原 著

 ^{111}In -oxine 標識血小板を用いたオートラジオグラフィによる家兎の脳および肺血管傷害の検討

藤本 司*** 鈴木 英紀** 黒岩 京子***
 田上憲次郎** 福島 義治* 山崎 博男**

Autoradiographic observations of the induced vascular
 injuries by arachidonic acid in rabbit's brain and
 lung...using ^{111}In -oxine labeled platelets

Tsukasa FUJIMOTO***, Hidenori SUZUKI**, Kyoko KUROIWA***,
 Kenjiro TANOUE**, Yoshiharu FUKUSHIMA* and Hiroh YAMAZAKI**

Key words: ^{111}In -oxine labeled platelets, autoradiogram, cerebrovascular injury, decompression sickness, arachidonic acid

Autoradiography using ^{111}In -oxine labeled autologous platelets was performed to observe the behavior of platelets in induced vascular injury by activated platelets in rabbit's brain and lung.

Cerebrovascular injuries were induced by injection of arachidonic acid (AA) (0.7 mg/kg) into right internal carotid artery. Fourteen animals were pretreated with antiplatelet drug, ticlopidine (200 mg/kg) and 10 were controls. Before the AA injection, ^{111}In -oxine (300 μCi) labeled platelets were injected intravenously. Evans blue was given as a marker of disturbances of blood brain barrier. Sixty min after the AA injection, brains were removed and autoradiographic and electron microscopic studies were done. In the nontreated animals and some of the treated animals whose platelet aggregability was not suppressed, blue staining were seen in the cerebral hemisphere of injection side and hot radioactivity in autoradiogram were revealed in corresponding area. In the treated animals

* 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病研究部, Department of Cardiovascular Research, The Tokyo Metropolitan Institute of Medicine, Tokyo, Japan.

*** 東京医科歯科大学医学部第一内科, The First Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan.

whose platelet aggregability was remarkably suppressed, no or slight blue staining or radioactivity were recognized. Only in hot radioactive area, platelet thrombi and vascular injuries were seen.

Vascular injuries of lung were produced by decompression after keeping animals under hyperbaric condition (6 atmosphere absolute for 40 min). Before this procedure, ^{111}In -oxine labeled platelets were injected. Lungs of both 4 control and 4 decompression sickness animals were removed and autoradiographic and lightmicroscopic observations were performed. In lungs of decompression sickness animals remarkable spotty high radioactivity and prominent platelet aggregates in the vessels were seen. These findings were not seen in control animals.

Our results suggested important roles of platelets in induced vascular injuries. And this autoradiographic approach seemed to be quite useful for observation of platelet's behavior in injured vessels and evaluation of antiplatelet drugs.

はじめに

生体内で血小板を活性化させた場合、血小板起因の脳血管傷害がおこりうることを報告してきた^{1,2,3)}。また実験的減圧症においても、血小板数の減少、血小板の偽足形成とともに肺血管傷害をみとめ、血小板がその発生に重要な役を演じている可能性を報告した⁴⁾。これらの脳および肺血管傷害発生時における、血小板の動態をより明らかにするために、放射性同位元素 ^{111}In -oxineで標識した自己血小板を用いてオートラジオグラフィーを行い、その有用性と、これらの血管傷害における血小板の関与を検討した。

I. 方 法

家兎の血小板の ^{111}In -oxineによる標識、およびその kinetics は油井等の変法⁵⁾にて行った。すなわち、血小板の標識は、ACD液(NIH, ACD-A液, テルモ) 3 ml 中に全血 18 ml を採血し、血小板を分離洗滌した後、 $300 \mu\text{Ci}$ の ^{111}In -oxine (Amersham, USA) で標識し自家 PPP (platelet poor plasma) に再浮遊させた。Recovery の測定時には、標識血小板を打ち返した2時間および22時間後に、100 mM の EDTA を含む生食水 0.5 ml に、全血 4.5 ml を採血して行った。なお家兎の血液量は体重の 4.7 % として計算した。

