

共焦点レーザー顕微鏡を用いた腎微小循環動態の解析

田中由紀子

新潟大学大学院医歯学総合研究科
内部環境医学腎膠原病内科学分野,
附属腎研究施設機能制御学分野

追手 巍

新潟大学大学院医歯学総合研究科
附属腎研究施設機能制御学分野

Analysis of Renal Microcirculation Using Real - Time Confocal Laser - Scanning Microscope

Yukiko TANAKA

*Division of Clinical Nephrology and Rheumatology,
and Department of Cellular Physiology, Institute of Nephrology,
Graduate School of Medical and Dental Science, Niigata University*

Takashi OITE

*Department of Cellular Physiology, Institute of Nephrology,
Graduate School of Medical and Dental Science, Niigata University*

Abstract

Blood flow in the microvasculature plays a pivotal role in determining the outcome of injury and repair in inflamed tissue of kidney composed of tubulointerstitium and glomeruli. We analyzed hemodynamic events that occurred in vivo during microvascular regeneration following destruction of glomerular capillaries, using an intravital microscope equipped with real - time confocal laser - scanning microscope (CLSM) in combination with a high - speed CCD videocamera. Mesangiolytic lesions leading to microaneurysms were induced by the injection of anti - Thy - 1.1 antibody. On days 3 and 7 after antibody injection, FITC - labeled dextran and FITC - labeled red blood cells (RBCs) were injected in order to measure vessel diameter of microvasculatures and blood flow. The RBC velocities of intertubular capillary were $1049.6 \pm 263.5 \mu\text{m}/\text{sec}$ and $1136.9 \pm 220.9 \mu\text{m}/\text{sec}$ on days 3, and 7 of the disease, respectively. The diameters of intertubular capillaries were $7.89 \pm 0.59 \mu\text{m}$ and $8.07 \pm 0.95 \mu\text{m}$, respectively. On day 3, these values were similar to those in untreated group. Blood flow intratubular capillaries was not retarded during recovery

Reprint requests to: Yukiko TANAKA
Division of Clinical Nephrology and
Rheumatology Graduate School of Medical and
Dental Science Niigata University
1 - 754 Asahimachi - dori,
Niigata 951 - 8510 Japan

別刷請求先: 〒951 - 8510 新潟市旭町通り 1 - 754
新潟大学大学院医歯学総合研究科内部環境医学腎膠
原病内科学分野 田中由紀子

from the glomerular injury.

The noninvasive procedure, using CLSM, allowed us to examine three - dimensionally hemodynamic events in intertubular capillary as well as glomerulus at the cellular level. It is useful for estimating hemodynamic response and microvascular regeneration in tubulointerstitium and glomerulus as well, and may be promising for clinical application.

Key words: confocal laser - scanning microscope (CLSM), microvasculature, intertubular capillary, three - dimension

はじめに

腎疾患の発症・進展機序を明らかにする上で、尿細管・間質を含めた腎微小循環系における血行動態を解析することは重要である。なぜならば生来の臓器であれ、移植された臓器であれ、微小循環系の障害が臓器死に至る過程の第一段階として作動していると考えられ、炎症の起点である血管透過性亢進、炎症性細胞浸潤の最前線となるのが微小血管だからである。しかし、これまで技術的な問題から実時間的に生体内微小血管系の血行動態を観察するのは困難であった。一般に生体組織内の蛍光標識物を観察する場合、深さの異なる部位から発する蛍光が重なって像が不鮮明になってしまう。共焦点光学系では、レーザー光により試料をピンポイントで照明し、観察点以外からの散乱光を防ぎ蛍光標識物を捉えることができる。また、受光器の前にピンホール窓を設置することにより、観察点以外からの光をカットし、高い分解能を得ることができる。私どもは共焦点レーザー走査顕微鏡 confocal laser - scanning microscope (CLSM) と高速度撮影ビデオカメラを組み合わせ、腎糸球体毛細血管、尿細管間質微小血管像、及びそこを流れる血流をリアルタイムで観察、解析できる研究を進めている。本論文では、被膜直下に糸球体毛細血管、尿細管間質血管を直視できる Munich Wistar rat^{1) - 3)} を用い、腎炎時における尿細管血行動態を実時間型レーザー走査顕微鏡で観察し、糸球体病変、糸球体血行動態との関連を解析した結果を報告する。

