

**糖尿病動物を用いた網膜の機能変化と
網膜症発症のメカニズムの解明**

09671781

平成9年度～平成10年度科学研究費補助金基盤研究(C)(2)研究成果報告書

平成12年3月

研究代表者 **吉田晃敏**

旭川医科大学医学部教授

はしがき

平成9年度より、文部省から、文部省科学研究費補助金（基盤研究（C））の助成のもとに行なわれた「糖尿病動物を用いた網膜の機能変化と網膜症発症のメカニズムの解明」は2年間の研究期間を終了し、ここに研究成果報告書をまとめることになった。今回の研究でいくつかの新しい知見を得ることができた。

2年間の成果をまとめるにあたり、いろいろとご指導を頂いた関係者の皆様に心からお礼を申しあげる。また、報告書についてご意見を頂ければ幸いである。

研究組織

研究代表者：吉田 晃敏（旭川医科大学医学部・教授）
研究分担者：広川 博之（旭川医科大学医学部・教授）
研究分担者：秋葉 純（旭川医科大学医学部・助教授）
研究分担者：小笠原博宣（旭川医科大学医学部・講師）
研究分担者：石子 智士（旭川医科大学医学部・助手）
研究分担者：森 文彦（旭川医科大学医学部・医員）

研究支援者

長岡 泰司（旭川医科大学生体情報調節系大学院生）
竹田 真純（旭川医科大学生体情報調節系大学院生）
高宮 央（旭川医科大学生体情報調節系大学院生）
佐藤 栄一（旭川医科大学生体情報調節系大学院生）
籠川 浩幸（旭川医科大学生体情報調節系大学院生）

研究経費

平成9年度	2,400千円
平成10年度	800千円
計	3,200千円

研究発表

1 学会発表

- 1) H. Kagokawa, T. Sakamoto, K. Takakusaki, H. Ogasawara, A. Yoshida
The effect of pure oxygen on retinal blood flow in the cat using a new laser doppler velocimetry system.
ARVO Annual Meeting, May 1997, Florida, USA
- 2) T. Nagaoka, H. Kagokawa, F. Mori, H. Ogasawara, A. Takamiya, K. Takakusaki, Y. Sakamoto, A. Yoshida
Autoregulation of retinal blood flow in cats using a new laser doppler velocimetry system.
International Congress of Eye Research, July, 1998, Paris, France
- 3) 長岡泰司、籠川浩幸、吉田晃敏、坂本尚志
レーザードップラー眼血流計を用いたネコ網膜血流の測定（高酸素および低酸素負荷による血流量変化の解析）.
第78回 北海道医学大会生理系分科会 1998年9月（旭川）
- 4) F. Mori, M. Takeda, A. Takamiya, E. Sato, H. Kiyama, and A. Yoshida
Abnormality of vascular permeability and nitric oxide synthase in the diabetic retina.
ARVO Annual Meeting May 1999, Florida, USA
- 5) 長岡泰司、坂本尚志、高草木薫、斎藤和也、幅口竜也、杉本純子、吉田晃敏
レーザードップラー眼血流計を用いたネコ網膜血流の測定.
第76回 日本生理学会 1999年3月（長崎）
- 6) 長岡泰司、吉田晃敏、坂本尚志、高草木薫、斎藤和也、杉本純子
低酸素負荷による網膜血流の変化とL-NAME硝子体注による影響.
第79回 北海道医学大会生理系分科会 1999年9月（札幌）
- 7) E. Sato, T. Nagaoka, F. Mori, H. Kagokawa, and A. Yoshida
Effect of nipradilol on retinal blood flow in cats using a stabilized laser doppler velocimetry system.
ARVO Annual Meeting May 2000, Florida, USA
- 8) T. Nagaoka, A. Yoshida, F. Mori, H. Kagokawa, E. Sato, and T. Sakamoto
Effect of intravitreal injection of N^G-nitro-L-arginine methylester on retinal blood flow during hypoxia.
ARVO Annual Meeting May 2000, Florida, USA

