

多色ラベリングを応用した骨の表面蛍光観察法

望 月 幹 久

望月歯科医院 長野県須坂市

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 Polychromatic Fluorescent Technique for Surveying External Bone Formation

Motohisa MOTIZUKI

Motizuki Dental Clinic, Suzaka City, Nagano

Hiroshi FURUSAWA and Kooji HANADA

Department of Orthodontics, School of Dentistry, Niigata University

(Director: Prof. Kooji Hanada)

Key words: *Polychromatic labelling, fluorescence, bone formation,
electrical stimulation, modeling*

要 旨

多色ラベリングを応用して、骨の表面蛍光の観察方法を確立することを目的として、雑種成犬の両側大腿骨に電極を埋め込み $20 \mu\text{A}$ の定電流を28日間通電して骨形成の促進をはかるとともに、実験開始1週間後、2週間後、3週間後にそれぞれ、オキシテトラサイクリン (Tc) 15 mg/kg/day 、カルセイン (Cal) 2 mg/kg/day 、アリザリンレッドS (AR) 20 mg/kg/day 、を2日間連続して大腿部に筋肉内注射しラベリングを行った。実験終了後は、大腿骨を摘出し軟組織を全て除去して低圧水銀ランプと落射蛍光顕微鏡を用い表面蛍光を観察、また透過蛍光顕微鏡を使用して非脱灰切片を観察して以下のような結論を得た。

1. 低圧水銀ランプを用いることにより、Tc, ARで多色ラベリングされた骨の表面蛍光を鮮明に観察することが可能である。
2. ブラックライト蛍光ランプを使用しても同

様の効果を得ることができ、また容易に光源の多灯化が行える。

3. 骨面のある特定の部位における石灰化時期をおおまかに知る必要がある場合、切片を用いた蛍光像の観察によったのでは、各種ラベリング剤の沈着傾向に一定の方向性がないため困難なことが多いが、表面蛍光を観察することにより容易に行うことができる。

4. 焦点深度の深い低倍のレンズを使用すれば、落射蛍光顕微鏡を用いて表面蛍光の観察が可能である。

緒 言

骨や歯などの硬組織の形成や骨内部における remodeling を研究するために、テトラサイクリン系抗生物質をはじめとする硬組織ラベリング剤を投与し、その蛍光像を観察する方法が行われてきた。しかし、このような硬組織ラベリング法の応用も、蛍光顕微鏡を利用して観察が可能な薄切

々片を用いた研究が殆んどであり，骨表面における形成，添加の観察を目的としてラベリングを行った例は，わずかに石井¹⁾がテトラサイクリンを用いて報告しているにすぎない。

歯科矯正学の領域においては，骨格性の不正咬合の異常の治療にあたって，種々の顎外矯正装置を用いて顎・顔面の成長やその方向をコントロールすることがしばしば行われており，それらの装置の作用機序を詳細に解明するために，動物実験により組織学的な検討も含め表面的な形態変化をも調べる必要に迫られている。このような理由から，本実験では，骨表面における形成・添加の部位を識別するとともに，それらの起こった時期をも特定するべく，硬組織多色ラベリング法を応用して，骨表面の蛍光色を観察するための諸条件，すなわち，

- 1) 表面蛍光像観察のための照明方法
- 2) 利用可能なラベリング剤の種類
- 3) 各ラベリング剤の蛍光色を最も明瞭に識別するためのフィルターワーク

について検討を加え，観察方法を確立することを目的とする。

実験材料・方法

実験動物として雑種成犬 3 頭を用い，骨表面における形成・添加を促進することを目的として，左右大腿骨々幹部中央において，外側から内側へ向け直径 1.2 mm ϕ の貫通孔を，15 mm の間隔をおき近遠心的に 2 本ドリリングし，電極として途中をテフロンチューブで絶縁し先端部のみ 2 mm 露出した直径 1.0 mm ϕ のステンレス線を挿入，近心側を陰極，遠心側を陽極とし，両側々腹部に埋め込んだバッテリーと結線して 20 μ A の定電流を 28 日間通電した。通電開始 1 週間後，2 週間後，3 週間後に，図 1 に示すように，オキシテトラサイクリン（以下 Tc と略，テラマイシン筋注液：台糖ファイザー）を 15 mg/kg/day，カルセイン（以下 Cal と略，半井科学）を 2 mg/kg/day，アリザリンレッド S（以下 AR と略，半井科学）を 20 mg/kg/day，2 日間連続して大腿部筋肉内に注射し多色ラベリングを行った。

