

とは native HDL が HDL-receptor と結合した時何らかの細胞内シグナルが細胞内に伝達され細胞内コレステロール輸送系が促進される機構のあることを推定させる。Mφ を acetyl LDL で培養して泡沫化させた後 HDL を加えて細胞内の CE 量を測定すると24時間で CE 量は半減する(脱泡沫化)が FC は変化しない。一方 acetyl HDL はその作用が弱いことから HDL と receptor の相互作用をトリガーに Mφ のコレステロール代謝が恐らく acyl CoA cholesterol acyltransferase (ACAT) 及び cholesteryl ester hydrolase をターゲットとする経路を介して調節させる可能性が考えられる。細胞レベルでは HDL は ACAT に抑制的で CE-hydrolase には促進的との報告はこの考えを支持しよう。

### 参 考 文 献

- 1) **Brown, M.S. and Goldstein, J.L.:** A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, **232**: 34~47, 1986.
- 2) **Herz, J., Hamann, U., Rogne, S., Myklebost, O., Gausephol, H. and Stanley, K.K.:** *EMBO J.*, **7**: 4119~4127, 1988.
- 3) **Kodama, T., Freeman, M., Rohrer, L., Zabrecky, J., Matsudaira, P. and Krieger, M.:** *Nature*, **343**: 531~535, 1990.

司会 小野先生, どうもありがとうございました。大変興味あるお話で, いろいろお尋ねしたいところですが, 質疑応答は後でまとめて時間をとりたいと思います。では続きまして, 皆河先生よろしくお願いいたします。

### 3) 脳微小血管内皮細胞の機能と病態

新潟大学脳研究所脳神経外科

皆河 崇志・田中 隆一

#### Function of Cerebral Microvascular Endothelial Cells in Normal and Pathological Conditions —— In Vitro Study Using Cultured Endothelial Cells ——

Takashi MINAKAWA and Ryuichi TANAKA

*Department of Neurosurgery, Brain Research Institute, Niigata University*

The biological characteristics of cerebral microvascular endothelial cells (CEs) and the effect of prostaglandins on permeability of CE were investigated in vitro. Cultured CE derived from cerebral microvessels were characterized by the positive reaction for factor-VIII related antigen and the uptake of low density lipoprotein. CE produced prostacyclin and other prostaglandins, and the ability to produce prostacyclin was unchanged by serial cultivation. CE aggregated and made capillary-like structures in type 1 collagen. Astrocytes migrated and closely attached to the structures. The cross section of CS co-cultured with

Reprint requests to: Takashi MINAKAWA,  
Department of neurosurgery,  
Brain Research Institute,  
Niigata University School of Medicine,  
Asahimachi-dori 1, Niigata City, 951,  
JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町  
新潟大学脳研究所脳神経外科

皆河 崇志

astrocytes showed continuous cells surronuding a lumen, and CEs were connected by tight junctions. A model for the blood brain barrier was made using CEs, type 1 collagen and double chambers. Cooling of this system and depletion of the glucose in the media supressed the permeability of CEs for FITC-Albumin. Prostaglandin E<sub>2</sub> and F<sub>2a</sub>, cyclooxygenase products, had no effect on the permeability of CEs, however Leucotrien C<sub>4</sub>, a lipoxygenase product, markedly increased the permeability. Leucotrien C<sub>4</sub> may have an important role in the occurence of the cerebral vasogenic edema.

