

# 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

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9422">http://hdl.handle.net/2297/9422</a>

## 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

金沢大学医学部医学科眼科学講座 (主任: 河崎一夫教授)  
酒 井 宏 之

ストレプトゾトシン (streptozotocin, STZ) 誘発糖尿病ラットにおける網膜機能変化を網膜電図 (electroretinogram, ERG) の a波, b波および律動様小波を指標として検討した。また糖尿病状態の血液・眼関門への影響を蛍光眼底検査, 硝子体フルオロフォトメトリーおよび組織学的検査法にて検討した。さらに本モデルラットに認められる ERG 変化が STZ の毒性によるのか, または糖尿病状態によって惹起されるのかを解明することを目的に, 糖尿病状態を一定期間維持した後にインスリンを投与し, ERG 変化に対するインスリンの濃度依存的な治療効果を検討した。また糖尿病における ERG 変化の原因の究明を目的として, 糖尿病ラットにおける網膜血流速度を走査レーザー検眼鏡によるフルオレセイン-Na 色素希釈法で測定し, さらに酸素分圧の変化による網膜機能変化をウサギ摘出眼杯の ERG の a波, b波および律動様小波を指標として検討した。STZ 投与後の糖尿病状態における a波および b波の振幅と頂点潜時は STZ 投与 6週間にわたり変化しなかったが, 律動様小波の振幅は STZ 投与 3週後より有意に低下し, 律動様小波の頂点潜時と頂点間隔は STZ 投与 2週後より有意に延長した。STZ 投与 6週後には血液・眼関門機能の有意な低下がみられたが, その際の蛍光眼底所見および網膜組織学的所見に明らかな異常はみられなかった。インスリンはこれらの電気生理学的な網膜機能異常を濃度依存的に回復させたが, 血液・眼関門機能に対しては明らかな回復効果を示さず, またその際の眼底所見および網膜組織学的所見に異常を認めなかった。STZ は投与 2週目で網膜血流量を有意に低下させたが, インスリン 5.0 単位/kg/日 1週間の投与は血糖値の改善とともに網膜血流量を明らかに回復させ, 同時に ERG も回復させた。ウサギ摘出眼杯において酸素分圧を 100.0% から 99.5% および 95.0% へと低下させることにより a波に有意な変化はみられなかったが, b波では 95.0% への低下により有意な振幅の低下と頂点潜時の延長がみられた。律動様小波では 99.5% への低下によって頂点潜時および頂点間隔は有意に延長し, 95.0% への低下ではさらに頂点潜時は顕著に延長し振幅は低下した。これらの変化は可逆的であり, 100.0% 酸素に置換することにより 30分以内には回復した。STZ 誘発糖尿病ラットにおける ERG 異常は, 血液・眼関門機能低下ならびに網膜組織学的な異常に先行して律動様小波に特徴的にみられ, これらの機能変化は STZ の毒性に起因せず, その一因として糖尿病状態に由来する網膜血流量の低下ないし低酸素状態が想定される。

**Key words** diabetes, oscillatory potential, electroretinogram, insulin, blood retinal barrier

糖尿病網膜症 (以下では網膜症と略記) は, 我国および欧米の先進国での主な失明原因である糖尿病合併症である<sup>1) 2)</sup>。近年の糖尿病治療の進歩により糖尿病患者の長寿が可能になり, それに伴い慢性合併症を持った罹病期間の長い糖尿病患者が年々増加の一途をたどり, 厚生省による疫学調査では我国における網膜症により失明に至る患者は年間 3000 人を越え, 成人失明原因の首位を占めている<sup>3)</sup>。網膜症は生命予後に直接関わる合併症ではないが, 進行すれば患者の生活に著しい支障を来すから, その発症・進展の阻止は糖尿病の管理上の重要課題の一つである。本症の管理の難しさの原因として, 臨床的にその病態が十分に把握されていないこと, 眼底所見以外にその進行程度を把握する検査法が乏しいこと, さらに治療薬の開発の遅れなどが挙げられる。

網膜症の成因に関してポリオール代謝異常仮説<sup>4)</sup>, レドックス

変化仮説<sup>5)</sup>, グリケーション仮説<sup>6)</sup>, 酸化ストレス仮説<sup>7)</sup> およびプロテインキナーゼ C (protein kinase C, PKC) 仮説<sup>8)</sup> などの諸説が従来提唱されてきたが, 最も有力な説の一つはポリオール代謝異常説である。これは高血糖によりポリオール代謝が亢進し, 細胞内でのソルビトールの蓄積によって細胞機能が障害され, さまざまな合併症が出現するとの説である。ポリオール代謝の中でグルコースからソルビトールへの過程を触媒する酵素がアルドース還元酵素である。数種類のアルドース還元酵素阻害剤 (aldose reductase inhibitor, ARI) が近年開発されつつあり<sup>9)</sup>, その治療効果が期待されている。それらの薬効を評価する上で動物モデルでの薬効の検証が不可欠であるが, 実験動物モデルにおける網膜症に対する薬効評価の常法は得られていない。したがって薬剤開発の面からも動物モデルにおける網膜症の定量的評価法の確立は極めて重要である。

平成10年12月25日受付, 平成11年3月26日受理

Abbreviations: ARI, aldose reductase inhibitor; DAG, diacylglycerol; DCCT, diabetes control and complications trial; EOG, electro-oculogram; ERG, electroretinogram; GABA,  $\gamma$ -amino butyric acid;  $\alpha$ -GI,  $\alpha$ -glucosidase inhibitor; IDDM, insulin-dependent diabetes mellitus; MCT, mean circulation time; NIDDM, non-insulin-dependent diabetes

Yonemuraら<sup>13)</sup>は網膜電図 (electroretinogram, ERG) が糖尿病患者において早期から異常を呈することを発見し、この所見が網膜症の早期診断の有力な指標であることを明らかにした。以来この知見は多くの追試確認を経て、広く臨床に活用されている<sup>13-14)</sup>。しかし糖尿病における律動様小波所見とその他の眼検査所見や糖尿病治療効果との関連についてはほとんど検討されていない。そこで本研究ではグルコサミンのN-メチルニトロソ誘導体であるストレプトゾトシン (streptozotocin, STZ) 誘発糖尿病ラットにおいて律動様小波所見に併せて網膜血流動態を調べ、さらにこれらの所見がインスリン治療によって改善するか検討した。

#### 対象および方法

##### I. 実験動物

実験動物には、日本エスエルシー (静岡) より入荷し、予め1週間検疫飼育した体重180~250gの雄性 Brown-Norway系有色ラットを主に使用した。ラットは温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、設定換気回数15回/時間、明暗サイクル12時間 (午前7時点灯、午後7時消灯) の条件を備えた飼育室内でラットブラケットケージ (23×43×20 cm, 日本クレア, 東京) に3匹ずつ収容して飼育した。飼育に際しては固形飼料 CE-2 (日本クレア) および水道水を自動給水装置PCP-PD (ラボエンジニアリング社, 静岡) により自由に摂取させた。なお本実験では実験開始前の眼底検査にて網膜に異常が認められたラット、および ERG 検査にて左右差が明らかなラット (b波振幅にて20%以上) を用いなかった。また糖尿病誘発ラットにおいては STZ による糖尿病誘発1週間後において血糖値が300mg/dl以下のラットを用いなかった。

酸素分圧の影響に関する実験では、北山ラベス (長野) より入荷し、予め1週間検疫飼育した体重2.5~3.5 kgの白色ウサギを用いた。ウサギは温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、設定換気回数15回/時間、明暗サイクル12時間 (午前7時点灯、午後7時消灯) の条件を備えた飼育室内で半固定式ウサギケージ (49×59×36 cm, 日本クレア) に1匹ずつ収容して飼育した。飼育に際しては固形飼料 RC-4 (オリエンタル酵母, 東京) および水道水を自動給水装置PCP-PD (ラボエンジニアリング社) により自由に摂取させた。

##### II. ストレプトゾトシンによる糖尿病誘発方法

STZ (Sigma, St. Louis, USA) を投与直前に0.1M クエン酸/リン酸緩衝液 (pH 4.6) に溶解し、12時間絶食したラットの腹腔内へ27ゲージの注射針にて投与量が60mg/kgになるように単回投与した。なお、STZは溶液中では不安定であるとの報告がある<sup>15)</sup>ので、秤量後には溶解せず粉末のまま氷冷下で保存し、投与直前に溶解し実験に供した。またSTZの投与に際しては通常用いられる尾静脈内注射では急激な血糖値の上昇のためか、急性期に死亡例がみられることがあるので、本研究では腹腔内投与方法を用いた。本研究では STZ 投与後の死亡例は皆無であった。

##### III. ラットの体重および血糖値測定方法

体重を、STZ投与前および投与後1週間間隔で体重計 LC-4201 (ザルトリウス, 東京) によって測定した。また血糖値の測定は心腔内より無麻酔下で27ゲージ針を用いて採取した動脈血を

遠心分離機CF7D (日立, 東京) にて遠心分離 ( $1000 \times g$ , 5分間) して、得られた血清を用いて、Glucose NK Test - Kit® (ペーリンガーマンハイム山之内, 東京) によって行った。測定値を $\bar{x} \pm \text{SEM}$ で示した。群間の平均値の有意差検定には対応のない標本のt検定を行い、危険率5%以下を有意差ありと判定した。

##### IV. ラットの眼底検査方法および蛍光眼底検査方法

生理食塩水にて1.0%に調製した塩酸フェニレフリン (Sigma) および硫酸アトロピン (ミニムス®, 千寿製薬, 大阪) の点眼により極大に散瞳させた。塩酸ケタミン (ケタラール® 50, 三共, 東京) 32.0mg/kg および塩酸キシラジン (セラクター®, 日本バイエル, 東京) 20mg/kgの腹腔内投与により不動化した後、暗室にて双眼倒像鏡 (オートビュービル倒像鏡, 甲南キラー, 大阪) によって眼底検査を行った。ついでフルオレセイン-Na溶液 (フルオレサイト® 注射液1号, 日本アルコン, 東京) 20mg/kgを尾静脈内に注入して蛍光眼底検査を行った。フルオレセイン-Na溶液は体重1kgあたり20mgになるように生理食塩水を用いて希釈し、全量100 $\mu\text{l}$ を投与した。投与15~20秒後の蛍光眼底像を黄色干渉フィルター W-15G (コダック, 東京) を介して眼底カメラ RC-2 (コーワ, 東京) によって連続的に写真撮影した。眼底検査を STZ 投与前および投与後1週間間隔で行い、蛍光眼底検査を STZ 投与前および投与3週または6週間後に行った。

##### V. ラットの ERG 検査方法

生理食塩水にて1.0%に調製した塩酸フェニレフリン (Sigma) および硫酸アトロピン (ミニムス®, 千寿製薬) の点眼により極大に散瞳させた。2時間の暗順応を施したラットを塩酸ケタミン (ケタラール® 50, 三共) 32.0mg/kg および塩酸キシラジン (セラクター®, 日本バイエル) 20mg/kgの腹腔内投与により不動化し、10ルクスの赤色光下で0.4%塩酸オキシプロカイン (ペノキシール®, 参天製薬, 大阪) を点眼後、ERG用電極を装着した。ERG用電極には、体重200, 250および300gのラットを用いて歯科用石膏 (ジーシーシューフレックス®, GC Dental Industrial, 東京) にて角膜面の鑄型に合わせて作製した3種類の川畑式白金コンタクトレンズ型電極 (直径3.5, 4.0および4.5mm, 京都コンタクトレンズ, 京都) を用いた。測定に先立ち電極を予め各ラットの角膜に装着し、装着良好なコンタクトレンズ電極を上記3種類のうちから選択した。不電極としては脳波用針電極 NE-233S (日本光電, 東京) を鼻腔皮下に、接地電極としては同種の針電極を尾の先端の皮下に刺入留置した。光刺激のためのキセノン放電管を被検眼の角膜前方10 cmの位置に設置し、全視野刺激効果を得る目的で電極の前面にピンポン球を半割した拡散板を置いた。20ジュールの単発白色放電閃光を用いてa波およびb波を両眼同時に記録した後、さらに5分間の暗順応後に、再度20ジュールの単発白色放電閃光により律動様小波 (oscillatory potential, OP) を両眼同時に記録した。光刺激により惹起された両眼のERGのa波およびb波については時定数0.3秒、OPについては3ミリ秒で交流増幅器366型ポリグラフ (日本電気三栄, 東京) により増幅した後、シグナルプロセッサ 7TO7A (日本電気三栄) 上に表示された波形をX-Yレコーダ8U16 (日本電気三栄) により描画するとともに、表示されたERG波形をERG解析プログラム (参天製薬) を用いて

mellitus; OP, oscillatory potential; PKC protein kinase C; SBF, segmental blood flow; SLO, scanning laser ophthalmoscope; STZ, streptozotocin

コンピューターPC-9801 RA (日本電気, 東京) に入力し解析に供した。

ERGの解析には図1のようにERGのa波, b波およびOPを用いた。基線からa波底までの振幅をa波振幅とし, a波底よりb波の頂点までの振幅をb波振幅とした。刺激開始時点からa波底またはb波頂点までの時間をそれぞれの頂点潜時とし, OPの振幅の計測は米村ら<sup>16)</sup>の計測法に準じた。略記すると, 時定数3ミリ秒で記録したOPの上向き(角膜側陽性方向)の振れを図1Bのようにそれぞれ頂点潜時の短い順にO<sub>1</sub>, O<sub>2</sub>およびO<sub>3</sub>と呼称した。O<sub>1</sub>直前の下向きの振れの底とO<sub>1</sub>直後の下向きの振れの底を結ぶ直線にO<sub>1</sub>の頂点より垂線をおろしその交点までをO<sub>1</sub>振幅とし, O<sub>2</sub>直前および直後の下向きの振れの底を結ぶ直線とO<sub>2</sub>の頂点よりおろした垂線の交点までをO<sub>2</sub>振幅とし, O<sub>3</sub>の直前および直後の下向きの振れの底を結ぶ直線とO<sub>3</sub>の頂点よりおろした垂線の交点までをO<sub>3</sub>振幅とした。O<sub>1</sub>, O<sub>2</sub>およびO<sub>3</sub>頂点潜時を光刺激開始時点からそれぞれの振れの頂点までとし, 上向きの振れの頂点間, すなわちO<sub>1</sub>とO<sub>2</sub>の頂点間隔, ならびにO<sub>2</sub>とO<sub>3</sub>の頂点間隔をそれぞれT<sub>1</sub>およびT<sub>2</sub>とした。ERGでは各ラットにおける各測定毎のa波, b波およびOPの振幅, ならびにa波, b波, OP頂点潜時および頂点間隔(T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>)を計測し, STZ投与前の各無処置鼠に対するSTZ投与後1週間間隔の変化を百分率で求め成績の項に示す。測定値を $\bar{x} \pm \text{SEM}$ で示した。群間の平均値の有意差検定には対応のない標本のt検定を行い, 危険率5%以下を有意差ありと判定した。

VI. ラット硝子体フルオロフォトメトリーの測定方法

生理食塩水にて1.0%に調製した塩酸フェニレフリン(Sigma)および硫酸アトロピン(ミニムス®, 千寿製薬)の点眼により極大に散瞳させた後, 塩酸ケタミン(ケタラル® 50, 三共)32.0mg/kgおよび塩酸キシラジン(セラクター®, 日本バイエル)20mg/kgの腹腔内投与により全身麻酔を施した。フルオレセイン-Na溶液(フルオレサイト® 注射液1号, 日本アル

コン)10mg/kgを大腿部を切開し露出した伏在静脈内に27ゲージ注射針を用いて注射し, 注射2時間後にフルオロフォトメーター(Fluorotron Master®, Coherent, Palo Alto, USA)にて硝子体内蛍光量を両眼について測定した。フルオロフォトメトリーの解析には, 各被験眼において紫外光を走査することにより得られる硝子体部位の蛍光量を加算平均化した値を用いた。測定値を $\bar{x} \pm \text{SEM}$ で示した。群間の平均値の有意差検定には対応のない標本のt検定を行い, 危険率5%以下を有意差ありと判定した。

VII. ラット網膜の組織学的検査方法

STZ投与6週後にペントバルビタール(ネプタール®, 大日本製薬, 大阪)の尾静脈注射で屠殺した後, 直ちに眼球を摘出した。摘出した眼球の角膜輪部より30ゲージ注射針を用いて前房穿刺を施し, 眼圧を低下させた後, ラット硝子体内に2.5%グルタルアルデヒド-0.05Mリン酸緩衝液(pH7.2~7.4)0.01mlを注入した。摘出眼球を上記の緩衝液中に1分間浸漬した後に, 眼球の赤道部に沿って1ヶ所に剖面を入れ, さらに15分間浸漬固定し, 眼球を二分し, 10%ホルマリン液中に固定・保存した。次にエタノール系列にて脱水し, パラフィン包埋を行い, 5 $\mu$ mに薄切してHE染色を施し, 光学顕微鏡にて観察した。

VIII. ラットにおけるインスリン投与方法

インスリンには生合成ヒト二相性イソフェンインスリン水性懸濁注射液(ペンフィル® 30R注, 山之内製薬, 東京)を用いた。インスリンをSTZ投与後より1~3週間にわたり1日1回体重1kgあたり0.2, 1.0または5.0単位になるように氷冷生理食塩水で希釈し, 100 $\mu$ lを背部皮下に注射した。現在わが国で市販されているインスリン製剤は多種にのぼるが, すべて遺伝子組み換え技術により製造されたもので, 作用時間と作用パターンによって速効型, 中間型, 複合型および持続型に分類される<sup>17)</sup>。本研究で用いた製剤は複合型に分類される。本剤の血糖下降作用はヒトにおいて投与0.5時間後より発現し, 2~8時間後に最大

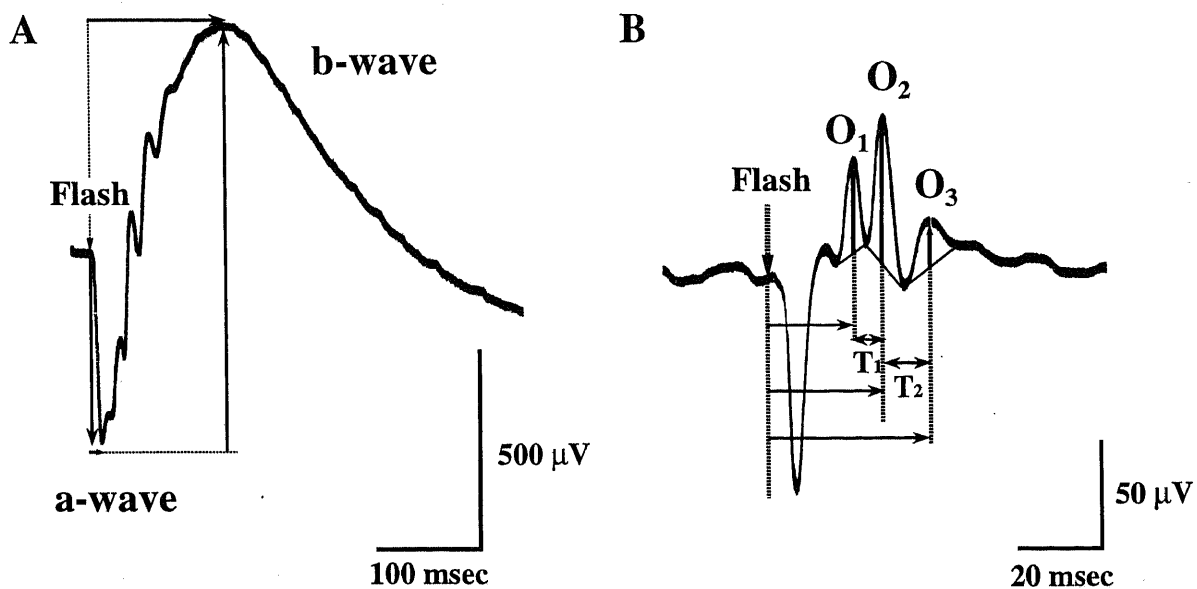


Fig. 1. Typical wave forms of the a-wave, the b-wave(A) and the oscillatory potential(B) in a rat. Paired flashes from a 20-joule xenon discharge lamp were delivered with a 5-minute-dark interval, the former for the a-wave and the b-wave, the latter for the oscillatory potential. O<sub>1</sub>, O<sub>2</sub> and O<sub>3</sub> designate the peaks of the oscillatory potential in the order of their peak latency. T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub> indicate the peak intervals between O<sub>1</sub> and O<sub>2</sub>, and between O<sub>2</sub> and O<sub>3</sub>, respectively. Time constant was 0.3 sec in A and 3 msec in B.

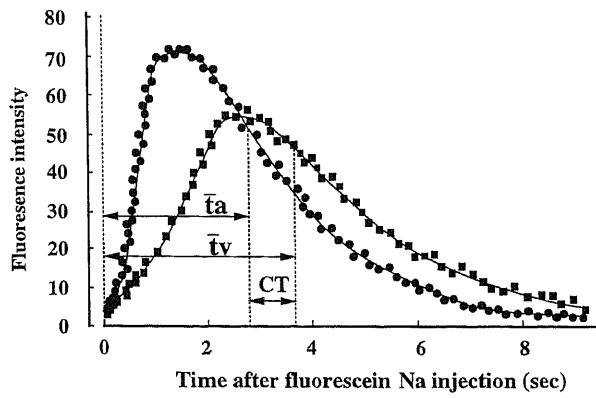


Fig. 2. Typical changes of fluorescein intensity in retinal artery and vein by a scanning laser ophthalmoscope for measurement of retinal blood flow velocity in rats. CT: circulation time;  $\bar{t}_a$ , half life time (sec) of fluorescein intensity in retinal artery (●);  $\bar{t}_v$ , half life time (sec) of fluorescein intensity in retinal vein (■).

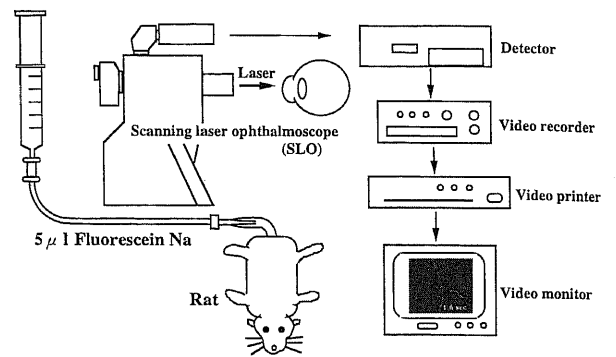


Fig. 3. Schematic diagram for measurement of retinal blood flow velocity in rats. The scanning laser ophthalmoscope system consists of fundus pictures at the sequence of 30 frames per second, a video monitor for observation and recording of the findings and an instrument for instant printing of a given frame. Fluorescein angiopathy was performed with a rapid injection of 5 μl of 10% fluorescein sodium into the tail vein.

