

# 動・静脈血栓形成過程に関する基礎的研究

— 走査および透過電子顕微鏡による観察 —

奈良県立医科大学第2外科学教室

金 雄 一

## EXPERIMENTAL STUDY OF ARTERIAL AND VENOUS THROMBUS FORMATION BY SCANNING AND TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPE

YUICHI KIN

*Department of Neurosurgery, Nara Medical University*

Received August 11, 2002

**Abstract:** The process of thrombus formation at arterial and venous endothelial surfaces was examined by scanning electron microscope (SEM) and transmission electron microscope (TEM) in a photochemical occlusion model.

The rats were divided into the following 4 groups after the injection of rose bengal : 1) control group (n=5) without illumination; 2) group A (n=10) irradiated for 1 min; 3) group B (n=10) for 5 min; 4) group C (n=14) for 10 min at cervical artery and vein.

As a result, SEM findings showed adhesion of blood platelets and endothelial damage in neither artery nor vein in control and A groups. Plasma membrane damage of endothelial cells (i.e. plasmalemmal pits, the crater-like structure associated with tear between endothelial cells, and decreased number of microvilli) was recognized in arterial wall, but these changes were not observed in vein in group B. Adhesion of blood platelets in addition to endothelial cell membrane obstacle in artery was remarkable by SEM examination and tear between arterial endothelial cells was found by TEM examination in group C. The degree of adhesion of platelets was clearly remarkable in artery compared with vein.

In conclusion, endothelial cell membrane injury, tear between endothelial cells and endothelial detachment occur before adhesion of blood platelets and thrombus formation in a blood vessel occlusion model by photochemical reaction. These changes occur significantly earlier in artery than in vein.

**Key words :** arterial and venous thrombosis, endothelial cell, photochemical dye, electron microscope, rat

### はじめに

血液は通常、流動性を維持して血管内を流れており決して凝固することはない。しかし、ある病的状態においては血栓を形成し血流を途絶させて重大な臓器障害を惹起する。生体内でどのように病的血栓が形成されるかは

血栓症の病態を考えるうえで非常に重要であり、その理解に基づいて予防・治療の対策がとられる。

血管内皮細胞障害から血栓形成に到る病態を調べる方法として、実験レベルでは様々な方法が試みられている。光感受性色素(rose bengal)を用いた血管閉塞モデルは、動脈および静脈において広く用いられている<sup>1-13)</sup>。動脈

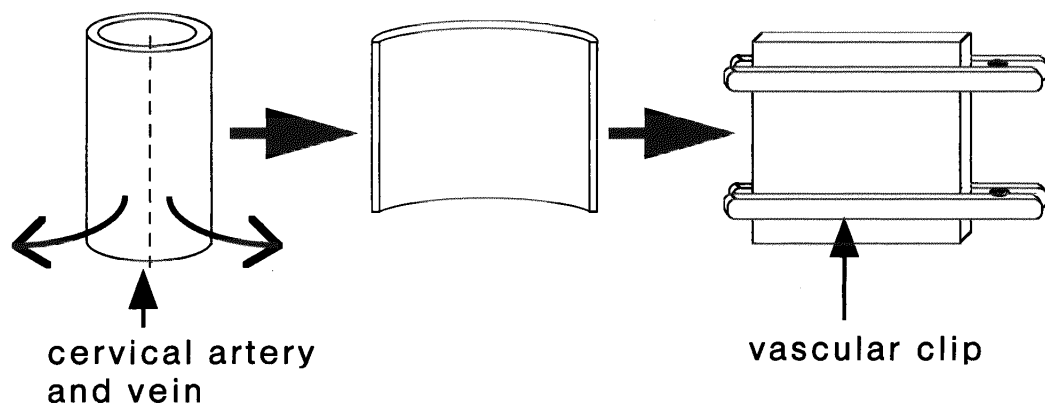


Fig. 1. The artery and vein were cut longitudinally in a major axis direction and opened, and then fixed by vascular clips not to make folds by following maneuver.

