
原 著

家兎総頸動脈における内膜切除術後の内膜再生機序についての実験的検討

——標準食飼育群と高コレステロール食飼育群における spindle type と ovoid type 細胞について——

阿川 昌仁

徳島大学医学部脳神経外科学教室 (主任: 松本圭蔵 教授)

(平成7年6月8日受付)

Experimental studies of endothelial regeneration in rabbit carotid arteries after endarterectomy

——*Spindle and ovoid type cells of a normal diet group versus a hypercholesterolemia group*——

Masahito Agawa

Department of Neurological Surgery, School of Medicine, The University of Tokushima, Tokushima
(Director: Prof. Keizo Matsumoto)

SUMMARY

Endothelial regeneration of the rabbit carotid artery was investigated after endarterectomy, which involved the removal of a 4 mm length including the endothelium, internal elastic laminae and part of the muscle layer of the media. Regeneration was studied at intervals from 1 hour to 8 weeks after surgery. There were two groups, Group A consisting of Japan White rabbits fed a standard diet and Group B consisting of rabbits fed a 1% cholesterol diet for a month prior to surgery and continued until the animals were sacrificed. The healing process of the endarterectomized arterial wall was observed using light microscopy, scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). The origin of regenerated cells was examined with immunohistochemical double-labeled staining. Scanning electron microscopy (SEM) showed two kinds of regenerated cells which were observed on the luminal surface of the endarterectomized wall, namely, spindle type and ovoid type cells in both Group A and Group B. Complete endothelial regrowth was confirmed 2 weeks after surgery in both groups. After the endothelial regrowth was completed, the ovoid type cells were localized in the low shear stress area. Transmission electron microscopy (TEM) showed both the spindle type and ovoid type cells consisted of pinocytotic vesicles and demonstrated tight-junction adherence, which confirmed their endothelial origin. Immunohistochemical findings showed both the spindle type and ovoid type cells stained positively for anti-Factor VIII antibody in Group A

and stained positively for anti-CD31 antibody in Group B, which confirmed their endothelial origin. In Group B the speed of the endothelial regrowth was not remarkably delayed from that in Group A, but SEM revealed enlarged spindle type cells and irregular-sized ovoid type cells. TEM showed vacuoles existed in both spindle type and ovoid type cells. In addition, foam cells which were stained for antimacrophage cell antibody RAM11 migrated subendothelially, after which intimal thickening was observed. It could be suggested that the reason for the low rate of clinically postoperative restenosis after carotid endarterectomy is that preoperative control leads to the reduction of risk factors of atherosclerosis, and consequently clinical endothelial regeneration of the human carotid artery after endarterectomy is likely to resemble that of the rabbit carotid artery in Group A.

(received June 8, 1995)

Key words : carotid endarterectomy, endothelial regeneration,
ovoid type cell, hypercholesterolemia.

頭蓋外内頸動脈狭窄性病変は日本人においても閉塞性脳血管障害(脳卒中)の重要な責任病巣の1つと考えられるようになってきた。これに対する外科的治療法としての頸動脈内膜切除術(carotid endarterectomy 以下CEA)は欧米での無作為臨床検討から有用な手術法として評価されている(North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial (NASCET) Investigators, 1991; European Carotid Surgery Trialists' Collaborative Group, 1991)。CEAが行われる粥状硬化巣の発現および進展機序の一つとして血管内皮細胞の損傷説(response-to-injury hypothesis of atherosclerosis)(Ross, Glomset, 1973; Ross, 1986, 1993)が注目されている。CEAでは、形成された粥状硬化巣とともに広範囲に内膜が切除されるため、上述のRoss(1993)の説からすると、術後に血管の再狭窄が起こりうる事が予想される。しかし、興味深いことに臨床CEA後早期に粥状硬化巣の再発や血管の狭窄、閉塞をきたさない(Uedaら, 1993)。

通常病的でない状況での正常血管の内膜再生は、内膜欠損部周辺から求心性にspindle typeの細胞により修復されるが、切除が広範な場合は内膜が欠損した中央部から遠心性に内膜の再生が起こる。しかも、再生されてきた細胞の一部はspindle typeの細胞と異なったovoid typeあるいはcuboidal typeと称される形態をとると言われている。その再生細胞の起源は、以前では平滑筋細胞由来とされていた(Schwartzら, 1975)が、最近では内皮細胞由来とする報告(Shimokawaら, 1987, Weidingerら, 1990)もあり、結論は

示されていない。

Yoshijima(1982)は、mongrel dogを用いた、頸動脈内膜切除後の再生過程を検討し、アスピリン投与群では、内膜再生は対照に比べて遅延し、ovoid type細胞の出現が多くみられた。このことから、周辺の内皮細胞の再生が遅れる時に中膜平滑筋細胞由来の再生細胞が出現するのではないかと推論している。そこで、ovoid typeの細胞の起源を解明するために、総頸動脈内膜切除後の再生過程を走査電顕、透過電顕による形態学的観察および免疫組織化学的観察を行った。また動脈硬化血管におけるCEA後の再生過程を検討するために標準食および高コレステロール食で飼育した家兎群を用いて比較検討した。

対象および実験方法

対象は体重2.5-3.0 kgの日本白色雄家兎40羽を用いた。このうちA群として20羽を、実験開始前1カ月より、標準食(オリエンタル酵母RC4)で飼育し、術後も実験終了時までそれを続けた。また残り20羽をB群とし、実験開始前1カ月より標準食に1%コレステロールを負荷した餌で飼育し、実験終了時までそれを続けた。

方法は家兎をチアミラールナトリウム(20 mg/kg)静脈麻酔下で頸部を剃毛後、ポビドンヨード液で消毒し、頸部正中切開を行なった。次いで手術用顕微鏡下で総頸動脈を露出し、脳血管吻合用クリップ(挟持圧力20 g, 瑞穂医科工業)で血流遮断を行ったあとメスにて小切開を加えた。内膜切除術として、微小鑷子により

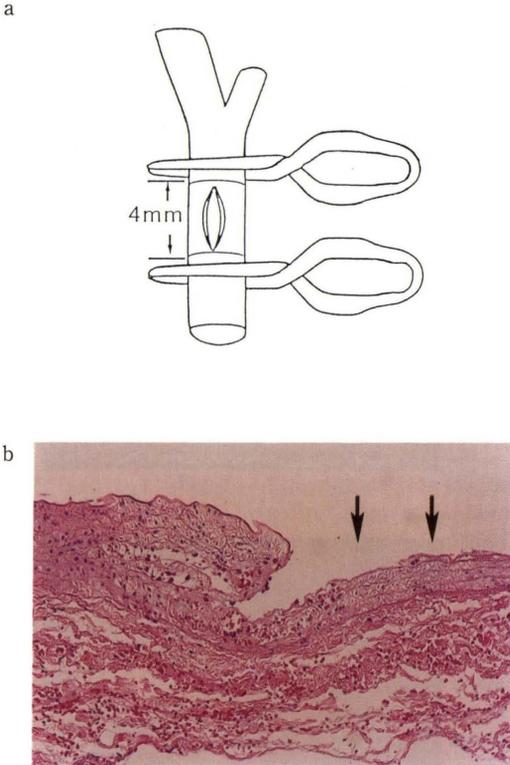


Fig. 1 a: Experimental schema. A sheet of the luminal surface of the rabbit carotid artery of 4 mm length was existed en bloc, including the endothelium, internal elastic laminae and part of the muscle layer of the media. b: Light microscopic finding of the endarterectomized wall (arrows). (Hematoxylin and eosin stain $\times 200$)

