

特集

ニードル型 CCD プローブ法による生体微小循環への応用

— 腎微小循環を中心に —

山本 徳則*, 久保田 英司**, 松田 洋人**, 林 晃一**
田中 啓幹*, 仲本 博***, 小笠原 康夫***, 梶谷 文彦***

はじめに

腎循環の特徴は、優れた制御性とともにも機能的多様性を持つことである。その理由は、(1)濾過に関係の深い糸球体循環及びその前後に位置する輸入・輸血管、(2)水及び電解質・アミノ酸その他の物質の再吸収と分泌に関係する皮質部尿管周囲血管網、(3)尿濃縮に関係が深い髓質循環、(4)尿管系フィードバック系が存在することである。これらは、腎微小循環との関連が深く、これらの病態を解析するためにも腎微小血管を直接可視化するニーズは極めて高い。

これまで行われてきた腎微小循環の観察は大きく分けて(1)摘出灌流腎または単離糸球体輸出入血管標本を用いる方法と、(2)生体顕微鏡を用いた直接 in vivo 観察法に分けることができる。後者の in vivo 観察法では、目的とする微小血管が観察可能な特殊な動物モデル(ネフロン表在化ラットモデル)か、微小循環が可能なように標本に特殊な工夫を加えたモデル(水腎病モデル)が用いられてきた。いずれも優れた微小循環可視化モデルといえるが、生理的な状態とはいえない点に難点があった。この問題点を解決するため、我々は最近、心内膜側微小血管観察のためにニードル型 CCD 生体顕微鏡を開発し、心微小循環の動特性や血流を可視化することに成功した¹⁻⁴⁾。ここでは、主に我々がニードル型 CCD プローブ法を

用いて腎微小循環を観察した結果について述べることにする。

高速度 CCD 生体顕微鏡システム

1. システムの構成

我々は腎微小循環の解析の目的に応じてプロトタイプ、ハイビジョンタイプ、高速度タイプを使い分けているが、ここでは最近開発した高速度システムの構成を図に示す(図1)⁵⁾。1画面を5 msec で撮像することが可能な CCD 素子を内蔵するシステムで、ニードルの周囲に光源用ライトガイドを有する。ニードル型レンズは、relay lens (組み合わせレンズ)より構成されており、サイズはレンズの周囲に配置した照明光ガイド用光ファイバを含めて直径6.5 mm、長さ170 mmである。照明光は光源(160 W メタルハライドランプ、シグマプレジジョン)からガイド用光ファイバを通して観測視野周囲の組織へ照射され、組織内で散乱した光によって観測部位を照射する。relay lens を通して結ばれた観測画像は、約12万画素の単板 CCD によってビデオ信号に変換され、同時に本体内部のデジタルメモリに1024画面(約5秒間分)蓄積される。このデジタルメモリの画像を再生する際に、再生画像は毎秒30フレームの標準 NTSC 信号として出力され、標準 VTR に録画できる。再生観測画像は28インチ(Hi-Vision タイプ)モニタ上に430倍に拡大した画像として表示され、ビデオカセットに記録できる。VTR に記録された画像を再生し、ビデオA/D変換装置(DFM, 計測技術研究所)でデジタル化して、解析システム(SPARC station 20, Sunmicro Co.)