Key words: cerebral microvascular endothelium, culture, permeability

脳微小血管内皮細胞, 培養, 透過性

## はじめに

脳の毛細血管は、最内層の内皮細胞とこれを取り囲む周囲細胞、そしてさらにこの外層を覆う星状膠細胞の突起から成立している。最内層の内皮細胞は他臓器のそれと同様、抗血栓性の物質と血管の緊張を保つ因子を放出し、これらにより微小循環が維持されていると考えられる。脳の毛細血管内皮細胞が他臓器の内皮と異なる点は、選択的な物質輸送システム、すなわち脳血液関門を構成し、神経細胞の機能維持に重要な役割を果たしていることにある。脳の毛細血管内皮細胞の機能と病態を知ろうとする時、in vivo の系ではその複雑な環境（循環する血液や多種類の細胞）を含めて検討せざるをえず、in vitro の系がより有用と考えられる。我々の教室では、脳微小血管の内皮細胞を純粹に培養する方法を考案し、培養細胞の特性の検索を行い、さらに、脳血液関門の重要な要素である tight junction の形成機序を解明してきた。本稿では、これまで得られた結果を簡単に述べ、アルブミンの内皮透過機序と透過性を亢進させる因子を検索した研究に関しても報告する。

## 方 法

### 1. 脳微小血管由来内皮細胞の培養と培養細胞の特性の検索

内皮細胞は、砂ネズミまたはウシの脳微小血管より分離し、継代培養したものを使用した。細胞の同定は、第Ⅷ因子関連抗原の免疫組織学的染色と、low density lipoprotein の取り込みにより行い、培養細胞の特性は以下の項目、(1) 透過型電子顕微鏡による微小形態、(2) プロスタグランジン産生能、(3) コラーゲン内での管腔形成とアストロサイトとの interaction に関し検討した。方法の詳細に関しては、文献を参照されたい<sup>1)2)</sup>。

### 2. 脳血管透過モデルの作製と透過促進物質の検索

透過モデルは、市販の 0.45 μ の孔径をもつフィルター (Millicel, Millipore 社) を、I 型コラーゲン (Cellmatrix, 新田) で覆い、この上に上記の砂ネズミ脳微小血管由来内皮細胞を培養することにより作製した。透過物質は、Fluorescein Isothiocyanate (FITC)-Albumin (ウシ, Sigma) を用い、2 時間当たりの透過量を分光光度計で測定した。透過促進物質の候補としては、アラキドン酸代謝産物を想定し、シクロオキシゲナーゼ系として、prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) と、-F<sub>2a</sub> (PGF<sub>2a</sub>)、リポキシゲナーゼ系として、leukotriene C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>) を、5 mg の FITC-Albumin とともに 1 cc の minimum essential medium (MEM) に溶解し、内皮細胞で覆った上室に加えた。下室は、2 cc の MEM のみを入れ、容器全体を、5% CO<sub>2</sub>, 37℃ の培養器内に入れ静置した。

## 結 果

### 1. 脳微小血管由来培養内皮細胞の特性

(1) 培養細胞は、培養皿上で数石状に配列し、内皮細胞のマーカーである第Ⅷ因子関連抗原及び、LDL の取り込みが陽性であった。この性格は、長期継代された細胞でも維持されていた。(2) 微小形態学的には、細胞質に窓形成は見られず、飲み込み小胞が少なく、そして、基底膜様の構造が細胞直下のコラーゲンとの間に形成され、in vivo の細胞には類似していた。相違点としては、細胞間の接合が gap junction であるという点であったが、後で述べるように、脳の毛細血管内皮に特有な tight junction は、アストロサイトとの co-culture により誘導された。(3) 内皮細胞は、各種プロスタグランジンを産生した。最も多量に放出したのはプロスタサイクリン (代謝産物の 6-keto-PGF<sub>1a</sub> で測定) で、その他、

