研 究

耳管の硬組織非脱灰研磨標本

広野 喜信 ・ 内藤 泰 ・ 本庄 巖
森 千里* ・ 星野 一正*

Undecalcified Ground Sections of the Eustachian Tube

Yoshinobu Hirono, Yasushi Naito, Iwao Honjo,
Chisato Mori and Kazumasa Hoshino
(Kyoto University)

Undecalcified ground sections can be made by polyester resin embedding. With this technique serial vertical and horizontal sections of the eustachian tube of the human cadaver can be prepared in 1 month. The time required is much shorter than the conventional celloidin section method which usually takes at least 6 months. The results were comparable to those of the celloidin sections for anatomical study of the eustachian tube.

Key words: polyester resin embedding, undecalcified ground section, eustachian tube

はじめに

樹脂包埋は電子顕微鏡による観察を目的に始められたもので、メタクリレート、スチレン、エポキシ、ポリエステルなどの樹脂を用いる方法が開発されてきた。パラフィン包埋に比べ細胞内構造保存に優れ、酵素活性や抗原性も失われないので、最近、光学顕微鏡標本作成にも応用されている¹⁾²⁾。また樹脂包埋すると、骨組織を脱灰せずに薄切、研磨でき、類骨と石灰化骨を判別できるので、骨の組織学的動態計測に応用されている³⁾。

われわれは樹脂包埋による硬組織非脱灰研磨標本を側頭骨に応用して、耳管の垂直断および

水平断の連続切片を短期間で作成し、耳管および周囲組織の形態を観察できたので報告する。

対 象

ホルマリン固定の82才女性の屍体頭部で、右側は耳管長軸に垂直な、左側は水平な連続切片を作成した。

方 法

1. トリミング

最初に頭部を矢状面で正中断した。耳管は概ね外耳道上端と硬口蓋前下端を含む水平面内を走行するので、この平面に平行な上2 cm、下3 cmの距離の面で、大型ボンカッター（マルトー MC-901）を用いて切断した。後方は外耳道

後端で正中面に垂直に, 前方は耳管咽頭口を明視下におき, 後面から 5~6 cm の距離で正中面に垂直に, 外側は鼓膜を標本に含め正中面から約 5 cm の距離で正中面に平行に切断した (図 1).

2. 樹脂包埋 (表 1)

① 脱水, アセトン置換

エタノールで十分に脱水した (12日間) 後, アセトンに 2 日間ずつ 2 回通してエタノールをアセトンに置換した.

② 樹脂浸透

樹脂はポリエステル系のマルトー硬組織包埋樹脂 A 液と B 液の 8 : 2 の割合の混合液に, 容量比で 1.5% の重合促進剤を加えたものを用いた. 樹脂 30% とアセトン 70% の混合液に組織片を入れ, 樹脂真空含浸装置 (マルトー MD-200) で 2 日間真空吸引した. 次に樹脂 50% とアセトン 50% の混合液の中で, 組織片から気泡が生じなくなるまで約 4 日間真空吸引した. 最後に樹脂 100% に移し, 約 2 日気泡が出なくなるまで真空吸引し, 樹脂浸透を完了した.

③ 重合硬化

50°C で 8 時間, 60°C で 8 時間加温し, 室温で約 4 日間放置し重合硬化させた. なお硬化の際, 組織片の切断面を容器の底に接するようにした.

3. 薄切

① 包埋した組織片のトリミング

余分の樹脂をマルトーカッター (MD-101) で切断し, さらに耳管の垂直断に用いた組織片では, 耳管長軸に垂直に切断するため, 図 2 の

図 1 頭部のトリミング

表 1 樹脂包埋の方法

脱 水	70% アルコール (2 日間)	樹 脂 浸 透 硬 化	↓	
	↓		樹 樹脂 30% + アセトン 70% (2 日間)	
	80% アルコール (2 日間)		↓	
	↓		浸 樹脂 50% + アセトン 50% (約 4 日間)	
	90% アルコール (2 日間)		↓	
	↓		樹 樹脂 100% (約 2 日間)	
	99% アルコール (2 日間)		↓	
	↓		恒 恒温器 (50°C) (8 時間)	
	無水 アルコール (2 日間)		↓	
	↓		恒 恒温器 (60°C) (8 時間)	
置 ア 換 セ ト ン	無水 アルコール (2 日間)	室 温	↓	
	↓		室 温 (約 4 日間)	
	ア セ ト ン (2 日間)			
ア セ ト ン	↓			
	ア セ ト ン (2 日間)			

ごとくトリミングした。

② マウント

垂直断では下面，水平断では外側面を素焼のマウント台に瞬間接着剤で接着した。

③ 薄切

マウントした組織片をクリスタルカッター（マルトー MC-411）に装着し，直径150mm，厚さ0.6mmのMD式ダイヤモンドブレードで切断した。これで高さ40mm，長さ80mmまで薄切可能である。1.2mm毎に連続切片を作成し，厚さ400～500 μ の標本が得られた（図3）。

4. 研磨

HT式硬組織研磨装置を用いた。切片をのり

図2 垂直断に用いた組織片のトリミング

図3 クリスタルカッターによる薄切

付耐水研磨紙（800番）に水貼し，鏡面に水貼した耐水研磨紙（1500番）で，厚さ約200 μ まで研磨した。

5. 染色

耳管軟骨，筋肉，骨，腺組織等を色彩で明瞭に識別するために，トルイジン青，ヘマトキシリン，エオジンの重染色を行った（表2）。通常のヘマトキシリン，エオジン染色も行った。

