動脈硬化の組織培養法による研究

—— ^{14}C -コレステロールの動脈組織へのとりこみと、その放出について ——

村 田 克 己*

1) ^{14}C -コレステロールの動脈組織へのとりこみ、および動脈組織よりの放出について、各種の組織培養の条件下で検討した。ヒト胸部大動脈を中心に各部位のヒト動脈組織とともに、一部サルの大動脈組織を使用した。さらに、細胞レベルでのコレステロールのとりこみを、ニワトリの動脈内層細胞、および系統化されたヒト細胞 (HeLa 細胞) を単層細胞として培養し、これを用いて検討した。

2) ヒト大動脈の培養組織への ^{14}C -コレステロールのとりこみは、24 時間～36 時間まで添加時間と正の相関を示した。ニワトリのヒナの大動脈内層細胞の単層培養においても、7 時間までコレステロールの細胞内へのとりこみは、添加時間と正の相関を示した。なお、HeLa 細胞においては 36 時間までこの相関性が認められた。

3) ヒト大動脈組織への ^{14}C -コレステロールのとりこみは 72 時間以降も持続するが、その導入率は漸次減少する。一方、一度とりこまれた ^{14}C -コレステロールの動脈組織よりの培養液中への放出は、数時間まで顕著であるが、以後放出率の漸減をみた。

4) ヒト大動脈組織へのコレステロールのとりこみは、胸部より起始部 (上行部、弓部) に比較的高く、冠動脈により著明であった。このとりこみ率は年齢別にみると、高令者より若年令層にたかい傾向がうかがわれ、屠殺直後のサル大動脈でもっとも顕著であった。

I. 目 的

従来、血流中のコレステロールと動脈硬化に関する研究報告は枚挙にいとまがなく、その関連性を積極的に支持する説と、直接的な関連を否定する報告がある。しかし、動脈壁中のコレステロール含量は、加齢とともに増加する傾向がみられ、さらに動脈硬化では顕著な増加が認められ、有意の相関が報告されている¹⁻³⁾。

酢酸などの前駆物質よりコレステロールの合成が動脈壁で行われているかどうかについては、その賛否は一定していない。少なくとも、動物種によって、かなりの差異がみられるといわれ、ヒト大動脈壁での合成は著しく低いか、あるいはほとんど否定である。

したがって、動脈硬化の主役をなす動脈壁のコレステロールは、動脈壁で合成されるよりもほとんど血流中よりの移行によって行われると考えられる⁴⁻⁶⁾。ここでは、

ヒト動脈を中心に、サル、ニワトリの動脈の組織培養を行い、 ^{14}C -コレステロールのこれら動脈組織へのとりこみと、その放出についての基礎実験を行った。また、 ^{14}C -コレステロールのとりこみを確認する目的で、ニワトリのヒナの動脈細胞および、ヒト細胞 (HeLa 細胞) を用いて、細胞レベルでの検討を行った。

II. 実 験 方 法

1) 使用した動物 (ニワトリ、サル) の動脈は屠殺後、およびヒトの動脈は剖検後あるいは手術時、なるべくすみやかに摘出し、無菌的に外膜を剥離した。動物よりの動脈はおもに大動脈 (一部腕動脈) であり、屠殺後ただちに使用できたが、ヒトの場合は、手術時をのぞき死後時間、4 時間より 19 時間に及んだ。組織の自己融解をさけるため、ヒト組織での実験は、なるべく冬期に行った。対象は各年齢層にわたり、動脈の肉眼的に正常部位を選んだ。胸部大動脈を主体に実験を行ったが、一部上行大動脈、大動脈弓部、冠動脈を用いた。

内膜、中膜を含む動脈組織は、これを細断して小切片

* K. Murata : 東京大学医学部物療内科 : 東京都文京区本郷 7-3-1.

受付 : 1970 年 2 月 17 日.