*川崎医科大学泌尿器科

**慶應義塾大学医学部内科

***川崎医科大学医用工学科

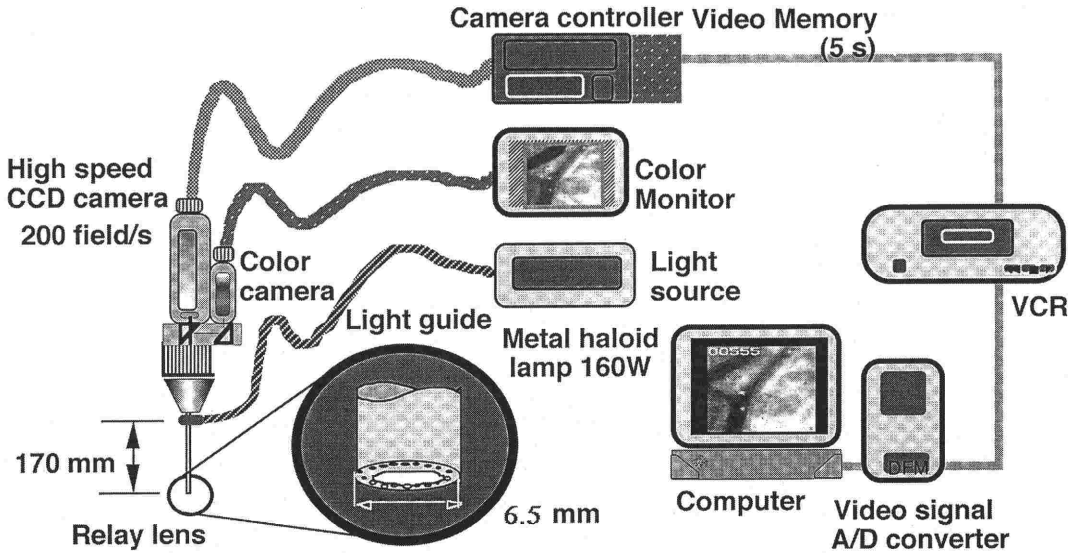


図1 高速度 CCD 生体顕微鏡システムの原理図。レンズ周辺の18本のファイバーで腎組織を照射しその散乱光で微小血管のイメージングを行う。

により画像データファイルとして蓄積する。解析システムでは、画像データの濃度調節およびノイズ除去などの画像処理を行い、光マーカー（ニオブ（Nb）マイクロスフェア）による微小血管内の血流の可視化、血流速度の計測を行う。

これまで開発してきたシステムの特徴は、高品位、および高速度の CCD 生体顕微鏡システムを有機的に活用し、微小循環の形態、動特性を観測解析する点にある。また、光マーカーの導入により、これまで困難であった *in vivo* 腎微小循環血流計測を実現したことにも特色がある。なお、血管径変化の観察にはプロトタイプ of 生体顕微鏡を用いている。

2. アクセス法⁶⁾

腎内微小血管を観察するためのニードルプローブのアクセス法であるが、ニードル先端は腎被膜を経由し、対象微小血管上に接触させた。プローブ先端は、対象となる血管に接近させた後、手前に数10 μm 引くことでニードル挿入の影響を可及的に少なくした条件下で、血管イメージが安定し、かつ明瞭に得られる部位に固定した。ついで focus ring を回してピントを合わせ血管像をより鮮明にしたが、血管イメージのコントラストをつけるために赤血球の補色となるグリーンフィルタ

を光源とプローブ間に装着した。なお実験中に視野内に出血がみられた場合にはその部位での観察を中止した。

微小循環の確認

ニードル型顕微鏡の時間分解能空間分解能が向上するにあたり、糸球体毛細血管レベルの血管内に流動する赤血球を観察することによりダイナミカルに血流動態がみられる微小循環の確認を行っている。図2（左）血流が流れ糸球体濾過圧が十分保たれている状態の糸球体（輸入・輸出細動脈、糸球体毛細血管、糸球体ボーマン嚢）のイメージングである。それに対して図2（右）は血流停止による輸入細動脈虚脱が生じて糸球体濾過圧低下に伴うボウマン嚢の萎縮が認められる場合のイメージングである。微小循環動態より両者が明らかに異なっていることが判る。

