

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

医科学応用研究財団研究報告 (2010.02) 27巻:341～344.

高血糖負荷は網膜動脈血管内皮機能を障害する

長岡泰司, 十川健司

高血糖負荷は網膜動脈血管内皮機能を障害する

旭川医科大学 眼科学教室 講師 長岡 泰司

旭川医科大学 眼科学教室 大学院生 十川 健司

1. はじめに

糖尿病網膜症はわが国の中途失明の主因であり，その治療法の確立は急務である．糖尿病患者では，網膜症が発症する前から網膜血流量が減少することが報告されており¹⁾，網膜血流量の減少が網膜組織のhypoxiaを引き起こし，糖尿病網膜症の発症の一因になると考えられている．近年，網膜以外の組織の糖尿病動物モデルを用いた基礎実験において，血管障害のごく早期において，血管内皮機能が障害されることが明らかになっている²⁾．また，非糖尿病モデルでも高血糖負荷すると血管内皮機能を障害すること³⁾，さらに高血糖により酸化ストレスが増加し，糖尿病の血管合併症の進行に関与していることが明らかになっており⁴⁾，糖尿病網膜症の発症・進展にも高血糖によって生じた酸化ストレスが網膜血管内皮機能障害を引き起こし，網膜血流を減少させる可能性が示唆される．しかしながら，高血糖による網膜血管内皮機能の障害を*in vivo*で詳しく評価した報告はなく，したがってその臨床的意義は大きい．

これまでわれわれは，ネコを用いた*in vivo*の実験系で，高酸素の吸入負荷後の網膜循環動態を評価することで，網膜内皮機能評価の指標になりうること⁵⁾，またブタの網膜摘出血管を用いた*in vitro*の実験系では，bradykinin (BK) は血管内皮依存性の血管拡張因子であることを明らかにしてきた⁶⁾．

本研究では，ネコに高血糖を負荷し，高血糖による網膜血管内皮機能への影響を，BKを硝子体注入すること，また高酸素の吸入負荷後の網膜循環動態を計測し評価した．また，活性酸素除去剤であるTEMPOLを投与し，活性酸素が網膜血管内皮機能にあたる影響についても検討した．

2. 実験方法

(1) 実験動物

実験には成ネコ49匹（体重2.1~4.8kg）を用いた．セボフルレンで全身麻酔し，臭化パンクロニウムにて非動化し，人工呼吸下にて実験を行った．

(2) 網膜血管内皮機能の評価

a) 薬物硝子体微量注入による網膜血管内皮機能評価

内皮依存性血管拡張因子であるBK (5.0×10^{-5} M)，または，内皮非依存性血管拡張因子であるsodium nitroprusside (SNP; 5.0×10^{-3} M)を片眼の硝子体中に50 μ l注入した．対象コントロールとしてphosphate buffer saline (PBS)を同様の手法で硝子体に注入した．

b) 高酸素吸入負荷による網膜血管内皮機能評価

人工呼吸器により100%O₂を10分間吸入させて行った．負荷開始前と負荷10分後（終了直前）に動脈血を採取し，血液ガス分析 (PaO₂, PaCO₂, pH)により，高酸素の吸入負荷の程度を評価した．

(3) 網膜循環の評価

レーザードップラー眼底血流計 (Canon Laser Blood Flowmeter, model CLBF; Canon, Inc., Tokyo, Japan)を用い，網膜動脈の血管径と血流速度を同時に測定して血流量算出し，網膜循環を評価した．

(4) 高血糖負荷

25% glucoseを大腿静脈より持続注入し，血糖値を30mMに保ち，これを5時間継続した（高血糖負荷群）．血漿浸透圧コントロール群として25% mannitolを用いた（Mannitol負荷群）．

a) 高血糖負荷による網膜循環動態への影響

高血糖負荷群とMannitol負荷群において負荷前と負荷5時間後に網膜循環動態を測定し，その変化を比較した．

b) 高血糖負荷時の網膜血管内皮機能への影響

高血糖負荷群 (n=10)，Mannitol (n=10) 負荷群のそれぞれに，負荷3時間後にBKまたはSNPを硝子体注入し，注入前と注入2時間後の網膜循環動態の変化を比較した．