とした。一実験群あたり、無選択に数個以上の動脈組織切片を含むようにし、実験群間の相互の一様性をはかった。これを、Eagle の minimum essential medium (MEM)⁷⁾にコウシ血清を 10% の割合で加えた標準培養液 10~15 ml に浮遊させて培養フラスコ (底面積約 10cm²) に入れ、37°C の恒温槽の中で組織培養を行った。

¹⁴C-4-コレステロール 50 μ C (比活性 30mC/mM, 0.5ml-Benzen に溶解したもの) は、New England Nuclear Co. よりのもので、10 μ l あたり 0.1 μ C (0.86 μ g) の濃度にして使用した。

2) 一部の実験では、ニワトリのヒナ (生後 3 週) の大動脈、腕動脈を屠殺後、ただちに摘出し、無菌的に、外層を剝離した。この動脈内層を燐酸バッファーに入れ、0.25% のトリプシン液を加えて、一夜 4°C に保存後、ピペットで約 5 分間繰返し吸引、圧出して細胞を分離した。えられた動脈単細胞を培養液 ml あたり 10⁶ の細胞数の割合で Falcon フラスコ中に入れ、MEM 液および 10% コウシ血清で培養した。数日の培養後、¹⁴C-4-コレステロールを 0.1 μ C-0.5 μ C/ml 添加して動脈細胞へのとりこみを検討した^{8,9)}。

3) 細胞の種類における ¹⁴C-コレステロールとりこみの差異を比較するため、系統化されたヒト細胞、HeLa 細胞を使用した。その培養方法は既報に準じて行なった¹⁰⁾。

なお、とりこまれた ¹⁴C-コレステロールは組織切片の場合は、ハイアミンまたは苛性ソーダで処理後、liquid scintillation spectrometer で測定し、さらに既知活性の ¹⁴C を添加して quench を検討し、その活性を補正した⁹⁾。細胞培養の場合には、Folch 法¹¹⁾で抽出、洗浄後、micro electric balance で総脂質重量を秤量した。その後、エタノールで繰返し溶出して、その活性を上記方法で測定した。また一部では、細胞数を算定して、細胞数あたりの活性として、そのとりこみを測定した¹⁰⁾。

III. 実験結果

実験1. ヒト動脈組織への ¹⁴C-4-コレステロールの経時的とりこみ

前記実験方法に従い、71才男子の大動脈組織細片を培養フラスコに入れ、これに ¹⁴C-4-コレステロールを 0.5 μ C/ml MEM の割合で、15 ml の培養液に加えた。これを 20 日間にわたり、培養切片を数個ずつ、任意の間隔をおいてとりだし、MEM で 3 回洗浄後、組織内へとりこまれた ¹⁴C の活性を乾燥重量単位で測定した。

図 1. ¹⁴C-cholesterol uptake in human aortic tissue of 71 year old male

表 1 ¹⁴C-4-cholesterol incorporation into human arterial tissue in organ culture

¹⁴ C-4-cholesterol added	¹⁴ C-activity $\times 10^5$ CPM		
	Cultured media	Arterial tissue	Ratio
0.1 μ C (0.86 μ g)	797	1,430	1.79
0.2 μ C (1.72 μ g)	1,424	2,074	1.46

¹⁴C-4-cholesterol was added in 8 sets in each group of human arterial tissues grown in Leighton tube with 2 ml of Eagle's minimum essential medium. The determination was made after 9 days incubation with ¹⁴C-cholesterol.

