

# レクチンを用いた微小血管透過性亢進の3次元イメージングと定量化

## Imaging and Quantification of Plasma Leakage from Microvessels by Using Intravital Lectin Injection

森川 俊一<sup>a\*</sup>, 渡邊 俊之<sup>b</sup>, 江崎 太一<sup>a</sup>  
Shunichi Morikawa, Toshiyuki Watanabe and Taichi Ezaki

<sup>a</sup>東京女子医科大学解剖学発生生物学講座

<sup>b</sup>Carl Zeiss MicroImaging Co., Ltd.

**要 旨** 微小循環系において血管壁の透過性亢進により引き起こされる血漿滲出は、種々の炎症をはじめ組織の再生過程や腫瘍に伴う血管新生との関連において重要な所見である。我々は、血管内皮細胞の糖鎖を特異的に認識するトマトレクチンを蛍光標識して実験動物に静脈注射し、共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて微小血管網を明瞭かつ簡便に立体視する方法を開発したが、この方法で血管透過性亢進の生じた微小循環系を観察すると、血管壁から血漿成分と共にレクチンも間質へ漏れ出すために、血管のみならず血漿滲出部も同時に検出することができる。さらに、共焦点顕微鏡に連動するIMARISソフトウェアを用い、取得した画像データを3次元像に再構築することで、間質へ漏れ出したレクチンの量を定量化することも可能となる。本稿では、このレクチンを用いた血管透過性亢進の観察と定量化の方法について具体的な例を挙げて紹介する。

キーワード：レクチン、血管透過性、血漿滲出、3次元イメージング、IMARIS

### 1. はじめに

レクチン (lectin) は特定の糖鎖に特異的な結合活性を示すタンパクの総称である。レクチンには動・植物、菌類由来の数多くの種類が存在するが、このうち幾つかの種類の植物由来レクチンは、ヒトをはじめとする哺乳動物の血管内皮細胞表面に存在する糖鎖をよく認識して結合するため、微小循環系を描出するためのマーカーとして使用されている<sup>1~5)</sup> (図1)。

レクチンを用いて血管系を染め出す際には、目的の組織から切片を作製し、切片上でレクチンを反応させる方法がよく採られるが、我々の研究室では生体の動物の血管系にレクチンを直接注入し、血流に乗せて循環させ、内腔面から血管を描出する方法を用いている<sup>1~5)</sup>。この方法では血流の及んでいない部位の血管がマークされないことにより、血栓等により生じた虚血域を区別できる。また、血管壁の透過性亢進が生じた場合にも、レクチンが血漿成分とともに血管壁から間質へと漏れ出すために、血漿の滲出部位を同定できる。このように、血管を描出するのみならずその部の微小循環系の病態機能も同時に把握できるのがレクチン注入による染色法の利点といえる。本稿では、このレクチ

ン注入の手技と、それを用いた血管透過性亢進の観察法について具体的に紹介する。

### 2. 血管描出におけるレクチンの有用性

血管系を染め出す際には、全身の血管系を最も万遍なく、かつ種差を超えて染め出すという理由で、トマトレクチン (*Lycopersicon esculentum* agglutinin: LEA) が最適であると我々は考える<sup>3,4)</sup>。特にマウス、ラットにおいて、我々はLEAがほぼ全身の血管系を明瞭に描出することを確認しており、また、種差に関しても、ヒトをはじめ、イヌ、ブタ、ヒツジ、ウシ等の多くの動物種でLEAが血管内皮細胞を認識することが知られている<sup>3)</sup>。ヒマレクチン (*Ricinus communis* agglutinin I: RCA-I) も血管系の描出に使用されるが、LEAに対してRCA-Iによる血管系の描出には偏りがあり、一部の組織では血管内皮細胞を認識しないことが報告されている<sup>2)</sup>。我々もマウスの中枢神経系、特に大脳の微小循環系ではRCA-Iが血管系を描出しないことを確認しており (未発表データ)、目的とする組織によってはRCA-Iの使用には注意を要する。また、ヒトの血管系を明瞭に染め出すハリエニシダレクチン (*Ulex Europaeus* agglutinin I: UEA-I) は、逆にマウス・ラットの血管内皮細胞を全く認識しないため、動物実験には使用できない。以上の様に、観察する対象によってそれに適したレクチンを選択することが肝要であるが、我々は主に動物実験においてはLEAを用いて血管系の可視化を行っている。

