

魚類全身血管系観察のための腐食鋳型法

岩水正志・板沢靖男

Corrosion Casting Method for the Gross Anatomy of the Blood Vascular System of Fish

Msashi Iwamizu and Yasuo Itazawa

(Received March 18, 1985)

A corrosion cast of the entire blood vascular system was made by a single injection of resin from the heart of carp and a Japanese catfish. Either semipolymerized methyl methacrylate or Mercox CL with 30–50% methyl methacrylate monomer was used as the resin preparation. The latter was better for photographing. Both were polymerized by addition of 1% benzoyl peroxide. The segmental blood vessels of carp and a catfish showed an alternating arrangement of artery and vein in successive segments with some irregularity.

(Department of Fisheries, Kyushu University, 46-04, Hakozaki, Fukuoka 812, Japan)

動物の血管系の立体構築を観察するには、血管内に墨や着色ゼラチンを注入して透明標本を作る方法、合成樹脂を注入し組織を腐食させて血管の鋳型を作る方法、造影剤を注入して軟X線で透視する方法がある（佐野、1981）。船越ほか（1981）は上記の諸方法を比較検討し、船越ほか（1983）はクロマグロの奇網の観察に際して鋳型法を採用した。

鋳型法は最近は主として微細血管の観察に用いられているが、主要血管系の複雑な立体配置を巨視的にしらべる際にも極めて有効である。この場合なるべく全身の鋳型を作ることが望ましい。

Ishimatsu *et al.* (1979) は *Channa* 属 2 種について心臓からアクリル系樹脂を注入して全身の血管鋳型を得た。しかし著者らがその方法をコイについて試みたところ、得られた鋳型は頭部の動脈系だけのものであった。その後、樹脂の処方ならびに注入方法を改変することにより、多くの種において全身血管鋳型を作成し得るようになり、また野外でも容易に樹脂注入を行ない得るようになった。著者らはこの方法によってコイのほかナマズ、ボラ、ブリ、マアジおよびクロマグロについても全身血管鋳型を得ることに成功した。

本報はこの技法を紹介するとともに、全身血管鋳型法の極めて巨視的な観察への応用例として、コイとナマズの体節血管の配列様式について観察した結果を示す。体節血管の配列様式は最近 Mosse (1980) が改めてとり上

げている問題である。

材料と方法

養殖業者から購入したコイ *Cyprinus carpio* 12 個体（全長 188–240 mm、体重 133–630 g）と、野外で採集したナマズ *Silurus asotus* 6 個体（全長 272–508 mm、体重 121–410 g）を全身血管鋳型の作製に用いた。

鋳型剤にはアクリル系樹脂を 2 種類の処方 (A, B) で用いた。A と B の原処方はそれぞれ村上 (1975) と Browning (1980) によるもので、どちらも重合触媒や重合促進剤の添加量を少なくして硬化時間を延長し、また注入操作が野外でも容易に行なえるように、あらかじめ計量しておいた 2 種類の液を使用直前に混合して注入する方式とした。A, B いずれの場合も、樹脂の調製に先立ち、東・遠山 (1973) に従ってメタクリル酸メチル・モノマー中のヒドロキノンを除去した。以下に A, B それぞれの具体的な調製手順を述べる。

A. 村上 (1975) に従い次の手順で主剤を調製する。メタクリル酸メチル・モノマー 200 ml を容量 1,000 ml のフラスコにとり、2 g の 2,4-ジクロル過酸化ベンゾイル（重合触媒）を加えてガスバーナーで加熱する。液温が 65°C に達した時に加熱を中止して放置し、重合熱により液温が 90°C に達した時ただちにフラスコをよく振りながら水道水で急冷する。以上の処理で得た半重合状態の樹脂の粘度を滴下法によって検査する（村上・大谷、

