

Experimental Studies on the Functions of Cleansing, Anti-inflammation and Angiogenesis with Omental Pedicle Flap

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8421

有茎大網移植における浄化・抗炎症作用と 血管新生に関する実験的研究

金沢大学医学部外科学第一講座 (主任: 渡辺洋宇教授)

小 林 孝 一 郎

(平成5年1月18日受付)

胸部外科手術後の気管支瘻性膿胸や縦隔炎の治療に、また気管支形成術や肺移植術における気管支吻合部の縫合不全や虚血による不良肉芽発生の予防に、感染巣の浄化・抗炎症作用や血管新生機能をもつ有茎大網片が多用されている。しかし、大網のもつ機能については未だ明らかにされていない点が多い。そこで、刺激した大網からどのような細胞が遊出し浄化・抗炎症作用を発揮するか、またその時大網乳斑がどのように関係するか、さらに大網がどのように血管を新生していくかなどを明らかにする目的で実験的研究を行なった。すなわち、New Zealand White 種の雌性ウサギ50羽を用いて、有茎大網片を容器に隔離した後容器内に刺激物質を注入して遊出する細胞をすべて収集する実験モデル、腹腔内へ刺激物質を注入して大網乳斑の変化をみる実験モデル、また腹腔内へ刺激物質を注入した後大網の血管造影を行ないその変化を観察する実験モデル等を作製し、それぞれの経時的な形態学的変化およびその機能的な役割について検討した。刺激した有茎大網片から遊出した細胞数は、24・48時間をピークとして増加し、以後減少した。細胞分画別にみると、顆粒球が6～12時間で急激に増加し、大食細胞やリンパ球は遅れて増加した。刺激した大網の単位面積あたりに占める血管性乳斑の比率は、24時間まで増加し、以後減少したが、無血管性乳斑は、時間と共に増加した。刺激した大網の血管性乳斑浅層においては、大食細胞が全観察期間を通じて最も多く存在したが、経時変化は認められなかった。リンパ球は12時間から増加した。また血管性乳斑深層においては、顆粒球が6～12時間で増加し、大食細胞とリンパ球は遅れて増加した。無血管性乳斑においては、大食細胞は全観察期間を通じて最も多く存在したが、経時変化は認められなかった。顆粒球はきわめて少なく、リンパ球は時間経過と共に増加した。刺激した大網の血管造影では、24時間で胃大網動静脈に沿って存在する索状の脂肪組織内の毛細血管や胃大網動静脈から大網後葉へ分岐する血管の分枝が数多くみられるようになり、48時間ではさらに発達した分枝や毛細血管網を認めた。以上の結果から、刺激した大網から遊出する細胞は主として血管性乳斑から供給され、血管性乳斑は遊出した大食細胞やリンパ球に覆われて2層構造を形成しながら成長し、また、無血管性乳斑は遊出した大食細胞やリンパ球が大網腹膜に接着する形で形成されて、共に感染巣の浄化・抗炎症作用を発揮すると考えた。また、刺激した大網の血管は24時間から増加して、新たに毛細血管網を形成することによって血行の増加をはかり、組織の浄化作用や血管新生機能を発揮すると考えた。

Key words pedicle transposition of the greater omentum, omentum, milky spots, angiogenesis, macrophage

胸部外科手術後の難治性感染症、とくに術後気管支瘻性膿胸や術後縦隔炎は、いったん発生すると治療に難渋したりすることが多く、患者に不幸な転帰をもたらすことの多い重篤な合併症である。これに対して胸腔・縦隔ドレナージ、開窓術、胸郭成形術、筋肉充填術などの治療が行なわれてきたが、根治性および患者の quality of life の面において、いずれの方法も満足できるものではない。1975年に Virkkula ら¹⁾が下葉切除術後の気管支瘻の治療に、1976年に Lee ら²⁾が開心術後の縦隔炎の治療に有茎大網片を利用して、良好な結果を報告して以来、一期的治療が期待できる有茎大網移植術が注目されてきた。また、1982年には Lima ら³⁾が気管支形成術や肺移植術において、気管支吻合部の縫合不全や虚血による不良肉芽発生の予防手段として有茎大網片を用いる実験的研究を報告して以来、すぐれた手段として臨床応用されるようになった。それ以後、浄化・抗炎症作用や血管新生機能をもつ有茎大網片の高い有用性は数多

くの臨床経験によって証明されている。このように臨床的研究が進む一方で、大網の解剖や大網中の乳斑の構造などの形態学的研究は古くから行なわれてきた。しかし、有茎大網片がどのようにして浄化・抗炎症作用や血管新生機能を発揮しているかなどの機能面からの検討は少ない。そこで著者は、実際に刺激した大網からどのような細胞が遊出し浄化・抗炎症作用を発揮するか、またその時大網乳斑がどのように関係するか、さらに大網がどのように血管を新生していくかなどを明らかにする目的で、ウサギを用いた研究を行なった。すなわち、有茎大網片を容器に隔離した後容器内に刺激物質を注入して遊出する細胞をすべて収集する実験モデル、腹腔内へ刺激物質を注入して大網乳斑の変化をみる実験モデル、また腹腔内へ刺激物質を注入した後大網の血管造影を行ないその変化を観察する実験モデル等を作製し、それぞれの経時的な形態学的変化およびその機能的な役割について検討した。

対象および方法

I. 大網および乳斑の一般形態の観察

1. 実験動物

体重 2.5kg の New Zealand White 種の雌性ウサギ (三協ラボサービス, 東京) 2羽を用いた。

2. 大網の観察

耳介の静脈からペントバルビタールナトリウム (アボット, イリノイ, 米国) 60mg/kg を急速に注入して深麻酔にて屠殺した後, 手術台に仰臥位で固定し, 腹部正中切開にて開腹して, 大網および大網乳斑について肉眼的に観察した。

II. 大網からの遊出細胞の検討

1. 実験動物

体重 2.4~2.7kg の New Zealand White 種の雌性ウサギ 6羽を用いた。

2. 実験系の作製

耳介の静脈に点滴路を確保し, ペントバルビタールナトリウム 30mg/kg を緩徐に注入して静脈内全身麻酔を行ない, 塩酸ケタミン (三協, 東京) 10mg/hr を持続点滴静注して維持した。補液は 5% 乳酸リンゲル液 (大塚製薬, 東京) 5ml/kg/hr を点滴静注した。30度頭高位とした手術台に仰臥位で固定し, 腹部を剃毛した。腹部正中切開にて開腹し, 大網を露出した。右胃大網動静脈を胃十二指腸動脈からの分岐部付近で結紮・切離

し, 右胃大網動静脈からの胃壁枝数本を結紮・切離して, 血流の多い左胃大網動静脈を温存した有茎大網片を作製した。自作の隔離容器を腹腔内に挿入して有茎大網片を充填し, 接続した注入・採取用チューブを右下腹部から体外に出して固定し, 閉腹した (図 1)。チューブから生理食塩水 100ml を注入して数回振盪後採取して対照 (0 時間) とした。続いて OK-432 (中外製薬, 東京) 10KE を溶解した生理食塩水 100ml を注入した。6, 12, 24, 48, 72 時間後に大網浸出液 10ml を採取し, 生理食塩水 10ml を補充した。

3. 測定

1) 細胞数の測定

採取液 1ml を分離し, フローサイトメーター R-1000 (東亜医用電子, 神戸) にて細胞数を測定し, 100ml に換算して総細胞数とした。

2) 細胞分画の測定

採取液中の細胞分画の割合をフローサイトメーター FACScan (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, カリフォルニア, 米国) にて測定した。

4. 統計学的検討

得られた成績はすべて平均値 ± 標準偏差 (standard deviation, SD) にて表記した。平均値の差は対応のある t 検定にて比較し, 危険率が 0.05 未満をもって統計学的に有意差ありと判定した。

