

異物肉芽腫の退縮における血管消退のアポトーチック機序

浜崎多美子

炎症、とくに慢性炎症に伴い形成された肉芽組織を構成する血管網は、いったん治癒機序が進行すると、今度は消退の過程をたどる。この消退の機序を明らかにするため、ラット背部皮下にコラーゲンスポンジを移植して異物肉芽腫を作成し、コラーゲンの分解吸収による異物肉芽腫の退縮に伴う血管網の消失を組織学的かつ微細構造的に観察した。試料として移植したコラーゲンスポンジを2日目より135日目まで計17回採取し、各日とも、血管内へ墨汁注入後の H-E 染色標本、およびエポン包埋による電顕標本を作成し観察を行った。移植したスポンジの空隙は、約30日で肉芽組織により充填された。肉芽組織の単位面積 (1 mm^2) あたりの血管数は、60日前後より緩やかに減少し、90日を経過すると急激な減少傾向を示した。電顕的観察によって、肉芽組織を構成する血管網の毛細血管、細動静脈において、内皮細胞、周皮細胞そして血管平滑筋細胞の各々の細胞に核クロマチンの濃縮と辺縁化を伴うアポトーチック変化の出現が見られた。このようなアポトーチック細胞の出現は、スポンジ構築が消失する120日目で最多を示した。異物肉芽腫の退縮に伴う血管の消退は、内皮細胞、周皮細胞そして血管平滑筋細胞のアポトーシスによる細胞死と密接な関係がある。

(平成7年10月9日採用)

Apoptosis as the Mechanism of Microvascular Rarefaction During Involution of the Foreign-Body Granuloma

Tamiko HAMASAKI

The vascular bed as an element of granulation tissue induced by inflammation, especially chronic inflammation, rarefies with the progress of healing mechanisms. In this study, foreign-body granulomas were induced by the implantation of collagen sponges subcutaneously in rats. They were histologically and microstructurally observed for microvascular rarefaction during involution. The implanted collagen sponges were removed 17 times between 2 days and 135 days after implantation. Biopsies were analyzed under microscope after injection of India ink into blood vessels and hematoxylin-eosin staining, and specimens were examined electron microscopically after they were embedded in epon. All the spaces in the implanted collagen sponges were filled with granulation tissue at about 30 days after implantation. The numbers of blood vessels per 1 mm^2 in granulation tissue gradually decreased from about 60 days, and rapidly decreased after 90 days. In electron micrographs, apoptotic chromatin condensation, margination and possibly fragmen-

tation were observed in the endothelial cells, pericytes and smooth muscle cells of capillaries and small vessels in the vascular bed. Apoptotic cell death appeared most frequently at 120 days, and thereafter the implanted collagen sponges disappeared. Microvascular rarefaction during involution of foreign-body granulomas is closely related to the apoptotic cell death of endothelial cells, pericytes and smooth muscle cells. (Accepted on October 9, 1995) *Kawasaki Igakkaishi* 21(3): 189-203, 1995

Key Words ① Foreign-body granuloma ② Blood vessel
③ Apoptotic cell ④ Electron microscopy

緒 言

アポトーシス (apoptosis) は、壊死 (necrosis) と区別される細胞死のひとつの様式である。病的な細胞障害による細胞死の場合の壊死は、細胞が集団をなして死に至ることが多く、多くの場合、細胞は水腫状に膨れ上がり、やがて細胞膜の破綻が起こって、それに対する炎症細胞の反応が認められる。これに対して、アポトーシスは、原則として single cell の単位で起こり、細胞は核クロマチンの凝縮が起こって隣接細胞との結合を失い、細胞と核の分断化のためにくびれてアポトーシス小体 (apoptotic body) を形成する。生体の組織中では、アポトーシス小体は健全な隣接細胞によってほとんど瞬時に貪食されてしまい、貪食細胞側のリソゾームと融合して貪食体が形成され、その内容は分解消化されてしまう。このようにアポトーシスに陥った細胞の処理は、原則として隣接する細胞内で起こるため、これに対する炎症細胞の反応は起こらないと言われている^{1)~3)}。

アポトーシスによる細胞死は、遺伝子によって能動的に制御されており、個体の発生から成熟、さらに老化の過程において絶えず起きている。例えば、発生過程における口蓋の癒合⁴⁾や四肢の指間形成⁵⁾、成熟個体における正常な細胞交替⁶⁾、内分泌系による恒常性の維持^{7)~11)}、免疫系の多様性と特異性の発現^{12)~18)}などに重要な役割をはたしている。すなわち、これらの現象は、個体の成立と恒常性の維持のために生体の中で不要になった細胞が、必然的な死に至るための

アポトーシスのプログラムをあらかじめ遺伝情報として普遍的に内蔵していることの証左である。このようにして、アポトーシスは、個体の中の特定部分の細胞・組織を消滅させることが可能である。

炎症、とくに慢性炎症の成立、進展に伴う肉芽組織の形成には、構成細胞であるマクロファージの増殖とともに血管の新生が本質的な役割を担っていることは事実である。通常、炎症性の異物性肉芽組織は、炎症の終焉によって治癒機転がいったん進行すると、縮小、退縮して瘢痕化にいたる。この時、肉芽組織を構築する血管網もまた消退する。そこで、このような肉芽組織における血管網の消退機序を明らかにするため、動物の体内に難吸収性のコラーゲンスポンジを移植して成熟した異物肉芽腫を作成し、スポンジ構造の分解吸収によって異物肉芽腫が消失するに伴い、増生した血管もまた自然退縮を起こすような in vivo モデルを作成した。本研究は、このような異物肉芽腫を電子顕微鏡にて観察し、増生した血管が肉芽組織から撤退する過程でアポトーシスが関与している可能性を初めて明らかにしたものである。

実験材料、方法

動物は、Fisher344系ラット♀生後5週齢(体重100~120g)を用いた。コラーゲンスポンジは、牛アテロコラーゲンをヘキサメチレンジオソシアネート架橋によりスポンジ形成したもの(KOKEN製)を使用し、スポンジの大きさは1×1×0.5cmとした。

