

## 学内グラント 報告書

## 平成26年度 学内グラント終了時報告書

AT II 受容体欠損マウス一過性脳虚血における  
脳軟膜血管での血小板動態の観察

研究代表者 福岡 卓也 (国際医療センター 脳卒中内科)

研究分担者 平山 真紀子\*, 丸山 元\*, 林 健\*, 高尾 昌樹\*, 棚橋 紀夫\*

## 緒 言

アンジオテンシンIIは血管収縮・拡張, 細胞増殖促進・抑制, 血管内皮細胞や血管平滑筋細胞のアポトーシスの抑制・誘導, 炎症反応の促進・抑制に関与していることが知られている. アンジオテンシンII受容体遺伝子欠損マウスのin vivoにおける脳微小血管での血管内皮細胞と血小板, 白血球の相互作用についての報告されていない. 我々はマウス脳軟膜動静脈での血小板 (rolling/adhesion) を生体用蛍光顕微鏡を用いて検討する方法を確立した. そしてこの方法を用いてアンジオテンシンII受容体遺伝子欠損マウスでの脳虚血再灌流時の微小血管における血小板動態を観察する.

## 材料と方法

C57BL/6Jマウス, AT1 遺伝子欠損マウス, AT2 遺伝子欠損マウスの両側総頸動脈閉塞モデルでの虚血再灌流後の脳微小循環障害を血小板動態に注目して観察する.

## Animal preparations

実験動物として20-28 gのC57BL/6Jを使用する. 抱水クロラル (0.3 mg/kg) を腹腔内投与し麻酔導入する. 大腿動脈にポリエチレンカテーテル (PE10, Intramedic; Clay Adams) を挿入し動脈血圧と血液ガス分析を行う. 体温測定用プローブを直腸内に挿入し体温をモニタリングし保温用カイロにて体温を37度前後に維持する. 頭皮を切開し頭蓋骨を露出し, 工作用ドリルを用いて約3 mmの頭窓を作成する.

## Common carotid artery occlusion and brain preparation

頸部正中に皮切をおき両側総頸動脈を露出させ顕微鏡下に血管クリップを用いて両側総頸動脈を遮断. 15分間の虚血後に遮断解除し血流を再開させる. 虚血解除後にマウスをear barにより, 腹臥位でプラスチックフレームに固定し頭皮を切開する. 右頭頂骨を露出させ工作用ドリルを用いて頭頂骨を直径約2 mmの円形に削り骨を

剥離し頭窓を作成する. 頭窓から観察することができと血管との相互作用を観察する. 本方法は観察用の頭窓を作成するために, 頭蓋骨, 硬膜を除去するのみでクモ膜は切除しない状態で脳表血管が観察することが特徴である. したがって髄液の漏出がなく生理的状态での実験が可能であった.

## Blood Sampling and Platelet Preparation

実験動物 C57 BL/6Jマウスを放水クロラルを腹腔内投与し麻酔する. 大腿動脈にポリエチレンカテーテル (PE10, Intramedic; Clay Adams) を挿入し血液 0.9 mlを採取. 遠心機で血小板のみを分離し採取する. 血小板染色としてCFSEを加えて血小板 (50  $\mu$ l) を準備する.

Intravital Fluorescence Microscopy and Video Analysis 水銀ランプ (Nikon, Super high pressure mercury lamp power supply) による直立型顕微鏡 (Japan Tokyo Sankei-CoLtd, SO-SM) を用いて脳表血管の観察を行う. 対物レンズ20倍, 接眼レンズ10倍とし200倍の倍率でビデオ撮像する. カラービデオカメラ (Japan Tokyo Toshiba, JK-TU52H) で画像をビデオ録画 (Sony) する. 30から40  $\mu$ mの太さで100  $\mu$ mの長さの動脈静脈をランダムに選択しrollingとadhesionを観察する. 血小板のrollingの定義は血管中心部を流れる血小板の速度と比較して明らかに遅く, 血管壁に密着して転がるように流れる血小板とし, adhesionは血管壁に2秒以上30秒以内同じ場所にとどまっている血小板とした. Rolling and adherentの数を動脈, 静脈とも1 mm<sup>2</sup>あたりで測定し, 生体用蛍光顕微鏡を用いてマウス脳軟膜血管の動態を観察する.

## Experimental Protocols

野生型マウス, AT1 遺伝子欠損マウス, AT2 遺伝子欠損マウスで虚血再灌流後3時間, 6時間での血小板のrollingとadhesionの数を比較する.

