

Sequential Morphological Changes of Endothelial Lesions after Temporary Arterial Clipping -Fine Structure of Regenerating Endothelial Cells-

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/2297/7998

一時的動脈クリッピングの血管内膜に及ぼす影響

— 再生内皮細胞の微細構造 —

金沢大学医学部脳神経外科学講座 (主任：山本信二郎教授)

谷 彦

(昭和62年12月18日受付)

一時的動脈クリッピングの血管，特に内膜に及ぼす影響を走査電顕と透過電顕を用い検索した。締挾力が120gのHeifetzクリップでWistar系ラットの総頸動脈を30分間クリッピングし，クリッピング開放直後，1，3，6，24時間後および3，5，7，14，30日後に標本を採取した。クリッピング部位では完全に内皮細胞は剝脱し，露出した内皮下組織に血小板が付着し，強い内膜損傷が起きていた。3日後に周辺正常内皮細胞の増殖による修復がみられ，7日後には損傷部は再生内皮細胞により完全に被覆されていた。幼若な再生内皮細胞の特徴として，その内腔面に多数の微絨毛様突起が観察された。その直径は100～150nmであり，長さは0.2～1μmであった。細胞内では粗面小胞体，ゴルジ装置が発達し，遊離リボソームが豊富に存在していたが，Weibel-Palade小体およびpinocytotic vesicleの数は少なかった。細胞の成熟と共に，Weibel-Palade小体，pinocytotic vesicleの数は増加し，微絨毛様突起および遊離リボソーム，粗面小胞体，ゴルジ装置は減少していた。14日後には微絨毛様突起はほとんどみられなくなり，30日後には正常内皮細胞のみが観察された。以上，一時的動脈クリッピングにより内膜損傷が起こるが，大きな血栓形成や動脈硬化への進展を見ることなしに約14日間で損傷がほぼ修復されることが示された。その修復過程で，幼若内皮細胞から成熟内皮細胞への移行が観察された。

Key words temporary clipping, fine structure, endothelial damage, regeneration, microvillous projections

血管外科において，クリップを用い一時的に血流を遮断する操作 (temporary clipping) はよく行われ，脳神経外科においても，特に血管吻合術の際には必要不可欠である。しかし，血管はこのクリッピングによりある程度の血管損傷をきたすことが認められており，内皮細胞の剝脱，露出した内皮下組織への血小板の付着等の内膜の損傷が主に走査電顕で示されている^{1)~11)}。これらの内膜損傷の結果として血栓や動脈硬化性病変による血管の狭窄や閉塞が危惧されるが，損傷後の過程を経時的に観察した報告は著しく限られ，Dujovny⁷⁾およびThurston⁸⁾による走査電顕での報告しかない。

本研究では，ラットの総頸動脈をクリップで一時的に遮断し，テンポラリー・クリッピングの血管，特に内膜に及ぼす影響を走査電顕と透過電顕を用い経時的に30日間にわたり検索した。

材料および方法

体重200～300gのWistar系ラット33匹を使用した。ウレタン1mg/g腹腔内注射による麻醉下に無菌的に総頸動脈を露出し，両側頸動脈を一時的にクリッピングした。クリッピングにはブレードの幅が1.5mmで，長さが8mmのHeifetzクリップを用い，ブレードの基部より4mmの位置でクリッピングした。クリップの締挾力をトランスジューサ (日本光電FDピックアップSB-1T) および，ひずみ・圧力計用前置増幅器 (日本光電RP-3) を用い測定した。ブレードの先端が約1mm開くの要する力は図1に示す如くブレードの基部から先端にかけて指數的に減少し，基部より4mmにおける締挾力は約120gである。クリッピング時間は30分間とし，開放直後，1，3，6，24時間後，3，5，7，14，30日後にクリッピング部

Abbreviations: MVP, microvillous projection.

位の血管標本を採取した。標本数は、各時期において、走査電顕用に2~3個、透過電顕用に2個である。走査電顕用の標本の場合、麻酔下に開胸し、右心房を切除後、左心室より0.1M カコジル酸塩緩衝2.5%グルタルアルデヒド液 (pH 7.4, 4°C) を120 mmHgの圧力で100 ml 灌流し、直ちに標本を採取した。さらに同固定液で90分間固定し、同緩衝2%オスミウム酸液で90分間後固定を行った。固定後、エタノール系列で脱水し、最後に99%酢酸イソアミルでアルコールを置換し、臨界点乾燥を行った。標本を長軸方向に半切し、カーボン、白金による表面蒸着を行い、走査電子顕微鏡 (日本電子 JEM-100B 型) で観察した。透過電顕用の標本の場合には、開胸後、左心室より2.5%グルタルアルデヒドを10 ml 注入し、直ちに標本を採取した。その後、走査電顕用の標本と同様に前固定、後固定し、脱水後、Mollenhauer¹²⁾の方法によりエボン・アラルダイトで包埋した。血管長軸方向に超薄切片を作製し、酢酸ウラニールと鉛の二重染色を行い、電子顕微鏡 (日本電子 JEM-100B 型及び日立 HU-11-DS 型) で観察した。

成 績

I. 正常対照群

A

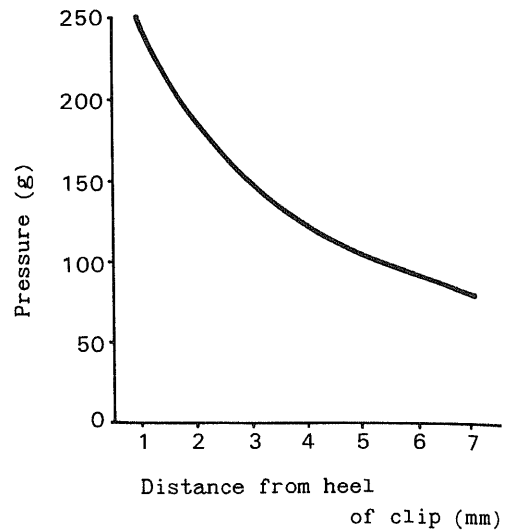
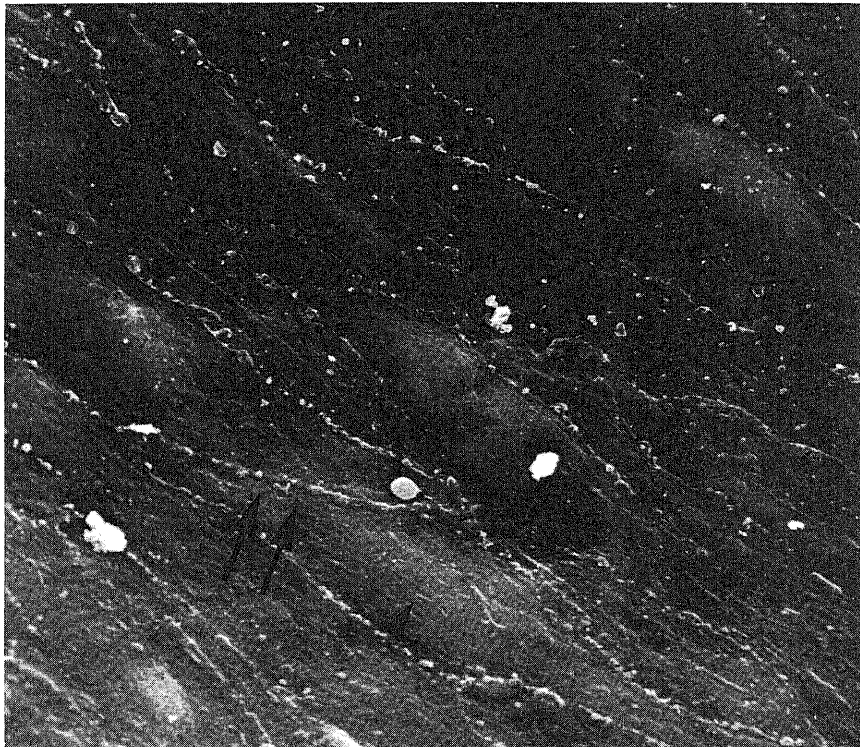


Fig. 1. The occlusive pressure at each distance from heel to top of the clip. The pressure that was able to open the clip 1 mm at the measuring point was used to define the occlusive pressure.

1. 走査電顕像

正常の内皮細胞は、辺縁ヒダで画された扁平紡錘形を呈し、血管の長軸方向に沿って規則正しい配列を示す(図2-A)。各細胞の中央は核による膨隆を示し、表面はほぼ平滑であるが、強拡大では pinocytotic vesicle による多数の micropore が認められる(図2-B)。

2. 透過電顕像

内皮細胞の核、胞体は扁平な紡錘形を呈する。胞体内には多数の pinocytotic vesicle が細胞膜に接してみられ、糸粒体や粗面小胞体等の細胞内小器官の他、血管内皮細胞に特徴的とされる Weibel-Palade 小体¹⁾が多数みられる。細胞基底部、細胞相互接触部付近の細胞質には少量の線維が存在する。隣接する細胞間は intermediate junction もしくは tight junction で結ばれ、複雑な interdigitation を示し、内腔面には辺縁ヒダを形成する。内皮細胞は基底膜を有し、少量の

内皮下結合組織がある。内弾性板があり、中膜は平滑筋細胞と太い弾性板が層状に配列する。

II. クリッピング開放直後～24時間

1. 走査電顕像

クリッピング部位に一致し、約0.3～0.5mmの幅で帯状の内皮細胞の剥離脱落がみられる(図3-A)。その辺縁より更に0.25～0.35mmの範囲内に、不規則な内皮細胞の剥離脱落があり、残存する内皮細胞も著明な挫滅を示す。内皮細胞が剥離した部分では、表面粗な板状構造をなす内皮下組織が露出し、その上に血小板が付着している(図3-B)。