ラットは、ネブタール腹腔内注入 (35 mg/kg) 麻酔後、背部を剃毛して 1 cm 切開を加え、皮下 (皮膚筋層下) にポケットを作製した。ここに、生理的食塩水またはヘパリン加生理的食塩水 (200 U/ml) に浸漬したコラーゲンスポンジを 1 個宛挿入し、皮膚は 3-0 絹糸にて縫合した。動物数は、生理的食塩水浸漬群 (生食群) とヘパリン加生理的食塩水浸漬群 (ヘパリン群) の各群 68 匹ずつで、移植後 2 日目より、4, 7, 14, 18, 25, 30, 40, 55, 62, 82, 91, 102, 108, 112, 120, 135 日目まで計 17 回にわたり毎回両群とも 4 匹から試料を採取した。採取方法は、各日ともネブタール腹腔内注入麻酔後、3 匹は開胸して、心尖部よりカニューレを挿入し、下大静脈より瀉血を行い、ヘパリン加リン酸緩衝液 (pH 7.4) にて 100 cm Hg の圧で灌流した後、同じ圧力で墨汁原液を注入した。摘出した試料は、表皮および周囲の皮下組織を含めて一塊とし、10% 中性ホルマリン固定後 H-E 染色を行い、光学顕微鏡にて観察した。

他の 1 匹は、電子顕微鏡用の試料とし、摘出したコラーゲンスポンジは、ただちに 2.5% グルタルアルデヒド (0.2 M カコジル酸緩衝液, pH 7.4) にて 2 時間固定後、1% オスミウム酸 (0.2 M カコジル酸緩衝液, pH 7.4) で 2 時間後固定し、エタノール上昇系列で脱水し、QY-1 (応研商事) にて置換後、エポン 812 に包埋した。超薄切片を作製し、これを酢酸ウラニール・クエン酸鉛で二重染色し、H-7100 型電子顕微鏡にて観察を行った。

また、異物肉芽腫の肉芽組織について、単位面積あたりの血管の出現数および管腔の内径についての計測には、高速ハイグレード画像解析装置 IBAS 2000 を使用した。なお、対照として、ラットの非侵襲性の背部皮下組織を観察した。

統計学的な処理は、Man-Whitney U test を用い、5% の危険率で有意差を検定した。

結 果

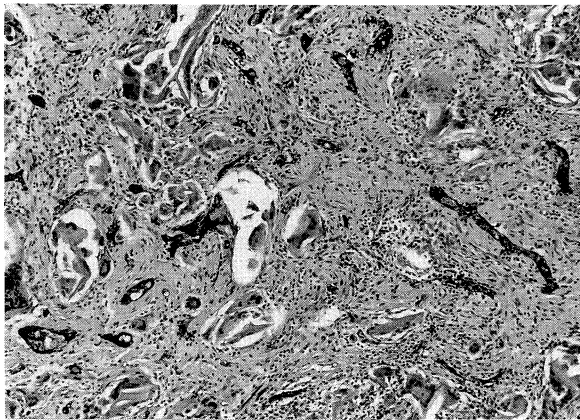
1. 光学顕微鏡的観察

(1) 異物肉芽腫の組織学的所見

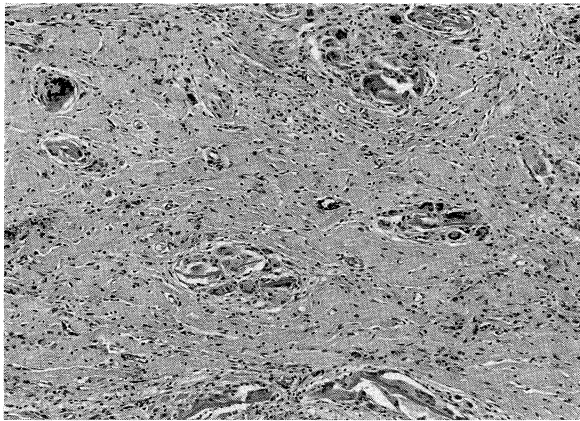
移植後 2 日目では、スポンジ内の周辺部に多数の赤血球とともに好中球の浸潤が優勢的に見られた。4 日目では、少数の多核巨細胞が出現し、血管の新生が認められた。7 日目になると、スポンジの辺縁部からスポンジ間隙を充填していくように線維芽細胞、マクロファージ様の単核細胞の浸潤が高度に見られ、スポンジのコラーゲン梁に接して 20 個以上の核をもった多核巨細胞がしばしば認められた。スポンジは、線維性の結合組織によって囲繞され、この結合組織には、多数の毛細血管の増生を認めた。その後、スポンジ辺縁部より中心部へと向かい、スポンジ間隙は単核性の細胞成分によって密に充填されていった。移植後 30 日を経過すると、ほぼすべての間隙が細胞成分で満たされ、コラーゲンスポンジの内部は完全に肉芽組織に置き換えられた。さらに、60 日目前後には、多核巨細胞の出現は最高となり、また、多数の毛細血管、細動静脈の走行が認められた (Fig. 1a)。移植後 90 日を経過すると、スポンジ構築の消失とともに単核性細胞、多核巨細胞の出現の減少傾向が認められるようになるが、その反面、結合組織線維の増生が顕著となった。このような肉芽組織を構成する細胞の減少傾向は血管網にもおよび、管腔の消失が際だって観察されるようになった (Fig. 1b)。さらに、移植後 120 日目ではスポンジ構築はほとんど認められず、縮小した肉芽組織が残存し、135 日目を経過すると異物肉芽腫の肉芽組織は完全に消失するか、または肉芽組織が瘢痕化して痕跡をとどめるのみとなった。

(2) 血管形成の経日的評価

移植した生食群およびヘパリン群のコラーゲンスポンジ内に形成された肉芽組織を構成する血管は、墨汁により黒染されており、組織学的な基準¹⁹⁾をもとに内径 12~15 μm を境界として、毛細血管と細動静脈性の細血管に区分された。生食群とヘパリン群の両群において、肉芽組織の単位面積 (1 mm²) あたりの毛細血管数の経日的な変動を見ると (Fig. 2)、移植後 14 日目より 30 日目の間ではヘパリンによる毛細血管新生促



a



b

Fig. 1. Light micrographs of foreign-body granulomas induced by the implantation of collagen sponges with saline. (H-E staining $\times 25$). **a**: A number of blood vessels which were made visible by India ink injection are observed in granulation tissue of a 55-day-old granuloma. **b**: Volume of the implanted collagen sponge decreases and the vessels also decrease in granulation tissue of a 102-day-old granuloma.