その結果、培養 48 時間まで、ほぼ一定のとりこみを示したが、その後とりこみ率が 48 時間以前に比し減少し、20 日まで漸減している (図 1)。

¹⁴C-コレステロールの濃度差によるとりこみの変動を Leighton tube 中で動脈組織を固着させて、検討したのが表 1 である。この実験条件下では濃度を 2 倍に増加しても動脈組織中の活性は同率の増加を示さず、1.4 倍にとどまった。また、動脈組織中の全活性を、培養液中の活性と比較した場合、コレステロールの濃度が低い方が、動脈組織へとりこまれる率がたかいことが認められた。

実験2. ニワトリのヒナ大動脈内層細胞および HeLa 細胞への ¹⁴C-コレステロールのとりこみ

培養後 5 日間、ニワトリ初代動脈の単層細胞に、¹⁴C-コレステロールを MEM 1 ml につき 0.1 μ C の割合で 48 個の Falcon フラスコに添加して、動脈細胞へのとりこみを検討した。その結果は、表 2 に示すように、¹⁴C-コレステロールの動脈細胞中へのとりこみが、顕著に認められた。7 時間までの観察では、そのとりこみは、incubation 時間と正の相関を示した。これは、2 回の実験で、いずれもほぼ同様のとりこみを示した。この場合、細胞内比放射活性は総脂質量に対する割合で比較し

表2. Effect of incubation time on ^{14}C -4-cholesterol incorporation into chick aortic cells in culture

	Specific activity of ^{14}C -cholesterol (dpm/ μg of total lipids)			
	1 h	2 h	4 h	7 h
1st run	30.9 $\pm$ 0.7	60.4 $\pm$ 2.4	131.6 $\pm$ 2.3	254.6 $\pm$ 7.4
2nd run	25.9 $\pm$ 0.5	55.2 $\pm$ 2.8	116.4 $\pm$ 1.7	214.8 $\pm$ 11.3

^{14}C -cholesterol was added at the rate of 0.1 $\mu\text{C}/\text{ml}$ with 5 ml of Eagle's minimum essential medium in 5 day-old chick aortic monolayer's cells.

Incubation was made for the indicated hours at 37°C.

Numbers indicate means and standard errors.

ている。

つぎに、 ^{14}C -コレステロールのヒト細胞へのとりこみを分化した HeLa 細胞を使用して観察した。図 2 に示すように、 ^{14}C -コレステロールのとりこみは、一定細胞数あたりで比較したところ、24 時間まで、添加時間とほぼ正の相関を示した。以後 48 時間まで、そのとりこみは持続するか、あるいはややとりこみ率の減少をみた。この 48 時間を最大とりこみとして、以後コレステロールのとりこみは減少した。

図 2. ^{14}C -cholesterol incorporation into HeLa cells in monolayer culture

実験 3. ヒト大動脈組織切片へとりこまれた ^{14}C -4-コレステロールの運命

前記実験と同じく、ヒト大動脈組織切片を培養フラスコ 36 個に入れ、 ^{14}C -4-コレステロールを培養 MEM 1 ml あたり 0.5 μC 添加して、120 時間 37°C で培養した。その後アイソトープ添加 MEM を捨て、大動脈切片を MEM で洗浄した。この大動脈組織切片にとりこまれた ^{14}C -ラベル-コレステロールの放出率をみるため、この組織切片を新しい MEM に換え、さらに培養を継続した。そして、経時的に大動脈組織切片にとりこまれている ^{14}C の放射活性を測定し、これを乾燥組織重量あたりの比活性として算出した。図 3 はその結果で 3 ない

し 4 の実験群よりえられた平均値を示す。図より明らかとなり、数時間の MEM 培養で組織中に残在する比放射活性は $1/2$ に減少し、以後、漸次、その減少をみ、80 時間後では、前値の約 $1/5$ に減少した。

図 3. Activity of ^{14}C -4-cholesterol in aortic tissue after incubation with Eagle's minimum essential medium with 10 % calf serum at 37°C. The aortic tissue was pretreated with ^{14}C -cholesterol (0.5 $\mu\text{C}/\text{ml}$) for 120 hours at 37°C.