<sup>a</sup> 〒162-8666 東京都新宿区河田町 8-1

TEL & FAX: 03-5269-7407

\* E-mail: shun@research.twmu.ac.jp

2011年6月28日受付

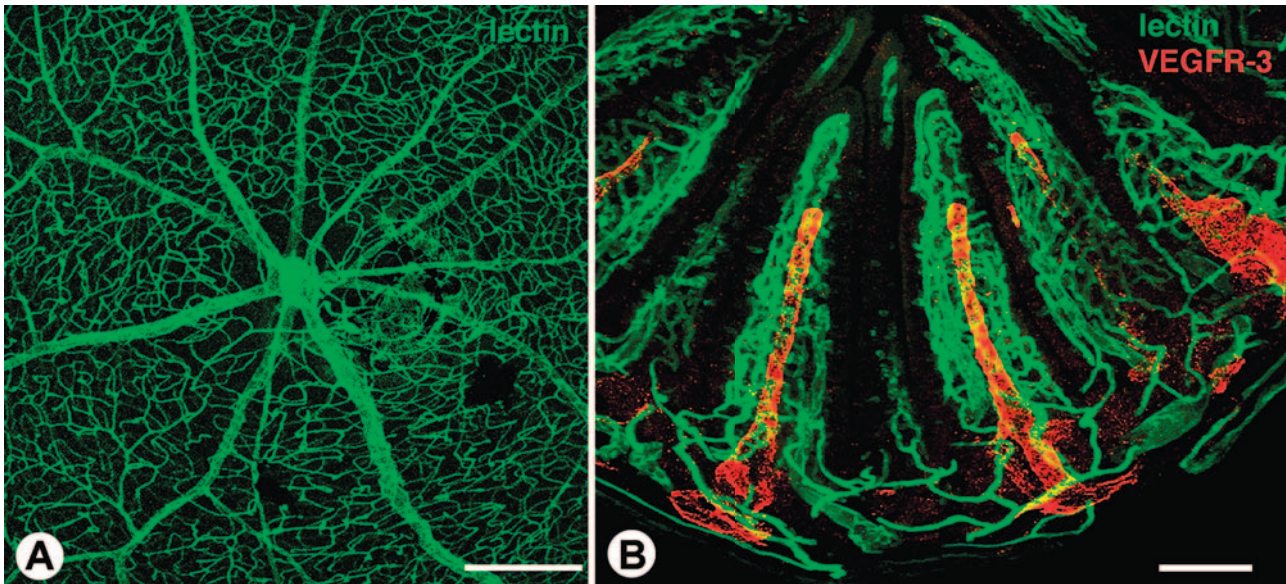


図1 (A) ヒト網膜の血管網. 眼球より後極部を中心として網膜を分離後, 全載伸展標本を作製し, FITC 標識 UEA-I レクチンを反応させて血管系を描出した. 網膜中心動静脈を中心に網膜全体に広がる血管系 (緑) が明瞭に描出されている. Scale bar: 300  $\mu\text{m}$  (B) マウス空腸の微小循環系. FITC で標識した LEA レクチンを動物に注入して血管系をマークした後, 空腸を切り出し, 厚さ 50  $\mu\text{m}$  の凍結切片を作製して抗 VEGFR-3 抗体でリンパ管内皮細胞 (赤) を染色した. 絨毛内に広がる毛細血管の網状構造の内側に, 広い内腔を有し盲端に終わる中心乳糜腔 (毛細リンパ管) が位置していることが観察できる. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$

