原 著

血小板凝集起因脳血管傷害発生機序の電顕的解析

藤本 司* 鈴木 英紀** 小林 正彦***
田上憲次郎** 福島 義治* 山崎 博男**

Electron microscopic analysis of the process of cerebrovascular
injury caused by platelet aggregation

Tsukasa FUJIMOTO*, Hidenori SUZUKI**, Masahiko KOBAYASHI***,
Kenjiro TANOUE**, Yoshiharu FUKUSHIMA* and Hiroh YAMAZAKI**

Key words: ADP, cerebrovascular injury, vesicular transport,
horseradish peroxidase (HRP), electron microscope

When platelets were aggregated with an injection of ADP into cerebral artery, cerebrovascular injuries were observed. For analysis of the process of this vascular injury, electron microscopic observation was performed using horseradish peroxidase (HRP) as a marker of vascular permeability change. Two different types of changes; increased vesicular transport and vacuole formation were recognized. Vesicles (0.05–0.2 μm) contained HRP reaction product but vacuoles (1.2–2.0 μm) did not. In middle cerebral artery, vacuole formation was mainly revealed. Extravasation of HRP reaction products was not seen. In capillaries, arterioles or venules, increased vesicular formation was rare. Extravasation and perivascular edematous changes were remarkable. Namely endothelial cell damage was more prominent in large artery but extravasation and perivascular edematous changes were mainly seen in smaller vessels. And extravasation was more frequently seen in cerebral cortex and hippocampus comparing with basal ganglia. Following the ADP injection, blood levels of TXB_2 and 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ revealed marked temporarily increase at 3 min after the injection. The results suggest that these vasoactive substances from platelets may play an important role in producing

* 昭和大学藤が丘病院脳神経外科〔〒227 横浜市緑区藤が丘 1-30〕, Department of Neurosurgery, Showa University, Fujigaoka Hospital, Yokohama, Japan.

** 東京都臨床医学総合研究所循環器部, Department of Cardiovascular Research, Tokyo, Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo, Japan.

*** 日本動脈硬化研究所, Japan Arteriosclerosis Research Institute, Tokyo, Japan. [1984年6月9日受付, 1984年8月20日受理]

these vascular injuries.

These phenomenon seems to be important to understand the mechanism of vascular damage in various cerebrovascular lesions.

はじめに

生体内において血管内血小板を活性化することにより、正常の脳血管に傷害が発生することを報告してきた¹⁾²⁾。本研究はさらにその詳細を明らかにするため、血小板凝集起因物質である ADP を内頸動脈内に投与し、脳血管に生ずる傷害の発生機序を脳組織の部位、ならびに太さによる傷害像の差の上から検討した。また血小板の活性化に伴い、生物学的活性の高い物質、すなわちセロトニン、プロスタグランディン中間体やトロンボキサン A₂ (TXA₂) 等が放出されるため、これらの物質が血管傷害発生に関係している可能性が考えられる。そこで ADP 注入後、同側内頸静脈血の TXB₂ (TXA₂ の終末代謝産物)、および 6-keto PGF_{1α} (PGI₂ の終末代謝産物) の血中濃度を経時的に測定し、血管傷害との関係を検討した。

I. 方 法

白色家兎13羽を用い、全麻下でポリエチレンチューブを右外頸動脈から逆行性に頸動脈分岐部まで挿入し、内頸動脈の血流を妨げずに 40 mg/kg (濃度 60 mg/ml) の ADP を 60 秒間で注入し、5, 15, 60 分後に屠殺した。なお屠殺 15 分前に 25 mg/kg の horseradish peroxidase (HRP) を、屠殺 30 分前に 2 % エバンス・ブルーを静注し血管透過性障害の指標とした。脳を摘出後、クモ膜下腔内を走行する中大脳動脈のほか、脳組織の各所、すなわち大脳皮質、海馬、大脳基底核の小片を切り出し、2.5 % グルタルアルデヒド液で固定後型の如く電顕標本を作成し、JEM-100 S (JEOL) を用いて観察した。また脳の相対する半分から凍結切片を作成し、ジアミノベンチジン処理にて HRP 反応物質の分布を光顕的に観察した。一方 9 羽を用い同様に頸動脈、さらに右内頸静脈にポリエチレンチューブを挿入し、上記と等量の ADP を同じ条

