岡山医誌（1992）104，39—49

メタクリレート単量体注入とマイクロウェーブプロセッサー急速加温による微細血管鋳型法

岡山大学医学部第二解剖学教室（指導：村上宅郎教授）

日根野谷　仁

（平成3年10月22日受稿）

Key words：マイクロウェーブ　プロセッサー，微細血管鋳型法，走査電子顕微鏡

緒　　言

血管，リンパ管などの内腔充塡腐触標本すなわち鋳型標本をつくり，これを走査型電子顕微鏡で観察すると，同管系の詳細で立体的な配置を明瞭に観察することができる[1-3]．この鋳型走査電顕法のために，現在多くの注入鋳型剤（ポリエステル系樹脂，ラテックス系ゴム等）が市販されている[4-7]．しかし，私達は実験室で調製できるオリジナルな低粘度半重合メチルメタクリレート樹脂を注入鋳型剤として常用している[1-3]．その理由は，私達の半重合樹脂は市販の注入鋳型剤より粘度が低く滑らかで注入しやすく，その結果よく注入された良い鋳型標本が得られるからである[8,9]．一方，私達の研究グループの1人であり鋳型走査電顕法の創始者でもある村上の20数年前（1969年）の未発表実験記録の中には，もっと粘度の低いメタクリレート未重合単量体（モノマー）を触媒と共に単独注入し電子レンジで急速加温すると，時々走査電子顕微鏡観察に耐える毛細血管あるいはその群の鋳型標本がえられるというメモがある．本研究ではこのメモをもとに，最近組織の迅速固定や同切片の簡易染色のために開発され周波数・温度等を適当に調節できる電子レンジすなわちマイクロウェーブ　プロセッサーを用いて，メタクリレート単量体注入による毛細血管の鋳型標本作製について検討する．

材料と方法

メチルメタクリレート単量体（未重合，ハイドロキノン含まず，片山化学工業）に1.0%（W/V）の割合に過酸化ベンゾイル（触媒，片山化学工業），さらに1.0%（V/V）の割合にN，N-ジメチルアニリン（促進剤，片山化学工業）を加えて，注入鋳型液Aを調製した．一方，メチルメタクリレート単量体とハイドロキシプロピルメタクリレート単量体（未重合，ハイドロキノン含まず，片山化学工業）を4対1の割合に混ぜ，これに上記と同じように過酸化ベンゾイルとN，N-ジメチルアニリンをそれぞれ1%の割合に加えて，注入液Bを調製した．これらのA，B各注入鋳型液はいずれも使用（注入）直前に調製した．

体重300～400g の成体雄性ラットをエーテル麻酔下に開胸し，右心房を切開した後に上行大動脈にカニューレを挿入結紮し，さらに左鎖骨下動脈起始部直下で胸部大動脈を結紮した．その後，カニューレを挿入した上行大動脈より生理食塩水と0.1M燐酸緩衝2%グルタールアルデヒド液（各50～60ml）を注入圧50～60mmHg下に用手注入し，引き続いて同注入圧下に上記AないしB注入鋳型液を十分（50～60ml）注入した．この注入で上大静脈は注入鋳型液で充満した．

鋳型液を注入した動物をそのまま，あるいは上半身を分離して，ガラス容器に入れて蒸留水で満たし，この容器をマイクロウェーブ　プロセッサー（H2500，Bio-Rad Laboratories，Cambridge，Massachusetts，U.S.A.）の試料室に入れ，500～550W・2,000～2,200MHz下50～60℃で約10分間加温した．その後動物ある

いは分離した上半身を同プロセッサーの試料室から取り出し，さらに30～60分間温水(50～60℃)に浸して孵卵器（50～60℃）中で保温した．

次に，動物をそのまま，あるいは適当に臓器を分離して，50～60℃に加温した10% NaOH またはKOH水溶液に浸して同温度に調節した孵卵器に一晩放置して組織成分を腐蝕し，その後流水中で約8時間洗って，腐蝕された組織を除去した．このアルカリ処理と水洗は数回繰り返した．骨成分は腐蝕処理後ピンセットで除去した．

以上の処理で得られた血管鋳型を実体顕微鏡下に水中でハサミ，ピンセット等を使って，あるいは同顕微鏡下に安全カミソリ等で凍結割断して，走査電子顕微鏡の試料台に載る程度の大きさに切り出し，濾紙上に放置して空気乾燥した．ついで，同乾燥試料を走査電顕用試料台に導電ペースト（ドータイトペイント）を用いて載台し，オスミウム蒸気処理[2]後金を真空蒸着して，加速電圧5 kVで走査電子顕微鏡（S 2300，日立）観察した．