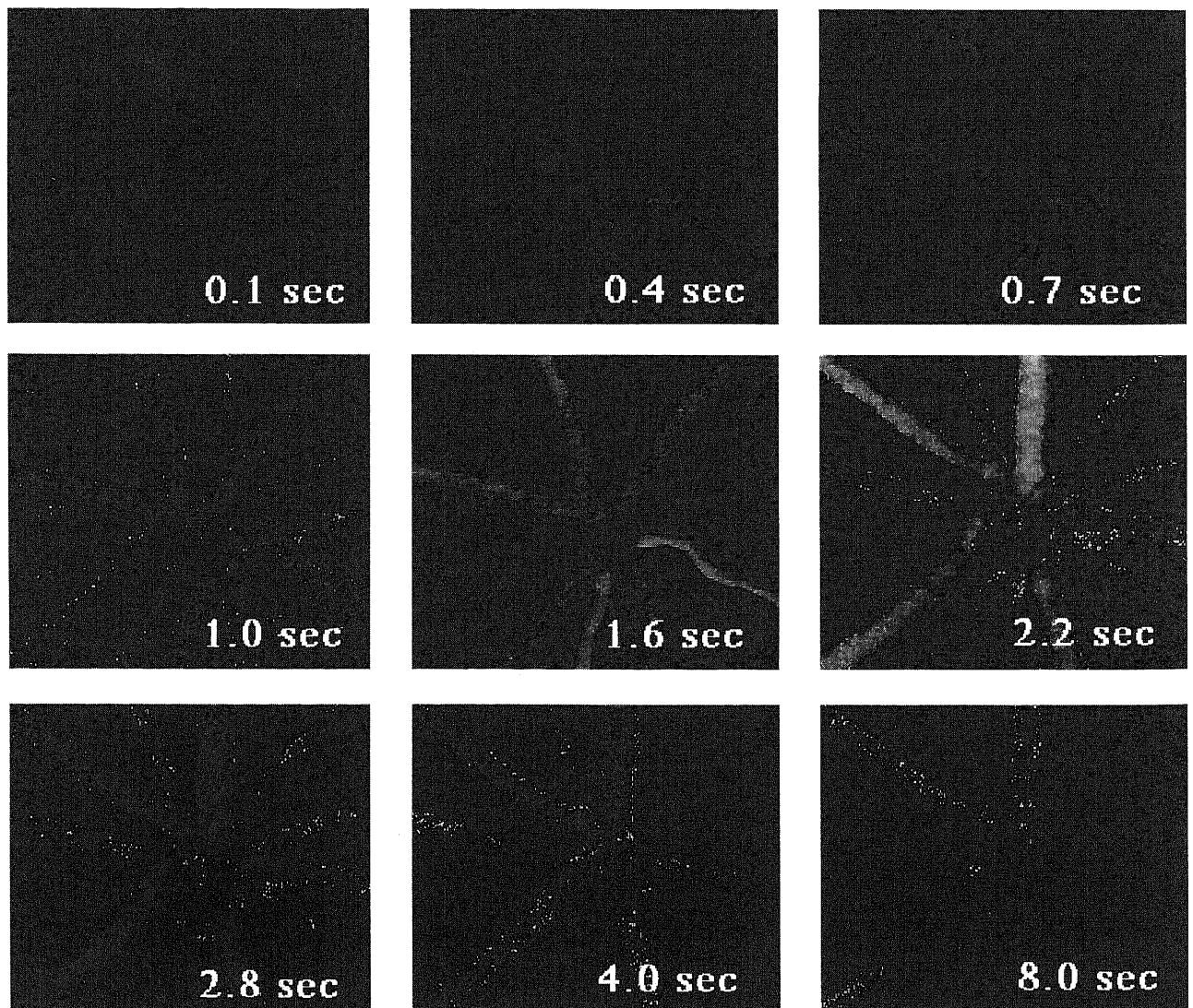


Fig. 4. Fluorescein fundus angiograms by a scanning laser ophthalmoscope in a rat. Numerals indicate the time (sec) after an injection of fluorescein sodium.

効果がみられ24時間の持続性を有するとされる。

K. ラット網膜血流の測定方法

糖尿病状態による網膜血流変化ならびにこれに対するインスリンの治療効果を検討するために、網膜血流を STZ 投与前、STZ 投与後2週目、さらに1週間のインスリン投与後 (STZ 投与3週後) に測定した。網膜血流速度を走査レーザー検眼鏡 (scanning laser ophthalmoscope) (SLO, Rodenstock, München, Germany) によってフルオレセイン-Na 色素希釈法で測定した。SLO では

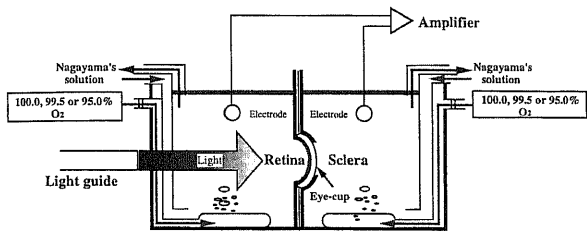


Fig. 5. Recording configuration for the in-vitro electroretinogram (ERG) in the excised eye-cup of rabbits. The posterior portion of the hemisected eyeball was mounted between two chambers. The ERGs were lead off through a pair of Ag-AgCl electrodes in each chamber. Nagayama's solution was oxygenated with 100.0% O<sub>2</sub> (control gas) and maintained at pH 8.2. Prior to bubbling with 99.5% or 95.0% O<sub>2</sub> (test gas), the stable ERGs were confirmed for at least 30 minutes in Nagayama's solution with the control gas. Stimulus intensity, 3.5 × 10<sup>2</sup> lux at the retina.

眼底をアルゴンレーザー (青色) で眼底を走査し毎秒30コマの画像をビデオテープに連続して記録することができ、その画像を解析することにより網膜循環時間を算出できる。すなわち本実験で用いた色素希釈法ではフルオレセイン-Na 溶液を急速に静脈内投与することにより得られる網膜血管の蛍光輝度を経時的に解析し、動脈血管の蛍光輝度の時刻に関する積分値が半減する時刻と静脈血管の蛍光輝度の時刻に関する積分値が半減する時間との時刻差により網膜循環時間を算出する (図2)。10フレーム間隔 (1/3秒) で抽出した各フレーム毎の動脈および静脈血管の蛍光輝度をSLO用蛍光画像解析システム (参天製薬) を用いてコンピューター PC-9821 V13 (日本電気) により算出した。本研究で用いたSLOの測定システムの概要を図3に示した。測定直前の体重を測定した後、1.0%に調製した塩酸フェニレフリン (Sigma) および硫酸アトロピン (ミニムス®, 千寿製薬) の点眼により極大に散瞳させ、塩酸ケタミン (ケタラル®50, 三共) 32mg/kg および塩酸キシラジン (セラクター®, 日本バイエル) 20mg/kg の腹腔内投与により全身麻酔を施した。本測定においては片眼 (右眼) のみで測定したが、両眼にヒアルロン酸点眼液 (ヒアレイン® 0.1m, 参天製薬) を1滴点眼し、角膜乾燥防止を目的としてコンタクトレンズ (0ジオプトリー, 京都コンタクトレンズ) を装着した。24ゲージ留置針を用いて確保した尾静脈より10%フルオレセイン-Na 溶液 (フルオレサイト®

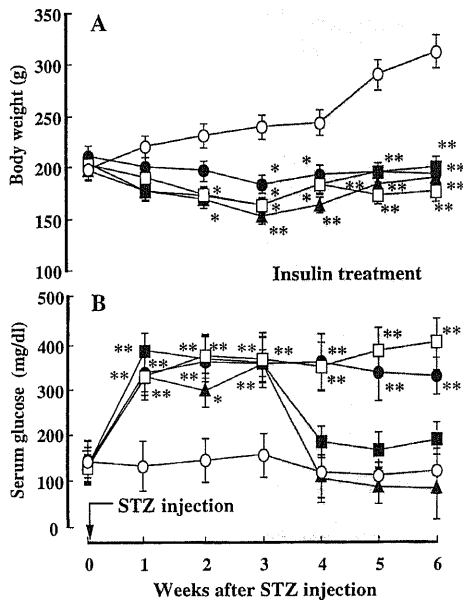


Fig. 6. Body weight (A) and serum glucose concentration (B) in control rats and STZ-injected rats during 3-week treatment by insulin 3 weeks after STZ injection. The width of the shaded area indicates the period of insulin treatment. Symbols and vertical bars indicate the mean and standard error in 6 rats, respectively. The rats were divided into 5 groups (6 rats in each) as follows; non-diabetic rats (no STZ, no insulin) ○, diabetic rats without insulin □, diabetic rats treated with 0.2 ●, 1.0 ■ and 5.0 ▲ U/kg/day insulin. Insulin was subdermally injected once a day for 3 weeks starting 3 weeks after STZ injection. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 versus control.

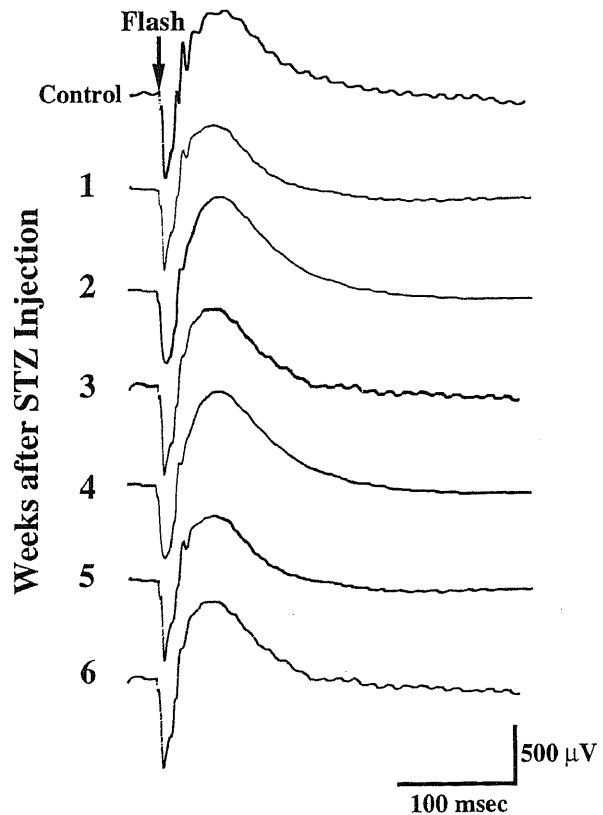


Fig. 7. Typical wave forms of the a- and b-waves in a diabetic rat during 3-week treatment by insulin 3 weeks after STZ injection. Numerals left to the ERG waveforms denote time (weeks) after STZ injection. Daily subdermal injection of 5.0 U/kg/day insulin was started 3 weeks after STZ injection. Stimulus intensity 20 joules. Time constant 0.3 sec.

注射液1号, 日本アルコン) を体重 200g あたり  $5 \mu\text{l}$  を急速に注入し, 注入と同時に眼底を走査することにより 1 分間の蛍光画像を記録した. 実際に測定した画像の 1 例を図 4 に示した. 蛍光画像の解析には, SLO 用蛍光画像解析システム (参天製薬) を用い, ラットの眼底では通常最低 6 対の動脈・静脈が観察可能であることから, 明瞭に観察可能な 6 対の動脈・静脈を無作為に選定し, 各 6 対の血流速度の平均値を平均網膜循環時間 (mean circulation time, MCT) とした. また区域血流量 (segmental blood flow, SBF) を下記の式より求めた<sup>18)</sup>. なお, SBF を算出するために選定したそれぞれの動脈および静脈の直径を蛍光輝度測定と同時に計測した. 測定値を  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  で示した. 群間の平均値の有意差検定には対応のない標本の t 検定を行い, 危険率 5% 以下を有意差ありと判定した.

$$\text{SBF} = \{(\text{動脈径})^2 + (\text{静脈径})^2\} / \text{MCT}$$

#### X. ウサギ摘出眼杯 ERG 検査法

眼杯の作製方法, 浸漬液用容器, 灌流装置および灌流条件は前報<sup>19,20)</sup> に準じた. 略記すれば, 24 時間以上暗順応を施したウサギから塩酸ケタミン (ケタラール®, 三共)  $50\text{mg}/\text{kg}$  の筋肉内投与による麻酔下で摘出した眼球を赤道部で切半し, 後極側の眼杯 (網膜, 脈絡膜および強膜からなる) を 2 個の浸漬液用容器

( $10 \times 10 \times 10 \text{ cm}$ , 容量各 100 ml) 間に直ちに固定した. 浸漬液用容器は 2 つの相対するプラスチック製容器からなり, 各容器の相対する面にウサギ強膜曲率半径に合致する半球状カップを取り付け, その中央に 10 mm の孔をあけ, この孔を塞ぐようにウサギ眼杯を両容器間に固定した (図 5). 浸漬液 (長山第 II 液<sup>21)</sup>) を各容器内に 25 ml/分の流速で灌流しながら, 各容器内の浸漬液に 100.0% 酸素ガスを 1.0 l/分の割合で通気し, 浸漬液の pH を 8.2 に, 温度を  $31 \pm 1^\circ\text{C}$ <sup>22)</sup> に維持した. 刺激光として安定化電源にて点灯したキセノン・アーク灯 Xenon Arc 45 (三双製作所, 東京) から得られた白色矩形波光を用いた. 網膜面照度  $3.5 \times 10^2$  ルックス, 持続時間 200 ミリ秒の刺激光により惹起された a 波, b 波および OP は, 眼杯をはさむ 2 個の浸漬液用容器内に固定された 1 対の銀-塩化銀円盤状電極 NS-type (日本光電) によって導出された. 光刺激により惹起された両眼の ERG の a 波および b 波については時定数 0.3 秒, OP については 3 ミリ秒で交流増幅器 366 型ポリグラフ (日本電気三栄) により増幅した後, シグナルプロセッサ 7TO7A (日本電気三栄) 上に表示された波形を X-Y レコーダ 8U16 (日本電気三栄) により描画するとともに, 表示された ERG 波形を ERG 解析プログラム (参天製薬) を用いてコンピューター PC-9801 RA (日本電気) に入力し

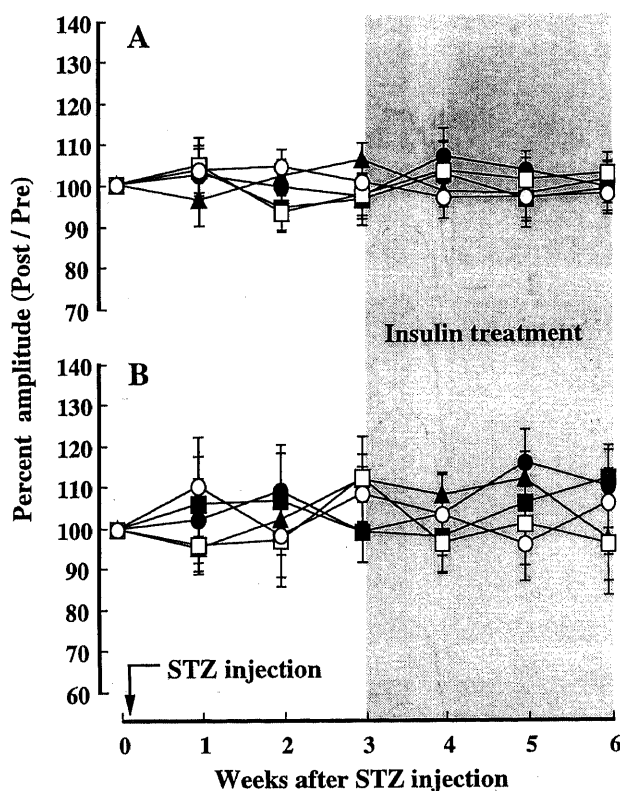


Fig. 8. The amplitude of the a-wave (A) and the b-wave (B) during 3-week treatment by insulin 3 weeks after STZ injection. All values are expressed relative to the pre-injection values. The width of the shaded area indicates the period of insulin treatment. Symbols and vertical bars indicate the mean and standard error in 6 rats, respectively. The rats were divided into 5 groups (6 rats in each) as follows; non-diabetic rats (no STZ, no insulin)  $\circ$ , diabetic rats without insulin  $\square$ , diabetic rats treated with 0.2  $\bullet$ , 1.0  $\blacksquare$  and 5.0  $\blacktriangle$  U/kg/day insulin. Insulin was subdermally injected once a day for 3 weeks starting 3 weeks after STZ injection.

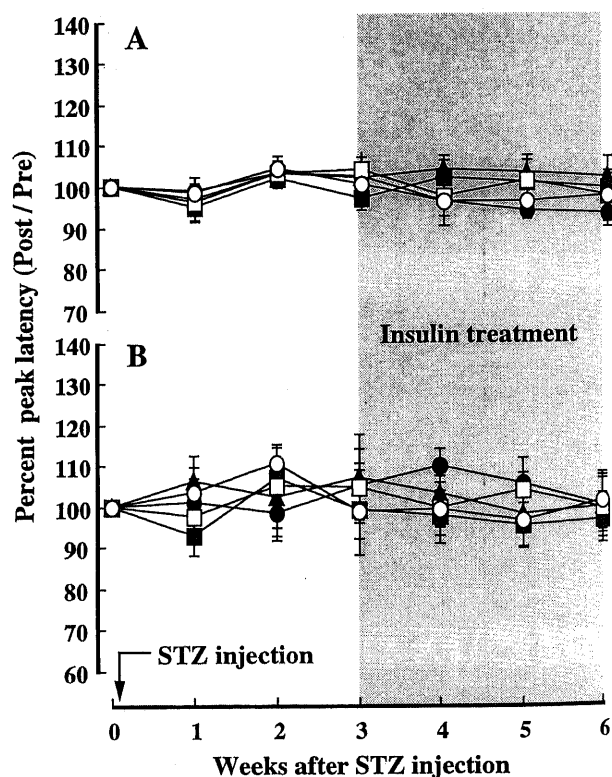


Fig. 9. The peak latency of the a-wave (A) and the b-wave (B) during 3-week treatment by insulin 3 weeks after STZ injection. The width of the shaded area indicates the period of insulin treatment. All values are expressed relative to the pre-injection values. Symbols and vertical bars indicate the mean and standard error in 6 rats, respectively. The rats were divided into 5 groups (6 rats in each) as follows; non-diabetic rats (no STZ, no insulin)  $\circ$ , diabetic rats without insulin  $\square$ , diabetic rats treated with 0.2  $\bullet$ , 1.0  $\blacksquare$  and 5.0  $\blacktriangle$  U/kg/day insulin. Insulin was subdermally injected once a day for 3 weeks starting 3 weeks after STZ injection.

解析に供した。ウサギ眼杯 ERG においても図1に示すラットでの ERG と同様に a 波, b 波, O<sub>1</sub>, O<sub>2</sub> および O<sub>3</sub> の観察が明瞭に記録可能であるため, それぞれの振れの振幅および頂点潜時, ならびに T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> 頂点間隔を計測し解析に供した。対照灌流液である長山第II液灌流中に ERG の安定な対照波形を記録した後, 通気している 100.0%酸素を 99.5%酸素 (0.5%二酸化炭素) または 95.0%酸素 (5.0%二酸化炭素) に置換し, 置換 15分後に ERG を再び記録した。さらに再度 100.0%酸素にもどして 15分後に ERG を記録し, ERG 変化の可逆性を検討した。各酸素濃度について 5眼ずつ検討した。各対照波形に対する 99.5%酸素 (0.5%二酸化炭素) または 95.0%酸素 (5.0%二酸化炭素) に置換後の変化ならびに再度 100.0%酸素に置換した際の ERG 変化を最初の 100.0%酸素通気中の各対照波形に対する百分率で求め成績の項に示す。測定値を  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  で示した。平均値の有意差検定には対応のある 2標本の t 検定を行い, 危険率 5%以下を有意差ありと判定した。

成 績

I. STZ 誘発糖尿病ラットにおける ERG 変化および血液・眼関門機能変化, ならびにこれらの変化におよぼすインスリン投与による治療効果の検討

本実験にはラット 30匹を次の 5群 (各群 6匹 12眼) に分けて用いた。すなわち正常対照群では STZ もインスリンも投与せず, 無治療群では STZ を投与したがインスリンを投与せず, 治療

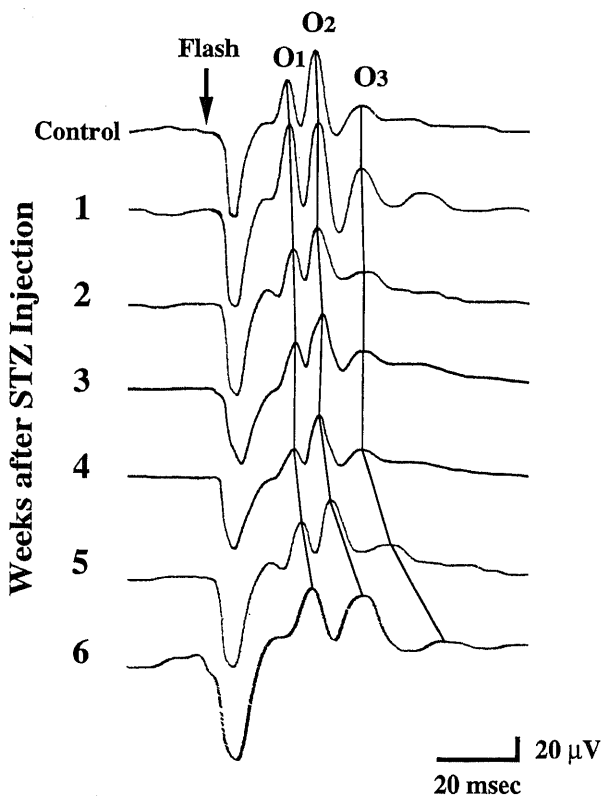


Fig. 10. Typical wave forms of the oscillatory potential in a diabetic rat during 6 weeks after STZ injection. Numerals left to the ERG waveforms denote time (weeks) after STZ injection. Stimulus intensity 20 joules. Time constant 3 msec.