材料と方法

実験動物

実験動物は Simonsen Laboratories Inc. (Day Road, Gilroy, USA) より購入した、6 から 7 週齢の雌の Munich Wistar rat を用いた。

腎炎惹起性モノクローナル抗体

腎炎惹起に用いた抗 Thy - 1.1 モノクローナル抗体 (mAb) 1 - 22 - 3 (IgG) はラットの糸球体で免疫したマウスより産生された⁴⁾。mAb は 2, 6, 10, 14 - tetra - methylpentadecane (Sigma, St. Louis, MO, USA) で刺激したマウスの腹水として産生された。腹水は 50 % saturated ammonium sulfate で沈澱させ、2 日間リン酸緩衝溶液 (PBS) で透析を行い、Immunoglobulin - rich fraction を得た。

実験デザイン

9 匹のラットを 3 群に分けた。(1) 未処置群 (N = 3)。(2) 0.5mg の mAb 1 - 22 - 3 を静注し、3 日後に屠殺した群 (3 日後群。N = 3)。(3) 0.5mg の mAb 1 - 22 - 3 を静注し、7 日後に屠殺した群 (7 日後群。N = 3)。

組織学的検査

mAb1 - 22 - 3 を静注した後、3 日目、7 日目にラットを屠殺した。光学顕微鏡用に腎臓の一部を 10 % neutral - buffered formalin で固定し、パラフィンに包埋した。2 から 3 μ m の厚さの切片を、periodic acid - schiff (PAS) と periodic acid methenamine silver (PAM) 染色した。

腎微小循環系の生体内観察

生体の微小循環系の観察は、生体顕微鏡による実時間的観察法を用いた。これは大島らが開発した“腹膜播種性腫瘍モデル”における微小血管動



図1 共焦点レーザー走査顕微鏡（右）と高速冷却 CCD ビデオカメラ

態観察法⁵⁾を応用して、共焦点レーザー顕微鏡（CSU-10：横河電機）と高速冷却 CCD ビデオカメラ（C2400-89：浜松フォトニクス）を連結させたシステムである（図1）。円盤（Nipkow disk：ニポウ板）に配置した小さな孔（ピンホール）を通してレーザー光を当て、反射光ないし発蛍光を高速回転したピンホールを通して共焦点像を得る。その際、2万個におよぶマイクロレンズを持つ円盤も同様に回転させ、集光効率を高めて1000フレーム/秒以上の高速走査が可能となる。こうして得られたフレームをICCDビデオカメラで捕らえ、解析した。

Munich Wistar rat は thiobutabarbital sodium salt (100mg/Kg) の腹腔内注射にて麻酔した。体温はホットパッドにより 37℃に保った。薬剤投与用にポリエチレンカテーテル（PE50）を大腿

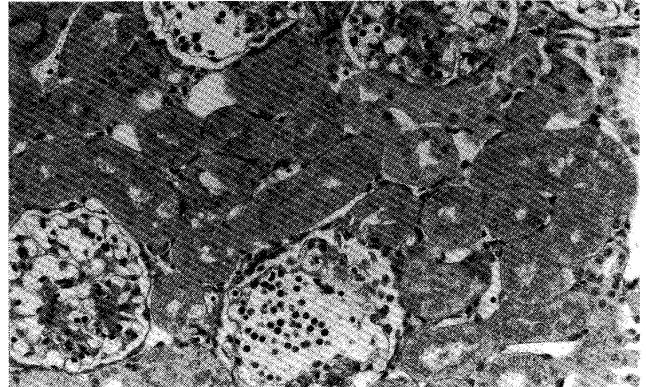


図2 3日後群の光学顕微鏡所見（PAS 染色，200 倍）

静脈に挿入した。腎表面の微小循環観察のため、麻酔したラットの左背側部を切開し腎を露出させ、動静脈を保ったまま CLSM 下に静置した。腎臓は温度を 37℃に加温した生理食塩水に浸し、この状態で血行動態が安定するまで、約 30 分待ってから観察した。