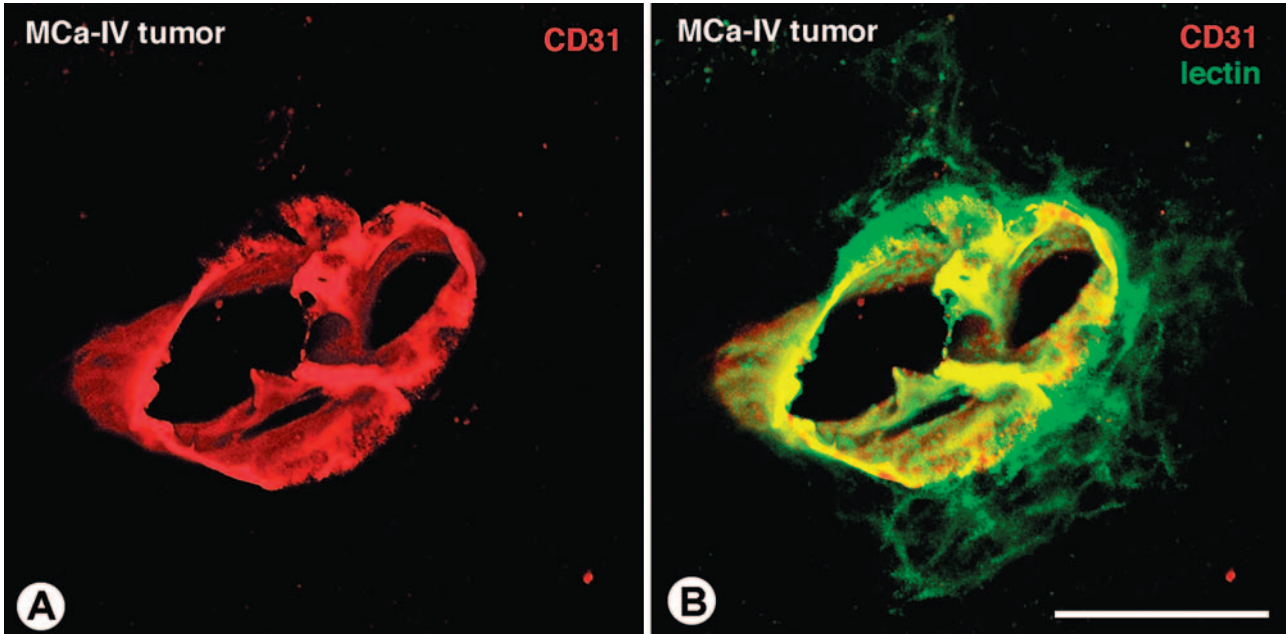


図2 MCA-IV mouse mammary carcinoma に認められた血管. FITC で標識した RCA-I レクチンを動物に注入した後, 腫瘍組織を切り出して厚さ 80  $\mu\text{m}$  の凍結切片を作製し, 抗 CD31 抗体により血管内皮細胞を染色した. (A) CD31 により描出された腫瘍血管 (赤) は, 血管内皮細胞の隔壁形成により内腔が複数に分割されて異常な形態を示す. (B) CD31 による血管内皮細胞の染色 (赤) に, レクチン (緑) による染色像を重ねた. 注入したレクチンは内腔面より血管内皮細胞を染色するため, 血管壁は CD31 とレクチンで二重 (黄色) にマークされている. 同時に, 透過性の血管壁から周囲の間質へ漏れ出したレクチン (緑) も明瞭に観察される. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$