また，両群に負荷5時間後に高酸素の吸入負荷をし，網膜循環動態の変化を比較した．

さらに，高血糖負荷による内皮機能の障害がglucose濃度依存性の反応かを検討するため，血糖値を10mM (n=5)，20mM (n=5)に保ち，上記と同様の方法でBKによる反応を比較した．

c) 血糖値が正常値へ回復した後の網膜循環動態への影響

高血糖負荷を5時間継続した後，glucoseの負荷を中止し，血糖が正常値に戻った後にBKによる反応を血糖非負荷群

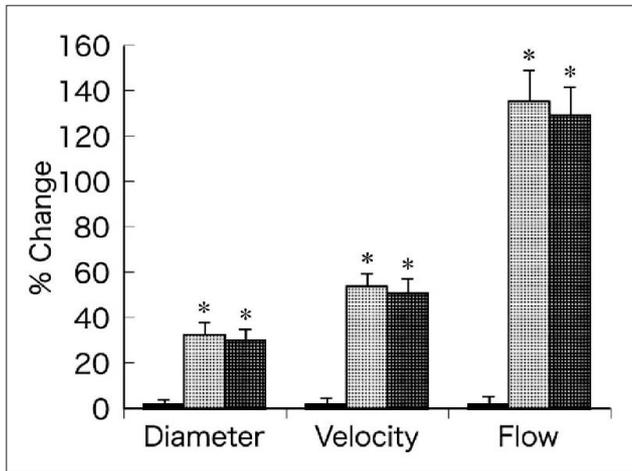


図1 BK, SNP硝子体注入による網膜循環動態の変化
 ■PBS (n=4), ▨SNP (n=5), ▩BK (n=5)
 (*p<0.05 vs PBS群)

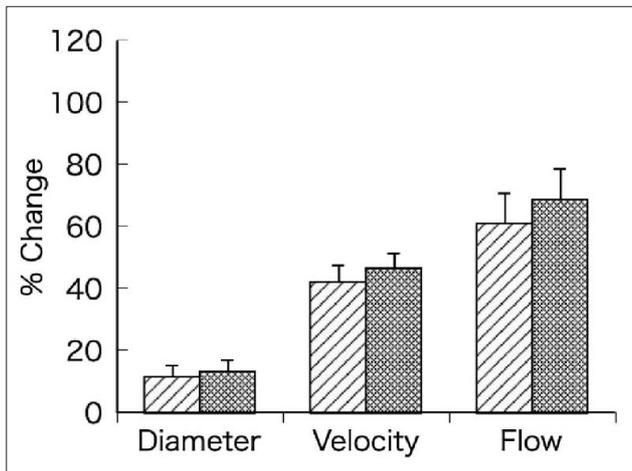


図2 Mannitol負荷, 高血糖負荷による網膜循環動態の変化
 ▨Mannitol (n=5), ▩Hyperglycemia (n=5)

と比較した (n=4).

d) 活性酸素の網膜血管内皮機能への影響

TEMPOL (2mM/L) を蒸留水に溶かして14日間経口投与し (n=4), 高血糖負荷した後のBKによる反応をTEMPOL非投与群 (n=4) と比較した.

(5) 統計学的処理

2群間の比較には, unpaired t-testを, 多群間の比較にはone way ANOVA後Tukey-Kramer testを行い, 解析した. 同一群の解析では, ANOVA for repeated measurements後, Dunnett multiple range testを行った. 危険率5%未満を統計学的有意とした.

