



Reversibility of retinal flow abnormalities is disease-duration dependent in diabetic rats

東, 晋也

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2003-10-08

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2714

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002714>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 1 6 0 】

氏 名・（本 籍） 東 晋也 （大分県）

博士の専攻分野の名称 博士（医学）

学 位 記 番 号 博ろ第1891号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第2項該当

学位授与の 日 付 平成15年10月8日

【 学位論文題目 】

Reversibility of Retinal Flow Abnormalities Is
Disease-Duration Dependent in Diabetic Rats
（糖尿病ラットにおける網膜血流異常の可逆性は
糖尿病罹病期間に依存する）

審 査 委 員

主 査 教 授 春日 雅人

教 授 千原 和夫

教 授 根木 昭

【緒言】

糖尿病治療において、糖尿病の慢性合併症、特に細小血管障害の予防は、未だに大きな課題である。糖尿病発症の初期から厳格な血糖コントロールを行うことで、合併症の進行を予防できることは示されている。しかしその一方で、DCCTやその他の研究では、網膜症が一旦発症した後では、その進行を阻止するのは困難であることも示された。さらに、現在の形態学的手法で明らかな異常が認められる前から、不可逆的な生化学的変化が起こっている可能性が示唆され、予防のためには、早期に異常を発見しうる指標も必要である。

糖尿病網膜症が臨床的に明らかとなる前から、網膜血流に異常が存在することや、糖尿病網膜症の進展と網膜血流異常の関係が報告され、網膜血流測定は、ごく早期の網膜症の良い指標となると考えられている。我々も、糖尿病ラットで網膜血流が減少していること、インスリンの1次介入治療により網膜血流量が正常に保たれることを報告した。

今回の研究は、インスリンの2次介入治療が網膜血流を正常化しうるかどうかをみるために行われた。臨床においては糖尿病の発症初期から厳格な血糖コントロールを達成することは困難であることから、2次介入の効果を見ることがより重要と考えた。そこで、われわれは、糖尿病ラットを用いて異なる糖尿病罹病期間の後にインスリン2次介入治療を行い、その網膜血流に対する効果を検討した。

【方法】

1) ビデオ蛍光眼底血管造影および網膜血流測定

ビデオ蛍光眼底血管造影法 (VFA) は、すでに報告された方法で実施した。すべての血管のパラメーターは、視神経乳頭中心から一定距離の血管上の測定点で測定された。ラットの頸静脈にカテーテルを留置し、そこから蛍光試薬を注射した。注射の後、血管の直径を pixel 単位で計測した。各動脈および静脈の蛍光度を記録して得られた蛍光希釈曲線から、平均動脈循環時間と平均静脈循環時間を算出した。平均網膜循環時間 (MCT) は平均動脈循環時間と静脈循環時間との差として計算した。以上の測定値から網膜血流量は、動脈および静脈の直径の二乗の和を MCT で除したものとして算出された。動脈内蛍光出現時間 (AT) は蛍光物質を頸静脈に注射後、最初に網膜中心動脈で蛍光が測定されるまでの時間として測定され、全身の循環の指標として用いられた。

2) 実験プロトコール

体重 200 g の雄の Sprague-Dawley rats (以下ラットと略す) を使用した。ラットを無作為に 2 週間グループと 4 週間グループに 2 分し、各グループをさらにコントロール群、糖尿病非治療群、糖尿病治療群 (2 次介入群) に 3 分した。

糖尿病ラットは 65mg/kgBW のストレプトゾトシン (STZ) を腹腔内に注射し作成した。

糖尿病治療群は、2 週間グループでは糖尿病導入 1 週間後、4 週間グループでは糖尿病導入 3 週間後にインスリン治療を開始し、その後それぞれ 1 週間治療を行った。VFA 測定は、治療期間終了後に各グループのすべての群において実施された。

3) ケトーシスと網膜血流

糖尿病ラットのケトーシスが網膜血流に及ぼす影響を調べるため、18頭のラットを用いて実験を行った。異なる程度のケトーシスを得るため、8頭に 65mg/kg の STZ を、また 5頭に 85mg/kg の STZ を注射した。残る 5頭はコントロール群とした。実験開始 2 週間後に VFA 測定と β -hydroxybutyrate 濃度測定を行った。

【結果】

1. 網膜血流とケトーシスの関係

糖尿病群では、コントロール群に比較して有意な β -hydroxybutyrate 濃度の増加と網膜血流の減少を認め、 β -hydroxybutyrate 濃度と網膜血流量との間には正の相関関係が認められた。

