

ツパイを用いた実験糖尿病モデルによる糖尿病発症早期の眼内変化

石子 智士¹⁾ 吉田 晃敏¹⁾ 森 文彦¹⁾ 安孫子 徹¹⁾北谷 智彦¹⁾ 小島 満²⁾ 斉藤 敬司³⁾¹⁾旭川医科大学眼科学教室, ²⁾札幌医科大学統計情報処理, ³⁾CSK リサーチパーク

要 約

ツパイにストレプトゾトシン(STZ)を用いて, 実験糖尿病モデルを作製した。そして, このモデルを用いて, 糖尿病作製1週間後の早期の眼内変化をフルオロフォトメトリーで検討した。ツパイに体重 kg 当たり 60~400 mg の STZ を腹腔内に投与した。このうち, 300 mg/kg 以上の STZ を投与したツパイのみに糖尿病を作製することができた。さらに, これらのツパイでは STZ 投与後1週間の早期で角膜自然蛍光が有意に増大しており, 糖尿病

発症に伴い, 眼内の恒常性維持機構に何らかの障害が生じていることが推測された。ツパイは霊長類に属することから, 今後, このモデルを用いることで, よりヒトの糖尿病患者に近い情報を得ることが期待される。(日眼会誌 101: 19-23, 1997)

キーワード: ツパイ, 実験糖尿病, フルオロフォトメトリー, 自然蛍光

Early Ocular Changes in a Tree Shrew Model of Diabetes

Satoshi Ishiko¹⁾, Akitoshi Yoshida¹⁾, Fumihiko Mori¹⁾,
Tohru Abiko¹⁾, Norihiko Kitaya¹⁾, Mitsuru Kojima²⁾
and Keiji Saito³⁾¹⁾Department of Ophthalmology, Asahikawa Medical College²⁾Department of Statistics, Sapporo Medical University³⁾CSK Research Park

Abstract

We developed a tree shrew model of diabetes using streptozotocin (STZ), and studied early ocular changes of diabetes (after one week of diabetes) by fluorophotometry. STZ was injected intraperitoneally at doses of sixty to 400 mg/kg body weight. Animals injected with more than 300 mg/kg of STZ developed diabetes. Corneal autofluorescence was significantly increased one week after STZ injection. These changes may be related to impairment of

the ocular homeostatic mechanisms due to the onset of diabetes. Using this model, we might be able to obtain diabetic ocular impairment data closer to human data than in previous models of diabetes, because tree shrews are primates. (J Jpn Ophthalmol Soc 101: 19-23, 1997)

Key words: Tree shrew, Experimental diabetes, Fluorophotometry, Autofluorescence

I 緒 言

近年, 我が国の糖尿病患者は著しい増加傾向を示し, その受療率は過去 30 年間で約 12 倍となっている。さらに, その主要な合併症の一つである糖尿病網膜症は年々増加の一途をたどっており, 現在我が国における失明原因の第一位を占めるようになった。しかしながら, 糖尿病およ

びその合併症の病態については未だ不明な点が多い。

そこで, 糖尿病眼合併症の病態を解明するため, これまで糖尿病自然発症動物¹⁾, ストレプトゾトシン(STZ)²⁾やアロキサン³⁾の投与により糖尿病を発症させた動物など各種の実験モデルを用いた研究がなされてきた。しかしながら, これらの実験糖尿病モデルの多くはハムスターやラット, あるいはイヌなどが用いられており, これらを

別刷請求先: 078 北海道旭川市西神楽 4-5 旭川医科大学眼科学教室 石子 智士
(平成8年6月4日受付, 平成8年7月18日改訂受理)

Reprint requests to: Satoshi Ishiko, M.D. Department of Ophthalmology, Asahikawa Medical College, 4-5 Nishikagura, Asahikawa-shi, Hokkaido 078, Japan.

