

ラット肝微小循環血流の長期観察法の開発

Long-Term Observation of Rat's Hepatic Microcirculation

○ 澤田 玲奈 (芝浦工大) 山田 晃世 (芝浦工大) 柴田 政廣 (芝浦工大)

Rena SAWADA, Shibaura Institute of Technology
Kosei YAMADA, Shibaura Institute of Technology
Masahiro SHIBATA, Institute of Technology

Abstract: A novel technique for in vivo long-term observation of hepatic microcirculation was applied to rat experimental model. Abdominal skin chamber, in which consists in transparent acryl tube and microscopic cover glass was surgically attached to rat abdominal skin right above the liver surface. The rat hepatic microcirculation was observed using our original intravital microscope-TV system. Although the artifacts occurred with the movements by respiration could not be removed from microscopic image, our novel technique could be confirmed which is useful to observe the blood flow in microvessels existing the surface of rat liver.

Key Words: hepatic microcirculation, long-term observation, intravital microscopy, Rat

1. はじめに

微小循環動態の観察は基礎・臨床医学分野を問わず、その重要性は高い。しかし、肉眼での観察が出来ず顕微鏡下での拡大観察が必要となるため、観察対象となる組織や器官は自ずと限られてくる。さらに我々の身体の大部分は表皮に覆われており、その表皮下に存在する微小血管を観察するためには、径皮的観察あるいは表皮の切開を伴う侵襲的観察に頼らざるを得ない。このような微小循環研究の現状において、数少ない微小血管血流の長期観察法として表皮への透明窓を装着したモデルが報告されている。本法は一部切除した表皮部分にガラスあるいはアクリル製透明窓を装着し、生体内を可視化しようとするものである。この透明窓装着モデルとしては、家兎の耳介(rabbit ear chamber)⁽¹⁾やラット・マウス背部皮膚(dorsal skin chamber)⁽²⁾、さらには家兎・猫の頭蓋(cranial chamber)⁽³⁾を対象としたものがあり(Fig.1 参照)、耳介と背部モデルは透過光照明でその直下の筋あるいは皮膚血流を、頭蓋モデルは落射光照明で大脳表層部微小循環血流の可視化を可能としている。これらの透明窓モデルの共通点として、呼吸や心拍等による体動の影響を比較的受けにくい部位であることが挙げられる。

一方、生体内には微小循環動態の長期観察が待ち望まれている臓器・器官は多々ある。その中でも肝臓は、生理・病態生理学的重要性に併せ、生体肝移植に用いられるように再生能力の高さにおいても特別な器官と言える。このような肝臓の微小循環動態、特に一部切除後あるいは移植後の再生過程における血流変化を径時的に観察できれば、生体肝移植術への貢献に留まらず、再生医療への寄与も期待できる。本研究では、前述の微小循環動態の長期観察法である透明窓モデルを、ラット腹部皮膚に適用し、その直下に存在する肝臓の表層部微小循環血流の長期観察が可能かどうか、その基礎的検討を行った。

2. 方法

2-1 実験対象

実験には雄の Wistar 系ラット(6-8wks,100-160g b.w)を用いた。全ての実験は芝浦工業大学動物実験倫理委員会の承認を得て行った。

Fig.2 にラット肝臓周辺の解剖学的配置図⁽⁴⁾を示す。本図からわかるようにラットの肝臓は 5 葉に分かれ、その第 3 葉(大きさ縦、約 11mm、横、約 8mm:内側右葉)⁽⁵⁾が腹部正中横隔膜下部に位置している。また、表皮から肝表面までの距離は約 5mm で、その間には他臓器はなく直接アプローチできる。本研究では、横隔膜下部皮膚を切開し透明窓を装着し、その直下に位置する第 3 葉表層部微小循環の観察を試みる。透明窓装着のためのプレパレーションおよび肝微小循環観察時はフローセン吸入麻酔下で行った。

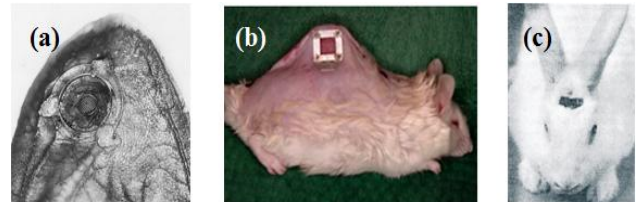


Fig.1 The transparent chamber technique for long-term observation of microcirculation. (a) rabbit ear chamber, (b) dorsal skin chamber, (c) cranial chamber.

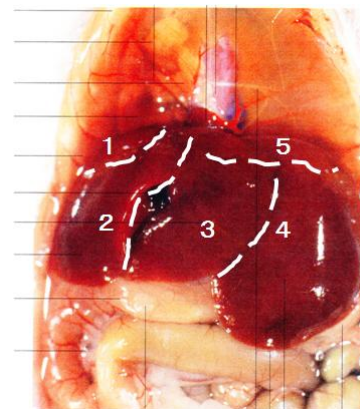


Fig.2 Anatomical location of liver in the rat abdomen. The numbers in the picture show lobe of the liver. The liver in the rat consists more than five lobes.