件で注入した。注入前、3, 60 分後に静脈血を採取し、RIA 法にて TXB₂, 6-keto PGF_{1α} の血中濃度を測定した³⁾⁴⁾。

II. 結 果

ADP 注入 60 分後、注入側のみエバンス・ブルーによる青染がみられ、光顕的にこの領域に一致して HRP 反応物質の血管外漏出がみられた。血管外漏出は注入側の大脳皮質、海馬、ついで大脳基底核の順に高頻度でみられた。各部位では特に毛細血管、細動静脈の周囲に強くみられた。一方中大脳動脈では HRP 反応物質を血管腔内に認めたが、血管外漏出は明らかではなかった。電顕的には、中大脳動脈では注入 5 分後、注入側の血管腔内に脱顆粒がみられる活性化された血小板がみられ、血管内皮細胞内に HRP 反応陽性の vesicle (直径 0.05~0.2 μm) が血管腔に面する内皮細胞表面近くで、非注入側の約 4~6 倍に増加しており、HRP 反応陰性の vacuole (直径 1.0~2.0 μm) が時にみられた。15 分後では vacuole はさらに高頻度でみられるが vesicle の増加は著明ではなかった。60 分後には内皮細胞内に多数の vacuole がみられ、細胞質の他の部分には HRP 反応物質が充満していた。一部では内皮細胞の剝離がみられ、その部には血小板凝集塊が認められた。血管壁の蛇行、内皮細胞下あるいは内弾性板下の浮腫性変化は著明であったが、HRP 反応物質の血管外漏出はみられなかった。全経過を通じて tight junction はよく保たれていた。一方 ADP 注入側の脳実質内の毛細血管、細動静脈では vacuole の出現は極めて少く、vesicle の増加が中心であった。時間の経過とともに増加し、60 分後には HRP 反応物質の血管外漏出、血管周囲の浮腫性変化が著明にみられた。しかしながら tight junction はこれらの細い血管でもよく保たれていた。太い中大脳動脈の場合と異なり、内皮細胞の剝離はみられなか

Fig. 1 Electron microscopic findings of middle cerebral artery sixty min after an injection of ADP. (1A) : Remarkable HRP negative vacuoles in the endothelial cells are seen. Tortuosity of internal elastic lamina and edematous changes in subendothelial tissue and muscle layers are also revealed. (1B) : Unstained specimen. Many HRP negative vacuoles are observed in the endothelial cells. Although the cytoplasm was filled with black HRP reaction products, extravasation is not seen.

った。なお、非注入側では血管はよく保たれており、これらの変化はみられなかった。一方 TXB_2 血中濃度の注入前, 3, 60分後の平均値±標準偏差は, $0.346 \pm 0.143 \text{ ng/ml}$, $1.266 \pm 0.741 \text{ ng/ml}$, $0.460 \pm 0.294 \text{ ng/ml}$ であった。6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ は各々, $0.833 \pm 0.403 \text{ ng/ml}$, $5.427 \pm 1.521 \text{ ng/ml}$, $1.342 \pm 0.707 \text{ ng/ml}$ であり, 3分後に共に有意 (TXB_2 は $p < 0.02$, 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ は $p < 0.001$) な一過性の上昇がみられ, 60分後には再び前値にもどっていた。上昇の程度は 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ より著明であった。

III. 考察および結論

ADP 注入後, 血小板凝集に伴って出現する血管内皮細胞傷害には, HRP 反応物質を含まない vacuole の出現と, 含む vesicular transport の増強とがみられた。血管の太さによりその出現様式が異っており, 細い血管, すなわち

毛細血管, 細動静脈の内皮細胞では vesicular transport 亢進が主であり, その結果と考えられる HRP 反応物質の血管外漏出, 血管周囲の浮腫性変化が著明にみられた。一方大型の動脈, すなわち中大脳動脈の内皮細胞では vacuole が著明にみられた。vacuole は HRP を含んでいず, ミトコンドリアや RES の変化したものである可能性が考えられるが明らかではない。変化が著明な内皮細胞では多数の vacuole が細胞内に出現し, HRP 陽性物質が細胞質内へ広汎に侵入していた。一部では内皮細胞と内弾性板との間にも vacuole が認められた。しかしながら血管外への HRP 陽性物質の漏出は認められず, 細い血管の傷害像とは異っていた。本来, 血管壁をとおしての物質交換は毛細血管で最も盛んであり, この部での vesicular transport の著増は極めて理解しやすい現象と思われる。これらの血管では, 剥離にまで進むような内皮細胞の傷害はみられず, 透過性亢進との関係で大

Fig. 2 Capillary in cortex sixty min after the injection.

(2A): Various-sized vesicles containing reaction products are increased in endothelial cells but HRP negative vacuoles are rarely seen. Prominent perivascular edematous changes are revealed.