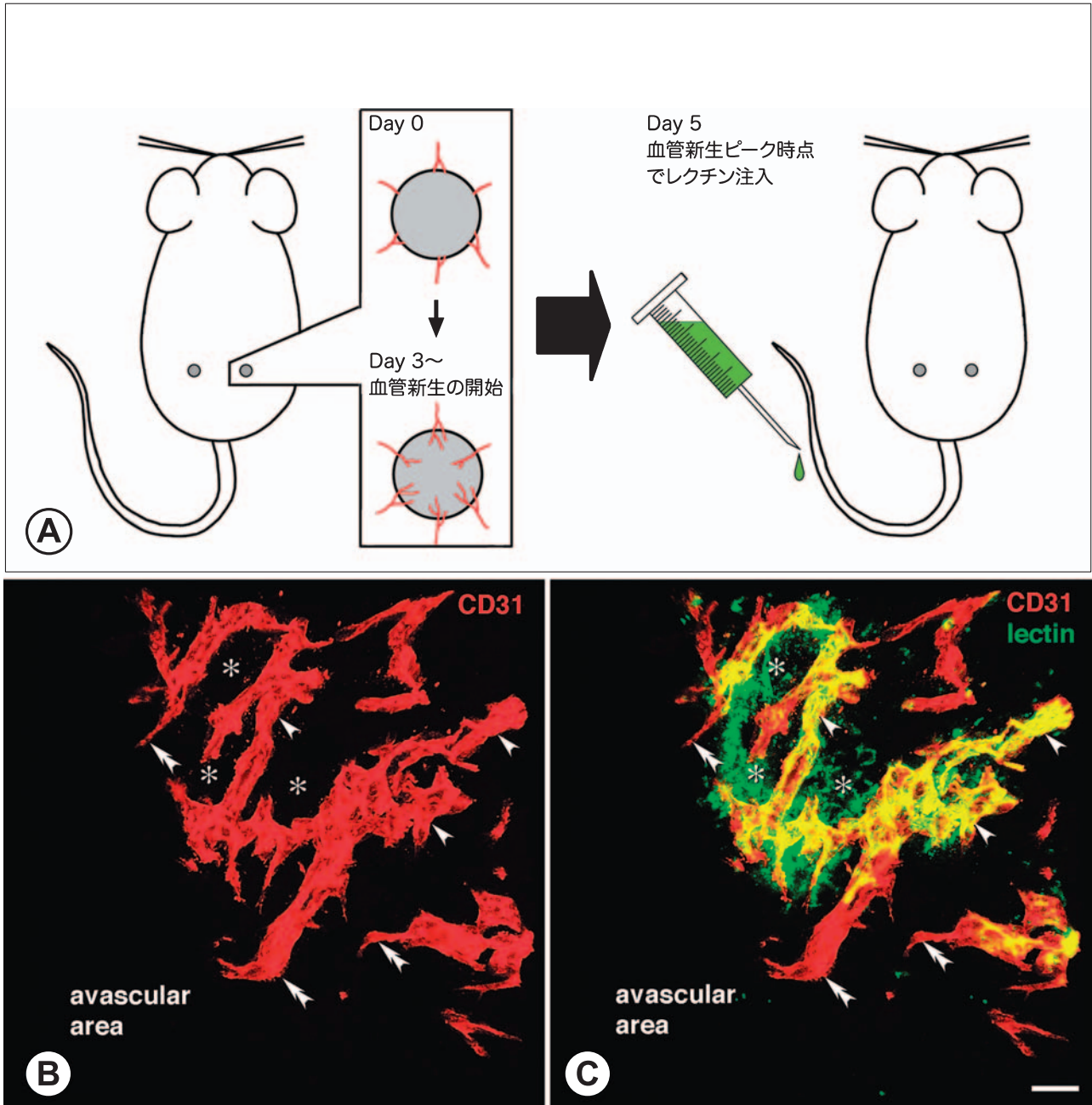


図3 (A) マウス創傷モデルを用いた血漿滲出観察の模式図。マウス背部皮膚に生検パンチを用いて開放創を作製する。この創傷では創傷作製後3日目に血管新生が開始し、5日目にそのピークに達するため、5日目の時点でFITC標識LEAレクチンを静脈内に注入する。その後動物を灌流固定し、創傷部を含む皮膚を切り出して凍結切片を作製する。(B, C) 創傷部へ侵入する新生血管像。上記の通り作製したLEAレクチン注入動物の創傷部皮膚切片に、さらに抗CD31抗体による血管内皮細胞の免疫染色を施した後、共焦点レーザー走査顕微鏡を用い、1  $\mu\text{m}$  厚ステップの断層像を45枚取得して2次元的に重ね合わせ、全体像を得た。(B) 抗CD31抗体による免疫染色像。CD31陽性の新生血管(赤色)が、画像に向かって左端部の血管網未形成の領域(avascular area)に向かって伸長していることが観察できる。(C) 抗CD31抗体と血管内に注入したLEAレクチンの二重染色像。矢尻で示す部位では、新生血管がCD31抗体(赤色)とレクチン(緑色)により二重(黄色)に染色されている。また、新生血管壁から周囲の間質に漏れ出したレクチン(\*)も明瞭に観察できる。二重矢尻で示す部位の盲端構造を示す血管はCD31にのみ陽性であり、レクチンでは認識されていない。これらの部位は新生中の血管内皮細胞による索状の出芽(budding)構造であり、内腔が未形成であるために注入したレクチンが到達できないものと考えられる。Scale bar: 20  $\mu\text{m}$

### 3. 血管新生と血管透過性亢進の関連性

微小循環系における血管透過性亢進は、血管新生と密接に関連することが知られている<sup>1,6~8)</sup>。レクチンを用いた血管透過性亢進の可視化の具体的手技について詳述する前に、まずこの点について少し触れておきたい。

創傷治癒過程や腫瘍中に認められる新生血管は、一般にその透過性の高さで特徴づけられるが<sup>1,6~8)</sup>、これには血管内皮増殖因子である Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

