

①

マウス腎癌における顕微血管造影法を用いた
腫瘍血管新生活性の検討

松下 靖、藤岡知昭

岩手医科大学医学部、泌尿器科学講座

(主任:久保 隆 教授)



連絡先: 〒020 盛岡市内丸19-1

岩手医科大学泌尿器科学講座

松下 靖

TEL 0196(51)5111

FAX 0196(23)1527

running title: 腫瘍血管新生過程の定量的解析

Microangiographic studies on the
process of tumor vascularization in
the murine renal cell carcinoma.

Yasushi MATSUSHITA and Tomoaki
FUJIOKA

Department of Urology, School of
Medicine, Iwate Medical Univer-
sity, Morioka, Japan (Prof. T. KUBO)

key words:

*angiogenesis, microangiography,
murine renal cell carcinoma(Renca),
quantitative analysis*

Abstract

Using mouse renal cancer (Renca) models, we studied tumor vascularization on the basis of microangiographic findings. The process of tumor vascularization was morphologically investigated on the X-ray films and quantitative evaluation was performed. The vascular volume, vascular surface area, and vascular length in the tumor were determined on the microangiograms using Chalkley's method and Vogel's method.

Generally, analysis of microangiography is not so quantitative. We were able to increase the precision of microangiographic analysis to the level of quantitation by using constant conditions with respect to the type and concentration of contrast medium and the injection pressure.

Based on the microangiographic findings, the tumor vascular network showed peripheral vascularization with penetrating vessels in both a subcapsular implantation and a liver metastasis model.

Quantitative analysis of the microangiograms indicated that there were two phases in the process of tumor vascularization in both models, which were the phase in which vascularization is dominant and the phase involving tumor necrosis.

The results of this study suggest that microangiography can provide an index of tumor vascularization and may be useful for investigations of cancer growth and the response to treatment.

I. 緒言

血管新生(angiogenesis)とは、既存の血管から内皮細胞が芽出し、新生血管網が完成するまでの全経過をさすもので、胎生期における血島から血管系が形成される血管発生(vasculogenesis)とは区別される現象である¹⁾。

1971年、Folkmanによって移植した腫瘍組織が一定の大きさ(細胞数約 10^6 個)を越えて発育増殖していくためには、栄養血管が侵入することが必須であり、このためには腫瘍由来の生理活性物質が重要な働きをしていることが報告されて以来、腫瘍の発育増殖に血管新生の重要性が注目されるようになった²⁾。実際、血管から酸素が拡散によって到達可能な距離(150-200 μm)より離れると、腫瘍細胞は壊死するとされている³⁾。

腫瘍血管新生活性を解析するin vivoモデルとして、ウサギやラット等の眼の角膜、ニワトリ卵の漿尿膜に腫瘍細胞を移植する方法、高分子ポリマーに腫瘍細胞を封入し動物の皮下に挿

入する方法(マウス背部皮下ポーチ法)、および腫瘍含有血液を測定する方法等が使用されているが、再現性・定量性が乏しいことや腫瘍移植操作による炎症性変化が起こる等の問題を有しており、現時点で決め手となる実験方法はない(1, 4, 5, 6)。

本研究の目的は、マウス腎癌の移植モデルにおいて、顕微血管造影(Microangiography)により腫瘍血管新生活性の解析が可能か否かを検討することである。すなわち、腫瘍移植モデルにおいて腫瘍血管新生過程を形態学的に検討し、さらにX線画像上において腫瘍内に占める血管容量、血管表面積および血管長を定量的に解析した。また、腫瘍の移植操作による血管新生に対する影響を取り除くため、転移モデルを作製し同様の検討を行ったので、得られた知見について報告する。

II. 材料および方法

1. 動物および腫瘍細胞

動物は、8～12週齢の雌性BALB/cマウスを使用した。腫瘍細胞として、Dr. R. H. Wiltrot (National Cancer Institute, USA)より恵与されたマウス腎癌株(Renca)を用いた。この腫瘍系はBALB/cマウス腎皮質由来の自然発生腺癌で、その細胞形態は未分化で悪性度が高く、ヒト腎癌のgranular cell subtypeに分類される。

2. 腫瘍移植および転移モデルの作製方法

①移植モデル；全麻下に開腹し、マウス左腎被

膜下に約 1mm^3 のRenca腫瘍片を移植した。

②転移モデル；同様に、マウス脾臓実質内に

Renca 5×10^5 細胞/0.02mlを移植し、門脈系を介して転移モデルを作製した。

移植モデルでは、移植後5、8、11、14日目に、転移モデルでは14、21日目に顕微血管造影を施行した。

3. 顕微血管造影

全麻下に開腹、腹部大動脈に静脈留置針を挿入し、下大静脈を脱血用に解放後、ヘパリン生

食水(生理的食塩水100mlにヘパリン1000単位)を注入して、血液を灌流、除去した。次に造影剤を180mmHgの一定圧で注入後、左腎または肝臓を摘出、10%ホルマリン溶液中で固定した。造影剤には2%ゼラチンを含むMicro-paque[®])を使用した。

摘出標本は腫瘍部の中央で切断し、一方は顕微血管造影のため約0.5mmに薄切し、他方の同一断面でHE染色を行った。0.5mmの厚さの切片は、Kodak high resolution filmの感光膜面に直接載せて、超軟X線発生装置を用いてX線撮影を行い、その血管造影を光学顕微鏡で観察した。

なお、移植モデルでは移植後5、8、11、14日目の各時点で10頭分の顕微血管像を、転移モデルでは移植後14、21日目に各5頭血管造影を行い、転移巣の直径より0.5mm以下、0.5~1.5mm、1.5mm以上の3群に分け、各群10個の転移巣の顕微血管像をそれぞれ解析した。

4. 顕微血管造影画像の定量化

血管新生の程度についてはChalkley法⁷⁾ならびにVogel法⁸⁾で、腫瘍組織内の血管量を測定することで定量的に評価した。すなわち顕微鏡接眼レンズにマイクロメーターを取り付け、これに任意の5点を設け視野を動かした際にこれらの点が血管に当たる確率を測定した。腫瘍組織内に占める血管の体積に近似するよう、点数を可及的に多くとった。また腫瘍内の任意の200個の血管径を測定し、血管の体積(V)と血管径の平均(\bar{d})、血管径の自乗の平均($\overline{d^2}$)から、次式から単位体積 1mm^3 の腫瘍組織内に含まれる血管の表面積(vascular surface area)および長さ(vascular length)を算出した。
($\text{surface area} = 4V\bar{d} / \overline{d^2}$ 、 $\text{length} = 4V / \pi \bar{d}$)

5. 統計学的検討

各値は、平均値±標準偏差で示し、検定は、Abacus Concepts Inc.の統計ソフトウェアStatView IIを用いてt-testで行い、pが5%未満を有意の差異とした。

Ⅲ. 実験結果

1. 顕微血管造影および組織学的所見

1) 腎癌移植モデル

移植後5日目では、組織像より腫瘍は生着し、腫瘍細胞の増殖が見られたが、顕微血管造影画像上、腫瘍内に血管像はほとんど認められなかった(図1)。

移植後8日目では、腫瘍細胞はさらに増殖し、顕微血管造影画像上、腫瘍周囲より腫瘍内に侵入する血管が多数認められた(図2)。

移植後11日目では、8日目と比較して腫瘍内の血管密度はさらに上昇し、豊富な新生血管網の形成が認められた。組織像では腫瘍壊死は見られず、腫瘍細胞のさらなる増殖が認められた(図3)。

しかし移植後14日目では、腫瘍内に血管像はほとんど見られなくなり、拡張した血管が散在性に認められ、組織像において腫瘍中心部に壊死が認められた(図4)。

2) 腎癌肝転移モデル

0.5mm以下群では、腫瘍の周囲を取り囲むように血管の新生像が見られたが、腫瘍内部にはほとんど血管像は認められなかった。組織像では腫瘍はほぼ円形に増殖し、腫瘍細胞は胞体が顆粒状で、Renca腫瘍の転移と確認された(図5)。