群では STZ 投与後 1日 1回体重 1kg 当り 0.2, 1.0 および 5.0 単位のインスリンを下記のように投与した。

1. 血糖値および体重変化

対照群以外では STZ 投与 1 週後の時点で血糖値が 300mg/dl 以上に達したことを確認した。STZ 非投与群の血糖値は 6 週間にわたり平均 120mg/dl 前後に維持された (図 6B)。STZ 60mg/kg の 1 回腹腔内投与によって血糖値は, 投与 1 週後から全観察期間 (投与 6 週後) を通じて STZ 非投与群に比して有意に上昇し ( $P < 0.01$ ), STZ を投与されたラットが実験期間中に糖尿病状態にあることが確認された (図 6 B)。そこで高血糖状態を維持した STZ 投与 3 週後より 3 週間にわたり 1日 1回インスリンを皮下投与したところ, 血糖値はインスリン 0.2 単位/kg/日投与群ではほとんど低下しなかったが, 1.0 および 5.0 単位/kg/日投与群では投与量依存的に明らかに低下し, 5.0 単位/kg/日投与群では STZ 非投与群に比較してさえ低下傾向を示した (図 6 B)。

体重は STZ 非投与群では順調な増加を示したが, STZ 投与群では STZ 投与前と比べむしろ低下傾向を示した。体重は STZ 投与 1 週後で低下しはじめ, STZ 投与後 3 週後では STZ 非投与群と比較して有意に低かった ( $P < 0.05$  または  $P < 0.01$ )。体重の低下は, 0.2, 1.0 および 5.0 単位/kg/日のいずれのインスリン投与群においても明らかな改善効果を示さず, STZ 投与 6 週後 (インスリン投与開始 3 週後) においても STZ 非投与群に比較し有意であった (図 6A)。

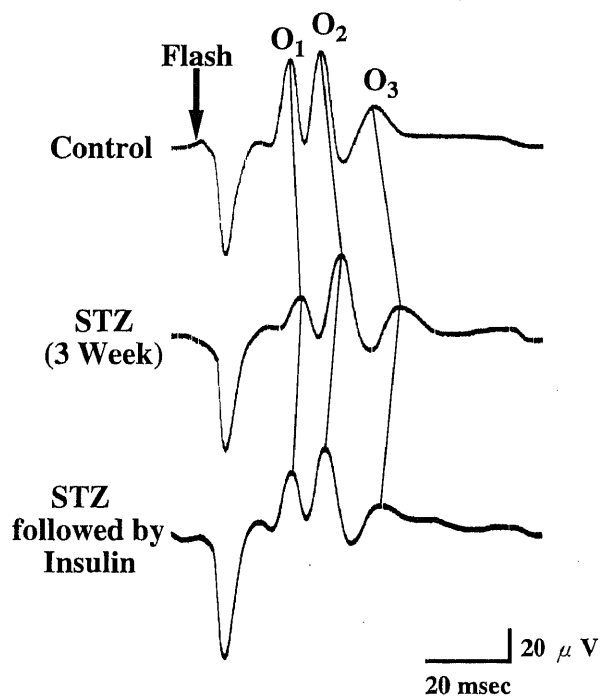


Fig. 11. Typical wave forms of the oscillatory potential (OP) in a diabetic rat after STZ injection followed by insulin treatment. The upper, middle and lower traces show the control OP before STZ, the delayed and diminished OP 3 weeks after STZ and the recovered OP after 3-week treatment by daily 5.0 U/kg subdermal injection of insulin started 3 weeks after STZ, respectively. Stimulus intensity 20 joules. Time constant 3 msec.



## 2. ERG所見

## 1) a波およびb波所見

STZ投与群におけるa波およびb波の振幅ならびに頂点潜時は、STZ投与後6週間にわたりSTZ非投与群に比較し有意に変化しなかった。またSTZ投与3週後の高血糖状態の後にインスリン0.2, 1.0および5.0単位/kg/日を3週間毎日投与し、血糖値を改善した群においてもa波およびb波の振幅、ならびに頂点潜時はSTZ非投与群に比較し有意に変化しなかった(図7, 8, 9)。

## 2) 律動様小波に及ぼす影響

O<sub>1</sub>, O<sub>2</sub>およびO<sub>3</sub>の振幅と頂点潜時はSTZ非投与群では6週間にわたり明らかな変化を示さなかったが、STZ投与群では著しく変化した(図10, 11)。例えばインスリン非投与群およびインスリン5.0単位/kg/日投与群におけるSTZ投与3週後(インス

リン投与開始前)のO<sub>3</sub>振幅は、それぞれ平均71.2および80.5%とSTZ非投与群に比較し有意に低下した(P<0.05)。O<sub>3</sub>振幅はインスリン5.0単位/kg/日投与群では、STZ投与6週後(インスリン投与開始3週後)には97.6%へと回復したが、インスリン非投与群では48.3%へとさらに低下した(図12)。またO<sub>3</sub>振幅はインスリン0.2および1.0単位/kg/日投与群のSTZ投与6週後(インスリン投与開始3週後)およびインスリン1.0単位/kg/日投与群のSTZ投与5週後(インスリン投与開始2週後)で有意に低下し、インスリンによるO<sub>3</sub>振幅の回復効果は認められなかった(図12)。O<sub>1</sub>振幅はインスリン非投与群および0.2単位/kg/日投与群ではSTZ投与5週後それぞれ平均81.3および85.4%とSTZ非投与群に比し有意に低下したが、1.0および5.0単位/kg/日投与群では6週間にわたりSTZ非投与群に比較し有意な変化を示さなかった。またO<sub>2</sub>振幅はインスリン非投与群および0.2単位/kg/日投与群ではSTZ投与6週後にそれぞれ平均

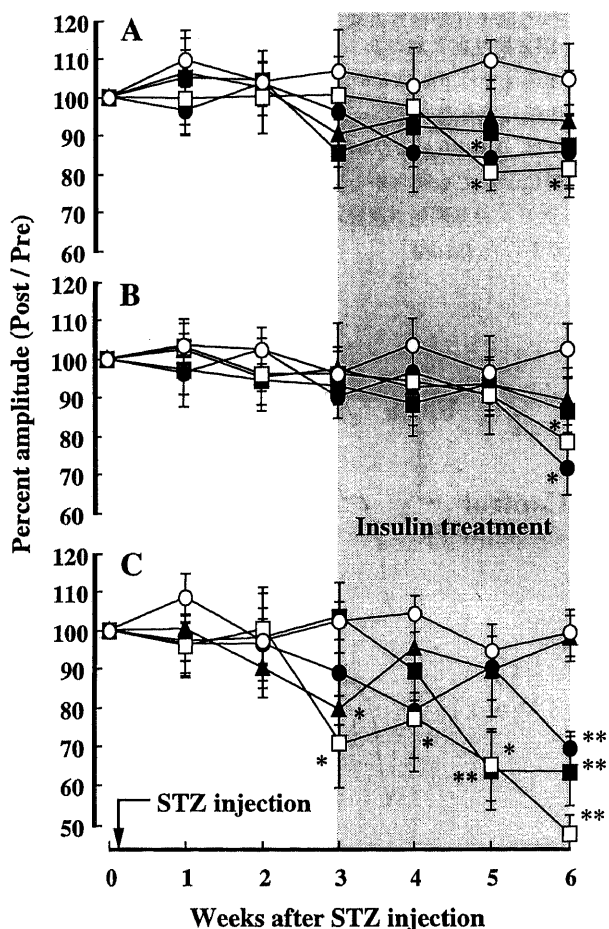


Fig. 12. The amplitude of the oscillatory potential during 3-week treatment by insulin 3 weeks after STZ injection. The graphs A, B and C show the changes of the O<sub>1</sub>, O<sub>2</sub> and O<sub>3</sub> amplitudes, respectively. The width of the shaded area indicates the period of insulin treatment. All values are expressed relative to the pre-injection values. Symbols and vertical bars indicate the mean and standard error in 6 rats, respectively. The rats were divided into 5 groups (6 rats in each) as follows; non-diabetic rats (no STZ, no insulin) ○, diabetic rats without insulin □, diabetic rats treated with 0.2 ●, 1.0 ■ and 5.0 ▲ U/kg/day insulin. Insulin was subdermally injected once a day for 3 weeks starting 3 weeks after STZ injection. \* P<0.05, \*\* P<0.01 versus control.

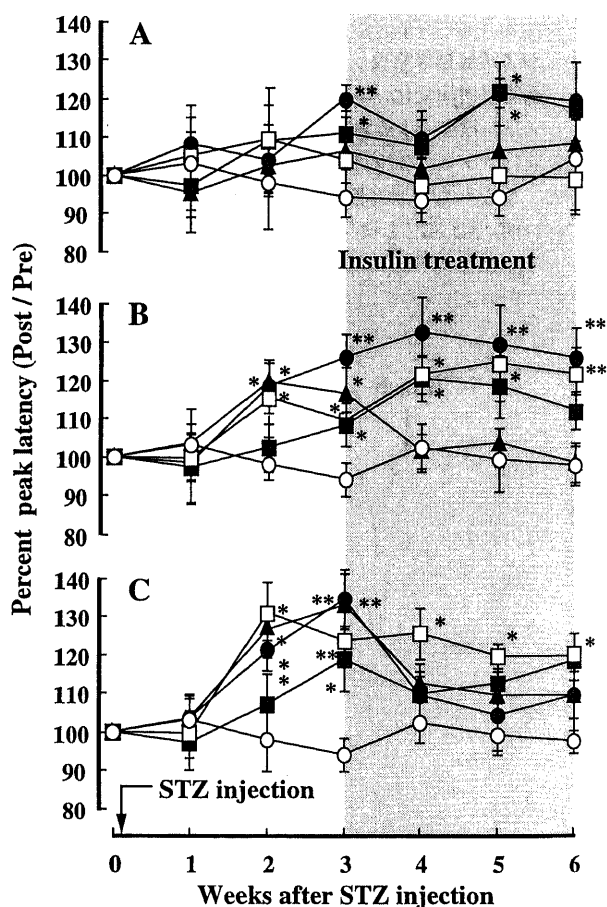


Fig. 13. The peak latency of the oscillatory potential during 3-week treatment by insulin 3 weeks after STZ-injection. The graphs A, B and C show the changes of the O<sub>1</sub>, O<sub>2</sub> and O<sub>3</sub> peak latencies, respectively. The width of the shaded area indicates the period of insulin treatment. All values are expressed relative to the pre-injection values. Symbols and vertical bars indicate the mean and standard error in 6 rats, respectively. The rats were divided into 5 groups (6 rats in each) as follows; non-diabetic rats (no STZ, no insulin) ○, diabetic rats without insulin □, diabetic rats treated with 0.2 ●, 1.0 ■ and 5.0 ▲ U/kg/day insulin. Insulin was subdermally injected once a day for 3 weeks starting 3 weeks after STZ injection. \* P<0.05, \*\* P<0.01 versus control.

78.3および71.8%とSTZ非投与群に比較し有意に低下した ( $P < 0.05$ ) (図12).

頂点潜時は振幅に比しさらに顕著に変化した。O<sub>1</sub>頂点潜時はインスリン 0.2および 1.0単位/kg/日投与群では STZ投与 3週後 (インスリン投与開始前) で平均 120.1および 113.8%とSTZ非投与群に比較し有意に延長し、その後のインスリン投与による明らかな回復効果を示さなかった。O<sub>2</sub>頂点潜時は、インスリン非投与群、0.2および5.0単位/kg/日投与群では STZ投与 2週後 (インスリン投与開始前) でそれぞれ平均 115.0, 119.2および 120.3%とSTZ非投与群に比較し有意に延長し、STZ投与 3週後 (インスリン投与開始前) ではすべての STZ投与群で有意に延長した。O<sub>2</sub>頂点潜時は、インスリン 0.2, 1.0および 5.0単位/kg/日投与群ではインスリン投与を行うことによりSTZ投与6週後 (インスリン投与開始3週後) でそれぞれ平均 125.1, 113.1および 100.9%とSTZ非投与群に比較し投与量依存的に回復した。O<sub>3</sub>頂点潜時は、インスリン非投与群、0.2および5.0単位/kg/日投与群ではSTZ投与 2週後 (インスリン投与開始前) でそれぞれ

130.1, 121.0および127.3%とSTZ投与群に比較し有意に延長し、STZ投与 3週後 (インスリン投与開始前) ではすべてのSTZ投与群で有意に延長した (図13)。しかしインスリンを投与した3群すべてで O<sub>3</sub>頂点潜時の明らかな回復効果がみられ、STZ投与 6週後 (インスリン投与開始3週後) でSTZ非投与群に比較し有意性は消失した (図13)。

T<sub>1</sub>およびT<sub>2</sub>頂点間隔はSTZ非投与群では6週間にわたり有意な変化を示さなかったが、STZ投与群では投与 2週後で 117.8および138.3%と有意に延長し、STZ投与 3週後ではすべての STZ投与群で有意に延長した (図14)。T<sub>1</sub>およびT<sub>2</sub>頂点間隔は STZ投与6週後 (インスリン投与開始3週後) でインスリン0.2単位/kg/日投与群では回復効果を示さなかったが、1.0および5.0単位/kg/日投与群では回復し、5.0単位/kg/日投与群のT<sub>1</sub>およびT<sub>2</sub>はそれぞれ 107.2および 102.3%とSTZ非投与群とほぼ同程度まで回復した (図14)。

### 3. 血液・眼関門機能への影響

硝子体フルオロフォトメトリーの測定にはラット 12匹 24眼 (STZ非投与6匹 12眼, STZ投与6匹 12眼) を用いた。硝子体フルオロフォトメトリーによる硝子体中へのフルオレセイン-Naの漏出量は、STZ非投与群では6週間にわたり有意には変化せず、また STZ投与群ではインスリン投与の有無にかかわらずSTZ投与 4週後まで STZ非投与群に比較し有意には変化しなかったが、STZ投与 6週後 (インスリン投与開始3週後) ではSTZ非投与群に比較して STZ投与群すべてで (インスリン投与群においても) 有意に高値を示した (図15)。しかし STZ投与 6週後において蛍光眼底検査および網膜組織学的検査に異常所見は認められなかった (図16)。したがって血液・眼関門の機能障害はSTZ投与 6週後で発症することが硝子体フルオロフォトメトリーで証明され、インスリンはSTZ誘発糖尿病ラットにおけるERG変化を回復させるが血液・眼関門の機能障害に対しては修

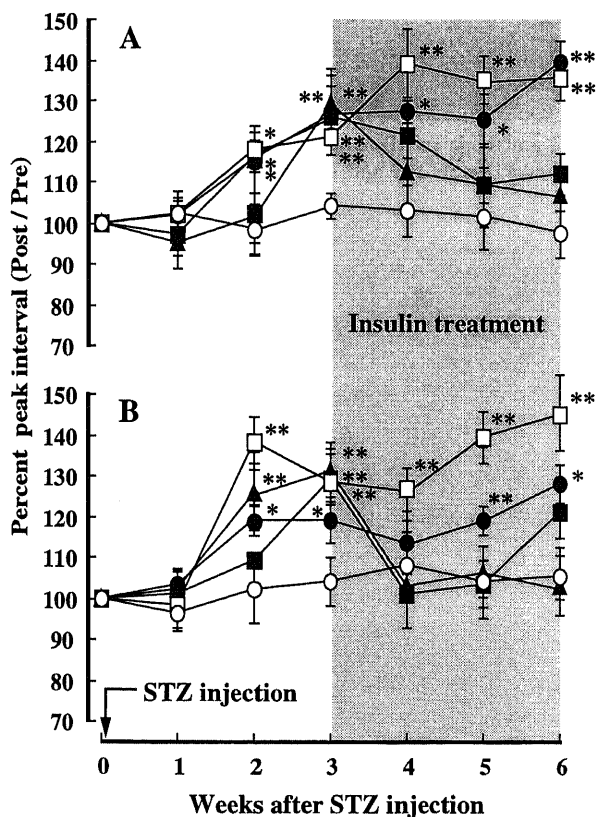


Fig. 14. The peak interval of the oscillatory potential during 3-week treatment by insulin 3 weeks after STZ injection. The graphs A and B show the changes of the T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub> peak intervals, respectively. The width of the shaded area indicates the period of insulin treatment. All values are expressed relative to the pre-injection values. Symbols and vertical bars indicate the mean and standard error in 6 rats, respectively. The rats were divided into 5 groups (6 rats in each) as follows; non-diabetic rats (no STZ, no insulin) ○, diabetic rats without insulin □, diabetic rats treated with 0.2 ●, 1.0 ■ and 5.0 ▲ U/kg/day insulin. Insulin was subdermally injected once a day for 3 week starting 3 weeks after STZ injection. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  versus control.

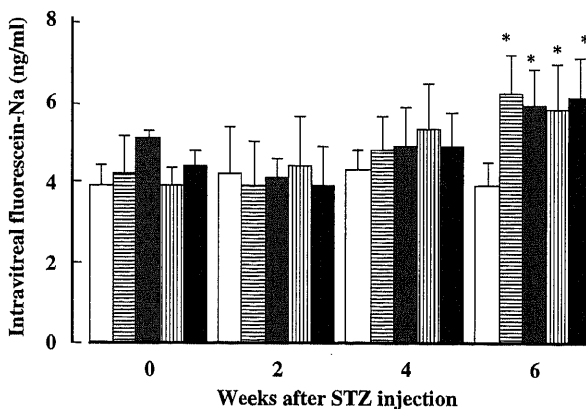


Fig. 15. Effects of STZ-induced diabetes and treatment of diabetes by insulin on intravitreal fluorescein concentration measured 2 hrs after an intravenous injection of fluorescein sodium during 6 weeks after STZ injection. The columns □ and ▨ indicate non-diabetic control (no STZ, no insulin) and positive diabetic control (STZ injection, no insulin), respectively. Daily subdermal injection of insulin was started 3 weeks after STZ injection at three dosages of ▩ 0.2, ▨ 1.0 and ■ 5.0 U/kg/day. Bars and vertical lines indicate the mean and standard error in 6 eyes of 6 rats, respectively. \*  $P < 0.05$  versus non-diabetic control.

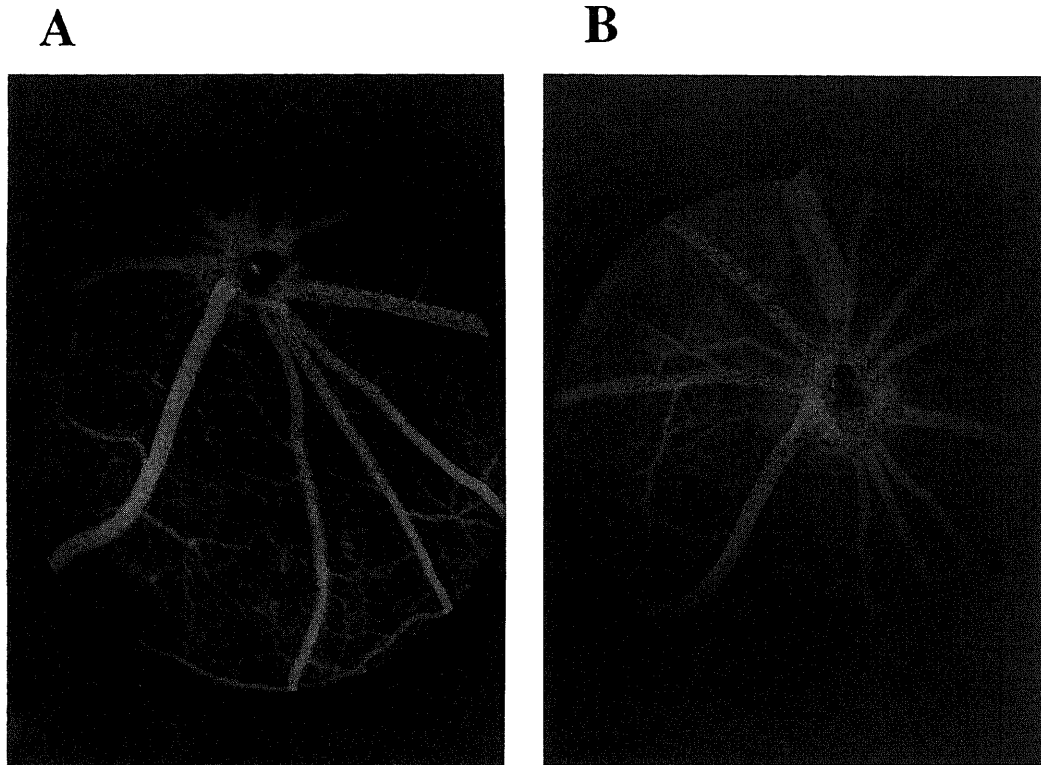


Fig. 16. Fluorescein fundus angiogram in a non-diabetic control rat (A) and a diabetic rat (B) 6 weeks after STZ injection. Fundus photographs were taken 5 seconds after injection of fluorescein sodium. The retinal and choroidal vasculature remained fluorographically normal both in control and diabetic rats.

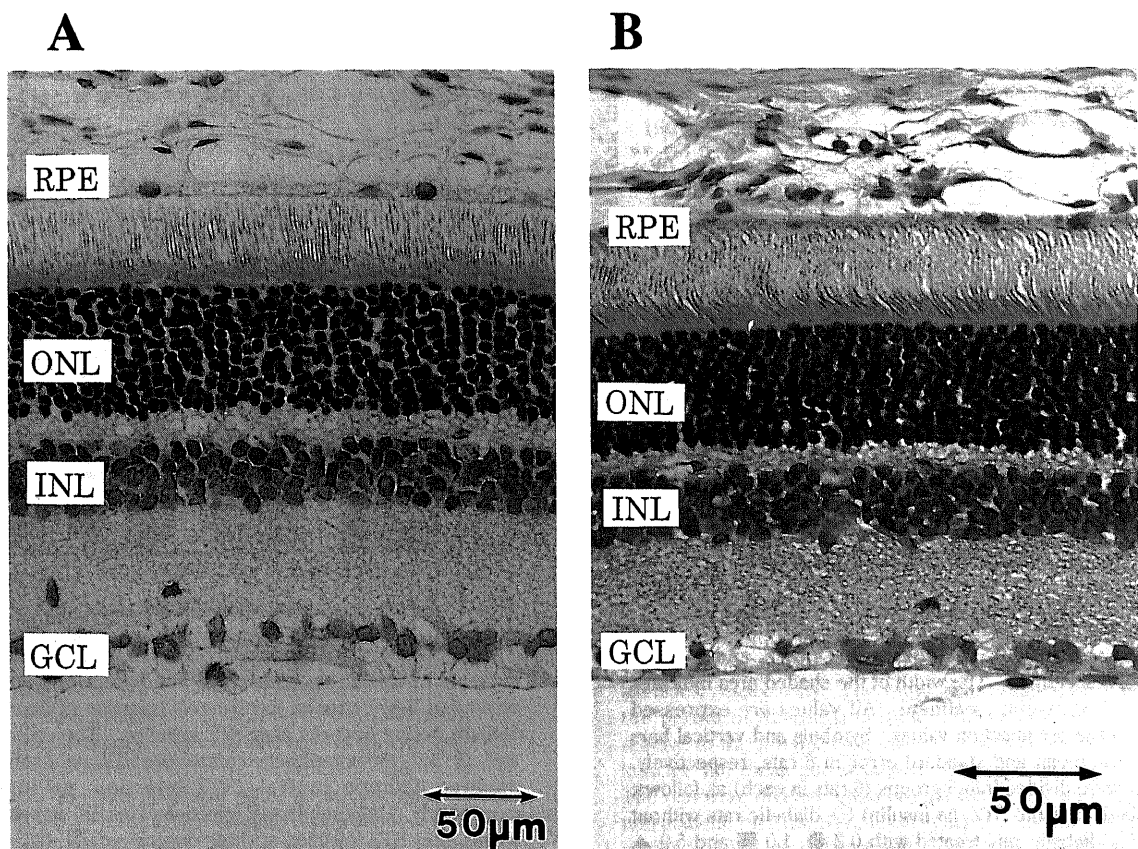


Fig. 17. Light micrographs of the retina in a non-diabetic control rat (A) and a diabetic rat (B) 6 weeks after STZ injection. Hematoxylin-eosin staining. GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; ONL, outer nuclear layer; RPE, retinal pigment epithelium.

