ストレプトゾトシンによる糖尿病モルモットにおける網脈絡膜の金属動態とアスコルビン酸の影響について

中島 裕美[1)]，八木橋 修[1)]，加島 陽二[1)]，石川 弘[1)]，北野 周作[1)]
木許 一良[2)]，冨岡恵知子[2)]，間野 素子[2)]，竹内 重雄[2)]
[1)]日本大学医学部眼科学教室，[2)]同 化学教室

要 約

糖尿病下での網脈絡膜に対するアスコルビン酸の働きを知る目的で，モルモットにストレプトゾトシン(STZ)を用いて糖尿病を発症させ，これにアスコルビン酸欠乏状態を作成し，網脈絡膜の微量金属量，superoxide dismutase 活性，および過酸化脂質量を測定した．網脈絡膜の微量金属動態は，STZ を投与することにより一時的に亜鉛，マグネシウム値が上昇し，この状態からアスコルビン酸欠乏に陥ると逆に著明に低下することがわかった．すなわち，糖尿病では，アスコルビン酸欠乏により微量金属動態に著しい変化が起こることが認められ，糖尿病における網脈絡膜障害の発生にアスコルビン酸が大いに関与していることが示唆された．しかし，この条件下では，過酸化脂質は網脈絡膜にはほとんど影響を及ぼしていないことが予想された．(日眼会誌 97：340—345，1993)

キーワード：微量金属，過酸化脂質，アスコルビン酸，糖尿病，網脈絡膜

Effects of Ascorbic Acid on Trace Element Metabolism in the Choroid-Retina of Streptozotocin-induced Diabetic Guinea Pigs

Hiromi Nakajima[1)], Osamu Yagihashi[1)], Youji Kashima[1)], Hiroshi Ishikawa[1)], Shuusaku Kitano[1)], Ichirou Kimoto[2)], Echiko Tomioka[2)], Motoko Mano[2)] and Shigeo Takeuchi[2)]
[1)]Department of Ophthalmology, [2)]Department of Chemistry, School of Medicine, Nihon University

Abstract

In order to investigate the effect of ascorbic acid on trace element metabolism in the choroid-retina, experimental diabetes mellitus was induced in Hartley guinea pigs with intraperitoneal injection of streptozotocin. After 4 weeks, ascorbic acid-deficient feed was given for 3 weeks. Trace elements of the choroid-retina were measured with inductively-coupled plasma emission spectrometry. The activity of superoxide dismutase and lipid peroxide content also were measured. The results indicated that zinc and magnesium increased in diabetes mellitus. However, with ascorbic acid deficiency in diabetes mellitus, zinc and magnesium significantly decreased. On the other hand, the activity of superoxide dismutase showed no change between either condition and lipid peroxide content decreased under ascorbic acid deficiency in diabtes mellitus. These findings suggested that ascorbic acid played an important role in chorioretinal damage of diabetes mellitus. However, it was also suggested that lipid peroxide has little influence on the choroid-retina under these conditions. (J Jpn Ophthalmol Soc 97 : 340—345, 1993)

Key words : Trace elements, Lipid peroxide, Ascorbic acid, Diabetes mellitus, Retina and choroid

別刷請求先：173 板橋区大谷口上町 30—1 日本大学医学部眼科学教室 中島 裕美
(平成 4 年 1 月 31 日受付，平成 4 年 8 月 19 日改訂受理)
Reprint requests to: Hiromi Nakajima, M.D. Department of Ophthalmology, School of Medicine Nihon University. 30-1 Ōyaguchikami-machi, Itabashi-ku, 173, Japan
(Received January 31, 1992 and accepted in revised form August 19, 1992)

I 緒　言

従来より，生体に亜鉛を主とする微量金属が必要であることは知られていたが，その動態については現在でも不明な点が多い．糖尿病においても全身的には亜鉛やクロムの異常動態の関与が報告されているが[1)~3)]，糖尿病下での眼球の金属動態の報告は少ない．我々[4)]は，Insulin 依存型自然発症糖尿病マウスである NOD マウスを用いて，網脈絡膜や水晶体の微量金属が低下することを示し，金属代謝の異常からも白内障や網膜症などの眼合併症が発生しやすいことを報告した．一方，アスコルビン酸は，生体の酸化還元系や微量金属動態に重要な役割を果たしていることが知られており，特にアスコルビン酸が欠乏すると血清亜鉛の著明な低下が引き起こされることから，各種の病態への関与が予想される[5)]．

