

## 食塩感受性高血圧と脳循環動態(脳血流・脳血管径)の解析 -遺伝子改変マウスと遺伝的脳卒中ラットを用いた研究-

助成研究者名 野口孝則(理化学研究所脳科学総合研究センター)  
共同研究者名 山田真久(理化学研究所脳科学総合研究センター)  
糸原重美(理化学研究所脳科学総合研究センター)  
池田克巳(武庫川女子大学生生活環境学部教授)  
家森幸男(WHO 循環器疾患予防国際共同研究センター)

生活習慣病のひとつである高血圧は、罹患率も高く、脳卒中や心筋梗塞などの重要な危険因子であることから高血圧の治療や予防につながる研究が重要視されている。現在まで、食塩を制限することによって高血圧の予防や治療が行われてきたが、今後、食塩感受性(または食塩耐性)遺伝子の同定や働きを解明し、遺伝と環境をコントロールすることが可能になれば今まで以上の高血圧予防効果があらわれると考える。本研究では、高血圧や脳循環疾患モデル動物を用いて新たな食塩感受性遺伝子の可能性を解析することを目的としておこなった。本研究において対象とした動物は以下の2種類である。(1) 遺伝的に高血圧を呈し、100%の確立で脳卒中(脳出血、脳梗塞)を発症する脳卒中易発症高血圧自然発症ラット(Stroke-Prone Spontaneously Hypertension Rats; SHRSP)。(2) 主要な神経伝達物質であり血管拡張作用物質でもあるアセチルコリンに対する受容体の中でも頸動脈以降の脳血管平滑筋に特異的に発現していると報告されているムスカリン様アセチルコリン受容体(サブタイプ5; M5R)遺伝子を遺伝子工学的手法を用いて欠損させたマウス(M5R<sup>-/-</sup>)。以上2種の実験動物を用い、食塩水への嗜好性、食塩水投与による血圧の変化(低濃度長期間、低濃度・高濃度交互投与)、そして食塩水投与後の神経活動と脳循環(脳血管、脳血流量)の測定を行った。

SHRSP、M5R<sup>-/-</sup>マウス共に食塩水を好む傾向があり、食塩水摂取により血圧の上昇がみられた。12週齢のSHRSPおよびWKYの脳血管径を観察した結果、WKY(80.2±3.5 μm)と比較して、SHRSP(55.3±4.1 μm)の中大脳動脈以下の細動脈において有意に血管径が減少していた。また同様に、野生型マウスと比較してM5R<sup>-/-</sup>マウス中大脳動脈以下の細動脈において有意に血管径が減少していた。

本研究助成によってマウス脳循環測定システムを構築し、遺伝的に脳卒中を発症する脳卒中ラットと、遺伝子改変により脳血管拡張が减弱しているM5R<sup>-/-</sup>マウスの両者の食塩感受性高血圧と脳循環障害の関係を調べることができた。今後、高血圧を呈して脳血管障害をおこすSHRSPと、正常血圧にもかかわらず脳血管障害をおこすM5R<sup>-/-</sup>マウスの両者の病態をさらに詳細に検討し、食塩感受性高血圧と脳血管疾患の関係を解明してゆきたい。



8

助成番号 0239

## 食塩感受性高血圧と脳循環動態（脳血流・脳血管径）の解析 — 遺伝子改変マウスと遺伝的脳卒中ラットを用いた研究 —

助成研究者名 野口孝則（理化学研究所脳科学総合研究センター）  
共同研究者名 山田真久（理化学研究所脳科学総合研究センター）  
系原重美（理化学研究所脳科学総合研究センター）  
池田克巳（武庫川女子大学生活環境学部教授）  
家森幸男（WHO 循環器疾患予防国際共同研究センター）

### 1. 研究目的

生活習慣病のひとつである高血圧は、罹患率も高く、脳卒中や心筋梗塞などの重要な危険因子であることから高血圧の治療や予防につながる研究が重要視されている。ゲノム研究により各種疾患関連遺伝子が同定され近い将来の医学に有用な情報が蓄積されている近年、高血圧研究においてはアンジオテンシノーゲンをはじめとする食塩感受性遺伝子の研究が盛んに行われている。現在まで、食塩を制限することによって高血圧の予防や治療が行われてきたが、今後、食塩感受性（または食塩耐性）遺伝子の同定や働きを解明し、遺伝と環境をコントロールすることが可能になれば今まで以上の高血圧予防効果があらわれると考える。

