

高脂肪食負荷高血圧自然発症ラットにおける眼底網膜への 光輝性物質発生要因の検討(1) (図3)

藤井 正満*・堀江 良一** (* 島根医科大学眼科学教室)
瀬戸川朝一*・家森 幸男** (**島根医科大学病理学教室)

Important Factors for the Appearance of Sparkling Substances in Ocular Fundi of Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats (SHRSP)(1)

Masamitsu Fujii*, Ryoichi Horie**, Tomoichi Setogawa*
and Yukio Yamori**

Department of Ophthalmology* and Pathology**,
Shimane Medical University, Izumo, 693, Japan

要 約

脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (Stroke-prone Spontaneously Hypertensive Rats: SHRSP) において、片側総頸動脈結紮後、高脂肪コレステロール (high-fat-cholesterol: HFC) 食負荷により結紮の反対側眼底に出現する光輝性物質について、その発生要因を検討した。1. 6週齢雄普通食飼育 SHRSP において片側総頸動脈結紮後、結紮群では血圧が非結紮群よりやや高かったが有意差は認められなかった。経過観察中、両群共眼底光輝性物質は認められなかった。2. 6週齢雄 SHRSP において結紮後、HFC 食投与群でも血圧はやや上昇したが普通食結紮群に比べ軽度であった。血漿総コレステロール値は、HFC 食結紮群では HFC 食投与後1週から4週まで高値を示し普通食結紮群との間に有意差を認めた ($p < 0.01$)。眼底光輝性物質は、HFC 食結紮群のみにおいて40%に出現し普通食結紮群には全く認められなかった。3. 6週齢ウイスター京都ラット (Wister-Kyoto Rats: WKY) において結紮後、血圧の上昇は HFC 食群、普通食群共上記 SHRSP の場合に比し軽度であったが、血漿総コレステロール値は HFC 食群では、投与後1週から4週まで高値を示し普通食群との間に有意差を認めた ($P < 0.01$)。しかし眼底光輝性物質は両群共全く認められなかった。以上の結果より、眼底光輝性物質の発生要因として、SHRSP における高血圧と高コレステロール血症の合併が重要である事が示唆された。(日眼 92: 876—882, 1988)

キーワード：眼底光輝性物質，脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP)，片側総頸動脈結紮，高血圧，高コレステロール血症

Abstract

It was reported that sparkling substances were observed in contralateral ocular fundi of high-fat-cholesterol (HFC) diet loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP) when their common carotid arteries were ligated. In the present study, the effects of common carotid unligation, hypercholesterolemia and hypertension on the appearance of sparkling substances in ocular fundi of rats were investigated. Five male SHRSP were fed a standard diet (Funahashi SP diet) with tap water for 5 weeks after unligation of the common carotid arteries at the age of 6 weeks. Five age-matched

別刷請求先：693 出雲市塩治町89-1 島根医科大学眼科学教室 藤井 正満 (昭和63年2月4日受付)

Reprint requests to: Masamitsu Fujii, M.D. Dept. of Ophthalmol., Shimane Medical Univ.

89-1 Enya-cho, Izumo 693, Japan

(Accepted February 4, 1988)

