

糖尿病家兎の視神経乳頭循環自動調節能障害におけるギャップ結合遮断の関与

Disruption of Gap Junctions may be Involved in Impairment of Autoregulation in Optic Nerve Head Blood Flow of Diabetic Rabbits

柴田真帆*

はじめに

視神経乳頭、網膜には、眼灌流圧の変化に対し血流量を一定に保つ自動調節能が存在し、自律神経支配はないが組織の代謝状態を反映した血流調節がなされている^{1,2)}。この自動調節能のメカニズムについては、これまで代謝性調節や筋原性調節、血管作動性因子の関与などが報告されているが、まだ十分に解明されていない。網膜血管と神経組織は血液網膜関門で遮断されているため、組織の代謝状態を反映して血管運動を制御するには、血管周囲グリア細胞と網膜血管組織間のギャップ結合を介した機能的連絡が重要であると考えられる^{3,4)}。網膜血管の周囲はグリア細胞の突起がこれを囲み、ギャップ結合の機能蛋白であるコネキシン 43 の発現がみられるが⁵⁾、糖尿病眼では網膜血管周囲でコネキシン 43 の発現の低下^{6~8)}、また網膜循環自動調節能の障害が報告^{9,10)}されている。

筆者らは、糖尿病眼における視神経乳頭循環において自動調節能の破綻がみられると仮定し、糖尿病家兎において眼灌流圧の低下に伴う視神経乳頭血流の変化をレーザースペックル法¹¹⁾で測定した。また、ギャップ結合遮断薬の投与下で同様に視神経乳頭循環自動調節能の破綻がみられるかどうかを調べることで、視神経乳頭循環自動調節能におけるギャップ結合の関与について検討した。

I 方 法

糖尿病家兎における視神経乳頭循環自動調節能を検討するため、アロキササン誘発糖尿病家兎を用いた。正常成

熟白色家兎 (2.6~2.8 kg) に 10% アロキササン溶液 80 mg/kg を耳静脈から投与し、8 週間後に血糖値が 300 以上のものを糖尿病群、対照として生理食塩水を耳静脈から投与したものを正常対照群として用いた。家兎は覚醒下に固定し、0.4% トロピカミド点眼液による散瞳、0.4% オキシブプロカイン塩酸塩点眼液による点眼麻酔を行った。前足に自動血圧計 (BP-98E, ソフトロン、東京) を設置し、実験中の血圧と脈拍数を記録した。家兎眼の毛様体扁平部に 4% リドカイン塩酸塩点眼液による局所麻酔下でインフュージョンカニューラを挿入し、カニューラを 2 本に分枝させて一方を眼内灌流液 (BSS Plus®, Alcon Laboratories, Fort Worth, TX) に、一方を圧トランスデューサ (P10EZ, Gould Statham Instruments, Hato Rey, Puerto Rico) に接続し、灌流圧ボトルの高さを変えることで眼圧を調節した。眼圧を 20 mmHg から 50, 70 mmHg と上昇させ、それぞれの眼圧レベルを 30 分間持続させた。各眼圧レベルでの視神経乳頭血流をレーザースペックルフローグラフィ (LSFG-NAVI, ソフトケア、福岡) で測定した。測定原理や解析の詳細は既報^{12~14)}のとおりであるが、血流測定部位は表在血管を避けた視神経乳頭の一部とし、同一部位を経時的に 10 分ごとに測定して血流速度の指標である NB (normalized blur) 値を算出した。眼灌流圧 (ocular perfusion pressure : OPP) は、測定した眼圧 (intra ocular pressure : IOP)、平均血圧 (mean arterial blood pressure : MBP)、拡張期血圧 (diastolic blood pressure : DBP)、収縮期血圧 (systolic blood pressure : SBP) を用いて次式から計算した¹⁵⁾。