実験 4. ヒト大動脈にとりこまれた ^{14}C -4-コレステロールの培養液中への放出

前記実験 3 と同一条件で、ヒト大動脈細片培養フラスコに ^{14}C -4-コレステロールを添加し、これを MEM 中で 120 時間培養した。 ^{14}C -コレステロール含有 MEM を捨て、新鮮な MEM で数回大動脈切片を洗浄後、この大動脈切片を 37°C で 192 時間培養した。培養期間中一定量 (10 ml) の新鮮 MEM で繰返し洗浄し、洗浄液中の ^{14}C の放射活性を測定した。その結果、実験開始後約 10 時間まで、比較的たかい ^{14}C -コレステロールの MEM 中への放出がみられ、前実験の大動脈組織中よりの減少と、逆の相関を示した (図 4)。ついで、24 時間までこの放出程度はやや減少し、以後、漸次減少傾向をみている。したがって、全体的に MEM 中への放出放

図 4. Radioactivities of ^{14}C -4-cholesterol released in the culture media from aortic tissue (4 month female). The tissues were exposed with ^{14}C -cholesterol for 120 hours as pretreatment. The vertical lines indicate the count distribution.

射活性をみれば、大動脈切片中に残存する放射活性も、推定しうるわけである。しかし、MEM 中の放射活性測定は洗浄条件により、必ずしも、一定値をうることがむずかしい。したがって以下の実験では、いずれも、組織切片中の放射活性を測定した。

実験 5. ^{14}C -コレステロールのヒト大動脈組織へのとりこみ

コレステロールのヒト大動脈組織へのとりこみを、51～71才のヒト大動脈について検討した。大動脈の上行部、弓部、胸部および冠動脈の肉眼的に正常部位をえらび、各部位より、乾燥重量にして 50～100 mg の動脈組織をとり、これを実験方法に述べたようにできるだけ、一様な細片とした。これに MEM 10 ml あたり 0.5 μC の ^{14}C -コレステロールを添加して、37°C 5 日間インキュベートした。この後、動脈組織の乾燥重量の測定および

表 3. Comparison of ^{14}C -cholesterol incorporation into different regions of human aorta

Sample	Specific activity $\times 10^5$ CPM/mg of dry tissue weight			
	Ascending aorta	Arch portion	Thoracic aorta	Coronary artery
71 year-old female 6 hour's postmortem	0.42	0.33	—	—
57 year-old male 5 hour's postmortem	—	0.49	0.45	—
57 year-old female 19 hour's postmortem	0.49	0.62	0.40	2.85
51 year-old female 19 hour's postmortem	0.50	0.41	0.36	2.97

^{14}C -cholesterol (0.5 μC per 10 ml of media) was incubated for 5 days at 37°C with small segments of aorta, 50 to 100 mg in dry weight.

Determination was made in duplicates.

表 4. Incorporation of ^{14}C -cholesterol into thoracic aortic tissue in various ages

Sample No.	Age	Sex	Postmortem hour	^{14}C -count $\times 10^5$ CPM/mg dry weight
W. M (1)	58 year	female	5	1.65
1.	57 year	female	19	0.40
W. (1)	57 year	male	5	0.45
W. (2)	51 year	female	19	0.36
W. (3)	16 year	—	—	1.60
CH (1)	6 year	female	10	1.90
CH (2)	3 year 10 month	female	10	1.35
9.	12 month	—	6-1/2	1.06
12.	4 month	—	18	4.25
11.	9 day	—	16	10.20
WM. (3)	3 day	—	15	4.00
Monkey			immediately	14.90

The thoracic aortic tissues were incubated with 0.5 μC of ^{14}C -4-cholesterol in Eagle's minimum essential medium for 5 days at 37°C.