今回我々は，糖尿病下での網脈絡膜に対するアスコルビン酸の働きを知る目的で，モルモットの腹腔内に streptozotocin（STZ）を投与して糖尿病状態を作成し，その後アスコルビン酸欠乏状態にした時の網脈絡膜の微量金属値を測定した．さらに，網脈絡膜の superoxide dismutase（SOD）活性と過酸化脂質値も同時に測定したので報告する．

II 対象と方法

対象は，体重 260 g 前後（平均体重：260±11 g）の雄 Hartley 系モルモットを用いて，STZ のみを投与した群，STZ を投与しアスコルビン酸欠乏状態にした群，アスコルビン酸欠乏状態のみの群，および対照群の4群をそれぞれ15匹ずつ作成した．

飼育方法は，図1に示すように，まず STZ 投与群ではモルモットの腹腔内に STZ 180 mg/kg を注射したのち，日本クレア製モルモット標準飼料 CG 7 にて4週間飼育した．Glucose oxidase を用いたテープ法によりデキストロメーターで血糖を測定し，糖尿病状態（400 mg/100 ml）にあることを確認した後，オリエンタル酵母工業製モルモット用アスコルビン酸欠乏飼料を3週間投与した．アスコルビン酸欠乏を行わない群は，このアスコルビン酸欠乏飼料に 150 mg/100 g のアスコルビン酸を添加した対照飼料で同じく3週間飼育した．STZ 非投与群は，4週間日本クレア製モルモット標準飼料 CG 7 で飼育後，3週間オリエンタル酵母工業製モルモット用アスコルビン酸欠乏飼料を与えた群とこれにアスコルビン酸 150 mg/100 g を添加した

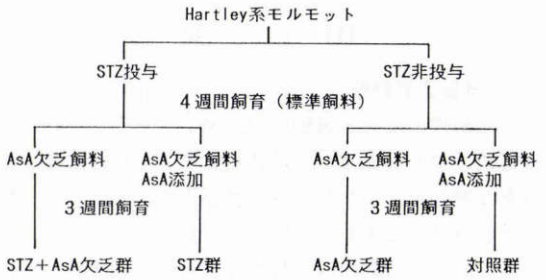

図1　実験系の作成方法．
STZ：ストレプトゾトシン　AsA：アスコルビン酸

対照飼料を与えた群に分類した．なお，飼育に際しては，pair feeding により一定量の飼料と除菌フィルターを通した水道水を飲料水として与えた．各群の平均体重は，STZ のみを投与した群は 349±32 g，STZ を投与後アスコルビン酸欠乏状態にした群 265±30 g，アスコルビン酸欠乏状態のみの群 325±44 g，および対照群 344±27 g であった．

モルモットをエーテル麻酔下で採血後脱血屠殺し，眼球を摘出後，実体顕微鏡下で網脈絡膜を分離した．分離した網脈絡膜は生理的食塩水で洗浄脱血し，直ちに無イオン水にて素早く洗浄し，水分を濾紙で取り除いた後，直示電子天坪で湿重量を測定した．微量金属の測定は，網脈絡膜を脱イオン処理した Pyrex 製ボート上で一定量秤量し，70℃で乾燥後，plasma asher（ヤマト製）にて 500 W，24 時間低温灰化を行った．灰化残物を 0.2 ppm のベリリウムを含む 0.05 N 塩酸に溶解し，日立 ICP 発光分析機 306 による内部標準同時測定法[6)]にて測定した．さらに，一定量秤量した組織を生理的食塩水にてホモジェナイズして，SOD 活性測定用と過酸化脂質測定用に二分した．SOD 活性は xanthine oxidase 法の今成[7)]の改良法で測定し，試料サンプルサイズから絶対値で表すのが適当と考え，NBT の消費量すなわち 1 μmol/min を 1 unit として表した．さらに，この反応系に最終濃度 10^{-3}M の KCN を添加して Mn-SOD 活性値を測定したが検出されなかったため，得られた SOD はすべて Zn-Cu-SOD であることが確認された．過酸化脂質は八木法[8)]による和光純薬製テストワコーを用いて測定した．なお，すべての測定は，1匹1検体では微量のため測定限界を越えるものもあることから，3匹を1群としてそれぞれ5群について測定した．さらに，各群の有意差の検定は Student t 検定で行った．