III. 大網刺激時の乳斑の形態学的検討

1. 実験動物

体重 2.4~2.7kg の New Zealand White 種の雌性ウサギ 36羽を用いた。

2. 実験系の作製

塩酸ケタミン 25mg/kg を筋注して全身麻酔を行ない右側臥位とし, OK-432 10KE を溶解した生理食塩水 300ml を左下腹部から腹腔内に注入して数回振盪した。普通飼料・自由水にて飼育し, 6, 12, 24, 48, 72 時間後に, 後述のごとく標本を摘出した。耳介の静脈に点滴路を確保し, ペントバルビタールナトリウム 30mg/kg を緩徐に注入して静脈内全身麻酔を行なった。動物を手術台に仰臥位で固定し, 腹部を剃毛して, 正中切開にて開腹した。ペントバルビタールナトリウム 60mg/kg を急速に注入して深麻酔にて屠殺し, 左右大網動静脈を根部で, また同胃壁枝を胃壁近くで結紮・切離し, 大網を切除した。

3. 標本の作製

1) 伸展標本の作製

切除した大網を大型スライドガラス (76×52mm) (松浪硝子工業, 大阪) 上に伸展して, 冷風乾燥した。つづいて 50 倍に希釈したギムザ液 (和光純薬工業, 大阪) で 1 時間染色し, 2~3 分間水洗した後, 冷風乾燥した。

2) 切片標本の作製

切除した大網から血管性および無血管性乳斑を切り出し, 直ちに 10% 中性緩衝ホルマリン液 (武藤化学薬品, 東京) に投入し, 6 時間固定した。ついで型のごとく脱水, パラフィンに包埋し, 厚さ 4μm の連続切片を作製し, periodic acid Schiff (PAS) 染色を行なった。

4. 標本の観察

1) 伸展標本の観察

刺激した大網の単位面積あたりに占める血管性および無血管性乳斑の比率の変化を求めるため, 各例について無作為に 3 ヶ

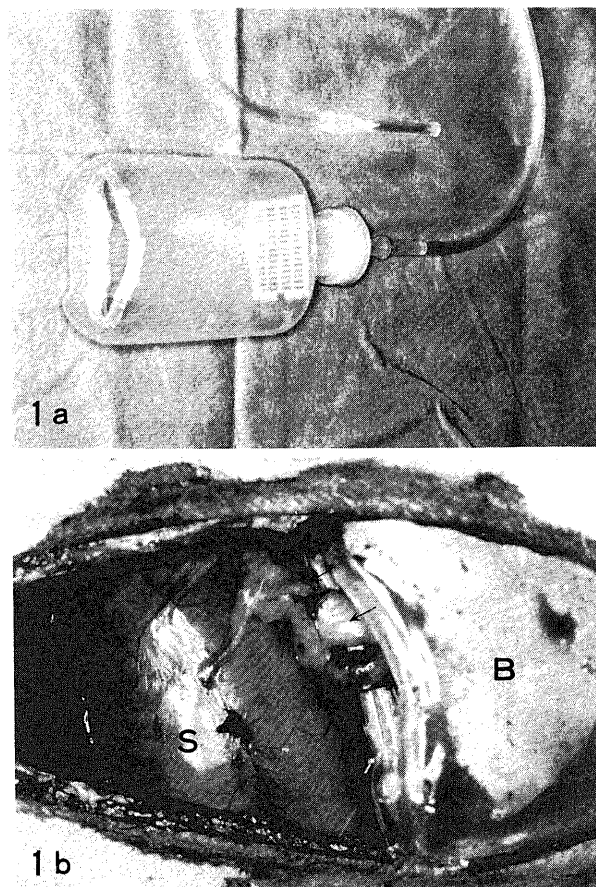


Fig. 1. Special bottle with sampling tube (a) for separating omental pedicle flap (arrows) from peritoneal cavity (b): S, stomach; B, bottle.

所を選び、実体顕微鏡にて6倍に拡大した写真を撮影した。この際、多重露出にて正方形の枠(15×15mm)を同時撮影し、写真枠内の紙重量と血管性または無血管性乳斑を切り抜いた後の紙重量を上皿天秤 LW-2200 (ヤマト科学, 東京) で測定して、大網の単位面積あたりに占める乳斑の比率 (%) を求めた。

2) 切片標本の観察

i. 血管性乳斑構成細胞の比率

血管性乳斑は、毛細血管の少ない表層近くと、毛細血管の多い深部の構成細胞の比率が大きく異なることから、血管性乳斑を浅層と深層の2層に分けて、それぞれ無作為に4ヵ所を選び、光学顕微鏡にて400~800倍に拡大し、大食細胞 (PAS 可染性)・顆粒球・リンパ球・その他の細胞数を計測し、各層別に構成細胞の比率を求めた。

ii. 無血管性乳斑構成細胞の比率

無血管性乳斑は、無作為に4視野を選び、前述の血管性乳斑と同様にその構成細胞の比率を求めた。

5. 統計学的検討

得られた成績はすべて平均値±標準偏差にて表記した。平均値の差の検定には1元配置分散分析法を用い、危険率が0.05未満をもって統計学的に有意差ありと判定した。

IV. 大網刺激時の血管新生の検討

1. 実験動物

体重2.5~2.6kgのNew Zealand White種の雌性ウサギ6羽を用いた。

2. 実験系の作製

塩酸ケタミン 25mg/kg を筋注して全身麻酔を行ない右側臥位とし、OK-432 10KE を溶解した生理食塩水 300ml を左下腹部から腹腔内に注入して数回振盪した。普通飼料・自由水にて飼育し、6, 12, 24, 48, 72時間後に、後述のごとく実験を行った。耳介の静脈に点滴路を確保し、ペントバルビタールナトリウム 30mg/kg を緩徐に注入して静脈内全身麻酔を行なった。動物を手術台に仰臥位で固定し、腹部を剃毛して、正中切開にて開腹した。抗凝固剤としてヘパリンナトリウム (ノボ・ノルディスク A/S, コペンハーゲン, デンマーク) 200 単位/kg を静注した後、腹部大動脈を露出して、腹腔動脈分岐部の上下および腹腔動脈根部に血管テープをかけた。腹腔動脈から分岐する総肝動脈と左胃動脈を露出して結紮した。左胃大網動脈の胃壁枝を胃壁近くで結紮・切離した後、5Fr の IVH 用カ

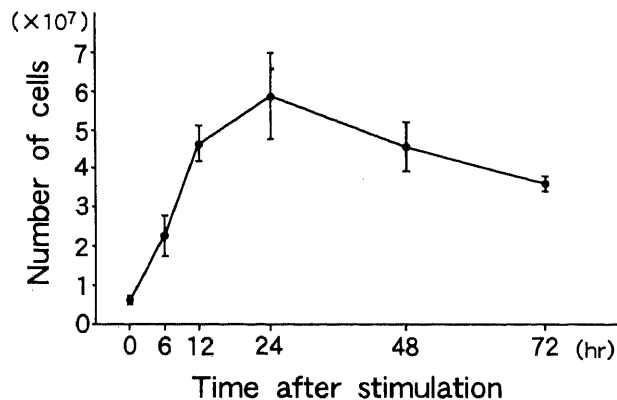


Fig. 2. Changes of number of cells in exudates from omental pedicle flap after stimulation. The data represent mean±SD.

テテル (日本シャーウッド, 東京) を腹部大動脈から腹腔動脈を経由して左胃大網動脈に挿入して固定した。ペントバルビタールナトリウム 60mg/kg を急速に注入して深麻酔にて屠殺した。腹部大動脈を結紮し、留置したカテーテルからヘパリンナトリウム200単位を加えた生理食塩水 20ml を注入した後、60% v/v に調節したバリトッ P (カイゲン, 大阪) 懸濁液と60% ウログラフィン (シェーリング AG, ベルリン, ドイツ) を2対3で混合した造影剤を20分かけて緩徐に注入した。左胃大網動脈を脾臓から末梢にて、右胃大網動脈を根部にて結紮・切離し、大網を切除した。

3. 血管造影写真の撮影

切除した大網を伸展し、X線撮影装置 MGU-01 (東芝, 東京) にてX線フィルム X-OmatTL (イーストマン・コダック, ニューヨーク, 米国) に軟X線撮影 (25kV, 160mAs, Mo フィルター使用) した。

