

人血管内皮細胞に関する研究

1. 初代細胞培養法の基礎的検討

(内皮細胞/コラゲナーゼ/組織培養)

岸本拓治*, 福澤陽一郎*, 多田 學*

Studies on Human Vascular Endothelial Cells

1. Basic Attempt to Primary Cell Culture

(endothelial cell/collagenase/tissue culture)

Takuji KISHIMOTO*, Yoichiro FUKUZAWA*, and Manabu TADA*

(Received October 31, 1982)

Various conditions of establishing the human endothelial cells in vitro culture were investigated. The endothelial cells derived from umbilical cord veins were collected by enzymatic digestions—with trypsin, collagenase, a mixture of trypsin and collagenase, bacterial neutral protease—and cultured in the synthetic Medium, 199 with 20% preclostrum new born calf serum. In primary culture the endothelial cells were seeded in 35 mm culture dishes for 24 hours and viable cells were counted after dispersing with trypsin. Section specimens of umbilical cords were histologically examined in order to confirm the isolation of endothelial cells from the umbilical cord veins before and after enzyme treatment. The relationship among the elapsed time after delivery till enzyme treatment, fetal Apgar Score and viable cell counts for primary culture were investigated. The treatment with collagenase within 1.5 hours after the delivery was most effective for collecting the endothelial cells. It is supposed that collagenase may act mainly on the subendothelial basement membrane, and damage the membrane of endothelial cells less than trypsin and other enzyme used in the experiment.

要 旨

人血管内皮細胞の in vitro culture の方法に関する培養条件を検討した。内皮細胞層を3種類の蛋白分解酵素処理—trypsin, collagenase, trypsin+collagenase, bacterial neutral protease (Dispase)—によって分散し, preclostrum new born calf serum を最終濃度20%に添加した合成培地199中で開放系静置培養をした。35 mm plastic culture dish に初代培養され, 24時間後に cell sheet を trypsin 処理し細胞数を算定した。臍帯静脈からの内皮細胞剝離をしらべるために酵素処理前後の切片を作製し組織学的に検討した。分娩から臍帯処理までの時間, 及び胎児の Apgar Score と得られた細胞数との関連について検討した結果, 分娩後1.5時間以内に collagenase 処理を行った実験群が, 細胞の収量及び培養の成績において最も効果的であった。collagenase は内皮細胞層下の基底膜に働き内皮細胞層を

* 環境保健医学教室

Department of Environmental Medicine

効率よく剝離し、そのうえ trypsin などとちがって細胞膜への障害も比較的少ないためと推察された。

I. 緒 言

血管内皮細胞は血管壁において細胞の再生、物質の透過など重要な役割をはたすとともに、その障害は炎症、血栓症、動脈硬化などに関連をもっている^{1,2)}。これらの疾患を解明するための一つの手がかりとして、血管内皮細胞の機能や障害の病態を *in vitro culture* のシステムを用いて研究することは有意義である³⁾。そこで、著者らは血管内皮細胞の *in vitro culture* の諸条件について検討したので報告する。人臍帯静脈内皮細胞の培養に関しては丸山⁴⁾ (1963), Fryer⁵⁾ (1965), Gimbrone⁶⁾ (1974), が trypsin 溶液を用いて細胞分散を行い、Jaffe⁷⁾ (1972), Gimbrone⁸⁾ (1975) らが collagenase 溶液を用いて細胞分離を報告している。これらはいずれも化学的分散法⁹⁾ であるが、一方機械的分散法としては Lewis¹⁰⁾ (1973) が眼科用小刀で血管内皮細胞の剝離を行い培養材料を得ている。著者らはより多量で、できるだけ純粋な内皮細胞を得、さらに常時実験可能な培養システムをつくるために長期間継代維持できる内皮細胞を得ることを目標とし、本報では主に多量の細胞採取に有効と思われる消化酵素による分散法を採用し、酵素の種類・使用濃度などの細胞分散の条件を検討した。