血管内腔全周にわたり長さ約 4 mm に内膜層及び内弾性板, 中膜筋層の一部を剝離除去し(Fig. 1a, b), 10-0 モノフィラメントナイロン糸(ETHICON)で血管切開部を縫合し終了した。血流遮断時間は約 20 分であった。術後 1 時間, 3 時間, 1 日, 3 日, 5 日, 1 週, 2 週, 4 週, 6 週, 8 週で再度静脈麻酔を行い, 速やかに開胸し, 左心室から 4% パラフォルムアルデヒド (0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.4) を用いて 150 cmH₂O の圧で灌流固定を行った後, 病理組織標本として総頸動脈を摘出した。

走査電顕観察: 1% オスミウム酸で二重固定後, アルコール系列で脱水, 臨界点乾燥, 金・パラジウム蒸着を行い, 日立 S-800 型走査電子顕微鏡で観察した。

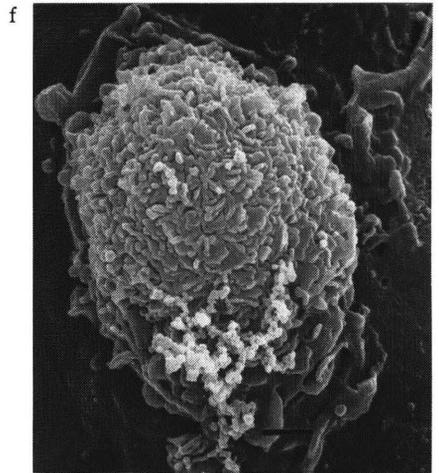
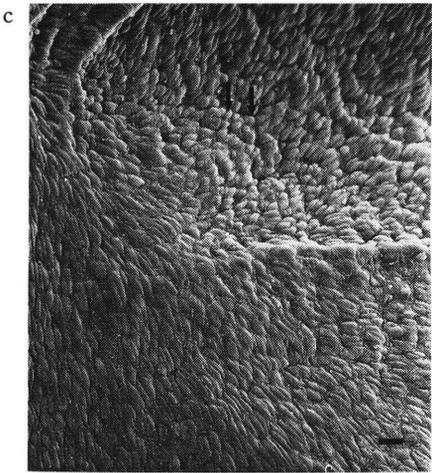
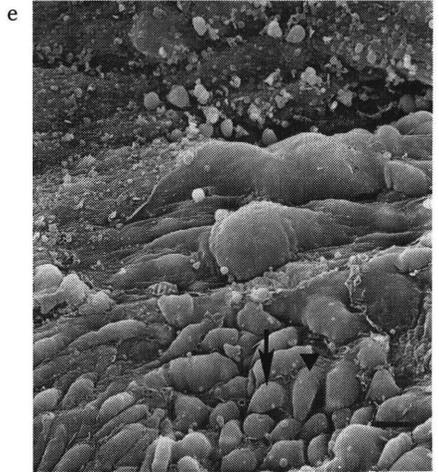
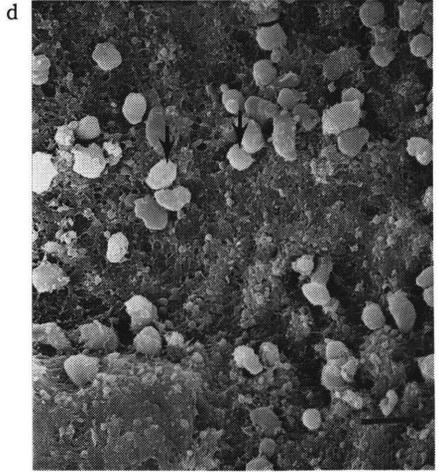
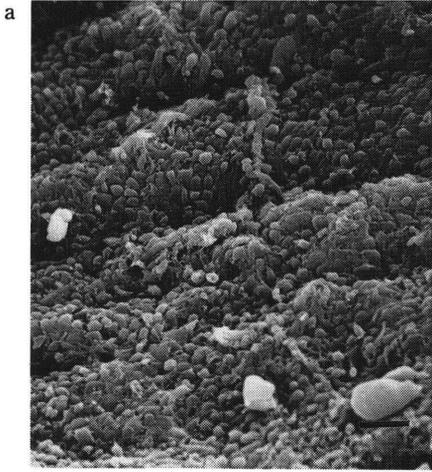
透過電顕観察: 1% オスミウム酸で二重固定後, アセトンで脱水, エポン包埋を行い, 80 nm の超薄切片を作成した後, 2% 酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛で電子染色を施し, 日本電子 GEM1200EX II 型電子顕微鏡で観察を行った。

光顕および免疫組織化学的観察: 20% ホルマリン固定液で固定し, 脱水, パラフィン包埋し, ヘマトキシリン・エオジン染色, エラスチカ・ファンギーソン染色を行った。さらに内皮細胞特異抗体である抗ヒト Factor VIII 単クローン性抗体(DAKO)(Jaffe, 1982)と抗ウサギ平滑筋単クローン性抗体(HHF35)(Tsukada ら, 1987), Factor VIII と抗ウサギマクロファージ単クローン性抗体(RAM11)(Tsukada ら, 1986), 内皮細胞膜糖タンパク特異性抗体である抗ヒト CD31 単クローン性抗体 (DAKO)(Parums ら, 1990)と HHF35 および CD31 と RAM11 とのそれぞれ二重染

Table 1 Characteristics and laboratory data of Group A and Group B prior to surgery

	Group A (n=20)	Group B (n=20)
Body weight (kg)	2.7±0.2	2.9±0.3
Red blood cell (/μl)	590±149×10 ⁴	417±102×10 ⁴
White blood cell (/μl)	6760±245	6850±279
Hemoglobin (g/dl)	13.0±2.2	10.2±1.3
Hematocrit (%)	43.1±10.7	34.9±4.4
Platelet (/μl)	31.7±8.5×10 ⁴	27.6±7.8×10 ⁴
Total cholesterol (mg/dl)	37.9±14.3	961±197
Triglyceride (mg/dl)	41.8±20.1	186±103
HDL-cholesterol (mg/dl)	23.5±3.8	27.4±8.5

Values show mean ± SD.