本研究では、高血圧や脳循環疾患モデル動物を用いて新たな食塩感受性遺伝子の可能性を解析することを目的としておこなった。

本研究において対象とした動物は以下の2種類である。

- (1) 遺伝的に高血圧を呈し、100%の確立で脳卒中（脳出血、脳梗塞）を発症する脳卒中易発症高血圧自然発症ラット（Stroke-Prone Spontaneously Hypertension Rats; SHRSP）
- (2) 主要な神経伝達物質であり血管拡張作用物質でもあるアセチルコリンに対する受容体の中でも頸動脈以降の脳血管平滑筋に特異的に発現していると報告されているムスカリン様アセチルコリン受容体（サブタイプ 5；M5R）遺伝子を遺伝子工学的手法を用いて欠損させたマウス（M5R<sup>-/-</sup>）

以上2種の実験動物を用い、食塩水への嗜好性、食塩水投与による血圧の変化（低濃度長期間、低濃度・高濃度交互投与）、そして食塩水投与後の神経活動と脳循環（脳血管、脳血流量）の測定を行った。

## 2. 実験方法

### 2.1. 実験動物

使用した動物は以下の2種類であった。

#### 2.1.1. 脳卒中易発症高血圧自然発症ラット

(stroke-prone spontaneously hypertensive rats; SHRSP)

(特徴) 遺伝的に高血圧を呈し、100%の確立で脳卒中（脳出血、脳梗塞）を発症する唯一の実験動物として共同研究者の家森らにより作製された（Figure 1.）。比較対照として正常血圧 Wistar Kyoto Rat (WKY) を用いた。

#### 2.1.2. ムスカリン様アセチルコリン受容体（サブタイプ5；M5R）遺伝子欠損マウス

(M5 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice; M5R<sup>-/-</sup>)

(特徴) M5R は、主要な神経伝達物質であり血管拡張作用物質でもあるアセチルコリンに対する受容体の一つとして最近同定された遺伝子である。発現部位は頸動脈以降の脳血管平滑筋に特異的に発現していると報告されている。このマウスは、共同研究者である山田らにより M5R 遺伝子を遺伝子工学的手法を用いて欠損させることにより作製された。

また、M5R<sup>-/-</sup>マウスにおいてアセチルコリンによる血管拡張能を測定したところ、体循環では血管が拡張するのに対して、脳血管でのみアセチルコリンによる血管拡張能が減少する特徴を持っていることがわかっている。

### 2.2. 実験方法

#### 2.2.1. 食塩水に対する嗜好性

食塩水に対する嗜好性の実験は2つの給水瓶を用い、一方には食塩水（低濃度または高濃度）、もう一方には蒸留水を入れておき、実験動物に自動摂取させた量を測定することにより嗜好性を明らかにした。

#### 2.2.2. M5R<sup>-/-</sup>における食塩水投与による血圧の変化

遺伝子工学的に脳血管機能を障害したマウス（M5R<sup>-/-</sup>）において食塩水摂取による血圧の変化を測定した。測定は週に一度の間隔で行い、収縮期血圧、拡張期血圧、心拍数、体重を同時に測定した。食塩濃度による血圧への反応性の違いを明らかにすることを考え、食塩水の投与は以下の2パターンを試験した。

(1) 低濃度長期間（0.9%生理食塩水を4か月間）

(2) 低濃度・高濃度交互投与（8.0%生理食塩水と0.9%生理食塩水を5日間ずつ2回）

#### 2.2.3. 食塩水投与後の神経活動と脳循環（脳血管、脳血流量）の測定

上記の研究で用いた動物（SHRSP, M5R<sup>-/-</sup>）を用いる。食塩水への嗜好性や食塩水による血圧の変化を測定した後、脳循環動態を測定する。ラットを対象とした脳循環測定装置は所有していたが、マウスを対象とした脳循環測定装置がなかったために、今回の研

究助成によりマウス脳循環測定装置をセットアップすることができた。以下に詳細を記入する。

#### 2.2.3.1. マウス脳循環測定装置

本研究により確立した脳循環測定システムは以下の通りである（Figure 2.）。

小動物用麻酔器（TK-4、BRC）を用いてイソフルレン麻酔を行い、小動物脳定位固定装置（SR6N、ナリシゲ）に動物を固定し、温度センサー付きサーモメーター（BAT-12、BRC）と小動物用体温保持装置（BTW-100、BRC）により体温を一定に保つ。気管カニューレを挿入して小動物ベンチレーター（SAR-830/AP、BRC）による人工呼吸を行い、大腿動脈カニューレーションにより、圧トランスデューサー（MLT0698、BRC）を用いた直接法による動脈血圧のモニタリングを脳循環動態計測の間をとおして行う（ML117-BP Amp、BRC）。

