

胎生期ラットの口腔組織における微小循環

—血管鑄型法と走査電顕による観察—

吉田重光 千葉順一※ 大島勇人
小林茂夫

新潟大学歯学部口腔解剖学第二教室

(主任：小林茂夫教授)

※新潟大学歯学部口腔外科学第二教室

(主任：大橋 靖教授)

(昭和62年11月13日受付)

Microcirculation of oral tissues in the rat fetuses

—Scanning Electron Microscopy of microcorrosion casts—

Shigemitsu YOSHIDA, Jun-ichi CHIBA※, Hayato OHSHIMA
and Shigeo KOBAYASHI

2nd Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Niigata University.

(Chief: Prof. Shigeo KOBAYASHI)

※2nd Department of Oral Surgery, School of Dentistry, Niigata University.

(Chief: Prof. Yasushi OHASHI)

Key words : 血管鑄型法 / 走査電顕 / 胎仔 / 舌 / 歯乳頭

要 旨

胎生期ラットの口腔組織における微小循環を血管鑄型標本で観察するための灌流装置を考案し、例として胎生18.5日から22.0日までのラット胎仔の舌背と上顎第一臼歯歯乳頭の血管網の走査電子顕微鏡写真を示した。

また、これらの血管鑄型標本の作製手順および試料の取り扱いについて述べた。

緒 言

口腔領域における微小循環に関する研究は、はじめは墨汁などの色素を血管内に注入した透明標本および切片標本、あるいは造影剤を注入したX線写真などにより光学顕微鏡的に観察する方法が行われていたが、これらの方法では血管網の立体的な分布状態までは明らかにすることはできな

った。

その後、MMA樹脂やLatex樹脂を血管内に注入した後に軟組織を腐食・除去し、血管の鑄型標本を作製して実体顕微鏡下で観察する方法が試みられたが、光学顕微鏡の低い分解能と浅い焦点深度では、毛細血管レベルでの血管構築を観察することは不可能であった。

ところが近年、Murakami (1971)¹⁾によって低粘度アクリル系合成樹脂を用いた血管鑄型標本作製法と、これに高い分解能と深い焦点深度を合わせ持つ走査電子顕微鏡を組み合わせる方法が開発され、口腔領域においてもこの方法を応用した毛細血管レベルでの微細血管構築の研究が活発になってきた²⁻⁴⁾。

しかしながら、これらの研究対象となっているのは出生後の個体であり、胎生期における微小循環を鑄型法によって観察した報告はなされてい

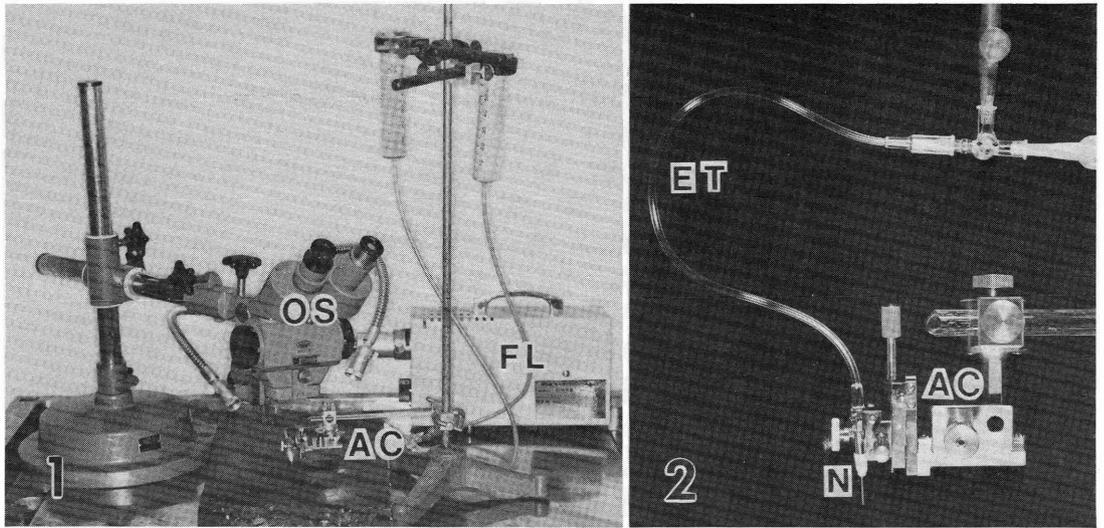


図1, 2: 今回考案した灌流装置 OS: 実体顕微鏡,
FL: 照明装置, AC: 三方向アジャストク
ランプ, ET: 延長チューブ, N: 注射針

い。これは灌流が比較的容易であると思われるイヌ、ネコ、サルなどの大型動物では、胎仔の入手が困難であること、および胎仔の入手が比較的簡単なラット、マウスなどの小型動物では、胎仔が非常に小さいために灌流に熟練を要すること、などの理由によるものと思われる。

