

# ラットの腹膜中皮細胞の再生： 光学顕微鏡的及び電子顕微鏡的観察

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9031">http://hdl.handle.net/2297/9031</a>

## ラットの腹膜中皮細胞の再生：光学顕微鏡的 及び電子顕微鏡的観察

金沢大学医学部病理学第一講座 (主任：梶川欽一郎教授)

桃 井 文 夫

(昭和57年12月7日受付)

中皮の再生機序を解明する目的で、ゲラチンフィルム法でラットの体壁腹膜に中皮の欠損 ( $5 \times 5 \text{ mm}^2$ ) を作成し、その修復過程を1～14日にわたり光顕的及び電顕的に観察した。中皮剝離後1日で創面は大食細胞で被覆され、2～3日後には創縁に近接する既存の中皮細胞の核分裂と創面における中皮細胞の移植が認められた。同時に下部結合組織に線維芽細胞の増殖が観察された。創傷7日以後は創面は下部に薄い瘢痕を残して完全に再生中皮で被覆された。この修復過程において、超微構造的にも細胞化学的にも大食細胞又は線維芽細胞が中皮細胞に転化することを示唆する証拠は得られなかった。これらの所見から、中皮の欠損は創縁からの中皮細胞の移動及び創面に移植された中皮細胞の増殖によって修復されるものと結論された。

---

**Key words** Mesothelial cell, Regeneration, Light microscopy, Electron microscopy.

---

腹膜表面の創傷は速やかに修復されることはよく知られており、これまでの研究で創面は早期に大食細胞で被われ、次いで再生中皮の被覆で置換されることが明らかにされている。しかし、再生中皮細胞の起源については意見が分かれ、様々な仮説が提唱されている。これらの主張は、再生中皮細胞は他の間葉細胞からの転化によるという見解と、既存の中皮細胞に由来するという見解に大別される。前者の説の中には、中皮細胞は滲出した大食細胞から転化するという説<sup>1)～5)</sup>と、下部結合組織の線維芽細胞から転化するという説<sup>6)～7)</sup>がある。既存の中皮細胞から中皮が再生されるとする見解の中では、腹膜の他の部位から創面に移植された中皮細胞の増殖によるという考えが多くの支持を得ている<sup>8)～10)</sup>。創縁に近接する既存の中皮細胞の分裂増殖によって連続性に中皮が再生される可能性が指摘されているが、腹膜創傷は非常に速やかに修復され、しかも中皮の再生は創面全域に平等に進行することから<sup>11) 12)</sup>、このような既存中皮からの連続性再生は限られた範囲に

止まるものと考えられている<sup>3) 9)</sup>。

これらの意見の相違の原因のひとつは研究方法の差に基づくものと思われる。たとえば、広く、且つ深い創傷では炎症細胞の浸潤やそれに続く結合組織細胞の反応が強く、これらの細胞と再生中皮細胞との関係の解析は困難になるであろう。又、他の細胞が中皮細胞へ転化するか否かは超微構造的及び細胞化学的特徴の比較が有力な手段となるであろう。さらに、中皮の再生が既存の中皮から連続性に行われるか、あるいは不連続性に行われるかについては、小皮標本や走査型電子顕微鏡 (以下走査電顕と略す) による創面の細胞分布の検討が重要な手掛りを与えるであろう。

本研究はこれらの諸点を考慮して、Wattersら<sup>8)</sup>のゲラチンフィルム法に従って腹膜中皮のみを剝離し、光学顕微鏡 (以下光顕と略す)、透過型電子顕微鏡 (以下透過電顕と略す)、走査電顕など、様々な観察手段を併用し、中皮細胞の再生機序を解明しようと試みたものである。

---

Mesothelial Regeneration of the Rat Peritoneum: Light and Electron Microscopic Observation. **Fumio Momonoi**, Department of Pathology (I), (Director: Prof. K. Kajikawa), School of Medicine, Kanazawa University.

## 材料及び方法

Sprague-Dawley系ラット(体重200g)を塩酸ケタミン(「ケタラー」三共)の麻酔下で開腹し、体壁腹膜に5mm平方のゲラチンフィルム(日本アップジョン社)を10秒間貼布後除去することによって中皮を剝離して創傷を作成した。剝離後1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 14日に組織を切出した。腹部切開のみを行ったものを対照とした。

1) 透過電顕的観察: 細切した組織を2.5%グルタルアルデヒド(0.1Mカコジル酸ソーダ緩衝液, pH 7.4)で4°C, 60分間固定後、さらに2%オスミウム酸(0.1Mカコジル酸ソーダ緩衝液, pH 7.4)で4°C, 90分間固定した。試料はエタノール系列で脱水し、EPOK 812に包埋した。超薄切片はダイヤモンドナイフを用いLKBウルトラトームで作製し、酢酸ウラニール・硝酸鉛の二重染色を行った。超薄切片は日立H-500型電子顕微鏡を用い直接倍率1,200~15,000倍で撮影した。

2) 走査電顕的観察: 創傷後1, 2, 3, 4日の材料をグルタルアルデヒド・オスミウム酸の重固定を行い、酢酸イソアミルで置換、臨界点乾燥後、金パラジウム蒸着を施した。試料は日立HFS-2形電界放射型走査電子顕微鏡を使用し、直接倍率20~10,000倍で撮影した。

3) 光顕的観察: 10%中性ホルマリンで固定された組織をパラフィン切片とし、H・E, van Gieson及び鍍銀染色を施した。

4) ゲラチンフィルム剝離標本(以下剝離標本と略す): 創傷後2, 3, 4日の材料からTsumumiらの方法<sup>11)</sup>に準じて次のように剝離標本を作製した。15mm平方のゲラチンフィルム(日本アップジョン社)を創傷を含む腹膜面に約10秒間密着圧迫し、フィルム面に細胞を貼布させた。フィルムは10%中性ホルマリンで固定し、フィルム自身の染色性を防ぐため市販のセロテープを貼布し、鉄ヘマトキシリンで染色した。このような方法で作製された正常腹膜標本には紡錘形の中皮細胞の敷石状の配列が観察され、中皮のen face観察に有効であることが確かめられた。

5) 酵素細胞化学的観察: 創傷後1, 2, 3, 4日の組織をKarnovsky固定液で固定し、vibratomeで200~300 $\mu$ に薄切し、Gomori法<sup>12)</sup>による酸性ホスファターゼ反応、勝田らの方法<sup>13)</sup>によるペルオキシダーゼ反応を行い、上記と同様な方法で電顕試料を作製した。

6) 食食実験: ミリポアフィルターで濾過したIndian ink(Pelikan社)2mlを創傷2時間後に腹腔内に注射し、1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 14日の間隔で組織

を採取し、上記の方法で光顕用組織切片及び電顕用超薄切片を作製した。

## 結 果

### I 肉眼所見

中皮剝離1日目では創面は白色に混濁し、透明滑らかな正常腹膜面と明瞭に境される。その後4日目まで創面の混濁は増加するが、5日以後から徐々に混濁は減少し14日では正常腹膜の外観に回復した。4日目まで極く少量の透明な腹水が認められたが、5日以後はほとんど消失し、又、腹膜の癒着は全く認められなかった。

### II 正常腹膜の構造

正常状態の腹膜は光顕的には、一層の扁平な中皮細胞で被われ、その直下に結合組織の薄層を隔てて弾力板が認められる。弾力板と腹筋との間は緻密な線維性結合組織で占められる。線維束の間に長い細胞突起を延ばした線維芽細胞が散在し、腹筋の近くには毛細血管が配列する。

透過電顕では、中皮細胞は腹膜表面を被覆する扁平な細胞として認められ、細胞は互にtight junction又はデスモソームによって接着する。細胞の自由表面には棍棒状の微絨毛が認められ、基底面は連続性の基底膜で包まれる。細胞小器官の特徴は比較的乏しく、断片状の粗面小胞体、ゴルジ装置、糸粒体及び小胞が認められる。時に、多房体が認められるがdense body型のリソゾームはほとんど存在しない。核は輪郭の不整な楕円形を呈し、クロマチンは少ない。ペルオキシダーゼ活性は陰性である。

中皮細胞の基底膜の下には、microfibrilと少数の細い膠原線維を含む結合組織が存在し、下部の線維性結合組織との間は弾力線維によって境される。弾力線維は腹膜表面に平行に走る板状の配列を示すが、所々にfenestrationが存在する。弾力線維の周囲はmicrofibrilで包まれる。弾力板と中皮との間には遊離状の細胞は認められない。

