特集 —血管透過の解析—

免疫グロブリンを tracer とした血管
透過性の形態学的観察*渡 辺 慶 一** 渡 辺 昌** 相 羽 元 彦***
大 石 隆 夫*** 影 山 圭 三***

Key words: permeability test, immunoglobulin as a tracer

血管透過性の観察には、通常、エヴァンス・ブルーとか、ポンタミン・スカイブルーというような生体染色色素類や、成分として、carbon 粒子を含む墨汁、インクなどが tracer として用いられている。さらに、最近では、電子顕微鏡観察を目的として、Horseradish peroxidase (HrP)¹⁾²⁾、Ferritin³⁾ あるいは、他動物から得られる cytochrome c, myoglobin⁴⁾⁵⁾ など使用されているが、これらの物質は、透過性の観察を受ける生体にとっては、いずれも外来性の異物であり、大なり小なり、血管壁や、血液成分に変化をもたらすことが考えられる。さらに、血液中の物質と、分子量も違えば、また、生物、化学的性状も異なる故、血液血漿成分とは異った血管透過を示す可能性もある。また、この点では異常がないにしても、血管を通過し、間質へ出た後のこれら tracers の動態は、浸出する自己血漿成分のそれとは、かなり異ったものであることが予想される。すなわち、異物に対しては、マクロファージ (Mφ)、白血球のような phagocytes は、積極的な貪食作用を示すであろうし、貪食後の二次的な変化 (例えば、lysosomal enzymes の細胞内外への放出など) による血管を含め、周囲組織への種々の程度の

影響のあることも予期される。これらの危惧を除き、もっとも自然な形で血管透過性をとらえ、透過後の浸出物の動態を正確にとらえるには、血漿中の成分の何かを marker として観察するのが、理にかなっているといえよう。そこで、著者らは、血清中の immunoglobulin をさらに、最近では、albumin を tracer として、血管透過性のみならず、浸出物の貯留から来る組織の水腫の状態を観察する方法を考案した。

I. 材料と方法

実験動物としては、いずれの場合も 200~250 g の Sprague-Dawley 系雄ラットを用い、これらの片肺のみに、1,000 r, 2,000 r あるいは、3,000 r の X 線照射を加えた。この照射により、初期から照射肺にのみ水腫が起るが、3,000 r の場合には、肺胞上皮の変性、壊死と、肺胞隔壁の水腫が殊に強く、またこれが長期間 (8 週以上) 持続し、6~8 週後には、それと見合う場所にびまん性の線維化を認めた。2,000 r 以下の場合には、水腫が起っても、それ程強くなく、また、2 週以上持続するものも少く、線維化は殆ど見られなかった。また、照射されなか

* Morphological observations on vascular permeability using immunoglobulin as a tracer.

** 東海大学医学部病理, Keiichi Watanabe and Akira Watanabe: Department of Pathology, School of Medicine, Tokai University, Sagamihara, Japan.

*** 慶応大学医学部病理, Motohiko Aiba, Takao Oishi and Keizo Kageyama: Department of Pathology, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan.

表 1 Preparation of rat serum albumin fraction

った左肺には、水腫も線維化も認められなかった。照射後、1, 3日, 1, 2, 4, 6, 8週 of 各時点で動物を屠殺し、右肺（照射肺）を取り出し、血管透過性、水腫の状態を次の3つの物質を marker として、形態学的に観察した：

I. Tracer として HrP を用いる。II. 血清中の immunoglobulin, および。III. Albumin. なお、いずれの場合も、左肺（非照射側）を対照観察に供した。

1. Tracer として、外来性酵素蛋白の HrP を用いる実験

精製 HrP としては、Sigma 社 Type VI を用い、10 mg/ml の割合で生食水に溶解し、これを照射後各時点にある動物の尾静脈より注入し30, 60, 120分、および24時間後に、動物を屠殺し、照射右肺と、対照として非照射左肺における tracer HrP の局在を、光学顕微鏡、および電子顕微鏡レベルにおける酵素細胞化学 (Graham-Karnovsky 法⁶⁾) で、観察した。

2. Immunoglobulin を tracer とした観察

Immunoglobulin を形態学的に観察できる marker とするため、動物を HrP で免疫し、血清中に、充分高い anti-HrP 抗体価が得られる

表 2 Preparation of anti-rat serum albumin antibody

ようにしておき、この場合、immunoglobulin (Ig) のかなりの部分をしめる anti-HrP 抗体の局在を、文献 7) に詳述されている方法で、光顕的、および電顕的に観察し、Ig の局在とした。なお、HrP による免疫方法については、X線照射時に、充分高い anti-HrP 抗体価が得られ、さらに屠殺時まで、約3週ごとに booster shot を繰り返すことにより、それが持続するような配慮を加えた。