閉塞モデルにおける病態生理および血管内皮の電子顕微鏡的考察は報告されているが<sup>19-26)</sup>、静脈閉塞に関する報告はない。また、本モデルでは、動・静脈間で血栓化までに要する時間に違いが認められる。脳血管を例に挙げると、脳動脈では2分間ほどで血栓化するのに対して、脳静脈では10分間ほど照射しなければ血栓化しない。

本研究では、動・静脈間で血栓が生じる過程での内皮細胞障害の有無およびその程度の差異を検討することを目的とした。そのために、ラットの頸部動・静脈を用いて、動・静脈間で血栓が生じる過程での内皮細胞障害を経時的に走査電子顕微鏡(scanning electron microscope: SEM)および透過電子顕微鏡(transmission electron microscope: TEM)を用いて観察した。

### 対象と方法

雄性ウイスターラット(n=39, 体重380~490g)を用い、抱水クロラル(36mg/100g体重)の腹腔内投与で全身麻酔を行った。自発呼吸下に、手術用顕微鏡を用いてラットの頸部動・静脈を露出した後、rose bengal(Sigma Chemical CO., St. Louis, U.S.A.)を0.2ml/100g体重で1~2分をかけて緩徐に静脈内投与した。その後、露出した頸部動・静脈に対して、xenonランプで550nm波長の緑色光を同時に照射した。その際、頸部動・静脈に均等に照射されるように光照射面に留意した。

光照射時間毎に、control群:光照射時間0分間群(n=5)、A群:光照射時間1分間群(n=10)、B群:光照射時間5分間群(n=10)、C群:光照射時間10分間群(n=14)の4群に分類し、血栓化の程度、内皮障害の有無およびその差異について、SEMを用いて電子顕微鏡的に観察した。10分間群ではTEMも用いて観察を行った。内皮損傷の

程度の指標として、①microvilliの減少、②細胞膜障害、③細胞接合部の解離、④内皮剥離の4項目に着目し、各々の項目について観察された検体数を、動・静脈間で比較検討した。

試料の作成については、電子顕微鏡を用いて血管内皮を観察するため、ラットを緑色光照射後に4% paraformaldehydeで灌流固定を行った。灌流固定後に頸部動・静脈を、照射点を中心にそれぞれ長軸方向に縦切開して観音開きにし、後の操作で血管壁に皺が生じぬように血管クリップで挟んで保持した(Fig.1)。paraformaldehydeを洗い出すため、試料を0.25Mシュウクロース液に一昼夜置いた。1% OsO<sub>4</sub>(osmium tetroxide)固定液で1~2時間の後固定の後に、上昇アルコールシリーズ(50%・70%・80%・90%・95%・100%・100%の冷エタノールを各15分ごとに交換)で脱水を行った。以後の行程は、SEMではアルコールを酢酸イソアミルに浸して置換し、液体CO<sub>2</sub>を用いた臨界点乾燥の後に(Critical Point Dryer HCP-1, HITACHI, Ibaraki, Japan)、イオン蒸着装置(JUC-5000 Magnetron Sputtering Device Ultra Fine Coat, Nihon Denshi, Tokyo, Japan)でplatinum coatingを行った。TEMではL-R whiteを用いて包埋を行い、超薄切片を作成した。電子顕微鏡はSEMではJSM-6301F(Nihon Denshi, Tokyo, Japan)を、TEMではJEM1200EX(Nihon Denshi, Tokyo, Japan)を用いた。

### 結 果

control群(光照射0分間群)では頸部動・静脈のどちらにおいても血小板の付着はなく、電顕(SEM)所見上、明らかな内皮細胞の障害は認められなかった。A群(光照