(Received June 4, 1996 and accepted in revised form July 18, 1996)

用いた場合、生物学的種族の差、さらには解剖学的相違により得られた結果をそのままヒトの糖尿病合併症に当てはめて考えることは困難である。したがって、よりヒトに近い霊長類を用いた実験モデルの確立が望まれてきた。

ツパイは霊長類の最も下等な種族であり、成熟した個体においてもその体重が150 g程度の小動物である。生後4か月で成熟するにもかかわらず、その寿命は7年以上と報告されており、慢性実験にも有用である。また、行動パターンがラットなど夜行性の動物とは異なり、ヒトと同じ昼行性である。さらに、眼球が大きく、色覚を有すること、脳における視覚野が大きいことなど、眼科領域の実験動物として有望である⁴⁾⁵⁾。近年、この動物を用いた研究が眼科領域においても散見されるようになった^{6)~8)}。

本研究では、ツパイにSTZを投与することで実験的に糖尿病を発症させ、新しい霊長類の実験糖尿病モデルを確立することを目的とした。さらに今回は、このモデルを用いて糖尿病発症1週間後の早期における眼内病態変化をフルオロフォトメトリーを用いて検討した。

II 実験方法

すべての実験において、対象には、成長による眼内および眼球構築変化の影響を除外するため、成熟ツパイを用いた⁹⁾¹⁰⁾。

1. 正常ツパイにおける血糖値の検討

成熟ツパイ21匹を対象とした、小型血糖測定機(トーエコースーパー®、京都第一科学社製)を用いて、その血糖値を測定した。

2. STZ投与量の検討

ツパイに実験的糖尿病を作製するために必要なSTZの投与量を検討した。対象は、成熟ツパイ15匹とした。塩酸ケタミン(ケタラル®)33 mg/kgの筋注で麻酔した後、STZを体重kg当たり60 mg(1匹)、100 mg(2匹)、140 mg(1匹)、200 mg(1匹)、220 mg(1匹)、300 mg(2匹)、そして400 mg(7匹)を腹腔内に投与した。STZ投与により膵ラ氏島B細胞が破壊され、一時的にインスリンが大量に放出されると低血糖のため死亡する可能性があるため、STZ投与後24時間の間は通常の食餌の他に砂糖水を与えた。STZ投与後2日目から連日血糖値の測定を行い、4日間以上高血糖(300 mg/dl以上)が持続したものを糖尿病と判断した。

3. 血液眼柵透過性機能の解析

角膜および水晶体自然蛍光、そして血液眼柵透過性機能評価のため、フルオロフォトメトリーと眼軸長の測定を行った。初めの対象は、STZ投与前のツパイ15匹すべてとした。STZ投与1週間後、糖尿病と確認されたツパイのみ同様の測定を再度施行した。

本実験系を行うに当たり、動物を用いた測定に際しては、塩酸ケタミン(ケタラル®)33 mg/kgの筋注および

ペントバルビタールナトリウム(ネンプタル®)25 mg/kgの腹腔内注射で麻酔を行い、アトロピン0.1 mgを腹腔内注射した。さらに、1%アトロピン点眼により調節を麻痺させ、ミドリンP®(参天製薬)、5%塩酸フェニレフリン(ネオシネジン®)を用いて散瞳させた後、測定を行った。

フルオロフォトメトリーは、フルオロフォトメーター(Fluorotron Master®, OcuMetrics, Inc)に小動物眼測定専用アダプターを装着して行った¹¹⁾。体重kg当たり2 mgのフルオレセイン静注前および静注30分後に眼内蛍光強度の測定を行った。静注前の値のうち、角膜および水晶体のピーク値をそれぞれの自然蛍光値とした。蛍光色素静注後5分および35分にヘマトクリット管を用いて採血し、遠心分離によって血漿を分離した。この血漿をフィルター(MPS-II filter®, Amicon Co, USA)によって眼外濾過(2,000 G, 15分)した。このようにして得られた血漿を希釈し、プラズマ測定用アダプターを装着したFluorotron Master®で測定することにより、血漿中タンパク非結合フルオレセイン(PUF)濃度を求めた。

