

ストレプトゾトシン誘発初期糖尿病ラットの網膜内層電位

金子 宗義, 菅原 岳史, 田澤 豊

岩手医科大学医学部眼科学教室

要 約

目 的：ストレプトゾトシン(streptozotocin)誘発糖尿病ラット(以下,糖尿病ラット)における網膜電図(electroretinogram, ERG)の暗所閾値電位(scotopic threshold response, STR)の動向を検討するため,律動様小波(oscillatory potential, OP)と比較して検討した。

対象と方法：糖尿病ラットの暗順応下 ERG を記録し,STR の最大振幅と潜時(implicit time)および OP 3 の最大振幅と頂点潜時(peak latency)について検討した。

結 果：STR の最大振幅および潜時は,対照群と糖尿病群との間で差はなかった。一方,OP 3 の最大振幅は対照群と糖尿病群との間で差はなかったが,頂点潜時は糖尿病群が対照群に比べて 125% に延長し,有意差($p <$

0.01)があった。

結 論：STR と OP はともに網膜内層由来の電位とされているにも拘わらず,初期糖尿病モデルでその動向に差があった。このことは,OP の発生にはドーパミン作動性アマクリン細胞が,STR の発生にはグリシンあるいは GABA 作動性アマクリン細胞が関与し,OP と STR の発生源が異なるとの報告を支持する結果である。初期の糖尿病網膜症では,虚血による障害だけではなく,アマクリン細胞の神経伝達に何らかの異常が発生していると考えられた。(日眼会誌 104 : 775—778, 2000)

キーワード：ストレプトゾトシン,糖尿病ラット,網膜電図,暗所閾値電位,律動様小波

Electrical Responses from the Inner Retina of Rats with Streptozotocin-induced Early Diabetes Mellitus

Muneyoshi Kaneko, Takeshi Sugawara and Yutaka Tazawa

Department of Ophthalmology, Iwate Medical University School of Medicine

Abstract

Purpose : To evaluate behavior of the scotopic threshold response (STR) and the oscillatory potential (OP) in the electroretinogram (ERG) in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats (DM rats).

Methods : The amplitude of the STR and the OP 3, the implicit time of the STR, and the peak latency of the OP 3 of the DM rats were measured.

Results : No significant differences were observed in the mean amplitude or the mean implicit time of the STR between the control and the DM rats. On the other hand, the mean peak latency of OP 3 of the DM rats was significantly prolonged up to 125% of the control rats ($p < 0.01$), although there were no significant differences between the two groups in the mean OP 3 amplitude.

Conclusions : Although both STR and OP were of inner retinal origin, their behavior was different in DM rats. This result supported some reports describing how dopaminergic amacrine cells generate OP and glycinergic or GABAergic amacrine cells generate STR. In the early stage of diabetic retinopathy, there may be not only minor ischemia but also disorder of neurotransmission of the amacrine cells in the inner retinal layers. (J Jpn Ophthalmol Soc 104 : 775—778, 2000)

Key words : Streptozotocin (STZ), STZ-induced diabetic rats, Electroretinogram, Scotopic threshold response, Oscillatory potential

I 緒 言

糖尿病網膜症では網膜内層由来の電位である律動様小

波(oscillatory potential, OP)が早期から障害される^{1)~4)}ことがよく知られているが,最近では各種の糖尿病モデル動物眼においても,OPが特異的に異常になることが

別刷請求先：020-8505 盛岡市内丸 19-1 岩手医科大学医学部眼科学教室 金子 宗義

(平成 11 年 12 月 27 日受付,平成 12 年 5 月 10 日改訂受理)

Reprint requests to: Muneyoshi Kaneko, M.D. Department of Ophthalmology, Iwate Medical University School of Medicine, 19-1 Uchimaru, Morioka 020-8505, Japan

(Received December 27, 1999 and accepted in revised form May 10, 2000)

確認されている⁵⁾⁶⁾。一方, OPと同様に網膜内層由来の電位として暗所閾値電位(scotopic threshold response, STR)⁷⁾がある。糖尿病網膜症でOPが障害される原因が網膜内層の虚血であるとするならば, STRもまた糖尿病網膜症で異常となると考えられる。この点については, STRはヒトの糖尿病網膜症の障害程度に相関して影響されるとの報告⁸⁾⁹⁾があるが, 糖尿病モデル動物眼におけるSTRの障害の有無は未だ確認されていない。今回ストレプトゾトシン(streptozotocin, STZ)によって誘発した初期糖尿病ラット¹⁰⁾¹¹⁾のSTRを記録し, OPの変化と比較して検討した。