^{14}C の活性測定を行い、 ^{14}C の比活性を乾燥重量あたりで表示したのが表3である。少数例にはあるが、大動脈では起始部に近いほど、コレステロールのとりこみがたかい傾向がえられた。すなわち、上行部位または弓部にたかく、ついで胸部にコレステロールのとりこみの漸減がみられる。また冠動脈へのとりこみは、大動脈に比較すると数倍たかい結果をえた。

これをさらに、各年令別に ^{14}C -コレステロールの胸部大動脈組織へのとりこみを示したのが、表4である。とりこまれた ^{14}C -コレステロールの活性は高令者ではかなりの変動がみられるが、若年者になるほど大動脈組織におけるそのとりこみの増加がみられた。屠殺直後のサルの大動脈においては、さらに著しい ^{14}C -コレステロールのとりこみが認められた。 ^{14}C 活性は死後時間とは必ずしも一定の関連はえられていない。しかし、同一動脈組織について、経時的な検討を行えば、その相関性も見出しうる可能性が残されている。

IV. 考 案

*In vitro*における各種組織のコレステロール合成系について、数多くの成績がある⁴⁻⁶⁾。たとえば、血液成分それ自身、 ^{14}C -酢酸よりコレステロールの合成能を有する報告もあり、この場合、動物種でかなりの合成能に差があるが、ウシ、ブタの血液ではこのコレステロール合成が比較的たかいという¹³⁾。しかし、動脈組織でのコレステロール合成、あるいは、血流中のコレステロールの動脈壁中への移行については、いまだ、いろいろの問題が残されている⁵⁾。Azarnoff¹⁴⁾は各種動物の動脈壁におけるコレステロールの合成について比較検討している。そして、 ^{14}C -酢酸よりステロールへの合成を digitonide さらに、dibromide として結合沈殿物の放射活性を測定し、ニワトリ、ウサギ、モルモットではコレステロールの合成が行われることを認めている。一方、ヒト、イヌ、ネコ、ネズミの動脈壁では、digitonide として沈殿するが、dibromide では、まったく捕捉されないと報告し、コレステロールの合成を否定している。現在でも、大動脈組織でのコレステロール合成には未解決の問題があり、大部分の動脈組織中のコレステロールは血液中よりの移行によって行われると考えられている。

著者は、ヒト、サル、ウサギ、ニワトリの動脈細胞につき、その単層細胞培養に成功した¹⁵⁾。しかし、ヒト高令者動脈では、容易に外的条件に順応できるいわゆる正常内層細胞の活性を保持した動脈組織をうることは困難

である。これは、加齢、および動脈硬化性変化による細胞の生活活性の低下が、原因と想定される。また、死後経過時間が比較的長いために、動脈組織の自己融解とこれに伴う動脈細胞の代謝能の低下が起り、細胞培養を行うために十分な細胞活性が消失するためと考えられる。

また、生活活性の残存する動脈組織をえても、これを組織培養として、その活性率をどの程度維持できるか問題となる。表1にみるように Leighton tube 中でヒト動脈切片をフィブリンクロットで培養板上に固着して、組織片から細胞の増殖が行われることを観察し、これを基礎実験に使用することができる¹²⁾。しかし、ヒト動脈でこの方法により代謝の実験に必要とする十分な細胞をうることはきわめてむずかしい。したがって、本実験では、冬期、自己融解の起こりにくい条件下で、死後なるべくすみやかに、えられた動脈組織を細片とし、数個以上を一実験群として、一つの培養瓶中に入れて実験に用いた。また、使用したアイソトープは、あらかじめ一定量を同一培養液に入れて、放射活性の一定をはかった。

実験1でみられるように、コレステロールは、経時的に細胞外液より、動脈組織の中にとりこまれるが、そのとりこまれる割合は漸次低下していく。これは、組織中のコレステロールが飽和状態になるためか、細胞活性が漸次低下することに起因するか不明である。また、動脈組織中の細胞活性を一定に保つことはむずかしいので、いわゆる物理的な吸収効果による組織内導入も考慮されなければならないであろう。

一方、著者は微量のアイソトープを利用して、培養動脈細胞における代謝を細胞レベルで測定しうることに成功した^{8,16,17)}。この方法によれば、実験2で示されたように、 ^{14}C -コレステロールの動脈細胞中へのとりこみが認められる。さらに ^3H -コレステロールの細胞中の細胞質へのとりこみも確認されている¹²⁾。