2. 透過電顕像

内皮細胞の剥離部位では、内皮下組織が僅かに残存し、その上に数層の血小板の付着が認められる(図3-C)。内弾性板の断裂はない。中膜では、多くの平滑筋細胞が著明な変性壊死を示している。

3時間後から内腔表面に白血球の遊走がみられる

B

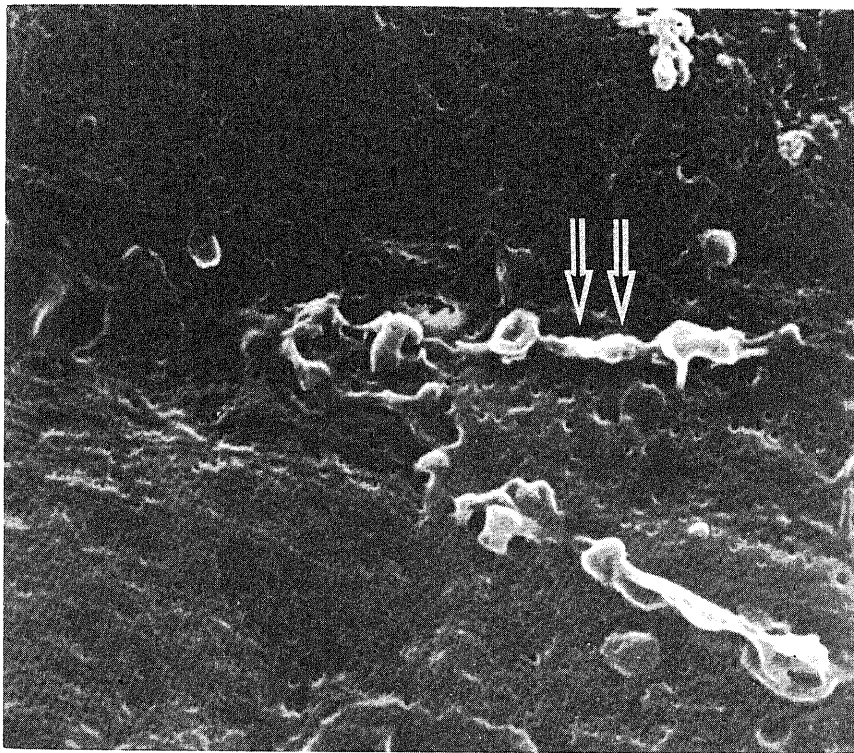
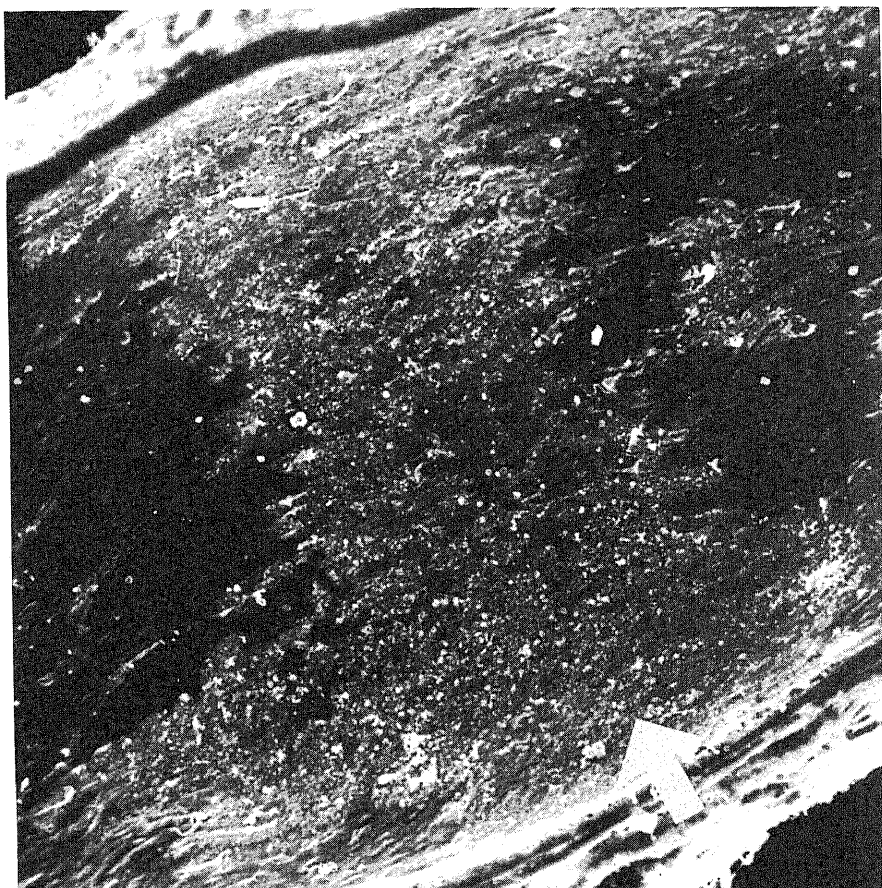


Fig. 2. Control specimens.

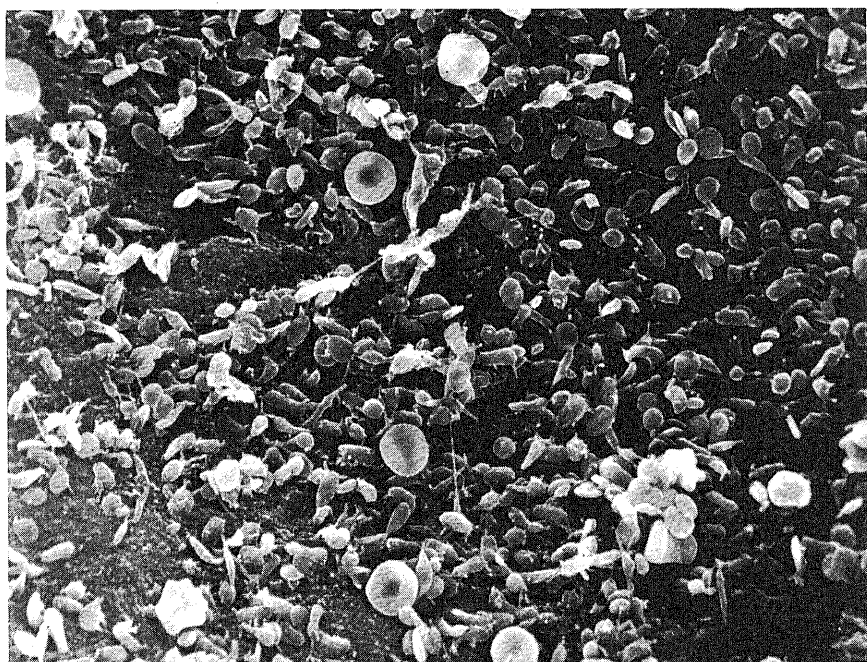
A: Scanning electron micrograph (SEM) of the endothelial surface shows marginal fold (arrows), and nuclear protrusions (arrow head). The endothelial cells are oriented parallel to the long axis of the artery. $\times 1,150$.

B: Higher magnification of the endothelial cells. A large number of micropores is observed at the surface of the endothelial cells. Arrows indicate marginal fold. SEM. $\times 11,500$.

A



B



が、その他の所見は24時間後まで上述の所見を維持する。

III. クリッピング開放後3日

1. 走査電顕像

内皮細胞剝離部はいぜんとして血小板に覆われているが、その周辺部位に異常な細胞群がみられる。これらの細胞は多角形ないしは短紡錘形をなし、中央の膨隆が著明である。細胞の配列は不規則で、細胞間には辺縁ヒダがなく、多数の裂隙を認める(図4-A, B)。細胞表面には微絨毛様突起(microvillous projec-

tion, MVP)が認められ、細胞の中央部に密生している。正常内皮細胞でみられたmicroporeはほとんどみられない(図4-C)。

2. 透過電顕像

上述の内皮細胞剝離部に隣接して存在する異常な細胞は、内腔へ膨隆した立方形をなし、大型の核を持つ(図4-D)。胞体内には遊離リボソームが豊富で、粗面小胞体、ゴルジ装置が良く発達しているが、pinocytotic vesicleは少なく、Weibel-Palade小体はみられない。細胞表面にはMVPがあり、その直径は100~150nm

