

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 近藤 俊三

胎仔期の血管解析は、これまで光顕を用いた切片法、色素、造影剤、合成樹脂などの注入法、透過電顕による切片観察などの解析から巨視的、基本的な知見が得られている。しかし、観察法が肉眼、光顕を主体としていたため、胎仔発生に伴い複雑化する血管網の三次元解析や微細形態的解析は進んでいない。村上(1971)の開発した血管鋳型法は、血管の三次元的解析と走査電顕観察を可能にしたことから広く普及したが、成熟組織を対象としていた。申請者は胎仔発生と血管構築に興味を持ち、これまで不可能視されていた小型哺乳動物胎仔（マウス）の全身血管鋳型作製法の開発を試みた。試行錯誤の末、注入装置の改良や樹脂注入に臍帯血管を用いる工夫などで胎齢 13.5～18.5 日の範囲で全身の血管鋳型の作製に成功した。また、鋳型作製が困難な若齢胎仔では造影剤を用いることで、胎齢 9.5 日の血管系まで観察を可能とした。さらに、造影剤を注入した腎臓や肺では、器官特有の生理的機能の現場を走査電顕で直接観察することにも成功した。

胎仔血管鋳型作製法:胎仔は胎盤を付けて卵黄嚢と羊膜に包まれた状態で母体から摘出し、4℃の緩衝液中に保存。樹脂の注入準備が整った時点で胎仔を 40℃の緩衝液に戻し、実体顕微鏡下で卵黄嚢と羊膜を除去し、臍帯を露出。この間、心臓の拍動が再開され臍帯の動静脈の観察が容易となる。この血管に実体顕微鏡下でガラス針を穿刺し、インジェクターを操作して樹脂を注入させた。その後、40℃の緩衝液中で樹脂の硬化を促進させ、NaOH 溶液で組織を腐食した。装置は樹脂を吸引・注入するインジェクター、シリコンチューブ、ガラス針、ガラス針を固定するマニピュレータ、胎仔を観察する実体顕微鏡で構成される。

胎仔全身血管への応用:これまで成功率は 10%以下だが胎齢 13.5～18.5 日で全身血管鋳型を作製した。胎齢 13.5 日では、特に肝臓が他臓器に比べ大きく血管構築も進んでいた。胎齢 18.5 日では各器官の血管構築はほぼ終了し、成熟組織の血管構築に類似していた。

組織への応用:1)心臓形成;胎齢 11.5 日では、左右心室の明瞭な区分と心室の肉柱形成を把握した。右心室から肺動脈に至る鋳型は細長い形状を呈し、心球組織の存在が推察された。胎齢 13.5 日の心球組織は右心室に吸収されて、右心室と肺動脈間は接近していた。さらに、肺動脈弁の形成異常も鋳型に反映されていた。2)肺形成;胎齢 10.5～12.5 日の鋳型では、気管支に沿う血管が肺葉を包む血管網を構築し、胎齢 13.5 日では血管網は密となっていた。胎齢 18.5 日では網目状の血管が複数の肺胞と接しており、ガス交換の効率のよさが推察された。3)腎臓形成;胎齢 13.5 日の血管系は未発達であった。胎齢 15.5 日では血管網が密となり、皮質深部で糸球体が形成され、胎齢 18.5 日では皮質全体で糸球体が形成されていた。4)眼形成;眼内血管の硝子体血管は一過性の血管として知られ、鋳型法による報告もみるが、出生後の解析であり胎生期の報告はない。マウスでは胎齢 15.5 日で硝子体血管の鋳型が得られた。硝子体血管の発達は、胎齢 16.5～17.5 日で著しく、胎齢 18.5 日で

は血管網の減少が、出生 2 日では、血管網の急速な減少と消失が見られ、出生後 2 週では消失していた。血管内皮の核は、出生 2 日においてアポトーシス様形状が顕著であった。

新たな観察法の開発：胎仔血管に硫酸バリウムを注入し、反射電子の情報を利用することで、組織内部の血管を同定することを申請者は試みた。1)肺胞への応用；胎齢 18.5 日の肺胞中隔の一部で、組織内血管の存在を示す反射電子が観察された。同一場所の二次電子像では肺胞上皮が扁平な形態として観察された。反射電子が得られた領域は、ガス交換可能な領域を示し、血液- 空気関門の現場を走査電顕で直接観察したといえる。2)糸球体の観察；胎齢 18.5 日の糸球体で反射電子が検出された。反射電子がスポット的に得られた領域では、円柱であった糸球体内壁上皮が扁平化していた。反射電子が幅広く得られた領域では、上皮が突起を伸ばしてその領域を包み込む形態を示した。この形態は成熟した糸球体に類似しており、尿の産生現場（尿- 血液関門）を観察しているものと考えられる。

これまで胎生期の血管解析は光顕での観察が主体であり。胎仔発生に伴う微細な解析を行うのは困難であった。今回の胎仔鋳型法の開発により胎生期血管系の構築を三次元的に把握することが可能となった。さらに造影剤を注入することで走査電顕で組織内の血管を同定することができた。胎生期の血管解析は、正常な血管発生の解明に留まらず、組織の形成異常に伴う変化、癌、腫瘍など急速な血管新生、皮膚などの再生医療にも通じる極めて重要な意味を持つ。以上、今回得られた成果は、学術上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。