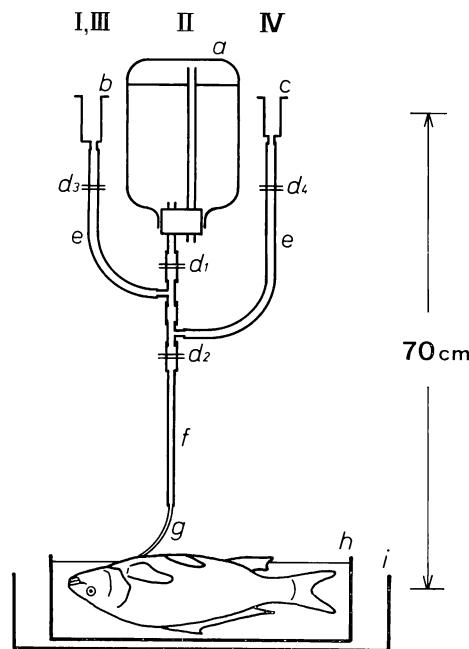


Fig. 1. Injection apparatus: saline I falls into the bulbus arteriosus from *b*, saline II from *a*, fixative III from *b*, and resin IV or IV' from *c*; *a*, plastic bottle; *b*, *c*, outer cylinder of disposable syringe; *d*, screw cock or forceps; *e*, vinyl plastic tubing; *f*, *g*, polyethylene tubing; *h*, *i*, plastic tank. A fish was placed in the inner tank *h* filled with anaesthetizing solution. After injection of salines, fixative and resin into the fish, hot water was poured into the outer tank *i*.

1980). 適当な粘度は 20–50% グリセリン水と同様の粘度で、これよりも低い時は再加熱し、高い時はモノマーを加えて調整する。この主剤は冷蔵庫内で長期間保存で

きる。

予測される魚体重の 20% を目安に適当量の主剤を容量 100 ml のフラスコにとり、これにフタル酸ジ-*n*-ブチル（可塑剤: Murakami, 1971）と過酸化ベンゾイル（重合触媒）をそれぞれ主剤の 10% (w/w) と 1% (w/w) の割合に加えて密栓し（1 液）、冷蔵庫またはアイスボックス内に保存する。灌流固定終了後、1 液主剤の 0.5–1% (v/w) の N,N-ジメチルアニリン（重合促進剤；2 液）をピペットにとり、1 液に加えて注入する。

B. 予測される魚体重の 20% を目安に注入予定量を定め、その 70–50% (w/w) のメルコックス CL（大日本インキ化学）を容量 100 ml のフラスコにとって密栓する（1 液）。別の 100 ml フラスコに注入予定量の 30–50% (w/w) のメタクリル酸メチル・モノマーをとり、これに注入予定量の 1–2% (w/w) の過酸化ベンゾイルを加えて密栓する（2 液）。1, 2 液ともに冷蔵庫またはアイスボックス内に保存する。灌流固定終了後、2 液を 1 液に混入して注入する。なおメルコックスには赤（CL-2R）と青（CL-2B）の 2 色があり、どちらも同様に使用できる。またメルコックスに同封されている硬化剤 MA は用いない。

A, B いずれの場合も脂溶性色素で着色して用いた。色素は 1 液と 2 液の合計量の 0.1–0.5% (w/w) になるよう、A ではフタル酸ジ-*n*-ブチルに、B ではメタクリル酸メチル・モノマーにあらかじめ加えておいた。用いた色素はズダン III, ズダン IV, ズダンイエロー GG, ズダンブラック B およびオイルブルー V の 5 種類で、このうちオイルブルー V は後述するように着色剤として不適当であった。

樹脂の注入に先立ち、生理的塩類溶液による血管の灌流およびグルタルアルデヒドによる血管壁の灌流固定を

Table 1. List of substances arranged in the order of injection. Solution 1 of IV and Solutions 1 and 2 of IV' can be preserved chilled for 1 week.