眼軸長の測定は、超音波発振受信装置(5052 pulser/receiver®, Panametric)を用いて行った。この超音波発振受信装置によって得られたエコーは、増幅器(Model 3080®, Accu-Tron Inc)を通してオシロスコープ(TDS 420®, Tektronix)に送った。S/N比を上げるため、8 pulseの平均を1波形とした。これをそれぞれの眼で6回測定し、専用の波形解析プログラムで解析した¹²⁾。

フルオロフォトメトリーにより得られた蛍光色素静注前後の前房内蛍光強度の差をPUF時間濃度曲線下の面積で除すことにより、血液房水柵機能の指標となる前房値を算出した。また、フルオロフォトメトリーと個々の眼軸長のデータから、我々が開発したコンピュータシミュレーション法を用いて血液網膜柵機能の評価値となる血液網膜柵内方透過性係数(Pin値)を解析した¹³⁾¹⁴⁾。

4. 網膜症発症の検討

眼底検査および蛍光眼底造影検査を、フルオロフォトメトリー施行時に小動物用眼底カメラ(Genesis®, 興和)を用いて行った。なお、正常ツパイにおける眼底像の特徴についてはすでに報告¹⁵⁾した。

以上の実験系において、動物を扱うに当たり倫理問題に十分配慮し、総理府告示の「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」に準じて実験を行った。

また、各評価値の糖尿病作製前後の統計学的検討にはpaired t-testを用い、危険率5%未満のものを有意とした。

III 結果

1. 正常ツパイにおける血糖値の検討

正常ツパイにおける血糖値の平均は 82.1 ± 20.8 mg/dlであった。採血の時間が一定していないものの、その

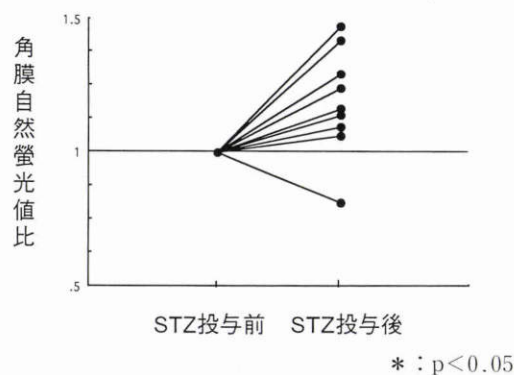


図1 角膜自然蛍光の変化(n=9).

ストレプトゾトシン(STZ)投与前の値を1としたときのSTZ投与後の値の比を表したものの、1例を除いてすべて1以上となり、有意な変化を示した($p < 0.05$).

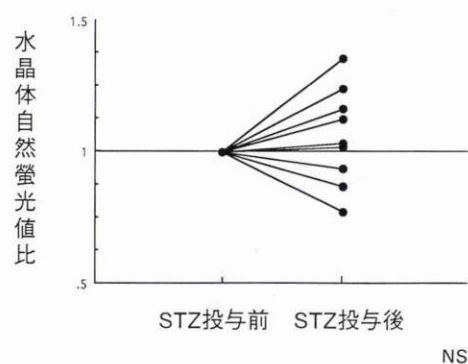


図2 水晶体自然蛍光の変化(n=9).

STZ投与前の値を1としたときのSTZ投与後の値の比を表したものの、STZ投与前後で有意な変化は認めなかった。

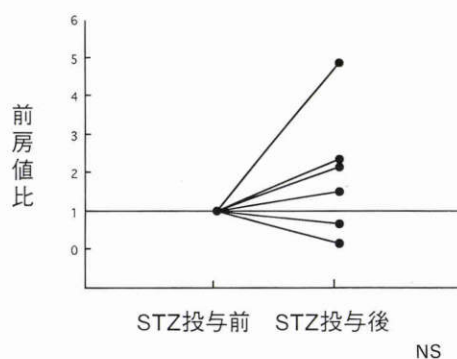


図3 前房値の変化(n=6).

