

ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラット網膜における gamma-aminobutyric acid の変化

梶浦 祐子¹⁾, 井上 正則¹⁾, 山本 節¹⁾, 岡田 安弘²⁾

¹⁾神戸大学医学部眼科学教室, ²⁾神戸大学医学部第一生理学教室

要 約

ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットを用いて, 網膜における γ -aminobutyric acid (GABA) の変化について生化学的, 組織学的に研究し, 併せて網膜電図(ERG)を測定した。正常および糖尿病ラット網膜において, 免疫組織学的には GABA は網膜内顆粒層, 内網状層, 神経節細胞層に存在していた。内顆粒層では強い陽性反応がアマクリン細胞に認められた。糖尿病ラット網膜では, GABA は正常ラットよりも強い染色性を示した。全網膜中の GABA 量は, 糖尿病発症 1 週間後には増加を認め,

2 か月後には最大量に達し, 5 か月後も維持されていた。ERG は発症後 1 か月後には律動様小波の潜時の延長が認められた。糖尿病網膜のアマクリン細胞における GABA の増加は律動様小波の抑制に関与している可能性が示唆された。(日眼会誌 98: 449—452, 1994)

キーワード: γ -aminobutyric acid (GABA), ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラット, アマクリン細胞, 律動様小波

Alteration of Gamma-aminobutyric Acid in Streptozotocin—Induced Diabetic Rat Retina

Yuko Kajiura¹⁾, Masanori Inoue¹⁾, Misao Yamamoto¹⁾ and Yasuhiro Okada²⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, School of Medicine, Kobe University

²⁾Department of Physiology, School of Medicine, Kobe University

Abstract

To elucidate possible alteration of γ -aminobutyric acid (GABA) in the diabetic retina, the distribution and determination of GABA was analyzed in streptozotocin—induced diabetic and normal rats after electroretinogram (ERG) recording. Immunoreactivity of GABA was found in the inner nuclear layer, inner plexiform layer, and ganglion cell layer in normal and diabetic rats. In the inner nuclear layer, strong immunoreactivity of GABA was found in amacrine-like cells. In diabetic retinas, GABA immunoreactivity was higher than in normal retinas. The contents of GABA increased began 1 week after occurrence of diabetes mellitus, attained

a maximum at 2 months, and maintained this amount for 5 months. The latencies of oscillatory potentials of ERG were prolonged beginning 1 month after occurrence. These results suggest that increase of GABA in the amacrine cells of diabetic retinas may be related with the abnormality of oscillatory potentials. (J Jpn Ophthalmol Soc 98: 449—452, 1994)

Key words: γ -aminobutyric acid (GABA), Streptozotocin induced diabetic rat, Amacrine cell, Oscillatory potential

I 緒 言

糖尿病発症早期から網膜電図(ERG)の律動様小波に変化が生じることは周知のことである¹⁾。しかし, この神

経症の発生機序については未だ不明である。律動様小波の発生には網膜内顆粒層のアマクリン細胞が関与していると考えられている。アマクリン細胞には多くの神経伝達物質が存在しており, 抑制性神経伝達物質である γ -

別刷請求先: 650 兵庫県神戸市中央区楠町7-5-2 神戸大学医学部眼科学教室 梶浦 祐子
(平成5年11月9日受付, 平成5年12月27日改訂受理)

Reprint requests to: Yuko Kajiura, M.D. Department of Ophthalmology, School of medicine, Kobe University, 7-5-2 Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe-shi, Hyogo-ken 650, Japan

(Received November 9, 1993 and accepted in revised form December 27, 1993)

aminobutyric acid (以下 GABA) もその一つである^{2)~5)}。今回、ストレプトゾトシンで誘発した糖尿病網膜での早期の GABA の変化を組織学的、生化学的に検討し、併せて ERG を測定したので報告する。

