学位論文の要旨

学位の種類	博 士	氏 名	十 川 健 司
-------	-----	-----	---------

学 位 論 文 題 目

Hyperglycemia Induces Endothelial Dysfunction in Retinal Arterioles in Cats

(高血糖負荷はネコ網膜動脈の内皮機能を障害する)

共 著 者 名

長岡 泰司、中林 征吾、吉田 晃敏

未 発 表

研 究 目 的

糖尿病網膜症は我が国の中途失明原因の第2位であり、その治療法は未だ確立されていない。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、糖尿病動物モデルを用いた研究から、網膜以外の組織においては、血管障害のごく早期から血管内皮機能が障害されていることが明らかになってきた。また、非糖尿病モデルでも高血糖を負荷すると血管内皮機能が障害されること、さらに高血糖による酸化ストレスの増加が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きた²⁾。従って、糖尿病患者においては、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、網膜血流量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* で詳しく検討した報告はない。

これまで我々は、ネコを用いた *in vivo* の実験系で、高酸素負荷後の網膜循環動態を評価することで、網膜内皮機能の評価ができること、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³⁾。

本研究では、ネコに高血糖を負荷し、網膜循環動態を計測することで、高血糖による網膜血管内皮機能を評価した。具体的には、BK の硝子体内投与と高酸素の吸入負荷を行うことで、高血糖が網膜血管内皮を障害するメカニズムの解明を試みた。また、活性酸素除去剤である TEMPOL を投与し、活性酸素が網膜内皮機能に与える影響についても検討した。

材 料 ・ 方 法

1. 実験動物

実験には成ネコ 59 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、人工呼吸下で以下の実験を行った。

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

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 $50 \mu\text{l}$ 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) 高酸素負荷による網膜血管内皮機能評価

100%O₂を、10 分間人工呼吸器を介して吸入させた。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を算出し、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% マンニトールを経静脈的に持続注入した(マンニトール群)。

a) 高血糖負荷による網膜循環動態への影響

高血糖負荷群とマンニトール群において、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)、マンニトール(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

活性酸素除去剤である 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 または Mann-Whitney's U 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。

成 績

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流量はPBS 注入群と比べ、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。

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、マンニトール群の両群において、負荷後の網膜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。

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、マンニトール群の両群において、SNP による網膜血流量の変化には有意差は認められなかったが、BK による変化は、高血糖負荷群ではマンニトール群に比べ有意に抑制された。

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。

高血糖負荷群の高酸素負荷終了後の網膜血流量の回復はマンニトール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値には回復しなかった。

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。

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 により血流速度、血流量が有意に増加した。

考 按

本研究において、高血糖負荷により BK の網膜血流量を増加させる作用は有意に抑制されたが、マンニトール負荷では抑制されなかった。また SNP による血流量増加反応は両群で抑制されなかった。この結果から、高血糖負荷により網膜血管内皮機能が障害されることが明らかになった。また、glucose 濃度別の負荷における BK の増加反応の結果から、高血糖による内皮機能障害は glucose の濃度依存性に起こることが明らかとなった。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から、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、臨床の現場では、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及び進行を予防す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お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、従ってこの方法は、非侵襲的に網膜血管内皮機能を評価でき、臨床応用も可能な有用な検査法となり得ると考えられた。今後は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を行いたい。

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かった。今回の我々の結果では、高血糖負荷により生じた活性酸素を TEMPOL で除去する事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。このことから、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。

結 論

ネコに高血糖を負荷し、網膜血流量を測定することで以下の結論を得た。

1. 高血糖負荷により BK による網膜血流量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 による網膜血流量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一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。

引 用 文 献

1. Konno S, Feke GT, Yoshida A, Fujio N, Goger DG, Buzney SM. Retinal blood flow changes in type 1 diabetes. A long-term follow-up study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37:1140-48.
2. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001;13:813-20.
3. Nagaoka T, Kuo L, Ren Y, Yoshida A, Hein TW. C-reactive protein inhibits endothelium-dependent nitric oxide-mediated dilation of retinal arterioles via enhanced superoxide production. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49:2053-60.