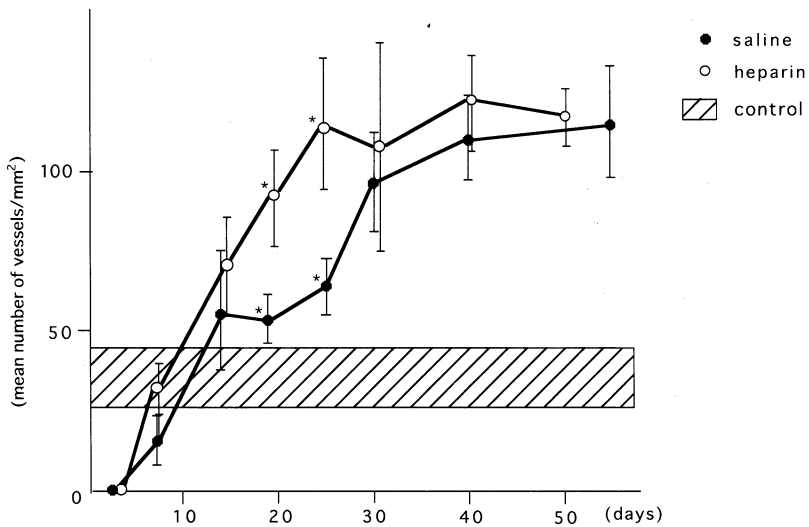


Fig. 2. Numbers of capillaries in foreign-body granulomas induced by the implantation of collagen sponges with saline and heparin. ●-●: saline, ○-○: heparin. Each circle and vertical line represents the mean \pm SE. Hatched horizontal bar represents the mean \pm SE of number of capillaries in normal tissue. (*: $p < 0.05$)

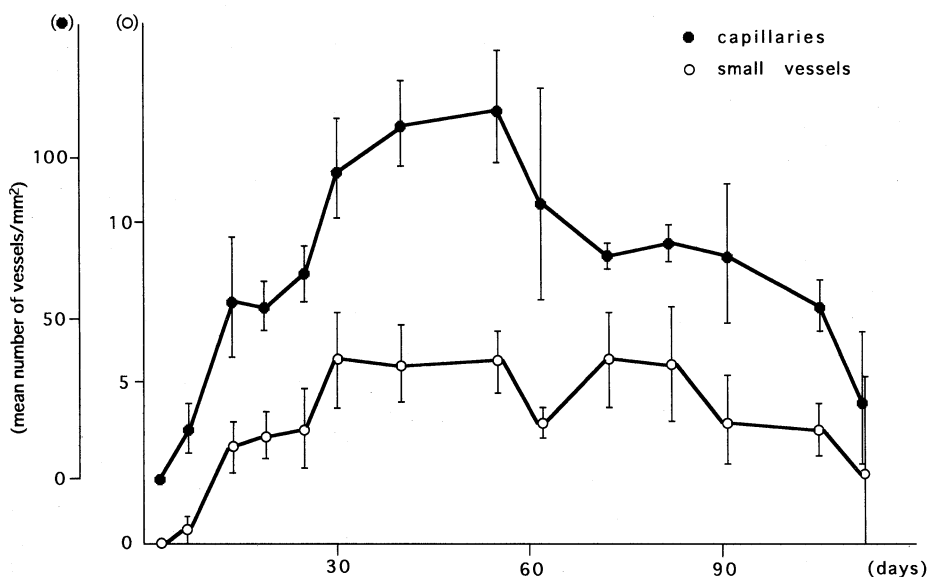


Fig. 3. Numbers of the blood vessels in foreign-body granulomas induced by the implantation of collagen sponges with saline. ●-●: capillary (<math><12-15 \mu\text{m}</math>), ○-○: small vessel (>12-15 $\mu\text{m}</math>). Each circle and vertical line represents the mean \pm SE.$

進作用²⁰⁾があるヘパリン群のほうが有意 ($t < 0.05$) に増加していた。しかし30日を経過すると、120日まで両群はほぼ同じ傾向を示し、2群間の統計学的な有意差は認められなかった(55日目以後のデータは示さない)。また、両群における細血管数の経日的な変動では、全経過を通じて2群間の統計学的な有意差は認められなかった。

そこで、生食群の毛細血管と細血管について、肉芽組織の単位面積(1 mm²)あたりのそれぞれの血管数の経日的な変動を見ると(Fig. 3)、毛細血管、細血管ともにスポンジ移植後30日までは顕著な増加を示した。しかし、それ以後になると増加の傾向は緩やかとなり、55日を経過すると共に最高値に達した後、両血管は減少の傾向を示した。この減少傾向は、移植後100日を経過するとより急激な傾斜を示した。

2. 電子顕微鏡的観察

(1) アポトーチック細胞の局在場所

アポトーチック細胞の微細構造的な特徴は、核クロマチンの濃縮と辺縁化である^{1)~3)}。このよう

な核クロマチンのアポトーチック変化は、コラーゲンスポンジの皮下移植による異物肉芽腫の肉芽組織を構成する血管網において、管腔を構築する内皮細胞(Fig. 4)、その管腔を囲繞する周皮細胞(Fig. 5)、さらに血管平滑筋細胞(Fig. 6)のいずれの細胞にも出現した。内皮細胞のアポトーチック変化は、クロマチンの濃縮と辺縁化とともに(Fig. 4a)、顕著な核の分断化の傾向を示した(Fig. 4b)。アポトーチック内皮細胞は、血管基底板より離脱して管腔の構築から逸脱し、しばしば管腔内に突出して遊離状となるが、隣接する内皮細胞との接着が残存しているため、ほぼ完全に管腔を閉鎖することがある(Figs. 4a, b)。しかし、このようなアポトーチック内皮細胞も、核の分断化とともに細胞の分断化が進行し、アポトーシス小体が形成される時点では既に管腔内に脱落しており、管腔には大小多数のアポトーシス小体が内在した(Fig. 4c)。内皮細胞のアポトーシスは、肉芽組織を構成する血管網の毛細血管、細動脈および細静脈のいずれの血管においても認められたが、

アポトーシス小体を貪食する内皮細胞の出現はそれほど顕著に観察できなかった。しかし、管腔の外側に位置するマクロファージの細胞質内にはしばしばアポトーチックな核片を含む貪食体が認められた (Fig. 7)。ただし、内皮細胞、

周皮細胞そして平滑筋細胞のいずれにおいてもアポトーシス小体が形成されると、隣接細胞あるいはマクロファージによって直ちに貪食を受けるために、貪食体より遡って細胞の由来を検索することは困難であった。