II 実験方法

「視覚および眼科研究における動物の使用についてのARVO宣言(The Association for Research in Vision & Ophthalmology Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research)」に準じて実験動物を扱った。

1. 糖尿病ラット

同胞8週齢の雄成熟白色ラット(Sprague-Dawley rat) (n=5)に, STZ(Sigma, St Louis, MO, 米国)の50 mg/kgを尾に筋注して糖尿病ラットを作製した。糖尿病の診断は血糖値をLifescan meter(Lifescan, Milpitas, 米国)を用いて計測することによって行った。また, 倒像鏡を用いて眼底検査をした。対照として, STZを投与しない同種同週齢の雄ラット(n=5)を用いた。

2. 網膜電図(ERG)の記録方法

ラットを12時間明所, 12時間暗所の環境下で2週間飼育し, ERG測定前に, 12時間暗順応をした。初回麻酔としてキシラジン塩酸塩(セラクター[®])10 mg/kgおよび塩酸ケタミン(ケタラル[®])14 mg/kgを臀部に筋注し, その後はインフュージョンポンプによる両薬剤の右大腿部への筋注によって持続麻酔(0.07 mg/kg/hour)を行った。麻酔後に, 暗赤色光下で以下の作業を行った。自作の固定装置でラットを固定し, 体温維持プレートで体温を36.8℃に保った。瞳孔はミドリンP[®](参天製薬)を, 実験開始約30分前から数回点眼して散瞳した。電極は銀-塩化銀ワイヤー(直径0.1 mm)で, 関電極を両眼の角膜の中央に, 不関電極を両眼の輪部から約1 mm鼻側の強膜上に置いた。接地電極は左側の耳朶につけた。その後, 30分間の前暗順応後に, 刺激として, タングステン-ハロゲンランプによる以下の輝度の白色矩形波光をGanzfeld bowl内で50 msec照射した。輝度を0.3あるいは0.4 log unit間隔のNdフィルタによって, -5.1~2.2 log cd/m²の間の9段階に調光した刺激光によって, 暗順応下でERGを記録した。また, STRは-5.1~-4.1 log cd/m²の刺激輝度による記録をそれぞれ10回加算し, その他の波形の記録は単発刺激とした。1回毎の記録の間隔は3分とした。ERG記録の周波数帯域は0.1~

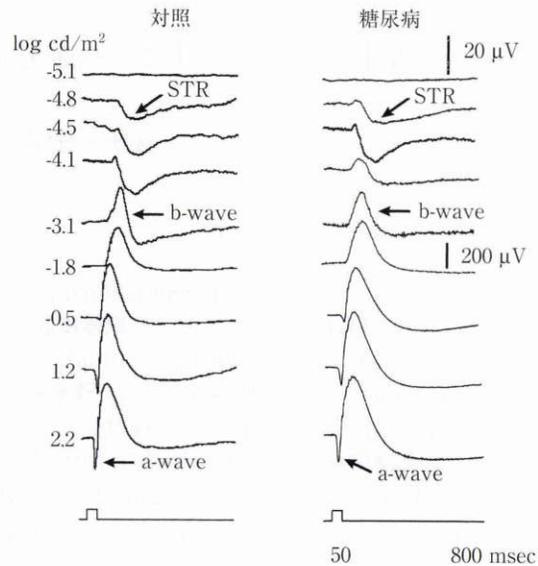


図1 対照と糖尿病ラット(ストレプトゾトシン注入2週後)の網膜電図。

暗所閾値電位(STR)は, 対照と糖尿病ラットとの間で差はない。

対照: 対照ラット, 糖尿病: 糖尿病ラット。

1,000 Hzの範囲とし, その波形から40~100 Hzの電位変動をフーリエの変換式を用いて抽出¹²⁾し, OPの波形を得た。この際に60 Hzのノイズは除去した。

3. 検討項目と有意差検定

STZの投与前と投与2週後にERGを記録し, OPの最大振幅と頂点潜時(peak latency)およびSTRの最大振幅と潜時(implicit time)について検討した。ラットのOPではOP2の振幅が最大であるとの報告¹³⁾があるが, 今回の記録ではOP3の振幅が最大であったので, OP3を検討の対象とした。