STZ投与前の値を1としたときのSTZ投与後の値の比を表したものの、STZ投与前後で有意な変化は認めなかった。

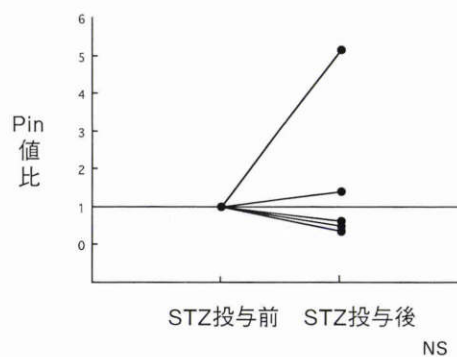


図4 血液網膜柵内方透過性係数(Pin値)の変化(n=6).

STZ投与前の値を1としたときのSTZ投与後の値の比を表したものの、STZ投与前後で有意な変化は認めなかった。

値は50~150 mg/dlの範囲にあり、したがって、正常のヒトで得られている値とほぼ同様と考えられた。

2. STZ投与量の検討

STZの投与量が300 mg/kg未満のツパイでは、一時的に高値を示したのも認められたが、最終的にすべてのツパイで血糖値は150 mg/dl以下となった。300 mg/kg以上のSTZを投与したツパイでは、9匹すべてにおいて投与後2日目から4日間以上300 mg/dl以上の高血糖が持続したため糖尿病と判断した。

3. 血液眼内柵透過性機能の解析

糖尿病となったツパイ9匹のみ、STZ投与1週間後にフルオロフォトメリーと眼軸長の測定を行った。このうち、蛍光色素の静注または採血に問題を生じた3匹は自然蛍光のデータのみ採用した。得られたデータは、各個体において左右眼の平均値を採用した。なお、これらのツパイでは、測定までの6日間は高血糖が持続したままであった。

STZ投与1週間で、角膜自然蛍光値(ngEq/ml)は平均 2.93 ± 0.51 から 3.43 ± 0.33 へ有意な増加を示した($p < 0.05$) (図1)。一方、水晶体自然蛍光値(ngEq/ml)は、平

均 44.1 ± 25.2 と 50.3 ± 33.9 であり、有意な差は認めなかった(図2)。さらに、血液房水柵透過性機能の指標である前房値($\times 10^{-3}/hr$)は、平均 18.6 ± 17.6 と 28.3 ± 32.6 であり(図3)、血液網膜柵透過性機能の評価値Pin値($\times 10^{-4}cm^2/min$)は、平均 8.9 ± 2.4 と 12.0 ± 16.6 であり(図4)、いずれも有意な増加は認められなかった。

4. 網膜症発症の検討

眼底検査および蛍光眼底造影検査上、明らかな変化は認めなかった。

IV 考 按

フルオロフォトメリーを用いた研究から、糖尿病患者では眼内の恒常性維持機構の一つである血液眼柵透過性機能に障害が生じることが報告¹⁶⁾¹⁷⁾されている。さらに我々は、特に糖尿病発症早期の変化に着目し、網膜症発症前からすでに血液眼柵透過性機能の障害が生じていることを報告¹⁸⁾¹⁹⁾した。しかしながら、糖尿病発症ごく早期の変化はヒトでは不明であり、この病態生理を考える上で実験モデルは不可欠である。

本研究では、霊長類であるツパイにSTZを用いて糖

尿病を発症させる実験モデルを作製した。今回、ツパイに糖尿病を作製するために要したSTZは、ラットに比べはるかに多い量であった。この投与量に関しては、STZの投与法の問題やSTZ自体に対する感受性など種族の差によるものである可能性もあげられるが、各条件に用いた個体数が少ないため、投与量に関しては今後対象数を多くして、さらに検討する必要があると思われる。このモデルを用いることにより、これまで用いられてきたラットやハムスターなどの糖尿病動物から得られるデータと比べ、よりヒトの糖尿病患者に近い情報を得ることが期待される。