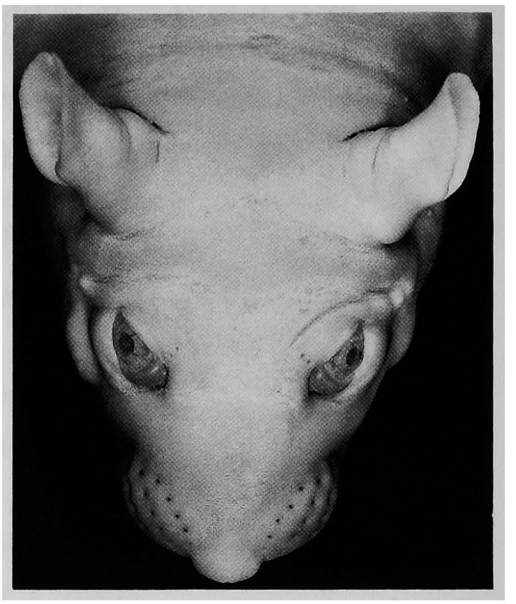


図1 A液によるメタクリレート未重合単量体注入鋳型法で作製した成体雄性ラット頭部毛細血管鋳型標本（本文参照）の光学顕微鏡写真．鋳型標本自体が，耳介を含めて，頭部の輪郭を再現している． ×1.3.

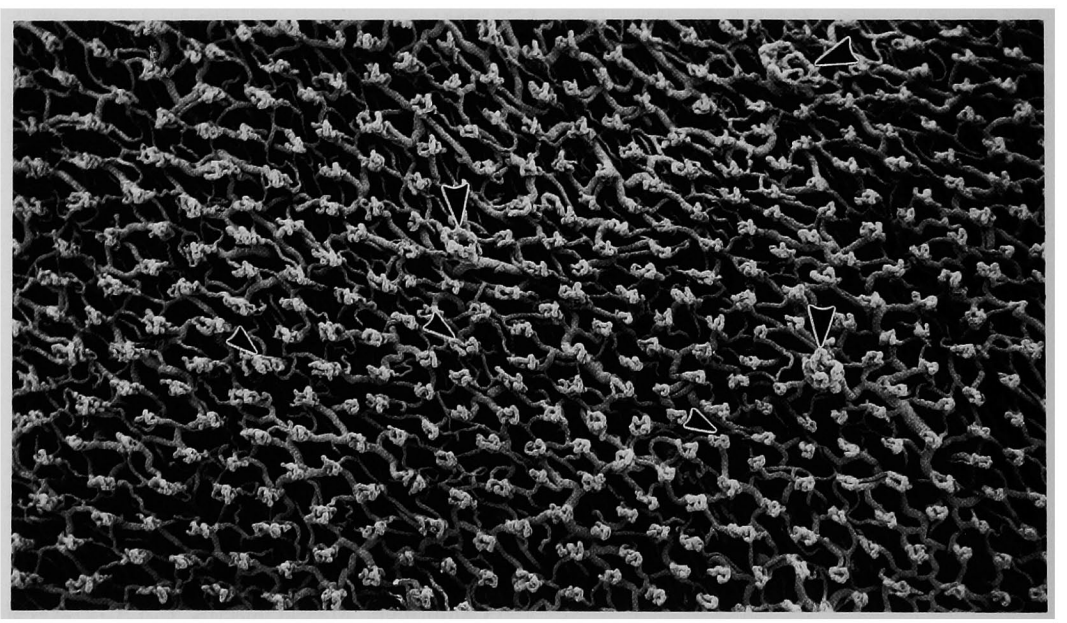


図2 B液によるメタクリレート未重合単量体注入鋳型法で作製した成体雄性ラット頭部毛細血管鋳型標本(本文参照)から分離した舌部の走査電子顕微鏡写真．舌の毛細血管網がよく鋳型されているのが確認できる．太い矢頭印は茸状乳頭の毛細血管網をしめし，細い矢頭印は糸状乳頭のそれをしめす． ×60.

結　　果

A，B各注入鋳型液は共に調製時は水のように粘度がひくい．A液は，調製後，室温(20～22℃)で非常にゆっくりと重合発熱し，約2時間で発泡完全硬化する．B液はA液より早く室温約1時間で発泡完全硬化する．

一方，A，B各注入鋳型液はマイクロウェーブ　プロセッサー中で50～60℃に急速加温されると急激に発泡硬化する．すなわち，AとB液は同プロセッサー中(500～550W，2000～2,200 MHz，50～60℃)でそれぞれ10～15分，3～5分で発泡硬化する．

水のように粘度が低いA，B各液はともに潅流固定直後の血管系に容易に十分注入できた．そして，マイクロウェーブ　プロセッサーによる急速加温処理による注入鋳型剤の迅速硬化によって，A液，B液注入の各例において良い鋳型標本を得ることができた（図1）．すなわち，A液，B液注入両例において，得られた鋳型標本は走査電子顕微鏡で見る限りアルカリ腐蝕処理による損傷（表面の不規則なでこぼこなど）を受けた形跡はなく，オスミウム蒸気処理や金属蒸着など導電処理による特別な損傷（表面のちぢれや不規則なしわなど）も認められなかった．

毛細血管網の再現性も良好と認められた．すなわち，図2～9に示すように，毛細血管を含む血管あるいは血管群の間に特に著明な不連続性（すなわち，注入不全）はほとんど認められなかった(図6)．しかし，例外的にところどころで注入鋳型液の血管からの逸脱（漏れ）と思われる血管外での樹脂の不規則な硬化が認められた(図8)．ただし，これらの漏れや注入不全は軽微で，特に観察の障害となることはなかった．