* Maho Shibata : 市立ひらかた病院眼科

〔別刷請求先〕 柴田真帆 : 〒569-8686 大阪府高槻市大学町 2-7 大阪医科大学眼科学教室

OPP=MBP-IOP-14 mmHg
 MBP=DBP+1/3 (SBP-DBP)

高眼圧負荷下における視神経乳頭血流変化を糖尿病群と対照群で比較し、各血流測定時に得られた眼灌流圧と血流値との相関について、対照群と糖尿病群とで比較した。

ギャップ結合障害眼における視神経乳頭循環自動調節能を検討するため、ギャップ結合遮断薬であるオクタノール^{3,16,17}、gap 27^{18,19}を用いた。正常白色家兎にオクタノールを200 μ l硝子体注射し、濃度別にオクタノール1.0mM群、3.0mM群、10mM群とし、gap 27を200 μ l硝子体注射した家兎をgap 27 (10 μ M)群、眼灌流液を200 μ l硝子体注射した家兎を対照群として、硝子体注射2時間後に上記同様に高眼圧負荷下での視神経乳頭血流を測定した。血流値の変化を対照群とそれぞれのギャップ結合遮断薬投与群とで比較し、上記同様に、眼灌流圧と血流値の相関について対照群とギャップ結合遮断薬投与群とで比較した。

ギャップ結合遮断薬による視機能への影響をみるため、投与前後の網膜電図 (electroretinograms : ERG) と視覚誘発電位 (visually evoked potentials : VEP) を記録した。家兎は覚醒下に固定し、0.4%トロピカミド点眼液による散瞳、0.4%オキシプロカイン塩酸塩点眼液による点眼麻酔を行った。シールドされた暗室で暗順応1時間後にERGを記録、オクタノール (10mM) またはgap 27 (10 μ M) を硝子体注射した3時間後のERGを記録し、a波の振幅と潜時、b波の振幅と潜時を投与前後で比較した。筆者らのVEP測定方法については既報²⁰のとおりであるが、シールドされた暗室で暗

順応1時間後にVEPを記録、オクタノール (10mM) またはgap 27 (10 μ M) 硝子体注射3時間後のVEPを記録し、N1潜時を投与前後で比較した。

統計学的解析には、one-way analysis of variance (ANOVA), two-way repeated measures ANOVA, *t*-testを用い、*p*<0.05を有意水準とした。

II 結 果

糖尿病家兎における視神経乳頭血流の経時の変化を図1に示した。糖尿病群では、眼圧を20mmHgから50、70mmHgへ上昇させ眼灌流圧を低下させると、視神経乳頭血流は対照群と比較して有意に低下した。一方対照

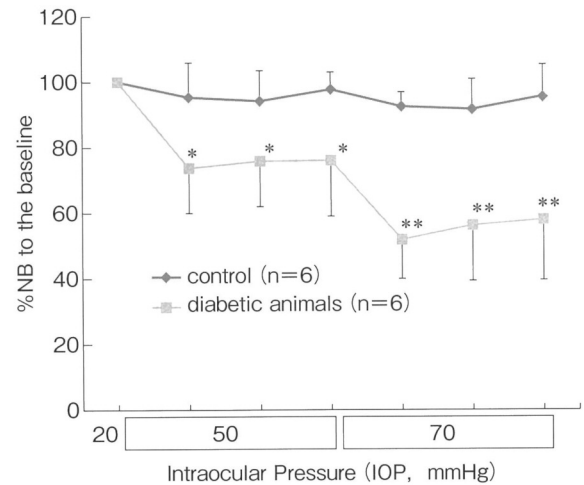


図1 糖尿病家兎での高眼圧負荷下における視神経乳頭血流の経時の変化
 糖尿病群では対照群に比して、高眼圧負荷下での血流が有意に低下し (*p*=0.0002, two-way ANOVA), 眼圧を50, 70mmHgに上昇させた各観察点で有意な血流低下を認めた (* *p*<0.01, ** *p*<0.05, Unpaired *t*-test vs control).