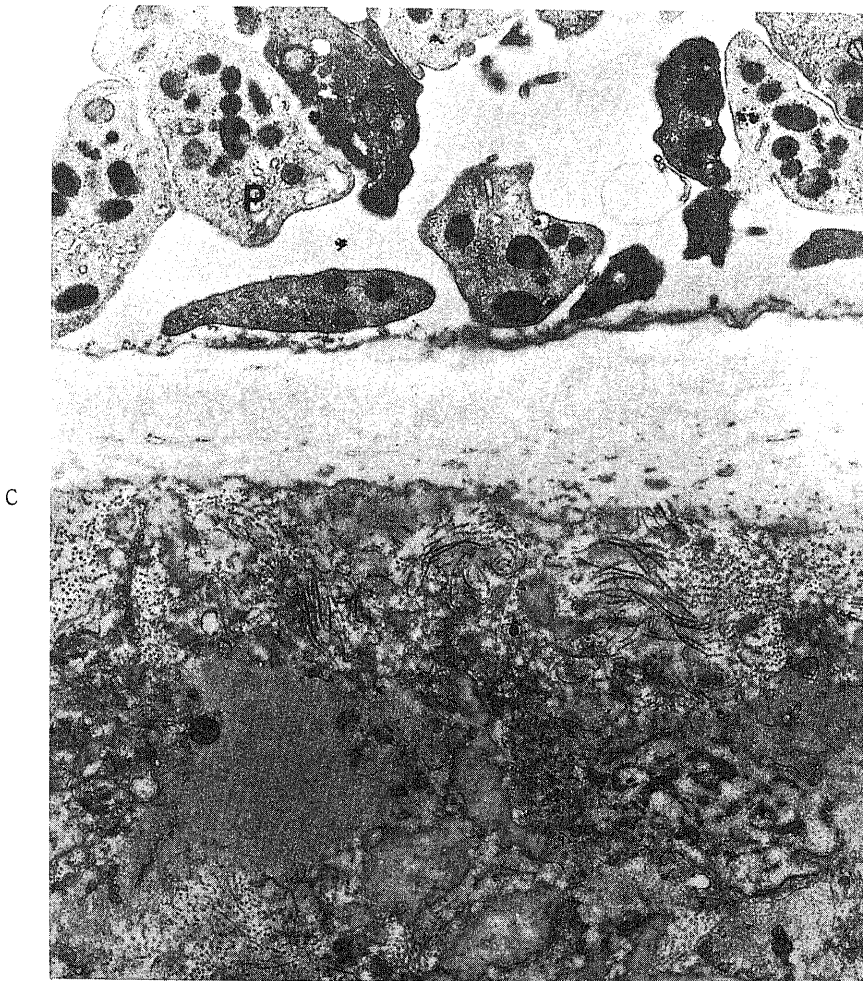


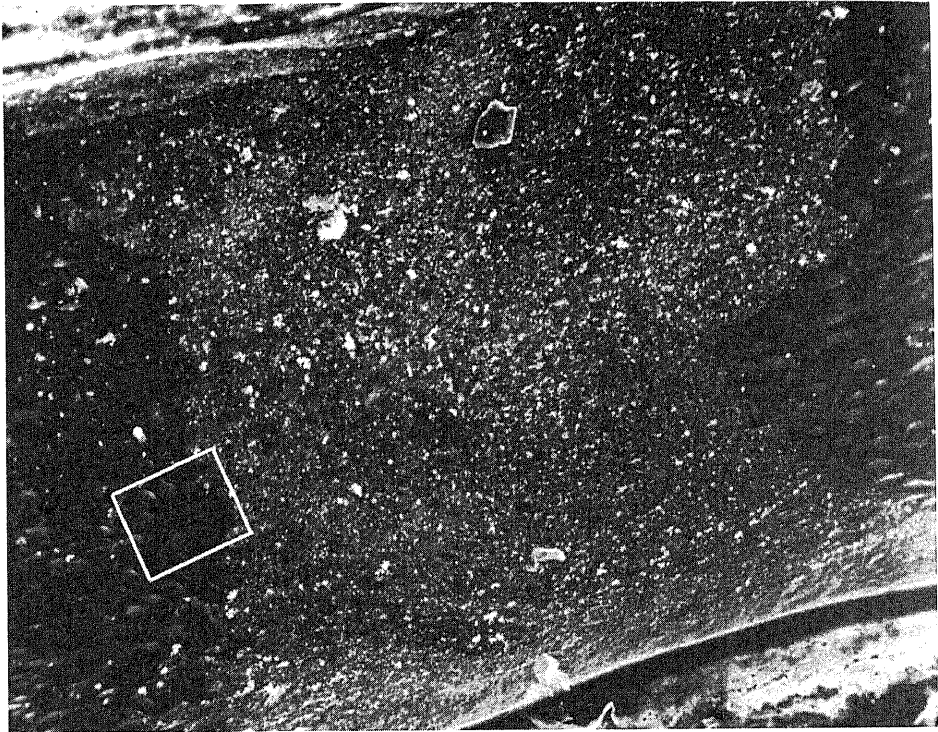
Fig. 3. Immediately after temporary clipping.

A: Very low magnification micrograph of the luminal surface. Endothelial cell desquamation area (large arrow) displays the site of the clip. SEM $\times 140$.

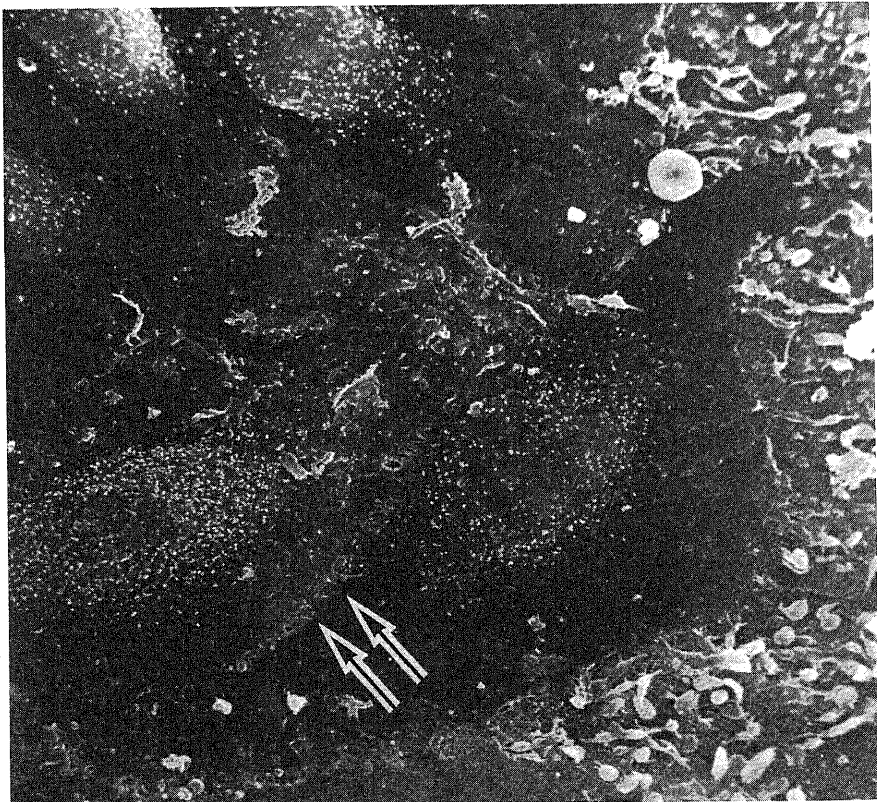
B: Higher magnification view of Fig. 3-A. Exposed subendothelial tissue is covered with platelets. SEM $\times 1,150$.

C: Transmission electron micrograph of the clipping site shows an adhesion of a few layers of platelets (P) on the exposed subendothelium and a degeneration of medial smooth muscle cells. $\times 10,800$.