そこで今回我々は、実験動物として最も一般的で胎生期の研究にもよく用いられているラットを材料として、舌および臼歯歯乳頭の微小循環について血管鋳型法による観察を行ったので報告する。

材料および方法

Wistar 系雌雄ラット (250-300 g) を用い、1 晩 Mating させた翌朝、膣垢検査により精子の認められた日の午前 0 時を胎生 0 日 0 時として、胎生 18.5 日から 22.0 日までの胎仔を観察の対象とした。

妊娠ラットに軽くエーテル麻酔を施した後、ネプタール腹腔内麻酔 (0.5ml/kg) を行って開腹し、子宮壁を切開して胎盤をつけたままの状態です母体から胎仔を取り出した。

ここで我々は、ラット胎仔のように非常に小さい動物の灌流を行うために、実体顕微鏡(Olympus

X-1)、照明装置 (Nikon ダブルアームファイバー照明装置)、三方向アジャストクランプ(Narishige BC-4, 右手用)、延長チューブ (Nipro エクステンションチューブ, ET-25)、および注射針 (Top, 27G) を組み合わせた灌流装置を考案した(図1, 2)。

母体から取り出した胎仔はコルク板上に虫ピンで固定し、胸郭を開いて心臓を露出させ、実体顕微鏡下に三方向アジャストクランプを調整して、注射針の先端を心尖部から左心室に向かって挿入した。

左心室に注射針が入ったのを確認した後、リンゲル液で血液を十分に洗い流し、10%中性ホルマリンまたは 4%パラフォルムアルデヒド (リン酸緩衝 pH7.4) で灌流固定を行った後、あらかじめ 25% の割合でメタクリレートモノマーを加えて粘度を下げた 5-10cc のメルコックス樹脂⁵⁾ (Mercox CL-2C: 大日本インキ) をゆっくりと (約 10cc/min) 注入し、注入終了の直前に胎仔の頸部を糸で結紮し、室温で 5 時間放置して樹脂を完全に硬化させた。