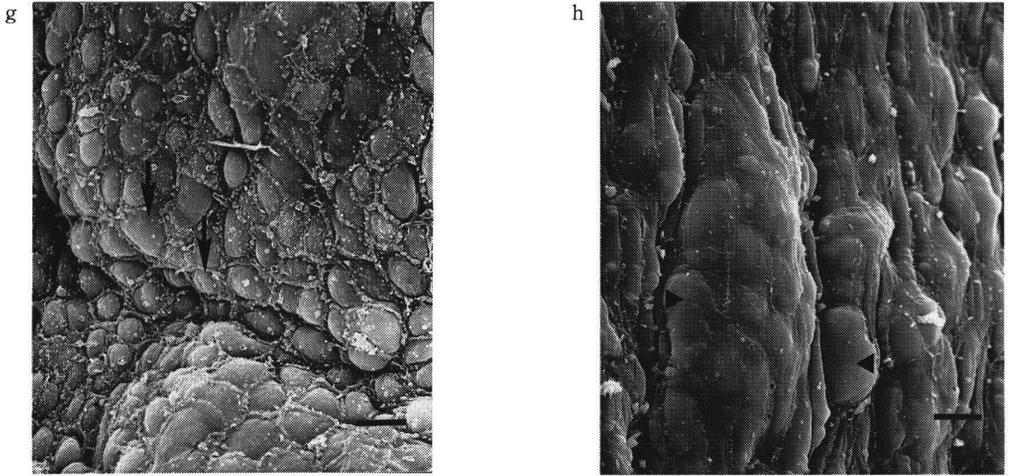


Fig. 2 Scanning electron microscopic finding of the endarterectomized wall. a: In Group A the fibrin-platelet carpet on the endarterectomized surface 1 hour after surgery. b: Regenerated cells can be divided into two types: spindle type (arrowhead) or ovoid type (arrow) 3 days after surgery in Group A. c: Ovoid type cells (arrows) were localized in the low shear stress area 4 weeks after surgery in Group A. d: In Group B numerous adherent leukocytes (arrows) are clustered on the endarterectomized surface 1 day after surgery. e: Spindle type (arrowhead) and ovoid type cells (arrow) were observed on the luminal surface of the endarterectomized wall 3 days after surgery in Group B. f: Monocytes adhered to the endothelium, and had begun to penetrate between the surface of the regenerated cells 7 days after surgery in Group B. g: Ovoid type cells of various sizes (arrows) were observed in the low shear stress area 4 weeks after surgery in Group B. h: The spindle type cells (arrowheads) were enlarged and demonstrated irregular protuberance of the luminal surface of the endarterectomized wall 8 weeks after surgery in Group B. (Bars: 10 μ m).

色を行った。Factor VIII, CD31 の両抗体の家兎内皮細胞に対する特異性はダコ・ジャパン社で確認された。

染色は厚さ 4 μ m の脱パラフィン切片を用いて、内因性ペルオキシダーゼ阻害を行い、Factor VIII と反応させ、Avidin-Biotin Peroxidase Complex (ABC) 法により 3, 3'-Diaminobenzidine (DAB) で発色させた。次いで 0.1 M グリシン塩酸緩衝液 pH 2.2 中で洗浄後、HHF35 あるいは RAM11 と反応させ、ABC 法により塩化コバルト-DAB で発色させた。また CD31 を用いた反応では、同様の ABC 法で 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) で発色、0.1 M グリシン塩酸緩衝液 pH 2.2 で洗浄を行った後、HHF35 あるいは RAM 11 と反応させ ABC 法により DAB で発色させた。なお、Factor VIII と CD31 については、0.1% トリプシンによる 37°C 30 分と前処置を一次抗体の反応前に行った。

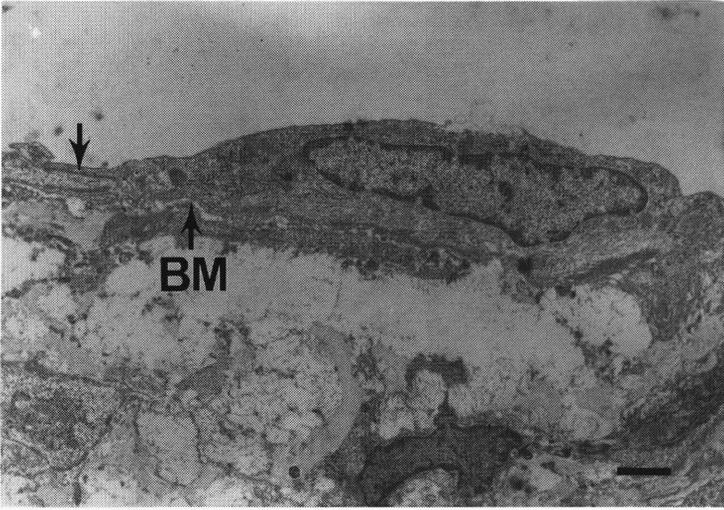
結 果

1 術前家兎検査所見：まず術前家兎の体重は A 群：2.7 \pm 0.2 (平均 \pm 標準偏差) kg, B 群：2.9 \pm 0.3 kg であった。血液検査データとして B 群は A 群と比べ、総コレステロール値が 961 \pm 197 mg/dl と著明な高値を示していた (Table 1)。しかし、内膜切除術直前の血管構造は正常血管の A 群と同様に、B 群でも内中膜層に fatty streak といえるような所見はみられなかった。

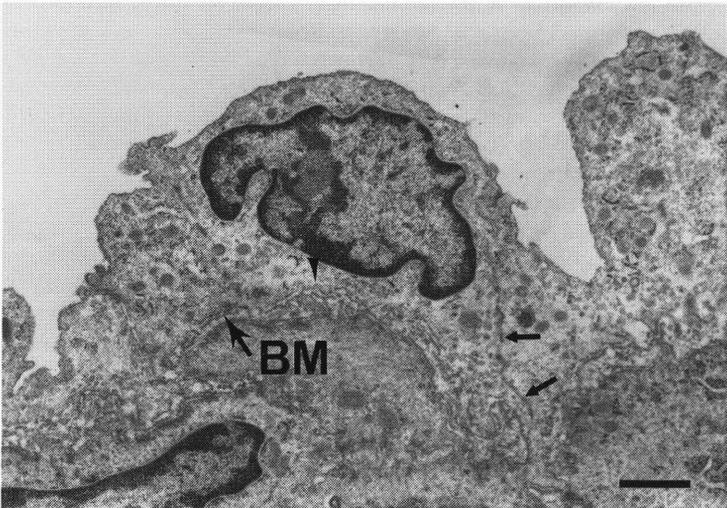
2 光顕所見：A 群、B 群とも早期の切除面の内皮細胞は完全に除去され、内弾性板および中膜筋層の一部も切除されており、残存平滑筋層には赤血球、白血球の細胞浸潤を認めた (Fig. 1b)。その後の再生過程では再生細胞による求心性の修復が認められ、上記浸潤細胞は経過とともに減少し、7 日目以降には消失した。