SHRSP were used as controls without ligation. From 1 week to 5 weeks after the ligation, blood pressure measured by an indirect method (Tail-pulse pickup method) seemed to increase, but no significant differences were observed between the ligated and non-ligated groups. Sparkling substances were not observed in ocular fundi of either group. Five male SHRSP were fed an HFC diet with 1% sodium chloride in their drinking water for 4 weeks after uniligation of the common carotid arteries at the age of 6 weeks. As controls, 5 age-matched SHRSP were fed on a standard diet with tap water for drinking after a similar ligation. Blood pressure in HFC group increased, while they were lower than those in standard diet group. Plasma total cholesterol levels measured by the enzymic method were significantly higher in the HFC group than in the standard diet group from 1 week to 4 weeks after HFC diet loading ($p < 0.01$). Sparkling substances in ocular fundi were observed only in the HFC group (40%). In contrast, they were never observed in standard diet group. Five male Wista-Kyoto rats (WKY) were fed on HFC diet with 1% sodium chloride in their drinking water for 4 weeks after uniligation of the common carotid arteries at the age of 6 weeks. As controls, 5 age-matched WKY were fed on a standard diet with tap water for drinking after a similar ligation. A slight increase in blood pressure within the normal range was observed in both groups. Plasma total cholesterol levels were significantly higher in the HFC group than in the standard diet group ($p < 0.01$). Sparkling substances in ocular fundi, however, were not observed in any WKY rats. These results suggested that hypertension and hypercholesterolemia as well as carotid ligation were important factors for the appearance of sparkling substances in ocular fundi of SHRSP after uniligation of the common carotid arteries, although further analysis of vasoconstriction in contralateral retinal arterioles of SHRSP should be performed. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 876—882, 1988)

Key words: Sparkling substances in ocular fundi, Stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP), Uniligation of common carotid artery, Hypertension, Hypercholesterolemia

I 緒 言

高血圧自然発症ラット (Spontaneously Hypertensive Rats: SHR¹⁾) は、自然に高血圧を発症し、ヒト本態性高血圧のモデル動物として広く研究されている。また、1974年にこの SHR から分離された脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (Stroke-prone Spontaneously Hypertensive Rats: SHRSP²⁾³⁾) は、脳卒中モデルとして研究されてきた。

Yamori⁴⁾ は、高血圧性血管性病変の成立機転を分析する研究において、SHR の亜系に高脂肪コレステロール食 (high-fat-cholesterol diet: HFC diet) を投与する事によって、反応性高脂血症下に 1~2 週という短期間で腸間膜動脈に脂肪沈着が生じる事実を見出した。さらに SHRSP では脳動脈への脂肪沈着も生じる事実を報告した⁵⁾。しかし SHRSP において脳動脈、腸間膜動脈と共に観察された網膜動脈においては全く脂肪沈着を生じないと報告され⁶⁾⁷⁾、その後の追試においても同様の結果が得られた⁸⁾。

この脳動脈と網膜動脈の違いは、高血圧に基づく虚血に対する血管反応性の差 (血管透過性亢進の差) に

起因する事が示唆されたため、両者の違いを明らかにする目的で SHRSP の片側総頸動脈を結紮し慢性虚血下における脳動脈と網膜動脈の血管透過性亢進の差を検索した⁹⁾。

その結果、SHRSP では片側総頸動脈結紮後、同側の網膜血管拡張と反対側の狭細が認められ、さらに、新しい事実として、HFC 食負荷例では結紮の反対側眼底に光輝性物質が出現する事が見出された。また、この光輝性物質が認められた眼球の網膜をズダン染色し網膜伸展標本を光顕下に観察すると、網膜内脂肪沈着が毛細血管付近に多数認められた。

この眼底光輝性物質 (網膜内脂肪沈着) の発生機序については、先の研究⁹⁾においてラットにおける網膜栄養血管を明らかにし、結紮による血行動態変化の観点から考察した。すなわち、SHRSP では片側総頸動脈結紮により同側 Carotid Sinus の血管内圧が低下し、これに伴う Carotid Sinus reflex のため反対側内頸動脈とその末梢側の網膜血管内圧が亢進し、結紮の反対側眼底では血管内圧亢進に伴う Bayliss 反射のため網膜動脈が狭細したと考えた。その結果、網膜動脈から末梢側の血管は虚血に陥り血管透過性が亢進するた

め、HFC食投与群では、血中の過剰な脂質が漏出し網膜内に沈着したと考えられた。

本稿においてはさらに検索を進め、ラット眼底網膜における光輝性物質について、その発生要因と考えられる①片側総頸動脈結紮、②高コレステロール血症、③高血圧について検討したので報告する。

II 方 法

対象は、島根医科大学病理学教室において、嚴重に系統維持管理されているSHRSP (F₆₉₋₇₀, A₃ strain)の雄20匹およびウィスター京都ラット (Wister-Kyoto Rats: WKY)の雄10匹である。