III 結 果

1. 微量金属動態

網脈絡膜の微量金属動態は，図2に示すように，まず亜鉛は対照群に対し，STZ投与のみを行った群では有意な増加を示したが，STZ投与下でアスコルビン酸欠乏状態にすると有意に低下を示した．また，アスコルビン酸欠乏状態のみの群では，対照群と比較してわずかに増加していた．

次にマグネシウムは，対照群に対し，STZ投与のみを行った群では有意な増加を示したが，STZ投与下でアスコルビン酸欠乏状態にすると有意に低下を示した．また，アスコルビン酸欠乏状態のみの群では，対照群と比較して変化はなかった．

これに対しマンガンは，対照群に対し，STZ投与のみを行った群では逆に低下を示したが，STZ投与下でアスコルビン酸欠乏状態にすると有意に増加を示した．しかし，アスコルビン酸欠乏状態のみの群では，対照群と差はなかった．

また，銅は，対照群に対し，STZ投与のみを行った群とSTZ投与下でアスコルビン酸欠乏状態にした群では変化はなく，アスコルビン酸欠乏状態のみの群のいずれの群の間にも有意差は認められなかった．

2. SOD活性

網脈絡膜のSOD活性は，図3に示すように，対照群，STZ投与のみを行った群，アスコルビン酸欠乏状態のみの群，STZ投与下でアスコルビン酸欠乏状態にした群のいずれの群の間にも有意差は認めなかった．

3. 過酸化脂質

網脈絡膜の過酸化脂質は，図4に示すようにSTZ投与のみを行った群，アスコルビン酸欠乏状態のみの群と両者とも対照群対し有意に低下していた．そして，STZ投与下でアスコルビン酸欠乏状態にした群でも，これら2群よりもさらに有意な低下を示した．