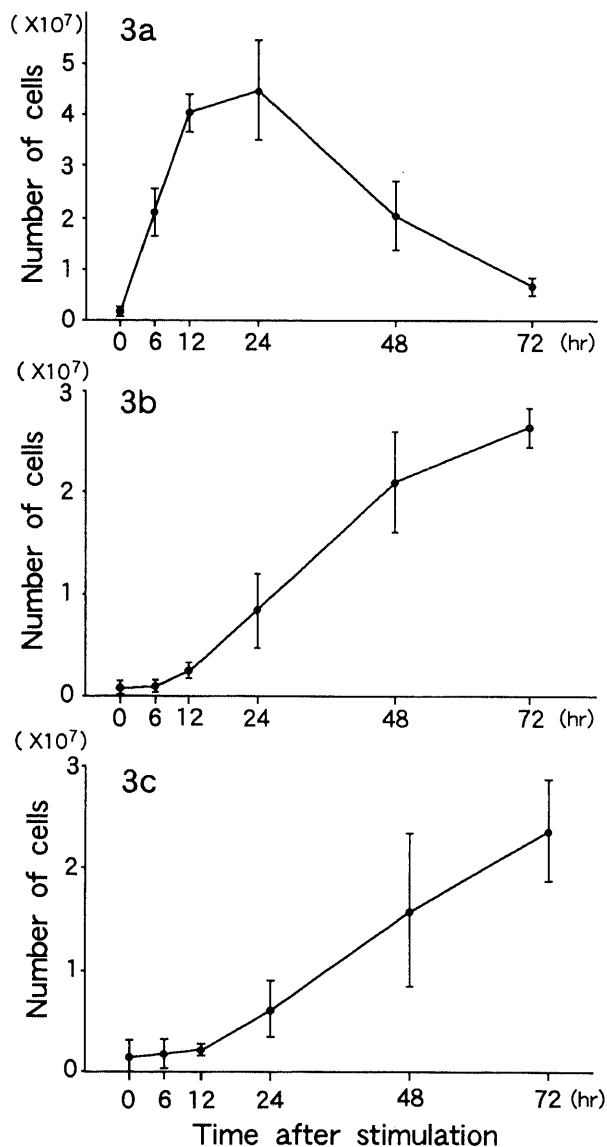


Fig. 3. Changes of number of granulocytes (a), macrophages (b) and lymphocytes (c) in exudates from omental pedicle flap after stimulation. The data represent mean±SD.

4. 血管造影写真の観察

2.3倍に拡大した写真を撮影し、経時的に形態学的変化を観察した。

成 績

I. 大網および乳斑の一般的形態の観察

ウサギの大網は、胃の大弯側からはじまり、下行した後反転して上行して脾臓腹側面に付着していた。脆弱で裂けやすいため、慎重に伸展して観察した。胃大弯の付着縁と脾臓の付着縁のほぼ中央に胃大網動静脈が横走しており、左側では腹腔動脈から分れた左胃動脈から分岐し、脾動静脈に連っていた。また右側では胃十二指腸動静脈の分枝となっていた。胃大網動静脈

を軸として二葉になるため、便宜上、腹側を前葉、背側を後葉と呼ぶことにした。切除した大網の前葉と後葉を広げて作製した伸展標本を観察すると、胃大網動静脈に沿って索状に存在する脂肪組織の辺縁部および胃大網動静脈から分岐している血管の枝々の先端部にリンパ組織様の結節状の血管性乳斑が多数並んでおり、胃大網動静脈からの枝が内部に進入して毛細血管網を形成していた。また、胃大網動静脈から離れた大網腹膜上には斑状の無血管性乳斑が散在しており、これは前葉に比べて後葉に多くみられた。

II. 大網からの遊出細胞の検討

1. 細胞数

刺激した有茎大網片から遊出した細胞数 ($\times 10^7$ 個、以下同

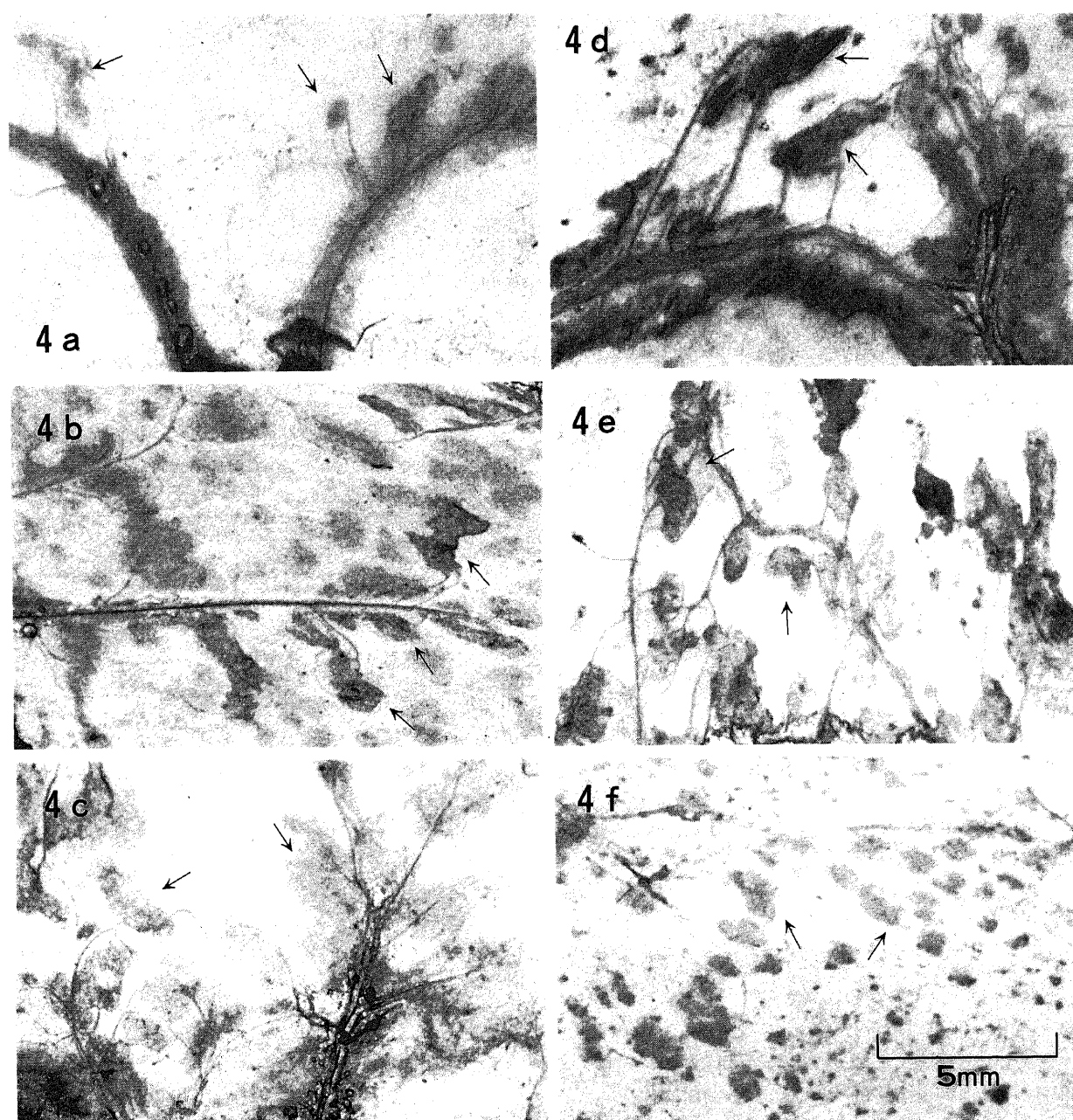


Fig. 4. Vascular milky spots on the posterior layer of omental peritoneum at 0 hr (a), 6 hr (b), 12 hr (c), 24 hr (d), 48 hr (e) and 72 hr (f) after stimulation. Size of vascular milky spot (arrows) changes at every time after stimulation.

様)は、0時間(正常時の対照, 以下同様)の 0.65 ± 0.11 から24時間で 5.88 ± 1.12 まで有意に増加し($p < 0.01$), 48時間で 4.58 ± 0.64 から72時間で 3.60 ± 0.20 まで有意に減少した($p < 0.05$)(図2).