## 結 果

結果を図に示す. AT2 欠損マウスの脳虚血再灌流

\*国際医療センター 脳卒中内科

後3時間後, 6時間後の脳軟膜動静脈への血小板のrolling/adhesion数はシャム群と比較して有意に増加していた ( $P<0.05$ ).

## 考 察

Ishikawa, et al. はAT1 ブロッカーを投与したマウスにおいてマウス脳虚血再灌流時に血小板, 白血球のrolling/adhesionが増加することを報告した (Ishikawa, et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2007).

AT2R KOマウスの脳虚血再灌流時に血小板のrolling/adhesionが増加したことより, AT2Rが血小板のrolling/adhesionに抑制的に働いている可能性が示された.

虚血再灌流時に血漿中のレニン/アンギオテンシンが

増加し, アンギオテンシンのAT1Rとの結合が相対的に増加したためと考えた.

## 研究成果リスト

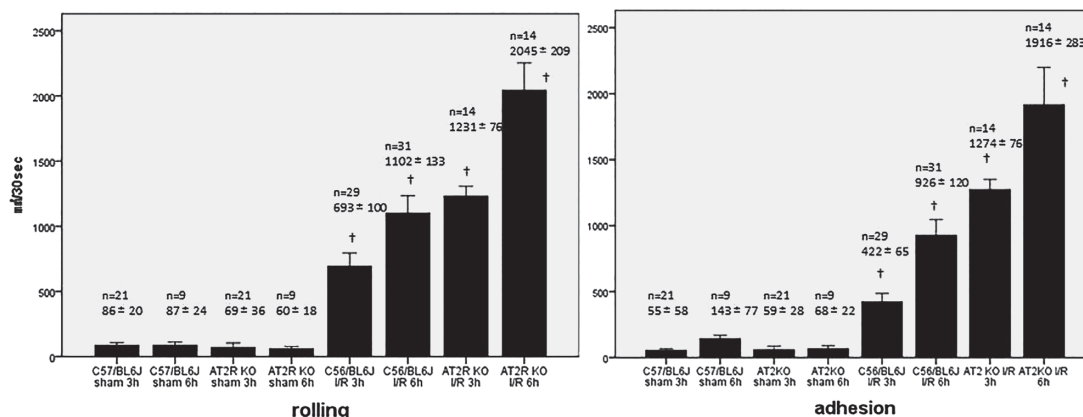
### 論文

- 1) J thrombosis and thrombolysis (in press).

### 学会発表

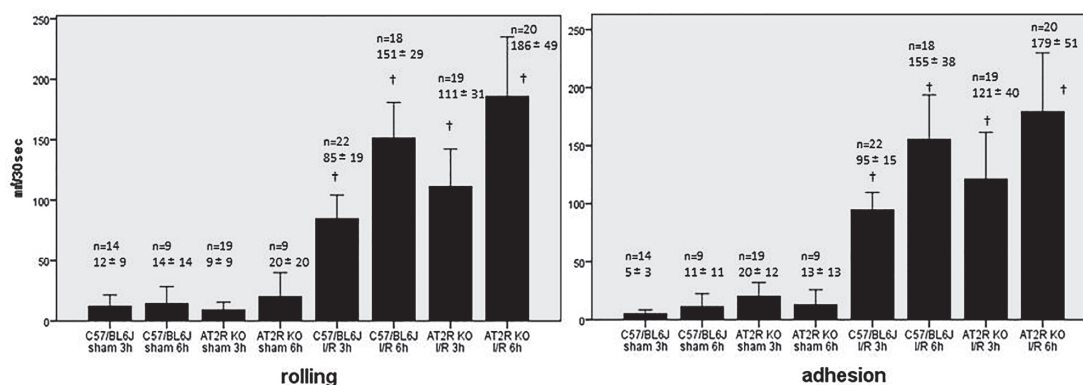
- 1) 福岡卓也, 林 健, 平山真紀子, 丸山 元, 棚橋紀夫. アンギオテンシンII type 2 レセプター欠損マウスにおける脳虚血再灌流後の脳軟膜血管での血小板動態の検討. 第55回日本神経学会学術大会, 平成25年5月, 福岡

## 虚血再灌流後の脳軟膜静脈への血小板のrolling/adhesionのまとめ



† $P<0.05$  relative to the corresponding C57/BL6J and AT2R KO Sham group at 3 and 6 h, respectively.  
n=number of vessel

## 虚血再灌流後の脳軟膜動脈への血小板のrolling/adhesionのまとめ



† $P<0.05$  relative to the corresponding C57/BL6J and AT2R KO Sham group at 3 and 6 h, respectively.  
n=number of vessel

図.