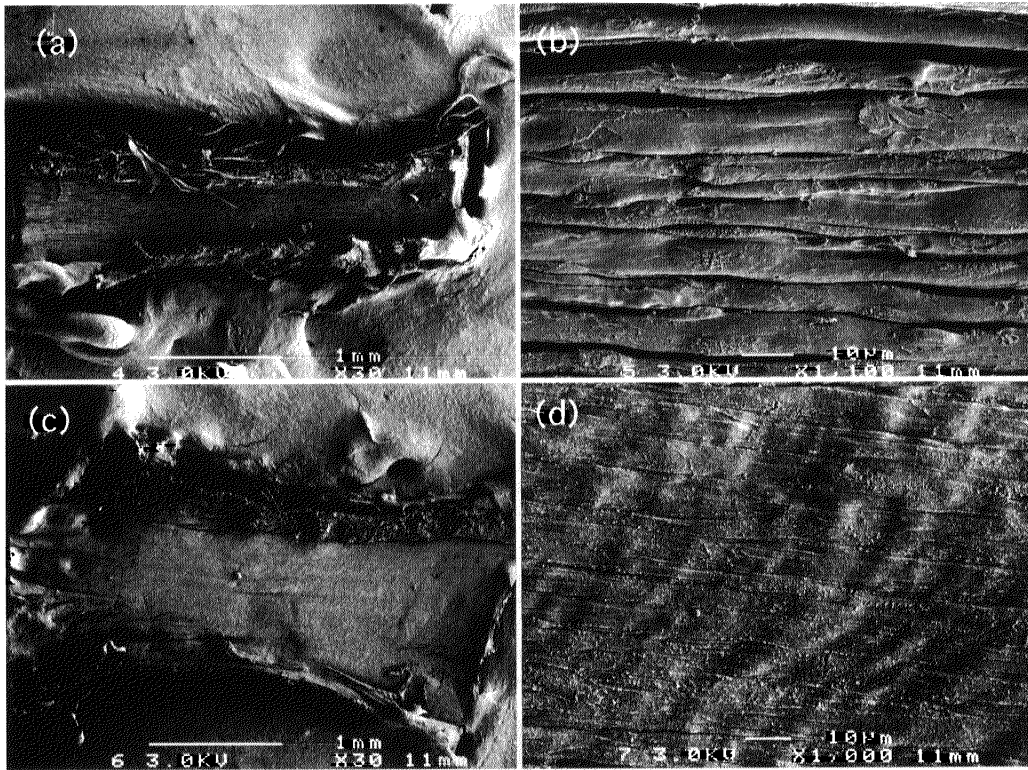


Fig. 2. Observations of the 1 min-illuminated segment of the endothelial surfaces of the cervical artery and vein by scanning electron microscope (SEM). Note the absence of luminal platelets or other blood elements and endothelial injury. (a) cervical artery.  $\times 30$  (b) cervical artery.  $\times 1,100$  (c) cervical vein.  $\times 30$  (d) cervical vein.  $\times 1,000$

射1分間群)でも control 群と同様に動・静脈ともに血小板の付着は認められず、内皮細胞の変化は認められなかった(Fig.2)(Table 1, 2)。B群(光照射5分間群)では血小板の付着は動脈で1例のみ認められた。動脈内皮では内皮細胞膜障害を示す plasmalemmal pit の出現が4例、細胞接合部の解離を示す crater-like structure の出現が4例、microvilli の減少が8例で認められたが、静脈内皮では認められなかった。本群では動・静脈内皮とも内皮剥離は認められなかった(Fig.3A, B)(Table 1, 2)。C群(光照射10分間群)では血小板の付着は動脈で顕著で、静脈でも1例に認められたが、付着の程度は動脈の方が強かった(Fig.4A, B)。本群では microvilli の減少は動脈では全例に認められ、静脈では10例に認められた。細胞膜障害は動脈で13例、静脈では5例、細胞接合部の解離は動脈で9例、静脈で3例、内皮剥離は動脈で5例、静脈で2例に認められた。(Table 1, 2)。B群とC群において、microrilli の減少の観察頻度は、動脈内皮の方が静脈内皮よりも有意に高かった( $p=0.035$ )。TEMでは

動脈内皮接合部の解離が認められた(Fig.5)。なお、いずれの各群においても、肉眼的には動・静脈ともに血栓化による閉塞は認められなかった。

## 考 察

健全な内皮細胞では、血栓抑制因子の産生が血栓亢進因子の産生よりも勝るため抗血栓性が維持されている。しかし、内皮細胞が異常な刺激を受けると、これら因子の産生バランスが破綻し、血栓形成(もしくは出血)という異常状態に陥る。血栓症の第一ステップとして血小板の血管壁への粘着が必須であり、抗血栓機能を有する血管内皮の脱落・剥離または機能障害が前提となる。本研究に用いた光感受性色素による血管閉塞モデルは、光感受性色素である rose bengal 投与後に 550nm 波長の緑色光を照射することで活性酸素が発生し、それによって内皮障害を生じて血小板が内皮に癒着し、その後血小板同士の反応により、フィブリンを欠く血小板主体の血栓(白色血栓)が形成されるというものである<sup>14-18)</sup>。動脈閉塞モ

Table 1. Damage score of morphologic findings by SEM in arterial endothelium

	decrease of microvilli	endothelial membrane injury	tear between endothelial cells	endothelial detachment
1 min (n=10)	0/10	0/10	0/10	0/10
5 min (n=10)	8/10	4/10	4/10	0/10
10min (n=14)	14/14	13/14	9/14	5/14

Table 1, 2 : In four items of SEM findings of arterial and venous endothelial surfaces; ① decrease of microvilli, ② endothelial membrane injury, ③ tear between endothelial cells, ④ endothelial detachment. In each case the morphological changes were evaluated.