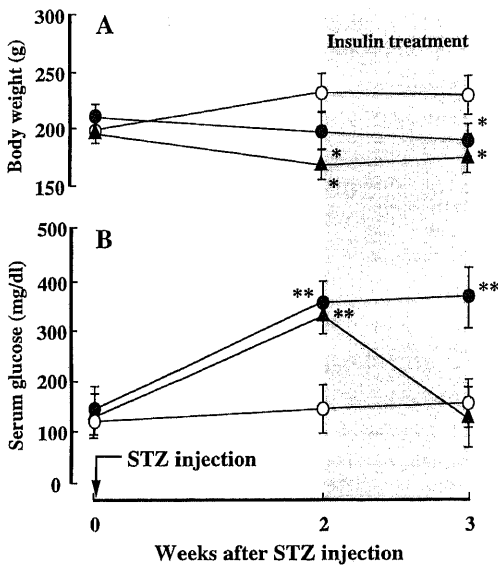


Fig. 18. Body weight (A) and serum glucose concentration (B) in control rats and STZ-injected rats during 3 weeks after STZ injection. The width of the shaded area indicates the period of insulin treatment. Symbols and vertical bars indicate the mean and standard error in 5 rats, respectively. The rats were divided into 3 groups (5 rats in each) as follows; non-diabetic rats (no STZ, no insulin) ○, diabetic rats without insulin ●, diabetic rats treated with 5.0 U/kg/day insulin ▲. Insulin was subdermally injected once a day for 1 week starting 2 weeks after STZ injection. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 versus control.

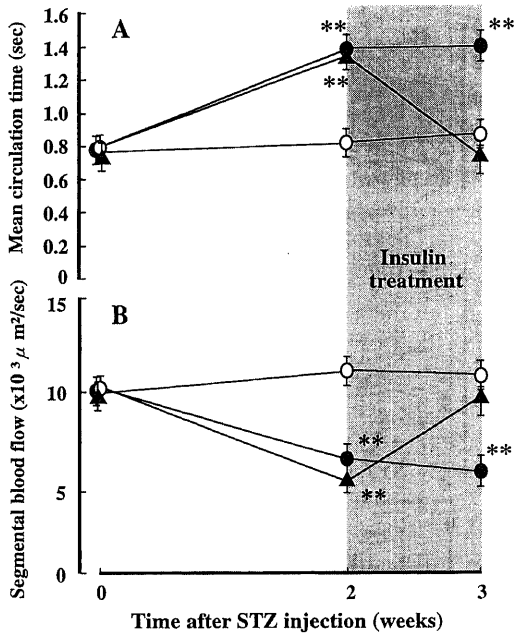


Fig. 19. Effects of STZ-induced diabetes and treatment by insulin on retinal mean circulation time (MCT) (A) and segmental blood flow (SBF) (B). The width of the shaded area indicates the period of insulin treatment. Symbols and vertical bars indicate the mean and standard error in 5 rats, respectively. The rats were divided into 3 groups (5 rats in each) as follows; non-diabetic rats (no STZ, no insulin) ○, diabetic rats without insulin ●, diabetic rats treated with 5.0 U/kg/day insulin ▲. Insulin was subdermally injected once a day for 1 week starting 2 weeks after STZ injection. \*\* P < 0.01 versus control.

復効果を示さないことが判明した。

4. 組織学的検討

組織学的検査にはラット 10 匹 20 眼 (STZ 非投与 5 匹 10 眼および STZ 投与 5 匹 10 眼) を用いた。糖尿病状態での ERG 変化および血液・眼関門の機能低下は STZ 投与 2 週後および 6 週後で検出されたが、STZ 投与 6 週後においてヘマトキシリン-エオジン染色による組織学的検査でも網膜全層において異常所見はみられなかった (図 17)。したがって STZ 誘発糖尿病ラットにおける早期の網膜機能異常は ERG 変化 (特に律動様小波の変化) につづいて血液・眼関門の機能異常として検出され組織学的変化に先行して発現することが判明した。

II. STZ 誘発糖尿病ラットにおける網膜血流変化およびインスリン投与による治療効果の検討

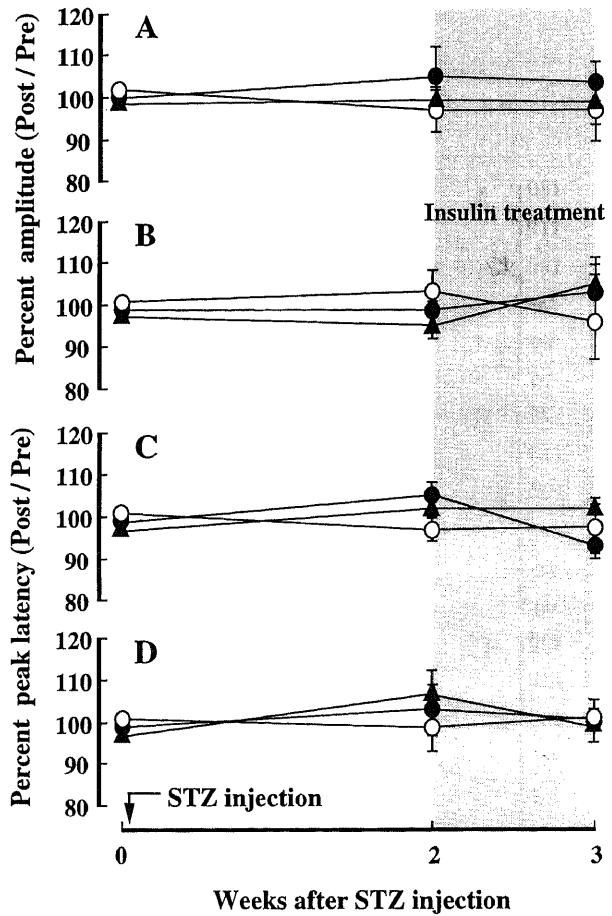


Fig. 20. Effects of STZ-induced diabetes and treatment by insulin on the amplitude and peak latency of the a- and b-waves in STZ-induced diabetic rats. The graphs A, B, C and D show the changes of the a-wave amplitude, the b-wave amplitude, the a-wave peak latency and the b-wave peak latency, respectively. All values are expressed relative to the pre-injection values. The width of the shaded area indicates the period of insulin treatment. Symbols and vertical bars indicate the mean and standard error in 5 rats, respectively. The rats were divided into 3 groups (5 rats in each) as follows; non-diabetic rats (no STZ, no insulin) ○, diabetic rats without insulin ●, diabetic rats treated with 5.0 U/kg/day insulin ▲. Insulin was subdermally injected once a day for 1 week starting 2 weeks after STZ injection.

Table 1. Effects of STZ-induced diabetes and treatment by insulin on body weight, serum glucose level and retinal blood flow parameters in rats

Number of the eyes	Non-diabetes (no STZ, no insulin)	Untreated diabetes (STZ-injection, no insulin)	Treated diabetes (STZ-injection, insulin treatment)
	5	5	5
Body weight (g)	232.5±10.1	193.3±8.2	184.9±11.7
Serum glucose (mg/dl)	126.2±30.1	363.1±14.3 **	106.3±18.6 <sup>##</sup>
Mean circulation time (MCT, sec)	0.81±0.05	1.39±0.12 **	0.74±0.19 <sup>##</sup>
Artery diameter (μm)	60.2±3.2	53.2±6.6	63.6±5.2 <sup>##</sup>
Vein diameter (μm)	80.8±2.3	74.8±4.9	86.2±4.2
Segmental blood flow (SBF, ×10 <sup>3</sup> μm <sup>2</sup> /sec)	10.2±1.9	6.2±1.4 **	11.3±3.3 <sup>##</sup>

Each parameter measured 3 weeks after STZ injection. 5.0 U/kg/day insulin was subdermally injected once a day for 1 week starting 2 weeks after STZ injection. \*\*P<0.01 versus non-diabetes. <sup>##</sup>P<0.01 versus untreated diabetes.

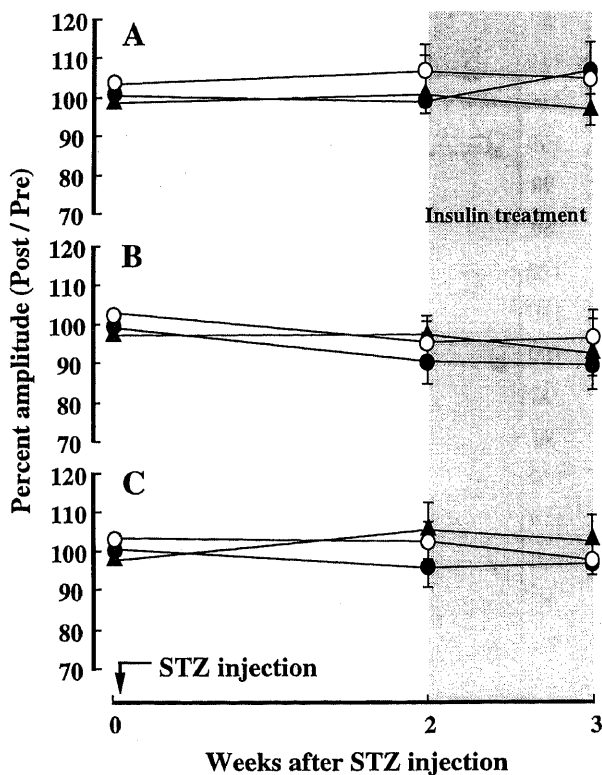


Fig.21. Effects of STZ-induced diabetes and treatment by insulin on the amplitude of the oscillatory potential in STZ-induced diabetic rats. The graphs A, B and C show the changes of the O<sub>1</sub>, O<sub>2</sub> and O<sub>3</sub> amplitudes, respectively. All values are expressed relative to the pre-injection values. The width of the shaded area indicates the period of insulin treatment. Symbols and vertical bars indicate the mean and standard error in 5 rats, respectively. The rats were divided into 3 groups (5 rats in each) as follows; non-diabetic rats (no STZ, no insulin) ○, diabetic rats without insulin ●, diabetic rats treated with 5.0 U/kg/day insulin ▲. Insulin was subdermally injected once a day for 1 week starting 2 weeks after STZ injection.

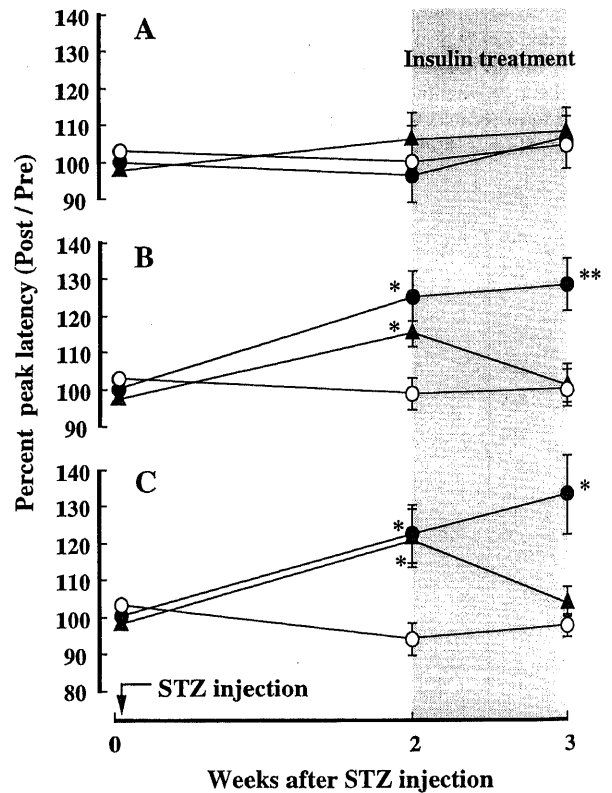


Fig.22. Effects of STZ-induced diabetes and treatment by insulin on the peak latency of the oscillatory potential in STZ-induced diabetic rats. The graphs A, B and C show the changes of the O<sub>1</sub>, O<sub>2</sub> and O<sub>3</sub> peak latencies, respectively. All values are expressed relative to the pre-injection values. The width of the shaded area indicates the period of insulin treatment. Symbols and vertical bars indicate the mean and standard error in 5 rats, respectively. The rats were divided into 3 groups (5 rats in each) as follows; non-diabetic rats (no STZ, no insulin) ○, diabetic rats without insulin ●, diabetic rats treated with 5.0 U/kg/day insulin ▲. Insulin was subdermally injected once a day for 1 week starting 2 weeks after STZ injection. \* P<0.05, \*\* P<0.01 versus control.

15匹のラットを次のように3群(各群5匹5眼)に分けた。すなわち正常対照群ではSTZもインスリンも投与せず、無治療群ではSTZを投与したがインスリンを投与せず、治療群ではSTZもインスリンも投与した。

1. 血糖値および体重変化

STZ 60mg/kgの1回の腹腔内投与によって2週後の血糖値は、非投与群に比較し有意に上昇し(P<0.01), STZを投与されたラットが糖尿病状態であることが確認された(図18B)。その後インスリン非投与群は高血糖状態を維持したが、インスリン 5.0単位/kg/日投与群の血糖値は1週間の投与で明らかに改善された。また体重はSTZ非投与群では観察期間中に順調な増加を示したが、STZ投与群ではインスリン投与の有無にかかわらず、ともにSTZ非投与群に比較し有意に低下した(図18A)。

2. 網膜血流変化

STZ非投与群のMCTおよびSBFには3週間にわたり明らかな変化はみられなかった。しかしSTZ投与群のMCTは投与2および3週後にはそれぞれ平均1.29および1.39秒とSTZ非投与群に比較し有意に延長し、SBFはそれぞれ平均7.0および6.2(×10<sup>3</sup>μm<sup>2</sup>/秒)と有意に低下した(図19)。STZ投与2週後より5.0

単位/kg/日インスリン投与を行うことによりMCTおよびSBFはそれぞれ0.74秒および9.2(×10<sup>3</sup>μm<sup>2</sup>/秒)と明らかな回復効果を示し、STZ投与3週後(インスリン投与開始1週後)にはSTZ非投与群との間の有意性は消失した(図19)。一方、動静脈血管径にはSTZ投与の有無に関わらず有意な変化はみられず、STZ投与3週後(インスリン投与開始1週後)においてSTZ投与群、インスリン非投与群および5.0単位/kg/日投与群のいずれの群間でも有意な変化はみられなかった(表1)。

3. ERG所見

1) a波およびb波所見

STZ投与群におけるa波およびb波の振幅と頂点潜時は、STZ投与後3週間にわたりSTZ非投与群と比較し有意に変化しなかった。またSTZ投与2週後の高血糖状態でインスリン5.0単位/kg/日を投与し血糖値を改善した群においてもa波およびb波の振幅と頂点潜時は、STZ非投与群に比較し有意に変化しなかった(図20)。

2) 律動様小波所見

STZ非投与群のO<sub>1</sub>, O<sub>2</sub>およびO<sub>3</sub>振幅は6週間にわたり明らかな変化はみられなかった(図21)。しかしSTZ投与群の頂点潜

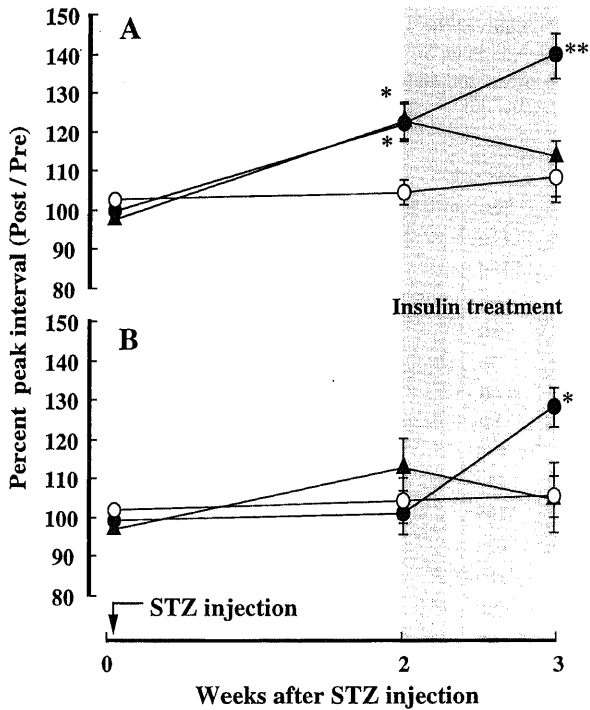


Fig. 23. Effects of STZ-induced diabetes and treatment by insulin on the peak interval of the oscillatory potential in STZ-induced diabetic rats. The graphs A and B show the changes of the T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub> peak intervals, respectively. All values are expressed relative to the pre-injection values. The width of the shaded area indicates the period of insulin treatment. Symbols and vertical bars indicate the mean and standard error in 5 rats, respectively. The rats were divided into 3 groups (5 rats in each) as follows; non-diabetic rats (no STZ, no insulin) ○, diabetic rats without insulin ●, diabetic rats treated with 5.0 U/kg/day insulin ▲. Insulin was subdermally injected once a day for 1 week starting 2 weeks after STZ injection. \* P<0.05, \*\* P<0.01 versus control

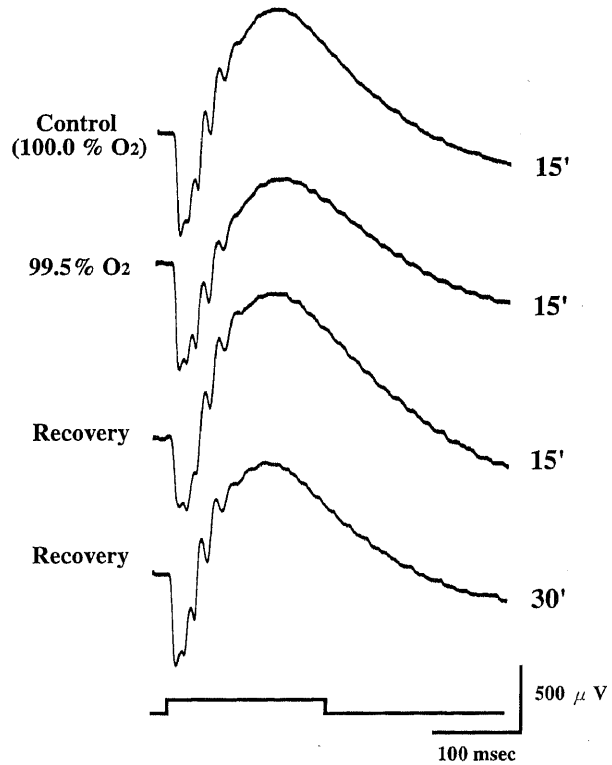


Fig. 24. Typical wave forms of the a- and b-waves of the in-vitro eye cup of an albino rabbit during perfusion with 100.0% O<sub>2</sub> and 99.5% O<sub>2</sub>. Numerals at the right indicate the time (minutes) after onset of perfusion with 100.0% O<sub>2</sub> (control gas) or 99.5% O<sub>2</sub>. The uppermost trace shows a response during initial perfusion with the control gas. The second trace shows a response during perfusion with the 99.5% O<sub>2</sub>. The third and fourth traces show recovery after reperfusion with the control gas. The upward deflection indicates positivity of the vitreous side in reference to the scleral side. The upward and downward deflections at the bottom indicate respectively onset and cessation of stimulus light. Stimulus intensity 3.5 × 10<sup>2</sup> lux at the retina. Time constant 0.3 sec.

時は明らかに延長し, STZ投与2週後の  $O_2$  および  $O_3$  はそれぞれ 125.3 および 123.5% と STZ非投与群に比し有意に延長し, 3週後ではさらにその潜時の延長が顕著となった ( $P < 0.05$  および  $P < 0.01$ ). インスリン 5.0 単位/kg/日投与群における STZ投与2週後 (インスリン投与開始前) の  $O_2$  および  $O_3$  はそれぞれ 115.3 および 120.1% と STZ非投与群に比較し有意に延長していたが, インスリン 5.0 単位/kg/日を1週間投与し血糖値が改善した状態ではそれぞれ 100.2 および 103.2% と明らかに回復した (図 22). また STZ非投与群の  $T_1$  および  $T_2$  頂点間隔は3週間にわたり有意な変化を示さなかったが, STZ投与群の  $T_1$  は STZ投与2週目で 123.4% と有意に延長し, 3週目ではさらにその潜時の延長が顕著となった ( $P < 0.01$ ). STZ投与群の  $T_2$  は STZ投与3週目で 128.0% と有意に延長したが, インスリン 5.0 単位/kg/日投与はこれらの変化を可逆的に回復させ, インスリンにより律動様小波の異常が可逆的に回復するという実験の成績が確認された (図 23).