3. 結果

(1) 薬物硝子体微量注入による網膜循環動態への影響

BK, SNP硝子体注入により網膜血管径, 血流速度, 血流量

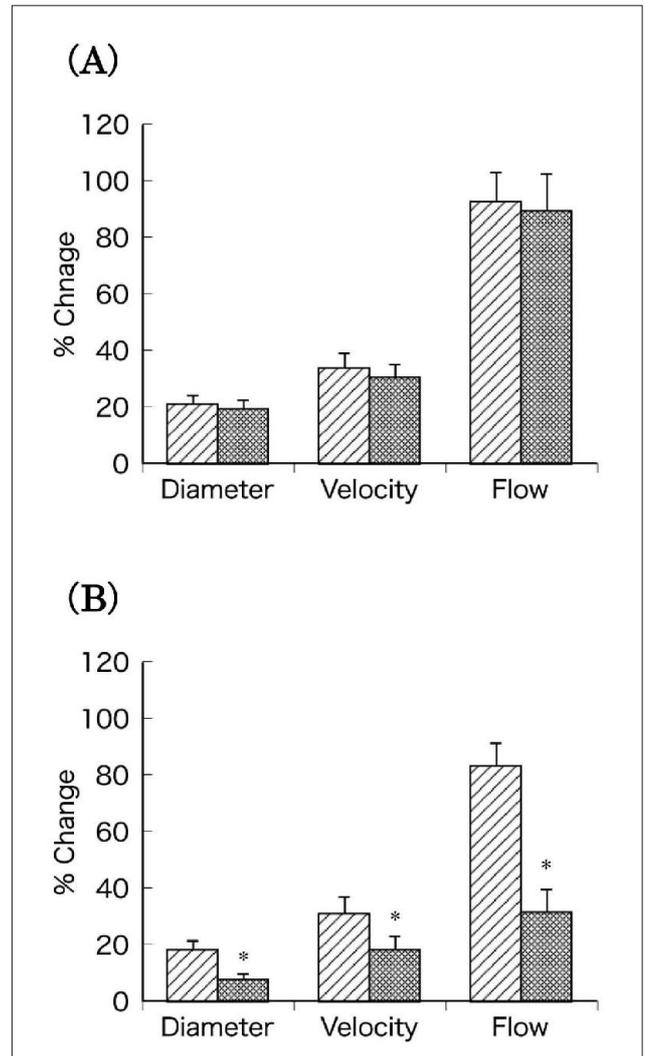


図3 (A) Mannitol負荷群, 高血糖負荷群にSNPを硝子体注入した後の網膜循環動態の変化
 (B) 両群にBKを硝子体注入した後の網膜循環動態の変化
 ▨Mannitol (n=5), ▩Hyperglycemia (n=5)
 (*p<0.05 vs Mannitol負荷群)

は増加した. また, PBS注入群と比べると有意に増加した. BK, SNPの両群の変化に有意差は認められなかった (図1).

(2) 高血糖負荷による網膜循環動態への影響

高血糖負荷群, Mannitol負荷群の両群において, 負荷後の網膜血管径, 血流速度, 血流量は負荷前と比較し, 有意に上昇した. 両群間の変化に有意差はなかった (図2).

(3) 高血糖負荷時の網膜血管内皮機能への影響

高血糖負荷群, Mannitol負荷群の両群において, SNPによる網膜血管径, 血流速度, 血流量の変化には有意差は認められなかったが (図3A), BKによる変化は, 高血糖負荷群ではMannitol負荷群に比べ有意に抑制された (図3B).

また, 10mMの血糖負荷により, BKの反応は血糖非負荷群に比べて有意な抑制は認められなかった. しかし, 20mM, 30mMの血糖負荷では, BKの反応は血糖非負荷群に比べ有意

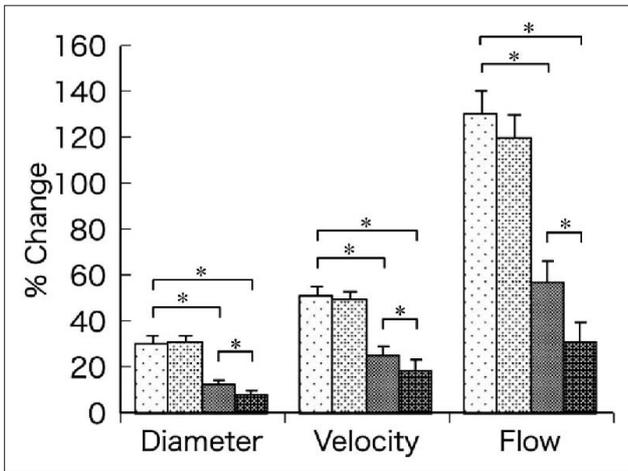


図4 高血糖の濃度によるBKの反応
 □Normoglycemia (n=5), ▨10mM (n=4), ■20mM (n=4), ▩30mM (n=5)
 (*p<0.05)