2. 細胞分画

刺激した有茎大網片から遊出した細胞を、大食細胞・顆粒球・リンパ球・その他に分類した。大食細胞は6時間で 0.06 ± 0.08 と少なかったが、12時間で 0.23 ± 0.08 , 24時間で 0.78 ± 0.36 と有意に増加し($p < 0.01$), 72時間で 2.60 ± 0.19 となった。顆粒球は6時間で 2.10 ± 0.47 , 12時間で 4.03 ± 0.35 と急増した($p < 0.01$)が、24時間値の 4.49 ± 0.98 を頂点として減少して($p < 0.01$)72時間では 0.67 ± 0.16 と6時間値を下回った。リン

パ球は6時間および12時間で 0.02 ± 0.01 と最も少なかったが、48時間で 0.16 ± 0.07 , 72時間で 0.24 ± 0.05 と他より遅れて増加した($p < 0.05$)(図3)。その他の細胞には一定の傾向は認められなかった。

Ⅲ. 大網刺激時の乳斑の形態学的変化

1. 伸展標本

1) 血管性乳斑の経時的な形態学的変化

刺激した大網の単位面積あたりに占める血管性乳斑の比率は、0時間の $2.9 \pm 0.3\%$ から6時間で $8.9 \pm 1.1\%$, 12時間で $11.2 \pm 1.1\%$, 24時間で $18.6 \pm 0.6\%$ と有意に増加した($p < 0.01$)が、24時間から48時間で $16.0 \pm 1.3\%$, 72時間で $8.5 \pm 0.9\%$ と減少した($p < 0.01$)(図4, 図5)。

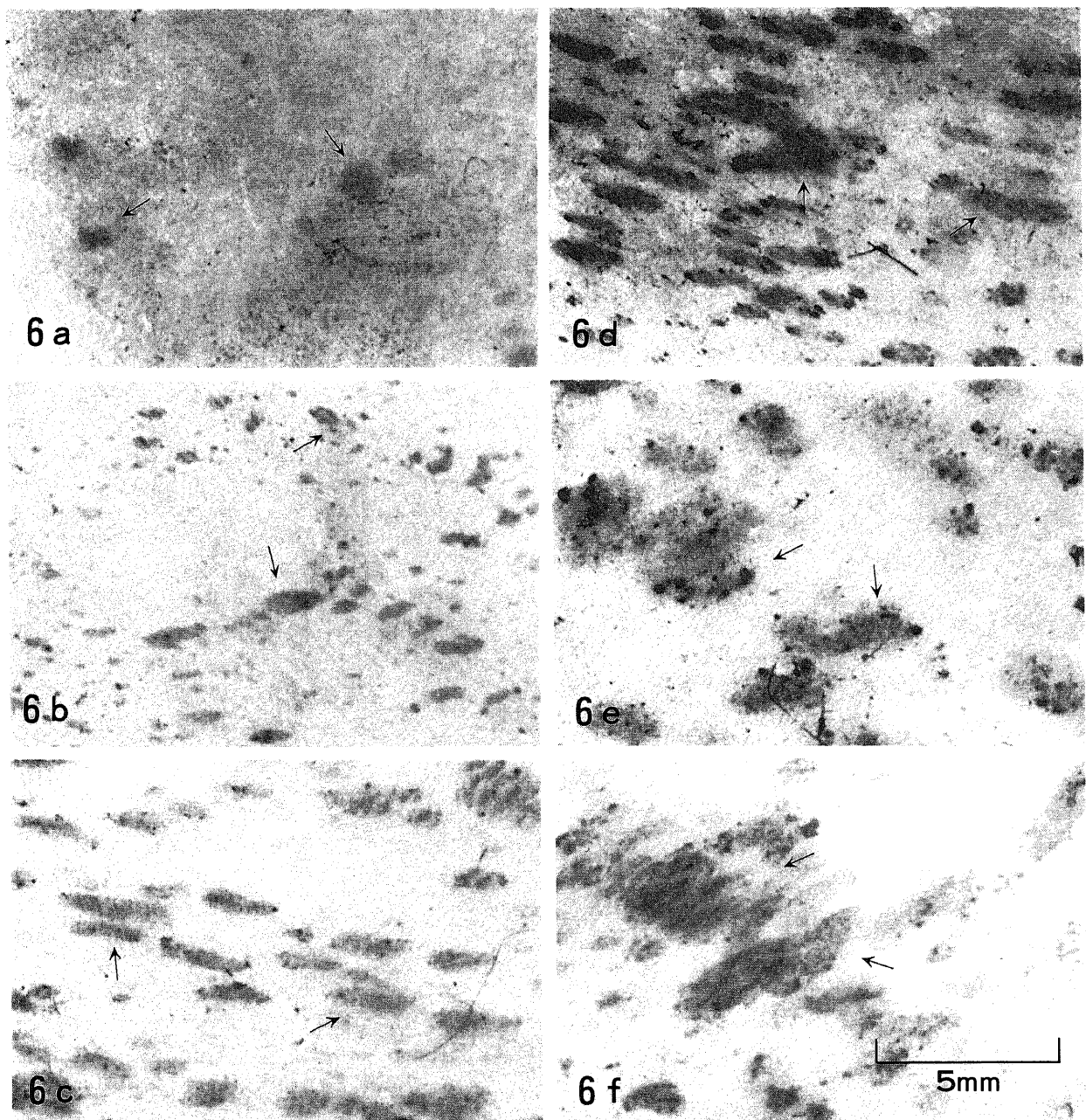


Fig. 6. Avascular milky spots on the posterior layer of omental peritoneum at 0 hr (a), 6 hr (b), 12 hr (c), 24 hr (d), 48 hr (e) and 72 hr (f) after stimulation. Size of vascular milky spot (arrows) changes at every time after stimulation.

2) 無血管性乳斑の経時的な形態学的変化

刺激した大網の無血管性乳斑は、0時間の $2.9 \pm 1.3\%$ から6時間で $6.4 \pm 2.3\%$ 、12時間で $14.6 \pm 3.0\%$ 、24時間で $21.7 \pm 3.3\%$ 、48時間で $31.2 \pm 4.3\%$ と有意に増加し ($p < 0.01$)、72時間で $34.6 \pm 3.5\%$ となった (図6, 図7)。

2. 切片標本

1) 血管性乳斑構成細胞比の経時的変化

血管性乳斑は、主として大食細胞、顆粒球、リンパ球から構成されており、その他として中皮細胞、線維細胞等が認められた (図8)。

i. 浅層細胞比の経時的変化

血管性乳斑浅層においては、大食細胞は $23.9 \sim 35.5\%$ と全観察期間を通じて最も多く存在したが、経時の変化は認められなかった。顆粒球は $2.6 \sim 5.6\%$ と少なく、経時の変化は認められなかった。リンパ球は0時間で $10.9 \pm 1.8\%$ 、6時間で $13.7 \pm 1.5\%$ 、12時間で $15.0 \pm 0.8\%$ と変化しないが、24時間で $17.1 \pm 0.4\%$ 、48時間で $28.6 \pm 1.2\%$ 、72時間で $35.0 \pm 1.2\%$ と12時間後から増加した ($p < 0.01$)。その他の細胞の比率は時間とともに減少した (図9, 図10)。

ii. 深層細胞比の経時的変化

血管性乳斑深層においては、大食細胞は0時間で $3.0 \pm$

1.3% 、6時間で $3.5 \pm 0.6\%$ 、12時間で $4.7 \pm 2.2\%$ から24時間で $10.6 \pm 0.7\%$ と増加 ($p < 0.01$)、48時間で $15.1 \pm 3.6\%$ と増加し ($p < 0.05$)、72時間で $15.0 \pm 2.6\%$ となった。顆粒球は0時間で $5.2 \pm 3.0\%$ から6時間で $15.2 \pm 4.5\%$ 、12時間で $22.5 \pm 2.2\%$ と増加し ($p < 0.01$)、24時間で $22.7 \pm 3.9\%$ から48時間で $10.5 \pm$



Fig. 8. Transverse section of vascular milky spot with macrophages, granulocytes and lymphocytes with PAS ($\times 400$). Arrows indicate the mesothelium. Capillaries (C) are seen in the deeper zone.