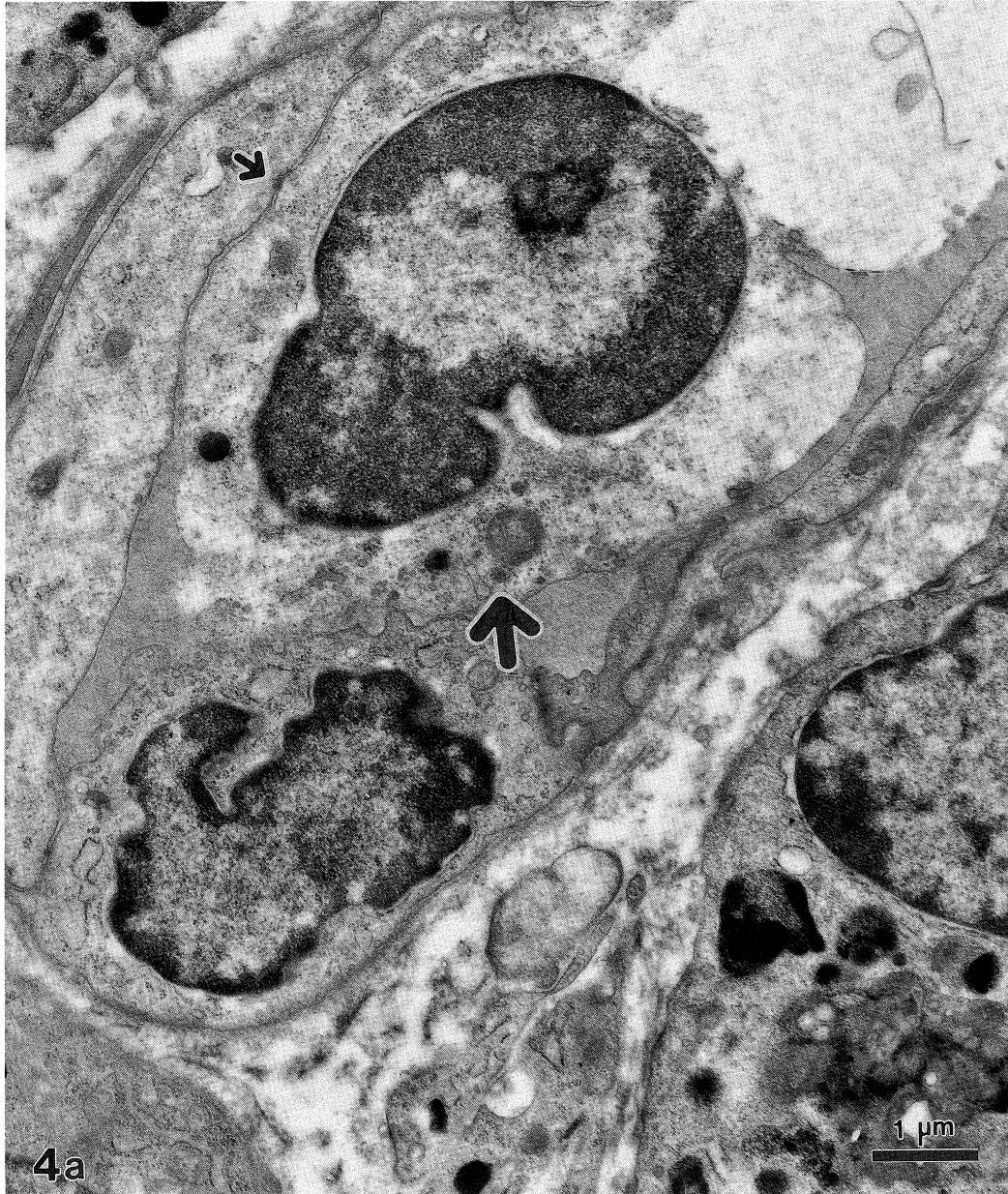
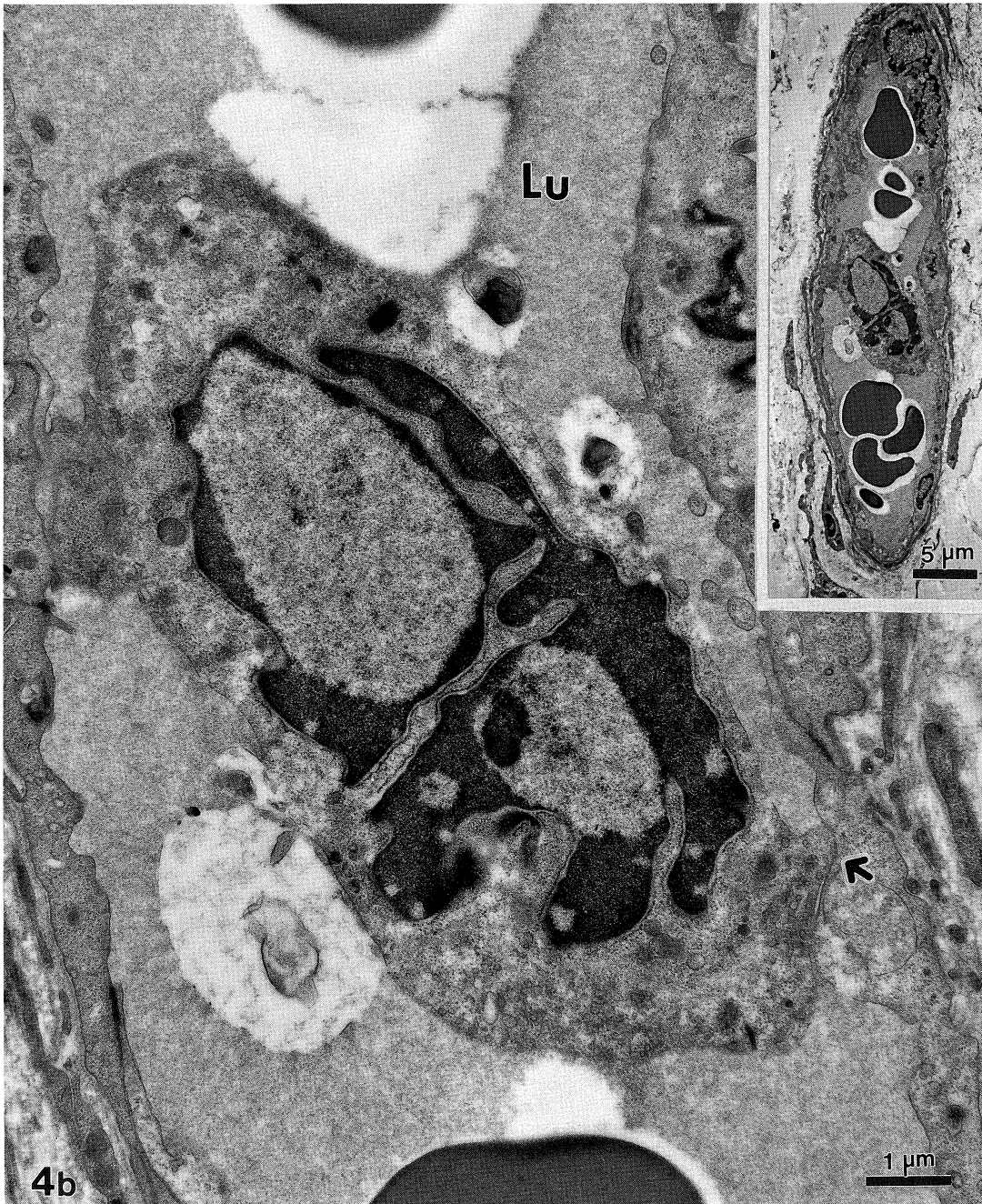
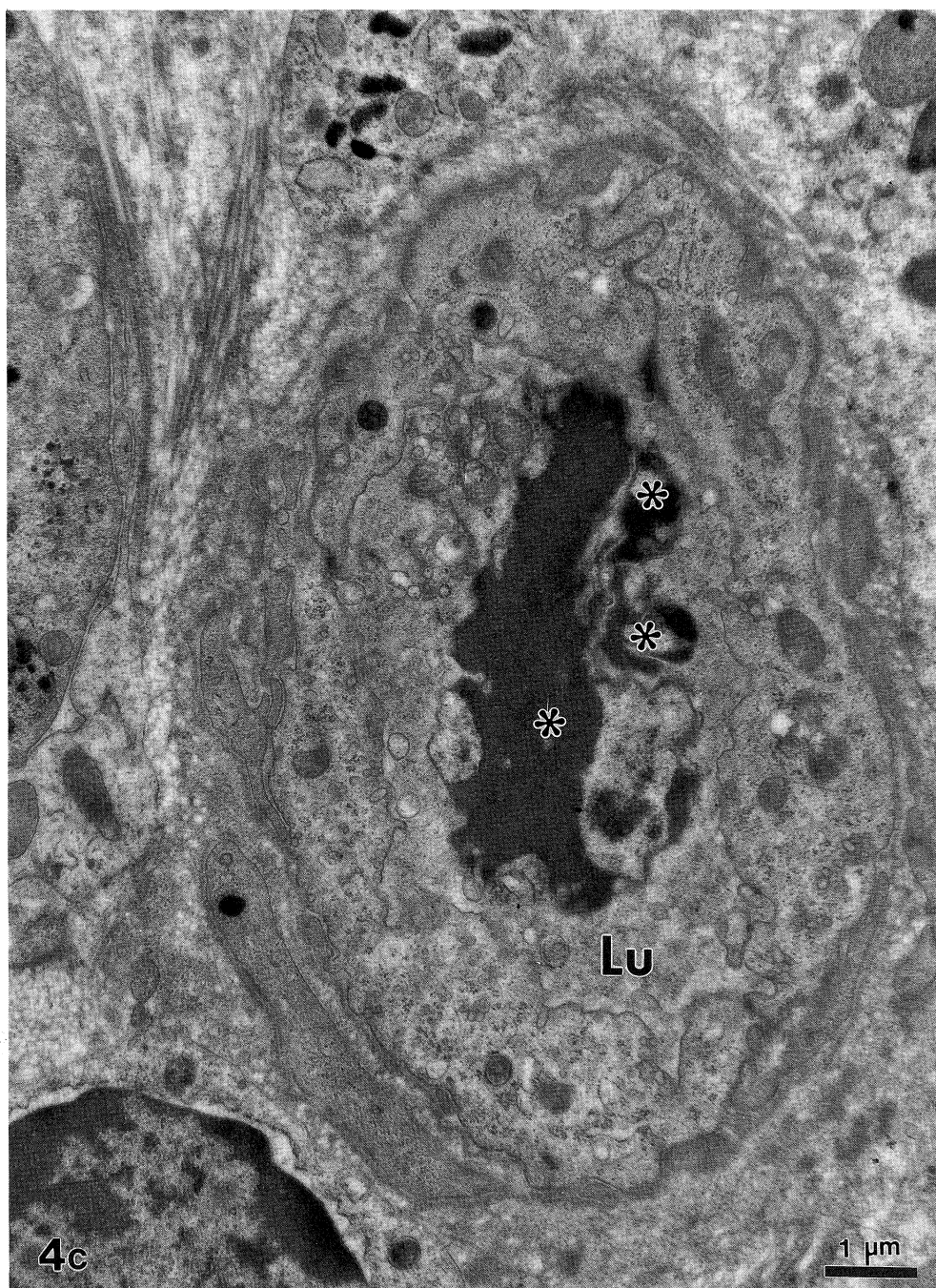


