凍結割断レプリカ法によるラット切歯歯髓血管の観察

田 畑 正 志 仙 波 輝 彦 和 田 薫

鹿児島大学歯学部口腔解剖学教室第1（主任：仙波輝彦教授）

〔受付：昭和62年4月10日〕

The blood vessels in rat incisor pulp by the freeze-fracture method

Shoji Tabata, Teruhiko Semba and Kaoru Wada

Department of Oral Anatomy, Kagoshima University

Dental School, Usuki-cho, Kagoshima 890 Japan

(Chief: Prof. Teruhiko Semba)

〔Accepted for publication: April 10, 1987〕

Key words: Blood vessels / rat incisor pulp / TEM / freeze-fracture method

Abstract: The blood vessels in the rat incisor pulp were studied by transmission electron microscopy (TEM) of freeze-fracture replicas. The fenestrae of fenestrated capillaries were randomly distributed, circular and 50 to 60 nm in diameter. The coalescence of about 30 to 40 fenestrae constituted a fenestrated area. Nonfenestrated areas were so extensive that fenestrated areas were widely separated. *En face* views were obtained of junctions between adjacent endothelial cells of continuous capillaries and venulae. The junctions of continuous capillaries were thought to be discontinuous zonula occludens, rather than perfect zonula occludens, because some gaps of about 10 nm could be seen in them. The junctions of venulae were the tight junctions constituting of 1 to 2 strands and the low profiles of linear creases.

緒 言

硬組織に周囲を包まれ、保護されている構造において歯髓は脳に似ている。事実かなり太い静脈でさえ、その中膜の発達が悪いことなどは類似性があるといえる¹⁾。ところが毛細血管の形態に関しては、かなり違ってくる。血液脳関門^{2,3)}で示されるように、脳では毛細血管はすべて連続型で、物質の透過性はかなり悪い。これに対し、例えばラット切歯歯髓では、その微小領域に有窓型と連続型の両型の毛細血管が、それぞれ局在している⁴⁾。このことは、硬組織特に象牙質形成とい

う歯髓の機能に対して、歯髓中の血管が、物質供給の面から応えた結果だと考えられる。果たして、この血管の透過性に関わる構造は、どのように形成されているのだろうか。この疑問を明らかにするため、著者らは凍結割断レプリカ法を用いた。

凍結割断法は1950年代後半 Steere により開発され、その後1966年 Branton により、この方法での膜の内部が見えることが示された⁵⁾。この方法の利点は広い範囲で膜の、正確には膜内部の正面観 (*en face* views) を得ることができることである。例えば超薄切片法を用いて、内皮細胞間の接合状態を検索するのは、それらの二次元的構造を詳細によることはできても、三次元的広がり

把握することに非常な困難をとまなう。そのため物質の血管内皮通過に関する論争に、なかなか終止符が打たれないでいるのが現状であり⁶⁾、このことについては考察で再び述べる。本論文の研究法として用いた凍結割断法は現在のところ、この問題に対する最も良い解決法であると考えるので、得られた結果を報告する。

材料および方法

20~30日齢の Wistar 系ラットを3.0%グルタルアルデヒド (0.1M cacodylate buffer, pH 7.4) で灌流固定し、下顎切歯を取り出した。同固定液中で4時間、氷水温下にて浸漬固定した。固定終了直前、実体顕微鏡下でピンセットを用いて、エナメル質と象牙質を静かに取り除き、象牙芽細胞が付着した状態の歯髄を取り出した。このようにすると、脱灰操作を省けて便利である。cacodylate buffer で数回洗浄後、phosphate buffered saline に30%の割合に溶かしたグリセリンに一晚、氷水温下で浸漬した。

凍結は真空ポンプで急速に減圧し、スラッシュ状を呈した液化窒素中に、試料台ごと試料をすばやく投入して行った。エイコー社製 FD-3 型凍結割断装置を用いて、高真空 (3×10^{-7} Torr 以下)、低温 (-130°C) 下で凍結割断後、白金で回転蒸着し、炭素を上方から蒸着してレプリカを得た。超薄切片の作製法については、以前に報告した通りである⁴⁾。観察は日本電子 200CX 型もしくは日立 H300 型透過電顕を用いて行った。レプリカを撮影したネガフィルムは図6を除き1回反転した後、印画紙に焼き付けた。このため蒸着量の多い部分は白く、少ない部分は黒く見える。