2 学会誌

- 1) H. Kagokawa, T. Sakamoto, K. Takakusaki, H. Ogasawara, A. Yoshida
The effect of pure oxygen on retinal blood flow in the cat using a new laser doppler velocimetry system.
Invest Ophthalmol Vis Sci. 1999; 40: S2451.
- 2) T. Nagaoka, H. Kagokawa, F. Mori, H. Ogasawara, A. Takamiya, K. Takakusaki, Y. Sakamoto, A. Yoshida
Autoregulation of retinal blood flow in cats using a new laser doppler velocimetry system.
Exp Eye Res. 1998; 67: S198.
- 3) F. Mori, M. Takeda, A. Takamiya, E. Sato, H. Kiyama, and A. Yoshida
Abnormality of vascular permeability and nitric oxide synthase in the diabetic retina.
Invest Ophthalmol Vis Sci. 1999; 40: S2451.
- 4) E. Sato, T. Nagaoka, F. Mori, H. Kagokawa, and A. Yoshida
Effect of nipradilol on retinal blood flow in cats using a stabilized laser doppler velocimetry system.
Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000 (suppl); 40: (in press).
- 5) T. Nagaoka, A. Yoshida, F. Mori, H. Kagokawa, E. Sato, and T. Sakamoto
Effect of intravitreal injection of N^G-nitro-L-arginine methylester on retinal blood flow during hypoxia.
Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000 (suppl); 40: (in press).
- 6) T. Nagaoka, T. Sakamoto, F. Mori, and A. Yoshida
The effect of the intravitreal injection of N^G-nitro-L-arginine methylester on the changes in retinal blood flow in response to hypoxia. (発表予定)
- 7) M. Takeda, F. Mori, A. Takamiya, S. Nakagomi, E. Sato, H. Kiyama, and A. Yoshida
Constitutive nitric oxide synthase is associated with retinal vascular permeability in early diabetic rats. (発表予定)

研究成果

研究目的

我が国においても失明原因の第1位である糖尿病網膜症の初期治療、あるいは網膜症の予防に関する明確な方針は定まっていない。最近、アメリカでの国家的研究により、厳格な血糖コントロールは網膜症の発症を76%抑制することが報告されたが、そのメカニズムはいまだ解明されていない。

我々は現在まで以下に示す微小循環動態の観点から、糖尿病網膜症の病態解明に関する臨床研究を生理学的手法で行ない、以下の研究成果をあげてきた。1) 網膜血流量：色素希釈法およびレーザードップラー法を用い、糖尿病患者の網膜血流量を測定した結果、初期に血流量は低下し、その後病期とともに増加すること、血糖の変動と血流量に相関をみとめること、そして、ある種の薬剤（アスピリン等）は血流量の異常を改善させる。2) 血液網膜柵透過性：vitreous fluorophotometryを用い、糖尿病患者の血液網膜柵の透過性を調べた結果、この透過性は網膜症の発現前から増加する。

また、近年、糖尿病血管合併症をvascular cell biologyのアプローチから血管制御因子の情報伝達系の障害として解明されつつはあるが、網膜症における研究はきわめて少ない。

本研究では、微小血管障害という視点から、糖尿病実験モデルを用い、これまでの生理学的手法にvascular cell biologyのアプローチを連関させて糖尿病網膜血管の初期の機能変化とそのメカニズムの解明を目的とした。具体的には、ネコを対象としたレーザードップラー眼底血流計による網膜血流量測定システムを開発した。次に、循環動態の血管制御因子である一酸化窒素(NO)、endothelinまた血管新生因子であるvascular endothelial growth factorの網膜循環およびその調節への関与をレーザードップラー眼底血流計を用いて検討した。さらに、糖尿病ラットにおける血液網膜柵透過性および網膜内の一酸化窒素合成酵素(NOS)発現をvitreous fluorophotometryと網膜のin situ hybridization、reverse transcription-polymerase chain reaction、western blot、Immunohistochemistryを用いて検討した。

研究計画、方法、結果、結論

1. レーザードップラー眼底血流計システムによる網膜血流量測定の開発

レーザードップラー眼底血流計システムを用いたネコ網膜血流量の測定法を新たに開発した。このシステムはネコ網膜動静脈の血管径、血流速度、血流量を同時にかつ連続的に測定可能で、変動係数は5-8%と高い再現性が得られた。