Fig. 4. Electron micrographs of apoptosis of endothelial cells in foreign-body granulomas after collagen sponge implantation. **a**: Endothelial cell (large arrow) with apoptotic chromatin condensation has been squeezed out into the capillary lumen and obliterates it. This cell has adhered to the neighboring cells by tight junctions (small arrow).



b : Protrusion of an endothelial cell is across the lumen (Lu) of a small vessel. Protruding cell forms tight junctions (small arrow) with other endothelial cells. Nucleus of this cell shows apoptotic chromatin condensation, margination, and possibly fragmentation. A lower-power view of this vessel is shown as a longitudinal section in the insert. **c** : A cluster of apoptotic bodies (asterisks) derived from an endothelial cell is appeared to lie in the lumen (Lu) of a small vessel.



(2) アポトーチック細胞の数量的評価
 コラーゲンスポンジ移植後90日を経過すると、
 スポンジ構築の消失とともに顕著な肉芽組織の
 縮小が起こることがこの異物肉芽腫の組織学的
 検索によって明らかになったので、この期間に

おける血管網を構築する毛細血管、細動脈およ
 び細静脈のなかで、アポトーチック細胞の出現
 を算定した。まず、血管増生の頂点に達する時
 期にあたるコラーゲンスポンジ移植後55日目
 では、内皮細胞と周皮細胞および平滑筋細胞にお



Fig. 5. Electron micrograph of apoptosis of a pericyte (arrow) in a foreign-body granuloma after collagen sponge implantation. This pericyte with apoptotic nuclear changes is embracing the capillary endothelium.

けるアポトーシスの出現頻度は、エポン812包埋ブロックによる肉芽組織の単位面積 (1 mm²) あたりそれぞれ1個以下であるが、移植後108日を経過して112日から肉芽組織の消失する直前の120日目では、それぞれ4個以上の出現をみた (Fig. 8).