A液，B液各注入において，得られた鋳型は適当に硬くて脆く微解剖に適していた．すなわ

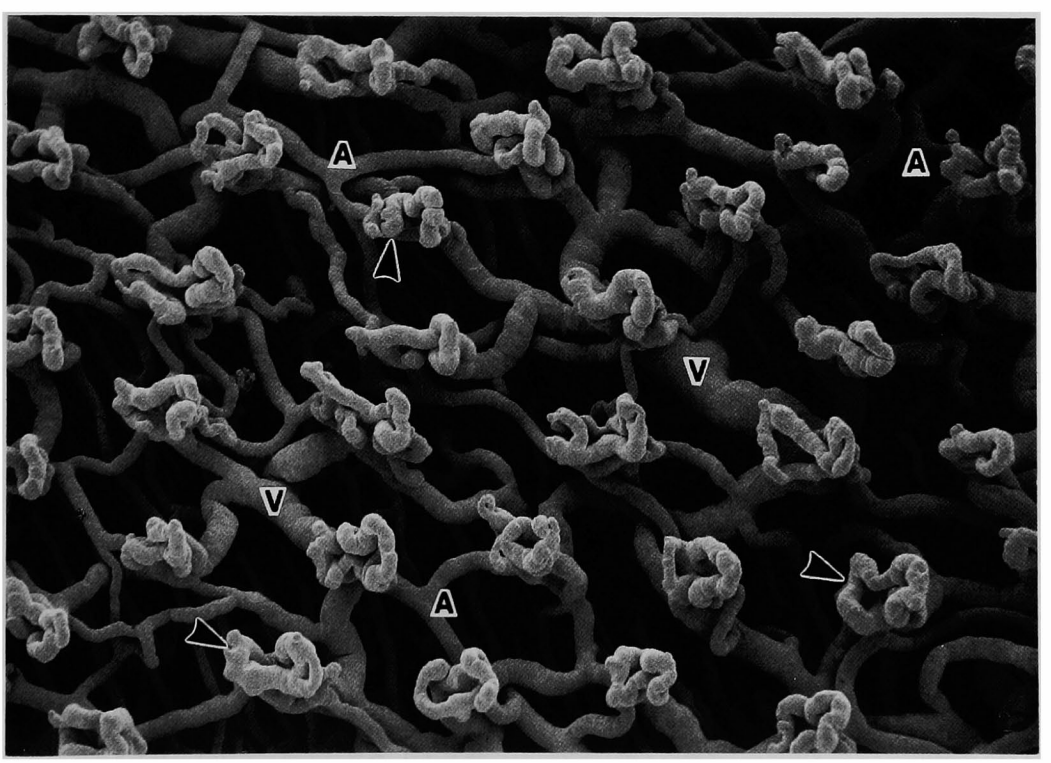


図3　図2の一部拡大走査電顕像．矢頭印は糸状乳頭の血管網をしめす．AとVはそれぞれ動脈と静脈をしめす．×240.

ち，太い血管はハサミやピンセットで容易に取り除くことができ，毛細血管や細い血管は実体顕微鏡下に鋭利に研いだピンセットやハリで安全に除去することができた．（図5，6，8，）．安全カミソリ（片刃，炭素鋼　刃厚0.245mm，フェザー）で簡単に凍結割断できた（図4）．

以上のような微細解剖を実体顕微鏡下におこなうことによって，目的とする臓器・器官・組織の血管床はもちろんのこと，場合によっては単一の微細血管あるいは毛細血管を剖出して走査電子検鏡することができる（図7，9）．この微解剖をおこなう際，オスミウム蒸気処理した血管鋳型は透光性を失って（黒く染って），個々の血管が実体顕微鏡下によく見える利点があった．上に述べたように，A，B各液で得られた鋳型標本は微解剖に適している．しかし実際には，A，B各液から得られた鋳型標本には，特に計測はしていないが，屈曲性ないし弾力性に多少の差異が感じられ，B液から得られた鋳型標本の方が弾力性と屈曲性に優れているように思えた．

考　　察

メタクリレートを基材とする注入鋳型剤は我が国で，谷口等によって肉眼解剖用に開発され，この鋳型法では予め粗い重合粉剤を作っておき，注入前にこの粉剤に単量体（モノマー）を混合して用いられる[11,12]．この谷口等の樹脂は米国や独国などで模倣され，Batson's plastic あるいは Technovit 注入剤として市販されている．

村上は谷口等[11,12]の鋳型剤を参考にして，メチルメタクリレート低粘度半重合注入鋳型液をつくり，これを用いて従来不可能であった適当に硬くて走査電子顕微鏡観察に耐え，しかも毛細