Table 2. Damage score of morphologic findings by SEM in venous endothelium

	decrease of microvilli	endothelial membrane injury	tear between endothelial cells	endothelial detachment
1 min (n=10)	0/10	0/10	0/10	0/10
5 min (n=10)	0/10	0/10	0/10	0/10
10min (n=14)	10/14	5/14	3/14	2/14

Table 1, 2 : In four items of SEM findings of arterial and venous endothelial surfaces; ① decrease of microvilli, ② endothelial membrane injury, ③ tear between endothelial cells, ④ endothelial detachment. In each case the morphological changes were evaluated.

デルにおける病態生理および血管内皮の電子顕微鏡的考察は過去にも報告されている<sup>19-26)</sup>。静脈閉塞に関しては、永田らが本モデルを用いて閉塞を来したラット脳皮質静脈のSEMによる血管断面を報告しているが、静脈内腔が白色血栓により完全にpackされていたため、静脈内皮の変化は観察しえなかった<sup>27)</sup>。本モデルにおいては、動・静脈間で血栓化までに要する照射時間に違いが認められることから、本研究では、同一個体(ラット)において、光感受性色素を静注後に動・静脈で同時に照射を行い、血管内皮を電子顕微鏡的に観察・検討した。

rose bengalを用いた血栓化モデルについては、Abby R. Saniabadiらはモルモットの大腿動脈内皮をSEMで観

察し、内皮細胞間の細胞接合部の解離と、それに続く細胞膜の破壊・核の露出を報告している<sup>19)</sup>。Takiguchiらは同モデルをTEMで観察した結果、内皮細胞が基底膜から剥離している状態を示している<sup>20)</sup>。Matsunoらはラットの大動脈内皮をSEMで観察し、膨化した内皮細胞に血小板が無数の偽足を伸ばして癒着している様子を示し<sup>21)</sup>、Takiguchiらも糖尿病ラットの大動脈で同様の報告をしている<sup>22)</sup>。W. D. Dietrichらはラットの脳皮質動脈をSEM、TEMの両方で観察しており、細胞膜障害を示すplasmalemmal pitの出現、内皮細胞接合部の解離を示すcrater-like structureの出現を報告し、TEMでは内皮細胞のミトコンドリアの膨化や血小板が基底膜

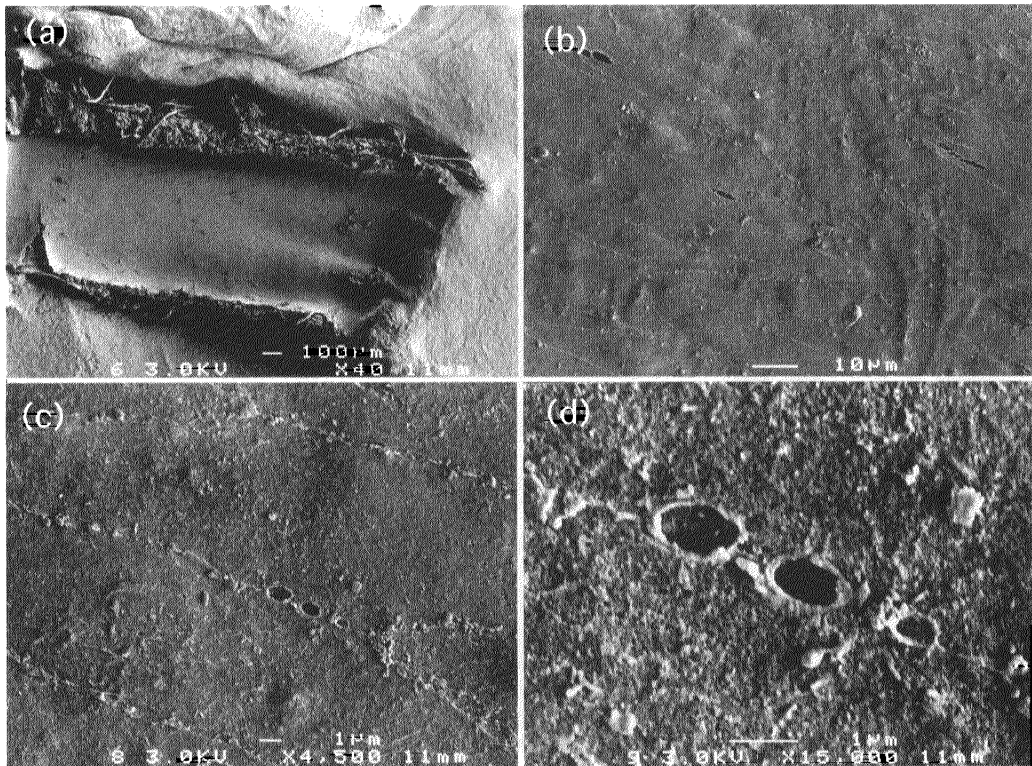


Fig.3(A). Observations of the 5 min-illuminated segment of the endothelial surfaces of the cervical artery by SEM. The high frequency of plasmalemmal pits and decreased number of microvilli were demonstrated. Note crater-like structures associated with endothelial junction. cervical artery (a)  $\times 40$  (b)  $\times 1,000$  (c)  $\times 4,500$  (d)  $\times 15,000$