本研究では、さらにツパイに糖尿病を作製し、その発症1週間目の早期における眼内変化を検討した。その結果、角膜自然蛍光に有意な変化が生じていることが明らかとなった。したがって、糖尿病発症に伴い、そのごく早期から眼内の恒常性維持機構に何らかの障害が生じていることが推測された。我々は糖尿病患者において、網膜発症前からすでに角膜自然蛍光が増大することを報告²⁰⁾しており、今回の実験結果は、この報告を基礎実験のレベルで支持するものである。また、角膜自然蛍光は血液房水柵透過性機能の障害¹⁸⁾¹⁹⁾、あるいは網膜の低酸素状態²¹⁾の影響を受けることが推測されており、今回得られた変化は糖尿病発症に伴うこれらの変化を反映している可能性もある。

糖尿病患者において増大する角膜自然蛍光に関しては、ミトコンドリアの呼吸状態などを反映する酸化型フラボプロテインやピリジンヌクレオチドがその起源と推測されている²²⁾²³⁾。さらに、糖尿病患者における角膜自然蛍光の増大は、非酵素的糖付加反応によって生じるadvanced glycation endproducts(AGE)に起因するのではないかと推測する報告²⁴⁾もある。島崎ら²⁵⁾は、遺伝性糖尿病マウスにレドックスフルオロメトリーを用いた研究から、角膜内皮において酸化型フラボプロテインとピリジンヌクレオチドそれぞれのシグナル単独では有意な変化は認められないものの、その比が有意に変化していることを報告し、この比の変化がポリオール経路の活性変化を反映していると推測した。一方、我々が測定に用いた装置の励起波長および蛍光波長から考えると、酸化型フラボプロテインを測定している可能性が高い。我々の結果と島崎らの結果が一致しない理由として、異なる物質を測定しているという可能性があるものの、それぞれの対象が糖尿病自然発症モデルとSTZを用いた急激発症のモデルであったことから、各モデルにおける慢性変化と急性変化といった糖尿病発症病態の違い、あるいは齧歯類と霊長類という用いた動物の種族の差によることも推測される。蛍光の起源を明確に特定することは今のところ困難であるが、いずれにせよ、角膜自然蛍光は角膜における細胞レベルでの代謝状態を反映しているものと考えられることから、糖尿病発症ごく早期においてす

でこれらの障害が生じている可能性が示唆された。

今回我々は、ツパイによる霊長類糖尿病モデルを用いることで、糖尿病誘発後1週間目の全身のおよび眼科的变化をとらえることができた。このような網膜発症前のごく早期から、眼内の恒常性維持機構に何らかの障害が生じていることが推測された。今後、このモデルを用い、誘発した糖尿病を長期に維持させることにより、糖尿病眼合併症の病態解明を行いたい。

本研究は、文部省科学研究費奨励研究(A 06771477)、千代田生命健康開発事業団社会厚生事業助成、およびホクサイテック財団一般研究奨励事業の補助を得て行われた。