マウス頭皮を切開し、頭頂部の片側頭蓋骨をドリルにより広範囲に削る。中大脳動脈以下の細動脈が観察できるようになる程度まで薄く削り、研磨後、ミネラルオイルの滴下により骨の透視性を高め、脳微小血管の観察を可能にする。反対側の頭頂部頭蓋骨も同様の処置をする。モーターフォーカスドライブ付き電動フォーカス実体顕微鏡（MZAPO、ライカ）下に動物を移動し、3CCD カラービデオカメラ（DXC-390、ソニー）を用いて画像処理用コンピュータ（PowerMac G4/800 dual、アップル）に脳血管画像を取り込み、TFT 液晶モニター（M7928J/A、アップル）上で脳軟膜上の細動脈や細静脈の血管の構築を観察し、脳血管径の測定を行う。また、反対側の大脳皮質に観察される中大脳動脈以下の細動脈の真上に脳血流量測定用のプローブ（ALF プローブ C、アドバンス）を留置し、レーザードップラー法（ALF-21R、アドバンス）を用いて脳血流量と脳血流速度の測定を行う。

脳循環動態測定前後には大腿動脈カニューレより採血を行い、全自動 pH/血液ガス分析装置（バイエル M248G、バイエル）を用いて動脈血中の酸素分圧、二酸化炭素分圧、pH を測定し、データの信頼性を高める。また、脳循環測定終了後には腹大動脈より採血を行い、血液中の生化学検査を行うとともに、血球数計測（赤血球数、白血球数、血小板数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度など）を行う。

本測定法を用いて観察したマウス脳軟膜上の微小血管の写真を Figure 3. に示す。

#### 2.2.3.2. ラット脳循環測定装置

飼育期間終了後のラットを用い、ネンプタール腹腔麻酔下（60mg/kg）で気管カニューレ挿入により人工呼吸を行った。ラット右頭頂骨中央部に直径 5mm の骨窓を形成し、人工脳脊髄液を骨窓内に灌流し（骨窓内圧；3~5mmHg）、CCD カメラを用いて脳血管をビデオモニター上で観察した。（Figure 4.）

### 3. 実験結果

#### 3.1. 食塩水に対する嗜好性

##### 3.1.1. 遺伝的脳卒中ラット（SHRSP）

結果を Figure 5. に示す。正常血圧ラットと比較して、遺伝的脳卒中ラットは統計学的有意に生理食塩水を好むことが明らかとなった。

##### 3.1.2. ムスカリン受容体欠失マウス（M5R<sup>-/-</sup>）

結果を Figure 6. に示す。0.9%、2.0%、4.0%の3段階の濃度で試験を行った結果、M5R<sup>-/-</sup>は、4.0%食塩水で統計学的有意に食塩水を好むことがわかった。

#### 3.2. M5R<sup>-/-</sup>における生理食塩水に対する血圧の変化（Figure 7.）

##### 3.2.1. 低濃度長期間（0.9%生理食塩水を4か月間）

0.9%生理食塩水投与前の基礎的な収縮期血圧には野生型マウスと比較して有意差は見られなかった。生理食塩水投与後4週目まではM5R<sup>-/-</sup>、野生型マウスともに収縮期血圧が減少する傾向がみられたが、投与5週目以降M5R<sup>-/-</sup>マウスにおいて血圧の有意な上昇が見られた。投与5週目以降も血圧の上昇はみられなかった。M5R<sup>-/-</sup>は、食塩感受性に血圧が上昇することがわかった。

##### 3.2.2. 低濃度・高濃度交互投与（8.0%生理食塩水と0.9%生理食塩水を5日間ずつ2回）

高濃度食塩水を投与したところ、M5R<sup>-/-</sup>は食塩感受性に血圧の有意な上昇がみられたが、野生型マウスでは血圧上昇の程度が低かった。5日間の高濃度食塩水負荷の後、5日間の生理食塩水負荷に切り替えたところ、野生型マウスは正常血圧まで血圧値が減少したが、M5R<sup>-/-</sup>マウスでは血圧値が正常血圧の値まで減少せず、統計学的有意に高い血圧値を示した。再び高濃度食塩水を負荷したところ、M5R<sup>-/-</sup>の血圧値はさらに上昇したが、野生型マウスの血圧上昇の程度は初回と同程度であった。

#### 3.3. 脳血管の観察結果

##### 3.3.1. 脳卒中ラット（SHRSP）

12週齢のSHRSPおよびWKYの脳血管径を観察した結果、WKY（80.2±3.5μm）と比較して、SHRSP（55.3±4.1μm）の中大脳動脈以下の細動脈において有意に血管径が減少していた。