参 考 論 文

1. Izumi N, Nagaoka T, Sato E, Sogawa K, Takahashi A, Kagokawa H, Kawahara A, Yoshida A. Role of nitric oxide in regulation of retinal blood flow in response to hyperoxia in cats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49:4595-4603.
2. Izumi N, Nagaoka T, Sato E, Mori F, Takahashi A, Sogawa K, Yoshida A. Short-term effects of topical tafluprost on retinal blood flow in cats. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2008;24:521-26.
3. 十川 健司、石子 智士、木ノ内 玲子、加藤 祐司、籠川 浩幸、吉田 晃敏 :Vogt-Koyanagi-Harada 病の OCT-ophthalmoscope で網膜色素上皮層の不整が認められた 1 症例. *臨床眼科紀.* 2008;1(4):335-337.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	十川 健司
審査委員長 高井 章			
審査委員 柏柳 誠			
審査委員 石子 智士			
学位論文題目			
Hyperglycemia induces endothelial dysfunction in retinal arterioles in cats			
「高血糖負荷はネコ網膜動脈の内皮機能を障害する」			
<p>【目的】ネコにおいてブドウ糖の静脈内注入により高血糖状態を誘導すると眼底微小血流の急性変化がみられる。糖尿病性網膜症の動物実験モデルとして、この応答における血管内皮の関与を検討する。</p> <p>【方法】両性成猫(計36頭)を用い、吸入麻酔/人工呼吸下で実施した。実験中は動脈血のpH、二酸化炭素分圧 $PaCO_2$、酸素分圧 PaO_2 を継続的に計測した。また大腿動脈に刺入したカニューレを介して体循環血圧と心拍数も持続的にモニターした。直腸温は37-38℃に保たれるよう保温を施した。なお、麻酔導入後、atropine (0.04 mg/kg) で前処理した。動物は腹臥位に置き、頭部は stereotactic 固定器で保持した。瞳孔は0.5% の tropicamide で散大し、角膜外面に0 diopter のレンズを装着して、そこから眼底を観察した。</p> <p>網脈血管内の血流速度(V;赤血球の移動速度)は Doppler 記録システムを用いて記録した。それと同時に、血管イメージから自動的に血管径 R を計測・記録した。これらの記録は、片眼の側頭部網膜動脈の二次分枝の比較的直線的な部分を選んで行い、それぞれ2分間の平均値を算出して時間に対してプロットした。血流量 RBF は $(\pi R^2/4) \times V$ として計算した。</p> <p>高血糖は、大腿静脈からの25%ブドウ糖液の注入により誘導した。浸透圧効果についてのコントロールとして、同濃度のマニトールを用いた。</p> <p>各種薬剤は磷酸緩衝食塩水(PBS)中に溶解して投与した。それら(通例各50 μL)は、limbus(前眼瞼縁)の後方7 mm の位置に刺入した30ゲージ針を介し100 μL Hamilton syringe を用いて、視神経乳頭部直前に注入した。</p>			
(次ページに続く)			

主な結果は次の2点に要約できる。

1. NO遊離剤である sodium nitroprusside (SNP)の眼底への局所投与は眼底血流を増加させたが、この作用は高血糖負荷時にも同濃度のマンニトール負荷時にも同等にみられた。内皮細胞に作用してNO遊離を引き起こすブラジキニン(BK)もSNP同様の眼底血流上昇作用を示したが、このBKの効果は、高血糖負荷時においてマンニトール負荷時に比べて有意に減弱した。これは高血糖負荷が血管内皮細胞に障害を与えている可能性を示唆する。
2. 活性酸素スカベンジャーである 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperadine-1-ol (TMPOL)をあらかじめ経口投与した動物において同様の実験を行うと、高血糖によるBKの眼底血流上昇作用の抑制が起らないことが確認された。これは、高血糖負荷が可逆的に血管内皮細胞機能を活性酸素依存的に傷害し、網膜循環動態の調節を阻害することを示唆する。

このように、本論文は、適切な方法を用いて行った実験により、高血糖負荷が血管内皮機能を障害することを明らかにした。また、活性酸素スカベンジャーを高血糖時に投与することにより、血管内皮機能の低下を回避し、網膜循環動態を改善することができる可能性を示したことは、臨床方面からも注目されるだろう。

高血糖負荷時の血中インスリン濃度のモニターなどが行われていれば、なお説得力のある論文になったかと思われるが、学位論文としては十分の内容であると評価できる。

論文提出者は、3名の審査員による個別の口頭試問において、本論文の内容とその重要性について明確に説明し、また、関連領域についての試問でも適切な回答を与えた。それにより、当人がこの領域において十分な知識と経験を有することを確認できた。

以上より、本審査委員会は、本論文が学位授与に値するものと判定した。