実験方法は以下の通りである。

1. SHRSPにおける片側総頸動脈結紮の影響

6週齢雄SHRSP (F₇₀, A₃ strain) 10匹を用い、うち5匹に対しPentobarbiturate 13mg/kg腹腔内麻酔 (Somnopentyl® 0.2ml/kg)を行い、併走する上頸神経節、迷走神経などの神経および頸動脈洞を損傷しないように片側総頸動脈を露出し、5号絹糸にて外頸動脈分岐部から3~4mm心臓側で総頸動脈を結紮し結紮群とした。残り5匹は手術はせず非結紮群とし、両群とも普通食 (船橋 SP diet) と普通飲水にて5週間飼育した。連日無麻酔下に眼底撮影 (コーワ RC II型)を行い、術前から1週毎に体重、血圧 (間接法¹⁰)を測定した。また、1週毎に24時間絶食後尾静脈から採血し血漿総コレステロール値 (酵素法)を測定し、体重、血圧と共にt検定により各週における両群の値を比較した。

全てのラットは、結紮後5週において体重、血圧測定後24時間絶食しPentobarbiturate 26mg/kg腹腔内麻酔 (Somnopentyl® 0.4ml/kg)下に開腹後下大静脈より採血し、その後腹部大動脈カニューレを挿入し生食 (38°C, 200ml)にて、麻酔前最終血圧を保ちながら眼球を灌流した。眼球は摘出後角膜、水晶体および硝子体を除去して眼杯とし10%ホルマリン溶液中に固定した。眼杯は3カ所を切開しSudan III (Sigma)染色後網膜のみを剥離してスライドガラス上に伸展し、実体顕微鏡および光学顕微鏡下に観察した。

2. ラット片側総頸動脈結紮後 HFC食負荷による影響

(1) SHRSPにおける影響

6週齢雄SHRSP (F₆₉, A₃ strain) 10匹の全例に対し、Pentobarbiturate 13mg/kg腹腔内麻酔 (Somnopentyl® 0.2ml/kg)後、上記と同様の方法で片側総

頸動脈を結紮した。結紮後1週まで普通食 (船橋 SP diet)と普通飲水にて飼育し、結紮後1週から2群に分け、5匹にHFC食 (20% suet, 5% cholesterol, 2% cholic acid 含)と1%食塩水を投与し (HFC食群)、残り5匹には普通食と普通飲水を与え (普通食群) 4週間飼育した。連日無麻酔下に眼底撮影 (コーワ RC II型)を行い、術前から1週毎に体重、血圧 (間接法¹⁰)を測定した。また術前から1週毎に24時間絶食後尾静脈からの採血により血漿総コレステロール値 (酵素法)を測定し体重、血圧と共にt検定により各週における両群の値を比較した。

全てのラットは、結紮後5週 (HFC食負荷後4週)において体重、血圧測定後24時間絶食し、上記と同様に麻酔し採血後生食にて腹部大動脈カニューレから眼球を灌流した。さらに、上記と同様の方法で眼杯を作成し、Sudan染色後網膜伸展標本を実体顕微鏡および光学顕微鏡下に観察した。

(2) WKYにおける影響

6週齢雄WKYの10匹を用い、全例に対し(1)と同様に麻酔後片側総頸動脈を結紮し、結紮後1週まで普通食 (船橋 SP diet)と普通飲水にて飼育し、結紮後1週からHFC食群と普通食群に分け4週間飼育した。連日無麻酔下に眼底撮影を行い(1)と同様、1週毎に体重、血圧、血漿総コレステロール値を測定しt検定により両群を比較した。

全てのラットは、結紮後5週 (HFC食負荷後4週)において体重、血圧測定後(1)と同様に麻酔し、採血後生食にて腹部大動脈カニューレから眼球を灌流した。さらに眼杯を作成しSudan染色後網膜伸展標本を実体顕微鏡および光学顕微鏡下に観察した。