糸球体微小血管系における計測

血管径の計測

血管の径を測定するために Fluorescein Isothiocyanate (FITC) でラベルしたデキストラン（FITC-Dx, molecular weight 150,000; Sigma Chemical Co.）を静注し（10mg/ml, 2ml/kg），血管を造影した^{6)–8)}。この方法により血管内腔が蛍光造影され、径を測定することができる。径はビデオに記録された個々の画像をノギスを用いて計測した。

赤血球速度

赤血球速度を計測するために FITC でラベルした自己赤血球を静注した^{6)–8)}。要約すると、実験ラットからあらかじめ採取した赤血球を 1mg/ml FITC（ICN Pharmaceutical Inc., Cleveland, OH, USA）を含む PBS（137mmol/L NaCl, 6.4mmol/L Na₂HPO₄, 2.7mmol/L KCl, 1.5mmol/L KH₂PO₄, pH7.8）中で反応させた後、結合しなかった蛍光色素を除去するために、1% bovine serum albumin（BSA; Sigma Chemical Co.）を含む生理食塩



図3 共焦レーザー顕微鏡を用いた間質の血管像
a. 弱拡大 b. 強拡大

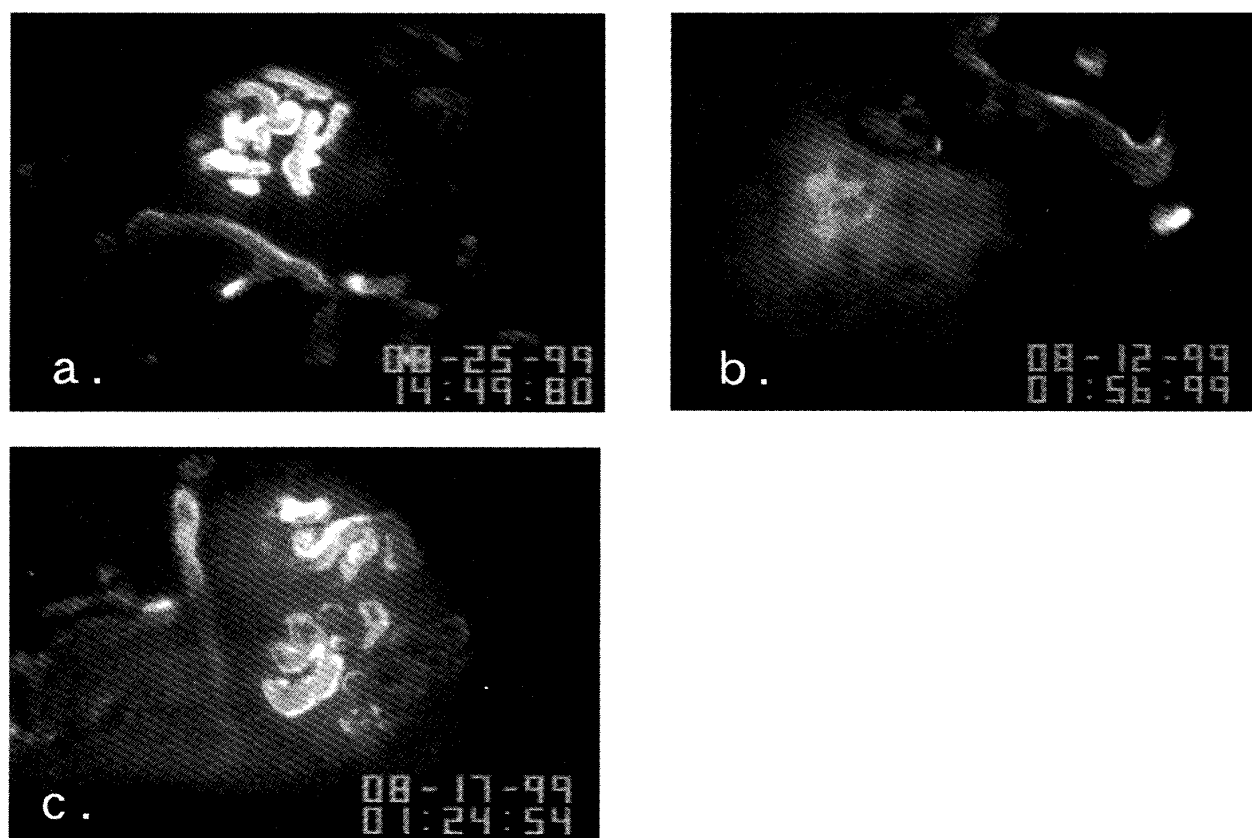


図4 糸球体毛細血管束と間質の血管像
a. 未処置群 b. 3日後群 c. 7日後群

水で2回洗浄した。最終的にはHt 50%になるように調整して、体重1kgあたり1ml静注したが、概算上、全赤血球の1%が標識されることになる。速度については、画像のフレーム毎の解析により、同一の赤血球が移動した距離を時間で割ることに