0.5~1.5mm群では、顕微血管造影画像上、腫瘍周囲から腫瘍内に侵入する血管が多数認められた。それらの血管は不規則に拡張し、形態上既存の血管とは異なるものと思われた。組織像では腫瘍細胞の増生が見られ、壊死像は認められなかった(図6)。

1.5mm以上群では腫瘍周囲に血管像は見られるが、腫瘍内の血管密度は著明に低下した。組織学的に腫瘍の中心部に壊死像が認められた(図7)。

2. 腫瘍血管の定量的解析

1) 腎癌移植モデル

(a) 血管密度

移植後5日目では画像上、腫瘍内の血管は疎

であり血管密度はほぼ0であったが、8日目には47.8±9.4%と上昇した。11日目では血管密度はさらに増加し、60.0±7.2%と最大となった。しかし腫瘍壊死の見られた14日目では、9.3±0.7%と11日目に比較して有意に低下した($p < 0.01$)(図8)。

(b)血管表面積

血管密度の推移と同様に、8日目で131.0±11.9mm²/mm³であったが、11日目には198.9±40.4mm²/mm³と経時的に有意に拡大した($p < 0.01$)。しかし14日目では23.2±4.2mm²/mm³と著明に縮小した($p < 0.01$)(図9)。

(c)血管長

8日目では血管長は4.13±0.81m/mm³であったが、血管新生の盛んな11日目では血管長はさらに延長し、7.08±1.96m/mm³と最長となった($p < 0.01$)。しかし腫瘍壊死の見られる14日目では0.61±0.18m/mm³と急激な減少を示した($p < 0.01$)(図10)。

(d)血管径

8、11日目では新生血管の増殖を反映して、
10 μ 以下の小血管が全体の約70%を占めたが、
腫瘍壊死の見られる14日目ではその割合は、50
%と減少した。(図11)。

2) 腎癌肝転移モデル

(a) 血管密度

0.5mm以下群では、腫瘍内に血管像はほとん
どなく血管密度はほぼ0であった。一方、0.5~
1.5mm群では63.1 \pm 13.2%と上昇したが1.5
mm以上群では30.7 \pm 15.6%と減少した($p <$
0.05)(図12)。

(b) 血管表面積

0.5~1.5mm群では、血管表面積は141.5 \pm
23.3mm²/mm³であったが、1.5mm以上群では
52.7 \pm 21.0mm²/mm³と有意に縮小した($p <$
0.01)(図13)。

(c) 血管長

血管新生の著明な0.5~1.5mm群では血管長
は3.79 \pm 1.20m/mm³であったが、腫瘍壊死の
見られる1.5mm以上群では0.92 \pm 0.27m/mm³

と有意に減少した($p < 0.01$)(図14)。

(d)血管径

新生血管の盛んな0.5~1.5mm群では10 μ m以下の小血管が全体の約50%を占めたが、腫瘍壊死の見られた1.5mm以上群ではその割合は約30%に減少し、逆に20 μ m以上の拡張した血管が全体の30%を占めた(図15)。

IV. 考按

顕微血管造影は、1944年Bohatyrschukにより開発された方法で、摘出臓器の動脈内に造影剤を注入後、軟線X線撮影によりその微少血管の観察に用いられている⁹⁾。

しかし本法は手技に左右され易く、またその解析が難しく、造影剤の選択、注入圧・注入速度等の検討により再現性、定量性を高めることが必要であると指摘されている^{10,11)}。

注入圧に関しては、最高血圧より高圧にするのが一般的であるが、毛細血管に障害を与えない最高注入圧は200mmHgとされている¹²⁾。また

Jainらは、腫瘍組織内圧が正常組織に比較し有意に高く、そのため腫瘍内血流が減少することを報告し、薬剤到達の面よりこの現象が腫瘍の化学療法の抵抗性の一因となっていることを指摘している^{13,14,15)}。このことは顕微血管造影において、造影剤の高圧注入することの必要性を示唆している。

本研究では、造影剤として2%ゼラチンを含むMicropaque[®]を使用した。本剤は硫化バリウム溶液でその微粒子の大きさは、0.015~10 μ m程度である¹⁶⁾。ゼラチンは血管内の停滞を良好にするために混じた。注入圧はマウスの一般の最高血圧(93~138mmHg)を考慮し、180mmHgに一定し注入した¹⁷⁾。また、手技の一定化を図るため実験はtriplicateで行った。以上の条件で85%の症例で腎糸球体血管が十分造影され、これらのX線画像を検討対象とした。

また、顕微血管造影による腫瘍血管新生の検討は、一度に500 μ mの厚さの組織内血管の密度およびその形態を評価でき、従来より血管新生

過程の解析や腫瘍における特異な血管構築の解明に用いられた、直接もしくは血管内に色素を注入して連続切片により光顕的観察や血管内にメタクリレート樹脂注入、作製した血管鑄型を走査電子顕微鏡により観察する組織学的方法に比較し、より簡便な方法であると考え¹⁸⁻²²⁾。

RubinとCasarett²³⁾は、顕微血管法を用いて移植腫瘍の微少循環を検討し、形態上3種に分類できると報告している。すなわち、腫瘍周囲にのみ血管網を形成する(Peripheral vascularization without penetrating vessels)型、腫瘍周囲の血管網より中心部への貫通枝を伴う(Peripheral vascularization with penetrating vessels)型および腫瘍の中央を栄養血管が走行し、辺縁に向かって枝を出す、樹枝状構造をとる(Central vascularization)型であり、第3の型の場合は中心部の壊死を形成しないと述べている。

今回の腫瘍血管新生過程における形態学的な検討において、移植腫瘍モデルと転移モデルは

腫瘍増殖初期を除き同様の過程をとり、マウス腎癌(Renca腫瘍)は、先に述べたPeripheral vascularization with penetrating vessels型に分類される形態を描写出来た。

YamauraとSato²⁴⁾は、腫瘍血管新生形態の定量化の解析の方法として、ラット背部皮膚に装着する透明窓を作製し、この部に肝臓癌(AH109A)を移植し周囲より誘導される新生血管の形態を経時的、定量的に観察し、血管新生を4期に分類することを提唱している。すなわち、slight capillary alterations(1期)、formation of fine capillary networks and changes in veins(2期)、modification in arteries(3期)、necrosis(4期)であり、血管容積、血管表面積および血管長は、正常組織(対照)でそれぞれ、20%、 $20\text{mm}^2/\text{mm}^3$ および $36\text{m}/\text{mm}^3$ であるのに対して、腫瘍を移植した窓内では、1期から2期には50%、 $70\text{mm}^2/\text{mm}^3$ 、 $160\text{m}/\text{mm}^3$ と増加し、血管新生活性は非腫瘍性血管新生時の40-50倍

であり、さらに3期から4期になると3者共に0となることを報告している。

さらに山浦と松沢²⁵⁾は、ラットを用いこの方法で癌放射線療法における局所微小血管径の動態に関し検討し、腫瘍血管新生が4000Rで完全に抑制されるとともに、新生血管形態の定量化が癌の増殖動態および治療効果の研究に有用であることを報告している。

今回のマウス腎癌移植モデルおよび転移モデルの顕微血管造影画像の定量的解析でも、血管新生過程はYamauraとSatoの報告²⁴⁾と同様の経過をとり、彼等が述べた1、2期は腫瘍血管の新生が盛んな時期で、3、4期は腫瘍が壊死に向かう時期であり、著者らは本法により前者を血管新生期、後者を腫瘍壊死期として2期に分類出来た。以上のように顕微血管造影法は形態学的にも定量的にも腫瘍血管新生活性の評価に有用であると考えられた。

V. 結語

マウス腎癌(Renca腫瘍)の腎被膜下移植モデルおよび肝転移モデルを作製し、顕微血管造影およびその定量化により、腫瘍血管新生活性を検討した。

1) 本法による腎糸球体血管描出率は85%と良好であった。

2) 移植モデルと転移モデルは腫瘍増殖初期を除き、同様の血管新生過程を呈し、ともに
Peripheral vascularization with
penetrating vesselsの型に分類された。