また、この期間の肉芽組織において、内皮細胞のなかにミトース (mitosis) の形態学的な特徴を示す細胞の出現頻度はいずれも0であった。

考 察

加工コラーゲンスポンジを動物の体内に移植すると異物肉芽腫が形成される。この異物肉芽腫は、スポンジの中に構築される肉芽組織から

成り、肉芽組織は、マクロファージ系の単核細胞、血管新生による血管網、多核巨細胞などから構成される。しかし、コラーゲンスポンジが長期間動物の体内に存在すると、異物であるコラーゲンが分解吸収されるとともに、肉芽組織を構成するこれらの細胞成分もまた消失に至り、このようにして異物肉芽腫は組織より退縮する。

今回の研究においては、コラーゲンスポンジの皮下移植による異物肉芽腫の成立後、スポンジ構築の消失する時期と一致して肉芽組織もまた縮小し、血管網の急速な消失が認められた。さらに、この時期の異物肉芽腫の電子顕微鏡による観察によって、血管内皮細胞、周皮細胞、血管平滑筋細胞のアポトーシスが認められ、異物肉芽腫の完成時期よりも増加の傾向を示した。

これまでに、アポトーシス細胞の核クロマ



Fig. 6. Electron micrograph of apoptosis of a smooth muscle cell (arrow) in a foreign-body granuloma after collagen sponge implantation. This muscle cell with apoptotic nuclear changes is present in the smooth muscle cell layer (SM) of an arteriole.

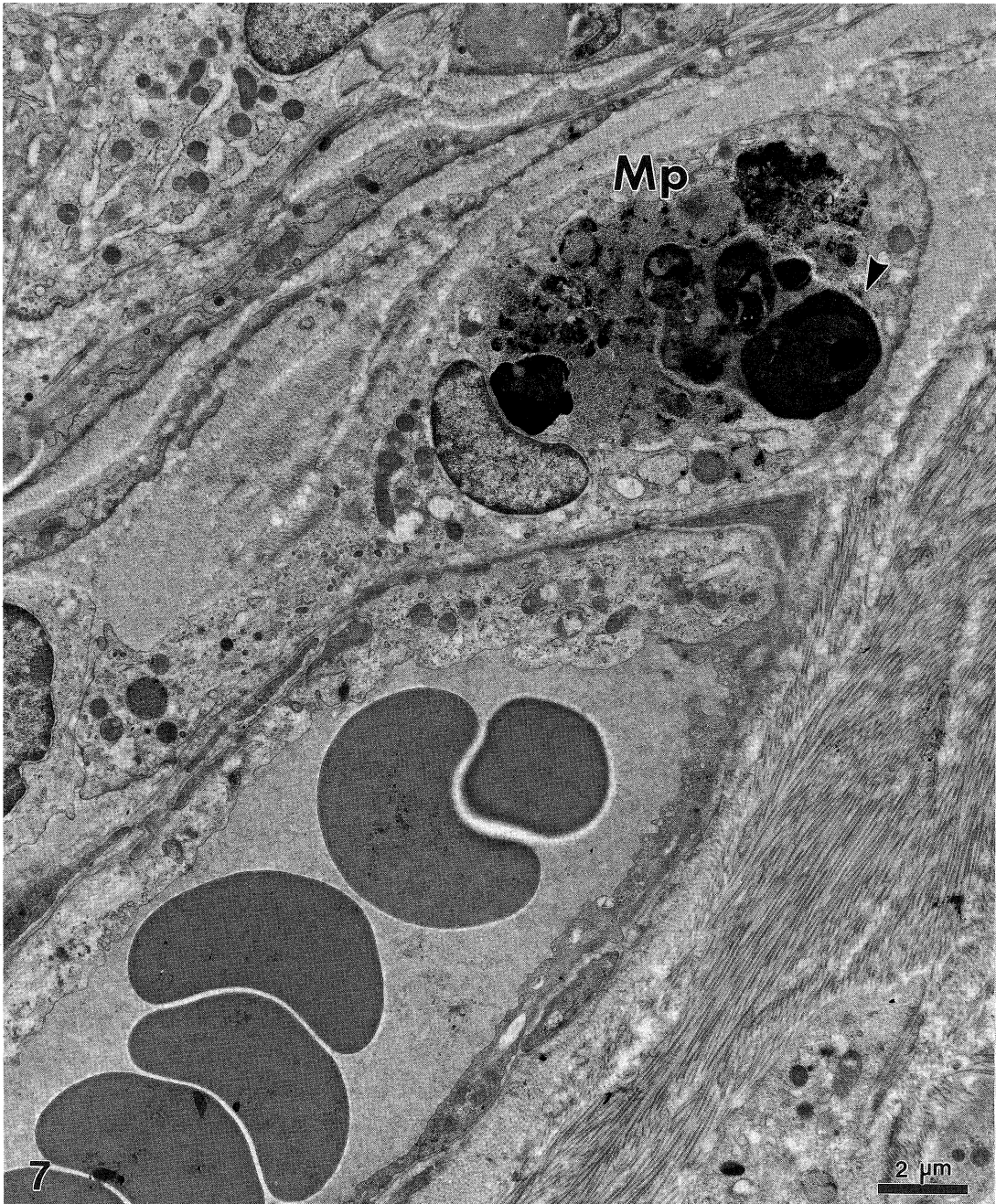


Fig. 7. Macrophage (Mp) lying adjacent to a capillary in a foreign-body granuloma after collagen sponge implantation contains degraded apoptotic bodies with a dense nuclear fragment (arrowhead) in phagolysosomes.

チンの形態学的観察に基づいて、細胞内におけるアポトーシスの出現頻度を算出した報告を見ると、ラットで肝臓過形成後に出現するアポト

ーシスは、肝細胞100個あたり 0.05 ± 0.02 であり²¹⁾、同じく肝臓への cycloheximide 静脈内投与(1.5 mg/kg) 3時間後では、 $0.65 \pm 0.11/100$

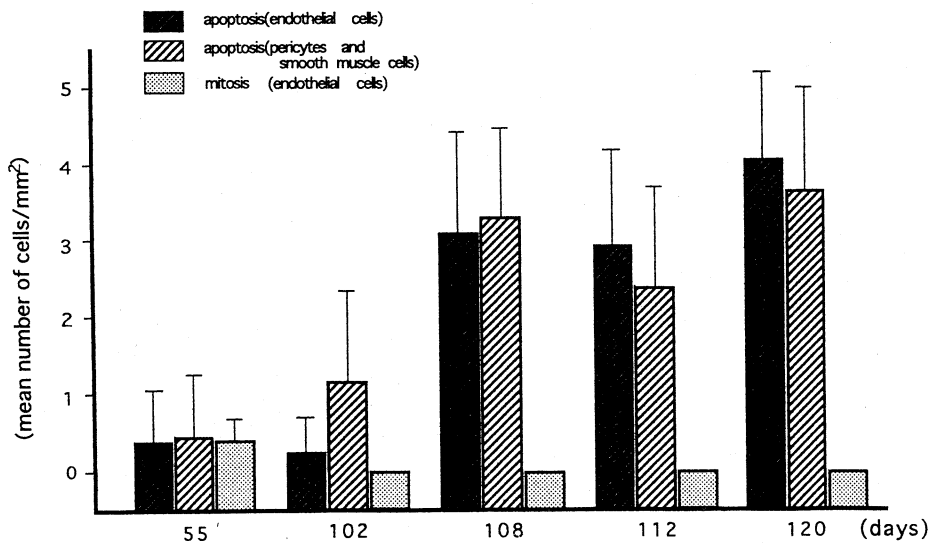


Fig. 8. Frequency of appearances of apoptotic cell death in the microvascular bed in foreign-body granulomas induced by the implantation of collagen sponges. Numbers of apoptotic cells (endothelial cells, pericytes and smooth muscle cells) are counted by 10 sections (1 mm²) each of 3 samples of respective day. Results represent the mean \pm SE.

