

## 血管新生に伴って現れる蛇行する細動脈

昆 和 典\* , 川 中 洋 平\*\* , 藤 原 隆\*\*\*

### Appearance of serpentine arteriole in angiogenesis

Kazunori KON, Youhei KAWANAKA, Takashi FUJIWARA

#### Abstract

It is well known that serpentine vessels are rich in tumor, therefore this morphological characteristic of blood vessel is valid for detecting tumor using technology of imaging. The serpentine vessels are believed to appear in vascular network in newly formed vessels because of immaturity of newly formed vessels. However, there are no experimental evidences to show that the serpentine vessels are newly formed vessels. In this study, we studied a remodeling of vascular network during angiogenesis with focusing on preexisting arterioles, where mouse cornea was used for the observation of angiogenesis. Angiogenesis was induced by inflammatory stimulus or transplantation of sarcoma cells. By transplantation of sarcoma cells, serpentine arteriole became remarkable with a progression of angiogenesis, but no detectable changes of arteriole morphology were detected when angiogenesis was induced by inflammatory stimulus. This discrepancy would result from a difference in the density of newly formed blood vessel and suggested that increased blood flow in arterioles causes the serpentine morphological change.

Key words : angiogenesis, cornea, arteriole, mouse

## 序 文

血管新生は、生理的あるいは種々の疾患の進展に伴って現れる生体反応である<sup>1)</sup>。具体的には創傷治癒、子宮内膜の肥厚などの過程でみられる、いわば生体にとって必須な血管新生と、がん組織に血液を供給するためのあるいは失明の要因となる糖尿病性網膜症に伴う、生体にとって不都合な血管新生もある。そのため、血管新生を調節する手段を得ることを目的とした研究が活発に行われている。一方、血管新生によって生じる新生血管の構造的特徴を利用し、臨床応用への試みがなされてきている。新生血管の構造的な特徴としては、血管の拡張、血管内皮細胞間隙が開くことによる血管透過性の亢進、蛇行する血管網という3点が上げられる<sup>2)</sup>。血管透過性の亢進については、透過性亢進を利用したがん患部への抗がん剤の有効な運搬方法がすでに臨床応用の段階にきている。そして、蛇行する血管網についても、最近、スプリング8を利用したイメージング技術により、蛇行血管の検出で、がん組織を見いだすことが有効であるとの報告がされている<sup>3)</sup>。今後、このイメージング技術が実用化される

ためにも、新生血管網にみられる血管の蛇行についての知見を得ることが必要である。しかし、これまで経時的に血管新生の過程を詳細に検討する方法がなかったため、血管の蛇行は新生血管が未成熟のためおこる現象と考えられてきた。今回マウスの角膜を観察対象として、盛んな血管新生がみられるがん細胞移植と穏やかな血管新生がおこる炎症刺激という異なる状況の血管新生の過程を経時的に観察した。その結果、既存細動脈の蛇行が盛んな血管新生に伴って現れることを認めたので報告する。

## 方 法

### 1. 血管新生の惹起

#### (1) がん細胞移植による血管新生の惹起

sarcoma細胞(CCRF S-180Ⅱ, 約10<sup>4</sup>)を氷冷したコラーゲン溶液(新田ゼラチン, セルマトリックス Type I-A, 3.0mg/ml)に浮遊させた後, 37℃で30分浮置しゲル化させた。そのゲル化コラーゲンをマウス角膜(ICR)に移植した。マウス角膜にはメスであらかじめポケットを形成しておき, このなかにコラーゲンを埋め込ん