3. Albumin を tracer とした観察

肺組織中での albumin (Alb) の局在を観察するために、Sprague-Dawley 系ラットの血清を集め、それから表 1 に記されているような方法で、精製 Alb を取り出し、さらに、それに対する抗体 (anti-Alb) を表 2 に記されているような方法で作製し、HrP ラベル抗体を用いた、酵素抗体法間接法を採用した。これについては、電顕観察はまだ行っていない。

II. 結果および考察

1. Tracer として、外来性酵素蛋白の HrP を用いた実験

未処置のラットの肺、あるいは、鉛板 (2.5

図 1, 2 外来性蛋白の HrP を静注した動物の肺。HrP の局在は、Graham-Karnovsky による peroxidase の酵素組織化学染色法⁶⁾によって黒く示されている。図 1: 放射線照射を受けない対照肺。HrP の血管透過の像は認められない。Mφ (←M) に HrP の貪食像は認められない。静注後、どのような時点でも同じような結果が得られた。(×400) 図 2: 放射線照射後 2 週のラット肺。肺胞に貯留した Mφ (M) に、大量の HrP の存在を認める (Mφ の胞質が黒く染っている)。血管を透過し、肺胞腔に出た HrP が Mφ に貪食されたものと思われる。(×400)

図 3~6 ラット肺の anti-HrP immunoglobulin (Ig) の局在。Anti-HrP の局在は、免疫反応で、そこに付着する抗原 HrP の有する peroxidase 活性の組織化学的染色法⁶⁾によって検出され、黒く見える。図 3: 放射線照射を受けない肺。肺胞隔壁内には、anti-HrP Ig は、ほとんど見当たらない。図 4: 照射後 3 日の肺。肺胞隔壁および胸膜の中皮直下に、明瞭な anti-HrP Ig の局在を認める。(×200) 図 5: 照射後 4 週の肺。肺胞隔壁は、さらに強く anti-HrP で染色されており、浸出した (血管透過) anti-HrP は肺胞腔内にも充満している。しかし、肺胞腔内の Mφ には貪食されず、Mφ は (図 2) の場合と逆に白く抜けて見える (←)。(×400) 図 6: 照射後 6 週の肺。強い anti-HrP Ig の貯留は、扇形を成すもっとも照射の強かった肺野 (←) に見られ、この部位に一致して、肺のびまん性線維化が起ってくる。(×32)

図 7~9 Anti-HrP 局在の電顕観察. Anti-HrP 局在部位は、そこに免疫反応によって付着する peroxidase の酵素細胞化学染色法により、電子密度の高い物質(写真では黒く見える)として示されている。図 7: 照射後 3 日の肺. 変性した毛細管内皮細胞に生じた“bleb”様の空胞内(←)に、anti-HrP Ig が充満している。(×19,000) 図 8: “bleb”様の構造が所謂“air-blood barrier”(矢印)と連続しているのがわかる。(×19,000) 図 9: 入り組んだ内皮の細胞間隙に anti-HrP が充満し、これが“air-blood barrier”に連続している(←)。(×17,000)

図 10, 11 放射線照射肺における albumin の局在を、HrP labeled antibody (ペルオキシダーゼ・ラベル抗体)を用いた酵素抗体間接法で示したものの。Albumin の局在は、やはり、抗体にラベルされた HrP の酵素組織化学染色により黒く見える。(×200) 図 10: 照射後 1 日の肺. 肺胞隔壁は、浸出した albumin で可成り強く黒く染色されている。図 11: 写真 10 で用いた切片と同一組織から得られた切片に行った酵素抗体間接法の対照試験. ラベルした抗体を作用させる前に、ラベルしない抗体で抗原局在部位を十分ブロックしたものである。明らかに染色性は減退している。(×200)

cm厚)でX線照射を遮へいした左肺では、HrP 注入後いずれの時点でも光顕観察では、tracer の HrP の血管透過の像は認められなかった(図 1)。電顕観察では、肺胞血管の中に少量の HrP が、認められるが間質あるいは、肺胞中に浸出し、Mφ など phagocytes に貪食された像は見られない。

照射後短時日(1日~1週)のラットについては、HrP 注入試験は行わなかったが、照射後 2~4 週を経たラットで、肺胞、および肺胞隔壁内に著明な水腫と、泡沫 Mφ (主として肺胞