薬物に対する腎微小血管の応答

薬物に対する応答を *in vivo* で解析できることが本法の最も優れた特色であるが、ここではアンギオテンシン II 投与後の輸入・輸出血管径の反応を示す。

図2はアンギオテンシン II（2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 動注）

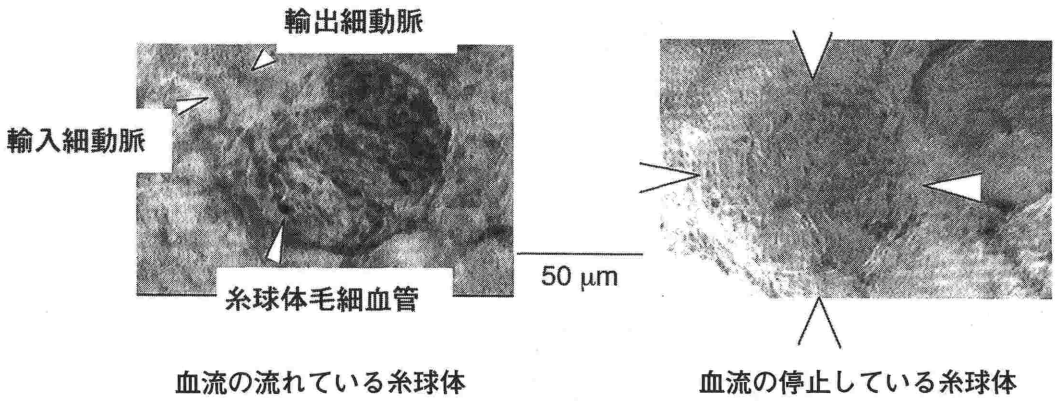


図2 血流が流れている状態と血流が停止した状態での糸球体（輸入・輸出細動脈，糸球体毛細血管）のイメージ。

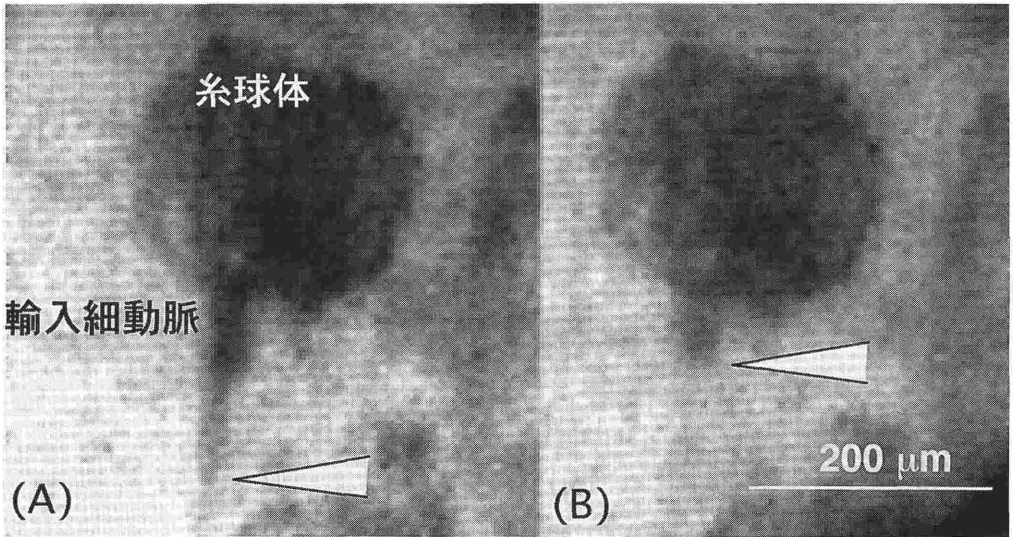


図3 アンギオテンシンⅡ動脈内負荷に対する輸入細動脈の経時的な血管収縮の伝搬イメージ（図左および図右矢印）。

後の輸入細動脈反応の一例である。この例では Vascular segment は一様に収縮するのではなく、proximal から distal に収縮波が伝搬していく様子が窺われる⁶⁾。このような収縮波伝搬はしばしば観察されたが、血管分枝近傍には、細胞内 Ca^{+} トランジェントのイニシエータの存在なども報告されており⁸⁾、細胞-細胞間のコミュニケーションもよく知られている。また、収縮時に拍動が増幅される場合もあり、このような収縮パターンには血管による個体差が認められた。また尿管糸

球体フィードバック時の収縮は輸入細動脈の末端部に生じるといわれており、このような血管反応の部位別相違 (Vascular segmentation) にも注意する必要がある。

図4 はアンギオテンシンⅡ静脈内投与に対する輸入・輸出細動脈の dose-response カーブである。輸出動脈の収縮の程度が輸入動脈に比してより強い収縮傾向を示している。この際、血圧・心拍数はアンギオテンシンⅡ投与前でそれぞれ 112 ± 5 mmHg, 91 ± 6 bpm であり、アンギオテンシンⅡ投