3 走査電顕所見：術直後の切除面は光顕所見と同様

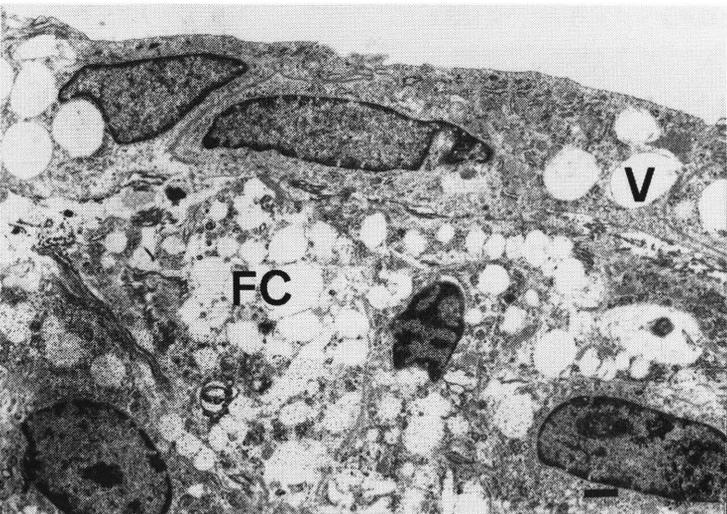
a



b



c



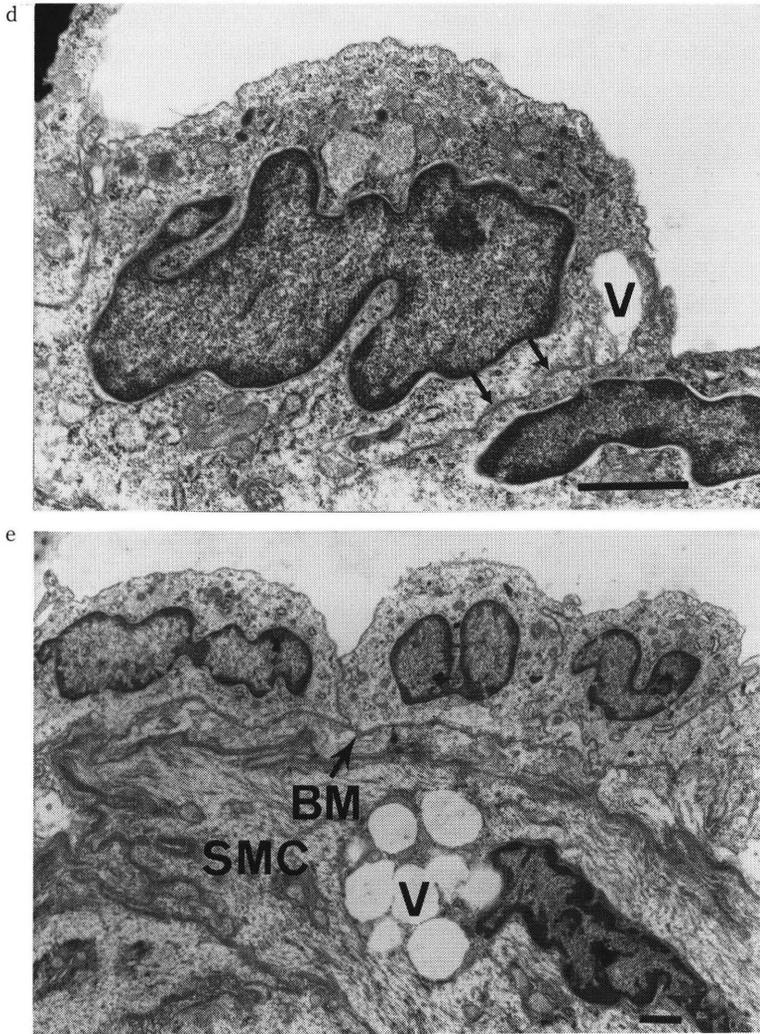
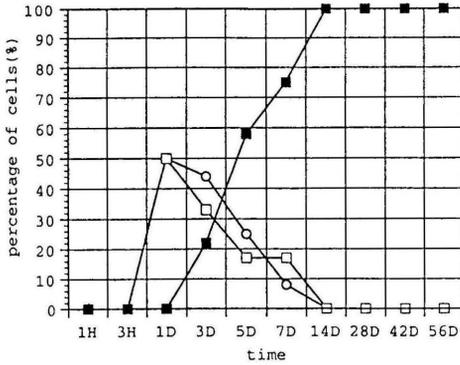


Fig. 3 Transmission electron microscopic finding of the endarterectomized wall. a : In Group A The spindle type cells formed interdigitation with tight-junction adherence (arrow) 4 weeks after surgery. b : The ovoid type cells consisted of pinocytotic vesicles (arrowhead) and formed end-to-end junctions with tight-junction adherence (arrows) 4 weeks after surgery in Group A. c : In Group B the cytoplasm of the spindle type cells contained vacuoles 4 weeks after surgery. d : The ovoid type cell consisted of vacuoles and formed end-to-end junctions (arrows) 4 weeks after surgery in Group B. e : Foam cells and smooth muscle cells containing vacuoles localized under the regenerated cell layer 6 weeks after surgery in Group B. (BM=basement membrane, V=vacuole, FC=foam cell, SMC=smooth muscle cell). (Bars: 1 μ m).

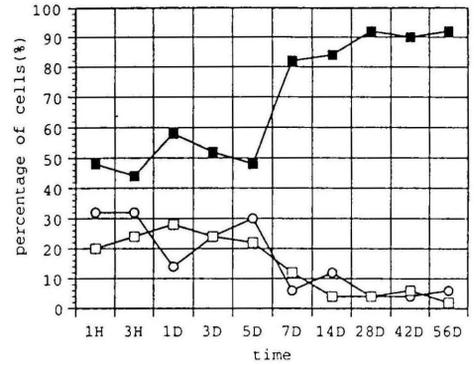
にA群, B群とも内皮細胞は完全に除去されていた。まずA群での再生過程をみると, CEA 後1時間, 3時間, 1日後ではフィブリン, 血小板カーベットおよび散在性に白血球の付着が認められ(Fig. 2a), 3日後には心臓側, 頭側の両方から内膜切除部位の辺縁より再

生細胞を認めた。5日後では, 再生細胞は血流方向に対し不規則な配列をし, 形状も spindle type と ovoid type が混在していた(Fig. 2b)。7日後には再生が切除部中央近くまで進み, 2週後では切除部全面が再生細胞で覆われ, ほとんどが spindle type であった。4週

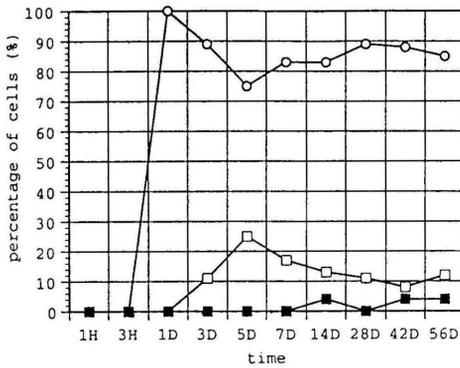
a.



c.



b.



d.

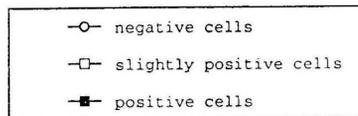
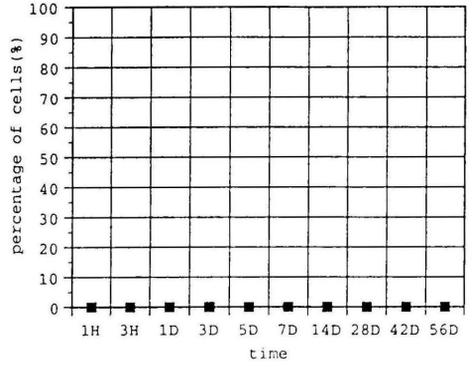


Fig. 4 Sequential changes in tissue reactivities of monoclonal antibodies. Graphs show tissue reactivities of monoclonal antibodies for Factor VIII(a), CD31(b), antimuscle cell antibody HHHF35(c) and antimacrophage cell antibody RAM11 (d) on the regenerated cells and cells in the subintimal layer at the site of carotid endarterectomy in Group A. H; hour, D; day

以降も spindle type の細胞が主であったが、一部の領域に ovoid type 細胞群が存在し、その局在としては縫合により生じた隆起部末梢側や、切除により生じた陥凹部など血流が乱れ易い、いわゆる低ずり応力領域に認められる傾向がみられた(Fig. 2c).