### Ⅲ. ウサギ摘出眼杯 ERG におよぼす酸素分圧の影響

酸素分圧の実験には白色ウサギ15匹15眼を使用した. 灌流

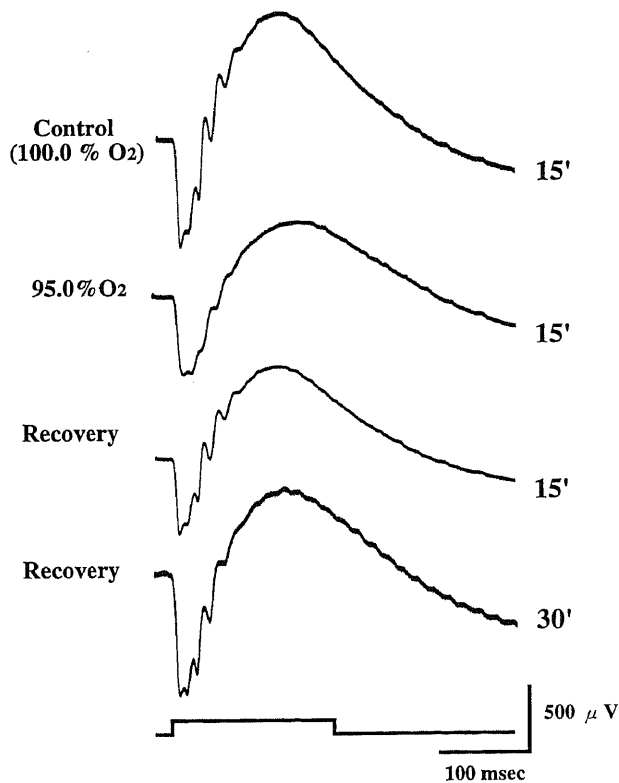


Fig. 25. Typical wave forms of the a- and b-waves of the in-vitro eye cup of an albino rabbit during perfusion with 100.0%  $O_2$  and 95.0%  $O_2$ . Numerals at the right indicate the time (minutes) after onset of perfusion with 100.0%  $O_2$  (control gas) or 95.0%  $O_2$ . The uppermost trace shows a response during initial perfusion with the control gas. The second trace shows a response during perfusion with the 95.0%  $O_2$ . The third and fourth traces show recovery after reperfusion with the control gas. The upward deflection indicates positivity of the vitreous side in reference to the scleral side. The upward and downward deflections at the bottom indicate respectively onset and cessation of stimulus light. Stimulus intensity  $3.5 \times 10^2$  lux at the retina. Time constant 0.3 sec.

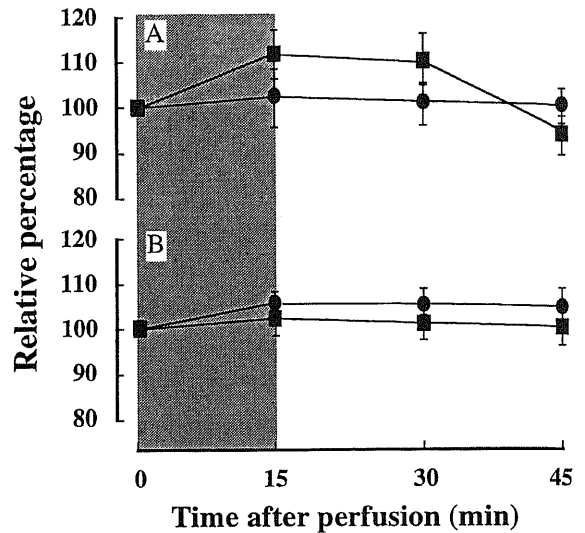


Fig. 26. The amplitude (A) and peak latency (B) of the a-wave during perfusion with 99.5%  $O_2$  or 95.0%  $O_2$  in the in-vitro eye cup of the albino rabbit. The percentages (mean and standard error in 5 eyes each) of the amplitude and peak latency during perfusion with 99.5%  $O_2$  (●) or 95.0%  $O_2$  (■) to those at the end of the initial perfusion with 100.0%  $O_2$  (control gas), (tested gas / control gas)  $\times 100$ , were plotted against the time after onset (time 0) of perfusion with 99.5%  $O_2$  or 95.0%  $O_2$ . The width of the shaded area indicates the period of perfusion with 99.5%  $O_2$  or 95.0%  $O_2$ . Symbols and vertical bars indicate the mean and standard error in 5 eyes, respectively. Stimulus intensity  $3.5 \times 10^2$  lux at the retina.

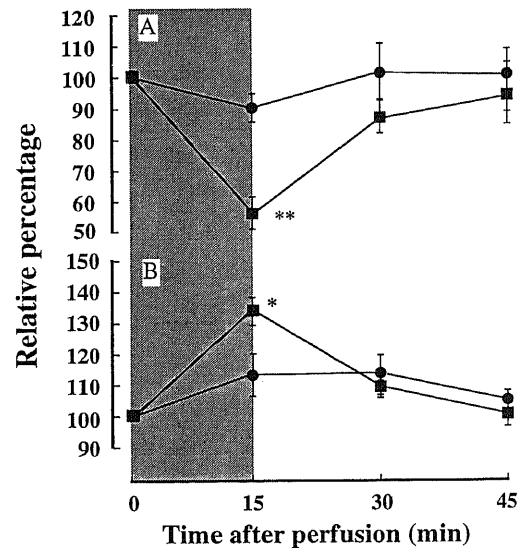


Fig. 27. The amplitude (A) and the peak latency (B) of the b-wave during perfusion with 99.5%  $O_2$  and 95.0%  $O_2$  in the in-vitro eye cup of the albino rabbit. The percentages (mean and standard error in 5 eyes each) of the amplitude and peak latency during perfusion with 99.5%  $O_2$  (●) or 95.0%  $O_2$  (■) to those at the end of the initial perfusion with 100.0%  $O_2$  (control gas), (tested gas / control gas)  $\times 100$ , were plotted against the time after onset (time 0) of perfusion with 99.5%  $O_2$  or 95.0%  $O_2$ . The width of the shaded area indicates the period of perfusion with 99.5%  $O_2$  or 95.0%  $O_2$ . Symbols and vertical bars indicate the mean and standard error in 5 eyes, respectively. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  versus control gas (time 0).

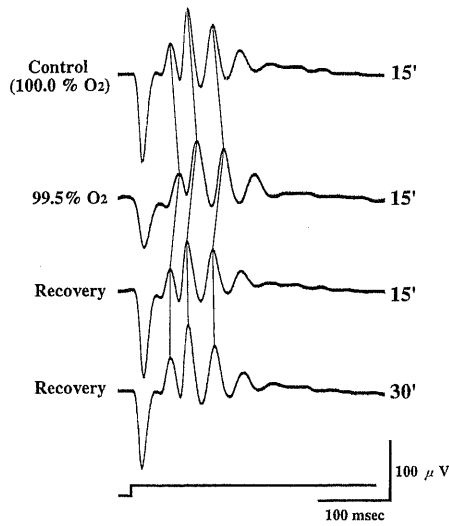


Fig. 28. Typical wave forms of the oscillatory potential of the in-vitro eye cup of an albino rabbit during perfusion with 100.0 % O<sub>2</sub> and 99.5 % O<sub>2</sub>. Numerals at the right indicate the time (minutes) after onset of perfusion with 100.0 % O<sub>2</sub> (control gas) or 99.5 % O<sub>2</sub>. The uppermost trace shows a response during initial perfusion with the control gas. The second trace shows a response during perfusion with the 99.5 % O<sub>2</sub>. The third and fourth traces show recovery after reperfusion with the control gas. The upward deflection indicates positivity of the vitreous side in reference to the scleral side. The upward deflection at the bottom indicate onset of stimulus light. Time constant 3 msec.

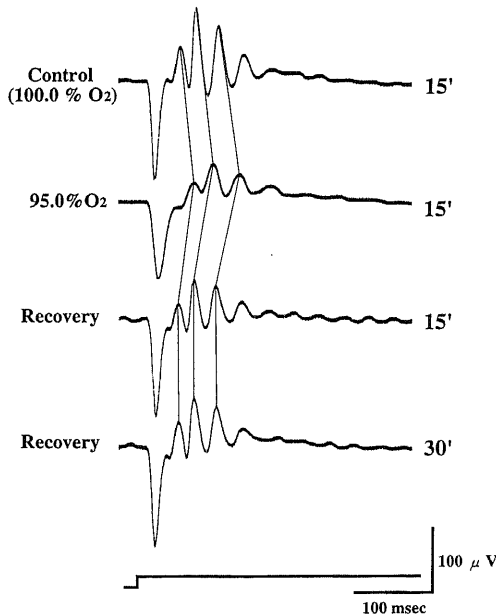


Fig. 29. Typical wave forms of the oscillatory potential of the in-vitro eye cup of an albino rabbit during perfusion with 100.0 % O<sub>2</sub> and 95.0 % O<sub>2</sub>. Numerals at the right indicate the time (minutes) after onset of perfusion with 100.0 % O<sub>2</sub> (control gas) or 95.0 % O<sub>2</sub>. The uppermost trace shows a response during initial perfusion with the control gas. The second trace shows a response during perfusion with the 95.0 % O<sub>2</sub>. The third and fourth traces show recovery after reperfusion with the control gas. The upward deflection indicates positivity of the vitreous side in reference to the scleral side. The upward deflection at the bottom indicate onset of stimulus light. Time constant 3 msec.

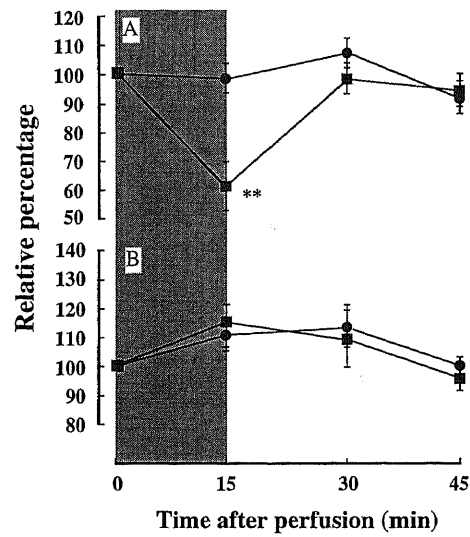


Fig. 30. The amplitude (A) and the peak latency (B) of the first peak (O<sub>1</sub>) of the oscillatory potential during perfusion with 99.5 % O<sub>2</sub> or 95.0 % O<sub>2</sub> in the in-vitro eye cup of the albino rabbit. The percentages (mean and standard error in 5 eyes each) of the amplitude and peak latency during perfusion with 99.5 % O<sub>2</sub> (●) or 95.0 % O<sub>2</sub> (■) to those at the end of the initial perfusion with 100.0 % O<sub>2</sub> (control gas), (tested gas / control gas) × 100, were plotted against the time after onset (time 0) of perfusion with 99.5 % O<sub>2</sub> or 95.0 % O<sub>2</sub>. The width of the shaded area indicates the period of perfusion with 99.5 % O<sub>2</sub> or 95.0 % O<sub>2</sub>. Symbols and vertical bars indicate the mean and standard error in 5 eyes, respectively. \*\* P < 0.01 versus control gas (time 0).

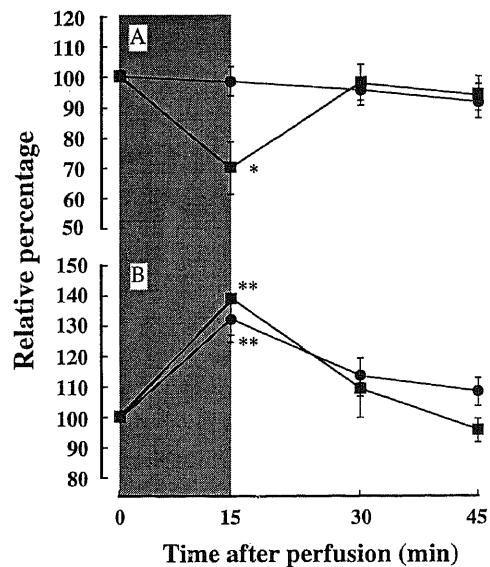


Fig. 31. The amplitude (A) and the peak latency (B) of the second peak (O<sub>2</sub>) of the oscillatory potential during perfusion with 99.5 % O<sub>2</sub> or 95.0 % O<sub>2</sub> in the in-vitro eye cup of the albino rabbit. The percentages (mean and standard error in 5 eyes each) of the amplitude and peak latency during perfusion with 99.5 % O<sub>2</sub> (●) or 95.0 % O<sub>2</sub> (■) to those at the end of the initial perfusion with 100.0 % O<sub>2</sub> (control gas), (tested gas / control gas) × 100, were plotted against the time after onset (time 0) of perfusion with 99.5 % O<sub>2</sub> or 95.0 % O<sub>2</sub>. The width of the shaded area indicates the period of perfusion with 99.5 % O<sub>2</sub> or 95.0 % O<sub>2</sub>. Symbols and vertical bars indicate the mean and standard error in 5 eyes, respectively. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 versus control gas (time 0).



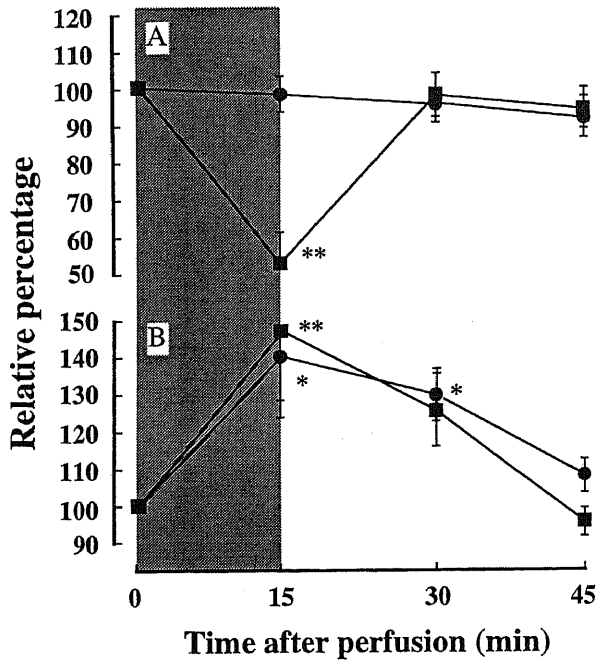


Fig. 32. The amplitude (A) and the peak latency (B) of the third peak ( $O_3$ ) of the oscillatory potential during perfusion with 99.5%  $O_2$  or 95.0%  $O_2$  in the in-vitro eye cup of the albino rabbit. The percentages (mean and standard error in 5 eyes each) of the amplitude and peak latency during perfusion with 99.5%  $O_2$  (●) or 95.0%  $O_2$  (■) to those at the end of the initial perfusion with 100.0%  $O_2$  (control gas), (tested gas / control gas)  $\times$  100, were plotted against the time after onset (time 0) of perfusion with 99.5%  $O_2$  or 95.0%  $O_2$ . The width of the shaded area indicates the period of perfusion with 99.5%  $O_2$  or 95.0%  $O_2$ . Symbols and vertical bars indicate the mean and standard error in 5 eyes, respectively. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  versus control gas (time 0).

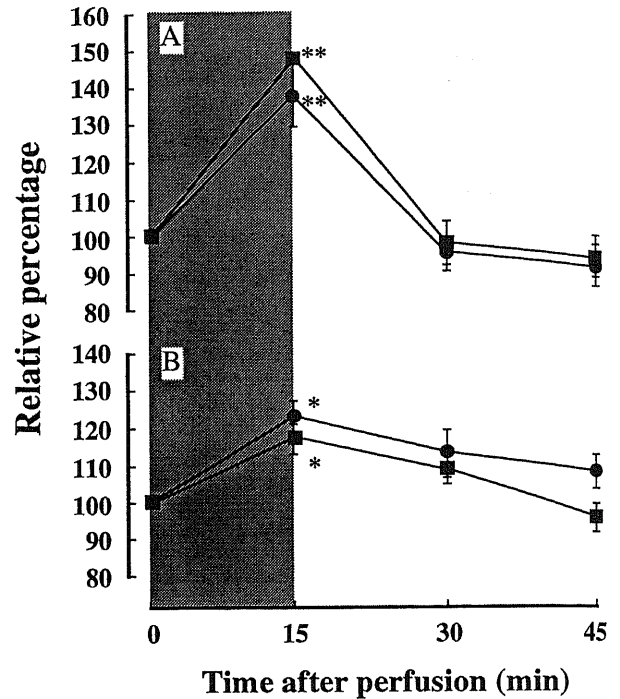


Fig. 33. The  $T_1$  (A) and  $T_2$  (B) peak intervals of the oscillatory potentials during perfusion with 99.5%  $O_2$  or 95.0%  $O_2$  in the in-vitro eye cup of the albino rabbit. The percentages (mean and standard error in 5 eyes each) of the peak interval during perfusion with 99.5%  $O_2$  (●) or 95.0%  $O_2$  (■) to those at the end of the initial perfusion with 100.0%  $O_2$  (control gas), (tested gas / control gas)  $\times$  100, were plotted against the time after onset (time 0) of perfusion with 99.5%  $O_2$  or 95.0%  $O_2$ . The width of the shaded area indicates the period of perfusion with 99.5%  $O_2$  or 95.0%  $O_2$ . Symbols and vertical bars indicate the mean and standard error in 5 eyes, respectively. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  versus control gas (time 0).

液に通気する酸素濃度 100.0% を対照として、99.5% および 95.0% 酸素の場合の a 波、b 波および律動様小波の変化を図 24-32 に示した。

#### 1. a 波および b 波所見

灌流液に通気する酸素濃度 100.0% を対照として 99.5% および 95.0% 酸素の通気では a 波の振幅および頂点潜時に有意な変化は認められなかった (図 24, 25, 26)。また 99.5% 酸素の通気に換えても b 波振幅および頂点潜時には有意な変化は認められなかった。しかし 95.0% 酸素の通気をすることによって 100.0% 酸素通気に比べ b 波振幅は約 58% にまで有意に低下し ( $P < 0.05$ )、b 波頂点潜時は平均 136% にまで有意に延長した (図 27)。これらの変化は対照灌流条件である 100.0% 酸素に置換することにより 30 分後には可逆的に回復した。

#### 2. 律動様小波所見

$O_1$ 、 $O_2$  および  $O_3$  振幅は 99.5% 酸素の通気では 100.0% 酸素通気に比較し有意には変化しなかったが (図 28)、95.0% 酸素の通気によりそれぞれ 61.9、71.4 および 52.1% と有意に低下した (図 29, 30 A, 31 A, 32 A)。99.5% 酸素の通気では 100.0% 酸素通気に比較し  $O_1$  頂点潜時は有意な変化しなかったが、 $O_2$  および  $O_3$  頂点潜時は 133.3 および 140.1% と有意に延長し、これらの潜時の延長はさらに 95.0% 酸素通気により顕著になった (図 30 B、

31 B, 32 B)。 $T_1$  および  $T_2$  頂点間隔は 99.5% 酸素通気では 100.0% 酸素通気に比較し 137.1 および 123.8% と有意に延長し、95.0% 酸素の通気においても同様に顕著に延長した (図 33)。これらの変化は対照灌流条件である 100.0% 酸素に置換することにより 30 分後にはほぼ可逆的に回復した (図 33)。したがって灌流液の酸素分圧の低下に ERG は鋭敏に反応することが明らかとなった。とくに律動様小波の頂点潜時は他の ERG 成分に先行して酸素分圧の低下に極めて鋭敏に延長した。

#### 考 案

糖尿病網膜症は、糖尿病性神経症および腎症と並ぶ糖尿病 3 大合併症の一つとされている。網膜症の最大の問題は、適確な予防または治療を行わない限り着実に失明へと進展していくことである。近年の先進国では高脂肪食の摂取<sup>23,24)</sup> やストレスの増加<sup>25,26)</sup> に伴って糖尿病人口が急激に増加しており、糖尿病に起因する失明者の増加も数多く報告されている。Kahn と Hiller<sup>27)</sup> によれば、米国において失明 (法的には視力 20/200 以下と定義される) と判定された症例のうち糖尿病に起因する率は約 10% であり、45~74 歳では約 20% に達するという。またスコットランドにおいて糖尿病は失明原因の約 10% を占め、45~54 歳、55~64 歳の年代では失明原因の筆頭となっている<sup>28)</sup>。

オランダでは1982年の時点ですでに糖尿病は失明原因の筆頭となり、その数は失明患者の約21%に達していた<sup>29)</sup>。その他イギリスのウエールズ<sup>30)</sup>やデンマーク<sup>31)</sup>においても同様に糖尿病は失明原因の筆頭に挙げられ、失明の危険性は糖尿病患者では非糖尿病患者より50~80倍高いとの推測もある<sup>31)</sup>。一方、日本でも日本失明予防協会と日本眼科医会とが協同で行った全国8府県の視覚障害者認定診断書に基づく失明原因調査<sup>32)</sup>では網膜症が失明原因の第一位であった。このように世界的に網膜症による失明者は着実に増加しており、光凝固治療が普及してきたにもかかわらず糖尿病による失明の発症率および有病率が減少する傾向にないのはおそらく糖尿病自体の発症率が増加しているためと考えられ、日本での糖尿病の有病者は約600万人に達すると推定されている<sup>33)</sup>。したがって網膜症対策は眼科領域における重要課題である。

古くから網膜症の病態把握を目的とする多くの研究がなされてきた<sup>34)35)</sup>。しかし網膜症が多様な臨床所見を呈すること、ヒトと同様な網膜症所見を発症する動物モデルがないこと、さらに網膜症の病態進行を定量的に把握する手段が乏しいことなどが問題となり、現在においてもその病態は十分に把握されていない。網膜症診断には通常の眼底検査に比べて蛍光眼底検査では毛細血管瘤などがより高率に検出されることが知られ、中川ら<sup>36)</sup>は通常の眼底検査法によっては網膜症が検出されない症例において蛍光眼底撮影による異常検出率は21.1%であったとしている。しかしその一方で蛍光眼底検査においても網膜症を見逃す場合も少なくない。すなわち蛍光眼底検査では網膜血管系に異常が生じにくい前網膜症を検出することは困難であり、発症後の進行過程を評価する客観性および定量性においても問題がある。また蛍光眼底検査および前述の硝子体フルオロフォトメトリー法では蛍光造影剤投与による薬剤性ショックの問題を常に念頭におく必要があり、しかも短期間での反復投与は困難とともに万全な検査法とは言い難い。したがって網膜症の発症機序については多くの仮説が提唱されるものの、その仮説の検証が十分に行われず、この点は網膜症に対する治療薬を開発する上でも極めて深刻な問題である。

