



Plasminogen activator activity of cultured endothelial cells derived from canine coronary vessel and human umbilical artery and vein

小川, 公二

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

1985-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0512

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000512>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍) お がわ こう じ 小川公二 (三重県)
 学位の種類 医学博士
 学位記番号 医博い第449号
 学位授与の要件 学位規則第5条第1項該当
 学位授与の日付 昭和60年3月31日
 学位論文題目 PLASMINOGEN ACTIVATOR ACTIVITY OF
 CULTURED ENDOTHELIAL CELLS DERIVED
 FROM CANINE CORONARY VESSEL AND
 HUMAN UMBILICAL ARTERY AND VEIN
 (犬冠状血管およびヒト臍帯動、静脈由来の培養内皮細胞のプラ
 スミノゲンアクチベータ活性)
 審査委員 主査教授 松村武男
 教授 岡田安弘 教授 堀 功

論文内容の要旨

概要

この研究の目的は、血管壁からのプラスミノゲンアクチベータ (Plg. Act.と略す) の分泌にどの細胞が関与しているかを知ることである。我々はまず、血管をうらうちしている内皮細胞に注目し、研究を行なった。

犬冠状血管が種々の薬物に反応して Plg. Act. を分泌することを、灌流実験により確め、次に冠状血管より内皮細胞を分離、培養し、その培養細胞の線溶活性を調べた。培養2日目の細胞には、Plg. Act. 活性が認められた。このことは、血管壁からの Plg. Act. の分泌には、内皮細胞が関与していることを示唆する。同様の実験をヒト臍帯動、静脈由来の内皮細胞でも行なった。これらの細胞には Plg. Act. 活性が認められなかった。以上のことより、血管内皮細胞の Plg. Act. 合成および分泌は、その由来する血管によりさまざまであることが推察された。

実験方法

犬冠状血管の灌流は、大動脈起始部より灌流液を注入し、静脈洞からの流出液を採取した。

犬冠状血管内皮細胞は、冠状血管内に酵素液 (150 u/ml コラゲナーゼ、0.1% トリプシン含有) を注入、37°C、60分間のインキュベーションにより血管壁より剥離させ、採取した。得られた内皮細胞を洗浄後、10% 胎児仔牛血清 (FCSと略す) を含む培地 199に浮遊し、37°C、5% CO₂、95% air 下で2日間培養した。ヒト臍帯動、静脈の内皮細胞は Jaffé ら (1973) の方法に準じ

て分離し、犬冠状血管内皮細胞と同じ条件下で培養した(ただし、FCSの代わりにヒト血清を用いた)。培養細胞が内皮細胞であるとの同定は、細胞内の血液凝固第VIII因子抗原を蛍光抗体を用いて検出することにより行なった。また、培養細胞を3回の凍結、融解によりホモジネート化し、線溶活性を測定する検体とした。

線溶活性の測定は、¹²⁵I-フィブリンプレート法により行なった。

実験結果

犬冠状血管のPIg. Act. 分泌能

犬冠状血管は、ブラディキニン、アセチルコリン、トロンビン等の薬物に反応してPIg. Act. を分泌することが、灌流実験により認められた。

犬冠状血管内皮細胞の培養とその同定

犬冠状血管から得た細胞を2日間培養した。それらのほとんどは、敷石状の内皮細胞特有の形態を示したが、紡錘状の細胞もわずかながら存在した。これら、紡錘状形態を呈すものを含め、ほとんどの細胞に第VIII因子抗原が認められた。以上のことより、培養細胞は、そのほとんどが内皮細胞と同定された。

犬冠状血管由来培養内皮細胞の線溶活性

培養2日目の冠状血管内皮細胞は、8検体中すべてプラスミノゲン依存性の線溶活性、すなわちPIg. Act. 活性が認められた。プラスミノゲン非依存性の線溶活性は認められず、また、酸処理(pH 2.7, 30分)に不安定な線溶インヒビターの存在も認められなかった。また、培養に使用したFCSには、いかなる線溶活性も認められず、培養細胞がPIg. Act. を培養液より吸着した可能性は否定された。

ヒト臍帶動、静脈由来培養内皮細胞の線溶活性

ヒト臍帶動、静脈の内皮細胞を2日間培養し、それらが第VIII因子抗原を持つことを確かめた。これら培養内皮細胞には、いかなる線溶活性も認められなかった。また、これらの細胞では、培養期間を延長し、“confluent”な状態でも調べたが線溶活性は認められなかった。