2. インスリン 2 次介入試験

1) 2 週間グループにおける網膜循環

糖尿病非治療群では、他の 2 群に比し、血管径に有意差はなく、MCT は有意に延長し ($p < 0.05$)、網膜血流量は有意に減少していた ($p < 0.05$)。

糖尿病治療群では、他の群に比し有意な動脈径の拡張が見られた ($p < 0.05$)。MCT は糖尿病非治療群に比し、有意に短縮した ($p < 0.05$)。網膜血流量は糖尿病非治療群に比べ有意に増加し ($p < 0.05$)、有意差はないもののコントロール群より多い傾向にあった。AT は、糖尿病非治療群とコントロール群の間には差は見られなかったが、糖尿病治療群では他の 2 群に比べて有意な AT の短縮が見られた。 ($p < 0.05$)

2) 4 週間グループにおける網膜循環

4 週間グループでは、MCT は糖尿病の 2 群で延長する傾向はみられたものの、3 群間の比較では有意差は見られなかった。

糖尿病非治療群では動脈径がコントロール群に比べ有意に収縮し ($p < 0.01$)、網膜血流量は有意に低下していた ($p < 0.05$)。

糖尿病治療群では、糖尿病非治療群に比し動脈径が有意に拡張していた

($p < 0.05$) が、MCT に有意差は見られなかった。網膜血流量は糖尿病非治療群に比べ多い傾向にあったものの、有意差は見られず、コントロール群に比べると低値であった。AT は、糖尿病非治療群とコントロール群の間では差はなく、糖尿病治療群で他の 2 群に比べ有意に短縮していた。($p < 0.05$)

【考察】

今回の実験において、2 週間グループ、4 週間グループ共に、糖尿病非治療群では、コントロール群に比べ有意に網膜血流量が減少していた。AT はコントロール群と差はなく、全身循環に変化はないと考えられた。1 週間の糖尿病期の後に行われたインスリン治療の二次介入は、網膜血流を正常化した、3 週間の糖尿病期の後では、網膜血流を完全には正常化し得なかった。

ケトン体の増加は糖尿病ラットの網膜血流を増加させた。しかし糖尿病ラットの平均網膜血流量は、なおコントロールラットの血流量よりも有意に低値であり、今回の実験の網膜血流変化に対するケトン体の影響は少ないと考えた。

2 週間グループにおいては、糖尿病非治療群の網膜血流量は、コントロール群に比べ 39% 減少していた。この減少は MCT の延長によるものであった。全身循環の指標である AT に差がなく、血管径に有意な変化は見られなかったことから、MCT の延長、すなわち血流抵抗の増大は、網膜の微小循環レベルに原因があると考えた。

他方、4 週間グループでは、糖尿病非治療群の網膜血流の減少は、血管の収縮と MCT の延長に関連していたが、このグループ内では各群の MCT に有意差はなかった。

2 週間、4 週間の両グループにおいて、糖尿病治療群の AT は他の群に比較して有意に短縮していた。インスリンが心臓に対し陽性変力効果を持ち、心拍出量を増加させることがこの AT の短縮に影響を与えたのかもしれない。

いずれのグループの糖尿病治療群でも、インスリン治療による網膜血流の増加は、糖尿病非治療群と比較して、動脈の拡張と MCT の短縮によってもたらされた。興味深いことに 2 週間グループの糖尿病治療群では、糖尿病非治療群と比較して、AT は 15% 短縮したのに対し MCT の短縮は 37% でこれを上回っていた。AT の短縮が血流学的に MCT の短縮に寄与したとしても、このことだけでは網膜血流改善のすべてを説明することはできず、1 週間という短い糖尿病罹病期間のラットでは、全身循環系の反応に加えて、網膜局所の微小循環系にもインスリン治療に対する反応があることが示唆された。対照的に、4 週間グループにおいては、糖尿病非治療群と比較して糖尿病治療群の AT と MCT の短縮率は 9% でほぼ一致していた。網膜血流の改善は、主に全身的な循環時間の短縮でもたらされた可能性があり、4 週間グループでは、網膜局所での微小循環反応がイ

ンスリン治療に対し抵抗性になったと考えられた。糖尿病罹病期間が長くなると、インスリン治療による網膜血流の正常化作用に抵抗性が現れるという事実は、臨床的に重要と思われる。

