

著 —

大型実験動物に対する硬組織多色ラベリング法 の改良に関する研究

徳田 信春 古沢 寛 花田 晃治

新潟大学歯学部歯科矯正学教室 (主任: 花田晃治教授)

(昭和58年5月2日受付)

A Study on the Administration Techniques for Polychromatic Labelling
of Mineralizing Tissues Relating to Large Laboratory Animals

Nobuharu TOKUDA Hiroshi FURUSAWA and Kooji HANADA

Department of Orthodontics, School of Dentistry, Niigata University

(Director: Prof. Kooji Hanada)

Key words: polychromatic labelling, hard tissue, undecalcified specimen, remodeling

要 旨

歯の移動や成長発育機序に関する研究を組織学的に行なう際、骨組織の石灰化の様子や内部構造の経時的変化の把握等を目的として硬組織内時刻描記ラベリングを行ない非脱灰標本を用いて蛍光像を観察する方法が行なわれてきた。このような目的に沿うべく従来から種々の薬剤が硬組織ラベリング剤として試用検討され、それらのいくつかについては、投与方法、投与量、石灰化障害等に関する報告がなされているが、犬などの大型実験動物に対して能率的に多色ラベリング法を実施する方法について検討した研究はまだ殆んどみられない。本研究は大型実験動物として最も多く使用されている犬を用い、蛍光色の異なる4種類のラベリング剤(オキシテトラサイクリン、カルセイン、カルセイブルー、アリザリンレッドS)を種々投与量を変え筋肉内注射し、投与方法、投与量、投与の順序等について検討した。その結果すでに溶液として調整されているオキシテトラサイクリンは15 mg/kg、その他は生理食塩水を用い

て、カルセインは2% W/V 溶液を2 mg/kg、カルセイブルーは2% W/V 溶液を20 mg/kg、アリザリンレッドSは3% W/V 溶液を20 mg/kgそれぞれ2日間連続投与したものが至適投与量であり、実験動物には何らの異害作用も及ぼさないことがわかった。また筋肉内注射法にて3色ラベリングを行なう場合には、Tc, Cal, ARの順で、4色の場合には、Tc, CB, Cal, ARの順で投与するのがラベリング線の鑑別上最も効果的であることがわかった。

緒 言

骨や歯などの硬組織を組織学的に研究する場合、試料を脱灰した後薄切しH-E染色を始めとする種々の染色を施して観察する方法が従来から一般的に行なわれてきた。しかし脱灰という操作によって骨や歯のミネラルが消失し、そのために多くの重要な情報も一緒に失われてしまう。それ故このような研究を行なう場合は、脱灰標本とともに非脱灰標本による検索も欠かすことができない。また歯の移動や成長発育機序に関する研究を

行なう際、骨組織の石灰化の程度及び内部構造の経時的変化の把握等を目的として硬組織内時刻描記法が用いられてきた。

さらに同一の非脱灰標本を用いて、コンタクトマイクロラジオグラムや蛍光像あるいは偏光像を観察することにより広い視野での硬組織観察が可能となりその利用が進められている^{1)~6)}。このような目的に沿うべく従来から種々の薬剤が硬組織ラベリング剤として試用検討され、それらのいくつかについては、投与方法、投与量、石灰化障害等に関する報告がなされてきている¹⁾²⁾⁴⁾⁶⁾。特にテトラサイクリン系抗生物質に関しては、硬組織および生体への為害性が少なく操作性も簡便であることから、最も一般的に利用されてきている。

一方、長期にわたる歯の移動や骨、軟骨の成長発育を研究する場合、骨組織は絶えず吸収、形成を繰り返しているためその改造の様子を単一のラベリング剤を用いた多重ラベリング法によって知ろうとしても、それが描記された時期を特定することは著しく困難であり二色、三色あるいはそれ以上の多種類のラベリング剤を用いた多色ラベリング法³⁾⁷⁾による時刻描記が不可欠となるが、犬などの大型実験動物に対して能率的に多色ラベリング法を実施する方法について検討した研究はまだ殆んどみられない。

本研究の目的は、大型実験動物として最も多く使用されている犬に対して投与の容易な筋肉内注射法により蛍光色の異なる4種類（オキシテトラサイクリン、カルセイン、アリザリンレッドS、カルセイブルー）のラベリング剤を種々投与量を変えて与えることにより、ラベリングに必要な最少量を知ることにより、ひいては長期間にわたる骨組織の構造改築の観察に応用可能な多色ラベリング法を確立することにある。