なお，Tc を除き，他のラベリング剤は生理食塩水を用いて，Cal は 2% 溶液を，AR は 3% 溶液を作製して使用した（図 1）。実験終了後は，塩

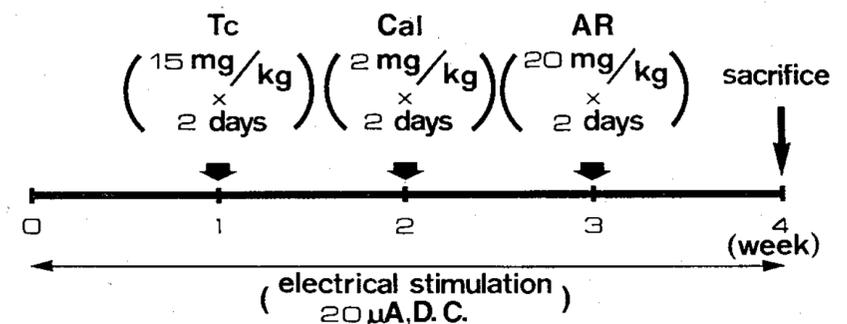


図 1 実験計画

化スキサメトニウム（サクシンバイアル 200 mg：山之内製薬）を腹腔内注射して屠殺し，直ちに両側の大腿骨を摘出した。骨表面に新たに形成・添加された仮骨を剥離しないように充分注意をはらいながら，骨膜を含む軟組織を全て除去し，70% エタノールに浸漬して固定を行った。固定後の試料は，タングステン光照明下で骨表面の性状について観察を行い，次いで，低圧水銀ランプ（Black Ray Lamp：Ultraviolet Products）を用い，電極周辺を中心として骨表面における各種ラベリング剤のとり込みを観察した。その後，一側の大腿骨は非脱灰のままエタノール系列にて脱脂，脱水し，ポリエステル樹脂（BPS 樹脂，京都科学標本）に包埋した。包埋後は骨の長軸に沿い 2 本の電極を含む面に平行に薄切した後，50 μ m の厚さまで研磨した大切片に調整した。また他の一側は，樹脂包埋せずに骨の長軸に沿い両電極を含む面で 2 分割した。薄切研磨片は，透過蛍光顕微鏡（ニコン実体顕微鏡 SMZ-10 改造型：日本光学）を使用して，骨膜面での仮骨を含む新生骨におけるラベリング剤のとり込みを観察した。

2 分割した試料は，落射蛍光顕微鏡（ニコンフルオフォト：日本光学）を使用し，低倍率の対物レンズを用いて，骨表面および分割面におけるラベリング剤のとり込みを観察した。

結 果

A. タングステン光照明下での骨表面の性状

電極周辺部の外側面および，前・後側面においては，骨膜性の骨新生は殆んど認められず，これ

に対して、電極先端部が位置していた内側面では、電極を中心として旺盛な骨新生がおきており、島嶼状に盛り上がっていた。また一部には AR の沈着を思わせるようなピンク色の色素沈着が認められた (図 2)。

B. 低圧水銀ランプ照明下での骨表面のラベリング像の観察

暗室内で低圧水銀ランプを用いて骨表面における Tc, Cal, AR のとり込みを観察したところ、島嶼状に骨新生が認められた部位に一致してその石灰化時期を示すように、Tc と AR の沈着帯がそれぞれ鮮やかな黄色と紅色の蛍光を発していた。これに対して、Tc と AR の中間に投与した Cal の蛍光色である鮮緑色は、注意深く観察したにもかかわらず、認めることができなかった (図 3-a, b)。

C. 落射蛍光顕微鏡によるラベリング像の観察

高圧水銀ランプを光源とする落射蛍光顕微鏡を用いて、B 励起法にて、骨表面および分割面におけるラベリング剤のとり込みを観察したところ、骨表面で、Tc, AR は鮮やかに蛍光を発しており、さらに、低圧水銀ランプ照明下では認められなかった Cal の沈着帯も観察された (図 4)。しかし、低圧水銀ランプ照明下での蛍光像と比較すると、輝度があまりに高過ぎるため殊に仮骨のように骨内膜の占める面積の割合が大きい部分では、骨内膜の発する自然蛍光や多くの散乱光にマスクされてしまうため、分割面でラベリング剤の発する蛍光を観察することは難しかった (図 5)。

D. 透過蛍光顕微鏡による非脱灰切片のラベリング像の観察

透過蛍光顕微鏡を用いて、50 μm という比較的厚い切片上で、仮骨を含む新生骨のラベリング像を観察したところ、骨内膜の発する自然蛍光や散乱光の影響をあまり受けることなく、Tc, Cal, AR とも、ラベリング線を観察することができた。しかし、仮骨の内部におけるラベリング線はまったく方向性をもっておらず、このような切片の蛍光像の観察のみからは、低圧水銀ランプを用いた骨表面の蛍光像にみられたように、ある特定の部位における石灰化時期をおおまかに知ること