弾力板の下部は膠原線維束で満たされ、線維束の間には、線維芽細胞が介在する。線維芽細胞は粗面小胞体が豊富で、樹枝状の細長い細胞突起を線維束の間に延ばしている。腹筋の近くには毛細血管が配列し、リンパ管もかなり多く認められる。

走査電顕では中皮細胞は密に配列した多角形細胞として認められ、表面には剛直性微絨毛の密生が観察される。

上述のように、腹膜は弾力板を境として、その内層と下層では構造的に異っているため、本論文では、弾力板より内層を腹膜固有層、下層を腹膜下層と呼び分

けて記載する。

### III 腹膜の修復

#### 1. 光顕的所見

1-2日:

露出した腹膜固有層の表面は大食細胞で被われ、所々大食細胞、好中球、線維素から成る滲出物が付着する。大食細胞には Indian ink の貪食を認めることができる。腹膜下層では腹筋に近接する毛細血管の周囲に少数の大食細胞と好中球の浸潤が認められ、線維芽細胞は軽度の増殖を示す。

剝離標本では創傷2日で創面は多数の大食細胞で被われ、創縁の中皮細胞の配列は不規則となり、多数の核分裂が認められる (Fig. 1)。被覆はその間に侵入する中皮細胞によって不規則に分断される。

3-4日:

腹膜固有層は細胞増殖によって肥厚する。構成細胞の大部分は Indian ink の貪食を示さない紡錘形細胞で、Indian ink を摂取した大食細胞は腹膜固有層の深部に集在する (Fig. 2)。腹膜下層では大食細胞の浸潤と線維芽細胞の増殖が認められ、線維芽細胞は腹膜固有層に侵入する。

剝離標本では創面の大部分は中皮細胞で被われ、その中に大食細胞が付着した創面が島状に残っている。

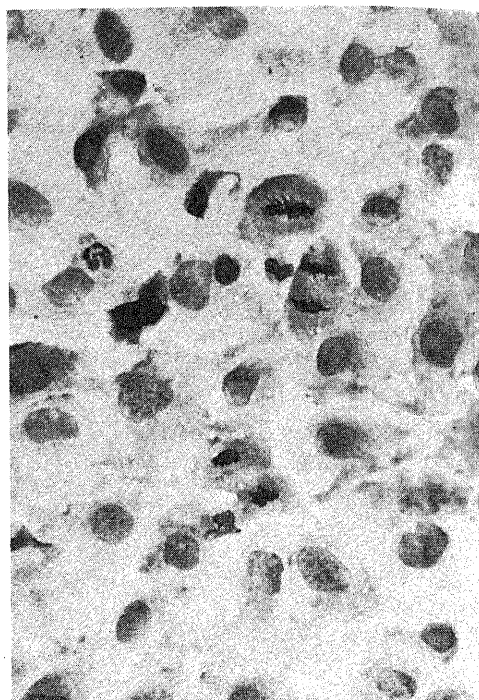


Fig. 1. Gelatin-film stripping preparation from the wound margin at 2 days after mesothelium-removal, showing mitoses of the mesothelial cells. Iron hematoxylin stain.  $\times 900$ .

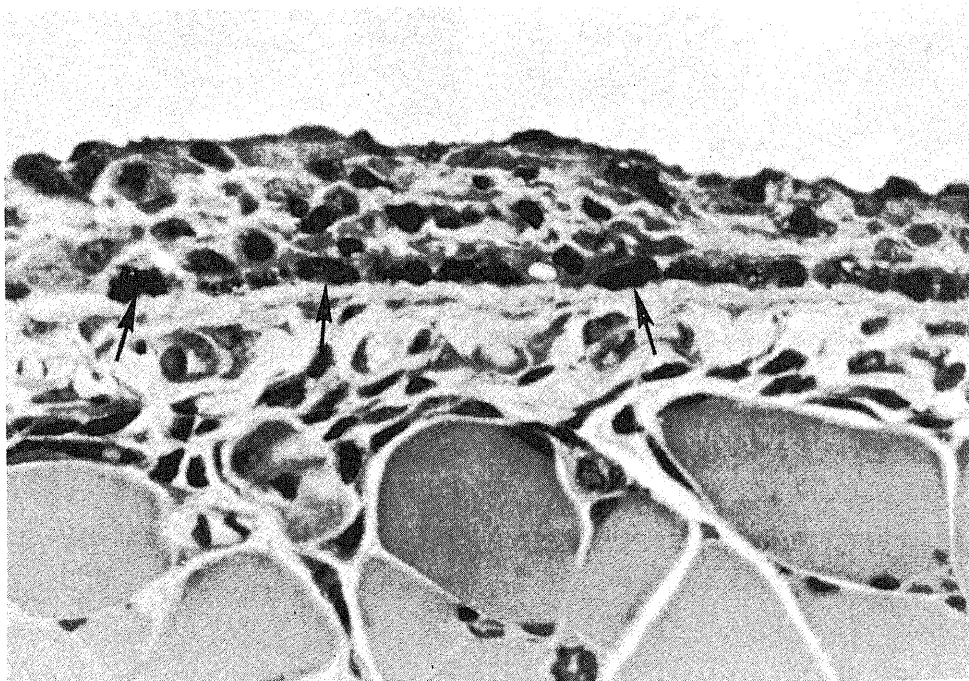


Fig. 2. Central part of a wound at 3 days. The surface cells form a discontinuous layer. The underlying connective tissue contains numerous cellular components, including Indian ink-phagocitized macrophages (arrows). H. E.  $\times 900$ .



Fig. 3. Gelatin-film stripping preparation from the central part of a wound at 3 days. Macrophage-covered areas are seen as irregular islets between regenerating mesothelial cells. Arrow indicates mitosis of a mesothelial cell. Iron hematoxylin stain.  $\times 450$ .

中皮細胞には所々核分裂が認められる (Fig. 3)。中皮細胞が創縁から求心性に創面を被覆することを示唆する所見は認められない。

5-6日:

腹膜固有層の増殖細胞は減少する。表面は一列に並ぶ扁平な細胞の被覆があり、下部には紡錘形細胞が平行に配列し、好銀線維の増加が認められる。Indian inkを摂取する大食細胞は腹膜固有層深部に散在性に認められるにすぎない。腹膜下層では線維芽細胞の増殖はなお続いているが、大食細胞は減少する。

7-9日:

創面は完全に一層の中皮細胞で被覆され、腹膜固有層に軽度の膠原線維の増加が認められる。少数の Indian inkの貪食を示す大食細胞が散在する。腹膜下層の線維芽細胞は減少する。

14日:

腹膜はほとんど正常構造に回復する。腹膜は扁平な中皮細胞で被覆され創傷の痕跡はほとんど確認できないが、よく注意すると、中皮下に膠原線維の増加が残

っている所がある。

## 2. 電顕的所見

1-2日:

中皮の欠損部には基底膜が露出し、腹膜固有層には軽度の水腫と少数の好中球の浸潤が認められる。露出した基底膜の表面は滲出細胞が付着する。滲出細胞の大部分は大食細胞であるが、少数の好中球と肥満細胞が混在しており、中皮細胞も散在性に認められる。

大食細胞はクロマチンの粗大な陥凹のある核を有し、細胞表面に多数の細偽足を出し、広い原形質には小胞及び空胞が多く、酸性ホスファターゼが陽性のリソゾームが認められる。粗面小胞体の発育の程度は様々で、数層に並ぶ細管状粗面小胞体が認められることがある。ゴルジ装置は中等度に発育し層板と小胞で構成される。ペルオキシダーゼ活性が核膜、粗面小胞体、原形質顆粒及びリソゾームに証明される細胞と、原形質顆粒やリソゾームのみに証明される細胞が混在する (Fig. 4)。

中皮細胞は原形質を延ばして創面に付着し、遊離面には微絨毛が認められる。基底膜の形成は不完全である (Fig. 5)。核の輪郭は不整でクロマチンは微細である。時々核小体がみられる。正常の中皮細胞に比べて粗面小胞体とゴルジ装置の発育が良好で、しばしば多房体が認められる。原形質周辺にマイクロフィラメントが集在する。ペルオキシダーゼ反応は陰性である。リソゾームは乏しく、酸性ホスファターゼ反応はゴルジ装置及び多房体に証明される。創縁では中皮細胞に時々核分裂が認められ、細胞間の結合がゆるくなり、腹腔内への剝離が認められる (Fig. 6, 7)。

