

低栄養状態における腸管吻合治癒過程の 組織化学的電子顕微鏡的研究

岡山大学医学部第1外科

緒方 卓郎 武村 志延 清藤 敬 木林 速雄
高尾 正彦 徳丸 勲 奥田 武彦 星島 昭
大沢 亘 松本 昭郎 松山 正春 田中 早苗

A COMPARATIVE HISTOCHEMICAL AND ELECTRON MICROSCOPIC STUDY ON THE HEALING PROCESS ON THE INTESTINAL ANASTOMOSIS IN WELL AND UNDERNOURISHED ANIMALS.

Takuro OGATA, Shinobu TAKEMURA, Takashi SEITO Hayao KIBAYASHI, Masahiko TAKAO,
Isao TOKUMARU, Takehiko OKUDA, Akira HOSHJIMA, Wataru OSAWA,
Teruo MATSUMOTO, Masaharu MATSUYAMA and Sanae TANAKA

Dept. of Surgery, Okayama University Medical School

低栄養状態が消化管吻合創の治癒過程に悪影響を及ぼすことは、周知の事実であるが、このような低栄養状態において吻合された吻合腸管の治癒過程が、いかなる影響を受けるかを実験的に低栄養状態を作製したラットの吻合腸管につき、ラジオオートグラフィーや透過電子顕微鏡を用いて、その吻合創の治癒過程を観察するとともに、血管樹脂鋳型を走査電子顕微鏡で観察する方法を用いて、吻合創における新生血管の発育状態を観察し、対照群の吻合創の治癒過程との差異につき考察した。

実験材料と方法

低栄養ラットの作製：体重 180 g 前後のウイスター系雄ラットをオリエンタル酵母工業製固型飼料を1日5gに制限して2週間飼育し、その結果、体重が平均35g減少した群を低栄養群とした。一方、同じく体重 180 g 前後のラットで、固型食を十分すなわち1日20~30g与え、2週後に体重が平均30g増加した群を対照群として用いた。

吻合法：ネブタール麻酔下に開腹し、Treitz 靭帯より約10cmの部の空腸を、腸間膜附着部を1mm残して横断し、実体顕微鏡下に Microsurgical technique により、

Albert-Lembert 法に準じ、日腸工業株式会社製の Q-2、8-0 の針付絹糸にて全層を連続縫合、漿膜筋層は結節縫合で吻合した。

透過電顕標本の作製：エーテル麻酔下に吻合部に近い空腸に切開を加え、切開孔より2% Glutaraldehyde 液を吻合部腸管が自然に充満される程度注入し、吻合部上下腸管を結紮切除し、直ちに2% Glutaraldehyde 液に投入固定後、吻合線を中心に幅3mmの細長いブロックを作製、さらに2% O_3O_4 で再固定し、Enon に封入し、thick section は toluidine blue で染色して光顕し、thin section はウランと鉛で重染後、日立HU-11型電子顕微鏡で観察した。

ラジオオートグラフ作製方法： 3H -thymidine-6-T (n) を体重1gあたり1 μ Ciの割合で腹腔内に注射して、flash labeling を行い、1時間後、および24時間後に吻合部を採取して、前項と同様にして Epon に封入し、dipping 法により、ラジオオートグラフィーを作製した。

血管鋳型標本の作製：ラットをネブタール麻酔下に、開胸、開腹し、小腸に十分樹脂を注入するため上腸間膜動脈より下部で腹部大動脈を結紮後、胸部大動脈より大日本インキ製メルコックス樹脂を注入し、硬化させた後、吻合部腸管を取りだし、20%苛性カリ液の中に入れて、周囲組織を溶解除去して血管の鋳型を作製し、金パ