I	Saline*: heparinized (1000 unit/50 ml)											
II	Saline*: unheparinized											
III	Fixative: 2.5% glutaraldehyde in phosphate buffer (20 mM, pH 7.4)											
IV	Resin A: mixture of Solutions 1 and 2; modified Murakami (1975) <table border="0" style="margin-left: 20px;"> <tr> <td>(i)</td> <td>semipolymerized methyl methacrylate</td> </tr> <tr> <td>(ii)</td> <td>di-<i>n</i>-butyl phthalate</td> <td>10% of (i)</td> </tr> <tr> <td>(iii)</td> <td>benzoyl peroxide</td> <td>1% of (i)</td> </tr> <tr> <td>Sol. 2</td> <td>(iv) N,N-dimethylaniline</td> <td>0.5–1% of (i)</td> </tr> </table>	(i)	semipolymerized methyl methacrylate	(ii)	di- <i>n</i> -butyl phthalate	10% of (i)	(iii)	benzoyl peroxide	1% of (i)	Sol. 2	(iv) N,N-dimethylaniline	0.5–1% of (i)
(i)	semipolymerized methyl methacrylate											
(ii)	di- <i>n</i> -butyl phthalate	10% of (i)										
(iii)	benzoyl peroxide	1% of (i)										
Sol. 2	(iv) N,N-dimethylaniline	0.5–1% of (i)										
IV'	Resin B: mixture of Solutions 1 and 2; modified Browning (1980) <table border="0" style="margin-left: 20px;"> <tr> <td>Sol. 1</td> <td>(i) Mercox CL (Dainippon Ink Inc.)</td> <td>70–50% of (i)+(ii)</td> </tr> <tr> <td>Sol. 2</td> <td>(ii) methyl methacrylate monomer</td> <td>30–50% of (i)+(ii)</td> </tr> <tr> <td></td> <td>(iii) benzoyl peroxide</td> <td>1–2% of (i)+(ii)</td> </tr> </table>	Sol. 1	(i) Mercox CL (Dainippon Ink Inc.)	70–50% of (i)+(ii)	Sol. 2	(ii) methyl methacrylate monomer	30–50% of (i)+(ii)		(iii) benzoyl peroxide	1–2% of (i)+(ii)		
Sol. 1	(i) Mercox CL (Dainippon Ink Inc.)	70–50% of (i)+(ii)										
Sol. 2	(ii) methyl methacrylate monomer	30–50% of (i)+(ii)										
	(iii) benzoyl peroxide	1–2% of (i)+(ii)										

* Prescribed by Yamamoto (1949), sometimes added with succinylcholine chloride (10 mg/l).

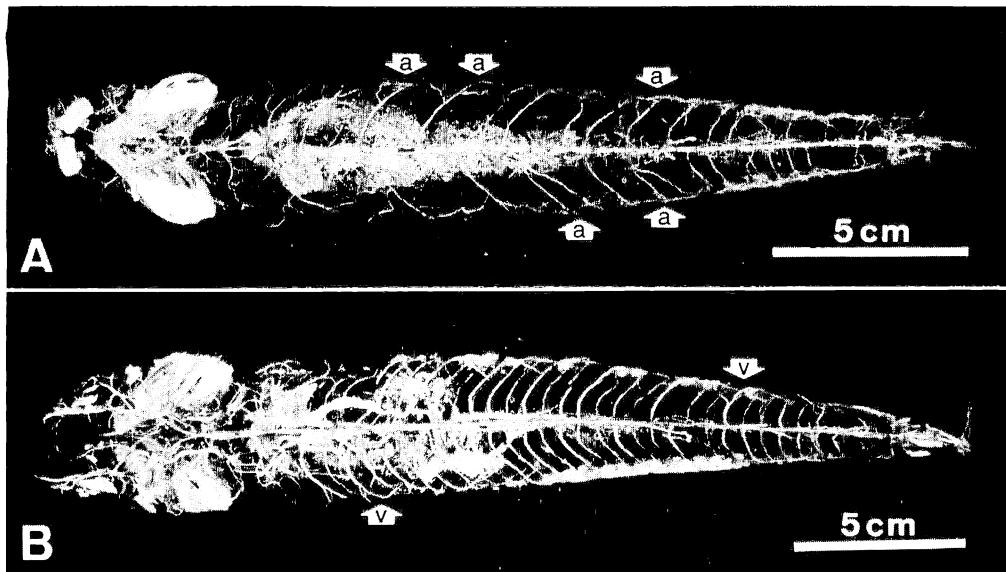


Fig. 2. Dorsal views of the blood vascular system of carp. (A) shows only the arterial system by partial injection of resin A. (B) shows the entire system of blood circulation by full injection of resin A. Each arrow indicates the artery(a) or vein(v) which has a branch toward the adjacent segment.

行なった。灌流液および樹脂はすべて動脈球に装着したポリエチレンチューブを通じ落差 70 cm の圧力によって注入した (Fig. 1)。すべての注入液を注入操作の順にならべて Table 1 に示す。

以下に血管鋳型作製の具体的な操作手順を Fig. 1 の記号を用いて述べる。

1. 注射器外筒 *b* (50 ml), *c* (30 ml) の上端はあらかじめアルミホイルで覆って埃の侵入を防ぐ。ポリエチレンチューブ *g* は魚の大きさに応じて外径 2 mm 前後のものを選び、先端部 1 cm を引き伸ばして細くし、断端を炎であぶって縁をつけておく。塩類溶液 II (室温保存) を満たしたポリ瓶 *a* に全チューブ類および *b*, *c* を接続して *d*。以上のチューブ内および *b* 内に II を満たし、チューブ内の気泡を除去する。*b* 内の II に 1 ml の局法ヘパリンナトリウム注射液 (1,000 単位/ml; 冷暗所保存) を加えて I とし、これを落下させて *g* の先端まで満たしておく。

2. 魚をベンゾカイン (*p*-アミノ安息香酸エチル) で鰓蓋運動が消失するまで麻酔する。ベンゾカインは 5% (w/v) エタノール溶液とし、これを水量の 0.1-0.2% (v/v) まで滴下する。

3. 体長と体重を測定した後、麻酔に使った水といっしょに魚を容器 *h* に入れ、スポンジで支持して水中に背

位に固定する。

4. 開心腔上の腹壁正中線を切開して小型開創器を装着し、注射器で魚体重の 0.1% (v/w) の局法ヘパリンナトリウム注射液を心室内に注入する。

5. 動脈球起始部に縫合糸をまわしておき、*g* の先端から I を滴下させておく。心室を腹側から半分ほど横断切開し、ただちに *g* の先端を動脈球内に挿入して結紮し、開創器をはずす。

6. I, 次いで II を落下注入して血管系全体を灌流し、心室切開部から流出させて血液を完全に排除する。

7. *b* から魚体重の 10% (v/w) の固定液 III を落下注入して血管壁を固定する。

8. *c* から樹脂 IV または IV' を落下注入し、灌流液中に水滴が見られなくなるまで続ける。

9. 外側の容器 *i* に熱湯をそそぎ入れ、血管内に注入された樹脂の硬化を促進する。しばらく放置してチューブ内に残った樹脂が硬化した後、*g* を切断する。

10. *h* 内のスポンジを除去し、魚を水中に没したまま *h* を 60°C の恒温器に入れて一晩放置し、樹脂を充分に硬化させる。

11. *h* 内の水を捨て、代わりに濃塩酸を注入して一晩放置し、骨を含む魚の全組織を腐食溶解させる。

12. *h* を大きな容器に入れ、*h* 内に静かに水を注入

しながらオーバーフローさせて腐食液を洗い流す。大きな容器に回収した腐食液は中和して捨てる。

13. *h* 内の水にクリーン 99-LO (アルカリ性洗浄液) を 10% (v/v) 加えて一晩放置し、残った組織を完全に溶解させる。

14. 12 と同じ操作で水洗し、水中に没した形で全身血管の鋳型標本を得る。

なお、コイの 1 例では動脈系だけの鋳型を得るために、樹脂 A の重合促進剤添加量を 2% に増やして注入し、樹脂が静脈系に達しないうちに硬化させた。また、コイとナマズのそれぞれ 2 例では動脈と静脈を識別しやすくするために、ズダンブラックを加えた樹脂 B に統いてズダンイエローを加えた樹脂 B を追加注入し、静脈を暗色に、動脈を明色に着色した。

結果および考察

技法について 樹脂 A と樹脂 B の鋳型剤としての

性能は下記の光学的性質以外は差がなく、どちらも魚体重の 10% 以上の量を注入することにより静脈系まで含む全身の血管鋳型が得られた。(Figs. 2, 3)。また、樹脂 A の 1 液、樹脂 B の 1 液および 2 液は 1 週間保存した後も使用できた。

操作手順 6 の生理的塩類溶液による灌流は血液を完全に排除するために少なくとも 10 分間は続ける必要があった。この間魚があばれだすことがあり、これは灌流液に塩化スチルコリン (筋弛緩剤) を加えることにより防止できた。

操作手順 7 の灌流固定は不可欠で、これを省くと樹脂注入時に鰓血管が破れて樹脂が漏れ出し、静脈系まで充分に注入できなかった。

操作手順 9 の加熱は注入圧を保ったまま樹脂を硬化させるためのもので、これを省くと背大動脈などの大きな動脈中の樹脂が他へ流出し、その部分がつぶれたりあるいは消失したりした鋳型が得られた。樹脂が充分量注入