樹脂の硬化完了後、上顎と舌をカミソリで切り出し、20%水酸化カリウム (40℃で 24-48 時間) で軟組織を腐食・除去し、流水中で十分に水洗し

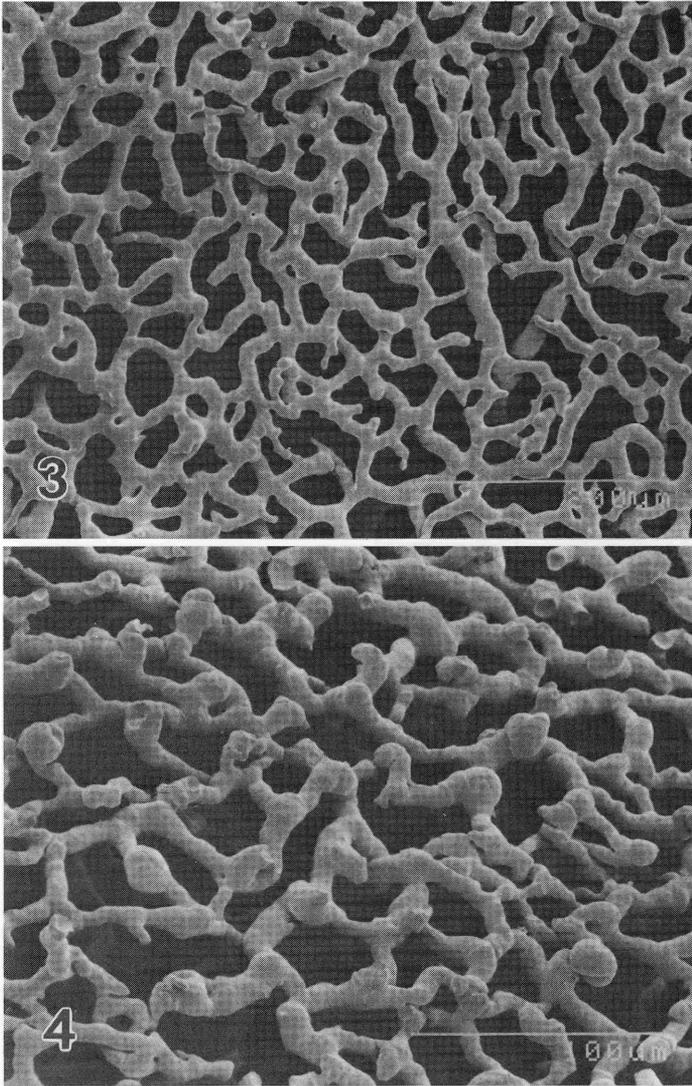


図3, 4: 胎生18.5日と22.0日の舌尖部舌背表面の血管網。18.5日では平坦な網目を呈しているが, 22.0日では血管網の一部がヘアピンループ状に突出している。

た後, 凍結乾燥 (ポラロンE5300) を行った。

乾燥の終了した試料は, 両面接着テープで試料ホルダーに取り付け, 舌はそのまま, また歯乳頭は鋭利なメスや針を用いて実体顕微鏡下での顕微解剖を行って周囲血管を除去した後に, イオンコータ (Eiko IB-3) で金のスパッタコーティングを施して, 走査電子顕微鏡 (Hitachi S-510, 加速電圧5KV) で観察を行った。

結果と考察

図3-10は, 胎生18.5日から22.0日までのラッ

ト胎仔の舌尖部舌背表面, 有郭乳頭部, および上顎第一臼歯歯乳頭の血管網を示したものである。

舌尖部舌背表面において, 胎生18.5日で平坦な網目状を呈していた血管網は, 胎生22.0日, すなわち出生直前になると, 最表面にある毛細血管の一部がヘアピンループ状に突出してくる。このような変化は, この領域に存在する糸状乳頭の発達に対応していると考えられる。また, 有郭乳頭部における血管網は, 胎生18.5日では比較的単純なループ状であるが, 胎生22.0日になるとやや複雑な糸球体状を呈するようになる。