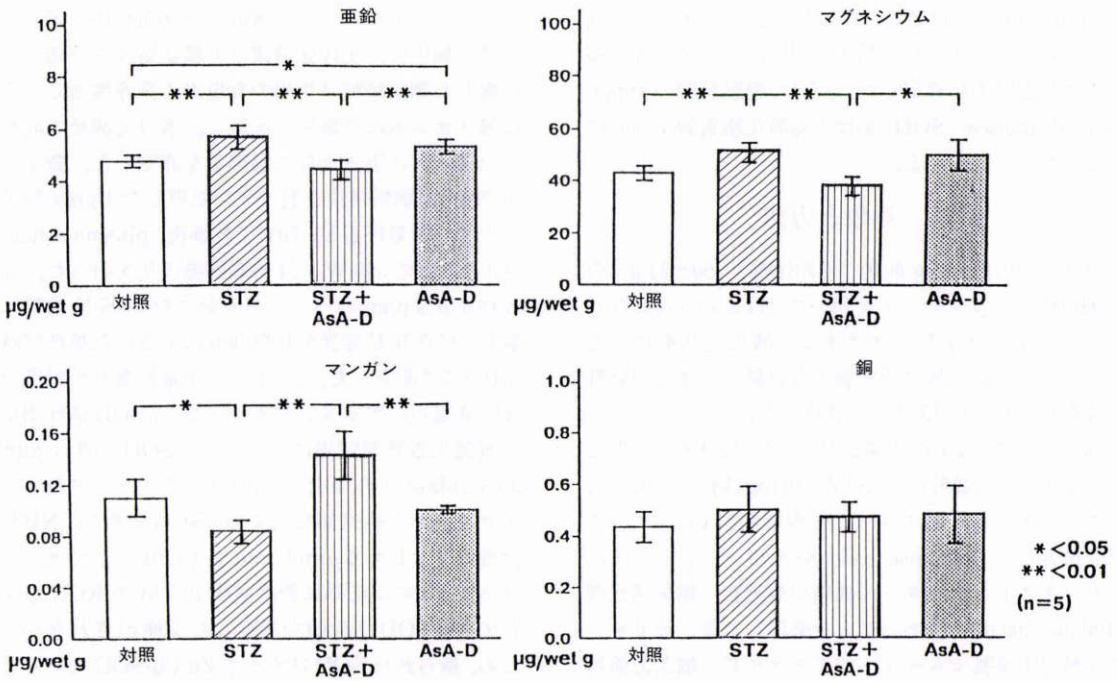

図2 網脈絡膜の主な金属量．

STZ+AsA-D：STZ投与後4週間標準飼料で飼育後，アスコルビン酸欠乏飼料を3週間与えた群．
STZ：STZ投与後4週間標準飼料で飼育後，3週間アスコルビン酸欠乏飼料にアスコルビン酸を添加して与えた群．
AsA-D：標準飼料で4週間飼育後，アスコルビン酸欠乏飼料を3週間与えた群．
対照群：標準飼料で4週間飼育後，3週間アスコルビン欠乏飼料にアスコルビン酸を添加して与えた群．
3匹を1群とし，それぞれ5群について測定した．平均値±標準偏差．

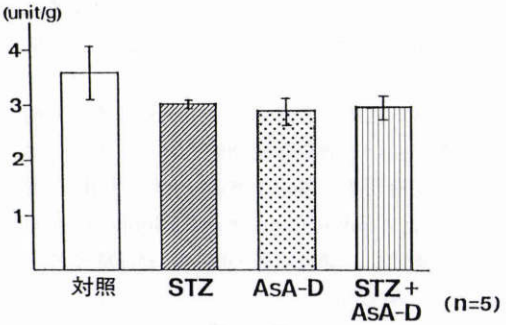

図3　網脈絡膜のSOD活性.
平均値±標準偏差.

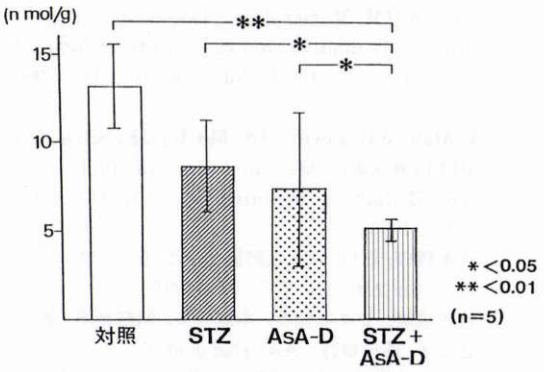

図4　網脈絡膜の過酸化脂質量.
平均値±標準偏差.

IV 考　按

従来より，生体と微量金属の関係に関する報告は種々なされてきたが，眼球についての報告は少ない．しかし，近年，測定方法の進歩により眼球各組織における微量金属の定量も行われるようになった[9)10)]．亜鉛は人眼中に多く含まれ，とくに網脈絡膜での亜鉛濃度は生体各組織中最も高値を示すことが報告されている[11)]．そして，亜鉛がalcohol dehydrogenaseのcofactorとして働いているなど，網膜でも大きな役割を担っていることが述べられてきた[12)]．今回，Hartley系モルモットにSTZを投与して糖尿病状態を発生させ，更にアスコルビン酸欠乏状態にした時の網脈絡膜の微量金属動態，SOD活性，および過酸化脂質値を測定した結果について考察した．

まず，微量金属とマグネシウムの動態について検討した．網脈絡膜では，STZを投与すると亜鉛，マグネシウムともに有意に増加したが，その後アスコルビン酸欠乏状態になると逆に亜鉛，マグネシウムは著明に低下した．これに対し，マンガンでは，STZ投与後アスコルビン酸欠乏状態下では有意に増加していることが認められた．最初に，STZの投与により一時的に亜鉛とマグネシウムが増加した理由について考えてみた．我々[4)]は，インスリン依存型自然発生糖尿病マウス（NODマウス）を用いて水晶体と網脈絡膜の金属量の測定結果を報告したが，亜鉛，マグネシウムはいずれの組織でも減少し，同時に^{65}Znの取り込み率も著明に低下していた．これは慢性障害を発症させる実験であったため，水晶体や網脈絡膜が既に障害状態に陥った状態になっていたものと考察した．これに対し，今回の実験では，同様に慢性障害を発症させる目的で180 mg/kgのSTZを腹腔内に注射したが，亜鉛やマグネシウムが増加した結果から考えるとある程度急性の膵臓障害が引き起こされたことが推察された．このため肝臓などの主要臓器にも障害が及び，これを修復するために皮膚などから亜鉛やマグネシウムが血中に放出され，肝臓などと同様にまだ修復機能が残っている網脈絡膜にも取り込まれる結果，これらの金属の含有量が増加したものと考えた．なお，同時に測定した血清中の亜鉛とマグネシウムは対照群と比較し有意差はないがわずかに減少を示しており[13)]，網脈絡膜を含む各臓器に取り込まれた結果と考えられた．さらに，アスコルビン酸欠乏では血清中に亜鉛やマグネシウムは著明に低下したが[13)]，網脈絡膜では亜鉛がわずかに増加を示す以外，他の金属には変化を認めなかった．しかし，STZ投与下でアスコルビン酸欠乏状態になると，亜鉛やマグネシウムが著明に低下することがわかった．このことから，糖尿病ではアスコルビン酸欠乏により微量金属に著しい変化が起こり，網脈絡膜に障害を及ぼすことが予想された．