脳血管傷害の作成には白色家兎24羽を用い、

50 mg/kg のペントバルビタール腹腔内投与による全麻下で、右舌動脈からカテーテルを逆行性に頸動脈分岐部まで挿入し留置させた。100 unit/kg のヘパリン投与後標識血小板を注入し、15分後にカテーテルを介して内頸動脈へアラキドン酸 (AA) (Sigma) 0.7 mg/kg (濃度 2 mg/ml) を5秒間で注入した。なお、24羽中14羽には、抗血小板剤チクロピジン 200 mg/kg/day を AA 注入に先だち1~3日間投与し、10羽には与えず対照とした。チクロピジン投与例では投与前後で、ADP ($10 \mu\text{M}$)、コラーゲン ($30 \mu\text{g/ml}$) を用いて血小板凝集能を測定し抑制の程度をみた。AA 注入の30分後に、血液脳関門障害の指標として、2 % エバンス・ブルー 1 ml/kg を静注、1時間後に断頭し脳を摘出した。摘出脳の半分をヘキサソ・ドライアイスで凍結させ、クライオトーム (Auto Cryotome NA-200 F, 中川誠光堂) を用い、 $40 \mu\text{m}$ 厚の薄切片とし、 4°C 下で X 線フィルム (Kodak DEF) に6日間露出させオートラジオグラムを作成した。残りの半分を用い、脳表クモ膜下腔内の中大脳動脈、大脳皮質、海馬、大脳基底核部の小片を摘出し、1 % グルタルアルデヒド 2 % パラフォルムアルデヒド液で固定し、電顕標本を作成し JEM-100 S (JEOL) を用いて観察した。他は中性ホルマリン液にて固定し光顕の観察に供した。

肺血管傷害は家兎を用い、 ^{111}In -oxine 標識血小板を注入した22時間後に、ペントバルビター

Fig. 1 Autoradiogram of the brain one hour after AA injection. (A) Remarkable dark spots meaning increased radioactivity were seen only in the injection side. (B) In the case of which platelet activity was suppressed with ticlopidine, no increased radioactivity was recognized. (Lower, left) Electronmicroscopic pictures of middle cerebral artery of the brain showed remarkable radioactivity revealed prominent vascular injury and platelet thrombus formation. (Lower, right) In small vessel in the cortex of the same animal, vascular cavity was filled with platelet thrombus and perivascular edema was remarkable.

ル腹腔内投与による全麻下で高圧チャンバーに入れ、1 ATA (絶対気圧)/min の速度で加圧し、6 ATA 下に40分間保圧後、減圧も1 ATA/min で行い減圧症を発症させた。減圧症の4羽と対照の4羽の肺の一部を凍結させ同様にオートラジオグラムを作成した。相対する切片を中性ホルマリン液で固定し光顕的観察に供した。

II. 結 果

標識血小板の2時間後の初期回収率は、 $74.7 \pm 11.8\%$ ($M \pm SD$, $n=7$) で、22時間後の回収率は $49.2 \pm 7.3\%$ であった。半寿命は32時間であった。

脳血管にAAを注入した場合、チクロピジン非投与群では10例中9例で注入側大脳半球にエバンス・ブルーによる著明な青染がみられ、投与群では14例中3例で青染はみられず、4例で軽度、7例で著明な青染がみられた。投与群で、青染は有意に少かった。

電顕的には青染部の血管では、内皮細胞の剝離、血小板凝集塊がみられ、大型血管である中大脳動脈では血管攣縮の存在を示していると思われる内弾性板の蛇行がみられ、脳実質内の毛細血管、細動静脈では著明な血管周囲の浮腫像がみられた。この青染部とはほとんど一致してオートラジオグラム上、径1～2 mm 大の黒化を

Fig. 2 Autoradiographic pictures of lung of decompression disease. (A) Remarkable dark spots showing increased radioactivity was prominent. (B) No radioactivity was seen in the control. (Lower, left) Pulmonary vessels are filled with platelet thrombus in these radioactive area. $\times 400$, HE stain. (Lower, right) $\times 400$, PTAH stain, fibrin fibers are seen in the thrombus.