腹膜下層には軽度の水腫と、好中球や大食細胞の浸潤が認められる。線維芽細胞は軽度の増殖を示し、弾力板の間隙から腹膜固有層へ侵入する像に遭遇する (Fig. 5)。

走査電顕では創面に多数の大食細胞の付着が認められる。大食細胞は中皮細胞より小さく、丸みを帯び、細胞表面にうねったひだ状の細偽足が認められる。創縁の中皮細胞は配列が乱れるが、多数の微絨毛を持つ大型の扁平な細胞として大食細胞と容易に区別される (Fig. 8)。創中央部にも大食細胞の間に原形質を延ばした中皮細胞が散在性に認められる (Fig. 9)。

3-4日:

この時期では光顕的に観察されるように、著明な細胞増殖のため腹膜固有層の細胞の構成は複雑となる。主要な増殖細胞は中皮細胞、大食細胞及び線維芽細胞である。

創面は大食細胞及び中皮細胞で被われるが、中皮細胞の占める割合が増加する。これは走査電顕によっても確かめられる (Fig. 10)。中皮細胞は隣接する大食細胞

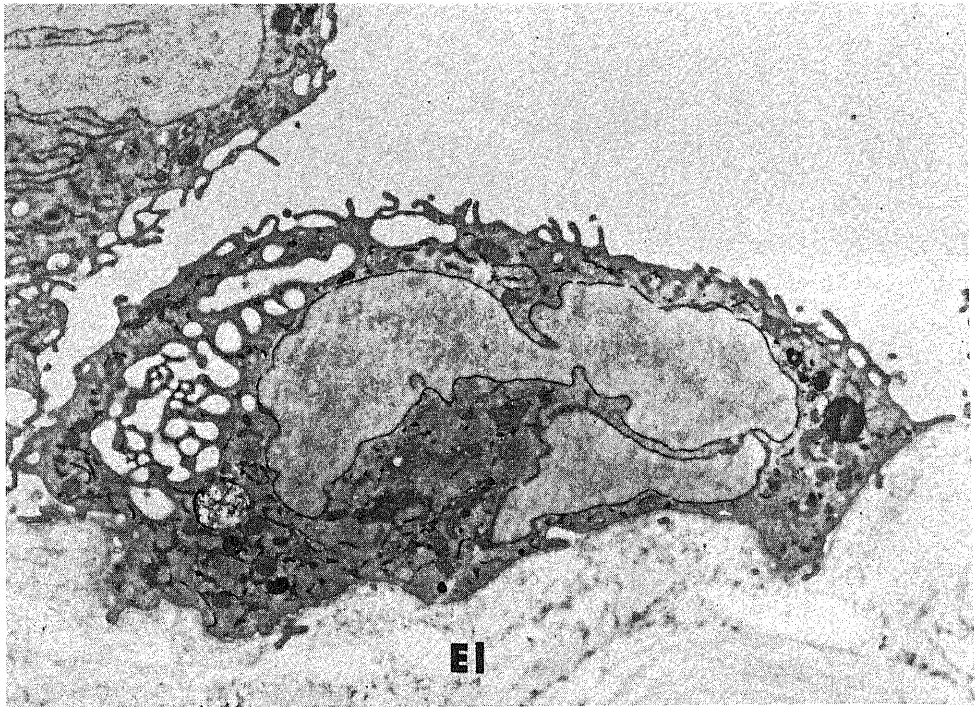


Fig. 4. A macrophage attached to the wound surface at 2 days, showing peroxidase activity in nuclear envelope, rough endoplasmic reticulum, azure granules and lysosomes. EI: elastic lamella.  $\times 6,500$ .

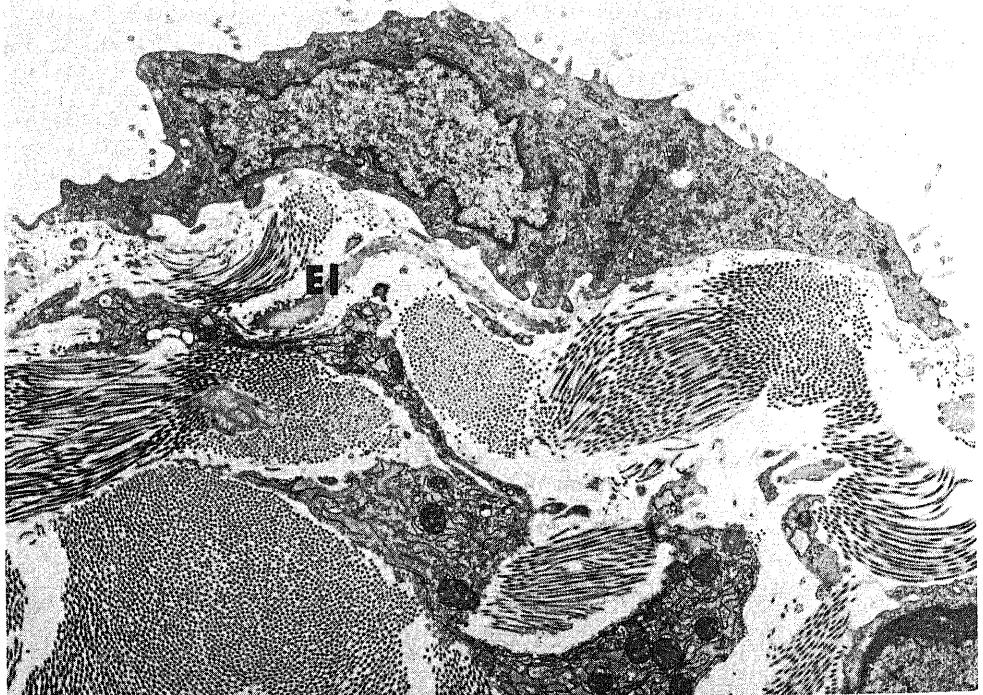


Fig. 5. A single mesothelial cell found in the central part of a wound at 1 day. The cell shows microvilli on the cell surface and increased rough endoplasmic reticulum. Invasion of a fibroblast into the underlying connective tissue through the fenestration of elastic lamella (EI).  $\times 6,300$ .

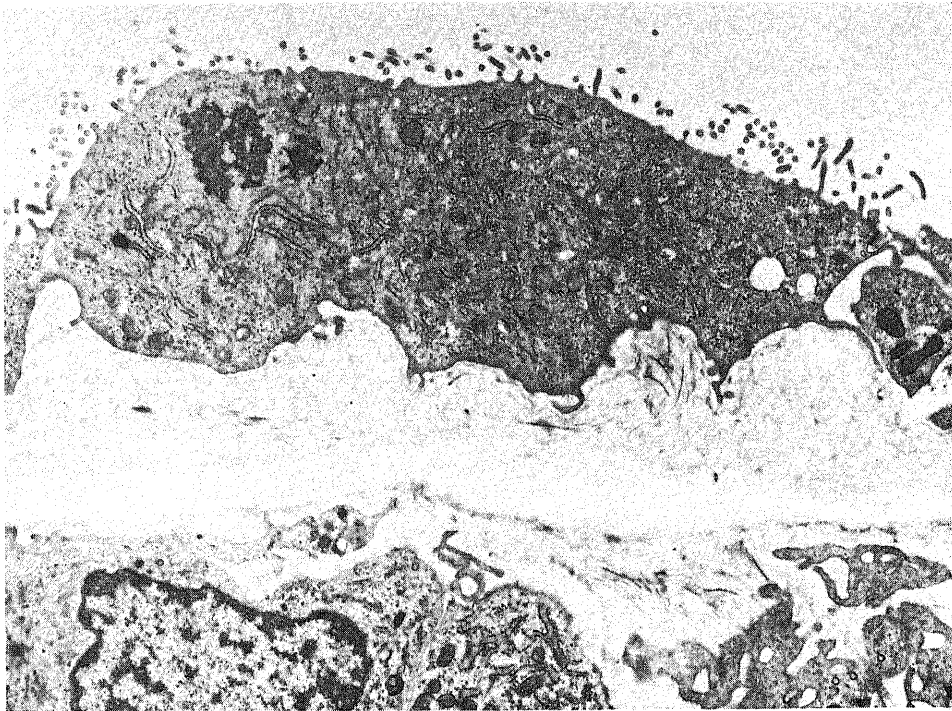


Fig. 6. Mesothelial lining in the marginal part of a wound at 2 days, showing mitotic activity and loosening of the intercellular junctions.  $\times 6,600$ .