核であった²²⁾。ラットの銅欠乏食による脾臓の退縮誘発では、銅欠乏6週後に1000腺房細胞あたり最高95のアポトーシス小体を認め²³⁾、尿管結紮後の水腎症により腎尿細管の萎縮が生じ、アポトーシスは腎実質で最高2週目に1mm²あたり 6.17 ± 0.93 であった²⁴⁾。家兎の子宮上皮においても human chorionic gonadotropin 投与による偽妊娠状態で、 $0.3 \pm 0.1\%$ 出現している²⁵⁾。人では腫瘍に関して、前立腺癌におけるアポトーシス小体出現頻度が Gleason の分類に相関があり、グレード4では $0.66/100$ 細胞の出現がある²⁶⁾。また、non-Hodgkin 型リンパ腫の胚中心では、平均 4.9% のアポトーシスが生じていると報告されている²⁷⁾。いずれも組織内での出現頻度の数値は小さい。しかし、これは、壊死とは異なるアポトーシスによる細胞死の過程が、組織内では直ちに隣接の細胞あるいは組織のマクロファージによって貪食を受け、結果的に炎症を惹起しないという事実¹⁾と密接に関連している。アポトーチック細胞の組織からの消失は急速で、2~3分でアポトーシス小体となり、4~9時間後には貪食が完了し、もはや組織内では確認が不可

能となるためである²⁾。本研究においても、これまでに報告された数値と同様に、肉芽組織の血管網の中でのアポトーチック細胞の出現頻度はいずれも低かった。しかし、肉芽組織が縮小する時期の血管網の内皮細胞、周皮細胞と血管平滑筋細胞のアポトーシスのいずれもが、コラーゲンスポンジ移植後55日目の成熟した肉芽組織を構成する血管網におけるこれらの細胞のアポトーシスの出現頻度よりも、細胞あたりの見当では10倍以上増加していることになる。このことは、肉芽組織が縮小する時期の血管網の消滅機転に、アポトーシスが深く関わっていることの確かな証拠である。

生体内における血管内皮細胞のアポトーシスによる細胞死の制御機構については、現時点ではまったく不明であるが、しかし、最近では、血管内皮細胞のアポトーシスが培養細胞で誘導できるようになり、人の臍静脈の培養内皮細胞から FGF (fibroblast growth factor) を除いた時²⁸⁾、あるいは牛の大動脈内皮細胞の培養細胞において、TNF (tumor necrosis factor) を添加した時²⁹⁾、アポトーシスが誘導される。ここで、

増殖因子の FGF については、創傷治癒の過程で組織修復の際に起こる急激な血管新生を惹起するサイトカインの候補に挙げられている³⁰⁾。本実験系において肉芽組織を構成する血管網の増殖完了に伴い、FGF の分泌停止が内皮細胞のアポトーシスに何らかの役割をはたしているかも知れない。

微小循環系では、血管内圧の上昇による微小血管への影響が報告されており、血管径の狭小化³¹⁾、血管数の減少³²⁾が起こる。このような現象と内皮細胞のアポトーシス細胞死との関連性が高血圧症ラットで調査されている³³⁾。周皮細胞や血管平滑筋細胞は、内皮細胞と構造的にまさに表裏一体をなしており、各々が機能的にも密接に連携することは、それが異物肉芽腫の肉芽組織を構成する血管網であっても変わらないはずである。異物肉芽腫の肉芽組織では、内皮細胞のアポトーシスによって血管径の縮小などの変化が生じると、局所的な持続性の血管内圧の上昇が惹き起こされるかもしれない。そうすると、このような情報が周皮細胞や血管平滑筋細胞に伝達され、アポトーシスの引き金となる可能性もあろう。

アポトーシスを起こした血管内皮細胞に関して、O'shea は、羊の黄体退行期および閉鎖卵胞における小血管の変化を観察し、管腔が内皮細胞由来のアポトーシス小体によって閉鎖されることを示している^{9),34)}。本研究においても、毛細血管の管腔を閉鎖するようにアポトーシス内皮細胞が突出する所見や、アポトーシス小体が

やはり管腔を閉塞するように存在する所見が認められた。アポトーシスによって内皮細胞が管腔側に脱落するとき、突出したアポトーシス内皮細胞と対側の内皮細胞との間に一過性の癒着が生じ、それによって血流の停滞による虚血が起こり、再血流の開始によって内皮細胞に傷害の起こることが示唆されている³⁵⁾。内皮細胞の傷害は、血小板の凝集と脱顆粒の充満による血管内腔の閉塞を招くことになるかも知れない^{36),37)}。異物肉芽腫の肉芽組織においても、血小板の凝集による血管腔の狭窄があり(未発表)、血管消退の進展に寄与しているものと考えられる。

コラーゲンスポンジの皮下移植によって形成された異物肉芽腫を長期観察することで、肉芽組織の退縮における血管消退を組織学的かつ微細構造的に観察することが可能であった。その血管消退の機序として、血管内皮細胞と周皮細胞および血管平滑筋細胞のアポトーシスによる細胞死が関与していることを明らかにした。

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました川崎医科大学薬理学教室 斎藤泰一教授、直接ご指導、ご協力をいただきました同教室 本間隆義助教授に深甚なる謝意を捧げます。また、標本作成にあたりご指導いただきました組織・電子顕微鏡センターの各位に深謝いたします。そして、研究にご協力いただきました薬理学教室各位に感謝いたします。

なお、本論文の主旨は、第3回日本形成外科学会基礎学術集会(1994年11月、於横浜)にて発表した。

文 献

- 1) Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR: Cell Death: The significance of apoptosis. *Inter Rev Cytol* 68: 251-306, 1980
- 2) Walker NI, Harmon BV, Gobé GC, Kerr JFR: Patterns of cell death. *Meth Achiev exp Pathol* 13: 18-54, 1988
- 3) Arends MJ, Wyllie AH: Apoptosis: Mechanisms and roles in pathology. *Invest Rev Exp Pathol* 32: 223-254, 1991
- 4) Hassell JR: Development of rat palatal shelves in vitro. An ultrastructural analysis of the inhibition of epithelial cell death and palate fusion by the epidermal growth factor. *Develop Biol* 45: 90-102, 1975