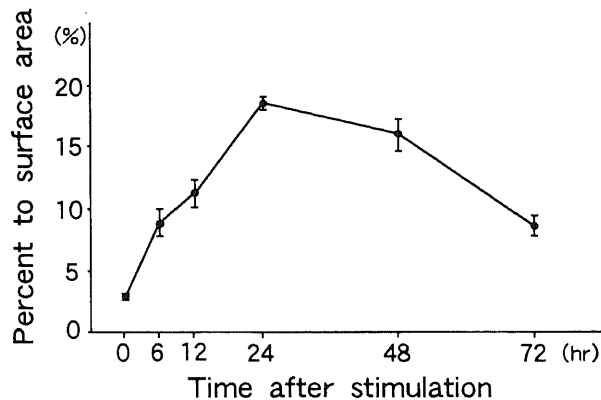


Fig. 5. Changes of percent to surface area of vascular milky spots on the posterior layer of omental peritoneum after stimulation. The data represent mean $\pm$ SD.

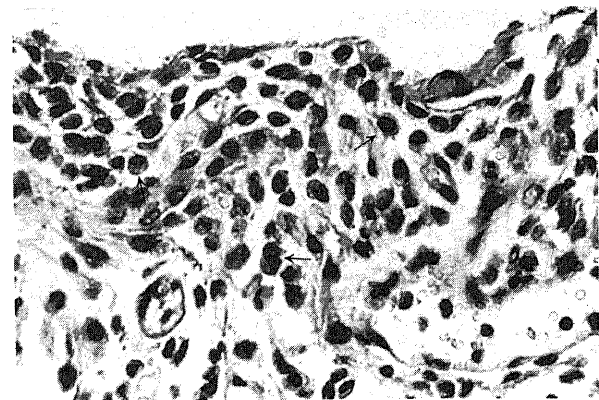


Fig. 9. Cells in the superficial zone of the vascular spots with PAS. Most of the cells are macrophages (arrows) that are stained with PAS ($\times 800$).

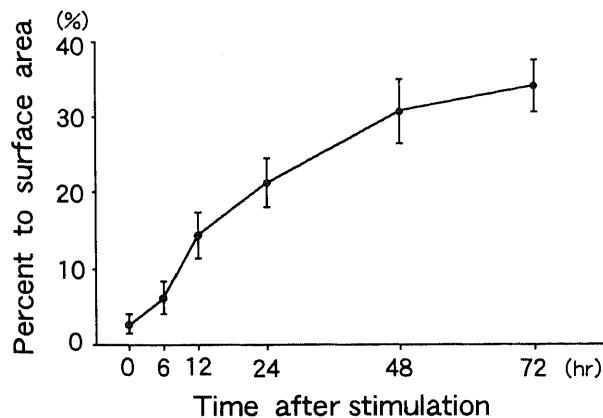


Fig. 7. Changes of percent to surface area of avascular milky spots on the posterior layer of omental peritoneum after stimulation. The data represent mean $\pm$ SD.

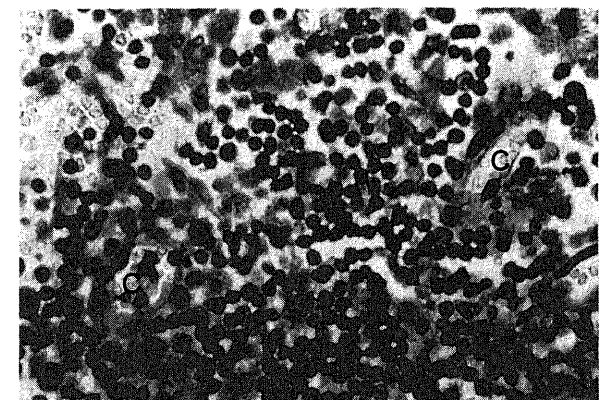


Fig. 11. Cells in the deeper zone of the vascular spots with PAS. Many lymphocytes are seen around the capillaries (C) after stimulation ($\times 800$).

2.9%と減少 ($p < 0.01$), 72時間で $6.8 \pm 1.0\%$ と減少した ($p < 0.05$). リンパ球は0時間で $26.0 \pm 2.6\%$, 6時間で $22.3 \pm 2.5\%$, 12時間で $25.6 \pm 2.1\%$ から24時間で $40.7 \pm 2.4\%$, 48時間で $53.1 \pm 6.2\%$, 72時間で $64.0 \pm 3.9\%$ と増加した ($p < 0.01$). その他の細胞の比率は時間とともに減少した (図11, 図12).

2) 無血管性乳斑構成細胞比の経時的変化

無血管性乳斑は, 主として大食細胞, リンパ球から構成されており, その他に中皮細胞, 線維細胞などが認められた. 顆粒球はほとんど認められなかった (図13).

無血管性乳斑においては, 大食細胞は $49.3 \sim 66.0\%$ と全観察期間を通じて最も多く存在したが, 経時的変化は認められなかった. 顆粒球は $0.0 \sim 0.2\%$ と極めて少なかった. リンパ球は0時間で $3.2 \pm 1.3\%$ から6時間で $4.8 \pm 0.9\%$ と増加 ($p < 0.05$), 12時間で $4.8 \pm 1.5\%$ から24時間で $6.8 \pm 1.3\%$, 48時間で $10.8 \pm 3.1\%$ と増加し ($p < 0.05$), 72時間で $9.4 \pm 1.6\%$ となった. その他の細胞の比率は時間とともに減少した (図14).

IV. 大網刺激時の血管新生の経時的な形態学的変化

1. 脂肪組織内の毛細血管の経時的観察

胃大網動静脈に沿って存在する索状の脂肪組織内の毛細血管は, 0時間ではあまり見られないが, 24時間では数多く見られ

るようになり, 48時間ではその先端に毛細血管網が発達しているのが認められた.

2. 胃大網動静脈から大網への分岐する血管の観察

胃大網動静脈から大網後葉へ分岐する血管は, 0時間に比べて24時間, 48時間と発達しているのが認められた. またその分枝数は, 0時間では少ないが, 24時間では数多く見られるようになり, 48時間では2次・3次分枝や発達した毛細血管網を認めた. 一部に血管の接合が見られ新たな血管網を形成しているのが観察された (図15).

考 察

大網には, 発達した血管とともに, 数多くの乳斑が存在しており, 感染巣の浄化作用や抗炎症作用, 血管新生機能を発揮すると考えられている. 大網乳斑の研究は古く, 1863年にRecklinghausen⁹⁾, 1874年にRanvier⁹⁾の報告がある. 大網乳斑はその存在部位・形態の違いによって, 血管性乳斑と無血管性乳斑の2種類に区分されている⁹⁾. 血管性乳斑は胃大網動静脈に沿って索状に存在する脂肪組織の辺縁部および近傍に存在して大網動静脈からの血管分布をうけている結節状の乳斑であり, 無血管性乳斑は胃大網動静脈から離れた大網腹膜上に存在して血管分布をうけていない斑状の乳斑である. 乳斑の組織学

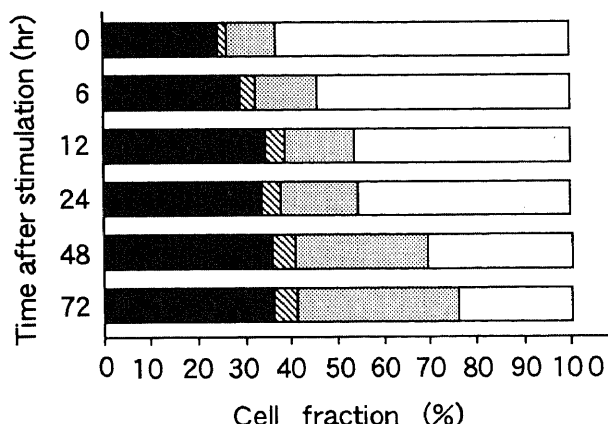


Fig. 10. Variation in cell fraction at every time after stimulation in the superficial zone of the vascular spots: ■, macrophage; ▨, granulocyte; ▩, lymphocyte; □, others.

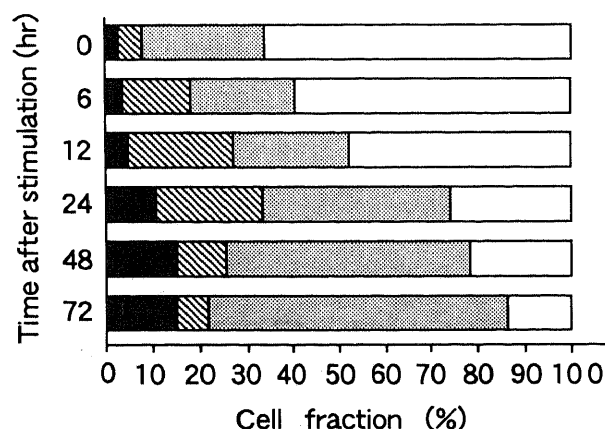


Fig. 12. Variation in cell fraction at every time after stimulation in the deeper zone of the vascular spots: ■, macrophage; ▨, granulocyte; ▩, lymphocyte; □, others.