* 第8回日消外総会シンポI 異常環境下の消化管の吻合法—1

ラジュウムを蒸着し、日本電子 JSM-U3 型走査電子顕微鏡で観察した。

実験結果

正常ラット吻合創の治癒過程：対照群すなわち正常ラットの腸管吻合創の治癒過程を簡単に記載すると、術後3時間目で創縁部の組織には、浮腫や、白血球浸潤が起り、また空腸の標識細胞の領域、すなわち generation-zone (G-zone) が絨毛近くまで拡大し、この拡大は吻合端より約30個の腺窩まで確認された。ついで術後2日目になると内翻し、消化管内に突出していた腸管の部分は壊死して脱落を始める。術後3、4日目になると、肉芽組織中の線維芽細胞や、毛細血管の内皮細胞に ^3H -Thymidine の標識が認められ、電顕でみるとこの時期の線維芽細胞は、粗面小胞体が豊富で、著明に拡張し、その内腔にはトロポコラーゲンと推定されている電子密度中等度の網状物質が充満している。一方この時期になると、吻合創辺縁の粘膜より再生上皮が伸展し始める。

術後7日目になると、吻合創は再生上皮により被覆され、吻合創の肉芽組織中の線維芽細胞の標識数は、みとめられるが4日目に較べると減少してくる。また電顕でみると、再生上皮はなお未分化な細胞の特徴をもち、一方線維芽細胞は細長くなり、細胞周囲には直径250~300 Å の膠原線維がみられる。

術後2週目になると標識細胞の数は減少し吻合創を覆う粘膜上皮も成熟し、線維芽細胞もほとんど細長くなり、その周辺には直径300~400 Å の膠原線維が多数認められて、一応吻合創の治癒は完成し、安定した状態となる。

低栄養群吻合後4日目の所見：低栄養群では吻合創の辺縁より一層の再生上皮が創部にむかい伸展を始める。ラジオオートグラフィーでみると、吻合創より1ないし2個目の腺窩は対照群と同じく短縮しているが、標識細胞は腺窩の全域に分布し、絨毛下端に達し、ときには再生上皮の起始部にも標識を認める。しかし吻合縁より2ないし3個目の腺窩からは標識が絨毛に近い部分にまで増大する所見すなわち G-zone の拡大は認められず、対照群で創縁より30個の腺窩まで G-zone の拡大を認めた所見と対比すると、G-zone の拡大はごく軽微にとどまる。

一方肉芽組織中の線維芽細胞や、毛細血管は、対照群と比較すると、数が少なく、分布が粗であり、 ^3H -Thymidine により標識される線維芽細胞や、毛細血管の内皮細胞の数は対照群と比較して少ない。

一方この時期の線維芽細胞を電顕でみると対照群と同

図1 低栄養群縫合創4日目にみられた線維芽細胞。粗面小胞体 (E) の発達が比較的悪く、トロポコラーゲンの充満もみられず、細胞外に矢印で示す膠原線維も余り認められない。

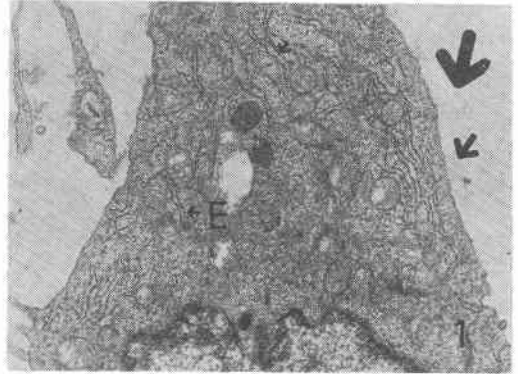
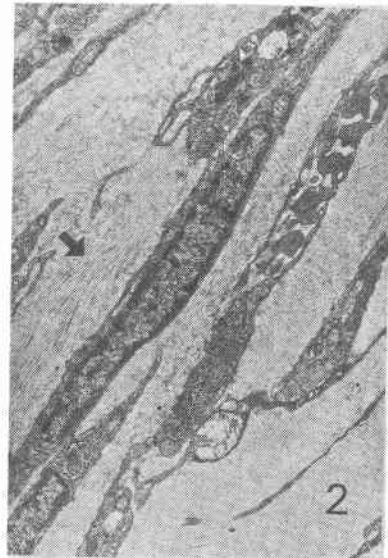