一方B群では、1時間、3時間、1日後ではフィブリン、血小板カーベットの表面ないしカーベット間に白血球の付着が著明であった(Fig. 2d). 3日後、5日後にはA群と同様に切除縁より再生細胞を認め、不規

則な配列をした spindle type と ovoid type 細胞の混在が認められた(Fig. 2e). 7日後になると微絨毛の発達した単球と思われる細胞が再生細胞間にみられ、さらに埋没していく所見が認められた(Fig. 2f). 2週後には spindle type を主体とした再生細胞で形態学的修復は完了していた。しかし、4週後でもA群と同様に血行力学的に低ずり応力域と考えられる陥凹部には大小不同の ovoid type の細胞群を認めた(Fig. 2g). 6週、8週では spindle type 細胞、ovoid type 細胞と

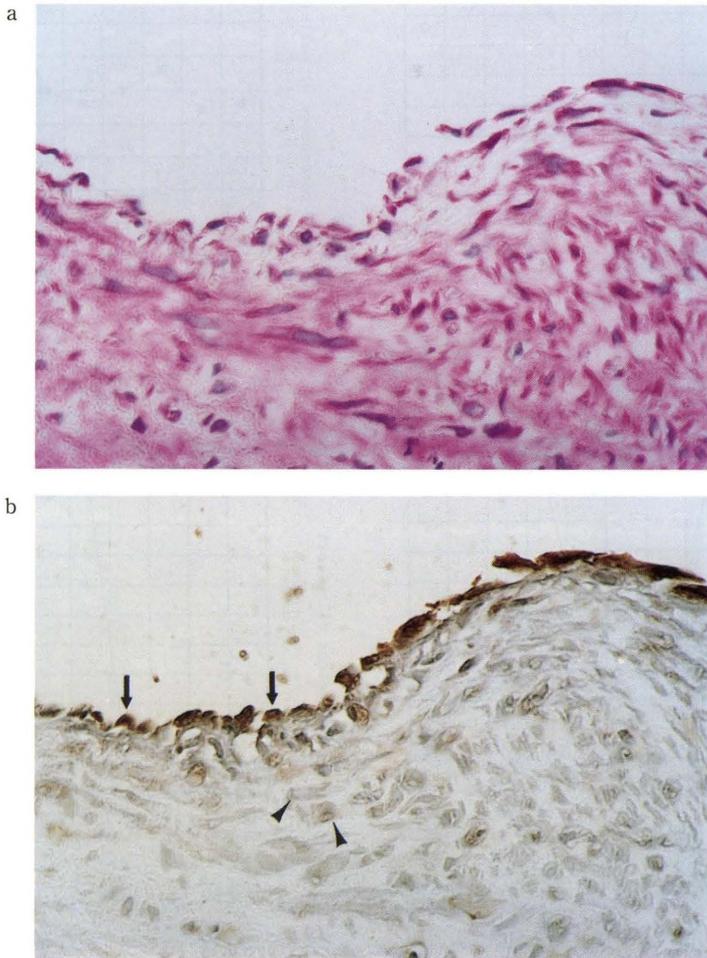


Fig. 5 Light microscopic finding and immunoreactive finding of the endarterectomized wall. Regenerated cells 4 weeks after surgery, from the region of the carotid artery of a Japan White rabbit in Group A, fed a standard diet. a: Hematoxylin and eosin ($\times 400$). b: Regenerated ovoid type cells are positive with anti-Factor VIII antibody (arrow). Emigrated smooth muscle cells localized under the regenerated cell layer are positive with antimuscle cell antibody HHF35 (arrowhead). Double-labeled avidin-biotin immunoperoxidase preparation of paraffin-embedded sections after reaction with indicated antibodies.

もに不規則に膨出し再生面の血管内腔への隆起が著明となっていた(Fig. 2h).

4 透過電顕所見：A群で認められた spindle type と ovoid type の両再生細胞は楕円形の核と核小体を認め、細胞内小器官として、粗面小胞体、リソソームの

発達、吸飲小胞(pinocytotic vesicle)を認めた。また両再生細胞は基底膜様構造を認めたが、連続性は不完全であった。ただし ovoid type 細胞では核の陥凹を認めるものが多かった。細胞間の接合は、spindle type 細胞では interdigitation(Fig. 3a), ovoid type 細胞では

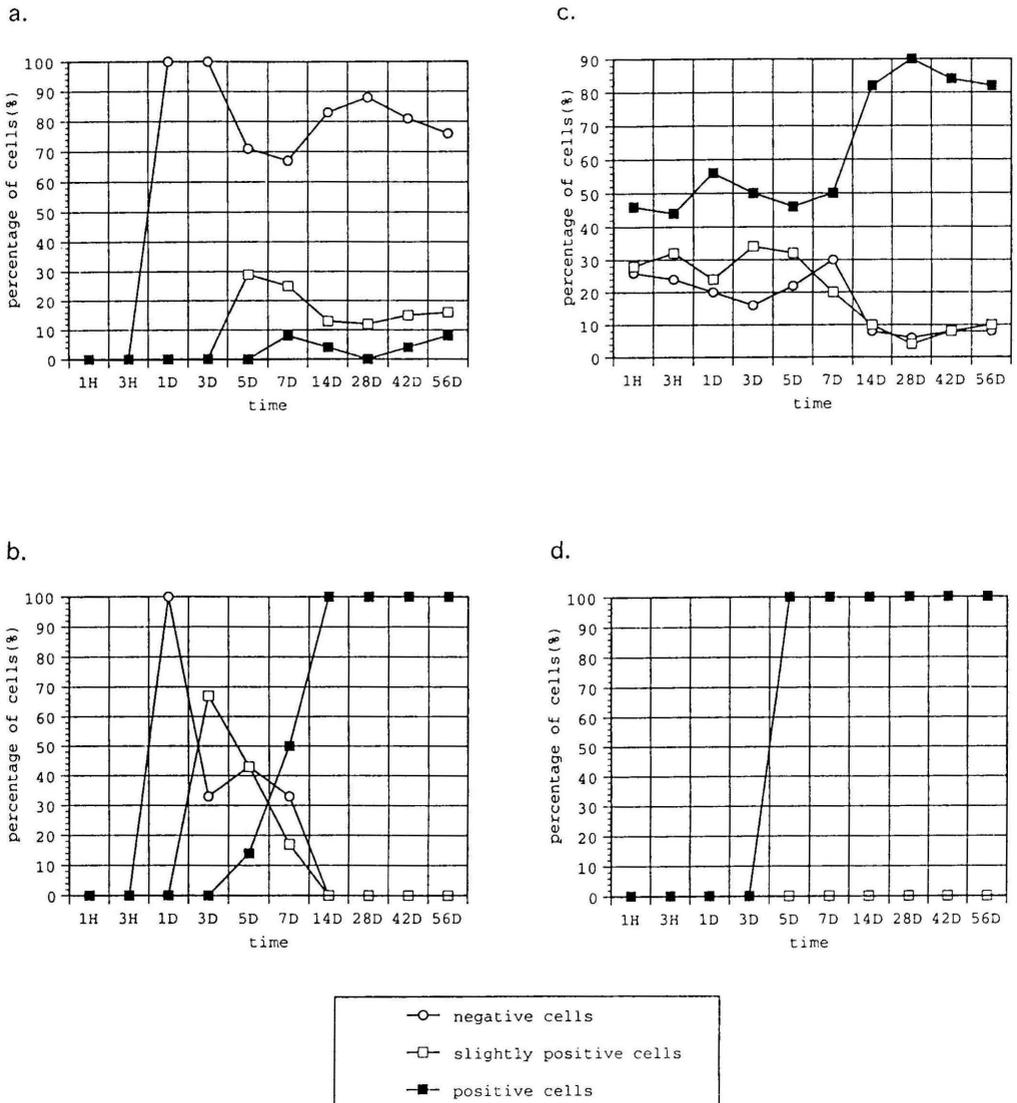


Fig. 6 Sequential changes in tissue reactivities of monoclonal antibodies. Graphs show tissue reactivities of monoclonal antibodies for Factor VIII(a), CD31(b), antimuscle cell antibody HHF35(c) and antimacrophage cell antibody RAM11 (d) on the regenerated cells and cells in the subintimal layer at the site of carotid endarterectomy in Group B. H; hour, D; day