より求めた。ラット1匹につき5～10個の糸球体とその周辺の尿細管、各5ヶ所における微小血管部位を5回計測した(mean ± SD)。

統計学的処理

すべての測定値はmean ± SDで示した。 p 値

表 1 各部位の血管内径 (μm)

	Gn	M	B	I
未処置群	7.46 \pm 0.60*			7.93 \pm 1.13***
3 日後群	7.12 \pm 0.63*	83.14 \pm 39.45	2.65 \pm 0.47**	7.89 \pm 0.59***
7 日後群	6.90 \pm 0.52*		2.98 \pm 0.05**	8.07 \pm 0.95***

*, **, ***; NS

Gn; glomerular capillaries with normal appearance

B; microvessels around Bowman's capsule

M; microaneurysm

I; intertubular microvessel

表 2 各部位の赤血球速度 (μm)

	B	I
未処置群	417.3 \pm 98.0	1184.6 \pm 263.5**
3 日後群	200.0 \pm 188.8*	1049.6 \pm 192.7**
7 日後群	217.9 \pm 193.6*	1136.9 \pm 220.9**

*; Significantly reduced from B of control($P<0.05$)

**; NS

B; microvessels around Bowman's capsule

I; intertubular microvessel

が 0.05 以下を有意とした。

結 果

組織学的所見：すでに報告のある通り^{9)–11)}, 3 日後群は空胞変性を含む著名なメサングウム融解がみとめられたが, 尿細管間質は異常所見が無い (図 2)。7 日後群では微小動脈瘤は殆どなく, 分節状にメサングウム細胞の増殖とマトリックスの増加がみとめられるのみで, 間質にも著変はみとめられなかった。

尿細管間質血管の観察

図 3 に未処置群の尿細管間質血管の CLSM による像を示した。尿細管毛細血管は分枝がつなが

りあい網目状に流れていることがわかる。この部位の速度は 1184.6 \pm 263.5 $\mu\text{m}/\text{sec}$ であった。

血管径の測定

表 1 に, 各部位の血管内径を示す。未処置群では糸球体血管 7.46 \pm 0.6 μm , 間質微小血管: 7.93 \pm 1.14 μm , 3 日後群では糸球体血管 7.12 \pm 0.63 μm , 間質微小血管: 7.89 \pm 0.95 μm であった。微小動脈瘤の径は最大径を計測し, 83.14 \pm 39.54 μm であった。7 日群では糸球体血管束 6.9 \pm 0.52 μm , 間質微小血管: 8.07 \pm 0.95 μm であり, 糸球体血管, 間質微小血管径は 3 日後群, 7 日後群とも未処置群と有意差はみとめられなかった。

尿細管間質赤血球速度

図4aは未処置群の糸球体と、その周囲の毛細血管像である。未処置群のボーマン嚢周囲の血流速度は $417.3 \pm 89.0 \mu\text{m/sec}$ 、尿細管微小血管の血流速度は $1184.6 \pm 263.5 \mu\text{m/sec}$ であった。図4bに3日後群の糸球体周辺の像を示した。微小動脈瘤に接したボーマン嚢周囲の血流速度は、 $200.0 \pm 188.8 \mu\text{m/sec}$ と低下していた。尿細管微小血管の血流速度は $1049.6 \pm 263.5 \mu\text{m/sec}$ であった。7日群では明らかな微小動脈瘤は認められず(図4c)、再生血管と思われる微小血管像(壁不整など)がみられた。この部位では赤血球流量・速度とも低下していた。ボーマン嚢周囲の血流速度も $217.9 \pm 193.6 \mu\text{m/sec}$ と、未処置群と比較して有意に抑制がみとめられたが、尿細管微小血管の血流速度は $1136.9 \pm 220.9 \mu\text{m/sec}$ と保たれていた。

