

マウス筋組織における微小循環系の研究

Histological Study of the Microcirculatory Vessels in the Mouse Musculature

土田 英美 (Emi Tsuchida) 指導：小室 輝昌教授

【研究の背景】

血管およびリンパ管系の末梢部を構成する微小な脈管は、ガス交換や物質代謝、また老廃物の除去といった役割を実質的に担っている生命維持に重要な部分であり、腫瘍の転移や増殖にも深く関与している。また、日常経験するむくみといった不快な症状や肺動脈血栓塞栓症などの疾患と、運動不足や加齢による筋力低下との関係がしばしば取り上げられるが、これも微小循環系の機能の低下によって説明されるものである。筋組織における微小循環系の形態・分布・走行を明らかにすることは、以上の観点からも重要である。従来、微小循環系を詳細に検索するために、走査型電子顕微鏡が広く使用されてきたが、ごく近年では、手法的に容易な蛍光物質で標識したレクチン (lectin) を利用した方法が試みられている。この方法は、レクチンを血管系に流し込み、全身の血管すみずみまで行きわたらせ、共焦点顕微鏡を用いることにより、微小循環系の三次元像を構築するものである。

【目的】

本研究では、筋組織における微小循環系の形態、分布、走行を可視化することを目的として、レクチン注入後、共焦点顕微鏡を用いて検討を行った。一般にレクチンには、結合に種差や組織特異性を示すものが多いが、本研究では、種差を越えて血管内皮を認識できる利点があるトマトレクチンを採用した。さらに、血管とリンパ管を識別するために、リンパ管内皮細胞に対するモノクローナル抗体LA102を用いた免疫組織化学的手法により観察、検討を行った。

【材料と方法】

動物はICRマウスを材料として用いた。筋には骨格筋と平滑筋があり、両者の相違を比較、検討するために、骨格筋については下腿の筋と舌を用い、平滑筋については小腸を用いた。

1) トルイジンブルー染色方法：下腿の筋と小腸は、固定後エポキシ樹脂包埋した。その後切片を作成し、トルイジンブルー染色を施し、各組織断面における微小循環系の形態、分布を観察した。

2) NADH染色方法：小腸壁平滑筋層の微小循環系の分布、

走行との関連を検討するため、同じく筋層に広がる筋層間神経叢の描出にはNADH染色を行った。

3) 共焦点顕微鏡観察のための標本作成方法：麻酔下において、マウス尾静脈よりトマトレクチンを注入し、10分後全身の血液除去を行い、その後固定し凍結切片を作成した。また、小腸においては、レクチン注入後、カミソリにて薄切した横断標本や、粘膜を剥離したWhole-mount伸展標本を作成し、それぞれ共焦点顕微鏡にて観察し、解析をした。

4) LA102を用いた免疫組織化学的手法 (蛍光抗体法)：クライオスタット切片作成後、リンパ管描出のためにLA102を用いた免疫組織化学的染色を行った。

【結果と考察】

レクチンを注入し、共焦点顕微鏡を用いた検索では、筋組織の微小循環系の三次元的観察が可能となった。下腿の筋では、筋線維に絡みつくように存在する毛細血管が観察され、またその走行から筋の運動と連動していることが示唆された。小腸では、トルイジンブルー染色では明瞭にできなかった、絨毛内の毛細血管網や、筋層内における血管の分布、走行が観察された。筋層内の血管は、NADH染色の結果と照らし合わせると、血管と神経叢は限られた空間の中でそれぞれ相補的な位置関係にあるものと推察された。LA102を用いた免疫組織化学的染色では、舌において血管とリンパ管の形態、分布、走行を識別することができた。

以上より、筋組織中における微小循環系の形態、分布、走行を明らかにすることが可能となった。特に、レクチン注入後の共焦点顕微鏡観察では、組織内の一断面図での分布はもとより、微小循環系の様子を微細に可視化することができた。レクチン注入による共焦点顕微鏡観察法は、簡便に三次元像を明らかにする手法として広く応用できるものと考えられた。