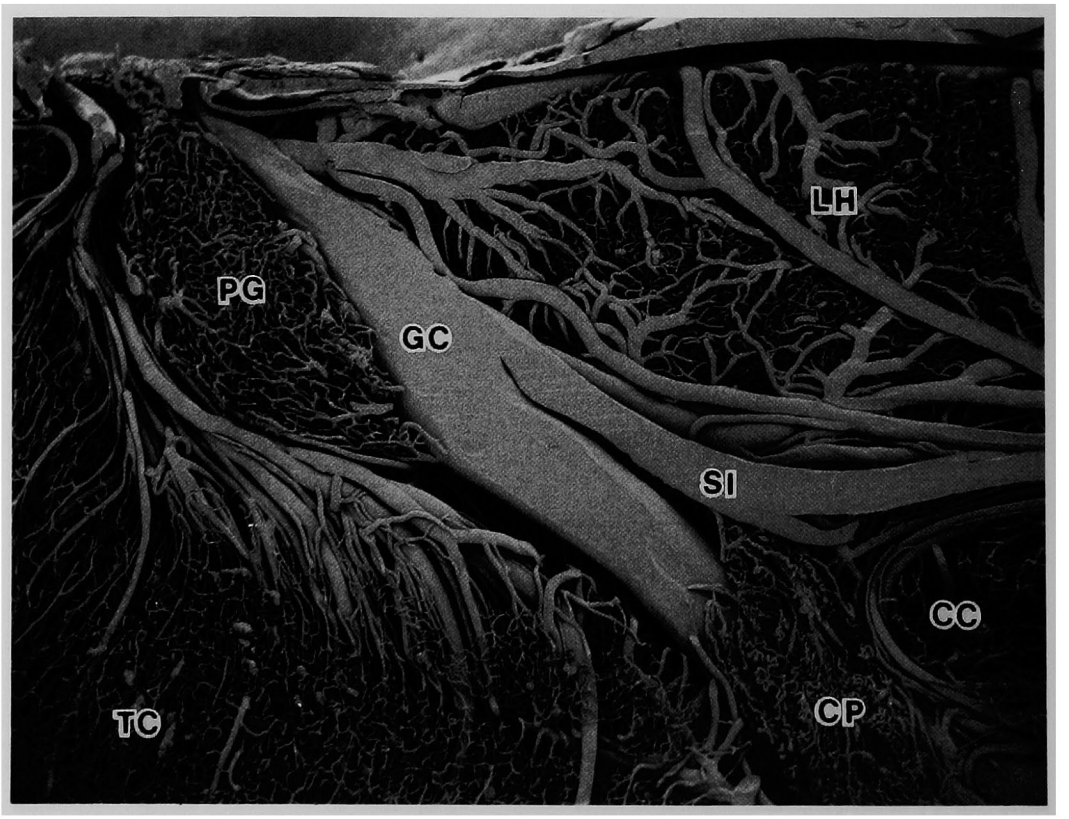


図4　図1の標本より分離，矢状断した松果体（PG）と周囲組織の血管叢，CC脳梁，CP第三脳室脈絡叢，GC大脳静脈，LH大脳半球，SI上矢状静脈，TC蓋板部．　×35.

血管などの細い管系を十分鋳型標本とすることができる方法を開発した[1-3]．これに類似する半重合注入液は Mercox（応研商事）として市販されているが，村上の原液と較べて可成り粘度が高い[4,5,8,9]．従って，Mercox でよく注入された良い鋳型標本をつくるには20～40％の割合に未重合メチルメタクリレート単量体でうすめて（粘度を下げて）使用した方がよい[8,9]．

何れにしても，低粘度半重合メチルメタクリレート注入鋳型剤の開発によって，動・静脈や毛細血管網を含む血管叢全体が初めて走査電子顕微鏡下に立体的に観察且つ分析できるようになり，開発から20年を経てようやく医学生物学の基本的研究手段として定着しつつあるよう思える．[6,7,9,13,14]．しかし一方で，肝内毛細胆管など毛細血管より一層細い管系の鋳型標本の作製には，従来の未固定生物試料への低粘度半重合メタクリレート鋳型剤注入では困難であった[1-3]．

この点に関して，村上は水溶性樹脂であるハイドロキシプロピルメタクリレート単量体に触媒（過酸化ベンゾイル１％）と促進剤（N，N-ジメチルアニリン１％）を加えると室温下即座に重合硬化することに着目し[15]，ハイドロキシプロピルメタクリレートを重合加速剤とする注入鋳型液（50～60％メチルメタクリレート単量体，50～40％ハイドロキシプロピルメタクリレート単量体，１～２％過酸化ベンゾイル，そして１～２％N，N-ジメチルアニリンの混液）を調製して，あらかじめ血管系（動脈系と門脈系の両方）より生理食塩水で潅流後0.1M燐酸緩衝２％グルタールアルデヒド液で潅流固定したラット肝の総肝管より逆行性にこの鋳型液（混液）を注入後60℃の孵卵器で重合を促進して，十分とはいえないまでも肝内毛細胆管の鋳型標本の作製に成功している[16]．なお，村上はこの論文でハイドロキシプロピルメタクリレートはじめ他の水溶性単量体樹脂は，注入後直ちに水に混じて血管外に出る（漏出するので），単独では使用で