次に，このような微量金属の異常動態により，どのような機序で網膜に障害を及ぼす可能性があるかを検討するため，その活性に亜鉛，銅，マンガンが密接に関係している生体防御因子であるSOD活性と，生体障害因子である過酸化物の代表としての過酸化脂質について検討した．最近，多くの疾患の病因として，スーパーオキサイド（O_2^-）などのフリーラジカルによる脂質過酸化反応が考えられ，眼科領域においてもこれらと関連した広範囲な研究がなされている[14)]．過酸化脂質の生成は，スーパーオキサイドを分解させるSODによって抑制されることが知られている[15)]．このSODは，眼内の各組織に存在が確認されており[16)]，光や化学

物質により発生したスーパーオキサイドに対する防御機構として働いていることが予想されている[17]．上田[18]は，糖尿病網膜症の患者の血清過酸化脂質量は正常者より高く，また実験的にもalloxan糖尿ラットの網膜の過酸化脂質量が高い傾向を示すことから，糖尿病網膜症の発生に過酸化脂質が大いに関係していると報告した．門屋[19]も，糖尿病網膜症では過酸化脂質の消去機構におけるSOD活性が障害され，その結果，反応性に富んだフリーラジカルが増加し，これが網膜の不飽和脂肪酸と結びついて過酸化脂質の増加を引き起こすと述べている．これに対し，小沼ら[20]は，糖尿病患者の血清過酸化脂質を測定した結果，過酸化脂質の増量は認められるも糖尿病の重症度や糖尿病網膜症の程度とは相関しないことから，糖尿病網膜症における過酸化脂質の役割に否定的な意見を述べている．菅原ら[21]も，糖尿病性血管障害を有する患者では血漿過酸化脂質が増加していたが，やはり糖尿病網膜症の程度とは相関しないと述べている．さらに新美ら[22]も，血清過酸化脂質が高値を示した症例では糖尿病網膜症も重症であったが，完全には一致していないことから，過酸化脂質が直接網膜血管に作用するのではなく，既に障害された網膜をさらに悪化させるよう働くのではないかと予想している．

今回の我々の結果では，網脈絡膜におけるSOD活性は各群の間でほとんど差が認められなかった．さらに，過酸化脂質量はアスコルビン酸欠乏状態で低下し，特に糖尿病状態下でアスコルビン酸欠乏にするとこの低下が著明であった．最初に，SOD活性が各群で変化しなかった理由について考えてみた．SODには，Cu, Zn-SODとMn-SODとがあるが，すでに我々[23]がNODマウスで報告したように，網脈絡膜ではCu, Zn-SODしか検出されていない．このCu, Zn-SODの活性にとくに重要な銅が，今回の実験では各群の間に変化が見られなかったことから，SOD活性も変化しなかったものと考えられた．次に，一般的には，アスコルビン酸はフリーラジカルによって誘発される脂質過酸化を抑制する働きがあるが，中性下で鉄イオンなどが共存すると逆に脂質過酸化を誘発する作用もある[15]．このように，アスコルビン酸の過酸化脂質の生成における役割は複雑である．今回の実験でSOD活性が正常にもかかわらずなぜ過酸化脂質が低下したかは不明であるが，アスコルビン酸欠乏により酸化還元系の機能低下が起こり，フリーラジカルの発生自体が抑えられ，結果として過酸化脂質の生成が抑制されたものと考えた．したがって，この条件下では，過酸化脂質は網脈絡膜に大きな影響は及ぼしていないことが示唆された．