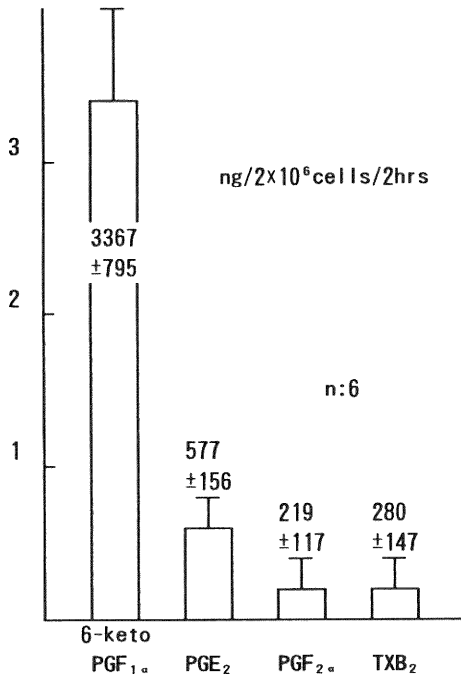


図 1 脳微血管由来の培養内皮細胞が産生する各種プロスタグランジン



図 2 脳微血管由来の培養内皮細胞が形成した毛細血管様構造 (矢頭) と、これに突起を伸ばし接着したアストロサイト (矢印)  
GFAP 染色 ×100

プロスタグランジン E<sub>2</sub> と少量のプロスタグランジン F<sub>2α</sub>, トロンボキサン A<sub>2</sub> を産生していた (図 1)。培養液中に、アラキドン酸ナトリウムを加えると、培養細胞はこれを利用し、あるいはアラキドン酸が培養細胞を刺激して、多量のプロスタサイクリンを放出した。(4) 内皮細胞は、コラーゲン等の細胞外基質を利用し、毛細血管様の構造を形成した。コラーゲン内で細胞を培養した場合、形成された毛細血管様構造物の断面は in vivo のものに類似し、管腔を形成し、外側には基底膜様の構造が認められた。新生児マウスから得られたアストロサイトを内皮細胞と co-culture すると、アストロサイトは単層に増殖した内皮細胞とは接触せず、毛細血管様の構造物にのみ遊走し接着した (図 2)。アストロサイトと接着した毛細血管様構造物を構成する内皮細胞は、tight junction により接合され、脳微血管内皮細胞の特性の一部はアストロサイトにより誘導されたと考えられた。

## 2. 脳血管透過モデルの作製とアラキドン酸代謝産物の透過に及ぼす影響

使用したフィルターは、アルブミンを自由に通過させ、2時間あたりの透過量は 3233.3±321.5 μg であった。これをコラーゲンで覆うとその透過率は半減 (1336.6±60.3 μg) し、更に内皮細胞で覆うと、著減 (56.7±5.8 μg) した (各々 n=4)。このモデルのアルブミン透過を、37℃、0℃、MEM の代わりに Phosphate buffer saline 使用、の3つの条件 (n=4) で比較すると、2時間あたりの透過量は各々、172.5±61.8、60.0±16.7、89.5±28.6 μg であり、後2者で透過抑制が認められた。低温とエネルギー源枯渇の状態では透過抑制が起こる事実は、アルブミン輸送がエネルギー依存性であることを示唆していた。

次にアラキドン酸代謝産物を上室に加えた時の透過性の変化について検討した。Cyclooxygenase 系の代謝産物である PGE<sub>2</sub> と PGF<sub>2α</sub> は、1~100 μg/ml の濃度では、透過性の変化を起こさなかった。Lipoxygenase 系の代謝産物である LTC<sub>4</sub> を上室に加えた場合、control、0.001、0.01、0.1 μg の濃度 (n=3) で透過量は各々、108.0±16.4、139.3±17.9、182.0±32.7 (p=0.05)、585.3±21.6 (p=0.001) であり、ごく低濃度で透過性を亢進させた。

## 考 察

血管の主たる機能は、生体のすみずみにまで血液を効率よく送り、末梢での代謝を司ることにあり、その最内層にある内皮細胞が血管の物質透過と機能調節に最も重

要な役割を果たしていると考えられる。しかし、プロスタグランジン、内皮由来弛緩因子、エンドセリン産生等の血管内皮細胞の多彩な機能が明らかにされてきたのはこの10年程度の間であり、それ以前の研究の遅滞は、方法論の限界によるものであった。内皮細胞の研究が飛躍的に進歩したのはその培養法の確立によるところが極めて大きい。内皮細胞の培養の歴史は、臍帯静脈<sup>3)</sup>に始まり、大動脈<sup>4)</sup>、そして各臓器に特有な内皮細胞の特性を検索する目的で微小血管由来内皮細胞<sup>5)6)</sup>の培養へ進歩してきた。