このニワトリ内層動脈細胞への ^{14}C -コレステロールのとりこみは、本実験に使用した濃度では7時間まで incubation 時間と正の相関を示し、ヒト HeLa 細胞での観察でも 24~48 時間、この相関性の持続が観察された。

また、一度動脈組織にとりこまれたコレステロールも、細胞外液のコレステロール濃度が希釈された場合には、経時的に動脈組織より放出されていくことが観察された。しかし、この場合、実質動脈細胞を使用した細胞レベルでの検討が欠いているので、これがどの程度物理的拡散

によるものか、検討の余地が残されている。

この ^{14}C -コレステロールのとりこみは、冠動脈に顕著で大動脈では起始部および、弓部に多く、胸部大動脈では漸減する結果をえた。これは、大動脈の部位により、組織活性が異なることを意味する。村田は無処置サル (*Saimiri sciureus*) に ^3H -サイミジンを投与し、大動脈細胞核への分布 (DNA へのとりこみ) をみたが、DNA の合成は、動脈硬化の初期変化の多い、上部大動脈に顕著であり、その内層のとくに細胞増殖、細胞肥大 (hyperplasia) 部位に、とりこみの増加を認めている¹⁸⁾。これらの所見は、大動脈上部に比較的細胞活性および組織活性がたかいことを示唆しており、このため、コレステロールのとりこみも比較的たかいものと想定される。以上の結果は、ヒト大動脈部位における動脈硬化の発生頻度と照合して、興味ある所見と思われる。

年令別に胸部大動脈組織にとりこまれる ^{14}C -コレステロールの活性を比較した場合、生後、数日より数ヵ月の若年動脈組織に顕著な活性の増加がみられた。このコレステロールのとりこみは、成年および高令者では、一定範囲内の比較的低下活性を示し、高令者で低下活性の減少傾向をみた。ここにおいても、加齢による実質細胞数の減少、ならびに細胞活性の低下が推定される。一方、屠殺直後のサル動脈組織に ^{14}C -コレステロールのとりこみが増加している事実は、このような実験条件下で、かなり細胞活性のたかい組織が生存していることを示していると思われる。

以上の実験は、動脈組織培養を用い、生体内の動脈壁代謝を *in vitro* で追求しようとした試みである。したがって、この結果を、多角的な代謝を営む生体動脈組織代謝と直接むすびつけることはむずかしい。しかし、動脈硬化の進行が、生検の不可能な血管腔内で行われている以上、これを組織レベルないし、細胞レベルで、その代謝を検討する必要がある。したがってこれらの方法は、動脈組織へのコレステロールの移行、放出など、その turnover を適確に把握する上において、有効な手段と考えてよいのではあるまいか。

大島教授のご指導ならびにご校閲に深謝します。

なお本研究の一部は生命保健協会の研究助成金によって行われたものである。岡本富美氏のご助力に感謝する。

文 献 1) Smith, E. B., Evans, P. H. and Downham, M. D.: Lipid in the aortic intima, The correlation of

morphological and chemical characteristics, *J. Atheroscler. Res.* **7**: 171, 1967. 2) Böttcher, C. J. F., van Houte, E. B. Haar Romeny-Wachter, Woodford, F. P. and Gent, C. M.: Lipid and fatty acid composition of coronary and cerebral arteries at different stages of atherosclerosis, *Lancet* **ii**: 1162, 1960. 3) Kirk, J. E. and Dyrbye, M.: Hexosamine and acid-hydrolyzable sulfate concentrations of the aorta and pulmonary artery in individuals of various ages, *J. Gerontol.* **11**: 273, 1956. 4) Day, A. J. and Wilkinson, G. K.: Incorporation of ^{14}C -labeled acetate into lipid by isolated foam cells and by atherosclerotic arterial intima, *Circulation Res.* **21**: 593, 1967. 5) Zilvermit, D. B.: Cholesterol flux in the atherosclerotic plaque, *Ann. New York Acad. Science* **149**: 710, 1969.