end-to-end 接合 (Fig. 3b) を示し、両細胞で異なっていたが、いずれも tight junction の形態を有していた。以上の形態学的所見は、いずれの細胞も内皮細胞としての特徴を示すものであった。一方、B群では細胞間接着様式を含め形態学的には spindle type, ovoid type 細胞とも A群と同様の所見を示していたが、2週目以降の両再生細胞の胞体内には脂質沈着に起因すると考えられる空胞化が認められた (Fig. 3c, d)。また再

生細胞の直下にも空胞を伴った遊走平滑筋細胞 (Fig. 3e) や泡沫細胞が認められた (Fig. 3c)。

5 二重免疫組織化学所見：A群において、切除術後1日目より出現する再生細胞は Factor VIII に対する反応が陰性を示す細胞と、微弱ながら陽性を示す細胞が約半数ずつを占めていた (Fig. 4a)。3日目から7日目までは Factor VIII に陽性を示す細胞の割合が、剥離縁より徐々に増加し、逆に陰性群が減少していった (Fig.

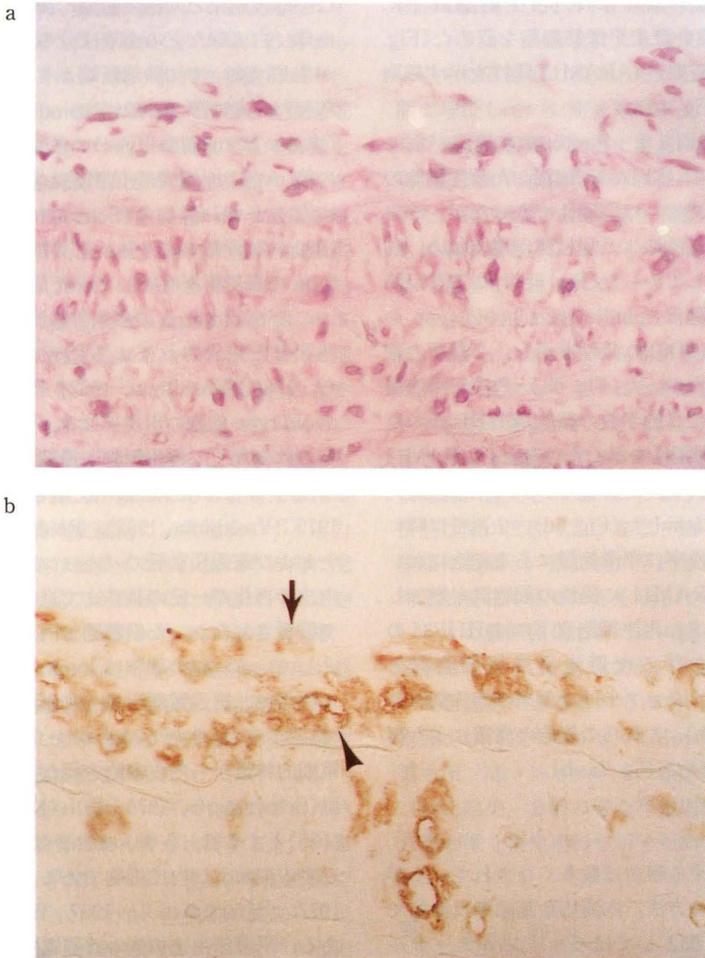


Fig. 7 Light microscopic finding and immunoreactive finding of the endarterectomized wall. In group B regenerated cells from the region of the carotid artery of a Japan White rabbit fed a 1% cholesterol diet 4 weeks after surgery. a: Hematoxylin and eosin ($\times 600$). b: Regenerated ovoid type cells are positive with anti-CD31 antibody (arrow). Foam cells localized under the regenerated cell layer are positive with antimacrophage cell antibody RAM11 (arrowhead). Double-labeled avidin-biotin immunoperoxidase preparation of paraffin-embedded sections reacted with indicated antibodies.

4a). 再生細胞の被覆が終了する2週目から8週目までの時期では、全ての再生細胞はFactorVIIIに陽性を示した(Fig. 4a). しかし spindle type, ovoid type の2種類の細胞間では反応に差を認めなかった(Fig. 5a, b). 一方、CD31 に対する反応は各時期とも弱く判定不能であった(Fig. 4b). また残存平滑筋層は、5日目までは切除部位の平滑筋層の構造が一部破壊され、HHF35 の反応が陰性あるいは弱陽性の細胞群が認められたが、7日目以降ではHHF35の反応が良好となり平滑筋層にある細胞の8割以上が陽性を示していた(Fig. 4c). また2週目以降には、再生細胞直下にHHF35の反応が強い遊走平滑筋細胞を認めた(Fig. 5a, b). しかし、各時期ともRAM11陽性を示す細胞群は認めなかった(Fig. 4d).

B群では逆に各時期ともFactorVIIIの反応が弱く(Fig. 6a), 術後1日目, 3日目に出現した再生細胞のCD31の反応は陰性あるいは弱陽性であったが, 5日目, 7日目になると切除縁より陽性群が増え始め, 陰性, 弱陽性群は減少していった(Fig. 6b). 2週目以降の時期では, 再生細胞は spindle type, ovoid type のいずれの細胞も全てCD31に陽性を示し, 2種類の細胞間に反応の差をみなかった(Fig. 6b). 残存平滑筋層においては7日目までは約半数の細胞がHHF35の反応は陰性で, 残りは弱陽性を示した(Fig. 6c). RAM11の反応については5日目, 7日目において平滑筋層内の少数の細胞に陽性を示した(Fig. 6d). 2週目以降になるとHHF35の陽性率は平滑筋層にある細胞において8割以上となり, RAM11に陽性の細胞群も増加していた(Fig. 6c, d). また再生細胞直下にはHHF35の反応の強い, 空胞を伴った遊走平滑筋細胞群とRAM11陽性を示すマクロファージ由来の泡沫細胞群が認められた(Fig. 7b). これらの細胞の集積により再生内膜層は肥厚していた(Fig. 7a, b).