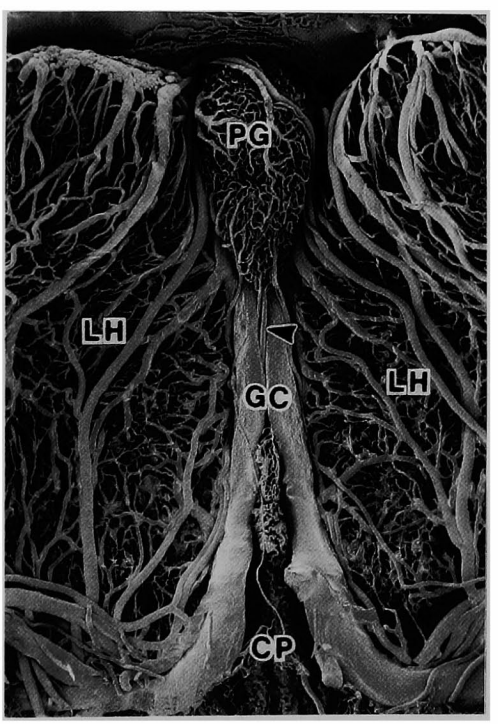


図５　図２と同じ標本より分離後，蓋板部を剥離して剖出した松果体（PG）と周囲組織の血管叢（後下面観）．ＣＰ第三脳室脈絡叢，ＧＣ大脳静脈，ＬＨ大脳半球，矢頭印は松果体動脈をしめす．　×20.

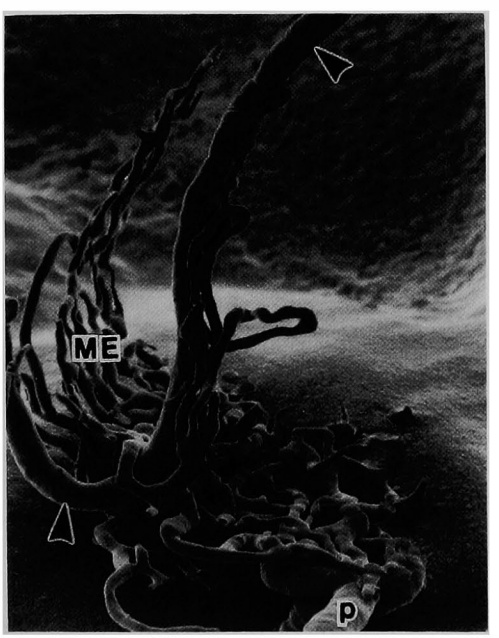


図７　図６の標本より分離剖出した正中隆起上行動脈（矢頭印）．ＭＥ正中隆起，Ｐ下垂体門脈．×170.