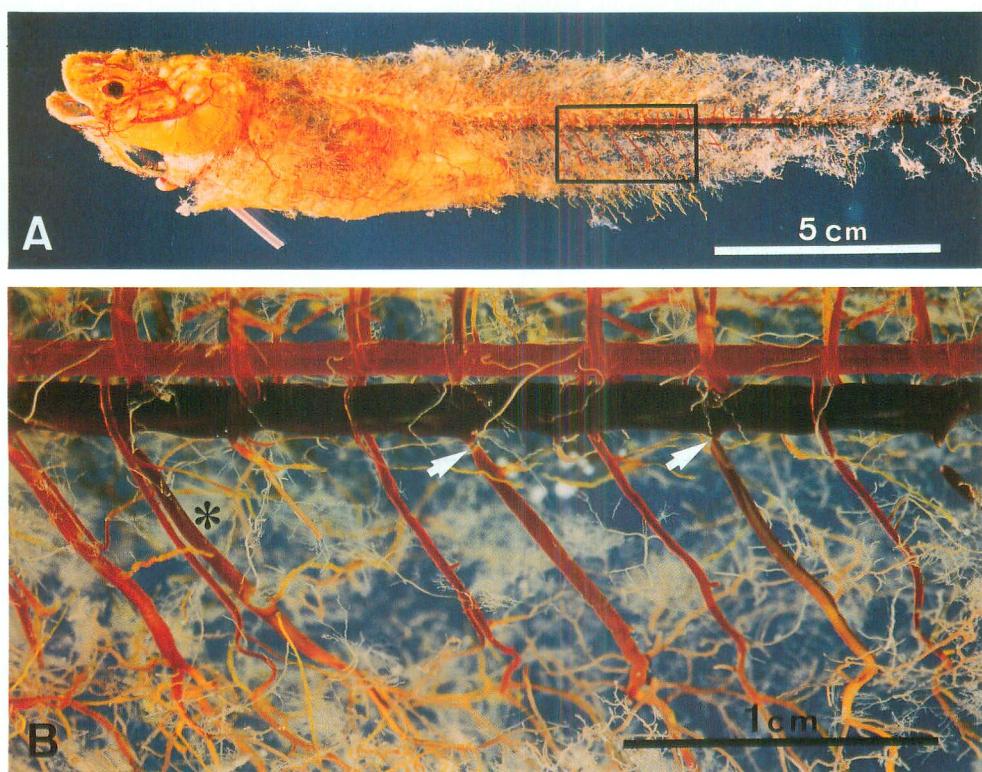


Fig. 3. Left lateral views of the blood vascular system of Japanese catfish. Resin B colored with Sudan Black was injected first to indicate the venous system, followed by resin B colored with Sudan Yellow to indicate the arterial system. (A) Whole picture except the caudal end. (B) Enlargement of the enclosed part of (A). Asterisk indicates the coexistence of artery and vein in the same segment. Arrows indicate the constrictions of segmental veins which suggest the valved entrance into the caudal vein.

された時点で自発的に硬化するのが理想的であるが、硬化速度は気温や注入速度にも左右されるので触媒や促進剤の添加量だけで調整するのは困難なため、この加熱を行なった。

操作手順 11 の濃塩酸による腐食は脱灰処理を省略した簡便法である。強酸は鋳型に損傷を与えるとされている（村上、1975）が、低倍率観察には支障をきたすことにはなかった。アルカリで組織を腐食させると個々の骨の脱落とともに鋳型がこわれるので、その場合は腐食前の脱灰処理が不可欠である。

鋳型法は最近はほとんど走査電子顕微鏡による観察に利用されているので、その解説書（村上・大谷、1980）においても鋳型の光学的な性質にはふれられていない。本報の樹脂 A のようにメタクリル酸メチル・モノマーを自家調製して用いた場合、得られる鋳型は透明で表面の光沢が強く、実体顕微鏡での観察ならびに写真撮影がむずかしくなる。これに対し市販のメルコックスを単独で用いると、鋳型の表面が白濁して観察、撮影に適したもののが得られる（Ishimatsu *et al.*, 1979; Olson, 1981）。本報の樹脂 B はメルコックスの性質を残しているが、メタクリル酸メチル・モノマーの混入割合が増すにつれて樹脂 A の性質を帯びてくる。この場合樹脂を着色するとある程度観察しやすくなる（Fig. 3B）。

今回用いた色素のうち、ズダン III とズダン IV は安定だが、その他は過酸化ベンゾイルと反応して赤変し樹脂の硬化を多少阻害した。特にオイルブルー V は懸濁粒子を生じて硬化を著しく阻害するので、着色剤として不適当である。

腐食鋳型法では血管系のみの標本が得られるので観察および撮影に便利であるが、体の各器官に対応した血管の位置関係がわかりにくい。これを明らかにするには、樹脂の硬化後腐食処理をせずに、解剖によって血管を追跡すると良い。この場合樹脂は強めに着色し、樹脂のエイジング（操作手順 10）は室温で行なう。