Fig. 7. Marginal part of a wound at 1 day. Macrophages (Mc), neutrophils (N) and a detached mesothelial cell (arrow) from the mesothelial lining (Ms) can be seen.  $\times 3,600$ .

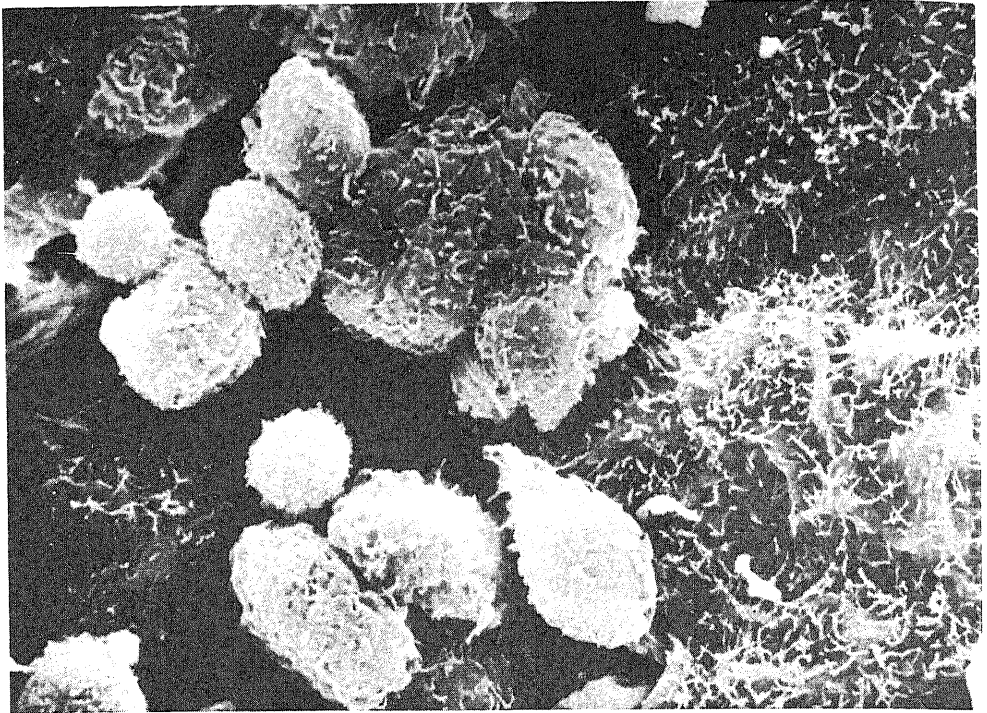


Fig. 8. A scanning electron micrograph from the wound margin at 2 days. Macrophages attached to the wound surface (left - side) show thin folds of the plasma membrane, while pre - existing mesothelial cells (right - side) have long microvilli.  $\times 1,300$ .

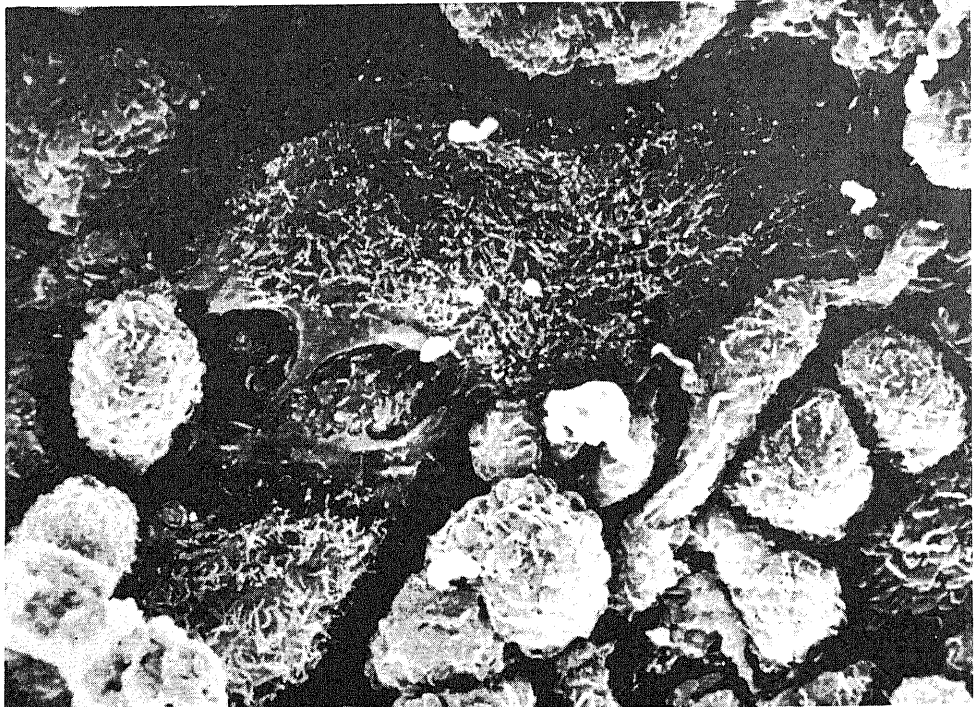


Fig. 9. A scanning electron micrograph from the central part of a wound at 2 days. Mesothelial cells with microvilli extend the cytoplasm between macrophages.  $\times 3,200$ .





Fig. 10. A scanning electron micrograph from the central part of a wound at 3 days, showing increased number of regenerating mesothelial cells.  $\times 3,200$ .

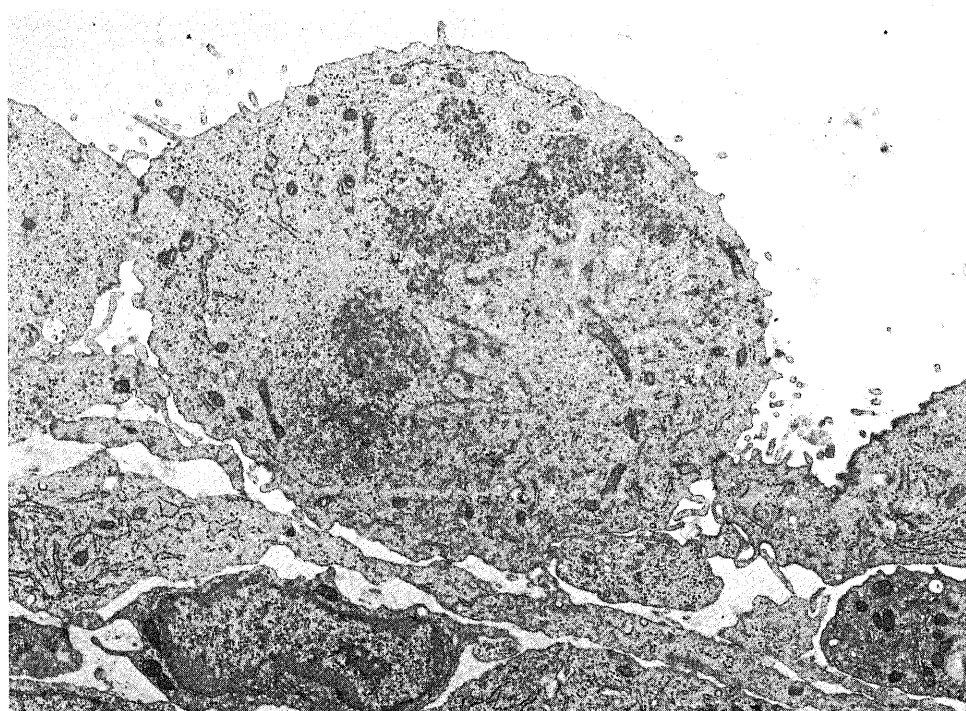


Fig. 11. Regenerating mesothelial cells at 3 days, showing mitotic activity.  $\times 6,300$ .