3) 移植モデルおよび転移モデルの顕微血管造影画像の定量的解析の結果、血管新生過程は、血管新生期と腫瘍壊死期の2期に分類できた。

稿を終えるにあたり、懇切丁寧なる御指導、
御校閲を賜りました岩手医科大学泌尿器科学
講座・久保 隆教授、臨床検査医学講座・伊藤
忠一教授、に深謝致します。

文献

- 1) Blood, C. H. and Zwttter, B. R. : Tumor interactions with tumor metastasis. *Biochem. Biophi. Acta.* 1032, 89-118, 1990.
- 2) Folkman, J. : Tumor angiogenesis: Therapeutic implication. *New Engl. J. Med.* 285, 1182, 1971.
- 3) Folkman, J. : The vascularization of tumors. *Scientific America* 234, 59-73, 1976.
- 4) Folkman, J., Langer, R., Linhardt, R. J. et al. : Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone. *Science* 221, 719-720, 1983.
- 5) 藤岡知昭、長谷川道彦、吉田直人、他 : マウス腎癌に対する活性型ビタミンD₃およびコルチゾンの血管新生阻害作用. *医学のあゆみ* 166, 619-620, 1993.
- 6) 小林美枝子、三井洋司 : 血管内皮と血管新

生. 臨床検査 36, 400-403, 1992.

- 7) Algire, G. H., Chalkley, H. W., Legallais, F. Y. et al: Vascular reaction of normal and malignant tissues in vivo. I. Vascular reaction of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. J. Natl. Cancer Inst. 6, 73-85, 1945.
- 8) Vogel, A. W.: Intratumoral vascular changes with increased size of a mammary adenocarcinoma: New method and results. J. Natl. Cancer Inst. 34, 571-578, 1965.
- 9) Bohatyrshuk, F.: Uber ergebnisse der Mikrorontgenographie. Acta Radiol. 25, 351-365, 1944.
- 10) 寺田洋子: 移植腎における拒絶反応の発生機序に関する実験的研究—Microangiographyによる検討—. 日泌尿会誌. 73, 343-361, 1982.
- 11) Rubin, P.: Microangiography: Facts and

- artifacts. *Radiol. Clin. N. Amer.* 2,
499-513, 1964.
- 12) Bromaqn, T. and Olessen, O. :Technique
for pharmaco-dynamic investigation
of contrast media for cerebral
angiography. *Acta Radiol.* 45, 96-
100, 1956.
- 13) Jain, R. K. :Delivery of novel thera-
peutic agents in tumors:Physiologi-
cal barriers and strategies. *J. Natl.
Cancer Inst.* 81, 570-576, 1989.
- 14) Gutmann, R., Leunig, M., Feyh, J., et al
:Interstitial hypertension in head
and neck tumors in patient:Correla-
tion with tumor size. *Cancer Res.* 52,
1993-1995, 1992.
- 15) Jain, R. K. :Transport of molecules in
the tumor interstitium:A review.
Cancer Res. 47, 3039-3051, 1987.

- 16) Brodman, R. F., Hackett, R. L., Finlayson, B. et al: Microangiography of the renal vasculature following total renal artery occlusion. *Surgery* 75, 734-739, 1974.
- 17) 佐藤徳光：動物実験の基本. p. 256, 西村書店, 新潟, 1986.
- 18) Warren, B. A.: The vascular morphology of tumor. In: H. I. Peterson (ed.), *tumor blood circulation*, Chap. 1, pp. 1-47, Boca Raton, FL: CRC press, 1979.
- 19) Grunt, T. W., Lametschwandtner, A. And Staindl, O.: The vascular pattern of basal cell tumours: light microscopy and scanning electron microscopic study on vascular corrosion casts. *Microvasc. Res.* 29, 371-386, 1985.
- 20) Skinner, S. A., Tutton, P. J. M., and O'Brien, P. E.: Microvascular architecture of experimental colon

- tumors in the rat. *Cancer Res.* 50,
2411-2417, 1990.
- 21) Less, J. R., Skalak, T. C., Sevick, E. M. et
al: Microvascular architecture in a
mammary carcinoma: Branching patterns
and vessel dimensions. *Cancer Res.*
51, 265-273, 1991.
- 22) Jain, R. K.: Determinations of blood
flow: A review. *Cancer Res.* 48, 2641-
2658, 1988.
- 23) Rubin, P., and Casarett, G.: Microcir-
culation of tumors. I. Anatomy, func-
tion, and necrosis. *Clin. Radiol.* 17,
220-229, 1966.
- 24) Yamaura, H. and Sato, H.: Quantitative
studies on the developing vascular
system of rat hepatoma. *J. Natl. Cancer
Inst.* 53, 1229-1240, 1974.
- 25) 山浦玄嗣、松沢大樹：血管の増殖に対する放
射線の影響—ラット透明窓法による定量的測

定一. 癌の臨床 21, 474-479, 1975.

図の表題とその説明

図1. マウス腎癌移植モデル (移植後5日目)

A : 顕微血管造影画像 (×150)

B : 組織標本 (×150)

図2. マウス腎癌移植モデル (移植後8日目)

A : 顕微血管造影画像 (×150)

B : 組織標本 (×150)

図3. マウス腎癌移植モデル (移植後11日目)

A : 顕微血管造影画像 (×150)

B : 組織標本 (×150)

図4. マウス腎癌移植モデル (移植後14日目)

A : 顕微血管造影画像 (×150)

B : 組織標本 (×150)

図5. マウス腎癌肝転移モデル (腫瘍径0.5mm

以下群)

A : 顕微血管造影画像 (×150)

B : 組織標本 (×150)

図6. マウス腎癌肝転移モデル (腫瘍径0.5~

1.5mm群)

A : 顕微血管造影画像 (×150)

B : 組織標本 (×150)

図7. マウス腎癌肝転移モデル (腫瘍径1.5mm
以上群)

A : 顕微血管造影画像 (×150)

B : 組織標本 (×150)