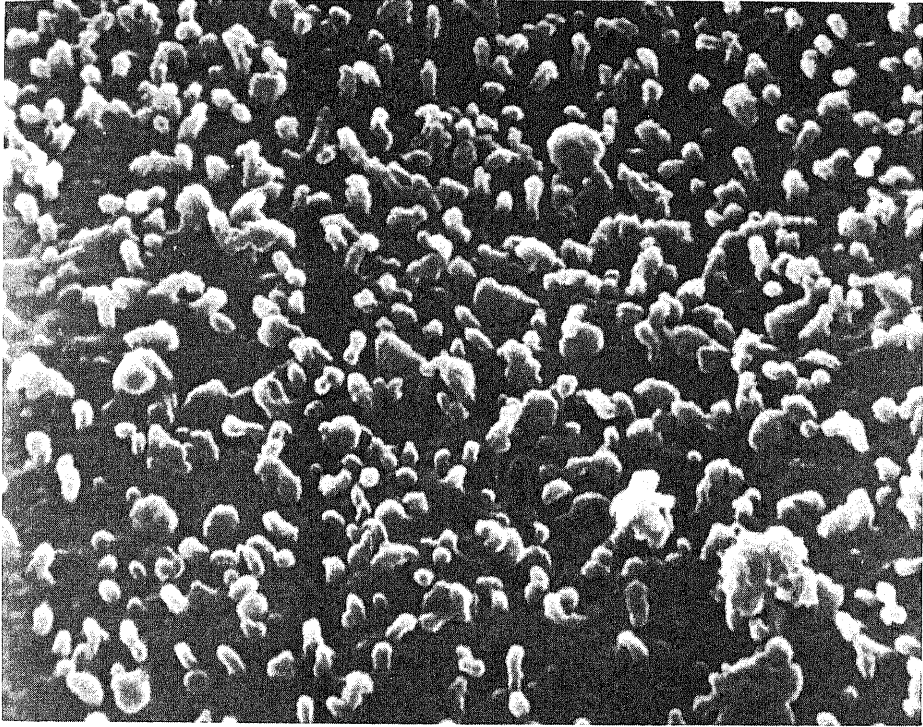
A



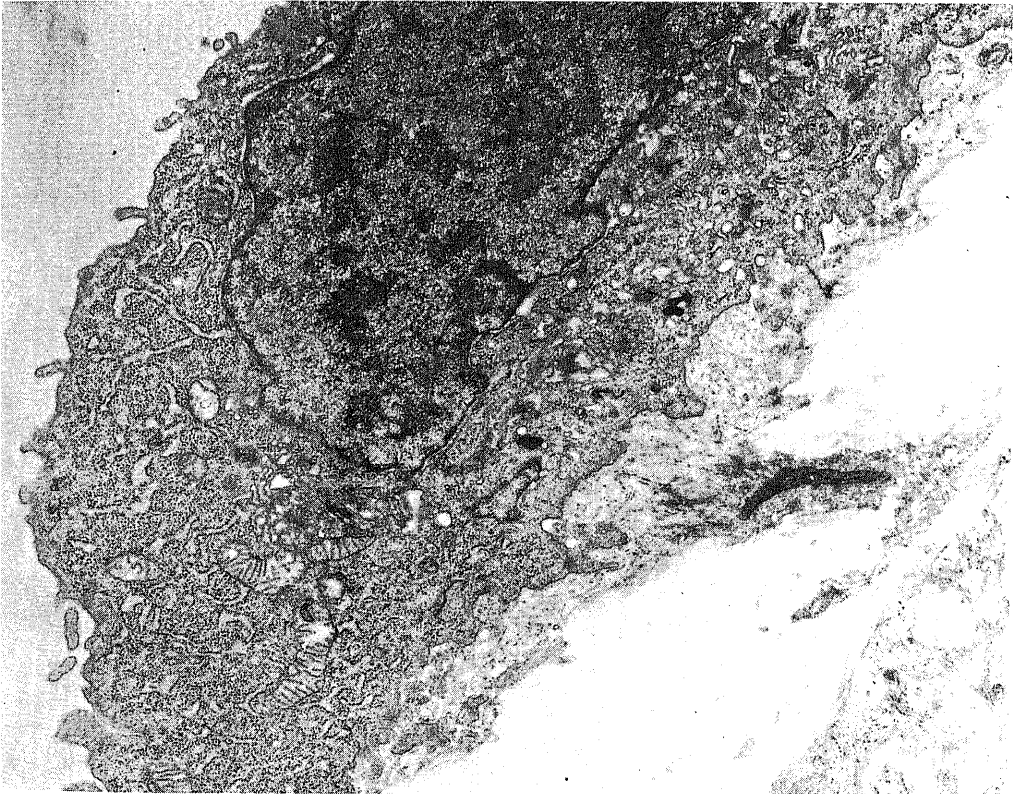
B



C



D



で、長さは $0.2\sim 1\mu\text{m}$ 程度である。MVPの内部には時に細維線が認められる。隣接する細胞間はintermediate junctionもしくはtight junctionを有し結合している場合と、結合がなく離開している場合とがある。中膜ではクリッピング部位におおむね範囲に控滅像

があるが、その周辺に、粗面小胞体が著明に発達したmodified smooth muscle cellの増殖がみられる(図4-E)。

なお、この時期に光顕でしばしば内皮細胞の核分裂像がみられた。

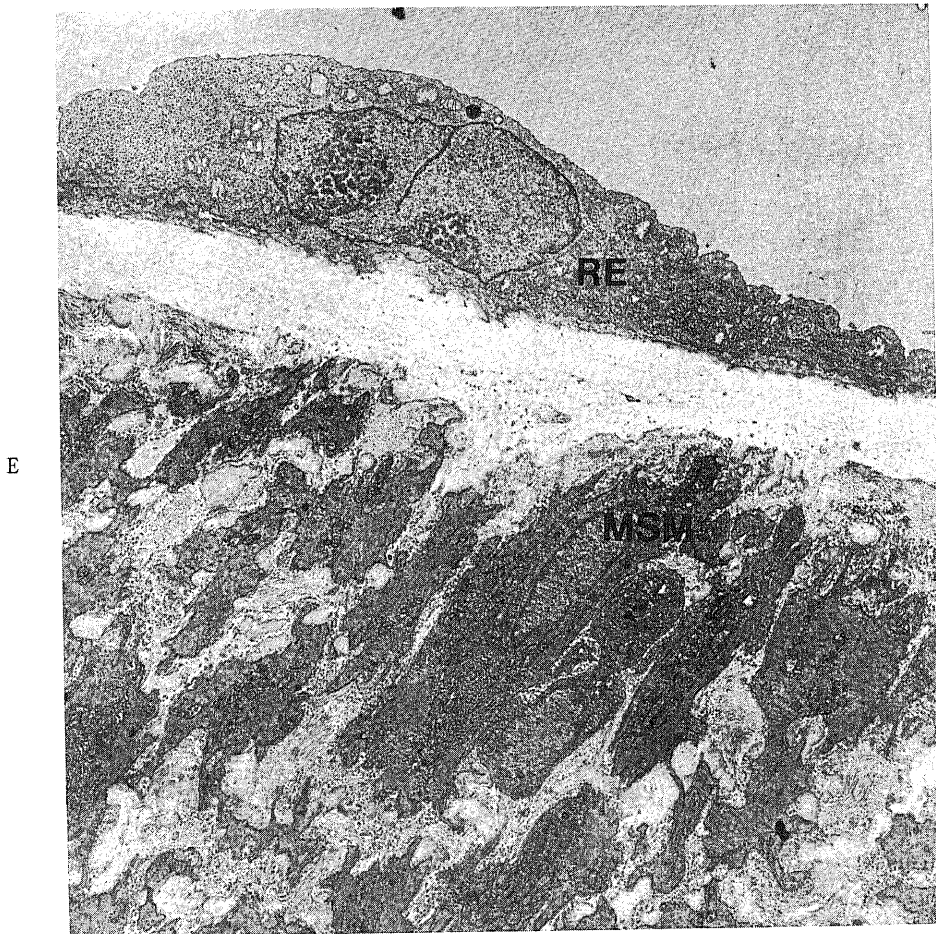


Fig. 4. Three days after temporary clipping.

A: Very low magnification micrograph of the luminal surface shows a transverse denuded lesion at the clipping site yet. SEM $\times 140$.

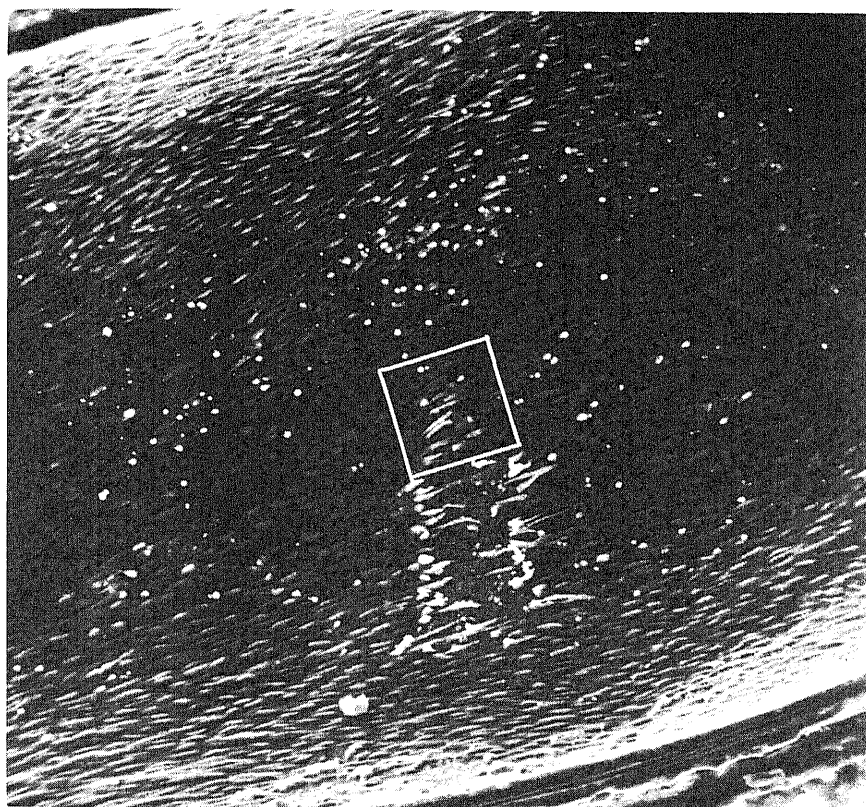
B: Enlargement of rectangle in Fig. 4-A. At the margin of the denuded area, the endothelial cells, polygonal in shape and prominent nuclear protrusions, are seen. Note a large number of microvillous projections on the surface and discontinuities (arrows) at the margins between the cells. SEM $\times 1,150$.

C: Higher magnification of the central part of the cell shown in Fig. 4-B. Numerous microvillous projections are seen, but micropores are not observed. SEM $\times 11,500$.

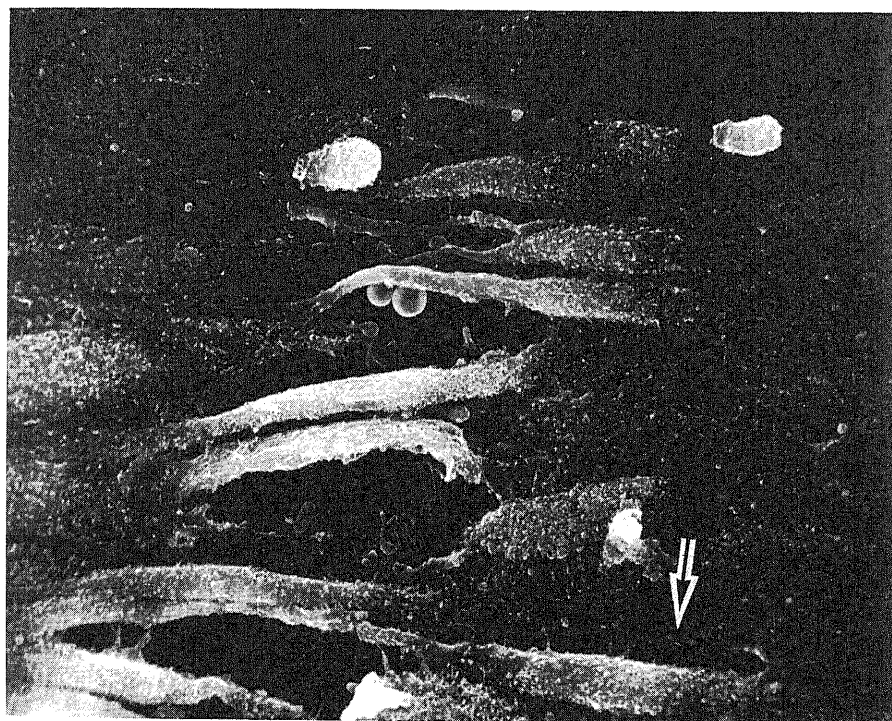
D: Transmission electron micrograph of the regenerating cell at the margin of the denuded area. The cell has microvillous projections at the luminal surface, and contains well developed rough endoplasmic reticula and many free ribosomes, but few pinocytotic vesicles. $\times 10,800$.

E: At the margin of the clipping site, many modified smooth muscle cells (MSM) are observed in the media. RE, regenerating endothelial cell. TEM $\times 4,500$.