の関与するところが大きい。すなわち VEGF は血管内皮細胞の増殖・遊走を引き起こして血管新生を促進するのみならず、Vascular Permeability Factor (VPF) という異名の通り、新生血管壁の透過性亢進を同時に引き起こす<sup>8,9)</sup>。この透過性亢進により間質中に滲出する物質には抗体や補体も多く含まれるため、創傷等の治癒過程では局所の生体防御反応を高めるのに有利な反面、腫瘍ではその透過性の高さが腫瘍細胞の微小循環系への移動を促進し遠隔転移をもたらす等、腫瘍の悪性度との関連性が示唆されている<sup>7)</sup>。さらに、腫瘍中に

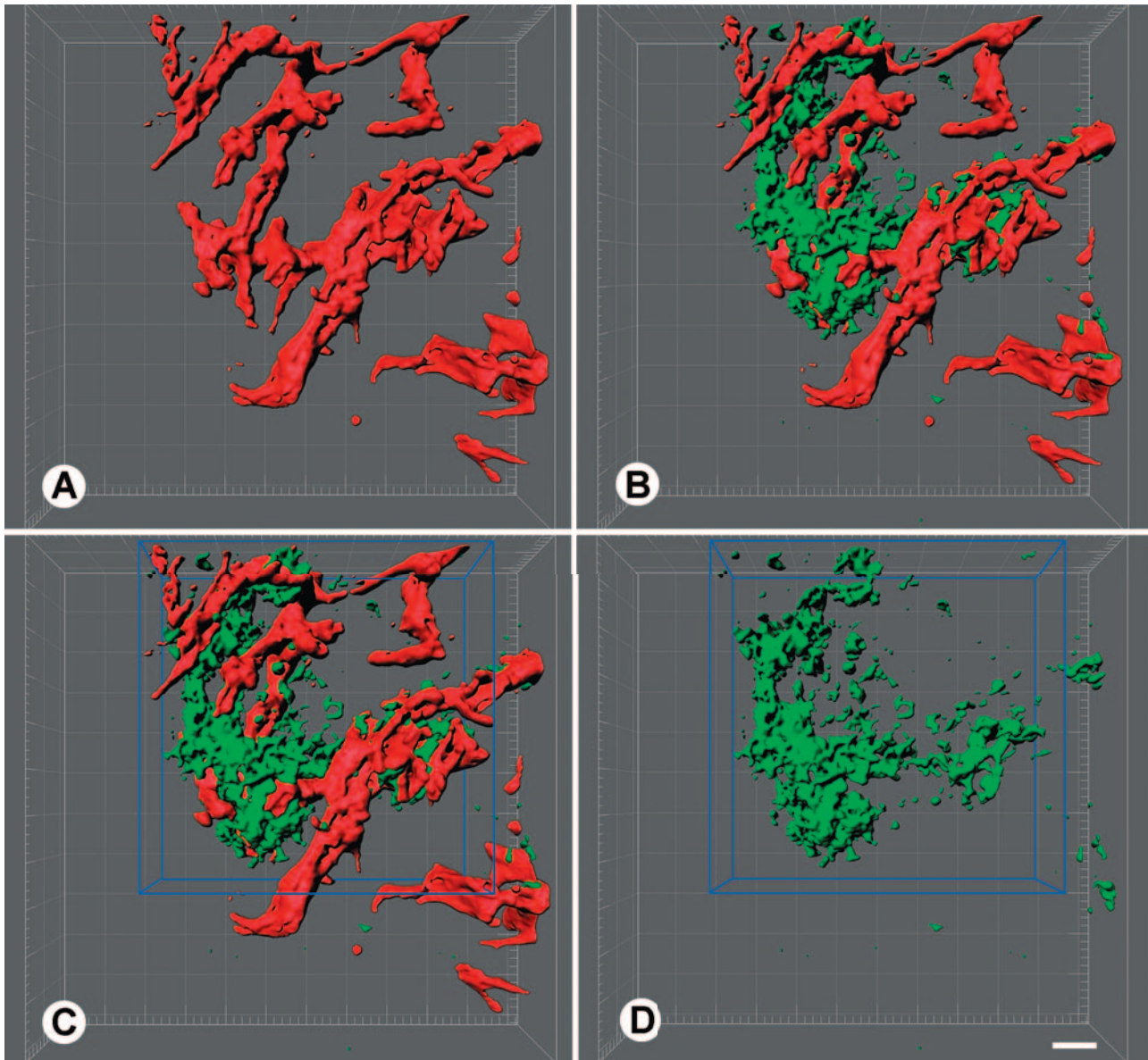


図4 創傷部へ進入する新生血管のIMARISによる3次元再構築像。図3B, Cに示した画像データから再構築を行った。(A) CD31抗体による血管内皮細胞染色のみの再構築像。(B) 血管内皮細胞染色(赤色)に、血管内に注入したLEAレクチン染色(緑色)を重ね合わせた二重染色の再構築像。血管内皮細胞に結合したレクチンの蛍光シグナル(図3Cで内皮マーカーCD31の赤色の染色と重なって黄色を呈する部分)は画像データから除去し、血管壁から間質に漏れ出したレクチンのみを再構築した。(C) 縦150 $\mu\text{m}$ ×横150 $\mu\text{m}$ ×厚さ45 $\mu\text{m}$ (厚さはこの立体像の最大限の厚さ)の範囲で二重染色再構築像の任意の領域を囲った状態。(D) Cで囲った領域から、血管内皮細胞の部分を除去した状態。間質に漏れ出したレクチンのみを示している。Scale bar: 20 $\mu\text{m}$

分布する血管の透過性と、その腫瘍の組織学的悪性度 (histological grade) とが相関を示すとの報告もある<sup>10)</sup>。我々自身も、血管透過性亢進を示すマウスの実験的乳腺腫瘍 (MCa-IV mouse mammary carcinoma) を用いて検索を行ったところ (図 2)、腫瘍内の血管から、予め注入したレクチンが周囲の間質へ漏れ出すことが明瞭に観察できた。

#### 4. レクチン注入の手技と血管透過性亢進の可視化法

ここでは、レクチンを用いた血管透過性亢進の可視化について、マウス創傷モデルを材料とした場合を例にして具体的な手技を述べる (図 3A)。まず、マウス背部皮膚に生検パンチを用いて表皮から皮下組織に及ぶ開放創を作製した。この方法で作製した創傷では、創傷作製後 3 日目より血管新生が始まり、5 日目にそのピークに達することが確認されたことから<sup>1)</sup>、血管透過性亢進の観察には創傷作製後 5 日目の動物を用いた。