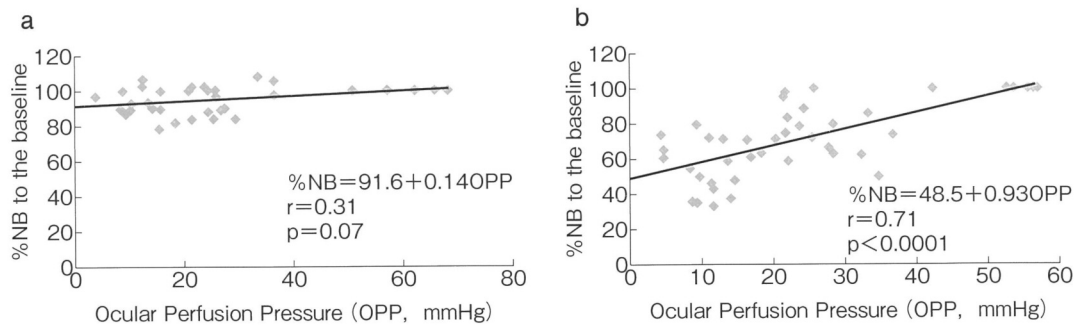


図2 糖尿病家兎における視神経乳頭血流と眼灌流圧の相関

a : 正常対照群, b : 糖尿病群. 対照群では眼灌流圧と血流値に相関を認めなかった (*p*=0.07, Pearson's correlation coefficient). 糖尿病群では眼灌流圧と血流値に正の相関を認めた (*p*<0.0001, *r*=0.71, Pearson's correlation coefficient).

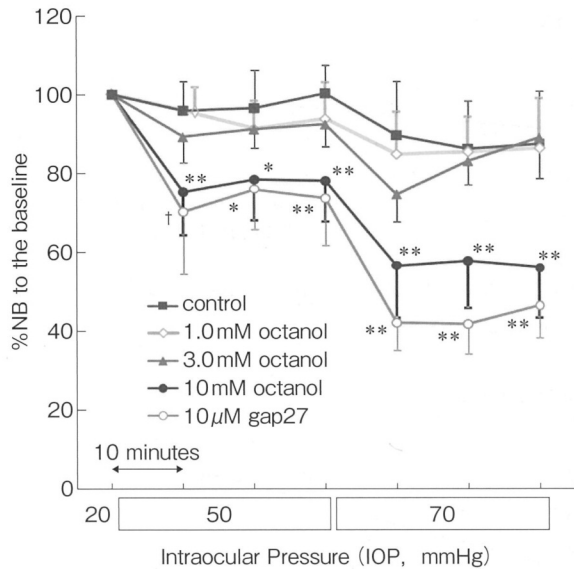


図3 ギャップ結合障害眼での高眼圧負荷下における視神経乳頭血流の経時的変化

10mM オクタノール群と gap 27 群では、対照群に比して高眼圧負荷下での血流が有意に低下し（それぞれ $p=0.002$, $p<0.05$, two-way ANOVA), 眼圧を 50, 70mmHg に上昇させた各観察点で有意な血流低下を認めた ($^{\dagger}p<0.05$, $*p<0.01$, $**p<0.001$ Unpaired t -test vs control).

群では眼圧 70mmHg まで視神経乳頭血流が維持された。

対照群では眼灌流圧の低下と血流値に相関を認めなかったが(図 2a), 糖尿病群では眼灌流圧の低下とともに血流値の低下を認め、両者に正の相関を認めた(図 2b)。

ギャップ結合障害眼における視神経乳頭血流の経時的変化を図 3 に示した。10mM オクタノール, gap 27 を硝子体投与した家兎では、眼圧を上昇させ眼灌流圧を減少させると、視神経乳頭血流は対照群と比較して有意に低下した。

