

論文の内容の要旨

論文題目

「マウスの精巣動脈を用いた、血管内皮細胞の構造変化と血栓形成に関する研究」

学位申請者 河村 洋太

キーワード：血管内皮細胞 塩化第二鉄 血栓症モデル 血小板血栓 抗血小板薬

〈背景〉

健常な血管内皮細胞の抗血栓性の維持には、血管内皮細胞から放出される一酸化窒素（NO）、プロスタグランジン（PG） I_2 ， t-PA， PAI-1などが関与する。動脈硬化巣の破綻は心筋梗塞や虚血性脳梗塞の引き金となる。緩徐な動脈硬化性狭窄の進行ではなく、動脈硬化巣の破綻と急速な閉塞血栓の形成が急性心筋梗塞の発症原因となる「急性冠症候群」の概念はFusterらにより提唱されたが、心筋梗塞の死亡例には病理学的に動脈硬化巣の破綻を認めない症例もある。動脈硬化巣の破綻を認めず、血管内皮細胞が存在するにも関わらず冠動脈を閉塞させるような血栓が形成されるメカニズムの理解は困難であった。動脈硬化巣破綻部位では血管内皮細胞が剥離するのみならず凝固系を活性化させる組織因子なども曝露され局所の血栓性が著しく亢進するが、血管内皮細胞存在下では内皮下の血栓性成分の関与がない。

動脈硬化巣破綻後モデルとしてバルーンによる血管内膜傷害モデルがあり、拡張したバルーンによる血管内皮細胞の物理的な損傷から血栓を惹起する。血管内皮細胞の機能的損傷による血栓惹起モデルとしては、レーザー光線照射後の血栓モデル、塩化第二鉄刺激モデルがあり、いずれも光線、ないし塩化第二鉄による酸化ストレス刺激が血栓形成の原因と理解されている。

〈目的〉

血管内皮細胞の存在下で、臓器灌流血管を閉塞させる血栓を形成できるか否かを検証する。実験方法の確立後、抗血小板薬としてアスピリン、クロピドグレルの血栓形成におよぼす効果を検証し、その後血栓形成後マウスを再飼育して1週間後の血栓と周囲の血管の性状を病理学的に検討する。

〈方法〉

マウス精巣動脈血栓モデル

週齢10～11週のオスICRマウスを用い、塩化第二鉄による刺激を行う。ケタミン、キシラジン、硫酸アトロピンと、ネンブタールを投与し麻酔を行い、マウスの精巣動脈を分離した。その後、FITCにより標識したイソレクチンB4を尾静脈より投与し、同様に0.1%ローダミン6G を投与してマウス血液中の血小板と白血球を蛍光標識した。0.25Mの塩化第二鉄溶液含有木綿糸をマウスの精巣動脈上に顕微鏡下におき、これを直径80-100 μm 径の精巣動脈上において血管の閉塞時間を計測した。

抗血小板薬の前投薬

抗血小板薬の薬効評価のために、塩化第二鉄傷害の4時間前に1mg/kg、10 mg/kg、100 mg/kgとなるようにアスピリンまたはクロピドグレルの経口前投与を行なった。

血栓の3次元イメージング

血栓形成過程の高速3次元イメージング技術を本動物モデルに応用した。高速共焦点顕微鏡を用いて塩化第二鉄傷害後の血栓の形成過程の3次元イメージングを行い、また血栓性閉塞までの時間を計測した。FITCとローダミンで血管内皮を緑、血栓を赤にて蛍光標識して両者のイメージングも施行した。

一週間後の病理組織標本

一連の実験施行後マウスを1週間飼育し、塩化第二鉄刺激を施行した精巣動脈と刺激しなかった精巣動脈の組織切片を作成しヘマトキシリン／エオジン染色を施行した。

解析方法

計測値はmean $\pm$ SEMにて表記し、各種濃度のアスピリン、クロピドグレルの薬効評価にはOne-Way ANOVAを用いた。2群間の比較にはStudent Newman-Keulsノンパラメトリック検定を行った。