考察

犬後肢灌流実験等により、血管壁は、アセチルコリン、ノルアドレナリン、ブラディキニン、トロンビンなどの血管作動物質に反応してPIg. Act. を分泌することが知られている。また、運動後や静脈閉塞後に得られた血漿は、高濃度のPIg. Act. を含んでいることが報告されている。これらのことより、血管壁は線溶系の調節に関与しているものと思われるが、血管壁のどの細胞がPIg. Act. を分泌するかは明らかでない。

そこで本研究ではまず、血管内皮細胞に注目し、内皮細胞が、血管壁からのPIg. Act. の分泌に関与している可能性について検討した。犬冠状血管がPIg. Act. の分泌反応を行なうことを灌流実験によりまず確めた。次に、冠状血管由来の内皮細胞を培養し、その線溶活性を測定した。

培養2日目の犬冠状血管内皮細胞は、PIg. Act. 活性をもつことが明らかとなり、この事実は、内皮細胞が血管壁からのPIg. Act. 分泌に関与する可能性を支持するものである。

過去多くの研究者により、ヒト臍帯血管内皮細胞のPlg. Act. 活性について検索されているが、その活性は認められないか、認められてもわずかであることが報告されている。そこで本研究でも、それらの細胞について、犬冠状血管内皮細胞同様培養2日目と、またこの場合は、“confluent”な状態での線溶活性を調べた。どの増殖段階においても、これらヒト臍帯動、静脈由来内皮細胞には、Plg. Act. 活性は認められなかった。犬冠状内皮細胞とヒト臍帯動、静脈内皮細胞の結果の違いは何によるのか不明であるが、以上の実験結果は、この種の研究にはどの血管由来の内皮細胞を用いるかが、非常に重要であることを示す。

Plg. Act. 活性が培養内皮細胞に認められるという事実は、必ずしも内皮細胞が反応性のPlg. Act. 分泌に関与していることを意味するものではないので、内皮細胞のPlg. Act. 分泌における関与を解明するには、さらに研究が必要である。

論文審査の結果の要旨

従来より、血液中での凝固・線溶系の調節機構における血管壁、特に内皮細胞の役割については注目されてきたところである。

ある種の血管の内腔側に plasminogen activator (PAと略) が存在することは組織化学的方法により明らかにされ、また種々の血管由来培養内皮細胞にも PA活性が認められている。しかし、これらPA活性を示す物質が実際に血液中に放出され、どのように線溶系の活性化の引き金となっているかは不明であり、また過去の研究においてはこの視点が欠けていたと言わざるを得ない。

そこで本研究では、まずPAを反応性に分泌する能力をもつ血管を検索し、その内皮細胞がPA活性を示す物質を含んでいるかどうかを調べ、内皮細胞のPA分泌への関与について検討した。

犬冠状血管が、種々の血管作動物質などに反応してPAを分泌することを血管灌流実験により確めた。次に9頭の犬冠状血管を酵素処理し、内皮細胞を分離・培養した。冠状血管系は、毛細血管から大血管まで大小さまざまな血管より構成され、内皮細胞だけを選択的に分離・培養するのは容易なことではないが、本研究では培養2日目でほとんどすべてが内皮細胞である状態でPA活性を測定し得た。この測定値にばらつきは見られたが、すべての検体にPA活性が認められた。このことは、内皮細胞が分泌に関与していることを示唆するものである。

また、ヒト臍帯血管はヒト由来の組織として、従来より血管壁と線溶系の関係を研究するために多く用いられてきたが、これらの研究からは、線溶系の活性化における内皮細胞の役割について未だ明らかにされていない。そこで、本研究では、犬冠状血管と同様にその内皮細胞を分離・培養し、それらのPA活性について比較検討した。臍帯動・静脈由来の内皮細胞では、培養2日目および細胞の“confluent”な状態においてもPA活性が認められなかった。このことは線溶系調節と内皮細胞の関係を研究する上で、ヒト臍帯血管は適当な材料であり得ないことを示すものである。しかし、何故血管部位によって、PA活性がことなるかは今後の課題である。

以上の結果より、血管壁と線溶系の調節機構を研究するには、動物種を始めとして、それらのどの部位

の血管を用いるべきかが重要な課題であることが示された。本研究は、血管内皮細胞が P A の分泌に関与していることを示唆する段階にとどまるものではあるが、内皮細胞に存在する P A がどのように反応性に分泌されうるものであるかという課題研究のための実験系を提供するものである。

以上、本研究は、出血や血栓の病態解明の *in vitro* 実験系を研究したものであるが、とくに凝固・線溶系の P A 分泌についての血管内皮細胞の役割について、重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。

よって、本研究者は、医学博士の学位を得る資格があると認める。