結 果

本研究には切縁側に近い切歯中部を材料に用いた。この部位には象牙芽細胞層の中に窓型毛細血管が、またこの細胞層直下には連続型毛細血管が存在するといったように、二種類の毛細血管が近接した距離内に存在する。これは凍結割断法のような偶然性の多い技術を用いる場合、目標とする血管の観察頻度が多くなるという利点をもっている。以下三種の血管について観察所見を述べる。

有窓型毛細血管 (Fig. 1 ~ Fig. 3)

切歯中部より切縁側にかけて、象牙芽細胞層の terminal web 直下に毛細血管網が存在する⁷⁻¹⁰⁾。ここに見られる毛細血管は象牙質が切縁側へ成長するに従い、連続型からしだいに窓型へと形態変化する⁴⁾。内皮細胞の窓は象牙質側に向って分布する傾向が特に強く、その径は 50~60 nm とほぼ均一である。その形は正円に近く、P面(P-fracture face)のくぼみE面(E-fracture face)の突出として認められる。その中心部には超薄切片法での隔膜(diaphragma)に見られる結節(central knob)と同等構造物と思われる肥厚部分が見られる場合もある。窓は形質膜小胞の開口部に比べてその径が大きくまたその底面が浅いので、両者の区別は容易である。窓は30~40個がひとつの集団として有窓野(fenestrated area¹¹⁾)を形成するが、これらの窓の配列についてはこの有窓野の中で一定の規則的分布を見出し得なかった。また有窓野相互間には窓を持たない幅広い内皮部分(nonfenestrated area)が介在し互いに隔てられている。なお窓状構造のなかには底面が極端に浅く膜内粒子を認め難いものがある。これらは窓に黒い縁どりが見られることにより、ようやくその存在が認められ、これらは窓の形成過程にあるものであろうと考えている。

連続型毛細血管 (Fig. 4 ~ Fig. 6)

象牙芽細胞層直下あるいはそれより内側の歯髄中に見られる毛細血管は連続型である。連続する内皮細胞中に含まれる形質膜小胞の数はあまり多くない。凍結割断レプリカ法の利点のひとつは、内皮細胞相互の接合部分の正面観を広い範囲に得ることができることである。ここではP面での隆起とE面での溝から成る内皮細胞間の密着結合(tight junction)が認められる(Fig. 6)。ほぼ平行に走る2~3条のストランド(strands)は、ところどころで分断し結果として幅 10 nm 程の不連続部よりなる間隙を作っている。この結合は内皮細胞間を完全にシールしているわけではないので、密着帯(zonula occludens)というよりは不連続密着帯(discontinuous zonula occludens)と呼ぶのが適切であるように思える。

静脈性の血管 (Fig. 7 ~ Fig. 9)

歯髄中には中膜が欠如してあたかもその構造は毛細血管様ではあるが、その径が大きいことからそれとは言い難い静脈性の血管が多数存在している。内皮細胞間の接合部分には、P面上の隆起とE面上の溝として認められる1~2条のストランドが見られる。また静脈性の血管には線条ひだ(linear crease¹²⁾)と呼ばれる構造がP面上では畝状隆起として、E面上では溝状として存在している。線条ひだの存在は静脈性の血管の特徴のひとつである。Fig. 9に見られるように、E面上のストランドの溝の中に多数の膜内粒子が存在している。

考 察

ラット切歯歯髄には連続型と有窓型の両型の毛細血管が存在している¹³⁾。それらは歯髄中に混在しているわけではなく、かなり局在性を示している。有窓型毛細血管は切歯中部の young odontoblasts¹⁴⁾ と呼ばれる象牙芽細胞層中より出現し始め、切歯が切縁側に成長するにつれ連続型より有窓型へと形態変化をおこす⁴⁾。連続型毛細血管は象牙芽細胞層直下に一層をなして見られる^{9, 10)}。このように微小領域に2種類の毛細血管がそれぞれ局在している切歯歯髄は、血管の形態と機能の関連を研究する上でとくに有用な材料である。

凍結切断法を用いた有窓型毛細血管の窓に関する報告は、すでに小腸および膀胱を用いて行なわれている¹⁵⁾。切歯歯髄中の有窓型毛細血管の窓は、その形および径において、小腸のものと大差ないと思われる。ところがその分布状態に著しい違いが認められる。

小腸の有窓型毛細血管は窓が非常に密集して有窓野を形成し、しかも窓のない内皮部分である細胞質稜(cytoplasmic crests)が狭い、という特徴を持つのに対し、歯髄のものは有窓野における窓の密集性は低く、窓のない内皮部分は非常に広い。このことは歯髄有窓型毛細血管の体液透過量が、小腸のものに比べて明らかに少ないことを物語っていると考えられる。