以前、われわれは、糖尿病ラットにおいて、網膜血流の減少は高血糖による DAG の de novo 産生の増加、それに引き続く PKC 活性化と ET-1 の活性化などに関係し、インスリン一次介入治療は、大血管の DAG 産生増加と PKC の活性化を抑制し、網膜血流を正常に保つことを報告した。その一方、2 週間の糖尿病期間の後に行われた 2 次介入実験では、大動脈 DAG レベルと PKC 活性化は正常化されなかった。この大血管系で見られたインスリン治療に対する生化学的な不可逆性が、今回の 4 週間グループで見られた網膜血流改善の抵抗性の原因となっている可能性がある。

今回の結果から、インスリン治療による 2 次介入は網膜血流の正常化に有効ではあるが、糖尿病罹病期間が長くなれば、網膜血流を完全に正常化するのは困難となる事が示された。網膜局所循環におけるインスリン治療に対する抵抗性の出現がその原因と思われ、この事が、糖尿病網膜症の進行予防を難しくしているのかもしれない。

糖尿病網膜症の発症の危険性を確実に減じるには、糖尿病のできるだけ早い段階から正常な網膜の生理的環境を維持することが重要である。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第 1895 号	氏 名	東 晋也
論文題目	Reversibility of Retinal Flow Abnormalities Is Disease-Duration Dependent in Diabetic Rats 糖尿病ラットにおける網膜血流異常の可逆性は 糖尿病罹病期間に依存する		
審査委員	主 査 春日 雅人 副 査 千原 和夫 副 査 根本 昭		
審査終了日	平成 15 年 9 月 25 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

糖尿病の治癒が望めない現時点における血糖コントロールの目的は、糖尿病合併症の予防である。糖尿病合併症の発症原因の解明や進展過程についての研究がこれまでも数多くなされ、予防策が模索されている。しかしながら、今なお、合併症の予防は困難である。

糖尿病網膜症においても、厳格な血糖コントロールを達成してもなお、網膜症の進行が十分に抑制できないことが報告されており、そのメカニズムの解明が重要な課題となっている。

研究者らは、網膜症の進展に関わっているとされる網膜血流の変化に注目し、インスリン治療が網膜血流量に及ぼす効果を検討した。すでに研究者のグループは、網膜血流量を厳密に測定できる蛍光眼底造影法を確立し、この方法を用いて、糖尿病発症早期の網膜血流異常と、インスリン一次介入の効果を報告した。今回は、より臨床的に重要な意義をもつインスリン二次介入の効果を検討したものである。

研究者らは、慢性的な高血糖状態の持続により、恒久的な生化学的異常が網膜血管系に発生することを想定し、その持続期間とインスリン治療に対する網膜血流の反応性を検討した。そのためにラットを用いて糖尿病罹病期間が1週間の群と3週間の群の異なる糖尿病罹病期間の二群を作成し、各群に1週間のインスリン治療を行い、それぞれの群におけるインスリン二次介入の効果を比較した。またケトン体の影響を考慮し、ケトン体濃度と網膜血流との関係も検討した。その結果、糖尿病ラットにおいて、網膜血流量が低下することを確認し、ケトン体濃度増加の影響は少ないことを確認した。インスリン二次介入の効果については、まず1週間群では網膜血流量が有意に改善することを示し、インス

リン二次介入の有効性を示した。また、この網膜血流の改善に際し、大循環系の他に、網膜局所の微小循環系にもインスリンに対する反応性が存在することを明らかにした。その一方で、3週間群においては、網膜血流の改善は部分的なものに留まることを示し、糖尿病の罹病期間に依存して、インスリン治療に対する網膜血流の反応が変化することを初めて報告した。さらに網膜血管径の変化、平均網膜循環時間の結果の分析から、その原因が大血管系ではなく、網膜微小循環レベルでのインスリン治療抵抗性にある可能性も指摘した。これらの結果は、大血管系ですでに報告されている生化学レベルでのインスリン治療抵抗性が、細小血管である網膜血管系においても存在することを示唆する重要な知見である。

以上のように、本研究は、糖尿病における網膜血流異常に対するインスリン二次介入の効果を見た研究である。従来明らかでなかった網膜血流改善に対するインスリン二次介入の有効性を示すとともに、糖尿病罹病期間に依存して、網膜血流量の可逆性が変化することを示し、網膜微小循環系におけるインスリン治療抵抗性の存在を明らかにした初めての報告であり、臨床において糖尿病網膜症予防を考える上での重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。