##### 3.3.2. M5R<sup>-/-</sup>マウス

12週齢の野生型マウスおよびM5R<sup>-/-</sup>マウスの脳血管径を観察した結果、野生型マウスと比較してM5R<sup>-/-</sup>マウス中大脳動脈以下の細動脈において有意に血管径が減少していた。（Figure 8-A、8-B）

#### 3.4. 脳血流量の変化

#### 3.4.1. 脳卒中ラット (SHRSP)

WKY ( $70.2 \pm 5.5 \text{ nL/sec}$ ) と比較して、SHRSP ( $45.7 \pm 6.2 \text{ nL/sec}$ ) では脳血流量は統計学的有意に減少していた。

#### 3.4.2. M5R<sup>-/-</sup>マウス

野生型マウスと比較して、M5R<sup>-/-</sup>マウスでは統計学的有意に脳血流量が減少していた。(Figure 8-C)

### 4. 考察

平成14年度の研究助成によってマウス脳循環測定システムを構築し、遺伝的に脳卒中を発症する脳卒中ラットと、遺伝子改変により脳血管拡張が减弱している M5R<sup>-/-</sup>マウスの両者の食塩感受性高血圧および脳循環障害についての検討を行った。その結果、SHRSP、M5R<sup>-/-</sup>マウスともに脳血管径が減少していることが観察され、脳循環も障害され、食塩感受性に高血圧を呈することも明らかとなった。

重度の高血圧が脳循環を悪化させることはこれまでも理解されてきたが、M5R<sup>-/-</sup>マウスにおいては、通常の高血圧値は高くなく、正常血圧を保っている。つまり、M5R<sup>-/-</sup>マウスは正常血圧でありながら脳循環障害を発症するモデル動物として、脳卒中研究に幅広く用いられることが考えられる。また、このマウスの興味深いところは、通常は正常血圧を維持しているにもかかわらず、生理食塩水の持続的な長期投与や、短期間の高濃度食塩水投与によって血圧が上昇し、一度上昇した血圧は正常血圧に戻りにくいことである。

食塩感受性高血圧のメカニズムとしてはこれまでも多数報告されてきているが、今回、M5R<sup>-/-</sup>マウスを用いた研究によって M5R も何らかの関与をする受容体の一つとして考えることができたと思う。

食塩水投与により急激な血圧上昇を示し、脳卒中を発症する SHRSP の病態との比較を目的として、今回の研究において SHRSP と WKY の実験も行った。M5R<sup>-/-</sup>マウスと同様に食塩嗜好性を示し、食塩感受性に高血圧を呈した。今後下記にも記すような実験を行うことによって食塩感受性高血圧と M5R の関係を明らかにしていきたい。

### 5. 今後の課題

平成14年度の研究結果を受けて、研究目標 (1) から (3) に関して、平成15年度は以下のような研究内容を具体的に進めていきたい。

#### 5.1. 遺伝的高血圧やムスカリン受容体 (M5R) 遺伝子と食塩感受性の関係

【内容】脳卒中ラット (SHRSP) における M5R 遺伝子の発現、機能解析

【方法】麻酔下において SHRSP ラット脳を切除し、大脳皮質、海馬、視床、小脳等分離し、TRIzol 処理により total RNA を調整後、cDNA を調整する。各部位にお

る M5R mRNA 遺伝子発現を定量的 RT-PCR 法により測定する。比較対照はウイスターキョウトラット（Wistar Kyoto rat; WKY）を用いる。また、同様の部位におけるタンパク発現をウェスタンブロッティング法により測定する。良好な抗体を入手することが可能となれば、SHRSP 脳における M5R 免疫染色を行い、M5R の局在を明らかにする。

## 5.2. 食塩感受性高血圧と脳循環疾患の関係

【内容】M5R 遺伝子欠失マウスにおける脳循環血流量の定量

【方法】平成14年度に行った脳循環測定は脳表の血管を対象として行った。その利点は、血管径の拡張や収縮を直接観察できる点にあり、脳血管径が食塩によって変化する様子を観察することができた。今回、さらに深部の食塩感受性の脳血流変化をとらえるため、放射性トレーサーを用いたオートラジオグラフィ（ARG）法を応用して脳深部を含めた脳全体の血流量を定量的に測定したい。国内においては放射性物質の取扱いの規制や手技の困難さなどから ARG 法による脳循環測定は現在ほとんど行われていない。また、本方法は現在まで主にラットやネコを用いて行われてきた方法であり、近年までマウスを用いた研究報告はされていなかった。しかし、マウスを対象とした ARG 法を開発することにより、今回測定を行う M5R マウスのみならず、多数作製されている遺伝子改変マウスにおける脳血流の定量的測定を行うことが可能となり、脳循環という観点から脳機能の解明につながる可能性が考えられる。今回、共同研究先として秋田県立脳血管研究センター副研究局長菅野巖先生にご指導いただくことが可能となった。菅野先生は放射線医学研究室長でもあり、国内における放射性トレーサーを用いた ARG 法の第一人者である。ラットを用いた ARG 法についての技術をご指導いただきながら、国内におけるマウスを用いた ARG 法の開発を行っていきたい。食塩感受性に脳血管拡張機能が減弱する M5R 欠失マウスの脳血流量を ARG 法によって定量することが可能となれば大変興味深い結果を示すことが可能となるだろう。