〈結果〉

コントロールのマウスの精巣動脈血管内皮細胞は長方形にて敷石状、かつ間隙がなかったが、塩化第二鉄刺激後には血管内皮細胞に間隙が生じ、そこに血小板の集積を認めた。

血栓の形成プロセスの3次元イメージングでは、観察時間を延長すると、成長と崩壊を繰り返しつつ血小板血栓は塊状となり、最終的に精巣動脈を閉塞した。

血栓閉塞時間を、無投薬コントロールマウス（n=22）アスピリン前投薬マウス（1mg/kg・10

mg/kg・100 mg/kg : n=8, n=17, n=11)、クロピドグレル前投薬マウス (1mg/kg・10 mg/kg・100 mg/kg : n=9, n=8, n=14) で計測した。血栓による精巣動脈閉塞時間は、コントロール群では、塩化鉄傷害後から血栓が動脈を完全に閉塞させるまで 10.6 ± 7.5 分を要したが、アスピリン前投与群の血栓閉塞時間はコントロールと差異を認めなかったのに対し、10 mg/kg、100mg/kgのクロピドグレル前投薬では血栓性閉塞に至る時間は各々 62.5 ± 21.0 分、 64.6 ± 25.3 分と有意に延長させた。

コントロールマウスの精巣動脈において血管内皮細胞と血栓の同時イメージングを行ったモデルでは、塩化第二鉄による血管内皮細胞刺激後に血管が完全閉塞した場合でも、血栓の底部の血管内皮細胞が存在していた。

一連の実験施行後に1週間マウスを継続飼育した後の精巣動脈の病理組織所見像でも、塩化第二鉄による内皮細胞刺激後に閉塞血栓を認めた精巣動脈でも血栓の底部に血管内皮細胞の存在を認め、また血管内膜の肥厚を認めた。

〈考察〉

塩化第二鉄による血管内皮細胞への刺激により内皮細胞への血小板の集積を認めるのみならず80-100 μ m径の精巣動脈閉塞血栓が形成されることを示した。また、閉塞血栓形成時にも閉塞血栓の基底部に血管内皮細胞が存在していることを示した。本モデルではまた、クロピドグレルでは血栓成長抑制効果を認めた一方、アスピリンの効果は確認できなかった。これはアスピリンによる心筋梗塞再発予防効果が冠動脈内の血栓の成長阻害以外の作用によることを示唆している。アスピリンの効果を反映できない理由として、本モデルは人工的な内皮細胞傷害後短時間の局所の血栓の成長のみに着目していることが挙げられる。

われわれは血管内皮細胞の機能的傷害のみにて精巣動脈閉塞血栓の形成が可能であることを示したが、これは血管内皮細胞の機能的傷害から惹起される血栓がヒトにおいてしばしば観察される動脈硬化巣破綻を伴わない冠動脈閉塞血栓と関連している可能性がある。

本研究はマウス精巣動脈を用いた実験的検討であり、研究結果から臨床的考察を行なうためには限界がある。マウスとヒトの血小板細胞には差異があるだろうし、ヒト心筋梗塞の発症に寄与する血小板と凝固系の活性化によるpositive feedbackがマウスにおいて同様に起こるか否かは

不明である。臨床試験において示されたアスピリンとクロピドグレルの有効性のわずかな差異を説明できる動物モデルは確立されていない。抗血小板薬の臨床的有効性を予測できる動物モデルの確立は今後の課題である。

〈結論〉

血管内皮細胞の機能的傷害時の血栓形成過程を反映する動物モデルを作成した。血管内皮細胞の存在下でも精巣動脈の閉塞血栓が形成された。本モデルにおける閉塞血栓の形成はクロピドグレルにより阻害されアスピリンにより影響を受けなかった。