次に、連続型毛細血管の隣接する内皮細胞間の接着装置のことについて述べる。分子量およそ4万、径約3 nmの西洋ワサビペルオキシダーゼ

(HRP)を用いたKarnovsky¹⁶⁾のトレーサー実験によると、連続型毛細血管の場合、内皮細胞間をHRPが通過できることから、彼はそこに幅4 nm程度の間隙があると考えた。内皮細胞間の結合は密着帯(zonula occludens)ではなく密着斑(macula occludens)であると論じた。一方、Paladeらのグループによると、血管内皮の細胞間接合部のほとんどは形態的にタイト(tight)な状態であり、機能的に11 nmの大きさのフェリチンから3 nmのミオグロビンあるいは2 nmのhemepeptideに対して透過性を示さなかった¹⁷⁻²⁰⁾。このように物質の毛細血管内皮通過の問題に関してはいまだ定説を得るに至っていない⁶⁾。

凍結切断法の利点は膜、正しくは膜内部の広い正面観を得られることである。この方法を用いると、広い範囲に隣接する内皮細胞間の接合部分を観察できる。歯髄の連続型毛細血管の場合、幅10 nm程度の間隙が接着装置のストランド中に点在していた。実際にはこの方法で、内皮細胞間の接合面における細胞膜の真の表面での微細構造に関して、直接情報を得ることはできないが、著者らは、ここに述べた間隙の存在がこの部位で小物質が出入りしていることを、形態的に反映しているものだと考えている。

Simionescuら¹²⁾は、凍結切断レプリカ法を用いて筋組織中の血管を観察している。それによるとタイト結合のストランドに関して、細動脈と毛細血管はE面上の溝に多数の膜内粒子を入れている。歯髄の場合、静脈性の血管においても同様に、E面上の溝に膜内粒子を多数残すという結果を得た。このようなことは、他の上皮のタイト結合ではめったに見られないことである(そのようなまれな例は文献21)を参照)。絶えず流れ続ける血液に対して、細胞膜外葉を安定化させるための内皮の適応性を示すものだと理解される。

終生成長を続けるラット切歯の歯髄に存在する毛細血管は、連続型から有窓型へと形態変化する⁴⁾。なかんずく、その中部は変化中のものが多く見られるため、窓の形成過程を研究するのに好都合の材料であり、部位でもある。著者らは、この部位の内皮細胞に、底面のかかなり浅い円形の輪郭をもった構造を認めた。その形状とか径が通常

の窓構造と一致すること、さらにこの部位で窓形成が盛んに進行していることなどから、我々は、それらが窓形成過程の一段階を示す構造ではないかと考えている。Lombardi ら²²⁾は、単離クローン化した牛副腎皮質内皮細胞を用いて、phorbol myristate acetate によりその窓の形成を増加方向へ刺激を行った。その結果、同様の円形輪郭をもった浅い凹み構造が出現すると報告し、彼らもこの構造が窓形成過程の一段階を示すものだと考察している。

結 論

凍結切断レプリカ法を用いてラット切歯歯髄中の血管を観察し、次のような結論が得られた。

抄録：凍結切断レプリカ法を用いてラット切歯歯髄中に存在する血管を観察した。有窓型毛細血管の窓は円形でその径は 50~60 nm と均一である。窓は30~40個がひとつの集団として有窓野を形成する。有窓野相互間には幅広い無窓野が介在し互いに隔てられている。連続型毛細血管の内皮細胞間の接着装置は、ところどころに 10 nm 程の間隙をもつ2~3条のストランドから成る不連続性密着結合である。静脈性の血管の内皮間接着装置は1~2条のストランドから成るタイト結合と線条ひだにより形成されている。