有意差検定にはStudent-t検定を行い, $p < 0.01$ を有意差ありとした。

III 結果

1. 糖尿病ラット

対照ラットの血糖値は 76 ± 8 (平均値 \pm 標準偏差, 以下同様)mg/dlであったのに対して, 5匹のSTZ投与ラットの血糖値の平均は, STZ投与2週後に 294 ± 27 mg/dlであり, 初期の糖尿病であると判断した。また, これらのラットの眼底に異常所見はなかった。

2. ERG

対照およびSTZ投与2週後の初期糖尿病ラットのscotopic ERG波形の1例を図1に示した。いずれの群においても刺激光の輝度を-5.1~2.2 log cd/m²にまで順次上げると, STR, b波, OP, a波の順に波形が出現した。また, 対照群とSTZ注入2週後の糖尿病ラット群のSTRの潜時およびOP3の頂点潜時の平均の比較を図2に示した。

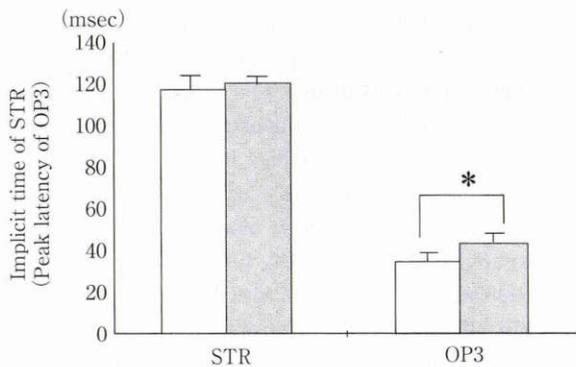


図2 対照群と糖尿病ラット群(ストレプトゾトシン注入2週後)のSTR.

STRの潜時(implicit time)および律動様小波(OP)中OP3の頂点潜時(peak latency). STRの潜時の平均は、対照群と糖尿病ラット群との間で有意差はない. しかし、OP3の頂点潜時の平均は、糖尿病ラット群で有意(*: $p < 0.01$)に延長している. バーは標準偏差を表す.

□: 対照ラット群(n=5) ■: 糖尿病ラット群(n=5)

1) STR

図1に示したように、対照群のSTRは刺激輝度が $-5.1 \log \text{cd/m}^2$ のときには現れず、 $-4.8 \log \text{cd/m}^2$ で出現し始め、 $-4.1 \log \text{cd/m}^2$ のときに振幅が最大となった. STZ投与2週後のSTRは、刺激輝度が $-5.1 \log \text{cd/m}^2$ のときにはみられず、 $-4.8 \log \text{cd/m}^2$ で出現し始め、 $-4.5 \log \text{cd/m}^2$ のときに振幅が最大となった. 両群でさらに刺激輝度を上げていくに従ってSTRはb波に覆われていった. 対象としたそれぞれ5匹のラットのSTRの振幅が最大であったときの振幅値および潜時の平均は、対照群ではそれぞれ $24.0 \pm 4.2 \mu\text{V}$ および $117.6 \pm 2.5 \text{msec}$ で、糖尿病群では $24.0 \pm 4.2 \mu\text{V}$ および $120.6 \pm 3.6 \text{msec}$ であり、いずれも両群間で差がなかった(図1, 2).

2) OP

対照群およびSTZ投与2週後の刺激光が $2.2 \log \text{cd/m}^2$ のときの各1例のOP波形を図3に示した. OP3の最大振幅は刺激光が $2.2 \log \text{cd/m}^2$ のときに記録され、対照群では5眼の平均は $28.0 \pm 2.1 \mu\text{V}$ 、糖尿病群では $30.4 \pm 3.2 \mu\text{V}$ であり、両群間に差はなかった. 頂点潜時は $2.2 \log \text{cd/m}^2$ のとき、対照群および糖尿病群でそれぞれ平均 36.2 ± 1.3 および $45.2 \pm 1.9 \text{msec}$ で、糖尿病群は対照群に比べて125%に延長し、両群間で有意($p < 0.01$)な差があった(図2, 3).