考 察

内膜再生過程に関する報告は数多くなされているが, 実験動物, 内膜損傷の方法, 内膜切除範囲等は多様である. 内膜損傷の方法としてはバルーンカテーテル(Steeleら, 1985), ナイロンフィラメントによる擦過(Reidy, Silver, 1985). 微小鋸子による外科的剝離切除(Schwartzら, 1975; 横山ら, 1980; Yoshijima, 1982), エタノールによる内皮細胞障害(徳永, 1994)などがあげられる. いずれの方法にも一長一短があり, バルーンカテーテルでは広い範囲にわたり内膜はほぼ完全に剝離損傷されるが, 中膜筋層の断裂, 浮腫が認

められる. ナイロンフィラメントを用いる方法では一層の内皮細胞のみを剝離除去でき, エタノールでも内皮細胞のみを傷害できるとされる. 微小鋸子による外科的剝離切除では内膜のみの剝離切除は困難で, 多少とも深部筋層に及ぶことがあげられる. 本研究では臨床におけるCEAに近い手技で検討するために外科的内膜切除を用いたところ, 術直後の光顕および走査電顕所見において内皮細胞は完全に切除されていた(Fig. 1b).

まず正常血管の内膜再生過程では, Yoshijima(1982)の結果と同様, 初期に血小板, フィブリン, 赤血球, 白血球などの血液成分の粘着, カーベット形成が生じ, 次いで切除部断端より, 再生細胞の伸展がみられた. その際, 一般に spindle type と ovoid type (あるいは cuboidal type)の2種類の細胞が出現し, その後 ovoid type 細胞は消退し spindle type 細胞のみになるとされている(Schwartzら, 1975; 横山ら, 1980). 本研究では再生が完了した後も局所的に ovoid type の細胞群が存在していた(Fig. 2c).

この ovoid type の細胞群の出現時期としては1-4週目と報告されている(Schwartzら, 1975; 横山ら, 1980; Yoshijima, 1982; Reidy, Silver, 1985). ovoid type 細胞の出現部位は, 明確な記載がなされたものは少なく, 再生細胞と連続性がなく剝離中央部に出現するとした報告が散見される(Schwartzら, 1975; Yoshijima, 1982). Reidyら(1983)によるラットおよび家兎頸動脈のバルーン剝離モデルでは, 血管内皮の再生が一定の長さまで進むと停止し, 内皮細胞で被覆されなかった剝離面で円形の細胞群が出現している. この細胞は luminal smooth muscle cell と称され, 透過電顕所見では平滑筋細胞の特徴を備えていた. これまで ovoid type 細胞の起源については電顕的特徴から内皮細胞と異なった未分化な平滑筋細胞(Schwartzら, 1975; 横山ら, 1980; Reidy, Silver, 1985)とする説, あるいは血液の単球由来(Geer, 1765)とする説および内皮細胞であるとする説(Gerrityら, 1977, Shimokawaら, 1987, Weidingerら, 1990)がある. 平滑筋由来細胞の透過電顕所見の特徴は, 1)細胞が内膜下に埋没している, 2)細胞質辺縁に dense body を認める, 3)表面に微絨毛を有する, 4)細胞間接着がないことなどがあげられる(Schwartzら, 1975; 横山ら, 1980; Reidy, Silver, 1985). 単球由来の特徴は, 1)細胞外へ伸びる細胞質の短い手指状の突起がみられる, 2)基底膜は認めないなどがあげられる(Geer, 1765). 内皮細胞由来の特徴は, 1)細胞内微細構造とし

ては特異的な所見はなく、核の陥凹、偏在を認め、2) 細胞間接合部は tight junction を有する end-to-end 接合で interdigitation はほとんど認められない、3) また基底膜は未発達ながら存在する、などとしている (Gerity ら, 1977; Shimokawa ら, 1987)。しかし、形態観察のみで平滑筋細胞由来か内皮細胞由来かを同定するには限界がある。そこで抗平滑筋抗体 (Tsukada ら, 1987) や抗マクロファージ抗体 (Tsukada ら, 1986) を用いた免疫組織化学的手法によって細胞由来を同定することが可能となってきた。本研究では内膜除去面積が狭小であったためか、再生細胞による修復過程はすべて求心性に生じ完成した。しかし、A群、B群とも内膜除去部の一部に ovoid type の再生細胞群がみられた。この ovoid type 細胞はA群、B群とも透過電顕での形態的な微細構造では内皮細胞としての特徴を備えていた。さらに免疫組織化学的陽性細胞の数をグラフ (Fig. 4, Fig. 6) で示し、再生経過に伴う定量観察を可能にした。その結果、ovoid type 細胞が内皮細胞特異性の Factor VIII (Jaffe, 1982) あるいは CD31 (Parums ら, 1990) に陽性を示したことにより、内皮細胞由来であることが考えられた。しかし、Factor VIII と CD31 での反応性の違いについては今後の検討を要する。

また ovoid type 細胞出現の要因としては、血行力学的因子、特に低ずり応力が重要であると考えられる。in vitro において培養内皮細胞に定常流性のずり応力を作用させると、細胞は細長くなり、流れの方向に配列する。一方、低ずり応力が作用した場合は内皮細胞は多角形で配列も乱れる (岡野・吉田, 1991; 佐藤, 1993)。本研究において ovoid type 細胞群の存在が認められた再生面での隆起部末梢側および陥凹部では、血液の乱流あるいはよどみを生じたために再生細胞の形態変化をきたしたと推察された。

次にB群すなわち高コレステロール食飼育下での内膜再生過程を標準食飼育したA群と比較すると、1) 走査電顕観察における早期 (3-5日後) の再生過程で spindle type および ovoid type の細胞が混在して出現した、2) ovoid type の細胞群の局在が低ずり応力の生ずる領域に認められた、および3) 再生が完了する速度などはA群、B群とも共通して認められた。一方、走査電顕所見でB群に特異的であった点は、1) 初期 (1時間-1日後) にはフィブリン-血小板カーベットに加えて白血球の付着が著明であった所見、2) 7日後に再生細胞間に単球の埋没所見がみられたこと、3) 4週以降の長期になると spindle type 細胞、ovoid type 細

胞ともに細胞の膨化、大小不同が認められていた所見、さらに透過電顕所見でB群に特異的であった点は、4) spindle type および ovoid type の再生細胞も空胞が認められており、5) 再生細胞直下には空胞を伴った遊走平滑筋細胞、泡沫細胞などの細胞群の集簇が認められた所見、6) それに伴う内膜の肥厚である。

以上よりB群における再生細胞の形態変化をもたらす要因として、spindle type と ovoid type を示す形態の相異は高コレステロール血症によるものではなく、血行力学的因子が関与することが示唆された。一方、細胞の膨化、大小不同、細胞質の空胞化は、細胞内のコレステロール蓄積による結果と考えられた。

さらにB群での興味ある点として、単球が再生細胞間に埋没していた走査電顕所見で、tight junction を示した細胞間接着が幼弱で容易に解離するか、あるいは再生組織の再損傷部から単球が侵入したことが考えられた。再生細胞が損傷部を被覆する以前に、脂質とともに単球あるいはTリンパ球などがすでに侵入している可能性も考えられる。

Ross (1993) は血小板よりも白血球の役割を重視しているが、いくつかの傷害因子が内皮細胞の機能的、器質的変化をもたらすことを示唆している。すなわち内皮細胞が傷害されると LDL が内膜層に侵入し、酸化されると単球、Tリンパ球が内皮下へ通過し、平滑筋細胞が遊走される。このようにマクロファージ、平滑筋細胞が変性 LDL を取り込み、泡沫細胞化して内膜層に蓄積し、脂肪斑が形成される。これらの病変は可逆的変化であることも示している。