A



B



IV. クリッピング開放後5日

1. 走査電顕像

内皮細胞剥離部位は僅かの部分を残し両側より連続的に修復されている (図 5-A). 修復の先端を担う細胞は表面に多数の MVP を持ち、その細胞質の一部は露出した内皮下組織の上を血管長軸方向に長く伸び、対側の修復細胞のそれと結合している (図 5-B). 隣接する細胞間の結合は不完全で、多数の裂隙がみられる。MVP は細胞の中央部に多い傾向があるが、ほぼ細胞全体に分布している。

2. 透過電顕像

修復細胞表面には多数の MVP を認める (図 5-C). 細胞内には遊離リボソーム、粗面小胞体が豊富であ

る。pinocytotic vesicle は少ない。Weibel-Palade 小体を有する細胞が少数ながらもみられる。隣接する細胞は intermediate junction もしくは tight junction で結合しているが、結合がなく離開しているものもある。中膜では modified smooth muscle cell の増殖をみる。

V. クリッピング開放後7日

1. 走査電顕像

損傷部位は内皮細胞により完全に修復されている。修復細胞は内腔に隆起した紡錘形を呈し、血管長軸に沿いおおむね規則正しく配列している。細胞表面にはなお多数の MVP がみられ (図 6-A), 特に細胞の配列に乱れのある部位に多い。細胞間には辺縁ヒダがはっ

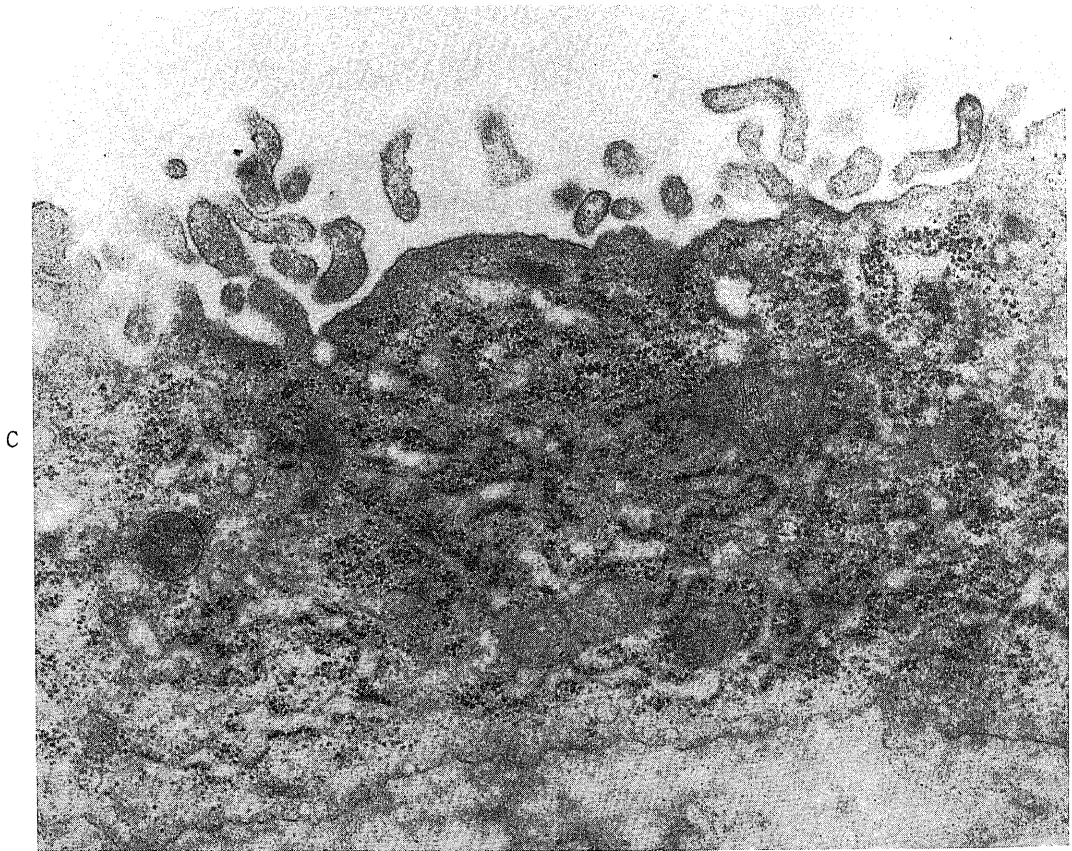


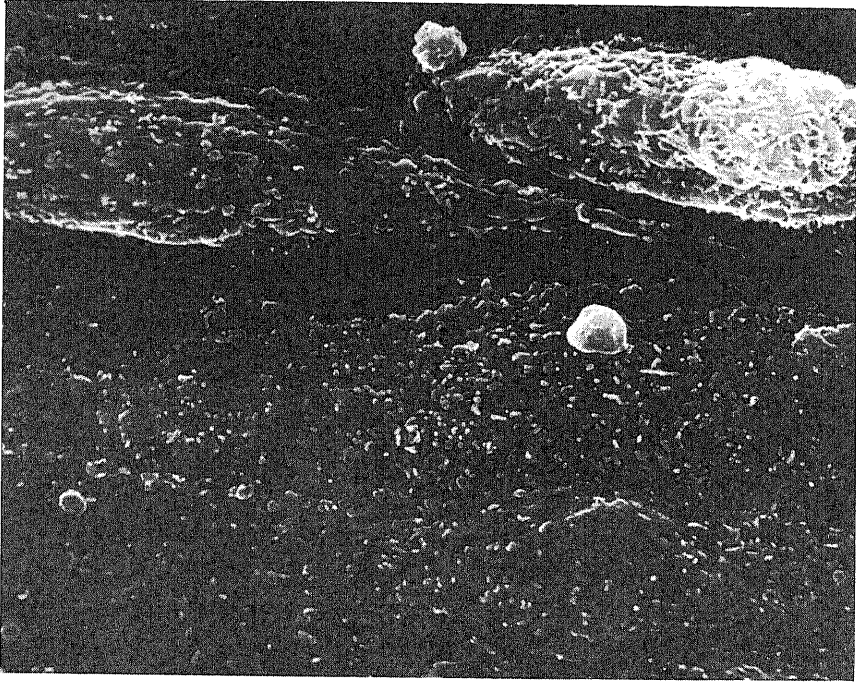
Fig. 5. Five days after temporary clipping.

A: Very low magnification micrograph of the luminal surface. Much of the denuded area is covered with the regenerating cells continuously. SEM $\times 140$.

B: Enlargement of rectangle in Fig. 5-A. The regenerating cells at the advancing edge have numerous microvillous projections on the surface. The cytoplasm of these cells extend longitudinally as a long process on the subendothelium and contact with opposite cells. Between adjacent cells, many cleavages (arrow) are seen. SEM $\times 1,150$.

C: Higher magnified transmission electron micrograph of the regenerating cell. Many microvillous projections are seen at the luminal surface. $\times 27,000$.

A



B



きりと連続してみられ、裂隙はもはや認められない。

2. 透過電顕像

細胞は長紡錘形をなし、細胞内腔面には MVP があ
るが、その密度は細胞により異なる。MVP の多少にか
かわらず、pinocytotic vesicle が内腔側にも基底面側
にも、3日後、5日後のものより多い。一方、遊離リ
ボゾーム、粗面小胞体は減少している。多くの細胞に
は Weibel-Palade 小体が見られ、時に多数の同小体を
認める (図 6-B)。細胞間には intermediate junction も
しくは tight junction で結合し、辺縁ヒダが見られる
(図 6-C)。中膜では、なお modified smooth muscle
cell が多い。

VI. クリッピング開放後 14 日

1. 走査電顕像

辺縁ヒダで画された扁平紡錘形の細胞が、血管長軸

に沿って規則正しく配列し、ほぼ正常像を示している
(図 7-A)。細胞表面には少数の MVP がみられるが、多
くは $0.2\mu\text{m}$ 以下の痕跡状のものである。

2. 透過電顕像

胞体、核共に扁平で長い (図 7-B)。MVP はほとん
どみられない。pinocytotic vesicle が形質膜に沿って著
明に存在し、多数の Weibel-Palade 小体が見られる。
遊離リボゾーム、粗面小胞体は、正常内皮細胞と比べ
ると多いが、7日後の細胞と比べると全体に減少して
いる。細胞基底面では細胞内線維が増加している。厚
さ $3\mu\text{m}$ 位の軽度の内皮下結合組織の肥厚がある。中
膜にはまだ modified smooth muscle cell がみられ
る。