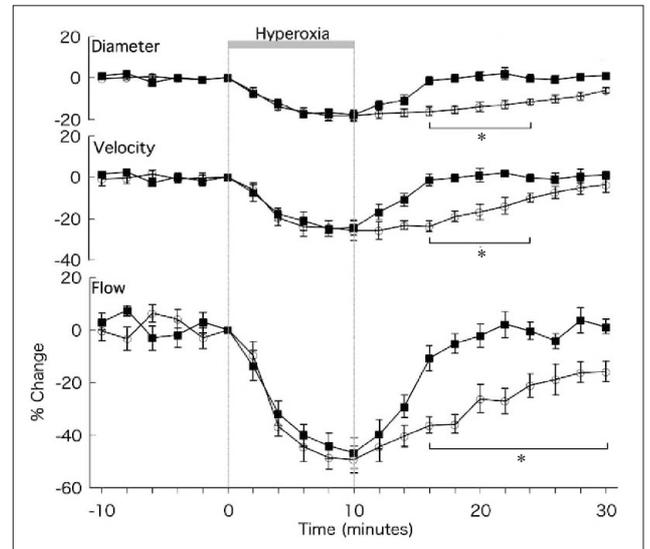


図5 高酸素の吸入負荷による網膜循環動態の変化
 ■Mannitol (n=4), ○Hyperglycemia (n=4)
 (*p<0.05 vs 高酸素吸入前のbaseline)

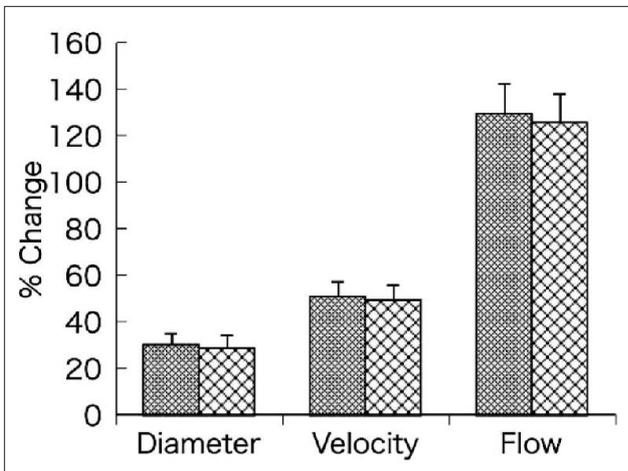


図6 血糖値が正常値に戻った後の網膜循環動態への影響
 □No hyperglycemia (n=5), ▨After hyperglycemia (n=4)

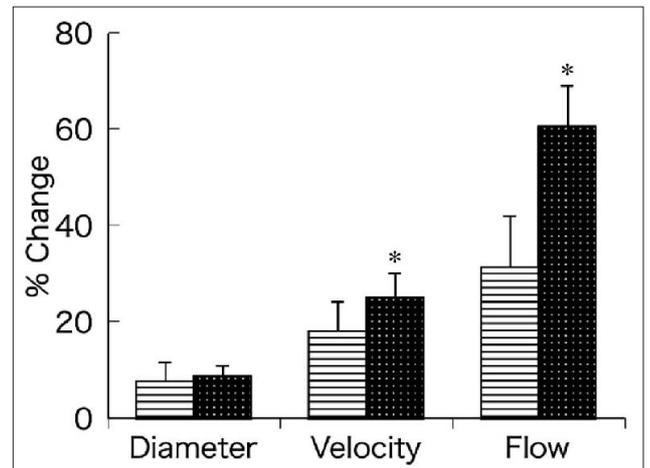


図7 高血糖負荷による活性酸素の内皮機能への影響
 ▨TEMPOL - (n=4), ■TEMPOL + (n=4)
 (*p<0.05 vs TEMPOL非投与群)

に抑制された。また30mM負荷群は20mM負荷群に比べBKの反応は有意に抑制された(図4)。

また、高血糖負荷群の高酸素の吸入負荷終了後の網膜血流量の回復は、Mannitol負荷群に比べ有意に抑制され、負荷終了20分でもベースラインには回復していなかった(図5)。