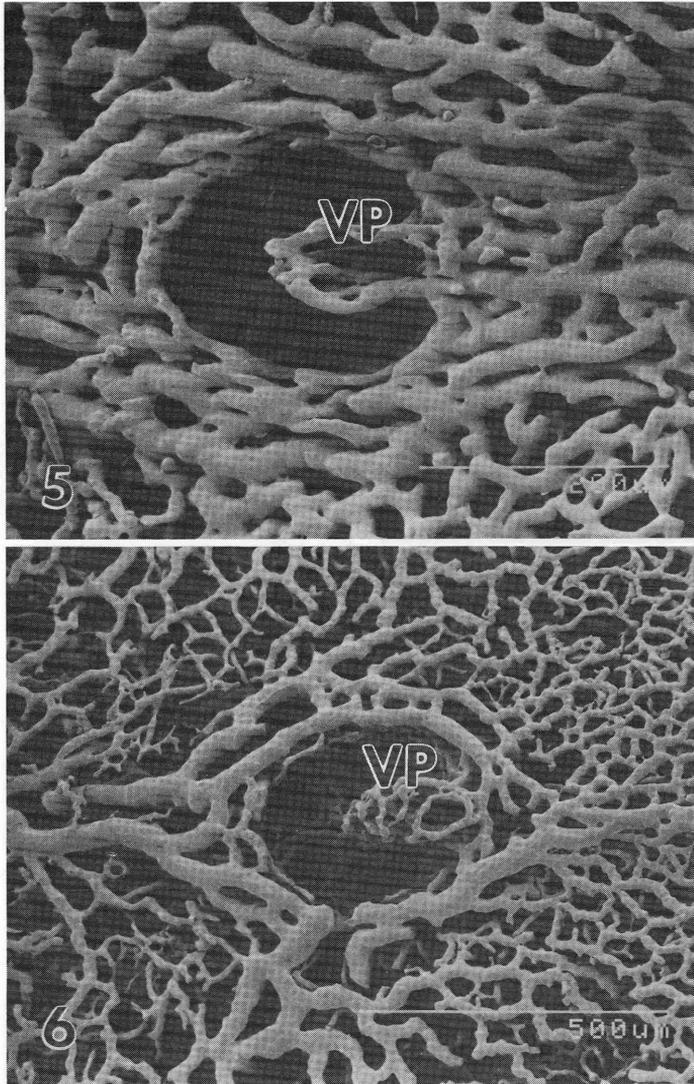


図5, 6: 胎生18.5日と22.0日の有郭乳頭部の血管網 (VP)。18.5日では比較的単純なループ状であるが, 22.0日になるとやや複雑な糸球体状を呈するようになる。

一方, 上顎第一臼歯歯乳頭の血管網では, 胎齢の進行に伴って各咬頭に対応した5つの髄角部が順次形成されてゆく過程が, 明瞭に観察された。

以上のことから, 今回我々が考案した灌流装置を用いて樹脂注入を行うことにより, ラット胎仔のように非常に小さな動物であっても, 微小循環の研究に血管鑄型法を応用することが可能であることが示された。

胎仔の灌流に際して特に注意することは, 注射針を必ず左心室に挿入することと, 心臓を強く掴まないことの2点である。もし誤って右心室に針

を挿入すると, 肺を灌流するだけになってしまうし, また, 心臓をピンセットなどで掴もうとすると心臓が破れてしまうことがある。

また, 胎仔の灌流を行うには, 今回の方法のように開胸して心臓から行う方法と, 臍静脈からおこなう方法の2通りがある。一般に樹脂の注入を行う時には, 目的とする臓器になるべく近い動脈から cannulation した方が樹脂も少量ですみ, しかも完全に注入できると言われている⁵⁾。我々の経験からも, 臍静脈から灌流するよりも心臓から灌流した方が結果は良好であった。