実験材料および実験方法

実験動物として体重6~12kgの健康な雑種成犬5匹を使用し、次にあげる4種類のラベリング剤を用いて多色ラベリングを行った。

(1) オキシテトラサイクリン (Oxytetracycline, 以下 Tc と略, テラマイシン筋注液, 台糖

ファイザー) 蛍光色: 黄色~黄金色

(2) カルセイン (Calcein, 以下 Cal と略, 3, 3'-bis [N, N-di (carboxymethyl) aminomethyl] fluorecein, 半井化学薬品), 生理食塩水で2%溶液を作製。蛍光色: 薄緑色

(3) アリザリンレッドS (Alizarin Red S, 以下 AR と略, 半井化学薬品), 生理食塩水で3%溶液を作製。蛍光色: 鮮紅色

(4) カルセイブルー (Calcein blue, 以下 CB と略, 4(β)-methylumbelliferone, methyleneimino diacetic acid, 半井化学薬品), 生理食塩水で2%溶液を作製。蛍光色: 薄青色

以上4種類のラベリング剤は、励起、蛍光スペクトラムの近接している Tc, Cal, AR の3者については、図1, (1)~(4)に示すようにこの順序

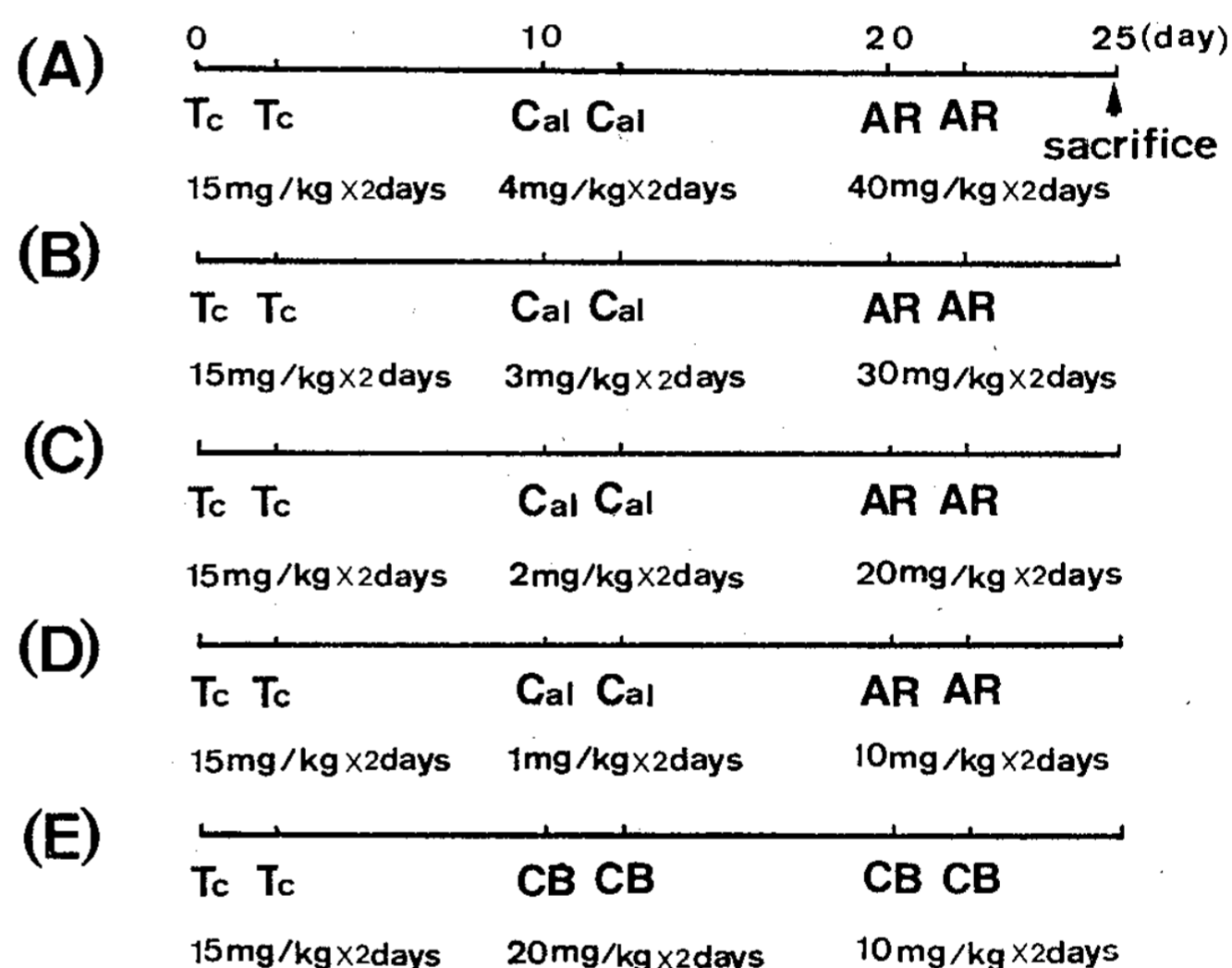


図1 ラベリング効果の観察にあたっての各種ラベリング剤の注射量と注射間隔

で中8日の間隔をおき、大腿部筋肉内に注射して2日間連続投与し、またCBについては比較的スペクトラムの近接しているTcと組合せて図1-(E)のように投与を行なった。投与量は、従来、諸家により至適投与量とされている量 (Tc: 30 mg/kg/day, Cal: 8 mg/kg/day, AR: 80 mg/kg/day, CB: 40 mg/kg/day) を血中濃度の持続をはかる目的で半量ずつ2日間に分けて投与したものを最大量とし、これを基準量としAR, Calは3/4, 1/2, 1/4を, CBは基準量, 1/2量を各々投与した。すべての動物は最終ラベリング後5日