II 方 法

Wistar 種のラット (体重約 150 g, 雄) 60 匹にストレプトゾトシン (和光純薬工業) 60 mg/kg を腹腔内に投与し、糖尿病ラットを作成した。血糖値 300 mg/dl 以上、尿糖陽性をもって糖尿病発症とした。糖尿病発症から 1 週、2 週、1 か月、2 か月、5 か月後に ERG を測定した。ERG を測定した後、1 日置いて眼球を摘出し、免疫組織学的に、また生化学的に網膜における GABA の分布と量を調べた。対照として、年齢を一致させた正常ラット、ならびにストレプトゾトシン投与で糖尿病を発症しなかったラットを用いた。正常ラットは 10 匹 10 眼、発症 1 週間糖尿病ラット 10 匹 10 眼、2 週間糖尿病ラット 6 匹 6 眼、1 か月糖尿病ラット 15 匹 15 眼、2 か月糖尿病ラット 10 匹 10 眼、5 か月糖尿病ラットは 8 匹 8 眼を用いた。

ERG はコンタクトレンズ電極 (京都コンタクトレンズ社製)、MEM 4104 (日本光電) を用いて測定した。12 時間の暗順応の後、全身麻酔下で白色 flash 20 J を 20 cm の距離から照射して光刺激とした。麻酔は、キシラジン塩酸塩 (セラクター®) と塩酸ケタミン (ケタラール®) の混合液 (1 : 9) を 1 ml/体重 kg 筋肉注射した。

摘出眼球を 2% paraformaldehyde-0.3% glutaraldehyde-0.2% picric acid に 2 時間浸漬した後、30% ショ糖液に浸漬した。その後、眼球を液体窒素を用いて

急速凍結し、クライオスタットで厚さ 7 μ m の切片を作成した。切片を 1.5% 過酸化水素に 15 分間、正常馬血清に 30 分間浸漬した後、抗 GABA 抗体 (Eugen Tech International, Inc. Ramsey, NJ) に反応させた (37°C, 12 時間)。0.1 M リン酸緩衝液 (PBS) で洗浄した後、ビオチン化抗マウス IgG 抗体 (Vector Laboratories, Inc. Burlingame) に浸漬 (37°C, 60 分) した。PBS で洗浄後、アビジン-ビオチン混合液に 30 分反応させた。洗浄した後ジアミノペンチジンに 10 分間浸漬し、光学顕微鏡で観察した。

摘出眼球から網膜を剝離しホモジナイズし、遠心分離した。その上清を高速液体クロマトグラフィーを用いてアミノ酸分析を行った。

III 結 果

ストレプトゾトシンを投与したラット 60 匹のうち、55 匹 (91.6%) に糖尿病が発症した (血糖、平均 425 mg/dl)。経過中に死亡または血糖値が正常化したものは 5 匹であった。

1. 免疫組織学的染色 (図 1, 2)

正常網膜においては、GABA 陽性反応は内顆粒層、内網状層、神経節細胞層に認められた。糖尿病ラット網膜では正常網膜と同様に内顆粒層、内網状層、神経節細胞層に反応がみられた。内顆粒層ではアマクリン細胞と思われる細胞に反応が認められた。GABA の反応性、GABA 陽性細胞数は糖尿病発症早期の 1 週間後から増加し、1 か月後には最大となり、5 か月後もその反応性を維持している (図 3)。

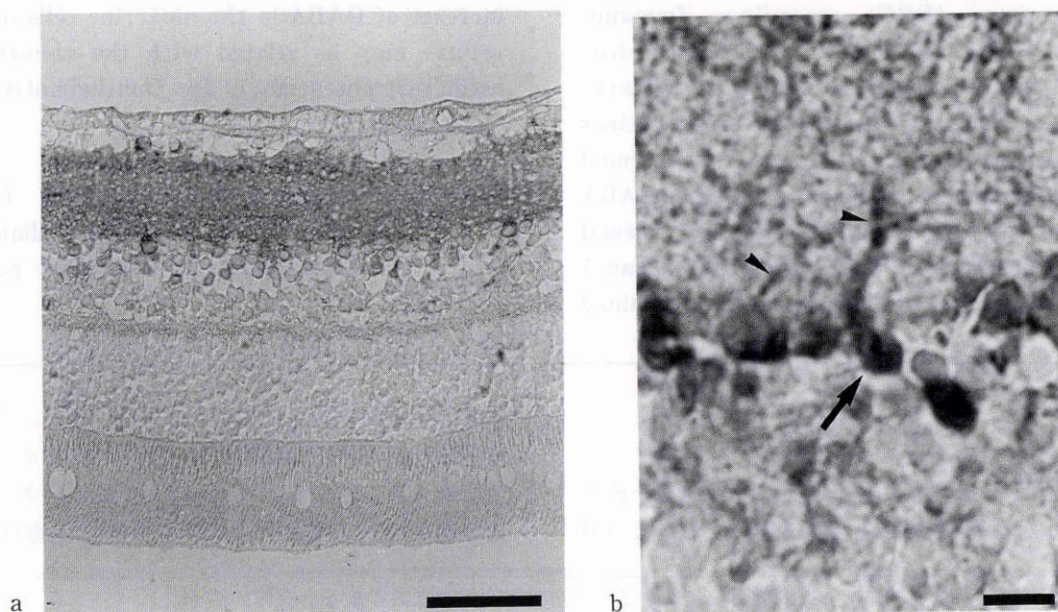
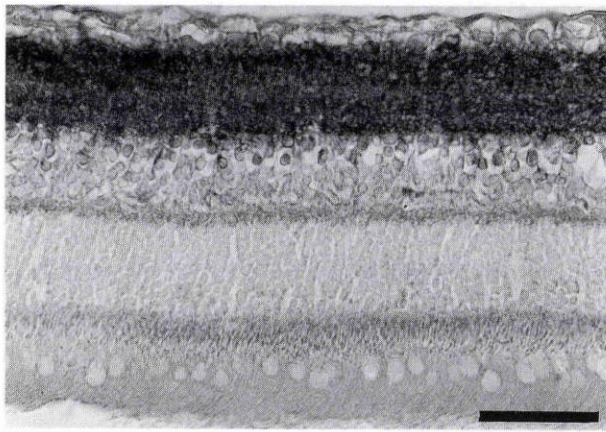
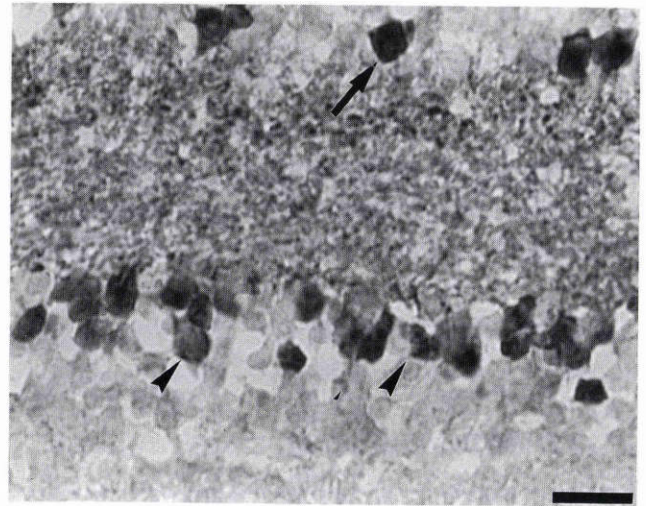


図 1 ラット正常網膜の gamma-aminobutyric acid 免疫組織染色。

a : 網膜内網状層は染色され、内顆粒層に陽性細胞を認める。バーは 50 μ m。b : アマクリン細胞 (矢印) と内網状層へと伸びている神経線維 (矢尻) が染色されている。バーは 15 μ m。



a



b

図2 糖尿病発症5か月のラット網膜のgamma-aminobutyric acid免疫組織染色。

a: 網膜内顆粒層, 神経節細胞層に陽性細胞を認め, 内網状層に陽性反応を認める. バーは50 μm. b: アマクリン細胞 (矢尻), 異所性アマクリン細胞 (矢印) 染色されている. バーは20 μm.

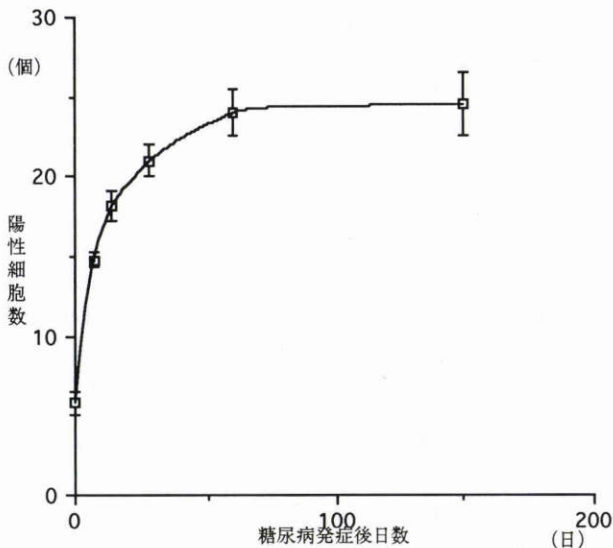


図3 糖尿病網膜内顆粒層におけるgamma-aminobutyric acid陽性細胞数100×100 μm中の細胞数(個).