## 5.3. 神経活動にともなう脳循環動態の変化に及ぼす食塩の影響

【内容】マウスを用いた神経活動と脳循環動態の同時測定法の開発と M5R 欠失マウスを用いた測定

【方法】前述のとおり、M5R 欠失マウスにおける脳循環動態は正常に機能せず、食塩の摂取によりさらに脳循環動態が変化することが明らかとなった。神経活動がおこるときに局所的に脳血流量の増加することが知られているが、食塩感受性の強い M5R 欠失マウスにおいては神経活動と脳血流量の関係が正常に機能していない可能性も考えられる。そこで申請者がこれまでにやってきたマウス脳循環測定法と同時に電気生埋学的に局所の神経学的活動をモニターできる方法を確立する。この方法は世界的にみてもラットを用いた報告が脳循環測定に関する研究室から数例あるのみであり、マ



ウスを用いて測定した例はまだない。しかし、秋田脳血管研究センター菅野巖副研究局長からのご指導、ご助言を上記(2)の研究と同様にいただくことが可能である。

Table 1 Body weight, systolic blood pressure (SBP), blood gases and blood biochemical markers in the M5R<sup>-/-</sup> mice and their wild-type littermates

		M5 <sup>+/+</sup>	M5 <sup>-/-</sup>
Body weight	(g)	39.3±0.7	39.9±0.9
SBP	(mmHg)	109.1±3.4	109.5±3.0
PaCO <sub>2</sub>	(mmHg)	34.5±1.2	33.1±1.9
PaO <sub>2</sub>	(mmHg)	123.2±2.5	121.0±1.5
pH		7.25±0.02	7.26±0.02
Blood Glucose	(mg/dL)	132.5±2.1	134.2±1.9
Total Protein	(g/dL)	5.2±0.1	4.9±0.2
Albumin	(g/dL)	1.88±0.01	1.87±0.01
Blood Urea Nitrogen	(mg/dL)	24.2±0.6	23.9±0.5
Creatinine	(μ mol/L)	79.6±1.3	80.7±1.4
Total Cholesterol	(mg/dL)	108.0±1.4	107.3±1.3
triglyceride	(mg/dL)	53.4±2.6	58.0±3.2
Na	(mEq/L)	142.9±0.6	143.0±0.4
K	(mEq/L)	4.86±0.16	4.93±0.12
Cl	(mEq/L)	118.9±0.8	118.4±0.7
Ca	(mEq/L)	4.83±0.07	4.91±0.05
No. of mice		12	12

All values are means ± S.E.M..

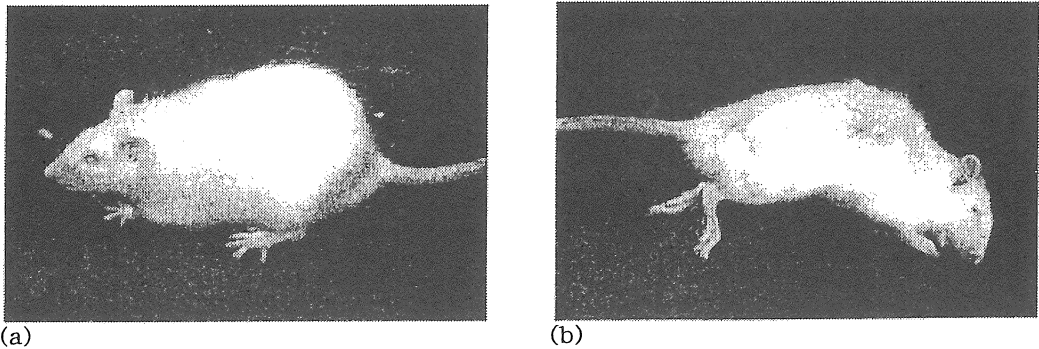


Figure 1. Pictures of Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats (SHRSP)  
 (a) normotensive Wistar Kyoto Rats. (b) SHRSP.