6) Hashimoto, S. and Dayton, S.: Transfer of cholesterol and cholesteryl esters into wall of rat aorta in vitro, *J. Atheroscler. Res.* **6**: 580, 1966. 7) Eagle, H.: Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture, *Science* **122**: 501, 1955. 8) Murata, K., Quilligan Jr., J. J. and Morrison, L. M.: Growth of chick aortic endothelial cells: incorporation of tritiated uridine and thymidine, *Experientia (Basel)* **21**: 637, 1965. 9) Murata, K.: Suppression of lipid synthesis in cultured aortic cells by laminaran sulfate, *J. Atheroscler. Res.* **10**: 371, 1969. 10) 村田克己: 培養ヒト細胞の生長におよぼすムコ多糖の効果について, 結合組織 I (No. 2), **1**, 1970.

11) Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G. H.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue, *J. Biol. Chem.* **226**: 497, 1957. 12) Murata, K.: Synthesis and transport of cholesterol in aortic cells: Radioisotopic studies in cell culture, *Experientia (Basel)* **24**: 1111, 1968. 13) Raut, V. S., Fish, C. A. and Pincus, G.: Biosynthesis of cholesterol in animal blood, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **99**: 534, 1958. 14) Azarnoff, D. L.: Species differences in cholesterol biosynthesis by arterial tissue, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **98**: 680, 1958. 15) 村田克己: 細胞培養よりみた動脈壁代謝, 脈管学, **9**: 184, 1969.

16) Murata, K., Quilligan Jr., J. J. and Morrison, L. M.: Suppressing effects of histamine on lipid synthesis in chick aortic cells, *Nature (London)* **213**: 1030, 1967.

17) Murata, K. and Furuhashi, T.: Inhibition of lipid synthesis by chondroitin polysulfate in cultured chick aortic cells, *Biochim. Biophys. Acta* (Amsterdam) **176**: 432, 1969. 18) Murata, K.: Tritiated thymidine

incorporation into aortic cells in vivo: Cell regeneration in spontaneous atherosclerosis in monkey. *Experientia* (Basel) **23**: 732, 1967.

Abstract

Studies on Atherosclerosis by Tissue Culture

—Uptake and Release of ^{14}C -Labeled Cholesterol in Arterial Tissues—

Katsumi Murata*

1) ^{14}C -cholesterol incorporation into arterial tissues and the release from the tissues were studied under various conditions of the tissue culture. The arterial tissues of various portions of human arteries as well as monkey aorta were used for the experiment. In addition, ^{14}C -cholesterol uptake into the cells was examined at cellular level using the monolayer cultures of chick aortic cells and HeLa cell lines.

2) ^{14}C -cholesterol uptake in human aortic tissue was associated with the incubation time for 36 hours. Moreover, the linear relationship between incorporation rate and incubation time also observed in chick aortic cells for 7 hours and also in HeLa cells for 36 hours.

3) Thus, the incorporation of ^{14}C -cholesterol was shown over 72 hours but the rate decreased gradually afterwards. Contrariwise, the release of ^{14}C -cholesterol from arterial tissue into media was clearly observed for several hours, and then the releasing rate was decreased.

4) The uptake of ^{14}C -cholesterol was comparatively higher in the ascending and arch portions than thoracic aorta and the greatest uptake was found in the coronary artery. The incorporation rate in the thoracic aorta trended to be much higher in young subjects than aged ones and it was demonstrably high in monkey thoracic aorta prepared immediately at postmortem.

*

*

*

*

*

*

* Department of Physical Therapy and Medicine, University of Tokyo School of Medicine. Hongo. 7-3-1, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan.