

一 般 演 題 抄 録

3. α_2 -アンチプラスミンノックアウトマウスの解析

岡田清孝 上嶋繁 深尾偉晴 松尾理
近畿大学医学部第2生理学教室

α_2 -アンチプラスミン (α_2 -AP) はプラスミンの阻害因子で、血液線溶系を制御している。最近、この線溶系因子は血管内での反応のみならず血管新生、創傷治癒や癌の浸潤・転移などの生体内での生理学的、病態生理学的機能に重要な役割を果たしていることが解明されつつある。その解析方法の一つとして、目的の因子をジーンターゲットングにより欠損させた、ノックアウトマウスが用いられている。そこで、 α_2 -AP の生体内での役割を検討する目的で、 α_2 -AP のノックアウトマウス (α_2 -AP^{-/-}) の作成とその解析を試みた。

マウスの α_2 -AP 遺伝子は P1 phage ライブラリーよりクローニングし、塩基配列解析と制限酵素マッピングを行なった。その結果、 α_2 -AP 遺伝子はヒトと同様に10個のエクソンと9個のイントロンからなり、496個のアミノ酸をコードしていた。そこで、 α_2 -AP 遺伝子の蛋白翻訳領域を *neomycin* 耐性遺伝子に置き換えたターゲットングベクター *pPNT α_2 -AP* を作成し、マウス胚性幹 (ES) 細胞に挿入した。その細胞を用いて α_2 -AP ノックアウトマウスを作成した。

α_2 -AP のキメラマウス (F1) 同士の交配より得られた3種の geno-type の比率は、1 : 2 : 1 (α_2 -AP^{+/+} : α_2 -AP^{+/-} : α_2 -AP^{-/-}) と正常であった。 α_2 -AP^{-/-} マウスは妊娠・出産および発育・成長とも正常であった。凝血学的パラメータは3 geno-type で差はなかった。ヒトの α_2 -AP 欠損症で認められる顕著な出血傾向は、 α_2 -AP^{-/-} マウスに認められなかった。実験的肺塞栓モデルにおける塞栓の自然溶解能は α_2 -AP^{-/-} マウスの方が、その wild-type (α_2 -AP^{+/+}) マウスに比べ、有意に増強していた。また、エンドトキシン (LPS) 投与による敗血症モデルでの腎臓におけるフィブリン沈着は、 α_2 -AP^{+/+} マウスに比べ、 α_2 -AP^{-/-} マウスの方が有意に減少していた。

以上のように α_2 -AP ノックアウトマウスは、正常に妊娠・出産および発育・成長した。出血傾向はヒトとマウスで種差が認められた。また、 α_2 -AP^{-/-} マウスは線溶酵素 plasmin の阻害因子である α_2 -AP の欠損により、線溶能が亢進していた。さらに種々の病態モデルにおける α_2 -AP^{-/-} マウスの挙動を検討中である。

4. Pneumatic control injury device を用いた脳損傷後の Cavity 面積と GFAP 陽性領域との関連

林 義之 玉井良尚* 伊藤龍生 蛭間真悟 佐藤隆夫 橋本重夫
近畿大学医学部第2病理学教室 *同医学部第3内科学教室

中枢神経組織に於いて神経損傷後でも様々な神経線維の再構築が生じていると考えられ、その様な機能を担う細胞群の一つとして astrocyte が知られている。中枢神経組織では過剰な glia 線維の増生は再生神経線維の伸長の妨げともなり、glia 増殖性は神経組織損傷後の治癒過程に大きな factor となる。今回、損傷によって形成される Cavity 面積とグリア増生範囲との関連を GFAP 染色にて形態計測学的に解析した。8週齢の雄ラットを麻酔 (pentobarbital 0.01 ml/kg を腹腔内注射) 後、頭蓋骨にドリルで穴を開け、硬膜を露出し、Pneumatic control injury device にて様々な強度の外力 (外力の程度は深さ、速度、チップ径の3要素で規定されている) を硬膜上から脳表と垂直方向に与え、脳損傷程度の異なる実験群を作製した。損傷後、7日後と30日後で還流固定し、損傷径最長部位で50 μ m の薄切切片を作成し、抗 GFAP 抗体を1次抗体として、ABC法にて免疫染色を行った。損傷側大脳半球全域を NIH image soft により GFAP 陽性領域を測定し、同時に Cavity 面積も計測した。グリア増生範囲と Cavity 面積との関連を7日後と30日後とで比較し画像解析を用いて形態計測学的に解析した。

結果：7日後と30日後の双方のモデルで Cavity 面積が大きい程、GFAP 陽性領域が増加する相関が5%の危険率で得られた。与える外力の3要素の内、最も強い要因は“深さ”であった。与える損傷の程度が同一の場合、Cavity 面積及び、GFAP 陽性面積は7日後と比較して30日後で減少し、7日後では Cavity 周辺部を含む広い範囲で GFAP 陽性の大型 astrocyte が見られたが、30日後では Cavity 周辺の狭い範囲でのみ GFAP 強陽性像が観察され、個々の astrocyte は小型であり線維増生が目立った。

考察：GFAP 陽性領域の広さは Cavity 面積の大きさと相関しており astrocyte の反応は組織障害の程度と相関する事が推察される。物理的損傷程度が同一の場合、7日後と30日後とを比較すると30日後で Cavity の大きさ及び、GFAP 陽性領域は有意に減少し、生体反応としての astrocyte の増減が Cavity の大きさを規定する可能性が推察される。組織障害の程度を規定しているのは今回の実験では主に“深さ”であり、従って“深さ”の変化によって astrocyte の反応態度を変化させられる事が示唆された。