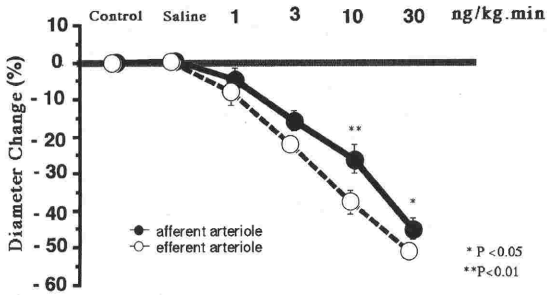


図4 アンギオテンシンⅡ静脈内負荷に対する輸入および輸出細動脈 dose-response カーブ。

与後は、10 ng および30 ng 負荷の時に血圧上昇傾向を示したが30 ngのみ有意であった(140±7 mmHg)。なお、心拍数には有意な変化がみられなかった⁷⁾。Ito⁹⁾らはウサギより単離した系でアンギオテンシンⅡの効果を計測し、輸出細動脈の方が輸入に比してより強い収縮反応があることを報告しており、我々の *in vivo* での結果も彼等の *ex vivo* の観察結果をサポートした。Ito¹⁰⁾や Yoshida¹¹⁾らは、輸入細動脈の収縮性の相対的な減弱には、NO やプロスタグランジン (PG) 系が関与していることを報告しているが、我々も *in*