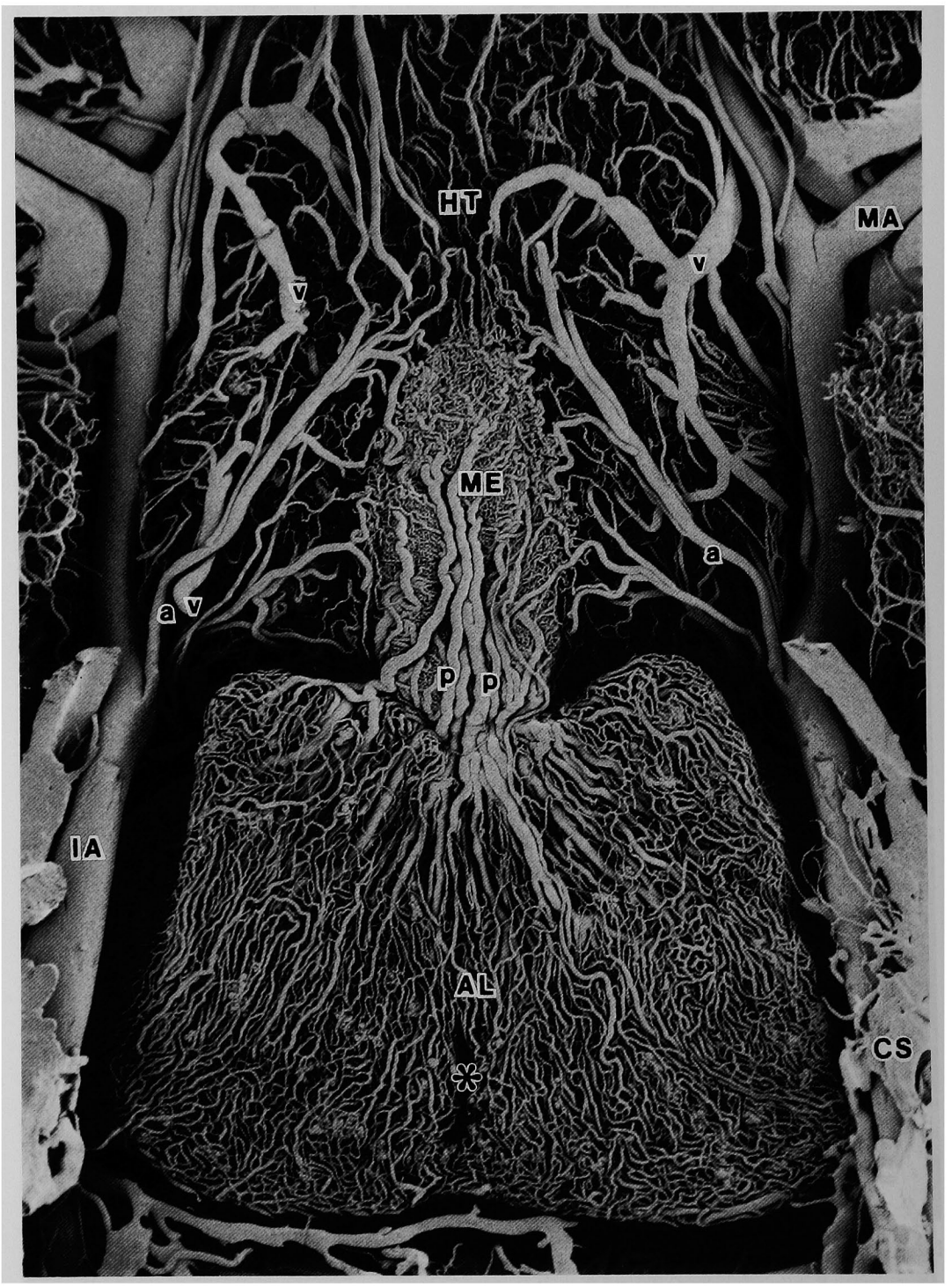


図6 図1の標本より分離剖出した脳下垂体前葉（AL）と正中隆起（ME）の血管叢．ＣＳ海綿静脈洞，ＨＴ視床下部，ＩＡ内頸動脈，ＭＡ中大脳動脈，ａ動脈枝，Ｐ下垂体門脈，ｖ静脈枝．星印は注入不全部をしめす． ×30.

きないと述べている[16]．また，ハイドロキシプロピルメタクリレートとメチルメタクリレートの混液で作製された鋳型標本は水を含んで軟らかく常に凍結乾燥を行う必要があるとしている[15,16]．

本論文で紹介した方法は上記村上とその共同研究者の単量体混液鋳型法[15,16]を改変したものであるが，その特色はメチルメタクリレートを単独に，或いは少量のハイドロキシプロピルメタクリレート混じて，触媒（過酸化ベンゾイル）と促進剤（N，N-ジメチルアニリン）と共に注入し，マイクロウェーブ処理で急速に硬化させる点にある．従来樹脂注入した生物試料は温水に浸して注入した樹脂の硬化を助けていたが，水は必ずしも熱伝導性が良くなく試料の深部の加温には時間を要した．一方マイクロウェーブは試料深部まで急速に温度を上昇させることが