考 察

腎は尿細管系と血管系が密に関連した独特な構造を取り、単位時間当たりの血流量も多く、虚血変化、炎症変化が起き易い臓器である。Bohleらは腎機能の低下は必ずしも糸球体硬化の程度と平行せず、むしろ間質病変、傍尿細管微小血管量と相関する事を報告した¹²⁾。この事からも尿細管間質微小血管の生理的・病理的状態における機能の重要性は明らかといえる。しかし、糸球体微小血管、間質微小血管の血行動態を検索するには技術的な問題点が多く、臨床的应用可能な検査手技には限界がある。今回、私どもは腎臓表面から非観血的に微小血管造影が可能な実時間型共焦点レーザー顕微鏡・ビデオ撮影装置の実用性について検討した。

抗メサングウム細胞抗体を投与して惹起したThy-1腎炎では、初期に糸球体微小動脈瘤が生じ、その部位では血流が停滞し、また、動脈瘤に圧排されたボーマン嚢周囲血管も血流が低下していた。病日7日目の糸球体微小血管再生時にも血管壁不整が残存し、圧排が解除されているはずのボーマン嚢周囲血管でも血行動態の変化が生じて

いた。

生体腎の微小循環系解析法としては、マイクロパンクチャー法がよく知られている¹³⁾。マイクロピペットを尿細管、微小血管に穿刺して、試料の注入や内圧の変化を測定する。この手法も被膜直下に糸球体を直視できるMunich Wistar ratなどを用いなくてはならない。水腎症モデル^{14)–17)}も有名である。尿管を結紮し、尿細管を壊死、吸収させて血管系を顕著に行う実験であるが、尿細管糸球体フィードバック反応などの細胞相互作用を解析するには非生理的なモデルといえよう。Navarらが開発した多くの血管を結紮し、腎を縦切開して腎盂被膜下の皮髓境界部位のネフロンを残す手術標本は¹⁸⁾、一種のスライス標本として糸球体の部位特異性、尿細管との相互作用を解析する上で有用な方法であるが、術法の困難さに問題がある。伊藤らのグループは、輸入・輸出動脈、尿細管が付着した単離糸球体を作製して灌流することにより尿細管糸球体フィードバック反応を含めた糸球体微小循環系について解析してきた¹⁹⁾。この方法は傍糸球体領域における細胞間相互作用を解析する上で大変有用である。内視鏡を用いた生体の実時間的観察法も開発されてきている²⁰⁾。ファイバースコープの先端にニードル型またはペンシル型のレンズを装着した内視鏡的なシステムでの解析方法である。ヒトへの応用も可能であるが深部の糸球体などにアクセスするときに、カメラ部先端の直径が1mm以下とはいえ腎皮質に挿入するため非侵襲的ではない点に問題がある。筆者らは、大島らが開発した“腹膜播種性腫瘍モデル”における微小血管動態観察法⁵⁾を応用して、共焦点レーザー顕微鏡と高速冷却CCDビデオカメラを連結したシステムを用いている。この方法だと尿細管間質血管を含めた腎微小循環動態を非侵襲的に検索できる。さらに、腎だけにとどまらず他臓器、組織における微小循環系の病態生理機能解析にも貢献することができ、移植臓器を含めた臓器微小循環系障害の発症、進行の診断、血管新(再)生の検索、微小循環系に対する薬剤作用の解析に役立つと予想され、今後の光学系機械技術の進歩が期待される。

結 論

血管再生により、光顕上、正常化してみえる血管も血行動態を三次元的にリアルタイムで解析することにより、糸球体毛細血管、尿細管間質血管再生が完成したか否かを検討することができる。機能再生の面から糸球体血行動態の解析は重要であるが、同時に尿細管間質血管の評価も重要であると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり御高閲をいただきました新潟大学大学院医歯学総合研究科内部環境医学講座 下条文武教授に深謝いたします。また御指導、ご協力いただきました新潟大学医歯学総合研究科附属腎研究施設機能制御学分野 森岡哲夫助教授、和田庸子先生、鎌田啓子技官に感謝申し上げます。