IV 考 按

OPの頂点潜時は糖尿病網膜症が初期の段階から遅延する^{1)~4)}ことが知られている. この理由は、糖尿病網膜症が網膜内層の細小血管障害であり、またOPの発生源が網膜内層に存在するアマクリン細胞である¹⁴⁾¹⁵⁾からである. したがって、糖尿病網膜症が初期の段階(例えば福

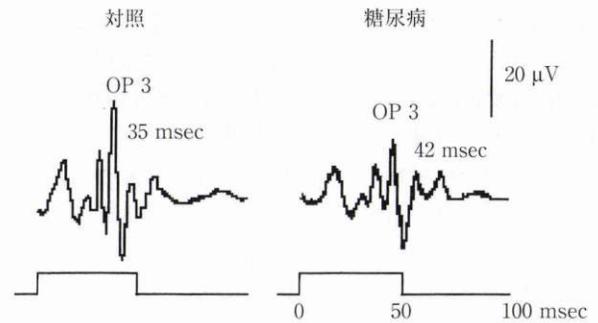


図3 対照と糖尿病ラット(ストレプトゾトシン注入2週後)の律動様小波(OP).

糖尿病ラットでは、OP3の頂点潜時が明らかに延長している.

対照: 対照ラット, 糖尿病: 糖尿病ラット.

田分類のA0)であっても、網膜内層には検眼鏡的に確認できない程度の軽度の循環障害が生じ、アマクリン細胞の機能失調を来し、これがOPの異常として表れると考えられる.

一方、OPの他に、臨床応用が可能な網膜内層電位としてSTRがある. Aylwardら⁸⁾⁹⁾はヒトのSTRの振幅や潜時が糖尿病網膜症の重症度と相関して障害されることを報告しているが、糖尿病モデル動物眼における検討はなされていない. 糖尿病網膜症におけるOPの頂点潜時が遅延する原因が網膜内層の虚血であるとすれば、糖尿病網膜症でOPの頂点潜時が遅延した場合には、同じ網膜内層由来であるSTRにも網膜内層の虚血による影響が及ぶと考えられる. しかし、今回の糖尿病モデル眼においては、OPは異常を呈したが、STRは障害されておらず、Aylwardら⁸⁾⁹⁾の臨床報告とは一致しなかった. 我々と彼らの結果の相違は、ラットとヒトという対象の種差、今回の糖尿病モデルがごく初期であるという罹病歴の差、または暗順応時間の差などが原因であると考えられる.

初期糖尿病モデルでは、網膜内層電位であるSTRとOPとの動向が異なり、STRは障害されなかったことから、糖尿病のごく初期の段階では網膜内層には虚血はほとんど生じていないと考えられる. したがって、初期の糖尿病においてOPの頂点潜時が遅延する機序は、網膜内層の虚血以外の要因が優位に関与している可能性があると考えられる.

アマクリン細胞のうち、OPの発生にはドーパミン作動性アマクリン細胞が⁵⁾⁶⁾¹⁶⁾、STRの発生にはグリシンあるいはGABA作動性アマクリン細胞が関与している¹⁷⁾ことが判明している. また、近年、糖尿病網膜症の初期変化として、ドーパミン作動性神経細胞の機能失調⁶⁾が注目されている. このことから、ごく初期の糖尿病でも網膜内層のドーパミン量が減少し、ドーパミン作動性アマクリン細胞の機能失調によってOPが変化するが、

STRはその発現にドーパミンが関与しないので正常を保つと考えられる。すなわち、今回の結果は糖尿病におけるOPの変化に、ドーパミン作動性神経細胞の機能失調が関与するとの説⁶⁾を支持すると思われる。

今回用いた糖尿病ラットは、網膜内層障害モデルの一つである。しかし、OP 1~4ではそれぞれ発生起源が異なる¹⁵⁾¹⁸⁾¹⁹⁾との報告や、網膜内層由来の電位であるOPは網膜内層の疾患のみならず外層の疾患でも、網膜外層由来の電位よりも選択的に障害される場合がある²⁰⁾²¹⁾との報告もあり、今後さらにOPの動向を詳細に検討するうえで、網膜内層障害モデルや網膜外層障害モデルなどの様々な動物モデルが有用になると考えられる。また、ラット糖尿病網膜症のlight-adapted OPの頂点潜時はdark-adapted OPと比較して遅延しにくい²²⁾との報告、さらに、dark-adapted OPの記録時に白色フラッシュ刺激を用いるとlight-adapted OPの成分が混入することを考えると、ERG記録の際の刺激光も青色光刺激を用いるなど考慮すべき点がある。

STRについても、今回の網膜内層障害モデルである糖尿病ラットおよび白色フラッシュ光を用いた実験では異常を呈さなかったが、今後はOPと同様に、異なる条件下での動態がさらに検討されるべきであると思われる。