クリッピング開放後 30 日には、内膜、中膜共に正常
所見を呈する。

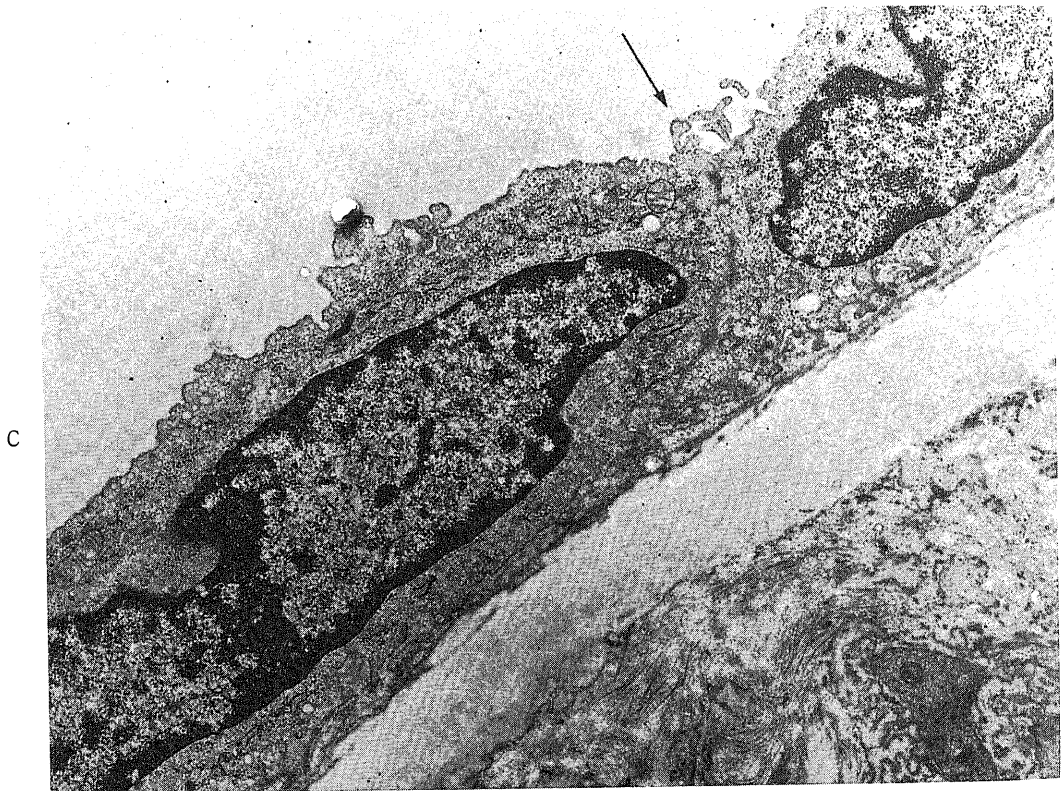


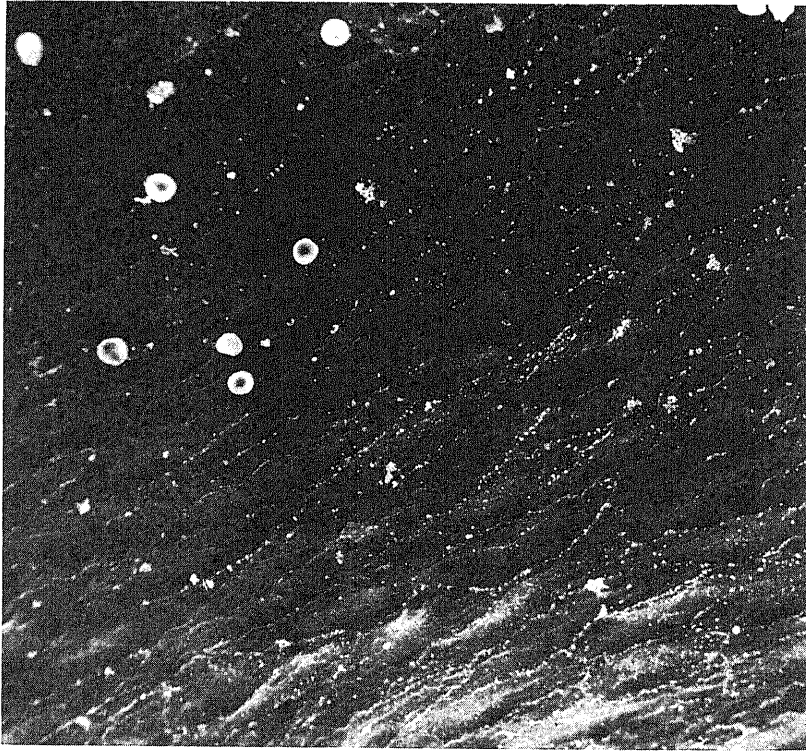
Fig. 6. Seven days after temporary clipping.

A: The denuded area is completely covered with the regenerating cells. Microvillous projections and marginal folds are evident. SEM $\times 3,450$.

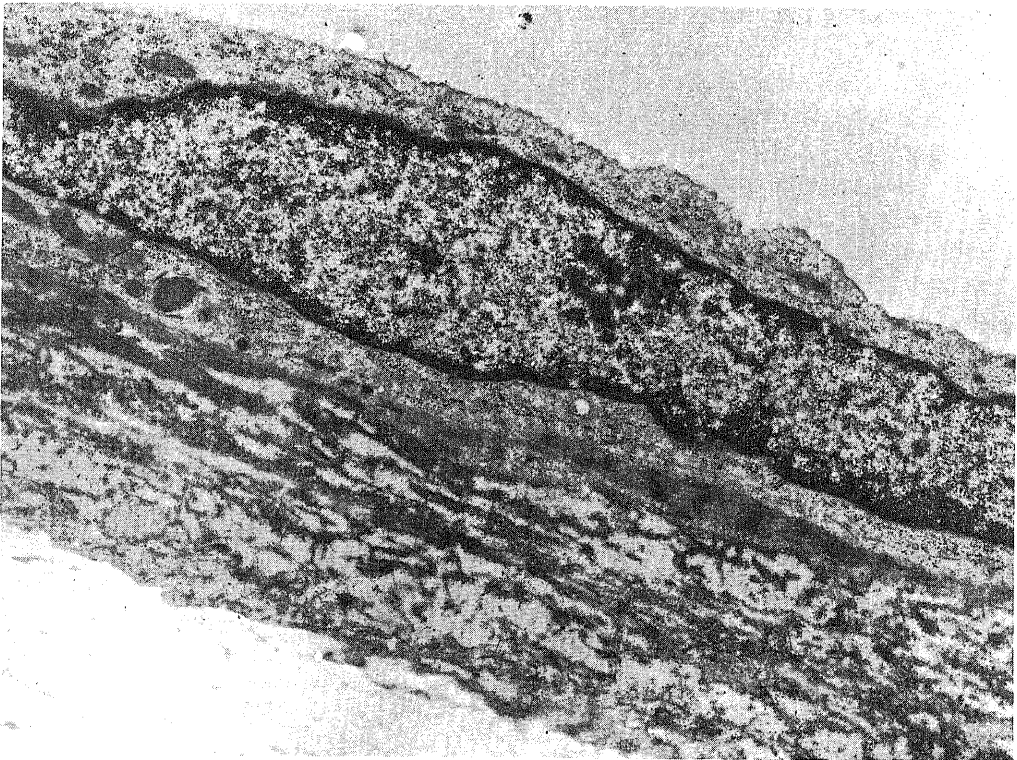
B: The regenerating cell contains many Weibel-Palade bodies and pinocytotic vesicles. TEM $\times 21,600$.

C: Between the regenerating cells, junctional complex and marginal fold (arrow) are seen. TEM $\times 9,000$.

A



B



考 察

血流の一時的遮断操作においては、この操作による血栓形成や動脈硬化の発生は避けるべき必須の条件である。しかし、微小血管外科領域でのテンポラリー・クリッピングによる血管損傷について近年多数の報告があり¹¹⁻¹⁴⁾、内皮細胞の剝脱、露出した内皮下組織への血小板の付着などの内膜損傷が示され、この内膜損傷から将来内腔を閉塞する血栓が形成される危険性、および動脈硬化性病変が進行する危険性が指摘されている。しかし、これらの問題について長期的に追跡した報告は以下の二つのみである。Thurston ら⁴⁾はラットの大腿動脈を50~200 gの力のクリップで1時間遮断し、20分後、4および72時間後、7日後に走査電顕による観察を行っている。これによると、クリップにより内皮細胞の剝脱が起こるが、いずれの時期においても大きな血栓形成はなく、72時間後に内皮細胞の修復が始まり7日で完了したとしている。また、Dujovny ら⁷⁾はイヌの中大脳動脈を市販のクリップで45分間遮断し、1ヶ月後に走査電顕で内皮細胞の配列の乱れ、離開を認めたと記載している。上記二つの報告は共に走査電顕のみによる観察で、透過電顕は用いていない。

本研究では、ラットの総頸動脈に一時的クリッピングを行い、血管、特に内膜の形態学的変化を、直後より30日間にわたり走査電顕および透過電顕により観察した。認められた所見は、①クリッピング解除直後から装着部位に完全な内皮細胞の剝脱がある、②内弾性板の破壊はないが、中膜平滑筋細胞の著明な挫滅がある、③露出した内皮下組織への血小板の付着は最大数層である、④内皮細胞の修復は3日後に既にみられる、⑤内皮細胞剝離部は5日後にほぼ修復細胞に被われ、7日後には欠損はみられない、⑥内膜肥厚はみられない、等である。確かにクリッピングにより著しい内膜損傷が起こるが、大きな血栓形成、動脈硬化性病変への進展はなかった。内皮細胞の障害による血小板の粘着・凝集、および脂質等の血漿成分の浸潤は動脈硬化の成因として重要であるが、病変が治癒するか、さらに進行するかは、障害因子の持続・強さと修復機転すなわち内皮細胞の再生とのバランスによると考えられている¹⁴⁾¹⁵⁾。テンポラリー・クリッピングにおいては、血管に対する侵害が単一、短時間であり、また障害域の幅が今回の実験でも約1 mmと狭いために内皮細胞

の修復が短期間に完成し得ること、更に永続的な血流停滞のないことが血栓および動脈硬化の発生の原因と考えられる。

しかし、修復細胞の微細構造はその過程において正常内皮細胞とは異なる所見を示した。内皮細胞が損傷された場合、その修復は一般には周辺の内皮細胞の増殖によるとされているが^{16)~22)}、損傷が著しく広範囲の場合には、内皮細胞の修復が間に合わず、一過性に中膜平滑筋細胞由来の細胞により剝離面が被覆されることがあるとされている^{23)~25)}。本研究では、①内皮細胞剝離部両端より連続的に再生が起こる、②剝離部に島状の内皮細胞再生がない、③周辺内皮細胞に細胞分裂がある、④再生細胞を経時的に観察すると、内皮細胞に特徴的とされるWeibel-Palade小体を多数認める様になる、等の所見が得られ、従って内皮の修復は周辺の内皮細胞の増殖によるものであり、平滑筋細胞の関与はなく、修復細胞の微細構造上の特徴は幼若内皮細胞のそれをとらえたものと考えられる。