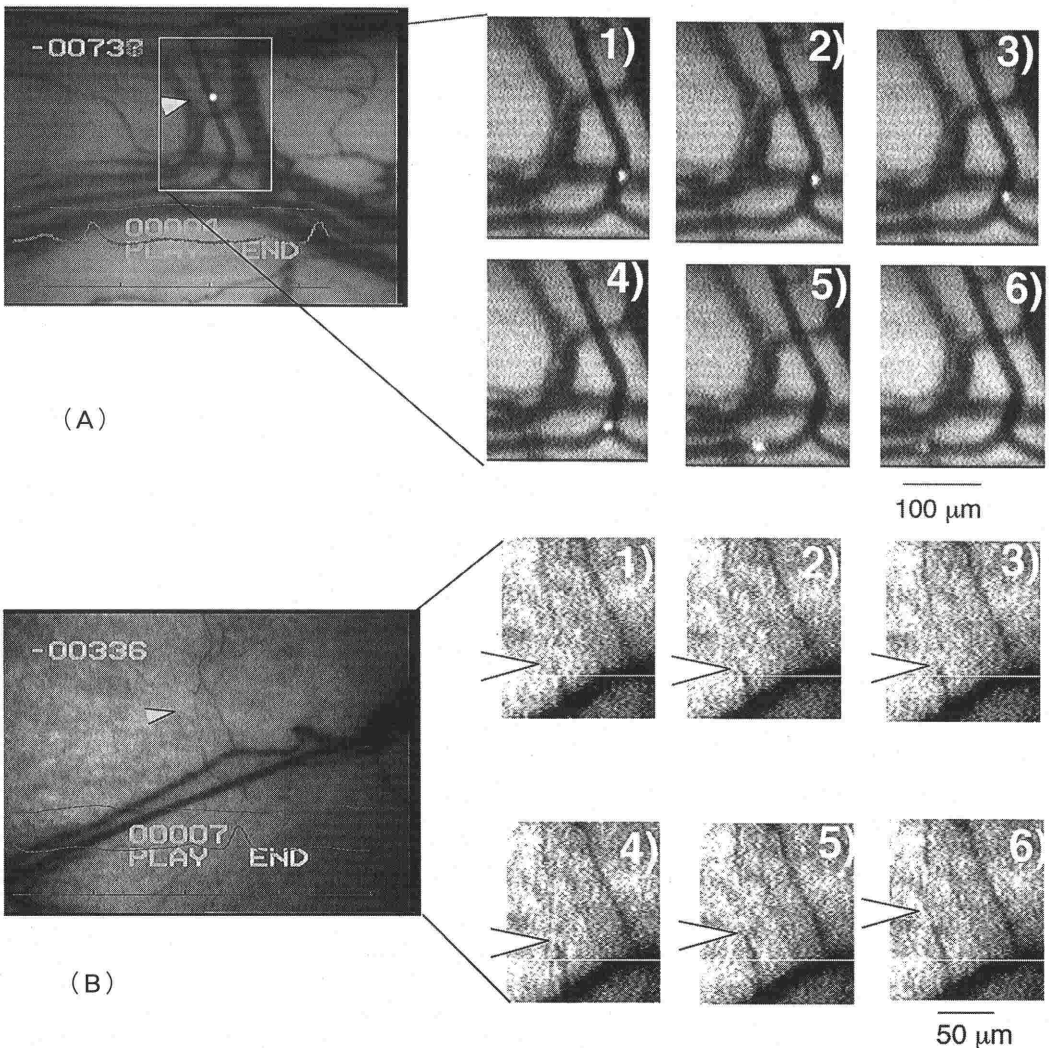


図5 皮膜細動脈を流れる Nb マイクロスフェア (粒径: 15 μm) の連続イメージ (A) および皮膜毛細血管内を流れるプラズマポケットの連続イメージ (B)。単位時間 (5 msec) におけるマイクロスフェアやプラズマポケット (血流光マーカ) の移動距離より血流速度を求める。