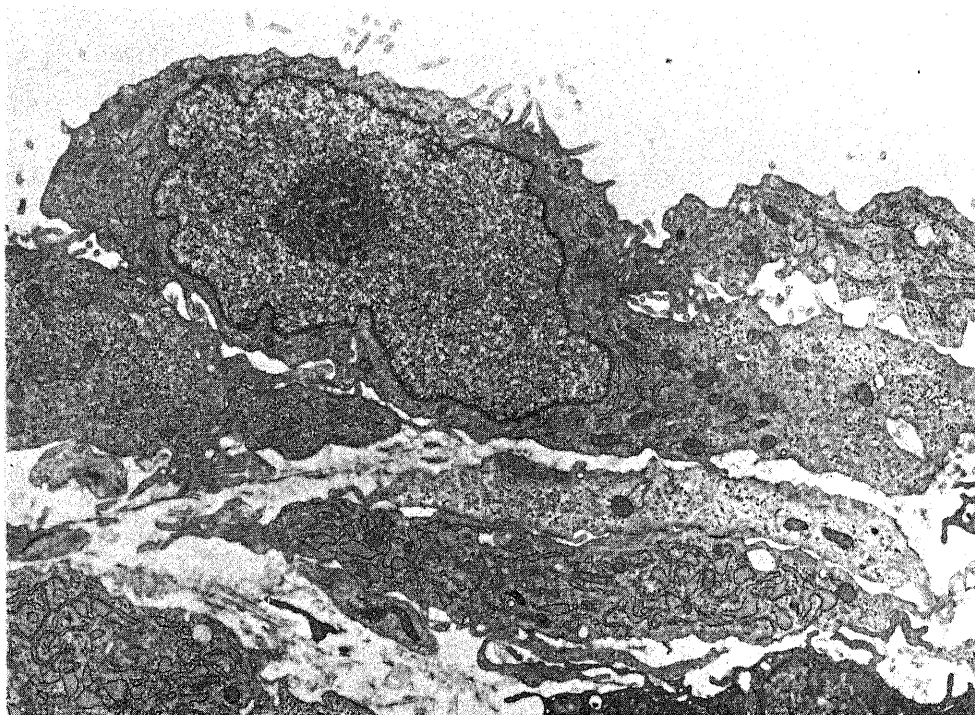


Fig. 12. Wound surface at 3 days, showing overlying of the mesothelial cells and proliferation of fibroblasts in the subjacent connective tissue.  $\times 6,000$ .

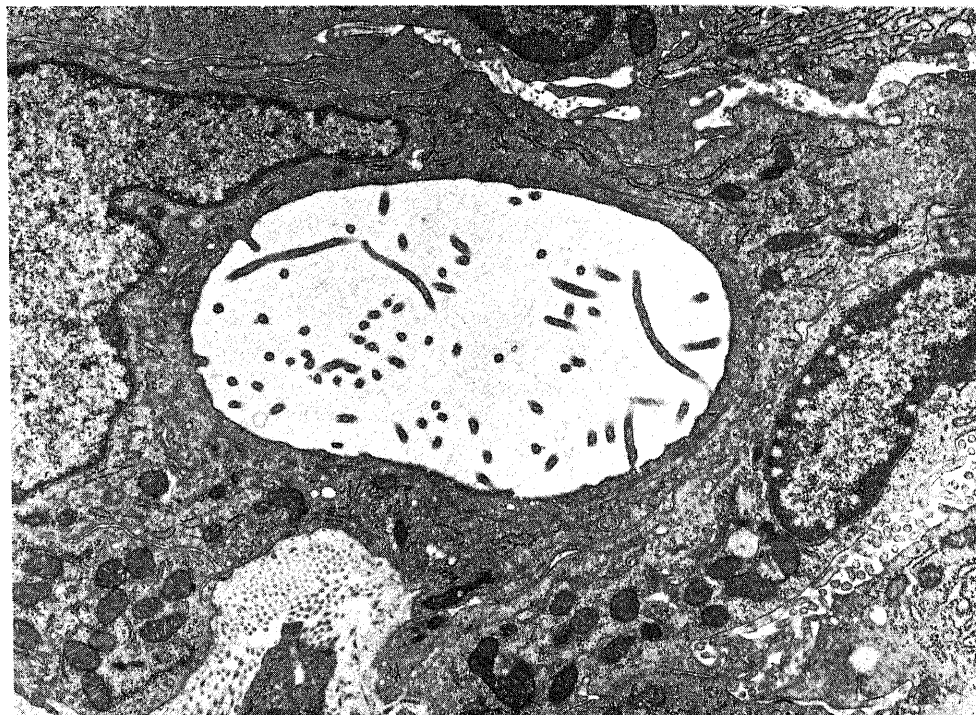


Fig. 13. A mesothelial cell infiltrated into the submesothelial connective tissue at 4 days after removal, showing intracytoplasmic lumen lined with microvilli.  $\times 10,000$ .

胞の表面に沿って原形質を延ばす。中皮細胞には時々核分裂が見出される (Fig. 11)。増殖した中皮細胞はしばしば 2-3 層に重積し、細胞間の接合はルースである (Fig. 12)。核は大きく著明な核小体を有し、原形質にはリボソームや粗面小胞体が増加する。時々脂肪滴がみられることがある。細胞の遊離面には特徴的な微絨毛が認められる。

中皮細胞は創面を被覆するばかりでなく、腹膜固有層の表層へ浸潤する。これらの細胞は紡錘形を呈し、細胞表面の微絨毛の減少と粗面小胞体の発育の結果、線維芽細胞との鑑別が困難な場合がある。しかし、核のクロマチンが微細で、核の輪郭が著しく不整であり、ゴルジ空胞が少ない点が鑑別の助けとなる。時々、中皮細胞に微絨毛をもった原形質内囊胞が形成されることがある (Fig. 13)。

大食細胞も増殖し、まれに核分裂がみられる。腹膜固有層の深部に、多数の貪食リソソームを含む大食細胞が集在する。

線維芽細胞の増殖も活発である。線維芽細胞は紡錘形を呈し、粗面小胞体とゴルジ装置の良好な発育によって特徴づけられる。粗面小胞体は拡張し、小胞腔は濃厚な架状物質で満たされる。ゴルジ装置では空胞の

発育が目立つ。時々脂肪滴が認められる。増殖した線維芽細胞は表層では創面に平行に配列し、創面の被覆細胞の直下にまで達するが、創面に露出することはない。線維芽細胞の周辺には microfibril を混じた無定形物質や細い膠原線維の沈着が認められる (Fig. 12)。

腹膜下層には線維芽細胞と大食細胞の増殖が認められる。線維芽細胞は細胞突起を延ばし、豊富な粗面小胞体とよく発育したゴルジ装置を有している。まれに線毛がみられる。大食細胞は細偽足と多数のリソソームを特徴とし、時々脂肪滴が認められる。

5-9日:

5日目では創面はほぼ完全に中皮細胞で被われ、大食細胞の被覆はほとんど認められない。大部分の中皮細胞は扁平となり、細胞は互に tight junction, 又はデスモソームによって連結する (Fig. 14)。腹膜固有層には線維芽細胞の増殖が続いている。線維芽細胞は創面に平行した層状の配列を示し、細胞間には多量の膠原線維が形成される (Fig. 15)。所々大食細胞や微絨毛で被われた原形質内囊胞を含む中皮細胞が認められる。

7日以後では創面は一層の扁平な中皮細胞で被われる。腹膜固有層は緻密な膠原線維束で占められ、その間に少数の萎縮状の線維芽細胞が散在性に存在する

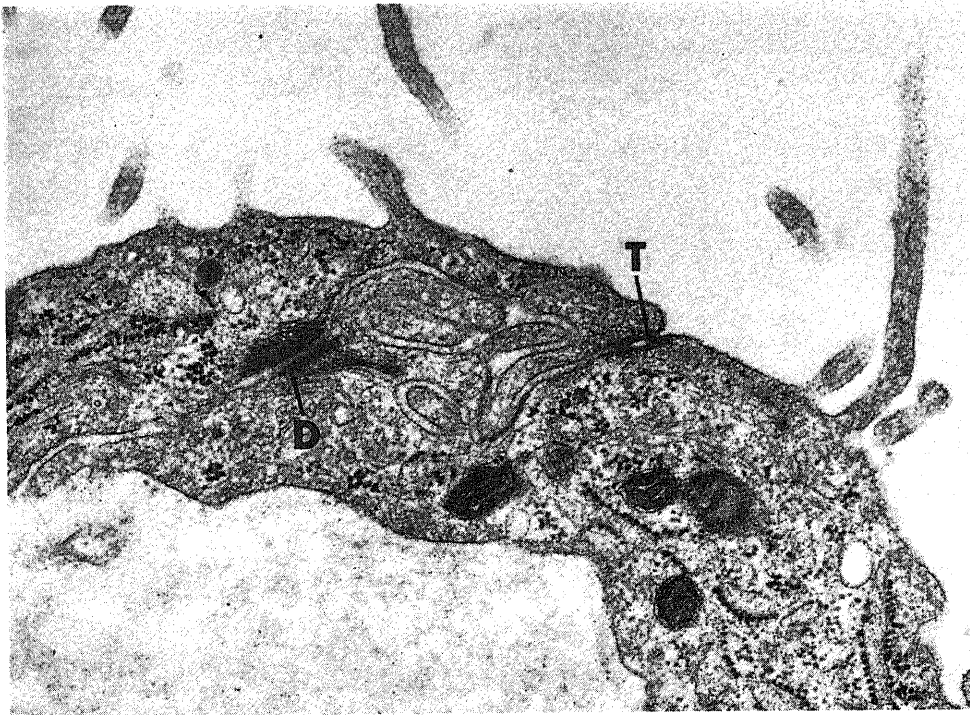


Fig. 14. Regenerating mesothelial cells at 5 days, showing close contacts between neighbouring cells with tight junction (T) and desmosome (D).  $\times 35,000$ .