ヒトの動脈硬化血管での内膜再生は、複雑な因子が関与しており (Ross, 1993)、本研究結果からのみですべてを説明できるものではない。臨床において CEA 術後での再狭窄率が低い (Meyer, 1994) 理由は、喫煙、高血圧、高コレステロール血症などの危険因子が除去された結果、B群の様な再生過程をとるのではなく、A群の様な再生過程を示すためではないかと考えられた。

要 約

1 本研究モデルの家兎総頸動脈に対する外科的内膜切除術後の内膜再生過程では、標準食飼育群 (A群)、高コレステロール食飼育群 (B群) ともに spindle type と ovoid type の2種類の再生細胞が認められた。

2 両群とも、spindle type 細胞、ovoid type 細胞はいずれも形態学的に内皮細胞としての特徴を有しており、また免疫組織化学的にも内皮細胞由来であること

が示唆された。また ovoid type の細胞群が出現した要因の一つとして、血行力学的低張り応力の関与が考えられた。

3 再生内膜層に関してB群に特異的な点は、spindle type, ovoid type 細胞のいずれの再生細胞も空胞化を認め、直下には泡沫化したマクロファージ、遊走平滑筋細胞がみられ、それら細胞の集積が内膜肥厚をもたらしていた所見であった。

4 本研究結果から、臨床におけるCEA術後の再狭窄予防には、術前術後の管理において、高コレステロール血症などの危険因子を排除しておくことが重要であると考えられた。

謝辞：稿を終えるにあたり、徳島大学医学部脳神経外科松本圭蔵教授に深謝いたします。実験において御指導御助言いただきました同上田伸助教授、同第一病棟伊井邦雄助教授に深謝いたします。免疫抗体を御提供いただきました三楽病院内科塚田豊弘先生に厚くお礼申し上げます。

なお、本論文の要旨は、第53回日本脳神経外科学会総会(1994、徳島)において発表した。

文 献

- 1 European Carotid Surgery Trialists' Collaborative Group: MRC European Carotid Surgery Trial (1991): Interim results for symptomatic patients with severe (70-99%) or with mild (0-29%) carotid stenosis. *Lancet*, 337, 1235-1243
- 2 Geer, J. C. (1765): Fine structure of human aortic thickening and fatty streaks. *Lab. Invest.*, 14, 1764-1783
- 3 Gerrity, R. G., Richardson, M., Somer, J. B., Bell, F. P. and Schwartz, C. J. (1977): Endothelial cell morphology in areas of in vivo Evans blue uptake in the aorta of young pigs. II. Ultrastructure of the intima in areas of differing permeability to proteins. *Am. J. Pathol.*, 89, 313-334
- 4 Jaffe, E. A. (1982): Synthesis of factor VIII by endothelial cells. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 401, 163-170
- 5 Meyer, F. B., Piepgras, D. G. and Fode, N. C. (1994): Surgical treatment of recurrent carotid artery stenosis. *J. Neurosurg.*, 80, 781-787
- 6 North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial (NASCET) Investigators (1991): Clinical alert: Benefit of carotid endarterectomy for patients with high-grade stenosis of internal carotid artery. *National institute of neurological disorders and stroke. Stroke and trauma division. Stroke*, 22, 816-817
- 7 岡野光志・吉田洋二(1991): 高脂血症ウサギ大動脈弓分岐分流部の内皮細胞の形態学的研究。一局部的血流プロファイルの推測一。 *Arteriosclerosis*, 19, 49-54
- 8 Parums, D. V., Cordell, J. L., Micklem, K., Heryet, A. R., Garter, K. C. and Mason, D. Y. (1990): JC70: a new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. *J. Clin. Pathol.*, 43, 752-757
- 9 Reidy, M. A., Clowes, A. W. and Schwartz, S. M. (1983): Endothelial regeneration. V. Inhibition of endothelial regrowth in arteries of rat and rabbit. *Lab. Invest.*, 49, 569-575
- 10 Reidy, M. A. and Silver, M. (1985): Endothelial regeneration. VII. Lack of intimal proliferation after defined injury to rat aorta. *Am. J. Pathol.*, 118, 173-177
- 11 Ross, R. and Glomset, J. A. (1973): Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell. Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science*, 180, 1332-1339
- 12 Ross, R. (1986): The pathogenesis of atherosclerosis.—an update.—*N. Engl. J. Med.*, 314, 488-500
- 13 Ross, R. (1993): The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 362, 801-809
- 14 佐藤正明(1993): 壁張り応力による血管内皮細胞の形態と機能の変化。 *病理と臨床*, 11, 805-812
- 15 Schwartz, S. M., Stemerman, M. B. and Benditt, E. P. (1975): The aortic intima. II. Repair of the aortic lining after mechanical

- denudation. *Am. J. Pathol.*, 81, 15-42
- 16 Shimokawa, H., Aarhus, L. L. and Vanhoutte, P. M. (1987): Porcine coronary arteries with regenerated endothelium have a reduced endothelium-dependent responsiveness to aggregating platelets and serotonin. *Cir. Res.*, 61, 256-270
- 17 Steele, P. M., Chesebro, J. H., Stanson, A. W., Holmes, Jr. D. R., Dewanjee, M. K., Badimon, L. and Fuster, V. (1985): Balloon angioplasty. Natural history of the pathophysiological response to injury in a pig model. *Circ. Res.*, 57, 105-112
- 18 徳永 藏(1994): エタノールによる内皮細胞傷害後の内膜変化。一速やかな内皮再生と内膜肥厚の欠如一。動脈硬化, 21, 687-689
- 19 Tsukada, T., Rosenfeld, M., Ross, R. and Gown, A. M. (1986): Immunocytochemical analysis of cellular components in atherosclerotic lesions. Use of monoclonal antibodies with the watanabe and fat-fed rabbit. *Arteriosclerosis*, 6, 601-613
- 20 Tsukada, T., Tippens, D., Gordon, D., Ross, R. and Gown, A. M. (1987): HHF35, a muscle-actin-specific monoclonal antibody. I. immunocytochemical and biochemical characterization. *Am. J. Pathol.*, 126, 51-60
- 21 Ueda, S., Ueta, H., Agawa, M. and Matsumoto, K. (1993): Management of cervical carotid atherosclerotic lesion, medical or surgical? —Carotid endarterectomy review of 211 cases.—*ISSN*, 33, 937-941
- 22 Weidinger, F. F., McLenachan, J. M., Cybulsky, M. I., Gordon, J. B., Rennke, H. G., Hollenberg, N. K., Fallon, J. T., Ganz, P. and Cooke, J. P. (1990): Persistent dysfunction of regenerated endothelium after balloon angioplasty of rabbit iliac artery. *Circulation*, 81, 1667-1679
- 23 横山博明・小野博久・森 和夫(1980): Carotid endarterectomy 後の修復過程に関する実験的研究。一特に新生内皮細胞の起源と内膜切除面の血球附着阻止能について一。 *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*, 20, 489-496
- 24 Yoshijima, S. (1982): Vessel healing in dogs after endarterectomy with and without aspirin administration. —observations by light and scanning electron microscopy. — *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*, 22, 499-506