Yonemuraら<sup>11)</sup>は糖尿病患者において眼底に異常が検出されない初期段階においてすでにERGの律動様小波に異常が生じることを報告し、この所見は網膜症の発症過程を把握する上で有効な指標になりうることを明らかにした。それ以来、ERGは網膜症の早期診断、重篤度の判定および病態把握に活用されるとともに、網膜症治療薬開発の評価指標として動物モデルにおいても活用することが期待されていた。しかし薬剤の効力評価という面においてERGは十分に普及してきたとは言い難いのが現状であり、動物眼におけるERG測定には臨床とは異なる種々の考慮すべき問題がある。その第一点は、動物のERG記録が麻酔下で行うことを余儀なくされるため、ヒトとは異なり麻酔の影響を無視できないことが挙げられる。しかし被験動物を麻酔することは実験を容易にし、かつ動物愛護の観点からも不可欠である。Watanabeら<sup>37)</sup>はウサギおよびラットのERG記録においてウレタンとペントバルビタール麻酔とを比較し、動物の麻酔にはウレタンを推奨すると結論したが、米村ら<sup>38)</sup>はラットにおけるウレタン麻酔下ではa波およびb波の振幅が減少するとしており、また発ガン性を有する点<sup>39)</sup>についても懸念される。したがってウレタン麻酔は頻りにERG測定を必要とする実験には不相当と判断し、本研究ではマウスのERGを測定する

際に用いられてきた塩酸ケタミンおよび塩酸キシラジンを併用することにした。Sasovetz<sup>40)</sup>は、有色ウサギにおいて塩酸ケタミンは25mg/kgの投与量まではERGに影響をおよぼさないとしており、杉本ら<sup>41)</sup>は有色マウスにおいて塩酸ケタミン(80mg/kg)と塩酸キシラジン(20mg/kg)の混液を用いた麻酔下では無麻酔下とほぼ変わらないERG記録が可能であると結論した。本研究で用いた麻酔量はこれらの報告での投与量より少量であり、したがってERGにおよぼす麻酔の影響はほとんどないと推察される。第二点としては、動物ではERG用の光刺激条件・順応条件に常法がないことが挙げられる。深い暗順応状態では律動様小波は減弱するので、本研究では律動様小波を明瞭に観察するために、5分間隔で2回に分けた光刺激のうち2回目の光刺激により律動様小波を記録した。またERG記録用閥電極にも配慮し、本研究では実験期間中の動物の成長に伴う眼球の大きさの変化に合わせて3種類の電極を使い分けた。

糖尿病動物モデルはその発症が遺伝的に規定されたものと外科的あるいは化学的処置を施して糖尿病を惹起されたものに大別されるが、外科的あるいは化学的処置をしたモデルは糖尿病の病態生理の解析に有用であるとされている<sup>42)43)</sup>。STZはカビの一種の*Streptomyces achromogenes*に由来する抗生物質で、その催糖尿病作用はRakietenら<sup>44)</sup>により初めて報告された。それ以来、アロキサンにとって代わり、実験的糖尿病モデル作成の目的に広く用いられている。この催糖尿病作用の機序は、主に迅速かつ不可逆性の壊死を伴う膵β細胞に対する特異的な細胞毒性によるものであり、その結果として膵ランゲルハンス島のNAD含量を減少させ、プロインスリン生成を阻害することが知られている<sup>45)~48)</sup>。またSTZはアロキサンとは異なり、成熟ラットに投与した場合に膵β細胞に対する変性効果を投与量により調節できることがJunodら<sup>49)</sup>により報告されている。すなわち成熟ラットに対してSTZを65~90mg/kg体重という大量を投与するとインスリン依存型糖尿病(insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM)モデルが作成されるが、45mg/kg体重程度に投与量を少なくすると軽度のインスリン非依存型糖尿病(non-insulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM)モデルとなり、投与量や投与方法により程度の異なる糖尿病モデルの作成が可能であるとしている<sup>50)</sup>。本実験モデルはこの分類の投与量に基づくIDDMモデルに属するが、本研究ではSTZ投与による急性の死亡を回避するために腹腔内投与を採用したので、変性効果が比較的緩和されたNIDDMモデルと考えるべきであろう。その他の外科的あるいは化学的処置を施す糖尿病モデルとしては、膵臓摘出<sup>51)52)</sup>、アロキサン投与<sup>53)54)</sup>およびガラクトース投与<sup>55)56)</sup>による動物モデルが報告されているものの、本モデルを含めいづれのモデルにおいてもその病態に迫る研究には乏しく、特にERGの律動様小波所見とその他の眼検査所見、血液・眼関門機能および血流動態との関連についての報告はない。そこで本研究では、STZ誘発糖尿病ラットの律動様小波を中心とするERG成分の詳細な解析を行い、眼底検査、血液・眼関門機能、血流動態および網膜組織学的所見との関連性について検討した。その結果、眼底検査所見や血液・眼関門機能に異常が認められないSTZ投与2週後においてa波およびb波にはほとんど異常は認められなかったが、律動様小波の頂点潜時は有意に延長し、それらの変化はその後の経過とともに顕著となった。すなわち本実験モデルにおける網膜機能異常は、糖尿病状態が誘発された後の血液・眼関門の機能異常や網膜組織学的異常に

先行することが判明した。本研究で認められた変化の中で注目すべき点としては、律動様小波にみられる頂点潜時の変化が  $O_1$  よりも  $O_2$ 、さらに  $O_2$  よりも  $O_3$  に顕著に認められ、また頂点間隔である  $T_1$  および  $T_2$  の延長が顕著であったことが挙げられるが、律動様小波の起源がアマクリン細胞を含む網膜内回帰性神経回路網にあると考えられている<sup>57)</sup>ことを考慮すると、より多くの神経回路網を介して記録される  $O_2$  および  $O_3$  により顕著な機能異常が生じやすくなることで説明できよう。一方、Kernellら<sup>58)59)</sup>は10日で血液・眼関門機能が低下するとしているが、本研究では血液・眼関門の機能低下は糖尿病誘発6週後と彼らの報告<sup>58)59)</sup>に比べかなり遅い時期に検出された。この相違の原因として、硝子体フルオロフォトメトリー値は糖尿病の病態や眼透光体の条件の相違などに依存するとされる。すなわちフルオロフォトメトリー値は後部硝子体剥離<sup>60)</sup>、白内障<sup>61)</sup>および硝子体混濁<sup>62)</sup>などの有無や程度に左右されるという臨床報告や、また動物モデルでは糖尿病誘発剤の種類、投与経路および投与量に起因する糖尿病病態の違いにも依存するとの報告もある<sup>63)64)</sup>。したがって STZの投与量ならびに投与方法が本研究とは異なり、血糖値も 400~500 mg/dl と高いラットにおける Kernellら<sup>58)59)</sup>の報告と本研究との間での硝子体フルオロフォトメトリー値の異常出現時期の相違は上記の実験条件の相違に起因する可能性がある。いずれにせよ、本モデルでは糖尿病病態を背景に眼底異常、血液・眼関門の機能低下ならびに網膜組織学的異常に先行し、網膜神経回路網の機能異常が生じるといふ松村<sup>65)</sup>の提唱する糖尿病性網膜内神経症 (diabetic intraretinal neuropathy) の概念によく適合し、その機能低下を阻止または回復させる薬剤は網膜症の治療薬となりうる可能性がある。

網膜症発症後の治療では網膜光凝固療法がその中心であるが、予防的な観点では食事療法およびインスリン投与による高血糖是正が有効であるとされてきた<sup>66)</sup>。しかし高血糖是正に関しては、より早期からの厳格な高血糖是正の重要性が指摘されているものの、科学的に証明した報告はなかった。IDDM患者1441名を対象とした米国の diabetes control and complications trial (DCCT)では、患者を一次予防群 (細小血管合併症の発症を予防しうるか) および二次介入群 (細小血管合併症の進展を阻止しうるか) に分け、各群ごとに無作為に現行インスリン治療群と強化インスリン治療群に割り付け、糖尿病コントロール状態と各種合併症の累積悪化率を平均6.5年にわたり追跡調査した結果が近年報告された<sup>67)68)</sup>。それによると、強化インスリン治療群においては良好な血糖是正を維持でき、細小血管症の累積悪化率を有意に低下させることが可能であった。その際の網膜症、腎症および神経症の発症・進展の相対リスク減少率はそれぞれ 63, 54 および 60% であり、IDDM患者において発症早期からの厳格な高血糖是正の重要性が証明された。一方、我国においても NIDDM患者においても DCCTによく似た調査<sup>70)</sup>が行われた。この研究<sup>70)</sup>では熊本大学代謝内科において中間型インスリン朝1回または朝夕2回で加療されていた患者および新規インスリン治療患者110名を一次予防群 (網膜症なし、尿アルブミン排泄量 30mg/日以下) と二次介入群 (単純性網膜症、尿アルブミン排泄量 300mg/日以下) に分け、それぞれ中間型インスリン治療群またはインスリン頻回注射療法群に無作為に割り付け、6年間の追跡調査を行った。その結果、インスリン頻回注射療法群では中間型インスリン治療群に比較し良好な高血糖是正が可能となり、網膜症増悪の粗相対リスク減少率は一次予防群にお

いては 76%、二次介入群では 56% と DCCT とほぼ同等の値を示した。また一次予防群ではインスリン頻回注射療法群における網膜症増悪者は中間型インスリン治療群に比較し 1/4 にも達しなかった。このように NIDDM においても IDDM と同様にインスリン頻回注射療法による厳格な高血糖是正が網膜症のリスクを減少させることが実証された<sup>70)</sup>。しかし長期間にわたり高血糖が持続した症例や糖尿病未治療例では短期間に急激に血糖値を正常化すると網膜症が急激に進行するとの報告がある<sup>71)72)</sup>。清水ら<sup>73)</sup>は単純網膜症を有する NIDDM 74例 131眼について初診後 3ヶ月間において  $HbA_{1c}$  を 3% 以上低下させた群では 3% 未満低下させた群に比べ、その後 2年間の網膜症の進行率が高く、網膜症の改善率は低かったとしている。長期間にわたり高血糖が持続した症例では、網膜症悪化防止の観点から、 $HbA_{1c}$  を 1% 低下させるのに約 2ヶ月間をかけるべきとの意見がある<sup>74)</sup>。

ところで、このインスリン投与による高血糖是正が ERG 変化を回復させたとの報告は一報しかなく<sup>75)</sup>、さらにその機序を検討した報告はない。そこで糖尿病における網膜機能異常に対するインスリンの治療効果を検討することを目的として、糖尿病により ERG 変化が生じた STZ 投与 3週後よりインスリン投与を開始し、その ERG 変化回復効果について調べた。今回用いたインスリン製剤は速攻型インスリンと中間型インスリンをそれぞれ 3:7 の割合で含有する混合型製剤であり、その臨床用法は 1回 4~20 単位/日の皮下注射である。本研究では、臨床投与量に準じ 0.2, 1.0 および 5.0 単位/kg/日のインスリンを投与したが、投与量によっては低血糖ショック等の副作用が発生するとされている<sup>76)</sup>。この点を考慮し、インスリン投与期間中の観察には特に注意を払ったが、一般症状を見る限り低血糖ショックを示唆する異常所見はみられず、インスリン投与による副作用はなかった。これらのインスリン投与量下においては投与量に依存して血糖値は是正され、これに伴って律動様小波の変化も回復した。特に 5.0 単位/kg/日投与群では正常対照 (非糖尿病) 群とほぼ同程度にまで血糖値および律動様小波の変化が回復したので、糖尿病誘発 3週後の律動様小波の異常は可逆的であることが明かとなった。この知見は、高血糖是正は律動様小波の異常に反映される網膜機能障害を回復させる効果を有することを実験的に証明したのみならず、この律動様小波の変化が STZ の毒性に起因せず糖尿病状態に由来することも明示している。

一方、インスリンは硝子体フルオロフォトメトリーによって検知される血液・眼関門の障害に対しては全く回復効果を示さなかった。Whiteら<sup>77)</sup>や Kernellら<sup>58)59)</sup>はインスリン注射による集中療法により硝子体フルオロフォトメトリーの異常所見が多くの患者で回復し、患者によっては正常化したと報告した。この可逆性はラットによる動物実験においても確認された<sup>78)</sup>。しかし本実験モデルでは STZ 投与 6週後において硝子体フルオロフォトメトリー値は高値を示し、血液・眼関門の異常を呈したが、この所見はインスリンによって回復せず、したがってインスリンによる血液眼関門の障害の可逆性を証明できなかった。3週間のインスリン投与では硝子体フルオロフォトメトリー値の有意な回復はみられなかったため、その可逆性を期待する上ではさらに早期から、ないしはさらに長期のインスリン投与が必要かもしれない。網膜症治療の早期開始の有用性に関しては、インスリン療法に限らず網膜光凝固療法に関する Agardhら<sup>79)</sup>の成績においても実証されており、網膜症の早期発見と時期を

得た網膜光凝固療法により視力予後は改善されたとしている。したがって網膜症の早期診断は本症治療上極めて重要であり、さらにその早期診断には蛍光眼底検査とは異なり、蛍光造影剤投与による薬剤性ショックの問題を考慮する必要がない律動様小波が極めて鋭敏でかつ安全な指標になる。

本実験モデルで特徴的に認められた律動様小波の異常の原因について以下に考察する。律動様小波の起源は、アマクリン細胞を含む網膜内回帰性神経回路網にあるとされており<sup>57)</sup>、その神経回路網において神経伝達物質の放出や取り込みなどの変化が電気的応答の発生あるいは修飾に反映していると考えられる。アマクリン細胞には20種類以上の神経伝達物質が存在するとされ<sup>80)</sup>、それらの伝達物質を網膜に作用させることにより律動様小波が変化する<sup>10)81)~84)</sup>。特にガンマアミノ酪酸( $\gamma$ -amino butyric acid, GABA)は、免疫組織学的検索において網膜内顆粒層、内網状層および神経節細胞層に検出され、特にアマクリン細胞に多いことが示されている<sup>85)~87)</sup>。Mizunoら<sup>88)</sup>はラットにおいてGABAの硝子体内投与によって律動様小波の頂点潜時が延長し、その振幅が低下すると報告した。また川口ら<sup>89)</sup>、河崎ら<sup>84)</sup>や著者ら<sup>89)</sup>もウサギ摘出眼杯 ERGの律動様小波がGABAによって減弱するとした。またアロキサン誘発糖尿病ラットにおいてアロキサン投与後約1週間で網膜内のGABAトランスアミナーゼの活性が低下すると報告されている<sup>88)</sup>。さらにSTZ誘発糖尿病ラットの網膜においてGABAが増えるとの報告があり、網膜内GABA量の増加が律動様小波減弱の原因として挙げられた<sup>88)87)</sup>。

またドーパミンもアマクリン細胞の神経伝達物質の一つであり<sup>90)</sup>、網膜内顆粒層付近の神経細胞、とりわけアマクリン細胞が律動様小波の細胞起源に深く関与すると考えられている<sup>57)</sup>。Northingtonら<sup>91)</sup>は、STZ誘発糖尿病ラットの網膜において高血糖がドーパミン代謝異常を惹起することを報告しており、またJaffeら<sup>92)</sup>はパーキンソン病において、病期が進行すれば全般的にERGが減弱する症例が多く、またERGが減弱した患者にレボドーパを静脈内投与すると律動様小波を含めてERGが回復する症例があると報告している。これらの知見は、糖尿病における律動様小波の異常がドーパミンの代謝異常と関連することを示唆するものである。さらにIshikawara<sup>93)</sup>はSTZ誘発糖尿病ラットにおいて網膜内のグリシン量がGABAと同様に上昇すると報告しており、糖尿病初期にみられる律動様小波の異常の一原因として網膜におけるGABA、ドーパミン、グリシンなどの神経伝達物質の代謝異常が挙げられよう。Wongら<sup>94)</sup>は糖尿病ラットにおいて脳内のGABA量が増加することを明らかにし、この増加をインスリンが回復させると報告しており、この可逆性からもSTZにより誘発される糖尿病は、STZの毒性に起因しないと考えられ、高血糖が引き金となり二次的に生じることが裏付けられる。糖尿病では高血糖状態が持続すると、高血糖自体がさらに膵からのインスリン分泌を低下させ、末梢のインスリン抵抗性を増悪させるいわゆる糖毒性(glucose toxicity)<sup>95)</sup>が生じ、ますます高血糖の状態が悪化する悪循環をきたし、この悪循環が神経伝達物質の代謝をさらに阻害しているであろう。

本研究でさらに注目すべき点は、律動様小波の異常が頂点潜時に顕著にみられたことである。すなわち本実験モデルでは振幅が有意に低下しないSTZ投与後間もない時期においても頂点潜時が選択的に延長した。これまでの報告<sup>10)80)82)</sup>にあるように、各種神経伝達物質によるERG変化は律動様小波に最も鋭敏に

みられるが、その変化は振幅の低下を伴っており、厳密には本研究結果にみられたような頂点潜時の選択的延長を呈するとの報告はない。したがってこの点に鑑みると頂点潜時の選択的延長の原因として別の可能性を考えねばならない。網膜機能を維持する上で重要な役割を担っている網膜血流の変化、すなわち網膜循環障害の関与の可能性がまず考えられよう。樋口ら<sup>96)</sup>は単純網膜症9例において、血管拡張作用を有するカルシウム拮抗薬ニカルジピン1日60mgの12週間の投与によってコントラスト感度が有意に改善されるとともにERGの律動様小波の頂点潜時は有意に短縮し、初期の網膜症において網膜循環の改善が有効であると報告した。そこで本研究では網膜血流量変化の可能性を検証するために、網膜血流量をSTZ投与前後およびインスリン療法前後でSLOによって測定した。その結果、STZ投与2週間には網膜血流量は正常群と比較し約2/3程度まで有意に低下し、この低下はインスリン5.0単位/kg/日投与により回復することが判明した。すなわちSTZにより律動様小波の起源となる網膜内層への血液循環動態に異常が生じ、この異常はSTZ毒性によらず糖尿病状態に起因することが明らかとなった。

Bursellら<sup>97)</sup>はSTZ誘発糖尿病モデルにおいてビデオ蛍光眼底画像システムを用い蛍光剤投与後の経時的な動脈・静脈画像輝度の解析によって求めた網膜循環時間は低下すると述べ、この知見も本実験結果によく対応する。また米村ら<sup>98)</sup>は塩化ツボクラリンにより全身麻酔を施したウサギにおいて人工呼吸下で吸気の酸素分圧を変化させ、その際の動脈血の酸素分圧とERGとの相関について検討した。その結果、わずかながらの酸素分圧の低下に対しても律動様小波は鋭敏に反応し、頂点潜時の選択的な延長が誘発されたと報告しており、組織呼吸を阻害するシアン化ナトリウムの硝子体内投与によっても律動様小波の頂点潜時は延長するという。したがって本実験モデルにおける律動様小波の頂点潜時の延長には、網膜血流量の低下とともに血液凝固能亢進あるいは赤血球異常等の増悪因子の影響が加味され、その結果招来される網膜の低酸素状態が関与する可能性がある。この可能性をさらに検証するために、本研究では摘出眼杯ERGにおける律動様小波におよぼす低酸素の影響を検討した。薬剤のERGへの影響を検討する目的で、薬剤の硝子体内注入や薬剤を添加した灌流液による硝子体切除術を施した実験モデルでの検討が行われている<sup>100)99)</sup>。しかしこれらの方法では、薬剤の眼内クリアランス、眼内灌流液の速度や方向、残存硝子体量などの実験条件を一定に保つことは容易でない。そこで上記の目的の実験ではしばしば摘出眼杯ERGが用いられる。これと同様にERGにおよぼす低酸素の影響を検討する際にも、全身的な低酸素負荷では得られたERG所見が低酸素の網膜への直接的影響に由来するのかわるいは低酸素の全身的效果に誘発した二次的変化であるのかわるいの識別が困難である。この点に鑑みERGへの低酸素の影響を検討するには摘出眼杯ERGを用いる方法が優れており、この摘出眼杯ERGに対する低酸素の影響を検討した結果、灌流液に通気する酸素分圧を100.0%から95.0%にまで低下させると律動様小波のみならずa波およびb波も変化したが、100.0%から99.5%にわずか0.5%低下させた場合にはa波およびb波は全く変化しなかったが、律動様小波の頂点潜時は有意に延長した。すなわち低酸素によって律動様小波の頂点潜時は選択的に延長し、この波形はSTZ誘発糖尿病ラットで早期にみられたERG変化に一致する。したがってこの一致はSTZ誘発糖尿病ラットにおける律動様小波の頂点潜時

の選択的延長が網膜血流量の低下に伴う低酸素状態に起因する可能性を示唆する。また本研究における STZ 誘発糖尿病ラットではインスリンは網膜血流量の低下を回復させかつ律動様小波の変化も回復させたから、インスリンは直接的または高血糖を介して間接的に網膜の低酸素状態を改善し、律動様小波異常として捉えられる網膜機能障害を回復させたと推論される。さらに網膜血流量には自己制御機構 (autoregulation) が作用すること<sup>99,100</sup>を鑑案すると、インスリンによって網膜血流量の自己制御機構も改善する可能性も考えられる。

一般にヒトにおいて高血糖状態では網膜血流は増大するとされ<sup>100,101</sup>、その機序の一つとして次のような仮説がある。血管内皮細胞に糖が流入すると解糖系、TCA サイクルの活性化が起き ATP/ADP 比の増加が ATP 依存性  $K^+$  チャンネルを抑制して血管内皮細胞の膜電位が脱分極し、膜電位依存性  $Ca^{2+}$  チャンネルを介して細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を上昇させ、血管内皮細胞から一酸化窒素を含む内皮細胞由来血管弛緩因子 (endothelium-derived relaxing factor) を放出する。この結果、毛細血管抵抗が低下し毛細血管が拡張する。すなわち高血糖による網膜血流の増加は、主として血管抵抗の低下に由来するといえる。このことは本実験モデルで認められた網膜血流の低下と相反するものであり、この相違についてはいくつかの原因が考えられる。Kohner ら<sup>100</sup>によれば、IDDM 患者において網膜静脈血流速度は網膜症を呈しない症例では増加しておらず、網膜症が進行するほど増加するという。また血圧を上昇させながら酸素吸入による血流速度減少率をみた成績でも網膜症を呈しない症例では自己制御機構は保たれていた<sup>102</sup>。これらの結果は、たとえ高血糖であっても網膜血流速度が増加しない症例において網膜症の発症も増殖性への進展も生じにくい可能性を示唆する。また増殖性変化が虚血組織に生じることを考えれば、ヒトでみられる高血糖状態での網膜血流増加は低酸素状態に陥った網膜領域の隣接の非低酸素状態にある網膜領域の血管拡張を促進し、その領域の網膜血流量を増加せしめた結果であるかもしれない。この観点から推察すると、本実験モデルでは組織学的な検討においても網膜に異常は認められず、また網膜は臨床で認められるような増殖組織を伴う虚血状態にもないことから、本実験モデルに認められる網膜血流の低下は、糖尿病患者で認められる網膜血流量の増加時期よりさらに早期の糖尿病発症直後の異常を反映しているかもしれない。