\*愛媛県立医療技術大学保健科学部臨床検査学科

\*\*西条中央病院・臨床検査部

\*\*\*愛媛大学総合科学研究支援センター

だ (図1)。

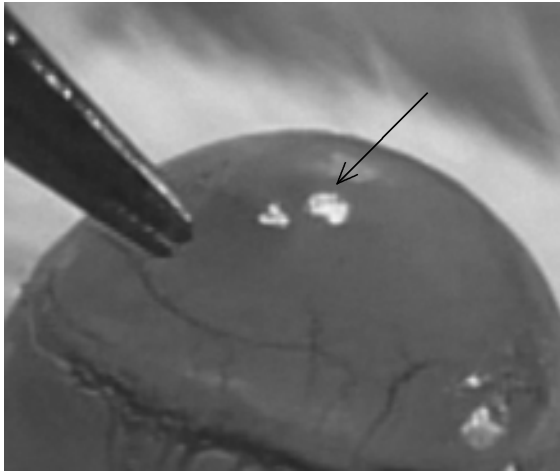


図1. マウス角膜へのがん細胞の移植  
矢印で示した箇所のがん細胞を移植した。

## (2) 炎症刺激による血管新生の惹起

血管新生を惹起する炎症刺激には硝酸銀を使用した。マウス (ICR) をネンプタルの腹腔内投与により麻酔 (50mg/Kg) を施した。次に飽和硝酸銀溶液に先端を平坦にしたガラス棒 (直径0.8mm) を浸し、乾燥させた後、マウスの角膜中央に8秒間接触させた。

## 2. 血管新生の観察

マウスにネンプタルによる麻酔を施した後、マウス眼球を実体顕微鏡 (MZ-16, Laica, Heerbrugge, Switzerland) 下に固定し、ライトガイドで角膜を照射しながら血管新生の過程を観察した。顕微鏡画像はDVD録画装置に記録した。角膜は無血管組織であるが、辺縁には角膜辺縁血管網として血管が走行している。この辺縁血管網に血液を供給している血管は、毛様体動脈であり、この血管は辺縁血管網に進入する前に二方向に分かれ、角膜辺縁動脈として走行している (図2)。毛様体動脈、角膜辺縁動脈のいずれも組織学的には平滑筋の筋層はうすく、細動脈の特徴を備えている。今回はこの細動脈の血管の変化に注目した。

## 結 果

### 1. 血管新生の過程

通常、角膜辺縁血管網の毛細血管の血流は実体顕微鏡下ではほとんど確認ができないが、血管新生刺激を与えると、毛細血管網の拡張による血流量の増加と、血管透過性の亢進による血液の漏出、いわゆる炎症反応がおこった。その後、漏出した血液の道筋をなぞるようにして新しい血管が形成された (図3)。これらの変化は、新しい血管が形成されるために必須の現象で、がん細胞の移植でも同様な過程による血管新生がおこった。

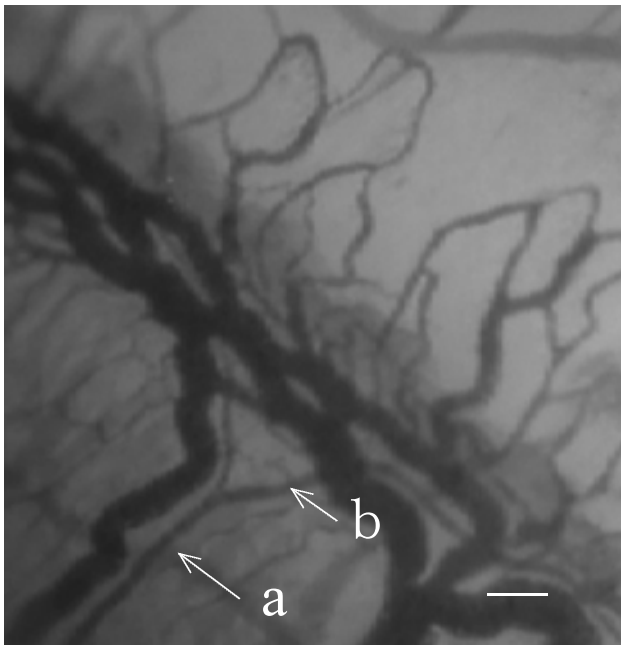


図2. 観察対象としたマウス角膜辺縁血管網

写真中の矢印 a は毛様体動脈で、矢印 b は角膜辺縁動脈である。右図は、角膜辺縁血管網のみを抽出したイラストレーション (写真には、虹彩の血管も背景に写っている)。写真中のバーは100 $\mu$ m。