目に注射用塩化スキサメトニウム（サクシンバイアル，山之内製薬）を腹腔内投与して屠殺し，直ちに大腿骨および下顎骨を切り出して軟組織を除去し，エタノールに浸漬し固定を行なった。固定後はエタノール系列にて順次脱脂，脱水しスチレンモノマー置換法によりポリエステル系樹脂に包埋後，それぞれの長軸に直角となる面で薄切した後研磨を行ない $30\sim 40\mu$ の横断切片を作製⁸⁾し，落射蛍光顕微鏡（ニコンフルオフォト）を用い (A)～(D) についてはB励起で，(E) についてはU励起により皮質骨における第2次骨単位に明瞭なラベリング線が認められるかどうかについて，20倍の対物レンズを用いて観察した。

結 果

1. 投与方法および局所，全身所見

既に5%溶液として調整されている Tc を除き，Cal, AR, CB はスターラーを用いて生理食塩水を溶媒として溶液を調整したが，3者とも完全には溶解せず懸濁液の状態で大腿部筋肉内に注射したが，AR $40\text{ mg/kg}\times 2\text{ days}$ 投与した犬で刺入部及びその周囲にわずかに壊死した部分が見られただけでその他については刺入部およびその周囲には，注射直後およびその後の実験期間内において肉眼的に異常所見は認められなかった。また，各犬とも AR 投与直後，運動の活発性が一時にぶったが，2～3日後には元どおりに回復した。

Tc, Cal, CB 投与後はその様な異常は認められず，かつ食欲も旺盛で体重は変化なかった。

2. 組織所見

下顎骨および大腿骨の非脱灰薄切研磨標本の蛍光像では，Cal, AR については，基準量投与された犬では，その投与時期に一致して Tc, Cal, AR のラベリング線がそれぞれ黄色，鮮緑色，鮮紅色の鮮明な蛍光色を呈しており境界も明瞭であった（図2）。

また Cal, AR の投与量を $3/4$, $1/2$ に減らした場合でも，蛍光色はやや弱まるが，各ラベリング線は明瞭に識別することができた（図3～4）。一方，投与量を $1/4$ に減らした場合には，各ラベ

リング線の境界は依然として明瞭であるが，AR の蛍光色は鮮明さがうすれるため，光源側の開口絞りを大きく開く必要が生じた（図5）。一方 CB については基準量と $1/2$ 量のラベリング線を比較した場合両者の間に特に差は認められず，蛍光強度，蛍光線の明瞭度ともに同等であった（図6）。