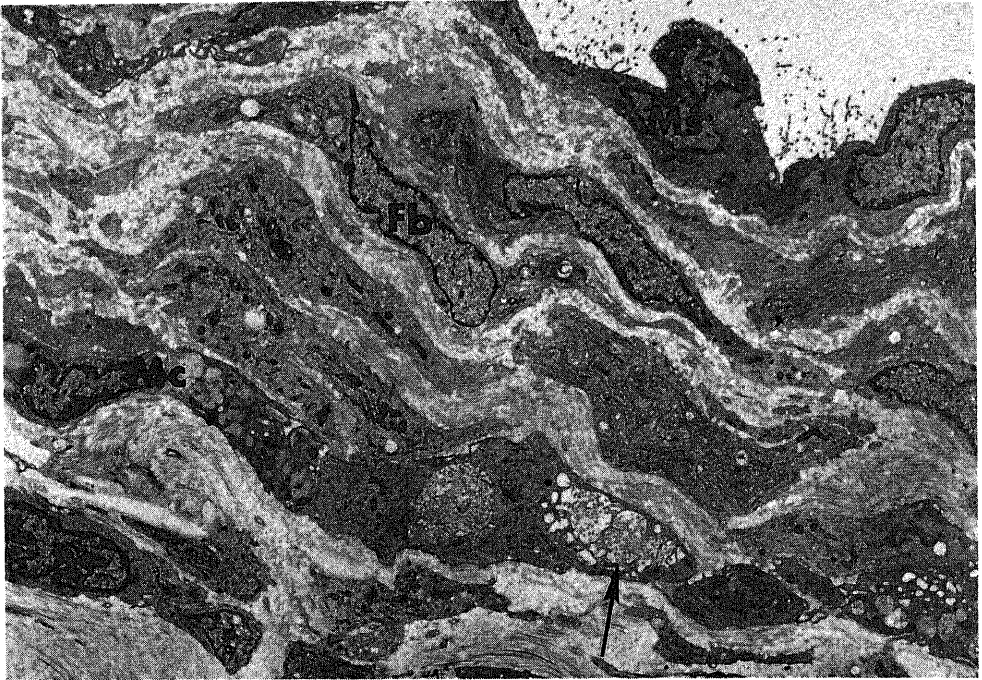


Fig. 15. Peritoneum 5 days after mesothelium - removal. Wound surface is covered with continuous mesothelial lining (Ms) and subjacent tissue contains macrophages (Mc) and fibroblasts (Fb) associated with collagen formation. A mesothelial cell containing microvillus - covered lumens can be seen as indicated by arrow.  $\times 3,000$ .

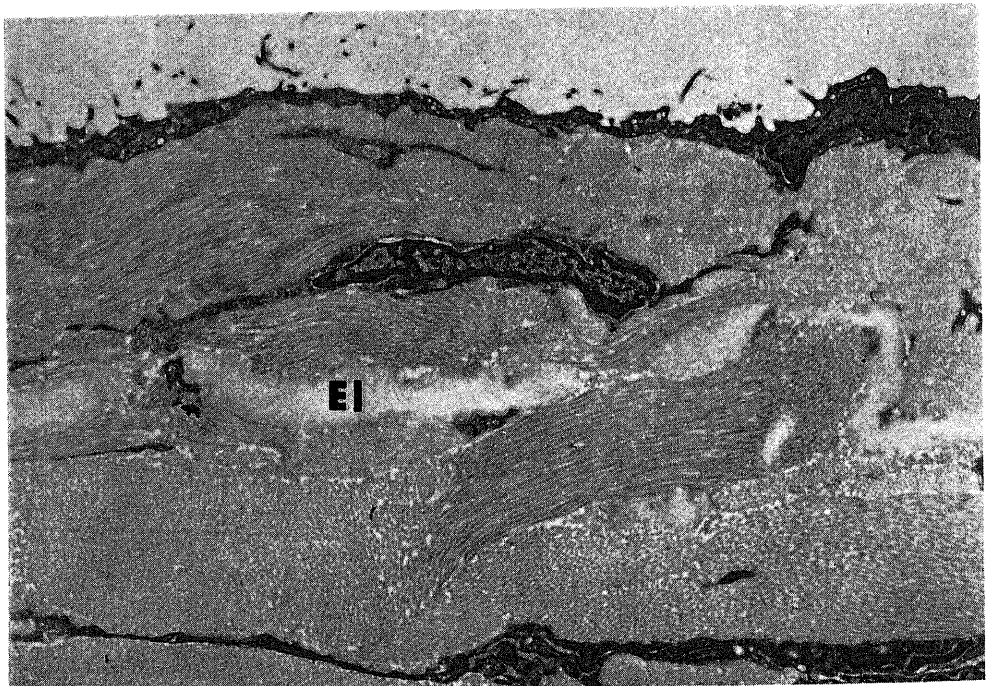


Fig. 16. Peritoneum 7 days after removal. Wound is completely lined with flattened mesothelial cells. Underlying tissue is occupied by fibrous tissue with scattered fibroblasts. El: elastic lamella.  $\times 6,800$ .

(Fig. 16). 時々リンパ管の拡張が認められる。

腹膜下層の細胞反応も消滅し、ほぼ正常構造に回復する。

### 考 察

腹膜中皮の再生は、表皮や内皮の再生と違ったいくつかの特徴があることが知られている。第1は腹膜の創傷は速やかに治癒することである。本研究においても中皮剝離後約1週間で、中皮は完全に再生されることが確かめられた。第2は腹膜創傷は創傷の大きさにかかわらずほとんど同じ速度で治癒することである<sup>3),6),7)</sup>。Eskeland<sup>3)</sup>は直径4, 12, 36 mmの腹膜中皮の欠損はいずれも約8日で修復されることを観察している。第3は中皮の再生は創面全域に平等に進行することである<sup>11)</sup>。これらの特徴は、表皮や内皮の再生の場合のように、創縁に近接する既存の細胞が分裂増殖して創面を求心性に被覆するという過程では説明することができない。そこで、再生中皮の起源として、序言で述べたように様々な可能性が提唱されている。

第1の可能性として、創面に付着する大食細胞から中皮細胞への転化が推定されている<sup>3)-5)</sup>。Curranら<sup>2)</sup>も腹腔内に移植された異物に対する反応を電顕的に観察した結果、腹腔大食細胞は中皮細胞及び線維芽細胞に分化しようと結論している。これらの主張の根拠は、傷害初期の大食細胞の反応が中皮細胞の増殖で置換され、両者に形態学的移行が存在すると言うことである。しかし、本研究においては、大食細胞と中皮細胞は構造的にも機能的にも明らかに異っており、両者が移行するという証拠はえられなかった。腹腔大食細胞は間質結合組織における大食細胞と同じく、細胞足と豊富な小胞、空胞及びリゾソームの存在によって特徴づけられることはよく知られている<sup>14)-16)</sup>。一方、中皮細胞は細胞表面の剛直性の微絨毛、基底面の基底膜及び細胞相互のtight junction又はデスモソームによる結合が最も特徴的でリゾソームは乏しい<sup>17),18)</sup>。Bradiら<sup>19)</sup>はウサギの腹膜中皮細胞の特徴的所見として多数の小胞の存在をあげているが、本研究では小胞の数は特に多いことはなかった。これは動物の差異によるものかも知れない。中皮細胞と大食細胞との形態学的差異は、走査電顕によっても明瞭に示されている<sup>9)</sup>。本研究においても中皮細胞は扁平で、大食細胞より大きく、その表面に微絨毛が密集し、一方、大食細胞は円形で、細胞表面にうねったひだ状突起が存在することが観察された。Carrら<sup>20)</sup>によると大食細胞の表面構造の特徴は様々な刺激に対してほとんど変化しないとされる。