II. 研 究 方 法

1. 材料と培地

血管内皮細胞の採取には人臍帯静脈を用いた。分娩後の臍帯を無菌的に入手し、臍帯の長さは 20 cm 以上のものを用いた。材料の新鮮度と細胞収量との関係を見るために、分娩から初代培養開始までの時間は 0.5 時間から 4.5 時間のものを用いた (Table II)。一応、本研究における標準培養液としては Medium 199 (Gibco Labo.) に preclostrum new born calf serum (Nakashibetsu Serum Center, Hokkaido) (以下 PCS と略す) を 20% に添加したものを用い、継代培養には 10% PCS を、HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-ethane sulfonic acid) を 15 mM (pH 7.4) に、penicillin 100 u/ml と streptomycin 120 μ g/ml をそれぞれ添加したものを用いた。

2. 酵素分散法

初代培養における内皮細胞の剝離効果を比較検討するため以下の 3 種類の蛋白分解酵素を用い、4 種の分散法を用いた。1) 0.25% trypsin 溶液 (Ca, Mg を含まない燐酸緩衝液 (以下 PBS(-) と略す) 中に溶解) 2) 125 u/ml collagenase 溶液 (*clostrum histolyticum* type I, Sigma Chemical Company, 燐酸緩衝液中に溶解) 3) 0.25% trypsin 溶液と 125 u/ml collagenase 溶液の 1:1 混合液 4) 1000 u/ml Dispase 溶液 (bacterial neutral protease, 合同酒精株式会社, 東京, Eagle's Medium に溶解)

3. 内皮細胞の初代培養法

無菌的に運ばれた臍帯を約 30 ml の PBS(-) (抗生物質添加) で 1 回洗い約 1 mm 径のカテーテル (アトム株式会社, 東京) を挿入し、注射器で PBS(-) を約 200 ml 注入し、血管内腔を洗浄して血液をできるだけ除去した。その後、臍帯を 4 等分し、それぞれカテーテルを入れ前述の消化酵素液を充滿し、カテーテルを入れたまま臍帯の両端をペアン鉗子でとめ、37°C の恒温器内に 15 分間静置した。次に臍帯中の剝離細胞を遠沈管の中へ PBS(-) 約 10 ml で押しだし 1300 r. p. m., 5 分間遠沈の後、沈渣 (細胞) を 6 ml の Medium

199 (20% PCS 添加) で再浮遊させ 3 枚のプラスチックシャーレ (Tissue Culture Dish 30001, Falcon, USA) に分注し, 37°C, 5% CO₂, 95% 以上の湿度に調整された恒温器内に入れ静置培養を開始した。さらに, 各酵素による内皮細胞剥離作用を組織学的に調べるため酵素処理前後の臍帯切片を 10% ホルマリンで固定, アルコール系列にて脱水後, パラフィン包埋し Leitz-Mikrotome 100 Jahre 型にて 10 μm 厚の切片を作製, 所定の手技により, ヘマトキシリン・エオジン染色して内皮細胞の剥離状態を観察した。また, 各酵素処理による細胞収量を比較するため, 培養開始して 24 時間後に Medium を捨て PBS(-) で 3 回シャーレに付着した細胞を洗い 0.25% trypsin+0.05% EDTA 溶液で処理して細胞分散を行い, 血球計算盤を用いて臍帯単位長さ (1 cm) あたりの生細胞数を算定し, 細胞収量の効果を比較した。