麻酔下に術後 5 日目のマウス尾静脈より FITC 標識 LEA (FL-1171: Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) を体重 100 g あたり 500  $\mu$ g の割合で注入し、動物を腹臥位で静置してレクチンを全身に循環させ、5 分後に開胸して上行大動脈より灌流固定を行った。固定剤には 2~4% の paraformaldehyde 含有 PBS を用いた。この操作により血管を含む全身の組織を固定し、かつ血中に残存しているレクチンを洗い流す。この際、paraformaldehyde は組織の固定のみならず、血管内皮細胞の糖鎖に結合したレクチンの安定化にも重要である。また、glutaraldehyde は自家蛍光を生ずるため使用は避けた。動物を固定後、血管系を立体的に観察するため、創傷部を含む皮膚を切り出し、クリオスタットを用いて 50  $\mu$ m の厚切り切片を作製した。その後、血管内皮細胞に特異的な抗 CD31 抗体で免疫組織化学染色を施し、共焦点レーザー走査顕微鏡で観察を行った。

図 3B, C に創傷部へ進入する新生血管像を示す。Carl Zeiss 社の LSM780 共焦点顕微鏡を用い、上記の方法に則って作製した 50  $\mu$ m 厚の切片のうち、両端の切断面を除く 45  $\mu$ m 厚分について、1  $\mu$ m 厚ステップで断層像を 45 枚取得し、重ね合わせて全体像を得たものである。図 3B には血管内皮細胞のみの画像を示したが、画像に向かって左端、未だ血管がない領域 (avascular area) に向かって新生血管が伸長していることが観察できた。図 3C は血管内皮細胞像に注入レクチン像をさらに重ね合わせたものであるが、この像からは、レクチンが血管内皮細胞をマークすると同時に新生血管壁から周囲の間質へ漏れ出ていることが確認できた。また、幾つかの部位で新生血管先端部の内皮細胞が先細りの盲端構造をなし、内腔からのレクチン染色を欠くことが確認されたが、これらの構造は新生血管先端から出芽 (budding) した血管内皮細胞塊を示すものであり、内腔が未形成であるために注入したレクチンが到達できないものと考えられた<sup>1,3,5)</sup>。