2-2 肝微小循環用透明窓

第3葉肝組織の解剖学的形状と配置を考慮し Fig.3 に示す形状の透明窓を試作した。内径 6mm のアクリルチューブを利用し、肝組織表面に接する部分に厚さ 0.16mm の顕微鏡用カバーガラスを装着した。透明窓の腹部への固定はアクリルチューブに設けた 8 箇所(皮膚(or 腹直筋)を縫合した。本固定法により、術後 2 日間腹腔内液の漏出がないことを確認した。呼吸による観察視野の動きを抑えるため、アクリルチューブ管壁に 23G 注射針 3 本を挿入して肝表面と観察窓とを固定できるようにした。ただし、穿刺による出血の可能性があるため、動きが大きい時のみ利用した。微小循環観察時にはラットを迎臥位に寝かせ、アクリルチューブを Z 方向微動装置に取り付けたアームで固定し肝組織表面に観察窓(カバーガラス部位)を押し付けることにより体動の影響を少なくした。

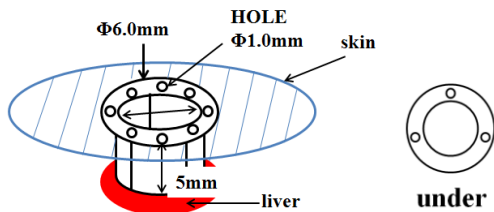


Fig. 3 Arrangement of rat abdominal skin chamber.

2-3 生体顕微鏡システム

微小循環の観察は従来から用いている生体顕微鏡システムを用いた(Fig.4)。システムの概要を簡単に述べる。顕微鏡には対物レンズから被写体までの作動距離が長い実体顕微鏡(SZH10: オリンパス)を用い、得られた画像は CCD カラーカメラを介し 21 インチモニター上に映写するとともに HDD レコーダーに収録した。21 インチモニター上での観察倍率は x50~x500 で任意の倍率が選択できる。顕微鏡照明用光源には 100W ハロゲンランプを用い、光ファイバーにより観察窓直近まで誘導し斜め上方向より落射照明で照射した。

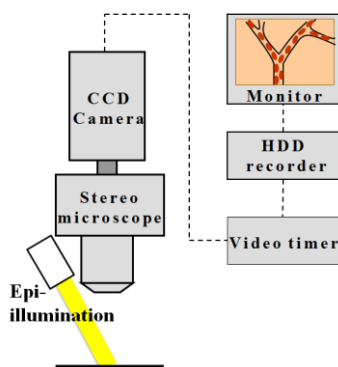
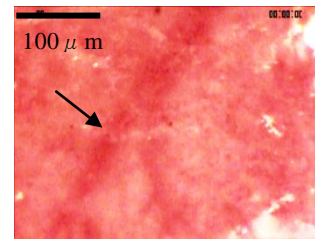


Fig. 4 Intravital microscopic system to observe the rat hepatic microcirculation.

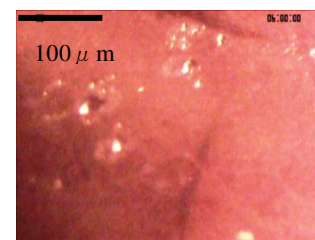
3. 結果と考察

固定用注射針を使用せずラット肝表層部微小循環血流動画を記録した。収録した動画の一部静止画像を Fig.5(a)に示す。拡大倍率はモニター上で 500 倍とした。本画像では判定できないが、実際の動画上では呼吸性の体動が十分抑えられていなかった。一方、本静止画では、画面中央(矢印部分)を流れる細静脈の合流部が不鮮明であるが、実際の画像上では血流を観察することが可能であった。

固定用注射針をセットし、体動の影響を少なくした観察例を Fig.5(b)に示す。本例も静止画で示すため分からないが、同図(a)に示した固定用注射針なしの観察例に比べ呼吸性の体動の影響は小さかった。しかし、画面左下に見える黒っぽい部分は穿刺による出血が視野内に入り込んだものであり穿刺の影響がでた。また、(a)と(b)の両観察例とともに、顕微鏡照明を斜め上から落射していることによるカバーガラスでの反射が画像に影響していることが分かる。



(a)



(b)

Fig.5 Typical examples of microscopic image in rat hepatic microcirculation obtain by normal (a) and needle fixing (b) chamber.

4. 結論

透明窓モデルをラット肝微小循環の長期観察に適用した結果、未だ多くの問題点を残すものの微小血管血流は可視化でき長期観察モデルと成りうる事が確認できた。呼吸による体動の影響を除くためには、陰圧を利用したカバーガラスと肝表面の密着などの新規方法を組み込む必要がある。さらに斜め落射方式照明による反射の影響は、2方向から落射照明することで解決したい。

参考文献

- (1) S.Ishioka, M.Shibata, K.Kosaki, Y.Sato, K.Harii, and A.Kamiya : In vivo measurement of morphometric hemodynamic changes in the microcirculation during angiogenesis under chronic α 1-adrenergic blocker treatment. *Microvasc Res*55 : 165-174, 1998
- (2) Minh TC, Ichioka S, Harii K, Shibata M, Ando J, Nakatsuka T : Dorsal bipediced island skin flap: a new flap model in mice. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* : 262-7,2002
- (3) Hermes A.Kontos : Cerebral preparations : advantage and disadvantages. *Microcirculatory technology / edited by Carleton H. Baker, William L. Nastuk. :55-64,1986*
- (4) 早川 敏之, 岩城 隆昌 : ラットの断面解剖アトラス, アドスリー, 2008
- (5) 野村慎太郎 : 細胞工学別冊マウス解剖イラストレイテッド(動画でわかる解剖手技と解剖組織像), 秀潤社, 2002