図2 対照群で術後7日目の肉芽創で、線維芽細胞の周辺には矢印で示す如く多数の膠原線維が認められ。



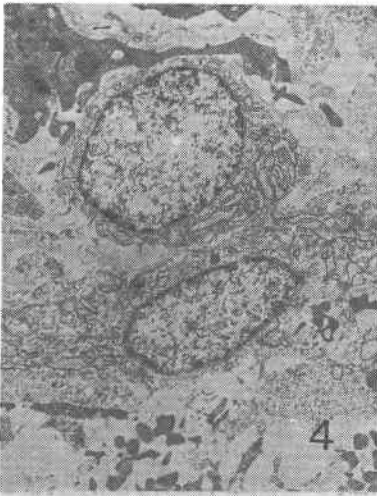
様に粗面小胞体もよく発達し、内腔にトロポコラーゲンを充満させたものもみるが、一方粗面小胞体の発育が悪く、内腔の拡張の軽微なものもしばしば認められる(図1E)。また細胞の周辺における膠原線維の量も(図2. 矢印)対照群と比較すると少ないことが多い。

低栄養群術後7日目の所見：対照群では、術後7日目になると、創縁は再生上皮により被覆されるのに対し、低栄養群では、完全に被覆されないことが多く、再生上皮の発育も遅延することが観察された。また吻合部の肉

図3 低栄養群術後7日目の肉芽創で、線維芽細胞の周辺の膠原線維は、対照群に比較すると少い。



図4 低栄養群術後7日目の肉芽組織中にみられた変性壊死にむかう線維芽細胞。



とが多い。一方図4に示すごとく、線維芽細胞で細胞膜はほとんど破壊され、粗面小胞体は拡張しているも分断して囊胞状となり、ライボソーム顆粒の脱落が認められ、また細胞内小器官はほとんどみられず、cristaeの破壊されたミトコンドリアとライソゾームが、まれに認められ、胞体の基質の電子密度が著しく低下し核ではクロマチンは凝集し、核質が脱落し、すなわち変性、壊死にむかう線維芽細胞がしばしば認められ、またこのような線維芽細胞の周辺では、膠原線維はほとんど認められないことが多かった。

図5 対照群術後5日目の血管鑄型の走査電顕像。枝分れしながら伸展してゆく新生血管が認められる。

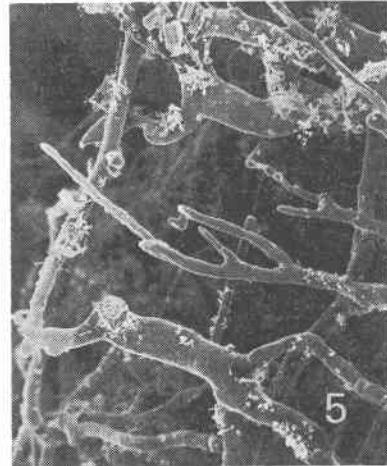
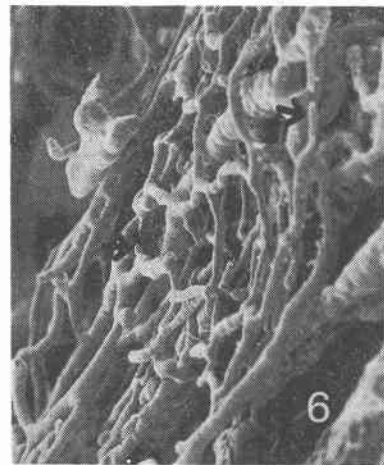