オクタノール 1.0mM 群, 3.0mM 群, 10mM 群, gap 27 群ともに眼灌流圧と血流値に正の相関を認め、オクタノール群においては濃度依存性に相関係数が増加した(図 4)。

オクタノール群, gap 27 群とも投与前後で ERG の a 波, b 波の振幅と潜時, VEP の N1 潜時に有意な変化を認めなかった(表 1)。

III 考 察

今回の実験により、糖尿病家兎において視神経乳頭循

環自動調節能が障害されていることが明らかとなった。ギャップ結合遮断薬投与家兎においても同様に視神経乳頭循環自動調節能の破綻がみられ、自動調節能のメカニズムにギャップ結合が関与する可能性のあることが示唆された。

血管内皮細胞は血管内皮由来過分極因子を分泌し、ギャップ結合を介して血管平滑筋や周皮細胞を弛緩させ、血管を拡張させる^{21,22}。すなわち、これらはギャップ結合を介し機能的に一つのユニットを構成し^{22,23}、組織の代謝状態を反映した血管運動制御に重要な役割を果たしていると考えられる^{24,25}。糖尿病眼においては網膜血管周囲のギャップ結合の障害⁶やギャップ結合構成蛋白であるコネキシン 43 の減少、内皮細胞のアポトーシスが報告^{8,26,27}されており、今回の結果のように、糖尿病眼ではギャップ結合を介した細胞間連絡の破綻により視神経乳頭・網膜血管の機能的・形態的異常、さらには血管運動制御の障害が引き起こされる可能性があると考えられた。

中枢神経系においてアストロサイトは、ニューロンの代謝状態を反映して血流を制御する neurovascular coupling に関与する⁵といわれる。視神経乳頭・網膜においても同様の報告^{28,29}がみられ、フリッカー刺激による神経活動で視神経乳頭血流が増加し、これにアストロサイトが関与するとの報告がある³⁰。視神経乳頭におけるおもなグリア細胞はアストロサイトであり、網膜においてはアストロサイト・Müller細胞がおもなグリア細胞である³¹が、異種・同種グリア細胞間にギャップ結合を介した細胞間連絡の存在が報告されている^{32,33}。今回の結果で、ギャップ結合遮断による視神経乳頭循環自動調節能の破綻がみられたことから、視神経乳頭循環においてこれらグリア細胞のギャップ結合を介した細胞間連絡の関与が示唆された。

臨床的には、厳格な血圧コントロールが網膜症の進行抑制に有効であるという報告³⁴があり、高血圧は糖尿病網膜症の増悪因子とされるが、このことから糖尿病眼では網膜循環自動調節能が障害されていることが示唆される。また、糖尿病は前部虚血性視神経症のリスクファクターの一つといわれ^{35,36}、糖尿病と緑内障の病期進行との関連³⁷が示唆されるなかで、眼循環研究は疾患の病態解明への一つのアプローチであると考えられる。