含む放射活性の著増が認められた。チクロピジン投与により凝集能が抑制された動物では青染の減少がみられ、特に抑制が著明であった3例では青染も放射活性の増加もみられなかった(図1)。

減圧症の4羽では全例オートラジオグラム上放射活性の著増がみられた。放射活性の高い部分に一致した組織では、壁在性血小板凝集塊と血管傷害像が認められた。一方対照の4例ではこれらの変化は1例にもみとめられなかった(図2)。

III. 考察および結論

血小板を放射性同位元素で標識してその動態を観察することは、血小板が関与する病態解明

に極めて有用である。核種としては ^{51}Cr が最も広く用いられているが、標識率が低いため検査には大量の採血が必要である。1976年 Thakur⁶⁾等は ^{111}In -oxineを用いて非常に高い標識率が得られることを報告した。標識血小板のkineticsは従来の ^{51}Cr を用いた成績にほぼ同等であり、ヒトのみならず家兎においてもすぐれた標識法と思われた。 ^{111}In -oxine標識血小板を用いてオートラジオグラフィーを行い、すでに報告してきた脳¹⁻³⁾および肺⁴⁾の血管傷害時の血小板の動態を観察した。

脳血管傷害作成には、強力な血小板凝集作用とともに、直接的に内皮細胞の傷害作用⁷⁾をあわせもつAAを用いた。動脈血栓の形成機構として、内皮細胞の傷害、剝離ということと、

血小板の粘着、凝集との二つのことが重要であり、AAはこの点から適していると考えたからである。

血液脳関門障害による青染の分布とオートラジオグラムの放射活性の高い部分とが極めてよく一致しており、血小板凝集塊の存在が血管壁の傷害に大きく関係していると思われた。またチクロピジン投与により著明に血小板凝集能が抑制されている場合には、これらの変化はみられず、このことから血小板の関与の重要性がうかがわれる。減圧症動物では、血小板数の減少や形態変化⁴⁾などがみられ肺のオートラジオグラム上著明な放射活性をみとめ、その部分に一致して血管内血小板凝集塊と血管壁の傷害が認められた。この肺血管傷害においても血小板の関与が大きいことを示していると思われる。

¹¹¹In-oxine 標識血小板を用いたオートラジオグラフィーは、血管壁の傷害に伴う血小板凝集塊の出現、抗血小板剤の効果判定、減圧症病態における血小板の関与などの解明に極めて有用な方法であると思われた。

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, 169~180, 1983.
- 2) Yamazaki, H., Motomiya, T. and Fujimoto, T.: Vascular injuries by intravascular platelet aggregation. *Acta Haematol. Jpn.*, **43**;208~216, 1980.
- 3) Fujimoto, T., Suzuki, H., Tanoue, K., Fukushima, Y. and Yamazaki, H.: Cerebrovascular injuries induced by activation of platelets in vivo. *Stroke*, **16**(2); 245~250, 1985.
- 4) Kuroiwa, K.: The functional and biochemical changes of platelets in experimental decompression sickness of rabbits. *The Bulletin of Tokyo Medical and Dental University*, **31**(2); 73~84, 1984.
- 5) Yui, T., Uchida, T., Matsuda, S., Tanaka, T., Saito, M. and Kariyone, S.: Basic study of platelet labelling with ¹¹¹In-oxine. *Nucl. Med.*, **18**(4); 463~472, 1981.
- 6) Thakur, M.L., Welch, M.J., Joist, J.H.: Indium-111-labeled platelets: Studies on preparation and evaluation of in vitro and in vivo functions. *Thromb. Res.*, **9**; 345~357, 1976.
- 7) Spector, A.A. and Hoak, J.C.: Fatty acids, platelets, and microcirculatory obstruction. *Science*, **190**; 490~491, 1975.

●自分で実際にやれる手術書！

植田小児外科

大阪市立保健センター外科 植田 隆著

B5判 364頁 図207 表18 定価9,800円(〒350円)