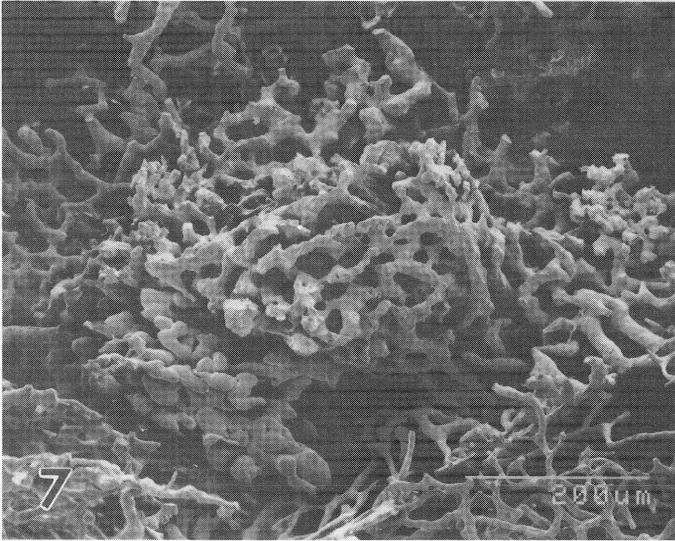


図7：胎生18.5日の歯乳頭血管網。歯乳頭に侵入を開始した比較的大い毛細血管によって、目の粗い毛細血管網の形成が始まっている。

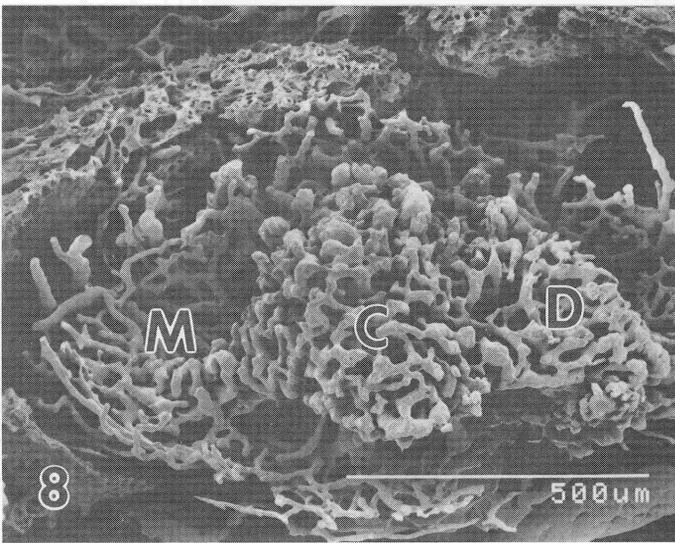


図8：胎生19.0日の歯乳頭血管網。歯乳頭の血管網に、中央咬頭(C)と遠心咬頭(D)に対応した領域の2つが区別されるようになるとともに、近心咬頭(M)に対応する領域にも血管の侵入が認められるようになる。

しかしながら、これよりも胎齢の若い胎仔では心臓からの灌流は困難であることから、臍静脈からの灌流を行わざるをえないと思われる。我々は今回よりも胎齢の若い胎仔に樹脂注入を試みているが、現在の段階では胎生15.5日より以前の個体では、心臓からの灌流は困難である。なお、臍静脈から灌流を行う場合には、胎盤をつけたままで母体から取り出した胎仔をコルク板上に固定し、臍帯の部分だけを小さく切った発砲スチロール上に載せ、心臓からの場合と同様に、実体顕微鏡下に三方向アジャストクランプを調整して注射針の

先端を臍静脈に挿入すればよい。

血管鑄型法では注入した樹脂が硬化した後に目的とする領域を切り出し、軟組織の除去・水洗・乾燥を行ってから、金蒸着を施して走査電子顕微鏡で観察している。一般に血管分布の密な鑄型であれば特に支持をせずに一連の処理を行うが、今回のように血管密度が疎で弱い鑄型の場合には、処理操作の途中で壊れてしまう可能性が高いので、これを防止するための処置を構ずる必要がある。

このために我々は、まず切り出した試料の底面(場合によっては側面も)を即時重合レジン(ユ

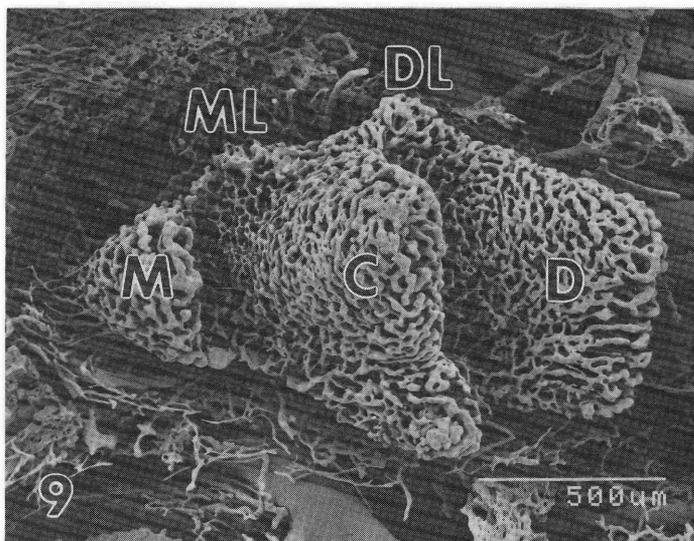


図9：胎生21.0日の歯乳頭血管網。中央咬頭(C), 遠心咬頭(D), および近心咬頭(M)に対応する血管網が明瞭になり, 遠心舌側咬頭(DL)に対応する領域に続いて, 近心舌側咬頭(ML)に対応する領域での血管網の形成が開始されている。