一方、NIDDM では診断のついた時点ですでに網膜血流量は減少しており、血圧が正常な時期には毛様体の毛細血管内圧亢進や血管透過性亢進などの網膜血流量に影響を及ぼすであろう血管異常はみられないという<sup>103</sup>。すなわち NIDDM 症例では多くの場合、初診時ですでに真の発症からすでに 7~12 年を経過していると報告<sup>104</sup>されており、糖尿病において網膜血流量が増加するという臨床知見の時期に比べて、本研究において律動様小波の頂点潜時が選択的に延長し網膜血流量が低下した時期はより早期である可能性がある。すなわち本実験モデルにおける網膜血流量の低下は糖尿病発症後の極めて早期の異常を反映する可能性がある。

糖尿病患者と本実験モデルにおける相反する網膜血流量の変化を上記の時期的な問題ではなく生理的な作用機作の相違と考えることも可能である。すなわち網膜血流量の変化は網膜血管の収縮および弛緩のバランスにより規定され、前述のごとくヒトの高血糖状態における網膜血流量の増加は血管抵抗性の低

下、すなわち血管拡張に起因すると考えられる。この生理的な作用機作に着目すると本実験モデルにおける網膜の動脈径および静脈径はともに有意性はなかったものの STZ 投与により収縮傾向を示し、インスリン投与により拡張傾向を示した。すなわち本実験モデルにおける網膜血流量の低下は、高血糖状態におけるヒトとラットの血管収縮-弛緩機構の反応性の相違による可能性が示唆され、ラットでは血流量低下を招来する血管収縮機構が強く働いた結果なのかもしれない。この可能性は、血管構成細胞の反応性の違いを意味し、網膜血管においてはこれに関与する細胞として平滑筋細胞とペリサイトが挙げられる。血管収縮に関するこれらの細胞機能の調節には PKC の活性化が関与しているとの報告が多い<sup>105</sup>。これは毒毒性仮説に基づくもので、解糖系の亢進に伴いジアシルグリセロール (diacylglycerol, DAG) の産生が増大し、PKC が活性化されるとされている<sup>106,107</sup>。平滑筋の収縮は、DAG のアナログであるホルボール 12-ミリステート 13-アセテート (phorbol 12-myristate 13-acetate) により直接収縮することや交感神経  $\alpha$  受容体を介する平滑筋の収縮には PKC 活性化が関与しているとの報告があり<sup>108</sup>、また血管収縮性ペプチドであるアンギオテンシン II やバゾプレッシンも DAG を増加させ PKC が細胞質分画から細胞膜へ変位し、活性化されることが報告されている<sup>109</sup>。血管内皮細胞より分泌されるエンドセリンの標的細胞は細胞上にその受容体が発現している平滑筋細胞と考えられ、G 蛋白質系を通しホスホリパーゼ C を活性化することにより DAG を増加させ、PKC を活性化させることが明らかとなっている<sup>110</sup>。平滑筋細胞の生化学的機序では、PKC の活性化はカルボニンのリン酸化反応に関わっている可能性が高く<sup>111</sup>、カルボニンのリン酸化が起こり平滑筋細胞は収縮するが、カルボニンをリン酸化するキナーゼとしては PKC のほかにカルモジュリンキナーゼが候補に挙がっており、カルボニンの分子構造をみると、塩基性アミノ酸に隣接するセリン残基があり、この部分が PKC によりリン酸化される可能性が高い。一方、微小血管においてはペリサイトの寄与が大きく、ペリサイトには免疫組織学的検討により、平滑筋型のアクチン<sup>112</sup> やトロポミオシン<sup>113</sup> などの収縮タンパクの存在が認められている。またペリサイトにはエンドセリン I 受容体が存在し、PKC 活性が存在することが報告されており<sup>114</sup>、また組織学的には大血管から微小血管へ移行する血管には、平滑筋細胞とペリサイトの中間的な性質を有する細胞も認められている。このように平滑筋細胞やペリサイトが血管構造の維持と血管の収縮の役割を担っていることは実証されており、その機構にはさまざまな因子の関与が推測される。DAG 含量増加と PKC 活性亢進が自己免疫機序で糖尿病を発症する BB ラットにおいて脳では認められないが、網膜では認められたという<sup>115</sup>。また Shiba ら<sup>114</sup> や Bursell ら<sup>99</sup> はこの PKC 活性の上昇を示した BB ラットにおいてビデオ蛍光画像解析によって求めた網膜循環時間と血流量はいずれも減少したという。さらに Bursell ら<sup>115</sup> や Ishii ら<sup>116</sup> は STZ 誘発糖尿病ラットにおいて網膜動脈径に変化がないことを示し、さらに正常対照ラットの網膜をホルボールエステルで特異的に刺激すると網膜血流量が低下し糖尿病状態の網膜血流変化に酷似すること、スタウロsporin を特異的に網膜に作用させ PKC 活性を阻害すると網膜血流量が正常化すること、糖尿病ラットをインスリン治療し血糖を正常化すると網膜 PKC 活性の低下と血流異常が正常化することを明らかにしている。このように、網膜血流量の変化には PKC 活性が寄

与していることは明らかであり、次に述べる網膜症発症機序仮説からも PKC の深い関与が類推される。糖尿病の主徴である高血糖により引き起こされる代謝異常としてはポリオール代謝亢進、蛋白質への非酵素的糖付加反応、PKC の活性化、活性酸素や過酸化脂質の産生増加、細胞内の酸化還元状態の変化、アラキドン酸カスケードの代謝異常などが挙げられる<sup>117)</sup> が、これらは相互に作用しながらネットワークを形成し血管壁を構成する血管内皮細胞や網膜を構成する種々の細胞を傷害する。すなわち形成されるネットワークとしては以下のようなことが考えられる。高血糖で過剰のグルコースが細胞内に流入するとポリオール代謝経路が亢進し、最終的にはフルクトースへと変換される。フルクトースはグルコースより糖蛋白の糖化を起こし易く、蛋白質の非酵素的糖化反応が亢進し最終糖化産物 (advanced glycation end products) が形成される<sup>118)</sup>。ポリオールの代謝経路の亢進に伴いフルクトースへの中間代謝産物であるソルビトールからフルクトースへの変換の際に  $\text{NAD}^+$  が  $\text{NADPH}^+$  へ変換され細胞内の  $\text{NADPH}^+/\text{NAD}^+$  比が上昇する。この状態を高血糖性偽低酸素状態 (hyperglycemic pseudohypoxia) と呼び、引き続いて PKC 活性化、ホスホリパーゼ  $\text{A}_2$  活性化、アラキドン酸カスケードの活性化、プロスタグランジン産生亢進などが連鎖反動的に引き起こされ種々の細胞が影響を受けることとなる<sup>119)</sup>。したがってヒトと相反する血流の変化にはこの PKC 活性の他、種々のネットワークが深く関わっており、本実験モデルで認められた網膜血流の低下は高血糖性偽低酸素状態を招来している可能性がある。これまでに網膜血流は糖尿病では初期に増加し末期には低下するとされてきたが、最近の知見では、極めて早期の糖尿病では網膜血流速度の低下や血流量の減少が報告され<sup>100)</sup> ており、本実験モデルでの所見はヒトで報告されたこのような臨床像に対応している可能性が示唆される。

従来よりはこれらの仮説に基づいて種々の薬剤の開発が進められ、なかでも ARI の網膜症に対する有効性が精力的に検討されてきた。しかし現在においてもソルビニール (sorbiniol), トルレスタット (tolrestat) および WAY-121509<sup>120)</sup> のいずれの化合物においても明らかな臨床での治療効果は示されていない。近年では血糖是正の観点から開発された薬剤の網膜症治療への応用が試みられつつあり動物実験での有効性が報告されている<sup>121)~123)</sup>。なかでも  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤 ( $\alpha$ -glucosidase inhibitor,  $\alpha$ -GI) はアミラーゼ、マルターゼおよびスクラーゼなどの二糖類水解酵素を競合的に阻害する作用を有し、腸管内での糖質の消化および吸収を遅延させ、食後の急激な血糖上昇を抑制する。Chakrabarti<sup>122)</sup> は BB/W ラットにおいて糖尿病発症後4ヶ月にわたる  $\alpha$ -GI の投与により糖尿病由来の網膜微血管の基底膜肥厚が完全に阻止されたと報告しており、Takagi ら<sup>123)</sup> は STZ 誘発糖尿病ラットにおいて網膜の微小循環異常が  $\alpha$ -GI の2週間の投与により予防可能であったとし、また尿中のアルブミン排泄が本薬剤の8週間の投与により改善されたこと<sup>124)</sup> から、糖尿病を管理する上での高血糖是正作用とともに、とくに網膜症の悪化抑制のための新しい進展の可能性を示した<sup>125)126)</sup>。今後さらにインスリン分泌促進剤やインスリン抵抗性改善剤などの効果が検討されることが予想される。その有用性の評価法の一つは、網膜機能障害の改善効果の有無の検討であり、この目的には律動様小波が有力な指標であることは確かである。本研究のインスリン療法でみられた律動様小波の回復、すなわち網膜機能異常の回復は米国で行われた DCCT<sup>67)~69)</sup> お

よび熊本 の調査<sup>70)</sup> でのインスリンの臨床効果を基礎的に裏づける結果となっていることから、将来の網膜症治療薬は本研究のインスリン投与でみられたような網膜機能回復効果を有することが臨床効果を期待する上での大前提になると考えられる。この方法はとくに眼底変化を呈するに至っていない早期の網膜障害に対する治療効果の判定に有用と期待される。

一方、近年の分子生物学の進歩により網膜症の成因については多くの事実が明らかになってきている。ここ数年の IDDM 遺伝子解析により、少なくとも10個の IDDM 遺伝子がマッピングされ<sup>127)</sup>、なかでも IDDM 1 はヒトのみならずマウスやラットなどの動物モデルにおいても主要組織適合遺伝子複合体として IDDM の発症に関連することが示され、種を越えた IDDM 1 の関与が証明されている<sup>127)~129)</sup>。また NIDDM ではインスリン<sup>130)</sup>、インスリンレセプター<sup>131)</sup>、グルコキナーゼ<sup>132)</sup>、ミトコンドリア tRNA<sup>133)</sup>、MODY 1<sup>134)</sup> および MODY 3<sup>135)</sup> の各単独遺伝子異常により発症することが示されている。IDDM は、何らかの遺伝的背景に隣  $\beta$  細胞に対する自己免疫学的異常が加わることによって  $\beta$  細胞が傷害され発症すると考えられているが、Eisenbarth<sup>136)</sup> は IDDM が慢性自己免疫疾患であるという概念を提唱している。この自己免疫学的異常は、いったん出現すると持続し進行するという説<sup>137)</sup> と寛解や再燃を繰り返す可逆的であるという説<sup>138)139)</sup> がある。いずれにせよ、糖尿病発症前の時期に何らかの予防策が重要であることは言うまでもなく、その危険因子を有する人を早期に検出することが分子生物学的なアプローチにおいても肝要と思われる。一方、NIDDM は IDDM より遺伝性の強い疾患であると考えられており、その候補遺伝子については今後上記のもの以外にもさらに見出されつつあり、複数の遺伝子が NIDDM 発症に関わっている。したがって糖尿病は遺伝因子という先天的な要因が関与し、後天的な環境因子や生活上の要因とともに網膜症が発症すると考えられ、それを事前に察知し予防することが糖尿病の発症、ひいては網膜症の発症を阻止することは明らかである。

これまで多くの研究者が網膜症の早期検出方法の創案に努力してきた。そのなかで前述のように律動様小波の検査の有用性は広く認知されている。これに加えて瀬川<sup>140)</sup> は、眼球電位図 (electro-oculogram, EOG) の薬物応答の一つである重炭酸応答が糖尿病患者において高頻度に減弱することを見出し、糖尿病性網膜色素上皮症の早期発見には従来の EOG L/D 法に比べて重炭酸応答がはるかに有効であることを示した。また松村<sup>65)</sup> は自らの創案による装置で測定した動物検査コントラスト閾値は糖尿病患者で前網膜症期から高頻度に上昇することを見出した。しかしながらこの自覚的指標はヒトにおいては有用な指標であるが、動物モデルで使用することは不可能であり、さらに臨床効果を期待する薬剤の薬効評価には基礎と臨床とで共通した指標を用いることが望ましい点においても、律動様小波は有用な指標である。また臨床研究においては、糖尿病では年齢、発病年齢、罹病期間、コントロール状態などの種々の要因が絡みかつコントロール状態などは経時的に変動し易いので、諸条件を一定に保つことは至難である。この点が糖尿病における薬剤の治療度の早期判定を困難にする。これに対し動物モデルは諸条件を一定に保ち、比較的安定した病態モデルを作成する上で有利である。

本研究において、糖尿病モデルラットにおける ERG の最も早期の変化は律動様小波の頂点潜時の延長であり、その一因は網

膜血流量の低下にあることが示され、インスリンによる高血糖是正によって律動様小波の変化は回復することが判明した。さらに律動様小波の頂点潜時延長をウサギ眼杯 ERG において低酸素によって模倣することができた。これらの知見は糖尿病における網膜の早期病態の解明に有用であり、かつ網膜症治療薬の開発にも活用しうると期待される。

### 結 論

STZ 誘発糖尿病ラットにおける網膜変化を明らかにすることを目的として ERG の a 波, b 波および律動様小波, 硝子体フルオロフォトメトリーによる血液・眼関門の機能, 眼底所見および網膜の組織学的所見を検討した。また, 本モデルラットにおける網膜変化が STZ の毒性に起因するのかわたは糖尿病状態に起因するのかわたを明らかにすることを目的として, インスリン投与による網膜変化の可逆性を検討した。さらに本モデルラットにおける網膜変化の原因を究明するために, 走査レーザー検眼鏡を用いて網膜血流量を測定し, またウサギ摘出眼杯 ERG におよぼす酸素分圧の影響を検討し, 以下の成績を得た。

1. STZ 誘発糖尿病ラットでは STZ 非投与群に比べ a 波および b 波の振幅ならびに頂点潜時は有意には変化しなかったが, 律動様小波の振幅は有意に低下し, その頂点潜時および頂点間隔は有意に延長した。また硝子体フルオロフォトメトリーによる血液・眼関門の機能は STZ 投与 6 週後に STZ 非投与群に比べ有意に低下した。この時点における眼底および網膜組織学的所見に異常はみられなかった。

2. STZ による律動様小波の頂点潜時の延長および振幅の低下はインスリンによって投与量依存的に回復し, 3 週間のインスリン 5.0 単位/kg/日の投与群ではインスリン非投与群とほぼ同程度まで回復した。しかし STZ 投与 6 週後 (インスリン投与 3 週目) にみられた血液・眼関門の機能異常はいずれのインスリン投与量群においても回復しなかった。

3. 本モデルラットにおいて ERG 記録とともに網膜血流量を測定した結果, STZ 非投与群に比し律動様小波の頂点潜時および頂点間隔は有意に延長し, その振幅は有意に低下した。これらの変化に呼応して網膜血流量は有意に低下した。またこれらの ERG および血流量変化は 1 週間のインスリン 5.0 単位/kg/日の投与により回復した。

4. 摘出眼杯 ERG において酸素分圧の低下による ERG への影響をウサギを用いて検討した結果, 浸漬液に通気する酸素濃度を 100.0% から 99.5% へと低下させることにより a 波, b 波および律動様小波の振幅ならびに a 波および b 波の頂点潜時は有意には変化しなかったが, 律動様小波の頂点潜時および頂点間隔は有意に延長した。通気する酸素濃度を 100.0% から 95.0% へと低下させることにより b 波および律動様小波の振幅は有意に低下し, これらの諸波の頂点潜時は有意に延長した。これらの変化は対照灌流条件である 100.0% 酸素に戻すと 30 分後には回復した。

以上より, STZ 誘発糖尿病モデルラットにおける網膜機能変化は, 糖尿病患者での報告と同様に, 律動様小波の異常として観察されることが判明した。これらの変化は, 糖尿病早期にみられる特徴的な網膜機能障害であり, 眼底変化や血液・眼関門の破綻に先行する網膜血流量の低下ないしは低酸素状態に起因すると推論される。律動様小波所見が糖尿病において眼底に異常を呈しない早期の網膜機能異常の検出に有効であるばかりでは

なく, 糖尿病網膜における早期の病態解明に有用であり, かつ網膜症治療薬の開発の薬効評価に活用されよう。

### 謝 辞

稿を終える臨み, 御指導・御校閲を賜りました恩師河崎一夫教授に深甚の謝意を捧げます。また貴重な御指導・御助言を賜りました白尾裕助教授に深く感謝致します。また貴重な御助言を賜りました参天製薬奈良眼科研究所 白澤栄一博士に深く感謝致します。実験器具・装置の製作について御協力下さいました元本学工作係水野清澄技官に感謝致します。

### 文 献

- 1) Report of the National Commission on Diabetes to the Congress of the United States: The long-term plan to combat diabetes. Department of Health, Education and Welfare. DHEW Publication No. NIH-76-1018, Vol. 1, Bethesda, 1976
- 2) Aiello LM. Diagnosis, management and treatment of nonproliferative diabetic retinopathy and macular edema. *In* DM Albert, FA Jakobiec (eds), Principles and Practice of Ophthalmology, Vol.2, p747-760, Saunders WB, Philadelphia, 1994
- 3) Niffengger JH, Fong D, Cavallerano J, Aiello LM. Diabetic mellitus. *In* DM Albert, FA Jakobiec (eds), Principles and Practice of Ophthalmology I, Vol.5, p2925-2936. Saunders WB, Philadelphia, 1994
- 4) 厚生省保健医療局疾病対策課. 糖尿病調査研究, 7頁 日本糖尿病財団, 東京, 1994
- 5) Williamson JR, Chang K, Frangos M, Hansan KS, Ido Y, Kawamura T, Nyengaard JR, Enden MVD, Kilo C, Tilton RG. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes* 42: 801-813, 1993
- 6) Williamson DH, Lund P, Krebs HA. The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. *Biochem J* 103: 514-527, 1967
- 7) Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end-products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med* 318: 1315-1321, 1988
- 8) Doly M, Droy-Lefaix MT, Braquet P. Oxidative stress in diabetic retina. *In* I Emerit, B Chance (eds), Free Radicals and Aging, p299-307, Birkhauser Verlag, Basel, 1992
- 9) Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258: 607-614, 1992
- 10) Robinson WG Jr, Raver NM, Jacot JL, Glover JP, Basso MD, Blouin P, Hohman C. Diabetic-like retinopathy ameliorated with the aldose reductase inhibitor WAY-121,509. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 1149-1156, 1996
- 11) Yonemura D, Aoki T, Tsuzuki K. Electroretinogram in diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 68: 19-24, 1962
- 12) Speros P, Price J. Oscillatory potentials. History, techniques, and potential use in the evaluation of disturbances of retinal circulation. *Surv Ophthalmol* 25: 237-252, 1981
- 13) Brunette JR, Lafond G. Electroretinographic evaluation of diabetic retinopathy: sensitivity of amplitude and time of response. *Can J Ophthalmol* 18: 285-289, 1983

- 14) Fort-Larsen K, Larsen HW, Simonsen SE. Value of electroretinography and dark adaptation as prognostic tools in diabetic retinopathy. *Dev Ophthalmol* 2: 222-234, 1981
- 15) Axler DA. Stability of the diabetogenic activity of streptozotocin. *IRCS Med Sci* 10: 157-158, 1982
- 16) 米村大蔵, 河崎一夫. 律動様小波とその臨床. *眼科 Mook No.14. 眼と電気生理* (三島清一, 塚原 勇, 植村恭夫, 田沢 豊編), 第1版, 59-70頁, 金原出版, 東京, 1986
- 17) 豊田隆謙, 鈴木 進. インスリン療法—NIDDMのインスリン療法—診断と治療 (岡 芳知, 久保 明編), 1649-1654頁, 診断と治療社, 東京, 1996
- 18) 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. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 898-905, 1996
- 19) 酒井宏之, 小松雅樹, 鳥崎真人, 望月清文, 岡山欣彦. ニューキノロン抗菌剤ノルフロキサシンの家兎網膜に及ぼす影響—in vitro ERGによる検討—. *あたらしい眼科* 8: 929-932, 1991
- 20) 酒井宏之, 望月清文, 鳥崎真人, 山下陽子, 小松雅樹, 棚橋俊郎. オフロキサシンのウサギ網膜におよぼす影響. *眼紀* 43: 1226-1231, 1992
- 21) 長山理三郎. 摘出家兎網膜ERGの実験的研究, 第1報 摘出家兎網膜からのERGの誘導. *日眼会誌* 73: 1900-1908, 1969
- 22) 川口博治, 米村大蔵, 河崎一夫, 柴田二郎, 白倉弘子, 田辺穰二. 家兎in-vitro ERGにおよぼす浸漬液pHの影響. *日眼会誌* 83: 454-462, 1979
- 23) Feskens EJM, Stengard J, Virtanen SM, Pekkanen J, Rasanen L, Nissinen A, Tuomilehto J, Kromhout D. Dietary factors determining diabetes and impaired glucose tolerance. *Diabetes* 18: 1104-1112, 1995
- 24) Marshall JA, Shetterly S, Hoag S, Hamman RF. Dietary fat predicts conversion from impaired glucose tolerance to NIDDM. The San Luis Valley Diabetes Study. *Diabetes Care* 17: 50-56, 1994
- 25) Thernlund GM, Ludvigsson J, Dahlquist G, Sjoblad S, Hansson K, Hagglof S, Ivarsson. Psychological stress and the onset of IDDM in children. *Diabetes Care* 18: 1323, 1995
- 26) Carter WR, Herrman J, Stokes, Cox DJ. Promotion of diabetes onset by stress in the BB rat. *Diabetologia* 30: 674-678, 1987
- 27) Kahn HA, Hiller R. Blindness caused by diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 78: 58-67, 1974
- 28) Ghafour IM, Allan D, Foulds WS. Common causes of blindness and visual handicap in the west of Scotland. *Br J Ophthalmol* 67: 209-213, 1983
- 29) Ten Doesschate J. Causes of blindness in the Netherlands. *Doc Ophthalmol* 52: 279-285, 1982
- 30) Sorby A. The incidence and causes of blindness in England and Wales 1983-1988. In *Reports on Public Health and Medical Subjects, Vol.28, p33-51, Her Majesty's Stationery Office, London, 1992*
- 31) Sjolje AK. Ocular complications in insulin-treated diabetes mellitus. *Ophthalmologica* 63: 1-7, 1985
- 32) 中島 章, 長屋幸郎, 本田礼士, 増田寛次郎. 眼の健康管理. *日医会誌* 104: 953-968, 1990
- 33) 赤澤好温. 糖尿病の疫学に関する研究. *糖尿病調査研究報告書*. 5-6頁, 厚生省, 東京, 1994
- 34) Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* 13: 18-32, 1992
- 35) King GL, Kunisaki M, Nishio Y, Inoguchi T, Shiba T, Xia P. Biochemical and molecular mechanisms in the development of diabetic vascular complications. *Diabetes* 45: S105-108, 1996
- 36) 中川寛忠, 奥村 忠, 田辺穰二. 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
- 37) Watanabe I, Toyama K. The effects of anesthetics on the ERG and EOG. *Doc Ophthalmol Proc Ser* 15: 21-30, 1978
- 38) 米村大蔵, 河崎一夫, 蓮井 勲. シロネズミの網膜電位図. I. 正常シロネズミのERG波形及び早期電位とa波の間に現れる新電位について. *日眼会誌* 71: 287-291, 1967
- 39) 小林嘉代, 倉林 謙. 小実験動物の麻酔—マウス・ラット・モルモット・ウサギー—. *アニテックス* 3: 556-565, 1991
- 40) Sasovetz D. Ketamine hydrochloride: an effective general anesthetic for use in electroretinography. *Ann Ophthalmol* 10: 1510-1514, 1978
- 41) 杉本真次, 今若美穂, 倉田一之. マウスの網膜電図記録法の検討及びそのヨーソ酸ソーダによる網膜症への応用. *J Toxicol Sci* 21: 15-32, 1996
- 42) Weir GC, Clore ET, Zmachinski CJ, Bonner-weir S. Islet secretion in a new experimental model for non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes* 30: 590-595, 1981
- 43) 川井紘一, 大森 肇, 山下亀次郎. ストレプトゾトシン投与によるNIDDMモデルラット: 新生時期大量投与と成熟期少量投与での比較. *糖尿病動物* 1: 180-185, 1987
- 44) Rakieta N, Rakieta ML, Nadkarni MV. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. *Cancer Chemother Rep* 29: 91-98, 1963
- 45) Uchigata Y, Yamamoto H, Nagai H, Okamoto H. Effect of poly (ADP-ribose) synthetase inhibitor administration to rats before and after injection of alloxan and streptozotocin on islet proinsulin synthesis. *Diabetes* 32: 316-318, 1983
- 46) Yamamoto H, Okamoto H. Protection by picolinamide, a novel inhibitor of poly (ADP-ribose) synthetase, against both streptozotocin-induced depression of proinsulin synthesis and reduction of NAD content in pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* 95: 474-481, 1980
- 47) Maldonato A, Trueheart PA, Renold AE, Sharp GW. Effects of streptozotocin in vitro on proinsulin biosynthesis, insulin release and ATP content of isolated rat islets of Langerhans. *Diabetologia* 12: 471-481, 1976
- 48) Gunnarsson R. Inhibition of insulin biosynthesis by alloxan, streptozotocin and N-nitrosomethylurea. *Mol Pharmacol* 11: 759-765, 1975
- 49) Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: Relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest* 48: 2129-2139, 1969
- 50) Ho RS, Aranda CG, Tillery SJ, Botelho LH, Olivieri M, Meserve C, Mcintosh R, Kerestan S, Foley JE. In-vivo and in-