(2B): Unstained specimen. Black HRP positive vesicles in endothelial cells and prominent extravasation of HRP reactive products are clearly seen.

変興味深いことと思われた。太い血管で内皮細胞剥離にまで進みうる細胞自身の傷害が強く生じたが、この原因としては透過性の亢進ということよりも、血管攣縮の発生、厚い内弾性板の存在等がより関係している可能性が考えられる。脳の部位別では大脳皮質、海馬、大脳基底核の順に血管外漏出がより高頻度にみられた。しかしながら部位間の血管傷害像には明らかな差を見出し得なかった。これらの部位は大脳血管皮質枝、あるいは穿通枝に支配されており、血行動態を含めた種々の要因が発現頻度の差に関係していると考えられる。ADP 注入の際のこれらの血管傷害の原因として、血小板凝集塊による微小循環障害の可能性を考えなければならないが、ADP による凝集は一過性であり、注入直後には多数凝集塊を認めても5分後にはわずかに散在しているのを認めるにすぎない。したがってこれによる虚血を主な原因と考えることはできない。一方 ADP 注入後の TX

B₂, 6-keto PGF_{1α} の血中濃度の経時的変化をみると、共に3分後に一過性の著増がみられた。TXA₂ は血小板から遊離される生物学的活性物質の中でも極めて強力な血管作動物質であり⁵⁾、ADP 注入後の TXB₂ の著明な増加は、TXA₂ がここに観察した血管傷害の原因の一つとなっている可能性をしめしていると思われる。PGI₂ は逆に血小板凝集を抑制し、血管壁の防禦機能を持っており⁶⁾、TXA₂ の増加とともにそれ以上の著明な増加を示したことは、生体の防禦機構を考えると極めて興味深いことである。

脳血管の太さ、部位により異った傷害像がみられるということは、脳血管傷害の成因解明にあまり重要であると考えられる。

文 献

- 1) Fujimoto T., Inaba Y., Motomiya T. and Yamazaki H: Intravascular aggregation of

- platelets and cerebrovascular insufficiency. In Circulatory and Developmental Aspects of Brain Metabolism. Ed. Spatz M. et al. Plenum Press, New York and London, 1980, p. 169 ~180.
- 2) Yamazaki H., Motomiya T. and Fujimoto T.: Vascular injuries induced by intravascular platelet aggregation. Acta Haematol. Jpn., **43** (6); 208~216, 1980.
 - 3) Yamazaki, H., Isohisa, I. and Tanoue, K.: Sudden death induced by intracoronary platelet aggregation. Jpn. Circ. J., **47** (5); 596~607, 1983.
 - 4) Wuthier R.E.: Purification of lipids from nonlipid contaminants on sephadex beads columns. J. Lipid Res., **7**; 558~561, 1966.
 - 5) Hamberg M., Svensson J. and Samuelsson B.: Thromboxanes, a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **72**; 2994~2998, 1975.
 - 6) Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S. and Vane, J.R.: An enzyme isolated from arteries transform prostaglandin endoperoxide to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. Nature, **263**; 663~665, 1976.

●治療指針と問題点を解説する！

急性白血病の化学療法—基礎と臨床—

編集 京都大学内科教授 内野治人ほか 専門医33氏分担執筆
A 5 判 268頁 図106 表65 定価6,800円(〒300円)

最近の急性白血病化学療法の進歩は著しいものがあり、新しい薬剤の開発と作用機序の解明、量、種類、使い方など、臨床のための数々の基礎的研究が全世界的にわたって集積された。本書はそれらの研究を整理して、ルーチン化できるものは治療指針として設立し、しかも現在の問題点を浮き彫りにして解説し、今後の研究に資した。

●内容：〔急性白血病化学療法の基礎〕第1章 白血病細胞の分化と化学療法、第2章 抗白血病剤の作用機序と臨床効果、第3章 造血器腫瘍細胞培養株の薬剤感受性度、第4章 細胞回転と化学療法、第5章 急性白血病における新しい治療法の試み、第6章 染色体分析からみた急性非リンパ性白血病化学療法の二、三の問題点、〔急性白血病化学療法の臨床〕第1章 成人急性白血病の化学療法、第2章 小児の急性リンパ性白血病の治療、第3章 血球成分の輸血療法、第4章 出血症状とその治療、第5章 感染症の治療、第6章 無菌病室による急性白血病治療、第7章 無菌室治療における腸管内無菌化処置、第8章 白血病の顆粒球機能異常と感染症化学療法、総括。