内) 浸出の見られる肺では、注入された HrP の大部分は、肺胞内の Mφ と、僅かながら隔壁内の Mφ に貪食されており(図 2)。隔壁の間質には、電顕観察でも、HrP の存在は認められない。すなわち、照射肺では、血管透過性が増し、注入された HrP は、血管外に浸出していることは、上記の結果より明らかなが、その殆どは、異物として Mφ に貪食されている。したがって HrP のような、異種蛋白を tracer として用いた場合、血管透過後の浸出物の正確な動態を知り得ない。

2. Ig を tracer とした観察

照射後、どの時点でも、鉛板で X 線を遮へいた左肺では、anti-HrP 抗体(Ig)の肺胞内および隔壁内の局在は認められなかったが(図 3)。照射肺(右肺)では、照射後 3 日には、図 4 に見られるような、肺胞隔壁は、anti-HrP でかなり強く染っている。これを、電顕で観察すると、anti-HrP は、I 型肺胞上皮と血管内皮の間の狭いスペース(“air-blood barrier”)に、充満している(図 7)。照射後 2 週では、可成り厚くなった隔壁は、anti-HrP で、さらに強く染っている。照射後 4 週以降になると、Ig (anti-HrP) の浸出は、肺胞内にも及び、それを充満する。しかし、実験 I の場合と異り、Mφ には殆ど貪食されず、そこだけが、染色されず淡く見える(図 5)。このような浸出物の貯留(水腫)は、リンパ管のある肋膜および、気管支周囲に、もっとも顕著に見られる。照射後 6 週以上たつと、このような水腫の範囲は、肋膜に向かって少し縮小して行き(図 6)。丁度、それと見合う領域に、びまん性の線維化が生じて来る。

Ig が浸出を始める初期(照射後 3 日)の状態を電顕で観察すると、肺胞血管内皮の胞質内に、しばしば、“bleb”様の構造が見られ、その中に、anti-HrP (Ig) が充満している(図 7)。これらのあるものは、“air-blood barrier”あるいは、拡張した細胞間隙に連続している(図 8, 9)。また、このような内皮の胞質には、pinocytotic vesicles が、非常に数を増している。Hüttner らによれば、HrP のような比較的分子量の小さい(M.W. 40,000)蛋白が、内皮を通過

する時は、主に細胞間隙を通り、Ferritin のような分子量の大きいもの(M.W. 500,000)の通過は、pinocytotic vesicles (PV) を介して行なわれると言う²³⁾。また、Simionescu, Palade らが外来性の myoglobin (M.W. 17,800) を使って行った正常心毛細血管内皮の透過性の観察では、PV と細胞間隙の双方の経路を経て行われるとしている⁵⁾。他にも種々の tracer を使って血管透過性を電顕で観察した報告があるが、傷害を受けていない血管では、本実験で認められたような“bleb”様の構造に tracer が充満していたり、これが細胞間隙や、基底膜側に破れているといったような現象は、観察されていない。ここでわれわれが、行っている観察では、外来性の物質を tracer として用いず、その動物個体の血漿中の Ig を tracer として使っている故、tracer による内皮の傷害は考えられない。したがって、X 線照射による血管透過の促進は、このような現象を介して引き起されるものと思われる。Tappel らの主張にも見られるように、X 線照射による free radical の生起と、これに続いて、脂酸、脂質の(hydro) peroxidation が、起ることは、容易に想像されるところであり、これが生体膜の生成に異常をもたらし、その結果 pinocytotic vesicles による物質の transport に支障を来し、これらの癒合により“bleb”の発生が促されるものと解釈される。

3. Albumin を tracer として行った観察

X 線照射 1 日で早くも図 10 に見られる如く、強い albumin の浸出が認められる。図 11 は、写真 10 と同じ実験条件の肺組織片にほどこした酵素抗体法の対照試験(anti-albumin-家免血清 [RGG]-を作用させた後、HrP をラベルした anti-RGG を作用させる前に、HrP をラベルしていない anti-RGG で blocking を行ったもの)の結果で、染色性は全然認められず、したがって、図 11 に見られる染色性は、浸出した albumin の存在を示すものである。しかし、Ig の場合と異り、照射を受けない左肺でも弱いながら albumin に基く染色性が認められる。電顕による観察に成功していないので、この alb-

umin が、肺胞血管内のものか、間質に浸出したものか断定できない。

種々の異ったタイプの炎症にあって、同じ血漿中の成分でも分子量が異り、また生物活性も異なる Ig と、albumin の透過性に相違があるのかどうか精査するのは、これからの課題である。