考 察

1. ラベリング剤溶液の濃度，PHについて

ラベリング剤の濃度を決定する場合，1回当りの注射量と溶液の濃度，PH との兼ね合いをうまくとることが大切である。たとえば，AR や CB のように投与量が多いラベリング剤では，1回当りの注射量が $10\sim 20\text{ ml}$ にも及ぶことがあり，犬のような大型実験動物であってもこれだけ大量のラベリング剤を投与することには非常な困難を伴う。このような場合，溶液の濃度を高めて，注射量を減らすことが可能であり，Cal や CB のようにアルカリ性以外では難溶性ラベリング剤については，KOH 等の強アルカリ性溶媒を用いて溶解し，濃度を高めて用いられることが多い²⁾³⁾⁶⁾⁷⁾。しかしそれにも一定の限度がありあまり濃度を高めた場合，特に筋肉内注射法では周囲組織との浸透圧の差が著しくなり，また溶液が強アルカリ性であることも手伝って，著るしい場合には壊死を来すことも往々にして認められる。従って本研究では，ラベリング剤の溶媒としてそれ自体に為害性のない生理食塩水を用い弱酸性の溶液を調整して，組織に対する影響をできるだけ減すようにした。その濃度は比較的可溶性の AR で3%，生理食塩水に難溶性 Cal と CB で2%であり，この程度の濃度であっても各ラベリング剤は完全には溶解せず，多少懸濁液の状態であった。したがって溶媒に生理食塩水を用いた場合，これ以上高濃度に調整することは難しい。

2. 投与方法と投与量に関して

ラベリング剤の投与方法⁶⁾としては①静脈内注射法，②腹腔内注射法，③皮下または④筋肉内注射法等があり，またカプセル状の Tc は⑤経口投与も可能である。これら投与方法のうち，静脈内注射法は最も短時間に有効血中濃度に達するが，排

泄も速やかにおこるため、もっとも幅の狭い境界の明瞭なラベリング線が得られ、腹腔内注射法がそれに次ぐ。皮下または筋肉内注射法は吸収が緩やかに起るため、有効血中濃度に達するまでに多少の時間がかかるが持続時間が比較的長いので、これによって得られるラベリング線はやや幅が広く、境界の明瞭さはやや劣る。

さらに経口投与は非常に簡便な方法であるが、腸管から吸収されるのは投与量の一部であるため大量投与が必要となり、しかも投与可能なラベリング剤はかなり限定されてしまう。また当然のことながらラベリング線の鮮明度は最も劣る。従って研究の目的や対象とする組織の種類に応じて投与方法を選択することが要求される。例えば形成速度の速い歯胚の象牙質や若い動物の骨をラベリングするためには静脈内注射法または腹腔内注射法が最も適しているであろうし、それに対して形成速度の遅い成熟動物の象牙質や骨のラベリングには、皮下または筋肉内注射法を用いた方が血中濃度の持続時間が長いため都合がよい。また同一のラベリング剤を2日ないしそれ以上連続して投与することも持続時間を延長させ、さらに、一日当りの投与量を減らすことが可能になるため大いに推奨されよう。

他方、実験に用いる動物の大きさによっても投与方法は限定される。たとえば、ラットやウサギなどの小型～中型の動物に対しては、どのような方法も簡単に実施可能だが、犬やサルなどの大型動物では、静脈内注射を行なうには一度麻酔をする必要があるため、多数の動物に長期に亘って投与する場合には筋肉内注射が最も能率的である。本実験においては筋肉内注射法により2日間に亘って連続投与を行ないラベリング剤の血中濃度の維持に努めた結果、従来明瞭なラベリング線を得るために最低限必要とされていた量の1/2の投与量においても、充分観察可能なラベリング線を得ることができた。

このことは当然、1回あたりのラベリング剤の注射量を大幅に減らせることにつながり、AR や CB などのように大量に投与する必要があるラベリング剤ではその利益は大きい。たとえば体重

10 kg の犬に対して AR ではラベリング 1 回あたりの投与量 80 mg/kg を 3% 溶液を用いて投与するならば 1 回あたりの注射量は約 26.7 ml であるが、40 mg/kg を 2 日間に分けて投与すれば 1 回あたりの注射量は約 6.7 ml ですむことになり、実験動物に与えるダメージを著しく軽減することが可能となる。

3. 各種ラベリング剤個々についての考察

(1) テトラサイクリン

Tc 系抗生物質を投与すると硬組織にとり込まれ、これに紫外線を照射すれば鮮やかな蛍光を発することは古くから知られており、この性質を利用して、硬組織ラベリング剤として、実験的にもまた臨床的にも最も頻繁に利用されている。しかし、Tc の硬組織への沈着がどのようにして起こるのか、そのメカニズムは単なるキレート結合ではないらしく、未だに詳細は不明である。しかし応用面では、投与量、石灰化障害などについても多くの研究が行なわれており¹⁾²⁾、本研究においてもそれらを参考に投与量を 15 mg/kg とし 2 日間連続投与して、他の 3 種のラベリング剤の投与量を決定するための基準とした。