図8. マウス腎癌移植モデル、腫瘍血管容量の
経時的変化

図9. マウス腎癌移植モデル、腫瘍血管表面積
の経時的変化

図10. マウス腎癌移植モデル、腫瘍血管長の
経時的変化

図11. マウス腎癌移植モデル、腫瘍血管径の
大きさとその比率

図12. マウス腎癌肝転移モデル、腫瘍血管容
量の腫瘍径による比較

図13. マウス腎癌肝転移モデル、腫瘍血管表
面積の腫瘍径による比較

図14. マウス腎癌肝転移モデル、腫瘍血管長
の腫瘍径による比較

図15. マウス腎癌肝転移モデル、腫瘍血管径

の大きさとその比率

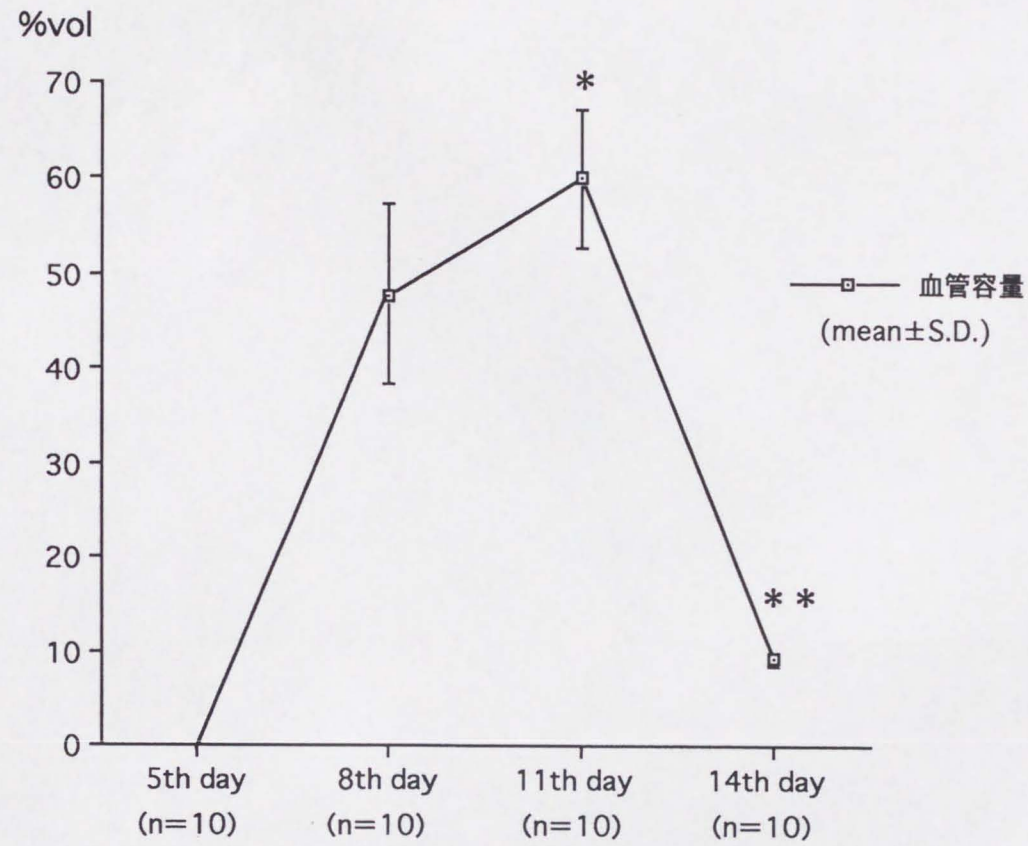


図8. 腎癌移植モデルにおける血管容量の経時的変化

* $p < 0.01$ compared with 8th day