中皮細胞と大食細胞の機能的差異として貪食能が注目される。In vitroの実験で、中皮細胞の貪食能が観

察されているが<sup>21)</sup>、in vivoでは大食細胞が異物の活発な貪食を示すのに対し、中皮細胞の貪食能は甚だ乏しいことが報告されている<sup>17),25)</sup>。本研究においても、大食細胞には多数の貪食リゾソームが証明されるが、中皮細胞のリゾソームは極めて少ないことが観察された。

又、中皮細胞はヒアルロン酸の合成能があることが知られており<sup>22),23)</sup>、中皮腫細胞の原形質に時々認められる微絨毛で被われた囊胞はヒアルロン酸の貯溜によるものと考えられている<sup>24)</sup>。

さらに、ペルオキシダーゼ活性は中皮細胞では陰性であるのに対し、大食細胞では核膜及び粗面小胞体、又は原形質顆粒及びリゾソームに陽性であった。腹腔大食細胞のペルオキシダーゼ活性の分布は、アゾール顆粒にのみ陽性の滲出大食細胞と、核膜と粗面小胞体のみ陽性の定住大食細胞の中間型を示すことは多くの研究者によって報告されている<sup>26)-28)</sup>。

腹腔大食細胞のkineticsは議論があり、その起源を血液単球とする説<sup>29)</sup>と大網乳斑の食細胞とする説<sup>16),30)</sup>があるが、いずれにしても腹腔大食細胞は増殖能を失った成熟細胞であるとされている。本研究においては腹膜結合組織に浸潤した大食細胞にまれに核分裂が認められることはあったが、創面に付着する大食細胞には核分裂は認められなかった。一方、創面に再生した中皮細胞には時々核分裂が見出された。この事実は中皮細胞はそれ自身細胞分裂によって増殖することを示している。

以上の中皮細胞と大食細胞の構造的及び機能的差異は腹膜の修復過程において常に保持されており、両者の中間型の細胞を見出すことはできなかった。従って、腹腔大食細胞が中皮細胞に転化するという見解は支持しがたいものと思われる。

再生中皮細胞の起源に関する第2の可能性は線維芽細胞からの転化である。Williams<sup>1)</sup>やHubbardら<sup>6)</sup>は腹膜中皮の再生は創面全域に平等に起こることに着目し、再生中皮細胞は下部の結合組織細胞に由来する可能性があると考えた。Ellisら<sup>7)</sup>も創面における中皮細胞の再生と共に下部結合組織に線維芽細胞の増殖が認められることから、線維芽細胞が中皮細胞に転化するものと推定した。しかし、本研究では、腹膜固有層における線維芽細胞の増殖は創傷3日以後に活発となるのに対し、創面の中皮細胞は創傷1日目ですでに出現し、その下部には線維芽細胞は認められない。又、3日以後においても線維芽細胞が創面に接近することはあっても、中皮細胞に転化することを示唆する所見は認められなかった。

再生中皮細胞の起源に関する第3の可能性は既存の中皮細胞の増殖である。創傷の早期に創縁の中皮細胞

は腫大し、核分裂が認められることは多くの研究者によって観察されている<sup>3),7),9)</sup>。Eskeland<sup>3)</sup>は創縁の中皮細胞は創傷2日目から分裂を開始し、4日目で最高となると述べている。本研究においても、剝離標本で創傷2日目に創縁に近接する中皮細胞が核分裂を伴って増殖することが観察された。従って、再生中皮細胞の少なくとも一部は創縁から連続的に増殖する中皮細胞に由来することは確かであると思われる。しかし、既述のように、中皮の再生は創縁からの求心性増殖によっては説明が困難ないくつかの特徴をもっているため、残された可能性として、中皮細胞の移植(implantation)が考えられる。

Eskeland<sup>3)</sup>は小皮標本の観察において創縁ばかりでなく創中央部にも中皮細胞の核分裂を認めており、又 Watters ら<sup>8)</sup>は走査電顕によって創傷30分ですでに創面の大食細胞の間に中皮細胞が出現することを観察している。これらの所見は、中皮細胞が創面で不連続性に増殖することを示唆している。

本研究における剝離標本で創傷2日目では創縁が極めて不規則であり、大食細胞の間に中皮細胞が散在性に増殖し、3-4日目では中皮細胞が創縁から求心性に増殖するのではなく、核分裂を伴った中皮細胞が創面を分画するように増殖することが観察された。電顕的にも創面に大食細胞と共に中皮細胞が不連続性に付着し、時々核分裂が認められた。以上の所見を総合すると、中皮細胞は創縁で分裂増殖し、一方、創中心部にも移植され、そこで分裂増殖するものと考えられる。

創面に移植される中皮細胞の起源に関しては、Bridges ら<sup>10)</sup>は創面に癒着した大網の中皮細胞に由来する可能性を指摘したが、本研究では腹膜の癒着は認められなかったため、この推定は支持されない。腹腔液には少量の中皮細胞が含まれ<sup>26),30)</sup>、刺激によって増加するので<sup>31),32)</sup>、このような浮遊中皮細胞が移植される可能性は否定されないであろう。Cameron ら<sup>33)</sup>は肝表面の創傷は創縁から増殖する中皮細胞と、周囲腹膜から遊離した中皮細胞で被覆されると述べている。本研究においても、創縁の中皮細胞に活発な核分裂があり、中皮細胞の剝離が認められることは、創縁で増殖した中皮細胞が遊離し創面に移植される可能性を示唆している。

本研究では増殖した中皮細胞の一部は腹膜固有層に浸潤することが観察された。結合組織に遊離した中皮細胞に時々微絨毛で被われた原形質内嚢胞が認められた。同様な原形質内嚢胞は腫瘍性に増殖した中皮細胞にも見出されている<sup>24)</sup>。中皮腫の構成細胞が線維芽細胞様及び上皮細胞様の形態を示すことから、中皮細胞は様々な細胞に分化しうるものと推定されている<sup>24),35)</sup>。

Marcus ら<sup>36)</sup>は生殖器の腺腫様腫瘍は超微構造的類似から中皮細胞に由来する可能性を指摘した。本研究では上述の原形質内嚢胞は認められたが、明らかな腺管形成はなく、又、腹膜固有層の線維芽細胞は腹膜下層から侵入し増殖した細胞であることが示され、中皮細胞からの転化を示唆する証拠は認められない。創傷7日以後には腹膜表面は一層の中皮細胞で被われ、下部組織の中皮細胞は消失するので、腹膜固有層に浸潤した中皮細胞は結合組織の増殖と共に死滅するものと考えられる。

## 結 論

ラットの体壁腹膜の中皮をゲラチンフィルム法で剝離し、その修復過程を光顕及び電顕によって観察し、次の成績を得た。

1. ゲラチンフィルム法によって中皮は基底膜を残して完全に剝離されるが、1日-2日で創面は大食細胞によって被覆される。

2. 創傷2-3日目で、創面には大食細胞にまじって中皮細胞の不連続性の付着が認められる。創縁に近接する既存の中皮細胞及び創面に付着した中皮細胞に核分裂が観察され、中皮細胞は大食細胞の表面を被うように増殖する。中皮細胞の一部は腹膜固有層に浸潤する。一方、腹膜下層の結合組織から線維芽細胞が腹膜固有層に侵入し増殖する。

3. 創傷7日以後は創面は一層の再生中皮で被覆され、腹膜固有層は薄い線維性組織が形成され、腹膜の修復は完了する。

4. 腹膜の修復過程において、超微構造的にも細胞化学的にも、大食細胞又は線維芽細胞が中皮細胞に転化することを示唆する所見は得られなかった。

5. 以上の成績から、腹膜中皮の再生は、創縁に近接する中皮細胞及び創面に移植された中皮細胞の増殖によって行われるものと結論された。

## 謝 辞

御指導と御校閲を賜りました恩師梶川欽一郎教授に深謝の意を表します。また、研究遂行にあたり御助言、御協力を戴きました教室員各位と電子顕微鏡室技術員の方々に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Williams, D. C.: The peritoneum. A plea for a change in attitude towards this membrane. *Br. J. Surg.*, **42**, 401-405 (1955).
- 2) Curran, R. C. & Clark, A. E.: Phagocytosis and fibrogenesis in peritoneal implants in the rat. *J.*