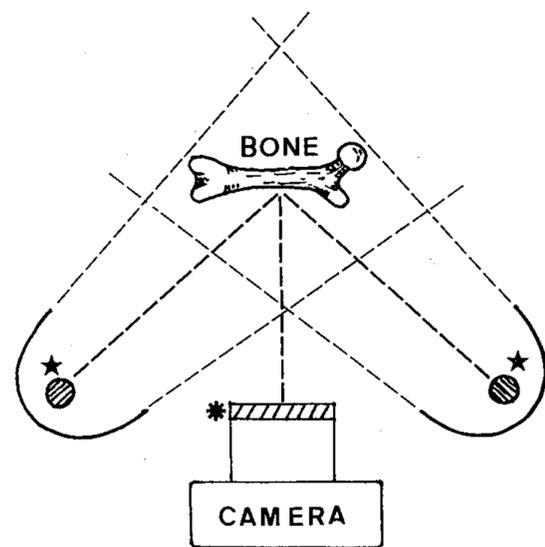
は、まったく不可能であることがわかった (図 6)。

考 察

I. 表面蛍光観察のための照明方法について

蛍光像観察のための励起光源としてよく用いられるものとして、キセノンランプ、高圧水銀ランプ、低圧水銀ランプ等があげられる。キセノンランプは紫外域から赤外域に至る全域にわたって強力な連続スペクトラムを有しており、蛍光照明の際にもその有用性は高い。高圧水銀ランプは蛍光顕微鏡の励起光源として最も一般的に用いられている。低圧水銀ランプは高圧水銀ランプと比較して、より短波長域から連続したスペクトラムを得ることができる。以上の中で、キセノンランプと高圧水銀ランプは、高圧で輝度が非常に高く、極く狭い視野の照明には適しているが、表面蛍光観察の際の光源としては不適當である。

低圧水銀ランプは、その構造上、管状の外形をしているため広い視野の照明が可能であり、各種の光源側フィルター (励起フィルター: exciter filter) と組み合わせることにより、任意の励起



★ BLACK LIGHT

* BARRIER FILTERS: L39 + (Y48 / Y44)

図 7 ブラックライトを用い多灯化して表面蛍光を観察、撮影する場合の模式図

光を得ることができる。その中で殊に 300~400 nm にかけての比較的長波長の紫外線を得るために、管壁を黒色にコーティングしたものをブラックライトと呼び、普通の蛍光ランプと全く同様に扱うことができるので、表面蛍光観察用の光源と

して最も手軽に利用できる安価で入手も容易であるため、光源を多灯化するのに適している²⁾。本実験では、既述のごとく Ultraviolet 社製の black ray lamp を用いて表面蛍光を観察したが、その後、同等の性能をもつブラックライトを入手して光源を多灯化し観察を行っている (図7)。

II. 表面蛍光観察に利用可能なラベリング剤について

I で述べたように、広い視野を観察する必要のある場合には低圧水銀ランプを使用するのが良いが、本実験のように 300~400 nm のスペクトラムをもつ励起光を選択した場合には、投与した3種類のラベリング剤、Tc, Cal, AR のうち、Tc と AR のみ表面蛍光を観察できた。しかし、一般的な低圧水銀ランプを使用し、励起フィルターを適切に選択することにより Cal の表面蛍光も観察可能であると考えられる。

III. 各ラベリング剤の蛍光色を明瞭に識別するためのフィルターワークについて

励起光が観察対象物に照射されることにより、そのラベリング剤特有の蛍光色が発せられるわけであるが、観察者の眼ないしは撮影用のカメラレンズに入射する光には、不要な紫外線までも含まれていて本来の蛍光色をマスクしてしまう。したがって、このような悪影響を避けるため、表面蛍光の観察の際には適切なバリアーフィルター (barrier filter) を選択することが要求される³⁾⁴⁾。本実験では、バリアーフィルターとして東芝ガラスフィルター Y44, Y48, Y52, O56, R60 を紫外線吸収フィルター L39 と併用して観察を行ないそれぞれを比較、検討した⁵⁾。

その結果、Tc と AR の表面蛍光の観察には、Y48 と L39, または Y44 と L39 を組み合わせて使用するのが適当であることがわかった。励起フィルターとバリアーフィルターを適当に組み合わせることにより、多色ラベリングの蛍光色を全色同時に観察することはもちろん、必要ならば1色ずつ選択して観察することも可能と考えられ、今後この方面における一層の研究が期待される。