** $p < 0.01$ compared with 11th day

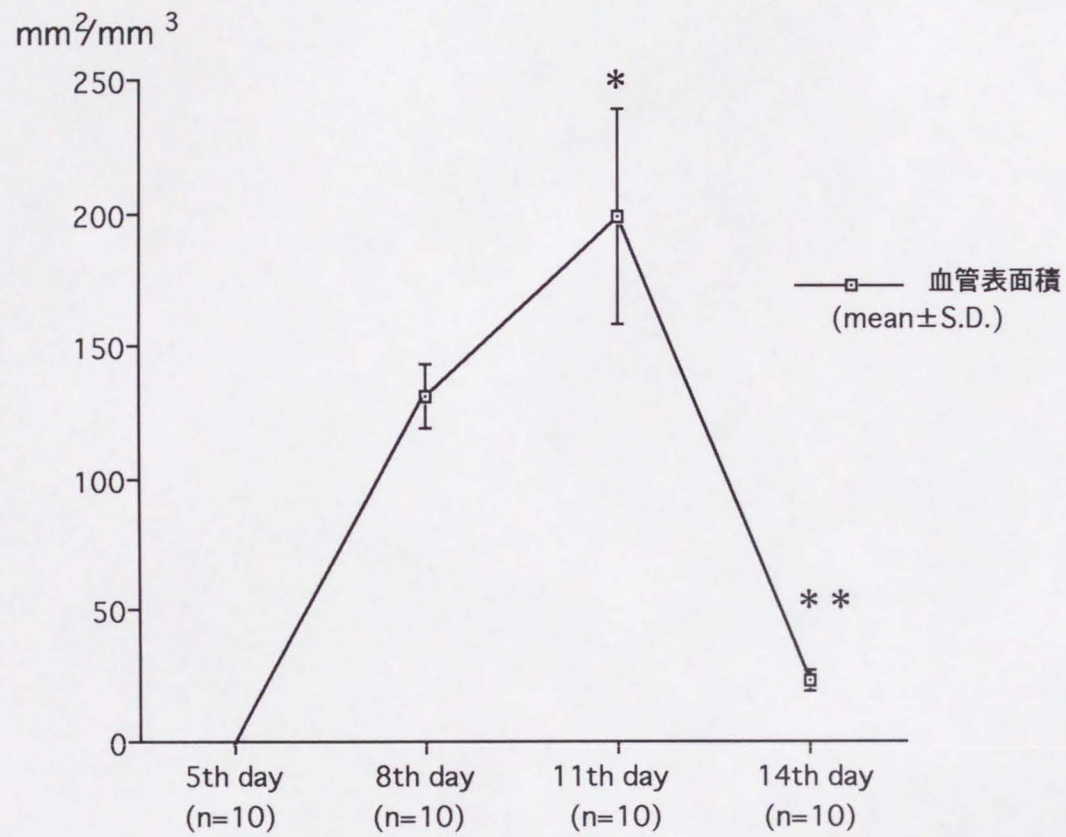


図9. 腎癌移植モデルにおける血管表面積の経時的変化

* $p < 0.01$ compared with 8th day

** $p < 0.01$ compared with 11th day

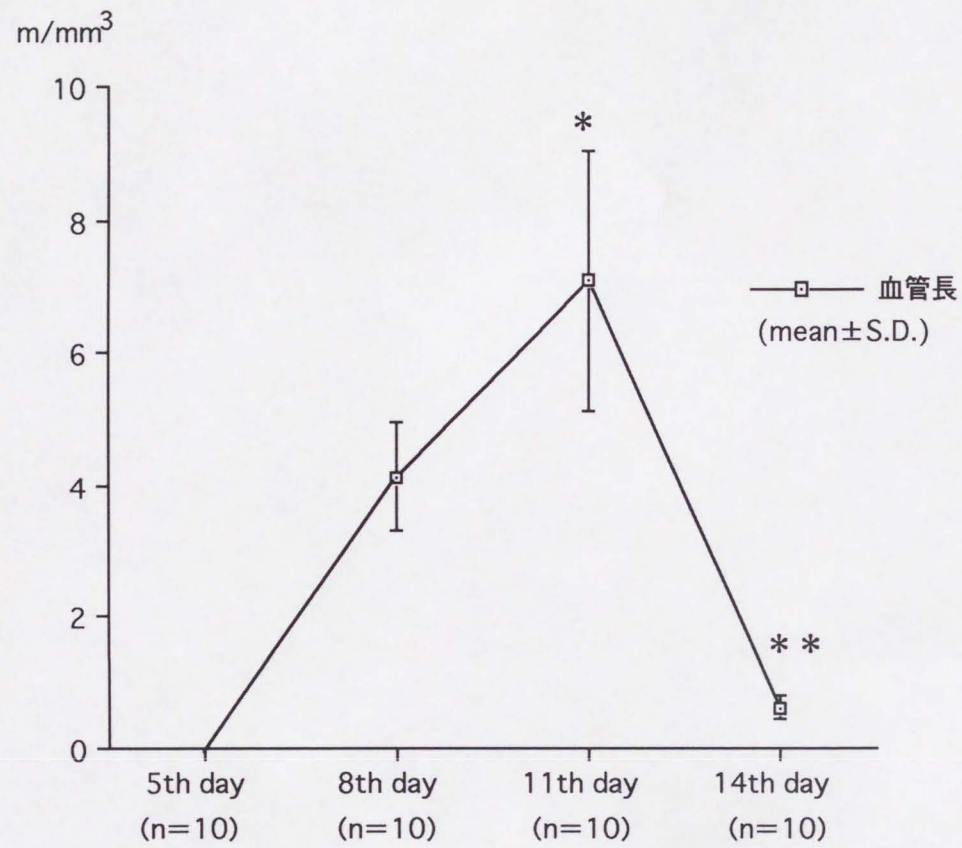


図10. 腎癌移植モデルにおける血管長の経時的变化

* $p < 0.01$ compared with 8th day

** $p < 0.01$ compared with 11th day

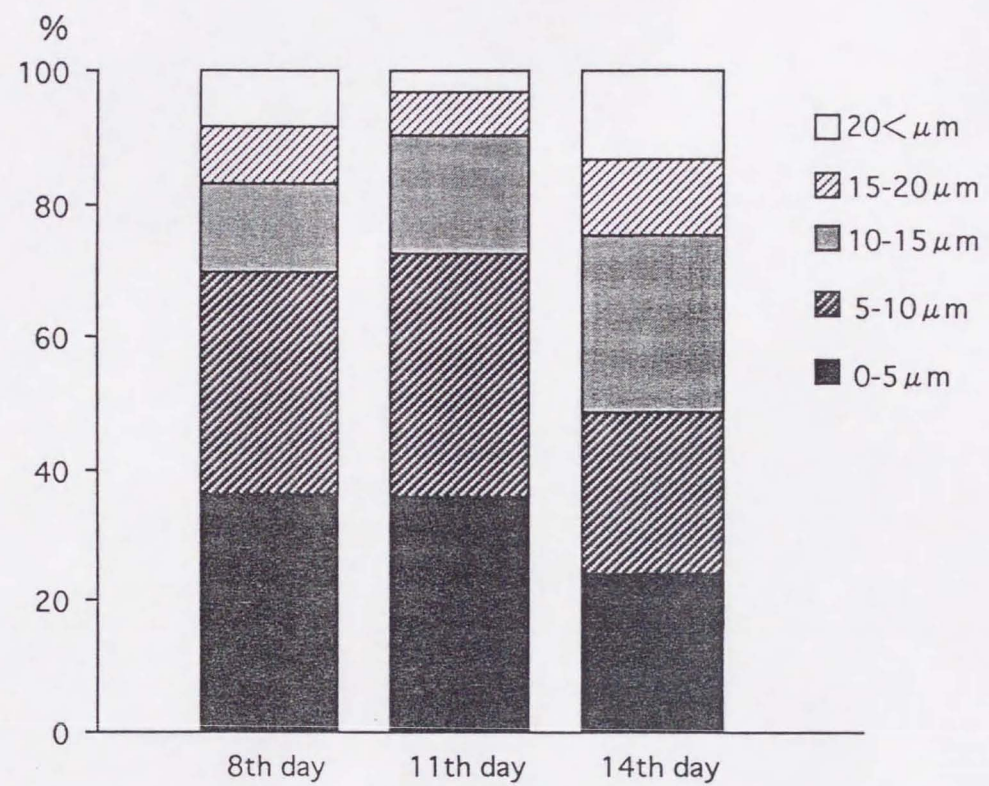


図11. 腎癌移植モデルにおける腫瘍血管径の比率