修復細胞の自由表面には多数の微絨毛様突起があり、その直径は100~150 nmであり、長さは0.2~1 μm位である。内部には時に細線維を認める。ほぼ細胞全体に分布しているが、核による中央隆起の上に密生する傾向がある。細胞によりその密度は異なり、修復初期に最も多く、時間的経過と共に約2週間位で消失し、細胞の成熟度と関係すると思われる。

成熟内皮細胞の微絨毛様突起についてはトリ櫛膜²⁶⁾、ラット心内膜²⁷⁾²⁸⁾、大動脈²⁸⁾、三叉神経節・精巢²⁹⁾、脳動脈³⁰⁾、イヌ肺動脈²⁸⁾³¹⁾、大動脈²⁸⁾、頸動脈³²⁾、ウサギ心内膜²⁷⁾²⁸⁾、肺動脈²⁸⁾、大動脈^{28)33)~35)}、サル心内膜³⁶⁾で報告があり、幼若内皮細胞については、ヒト胎児の肺動脈・大動脈・動脈管³⁵⁾、幼若ウサギ・イヌの心内膜・大動脈²⁸⁾、新生³⁷⁾および再生内皮細胞^{18)38)~42)}で認められている。竹重ら³⁷⁾は、ラット胎児の腸絨毛内毛細血管の新生機序を透過電顕で観察し、幼若内皮細胞に微絨毛様突起を認めるとともに、突起が細胞の成熟につれ消失していく所見を得ている。また、Gordon ら⁴¹⁾は、ラットおよびウサギの角膜に損傷を与え、その修復過程を観察し、再生内皮細胞の大きな形態学的変化として微絨毛様突起の出現を認め、細胞分裂前に突起が増加し、分裂後数が減少する所見を得ている。Smith ら³¹⁾は微絨毛様突起は表面積を増し、また血流を遅くすることにより細胞と血漿との間の物質代謝に

Fig. 7. Fourteen days after temporary clipping.

- A: Low magnified scanning electron micrograph of the luminal surface. The cells are oriented parallel to the long axis of the artery. Microvillous projections are short and sparse. $\times 570$.
 B: The cell is slender, and contains many pinocytotic vesicles and Weibel-Palade bodies. Microvillous projections are not observed. TEM $\times 10,800$.

有利に作用するものと推定している。しかし本突起が幼若細胞の細胞膜の不完全性による二次的変化である可能性は否定できない。

幼若な再生内皮細胞の胞体内には豊富な遊離リボゾーム、粗面小胞体、ゴルジ装置が認められ活発な代謝が推測される。一方、pinocytotic vesicle の数は少なく、幼若期には pinocytotic vesicle による物質輸送は少ないと考えられる。Weibel-Palade 小体の数も少ない。本小体は Weibel ら¹³⁾により始めて詳細な記載がなされ、血管内皮細胞に特徴的とされている。その機能については第VIII凝固因子関連抗原の貯蔵に関係があると推測され⁴³⁾⁴⁴⁾、またゴルジ装置由来が推定されている⁴⁵⁾⁴⁶⁾。ラットの総頸動脈内皮細胞にも多数の同小体が存在しているが、修復初期の幼若な再生内皮細胞においては同小体は認められず、修復が始まって4日以後多数の同小体がみられるようになり、細胞の成熟と共に Weibel-Palade 小体が形成されると考えられる。

以上の如く再生内皮細胞の微細構造の変化は細胞の成熟過程における生理的変化と考えられ、クリッピング損傷後14日には内皮細胞はほぼ正常化し、30日後ではクリッピング部位には正常内皮細胞のみが観察された。

従来、一時遮断に用いられるクリップの至適条件としては、血圧に抗する最小限の締括力を持ち、単位面積の圧を小さくするためにブレードの幅が広い事があげられている^{3)4)7)~11)47)48)}。脳外科においてはテンポラリークリッピングの対象となる動脈の直径は0.8~5mm位である。血流遮断に必要な力を血管壁の弾性を無視し単純に Laplace の法則、すなわち

$$F = BP \times W \times 1/2 \pi D$$

F, 血流遮断に必要な力; BP, 血圧; W, ブレードの幅; D, 血管の直径。

によって求めると、1.5mmの幅のクリップを使用した場合、血管の直径が0.8mmで血圧が100mmHgの時には僅かに約2.6gであり、直径が5mmで血圧が200mmHgの時には約32gである。ただし、実際にテンポラリー・クリッピングを行うに際してはクリップの滑脱は避けねばならず、上記より大きな締括力を持つ事がクリップに要求される。本研究で使用した Heifetz クリップの締括力は約120gであり、血流遮断に最低限必要な力よりはるかに強く、このためにラット(平均血圧、約120mmHg)の頸動脈(直径、約1mm)を30分間クリッピングした結果、幅約1mmの内皮細胞の脱落を認めた。脱落の幅はクリップのブレードの幅(1.5mm)より狭いが、これはブレードの断面が円弧をなすためと考えられる。しかし損傷

範囲が狭いため、内皮細胞による修復は約7日間で完成し、再生内皮細胞の微細構造上の変化はあったが一時的生理的なものであり、大きな血栓形成や動脈硬化への進展はなかった。今回使用した Heifetz クリップは動脈瘤頸部クリッピング等の永久的使用に主に用いられるクリップであり、テンポラリー・クリッピング用には Biemer や Yasargil 等の弱い締括力のクリップがある。しかし例えば Biemer クリップでも締括力は約45gと、いずれのクリップにおいても滑脱を防ぐためもありある程度強い締括力を持ち、内膜損傷は避けられない。しかしブレードの幅はいずれも1~2mmと狭く、本研究結果から通常は必ず修復されると考えられ、日常使用されているテンポラリー・クリップは実際上では大きな問題はないと考えられる。

結 論

ラットの総頸動脈を締括力120gの Heifetz クリップで30分間クリッピングし、一時的動脈クリッピングの血管、特に内膜に及ぼす影響を走査電顕と透過電顕を用い30日間にわたり検索した。

1. クリッピング部位では完全に内皮細胞は剥脱し、露出した内皮下組織に血小板が付着し、強い内膜損傷が起きた。

2. クリッピング開放後3日目には周辺正常内皮細胞の増殖による修復があり、開放後7日目には傷害部は再生内皮細胞により完全に被覆された。

3. 幼若な再生内皮細胞の特徴として、その内腔面に多数の微絨毛様突起が観察された。その直径は約100~150nmであり、長さは0.2~1 μ mであった。細胞内では粗面小胞体、ゴルジ装置が発達し、遊離リボゾームが豊富に存在した。

4. 細胞の成熟と共に、Weibel-Palade 小体および pinocytotic vesicle の数は増加し、微絨毛様突起、遊離リボゾーム、粗面小胞体およびゴルジ装置は減少した。クリッピング開放後14日目には微絨毛様突起はほとんど見られなくなり、30日後には正常内皮細胞のみが観察された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った恩師山本信二郎教授に深甚なる謝意を捧げます。また御指導、御助言を賜りました福井医科大学脳神経外科学教室久保田紀彦助教授、本学伊藤治英助教授、山嶋哲盛講師ならびに教室の諸先生に深謝致します。最後に本研究の遂行にあたり御協力を頂きました電子顕微鏡技術員の横田輝一氏ならびに当教室今村明子嬢に厚く御礼申し上げます。