2. 網膜内GABA量 (表1)

糖尿病網膜におけるGABA量は, 正常網膜と比較して有意に増加している. その量は, 2か月で最大値となり, 5か月後も維持している.

3. ERG (図4)

正常眼に比較して糖尿病眼では律動様小波の潜時の延長が認められる. この延長は, 発症1週間後のラットでは有意な延長ではないが, 1か月後には有意な遅延として認められる. 振幅の低下は認められない. また, 律動様小波以外のa波, b波については, 発症1か月以内では有意な変化はみられない. なお, ストレプトゾトシンを投与しても糖尿病を発症しなかったラットにおいては, GABA量の増加, ERGの変化は認められなかった.

表1 糖尿病ラット網膜におけるGABA量

発症後日数(眼)	GABA量(μmol/protein g)
対 照 (10)	12.64±1.65
7 (10)	14.23±2.27
14 (6)	14.09±0.37
28 (15)	14.93±0.56
60 (10)	19.42±1.23
150 (8)	22.19±0.65

(平均値±標準偏差)

GABA: Gamma-aminobutyric acid

Student t検定を行った.

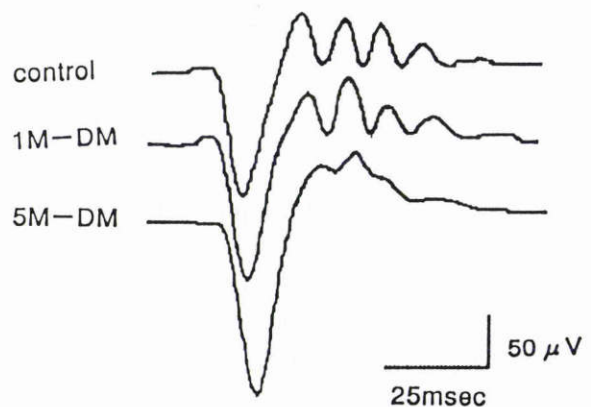


図4 ラット網膜の白色閃光網膜電図. 律動様小波の潜時の延長を認める.

IV 考 按

糖尿病における網膜の変化として細小血管症が最も知られている⁶⁾⁷⁾. しかし, 血管症が認められない早期からERGの律動様小波の減弱などの変化が認められ⁸⁾⁹⁾, 網膜内の神経症が発生していると考えられる. 律動様小波

などの電氣的応答は神経細胞間での連絡や神経細胞内の電位の変化により生じるが、その際に神経伝達物質の放出や取り込みなどの変化が生じ、電氣的応答を発生あるいは、修飾していると想定できる。網膜の種々の細胞に種々の神経伝達物質が存在することは、既に報告されている。中でも、網膜内顆粒層のアマクリン細胞には20種類以上の神経伝達物質が存在する¹⁰⁾。アマクリン細胞は律動様小波の発生に関係していると考えられており¹¹⁾、したがって、糖尿病早期には、このアマクリン細胞内に何らかの変化が生じていると推察される。

GABAは、抑制性の神経伝達物質で網膜内では約90%が内顆粒層、内網状層に存在する¹²⁾¹³⁾。GABAは、組織学的検索ではアマクリン細胞に多く存在する。一方、電気生理学的検討で、GABAを硝子体腔内に投与すると律動様小波の潜時の延長、振幅の低下が認められると報告している¹⁴⁾。今回の実験で、糖尿病発症1週間という早期にアマクリン細胞でのGABAの増加が認められ、その後を追うように、律動様小波の潜時の遅延が出現してきた。先に述べたことと併せると、糖尿病網膜でのGABAはアマクリン細胞の電氣的応答の抑制に関与していることを示唆するといえる。