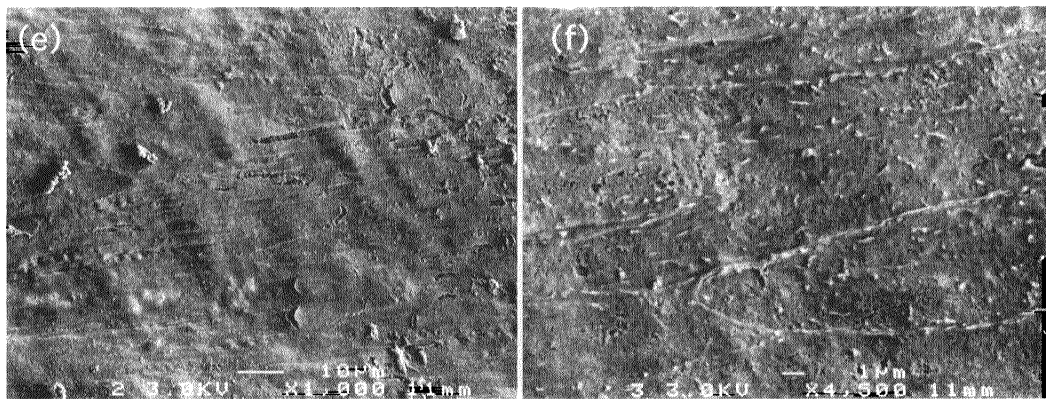


Fig.3(B). Observations of the 5 min-illuminated segment of the endothelial surfaces of the cervical vein by scanning electron microscope SEM. No definite morphological changes were found. cervical vein (e)  $\times 1,000$  (f)  $\times 4,500$

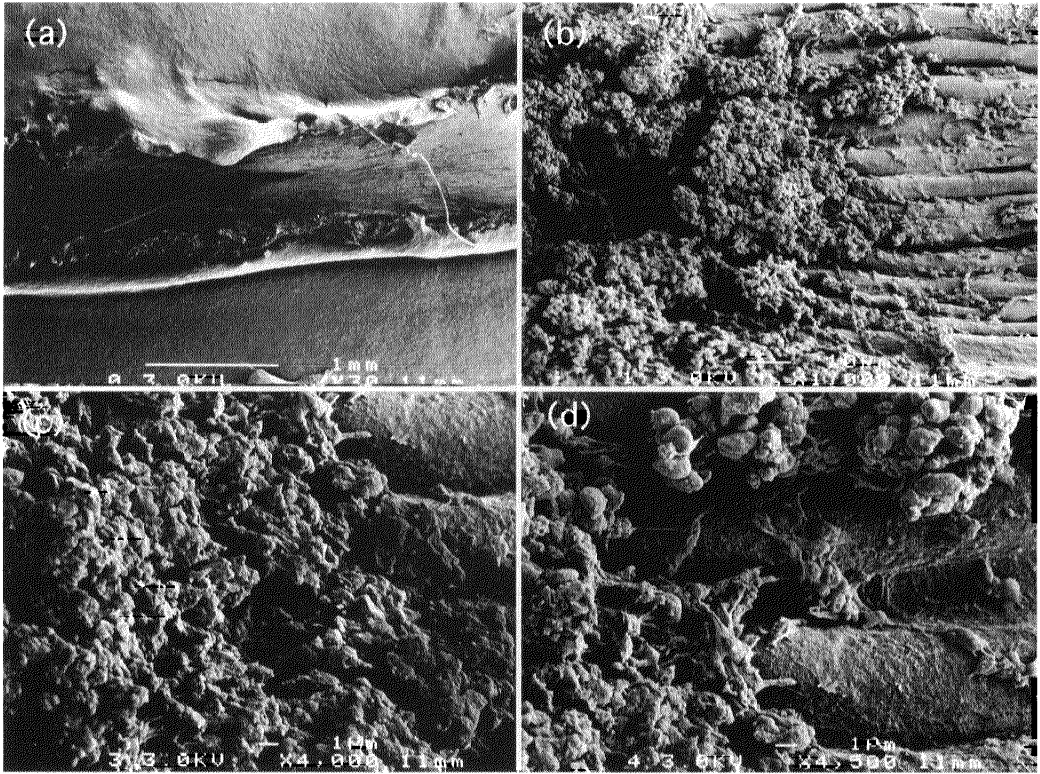


Fig. 4 (A). Observations of the 10 min-illuminated segment of the endothelial surfaces of the cervical artery by scanning electron microscope SEM. Platelet aggregates adhering to the luminal surface of a cervical artery. The degree of the adhesion of platelets was clearly stronger in artery than in vein. cervical artery (a)  $\times 30$  (b)  $\times 1,000$  (c)  $\times 4,000$  (d)  $\times 4,500$