2. 酸素分圧の変化による網膜血流量の変化

低酸素および高酸素負荷による網膜血流量の変化をレーザードップラー眼底血流計システムを用いて検討した。10%酸素負荷10分間による低酸素負荷により、網膜血流量は70%増加した。血管径、血流速度はともに増加したが、血管径の増加よりも血流速度の方が先に増加した。血管抵抗は増加し、ずり応力の指標であるずり速度は増加した。100%酸素10分間による高酸素負荷により、網膜血流量は40%減少した。血管径、血流速度はともに減少したが、低酸素負荷と同様に血管径の変化よりも血流速度の変化が先行していた。また、ずり速度は減少した。以上の結果より、酸素分圧の変化に応じて網膜血流は変化することが示唆された。また、細動脈および毛細血管が太い細動脈に先行して変化し、ずり速度が変化したことから、太い細動脈の変化は、ずり応力の変化に応じて引き起こされる、いわゆる血流依存性調節が関与していることが推測された。

3. 低酸素負荷に対する網膜血流量の変化への一酸化窒素の関与の検討

低酸素負荷に対する網膜血流量の変化への一酸化窒素(NO)の関与をレーザードップラー眼底血流計システムを用いて検討した。一酸化窒素合成酵素(NOS)阻害剤であるL-NAMEあるいは対照としてphosphate buffer saline (PBS)をネコの硝子体に注入した後、網膜血流量を測定した。PBS群では、血管径、血流速度、血流量はいずれも変化しなかった。L-NAME群では、血管径、血流速度、血流量は減少した。以上より、NOが定常状態における網膜血流維持に関与していることが明らかになった。次に、L-NAMEあるいはPBSを硝子体に注入後、低酸素負荷して網膜血流量を測定した。PBS群では、血管径、血流速度、血流量はいずれも増加した。L-NAME群では、PBS群で認められた増加は、明らかに抑制された。L-NAME投与により低酸素負荷による血流の増加が抑制されたことから、NOが低酸素負荷による血流増加反応に関与していることが示唆された。

4. 血管新生因子および血管作動性物質の網膜血流量への影響

ネコの硝子体に薬物を注射し、endothelin (ET)-1、vascular endothelial growth factor (VEGF) の網膜血流量への影響をレーザードップラー眼底血流計システムを用いて検討した。VEGF投与により網膜血流量は動脈で32%、静脈で28%増加した。ET-1投与により網膜血流量は動脈で34%、静脈で38%減少した。ET-1およびVEGFが網膜血流量に影響を与えたと考えられた。

5. 糖尿病ラットを用いた血液網膜柵透過性と網膜内の一酸化窒素合成酵素の発現の検討

vitreous fluorophotometryを用いて、糖尿病および正常ラットの血液網膜柵透過性を比較した。糖尿病ラットの血液網膜柵透過性は正常ラットに比べて有意に増加していた。さらに、in situ hybridizationとimmunohistochemistryにより、糖尿病および正常ラットの網膜組織におけるNOSの発現の変化を比較した。網膜内層において、糖尿病ラットでは正常ラットに比較して、NOSの発現は増加していた。さらに、reverse transcription-polymerase chain reaction及びwestern blotにより全網膜中のNOSのmRNA及びおよびタンパク量の変化を検討した。、糖尿病ラットにおいて、全網膜中のNOSのmRNA及びおよびタンパク量は正常ラットに比べて増加していた。糖尿病において血液網膜柵透過性は増加し、そのメカニズムとして網膜内のNOSの発現の増加が関与していると推察された。

総括と今後の展望

本研究により、レーザードップラー眼底血流計システムを用いたネコ網膜血流量の測定法を新たに開発することができた。このシステムを用いて、酸素分圧により網膜血流量が変化すること、酸素分圧による網膜循環の調節に一酸化窒素が関与していること、血管新生因子のvascular endothelial growth factorおよび血管作動性物質のendothelin-1の網膜循環への影響を明らかにした。

また、vitreous fluorophotometryを用いて、糖尿病ラットにおける血液網膜柵透過性の増加が示された。in situ hybridizationとimmunohistochemistryにより、糖尿病ラットの網膜内層において、一酸化窒素合成酵素 (NOS)の発現は増加していた。さらに、reverse transcription-polymerase chain reaction及びwestern blotにより全網膜中のNOSのmRNA及びおよびタンパク量は正常ラットに比べて増加していた。糖尿病において血液網膜柵透過性は増加し、そのメカニズムとして網膜内のNOSの発現の増加が関与していると推察された。

今後は、糖尿病モデルにおいてVitamin E、PKC β inhibitorなどの薬剤により血液網膜柵透過性、網膜血流量と各因子の網膜内の発現が正常化するかを検討し、その治療薬としての可能性を検討する。