流血中内皮細胞に関する研究*

岩 田 芳 郎** 早 川 道 彦** 藤 田 勝 成**
加 藤 庄 志** 牛 込 裕 代** 大 原 清 仁**
吉 峯 徳** 葛 谷 文 男**

I. はじめに

血管内皮細胞の損傷は、動脈硬化、血栓形成、炎症において、重要な役割を演じ、その最初の引き金になるのが、血管内皮細胞の剥離離開であると考えられる。Bourier¹⁾, Hladovec²⁾ らは、流血中に血球細胞成分以外の細胞成分が存在することを見出し、血管固有の内皮と比較検討し、内皮細胞であると報告している。

昭和55年度日本動脈硬化学会冬季大会においてわれわれも、ヒトについて Hladovec ら²⁾ の方法に準じて検討し、Giemsa 染色, Ruthenium Red 染色にて観察したことを報告した。今回われわれは、さらに抗ヒト第 VIII 因子蛍光標識血清を用い、直接蛍光抗体法により、これらの細胞を観察した。また動脈血についても検索した。

II. 対象および操作

健常男性14人と健常女性8人および慢性透析患者5人のグループを、対象とした。

今回、透析患者は、透析中体外循環の動脈側 tube より採血した。細胞数の count, Giemsa 染色, Ruthenium Red 染色を行ったがこれらの実験方法の詳細については、以前報告した³⁾。さらに Fig. 1 に示した方法により直接蛍光抗体法も行った。方法は、5 分間 alcohol 固定した標本をリン酸 buffer (以下 PBS と略す。) で 5 分間洗浄、これに 10 倍希釈した抗ヒト第 VIII 因子蛍光標識血清をのせ 30 分間暗所にて保存する。その後 PBS 液にて 10 分

間洗浄振盪させる。

次に glycerin buffer (glycerin 9 : PBS 1) にてカバーガラスをかけ包埋する。これを蛍光顕微鏡にて鏡検する。

III. 結 果

Fig. 2 は、それぞれのグループにわけて細胞を count した結果である。健常男性の平均は、約 2.77 個/9 μ l PRP, 健常女性の平均は、約 2.74 個/9 μ l PRP, 透析患者の平均は、約 1.8 個/9 μ l PRP で、それぞれ有意差はなかった。

Giemsa 染色したものは、以前報告した様に細胞には、核がないものが多く、多角形を呈し、時に細胞の重なりや、折れ曲った状態のものも見られた³⁾。Ruthenium Red 染色にても前に報告した様に、Ruthenium Red により細胞膜が赤く染まっているのが観察された³⁾。Fig. 3 a, b, c は、蛍光抗体法により染色されたものを、400 倍にて鏡検したものである。Giemsa 染色, Ruthenium Red 染色で染色されたのと同様な細胞の細胞全体が蛍光を発しているのが観察された。Fig. 3 a, b は健常人, Fig. 3 c は透析患者のものである。

IV. ま と め

以前報告した様に、文献的にも Bouvier ら¹⁾ は、流血中に内皮細胞の存在を認め Hladovec ら²⁾ は、ラットでの流血中での内皮細胞数を定量し、種々の血管刺激物質により流血中内皮細胞数が増加すると述べ、またヒトにおいて心筋硬塞でも増加すると報告している⁴⁾。われわれは Hladovec らの方法に準じて、血液の中に血球成分以外の細胞成

* 1981年5月、第13回日本動脈硬化学会において発表

** 名古屋大学医学部老年科

分が存在することを, Giemsa 染色, Ruthenium Red 染色にて観察し, さらに今回この細胞が抗ヒト第VIII因子蛍光標識血清にて染色されたことより, この細胞が血管内皮細胞由来のものである可能性が強いと思われた. また採血時に血管を穿刺するため内皮細胞がはがれ, 混入する可能性もあると考えられるため, 今回は, 人工透析中の患者の体外循環における, 動脈側 tube より採血したが, この検体にも細胞が存在することより血管内を流れている細胞であることが強く示唆され, 今後, 形態学的, ならびに代謝学的にもこの細胞を, 検討する必要があると考えられる.

文 献

- 1) Claude Bouvier, Evelyn Gaynor, Thodore H. Spaet: Vascular lesions; Possible pathogenetic basis of generalized. Swartman Reaction Science, 986, Vol. 170. 986-988
- 2) Josef Hladovec, Pavel Rossman: Circulating endothelial cells isolated together with platelets and the experimental modification of their counts in rats. Thrombosis Research. Vol. 3. pp. 665-674 (1973).
- 3) 岩田芳郎, 吉峯徳, 葛谷文男, 他: 流血中に内皮細胞は存在するか. 動脈硬化, 9: 617-621 (1981).
- 4) J. Hladovec, I. přerovsky, V. Staněk, J. Fabián: Circulating endothelial cells in acute myocardial infarction and angina pectoris. Klin. Wochenschr. 56: 1033-1036 (1978).

Fig. 1 螢光抗体法

Fig. 2 Endothelial cells in the blood of normal subjects, and of hemodialysis patients.

Summary

Studies on Circulating Endothelial Cells in Human Blood

Yoshio IWATA, Michihiko HAYAKAWA, Katsunari FUJITA, Shoji KATO,
Yasuyo USHIGOME, Kiyoji OHARA, Noboru YOSHIMINE and Fumio KUZUYA

The Department of Geriatrics, School of Medicine Nagoya University

It has been known that exfoliation of endothelial cell is a factor of atherogenesis. Already, we reported that we observed the circulating exfoliated endothelial cells in man by Hladovec's method with Giemsa staining and Ruthenium Red Staining.

In the present study, we examined these cells with direct immunofluorescent staining using anti-human factor VIII serum.

This study was performed on 14 healthy men, 8 healthy women and 5 hemodialysis patients.

The blood was collected from extracorporeal artificial vessel in hemodialysis patients.

Results obtained were as follows;

- (1) The average numbers of the circulating endothelial cells were 2.77 cells/9 μ l PRP in men, 2.74 cells/9 μ l PRP in women, and 1.8 cells/9 μ l

PRP in hemodialysis patients respectively.

- (2) The diameter of these cells is about 20–50 μ m in average.
- (3) The circulating endothelial cells showed, as a rule, polygonal shape, often with folded or rolled suggesting a marked flatness in Giemsa staining.
- (4) The membrane of the cell was stained with Ruthenium Red.
- (5) In the fluorescent staining, we could observe the intense fluorescence in the cell with anti-human factor VIII serum.

These results were confirmed that the endothelial cells existed in the blood stream.

Key words: endothelial cell, anti-human factor VIII serum.