体節血管について 体節血管の配列様式をコイ（Fig. 2）とナマズ（Fig. 3）の例によって示す。Fig. 2 はコイの側方体節血管について、動脈系だけの鋳型（A）と静脈系を含む全血管系の鋳型（B）との対照を示したものである。また、Fig. 3 はナマズの腹方体節血管について、2 色の樹脂を順次注入した鋳型によって動脈系（明色）と静脈系（暗色）を区別して示したものである。

コイとナマズの体節血管はそれぞれ神経棘、血管棘、筋隔に沿って走る背方、腹方、両側方の 4 方向の要素からなり、Harder (1975) の魚類一般についての記述と一致して、どの要素とも連接する節において動脈と静脈が

ほぼ交互に配列する。従って、それぞれの要素について各節に動脈か静脈のいずれか一方しか存在しないのが普通である。しかし同じ節に動脈と静脈が共存することがあり（Fig. 3B: *印），このような体節血管の増加配置は尾端に向かって出現頻度が高くなる。また体節動脈は固有の体節動脈をもたない隣の節へ向かう分枝を出すことがあり（Fig. 2A: 矢印），静脈についても同様の分枝がみられる（Fig. 2B: 矢印）。このような分枝は血合筋の血流を担う側方体節血管に多く見いだされる。以上のような交互配列を補う形の不規則な血管配置は perch (Pollak, 1960) および pond-loach (Pollak, 1961) についても見られる。

尾部の体節静脈が尾動脈に合流する部位では血管鋳型上に必ずくびれが現われ、弁の存在を示唆している（Fig. 3B: 矢印）。

引用文献

- 東 昇・遠山 益. 1973. 電子顕微鏡学実習. モダンバイオロジーシリーズ 21, 共立出版, 東京, xii +286 pp.
- Browning, J. 1980. The vasculature of *Octopus* arms: a scanning electron microscope study of corrosion casts. *Zoomorph.*, 96: 243-253.
- 船越将二・鈴木 徹・和田浩爾. 1981. クロマグロ幼魚の向流熱交換系の観察手法の検討. 養殖研究所研究報告, (2): 55-63.
- 船越将二・鈴木 徹・和田浩爾. 1983. クロマグロ幼魚の奇綱の形態. 養殖研究所研究報告, (4): 87-97.
- Harder, W. 1975. Anatomy of fishes. E. Schweizerbart'sche Verlag., Stuttgart, xii+612 pp.
- Ishimatsu, A., Y. Itazawa and T. Takeda. 1979. On the circulatory system of the snakeheads *Channa maculata* and *C. argus* with reference to bimodal breathing. *Japan. J. Ichthyol.*, 26(2): 167-180.
- Mosse, P. R. L. 1980. Vascular anatomy of the lateral musculature of the flathead, *Platycephalus bassensis* (Teleostei: Perciformes). *Zoomorph.*, 95: 133-148.
- Murakami, T. 1971. Application of the scanning electron microscope to the study of the fine distribution of the blood vessels. *Arch. Histol. Japan.*, 32(5): 445-454.
- 村上宅郎. 1975. 微細血管分布機構研究のための鋳型走査電子顕微鏡法. 細胞, 7 (1): 11-18.
- 村上宅郎・大谷 修. 1980. 鋳型観察法. Pages 131-139. 田中敬一・永谷 隆編. 図説走査電子顕微鏡, 朝倉書店, 東京.
- Olson, K. R. 1981. Morphology and vascular anatomy of the gills of a primitive air-breathing fish, the bowfin (*Amia calva*). *Cell Tissue Res.*,

- 218: 499–517.
- Pollak, A. 1960. The main vessels of the body and the muscles in some teleost fish. Part I. The perch (*Perca fluviatilis* L.). Acta Biol. Cracov., Ser. Zool., 3: 115–138.
- Pollak, A. 1961. The main vessels of the body and the capillaries of the muscles in some teleost fish. Part II. The pond-loach (*Misgurnus fossilis* L.). Acta Biol. Cracov., Ser. Zool., 4: 143–169.
- 佐野 豊. 1981. 紹織学研究法. 第6版, 南山堂, 東京, x+961 pp.
- 山本時男. 1949. 動物生理の実験. 河出書房, 東京, 2+7+212 pp.

(812 福岡市東区箱崎 九州大学農学部水産学科)