結 果

1. 耳管の垂直断（図4）

軟骨はやや赤みがかった青に，腺組織は青に，筋肉は赤に，骨は赤褐色に染まった。①耳管軟骨の形態，②口蓋帆張筋，口蓋帆挙筋の走行，③耳管粘膜下組織，ローゼンミューラー窩の状態，④頭蓋底，内頸動脈と耳管との関係が明確に示された。口蓋帆張筋は耳管咽頭口付近では頭蓋底に付着し（図4 A），耳管軟骨部中央部でのみ耳管軟骨に付着していた（図4 B）。

2. 耳管の水平断（図5）

①耳管の走行は直線ではなく，前方に曲がっていること（図5 A），②口蓋帆張筋が耳管外側の軟部組織に付着していると思われること（図5 B），③口蓋帆挙筋の走行と軟口蓋への放射状の停止（図5 C，D），④ローゼンミュー

表2 染色方法

1%トルイジン青	
↓	←流水水洗
無水アルコールで分別	
↓	←流水水洗
ヘマトキシリン (Mayer)	
↓	←流水水洗
エ オ ジ ン	
↓	
ア ル コ ー ル	
↓	
キ シ レ ン	
↓	
封 入

図4 A 耳管咽頭口付近の垂直断

ET—耳管 C—耳管軟骨 TVP—口蓋帆張筋 LVP—口蓋帆挙筋 →—帆張筋の頭蓋底への付着

図4 B 耳管軟骨部中央部の垂直断

ET—耳管 C—耳管軟骨 TVP—口蓋帆張筋 LVP—口蓋帆挙筋 ▲—帆張筋の耳管軟骨への付着

図4C 耳管骨部の垂直断 (ヘマトキシリン・エオジン染色)

ET—耳管 TT—鼓膜張筋 ICA—内頸動脈

ラー窩の広がり が明確に示された。

考 案

耳管およびその周囲組織の解剖学的研究は古くから行われている。しかし従来の報告はいずれも脱灰操作を必要とするセロイジン包埋法によるものであった^{4)~9)}。そのため薄切までに少なくとも6カ月を要する⁹⁾。樹脂包埋による硬組織非脱灰標本では、1カ月で標本が完成し、従来の方法と比して著しく早く結果を得ることができた。染色性も良好で、耳管やその周囲組織の形態観察を目的とするなら、セロイジン包埋の切片と遜色なかった(図4, 5)。連続切片は1.2mm毎に作成したが、耳管やその周囲組織の構造を把握するのに十分で、三次元グラフィックスによる耳管の立体構築の基礎データとなった¹⁰⁾。また核磁気共鳴画像との対比にも利用できた¹¹⁾。

今回は肉眼解剖的な観察を目的としたので厚さ約200 μ の非脱灰研磨標本を作成し、細胞レ

ベルの組織学的観察は不能であった。しかしHT式硬組織研磨装置を用いた手による研磨でも熟練すれば50 μ まで薄くできる。また機械式研磨機(マルトースピードラップML-150Dc)を用いれば10 μ まで研磨でき、セロイジン包埋法のマイクロトームで薄切した標本と同等に組織学的観察が可能である。

成人耳管の長軸に水平な切片による解剖学的な研究は少ない⁴⁾。耳管と上咽頭との関係、口蓋帆張筋、口蓋帆挙筋の軟口蓋への走行方向等、垂直断ではわかりにくい情報が得られ、耳管やその周囲組織の解剖学的理解に必要であると思われる。

ま と め

樹脂包埋による硬組織非脱灰研磨標本で、耳管の垂直断および水平断の連続切片を1カ月で作成し、耳管およびその周囲組織の形態を観察できた。

A: 耳管上部

B: 耳管中央部

C: 耳管より下部

D: Cより約3.6mm下方

図5 耳管の水平断

ET—耳管 C—耳管軟骨 TVP—口蓋帆張筋 LVP—口蓋帆挙筋
ICA—内頸動脈 RF—ローゼンミュラー窩

参考文献

- 1) 瀬野尾章, 他: 光顕用樹脂包埋法とその特徴 *Medical Technology* 11 : 335~340, 1983.
- 2) 勝又 修, 他: 光学顕微鏡標本作製への迅速凍結置換樹脂包埋法の導入. *病理と臨床* 2 : 726~730, 1984.
- 3) 今野俊幸, 他: 非脱灰骨薄切片のための包埋染色法. 骨形態計測 (高橋栄明編). 1~8頁, 医歯薬出版, 1981.
- 4) Zöllner F : *Anatomie, Physiologie, Pathologie und Klinik der Ohrtrompete und ihrer diagnostisch therapeutischen Beziehungen zu allen Nachbarschaftserkrankungen. Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde der Gegenwart* Berlin Springer-Verlag, 1942.
- 5) Graves GO, et al : The eustachian tube. *Arch Otolaryngol* 39 : 359~397, 1944.
- 6) Aschan G : The anatomy of the eustachian tube with regard to its function. *Acta Soc Med Upsal* 60 : 131~149, 1955.
- 7) 上村卓也: 耳管とその周囲組織の機能的構造. *耳鼻と臨床* 7 : 184~200, 1961.
- 8) Djerić D, et al : Anatomical variations and relations of the bony portion of the eustachian tube. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 99 : 543~550, 1985.
- 9) Sando I, et al : A method for the histopathological analysis of the temporal bone and the eustachian tube and its accessory structures. *Ann Otolaryngol* 95 : 267~274, 1986.
- 10) 森 一功, 広野喜信, 本庄 巖: 耳管の三次元コンピュータグラフィックス. *日耳鼻* 90 : 736~740, 1987.
- 11) Naito Y, Hirono Y, Honjo I, et al : magnetic resonance imaging of the eustachian tube : A correlative anatomical study. (submitted)

(原稿採択: 昭和62年2月16日
別刷請求先: 広野喜信
〒650 神戸市中央区港島4-6
神戸市立中央市民病院耳鼻咽喉科)