- vitro glucose metabolism in a low-dose streptozotocin rat model of noninsulin-dependent diabetes. In E Shafir, SE Renold (eds), *Frontiers in Diabetes Research - Lessons from Animal Diabetes*, p288-294, John Libbey, London, Paris, 1988
- 51) Braun RD, Fisher TC, Meiselman HJ, Hatchell DL. Decreased deformability of polymorphonuclear leukocytes in diabetic cats. *Microcirculation* 3: 271-278, 1996
- 52) Sonkin PL, Freedman SF, Needham D, Rao KM, Hatchell DL. Pentoxifylline modulates deformability, F-actin content and superoxide anion production of polymorphonuclear leukocytes from diabetic cats. *Exp Eye Res* 55: 831-838, 1992
- 53) Jones CW, Cunha-Vaz JG, Rusin MM. Vitreous fluorophotometry in alloxan- and streptozotocin-treated rat. *Arch Ophthalmol* 100: 1141-1145, 1982
- 54) MacGregor LC, Rosecan LR, Laties AM, Matschinsky FM. Altered retinal metabolism in diabetes. I. Microanalysis of lipid, glucose, sorbitol, and myo-inositol in the choroid and in the individual layers of the rabbit retina. *J Biol Chem* 261: 4046-4051, 1986
- 55) Kern TS, Engerman RL. Galactose-induced retinal microangiopathy in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 490-496, 1995
- 56) Robison WG Jr, Laver NM, Jacot JL, Chandler ML, York BM, Glover JP. Efficacy of treatment after measurable diabeticlike retinopathy in galactose-fed rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 1066-1073, 1997
- 57) 白尾 裕. ERG構成成分の細胞起源と解釈. *眼科* 34: 625-635, 1992
- 58) Kernell A, Dahlkvist H, Arnqvist H, Ludvigsson J. Influence of metabolic control on the blood-retinal barrier in streptozotocin diabetic rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 222: 179-181, 1985
- 59) Kernell A, Ludvigsson J. Blood-retinal barriers in juvenile diabetes in relation to early clinical manifestations, HLA-DR types and metabolic control. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 222: 250-253, 1985
- 60) Prager TC, Chu HH, Garcia CA, Anderson RE, Field JB, Orzeck EA, Comstock JP. The use of vitreous fluorophotometry to distinguish between diabetics with and without observable retinopathy: Effect of vitreous abnormalities on the measurement. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 57-65, 1983
- 61) Delori FC, Bursell SE, Yoshida A, McMeel JW. Vitreous fluorophotometry in diabetics: Study of artifactual contributions. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 222: 215-218, 1985
- 62) Klein R, Ernest JT, Engerman RT. Fluorophotometry. I. Technique. *Arch Ophthalmol* 98: 2231-2232, 1980
- 63) Smith SS, Ashburn FS, Pilkerton AR, Recant L. Vitreous fluorophotometry in three models of experimental diabetes mellitus. *Retina* 2: 121-125, 1982
- 64) Klein R, Ingolf I, Wallow IHH, Ernest JT. Fluorophotometry. III. Streptozotocin-treated rats and rats with pancreatectomy. *Arch Ophthalmol* 98: 2235-2237, 1980
- 65) 松村孝司. 糖尿病網膜症早期における自覚的視機能異常の検出. *十全医会誌* 105: 1-18, 1996
- 66) Roysarkar TK. Effect of insulin therapy on progression of retinopathy in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Ophthalmol* 115: 569-574, 1993
- 67) The diabetes control and complications trial research group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329: 977-986, 1993
- 68) The diabetes control and complications trial research group. The relationship of glycemic exposure (HbA<sub>1c</sub>) to the risk of development and progression of retinopathy in the diabetes control and complications trial. *Diabetes* 44: 968-983, 1995
- 69) The diabetes control and complications trial research group. The effect of intensive diabetes treatment on progression of diabetic retinopathy in insulin-dependent diabetes mellitus. The diabetes control and complications trial. *Arch Ophthalmol* 113: 36-51, 1995
- 70) 七里元亮, 岸川秀樹. NIDDMにおける厳格な血糖コントロールの意義-熊本スタディー-. 分子糖尿病学の進歩 (矢崎義雄監修), 158-164頁, 金原出版, 東京, 1996
- 71) Daneman D, Drash AL, Lobes LA, Becker DJ, Baker LM, Travis LB. Progressive retinopathy with improved control in diabetic dwarfism (Mauriac's syndrome). *Diabetes care* 4: 360-365, 1981
- 72) Frier BM. Management of insulin-dependent diabetes: Hypoglycemia and the eye. *Eye* 7: 293-297, 1993
- 73) 清水えりか, 船津英陽, 北野滋彦, 堀 貞夫. 急速な血糖是正と糖尿病網膜症期の推移. *眼紀* 47: 1095-1099, 1996
- 74) 七里元亮. 血糖調整と糖尿病網膜症. *眼紀* 47: 1-6, 1996
- 75) 佐藤秀蔵. ラット及びビヌにおける視覚毒性試験法並びにその応用に関する研究. *武田研究所報* 45: 1-42, 1986
- 76) Teuscher A, Baillod P, Rosman JB, Teuscher A. Absence of diabetes in a rural west African population with a high carbohydrate / cassava diet. *Lancet* 8536: 765-768, 1987
- 77) White NH, Waltman SR, Krupin T, Santiago JV. Reversal of abnormalities in ocular fluorophotometry in insulin-dependent diabetes after five to nine months of improved metabolic control. *Diabetes* 31: 80-85, 1982
- 78) Waltman S, Krupin T, Hanish S, Oestrich C, Becker B. Alteration of the blood retinal barrier in experimental diabetes mellitus. *Arch Ophthalmol* 96: 878-879, 1978
- 79) Agardh E, Agardh CD, Hansson-Lundblad C. The five-year incidence of blindness after introducing a screening programme for early detection of treatable diabetic retinopathy. *Diabetic Med* 10: 555-559, 1992
- 80) 宮地栄一, 村上元彦. 網膜の神経伝達物質とその役割. *医学のあゆみ* 146: 616-618, 1988
- 81) 川口博治, 米村大蔵, 河崎一夫, 柳田 隆. 神経化学伝達物質による律動様小波の減弱と拮抗物質による回復. *日眼会誌* 84: 45-51, 1979
- 82) Wachtmeister L, Dowling JD. The oscillatory potentials of the mudpuppy retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17: 1176-1188, 1978
- 83) 米村大蔵, 河崎一夫. 臨床網膜電図学. 114-119頁, 医学書院, 東京, 1985

- 84) 河崎一夫, 米村大蔵. “神経伝達物質”と網膜電気現象. 眼科Mook No14. 眼と電気生理(三島清一, 塚原 勇, 植村恭夫, 田沢 豊編), 第1版, 22-34頁, 金原出版, 東京, 1986
- 85) Berger SJ, McDaniel ML, Carter JG, Lowry OH. Distribution of four potential transmitter-amino acids in monkey retina. *J Neurochem* 28: 159-163, 1987
- 86) Ishikawa A, Ishiguro S, Tamai M. Changes in GABA metabolism in streptozotocin-induced diabetic rat retinas. *Curr Eye Res* 15: 63-71, 1995
- 87) 梶浦祐子, 井上正則, 山本 節, 岡田安弘. ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラット網膜における gamma-aminobutyric acid の変化. *日眼会誌* 98: 449-452, 1994
- 88) Mizuno A, Kamada Y, Matsuda M. Retinal gamma-aminobutyric acid metabolism in alloxan-induced diabetic rat. *Jikeikai Med J* 25: 117-122, 1978
- 89) 酒井宏之, 望月清文, 鳥崎真人. ロメフロキサシンのウサギ網膜に及ぼす影響. *日眼会誌* 97: 812-819, 1993
- 90) Dowling JE, Ehinger B. Synaptic organization of the amine-containing interplexiform cells of the goldfish and cebus monkey retinas. *Science* 188: 270-273, 1975
- 91) Northington FK, Hamill RW, Banerjee SP. Dopamine-stimulated adenylate cyclase and tyrosine hydroxylase in diabetic rat retina. *Brain Res* 337: 151-154, 1985
- 92) Jaffe MJ, Bruno G, Campbell G. Ganzfeld electroretinographic findings in Parkinsonism: Untreated patients and effect of levodopa intravenous infusion. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 50: 847-852, 1987
- 93) Wong KL, Tyce GM. Glucose and amino-acid metabolism in rat brain during sustained hypoglycemia. *Neurochem Res* 8: 401-416, 1983
- 94) Rossetti L, Giaccari A, Defronzo RA. Glucose toxicity. *Diabetes Care* 13: 610-630, 1990
- 95) 樋口裕彦, 福田敏雅, 鶴飼一彦, 宮田幹夫. コントラスト感度測定装置による糖尿病性網膜症視機能評価と塩酸ニカルジピンの有用性. *日眼会誌* 99: 914-919, 1996
- 96) Bursell SE, Clermont AC, Shibata T, King GL. Evaluating retinal circulation using video fluorescein angiopathy in control and diabetic rats. *Curr Eye Res* 11: 287-295, 1992
- 97) 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
- 98) Riva CE, Sinclair SH, Grunwald JE. Autoregulation of retinal circulation in response to decrease of perfusion pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 21: 34-38, 1981
- 99) Grunwald JE, Sinclair SH, Riva CE. Autoregulation of retinal circulation in response to decrease of perfusion pressure below normal. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 23: 124-127, 1982
- 100) Bursell SE, Clermont AC, Kinsley BT, Simonson DC, Aiello, Wolpert HA. Retinal blood flow changes in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and no diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 886-897, 1996
- 101) Kohner EM, Patel V, Rassam SMB. Role of blood flow and impaired autoregulation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes* 44: 603-607, 1995
- 102) Patel V, Rassam SMB, Chen HC, Kohner EM. Oxygen reactivity in diabetes mellitus: Effect of hypertension and hyperglycemia. *Clin Sci* 86: 689-695, 1995
- 103) Tooke JE. Microvascular function in human diabetes: A physiological perspective. *Diabetes* 44: 721-726, 1995
- 104) Joyce NC. Contractile proteins in pericytes. II. Immunocytochemical evidence for the presence of two isomyosins in graded concentrations. *J Cell Biol* 100: 1387-1395, 1985
- 105) Lee TS, Hu KQ, Chao T, King GL. Characterization of endothelin receptors and effects of endothelin on diacylglycerol and protein kinase C in retinal capillary pericyte. *Diabetes* 38: 1643-1646, 1989
- 106) Lee TS, Saltsman KA, Ohashi H, King GL. Activation of protein kinase C by elevation of glucose concentration: Proposal for a mechanism in the development of diabetic vascular complications. *Proc Natl Acad Sci* 86: 5141-5145, 1989
- 107) Ishii H, Koya D, King DL. Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *J Mol Med* 76: 21-31, 1998
- 108) Rapoport RM, Campbell AK, Bazan E. Effects of PKC downregulation on norepinephrine and prostaglandin F2 alpha-induced contraction in rat aorta. *Am J Physiol* 269: 590-598, 1995
- 109) Tang EK, Houslay MD. Glucagon, vasopressin and angiotensin all elicit a rapid, transient increase in hepatocyte protein kinase C activity. *Biochem J* 283: 341-246, 1992
- 110) Murthy KS, Makhlof GM. Agonist-mediated activation of phosphatidylcholin-specific phospholipase C and D in intestinal smooth muscle. *Mol Pharmacol* 48: 293-304, 1995
- 111) Winder JJ, Walsh MP. Smooth muscle calponin. *J Biol Chem* 265: 10148-10155, 1990
- 112) Joyce NC. Contractile proteins in pericytes. I. Immunoperoxidase location of tropomyosin. *J Cell Biol* 100: 1379-1386, 1985
- 113) de la Rubia G, Oliver FJ, Inoguchi T, King GL. Induction of resistance to endothelin-1's biochemical actions by elevated glucose levels in retinal pericytes. *Diabetes* 41: 1533-1539, 1992
- 114) Shiba T, Inoguchi T, Sportsman JR, Heath WF, Bursell S, King G. Correlation of diacylglycerol level and protein kinase C activity in rat retina to retinal circulation. *Am J Physiol* 265: E783-E793, 1993
- 115) 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
- 116) Ishii H, Jirousek MR, Koya D, Takagi C, Xia P, Clermont A, Bursell SE, Kern TS, Ballas LM, Heath WF, Stramm LE, Feener EP, King GL. Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor. *Science* 272: 728-31, 1996
- 117) 羽田勝計, 吉川隆一. 糖尿病性血管合併症の成因. *実験医学* 13: 266-270, 1995
- 118) 老初宗忠, 坂井 誠, 岩谷逸平, 松岡 彰. AGEと糖尿病性眼合併症. *眼科* 36: 741-748, 1994
- 119) Willaimson JR, Chang K, Frangos M, Hasan KS, Ido Y, Kawamura T, Nyengaard JR, Vanden-Enden M, Kilo C, Tilton

- RG. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes* 42: 801-813, 1993
- 120) Robinson WG, Laver NM, Jacot JL, Glover JP, Basso MD, Blovin P, Hohman TC. Diabetic-like retinopathy ameliorated with the aldose reductase inhibitor WAY-121,509. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 1149-1156, 1996
- 121) Takagi C, King GL, Clermont AC, Cummins DR, Takagi H, Bursell SE. Reversal of abnormal retinal hemodynamics in diabetic rats by acarbose, an alpha-glucosidase inhibitor. *Curr Eye Res* 14: 741-749, 1995
- 122) Chakrabarti S. The effect of acarbose on diabetes- and age-related basement membrane thickening in retinal capillaries of the BB/W-rat. *Diabetes Res Clin Pract* 20: 1993
- 123) 後藤由夫. グリコシダーゼ阻害剤. *Diabetes Frontier* 3: 557-564, 1992
- 124) Cohen MP, Vasselli JR, Neuman RG, Witt J. Treatment with acarbose, an alpha-glucosidase inhibitor, reduces increased albumin excretion in streptozotocin-induced diabetic rats. *Gen Pharmacol* 26: 1355-1361, 1995
- 125) Bischoff H. Pharmacology of alpha-glucosidase inhibition. *Eur J Clin Invest* 24: 3-10, 1994
- 126) Bischoff H. The mechanism of alpha-glucosidase inhibition in the management of diabetes. *Clin Invest Med* 18: 303-311, 1995
- 127) 池上博司, 川口義彦, 荻原俊男. I型糖尿病の遺伝解析: 疾患感受性遺伝子と抵抗性遺伝子 (小坂樹徳, 赤沼安夫編), 1-20頁, 診断と治療社, 東京, 1993
- 128) Ikegami H, Eisenbarth GS, Hattori M. Major histocompatibility complex-linked diabetogenic gene of the nonobese diabetic mouse: Analysis of genomic DNA amplified by the polymerase chain reaction. *J Clin Invest* 85: 18-24, 1990
- 129) Ikegami H, Makino S, Yamato E, Kawaguchi Y, Uedda H, Sakamoto T. Identification of a new susceptibility locus to insulin-dependent diabetes mellitus by ancestral haplotype congenic mapping. *J Clin Invest* 96: 1936-1942, 1995
- 130) Steiner DF, Tager HT, Chan SJ, Nanjyo K, Sanke T, Rubenstein AH. Lessons learned from molecular biology of insulin gene mutations. *Diabetes Care* 13: 600-609, 1990
- 131) Kadowaki T, Bevins CL, Cama A, Ojamaa K, Marcus-Samuels B, Kadowaki H, Beitz L, Mckeon C, Taylor SI. Two mutant alleles of the insulin receptor gene in a patient with extreme insulin resistance. *Science* 240: 787-789, 1988
- 132) Froguel P, Zouali H, Vionnet N, Velho G, Vaxillaire M, Sun F, Lesage S, Stoffel M, Takeda J, Passa P, Permutt A, Beckmann JS, Bell GI, Cohen D. Familial hyperglycemia due to mutation in glucokinase: Definition of subtype of diabetes mellitus. *N Engl J Med* 328: 697-702, 1993
- 133) van den Oveland JMW, Lemkes HHPJ, Ruitenbeek W, Sandkuijl LA, de Vijlder MF, Struyvenberg PAA, van de Kamp JJP, Maassen JA. Mutation in mitochondrial tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness. *Nature Genet* 1: 368-371, 1992
- 134) Bell GI, Xiang K, Newman MV, Wu S, Wright LG, Fajans S, Spielman RS, Cox NJ. Gene for non-insulin-dependent diabetes mellitus (maturity-onset diabetes of the young subtype) is linked to DNA polymorphism on human chromosome 20q. *Proc Natl Acad Sci* 88: 1484-1488, 1991
- 135) Vaxillaire M, Boccio V, Philippi A, Vigouroux C, Terwilliger J, Passa P, Beckmann JS, Velho G, Lathrop GM, Froguel P. A gene for maturity onset diabetes of the young (MODY) maps to chromosome 12q. *Nature Genet* 9: 418-423, 1995
- 136) Eisenbarth GS. Type 1 diabetes mellitus: A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med* 314: 1360-1368, 1986
- 137) Ziegler AG, Herskowitz RD, Jackson RA, Soelder JS, Eisenbarth GS. Predicting type 1 diabetes. *Diabetes Care* 13: 762-775, 1990
- 138) Palmer JP, McCulloch DK. Prediction and prevention of IDDM-1991. *Diabetes* 40: 943-947, 1991.
- 139) Leslie RDG. Escaping insulin dependent diabetes. Characteristic immunological changes don't invariably lead to disease. *Br Med J* 302: 1103-1104, 1991.
- 140) 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

**Electroretinographic Changes and Their Pathogenesis in Diabetic Rats** Hiroyuki Sakai, Department of Ophthalmology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Jusen Med Soc., **108**, 303 — 329 (1999)

**Key words** diabetes, oscillatory potential, electroretinogram, insulin, blood retinal barrier

#### **Abstract**

Diabetic retinal disorders were studied in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats by electroretinogram (ERG), oscillatory potential (OP) fluorescein fundus angiogram, vitreous fluorophotometry (VFP), retinal blood flow measured as using scanning laser ophthalmoscopy and histological examination. In addition, the effects of oxygen pressure on the OP were examined in rabbit in-vitro ERG. The peak latency and the amplitude of the OP in the diabetic rats were respectively delayed and diminished significantly, and were restored after 3-week dose-dependent treatment with insulin. The blood-ocular barrier revealed by the VFP was disrupted 6 weeks after STZ injection, and remained abnormal after 3-week insulin treatment even though the OP changes were restored. Retinal blood flow was significantly lower in the diabetic rats compared with the normal control rats, and was normalized by insulin treatment at 5.0 U/kg/day. The ocular fundus, fundus angiogram and retinal histology remained normal in the diabetic rats throughout the follow-up period. The peak latency of the OP was selectively delayed by lowering the oxygen pressure of the perfusion solution in the rabbit in-vitro ERG. The selective changes of the OP are characteristic to early diabetic retinal dysfunction, precede the funduscopy and angiographic changes of the retina, and most likely result from blood flow reduction and/or the consequent hypoxia in the retina. Observation of the OP may prove useful in early detection of diabetic retinal dysfunction at the preretinopathic stage, understanding of the early pathophysiology of the diabetic retina and estimation of therapeutic effects on diabetic retinopathy.