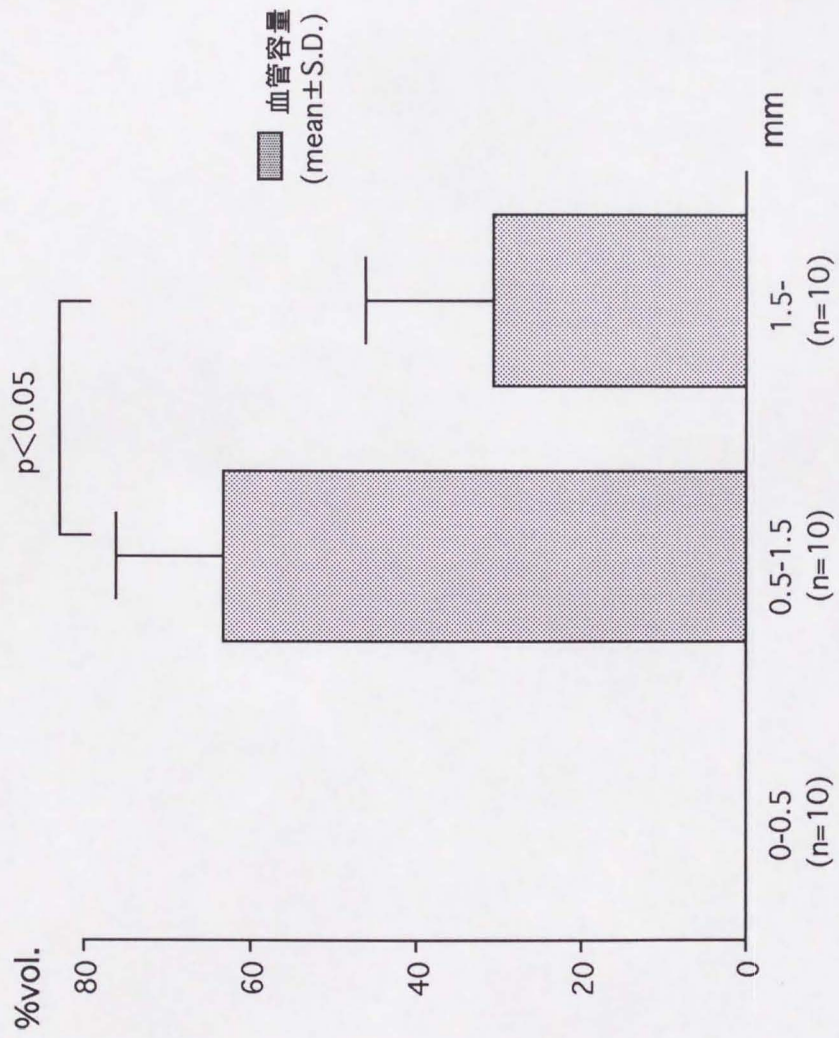


図12. 腎癌肝転移における腫瘍sizeによる血管容量の比較

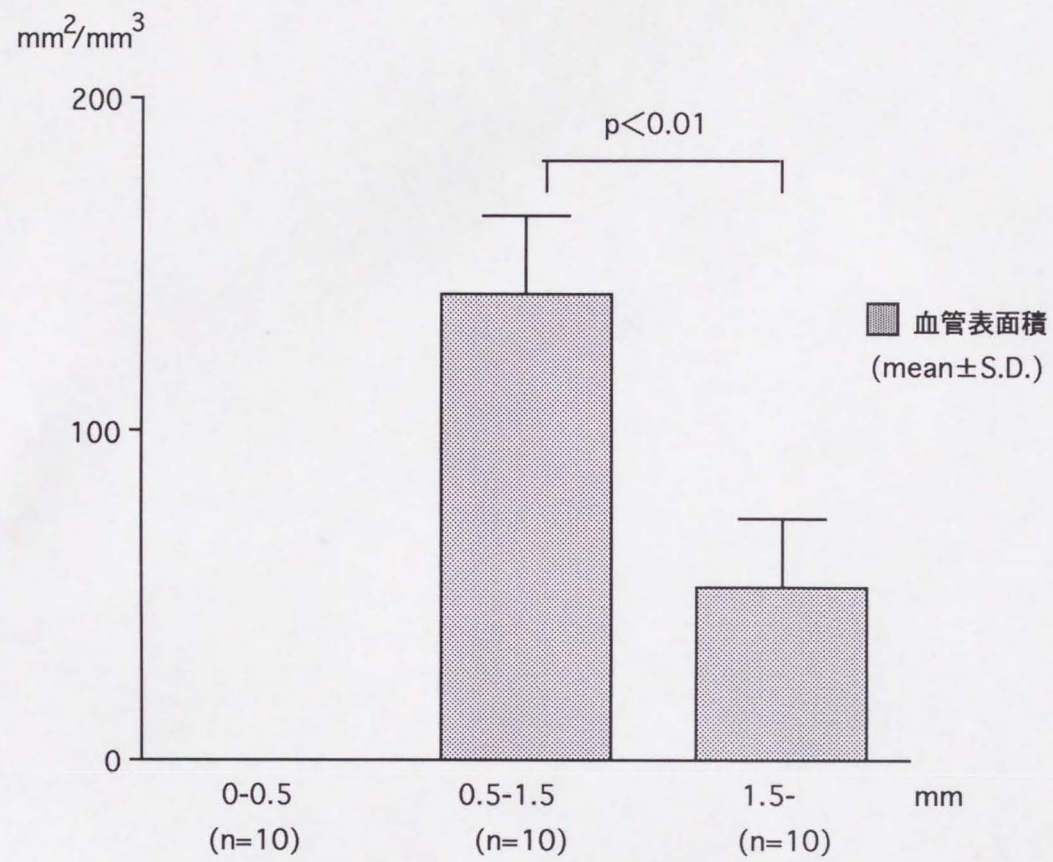


図13. 腎癌肝転移モデルにおける腫瘍sizeによる血管表面積の比較

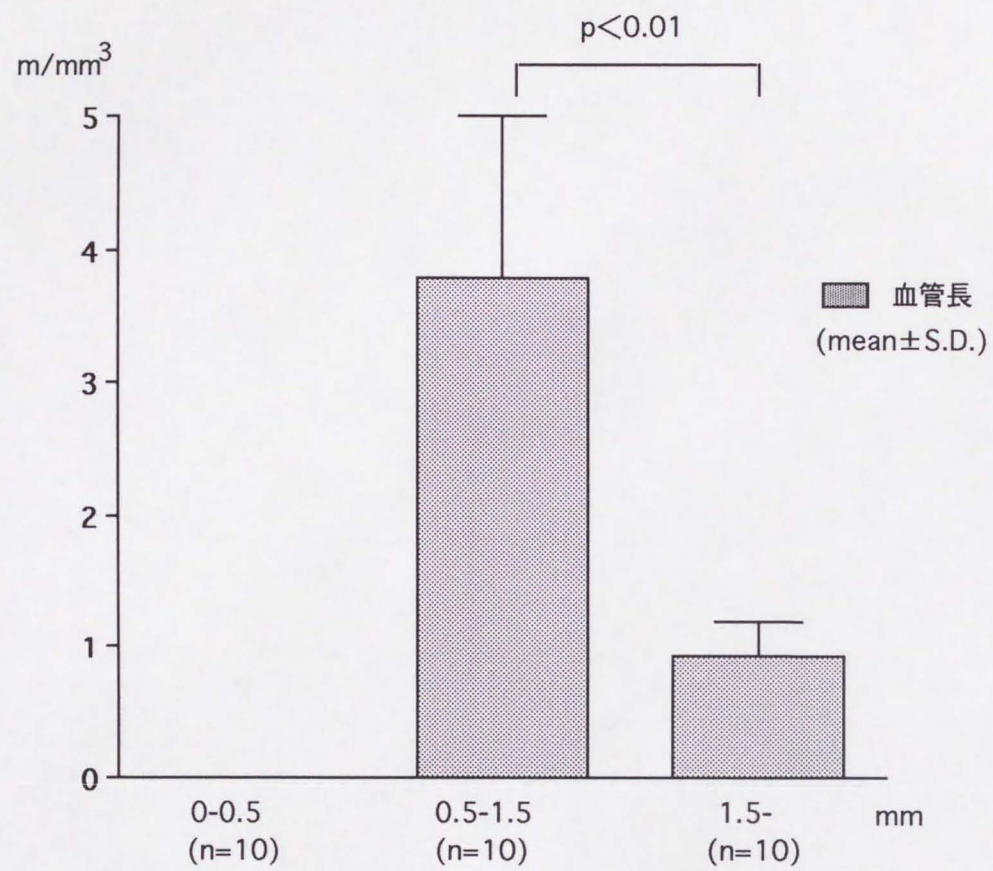


図14. 腎癌肝転移モデルにおける腫瘍sizeによる血管長の比較

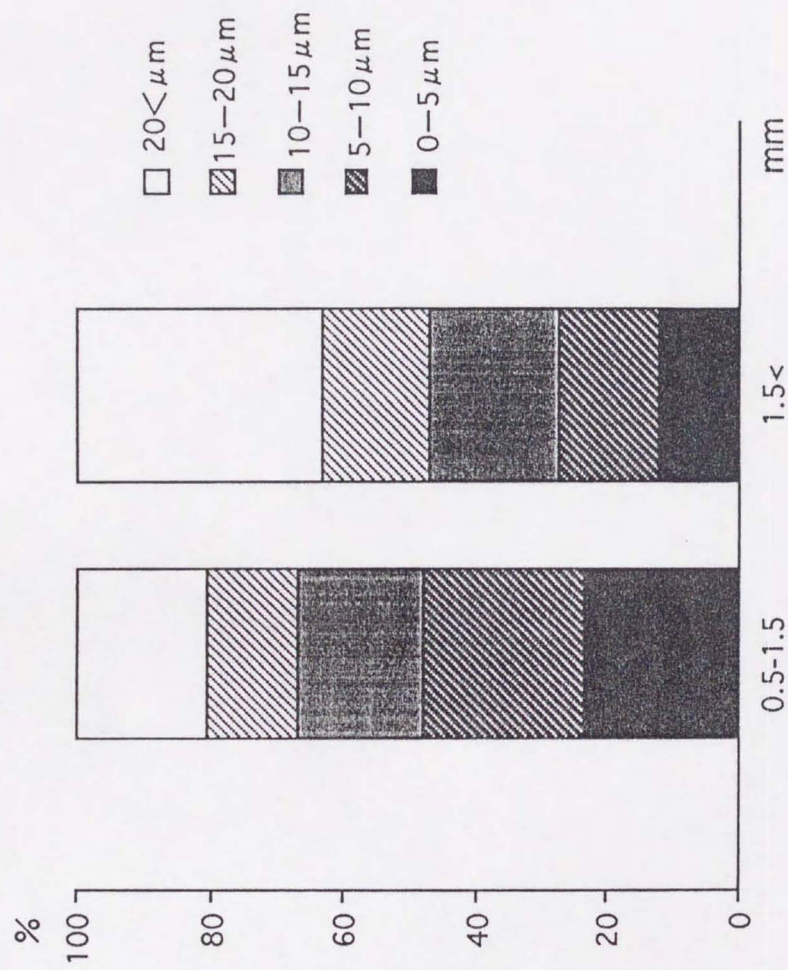
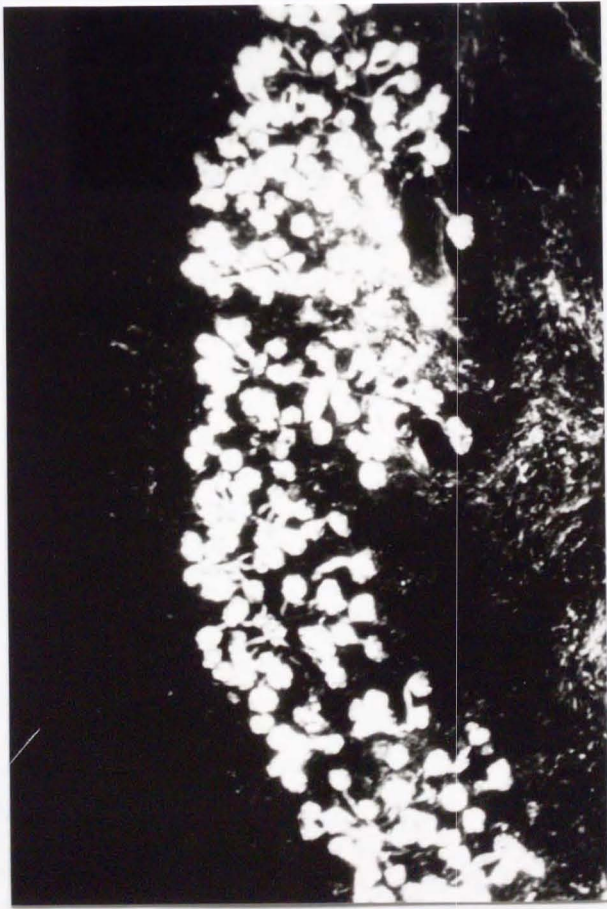


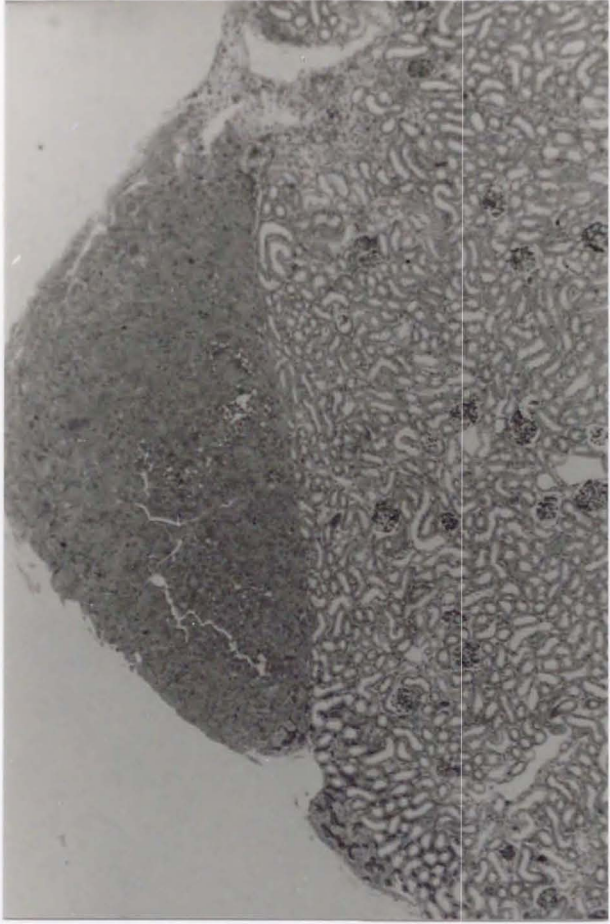
図15. 腎癌肝転移モデルにおける腫瘍血管径の比率

129. 1.