Ⅲ. 研 究 結 果

1. 酵素処理による内皮細胞層の剥離

静脈内壁の内皮細胞層は 1 層からなっている (Fig. 1A)。酵素処理した臍帯では内皮細胞

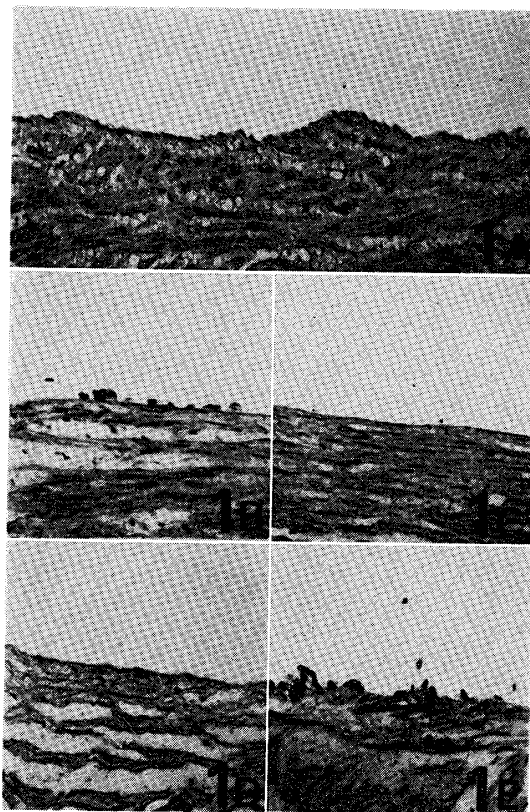


Fig. 1. Photomicrograph of umbilical cord vein. (Hematoxylin and Eosin stain, ×125)

- A. before enzyme treatment
- B. after treatment with trypsin
- C. after treatment with collagenase
- D. after treatment with trypsin+collagenase
- E. after treatment with Dispase

層が脱落している状態が観察され, 酵素のうち collagenase 処理と trypsin+collagenase 処理が内皮細胞層の剥離に, より効果的であり, trypsin 処理と Dispase 処理では部分的に内皮細胞の剥離が悪いことが観察された (Fig. 1C, 1D)。

2. 各処理法にみられる細胞収量

初代培養開始から 24 時間後にシャーレの底面に付着した細胞数（臍帯単位長さ（1 cm）あたり）は、1) collagenase 処理, 2) trypsin+collagenase 処理, 3) Dispase 処理, 4) trypsin 処理の順に多く, collagenase 処理が最も効果的であった (Table I)。さらに, 臍帯の酵素処理時の状態と細胞収量との関連について検討を行った (Table II)。1) 分娩から

TABLE I. Cell Count after 24 Hours in Culture* ($\times 10^3$)

Case of primary culture	Trypsin	Collagenase	Trypsin+Collagenase	Dispase
1	3	60	15	0
2	12	42	2	2
3	10	23	12	13
4	5	20	10	3
5	3	46	7	6
6	4	49	16	0
7	0	28	36	16
8	8	16	16	8
9	0	16	8	16
10	4	1	1	1
M. \pm S. D.	4.9 \pm 4.0	30.9 \pm 17.1	12.5 \pm 7.8	6.5 \pm 6.4

* Cell count : mean of triplicate culture

TABLE II. Conditions of Umbilical Cords Used for the Enzyme Treatment

Case of primary culture	Age of mother	Fetal sex	Apgar Score	Time elapsed after delivery (hr.)
1	28	F*	8	1.5
2	27	M**	9	0.5
3	29	M	9	0.5
4	22	F	8	1.5
5	35	M	8	1.0
6	28	M	10	1.0
7	27	M	4	2.0
8	26	M	8	2.0
9	25	F	8	4.5
10	31	M	8	1.0
Mean	28		8	1.6

* Female ** Male

酵素処理開始までの経過時間をみると 1.5 時間以内に酵素処理を開始した群が比較的細胞収量が良い傾向がみられた。2) 母親の出産年齢は 25~35 才にわたるが, 出産年齢と細胞収量の間には特別な相関は認められなかった。3) 胎児の性別と細胞収量との関係についても差はみられなかった。4) 胎児の Apgar Score は 4 点から 10 点の範囲であったが, Apgar Score と細胞収量との間には特別な相関はみとめられなかった。