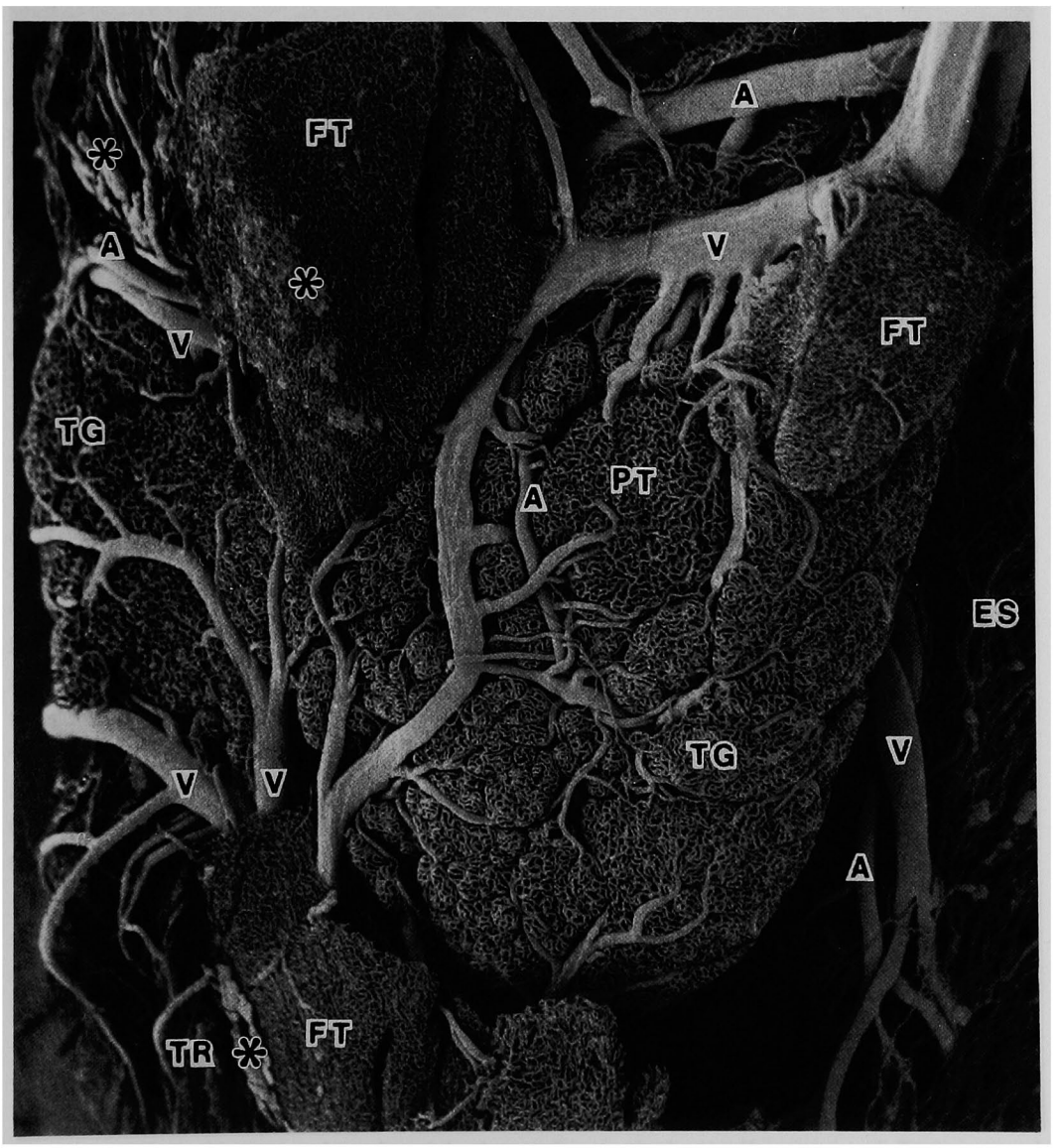


図8　図1の標本より分離剖出した上皮小体（PT），甲状腺（TG）と周囲組織の血管叢．ＥＳ食道，ＦＴ脂肪組織，ＴＲ気管，Ａ動脈，Ｖ静脈，星印は血管外に漏れて硬化した樹脂をしめす．　×50．



図9 図8の甲状腺血管鋳型標本の一部を微解剖して深部を露出．A動脈，V静脈，F甲状腺の濾胞を囲む毛細血管のバスケット． ×130.

でき，このことがメチルメタクリレート単量体注入による鋳型標本の作製の成功につながったと考えられる．上述したように，メチルメタクリレート未重合単量体を主剤とした注入鋳型液は粘度が非常に低く潅流固定試料にも十分注入できる利点がある．しかし，同単量体注入鋳型液は未固定試料には強い毒性があり，同液の未固定試料注入ではマイクロウェーブ処理下でも大，小，毛細血管のレベルで無数の漏れがみられ，走査電子顕微鏡の観察に耐えない．従って，本単量体注入鋳型法は未固定生物試料には使えない．固定する場合でも，注入動物・臓器は予め潅流固定して血液を十分排除すると共に血管壁を十分保護補強しておく必要がある．また，潅流固定後10分以上経過すると血管壁が完全に固定されて弾力性を失う．このために毛細血管床への十分な注入は困難となるので注意を用する．

本論文で紹介した単量体注入鋳型法は，図2～9にしめしたように，脳組織はもちろんのこと下垂体，松果体，舌，甲状腺の血管の再現に十分適用できる．このことは，私達の低粘度半重合樹脂注入血管標本作製の経験から判断して[1-3,8-10]，本単量体鋳型法は他の臓器の血管系の再現にも広く使用できると思われ，同時に他の動物の各臓器や新鮮なものに限られるがヒトの病理解剖摘出試料の血管系の再現にも十分使用できることを示している[15,16,17]．なお，私達の最近の経験では，本法も肝内毛細胆管の再現に使用できることが証明されている．このことについては別に述べる予定である．リンパ管注入についてはある程度粘度がある方がよい鋳型が得られるという報告があるが[8,19]，本法がリンパ管鋳型にどこまで有効であるか現在検討中である．

メチルメタクリレート未重合単量体を試験内で硬化させると，その容積を35%減じる．潅流固定によって血管の内腔壁面がよく保存されているはずにも拘らず，本単量体注入鋳型法で得られる鋳型標本の表面には血管内皮細胞核の血管内腔への突出や同細胞間の境界部が必ずしも明瞭に刻印されない．これは先に述べた単量体注入鋳型剤の硬化時の収縮によるものと思われる．

本論文で示したような血管（管腔）の内腔を再現する試料（内腔充塡腐蝕標本，上記参照）は，正しくは血管（管腔）の鋳物（標本）と呼ばれるべきと思われるが，従来の記載に従って鋳型（標本）と呼んだ．

結　　論

潅流固定したラット上半身に上行大動脈より，1%の割合に過酸化ベンゾイル（触媒）と1%の割合にN, N-ジメチルアニリンを添加したメチルメタクリレート未重合単量体（ハイドロキノン含まず）を注入し，マイクロウェーブ プロセッサーで急速加温した．このメタクリレート単量体注入鋳型法は脳実質，脳下垂体，松果体，舌等の毛細血管網の再現に有効であり，これらの血管網は走査電子顕微鏡下に立体的により詳細に観察できた．

稿を終るにあたり，本研究をはじめる貴重なデータをいただいた村上宅郎教授にお礼申し上げます．また，ご指導いただいた菊田彰夫講師，大塚愛二講師，田口勇仁助手に感謝します．なお，本研究の一部は文部省科学研究費（平成3年度，一般研究C，村上宅郎，03670010）の援助をうけた．

文　　献

1) Murakami T : Applicaton of the scanning electron microscope to the study of fine distribution of the blood vessels. Arch Histol Jpn (1971) **32**, 445—454.