#### 5. IMARIS を用いた血管透過性亢進の 3 次元イメージングと定量解析

次に、この間質に漏れ出したレクチンについて、Carl Zeiss 社の共焦点顕微鏡と連動する IMARIS (Bitplane AG, Zurich, Switzerland) というソフトウェアを使って 3 次元レベルの定量解析を行う方法を紹介する。

解析には LSM780 共焦点顕微鏡で取得した創傷部新生血管の画像データを用いた。血管内皮細胞とレクチンのそれぞれの蛍光シグナルについて、IMARIS を用いて 45 枚の個々の断層像上で「表面構造」として追跡し、立体的に再構築することで、極めて精緻な 3 次元像を得ることができた (図 4A-D)。図 4A には血管内皮細胞のみの再構築像を赤色で示した。また、図 4B には血管内皮細胞の染色に緑色のレクチン染色を重ね合わせた二重染色の再構築像を示した。この場合、緑色で示されている構造は血管壁から間質に漏れ出したレクチンのみを再構築したものであり、血管内皮細胞に結合したレクチンの蛍光シグナル (図 3C で内皮マーカー CD31 の赤色の染色と重なって黄色を呈する部分) は除去した。IMARIS で作製したこのような再構築像では、像を回転してあらゆる角度から、また任意の部位を任意の倍率で拡大して構造の形状やサイズに関する詳細な計測を行うことが可能である。そこで次に、この再構築像を用いて間質に漏れ出したレクチンの量の算出を試みた。測定範囲は視野全体でも可能だが、一定の領域を定めて定量化する場合の例として、試みに縦 150  $\mu$ m  $\times$  横 150  $\mu$ m  $\times$  厚さ 45  $\mu$ m (厚さはこの立体像の最大限の厚さ) の空間 (領域) の範囲を設定することとした。この範囲で画像中の任意の領域を囲った状態が図 4C に示した画像である。さらにこの領域から、赤色で示した血管内皮細胞の部分を除去すると、図 4D のように間質に漏れ出したレクチンのみを領域内で抽出することができた。IMARIS を用いることにより自動的に指定した構造の体積を計算できるので、この領域内の間質に漏れ出したレクチンの量は 70477.8  $\mu$ m<sup>3</sup> と算出された。

今後は、この IMARIS を用い、創傷作製直後から治癒に至るまでの期間内において、一定の時期ごとに間質に漏れ出したレクチンの量を定量化し、創傷治癒に伴う血管新生量の径時的推移をより詳細に追跡していくことを検討している。

#### 6. おわりに

本稿で紹介したレクチン注入による血管透過性亢進のイメージングと定量化法は手技も簡単であるため、様々な場面で活用できるものと考えられる。炎症病態はもとより、前述した腫瘍の悪性度判定や、発生過程、組織の修復・再生過程における血管新生部位の同定にも有用な手段となるであろう。形態学的手法による微小循環系の解析に興味を持つ読者諸氏に本法が少しでもお役に立てば幸いである。

文 献

- 1) Morikawa, S. and Ezaki, T.: *Histol. Histopathol.*, **26**, 979–995 (2011)
- 2) You, W.K., Kasman, I., Hu-Lowe, D.D. *et al.*: *Am. J. Pathol.*, **176**, 1927–1940 (2010)
- 3) 森川俊一, 江崎太一: 生体の科学, **55**, 266–272 (2004)
- 4) Mazzetti, S., Frigerio, S., Gelati, M. *et al.*: *Eur. J. Histochem.*, **48**, 423–428 (2004)
- 5) Morikawa, S., Baluk, P., Kaidoh, T. *et al.*: *Am. J. Pathol.*, **160**, 985–1000 (2002)
- 6) Nagy, J.A., Benjamin, L., Zeng, H. *et al.*: *Angiogenesis.*, **11**, 109–119 (2008)
- 7) Fukumura, D. and Jain, R.K.: *Microvasc. Res.*, **74**, 72–84 (2007)
- 8) Dvorak, H.F.: *Exp. Cell Res.*, **312**, 522–526 (2006)
- 9) Collins, P.D., Connolly, D.T. and Williams, T.J.: *Br. J. Pharmacol.*, **109**, 195–199 (1993)
- 10) Daldrup, H., Shames, D.M., Wendland, M. *et al.*: *AJR Am. J. Roentgenol.*, **171**, 941–949 (1998)