- 5) Garcia-Martinez V, Macias D, Gañan Y, Garcia-Lobo JM, Francia MV, Fernandez-Teran MA, Hurlle JM : Internucleosomal DNA fragmentation and programmed cell death (apoptosis) in the interdigital tissue of the embryonic chick leg bud. *J Cell Sci* 106 : 201-208, 1993
- 6) Pipan N, Sterle M : Cytochemical and scanning electronmicroscopic analysis of apoptotic cells and their phagocytosis in mucoid epithelium of the mouse stomach. *Cell Tissue Res* 246 : 647-652, 1986
- 7) Wyllie AH, Kerr JFR, Macaskill IAM, Currie AR : Adrenocortical cell deletion : The role of ACTH. *J Path* 111 : 85-94, 1973
- 8) Kerr JFR, Searle J : Deletion of cells by apoptosis during castration-induced involution of the rat prostate. *Virchows Arch Abt B Zellpath* 13 : 87-102, 1973
- 9) O'Shea JC, Nightingale MG, Chamley WA : Changes in small blood vessels during cyclical luteal regression in sheep. *Biol Reprod* 17 : 162-177, 1977
- 10) Walker NI, Bennett RE, Kerr JFR : Cell death by apoptosis during involution of the lactating breast in mice and rats. *Am J Anat* 185 : 19-32, 1989
- 11) O'Shea JD, Wright PJ : Involution and regeneration of the endometrium following parturition in the ewe. *Cell Tissue Res* 236 : 477-485, 1984
- 12) Kerr JFR, Searle J : A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal-cell carcinomas that contain numerous mitotic figures. *J Path* 107 : 41-44, 1972
- 13) Sarraf CE, Bowen ID : Kinetic studies on a murine sarcoma and an analysis of apoptosis. *Br J Cancer* 54 : 989-998, 1986
- 14) Trauth BC, Klas C, Peters AMJ, Matzku S, Möller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH : Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245 : 301-305, 1989
- 15) Debatin KM, Goldmann CK, Bamford R, Waldmann TA, Krammer PH : Monoclonal-antibody-mediated apoptosis in adult T-cell leukaemia. *Lancet* 335 : 497-500, 1990
- 16) Yamada T, Ohyama H, Kinjo T, Watanabe M : Evidence for the internucleosomal breakage of chromatin in rat thymocytes irradiated in vitro. *Radiat Res* 85 : 544-553, 1981
- 17) Smith CA, Williams GT, Kingston R, Jenkinson EJ, Owen JT : Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures. *Nature* 337 : 181-184, 1989
- 18) Shi Y, Sahai BM, Green DR : Cyclosporin a inhibits activation-induced cell death in T-cell hybridomas and thymocytes. *Nature* 339 : 625-626
- 19) Fawcett DW, Raviola E : Blood and lymph vascular systems. *In* Bloom and Fawcett A Textbook of Histology by Fawcett DW, 12th ed. New York, Chapman & Hall. 1994, pp 368-388
- 20) Ehrlich HP, Jung WK, Costa DE, Rajaratnam JB : Effects of heparin on vascularization of artificial skin grafts. *Exp Mol Pathol* 48 : 244-251, 1988
- 21) Columbano A, Ledda-Columbano GM, Coni PP, Faa G, Liguori C, Cruz GS, Pani P : Occurrence of cell death (apoptosis) during the involution of liver hyperplasia. *Lab Invest* 52 : 670-675, 1985
- 22) Ledda-Columbano GM, Coni P, Faa G, Manenti G, Columbano A : Rapid induction of apoptosis in rat liver by cycloheximide. *Am J Pathol* 140 : 545-549, 1992
- 23) Rao MS, Yeldandi AV, Subbarao V, Reddy JK : Role of apoptosis in copper deficiency-induced pancreatic involution in the rat. *Am J Pathol* 142 : 1952-1957, 1993
- 24) Gobe GC, Axelsen RA : Genesis of renal tubular atrophy in experimental hydronephrosis in the rat. *Lab Invest* 56 : 273-281, 1987
- 25) Rotello RJ, Hocker MB, Gerschenson LE : Biochemical evidence for programmed cell death in rabbit uterine epithelium. *Am J Pathol* 134 : 491-495, 1989

- 26) Aihara M, Truong LD, Dunn JK, Wheeler TM, Scardino PT, Thompson TC : Frequency of apoptotic bodies positively correlates with Gleason grade in prostate cancer. *Hum Pathol* 25 : 797—801, 1994
- 27) Hollowood K, Macartney JC : Reduced apoptotic cell death in follicular lymphoma. *J Pathol* 163 : 337—342, 1991
- 28) Araki S, Shimada Y, Kaji K, Hayashi H : Apoptosis of vascular endothelial cells by fibroblast growth factor deprivation. *Biochem Biophys Res Commun* 168 : 1194—1200, 1990
- 29) Robaye B, Mosselmans R, Fiers W, Dumont JE, Galand P : Tumor necrosis factor induces apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells in vitro. *Am J Pathol* 138 : 447—453, 1991
- 30) Hanneken A, Luty GA, McLeod DS, Robey F, Harvey AK, Hjelmeland LM : Localization of basic fibroblast growth factor to the developing capillaries of the bovine retina. *J Cellular Physiol* 138 : 115—120, 1989
- 31) Devis E, Landau J : The influence of adrenalin on the small blood vessels in normotension and hypertension. *Bibl Anat* 9 : 1—6, 1967
- 32) Landau J, Davis E : Capillary thinning and high capillary blood-pressure in hypertension. *Lancet* 29 : 1327—1330, 1957
- 33) Gobe GC, Browning J, Etheridge MR, Winterford C, Petrie J, Cross RB : A role for apoptosis (programmed cell death) in the pathogenesis of microvascular rarefaction in hypertension. *International Symposium on Cell and Molecular Biology of Apoptosis*. Brisbane, Australia. 1992, pp 9
- 34) O'Shea JD, Hay MF, Cran DC : Ultrastructural changes in the theca interna during follicular atresia in sheep. *J Reprod Fert* 54 : 183—187, 1978
- 35) Azmi TI, O'Shea JD : Mechanism of deletion of endothelial cells during regression of the corpus luteum. *Lab Invest* 51 : 206—217, 1984
- 36) Ausprunk DH, Falterman K, Folkman J : The sequence events in the regression of corneal capillaries. *Lab Invest* 38 : 284—294, 1978
- 37) Desmoulière A, Redard M, Darby I, Gabbiani G : Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol* 146 : 56—66, 1995