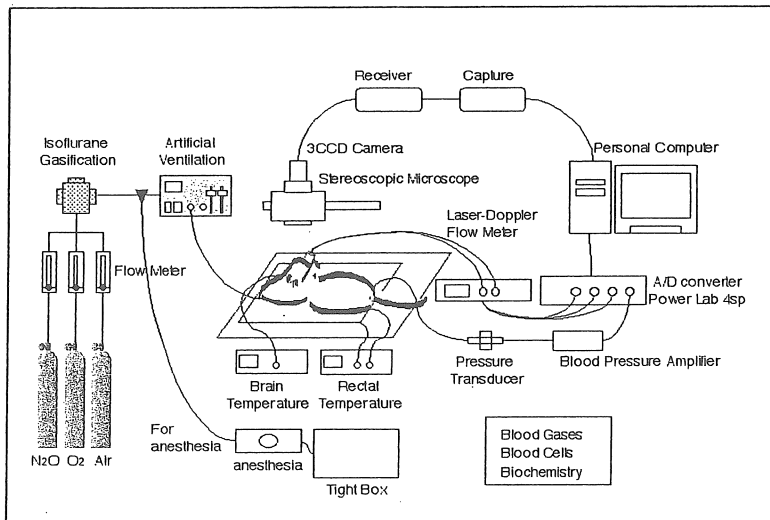


Figure 2. Cerebral Measurement System for Mouse.

Mice were initially anesthetized with a mixture of ketamine (200 mg/kg body weight, i.p.) and xylazine (10 mg/kg body weight, i.p.) and were breathing freely. The animals were fixed in a stereotaxic frame, with the bone overlying the dorsal surface positioned at the center of the left parietal bone. The animal in the stereotaxic frame was placed on the stage of a microscope equipped with a long-working-distance objective, and the cerebral vessels were monitored with a CCD camera and their images captured on a personal computer. The branches of the middle cerebral vessels were defined in the order from A1 to A3. A probe with a diameter of 0.5 mm was attached to the point of divergence of the middle cerebral vessel, and CBF in the parietal lobe was measured continuously using a laser Doppler flowmeter (ALF 21, Advance Co., Ltd, Tokyo) and that data were analyzed using a PowerLab system (ADInstruments, CA, USA). After a measuring of CBF and vessel diameter, blood samples (30  $\mu$ L) were obtained from the abdominal aorta to measure levels of arterial blood gases (PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub>) and pH (Blood Gas Analyzer 248, Bayer Medical, Medford, MA, USA).

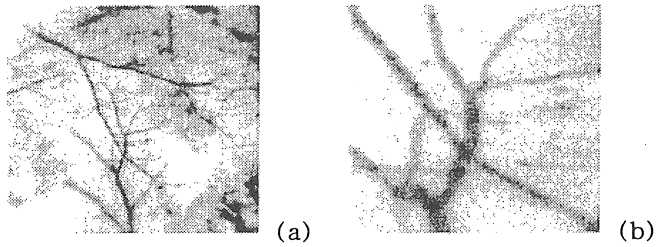


Figure 3. Cerebral microvessels in mouse.

(a)broad area. (b)expansion of artery and venules.

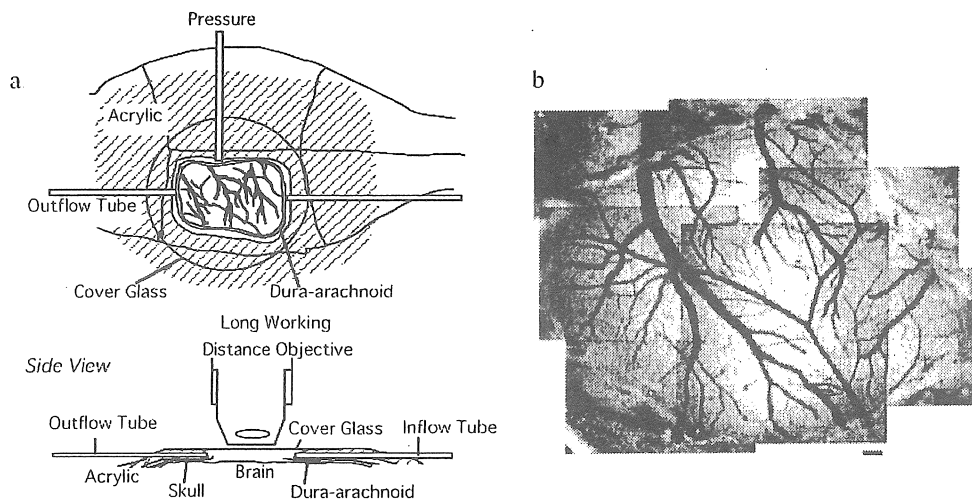


Figure 4. A schematic illustration of the closed cranial window methods (a).