脳微小血管由来の内皮細胞の純粋継代培養は、Debaultら<sup>7)</sup>により初めて報告され、培養細胞の生物学的特性に関しては、我々の論文<sup>1)2)8)</sup>を含め散見される。培養細胞の基本的性格は、大血管の細胞と同様である。第Ⅶ因子関連抗原に関しては、陽性と陰性の報告に分かれるが、動物種の差によると考えられる<sup>1)7)9)</sup>。プロスタサイクリンの産生に関しては、我々の報告<sup>1)</sup>以外認められず、大血管由来培養細胞との産生能の比較はされていない。微小形態学的には、*in vivo*のものに類似するが、細胞間には主として *gab junction* により接合され、初代培養細胞を除き、脳の毛細血管内皮に特有な *tight junction* は認められない<sup>1)7)10)</sup>。同様に、特有な膜酵素である  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase と alkaline phosphatase は継代を続けることにより失われる<sup>7)8)</sup>。脳微小血管由来の培養内皮細胞が大血管由来のものと異なる点は、コラーゲン上あるいは内に培養した時、毛細血管様の構造を作りやすいことと<sup>1)2)</sup>、アストロサイトとの *co-culture* により、先述の *tight junction* と膜酵素を再び獲得する点である<sup>2)11)15)</sup>。これらの特性は、大血管由来のものとは認められないか、あってもわずかである<sup>13)14)</sup>。結果の項で述べた如く、脳微小血管由来の培養細胞に毛細血管様の構造を構成させると、アストロサイトはこれに向い遊走、接着し、この構造物の内皮細胞間が *gab junction* から *tight junction* に変化する。以上のことから、脳微小血管由来の培養内皮細胞は大血管由来のものとは異なる特性を示すが、*in vivo*での特性の一部喪失していることは明らかである。これは、中枢神経系に特有な細胞であるアストロサイトとの接触が失われることが大きな原因と考えられる。

脳の毛細血管レベルでの病態を考えると、最も重要な問題は血管透過性の変化による脳浮腫の発生 (*vasogenic edema*) である。*Vasogenic edema* は、腫瘍、外傷そして血管障害等で発生し、脳実質の水分量を測定する以外にアルブミンの漏出でもとえられることができる。脳浮腫の発生を継時的に観察するのに適した実験モデル

の一つは脳虚血である。分単位の短時間、心臓停止を起こしたヒトあるいは動物を蘇生した時、神経細胞の障害が著しく、脳機能が回復しないことがしばしばある。この場合、蘇生後時間を追って観察しても *vasogenic edema* は生じず、このように短時間の虚血では内皮細胞の透過性は障害されない<sup>16)</sup>。逆に言えば、内皮細胞の透過性に変化が生じるような長時間の心臓停止では、その個体を蘇生しえないということになる。実験的脳虚血で、微小形態学的に内皮細胞に変化が生じるのは、虚血後10時間を過ぎてからであると言われている<sup>17)18)</sup>。この時点では、神経細胞とアストロサイトには著明な障害が認められる。内皮細胞障害を、アルブミンの漏出という点からみると、障害はより早くとらえられる。Klatzo ら<sup>19)</sup>の報告によるネコ中大脳動脈閉塞実験では、虚血4～6時間後にわずかにアルブミンの漏出（この場合、エバンスブルーに結合したアルブミン）がみられ、最も早いものでは、1時間後に内因性のアルブミンの漏出がみられたという報告がある<sup>20)21)</sup>。以上のことから、脳虚血後の初期に発生する脳浮腫は、内皮細胞の形態学的変化—透過型電子顕微鏡でとらえうる—は伴わずに、機能障害により水分とアルブミンの透過が生じると考えられる。我々が作製した透過モデルは、脳微小血管由来の培養内皮細胞の透過性を、外因性のアルブミンで見たものである。通常の培養条件でアルブミンの漏れが若干認められることから、*in vivo*の状態とは異なる。培養内皮細胞のアルブミン透過性は、モデルを0℃に冷却、あるいは培養液中の栄養素を枯渇させることにより1/2以下に抑制された。このことは、脳の毛細血管レベルでのアルブミン輸送が、主としてエネルギー依存性であることを示唆している。Lipoxygenase 系の代謝産物である LTC<sub>4</sub> は、このモデルでアルブミンの透過性を著明に亢進させた。LTC<sub>4</sub> は、脳虚血時にアラキドン酸の代謝により生じ、*in vivo*でも強い脳浮腫を喚起することが知られている。脳虚血急性期に、内皮細胞に直接作用し、その透過性を亢進させる物質の有力候補として、LTC<sub>4</sub> が考えられた。脳浮腫の発生機序の解明と、その治療法の開発は、脳神経外科医が携わるところの最も重要なテーマのひとつである。我々が提示した脳血管透過モデルは、方法論として魅力があるが、いまだ不完全である。今後、培養技術の進歩により、アストロサイトを利用した *in vivo*により近い culture system の開発が期待される。