STZ誘発糖尿病ラットを提供して下さったPennsylvania大学Erich Lieth先生、ご指導いただいたMichigan大学Paul A. Sieving教授、研究に協力して下さった同大学Kellogg Eye Centerのスタッフの方々に厚く御礼申し上げます。

本論文は第5回日本糖尿病眼学会総会で発表した。

文 献

- 1) 青木辰夫：網膜電図Electroretinogramの臨床的応用。日眼会誌 64:805—810, 1960.
- 2) 都筑幸哉：ERGに現れる律動様小波の臨床的観察。日眼会誌 65:1494—1509, 1961.
- 3) Yonemura D, Tsuzuki K, Aoki T: Clinical importance of the oscillatory potential in the human ERG. Acta Ophthalmol Scand Suppl 70: 115—122, 1962.
- 4) Yonemura D, Aoki T, Tsuzuki K: Electroretinogram in diabetic retinopathy. Arch Ophthalmol 68: 19—24, 1962.
- 5) Shirao Y, Kawasaki K: Electrical responses from diabetic retina. Prog Retin Eye Res 17: 59—76, 1998.
- 6) 河崎一夫, 白尾 裕, 瀬川安則, 浅井宏志, 加藤 要, 西村 彰, 他：視覚における情報処理機構 律動様小波が関与する網膜内情報処理とその異常 糖尿病網膜症を中心に。日眼会誌 102:813—836, 1998.
- 7) Sieving PA, Frishman LJ, Steinberg RH: Scotopic threshold response of proximal retina in cat. J Neurophysiol 56: 1049—1061, 1986.
- 8) Aylward GW: The scotopic threshold response in diabetic retinopathy. Eye 3: 626—637, 1989.
- 9) Aylward GW, Billson FA: The scotopic threshold response in diabetic retinopathy—a preliminary report. Aust NZ J Ophthalmol 17: 369—372, 1989.
- 10) Like AA, Rossini AA: Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: New model of diabetes mellitus. Science 193: 415—417, 1976.
- 11) Rossini AA, Like AA, Chick WL, Appel MC, Cahill GF Jr: Studies of streptozotocin-induced insulinitis and diabetes. Proc Natl Acad Sci USA 74: 2485—2489, 1977.
- 12) van der Torren K, Groeneweg G, van Lith G: Measuring oscillatory potentials: Fourier analysis. Doc Ophthalmol 69: 153—159, 1988.
- 13) Sakai H, Tani Y, Shirasawa E, Shirao Y, Kawasaki K: Development of electroretinographic alterations in streptozotocin-induced diabetes in rats. Ophthalmic Res 27: 57—63, 1995.
- 14) Dowling JE: The Electroretinogram and Glial Responses. The Retina. Harvard University Press, Cambridge, 164—186, 1987.
- 15) 若林謙二, Sieving PA: 暗所閾値電位(Scotopic threshold response: STR). 安達恵美子(編): 眼科MOOK No. 41 視覚電気生理最新の知識。金原出版, 東京, 138—149, 1989.
- 16) Nishimura C, Kuriyama K: Alterations in the retinal dopaminergic neuronal system in rats with streptozotocin-induced diabetes. J Neurochem 45: 448—455, 1985.
- 17) Naarendorp F, Sieving PA: The scotopic threshold response of the cat ERG is suppressed selectively by GABA and glycine. Vision Res 31: 1—15, 1991.
- 18) Yonemura D, Hatta M: Studies of the minor component of the frog's electroretinogram. Jpn J Physiol 16: 11—22, 1966.
- 19) 柳田 隆, 小清水正人, 河崎一夫, 米村大蔵: 微小電極による網膜電図の分析, 律動様小波。日眼会誌 90: 1014—1017, 1986.
- 20) 三宅養三, 栗屋 忍, 柳田和夫, 近藤 俊, 矢ヶ崎克哉, 市川一夫, 他: 黄斑部疾患の基礎と臨床 黄斑部局所ERGの研究。日眼会誌 92: 1419—1449, 1988.
- 21) Miyake Y, Shiroyama N, Ota I, Horiguchi M: Local macular electroretinographic responses in idiopathic central serous chorioretinopathy. Am J Ophthalmol 106: 546—550, 1988.
- 22) Shirao Y, Segawa Y, Higashide T, Kawasaki K, Yamagishi S, Yamamoto H, et al: Biochemical and Electrophysiological Alterations in the OLETF Rat Retina. In: Shima K (Ed): Obesity and NIDDM: Lessons from the OLETF Rat. Elsevier Science Inc. BV, Amsterdam, 129—139, 1999.