文 献

- 1) Karnovsky, M.J.: J. Cell Biol., **35**: 213, 1967.
- 2) Hiittner, I., Boutet, M. and More, R.H.: Lab. Invest., **28**: 672, 1973.
- 3) Bruns, R.R. and Palade, G.E.: J. Cell Biol., **37**: 277, 1968.
- 4) Karnovsky, M.J.: Alfred Benzon Symposium II "Capillary Permeability", Academic Press Inc., New York, p.341, 1970.
- 5) Simionescu, N., Simionescu, M. and Palade, G.E.: J. Cell Biol., **57**: 424, 1973.
- 6) Graham, R.C. and Karnovsky, M.J.: J. Histochem. Cytochem., **14**: 291, 1966.
- 7) 渡辺慶一, 渡辺 昌, 増淵誠夫, 大谷武彦: 細胞, 1974.

<質疑応答>

<質 疑> 鹿児島市立病院・放射線 服部行麿

- (1) 放射線照射の条件についてお教え下さい (X線かγ線でしょうか)。

- (2) 3,000rads 1回片肺照射時のLD₅₀はどの程度か?

<応 答> 東海大・病理 渡辺慶一

- (1) X線 (250 kV アルミ半過層, あと詳しいことは、現在覚えておりません。島津の深部治療用のものです)。
- (2) 片肺のみの照射では、3,000 r でもほとんどがそのまま生存いたしました。

<質 疑> 九大・病理 田中健蔵

- (1) Blood-air barrier には、毛細血管内皮細胞層、基底膜、肺胞上皮細胞層の三者が関係すると考えられるが、放射線を照射した場合に、肺胞上皮層の透過性の変化はどうか。
- (2) 胞壁への immunoglobulin の沈着はどのような経過を経て沈着するのですか。基底膜自身の透過性に変化はありませんか。

<応 答> 東海大・病理 渡辺慶一

- (1) いわゆる I 型肺胞上皮 (membranous pneumocyte) には血管内皮に起ったものと同じような変化 (smooth vesicles-pinocytotic vesicles) の増加、

おそらくこれらの癒合によって生じられると思われる vacuoles の出現、などが見られ、これらの中には、やはり免疫グロブリンが含まれている像が観察された。変化の強いものは、ついには壊死に陥る) が見られました。

- (2) Immunoglobulin の肺胞血管の通過には、2つの経路があります。① Pinocytotic vesicle による vesicular transportation ②内皮細胞間隙の通過。①の場合には、胞質内に "bleb" 様の構造ができ、ここに一時大量にためられて、これが B-A barrier の方に破れることもあります。また、②の場合にも、B-A barrier に続く内皮の細胞間隙にも、かなり大きな腔が形成され、ここにも、Imm. Globulin の貯留が見られ、このような腔の巨大化、血管内外への破裂によって、内皮細胞の破壊もたらされるように思えます。

<質 疑> 神戸大・病理 京極方久

血管の透過性を高めた状態で、内皮細胞の Lumen 側と基底膜側に micropinocytosis が沢山あるのにマーカーが peroxydase の場合には、あまりその中に見られず、たまに見られても cell 内で処理されて内皮は通過しません。しかし先生の方法でグロブリンやアルブミンを追うとそれは micropinocytotic vesicle の中に入って細胞の中央を active に transport されることが明らかに見えるのでしょうか。

<応 答> 東海大・病理 渡辺慶一

Immunoglobulin を marker とした場合には、明らかに vesicle による transportation が見られます。pinocytotic vesicle が血管腔側および基底膜側の両面に open している像が見られます。同じような現象が、I 型肺胞上皮にも見られます。

<質 疑> 北里大・薬理 鹿取 信

Radiation していない正常の動物でアルブミンが血管外に出ていますか。

<応 答> 東海大・病理 渡辺慶一

まったくの無処置動物の肺については、まだ、Albumin の透過性の観察は行っておりません。Radiation をあてない方の対照肺では、照射肺よりは、ずっと少いが、ある程度の血管透過があることは、写真で示した通りです。

<追 加> 九大・病理 田中健蔵

血漿成分の透過と炎症との関係のなかで、フィブリノーゲンの透過、沈着、代謝の意義が大きいのと思う。免疫グロブリン、アルブミンとともにフィブリノーゲンとの透過をも検討する必要があると思う。