- Pathol. Bacteriol., 88, 489 - 502 (1964).
- 3) **Eskeland, G.**: Regeneration of parietal peritoneum in rats. 1. A light microscopic study. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **68**, 355 - 378 (1966).
  - 4) **Eskeland, G. & Kjaerheim, A.**: Regeneration of parietal peritoneum in rats. 2. An electron microscopic study. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **68**, 379 - 395 (1966).
  - 5) **Ryan, G. B., Grobety, J. & Majno, G.**: Mesothelial injury and recovery. *Am. J. Pathol.*, **71**, 93 - 112 (1973).
  - 6) **Hubbard, T. B. Jr, Khan, M. Z., Carag, V. R. Jr., Albites, V. E. & Hricko, G. M.**: The pathology of peritoneal repair: its relation to the formation of adhesions. *Ann. Surg.*, **165**, 908 - 916 (1967).
  - 7) **Ellis, H., Harrison, W. & Hugh, T. B.**: The healing of peritoneum under normal and pathological conditions. *Br. J. Surg.*, **52**, 471 - 476 (1965).
  - 8) **Watters, W. B. & Buck, R. C.**: Scanning electron microscopy of mesothelial regeneration in the rat. *Lab. Invest.*, **26**, 604 - 609 (1972).
  - 9) **Johnson, F. R. & Whitting, H. W.**: Repair of parietal peritoneum. *Br. J. Surg.*, **49**, 653 - 660 (1962).
  - 10) **Bridges, J. B. & Whitting, H. W.**: Parietal peritoneal healing in the rat. *J. Pathol. Bacteriol.*, **87**, 123 - 130 (1964).
  - 11) **Tsutsumi, H. & Gore I.**: Isolation of living endothelial cells by gelatin - film stripping of vascular walls. *Stain Technol.*, **44**, 139 - 142 (1969).
  - 12) **Gomori, G.**: Distribution of acid phosphatase in the tissues under normal and under pathologic conditions. *Arch. Pathol.*, **32**, 189 - 199 (1941).
  - 13) **勝田省吾, 中西功夫, 三輪淳夫**: ウサギ総頸動脈の内皮細胞の内因性ペルオキシダーゼ活性の局在, *脈管学*, **22**, 209 - 212 (1982).
  - 14) **Cohn, Z. A., Hirsch, J. G. & Fedorko, M. E.**: The in vitro differentiation of mononuclear phagocytes. IV. The ultrastructure of macrophage differentiation in the peritoneal cavity and in culture. *J. Exp. Med.*, **123**, 747 - 756 (1966).
  - 15) **North, R. J. & Mackaness, G. B.**: Electron microscopical observations on the peritoneal macrophages of normal mice and mice immunised with *Listeria monocytogenes*. 1. Structure of normal macrophages and the early cytoplasmic response to the presence of ingested bacteria. *Br. J. Exp. Pathol.*, **44**, 601 - 607 (1963).
  - 16) **Imai, Y., Kasajima, T. & Matsuda, M.**: Electron microscopic study on the peritoneal macrophage and milky spot in omentum. *Recent Adv. RES Res.*, **11**, 54 - 84 (1971).
  - 17) **Fukata, H.**: Electron microscopic study on normal rat peritoneal mesothelium and its changes in absorption of particulate iron dextran complex. *Acta Pathol. Jap.*, **13**, 309 - 325 (1963).
  - 18) **Odor, D. L.**: Observations of the rat mesothelium with the electron and phase microscopes. *Am. J. Anat.*, **95**, 433 - 465 (1954).
  - 19) **Baradi, A. F. & Hope, J.**: Observations on ultrastructure of rabbit mesothelium. *Exp. Cell Res.*, **34**, 33 - 44 (1964).
  - 20) **Carr, I., Clarke, J. A. & Salsbury, A. J.**: The surface structure of mouse peritoneal cells. A study with the scanning electron microscope. *J. Microsc.*, **89**, 105 - 111 (1969).
  - 21) **Jaurand, M. C., Kaplan, H., Thiollet, J., Pinchon, M. C., Bernaudin, J., F. & Bignon, J.**: Phagocytosis of chrysotile fibers by pleural mesothelial cells in culture. *Am. J. Pathol.*, **94**, 529 - 538 (1978).
  - 22) **Wagner, J. C., Munday, D. E. & Harington, J. S.**: Histochemical demonstration of hyaluronic acid in pleural mesothelioma. *J. Pathol. Bacteriol.*, **84**, 73 - 78 (1962).
  - 23) **Castor, C. W. & Naylor, B.**: Characteristics of normal and malignant human mesothelial cells studied in vitro. *Lab. Invest.*, **20**, 437 - 443 (1969).
  - 24) **Wang, N.**: Electron microscopy in the diagnosis of pleural mesotheliomas. *Cancer*, **31**, 1046 - 1054 (1973).
  - 25) **Felix, M. D. & Dalton, A. J.**: A comparison of mesothelial cells and macrophages in mice after the intraperitoneal inoculation of melanin granules. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **2**, 109 - 114 (1956).
  - 26) **Beelen, R. H. J., Broekhuis - Fluitsma, D. M., Korn, C. & Hoefsmit, E. C. M.**: Identification of exudate - resident macrophages on the basis of peroxidatic activity. *J. Reticuloendothel. Soc.*, **23**, 103 - 110 (1978).
  - 27) **Bodel, P. T., Nichols, B. A. & Bainton, D. F.**: Differences in peroxidase localization of rabbit peritoneal macrophages after surface adherence. *Am. J. Pathol.*, **91**, 107 - 118 (1978).

- 28) **Ogawa, T., Koerten, H. K. & Daems, W. Th.**: Peroxidatic activity in monocytes and tissue macrophages of mice. *Cell Tissue Res.*, **188**, 361 - 373 (1978).
- 29) **Van Furth, R. & Cohn, Z. A.**: The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.*, **128**, 415 - 433 (1968).
- 30) **村田純一郎**: 腹腔内食細胞の研究, 前編, 腹腔内食細胞の細胞学的研究, 後編, 腹腔内食細胞の由来について, *日血会誌*, **18**, 38 - 62 (1955).
- 31) **Shelton, E. & Rice, M. E.**: Growth of normal peritoneal cells in diffusion chambers: a study of cell modulation. *Am. J. Anat.*, **105**, 281 - 342 (1959).
- 32) **Eskeland, G. & Eskelund, T.**: Development of mesothelium on the outer surface of intraperitoneal diffusion chambers. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **66**, 447 - 464 (1966).
- 33) **Cameron, G. R., Hasson, S. M. & De, S. N.**: Repair of Glisson's capsule after tangential wounds of the liver. *J. Pathol. Bacteriol.*, **73**, 1 - 10 (1957).
- 34) **Suzuki, Y., Churg, J. & Kannerstein, M.**: Ultrastructure of human malignant diffuse mesothelioma. *Am. J. Pathol.*, **85**, 241 - 262 (1976).
- 35) **Stoebner, P. & Brambilla, E.**: Ultrastructural diagnosis of pleural tumors. *Path. Res. Pract.*, **173**, 402 - 416 (1982).
- 36) **Marcus, J. B. & Lynn, J. A.**: Ultrastructural comparison of an adenomatoid tumor, lymphangioma, hemangioma and mesothelioma. *Cancer*, **25**, 171 - 175 (1970).

**Mesothelial Regeneration of the Rat Peritoneum: Light and Electron Microscopic Observation** Fumio Momonoi, Department of Pathology (I), (Director: Prof. K. Kajikawa), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920—J. Juzen Med. Soc., **91**, 992—1006 (1982)

**Key words:** Mesothelial cell, Regeneration, Light microscopy, Electron microscopy.

#### Abstract

To elucidate the regeneration mechanism, the mesotheliums of the parietal peritoneums of rats were removed by a piece of gelatin-film ( $5 \times 5 \text{ mm}^2$ ), and mesothelial regeneration processes were examined by light and electron microscopy during a period of one to fourteen days after removal. One day following mesothelium-removal, the denuded area was covered by macrophages. During a few subsequent days, the mesothelial cells adjacent to the margin of the mesothelium-removed wound showed numerous mitoses, and implantation of mesothelial cells was observed on the wound surface. At the same time, fibroblasts were found to proliferate in the underlying connective tissue. After seven days the mesothelial regeneration was accomplished, a thin submesothelial scar being formed. During the peritoneal repair period, there was neither ultrastructural nor cytochemical evidence suggesting that macrophages or fibroblasts transformed into mesothelial cells. From these findings it was concluded that the mesothelial defect was restored by migration of mesothelial cells from the wound margin and by proliferation of mesothelial cells implanted on the wound surface.