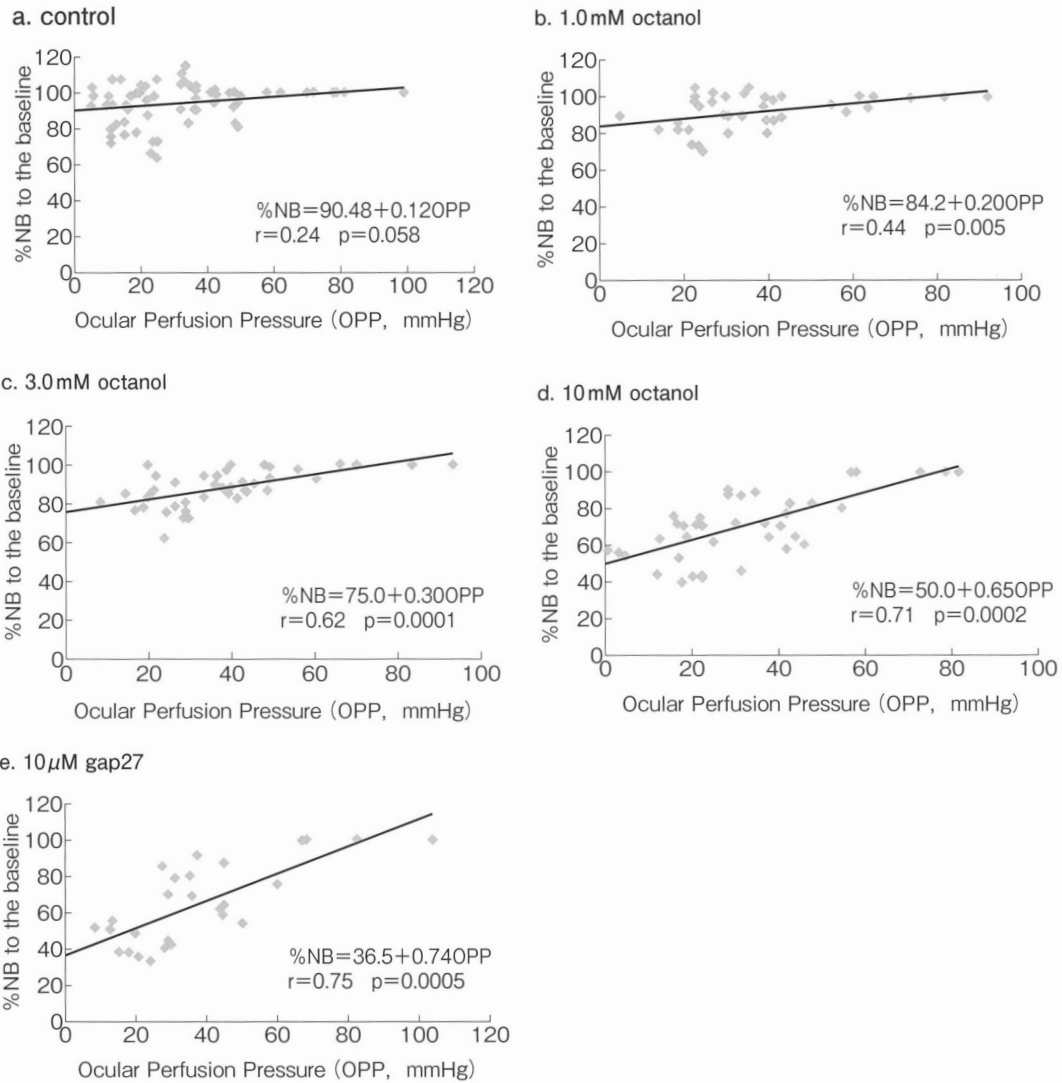


図4 ギャップ結合障害眼における視神経乳頭血流と眼灌流圧の相関

a: 対照群, b: 1.0mM オクタノール, c: 3.0mM オクタノール, d: 10mM オクタノール, e: 10 μ M gap 27. 対照群では眼灌流圧と血流値に相関を認めなかった ($p = 0.058$, Pearson's correlation coefficient). 各オクタノール群 (1.0mM, 3.0mM, 10mM) で眼灌流圧と血流値に有意かつ正の相関を認めた (それぞれ $r = 0.44$, $r = 0.62$, $r = 0.71$, Pearson's correlation coefficient). gap 27 群でも眼灌流圧と血流値に有意かつ正の相関を認めた ($p = 0.0005$, $r = 0.75$, Pearson's correlation coefficient).