III 結 果

1. SHRSPにおける片側総頸動脈結紮の影響 (Fig. 1)

体重については、結紮群と非結紮群の間に統計学的有意差は認められなかった。血圧は、両群共成長につれて増加し、結紮群は非結紮群に比べ術後1週から4週にかけてやや高い傾向にあったが、有意差は認められなかった。

血漿総コレステロール値は、両群共成長につれて低下したが、経過観察中両群間に有意差は認められなかった。

眼底においては光輝性物質は両群共全く認められず、眼球摘出後の網膜伸展標本の観察でも脂肪沈着は

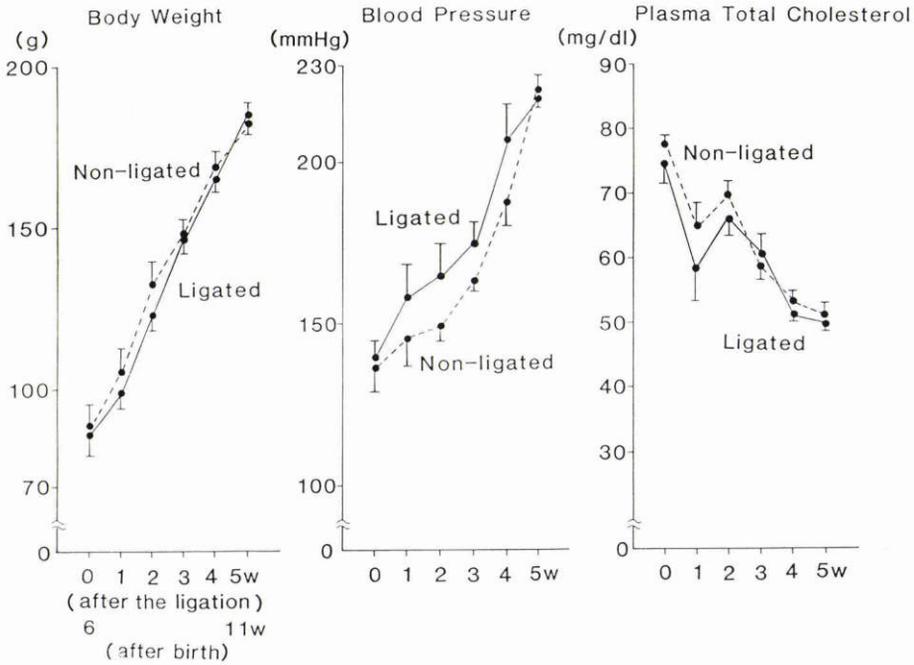


Fig. 1 Changes in Body Weight, Blood Pressure and Plasma Total Cholesterol in male SHRSP (F70, A3 strain) with or without Common Carotid Artery Ligation. — a standard diet—Ligated: Common carotid artery ligated group (n=5), Non-ligated: Non-ligated group (n=5)

全く認められなかった。

2. ラット片側総頸動脈結紮後 HFC 食負荷による影響

(1) SHRSP における影響 (Fig. 2)

体重については、HFC 食群は普通食群に比べ体重増加は軽度であり、HFC 食投与後 2 週から 4 週まで統計学的有意差を認めた (P<0.01)。

血圧は、HFC 食群は HFC 食投与後 1 週間はあまり上昇せず、以後普通食群とはほぼ平行して上昇した。HFC 食投与後 3 週まで有意差は認められず、HFC 食投与後 4 週では両群間に有意差が認められた (HFC 食群 179±4, 普通食群 216±5, M±SEmmHg, P<0.01)。

血漿総コレステロール値は、HFC 食群では HFC 食投与後 1 週から著明に増加したが普通食群では上記 1 と同様に漸減し、1 週後 (HFC 食群 363.5±42.3, 普通食群 63.8±2.8mg/dl) から 4 週後 (同 429.3±61.6, 54.9±4.7mg/dl) まで両群間には有意差が認められた (P<0.01)。

