

氏名	にし 西	じま 嶋	かず 一	あき 晃
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)			
学位記番号	医 博 第 2579 号			
学位授与の日付	平成 15 年 3 月 24 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研究科・専攻	医学研究科外科系専攻			
学位論文題目	In Vivo Evaluation of Platelet-Endothelial Interactions after Transient Retinal Ischemia (生体下での網膜虚血再灌流後の血小板-血管内皮の相互作用の画像化とその評価)			
論文調査委員	(主査) 教授 月田承一郎 教授 西川伸一 教授 本田孔士			

### 論 文 内 容 の 要 旨

血小板を除くことにより虚血再灌流障害が軽減されることから、血小板は虚血再灌流後の組織障害に重要な役割を果たしていることが明らかになってきている。血小板は活性化すると活性酸素や serotonin, thromboxane A<sub>2</sub>, PDGF などの放出や、白血球の誘導を通して組織障害に寄与していることが *in vitro* の実験で報告されている。生理下では血管内皮細胞が NO や prostaglandin I<sub>2</sub>などを放出して血小板の接着を抑制しているが、血管内皮が傷害されると血小板が一時的な接着をおこしながら活性化され、ひいては血管内皮に堅固な接着をおこすことも示されている。しかし、生体下での血管内皮と血小板の相互作用についてはほとんど報告がなく、特にずり応力の大きい網膜血管における再灌流後の血小板と血管内皮の相互作用に関する報告は皆無である。そこで侵襲が少なく血流をリアルタイムで観察できる利点を生かし、網膜における虚血再灌流後の血小板と網膜血管内皮との相互作用を映像化し、そこに働く分子機構について検討した。

方法は、まずドナーラットから採血して遠心分離した血小板に carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester を加えて染色し、単位体積あたりの血小板量を調節する。レシピエントラットの視神経軸を結紮して60分後に解放する網膜虚血再灌流モデルを作成し、再灌流後 1, 2, 4, 6, 9, 12, 24, 48時間経過した後一定量の血小板を投与して走査型レーザー検眼鏡にて血小板動態を観察する。一方、再灌流12時間後に(1)何も処置をしていないラットから採取した血小板を投与するグループ(2)虚血再灌流後のラットから採取した活性化した血小板を投与するグループ(3)抗 P-selectin 抗体を投与したレシピエントラットに非活性化血小板を投与するグループ(4)血小板に抗 P-selectin 抗体を作用させて投与するグループ、以上 4 つに分けて検討を加えた。また再灌流後、網膜に発現する P-selectin mRNA を半定量 PCR にて測定した。

再灌流後各時間のずり応力には差は認められなかった。再灌流 4 時間後から網膜静脈にて血管壁に沿ってローリング、接着する血小板が観察され、再灌流後12時間で最大値をとり ( $555 \pm 65/\text{mm per min}$ ,  $25.8 \pm 3.2/\text{mm}^2$ ) ローリング速度は 9 - 12 時間後で最小値をとった。網膜動脈では血小板のローリング、接着は認めなかった。ローリング、接着は血小板の活性化状態によらず、抗 P-selectin 抗体をレシピエントラットに投与した場合有意な抑制を認めたが、抗 P-selectin 抗体を反応させた血小板をレシピエントラットに投与した場合には抑制は認められなかった。網膜における P-selectin mRNA の発現は再灌流後増加し、9 - 24 時間で最大値をとった。

これらの結果より、網膜虚血再灌流後血小板は血管内皮とローリング、接着といった相互作用をおこし、これには血管内皮表面に発現する P-selectin が関与しており、血小板側に発現する P-selectin は関与していないことが明らかになった。また内皮の P-selectin に対する血小板側のリガンドは恒常的に発現していることが判った。虚血再灌流後 P-selectin をブロックすることで血管内皮と白血球の相互作用が抑制され、組織障害が軽減されるとの報告があるが、血管内皮と血小板の相互作用が抑制されるためでもありと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

内部に様々な生理活性物質を内包する血小板は、膜表面に接着分子を発現して血管内皮と作用をおこすことにより、炎症反応において白血球と共に主要な役割を演じていることがわかってきている。本研究では走査型レーザー検眼鏡を用いて、虚血再灌流後のラット網膜の血小板動態を視覚化することにより、血小板と血管内皮との相互作用を定量評価した。その結果、再灌流後各時間のずり応力に差は認められなかったが、再灌流4時間後から網膜静脈の血管壁に沿ってローリング・接着する血小板が観察され、その数は再灌流後12時間で最大となった。血小板のローリング・接着は、抗P-selectin抗体を虚血再灌流後のラットに投与した場合に有意な抑制を認めたが、抗P-selectin抗体を反応させた活性化血小板を虚血再灌流後のラットに投与した場合には抑制が認められなかった。網膜におけるP-selectin mRNAの発現は再灌流後増加し、9-24時間で最大値をとった。従って、網膜虚血再灌流後、血小板は血管内皮表面に発現するP-selectinを介して血管内皮と相互作用をおこし、血小板側に発現するP-selectinは関与していないことが明らかになった。

以上の研究は虚血再灌流後の網膜における血小板動態を初めて生体下で画像化し定量的に評価したもので、血小板を介する炎症反応機構の解明に寄与するものと考えられる。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成15年2月10日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。