—Note—

Improvement of Pituitary Homograft under the Kidney Capsule in Mice

Shinobu AOKI, Toru R. SAITO*, Shigeo OTAKA****, Hiromi AMAO*,
Masahiro TAGAWA**, Masaki UMEDA**, Masahiro SUGIYAMA**,
and Kazuaki W. TAKAHASHI*

*Veterinary Medical Teaching Hospital, *Department of Laboratory Animal Science, **Department of Veterinary Pathology, and ***Department of Veterinary Surgery, Nippon Veterinary and Animal Science University, 1-7-1 Kyonan-cho, Musashino-shi, Tokyo 180 and ****Funabashi Farm Co., Ltd., 2-465 Kamiyama-cho, Funabashi-shi, Chiba 273, Japan*

(Received 26 July 1991/Accepted 25 September 1991)

The model of hyperprolactinemia induced by pituitary homografts under the kidney capsule has been used mainly in the field of reproductive physiology. The authors report an improved method for pituitary grafting in mice. The procedure was as follows: 1. The male pituitary glands with normal saline were aspirated into a polyethylene tube. 2. Two incisions were made in the kidney capsule. 3. The polyethylene tube with pituitary glands was inserted via a large incision. 4. Blowing air into the tube, the pituitary glands were left under the kidney capsule and normal saline streamed out of a small incision. Using this method, all pituitary grafted mice became pseudopregnant. — : KEY WORDS: graft, mouse, pituitary gland

マウス下垂体の腎被膜下移植手術法の改良

青木 忍・斎藤 徹*・大高茂雄****・天尾弘実*・
多川政弘***・梅田昌樹**・杉山公宏**・高橋和明*

日本獣医畜産大学附属家畜病院

*日本獣医畜産大学実験動物学教室

**日本獣医畜産大学獣医病理学教室

***日本獣医畜産大学獣医外科学教室

****株式会社船橋農場

現在、組織移植 (graft) は種々の研究分野ならびに臨床面において広く応用されている。特に、今日の内分泌学の分野における目覚ましい進歩には graft の貢献する所が多であったことも周知の事実である。

今回、著者らはマウスの母性行動の発現機構を追求していく過程において、下垂体の腎被膜下への移植を試みた。従来の方法 [2] に基づき実施したが、腎被膜下に

挿入した下垂体が被膜切開部位より押し戻され、被膜下に活着したものは、極く少数例であった。そこで、種々の検討を重ね、このような問題点を解決できる方法を考案した。この改良法により雌マウスの腎被膜下に雄マウスの下垂体を移植し、偽妊娠期間を観察したので報告する。

供試動物: VCS 系雌雄マウス (生後 8～12 週齢) で

あり、雌の左腎に雄の下垂体を移植した。

麻酔：ペントバルビタールナトリウム（大日本製薬株式会社；ネンブタール®）40～50mg/kg（体重）を腹腔内に注射した。

除毛：アニマルクリッパーにて左腹側の体毛を広めに除去した。

消毒：術野全面を酒精綿（70%エタノールに2%の割合で、グルコン酸クロルヘキシジンを添加）にて消毒した。

手指を4%グルコン酸ヘキシジン（住友製薬株式会社；ヒビスクラブ®）にて洗浄、消毒した。

器具：Fig. 1 に示したような器具を滅菌して使用した。

手術法：

- 1) 内径0.8～1.0×外径1.4～1.7mmのMRC製ポリエチレンチューブの先端を腎被膜下に挿入し易いように鋭利にカットしておく。
 - 2) 雄マウスより摘出した下垂体を、用意したポリエチレンチューブ内に滅菌生理食塩液とともに収容しておく（Fig. 2）。
 - 3) 麻酔された雌マウスを右横臥位に保定する。
 - 4) 術野を消毒し、有窓布で覆う。
 - 5) 最後肋骨より約1cm尾側よりのところで皮膚を約2cm切開し、続いて腹壁の筋肉をなるべく血管を避けて切開する。
 - 6) 脂肪層の下にある腎臓を、腹腔外に出す。
 - 7) 有窓布の上に露出した腎の外側縁上の頂点部の被膜をチューブが挿入できる大きさに約1.5～2.0mm, No. 11のメスにて腹側面に向けて切開する（Fig. 3）。
 - 8) 同様に、外側縁上の尾端部被膜も生理食塩液が流出できるように約0.5mm切開する。
 - 9) チューブを腎実質面に圧力をかけて被膜と線維被膜下組織の間にポケットを作るように挿入する（Figs. 4, 5）。
 - 10) チューブ内に残存する下垂体が被膜下に充分挿入された時点で、チューブの一端より空気を送り込む。この時、生理食塩液のみが被膜下より流出し、下垂体が被膜下に残存する（Fig. 6）。
 - 11) 移植部分に懸濁水性プロカインペニシリンG明治®（明治製菓株式会社）を1～2滴、滴下する。
 - 12) 腹壁の筋肉を絹糸で縫合する。
 - 13) 皮膚を絹糸で結紮縫合する。
- 手術に際して留意すべき点を列記すると以下の如くで

Fig. 7. Mean duration of the diestrus in pituitary grafted mice. The first day of appearance of leucocytes in vaginal smear is designated as day 1. PSP and lines represent pseudo-pregnancy induced by vasectomized mice and $\pm$ SD, respectively.