The head of rat was fixed in a stereotaxic frame, and the skull was exposed by incision. A craniotomy (5 mm diameter) was performed in the center of the right parietal bone using a hand drill.

Pial arterioles and venules in SHRSP/Izm at the age of 4 weeks (b).

The pial vessels were observed on a video monitor and recorded on videotape by a CCD video camera. Bar is 100  $\mu$ m.

(mg/day/rat)

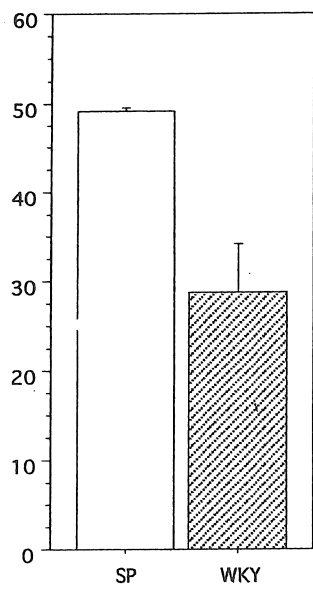


Figure 5. Salt water drinking in SHRSP.

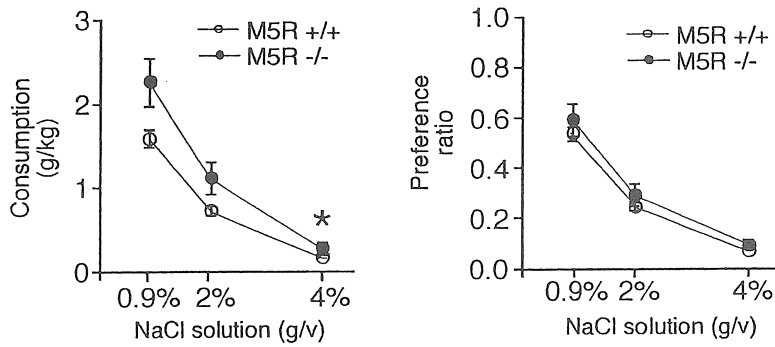


Figure 6. Salt consumption in M5R<sup>-/-</sup> mouse.

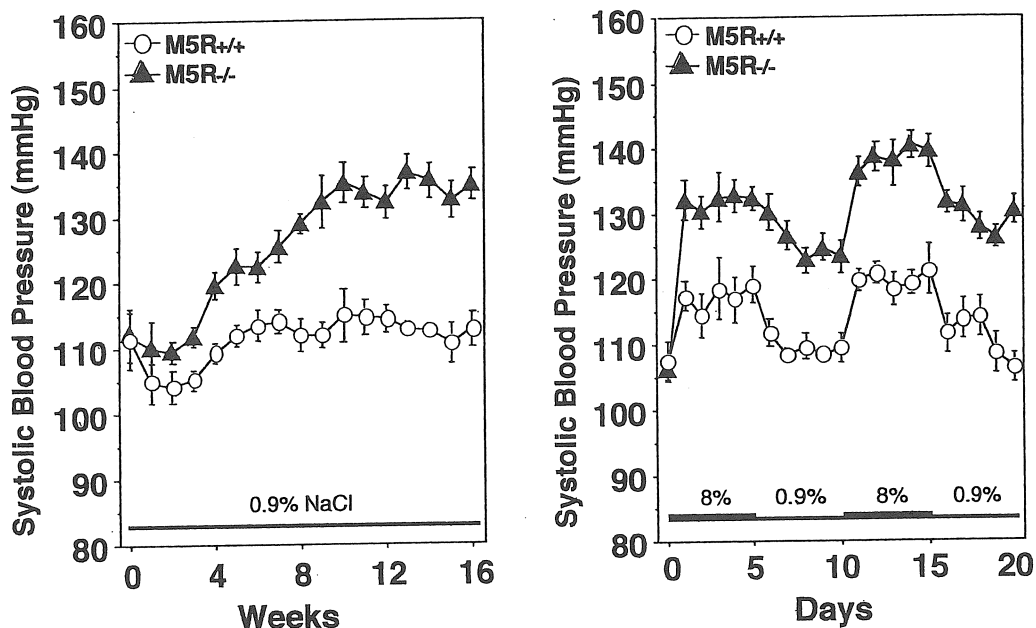


Figure 7. Salt-sensitive hypertension in M5R<sup>-/-</sup> mouse.