(4) 血糖値が正常値へ回復した後の網膜循環動態への影響

血糖値が正常値へ回復した後は、BKによる反応は抑制されなかった(図6)。

(5) 活性酸素の網膜血管内皮機能への影響

TEMPOL投与群では、非投与群と比べ高血糖負荷後もBKの硝子体注入により血流速度、血流量が有意に増加した(図7)。

4. 考察

本研究において、高血糖負荷によりBKの網膜循環動態を増

加させる作用は有意に抑制されたが、Mannitol負荷では抑制されなかった。また、SNPによる増加反応は両群で抑制されなかった。この結果より、高血糖負荷は網膜血管内皮機能を障害することが示された。また、10mMの血糖負荷ではBKによる増加反応は抑制されず、20mMでは有意に抑制され、さらに30mMではさらに抑制された。この結果より高血糖による内皮機能障害は、glucoseの濃度依存性に起こる現象であることが示唆された。さらに、高血糖負荷後に血糖値を正常に戻した後のBKの増加反応は抑制されなかったことより、高血糖による網膜血管内皮機能の障害は一過性のものであり、可逆性の反応であることが示唆された。以上の結果より、早期の高血糖の是正が網膜血管内皮機能の障害を防ぎ、糖尿病網膜

症の発症および進行を予防し得る可能性が示唆された。

また、本研究で高酸素負荷に引き続いて起こる負荷終了後の網膜血流の回復反応が、高血糖負荷で有意に抑制された。この反応は高血糖負荷によって網膜血管内皮機能が障害されていることを示唆しており、したがって、この方法は非侵襲的に網膜血管内皮機能を評価でき、臨床応用も可能な大変有用な手段のひとつと考えられる。今後は、実際に糖尿病患者に高酸素負荷後の網膜循環動態を測定し、臨床的な観点からの検討も求められる。

近年、高血糖負荷により増加する酸化ストレスが糖尿病血管合併症の進行に関与していることが*in vitro*の実験で数多く報告されているが、*in vivo*の実験では酸化ストレスの関与は定かではない。今回のわれわれの結果では、高血糖負荷により生じた活性酸素をTEMPOLで除去することによって網膜血流速度、血流量は有意に改善されたが、完全には回復しなかった。このことより高血糖による網膜血管内皮機能の障害は酸化ストレスが一部関与していることが示唆された。

5. 結論

- (1) 高血糖負荷によりBKによる網膜循環動態の増加作用が抑制されたが、SNPによる反応は抑制されなかった。また、血糖値を正常値に戻すと、BKによる増加作用は回復した。
- (2) glucose濃度依存性にBKによる網膜循環動態の増加作用が抑制された。
- (3) 高酸素負荷により、高血糖負荷時の網膜血管内皮機能を

非侵襲的に評価できた。

- (4) TEMPOL投与により、高血糖負荷後のBKによる増加反応は改善された。
- (5) 以上の結果から、高血糖負荷は濃度依存性に網膜血管内皮を障害すること、またそのメカニズムのひとつとして酸化ストレスの増加が関与していることが推測された。

謝辞

本研究を推進するにあたり御援助いただきました鈴木謙三 記念 財団法人医科学応用研究財団に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) Konno S, Fekete GT, Yoshida A, *et al*: Retinal blood flow changes in type I diabetes. A long-term follow-up study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 1140-1148, 1996.
- 2) Diederich D, Skopec J, Diederich A, *et al*: Endothelial dysfunction in mesenteric resistance arteries of diabetic rats: role of free radicals. *Am J Physiol* 266: H1153-1161, 1994.
- 3) Tesfamariam B, Brown ML, Deykin D, *et al*: Elevated glucose promotes generation of endothelium-derived vasoconstrictor prostanoids in rabbit aorta. *J Clin Invest* 85: 929-932, 1990.
- 4) Brownlee M: Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 13: 813-20, 2001.
- 5) Izumi N, Nagaoka T, Sato E, *et al*: Role of nitric oxide in regulation of retinal blood flow in response to hyperoxia in cats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49: 4595-4603, 2008.
- 6) Nagaoka T, Kuo L, Ren Y, *et al*: C-reactive protein inhibits endothelium-dependent nitric oxide-mediated dilation of retinal arterioles via enhanced superoxide production. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49: 2053-2060, 2008.