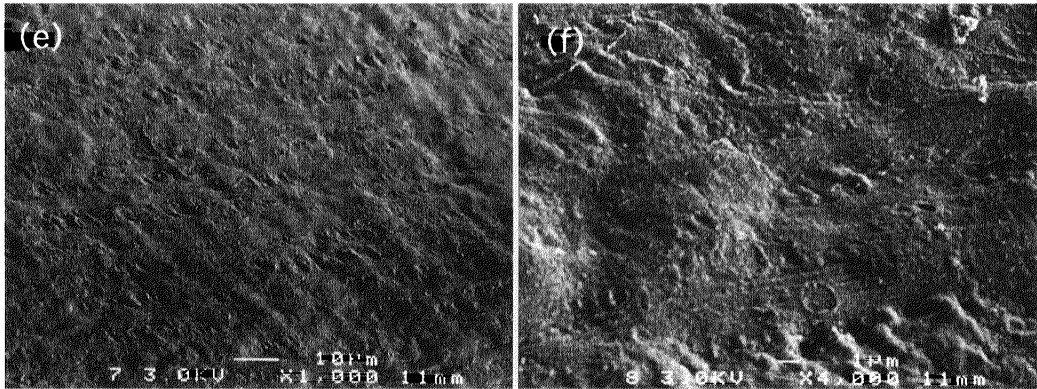


Fig. 4 (B). Observations of the 10 min-illuminated segment of the endothelial surfaces of the cervical vein by scanning electron microscope SEM. Note the decreased number of microvilli. cervical vein (e)  $\times 1,000$  (f)  $\times 4,000$

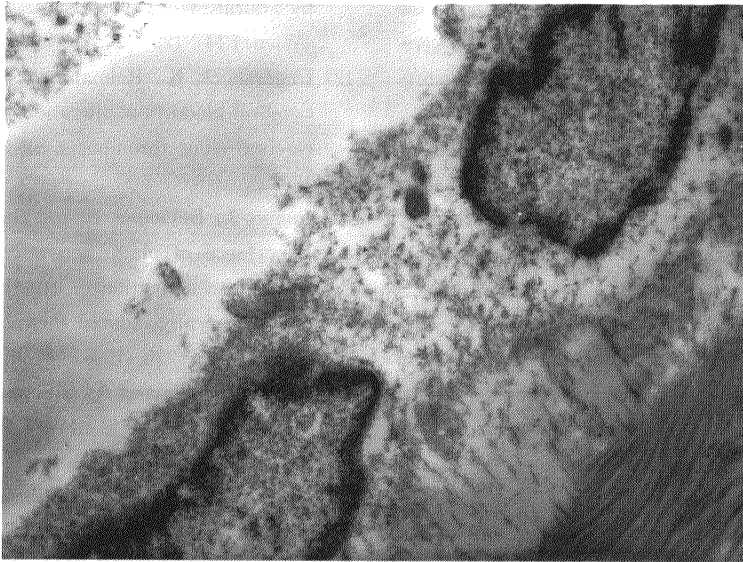


Fig. 5. Observations of the 10 min-illuminated segment of the endothelial surface of the cervical artery by transmission electron microscope (TEM). Tear between endothelial cells were demonstrated. cervical artery  $\times$  12,000

に癒着している様子を示している<sup>29)</sup>。我々が渉猟しえた限り、動・静脈において血栓が生じる過程での内皮細胞障害の有無およびその程度の差異を、時間経過ごとに電子顕微鏡で観察し比較・検討した報告はない。

本実験では、光照射時間1分間群では頸部動・静脈のどちらにおいても、電顕(SEM)所見上、血小板の付着はなく、内皮細胞の形態変化も認められなかった。一方、5分照射群では動脈において内皮障害を示す所見(plasmalemmal pitsやcrater-like structureの出現、microvilliの減少)が認められたが、静脈内皮では認められなかった。10分間照射すると動脈では血小板の癒着が顕著であったが、静脈では1例でのみ認められただけであった。