## 参 考 文 献

- 1) Minakawa, T.: Long-term culture of microvascular

- endothelial cells derived from Mongolian gerbil brain. *Stroke*, **20**: 947~951, 1989.
- 2) **Minakawa, T., Bready, J., Berliner, J., Fisher, M. and Cancilla, P.**: In vitro interaction of astrocytes and pericytes with capillary-like structures of brain microvessel endothelium. *Laboratory Investigation*, **65**: 32~40, 1991.
  - 3) **Jaffe, E.A., Nachman, R.L., Becker, C.G. and Minick, C.R.**: Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphological and immunologic criteria. *J Clin Invest*, **52**: 2745~2756, 1973.
  - 4) **Schwartz, S.M.**: Selection and characterization of bovine aortic endothelial cells. *in vitro*, **14**: 966~980, 1978.
  - 5) **Folkman, J., Haudenschild, C.C. and Zetter, B.R.**: Long-term culture of capillary endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **76**: 5217~5221, 1979.
  - 6) **Wagner, R.C. and Matthews, M.A.**: The isolation and culture of capillary endothelial cells from epididymal fat pad. *Microvascular Res*, **10**: 286~297, 1975.
  - 7) **DeBault, L.E., Henriquez, E., Hart, M.N. and Cancilla, P.A.**: Cerebral microvessels and derived cells in tissue culture. II. Establishment, Identification, and preliminary characterization of an endothelial cell line. *In Vitro*, **17**: 480~494, 1981.
  - 8) 皆河崇志, 田中隆一, 佐々木 修, 小池哲雄, 石井 鐸二: 砂ネズミ脳微小血管内皮細胞の継代培養—培養細胞の膜酵素の染色性に関する検討—. *脳卒中*, **11**: 89~95, 1989.
  - 9) **Spatz, M., Bembry, J., Dodson, R.F., Hervonen, H. and Murray, M.R.**: Endothelial cell cultures derived from isolated cerebral microvessels. *Brain Res*, **191**: 577~582, 1980.
  - 10) **Bowman, P.D., Ennis, S.R., Rarey, K.E., Bets, A.L. and Goldstein, G.W.**: Brain microvessel endothelial cells in tissue culture: A model for study of blood-brain barrier permeability. *Ann Neurol*, **14**: 396~402, 1983.
  - 11) **Arthur, F.E., Shivers, R.R. and Bowman, P.D.**: Astrocyte-mediated induction of tight junctions in brain capillary endothelium: an efficient in vitro model. *Dev Brain Res*, **36**: 155~159, 1987.
  - 12) **DeBault, L.E. and Cancilla, P.A.**: Gamma glutamyl transpeptidase in isolated brain endothelial cells: induction by glial cells in vitro. *Science*, **207**: 653~655, 1980.
  - 13) **Maxwell, K.M., Berliner, J.A. and Cancilla, P.A.**: Induction of gamma glutamyl transpeptidase in cultured cerebral endothelial cells by a product released by astrocytes. *Brain Res*, **410**: 309~314, 1987.
  - 14) **Shivers, R.R., Arthur, F.E. and Bowman, P.D.**: Induction of gap junctions and brain endothelium-like tight junctions in cultured bovine endothelial cells: local control of cell specialization. *J Submicrosc Cytol Pathol*, **20**: 1~14, 1988.
  - 15) **Tao-Cheng, J.H. and Brightman, M.W.**: Development of membrane interactions between brain endothelial cells and astrocytes in vitro. *Int J Dev Neurosci*, **6**: 25~37, 1988.
  - 16) **Hossman, K.A.**: Total ischemia of the brain. In: Zülch KJ, Kaufmann, W, Hosmann, KA, Hossman, V (eds) *Brain and Heart Infarct*, Springer-Verlag, Berlin, 1977, pp. 107~124.
  - 17) **Garcia, J.H., Conger, K.A., Morawetws, R. and Halsey, J.H.**: Postischemic brain edema: Quantification and evolution. *Adv Neurol*, **28**: 147~169, 1980.
  - 18) **Westergaard, E., Go, G., Klatzo, I. and Spatz, M.**: Increased permeability of cerebral vessels to horseradish peroxidase induced by ischemia in Mongolian gerbils. *Acta Neuropathol (Berl)*, **35**: 307~325, 1976.
  - 19) **Klatzo, I.**: Interrelationships between cerebral blood flow and brain edema. In: Minderhoud JM(ed) *Cerebral blood flow*, Excerpta medica, Amsterdam, 1981, pp. 61~173.
  - 20) **Gotoh, O., Asano, T., Tamura, A. and Takakura, K.**: Ischemic brain edema and the glutathione system. In: Ishii S, Nagai H, Brock M(eds) *Intracranial Pressure V*, Springer-Verlag, Berlin, 1983, pp. 399~404.