今後，さらに慢性障害実験モデルを作成し，糖尿病の各病期における微量金属動態やアスコルビン酸の影響について検討する予定である．また，SODや過酸化脂質に加え，gultathioneやgultathione peroxidaseも同時に測定し，網脈絡膜の障害の発症機序についても追及してみたい．

文　献

1) **林　洋一，朝岡　昭，遠藤素夫**：糖尿病と微量元素．最新医学　45：770—775, 1990.
2) **Levine AS, McClain CJ, Handwerger BS, Brown DM, Morley JE:** Tissue zinc status of genetically diabetic and streptozotocin-induced diabetic mice. Am J Clin Nutr 37: 382—386, 1983.
3) **Kinlaw WB, Levine AS, Morley JE, Silvis SE, McClain CJ:** Abnormal zinc metabolism in type II diabetes mellitus. Am J Med 75: 273—277, 1983.
4) **八木橋修，石川　弘，北野周作**：眼球の微量金属動態．日眼会誌　95：771—775, 1991.
5) **竹内重雄，佐々木朝照，木許一良，間野素子，冨岡恵知子，荒川泰行**：Ascorbic acid欠乏モルモットにおける血清および臓器中金属の動態．微量金属代謝　14：57—64, 1986.
6) **佐々木朝照，竹内重雄，木許一良，間野素子，冨岡恵知子，荒川泰行**：ICP発光分析による生体試料中の金属分析法の検討．微量金属代謝　14：153—159, 1986.
7) **今成登志男，広田元子，宮崎元一，早川和一，田村善蔵**：Superoxide dismutase活性測定法の改良．医学のあゆみ　101：496—497, 1977.
8) **八木国夫**：Tiobarbituric acid蛍光法による血漿又は血清中の過酸化脂質の微量定量法．ビタミン　49：403—405, 1975.
9) **氏家瑞恵**：生体微量金属代謝に関する研究，第1報．日眼会誌　83：2149—2157, 1979.
10) **氏家瑞恵**：生体微量金属代謝に関する研究，第2報．日眼会誌　83：2158—2165, 1979.
11) **Karcioglu ZA:** Zinc in the eye. Surv Ophthalmol 27: 114—122, 1982.
12) **Oomen HAPG:** Vitamin A deficiency, xerophthalmia and blindness. Nutr Rev 32: 161—166, 1962.
13) **中島裕美，加島陽二，石川　弘，木許一良，竹内重雄**：糖尿病における眼球の金属動態とアスコルビン酸の影響について．眼紀　印刷中．
14) **平光忠久**：眼疾患とフリーラジカル・過酸化脂質．

眼紀　39：1911—1926, 1988.
15）**福沢健治**：過酸化脂質の生成防止．内山　充，他（編）：過酸化脂質と生体．学会出版センター，東京，64—66, 1985.
16）**Grouch R, Priest DG, Duke EJ**：Superoxide dismutase activities of bovine ocular tisues. Exp Eye Res 27：503—509, 1978.
17）**Varma SD**：Superoxide and lens of the eye：A new theory of cataractogenesis. Int J Quant Chem 20：479—484, 1981.
18）**上田準一**：糖尿病性網膜症における過酸化脂質について．日眼会誌　73：1367—1378, 1969.
19）**門屋講司**：糖尿家兎網膜の過酸化脂質とその消去機構．日眼会誌　85：646—655, 1981.
20）**小沼富夫，大平誠一，武部和夫**：糖尿病患者の血清過酸化脂質．—ビタミンEニコチネート投与前後の経時的推移について—．臨床と研究　56：1192—1196, 1979.
21）**菅原　啓，依田敏行，平田　徹，後藤由夫**：糖尿病と血漿過酸化脂質．糖尿病　24：891—896, 1981.
22）**新美勝彦，平岩紀子**：糖尿病性網膜症と血清過酸化脂質について．日眼会誌　89：141—144, 1985.
23）**Ishikawa H, Takeuchi S**：Trace elements in ocular tissues of NOD mouse. In：Goto Y, et al (Eds)：Lesson from Aniaml Diabetes. The Tokyo Workshop 1990. Smith-Gordon, London, 135—139, 1991.