結 論

骨の表面蛍光を観察することを目的として、Tc, Cal, AR を用いて多色ラベリングを行い、次のような結論を得た。

1. 低圧水銀ランプを用いることにより、Tc, AR で多色ラベリングされた骨の表面蛍光を鮮明に観察することが可能である。
2. ブラックライト蛍光ランプを使用しても同様の効果を得ることができ、また容易に光源の多灯化が行える。
3. 骨面のある特定の部位における石灰化時期をおおまかに知る必要がある場合、切片を用いた蛍光像の観察によったのでは、各種ラベリング剤の沈着傾向に一定の方向性がないため困難なことが多いが、表面蛍光を観察することにより容易に行うことができる。
4. 焦点深度の深い低倍の対物レンズを使用すれば、落射蛍光顕微鏡を用いて表面蛍光の観察が可能である。

謝 辞

稿を終えるにあたり、蛍光スペクトラム測定に際して御協力いただいた滋賀医大解剖学第2教室、越智教授、山本、清水両助手に深謝いたします。また御助言下さいました日本光学新潟営業所 塩氏、日本光学横浜工場 小野木氏に対して心より御礼申し上げます。

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) の補助による。

引 用 文 献

- 1) 石井英司: 上顎劣成長を伴う Skeletal Class III 症例に用いられる Orthopedic Appliance の効果の実験的検討. 日矯歯誌, **38**: 187-209, 1979.
- 2) 入江製作所: 計測機器・電子部品と光源装置総合カタログ, 1980.
- 3) 塩 育: 蛍光顕微鏡の基礎知識, 日本光学.
- 4) KODAK: Ultraviolet and fluorescence photography, KODAK data book.
- 5) 東 芝: 色ガラスフィルターカタログ.



図 2 : 摘出した大腿骨の内側面観

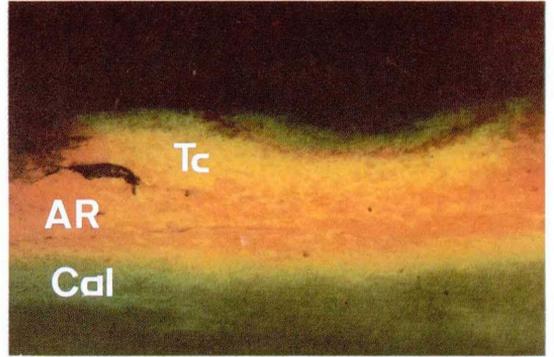


図 4 : 落射蛍光顕微鏡による骨表面の蛍光像

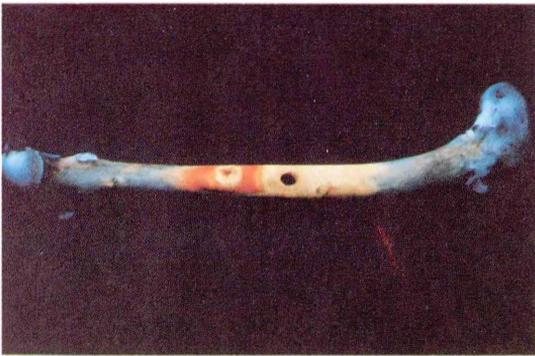


図 3 - a : 低圧水銀ランプ照明下での表面蛍光像

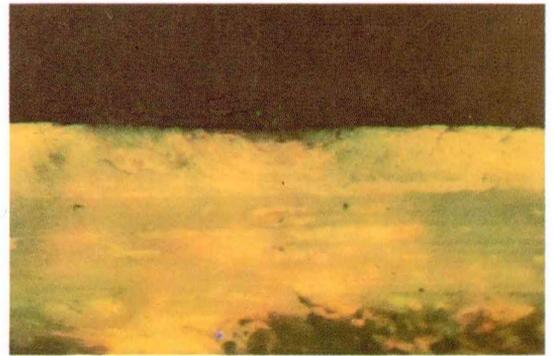


図 5 : 落射蛍光顕微鏡による2分割骨内面の蛍光像



図 3 - b : 図 3 - a の電極周辺の拡大観

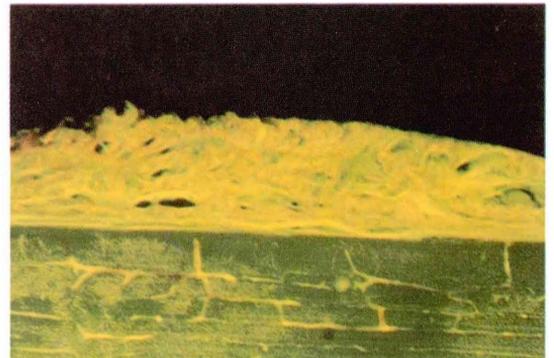


図 6 : 透過蛍光顕微鏡による非脱灰切片上の蛍光像