糖尿病網膜でのGABA量の増加機序について、Mizunoら¹⁴⁾は糖尿病発症後約1週間でGABA transaminaseの活性が減少すると報告しているが、その調節機序の詳細は不明である。脳全体のGABA量をインスリン治療により低下させることができるという報告があり¹⁵⁾、血中のglucoseレベルがGABA量の調節に関係していることは間違いないと思われる。しかし、網膜におけるGABAについては、インスリンによっても軽度の減少傾向をみるだけであり¹⁶⁾、今後さらなる検討が必要である。また、糖尿病状態でのポリオール経路、グリケーションの異常が近年注目されており⁷⁾、これらの系と関連していることも推察される。

糖尿病網膜ではGABA以外の神経伝達物質も変化することが報告されている。Dopamine (DA)は糖尿病発症により減少するといわれている¹⁷⁾。このDAもアマクリン細胞に存在し、律動様小波の発生に関与が疑われている。また、グルタミン酸が糖尿病網膜で増加するとの報告もある¹⁸⁾。したがって、糖尿病網膜での律動様小波の変化には種々の物質が関与しており、一元的に考えるのは困難であり、GABAを含めて他の神経伝達物質についても、今後さらに深く検討を重ねる必要がある。

文 献

- 1) **Speros P, Price J**: Oscillatory potentials. History, techniques and potential use in the evaluation of disturbances of retinal circulation. *Surv Ophthalmol* 25: 237-252, 1981.
- 2) **Agardh E, Ehinger B, Wu JY**: GABA and GAD-like immunoreactivity in the primate retina. *Histochemistry* 86: 485-490, 1987.
- 3) **Seki T, Fukado S, Shioda S, Nakai Y, Koide R, Fukado Y**: Immunoelectron microscopic observation of cells in the rat retina containing gamma aminobutyric acid and catecholamine. *Jpn J Ophthalmol* 35: 30-41, 1991.
- 4) **Graham LT Jr**: Intraretinal distribution of GABA content and GAD activity. *Brain Res* 36: 476-479, 1972.
- 5) **Mosinger JL, Yazulla S, Studholme KM**: GABA-like immunoreactivity in the vertebrate retina: A species comparison. *Exp Eye Res* 42: 631-644, 1986.
- 6) 小嶋一晃, 馬嶋慶直, 新美勝彦, 小嶋 克: 実験的糖尿病ラット (Streptozotocin) 眼の組織学的研究. *日眼会誌* 76: 1001-1016, 1972.
- 7) 小嶋一晃, 鈴木万里子, 原田敬志, 水野計彦, 堀田 鏡, 角田博信, 他: 実験的糖尿病性細小血管症と polyol pathway. 1. Fructose の血管障害への影響. *眼紀* 35: 749-759, 1984.
- 8) 米村大蔵, 蓮井 勲: 正常人眼 ERG の律動様小波の統計的観察 (その1). *眼紀* 22: 260-265, 1971.
- 9) 田中一徳: Streptozotocin 糖尿病ラット ERG におよぼす各種薬剤の影響. *眼紀* 32: 1470-1480, 1981.
- 10) 宮地栄一, 村上元彦: 網膜の神経伝達物質とその役割. *医学のあゆみ* 146: 616-618, 1988.
- 11) 鎌田芳夫, 国田正矩, 水野有武: ラット網膜の GABA 代謝と ERG. *眼紀* 30: 674-680, 1979.
- 12) **Berger SJ, McDaniel ML, Carter JG, Lowry OH**: Distribution of four potential transmitter-amino acids in monkey retina. *J Neurochem* 28: 159-163, 1977.
- 13) 岡田安弘: 生体における GABA の分布と機能. *代謝* 15: 327-340, 1978.
- 14) **Mizuno A, Kamada Y, Matsuda M**: Retinal gamma-aminobutyric acid metabolism in alloxan-induced diabetic rat. *Jikeikai Med J* 25: 117-122, 1978.
- 15) **Norberg K, Siesjo BK**: Oxidative metabolism of the cerebral cortex of the rat in severe insulin-induced hypoglycemia. *J Neurochem* 26: 345-352, 1976.
- 16) 梶浦祐子, 井上正則: 糖尿病ラット網膜での GABA 増加へのインスリンの影響. *眼紀* 44: 1077, 1993.
- 17) **Nishimura C, Kuriyama K**: Alteration in the retinal dopaminergic neuronal system in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Neurochem* 45: 448-455, 1985.
- 18) 石川 明, 石黒誠一, 玉井 信: 糖尿病ラットにおける ERG 律動様小波と網膜の遊離アミノ酸組成. *眼紀* 44: 660, 1993.