(2) カルセイン

Cal は Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 等と結合すると蛍光を発する性質があり、硬組織中の Ca^{2+} と結合させ、実験的に顎骨、歯などの成長変化の様相を把握する目的に用いられてきた³⁾⁵⁾。Cal は水に対する溶解度が低く $\text{PH} < 12$ の溶液では完全に溶解しないので、アルカリ溶液中で溶解させるのであるが、NaOH 溶液では background の蛍光度を高め観察を不正確にする性質があるため、KOH 溶液が用いられている。しかし、投与後に皮下及び筋肉内の Cal 溶液刺入部位を中心にして広範囲に著るしい壊死を生じ、多量に注射した場合には死亡例が多いというような重大な欠点を有しているために応用例も限定される⁶⁾。この原因としては、強アルカリ溶液の水酸化カリウム ($\text{PH} \approx 12$) の注入による組織破壊が考えられる。この推察をもとに本実験においては、生理食塩水を溶媒として用い 2% の溶液を調整し筋肉内注射を行なった。

Cal の生理食塩水への溶解度は低く、時間をか

けても懸濁液の状態であるものの実用上差は認められず、また、刺入部位周辺における壊死も認められなかった。さらに実験動物に対する影響や石灰化障害を考えると、現在、至適投与量として一般に支持されている 8 mg/kg/day ²⁾³⁾⁶⁾⁷⁾ の $1/4$ 量である 2 mg/kg を 2 日間連続投与することが適当である。

(3) アリザリンレッド S

AR は Alizarin をスルホン化したナトリウム塩で、水溶性であり $1 \sim 2\%$ 水溶液は、 $2.6 < \text{PH} < 3.0$ を示すが PH を上げるためアルカリ性溶液を点滴すると viscous gel が生成され注入液としては不適當なものになる。したがって使用に際しては生理食塩水に溶かして $2 \sim 4\%$ 溶液を製し筋肉内注射により $50 \text{ mg/kg/day} \sim 100 \text{ mg/kg/day}$ を投与することが一般に行なわれている²⁾⁶⁾⁷⁾。しかし、この方法では体重 10 kg の犬の場合、 2% 溶液で $25 \sim 50 \text{ ml}$ 必要となり筋注用としては量が多くなり過ぎる。本実験では、 3% 溶液を用いて、 20 mg/kg を 2 日間連続投与した場合でも、充分明瞭なラベリング線を得ることができ、局所および全身的に何らの異常所見も観察されなかった。

(4) カルセインプルー

CB は白色から一淡黄色の粉末で、水にはほとんど溶けないが、アルカリ性水溶液には溶けやすい。PH $4 \sim 11$ で鮮青色の蛍光を発するが PH 12 以上では蛍光を発しなくなる。しかし、 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} などのアルカリ土類金属が存在すると蛍光を発すると言われており、従来は金属指示薬として用いられてきた。高橋らの報告によると⁷⁾、 40 mg/kg 以上注射したときにラベリング線が得られるとしているが、Cal と同様強アルカリの KOH に溶解して用いることが多い。しかし投与量が多くなるため、局所の異常や全身への影響が報告されている。

本実験では生理食塩水を溶媒として 2% 溶液を調整し、 20 mg/kg を 2 日にわたり連続投与した場合にも十分明瞭な蛍光像が観察されており、AR と同様 1 回あたりの注射量を大幅に減らすことができた。

4. 各種ラベリング剤の投与順序について

多色ラベリングを行なう時、最も留意しなければならないことは、各ラベリング線の色が明瞭に区別できることである。特に、Tc は蛍光強度が低下した場合、骨膜等から発する自然蛍光と区別がつけ難くなることがあるので 3 色ラベリング法の場合には、① Tc, ② Cal, ③ AR の順に投与し、落射蛍光、透過蛍光ともに B 励起法で観察すれば、そのようなおそれはなくなる。また 4 色ラベリング法の場合には、① Tc, ② CB, ③ Cal, ④ AR の順に投与し、B 励起法と U 励起法を併用して観察すればよい。しかし U 励起にした場合、観察時間が長くなると、特に CB の蛍光が速やかに褪色し、眼も被勞するので注意が必要である。

