陽圧環境下における培養血管内皮細胞・平滑筋細胞 の増殖と機能*

徳 永 藏**† 森 松 稔** 中 島 輝 之**

I. はじめに

粥状硬化は主に大動脈にみられ、静脈や肺動脈では通常みられないか、あってもごく軽度である。しかし腎透析患者の静脈グラフトや門脈圧亢進症時の門脈においては、静脈にもかかわらず著明な内膜肥厚が起こってくる¹⁾。また肺高血圧症患者の肺動脈でも、著明な内膜肥厚と肺動脈粥状硬化病巣の増加がしばしばみられる。小血管や毛細血管では通常、粥状硬化はみられないことから、血圧そのものが(正常血圧も含めて)動脈硬化の initiation と進展に関係していることが考えられる。

今回は血圧に対する血管内皮細胞と平滑筋細胞の反応を検討する目的で、圧力容器内でおおの細胞を培養し、その変化を観察し、圧力を加えない場合と全く違った結果を得たので報告する。

II. 材料および方法

内皮細胞は Dispase により人臍帯静脈より^{2,3)}、平滑筋細胞は臍帯動脈より Ross ら⁴⁾の方法に従って分離し、継代による細胞の変化をでき得る限り避けるように、それぞれ2継代目、3継代目の細胞が使用された。圧力容器は大型の培養瓶を使用し、5% CO₂+95% air 混合気体にて 0 mmHg (大気圧)、40, 80, 120, 160 mmHg、一部 200 mmHg

加圧することによって、陽圧環境を作製して細胞増殖、光顕、電顕所見、プロスタグランジン代謝を検討した⁵⁾。

III. 結果および考察

動脈硬化は内膜肥厚と密接な関係を有し、その内膜肥厚については生理的現象論から病的現象論まで異論の多いところであるが、少なくとも内膜肥厚のない部位には動脈硬化病巣はみられないことは事実である。したがって内膜肥厚の成り立ちを考えることは、動脈硬化の initiation と進展を解明する一つの手段と考えることができる。

この圧力容器内における培養実験系は、in vivo の血管系で実際に起こっているであろう、血圧や血流に対する内皮細胞や平滑筋細胞の動態を追求する目的で行ったものであり、事実、通常の培養条件 0 mmHg とは全く異った生物学的反応が観察された。すなわち内皮細胞は圧による影響が大で、特に 80 mmHg 以上でプロスタサイクリン産生量は極端に減少し (Fig. 1)、形態的には 120 mmHg 以上で変性・壊死が目立つようになり、incubation 日数の増加とともに顕著な変性が起こった。

内皮細胞の増殖は圧によってやや変化を受けるが、平滑筋細胞は200~300倍増殖能が大きく、しかも圧に対してほとんど影響を受けなかった (Fig. 2)。

人の内膜肥厚は生後6か月~1年で急速に起こるが^{6,7)}、その原因として出生時約 60 mmHg の血圧が、生後1週で 100 mmHg に上昇すること

* 1983年12月、日本動脈硬化学会 昭和58年度冬季大会において発表

** 久留米大学医学部病理学第II講座

† 現所属：佐賀医科大学病理学講座

Fig. 1 Prostacyclin synthesis by endothelial cells and smooth muscle cells.

Prostacyclin production showed minimal levels in the endothelial cell sheet cultured at 80 mmHg, compare with the production at 0 mmHg (●—● END) Smooth muscle cells produced very little prostacyclin (○---○ SMC). 5×10^4 cells/well were seeded. Each point indicates the mean $\pm$ SD of quadruplicate determinations.