眼底光輝性物質は、HFC 食群においてのみ結紮の反

対側眼底に出現し (出現率 40%) その出現時期は最も早い例で HFC 食投与後 4 日 (結紮後 11 日) であった。また網膜内脂肪沈着は、眼底光輝性物質が観察された眼球においてのみ認められた。しかし普通食群では、眼底光輝性物質および網膜内脂肪沈着は全く認められなかった。

(2) WKY における影響 (Fig. 3)

体重については、HFC 群は普通食群に比べ HFC 食投与開始後 1 週から増加がやや軽度であったが、全経過を通じて統計学的有意差は認められなかった。

血圧は、HFC 群は普通食群に比べやや低く HFC 食投与後 2, 3 週において有意差が認められた (P<0.05) が 4 週では差はなかった。

血漿総コレステロール値は、HFC 食群では HFC 食投与後 1 週から高値を示し (HFC 食群 210.9±20.4, 普通食群 80.9±3.4mg/dl) 4 週まで普通食群との間に有意差が認められた (P<0.01)。

眼底光輝性物質および網膜内脂肪沈着は、HFC 食群普通食群共全く認められなかった。

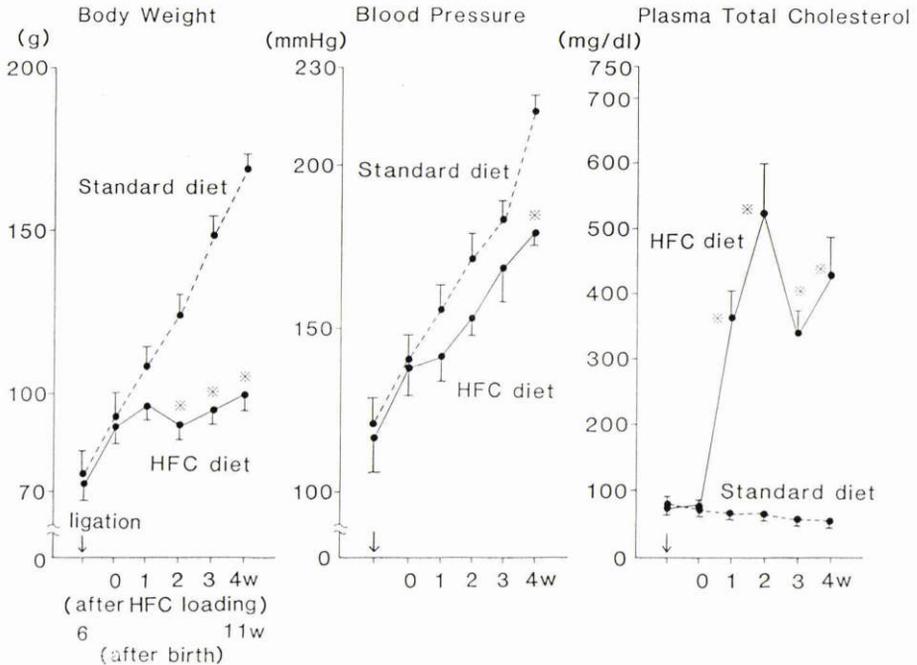


Fig. 2 Changes in Body Weight, Blood Pressure and Plasma Total Cholesterol in male SHRSP (F69, A₃ strain) fed on a standard diet or HFC diet after Common Carotid Artery Unligation. Standard diet : Standard diet group (n=5), HFC diet : High-fat-cholesterol diet group (n=5). *Significant differences from standard diet group (p<0.01)

IV 考 按

SHRSP では、片側総頸動脈結紮後、結紮側の網膜血管拡張と反対側の血管狭細を認め、さらに、HFC 食負荷により術後 3 週から結紮の反対側眼底に光輝性物質を高頻度（7 匹中 6 匹、出現率 85.7%）に認め、網膜伸展標本ではズダン陽性の網膜内脂肪沈着が観察された⁹⁾。本研究においては、眼底光輝性物質の発生要因について、①片側総頸動脈結紮、②高コレステロール血症、③高血圧との関連性を検討した。