本研究の要旨は第22回日本神経病理学会学術研究会(1981年)で発表した。

文 献

- 1) Osgood, C. P., Dujovny, M., Faille, R., Barrionuevo, P. J., Longa, E. Z. & Matta, R. : Early scanning electron microscopic evaluation of microvascular maneuvers. *Angiology*, **27**, 96-105 (1976).
- 2) Slayback, J. B., Bowen, W. W. & Hinshaw, D. B. : Intimal injury from arterial clamps. *Am. J. Surg.*, **132**, 183-188 (1976).
- 3) Sugita, K., Hirota, T., Iguchi, I. & Mizutani, T. : Comparative study of the pressure of various aneurysm clips. *J. Neurosurg.*, **44**, 723-727 (1976).
- 4) Thurston, J. B., Buncke, H. J., Chater, N. L. & Weinstein, P. R. : A scanning electron microscopy study of micro-arterial damage and repair. *Plast. Reconstr. Surg.*, **57**, 197-203 (1976).
- 5) Gertz, S. D., Rennels, M. L., Forbes, M. S., Kawamura, J., Sunaga, T. & Nelson, E. : Endothelial cell damage by temporary arterial occlusion with surgical clips. *J. Neurosurg.*, **45**, 514-519 (1976).
- 6) Gertz, S. D., Kurgan, A., Wajnberg, R. S. & Nelson, E. : Endothelial cell damage and thrombus formation following temporary arterial occlusion. *J. Neurosurg.*, **50**, 578-586 (1979).
- 7) Dujovny, M., Osgood, C. P., Barrionuevo, P. J., Perlin, A. & Kossovsky, N. : SEM evaluation of endothelial damage following temporary middle cerebral artery occlusion in dogs. *J. Neurosurg.*, **48**, 42-48 (1978).
- 8) Dujovny, M., Kossovsky, N., Laha, R. K., Leff, L., Wackenhut, N. & Perlin, A. : Temporary microvascular clips. *Neurosurgery*, **5**, 456-463 (1979).
- 9) Dujovny, M., Wackenhut, N., Kossovsky, N., Gomes, C. W., Laha, R. K., Leff, L. & Nelson, D. : Minimum vascular occlusive force. *J. Neurosurg.*, **51**, 662-668 (1979).
- 10) Dujovny, M., Kossovsky, N., Munoz, G., Langhi, R., Nelson, D. & Fein, J. M. : Reduced vascular trauma after temporary occlusion with modified Biemer and Yasargil clips. *J. Microsurg.*, **2**, 195-201 (1981).
- 11) Richling, B., Griesmayr, G., Lametschwandtner, A. & Scheiblbrandner, W. : Endothelial lesions after temporary clipping. *J. Neurosurg.*, **51**, 654-661 (1979).
- 12) Mollenhauer, H. H. : Plastic embedding mixtures for use in electron microscopy. *Stain. Tech.*, **39**, 111-114 (1964).
- 13) Weibel, E. R. & Palade, G. E. : New cytoplasmic components in arterial endothelia. *J. Cell Biol.*, **23**, 101-112 (1964).
- 14) Ross, R. & Glomset, J. A. : The pathogenesis of atherosclerosis. (First of two parts) *N. Engl. J. Med.*, **295**, 369-377 (1976).
- 15) Ross, R. & Glomset, J. A. : The pathogenesis of atherosclerosis. (Second of two parts) *N. Engl. J. Med.*, **295**, 420-425 (1976).
- 16) Poole, J. C. F., Sanders, A. G. & Florey, H. W. : The regeneration of aortic endothelium. *J. Path. Bact.*, **75**, 133-143 (1958).
- 17) Webster, W. S., Bishop, S. P. & Geer, J. C. : Experimental aortic intimal thickening. *Am. J. Pathol.*, **76**, 265-284 (1974).
- 18) Fishman, J. A., Ryan, G. B. & Karnovsky, M. J. : Endothelial regeneration in the rat carotid artery and the significance of endothelial denudation in the pathogenesis of myointimal thickening. *Lab. Invest.*, **32**, 339-351 (1975).
- 19) Hirsch, E. Z. & Robertson, A. L. : Selective acute arterial endothelial injury and repair. I. Methodology and surface characteristics. *Atherosclerosis*, **28**, 271-287 (1977).
- 20) Sholley, M. M., Gimbrone, M. A. & Cotran, R. S. : Cellular migration and replication in endothelial regeneration. *Lab. Invest.*, **36**, 18-25 (1977).
- 21) Schwartz, S. M., Haudenschild, C. C. & Eddy, E. M. : Endothelial regeneration. I. Quantitative analysis of initial stages of endothelial regeneration in rat aortic intima. *Lab. Invest.*, **38**, 568-580 (1978).
- 22) Haudenschild, C. C. & Schwartz, S. M. : Endothelial regeneration. II. Restitution of endothelial continuity. *Lab. Invest.*, **41**, 407-418 (1979).
- 23) Schwartz, S. M., Stemerman, M. B. & Benditt, E. P. : The aortic intima. II. Repair of the aortic lining after mechanical denudation. *Am. J. Pathol.*, **81**, 15-42 (1975).
- 24) Spaet, T. H., Stemerman, M. B., Veith, F. J. & Lejnieks, I. : Intimal injury and regrowth in the rabbit aorta. Medial smooth muscle cells as a source of neointima. *Circ. Res.*, **36**, 58-70 (1975).
- 25) Stemerman, M. B., Spaet, T. H., Pitlick, F.,

- Cintron, J., Lejnieks, I. & Tiell, M. L.: Intimal healing. The pattern of reendothelialization and intimal thickening. *Am. J. Pathol.*, **87**, 125-142 (1977).
- 26) 田中 昭: 鳥類眼球の櫛膜の電子顕微鏡的研究 I. *動物学雑誌*, **69**, 16-19 (1960).
- 27) Edanaga, M.: A scanning electron microscope study on the endothelium of the vessels. II. Fine surface structure of the endocardium in normal rabbits and rats. *Arch. Histol. Jap.*, **37**, 301-312 (1975).
- 28) 枝長正修: 実験動物における心内膜, 大動脈及び二三の動物内膜の走査電子顕微鏡による研究. *九州歯会誌*, **32**, 261-281 (1978).
- 29) Gabbiani, G. & Majno, G.: Endothelial microvilli in the vessels of the rat gasserian ganglion and testis. *Z. Zellforsch.*, **97**, 111-117 (1969).
- 30) Hazama, F., Ozaki, T. & Amano, S.: Scanning electron microscopic study of endothelial cells of cerebral arteries from spontaneously hypertensive rats. *Stroke*, **10**, 245-252 (1979).
- 31) Smith, U., Ryan, J. W., Michie, D. D. & Smith, D. S.: Endothelial projections as revealed by scanning electron microscopy. *Science*, **173**, 925-927 (1971).
- 32) Masuda, H., Shozawa, T., Kanda, M. & Kamiya, A.: Endothelial surface of the blood flow loaded canine carotid artery. *Acta. Pathol. Jpn.*, **35**, 1037-1046 (1985).
- 33) Tokunaga, J., Osaka, M. & Fujita, T.: Endothelial surface of rabbit aorta as observed by scanning electron microscopy. *Arch. Histol. Jap.*, **36**, 129-141 (1973).
- 34) Edanaga, M.: A scanning electron microscope study on the endothelium of the vessels. I. Fine structure of the endothelial surface of aorta and some other arteries in normal rabbits. *Arch. Histol. Jap.*, **37**, 1-14 (1974).
- 35) Fujimoto, S., Yamamoto, K. & Takeshige, Y.: Electron microscopy of endothelial microvilli of large arteries. *Anat. Rec.*, **183**, 259-266 (1975).
- 36) Harasaki, H., Suzuki, I., Tanaka, J., Hanano, H. & Torisu, M.: Ultrastructure research of the endocardial endothelium of monkeys. *Arch. Histol. Jap.*, **38**, 71-84 (1975).
- 37) 竹重順夫, 毛利 純, 藤本 淳: 血管新生機序に関する電顕的研究. *脈管学*, **15**, 271-275 (1975).
- 38) Malczak, H. T. & Buck, R. C.: Regeneration of endothelium in rat aorta after local freezing. *Am. J. Pathol.*, **86**, 133-148 (1977).
- 39) Taura, S., Taura, M., Imai, H. & Kummerow, F. A.: Morphological alteration of aortic wall and mitotic cells after complete endothelial loss induced by repeated balloon denudation of swine aorta. *Tohoku J. Exp. Med.*, **129**, 25-39 (1979).
- 40) 福田利夫: 凍結障害と高脂肪食による実験的動脈硬化の進展と退縮に関する病理学的研究. *脈管学*, **19**, 847-862 (1979).
- 41) Gordon, S. R., Rothstein, H. & Harding, C. V.: Studies on corneal endothelial growth and repair. IV. Changes in the surface during cell division as revealed by scanning electron microscopy. *Eur. J. Cell Biol.*, **31**, 26-33 (1983).
- 42) Hess, F., Jerusalem, C. & Braun, B.: The endothelialization process of a fibrous polyurethane microvascular prosthesis after implantation in the abdominal aorta of the rat. *J. Cardiovasc. Surg.*, **24**, 516-524 (1983).
- 43) Wagner, D. D., Olmsted, J. B. & Marder, V. J.: Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *J. Cell Biol.*, **95**, 355-360 (1982).
- 44) Warhol, M. J. Sweet, J. M.: The ultrastructural localization of von Willebrand factor in endothelial cells. *Am. J. Pathol.*, **117**, 310-315 (1984).
- 45) Matsuda, H. & Sugiura, S.: Ultrastructure of tubular body in the endothelial cells of the ocular blood vessels. *Invest. Ophthalmol.*, **9**, 919-925 (1970).
- 46) Sengel, A. & Stoebner, P.: Golgi origin of tubular inclusions in endothelial cells. *J. Cell Biol.*, **44**, 223-226 (1970).
- 47) Dujovny, M., Kossovsky, N., Kossovsky, R., Perlin, A., Gatti, E. F., Segal, R. & Diaz, F. G.: Mechanical and metallurgical properties of vascular clips designed for temporary use. *Microsurgery*, **4**, 124-133 (1983).
- 48) 蛭名国彦: 長期クリッピング, 結紮による頭蓋内血管壁の経時的, 組織学的変化. 第2報, 臨床剖検例における検討. *脳神経外科*, **8**, 343-354 (1980).

Sequential Morphological Changes of Endothelial Lesions after Temporary Arterial Clipping—Fine Structure of Regenerating Endothelial Cells— Kazuhiko Tani, Department of Neurosurgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920—J. Juzen Med. Soc., **96**, 1219—1236 (1987)

Key words: temporary clipping, fine structure, endothelial damage, regeneration, microvillous projections

Abstract

Sequential morphological changes of the endothelial cells after temporary arterial clipping were studied by scanning and transmission electron microscopy. A Heifetz clip with an occlusive force of 120 grams was used to occlude the carotid artery of Wistar rat for 30 minutes. Animals were sacrificed at the following intervals after the operation: 0, 1, 3, 6, 24 hours and 3, 5, 7, 14, 30 days. Immediately after removal of the clip, arterial segments compressed by the clip revealed severe endothelial desquamations and adhesions of a few layers of platelets on the exposed subendothelium. Three days after the clipping, the repair of the endothelium was developed by replication of the adjacent undamaged endothelial cells. The endothelial covering was accomplished at the end of one week. Immature regenerating cells were characterized by numerous microvillous projections at the luminal surface. These projections were approximately 100 to 150 nm in width and 0.2 to 1 μ m in length. These immature endothelial cells contained well-developed rough endoplasmic reticula and many free ribosomes but few Weibel-Palade bodies. The number of pinocytotic vesicles was also reduced as compared to normal endothelium. However, with maturity of the endothelial cells, pinocytotic vesicles and Weibel-Palade bodies increased whereas the microvillous projections decreased. Within 14 days, the microvillous projections disappeared and the endothelial cells appeared to be normal. It is concluded from the present data that temporary arterial clipping causes endothelial damages without resultant thrombus and atherosclerotic lesions, which might be almost repaired within 14 days after the operation.