5. その他の使用可能なラベリング剤について

Tc, Cal, AR, CB の他に硬組織ラベリング剤として使用、報告されているものに⁶⁾、Alizarin complexon (赤色), Xylenol orange (オレンジ色), Hematoporphyrine (赤色) 等があるが、溶液の調整法や毒性の点で多くの問題を有しており、硬組織ラベリング剤として生体に使用するには、投与量、投与方法等についてさらに検討が必要である。

結 論

犬などの大型動物の骨に対して、長期間にわたり効率的に多色ラベリングを施すことを目的として、筋肉内注射法により、テトラサイクリン、カルセイン、アリザリンレッド S、カルセインプルーの 4 種のラベリング剤を投与し、これらの投与方法、投与量について検討を加えた結果、以下のような結論を得た。

(1) テトラサイクリン、カルセイン、アリザリンレッド S、カルセインプルーの各ラベリング剤を筋肉内注射する場合、必要量を 1 回に大量投与するよりも、 $1/2$ 量づつを 2 日間に分けて投与した方がよい。この方法によれば 1 回あたりの注射量を大幅に減じることができ、また、骨におけるラベリング線も適当な幅を有し、境界も明瞭なままであるため好都合である。

(2) カルセイン、アリザリンレッド S、カル

セインブルーは生理食塩水を溶媒とし、懸濁液の形で溶液を調整しても、本法に従えば実用上全く支障が無く、組織障害上問題のある KOH に溶解する必要を認めなかった。

(3) 本実験より得られた各ラベリング剤の至適投与量

① オキシテトラサイクリン: 15 mg/kg × 2 days

② カルセイン (2% W/V): 2 mg/kg × 2 days

③ アリザリンレッド S (3% W/V):

20 mg/kg × 2 days

④ カルセインブルー (2% W/V):

20 mg/kg × 2 days

(4) カルセインブルーは他の3種のラベリング剤との同時観察は困難であり、またU励起を用いる必要があることから、CBはもち論、他のラベリング線の褪色を起こしやすく、眼の疲労も招きやすいため長時間の観察には不適である。従って一般的には、多色ラベリングを行なう場合、テトラサイクリン、カルセイン、アリザリンレッド S の3種のラベリング剤を組合せて用いることが推奨される。

(5) 上記3種のラベリング剤の投与順序は、骨膜等の自然蛍光と最終ラベリング剤の蛍光色を明瞭に識別できることから①テトラサイクリン、②カルセイン、③アリザリンレッド S の順序でラベリングを行なうことが望ましい。

(6) 以上の方法に従うことにより、大型の実験動物に対して長期間にわたり、安全に、効率よく多色ラベリングを行なうことが可能である。

なお、本研究の一部は、56年度文部省科学研究費のうち、一般研究 C (課題番号56570696) および奨励研究 (課題番号56771006) の補助によった。

文 献

- 1) 須賀昭一: 硬組織と Tetracycline, 歯学, **53**: 137-143, 1965.
- 2) 前田光突: Tetracycline 投与による歯牙硬組織のラベリングと形成異常に関する実験的研究, 歯学, **57**: 40-67, 1969.
- 3) 狩山昌万: 三色蛍光標示法によるワニの歯と顎骨の発育に関する研究. 阪大歯誌, **14**: 17-38, 1969.
- 4) 須賀昭一: テトラサイクリンによるラベリング法 (須賀昭一, 田熊庄三郎, 佐々木哲編: 歯の研究法). 医歯薬出版, 227-240, 1973.
- 5) 原 林作: 抜歯窩への実験的歯牙移動による歯槽骨変化のラベリング法とコンタクトマイクロラジオグラフィーによる研究. 歯学, **65**: 361-408, 1977.
- 6) 大野康亮: テトラサイクリンによる形成期硬組織のラベリング像に及ぼす諸条件について. 歯基礎誌, **20**: 252-209, 1978.
- 7) 高橋 学, 川口哲郎他: 石灰化組織の多色ラベリングのためのラベリング剤の投与方法について: 歯学, **67**: 53-66, 1979.
- 8) 大竹秀明, 古沢 寛他: 軟組織を含む硬組織非脱灰大型標本の作製方法について: 新潟歯学会誌, **13**: 15-21, 1983.