A

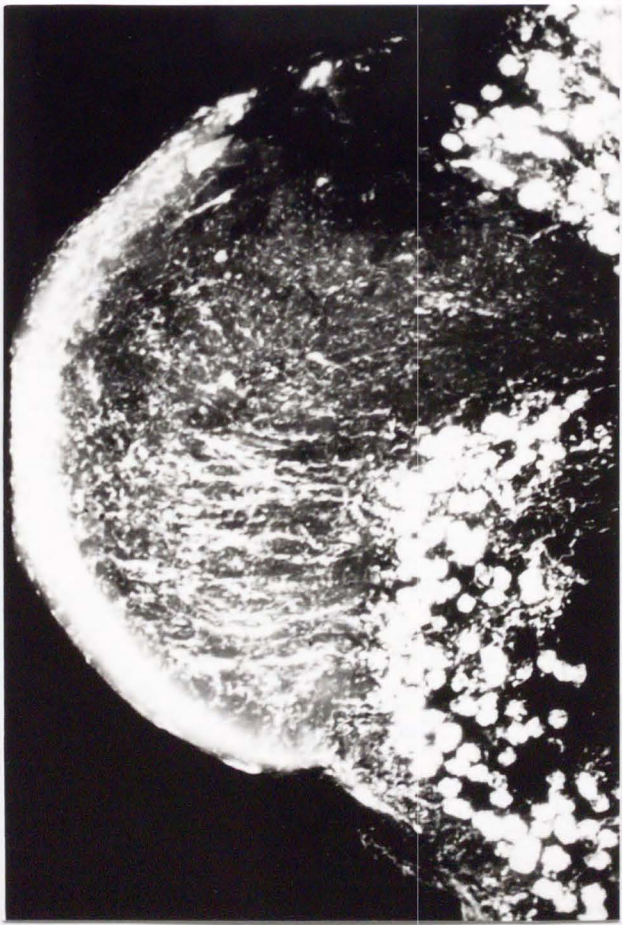


B

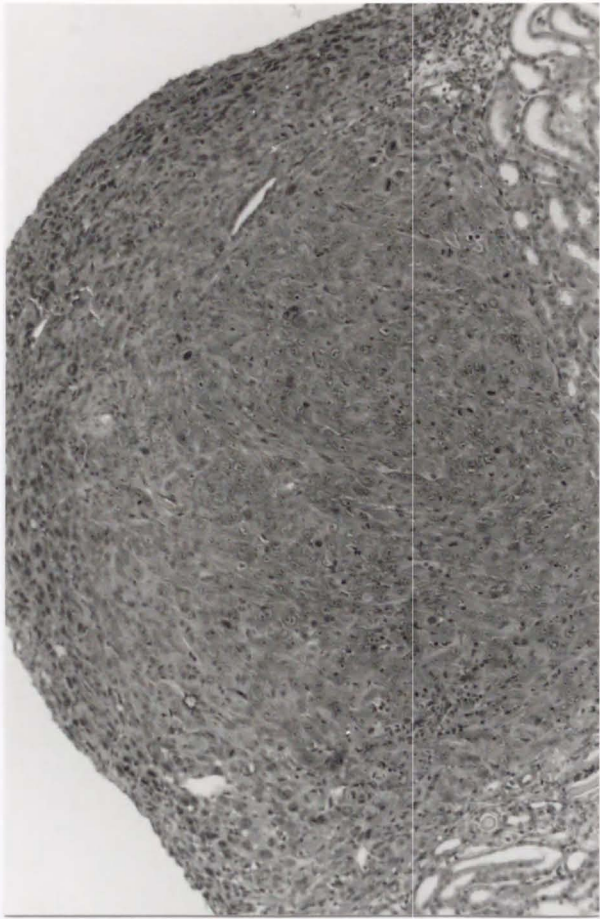


182.

A

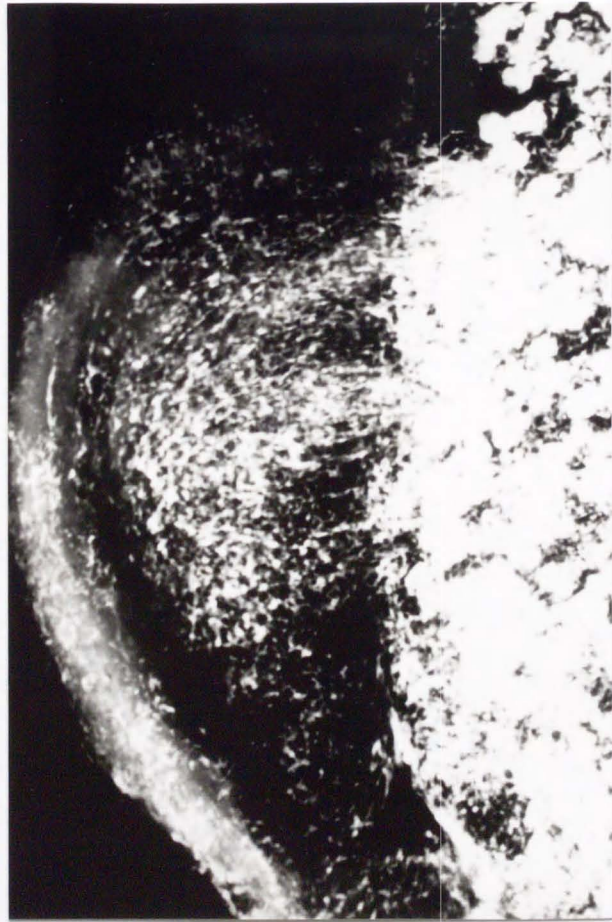


B

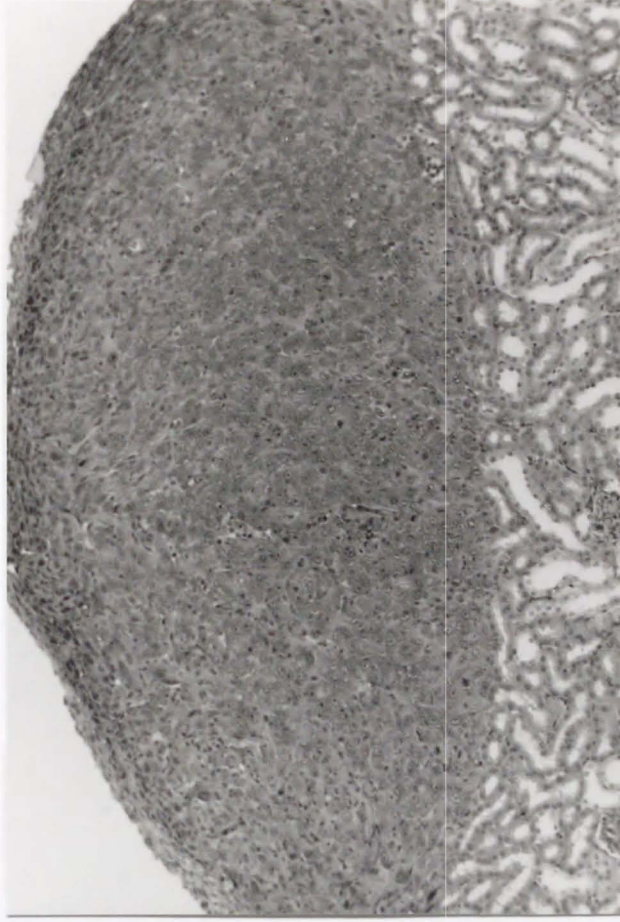


123.