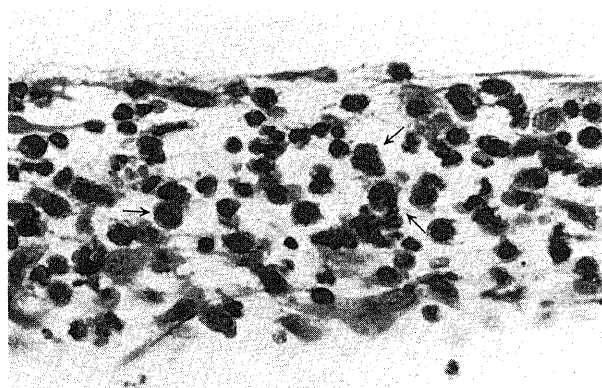


Fig. 13. Avascular milky spots with macrophages and lymphocytes with PAS. It is shown that macrophages (arrow) of all sizes are stained with PAS ($\times 800$).

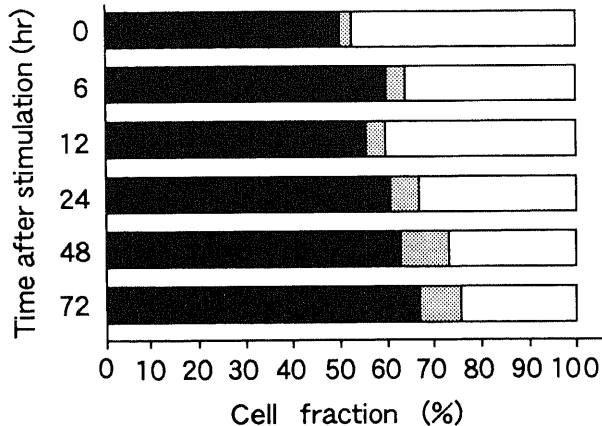


Fig. 14. Variation in cell fraction at every time after stimulation in the avascular spots: ■, macrophage; ▨, granulocyte; ▩, lymphocyte; □, others.

的ならびに細胞学的構造については、すでに光学顕微鏡レベルで多くの観察が報告され⁷⁸⁾、近年においては電子顕微鏡レベルでの観察も行なわれている⁹¹⁰⁾、これら従来の研究によって、血管性乳斑は主として大食細胞、リンパ球から構成され、浅層と深層とで構成が異なるのに対して、無血管性乳斑は血管性乳斑と同じく主として大食細胞、リンパ球から構成されているが、扁平で層構造がないことが認められている¹¹⁾。しかしながら、従来の研究では刺激した乳斑の変化に関する報告は少なく¹²¹³⁾、乳斑の経時的变化についての検討はほとんどなされていない。そこで、今回の研究では、OK-432を用いて刺激した大網から遊出した細胞と大網乳斑の経時的な形態学的変化および

大網乳斑の機能的役割について検討を行なった。

刺激した大網から遊出する細胞は、早期には顆粒球が中心であり、大食細胞やリンパ球は遅れて出現しており、古くから行なわれている腹腔内の実験的炎症における研究¹⁴⁻¹⁷⁾とはほぼ同様であった。これは、大網が腹腔内に遊出する細胞の供給源となっているため¹⁸⁻²¹⁾と考えられるが、これに大網乳斑がどのように関連しているかが興味あるところである。神谷ら²²⁾は tritium thymidine (H^3 -TdR) を使用した細胞動態の研究で、骨髓で産生される前単球・血液単球といった系列の細胞が大網乳斑で分裂・増殖の場を与えられ、生理的条件下では乳斑が腹腔大食細胞の主な供給源となっているとしている。今回の実験において、刺激した大網の単位面積あたりに占める血管性乳斑の比率は24時間まで増大し48時間以後縮小したが、この経時的变化は刺激した大網から遊出した細胞数の経時的变化と近似している。また、刺激した大網の血管性乳斑深層を構成する大食細胞・顆粒球・リンパ球それぞれの経時的变化は遊出したそれぞれの細胞の経時的变化と同様の傾向を示している。これらの結果から、乳斑が腹腔大食細胞の主な供給源となっているものと推察された。また血管性乳斑深層においては毛細血管の発達が著しいが、電子顕微鏡による観察では、この毛細血管は有窓性内皮をもつ有窓性毛細血管であることが明らかにされており²³⁾、その周囲に多くの細胞浸潤がみられることと合致している(図11)。一方、血管性乳斑浅層の細胞構成は、リンパ球は刺激後経時的に増加しているものの大食細胞は全観察期間を通じて30~40%を占めて経時的变化を示さず、また浅層から深層にかけての縦方向の切片標本で血管がほとんどみられないという24点において、血管性乳斑深層の構成と大きく異なっている。竹森ら²⁴⁾はコロイド性含糖酸化鉄の腹腔内投与による血管性乳斑の貧食能をみた研究で、投与後12時間以後、血管周囲に単核細胞の集積が見られ、活発な貧食能をもつ大食細胞によって乳斑が成長するとしており、今回の研究において血管性乳斑に2層構造が認められたのは、豊富な血管網をもつ乳斑から遊出した細胞によって、乳斑自身が覆われて浅層を形成しながら成長していくためと考えた。

一方、刺激した大網の単位面積あたりに占める無血管性乳斑の比率は経時的に増加するが、その細胞構成は血管性乳斑と異なり、大食細胞が全観察期間を通じて50~70%を占めて経時的变化を示さなかった。従来の研究は血管性乳斑が中心であり、無血管性乳斑に関する研究はほとんどみられず、またその形成過程や存在意義についてはまったく検討されていない。無血管性乳斑の意義を考えると、その形成過程が問題となる。血管のない乳斑が血管から供給される細胞で構成されているということは、その細胞は他から供給されるということになる。周知のように大食細胞には強い接着能が存在することと、今回の研究において、刺激した大網の単位面積あたりに占める無血管性乳斑の比率の増加曲線が遊出した大食細胞やリンパ球の増加曲線に近似していることから、無血管性乳斑は血管性乳斑から腹腔内に遊出した自由細胞が大網腹膜に付着して形成され、刺激による遊出細胞数の増加に伴い成長するものと考えた。しかし、血管性乳斑が強い貧食能を有しかつ腹腔内に抗炎症細胞を供給するという役割を果たしているのに対して、無血管性乳斑はどのような機能的役割を果たしているのだろうか。Dux²⁵⁾は、エールリッヒ腹水腫瘍細胞をラットおよびマウス腹腔内に移植した結果、大網乳斑の肥大が観察され、やがて乳斑は腫瘍細胞