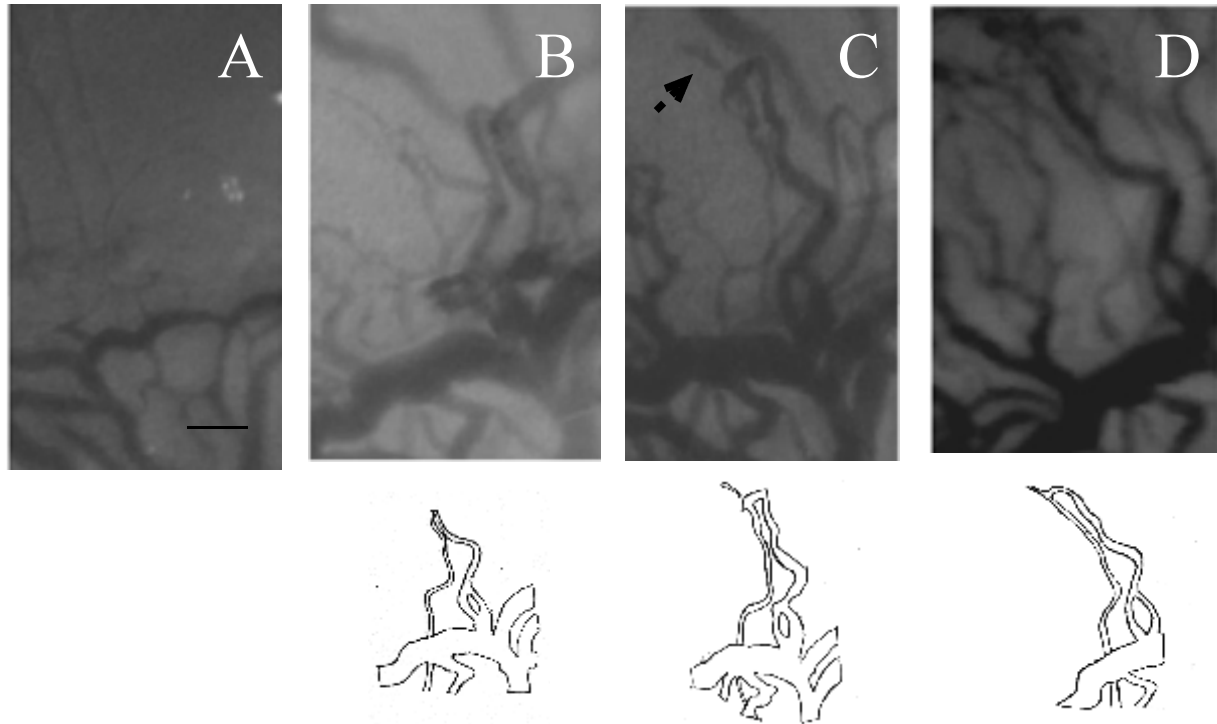


図3. 血管新生の経時的変化

血管新生は角膜を硝酸銀で焼灼し、引き起こした。A：刺激前，B：刺激後2日，C：刺激後3日，D：刺激後4.5日“漏出した血液の道筋”は写真Cの中の矢印で示した。B～Dの写真の下にあるイラストレーションは、注目している角膜の血管。写真中のバーは100 $\mu$ m。

## 2. がん細胞移植による血管網の変化

直線的に走行していた毛様体動脈，角膜辺縁動脈には，がん細胞移植後，血管新生が顕著になると，血管の拡張とともに蛇行がみられるようになった（図4）。この蛇行ががん細胞移植による血管新生に特徴的に現れる現象かどうかを検討するために，炎症刺激とがん細胞移植による血管新生で，その伸長の程度が同程度の場合で血管の走行を比較した。その結果を図5に示した。この図に示されているように，炎症刺激の血管新生では細動脈の蛇行はみられなかった。そして，両者の顕著な相違として，がん細胞移植による新生血管網の密集度は，炎症刺激によるそれに比べはるかに高いことがあげられる。

## 考 察

新生血管の特徴として挙げられる血管の蛇行は，新生血管が未成熟のためと考えられているが，実験的には明らかにされていない。これまでの観察では，血管新生が起こっている組織の血管を既存の血管と新生血管に区別することができず，正しい知見を得ることが出来なかったことが原因である。既存血管と新生血管を区別するためには，血管新生の過程を経時的に観察することが必要であり，そのための組織としては観察が簡単な角膜が最適である。しかし，角膜の観察は実体顕微鏡下での観察