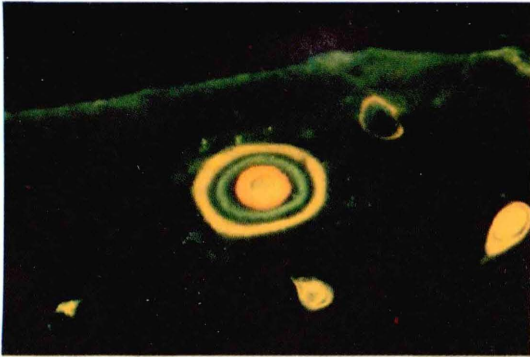


図2 (A)のラベリング像

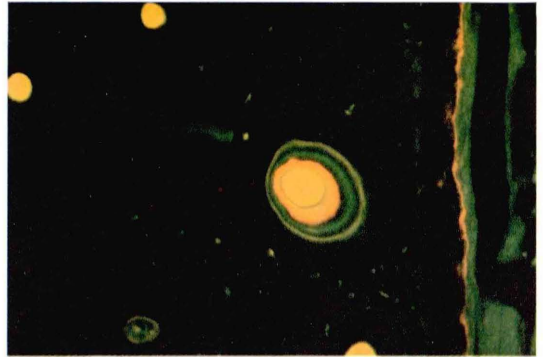


図3 (B)のラベリング像

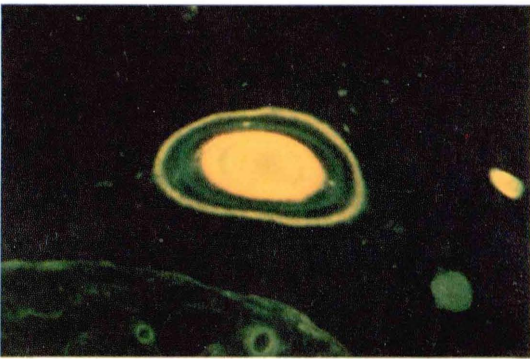


図4 (C)のラベリング像

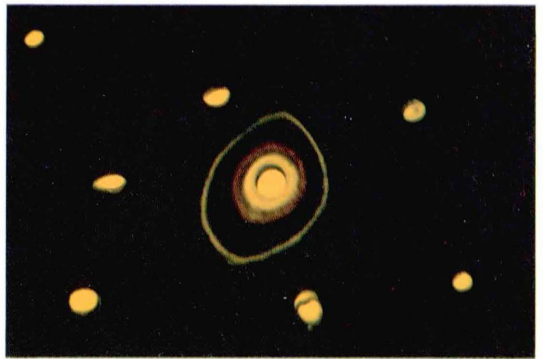


図5 (D)のラベリング像

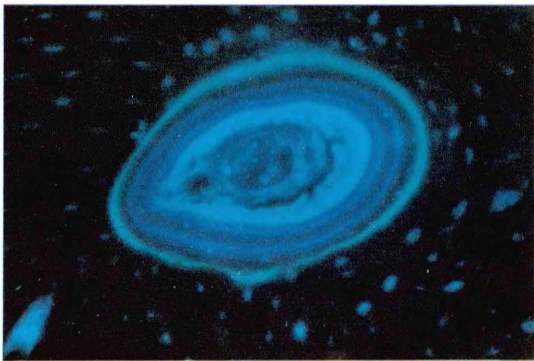


図6 (E)のラベリング像

図2～図5のラベリング像は、最外層より黄色はテトラサイクリン (Tc), 鮮緑色はカルセイン (Cal), 赤色はアリザリンレッドS (AR) の各ラベリング線が見られる。図2は、Tc : 15 mg/kg × 2 days, Cal : 4 mg/kg × 2 days, AR : 40 mg/kg × 2 days 投与したもの。図3は、Tc : 15 mg/kg × 2 days, Cal : 3 mg/kg × 2 days, AR : 30 mg/kg × 2 days 投与したもの、図4は、Tc : 15 mg/kg × 2 days, Cal : 2 mg/kg × 2 days, AR : 20 mg/kg × 2 days 投与したもの、図5は、Tc : 15 mg/kg × 2 days, Cal : 1 mg/kg × 2 days, AR : 10 mg/kg × 2 days 投与したもの。図6のラベリング像は最外層より、Tc : 15 mg/kg × 2 days, カルセインブルー : 20 mg/kg × 2 days, カルセインブルー : 10 mg/kg × 2 days 投与したもののラベリング線である。