我々は内皮損傷の程度の指標として、①microvilliの減少、②細胞膜障害、③細胞接合部の解離、④内皮剥離の4項目に着目し、各々の項目について観察された検体数を、動・静脈間で比較した(Table 1, 2)。5分間照射群と10分間照射群の各観察項目毎に2 $\times$ 2分割表を用いて動・静脈間で観察頻度を $\chi^2$ 乗検定したところ、microvilliの減少について有意差が認められた( $p=0.035$ )。今回の観察結果から、静脈内皮でも動脈内皮と同様の血管内皮障害が生じていることが示唆されるが、rose bengal投与後の光照射時間が同じであれば、各項目毎の血管内皮障害の程度は静脈よりも動脈の方が大きく、故に動脈の方が血栓化を来しやすいことが示された。なお、血管内

皮の機能的差異に関しては、D'AngeloらはtPA活性について静脈のほうが動脈よりも明らかに高いことを示しており<sup>28)</sup>、このことから動脈の方が血栓化を来しやすい可能性が考えられる。

本モデルにおいて、何故、動脈内皮の方が静脈内皮よりも損傷されやすいのかについては、今後、動・静脈における灌流圧・血流等の血行力学的な因子の違いが内皮損傷に及ぼす影響<sup>29)</sup>やtPA活性などの内皮細胞の機能的な差異の影響を検討する必要があると思われる。

## ま と め

光感受性色素(rose bengal)を用いた血管閉塞モデルにおいて、血小板の付着・血栓化には、電顕所見上、内皮細胞膜の障害・細胞接合部の解離・内皮剥離などの内皮障害が認められ、同障害は、静脈よりも動脈において顕著であり、故に動脈の方が血栓化を来しやすいことが証明された。

## 文 献

- 1) Nakase, H., Heimann, A. and Kempfski, O.: Local cerebral blood flow in a rat cortical vein occlusion model. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* **16**: 720-728, 1996.
- 2) Nakase, H., Nagata, K., Otsuka, H., Sakaki,