表1 gap 結合障害の ERG・VEP への影響

				投与前	投与後	p*
ERG	Octanol (10 mM)	a 波	振幅 (μ V)	72.7 \pm 10.4	86.4 \pm 32.6	0.39
			潜時 (ms)	4.3 \pm 0.2	4.15 \pm 0.25	0.60
		b 波	振幅 (μ V)	212.6 \pm 40.2	216.0 \pm 34.4	0.90
			潜時 (ms)	58.7 \pm 3.9	60.6 \pm 6.0	0.65
	gap 27 (10 μ M)	a 波	振幅 (μ V)	118.1 \pm 25.2	128.6 \pm 19.7	0.28
			潜時 (ms)	4.1 \pm 0.1	4.2 \pm 0.1	0.18
VEP	Octanol (10 mM)	N1	振幅 (μ V)	310.2 \pm 63.0	319.4 \pm 128.9	0.81
			潜時 (ms)	59.3 \pm 4.8	59.9 \pm 2.2	0.88
	gap 27 (10 μ M)	N1	振幅 (μ V)	20.3 \pm 1.0	19.8 \pm 1.0	0.24
			潜時 (ms)	20.8 \pm 0.7	20.8 \pm 0.5	0.78

*paired *t*-test

(mean \pm SD)

文 献

- 1) Bill A, Sperber GO : Control of retinal and choroidal blood flow. *Eye (Lond)* **4** : 319-325, 1990
- 2) Riva CE, Hero M, Titze P et al : Autoregulation of human optic nerve head blood flow in response to acute changes in ocular perfusion pressure. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **235** : 618-626, 1997
- 3) Javid PJ, Watts SW, Webb RC : Inhibition of nitric oxide-induced vasodilation by gap junction inhibitors : a potential role for a cGMP-independent nitric oxide pathway. *J Vasc Res* **33** : 395-404, 1996
- 4) Chauhan SD, Nilsson H, Ahluwalia A et al : Release of C-type natriuretic peptide accounts for the biological activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **100** : 1426-1431, 2003
- 5) Simard M, Arcuino G, Takano T et al : Signaling at the gliovascular interface. *J Neurosci* **23** : 9254-9262, 2003
- 6) Oku H, Kodama T, Sakagami K et al : Diabetes-induced disruption of gap junction pathways within the retinal microvasculature. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42** : 1915-1920, 2001
- 7) Sato T, Haimovici R, Kao R et al : Downregulation of connexin 43 expression by high glucose reduces gap junction activity in microvascular endothelial cells. *Diabetes* **51** : 1565-1571, 2002
- 8) Li AF, Sato T, Haimovici R et al : High glucose alters connexin 43 expression and gap junction intercellular communication activity in retinal pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44** : 5376-5382, 2003
- 9) Kohner EM, Patel V, Rassam SM : Role of blood flow and impaired autoregulation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes* **44** : 603-607, 1995
- 10) Takahashi Y : Optic nerve head circulation in alloxan-induced diabetic rabbits. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* **99** : 166-172, 1995
- 11) Tamaki Y, Araie M, Kawamoto E et al : Non-contact, two-dimensional measurement of tissue circulation in choroid and optic nerve head using laser speckle phenomenon. *Exp Eye Res* **60** : 373-383, 1995
- 12) Sugiyama T, Utsumi T, Azuma I et al : Measurement of optic nerve head circulation : comparison of laser speckle and hydrogen clearance methods. *Jpn J Ophthalmol* **40** : 339-343, 1996
- 13) Sugiyama T, Araie M, Riva CE et al : Use of laser speckle flowgraphy in ocular blood flow research. *Acta Ophthalmol* **88** : 723-729, 2010
- 14) Takayama J, Tomidokoro A, Ishii K et al : Time course of the change in optic nerve head circulation after an acute increase in intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44** : 3977-3985, 2003
- 15) Bill A : Blood pressure in the ciliary arteries of rabbits. *Exp Eye Res* **2** : 20-24, 1963
- 16) Brandes RP, Schmitz-Winnenthal FH, Feletou M et al : An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **97** : 9747-9752, 2000
- 17) Ryan MJ, Liu B, Herbowy MT et al : Intercellular communication between renin expressing As4.1 cells, endothelial cells and smooth muscle cells. *Life Sci* **72** : 1289-1301, 2003