A



B

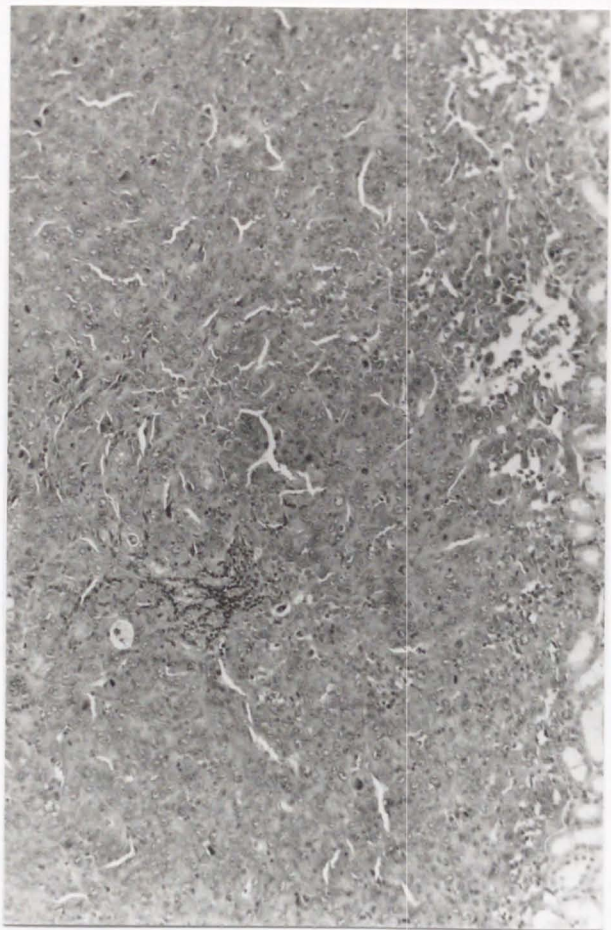


124

A



B



105

A

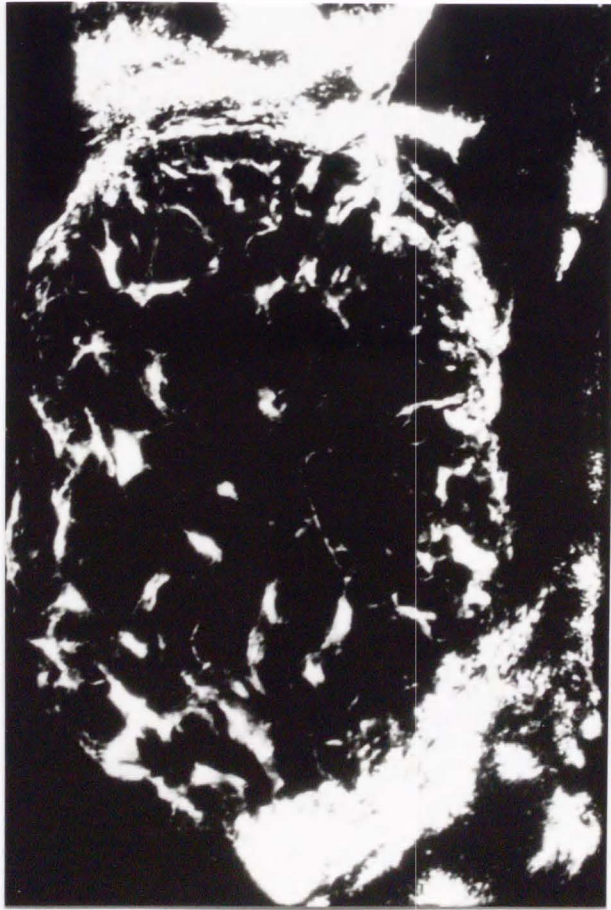


B



12. 6

A



B

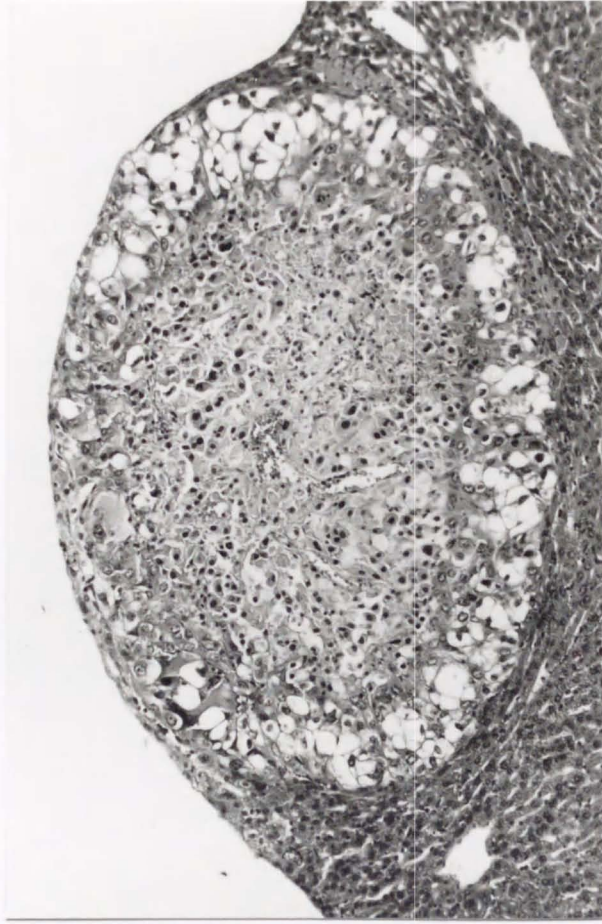
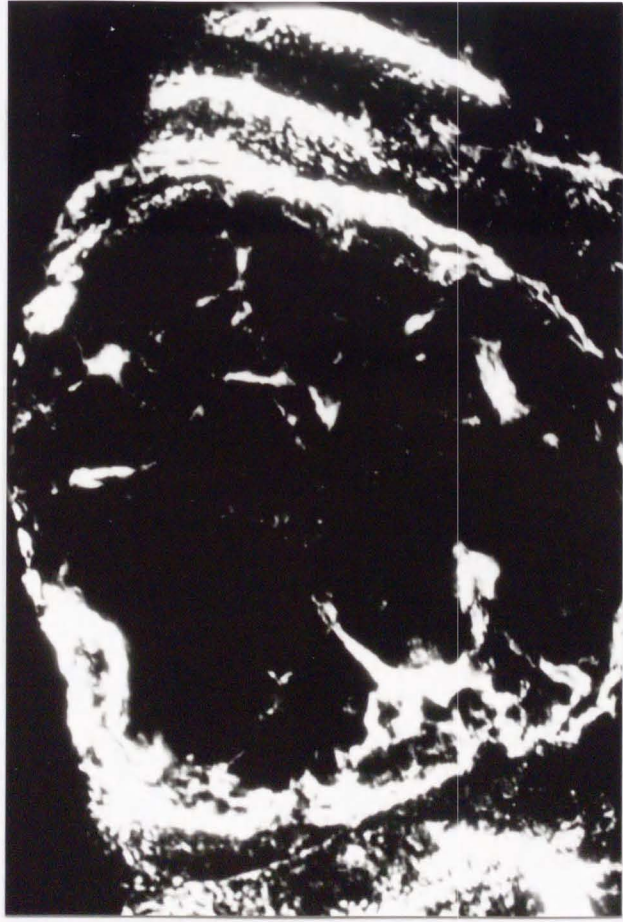


图 7.

A



B



inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