3. 初代培養における細胞の特徴

collagenase 処理により得た細胞が増殖して confluent になった状態を位相差顕微鏡により観察すると 2~3 個の大きな核小体をもった卵形の核, 核周辺の顆粒状物質, 周辺がうす

く広い細胞質など血管内皮細胞に特徴的な所見が観察された (Fig. 2)。

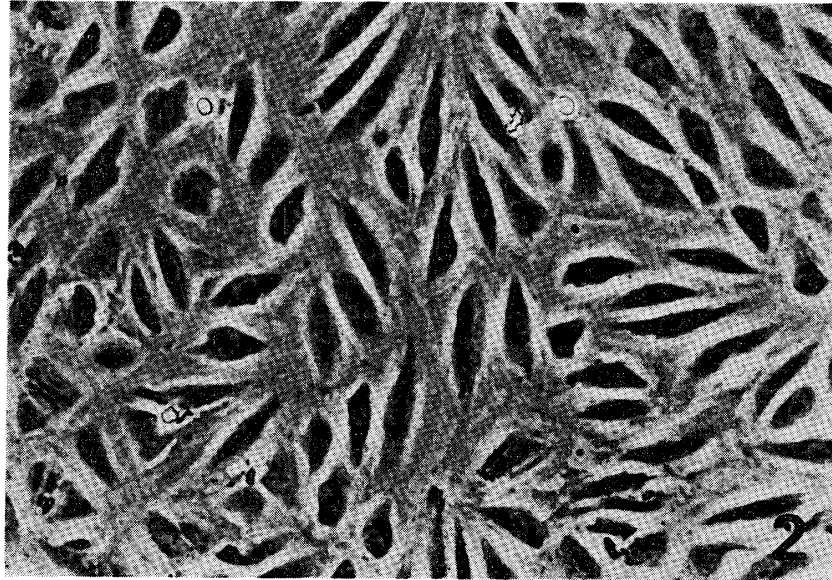


Fig. 2. Photomicrograph of 3-day cultured endothelial cells by phase contrast microscopy. ($\times 200$)

IV. 考 察

人臍帯静脈内皮細胞の培養に関しては内皮細胞の臍帯からの剝離，採集の方法に関する検討がいろいろ試みられているが，現在のところ，最も効率的で正確な方法は確立されていない。従来，trypsin 溶液や collagenase 溶液を用いた細胞分散方法や眼科用小刀を用いた機械的分散方法などが報告されている。これまで使用されてきた 2 酵素に加え新たに trypsin + collagenase 溶液，Dispase 溶液の 4 種の酵素処理法を用いた化学的分散法について比較検討したが，内皮細胞の剝離状態，初代培養 24 時間後の生細胞収量などから最も効果的な酵素処理法は collagenase 単独で行ったときであった。このことは，即ち，collagenase の有効性は内皮細胞層下の内弾性板層に作用して剝がれやすくなるという作用機序と，trypsin などと異なり内皮細胞の細胞膜そのものに比較的障害を与えないという特徴をもつためと考えられる¹¹⁾。trypsin にかわる初代培養用の消化酵素として使用されている Dispase は，trypsin の効果と差は認められなかった。trypsin + collagenase はニワトリ胎児の心筋細胞の初代培養に効果的であったと報告されている¹²⁾が，人臍帯静脈については collagenase よりも細胞収量は少なく，処理時間を長くすると細胞障害が大であった。このちがいの理由は不明だが酵素作用に臓器特異性があるものと思われる。