実験 1 では、普通食飼育 SHRSP における①片側総頸動脈結紮について検討した。その結果、統計学的有意差は認められなかったが、結紮後 1～4 週において結紮群の血圧が非結紮群に比べやや高くなり、結紮後の Carotid sinus reflex の影響が考えられた。しかし、眼底光輝性物質は全く認められず、普通食飼育 SHRSP の片側総頸動脈結紮だけでは光輝性物質の発生要因とはなり得なかった。

次に、実験 2 では（1）SHRSP と（2）WKY を用

いて①片側総頸動脈結紮②高コレステロール血症③高血圧の影響を検討した。

（1）SHRSP では、片側総頸動脈結紮後 HFC 食を負荷すると、すでに報告されているように¹¹⁾¹²⁾、著しい高コレステロール血症を示し、また血圧は HFC 食群では普通食結紮群に比べその上昇程度は軽度であった。眼底光輝性物質は、HFC 食結紮群のみに 5 匹中 2 匹に認められ（出現率 40%）、前報⁹⁾（同 85.7%）に比べ出現頻度がやや低かった。その差については、今後例数を増し再検討する。

以上の結果から、高血圧の SHRSP では①片側総頸動脈結紮②高コレステロール血症の存在下に眼底光輝性物質が出現する事が確認された。

次に、WKY を用いて同様の実験を行い③高血圧の必要性について検討した。

（2）WKY では、①片側総頸動脈結紮により血圧はやや上昇したが、SHRSP に比べ軽度であった。血漿総コレステロール値は、HFC 食投与後 1 週から上昇し普通食結紮群に比べ統計学的有意差を認めたが、眼底光

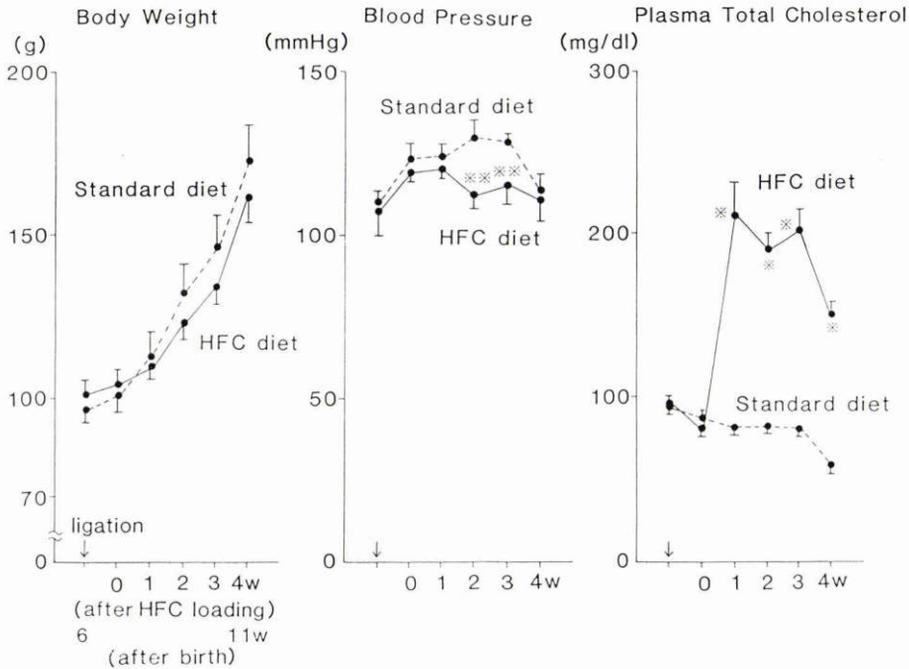


Fig. 3 Changes in Body Weight, Blood Pressure and Plasma Total Cholesterol in male WKY fed on a standard diet or HFC diet after Common Carotid Artery Uniligation. Standard diet: Standard diet group (n=5), HFC diet: High-fat-cholesterol diet group (n=5). ***Significant differences from standard diet group (p<0.01, p<0.05)

