) において有意に短く ($p < 0.05$), 45 週齢以降 (45 週齢 $103.2 \pm 2.7\%$, 55 週齢 $104.6 \pm 5.6\%$) で有意に延長した (45 週齢 $p < 0.01$, 55 週齢 $p < 0.05$) (図 17A)。 O_1 振幅は自由摂食 OLETF では食餌制限 OLETF に比べ 20 週齢 ($79.7 \pm 22.6\%$), 35 週齢 ($88.2 \pm 17.4\%$) および 45 週齢 ($85.4 \pm 16.3\%$) で有意に小さ

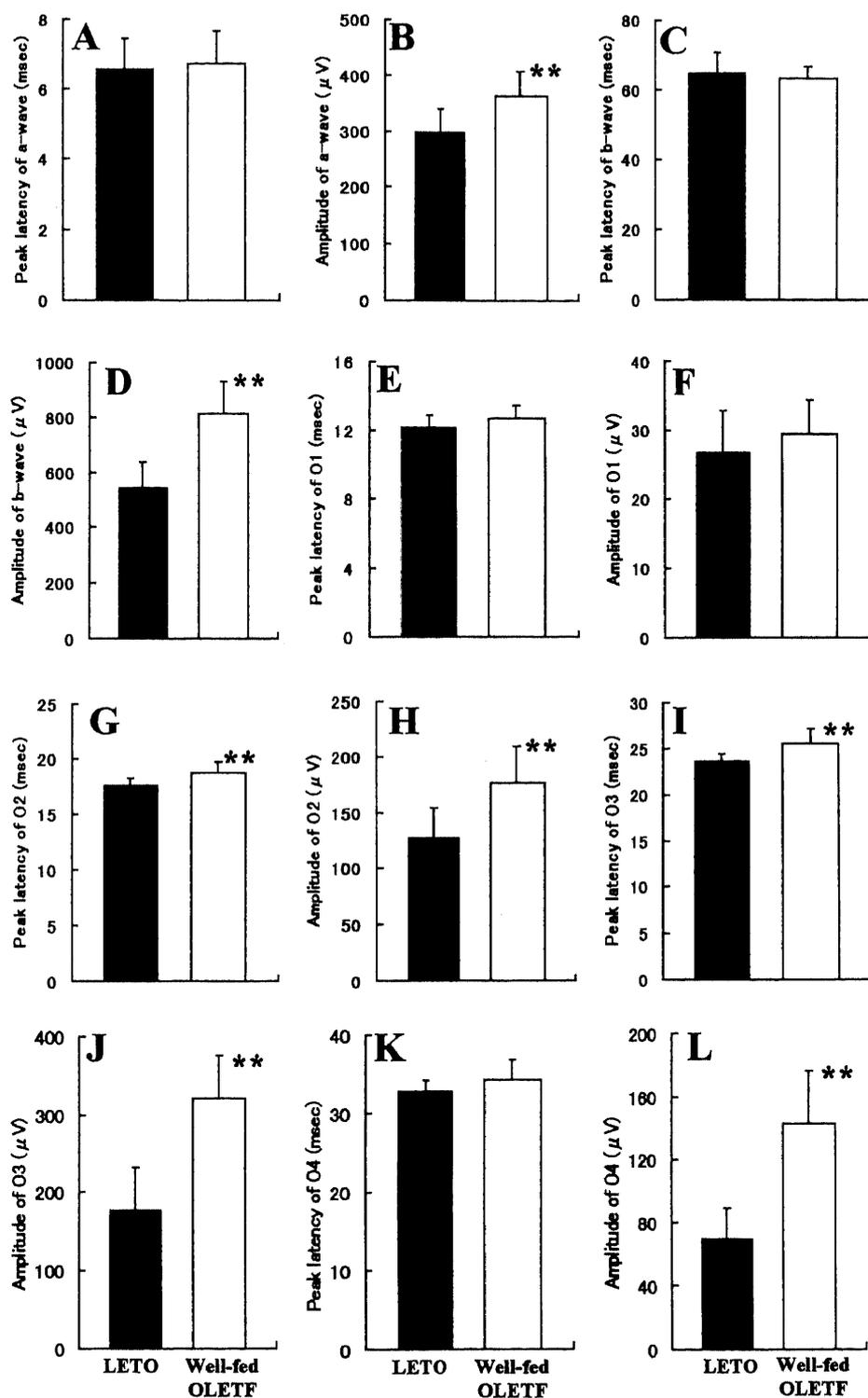


Fig. 14. Comparison of the peak latency and the amplitude of the a-wave, b-wave, O₁, O₂, O₃ and O₄ between the LETO and well-fed OLETF rats at 55 weeks of age. Filled columns, LETO rats; open columns, well-fed OLETF rats. *p<0.05; **p<0.01.

く (20週齢p<0.001, 35週齢および45週齢p<0.05), その他の週齢で両群間に有意差はなかった(図17B)。

O₂頂点潜時は自由摂食OLETFでは食餌制限OLETFに比べ糖尿病早期に当たる15週齢(97.1±2.6%)および20週齢(97.9±2.7%)において有意に短縮し(p<0.05), 35週齢以降(35週齢102.1±2.6%, 40週齢102.1±1.9%, 45週齢103.3±3.8%, 55週

齢104.8±5.2%), 糖尿病状態の進行とともに有意に延長した(35週齢および55週齢p<0.01, 40週齢p<0.001, 45週齢p<0.05)(図18A)。O₂振幅は自由摂食OLETFでは食餌制限OLETFに比べ35週齢以降(35週齢80.9±13.2%, 40週齢84.8±17.6%, 45週齢75.0±10.2%, 55週齢79.9±14.6%)で有意に減弱した(35週齢p<0.0001, 40週齢p<0.01, 45週齢p=0.0001, 55週

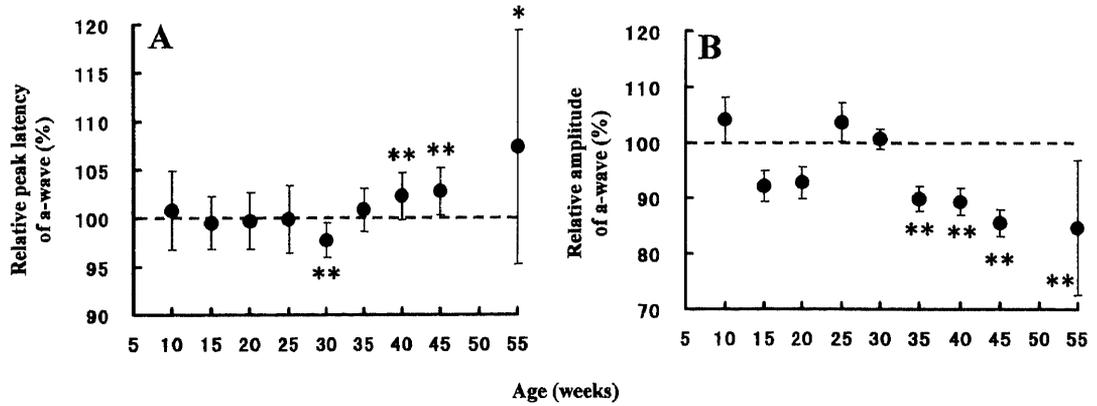


Fig. 15. Chronological changes of the percent peak latency (A) and the percent amplitude (B) of the a-wave of the well-fed OLETF rats to those of the diet OLETF rats. ERG measurements were performed at 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, and 55 weeks of age (well-fed OLETF rats, n=10, 13, 21, 15, 21, 21, 22, 9, and 15, respectively; diet OLETF rats, n=13, 13, 26, 23, 27, 24, 20, 16, and 17, respectively). Ordinate, percent peak latency (A) and percent amplitude (B) of the well-fed OLETF rats to those of the diet OLETF rats at the same age; abscissa, age in weeks. *p<0.05; **p<0.01.

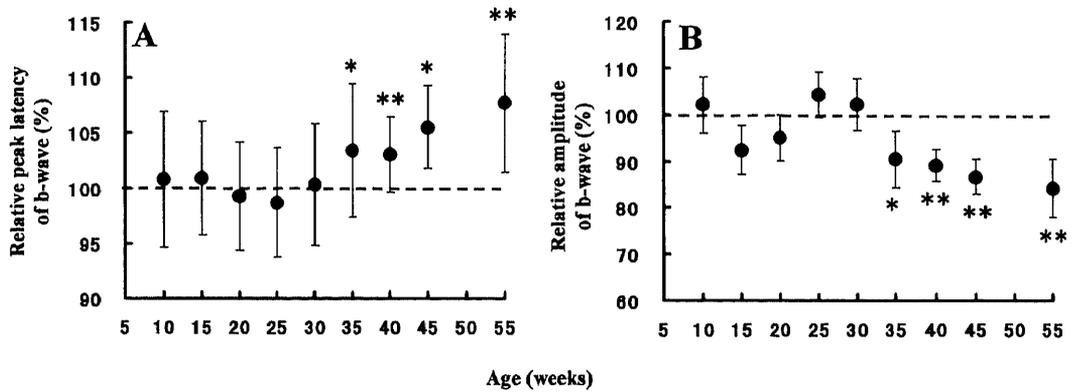


Fig. 16. Chronological changes of the percent peak latency (A) and the percent amplitude (B) of the b-wave of the well-fed OLETF rats to those of the diet OLETF rats. ERG measurements were performed at 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, and 55 weeks of age (well-fed OLETF rats, n=10, 13, 21, 15, 21, 21, 22, 9, and 15, respectively; diet OLETF rats, n=13, 13, 26, 23, 27, 24, 20, 16, and 17, respectively). Ordinate, percent peak latency (A) and percent amplitude (B) of the well-fed OLETF rats to those of the diet OLETF rats at the same age; abscissa, age in weeks. *p<0.05; **p<0.01.

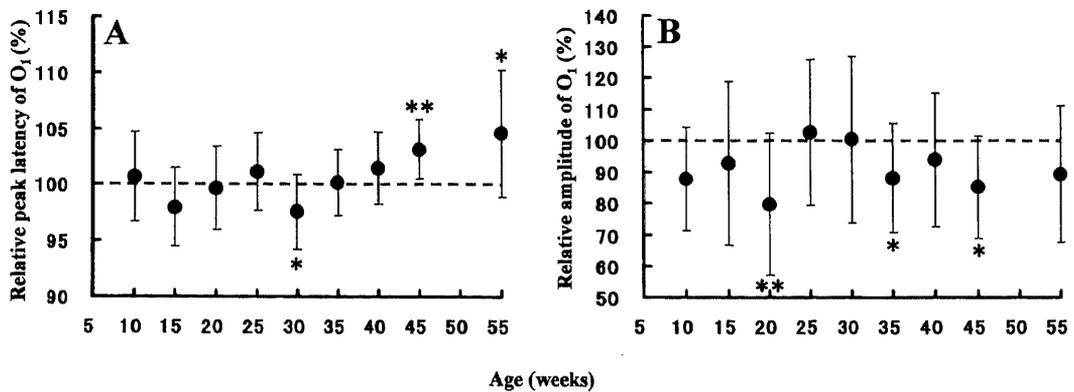


Fig. 17. Chronological changes of the percent peak latency (A) and the percent amplitude (B) of the O₁ of the well-fed OLETF rats to those of the diet OLETF rats. ERG measurements were performed at 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, and 55 weeks of age (well-fed OLETF rats, n=10, 13, 21, 15, 21, 21, 22, 9, and 15, respectively; diet OLETF rats, n=13, 13, 26, 23, 27, 24, 20, 16, and 17, respectively). Ordinate, percent peak latency (A) and percent amplitude (B) of the well-fed OLETF rats to those of the diet OLETF rats at the same age; abscissa, age in weeks. *p<0.05; **p<0.01.

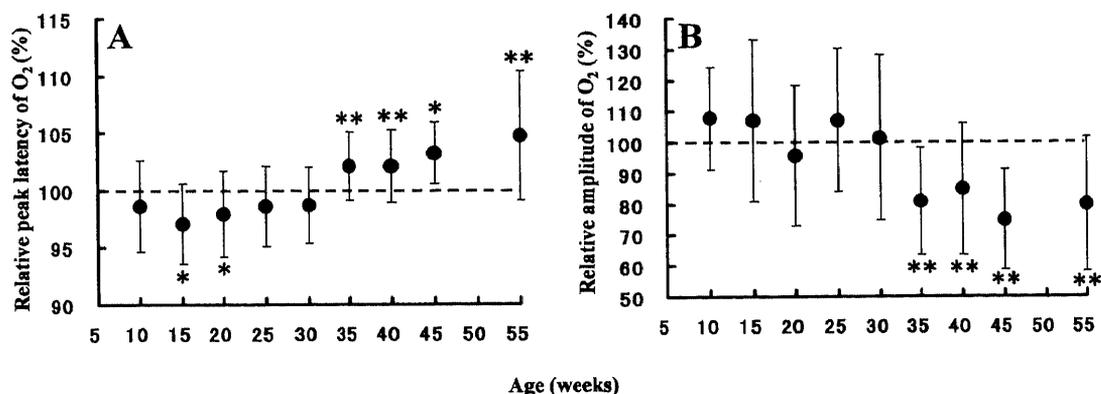


Fig. 18. Chronological changes of the percent peak latency (A) and the percent amplitude (B) of the O₂ of the well-fed OLETF rats to those of the diet OLETF rats. ERG measurements were performed at 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, and 55 weeks of age (well-fed OLETF rats, n=10, 13, 21, 15, 21, 21, 22, 9, and 15, respectively; diet OLETF rats, n=13, 13, 26, 23, 27, 24, 20, 16, and 17, respectively). Ordinate, percent peak latency (A) and percent amplitude (B) of the well-fed OLETF rats to those of the diet OLETF rats at the same age; abscissa, age in weeks. *p<0.05; **p<0.01.