臍帯の状態については Fryer ら⁵⁾ (1966) は分娩後 3～4 時間以内に初代培養を開始することが必要だと指摘しているが，本研究では Table II に示される通り 1.5 時間以内に初代培養を実施したものが他の条件よりも有効であった。この成績は材料が新鮮なほど培養材料として適していることを示唆している。Gimbrone ら⁸⁾ (1976) は初代培養の成績が不振な場合の理由として胎児血中酸素減少など胎児の状態の悪さによる可能性を指摘しているが，本研究においては胎児の分娩直後の状態を示す Apgar Score と細胞収量との間には特に関連性は認められなかった。

細胞を継代培養により観察すると，最も細胞収量の多かった collagenase による初代培養では単層で confluent な細胞を得たが，継代を約 4 代続けると内皮細胞の増殖が衰え，形態の異なる細胞が出現してきた。このことは初代培養時に少量の異種細胞の混入の可能性が

考えられ、今後継代培養において純粋な内皮細胞を得るにはクローニング操作などを用いる必要があると考えられる。しかし、実験に使用した細胞が大部分内皮細胞であることの確認は酵素処理前後の臍帯の組織学的な所見と *in vitro* での形態学的な所見によった。なお、内皮細胞の特性については検討中である。

V. 要 約

人臍帯を用い静脈内皮細胞の剥離、培養に関する技術的な諸条件及び胎児の臍帯材料との関連について検討した。初代培養における消化酵素の種類と組み合わせ、酵素処理時の臍帯の状態と細胞収量との関連などについて分析し、消化酵素のうち *collagenase* が最も有効であり、酵素処理時の材料の鮮度が高いことが重要であることが示唆された。また本研究では *collagenase* の type I を用いたが、他の分画についても検討する必要がある。

本研究を行うにあたり、種々のご指導とご助言を賜った国立予防衛生研究所ウィルス・リケッチャ室長の奥村秀夫先生、材料を提供していただいた島根医科大学産婦人科教授の北尾 學先生、島根県立中央病院産婦人科部長の佐野正治先生に深謝いたします。培養実験に協力いただいた大木戸昌子氏に感謝いたします。

本論文の要旨は第52回日本衛生学会総会（昭和57年）において発表した。

文 献

- 1) Ross, R. and Glomset, J. A. (1976) The pathogenesis of atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* **295**, 369–377, 420–425
- 2) Gudmundur, T. and Robertson, A. L. (1978) Platelet factors and the human vascular wall. *Atherosclerosis* **30**, 67–78
- 3) Stein, Y. and Stein, O. (1979) Model systems in tissue culture for the study of atherogenesis. *Klin. Wochenschr.* **57**, 857–862
- 4) Maruyama, Y. (1963) The human endothelial cell in tissue culture. *Z. Zellforsch.* **60**, 69–79
- 5) Fryer, D. G., Birman, G., and Luttrell, C. N. (1966) Human endothelium in cell culture. *J. Atheroscler. Res.* **6**, 151–163
- 6) Gimbrone, M. A., Cotran, R. S., and Folkman, J. (1974) Human vascular endothelial cells in culture. *J. Cell. Biol.* **60**, 673–684
- 7) Jaffe, E. A. and Nachman, P. L. (1973) Culture of endothelial cells derived from umbilical veins. *J. Clin. Invest.* **52**, 2745–2756
- 8) Gimbrone, M. A. (1976) Culture of vascular endothelium. *Prog. Hemost. Thromb.* **3**, 1–28
- 9) 井中準之助, 山根績, 山田正篤, 井上幸重, 堀川正克 (1971) 組織培養47–68, 朝倉書店, 東京
- 10) Lewis, L. J., Hoak, J. C., and Fry, G. L. (1973) Replication of human endothelial cells in culture. *Science* **181**, 453–454
- 11) Majino, G. (1970) Two endothelial novelties ; Endothelial contraction ; Collagenase digestion of basement membrane. *Thromb. Diath. Haemorrh.* **40** (Suppl.), 23–30
- 12) Vahouny, G. V., Wei, R., Starkweather, R., and Davis, C. (1970) Preparation of beating heart cells from adult rats. *Science* **167**, 1616–1618