輝性物質は全く認められなかった。このため光輝性物質の発生には①片側総頸動脈結紮②高コレステロール血症に加え、SHRSPにおける③高血圧の存在が必要である事が示された。

本実験系において、HFC食の持続投与により慢性的に増加する外因性の血中脂質は、indicatorの一時的な血中投与とは異なり、結紮後の網膜血管透過性亢進により漏出した血中成分を結果的に眼底光輝性物質として肉眼的に観察しうる点から、生体下に観察できる一種のトレーサーと解釈される。また、その透過性亢進部位は、Barium Contrastred Sudan Staining method (BCSS法, Yamoriら, 1975⁹⁾)に従って検索すると網膜毛細血管である可能性が示唆されており⁹⁾、肉眼的には特に変化は認められないが、普通食群においても、結紮により反対側眼底の血管透過性が亢進し他の血中成分が網膜内に漏出している可能性が考えられる事から、各種トレーサーを用いてさらに詳細に検討する必要がある。

③ 高血圧については、今回遺伝的高血圧素因をもつ

SHRSPを用いたが、眼底光輝性物質出現に必要な高血圧が遺伝性か非遺伝性かという点についても検討する必要がある。

本稿においては、眼底光輝性物質の発生要因として、SHRSPにおける高血圧と高コレステロール血症の合併の重要性を示した。しかしながら、眼底光輝性物質の発生要因についてはさらに解決すべき点が残されており引き続き検索中である。

文 献

- 1) Okamoto K, Aoki K: Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. Jap Circ J 27: 282—293, 1963.
- 2) Yamori Y, Nagaoka A, Okamoto K: Importance of genetic factors in stroke: An evidence obtained by selective breeding of stroke-prone and resistant SHR Jap Circ J 38: 1095—1100, 1974.
- 3) Okamoto K, Yamori Y, Nagaoka A: Establishment of stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHR). Circ Res 34: 143—153, 1974.

- 4) **Yamori Y**: Metabolic pathology of vasculatures in hypertension and vascular lesions in spontaneously hypertensive rats. *Tr Soc Pathol Jap* 63: 226—227, 1974.
- 5) **Yamori Y, Horie R, Otsubo K**, et al: Studies on stroke in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP). (II) Cerebrovascular fat deposition and cerebrovascular permeability. *Jap Heart J* 16: 332—335, 1975.
- 6) **Yoshida M, Horie R, Akiguchi I**, et al: Relationship between arterial lesions of the retina and the brain in stroke-prone SHR (SHRSP). *Jap Heart J* 19: 612—614, 1978.
- 7) **Yoshida M, Horie R, Yamori Y**, et al: Essential difference in pathogenesis of arteriosclerosis and atherosclerosis in the retinal arteries and other arteries. *Jpa. Heart J* 20: 725, 1979.
- 8) **藤井正満, 堀江良一, 瀬戸川朝一**: 高脂肪食負荷高血圧自然発症ラットにおける眼底網膜への光輝性物質の出現とその機序. (1)網膜動脈と脳動脈および腸間膜動脈の粥状硬化性病変. *日眼* 92: 557—564, 1988.
- 9) **藤井正満, 堀江良一, 瀬戸川朝一**: 高脂肪食負荷高血圧自然発症ラットにおける眼底網膜への光輝性物質の出現とその機序. (2)片側総頸動脈結紮による網膜の変化. *日眼* 92: 619—631, 1988.
- 10) **Yamori Y, Tomimoto K, Ooshima A**, et al: Developmental course of hypertension in the SHR-substrains susceptible of hypertensive cerebrovascular lesions. *Jap Heart J* 15: 209—210, 1974.
- 11) **Yamori Y, Horie R, Ohtaka M**, et al: Hypertension, stroke and atherogenesis in experimental models. *Atherosclerosis IV* Schettler CG, Goto Y, Hana, Y & Klose G, eds, p79. Springer-verlag, Berlin/Heidelberg/New York, 1979.
- 12) **Horie R**: Studies on stroke in relation to cerebrovascular atherogenesis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP). *Arch Jap Chir* 46: 191—213, 1977.