になるため分解能に限界があり，特定の血管の変化を追跡することは困難であった。このような状況のなかで，我々はマウス角膜を用いて詳細に血管新生の過程を追跡できる方法を最近確立した<sup>4)</sup>。マウスの眼球は小さいため，角膜の血管新生を観察する場合でも，観察が難しく一般には用いられていない。しかし角膜辺縁血管網の構築はシンプルで，また個体間の相違が小さいため，特定の血管（今回の研究では，毛様体動脈，角膜辺縁動脈）の経時的な観察に適している（図3）。さらに，動物種を問わず血管新生が起こっている角膜部とその後方に位置する強膜との間が組織学的に隔離されていることも利点である。強膜に炎症刺激を与えても角膜の領域にある血管からの血管新生は見られないことから，少なくとも血管新生に関係する因子の交流はないと考えられる。今回観察対象とした既存の細動脈（毛様体動脈ならびに角膜辺縁動脈）は強膜に位置するため，本研究の目的である血管の蛇行は，血管新生に関係する因子の影響を受けていない現象と考えられる。これらの方法上の利点を活かし，がん細胞移植による血管新生で，既存の細動脈に蛇行がおこることを認めた（図4）。しかし，炎症刺激で血管新生を引き起こした時には蛇行は見られなかった（図5）。がん細胞移植による血管新生と炎症刺激による血管新生で形成される新生血管網の大きな相違は，新生血管網の密度の違いである。がん細胞移植による血管新生での新

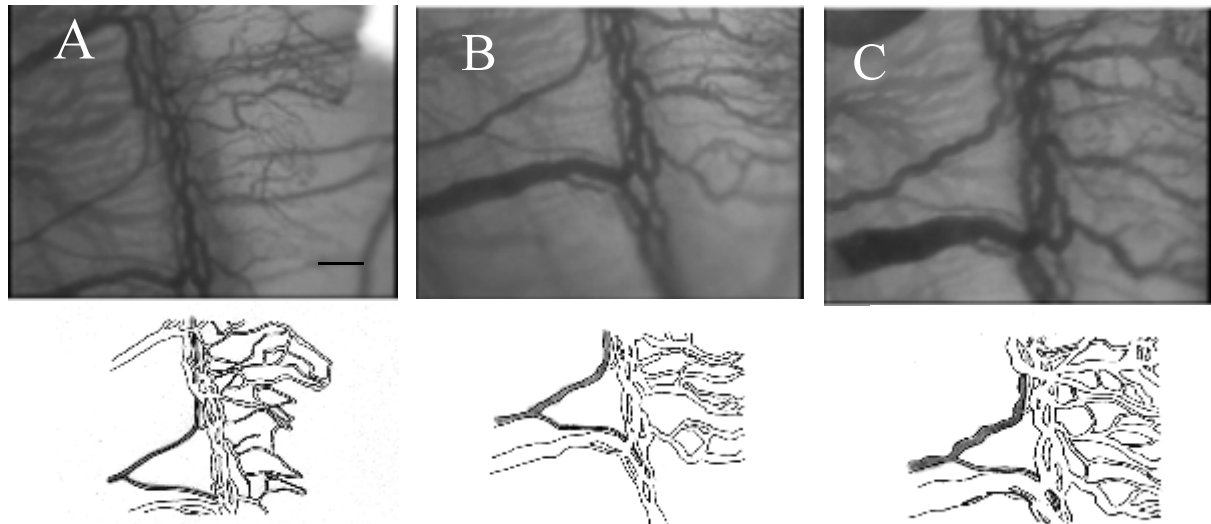


図4. がん細胞移植による血管新生と既存血管の蛇行

A: がん細胞移植後3日, B: 移植後9日, C: 移植後15日 写真の下にあるイラストレーションは角膜辺縁血管網の血管を抽出した図で、塗りつぶした血管が毛様体動脈とそれから枝分かれした角膜辺縁動脈である。写真中のバーは100 $\mu$ m。