2) Murakami T, Unehira M, Kawakami H and Kubotsu A : Osmium impregnation of methyl methacrylate vascular casts for scanning electron microscopy. Arch Histol Jpn (1973) **36**, 119—124.

3) Murakami T : Methyl methacrylate injection replica method. in ; Principles and Techniques of Scanning Electron Microscopy. Biological Applications Vol. 6, Hayat ed, Van Nostrand Reinhold

Co., New York/Cincinnati/Atlanta/Dallas/San Francisco (1978) pp 159—169.

4) Nowell JA and Lohse CL : Injection replication of the microvascular systems for SEM. in ; Scanning Electron Microscopy/1974, IIT Research Institute, Chicago (1974) pp 267—274.

5) Hodde KC and Nowell JA : SEM of micro-corrosion casts. in, Scanning Electron Microscopy/1980/II, SEM Inc., AMF O'Hare (Chicago) (1980) pp 88—106.

6) Christofferson RM and Nilsson BO : Microvascular corrosion casting with analysis in the scanning electron microscope. Scanning (1987) **10**, 43—63.

7) Lametschwandtner A and Lametschwandtner U : Historical review and technical survey of vascular casting and scanning electron microscopy ; in ; Scanning Electron Microscopy of Vascular Casts : Mehods and Applications, Motta, Murakami and Fujita eds, Kluwer Academic Publishers, Boston/Dordrecht/London (1991) pp 1—11.

8) Ohtani O and Murakami T : Routine Methods for vascular casting and SEM. In ; Scanning Electron Microscopy of Vascular Casts : Methods and Applications, Motta, Murakami and Fujita eds, Kluwer Academic Publishers, Boston/Dordrecht/London (1991) pp 12—25.

9) Murakami T, Ohtani O, Ohtsuka A and Kikuta A : Injection replication and scanning electron microscopy of blood vessels. In ; Biomedical Research Applications of Scanning Electron Microscopy. Vol. 3., Hodges and Carr eds, Academic Press, London (1983) pp 1—30.

10) Murakami T : Scanning electron microscopy of vascular casts : a methodological review with some comments on the angioarchitecture of rat hypophysis. Zoological Science (1989) **6**, 1048—1058.

11) Taniguchi Y, Ohta Y and Tajiri S : New improved method for injection of acrylic resin. Okajimas Folia Anat Jpn (1952) **24**, 259—267.

12) Taniguchi Y, Ohta Y, Tajiri S, Okano H and Hanai H : Supplement to new improved method for injection of acrylic resin. Okajimas Folia Anat Jpn (1955) **27**, 401—406.

13) Lametschwandtner A, Lametschwandtner U and Weiger T : Scanning electron microscopy of vascular casts, techniques and applications. in ; Scanning Electron Microscopy/1984/II, SEM Inc., AMF O'Hare (Chicago) pp 663—695.

14) Murakami T : Vascular casting and scanning electron microscopy. in ; This Week's Citation Classic. Current Contents, Garfield ed, Institute for Scientific Information, Philadelphia, [Clinical Medicine (1990) Vol. 18, No. 37, p 20] [Life Sciences (1990) Vol. 33, No. 37, p 21] [Agriculture, Biology and Environmental Sciences (1990) Vol. 21, No. 37, p 20].

15) Murakami T : Pliable methacrylate casts of blood vessels : use in a scanning electron microscope study of microcirculation in rat hypophysis. Arch Histol Jpn (1975) **38**, 151—168.

16) Murakami T, Itoshima T, Hitomi K, Ohtsuka A and Jones AL : A monomeric methyl and hydroxypropyl methacrylate injection medium and its utility in casting blood capillaries and liver bile canaliculi for scanning electron micrscopy. Arch Histol Jpn (1984) **47**, 223—237.

17) Murakami T, Hinenoya H, Taguchi T, Ohtsuka A and Uno Y : Blood vascular architecture of the rat parathyroid glands : a scanning electron microscopic study of corrosion casts. Arch Histol Jpn (1987) **50**, 495—504.

18) Macciarelli G, Notolla SA, Vizza E, Kikuta A, Murakami T and Motta PM : Ovarian microvasculature in normal and hCG stimulated rabbits. A study of vascular corrosion casts with particular regard to the interstitium. J Submicrosc Cytol Pathol (1991) **23**, 391—395.

19) Ohtani O : Three-dimensional organization of lymphatics and its relationship to blood vessels in rat small intestine. Cell Tissue Res (1987) **248**, 365—374.

Fine blood vascular casting by monomeric methacrylate injection and microwave treatment

Hitoshi HINENOYA

Section of Human Morphology,

Department of Anatomy, Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. T. Murakami)

A modified injection replica SEM method was introduced. Thorough injection of a resin mixture (monomeric methacrylate containing 1% benzoyl peroxide and 1% N, N-dimethylaniline) prior to the microwave treatment prepares good and fine blood vascular casts or replicas of brain, hypophysis, pineal body, thyroid gland and other organs. These casts sufficiently withstood ionbombardment and were useful for scanning electron microscopy. In this casting, preliminary perfusion fixation prior to the resin injection was always necessary because the mixture was toxic to the vascular walls and destroyed them.