文 献

- 1) 藤田尚男, 藤田恒夫: 標準組織学, 第2版, 各論, pp. 1-35, 医学書院, 東京, 1984.
- 2) Dobbing, J.: The blood-brain barrier. *Physiol. Rev.* **41**: 130-188, 1961.
- 3) Reese, T. S. and Karnovsky, M. J.: Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell Biol.* **34**: 207-217, 1967.
- 4) 田畑正志, 仙波輝彦: ラット切歯歯髄毛細血管の部位的变化, 歯基礎誌 **27**: 1055-1064, 1985.
- 5) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. D. (中村桂子, 松原謙一監訳): 細胞の分子生物学, 上巻 pp. 148-159, 教育社, 東京, 1985.
- 6) 山元寅男: 毛細血管の微細構造と透過性, 細胞, 12巻1号, pp. 6-11, ニューサイエンス社, 東京, 1985.
- 7) James, W. W.: The blood capillary system of the odontoblast layer of the dental pulp. *J. Anat.* **89**: 547-549, 1955.
- 8) Adams, D.: Peripheral capillaries in the rodent incisor pulp. *J. Dent. Res.* **38**: 969-978, 1959.
- 9) 仙波輝彦: 象牙質の体液流動に関する形態学的考察, 歯歯紀, 第2巻, pp. 1-9, 1982.
- 10) 仙波輝彦, 田畑正志, 山本博崇: 合成樹脂鑄型法によるラット下顎切歯血管の立体構築について, 鹿大医誌 **35**: 141-152, 1983.
- 11) Fawcett, D. W.: Bloom and Fawcett, A Textbook of Histology. 11th ed. pp. 367-405, Igakushoin/Saunders International Edition, Tokyo, 1986.
- 12) Simionescu, M., Simionescu, N. and Palade, G. E.: Segmental differentiations of cell junctions in the vascular endothelium. The microvasculature. *J. Cell Biol.* **67**: 863-885, 1975.
- 13) Semba, T. and Ishida, M.: On the fluid flow in the pulp of young rat incisor. *Proc. 10th Int. Cong. Anat.*, Yamada, E., ed., Science Council of Japan, 409, 1975.
- 14) Takuma, S. and Nagai, N.: Ultrastructure of rat odontoblasts in various stages of their development and maturation. *Arch. Oral Biol.* **16**: 993-1011, 1971.
- 15) Simionescu, M., Simionescu, N. and Palade, G. E.: Morphometric data on the endothelium of blood capillaries. *J. Cell Biol.* **60**: 128-152, 1974.
- 16) Karnovsky, M. J.: The ultrastructural basis of capillary permeability studied with peroxidase as a tracer. *J. Cell Biol.* **35**: 213-236, 1967.

- 17) Simionescu, N.: Cellular aspects of trans-capillary exchange. *Physiol. Rev.* **63**: 1536-1579, 1983.
- 18) Bruns, R. R. and Palade, G. E.: Studies on blood capillaries. II: Transport of ferritin molecules across the wall of muscle capillaries. *J. Cell Biol.* **37**: 277-299, 1968.
- 19) Simionescu, N.: 毛細血管透過性の構造的基盤. *生体の科学* **27**: 152-161, 1976.
- 20) Palade, G. E., Simionescu, M. and Simionescu, N.: Structural aspects of the permeability of the microvascular endothelium. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* **463**: 11-32, 1979.
- 21) Claude, P. and Goodenough, D. A.: Fracture faces of zonulae occludentes from "tight and leaky" epithelia. *J. Cell Biol.* **58**: 390-409, 1973.
- 22) Lombardi, T., Montesano, R., Furie, M. B., Silverstein, S. C. and Orci, L.: Endothelial diaphragmed fenestrae: *in vitro* modulation by phorbol myristate acetate. *J. Cell Biol.* **102**: 1965-1970, 1986.

EXPLANATION OF FIGURES

- Fig. 1 A fenestrated capillary in the odontoblastic layer. (10,000×)
- Fig. 2 Freeze-fracture replica of a fenestrated capillary in the odontoblastic layer. The fenestrations are seen as circular grooves on the P-fracture face or circular protrusions on the E-fracture face (arrows). (24,000×)
- Fig. 3 The P-fracture face of a fenestrated capillary in the rat incisor pulp. Very shallow hollows of fenestrae (arrows) are seen around the normal fenestrae. These structures are thought to represent intermediate stages in the process of pore formation. (48,000×)
- Fig. 4 A continuous capillary in the pulp. (15,000×)
- Fig. 5 Freeze-fracture replica of a continuous capillary in the subodontoblastic region. (7,000×)
- Fig. 6 Higher magnification of Fig. 5. A tight junction between two endothelial cells of a continuous capillary. This junction is formed by 2 to 3 parallel strands, and has two gaps of about 10 nm in it (arrows). (60,000×)
- Fig. 7 A vein (V) and a artery (A) in the central pulp. (8,000×)
- Fig. 8 Freeze-fracture replica of a venula in the pulp.
P: P-fracture face, E: E-fracture face, L: venular lumen (5,000×)
- Fig. 9 Higher magnification of E-fracture face in Fig. 8. The junction is the tight junction constituting of 1 to 2 strands (small arrow) and the low profiles of linear crease (large arrow). (50,000×)