- T. and **Kempinski, O.** : Local cerebral blood flow autoregulation following "asymptomatic" cerebral venous occlusion in the rat. *J. Neurosurg.* **89** : 118-124, 1998.
- 3) **Nakase, H., Kempinski, O., Heimann, A., Takeshima, T. and Tintera, J.** : Microcirculation after cerebral venous occlusions as assessed by laser Doppler scanning. *J. Neurosurg.* **87** : 307-314, 1997.
  - 4) **Sakaki, T., Kakizaki, T., Takeshima, T., Miyamoto, K. and Tsujimoto, S.** : Importance of prevention from intravenous thrombosis and preservation of the venous collateral flow in bridging vein injury during surgery. An experimental study. *Surg. Neurol.* **44** : 158-162, 1995.
  - 5) **Otsuka, H., Nakase, H., Nagata, K., Ueda, K., Kempinski, O. and Sakaki, T.** : Effect of Age on Cerebral Venous Circulation Disturbances in the Rat. *J. Neurosurg.* **93** : 298-304, 2000.
  - 6) **Nagata, K., Nakase, H., Kakizaki, T., Otsuka, H. and Sakaki, T.** : The effect of brain compression under venous circulatory impairment. *Neurol. Res.* **22** : 713-720, 2000.
  - 7) **Nakase, H., Nagata, K., Otsuka, H., Sakaki, T. and Kempinski, O.** : An experimental model of intraoperative venous injury in the rat. *Skull Base Surgery* 123-128, 1997.
  - 8) **Kaido, T., Nakase, H., Nagata, K., Otsuka, H. and Sakaki, T.** : Intermittent constant exposure for brain retraction injury under venous circulatory impairment. *Neurol. Res.* **23** : 739-744, 2001.
  - 9) **Frerichs, K.U., Deckert, M., Kempinski, O., Schürer, L., Einhüpl, K. and Baethmann, A.** : Cerebral sinus and venous thrombosis in rats induces long-term deficits in brain function and morphology - evidence for a cytotoxic genesis. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* **14** : 289-300, 1994.
  - 10) **Fries, G., Wallenfang, T., Hennen, J., Velthaus, M., Heimann, A., Schild, H., Perneczky, A. and Kempinski, O.** : Occlusion of the pig superior sagittal sinus, bridging and cortical veins; multistep evolution of sinus-vein thrombosis. *J. Neurosurg.* **77** : 127-133, 1992.
  - 11) **Gotoh, M., Ohmoto, T. and Kuyama, H.** : Experimental study of venous circulatory disturbance by dural sinus occlusion. *Acta. Neurochir. (Wien)* **124** : 120-126, 1993.
  - 12) **Ungersbock, K., Heimann, A. and Kempinski, O.** : Cerebral blood flow alterations in a rat model of cerebral sinus thrombosis. *Stroke* **24** : 563-570, 1993.
  - 13) **Inamo, J., Belougne, E. and Doutremepuich, C.** : Importance of photo activation of rose bengal for platelet activation in experimental models of photochemically induced thrombosis. *Thrombosis Res.* **83** : 229-235, 1996.
  - 14) **中瀬裕之, Heimann A., Kempinski O., 神 寿右** : 脳静脈灌流障害の病態と治療に関する基礎的研究. *静脈学* **7** : 393-398, 1996.
  - 15) **Nakase, H., Kakizaki, T., Miyamoto, K., Hiramatsu, K. and Sakaki, T.** : Use of local cerebral blood flow monitoring to predict brain damage after disturbance to the venous circulation : cortical vein occlusion model by photochemical dye. *Neurosurgery* **37** : 280-286, 1995.
  - 16) **Lee, P.C.C. and Rodgers, M.A.J.** : Laser flash photokinetic studies of rose bengal sensitized photodynamic interactions of nucleotides and DNA. *Photochem. Photobiol.* **45** : 79-86, 1987.
  - 17) **Kukreja, R.C., Kearns, A.A., Zweier, J.L., Kuppusamy, P. and Hess, M.L.** : Singlet oxygen interaction with Ca-ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Circ. Res.* **69** : 1003-1014, 1991.
  - 18) **Matsuno, H., Uematsu, T., Umemura, K., Takiguchi, Y., Asai, Y., Muranaka, Y. and Nakashima, M.** : A simple and reproducible cerebral thrombosis model in rat induced by a photochemical reaction and the effect of a tissue plasminogen activator in this model. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **29** : 165-173, 1993.
  - 19) **Abby, R. Saniabadi, Uemura, K., Matsumoto, N., Sakuma, S. and Nakashima, M.** : Vessel wall injury and arterial thrombosis induced by a photochemical reaction. *Thrombosis and Haemostasis* 868-872, 1995.
  - 20) **Takiguchi, Y., Hirata, Y., Wada, K. and Nakashima, M.** : Arterial thrombosis model with photochemical reaction in guinea-pig and its property. *Thrombosis Res.* **67** : 435-445, 1992.
  - 21) **Matsuno, H., Uematsu, T., Nagashima, S. and**



- Nakashima, M.** : Photochemically induced thrombosis model in rat femoral artery and evaluation of effects of heparin and tissue-type plasminogen activator with use of this model. *J. Pharmacol. Method* **25** : 303-318, 1991.
- 22) **Takiguchi, Y., Wada, K., Matsuno, H. and Nakashima, M.** : Effect of diabetes on photochemically induced thrombosis in femoral artery and platelet aggregation in rats. *Thrombosis Res.* **63**:445-456, 1991.
- 23) **Dietrich, W.D., Watson, B.D., Busto, R., Ginsberg, M.D. and Bethea, J.R.** : Photochemically induced cerebral infarction. *Acta. Neuropathol.* **72** : 315-325, 1987.
- 24) **Dietrich, W.D., Watson, B.D., Wachtel, M.S., Busto, R. and Ginsberg, M.D.** : Ultrastructural analysis of photochemically induced thrombotic stroke in rat brain. *Stroke* **15** : 191, 1984.
- 25) **Dietrich, W.D., Ginsberg, M.D., Busto, R. and Watson, B.D.** : Photochemically induced cortical infarction in the rat. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* **6** : 195-202, 1986.
- 26) **Watson, B.D., Dietrich, W.D., Busto, R., Wachtel, M.S. and Ginsberg, M.D.** : Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann. Neurol.* **17** : 497-504, 1985.
- 27) **Nagata, K., Nakase, H., Kakizaki, T. and Sakaki, T.** : Scanning electron microscopic (SEM) study of rat cortical vein occlusion. *Current topics in phlebology* 15-19, 1996.
- 28) **D'Angelo, V., Villa, S., Mysliwiec, M., Donati, M.B. and de Gaetano, G.** : Defective fibrinolytic and prostacyclin-like activity in human atherosclerotic plaques. *Thromb. Haemost.* **39**(2) : 535-536. 1978.
- 29) **安藤 謙二** : 内皮細胞機能の調節因子としての血流量細胞 **27** : 18-21, 1995.