文 献

- 1) 福井康夫, 吉田晃敏, 野見山豪, 高橋正年, 小島 満: 自然発症チャイニーズハムスターにおける血液眼内柵透過性機能. 日眼会誌 96: 328—334, 1992.
- 2) Jones GW, Cunha-Vaz J, Zweig KO, Stein M: Kinetic vitreous fluorophotometry in experimental diabetes. Arch Ophthalmol 97: 1941—1943, 1979.
- 3) Kern TS, Engerman RL: Comparison of retinal lesions in alloxan-diabetic rats and galactose-fed rats. Curr Eye Res 13: 863—867, 1994.
- 4) Luckett WP: The suggested evolutionary relationships and classification of tree shrews. In: Comparative Biology and Evolutionary Relationships of Tree Shrews. Plenum Press, New York, 3—29, 1980.
- 5) 堤 英樹, 萬 啓悟, 斉藤敬司: 特徴ある実験動物. 2. ツパイ. アニテクス 7: 207—210, 1995.
- 6) Marsh-Tootle WL, Norton TT: Refractive and structural measures of lid-suture myopia in tree shrew. Invest Ophthalmol Vis Sci 30: 2245—2257, 1989.
- 7) McBrien NA, Norton TT: Prevention of collagen crosslinking increases form-deprivation myopia in tree shrew. Exp Eye Res 59: 475—486, 1994.
- 8) Ishiko S, Yoshida A, Mori F, Abiko T, Kitaya N, Kado M, et al: Changes in blood-retinal barrier permeability in form deprivation myopia in tree shrews. Invest Ophthalmol Vis Sci 36(Suppl): S760, 1995.
- 9) Kado M, Ishiko S, Yoshida A, Kitaya N, Abiko T, Mori F, et al: Lenticular autofluorescence in normal tree shrews. Ophthalmic Res 28: 160—164, 1996.
- 10) 石子智士, 吉田晃敏, 北谷智彦, 安孫子徹, 森 文彦, 門 正則, 他: ツパイの成長および加齢に伴う眼球構築変化. 眼紀 46: 1168—1171, 1995.
- 11) 石子智士, 吉田晃敏, 北谷智彦, 安孫子徹, 森 文彦, 門 正則, 他: 実験動物に対するfluorophotometryの検討. 日眼会誌 100: 257—261, 1996.
- 12) 石子智士, 吉田晃敏, 北谷智彦, 安孫子徹, 森 文彦, 高橋正年, 他: 小動物の眼軸長測定—ツパイ眼における検討—. あたらしい眼科 12: 1625—1627, 1995.
- 13) Yoshida A, Kojima M, Nara Y, Ishiko S, Kado

- M: Inward and outward permeability of the blood-retinal barrier. In: Cunha-Vaz JG, et al (Eds): Ocular Fluorophotometry and the Future. Kugler & Ghedini, Amsterdam, 89—97, 1989.
- 14) **Yoshida A, Ishiko S, Kojima M, Lipsky SN**: Blood-ocular barrier permeability in monkeys. *Br J Ophthalmol* 76: 84—87, 1992.
- 15) 安孫子徹, 石子智士, 吉田晃敏, 北谷智彦, 森 文彦, 門 正則, 他: 霊長類の実験動物(ツバイ)の眼底像. *眼紀* 46: 1281—1284, 1995.
- 16) **Cunha-Vaz JG, de Aberu JRF, Campos AJ**: Early breakdown of the blood-retinal barrier in diabetes. *Br J Ophthalmol* 59: 649—656, 1975.
- 17) **Bursell SE, Delori FC, Yoshida A, Parker JS, Collas G, McMeel JW**: Vitreous fluorophotometric evaluation of diabetics. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25: 703—710, 1984.
- 18) **Ishiko S, Yoshida A, Takahashi M, Hikichi T, Fukui K, Yokoyama T, et al**: Early ocular changes in young diabetic patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32(Suppl): 1141, 1991.
- 19) **Yoshida A, Ishiko S, Kojima M, Ogasawara H**: Permeability of the blood-retinal barrier in adolescent and adult diabetic patients. *Br J Ophthalmol* 77: 158—161, 1993.
- 20) **Ishiko S, Yoshida A, Konno S, Abiko T, Kato Y**: Corneal and lens autofluorescence in young diabetic patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35(Suppl): 1962, 1994.
- 21) 三宅芳子, 前久保久美子, 三宅武子, 三宅謙作: 網膜静脈分枝閉塞症の角膜自発蛍光. *日眼会誌* 98: 385—388, 1994.
- 22) **Laing RA, Fischbarg J, Chance B**: Noninvasive measurements of pyridine nucleotide fluorescence from the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19: 96—102, 1980.
- 23) **Masters BR**: Noninvasive redox fluorometry: How light can be used to monitor alterations of corneal mitochondrial function. *Curr Eye Res* 3: 23—26, 1984.
- 24) 石田美幸, 横井則彦, 奥沢淳治, 前田耕志, 木下 茂: 糖尿病網膜症における角膜自発蛍光の測定. *日眼会誌* 99: 308—311, 1995.
- 25) 島崎 潤, 坪井一男, 服部正和, **Laing RA**: 糖尿病における角膜・水晶体代謝の非侵襲的測定: 生体眼での測定. *日眼会誌* 96: 119—124, 1992.