参 考 文 献

- Steinhausen M, Zimmerhackl B, Thederan H, Dussel R, Parekh N, Esslinger H, von Hagens G, Komitowski D and Dallenbach F: Intraglomerular microcirculation: measurements of single glomerular loop flow in rats. *Kidney Int* 20: 230-239 1981.
- Hackbarth H, Buttner D, Jarck D, Pothmann M, Messow C and Gartner K: Distribution of glomeruli in the renal cortex of munich Wistar Fromter (MWF) rata. *Renal Physiol Basel* 6: 63-71 1983.
- Saito M HS, Yamatsu I, Sato M and Ohshima N: Visualization of renal microcirculation in isolated Munich - Wistar rat kidney: Effects of endothelin - 1 on Renal Hemodynamic Activity. *Jpn J Pharmacol* 66: 221-229 1994.
- Orikasa M, Matsui K, Oite T and Shimizu F: Massive proteinuria induced in rats by a single intravenous injection of a monoclonal antibody. *J Immunol* 141: 807-814 1988.
- Yanagi K and Ohshima N: Angiogenic vascular growth in the rat peritoneal disseminated tumor model. *Microvasc Res* 51: 15-28 1996.
- Suzuki T, Yanagi K, Ookawa K, Hatakeyama K and Ohshima N: Flow visualization of the micro-circulation in solid tumor tissues: intravital microscopic observation of blood circulation by use of a confocal laser scanning microscope. *Front Med Biol Eng* 52: 4265-4268 1992.
- Homma S, Sato M, Sugishita Y and Ohshima N: Flow behavior of erythrocytes in living microvessels: analysis of the distribution of dynamic hematocrits measured in vivo. *Int J Multiphase Flow* 19: 897-904 1993.
- Suzuki T YK, Ookawa K, Hatakeyama K and Ohshima N: Blood flow and leukocyte adhesiveness are reduced in the microcirculation of a peritoneal disseminated colon carcinoma. *Ann Biomed Eng* 26: 803-811 1998.
- Kawachi H, Orikasa M, Matsui K, Iwanaga T, Toyabe S, Oite T and Shimizu F: Epitope-specific induction of mesangial lesions with proteinuria by a MoAb against mesangial cell surface antigen. *Clin Exp Immunol* 88: 399-404 1992.
- Cheng Q, L, Orikasa M, Morioka T, Kawachi H, Chen X, M and Oite T: Progressive renal lesions induced by administration of monoclonal antibody 1-22-3 to unilaterally nephrectomized rats. *Clin Exp Immunol* 102: 181-185 1995.
- Nakayama H, Oite T, Kawachi H, Morioka T, Kobayashi H, Orikasa M, Arakawa M and Shimizu F: Comparative nephritogenicity of two monoclonal antibodies that recognize different epitopes of rat Thy-1.1 molecule. *Nephron* 78: 453-463 1998.
- Bohle: *Kidney Int* 49 (suppl. 54): S.2-S.9 1996.
- Schnermann J: Function of juxtaglomerular apparatus; Control of glomerular hemodynamics and rennin secretion. In the *Kidney: Physiology and Pathophysiology*. (ed. Seldin DW, Giebisch G), Raven Press, New York, 1985, p1249-1289.
- Steinhausen M, Snoei H, Parekh N, Baker R and Johnson P: Hydronephrosis: A new method to visualize vas afferens, efferens, and glomerular network. *Kidney Int* 23: 794-806 1983.
- Altschul R and Fedor S: Vascular changes in hydronephrosis. *Am Heart J* 46: 291-259 1953.

- 16) Rao N and Heptinatall R: Experimental hydro-nephrosis: A microangiographic study. Invest Urol 6: 183-204 1968.
- 17) Vaughan EJ, Sorenson E and Gillenwater I: The renal hemodynamic response to chronic unilateral complete ureteral occlusion. Invest Urol 8: 78-90 1970.
- 18) Csellas D and Navar LG: In vitro perfusion of juxtamedullary nephrons in rats. Am J Physiol 246: F349-F358 1984.
- 19) Ito S and Carretero OA: An in vitro approach to the study of macula densa-mediated glomerular hemodynamics. Kidney Int 38: 1206-1210 1990.
- 20) Yamamoto T, Hayashi K, Matsuda H et al.: In vivo visualization of angiotensin II- and tubuloglomerular feedback mediated renal vasoconstriction. Kidney Int 60: 364-366 2001.

(平成15年6月26日受付)