- 18) Martin PE, Wall C, Griffith TM : Effects of connexin-mimetic peptides on gap junction functionality and connexin expression in cultured vascular cells. *Br J Pharmacol* **144** : 617-627, 2005
- 19) Chaytor AT, Bakker LM, Edwards DH et al : Connexin-mimetic peptides dissociate electrotonic EDHF-type signalling via myoendothelial and smooth muscle gap junctions in the rabbit iliac artery. *Br J Pharmacol* **144** : 108-114, 2005
- 20) Okuno T, Oku H, Ikeda T : The reproducibility and sensitivity of visual evoked potential testing in rabbits. *Neuro-Ophthalmology* **26** : 59-66, 2001
- 21) Wu DM, Minami M, Kawamura H et al : Electrotonic transmission within pericyte-containing retinal microvessels. *Microcirculation* **13** : 353-363, 2006
- 22) Griffith TM : Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization : do gap junctions provide a unifying hypothesis? *Br J Pharmacol* **141** : 881-903, 2004
- 23) Puro DG : Physiology and pathobiology of the pericyte-containing retinal microvasculature : new developments. *Microcirculation* **14** : 1-10, 2007
- 24) Kawamura H, Oku H, Li Q et al : Endothelin-induced changes in the physiology of retinal pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43** : 882-888, 2002
- 25) Yamanishi S, Katsumura K, Kobayashi T et al : Extracellular lactate as a dynamic vasoactive signal in the rat retinal microvasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290** : H925-934, 2006
- 26) Li AF, Roy S : High glucose-induced downregulation of connexin 43 expression promotes apoptosis in microvascular endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50** : 1400-1407, 2009
- 27) Bobbie MW, Roy S, Trudeau K et al : Reduced connexin 43 expression and its effect on the development of vascular lesions in retinas of diabetic mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51** : 3758-3763, 2010
- 28) Gugleta K, Fuchsjaeger-Mayrl G, Orgul S : Is neurovascular coupling of relevance in glaucoma? *Surv Ophthalmol* **52** : S139-143, 2007
- 29) Buerk DG, Riva CE, Cranston SD : Frequency and luminance-dependent blood flow and K⁺ ion changes during flicker stimuli in cat optic nerve head. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **36** : 2216-2227, 1995
- 30) Riva CE, Logean E, Falsini B : Visually evoked hemodynamic response and assessment of neurovascular coupling in the optic nerve and retina. *Prog Retin Eye Res* **24** : 183-215, 2005
- 31) Mackenzie PJ, Cioffi GA : Vascular anatomy of the optic nerve head. *Can J Ophthalmol* **43** : 308-312, 2008
- 32) Zahr KR, Wu T : Confocal microscopic study of glial-vascular relationships in the retinas of pigmented rats. *J*

Comp Neurol **429** : 253-269, 2001

- 33) Zahs KR, Ceelen PW : Gap junctional coupling and connexin immunoreactivity in rabbit retinal glia. *Vis Neurosci* **23** : 1-10, 2006
- 34) United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group : Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complication in type 2 diabetes : UKPDS 38. UK Prospective Diabetes Study Group. *Br Med J* **317** : 703-713, 1998
- 35) Beri M, Klugman MR, Kohler JA et al : Anterior ischemic optic neuropathy. VII. Incidence of bilaterality and various influencing factors. *Ophthalmology* **94** : 1020-1028, 1987
- 36) Preechawat P, Bruce BB, Newman NJ et al : Anterior ischemic optic neuropathy in patients younger than 50 years. *Am J Ophthalmol* **144** : 953-960, 2007
- 37) Nakamura M, Kanamori A, Negi A et al : Diabetes mellitus as a risk factor for glaucomatous optic neuropathy. *Ophthalmologica* **219** : 1-10, 2005

☆

☆

☆