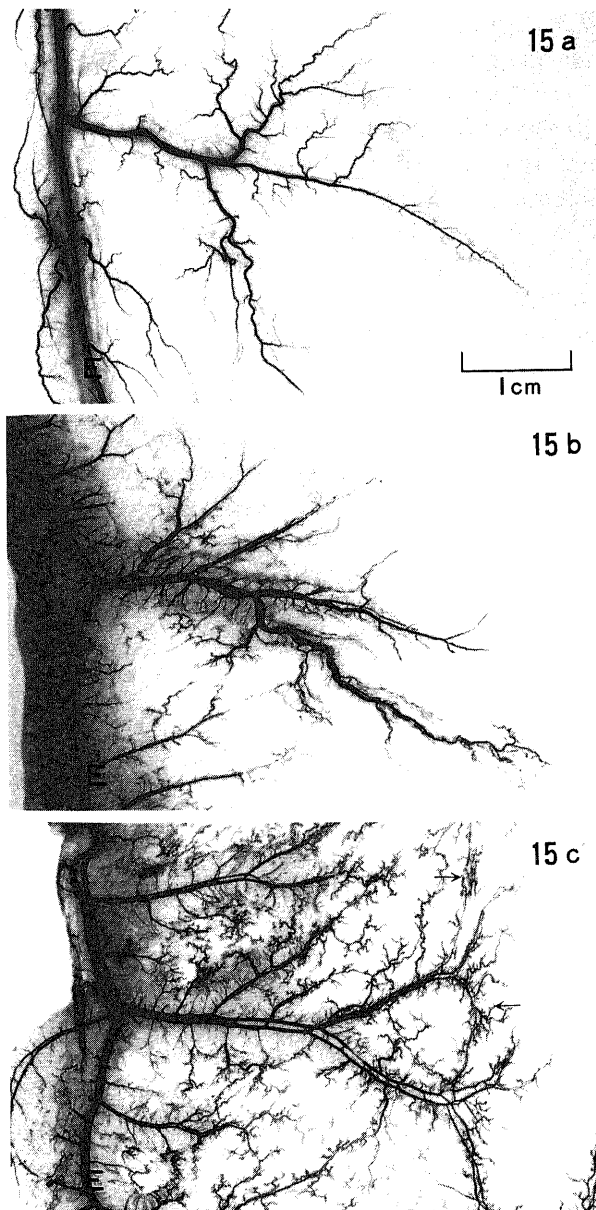


Fig. 15. Angiogenesis of the omentum with capillary glomera at 0 hr (a), 24 hr (b) and 48 hr (c) after stimulation by angiography. Blood vessels are visualized due to positive reaction. On the posterior layer of epiploic artery and vein (E) running in the middle of the omentum, short collateral branches and spheric networks of capillaries (arrows) are seen after 48 hr.

に覆われてしまったと報告している。無血管性乳斑はその大半が大食細胞であり、乳斑自体が貪食能をもつことから、大網腹膜上において腹腔内の異物を貪食する一種の防御器官として働いているものと考えたい。

ところで、感染巣に対する大網の機能的意義として、感染巣の浄化作用と血管新生による血行の増加が重要であるが、これは大網が多くの血管から構成され、豊富な血行を有することによると一般的に考えられている²⁶⁾。しかし、刺激した大網が、このような作用を発揮する過程において血管がどのように発達していくかについての詳細な報告はみられない。今回の研究では、大網に刺激を加えて経時的に造影して観察していくと、6時間や12時間では正常時とあまり変わらないが、24時間および48時間では胃大網動静脈から分岐する血管自体も太くなり、さらに多くの分枝を形成し、その先端に乳斑の血管とみられる発達した毛細血管網が認められた。また、48時間では一部に血管と血管の接合がみられ、新たな血管網が形成されているのが観察され、血管新生の状態が形態学的に確認できた。このような血管新生能は、有茎大網片で被覆した気管支吻合部の治癒に関する実験的研究でも報告されている^{27)~29)}。この血管新生機能を利用して、Cooper ら³⁰⁾は気管支形成術や肺移植術において、気管支吻合部の縫合不全や虚血による不良肉芽発生の予防手段として有茎大網片を用いている。しかし、形態学的に証明されている血管新生がどのような因子で促進され、どのような機序で起こっているかについては、近年盛んに研究されている^{31)~33)}が、いまだに明らかにされていない。Goldsmith ら³⁴⁾は、大網の脂質分画をウサギの角膜に投与することで血管新生が起こることから、血管新生促進因子は脂質性のものであると報告した。さらに Castellot ら³⁵⁾は、3T3-F442A adipocyte という分化した脂肪細胞が血管内皮細胞に特異的な成長因子を放出すると報告し、分化した脂肪組織が発達する際には同因子が放出されて血管新生が起こるのであろうと考察している。最近では、Form ら³⁶⁾や Silverman ら³⁷⁾は、インドメタシンで血管新生が抑制されることから、血管新生促進因子はプロスタグランディンではないかと報告しており、なかでもプロスタグランディン E_2 が脂質性の血管新生促進因子であろうと推察している。このように、血管新生促進因子や血管新生の機序について完全には解明されていないが、大網に刺激が加わると血管新生促進因子が働き、大網の血管のみならず周囲組織の血管新生も促すと考えられている。

大網およびその乳斑の研究については、大網の浄化・抗炎症作用および血管新生機能を利用した有茎大網充填術や気管支大網被覆術などのように臨床が先行する形で研究されてきた。それに伴って基礎的研究においても、外科のみならず病理や免疫など多くの分野で研究され、その機序が次第に明かとなってきている。今回の研究では、有茎大網片の機能について、経時的な形態学的変化をとらえることにより検討してきたが、未解決な点も残されており、今後の研究の発展をめざしている。

結 論

有茎大網片が浄化・抗炎症作用や血管新生機能を発揮する際に、大網からどのような細胞が遊出してくるか、またその時大網乳斑はどのように変化していくか、さらに大網がどのように血管を新生していくかなどを研究し、それぞれの経時的な形態学的変化およびその機能的な役割について検討し、以下のよう

な結論を得た。

1. 刺激した有茎大網片から遊出した細胞数は、24・48時間をピークとして増加し、以後減少した。

2. 刺激した有茎大網片から遊出した細胞を細胞分画別にみると、顆粒球が6~12時間で急激に増加し、大食細胞やリンパ球は遅れて増加した。

3. 刺激した大網の単位面積あたりに占める血管性乳斑の比率は、24時間まで増加し、以後減少した。

4. 刺激した大網の単位面積あたりに占める無血管性乳斑の比率は、時間と共に増加した。

5. 刺激した大網の血管性乳斑浅層においては、大食細胞が全観察期間を通じて最も多く存在したが、経時変化は認められなかった。リンパ球は12時間から増加した。

6. 刺激した大網の血管性乳斑深層においては、顆粒球が6~12時間で増加し、大食細胞とリンパ球は遅れて増加した。

7. 刺激した大網の無血管性乳斑においては、大食細胞は全観察期間を通じて最も多く存在したが、経時変化は認められなかった。顆粒球はきわめて少なく、リンパ球は時間と共に増加した。

8. 刺激した大網の血管造影では、24時間で胃大網動静脈に沿って存在する索状の脂肪組織内の毛細血管や胃大網動静脈から大網後葉へ分岐する血管の分枝が数多くみられるようになり、48時間ではさらに発達した分枝や毛細血管網を認めた。

以上の結果から、刺激した大網から遊出する細胞は主として血管性乳斑から供給され、血管性乳斑は遊出した大食細胞やリンパ球に覆われて2層構造を形成しながら成長し、また、無血管性乳斑は遊出した大食細胞やリンパ球が大網腹膜に接着する形で形成されて、共に感染巣の浄化・抗炎症作用を発揮すると考えた。また、刺激した大網の血管は24時間頃から増加して新たに毛細血管網を形成することによって血行の増加をはかり、組織の浄化作用や血管新生機能を発揮すると考えた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師渡辺洋宇教授に深甚なる謝意を表します。終始御助言を頂きました清水淳三講師をはじめ第一外科学教室の諸先生方に深く感謝致します。また、本研究に御協力頂きました高村利治技官、川岸徳子技官に感謝致します。

文 献

- 1) Virkkula, L. & Eerola, S.: Use of omental pedicle for treatment of bronchial fistula after lower lobectomy. J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 9, 287-290 (1975).
- 2) Lee, A. B. Jr., Schimert, G. & Shatkin, S.: Total excision of the sternum and thoracic pedicled transposition of the greater omentum: Useful strategems in managing severe mediastinal infection following open heart surgery. Surgery, 80, 433-436 (1976).
- 3) Lima, O., Goldberg, M., Peters, W. J., Ayabe, H., Townsend, E. & Cooper, D.: Bronchial omentopexy in canine lung transplantation. J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 83, 418-421 (1982).
- 4) Recklinghausen, F.: Über Eiter und Bindegewebskörperchen. Virchow's Arch., 28, 157-197 (1863).
- 5) Ranvier, L.: Du développement et de l'accroissement