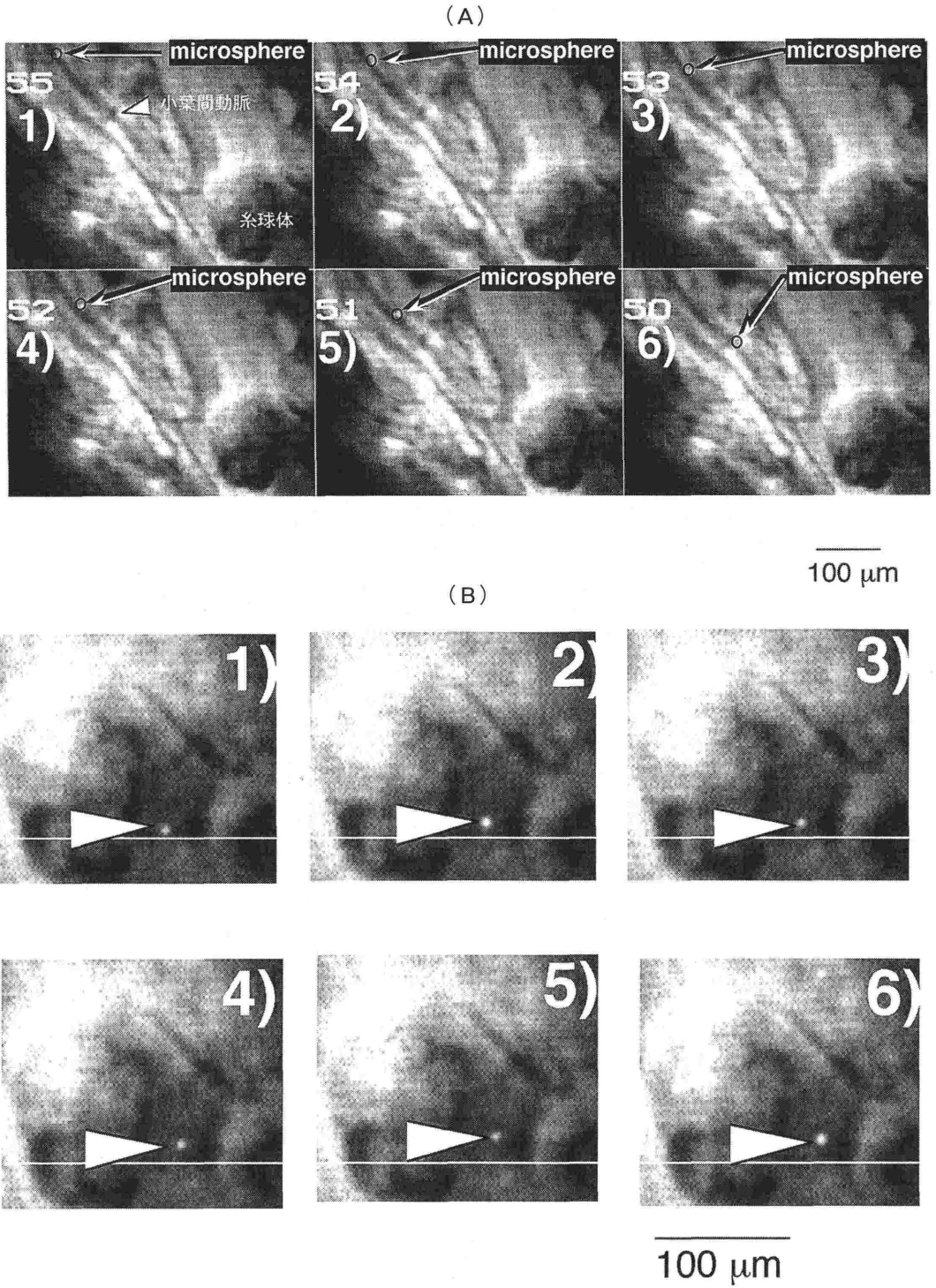


図6 小葉間動脈を流れるNb マイクロスフェア (粒径: $15\mu\text{m}$) の連続イメージ (A) および糸球体ループ内を流れるNb マイクロスフェア (粒径: $4\mu\text{m}$) の連続イメージ (B). 単位時間 (5 msec) におけるマイクロスフェア (血流光マーカ) の移動距離より血流速度を求める.

vivo系でアンジオテンシンIIとNOやPGの量的相互関係の解析を進めている。

腎微小血管血流速度

in vivoにおける腎微小血管内血流観察は、方法論的に先に述べた2つの方法に限られていた。すなわち、その一つは表在化ネフロンラット(munich-wistar ratsやwistar-Furth rats)を用いて蛍光ラテックス粒子を動脈内に注入してその粒子の通過時間で血流速度を見るものであり、他の一つは水腎症ラットの二分腎の血流速度を計測するものである。上記のモデルより生理的狀態に近い条件下血流計測を行うため、我々は血流速度マーカーとしてニオブ(Nb)マイクロスフェア⁵⁾と従来から微小循環の分野で用いられているプラズマポケット法より血流速度の計測を行った¹⁴⁾。ここで、Nb微粒粒子は $0.2\mu\text{m}$ のサイズであり、これを内部に含有するポリスチレンマイクロスフェア(比重:1.32)を作成することにより任意の大きさの血流速度マーカーを得ることができる。このマイクロスフェアは通常光でよく光るので、その奇跡を追跡することは比較的容易である。一方プラズマポケット法は細動脈または毛細血管の赤血球間隙の透視部分をマーカーとして利用するが、より自然な状態で測定できる利点を持つ。

まず始めにアクセスの容易な腎表面の皮膜細動脈・毛細血管の速度測定を行った。図5は血流マーカーとしてマイクロスフェアとプラズマポケットを用いた皮膜細動脈および毛細血管におけるイメージである。この移動距離を計測することにより皮膜細動脈は約 3.8mm/sec および毛細血管は約 1.0mm/sec と計算された。次に、腎実質内の微小血管にアプローチした。図6は、小葉間動脈(A図)および糸球体内(B図)におけるイメージである。小葉間動脈内血流速度は約 2.9mm/sec 、糸球体内毛細血管血流速度は約 0.8mm/sec と計算された^{7,13)}。Steinhausenが、ラットの表在性ネフロンでホットフィルム法で計測した糸球体ループ血流速度は $780\pm 270\mu\text{m/sec}$ であり、今回の我々の計測とオーダ的に一致した値である。ただし、腎内層、外層では血流分布不均一性があることが知られているので、今後部位別に分けた血流速度計測を進める必要がある。