ある。①腎臓を有窓布に出す時、腎臓周囲の脂肪を静かに引き出すようにすると、腎実質の損傷を少なくすることができる。②皮膚および腹筋の切開を大きくしすぎなければ、一旦、引き出した腎臓が腹腔内に戻ることはない。③腎臓の被膜を切開する場合メスを上向きに用いると腎実質を深く傷つけずにすむ。④チューブ先端のカット面を平滑にしないと腎臓の被膜を裂いてしまうので注意が必要である。なお、被膜切開時およびチューブの挿入時に腎実質より多少出血が見られるが、自然に止血する。

次に、この改良した手術法を用いて生後8～12週齢のIVCS系マウスにおける偽妊娠の発現状態を観察した。Recipientとして雌12匹を使用し、雄の下垂体1個移植群および2個移植群をそれぞれ6匹ずつもうけた。手術時の雌の平均体重は24.8 $\pm$ 1.6g（平均値 $\pm$ 標準偏差）であった。飼育環境は以下の如くであった。温度24 $\pm$ 1℃。湿度55 $\pm$ 5%。換気回数、オールフレッシュエアー方式にて1時間12回。照明条件、午前5時点灯・午後7時消灯の14時間照明。ケージ内照度、75ルクス以上であった。ケージは金網床アルミ製（210W×330D×180Hcm）を用いた。固型飼料（日本クレア株式会社；CA-1）を飽食させ、水は自由摂取とした。

下垂体移植後、1日1回午前中に腔垢の検査を行い、偽妊娠の発現状態を観察した。腔垢の検査は以下の方法を用いた。小ビペットにて腔内を水で2～3回洗い、洗

Fig. 8. Micrographs of pituitary graft on the 6th week after the operation a) HE×60 b) HE×600 G: graft R: renal tissue

った液をスライドグラスにとり、乾燥後、ギムザ染色を行い鏡検した。腔垢像は原則として信永らの分類に従って判定し〔3〕、腔垢に多数の白血球が最初に出現した日を偽妊娠第1日目とした。

下垂体1個移植群と2個移植群の偽妊娠期間とサイクルをFig. 7に示した。下垂体を1個移植した群では、平均7.7～8.8日間であるのに対し、下垂体を2個移植した群では平均9.5～12.5日であり、2個移植の方が1個移植群に比べて1日から5日間長い偽妊娠期間を示した ($p < 0.05$)。

移植手術後、約6週間で1個体を解剖し、移植した下垂体の状態を観察した。移植した下垂体は、肉眼的には腎被膜下に直径、約2×3mmの白色斑状物として存在し、腎被膜に付着した脂肪組織との区別は可能であった。組織学的には、下垂体は腎被膜下に帽子状に拡がり、組織内には毛細血管が存在していた。また、隣接する腎実質には、軽度のリンパ球浸潤と結合組織増生がみられた (Figs. 8-a, b)。

以上の成績より、移植した下垂体が腎被膜下に活着し、ホルモン、すなわちプロラクチンの分泌を促進しているものと考えられた。

本法は従来の手技と異なり、腎被膜に2ヵ所切開を施し、かつポリエチレンチューブを使用することにより、下垂体を容易に腎被膜下に収容することができた。その結果、腎および下垂体に与える損傷も従来の方法に比べ少なくすることができた。

さらに本手術方法を、ラット、ウサギの下垂体の腎被膜下移植に試みたところ、チューブの口径 (ラット: 内

径1.2×外径2.0mm, ウサギ: 内径2.0×外径2.7mm) を換えることにより、マウスの場合と同様、良好な成績を得ることができた。

要 約

下垂体腎被膜下移植は高プロラクチン血症の動物モデルとして繁殖生理の分野で、主に用いられてきた。今回、マウス下垂体の腎被膜下移植法を改良したので報告する。

先に、ポリエチレンチューブ内に雄マウスの下垂体を1～2個、生理食塩液とともに収容しておく。次いで、同系統の雌マウスの腎被膜を大小2ヵ所切開する。一方の大きい切開創よりチューブを挿入し、チューブの一端より空気を送りこむことにより、他方の切開創より生理食塩液のみ排出され、下垂体は腎被膜下に残存する。本法では、下垂体が腎被膜下から押し戻されることがなく、確実に腎被膜下に収めることができ、すべてのマウスに偽妊娠を生じさせることができた。

本手術法に対して、貴重なご助言を頂きました東北大学医学部附属動物実験施設の信永利馬教授にお礼申し上げます。

文 献

- 〔1〕 守 隆夫 (1991). 畜産の研究, **45**, 135-142.
- 〔2〕 中山純子・長澤 弘 (1986). ラボラトリーアニマル, **3**, 37-40.
- 〔3〕 信永利馬・菊地通子・大和田一雄・中村勝美 (1978). 実験動物技術, **13**, 73-79.

Explanation of Figures

Fig. 1. The surgical instruments for grafting the pituitary in to the mouse

Fig. 2. Preparation of the donor Aspirating male pituitary glands into a polyethylene tube

Fig. 3. Preparation of the recipient Cutting the capsule of left kidney with a scalpel blade

Fig. 4. Inserting the polyethylene tube with pitui-

tary glands under the kidney capsule

Fig. 5. An illustration of Fig. 4. The arrow indicating the pituitary into the polyethylene tube under the kidney capsule

Fig. 6. The pituitary gland transplanted under the kidney capsule

Fig. 1

Fig. 2	Fig. 3
Fig. 4	Fig. 5
Fig. 6	