- des vaisseaux sanguins. Arch. Phys. Norm. Pathol., 6, 429-446 (1874).
- 6) Mixer, R. L.: On macrophagal foci ("milky spots") in the pleura of different mammals, including man. Am. J. Anat., 69, 159-186 (1941).
- 7) Hamazaki, Y.: Comparative studies on the milk-spots, "tâches laiteuses" of various animals. Folia Anat. Jpn., 3, 243-265 (1925).
- 8) Mandache, E., Moldoveanu, E. & Savi, G.: The involvement of omentum and its milky spots in the dynamics of peritoneal macrophages. Rev. roum. Morphol. Embryol. Physiol., 31, 137-142 (1985).
- 9) Felix, M. D.: Observations on the surface cells of the mouse omentum as studied with the phasecontrast and electron microscopes. J. Natl. Cancer Inst., 27, 713-745 (1961).
- 10) Beelen, R. H. J., Fluitsma, D. M. & Hoefsmit, E. C. M.: The cellular composition of omentum milky spots and the ultrastructure of milky spot macrophages and reticulum cells. J. Reticuloendothel. Soc., 28, 585-599 (1980).
- 11) 竹森信男: マウス大網における乳斑の形態学的研究: 光学ならびに電子顕微鏡観察. 北海道医誌, 54, 265-283 (1979).
- 12) Shimotsuma, M., Kawata, M., Hagiwara, A. & Takahashi, T.: Milky spots in the human greater omentum: Macroscopic and histological identification. Acta Anat., 136, 211-216 (1989).
- 13) Cranshaw, M. L. & Leak, L. V.: Milky spots of the omentum: A source of peritoneal cells in the normal and stimulated animal. Arch. Histol., Cytol., 53, 165-177 (1990).
- 14) Szaniawska, B.: Changes in the greater omentum of mice of different strains after intraperitoneal immunization with sheep erythrocytes. Arch. Immunol. Ther. Exp., 22, 585-593 (1974).
- 15) Beelen, R. H. J., Fluitsma, D. M. & Hoefsmit, E. C. M.: Peroxidatic activity of mononuclear phagocytes developing in omentum milky spots. J. Reticuloendothel. Soc., 28, 601-609 (1980).
- 16) Uchida, A. & Klein, E.: Activation of human blood lymphocytes and monocytes by the streptococcal preparation OK432: Enhanced generation of soluble cytotoxic factors. Immunol. Lett., 10, 177-181 (1985).
- 17) Ratajczak, M. Z., Jaskulski, D., Pojda, Z. & Jedrzejczak, W.: Omental lymphoid organ as a source of macrophage colony stimulating activity in peritoneal cavity. Clin. Exp. Immunol., 69, 198-203 (1987).
- 18) 平田ともゑ: 腹腔内単球並に大網乳斑に関する研究. 日血会誌, 9, 3-9 (1946).
- 19) Volkman, A. & Gowans, J. L.: The production of macrophages in the rat. Br. J. Exp. Pathol., 46, 50-61 (1965).
- 20) Volkman, A.: The origin and turnover of mononuclear cells in peritoneal exudates in rats. J. Exp. Med., 124, 241-254 (1966).
- 21) Imai, Y., Kasajima, T. & Matsuda, M.: Electron microscopic study on the peritoneal macrophage and milky spot in omentum. Recent Adv. Reticuloendothel. Syst. Res. 11, 54-84 (1973).
- 22) 神谷 修, 太田 宏: Mononuclear phagocyte system (単核食細胞系): その細胞動態と大網乳斑の役割. 医学のあゆみ, 80, 617-621 (1972).
- 23) Bartoszewicz, W. & Dux, K.: Electron-microscopic examinations of omental milky spots of normal mice. Nowotwory, 18, 225-230 (1968).
- 24) 竹森信男, 伊藤 隆: コロイド性含糖酸化鉄の腹腔内投与によるマウス大網乳斑の変化: 光学ならびに電子顕微鏡の観察. 北海道医誌, 56, 199-216 (1981).
- 25) Dux, K.: Role of the greater omentum in the immunological response of mice and rats to the intraperitoneal inoculation of Ehrlich ascites tumor. Arch. Immunol. Ther. Exp., 17, 425-432 (1969).
- 26) Dux, K.: Proliferative activity of macrophages in the greater omentum of the mouse in relation to the early postnatal development of the vascular structure. J. Leucocyte Biol., 40, 445-458 (1986).
- 27) Morgan, E., Lima, O., Goldberg, M., Ayabe, H., Ferdman, A. & Cooper, J. D.: Improved bronchial healing in canine left lung reimplantation using omental pedicle wrap. J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 85, 134-139 (1983).
- 28) Nelson, R. J., White, R. A. & Hirose, F. M.: Neovascularity of a tracheal prosthesis/tissue complex. J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 86, 800-808 (1983).
- 29) Dubois, P., Choiniere, L. & Cooper, J. D.: Bronchial Omentopexy in canine lung allotransplantation. Ann. Thorac. Surg., 38, 211-214 (1984).
- 30) Cooper, J. D., Pearson, F. G., Patterson, G. A., Todd, T. R. J., Ginsberg, R. J. & DeMajo, W. A. P.: Technique of successful lung transplantation in humans. J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 93, 173-181 (1987).
- 31) Ausprunk, D. H. & Folkman, J.: Migration and proliferation of endothelial cells in performed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. Microvasc. Res., 14, 53-65 (1977).
- 32) Greenburg, G. B. & Hunt, T. K.: The proliferative response in vitro of vascular endothelial and smooth muscle cells exposed to wound fluids and macrophages. J. Cell Physiol., 97, 353-360 (1987).
- 33) Form, D. M., Pratt, B. M. & Madri, J. A.: Endothelial cell proliferation during angiogenesis: *In vitro* modulation by basement membrane components. Lab. Invest., 55, 521-530 (1986).
- 34) Goldsmith, H. S., Griffith, A. L., Kupfermann, A. & Catsimpoles, A.: Lipid angiogenic factor from omentum. JAMA, 252, 2034-2036 (1984).
- 35) Castellot, J. J. J., Karnovsky, M. J. & Spiegelman, B. M.: Potent stimulation of vascular endothelial cell growth by differentiated 3T3 adipocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 6007-6011 (1980).
- 36) Form, D. M. & Auerback, R.: PGE₂ and angiogenesis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 172, 214-218 (1983).

- 37) Silverman, K. J., Lund, D. P., Zetter, B. R.,
Lainey, L. L., Shahood, J. A., Freiman, D. G., Folkman,
J. & Barger, A. C.: Angiogenic activity of adipose tissue.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 153, 347-352 (1988).

Experimental Studies on the Functions of Cleansing, Anti-inflammation and Angiogenesis with Omental Pedicle Flap Koichiro Kobayashi, Department of Surgery (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., 102, 70—80 (1993)

Key words pedicle transposition of the greater omentum, omentum, milky spots, angiogenesis, macrophage

Abstract

The Omental pedicle flap has been frequently used for empyema with bronchopleural fistula, mediastinal infection and ischemia of the anastomosis of bronchus because of its cleansing function, anti-inflammatory function and angiogenesis. However, those mechanisms are not clear. The purposes of the present experiment were to make clear them. Experimental studies were done using fifty New Zealand White rabbits which were divided into 3 models. In Model I, the cells in exudates were examined at various intervals from the omental pedicle flap after stimulation with OK-432. In Model II, the milky spots of the omentum were examined at various intervals after stimulation. In Model III angiogenesises of the omentum were examined by angiography. The number of cells in exudates from the stimulated omentum increased for 24 hours and began to decrease from 48 hours after stimulation. Granulocytes increased rapidly, and macrophages and lymphocytes also increased but at a later stage. The size of the vascular milky spots increased for 24 hours and began to decrease from 24 hours after stimulation. However, the size of the avascular milky spots increased for 72 hours. In the superficial zone of the vascular spots, most of the cells were macrophages and their number remained constant. Lymphocytes began to increase from 12 hours after stimulation. In the deeper zone of the vascular spots, granulocytes increased for 12 hours but macrophages and lymphocytes increased later. In the avascular spots, most of the cells were macrophages but their number remained constant. Lymphocytes increased for 72 hours. Few granulocytes were observed at any time. By angiography after stimulation via the epiploic artery, it was found that branches on the posterior layer and microvasculature in the fat tissue increased after 24 hours. Therefore, many capillary glomera were formed and many milky spots developed in the omentum. From the result of the present study, it can be concluded as follows: The vascular spots supply free cells in the peritoneal cavity and are enlarged by the cells. Therefore, those structures divide into two zones. The avascular spots form in the peritoneum of the omentum by adhesion of these macrophages and lymphocytes. Both of the two spots have a cleansing and an anti-inflammatory function. Increasing blood supply with neovascularity cleans the necrotic tissue and promotes angiogenesis.