や⁸⁾, 乳幼児の号泣時の血圧変動が, この実験で得られた内皮細胞の圧の変化に対する脆弱性と, 平滑筋細胞の圧に抵抗する増殖能の結果, 内皮細胞障害とつづいて起こる血清脂質の滲み込み⁹⁾ や, 血小板沈着⁴⁾ が平滑筋細胞の増殖を惹起させるために内膜肥厚が起こる可能性も考えられる。

人の場合, 以後10~20年を経て内膜肥厚は徐々に進行し, やがて粥状硬化の発生を認めるようになる^{6,7)}。

内皮細胞障害時の血小板付着の条件として, 圧力容器実験で得られた, 抗凝固作用を有するプロスタサイクリン産生能の低下と, 凝固促進能を示す thromboxane A_2 産生が 80~120 mm Hg で亢進することや, 内弾性板の露出が大きな役割を果たすと考えられる。

このような内皮細胞障害→血清脂質滲み込み・血小板沈着→平滑筋細胞増殖による内膜肥厚は,

Fig. 2 ³H thymidine incorporation of nuclei in the endothelial cells and smooth muscle cells for the first 2 days.

Endothelial cell growth (●—● end) was maximal at 80 mmHg and minimal at 0 mmHg. Smooth muscle cells (○---○ smc) shown greater incorporation of ³H thymidine than endothelial cells, and they were not affected by changes in the pressure environment. 5×10^4 cells/well were seeded. Each point represents the mean $\pm$ SD of three cultures in duplicate.

circulating endothelium¹⁰⁾ などの考えから, 血管系, 特に圧の高い大動脈では, microscopical な単位で絶えず起こっていることが考えられ, 10~20年繰り返し起こることによって大動脈の diffuse intimal thickening¹¹⁾, さらには粥状硬化へと進展することが考えられる。

文 献

- 1) 内藤寿則: 門脈圧亢進症における肝外門脈の病理形態学的研究. 久留米医学会雑誌, **38**: 1023 (1975).
- 2) Tokunaga, O., Morimatsu, M. and Nakashima, T.: Ring formation of human variant endothelial cells in vitro. Brit. J. Exp. Pathol., **65**: 165 (1984).
- 3) Tokunaga, O., Morimatsu, M. and Nakashima, T.: Growth and functions of endothelial cells cultured in a pressure chamber. Atherosclerosis in submission.
- 4) Ross, R. and Glomset, J.: The pathogenesis of atherosclerosis. Science, **180**: 1332 (1973).
- 5) 徳永 蔵, 野原正敏, 森松 稔, 中島輝之: 培養人血管内皮細胞および平滑細胞に対する陽圧負荷の影響について. 動脈硬化, **11**: 173 (1983).
- 6) 小松良治: 人大動脈内膜の加齢的变化. 久留米医学会雑誌, **39**: 713 (1976).

- 7) 大場憲邦：人中型動脈内膜の加齢的变化. 久留米医学会誌, **41**: 1053 (1978).
- 8) 馬場一雄, 新生児病学. 日本小児医事出版社, 東京, (1971).
- 9) 吉田洋二：動脈内膜細胞. 日本動脈硬化学会昭和58年度冬季大会 (1983).
- 10) 岩田芳郎, 早川道彦, 葛谷文男：流血中内皮細胞. 動脈硬化, **11**: 47 (1983).
- 11) Stout, L. C., Whorton, E. B. Jr. and Vaghela, M.: Pathogenesis of diffuse intimal thickening (DIT) in non-human thoracic aortas. Atherosclerosis, **47**: 1 (1983).

Summary

Growth and Functions of Endothelial Cells Cultured in a Pressure Chamber

Osamu TOKUNAGA, Minoru MORIMATSU and Teruyuki NAKASHIMA

The Second Department of Pathology, Kurume University
School of Medicine, Fukuoka 830, Japan

The culture of endothelial cells and smooth muscle cells were studied in a constant pressure chamber. The following results were obtained: Endothelial cell growth was maximal at 80 mmHg, minimal at 0 mmHg (atmospheric pressure) on the second day of incubation. Cell degeneration began at 120 mmHg. Marked degeneration was noted at

160 mmHg. Conversely, production of prostacyclin was maximal at 0 mmHg and minimal at 80 mmHg. Smooth muscle cell growth and prostaglandin production were not affected by the pressure chamber environment.

Key words: Endothelial cell, Smooth muscle cell, Cell culture, Pressure, Prostacyclin.