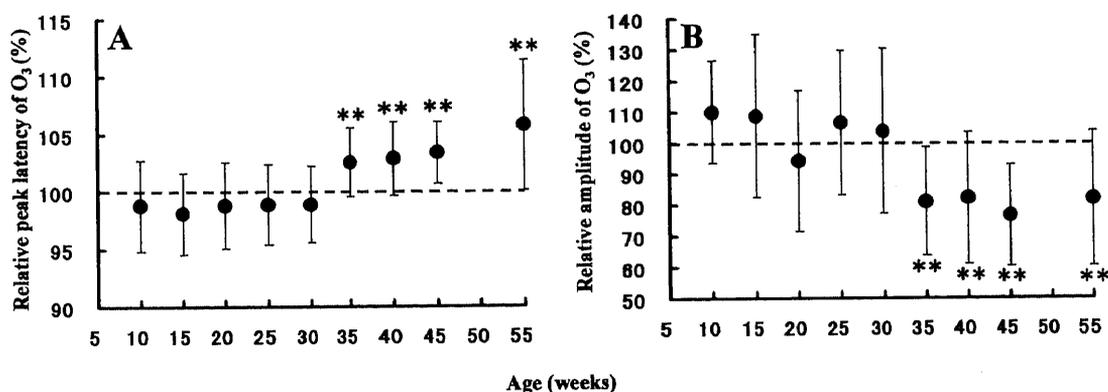


Fig. 19. Chronological changes of the percent peak latency (A) and the percent amplitude (B) of the O₃ of the well-fed OLETF rats to those of the diet OLETF rats. ERG measurements were performed at 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, and 55 weeks of age (well-fed OLETF rats, n=10, 13, 21, 15, 21, 21, 22, 9, and 15, respectively; diet OLETF rats, n=13, 13, 26, 23, 27, 24, 20, 16, and 17, respectively). Ordinate, percent peak latency (A) and percent amplitude (B) of the well-fed OLETF rats to those of the diet OLETF rats at the same age; abscissa, age in weeks. *p<0.05; **p<0.01.

齢p<0.001) (図18B).

O₂頂点潜時は自由摂食OLETFでは食餌制限OLETFに比べ35週齢以降(35週齢102.6±2.5%, 40週齢102.9±1.9%, 45週齢103.4±3.5%, 55週齢105.8±5.9%), 糖尿病状態の進行とともに有意に延長した(35週齢p<0.001, 40週齢p<0.0001, 45週齢および55週齢p<0.01)(図19A)。O₃振幅は自由摂食OLETFでは食餌制限OLETFに比べ35週齢以降(35週齢81.1±14.2%, 40週齢82.2±15.1%, 45週齢76.8±11.6%, 55週齢82.0±15.1%), 糖尿病状態の進行とともに有意に減弱した(35週齢, 40週齢および45週齢p<0.0001, 55週齢p<0.001)(図19B)。

O₄頂点潜時は自由摂食OLETFでは食餌制限OLETFに比べ35週齢以降(35週齢102.9±3.0%, 40週齢103.4±2.2%, 45週齢103.3±4.0%, 55週齢105.9±6.6%), 糖尿病状態の進行とともに有意に延長した(35週齢p<0.001, 40週齢p<0.0001, 45週齢p<0.05, 55週齢p<0.01)(図20A)。O₄振幅は自由摂食OLETFでは食餌制限OLETFに比べ30週齢(112.6±21.7%)において有意に大きく(p<0.05), 35週齢から45週齢(35週齢82.6±19.7%,

40週齢82.8±17.6%, 45週齢82.4±14.8%)で有意に小さかった(p<0.01)(図20B)。

2. グループ2の55週齢における食餌制限OLETFと自由摂食下で飼育したOLETFとの比較

1) 体重

体重は自由摂食OLETF(652±104g)では食餌制限OLETF(520±20g)に比べ有意に重かった(p=0.0046)(図21A)。

2) 血糖値

血糖値は自由摂食OLETF(355±169mg/dl)では食餌制限OLETF(123±8mg/dl)に比べ有意に高かった(p=0.0034)(図21B)。

3) 血清ヘモグロビンA_{1c}値

血清ヘモグロビンA_{1c}値は自由摂食OLETF(14.37±5.57%)では食餌制限OLETF(6.19±0.90%)に比べ有意に高かった(p=0.0024)(図21C)。

4) 血清トリグリセリド, 総コレステロール, HDLコレステロール値

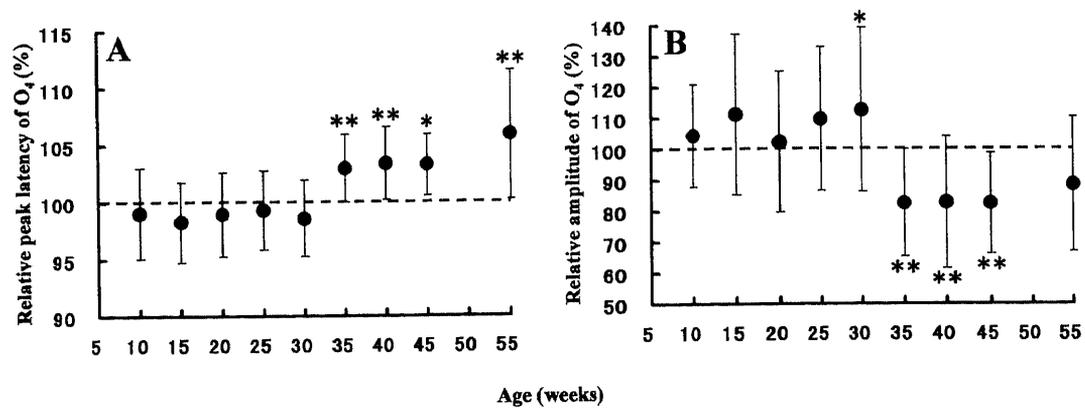


Fig. 20. Chronological changes of the percent peak latency (A) and the percent amplitude (B) of the O₄ of the well-fed OLETF rats to those of the diet OLETF rats. ERG measurements were performed at 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, and 55 weeks of age (well-fed OLETF rats, n=10, 13, 21, 15, 21, 21, 22, 9, and 15, respectively; diet OLETF rats, n=13, 13, 26, 23, 27, 24, 20, 16, and 17, respectively). Ordinate, percent peak latency (A) and percent amplitude (B) of the well-fed OLETF rats to those of the diet OLETF rats at the same age; abscissa, age in weeks. *p<0.05; **p<0.01.

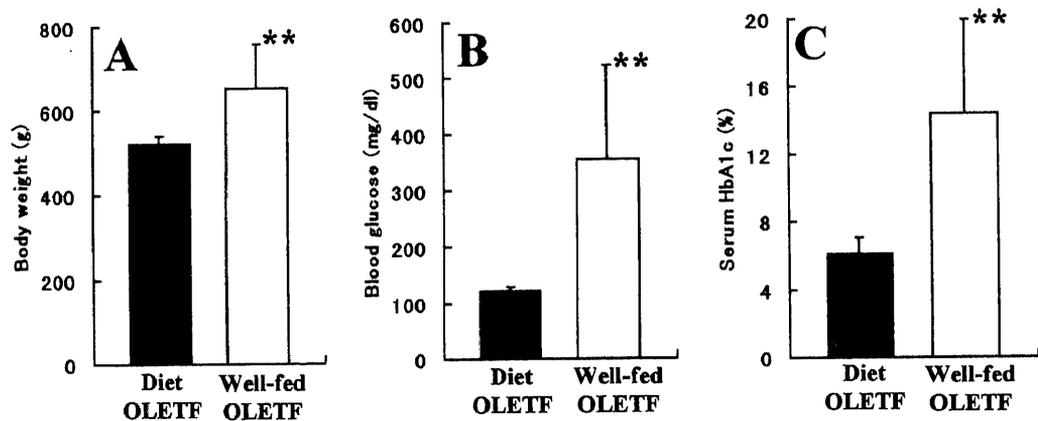


Fig. 21. Comparison of body weight (A), blood glucose (B) and serum HbA1c (C) between the diet OLETF and well-fed OLETF rats at 55 weeks of age. Filled columns, diet OLETF rats; open columns, well-fed OLETF rats. *p<0.05; **p<0.01.

血清トリグリセリドは自由摂食OLETF (538.5 ± 218.9 mg/dl) では食餌制限OLETF (124.7 ± 22.9 mg/dl) に比べ有意に高かった (p=0.0011) (図22A)。血清総コレステロールは自由摂食OLETF (247.1 ± 74.2 mg/dl) では食餌制限OLETF (119.7 ± 9.4 mg/dl) に比べ有意に高かった (p=0.0019) (図22B)。血清HDLコレステロールは自由摂食OLETF (76.5 ± 18.1 mg/dl) では食餌制限OLETF (54.8 ± 4.2 mg/dl) に比べ有意に高かった (p=0.011) (図22C)。

5) 網膜ドーパミン, DOPAC, HVA

網膜ドーパミンは自由摂食OLETF (3.866 ± 0.353 ng/mg 蛋白) では食餌制限OLETF (4.341 ± 0.549 ng/mg 蛋白) に比べ有意に低かった (p=0.041) (図23A)。網膜DOPACは自由摂食OLETF (0.407 ± 0.088 ng/mg 蛋白) では食餌制限OLETF (0.545 ± 0.129 ng/mg 蛋白) に比べ有意に低かった (p=0.015) (図23B)。網膜HVAは自由摂食OLETF (0.358 ± 0.063 ng/mg 蛋白) では食餌制限OLETF (0.432 ± 0.049 ng/mg 蛋白) に比べ有意に低かった (p=0.011) (図23C)。

6) ERG 所見

a波頂点潜時は自由摂食OLETF (6.71 ± 0.94 ミリ秒) と食餌制

限OLETF (6.11 ± 0.22 ミリ秒) との間で有意差はなかったが (図24A), a波振幅は自由摂食OLETF (363.3 ± 43.4 μV) では食餌制限OLETF (411.5 ± 37.6 μV) に比べ有意に小さかった (p=0.019) (図24B)。

b波頂点潜時は自由摂食OLETF (63.3 ± 3.5 ミリ秒) では食餌制限OLETF (57.1 ± 4.6 ミリ秒) に比べ有意に延長していた (p=0.0046) (図24C)。b波振幅は自由摂食OLETF (814.9 ± 115.6 μV) では食餌制限OLETF (915.3 ± 86.8 μV) に比べ有意に小さかった (p=0.046) (図24D)。

O₁頂点潜時は自由摂食OLETF (12.7 ± 0.8 ミリ秒) では食餌制限OLETF (11.9 ± 0.4 ミリ秒) に比べ有意に延長していたが (p=0.019) (図24E), O₁振幅は自由摂食OLETF (29.4 ± 5.0 μV) と食餌制限OLETF (33.6 ± 5.4 μV) との間で有意差はなかった (図24F)。

O₂頂点潜時は自由摂食OLETF (18.8 ± 1.0 ミリ秒) では食餌制限OLETF (17.6 ± 0.6 ミリ秒) に比べ有意に延長していた (p=0.0075) (図24G)。O₂振幅は自由摂食OLETF (176.9 ± 32.3 μV) では食餌制限OLETF (211.3 ± 33.1 μV) に比べ有意に小さかった (p=0.035) (図24H)。

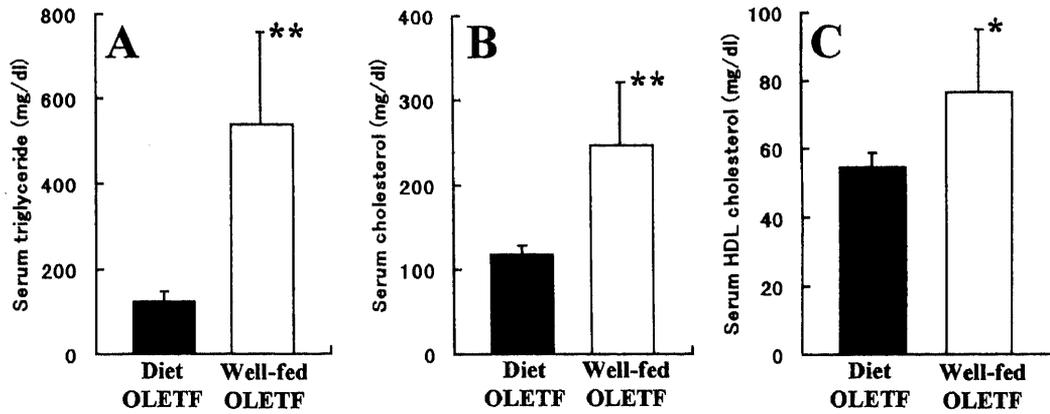


Fig. 22. Comparison of serum triglyceride (A), total cholesterol (B) and HDL cholesterol (C) levels between the diet OLETF and well-fed OLETF rats at 55 weeks of age. Filled columns, diet OLETF rats; open columns, well-fed OLETF rats. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

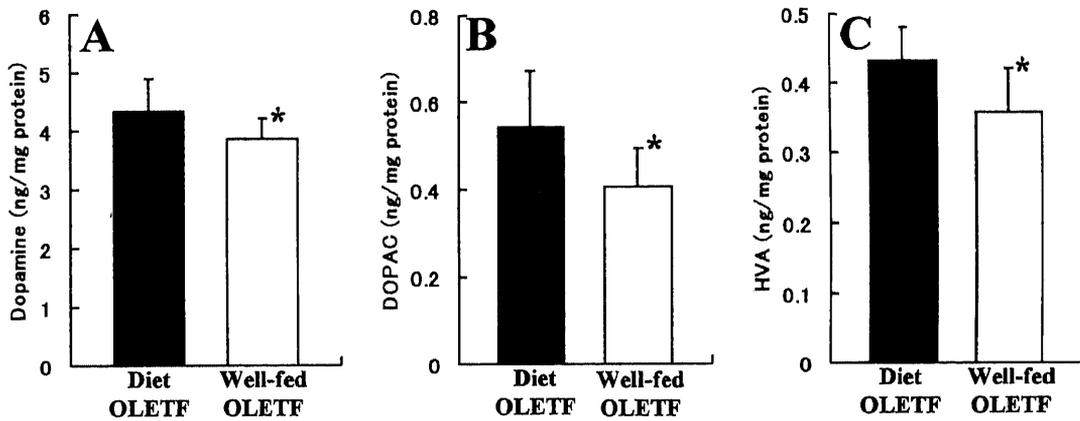


Fig. 23. Comparison of retinal dopamine (A), DOPAC (B) and HVA (C) contents between the diet OLETF and well-fed OLETF rats at 55 weeks of age. Filled columns, diet OLETF rats; open columns, well-fed OLETF rats. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

O_3 頂点潜時は自由摂食 OLETF (25.5 ± 1.6 ミリ秒) では食餌制限 OLETF (23.7 ± 1.0 ミリ秒) に比べ有意に延長していた ($p = 0.0091$) (図 24I)。 O_3 振幅は自由摂食 OLETF ($321.0 \pm 55.8 \mu V$) では食餌制限 OLETF ($367.2 \pm 29.2 \mu V$) に比べ有意に小さかった ($p = 0.035$) (図 24J)。

O_4 頂点潜時は自由摂食 OLETF (34.4 ± 2.6 ミリ秒) では食餌制限 OLETF (32.0 ± 1.5 ミリ秒) に比べ有意に延長していた ($p = 0.027$) (図 24K)。 O_4 振幅は自由摂食 OLETF ($142.7 \pm 34.0 \mu V$) と食餌制限 OLETF ($150.7 \pm 17.5 \mu V$) との間で有意差はなかった (図 24L)。

VI. OLETF (自由摂食, 食餌制限を含む)における ERG 所見と諸因子との相関

1. グループ1の15, 20, 25, 30, および35週齢 OLETF における O_2 , O_3 頂点潜時と血糖値との相関, および35週齢 OLETF における O_2 , O_3 振幅と血糖値との相関

O_2 頂点潜時は15, 20週齢において血糖値と負の相関 (15週齢 $r = -0.395$, $p = 0.046$, 20週齢 $r = -0.422$, $p = 0.0031$) を認めたが, 25, 30週齢では消失 (25週齢 $r = -0.282$, $p = 0.086$, 30週齢 $r = 0.058$, $p = 0.69$) し, 35週齢において反対に正の相関 ($r = 0.391$, $p = 0.0080$) を示した。 O_3 頂点潜時も15, 20週齢において血糖値と負の相関 (15週齢 $r = -0.445$, $p = 0.023$, 20週齢 $r = -0.304$, $p = 0.038$) を認めたが, 25, 30週齢では消失 (25週齢 $r = -0.230$,

$p = 0.17$, 30週齢 $r = -0.018$, $p = 0.90$) し, 35週齢において反対に正の相関 ($r = 0.399$, $p = 0.0066$) を示した。 また, 35週齢において O_2 振幅は血糖値と負の相関 ($r = -0.555$, $p < 0.0001$) を示し, O_3 振幅も血糖値と負の相関 ($r = -0.562$, $p < 0.0001$) を示した。

2. グループ2の55週齢 OLETF (自由摂食, 食餌制限を含む) における ERG 所見と体重, 血糖値, 血清ヘモグロビン A_{1c} 値, 血清脂質, および網膜ドーパミン代謝との相関

1) a波

体重とは頂点潜時・振幅ともに有意な相関はなかった。 血糖値とは頂点潜時において有意な正の相関 ($r = 0.556$, $p = 0.013$), 振幅において有意な負の相関 ($r = -0.728$, $p = 0.0004$) を認めた。 血清ヘモグロビン A_{1c} 値とは頂点潜時において有意な正の相関 ($r = 0.690$, $p = 0.0011$), 振幅において有意な負の相関 ($r = -0.689$, $p = 0.0011$) を認めた。

血清トリグリセリドとは頂点潜時において有意な相関を認めなかったが, 振幅において有意な負の相関 ($r = -0.527$, $p = 0.025$) を認めた。 血清総コレステロールとは頂点潜時において有意な正の相関 ($r = 0.600$, $p = 0.0085$), 振幅において有意な負の相関 ($r = -0.702$, $p = 0.0012$) を認めた。 血清 HDL コレステロールとは頂点潜時において有意な正の相関 ($r = 0.606$, $p = 0.0076$), 振幅において有意な負の相関 ($r = -0.680$, $p = 0.0019$) を認めた。

網膜ドーパミンとは頂点潜時・振幅ともに有意な相関はな

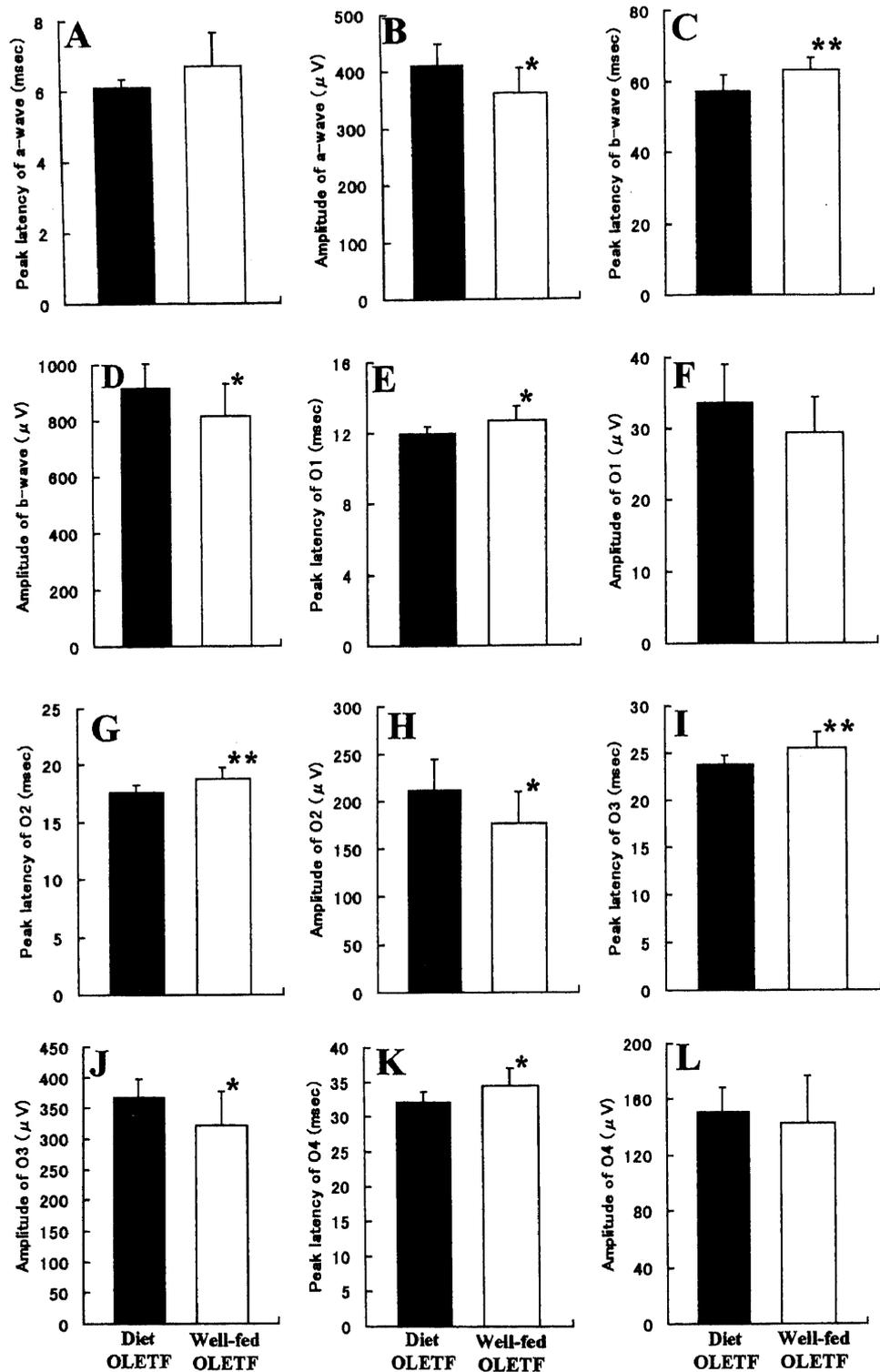


Fig. 24. Comparison of the peak latency and the amplitude of the a-wave, the b-wave, and the oscillatory potentials (O₁, O₂, O₃, O₄) between the diet OLETF and well-fed OLETF rats at 55 weeks of age. Filled columns, diet OLETF rats; open columns, well-fed OLETF rats. *p<0.05; **p<0.01.

った。網膜DOPACとは頂点潜時において有意な負の相関 ($r = -0.583$, $p = 0.0088$) を認めたが、振幅において有意な相関を認めなかった。網膜HVAとは頂点潜時において有意な負の相関 ($r = -0.634$, $p = 0.0036$)、振幅において有意な正の相関 ($r = 0.503$, $p = 0.028$) を認めた (表1)。

2) b波

体重とは頂点潜時・振幅ともに有意な相関はなかった。血糖値とは潜時において有意な正の相関 ($r = 0.457$, $p = 0.049$)、振幅において有意な負の相関 ($r = -0.610$, $p = 0.0055$) を認めた。血清ヘモグロビンA_{1c}値とは頂点潜時において有意な正の相関 ($r = 0.590$, $p = 0.0078$)、振幅において有意な負の相関 ($r = -0.634$, $p = 0.0036$) を認めた。

血清トリグリセリドとは頂点潜時において有意な正の相関 ($r=0.585, p=0.011$) を認めたが、振幅において有意な相関を認めなかった。血清総コレステロールとは頂点潜時において有意な正の相関 ($r=0.644, p=0.0039$)、振幅において有意な負の相関 ($r=-0.636, p=0.0046$) を認めた。血清HDLコレステロールとは頂点潜時において有意な正の相関 ($r=0.627, p=0.0054$)、振幅において有意な負の相関 ($r=-0.611, p=0.0071$) を認めた。

網膜ドーパミンおよびDOPACとは頂点潜時・振幅ともに有意な相関はなかった。網膜HVAとは頂点潜時において有意な負の相関 ($r=-0.553, p=0.014$) を認めたが、振幅において有意な相関を認めなかった (表1)。

3) O₁

体重とは頂点潜時・振幅ともに有意な相関はなかった。血糖値とは頂点潜時において有意な正の相関 ($r=0.581, p=0.0091$) を認めたが、振幅において有意な相関を認めなかった。血清ヘモグロビンA_{1c}値とは頂点潜時において有意な正の相関 ($r=0.709, p=0.007$) を認めたが、振幅において有意な相関を認めなかった。

血清トリグリセリドとは頂点潜時において有意な正の相関 ($r=0.506, p=0.032$) を認めたが、振幅において有意な相関を認めなかった。血清総コレステロールとは頂点潜時において有意な正の相関 ($r=0.639, p=0.0043$) を認めたが、振幅において有意な相関を認めなかった。血清HDLコレステロールとは頂点潜時において有意な正の相関 ($r=0.655, p=0.0032$) を認めたが、振幅において有意な相関を認めなかった。

網膜ドーパミンとは頂点潜時・振幅ともに有意な相関はなかった。網膜DOPACとは頂点潜時において有意な負の相関 ($r=-0.624, p=0.0043$) を認めたが、振幅において有意な相関を認めなかった。網膜HVAとは頂点潜時において有意な負の相関 ($r=-0.613, p=0.052$) を認めたが、振幅において有意な相関を認めなかった (表1)。

4) O₂

体重とは頂点潜時・振幅ともに有意な相関はなかった。血糖値とは頂点潜時において有意な正の相関 ($r=0.636, p=0.0035$) を認めたが、振幅において有意な相関を認めなかった。血清ヘモグロビンA_{1c}値とは頂点潜時において有意な正の相関

($r=0.767, p=0.0001$)、振幅において有意な相関を認めなかった。

血清トリグリセリドとは頂点潜時において有意な正の相関 ($r=0.644, p=0.0039$) を認めたが、振幅において有意な相関を認めなかった。血清総コレステロールとは頂点潜時において有意な正の相関 ($r=0.741, p=0.004$) を認めたが、振幅において有意な相関を認めなかった。血清HDLコレステロールとは頂点潜時において有意な正の相関 ($r=0.762, p=0.0002$) を認めたが、振幅において有意な相関を認めなかった。

網膜ドーパミンとは頂点潜時・振幅ともに有意な相関はなかった。網膜DOPACとは頂点潜時において有意な負の相関 ($r=-0.618, p=0.0048$) を認めたが、振幅において有意な相関を認めなかった。網膜HVAとは頂点潜時において有意な負の相関 ($r=-0.608, p=0.0057$) を認めたが、振幅において有意な相関を認めなかった (表1)。

5) O₃

体重とは頂点潜時・振幅ともに有意な相関はなかった。血糖値とは頂点潜時において有意な正の相関 ($r=0.591, p=0.0077$) を認めたが、振幅において有意な相関を認めなかった。血清ヘモグロビンA_{1c}値とは頂点潜時において有意な正の相関 ($r=0.724, p=0.0005$) を認めたが、振幅において有意な相関を認めなかった。

血清トリグリセリドとは頂点潜時において有意な正の相関 ($r=0.560, p=0.016$) を認めたが、振幅において有意な相関を認めなかった。血清総コレステロールとは頂点潜時において有意な正の相関 ($r=0.703, p=0.0011$) を認めたが、振幅において有意な相関を認めなかった。血清HDLコレステロールとは頂点潜時において有意な正の相関 ($r=0.738, p=0.0005$) を認めたが、振幅において有意な相関を認めなかった。

網膜ドーパミンとは頂点潜時・振幅ともに有意な相関はなかった。網膜DOPACとは頂点潜時において有意な負の相関 ($r=-0.553, p=0.014$) を認めたが、振幅において有意な相関を認めなかった。網膜HVAとは頂点潜時において有意な負の相関 ($r=-0.506, p=0.027$) を認めたが、振幅において有意な相関を認めなかった (表1)。

6) O₄

Table 1. Correlation of ERG data with body weight and laboratory data in OLETF rats (55 weeks)

Body weight and laboratory data	r	a-wave		b-wave		O ₁		O ₂		O ₃		O ₄	
		Peak latency	Amplitude	Peak latency	Amplitude	Peak latency	Amplitude	Peak latency	Amplitude	Peak latency	Amplitude	Peak Latency	Amplitude
Body weight	r	0.046	-0.099	0.365	-0.047	0.150	-0.381	0.148	-0.364	0.170	-0.358	0.199	-0.253
	p	0.85	0.69	0.12	0.85	0.54	0.11	0.55	0.13	0.49	0.13	0.41	0.30
Blood glucose	r	0.556*	-0.728**	0.457*	-0.610**	0.581**	-0.245	0.636**	-0.366	0.591**	-0.332	0.442	0.131
	p	0.013	0.0004	0.049	0.0055	0.0091	0.31	0.0035	0.12	0.0077	-0.17	0.058	0.59
Serum HbA _{1c}	r	0.690**	-0.689**	0.590**	-0.634**	0.709**	-0.177	0.767**	-0.305	0.724**	-0.380	0.601**	-0.042
	p	0.0011	0.0011	0.0078	0.0036	0.0007	0.47	0.0001	0.20	0.0005	0.11	0.0065	0.77
Serum triglyceride	r	0.438	-0.527*	0.585*	-0.442	0.506*	-0.116	0.644**	-0.429	0.560*	-0.416	0.472*	-0.102
	p	0.069	0.024	0.011	0.066	0.032	0.65	0.0039	0.075	0.016	0.086	0.048	0.69
Serum cholesterol	r	0.600**	-0.702**	0.644**	-0.636**	0.639**	-0.103	0.741**	-0.356	0.703**	-0.445	0.610**	-0.135
	p	0.0085	0.0012	0.0039	0.0046	0.0043	0.69	0.0004	0.15	0.0011	0.064	0.0071	0.59
Serum HDL cholesterol	r	0.606**	-0.680**	0.627**	-0.611**	0.655**	0.003	0.762**	-0.307	0.738**	-0.394	0.627**	-0.055
	p	0.0076	0.0019	0.0054	0.0071	0.0032	0.99	0.0002	0.21	0.0005	0.11	0.0054	0.83
Retinal dopamine	r	-0.272	0.266	-0.116	0.071	0.254	0.312	-0.167	0.033	-0.116	0.049	-0.076	-0.147
	p	0.26	0.27	0.64	0.77	0.29	0.19	0.49	0.89	0.64	0.84	0.76	0.55
Retinal DOPAC	r	-0.583**	0.384	-0.453	0.400	-0.624**	0.106	-0.618**	0.168	-0.553*	0.211	-0.467*	0.023
	p	0.0088	0.10	0.051	0.090	0.0043	0.67	0.0048	0.49	0.014	0.39	0.043	0.93
Retinal HVA	r	-0.634**	0.503*	-0.553*	0.312	-0.613**	0.004	-0.608**	0.173	-0.506*	0.227	-0.427	0.201
	p	0.0036	0.028	0.014	0.19	0.0052	0.99	0.0057	0.48	0.027	0.35	0.068	0.41

DOPAC, dihydroxyphenylacetic acid; HDL, high density lipoprotein; HVA, homovanillic acid; r, Pearson's correlation coefficient; p, level of significance. *p<0.05; **p<0.01.

体重および血糖値とは頂点潜時・振幅ともに有意な相関はなかった。血清ヘモグロビンA_{1c}値とは頂点潜時において有意な正の相関 ($r=0.601$, $p=0.0065$) を認めたが、振幅において有意な相関を認めなかった。

血清トリグリセリドとは頂点潜時において有意な正の相関 ($r=0.472$, $p=0.048$) を認めたが、振幅において有意な相関を認めなかった。血清総コレステロールとは頂点潜時において有意な正の相関 ($r=0.610$, $p=0.0071$) を認めたが、振幅において有意な相関を認めなかった。血清HDLコレステロールとは頂点潜時において有意な正の相関 ($r=0.627$, $p=0.0054$) を認めたが、振幅において有意な相関を認めなかった。

網膜ドーパミンおよびHVAとは頂点潜時・振幅ともに有意な相関はなかった。網膜DOPACとは頂点潜時において有意な負の相関 ($r=-0.467$, $p=0.044$) を認めたが、振幅において有意な相関を認めなかった (表1)。

考 察

現在、糖尿病網膜症は日本を含む先進国における成人中途失明の主因でありその病態解明、治療法開発にはヒト糖尿病と類似したモデル動物が必要である。従来からのSTZ誘発糖尿病ラットにはインスリン非依存型糖尿病とは病態が異なることやその薬物毒性を考慮する必要があることなどの問題点があった。

OETFラットは大塚製薬がチャールズ・リバー・カナダ社Long-Evans系ラットから糖尿病血統を見出し、25週齢経口ブドウ糖負荷試験で糖尿病型と診断されたラットの仔ばかりを選択交配させて1989年に開発樹立された自然発症のインスリン非依存型糖尿病モデル動物である³⁾。ストレスの少ない快適な環境下で飼育するとOETFラット雄は離乳直後より多食と肥満を呈し、6週齢より高脂血症⁸⁾、12週齢頃よりインスリン抵抗性⁹⁾を来す。18週齢頃より高血糖、高インスリン血症となり、25週齢までに経口ブドウ糖負荷試験においてほぼ100%が糖尿病と診断される。糖尿病初期の膵ランゲルハンス島は線維化を伴って肥大し、高血糖状態の持続に伴い40週齢頃より膵ランゲルハンス島は次第に疲弊・萎縮し、糖尿病末期に当たる65週齢頃になるとインスリン値は逆にLETOラットに比べ低値となる¹⁰⁾。

糖尿病合併症に関する検討では、30週齢以降にはヒト糖尿病性腎症に類似した瀰漫性病変と滲出性病変が認められる。ただし、食餌制限による糖尿病状態のコントロールを行うと腎糸球体病変の進展が抑制される¹¹⁾。腎症は顕著に出現するのに対し、シヨ糖負荷などを行わない限り、48週齢を過ぎても電気生理学的、組織学的に糖尿病性神経障害を来さない¹²⁾。血糖上昇が穏やかなため白内障にもなりにくく、80週齢まで検眼鏡的に明らかな糖尿病網膜症は認められない¹³⁾。本研究では検眼鏡的糖尿病網膜症を呈さないOETFラットにおいて機能的糖尿病網膜症が存在するのかを調べることを目的として経時的にERGを測定し、対照であるLETOラットおよび食餌制限下で飼育したOETFラットと比較した。またOETFラットのERG変化の成因を調べるため、ERG変化と糖代謝、脂質代謝、ドーパミン代謝との関係について検討した。

OETFはアンモニア臭や騒音などのストレスの多い環境下では食餌量が減り糖尿病状態にならないことが知られている¹⁴⁾。今回、自由摂食下で飼育したOETFの平均体重は、経時的にERGを測定したグループ1では55週齢 (732 ± 38 g) に至るまで

漸増した (図2A) が、55週齢までERG測定を施行しなかったグループ2では30週齢 (708 ± 15 g) でピークに達し以後減少した (図2B)。自由摂食下で飼育したOETFの各週齢毎の平均血糖値における最大値はグループ1で130 ± 8 mg/dl (50週齢) (図3A)、グループ2で355 ± 168 mg/dl (55週齢) であった (図3B)。よって自由摂食OETFの体重および血糖値の経時的変化は、グループ1では5週毎の全身麻酔下でのERG測定がストレスとなりグループ2に比べ食餌量が減り、体重増加が遅れ、糖尿病状態の進行がやや軽度であった可能性を示唆する。しかしながら、グループ1においても30週齢、45週齢での経口ブドウ糖負荷試験において自由摂食下で飼育したOETFでは最高値が240 mg/dlを超えており (図4AおよびB)、LETO、食餌制限OETFに比べ強く耐糖能障害を呈しており、糖尿病状態であることが確認された。

自由摂食下で飼育したOETFのO₁、O₂、O₃頂点潜時はLETOのそれに比べ糖尿病発病後に延長した (図7A, 8A, 9A)。このLETOとの比較における自由摂食OETFのO₁、O₂、O₃頂点潜時の経時的変化はヒト糖尿病におけるERG変化に類似し、OETFにおける糖尿病状態の進行が一因と考えられる。しかしながら、自由摂食下で飼育したOETFのb波、O₄頂点潜時は糖尿病状態である35週齢以降においてもLETOに比べ有意に短縮し (図6A, 10A)、a波、b波、O₂、O₃、O₄振幅は増大していた (図5B, 6B, 8B, 9B, 10B)。これらのLETOとの比較におけるOETFのERG所見はこれまで報告されているような糖尿病患者^{5)7)15)~18)}および糖尿病動物^{19)~23)}におけるERG所見に合致しない。

白尾ら²⁴⁾によればウサギのOP振幅は硝子体内へのドーパミン注入によって増大し、ハロペリドール (ドーパミン受容体拮抗剤) 注入で減弱する。小林ら²⁵⁾はドーパミン神経終末への再吸収阻害剤であるノミフェンシンの注入によってOP振幅が増大したことから内因性ドーパミン放出量がERGを変化させるに十分であることを報告した。また、高綱ら²⁶⁾はマウスでドーパミン含有神経細胞を特異的に破壊する1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジンの腹腔内投与によりERG各波振幅は減弱し、その程度はOP、b波、a波の順に大きいと報告した。これらの報告はいずれもドーパミンがOP振幅を左右することを示唆している。

OETFにおいて糖尿病状態にもかかわらずOP振幅がLETOに比し増大する理由として次のようなことが考えられる。糖尿病ラットにおける網膜ドーパミン、DOPACおよびチロシンヒドロキシラーゼ (tyrosine hydroxylase, TH) 活性は正常もしくは低下するとの報告が多い^{27)~31)}。ところが、グループ2の55週齢での網膜ドーパミン、DOPACが自由摂食下で飼育したOETFにおいてLETOに比べ有意に高かった (図13A, B)。また、自由摂食下で飼育した20、45、60週齢OETFの網膜THのmRNAレベルはLETOに比べ有意に上昇するという³²⁾。即ちLETOとの比較における自由摂食OETFでのOP振幅の増大に網膜ドーパミン代謝の違いが関与している可能性がある。加えて、ラット脳においてコレシストキニン (cholecystokinin, CCK) がドーパミン作動性神経細胞を調節しているとの報告³³⁾があるが、OETFではCCK-A受容体遺伝子の欠損が確認されている³⁴⁾。以上を考慮すると、LETOとの比較におけるOETFでのERG振幅増大は糖尿病に起因するのではなく、CCK-A受容体の遺伝的欠損に関連した網膜ドーパミン代謝の違いに起因

している可能性があると思われる。

ERGに対する遺伝因子の直接的関与を除外し、糖尿病そのものによるERG変化を検出するためには、同一の遺伝的背景を持ちかつ糖尿病を発病しない動物を対照としてERGを比較検討する必要がある。OLETFに食餌制限を行うと糖尿病発病率の低下、耐糖能障害の改善、膵β細胞減少の抑制、インスリン抵抗性の改善、糖尿病性腎症の改善¹¹⁾、脂質代謝の改善³⁵⁾などの効果があり、糖尿病とその合併症の進行が抑制されることが確認されている。本研究でも食餌制限によってOLETFの血糖値の低下、耐糖能障害の改善が確認され、糖尿病状態の進行が抑制された。そこで食餌制限OLETFのERGを対照として自由摂食下で飼育したOLETFのERGを比較検討した。

自由摂食下で飼育したOLETFのO₂頂点潜時は食餌制限OLETFに比べ、OLETFが耐糖能障害を来し始める15、20週齢において有意に短縮していた(図18A)。また、15、20週齢OLETF(自由摂食、食餌制限を含む)におけるO₂、O₃頂点潜時と血糖値の間に負の相関関係が認められた。即ち、15、20週齢における自由摂食下で飼育したOLETFのO₂頂点潜時の短縮(図18A)は血糖値の高いものほど顕著であった。糖尿病極早期にb波ないしOPの頂点潜時短縮、振幅増大が見られるとの報告は散見される。Simonsen¹⁵⁾の報告では検眼鏡的糖尿病網膜症の見られない若年性インスリン依存型糖尿病患者120人中36人(30%)にOP振幅の増大を認め、増殖性糖尿病網膜症への進行の危険が比較的少ないとしている。安藤³⁶⁾は糖尿病早期患者およびアロキサン誘発糖尿病家兔におけるブドウ糖負荷試験時にOP振幅が増大した例を報告し、高血糖時の網膜代謝の亢進が原因であるとしている。Lovasikら³⁷⁾は検眼鏡的糖尿病網膜症の見られない若年性インスリン依存型糖尿病患者(平均罹病期間5.6年)において明所視ERGのb波頂点潜時の短縮、OP振幅の増大傾向を認めたとし、低酸素状態の代償として網膜血管の自動調節機構が働き網膜局所血流の増加をもたらすとしている。自由摂食下で飼育したOLETFに見られた糖尿病極早期のO₂頂点潜時の短縮(図18A)はこれらの報告に合致する。

糖尿病と網膜血流に関して、軽度の網膜症を有する糖尿病患者において血糖値が高いほど、網膜血流量は増加するとの報告³⁸⁾³⁹⁾や、高血糖時には血液の網膜への灌流圧や網膜酸素濃度の変化に対する自動調節機構の障害により網膜血流が増加するとの報告⁴⁰⁾がある。菊池⁴¹⁾によれば高血糖下の網膜では細胞内グルコースの大量処理のため解糖系、クエン酸回路およびソルビトール回路が促進され、その結果、組織の低酸素状態を招き前毛細血管小動脈が拡張し、血管抵抗を低下させるので糖尿病の発症と同時に血流は増加するという。以上より、15、20週齢における自由摂食OLETFに見られたO₂頂点潜時短縮(図18A)の一因として、高血糖状態に伴う網膜代謝の亢進や網膜局所血流の増加が考えられる。

15、20週齢OLETF(自由摂食、食餌制限を含む)で見られた血糖値とO₂、O₃頂点潜時との間における負の相関関係は25、30週齢では消失し、35週齢になると反対に正の相関関係へと推移した。加えて、35週齢では血糖値とO₂、O₃振幅との間に負の相関関係が見られた。即ち、高血糖を来し始める15、20週齢OLETFにおいては血糖値の高いもの程O₂、O₃頂点潜時は短縮するが、35週齢になると逆に血糖値の高いもの程O₂、O₃頂点潜時は延長し、O₂、O₃振幅は減弱した。この糖尿病進行に伴ってOP頂点潜時が延長し振幅が減弱する所見は糖尿病患

者^{5)7)15)~18)}やSTZ誘発糖尿病ラット¹⁶⁾¹⁹⁾²¹⁾²²⁾でも見られる現象であり、機能的糖尿病網膜症の発症を象徴している可能性がある。

Miyamotoら⁴²⁾は24週齢OLETFでは網膜微循環で捕捉される白血球密度がLETOの約2倍に増加していることを見出し、虚血および血管内皮細胞傷害の基となる毛細血管閉塞の原因となっている可能性を示唆した。この24週齢は今回のERG所見では自由摂食下で飼育したOLETFでいったん短縮したOP頂点潜時が延長し始める時期に相当しており、この週齢の白血球の一過性毛細血管栓塞が35週齢以降のERG異常に至る最初の過程を示しているのかもしれない。しかし、この時点では網膜毛細血管における白血球の速度に違いは見られず、一過性かつ局所的な毛細血管の血流障害であるという⁴²⁾。したがって、後述のように検眼鏡的糖尿病網膜症の見られない時期のERG異常が網膜血流障害に起因するとすれば、本研究においてこの週齢でERG異常がまだ見られないのは妥当と思われる。

自由摂食下で飼育したOLETFのERG頂点潜時は食餌制限OLETFに比べb波、O₂、O₃、O₄で35週齢より延長し(図16A、18A、19A、20A)、40週齢よりa波(図15A)、45週齢よりO₁でも延長した(図17A)。自由摂食下で飼育したOLETFのERG振幅は食餌制限OLETFに比べa波、b波、O₂、O₃において35週齢以降減弱した(図15B、16B、18B、19B)。

OLETFでは80週齢まで検眼鏡的糖尿病網膜症は見られないとされている¹³⁾が、糖尿病患者では検眼鏡的糖尿病網膜症が検出されない時期からOP異常を呈する⁵⁾⁷⁾ことが明らかになっており、今回の食餌制限OLETFとの比較における自由摂食OLETFでのERG OP変化はヒトでのOP異常所見に合致する。OP頂点潜時の延長は糖尿病患者¹⁶⁾および糖尿病動物¹⁹⁾において硝子体フルオロメトリーに表される血液網膜関門の異常に先行して生じることが明らかにされているが、OLETFにおいてもヒトと同様に検眼鏡的糖尿病網膜症が見られなくても機能的糖尿病網膜症が生じていると考えられる。さらに35週齢OLETFにおいて、OP頂点潜時の延長(図18A、19A、20A)のみならず、OP振幅の低下(図18B、19B)、b波の頂点潜時延長(図16A)、a波およびb波の振幅低下が見られた(図15B、16B)。

b波の起源は局所的細胞外K⁺イオン濃度上昇に応答したMüller細胞の脱分極にあるという説⁴³⁾⁴⁴⁾、およびそれに加えて近年オン型双極細胞が直接関与するという証拠⁴⁵⁾が発表された。糖尿病におけるb波異常の発症時期に関して諸説があり、米村ら⁷⁾は糖尿病患者においてOP異常に遅れてb波異常が見られるとしているが、糖尿病患者¹⁷⁾¹⁸⁾および糖尿病動物²⁰⁾²¹⁾において検眼鏡的糖尿病網膜症が検出されない時期にb波異常を認めるとの報告がある。35週齢OLETFにおけるb波減弱(図16AおよびB)は後者に合致する。またSimonsen⁴⁶⁾によると、糖尿病によって網膜血管に影響が現れる以前からMüller細胞が傷害されるという。よって本研究で見られたOLETFにおける糖尿病早期(35週齢)からのb波減弱はMüller細胞の機能失調に由来している可能性がある。

a波は主に視細胞電位を反映する⁴⁷⁾と考えられてきたが、近年オフ型双極細胞の関与も指摘されている⁴⁸⁾。それゆえa波の振幅や頂点潜時は、従来考えられてきたようにb波の振幅や時間特性に影響されるばかりではなくオフ型双極細胞の電気的活動にも影響される。したがって、a波をもって視細胞機能を論じるには、その起始部下降脚の解析が必要である⁴⁸⁾。それゆえ、

自由摂食下で飼育したOLETFのa波における頂点潜時延長および振幅低下のみでは視細胞における応答の異常を直ちに論じられない。

検眼鏡的糖尿病網膜症が検出されない早期の糖尿病患者および糖尿病動物におけるERG減弱に代謝因子、血流因子の関与が考えられる。まず検眼鏡的糖尿病網膜症が検出されない早期の糖尿病患者および糖尿病動物におけるERG減弱に対する代謝因子の関与について以下に考察する。

血管、網膜を含む糖尿病性合併症と関連の深い組織では、グルコースの細胞膜を介しての細胞内への通過がインスリン非依存型で細胞外グルコース濃度に依存している。通常、細胞内に取り込まれたグルコースは解糖系の最初の律速酵素ヘキソキナーゼに親和性が強く、ポリオール経路を介するグルコース利用は3%にすぎないが、高血糖状態ではアルドース還元酵素の活性化が起こればポリオール経路を介したグルコース利用が正常状態の約4倍となり、ソルビトール、フルクトースの産生が増加する。ソルビトール、フルクトースの細胞内蓄積による細胞内浸透圧の亢進が細胞浮腫を来し、必要な酸素・栄養の不足から種々の細胞機能が障害される⁴⁹⁾。これがポリオール代謝異常仮説であり、ERG異常に関与するとの報告が見られる。Segawaら²²⁾は糖尿病ラット(STZ 60 mg/kg, 静脈内投与6週後)および30%ガラクトース含有食餌負荷ラットにおいてOP頂点潜時延長(a波、b波の頂点潜時、振幅は不変)が見られ、OP頂点潜時延長と網膜ソルビトール、フルクトース濃度との間に正相関が見られること、更にインスリン、アルドース還元酵素阻害剤投与によりOP頂点潜時延長が抑制されたことから、ポリオール産生活性を有するMuller細胞の機能変化が網膜内層の神経機能不全の原因となっている可能性を示唆した。Hottaら²³⁾によればショ糖負荷OLETF(38週齢)のOP頂点潜時の和($O_1+O_2+O_3+O_4$)はLETOに比べ有意に延長し、アルドース還元酵素阻害剤および血小板凝集抑制・末梢血流改善作用を有するシロスタゾール投与によりOP異常が抑制されるという。本研究で見られた自由摂食OLETFのOP異常にもポリオール代謝の亢進による網膜の低酸素状態が関与している可能性がある。Williamsonら⁵⁰⁾によれば高血糖時にはソルビトールからフルクトースへの変換が増加し、低酸素組織において血管拡張と血流増加に密接に関わるNADH/NAD⁺比の上昇が起こる。このいわゆる高血糖性偽低酸素状態がジアシルグリセロール(diaclyglycerol, DAG)/プロテインキナーゼC(protein kinase C, PKC)経路の亢進などを介して微小血管および神経細胞の機能失調の原因になるとしている。本研究で見られたOLETFのERG(b波、OP)異常にもNADH/NAD⁺比の上昇による網膜微小血管および神経細胞の機能変化が関与している可能性がある。

次に検眼鏡的糖尿病網膜症が検出されない早期の糖尿病患者および糖尿病動物におけるERG減弱に対する血流因子の関与について以下に考察する。Bursellら⁵¹⁾は検眼鏡的糖尿病網膜症が検出されないインスリン依存型糖尿病患者(罹病期間10年未満)において正常者に比べ網膜血流量の低下を認め、血管径には有意差がなかったことから、網膜血流量の低下は網膜主幹血管よりも微小循環における血管抵抗の増大に起因すると考えた。Miyamotoら⁵²⁾はOLETFとは別種の自然発症インスリン非依存型糖尿病モデルであるGoto-Kakizakiラットにおいて平均網膜循環時間の遅延、網膜区域血流量の減少を見出した。また、

前述の代謝因子に関連して高血糖状態ではDAGのグルコースからの新たな合成が亢進し、その結果PKCが活性化される。このPKCは様々な細胞機能調節作用を持つことで知られる⁵³⁾が、直接的ないしは強力な網膜血管収縮作用を有するエンドセリン-1を増加させることで間接的に網膜血流障害を引き起こすとされる⁵⁴⁾⁵⁵⁾。したがって、OLETF 35週齢以降のERG(b波、OP)異常にDAG/PKC経路の亢進、エンドセリン-1の増加による網膜血流障害が関与している可能性がある。網膜血流量とERGに関して、酒井¹⁹⁾は糖尿病ラット(STZ 50 mg/kg, 腹腔内投与)においてOP頂点潜時の延長、振幅の低下(a波、b波の頂点潜時、振幅は不変)と同時に網膜血流量の低下が見られ、これらの変化はインスリン投与によって可逆的なものであること、またSTZ投与6週後になると硝子体フルオロメトリー値に表される血液網膜関門の機能低下を来したが、この時点では眼底および網膜組織学的所見に異常が見られないことを明らかにした。本研究で見られたOLETFにおけるERG(b波、OP)異常においても網膜微小血管レベルでの血流量の低下が関与している可能性がある。OLETFにおける経時的な網膜血流変化に関する報告はなく今後更なる研究が必要である。

さらに前述の代謝因子や血流因子により招来する低酸素状態がERG(b波、OP)異常を引き起こしている可能性がある。Ditzel⁵⁶⁾によるとケトアシドーシスのない糖尿病患者(平均罹病期間8.5年)において血液の酸素解離曲線が左方に移動し、その結果組織への酸素供給量が対照に比べ30%減少するという。Alderら⁵⁷⁾によれば、STZ誘発糖尿病ラットで網膜動脈からの酸素の拡散が減少するとともに無毛細血管領域における酸素消費が増加するため、網膜の低酸素状態を来すという。軽度の糖尿病網膜症を有する患者で高酸素負荷に対する血流低下の反応性が正常人に比べ減弱しているとの報告⁵⁸⁾や、網膜症があっても軽度インスリン依存型糖尿病患者において、正常人に比べコントラスト感度が低下しており、このコントラスト感度低下は高酸素負荷により改善されるとの報告⁵⁹⁾がある。これらはいずれも糖尿病網膜において低酸素状態を来していることを示唆するものと言える。よってOLETFにおいても糖尿病の進行に伴い網膜の低酸素状態を来している可能性が想定される。低酸素状態とERG異常に関して、米村ら⁶⁰⁾によれば、ウサギで低酸素呼吸(8~11%酸素)させるとOPの振幅は減弱せず、頂点潜時のみが増長する。酒井¹⁹⁾によれば、ウサギの摘出眼杯ERGにおいて浸漬液に通気する酸素濃度を100%から99.5%へ低下させることでOP頂点潜時は延長し(a波、b波の頂点潜時・振幅、およびOP振幅は不変)、100%から95.0%へ低下させると、それに加えてb波の頂点潜時延長・振幅低下、およびOPの振幅低下(a波は不変)が見られるという。これらより網膜の実験的低酸素状態によりヒト糖尿病網膜症早期におけるERG所見を模すことができ、網膜の低酸素状態が糖尿病網膜症におけるERG異常の成因に深く関わっている可能性を示唆する。OLETFでも、24週齢において白血球の一過性網膜毛細血管栓塞⁴²⁾が証明されており、35週齢に至って不可逆的な毛細血管閉塞へと進行し網膜虚血ないし低酸素状態を生じた可能性がある。OLETFの35週齢以降のb波、OP異常においてもポリオール代謝異常、DAG/PKC経路の亢進などの代謝因子、および血流因子によって低酸素状態を来し網膜神経細胞の機能失調を生じている可能性が考えられる。

糖尿病発病後長期経過した55週齢OLETFにおいて、血清へ

モグロビンA_{1c}値はa波頂点潜時, b波頂点潜時, O₁, O₂, O₃, O₄頂点潜時と正の相関, a波振幅, b波振幅と負の相関を示した(表1)。ヘモグロビンA_{1c}値は過去の血糖状態を示しているもので, これらERG諸因子の変化は持続する高血糖の影響であると考えられる。また, 血糖値も血清ヘモグロビンA_{1c}値とERGの関係とはほぼ同様に, a波頂点潜時, b波頂点潜時, O₁, O₂, O₃頂点潜時と正の相関, a波振幅, b波振幅と負の相関を示し, 血糖値が高いほどERGが減弱していた(表1)。55週齢OLETFにおける糖尿病網膜症およびERG減弱に対する血管因子の関与について以下に考察する。

高血糖の持続により生じる終末糖化産物(advanced glycation endproduct, AGE)が微小血栓形成を促進するとの報告がある。Yamagishiら⁶¹⁾によればAGEはAGE受容体を介して培養ヒト皮膚微小血管の内皮細胞に働いて血小板凝集抑制作用を有するプロスタサイクリンの産生を阻害し, 抗線溶作用を有するプラスミノゲンアクチベーターインヒビター-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)のmRNAレベルを亢進させる。また, 培養ヒト臍帯静脈内皮細胞におけるプロスタサイクリン産生を促進する周皮細胞に対して, AGEはその増殖に抑制的に働き, 急性毒性を有する⁶²⁾⁶³⁾。さらに抗凝固作用を有するトロンボモジュリンの活性を抑制し, 凝固作用を持つ組織因子の発現を誘導するという⁶⁴⁾。

また, AGEは血管拡張作用を有する一酸化窒素(nitric oxide, NO)を不活性化すると報告⁶⁵⁾がある。NOが不活性化されれば, 網膜毛細血管の拡張性が失われ前述のDAG/PKC経路の亢進, エンドセリン-1の増加とともに網膜低灌流を引き起こす可能性が示唆される。Segawaら⁶⁶⁾は60週齢OLETFにおける血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)の網膜mRNA量はLETOの2.2倍と高く(9週齢では有意差なし), AGEの血清濃度と正の相関を示し, また, 血清AGE濃度とO₃頂点潜時との間にも正の相関が見られることを報告した。Miyamuraら⁴⁾は56週齢OLETFにおける網膜病理所見でヒトの糖尿病網膜症と同様に毛細血管の口径不同, 狭小化, 蛇行, ループ形成, 毛細血管基底膜の肥厚, 周皮細胞の萎縮・変性, 内皮細胞の変性を確認した。即ち, この時期で細小血管瘤は見られないものの形態学的な網膜内細小血管症が存在することが明らかになっている。本研究においても週齢を重ねるにつれてAGEが主に血管壁や血管周囲のグリア細胞に蓄積し微小血栓の形成および低灌流により網膜の低酸素状態を引き起こし, OLETF 35週齢以降のOP異常を招来した可能性が示唆される。

これらのAGEの直接的な作用の他に, AGEはVEGFの発現を亢進させるとの見解がある。VEGFは, 血小板活性化作用を有するフォンウィルブランド因子の分泌を促進し⁶⁷⁾, 凝固作用を持つ組織因子の発現を誘導する⁶⁸⁾ことから, AGEと同様, 血栓形成作用を有することが知られる。サルでVEGFを硝子体内に注入すると虚血を伴った毛細血管閉塞やその他の糖尿病網膜症同様の網膜血管病変, 即ち網膜血管の拡張, 蛇行, 浮腫, 細小血管瘤, 網膜内出血を呈することが報告されている⁶⁹⁾。AGEをラット硝子体内へ注入して4時間後, 網膜神経節細胞層, 内顆粒層, 網膜色素上皮細胞層においてVEGFの発現亢進が起こる⁷⁰⁾。AGEを10日間腹腔内投与したラットの網膜神経節細胞層, 内顆粒層でVEGFの発現亢進が見られる⁷¹⁾。試験管内の実験では, 血管内皮細胞, 平滑筋細胞, Müller細胞, 網膜色素上皮細胞でAGEによるVEGF発現の亢進が報告されている⁷⁰⁾⁷²⁾⁷³⁾。

臨床的にも糖尿病患者の網膜血管においてAGEとVEGFの局在に相関が見られるとの報告⁷⁴⁾や前房水のAGEとVEGFの濃度に正相関が見られるとの報告⁷⁵⁾がある。以上よりAGEが直接的ないしVEGFの発現を誘導することによって間接的に微小血栓形成を促し, やがて毛細血管閉塞を生じ, 網膜の虚血および低酸素状態を来すと想定される。さらにVEGFは低酸素状態で誘導されるという⁷⁶⁾⁷⁸⁾。よって低酸素状態がさらにVEGFの発現を助長し悪循環を引き起こし網膜症を悪化させると考えられる。本研究でもAGEの沈着およびVEGFの発現亢進により, 毛細血管閉塞を来し, 結果として生じる網膜低酸素状態が55週齢OLETFにおけるERG異常に深く関与するものと考えられる。

VEGFは血管透過性因子(vascular permeability factor)としても知られるように, 強力な血管透過性亢進作用を有し, その結果, 血液網膜関門の障害を来す。糖尿病患者⁷⁹⁾および糖尿病ラット⁸⁰⁾において, VEGF発現の見られる網膜血管にアルブミンの漏出に表れる血液網膜関門の障害の検出率が高いと報告されている。血管透過性亢進の起こる時期に関して検眼鏡の網膜症の見られない糖尿病患者においても蛍光眼底造影を行うと血管漏出が21.1%に認められ⁸¹⁾, 糖尿病ラット(STZ 65 mg/kg, 静脈内投与)において毛細血管基底膜の肥厚や周皮細胞の変性といった組織学的所見に先行するとされる⁸²⁾。一方, VEGF発現も網膜血管の解剖学的異常のほとんど見られない糖尿病患者の網膜に見られている⁸³⁾。これらよりVEGFが糖尿病網膜症早期より見られる血管透過性亢進(血液網膜関門の障害)の一因となっていることが示唆される。血液網膜関門が破綻すると血中のAGEが神経網膜へ漏出し, AGEに感受性のある神経節細胞, Müller細胞でのVEGF発現の更なる亢進を招くと想定される。これらを勘案すればAGEが直接的ないしは血栓形成作用や血管透過性亢進作用を有するVEGFの過剰発現を介して間接的に毛細血管の閉塞や血液網膜関門の障害を引き起こし, OLETFにおける糖尿病網膜症の病態に重要な役割を担っていると同時に, ERG異常に表される網膜神経細胞の機能不全に関与していることが示唆される。

グループ2の自由摂食下で飼育した55週齢OLETFにおいて, 血清トリグリセリド, 総コレステロール, HDLコレステロール値はLETO(図12A, BおよびC), 食餌制限OLETF(図22A, BおよびC)に比べ有意に上昇していた。また, 55週齢OLETFの血清トリグリセリド値はb波頂点潜時, O₁, O₂, O₃, O₄頂点潜時と正の相関, a波振幅と負の相関, 血清総コレステロール, HDLコレステロール値はa波頂点潜時, b波頂点潜時, O₁, O₂, O₃, O₄頂点潜時と正の相関, a波振幅, b波振幅と負の相関を示した(表1)。

糖尿病患者では高トリグリセリド血症, 高コレステロール血症, 高低比重リポ蛋白(low density lipoprotein, LDL)コレステロール血症, 低HDLコレステロール血症を高頻度で合併する。中でも高コレステロール血症, 高LDLコレステロール血症は血管の硬化性変化の原因になるとされている。生井ら⁸⁴⁾によれば電子顕微鏡による病理組織学的検討で網膜細動脈だけでなく毛細血管にも硬化性病変が見られ, 後者の方が早期に現れるという。一方で高トリグリセリド血症はインスリン非依存型糖尿病において最も高頻度に合併し, 高インスリン血症とともに抗線溶作用を有するPAI-1を増加させ, 微小血栓形成の一因と成り得るとい⁸⁵⁾⁸⁶⁾。病理学的に脂肪血栓が糖尿病網膜症患者の

網膜毛細血管や細動脈に多く検出され⁸⁷⁾、瀬川⁸⁸⁾は、網膜症が重篤になるほど高トリグリセリド血症、高超低比重リポ蛋白血症を合併している割合が高いと報告している。以上より脂質代謝異常が毛細血管硬化および微小血栓形成の一因となり網膜症を増悪させている可能性がある。脂質代謝とERGの関係を調べた報告は少ないが、Hottaら⁸⁹⁾は糖尿病ラット(STZ 50 mg/kg, 静脈内投与)のOP頂点潜時の延長はプロピオニル-L-カルニチンの投与により改善され、OP頂点潜時と血漿トリグリセリドおよび総コレステロール濃度との間に正の相関が見られたことより、プロピオニル-L-カルニチン投与による脂質代謝の正常化により糖尿病ラットのERG異常が改善した可能性を示唆した。Kuriyamaら⁹⁰⁾によればOLETFの血漿トリグリセリド値、総コレステロール値は過食により6週齢で既にLETOに比べ有意に高い。また木村ら³³⁾は60週齢OLETFの組織学的検討において網膜毛細血管壁に脂質と蛋白質の重合した高分子物質の沈着を認めると報告している。本研究においても55週齢OLETFの血清トリグリセリド値はLETOの約9倍(図12A)、総コレステロール値は約2倍(図12B)であった。OLETFにおいて低週齢からの脂質代謝異常が網膜毛細血管の硬化性病変や微小血栓形成に深く関与し、それによって招来する虚血ないし低酸素状態によりERG異常を引き起こしている可能性がある。

グループ2の55週齢の自由摂食下で飼育したOLETFでは食餌制限OLETFに比べ、網膜ドーパミン、DOPAC、HVAは有意に低下しており(図23A, BおよびC)、これまでの糖尿病における網膜ドーパミン代謝に関する報告^{27)~31)}に一致した。網膜ドーパミンとERG各波頂点潜時、振幅には相関は見られなかった(表1)。DOPACはa波、O₁、O₂、O₃、O₄頂点潜時とは負の相関を示したが、b波頂点潜時および各波振幅とは相関を示さなかった(表1)。HVAはa波、b波、O₁、O₂、O₃、O₄頂点潜時と負の相関を示し、a波振幅と正の相関を示したが、その他各波振幅と相関しなかった(表1)。

ドーパミン性シナプスの前シナプス性神経終末に取り込まれたチロシンはTHによって3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン(3,4-dihydroxyphenylalanine, DOPA)に変換され直ちにドーパデカルボキシラーゼにより脱炭酸化されドーパミンとなる。シナプス間隙に放出されたドーパミンは神経細胞内に取り込まれモノアミンオキシダーゼにより脱アミノ化されDOPACとなり最終的にカテコール-O-メチルトランスフェラーゼによりHVAへと代謝される。

河崎⁹⁰⁾は糖尿病患者および糖尿病動物におけるOP異常の一因が網膜のドーパミン作動性神経細胞の機能失調にあると述べた。本研究において網膜ドーパミン、DOPAC、HVAとOP振幅の間に相関が見られなかった理由として、第1に、ドーパミン作動性アマクリン細胞がOPの発生源であるとすればそのシナプス間隙における局所ドーパミン濃度がOP振幅に深く関わっていると思われ、網膜における単位蛋白当たりのドーパミン含量が網膜中の神経細胞のおおむね1%以下を占めるにすぎないドーパミン作動性神経細胞(アマクリン細胞、網状層間細胞)のシナプス間隙における濃度を適切に反映していない可能性が挙げられる。第2に、網膜ドーパミンおよびその代謝産物含量の日内変動の影響や明順応、暗順応の影響が挙げられる。Gibson³¹⁾によれば、正常ラットの血清チロシン比(血清ロイシン+イソロイシン+バリン+トリプトファン+フェニルアラニン

に対する血清チロシンの比)、網膜チロシン、ドーパミン、DOPAC、HVA濃度、DOPA蓄積率はおよそ平行して日内変動(夜間に低値、日中早い時間帯にピーク)を示し、糖尿病ラット(STZ 65 mg/kg, 腹腔内投与後3週)でも網膜ドーパミン代謝回転のピークの鈍化と遅延が見られるものの網膜DOPAC、HVA濃度にははっきりとした日内変動を認めるという。また、Fernstromら³⁰⁾は網膜におけるTH活性とDOPAの蓄積率が暗順応下に比べて明順応下(照明開始15分後)では糖尿病ラット(STZ 65 mg/kg, 心臓内投与10~14日後)の場合には3倍、正常ラットの場合には8倍に上昇しており、明順応下でのみ網膜チロシン濃度とDOPAの蓄積率との間に正相関が見られたことから、THの活性化が起こる明順応下でのみ網膜アマクリン細胞においてチロシンの供給に対してDOPAの蓄積率が増加するとした。本研究では網膜単位蛋白当たりのドーパミン含量を測定しており、またERG測定と網膜ドーパミンの測定は別日に行っている。第1の可能性を検証するためには神経細胞シナプス間隙におけるドーパミン濃度測定が必要であり、これは現状では手技的に困難である。第1の可能性が否定できたとして第2の理由が関与するとすれば、ERGと網膜ドーパミンの関係を調べるためにはERG測定と網膜ドーパミン測定を同日同時帯に行う必要がある。本研究はERGと網膜ドーパミンの関係よりも同一週齢でのLETOおよび食餌制限OLETFと自由摂食OLETFとの間でのERGおよび網膜ドーパミン代謝の比較に重点をおいていた。ERG測定と網膜ドーパミン測定を同日同時帯に行えばERG測定期間が長くなり同一週齢での各群間での比較が難しくなる。したがってERG測定と網膜ドーパミンの測定は別日時に施行しなければならなかった。ERGと網膜ドーパミンのより直接的な関係を知るには今後更なる研究が必要と思われる。

本研究は、自然発症インスリン非依存型糖尿病モデル動物であるOLETFにおいて検眼鏡の糖尿病網膜症の発症がなくともERG異常に見られる機能的糖尿病網膜症を発症していることを明らかにし、ERG異常には高血糖およびそれに付随する生化学的異常が直接に網膜内神経伝達を変化させることあるいは眼内血流動態および酸素供給が失調することの一方または両方が関与する可能性があること、さらに食餌制限により糖尿病発症を抑制すれば遺伝的に糖尿病に至る動物でも糖尿病網膜症の発症を抑制できることを明らかにした。従来、糖尿病モデル動物にSTZ誘発糖尿病ラットが多用されてきたが、OLETFはヒトインスリン非依存型糖尿病に近い病態を呈するという大きな利点がある。OLETFの網膜機能をOPを指標として追跡することにより、糖尿病網膜症の発症・進展・治療効果の評価が格段に進むと期待される。

結 論

自然発症インスリン非依存型糖尿病モデルであるOLETFラットにおけるERGの経時的変化および体重、血糖値、血清ヘモグロビンA_{1c}値、血清脂質、網膜ドーパミンとその代謝産物を同系であってかつ糖尿病を発症しないLETOラットおよび食餌制限により糖尿病発症を抑制したOLETFラットと比較した。また、55週齢OLETFにおけるERG各波の頂点潜時および振幅と、体重、血糖値、血清ヘモグロビンA_{1c}値、血清脂質、網膜ドーパミンとその代謝産物との相関を検討した。

1. LETOと比較した自由摂食OLETFのERG経時的変化の検

討では、b波、およびO₄頂点潜時は糖尿病状態である35週齢以後も有意に短縮し、a波、b波、O₂、O₃、O₄振幅は有意に増大していた。また、55週齢における網膜ドーパミン、DOPACが自由摂食OLETFにおいてLETOに比べ有意に高く、OLETFにおける自然発症糖尿病以外の遺伝的異常であるCCK-A受容体の欠損の関与が示唆された。

2. 食餌制限OLETFと比較した自由摂食OLETFのERG経時的变化の検討では、耐糖能障害を来し始める15、20週齢においてO₂頂点潜時は有意に短縮しており、高血糖に伴う網膜代謝の亢進や血流増加が想定された。35週齢よりb波、O₂、O₃、およびO₄の、40週齢よりa波の、45週齢よりO₁の頂点潜時が自由摂食OLETFでそれぞれ延長し、また35週齢以降ではa波、b波、O₂、O₃振幅が低下し、そのERG変化は糖尿病状態の進行によるものと考えられた。

3. 糖代謝に関して、55週齢OLETFの血糖値はa波頂点潜時、b波頂点潜時、O₁、O₂、O₃頂点潜時と正の相関、a波振幅、b波振幅と負の相関を示し、血清ヘモグロビンA_{1c}値はそれに加えてO₄頂点潜時も正の相関を示し、糖尿病状態がERG異常を決定する重要な因子であると考えられた。

4. 脂質代謝に関して、55週齢OLETFの血清総コレステロールおよびHDLコレステロール値はa波頂点潜時、b波頂点潜時、O₁、O₂、O₃、O₄頂点潜時と正の相関、a波振幅、b波振幅と負の相関、血清トリグリセリド値はb波頂点潜時、O₁、O₂、O₃、O₄頂点潜時と正の相関、a波振幅と負の相関を示し、脂質代謝異常もERG異常に関与していると思われる。

5. 55週齢における網膜ドーパミン、DOPAC、HVAは自由摂食OLETFにおいて食餌制限OLETFに比べ有意に低く、糖尿病状態による網膜ドーパミン代謝の低下が示唆された。55週齢OLETFの網膜ドーパミンとERGの間に相関は認められなかった。DOPACはa波、O₁、O₂、O₃、O₄頂点潜時とは負の相関を示し、HVAはa波、b波、O₁、O₂、O₃、O₄頂点潜時と負の相関を示し、a波振幅と正の相関を示した。網膜内ドーパミン代謝異常もERG異常に関与していると思われる。

以上より、OLETFラットにおいて、糖尿病状態の進行に伴う網膜神経細胞の機能失調がERGによって確認され、脂質代謝異常による眼内血流動態の異常ないし網膜内ドーパミン代謝異常による網膜内神経伝達の異常がERG異常に関与していることが示唆された。OLETFを食餌制限下で飼育したOLETFと比較して使用することにより遺伝因子の関与を否定でき、糖尿病網膜症の病態解明および治療薬開発が進歩していくものと考えられた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師河崎一夫教授に深甚なる謝意を捧げます。また、御指導と御校閲を頂きました白尾裕助教授に深く感謝致します。更に、終始直接の御指導と御教示を賜りました瀬川安則講師に心より感謝致します。本研究に際し多大な御協力を戴きました桜井真由美助手、金沢大学大学院医学系研究科光情報伝達学の諸先生方に厚くお礼を申し上げます。

尚、本論文の要旨の一部は第4回OLETFラット研究会(1998年、大阪)、第46回日本臨床視覚電気生理学会(1998年、別府)において発表した。

文 献

1) 赤澤好温. 糖尿病及びその合併症の予防と疫学に関する研究. 糖尿病調査研究報告書. 17頁, 厚生省, 東京, 1997

2) Kobayashi T, Kubo E, Takahashi Y, Kasahara T, Yonezawa H, Akagi Y. Retinal vessel changes in galactose-fed dogs. *Arch Ophthalmol* 116: 785-789, 1998

3) Kawano K, Hirashima T, Mori S, Man ZW, Natori T. Establishment of the OLETF rat. *In* Shima K (ed), Obesity and NIDDM: Lessons from the OLETF rat, 1st ed, p1-11, Elsevier Science B.V. Amsterdam, 1999

4) Miyamura N, Bhutto IA, Amemiya T. Retinal capillary changes in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats (spontaneously diabetic strain). *Ophthalmic Res* 31: 358-366, 1999

5) 米村大蔵. 人眼網膜電図の研究. *日限会誌* 81: 1632-1665, 1977

6) 米村大蔵, 河崎一夫. 律動様小波. *臨床網膜電図学*, 第1版, 104-123頁, 医学書院, 東京, 1985

7) 米村大蔵, 河崎一夫. 糖尿病網膜症. *臨床網膜電図学*, 第1版, 154-164頁, 医学書院, 東京, 1985

8) Kuriyama H, Matsuzawa Y. Molecular mechanism of hyperlipidemia in the OLETF rat. *In* Shima K (ed), Obesity and NIDDM: Lessons from the OLETF rat, 1st ed, p149-157, Elsevier Science B.V. Amsterdam, 1999

9) Sato T. Molecular mechanism of insulin resistance in skeletal muscle of the OLETF rat. *In* Shima K (ed), Obesity and NIDDM: Lessons from the OLETF rat, 1st ed, P67-72, Elsevier Science B.V. Amsterdam, 1999

10) 河野一弥, 平嶋 司, 森 茂人, 名取 孝. OLETFラット: その誕生の背景と発想そして進展. *OLETFラット研究会記録* 1: 1-4, 1995

11) 森 茂人, 平嶋 司, 河野一弥, 名取 孝. OLETFラットの糖尿病および糖尿病性腎症に対する食餌療法の効果. *糖尿病* 38: 593-599, 1995

12) 中村二郎, 堀田 鏡. OLETFラットと糖尿病性神経障害. *OLETFラット研究会記録* 1: 79-84, 1995

13) 木村 聡, 鶴谷知子, 吉本弘志. OLETFラットにおける網膜の組織学的変化. *OLETFラット研究会記録* 1: 85-88, 1995

14) 河野一弥, 平嶋 司, 森 茂人. 糖尿病のモデル実験動物II. 肥満を伴うインスリン非依存型糖尿病 糖尿病が長期間持続し合併症を伴うOLETFラットのモデル動物としての有用性. *アニテックス* 5 (4): 186-190, 1993

15) Simonsen SE. The value of the oscillatory potential in selecting juvenile diabetics at risk of developing proliferative retinopathy. *Metab Pediat Syst Ophthalmol* 5: 55-61, 1981

16) Yoshida A, Kojima M, Ogasawara H, Ishiko S. Oscillatory potentials and permeability of the blood retinal barrier in noninsulindependent diabetic patients without retinopathy. *Ophthalmology* 98: 1266-1271, 1991

17) Juen S, Kieselbach GF. Electrophysiological changes in juvenile diabetics without retinopathy. *Arch Ophthalmol* 108: 372-375, 1990

18) Holopigian K, Seiple W, Lorenzo M, Carr R. A comparison of photopic and Scotopic electroretinographic changes in early diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 2773-2780, 1992

19) 酒井宏之. ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットにおけ

- る網膜電図変化とその要因に関する研究. 十全医会誌 108: 303-329, 1999
- 20) Lowitt S, Malone JI, Salem A, Kozak W, Orfalian Z. Acetyl-L-carnitine corrects electroretinographic deficits in experimental diabetes. *Diabetes* 42: 1115-1118, 1993
- 21) Biró K, Pálhalmi J, Tóth AJ, Kukorelli T, Juhász. Bimoclolmol improves early electrophysiological signs of retinopathy in diabetic rats. *Neuroreport* 9: 2029-2033, 1998
- 22) Segawa M, Hirata Y, Fujimori S, Okada K. The development of electroretinogram abnormalities and the possible role of polyol pathway activity in diabetic hyperglycemia and galactosemia. *Metabolism* 37: 454-460, 1988
- 23) Hotta N, Nakamura J, Sakakibara F, Hamada Y, Hara T, Mori K, Nakashima E, Sasaki H, Kasama N, Inukai S, Koh N. Electroretinogram in sucrose-fed diabetic rats treated with an aldose reductase inhibitor or anticoagulant. *Am J Physiol* 273: E965-971, 1997
- 24) 白尾 裕, 加藤 要, 田村敏博, 佐々木次壽, 河原崎正裕, 東出朋巳, 小林 顕. ドパーミンおよびハロペリドール硝子体内注入のウサギin-vivo ERGに及ぼす影響. 眼紀 45: 23-28, 1994
- 25) 小林 顕, 白尾 裕, 田川茂樹, 加藤 要, 田村敏博. 網膜内因性ドーパミンによるウサギin vivo 網膜電図の変化. 日眼会誌100: 111-117, 1996
- 26) 高綱陽子, 安達恵美子, 稲生英俊, 千葉胤道. ドーパミン神経毒MPTPの Maus 網膜に及ぼす影響. 日眼会誌 96: 767-775, 1992
- 27) Fernstrom M, Volk E, Fernstrom JD. In vivo tyrosine hydroxylation in the diabetic rat retina: effect of tyrosine administration. *Brain Res* 298: 167-170, 1984
- 28) Northington FK, Hamill RW, Banerjee SP. Dopamine-stimulated adenylate cyclase and tyrosine hydroxylase in diabetic rat retina. *Brain Res* 337: 151-154, 1985
- 29) Nishimura C, Kuriyama K. Alterations in the retinal dopaminergic system in rats with streptozotocin induced diabetes. *J. Neurochem* 45: 448-455, 1985
- 30) Fernstrom MH, Volk EA, Fernstrom JD, Iuvone PM. Effect of tyrosine administration on dopa accumulation in light- and dark-adapted retinas from normal and diabetic rats. *Life Sci* 39: 2049-2057, 1986
- 31) Gibson CJ. Diurnal alterations in retinal tyrosine level and dopamine turnover in diabetic rats. *Brain Res* 454: 60-66, 1988
- 32) Shirao Y, Segawa Y, Higashide T, Kawasaki K, Yamagishi S, Yamamoto H, Shima K, Mizuno A, Yabe-Nishimura C, Hashimoto T, Miyata H. Biochemical and electrophysiological alterations in the OLETF rat retina. *In* Shima K (ed), Obesity and NIDDM: Lessons from the OLETF rat, 1st ed, P129-139, Elsevier Science B.V. Amsterdam, 1999
- 33) You ZB, Herrera-Marschitz M, Pettersson E, Nylander I, Gojny M, Shou HZ, Kehr J, Godukhin O, Hokfelt T, Terenius L, Ungerstedt U. Modulation of neurotransmitter release by cholecystokinin in the neostriatum and substantia nigra of the rat: regional and receptor specificity. *Neuroscience* 74: 793-804, 1996
- 34) 船越顕博, 宮坂京子. CCK-A受容体異常のOLETFラットの病態へのかかり合い. OLETFラット研究会記録5: 24-30, 1999
- 35) 満 志偉, 平嶋 司, 森 茂人, 河野一弥. 食餌制限による組織へのトリグリセライド蓄積の減少と糖尿病改善との関連性: OLETFラットを用いての検討. 糖尿病42: 657-665, 1999
- 36) 安藤文隆. 糖尿病患者のブドウ糖負荷試験時の律動様小波の研究. 日眼会誌72: 1232-1243, 1968
- 37) Lovasik JV, Spafford MM. An electrophysiological investigation of visual function in juvenile insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Optom Physiol Opt* 65: 236-253, 1988
- 38) Grunwald JE, Riva CE, Martin DB, Quint AR, Epstein PA. Effect of insulin-induced decrease in blood glucose on the human diabetic retinal circulation. *Ophthalmology* 94: 1614-1620, 1987
- 39) Feke GT. Effect of blood glucose variations on the reproducibility of retinal blood flow measurements in type I diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29 (suppl): 260, 1988
- 40) Kohner EM, Patel V, Rassam SMB. Role of blood flow and impaired autoregulation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes* 44: 603-607, 1995
- 41) 菊池方利. 糖尿病発症以前に何が起きているか. 日本医事新報 3491: 127, 1991
- 42) Miyamoto K, Hiroshiba N, Tsujikawa A, Ogura Y. In vivo demonstration of increased leukocyte entrapment in retinal microcirculation of diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 2190-2194, 1998
- 43) 米村大蔵, 河崎一夫. b波. 臨床網膜電図学, 第1版 73-78頁, 医学書院, 東京, 1985
- 44) 白尾 裕. ERG構成成分の細胞起源と解釈. 眼科 34: 625-635, 1992
- 45) Tian N, Slaughter MM. Correlation of dynamic responses in the ON bipolar neuron and the b-wave of the electroretinogram. *Vision Res* 35: 1359-1364, 1995
- 46) Simonsen SE. ERG in diabetics. *In* Francois J (ed), The clinical value of electroretinography. 1st ed, p403-412, Karger, New York, 1968
- 47) McNaughton PA. Light response of vertebrate photoreceptors. *Physiol Rev* 70: 847-883, 1990
- 48) Bush RA, Sieving PA. A proximal retinal component in the primate photopic ERG a-wave. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 635-645, 1994
- 49) 堀田 饒, 坂本信夫. 糖尿病網膜症とアルドース還元酵素阻害剤. あたらしい眼科 8: 885-895, 1991
- 50) Williamson JR, Chang K, Frangos M, Hasan KS, Ido Y, Kawamura T, Nyengaard JR, Enden MVD, Kiro C, Tilton RG. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes* 42: 801-813, 1993
- 51) Bursell SE, Clermont AC, Kinsley BT, Simonson DC, Aiello LM, Wolpert HA. Retinal blood flow changes in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and no diabetic retinopathy. A video fluorescein angiography study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 886-897, 1996
- 52) Miyamoto K, Ogura Y, Nishiwaki H, Matsuda N, Honda Y, Kato S, Ishida H, Seino Y. Evaluation of retinal microcirculatory

- alterations in the Goto-Kakizaki rat. A spontaneous model of Non-insulin-dependent diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 898-905, 1996
- 53) Ishii H, Koya D, King GL. Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *J Mol Med* 76: 21-31, 1998
- 54) Bursell SE, Takagi C, Clermont AC, Takagi H, Mori F, Ishii H, King GL. Specific retinal diacylglycerol and protein kinase C beta isoform modulation mimics abnormal retinal hemodynamics in diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 2711-2720, 1997
- 55) Park JY, Takahara N, Gabriele A, Chou E, Naruse K, Suzuma K, Yamauchi T, Ha SW, Meier M, Rhodes CJ, King GL. Induction of endothelin-1 expression by glucose: an effect of protein kinase C activation. *Diabetes* 49: 1239-1248, 2000
- 56) Ditzel J. Impaired oxygen release caused by alterations of the metabolism in the erythrocytes in diabetes. *Lancet* 1: 721-723, 1972
- 57) Alder VA, Su EN, Yu DY, Cringle SJ, Yu PK. Diabetic retinopathy: early functional changes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 24: 785-788, 1997
- 58) Grunwald JE, Riva CE, Petrig BL, Sinclair SH, Brucker AJ. Effect of pure O₂-breathing on retinal blood flow in normals and in patients with background diabetic retinopathy. *Curr Eye Res* 3: 239-241, 1984
- 59) Harris A, Arend O, Danis RP, Evans D, Wolf S, Martin BJ. Hyperoxia improves contrast sensitivity in early diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 80: 209-213, 1996
- 60) 米村大蔵, 河崎一夫, 柳田 隆, 生体眼 ERG におよぼす低酸素呼吸の影響. *眼紀* 28: 779-785, 1977
- 61) Yamagishi S, Fujimori H, Yonekura H, Yamamoto Y, Yamamoto H. Advanced glycation endproducts inhibit prostacyclin production and induce plasminogen activator inhibitor-1 in human microvascular endothelial cells. *Diabetologia* 41: 1435-1441, 1998
- 62) Yamagishi S, Kobayashi K, Yamamoto H. Vascular pericytes not only regulate growth but also preserve prostacyclin-producing ability and protect against lipid peroxide-induced injury of co-cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 190: 418-425, 1993
- 63) Yamagishi S, Hsu CC, Taniguchi M, Harada S, Yamamoto Y, Ohsawa K, Kobayashi K, Yamamoto H. Receptor-mediated toxicity to pericytes of advanced glycosylation end products. *Biochem Biophys Res Commun* 213: 681-687, 1995
- 64) Esposito C, Gerlach H, Brett J, Stern D, Vlassara H. Endothelial receptor mediated binding of glucose-modified albumin is associated with increased monolayer permeability and modulation of cell surface coagulant properties. *J Exp Med* 170: 1387-1407, 1989
- 65) Hogan M, Cerami A, Bucala R. Advanced glycosylation endproducts block the antiproliferative effect of nitric oxide. *J Clin Invest* 90: 1110-1115, 1992
- 66) Segawa Y, Shirao Y, Yamagishi S, Higashide T, Kobayashi M, Katsuno K, Iyobe A, Harada H, Sato F, Miyata H, Asai H, Nishimura A, Takahira M, Souno T, Segawa Y, Maeda K, Shima K, Mizuno A, Yamamoto H, Kawasaki K. Upregulation of retinal vascular endothelial growth factor mRNAs in spontaneously diabetic rats without ophthalmoscopic retinopathy. *Ophthalmic Res* 30: 333-339, 1998
- 67) Brock TA, Dvorak HF, Senger DR. Tumor-secreted vascular permeability factor increases cytosolic Ca²⁺ and von Willebrand factor release in human endothelial cells. *Am J Pathol* 138: 213-221, 1991
- 68) Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti PC, Pan YCE, Olander JV, Connolly DT, Stern D. Vascular permeability factor: A tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med* 172: 1535-1545, 1990
- 69) Tolentino MJ, Miller JW, Gragoudas ES, Jakobiec FA, Flynn E, Chatzistefanou K, Ferrara N, Adamis AP. Intravitreal injections of vascular endothelial growth factor produce retinal ischemia and microangiopathy in an adult primate. *Ophthalmology* 103: 1820-1828, 1996
- 70) Lu M, Kuroki M, Amano S, Tolentino M, Keough K, Kim I, Bucala R, Adamis AP. Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelial growth factor expression. *J Clin Invest* 101: 1219-1224, 1998
- 71) Stitt AW, Bhaduri T, McMullen CBT, Gardiner TA, Archer DB. Advanced glycation end products induce blood-retinal barrier dysfunction in normoglycemic rats. *Molecular Cell Biology Research Communication* 3: 380-388, 2000
- 72) Yamagishi S, Yonekura H, Yamamoto Y, Katsuno K, Sato F, Mita I, Ooka H, Satozawa N, Kawakami T, Nomura M, Yamamoto H. Advanced glycation end products-driven angiogenesis in vitro. Induction of the growth and tube formation of human microvascular endothelial cells through autocrine vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 272: 8723-8730, 1997
- 73) Hirata C, Nakano K, Nakamura N, Kitagawa Y, Shigeta H, Hasegawa G, Ogata M, Ikeda T, Sawa H, Nakamura K, Ienaga K, Obayashi H, Kondo M. Advanced glycation end products induce expression of vascular endothelial growth factor by retinal Muller cells. *Biochem Biophys Res Commun* 236: 712-715, 1997
- 74) Murata T, Nagai R, Ishibashi T, Inomata H, Ikeda K, Horiuchi S. The relationship between accumulation of advanced glycation end products and expression of vascular endothelial growth factor in human diabetic retinas. *Diabetologia* 40: 764-769, 1997
- 75) Endo M, Yanagisawa K, Tsuchida K, Okamoto T, Matsushita T, Higuchi M, Matsuda A, Takeuchi M, Makita Z, Koike T. Increased levels of vascular endothelial growth factor and advanced glycation end products in aqueous humor of patients with diabetic retinopathy. *Horm Metab Res* 33: 317-322, 2001
- 76) Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, Pasquale LR, Thieme H, Iwamoto MA, Park JE, Nguyen HV, Aiello LM, Ferrara N, King GL. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 331: 1480-1487, 1994
- 77) Tuder RM, Flook BE, Voelkel NF. Increased gene

expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lung exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide. *J Clin Invest* 95: 1798-1807, 1995

78) Minchenko A, Bauer T, Salceda S, Caro J. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *Lab Invest* 71: 374-379, 1994

79) Mathews MK, Merges C, McLeod DS, Luty GA. Vascular endothelial growth factor and permeability changes in human diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 2729-2741, 1997

80) Murata T, Nakagawa K, Khalil A, Ishibashi T, Inomata H, Sueishi K. The relation between expression of vascular endothelial growth factor and breakdown of the blood-retinal barrier in diabetic rat retina. *Lab Invest* 74: 819-825, 1996

81) 中川寛忠, 奥村 忠, 田辺譲二. 糖尿病における蛍光眼底造影所見とERG. *日眼会誌* 82: 810-817, 1978

82) Ishibashi T, Tanaka K, Taniguchi Y. Disruption of blood-retinal barrier in experimental diabetic rats: an electron microscopic study. *Exp Eye Res* 30: 401-410, 1980

83) Amin RH, Frank RN, Kennedy A, Elliott D, Puklin JE, Abrams GW. Vascular endothelial growth factor is present in glial cells of the retina and optic nerve of human subjects with nonproliferative diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 36-47, 1997

84) 生井 浩, 富永佳也, 猪俣 孟, 宇賀茂三, 岡田哲朗. 網膜毛細血管硬化“Capillarosclerosis retinae”の提唱とその概念. *日眼会誌* 72: 553-562, 1968

85) Bruckert E, Ankri A, Giral P, Turpin G. Relation between plasminogen activator inhibitor-1 and hepatic enzyme concentrations in hyperlipidemic patients. *Thromb Haemost* 72: 434-437, 1994

86) Juhan-Vague I, Roul C, Alessi MC, Ardisson JP, Heim M, Vague P. Increased plasminogen activator inhibitor activity in noninsulin dependent diabetic patients — relationship with plasma insulin. *Thromb Haemost* 61: 370-373, 1989

87) Chester EM, Banker BQ. The role of lipid thrombi in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Arch Intern Med* 120: 397-407, 1967

88) 瀬川要司. 糖尿病における網膜色素上皮症. *十全医会誌* 103: 743-781, 1994

89) Hotta N, Koh N, Sakakibara F, Nakamura J, Hamada Y, Hara T, Fukasawa H, Kakuta H, Sakamoto N. Effect of propionyl-L-carnitine on oscillatory potentials in electroretinogram in streptozotocin-diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 311: 199-206, 1996

90) 河崎一夫. 視覚における情報処理機構 律動様小波が関与する網膜内情報処理とその異常 糖尿病網膜症を中心に. *日眼会誌* 102: 813-836, 1998

Alteration of electroretinogram in spontaneously diabetic rats: effect of caloric restriction. Akihisa Yamada. Department of Ophthalmology, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — *J. Juzen Med Soc.*, **110**, 418 — 442 (2001)

Key words diabetes mellitus, electroretinogram, dopamine, retinopathy, caloric restriction

Abstract

Changes of the electroretinogram (ERG) in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats, which spontaneously develop non-insulin-dependent diabetes, were compared with controls in regard to parameters for diabetes and retinal dopamine metabolism. Non-diabetic Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) and calory-restricted (diet) OLETF rats served as control. The parameters for diabetes included body weight, blood glucose, serum HbA_{1c}, serum triglyceride, total cholesterol, high density lipoprotein (HDL) cholesterol, and those for retinal dopamine metabolism included retinal contents of dopamine, dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA). In contrast to numerous reports in the past, the well-fed (therefore, seriously hyperglycemic) OLETF rats in comparison to the LETO (normoglycemic) rats showed significantly larger amplitude of the 2nd to 4th wavelets (O₂ to O₄) of the oscillatory potentials, and significantly higher content of retinal dopamine and DOPAC even during diabetic state, which suggests that the supernormal oscillatory potentials in the well-fed OLETF rats derive from some intrinsic background of OLETF rats. When compared with the diet OLETF rats, the well-fed ones showed significantly faster O₂ at 15 to 20 weeks of age; but significantly delayed and smaller O₂ and O₃ at 35 weeks of age and later; and, at 55 weeks of age, delayed O₁ to O₃ whose peak latencies were prolonged in a positive correlation to the blood glucose and the serum HbA_{1c} levels. At 55 weeks of age in the well-fed OLETF rats, serum total cholesterol, serum HDL cholesterol and serum triglyceride levels were positively correlated to the peak latencies of the O₁ through O₄; and the retinal DOPAC and HVA contents were significantly lower compared with the diet ones and negatively correlated to the peak latencies of the O₁ to O₃. The present results suggest that OLETF rats develop retinal dysfunction along with the progression of diabetic state as evidenced by ERG, probably via disorders in the fundus circulation and/or retinal neural processing.