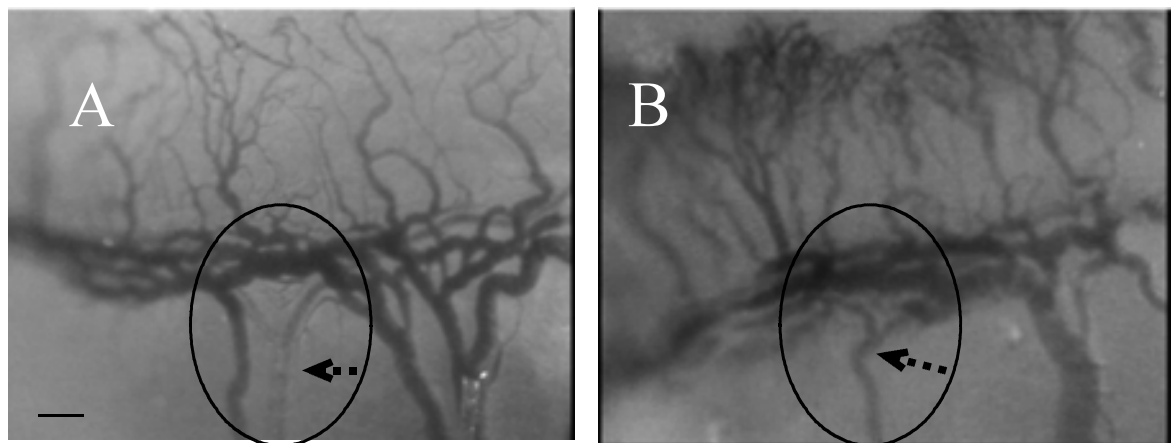


図5. 炎症刺激とがん細胞移植による血管新生と血管の蛇行の比較

A: 炎症刺激(硝酸銀での焼灼)から5日後。B: がん細胞移植から12日後。写真中のサークル内に注目している, 毛様体動脈(矢印)と角膜辺縁動脈が示されている。写真Bの毛様体動脈は蛇行している。写真中のバーは100 $\mu$ m。

生血管網はカリフラワー状で, そこを流れる血流量も多くなる。すなわち, そこに至る細動脈の血流量の増加を意味している。血流量の増加による血管網の再構築はよく研究されており, 細動脈の平滑筋層の肥厚, 毛細血管の細動脈化などがあげられる<sup>5)</sup>が, それらの変化を引き起こす原因物質として platelet derived growth factor (PDGF) が現在考えられている。PDGFは平滑筋細胞(あるいはその前駆細胞)の血管内皮細胞への遊走を引き起こす機能を持ち, 血流量の増加で血管内皮細胞からのPDGF分泌が増加することが知られている<sup>6)</sup>。このような事から今回の蛇行も細動脈の平滑筋層の変化が起因していると考えられる。

本研究で, これまで新生血管の特徴と考えられていた,

血管の蛇行が既存血管でもあらわれることが明らかになった。そして, 血管新生が活発に起こっているがん組織で血管の蛇行があらわれることが示唆されことから, 血管の蛇行を検出することが, がん検出の一方法としての発展が期待できる。

## 文 献

1. Folkman, J., Shing, Y. (1992) : Angiogenesis. *J Biol Chem*, 267, 10931-10933.
2. 藤原隆, 昆和典, 樺木勝巳, 松田正司 (2005) : 血管内皮細胞構造の多様性. *血液フロンティア*, 15, 25-35.

3. Tokiya,R.,Umetani,K.,Imajo,Y.(2004) : Analysis of microvasculature of transplanted rat tumors using synchrotron radiation microangiography system. *SPRING-8 Research Frontiers* 2004,37-38.
4. Kon,K.,Fujii,S.,Kosaka,H.,Fujiwara,T.(2003) : Nitric oxide synthase inhibition by N-nitro-arginine methyl ester retards vascular sprouting in angiogenesis. *Microvasc Res*,65, 2-8.
5. Djonov,V.,Baum,O.,Burri,P.H.(2003) : Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. *Cell Tissue Res*,314, 107-117.
6. Deindl,E., Schaper,W.(2005) : The art of angiogenesis. *Cell Biochem Biophys*,43, 1-15.
7. Nakazawa,T., Yasuhara,H., Shitematsu,K., Shigematsu,H.(2000) : Smooth muscle cell migration induced by shear-loaded platelet and endothelial cells. Enhanced platelet-derived growth factor production by shear-loaded platelets. *Int Angiol*,19, 142-149.

---

## 要 旨

血管の蛇行はがん組織に特徴的に見られる現象であり、イメージング技術によるがんの検出への応用が期待される。蛇行する血管は、新生血管が未成熟なため、新生血管の血管網に現れると考えられているが、実験的根拠はない。本研究では、マウス角膜辺縁の血管網を実体顕微鏡下で観察し、血管新生に伴う既存血管の形態的变化を検討した。血管新生は、炎症刺激あるいはがん細胞の移植により引き起こした。がん細胞を移植した時、血管新生の進行とともに角膜辺縁血管網へ進入する細動脈の蛇行が認められたが、炎症刺激では認められなかった。がん細胞移植による血管新生は盛んであり、新生血管網への血流が増加するために細動脈の蛇行が引き起こされると考えられた。