図6 低栄養群術後5日目の吻合創部の血管鑄型で矢印で示すごとく血管新生はみとめられるが対照群に比較すると不良である。



芽組織をみると、術後4日目に比較すると線維芽細胞および毛細血管の数が多く、 ^3H -Thymidineによる標識細胞も、対照群の7日目に比較すると、はるかに少ない。

また吻合部の肉芽組織を電顕でみると、図3の如く、正常の構造をもつ線維芽細胞を認めるが、線維芽細胞周囲のコラーゲン量は対照群に比較すると減少しているこ

図7 対照群7日目の血管鑄型で両側吻合創より伸びてきた血管が吻合を完成している。



図8 低栄養群7日目で吻合創の血管新生は少く、右上には血管破綻に一致して、メルコックスの流出による塊状物 (M) が認められる。



樹脂血管鑄型法による吻合創血管再生過程の観察：吻合部の血管樹脂鑄型を作製し、走査電子顕微鏡で観察すると、術後4日目頃より、既存の血管壁より新生血管の発芽する像が、既存血管よりまず半球型の突起としてみられ、これがしだいに進展してゆく。図5は対照群術後

図9 対照群10日目の吻合創の鑄型で、丈の低い絨毛に一致する血管鑄型がみられるが、血管の欠損部は認められない。

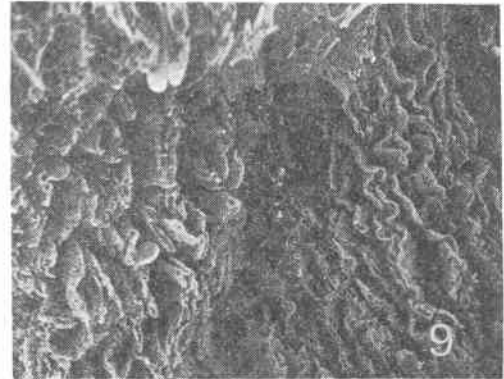
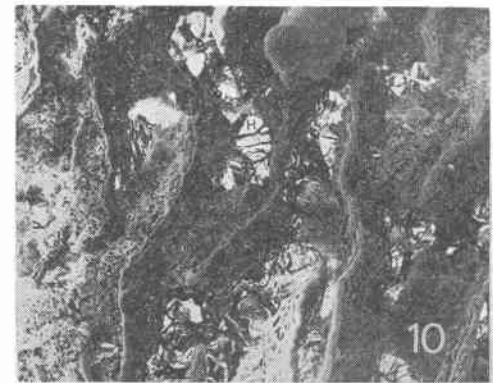


図10 低栄養群10日目の吻合創の鑄型で、血管の再生の遅延による血管の欠損部に一致する大きな孔 (H) がみられる。なおメルコックス樹脂の流出像 (M) もみられる。



5日目の像で、吻合創にむかい新生血管が伸び、これよりさらに別の新生血管が枝別れしながら伸展していく像が認められる。これに対し図6は低栄養群の吻合創5日目であるが、血管より小突起は始めているが、対照群に比較すると血管新生が著しく不良なことがうかがわれる。

また図7は対照群の1週目の血管鑄型であるが、左右の吻合創より伸びてきた新生血管が中央ですでに連結しているのがみられるのに対し、図8の低栄養群では、血管の新生は著しく悪く、かつ血管の破綻部よりのメルコックス樹脂の流出と考えられる塊状の樹脂の塊がみられ、このような出血巣と考えられる所見は低栄養群のほうにしばしば認められた。

なお図9は術後10日目の対照群であるが、吻合創は丈は低い、新生された絨毛で充填されているため、これに一致した毛細血管の鑄型がみつめられ、吻合創に血管の欠損部等は認められない。これに対し、図10の低栄養群の10日目をみると、いまだ血管が十分再生されていないための血管の欠損部、すなわち多数の孔がみられ、また10日目でもなお出血巣と考えられるメルコックス樹脂の流出像がみられ、対照群に比較して、著しく血管の再生が不良であることが観察された。