ま と め

腎微小循環を、より生理的な条件下でin vivo可視化した結果について述べた。特に、我々のニードル型ポータブルCCD生体顕微鏡はプロトタイプ(25万画素, 30フレーム/秒)、ハイビジョンタイプ(200万画素)、ハイスピードタイプ(200フレーム/秒)最近開発したペンシル型(モノクロ40万画素)の4タイプがあり、それを目的に合わせて使い分けることにより腎微小循環の解析をより精度よく行うことができる。また、アクセス法を工夫することにより臨床応用も可能であり、これまで糸球体から近位尿細管へ向かうインジゴカルミンの動特性の解析などに応用している¹⁵⁾。さらに、新たに開発したペンシル型は先端径が 1mm で700倍(20インチモニター上)の高分解能を有しており実験小動物(ラット, マウス)の糸球体毛細血管レベルへの応用が可能で、以前よりも広範囲な応用が考えられるシステムである。我々は現在糖尿病性腎症モデルを対象に実験を行っている。今後、本法によって生体腎微小循環に関して新たな病態生理学的知見が得られるものと期待している。

文 献

- 1) Yada T, Hiramatsu O, Kajiya F, et al : In vivo observation of subendocardial microvessels of the beating porcine heart using a needle-probe video-microscope with a CCD camera. *Circ Res* 72 : 939-946, 1993
- 2) Yada T, Hiramatsu O, Kajiya F, et al : Effects of nitroglycerin on diameter and pulsation-amplitude of subendocardial arterioles in beating porcine heart. *Am J Physiol* 36, H1719-H1725, 1994
- 3) Hiramatsu O, Goto M, Kajiya F, et al : Diameters of subendocardial arterioles and venules during prolonged diastoles in canine left ventricles. *Circ Res* 75 : 393-399, 1994
- 4) Yada T, Hiramatsu O, Kajiya F, et al : Direct in vivo observation of subendocardial arteriolar response during reactive hyperemia. *Circ Res* 77 : 622-631, 1995
- 5) 梶谷文彦, 矢田豊隆, 後藤真己ら : 心筋微小循環とエネルギーの効率的供給に関する研究。心臓血管(循環器)系の医用工学的計測制御に関する基礎研究。(科技庁生活地域流動研究) 1-11, 1996
- 6) 山本徳則, 田中啓幹, 梶谷文彦 : 腎微小循環の観察。Annual Review 腎臓 1995. 57-62, 1995
- 7) 梶谷文彦, 山本徳則 : in vivo 腎内微小循環の可視化。Annual Review 腎臓 1997. 57-62, 1997
- 8) Yamamoto T, Tanaka H, Kajiya F, et al : In-vivo hyperdynamic imaging in dog kidney microcirculation by High speed needle probe CCD microscope. *Journal of the*

- American Society of Nephrology Vol. 6 No 3 (suppl.): p 140, 1996
- 9) Goligorsky M, Colflesh D, Gordienko D, et al ; Branching points of renal resistance arteries are enriched in L-type calcium channels and initiate vasoconstriction. *Am J Physiol* 268(Renal Fluid Electrolyte Physiol.) 37. F251-F257, 1995
 - 10) Ito S, Arima S, Ren YL, et al ; Endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide modulates angiotensin II action in the isolated microperfused rabbit afferent but not efferent arteriole. *J Clin Invest* 91 : 2012-2019, 1993
 - 11) Arima S, Ren Y, Juncos LA, et al ; Glomerular prostaglandins modulate vascular reactivity of the downstream efferent arterioles. *Kidney Inter* 45 : 650-658, 1994
 - 12) Yoshida H, Tamaki T, Aki Y, et al ; Effects of angiotensin II on isolated rabbit afferent arterioles. *Jpn J Pharmacol* 66 : 457-464, 1994
 - 13) Yamamoto T, Tanaka H, Kajiya F, et al ; In-vivo hyperdynamic imaging in dog kidney microcirculation by high speed needle probe CCD microscope. *Am Soc Nephrol* Vol. 8 (suppl.): 356A, 1996
 - 14) Yamamoto T, Tanaka H, Kajiya F, et al ; In-vivo high speed imaging of canine renal microcirculatory blood flow by needle-probe CCD microscope with blood flow marker. *Circulation* Vol. 96 No 8 (suppl.): I-340, 1997
 - 15) Yamamoto T, Tanaka H, Kajiya F, et al ; Vivo visualization of human intra-renal microcirculation with dye observed by a novel needle-type CCD videomicroscope. *J Am Soc Nephrol* Vol. 6 No 3 (suppl.): p688, 1996