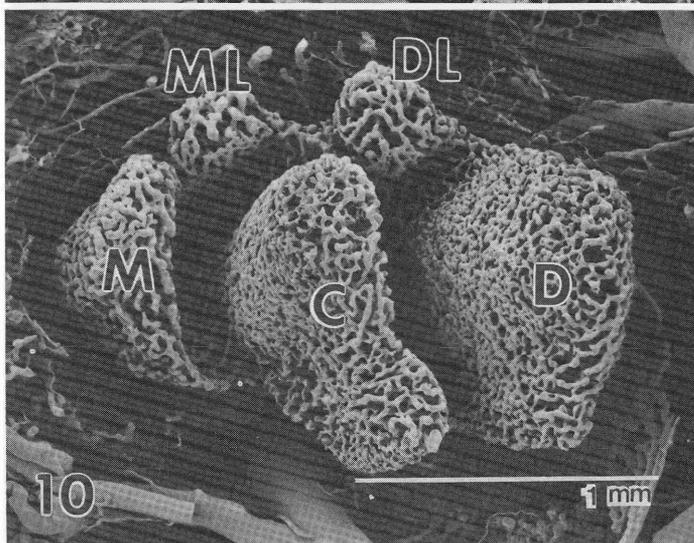


図10：胎生22.0日の歯乳頭血管網。この時期になると, 上顎第一白歯の5つの咬頭に対応した5つの血管網が明瞭に認められるようになる。C：中央咬頭, D：遠心咬頭, M：近心咬頭, DL：遠心舌側咬頭, ML：近心舌側咬頭に対応する血管網

ニファースト、而至歯科工業)で固定し、さらに試料の浮き上がりを防止するために、底面のレジン中に薄いステンレス板を挿入した。また、水洗にはシャーレを二重にして水圧による破壊を防止し、乾燥も試料の変形が最も少ないと思われる凍結乾燥法を用いた。

鋳型標本の観察は、試料表面であればそのまま金蒸着を行って観察すればよいが、目的とする部位が試料内部にあるときは、これを剖出する必要がある。一般には凍結切断、あるいは鋭利なメス、ピンセット、ハサミ、針などを用いた実体顕微

鏡下での顕微解剖が行われている。本研究での歯乳頭血管網の剖出は実体顕微鏡下で行ったが、この他に走査電顕の試料室内でマイクロマニピュレータを操作することによって高倍率・明視野のもとで顕微解剖を行う方法もある⁶⁾。但し、この方法では試料の一部が切断されるため、通常金蒸着法では顕微解剖中に観察が不可能になるので、あらかじめオスミウム蒸気処理によって導電染色^{7,8)}を施しておく必要がある。

結 論

今回我々が考案した灌流装置を用いて、胎生期ラットの口腔組織における微小循環を血管鑄型法で観察した結果、以下の結論を得た。

1) このような灌流装置を用いることによって、ラット胎仔のように非常に小さな動物であっても灌流が容易に行えるため、胎生期における微小循環の研究に血管鑄型法を応用することが可能であることが示された。

2) 樹脂注入を成功させるためには、なるべく心臓からの灌流を行い、必ず左心室にカニューレを挿入する。

3) 胎生期では血管密度が疎で鑄型が弱いため、途中の操作で鑄型を壊さないような方法を構ずる必要がある。

参 考 文 献

- 1) Murakami, T. : Application of scanning electron microscope to the study of the fine distribution of the blood vessels. Arch. histol. jap., **32** : 447-454, 1971.
- 2) 岸 好彰, 高橋和人 : 口腔粘膜における毛細血管ループの立体的観察 I. 舌, II. 舌における動静脈吻合について, III. 歯根膜について, IV. 歯肉内縁上皮, 歯基礎誌, **17** : 178-187, 1975, **18** : 171-181, 1976, **19** : 192-207, 1977, **20** : 406-420, 1978.
- 3) Iwaku, F. and Ozawa, H. : Blood supply of the rat periodontal space during amelogenesis as studied by the injection replica SEM method. Arch. histol. jap., **42** : 81-88, 1979.
- 4) 吉田重光 : ラット臼歯の萌出に伴う血管系の変化. 歯基礎誌, **26** : 94-115, 1984.
- 5) 村上宅郎, 大谷 修, 菊田彰夫, 大塚愛二 : 走査電子顕微鏡による血管鑄型の観察 (方法の総括). 電子顕微鏡, **16** : 11-18, 1981.
- 6) Yoshida, S., Kobayashi, S., Domon, T. and Wakita, M. : Microdissection of methyl methacrylate vascular casts in the scanning electron microscope. J. Electron Microsc., **35** : 276-279, 1986.
- 7) Murakami, T., Unehira, M., Kawakami, H. and Kubotsu, A. : Osmium impregnation of methyl methacrylate vascular casts for scanning electron microscopy. Arch. histol. jap., **36** : 119-124, 1973.
- 8) Kubotsu, A. and Ueda, M. : A new conductive treatment of the specimen for scanning electron microscopy. J. Electron Microsc., **29** : 45-53, 1980.