考 察

栄養不良状態における腸管吻合創治療過程の光顕的な観察は、すでに藤岡⁹⁾により報告され、線維芽細胞や、毛細血管の増殖の不良や、再生上皮の発育の不良などを報告している。

本研究の結果では、栄養不良状態でも一応再生上皮は認められたが、吻合創周囲の腺窩における G-zone の拡大は対照群に比較すると著しく軽微であり、これは栄養不良状態における特有の所見と考えられる。

一方、肉芽組織についていえば、光顕所見およびラジオオートグラフィーの所見よりすれば、線維芽細胞や毛細血管の新生が著しく抑制されている。また線維芽細胞を電顕でみると、分裂後の時間や肉芽創内における線維芽細胞の存在部位等により、かなりその所見を異にするが、一般に対照群に比較すると、粗面小胞体の発育が悪く、またトロポコラーゲンの充満が不十分なものが多く、かつ線維芽細胞周辺にみられる膠原線維の量も少ない。すなわち、単に線維芽細胞が少いのみでなく、たとえ線維芽細胞は存在しても、創治療に極めて重要な働きをするコラーゲン合成も著しく阻害されていることが明らかとなった。

一方、7日目の肉芽創中では細胞膜、細胞小器官、核などの変化より明らかに変性壊死にむかうと考えられる線維芽細胞がしばしば認められたが、このような細胞は対照群の肉芽組織中ではほとんど認められず、栄養不良状態そのものに加え、血管新生の不良による血行障害などがこのような変化を起す重要な因子と考えられた。

一方、血管樹脂鑄型を走査電顕で観察する方法は、従来の実体顕微鏡所見では観察しえない微細な血管系の変

化の観察を可能としたが、吻合創のみでなく、潰瘍底や腫瘍組織等の新生血管のみみられる部では、まず既存血管壁より小突起があらわれ、これが細長く伸展するとともに、この進展してゆく血管より、別の新生血管が枝分れてゆく像がみられる。すなわち、対照群では術後4日頃より、吻合創にむかい血管の新生像が活発にみられ、術後1週目では、左右の吻合創から伸展してきた血管の間に吻合が完成するのに対し、低栄養群では、このような血管の新生が著しく不良であり、術後10日目でも、なお吻合創に血管の欠損がみられ、このような吻合創血管の再生の不良は、吻合創の治療に著しい悪影響をおよぼすものと結論された。

また吻合創でメルコックス樹脂の流出により塊状の塊りがみられたが、このような像は平常の腸管では全く認められず、血管の破綻部位よりの流出と考えられ、対照群でも初期にはみられるが、低栄養群によりしばしば、また術後長期間にわたつてみられる傾向が観察された。

結 語

ラッテに低栄養状態を作製し、腸管吻合を行ない、その治療過程をラジオオートグラフィー、透過電顕で観察し、また吻合創の血管樹脂鑄型を走査電顕で観察し、対照群の吻合創と比較して次の結果を得た。

- 1) 低栄養群では、線維芽細胞の増殖が抑制され、また線維芽細胞のコラーゲン生成も著しく抑制される。
 - 2) 再生上皮の増殖も抑制され、ために創面被覆保護が遅延される。
 - 3) 血管の新生が著しく遅延し、血行障害が起る。
- 低栄養状態では、これ等の因子がからみ合い、吻合創治療の遅延、ひいては縫合不全の前段階を形成すると考えられた。

参考文献

- 1) 藤岡興人：腸管吻合創の癒合に関する実験的研究。医学研究，29：117，1959。
- 2) 緒方卓郎，ほか：消化管損傷治療過程の組織化学的，電子顕微鏡的研究。日本消化器外科学会誌，6：6，1973。
- 3) 武村志延：腸管吻合創治療過程の組織化学的，電子顕微鏡的研究。岡山医学会誌，84：511，1972。