司会 皆河先生, どうもありがとうございました。本

日は、動脈硬化を中心にと申し上げましたが、先天奇形や感染症などによる障害を除くというつもりでございます。したがって、血管障害一般ということで、今日

は議論して頂きたいと思っております。続きまして、川野先生、お願いいたします。

#### 4) 糖尿病性網膜症における Microangiopathy について

——蛍光眼底所見を中心に——

新潟眼科 川 野 修 司

司会 川野先生、どうもありがとうございました。続きまして、上野先生、よろしくお願いします。

#### 5) 糖尿病性腎症の血管障害

新潟大学医学部第二内科学教室 (主任：荒川正昭教授)

上野 光博・荒川 正昭

#### Renal Vascular Lesions of Diabetic Nephropathy

Mitsuhiro UENO, Masaaki ARAKAWA

*Department of Medicine (II),*

*Niigata University School of Medicine*

*(Director: Prof. Masaaki ARAKAWA)*

Intrarenal vascular lesions of diabetic glomerulosclerosis were evaluated in order to clarify the relationship between vascular lesions and diabetic nephropathy in 108 NIDDM patients. Index of arteriolar hyaline change (IAHC), designed as grade of AHC, was correlated significantly with age at biopsy, DM duration, GFR, PSP (15'), urine protein, systolic blood pressure (BP) and index of glomerular lesion (IGL). IAHC was also higher in hypertensive patients than in normotensive patients. Intimal thickening of small arteries (IT/SA) had a significant correlation with DM duration, systolic BP, GFR and Fishberg's concentration test. IAHC and IGL were significantly higher in IT/SA (+) group than in IT/SA (-) group. Intimal thickening of arteries (IT/A) was not related with clinical findings, although IAHC was significantly higher in IT/A (+) group.

In conclusion, arteriolar hyalinosis may be closely related to the progression of diabetic nephropathy and intimal thickening of small arteries and arteries may contribute as well.

---

Key words: diabetic nephropathy, renal vascular lesions, microangiopathy

糖尿病性腎症, 腎内動脈病変, 細小血管障害

---

Reprint requests to: Mitsuhiro UENO,  
Department of Medicine (II), Niigata  
University School of Medicine,  
Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町  
新潟大学医学部第二内科学教室  
上野 光博