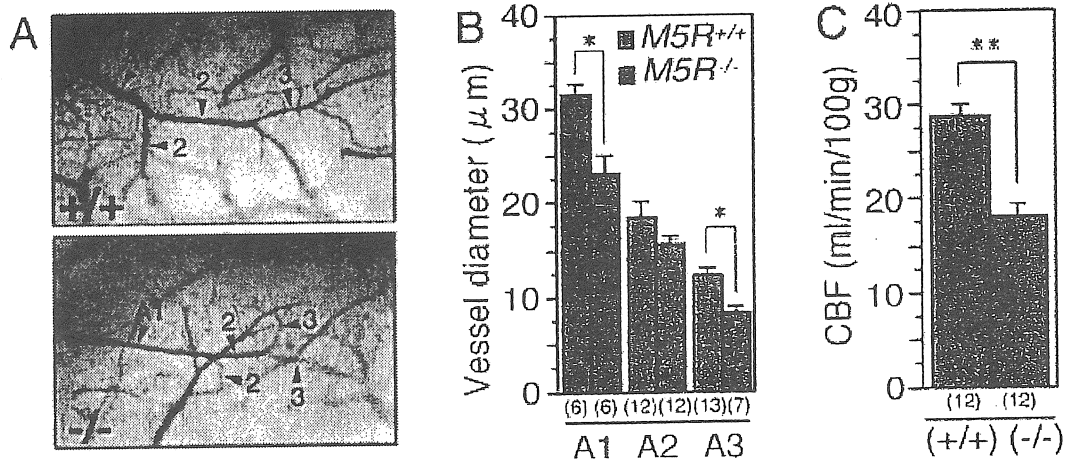


Figure 8. Cerebral circulation in M5R<sup>-/-</sup> mouse.

A; Picture of microvessels. B; Vessel diameter. C; Cerebral blood flow.

**Salt-Sensitive Hypertension and Cerebral Circulation  
in Gene-Mutant Mouse and Genetically Stroke Rat**

Takanori Noguchi<sup>1)</sup>, Masahisa Yamada<sup>1)</sup>, Shigeyoshi Itoharu<sup>1)</sup>, Katsumi Ikeda<sup>2)</sup>, Yukio Yamori<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Brain Science Institute (BSI), RIKEN, Wako, Japan, <sup>2)</sup>School of Human Environmental Sciences, Mukogawa Women's University, Nishinomiya, Japan, <sup>3)</sup>WHO Collaborating Center for Research on Primary Prevention of Cardiovascular Diseases, Kyoto, Japan.

Summary

Recently, the availability of transgenic mice has enabled us to examine the involvement of specific gene products in various pathological and physiological conditions. Furthermore, we used gene-targeting technology to generate M5 muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice ( $M5R^{-/-}$  mice). In the present study, we made a measurement system for blood pressure and cerebral hemodynamics (cerebral blood flow; CBF, vessel diameter; VD) in pial microcirculation in mouse. Using this system, we measured cerebral hemodynamics in gene mutant mice and genetically stroke model rat (stroke-prone spontaneously hypertensive rats; SHRSP) under physiological and pathological condition.

Under anesthetized and automatically ventilated, the animals were fixed in a stereotaxic frame, with the bone overlying the dorsal surface positioned at the center of the left parietal bone. The animals in the stereotaxic frame was placed on the stage of a microscope equipped with a long-working-distance objective, and the cerebral vessels, the branches of the middle cerebral artery, were monitored with a CCD camera and their images captured on a personal computer. A probe with a diameter of 0.5 mm was attached to the point of divergence of the middle cerebral vessel, and CBF in the parietal lobe was measured continuously using a laser-Doppler flow meter and that data were analyzed using a PowerLab system. After a measuring of CBF and vessel diameter, blood samples (30 microL) were obtained from the abdominal aorta to measure levels of arterial blood gases ( $PaO_2$ ,  $PaCO_2$ ) and pH.

We noticed that  $M5R^{-/-}$  mice showed normal peripheral blood pressure (tail-cuff). We determined the diameter of cerebral arterioles and CBF by intravital microscopy through a cranial window in  $M5R^{-/-}$  mice and wild-type mice. Male  $M5R^{-/-}$  mice and SHRSP rats showed a small but significant reduction in the diameter of middle cerebral arterioles (MCA) under resting conditions.  $M5R^{-/-}$  mice and SHRSP rats showed significantly low CBF in a resting state of MCA. Consistent with the observed reduction in the diameter of blood vessels, continuous vasospasm was observed in the posterior cerebral arterioles close to the circle of Wills.